

出の工程があるものについて、抽出に使用できる有機溶剤の種類及び製品への残留の許容限度を定めている。FDAではアナトー、パブリカ色素などの天然着色料について、メタノール、アセトン、イソプロパノール、ヘキサン、ジクロロメタン、トリクロロエチレン等の許容限度を定めている<sup>2)</sup>。また、FAO/WHOではカロテン、コチニール抽出物等の天然着色料について、残留溶媒としてアセトン、ヘキサン、メタノール、エタノール、イソプロパノール等の許容限度が定められている<sup>3)</sup>。そこで、今回の分析条件における、これらの有機溶剤の保持時間を求め、試料 RI 及び RII の各ピークの保持時間との比較を行った。その結果、試料 RI、RII にはメタノール及びエタノールの保持時間 (3.0 分及び 4.2 分) にピークが観察された。そこで、メタノール及びエタノール標準溶液を加えた試料溶液について GC を行い、メタノール及びエタノールのピークであることを確認した。なお、両試料ともアセトンの保持時間 (5.1 分) に小さなピークが観察されたが、確認は困難であった。そこで、メタノール及びエタノールの定量を行った。なお、エタノールについてもメタノールと同様にイソプロパノールを内部標準物質として検量線を作成し、0 から 500  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で直線性が得られた ( $r^2=0.999$ )。定量結果を Table 1 に示す。試料 RI のメタノール及びエタノール含量はそれぞれ  $28 \pm 6 \mu\text{g/g}$  及び  $31 \pm 5 \mu\text{g/g}$  であった。一方、

試料 RII のメタノール及びエタノール含量は  $13 \pm 3 \mu\text{g/g}$  及び  $177 \pm 9 \mu\text{g/g}$  であった。

### 3. アミノ酸分析

クチナシ赤色素試料 RI、RII についてそれぞれ限外ろ過器具を用いて限外ろ過を行い、得られた分子量 3,000 以下の画分をアミノ酸分析に供した。ラベル化試薬としてイソチアン酸フェニル (PITC) を用い、フェニルチオカルバミルアミノ酸 (PTC アミノ酸) に誘導体化した後、HPLC により分析を行った。結果を Fig. 2 に示す。

試料 RI には保持時間 12.5 分に比較的大きなピークがみられ、アルギニン (Arg) が存在していると予想された。また、試料 RII には、4.58 分に大きなピークがみられ、L-グルタミン酸 (Glu) が存在していると予想された。そこで、各々の試料に Arg あるいは Glu の誘導体を試料溶液に添加し、HPLC を行い、ピーク同定を行った。

また、両試料において 19.30 分近くに大きなピークが観察された。そこで、フェニルアラニン (Phe、保持時間 19.54 分) の誘導体を添加して HPLC を行ったところ、Phe のピークとは一致せず、フォトダイオードアレイ検出器における吸収スペクトルも一致しなかった。このように存在している主なアミノ酸は、試料 RI では Arg、試料 RII では Glu であった。各試料に存在していると確認あるいは予想されたアミノ酸及び残留量を Table 2 に示す。色素中

に存在していると確認あるいは予想されたアミノ酸の割合は、試料 RI が 0.10 %、試料 RII が 0.23 %であった。

#### 4. 分子量の推定

クチナシ赤色素は、クチナシ青色素と同様の方法で製造され、高分子構造を持つと推定されることから、高速ゲルろ過クロマトグラフィー (HPGFC) による色素の分子量の推定を試みた。

カラムとしてポリマー系カラム (ポリヒドロキシメタクリレートを担体とする Shodex SB-803HQ) を、移動相としてペプチドの HPGFC に用いられる Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) を用いて、HPGFC を行った。試料 RI では、示差屈折計検出器で得られたクロマトグラムではピークが見られたが、紫外可視検出器で得られたクロマトグラムではピークが見られなかったため、試料 RII のクロマトグラムのみを Fig. 3 に示す。試料 RII の色素成分の分子量は、10 万前後と予想された。また、紫外可視検出器と示差屈折計検出器で得られたクロマトグラムは異なり、示差屈折計検出器で得られたクロマトグラムには色素成分以外の成分の関与が大きいものと考えられた。なお、両試料について示差屈折計検出器で得られたクロマトグラムはいずれも同様であり、デキストリンのクロマトグラム (Fig. 4) と類似していた。

次に、SDS ゲル電気泳動法による分子量の推定を試みた。2-メルカプトエタノールによる還元を行った、ある

いは行わなかった、クチナシ赤色素について、分子量スタンダードタンパク質 (分子量 3,500、8,200、15,600、28,700、37,600 の混合物) とともに、電気泳動を行った。結果を Fig. 5 に示す。いずれの色素においても、還元の影響はみられなかった。試料 RI については、分子量 8,200 から 15,600 及び 28,700 から 37,600 の 2 つのスポットが観察された。一方、試料 RII では、分子量 3,500 から 37,600 以上と予想された。また、一部緩衝液フロントを越えて泳動していた。

さらに、タンパクや酵素あるいは DNA の濃縮、脱塩等に用いられる限外ろ過膜器具を用いた分子量の推定を行った。試料溶液とろ過処理後の試料溶液の吸収極大 534 nm における吸光度を測定し、試料溶液の吸光度に対する各画分の吸光度の割合を求めた。試料 RI の場合、分子量 30,000 以上が 37%、10,000 ~ 30,000 が 3%、3,000 ~ 10,000 が 3%、3,000 以下が 7%であった。1 mg/mL の試料溶液の吸光度が 0.30 であったのに対し、分子量 30,000 以上の画分でもその吸光度は 0.11 と低く、吸光度から算出した色素成分の回収率は全体で 50%であった。用いた限外ろ過膜器具のろ過膜表面に着色が観察され、水洗等の操作によっても溶出しなかったことから、残りの色素成分はろ過膜に吸着したものと考えられた。試料 RII については、分子量 30,000 以上が 83%、分子量 10,000 ~ 30,000 が 17%であった。

