報 文

逆相 TLC/スキャニングデンシトメトリーによる食品中のウコン色素、
クチナシ黄色素及びアナトー色素の分析

(平成 12 年 4 月 10 日受理)

尾関 尚子^{*1} 上野 英二^{*2} 伊藤 裕子^{*2} 岡 尚男^{*2}
 林 智子^{*3} 板倉 裕子^{*4} 山田 貞二^{*5} 松本 浩^{*2}
 伊藤 徹^{*1} 圓山 皋^{*1} 鶴田 益清^{*1} 宮澤 孝彦^{*1}

Analysis of Turmeric Oleoresin, Gardenia Yellow, and Annatto Extract in Foods Using
Reversed-phase Thin-layer Chromatography/Scanning Densitometry

Naoko OZEKI^{*1}, Eiji UENO^{*2}, Yuko ITO^{*2}, Hisao OKA^{*2}, Tomoko HAYASHI^{*3}, Yuko ITAKURA^{*4},
 Sadaji YAMADA^{*5}, Hiroshi MATSUMOTO^{*2}, Toru ITO^{*1}, Takashi MARUYAMA^{*1},
 Masukiyo TSURUTA^{*1} and Takahiko MIYAZAWA^{*1}

(^{*1}Seto Public Health Center, Aichi Prefecture: 38-1, Mitsuke-cho, Seto, Aichi 489-0808, Japan;

^{*2}Aichi Prefectural Institute of Public Health: 7-6, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya
 462-8576, Japan; ^{*3}Kasugai Public Health Center, Aichi Prefecture: 2-31, Kashiwai-cho,

Kasugai, Aichi 486-0927, Japan; ^{*4}Okazaki Public Health Center, Aichi Prefecture:

3-30, Kosei-dorinishi, Okazaki, Aichi 444-8545, Japan; ^{*5}Aichi Prefectural

Food Inspection Office: 107, Hattan, Toyoba, Toyoyama-cho,

Nishikasugai-gun, Aichi 480-0202, Japan)

We established an analysis method of food colors, turmeric oleoresin, gardenia yellow, and annatto extract (including annatto, water-soluble), in foods using reversed-phase thin-layer chromatography/scanning densitometry. The method involves the following three steps: 1) clean-up of the colors with a C18 cartridge, 2) separation of the colors by reversed-phase C18-TLC using acetonitrile-tetrahydrofuran-0.1 mol/L oxalic acid (7:8:7) as a solvent system and 3) measurement of visible absorption spectra of the colors using scanning densitometry without isolation of the colors. In order to investigate the capability of the present method, 89 commercial foods were analyzed, and their chromatographic behavior and spectra were observed. The separation and the spectra obtained were not affected by coexisting substances in the foods. The spots always gave the same *R_f* values and spectra as the standards with good reproducibility. The present method is considered to be useful for the rapid analysis of turmeric oleoresin, gardenia yellow, and annatto extract (including annatto, water-soluble) in foods.

(Received April 10, 2000)

Key words: 逆相薄層クロマトグラフィー reversed-phase thin-layer chromatography; スキャニング
 デンシトメトリー scanning densitometry; C18 カートリッジ C18 cartridge; ウコン色素 tur-
 meric oleoresin; クチナシ黄色素 gardenia yellow; アナトー色素 annatto extract

緒 言

オレンジ色あるいは黄色に着色された食品は、滋養がある、おいしそう、甘いといった印象を与え、人の食欲を刺

激する¹⁾。既存添加物名簿の中にも多数のオレンジ-黄色系の色素が収載されている。なかでも、その代表例はウコン色素、クチナシ黄色素、アナトー色素と考えられる。

第7版食品添加物公定書にも収載されているウコン色素は、ショウガ科のウコンの地下茎の乾燥品から抽出して得られる黄色の色素で、カレー粉、たくあん、高菜漬けなどの着色に用いられる^{2), 3)}。主成分のクルクミン (Fig. 1A) は、水に難溶であるがアルコールに溶けて黄色を呈し、アルカリに溶けて赤褐色を呈する。クチナシ黄色素は、アカネ科のクチナシの果実を水又はエタノールで抽出、もしく

^{*1} 愛知県瀬戸保健所: 〒489-0808 愛知県瀬戸市見付町 38-1

^{*2} 愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6

^{*3} 愛知県春日井保健所: 〒486-0927 愛知県春日井市柏井町 2-31

^{*4} 愛知県岡崎保健所: 〒444-8545 愛知県岡崎市康生通西 3-30

^{*5} 愛知県食品衛生検査所: 〒480-0202 愛知県西春日井郡豊山町大字豊場字八反 107

Fig. 1. Main components of turmeric oleoresin (A), gar-
denia yellow (B), and annatto extract (C)

は加水分解を経て得られる黄色色素で、麺類、キャンディー、栗甘露煮などの着色に広く用いられている³⁾。色素成分のクロシン及びクロセチン (Fig. 1B) はカロテノイド系の色素で、クロシンが加水分解するときクロセチンを生ずる⁴⁾。アナトー色素はベニノキ科ベニノキの種子の被覆物から抽出して得られる色素で、主色素はカロテノイド系色素のビキシン及びノルビキシンで、オレンジ-黄色を呈する (Fig. 1C)³⁾。国内需要量が高く、ハム、ソーセージ、菓子類などに使用されている。なお、ノルビキシンはビキシンのメチルエステル部分が加水分解されたものであり、ノルビキシンのカリウム塩及びナトリウム塩は化学的合成添加物の「水溶性アナトー」として食品添加物公定書に収載されている⁵⁾。このように、これらオレンジ-黄色系のウコン色素、クチナシ黄色素、アナトー色素 (水溶性アナトーを含む) は広く使われており、食品衛生上の観点から保健所などの現場ルーチン分析に応用できる簡便迅速な方法が求められている。

前報において、著者らは簡便迅速に色素を同定する手法として、試料精製に C18 カートリッジを用い、 R_f 値の再現性に優れた逆相 C18TLC と TLC 上の色素を単離することなく可視部吸収スペクトルの測定が可能であるスキヤニングデンストメトリーとを組み合わせた逆相 TLC/スキヤニングデンストメトリーによる食用色素の分析法について報告した⁶⁾。

著者らは、ウコン色素、クチナシ黄色素及びアナトー色素の分析に上述の方法を適用するため種々検討を加えたところ、これらの色素を簡便に同定する手法を見いだしたの

で報告する。なお、水溶性アナトーとノルビキシンの構造上の相違点は塩であるか否かの違いであり、後述のように TLC 上の挙動も吸収スペクトルも全く同一のものであることから、本研究においてはノルビキシンの範疇に水溶性アナトーを含めて取り扱った。また、以下の記述において「アナトー色素」は、ビキシン、ノルビキシン、水溶性アナトーの総称として使用することとした。

実験方法

1. 試料

1998 年 3 月～12 月に購入した市販の菓子類、魚肉ねり製品、食肉製品、漬物、麺類などで、ウコン色素の使用が表示されていた食品 21 件、クチナシ黄色素の使用が表示されていた食品 35 件、アナトー色素の使用が表示されていた食品 33 件を用いた。

2. 標準品及び試薬類

クルクミンは和光純薬工業 (株) 製を、クロセチンはシグマ社製を、ビキシンは東京化成工業 (株) 製を標準品として用いた。クロシンは LC/MS 及びフォトダイオードアレイ検出器付き HPLC による分析結果より和光純薬工業 (株) 製のガーディニアイエローを⁴⁾、ノルビキシンは和光純薬工業 (株) 製のアナトー色素を標準品として使用した。水溶性アナトーは三栄源エフ・エフ・アイ (株) 製のサンアナト No. 2380 を標準品として用いた。C18 カートリッジは Waters 社製 Sep-Pak C18 Vac 3cc (500 mg) を使用した。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

3. 薄層クロマトグラフ条件

逆相 TLC 条件は、プレートは Merck 社製 RP-18 F 254s (Art. 15389) を、展開溶媒はアセトニトリル-テトラヒドロフラン-0.1 mol/L シュウ酸 (7:8:7) を用いた。

4. 色素の精製法

ジュースなどの液体食品はそのまま、キャンディー、ゼリーなど水に溶解できる食品は温湯で溶かし、ジュース程度の糖分濃度になるよう温湯で希釈し、色素抽出液とした。菓子、漬物などの固形の試料はメタノール又は含水メタノールを加えてホモジナイズし、遠心分離した。生麺類は少量の水を加えてゆでた後、水でよく洗浄し、メタノールを加えて同様に処理した。その後、上清を濃縮又は水を加えることにより、メタノール濃度が 30% 以下になるよう調製し、色素抽出液とした。

上述の操作で得られた色素抽出液 50 mL を必要があればろ過した後、あらかじめ少量のメタノールと水で活性化した C18 カートリッジに負荷した。負荷したカートリッジを水 20 mL で洗浄後、メタノール 5 mL で色素を溶出し、得られた色素溶出液を濃縮して試験溶液とした。

5. スキヤニングデンストメータ測定条件

スキヤニングデンストメータは (株) 島津製作所製 CS-9000 を用い、波長走査範囲、スリットサイズなどの操作条件は前報と同様に実施した⁶⁾。

Fig. 2. TLC separation of turmeric oleoresin, gardenia yellow, and annatto extract
 A) curcumin; B) crocin; C) crocetin; D) bixin; E) norbixin
 TLC conditions
 Plate: RP-18F_{254s} (E. Merck, 15389)
 Solvent system: acetonitrile-tetrahydrofuran-0.1 mol/L oxalic acid (7:8:7)

結果及び考察

1. TLC 条件の検討

ウコン色素、クチナシ黄色素及びアナトー色素を良好に分離同定できる TLC 条件を種々検討した結果、TLC プレートとして逆相 C18 を、展開溶媒としてアセトニトリル-テトラヒドロフラン-0.1 mol/L シュウ酸 (7:8:7) を用いることにより、色素を良好に分離することができた。すなわち、ウコン色素のクルクミン、クチナシ黄色素のうちのクロセチン、アナトー色素のビキシン及びノルビキシンはそれぞれ R_f 値 0.60, 0.53, 0.33, 0.46 に単独のスポットとして検出することができた。しかし、上述のようにノルビキシンの塩である水溶性アナトーは、種々検討を行ったがノルビキシンと同一の R_f 値を示し、分離することはできなかった。一方、クチナシ黄色素のうちクロシンは R_f 値 0.85 の主スポットと R_f 値 0.80, 0.75 の 2 つの副スポットに分離することができた (Fig. 2)。これらのスポットは前報の結果より⁴⁾、 R_f 値 0.85 のスポットが *trans*-クロシン、0.80 が 13-*cis*-クロシン、0.75 が *trans*-クロシンからグルコースが 2 個脱離したものであると推定している。

1) 有機溶媒の選択及びその混合比

展開溶媒として使用する有機溶媒にメタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、メチルエチルケトン、テトラヒドロフランを選択し、これら有機溶媒と 0.1 mol/L シュウ酸とのさまざまな混合比の展開溶媒を調製し、その分離に与える影響を検討した。その結果、各有機溶媒と 0.1 mol/L シュウ酸の混合液を用いた場合には、満足すべき分離を得ることは難しいことが判明した。しかし、そのなかでもテトラヒドロフランが比較的まとまりのよいスポットを与えたので、テトラヒドロフランと上述の有機溶媒をさまざまな比率で混合し、更に検討を加えた。メタノールとの混合では、クロシンのスポットの形状が悪く、メチルエチルケトンでは R_f 値が全体的に大きく、良好な分離が

得られなかった。酢酸エチルは二相に分離し、展開溶媒として使用できなかった。しかし、アセトニトリルとテトラヒドロフランを 7:8 に混合した場合には、Fig. 2 に示すように良好な分離が得られたので、展開溶媒に使用する有機溶媒はアセトニトリルとテトラヒドロフラン (7:8) を用いることとした。

2) 酸の濃度及びその混合比

上述の有機溶媒と水の混合液で展開溶媒を調製したところ、クルクミンのスポットにテーリングが見られたため、酸の添加を試み、酢酸、リン酸、シュウ酸を用いて、比較検討した。3 者の違いはクロシンのスポットの形状に現れ、酢酸の場合には輪郭が不鮮明でまとまりの悪いスポットであったが、リン酸及びシュウ酸を用いた場合に輪郭の鮮明なまとまりの良いスポットが得られた。しかし、前報のラック、コチニールの分析にシュウ酸を用いており⁶⁾、利便性の面から本研究でもシュウ酸を用いることとした。シュウ酸の濃度については、0.05 mol/L から 0.6 mol/L の間で変化させ、分離に与える影響を検討したところ、0.1 mol/L を用いたときに、最もまとまりの良いスポットを示したので、0.1 mol/L を選択した。したがって、最終的にアセトニトリル-テトラヒドロフラン-0.1 mol/L シュウ酸 (7:8:7) を展開溶媒として選択した。

2. スキャンングデンシトメトリーによる可視部吸収スペクトルの測定

上述の条件で分離した TLC 上のスポットについてスキャンングデンシトメータを用い、走査波長 370~700 nm の範囲で反射吸収を測定した。得られた吸収スペクトルを Fig. 3 に示すが、これらはメタノール中で測定した各色素の可視部吸収スペクトルと一致し、スキャンングデンシトメータにより得られたスペクトルを用いて色素の同定が可能と考えられた。しかし、ノルビキシンと水溶性アナトーは同一のスペクトルを示したので、スペクトルによって両化合物を識別するのは困難であった。

