

卵に使用された色素の分析

鈴木 敬子, 前 潔, 石 川 ふさ子, 貞 升 友 紀,
藤 原 卓 士, 伊 藤 弘 一, 中 里 光 男

Analysis of Colors Used in Eggs

Keiko SUZUKI, Kiyoshi MAE, Fusako ISHIKAWA, Yuki SADAMASU,
Takushi FUJIWARA, Kouichi ITO and Mitsuo NAKAZATO

卵に使用された色素の分析

鈴木 敬子*, 前 潔*, 石 川 ふさ子*, 貞 升 友 紀*,
藤 原 卓 士*, 伊 藤 弘 一**, 中 里 光 男*

Analysis of Colors Used in Eggs

Keiko SUZUKI*, Kiyoshi MAE*, Fusako ISHIKAWA*, Yuki SADAMASU*,
Takushi FUJIWARA*, Kouichi ITO** and Mitsuo NAKAZATO*

Keywords : 色素 colors, 卵 eggs, フクシン fuchsine, カンタキサンチン canthaxanthin,

はじめに

国内で食用に流通している卵は、主に鶏の卵である。その卵殻の表面の色には、いわゆる白玉、赤玉の他にピンクや青いものもあるが、これは産卵した鳥の種類に由来する天然の色である¹⁾。外国では、「イースターエッグ」の様に、祭礼や祝い事のために卵殻に着色した卵が販売されることがある。平成 17 年に当センター多摩支所において、着色された卵殻より「フクシン」を検出し、厚生労働省へ問い合わせたところ²⁾、食品である卵は卵殻を含み、着色を目的として使用する化学的合成品は食品衛生法上の添加物（着色料）に該当するとの回答を得た³⁾。「フクシン」は食品衛生法上の添加物（着色料）に指定されていないことから、この卵は違反食品となった。

平成 18 年 7 月、当研究科においても卵殻に着色された卵の色素を検査し、「フクシン」と思われる色素を検出した。しかし、この時に標準品として用いた、一般的に「フクシン」として用いられるパラローズアニリン(C.I.No.42500)、塩基性フクシン(C.I.No.42510)及びニューフクシン(C.I.No.42520)（これらの構造式を図 1 に示した）の 3 種の色素試薬は数種の色素の混合物であった。このため、試料から検出された色素を同定する上からも、さらにこれらの色素試薬のいくつかを購入し、その純度と組成の比較調査を行う必要があった。その調査の結果、いくつかの知見が得られたので報告する。

また、卵の卵黄の黄色はカロテノイド系色素であるが、その親鳥体内では合成されず、食餌の中に含まれるカロテノイド系色素が移行したものである⁴⁾。市販されている卵には、卵黄の色が濃く赤みが強いものが好まれることから、親鳥の食餌中にカンタキサンチンのようなカロテノイド系色素を添加して、商品価値を高めているものがある。しかし、市販されている卵の卵黄についてその残存量の実態は明らかではない。今回卵黄中のカンタキサンチンを分析し

たので、その結果も併せて報告する。

実験方法

1. 試料

1) 卵殻の「フクシン」の分析試料 平成 18 年 6 月に都内の販売店から収去された「赤紫色の卵」（以下卵試料とする）及び「赤紫色の液体」（以下色素試料とする）の 2 検体を用いた。

2) 卵黄中のカンタキサンチンの分析試料 平成 18 年 10 月～平成 19 年 4 月に都内で購入した鶏卵（生）25 検体及びアヒルの卵加工品（塩ゆで）5 検体を用いた。

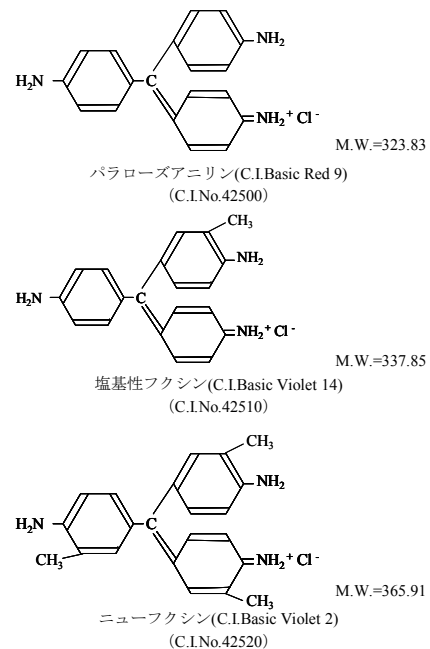


図 1. 「フクシン」の構造式

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

2. 試薬

1) 「フクシン」 今回の分析の標準品として、パラローズアニリン塩酸塩 (C.I.No.42500) (MERCK), 塩基性フクシン (C.I.No.42510) (MERCK) 及びニューフクシン (C.I.No.42520) (SIGMA) を使用した.

2) カンタキサンチン (C.I.No.40850) (関東化学)

3) 試薬 移動相には HPLC 用を, その他の試薬は市販特級品を使用した.

3. 分析方法

1) 「フクシン」

(1) 試験溶液の調製⁵⁾ エタノールを用いて卵殻の表面についている色素を溶かし, 試料抽出液を得た. これを塩基性色素の試験法に従い毛糸染色による精製を行った. まずアンモニアアルカリ性で毛糸に染色し, これを水洗いした後, 10%酢酸で溶出した液を水浴上で乾固し, 得られた色素を少量のエタノールで溶解して試験溶液とした.

(2) TLC による分析⁶⁾ 薄層板に RP-18F_{254S} (MERCK) を使用し, 展開溶媒は次に示す 2 種類を用いた. ①アセトニトリル・メタノール・5%硫酸ナトリウム (3:3:10), ②2-ブタノン・メタノール・5%硫酸ナトリウム (1:1:1).

(3) HPLC⁷⁾ 及び LC/MS による分析 試験溶液を前処理用フィルター (0.45 µm) でろ過し, HPLC 用試験溶液とした. HPLC の測定条件は, カラム COSMOSIL 5C18-AR (4.6 i.d.×250 mm), 移動相 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム・アセトニトリルの 2 液によるグラジエント法を用い, (95:5) から (1:1) までの直線濃度勾配を 30 分間行い, その後 5 分間保持した. 流速 1 mL/min, カラム温度 40℃, 測定波長 400~650 nm (検出波長 550 nm).

LC/MS の LC 条件は, カラム CAPCELL PAK C18 UG120 (2.0 i.d.×150 mm), 移動相条件は HPLC と同じ, 流速 0.2 mL/min, カラム温度 40℃, MS 条件はイオンモード ESI+, コーン電圧 35 V, 測定質量範囲 m/z90~400 (主なイオン m/z288, 302, 316, 330).

2) カンタキサンチン

(1) 試験溶液の調製⁸⁾ 卵黄だけを取り出し, その 5 g を遠心管に秤取し, アセトンを加えて 50 mL とした. 30 分間超音波抽出後, 遠心分離 (3000 rpm, 15 分間) し, その上清を分取して試験溶液とした. これをフィルター (0.45 µm) でろ過して HPLC 用試験溶液とした.

(2) HPLC による分析⁸⁾ 測定条件は, カラム COSMOSIL 5C18-AR-II (4.6 i.d.×250 mm), 移動相 アセトン・水 (4:1), 流速 0.8 mL/min, カラム温度 40℃, 測定波長 400~650 nm (検出波長 480 nm).

結果及び考察

1. 「フクシン」

1) 卵殻の色素の分析

(1) 抽出 使用されていた色素は水溶性であったが, 水の

みでは卵殻についている色素を完全に溶かし出すことができなかったため, エタノールを用いることにした. 色素を溶出した結果, この卵の卵殻は白色であることが分かった.

(2) 分離精製及び染色試験⁵⁾ 着色された卵殻の色素の分析については当センター多摩支所での検出事例より, 「フクシン」を疑い, 塩基性色素の分離操作を行なった. まず, 試料抽出液 5 mL に 1 mol/L 水酸化ナトリウム 2 mL を加えアルカリ性とし, ジエチルエーテル 5 mL を加えて振とうして, エーテル層に色素を抽出した. この時水層及びエーテル層は無色透明となった. エーテル層を別の試験管にとり, 1 mol/L 酢酸 5 mL で再抽出すると, 酢酸層は赤紫色に呈色した (図 2).

次いで, 脱脂羊毛による染色を行ったところ, アンモニアアルカリ性で完全に染色され, 酢酸酸性にすると羊毛より完全に溶出した (図 3). 標準品とした 3 種類の「フクシン」も, 同様の挙動を示したことから, 卵試料及び色素試料は「フクシン」ではないかと推定された. また, ポリアミドを用いても同様の結果が得られた. 次いで, TLC 及び HPLC による確認操作を行った.

(3) TLC 衛生試験法・注解 2005⁶⁾ の着色料の分析に用いる 2 種類の展開溶媒で試験溶液の分析を試み, その挙動を調べた. その結果, 卵試料及び色素試料ともに, キサンテン系色素に近似したところに複数のスポットが見られたが, 蛍光は認められなかった. 同時に展開した 3 種類の「フクシン」についても複数のスポットが認められ, 試料のスポットと同様の性状を示した (図 4).

(4) HPLC 分析条件として LC/MS で使用できるものを検討することにしたが, 宮武ら⁹⁾ の塩基性色素の HPLC 分析は移動相にイオンペアを使用しており LC/MS 分析には適さなかった. そこで, 食品衛生検査指針⁷⁾ のグラジエント法で分析したところ良好に分離でき, 19~26 分に複数のピークが認められ, 主ピークは 26 分であった (図 5).

同様に, 標準品とした 3 種類の「フクシン」についても同様の位置に複数のピークが認められた. クロマトグラム及び吸収スペクトルの比較から, 試料の色素はニューフクシンが最も類似していることが分かった. 得られた各ピークの面積比を表 1 に示した. 各ピークの極大吸収波長は P-1 (544 nm), P-2 (547 nm), P-3 (550 nm), P-4 (553 nm) であった.

(5) LC/MS 上記 HPLC 条件に準じて, 各ピークのマススペクトルを測定した. 試料については, その主ピーク (P-4) では m/z330 の分子イオンが観察され, 他のピークでは m/z316 (P-3) と 288 (P-1) の分子イオンが確認された. 試料の主ピークの分子イオンは標準としたニューフクシンのプロトン化分子の m/z330 と一致し, 試料から検出された「フクシン」はニューフクシンと確認された. なお標準としたニューフクシンからは, その他に m/z316, 302, 288 のピークも認められ, 試料とは, その比率が異なっていた. またパラローズアニリンの主ピークはそのプロトン化分子である m/z288 が観察されたが, 塩基性フクシンは目的とす

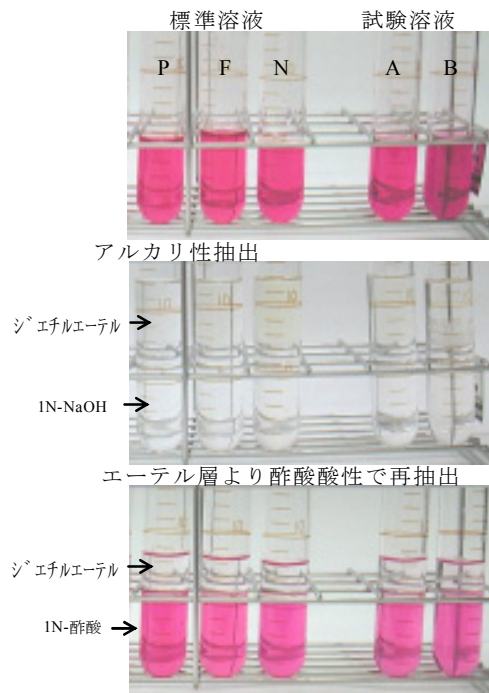


図2. 塩基性色素の分離精製

P : パラローズアニリン (C.I.No.42500)
F : 塩基性フクシン (C.I.No.42510)
N : ニューフクシン (C.I.No.42520)
A : 卵試料, B : 色素試料



