

アルミニウムシートを用いたTLCによる食品中のタール色素の検出

青柳陽子*, 荻原勉*, 天川映子*, 鈴木助治*

Detection of Coal Tar Dyes in Foods by TLC Using Aluminium Sheet

YOKO AOYAGI*, TSUTOMU OGIWARA*, EIKO AMAKAWA* and SUKEJI SUZUKI*

Thin layer chromatography (TLC) using an aluminium sheet for analysis of coal tar dyes in foods was studied. The chromatographic behaviors of the 12 permitted coal tar dyes and 8 non-permitted dyes using an aluminium sheet were the same as that using a glass plate in normal- and reversed- phase TLC. Dyes permitted in commercial foods were developed with good reproducibility in reversed-phase TLC using an aluminium sheet and a glass plate. Normal-phased TLC using an aluminium sheet and glass plate were influenced by admixturing in foods and R_f values were reduced. However, normal-phased TLC was useful for a screening test of 12 permitted coal tar dyes from commercial foods. Chromatograms on aluminium sheet and glass plate did not disappear during seven months under shield light. TLC with an aluminium sheet could be used for analysis of coal tar dyes in foods corresponding to GLP.

Keywords : アルミニウムシート aluminium sheet, ガラス板 glass plate, 逆相薄層クロマトグラフィー reversed-phase thin layer chromatography, 順相薄層クロマトグラフィー normal-phase thin layer chromatography, 食用タール色素 food coal tar dyes, 不許可色素 non-permitted dyes

はじめに

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、簡便な装置で短時間に高感度な一斉分析が可能であり、結果を視覚で確認できるなど、数々の利点があることから、食品中のタール色素の同定法¹⁾として用いられている。

平成9年度より、当所ではGLP対応で試験検査が行われるようになり、3年間の検査記録の保存が義務づけられたため、展開したクロマトグラムなどのデータは長期間にわたる保存が必要となった。しかし、従来から使用されているガラス製薄層板は、割れやすく、重く、かさばるため、特に多量のデータを保存する際に難点がある。最近、ガラス板のこれらの欠点を補うものとして、かさばらず、軽くて割れるおそれのない逆相及び順相のTLC用アルミニウムシート (AS) が市販されているが、食品中のタール色素への適用例はほとんどない。アルミニウムは、一般的には酸やアルカリに不溶で安定な軽金属であると考えられているが、調理器具に使用された場合、微量の溶出が認められる²⁾など、ガラスに比べて耐薬品

性は低い。そのため、色素あるいは検査試料によっては、 R_f 値などに影響がでてくる可能性がある。

そこで、ASをTLCに用いた場合、 R_f 値やスポットの状態などがガラス板の場合に比べて差があるか否か、さらに、ガラス板に代わって、ASを食品中のタール色素のGLPに対応した試験検査に使用できるか否かを、タール色素の使用表示のある市販食品を用いて逆相及び順相の条件下で検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

2000年3月から2000年5月までに都内の小売店より購入したタール色素使用表示のある市販の食品、漬け物12試料、蛋白性食品16試料、菓子21試料、清涼飲料水7試料計56試料を用いた。

2. 標準品及び試薬類

食用色素標準品は食用赤色2号 (R2)、同赤色3号 (R3)、同赤色102号 (R102)、同赤色104号 (R104)、同赤色105号 (R105)、同赤色106号 (R106)、同黄色4号

* 東京都立衛生研究所多摩支所 190-0023 東京都立川市柴崎町3-16-25

* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

3-16-25, Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

(Y4), 同黄色5号(Y5), 同青色1号(B1), 同青色2号(B2), 同緑色3号(G3)は東京化成工業(株)製, 同赤色40号(R40)は和光純薬工業(株)製を用いた. アズルピレン(C.I.No.14720), アシッドグリーン50(C.I.No.44090), ライトグリーンSF黄口(C.I.No.42095)は東京化成工業(株)製, ファーストレッドE(C.I.No.16045), オレンジII(C.I.No.15510)はクロマ社製, グリーンS(Acid Green 50)(C.I.No.44090)はシグマ社製を用いた.

キノリンエロー(C.I.No.47005)は, 東京化成工業(株)製, クロマ社製, シグマ社製の3社の製品を, パテントブルーバイオレットは, シグマ社製のC.I.No.42045及びC.I.No.42051の2種を用いた.

