フォトダイオードアレー検出器付き高速液体クロマトグラフ 質量分析計による食品中のクチナシ黄色素の分析法

(平成7年2月13日受理)

市 隆人^{*1} 東村 豊^{*2} 片山 豪^{*2}
香田隆俊^{*2} 多田幹郎^{*3}

Determination of a Food Colorant, Cardenia Yellow Pigment, in Processed Foods with a High Performance Liquid Chromatograph/Photodiode-array Detector/Mass Spectrometer System

Takahito ICHI^{*1}, Yutaka HIGASHIMURA^{*2}, Tsuyoshi KATAYAMA^{*2},
Takatoshi KODA^{*2} and Mikiro TADA^{*3}

(^{*1}The Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University:
3-1-1, Tsushima-naka, Okayama 700, Japan; ^{*2}San-Ei Gen F.F.I., Inc:
1-1-11, Sanwa-cho, Toyonaka, Osaka 561, Japan; ^{*3}Department
of Biological Function and Genetic Resources Science,
Okayama University: 1-1-1, Tsushima-naka,
Okayama 700, Japan)

A determination method for a food colorant, gardenia yellow pigment, in processed foods using a high performance liquid chromatograph/photodiode-array detector/mass spectrometer (LC-PDA-MS) system was examined. In this method, the total contents and the composition of crocetin derivatives (the seven main components of gardenia yellow pigment) were measured at the same time in unboiled noodles and dairy beverages to which more than 200 μg of gardenia yellow pigment as crocetin per 100 g of the processed foods had been added. The contents of gardenia yellow pigment in processed foods could be calculated by determining the recovery from model foods

The total contents of gardenia yellow pigment extracted from commercial unboiled noodles and dairy beverages were 3.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ and 2.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ as crocetin. From the recoveries (unboiled noodle: 45%, dairy beverage: 62%) in these experiments, it was calculated that the commercial unboiled noodle and dairy beverage had been prepared with 750 μg and 370 μg of gardenia yellow pigment as crocetin per 100 g of the processed foods, respectively. These values were close to those in the recipe used by the food company. The composition of gardenia yellow pigment from commercial foods was similar to that of gardenia yellow pigment in the fruit.

(Received February 13, 1995)

Key words: クチナシ黄色素 gardenia yellow pigment; 天然着色料 natural food color; クロセチン誘導体 crocetin derivative; フォトダイオードアレー検出器付き高速液体クロマトグラフ・質量分析計 high performance liquid chromatograph/photodiode-array detector/mass spectrometer system

^{*1} 岡山大学自然科学研究科: 〒700 岡山市津島中 3-1-1

^{*2} 三栄源エフ・エフ・アイ(株): 〒561 大阪府豊中市三和町 1-1-11

^{*3} 岡山大学農学部: 〒700 岡山市津島中 1-1-1

緒 言

従来、天然添加物は、「天然物は安全である」との理由に基づいて、その使用についての規制と表示義務はなかったが、平成元年の食品衛生法施行規則の改正によって全面表示が義務づけられた。更に、天然添加物の規格及び使用基準の設定も要求されている¹⁾。現在、食品の着色に多種の天然色素が使用されているが^{2)~5)}、これらの食品用天然着色料についても、その規格の設定が求められている^{6), 7)}。

現在使用されている天然由来の食品用着色料のほとんどは、複数の色素成分の混合物である。従って、天然着色料の規格を設定するためには、それに含まれている構成成分の個々について、その構造を明らかにし、それらの組成比を知ることが必須となる。また、実際に使用した食品中での変化についても、個々の成分について理解することも必要であろう。

著者らは、このような観点から、多くの食品に黄色着色料として使用されているクチナシ黄色素の構成成分とその組成比を明らかにし、個々の成分の食品化学的性質を調べて既に報告した^{8), 9)}。本報告では、クチナシ黄色素で着色した食品からクチナシ黄色素成分の定性・定量分析を簡便・かつ正確に行う方法をフォトダイオードアレー検出器付き高速液体クロマトグラフ-質量分析計(PDA-LC/MS)を用いて検討した。

実験方法

1. 試 料

1) クチナシ黄色素標準品

三栄源エフ・エフ・アイ(株)の温室で完熟期(結実後7か月)まで栽培したクチナシ(*Gardenia jasminoides* Ellis)果実を用いて、以下の方法で調製したクロシン黄色素の画分を“クチナシ黄色素標準品(Standard Gardenia Yellow Pigment; SGYP)”として使用した。

完熟クチナシ果実に、5倍量の50%エタノールを加え磨砕して、冷暗所で浸漬抽出を3回行い、次いで、95%エタノールを用いて黄色素に由来する色が抽出液に認められなくなるまで抽出操作を繰り返した。得られたクチナシ抽出液を合わせて、減圧下、40°でエタノールを除去した後、水で希釈して高多孔性吸着樹脂ダイアイオン HP-20 カラムに供して黄色素を吸着させ、十分に水洗した後、80%エタノールを流下して溶出してくる黄色素画分を集めた。この溶出液を40°で減圧濃縮し、得られた濃縮物を Sephadex LH-20 カラムに供し、メタノールで溶出する黄色素画分を集めた。更に純度を高めるために、この黄色素画分を、そのメタノール濃度が30%になるように水で希釈して、分取用 HPLC に供した。HPLC で分画溶出してくる主要色素成分を全部集め、減圧下で溶媒を除去し、真空乾燥して得られる粉末を“クチナシ黄色素標準品(SGYP)”として本研究に使用した。なお、HPLC による黄色素画分の分取

には、Waters 社製分取システム(PREP 4000)に Sic 社製のデータ処理機(Chromatocorder 12)と Waters 社製のフラクションコレクター(WFC)を接続した装置を利用した。また、カラムには Nucleosil 5C18 (ϕ 25 mm×250 mm)を用い、移動相及びそのタイムプログラムは、10 ml/min の流速条件で、0分から15分までは50%メタノール、15分から30分にかけてはメタノール濃度を連続濃度勾配で50%から100%まで上昇させ、30分以降はメタノールで溶出した。

このようにして調製したクチナシ黄色素標準品は、後述するように、その乾燥重量1g当たりクロセチン換算値として782mgの総クチナシ黄色素を含有しており、主要構成成分として7種のクロセチン誘導体を含んでいる。

2) 生めん

市販生めん(商品名:中華麺)と実験室で調製した生めんを使用した。市販生めんは製造日の夕方に購入し、1夜冷蔵庫に保存した後分析に供した。実験室での調製は市販品とほぼ同様の方法で行った。すなわち、準強力粉100gに、食塩1gとクエン酸0.53gを混合し、これに水を35g添加した後、練合せてめん帯を形成し、切断してめん線を作り、ビニール袋に封入した。着色生めんは、上記の材料にクチナシ黄色素標準品を880 μ g(クロセチン換算値として688 μ g)添加して、無添加の調製品と同様の方法で調製した。従って、このようにして調製した着色生めん100g当たりの総クチナシ黄色素含有量は、クロセチン換算値として、500 μ gと算出される。

3) 乳飲料

市販乳飲料(商品名:バナナ牛乳)と実験室で調製した乳飲料を使用した。市販乳飲料は、クチナシ黄色素の添加が表示してあり、製造日から3日経過したものを購入し、その日のうちに分析に供した。実験室での乳製品の調製は、市販製品を模して、以下の方法で行った。牛乳30gに、脱脂粉乳2.4g、砂糖20g、クエン酸0.5g、バナナフレーバー0.2gを加え、これに水を加えて全量を200gにした。次いで、ろ紙でろ過して100ml容量のガラス瓶に分注し、加熱殺菌と冷却の工程を経た後、冷蔵庫で貯蔵した。着色乳飲料は、上記の材料にクチナシ黄色素標準品を880 μ g(クロセチン換算値として688 μ g)添加して、無添加の調製品と同様の方法で調製した。従って、このようにして調製した着色乳飲料100g当たりの総クチナシ黄色素含有量は、クロセチン換算値として、340 μ gと算出される。

