

銅葉緑素（銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム）の分析について

國井敏 神尾典子 伊藤岩夫
衛生研究所 県中支所

要旨

着色料である銅葉緑素には、銅クロロフィルと銅クロロフィリンナトリウムがあり、食品衛生法でそれぞれ使用可能な食品とその使用量が定められている。使用量の基準は銅葉緑素製剤量ではなく錯体核である銅の量で規定されており、公定法では、溶媒抽出により分別した2種の液層に含まれるそれぞれの銅量をもって、銅葉緑素製剤の含有とする分析法が用いられている。しかし我々の経験では、銅葉緑素使用食品の分析において必ずしも添加物表示内容と一致しない例や、添加回収試験に用いる銅葉緑素標準品が期待通り回収できない例があるため、公定法の溶媒抽出で理論通り正しく分別できるのかどうか、標準品を用いて検討した。銅クロロフィルはエーテル層からの0.5%水酸化ナトリウム抽出で約70%が水酸化ナトリウム層に移行し、銅クロロフィリンナトリウムは水層からの酢酸エチル抽出で約40%が酢酸エチル層に移行していた。

キーワード 銅葉緑素, 銅クロロフィル, 銅クロロフィリンナトリウム, 溶媒抽出

はじめに

銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム(以下 CuChl, CuChl-Na と略す)は食品衛生法で着色料として使用が認められている。CuChl, CuChl-Naの製法は、植物に存在している天然のクロロフィルの配位元素であるマグネシウムを銅に置換して、クロロフィルの緑色を安定させ、酸や光に強くしたものである。単にマグネシウムを銅に置換したものが CuChl であり、これをアルカリによる加水分解で水溶性にしたものが CuChl-Na で、緑色の着色料として使用される。

平成5年4月には基準の改訂があり、使用対象食品として従来の野菜・果実貯蔵品及びチューインガムなどの他に、あめ類、生菓子、魚肉練り製品などの食品が追加¹⁾され、用途が拡大された。CuChl, CuChl-Naの使用量は銅の含有量で基準値が規定されているため、食品中の食品添加物分析法²⁾(以下“公定法”とする)では、両者を酢酸エチルを用いて食品より分別抽出し、原子吸光法によりそれぞれの銅を分別定量する方法が示されている。

しかし我々は、表示が CuChl-Na のみであ

るのに CuChl が検出される等表示違反にもなりかねないケースを経験している。

これは、CuChl や CuChl-Na の製剤が天然物を原料としていることによる純度の問題なのか、それとも公定法に問題があり理論通りに分別されないのかを、市販標準品を用いて検討したので報告する。

試薬及び方法

1 試薬

1) 銅葉緑素製剤

「食品添加物用 銅クロロフィル：クロロンGA」日本葉緑素株式会社

「銅クロロフィリンナトリウム 粉末」和光純薬

「銅クロロフィリンナトリウム」特級 関東化学

2) 銅標準液

「銅標準液」原子吸光分析用 100mg/L 関東化学

3) その他の試薬は市販特級品以上のものを使用した。

2 装置

原子吸光分光光度計：島津製作所
AA-6400F
ホットプレート：ヤマト科学 HK-41

3 方法

1) 銅葉緑素製剤の銅含有量の測定

公定法の検討において、抽出試験での回収率を算出するため、各製剤の銅含有量を衛生試験法³⁾に示された方法に従い、測定した。

2) 公定法の検討

CuChl, CuChl-Na の調製試料および原子吸光分析用の銅標準液を検体とし、酢酸エチル及び 0.5 % NaOH 溶液による抽出状況の検討を行った。

結果及び考察

1 銅葉緑素製剤の銅含有量の測定

硫酸-硝酸法による湿式分解後、原子吸光度計で銅を測定した。結果を表 1 に示す。

この結果から CuChl-Na 抽出試験は、銅含有量が高い値を示した関東化学製のものを使用することにした。

2 公定法の検討

図 1 に公定法のフローを示す。この方法は酢酸エチルに抽出されるのが CuChl で、水層に残存するのが CuChl-Na であるとの理論で構築された方法である。しかし、表 2 に

表 1 銅葉緑素製剤の銅含有量

銅含有量	
銅クロロフィル (日本葉緑素)	0.67%
銅クロロフィリン ナトリウム (和光純薬)	3.8%
銅クロロフィリン ナトリウム (関東化学)	4.0%

示すように実際に我々が経験した収去検査では、着色料としての添加物表示が「銅クロロフィリンナトリウム」とされている検体においても銅クロロフィルを検出する例がある。

そこで、公定法の抽出操作において CuChl と CuChl-Na が理論通りに分別されるのかどうか、各々の標準試薬を用いて図 2 に示す方法で抽出状況を検討した。

1) 酢酸エチルによる CuChl-Na の抽出の検討

CuChl-Na が酢酸エチル層に抽出されるか検討した。分液漏斗に CuChl-Na 調製液 (CuChl-Na 製剤 0.1g を水 100mL に溶解した調製液の 2mL) を採り、弱アルカリ性を確認し、酢酸エチル 50mL を加え抽出した。これを 3 回繰り返す、抽出ごとの酢酸エチル

表 2 収去検体における添加物表示と公定法による分析結果

試験品名	表示	銅クロロフィリンナトリウム	銅クロロフィル
		銅濃度 (g/kg)	銅濃度 (g/kg)
うどたまり	銅クロロフィリンナトリウム	0.004	—
味わらび	銅クロロフィリンナトリウム	0.009	—
うどたまり	銅クロロフィリンナトリウム	0.003	0.004
わらび水煮	銅クロロフィリンナトリウム	0.011	0.003
わらびたまり	銅クロロフィリンナトリウム	0.015	0.010
たらの芽水煮	銅葉緑素	0.002	0.001
わらびたまり漬け	銅葉緑素	0.017	0.011
わらび水煮	銅葉緑素	0.023	0.011
わらびたまり漬け	銅葉緑素	0.025	0.017
わらび水煮	銅葉緑素	0.028	0.005