## 5. 吸収スペクトル

試料 RI、RII、ビートレッド、ブドウ果皮色素、食用赤色 3 号、104 号、105 号及び 106 号の水溶液における吸収スペクトルを Fig. 6 に示す。試料 RI 及び RII の吸収極大は 534 nm であった。試料 RI と試料 RII では吸収極大は一致するものの、試料 RI の方が紫外部吸収が強かった。また、ビートレッド及びブドウ果皮色素の吸収極大は 529 nm 及び 534 nm であり、試料 RI、RII の吸収極大と近く、吸収スペクトルの形状も類似していた。一方、合成着色料の食用赤色 3 号、104 号、105 号及び 106 号については、いずれも吸収スペクトルの形状は試料 RI、RII と異なっていたが、吸収極大は 528、538、549、565 nm であり、食用赤色 3 号及び 104 号の吸収極大はクチナシ赤色素と近接していた。

クチナシ赤色素の水溶液は他の水溶性天然着色料の水溶液と吸収スペクトルが類似し、吸収極大は食用赤色 3 号及び 104 号の水溶液と類似していたため、クエン酸緩衝液 (pH3.0) 及びリン酸緩衝液 (pH8.0) 中での吸収スペクトルを比較した。結果を Fig. 7 及び Fig. 8 に示す。酸性下では天然着色料には大きな変化がみられなかったが、食用赤色 3 号、104 号及び 105 号の著しい退色がみられた。塩基性下ではブドウ果皮色素が青色に変化した。試料 RI、RII、及びビートレッドは、いずれの測定溶媒においても吸収極大にほとんど変化は見られなかった。そこで、

試料 RI、RII 及びビートレッドのリン酸緩衝液 (pH8.0) 溶液を 90 °C、5 分間加熱したところ、試料 RI、RII はほとんど変化が見られなかったのに対し、ビートレッドは薄黄色に変化した。

## 6. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

クチナシ赤色素と他の赤色素の識別に TLC を応用するための条件を検討するため、衛生試験法・注解<sup>4)</sup>に示されている天然色素定性分析の各種条件により、TLC を行った。

薄層板としてポリアミド薄層板を用い、展開溶媒として、イソプロパノール-水-ギ酸 (7:3:1) を用いた。試料液は、試料 RI 及び RII については 0.4 g/mL、ビートレッドについては 0.5 g/mL、ブドウ果皮色素については 0.2 g/mL とし、各々 0.5  $\mu$ L スポットしたところ、試料 RI、RII 及びブドウ果皮色素は原点に残った。ビートレッドの Rf 値は 0.46 であった。次に同じ試料液を用い、セルロース薄層板を用いた TLC について検討した。展開溶媒として、アセトン-イソアミルアルコール-水 (6:5:5) を用いた場合、試料 RI はほとんど原点に残り、試料 RII とビートレッドの Rf 値は、いずれも約 0.14 であった。ブドウ果皮色素の Rf 値は約 0.28 であった。展開溶媒として水-酢酸-塩酸 (82:15:3) を用いた場合には、いずれの色素でもテーリングが観察され、ブドウ果皮色素では溶媒先端まで色素が上がっていた。酢酸-水-塩酸 (6:5:5) の場合には、試料 RI、RII 及びブドウ果皮色素は溶媒先端まで色素が上がり、4 色素ともスポット

にならなかった。0.5 mol/L 塩酸-アセトン (3:1) の場合にも各色素の挙動は異なるものの、いずれもスポットにならなかった。そのため、これ以上の条件検討は行わなかった。

#### D. 考察

##### 1. クチナシ赤色素の製造方法に関する特許について

クチナシ赤色素の性質についての情報を得るため、クチナシ赤色素に関する特許等の資料を収集した。

クチナシ赤色素は、もともと純度の低いクチナシ黄色素により食品が緑変するというクレーム問題から始められた研究により、クチナシ青色素とともに開発された色素であり、現在製造を行っているのは、開発を行った1社である (日添協会報 vol 18, No5 pp19-22)。

1980年には、赤色系色素組成物の製造方法についての特許出願公告 (特公)<sup>6)</sup>が出されている。この特公による製造方法の要約を Fig. 9 に示す。原料となるイリドイド化合物を含有する植物としては、クチナシ、チブサノ木 (*Genipa americana* Linn.) があげられている。特公におけるクチナシ果実抽出物からの赤色系色素組成物の製造方法の概略を示す。クチナシ果実抽出液に多数含有されているイリドイド化合物のうち、ゲニピン (Fig. 9)、ゲニボシド (Fig. 9) のように4位に  $-\text{COOCH}_3$  基を有する物質よりアルカリ性溶液、OH型イオン交換樹脂、エステラーゼ活性を有する酵素等を単独にあるいは

組み合わせて作用させ、エステル加水分解を行う。次いで含有イリドイド配糖体に酸、微生物、酵素等を単独にまたは組み合わせて作用させ、アグリコンとする。このアグリコンを一級アミノ基含有物質と処理し、赤色系色素組成物を得ることができる。

また、1991年には明色化した赤色色素の製造方法について特許出願公開されており<sup>6)</sup>、これは1998年に特許を得ている<sup>7)</sup>。内容は、1980年に提案したイリドイド化合物から赤色系色素組成物を製造する方法を改良したもので、それまでに比べ、明るく鮮明で、かつ堅牢、安全な赤色色素を高収率で製造できる方法を提供することを目的としている。イリドイド骨格の4位にカルボキシル基を有するイリドイド化合物と一級アミノ基含有物質との反応における一級アミノ基含有物質をアルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン又はこれらの塩とし、クエン酸等の特定の有機酸の存在下で pH3 ~ 6 の範囲で反応させることを特徴としている。