ポリアミドは和光純薬工業(株)製クロマトグラフィー用ポリアミドC-100を, その他の試薬はすべて市販特級品を用いた.

3. TLC条件

逆相TLC: ガラス板はメルク社製TLCプレートRP-18 F254S (20×20cm)を, アルミニウムシートは同社製TLCアルミニウムシートRP-18 F254S (20×20cm)をそれぞれ4分の1(10×10cm)に切断して使用した. 展開溶媒はメタノール-アセトニトリル-5%硫酸ナトリウム溶液(3:3:10)(展開溶媒A)を用いた³⁾.

順相TLC: ガラス板はメルク社製シリカゲル60 F254 (20×20cm)を, アルミニウムシートは同社製TLCアルミニウムシートシリカゲル60 F254 (20×20cm)をそれぞれ4分の1(10×10cm)に切断して使用した. 展開溶媒は順相TLC-Iには酢酸エチル-メタノール-28%アンモニア水(3.3:1:1)(展開溶媒B)⁴⁾, 順相TLC-IIにはイソアミルアルコール-*n*-ブタノール-石油エーテル-1 mol/L水酸化ナトリウム(1:1:1:1, 上層)(展開溶媒C)を用いた.

4. 試料からの色素の精製

市販食品中の合成着色料は, 常法として用いている毛糸染色法⁵⁾及びポリアミド法^{4,6)}によって精製した.

5. TLCによる分析

アルミニウムシートまたはガラス板の下端から2cmのところスポットし風乾後, 約7cm展開して観察後, *R_f*値を測定した.

結果及び考察

1. 標準色素におけるアルミニウムシートとガラス板TLCの比較

許可色素12種と輸入食品に比較的高頻度で検出される不許可の標準色素8種⁷⁾(10品目)の計20種について検討した. ASとガラス板にスポットした標準色素を同一

槽内で同時に展開し, スポットの状態を観察した後, *R_f*値を測定し, ASでの*R_f*値をガラス板の*R_f*値で除した値, すなわち*R_f*値比を算出した.

Table 1に逆相及び順相TLCのASとガラス板の色素別*R_f*値及び*R_f*値比を示した.

逆相TLCでASを用いた時の許可色素の*R_f*値比は, 0.99~1.06(平均:1.01, CV:2.0%)であり, ほとんど展開しないキサントレン系の4色素(R3, R104, R105, R106)以外は, ガラス板とほぼ同様の*R_f*値で展開できることが確認された. また, アズルピレンなど不許可色素では, *R_f*値比は0.94~1.09(平均:1.01, CV:4.0%)であり, 許可色素の場合と同様にガラス板との差はみられなかった.

順相TLCでASを用いた時の許可色素の*R_f*値比は, 順相TLC-Iの展開溶媒(B)では0.91~1.05(平均:0.99, CV:3.8%)であり, 不許可色素では, 0.90~1.08(平均:1.00, CV:6.4%)であった. キサントレン系色素の4色素(R3, R104, R105, R106)の分離に優れている順相TLC-IIの展開溶媒(C)では, 1.0~1.01(平均:1.0, CV:0.5%)であった. 順相TLCは逆相に比べて変動係数が若干高かったが, ASはガラス板とほぼ等しい*R_f*値であった.

パテントブルーバイオレットは, シグマ社製のC.I.Noの異なる2色素を用いた. 逆相TLCでは2色素とも原点付近にとどまるが, 順相TLC-IではC.I.No.42045はAS及びガラス板でそれぞれ*R_f*値0.35, 0.39であった. これに対してC.I.No.42051は0.08, 0.08であり, ASとガラス板のいずれを用いても両色素は分離できた.

1スポット当たりの塗布量, スポットのまとまり方や展開時間についても, 逆相及び順相でASとガラス板のいずれの場合も差がみられなかった.

以上の結果から, 標準色素については, ASとガラス板は, 逆相, 順相TLCとも差はなく使用できることが確認された.

2. 試料から抽出した色素のアルミニウムシートとガラス板TLCの比較

食品から抽出された色素の場合, 共存する塩分やタンパク質などの影響で*R_f*値が標準色素と異なる場合がある. そこで, ASのTLCが市販食品に適用できるか否かを検討するために, 市販食品から抽出した合成着色料を使用し, ガラス板のTLCとの比較を行った.

