「かに風かまぼこ」中の天然色素の検出^{*1}

(昭和 57 年 7 月 13 日受理)

平田 恵子^{*2} 荻原 勉^{*2} 天川 映子^{*2}
大西 和夫^{*2}

Detection of Natural Dyes in Kamaboko Prepared as Imitation Crab (Analytical Methods for Natural Dyes in Foods II)

Keiko HIRATA, Tsutomu OGIWARA, Eiko AMAKAWA and Kazuo OHONISHI

(Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
16-25, Shibazakicho 3-chome, Tachikawa-shi, Tokyo, Japan)

A method for the extraction and identification of natural dyes in Kamaboko (fish paste products) prepared as imitation crab was developed.

A sample (5 g) cut into small pieces was incubated with sodium dodecyl sulfate (0.3 g) and 50 ml of 0.2% protease solution (Pronase P) at 37°C for 2 hours, then the mixture was centrifuged. The supernatant fluid was extracted with ether. DEAE-Sephadex was added to the lower aqueous layer, and this mixture was stirred for 10 min. The DEAE-Sephadex was filtered off and washed with water and 0.1% hydrochloric acid, then the dyes were eluted with 5% sodium chloride solution-ethanol (1:3). The eluate was evaporated to dryness on a steam bath and the dyes were extracted with ethyl acetate from the residue. The extract was filtered, the solvent was evaporated off and the residue was dissolved in ethyl alcohol.

The dyes from the ether and aqueous layers were identified by thin-layer chromatography. The recoveries of monascus pigments, cochineal, laccaic acid and norbixin added to Kamaboko prepared as imitation crab were over 80%.

The method was applied for the detection of natural dyes in commercial imitation crab products prepared from Kamaboko, and monascus pigments, laccaic acid and norbixin were found.

(Received July 13, 1982)

Key words: 天然色素 natural dye; かまぼこ fish paste products (kamaboko); ドデシル硫酸ナトリウム sodium dodecyl sulfate; タンパク分解酵素 protease; DEAE-セファデックス A-25 DEAE-Sephadex A-25; 薄層クロマトグラフィー thin-layer chromatography

天然色素を用いた食品が増加するに及んで使用基準の設定及び試験法の確立が急がれている。しかし、現段階では食品中の天然色素の分析法について報告した例は少

ない^{1),2)}。

著者らは前報であめ、清涼飲料水中の水溶性天然色素の検出法を報告³⁾したが、今回は魚肉ねり製品特に、「かに風かまぼこ」の天然色素の検出法について検討を行った。当かまぼこに使用されている天然色素はタンパク質への染着性が強い^{4),5)}ため常法^{4),5)}では抽出が難しく同定

^{*1} 食品中の天然色素の分析法 (第 2 報)

^{*2} 東京都立衛生研究所多摩支所: 東京都立川市柴崎町 3-16-25

は困難である。

Boley ら⁶⁾は食品中の合成着色料の抽出に酵素を用いた方法を、鈴木ら⁷⁾は分解酵素及び界面活性剤を用いて皮膚から定量的に色素を抽出する方法についてそれぞれ報告している。

そこで我々は、使用が予想される⁸⁾ノルビキシン、モナスカス色素、コチニール、ラッカイン酸を添加した「かに風かまぼこ」を対象にタンパク分解酵素及び界面活性剤の併用による抽出法を検討し、更に、本法を市販品に適用したところ良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 装置

振とう恒温水槽：大洋工業(株)製の恒温振とう機 R-300.

スターラー：東洋科学産業(株)製 MS-16B 型

2. 試薬

1) 溶出溶媒：5% 塩化ナトリウム溶液-エタノール (1:3) 混液

2) 展開溶媒：①クロロホルム-酢酸エチル (1:1) ② *n*-ブタノール-水 (9:1) ③ *n*-ブタノール-酢酸-水 (3:1:1) ④アセトン-0.5 *N* 塩酸 (1:3).

以上の試薬はすべて市販特級品を用いた。

3) パンクレアチン、パペイン及びトリプシン：和光純薬工業(株)製。

4) 0.2% プロナーゼ P 溶液：科研化学(株)製のプロナーゼ P (750×10³ チロジン単位/g) 1 g を水 500 ml に溶かした。

5) ドデシル硫酸ナトリウム (以下 SDS と記す)：東京化成工業(株)製

6) 吸着剤：Pharmacia Fine Chemicals (社) 製の DEAE-セファデックス A-25 を 0.5% アンモニア溶液で一夜膨潤させ、水洗して中性とした後 0.5 *N* 酢酸溶液中に一夜放置後、中性となるまで水洗し、使用時に吸引ろ過して用いた。

7) 薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と記す) 用プレート：①シリカゲルプレートは TLC 用ガラス板 (10×20 cm) に和光純薬工業(株)製ワコーゲル B-0 及び B-5 を 250 μm の厚さに塗布し、B-0 は 100° で B-5 は 110° で 30 分間乾燥したものを用いた。②セルロースプレートはフナコシ薬品(株)製微結晶セルロース「アビセル SF」プレート 5×20 cm 又は 10×20 cm を用いた。

8) 天然色素標品：①モナスカス色素は、三栄化学工業(株)製のサンレッド MR (粉末状) ②ノルビキシンは三栄化学工業(株)製のサンオレンジ No. 1, (粉末状) ③コチニールはアイゼン(株)製のコチニールレッド(液状) ④ラッカイン酸は東京田辺製薬(株)製のキドレニン S (液状)。

3. 市販試料

都内で市販されている「かに風かまぼこ」25検体を用いた。

4. 色素添加かまぼこ

魚肉のすり身にデンプン、食塩、卵白、みりん、砂糖、化学調味料及び保存料等を添加した「かに風かまぼこ」の半製品をかまぼこ製造工場より入手し、その 5 g ずつに各種天然色素液 0.1~0.3 ml を塗布し、45° 1 時間加熱後、85° 20 分間加熱処理して一夜冷蔵したものを用いた。

かまぼこに添加した天然色素液としては、モナスカス色素は 15 mg/ml の水溶液、コチニール及びラッカイン酸は 5% 水溶液、ノルビキシンは 30 mg/ml の水-エタノール (1:1) 溶液をそれぞれ調製した。

5. 試験溶液の調製

i. 色素の抽出

試料の着色部分 5 g を細切して 300 ml 容三角フラスコにとり、SDS 0.3 g 及び 0.2% プロナーゼ P 溶液 50 ml を加え、旋回振とう恒温水槽中 (150 rpm) で 37° 2 時間の反応後、遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) し、その上清液を色素抽出液とした。なお、その時残留物が着色している場合は、残留物に SDS 0.2 g 及び水 30 ml を加え上記同様 37° 2 時間の反応後、遠心分離し、その上清液を先の抽出液に合わせた。

ii. 色素抽出液の精製

色素抽出液にエーテル 20 ml を加え、軽く振り混ぜて 3 回色素を抽出し、得られたエーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ガラス綿 (繊維径 2~4 μm) でろ過した。ろ液は減圧濃縮し残留物にエタノール 0.5 ml を加え試験溶液 (1) とした。つぎに下層の水溶液に DEAE-セファデックス A-25 を 5 g 加え、スターラーで 10 分間攪拌し色素を吸着させた。ついでガラスフィルター (3G4) で吸引ろ過しフィルター上のセファデックスを水 150 ml で洗い、さらに 0.1% 塩酸溶液 80 ml を用いて樹脂との接触時間を 5 分間以上保ちながら洗った。つぎに 5% 塩化ナトリウム-エタノール (1:3) 混液で色素を溶出し、最初の 3 ml をすべて全量 40 ml とした。

この色素溶出液は、沸騰水浴上で短時間に蒸発乾固した後、酢酸エチル 5 ml で 2 回残留物から色素を抽出しガラス綿を用いてろ過した。ろ液は減圧濃縮し残留物にエタノール 0.5 ml を加え試験溶液 (2) とした。

分析操作についての概略は Scheme 1 に示した。

6. 薄層クロマトグラフィーによる定性分析

標準色素液及び試験溶液 (1), (2) をそれぞれ TLC 用プレートの下端より 2 cm の位置に塗布し 12 cm 展開後、風乾して得られたクロマトグラムを観察した。

試験溶液 (1) については、シリカゲルプレート (B-0) で展開溶媒①, ②を用いた。

Scheme 1. Analytical procedure for natural dyes in Kamaboko prepared as imitation crab

試験溶液 (2) については、シリカゲルプレート (B-5) で展開溶媒③を、セルロースプレートでは展開溶媒④を用いた。

なお、標準色素液は、色素標品を試料と同様に処理して得た溶液を用いた。

実験結果

1. 抽出条件の検討

1.1 タンパク分解酵素

タンパク分解酵素としてパバイン⁶⁾、パンクレアチン⁹⁾、トリプシン、プロナーゼ P^{7),9),10)}を用い、それぞれを水 50 ml に加え酵素溶液を調製した。

細切したモナスカス色素添加かまぼこ 5g にそれぞれの酵素溶液を加え、37° 2 時間旋回振とう恒温水槽中で反応させた時の色素の回収率を Table 1 に示した。

プロナーゼ P が他の酵素に比して良い値を示したためプロナーゼ P を用いることにした。

プロナーゼ P の添加量は 75×10^3 単位で十分であるため 0.2% プロナーゼ P 溶液 50 ml を用いることに

Table 1. Effect of Proteases on Recovery of Monascus Pigments

Protease solution	Tyrosin unit/50 ml	Recovery (%)
0.04% Pronase P	15×10^3	18
0.1% Pronase P	38×10^3	27
0.2% Pronase P	75×10^3	29
0.4% Pronase P	150×10^3	29
1% Pronase P	375×10^3	32
6% Papain	60×10^3	5
4% Pancreatin	70×10^3	18
10% Trypsin	39×10^3	9

した。

なお、水 50 ml 中の酵素量は局方¹¹⁾「パンクレアチン」中のタンパク消化価測定の方法に従って測定した時のチロジン単位で示した。

1.2 SDS の添加量

色素の回収率を上げるため、0.2% プロナーゼ P 溶

Fig. 1. Effect of SDS on recovery of monascus pigments

Table 2. Effect of Incubation Time and Temperature on Recovery of Monascus Pigments

Temp. (°C)	Recovery (%)	
	1 hr	2 hr
25	77	80
37	83	87
45	85	86
55	76	78

液と SDS⁷⁾ を併用することにした。

モナスカス色素添加かまぼこ 5g に 0.2% プロナーゼ P 溶液 50 ml 及び SDS を 0.05~0.5g の範囲で添加し、それぞれ 37° 2 時間反応させ色素の回収率を求めたところ Fig. 1 に示すように SDS 0.1g 以上添加すれば、色素を 80% 以上回収できることがわかった。そこで SDS の添加量は 0.3g とした。

1.3 抽出時の温度及び時間

色素を抽出するのに適当な温度及び時間を設定するため、モナスカス色素添加かまぼこ 5g に 0.2% プロナーゼ P 溶液 50 ml 及び SDS 0.3g を加え、それぞれの温度及び時間で反応させ色素の回収率を求めた結果を Table 2 に示した。

25~45° 2 時間で良好な結果を示したので 37° 2 時間を抽出時の温度及び時間とした。

1.4 抽出法の設定

モナスカス色素添加かまぼこで決めた抽出条件を、ノルビキシン、コチニール、ラッカイン酸を添加したかまぼこに適用した。

ノルビキシンは 0.2% プロナーゼ P 50 ml 及び SDS

0.3g を加え 37° 2 時間反応させた時 80% 回収され抽出操作後の遠心残留物に色が残らないが、ラッカイン酸、コチニールは 60~70% の回収率で遠心残留物が着色していた。そこで残留物に SDS 0.2g 及び水 30 ml を加え、更に 2 時間反応させたところコチニール、ラッカイン酸ともほぼ 90% 回収された。

以上の結果、「かに風かまぼこ」の色素を抽出する時、まず 2 時間の抽出操作をし、その段階で遠心残留物に色が残る場合は、残留物の色素をさらに 2 時間で抽出することにした。

2. DEAE-セファデックスによる色素の精製

色素の吸着剤としては、SDS の共存下で吸着率の良い DEAE-セファデックス A-25 を用いた。DEAE-セファデックスに対するモナスカス色素、コチニール、ラッカイン酸の吸着率は 100% であり市販試料においても同様であった。

溶出溶媒は、中性溶媒の 5% 塩化ナトリウム溶液-エタノール (1:3) 混液を用いることにした。又、色素の溶離を良くするため 0.1% 塩酸で樹脂を洗う操作を加えた時、モナスカス色素、コチニール、ラッカイン酸は再現性良く溶離した。

ノルビキシンは、エーテル層に 75% 抽出されるが、一部は水層に残り DEAE-セファデックスに吸着された後、上記の溶出溶媒で溶離した。

3. TLC による確認

標準色素液を用いて、試験溶液 (1)、(2) より色素の同定をした。

(1) でノルビキシンを、(2) でモナスカス色素、コチニール及びラッカイン酸を確認できた。

モナスカス色素はシリカゲルプレート (B-5) 上で 3~4 点の赤色スポットとなり R_f 値 0.65 に主スポットが見られた。しかし、セルロースプレート上ではかっ変し原点にとどまった。コチニール、ラッカイン酸はセルロースプレート上で安定した赤色を呈し、シリカゲルプレート上では紫変した。R_f 値が近いコチニール、ラッカイン酸は、紫外線下 (365 nm) での蛍光の有無を調べることで差が明確となった。

Fig. 2 は、ノルビキシン、モナスカス色素、ラッカイン酸を検出した市販試料のクロマトグラムであるが、試験溶液と標準色素液はよく一致し、上述通りそれぞれの色素を確認できることがわかった。

次に、他の色素が存在した場合の分離状態を見るため、許可タール色素 11 種類及び天然色素¹²⁾のビキシン、β-カロチン、カプサンチン、クルクミン、サフロールエロ、クロシン、クロシブルー、紫トウモロコシ色素、ブドウ果汁色素、ベタニンのそれぞれについて標準色素液を調製し本法に従って TLC を行った。その結果、妨害となる色素はなく、ノルビキシン、モナスカス色素、ラッカイン酸、コチニールとよく分離した。

Fig. 2. Thin-layer chromatograms of natural dyes in Kamaboko prepared as imitation crab

I. Adsorbent: silica gel (Wakogel B-0); Solvent: *n*-propanol-water (9:1)

II. Adsorbent: silica gel (Wakogel B-5); Solvent: *n*-butanol-acetic acid-water (3:1:1)

III. Adsorbent: microcrystalline cellulose; Solvent: acetone-0.5 *N* HCl (1:3)

a, standard norbixin; b, standard monascus pigments; c, standard cochineal; d, standard laccaic acid; s₁, test solution (1) from commercial food; s₂, test solution (2) from commercial food

Table 3. Number of Samples (Kamaboko Prepared as Imitation Crab) Containing Dyes

Dye	Number in 25 samples
Monascus	16
Monascus+Norbixin+Lacc.	4
Norbixin+Lacc.	2
Monascus+Norbixin	1
Norbixin+R-3	1
R-3	1

Monascus., Monascus pigments; Lacc., Laccaic acid; R-3, Erythrosine

4. 市販試料中の天然色素

25 検体の市販の「かに風かまぼこ」について本法を適用した結果を Table 3 に示した。

検出された天然色素は、モナスカス色素、ノルビキシン、ラッカイン酸であった。25 中 24 検体に天然色素を検出し、モナスカス色素のみを検出した試料は 16 検体あった。その他は 2 種類以上の色素が併用されており、ノルビキシン、モナスカス色素、ラッカイン酸の 3 種類の色素を検出した試料は 4 検体あった。

考察

食品中の色素を同定するためには、まず、必要な濃度の色素を抽出しなければならない。しかし、魚肉ねり製品では常法⁵⁾を用いた場合、色素の抽出率が著しく低い、これは加熱加工前に添加された色素が食品中の構成成分のタンパク質、デンプンなどとより強固に結合するためと考えられる。

Boley⁶⁾らは、合成色素の抽出率を高めるためタンパ

ク質が多い食品から色素を抽出する時、パパインなどのタンパク分解酵素を用いている。

そこで著者らはタンパク分解酵素を用いて「かに風かまぼこ」中の天然色素を抽出したところプロナーゼ P で約 30%回収することができた。

しかし、ここで酵素により組織の分解は進行しているにもかかわらず十分満足な結果が得られなかったのは、「かに風かまぼこ」に添加された天然色素が合成色素よりタンパク質への染色性が強いことから、イオン化されにくく、組織細片に残存したためと考えられる。

そこで色素のイオン化を促進させるため、著者らは、原田ら¹³⁾及び鈴木ら⁷⁾の報告に準じて界面活性剤 (SDS) を併用したところ回収率は 80% 以上と上昇した。

これは、酵素による組織の破壊と SDS による色素のイオン化が同時に進行することにより、組織からの色素抽出に相乗的に作用し良好な結果をもたらしたと考える。

天然色素は pH 及び温度などの条件によって分解退色するため抽出条件の選択が重要となるが¹⁴⁾、本法は中性、37° の条件下で短時間に抽出する方法なので色素の退色は最小限にとどめることができると考える。

市販のモナスカス色素標品の 23 品目について調査した結果、TLC では明白な差はないが、可視部吸収スペクトルの極大吸収波長が 5~10 nm の範囲でずれがあり、波形にも多少変化が見られ色素間に差異があることが判明した。そこで、今後は色素標品が一律なものに規格化されることが望まれる。

要約

「かに風かまぼこ」中の天然色素の抽出、精製及び同定法について検討した。

1. 細切した試料の着色部分 5 g に 0.2% プロナー

ゼ P 50 ml 及び SDS 0.3 g を加え, 37° 2 時間旋回振とう恒温水槽中で反応後, 遠心しその上清液を色素抽出液とし, 残留物が着色している時は, 残留物に SDS 0.2 g 及び水 30 ml 加え, 上記同様 2 時間反応後遠心し, 上清液を先の抽出液に合わせた。

色素抽出液において, エーテル抽出より試験溶液 (1) を得, エーテル抽出後の水層を DEAE-セファデックス処理し試験溶液 (2) を得た後, (1), (2) を用いて TLC で色素の同定をした。

2. ノルビキシン, モナスカス色素, コチニール, ラッカイン酸を添加したかまぼこの回収実験で, いずれの色素も 80% 以上の回収率であった。

3. 本法を市販の「かに風かまぼこ」に適用したところ, ノルビキシン, モナスカス色素, ラッカイン酸などを検出し良好な結果を得た。

なお, 本研究の要旨は日本食品衛生学会第 42 回学術講演会 (昭和 56 年 11 月大阪) で発表した。

終わりに, 本研究に御協力いただいた紀文 (株), 東洋インキ製造 (株), アイゼン (株), 三栄化学工業 (株), 台糖 (株), 東京田辺製薬 (株), 江崎グリコ栄食 (株), ダイワ化成 (株), に深謝の意を表します。

文献

- 1) Lemann, G., Collet, P., Hahns-Gert, H., Ashworth, M.R.F.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem. **53**, 1182~1189 (1970).
- 2) Perdih, A., Ekar, I.: Z. Lebemsm. Unters. Forsch. **163**, 100~103 (1977).
- 3) 荻原 勉, 野沢竹志, 平田恵子, 天川映子, 大石充男, 関 博磨: 食衛誌. **21**, 207~213 (1980).
- 4) Official Methods of Assoc. Offic. Anal. Chem. 12th Ed. 34.014 (1975).
- 5) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 374 (1980) 金原出版.
- 6) Boley, N. P., Bunton, N. G., Crosby, N. T., Johnson, A. E., Roper, P., Somers, L.: Analyst **105**, 589~599 (1980).
- 7) Suzuki, M., Arai, H.: Jap. J. Pharmacol. **16**, 25~31 (1966).
- 8) 谷村顕雄, 片山 脩, 遠藤英美, 黒川和男, 吉積智司: “天然着色料ハンドブック” p. 615 (1979) 光琳.
- 9) 石綿 肇, 渡部美知子, 谷村顕雄: 食衛誌. **15**, 36~42 (1974).
- 10) 川名清子, 和田 裕, 高橋武夫, 管野三郎: 同上. **12**, 33~39 (1971).
- 11) 日本公定書協会編: “日本薬局方” D715~D718 (1981) 広川書店.
- 12) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 381 (1980) 金原出版.
- 13) 原田 稔, 竹内三津男, 片桐 謙: アレルギー **15**, 1~7 (1966).
- 14) 谷村顕雄, 片山 脩, 遠藤英美, 黒川和男, 吉積智司: “天然着色料ハンドブック” p. 535 (1979) 光琳.