

セファデックスによる食用色素の分離分析法について

駒井 功一郎*, 佐藤 庄太郎*

Studies on Separation and Analysis of Food Dyes by Sephadex Column Chromatography

Koichiro KOMAI and Shotaro SATO

A simple method for separation and determination of food dyes was investigated by using Sephadex G-10 and LH-20. Eluants were used in the condition of simple aqueous solution and 50% ethyl alcohol solution of sodium phosphate dibasic.

Adsorption intensity of Sephadex and food dyes was expressed as R values. R values of the dyes in above mentioned eluants was ratio of two distances dyes band and eluant surface in a Sephadex column that travelled. The dyes containing halogen radical was strongly shown adsorption on both Sephadex G-10 and LH-20. Elution of the dyes from such a column was easier LH-20 than G-10.

The chromatogram for separation of mixture twelve kinds of dyes was developing until the fastest bands (blue or red) reached bottom of the column. By using 0.002M sodium phosphate solution as the eluant, 12 food dyes were separated into seven groups on Sephadex G-10, that is A (Acid Red), B (Brilliant Blue FCF), C (Tartrazine), D (Acid Violet 6B, New Coccine), E (Sunset Yellow FCF, Erythrosine, Amaranth, Indigocarmine), F (Eosine), G (Rose Bengale, Phloxine).

Separation and determination from a mixture of ordinary SHOYU SAUCE using for ARARE (rice-cake cubes) and eight kinds of dyes was developed until all of fast elute bands (blue, red and yellow) eluted from bottom of the column. The dyes between Amaranth, Sunset Yellow FCF and Indigocarmine in E group could not be separated on Sephadex G-10 and LH-20 in this case. But they were separated by exchange the electrolyte concentration of eluants from 0.02M to 0.006M in the developing process.

ま え が き

食品中のタール色素を分離および分析するには種々の方法¹⁾²⁾³⁾⁴⁾があるが、多くの場合数種の方法を併用して実施されている。色素定量のためには複雑な抽出、分離などの前処理は実験精度を低下させることになり、できるだけ簡単に、しかも多量の試料が得られる抽出、分離法がのぞまれる。

* 農芸化学科，農業化学研究室 (Lab. of Agr. Chemicals, Dept. of Agr. Chem.)

著者らは架橋度の密なセファデックスがタール色素と特異的な吸着を示すことを知り、その性質を利用すれば食品中のタール色素を分離できることを認めた。

一般的にセファデックスは分子ふるい効果として用いられるが、本法では一種の吸着効果を利用する方法で、その吸着は芳香族、異項環化合物の吸着と類似⁶⁾のものと考えられる。

J. R. PARRISH⁵⁾らはセファデックス G-25 による食用色素の分析を報告しているが、吸着の弱い色素はテーリングが生じ、多種類色素の混合物の分離には適さない。

本実験はリン酸塩の低電解質溶液を溶離剤とし、交換体として水溶液に適する G-10 と有機溶剤に適する LH-20 の二種のセファデックスを供試してカラムクロマトグラフィーを行ない、タール色素の分離、分析への応用とその精度について検討した。

材 料 お よ び 試 薬

I 材 料

食用色素は現在使用されているタール系水溶性色素 12 種を用い、それぞれ $10^{-3}M$ に調製した。

Rose Bengale	R-105	(東京化成)
Phloxine	R-104	(東京化成)
Eosine	R-103	(和光純薬)
Erythrosine	R-3	(保土谷化学)
Sunset yellow FCF	Y-5	(保土谷化学)
Amaranth	R-2	(東京化成)
Indigocarmine	B-2	(和光純薬)
Acid Violet	V-1	(保土谷化学)
New Coccine	R-102	(保土谷化学)
Tartrazine	Y-4	(保土谷化学)
Brilliant Blue FCF	B-1	(保土谷化学)
Acid Red	R-106	(保土谷化学)

なお、食品からの回収を検討するため、とくに色素無添加のアラレに使用されている製菓用しょう油を供試した。しょう油の主な成分分析値は次の通りである。

全窒素：2.25%，アミノ態窒素：1.01%，塩化ナトリウム：15.01%，還元糖：8.0%，砂糖カラメル：85 g/l, pH：5.05

II 試 薬

1) 溶 離 液：リン酸二ナトリウム（無水）和光純薬の 0.006 M, 0.02 M, 0.07 M, 0.15 M 各水溶液および 50% エタノール溶液を調製した。

2) 吸着剤：セファデックス G-10 (Particle size 40~120 μ と セファデックス LH-20 (Particle size 25~100 μ) を用いた。

実験および結果

I 色素の R 値測定

長さ 40 cm, 内径 0.6 cm のガラス管の一端にガラスウールをつめ、溶離液で 24 時間膨潤したセファデックス G-10 および LH-20 を厚さ 20 cm になるように均一に充填してカラムを作成する。その後色素溶液 0.5 ml をカラム上部に加え、溶離液で展開溶離さす。室温 (約 20°), 流速 5~7 ml/hr で 1 時間展開後、溶離剤の液面が a cm 下降したときに色素帯の中心がセファデックス層の上面から b cm までの距離を移動したときの比 ($R = b/a$) で R 値を求め、色素吸着を表わした。

その結果は Table 1, Table 2 に示すように、蒸留水、50%エチルアルコールに比してリン酸二ナトリウム溶液では吸着が著しく増加し、R 値は小さくなった。吸着は LH-20 よりも G-10 の方がいくぶん強いが、LH-20, G-10 とも電解質濃度に比例して吸着力が増加することを認めた。またアルコール存在下では吸着力は多少減少する傾向を示した。

Table 1. R Values of Dyes on Sephadex G-10 Column Chromatography

Dyes	Numbers of the halogen radical in each molecule of Dyes	R Values				
		1	2	3	4	5
Rose Bengale (R-105)	I (4), cl (4)	1.272	0.006	0.006	0.006	0.006
Phloxine (R-104)	Er (4), cl (4)	0.954	0.015	0.015	0.015	0.012
Eosine (R-103)	Br (4),	0.954	0.021	0.021	0.021	0.015
Erythrosine (R-3)	I (4)	1.636	0.042	0.042	0.030	0.021
Sunset Yellow FCF (Y-5)		1.818	0.045	0.042	0.033	0.021
Amaranth (R-2)		1.690	0.061	0.086	0.045	0.027
Indigocamine (B-2)		1.954	0.070	0.061	0.061	0.030
Acid Violet 6B (V-1)		1.590	0.151	0.128	0.076	0.067
New Coccine (R-102)		1.272	0.151	0.133	0.112	0.061
Tartrazine (Y-4)		1.863	0.566	0.473	0.241	0.136
Brilliant Blue FCF (B-1)		1.811	0.591	0.530	0.363	0.272
Acid Red (R-106)		1.954	0.586	0.560	0.485	0.294

Eluants

- 1: Distilled Water
- 2: 0.006 M Sodium Phosphate Solution
- 3: 0.02 M Sodium Phosphate Solution
- 4: 0.07 M Sodium Phosphate Solution
- 5: 0.15 M Sodium Phosphate Solution

R Value

$$R = \frac{\text{travell distance of dye band (cm)}}{\text{travell distance of eluant surface (cm)}}$$

Table 2. R Values of Dyes on Sephadex LH-20 Column Chromatography

Dyes	R Value				
	1	2	3	4	5
Rose Bengale	0.871	0.010	0.008	0.028	0.008
Phloxine	0.880	0.045	0.015	0.059	0.015
Eosine	0.931	0.092	0.025	0.136	0.020
Erythrosine	1.031	0.087	0.031	0.064	0.024
Sunset Yellow FCF	1.532	0.168	0.062	0.405	0.025
Amaranth	1.663	0.232	0.069	0.325	0.048
Indigocarmine	1.432	0.281	0.098	0.598	0.073
Acid Violet 6B	1.658	0.309	0.114	0.627	0.094
New Coccine	1.693	0.330	0.127	0.681	0.109
Tartrazine	1.894	0.437	0.295	1.024	0.181
Brilliant Blue FCF	1.902	0.664	0.438	1.113	0.347
Acid Red	1.799	0.614	0.400	1.080	0.360

Eluants

- 1 : 50 % Ethyl Alcohol
- 2 : 0.006 M Sodium Phosphate Solution
- 3 : 0.02 M Sodium Phosphate Solution
- 4 : 0.02 M Sodium phosphate Solution Containing
50 % Ethyl Alcohol
- 5 : 0.15 M Sodium Phosphate Solution

II セファデックスからの色素の回収率測定

R値を測定した色素帯をガラス管を切断してセファデックス層から分離し、吸着の弱い色素は水

Table 3. Wave Length Used for Standard Curve of Dyes

Dyes	Solvents	Wave Length m μ
Rose Bengale	P., EtOH	550
Phloxine	P., EtOH	540
Eosine	P., EtOH	518
Erythrosine	P., EtOH	526
Sunset Yellow FCF	P., EtOH	482
Amaranth	P., EtOH	520
Indigocarmine	P., EtOH	612
Acid Violet 6B	P., EtOH	550
New Coccine	P., EtOH	510
Tartrazine	P.	430
Brilliant Blue FCF	P.	630
Acid Red	P.	566

Solvents

- P. : 0.006 M Sodium Phosphate Solution
EtOH : 50 % Ethyl Alcohol

または50%エタノールで、吸着の強い色素は1%アンモニア水を含むエタノールで3~4回抽出し、抽出液を定容後、各色素の極大吸収波長域にて1cmセルで吸光度を測定し、Table 3の条件で求めた検量線より色素量を算出して回収率を求めた。

その結果はFig. 1, Fig. 2のようであった。G-10, LH-20とも溶離液濃度の低下とともに回収率も好結果を示したが、全般的には吸着のやや弱いLH-20の方が良好であった。

