

食用黄色 4 号の HPLC における保持時間の変動

新藤 哲也*, 大石 充男*, 石川 ふさ子*, 堀江 正男*,
安井 明子*, 伊藤 弘一*

Retention Time Variation of Food Yellow No.4 (Tartrazine) in HPLC

Tetsuya SHINDO*, Mitsuo OISHI*, Fusako ISHIKAWA*, Masao HORIE*,
Akiko YASUI* and Koichi ITO*

When food yellow No.4 (Y4) extracted from *kounago* (sand lance) was analyzed on an HPLC, a retention time of Y4 peak was shifted and this phenomenon was reproducible. The retention time of the Y4 peak was not affected by Y4 concentration in the test solution, but was affected as the ethanol concentration in the solution increased or the solution volume into HPLC increased. These results revealed that the retention time variation of the Y4 peak was based on the total volume of ethanol in the test solution loaded to HPLC. When ethanol as a organic solvent in the test solution was converted to acetonitrile or methanol, the retention time of Y4 peak shifted, too. On the determination of eleven kinds of synthetic food dyes except for Y4 by HPLC, the retention times of R2, B2, R40, R102 and Y5 peaks were affected by volumes of 20 μ L (R2 and B2) or 50 μ L (R40, R102 and Y5) loaded on HPLC. The retention times of dyes eluted early from the HPLC column tend to shift, and from the results it was suggested that the retention time variation of dye peaks was caused by the polarity of the test solution that was lower than the mobile phase.

Keywords : 食用黄色 4 号 food yellow No.4 (tartrazine), 高速液体クロマトグラフィー HPLC, 保持時間の変動 change of retention time, タール色素 coal-tar dye, 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC/MS

はじめに

わが国では現在 12 種類の食用タール色素が許可されている。その中で食用黄色 4 号 (Y4) は年間約 6 万 t と最も需要が多く、漬け物や菓子、液状食品等、様々な食品に利用されている。

食品中の食用タール色素の分析には主にペーパークロマトグラフィー (PC), 薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が利用されている¹⁻³⁾。近年, HPLC による分析が汎用され, 特に表示違反や指定外色素の同定確認に利用されている⁴⁻⁸⁾。

今回, 食用赤色 102 号 (R102) および青色 1 号 (B1) の添加表示のある市販の国内産小女子を衛生試験法・注解 (2005)¹⁾ に準拠し, 水抽出, 糸糸染色後, PC および TLC で分析を行ったところ, R102 および B1 以外に, 表示にない Y4 と Rf 値が一致するスポットが得られた。そこで, HPLC による確認を行ったところ, Y4 の保持時間 (約 6 分) 付近にピークはみられず, 約 3 分付近に別のピークが検出された。このことから, この不明ピークについて, 同定を試みたところ, 興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

1. 標準品および試薬

1) 標準品 食用黄色 4 号 (Y4), 食用赤色 2 号 (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), 食用黄色 5 号 (Y5), 食用青色 1 号 (B1), 食用青色 2 号 (B2), 食用緑色 3 号 (G3) : 以上東京化成工業 (株) 製

2) 標準原液および標準溶液 標準品 50 mg をそれぞれ正確に量り, 水 50 mL で希釈して標準原液 (1000 μ g/mL) とした。標準原液を用時, 水で希釈して標準溶液を調製した。

エタノール, メタノールおよびアセトニトリルは HPLC 用, 酢酸アンモニウムおよびその他の試薬は特級品を用いた。

2. 装置

1) HPLC ポンプ : PU-1580, フォトダイオードアレイ検出器 : MD-1515, オートサンプラー : AS-1555-10 (以上日本分光工業 (株) 製)

2) LC-MS LC : Alliance 2695 (Waters 社製), MS :

* 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

Quattro Ultima Pt (Micromass社製)

3) 遠心分離機 KN-45 (久保田商事㈱製)

