

## 食品中着色料検査におけるTLC分析の検出限界と分離条件の検討

見上 葉子<sup>a,b</sup>, 鈴木 理央<sup>c</sup>, 高木 優子<sup>c</sup>, 坂牧 成恵<sup>c</sup>, 小林 千種<sup>c</sup>

食品中の着色料は、主にTLCを用いた定性検査が行われているが、各個人や色素の種類、使用するTLC固定相により検出できる濃度は異なる。今回、12種類の酸性タール色素及び指定外色素5種類についてTLC分析における検出限界を調べるため目視評価による検討を行った。各色素の0.1-50 µg/mL水溶液を調製し、それぞれについて連続した4濃度を選び、RP-18及びシリカゲルアルミプレートをを用いて展開した。肉眼でスポットを確認できた最小濃度を各個人の検出限界値とし、検査員35人で確認を行った結果、固定相の種類、色素の種類、検査員による差で検出限界値は10倍以上の開きがあることが示された。また、既知のシリカゲルプレートの展開条件では、食用赤色2号と食用黄色4号、食用赤色102号と食用緑色3号の分離が十分ではなく、複数の着色料が使用されている食品の検査では判定が困難となる。これらの4種類の色素を分離するTLC条件を検討し、1-ブタノール・エタノール・3%酢酸（7:2:4）などの条件で、良好な分離を得られた。同時に、指定外添加物であるボンソー6Rについても分離可能な条件を検討し、シリカゲルプレートにおいて、酢酸エチル・アセトニトリル・メタノール・28%アンモニア（4:2:1:2）で良好な分離が得られた。

**キーワード：**酸性タール色素，薄層クロマトグラフィ（TLC），食品

### はじめに

我が国で食品への使用が許可されている添加物のなかには、12種類の酸性タール色素がある。これらの着色料には使用基準値が設定されておらず、主として薄層クロマトグラフィ（TLC）を用いた定性検査が行われている。TLCでの判定は基本的に人の目で行われているが、検査員の各個人や着色料の種類、TLC固定相の種類によっても定性確認できる濃度は異なることが知られている。しかし、具体的な検出限界やその差異の程度は明らかになっていない。そこで今回、12種類の酸性タール色素及び検疫所での検出事例の多い指定外色素5種類を対象に、TLC分析における検出限界の目視評価を行った。

また、第2版食品中の食品添加物分析法<sup>1)</sup>に記載されているシリカゲルプレートのTLC条件（2版法）では、食用赤色2号（R2）と食用黄色4号（Y4）、食用赤色102号（R102）と食用緑色3号（G3）の相互分離が十分ではなく、複数の着色料が使用されている食品の検査では判定が困難となる。本検討ではこれらの4種類の着色料を分離するTLC条件について、複数色使用されている食品及び添加した食品を用いて検証を行った。同時に指定外添加物であるボンソー6R（P6R, C.I. No. 16290）についても分離可能な条件を検討したので合わせて報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

市販の福神漬け、こしあん、マカロン、シロップ、梅肉

ペースト、たらこ、大福、ソーセージ、チョコチップ、スプレーチョコを使用した。試料の一覧及び各試料に使用されていた色素の内訳を表1に示した。

#### 2. 標準品及び試薬等

##### 1) 標準品

酸性タール色素12種類（R2，食用赤色3号（R3），食用赤色40号（R40），R102，食用赤色104号（R104），食用赤色105号（R105），食用赤色106号（R106），Y4，食用黄色5号（Y5），食用青色1号（B1），食用青色2号（B2），G3）は一般社団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団製を、P6R，ファストレッドE（FRE, C.I. No. 16045），アズルビン（AZB, C.I. No. 14720），パテントブルーV（PBV, C.I. No. 42051）は株式会社東京化成製，キノリンイエロー（QY, C.I. No. 47005）はCHROMA製を用いた。

##### 2) 標準溶液

標準品をそれぞれ10 mgずつ正確に量り、水に溶解して10 mL（1,000 µg/mL標準原液）とした。これを水で段階的に0.1, 0.5, 1, 5, 25, 50 µg/mLとなるよう希釈し、各色の標準色素溶液を調製した。

##### 3) その他の試薬

メタノール，アセトニトリルはHPLC用，酢酸エチル，1-ブタノール，酢酸，アンモニアは市販の特級品を，エタノールは日本薬局方の無水エタノールをそれぞれ使用した。

<sup>a</sup> 現所属：東京都健康安全研究センター広域監視部食品監視第二課 190-0023 東京都立川市柴崎町2-21-19 東京都立川福祉保健庁舎4階  
<sup>b</sup> 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 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1  
<sup>c</sup> 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