図3. 脱脂羊毛による染色試験

左 : 酢酸酸性で染色した場合
右 : アンモニア性で染色した場合

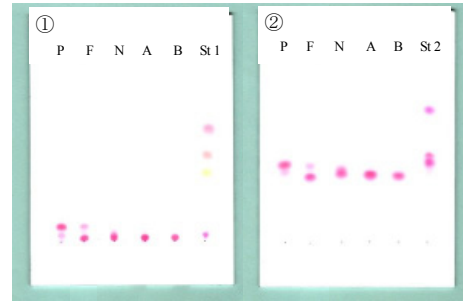


図4. 試料及び標準品の薄層クロマトグラム

P : パラローズアニリン (C.I.No.42500), F : 塩基性フクシン (C.I.No.42510)
N : ニューフクシン (C.I.No.42520), A : 卵試料, B : 色素試料
St1 : R2, R102, R106, Y5, St2 : R3, R104, R105, R106
薄層板 : RP-18F254S (MERCK)
展開溶媒 : ①アセトニトリル・メタノール・5%硫酸ナトリウム (3 : 3 : 10)
②2-ブタノン・メタノール・5%硫酸ナトリウム (1 : 1 : 1)

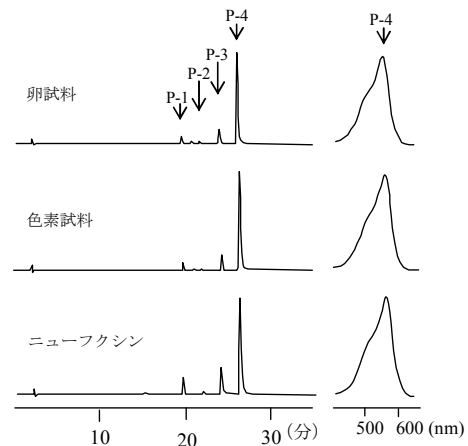


図5. 試料及び標準品のHPLCクロマトグラム及び吸収スペクトル

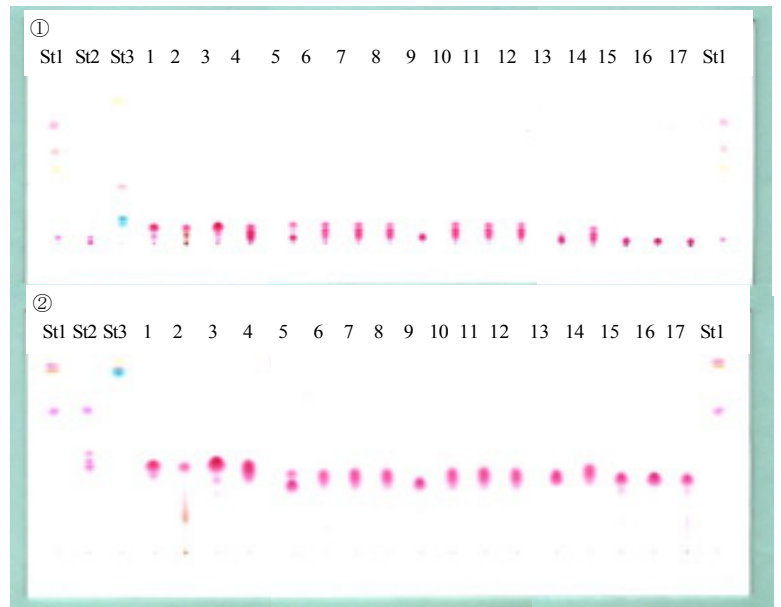


図6. 市販色素試薬「フクシン」の薄層クロマトグラム

1~4 : パラローズアニリン, 5~12 : 塩基性フクシン, 13~17 : ニューフクシン
St1 : R2, R102, R106, Y5 ; St2 : R3, R104, R105, R106 ; St3 : R40, Y4, G3, B1
薄層板 : RP-18F254S (MERCK)
展開溶媒 : ①アセトニトリル・メタノール・5%硫酸ナトリウム (3 : 3 : 10)
②2-ブタノン・メタノール・5%硫酸ナトリウム (1 : 1 : 1)

る m/z302 のピークは小さく、他のピークが大きい、主成分の純度の低い色素製品であった。これらの結果から、標準として用いた色素試薬はいずれも混合物であり、標準として用いるには問題があった。そこで市販の試薬について、さらに検証することとした。

表 1. 試料及び標準品の HPLC クロマトグラムにおける各ピークの面積比* (%)

