

クトルの測定が適当であるかどうかを検討するため、クチナシ青色素及び他の青色素として、スピルリナ色素、食用青色1号及び食用青色2号に加え EC 諸国等で食品への使用を許可されているが、日本では許可されていないパテントブルーVの主色素成分であるアシッドブルー1及びアシッドブルー3⁶⁾について吸収スペクトルを測定した。吸収スペクトルを Fig. 15 に示す。各青色素の吸収極大は、試料 BI は 595 nm、試料 BII は 596 nm、試料 BIII は 598 nm、スピルリナ色素は 616 nm、食用青色1号は 630 nm、食用青色2号は 612 nm、アシッドブルー1は 640 nm、アシッドブルー3は 639 nmであった。クチナシ青色素同士では吸収スペクトルのパターンは似ていた。スピルリナ色素もクチナシ青色素と吸収スペクトルのパターンは似ていたが、吸収極大には 15 nm 以上の違いがあった。以上のことから、吸収スペクトルの測定は、クチナシ青色素の確認に用いることができると考えられた。

5. TLC

クチナシ青色素と他の青色素を区別する方法として TLC が適切であるか、また適切な条件はどんな条件かを検討した。

1) TLC の条件の検討

これまでに食用色素の分析法として報告されている条件で、各色素についての TLC を行った。

(1) 衛生試験法・注解に示されている水溶性合成色素の分析条件⁷⁾ (薄層板：シリカゲル 60、展開溶媒：酢酸エチル-メタノール-28%アンモニア水 (3.3 : 1 : 1)) では、市販クチナシ青色素及びスピルリナ色素はいずれも原点に残った。食用青色1号は Rf 値 0.18 ~ 0.3 付近にスポットを認め、食用青色2号は Rf 値 0.18 から原点近くまでテーリングした。

(2) 衛生試験法・注解に示されている天然

色素の分析条件⁸⁾ (薄層板：アビセル SF、展開溶媒：アセトン-イソアミルアルコール-水 (6 : 5 : 5)) では、試料 BII、BIII は Rf 値 0.63 から原点近くまでテーリングし、試料 BI は Rf 値 0.63 から原点にかけてテーリングし原点にもわずかに残った。スピルリナ色素は完全に原点に残り、食用青色1号は Rf 値 0.63、食用青色2号は Rf 値 0.37 にスポットを認めた。

(3) クチナシ果実中の Brilliant Skyblue の分析条件⁹⁾ (薄層板：シリカゲル 60、展開溶媒：n-ブタノール-酢酸-水 (4 : 1 : 2)) では、試料 BIII は Rf 値 0.26 付近から原点近くまでテーリングし、試料 BI、BII は Rf 値 0.25 付近から原点近くまでテーリングし原点にも残った。スピルリナ色素は Rf 値 0.23 に小さなスポットを認めたが殆ど原点に残った。食用青色1号は Rf 値 0.26 ~ 0.44 付近に幾つかのスポットを認め、食用青色2号は Rf 値 0.25 から原点までテーリングした。

さらに、薄層板にポリアミドを用いて検討した。展開溶媒として n-ブタノール-酢酸-水 (4 : 1 : 1) あるいは酢酸エチル-メタノール-28%アンモニア水 (3.3 : 1 : 1) を用いた場合、原点に残ったり、テーリングし、クチナシ青色素と他の青色色素との識別には適当でなかった。

また薄層板に RP8 を使い、展開溶媒として水-メタノール (1 : 1) あるいは 0.01% HClO₄-メタノール (1 : 1) あるいは水-メタノール (1 : 1) + 0.1% HNO₃ を用いた場合も、原点に残ったり、テーリングし、クチナシ青色素と食用青色1号、食用青色2号との識別には適当でなかった。

そこで、上記条件の中で比較的良いと考えられた薄層板、溶媒の条件について試料 BIII を用いて、さらに溶媒組成を検討した。薄層板にアビセル SF、展開溶媒としてイソアミルアルコール-アセトン-水 (8 : 7 :

6) を用いたとき、Rf 値 0.21 付近にテーリングのないスポットが得られた。

また、溶媒条件を酸性とした場合（展開溶媒としてイソアミルアルコール-アセトン-10% 酢酸（8:7:6））、試料 BIII は Rf 値 0.55 付近にスポットを認め、試料 BII は Rf 値 0.53 付近から、試料 BI は Rf 値 0.52 付近から原点にかけテーリングし、スピルリナ色素は原点に残り、食用青色 1 号は Rf 値 0.48 ~ 0.56、食用青色 2 号は Rf 値 0.17 にスポットを認めた。次に、溶媒条件をアルカリ性とした場合（展開溶媒としてイソアミルアルコール-アセトン-5% アンモニア水（8:7:6））、酸性条件よりも増して試料 BI は原点に残った。また、イソアミルアルコールの代わりに *n*-ブタノールを用い、*n*-ブタノール-アセトン-水（8:7:6）で展開した場合にも、試料 BI は原点に残り、テーリングもした。

2) クチナシ青色素と他の青色素の TLC

クチナシ青色素及び他の色素について、薄層板としてアピセル SF、展開溶媒としてイソアミルアルコール-アセトン-水（8:7:6）を用いて TLC を行った。結果を Fig. 16 に示す。市販クチナシ青色素はすべて Rf 値 = 0.19 ~ 0.17、スピルリナ色素は原点に残り、食用青色 1 号は Rf 値 = 0.49、食用青色 2 号は Rf 値 = 0.22、アシッドブルー 1 は Rf 値 = 0.56、アシッドブルー 3 は Rf 値 = 0.59 を示した。以上より、市販クチナシ青色素と他の青色素の識別が TLC を用いて可能であると考えられた。

D. 考察

1. 分子量の推定

HPGFC においては、クチナシ青色素は製品によりクロマトグラムパターンは異なり、同じ品名でありながら、色素成分の分子量分布は異なるものと考えられた。また、強電解質を加えた移動相を用いた場合には、ピーク

の保持時間が Tris-HCl 緩衝液のみを移動相として用いた場合に比べて長くなった。いずれの場合も、ピークはブロードであり、様々な分子量の色素成分が含まれているものと考えられた。ピーク頂点の保持時間を元に算出した分子量は、Tris-HCl 緩衝液のみを移動相とした場合には、クチナシ青色素 3 製品全体で $2.3 \times 10^4 \sim 9.9 \times 10^4$ となった。一方、強電解質を含む移動相では、 1.0×10^4 以下と、小さくなった。

近年、HPGFC の検出器として、多角度光散乱検出器が用いられるようになってきている。多角度光散乱検出器の場合、較正曲線を必要とせずに分子量の測定が可能であることから、HPGFC の検出器として注目されるが、色素は光散乱に影響を及ぼすため、クチナシ青色素の分析には、使用することはできなかった。

SDS ゲル電気泳動法は、通常、タンパク質の分離に用いられる。通常、タンパク質分子内の S-S 結合を 2-メルカプトエタノールなどの還元剤によって切断して泳動を行う。クチナシ青色素は、genipin (Fig. 2) 等とタンパク質分解物（アミノ酸）との反応生成物であるため、S-S 結合は存在しないと考えられた。実際、色素について、電気泳動を行った結果、2-メルカプトエタノールによる還元の影響は受けなかった。

一般に、SDS-ポリペプチド複合体は、SDS とポリペプチドの疎水部分との結合により、過剰の負の電荷を持っている。SDS-ポリペプチド複合体がポリアクリルアミドゲル内で電気泳動されるとき、これらの複合体は、ゲルの分子篩作用を受けて、単に、それらの分子量の差だけに依存して分離される。クチナシ青色素は、緩衝液フロントを越えて泳動したことから、これらの色素と SDS との複合体の一部は、さらに大過剰の負の電荷を持つものと考えられた。SDS ゲル電気泳動法により、分子量を予想したところ、クチ

ナシ青色素は $<0.35 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^4$ となった。

なお、残留アミノ酸の分析の際に、クチナシ青色素の水溶液について限外ろ過膜を用いて分子量 3,000 以下の画分を集めたが、いずれの試料についても分子量 3,000 以下の画分はほとんど着色していなかった。したがって、クチナシ青色素の色素成分は、水溶液の状態ではいずれも分子量 3,000 以上と予想された。

