

高タンパク食品中の酸性タール色素分析

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	大須賀,愛幸 植松,洋子 山嶋,裕季子 田原,正一 宮川,弘之 高梨,麻由 門間,公夫
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	59巻2号
掲載ページ	p. 73-79
発行年月	2018年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



報 文

高タンパク食品中の酸性タール色素分析： pH 8.5でのポリアミドカラム負荷による回収率の向上および迅速化

(平成29年6月6日受理)

大須賀愛幸* 植松洋子 山嶋裕季子 田原正一
宮川弘之 高梨麻由 門間公夫

Analysis of Acidic Tar Dyes in High-Protein Foods: Achievement of Improved Recoveries and Shortened Operation Time by Loading Sample Extract onto Polyamide Columns at pH 8.5

Asa OSUGA, Yoko UEMATSU, Yukiko YAMAJIMA, Shoichi TAHARA,
Hiroyuki MIYAKAWA, Mayu TAKANASHI and Kimio MONMA

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health:
3-24-1 Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan;
* Corresponding author

The recoveries of xanthene dyes in the analysis of acidic tar-dyes in high-protein foods were improved by loading them onto polyamide columns at pH 8.5, instead of using the conventional pH 3-4 solution. The experimental scale was reduced to approximately half that of the conventional method. Furthermore, instead of eliminating the organic solvent in the extract by evaporation, the extract was diluted with water prior to PA column cleanup in order to reduce the ratio of organic solvent so that acidic tar-dyes would be better retained on the column. The above two procedures shortened the operation time and allowed for a simpler protocol. With this method, the recoveries of erythrosine, phloxine, and rose bengal from salted cod roe were 82, 88, and 74%, respectively. The recovery percentages were greatly improved compared to those achieved by conventional column loading at pH 3.5 (26, 44, and 18%, respectively). The recoveries of azo-dyes (Amaranth, New Cocine, Allura Red AC, Tartrazine, Sunset Yellow FCF) were also improved from 41-66 to 79-99%.

(Received June 6, 2017)

Key words: 高タンパク食品 high protein food; 酸性タール色素 acidic tar dye; キサンテン系色素 xanthene dye; ポリアミド polyamide; 弱塩基性 weakly basic; 迅速化 speed up; かまぼこ boiled fish paste; はんぺん pounded fish cake; ソーセージ sausage; 辛子明太子 salted cod roe with red pepper

付録資料: 付録資料 (Fig.S1, Fig.S2, Table S1) はJ-Stageの日本食品衛生学雑誌 (<http://dx.doi.org/10.3358/shokueishi.59.73>) で閲覧できる。

はじめに

食品中の酸性タール色素の検査では、一般的にポリアミド (PA) に抽出液中の色素を吸着・脱着させる精製方法が用いられている^{1),2)}。

しかし、かまぼこ、辛子明太子等の高タンパク食品に添加された赤色3号、赤色104号および赤色105号 (キサンテン系3色素) の検出が困難な場合が多い³⁾⁻⁵⁾。

前報^{6),7)}において、食品からの抽出液をPAカラムで精製する際に、カラムに負荷する溶液を衛生試験法・注解に

示されているpH 3~4²⁾よりも高いpH 6.0~7.0に調整することにより、高タンパク食品中のキサンテン系3色素の回収率および操作性を向上させたが、他の酸性タール色素と比べると低い回収率しか得られなかった。

一方、抽出液をpH 11.0に調整し、ジビニルベンゼンピロリドン共重合体カラム (HLBカラム) により精製したとき、キサンテン系3色素は70%以上の良好な回収率が得られた。そのため、すべての色素において良好な回収率を得るために精製にはPAカラムとHLBカラムを併用した。

今回われわれは、PAカラムでの精製時のpHについて弱塩基性領域まで検討することにより、キサンテン系3色素の回収率を向上させ、精製に使用するカラムをPAカラ

* 連絡先 Asa_Oosuga@member.metro.tokyo.jp
東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

ム1種類にすることを試みた。

また、前報の方法^{6),7)}では、試料量を10gとしていたため、抽出液量、カラム溶出液量が多く、操作に時間を要していた。そのため、前報の分析法のスケールダウンにより迅速化を試みた。