ポリアミド法^{4,6)}あるいは毛糸染色法⁵⁾に従って, 試料から調製した試験溶液を, AS及びガラス板にスポットし, 逆相及び順相TLC-Iでそれぞれを展開した後,

Table 1. *Rf* Values of Standard Coal Tar Dyes by TLC Using Aluminium Sheet and Glass Plate

Dyes	Reversed phase*1			Normal phase*2 I			Normal phase*3 II		
	Alm**4	Glass**5	Rf ratio**6	Alm	Glass	Rf ratio	Alm	Glass	Rf ratio
R2	0.75	0.71	1.05	0.05	0.05	1.00			
R102	0.65	0.61	1.06	0.08	0.08	1.00			
R3	0	0		0.56	0.56	1.00	0.77	0.76	1.01
R104	0	0		0.57	0.61	0.93	0.28	0.28	1.00
R105	0	0		0.59	0.65	0.91	0.38	0.38	1.00
R106	0.04	0.04	1.00	0.41	0.42	0.98	0.02	0.02	1.00
R40	0.38	0.37	1.02	0.35	0.35	1.00			
Y4	0.76	0.75	1.01	0.05	0.05	1.00			
Y5	0.45	0.44	1.02	0.33	0.33	1.00			
B1	0.16	0.16	1.00	0.20	0.21	0.95			
B2	0.68	0.69	0.99	0.19	0.18	1.05			
G3	0.18	0.18	1.00	0.08	0.08	1.00			
Azorbin	0.18	0.18	1.00	0.14	0.15	0.93			
Fast Red E	0.25	0.23	1.09	0.39	0.41	0.95			
Orange II	0.08	0.08	1.00	0.62	0.60	1.03			
Quinoline Yellow**7(Sigma)	0.43	0.43	1.00	0.56	0.54	1.04			
Quinoline Yellow**7(Chroma)	0.58	0.58	1.00	0.13	0.12	1.08			
Quinoline Yellow**7(Tokyo Kasei)	0.13	0.12	1.08	0.56	0.52	1.08			
Light Green SF Yellowish	0.15	0.15	1.00	0.17	0.18	0.94			
Patent Blue Violet(Sigma,C.I.No.42045)	0.06	0.06	1.00	0.35	0.39	0.90			
Patent Blue Violet(Sigma,C.I.No.42051)	0.03	0.03	1.00	0.08	0.08	1.00			
Acid Green 50	0.16	0.17	0.94	0.09	0.09	1.00			

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

* 2 : solvent system B, ethyl acetate-methanol-28% aqueous ammonia(3.3 : 1 : 1)

* 3 : solvent system C, isoamyl alcohol-*n*-butyl alcohol-petroleum ether-1 mol/L sodium hydroxide solution(1 : 1 : 1 : 1, upper layer) for xanthin dyes

* 4 : TLC using aluminium sheet

* 5 : TLC using glass plate

* 6 : *Rf* value of dye using aluminium sheet / *Rf* value of dye using glass plate

* 7 : *Rf* value of main spot

Rf 値を測定した。

市販食品58検体から、R2, R3, R40, R102, R106, Y4, Y5及びB1の計8種の合成着色料が検出された。これを食品群別に4つのグループ、すなわち菓子類(せんべい、ビスケット、あめ、チョコレート、干菓子、ゼリー21検体)、タンパク質の多い食品(食肉及び魚肉練製品、でんぷ、フレーク、桜えび、魚卵16検体)、塩分の多い食品(漬物、佃煮12検体)、清涼飲料水(7検体)に分け、Table 2に逆相、Table 3に順相TLC-Iでの*Rf* 値比を示した。

なお、*Rf* 値比は、検出された色素の*Rf* 値を相当する標準色素の*Rf* 値で除したものとし、3検体以上から検出された色素については、変動係数を算出した。

Table 2に示したように逆相TLCではR2, R40, R102, Y4, Y5, B1の6色素が確認された。ASでの*Rf* 値比は、

食品群を通して0.98~1.10で変動係数は5%以内であり、ガラス板と同様に再現性よく使用できることがわかった。

Table 3に示したように順相TLCでは、R2, R3, R40, R102, R106, Y4, Y5, B1の8色素が確認された。

菓子類ではAS、ガラス板ともに、原点付近に展開するR102とY4を除いてR3, R106, Y5, B1の4色素は変動係数が5%以上であり、特にY5は10%を越えており、共存物により影響を受け、*Rf* 値が低くなることが認められた。

