

## 天然着色料の分析法に関する研究（第2報） 食品および色素製剤中のビートレッド 色素の分析

Studies on the Analysis of Natural Dyes (Part 2)  
Analysis of Beet Red Dye in Foods and Dye Preparations

西澤 信 長南 隆夫 堀 義宏

Makoto Nishizawa, Takao Chonan and Yoshihiro Hori

### 緒論

現在、多くの天然着色料が食品添加物として使用されている。しかし、天然着色料は植物などの抽出物で色素の中に多くの成分が共存し、定量分析に用いる色素の標準品も入手が困難なものが多い。そのため、これまで報告されている分析法<sup>1)</sup>は定性分析にとどまっており、天然着色料の使用実態は十分把握されているとはいえない。

著者らは、天然着色料の分析法として、主色素などを指標物質とし、これらを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量分析する方法を研究しており、すでにクチナシ黄色素、アナト一色素の分析法について報告した。<sup>2)</sup> 今回は赤ビート(*Beta vulgaris L. var. rubra*)の根の抽出物であるビートレッド色素を選び、指標物質として主色素betaninを単離精製し、これを標準品として食品および色素製剤中のビートレッド色素の分析法を検討した。

### 実験方法

#### 1. 試料

##### (1) 食品

道内の食品製造所および販売店で入手した菓子類、清涼飲料水、水産加工品、魚肉ねり製品など65試料を用いた。

##### (2) 色素製剤

道内の食品製造所および色素製剤販売業者より入手したビートレッド色素製剤6試料を用いた。

#### 2. 試薬

有機溶媒はすべて一級品を蒸留したもの、水は脱イオン蒸留水、その他の試薬は特級品を用いた。

#### 3. betaninの単離

赤ビート(ホクレン農業総合研究所より入手)1.3kgに水

1 ℥を加えてホモジナイズ後ろ過し、残渣はさらに同様の操作を2回くり返す。抽出液をあわせ減圧下約1 ℥まで濃縮後、凍結乾燥してエキス99gを得た。エキス30gを1%酢酸水溶液100mℓにとかし、逆相系分取カラム(富士ゲル製RQ-3)、FMI低圧ポンプを用いた分取HPLCをおこなった。溶離液はメタノールと1%酢酸水溶液の混合液を用い、メタノール濃度を0、5、10、12、15%と上げるステップワイズグラジェント溶離法で20mℓづつのフラクションに分画した。各フラクションをHPLCで分析し、betaninを含むフラクションを集め濃縮後、1%塩酸を加え、析出する結晶を集めて減圧下乾燥した(収量62mg)。

#### 4. betaninの同定

##### (1)機器分析

betaninの同定には、分光光度計島津UV-180型、融点測定器柳本MP-S3型、NMR JEOL FX-200およびフォトダイオードアレー検出器島津SPD-M1Dを用いた。

##### (2)betaninの酵素分解

betanin 1 mgを10mℓの水に溶かし、 $\beta$ -glucosidase(シグマ社製)1 mgを加えて室温で30分間反応させた後、反応液をHPLCで分析した。

#### 5. 分析法

##### (1)食品

食品5.00 gを正確に量り、伊藤ら<sup>3)</sup>の方法に従ってセライトカラム法で色素を分画し、試験液を調製した。ただし、伊藤らがカラム洗浄の目的で用いているメタノール分画にも色素が溶出したのでメタノール分画も試験液とした。

##### (2)色素製剤

ビートレッド色素製剤60~75mgを精密に量り、水を加えて100mℓとし試験液とした。

##### (3)検量線

betanin 3.85mgを水に溶かして25mlとしたものを標準溶液とし、これを10, 20, 40倍に希釈し検量線を作成した。定量はピーク面積を用いた絶対検量線法でおこなった。

#### (4) HPLCの条件

機 器：東洋曹達803A型液体クロマトグラフ、東洋曹達UV-100modle II型可視検出器、HP 3390A型データ処理機  
カラム：Nucleosil 5C<sub>18</sub>(4 mmI.D.× 250mm)  
溶離液：アセトニトリル：0.05Mリン酸1アンモニウム水溶液(pH2.75)=8:92  
流 量：1.0ml/min  
検出波長：540nm (0.04AU)  
注入量：10μl

## 実験結果と考察

### 1. betaninの同定

赤ビート抽出エキスのHPLCのクロマトグラムはFig.1-Aに示すとおりで、リテンションタイム(Rt) 4.3分に主ピークが認められ、HPLCの溶離液を溶出力が大きくなるようにアセトニトリルの濃度を27%まで変えて分析したが、他に大きなピークは認められなかった。さらに、フォトダイオードアレー検出器SPD-M1Dを用いて分析するとFig.1-Bに示す3次元クロマトグラムが得られ、Rt 4.3分のピークのスペクトルは540nm付近に極大吸収を示し、このピークがbetaninと推定された。このピークは分取HPLCではメタノール12%の条件で溶出し、塩酸塩として結晶化した。

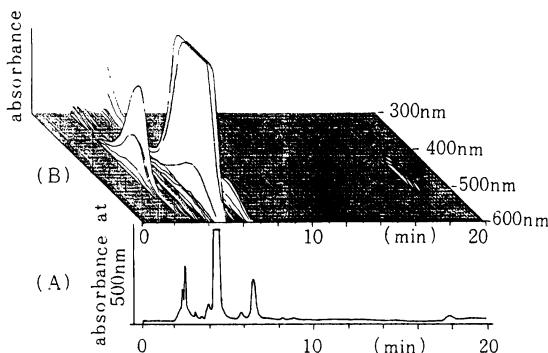


Fig. 1 High Performance Liquid Chromatograms of Extract of Fresh Red Beet

(A) detected at 500nm  
(B) detected with SPD-M1D (three dimensionl chromatogram)  
Condition column : Nucleosil 5C<sub>18</sub>(4mmI.D. 250mm)  
solvent; CH<sub>3</sub>CN: 0.05M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.75)=8: 92  
flow rate; 1.0ml/min

この物質は明確な融点をもたない深緑色結晶で、UV;  $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$  (log ε) nm, 269 (3.96), 300sh. (3.87), 537 (4.70), <sup>1</sup>H-NMR; δ<sub>H</sub>(DMSO-d<sub>6</sub>) 4.27 (1H, dd, J=5, 9 Hz), 4.87(1H, dd, J=3, 10Hz), 5.52(1H, d, J=13Hz), 6.21 (1H, s), 7.13(1H, s), 7.31 (1H, s), 8.37(1H, d, J=13Hz) の物理恒数を有し、Wylerら<sup>4)</sup> Wilcoxら<sup>5)</sup>の報告と一致したのでbetanin の塩酸塩と同定した。また、betaninをβ-glucosidase で加水分解し反応液をHPLCで分析すると、Rt 4.3分のbetanin のピークが消失し、Rt 8.4分に新しいピークが認められた。この化合物の極大吸収は  $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$  542 nm で、betanin のアグリコンbetanidin の極大吸収<sup>5)</sup>と一致し、betanin の構造がうらづけられた。

### 2. ピートレッド色素の分析

#### (1) betaninのHPLC

Schwartsら<sup>6)</sup>は担体としてμBondapack C<sub>18</sub>、溶離液としてメタノールとリン酸1カリウム緩衝液を用いたHPLCでbetaninを分析している。著者らは担体としてNucleosil 5C<sub>18</sub>を用いてbetanin の分析条件を検討したところ、溶離液としてアセトニトリル：リン酸1アンモニウム緩衝液(0.05M, pH2.75)=8:92を用いると短時間にbetanin を分析することができ、他の成分との分離もSchwartzsらの報告より向上することがわかった(Fig. 1, 2)。

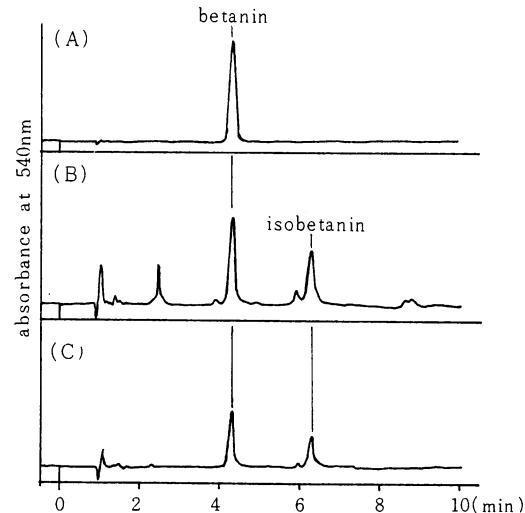


Fig. 2 High Performance Liquid Chromatograms of Betanin

(A) standard  
(B) dye preparation No. 6  
(C) extract of marble chocolate  
Condition column ; Nucleosil 5C<sub>18</sub> (4mmI. D. 250mm)  
solvent ; CH<sub>3</sub>CN: 0.05M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.75)=8: 92  
flow rate; 1.0ml/min

この条件でbetanin の検量線は0.02~0.15 $\mu\text{g}$  の間で原点を通る直線となった。

### (2)色素製剤中のbetaninの定量

ビートレッド色素製剤 6 試料のbetanin の定量結果を Table 1 に示した。betanin 含量は0.54~2.14mg/g の範囲にあり、平均は1.34mg/g であった。

Fig.2-B にクロマトグラムを示したが、Rt4.3分にbetanin のピークが認められるほか、Rt6.3分にもピークが認められた。SPD-M1D を検出器として分析するところのピークの極大吸収は540nm 附近でbetanin のそれと一致した。Schwartzsら<sup>6)</sup> の報告によると逆相HPLCにおいてisobetanin はbetaninとbetanidin の中間に溶出することから、Rt6.3 分のピークはisobetanin と推定した。isobetaninはbetanin のC-15位の光学異性体であり、540nm付近における分子吸光係数はbetaninと等しいと考えられ、betanin の検量線を用いてisobetanin も定量した。その結果、製剤中のisobetanin 含量は0.39~1.76mg/g、平均1.00mg/g でbetanin の約3% も含まれていた。betaninは酸や塩基によりC-15位の異性化がおこりisobetanin になることが知られている。<sup>4)</sup> Fig. 1 に示した新鮮な赤ビート中ではbetaninが主でisobetanin はほとんど含まれていないため、色素製剤を製造する過程においてbetaninからisobetaninへの変化がおこったものと考えられる。

Table 1. Betanin Contents in Beet Red Dye Preparations

Sample No.	Betanin(mg/g)	Isobetanin(mg/g)*
1	1.03	0.83
2	0.62	0.39
3	0.54	0.52
4	2.14	1.76
5	2.01	1.53
6	1.70	0.98

\*isobetanin was characterized by its retention time on HPLC and visible spectrum, and the molecular absorption coefficient was assumed to be same as that of betanin.

### (3)食品中のビートレッド色素の分析

食品65試料についてレッドビート色素の分析をおこなった結果、Table 2に示した菓子類2試料よりbetanin 5.7、4.4 $\mu\text{g}/\text{g}$  が検出され、色素製剤の場合と同様にisobetaninもそれぞれ5.5、3.0 $\mu\text{g}/\text{g}$  検出された(Fig. 2-C)。

Table 2. Betanin Contents in Foods

Sample	Betanin( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	Isobetanin( $\mu\text{g}/\text{g}$ )*
Marble chocolate	5.7	5.5
Cake	4.4	3.0

\*see footnote of Table 1.

伊藤ら<sup>4)</sup>はセライトカラム法による食品中の天然着色料の分画において、ビートレッド色素はメタノールー水分画に溶出すると報告しているが、上記2試料ではメタノール分画、メタノールー水分画の両方に溶出するため、食品中のbetanin の精製法は今後くわしく検討しなければならない。しかし、HPLCを用いて分析した場合betanin の検出限界は0.5ngと低く、食品中のビートレッド色素の検出にはbetanin を指標物質としてHPLC で定量する方法が有効と考えられる。

最後に、本研究をおこなうにあたり、赤ビートを御恵与いただいたホクレン農業総合研究所 星久保正一氏、試料の入手に御協力いただいた北海道衛生部食品衛生課の方々に深謝致します。

## 結語

赤ビートより主色素betaninを単離し、これを指標物質として、食品、色素製剤中のビートレッド色素を分析した。その結果、食品では菓子類2試料から5.7、4.4 $\mu\text{g}/\text{g}$  のbetanin が検出され、色素製剤6試料からは0.54~2.14mg/g のbetanin が検出された。

HPLCを用いて分析した場合betaninの検出限界は0.5 ng で、食品中のビートレッド色素の分析にはbetaninを指標物質としてHPLCで定量する方法が有効と考えられる。

## 文献

- 1) 遠藤英美、食品衛生研究、29, 909 (1979); 萩原勉他、食衛試、21, 207 (1980); 神蔵美枝子、食品衛生研究、29, 997 (1979); 伊藤誉志男他、分析化学、32, T 5 (1983); 谷村顯雄他、『天然着色料ハンドブック』、光琳、(1979)
- 2) 西澤信他、道衛研所報、33, 28 (1983)
- 3) 伊藤誉志男他、分析化学、32, 55 (1983)
- 4) H.Wyler et al., Helv. Chim. Acta, 40, 191 (1957); H.Wyler et al., Helv. Chim. Acta, 46, 110 (1963)
- 5) M.E.Wilcox et al., Helv. Chim. Acta, 48, 252 (1965)
- 6) S.J.Schwartzs et al., J.Agric. Food Chem., 28, 540 (1980)

## 英 文 要 約

Studies of the Analysis of Natural Dyes (Part 2)  
Analysis of Beet Red Dye in Foods and Dye Preparations

Makoto Nishizawa, Takao Chonan and Yoshihiro Hori

Betanin in red beet (*Beta vulgaris* L. var. *rubra*) was isolated by reversed phase preparative high performance liquid chromatography (HPLC) and identified by spectrometry. Using this as standard, betanin in foods and dye preparations was quantitatively determined by HPLC.

The betanin contents of dye preparations were found to be 0.54- 2.14mg/g (average 1.34mg/g). Betanin was detected in 2 of 65 foods samples, in a marble chocolate 5.7 $\mu$ g/g, in a cake 4.4 $\mu$ g/g.

The detection limit of betanin on HPLC analysis was appeared to be 0.5ng, therefore, quantitative determination of betanin by HPLC presumed to be useful for the analysis of beet red dye in foods.