

野菜・果実貯蔵品の銅クロロフィリンナトリウム 及び銅クロロフィルの分析法について

日高 千恵¹・江崎 好美¹・藤本 喬¹

Study of Analytical Method of Sodium Copper Chlorophyllin and Copper Chlorophyll in Processed Vegetables and Fruits

Chie HIDAKA, Yoshimi ESAKI, and Takashi FUJIMOTO

野菜・果実貯蔵品中の銅クロロフィリンナトリウム及び銅クロロフィルの分析について、公定法を補完する方法として、色素抽出液の吸収スペクトル測定による色素の定性と定量法を検討した。

市販の色素製剤の純度と銅含有量を調べたところ、純度はいずれも食品添加物公定書に示す規格の範囲以内であったが、銅の含有量の平均値は銅クロロフィリンナトリウム製剤で3.9%、銅クロロフィル製剤で0.6%と理論値の半分程度であった。この色素濃度と銅との関係に基づき、市販食品中の色素濃度から銅の濃度を推定したところ、原子吸光法による実測値とよく一致した。色素濃度を求めその値から銅濃度を推定する本分析法は、公定法を補完し、かつ迅速で実用的な分析法であると思われた。

Key Words: 銅クロロフィリンナトリウム Sodium copper chlorophyllin,
銅クロロフィル Copper chlorophyll,
野菜・果実貯蔵品 Processed vegetables and fruits,
吸収スペクトル Absorption spectrum

I はじめに

銅クロロフィリンナトリウム及び銅クロロフィル（以下CuCL-Na, CuCLと略す）は、緑色の着色料で、天然クロロフィルの酸や光に弱い性質を補うために使用される。クロロフィル分子中のMgをCuに置換したものがCuCL, これを酸化して水溶性にしたものがCuCL-Naである。これらは従来、野菜・果実貯蔵品やチューインガムなどに添加が許可されていたが、平成5年4月に使用基準が改正され、新たにあめ類、生菓子、魚肉練り製品などの食品にも使用できるようになった。CuCL-Na, CuCLの使用量はそれぞれ銅の含有量で規定されているため、食品中の食品添加物分析法¹⁾（以下公定法とする）では両者を酢酸エチル及びn-ブタノールを用いて食品より分別抽出し、原子吸光法により銅を定量する方法が示されている。しかしこの方法は抽出された銅をすべてCuCL-Na, CuCL由来の銅として測定しており、実際にこれらの色素が使用されたかどうかの確認

法として十分とは言えない。そこで、抽出液の吸収スペクトルから使用の有無を判定する方法を検討し、吸光度から求めたCuCL-Na, CuCLの濃度と銅の関係について若干の知見が得られたので以下報告する。

II 実験方法

1. 試料

平成6年度に福岡市内で収去された野菜・果実貯蔵品でCuCL-Na, CuCLの表示のあったもの10件を用いた。添加回収試験にはCuCL-Na, CuCLを使用していないことを確認したきゅうり漬物を用いた。

2. 試薬

CuCL-Na: 和光純薬工業(株)製, 東京化成工業(株)製, 関東化学(株)製, キシダ化学(株)製, 片山化学工業(株)製, 日本葉緑素(株)製

CuCL: 片山化学工業(株)製, 日本葉緑素(株)製

CuCL-Na 標準原液: 日本葉緑素(株)製 CuCL-Na 10 mg を 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 100 ml に溶解し標

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

準原液とした。

CuCL 標準原液：日本葉緑素(株)製 CuCL 10 mg を酢酸エチル 100 ml に溶解し標準原液とした。

酢酸エチル、アセトン：和光純薬工業(株)製、残留農薬試験用

硝酸、過塩素酸：原子吸光分析用

その他の試薬：市販特級品

3. 装置

分光光度計：島津 UV-240

原子吸光分光光度計：日本ジャーレルアッシュ AA-781

4. CuCL-Na, CuCL 製剤の純度と銅含有量の測定

食品添加物公定書²⁾の方法に従って比吸光度から純度を求めた。さらに硝酸、過塩素酸で湿式分解した後、原子吸光法で銅の含有量を測定した。

5. 試験溶液の調製

フードプロセッサーで細切した試料 10 g を取り、水 10 ml とアセトン 40 ml を加えホモジナイズした。5% 塩酸で pH 3~4 に調整し、酢酸エチル 40 ml を加え振り混ぜた後、酢酸エチル層を分取した。酢酸エチル 10 ml で再度抽出した後、先の酢酸エチル層と合わせ、塩酸酸性水及び蒸留水で洗浄した。0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 5 ml を加えおだやかに振り混ぜ、酢酸エチル層 (CuCL 分画) と水層 (CuCL-Na 分画) に分離した。

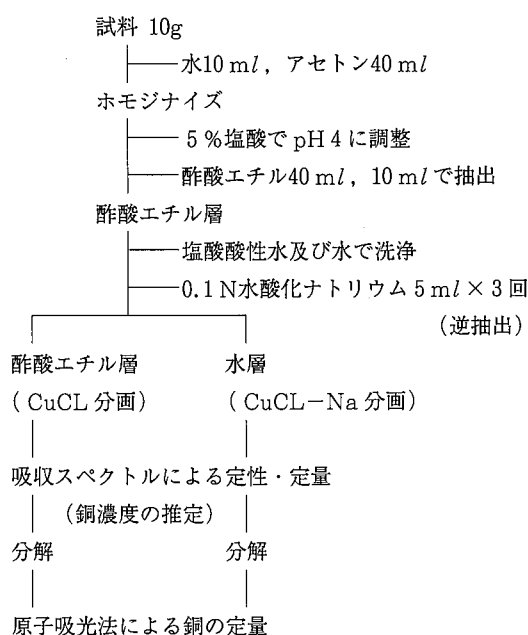


図1 CuCL, CuCL-Na の分析法

この操作を3回繰り返した。それぞれの分画を2分し、半量を吸収スペクトル測定用試験溶液とした。もう半量はケルダールフラスコに移し、水浴上で濃縮した後、硝酸、過塩素酸を加えて湿式分解し原子吸光分析用試験溶液とした。フローチャートを図1に示す。

III 結 果

1. 製剤の純度と銅含有量

CuCL-Na 製剤として6社, CuCL 製剤として2社の製品の純度と銅含有量を測定した結果を表1に示す。

CuCL-Na 製剤の純度は $E_{1cm}^{1\%} = 508 \sim 576$ で、濃度換算するとほぼ90%以上であった (CuCL-Na の $E_{1cm}^{1\%} = 565$)²⁾。銅の含有量は3.4~4.5%, 平均3.9%であった。CuCL 製剤の純度は $E_{1cm}^{1\%} = 62$ と 66 で、濃度は約16% (CuCL の $E_{1cm}^{1\%} = 415$)²⁾ であり、銅含有量は0.3%と0.8%とバラツキがあった。

これらの製剤の純度は、すべて食品添加物公定書に示す規格の範囲以内であったが、銅の含有量は理論値と比べてはるかに低い値であった (分子量比から求めた理論値は CuCL-Na で9.2%, CuCL では純度15%としたとき1.0%)。この結果から以下の検討には日本葉緑素製の CuCL-Na, CuCL 製剤を標準品として用いた。

表1 製剤の純度と銅含有量

	$E_{1cm}^{1\%}$	濃度 (%)	銅含有量 (%)
CuCL-Na 製剤			
和光	520	92	3.4
片山	520	92	4.5
東京化成	518	92	3.8
関東	508	90	3.9
日本葉緑素	576	102	3.8
CuCL 製剤			
片山	62	15	0.3
日本葉緑素	66	16	0.8

2. 高速液体クロマトグラフィーによる検出法の検討

CuCL-Na 水溶液を0.1 N 水酸化ナトリウムで pH 9 とし、酢酸エチルを加えて振とう後、遠心分離により酢酸エチル層と水層を分離した。得られた酢酸エチル層、水層を濃縮し、メタノールに溶かして高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC とする) で測定した。CuCL-Na 標準品と、分離後の酢酸エチル層と水層のクロマトグラムを図2-a, b, c に示す。HPLC 条件は下記のとおりである。

CuCL - Na 標準品のクロマトグラムには10本以上のピークが検出された(図2-a)。CuCL - Naは本来水溶性であるが、酢酸エチル層にもピークが検出され(図2-b)、CuCL - Naには極性の異なる多成分が存在することが判明した。

HPLC 測定条件

カラム : Wakosil II 5 C - 18 AR 4.6 mm × 150mm
 溶離液 : 95 % アセトニトリル
 検出波長 : 630 nm

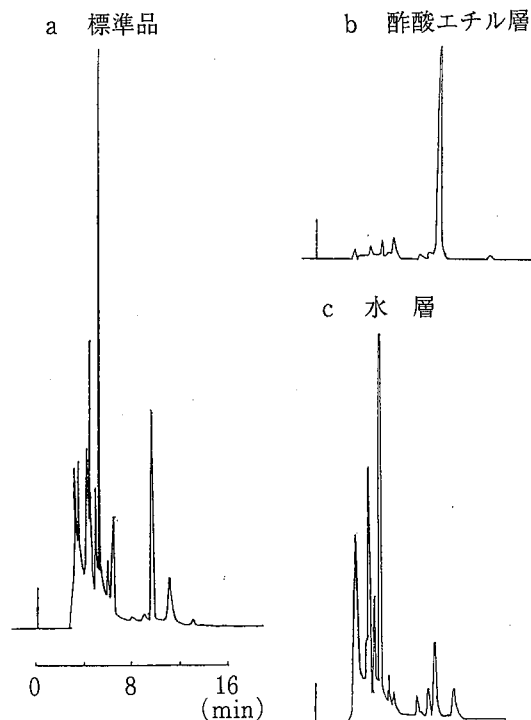


図2 HPLCのクロマトグラム

3. CuCL - Na, CuCL の試料中での安定性

あらかじめCuCL - Na, CuCLの両方を検出した2試料(山菜水煮)を約5℃の冷蔵庫に5か月間保存して試料中の変化を調べた。保存前後の色素と銅の濃度を表2に示す。保存前後で数値にバラツキがみられたが、5か月後でも色素濃度、銅濃度ともに始めの濃度と同程度のレベルであった。

表2 CuCL - Na, CuCL の試料中での安定性

No.	pH	CuCL - Na (ppm)		CuCL (ppm)	
		色素濃度	銅濃度	色素濃度	銅濃度
1	開始時	4.7	66	2.7	82
	5か月後	4.2	82	3.5	66
2	開始時	4.3	31	1.3	54
	5か月後	3.5	44	1.5	36

4. 無機銅の挙動

試料(きゅうり漬物)に銅として100 ppmに相当する硫酸銅を添加し、本法に従って得たCuCL - Na分画とCuCL分画の銅を測定した。その結果、添加した無機銅はいずれの分画からも検出されなかった。

5. CuCL - Na の逆抽出

CuCL - Naを酢酸エチル層から逆抽出するために、0.1 Nの水酸化ナトリウム溶液を用いた。抽出回数とCuCL - Na抽出率を表3に示す。1回の抽出ではpHが十分に上がらずCuCL - Naの抽出率も低かった。抽出回数3回でpHは10程度になりCuCL - Naは水層にほぼ移行したが、その際CuCLも10%程度抽出されてきた。

表3 アルカリ抽出回数とCuCL - Na抽出率

抽出回数	pH	銅濃度 (μg)	抽出率 (%)
1	7~8	3.3	30
2	8~9	6.3	58
3	9~10	1.3	12
計		10.9	100

6. 吸収スペクトル

図3にCuCL - Na標準液及びCuCL - Naを添加した試料(山菜水煮)のCuCL - Na分画の吸収スペクトルを示す。CuCL - Naの濃度は食品添加物公定書に準じて405 nm付近のピークから求めることにしたが、試料のスペクトルではUV域に食品由来の大きなピークがあるため以下の計算式によりベースラインを補正した。

$$A = A_{405} - \frac{A_{360} + A_{460}}{2}$$

($A_{\lambda} = \lambda$ nmにおける吸光度)

図4にCuCL標準液及びCuCLを添加した試料(山菜水煮)のCuCL分画の吸収スペクトルを示す。製剤のスペクトルには、420 nm付近のピークに製剤中のクロロフィルなどによるピークが重なっていたので650 nmのピークから濃度を求めた。

なお、本分析法による定量下限はCuCL - Na, CuCLともに10 μg/gであった。

7. 添加回収試験

試料にCuCL - Na 250 μg, CuCL 200 μg(いずれも銅として1 ppm相当)を添加し、各分画の色素濃度を測定したところ、山菜水煮に添加した場合の回収率はCuCL - Naで105%, CuCLで95%と良好であった。しかしきゅうり漬物に添加した場合は試料由来の色素の

