

輸入アップルシロップ製品中の耐酸性コチニールの同定

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	川崎, 洋子 杉本, 直樹 佐藤, 恭子 山崎, 壮 石綿, 肇 米谷, 民雄
巻/号	43巻4号
掲載ページ	p. 191-195
発行年月	2002年8月

報 文

輸入アップルシロップ製品中の耐酸性コチニールの同定

(平成 13 年 11 月 27 日受理)

川崎 洋子* 杉本直樹*[†] 佐藤 恭子*
山崎 壮* 石綿 肇* 米谷 民雄*

Identification of Acid-stable Carmine in Imported Apple Syrup Product

Yoko KAWASAKI, Naoki SUGIMOTO[†], Kyoko SATO, Takeshi YAMAZAKI,
Hajimu ISHIWATA and Tamio MAITANI(National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan; [†]Corresponding author)

An unknown red pigment was purified from an apple syrup product imported from Canada, using a DIAION HP-20 column with methanol as the eluent. By spectroscopic means and chemical synthesis, the isolated pigment was identified as 4-aminocarminic acid, which is the major pigment of acid-stable carmine (a red colorant illegal in Japan). In addition, HPLC and TLC methods were proposed to detect this illegal colorant. While the color of carminic acid changed from yellow to red in the pH range of McIlvaine buffer (3.0~7.0), the color of 4-aminocarminic acid was always red, and also the ultraviolet/visible (UV/Vis) spectra did not change. These characteristics are useful to distinguish 4-aminocarminic acid from carminic acid.

(Received November 27, 2001)

Key words: アップルシロップ apple syrup; 食品添加物 food additive; 赤色色素 red colorant; カルミン酸 carminic acid; 耐酸性コチニール acid-stable carmine; 薄層クロマトグラフィー TLC; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 同定 identification

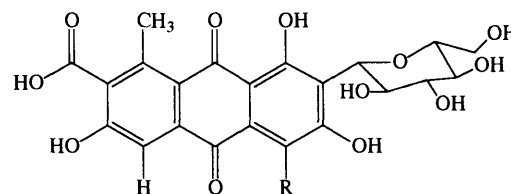
緒 言

既存添加物名簿¹⁾に記載されているコチニール色素は、カルミン酸^{2), 3)}を主色素成分とする天然赤色色素である。我が国では、カルミン酸のアルミニウムレーキ (又はその塩類) であるカルミン⁴⁾や、カルミン酸を原料として化学的処理により構造を改変して得た色素などはすべて化学的合成品扱いとなり、食品への使用が許可されていない。一方、諸外国ではカルミン酸、カルミンともに許可色素である場合が多い。

更に、最近、欧米では、耐酸性コチニール (acid-stable carmine) と称する酸性条件下でも赤色が保持される色素⁵⁾も、新たに流通している。しかし、耐酸性コチニールの色素成分の構造は公表されておらず、食品からの検出法も報告がない。そのため、我が国に輸入されている食品にも耐酸性コチニールが使用されている可能性があるにもかかわらず、その分析が実施できなかった。そこで、著者らは前報⁶⁾において、耐酸性コチニールの主色素の構造について検討し、それがカルミン酸の4位の水酸基がアミノ

基に置換した4-アミノカルミン酸であることを明らかにした (Fig. 1)。

今回、著者らは、カナダより輸入申請されたアップルシロップ製品中の未知赤色色素について検討した結果、我が国では食品への使用が認められていない耐酸性コチニールの主色素である4-アミノカルミン酸を初めて検出したので報告する。また同時に、本色素の抽出法、4-アミノカルミン酸標準品の簡便な合成法、HPLC 保持時間、紫外可視吸収スペクトル、TLC 及び色素溶液の色調による確認法など、本色素の分析に必要な諸データを検討したので報告する。



R = OH: carminic acid
R = NH₂: 4-aminocarminic acid

Fig. 1. Structures of carminic acid and 4-aminocarminic acid

[†] 連絡先

* 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野賀 1-18-1

実験方法

1. 試料

カナダより輸入申請されたアップルシロップは、大阪検疫所より平成11年10月に分与されたものを用いた。なお、本輸入食品は、カルミン酸添加の表示がされていたが、カルミン酸以外の構造未知の赤色色素が使用されているとして、確認依頼があったものである。

2. 試薬

アナトー色素、ビートレッド色素、コウリヤン色素、エルダーベリー色素、ベリー類色素は、日本食品添加物協会を通じて市販品を入手した。カルミン酸はMerck社製又は和光純薬工業(株)製、カルミン(カルミン酸アルミニウムレーキ)はSigma社製、その他の試薬は市販特級品を用いた。

3. 4-アミノカルミン酸標準品の合成

カルミン酸500 mgを25%アンモニア水2.5 mL、水4.5 mLに溶解し、封管中、120~130°Cで1時間加熱、かくはんした。反応液より溶媒を減圧下で留去し、生成物523 mgを得た。生成物より再結晶(メタノール-水)し、得られた4-アミノカルミン酸(収率: >90%)を分析用標準品とした。なお、本標準品の確認は、既報⁶⁾の4-アミノカルミン酸の各種スペクトルデータとの比較により行った。

4. アップルシロップ製品中の赤色色素の試験溶液の調製

アップルシロップ製品10.0 gに水20 mL及びDIAION HP-20樹脂(三菱化学(株)製)2 gを加え穏やかにかくはんした後、あらかじめDIAION HP-20樹脂を高さ約5 cmに湿式充てんした内径1 cmのカラムに上積した。その後、水100 mLで洗浄し、次いで、赤色色素をメタノール50 mLで溶出させた。メタノール溶出画分を減圧下で濃縮乾固後、50%メタノール0.5 mLを加え溶解してHPLC及びTLC用試験溶液とした。

5. 色素成分の単離・精製

上記アップルシロップのHPLC及びTLC用試験溶液を減圧下で濃縮乾固後、得られた残留物を水に溶解して分取HPLCに付し、赤色色素5 mgを単離・精製した。

6. HPLC条件

1) 分析HPLC装置には、HP-1100 series (Hewlett Packard社製)を用いた。

分析条件: カラム, Shim-Pack CLC-ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm) ((株)島津製作所製); カラム温度, 40°C; 移動相: A=アセトニトリル, B=0.1 mol/Lクエン酸緩衝液(pH 3.6), リニアグラジエント0 min(A 0%)–30 min(A35%); 流速, 1.0 mL/min; 検出器, フォトダイオードアレイ(PDA); 検出波長, 490及び530 nm。

2) 分取HPLC装置には、LC-6A ((株)島津製作所製)を用いた。

分取条件: カラム, YMC-ODS-L80 (20 mm i.d. × 250 5 mm) (YM社製); カラム温度, 40°C; 移動相, 2% 酢

酸-アセトニトリル(4:1); 流速, 7.0 mL/min; 検出波長, 460 nm。

7. TLC条件

A. 薄層板, HP-cellulose (Merck社製, No. 1.15035) (セルロースプレート); 展開溶媒, アセトン-イソアミルアルコール-水(6:6:5)

B. 薄層板, RP-18WF_{254S} (Merck社製, No. 1.13124) (ODSプレート); 展開溶媒, メタノール-水(1:4)

C. 薄層板, Silica gel 60F₂₅₄ (Merck社製, No. 1.05715) (シリカゲルプレート); 展開溶媒, アセトン-メタノール-水(15:5:1)

8. pHによる色調の変化

カルミン酸及び4-アミノカルミン酸をMcIlvaine緩衝液(pH 3, 5, 7)にそれぞれ溶解し、その色調を目視した。また、その紫外・可視吸収スペクトルを分光光度計(UV-1600: (株)島津製作所製)で測定した。

結果及び考察

1. 色素成分の精製

未知赤色色素を含むアップルシロップ製品の添加物表示には、カルミン酸が記載されていたことから、カルミン又は4-アミノカルミン酸、もしくは他の天然水溶性赤色色素などの使用が疑われた。食品中のコチニール色素の精製法には、ODSカートリッジを用いる方法⁷⁾や、衛生試験法・注解⁸⁾に記載されるポリアミドを色素吸着剤とし、2%アンモニア水-エタノール(1:1)により溶出させる方法などがある。しかし、アンモニア水を用いるコチニール色素の精製法を用いた場合、操作中にカルミン酸がアンモニアと反応して耐酸性コチニールの主色素成分である4-アミノカルミン酸を与える可能性が考えられた。実際にカルミン酸を25%アンモニア水に溶解して、室温又は加熱条件下でかくはんし、その反応液の組成をHPLCにより経時的に観察したところ、室温条件では反応は非常に緩やかに進行し、24時間後にカルミン酸のピークは消失し、4-アミノカルミン酸のピークのみを与えた。また、加熱条件では1時間以内に4-アミノカルミン酸のピークのみを与えた(実験の項3参照)。

そこで、アップルシロップ製品中の未知赤色色素の精製は、アンモニア水を用いない方法で行った。すなわち、DIAION HP-20樹脂に色素成分を吸着させ、メタノールで溶出させることによって収率よく色素成分を精製できた。

2. HPLCによる色素成分の確認

輸入アップルシロップ製品より調製した試験溶液をHPLCに付したところ、試験溶液の主ピークはカルミン酸とは異なった保持時間(17.9分)に出現した(Fig. 2)。また、そのPDAスペクトルも、カルミン酸とは異なり、近接した2つの極大吸収を530 nm付近に示した(Fig. 3)。試験溶液の主ピークの保持時間及びPDAスペクトルは、合成により得た4-アミノカルミン酸標準品と一致し、

更に分取HPLCにより単離精製した色素の ^1H -, ^{13}C -NMR, MS, UV/Vis スペクトルデータは、既報⁶⁾の4-アミノカルミン酸のそれと完全に一致した。

したがって、アップルシロップに使用されている未知赤色色素は、コチニール色素（カルミン酸）ではなく、我が国においては未許可の耐酸性コチニール（4-アミノカルミン酸）と断定した。

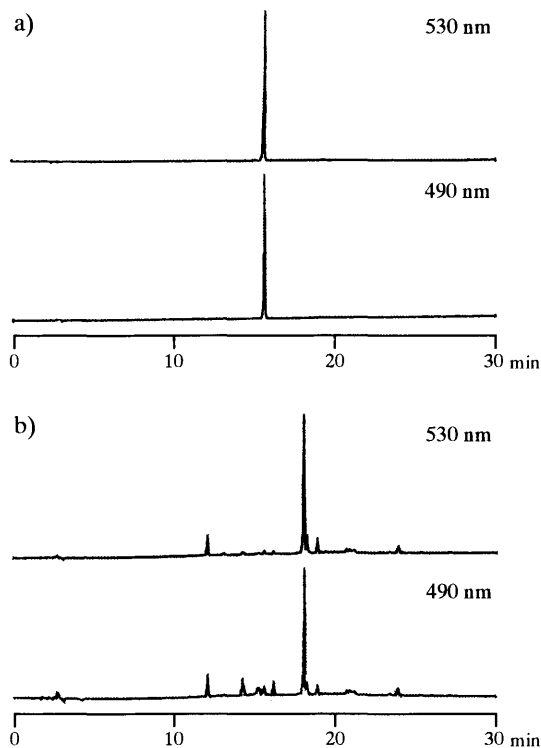


Fig. 2. HPLC profiles of carminic acid and the major pigment isolated from the imported apple syrup a) carminic acid, b) major pigment (4-aminocarminic acid) from the syrup
HPLC conditions: column, Shim-Pack CLC-ODS (4.6 mm i.d. \times 150 mm); column temp., 40°C; solvent, A=acetonitrile, B=0.1 mol/L citric acid buffer (pH 3.6), 0 min (A=0%)-30 min (A=35%); flow rate, 1.0 mL/min; detection, 490, 530 nm.

3. TLCによる色素成分の確認

着色料の簡易分析法として、多数の試料の同時分析が可能であるTLCが優れている。また、TLCは、試料のRf値、自然光又は紫外線照射時の色調、試液噴霧後の試料の色調変化などの多くの化合物情報が得られることから、行政試験などに適している。

そこで、4-アミノカルミン酸、コチニール色素（カルミン酸）、そのアルミニウムレーキであるカルミン、また、その他の入手できた数種の天然赤色色素（アナトー色素、ビートルレッド、コウリャン色素、ベリー類色素、エルダーベリー色素）にTLCを適用し、得られたRf値及び色調について比較検討を行った (Table 1)。セルロースプレートを用いた場合、4-アミノカルミン酸は、カルミン、ビートルレッド、ベリー類色素及びエルダーベリー色素とは異なったRf値を示した。カルミン酸、アナトー色素及びコウリャン色素は4-アミノカルミン酸と分離していないが、4-アミノカルミン酸のスポットがピンク色を示すのに対して、カルミン酸がオレンジ色、アナトー色素が黄色、コウリャン色素が茶色を示し、それぞれのスポットの色調が明らかに異なった。次に、4-アミノカルミン酸、カルミン酸及びカルミンについては、ODS及びシリカゲルプレート

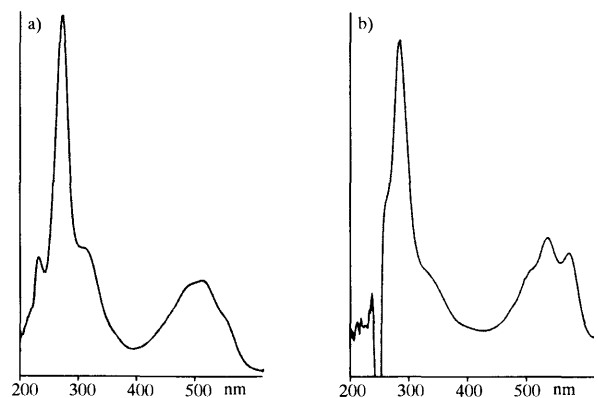


Fig. 3. PDA spectra of carminic acid and the major pigment isolated from the imported apple syrup a) carminic acid, b) major pigment (4-aminocarminic acid) from the syrup

Table 1. Rf Values and Colors of Carminic Acid, Carmine, 4-Aminocarminic Acid and Several Natural Colorants

Colorant	Cellulose ^{b)}		ODS ^{c)}		Silica gel ^{d)}	
	Rf Value ^{a)}	Color	Rf Value	Color	Rf Value ^{a)}	Color
Carminic acid	0.68~0.48	Orange	0.38	Orange	0.19~0	Orange
Carmine	0	Pink	0	Pink	0	Pink
4-Aminocarminic acid ^{e)}	0.75~0.33	Pink	0.30	Pink	0.81	Pink
Sample ^{f)}	0.75~0.33	Pink	0.30	Pink	0.81	Pink
Annatto extract	0.96~0	Yellow				
Beet red	0.15~0	Pink				
Kaoliang color	0.73~0	Brown				
Berries color	0.31~0.17	Gray				
Elderberry color	0.42~0.24	Brown				

^{a)} A range of Rf values indicates a tailing spot. ^{b)} HP-cellulose: solvent; acetone-isoamyl alcohol-water (6:6:5) ^{c)} HP-RP18 WF_{254S}: solvent; methanol-water (4:1) ^{d)} Silica gel 60F_{254S}: solvent; acetone-methanol-water (15:5:1) ^{e)} 4-Aminocarminic acid is a major pigment of acid-stable carmine. ^{f)} The sample was isolated from apple syrup imported from Canada.

を用いて展開した。その結果、ODSプレートでは4-アミノカルミン酸が R_f 値0.30にピンク色のスポットを示したのに対し、カルミン酸及びカルミンは、それぞれ R_f 値0.38にオレンジ色及び原点にピンク色のスポットを示した。また、シリカゲルプレートでは、4-アミノカルミン酸が R_f 値0.81にピンク色のスポットを示したのに対し、カルミン酸及びカルミンは、それぞれ R_f 値0~0.19及び原点にピンク色のスポットを示した。

したがって、4-アミノカルミン酸は、ODS及びシリカゲルプレートを用いることで、容易にカルミン酸及びカル

ミンと区別できることが明らかとなった。

4. pHによる色調の変化

4-アミノカルミン酸とカルミン酸の色調及びその紫外・可視吸収スペクトルを、pHの異なるMcIlvaine緩衝液中で比較した結果をTable 2に示す。カルミン酸はpH 7で赤色、pH 5でオレンジ色、pH 3で黄色を示したのに対して、4-アミノカルミン酸は、溶液のpHにかかわらずすべて赤色を示し、その色調に全く変化が認められなかった。また、紫外可視吸収スペクトルは、カルミン酸ではpHにより変化し、中性(pH 7)溶液と酸性(pH 3, 5)溶液

Table 2. Color and Wavelength of Maximum Absorption of Carminic Acid and 4-Aminocarminic Acid in McIlvaine Buffer

	McIlvaine buffer		
	pH 3	pH 5	pH 7
Carminic acid	Yellow	Orange	Red
λ_{\max} nm (log ϵ)	492 (3.29)	494 (3.29)	529 (3.33)
	—	—	333 (3.62)
	278 (3.89)	279 (3.95)	282 (3.93)
4-Aminocarminic acid	Red	Red	Red
λ_{\max} nm (log ϵ)	561 (3.34)	555 (3.51)	555 (3.49)
	526 (3.41)	526 (3.51)	528 (3.48)
	275 (3.89)	283 (3.91)	286 (3.87)

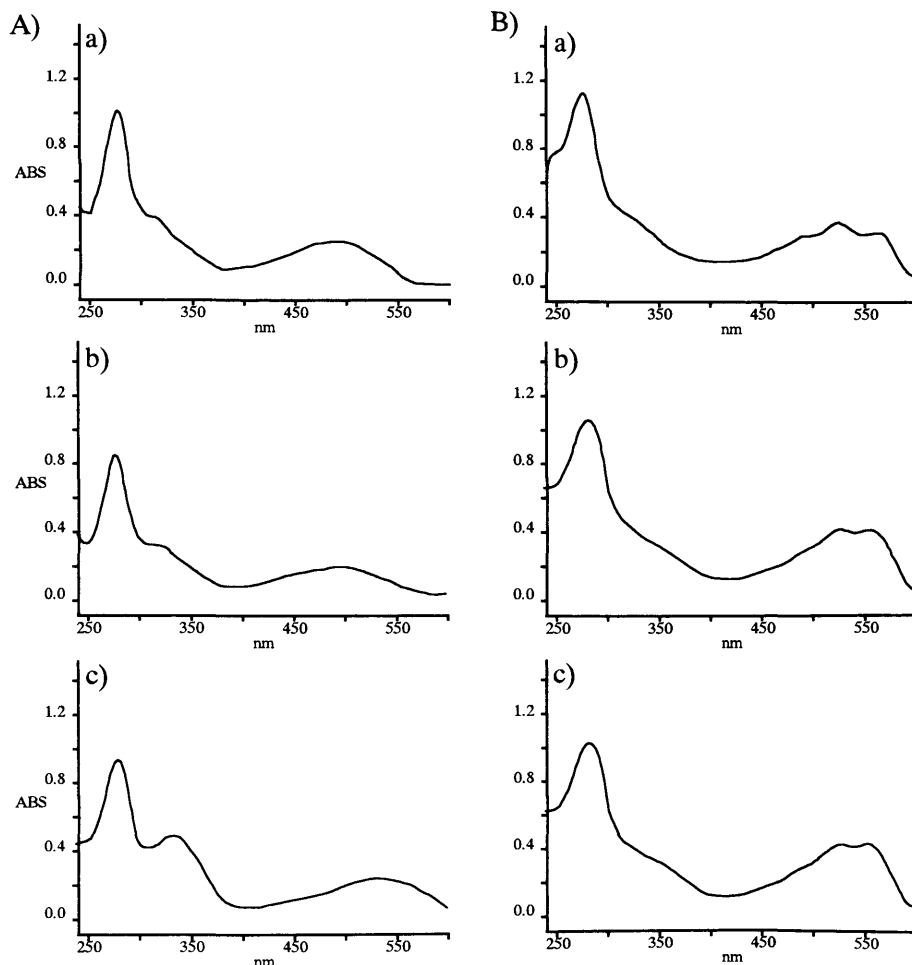


Fig. 4. UV/Vis spectra of carminic acid and 4-aminocarminic acid in McIlvaine buffer
 A) carminic acid: a) 0.13 mmol/L, pH 3, b) 0.10 mmol/L, pH 5, c) 0.12 mmol/L pH 7
 B) 4-aminocarminic acid: a) 0.14 mmol/L, pH 3, b) 0.13 mmol/L, pH 5, c) 0.14 mmol/L pH 7

で異なるパターンを与えたのに対して、4-アミノカルミン酸では、溶液のpHによってほとんど変化せず、2つの近接した極大吸収を530 nm付近に持つ特徴的なパターンを示した (Table 2, Fig. 4).

したがって、pH 3~7の範囲で赤色を示す4-アミノカルミン酸の性質から、目視によりカルミン酸と区別することが可能であり、また、紫外可視吸収スペクトルにより4-アミノカルミン酸を簡便に確認することができた。

ま と め

カナダより輸入申請されたアップルシロップ中の未知赤色色素について検討した結果、我が国において食品への使用が認められていない耐酸性コチニールの主色素である4-アミノカルミン酸を初めて検出・同定した。また、4-アミノカルミン酸の抽出・確認法などについて検討し、以下の知見を得た。

1. 4-アミノカルミン酸の標品は、カルミン酸をアンモニア水中で加熱することで容易に合成できた。
2. 食品からの4-アミノカルミン酸及びカルミン酸の抽出・精製には、アンモニア溶液を使用しない方法が適当であると考えられた。
3. 4-アミノカルミン酸は、HPLC測定による保持時間及びPDAスペクトルパターンより容易に検出可能であった。
4. 4-アミノカルミン酸は、ODS及びシリカゲルTLCプレートで、容易にカルミン酸及びカルミンと区別できた。
5. 4-アミノカルミン酸は、pH 3~7の範囲で赤色を示し、紫外可視吸収スペクトルもほとんど変化しない点で、色調の変化が見られたカルミン酸と区別可能であっ

た。

これらの知見より、我が国において未許可の耐酸性コチニールのアップルシロップ中からの検出が可能となり、今後、輸入食品の行政検査に応用できると考えられた。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知“既存添加物名簿収載品目リスト”平成8年5月23日、衛化第56号(1996).
- 2) Schmitt, P., Günther, H., Hägele, G., Stilke, R., A ¹H and ¹³C NMR study of carminic acid. *Org. Magn. Reson.*, **22**, 446-449 (1984).
- 3) Thomson, R.H., “Naturally occurring quinones”, 2nd Ed., London, Academic Press, 1971, p. 407-408, p. 459-462. (ISBN 0-12-689650-X)
- 4) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), “Compendium of food additives specifications, Addendum 8”, p. 39-41, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2000. (ISBN 92-5-104508-9)
- 5) Schul, J., U. S. Patent 5147673 (Sep. 15, 1992).
- 6) Sugimoto, N., Kawasaki, Y., Sato, K., Aoki, H., Ichi, T., Koda, T., Yamazaki, T., Maitani, T., Structure of acid-stable carmine. *Shokuhin Eisegaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, 18-23 (2002).
- 7) Itakura, Y., Ueno, E., Ito, Y., Oka, H., Ozeki, N., Hayashi, T., Yamada, S., Kagami, T., Miyazaki, Y., Otsuji, Y., Hatano, R., Yamada, E., Suzuki, R., Analysis of lac and cochineal colors in foods using reversed-phase thin-layer chromatography/scanning densitometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **40**, 183-188 (1999).
- 8) 日本薬学会編“衛生試験法・注解2000”東京、金原出版、2000, p. 356-365. (ISBN 4-307-47033-8)