3. 食品中からの色素の精製

次に各色素の食品中からの精製法を検討することとした。汎用されている試料精製法の中で最も簡便迅速な手法と思われる C18 カートリッジによる精製法を検討した。ウコン色素、クチナシ黄色素及びアナトー色素の食品からの抽出については、メタノール-水溶液あるいはメタノールが適していると思われたので、この抽出液中の色素を精製することを念頭に置いて検討を加えた。すなわち、色素抽出液はそのまま C18 カートリッジに負荷されるので、その際のメタノール濃度と色素の C18 カートリッジへの保持率について検討した。メタノール濃度を 0~100% まで変化させた溶液で、0.0001% のウコン色素溶液、0.0025% のクチナシ黄色素及びアナトー色素を調製し、その 50 mL をカートリッジに負荷した。保持率は色素負荷時に保持されない色素量を吸光度法により定量した。その結果、各色素ともに、メタノールが 30% 以下の場合には、ほぼ 100% 保持されるが、40% を超えると急速に保

Fig. 3. Visible absorbance spectra of turmeric oleoresin (A), gardenia yellow (B), and annatto extract (C) by scanning densitometry

Table 1. R_f/R_s Values of Turmeric Oleoresin, Gardenia Yellow, and Annatto Extract

		R_f value	Average R_f/R_s value* ¹	C.V. (%)	n
Turmeric oleoresin	Curcumin	0.60	1.00	1.7	21* ²
	Gardenia yellow				
Gardenia yellow	Crocin	0.85	0.99	1.8	30* ³
	Crocetin	0.53	0.98	1.7	5* ⁴
Annatto extract	Bixin	0.33	1.00	—	2* ⁵
	Norbixin	0.46	1.00	1.7	31* ⁶

*¹ Ratio of R_f (sample)/ R_f (standard)

*² Candy, pickles, jelly, mustard, grated wasabi, etc.

*³ Chocolate, pickles, chewing gum, jelly, sweet-boiled Japanese chestnut (kuri-kanroni), etc.

*⁴ Chinese noodle

*⁵ Biscuit and rice cracker

*⁶ Candy, sausage, jelly, chewing gum, boiled fish paste (kamaboko), cracker, etc.

持率が低下し、70% 以上になると保持率が 20% 以下であった。このことから、色素抽出溶液を C18 カートリッジに保持する前に、メタノール濃度を 30% 以下になるように調整する必要があることが判明した。

次に、30% メタノール水溶液の液量を 50 mL 以上に増量して検討したが、100 mL 以下の負荷容量では 100% の保持率を示した。以上のことから、抽出した色素溶液を、メタノール濃度が 30% 以下になるよう水で希釈し、その全量が 100 mL 以下であるならば、そのままカートリッジに各色素を保持させることができることが明らかとなった。

C18 カートリッジからの目的化合物の溶出は、通常メタノールを用いて行われるが、その必要量は化合物によって異なるので、0.0001% ウコン色素水溶液、0.0025% のクチナシ黄色素水溶液及びアナトー色素水溶液 50 mL を C18 カートリッジに負荷し、1 から 10 mL のメタノール

を用いて検討した。定量は上述の 2 つの実験と同様に吸光度法により行った。その結果、5 mL のメタノールを使用することにより、各色素はカートリッジから溶出することが判明した。これらのことから C18 カートリッジによるウコン色素、クチナシ黄色素及びアナトー色素の精製は十分に可能であると判断し、実験の部に示す試料精製法を作成した。

4. 市販食品への適用

1) 市販食品から抽出したウコン色素、クチナシ黄色素及びアナトー色素の R_f 値の再現性

試料中の夾雑物の R_f 値に与える影響を検討するために、市販食品 89 件（ウコン色素：21 件、クチナシ黄色素：35 件、アナトー色素：33 件）を上述の精製法により精製し、逆相 TLC により分析し、得られたスポットの R_f 値について比較検討した。TLC 上における標準色素の R_f 値と試料中の色素の R_f 値の相違の度合いは前報と同

Fig. 4. TLC chromatograms and visible absorption spectra of turmeric oleoresin extracted from various commercial foods under TLC/scanning densitometric conditions
A) turmeric oleoresin standard; B) candy; C) pickles

Fig. 5. TLC chromatograms and visible absorption spectra of gardenia yellow extracted from various commercial foods under TLC/scanning densitometric conditions
A) gardenia yellow standard (crocin); B) sweet-boiled Japanese chestnut; C) gardenia yellow standard (crocetin); D) unboiled Chinese noodle

