

β -シクロデキストリン包接現象を利用した クチナシ色素の HPLC 分析

小嶋 健博・房前 彩香*

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

*大分市立原川中学校

(2006年10月2日受付、2006年11月6日受理)

1. 諸言

食品中には種々の着色剤や保存料が添加されている¹⁾。近年、消費者の間で食品の安全性、なかでも食品に添加されている色素は容易に視覚的に完治できるために発ガン性等の関心が高い。食品中の着色剤もタール系色素から天然色素に変わりつつある。天然着色料の分析法は薄相クロマトグラフィー²⁾、液-液抽出³⁾や高速液体クロマトグラフィー⁴⁻⁵⁾が報告されている。近年、包接現象のクロマトグラフィーへの応用が報告されている⁶⁻⁹⁾また、 β -シクロデキストリンによるフェノールフタレインの包接体の生成¹⁰⁾やビタミン K3 の吸光度定量が報告¹¹⁾されている。

本研究では、食品中の天然色素、クチナシ黄色素の分析を目的に β -シクロデキストリンとの包接現象について、できるだけ天然の試薬をもちいた環境に優しい定量法について検討した。

2. 実験

2. 1 試薬

クチナシ黄色素は、和光純薬製食品添加物試験用ガーディニアイエローを用いた。 α -シクロデキストリン (α -CD)、 β -シクロデキストリン (β -CD)、および γ -シクロデキストリン (γ -CD) はナカライテスク製を使用し、その他の試薬はすべて特級品を使用した。また、メンブランフィルターはアドバンテック製セルロースアセテート (孔径 0.45 μ m)、純水はイオン交換水を Milli-Q に通したものを使用した。

2. 2 装置

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の装置は、日立製作所製 L-6000 システムを用い、検出器は同社製の L-4000 紫外検出器、カラムオーブンは 655A-52、データ処理には D-2500 データ処理機を用いた。また、HPLC 分析条件は Table-1 に示した。吸光度の測定は日立製作所製 U-2000 分光光度計に光路長 1cm 石英セルを用い、pH の測定には日立製作所製ガラス電極 pH メーター M-8 を使用した。

2. 3 クチナシ色素の分析

はじめに、25ppm ガーディニアイエロー (GY) の 20% (v/v) メタノールリン酸緩衝水溶液の吸収スペクトルを測定し、紫外域では 239nm に極大吸収があることから HPLC の検出波長は 239nm とした。GY の HPLC 分析は、pH5.0、1mM β -CD を含む 0.1M リン酸緩衝溶液/メタノール混合溶液 (60:40) を移動相として用いた。

3. 結果と考察

3. 1 シクロデキストリンの選択

3種類の α -CD、 β -CD、および γ -CDを移動相に添加したときのGYのピークに及ぼす影響について調べた。はじめに、pH5.0の20%メタノール/リン酸緩衝溶液を用い β -CDの添加濃度について検討した。移動相への添加量を0.1、0.25、0.50、および1mMと変えて検討した結果、1mMで安定したGYのクロマトグラムが得られた。また、CDを含まない時には、はっきりしたピークは見られなかった。1mMの α -CDの場合、保持時間37.64min、 β -CDでは24.63min、また γ -CDでは42.55minに明確な大きなピークが見られた。GYは色素クロシン、クロセチンと非色素としてゲニポサイドからなることが知られており、この大きなピーク

はクロセチンと見られる⁵⁾。その結果を Fig.1 に示した。CD のなかで β -CD を含まない移動相に比べ約 20 倍の感度の増大が見られた。

3. 2 pH の影響

移動相として用いた 1mM の β -CD を含むリン酸緩衝溶液を用い、pH の GY のピークに及ぼす影響について検討し、その結果を Fig.2 に示した。GY の保持時間は大きく変化した。ピークの高さは pH5.0 で大きいことを示した。

3. 3 移動相中のメタノール組成の影響

移動相、リン酸緩衝溶液の pH を 5.0、 β -CD の濃度を 1mM にしてメタノール濃度の GY の保持時間、ピークの高さに及ぼす影響について検討した。その結果を Table-2 に示した。移動相中のメタノールの割合の増大と共に GY の保持時間は小さくなり、ピークの高さは大きくなった。メタノールの割合が 50% (v/v) を超えるとクロマトグラムのベースラインが不安定になり、またクロマトグラムの再現性が低下する傾向になった。そこで、メタノールの割合は 40% とした。食品添加物試験用 GY から標準溶液を調製しクロマトグラムの高さから検量線を作成した。検量線は 50ppm まで相関係数 (r) 0.997 の原点を通る直線が得られた。本法は包接現象を利用した増感作用を見だし、食品中の天然色素の高感度 HPLC への応用が分析期待される。