	P-1	P-2	P-3	P-4
卵試料	7	1	10	82
色素試料	4	0	4	92
ニューフクシン	10	2	20	68
塩基性フクシン	45	9	9	37
パラロースアニリン	87	0	10	3

* : 波長550nmにおける面積比

2) 「フクシン」市販試薬調査 いわゆる「フクシン」の市販されている試薬について、TLC, HPLC 及び LC/MS で分析し、その組成を調査した。調査対象とした「フクシン」を表 2 に示した。

表 2. 市販色素試薬「フクシン」の内訳

番号	試薬名	C.I.No.	製造
1	パラロースアニリン塩酸塩	42500	MERCK
2	Pararosaniline Base	(42500)	SIGMA
3	塩基性フクシン	42500	Polysciences, Inc
4	パラロースアニリン塩酸塩	42500	ナカライ
5	フクシン (塩基性)	42510	MERCK
6	フクシン	42510	和光
7	塩基性フクシン	42510	Polysciences, Inc
8	塩基性フクシン	42510	ナカライ
9	ダイヤモンドフクシン	42510	Chroma
10	塩基性フクシン	(42510)	ACROS
11	塩基性フクシン	42510	東京化成
12	塩基性フクシン	42500、42510	関東
13	ニューフクシン	(42520)	SIGMA
14	ニューフクシン	—	MP Biomedicals, Inc.
15	ニューフクシン	42520	Chroma
16	ニューフクシン	(42520)	ACROS
17	ニューフクシン	42520	東京化成

() : カタログに表示されているが、製品には表示されていない
— : カタログ、製品ともに表示されていない

これらの試薬を TLC で展開したところ、全ての製品が複数のスポットを示した。特に塩基性フクシン 8 製品 (5~12) の中、6 製品は複数のスポットがほぼ同じ程度の比率を示すものであった (図 6)。

また、これらの「フクシン」を HPLC で分析したところ、全ての製品で複数のピークが認められた。TLC と同様に、塩基性フクシン 6 製品は 4 本のピークがほぼ同じ面積比を示していた。この中で代表的な 4 種類の成分を含んでいる「塩基性フクシン (製品 7)」の HPLC クロマトグラムを図 7 に、また各製品におけるクロマトグラムのピーク面積比を表 3 に示した。

各ピークは LC/MS の結果から、P-1 はメチル基を持たないパラロースアニリン (m/z288)、P-2 はメチル基が 1 個導入された塩基性フクシン (m/z302)、P-4 は 3 個導入されたニューフクシン (m/z330) と推測された。P-3 は、m/z316

で、メチル基が 2 個ついていると推定され、試薬製造過程における副生成物と考えられた。これらの結果より、C.I.No.42500 の色素については、主成分はパラロースアニリン (含有比 56~95%)、また C.I.No.42520 の色素についても主成分はニューフクシン (含有比 33~77%) であったが、C.I.No.42510 の塩基性フクシンについては、その本体を主成分とするものは無く、混合物であることが分かった。そこで標準品としては、主成分の含有量が比較的多いものを使用し、TLC, HPLC 及び LC/MS の分析結果を合わせて判定する必要があると思われる。

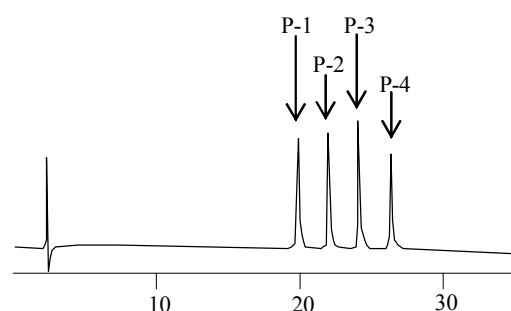


図 7. 塩基性フキシンの HPLC クロマトグラム

P-1 : m/z288, P-2 : m/z302,
P-3 : m/z316, P-4 : m/z330,

表 3. 市販色素試薬「フクシン」の HPLC クロマトグラムにおける各ピークの面積比* (%)

