調査・資料

食品中のタール色素の定量法の検討

(I) 食用飲料中のタール色素の定量法

高 木 茂 明*

Investigation of Quantitative Method of Coal-Tar Dyes in Artificial Foods

I. The Quantitative Method of Coal-Tar Dyes in Some Drinks

Shigeaki TAKAGI

(Faculty of Nutrition, Kanagawa Prefectural Nutritional Junior College:
Sakuragaoka, Hodogaya-ku, Yokohama-shi)

1. ま え が き

現在わが国においては14種類のタール色素が食品添加物として使用許可され、多数の加工食品に見い出されていることは衆知のところである。しかしタール色素の定量法に関する研究は少なく¹⁾²⁾、とくに食品衛生の立場でそれをチェックする実用的定量法はこれまで見られない。本報告では従来から行なわれている毛糸を用いたタール色素の定性分析法を応用改変して各種飲料および固形食品からの抽出液中のタール色素の定量法として用いることについて検討した。

2. 実 験

2.1. 供 試 材 料

供試標準色素はつぎの18種類である。標準色素の一般食品からの回収率検討に市販合成レモン飲料(S社製)を用いた。毛糸は市販の白色毛糸を多量の3%アンモニア水で4回加熱沸騰処理し、水洗を繰り返してケイ光を示さないようにしたものを用いた。

2.2. 方 法

具体的な分析法はつぎのとおりである。まず、あらかじめ標準曲線を描いておく。すなわち、各標準色素を0.02 M 酢酸アンモニウムに溶かして 0.5×10^{-4} ~ 0.01 の溶液を作り、この色素溶液について極大吸収を示す波長またはそれよりも少し長波長の光を選び色素濃度対吸光度の関係について標準曲線を作成する。

それを Fig. 1~3 に示す。吸光度の測定には分光光度

色 素	メーカー	規 格
ポ ン ソ ー 3 R (R-1)	東京化成	一
食 用 赤 色 2 号 (R-2)	"	食添検査済
" 3 " (R-3)	"	"
" 102 " (R-102)	"	"
" 103 " (R-103)	"	"
" 104 " (R-104)	"	"
" 105 " (R-105)	"	"
" 106 " (R-106)	"	"
アシッドオレンジ I (O-1)	"	一
ナフトールエロー S (Y-1)	"	一
食 用 黄 色 4 号 (Y-4)	"	食添検査済
" 5 " (Y-5)	"	"
ギ ネ ア グ リ ン (G-1)	"	一
食 用 緑 色 2 号 (G-2)	"	"
" 3 " (G-3)	"	"
食 用 青 色 1 号 (B-1)	"	"
" 2 " (B-2)	"	"
食 用 紫 色 1 号 (V-1)	"	一

計 (日立 139 型) を用い、セルの層長 1 cm, 対照液には 0.02 M 酢酸アンモニウムを用いた。

実験操作はつぎのとおりである。10~20 ml の色素溶液に30%酢酸2 ml を加え、さらに 0.2~0.4 g の脱脂毛糸を加えて色素を吸着させる。この残液から加熱によって酢酸を追い出して蒸留水で一定量とした後その吸光度を測り、はじめの色素溶液の吸光度との比から吸着率を算出する。1回では吸着が不十分な場合は再度繰り返し

* 神奈川県立栄養短期大学：横浜市保土谷区桜ヶ丘

Fig. 1. Standard curve of R-2, R-102 and B-1 solution in 0.02 M ammonium acetate

Fig. 2. Standard curve of R-103, Y-4 and G-2 solution in 0.02 M ammonium acetate

Fig. 3. Standard curve of R-106, G-3 and acid violet solution in 0.02 M ammonium acetate

行なう。

色素を吸着させた毛糸を蒸留水で2回洗浄後、1%アンモニア水 20 ml を加えて80~90°の水浴中で10分間処理して色素を溶出させる。毛糸が着色しているときは再度同様にして溶出し、これを数回繰り返して行なう。これらの溶出液を集めて常圧 80~90°で濃縮し、蒸留水で10 ml にしたのち吸光度を測定し、供試色素溶液の吸光度との比から溶出率を算出する。

この溶出液を濃縮乾固し、乾固物に 0.5 ml の蒸留水を加えて色素を溶かす。この溶液の 0.05~0.15 ml をマイクロピペットによって正確に取り、東洋ロ紙 No. 50 (25 cm×3.2 cm)の下端から5 cm のところに原線いっばいに線状にスポットする。これを溶媒を用いて展開し、風乾ののちクロマトグラムの各スポットを切り抜き4~5 ml の0.02 M 酢酸アンモニウム溶液によって試験管中で溶出する。溶出液の吸光度を各色素の極大吸収波長域で測定し得られた値から標準曲線を使って色素量を算出する。

2.3. 結 果

(1) タール色素の毛糸からの回収

タール色素の毛糸からの回収は本定量法のもっとも重要な因子の1つである。これを小さく分けると毛糸への吸着、溶出の2つになり、これらの条件因子としてつぎのようなものがあげられる。a) 毛糸の品質、b) 毛糸の使用量、c) 吸着回数、d) 溶出回数、e) 吸着、溶出時の液量。これらの因子は相互に密接な関係があるので、できるだけ一定のものを多くする必要があるので、aは市販の毛糸からケイ光剤を完全に除いたものであれば大差ないと考えられ、bは試料色素量により増減する必要があるが1回の使用量を0.2 g とした。eの使用液量は溶出の場合 20 ml、吸着の場合 10~20 ml とした。したがって毛糸からの回収に際し、問題となるのは吸着回数および溶出回数である。

吸着については、上記条件下で80~90°の水浴中において5~10分ときどきガラス棒でかきまぜることにより吸着率は1回で95%以上となり2回行なえば大部分の色素は100%吸着される。

溶出は80~90°の水浴中で5~10分加熱して行なった。得られた溶出率は色素の種類によりかなりの差があり、1回で95%以上のものもあれば40%程度のものもある。しかし全般的には溶出を3回繰り返せば95%以上の溶出率となる。Table 1 に各色素の吸着率、溶出率をまとめて示す。

これをみると溶出率の低い色素 (R-3, R-104, G-1, B-2, V-1) のなかには光、熱、あるいは酸およびアルカリに比較的不安定なものもあるが、溶出率にはそれ以外に毛糸と色素との親和力が大きく影響する。この観点から数種の色素の溶出率と溶出回数との関係を検討した、その結果を Fig. 4 に示す。これからわかるように

Table 1. Adsorption and Elution Ratio of Coal-Tar Dyes with Wool

Tar dyes	Adsorption* ¹ ratio (%)	Elution* ² ratio (%)	Recovery (%)	Wave length m μ
Ponceau 3 R (R-1)	99.0	100.0	99.0	500
Amaranth (R-2)* ³	100.0	100.0	100.0	520
Erythrosine (R-3)* ³	96.9(99.5)	78.8(93.7)	76.4(93.3)	540
New Coccine (R-102)* ³	95.4(99.0)	96.3	92.0	490
Eosine (R-103)* ³	98.3	100.0	98.3	535
Phloxine (R-104)* ³	100.0	69.5	69.5	540
Rose Bengal (R-105)* ³	100.0	—	—	550
Acid Red (R-106)* ³	94.4	94.6	89.3	565
Acid Orange I (O-1)	100.0	97.6	97.6	475
Naphthol Yellow S (Y-1)	100.0	100.0	100.0	430
Tartrazine (Y-4)* ³	98.0	100.0	98.0	430
Sunset Yellow FCF (Y-5)* ³	100.0	100.0	100.0	490
Guinea Green B (G-1)	93.5	67.6	63.2	620
Light Green SF (G-2)* ³	99.2	93.4	92.7	630
Fast Green FCF (G-3)* ³	99.6	97.2	96.8	625
Brilliant Blue FCF (B-1)* ³	99.6	100.0	99.6	600
Indigo Carmine (B-2)* ³	100.0	56.5(59.4)	56.5	610
Acid Violet (V-1)* ³	99.1	66.3(76.6)	65.7	550

0.1~0.2 ml of 0.1% dye solution was taken up and the total volume was filled up to 10 ml with distilled water.

