

高性能薄層クロマトグラフィーによる食品中の 着色料の分離に関する研究 (第 I 報)

水溶性タール色素の展開溶媒の検討

高 木 瞳

Studies on Separation of the Dyes in Foods by means of High Performance Thin-Layer Chromatography (Part. I) On the Developers of Water-Soluble Coal-tar Dyes

Hitomi Takagi

The different known water-soluble coal-tar dyes were studied as to their separation by means of developing solvents in HPTLC silica gel 60 plates. In the primary development the designed developer (n-butanol, methyl-ethyl-ketone, 15% ammonia and water at the ratio of 4, 2, 1, and 1 in vol.) was demonstrated to be superior in separating capacity showing clearer and more collective spots by addition of pyridine to the developer. The separating capacity of the different dyes was superior at the concentrations of 0.01~0.05%. About 60 minutes were required for development at the temperature of $26.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$.

緒 言

食品衛生法によって、食品添加物として現在使用を許可されている着色料は、合成色素11種、その他アルミニウムレーキ7種および天然色素などである。使用許可されている合成色素は、全て水溶性タール色素である。

古くは天然色素が着色料として使用されていたが、1856年イギリスの W.H. Perkin がタール色素の合成に成功して以来、天然色素は色調の安定性に欠けること、価格が高いなどの理由で、タール色素が代わって使用されてきた。戦後、食品衛生法の成立によってタール色素の種類も制限され、当初は22種が使用許可されていた。

その後、1954年頃から世界的に食品添加物の毒性研究が取り上げられ、日本においても慢性毒性の立場から再検討されている。

許可タール色素においては、1965年一部の色素が発がん性があるとして使用禁止になってから相継いで指定から削除され、現在は、使用制限や表示の義務が課せられている¹⁾。しかしまだ使用許可されている中にも問題^{2) 3)}になっている色素がある。着色料の毒性が問題になり、さまざまな評価がなされるにつれて、それらの正確な分析が必要になってくる。

タール色素は染着力が強く、微量でまた数種を混合して使用されており、クロマトグラフィーを応用したその分析法についていくつかの報告がある。

ペーパークロマトグラフィーによる分析は、展開時間が10時間以上と長く必要なことや、スポットが広がるなどの欠点がある。薄層クロマトグラフィーにおいては、展開時間は短縮されたが混合着色料を一度に分離するに最も良好な溶媒系が^{4) 5) 6) 7)}少ない。しかし、高速液体クロマトグラフィーでは、一斉相互分離法の可能性を見出した⁸⁾という報告がある。

最近、高性能クロマトグラフィー⁹⁾（以下、HPTLC とする）が、微量サンプルで、迅速・簡単に定性・定量できるとして使用されつつあるが、着色料についての分析例は少ない。

筆者は、食品中の着色料について研究するにあたり、このHPTLC を用いて分析するため、その展開溶媒について検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料色素

使用した着色料は、Table 1 に示す8種類の法定色素（三栄化学製）である。

各色素は、0.1%濃度の水溶液とし、その0.001mlをスポットした。

なお、フロキシン（赤色104号）およびローズベンガル（赤色105号）は、使用頻度がきわめて低いので除外した。また、ファーストグリーンFCF（緑色3号）は、製造されていない。

Table 1 Water-soluble coal-tar dyes

Type	Dye	Name of Food Dye
Azo	Amaranth	Food Red No 2
	New Coccine	Food Red No 102
	Tartrazine	Food Yellow No 4
	Sunset Yellow FCF	Food Yellow No 5
Xanthine	Erythrosine	Food Red No 3
	Acid Red	Food Red No 106
Triphenyl	Brilliant Blue FCF	Food Blue No 1
Indigoid	Indigo Carmine	Food Blue No 2

2. 試薬および装置

i) 展開溶媒：Table 2 に示す。なお、試薬は、いずれも J I S 特級試薬を用いた。

Table 2 Developers used

No.	Developer	System
S-1	Methyl-Ethyl-Ketone : Water (20 : 1.0)	
S-2	Methyl-Ethyl-Ketone : Acetone : Water (10 : 0.1 : 0.4)	
S-3	Chloroform : Acetone : Isopropanol : 5% Sulfurous Acid (30 : 40 : 20 : 10)	
S-4	n-Propanol : Formic Acid (80 : 20)	
S-5	n-Butyl Acetate : Pyridine : Water (30 : 45 : 25)	
S-6	Ethyl Acetate : Pyridine : 28% Ammonia (5 : 2 : 1)	
S-7	Ethyl Acetate : Pyridine : Water (10 : 10 : 1)	
S-8	Ethyl Acetate : Methanol : 28% Ammonia (3.3 : 1 : 1)	
S-9	Ethyl Acetate : Methanol : 28% Ammonia (4.5 : 1 : 0.7)	
S-10	Ethyl Acetate : Methanol : 28% Ammonia (5 : 2 : 1)	
S-11	Ethyl Acetate : Methanol : 25% Ammonia (9 : 2 : 1.4)	
S-12	Ethyl Acetate : Methanol : 5 N Ammonia (60 : 30 : 10)	
S-13	n-Butanol : Methyl-Ethyl-Ketone : 25% Ammonia : Water (4 : 2 : 1 : 1)	
S-14	n-Butanol : Methyl-Ethyl-Ketone : 1% Ammonia : Water (4 : 2 : 1 : 1)	

ii) 高性能薄層クロマトグラフィープレート: HPTLC Fertig Platten Silicagel 60 (Merck社製) 10×10 cm Art. 5631 を用いた。

iii) 装置: ハンキング式薄層クロマト展開槽 HPS-204型を用いた。

3. 操作

HPTLC プレートの下端より 1.5 cm の位置に、試料色素をスポットの直径が 2 mm 以内になるようそれぞれ 1 cm 間隔で塗布した。次に、塗布した HPTLC プレートの下端が展開溶媒に 1 cm 程度つかると垂直につき、上昇法で、8 cm 展開した後、風乾し、*R_f* 値を求めた。

展開は、あらかじめ展開溶媒を展開槽に入れ、室温 (26.0 ± 2 °C) で 3 時間放置した後行なった。

結果および考察

1. 展開溶媒の選択

HPTLC プレートを用いての水溶性色素の展開溶媒の検討がなされていないので、従来の主に、TLC シリカゲルプレートを用いての水溶性色素分離用の展開溶媒を整理し、検討した。実験した展開溶媒は Table 2 に示す通りである。展開結果を述べると次の通りである。

展開溶媒 S-1⁴⁾ および S-2⁴⁾ は、エリスロシンのみが移動し、他の色素は、ほとんど原点より移動¹⁰⁾ がなかった。インジゴカルミンは退色していた。S-3 は、アシッドレッドがわずかに移動した他は、S-1 および S-2 と同様の結果であった。展開所要時間はいずれも 17 分~24 分であった。

S-4¹⁰⁾ は、各色素とも分離能は良好であったが、エリスロシンを除いてはテーリングしていた。ま

た、インジゴカルミンは退色していた。展開所要時間は、約60分であった。

展開溶媒¹⁰⁾S-5は、全ての色素のスポットがまとまっていた、分離能も良好であるが、*Rf*値は0.59~0.78にまとまっていた。展開所要時間は、約54分であった。

S-6は、キサントン系色素がわずかに移動した他は、全て原点から動かなかった。展開所要時間は、約25分であった。

S-7は、キサントン系色素が比較的高く移動したが、エリスロシンはテーリングしていた。また、アゾ系色素のサンセットイエローFCFもわずかに移動したがテーリングしていた。その他の色素は原点にとどまっていた。インジゴカルミンは、退色していた。展開所要時間は、約27分であった。

次に、酢酸⁵⁾エチル-メタノール-アンモニア水系溶媒で、混合割合およびアンモニア濃度の異なる⁵⁾S-8、¹¹⁾S-9、⁷⁾S-10、¹⁰⁾S-11およびS-12の*Rf*値をまとめると、Table 3の通りである。展開所要時間は、25~30分であった。

Table 3 Approximate *Rf* values of water-soluble coal-tar dyes

Dye	Developer				
	S-8	S-9	S-10	S-11	S-12
Amaranth	0.06	0	0.03	0	0.12
New Coccine	0.11	0	0.04	0	0.08
Tartrazine	0.06	0	0.04	0	0.15
Sunset Yellow FCF	0.37	0.05	0.26	0.05	0.40
Erythrosine	0.63	0.34	0.62	0.23	0.60
Acid Red	0.55	0.14	0.34	0.08	0.34
Brilliant Blue FCF	0.25*	0.01	0.15*	0.02	0.26*
Indigo Carmine	0.22**	0 *	0 *	0 *	0 *

* Tailing

** Discolouration

n-ブタノール-メチルエチルケトン-アンモニア水-水系溶媒⁷⁾であるS-13およびS-14⁷⁾について*Rf*値をまとめるとTable 4の通りである。展開所要時間は55分~60分であった。

Table 4 Approximate *Rf* values water-soluble coal-tar dyes

Dye	Developer	
	S-13	S-14
Amaranth	0.08	0.14
New Coccine	0.14	0.15
Tartrazine	0.02	0.08
Sunset Yellow FCF	0.28	0.31
Erythrosine	0.50	0.73
Acid Red	0.31	0.28
Brilliant Blue FCF	0.24	0.20
Indigo Carmine	— *	0.24

* Discolouration

結果からわかるように、HPTLC シリカゲル60プレートを用いての水溶性色素の展開溶媒では、S-1, S-2, S-3およびS-6は不適當である。その他の溶媒においては、アゾ系色素は、サンセットイエローFCFを除いては R_f 値が接近しており、比較的判別が困難であった。

キサントレン系色素においては、色素相互間の分離状態およびスポットのまとまりは、前述の4種類の溶媒を除いては、いずれも良好であった。

トリフェニール系色素は、分離は比較的良いが、溶媒によってはテーリングや副スポットが出た。これは、試薬の純度にも一つの原因があると考えられる。

インジゴイド系色素は、最もテーリングや退色があり不安定な色素であるが、 R_f 値が高く、スポットにまとまりがあり、退色の少なかった展開溶媒は、S-5, S-8およびS-13であった。

以上の結果から、8種類の混合水溶性色素を一次元法で比較的良好的な結果が得られる展開溶媒を選択すると、*n*-ブタノール-メチルエチルケトン-アンモニア水-水系溶媒である。しかし、インジゴカルミンはアンモニア濃度が高くなるにつれて退色する性質があるので、更にアンモニア濃度について検討した。

2. アンモニア濃度の検討

n-ブタノール-メチルエチルケトン-アンモニア水-水 (4 : 2 : 1 : 1) 溶媒で、アンモニア濃度のみを、1, 5, 10, 15, 20および25%と変化させて求めた R_f 値は、Fig.1に示す通りである。

アンモニア濃度が高くなるにつれてキサントレン系色素の分離能は良好であるが、インジゴカルミンは退色し、25%アンモニア濃度においては消失した。色素相互の分離や退色の少ない点において、15%アンモニア濃度の場合が最も良好であった。しかし、スポットにいくらか広がりをも認めたのでピリジンを添加し、その割合について検討した。

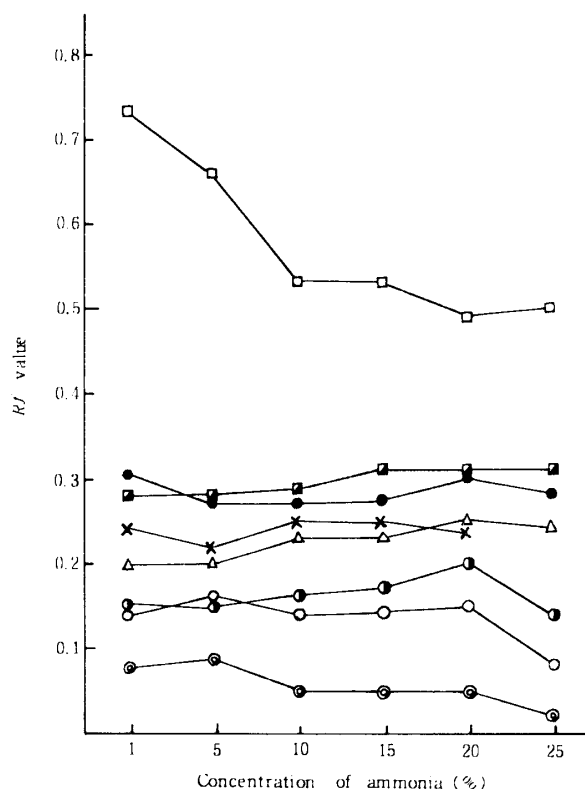


Fig. 1 Relationship between R_f values of the different dyes and concentrations of ammonia in the developer (*n*-butanol, methyl-ethyl-ketone, ammonia and water at the ratio of 4, 2, 1, and 1 in vol.)

○—○ Amaranth ●—● New Coccine
 ⊙—⊙ Tartrazine ●—● Sunset Yellow FCF
 □—□ Erythrosine ■—■ Acid Red
 △—△ Brilliant Blue FCF ×—× Indigo Carmine

3. ピリジンの影響

n-ブタノール-メチルエチルケトン-15%アンモニア水-水 (4 : 2 : 1 : 1) 溶媒にピリジンを添加し, *Rf* 値を求めるとTable 5の通りである。ピリジンの添加割合によってはテーリングを起した。しかし, ピリジンの添加によってスポットがまとまり, 色調が強くなった。0.1の比でピリジンを添加した場合が色素相互の分離も良好であった。

Fig.2 はピリジン添加による影響を示したものである。

Table 5 Approximate *Rf* values of water-soluble coal-tar dyes

Dye	Developer			
	A	B	C	D
Amaranth	0	0.17	0.21*	0.18
New Coccine	0	0.17	0.17	0.16
Tartrazine	0	0.14	0.16	0.13
Sunset Yellow FCF	0.16	0.32	0.42	0.32
Erythrosine	0.48	0.57	0.77	0.58
Acid Red	0.18	0.34	0.33	0.33
Brilliant Blue FCF	0.05	0.25	0.26*	0.24
Indigo Carmine	0.02*	0.27	0.26*	0.27

* Tailing

Developer system

A : *n*-Butanol : Methyl-Ethyl-Ketone : 15% Ammonia : Pyridine (4 : 2 : 1 : 1)

B : *n*-Butanol : Methyl-Ethyl-Ketone : 15% Ammonia : Water : Pyridine (4 : 2 : 1 : 1 : 1)

C : *n*-Butanol : Methyl-Ethyl-Ketone : 15% Ammonia : Water : Pyridine (4 : 2 : 1 : 1 : 0.5)

D : *n*-Butanol : Methyl-Ethyl-Ketone : 15% Ammonia : Water : Pyridine (4 : 2 : 1 : 1 : 0.1)

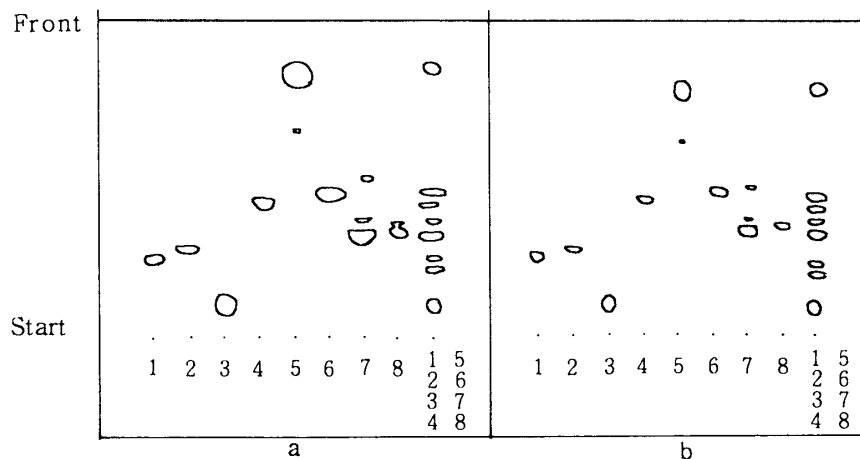


Fig. 2

Comparison of separation of the different dyes with the developer a (*n*-butanol, methyl-ethyl-ketone, 15% ammonia and water at the ratio of 4, 2, 1, and 1 in vol.) and b (the same as the former, but pyridine was added in 0.1 in vol.)

1 Amaranth 2 New Coccine 3 Tartrazine 4 Sunset Yellow FCF

5 Erythrosine 6 Acid Red 7 Brilliant Blue FCF 8 Indigo Carmine

Developer system

a: *n*-Butanol: Methyl-Ethyl-Ketone: 15% Ammonia: Water (4 : 2 : 1 : 1)

b: *n*-Butanol: Methyl-Ethyl-Ketone: 15% Ammonia: Water : Pyridine (4 : 2 : 1 : 1 : 0.1)

4. 塗布濃度の検討

各色素濃度が、0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05および0.1%になるよう混合色素溶液をつくり、それぞれ0.001 mlを塗布し、*n*-ブタノール-メチルエチルケトン-15%アンモニア水-水-ピリジン(4:2:1:1:0.1)溶媒で展開して、呈色および色素相互間の分離について検討した。

Fig. 3 に示すように、試料濃度が高くなるにつれて *R_f* 値は低くなる傾向にある。また、インジゴカルミンは他の色素に比べて退色があり色素濃度が0.01%以上でないとも認めがたい。よって塗布濃度は、0.01%から0.05%以内で良好な結果を得ることができる。

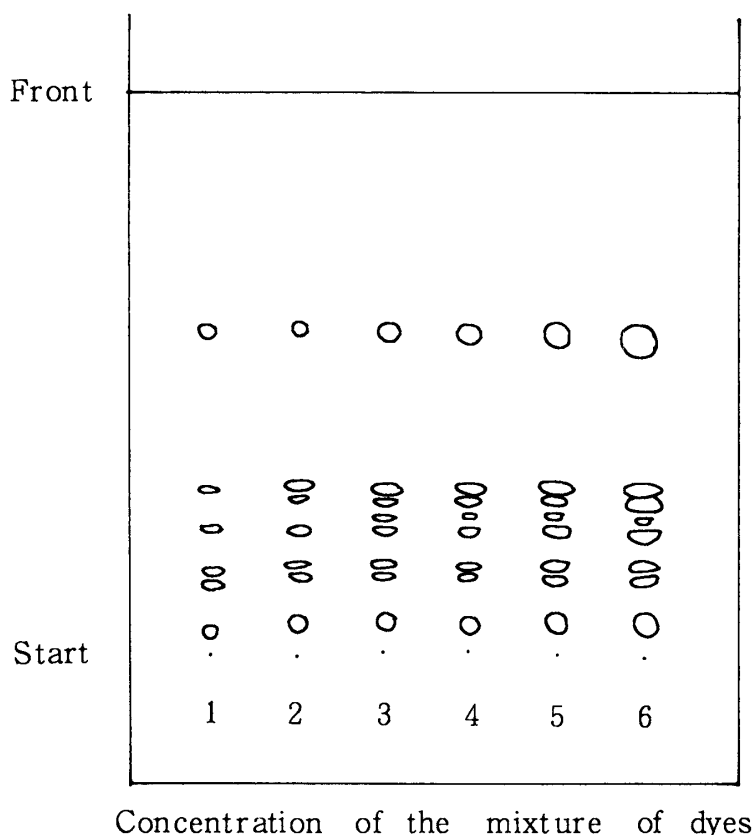


Fig. 3 Separation of spots according to the concentrations of the mixture of different dyes in the developer (*n*-butanol, methyl-ethyl-ketone, 15% ammonia and water at the ratio of 4, 2, 1, 1 and 0.1 in vol.)
 1 0.001% 2 0.002% 3 0.01% 4 0.02% 5 0.05% 6 0.10%
 Erythrosine > Acid Red > Sunset Yellow FCF > Indigo Carmine > Brilliant Blue FCF > New Coccine > Amaranth > Tartrazine

要 約

既製のHPTLC シリカゲル60プレートを用いて、8種類の混合水溶性色素の展開溶媒について検討した。展開溶媒としては、*n*-ブタノール-メチルエチルケトン-15%アンモニア水-水(4:2:1:1)溶媒が、色素相互間の分離が最も良好であった。更に、ピリジンを0.1の比で添加することによってスポットにまとまりを得、エリスロシン>アシッドレッド>サンセットイエローFCF>インジゴカルミ

ン>ブリリアントブルーFCF>ニューコクシン>アマランス>タートラジンの順に分離することができた。

また、色素の塗布濃度は、0.01～0.05%で分離が良好であった。

8 cm 展開するに要した時間は、 26.0 ± 2.0 °Cにおいて約60分であった。

今後更に、食品中の水溶性タール色素の分離法や、色素分離時の共存物質の影響などについて検討したい。

(1978. 10. 21 受理)

文 献

- 1) 神蔵美枝子：臨床栄養，**52**， 676 (1978)
- 2) 柳沢文徳著：『食品衛生の考え方 添加物の安全性』p. 167～186 N H K ブックス，1969年2月発行
- 3) 「赤色2号」の発がん性：朝日新聞 1976年2月14日付
- 4) 神蔵美枝子：食衛誌，**7**， 338 (1966)
- 5) 竹下隆三，坂上米次：衛生化学，**15**， 72 (1969)
- 6) 竹下隆三：衛生化学，**16**， 293 (1970)
- 7) 西島基弘，上村尚他：食衛誌，**18**， 463 (1977)
- 8) 野田明男，綿節子：食衛誌，**18**， 321 (1977)
- 9) R. E. カイザー著，原昭二監訳：『高性能薄層クロマトグラフィー』，講談社，1978年2月発行
- 10) 藤井清次，神蔵美枝子：化学の領域，**64**， 173 (1964)
- 11) J. F. Barrett, A. J. Ryan : *Nature*, **199**, 372 (1963)