さらに、1993年には、クチナシ赤色系色素の製造方法についての特許出願が公開されている (特開)<sup>8)</sup>。ここでは、クチナシ赤色素の青味を効率的に減らすことを目的とし、上記の特許で述べられているイリドイド化合物及び一級アミノ基含有物質とを五炭糖の存在下、酸性条件で反応させる方法が述べられている。

以上の特許等を参考に以下、考察を

行った。

## 2. メタノールの分析結果について

クチナシ赤色素の製造工程に、イリドイド化合物のエステル加水分解が入ることから、メタノールが遊離することが考えられた。そこで、クチナシ赤色素中のメタノールの分析を行った (Table 1) が、昨年度報告したクチナシ青色素中の含量 (46 ~ 93  $\mu$  g/g) に比べ低かった (13 ~ 28  $\mu$  g/g)。クチナシ赤色素の場合、メタノールは製造工程の初期段階で遊離し、その後の製造工程に除去されるものと考えられた。また、試料 RI、RII におけるメタノールの濃度は、FDA において食品添加物に対して一般に定められている残留溶剤としてのメタノールの許容限度 (0.005%) を越えていなかった。1980 年の特公<sup>5)</sup>では、クチナシ果実からの抽出に含水メタノールが使用されているが、既存添加物名簿収載品目リストにおいては、水で抽出することになっている。実際に抽出溶剤としてメタノールを使用していないのであれば、メタノールの規格は必要ないものと考えられるが、残留溶剤として規定する場合でも限度値は一般的な値がとられても問題ないと考えられた。

## 3. アミノ酸の分析結果について

1998 年の特許<sup>7)</sup>によれば、クチナシ赤色素の原料アミノ酸としては、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸及びこれらの塩の 1 種、又は同じ酸性あるいは塩基性アミノ酸の混合物、又はこれらのアミノ酸及びそ

の塩類を主成分としたアミノ酸混合物を反応系に加えることを特徴とする。そこで、原料アミノ酸の組成を知る手がかりを得るために、アミノ酸分析を行った。

試料 RI でアルギニン (Arg)、試料 RII ではグルタミン酸 (Glu) が顕著であったことから、試料 RI では Arg が、試料 RII では Glu が主原料アミノ酸である可能性が高い。さらに、他のいくつかのアミノ酸の存在も推定されたことから、原料としては、特許にあるように Arg あるいは Glu 及びその塩類を主成分としたアミノ酸混合物が用いられたものと考えられた。

なお、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln) 及びトリプトファン (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、システイン、イソロイシン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. 分子量について

分子量を推定するために、HPGFC を試みたところ、クチナシ赤色素 2 試料のうち、アルギニンを構成アミノ酸とすると考えられる試料 RI についてはピークが観察されなかった。一方、限外ろ過膜により分画を行った際に膜への吸着がみられたことから、RI については、分子量が極端に小さいというのではなく、HPGFC でもカラムへの吸

着が起こったものと考えられた。

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。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。クチナシ赤色素は、イリドイド化合物と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、クチナシ赤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を受けなかった。また、RII では緩衝液フロントを越えて泳動した。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つ。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、電荷の影響を受けず、ゲルの分子篩作用によって、単にそれらの分子量の差だけに依存して分離される。しかし、RII については 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。一方、RI については緩衝液フロントを越えた泳動はみられなかった。RI と RII の電気泳動における挙動の違いは構成アミノ酸 (RI はアルギニン、RII はグルタミン酸) の違いによるものと考えられた。SDS ゲル電気泳動の結果からは、クチナシ赤色素の色素成分は分子量分布は広範囲である ( $0.35 \times 10^4 \sim > 3.76 \times 10^4$ ) と考えられた。

限外ろ過膜を用いた分子量の推定では、試料 RI は分子量 3,000 以下の色素

成分の存在が予想されたのに対し、RII の色素成分は分子量 10,000 以上と考えられ、両試料の色素成分は構成アミノ酸が異なるだけでなく、分子量的にも異なると考えられた。

#### 5. 確認試験法について

吸収スペクトルをクチナシ赤色素の確認に用いることができるかどうかを検討するために、まず、試料 RI、RII 及び第 7 版食品添加物公定書に記載されている着色料のうちクチナシ赤色素に近い極大吸収部を持つと考えられた、水溶性天然着色料のビートレッド (酢酸緩衝液 (pH5.4) における極大吸収部 525 ~ 535 nm)、ブドウ果皮色素 (クエン酸緩衝液 (pH3.0) における極大吸収部 520 ~ 534 nm)、合成着色料の食用赤色 3 号 (酢酸アンモニウム溶液における極大吸収部 524 ~ 528 nm)、同 104 号 (酢酸アンモニウム溶液における極大吸収部 536 ~ 540 nm)、105 号 (酢酸アンモニウム溶液における極大吸収部 546 ~ 550 nm)、106 号 (酢酸アンモニウム溶液における極大吸収部 564 ~ 568 nm) の水溶液について吸収スペクトルを測定した。水溶液におけるクチナシ赤色素の吸収スペクトルは水溶性天然着色料のビートレッド及びブドウ果皮色素と類似し、吸収極大は合成着色料の食用赤色 3 号及び同 104 号と近いことが明らかとなった。さらに pH を変えて測定したところ、食用赤色 106 号を除く合成着色料は、キサントレン系色素であり、水溶液に塩酸を加えると沈殿を生じることが知ら

