

食品中着色料分析において見出される副成色素について

武森 真由美^a, 佐藤 絵里^a, 京小 ひと美^b, 貞升 友紀^c, 坂牧 成恵^a, 牛山 慶子^a, 小林 千種^a

指定着色料に由来する副成色素について、食品中着色料の分析方法により試験を行った。現在、標準品の入手が可能な赤色2号、赤色102号、赤色40号及び黄色5号の副成色素について、薄層クロマトグラフ (TLC)、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 及び液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) により分析を行い、*R_f*値、保持時間、HPLCクロマトグラム、PDAスペクトル等の情報を収集した。赤色2号及び赤色102号由来の副成色素については判別が容易であった。赤色40号及び黄色5号由来の副成色素については、主色素との分離は良好であったが、各副成色素を比較すると、TLC、HPLCでの判別が困難な色素もあり、LC-MS/MSによる分析が有効であった。これらのデータを、食品中着色料の試験で検出される不明色素について、副成色素であるのか、指定外着色料であるのかを判定するための有用な資料として活用することで、判定の迅速化及び検査の信頼性向上が期待される。

キーワード：着色料、副成色素、赤色2号、赤色102号、赤色40号、黄色5号、薄層クロマトグラフ
液体クロマトグラフ、液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計

はじめに

食品中着色料の試験は、第2版食品中の食品添加物分析¹⁾や衛生試験法・注解²⁾に準じ、薄層クロマトグラフ (TLC) 及び液体クロマトグラフ (HPLC) で行うのが一般的である。その際、食品中から、指定着色料に含まれる副成色素や、指定着色料が変化して生成した色素に由来する不明色素を検出することがある³⁻⁶⁾。副成色素については、第9版食品添加物公定書解説書⁷⁾ 及び各報告^{8, 9)} に、食品添加物の規格としての分析方法が示されているが、食品中着色料の試験方法での検出例が示されている資料はない。そのため、不明色素が副成色素であるのか指定外着色料であるのか判定に時間を要し、検査日数の長期化や行政上の処置に苦慮するケースがある。そこで、試験結果の判定に有用な資料として活用するため、入手できた赤色2号、赤色102号、赤色40号及び黄色5号の副成色素10種類について、食品中着色料の試験法 (衛生試験法・注解²⁾) で得られたTLC、HPLC及び液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) の分析結果を報告する。

実験方法

1. 標準品・試薬

1) 着色料標準品

赤色2号 (R2)、赤色3号 (R3)、赤色40号 (R40)、赤色102号 (R102)、赤色104号 (R104)、赤色105号 (R105)、赤色106号 (R106)、黄色5号 (Y5) は一般財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用いた。ファストレッドE (FRE, C.I.No. 16045)、ボンソー6R (P6R, C.I.No. 16290)、アニリンアゾシェファー

塩色素 (Orange RN, C.I.No. 15970) は東京化成工業 (株) 製、クレシジンアゾシェファー塩色素 (CR-S)、クレシジンスルホン酸アゾβ-ナフトール色素 (CSA-2N)、クレシジンスルホン酸アゾG塩色素 (CSA-G)、クレシジンスルホン酸アゾR塩色素 (CSA-R)、スルファニル酸アