に 30 cc を残しこれに新たな Sabouraud 培地 15 cc を加え充分混合し、この 10 cc を第 3 試験管に採る (1/2,250). 順次この操作を繰り返せば、1/1,000, 1/1,500, 1/2,250.....の検体濃度の系列 (1.5 倍希釈系列) を得る。なお、1/1,000 で Sabouraud 培地に溶解しない検体は 40 mg を精秤し Sabouraud 培地 456 cc を用いて研磨、溶解せしめる (1/11,400). これは上記希釈系列の第 7 番の濃度に相当するから以下前述の如く 1.5 倍希釈を繰り返すこれ等を滅菌し、白黴菌を接種、27° で 14 日間培養後、発育阻止最大希釈倍数を観察した。使用菌種は *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton asteroides*, *Trichophyton rubrum* の 3 種である。接種菌量は 27°, 10 日間培養の Sabouraud 寒天培地 10 cc の斜面上に滅菌生理食塩水 7 cc を注入し、パイプレーターで 3 分間振盪して得る孢子浮遊液 1 白金耳量を用いた。

大正製薬株式会社

UDC 547.556 : 544.621 : 614.31

227. 鈴木美智雄, 中村栄三, 長瀬雄三: 色素類の赤外部吸収スペクトルによる分析的研究 (第 1 報*) 黄色食用色素およびオーラミン, バターイエローの分析

Michio Suzuki, Eizo Nakamura, and Yuzo Nagase: Analytical Studies for Dyes by using Infrared Spectrum. I. Studies on Yellow Dyes for Food, Auramine, and Butter Yellow.

(Tokyo College of Pharmacy**)

Infrared spectral analysis of yellow dyes (Naphthol Yellow S, Yellow AB, Yellow OB, Tartrazine, Sunset Yellow FCF, Auramine, and Butter Yellow) with the use of KBr pellet method was examined and it was found that detection up to ca. 40 γ would be possible by the use of their characteristic absorption bands. As an example of this method of quantitative analysis, determination of Auramine and of Auramine present in Tartrazine was carried out, utilizing the absorption at 1008 cm^{-1} as a key band for Tartrazine and that at 945 cm^{-1} for Auramine. Standard deviation of analytical results of each component in the mixture was calculated from the method of Youden and the values were 1.39 for Tartrazine and 1.55 for Auramine.

(Received February 12, 1959)

食用色素類の確認と定量は食品衛生の見地から必要で、従来はおもにペーパークロマトグラフ法などが利用されている。著者等は赤外部吸収スペクトル法によつて公定外色素の検出と混入量を知ることを主な目的とし、さらに同系統の色素の鑑別法としても役立てるため本研究に着手した。

(1) 定性的分析: 各色素の鑑別と確認限度を調べるためナフトールイエロー S (I), イエロー AB (II), イエロー OB (III), タートラジン (IV), サンセットイエロー FCF (V), オーラミン (VI), およびバターイエロー (VII) のそれぞれ (Chart 1) 約 2 mg を含む IR 用臭化カリウム錠剤を調製し、これらの赤外部吸収スペクトルを検討したところ、Table I に示すような定性的特性波長をそれぞれ得た。すなわち (I) は NO_2 基に起因すると考えられる 796 cm^{-1} , (II) は *o*-ジ置換によると考えられる 922 cm^{-1} , (III) は benzene モノ置換によると考えられる 1109 cm^{-1} , (IV) は SO_3H 基によると考えられる 1008 cm^{-1} , (V) は β -ナフトールによると考えられる 903 cm^{-1} , (VI) は $>\text{NH}\cdot\text{HCl}$ に起因すると思われる 945 cm^{-1} , (VII) は benzene トリ置換によると考えられる 767 cm^{-1} と *o*-ジ置換によると考えられる 928 cm^{-1} をそれぞれ特性波長として選び約 50 γ まで検出できた。

(2) 定量的分析: 定量法の一例として (IV) ならびに (VI) の定量および (IV) 中の (VI) の定量に臭化カリウム錠剤法¹⁻³⁾の利用を試みた。試料光路および補償光路に何も置かない場合を透過率 100% とし、試料光路だけに (VI) の 0.2~2.5 mg/700 mg 濃度範囲に調製した幾つかの臭化カリウム錠剤を置き、(VI) の特性波長 945 cm^{-1} に

* 日本薬学会関東支部講演 (1958 年 9 月)。

** Kashiwagi-cho, Shinjuku-ku, Tokyo.

1) R. S. Browning, et al.: Anal. Chem. 27, 7(1955).

2) 田中, 小川: 分析化学 6, 285(1957).

3) 長瀬, 馬場, 鈴木: 本誌 79, 705(1959).

Chart 1.

Table I. Key Bands using for the Discernment of Dyes (I ~ VII) (cm^{-1})

Naphthol Yellow S	1050	1017	796
Yellow AB	922	748	700
Yellow OB	1109	723	
Tartrazine	1040	1008	775
Sunset Yellow FCF	1040	990	903
Auramine	1000	960	945
Butter Yellow	928	827	767

おける透過率を測定し $D_{\lambda i} = \log \frac{I_0}{I} = kc$ から各濃度の吸光度を算出した. この際従来の計算法, すなわち $\log \frac{I_0}{I}$ において I_0 に 100%透過線をとる方法では Table III に示すように錠剤調製の条件だけでなく, 錠剤を装置する位置によつてもこれらの吸光度が変化する. またし混合物である場合は base-line 法はたがいの吸収が干渉しあつて利用できないし, 補償法も濃度が未知のため利用できない. 著者等は (IV) および (VI) の両者の吸収が Fig. 1 に示すように, ほとんど認められない $1800 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ の領域で最も透過度の高い点を I_0 として吸光度を算出すると, 錠剤のできぐあい, およびそれを装置する位置によつて生ずる誤差を比較的減少させるることを見出した (Table II, III).

この計算法により各濃度の吸光度を算出し Fig. 2 に示すように $0.2 \sim 2.5 \text{ mg}/700 \text{ mg}$ の範囲では Lambert-Beer の法則にしたがい, 一次方程式 $y_{(1)} = 0.128x + 0.005 \dots (1)$ を得た. つぎに (IV) にもまたこの方法を適用して濃度を変えて測定し, 特性波長 1008 cm^{-1} における吸光度を算出し検量線を作成したところ, Fig. 3 に示す

Fig. 1. Infrared Absorption Spectra of Tartrazine (IV) and Auramine (VI)

Table II. Check of the Extinction during Tableting
(with the same content of Auramine)

	Base transmittance (at 1800 cm ⁻¹)	Key band (at 945 cm ⁻¹) transmittance	Extinction	Extinction (I=100)
1	81.2	51.6	0.1973	0.2874
2	85.2	54.2	0.1964	0.2664
3	84.5	53.5	0.1985	0.2716
4	85.7	54.5	0.1990	0.2636

Table III. Check of the Constancy of the Extinction by Direction
of one Tablet (Auramine)

	Base transmittance (at 1800 cm ⁻¹)	Key band (at 945 cm ⁻¹) transmittance	Extinction	Extinction (I=100)
a	84.6	52.8	0.2040	0.2774
b	83.8	52.5	0.2030	0.2798
c	84.1	52.7	0.2030	0.2782
d	84.0	52.1	0.2033	0.2832
e	84.6	53.0	0.2031	0.2757

Fig. 2.
Calibration Curves for Auramine (1)
and Tartrazine (2)
at 945 cm⁻¹ Fig. 3.
Calibration Curves for Tartrazine (1)
and Auramine (2)
at 1008 cm⁻¹

ように 0.2~2.5mg/700 mg の濃度範囲で直線性を示し、一次方程式 $y_{(2)} = 0.308x + 0.001 \dots (2)$ を得た。

つぎに両者混合物中の各成分の定量を行なうため、両成分につきたがいに行なうことができるだけ吸収の重なり合わないバンド、すなわち (VI) では 945 cm⁻¹, (IV) では 1008 cm⁻¹ をキーバンドとして選んだ。この場合 (VI) の特性波長 945 cm⁻¹ においては (IV) の濃度が増すにつれ、また (IV) の特性波長 1008 cm⁻¹ においても (VI) の濃度が増すにつれ、その吸収がわずかながら増加することが認められた。すなわち両者の混合物についての各キーバンドにおいて測定した吸光度は両者の吸収の和となつて現われ、 $D_{\lambda i} = k_{(1)i} \cdot C_{(1)} + k_{(2)i} \cdot C_{(2)} \dots (3)$ にしたがった。ここで $C_{(1)}$, $C_{(2)}$ は錠剤中の混合物のそれぞれの量、 $k_{(1)i}$, $k_{(2)i}$ はキーバンドにおけるそれぞれの吸光度、 $D_{\lambda i}$ は波長 λi のときの混合物の吸光度で、実験的に求められる値である。そこで、あらかじめそれらのキーバンドの吸光係数からつぎの二元一次方程式を解けば、混合物中の各成分の量を算出することができる。

$$\begin{cases} D_{\lambda i} = k_{(1)i} \cdot C_{(1)} + k_{(2)i} \cdot C_{(2)} \\ C_{(1)} + C_{(2)} = \text{sample} \end{cases} \dots (4)$$

したがって 945 cm⁻¹ における (IV) と (VI) の吸光係数を (4) 式に代入して式を導くと、混合物中の (VI) の混入量 $C_{(1)}$ は

$$C_{(1)} = \frac{D_{\lambda i} - 0.005 - 0.031 \times \text{sample}}{0.128 - 0.031} \dots (5)$$

から求められる.

また (IV) の混入量 $C_{(2)}$ は 1008 cm^{-1} の吸光度から

$$C_{(2)} = \frac{D_{\lambda 1} - 0.010 - 0.056 \times \text{sample}}{0.308 - 0.056} \dots\dots\dots (6)$$

で求められる.

今 (IV) と (VI) 両者の種々な混合比の, しかも混入量のわかっている幾つかの混合物を製錠してそれらの吸収スペクトルを測定し, (5) 式に代入して混合物中の (VI) 量を求めたところ, Table IV のような結果を示した. 混合組成と分析結果との回帰直線に対し, Youden の方法^{4,5)} を用いて標準偏差を推定すれば $\hat{\sigma}$ 1.55 となり, 混合物としては $0.5 \sim 2.5\text{ mg}/700\text{ mg}$ の範囲で定量できうことを認めた. また試みに (IV) の混入量を検討するために 1008 cm^{-1} の吸光度を (6) 式に代入して求めたところ Table IV に示すような結果を得た. Youden の方法から標準偏差は $\hat{\sigma}$ 1.36 であった.

Table IV.

Analytical Results for Mixtures of Tartrazine and Auramine

Tartrazine added (%)	Tartrazine found (%) from 1008 cm^{-1} band	Auramine added (%)	Auramine found (%) from 945 cm^{-1} band
0.0	0.4	100.0	98.8
5.7	6.4	94.3	96.8
9.9	8.6	90.1	89.4
26.1	28.1	73.9	75.9
50.1	48.9	49.9	51.4
74.5	74.0	25.5	24.2
91.6	90.6	8.4	7.7
100.0	99.7	0.0	0.0

Computation for the Standard Deviation of Regression Line

Tartrazine
Slope $b = 0.9878$
Intercept. $a = 0.406$
Standard deviation $\hat{\sigma} = 1.359$

Auramine
Slope $b = 1.0100$
Intercept. $a = -0.330$
Standard deviation $\hat{\sigma} = 1.551$

この研究の機会を与えられた東京薬大学長村山義温先生, 色素に関して助言と試料の一部を提供せられた国立衛生試験所藤井清次博士に深謝する.

実 験 の 部

測定条件 応用光研複光路式 DS 301 型赤外線分光器の補償光路に何も置かず試料光路にだけ KBr 錠剤を置きゆつくり回わし透過度のもつとも良好な位置に静置し測定した. 感度 5, サプレッション 0, $4000 \sim 650\text{ cm}^{-1}$ を 20 分で測定した.

試料と倍散調製の条件 試料としては (I)~(VII) の市販特級品を用いた. ただし 尹紙法により色素としてスポット 1 つをあたえること, および無機物として混在の考えられる Na_2CO_3 , Na_2SO_4 について赤外部吸収スペクトル的には純粋であることを確かめて用いた. 試料を細末にしたものに赤外線用 KBr (コロンビア商事) を 200 メッシュ粉末とし一昼夜以上 120° で乾燥したものを加え 20 倍量とし 5 分間バイブレーターでふりまぜた後, メノール乳鉢にとり 5 分間よくすり再び 5 分間バイブレーターにかけ 20 倍散とした.

製錠の条件 20倍散の一定量に KBr を加え全量を 700 mg とした. これを 5 分間バイブレーターでふりまぜた後製錠器にとり減圧ポンプで 10 mm 以下にし $150 \sim 170\text{ kg/cm}^2$ で 7~10 分間保ち製錠した. できた錠剤を秤量して製剤に伴う損失を補正した.

東京薬科大学

4) W. J. Youden: Anal. Chem. 19, 946(1947).

5) 鎌田, 田中: 分析化学 2, 334(1953).