Y5については、同様な傾向がタンパク質含量の多い食品群や塩分濃度の高い食品群においてもAS、ガラス板のいずれの場合にもみられた。しかし、清涼飲料水では、変動係数はASで2.2%、ガラス板で4.1%と低かった。これらのことから、Y5は清涼飲料水に多く含まれている糖分よりむしろ菓子類に多いでんぷん質や、食肉製品

などのタンパク質あるいは漬け物中の塩分により、*R_f*値が大きく影響されることが考えられる。また、数種の色素が混合して用いられている場合、例えばY5のほかにR102及びR106が検出されたさけフレークでのY5の*R_f*値比は、ASで0.72、ガラス板で0.68と低くなり色素相互の影響もみられた。

全体的に順相TLCは逆相TLCに比べてAS、ガラス板ともに*R_f*値比の変動係数が大きく、これは尾関らの報告⁸⁾とも一致していた。しかし、順相TLCはキサンテン系を含めたすべての許可色素が展開できるため、ガラス板と同様にASにおいても、スクリーニング方法としては非常に有効に使用できると考える。

3. クロマトグラムの保存性

GLPではクロマトグラムの3年間の保存が義務づけられているため、ASで展開されたクロマトグラムの保存性を検討した。

市販食品から常法により調製した試験溶液について、逆相及び順相TLC-I、IIで展開後、風乾し7ヶ月間室温で遮光保存してASとガラス板のクロマトグラムを比較した。

標準色素に関しては、12許可色素と不許可色素8種10品目のうち、ライトグリーンSF黄口、B2で若干の退色がみられたが、いずれの色素についてもAS、ガラス板

ともにスポットの消失はなかった。

また、試料から調製したR2, R3, R40, R102, R106, Y4, Y5及びB1の計8種の合成着色料についてもAS、ガラス板いずれの場合もスポットの消失はみられなかった。

今回、本研究が7ヶ月前から開始されたため、GLPで要求される3年間の保存性については検討できなかったが、今後、さらに長期に及ぶクロマトグラムの経過観察が必要と考える。また、使用した展開溶媒A, B, CはいずれもpHが中性か揮発性の高いアンモニアを含むアルカリ性だったため、ASにおいても、保存性が良好であった。しかし、酢酸やギ酸など揮発性の低い酸性物質を含有する展開溶媒では、長期間の保存中に微量でも酸が残留した場合、これらの物質による色素の退色、あるいは消失やアルミニウムの腐食によってクロマトグラムが損傷をうける可能性がある。用いる展開溶媒については、ASのクロマトグラムの長期保存が可能か、詳細な検討が必要と考える。

ま と め

アルミニウムシートを用いたTLCがGLPに対応した食品中のタール色素の分析に適用できるか否かをガラス板を使用したTLCを対照に検討したところ、以下の結果が明らかになった。

1. 許可色素12種と不許可色素8種10品目の標準色素

Table 2. *R_f* Ratio of Coal Tar Dyes from Commercial Foods Using Aluminium Sheet and Glass Plate by Reversed-Phase TLC

Food	Dye	n	<i>R_f</i> ratio* ¹							
			Aluminium sheet				Glass plate			
			Min.	Max.	Ave.	CV(%)	Min.	Max.	Ave.	CV(%)
Confectionaries	R102	5	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.02	1.00	0.9
	R40	1		1.09				1.10		
	Y4	19	1.00	1.01	1.00	0.3	0.95	1.00	0.99	1.4
	Y5	9	0.98	1.03	1.00	1.3	1.00	1.08	1.01	2.7
	B1	16	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0
Protein rich foods	R102	9	1.00	1.02	1.01	1.0	1.00	1.02	1.00	0.7
	Y4	1		1.04				1.04		
	Y5	4	1.00	1.10	1.04	4.7	1.00	1.05	1.02	2.3
Salty foods	R102	7	0.98	1.00	1.00	0.7	1.00	1.02	1.00	0.7
	Y4	8	1.00	1.01	1.00	0.4	0.99	1.02	1.00	0.6
	Y5	4	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0
	B1	3	1.00	1.08	1.03	4.5	1.00	1.00	1.00	0.0
Soft drinks	R2	3	1.00	1.04	1.02	2.0	1.00	1.06	1.03	3.0
	R102	2	0.98	1.00	0.99		1.00	1.04	1.02	
	Y4	3	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0
	Y5	5	0.98	1.02	1.00	1.4	1.00	1.05	1.01	2.2
	B1	4	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0

