

赤色102号を使用したシロップから付随色素を検出した事例について

貞升 友紀^a, 京小 ひと美^a, 坂牧 成恵^a, 加藤 妙子^b, 門間 公夫^a

パキスタン産フルーツミックスシロップから原材料表示に記載のあった赤色102号以外に4種類の赤色色素を検出した。薄層クロマトグラフィー及びHPLCを用いて分析した結果、これらの赤色色素はファストレッドE、赤色40号、赤色2号及びボンソー6Rであることがわかった。ファストレッドE、赤色2号及びボンソー6Rは赤色102号の付随色素として知られている一方、添加された可能性も考えられた。そこで、HPLCにより定量値を求めたところ、赤色102号に対するファストレッドE、赤色2号及びボンソー6Rの比率はいずれも1%未満と少ない上、3種類が同時に検出されていることから、赤色102号の付随色素であることが推測された。一方、赤色40号については、赤色102号の付随色素としての報告もなく、化学構造からも生成されることは考えにくいと、キャリアオーバーか、もしくは添加された可能性が高いと推測された。

キーワード: 赤色102号, 赤色2号, ボンソー6R, ファストレッドE, 付随色素, 薄層クロマトグラフ, HPLC

はじめに

我が国では食品に使用できる合成着色料として12種の酸性タール色素が許可されている¹⁾。その成分規格は第8版食品添加物公定書(添加物公定書)²⁾に記載されており、いずれの着色料も原料由来の付随色素について規格試験が設けられている。しかし、食用赤色40号(R40)及び食用黄色5号(Y5)以外の着色料についてはペーパークロマトグラフィーによる定性試験法で規格値は明記されていない。また、第8版食品添加物公定書解説書³⁾で解説されているようにFAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)規格でも付随色素についての規格試験が設けられている着色料は多いが、限度値については主色素の1~6%と着色料によって異なっている。したがって、規格試験の適合範囲内であっても付随色素を多く含んでいる着色料製剤を多量に使用した場合、食品から付随色素が検出される可能性がある。

今回、赤色102号(R102)の使用表示があったパキスタン産シロップからR102以外に3種類の付随色素及び表示のないR40を検出した事例について報告する。

実験方法

1. 試料

平成27年6月に東京都内で収去されたパキスタン産フルーツミックスシロップ(原材料表示にR102の記載があったもの)

2. 試薬

1) 標準品

赤色2号(R2), 赤色3号(R3), R40, R102, 赤色104号(R104), 赤色105号(R105), 赤色106号

(R106), Y5及びボンソー6R(P6R, C.I.No. 16290)は国立医薬品食品衛生研究所標準品, ファストレッドE(FRE, C.I.No.16045)は東京化成工業(株)製を用いた。

2) ポリアミド

和光純薬工業(株)製カラムクロマトグラフィー用C-100を用いた。

アセトニトリル及びメタノールは高速液体クロマトグラフ用, その他の試薬は特級品を用いた。

3. 標準溶液及び混合標準溶液

標準品10 mgを正確に量り, 水を加え正確に10 mLとしたものを標準溶液(1,000 µg/mL)とした。また, R2, R102, Y5及びR106の標準溶液を各1 mLずつ取って混合したものを混合標準溶液1(0.025%, st1), R3, R104, R105及びR106の標準溶液を各1 mLずつ取って混合したものを混合標準溶液2(0.025%, st2)とした。

4. 装置

フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフ: 1200システム(Agilent Technologies 社製)

5. 測定条件⁴⁾

1) 薄層クロマトグラフ(TLC)条件

(条件1) 展開槽: CAMAG社製二層式展開槽(D5.5×W13×H10 cm), 薄層板: MERCK社製TLCアルミニウムシートRP-18F₂₅₄S(20×20 cm)を10×10 cmに切断したもの, 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)

(条件2) 展開槽: D5.5×W13×H10 cm, 薄層板: MERCK社製TLCアルミニウムシートシリカゲル60F₂₅₄

^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

^b 当時: 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

(20×20 cm) を10×10 cmに切断したもの、展開溶媒：
酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア水 (10 : 3 : 3)
スポット量はいずれの条件でも標準溶液及び混合標準溶
液約0.5 μ L, TLC用試験溶液1 μ Lとした。