さらに、抽出液を水希釈してカラムに負荷することにより、溶媒留去操作を省略し、簡便化を試みた。

その結果、キサントン3色素の回収率の大幅な向上、前処理の迅速化および簡便化が達成されたので報告する。

実験方法

1. 試料

添加回収試験には、前報^{6),7)}と同じかまぼこ、はんぺん、ソーセージ、および辛子明太子を使用した。

2. 標準品および標準液

色素標準品は(一財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団製の、食用青色2号を除く11種類の指定酸性タール色素標準品(赤色2号(R2), 赤色3号(R3), 赤色40号(R40), 赤色102号(R102), 赤色104号(R104), 赤色105号(R105), 赤色106号(R106), 黄色4号(Y4), 黄色5号(Y5), 青色1号(B1), 緑色3号(G3))を用いた。

標準原液: 各色素標準品を水に溶解して1,000 µg/mLとした。

混合標準溶液: 各標準原液を混合し、水で希釈して、各色素50 µg/mLを含む水溶液とした。

LC用混合標準溶液: 混合標準溶液を水で適宜希釈し、各色素が0.1~2 µg/mLになるよう調製した。

抽出液組成に合わせた色素標準溶液: 有機溶媒留去前の試料抽出液の組成に合わせて1%アンモニア水45 mL, EtOH 32.5 mLおよびTHF 12.5 mLを混合し、さらに0.5%酢酸アンモニウム溶液5 mLと混合標準溶液0.5 mLを加え、水で100 mLとした。

3. 試薬, 試液および器具

PA: 粒度150~425 µm, C-100, 和光純薬工業(株)製

なお、無水エタノール(EtOH), 酢酸, 酢酸アンモニウム, 25%アンモニア水, メタノール(MeOH), アセトニトリル, テトラヒドロフラン(THF)は前報^{6),7)}と同じものを用いた。

1%アンモニア水: 25%アンモニア水40 mLを水で希釈し、1,000 mLとした。

アンモニア-EtOH混液: 1%アンモニア水とEtOHを1:1(v/v)の比率で混合した。

アンモニア-THF混液: 1%アンモニア水とTHFを1:1(v/v)の比率で混合した。

6 mL容リザーバー(内径12.8 mm), フリット(ポリエチレン製, 孔径20 µm, 6 mL容リザーバー用): ジーエルサイエンス(株)製

50 mL容遠心管(遠心管): ポリプロピレン製(本体), ポリエチレン製(蓋), ザルスタット(株)製

その他の器具は前報^{6),7)}と同じものを用いた。

4. 装置

LC: Agilent 1260 Infinity (PDA検出器付), アジレント・テクノロジー(株)製

窒素パージ濃縮器: DTC-IC, タイテック(株)製

pHメーター: LAQUA, (株)堀場製作所製

その他の機器は前報^{6),7)}と同じものを用いた。

5. PAカラムの作成

6 mL容のリザーバーの下部にコックを取り付け、底部にフリットを敷き、フリットを少量のMeOHを用いて湿らせた後、PA 0.8 gを水で充填した。フリットから細かい粒子が出てこなくなるまで、水で十分に洗浄した。PAの上部には、海砂(1.5 g)を載せ、さらに水10 mLを流してコンディショニングした。

6. pH調整

前報⁶⁾に従い、酢酸(0.01~17 mol/L)を用いて目的のpHに調整した。

7. 抽出液の調製

試料を細切して、その5 gを遠心管に秤取し、混合標準溶液を0.5 mLまたは0.1 mL添加後、よく混合してから30分間放置し、添加回収用の試料とした(各色素濃度は試料あたり5 µg/gまたは1 µg/g)。

かまぼこ、はんぺん、ソーセージの抽出では、添加回収用試料5 gに1%アンモニア水20 mLを加え、1分間振り混ぜた後、80℃の水浴中で10分間加温した。氷冷後、EtOH 20 mLを加えて蓋をし、1分間手で振り混ぜた(以下、振とう)。これを80℃の水浴中で10分間加温し、4℃, 3,000 rpmで5分間遠心分離した後(以下、遠心分離)、上清を採取した。残さにアンモニア-EtOH混液25 mLを加え、1分間振とうし、80℃の水浴中で10分間加温した後、遠心分離し、上清を採取した。残さにアンモニア-THF混液25 mLを加え、1分間振とうし、以下、抽出2回目と同様に操作した。

なお、遠心分離後、固形物の一部が上清に浮遊した場合はフリットをつけた60 mLリザーバーを通過させて固形物を除いた。

採取した上清を合わせ、水で100 mLに定容した。この液の25 mLをホールピペットでとり、水を加えて約90 mLとし、この希釈した液を目的のpHに調整した後、さらに水を加えて100 mLに定容した。これをPAカラムに負荷する抽出液とした。

辛子明太子の抽出では、試料5 gにアンモニア-EtOH混液25 mLを加え1分間振とう後、80℃の水浴中で10分間加温した。その後遠心分離し、上清を採取した。抽出2回目以降の操作は、かまぼこ等と同様に行った。

