

セライトカラム法による食品中の合成及び天然着色料の系統的分析法*

伊藤 蒼志男[®] , 小川 俊次郎^{**} , 峯 孝則 , 田嶋 克彦^{***} , 伊藤 青史 ,
中西 弘^{****} , 小原 一雄^{*****} , 外海 泰秀 , 慶田 雅洋^{**}

(1982 年 7 月 26 日受理)

多種類の合成着色料, 天然着色料及び食品に適用できる統一かつ系統的な定性, 定量法として, セライト 545 を用いるカラム法を検討した. 試料をセライト 545 と混和しカラムに充てんし, タール色素の場合はヘキサン, 3% 酢酸含有酢酸エチル, 5% アンバーライト LA-2 含有酢酸エチルで順次溶出し, 油性, 塩基性, 酸性第1群, 酸性第2群色素に分画した. 天然色素の場合は, より穏やかな条件として, ヘキサン, 酢酸エチル, メタノール・水 (1:1) 混液で順次溶出し, 油性及び水溶性色素に分画した. 各分画は簡単な後処理をした後, 薄層及びペーパークロマトグラフィーにより定性試験を, 高速液体クロマトグラフィーにより定量試験を行った. 食品からの添加回収率は一部の色素を除き良好で, 特に天然色素にも良い結果が得られた.

1 緒 言

食品中の合成着色料及び天然着色料の分析法については従来より種々の報告があるが, これらは対象色素が限られていたり, 食品の種類によって前処理法がそれぞれ異なる場合が多く, すべての色素及び食品について統一的方法はまだ確立されていない. そこで著者らは, 多種類の食品を対象として前処理法の統一を試み, 又, 多種類の許可, 不許可を含めたタール色素及び天然色素について系統的に分画し, 分画した色素を薄層クロマトグラフィー (TLC) 及びペーパークロマトグラフィー (PC) により定性試験を, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量試験を行う系統的試験法の確立を検討してきた.

先に, 液体陰イオン交換樹脂 アンバーライト LA-2 を用いる液・液分配法による系統的試験法を報告¹⁾した

が, 特に天然色素の中には酸, アルカリ, 熱などに不安定で分解するものが認められた. そこで, 本報ではより分析条件の穏やかなセライト 545 を用いるセライトカラム法について検討した.

セライト 545 を用いる方法としては, Dolinsky ら²⁾, や Graichen ら³⁾の方法があるが, 適用可能な色素及び食品が限られている. これに対し本法では, 多種類の食品に適用できかつタール色素及び天然色素について良好な結果が得られたので報告する.

2 試料, 試薬及び装置

2.1 試 料

市販のみかん果汁入り清涼飲料水 (ソフトドリンクス), フルーツキャンディ, ラクトアイス, フルーツゼリー, いちごジャム, たくあん漬, 焼きかまぼこ, マーガリン及びバタークッキーを用いた.

2.2 試 薬

アンバーライト LA-2: 前報¹⁾に同じ.

色素標準品: 前報¹⁾に同じ.

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA): 片山化学工業製特級品を用いた.

5% LA-2 含有酢酸エチル溶離液: アンバーライト LA-2 25 ml を酢酸エチル 475 ml に溶かし, これに 3% 酢酸 200 ml 及び飽和硫酸アンモニウム溶液 15 ml を加えて振り混ぜ, 放置後分離した有機溶剤層を回収し

* 食用色素の系統的分析法に関する研究 第2報

** 国立衛生試験所大阪支所: 大阪府大阪市東区法門坂 1-1-43

*** サントリー(株)中央研究所: 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1

**** 滋賀県立環境衛生センター: 滋賀県大津市御殿浜 13-45

***** (財)日本食品分析センター大阪支所: 大阪府吹田市豊津町 3-1

て使用する。

セライト 545：和光純薬製のものを、その 200 g に塩酸 200 ml 及び水 500 ml を加え 1 時間加熱し、冷却後、濾紙（東洋 No. 5A）を用いて吸引濾過し、濾紙上のセライト 545 を濾液が中性になるまで水洗する。次に 110 °C で 10 時間以上加熱して乾燥した後、粉碎して使用する。

その他の試薬は市販特級品を用いた。

2.3 器具及び装置

クロマト管：内径 2.0 cm、長さ 30 cm の活栓付きガラス管を用いた。

その他の器具及び装置は前報¹⁾に同じ。

3 実験操作

3.1 カラムの作製

固体試料：細切りした試料 5 g にセライト 545 20 g 及び水 5 ml を加え、乳鉢で均一になるようよく混和した後、カラム床高さが約 20 cm になるよう乾式充てんする。

液体試料：水 5 ml の代わりに試料 5 g を用い、以下固体試料と同様に操作する。

3.2 色素の系統的分画法

3.2.1 タール色素の場合 3.1 のカラムにヘキサン 50 ml を流し、溶出液を分取し画分 I とする。次いで 3 % 酢酸含有酢酸エチル 100 ml を流し、溶出液を分取し、ロータリーエバポレーターで約 10 ml に濃縮した後、ヘキサン 15 ml を加え、水 2 ml ずつで 3 回抽出し、水層を合わせ画分 II とする。残った有機溶剤層は 2 % アンモニア水 3 ml ずつで 4 回抽出し、水層を合わせ画分 III-1 とする。有機溶剤層は捨てる。カラムに 5 % LA-2 含有酢酸エチル溶離液 100 ml を流し、溶出液を分取し画分 III-2 とする。

3.2.2 天然色素の場合 3.1 のカラムにヘキサン 100 ml を流し、溶出液を分取し画分 A とする。次いで酢酸エチル 100 ml を流し、溶出液を分取し画分 B とする。カラムをメタノール 30 ml で洗浄し、洗浄液は捨てる。次いで水・メタノール (1:1) 混液 100 ml を流し、溶出液を分取し画分 C とする。

3.3 各画分の精製及び試験溶液の調製

3.3.1 タール色素の画分について

画分 I：減圧下濃縮乾固した後、残さをヘキサン 15 ml に溶かし、ヘキサン飽和 *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 15 ml ずつで 3 回抽出する。DMF 層を合わせ、DMF 飽和ヘキサン 20 ml で 2 回洗浄した後、2 %

塩化ナトリウム溶液 300 ml を加え、ヘキサン 30 ml ずつで 2 回再抽出する。ヘキサン層を合わせ、減圧下で濃縮乾固した後、残さをアセトニトリルに溶かし 10 ml とし、試験溶液とする。

画分 II：ヘキサン 10 ml で洗浄した後、減圧濃縮し、残さをメタノールに溶かし 10 ml とし、試験溶液とする。

画分 III-1：ヘキサン 15 ml で洗浄した後、減圧濃縮し、残さを水・メタノール (1:1) 混液に溶解し 10 ml とし、試験溶液とする。

画分 III-2：減圧下約 10 ml まで濃縮し、ヘキサン 10 ml を加えた後、飽和硫酸アンモニウム溶液 20 ml ずつで 2 回洗浄し、次いで 0.5 % EDTA 含有 3 % アンモニア水 3 ml ずつで 4 回抽出する。水層を合わせ、エーテル 15 ml ずつで 2 回洗浄した後、減圧下濃縮し、残さを水・メタノール (1:1) 混液に溶かし 10 ml とし、試験溶液とする。

3.3.2 天然色素の画分について

画分 A：3.3.1 の画分 I の処理法に同じ

画分 B：減圧下濃縮した後、酢酸エチルで 10 ml とし、試験溶液とする。

画分 C：G 4 のグラスフィルターで濾過した後、減圧下濃縮し、残さを水・メタノール (1:1) 混液に溶かし 10 ml とし、試験溶液とする。

3.4 定性、定量試験

各試験溶液中の色素の TLC 及び PC による定性試験及び HPLC による定量試験は前報¹⁾に従った。

4 結果及び考察

4.1 セライトカラムの調製

セライトカラムからの色素の溶出パターンは、セライト 545 量、試料採取量、試料の水分含量及び試料の pH により変動することが観察された。そこで、セライト 545 量を 20 g、試料採取量を 5 g と定めた。固体試料では、試料を湿潤させ色素の溶出を容易にするため、水を加える必要があったので、種々の水量を検討した結果、5 ml が適当であることが分かった。従って、液体試料では試料のみ 5 g (水約 5 ml 相当) を用いることにした。

カラム溶出時の pH は、試料中に酸性及び塩基性色素が共存する可能性があるため、酸性又は塩基性に固定することは溶出の点で好ましくなかった。そこで、中性で行うこととし、試料は必要に応じ酸又はアルカリで中性としてからカラムに充てんすることにした。

4.2 溶出条件の検討

4.2.1 タール色素について 溶出は色素と溶離液の極性の関係を考慮して, 油性, 塩基性, 酸性色素と極性の低い順に行うことを計画し, 各々の最適溶出条件を検討した。

油性色素: オイルレッド XO 及びスダン III をマーカー色素とし, イソオクタン, ペンタン, ヘキサン及びシクロヘキサンの各 50 ml を用いてカラムからの色素の回収率をみた。その結果, いずれの溶剤を用いても両色素の回収率は 93.8 % 以上と良好であったので, ヘキサンを用いることにした。

塩基性色素: ローダミン B, オーラミン, フクシン及びメチルバイオレットをマーカー色素として用い, ヘキサン, ベンゼン, ジクロロメタン, エーテル及び酢酸エチルの各 100 ml で溶出したところ, メチルバイオレットを除き他の色素は酢酸エチルで 84.9 % 以上溶出することが分かった。メチルバイオレットのみは 38.4 % と不良であったので, 溶出を助ける目的で酢酸の添加を検討した。Table 1 に示したように, 酢酸エチルに酢酸を 2 % 以上添加することによりメチルバイオレットの回収率は 93.1 % と改善され, 又, 他の色素もいずれも 92.5 % 以上と良好な回収率が得られた。従って, 塩基性色素は 3 % 酢酸含有の酢酸エチル 100 ml で溶出することにした。

Table 1 Effect of concentration of acetic acid in ethyl acetate on recovery of basic coal-tar dyes

Dye	Recovery (%)					
	Concentration of acetic acid (%)					
	0	1	2	3	4	5
Rhodamine B	96.2	99.3	100.0	100.0	100.0	100.0
Auramine	84.9	90.7	92.5	94.2	94.2	94.2
Fuchsine	84.9	87.3	94.9	96.0	96.0	96.5
Methyl Violet	38.4	89.3	93.1	93.5	93.7	93.3

Each 1000 µg of dye was eluted from the Celite column with 100 ml of ethyl acetate containing acetic acid of various concentrations.

酸性色素第 1 群: 塩基性色素の溶出条件を用いると, 酸性色素のうちキサンテン系色素のエリスロシン (食用赤色 3 号), フロキシシン (食用赤色 104 号), ローズベンガル (食用赤色 105 号) 及びエオシンを同時に溶出できることが分かった。そこで, これらの色素は塩基性色素と同時に溶出させた後, 液・液抽出により分離することにした。すなわち溶出液を濃縮し, ヘキサンを加えて溶剤極性を下げた後, 水でまず塩基性色素を抽出分離し

(画分 II), 次いでアンモニア水でキサンテン系の酸性色素を抽出 (画分 III-1) した。又, この操作により, 試料由来の油脂分は有機溶剤層にとどまるので, 色素の精製もできた。

酸性色素第 2 群: 他の酸性色素は, ヘキサン, 3 % 酢酸含有酢酸エチルではカラムから溶出しなかったため, これらは LA-2 を含む有機溶剤で溶出することにした。

マーカー色素としてファーストグリーン FCF (食用緑色 3 号), ニューコクシン (食用赤色 102 号) 及びアシッドレッド (食用赤色 106 号) を用い, 前報¹⁾に従って 5 % LA-2 を含むベンゼン, ジクロロメタン, エーテル, 酢酸エチル及びベンゼン・1-ブタノール (7:3) 混液の各々 100 ml を用いて溶出した。その結果, Table 2 に示すように, いずれの色素も 5 % LA-2 含有の酢酸エチル又はベンゼン・1-ブタノール (7:3) 混液により 95 % 以上が回収された。一方, 両者の溶出時間は, ベンゼン・1-ブタノール (7:3) 混液が約 4 時間を要するのに対し, 酢酸エチルでは約 1 時間と短時間で済むことから, 最終的に 5 % LA-2 含有の酢酸エチル 100 ml を用いることにした。

Table 2 Elution of acidic coal-tar dyes by various organic solvents containing 5 % Amberlite LA-2

Organic solvent	Recovery (%)		
	Fast Green FCF	New Coccine	Acid Red
Benzene	68.8	97.0	96.8
Dichloromethane	89.3	75.1	82.0
Ether	76.4	98.3	81.7
Ethyl acetate	95.6	98.7	98.1
Benzene : 1-Butanol (7:3)	95.1	98.1	98.8

Each 1000 µg of dye was eluted from the Celite column with 100 ml of organic solvents containing 5 % of Amberlite LA-2.

4.2.2 タール色素の標準系における添加回収実験

4.2.1 で検討した溶出条件について, 油性色素 6 種, 塩基性色素 7 種, 酸性色素第 1 群 4 種, 同第 2 群 22 種及び酸性色素のアルミニウムレーキ 2 種の計 41 種類の色素について, 試料の代わりに水を使用した標準系による全行程の添加回収実験を行った。Table 3 に示すように, メチレンブルー, オレンジ I, オレンジ II のみやや低い回収率となった外は, ほとんどの色素について 90 % 以上の良好な回収率が得られ, タール色素については溶出条件が適当であることが明らかとなった。

4.2.3 天然色素の溶出条件について タール色素の溶出条件を, 天然色素の β -カロチン, モナスコルブリン, リボフラビン, カルミン酸, ラッカイン酸及びベタ

Table 3 Recovery of standard coal-tar dyes without food samples

Fraction No.	Dye	Amount added (μg)	Recovery (%)
I	Oil soluble dye		
	Oil Red XO	500	94.3
	Oil Orange SS	500	93.6
	Oil Yellow AB	1500	95.4
	Sudan III	500	92.6
	Sudan G	500	101.3
	Sudan I	500	83.7
II	Basic dye		
	Crystal Violet	150	91.9
	Methylene Blue	150	35.5
	Rhodamine B	100	93.0
	Fuchsin	150	90.1
	Malachite Green	150	94.1
	Auramine	150	95.4
	Methyl Violet	150	93.1
III-1	Acidic dye (1st group)		
	Erythrosine	500	97.1
	Phloxine	500	93.8
	Rose Bengale	500	93.5
III-2	Eosine	500	96.9
	Acidic dye (2nd group)		
	Tartrazine	500	99.6
	Sunset Yellow FCF	500	92.6
	Amaranth	500	92.7
	New Coccine	500	97.5
	Acid Red	500	94.3
	Brilliant Blue FCF	500	93.1
	Fast Green FCF	500	103.4
	Indigo Carmine	500	91.9
	Ponceau 6R	500	96.2
	Ponceau SX	500	95.3
	Azorubin	500	88.3
	Allura Red AC	500	95.4
	Orange GGN	500	89.2
	Naphthol Yellow S	500	98.2
	Azure Blue VX	500	96.7
	Acid Violet 6B	500	93.9
	Wool Green S	500	103.6
	Orange I	500	13.1
	Orange II	500	58.0
	Chrysoine	500	47.6
	Orange G	500	97.4
	Acid Fast Red 3G	500	90.3
	Aluminum lake		
	Tartrazine lake	1000	95.2
	Brilliant Blue FCF lake	1000	93.8

Table 4 Comparison of recoveries of natural dyes between original method and improved method

Dye	Recovery (%)					
	(I) Original method			(II) Improved method		
	F-1	F-2	F-3	F-A	F-B	F-C
β-Carotene	42.0	39.5	—	74.4	—	—
Monascorubrin	—	31.1	17.2	—	—	90.9
Riboflavin	—	—	4.4	—	—	78.4
Carminic acid	—	—	52.7	—	—	89.7
Laccaic acid	—	—	35.0	—	—	92.0
Betanine	—	—	0.0	—	—	77.0

Each 1000 μg of dye was added; F: Fraction; (I) Original method: Each dye was eluted from Celite column with 50 ml of hexane (F-1), 100 ml of ethyl acetate containing 3 % acetic acid (F-2), and 100 ml of ethyl acetate containing 5 % LA-2 (F-3); (II) Improved method: Each dye was eluted with 100 ml of hexane (F-A), 100 ml of ethyl acetate (F-B), and 100 ml of a water-methanol (1:1) mixture (F-C).

種々の有機溶剤を再検討した結果、油溶性色素はヘキサンを倍量の 100 ml と酢酸エチル 100 ml とを用いて溶出させ、各々画分 A, B とし、次いでメタノールで洗浄した後、水溶性色素を水・メタノール (1:1) 混液で溶出 (画分 C) させることにした。本溶出条件により、Table 4 の(II) に示すように色素の分画割れはなくなり、回収率もいずれも (74~92)% と良好な結果を得た。

4.3 食品での添加回収実験

4.3.1 タール色素について タール色素 27 種類を (100~1500) ppm, みかん果汁入り清涼飲料水 (ソフトドリンクス), フルーツキャンディ, ラクトアイス, いちごジャム及びたくあん漬に添加し、タール色素の溶出条件で分析した結果を Table 5 にまとめた。

ほとんどの色素は各食品についてはほぼ満足のいく回収率が得られた。クリスタルバイオレット及びメチレンブルーは回収率が悪かったが、これらの色素は食品への染色性が極めて高いためと考えられる。又、フルーツキャンディ, フルーツゼリー及びラクトアイスでは、スダン III, エリスロシン, フロキシン及びローズベンガルの回収率が若干低くなる傾向がみられた。オレンジ I 及びオレンジ II では、標準系でみられなかった色素の分画割れがみられた。

4.3.2 天然色素について 油溶性色素 2 種, 水溶性色素 11 種の計 13 種類を各 5000 ppm, みかん果汁入り清涼飲料水, バタークッキー, マーガリン, 焼きかまぼこ, いちごジャム及びたくあん漬に添加し、天然色素の溶出条件で分析した結果を Table 6 にまとめた。

ニンに適用してみたところ、Table 4 の (I) に示すように、β-カロチン及びモナスコルブリンでは分画割れが、リボフラビン, カルミン酸, ラッカイン酸及びベタニンでは回収率の低下が見られ、条件として好ましくなかった。天然色素はタール色素に比し酸, アルカリ, 熱などに対し不安定で分解しやすいものも少なくないので、より穏やかな溶出条件が必要と考えられた。そこで、天然色素では酢酸や LA-2 を用いず、溶剤の極性の変化のみで溶離, 分画することを試みた。

Table 5 Recovery of coal-tar dyes added to several kinds of foods

Dye	Added (μ g)	Fraction No.	Recovery (%)					
			Orange soft drink	Fruit candy	Lacto ice	Fruit jelly	Strawberry jam	Pickled radish "TAKUAN-ZUKE"
Oil soluble dye								
Oil Red XO	500	I	108.5	92.8	90.2	71.5	69.3	76.0
Oil orange SS	500	I	82.9	77.8	69.7	77.6	76.0	74.0
Oil Yellow AB	1500	I	103.5	83.6	97.3	90.6	75.9	80.9
Sudan III	500	I	97.9	84.7	90.1	77.5	74.6	86.9
Basic dye								
Crystal Violet	150	II	41.6	14.4	22.9	11.4	5.5	0.0
Methylene Blue	150	II	0.0	16.0	49.9	0.0	0.0	1.9
Rhodamine B	100	II	96.2	74.3	94.7	94.4	86.8	90.7
Acidic dye-1								
Erythrosine	500	III-1	94.5	81.6	77.2	95.5	80.6	76.7
Phloxine	500	III-1	96.1	87.0	71.7	93.6	74.9	75.8
Rose Bengale	500	III-1	87.9	81.7	64.5	94.1	71.1	70.6
Acidic dye-2								
Tartrazine	500	III-2	95.9	78.9	100.8	90.2	86.3	88.9
Sunset Yellow FCF	500	III-2	92.7	85.9	93.5	93.8	78.5	89.3
Amaranth	500	III-2	89.8	85.6	84.7	88.8	80.8	78.4
New Cocchine	500	III-2	96.8	72.7	100.1	98.0	86.3	86.5
Acid Red	500	III-2	103.0	72.4	94.9	90.1	103.1	86.9
Brilliant Blue FCF	500	III-2	91.0	74.8	88.3	89.8	78.6	71.9
Fast Green FCF	500	III-2	93.7	80.2	82.7	91.6	82.6	78.2
Ponceau 6R	500	III-2	96.4	82.5	83.3	92.8	80.7	86.1
Ponceau SX	500	III-2	101.5	79.1	80.6	91.6	79.0	90.7
Azorubin	500	III-2	61.0	81.6	85.5	86.2	84.4	83.0
Allura Red AC	500	III-2	104.7	84.2	92.6	93.6	84.5	85.5
Orange GGN	500	III-2	95.9	65.4	85.4	95.7	71.1	90.7
Naphthol Yellow S	500	III-2	99.3	52.9	71.5	94.6	81.0	94.1
Azure Blue VX	500	III-2	97.6	85.7	85.0	96.0	94.5	81.1
Acid Violet 6BN	500	III-2	95.7	73.4	72.5	100.6	70.1	78.3
Orange I	500	{ II III-2	23.9 71.2	4.0 72.1	2.2 77.5	3.1 75.5	4.5 53.0	28.1 62.8
Orange II	500	{ II III-2	37.4 51.3	17.8 58.1	32.9 66.7	8.2 84.6	9.1 66.3	43.8 42.6