2) HPLC条件

カラム：COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (5 μ m, 4.6 mm i.d.
×250 mm, ナカライテスク(株)製), 移動相：A ; 0.5%
酢酸アンモニウム含有メタノール・アセトニトリル・水 (3
: 3 : 4) 混液, B液 ; 0.5%酢酸アンモニウム溶液, A液10
→100→100% (0→30→40分) のグラジエント溶出, 流
速：1.0 mL/min, カラム温度：40°C, 注入量：10 μ L,
検出器：PDA, 検出波長：400~700 nm (定量は520 nm)

6. 試験溶液の調製

第2版食品中の食品添加物分析法⁴⁾に準じ, 試料10 mL
(12.5 g) を採取し, ポリアミドを用いて精製した。精製
後, 50%エタノール1 mLに溶解し, TLC用試験溶液とし
た。また, HPLC条件に示した移動相A液及びB液の1 : 1
混液でTLC用試験溶液を適宜希釈した溶液をHPLC用試験
溶液とした。(Fig. 1)

結果及び考察

1. TLC

条件1及び2で展開したところ, 条件1では5種類の赤色
スポットを確認した。条件2では3種類の赤色スポットを
確認し, うち1つは大きな雫状のスポットで, 単独のスポ
ットであるのか複数のスポットが重なったものであるのか
判別が不可能であった (Fig.2) 。そこで, TLC用試験溶

Sample 10 mL

Add 50 mL of water
Mix
Adjust to pH4 with 10% acetic acid solution

Polyamide column

Wash with 25 mL of acetic acid solution (1→100)
Wash with 20 mL of water
Elute with 40 mL of 2% ammonium·ethanol solution

Eluate

Neutralize with 10% acetic acid solution
Dry on water bath (80°C)

Residue

Dissolved with 50% ethanol

TLC or HPLC

Fig. 1. Analytical Method of Coloring Agents in Syrup

液25 μ Lを帯状に塗布し, 条件1を用いて展開後 (Fig.3) ,
色素分画ごとに切り取って2%アンモニア・エタノール溶
液で抽出し, 5種類の色素抽出液を得た。これらを条件1
で展開したところ, 各標準溶液とR値が一致した。また,
各色素抽出液を塗布した上に推測された標準溶液を重ねて
塗布し, 条件1で展開したところ, 色素抽出液と標準溶液
のスポットは分離しなかった。以上の結果から, もっとも
濃いスポットは試料に表示のあったR102, その他のスポ
ットはTLCの原点に近い方から順にFRE, R40, R2,
P6Rと推測された。

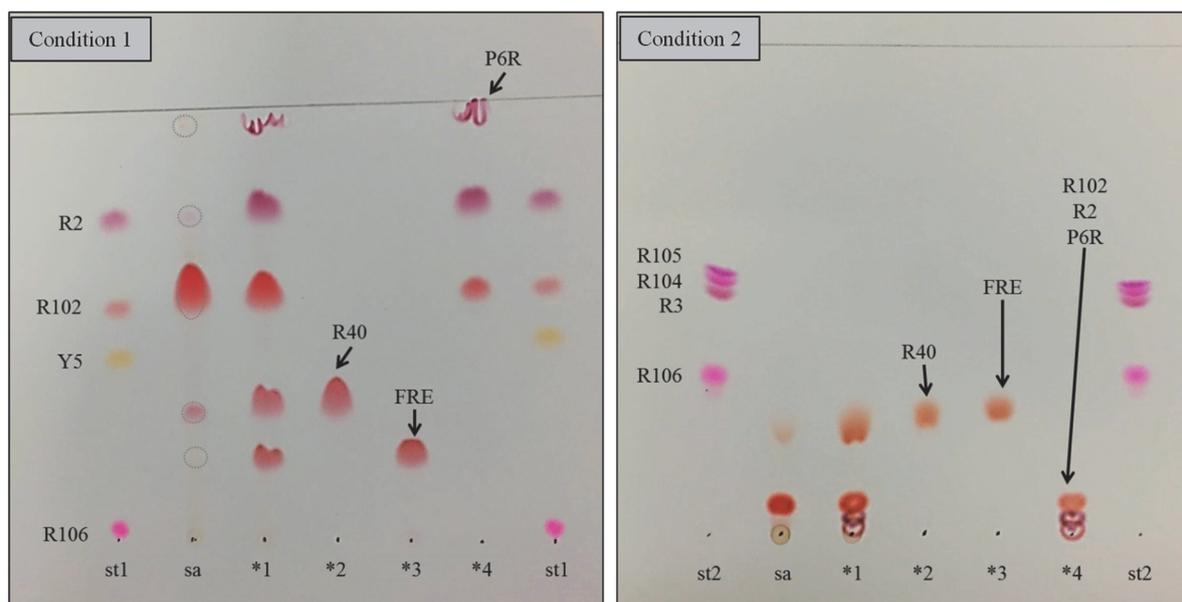


Fig. 2. TLC Chromatograms of Syrup

st1: mixed standard solution of R2, R102, Y5 and R106

st2: mixed standard solution of R105, R104, R3 and R106

sa : sample solution *1 : sample solution and 5 red mix standard solutions (P6R, R2, R102, R40 and FRE) were applied

*2 : standard solution of R40 *3 : standard solution of FRE *4 : mixed standard solution of P6R, R2 and R102

Condition 1 : TLC plate ; RP-18F_{254S} (MERCK, aluminium sheet), developing solvent ; CH₃OH-CH₃CN-5%Na₂SO₄ solution (3:3:10)

Condition 2 : TLC plate ; silicagel60F₂₅₄ (MERCK, aluminium sheet), developing solvent ; CH₃COOC₂H₅-CH₃OH-28%NH₄OH (10:3:3)

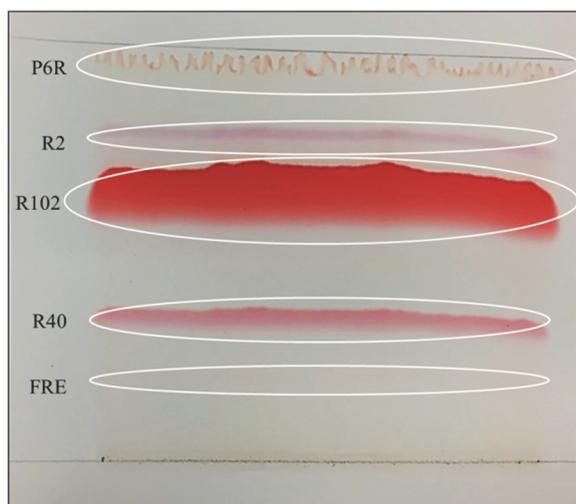


Fig. 3. TLC Chromatogram of Syrup

Sample solution for TLC was applied in strip form and developed using condition 1 (the same condition as in Fig.2)

2. HPLC

HPLC用試験溶液について分析を行ったところ、5種類のピークを検出し、いずれも各標準溶液と保持時間が一致した (Fig.4)。また、各ピークのPDAスペクトルも各標準溶液と一致することを確認し、それぞれR102, FRE, R40, R2及びP6Rと確定した。その化学構造式をFig.5に示した。表示のないFRE, R2及びP6Rについては第8版食品添加物公定書解説書³⁾でR102の付随色素として列挙されている。一方で衛生試験法・注解1965⁵⁾には、FREはイギリス, イタリア, デンマーク等, P6Rはデンマーク, 西ドイツ等で食品への使用を許可しているとの記載があり, R2は現在日本, パキスタン, EU等世界各国で食品への使

用を許可している⁶⁾。よって、今回のシロップから検出された3色素がR102の付随色素なのか、添加された着色料なのかにより、行政的な判断が異なると考えた。そこで、各標準溶液を適宜希釈してそれぞれ検量線を作成し、各色素の定量値を求めた (Table 1)。その結果、表示のあったR102は0.29 g/kg検出したが、この定量値はこれまで報告されている食品中R102の定量値^{7,8)}と比較すると非常に高い値であった。FRE, R2及びP6Rについては、いずれも0.005 g/kg未満と非常に少ない量であった。添加物公定書によれば、R102について「他の色素」の項⁹⁾に、1,000 µg/mL溶液を2 µL塗布後、示された条件でペーパークロマトグラフィーを行った時、一つのスポット以外のスポットを認めないと記載されている。そこで、TLC用試験溶液をR102として1,000 µg/mL相当になるよう希釈し上記の条件⁹⁾で分析したところ、R102以外のスポットは認められなかった。この規格試験について第8版食品添加物公定書解説書³⁾では試験品中に3%以上の付随色素が混在していた場合検出することができるとの注釈が記載されている。また、JECFA規格ではR102の付随色素についてPC法で1%以下との限度値¹⁰⁾が設けられている。HPLCによる定量値を用いて、本試料中から検出されたR102に対する各色素の比率を求めると、いずれの色素も1%未満であり、添加物公定書及びJECFA規格ともに適合していた。さらに、単独ではなく3種類が同時に検出されたことから、これらは添加されたものではなくR102の付随色素であると推測された。

一方、0.006 g/kg検出されたR40については、R102の付随色素としての報告もなく、化学構造からも生成されることは考えにくいとため、キャリアオーバーか、もしくは添加

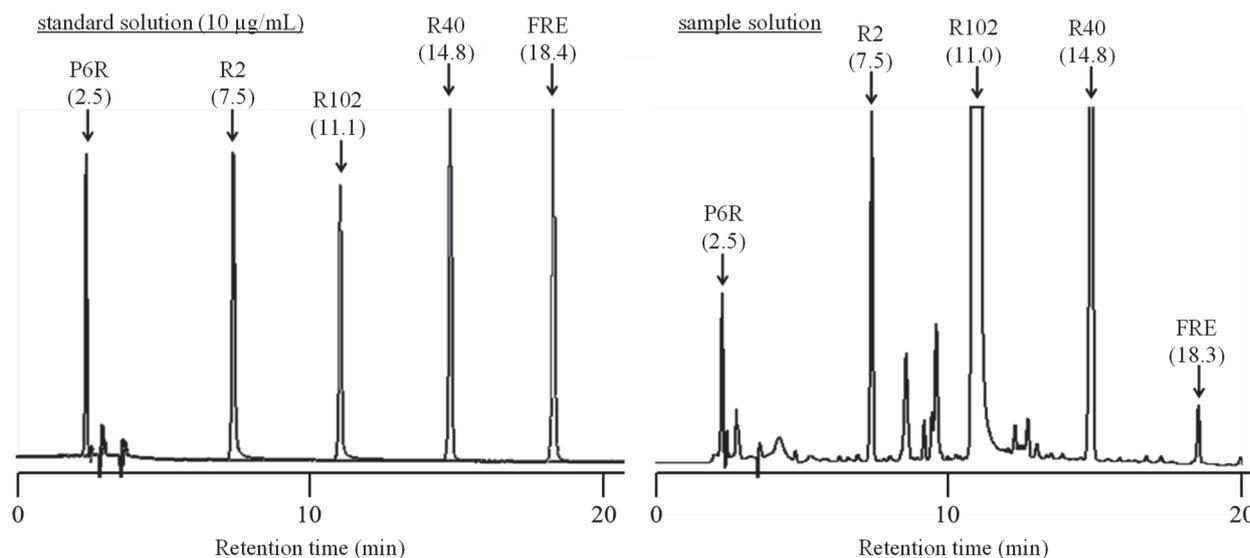


Fig. 4. HPLC Chromatograms of Syrup

HPLC condition : column ; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (4.6 mm i.d. × 250 mm),
mobile phase ; (A) CH₃CN-CH₃OH-water containing 0.5%CH₃COONH₄, (B) 0.5%CH₃COONH₄,

A:B(10:90)→30min→(100:0) keep for 10min

flow rate ; 1.0 mL/min, column temp. ; 40°C, injection vol. ; 10 µL, PDA detector ; 400~700 nm (520 nm at the time of quantification)
() : retention time (min)

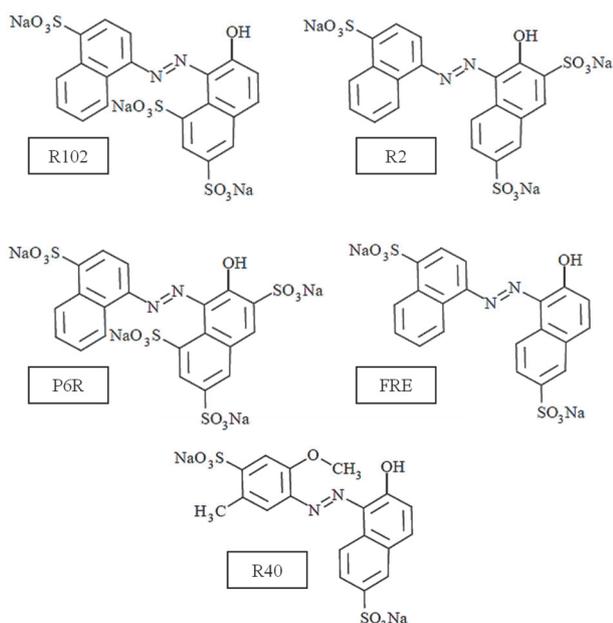


Fig. 5. Chemical Structures of 5 Red Colorants Detected From Syrup

された可能性が高いと推測された。よって、本試料はR40の表示違反疑いと報告を行った。

ま と め

パキスタン産フルーツミックスシロップから原材料表示に記載のあったR102以外に4種類の赤色色素を検出した。TLC及びHPLCの分析結果からこれらの赤色色素はFRE, R40, R2及びP6Rであることが分かった。FRE, R2及びP6RについてはR102の付随色素であるか、または添加されたものかにより、行政判断が異なるため、HPLCにより定量値を求めた。その結果、R102に対するFRE, R2及びP6Rの比率はいずれも1%未満で、なおかつ3種類が同時に検出されていることから、R102の付随色素であることが推測された。一方、R40については添加されたものと推測された。

今回の試料は液体で操作上のロスが少ないこと、R102の付随色素に関する資料が豊富で入手できたことなどから、付随色素であると判定することができた。今後もこのような事例についてのデータを蓄積し、日常検査に生かしていくことが必要であると考え。

(本研究の概要は、第53回全国衛生化学技術協議会年会、2016年11月、において発表した。)

Table 1. Quantitative Values of Each Color in Syrup by HPLC and Ratio of Each Color to R102

	Quantitative value (g/kg)	Ratio of each color to R102 (%)
R102	0.29	—
R2	0.002	0.6
P6R	0.001	0.3
FRE	0.0004	0.1
R40	0.006	—

文 献

- 厚生労働省監修：食品衛生小六法 平成29年版，144，2016，新日本法規，東京。
- 厚生労働省：第8版食品添加物公定書，410-434，2007，日本食品添加物協会，東京。
- 谷村顕雄：第8版食品添加物公定書解説書，D857-D866，2007，廣川書店，東京。
- 日本食品衛生協会編：第2版食品中の食品添加物分析法2000，113-118，2000，日本食品衛生協会，東京。
- 日本薬学会編：衛生試験法・注解1965，242-243，1965，金原出版，東京。
- 日本薬学会編：衛生試験法・注解2010，371-372，2010，金原出版，東京。
- 西島基弘，上村 尚，冠 政光，他：食衛誌，18(5)，463-469，1977。
- 小嶋健博，吉岡加奈子，二宮美佳，他：分析化学 51(4)，281-285，2002。
- 厚生労働省：第8版食品添加物公定書，418，2007，日本食品添加物協会，東京。
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food additives：FAO JECFA Monographs 1, Combined Compendium of food additive specifications Volume 3, 109-110, 2006, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Study of Subsidiary Colors Detected in Syrup Used Red No. 102Yuki SADAMASU^a, Hitomi KYOKO^a, Narue SAKAMAKI^a, Taeko KATO^b and Kimio MONMA^a

Four types of red pigment in addition to Red No. 102 (New Coccine) which was listed in the ingredients were detected in fruit syrup produced in Pakistan. Analysis by thin-layer chromatography and HPLC revealed that these red pigments are Fast Red E, Red No. 40 (Allura Red AC), Red No. 2 (Amaranth), and Ponceau 6 R. Fast Red E, Red No. 2, and Ponceau 6 R are known as subsidiary colors of Red No. 102, but it was also considered possible that these had been added to the syrup. When the quantitative values of these subsidiary colors were determined by HPLC, the ratio of Fast Red E, Red No. 2, and Ponceau 6 R to Red No. 102 were less than 1%. Fast Red E, Red No. 2, and Ponceau 6 R were detected at the same time; these were presumed to be subsidiary colors of Red No. 102. On the other hand, Red No. 40 was not reported as a subsidiary color of Red No. 102, and it was thought unlikely that it was generated even though its chemical structure was considered, so it was speculated that there is a high possibility of carry-over or addition.

Keywords: New Coccine, Amaranth, Ponceau 6R, Fast Red E, subsidiary color, thin-layer chromatograph, HPLC

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

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