3. 試験溶液の調製

衛生試験法・注解(2005)¹⁾に準じて調製を行った。
試料25gに水を加え、加温しながら混和し、色素を抽出した。遠心分離後、上清を分取した。酢酸で約pH4に調整し、脱脂毛糸を入れて沸騰水浴上で30分間時々かくはんしながら加温した。毛糸を水洗した後、0.5%アンモニア水10mLを加えて沸騰水浴上で15分間加温し、色素を溶出させた。溶出液を濃縮乾固し、残留物に水または50%エタノールを加えて0.45 μmメンブランフィルターでろ過し、HPLCおよびLC-MS用試験溶液とした。

4. HPLC条件

カラム: Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 mm i.d.×250 mm) ナカライテスク㈱製, 移動相: A液; メタノール・アセトニトリル・水 (3:3:4) 混液に0.5%となるように酢酸アンモニウムを加えたもの, B液; 0.5%酢酸アンモニウム, A液・B液の比が (1:9) 混液から (10:0) まで30分間で直線濃度勾配溶出を行い, さらに10分間保持した。流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出器: フォトダイオードアレイ (350~600 nm), 注入量: 50 μL

5. LC-MS条件

カラム: CAPCELL PAK C18 UG120 (2.0 mm i.d.×150 mm) ㈱資生堂製, 移動相: A液; アセトニトリル, B液; 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム, A液・B液の比が (5:95) 混液から (55:45) まで35分間で直線濃度勾配溶出を行った。流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 10 μL, イオン化: ESI (-), キャピラリー電圧: 1.00 kV, ソース温度: 120°C, デソルベーション温度: 500°C, コーン電圧: 35 V, スキャン: m/z 280-1000

結果及び考察

1. 不明ピークの同定

小女子抽出液のHPLCクロマトグラムをFig. 1に示した。約3分付近にみられたY4'とY4ピークのPDAスペクトル(350~600 nm)を比較したところ, Fig. 2に示したように, ほぼ一致した。また, 食品衛生検査指針 食品添加物編(2003)²⁾に示されたHPLC条件に準拠し, LC-MS分析を行ったところ, Fig. 3に示したようにY4'ピークとY4ピークのマススペクトルもよく一致した。そこで, 今回HPLC分析を行うにあたり, Y4標準溶液は水に溶かし, 小女子抽出液は50%エタノールに溶解してHPLC分析を行っていたことに着目し, 試験溶液のエタノール濃度およびHPLC分析における注入量について検討を行った。小女子抽出液のHPLCへの注入量を減少させた場合, または水で希釈してからHPLCで分析した場合, Y4'ピークは出現せず, Y4ピークのみとなった。次にY4標準溶液を水ではなく, 50%

エタノールに溶解してHPLCで分析すると, Fig. 1の小女子抽出液の場合と同様にY4'ピークが出現し, Y4ピークは

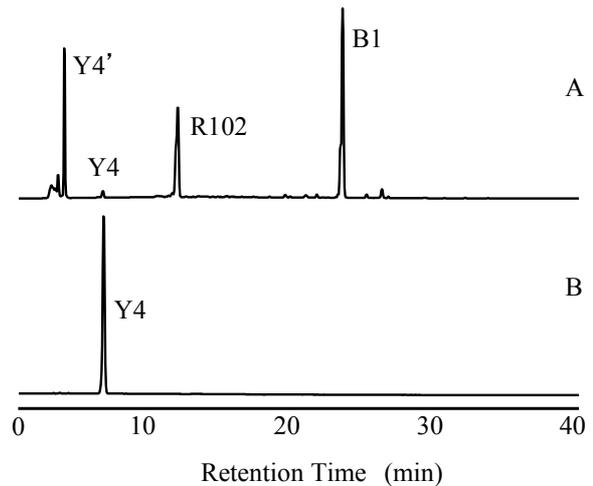


Fig. 1. HPLC Chromatograms of Extract from *kounago* in 50% ethanol(A) and Standard in water(B)
Injection volume: 50 μL(A), 10 μL of 20 μg/mL (B)

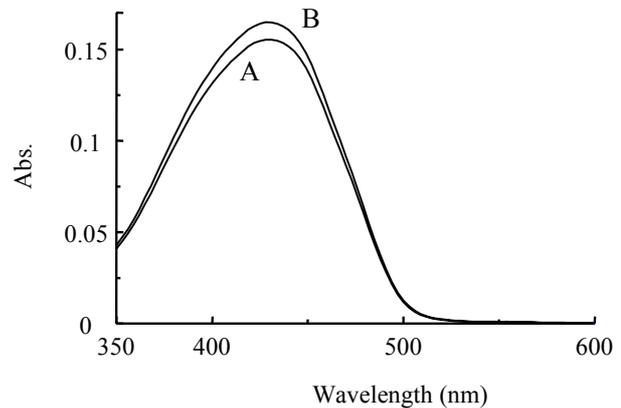


Fig. 2. PDA Spectra of Y4' (A) and Y4 Standard (B)

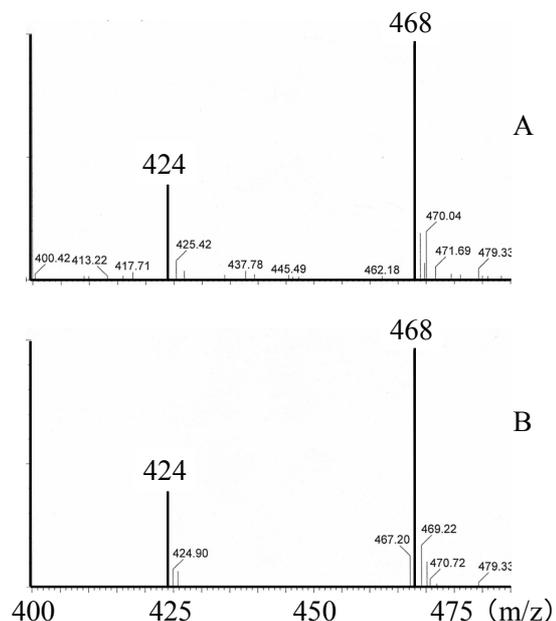


Fig. 3. LC/MS Spectra of Y4' (A) and Y4 Standard (B)

ほとんど確認できなかった。これらのことから、Y4'はY4の構造が変化したものではなく、Y4そのものであり、HPLCカラム内でエタノールの影響によりY4がY4'の保持時間に溶出されたことが明らかとなった。

そこで、このような現象がどのような場合に起こるかY4標準溶液を用いて種々検討を行うとともに、他の食用タール色素の挙動についても調査を行った。

2. 保持時間を変動させる要因

1) Y4標準溶液のエタノール濃度 Y4標準溶液のエタノール濃度の違いがHPLCクロマトグラムに及ぼす影響について検討を行った。Y4標準溶液の濃度を50 $\mu\text{g/mL}$ とし、エタノールの濃度を0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 95%と変化させて分析したところ、Fig. 4に示したようにエタノール濃度が30%でY4のピーク形状が変化し、5.33分に小さなピークが現れた。エタノール濃度をさらに50%に増加すると、3.61分にY4'ピークが現れ、エタノール濃度の増加とともにY4'ピークへの変動割合が大きくなり、95%ではY4の保持時間におけるピークはかなり小さくなった。

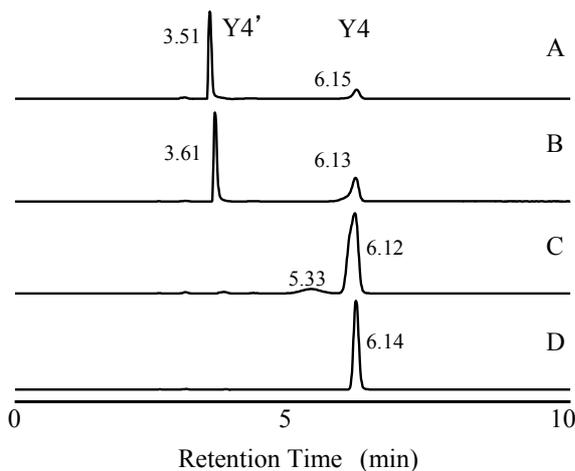


Fig. 4. Effect of ethanol concentration in test solution on change of retention time of Y4
Concentration of ethanol: 95% (A), 50% (B), 30% (C), 0% (water) (D) Injection volume: 10 μL

