食品添加物の分析に関する研究 (第1報)
液状陰イオン交換体による食品中のタール色素の定量

外 海 泰 秀
国立衛生試験所大阪支所¹⁾

Studies on the Analysis of Food Additives. I.
Determination of Coal-Tar Dyes in Food with Liquid Anion Exchanger

Y ASUhide TONOGAI
National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch¹⁾

(Received December 7, 1972)

Studies on the extraction method for various kinds of dyes in a mixture with liquid anion exchanger are described. Organic layer, primene-JMT in benzen shaken with acetic acid, was used as the extraction agent, ammonia solution was used as the stripping agent, and 12 of coal-tar dyes in aqueous solution were quantitatively recovered. This method was used for the separation of natural dye in anchovy sauce and determination of a mixture of coal-tar dyes in strawberry jam, and satisfactory results were obtained.

緒 言

食品中のタール色素を定量するには、色素をタンパク質、脂肪、種々の塩類および糖類などから分離しなければならない。食品より色素を分離する手段として衛生試験法に採用されている毛糸染色法²⁾は、染色時における酸性条件下の加熱および色素溶液濃縮時におけるアルカリ性条件下の加熱により色素の分解を招くおそれがあり、³⁾ 分析の迅速性にも欠けるように思われる。

食品中の色素の定量法としてはポリアミド⁴⁾、セファデックス⁵⁾などを用いる方法が報告されているが、著者らは比較的分析操作の簡単な液状陰イオン交換体である高分子アミンを用いる方法について検討した。

高分子アミンを用いて原子核燃料であるウラン、トリウムを中心とする陽イオンの金属を錯陰イオンにかえて抽出する方法は多数報告⁶⁾されているが、陰イオンそのもの、すなわち、食品中のタール色素をイオン交換抽出する方法についての報告^{7,8)}は少なく、とくに蛋白性食

品についての分析例はほとんどみられない。著者らは天然色素も含めて多種類の色素を混合状態のまま同一条件で有機層へ抽出後、水層へ逆抽出して色素を定量する系統的な方法を求めるとともに、その結果を食品に応用して蛋白質に富んだアンチョビソース中の天然色素の分離および不許可色素を含むいちごジャム中の混合色素の定量を行ない、若干の知見をえたので報告する。

実 験 の 部

1. 試薬および装置 1.1 試薬—Primene-JMT : オルガノ K K 製、18—24ヶの炭素をもつ第1級のトリアルキルメチルアミンの同体混合物で、真空蒸留して80—160°の留分を用いた。

イオン交換溶液 : Primene-JMT 100 ml をベンゼン 900 ml に溶かし、1N 硫酸、1N 水酸化ナトリウムおよび水で洗い、水溶性の不純物を除いたのち、3%酢酸溶液 400 ml を加えてふりまぜ、分離した有機層を使用した。タール色素は国立衛生試験所標準品を用い、その他の

- 1) Location : No. 6, Hoenzaka-cho, Higashi-ku, Osaka (大阪市東区法円坂町 6)。
- 2) 日本薬学会編、衛生試験法注解、金原出版、1965, p. 249。
- 3) 竹下隆三、衛生化学、**16**, 293 (1970)。
- 4) J. Davidek, Z. Lebensmitt.-Untersuch. u. Forsch., **132**, 285 (1967)。
- 5) 竹下隆三、坂上米次、衛生化学、**15**, 72 (1962)。
- 6) 垣花秀武、中川元吉、化学の領域、**16**, 100 (1962)。
- 7) M. Dolinsky, C. Stein, J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, **45**, 767 (1962)。
- 8) C. Gjaichen, J. C. Moliter, J. Assoc. offic. Agr. Chemists, **46**, 1022 (1963)。

試薬は市販特級品を使用した。

1. 2 装置——分光光度計：島津光電分光光度計 QV-50型および日立自記分光光度計 EPS-3型をセル長 1 cm で使用した。

2. 実験操作法 2. 1 標準タール色素の回収率の測定法——0.002 % 色素溶液 5 ml, 飽和硫酸アンモニウム溶液 5 ml およびイオン交換溶液 10 ml を分液ロートにとり, 3 分間ふりまぜて色素を有機層へ抽出する。ついでこの有機層に 1N アンモニア溶液 5 ml を加え, ふりまぜたのち水層を分取する。さらに 1N アンモニア溶液 5 ml を加えて同様に操作し, 水層を先の水溶液に合わせたのち適度に希釈し, 分光光度計を用いて色素濃度を測定する。

2. 2 食品中の色素の定量法——食品を粉碎などして色素が抽出され易いように前処理した試料の適量に, イオン交換溶液 30 ml を加えふりまぜて色素を抽出する。ついで有機層に 1N トリクロル酢酸溶液を加えて附随的に抽出された不純物を除去したのち, 1N アンモニア溶液 5 ml を加えてふりまぜ, 色素を水層へ逆抽出して水溶液中の色素濃度を分光光度計を用いて測定する。

結果と考察

1. 標準色素の回収条件の検索

1. 1 抽出剤の検討 アミンとしては第 1 級アミンである Primene-JMT, 有機溶媒としてはベンゼン, アミンカチオンと塩を作る酸アニオンとしては酢酸を用いた。

色素の抽出率におよぼすイオン交換溶液中の酢酸濃度の影響を検討するため, アミン 100ml, ベンゼン 900ml および種々な濃度の酢酸 400 ml をふりまぜて作製したイオン交換溶液を用い, アマランサスとアシッドレッドの抽出率を測定して Fig. 1 に示した。

1—6 % の酢酸溶液を用いたとき色素の抽出率は良好で, それ以上酢酸の濃度を増すに従って, 抽出率は減少した。

また, 有機層中のアミンと酢酸の量的関係を調べるため, アミンのベンゼン溶液とふりまぜたあとの水層中の酢酸濃度を 1N 水酸化ナトリウム溶液で滴定して有機層に抽出された酢酸量を求めるとともに, 遊離のアミンを氷酢酸中 0.1N の過塩素酸溶液で非水滴定⁹⁾して平均分子量を求めた。

1 % 酢酸溶液を用いたときアミンと酢酸のモル比は, ほぼ 3 対 2, 3 % 酢酸溶液の場合は 1 対 1, 6 % 酢酸溶液の場合は 2 対 3 と思われる値をえた。また, 遊離アミンのベンゼン溶液では色素を全く抽出できないことから

Fig. 1. Effect of Acetic Acid on the Extraction of Dyes

Fig. 2. Effect of Various Salts on the Extraction of Acid Red

酢酸は色素の抽出に必要なではあるが, アミンと当量以上に多く用いるとかわって色素の抽出率を低下させることがわかった。

1. 2 塩析剤の検討 抽出剤として Primene-JMT のベンゼン溶液および酢酸から調製したイオン交換溶液を使用するときは, 抽出する際に塩析剤を加えないと層分離が悪く, 色素の抽出率もキサンテン系色素は特に低下したので, 種々な無機塩を抽出時に添加したときのアシッドレッドの抽出率を測定した。

Fig. 2 に示したように, 硫酸塩である硫酸ナトリウ

9) 鹿島 哲, 化学の領域増刊, 30, 45 (1958).

ムおよび硫酸アンモニウムを用いたときの色素の抽出率は良好で、塩酸塩である塩化ナトリウムおよび塩化アンモニウムを用いたときは、塩濃度を増すに従って色素の抽出率は著しく低下した。

この理由は、色素のイオン交換抽出に無機の陰イオンが妨害した結果であり、アミンカチオンへの結合力は、色素アニオンよりも塩素イオンの方が強いと思われるので、多量の塩類を含む食品中から色素を抽出する場合にはあらかじめ除去する必要がある。

1. 3 逆抽出剤の検討 有機層へ抽出された色素を水層へ移行させるための逆抽出剤として、1N 水酸化ナトリウム溶液を用いると逆抽出された色素が変色する。アンモニア水および塩化アンモニウムから調製した pH 10 の緩衝溶液を用いると、キサンテン系色素は水層へ移行せず、1N アンモニア溶液を用いて 2 回逆抽出操作をくり返すことにより全ての色素が水層へ回収された。

また、pH 10 の緩衝溶液でアゾ色素は逆抽出されるがキサンテン系色素は塩濃度の少ない 1N アンモニア溶液で 2 回目にしか逆抽出されないことから、アミンカチオンと結合する色素アニオンは、スルホン基をもつ色素よりもカルボキシル基をもつ色素の方が強いと推定された。

1. 4 色素の回収 以上のように求めた標準色素の回収条件は、Primene-JMT 100 ml, ベンゼン 900 ml に 3% 酢酸 400 ml を加えてふりまぜ、層分離した有機層をイオン交換溶液とし、抽出時に加える塩析剤としては飽和硫酸アンモニウム溶液を用い、色素の逆抽出には

1N アンモニア溶液を用いて 2 回ふりまぜ操作をくり返すのがよいとわかった。

この方法を用いてアゾ系、トリフェニルメタン系およびキサンテン系など 16 種類の色素の回収率を測定して Table I に示した。

キサンテン系色素およびアシッドバイオレット 6B は一部退色するため回収率はやや低い、他の色素については定量的な結果がえられた。

2. 酸性色素以外の色素の分離

TABLE I. Recovery of Coal-Tar Dyes in Aqueous Solution by Liquid Anion Exchanger Method

Coal-tar dyes	C. I. number	Recovery (%)
Poncean 3R	16155	100.9
Amaranth	16185	102.5
Ponceau SX	14700	102.5
Ponceau R	16150	100.8
New cocine	16255	102.0
Naphthol yellow S	10316	98.5
Tartrazine	19140	101.0
Sunset yellow FCF	15985	97.2
Erythrosine	45430	89.4
Eosine	45380	97.5
Phloxine	45410	81.0
Rose bengale	45440	42.1
Acid red	45100	102.8
Brilliant blue FCF	42090	96.9
Indigo carmine	73015	90.5
Acid violet 6B	42640	55.2

Fig. 3. Separation Diagram of Various Dyes by Liquid Anion Exchanger Method

天然色素、塩基性色素および油溶性色素が酸性色素と混在する場合には、Fig. 3 に示したように、検液 5 ml および飽和硫酸アンモニウム溶液 5 ml をイオン交換溶液 10 ml とふりまぜた有機層に 1N アンモニア溶液 5 ml を加え、ふりまぜて水層を分取し、さらにこの有機層に 1N 酢酸溶液 5 ml を加え、ふりまぜて水層を分取する。

銅クロロフィリンナトリウム、アンナットーなどの天然色素は有機層 (1) に抽出され、1N アンモニア溶液とふりまぜる際に分解した。酸性色素であるタール色素は水層 (2) に回収された。オーラミン、メチルバイオレットなどの塩基性色素はほとんど水層 (1) にとどまり、一部抽出された色素は有機層 (2) を酢酸溶液とふりまぜることにより水層 (3) に回収された。

また、有機層 (1) に抽出されたオイルレッド XO、オイルオレンジ SS などの油溶性色素は、当然のことながらアンモニア溶液および酢酸溶液いずれとふりまぜても水層へは移行せず、有機層 (3) にとどまった。このようにして種々な色素を系統的に分離することが可能となった。

3. 食品分析の実例

3.1 アンチョビソースから天然色素の分離

試料はひしこ、塩、トラガントゴムおよび着色料を含む蛋白質に富んだ食品からなる。毛糸染色法で分離した着色料は酸性色素と類似の挙動を示し、*n*-ブタノール、無水エタノール、1%アンモニア溶液 (6+2+3) を展開溶媒とするペーパークロマトグラフではスポットが原点にとどまり、色素の同定が困難であったが、本法を適用して色素を分離精製し、吸収スペクトルの形状から天然色素コチニール¹⁰⁾と同定した。

操作法は、試料 50 g を水 100 ml で 3 回洗浄したのち遠心分離し、残渣に 1%アンモニア水を含む 70%アルコール溶液 50 ml を加え色素を溶出する。この溶出液を酢酸で中和したのち、イオン交換溶液 30 ml を加え 3 分間ふりまぜて色素を有機層へ抽出し、ついで 2.2 の定量操作法に従って色素を水層へ逆抽出する。有機層および水層の可視部吸収スペクトルを測定し、それぞれ Fig. 4 および 5 に示した。なお、市販コチニールを標準物質とし、試料と同様に操作したものを対照とした。

Fig. 4 に示したように、試料を前処理せずにイオン交換溶液とふりまぜても、試料中に多量含まれる食塩のために色素のイオン交換抽出が妨害され、色素は全く抽出されない。一方、試料を前処理したのち抽出した有機層は、標準色素とほぼ類似の吸収スペクトルを示したが

Fig. 4. Absorption Spectra of Cochineal extracted into Organic Layer

A : dye extracted without pre-treatment
B : dye extracted with pre-treatment
C : standard cochineal extracted

Fig. 5. Absorption Spectra of Cochineal recovered into Aqueous Layer

A : dye extracted with extraction once
B : dye extracted with extraction twice
C : standard cochineal recovered

不純物もかなり同時に抽出されていることがわかった。

Fig. 5 に示したように、1N アンモニア溶液で水層へ転溶した色素の吸収スペクトルは、 $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 520 mμ および 560 mμ で標準色素と一致を示したので、試料中にはコチニールが含まれていることを確認した。

また、色素を抽出した有機層を 1N トリクロル酢酸溶液とふりまぜると、色素は水層へ移行せずに白色の沈殿が生じた。この沈殿はニンヒドリン反応、キサントプロテイン反応陽性であることから、タンパク質の一部もイオン交換溶液により有機層へ抽出されていることがわかった。

なお Fig. 5 の A より B が標準色素の吸収スペクトルに近いことから、色素の抽出回収操作をくり返すことにより色素の精製度が向上した。また、試料から標準コチニールの添加回収率は 62% で低い値となった。この原因は試料を 1N アンモニア溶液とふりまぜる際に一部分解したり、沈殿とともに除去されるためと思われる。

10) 厚生省編, 日本公衆衛生協会, 衛生検査指針 (Ⅲ), 食品衛生検査指針 (Ⅱ), 着色料検査法, 1963, p. 70.

3. 2 いちごジャムから混合色素の定量 蔗糖, 繊維, 炭水化物などからなる市販いちごジャム中の混合色素の定量を行なった.

操作法は, ジャム 15 g に水 10 ml を混和したのちイオン交換溶液 30 ml を加えてふりまぜ, 色素を抽出する. 水溶性タール色素とともに天然色素や食品成分の一部も有機層へ抽出されるので, 附随的に抽出された不純物を除くため, 有機層に 1N トリクロル酢酸溶液 5 ml を加えふりまぜる.

このときタール色素は逆抽出されず, まず不純物のみが水層に析出するので除去し, 有機層を水 10 ml で洗ったのち 1N アンモニア溶液 5 ml とふりまぜる操作を 2 回くり返し, 分取した水層を合わせて検液とする.

検液をペーパークロマトグラフで展開して, ポンソー R およびニューコクシンの含有されていることを確認するとともに, 展開した濾紙の両色素スポットを 1% アンモニア水で溶出し, それぞれの吸光度を測定して両色素の含有量を求め Table II に示した.

試料 A および B には, ポンソー R とニューコクシンがそれぞれ約 1 対 6 および 1 対 1 の割合で含まれていることがわかった. また, いちごジャムからポンソー R およびニューコクシンの添加回収率は, それぞれ 82.0—85.8 % であった.

総 括

天然色素も含めて多種類の色素を混合状態のまま同一条件で有機層へ抽出し, ついで水層へ逆抽出して定量する系統的な方法を求めた.

TABLE II. Determination of Coal-Tar Dyes in Strawberry Jam

Coal-tar dyes	Absorbance ^{a)}	Content (%)
Standard ponceau R (0.001%)	0.435	—
Standard new coccine (0.001%)	0.352	—
Poncenau R in sample A	0.174	0.0008
New coccine in sample A	0.880	0.0050
Ponceau R in sample B	0.718	0.0033
New coccine in sample B	0.563	0.0032

a) Solution was 200 ml.

抽出剤としては Primene-JMT, ベンゼンおよび 3% 酢酸を 1 対 9 対 4 の割合でふりまぜた有機層を用い, 逆抽出剤としては 1N アンモニア溶液を用い, 2 回ふりまぜ操作をくり返すことにより 12 種類の色素を定量的に回収できた.

また, 前処理した食品をイオン交換溶液とふりまぜると, 水溶性タール色素とともに食品成分の一部も有機層へ抽出されて妨害するので, 1N トリクロル酢酸溶液を用いて除去し, 1N アンモニア溶液で色素を水層へ回収することにより, 色素の分離精製が可能となった.

この方法を用いて蛋白質に富んだアンチョビソース中の天然色素の分離, 不許可色素を含むいちごジャム中の混合色素の定量を行ない, ほぼ満足すべき結果をえた.

謝辞 この報告をするに際し, 種々御教示下さいました志村 博博士, 野村幸雄博士に感謝致します.