

氷冷下での展開による食品中着色料の改良TLC試験法

京小 ひと美^a, 小川 麻萌^a, 貞升 友紀^a, 坂牧 成恵^a, 新藤 哲也^a, 植松 洋子^a

食品中に含まれる着色料の試験は、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて行われている。アルミニウム製逆相 TLCプレートを用い、展開を行うと、 R_f 値の大きい着色料のスポット形状が悪く判定が困難となる事例がみられた。そこで、この問題を解消するために展開条件について検討を行った。その結果、氷冷下で塗布後のアルミニウム製逆相TLCプレートを展開槽内で展開溶媒蒸気により飽和させた後、展開する改良法を確立した。なお、展開溶媒中に含まれる硫酸ナトリウムの析出を防止するため、展開溶媒をメタノール-アセトニトリル-5%硫酸ナトリウムからメタノール-アセトニトリル-2%硫酸ナトリウムに変更した。本法を用いて指定着色料及び指定外着色料計24種類を分析したところ、着色料の分離及びスポット形状が良好であった。また、都内で入手した食品試料から抽出した指定着色料についても、再現性は良好で着色料の分離能も高かったことから、本法は日常の分析法として有用であると考える。

キーワード：薄層クロマトグラフィー、アルミニウム製逆相TLCプレート、着色料、指定外着色料

はじめに

現在我が国では食品添加物として12種類の着色料が許可されている¹⁾。一方、輸入食品から許可されていない着色料が検出されるという違反事例がしばしば報告されており²⁾、多数の検体を迅速かつ正確に検査する必要がある。着色料の試験はペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィー (TLC) で試験を行っているところが多く、なかでも、シリカゲルをC₁₈で化学修飾した逆相TLCは優れた分離能を有しており³⁻⁵⁾、ガラス製やアルミニウム製の逆相TLCプレートが汎用されている。著者らは保存性に優れるアルミニウム製逆相TLCプレート（以下、AI製プレートと略す）を主に使用しているが^{3,5)}、展開溶媒にメタノール-アセトニトリル-5%硫酸ナトリウム (3 : 3 : 10) を用いて展開を行うと、 R_f 値の大きい着色料のスポット形状が悪く分離ができないため、判定が困難となる事例がみられた。そこで、この問題を解消するために、展開条件について検討を行ったところ、有効な改良法を確立したので報告する。

実験方法

1. 試料

2013年4月から2014年2月までに東京都内で入手した着色料使用表示のある市販の加工食品を用いた。

2. 標準品及び試葉

赤色2号 (R2), 赤色3号 (R3), 赤色40号 (R40), 赤色102号 (R102), 赤色104号 (R104), 赤色105号 (R105), 赤色106号 (R106), 黄色4号 (Y4), 黄色5号 (Y5), 緑色3号 (G3), 青色1号 (B1), 青色2号 (B2) は国立医薬品食品衛生研究所標準品を用いた。また、指定外着色料とし

て、アズルビン (C.I.No.14720), ファーストレッドE (C.I.No.16045), オレンジG (C.I.No.16230), ライトグリーンSF (C.I.No.42095) は東京化成工業(株)製、スカーレットGN (C.I.No.14815), キノリンイエロー (C.I.No.47005) はCHROMA社製、グリーンS (C.I.No.44090), ブリリアントブラックBN (C.I.No.28440) はSIGMA社製、ポンソーレ (C.I.No.16150), ポンソーレ3R (C.I.No.16155), ポンソーレ6R (C.I.No.16290), ナフトールイエロー-S (C.I.No.10316) は国立医薬品食品衛生研究所標準品を用いた。

ポリアミドは和光純薬工業(株)製カラムクロマトグラフ用ポリアミドC-100を、メタノール及びアセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用を、その他の試葉は特級品を用いた。