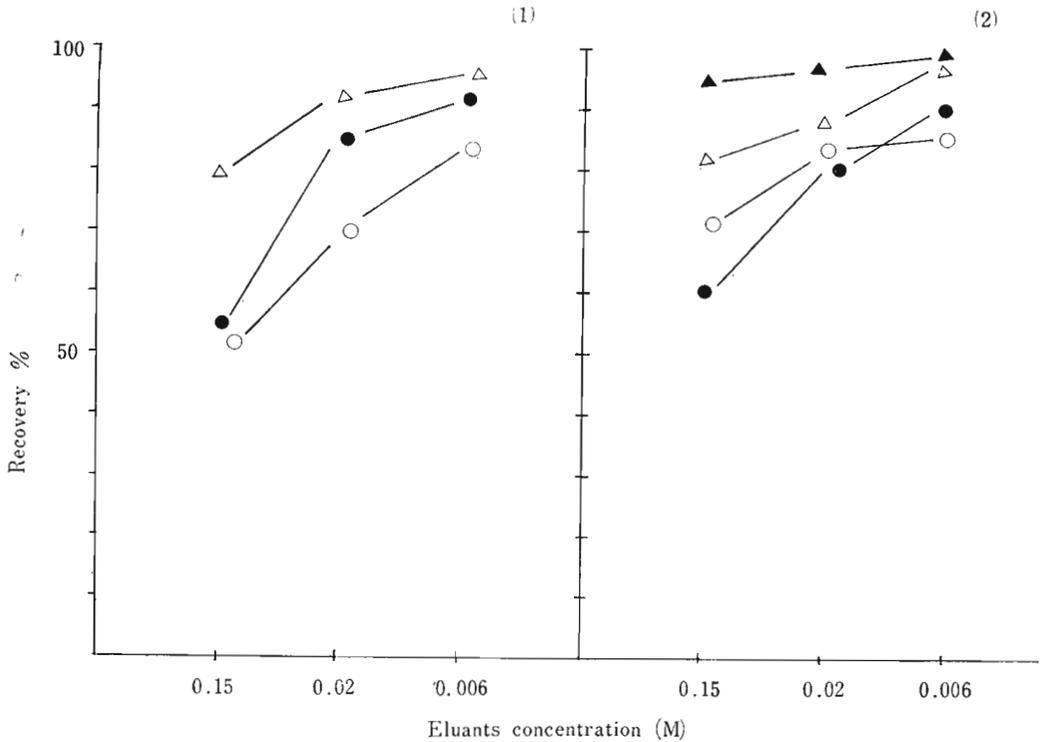


Fig. 1. Relation of eluants concentration and recovery ratio from Sephadex G-10

Eluant : Sodium Phosphate Solution

- (1) ○—○ R-105
- R-104, R-103, R-3
- △—△ Y-5, R-2
- (2) ○—○ B-2
- V-1, R-102
- ▲—▲ R-106
- △—△ Y-4, B-1

III 多種類色素混合物の分離

長さ100cm, 内径0.8cmのガラス管に、セファデックスG-10およびLH-20を厚さ80cmになるように充填し、カラムを作成する。前記12種の色素液5mlづつを混合してその2mlをカラム上部に加え、G-10は0.02Mリン酸ニナトリウム水溶液、LH-20では0.02Mリン酸ニナトリウムの水溶液および50%アルコール溶液を溶離剤として分離能の比較検討を行なった。一番

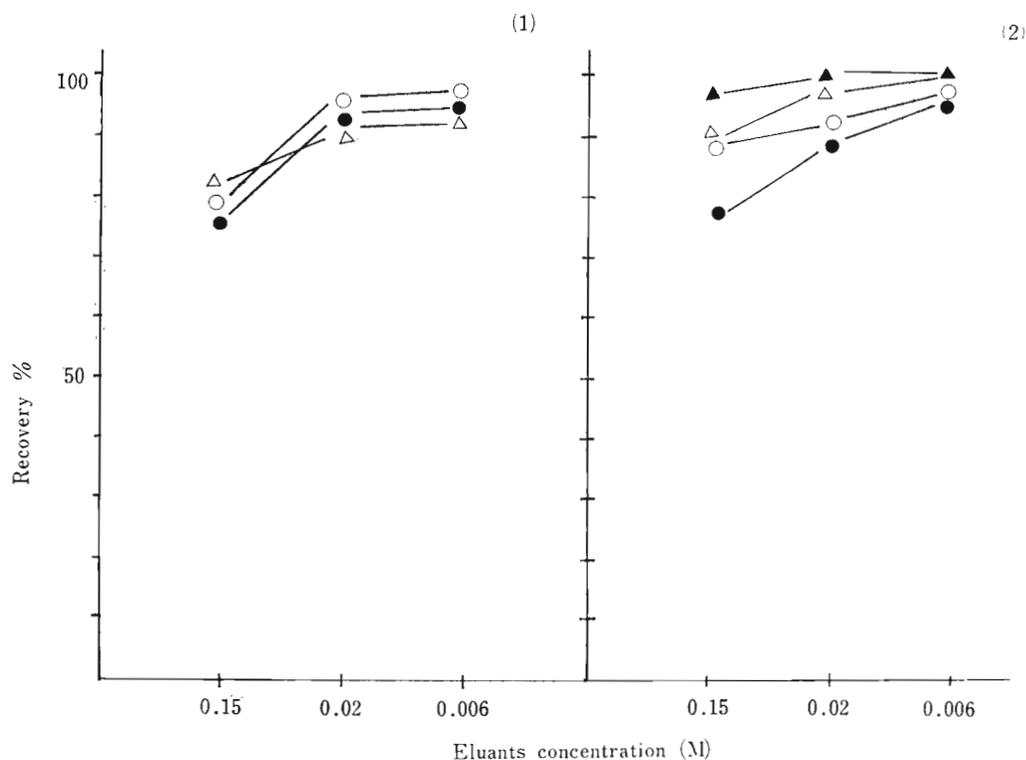


Fig. 2. Relation of eluants concentration and recovery ratio from Sephadex LH-20

Eluant : Sodium Phosphate Solution

(1) ○—○ R-105, R-104

●—● R-103

△—△ R-3

(2) ○—○ Y-5, R-2

●—● B-2

△—△ V-1, R-102, Y-4

▲—▲ B-1, R-106

移動の速い色素が下端に達したとき展開を終了し、その後分離色素帯付近からガラス管を切断して色素帯を分別し、抽出して可視部吸収スペクトルを測定し、色素の確認を行なった。