HPGFC、SDS ゲル電気泳動法及び限外ろ過の結果から、クチナシ青色素は水溶液中で分子同士が会合しており、強電解質や SDS の影響で解離するものと予想された。

2. メタノール

クチナシ青色素から、製造過程からは生成しないはずのメタノールが検出された。その量は、試料 BII 及び BIII では、FDA における残留溶剤としてのメタノールの許容限度値 (0.005%) を越えていた。クチナシ青色素については、その分子内にエステル結合を保持しているため、製造過程でエステルが切れ、メタノール生成する可能性が考えられる。最終的にデキストリンを加えて乾燥し、粉末化されるが、デキストリン存在下では、乾燥しても色素内に残る可能性が考えられる。各試料でメタノール含量が異なるのは、製造工程における精製、殺菌、粉末化の方法が異なるためであると考えられた。

有機溶媒抽出により製造される天然着色料については、メタノールの許容限度が定められているものがある。それらの許容限度は 0.005% であるが、アナトー色素についての許容限度は、自然に生成するメタノールを越えて 0.005% (*methyl alcohol*: not more than 0.005% in excess of that produced naturally) という規定であり¹⁰⁾、クチナシ青色素中のメタノールについても、残留溶剤として規定する際には、限度値について注意が必要と考えられた。

3. アミノ酸

原料のタンパク質分解物の組成を知るために、アミノ酸の分析を行った。その結果、試料 BII のみに、顕著な Ala、Pro のピークが認められ、BI 及び BIII では、アミノ酸由来と思われるピークは多く観察されたが、顕著なピークは観察されなかった。また、試料 BII の原料のタンパク質分解物の成分組成によれば、15 種類のアミノ酸を含み、そのうち Glu が最も多く、次いで Pro、Ala、Asp の順で含まれており、用いたアミノ酸が残存している可能性が考えられるが、一方、製造工程で除かれることも考えられるため、アミノ酸の含量から使用したタンパク質分解物の組成を推定することは困難であると考えられた。

なお、Asn、Gln 及び Trp については、PTC 誘導体化の際に、Asn 及び Gln は Asp 及び Glu に変化し、Trp は分解することが知られているため、分析を行わなかった。また、Cys、Ile についても分析を行わなかったが、文献中の保持時間と比較し、これらはあまり含まれていないものと考えられた。

4. クチナシ青色素の確認試験

クチナシ青色素及び食品添加物として使用の認められている食用青色 1 号、食用青色 2 号、及び不許可添加物であり、違反事例の多いパテントブルーの主色素成分であるアシッドブルー 1、アシッドブルー 3 について、溶媒として水を用いて吸収スペクトルを測定した結果、吸収スペクトルはクチナシ青色素の確認に用いることができると考えられた。しかし、クチナシ青色素とスピルリナ色素では、吸収スペクトルパターンが似ていることから、混合物の場合には、確認できない可能性があった。

クチナシ青色素の確認に用いることのできる TLC 条件を検討したところ、クチナシ青色素同士は同じ挙動を示し、他の青色素とは

識別可能である条件を見出したが、一方、多くの条件では、クチナシ青色素同士が異なる挙動を示した。このことから、クチナシ青色素は、製品により成分が異なると考えられた。さらに、新たなクチナシ青色素が開発された場合、今回検討した 3 製品とは性質が異なる可能性も考えられ、今回の TLC 条件で、同様の挙動を示すかどうかは不明である。

E. まとめ

1. クチナシ青色素は高分子であることが予想されたため、HPGFC 及び SDS ゲル電気泳動法を用いて、分子量の推定を行ったところ、分析条件により値は大きく異なった。
2. クチナシ赤色素では原料 geniposide のエステル加水分解の際にメタノールが生成すると考えられるが、クチナシ青色素について分析を行ったところ、0.0046 ~ 0.0093%の濃度で検出された。
3. クチナシ青色素製造の原料であるタンパク質分解物の組成を知るため、アミノ酸の分析を行ったが、ほとんどの製品で低濃度であった。製造工程で除かれたことも考えられるため、アミノ酸の含量から使用したタンパク質分解物の組成を推定することは困難であると考えられた。
4. クチナシ青色素の確認試験法として、吸収スペクトル及び薄層クロマトグラフィーが応用できるかを検討したところ、両者とも確認試験法として有用と考えられた。

F. 参考文献

- 1) 月刊フードケミカル 1998-7、p.32 (1998).
- 2) 遠山良介、井上博之、瀬崎仁、天然着色料クチナシ青色素の分子量及び消化管内における安定性と吸収、衛生化学、40、259-265 (1994).
- 3) 第 7 版食品添加物公定書の概要について、

日添協会報、187(5)、1-3 (1998).

- 4) 梶尾武一編集、蛋白質・酵素の基礎実験法 (改訂第 2 版)、南江堂、p.344 (1994).
- 5) 上松洋子、広門雅子、平田恵子、中島和雄、風間成孔、標準添加ヘッドスペースーガスクロマトグラフィーによる天然着色料製剤中の残留溶剤の分析、食衛誌、34、232-238 (1993).
- 6) 谷村顕雄、藤井正美、義平邦利、伊藤誉志男、城照監修、食品中の食品添加物分析法解説書、講談社サイエンティフィック、p.903 (1993).
- 7) 日本薬学会編、衛生試験法・注解、金原出版 (東京)、p.366 (1980).
- 8) 日本薬学会編、衛生試験法・注解、金原出版 (東京)、p.381 (1980).
- 9) S. Fujikawa, Y. Fukui, K. Koga, J. Kumada, Brilliant Skyblue Pigment Formation from Gardenia Fruits, J. Ferment. Technol., 65, 419-424 (1987).
- 10) Committee of Food Chemicals Codex, Food Chemicals Codex 4th Ed., National Academy Press, p.31 (1996).

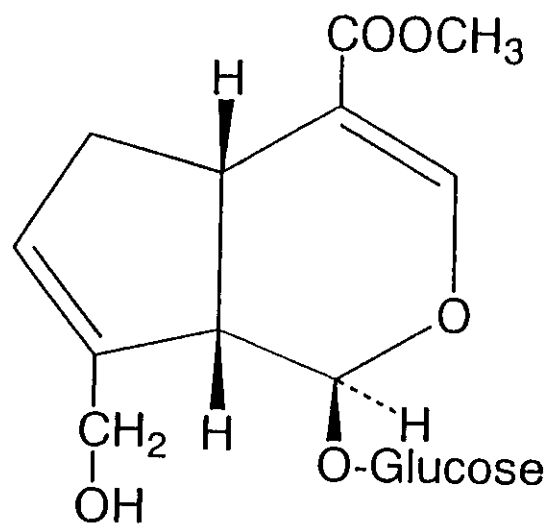


Fig.1. Structure of geniposide

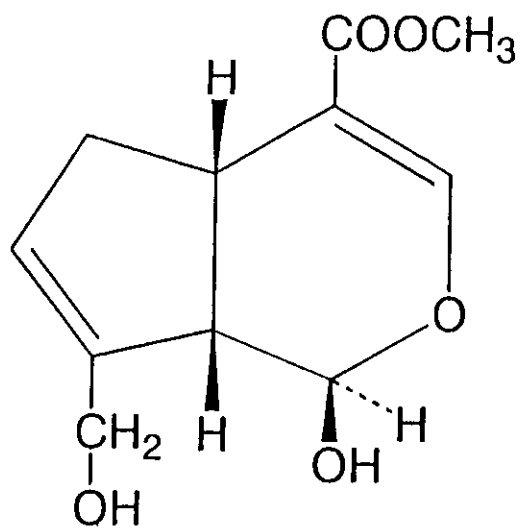


Fig.2. Structure of genipin

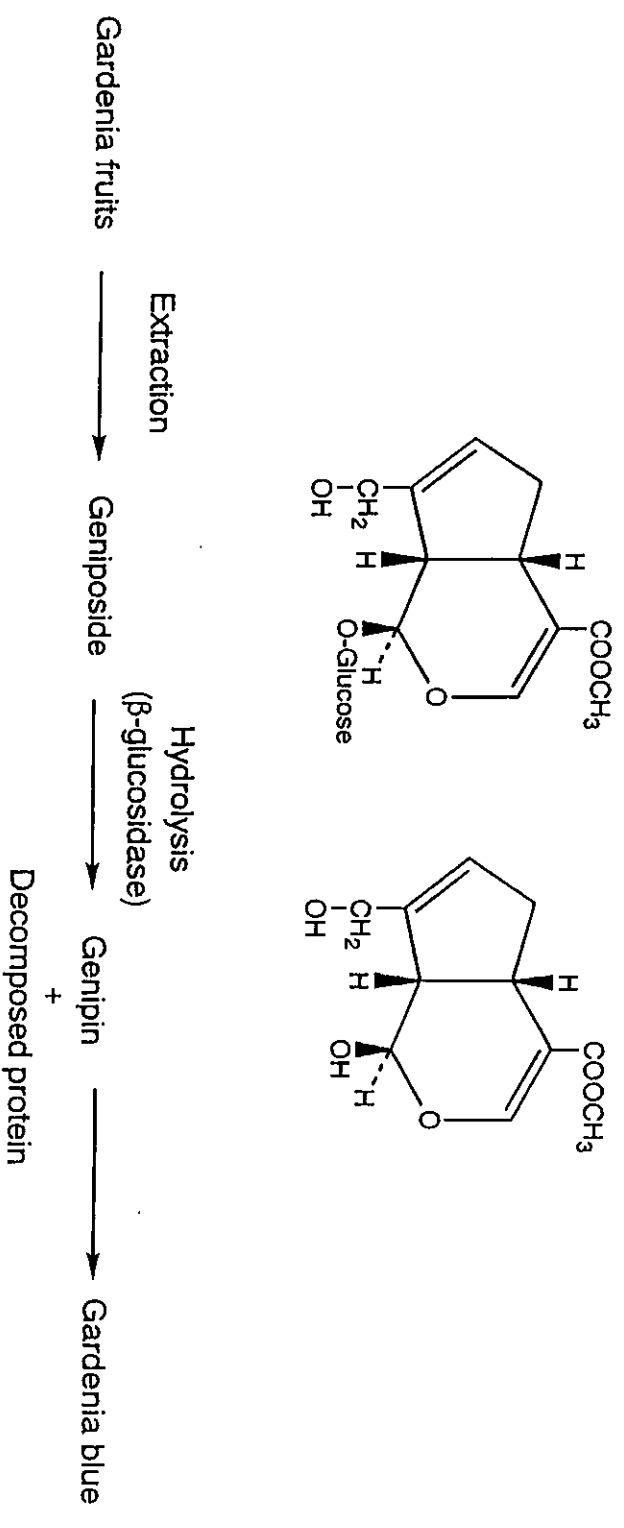


Fig.3.Mechanism of gardenia blue formation from
 gardenia fruits

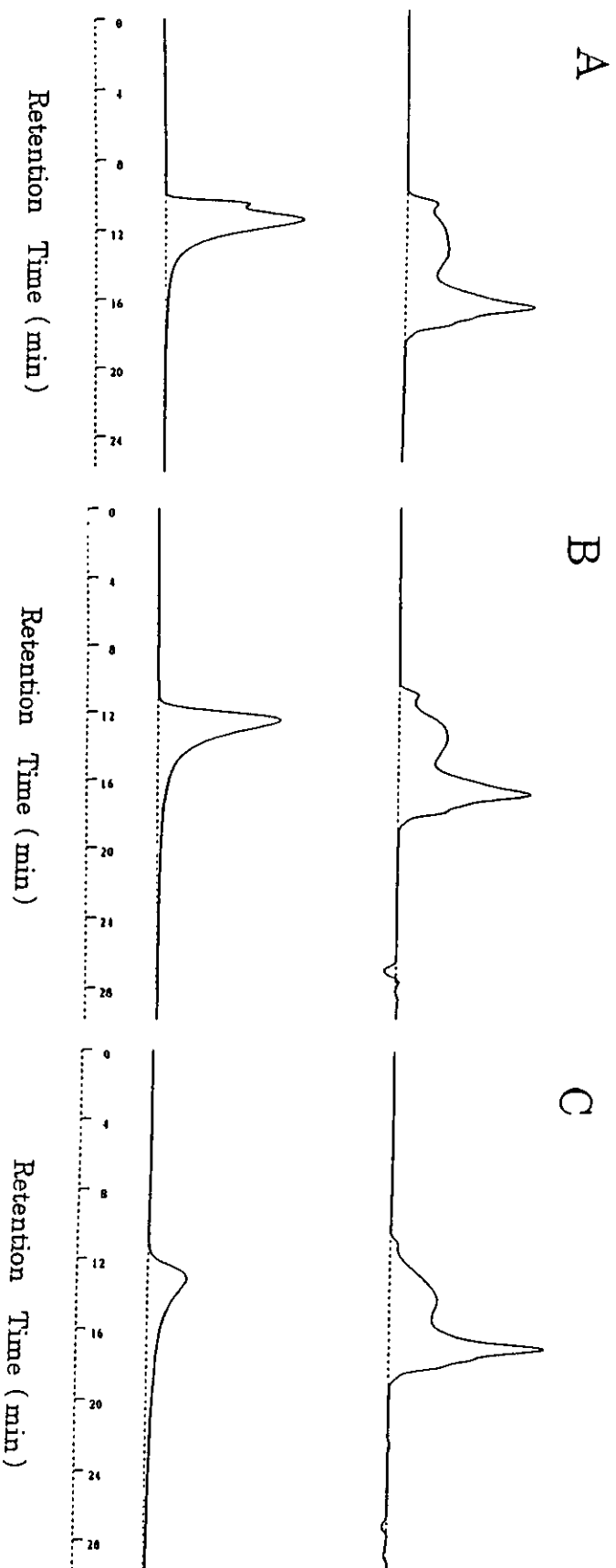


Fig. 4. HPGFC chromatograms of gardenia blue
 A: sample BI; B: sample BII; C: sample BIII.
 HPGFC conditions are as follows. Column: OH pak
 SB-803HQ; mobile phase: 10 mmol/L Tris-HCl
 (pH7.4); detection: refractive index (upper) and
 598 nm (lower).

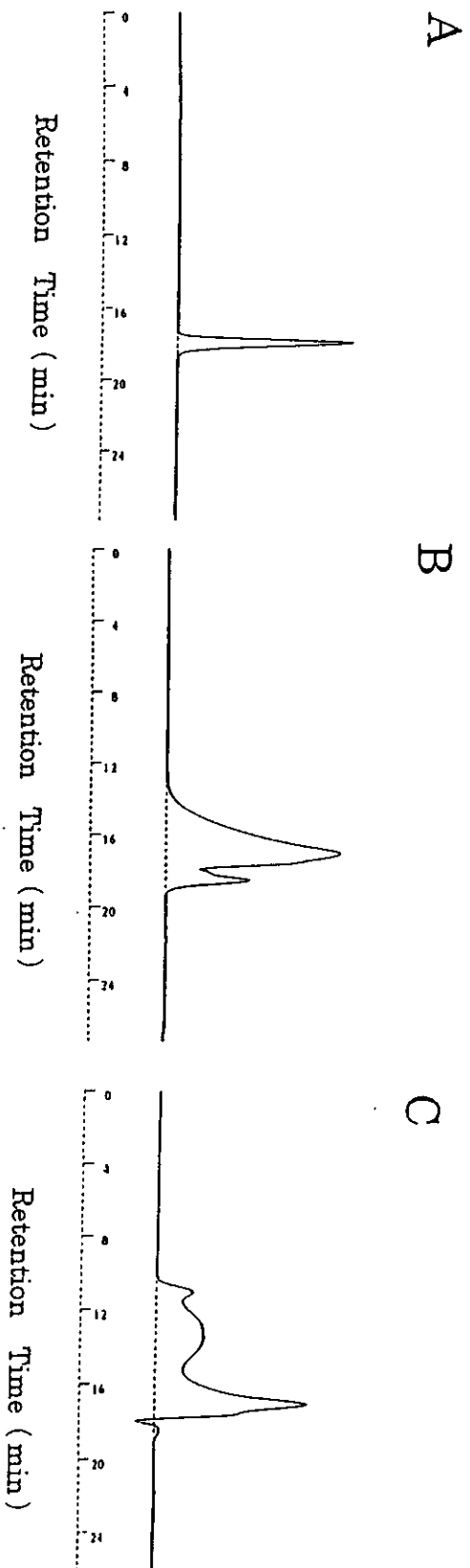


Fig. 5. HPGFC chromatograms of lactose and dextrin

A: lactose; B: dextrin A; C: dextrin B.

HPGFC conditions are as follows. Column: OH pak SB-803HQ; mobile phase: 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.4).

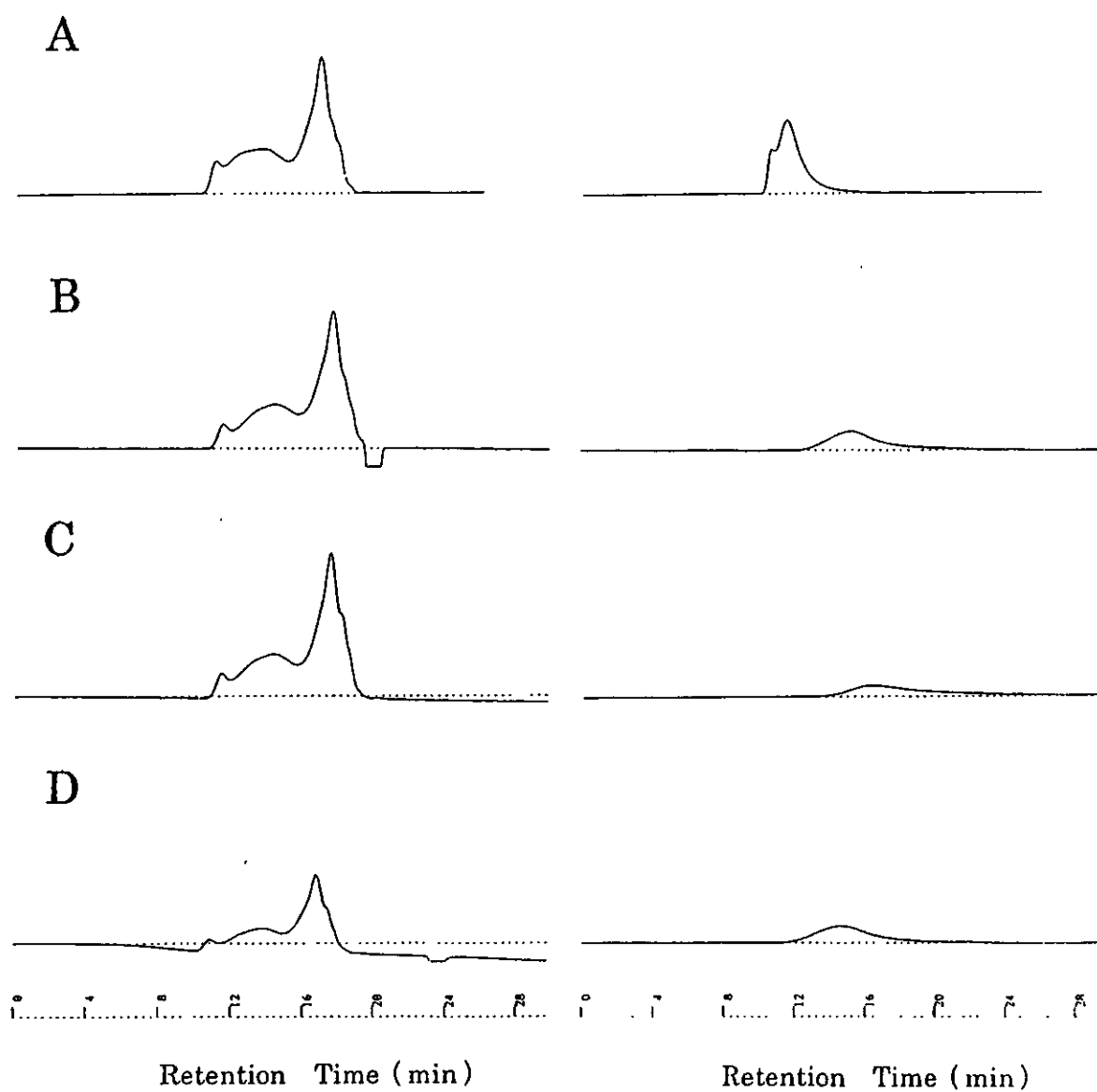


Fig. 6. HPGFC chromatograms of gardenia blue (sample BI) under different mobile phase conditions
 HPGFC conditions are as follows. Column: OH pak SB-803HQ; mobile phase: A, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4); B, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) - 0.2 mol/L LiCl; C, 0.1 mol/L Na₂SO₄; D, 0.1 mol/L Na₂SO₄ - CH₃CN (9 : 1); detection: refractive index (left) and 598 nm (right).

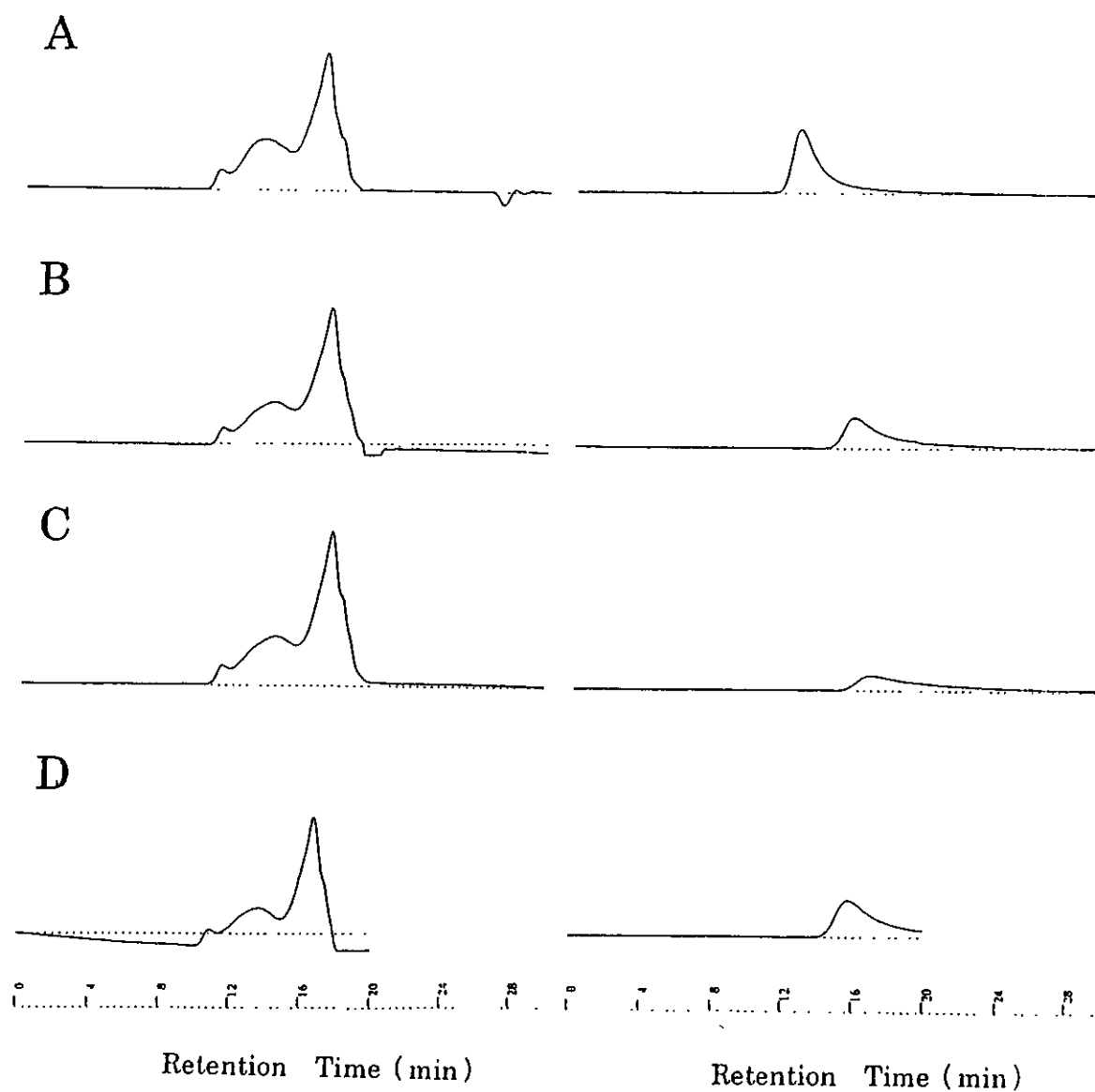


Fig. 7. HPGFC chromatograms of gardenia blue(sample BII) under different mobile phase conditions
 HPGFC conditions are same as described in Fig. 6.

