

TLCを用いた着色料検査におけるスポット形状の歪み発生とその改善法

青木 均^a, 藤原 卓士^a, 山嶋 裕季子^a, 京小 ひと美^a,
小川 麻萌^a, 植松 洋子^a, 門間 公夫^a

食品に含まれる着色料の試験において、キサントゲン系色素である赤色3号 (R3), 赤色104号 (R104), 赤色105号 (R105), 赤色106号 (R106) は, 薄層クロマトグラフィー (TLC) により, 逆相TLCプレートを用いて, メチルエチルケトン・メタノール・5%硫酸ナトリウム混液 (1:1:1) の展開溶媒で展開する方法が用いられている。市販のアルミニウム製逆相TLCプレートを用いて上記の4色素を展開した際, プレートのロット間で4色素の R_f 値及び相互分離に差異が生じた。また, 一部のロットでは R_f 値の大きいR106のスポット形状に歪みが生じる事例があった。4色素の相互分離を維持しながらスポット形状を改善することを目的として, 種々の検討を行った。その結果, メタノールによるTLCプレートの前洗浄を行うことが有効であった。展開を行ったTLCプレートに紫外線を照射したところ, 展開前には確認されなかった波状の蛍光物質が溶媒先端付近に確認された。また, 歪みの生じたTLCプレートではこの蛍光物質がR106のスポットに重なっていた。これらのことから, プレート上に存在するR106と R_f 値の近い物質がR106と重なって展開されることによりスポット形状に歪みが生じたと推測された。

キーワード: 薄層クロマトグラフィー, TLCプレート, 着色料, スポット

はじめに

日本では食品添加物として12種類の酸性タール色素の使用が許可されており, 食品中の酸性タール色素検査において薄層クロマトグラフィー (TLC) が汎用されている。12種類の色素の中で, キサントゲン系色素である赤色3号 (R3), 赤色104号 (R104), 赤色105号 (R105), 赤色106号 (R106) は, 逆相TLCプレートを用いて, メチルエチルケトン (MEK) ・メタノール (MeOH) ・5%硫酸ナトリウム (Na_2SO_4) 混液 (1:1:1) の展開溶媒で試験を行う方法が用いられている^{1,2)}。市販のTLCプレートを用いて上記の4色素を展開した際, 同一製品であっても, プレートのロットによって4色素の R_f 値や相互分離に差があり, 一部のロットではR106のスポット形状に歪みが生じる事例があった。この事例に対して, 4色素全体の相互分離を良好に保ちながら, 歪みの生じたR106のスポット形状を改善することを目的とし, TLC条件の検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 標準品及び試薬

R3, R104, R105, R106及び赤色2号 (R2), 赤色40号 (R40), 赤色102号 (R102), 黄色4号 (Y4), 黄色5号 (Y5), 青色1号 (B1), 青色2号 (B2), 緑色3号 (G3) は国立医薬品食品衛生研究所標準品を用いた。

メチルエチルケトン, メタノール, 硫酸ナトリウムは和光純薬工業 (株) の試薬特級を用いた。

2. 標準溶液及び混合標準溶液

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とした (各1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

また, R3, R4, R105, R106を各100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように混合したものを混合標準溶液とした。

3. 装置及び機器

純水製造装置はミリポア社製Elix 5UV, 展開槽は (株) 矢沢科学製二槽式展開槽 (幅10.5 cm×奥行3.5 cm×高さ11 cm), TLC画像記録・解析装置はCAMAG社製ヴィジュアライザー (解析ソフトはvisionCATS ver. 2.1.15272.1), 定温乾燥器はヤマト科学 (株) 製DX300を用いた。

4. TLCプレート

ロットの異なるMERCK社製TLCアルミニウムシートRP-18F_{254S} (20 cm×20 cm) を高さ10 cm×幅3~10 cmに切断して使用した。ロットに関しては, 数年前に購入して開封済みのものをLot A, 直近に購入したものを購入時期順にLot B, Lot Cとした。

5. 検討内容

以下の5種類の条件で展開を行い, 各条件で展開を行ったプレートをTLC画像記録装置で白色光を照射して記録した。R106のスポット形状に関しては, 歪みの度合をより明確に判断するため366 nmのUVを照射して判定した。