様に、試料中色素の R_f 値 (R_a)/標準色素の R_f 値 (R_s) で表し、再現性はそれらの変動係数で評価した⁷⁾。その結果を Table 1 に示したが、各色素のスポットの R_a/R_s 値の平均値は 0.98~1.00、変動係数はすべて 2.0% 未満であった。このことは試料中の各色素のスポットは標準色素のそれらとほぼ同じ位置に現れ、再現性にも優れており、各色素を確実に同定できることを示している。したがって、保健所などのルーチン分析にも十分に適用できると考えられる。

2) 逆相 TLC/スキャニングデンシトメトリーによる同定

上述の R_f 値の再現性を検討した逆相 TLC プレート上の色素スポットについてスキャニングデンシトメータを用いて可視部吸収スペクトルを測定した。それぞれの色素の TLC クロマトグラムとスペクトルの代表例を Fig. 4, 5 及

び 6 に示したが、食品中より精製した色素の極大吸収、スペクトルパターンともに標準色素のそれとよく一致し、確実に同定できることが明らかになった。すなわち、色素を単離することなく、色素を確実に同定できる逆相 TLC/スキャニングデンシトメトリーは、食品中のウコン色素、クチナシ黄色素及びアナトー色素の分析に有用な方法であると思われる。

まとめ

食品中のウコン色素、クチナシ黄色素及びアナトー色素を簡便迅速に同定するため、TLC/スキャニングデンシトメトリーによる分析法を検討し、以下に示す知見を得た。

- 1) 逆相 C18 TLC プレートを用い、展開溶媒を種々検討した結果、アセトニトリル-テトラヒドロフラン-0.1 mol/L シュウ酸 (7:8:7) が最も良好な分離を示

Fig. 6. TLC chromatograms and visible absorption spectra of annatto extracted from various commercial foods under TLC/scanning densitometric conditions
A) annatto extract standard (bixin); B) rice cracker; C) annatto extract standard (norbixin); D) candy; E) chewing gum

した。

- 2) ウコン色素, クチナシ黄色素及びアナトー色素の精製には, C18 カートリッジによる方法が有効であった。
- 3) 展開したプレート上のスポットにスキャニングデンストメトリーを適用したところ, 良好な可視部吸収スペクトルが得られ, 市販食品の色素スポットと標準品のスポットのスペクトルは完全に一致した。
- 4) 市販食品 89 試料 (ウコン色素: 21 試料, クチナシ黄色素: 35 試料, アナトー色素: 33 試料) について, 本法における R_f 値の再現性を検討したところ, 良好な再現性を示した。

以上のことから, 本法は市販食品中のウコン色素, クチナシ黄色素及びアナトー色素の分析に有効であることが判明した。

本研究は本学会第 76 回学術講演会 (1998 年 11 月, 新潟) において発表した。

文 献

- 1) Kamata, H., Katayama, O. "Shokuhin No Iro", 4th Ed., Tokyo, Korin-Zensho, 1977, p. 1-11.
- 2) Suzuki, I. *et al.* eds., "Shokuhin Tenkabutsu Koteisho Kaisetsusho, 7th Ed.", Tokyo, Hirokawa Shoten, 1999, D-158-D-162. (ISBN 567-0182-4)
- 3) "Standard method of analysis for hygienic chemists with commentary", authorized by the Pharmaceutical Society of Japan, 1990, Tokyo, Kanehara Shuppan, 1995, p. 523. (ISBN 4-307-47031-1)
- 4) Oka, H., Ikai, Y., Hayakawa, J., Harada, K., Suzuki, M., Nakazawa, H., Ito, Y., "Modern Countercurrent Chromatography", Conway, W. D., Petroski, R. J. eds., Washington, D. C., American Chemical Society, 1995, p. 92-106. (ISBN 0-8412-3167-2)
- 5) Suzuki, I. *et al.* eds., "Shokuhin Tenkabutsu Koteisho Kaisetsusho, 7th Ed.", Tokyo, Hirokawa Shoten, 1999, D-824-D-827. (ISBN 567-0182-4)
- 6) Itakura, Y., Ueno, E., Ito, Y., Oka, H., Ozeki, N., Hayashi, T., Yamada, S., Kagami, T., Miyazaki, Y., Otsuji, Y., Hatano, R., Yamada, E., Suzuki, R., Analysis of lac and cochineal colors in foods using reversed phase thin layer chromatography/scanning densitometry. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **40**, 183-188 (1999).
- 7) Ozeki, N., Oka, H., Ikai, Y., Ohno, T., Hayakawa, J., Hayashi, T., Aoyama, T., Kushibiki, Y., Sato, T., Ito, M., Suzuki, R., Application of reversed-phase TLC to the analysis of coal tar dyes in food. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **34**, 542-545 (1993).