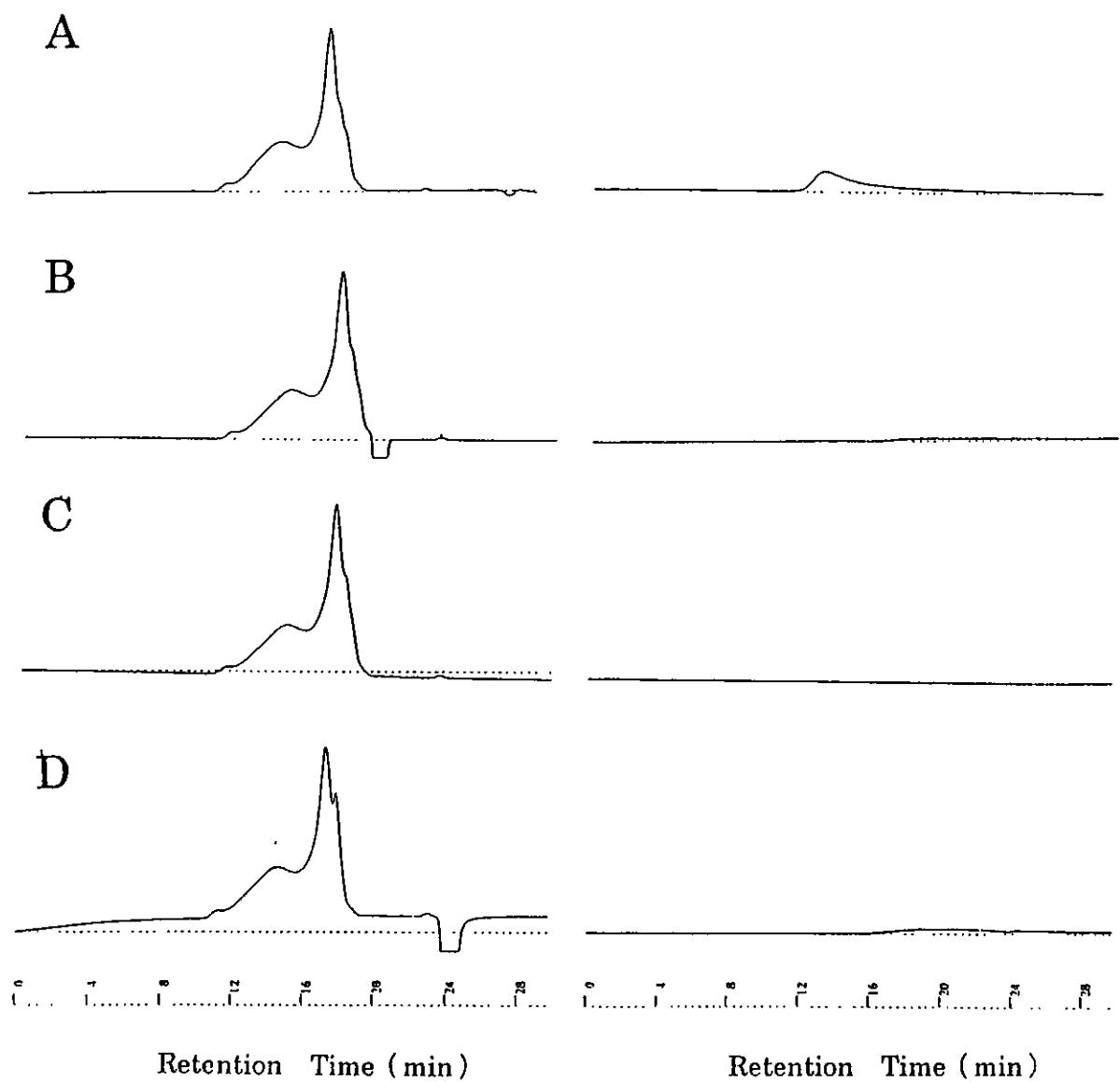


Fig. 8. HPGFC chromatograms of gardenia blue(sample BIII) under different mobile phase conditions HPGFC conditions are same as described in Fig. 6.

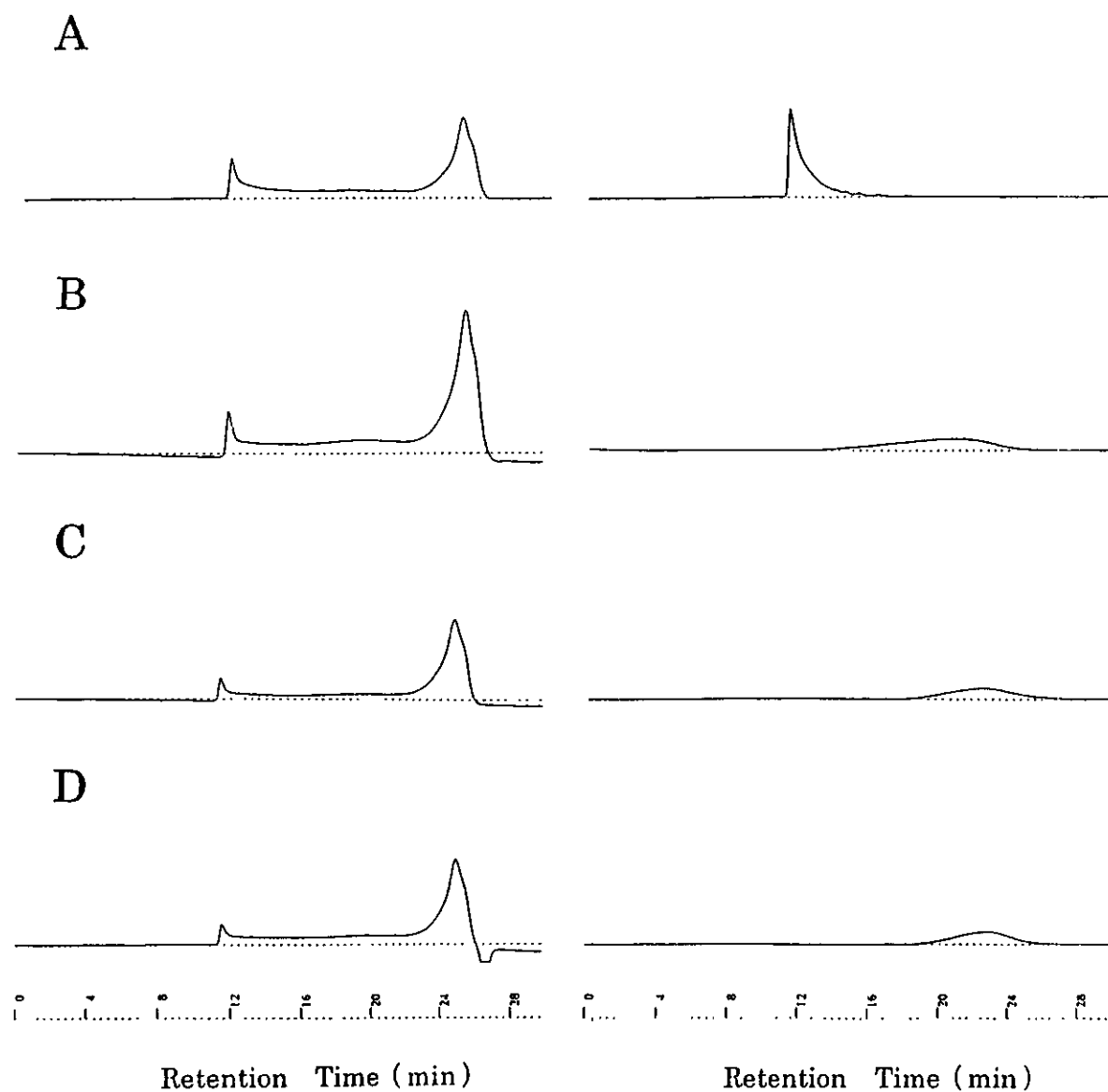


Fig. 9. HPGFC chromatograms of gardenia blue(sample BI) under different mobile phase conditions
 HPGFC conditions are as follows. Column: TSK-GEL G3000SW; Other conditions are same as described in Fig. 6.

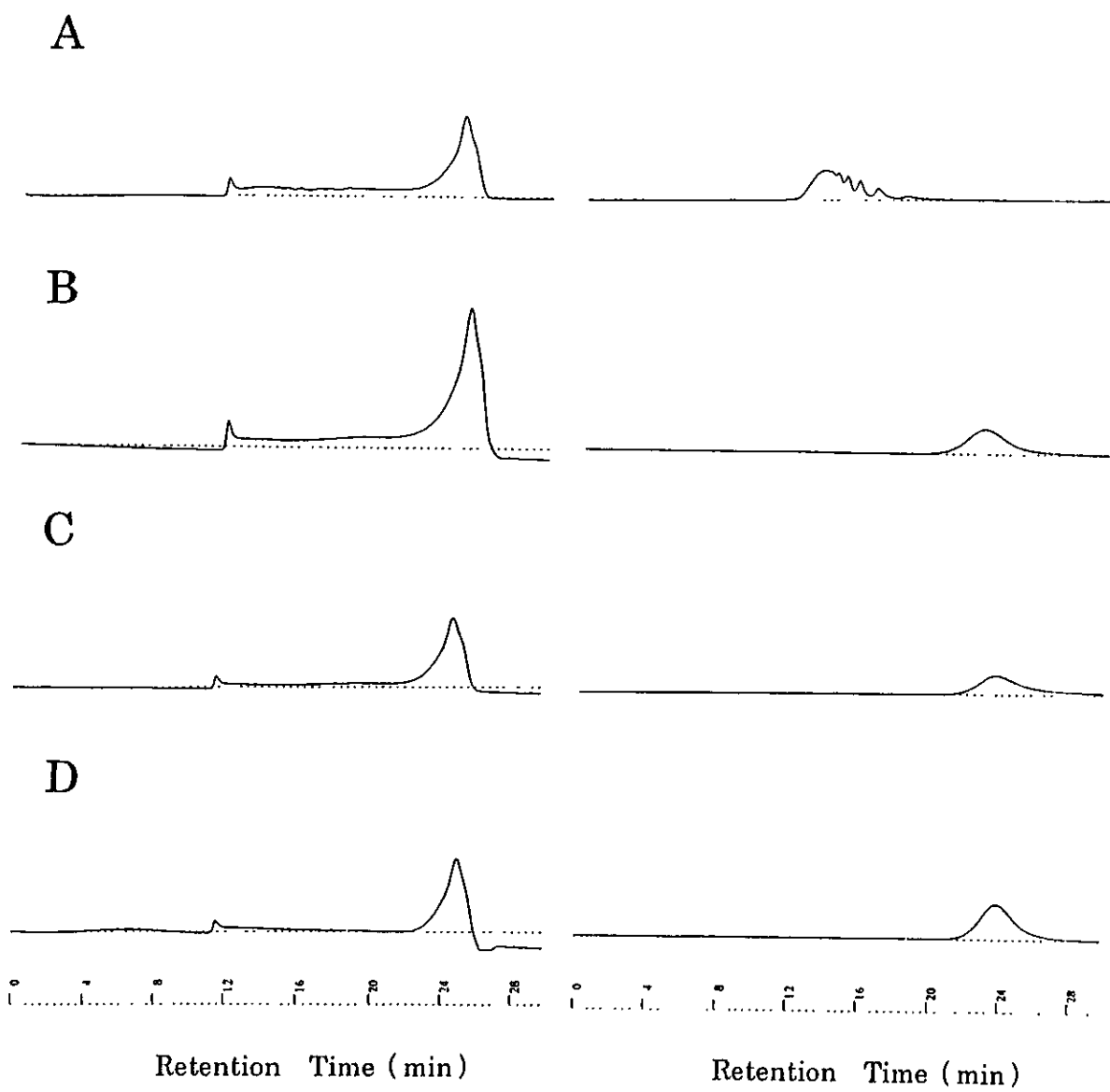


Fig. 10. HPGFC chromatograms of gardenia blue (sample BII) under different mobile phase conditions. HPGFC conditions are the same as described in Fig. 9.

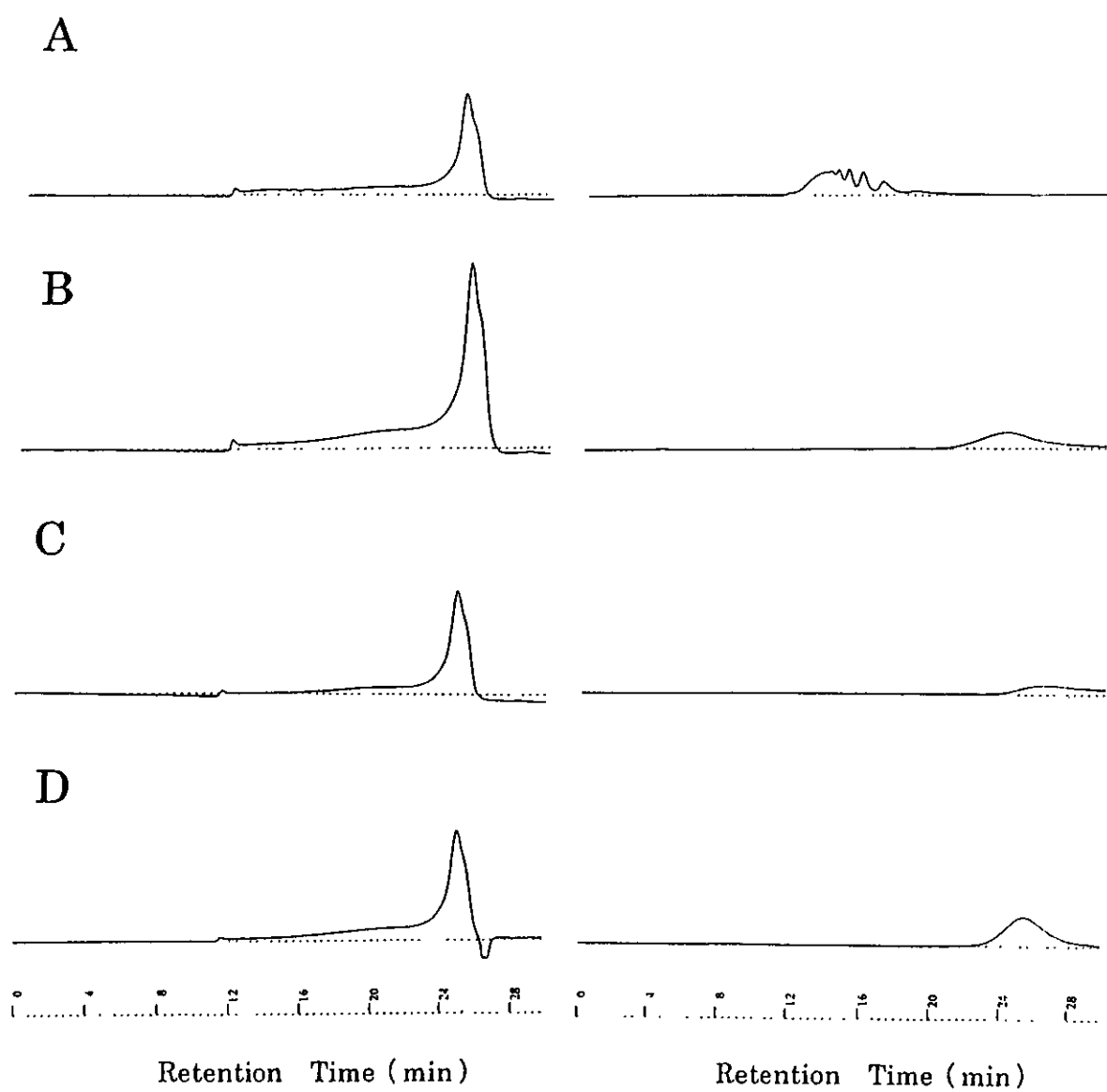


Fig. 11. HPGFC chromatograms of gardenia blue (sample BIII) under different mobile phase conditions. HPGFC conditions are the same as described in Fig. 9.