1) 基本となる展開法

二槽式展開槽の片側の槽にMEK・MeOH・5% Na_2SO_4 混液 (1:1:1) の展開溶媒を入れ, 40分以上放置した。

^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

TLCプレート下端から1.5 cmの高さを原点として、混合標準溶液をプレートの両端から1 cm以上離して1 μ L塗布し、そのTLCプレートを同じ側の槽に挿入して約5 cm展開した(以下、基本法とする)(図1-A)。

2) ろ紙で展開槽内を飽和した展開法

二槽式展開槽の両側の槽に基本法の展開溶媒を入れ、片側の槽に展開溶媒で湿らせたろ紙を挿入し、40分以上放置した。その後、基本法と同様に混合標準溶液を塗布したTLCプレートを、ろ紙を挿入していない側の槽に挿入して約5 cm展開した(図1-B)。

3) TLCプレートの固相と気相の平衡化を行った展開法

二槽式展開槽の片側の槽に基本法の展開溶媒を入れ、基本法と同様に混合標準溶液を塗布したTLCプレートを別の側の槽に挿入して40分以上放置した(以下、プレコンディショニングとする)。その後、展開槽を傾けて展開溶媒をTLCプレートの置いた側の槽に移動させて約5 cm展開した(図1-C)。

4) 展開溶媒の組成比を変更した展開法

MEK・MeOH・5%Na₂SO₄混液(1:1:1)の展開溶媒の組成比を(4:5:5)、(3:4:4)、(2:3:3)に変更し、基本法で約5 cm展開した。

5) メタノールによる前洗浄を行った展開法

塗布を行う前のTLCプレートをメタノールで上端まで展開させた後、定温乾燥器を用いて120°C、20分間乾燥した。そのTLCプレートに基本法と同様に混合標準溶液を塗布した後、基本法で約5 cm展開した(図1-D)。

結果及び考察

1. TLC条件の検討

基本法で展開を行った各ロットのTLCプレートでのR106のスポット形状、4色素のR_f値及び相互分離を基準とし、他の条件で展開を行った結果を比較した。

1) 基本法

基本法による各ロットのTLCプレートでの展開結果を図2-①、②、③に示した。4色素のR_f値については、Lot AではR_f値の大きい順からR106、R104、R105、R3となったが、Lot B及びLot Cでは大きい順からR106、R3、R105、R104となり、順序が異なった。また、Lot BではR106のスポッ

ト形状に歪みが生じた。4色素全体の相互分離について、Lot A及びLot BではR106以外の3色素のスポットが近接していたのに対し、Lot Cでは3色素のスポットが離れていた。以上の結果から、基本法によるR106のスポット形状、4色素のR_f値、順序及び相互分離はロット間で異なることが分かった。これは、ロット間で製品の性質に差異が生じたためと推測された。

2) ろ紙で展開槽内を飽和した展開法

展開槽内の気相の飽和状態を変更すると、TLCプレート上での溶媒移動の挙動が変化し、スポットの分離に影響を与えることが知られている³⁾。そこで、各ロットについて、ろ紙で展開槽を飽和して展開を行った。その結果、すべてのロットにおいて4色素のR_f値が増加し、Lot AではR106以外の3色素のスポットが近接して判定が困難となったが(図2-④)、Lot B及びLot Cではスポット間の距離が広がった(図2-⑤、⑥)。R106のスポット形状については、Lot Aでは良好のまま維持されたが、Lot B及びLot Cでは基本法よりも悪化した。以上の結果から、この条件ではR106のスポット形状の改善に至らなかった。

3) TLCプレートのプレコンディショニングを行った展開法

TLCプレートのプレコンディショニングを行うことにより、プレートの固相と槽内の気相が平衡化され、スポット形状やR_f値、相互分離に影響を与えることが知られている^{4,5)}。そこで、各ロットについて、TLCプレートのプレコンディショニングを行った後、展開を行った。その結果、Lot Aでは4色素の相互分離は維持されたが(図2-⑦)、Lot B及びLot Cではろ紙で展開槽内を飽和した場合の結果とほぼ同様であった(図2-⑧、⑨)。以上の結果から、この条件でもR106のスポット形状の改善に至らなかった。

4) 展開溶媒の組成比を変更した展開法

逆相TLCプレートを用いる場合、一般に展開溶媒の極性を大きくすることでスポットのR_f値が減少する⁶⁾。そこで、これまでの結果においてR106のスポット形状が改善されなかったLot Bを用いて、展開溶媒の組成比を変更して展開を行った。その結果、MEK・MeOH・5%Na₂SO₄混液(4:5:5)、(3:4:4)を用いた場合、366 nmのUV照射下でR106にスポット形状に歪みが確認された(図3-II, III)。