れている<sup>9)</sup>が、クエン酸酸性下において著しい退色がみられ、識別が可能であった。食用赤色 106 号については、吸収極大がクチナシ赤色素に比べて、長波長にあるため、識別可能と考えられた。また、ブドウ果皮色素はアントシアニン系色素であるため、塩基性下で暗青色となり、クチナシ赤色素との識別が可能であった。さらに、ビートレッドについては塩基性下、酸性下においてクチナシ赤色素と同様の吸収スペクトルを示したが、加熱により退色し、識別が可能であった。

以上のことから、クチナシ赤色素の確認には、極大吸収部の規定の他にクチナシ色素を特定できる確認試験が必要と考えられた。

#### 6. クチナシ赤色素の範囲について

既存添加物とは、平成 7 年（1995 年）に食品衛生法及び栄養改善法の一部を改正する法律が公布された際、現にあった添加物である。

今回試料として用いたクチナシ赤色素は、紫色に近い色をしていたが、特開<sup>7)</sup>にあるように、青味を減らしたクチナシ赤色素も製造可能である。この場合には、精製方法の変更ではなく、製法の変更により色調を変化させることになる。もともとクチナシ赤色素は色素成分が何であるかの記載がないが、何らかの色素成分の変化が考えられる。このため、新たな成分を含むものも既存添加物として取り扱ってよいのかという疑問が生じる。新たな天然由来の着色料は事実上開発は難しく、他の着

色料についても今後、改良が進むことが考えられるため、安全性試験の実施あるいは規制等、何らかの対応が必要であると考えられた。

#### E. まとめ

1. クチナシ赤色素では、原料ゲニボシド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たため、分析を行ったが、問題となる濃度ではなかった。
2. 主な原料アミノ酸を知るため分析を行ったところ、製品により異なり、アルギニンあるいはグルタミン酸含量が高く、これらのアミノ酸が主な原料アミノ酸と考えられた。
3. クチナシ赤色素は高分子であることが予想されたため、限外ろ過膜を利用し、分子量分布の推定を行ったところ、製品により異なり、1 製品は 3,000 以下から 30,000 以上と幅広く分布してると考えられ、他の 1 試料は分子量 10,000 以上と考えられた。
4. クチナシ赤色素の吸収スペクトル等を検討した。吸収スペクトルは他の赤色系色素と類似し、クチナシ赤色素の確認には、極大吸収部の規定の他にクチナシ色素を特定できる確認試験が必要と考えられた。

#### F. 参考文献

- 1) 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).

- 2) Food Chemical Codex 4th Ed., p.31, p.392 (1996) National Academy Press.
- 3) FAO Food and Nutrition Paper, 52 Add. 6, p.25～28, p. 41～42 (1998).
- 4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 1990, p.530 (1990), 金原出版.
- 5) 遠山良介他：特公昭 55-5778 (1980).
- 6) 漏留信晴他：特開平 3-277663 (1991).
- 7) 漏留信晴他：特許第 2802451 号 (1998).
- 8) 漏留信晴他：特開平 5-59296 (1993).
- 9) 鈴木郁生他：第 7 版食品添加物公定書解説書 p.D-676 (1999), 廣川書店.



Table 1. Contents of residual solvent in gardenia red

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	
	Methanol	Ethanol
RI	$28 \pm 6$	$31 \pm 5$
RII	$13 \pm 3$	$177 \pm 9$

Table 2. Contents of residual amino acids in gardenia red

Sample	Concentration (ug/g)									
	Asp	Glu	Ser	Gly	Ala	Pro	Arg	Val	Leu	Total
RI	19					13	61		9	102
RII		143	7	7	14		10	28	23	232

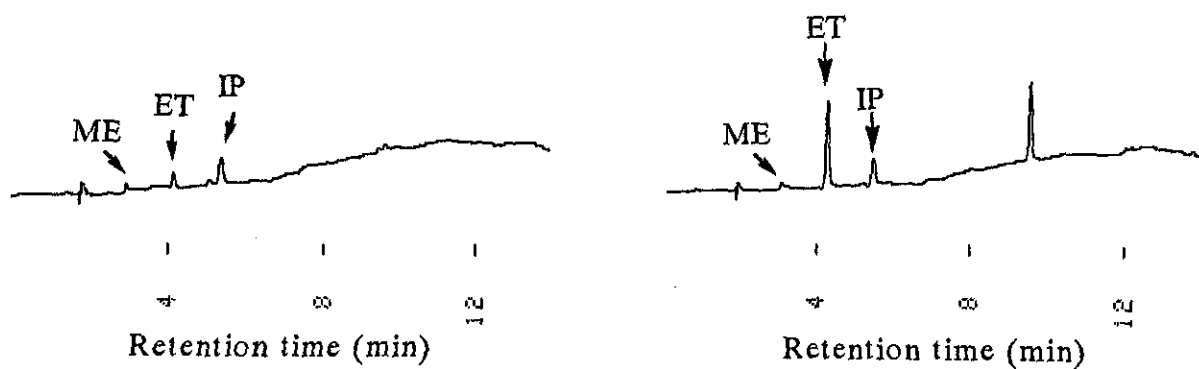
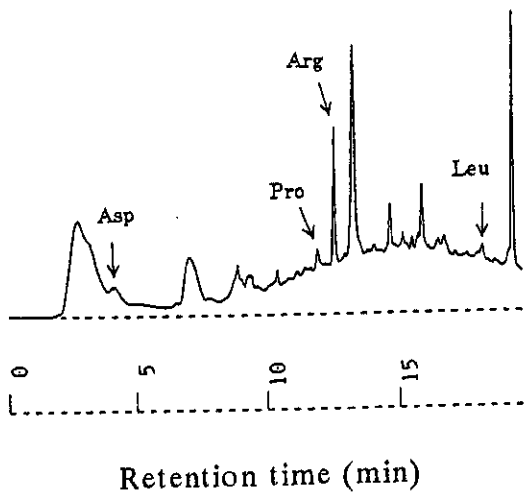


Fig. 1. Gas chromatograms of headspace vapor of gardenia red preparations  
A: sample RI; B: sample RII.  
ME: methanol; ET: ethanol; IP: isopropanol.

