

## 合成着色料の一斉分析法の検討

尾上恵子 今井浩一 吉田栄充 石井里枝

Development of simultaneous analysis for synthetic colorants

Keiko Onoue, Koichi Imai, Terumitsu Yoshida, Rie Ishii

### はじめに

着色料は食品、医薬品、化粧品等に色を付けるために用いられており、天然色素と合成色素に大別され、現在、わが国では食品に対して天然色素及び12種類の合成色素の使用が認められている。しかし、海外においては、わが国で使用許可がされていない合成色素、いわゆる指定外色素が食品に使用されており、輸入食品の検査において違反事例が度々報告されている<sup>1)</sup>。よって、今後、環太平洋経済連携協定 (Trans-Pacific Strategic Economic Partnership Agreement, 以下 TPP) の締結に伴い、指定外色素が食品に使用された事例の増加が懸念される。

一方、わが国における着色料の検査法は、薄層クロマトグラフィー (Thin Layer Chromatography, 以下 TLC) や高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, 以下 HPLC) を用いた定性法が主体であり、当所では12種類の合成色素及び2種類の指定外色素 (ローダミン、キノリンイエロー) について TLC による検査を行っている。しかし、塩基性色素であるローダミンの抽出は、有害物質であるジクロロメタンを使用していること、また TLC は、測定時の環境条件や試料由来の成分による影響を受け、時に判定が困難な場合があること等、問題点があるのが現状である。

そこで今回、当所が検査している色素に加え、近年、違反報告事例の多い指定外色素を中心に6種類を加えた計20種類の色素 (酸性色素18種類及び塩基性色素2種類) を対象として、ジクロロメタンを使用しない前処理法について検討し、TLCによる定性試験への適用性を確認した。また、HPLCよりもさらに迅速な分析が可能な超高速液体クロマトグラフィー (Ultra High Performance Liquid Chromatography, 以下 UHPLC) を用いた確認試験法についても検討を行ったので、ここに報告する。

### 実験方法

#### 1. 試薬および器具

##### (1) 着色料標準品

許可色素 (酸性) : 食用赤色2号 (以下 R2), 食用赤色3

号 (R3), 食用赤色40号 (R40), 食用赤色102号 (R102), 食用赤色104号 (R104), 食用赤色105号 (R105), 食用赤色106号 (R106), 食用青色1号 (B1), 食用青色2号 (B2), 食用黄色4号 (Y4), 食用黄色5号 (Y5) 及び食用緑色3号 (G3) は和光純薬工業 (株) 製を用いた。

指定外色素 (酸性) : キノリンイエロー (QY) はダイワ化成 (株) 製, アズルピン S (AZO), オレンジ II (OR II), ブリリアントブラック BN (BBBN) は和光純薬工業 (株) 製, アシッドレッド 13 (AR13) は東京化成工業 (株) 製, パテントブルー V (PBV) は関東化学 (株) 製を用いた。

指定外色素 (塩基性) : ローダミン B (RHO), オーラミン (AUR) は和光純薬工業 (株) 製を用いた。

標準溶液 : 標準品を10 mg 量り、水10 mL に各々を溶解し、標準原液とした。これを水で適宜希釈、混合し、定性試験用標準溶液とした。

#### (2) その他の試薬

蒸留水、アセトニトリル及びメタノールは和光純薬工業 (株) 製高速液体クロマトグラフ用、酢酸エチルは和光純薬工業 (株) 製残留農薬・PCB 試験用を用い、酢酸、25% および28% アンモニア水、酢酸アンモニウムは和光純薬工業 (株) 製試薬特級を用いた。硫酸ナトリウム (無水) は関東化学 (株) 製の PCB 分析用を用いた。

#### (3) 固相抽出カラム

陽イオン交換 : ジーエルサイエンス (株) 製の InertSep PRS (500 mg/6 mL), InertSep SCX (500 mg/6 mL), InertSep MPC (200 mg/6 mL) を用いた。

陰イオン交換 : Waters 社製の Oasis WAX (150 mg/6 cc), ジーエルサイエンス (株) 製の InertSep PSA (500 mg/6 mL), InertSep NH2 (500 mg/6 mL), アジレントテクノロジー (株) 製の BOND ELUT- SAX (500 mg/6 mL) を用いた。

各固相はあらかじめ、メタノール、水各5 mL で順次、コンディショニングして用いた。

#### 2. 試料

合成着色料が使用されていないビスケット及び大根の漬物を試料とした。

#### 3. 試料溶液の調製

試料溶液の調製方法を図1に示した。

##### (1) 塩基性色素

試料2gを採取し、アセトニトリル及び水(1:1)混液18mL及び酢酸1mLを加えてホモジナイズした。3,500rpm,5分間遠心分離後、上清を採取した。そのうち2mLをとり、水2mLを加えた。この溶液をInertSep PRS(500mg/6mL)に負荷した後、水及びメタノール各5mLで洗浄し、25%アンモニア:メタノール(1:19)5mLで溶出した。溶出液を減圧乾固した後、水0.2mLで溶解したものを試料溶液とした。

(2) 酸性色素

上記4.(1)の遠心分離後の残留物にアセトニトリル及び水(1:1)混液18mL及び25%アンモニア1mLを加えてホモジナイズし、3,500rpm,5分間遠心分離した。この上清1.5mLに、4.(1)で調製した上清1.5mL及び水3mLを加えた。この溶液を酢酸で酸性(pH3~4)にし、OASIS WAX(500mg/6cc)に負荷した後、水及びメタノール各5mLで洗浄し、25%アンモニア:メタノール(1:19)5mLで溶出した。溶出液を減圧乾固した後、水0.2mLで溶解したものを試料溶液とした。

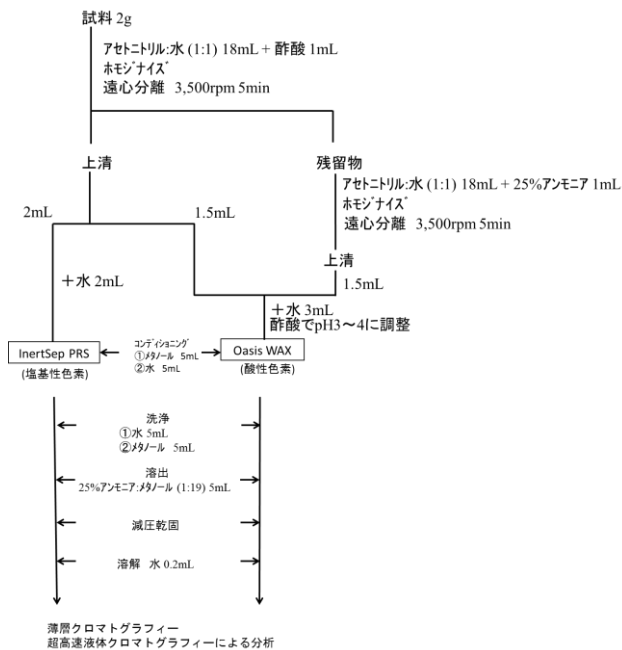


図1 試料溶液の調製方法

4. 装置及び測定方法

(1) TLCによる定性試験

スポット量: 5 µL

<条件1>

TLCプレート: Kieselgel 60 (Merck社製)

展開溶媒: 酢酸エチル:メタノール:28%アンモニア(2:1:1)混液

<条件2>

TLCプレート: RP-18 (Merck社製)

展開溶媒: メタノール:アセトニトリル:5%硫酸ナトリウム(3:3:10)混液

(2) UHPLCによる確認試験

装置: ACQUITY UPLC H-class (Waters社製)

カラム: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 1.7 µm, 2.1×150 mm (Waters社製)

カラム温度: 50°C

流速: 0.4 mL/min

注入量: 2 µL

測定波長: 210~800 nm

移動相: A; 25 mM 酢酸アンモニウム:アセトニトリル(95:5), B; 25 mM 酢酸アンモニウム:アセトニトリル(15:85)

グラジエント条件: B 0%(0-0.45min)→30%(3-3.75min)→70%(7.5min)→100%(7.65-7.8min)→0%(8.25-11min)

5. 添加回収試験

実際の食品への適用を検討するため、当所での検査頻度の高いビスケット及び漬物の2種類の食品を用いて添加回収試験を行った。

試料2gに対し、検討した色素20種を各100µg添加し、TLCによる定性試験およびUHPLCによる確認試験を行った。

なお、添加濃度については、実際に着色料が使用された食品からの検出量の報告をもとに設定した<sup>2)</sup>。

結果および考察

1. 試料溶液の調製

許可色素12種類については陰イオン交換体ミニカラムを用いた固相抽出法が報告されている<sup>3)</sup>。本報においては塩基性色素を陽イオン交換固相で、酸性色素を陰イオン交換固相で抽出する方法を検討した。

