強化食品中のビタミン B₁ 定量に及ぼす バニリンの影響について (第1報)

簡易チオクロム法におけるバニリンの阻害作用

(昭和 39 年 8 月 24 日 受理)

吉松 洋一^{*1} 小谷 忠男^{*2} 平山 謡子^{*2}

Influence of Vanillin on the Determination of Vitamin B₁ in Enriched Foods (I) Interference of Vanillin on the Simplified Thiochrome Method

Yoichi YOSHIMATSU^{*1}, Tadao KOTANI^{*2}, and Utako HIRAYAMA^{*2}

(^{*1} Mishima Factory, Morinaga Confectionery Co., Ltd.: 231, Naka, Mishima-shi, Shizuoka-ken; ^{*2} Quality Control Room, Morinaga Confectionery Co., Ltd.: Shimosueyoshi, Tsurumi-ku, Yokohama-shi, Kanagawa-ken)

On determining vitamin B₁ in enriched foods added flavours by the simplified thiochrome method, the recovery of vitamin B₁ was decreased by the interference of vanillin which was often used as flavour and coexisted with vitamin B₁. However, this interference could be removed, if vitamin B₁ was purified by Permutit. In the case of colorimetric determination by *p*-aminoacetophenone, the above interference did not show at all.

(Received August 24, 1964)

1. 緒 言

食品添加物として許可され、広く実用に供されている各種ビタミンB₁塩、B₁誘導体のうち、ビスケット、あるいはホットケーキミックスの強化用としては、アルカリ膨剤に対する抵抗力の大きいジベンゾイルチアミン(DBTと略称する)が最も有利なことは周知のところであろう。これは、その化学構造の特異性によるものであるが、この特異性が分析する場合に、抽出困難の原因となったり、あるいは加水分解の必要を生ずるという問題点もないわけではなかった。しかしこの障害も、川北¹⁾、鎌田²⁾、村田³⁾、鈴置⁴⁾、稲垣・福場⁵⁾、福士⁶⁾、堀⁷⁾らの研究によって、次第に克服され、一応の解答は得られたかに見える。一方、強化食品中のB₁をチオクロム蛍光法によって試験する際に、盲蛍光物質の少ない検体には、パームチット処理を省略した簡易法が用いられることが多いようで、上述の諸報告の多くも、この簡易法について述べている。筆者らはホットケーキミックス

製造にあたって、じん速性に重きを置いて、その管理分析に堀⁷⁾らの簡易チオクロム法を適用したところ、予想に反してきわめて低い回収率しか得られなかった。この原因について検討したところ共存するバニリンがチオクロム蛍光の発現を妨害することが認められ、盲蛍光物質の少ない強化食品といえども、簡易チオクロム法を適用することは、危険な場合が多いことを見いだした。

2. 実験方法と結果

2.1 ホットケーキミックス中の DBT 簡易定量法

堀⁷⁾らの方法に準じて、つぎのごとく術式を定めた。
ホットケーキミックス(DBT 0.735 mg%) 10g をとり、遠沈管に入れ、0.1N塩酸・70%エタノール 50 ml で60~70°, 30分間浸出する。冷後3000 rpm 5分間遠心分離し上澄液を0.1N塩酸・70%エタノールで正確に100 ml とした。この4 ml を50 ml の共セン試験管にとり、N-NaOH 2 ml を加え、正確に20分間アルカリ分解したのち、N-HCl 2.4 ml を加える。これに氷冷BrCN 6 ml を加えて混合し、続いて30%NaOH 4 ml を加えて混合する。つぎにイソブタノール20 ml を加えて、約100回激しく振り抽出する。1.5時間暗所に静置し、上層

^{*1} 森永製菓株式会社三島食品工場：三島市中231

^{*2} 森永製菓株式会社品質検査室：横浜市鶴見区下末吉町1035

をビレットでとり、口紙でろ過後、蛍光を測定する（コタキ光電比色計5号D型、蛍光測定補助装置を用いる）。

別に DBT 標準液を、上記のアルカリ分解のところから同様に操作してその蛍光度を測定し、検量線を作製して試料中の DBT 含量を求める。

2.2 分析結果

製造月日の異なる製品を選び、分析したところ、第1表に示すようにきわめて低い回収率（30～40%）しか得られず、抽出回数を増しても、結果は同じであった。

第1表 簡易定量法による製品分析値

試料の種類	理論値	分析値	回収率
	$\mu\text{g/ml}^*$	$\mu\text{g/ml}$	%
標準 1	1.45	1.45	100.0
標準 2	1.00	1.13	113.0
標準 3	0.75	0.75	100.0
製品A（抽出 1 回）	0.735	0.28	38.1
製品B（抽出 1 回）	0.735	0.29	39.5
製品C（抽出 1 回）	0.735	0.27	36.8
製品D（抽出 2 回） 50 ml $\times$ 2	0.735	0.24	32.7
製品E（抽出 3 回） 40, 30, 20 ml	0.735	0.25	34.0

* 採取検液 1 ml (=製品0.1 g 中) の DBT μg 数

なお、この操作による DBT の検量線は、第1図に示すごとく、0～1.5 $\mu\text{g/ml}$ の範囲内では直線関係を示した。

第1図 DBT の検量線

2.3 3種類の主原料配合品に対する DBT の添加実験

筆者らの得た分析値が、類似食品であるクラッカー、

スーパ、食パン等について報告されている DBT 検出率、95～100% に比べて低すぎるので、ロス、バラツキ等を考慮して、実験モデルとして、小麦粉、粉乳、膨剤の3種類の原料を配合したものを実験室で調製し、DBT を添加して分析したところ第2表のごとくきわめて良好な回収率で検出された。

第2表 3種類の主原料配合品に対する DBT の添加実験

試料の種類*	理論値	分析値	回収率
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	%
試料 A	1.50	1.39	92.6
試料 B	1.00	0.97	97.0
試料 C	0.75	0.73	97.4
試料 D	0.50	0.49	98.0

* 試料はそれぞれ配合品10g に対して、DBT 標準液を、150 μg (A)、100 μg (B)、75 μg (C)、50 μg (D) 添加したもの

2.4 小麦粉強化剤の回収実験

ホットケーキミックスには、DBT 含有小麦粉強化剤を使用しているので、念のためにこの強化剤での回収実験を実施した（強化剤中の DBT 含量は37.0%）。

ロットの異なる小麦粉強化剤を、少量添加実験におけるひょう量誤差を避けるために食塩で10倍に希釈混合し前記3種の主原料配合品に添加、回収実験を行なった。

この結果も、第3表に示すごとく、回収率はいずれも良好であり、また強化剤を10倍に希釈混合しただけのものも、正常な分析値を示し、強化剤中の DBT 含有量は表記のとおりであることが確認された。

第3表 小麦粉強化剤の回収実験

試料の種類*	理論値	分析値	回収率
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	%
試料 A	0.74	0.73	98.7
試料 B	0.74	0.72	97.3
試料 C	0.74	0.73	98.7
試料 D	0.74	0.74	100.0

* 試料A、Bは3種原料配合品10g に強化剤希釈混合品20 mg 添加したもの、試料C、Dは強化剤を食塩で10倍に希釈しただけのもの20 mg

2.5 試作配合品および副原料類に対する小麦粉強化剤の添加実験

主原料でのモデル実験では、回収率は良好であり、また DBT 自体の高い安定性、それに詳細なデータは省略するが、バラツキをチェックした工程間の多数回の試験結果は、回収率こそ低い、いずれも一様な測定値を与えることから、DBT の低い回収率は、簡易チオクロム

法での定量を阻害する物質の共存によるものと考えざるをえない。そこで筆者らはこの阻害物質を探し出す目的で、ホットケーキミックスの配合を部分的に変えた、

試作品 A：基準配合から、油脂、強化剤およびビタミン B₂ を除外

試作品 B：基準配合から、バニリン粉末香料、強化剤およびビタミン B₂ を除外

を作り、これに強化剤を添加して回収実験を試みた。なお、副原料の一部についても、それぞれ単独に強化剤を加えて回収実験を行なった。結果は第 4 表のごとくである。

第 4 表 少量添加物等への小麦粉強化剤の添加実験

試料の種類	理論値	分析値	回収率
試作品 A に希釈強化剤* 添加 (10 g+20 mg)	μg/ml 0.74	μg/ml 0.26	% 35.2
試作品 B に希釈強化剤添加 (10 g+20 mg)	0.74	0.72	97.4
希釈添加剤 20 mg	0.74	0.75	101.3
ケイ皮末に希釈強化剤添加 (2 mg+20 mg)	0.74	0.69	93.3
卵白粉末に希釈強化剤添加 (10 mg+20 mg)	0.74	0.75	101.3

* 小麦粉強化剤を食塩で 10 倍に希釈 (以下同様)

試作品 A を除き、その他はすべて 93~100% の DBT 回収率を示している。ところが試作品 A のみは、今までの分析値と同様 35% と低い回収率であった。

試作品 A と B の相違点はバニリン粉末香料を含有するか否かの差である。このことから DBT 回収率不良の原因はバニリン粉末香料の存在にあることが推定される。

2.6 小麦粉強化剤にバニリン粉末香料およびバニリンの添加実験

ホットケーキミックス中の DBT 回収率不良の原因はバニリン粉末香料の共存によるものらしいことがわかったので、小麦粉強化剤にこのものを添加して確認実験を行なった。

なおバニリン粉末香料は、バニリンと付加物質から成るため、このうちのどれが定量を阻害しているかを確かめる意味で、バニリンそのものも強化剤に加えて回収実験を行なった。結果は第 5 表に示すように、バニリン粉末香料の添加により小麦粉強化剤中の DBT 回収率ははなはだしく低下する。この低下の度合は、バニリン粉末香料の添加量が多くなるほど大きい。また純バニリンの添加では、回収率はほとんど 0% 近くまで下ってしまうことより、阻害物質はバニリン粉末香料の付加物質ではなくバニリンそのものであると考えられる。

第 5 表 小麦粉強化剤にバニリン関係添加物の添加実験

試料の種類	理論値	分析値	回収率
希釈強化剤 20 mg にバニリン粉末香料 25 mg を添加	0.74 μg/ml (バニリン 2.31 μg/ml)	μg/ml 0.22	% 29.8
希釈強化剤 20 mg にバニリン粉末香料 35 mg を添加	0.74 μg/ml (バニリン 3.23 μg/ml)	0.13	17.6
希釈強化剤 20 mg にバニリン 20 mg を添加	0.74 μg/ml (バニリン 7.43 μg/ml)	痕 跡	0

2.7 その他の B₁ 類定量に及ぼすバニリンの影響

DBT の定量におけるバニリンの阻害作用については、今までの実験で明らかになったが、その他の B₁ 塩類に対するバニリンの影響はどうかということを調べた。使用した B₁ 塩類は、(イ) B₁・硝酸塩、(ロ) B₁・ロダン塩、(ハ) B₁・ナフタリン-1,5-ジスルホン酸塩(NDS と略称する)の 3 種類である。

2.7.1 B₁ をバニリンと共存させた場合の回収実験

3 種類の B₁ 塩について、バニリン無添加のものと、それぞれについて塩酸チアミン (B₁ と略称する) 換算対比として一定量のバニリンを添加したものとの 2 組に対して、後記するようにいろいろの B₁ 分析法を実施し阻害作用の有無を調べた。

(a) チオクロム蛍光法の場合

純品に対する試験法をフェリシアン化カリによる酸化法⁸⁾と BrCN による酸化法⁹⁾について実施した結果は第 6 表に示すごとくで、程度の差はあるが、いずれも著しく阻害作用を受けることが判明した。なおこの場合は純品に対する試験であるので、当然のことながら、パームチットによる精製は行っていない。

第 6 表 純 B₁ 塩類のチオクロム法による試験に及ぼすバニリンの影響

試料の種類	得られた蛍光の強さ			
	フェリシアン化カリ酸化法		BrCN 酸化法	
	純品	バニリン添加*	純品	バニリン添加*
硝酸塩	100.0	56.3	100.0	19.1
ロダン塩	100.0	0.4	100.0	14.0
NDS	100.0	50.9	100.0	6.0

* B₁ 1 μg+バニリン 100 μg

(b) ジアゾ比色法¹⁰⁾の場合

この場合も酸性白土による精製は行わずに実施したが、結果は第 7 表に示すごとく、バニリン添加の有無に関係なく良好な回収率を示した。すなわちジアゾ法では

バニリンの存在は B_1 定量になんの影響も及ぼさないわけである。

第7表 純 B_1 塩類のジアゾ法による試験に
及ぼすバニリンの影響

試料の種類	吸光度* ¹ (350 m μ)	
	純品	バニリン添加* ²
硝酸塩	0.402 (100.0)	0.403 (100.2)
ロダン酸塩	0.394 (100.0)	0.392 (99.5)
NDS	0.212 (100.0)	0.213 (100.4)

*¹ キシレン10 ml, 1 cm セル

*² B_1 100 μ g + バニリン10 mg

2.7.2 パームチット精製・BrCN 酸化によるチオ クロム法へのバニリンの影響

強化食品中の B_1 塩類をチオクロム蛍光法で定量する際、盲蛍光物質を除くためにパームチットで精製するのが最も標準的であるとされている。一方、周知のようにバニリンは食品香料中で一番普通に使用される香料であり、当然 B_1 強化菓子類にも広く使用されていると考えられる。それにもかかわらず、今まで、これの阻害作用が問題とならなかったのは、(1)パームチット処理によってバニリンが除かれてしまうためか——筆者らの場合、対象となる製品にバニリンを含むものが多いにもかかわらず、今まで問題を生じなかったのは、従来 B_1 定量の際には、DBT を含めて、すべてパームチット処理を行っていたためであろうと考えられる——、(2)パームチット処理を省略した場合は、 B_1 の低い検出値は、すべて製造時のロスと誤認されたか、(3)またとくにパームチット処理の省略されることの多い DBT の場合は、その抽出の困難さのために、バニリンの影響が見すごされてきたかのいずれかであろう。このうちパームチット処理の効果を確認するため、つぎのような2種類のホットケーキミックスのモデル試料

(イ) 基準配合から小麦粉強化剤、バニリン粉末香料を除外したもの、

(ロ) 基準配合から小麦粉強化剤のみを除外したものを作り、これに2.7.1で使用したのと同じ3種類の B_1 塩を B_1 換算0.5 mg% 相当量添加し、BrCN によるチオクロム法で回収率を調べた。

結果は第8表に示すごとく、すべてに良好な回収率が得られ、パームチット処理によってバニリンの妨害作用は完全に排除されることがわかった。

3. 総括

(1) ホットケーキミックス中の DBT を定量するとき簡易定量法では回収率が著しく低下する (30~40%)。

第8表 パームチット処理・BrCN 酸化チ
オクロム法による分析値

区 分	試料の種類	得られた蛍光の強さ
バニリン無添加	硝酸塩	95.7~100.0
	ロダン酸塩	98.3~100.1
	NDS	100.0~100.1
バニリン添加	硝酸塩	97.5~100.1
	ロダン酸塩	100.2~100.3
	NDS	100.0~100.3

(2) この原因について、浸出回数、製造工程、原料等について検討した結果、共存するバニリンが阻害作用を及ぼしていることがわかった。

(3) バニリンは簡易チオクロム法による場合、すべての B_1 類に対して阻害作用を及ぼす。

(4) ジアゾ法はバニリンの阻害作用を受けない。

(5) チオクロム法の場合、バニリンはパームチット吸着によって除かれ、定量に支障を与えなくなる。

(6) DBT の場合も、アルカリ分解後、パームチット処理を行なうことによって始めて正しい回収率が得られる。これについては、バニリンの阻害の原因とともに、後報で述べることにする。

文 献

- 川北兵蔵, 林 右市: ビタミン 14 , 1199, 202, 894 (1958); 16 , 753 (1959); 川北兵蔵: 醗酵工学 38 , 207, 260, 267 (1960).
- 鎌田政喜, 堀正剛: 武田年報 14 , 19 (1955).
- 村田希久, 山野敏子: ビタミン 13 , 105 (1957).
- 鈴置二郎, 鈴置恒子, 栗原美栄子: 同上 7 , 120 (1953).
- 稲垣長典, 福場博保: 同上 13 , 74, 553 (1957); 17 , 17 (1959); 稲垣長典, 福場博保, 宮川尚子: 同上 17 , 20 (1959); 稲垣長典, 福場博保, 岩田祥子: 同上 17 , 23 (1959).
- 福土敏雄: 同上 25 , 225 (1962).
- 堀正剛, 青木勇: 同上 25 , 225 (1962).
- 食品添加物公定書注解編集委員会: “食品添加物公定書注解” 387, 392, 396, 398 (1961) 金原出版.
- 八木国夫編: “最新ビタミン定量法” 19 (1954) 医歯薬出版.
- 永原太郎, 岩尾裕之: “食品分析法” 186 (1962) 柴田書店.