参考文献

- 1) 厚生省環境衛生局食品化学課 編：“食品中の食品添加物分析法”，(1998)，(講談社)。
- 2) 伊藤善志男，外海泰英，三ツ橋幸正，浜野孝，松本幸夫，加藤太郎，藤原孝行，小川俊次郎，豊田正武，慶田雅洋：分析化学 (Bunseki Kagaku)，32，47(1983)。
- 3) 宮本文夫，佐伯政信，上条昌弥，神田宏，中岡正吉，西島基弘，伊藤善志男，竹下隆三：衛生化学 (Eisei Kagaku)，37，542 (1991)。
- 4) 市隆人，東村豊，片山豪，香田隆俊，多田幹朗：食品衛生誌 (Shokuhin Eiseishi)，36，482 (1995)。
- 5) 山田貞二，大島晴美，斉藤勲，早川順子：食品衛生誌 (Shokuhin Eiseishi)，37，372(1996)。
- 6) 田伏岩夫，新海英孝：ぶんせき (Bunseki)，162 (1985)。
- 7) 渡川明正，中川照真：ぶんせき (Bunseki)，849(1986)。
- 8) T. Takeuchi and T. Miwa: Anal. Chim. Acta, 292, 275 (1994)。
- 9) H. W. Frijlink: J. Chromatog., 415, 325 (1987)。
- 10) A. Buvari and L. Barcza: J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1687 (1988)。
- 11) J. J. B. Nevado, J. A. M. Pulgarin, and M. A. C. Laguna: Talanta, 53, 951 (2000)。

Table 1 Operating conditions of analytical system

Column: Lichrosorb RP18 (5 μ m, 250mm × 4mm i.d.)
Mobile phase: Phosphate buffer (pH5.0) : Methanol 6:4 (containing 1mM β-cyclodextrin)
Flow rate: 1.0ml / min
Detector: UV-239nm, ATT: 2
Column oven: 25 °C
Injection size: 5 μ l

Table 2 Effect of content of methanol in phosphate buffer the retention time and peak height of GY

MeOH:buffer (%)	Retention time, min	Peak height
10	48.9	1.18×10^2
20	24.6	5.10×10^2
30	14.6	8.30×10^2
40	11.3	1.33×10^3
50	9.0	1.14×10^3

GY taken: 25ppm, β-cyclodextrin: 1mM

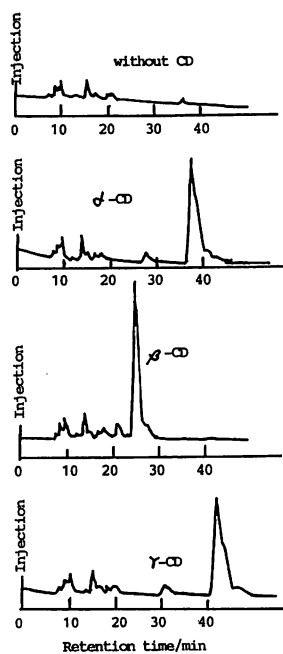


Fig. 1 Chromatograms of complexes of gardenia yellow and cyclodextrins.

Injection volume: 5 μ l; mobile phase: phosphate buffer (pH5.0) containing 1mM cyclodextrins-methanol (80/20, v/v); flow rate: 1.0ml/min; temperature: 25 °C; detector: UV at 239nm; gardenia yellow: 25ppm

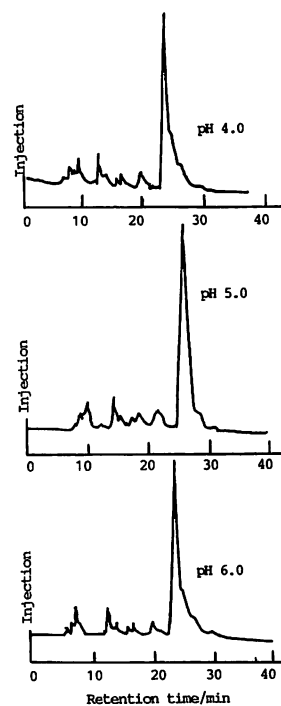


Fig.2 Chromatograms of complexes of gardenia yellow and cyclodextrin.

Injection volume: 5 μ l; mobile phase: phosphate buffer containing 1mM β-cyclodextrin-methanol (60/40, v/v); flow rate: 1.0ml/min; temperature: 25 °C; detector: UV at 239nm; gardenia yellow: 25ppm.

Effect of cyclodextrin as mobile phase additive on absorbance of Gardenia Yellow in HPLC

Takehiro KOJIMA and Ayaka HUSAMAE*

Department of life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science

1-1, Ridai-cho, Okayama 700-0005, Japan

**Harakawa Junior High School*

1-10-1, Terasaki-cho, Ooita 870-0137, Japan

(Received October 2, 2006; accepted November 6, 2006)

The effect of cyclodextrin(CD) as mobile phase additive on the absorbance of gardenia yellow were examined in the HPLC. Signal enhancement was observed for α -, β - and γ -CD. The measurements were performed at pH5.0 adjusted by adding 0.1M phosphate buffer solution and 1mM β -CD as mobile phase. The working curve was linear over the range 2 to 50ppm with a repeatability of 2.7%.

Keywords: Gardenia yellow; β -cyclodextrins; HPLC.