表1. 着色料使用試料及び添加試料

着色料使用試料		添加試料	
食品名	使用着色料	食品名	使用着色料
i 福神漬け	R102, R106, Y4, Y5	a こしあん	不使用
ii こしあん	R2, R3, R105, Y4	b たらこ	不使用
iii マカロン	R102, Y4, Y5	c 大福	不使用
iv シロップ	R102, Y4, Y5	d ソーセージ	不使用
v 梅肉ペースト	R102, Y4	e スプレーチョコ	R3, Y4, Y5, B1
		f チョコチップ	不使用
		g シロップ	R2, R102

#### 4) TLCプレート

TLC Silica gel 60 RP-18 F<sub>254S</sub> アルミプレート (RP-18) 及びTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> アルミプレート (シリカ) は Merck社のものを使用した。プレートはいずれも10 cm×10 cmに切って使用した。

#### 3. 検出限界の評価

作成した標準色素溶液から、色素ごとに連続した4濃度を選び、左側から順に濃い濃度になるように、各1 µLをRP-18, シリカに塗布し、RP-18はA液 (メタノール・アセトニトリル・5%硫酸ナトリウム (3:3:10))、シリカはB液 (酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア (10:3:3)) を用いて5 cm以上展開した。乾燥後直ちに遮光し、検査まで保管した。薄い濃度から順に観察し、肉眼でスポットを確認できた最小濃度を各個人の検出限界値とした。最大濃度で確認できなかったものはNDとした。これらの作業を色素ごとに繰り返し行い、また、TLCの確認は35人の検査員で行った。同時に、透明なバイアル瓶 (直径11 mm, 高さ24 mm) に入れた標準色素溶液について、各色素ごとに濃度の薄い順に色を確認し、無色の水と比較して色がついていると識別できる濃度 (認知閾値) の評価を行った。

#### 4. シリカプレートにおけるTLC分離条件

酢酸エチル, アセトニトリル, メタノール, 1-ブタノール, 28%アンモニア, 酢酸, 水から3-4種類を選び、比率を変えながら組み合わせ、シリカプレート上で、標準色素溶液を展開した。分離が良好な条件を用い、表1に示す着色料を使用した試料及び添加した模擬試料について試料液を展開した。

#### 5. 試料液調製方法

各試料について、衛生試験法・注解2020<sup>2)</sup> に準じ、毛糸染色法で精製を行った。すなわち福神漬け, こしあん, マカロン, シロップ, 梅肉ペースト, チョコレートは試料10 gを量りとり、水50 mLを加え80°Cで1時間加熱し、脱脂綿

でろ過したものを色素抽出液とした。たらこは50%エタノールに2時間程度浸漬し、ろ過後、ろ液を加熱しエタノールを除去した。残液に水を加え約50 mLとしたものを色素抽出液とした。大福及びソーセージは試料10 gに28%アンモニア水を30 mL加え1分間ホモジナイズした。そこに無水エタノールを30 mL加えさらに1分間ホモジナイズした。3,000 rpmで10分間遠心し、上清を脱脂綿でろ過した。同様の操作を繰り返し、得られたろ液を合わせ、水浴中で加熱しエタノール及びアンモニアを除去した。残液に水を加え、約50 mLとしたものを色素抽出液とした。各色素抽出液に10%酢酸を加え、pH3-4に調整した。これに脱脂した5 cm長の毛糸5本を加え、80°Cで1時間加熱し色素を吸着させた。着色した毛糸を中性洗剤を用いて水洗後、2%アンモニア水・エタノール (1:1) 20 mLを加え、沸騰水浴中で10分間加熱し色素を溶出した。毛糸を取り除き、溶出液を乾固させ、残留物に50%エタノールを250 µL加えて溶かし、試料液とした。

添加試料はシロップ以外の試料10 gにR2, R102, Y4, G3の1,000 µg/mL溶液を各100 µL, シロップにはP6Rの1,000 µg/mL溶液を50 µL添加し、同様に抽出・精製し、試料液を調製した。スプレーチョコにはY4が含まれていたため、R2, R102, G3を添加した。これらの試料液をTLCに供し、分離条件の検討を行った。添加試料には、高タンパク質含有食品や高でんぷん質食品等の夾雑物質が多く、一般的にTLCの分離が悪い傾向にある食品を用いた。

### 結果及び考察

#### 1. 酸性タール色素の検出限界について

各色素における検出限界値の分布を図1に、検査員の属性等を表2に示した。R40, B1, Y5, FRE, AZBではシリカとRP-18のTLC間に差があり、すべてシリカよりRP-18において検出限界値が低かった。また、色素による差も大きく、目視で確認できる濃度が10倍以上異なる場合もあった。最も高濃度だったのは、RP-18ではY4とQY, シリカではY4, Y5, QY, P6Rでいずれも25 µg/mLであった。最も低濃度だったのはRP-18ではB1で1 µg/mL, シリカではR104で

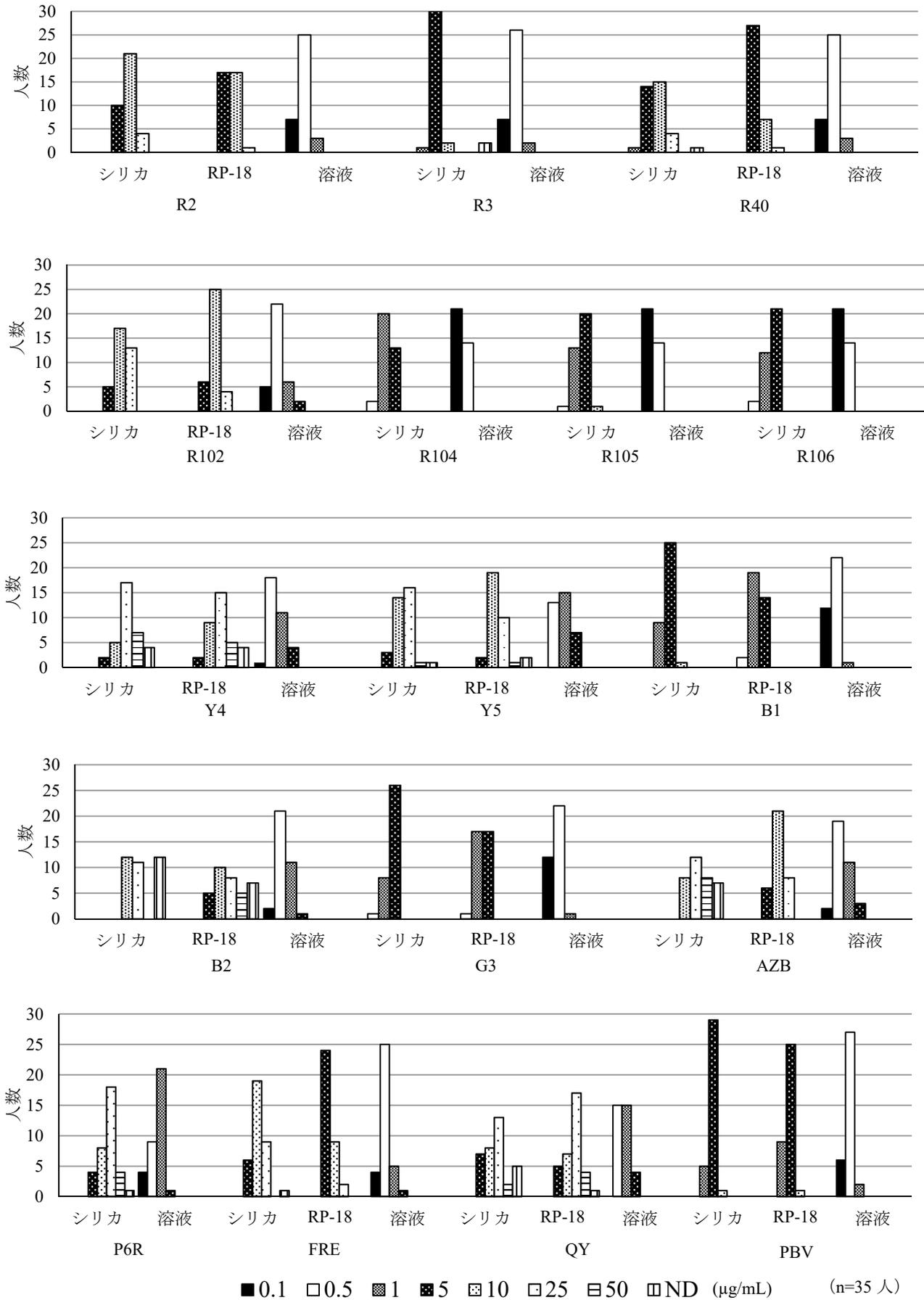


図1. 各色素における TLC 検出限界値の分布

表2. 検査員の属性

	回答	人数
着色料検査経験	有	23
	無	11
	その他・無回答	1
年齢	20代	10
	30代	8
	40代	3
	50代	8
	60以上	5
	その他・無回答	1

1 µg/mLだった。両プレートでY4, QYは検出限界値が高く、B1, G3は低濃度でも検出でき、黄色系の確認が困難、青色系が確認しやすい傾向であった。またR3, R104, R105, R106についてはRP-18のA液では展開できないため、シリカのみでの確認としたがその検出限界値は低い値となった。一方、B2では個人差が大きく、シリカでは10 µg/mLとNDが同数、RP-18でも5-50 µg/mLあるいはNDと結果が分散し、各濃度間の人数差は5人以内だった。シリカプレートの結果は清宮ら<sup>3)</sup>の結果とほぼ同様となった。検出限界について清宮らは検査員全員が肉眼で確認できる値としており、本検討での定義と異なることから、一部結果に差異が生じたと考えられた。また着色料検査経験の有無で比較した場合、RP-18ではR40, Y4, Y5, B1, B2で、

シリカではR102, R104, Y5, B2において、着色料検査経験のある検査員の検出限界値が、経験のない検査員より低い値となった。着色料のTLC検査では経験を積むことで、検出限界値を下げることができ、検査トレーニングが有用であると考えられた。本研究では検査員の属性に偏りがあり、十分な人数の回答が得られなかったため、世代による差等は確認できなかった。

以上、TLC検査では、TLC固定相、色素の色調、検査員による差異があることが示されたため、着色料の定性検査においては、複数種のTLCプレートの組み合わせ、塗布量の調整や複数人での確認などが必要であることが示唆された。また、標準溶液ではすべての色素で0.1-1 µg/mLの範囲に認知閾値があった。標準溶液とTLCスポットでは、含まれる色素の絶対量が異なり、単純に比較することは難しいが、この値はプレート上での検出限界値よりいずれも低い値であった。試料液が着色しているがTLCで確認できない場合には塗布量を増やす等の工夫が必要であると考えられた。

## 2. TLCの展開条件について

色素標準溶液を用いて、シリカにおけるR2とY4及び、R102とG3の分離条件を検討したところ、表3に示す条件①~③で良好な分離が得られた(図2)。各展開条件によるRf値を表4に示した。2版法(酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア=3:1:1で15 cm以上展開)及びそれに近い

表3. シリカプレートにおける展開条件

No.	溶媒	組成
①	1-ブタノール・酢酸・水	8:2:4
②	1-ブタノール・エタノール・3%酢酸	7:2:4
③	1-ブタノール・アセトニトリル・3%酢酸	6:2:2
④	酢酸エチル・アセトニトリル・メタノール・28%アンモニア	4:2:1:2

表4. シリカプレートにおける各展開条件でのRf値

条件	G3	R102	R2	Y4	SaR	P6R
2版法	0.16	0.16	0.09	0.09	-	-
B液	0.07	0.09	0.06	0.03	0.04	0.01
①	0.36	0.27	0.16	0.12	-	-
②	0.39	0.36	0.31	0.21	-	-
③	0.52	0.39	0.44	0.36	-	-
④	-	0.27	0.22	-	0.25	0.08

2版法: 酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア=3:1:1を用い、15 cm以上展開

B液: 酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア(10:3:3)を用い、5 cm以上展開

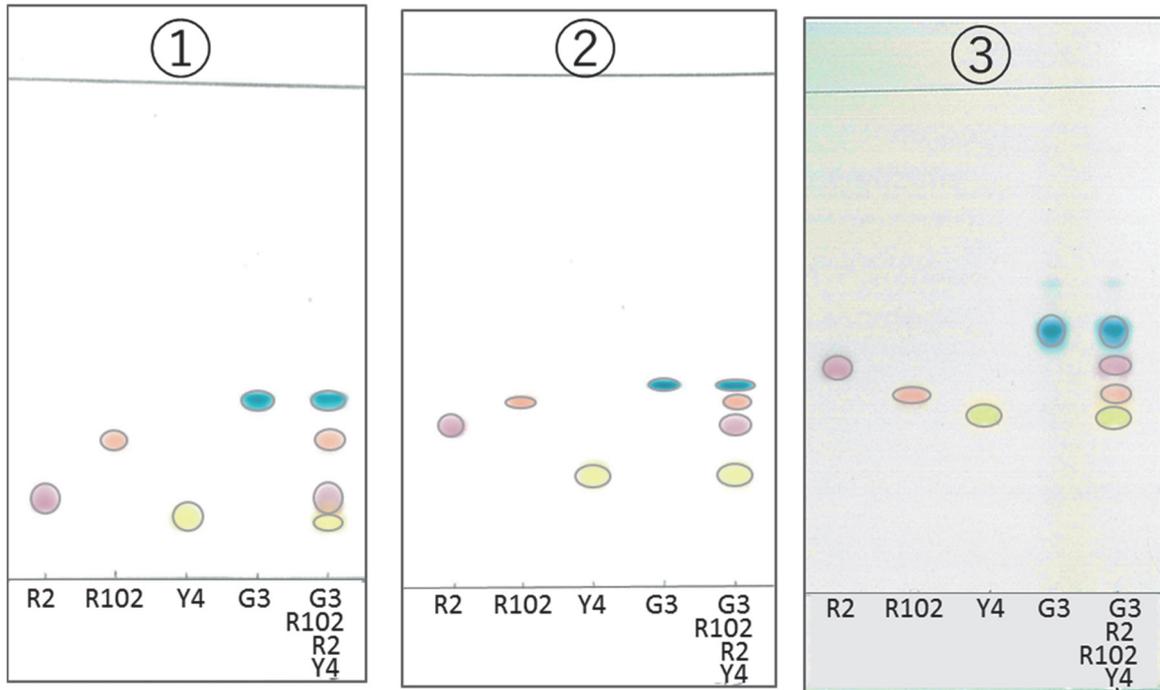


図2. 条件①～③における標準溶液のTLCクロマトグラム

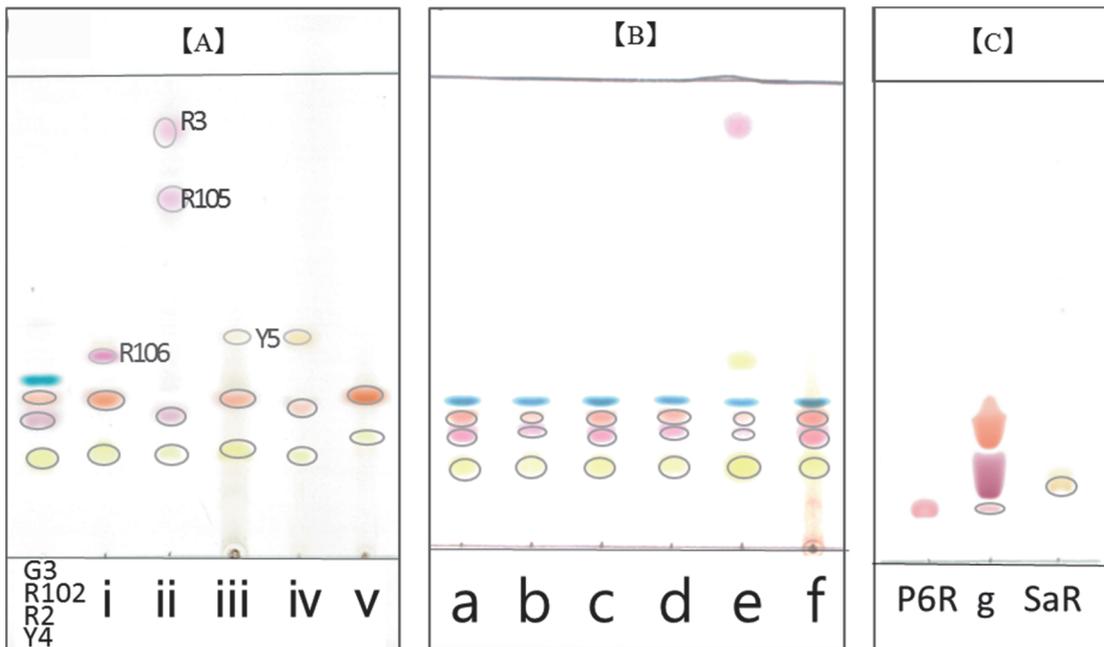


図3. 各種試料のシリカプレートによるTLCクロマトグラム

【A】条件②, 着色料使用試料 【B】条件②, 添加試料 【C】条件④, 添加試料

条件であるB液ではR2とY4, R102とG3がほぼ重なってしまうが, 条件①～③ではいずれも4色をそれぞれ分離できた. 特に①ではR102とG3の分離が, ②はR2とY4の分離が良好であったため, 目的の色素に合わせて展開条件を選ぶことも有効だと考えられた. 条件③は4色ともほぼ等間隔に分離されたが, 条件①及び②と比較するとスポットのまとまりがやや悪かった. また, 条件③ではR2とR102のス

ポット位置が他の条件と逆の順になるので, 注意が必要である. これらの着色料を複数使用した, 菓子, 漬物, シロップ等をTLC分析したところ, いずれも良好な分離が得られ, 正確に定性を行うことができた. ここでは4色素をほぼ均等に分離できた②での結果を示した. また, たらこ, チョコレート等に添加した場合でも良好な分離を得られた(図3 A, B).

一方、P6RはR2もしくはR102の副成色素としてこれらを含む食品から検出されることがある。しかし、A液、B液及び水100%でのTLC展開条件で、RP-18では溶媒先端に、シリカでは原点付近に留まり、さらに、Y5の副成色素であるスルファニル酸アゾR塩 (SaR) も同様の挙動を示すため、R2あるいはR102とY5を含むような試料では、しばしば定性検査が困難となる。そこでシリカにおける分離条件を検討したところ、表3に示した展開条件④で良好な分離が得られた (図3 C)。条件④でのP6RとSaRのRf値を表4に示した。P6Rが検出されうるR2及びR102を多量に含むシロップにP6Rを添加したところ、④で良好な分離が得られた。P6Rは指定外添加物でもあるため、慎重に定性検査を行う必要があるが、この条件を用いることで、食品由来の色素等との分離及び判別が可能となれば、HPLCやLC-MS等の機器分析に供する検体の低減の一助となると考えられた。

### ま と め

本研究により、着色料検査でのTLC分析における検出限界及びその特性が示された。また、シリカゲルプレートでの展開条件を改良し、R2とY4、R102とG3が分離できた。短い展開距離でも良好な分離が得られるためTLCの節約及び検査時間の短縮にもつながる。これらにより、検査の信頼性の向上及び検査の効率化に寄与した。

### 文 献

- 1) 社団法人日本食品衛生協会：第2版食品中の食品添加物分析法2000, 113-131, 壮光舎印刷, 東京.
- 2) 公益社団法人日本薬学会編：衛生試験法・注解 2020, 403-413, 2020, 金原出版, 東京.
- 3) 清宮康子, 山口玲子：千葉市環境保健研究所年報, 21, 70-72, 201

**Investigation of the Detection Limit and Isolation Conditions of Coal Tar Dyes in Foods Using TLC**Yoko MIKAMI<sup>a</sup>, Rio SUZUKI<sup>a</sup>, Yuko TAKAGI<sup>a</sup>, Narue SAKAMAKI<sup>a</sup> and Chigusa KOBAYASHI<sup>a</sup>

We generally visually detect food coloring with thin layer chromatography (TLC) as a qualitative test; however, the lowest concentrations of colorings vary according to the individual, coloring, and TLC plate type. In this study, we investigated the lowest limit concentration of 17 coal tar dyes as TLC permitted or non-permitted dye via visual evaluations. We spotted and developed four contiguous concentration solutions from 0.1 to 50 µg/mL aqueous solutions of these dyes on silica gel and RP-18 TLC plates. Then, 35 inspectors detected and judged the lowest visible (as dye spots) concentration level for each dye. The results showed the contrasts between the two types of TLC plates, dyes, and inspectors, with a concentration difference greater than 10.

In addition, the existing silica gel plate condition did not divide Food Red 2, Food Red 102, Food Yellow 4, and Food Green 3; as such, it would be difficult to detect these dyes in food. We investigated the sufficient developing conditions; a mixture of 1-butanol, ethyl alcohol, and 3% acetic acid (7:2:4) separated them adequately. Additionally, the mixture of ethyl acetate, methyl alcohol, and 28% ammonia solution (4:2:1:2) developed ponceau-6R on silica gel plates.

**Keywords:** acid coal tar dye, thin-layer chromatography, food

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan