

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II報)

—DEAE-Sephadex を用いる分離・定性法—

高 木 瞳

Studies on Separation of the Dyes in Foods by means of High Performance Thin-Layer Chromatography (Part II)

On the separation and qualitative analysis with DEAE-Sephadex

Hitomi Takagi

The dyes in foods were separated and purified by DEAE-Sephadex ion exchange chromatography, and the separated dyes were analysed by high performance thin-layer chromatography.

1) The adsorption of tested dyes to DEAE-Sephadex was made at pH 2.8~11.7 of the extract solutions.

2) The quantity of dyes adsorbed to 0.5 ml Sephadex suspension was maximum in Indigo Carmine, amounting to 90 μ g, and minimum in Acid Red, the value being 18 μ g, among 8 dyes (Amaranth, New Coccine, Tartrazine, Sunset Yellow FCF, Erythrosin, Acid Red, Brilliant Blue FCF, and Indigo Carmine) mentioned in the text.

3) As the eluate for separating dyes from the adsorbent (Sephadex), equal volume mixture of 2N-Sulfuric acid and 50% Isopropanol was most excellent.

4) As to the eluate for Brilliant Blue FCF, the mixture of 2N-Sulfuric acid and 50% Isopropanol was most excellent when the concentration of the extract was less than 0.008 %, and on the other hand, when it was below 0.03% the mixture of 2M-Acetic acid-Sodium acetate Buffer and 50 % Isopropanol was better because this stopped eluation of the accompanying dyes.

結 言

近年, 高性能薄層クロマトグラフィー(以下 HPTLC とする)が開発され, 薄層クロマトグラフィー

に代わるものとして使用されつつある。

この HPTLC プレートは、従来の薄層クロマトグラフィープレートに比べて、薄層表面が非常に平滑かつ均質であるため分離能も高く、スポットの拡散も非常に小さい。よって、微量の試料で短時間に定性分析ができる利点がある。

そこで、この HPTLC プレートを用いて、食品中の水溶性タール色素の分離・定性を行う目的で前報⁽¹⁾では展開溶媒について検討した。

今回は、色素抽出液の精製における条件および展開溶媒におよぼす影響について検討した。

現在、食品より抽出された色素溶液を精製する方法としては、毛糸染色法⁽²⁾が一般に用いられているが、この方法は、着色料を毛糸に染色する際に、酸およびアルカリで加熱操作を行うため、着色料によっては不溶化して、毛糸への吸着が弱くなるという問題がある。また、試験溶液を調製するには、毛糸染色、脱色そして濃縮するなど、操作に時間がかかるということである。

その他の精製法として、陰イオン交換体のアンバーライト LA-2 を用いる方法⁽³⁾⁽⁴⁾や、DEAE-Sephadex A-25 を用いる方法⁽⁵⁾などが報告されている。

しかし、アンバーライト LA-2 を利用しての方法は、LA-2 を含む有機溶媒に溶出された着色料を逆抽出する時に用いるアンモニア水が、インジゴカルミンを不安定にする点に問題が残る。

DEAE-Sephadex A-25 を利用しての方法は、着色料の精製と濃縮が同時に行えること、吸着された着色料は酸を用いて逆抽出するので着色料への影響が少ないなどの利点がある。

著者は、DEAE-Sephadex を用いる方法により、着色料のクリーンアップおよび、その展開における諸条件について検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 試 薬

i) DEAE-Sephadex A-25, 40~120 μ , (Pharmacia 社): 市販品 Cl 型を水で十分に膨潤させカラムにつめ、溶出液中に Cl⁻ が消失する程度まで 0.5 N-アンモニア水を流下したのち水で十分洗浄し、OH 型にする。保存は、水に浸漬し冷蔵庫内で行った。

ii) DEAE-Sephadex 懸濁液: DEAE-Sephadex A-25 (OH 型) に同重量の水を加えて混合したものを用時攪拌して用いた。

iii) 着色料溶出液: ① 2 N-硫酸: 50%, iso-プロパノール (1:1) 混合液, ② 2N-塩酸: 50% iso-プロパノール (1:1) 混合液, ③ 2M-酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液: 50% iso-プロパノール (1:1) 混合液