3. 標準溶液及び標準混合溶液

標準品10 mgをそれぞれ正確に量り、水10 mLで溶解して標準溶液 (1,000 µg/mL) とした。

また、R2, R102, Y5及びR106を各0.025%になるように混合したものを標準混合溶液 (Std) とした。

4. 試料からの着色料の精製

市販食品中の着色料は、衛生試験法・注解¹⁾に準じ、毛糸染色法及びポリアミド法を用いて精製した。精製後、50%エタノールに溶解し、試験溶液とした。

5. TLC条件

装置：展開槽はCAMAG社製二槽式展開槽 (D5.5 cm × W13 cm × H10 cm) を使用した。薄層板はMERCK社製 TLCアルミニウムシートRP-18F_{254S} (20 cm × 20 cm) を、

^a 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

10 cm×10 cmに切断して用いた。

展開溶媒：メタノール-アセトニトリル-2%硫酸ナトリウム (3:3:10)

スポット量：標準溶液及び標準混合溶液 約0.5 μL, 試験溶液 約1 μL

展開条件：容器内に展開槽を置き、展開溶媒を入れたときの高さより約1 cm上の高さまで氷水を入れた (Fig. 1)。次に、展開溶媒と塗布後のAl製プレートを展開槽中に15分以上放置して飽和させた (プレコンディショニング) 後、約5 cm展開を行った。

結果及び考察

1. TLC条件の検討

1) 平衡化についての検討

衛生試験法・注解¹⁾にはガラス製逆相TLCプレート（以下、G製プレートと略す）を用いる方法が収載されており、著者らも使用してきたが、G製プレートは割れやすく保存性に欠けること、またAl製プレートでも同様の結果が得られる^{3,5)}との報告もあることから、現在は保存性の良いAl製プレートを使用している。また、ガラス製展開槽の内側にろ紙を貼り、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)）を展開槽の底から0.5~1 cmの高さになるまで入れ、しばらく放置して内部を蒸気で飽和させた後、着色料を塗布したAl製プレートを挿入して展開溶媒に浸し、室温（約20~25°C）で展開を行っている（以下、従来法）。しかし、この方法では、 R_f 値の大きい着色料（特にY4, R2）の展開後のスポット形状が悪く、分離ができないという問題点があった (Fig. 2 (A))。

TLCにおいて着色料は、プレート上を上昇する展開溶媒と固相の間で分配を繰り返して分離する。 R_f 値の大きい着色料のスポット形状が悪くなる理由の一つとして、Al製プレートの固相の層厚が200 μmと、G製プレートが250 μmであるに比べて約4/5と薄いことが考えられた。固相が薄いと単位面積当たりの保持容量が小さくなるため、スポットの面積が広がり、分離が悪くなることが推測された。

また、プレートを展開槽内に挿入して直ちに展開溶媒に浸し展開を始めると、固相には展開溶媒が溶媒和していない。一方、固相に展開溶媒が溶媒和していると、それがもう一つの固定相として機能するため⁶⁾、固定相への分配比率が高くなり、結果として保持が向上する。また、固相表面に展開溶媒が均一に溶媒和することにより、展開溶媒の上昇速度が一定となり、スポット形状が良好になることが考えられる。さらに、ODSシリカゲルのような無極性の固相では、固相の細孔内部に展開に先立って展開溶媒が入り込んでいると、プレート上を上昇する展開溶媒が細孔に入りやすくなり、結果として細孔内の官能基との分配が可能となることも考えられる⁷⁻⁹⁾。これらの結果、保持容量が大きくなり、また、スポット形状も改善するのではないかと考えた。そこで、展開溶媒と塗布後のAl製プレートを展開槽中に15分以上放置して固相を溶媒和させるプレコンディショニングを行い、室温で展開した結果、若干の改善が見られた (Fig. 2 (B))。しかし、スポット形状、分離とともにさらに改良が必要であると考え、次に展開温度について検討を行った。

2) 展開温度の検討

展開温度を室温でなく、液体クロマトグラフィーのように一定に保つことにより、分離が改善されるのではないかと考え、以下の検討を行った。まずははじめに、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) と塗布後のAl製プレートの入った展開槽を40°Cの水浴に浸け、15分以上プレコンディショニングを行い、展開を開始した。その結果、展開時間は約15分となり室温での展開時間約20分より短縮されたが、展開が不均一となり、全体的にスポットがまとまらず、 R_f 値が大きいY4及びR2の分離が全くできなかった (Fig. 2 (C))。

次に、上記と同組成の展開溶媒を用いて冷蔵庫（庫内温度は約4°C）の中で同じく15分間以上プレコンディショニングを行い、展開を行った。その結果、展開時間は約25分であり、スポット形状、Y4及びR2の分離ともに良好であったが、Al製プレートの両端に塗布した標準混合溶液の R_f

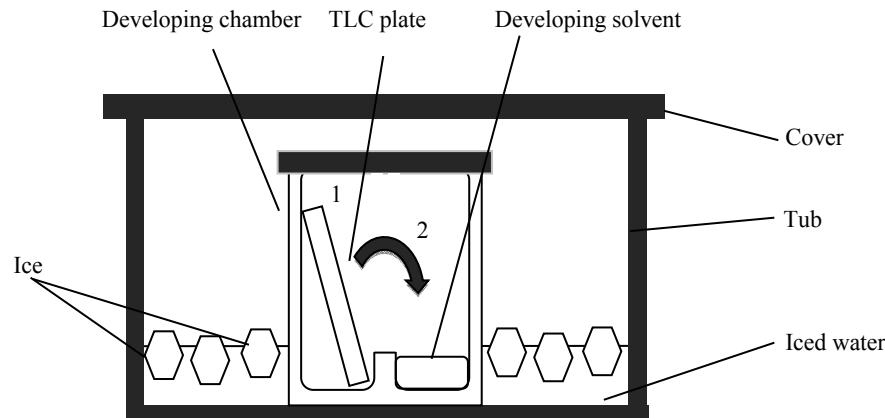


Fig. 1. TLC by Cooling with Iced Water

1: Pre-conditioning of the plate in the chamber

2: Development of the compounds

値が左右で異なる現象が見られた (Fig. 2 (D)). 冷蔵庫のドアを開閉すると、庫内の温度が上昇し、温度調節のために冷風口から冷気が出てくる。その際、冷風口から近い部分と遠い部分とで温度差が生じて展開速度に影響を与え、 Rf 値に差が見られるのではないかと考えた。この現象を解消するために実験方法に示した氷冷下(約2°C)での展開を試みた。その結果、展開時間が冷蔵庫での展開と同様約25分であり、スポット形状、Y4及びR2の分離も良好で、 Rf 値の左右差も見られなかった。

クロマトグラフィーにおいては、van't Hoffの式で示されるように一般に温度が低くなると保持能が大きくなる¹⁰、¹¹。展開温度を下げると固相の保持能が高くなり、ほとんど保持されていなかった Rf 値の大きいY4とR2の Rf 値が小さくなり、結果として両者の分離が良くなつたと推測された。さらに、温度が低くなると展開溶媒の粘性が高くなり、結果として展開速度が遅くなつた。このため、固相との十分な相互作用が得られ、分離やスポット形状の改善が見られたものと考えられる。また、温度が低くなることにより物質の拡散が小さくなる¹²こともスポット形状の改善に繋がつたと考えられる。しかし、展開温度を下げたことにより展開溶媒中の硫酸ナトリウムの析出が見られた。そこで、この析出を防ぐために、展開溶媒に用いる硫酸ナトリウムの濃度について検討することとした。

3) 展開溶媒に用いる硫酸ナトリウム濃度の検討

氷冷下で展開した際に、展開溶媒中の硫酸ナトリウムが析出するとAl製プレートに結晶が付着する。この現象を解消するために硫酸ナトリウムの溶液濃度を検討した。硫酸ナトリウムの濃度を1~5%に変化させ、展開溶媒を調製後、

展開を行つた。その結果、3%~5%の硫酸ナトリウムを含む展開溶媒を用いた場合、スポット形状は良好だが、析出が確認された。また、1%硫酸ナトリウムでは、析出はみられなかつたが、スポット形状が悪く、Y4及びR2の分離もできなかつた。一方、2%硫酸ナトリウムを含む展開溶媒を用いた場合は、析出もなく、スポット形状、分離ともに良好であった (Fig. 2 (E))。なお、2%硫酸ナトリウムを用いて室温で展開した場合はスポット形状が悪く、分離が不十分であつた。以上の結果から氷冷下で展開溶媒にメタノール-アセトニトリル-2%硫酸ナトリウム (3:3:10) を使用し、プレコンディショニング後展開する改良法を確立した。

2. 従来法との比較

1) 標準品

指定着色料12種類と指定外着色料12種類について従来法及び本法により展開し、それぞれの Rf 値を比較した。Al製プレートに塗布した標準品を室温及び氷冷下で展開し、 Rf 値を測定後、室温で展開した着色料の Rf 値を氷冷下で展開した着色料の Rf 値で除した値、すなわち Rf 値比を算出した。

Fig. 3に指定着色料12種類の展開後のAl製プレートを、Table 1に着色料別 Rf 値及び Rf 値比を示した。Al製プレートの中央から溶媒先端にかけてあがるスポット (R2, R40, R102, Y4, Y5及びB2) の Rf 値比は、0.90~1.00 (平均: 0.94, 変動係数: 4.3%) であり、室温で展開する場合と同等の Rf 値が得られることがわかつた。また、 Rf 値の大きい着色料については氷冷下での展開のほうがスポット形状が良好であつた。ほとんど展開しないキサンテン系の4色

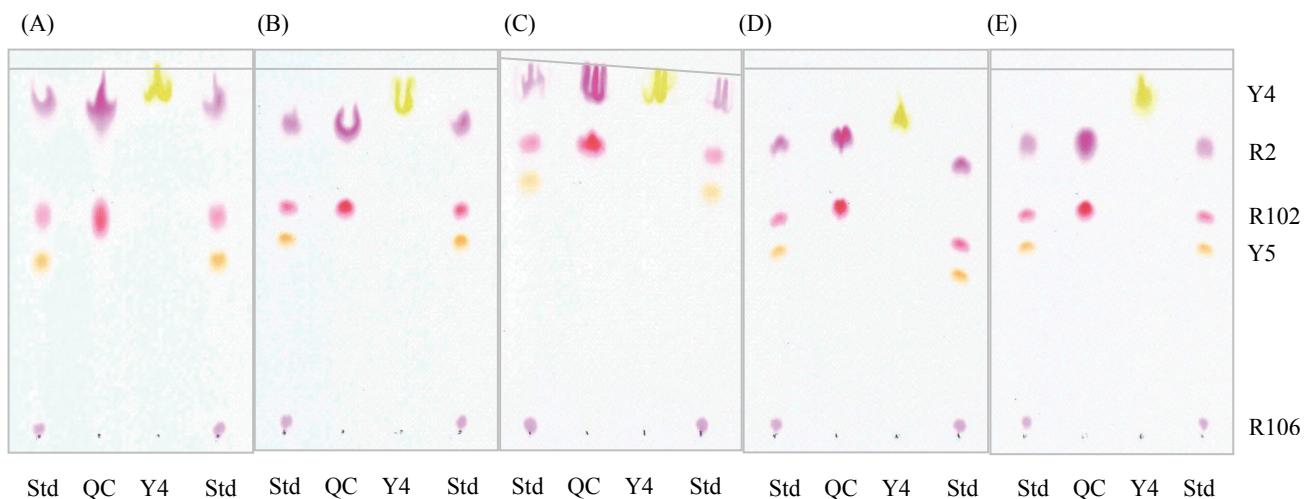


Fig. 2. TLC with Various Developing Conditions:

(A) Room temperature (RT), (B) RT (after pre-conditioning), (C) Heated in the water bath (at 40°C, after pre-conditioning),

(D) Cooled in the refrigerator (after pre-conditioning) and (E) Cooled with iced water (after pre-conditioning)

Std: standards of R2, R102, Y5 and R106; QC: quality control (extract of syrup added R2 and R102)

(A-D) Developing solvent: methanol-acetonitrile-5% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

(E) Developing solvent: methanol-acetonitrile-2% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

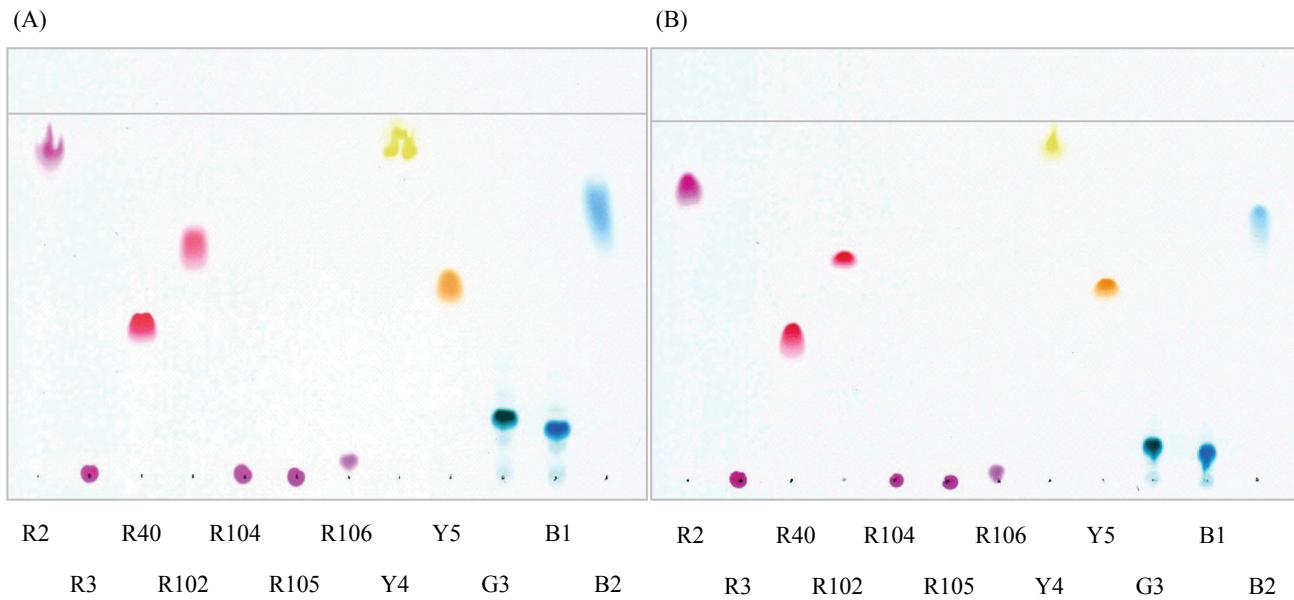


Fig. 3. TLC of Standard Substances of 12 Permitted Coloring Agents Developed at RT (A) and Developed by Cooling with Iced Water (B)

(A) Developing solvent: methanol-acetonitrile-5% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

(B) Developing solvent: methanol-acetonitrile-2% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

Table 1. *Rf* Values of Standard Permitted Coloring Agents Developed at RT and by Cooling with Iced Water

Dyes	n ^{*1}	<i>Rf</i> value		<i>Rf</i> ratio ^{*4}
		RT ^{*2}	Iced water ^{*3}	
R2	3	0.86	0.77	0.90
R3	3	0.00	0.00	
R40	3	0.42	0.38	0.90
R102	3	0.60	0.60	1.00
R104	3	0.00	0.00	
R105	3	0.00	0.00	
R106	3	0.04	0.02	0.50
Y4	3	0.92	0.84	0.91
Y5	3	0.53	0.50	0.94
G3	3	0.18	0.11	0.61
B1	3	0.16	0.10	0.63
B2	3	0.69	0.66	0.96

*1: Total numbers of samples

*2: TLC developed at RT (developing solvent: methanol-acetonitrile-5% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10))

*3: TLC developed by cooling with iced water (developing solvent: methanol-acetonitrile-2% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10))

*4: *Rf* ratio: *Rf* value of the food colors developed by cooling with iced water / *Rf* value of the food colors developed at RT

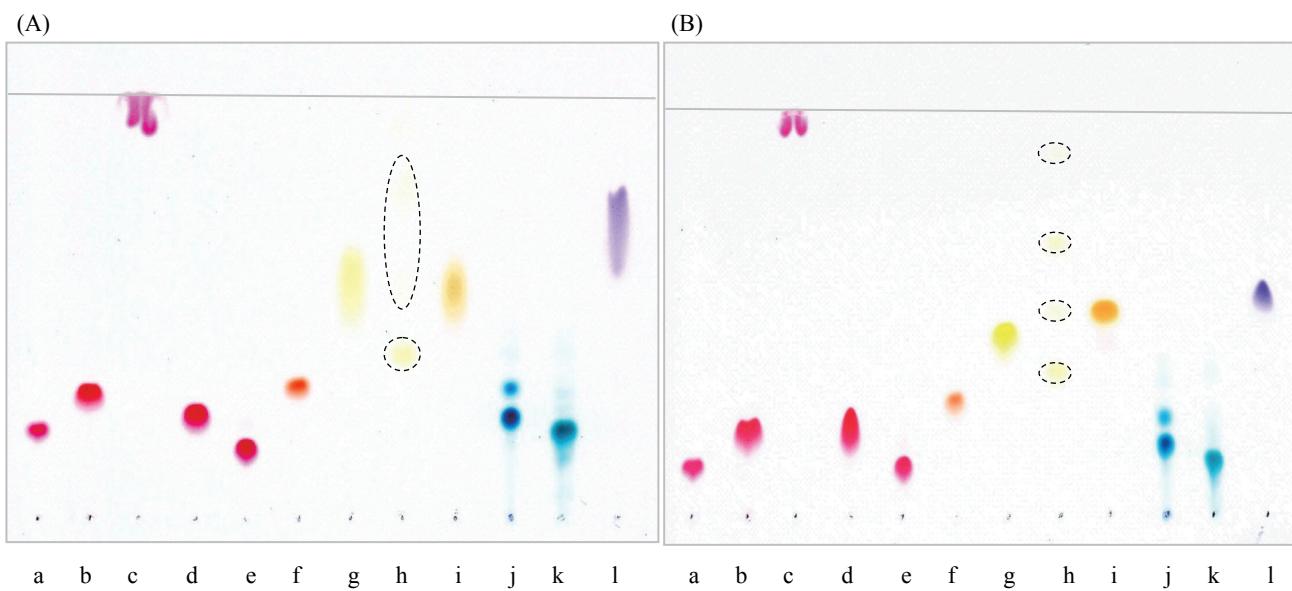


Fig. 4. TLC Chromatogram of Non-Permitted Coloring Agents Developed at RT (A) and Developed by Cooling with Iced Water (B)
 (A) Developing solvent: methanol-acetonitrile-5% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)
 (B) Developing solvent: methanol-acetonitrile-2% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)
 a) Azo Rubine, b) Fast Red E, c) Ponceau 6R, d) Ponceau R, e) Ponceau 3R, f) Scarlet GN, g) Naphthol Yellow S,
 h) Quinoline Yellow, i) Orange G, j) Green S, k) Light Green SF, l) Brilliant Black BN

Table 2. *Rf* Values of Non-Permitted Coloring Agents Developed at RT and Developed by Cooling with Iced Water