8. PAカラムによる抽出液の精製

PAカラムに抽出液を負荷する際や洗浄でのカラムからの流下速度は1秒間に約1滴となるように調整した。抽出液をカラムに負荷後、水15 mL, EtOH 10 mLで洗浄した。アンモニア-EtOH混液10 mLで色素を溶出し、

10 mLに定容した。その8 mLを窒素気流下80°Cで2 mL以下に濃縮し、溶出液のEtOHとアンモニアを除き、水で5 mLに定容したものをLC試験液とした。

9. LC測定

衛生試験法・注解²⁾に準じ、前報^{6),7)}と同様の条件で測定した。定量は絶対検量線法により行った。

結果と考察

1. 弱酸性溶液負荷時のPAカラム精製におけるキサントゲン系3色素の回収率の低下原因

通知法¹⁾では、PAカラムからの溶出液を濃縮乾固し、残留物を水で溶かして試料液とするが、濃縮後はキサントゲン系色素が水に溶けにくいと記載されている²⁾。そこで、前報⁶⁾に従い調製したpH 3.0~7.0の色素標準溶液をPAカラムに負荷して得られた溶出液からEtOHとアンモニアを留去せず、そのまま測定した結果をFig. S1に示した。なお、キサントゲン系3色素およびR106の4色素以外の色素は、溶出液をそのまま測定すると、LCカラムに保持されない場合やピーク割れが生じる場合があるため、検討対象色素は、キサントゲン系3色素およびR106の4色素とした。

キサントゲン系3色素の回収率は、溶出液をそのまま測定した場合、88~98%であった (Fig.S1)。この結果から、pH 3.0~5.0で負荷したキサントゲン系3色素の回収率低下は、色素がPAカラムに保持されないのではなく、溶出液中のEtOHとアンモニアを留去して水に置換する過程で起きていると考えられた。

キサントゲン系3色素およびR106について、前報⁶⁾に従い調製したpH 3.0~7.0のかまぼこ抽出液 (各色素をかまぼこ10 gに5 µg/gになるように添加) をPAカラムに負荷して得られた溶出液をそのまま測定した (Fig. S2)。その結果、キサントゲン系3色素の回収率は25~89%であった。前報⁶⁾では溶出液からEtOHとアンモニアを留去して、水で置換したものをLC試験液として測定したが、この時のキサントゲン系3色素の回収率は11~55%であった⁶⁾。なお、R106の回収率は、LC試験液では98~100%、溶出液をそのまま測定した場合は98~99%の回収率であり、差がなかった。pH 3.0~5.0のかまぼこ抽出液の負荷では、抽出液に溶解していた成分がpH調整で析出し、それが溶出液に溶けて混入して、キサントゲン系3色素の見かけ上の回収率が低下したと考えられた。前報⁶⁾でもタンパク質と推察される成分が負荷時にPAカラム上部に堆積し、その後の水とEtOHによる洗浄操作では溶解しなかったが、溶出液には溶解し色素と共にカラムから溶出された。この溶出液を水で置換した際に不溶となり、析出物にキサントゲン系3色素が吸着したことが、キサントゲン系3色素の回収率が低下した原因と考えられた。

以上の結果から溶出液とLC試験液の両方を測定することにより、キサントゲン系3色素の回収率を向上させる条件が得られることが可能と考えられた。そのため、後段の

「4.弱塩基性下でのカラム負荷による回収率向上の試み」「5.高タンパク食品における添加回収試験」では、両液をLCで測定し比較することとした。

2. 分析法のスケールダウン

操作性の向上を目的とし、前報^{6),7)}の条件から試料量、試液量等のスケールダウンを検討した。

すなわち、前報^{6),7)}と操作方法は同じまま、試料、抽出溶媒等の量を1/2に、PAカラムのリザーバーを容量20から6 mLに、充填PA量を2から0.8 g、PAカラムに負荷する液量を抽出液の総量の1/2から1/4に変更した。その結果、かまぼこを試料とした場合、前報⁶⁾とほぼ同程度の回収率 (各色素5 µg/g相当添加で56~102%) が得られた。また、色素が大量 (食品1 g当たり各色素50 µg, 11色合計で550 µg相当⁶⁾) に使用されたケースを想定し、各色素250 µgを含む溶液を負荷して同様に操作したところ、すべての色素で99%以上回収された (データ未掲載)。