Adsorption and elution was carried out with the method mentioned above.

*¹ The values of adsorption ratio were obtained by only one adsorption to wool and the values of twice adsorption were shown in parentheses

*² The values of elution ratio were obtained by twice elution from the colored wool, and the values at three times elution were shown in parentheses

*³ Food color

Fig. 4. Relation of elution time and elution ratio from colored wool

0.2 g of colored wool was eluted by 20 ml of 1% ammonia water each time at 80~90°C for 10 minutes

① Y-4, Y-5, R-102 のごとく 1 回で 95% 以上溶出するものと, ② R-3 のように溶出を繰り返すことによって溶出率が 100% に達するものおよび ③ V-1, B-2 のように低いレベルで平衡に達し溶出回数を増しても溶出率が増加しないものの 3 つの型に分けられる。本報の方法で定量できるのは ① 型, ② 型の色素である。

供試溶液中に色素以外の食品成分が含まれている場合, 吸着, 溶出を繰り返すことによってそれらを除去する必要がある。その際, 回収率が次第に低下するおそれがあるが実験の結果 Table 2 のように 2 回の繰り返しでは回収率はほとんどかわらない。3 回繰り返しでやや低下するようであるが実際は 1~2 回の吸着, 溶出を行なう場合が多いので実用上問題はないと考えられる。

(2) タール色素のロ紙からの回収率

毛糸に対する吸着, 溶出ののち, 溶出液を濃縮して一定量となしてロ紙クロマトグラフィーを行ない, 得られる各スポットから色素を溶出して一定量としたのち比色を行なうのであるが, この場合に問題となるのはロ紙からの色素の溶出率である。

色素のロ紙に対する吸着は毛糸の場合と異なり物理的

Table 2. The Recovery of Dyes at Repeat of Adsorption and Elution

Tar dyes	Times of adsorption*1-elution*1		
	1	2	3
R-1	100	100	97.6
R-2	100	99.8	99.0
R-102	97.5	96.2	94.3
R-106	95.0	94.4	92.1
O-1	100.0	99.0	97.6
Y-1	100.0	100.0	99.7
Y-4	100.0	99.9	99.9
Y-5	100.0	100.0	100.0
G-2	95.0	91.1	86.9
G-3	100.0	98.8	95.6
B-1	100.0	100.0	100.0

*1 Once adsorption and twice elution were carried out except R-106 in which twice adsorption and three times elution were carried out

The elute from the original wool with 1% ammonia water was used as the control solution at spectrophotometry

吸着であるので中性塩溶液で容易に溶出することができる。しかし少数の溶出しにくいものもあるので、そのような場合には溶出方法に工夫を要する。溶出が容易な色素の場合は試験管にロ紙片を入れ、これに 0.02 M 酢酸アンモニウム 4~10 ml を加えて室温または 50° に温めて 30分~1 時間放置すれば完全に溶出する。いっぽう溶出しにくい色素 (R-1, R-3, R-104, R-105, V-1) は 50° に加温して溶出を数回繰り返す必要があるが、下図のような装置を用いて溶出すると便利である。Table 3 に各色素のロ紙からの回収率を示す。

回収率算定に至る過程はつぎのようである。マイクロピペットで濃度既知 (0.1%) の色素溶液一定量 (0.01~0.05 ml) をロ紙にスポットし、風乾ののち、アセトン: イソアミルアルコール: 水 = 6:5:5 の溶媒⁵⁾ で展開し、取り出して風乾する。

このクロマトグラムから色素の部分の切り抜き抽出したのち、溶出液を一定量として吸光度を測定した。標準

Table 3. Recovery Ratio of Tar Dyes from Filter Paper

Dyes	Recovery ratio %	Elution times with 4 ml of 0.02 M ammonium acetate solution
R-1	98.5	3
R-2	100.0	1
R-3	96.6	2
R-102	100.0	1
R-103	95.5	1
R-104	98.6	3
R-105	99.1	3
R-106	98.0	1
O-1	100.0	1
Y-1	100.0	1
Y-4	100.0	1
Y-5	100.0	1
G-1	100.0	1
G-2	100.0	1
G-3	100.0	1
B-1	100.0	1
B-2	97.3	1
V-1	97.9	2

曲線から溶出液中の色素量を読みとり、スポットした色素量との 100 分比を算出した。この結果、多くの色素はロ紙からほとんど完全に溶出回収されることがわかった。

(3) 標準タール色素の市販ジュースからの回収

標準タール色素の毛糸、ロ紙からの回収率の検討に引き続き、市販ジュースにタール色素を混入して、その回収率を調べた。これは一般食品中のタール色素定量法のモデルとなるものと考えられる。一部方法の項と重複するが分析法はつぎのようである。

① 試料溶液調製 市販合成レモン飲料 (含有タール色素は Y-4 のみである)。10 ml に調べようとする 0.01 % 標準色素溶液 1~4 ml を加え、よく混合する。② 吸着 これに 30% 酢酸溶液 2 ml を加え、さらに脱脂毛糸 0.2 g を加えて 80° 10 分加熱、吸着させる。毛糸を取り出したあとの溶液に色素が残っているような場合は脱脂毛糸 0.2 g に再度吸着させる。③ 溶出 色素を吸着した毛糸を 20 ml の蒸留水によって 3 回水洗後、1 % アンモニア水各 20 ml にて 2~6 回溶出し。④ 蒸発乾固 溶出液を合わせて常圧下 80° で蒸発乾固させる。乾固物は一般に微量であるので、これに 0.5 ml の 0.02 M 酢酸アンモニウムを加えて色素を溶解させた溶液の量は 0.5 ml にはほぼ等しいとみなせるから、⑤ ペーパークロマトグラフィー この溶液の一定量 (0.05 ml あるいは 0.1 ml) をマイクロピペットでとって 3.2×25 cm のロ紙

(東洋ロ紙 No. 50) の下端から 5 cm のところに引いた原線いっばいに線状にスポットする。風乾のち溶媒により展開する。展開溶媒はアセトン：イソアミルアルコール：水 = 6：5：5 を用いた。⑥ 溶出 得られたクロマトグラム上の各スポットを (2) で述べた方法に従って溶出し。⑦ 比色 溶出液を比色する。定量結果を Table 4 に示す。なお単一色素のみ含有している試料の場合は、前記実験操作のうち ④ 以下を省くことができる。すなわち ⑤ で溶出した液を一定量にメスアップしたのち比色すればよい。

これをみると、R-104, R-105, R-106, G-1, G-2, B-2, V-1 を除いてはほぼ 90% 以上の回収率を示している。この値は毛糸に対する吸着、溶出、ロ紙からの溶出およびその間における色素の変質、退色などの諸因子を含んだものであって実際の市販品のタール色素定量値に相当するものと考えられる。回収率は 3 連の実験値の算術平均値であり、その後欄に標準偏差値を示しておいた。

Table 4. Recovery Ratio of Coal-Tar Dyes from the Mixture of an Commercial Juice and Each Standard Dyes

Dyes	Recovery ratio %	Standard deviation	Times of adsorption and elution with wool	
			Adsorption	Elution
R-1	89.3	±3.52	1	2
R-2	92.8	±3.9	1	2
R-3	95.6	±5.9	2	4
R-102	88.0	±4.1	1	2
R-103	88.0	±4.1	1	2
R-104	69.7	±5.9	2	4
R-105	28.7	±0.4	2	6
R-106	77.8	±3.6	2	3
O-1	90.0	—	1	2
Y-1	92.0	±2.6	1	2
Y-4 ^{*1}	98.2	±3.5	1	3
Y-5	88.0	±1.8	1	2
G-1	32.2	±2.6	2	2
G-2	31.0	—	1	2
G-3	93.2	—	1	2
B-1	94.0	±1.5	1	2
B-2	15.2	—	1	2
V-1	51.2	±0.31	2	4

^{*1} The recovery ratio of tartrazine was that from the mixture of B-1, Y-5 and Y-4