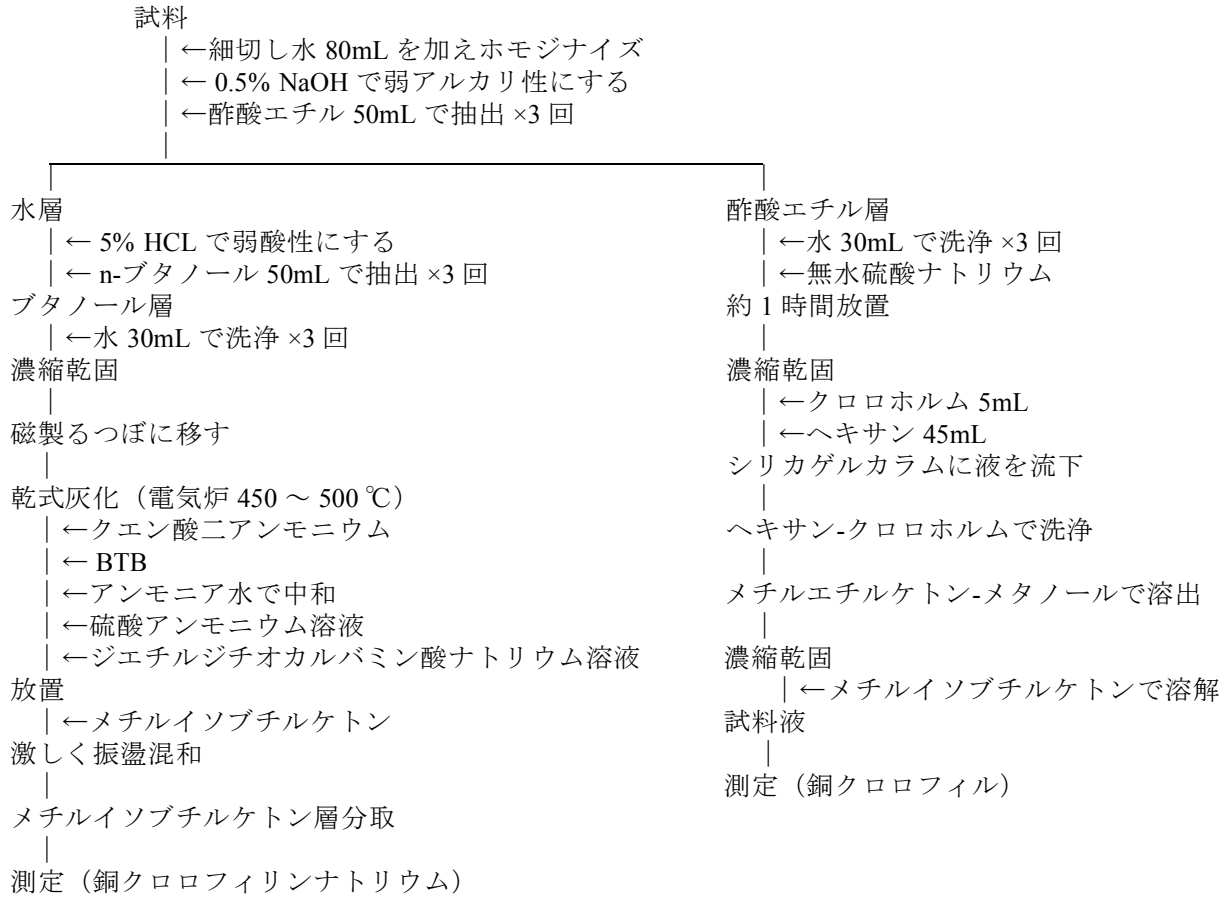


図 1 公定法による銅葉緑素の分析法

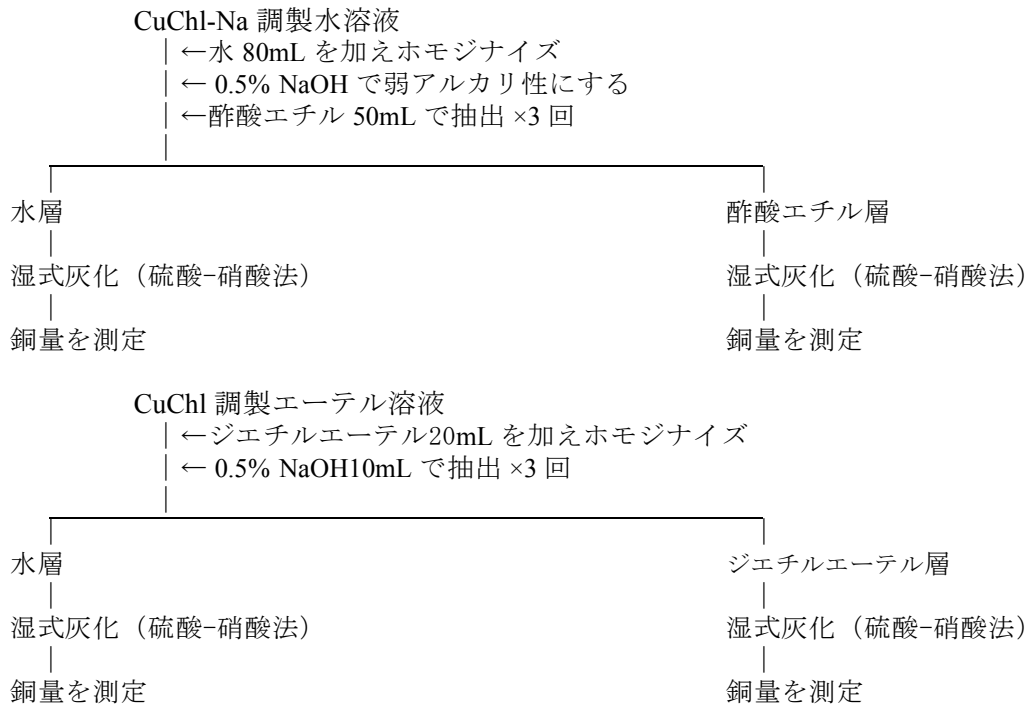


図 2 酢酸エチルによる CuChI-Na の抽出法および 0.5% NaOH による CuChI の抽出法

表3 CuChI-Naの酢酸エチル抽出

		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	平均	銅標準液
		銅量	銅量	銅量	銅量	銅量	(No.1 ~ 5)	銅量
		μg	μg	μg	μg	μg	銅量 μg	μg
酢酸 エチ ル層	1回目	8.4 (10.8%)	6.9 (8.6%)	7.3 (9.5%)	5.1 (6.6%)	7.8 (10.1%)		0.1 (0.2%)
	2回目	11.6 (15.0%)	13.7 (17.2%)	15.5 (20.1%)	15.5 (20.2%)	16.6 (21.6%)		0
	3回目	10.5 (13.5%)	11.7 (14.7%)	10.0 (13.0%)	10.5 (13.7%)	8.5 (11.1%)		0
酢酸エチル層		30.5	32.3	32.8	31.1	32.9	31.9	0.1
Total		(39.4%)	(40.5%)	(42.6%)	(40.5%)	(42.8%)	(41.2%)	(0.2%)
水層		47.0	47.5	44.2	45.7	44.0	45.7	49.0
Total		(60.6%)	(59.5%)	(57.4%)	(59.5%)	(57.2%)	(58.9%)	(99.8%)
全体		77.5	79.8	77.0	76.8	76.9	77.6	49.1
銅濃度		3.9%	4.0%	3.9%	3.8%	3.9%	3.9%	

表4 CuChIの水酸化ナトリウム抽出

		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	平均	銅標準液
		銅量	銅量	銅量	銅量	銅量	(No.1 ~ 5)	銅量
		μg	μg	μg	μg	μg	銅量 μg	μg
NaOH 層	1回目	20.3 (33.8%)	17.6 (28.8%)	16.7 (26.3%)	17.9 (28.1%)	33.1 (60.1%)		42.9 (94.9%)
	2回目	18.3 (30.4%)	21.4 (35.0%)	26.9 (42.4%)	24.6 (38.6%)	2.6 (4.7%)		1.8 (4.0%)
	3回目	2.7 (4.5%)	1.3 (2.1%)	2.3 (3.6%)	3.1 (4.9%)	0.7 (1.3%)		0.5 (1.1%)
NaOH層		41.3	40.3	45.9	45.6	36.4	41.9	45.2
Total		(68.7%)	(66.0%)	(72.3%)	(71.6%)	(66.1%)	(68.9%)	(100%)
エーテル層		18.8	20.8	17.6	18.1	18.7	18.8	0
Total		(31.3)	(34.0%)	(27.7%)	(28.4%)	(33.9%)	(31.1%)	
全体		60.1	61.1	63.5	63.7	55.1	60.7	45.2
銅濃度		0.75%	0.76%	0.79%	0.79%	0.69%	0.76%	

と残存水層についてそれぞれ銅量を測定した。併せて銅標準液(原液 100mg/L の 0.5mL)についても同様に実施した。結果を表3に示す。

CuChI-Na のメーカーのデータシートには「水に溶けやすく、エタノール又はエーテルにほとんど溶けない」(和光純薬)、「水；易溶、有機溶媒；エタノール、クロロホルムに微溶」(関東化学)とあり、公定法の分

別抽出は、CuChI-Na が溶媒層に移行せず、水層に留まることを利用した方法である。しかし、実験の結果では3回の酢酸エチル抽出操作で41.2%もの銅が酢酸エチル層に移行していることが明らかになった。この原因は標準液の無機銅がほとんど水層に留まっていることをみると、CuChI-Naとしての性質が関与していることも考えられる。なお2回目の抽出で最も多く移行していた。

この原因として抽出時の pH が関与すること、1 回目の抽出における酢酸エチルの暴露に更に易溶化させる要因があることなどが推測される。また、今回の抽出操作は 3 回で終了したが回数を増やした場合には、更に多く酢酸エチル層に移行があるのではと推定される。

2) 0.5 % NaOH による CuChl の抽出

CuChl が NaOH 層に抽出されるか検討した。分液漏斗に CuChl 調製液 (CuChl 製剤 0.1g をジエチルエーテル 25mL に溶解した調製液の 2mL) をとり 0.5 % 水酸化ナトリウム 10mL を加え、振盪混和し抽出をした。これを 3 回

繰り返し、抽出ごとの NaOH 層と残存エーテル層についてそれぞれ銅量を測定した。併せて銅標準液 (原液 100mg/L の 0.5mL) も同様に実施した。結果を表 4 に示す。

試験に用いた CuChl は日本葉緑素株式会社にて、食品添加物用として一般に販売されている製剤であり、製品のパンフレットによれば「溶解性」の項には「油脂に溶解します。アルコールにはわずかに溶解します。水には不溶です。」との記載がある。結果から、エーテルに溶解した後に 0.5 % NaOH を用いての抽出操作では 68.9 % が NaOH 層に移行した。抽出割合はエーテル層に残存するより多く非常に抽出され易いと言えよう。

まとめ

水溶性である CuChl-Na の酢酸エチル抽出では、約 41 % が酢酸エチル層に移行しており、非水溶性の CuChl の 0.5 % NaOH 抽出では約 69 % が NaOH 層に移行していた。今回、標準品の銅葉緑素製剤を用いた抽出実験では、正しく CuChl-Na であると分別ができたのは約 60 % であり、CuChl にいたっては約 30 % しか分別されない結果であった。

CuChl と CuChl-Na の使用基準は個別に定められているので、分別して測定する必要がある。しかし、葉緑素の錯体は界面活性を有するために溶媒による抽出分別が難し

い⁷⁾ こと、公定法による分析があくまで錯体核である銅の定量であって実際に銅葉緑素として使用された量を知る方法⁴⁾ とは言えないことなどから、CuChl と CuChl-Na を分別して定量する方法として公定法に全く問題がないわけではない。

我々の試験結果同様に、本来水溶性である CuChl-Na が抽出の過程において酢酸エチル層にも存在したとする報告⁴⁾ もあり、また、銅葉緑素製剤を添加しなくても保存や加工作業の過程で銅釜や銅網を使用することで山菜等にもともと含まれる葉緑素と銅が反応し銅葉緑素成分を生成するために、無添加のはずの加工品から検出⁸⁾ されてしまうケースや、銅葉緑素を含む製品の製造工程での pH 及び温度の影響により組成成分が変化する例⁹⁾ があることなど、現行の銅葉緑素分析については他にもまだ検討すべき点があるようだ。

今後、溶媒の量を変えての抽出回数ごとの試験検体の pH 変化や界面活性作用の検証、更には、単一の溶媒による抽出だけでなく混合溶媒による分別抽出の可能性を探るなどの検討が必要だと思われる。

また、今回は標準品を用いての検討であったが、食品検体に使用された場合の CuChl および CuChl-Na が分析過程においてどのような挙動を示すのかも今後検討し、収去検査における問題点を整理していきたい。

引用文献

- 1)厚生省生活衛生局長通知. 食品, 添加物等の規格基準の一部改正について. 平成 5 年 4 月 21 日 衛化第 40 号, 1993.
- 2)厚生省環境衛生局食品化学課. 食品中の食品添加物分析法 第2版. 2000 : 135-137.
- 3)日本薬学会. 衛生試験法・注解 2005. 2005 : 388-389.
- 4)日高千恵, 江崎好美, 橋本喬. 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. 福岡市衛生試験所試報 1995 ; 20 : 108-112.

- 5)佐藤健一. 銅クロロフィル, 同ナトリウム
の新しい用途. 月刊フードケミカル 1993 ;
96 : 43-46.
- 6)佐藤正基, 今井公江, 村田 敏郎. 銅クロ
ロフィリンナトリウムの脂質過酸化反応に
およぼす影響(第3報) 市販銅クロロフィリ
ンナトリウムの抗酸化能について. 日本薬
剤師会雑誌 1980 ; 100 : 580-584.
- 7)角田光淳, 井上典子, 立花光雄, 他. 食品
中のクロロフィル及びクロロフィリンの錯
体核(銅, 鉄, マグネシウム)の分別定量
とその含有量. 食品衛生学雑誌 1993 ; 34 :
25-31.
- 8)米山嶮, 中野文夫, 植松恒男, 他. 山菜加
工品の銅について. 食品衛生研究 1980 ; 30
: 678-681.
- 9)安田和夫, 只野敬子, 牛山博文, 他. 食品
中の銅クロロフィリンナトリウム分析にお
ける指標成分. 食品衛生学雑誌 1995 ; 36 :
710-716.