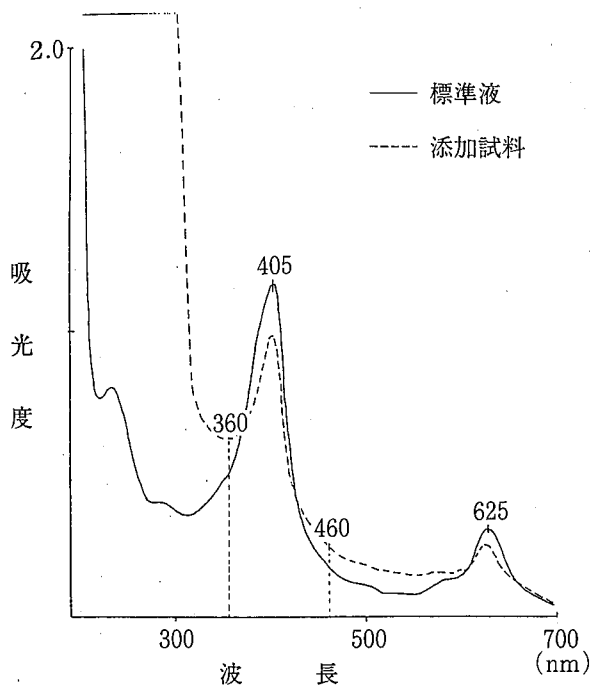


図3 CuCL-Naの吸収スペクトル

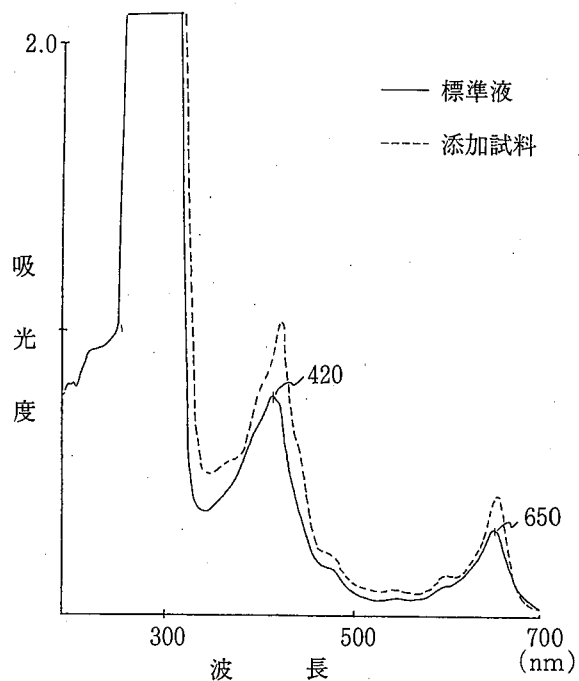


図4 CuCLの吸収スペクトル

ために両方の分画とも濃緑色に着色した。この色素の吸収極大はCuCL-Na, CuCLの吸収極大と近接していたためCuCL-Na, CuCLの濃度が測定できなかった。そこで各分画の銅の濃度を測定した。その結果を表4に示す。きゅうり漬物のバックグラウンドとしてCuCL-Na分画に0.1 ppm, CuCL分画に0.02 ppm (いずれも検体換算)の銅が存在した。またCuCL-Naを添加した場合のCuCL分画, CuCLを添加した場合のCuCL-Na分画にそれぞれ10%, 14%の銅が検出された。

表4 きゅうり漬物における各分画のCuCL-Na, CuCLの回収

	添加量 (μg)	CuCL-Na分画		CuCL分画	
		銅(μg)	回収(%)	銅(μg)	回収(%)
きゅうり漬物	—	1.0		0.2	
CuCL-Na添加	9.1	8.1	78	1.1	10
CuCL添加	9.5	2.3	14	6.4	65

8. 色素濃度から推定した銅濃度と原子吸光法による実測値との比較

市販の野菜・果実貯蔵品10件についてCuCL-Na, CuCL濃度を測定した。先に求めた製剤中の銅含有量や文献値²⁾からCuCL-Naは銅として4%, CuCLの銅は純度16%において0.3~1.0% (色素測定値の1.9~6.3%)として色素濃度から銅の濃度を推定し, 原子吸光法による銅の実測値と比較した。結果を表5に示す。

CuCL-Naについては銅濃度の推定値と実測値はほぼ同じ値であった。CuCLでは実測値はすべて推定値の範囲に入っており, 色素測定値に対する銅の割合は, 一部の高濃度ものを除いて2.5%程度であった。

食品に記載された表示を見ると, CuCL-NaとCuCLの両方を意味する「銅葉緑素」の記載が多かった。また表示と検査結果が一致しないものが, 10件中4件あった(②, ⑥, ⑧, ⑨)。

IV 考 察

CuCL-Na, CuCLは着色料であるにも関わらず使用基準が銅濃度で規定されているため, 公定法には銅の定量法のみが示されている。このため着色料としての分析方法の必要性を感じ, さらに色素濃度から銅濃度を推定する方法を検討したが, その中でCuCL-Na, CuCLの, 通常の化学的合成品とは若干異なる性質が明らかになった。ひとつは原料のクロロフィルに起因するもので, CuCL-Na, CuCLは極性の異なる多成分からなる複合体であるということが挙げられる。このことはHPLCのクロマトグラムや添加回収試験からも明らかである。また製剤の銅の含有量やCuCLの純度については, 通常の化学的合成品たる食品添加物の濃度の範囲から逸脱していると思われるが, 天然物を原料とした工業的生産品ではこの程度のものとされている²⁾。

これらの性質をふまえて色素の定量法を検討するとき, HPLC法では, 10本以上のピークが検出されることや

表5 市販の野菜・果実貯蔵品中のCuCL-Na, CuCL濃度と銅含有量

検 体	表 示	銅クロロフィリンナトリウム(ppm)			銅クロロフィル(ppm)		
		色素濃度	銅実測値	銅推定値	色素濃度	銅実測値	銅推定値
①味付山菜	銅葉緑素	28	1.0	1.1	29	1.7	0.5~1.8
②山菜入りサラダ	銅クロロフィリンナトリウム	(-)	0.1	(-)	13	0.3	0.2~0.8
③山菜入りサラダ	銅クロロフィリンナトリウム	10	0.3	0.4	(-)	(-)	(-)
④味付山菜	銅葉緑素	18	0.8	0.7	66	1.4	1.2~4.1
⑤味付山菜	銅葉緑素	29	0.8	1.1	78	1.6	1.5~4.9
⑥味付山菜	銅クロロフィリンナトリウム	66	2.7	2.7	82	1.7	1.5~5.1
⑦山菜ご飯の素	銅葉緑素	18	0.4	0.7	15	0.4	0.3~0.9
⑧山菜水煮	銅クロロフィル	31	1.3	1.4	54	1.3	1.0~3.4
⑨袖胡椒	葉緑素	54	1.8	2.2	(-)	0.2	(-)
⑩山くらげ	銅葉緑素	(-)	(-)	(-)	72	1.8	1.3~4.5

(-) について：色素濃度は10 ppm 以下，銅実測値は0.1 ppm 以下

これらのピークは製剤によって比率が変わることが予想されること，ピークのすべてが色素成分として着色効果を持つことなどから，成分を分離せずに色素団として定量する吸収スペクトル法が適当であると判断した。ただし，きゅうり漬物など本来の色が濃い場合はその色素の妨害により定量できなかつた。だが当市におけるここ数年の検査結果からみるときゅうり漬物にはタール色素のみが使用され，CuCL-Na や CuCL は使用されていないため，実質的にはCuCL-Na や CuCL の測定における障害はなかつた。

公定法では色素由来以外の有機銅が検出されても判別できないが，本分析法では着色の有無や吸収スペクトルのパターンから判別が可能であると思われる。さらに色素を定量した時点で迅速に銅の濃度を推定できるという利点がある。ただし，色素製剤中の銅含有量は理論値よりはるかに低くバラツキがあるため，推定値は必ずしも実測値と一致しない場合があつた。

CuCL-Na, CuCL の使用基準は銅濃度で規定されているため，本来，最終的には銅を定量すべきであろう。しかし表5に示したように市販の野菜・果実貯蔵品の銅

の濃度は基準の100分の1程度で，銅濃度を色素濃度から推定しても行政検査のレベルでは問題はないと思われる。本分析法は公定法を補完し，なおかつ迅速，簡便で実用的な分析法であると考ええる。

今回は野菜・果実貯蔵品についての検討であつたが，今後輸入食品の増加に伴いCuCL-Na, CuCLを使用した食品も多く市場に出回ることが予想されるため，本分析法を活用すると共に，種々の食品の銅含有量のバックグラウンド値を調査することが必要であると考ええる。

なお本研究の一部は第20回九州衛生公害技術協議会(1994, 熊本市)で発表した。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課：食品中の食品添加物分析法，174~176
- 2) 石館守三，他監修：食品添加物公定書解説書（第六版），D-784~791，広川書店，1992