A



B

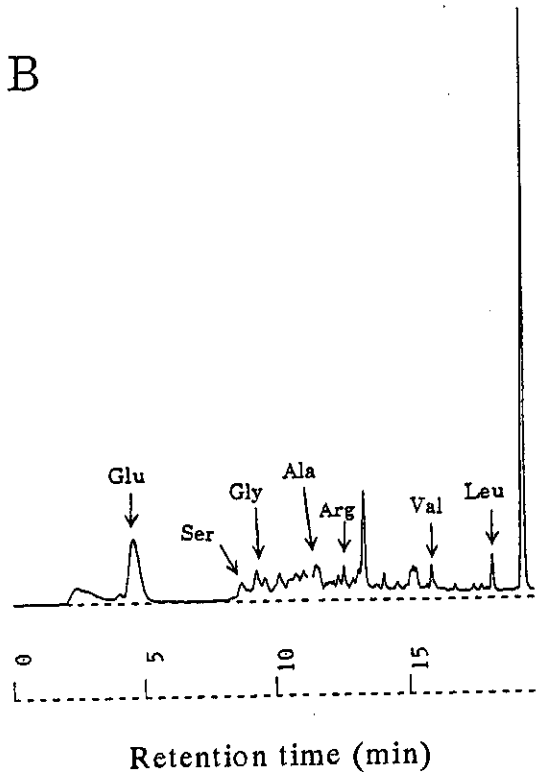


Fig. 2. Amino acid analysis of gardenia red by HPLC  
A: sample RI; B: sample RII.

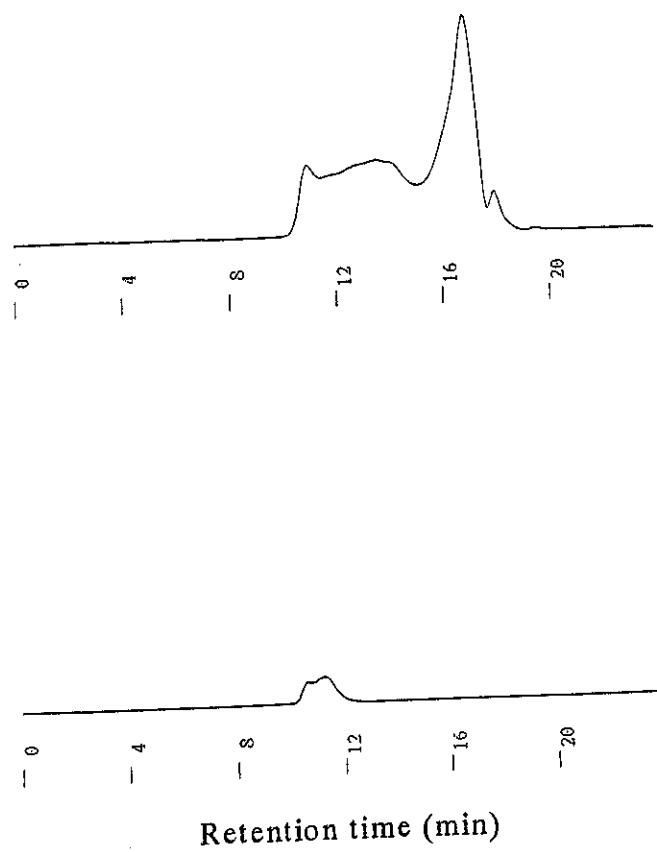


Fig. 3. HPGFC chromatograms of sample RII  
HPGFC conditions are as follows. Column: OHpak SB-803HQ; mobile phase: 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.4); detection: refractive index (upper) and 598 nm (lower).

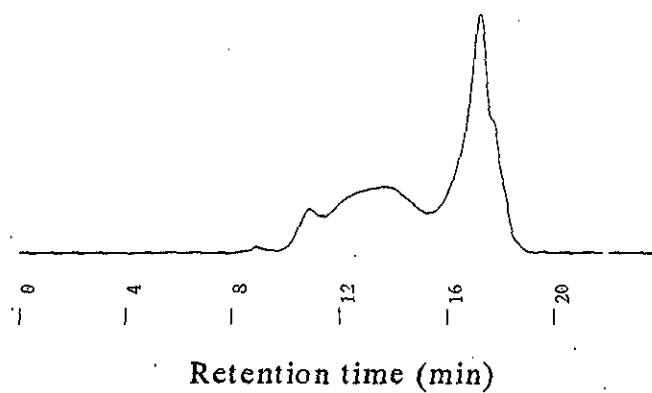
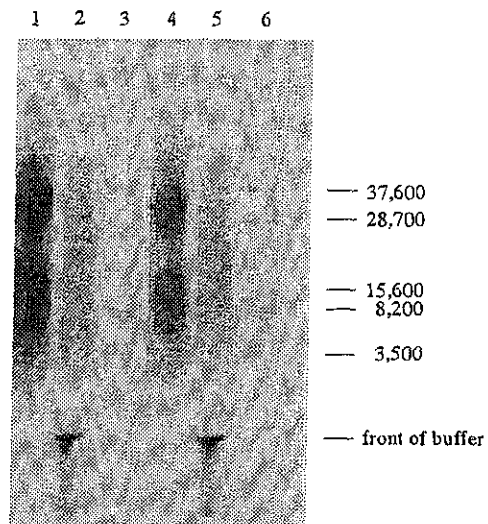


Fig. 4. HPGFC chromatograms of dextrin

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



**Fig. 5. SDS-PAGE profile of gardenia red**

The reduced samples (lane 1: RI, lane 2: RII, lane 3: MW markers) and nonreduced samples (lane 4: RI, lane 5: RII, lane 6: MW markers) were analyzed by 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.