番号	P-1	P-2	P-3	P-4
1	87	0	10	3
2	93	0	2	5
3	95	0	2	3
4	56	18	20	6
5	45	9	9	37
6	40	22	16	22
7	24	26	27	22
8	22	29	29	19
9	12	14	21	52
10	14	25	27	34
11	16	28	30	26
12	15	27	34	24
13	10	2	20	68
14	10	24	34	33
15	6	14	27	53
16	3	6	14	77
17	4	8	13	74

* : 波長550nmにおける面積比

2. カンタキサンチン

カンタキサンチンはカロテノイド系色素で飼料添加物として認められているが、視野狭窄を起こすとして問題になったため、厚生労働省は食品安全委員会へ食品健康影響評

価を依頼した。1日摂取許容量（ADI）を0.025 mg/kg 体重/day とする報告¹⁰⁾を受けて、平成16年11月に畜産食品9品目に残留基準値を設定し、鶏の卵（卵黄に限る）で25 ppmとした¹¹⁾。卵黄中のカンタキサンチンを分析した結果を表4に示した。日本産25検体は全て生の鶏卵で、卵黄中からカンタキサンチンは検出されなかった。中国産（3検体）と台湾産（2検体）の塩ゆでのアヒルの卵の卵黄からは、カンタキサンチンが1.7～5.0 ppm 検出された。また、「フクシン」を検出した卵試料の卵黄からは4.4 ppm のカンタキサンチンが検出された。なお、これらはカンタキサンチンであることをLC/MSで確認した¹²⁾。

表4. 卵黄中のカンタキサンチンの分析結果

原産国	種類	検体数	カンタキサンチン (ppm)
日本	鶏卵	25	—
中国	アヒルの卵	3	3.7, 3.2, 1.7
台湾	アヒルの卵	2	5.0, 3.2,
不明*	不明	1	4.4

* ; 卵試料

ま と め

着色された卵殻より指定外着色料の塩基性色素である「フクシン」を検出した。本色素をTLC, HPLC 及びLC/MSで分析したところ、主成分はニューフクシンと同定されたが、その他にも複数の同族体の副成分を含んでいることが分かった。しかし、標準に用いた3種類の色素試薬の中にその組成比率が同じものは無かった。

そこで、市販されているニューフクシン等の試薬17製品について、TLC, HPLC 及びLC/MSを用いて測定したところ、パラローズアニリン及びそのメチル置換体の混合物であることを確認した。そのため、食品に使用された「フクシン」の分析に使用する標準品としては、目的とする成分の多い製品を用い、さらにTLC, HPLC 及びLC/MSの分析結果を合わせて判定する必要があることが分かった。

また、市販されている卵の卵黄についてカンタキサンチンを分析したところ、国産鶏卵25検体からは検出されなかった。一方、中国及び台湾産のアヒルの卵加工品5検体の卵黄より検出されたが、その値は1～5ppmで残留基準値より低かった。

文 献

- 1) 秋庭隆：食材図典，166-167，1995，小学館，東京。
- 2) 東京都福祉保健局健康安全室長“添加物の使用に係る疑義について”平成17年12月1日17福保健食第3039号（2005）。
- 3) 厚生労働省医薬食品安全部監視安全課長“添加物の使用に係る疑義について（回答）”平成17年12月28日食安監発第1228001号（2005）。
- 4) 中村良：卵の科学，10-29，1998，朝倉書店，東京。
- 5) 日本薬学会：衛生試験法注解1973，356-358，1973，金原出版，東京。
- 6) 日本薬学会：衛生試験法・注解2005，348-359，2005，金原出版，東京。
- 7) 厚生労働省：食品衛生検査指針 食品添加物編 2003，169-199，2003，日本食品衛生協会，東京。
- 8) 鈴木敬子，貞升友紀，平田恵子，他：東京健安研セ年報，57，219-222，2006。
- 9) 宮武ノリエ，永山敏廣：東京健安研セ年報，56，145-151，2005。
- 10) 食品安全委員会委員長“厚生労働省発食安第0825002号に係る食品健康影響評価の結果の通知について”平成16年3月11日府食第281号の2（2004）。
- 11) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長“乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について”平成16年11月26日食安発第1126001号（2004）。
- 12) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長“食品中に残留する農薬等の成分である物質の試験法について”平成16年11月26日食安発第1126002号（2004）。