2) Y4の濃度 50%エタノールに溶解したY4の濃度を変化させたときのHPLCクロマトグラムをFig. 5に示した。Y4濃度が10, 50, 500 $\mu\text{g/mL}$ のいずれにおいてもクロマトグラムのパターンに顕著な差はみられなかった。このことから、Y4ピークの保持時間の変動はY4の濃度に関係なく、溶液中のエタノールに依存していることが確認された。

3) Y4' およびY4ピークの再現性 Y4'ピークの出現したY4の50%エタノール溶液 (50 $\mu\text{g/mL}$) のHPLC分析における再現性について調べた。10 μL 注入の5回繰り返し分析で得られたY4およびY4'の変動係数は保持時間ではいずれも0.1%、面積値ではY4'が0.4%、Y4が1.0%であり、保持時

間の変動は再現性のある現象であることがわかった。

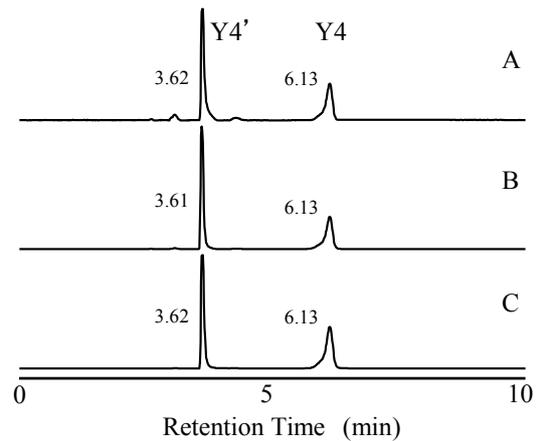


Fig. 5. Effect of Y4 concentration in test solution (50% ethanol) on change of retention time of Y4
Concentration of Y4: 10 $\mu\text{g/mL}$ (A), 50 $\mu\text{g/mL}$ (B), 500 $\mu\text{g/mL}$ (C)
Injection volume: 10 μL

4) 注入量 Y4の50%エタノール溶液 (50 $\mu\text{g/mL}$) のHPLC分析において、注入量を変化させたときのHPLCクロマトグラムをFig. 6に示した。注入量が5 μL の場合にはY4ピークの保持時間の変動はみられなかったが、10 μL を超えると保持時間の変動がみられ、注入量が増加するほど変動割合が大きくなり、変動したY4'の保持時間も早くなる傾向がみられた。また、注入量が50 μL ではこれまで1本だったY4'ピークより前の2.99分にも新たなピーク (Y4'') が出現し、さらに保持が弱くなっていることが推察された。

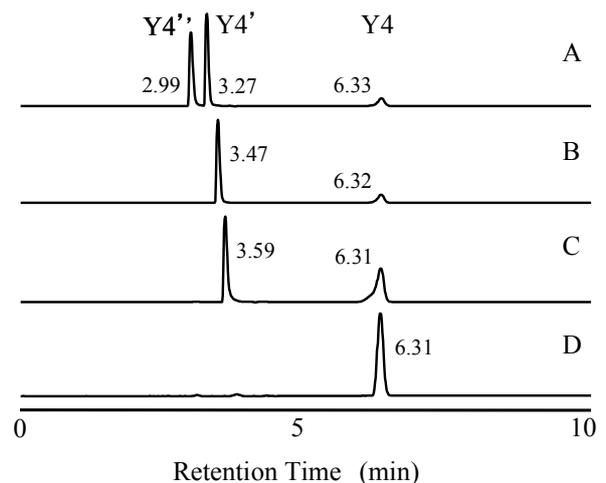


Fig. 6. Effect of injection volume (50% ethanol) on change of retention time of Y4
Injection volume: 50 μL (A), 20 μL (B), 10 μL (C), 5 μL (D)

以上の結果、Y4ピークは、HPLCへの注入量が50%エタノール溶液5 μL (エタノールとして2.5 μL) では保持時間の変動せず、10 μL (エタノールとして5 μL) で保持時間が