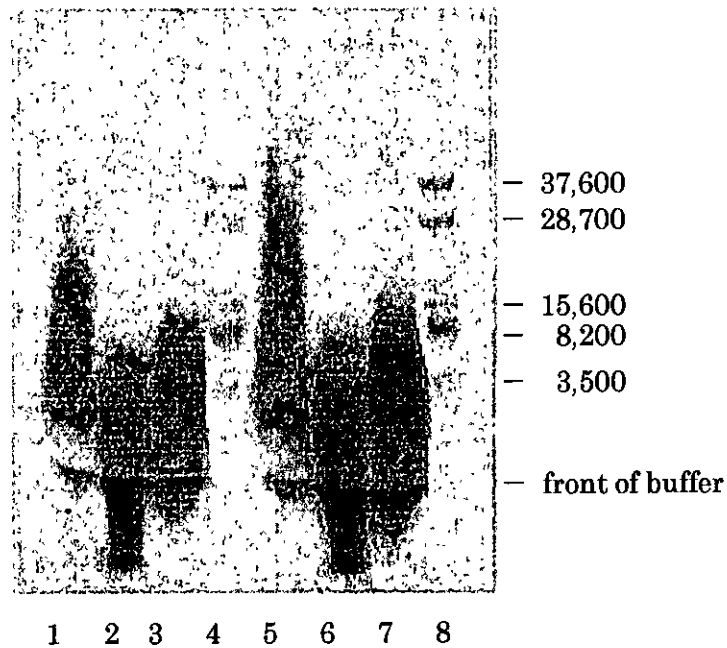


Fig. 12. SDS-PAGE analysis of gardenia blue

The reduced samples (lane 1: BI, lane 2: BII, lane 3: BIII , lane 4: MW markers) and samples (lane 5: BI, lane 6: BII, lane 7: BIII, lane 8: MW markers) were analyzed by an SDS-PAGE using a 10 to 20% gradient gel. Carbonic anhydrase (37.6 kDa), soybean trypsin inhibitor (28.7 kDa), lysozyme (15.6 kDa), aprotinin (8.2 kDa), and insulin (3.5 kDa) were used as standard marker proteins.

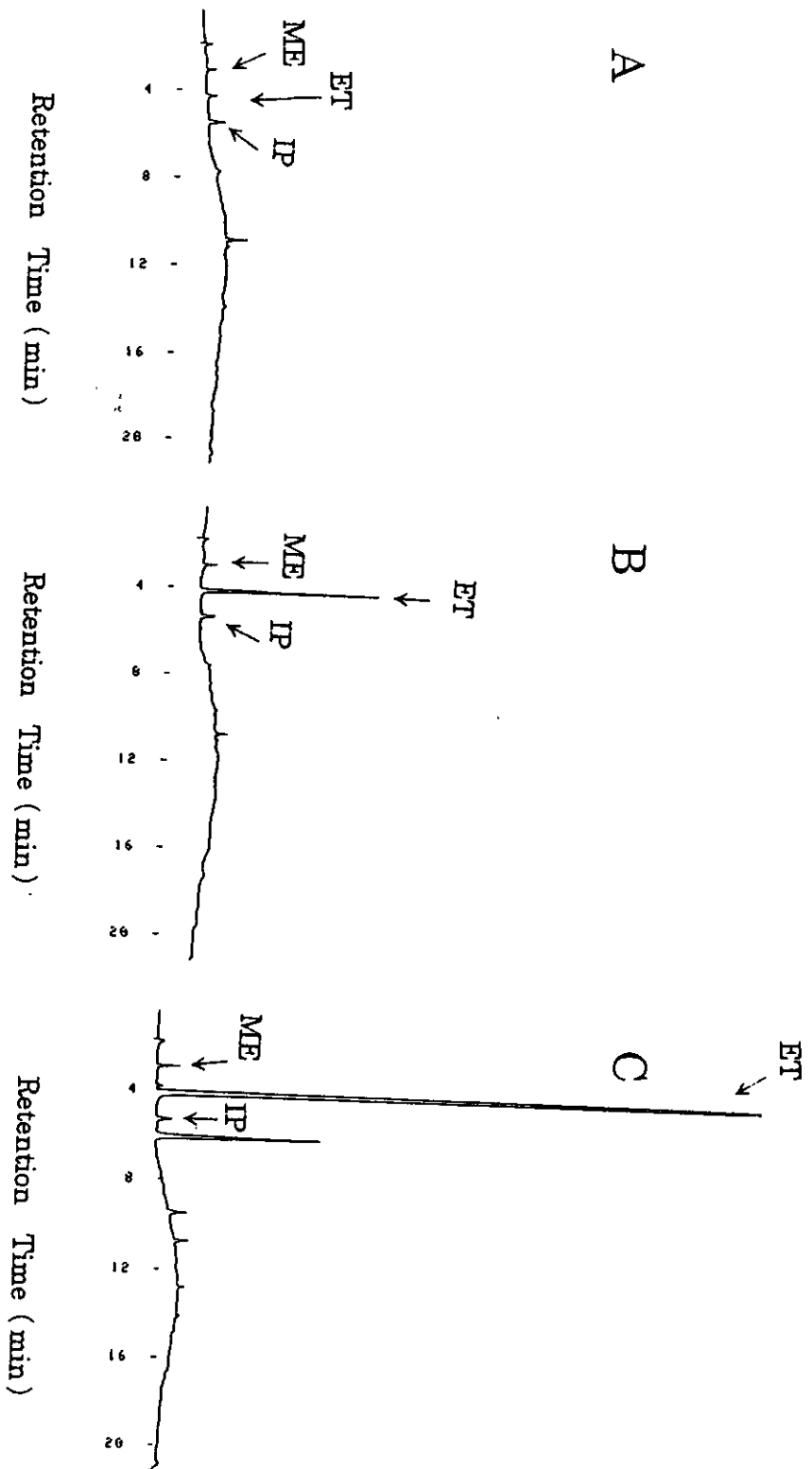


Fig. 13. Gas chromatograms of headspace vapor of gardenia blue preparations

A: sample BI; B: sample BII; C: sample BIII.
 ME metanol; ET: ethanol; IP: isopropanol.

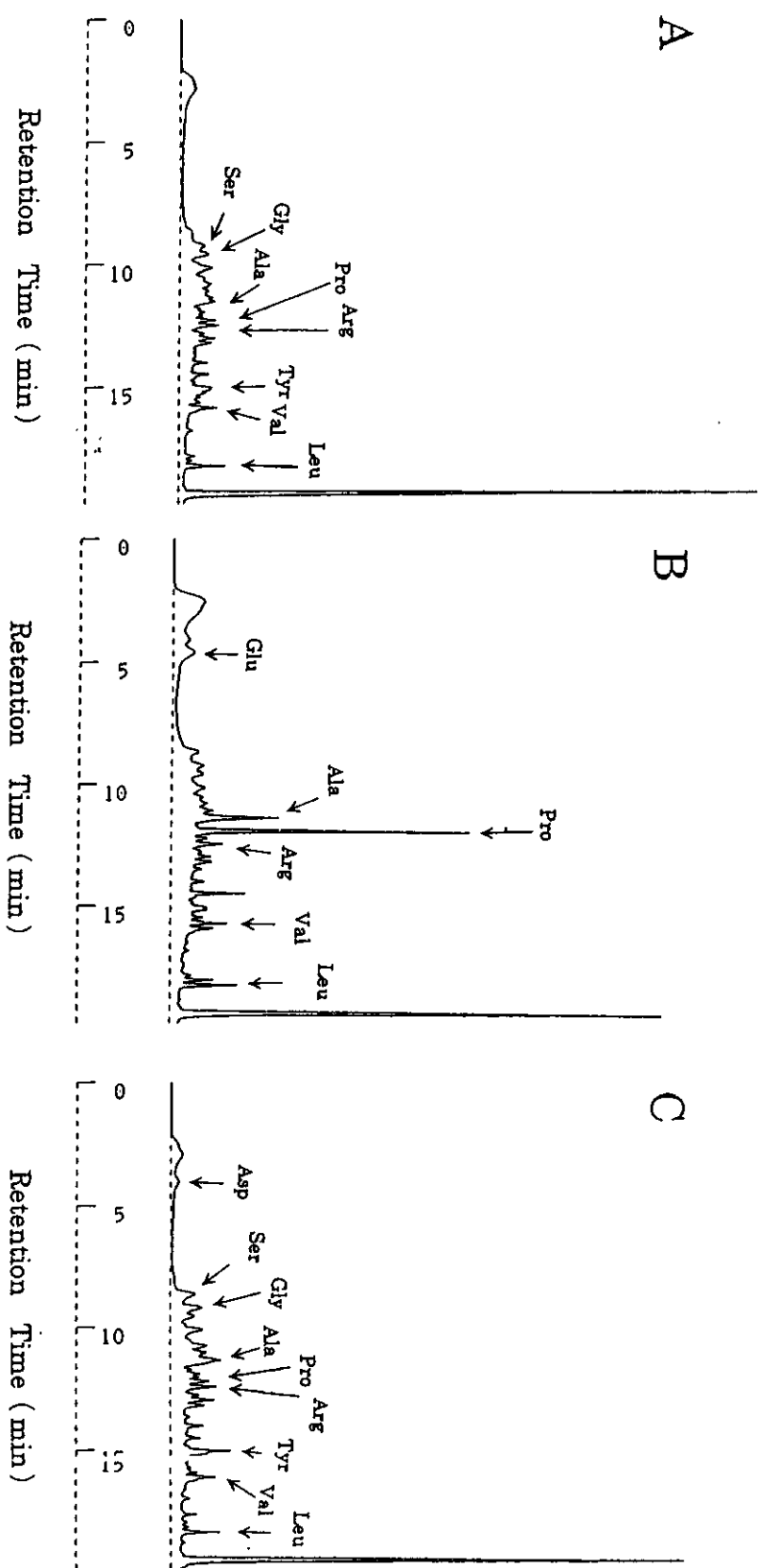


Fig. 14. Amino acid analysis of gardenia blue by HPLC
 A: sample BI; B: sample BII; C: sample BIII.

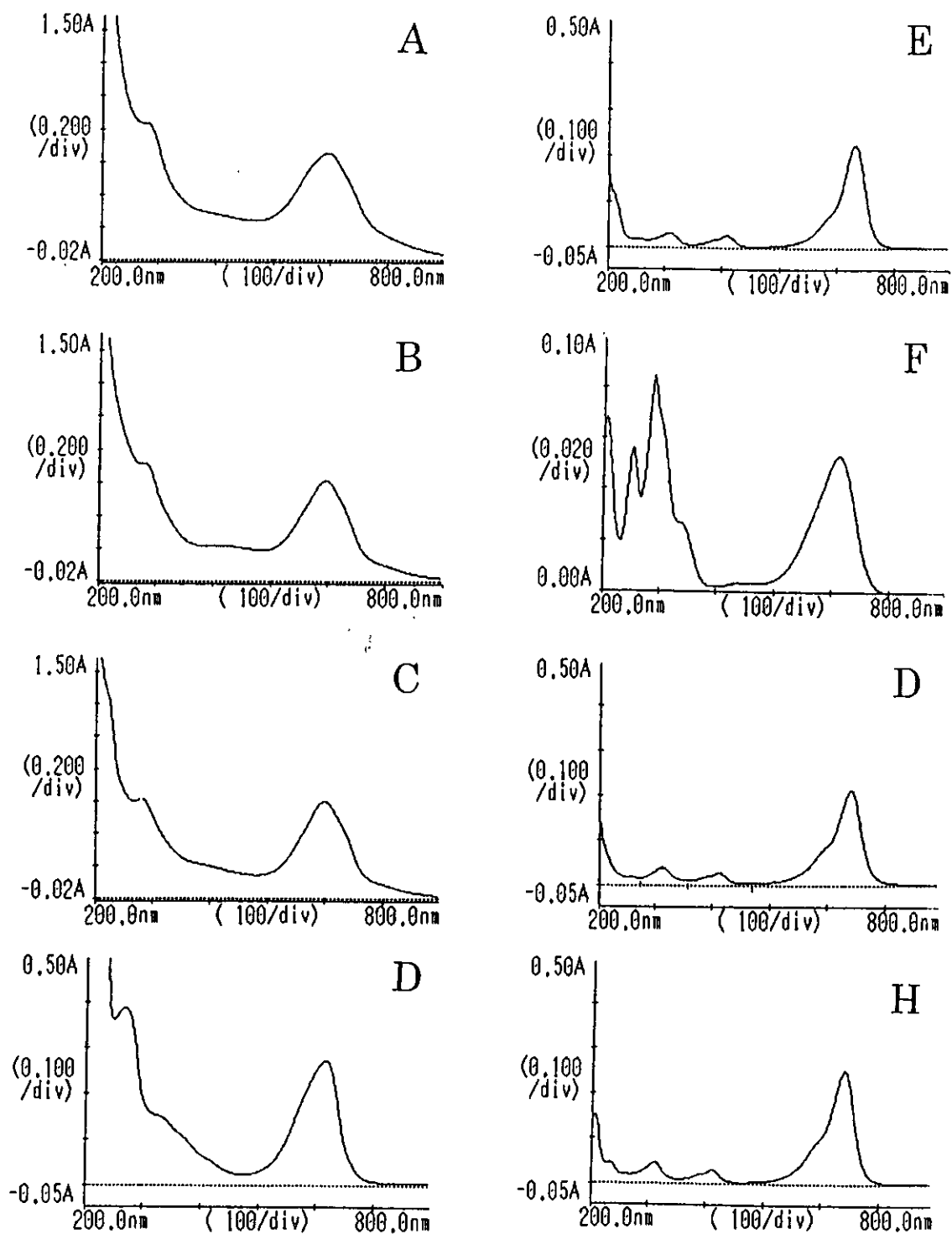


Fig. 15. Absorbance spectra of gardenia blue and other blue pigments

A: sample BI; B: sample BII; C: sample BIII; D: spirulina colour; E: food blue No.1; F: food blue No.2; G: acid blue 1; H: acid blue 3.

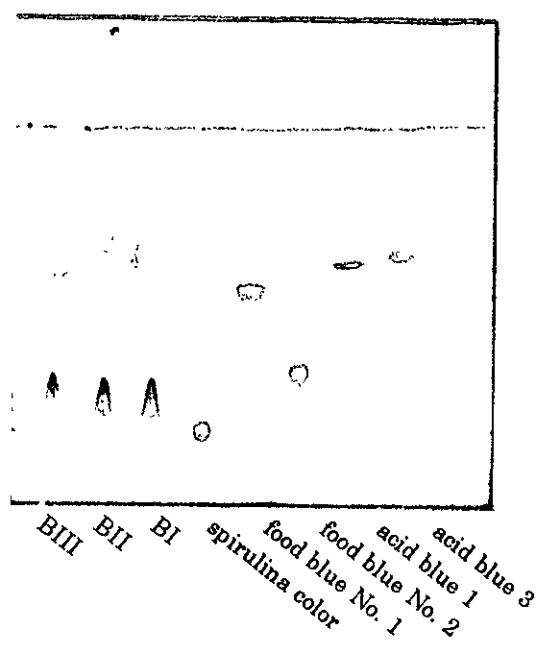


Fig. 16. Thin layer chromatographic analysis of gardenia blue
 plate: AVICEL SF.
 solvent: isoamyl alcohol - acetone - water (8:7:6).