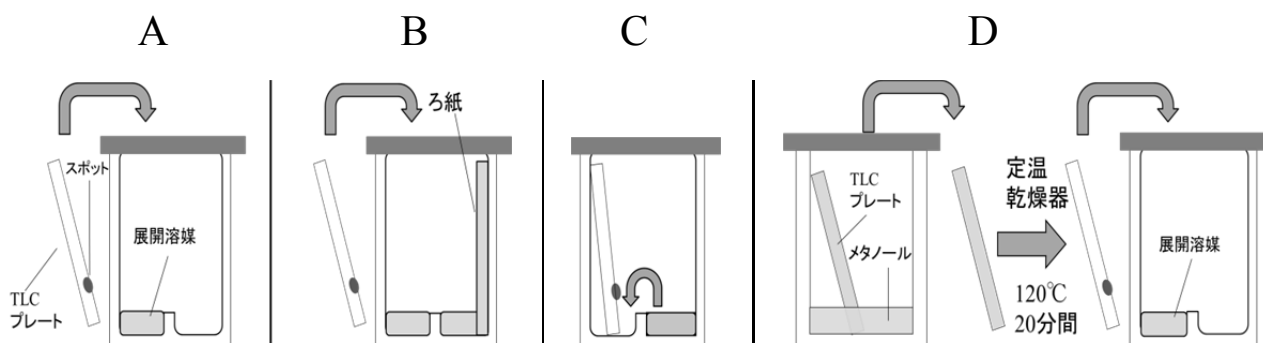


図1. TLCプレートの展開法

A: 基本法 B: ろ紙による展開槽内の飽和 C: TLCプレートのプレコンディショニング D: メタノールによる前洗浄

MEK・MeOH・5%Na₂SO₄混液 (2:3:3) を用いた場合はスポット形状が改善されたが, R3, R104, R105の3色素のR_f値が全体的に減少し, R105とR104のスポットが重なった (図3-IV) . 以上の結果から, この条件ではR106のスポット形状が改善されたが, 4色素全体の相互分離を良好に保つことができず, 検査に用いることは難しいと判断した.

5) メタノールによる前洗浄を行った展開法

TLCプレートに付着した汚染物質の除去として, メタノールを用いた前洗浄が推奨されている⁷⁾. そこで, 各ロットについて, メタノールによる前洗浄を行ってから展開した. その結果, Lot A及びLot Cではスポット形状が良好に維持され (図2-⑩, ⑫), Lot Bではスポット形状が改善された (図2-⑪) . また, Lot A及びLot Bの4色素間の相互分離は維持され, Lot CではR104とR105のR_f値が小さくなることでR3のスポットと距離が広がった.

以上の結果から, 前洗浄を行うことで展開後のR106のスポット形状を改善できることが分かった. また, この条件ではすべてのロットにおいて4色素全体の相互分離を維持, またはわずかに改善できた.

1)から5)のTLC展開条件の検討結果から, 4色素の相互分離を良好に保ちながらR106のスポット形状を改善させる方法として, メタノールによるTLCプレートの前洗浄を行うことが有効であると示された.

2. 歪みについての考察

色素の塗布を行わず, 基本法で展開した後のLot BのTLCプレートを366 nmのUV照射下で観察した. その結果, 展開前 (図4-I) には確認されなかった波状の蛍光物質 (以下, 波状バンドとする) が, 溶媒先端付近に確認された (図4-II) . また, メタノールによる前洗浄を行ったプレートを366 nmのUV照射下で観察したところ, プレート上部の溶媒先端付近に波状バンドが確認された (図4-III) . このプレートを基本法で展開し, 366 nmのUV照射下で観察したところ, 展開溶媒による溶媒先端付近に波状バンドが確認されたが, 波状バンドの幅は狭くなった (図4-IV) . これは, 波状バンドを構成する蛍光物質の大部分が前洗浄によってプレート上部に除去されたためと考えられた.

これらの現象は今回用いたすべてのロットで確認された. したがって, 波状バンドはTLCプレート上に存在するR_f値の大きい物質が展開によって濃縮されることで生じたものであると推測された.

TLC条件の検討で用いたTLCプレートに366 nmのUVを照射した画像を図5に示した. 基本法での展開結果において, R106のスポット形状が良好であったLot A及びLot CのTLCプレートは, R106のスポットが波状バンドから離れていた (図5-①, 図5-③) . 一方, R106のスポット形状に歪みが生じたLot Bのプレートは, スポットが波状バンドに重なっていた (図5-②) . ろ紙で展開槽内を飽和した後に展開した結果及びプレコンディショニングを行

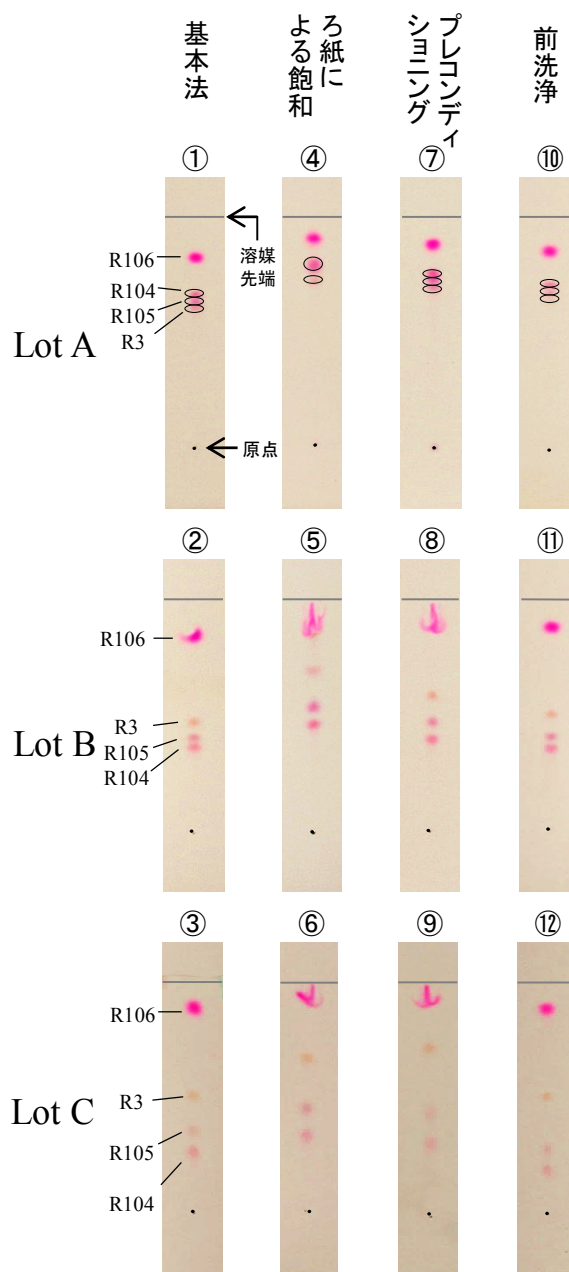


図2. TLCプレートの異なるロットと展開条件における4色素のスポット画像

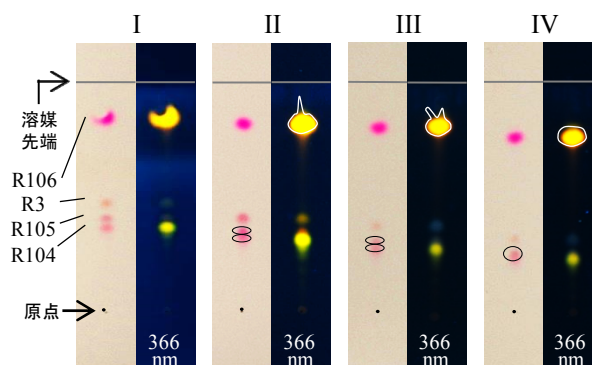


図3. 展開溶媒の組成比を変更して展開した4色素のスポット画像
MEK・MeOH・5%Na₂SO₄混液
I(1:1:1) II(4:5:5) III(3:4:4) IV(2:3:3)

った後に展開した結果において、Lot C の R106 のスポット形状に歪みが生じた場合でも、R106 のスポットの R_f 値が増加することで、スポットが波状バンドに重なっていた (図 5-④, ⑤) . これらのことから、波状バンドと R106 のスポットが重なって展開されることで、そのスポット形状に歪みが生じることが推測された.

展開溶媒の組成比を変更して展開した結果において、Lot B の R106 のスポット形状が改善されたが、これは組成比を変更することによって R_f 値が小さくなり、波状バンドがスポットと重ならなかったためと考えられた (図 5-⑥) . また、メタノールの前洗浄を行って展開した結果においても、R106 のスポット形状が改善された。これは前洗浄を行ってから展開した TLC プレートでは波状バンドの幅が狭くなり、スポットと重ならなかったためと考えられた (図 5-⑦) .

キサントゲン系色素を除く 8 種類の酸性タール色素検査において、逆相 TLC プレートを用いて、メタノール・アセトニトリル・5%硫酸ナトリウム混液 (3 : 3 : 10) の展開溶媒で展開する方法が用いられている^{1,2)}. 波状バンドの影響によるスポット形状の歪みが、キサントゲン系色素以外の色素においても発生するかを確かめるため、Lot B の TLC プレートにこれら 8 種類の酸性タール色素を塗布し、基本法を用いて上記の展開溶媒で展開した。その結果、 R_f 値の大きい Y4 のスポット形状に歪みが生じ、この場合でも溶媒先端付近の波状バンドが Y4 のスポットに重なっていた (図 6-I) . メタノールによる前洗浄を行った展開法により Y4 のスポット形状は改善され、波状バンドは Y4 のスポットと重なっていなかった (図 6-II) . このことから、波状バンドの影響によるスポット形状の歪みは、R106 に限らず、波状バンドと色素のスポットが重なって展開される場合において発生するものと考えられた.

なお、ロットの異なる 2 種類のガラス製逆相 TLC プレートを用いて基本法で展開を行ったところ、どちらも R106 のスポット形状や 4 色素の R_f 値、相互分離が Lot C と類似していた。また、どちらのプレートでも溶媒先端付近に波状バンドが確認され、ろ紙で展開槽を飽和した展開法では波状バンドが R106 のスポットと重なり、歪みが生じたが、基本法及びメタノールによる前洗浄を行った展開法では R106 のスポット形状は良好であった.

以上の結果より、波状バンドによるスポット形状の歪みに対して、展開溶媒の組成比の変更や TLC プレートの前洗浄により、展開後のスポットを波状バンドから離すことでスポット形状を改善できることが示された.

今回の事例から、着色料の試験において、スポット形状、 R_f 値や相互分離などに変化が生じた場合には、TLC プレートの前洗浄や展開する際の条件を検討する必要があると考えられた.

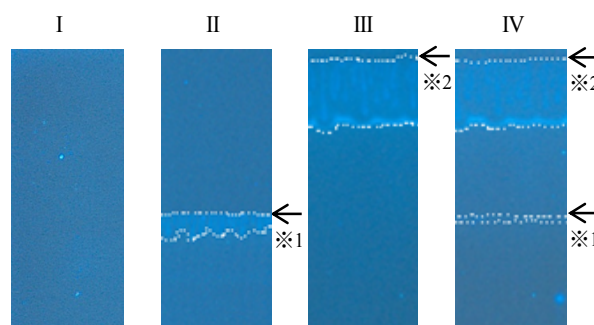


図4. 色素を塗布せずに展開を行った条件における UV (366 nm) 照射時の TLC プレート上部拡大画像 (Lot B)
 ※1 基本法による溶媒先端 ※2 前洗浄による溶媒先端
 I: 展開前 II: 基本法による展開のみ
 III: 前洗浄のみ IV: 前洗浄後、基本法による展開

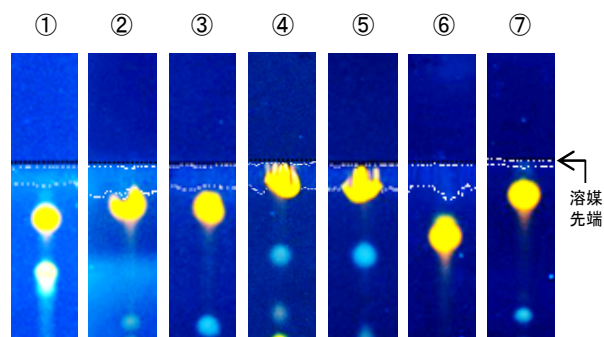


図5. TLC プレートのロット及び展開条件の違いによる UV (366 nm) 照射時の TLC プレート上部拡大画像
 ①: Lot A - 基本法, ②: Lot B - 基本法, ③: Lot C - 基本法
 ④: Lot C - ろ紙で飽和した展開法
 ⑤: Lot C - プレコンディショニングを行った展開法
 ⑥: Lot B - 展開溶媒の組成比を変更した展開法
 ⑦: Lot B - 前洗浄を行った展開法

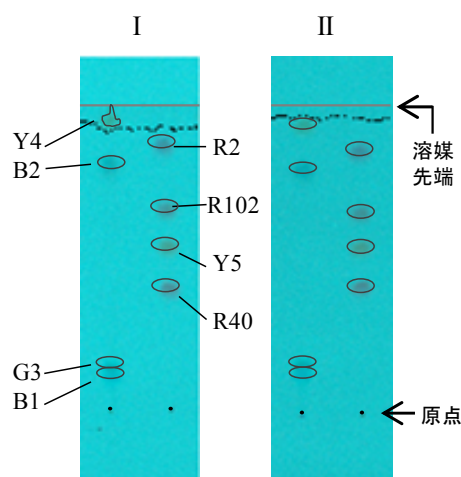


図6. メタノール・アセトニトリル・5%硫酸ナトリウム (3 : 3 : 10) で展開した TLC プレート画像 (Lot B)
 I: 基本法 II: 前洗浄を行った展開法
 Y4, B1, B2, G3 の色素混液 (各 100 μ g/mL) 及び R2, R40, R102, Y5 の色素混液 (各 100 μ g/mL) をそれぞれ 1 μ L 塗布し、約 5 cm 展開後 UV (254 nm) を照射

ま と め

市販のアルミニウム製逆相TLCプレートを用いてキサントン系色素を展開した際、ロットによってR106のスポット形状に歪みが生じる事例があった。色素の相互分離を維持しながらスポット形状を改善することを目的とし、種々の検討を行った。その結果、メタノールによるTLCプレートの前洗浄を行うことが有効であった。歪みの原因は、展開した際にTLCプレート上に存在する物質とスポットが重なって展開されることで生じると推測され、これらを離すことが重要であると考えられた。着色料の試験において、スポット形状、*R_f*値や相互分離などに変化が生じた場合には、TLCプレートの前洗浄や展開する際の条件を検討する必要があると考えられた。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015, 380-388, 2015, 金原出版, 東京.
- 2) 日本食品衛生協会：第2版 食品中の食品添加物分析法 2000, 113-131, 日本食品衛生協会, 東京.
- 3) F.ガイス著, 原 昭二, 大森竹塩, 成松一久訳：液体ロマトグラフィーの最適化, 135-138, 1980, 講談社, 東京.
- 4) R.E.カイザー著, 原 昭二監訳：高性能薄層クロマトグラフィー, 137-138, 1978, 講談社, 東京.
- 5) 京小ひと美, 小川麻萌, 貞升友紀, 他：東京都健安研 七 年 報, 65, 135-142, 2014
- 6) 鈴木郁生, 斉藤行生, 豊田正武：薄層クロマトグラフィーの実際—第2版—, 36-37, 1990, 廣川書店, 東京.
- 7) メルク株式会社：メルクTLCマニュアル, 22, メルク株式会社, 東京

Improvement of the Spot Shape of Food Dyes in Thin-Layer Chromatography

Hitoshi AOKI^a, Takushi FUJIWARA^a, Yukiko YAMAJIMA^a, Hitomi KYOKO^a,
Asamoe OGAWA^a, Yoko UEMATSU^a and Kimio MONMA^a

A distorted spot of acid red (R106) was observed in thin layer chromatography, slightly below the solvent front line, by developing with a mixture of methyl ethyl ketone, methanol, and 5% aqueous sodium sulfate (1:1:1) on ready-to-use aluminum sheet coated with octadecylsilanized silica gel. Among three batches of plate, the phenomenon was observed on the plates belonging to a particular batch. The spot shapes of erythrosine (R3), phloxine (R104), and rose bengal (R105), which were developed under the same conditions, and exhibited lower R_f values than R106, were not distorted. By pre-developing the plate with methanol, the phenomenon was eliminated.

Under a UV light, a band was observed on the developed plate, slightly below the solvent front line, overlapping with the spot of R106. The band was assumed to be formed with the concentrate of some fluorescent material previously existing on the plate, which may have been developed simultaneously with R106, and distorted the spot shape.

Keywords: thin-layer chromatography, TLC plate, food dye, spot

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