高速液体クロマトグラフィーによる食品中の アカネ色素の定量

(平成4年5月26日受理)

川崎 洋子* 合田 幸広* 米谷 民雄*
義平 邦利* 武田 明治*

Determination of Madder Color in Foods by High Performance Liquid Chromatography

Yoko KAWASAKI, Yukihiro GODA, Tamio MAITANI, Kunitoshi YOSHIHARA
and Mitsuharu TAKEDA

(National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan)

An analytical method for madder color in foods by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. As reference/guide compounds for the analysis, ruberythric acid (1), lucidin-3-*O*-primeveroside (2), and alizarin (3) were selected, since they are the principle coloring constituents in the ethanol-water (1:1) extract of madder. Soft drink colored with madder extract was subjected to HP-20 (Diaion) ion-exchange column chromatography prior to the HPLC procedure. Recoveries of 1, 2, and 3 from the soft drink were 83, 85, and 100%, respectively. In the case of proteinaceous foods (kamaboko and lactic drink) colored with madder extract, the raw material (5 g) was homogenized in water and the homogenate was heated at 85°C for 3 hours under an acidic condition (pH 2, adjusted with HCl) to extract the reference/guide compounds. After neutralization with NH₄OH solution, the homogenate was purified by HP-20 column chromatography for HPLC. By the acid treatment, 1 and 2 were partially hydrolyzed to compounds 4 and 5. On the basis of the spectroscopic data, 4 and 5 were identified as alizarin-2-*O*-glucoside and lucidin-3-*O*-glucoside, respectively. The recoveries of 1, 2, and 3 were 68, 83 and 100% (kamaboko) and 71, 78, and 100% (lactic drink), respectively, taking into account the amounts of the hydrolyzed compounds.

(Received May 26, 1992)

Key words: アカネ色素 madder color; セイヨウアカネ *Rubia tinctorum*; ルベリトリン酸 ruberythric acid; ルシジンプリムベロシド lucidin-3-*O*-primveroside; アリザリン alizarin; アリザリングルコシド alizarin-2-*O*-glucoside; ルシジングルコシド lucidin-3-*O*-glucoside; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

緒 言

化学的合成品以外の食品添加物(天然添加物)は各種加工食品に数多く利用され、平成3年7月からはその表示が義務付けられた¹⁾。今後、各品目についての規格基準が必要になってくるであろう。天然添加物は、多種多様な成分より成り立っている関係上、あらかじめ有効成分や指標成分が明らかにされていることが望ましい。又、その成分についての分析法が確立されていることも必要

であろう。

このような観点から著者らはこれまでに、天然色素中の指標成分の単離、同定やその分析法に関する研究を行ってきた^{2)~5)}。今回は、すでに原料植物及び市販着色料中の成分について検討を加えたアカネ色素^{3), 6), 7)}について、得られた知見を基に、食品中からの分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試 料

アカネ色素を使用した清涼飲料水、乳飲料及びかまぼ

* 国立衛生試験所: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

こは日本食品添加物協会より入手した。着色料使用の表示のない市販かまぼこは、東京都内の小売店より購入した。セイヨウアカネ根は、イラン産の乾燥チップを三栄化学工業(株)より入手した。

2. 試 薬

1) Ruberythric acid (1): フナコシ薬品(株)製

2) Lucidin 及び lucidin-3-O-primeveroside (2): セイヨウアカネ根の抽出エキスより単離し、標品との各種機器分析⁹⁾による直接比較により同定したものをを用いた。標品の lucidin は熊本大学の広瀬教授から、lucidin-3-O-primeveroside は京都大学の井上教授から恵与された。Lucidin-3-O-primeveroside の $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (400 nm, MeOH) 値は 220.0 であった。

3) Alizarin (3): 和光純薬(株)製

4) 吸着剤: ダイヤイオン HP-20 (三菱化成(株)製)をあらかじめメタノール及び水で洗浄して用いた。

5) 合成着色料: 食用黄色 4 号, 同 5 号, 食用赤色 2 号, 同 3 号, 同 102 号, 同 104 号, 同 105 号, 同 106 号は国立衛生試験所標準品を用い、食用赤色 40 号は和光純薬工業(株)製を用いた。

その他の試薬は、試薬特級品を用いた。

3. 装 置

高速液体クロマトグラフ (HPLC): 日本分光 880-PU; 検出器: 日本分光 875-UV; 質量分析 (MS) 装置: 日本電子(株) JMS-DX 300 型; 核磁気共鳴 (NMR) 装置: Varian-Gemini-300 及び Varian-VXR-400S 型

赤外分光 (IR) 光度計: 日本電子 JIR-3510 型

融点測定器: 柳本デジタル微量融点測定器 MP-500D 型

紫外可視 (UV-VIS) 光度計: 島津 UV-240 型

4. HPLC 条件

4.1 分析 HPLC

カラム: Shim-pack CLC-ODS 6×150 mm i.d.; カラム温度: 40°; 移動相: 5% 酢酸-メタノール (6:4) (配糖体) または、5% 酢酸-メタノール (3:7) (アグリコン); 流速: 1 ml/min; 注入量: 10 µl; 検出波長: 280 及び 400 nm

4.2 分取 HPLC

カラム: Shim-pack prep-ODS 20×250 mm i.d.; カラム温度: 40°; 移動相: 5% 酢酸-メタノール (6:4); 流速: 10 ml/min

5. セイヨウアカネ根より色素液の調製

「化学的合成品以外の食品添加物リスト」⁹⁾に準拠してセイヨウアカネ根の乾燥チップ 5 g を 50% エタノール 100 ml で 2 時間 85~90°の水浴中で還流抽出した。冷後、ろ過して、100 ml とし、セイヨウアカネ抽出色素液 (色素液) とした。

本色素液の主成分は ruberythric acid (1), lucidin-3-O-primeveroside (2), alizarin (3) であり、色素液中の濃

度は、それぞれ 1,300 ppm, 1,960 ppm, 100 ppm であった。

6. 塩酸性下での色素液の加温実験

塩酸性下で色素液を加温した後、HPLC で分析したところ、上記の色素成分以外に新たに化合物 4 及び 5 が色素成分として検出された。そこで、分取 HPLC を行い、化合物 4 及び 5 を単離した。化合物 4 及び 5 の $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (400 nm) 値はそれぞれ、109.0, 108.7 であり、融点及びスペクトル特性は以下のとおりである。

化合物 4: 橙黄色針状晶, 融点 196~197°

IR $\nu_{\text{KBr}}^{\text{max}}$ cm⁻¹: 3465, 1662, 1635, 1589, 1269

Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FABMS) (Pos./*m*-nitrobenzyl alcohol) *m/z*: 441 ([M+K]⁺), 425 ([M+Na]⁺), 403 ([M+H]⁺)

UV-VIS $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ): 280 (8330), 330 (2520), 415 (4630)

¹H-NMR (acetone-*d*₆), δ ppm: 3.48~3.74 (5H, m), 3.90 (1H, br d, *J*=9.6 Hz), 5.23 (1H, d, *J*=7.5 Hz), 7.63 (1H, d, *J*=8.5 Hz), 7.79 (1H, d, *J*=8.5 Hz), 7.91~7.98 (2H, m), 8.25~8.35 (2H, m)

化合物 5: 黄色針状晶, 融点 212~213°

IR $\nu_{\text{KBr}}^{\text{max}}$ cm⁻¹: 3434, 1668, 1631, 1587, 1375

FABMS (Neg./*m*-nitrobenzyl alcohol) *m/z*: 431 ([M-H]⁻)

UV-VIS $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ): 285 (9250), 405 (4700)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆), δ ppm: 3.18~3.60 (5H, m), 3.72 (1H, br d, *J*=9.6 Hz), 4.60, 4.68 (each 1H, d, *J*=15 Hz), 5.12 (1H, d, *J*=7.5 Hz), 7.48 (1H, s), 7.93~7.98 (2H, m), 8.19~8.25 (2H, m)

7. 色素液による食品の染着及び HPLC 用試験溶液の調製

7.1 清涼飲料水

清涼飲料水 100 ml に色素液 100 µl を添加して染着した。次に、ろ紙 (東洋濾紙 No. 5C) でろ過し、ろ液を HP-20 カラム (2×10 cm) に吸着させた。ついで、カラムを水 100 ml で洗浄して、水溶性の来雑物を除去した後、200 ml のメタノールで溶出してくる着色溶液を集め、減圧下で濃縮乾固した。乾固した残留物にメタノールを加え 5 ml とし、HPLC 用試験溶液とした。

7.2 タンパク性食品

7.2.1 かまぼこ

無色かまぼこ 5 g に、色素液 400 µl を添加し、80° 20 分間加熱した後、一晚冷蔵庫に放置し染着した。ついで、水 15 ml を加えて 5 分間ホモジナイズし、1 N 塩酸 3 ml を加えた後、冷却管をつけて 85°水浴中 3 時間、加温した。放冷後、5% アンモニア水で中和し、2 倍量のアセトンを加えて水冷し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、上清を分取した。更に残留物について同様のアセトン抽出を 2 回繰り返し、分取した上清を集めてその溶媒を減

圧下で留去した。ついで残留物に水 10 ml を加えて溶かし、HP-20 カラムに吸着させ、以下、清涼飲料水と同様に操作し、HPLC 用試験溶液を得た。

7.2.2 乳飲料

無色の乳飲料 5 ml に、色素液 400 μ l を添加して染色した。ついで、1 N 塩酸 3 ml を加え、以下は、かまぼこと同様に操作し、HPLC 用試験溶液を得た。

8. 色素成分の定量

HPLC による定量は、検出感度 0.04 AUFS、ピーク高さによる絶対検量線法を用いて行った。化合物 1~5 は 0.1 から 1.4 μ g の範囲で良好な直線性が得られた。

結果及び考察

1. 指標成分の選定

これまでの研究から、市販アカネ色素中の主色素成分は、アントラキノンの配糖体である ruberythric acid (1) 及び lucidin-3-O-primeveroside (2) であることが明らかになっている³⁾。また、「化学的合成品以外の食品添加物リスト」⁹⁾に準拠して、セイヨウアカネ根より抽出した色素液の主成分も 1, 2 である。しかし、今回の実験で、1 のアグリコンである alizarin (3) もある程度、存在していることが明らかとなった。そこでアカネ色素分析のための指標成分として主色素 1, 2, 3 を選ぶことにした。

2. HPLC の条件

アカネ色素成分の極性の高い配糖体とより極性の低いアグリコンの両方について HPLC を行うために、移動相について検討した。その結果、配糖体の分析ではメタノール-5% 酢酸 (4:6) で、アグリコンの分析ではメタノール-5% 酢酸 (7:3) で良好な分離が得られたので、以下これらの系を用いて分析を行うことにした。

検出波長は指標成分の吸収極大波長がすべて 280 nm と 400 nm 付近にあることから、280 nm と 400 nm を選択した。定量には、感度の面ではやや 280 nm に劣るものの、食品からの来雑物由来の妨害ピークが少なく、より高い定量精度を得られる 400 nm を用いることにした。

3. イオン交換カラムの吸着、溶出特性の検討

アカネ色素液 1 ml を用い、イオン交換カラムに対する吸着、溶出特性について検討した。その結果、溶媒留去後、水に再溶解した色素液は、HP-20 カラムによく吸着され、水 500 ml で洗浄しても溶出しないことが判明した。ついでメタノールを 100 ml ずつ加え、溶出した画分中の 1~3 について HPLC で分析を行ったところ、200 ml のメタノールで 1, 2 及び 3 がそれぞれ 96, 97 及び 100% 回収されることが判明した。

4. 添加回収実験

4.1 清涼飲料水

アカネ着色料の表示のある清涼飲料水に直接色素液を加えた。ついで若干の濁りをろ紙 (東洋濾紙 No. 5C) で

除き、ろ紙を HP-20 カラムに吸着させ、水で洗浄した。およそ 100 ml の水で洗浄した後に流出液は無色透明になり、清涼飲料水中の糖分や塩など水溶性の来雑物を除去できたものと考えられた。ついで、メタノール 200 ml で色素画分を溶出させた後、実験方法 7.1 に従って 1, 2 及び 3 の回収率を検討した結果、それぞれ 83%, 85% 及び 100% であり、いずれの指標成分についても良好な回収率であることが示された。

4.2 タンパク性食品

かまぼこ及び乳飲料について衛生試験法¹⁰⁾により弱酸性条件下で色素の抽出を行ったところ、色素成分が食品中のタンパクに強く結合し、ほとんど抽出されないことが明らかになった。そこで、塩酸酸性下で加温抽出を試みた。

指標成分 1, 2 は配糖体であり、塩酸酸性での加温抽出を行うと加水分解することが推定された。まず、このことを明らかにするために、塩酸酸性下での色素液の加温実験を行った。その結果、HPLC 分析により新たに未知化合物 4 及び 5 が色素成分として検出された。そこで、以後化合物 4, 5 も含めた定量を可能にするために、分取 HPLC を行い 4, 5 を単離、同定することにした。

4.2.1 化合物 4, 5 の単離同定

化合物 4 は FABMS で 441, 425, 405 のイオンピークが観測され、それぞれ $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+H]^+$ に由来するものと推定された。また、¹H-NMR において 1¹¹⁾に近似した芳香族領域のプロトンシグナル及びアノメリックプロトン (δ 5.23) を含むグルコース 1 個分と推定されるプロトンのシグナルが観測された。よって 4 は 1 の糖部分である primeverose から xylose がははずれた alizarin-2-O-glucoside と同定した。

5 はネガティブモードの FABMS で $[M-H]^-$ と推定される 431 のイオンピークが観測された。また、¹H-NMR において 2⁸⁾に近似した芳香族領域のプロトンシグナル、及びメチレン由来と考えられる δ 4.62 のシグナル、一つのアノメリックプロトン (δ 5.12) を含むグルコース 1 個分と推定されるプロトンのシグナルが観測された。よって 5 は 2 の糖部分である primeverose から xylose がははずれた lucidin-3-O-glucoside と同定した。Fig. 1 に 1~5 の構造式を示した。

4.2.2 酸加温抽出条件の検討

以上の結果より、4, 5 はそれぞれ 1, 2 に由来することが明らかになったので、市販の無色かまぼこ 5 g にアカネ色素液を 400 μ l 添加して、染色した試料を用いて、色素成分の回収率を指標として加温抽出時の至適酸濃度を検討した。その際加温時間は 3 時間とし、4 は 1 由来の、5 は 2 由来の化合物として 1, 2 の回収率に加えた。また標品を用いた実験から 3 はこの条件下では分解されないことが判明していたので、その増加分は 1 に加えた。その結果、Fig. 2 に示すように 1 N 塩酸を 3 ml 加えた

Fig. 1. Chemical structures of reference/guide compounds for analysis of madder color in foods

Fig. 2. Effect of additional acid volume on the recoveries of reference/guide compounds from dyed kamaboko

—●—: ruberythric acid; —■—: lucidin-3-O-primeveroside

Fig. 3. Effect of heating time on the recoveries of reference/guide compounds from dyed kamaboko

—●—: ruberythric acid; —■—: lucidin-3-O-primeveroside

条件 (実測 pH 2) において, 1, 2 とも良好な回収率を示した. なお, すべての実験条件下で定量限界 (0.05 ppm) 以上の lucidin は検出されなかった.

次に, 1 N 塩酸を 3 ml 加えた条件下で最も高い回収率を示す加温抽出時間の検討を行った. 回収率の計算は, 上記の至適酸濃度の検討の場合と同様に行った. Fig. 3 に示すように 3 時間の加温抽出により 1, 2 とも最も良い回収率が得られた. よって, タンパク食品からの色素の酸加温抽出は, 1 N 塩酸 3 ml を加え, 85° 水浴中で 3 時間行うことにした. この条件下での色素成分 1, 2, 3 の回収率はそれぞれ 68, 83, 100% であった. また, 乳飲料においては同条件下で, 71, 78, 100% の回収率が得られた.

5. 食品からのアカネ色素の定量

以上の実験結果より確立した方法を用いて, 清涼飲料水, 乳飲料, かまぼこ中のアカネ色素の定量を行った (Fig. 4). 清涼飲料水からは 1 及び 2 がそれぞれ 0.3 ppm 及び 0.7 ppm 検出され, 3 は検出限界以下であった. これは 420 nm での, $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (MeOH) 値が 0.2 の市販品²⁾が清涼飲料水 1 L 当たりほぼ 1 ml 添加されている計算になり, 極めて少量の着色料の添加量でも, 定量が可能であることが明らかとなった.

一方, 乳飲料及びかまぼこからは 3 がそれぞれ 0.8 ppm, 10.5 ppm 検出されたが, 配糖体である 1, 2 及びその分解物 4, 5 は検出限界以下であった. 本法では, 配糖体からアグリコンへの完全な分解は起こらないので, 乳飲料及びかまぼこに使用されたアカネ色素は, 著者らが成分研究に用いた市販品とは色素成分比が異なる製品と考えられる.

なお, 本法における指標物質の定量限界は, 3 が 0.05 ppm, 1, 2, 4 及び 5 は 0.2 ppm であり, 検出限界は, 3 が 0.5 ng, 1, 2, 4 及び 5 が 2 ng である.

天然添加物の分析において, タンパク性食品からの色素の抽出には酸性下での加温が効果的であることが知られている. 他方, 指標成分として, このような条件に不

Fig. 4. High performance liquid chromatograms of madder color in foods under the mobile phase condition of methanol: 5% acetic acid=4:6 (upper) and methanol: 5% acetic acid=7:3 (lower)

a) soft drink; b) kamaboko; c) lactic drink

1: ruberythric acid; 2: lucidin-3-O-primeveroside; 3: alizarin; 4: alizarin-2-O-glucoside; 5: lucidin-3-O-glucoside

安定な配糖体などを選ばざるを得ない場合も多い。その結果、抽出過程で指標成分が分解する可能性もあり、天然添加物の分析法の開発の際に、留意すべき点と考える。

6. 合成着色料との識別

黄色及び赤色の合成着色料9種類について、試料と同条件下でのダイヤイオン HP-20 に対する吸着性を Table 1 に示した。黄色4号及び赤色2号は HP-20 に吸着せず、水で完全に溶出した。黄色5号、赤色3, 40, 102号は一部が、またキサントン系色素はほぼ100%が HP-20 カラムに吸着し、メタノールで溶出した。よって HP-20 による前処理により黄色4号及び赤色2号とアカネ色素の指標成分は分離できることが判明した。また、他の色素は、食用黄色5号(Y5)、食用赤色102号(R102)を除き、HPLC 上 400 nm では検出されない。又、Y5 及び R102 は、アグリコン分析条件で3と比較して、保持時間が異なる(Y5:13.5分, R102:60分以上)ことが判明した。よって本分析法で、各種合成食用色素とアカネ色素の指標成分の識別は可能であることが明らかになった。

まとめ

食品中の天然添加物の分析法に関する研究の一環として、アカネ色素の分析法について検討した。

原料植物から色素液を抽出し、成分分析を行い指標成分を選定した。次にこの色素液で着色した試料について

Table 1. Recovery of Synthetic Dyes from HP-20 Column with H₂O

Dyes	Recovery (%)
Food Yellow No. 4 (Tartrazine)	100
Food Yellow No. 5 (Sunset Yellow FCF)	75
Food Red No. 2 (Amaranth)	100
Food Red No. 40 (Allura Red)	80
Food Red No. 102 (New Coccine)	75
Food Red No. 3 (Erythrosine)	0
Food Red No. 104 (Phloxine)	5
Food Red No. 105 (Rose Bengale)	0
Food Red No. 106 (Acid Red)	0

指標成分の抽出、定量法を検討した。更に、タンパク食品の場合、抽出過程で、指標成分が分解する可能性が考えられるので、予想分解物の単離、同定を行い、指標成分に由来する化合物であることを確認した。定量は、指標成分に由来する化合物を指標成分に換算し、総量として定量値を算出した。

文献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知: “化学的合成品以外の添加物の表示について” 平成元年 11 月 28 日衛化第 66 号 (1989).
- 2) 合田幸広, 鈴木淳子, 義平邦利: 衛生試験. **106**, 101~105 (1988).

- 3) 川崎洋子, 合田幸広, 佐藤恭子, 義平邦利: 同上 **107**, 103~105 (1989).
- 4) Sato, K., Goda, Y., Yoshihira, K., Noguchi, H.: J. Food Hyg. Soc. Japan **32**, 301~307 (1991).
- 5) Sato, K., Iwakami, S., Goda, Y., Okuyama, E., Yoshihira, K., Ichi, T., Otake, Y., Noguchi, H., Sankawa, U.: Heterocycles, **34**, 2,057~2,060 (1992).
- 6) Kawasaki, Y., Goda, Y., Yoshihira, K.: Jap. J. Pharmacog. **42**, 166~167 (1988).
- 7) Kawasaki, Y., Goda, Y., Yoshihira, K., Noguchi, H.: *ibid.* **44**, 95~97 (1990).
- 8) Demagos, G., Baltus, W., Höfle, G.: Z. Naturforsch. **36b**, 1,180~1,184 (1981).
- 9) 厚生省生活衛生局食品化学課編: “化学的合成品以外の食品添加物リスト” (1989).
- 10) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解” p. 531~532 (1990), 金原出版.
- 11) Itokawa, H., Mihara, K., Takeya, K.: Chem. Pharm. Bull. **31**, 2,353~2,358 (1983).