変動した。また、結果および考察の2. 1)で示したように30%エタノール溶液10 μ L (エタノールとして3 μ L) で保持時間がわずかに変動した。これらのことから、Y4ピークの変動はエタノール濃度ではなく、エタノールの総量に影響していることが明らかとなり、Y4ピークの保持時間に変動がみられる注入時のエタノール量は約3 μ Lであると考えられた。

5) 溶媒の種類 Y4標準溶液 (50 μ g/mL) のHPLC分析において標準溶液を溶解する溶媒をエタノール、メタノールおよびアセトニトリルにしたときのHPLCクロマトグラムをFig. 7に示した。10 μ Lの注入において、エタノールおよびアセトニトリルではY4の保持時間の変動がみられたが、メタノールではピーク幅がやや広がったものの変動はみられなかった。しかし、メタノールを用いた場合でも、20 μ Lの注入 (メタノールとして10 μ L) においてはY4の保持時間の変動がみられた。さらに、70%メタノールを10 μ L (メタノールとして7 μ L) 注入した場合、保持時間がわずかに変動した。これらのことから、メタノールでは総量として約7 μ Lの注入で、Y4の保持時間に変動がみられることが明らかとなり、エタノールの約2倍量までHPLCに注入することが可能であった。以上の結果、極性のより低い溶媒に溶解した場合にY4の保持時間が変動しやすいことが示唆された。

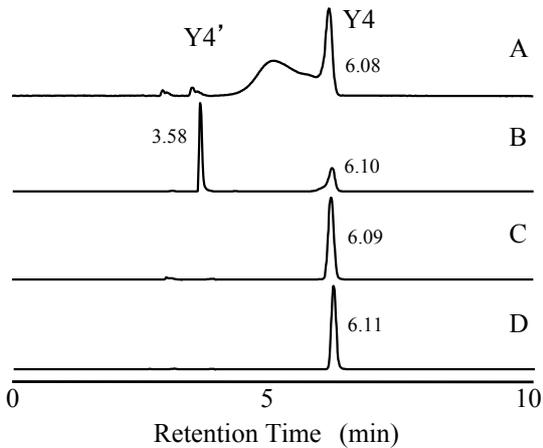


Fig. 7. Effect of solvent of test solution on change of retention time of Y4

Solvent: 50% acetonitrile(A), 50% ethanol(B), 50% methanol(C), water(D) Injection volume: 10 μ L

6) C18カラムの検討 C18カラムとしてCosmosil 5C18-AR (ナカライテスク(株)製), Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス(株)製), Wakosil II 5C18-HG (和光純薬工業(株)製), Develosil ODS-UG-5 (野村化学(株)製), いずれも内径4.6 mm, 長さ250 mm, 粒径5 μ mを用いてY4標準溶液 (50 μ g/mL) をエタノールおよびメタノールに溶解し, HPLC分析を行った。その結果, いずれのカラムの場合もCosmosil 5C18-AR-II でみられたようなY4ピークの変動がほぼ同様に確認された。

3. 他の食用タール色素の挙動

Y4でみられた保持時間の変動が他の色素においてもみられるか調査するため, 日本で許可されているその他11種のタール色素 (R2, R3, R40, R102, R104, R105, R106, Y5, B1, B2, G3) について検討を行った。50%エタノールに溶解した各色素 (50 μ g/mL) 溶液20 μ LをHPLCで分析したところ, R3, R40, R102, R104, R105, R106, Y5, B1, G3の9種のタール色素では保持時間の変動はみられなかったが, Fig. 8に示したようにR2およびB2の保持時間がそれぞれR2'およびB2'へ一部変動した。また, 注入量を50 μ Lにしたところ, R40, R102, Y5においても保持時間の変動が認められた。20 μ L注入で保持時間の変動がみられたR2およびB2の保持時間はそれぞれ7.98, 8.58分であり, 12種の中でY4 (6.30分) に次いで早くカラムから溶出された。また, 50 μ L注入で保持時間の変動がみられたR102, Y5, R40の保持時間はそれぞれ11.9, 12.9, 15.4分であり, 保持