* 1 : *R_f* value of dye from commercial food / *R_f* value of standard dye

Table 3. *Rf* Ratio of Coal Tar Dyes from Commercial Foods Using Aluminium Sheet and Glass Plate by Normal-Phase TLC*1

Food	Dye	n	<i>Rf</i> ratio*2							
			Aluminium sheet				Glass plate			
			Min.	Max.	Ave.	CV(%)	Min.	Max.	Ave.	CV(%)
Confectionaries	R102	5	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0
	R3	4	0.91	1.07	1.07	6.7	0.87	1.02	0.87	7.5
	R106	6	0.90	1.03	0.95	5.2	0.86	1.03	0.95	7.2
	R40	1		0.88				0.88		
	Y4	19	0.75	1.33	0.97	8.4	1.00	1.00	1.00	0.0
	Y5	9	0.76	1.08	0.93	10.2	0.71	0.97	0.91	7.5
	B1	16	0.85	1.00	0.96	7.0	0.83	1.10	0.94	6.5
Protein rich foods	R102	9	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0
	R3	2	1.00	1.04	1.02		0.94	0.96	0.95	
	R106	7	0.92	1.00	0.98	3.5	0.90	1.03	0.94	5.0
	Y4	1		1.00				1.00		
	Y5	4	0.72	0.92	0.87	11.2	0.68	0.91	0.79	11.9
Salty foods	R102	7	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0
	R106	7	0.91	1.06	0.99	5.1	0.92	1.15	1.01	7.3
	Y4	8	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0
	Y5	4	0.93	1.09	0.97	8.2	0.75	0.96	0.89	8.2
	B1	3	0.89	1.00	0.98	2.9	0.82	0.94	0.95	0.5
Soft drinks	R2	3	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0
	R102	2	0.88	1.00	0.94		1.00	1.00	1.00	
	Y4	3	1.00	1.00	1.00	0.0	1.00	1.00	1.00	0.0
	Y5	5	1.00	1.04	1.02	2.2	0.91	1.00	0.97	4.1
	B1	4	1.00	1.06	1.03	3.1	0.85	1.00	0.95	6.5

* 1 : solvent system B

* 2 : *Rf* value of dye from commercial food / *Rf* value of standard dye

の場合は、AS及びガラス板で順相、逆相ともに*Rf*値に差はみられなかった。

2. 試料から調製した許可色素8種類についても逆相TLCではガラス板と差はなく、*Rf*値が標準色素とよく一致し再現性も良好であった。順相TLCでは、AS、ガラス板のいずれの場合も食品の種類により*Rf*値に影響がみられたが、許可色素12種の展開が可能なことから、スクリーニング法として有効と考えられる。

3. クロマトグラムを7ヶ月間遮光保存したところ、ASはガラス板と同様に保存できた。

以上の結果から、保存期間については、さらに長期間での検討が必要であるが、ASはガラス板と同様にGLP対応の食用タール色素の試験検査に使用できるものと考えられる。

文 献

1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2000, 326-341, 金原出版, 東京.

2) 武田由比子, 河村葉子, 山田 隆：食衛誌, 40, 172-177, 1999.

3) Oka, H., Kawamura, Y. and Yamada, N.: *J. Chromatogr.*, 411, 437-444, 1987.

4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解1990, 500-547, 金原出版.

5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解1980, 351-374, 金原出版.

6) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針食品中の食品添加物分析法, 142-166, 1989, (社)日本食品衛生協会.

7) 厚生省生活衛生局検疫所業務管理室 厚生省輸入食品衛生監視員協議会編：輸入食品1991 (1992), 輸入食品1992 (1993) 日本食品衛生協会.

8) 尾関尚子, 岡 尚男, 猪飼誉友, 他：食衛誌, 34, 542-545, 1993.