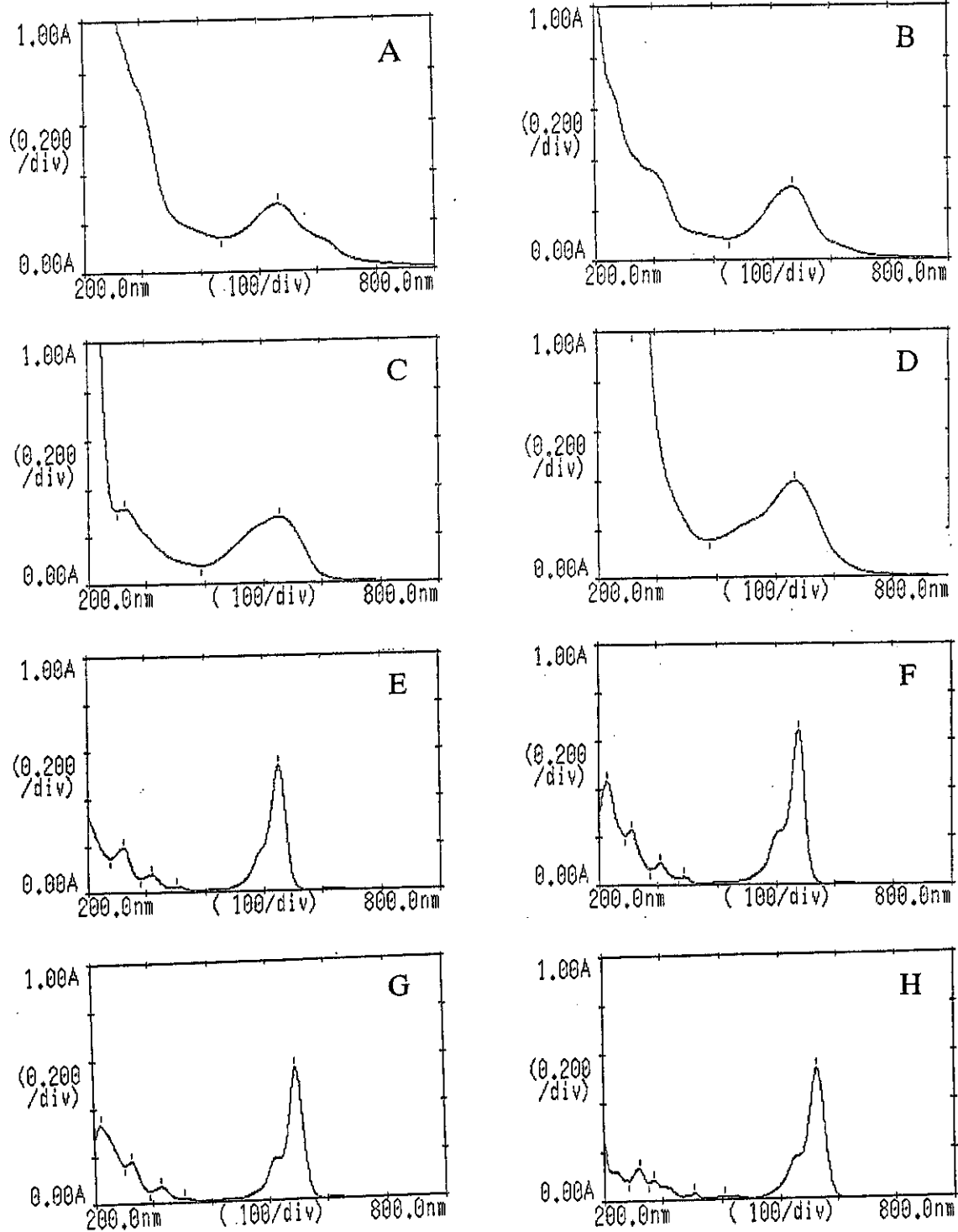


Fig. 6. Absorption spectra of gardenia red and other red pigments in water  
 A: sample RI; B: sample RII; C: beet red; D: grape skin color; E: food red No.3; F: food red No.104; G: food red No.105; H: food red No.106.



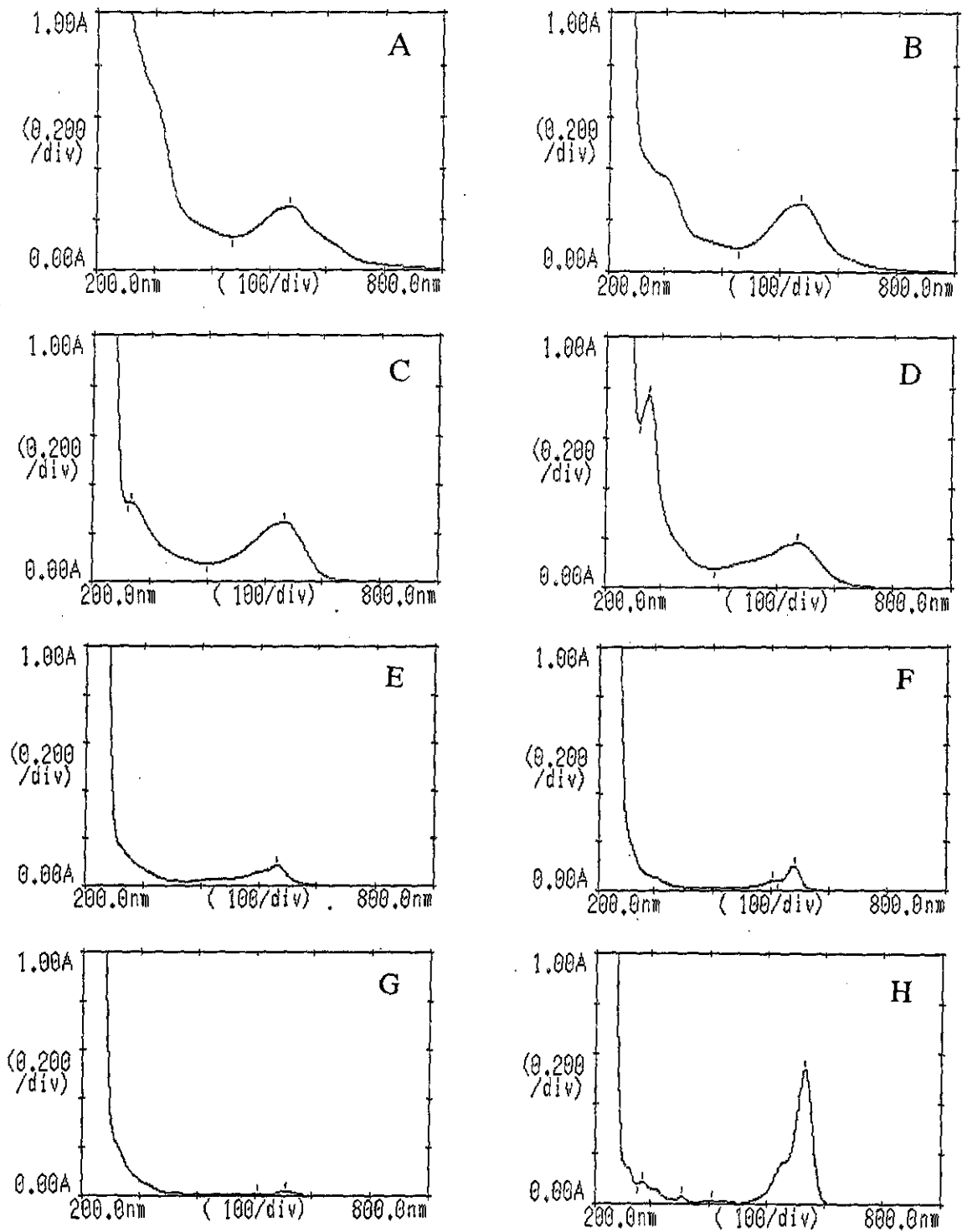
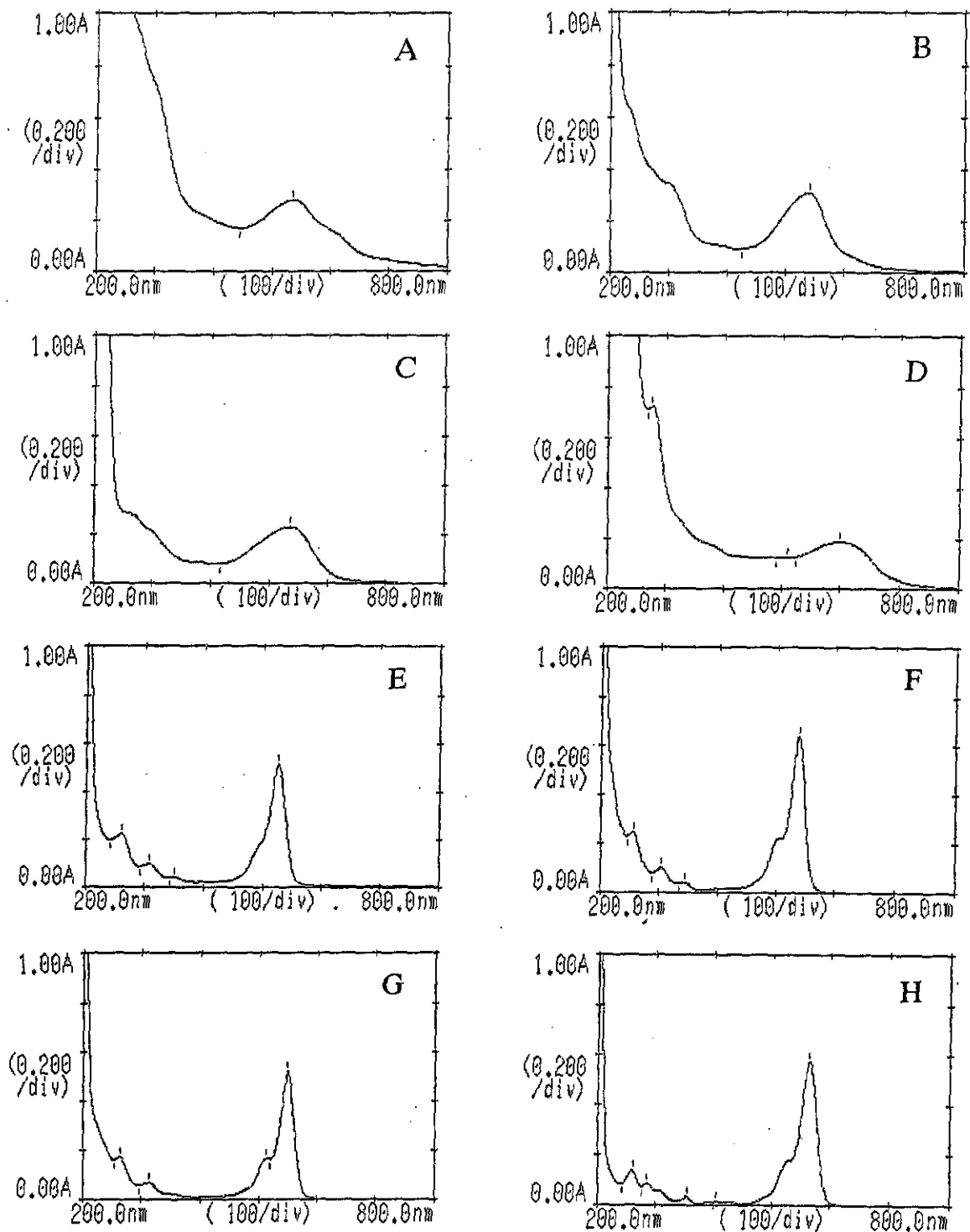


Fig. 7. Absorption spectra of gardenia red and other red pigments in citrate buffer (pH3.0)

A: sample RI; B: sample RII; C: beet red; D: grape skin color; E: food red No.3; F: food red No.104; G: food red No.105; H: food red No.106.



**Fig. 8. Absorption spectra of gardenia red and other red pigments in phosphate buffer (pH8.0)**

**A: sample RI; B: sample RII; C: beet red; D: grape skin color; E: food red No.3; F: food red No.104; G: food red No.105; H: food red No.106.**

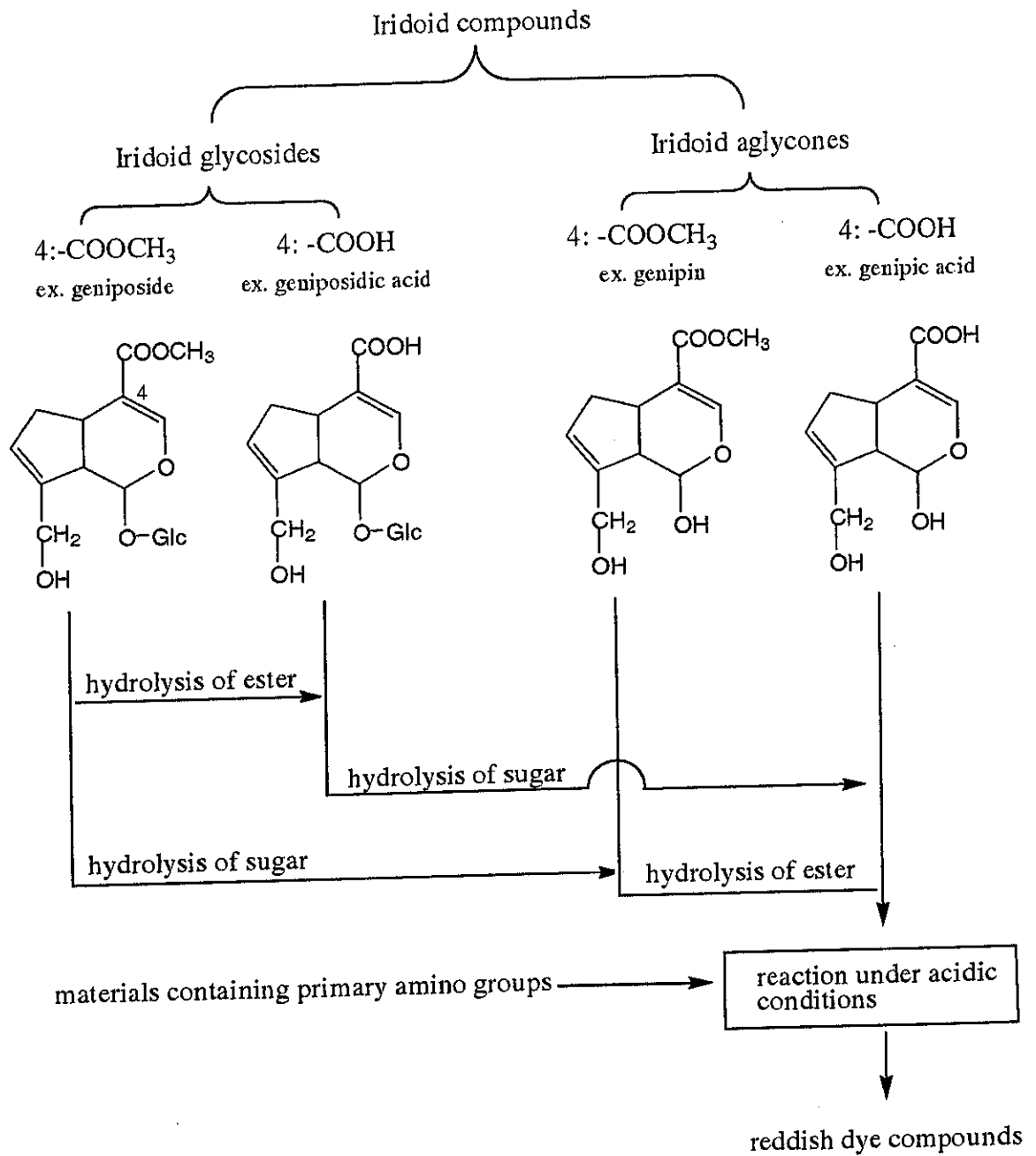


Fig. 9. Outline of the process of making gardenia red

平成11年度 厚生科学研究

食品添加物の規格基準設定等に関する  
基礎的調査研究

既存添加物の主要成分の構造に関する研究

分担研究者

東亜大学大学院

義平邦利