以上の結果から、以降の検討はこのスケールダウンした方法で行った。

3. 希釈による抽出液作製・カラム負荷の試み

EtOH等有機溶媒の存在はPAに対する色素の保持を低下させるため¹⁾、カラムに負荷する溶液中の有機溶媒を除去する必要があり前報^{6),7)}では、カラムに負荷する前に、抽出液中の有機溶媒をロータリーエバポレーターで留去した。この操作は水浴上で濃縮を行うこと^{1),2)}より短時間ではあるものの相当の時間を要し、また液の泡立ちを防止するため減圧度の微調整を行う必要がある等煩雑であった。そこで、水で抽出液を希釈することにより、有機溶媒濃度を下げて、PAカラムに色素を保持させることが可能かについて検討した。

抽出液組成に合わせた色素標準溶液の25 mLを採取し、希釈しない場合はそのままpH 7.0に調整し、2倍、4倍に希釈する場合は水で希釈後pH 7.0に調整した。これらをPAカラムに負荷した結果をFig. 1に示した。希釈しない場合は、一部の色素がカラムに保持されず負荷液とともに

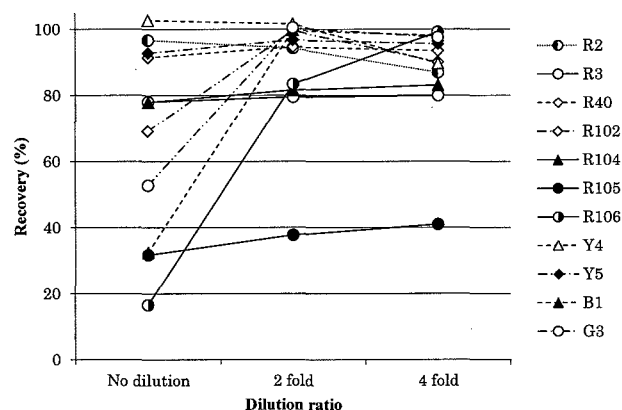


Fig. 1. Recoveries of acidic tar dyes in PA column cleanup using aqueous standard dye solutions containing the same ratio of EtOH and THF as in the extract ($n=3$)

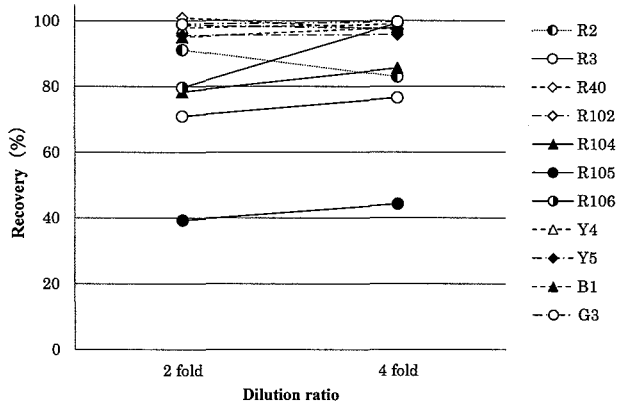


Fig. 2. Recoveries of acidic tar dyes spiked into boiled fish paste (kamaboko) in PA column clean-up after aqueous dilutions of the extracts ($n=3$)

流出したため、17~103%と一部の色素の回収率が低かった。2倍または4倍希釈では、色素の流出は見られず、回収率もR105以外は83%以上で良好であった。

次に、かまぼこに色素を5 $\mu\text{g/g}$ となるよう添加し、保持が良好だった2倍希釈と4倍希釈液の抽出液をPAカラムで精製した場合も比較した (Fig. 2)。その結果、4倍希釈の方が回収率の良好な色素が多いことから、以下の検討では抽出液を水で4倍希釈してPAカラムに負荷することとした。

4. 弱塩基性下でのカラム負荷による回収率向上の試み

PAは等電点pH 4.2より下がるとプラスのチャージをもち、酸性タール色素と反応すると考えられていることから⁸⁾、弱塩基性下では、色素がPAに吸着しにくいと考え、PAカラムに負荷する溶液のpHについては弱酸性から中性の範囲で検討してきた。

しかし、pH 7.0でも色素が十分保持されること、また、pHが高いほどタンパク質の析出は減少すると考えられたことから、弱塩基性溶液をカラムに負荷することについて検討した。

抽出液組成に合わせた色素標準溶液の25 mLを採取し、水で4倍に希釈したものをpH 6.0~9.5の範囲で調整し、PAカラムの精製操作を行った。

LC試験液を測定した場合、キサントレン系3色素はpHが高くなるにつれて回収率が向上した (Fig. 3)。pH 6.0~7.5でR3、R104は約80%程度、R105は約40%程度であったが、pH 8.5以上ではR3、R104は90%以上、R105は75%以上であった。pH 9.5ではR106とB1の回収率が低下したが、これはpH 9.5では負荷時のPAカラムへの保持が悪くなることが原因と考えられた。