iv) 標準着色料: 前報⁽¹⁾と同様, 8 種類の法定色素 (三栄化学) を用いた。なお, インジゴカルミンについては, 用時調製して用いた。

v) 展開溶媒: 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) 混合液

試薬は, いずれも JIS 特級試薬を用いた。

2. 装置および器具

i) 小カラム：図1に示すようなカラムを用い、下端部にガラスウールをつめて滴下速度を調節したものを用いた。

ii) HPTLC プレート：Fertig Platten Silicagel 60 (Merck 社) 10×10cm, Art. 5631

iii) 展開槽：ハンキング式薄層クロマト展開槽 HPS-204型

3. 試験溶液の調製

i) 抽出：各標準着色料を0.01%濃度になるよう再蒸留水で溶解したものを抽出溶液として使用した。

ii) 精製：小試験管に DEAE-Sephadex 懸濁液0.5mlを入れ、これに抽出液を少量ずつ加えてよく混合し、上澄液に着色が残る程度まで加えて十分吸着させる。2～3分静置したのち上澄液をすて、残った DEAE-Sephadex-着色料吸着体 (以下吸着体とする) を洗液が混濁しなくなるまで水で洗浄し、静置して洗液をすてる。次に、この吸着体に50% iso-プロパノール 5 mlを加えて、5分間静置する。あらかじめ小カラム管中を50% iso-プロパノールで満したところに駒込ピペットで吸着体を少量ずつ注入して、ガラスウール上約1.0cm程度までつめる。過量の50% iso プロパノールを流出したのち、溶出液を徐々に加えて吸着体から着色料を溶出し、カラム先端から滴下する着色料の最も濃厚な部分を分取し、これを試験溶液とした。

4. 操 作

試験溶液の同定は、HPTLC プレートをを用いて前報⁽¹⁾に準じて展開し、Rf 値を求めた。

なお、展開時の室温は29.0±2℃であった。

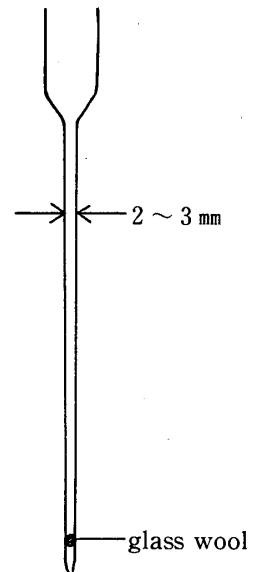


Fig. 1 Micro-chromatographic Tube

結果および考察

1. 吸着条件の検討

Type	Dye	Wavelength(mμ)
Azo	Amaranth	520
	New Coccine	508
	Tartrazine	428
	Sunset Yellow FCF	482
Xanthine	Erythrosine	526
	Acid Red	566
Triphenyl	Brilliant Blue FCF	612
Indigoid	Indigo Carmine	630

Type	Dye	a (×10 ⁻²)
Azo	Amaranth	4.00
	New Coccine	3.34
	Tartrazine	4.40
	Sunset Yellow FCF	5.15
Xanthine	Erythrosine	0.101
	Acid Red	0.185
Triphenyl	Brilliant Blue FCF	0.118
Indigoid	Indigo Carmine	4.27

$y = a \times 10^{-2} x$
 y : absorbance
 x : concentration of dyes (μg/ml)

1) 検量線の作成

各標準着色料10, 50, 100, 300および500 μ gをそれぞれ0.02 N-酢酸アモニウム溶液で溶解して100mlとし、各濃度の吸光度を表1に示す波長で測定した。分光光度計は、日立101型を使用した。

各標準着色料の検量線は、いずれも原点を通る直線で、 $y = ax$ の式で表わすのことができる。表2は、各着色料の比例定数 a を示したものである。比例定数は、アゾ系およびインジゴイド系着色料が大きく、キサンチン系およびトリフェニール系の着色料は小さいことがわかる。

2) 吸着容量の比較

抽出溶液のpHが、DEAE-Sephadexへの吸着容量に影響を与えるか調べた。

それぞれのpHに調製した0.01%標準着色料溶液を、懸濁液0.5mlに着色料が飽和になるまで吸着させ、それぞれの上澄液を中和して、検量線作成と同様に比色定量した。各着色料の吸着容量を求めた結果が、図2である。