3. 考 察

毛糸のタンパク質ケラチンに対する各色素の吸着およびそれからの溶出は、ケラチンが複雑な立体構造を有す

るために単に現象としてとらえるだけである。しかし酸性タール色素が酸性溶液中で毛糸によく吸着するのは主としてケラチン分子中のアミノ酸の遊離アミノ基が陽イオンに解離し、これと色素（陰イオン）との間で塩結合するものと考えられる。この点については他のタンパク質について検討されている⁸⁾⁴⁾。したがって吸着、溶出ともに回数を重ねれば色素の回収率はほとんど 100% になるはずであるが、Fig. 4 の V-1, B-2 のように回収率の低いものは加熱時において酸、アルカリに不安定なために分解するからである。しかしながら多くの色素は毛糸からの回収率 95% 以上であり、十分注意して吸着、溶出を行えば一部の不安定な色素を除き問題ないと思われる。

ロ紙からの溶出は酢酸アンモニウム溶液を用いるのでアルカリに弱い色素も分解しない。またペーパークロマトグラフィー展開中におけるロ紙面での色素の分解に関する因子は Table 3 に包括されているので、Table 3 の結果からみられるとおりその点における心配は不要である。これらの結果から、色素の分解に関するかぎりではロ紙の吸着、展開、溶出は本法の制限因子とはならない。

標準色素の市販ジュースからの回収率は 90% 以上のものと極端に低いものがあり、とくに B-2 は 15.2% という低い値を示した。

この回収率低下のもっとも大きい原因は溶出液をアンモニア・アルカリ性で 80~90° において濃縮する場合の分解であり、とくにアルカリに不安定な色素はこの傾向が強い。このことは G-1, G-2, B-2 の場合、クロマトグラム上に多量の黄色い物質がスポットとして現われることによって証明される。毛糸から色素を回収する場合もこの分解の徴候は現われているが、アルカリ性における比較的長時間の加熱は不安定な色素を定量不能なまでに分解させる。したがって、このような色素の正確な定量は本法では不可能である。しかし一般に食品に使用されている色素は比較的熱、光、酸、アルカリに強いものが多いので実用上大きい支障はないと考えられる。

要 約

食用タール色素の定量法として従来定性分析に使われているところの毛糸を用いて吸着、溶出を行なう方法を改善することを検討した。

方法はつぎのようである。あらかじめ色素濃度と極大吸収を示す波長の吸光度との間に標準曲線を作っておく。色素溶液（あるいは試料溶液）から色素を毛糸に吸着させその吸着毛糸からアンモニア水を使って溶出する。溶出液を濃縮して一定量となし、その溶液の一定部分をとってペーパークロマトグラフィーを行なう。ペーパークロマトグラム上の各スポットを切り抜き、色素を溶出して一定容量となし、吸光度を測定してその値から標準曲線を使って色素の絶対量を読みとる。

毛糸からの回収率, ロ紙からの回収率, 市販合成レモン飲料に標準色素を混じたものからの色素の回収率を調べた結果, 供試 18 種類のタール色素のうち R-104, R-105, R-106, G-1, G-2, B-2, V-1 以外は最終的に約 90 % 以上の回収率を示した。

終わりに臨み, 本実験を行なうに際し有益なご助言をいただいた神奈川県衛生研究所, 和田 裕科長に厚くお礼を申し上げる。本報告の概要は食品衛生学会, 第14回学術講演会において発表した。

文 献

- 1) 福原健一: 日本公衆衛生学会総会講演要旨集 (1963).
- 2) 福原健一, 和田 裕: 保健文化賞受賞記念事業研究報告集第 4 集 p. 89 (1963).
同: 神奈川県公衆衛生学会抄録集 (1964).
- 3) 中林敏郎, 川崎貞夫: 食品工誌. 9, 331, 336 (1962).
中林敏郎, 竹内弘明: 同上 10, 441 (1963).
- 4) 相沢秀俊: 食衛誌. 8, 40 (1967).
- 5) 日本薬学会編: 衛生試験法注解 [8]. 飲食物着色料試験法 p. 254 (1965) 金原出版.