

食品に含まれる「クチナシ青色素」の定量法の検討

Determination of Gardenia Blue, a natural color additive, in Food

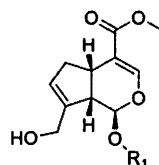
伊藤裕才、小野田千保、小林美伽、中谷沙織、鈴木ゆりか

Yusai ITO, Chiho ONODA, Mika KOBAYASHI, Saori NAKATANI, Yurika SUZUKI

1. 緒言

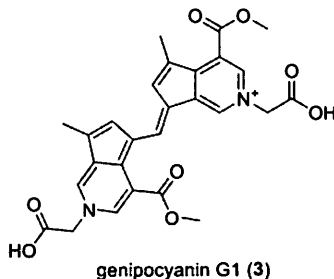
「クチナシ青色素」は食品添加物の 1 つで食品の着色料である。食品添加物公定書第 8 版において「クチナシ (*Gardenia augusta* Merrill 又は *Gardenia jasminoides* Ellis) の果実から得られたイリドイド配糖体とタンパク質分解物の混合物に、 β -グルコシダーゼを添加して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」と定義されている。本色素は青色を呈する数少ない食品添加物の 1 つである。クチナシ青色素は光や熱に対して安定であり、また水溶性が高いことから、飲料、冷菓、焼き菓子等の着色に使用される。クチナシの実には黄色のカロテノイド色素であるクロシンやクロセチンが含まれている。しかし、これらはクチナシ青色素の色素形成には関係しない。クチナシ青色素は、クチナシの実に含まれる無色のイリドイド配糖体であるゲニボシド (1) を原料とする (図 1)。まず初めにゲニボシドを β -グルコシダーゼで加水分解してアグリコンのゲニピン (2) とする。続いて、酸素存在下でゲニピンにたんぱく質加水分解物中のアミノ基を反応させると、連鎖反応が進行して青色素が形成される。青色素は重合化合物のため高分子量

であり、正確な化学構造は未だ不明である。部分推定構造として、ゲニピンとグリシンの反応物から、青色素の最小ユニットと考えられる genipocyanin G1 (3) が単離構造決定されたのが唯一の報告例である¹⁾ (図 2)。



geniposide (1): $R_1 = D\text{-Glu}$
genipine (2): $R_1 = H$

図 1 クチナシの実に含まれるイリドイド化合物、ゲニボシド (geniposide) およびゲニピン (genipin) の構造



genipocyanin G1 (3)

図 2 ゲニピンとグリシンから形成された青色素、ゲニボシアニン G1 (genipocyanin G1) の構造

クチナシ青色素は天然に存在しない色素であるが、天然の材料だけで製造されることから天然着色料に位置付けられ、既存添加物として認可されている。既存添加物とは、これまでの長い使用実績に基づいて厚生労働省が認可した天然添加物である。現在、新しい添加物の認可を受ける際には（指定添加物という）、動物を使った安全性試験に加えて、添加物の成分組成に関する詳細なデータと食品からの回収方法の提出が義務付けられている。これは米国や欧州でも同様である。しかし、既存添加物は使用実績に基づいて認可されたため、成分組成が不明のままの使用され続けているものも多い。多くの既存添加物の成分組成は、認可後の試験研究によって解析されてきているが、現在でも成分構造および分析方法が確立されていないまま使用されている既存添加物が複数ある。クチナシ青色素もその 1 つである。クチナシ青色素中に残留した原料のゲニピンの検出による定性分析法だけが報告されているだけで²⁾、色素成分の食品からの分析方法は確立していない。それゆえ、クチナシ青色素は米国や EU 諸国で認可されておらず、日本の輸出品にクチナシ青色素を添加することはできない。現在、日本で認可されている青色着色料は、合成着色料の「青色 1 号（ブリリアントブルー）」と「青色 2 号（インジゴカルミン）」、および既存添加物の「スピルリナ色素」の 3 つだけである。近年、消費者の合成着色料に対する忌避心理はますます高くなっており、加工食品には天然色素の使用がより好まれるようになった。「スピルリナ色素」は植物プランクトンの 1 種である藍藻類から分離される天然色素であるが、色素成分がたんばく質に結合した複合体であるため、pH の変化や熱で容易に退色するという欠点がある。一方クチナシ青色素は、原料が全て天然由来であることに加え、酸・アルカリおよび光と加熱に対して安定であることから、加工と消費の両面のニーズにあった理想的な着色料といえる。このような理由からクチナシ青色素は海外でも注

目を集めているが、上記のとおり、構造の解析と食品中の分析法が解決していないため、認可されておらず使用できないのが現状である。

そこで本研究では、クチナシ青色素の食品中の分析方法の確立を最終目標に、まず冷凍（ゼリー）を対象として、色素の回収法を検討したのでここに報告したい。

2. 実験

試料：クチナシ青色素製剤は、三栄源エフ・エフ・アイ（株）から分譲をうけたアートブルー GBF を用いた。

試薬：各種有機溶媒（メタノール、エタノール、*n*-ブタノール、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド（DMF）、ピリジン）、水酸化ナトリウム、塩酸、およびスクロースは和光純薬（株）の特級品を用いた。ゼラチンはゼライス株式会社の製品を使用した。使用した水は全て蒸留水を用いた。

器具および機器：分離精製に用いた固相カートリッジは、陰イオン交換カートリッジとして Accell Plus QMA cartridges（Waters 社 製、WAT020545）を、逆相系カートリッジとして Sep-Pak Vac 6cc (1g) C18 cartridges（Waters 社 製、WAT036905）を用いた。吸光度の分析には、Shimadzu UV spectrometer（UV-1800）を用いた。吸光度分析用のセルは石英製の光路長 10 mm のものを用いた。

クチナシ青色ゼリーの作成：ピーカー（500 mL）にゼラチン（約 7.5g）を精密に量り取り、蒸留水 100 g を加えて 10 分間静置してゼラチンを膨潤した。続いてスクロース（約 15g）を精密に量り取り、蒸留水 190 g を加えた。これにふやかしたゼラチン懸濁液を加えて攪拌した。次にクチナシ青色素製剤（約 0.25g）を精密に量りとり、ゼラチン懸濁液に添加して攪拌した。その後、懸濁液を 60℃ まで加熱し、全体が均質なるように溶解した。その後、溶液全量の重量を計量した。溶解した青色ゼラチン溶

液をステンレスバットに移し、冷蔵庫（3℃）にて冷やし固めた。

各種溶媒による青色素の抽出：クチナシ青色ゼリー（50 g）を量り取って小さく砕いたのち、メタノール、エタノール、*n*-ブタノール、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ピリジンをそれぞれ 30 mL 添加して、常温で 24 時間静置した。また、同様に 0.1M 塩酸および 0.5M 水酸化ナトリウム水溶液をそれぞれ添加した。

逆相系カートリッジによる青色素の精製：逆相系カートリッジは、メタノール 5 mL および蒸留水 5 mL によって樹脂の膨潤と安定化を行った。続いて DMF または 0.5M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解したクチナシ青色ゼリー試料液 10 mL を、それぞれ逆相系カートリッジに負荷して色素を保持させることを試みた。

陰イオン交換系カートリッジ（QMA カートリッジ）による青色素の精製：クチナシ青色ゼリー 50 g を精密に量り取り、0.5M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解させ、50 mL に定容して検液とした。QMA カートリッジを各種溶媒で膨潤させ、続いて平衡化させた。検液 10 mL をカートリッジに負荷し、青色素をカートリッジのトップに保持させることを試みた。色素が保持された場合、カートリッジを各種溶媒で洗浄し、各種溶出溶媒で色素を溶出させた。溶出液を 10 mL のメスフラスコにうけ、溶出溶媒で 10 mL に定容した。溶出液の 597 nm における吸収波長を測定した。カートリッジを膨潤させるために、メタノールと 0.1M 塩酸 / メタノール（1:1）混液、0.1M 水酸化ナトリウム水溶液 / メタノール（1:1）混液で検討を行った。カートリッジの平衡化は、蒸留水と 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液で検討を行った。カートリッジの洗浄は、洗浄なしと蒸留水、および 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液 / メタノール（1:1）で検討を行った。溶出溶媒は、0.1M 塩酸 / メタノール（1:1）混液と 6 M 塩酸 / メタノール（1:1）混液にて検討を行った。

回収率の算出：クチナシ青色素製剤約 50 g を

精密に量り取り、6 M 塩酸 / メタノール（1:1）混液 50mL に溶解した。本液を 1/5 および 1/10 に希釈し、各濃度の溶液の 597 nm における吸光度を測定した。測定値をもとに濃度（mg/mL）に対する吸光度の検量線を作成した。検液の測定結果を検量線にあてはめ、検液中の青色素の濃度を求め、濃度から試料中の青色素含量を求めて、添加量から回収率（%）を算出した。

3. 結果

クチナシ青色素の pH に対する安定性を確認するために、試料を 6M 塩酸および 0.5M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、青色を示す極大吸収 597 nm の吸光度の経時変化を観察した（図 3）。その結果、酸・アルカリともに、経時的に吸光度は低下し、酸は 24 時間後に 76% に、アルカリでは 62% となった（図 4）。しかし分析時間は 1 時間、もしくは 30 分以内で完結することが望ましい。1 時間後では、酸は 93%、アルカリでは 98% の吸光度が維持された。よって酸・アルカリ溶液による抽出作業・精製作

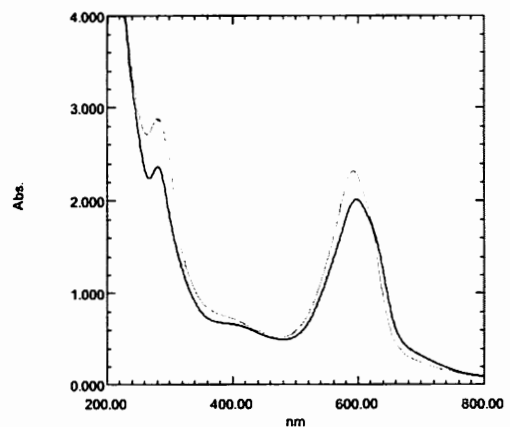


図 3 クチナシ青色素の紫外可視部吸収スペクトル。
実線：6M 塩酸溶液、点線：0.5M 水酸化ナトリウム水溶液

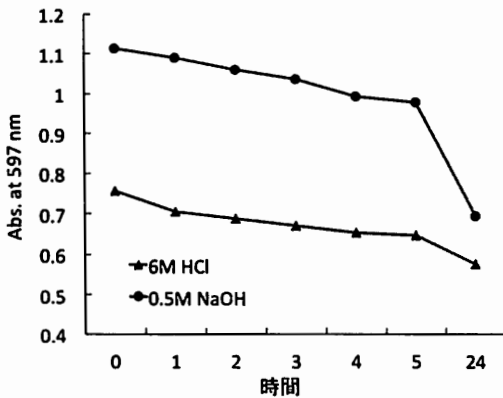


図 4 クチナシ青色素の酸水溶液およびアルカリ水溶液中での安定性

業を行っても、回収率に大きな影響は与えないと判断した。

クチナシ青色素を含む冷菓（ゼリー）は、食用ゼラチンとスクロースと水から調整した。青色素は、精密に秤量して水で希釈した後に、冷却前のゼラチン＝スクロース溶液に添加して、冷蔵庫で冷やし固めた。本試料から青色素の溶出を試みるために、各種有機溶媒（メタノール、エタノール、*n*-ブタノール、アセトニトリル、アセトン、ピリジン）が抽出溶媒として試された。溶媒中に試料を砕き入れて 4℃で静置したが、色素が溶出することはなかった。続いて極性有機溶媒であるジメチルホルムアミド (DMF) を抽出溶媒として試した結果、試料は全て溶解した。色素が溶けだすのではなく、ゼラチン試料が DMF に溶解する形となった。有機溶媒とは別に、酸水溶液 (0.1M 塩酸溶液) およびアルカリ性水溶液 (0.5M 水酸化ナトリウム水溶液) による溶出を試みた。酸性水溶液への溶出は観察されなかったが、0.5M 水酸化ナトリウム水溶液には DMF 同様に試料全体が溶解した。ゼラチンがたんぱく質であることを考えると、アルカリ性で溶解したことは当然の結果と言える。このように色素のみの抽出には

成功しなかったが、青色色素を含む溶液を得ることができたので、試料を溶解した DMF 溶液および 0.5M 水酸化ナトリウム水溶液を試料液として、固相カートリッジによる青色素の分離精製を試みた。

クチナシ青色素は高分子の重合体であり、重合度の違いによる様々な分子量の化合物から構成されている。クチナシ青色素製剤をギ酸含有の含水メタノールを移動相とした逆相 HPLC で分析した結果、色素は明確なピークを形成せず、広範な範囲に広がるブロードとして観測された。この結果はピーク面積を用いた HPLC 定量が不可能であることを示している。そこで、食品からクチナシ青色素全体を抽出し、妨害成分を除いて消澄な溶液とした後、青色素特有の吸収波長 (597 nm) における吸光度を用いて定量する方法の検討を行うことにした。上記の HPLC 分析の結果は、逆相系の固相カートリッジを使用した場合、色素は特異なバンドとして分離することが難しいことを示している。しかしながら、色素をカートリッジのトップに保持することができれば、洗浄によって極性の高い物質（スクロースや高極性たんぱく質）を除去し、色素だけを低極性溶媒で溶出して吸光度から回収率を出すことができる。そこで DMF に溶解した試料検液を Sep-Pak C18 固相カートリッジに負荷した。しかし、ほとんどの色素は保持されずに溶出した。これは DMF の溶出力によるものである。DMF 濃度を下げるために、検液に蒸留水を 1:1 で混和してからカートリッジに負荷したが、それでも青色素は保持されなかった。次に 0.5M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解した試料検液を逆相系の固相カートリッジに負荷した。オクタデシル基で修飾されたシリカベースの樹脂にアルカリ溶液を負荷することは、一般的には行われない。なぜなら、アルカリ性における加水分解によって、シリカ樹脂からオクタデシル基が剥離してしまうからである。しかしながら、少量溶液の負荷と迅速な蒸留水による洗浄を行えば、色素の保持は可能と

食品に含まれる「クチナシ青色素」の定量法の検討

考え、試料液をカートリッジに負荷した。しかしながら、一部の青色素は保持されたものの、大半の青色素は溶出した。これらの結果から逆相系の固相カートリッジによる色素の保持は難しいと判断した。続いて、アルカリ抽出の試料液を処理することを念等に、陰イオン交換樹脂を検討した。陰イオン交換の固相カートリッジとしてQMA カートリッジを選択した。QMA カートリッジは正イオンに帯電した4級アミノ基が担体に組み込まれており、陰イオンを保持しつつ、中性化合物または正イオンに帯電した化合物を除去することができる。アルカリ溶液に溶解しているということは、色素成分は陰イオンに帯電している可能性が高い。そこで0.5M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解した試料検液をQMA カートリッジに負荷した結果、全ての色素がカートリッジのトップに保持された。一方DMFに溶解した検液は、QMA カートリッジには保持されず大半が溶出した。これは色素が電気的に中性のままであったからと推測される。青色素が保持されたQMA カートリッジを水で洗浄後、0.1M 塩酸/メタノール(1:1) 溶液で溶出を行った。その結果、保持されていた青色素が溶出した。溶出した色素の597nmにおける吸光度を測定し、溶出溶媒を用いて作成した検量線を用いて色素の回収率を算出した。その結果、回収率は64.4%であった。検量線はクチナシ青色素製剤の0.1M 塩酸/メタノール(1:1) 溶液または6 M 塩酸/メタノール(1:1) 溶液における597nmの極大吸収の吸光度を測定して作成した。作成した検量線は $R^2=0.9999$ の高い直線性を示した(図5)。一般的に食品からの回収率は70%以上であることが望ましいとされている。そこで、カートリッジの安定化(溶媒和と平衡化)および洗浄液と溶出溶媒について検討を行った。カートリッジを膨潤させる溶媒和は、メタノールと0.1M 塩酸/メタノール(1:1) 混液、0.1M 水酸化ナトリウム水溶液/メタノール(1:1) 混液で検討を行った。また平衡化は水と0.1M 水

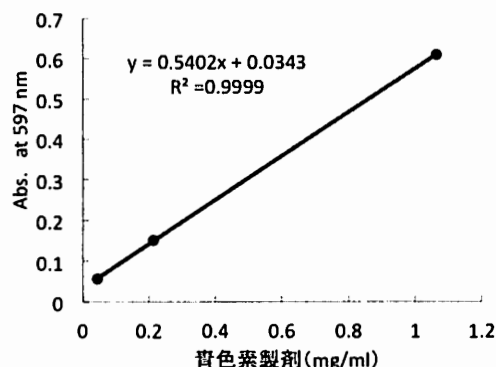


図5 クチナシ青色素製剤の絶対検量線(6M 塩酸/メタノール(1:1)水溶液)

酸化ナトリウム水溶液で検討を行った。洗浄は、洗浄なしと蒸留水、および0.1M 水酸化ナトリウム水溶液/メタノール(1:1)で検討を行った。溶出溶媒は、0.1M 塩酸/メタノール(1:1)混液と6 M 塩酸/メタノール(1:1)混液にて検討を行った(表1)。その結果、カートリッジ膨潤のための溶媒和をメタノール、そして平衡化を0.1M 水酸化ナトリウム水溶液で行い、洗浄を0.1M 水酸化ナトリウム水溶液/メタノール(1:1)混液で行い、溶出を6 M 塩酸/メタノール(1:1)混液で行った場合、回収率が77.0%となった(表1)。回収率が70%を超えたことにより、本方法はゼリーから青色素を回収する方法として妥当と考えられる。

表1: QMA カートリッジからのクチナシ青色素の溶出条件と回収率の関係

	溶媒条件				回収率 (%)	
	溶媒和	平衡化	洗浄	溶出		
1	メタノール	水	水	0.1M HCl/ メタノール (1:1)	64.4	
2	0.1M HCl/ メタノール (1:1)		なし			71.3
3	0.5M NaOH/ メタノール (1:1)					59.9
4	メタノール	0.5M NaOH 水溶液	0.5M NaOH/ メタノール (1:1)	6M HCl/ メタノール (1:1)	73.2	
5					77	

4. 考察

今回我々が考案した分析法は、70% 以上の回収率を示したため実用性が高いと考えられる。回収率が 100% 近くにならなかった理由として、色素の溶出が完全でないことが考えられた。実際、QMA カートリッジのトップに残留した青色色素が観察された。残留色素を溶出するために各種溶媒の検討を行ったが、溶出させることはできなかった。カートリッジを分解して観察した結果、色素は樹脂ではなく、カートリッジのプラスチック容器に付着残留していることが判明した。カートリッジの溶媒和や安定化プロセスにおいて改良の必要性があると考えられた。

今回はモデル食品として冷菓（ゼリー）をゼラチンとスクロースのみで製造したが、市販商品には乳化剤やクリーム等の脂質が加えられている。今後、市販商品を分析する際は、脂溶性成分を除去するために、脱脂工程を加える必要があると考える。またクチナシ青色色素は多くの場合、緑色を表現するために添加される。冷菓の場合、抹茶ゼリーや抹茶プリンなどにおいて、

抹茶の緑色の補強のために黄色色素と混ぜて使用される。今回考案したアルカリ溶液による抽出方法を抹茶製品に応用すると、抹茶からクロロフィル成分が溶出する可能性が高い。クロロフィル成分の極大吸収波長はクチナシ青色色素の極大吸収波長に近いので、検液に残存すると青色色素の定量に影響を及ぼすことが予想される。よって、抹茶プリンや抹茶ゼリーの分析を検討する際には、クロロフィル成分を除去する、またはクロロフィル成分を抽出しない方法を検討しなければならないと考える。今後は市販の抹茶プリン粉末に青色色素を添加し回収方法の検討を行う予定である。

参考文献

- 1) S. Fujikawa, Y. Fukui, K. Koga, T. Iwashita, H. Komura, K. Nomoto: *Tetrahedron Letters*, 28 (40), 4699 (1987)
- 2) 千葉美子、山口友美、平本都香、柳茂、齋藤善則、濱名徹：宮城県保健環境センター年報, 28, 50 (2010)