Table 6 Recovery of natural dyes added to several kinds of food by the procedure for natural dyes

Dye	Fraction No.	Recovery (%)					
		Orange soft drink	Butter cookie	Margarine	Steamed, baked fish paste "YAKI-KAMABOKO"	Strawberry jam	Pickled radish "TAKUAN-ZUKE"
β -Carotene	I	79.7	79.1	57.1	70.9	66.5	71.5
Bixin	I	94.9	84.2	54.9	86.0	86.0	75.4
Curcumin	III	82.5	78.0	57.2	74.9	78.8	76.8
Betanine	III	86.5	83.5	81.4	77.5	83.9	75.0
Caramel	III	85.1	75.1	81.6	74.5	82.4	84.9
Grapeskin extract	III	85.7	31.3	20.0	80.4	84.9	30.1
Carminic acid	III	86.9	77.8	72.9	65.8	64.5	76.0
Carminic acid	III	87.5	74.1	84.0	55.4	76.9	66.1
Laccaic acid	III	95.0	85.2	93.4	87.5	92.1	87.2
Monascorubrin	III	92.7	103.2	76.0	64.7	92.6	88.0
Norbixin	III	89.5	85.1	91.6	64.0	83.6	89.4
Crocin	III	101.6	98.0	94.1	79.6	86.4	89.6
Riboflavin	III	99.8	88.7	89.5	57.0	93.9	95.2

Each 5000 μ g of natural dye was added.

マーガリンでは一部の色素の回収率がやや低く、又、
焼きかまぼこでは染着性が強いことから他の食品に比し
色素の回収率が若干低くなる傾向がみられた。ぶどう果

皮抽出色素は、バタークッキー、マーガリン及びたくあ
ん漬での回収率が良くなかったが、これは色素が不安定
なため分解したためと思われる。その他のほとんどの色

Chem., **46**, 1022 (1963).

☆

Systematic determination of artificial and natural dyes in foods by a Celite column chromatographic method (Studies on systematic analysis of dyes in food II). Yoshio ITO, Shunjiro OGAWA*, Takanori MINE, Katsuhiko TAJIMA**, Seishi ITO, Hiroshi NAKANISHI***, Kazuo OHARA****, Yasuhide TONOGAI, and Masahiro IWAIDA* (*National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch, 1-1-43, Hoenzaka, Higashi-ku, Osaka-shi, Osaka; *Central Research Institute, Suntory Co. Ltd., 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka; **Shiga Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 13-45, Goten-hama, Otsu-shi, Shiga; ***Japan Food Research Laboratories, Osaka Branch, 3-1, Toyotsu-cho, Suita-shi, Osaka)

Celite 545-column chromatography was applied to the systematic determination of artificial and natural dyes in foods. A sample was ground well in a mortar with Celite 545 to yield a dry product and then the mixture was transferred into a glass tube. Coal-tar dyes were eluted out using hexane, 3 % acetic acid in ethyl acetate, and 5 % Amberlite LA-2 (LA-2, liquid anion exchange resin) in ethyl acetate in this order. The 2nd fraction was then separated into 2 fractions by liquid-liquid partitioning with water and 2 % ammonia water. By these procedures, coal-tar dyes were fractionated into oil soluble, basic, group 1 acidic, and group 2 acidic dyes. Natural dyes were eluted out using hexane, ethyl acetate, and a water-methanol mixture (1 : 1). They were fractionated into oil soluble and water-soluble dyes. After simple clean-up applied to each fraction, dyes in each fraction were determined qualitatively by either paper or thin layer chromatography, and quantitatively by high-performance liquid chromatography. The recoveries when 27 coal-tar dyes and 13 natural dyes were added to several foods were not less than 70 %, results being satisfied especially for natural dyes.

(Received July 26, 1982)

Keyword phrases

systematic determination of coloring matters in foods; column chromatography using Celite 545; coal-tar dyes; natural dyes; Amberlite LA-2.

- 1) 伊藤誉志男, 外海泰秀, 三ツ橋幸正, 浜野 孝, 松木幸夫, 加藤太郎, 藤原孝行, 小川俊次郎, 豊田正武, 慶田雅洋: 分化, **32**, 47 (1983).
- 2) M. Dolinsky, C. Stein: *J. Assoc. Agric. Chem.*, **45**, 767 (1962).
- 3) C. Graichen, J. C. Molitor: *J. Assoc. Agric.*