その結果、リン酸ニナトリウム水溶液では Fig. 3 のように、G-10 では A, B, C, D, E, F, G の 7 グループに、LH-20 では A, B, C, D, E, F の 6 グループに分離することができた。一方、リン酸ニナトリウム 50% アルコール溶液により、LH-20 で実施したがテーリングが強く有効な分離を示さなかった。しかし、電解質濃度を高くすることで水溶液同様の分離がえられた。

IV しょう油中の色素分離と回収率の測定

食品からの分離、回収を検討するため、アラレに使用されている製菓用しょう油に大別したグループから 8 種の色素 (R-104, R-2, Y-5, B-2, R-102, Y-4, B-1, R-106) を選び、そ

の一定量を添加し、その混合溶液 2ml をⅢと同様に作成した G-10 および LH-20 のカラムに加え、クロマトグラフィーを行なった。

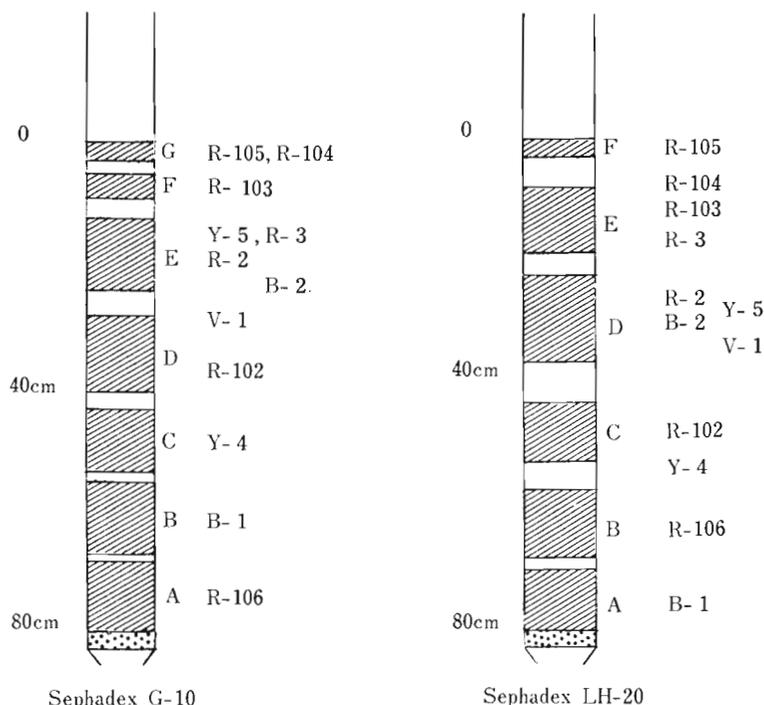


Fig. 3. Chromatogram of mixture twelve kinds of dyes by Sephadex G-10 and LH-20

G-10では最初 0.02M リン酸ニナトリウムで展開し、しょう油のカaramel色素が溶出されたところで 0.006M に濃度を低下させて展開した。展開中 R-106, B-1, Y-4などは分離し、カラム下端から溶出され、R 値の類似した B-2, Y-5, R-102 間の色素も完全に分離した。また LH-20 では 0.02M リン酸ニナトリウム水溶液で分離不能の Y-5 と R-2 の色素も分離した。

Table 4. Recovery Ratio of Dyes from the Mixture of Shoyu Sauce Using for ARARE and Eight Kinds of Dyes by Sephadex G-10 and LH-20 Column Chromatography

Dyes	Added (mg/L)	Sephadex G-10		Sephadex LH-20	
		Found(mg/L)	Recovery (%)	Found (mg/L)	Recovery (%)
Phloxine	24.6	20.4	82.9	22.8	92.7
Ameranth	15.3	14.5	94.8	14.3	93.5
Sunset Yellow FCF	51.0	47.1	92.2	50.6	99.2
Indigocarmine	22.8	18.9	82.5	21.4	93.9
New Coccine	15.1	13.5	89.4	14.1	93.4
Tartrazine	301.4	296.7	98.4	298.5	99.0
Brilliant Blue FCF	52.6	52.3	99.4	52.0	98.9
Acid Red	149.3	148.1	99.2	148.9	99.7

カラム中の色素帯を前記同様に分離，抽出し，回収率を求めた。検量線作成，色素確認には日立自記分光光度計 EPS-3T 型を用いた。

その結果は Table 4 に示した。8種類の色素分離にはしょう油の影響はなかった。色素分離を完全にし，展開時間を短縮するために展開途中で溶離剤濃度および種類を変えることが有効であった。色素回収は G-10 よりも LH-20 の方が容易で，回収率も好結果を示した。

考 察

セファデックスとタール色素の吸着はセファデックスによって異なり，G-10 に比べて架橋度のやや粗である LH-20 では減少し，一方，ハロゲン基をもつ色素 (R-105, R-104, R-103, R-3) が顕著な吸着を示すことから，セファデックス中に微量存在するカルボキシル基とのイオン交換的な吸着が考えられる。しかし，ハロゲン基をもたない色素間でも明らかな吸差異があるところから，そこには色素間の構造効果による吸着の強弱が存在するものと想定した。

色素の R 値は溶離剤濃度によっても異なり，正確な再現性はのぞめないが，カラム内での定性確認にはさしつかえない。一方セファデックスからの色素回収は吸着力により大きく左右される。そのため回収操作は吸着の弱い LH-20 の方が容易である。しかし，B-2 では回収操作中分解退色がみられ，他に比して回収率が低下した。

多種類色素混合物の分離能は LH-20 よりも G-10 の方が優れているが，混合色素が数種のときは LH-20 の方が有効である。また分離能をより向上させるためには展開途中の溶離剤交換が必要で，LH-20 ではアルコールなどの有機溶媒系の溶離剤の使用で分離能を高め，展開時間を短縮することができた。

要 約

タール色素とセファデックスとの特異的吸着を利用してカラクロマトグラフィーを実施し，タール色素の分離，分析に応用することを試みた。

(1) 本法では薄層クロマトグラフィーやろ紙クロマトグラフィーのごとく糸染色法などの食用色素の抽出前処理操作を必要とせず，直接試料添加することにより，色素の分離，抽出ができる。

(2) カラムの長さ，径を変えることで，ある程度多種類の色素混合物でも完全に分離でき，一度に多量の色素溶液がえられるので，定量に都合がよい。

(3) ほぼ一定の R 値を示すのでカラム内での色素確認が可能である。

(4) 精度の高い定量値をえるためには回収容易な LH-20 が適する。これはまた，有機溶媒系溶離剤の使用が可能のため，粉末，固型試料中の色素の直接分離分析に応用できる。

以上のことより本方法は食用色素の分離分析に十分使用できることを認めた。

本研究を行なうに当たり、試料提供のお世話になったトヨス製菓株式会社研究室坂下晴彦氏に感謝いたします。

本研究の一部は食品衛生学会第 17 回学術講演会で発表した。

文 献

- 1) 高木茂明：食衛誌，9，399 (1968)
- 2) 寺島敏雄：食衛誌，8，46 (1967)
- 3) 藤川福二郎他：食衛誌，8，467 (1967)
- 4) 能勢憲英：食衛誌，11，46 (1970)
- 5) J. R. PARRISH：J. Chromatog.，33，542 (1968)
- 6) J. C. TANSON：J. Chromatog.，28，12 (1967)