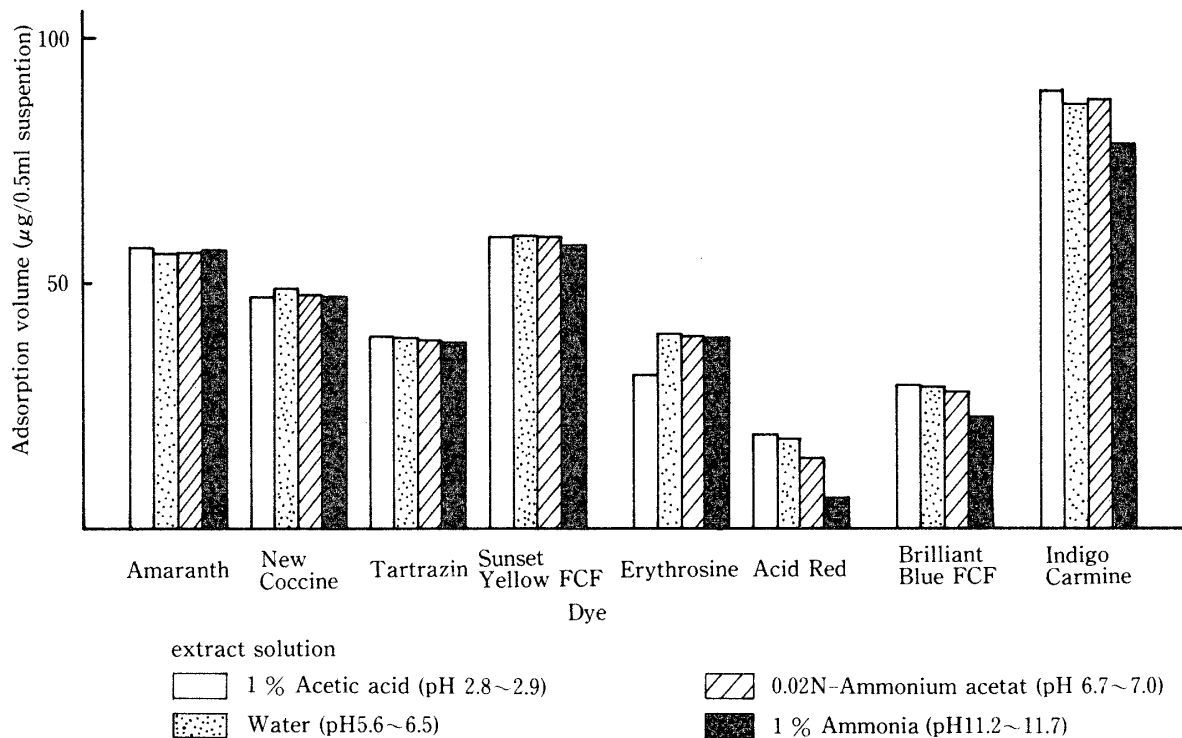


Fig. 2 Influence of extract eluate pH on adsorption to Sephadex in each dye

吸着容量は、インジゴカルミンが最大で、最も小さいアシッドレッドの約5倍であった。また、エリスロシンを除いては、酸性側での吸着が良好であったが、pH 2.8~11.7と広い範囲で吸着されている。

以上のことから、吸着においては、抽出溶液は弱酸性側で、着色料は約90 μ g含有されておれば、DEAE-Sephadex懸濁液の吸着は飽和状態に達したとした。

2. 溶出条件の検討

1) 着色料溶出液の選択

溶出液として、2 N-硫酸：50% iso-プロパノール（1：1）混合液および2 N塩酸：50% iso-プロパノール（1：1）混合液について検討した。

Table 3 Influence of H₂SO₄ and HCl on developing of Dyes

Dye	Rf value		
	Control	H ₂ SO ₄	HCl
Amaranth	0.20	0.19	0.08~0.18*
New Coccine	0.22	0.21	0.18
Tartrazine	0.11	0.09	0.08
Sunset Yellow FCF	0.30	0.31	0.27
Erythrosin	0.54	0.54	0.55
Acid Red	0.32	0.32	0.31
Brilliant Blue FCF	0.24	0.23	0.20
Indigo Carmine	0.26	0.27	——**

* tailing

** faded

まず、既定の展開溶媒において硫酸および塩酸が着色料に影響を与えるかどうかを調べた。

各標準着色料溶液をプレート上に2点ずつスポットし、一方の同一点上に2N-硫酸を他方には2N-塩酸を塗布し展開した。同時に対照として標準着色料溶液も行った。

表3に示すとおり、塩酸によりアマランスおよびインジゴカルミンは大きく影響を受け、その他の着色料においても対照に比べてRf値が低くなっている。硫酸においてはRf値が対照に近い値で、全体に影響は少ない。竹下らの実験によると、展開溶媒の種類によっては塩酸がRf値に影響を与えることがあると報告⁽⁵⁾されているが、本実験に用いた展開溶媒においてもその影響がみられた。

以上のことから、着色料溶出液は、2N-硫酸と50% iso-プロパノールの等量混合液を用いることとした。

2) アンモニア水のRf値への影響

試験溶液のスポット時の条件について検討した。

試験溶液およびそれを10%アンモニア水で中和した溶液それぞれを展開し、Rf値について比較した。対照として各標準着色料も同時に行った。

表4は、それぞれのスポットのRf値を示したものである。

アルカリに不安定なインジゴカルミンは、中和に用いたアンモニアによって退色した。

Table 4 Rf value of neutralizing eluates and eluates

Dye	0.01% Dye solution	2N-H ₂ SO ₄ : 50% iso PrOH (1 : 1)	
		Non-neutralization	Neutralization
Amaranth	0.19	0.19	0.19
New Coccine	0.22	0.21	0.21
Tartrazine	0.11	0.10	0.10
Sunset Yellow FCF	0.33	0.33	0.33
Erythrosine	0.60	0.61	0.61
Acid Red	0.36	0.36	0.35
Brilliant Blue FCF	0.26	0.25	0.27
Indigo Carmine	0.28	0.28	——*

* faded

その他, Rf 値については, 試験溶液は強い酸性を示すにもかかわらず, 本展開溶媒においては三者の間に顕著な差は認められなかった。

よって, 本実験に用いた展開溶媒においては, スポット時の中和の必要性はないと考える。

エリスロシンは, pH 4.5 以下で不溶化するため, 溶出時において色調がうすくなったが, HPTLC プレートでの展開は, スポットも鮮明で Rf 値にも大きな影響は認められなかった。

また, ブリリアントブルー FCF は, 展開において青色の他にあらたに紅紫色のスポットが出現したが, これは濃縮されて着色料濃度が高くなったため付随色素が生じたと考えられる。そこで, ブリリアントブルー FCF の抽出溶液濃度および溶出液について検討した。

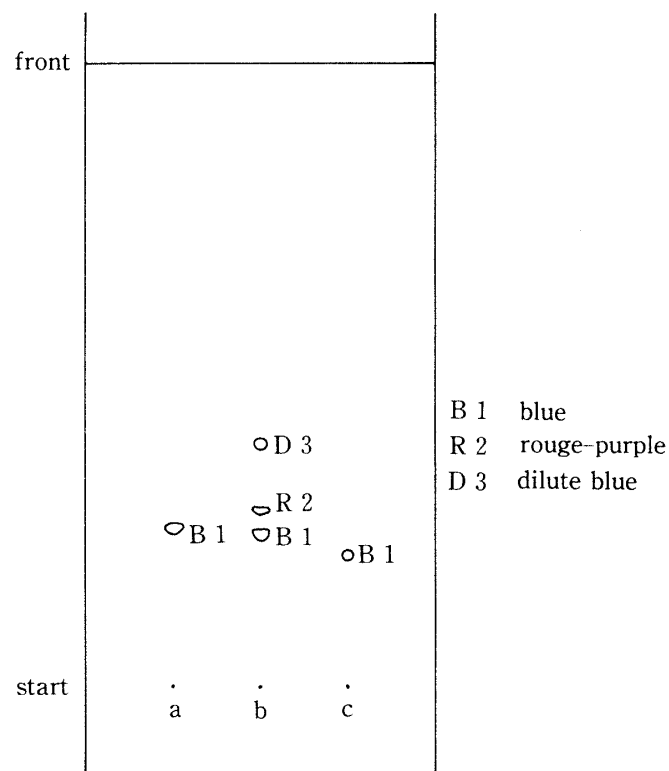
3. ブリリアントブルー FCF の溶出液および抽出溶液濃度の検討

付随色素の出現を押さえるため, 溶出液および抽出溶液の着色料濃度について検討した。

図 3 は, 溶出液を変えて分離したものである。

2 N-硫酸に代わるものとして, 2 M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液と50% isoプロパノールを用いて溶出し展開したのが図 4 の C である。スポットの呈色はうすいが, 付随色素は分離されていない。

次に, 着色料濃度を0.001, 0.008, 0.01, 0.03および0.5%とした抽出溶液を, それぞれの溶出液で溶出し展開した。表 5 に示すのが, Rf 値を比較したものである。



a control
b eluate : 2N-H₂SO₄ : 50% Isopropanol (1 : 1)
c eluate : 2M-Acetic acid-Sodium acetate Buffer : 50% Isopropanol (1 : 1)

Fig. 3 Development of Brilliant Blue FCF by different eluates in 0.01% concentration of the extract

Table 5 Approximate Rf values and coloration of the difarance extracting solutions

Concentration (%)	Elution					
	2N-H ₂ SO ₄ : 50% iso PrOH			2M-Acetate Buffer : 50% iso PrOH		
	Blue	Rouge-purple	dilute Blue	Blue	Rouge-purple	dilute Blue
0.001	0.24			0.22		
0.008	0.25			0.22		
0.010	0.26	0.28	0.38	0.22		
0.030	0.25	0.28	0.37	0.21		
0.050	0.26	0.29	0.39	0.22	0.25	0.37
control	0.26					

表からわかるように 2 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液-50% isoプロパノールは、着色料濃度の 0.03%以下では付随色素の溶出を押さえるが、Rf 値は低くなっている。

また 2 N-硫酸-50% isoプロパノールで溶出された場合は、Rf 値は標準着色料とほぼ一致するが、抽出溶液の着色料濃度は0.008%以下でなければならない。

しかし、着色料には使用基準の規定はないが、食品の着色には通常0.01%前後の濃度で使用⁽⁶⁾⁽⁷⁾されていることから、溶出液は 2 N 硫酸-50% iso-プロパノール混合液で、抽出溶液の着色料濃度は、0.008%以下に調製する必要がある。

4. 食品中からの着色料の抽出

市販食品について、実験方法に従って試験した。

抽出においては、粉末ジュース、アメおよび炭酸飲料は水に溶解した上澄液を、かまぼこ、ねりわさびなどは80%エチルアルコールで抽出した上澄液を、それぞれ抽出溶液とした。

実験方法に従って DEAE-Sephadex を用いて精製し、展開を行ったが、着色料を分離・同定することができた。

要 約

食品中の着色料を分離・精製する目的で、DEAE-Sephadex を用いてイオン交換を行い、更に、高性能薄層クロマトグラフィーを用いて、定性分析した。

1) 供試検体の DEAE-Sephadex への吸着は、抽出溶液の pH が2.8~11.7の広い範囲で行える。

2) 吸着容量は、8種類の着色料（アマランス、ニューコクシン、タートラジン、サンセットイエロー FCF, エリスロシン, アシッドレッド, ブリリアントブルー FCF そしてインジゴカルミン）のうち、DEAE-Sephadex 懸濁液0.5mlに対して、インジゴカルミンが最大で90 μ g, 最も小さいアシッドレッドは、18 μ g であった。

3) DEAE-Sephadex-着色料吸着体からの着色料の溶出液は、2 N-硫酸と50% iso-プロパノールの等量混合液が良好であった。

4) ブリリアントブルー FCF についての溶出液は、供試検体の着色料濃度が0.008%以下の場合、2 N-硫酸と50% iso-プロパノールが最適であるが、0.03%までは、2 M-酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液と50% iso プロパノールが付随色素の出現を押えた。

本報告の要旨は、1979年10月7日、日本家政学会第31回総会において発表した。

文 献

- (1) 高木瞳：聖徳学園女子短期大学紀要，第5集，167~174，(1979)
- (2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，351~366 (1980) 金原出版
- (3) 西島基弘，上村尚ら：食衛誌，18，(5)，463~469，(1977)
- (4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，366~368，(1980) 金原出版
- (5) 竹下隆三，坂上米次：衛生化学，15，72~76，(1969)

- (6) 川城巖, 藤井清次編: 食品添加物試験法—機器分析を中心として—, 5~41, (1966) 東京化学同人
- (7) 佐々木英人: 食衛誌, 20, (2), 93~100, (1979)

(1981. 10. 12. 受理)