塩基性色素のAURは塩基性条件下では分解しやすいとの報告<sup>4)</sup>があることから、はじめに酸性下で色素の抽出操作を行った。その後さらに、試料に残留した酸性色素の抽出を行うため、塩基性下での抽出操作を行った。また、溶出液に25%アンモニア:メタノール(1:19)を用いることにより、固相カラムからの溶出液の溶媒除去が容易となり、分析時間の短縮が図れた。陽イオン交換固相では、InertSep PRS(500mg/6mL)のほか、InertSep SCX(500mg/6mL)及びInertSep MPC(200mg/6mL)を用いて検討を行った。他の固相では目的物質が強固に保持され、溶出できなかったことから、PRSを採用することにした。AURはRHOと比べ、PRSに強固に保持される傾向があった。溶出溶媒が5mL未満では固相にAURの色調が残留することがあったため、5mLで溶出することにした。一方、陰イオン交換固相ではOasis WAX(150mg/6cc)、InertSep PSA(500mg/6mL)、InertSep NH<sub>2</sub>(500mg/6mL)及びBOND ELUT-SAX(500mg/6mL)を検討した。その結果、InertSep PSA(500mg/6mL)、InertSep NH<sub>2</sub>(500mg/6mL)およびBOND ELUT-SAX(500mg/6mL)では、25%アンモニア:メタノール(1:19)5mLでは、

固相に強固に保持された一部の色素を溶出させることが困難であったため、Oasis WAX (150 mg/6 cc) を採用した。

## 2. 分析方法の検討

当所での着色料検査法をもとに、TLC による定性試験とUHPLCによるさらに迅速な確認試験の検討を行った。

### (1) TLC による定性試験及び添加回収試験

塩基性色素 2 種類と酸性色素 18 種類の標準溶液は、条件 1 または条件 2 で展開距離や色調から区別することが可能であった。標準溶液の Rf 値を表 1 に示した。添加回収試験では全ての色素を色調や Rf 値により同定することができた。

表 1 20 種類の着色料の Rf 値

No.	色素名	Rf 値(条件 1)	Rf 値(条件 2)
1	Y4	0.27	0.94
2	R2	0.24	0.88
3	B2	0.42	0.91
4	QY	0.34, 0.45, 0.55	0.72, 0.79, 0.93
5	BBBN	0.25	0.69
6	R102	0.32	0.69
7	Y5	0.44	0.62
8	R40	0.52	0.49
9	AR13	0.53	0.35
10	AZ0	0.39	0.27
11	G3	0.32	0.24
12	B1	0.42	0.22
13	R3	0.61	0.00
14	OR II	0.70	0.08
15	R106	0.53	0.08
16	R104	0.63	0.00
17	PBV	0.21	0.06, 0.13
18	AUR	0.90	0.38
19	R105	0.66	0.00
20	RHO	0.79	0.03

### (2) UHPLC による確認試験及び添加回収試験

酸性色素の R104 と PBV は保持時間が近似していたが、その他の 18 種類の色素は、11 分間という短時間で分離することが可能であった(図 2)。分離が不十分であった 2 種類の色素に関しては、(1) の定性試験で色調と Rf 値が異なることから区別は可能であると考えられたが、UHPLC においても保持時間を確実に分離できるよう、別の測定条件の検討を行うことにした。分離のためには使用した ODS カラムとは官能基の異なるカラムを使用することが有効であると考えられたことから、固定相にフェニル基の結合したカラムを用いて検討を行ったところ、2 つの色素の保持時間の分離が可能であった(図 3)。添加回収試験では検討したビスケット及び漬物で全ての色素が検出された。図 4 に 20 種類の色素全てを添加したビスケットを試料とした添加回収試験のクロマトグラムを示す。R104 と PBV 以外の 18 種類の色素を定性することができた。さらに、R104 と PBV の添加回収を確認するため、R104 を含む 17 種類の酸性色素を添加した試料と、PBV

のみを添加した試料でのクロマトグラムを図 5 に示す。R104 と PBV はそれぞれ検出され、検討した前処理法の有効性が示唆された。

## まとめ

20 種類の着色料を対象とした一斉試験法を検討した。本法では、イオン交換固相抽出カラムを用いることで塩基性および酸性の色素を同様の操作で抽出・精製することを可能とした。また、TLC による定性試験のほか、UHPLC による短時間での確認試験を可能としており、簡便で迅速な着色料の検査法であると考えられる。なお、今回は漬物及びビスケットの 2 種類の食品を対象にしたが、検査法を確立するため、成分の異なる他の食品への適用や検出可能な濃度についても検討していきたい。

## 文献

- 1) 食品衛生情報ポータルサイト  
<http://www.nihs.go.jp/hse/food-kkportal/>
- 2) 長南隆夫, 堀義宏: 高速液体クロマトグラフィーによる食品中のタール色素の定量. 道衛研所報, 36, 1-8, 1986
- 3) 蕪木康朗, 柴田雅久, 吉田絵美子, 他: 許可色素 12 種の陰イオン交換体ミニカラムを用いた精製法の検討. 平成 21 年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部 第 22 回理化学研究部会研究会 資料, 60 ~63
- 4) 公益社団法人日本薬学会編: 衛生試験法・注解 2015, 380-391

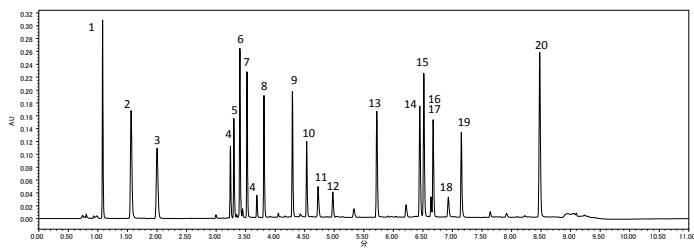


図2 20種類の着色料のクロマトグラム (10ppm, 検出波長 254nm)

1, Y4; 2, R2; 3, B2; 4, QY; 5, BBN; 6, R102; 7, Y5; 8, R40; 9, AR13; 10, AZO; 11, G3; 12, B1; 13, R3; 14, OR II; 15, R106; 16, R104; 17, PBV; 18, AUR; 19, R104; 20, RHO

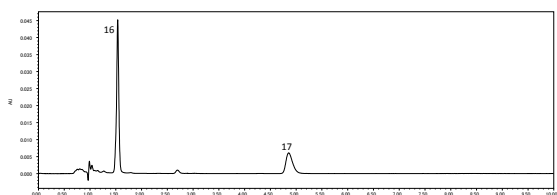


図3 R104とPBVのクロマトグラム (検出波長 254nm)

16, R104; 17, PBV

測定条件

カラム: ジーエルサイエンス株式会社 InertSustain PhenyI 2 μm 2.1×150 mm

カラム温度: 50°C

流速: 0.4 mL/min

注入量: 2 μL

測定波長: 210~800 nm

移動相: 25mM 酢酸アンモニウム: メタノール (40:60)

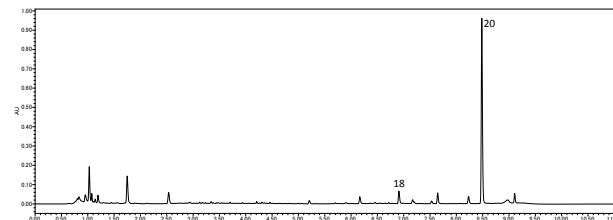
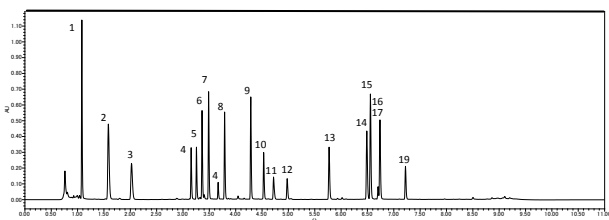
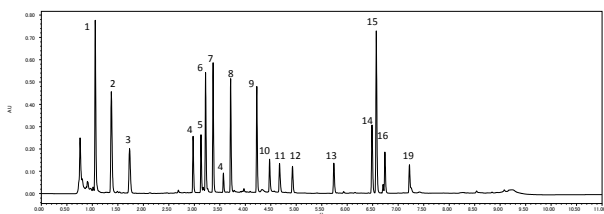


図4 ビスケットでの20種類の着色料の添加回収試験のクロマトグラム (検出波長 254nm)

1, Y4; 2, R2; 3, B2; 4, QY; 5, BBN; 6, R102; 7, Y5; 8, R40; 9, AR13; 10, AZO; 11, G3; 12, B1; 13, R3; 14, OR II; 15, R106; 16, R104; 17, PBV; 18, AUR; 19, R105; 20, RHO

(1)



(2)

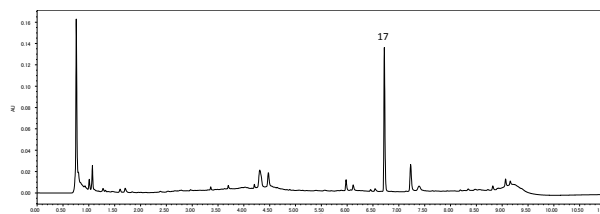


図5 ビスケットでの酸性色素の添加回収試験のクロマトグラム (検出波長 254nm)

(1) PBV以外の17種類の酸性色素を添加

(2) PBVのみを添加

1, Y4; 2, R2; 3, B2; 4, QY; 5, BBN; 6, R102; 7, Y5; 8, R40; 9, AR13; 10, AZO; 11, G3; 12, B1; 13, R3; 14, OR II; 15, R106; 16, R104; 17, PBV; 19, R105