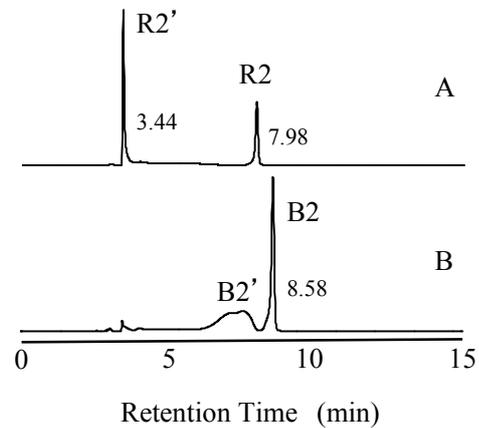


Fig. 8. HPLC Chromatograms of R2(A) and B2(B) Standards in 50% ethanol Injection volume: 20 μ L (50 μ g/mL)

時間の変動がみられなかったその他6種のタール色素の保持時間はいずれも20分以上であった。これらの結果はHPLCにおける保持時間が早い色素ほど変動しやすいことを示している。

一般に, 移動相よりも極性の低い溶媒に試料を溶解してHPLC分析を行った場合, ピークの変形や割れを生じることがある⁹⁻¹²⁾ため, 移動相に溶解することが望ましいといわれている。今回著者らが行ったHPLC条件では移動相の極性よりも試験溶液の極性のほうが低かったため, 保持時間の変動が生じたものと推察された。

以上の結果から, HPLCでY4など極性の比較的高い食用タール色素を分析する場合には, 試料を水で溶解するか, 水に溶けない場合には50%メタノールに溶解し, 注入量を減らして分析する必要があると考えられた。

まとめ

市販の小女子から検出されたY4の確認をHPLCを用いて

行ったところ、Y4の保持時間が変動する現象がみられ、その現象には再現性が認められた。Y4ピークの保持時間の変動はY4の濃度には関係なく、標準溶液や試料を溶解するときに用いるエタノールが影響していることがわかった。また、エタノール濃度および注入量の増加とともに変動割合が大きくなったことから、Y4ピークの変動はHPLCに注入されたエタノールの総量に影響して保持時間が変動していることが明らかとなった。Y4を溶解する溶媒をエタノールからアセトニトリルやメタノールにした場合でも変動がみられたが、メタノールを用いた場合比較的Y4は変動しにくく、極性のより低い溶媒に溶解した場合に変動しやすいことがわかった。また、Y4以外の食用タール色素11種についてHPLCで分析したところ、20 µL注入でR2, B2, 50 µL注入ではさらにR40, R102, Y5においても保持時間の変動が認められた。これらの結果はHPLCにおける保持時間が早い色素ほど変動しやすいことを示しており、移動相よりも極性の低い試験溶液を用いたことで保持時間の変動が生じたものと推察された。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2005, 348-359, 2005, 金原出版, 東京.
- 2) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編, 169-199, 2003, 壮光舎出版, 東京.
- 3) 高 智美, 矢田朋子, 飛松佳江, 他：日食化誌, **2(1)**, 64-67, 1995.
- 4) 植松洋子, 広門雅子, 中島和雄, 他：東京衛研年報, **39**, 151-155 1988.
- 5) 石川ふさ子, 斉藤和夫, 中里光男, 他：東京衛研年報, **42**, 141-146 1991.
- 6) 中沢久美子, 石川ふさ子, 田端節子, 他：東京衛研年報, **43**, 98-110 1992.
- 7) 石川ふさ子, 大石充男, 新藤哲也, 他：食衛誌, **46(5)**, 228-233, 2005.
- 8) Yamada, M., Kato, Y., Nakamura, M. *et al.* : *Chem. Pharm. Bull.* , **46(3)**, 494-499, 1998.
- 9) 財団法人 化学物質評価研究機構：クロマトセミナー要旨集, 17, 2004, クロマト技術部, 東京.
- 10) 船山恵市, 金子令子, 羽石奈穂子, 他：東京健安研七 年報, **55**, 117-122 2004.
- 11) 中村 洋監修：液クロ虎の巻, 140-141, 2001, 丸善, 東京.
- 12) 中村 洋監修：液クロ犬の巻, 156, 2004, 丸善, 東京.