2. 食品試料からのクチナシ黄色素の抽出

生めんの場合、試料約10gを正確にひょう取して、これに50%アセトンを100ml加えて、乳鉢中で十分に磨砕混合して2~3時間室温暗所で放置した後、ろ紙(東洋濾紙, No. 5C)を用いて自然ろ過し、得られる約

80 ml のろ液を 100 ml に定容した。乳飲料の場合には、試料約 10 g を正確にひょう取して、これに 50% アセトン を 90 ml 加えて良く振り混ぜて 2~3 時間室温暗所で放置した。生じた沈殿物をろ紙（東洋濾紙, No. 5C）を用いて自然ろ過し、得られるろ液を 100 ml に定容した。以後の操作は両試料共に同じように行った。すなわち、これらの定容溶液から 50 ml を取り、減圧下、40° でアセトン を留去した後、油脂分を *n*-ヘキサン 10 ml で抽出除去してから、その全量を Sep-pak カートリッジ C18（Waters 社製）に供して黄色素を吸着させた。続いてカートリッジを蒸留水 25 ml で水洗した後、2.5 ml のメタノールで黄色素を溶出させ、これに水を加えて 5 ml に定容し、この定容溶液を分析供試液とした。

3. 総クチナシ黄色素の定量

クチナシ黄色素標準品及び食品試料中の総クチナシ黄色素含量は、クロセチンの極大吸収波長 (430 nm) における比吸光係数 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}=4320$)¹⁰⁾ に基づく分光光度法によって、クロセチン換算値として求めた。溶媒には 80% メタノールを用い、吸収スペクトル及び吸光度の測定は自記分光光度計（(株)日立製作所 U-3200）を使用した。また、クチナシ黄色素を構成するクロセチン誘導体の組成比は HPLC のピーク面積の比で求め、個々の成分の量は組成比に含有量を乗じることによって算出した。

4. フォトダイオードアレー検出器付き高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (PDA-LC/MS) による各成分の定性、定量分析

1) 装置

液体クロマトグラフ本体（日本分光：PU-980 型）にフォトダイオードアレー検出器（日本分光(株)：MD-910）と四重極型質量分析計（VG Biotech：PLAT-FORM 型）及びデータ処理機（Hewlett Packard：VECTRA 286/20N）を連結した装置を使用した。

2) 使用条件

HPLC 条件として、カラムには Nucleosil 5C18 ($\phi 4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$) を用い、移動相及びそのタイムプログラムは、1.0 ml/min の流速条件で、0 分から 15 分は 50% メタノール、15 分から 30 分にかけてメタノール濃度を連続勾配で 50% から 100% まで上昇させ、30 分以降 40 分までメタノールで溶出した。黄色素成分の検出はフォトダイオードアレー検出器で 250~500 nm の波長域で行い、マススペクトルは、イオン化（イオン源温度 70°、ネブライザーガス (N_2) 流量 10 L/hr、スキマー電圧 100 V）にエレクトロ・スプレー・イオン化 (ESI) 法を用い、ネガティブモードで測定した。また、スプリッターを 97:3 に設定して、溶出液の 3/100 を質量分析計へ、97/100 をフォトダイオードアレー検出器に導き、質量分析計によるマススペクトルの

分析とフォトダイオードアレー検出器による吸収スペクトルの測定は 4 秒間に 1 回の頻度で行った。なお、1 回の分析に分析供試液 20 μl を使用した。

3) 定性・定量

各成分の同定は、HPLC の保持時間、吸収スペクトルの 420~440 nm 付近の極大吸収波長及びマススペクトルによって同定し、シス型の成分に関しては、これらの結果に加えてシスピークである 320 nm 付近の吸収の有無によって判定した。

構成色素成分（クロセチン誘導体）の組成比は、検出波長 440 nm で得られたクロマトグラムから、相当する成分のピーク面積の総和に対する個々の成分の比 (%) として表した。個々の成分の量は、求めた組成比にあらかじめ「3. 総クチナシ黄色素の定量」に示した分光学的手法で求めた総含有量を乗じることによって算出した。

5. 食品中のクロセチン誘導体の耐熱・耐光試験

実験室で調製した着色生めんと着色乳飲料を用いて、クロセチン誘導体の耐熱性と耐光性を調べた。着色生めんは、その 50 g をガスバリア性のポリ袋に、生めんが平らな一層になるように入れて真空パックした。着色乳飲料は、その 100 g をガラス容器 ($\phi 3.8\text{ cm} \times 10\text{ cm}$) に入れて実験に供した。

耐熱性は 80° の水浴中で 30 分間及び 120 分間加熱処理し、耐光性はロングライフフュードメーター（スガ試験機：FAL-3 型）を用いて、キセノンランプを光源とする光強度（放射光強度：490 W/m²）の白色光（波長幅：300~750 nm）を 2 時間及び 4 時間照射処理した。生めんについては、照射中 1 時間ごとに裏返して、試料への均一照射を図った。処理前後のクロセチン誘導体の総量及び個々の成分の量の変化を PDA-LC/MS を用いて求めた。なお、すべての実験はいずれも 5 回連続して行い、その平均値を採用した。

結果及び考察

1. クチナシ黄色素標準品のクロセチン誘導体の総含有量及び組成比

クチナシ黄色素標準品の濃度が、1.0 $\mu\text{g/ml}$ になるように調製した 80% メタノール溶液の 430 nm での吸光度は、0.338 であった。この結果とクロセチンの比吸光係数 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}=4320$)¹⁰⁾ に基づき、調製したクチナシ黄色素標準品の色素純度は 78.2% であると算出した。次いで、主要構成成分の同定と組成比を PDA-LC/MS を用いて調べた。得られた 3 次元 HPLC パターン、440 nm でのモニターによる 2 次元 HPLC パターン、各ピーク成分の吸収スペクトル及びマススペクトルを Fig. 1~4 に示した。2 つの HPLC パターン (Fig. 1, 2) から、クチナシ黄色素標準品には主要構成成分として 7 種 (P-1~P-7) が存在していることが認められ、更に、これらの構成成分のうち P-4 と P-7 は吸収スペクトル (Fig. 3)

にシス異性体であることに由来する明確なシスピーク (321 nm と 314 nm) が認められた。また、P-1~P-7 マススペクトル (Fig. 4) の脱プロトン化分子 ($[M-H]^-$) は、それぞれ m/z 975, 813, 651, 651, 651, 489, 489 に出現し、すべての構成成分にクロセチンに由来するフラグメントイオン m/z 327 が観察された。各成分の分子量は極性が低下するに伴って、グルコースに相当する質量、すなわち 162 ずつ段階的に減少していた。これらの吸収スペクトルとマススペクトルの結果を前報⁸⁾の結果と比較することによって、この7成分を同定することができた。これらの結果を溶出順に付した略記号 (P-1~7) 及びデータ処理によって求めたクチナシ黄色素標準品中の主要構成成分の組成比と共に、Table 1 に示した。なお、その組成比は前報⁸⁾で測定した完熟果実の組成比の結果に近似したものであった。

2. 検量線及び検出限界

クチナシ黄色素標準品を用いて種々のクチナシ黄色素濃度 (0.2~8.0 $\mu\text{g/ml}$; クロセチン換算) に調製した色

素液を PDA-LC/MS に供して、検出波長 440 nm で得られた7成分のピーク面積の総和と濃度の関係を求めた結果、色素濃度が 1~8 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で原点を通る良好な直線が得られた。そして、この濃度範囲で7種のクロセチン誘導体の組成比も再現性良く得られた。しかし、1 $\mu\text{g/ml}$ より低い濃度では、求めた組成比の再現性が悪く、従って、定量値にも信頼性が無くなった。これらの結果から、分析供試液のクチナシ黄色素濃度がクロセチン換算量として、1 $\mu\text{g/ml}$ 以上であれば、その 20 μl を使用することによって、7種の主要構成成分の組成比を求めることができ、また、それらの 440 nm で得られたクロマトグラムのピーク総面積から、クチナシ黄色素量の定量が可能であることが明らかになった。

3. クチナシ黄色素の添加回収実験

着色された食品中よりクチナシ色素量を求めるときには、あらかじめその回収率を求めることが重要である。そこで、実験室で、クチナシ黄色素標準品をそれぞれの

Fig. 1. 3D-HPLC pattern of crocetin derivatives in SGYP

Column: Nucleosil 5C18 ($\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$); flow rate: 1 ml/min

Detector: photodiode-array (250~500 nm; Nippon Bunko 980)

Solvent: 0-15 min (50% MeOH) $\rightarrow$ 15-30 min (50-100% MeOH; linear gradient) $\rightarrow$ 30-40 min (100% MeOH)

Fig. 2. HPLC pattern of crocetin derivatives in SGYP

Column: Nucleosil 5C18 ($\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$); flow rate: 1 ml/min

Detector: photodiode-array (440 nm; Nippon Bunko 980)

Solvent: 0-15 min (50% MeOH) $\rightarrow$ 15-30 min (50-100% MeOH; linear gradient) $\rightarrow$ 30-40 min (100% MeOH)

Fig. 3. UV spectra of crocetin derivatives in SGYP
P-1~P-7 see Table 1

試料 100 g 当たり, 生めんには 640 μg (クロセチン換算量: 500 μg), 乳飲料には 440 μg (クロセチン換算: 340 μg) を添加して調製した生めんと乳飲料を用い, 一連の操作を行って分析供試液を調製して回収実験を行った.

その結果を, PDA-LC/MS による主要構成成分の組成比の分析結果と共に Table 2 に示した. 分析供試液中の総クチナシ黄色素量を分光学的方法によって測定し

た回収率は, 生めんが 45.0%, 乳飲料が 66.2% で, 5 回連続の実験結果から求めた変動係数 (%) (標準偏差/平均値 $\times$ 100) は, それぞれ, 5.0%, 3.4% であった. なお, 上記の検出波長 440 nm で得られたピーク総面積と濃度の関係の検量線に基づいて算出した平均回収率は, 生めんについては 44.2%, 乳飲料は 64.4% で, 分光学的方法での結果との間に大差は無く, 検量線の有効性が確認された.

また, PDA-LC/MS による主要構成成分の組成比の分析結果より, 生めん, 乳飲料とも添加したクチナシ黄色素標準品の組成 (P-1: 65.3%, P-2: 4.5%, P-3: 3.1%, P-4: 8.8%, P-5: 12.4%, P-6: 3.3%, P-7: 0.4%) と極めて近似していた. これらのことは, 添加したクチナシ黄色素中の特定の成分が食品製造中に特異的に変化していないこと, また, すべての成分が同じ割合で抽出されていると考えられた. また, 食品の着色に使用した

Fig. 4. Mass spectra of crocetin derivatives in SGYP

Fig. 5. Heat stability of crocetin derivatives in unboiled noodle and dairy beverage prepared in laboratory

a): unboiled noodle; b): dairy beverage
 ■: 80°C, 30 min; □: 80°C, 120 min (in dark)
 T-P: SGYP

Table 1. Structure and Composition of Crocetin Derivatives in SGYP¹⁾

Symbol	Structure	Composition (%)
P-1	Crocetin-digentiobioside ester (<i>trans</i>): crocin	65.26
P-2	Crocetin-monogentiobioside-monoglucoside ester (<i>trans</i>)	4.52
P-3	Crocetin-monogentiobioside ester (<i>trans</i>)	3.06
P-4	Crocetin-monogentiobioside ester (<i>cis</i>)	8.75
P-5	Crocetin-diglucoside ester (<i>trans</i>)	12.44
P-6	Crocetin-monoglucoside ester (<i>trans</i>)	3.32
P-7	Crocetin-monoglucoside ester (<i>cis</i>)	0.38

¹⁾ Standard Gardenia Yellow Pigment

Table 2. Recoveries of Crocetin Derivatives from Unboiled Noodle and Dairy Beverage Prepared in Laboratory

Sample	No.	Extracted total pigments (μg/g)				Composition (%)						
		(Recovery %)				P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7
		Method 1 ^{a)}		Method 2 ^{b)}								
Unboiled noodle	1	2.26	(45.2)	2.18	(42.0)	65.4	4.1	3.1	8.7	12.5	3.0	0.4
	2	2.18	(43.6)	2.26	(45.2)	65.7	4.4	3.2	9.0	12.4	3.1	0.4
	3	2.22	(44.4)	2.09	(41.8)	64.3	4.5	3.2	8.7	12.8	3.1	0.4
	4	2.38	(47.6)	2.28	(45.6)	64.9	4.5	3.3	8.9	12.6	3.2	0.4
	5	2.21	(44.2)	2.31	(46.2)	66.7	4.5	3.2	8.7	12.7	3.1	0.4
	$X\pm\sigma^c)$	2.25±0.07	(45.0)	2.22±0.08	(44.2)	65.3	4.4	3.2	8.8	12.6	3.1	0.4
Dairy beverage	1	2.28	(67.1)	2.22	(65.3)	65.3	4.4	3.2	8.8	12.2	3.0	0.4
	2	2.20	(64.7)	2.18	(64.1)	64.8	4.5	3.2	8.8	12.3	3.1	0.4
	3	2.34	(68.8)	2.12	(62.4)	65.5	4.2	3.3	9.0	12.1	3.1	0.4
	4	2.26	(66.5)	2.16	(63.5)	64.5	4.2	3.1	8.9	12.0	3.2	0.4
	5	2.17	(63.8)	2.27	(66.8)	64.4	4.2	3.2	9.0	12.4	3.1	0.4
	$X\pm\sigma^c)$	2.25±0.06	(66.2)	2.19±0.05	(64.4)	64.9	4.3	3.2	8.9	12.2	3.1	0.4

^{a)} Determination based on spectrophotometry
^{b)} Determination based on HPLC analysis
^{c)} Average ± standard deviation

Table 3. Light Stability of Crocetin Derivatives in Unboiled Noodle and Dairy Beverage Prepared in Laboratory

Sample	Light treatment (hr)	Extracted total pigments (μg/g)	Crocetin derivatives (Composition %)						
			P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7
Unboiled noodle	0	3.09	1.94	0.10	0.09	0.28	0.32	0.11	0.01
			(62.8)	(3.2)	(3.0)	(9.1)	(10.3)	(3.6)	(0.3)
		[100]	[100]	[100]	[100]	[100]	[100]	[100]	
	2	1.52	1.00	0.05	0.05	0.12	0.03	0.02	0.01
			(65.7)	(3.41)	(3.23)	(8.22)	(2.28)	(1.0)	(0.11)
		[49.2]	[51.46]	[52.42]	[52.96]	[44.43]	[10.89]	[14.48]	[18.04]
4	0.58	0.44	0.02	0.02	0.05	0.01	0.01	0.01	
		(76.3)	(3.95)	(3.74)	(8.82)	(0.58)	(0.23)	(0.01)	
		[18.8]	[22.81]	[23.17]	[23.40]	[18.19]	[1.06]	[1.20]	[0.63]
Dairy beverage	0	2.24	1.41	0.07	0.07	0.20	0.23	0.08	0.01
			(62.8)	(3.2)	(3.0)	(9.1)	(10.3)	(3.6)	(0.3)
		[100]	[100]	[100]	[100]	[100]	[100]	[100]	
	2	1.34	0.88	0.04	0.04	0.11	0.03	0.01	0.01
			(65.7)	(3.22)	(2.99)	(8.22)	(2.12)	(0.95)	(0.08)
		[60.0]	[62.58]	[60.20]	[59.62]	[54.04]	[12.31]	[15.79]	[13.12]
4	0.56	0.43	0.02	0.02	0.05	0.01	0.01	0.01	
		(76.3)	(3.95)	(3.74)	(8.82)	(0.58)	(0.23)	(0.01)	
		[25.0]	[30.37]	[30.86]	[31.17]	[24.23]	[1.41]	[1.16]	[0.83]

[] Ratio of remaining component (%)

Table 4. Determination of Crocetin Derivatives Extracted from Commercial Foods

Sample	Extracted total pigments ($\mu\text{g/g}$)		Composition (%)						
	No.	Method 1 ^{a)}	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7
Unboiled noodle	1	3.44	66.3	4.5	3.7	9.3	5.6	1.8	0.2
	2	3.68	68.2	4.4	3.9	9.0	4.3	2.3	0.2
	3	3.71	67.5	4.5	3.6	9.1	4.2	1.7	0.2
	4	3.31	67.1	4.6	3.4	8.8	4.8	1.9	0.2
	5	3.41	67.4	4.5	3.4	8.8	5.5	2.4	0.2
	$X \pm \sigma^b)$	3.51 ± 0.16	67.3	4.5	3.6	9.0	4.9	2.0	0.2
Dairy beverage	1	2.41	66.4	4.9	4.2	8.7	4.3	1.8	0.1
	2	2.15	64.1	5.1	3.5	8.8	4.4	1.7	0.1
	3	2.22	65.5	4.4	3.8	8.7	4.7	2.2	0.1
	4	2.35	66.3	4.6	3.9	9.2	4.6	2.5	0.1
	5	2.37	66.7	4.5	4.1	9.1	4.5	1.8	0.1
	$X \pm \sigma^b)$	2.30 ± 0.10	65.8	4.7	3.9	8.9	4.5	2.0	0.1

^{a)} Determination based on spectrophotometry^{b)} Means $\pm$ standard deviation

クチナシ黄色素とクチナシ黄色素標準品との違いも判断でき、また、添加したクチナシ黄色素の品質も判断できると考えられた。

4. 食品中におけるクチナシ色素の熱及び光による変化

著者らは、McIlvaine 緩衝液 (pH=7.0) を用いた以前の実験⁹⁾で、クチナシ黄色素は高い耐熱性を有しているが、耐光性は低いことを明らかにした。そこで、実験室で調製した着色生めんと着色乳飲料をモデルとして用いて、実際の食品中でのクチナシ黄色素の熱及び光に対する安定性を PDA-LC/MS で調べた。なお、これらの実験における総クチナシ色素量は分光学的方法で求めた。

耐熱性試験の結果は Fig. 5 に各色素成分の残存率で示した。生めんと乳飲料の両者において、クチナシ黄色素の主要構成成分である 7 種のクロセチン誘導体のいずれも、30 分の熱処理による減少は 5% 程度に過ぎず、120 分の処理においても 85% 以上の色素残存率を示し、食品中においてもクチナシ黄色素の高い耐熱性が示された。

耐光性試験の結果は Table 3 に、クチナシ黄色素の総クチナシ色素量及び 7 種のクロセチン誘導体個々の量と共に、その組成比を、() 内、各色素の残存率を [] 内に % で示した。総クチナシ色素量及び個々のクロセチン誘導体の量が光照射時間に依存して減少し、クチナシ黄色素は耐光性に乏しいことが明らかに示された。また、色素残存率の変化から、クロセチン母核にゲンチオビオースがエステル結合している成分 (P-1~P-4) とその他の成分 (P-5~P-7) の耐光性には差があり、これが光照射による組成比の変化をもたらしていることが

分かった。言い換えると、後者の成分 (P-5~P-7) は前者に比べて光感受性が高く、このことは前報⁹⁾での結果と一致した。

5. 市販品への適用

市販品のクチナシ黄色素使用表示のある生めん及び乳飲料各 1 種、それぞれ 5 検体について PDA-LC/MS を用いて分析を行った結果を Table 4 に示した。生めん及び乳飲料から検出されたクチナシ色素量は、それぞれ検体 100 g 当たり、クロセチン換算として 350 μg 、230 μg であった。更に、5 回連続の実験結果より求めたクチナシ黄色素量の変動係数は、それぞれ 4.6%、4.3% と良好な再現性を示し、本方法の食品への使用の有用性を示している。

「3. クチナシ黄色素の添加回収実験」で得たそれぞれの回収率 (生めん 45.0%、乳飲料 66.2%) を採用すると、市販の生めん及び乳飲料の製造には、製品 100 g 当たりクロセチン換算値として 750 μg 、370 μg の濃度のクチナシ黄色素が使用されたことが推測された。これらの値は、食品製造会社が用いる生めん及び乳飲料の一般処方への添加量と良く一致していた。

また、抽出されたクチナシ黄色素中の構成成分は両者ともにクチナシ黄色素標準品の組成比と近似したものであり、市販食品に使用されたクチナシ黄色素の品質は良好なものであると考えられ、また、製造工程及び流通での変化も少ないことが推察された。

ま と め

食品中のクチナシ黄色素の定量、定性分析にフォトダイオードアレー検出器付き高速液体クロマトグラフ・質量分析計を用いる方法を検討した。本方法では、色素成

分をマスペクトルの測定及びフォトダイオードアレー検出器による吸収スペクトルにより定性分析を行い、検出波長 440 nm で得られたクロマトグラムより定量分析を行うことによって、1 回の分析で定性・定量分析を簡便に行うことができる。

この方法を用いて、クチナシ黄色素で着色した市販の生めん及び乳飲料について調べた。その結果、それぞれ製品 100 g 当たり、クロセチン換算量として 350 μ g, 230 μ g が検出され、また、主要構成成分の組成比は、クチナシ黄色素標準品のそれと近似していた。これらの値をモデル食品で得た回収率（生めん 45.0%, 乳飲料 62.2%）で補正すると、市販の生めん及び乳飲料中では、それぞれ食品 100 g 当たり 750 μ g, 370 μ g のクチナシ黄色素を使用し製造したことが推定された。これらの値は、食品製造会社が用いる生めん及び乳飲料の一般処方への添加量と良く一致していた。また、抽出されたクチナシ黄色素中の構成成分は両者ともにクチナシ黄色素標準品の組成比と近似していた。

以上の結果から、あらかじめモデル食品を用いて回収

率を求めておくことによって、食品に添加されたクチナシ黄色素中の各成分量と組成比を調べることができた。

文 献

- 1) 佐々木弥生：食衛誌, **33**, 516~517 (1992).
- 2) 西島基弘：同上 **33**, 515~516 (1992).
- 3) 長南隆夫：同上 **33**, 517 (1992).
- 4) 山田貞二：同上 **33**, 518~519 (1992).
- 5) 岸 弘子：同上 **33**, 519~520 (1992).
- 6) 清水孝重, 中村幹雄, 藤井正美監修：“概説 食用天然色素” p.3~36 (1993) 光琳.
- 7) 谷村顕雄, 片山 修, 遠藤英美, 黒川和男, 吉積智司：“天然着色料ハンドブック” p. 212~232 (1979) 光琳.
- 8) 市 隆人, 東村 豊, 片山 豪, 香田隆俊, 多田幹郎：日食工誌, 印刷中.
- 9) 市 隆人, 東村 豊, 片山 豪, 香田隆俊, 多田幹郎：同上, 印刷中.
- 10) Davies, B. H.: “Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments”, ed. by Goodwin, T. W., p. 149 (1975) Academic Press.