なお、固相抽出では一般的に、目的物質が固相に強く保持されているときは、固相床上部に狭い範囲にバンド状に濃縮保持される⁹⁾。pH 6.0~8.5では色素がカラム上部に狭いバンド状で保持されていたが、pH 9.0、9.5ではバンドに広がり認められた色素があった。これらの色素はPAに保持されにくいと考えられ、回収率の低かった

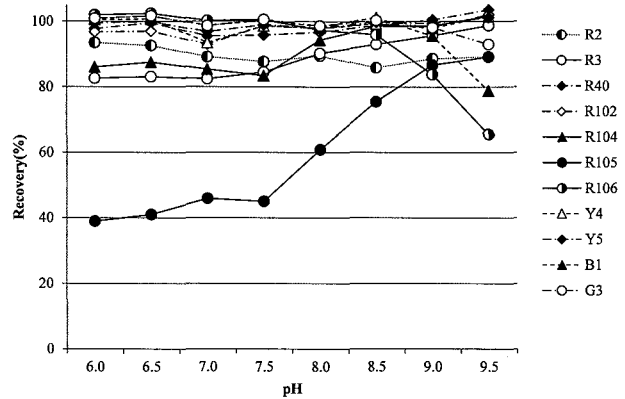


Fig. 3. Recoveries of 11 acidic tar dyes in PA column clean-up of standard dye solutions at pH 6.0 to 9.5

The column eluent was concentrated to remove ethanol and ammonia before LC injection. Each solution contained 6.25 μg of each acidic tar dyes in 100 mL. ($n=3$)

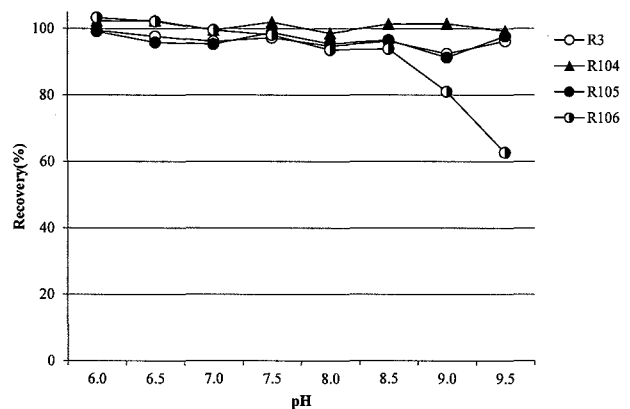


Fig. 4. Recoveries of 4 acidic tar dyes in PA column clean-up of standard dye solutions at pH 6.0 to 9.5

Column eluent was directly injected into the LC system. ($n=3$)

R106およびB1と推測された。キサントレン系3色素、R106、B1以外の6色素はいずれのpHでも良好な回収率を示した。

一方、溶出液をそのまま測定した結果、キサントレン系3色素はいずれのpHにおいても90%以上の回収率であった (Fig. 4)。

次に、かまぼこに混合標準溶液を5 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し、抽出液のpHを6.0~9.5に調整してPAカラムを用いた精製で回収試験を行った。

LC試験液を測定したとき、抽出液に合わせた色素標準溶液の場合と同様に、pHが高くなるほどキサントレン系3色素の回収率が向上する傾向となった (Fig. 5)。pH 6.0におけるキサントレン系3色素の回収率は13~51%であり、pHが上がるほど向上し、pH 8.5以上の場合70%以上となった。

一方、溶出液をそのまま測定すると、キサントレン系3色素の回収率は、pH 6.0で46~92%、pH 8.0以上で79%以

上とLC試験液の回収率よりも全体的に高く、回収率が向上した (Fig. 6).

この回収率の差は、pH調整時に析出したタンパク

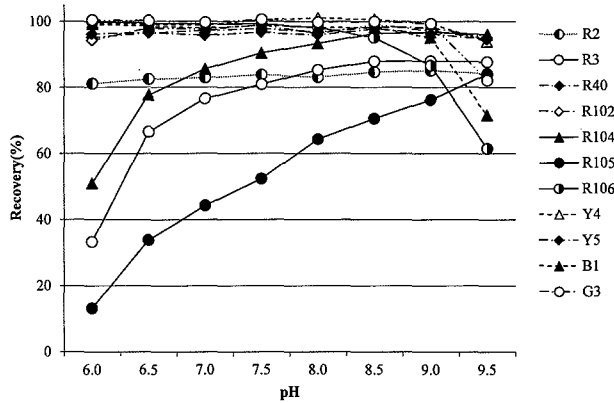


Fig. 5. Recoveries of 11 acidic tar dyes spiked into boiled fish paste (kamaboko) in PA column clean-up of extracts at pH 6.0 to 9.5

The column eluent was concentrated to remove ethanol and ammonia before LC injection. Each acidic tar dye was spiked into boiled fish paste at the level of 5 µg/g. (n=3)

質^{10), 11)} が溶出液に溶解し、EtOHとアンモニアを留去してLC試験液を作成する際に再び析出し、この析出物に色素が吸着したことによるものと考えられた。前報⁶⁾において抽出液のpHを6.0~7.0に調整したときには析出物が認められなかったが、本検討ではpHを6.0~7.0に調整したと

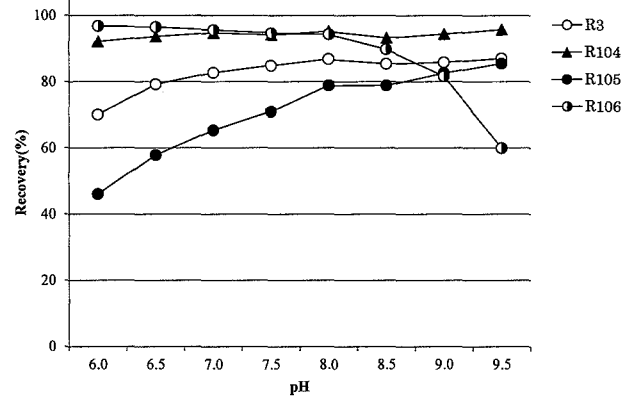


Fig. 6. Recoveries of 4 acidic tar dyes spiked into boiled fish paste in PA column clean-up of extracts at pH 6.0 to 9.5

Column eluent was directly injected into the LC. (n=3)

Table 1. Recoveries of acidic tar dyes from high-protein foods

Sample	Spiked level (µg/g)	Injected solution	Recovery (%) (RSD (%)) n=3										
			R2	R3	R40	R102	R104	R105	R106	Y4	Y5	B1	G3
Boiled fish paste (kamaboko)	5	LC test solution*	85 (1)	88 (2)	98 (1)	99 (2)	96 (1)	71 (8)	95 (4)	101 (1)	98 (0)	98 (1)	100 (1)
		Eluent from PA column		85 (2)			93 (5)	79 (4)	90 (7)				
	1	LC test solution*	82 (9)	77 (9)	98 (4)	92 (5)	97 (9)	68 (11)	99 (2)	102 (1)	98 (7)	94 (5)	100 (1)
		Eluent from PA column		71 (3)			96 (4)	77 (21)	94 (1)				
Pounded fish cake (hanpen)	5	LC test solution*	92 (2)	88 (3)	99 (1)	98 (2)	96 (3)	67 (2)	97 (2)	97 (2)	97 (2)	98 (2)	100 (2)
		Eluent from PA column		84 (1)			92 (4)	74 (5)	89 (3)				
	1	LC test solution*	82 (3)	73 (6)	95 (3)	95 (3)	87 (1)	56 (3)	97 (1)	97 (1)	98 (2)	95 (4)	99 (2)
		Eluent from PA column		78 (9)			81 (4)	56 (1)	91 (5)				
Sausage	5	LC test solution*	71 (8)	95 (3)	93 (2)	90 (2)	99 (2)	85 (2)	96 (1)	98 (2)	94 (4)	96 (2)	100 (1)
		Eluent from PA column		89 (1)			96 (2)	80 (5)	91 (1)				
	1	LC test solution*	63 (5)	86 (7)	89 (3)	85 (4)	96 (5)	80 (4)	97 (3)	96 (1)	94 (2)	94 (1)	100 (1)
		Eluent from PA column		83 (7)			106 (2)	72 (14)	98 (1)				
Salted cod roe with red pepper	5	LC test solution*	79 (1)	82 (3)	99 (1)	95 (1)	88 (1)	74 (2)	63 (6)	91 (4)	95 (3)	70 (6)	85 (4)
		Eluent from PA column		79 (2)			88 (1)	72 (3)	60 (5)				
	1	LC test solution*	77 (4)	71 (8)	96 (6)	88 (2)	84 (3)	65 (12)	63 (3)	93 (2)	95 (4)	72 (3)	87 (1)
		Eluent from PA column		68 (7)			86 (17)	57 (9)	64 (2)				

*: The PA column eluent was concentrated to remove ethanol and ammonia.

きにタンパク質と考えられる白い濁りのような細かい析出物が生じた。このように目視できる量の析出物が生じたpHが前報⁶⁾より高くなったのは、抽出液にEtOHとTHFが含まれることによりタンパク質の溶解度が減少し¹⁰⁾、析出しやすくなったためと考えられた。

抽出液組成に合わせた色素標準溶液およびかまぼこの回収試験結果から、PAカラムで精製する前の抽出液のpHをR106やB1の回収率の低下が抑えられ、かつキサント系3色素の回収率も良好な8.5に調整することにした。

5. 高タンパク食品における添加回収試験

かまぼこ、はんぺん、ソーセージ、辛子明太子を用いて、本法により5と1 µg/gの2濃度で添加回収試験を行った (Table 1)。

かまぼこにおいて、5 µg/g添加でのR3, R104, R105の回収率はそれぞれ88% (2), 96% (1), 71% (8)であった (() はRSD%)。これらの結果は、前報⁶⁾の方法を用い、抽出液をpH 3.5に調整し、PAカラムで精製した場合の回収率 (それぞれ36% (42), 50% (23), 28% (36)) と比較して⁶⁾ 向上しており、RSDの値も小さくなり再現性が向上した。なお、pH 3.5は衛生試験法・注解²⁾ に示されているpH 3~4の間値である。その他の色素の回収率は85~101%であった。また、1 µg/g添加の場合、R105の回収率が68%、それ以外の色素の回収率は77%以上であった。

はんぺんにおいて、5 µg/g添加でのR3, R104, R105の回収率は、それぞれ88%, 96%, 67%であった。その他の色素は、92~100%の回収率であった。1 µg/g添加の場合、R105の回収率が56%、それ以外の色素の回収率は73%以上となった。

ソーセージにおいて、5 µg/g添加でのR3, R104, R105の回収率は、それぞれ95%, 99%, 85%であった。その他の色素は、71~100%の回収率であった。1 µg/g添加の場合、R2が63%、その他の色素は80%以上の回収率が得られた。

辛子明太子は酸性タール色素の分析が特に難しく、表示があっても検出できない事例が多数ある^{3), 5)}。そこで、本法の結果を前報の方法⁷⁾を用いて、抽出液をpH 3.5に調整し、PAカラムで精製した場合の回収率と比較した。

5 µg/g添加でのR3, R104, R105の回収率は、本法ではそれぞれ82%, 88%, 74%であり、pH 3.5で精製した場合の回収率26%, 44%, 18%と比較して大幅に向上した。その他の色素については、本法で63~99%、pH 3.5で精製した場合は41~95%であった。

なお、R2の回収率は、前報⁷⁾に従い試験液を調製すると、pH 6.0⁷⁾ および3.5 (Table S1) で精製した場合ともに、40%程度であったが、本法では79%と大幅に向上した。これは、前報⁷⁾で行われた水浴での加熱 (60~80℃) および溶媒留去過程がなくなったためと推測された。R2は還元糖が共存する条件下で加熱をすることで分解し、退色することが報告されているが¹²⁾、R2に対し、辛子明太子

由来の成分が還元糖と同様の作用を及ぼしたと考えられた。

以上の結果から、pH 8.5においては、キサント系3色素の回収率は、5 µg/g添加では67~99%で、また溶出液からEtOHとアンモニアを留去した影響も、ほとんど認められなかった。そのため、操作の簡便性も考慮すると、LC試験液のみを測定すれば十分であると判断した。

PAカラム溶出液に試料由来のタンパク質が多く混入した場合、溶出液からEtOHとアンモニアを留去する際にこれが水に不溶になり、キサント系3色素を吸着して、これらの色素の回収率を下げると考えられた。

しかし、pH 8.5ではpH 6.0に比べ抽出液中のタンパク質が溶解しやすいため、PAカラムへ抽出液の負荷時および洗浄操作で容易に流出すると示唆されたことから、精製後の溶出液中にタンパク質が混入する量が減少し、回収率の向上を図れたと考えられた。

ま と め

高タンパク食品中の酸性タール色素分析法について、前処理にPAカラムを用い、回収率に優れ、かつ簡便で迅速な試験法を作成した。

1. 前処理法のスケールダウンにより、分析に必要な試料量や溶媒量が半減し、PAカラム精製の操作時間を短縮した。
2. 抽出液を水で希釈して有機溶媒の相対濃度を下げることにより、抽出液をPAカラムに負荷した際の色素の保持が可能となり、これまで行っていた煩雑な溶媒留去操作^{1), 2), 6), 7)} を省略でき、操作を簡便化することができた。
3. PAカラムに負荷する抽出液のpHを8.5にすることで、キサント系3色素の回収率が大幅に向上した。高タンパク食品に酸性タール色素11種類を5 µg/g添加したときの回収率は63~101%、そのうち、キサント系3色素の回収率は67~99%であった。

文 献

- 1) 日本食品衛生協会. 第2版食品中の食品添加物分析法 2000. 東京, 壮光舎印刷, 2000, p. 113-131. (ISBN: 97000000.8-4889250053)
- 2) The Pharmaceutical Society of Japan ed. Eiseishikhenho Chukai 2015. Tokyo, Kanehara Shuppan, 2015, p. 380-388 (ISBN: 978-4307470438)
- 3) Hidaka, C., Kawaguchi, R., Nakanishi, K., Fujimoto, T. On display and inspection result of legal tar dye in Karashimentaiko. Fukuokashi Eiseishikenshoho, 18, 100-102 (1992).
- 4) Hayashi, K., Chiba, Y., Yanagi, S., Yamaguchi, Y., Ujiie, A., Hamana, T. Studies on Extraction and Clean-up for Food Coal-Tar Dyes, Miyagiken Hoken Kankyo Senta Nempo, 27, 97-99 (2009).
- 5) Koga, A., Akaki, K. Survey of Food Colors in Spicy Cod Roe in Fukuoka City and Study on Purification. Fukuoka

- kashi Eiseishikensho, 37, 77-80 (2011).
- 6) Osuga, A., Uematsu, Y., Yamajima, Y., Fujiwara, T., Tahara, S., Miyakawa, H., Mizumachi, T., Monma, K. Analysis of acidic tar dyes in high protein food; Effect of pH of column loading solution for clean-up. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **57**, 207-212 (2016).
 - 7) Osuga, A., Uematsu, Y., Yamajima, Y., Fujiwara, T., Tahara, S., Miyakawa, H., Monma, K. Analyses of acidic tar dyes in high-protein foods and examination of extraction and clean-up methods for various foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **58**, 160-165 (2017).
 - 8) Dixit, S., Khanna, SK., Das, M. A simple method for simultaneous determination of basic dyes encountered in food preparations by reversed-phase HPLC. *J. AOAC Int.*, **94**(6), 1874-1881 (2011).
 - 9) Dennis D. Blevins, Michael F. Burke, Thomas J. Good, Phillip A. Harris, K. C. Van Horne, Lane S. Yago, Edited by K. C. Van Horne (Hajime Kato), *The Handbook of Sorbent Extraction Technology (Kosochushutsuho Handobukku)*, Tokyo, Uniflex Co., Ltd., 1986, p. 16-17.
 - 10) 岡本雅人, 宮崎香編. 改定 タンパク質実験ノート上 抽出と分離精製, 東京, 羊土社, 1996, p. 74. (ISBN: 978-4897069111)
 - 11) Ishikawa, F., Shigeoka, S., Nagashima, M., Takahashi, M., Kamimura, H., Onishi, K., Nishijima, M. Analytical method of 21 coal-tar dyes in protein-rich foods by solid-phase Extraction and HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **41**, 194-199 (2000).
 - 12) Ross KD. Reduction of the azo food dyes FD&C Red 2 (Amaranth) and FD&C Red 40 by thermally degraded D-fructose and D-glucose. *J. Agric. Food Chem.*, **23**(3), 475-478 (1975).

高タンパク食品中の酸性タール色素分析: pH8.5でのポリアミドカラム負荷による回収率の向上および迅速化

大須賀愛幸* 植松洋子 山嶋裕季子 田原正一
宮川弘之 高梨麻由 門間公夫
食衛誌 59(2), 73~79(2018)

高タンパク食品中の酸性タール色素分析法について、回収率に優れ、かつ簡便で迅速な試験法を作成した。試薬量等のスケールダウンを行い、さらにポリアミド (PA) カラムに負荷する液の調製法として、溶媒留去の代わりに抽出液を水で希釈し有機溶媒濃度を下げ、色素を PA カラムに保持させることにより、操作の簡便化および迅速化を達成した。また PA カラムで色素を精製する際、負荷する液の pH を汎用される pH 3~4 から pH 8.5 にすることで、高タンパク食品における、キサントゲン系色素の回収率が大きく向上した。高タンパク食品の中でも特に酸性タール色素の分析が困難とされてきた辛子明太子での 11 種類の色素の回収率は pH 8.5 で精製することで 63~101% となり、pH 3.5 での精製 (回収率 18~95%) に比べ大幅な改善が認められた (5 $\mu\text{g/g}$ 添加)。

* 東京都健康安全研究センター