Dyes	n	<i>Rf</i> value		<i>Rf</i> ratio
		RT ^{*1}	Iced water ^{*2}	
Azo Rubine	3	0.20	0.16	0.80
Fast Red E	3	0.27	0.24	0.89
Ponceau 6R	3	0.94	0.95	1.01
Ponceau R	3	0.22	0.21	0.95
Ponceau 3R	3	0.15	0.13	0.87
Scarlet GN	3	0.28	0.29	1.04
Naphthol Yellow S	3	0.43	0.45	1.05
Quinoline Yellow ^{*3}	3	0.58	0.62	1.07
Orange G	3	0.45	0.44	0.98
Green S ^{*3}	3	0.21	0.19	0.90
Light Green SF	3	0.19	0.18	0.95
Brilliant Black BN	3	0.55	0.54	0.98

*1: Developing solvent: methanol-acetonitrile-5% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

*2: Developing solvent: methanol-acetonitrile-2% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

*3: *Rf* value of the dominant spot

Table 3. *Rf* Ratio of Extracted Coloring Agents from Commercial Foods to Standard Coloring Agents Developed at RT and Developed by Cooling with Iced Water

Food	Dyes	n	RT ^{*1}			Iced water ^{*2}		
			<i>Rf</i> ratio ^{*3}	Ave.	CV(%)	<i>Rf</i> ratio	Ave.	CV(%)
Soft drink	R2	1	N.D ^{*4}			0.99		
	R106	1	0.80			1.00		
	Y4	3(2) ^{*4}	1.00, 1.00	1.00		0.98-1.02	1.00	2.0
	B1	3	0.93-1.00	0.98	2.8	1.00	1.00	0.0
Salty foods	R102	7	0.97-1.03	1.00	2.0	0.95-1.05	0.98	3.5
	R106	3	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	0.0
	Y4	6	1.00-1.02	1.02	0.8	0.98-1.02	1.00	1.6
	B1	1	1.07			1.00		
Protein rich foods	R102	1	0.98			0.92		
	Y5	2	1.02, 1.09	1.06		0.96, 1.04	1.00	
Others	R40	1	1.05			1.13		
	R102	1	1.00			1.00		
	Y4	2	1.02, 1.02	1.02		1.01, 1.01	1.01	
	Y5	1	1.00			0.98		
	B1	2	0.93, 1.00	0.97		1.00, 1.00	1.00	

*1: Developing solvent: methanol-acetonitrile-5% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

*2: Developing solvent: methanol-acetonitrile-2% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

*3: *Rf*ratio: *Rf* value of the coloring agent extracted from commercial foods / *Rf* value of the standard coloring agent

*4: Unable to measure the *Rf* values because of the overlapping of spots (Y4 and R2)

(R3, R104, R105, R106) を除いたG3とB1の*Rf*値比はそれぞれ0.61, 0.63であり、室温よりも氷冷下で展開した場合の*Rf*値が若干低めの値となった。これは展開溶媒の組成が多少異なること等が考えられたが、分離については従来法と差がなかった。

指定外着色料においても、*Rf*値比は0.80～1.07（平均：0.96、変動係数：8.5%）であり、指定着色料の場合と同様に室温とほぼ同等の結果が得られた（Fig. 4, Table 2）。また、*Rf*値の大きい着色料については氷冷下での展開のほうがスポット形状が良好であった。

以上の結果から、標準品24種類の分離については従来法とほとんど差がなく、スポット形状は氷冷下で展開したほうが良好な結果が得られることが確認できた。

2) 市販食品から抽出した着色料の*Rf*値比

毛糸染色法またはポリアミド法に従って、市販食品から抽出した試験溶液をAl製プレートに塗布し、室温及び氷冷下でそれぞれ展開した後、*Rf*値を比較した。

R2, R40, R102, R106, Y4, Y5及びB1の計7種類の指定着色料いずれかが検出された市販食品21検体を食品群別に4つのグループ、すなわち清涼飲料水（5検体）、塩分の多い食品（10検体）、タンパク質の多い食品（2検体）及びその他の食品（乾燥果実、惣菜等4検体）に分け、Table 3にそれぞれの*Rf*値比を示した。

なお、*Rf*値比は、検出された着色料の*Rf*値をそれに相当

する標準品の*Rf*値で除したものとし、3検体以上から検出された着色料については、変動係数を算出した。

Table 3に示したように、室温での展開における*Rf*値比は食品群を通して0.80～1.09で変動係数は5%以内であった。一方、氷冷下での展開における*Rf*値比は0.92～1.13で、こちらも変動係数は5%以内であったことから、氷冷下での展開は室温とほぼ同等の結果を得ることができた。また、室温での展開ではY4とR2のスポット形状が悪く、分離が不十分で判定が困難となる場合があった。しかし、氷冷下で展開すると、この2色が明確に分離し、*Rf*値を測定することができた。以上の結果より、市販食品から抽出した試験溶液についても、室温より氷冷下で展開したほうが着色料の分離能が優れており、有効な方法であることが確認できた。

ま と め

アルミニウム製逆相TLCプレートを用いて展開を行うと、展開後のスポット形状が悪く分離ができないという問題がみられた。そこで、展開条件について検討を行い、氷冷下でプレコンディショニングを行った後展開を行う改良法を確立した。

本法を用いて指定着色料12種類及び指定外着色料12種類計24種類を分析したところ、着色料の分離及びスポット形状が良好であった。また、都内で入手した食品試料から抽

出した7種類の指定着色料についても再現性は良好であり、着色料の分離能も高かったことから、本法は日常の分析法として有用であると考える。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2010, 370-381, 2010, 金原出版, 東京.
- 2) 厚生労働省：輸入食品監視業務ホームページ 輸入届出における食品衛生法違反事例
<http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/tp0130-1.html> (2014年7月18日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) 青柳陽子, 萩原勉, 天川映子, 他：東京衛研年報, 51, 91-95, 2000.
- 4) 尾関尚子, 岡尚男, 猪飼誉友, 他：食衛誌, 34(6), 542-545, 1993.
- 5) 林智子, 尾関尚子, 岡尚男, 他：日食化誌, 5(2), 106-110, 1998.
- 6) 渋川雅美：クロマトグラフィー, 29(3), 13-20, 2008.
- 7) 長江徳和, 榎並敏行：分析化学, 49(11), 887-893, 2000.
- 8) 榎並敏行, 長江徳和：分析化学, 53(11), 1309-1313, 2004.
- 9) 長江徳和：分析化学, 59(3), 193-205, 2010.
- 10) 中村洋監修：液クロド犬の巻, 45-46, 2004, 丸善, 東京.
- 11) 津田孝雄：クロマトグラフィー第2版 - 分離のしくみと応用 -, 81-82, 1995, 丸善, 東京.
- 12) 自然科学研究機構 国立天文台：理科年表平成24年(机上版), 392, 2011, 丸善, 東京.

Thin-Layer Chromatography of Coloring Agents in Food Developed Using the Iced Water Cooling Method

Hitomi KYOKO^a, Asamoe OGAWA^a, Yuki SADAMASU^a, Narue SAKAMAKI^a, Tetsuya SHINDO^a and Yoko UEMATSU^a

Thin-layer chromatography (TLC) is used for the analysis of coloring agents in food. The spot shape of some coloring agents with high *Rf* values on reversed phase TLC, for example Y4 (tartrazine) and R2 (amaranth), was found to be distorted sometimes. This happened, when working with a solid phase layer coated on an aluminum sheet, and made spot identification difficult. Equilibration of the developing solvent between the vapor phase in the developing chamber and the solid phase on the plate prior to the development, and development by cooling with iced-water led to improvements in spot shape and retention behavior. This made identification of the coloring agent possible. The concentration of sodium sulfate in the conventional developing solvent was reduced from 5% to 2%, because sodium sulfate precipitated on the plate due to the low temperature. The developing solvent used was a mixture of methanol, acetonitrile and 2% aqueous sodium sulfate (3:3:10).

The separation and variation in *Rf* values for 12 permitted coloring agents and 12 non-permitted coloring agents using the new method were equal or better compared to the conventional method. The method was applied with good results to some permitted coloring agents extracted from commercial foods.

Keywords: thin-layer chromatography, aluminum sheet, reversed-phase TLC plate, coloring agent

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan