〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
27 (1) 50-55 (1981)

ポリアミド薄層クロマトグラフィーによる食用天然色素の分離・検出¹⁾

神田 宏,^{2a)} 藤 由美,^{2b)} 佐藤英一,^{2c)} 山下多恵子,^{2d)} 竹下隆三^{2e)}

横浜市食品衛生検査所,^{2a)} 江戸川区小岩保健所,^{2b)} 北海道室蘭保健所,^{2c)}

関東学院女子短期大学,^{2d)} 国立公衆衛生院^{2e)}

Detection of Some Natural Dyes by Polyamide Thin-Layer Chromatography

HIROSHI KANDA,^{2a)} YUMI WARABI,^{2b)} EIICHI SATO,^{2c)}

TAEKO YAMASHITA,^{2d)} and RYUZO TAKESHITA^{2e)}

Yokohama Public Food Inspection,^{2a)} 1, Yamanouchi-cho, Kanagawa-ku,

Yokohama, Edogawa-ku Koiwa Public Health Center,^{2b)} 3-23-3, Higashi-

koiwa, Edogawa-ku, Tokyo, Hokkaido Muroran Public Health Center,^{2c)}

9-11, Saiwai-cho, Muroran, Kantogakuin Women's Junior College,^{2d)}

4834, Mutuura-cho, Kanazawa-ku, Yokohama, and The Institute of

Public Health,^{2e)} 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo

(Received September 16, 1980)

The separation and detection of some natural dyes comprising 12 water soluble and 8 non-water soluble dyes were investigated by thin-layer chromatography by using polyamide as an adsorbent. Polyamide 11 F₂₅₄ layers and polyamide layer sheets were used as plates, two series of water and non-water soluble dyes being developed with different solvent systems, respectively.

The solvent systems for the separation of non-water soluble dyes were *n*-hexane, *n*-hexane-benzene-acetic acid (6:3:1) and acetone-acetic acid (19:1). Especially the development with *n*-hexane was most suitable for the separation of β -carotene from paprika extract. When developed with isopropanol-formic acid-water (7:1:3), all water soluble dyes were separated. In the development, dyes containing anthocyanin derivatives such as grape skin and purple corn extracts were observed as slightly overlapped spots, showing that the dyes were composed of many compounds.

Keywords—natural dye ; detection ; polyamide ; thin-layer chromatography ; separation

緒 言

タール色素の安全性について再評価がなされ、その安全性に疑問がもたれるものが見出されるにつれて、消費者の間でタール色素をはじめとし、食品添加物全般について不安が抱かれるようになった。

これに伴って食品の着色において表示基準のない天然色素の使用が活発となり、天然色素の需要は年々増加の傾向をたどっている。一方、天然色素は原料としては果実、根、花、葉など植物性のもののほか昆虫、微生物などが用いられ、種類においても年々増加の傾向にある。

天然色素は化学的合成品と異なり原料（種類、成育状態、採取時期、採取場所など）、製造あるいは加工方法などにより製品が一定せず、単一な組成とする精製手段

をとらない限り色調は変動する。天然色素製品の色調管理さらには各種製品に添加使用したのちの色調保持を狙いとして合成タール色素が混合使用されることが予想される。

このように天然色素の原料ならびに製造方法の選択から色素製品と色素添加剤ならびに食品の管理上色素の分析が行なわれるが、色素の組成を知るには薄層クロマトグラフィーが極めて有用な分析手法となる。

天然色素の薄層クロマトグラフィーにおいては一般にシリカゲル^{3,4)}またはセルロース³⁻⁵⁾が担体として利用されているが、これら2者の担体と物質の分離原理において異なる担体ポリアミドを用いることにより各種天然色素の組成をより明確に把握できるものと考え、分離条

TABLE I. Natural Dyes Tested

No.	Water soluble dye	No.	Non-water soluble dye
1	Carthamin (Safflower R ^{c)})	I	Riboflavin ^{a)}
2	Lac colour (Laccaic acid ^{a)})	II	Turmeric extract (Curcumin ^{a)})
3	Cochineal extract (Carminic acid ^{a)})	III	Norbixin (Annatto "San-Ei" ^{b)})
4	Beet red (Betanin ^{a)})	IV	Bixin (Oil-soluble annatto T-2 ^{b)})
5	Crocin (Powdered San Yellow No. 3 ^{b)})	V	Paprika extract (Capsanthin ^{a)})
6	Safflower yellow (San Yellow No. 2 ^{b)})	VI	β -Carotene ^{a)}
7	Enzyme-treated geniposide (Gardenian blue ^{d)})	VII	Chlorophyll ^{a)}
8	Monascus colour (Sun Red MA ^{b)})	VIII	Chlorophyll copper complex ^{e)}
9	Monascus colour (Sun Red M ^{b)})		
10	Grape skin extract (Enocyanin ^{c)})		
11	Grape skin extract (Sun Red No. 2N ^{b)})		
12	Purple corn extract (Sun Red No. 5 ^{b)})		

a) Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.

b) San-Ei Chemical Industries.

c) Daiwa Dye-stuff Manufacturing Co., Ltd.

d) Taito Co., Ltd.

e) Nisshin Chemical Co., Ltd.

件を検討した。

実験方法

試料および試薬 1. 天然色素——Table I に示す市販食用水溶性色素12種および非水溶性色素8種（銅クロロフィルは天然色素ではないがクロロフィル関連物質なので、ここに含めた）を対象とした。

2. 色素溶液——水溶性色素（プロピレングリコールを含有する液状試料を除く）のうち、カーサミンおよびラック色素はエタノールに溶かし、そのほかのものは水に溶かし、それぞれ 10—100 mg/ml の溶液を調製した。

非水溶性色素（プロピレングリコールを含有する液状試料を除く）のリボフラビン、ウコン抽出物色素およびパプリカ抽出物色素はエタノールに、ビキシンは酢酸エチルに、 β -カロチン、クロロフィルおよび銅クロロフィルはアセトンに溶かし、水溶性色素と同様な濃度に調製した。

一方、プロピレングリコールを含有する液状試料、モナスカス色素およびノルビキシンは遠心分離管に試料を入れ、これに試料の約50倍量の酢酸エチルを加え、栓をして振り混ぜたのち、遠心分離し、上澄液を捨てたのち、エタノールに溶かして同様の濃度の溶液を調製し、色素溶液とした。

3. タール色素溶液——Table II に示す食用タール色素（国立衛生試験所標準品）11種の 0.1 % 水溶液を用いた。

4. 薄層クロマトグラフィー用プレート——DC-Alu-folien Polyamide 11 F₂₅₄, 20×20 cm (Merck 社製) と Polyamide Layer Sheets, 15×15 cm (Cheng Chin 社

TABLE II. Coal Tar Dyes Tested

No.	Compound
a	Amaranth (Food Red No. 2)
b	Erythrosine (Food Red No. 3)
c	New Coccine (Food Red No. 102)
d	Phloxine (Food Red No. 104)
e	Rose Bengale (Food Red No. 105)
f	Acid Red (Food Red No. 106)
g	Tartrazine (Food Yellow No. 4)
h	Sunset Yellow FCF (Food Yellow No. 5)
i	Fast Green FCF (Food Green No. 3)
j	Brilliant Blue FCF (Food Blue No. 1)
k	Indigo Carmine (Food Blue No. 2)

製) の 2 種のプレートを用いた。

装置 1. 展開槽：ハンギング式薄層クロマトグラフィー用展開槽 204 型（東洋科学産業社製）

2. 紫外線検出器：暗箱型紫外線検出器（2536 および 3650 Å を照射できる）（入江製作所製）

操作 薄層プレートの下端から 2 cm の位置に色素溶液をそれぞれ 1 cm 間隙にキャピラリーを用いてスポットした。展開溶媒を入れた展開槽内壁に紙を巻き、薄層プレートを溶媒に浸漬させずに約 20 分間懸吊させたのち、展開槽の蓋を開けずに薄層下部を溶媒に浸漬させ、10 cm 展開した。展開後、自然光下および紫外線照射下で観察した。

結果および考察

ポリアミド薄層における水溶性天然色素の挙動

水溶性色素についてメタノールを用いて展開したとこ

ろ、各色素はポリアミドに対してかなり強く親和し、原点付近にとどまった。さらにアセトンによる展開ではカーサミン、ラック色素およびコチニール抽出物色素は原点付近にとどまったが、その他の色素は原点よりテーリングしながら溶媒先端まで展開した。さらにメタノール・水系およびメタノール・酢酸・水系により展開を試みたが、大部分の色素は原点付近に、クロシンおよびムラサキトウモロコシ抽出物色素のみが R_f 値 0.8 付近までテーリングするパターンを示した。

そこで色素とポリアミドとの結合を弱めるために、メタノール・酢酸・水系における酢酸の代りにギ酸を用いた溶媒系で展開を行なった。この系による展開では複合色素であるカーサミン、ラック色素、コチニール抽出物色素、サフラワイエローおよびアントシアン系色素は、いくつかの成分からなっていることを示す濃淡の異なるいくつかのスポットが観察され、これらの色素の検出が容易であった。

この系におけるギ酸の割合が色素間の分離にどのように影響するかを調べたところ、ギ酸割合を多くした展開溶媒、メタノール・ギ酸・水 (6:2:5) による展開では各色素成分のスポットがやや不明確となり、またギ酸割合を少なくした展開溶媒、メタノール・ギ酸・水 (6:0.5:5) ではアントシアン系色素が溶媒先端方向に少しずつ幅広くなってテーリングしたパターンを示した。

さらにメタノール・ギ酸・水系のうち、メタノールの代りにエタノール、イソプロパノールあるいはブタノールを用いてパターンの変化を調べたところ、イソプロパ

Fig. 1. Effect of Water Content in Solvent Systems, Isopropanol-Formic Acid-Water (A:1:B) on Distribution of Enocyanin

Layer: polyamide layer sheet (Cheng Chin).

ノールの場合が各スポットについて最も纏まりが良好であった。

水溶性色素の分離に適する溶媒系の選択の過程でアントシアン系色素の構成成分が明確に分離できる条件は他の水溶性色素の分離にも適することが予想された。そこでその条件を見出すためグレープスキンの抽出物色素 (エノシアニン) を選び、溶媒組成の変化と色素のパターンとの関係を調べた。Fig. 1 に示すようにイソプロパノール・ギ酸・水の割合が 9:1:1 のときはスポットは原点より R_f 値 0.6 まで分布し、各スポットはやや縦長隋円形を示し、スポット相互の分離は悪く、特に R_f 値 0.4—0.6 までは各スポットはテーリングの様相を示した。溶媒組成 7:1:3 である溶媒を用いて展開したときは構成成分のスポットは良く纏まる。さらに展開溶媒中の水の量を増加し、その割合を 6:1:4 として展開すると、7:1:3 による展開で得られたクロマトグラムにおける R_f 値 0.55—0.8 に分布するスポットおよび原点付近にあったスポットがそれぞれ R_f 値 0.5—0.7 および 0—0.3 にテーリングして集められたパターンを示した。

グレープスキンの抽出物色素の構成成分を分離するのに最も適した溶媒系イソプロパノール・ギ酸・水 (7:1:3) を用いて水溶性色素すべてとリボフラビンを展開し、そのクロマトグラムを得た (Fig. 2)。

Fig. 2. Chromatograms of Natural Water-soluble Dyes on Polyamide Layer

1: carthamin red, 2: laccaic acid, 3: carmic acid, 4: betanin, 5: crocin, 6: safflower yellow, 7: gardenian blue, 8: monascus dye (Sunred MA), 9: monascus dye (Sunred M), 10: enocyanin, 11: enin, 12: cyanin, 13: shisonin. Layer: polyamide layer sheet (Cheng Chin). Solvent system: isopropanol-formic acid-water (7:1:3).

カーサミンはポリアミドに対して強い親和性を持ち、原点にとどまり、ラック色素とコチニール抽出物色素はやや展開され、類似の色調を有する R_f 値の接近した 2, 3 のスポットが観察された。さらにビートレッド、クロシン、サフラワイエロー、クチナシ青色素、モナスカス色素が順次高い R_f 値を示した。ビートレッドは紫がかった桃色のスポットを形成するが、短時間で褪色した。これは恐らく展開溶媒中のイソプロパノールが薄層

から揮散するにつれて残存するギ酸により影響を受けたものと考えられる。黄色色素であるクロシン、サフラワイエローおよびリボフラビンに近似の R_f 値を示すが、サフラワイエローは濃淡の異なるスポットを形成することで他のものと区別できるほか、3者のスポットが紫外線照射下で挙動が異なることで区別できる。すなわち短波長 (2536 Å) 照射下でリボフラビンは強い蛍光を示すが、他のものは蛍光を示さず、また長波長 (3650 Å) 照射下でリボフラビンは強い蛍光を、サフラワイエローは弱い蛍光を示すのに対し、クロシンは蛍光を示さない。

クチナシ青色素とモナスカス色素 サンレッド MA とは、それぞれやや隋円形のスポットを形成し、ほぼ同一 R_f 値を示し、両者の分離は不可能であったが、両者のスポットの色調が異なるので、それぞれ単独の場合には区別が可能である。

モナスカ色素のサンレッド M および MA は製法における抽出溶媒が異なるためか、構成成分に差のあることが観察された。

グレープスキンの抽出物色素 (エノシアン、およびエニン) およびムラサキトウモロコシ抽出物色素 (シアニン) は原点から R_f 値 0.8 付近までそれぞれ濃淡の異なるいくつかのスポットがやや重なりながら連なるパターンを示し、アントシアン系色素の特徴パターンとして検出に役立つ。これら色素のうちムラサキトウモロコシ抽出物色素は紫外線照射下 (3650 Å) けい光を発し、他の色素と区別できる。

ポリアミド薄層におけるタール色素の挙動

天然色素製剤をタール色素製剤と区別したり、天然色素を食品から分離し、検出する際に水溶性タール色素がどのように天然色素の検出を妨害するかが問題となる。そこで現在食品添加物に指定されているタール色素11種について天然色素の検出への影響を調べた。すなわち、水溶性天然色素の展開条件、イソプロパノール・ギ酸・水 (7:1:3) を展開溶媒とし、2種のポリアミド薄層を用いて分離を観察した。各色素の R_f 値を Table III に示す。これら色素のうち、食用赤色3号、104号、105号および106号、食用緑色3号および食用青色1号についてはクロマトグラムから副色素が存在することが知られた。

Polyamide layer sheet を用いたときには11種のタール色素すべてのスポットは、クチニール抽出物色素について同一条件で展開したときのスポットより R_f 値は低く、水溶性天然色素のうちラック色素およびカーサミンを除けば容易に検出できる。ラック色素については食用赤色105号および106号と近似の R_f 値を示すが、ラック色素は色調が異なるので区別は困難ではない。カーサミンについても原点にとどまり、食用赤色2号および102号とほぼ同一 R_f 値を示すが、色調を異にし、またカーサミンは紫外線照射下けい光を発するので、それぞれ単独に存在するときは同様検出は困難でない。

Polyamide 11 F₂₅₄ 薄層を用いたときは、食用赤色106号、食用緑色3号および食用青色1号が R_f 値が高く、テーリングスポットを形成するので、天然色素のあるものについて検出の妨害となる。

ポリアミド薄層における非水溶性天然色素の挙動

TABLE III. R_f Values of Coal Tar Dyes on Polyamide Layers under Development Condition of Natural Water Soluble Dyes

Compound	R_f value	
	Polyamide layer sheet	Polyamide F 11 ₂₅₄
Amaranth	0	0
Erythrosine	0.12, 0.22 ^{a)}	0, 0.10 ^{a)}
New Coccine	0	0
Phloxine	0.22, 0.33 ^{a)}	0
Rose Bengale	0.16, 0.28 ^{a)}	0, 0.02 ^{a)}
Acid Red	0.17, 0.09 ^{a)}	0.8, 0.45—0.8 ^{a, b)}
Tartrazine	0.02	0
Sunset Yellow FCF	0.03	0
Fast Green FCF	0.03, 0.12 ^{a)}	0.1—0.4, ^{b)} 0.4—0.65 ^{a, b)}
Brilliant Blue FCF	0.05, 0.17 ^{a)}	0.15—0.55, ^{b)} 0.55—0.85 ^{a, b)}
Indigo Carmine	0	0

a) Concomitant dye.

b) Tailing spot.

Solvent system: Isopropanol-formic acid-water (7:1:3).

Fig. 3. Chromatograms of β -Carotene and Capsanthin on Polyamide Layer

Layer: polyamide layer sheet (Cheng Chin),
solvent system: *n*-hexane.

非水溶性天然色素8種について、まず展開溶媒としてヘキサンを用いて展開したところ、 β -カロチンのみが展開され、パプリカ抽出物色素の主要成分が原点よりわずかに展開するパターンを示し、他の非水溶性色素は原点にとどまることが観察された (Fig. 3)。したがって、この展開条件において β -カロチンおよびパプリカ抽出物色素の検出が可能となった。

ついでヘキサン、ベンゼン、酢酸エチル、アセトンおよびイソアミルアルコールにそれぞれ酢酸を5%および10%添加した展開溶媒により展開を試みた。各色素の薄

層上の分布を Fig. 4 に示す。

これら系による展開のうち、ヘキサン-酢酸 (9:1) による展開では β -カロチンおよびパプリカ抽出物色素が他の非水溶性色素と明確に区別ができ、ヘキサンによる展開パターンと合わせて両者の色素の検出を容易にすることができる。ベンゼン-酢酸系ではリボフラビン以外の色素が展開されたが、ビキシンおよびノルビキシンの分離も悪く、その他の色素の分離についても満足すべき結果を与えなかった。そこでこの系にヘキサンを加えた溶媒、ヘキサン-ベンゼン-酢酸 (6:3:1) により展開した。そのクロマトグラム (Fig. 5 (a)) において β -カロチンおよびパプリカ抽出物色素は溶媒先端近くに移動して両者の検出には適さないが、ビキシンおよびノルビキシンは他の色素と挙動を異にし、検出が容易であった。実験に用いたビキシンはノルビキシンを含んでいることもそのパターンから知られた。またクロロフィルおよび銅クロロフィルは原点近くから溶媒先端近くまでスポットが連なって分布し、いくつかの構成成分からなっていることを示すパターンが得られた。

さらに展開溶媒としてアセトン-酢酸 (19:1) を用いるときは Fig. 5 (b) に示すようにウコン抽出物色素がかなり移動し、リボフラビンおよびノルビキシンとも分離し、ウコン抽出物色素の検出が可能となった。また、この展開においてはビキシンおよびノルビキシン相互の分離も良好である。したがってヘキサン・ベンゼン・酢酸 (6:3:1) による非水溶性色素の展開において色素の鑑別が難しいときに、この系による展開を行ない、パ

Fig. 4. Distribution of Natural Oil-soluble Dyes on Polyamide Layers

●-●: riboflavin, ○-○: curcumin, ■-■: norbixin,
□-□: bixin, ▲-▲: capsanthin, △-△: β -carotene,
x-x: chlorophyll copper complex.
Layer: polyamide layer sheet (Cheng Chin).

Fig. 5. Chromatograms of Natural Oil-soluble Dyes on Polyamide Layers

I: riboflavin, II: curcumin, III: norbixin, IV: bixin, V: capsanthin,
 VI: β -carotene, VII: chlorophyll, VIII: chlorophyll copper complex,
 VIII: sodium salt, layer: polyamide layer sheet (Cheng Chin).

ターンを比較すると便利であり、特にリボフラビン、ウコン抽出物色素、ビキシンおよびノルビキシンが同時に使用されているときに、それぞれを検出するのに有効な展開条件である。

ポリアミド薄層担体について

天然色素の薄層クロマトグラフィーにおいて、担体として Polyamide layer sheet と DC-Alufolien Polyamide 11 F₂₅₄ の2種のプレートを用いた。この両者担体による天然色素の展開パターンを比較すると、前者を用いたときの方が各色素のスポットの纏まりが良好であり、特にアントシアニン系色素などの複合色素の場合に各構成成分のスポットの纏まりが良く、スポットの連なりが明確に観察された。また後者の薄層を用いたとき、展開後薄層プレートを放置するとコチニール抽出物色素およびラック色素は赤色から青紫色に変化し、アントシアニン

系色素も紫色から青色に変化する。この現象は展開溶媒中のイソプロパノールが揮散するに伴って薄層上の pH が変化したことによると考えられ、それぞれの色素の特性として検出に役立つ。一方、Polyamide layer sheet ではこのような現象は観察されず、長時間色素の色調が保持される。

一方、水溶性天然色素の検出にあたり、共存するタール色素との区別が問題となるが、水溶性天然色素の分離条件においてタール色素の分布が2種薄層間で多少相異なる。Polyamide 11 F₂₅₄ を用いたときは前述のように食用赤色 106 号、食用緑色 3 号および食用青色 1 号がかなり展開され、しかも後者2色素はテーリングが大きいので天然色素の検出を妨害することがある。したがってこれらタール色素を含む可能性があるときは Polyamide layer sheet を用いることが望ましい。

引用文献および注

- 1) 第35回食品衛生学会学術講演会，静岡，1978年12月発表。
- 2) Location: a) 1, Yamanouchi-cho, Kanagawa-ku, Yokohama (横浜市神奈川区山の内町1); b) 3-23-3, Higashi-koiwa, Edogawa-ku, Tokyo (東京都江戸川区東小岩3-23-3); c) 9-11, Saiwai-cho, Muroran (室蘭市幸町9-11); d) 4834, Mutuura-cho, Kanazawa-ku, Yokohama (横浜市金沢区六浦町4834); e) 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo (東京都港区白金台4-6-1)。
- 3) 日本薬学会編，衛生試験法注解，金原出版，東京，1980，p. 374。
- 4) 荻原 勉，野沢竹志，平田恵子，天川映子，大石充男，岡 博磨，食衛誌，21，207 (1980)。
- 5) J. Sherma, J. Chromatog., 52, 177 (1970)。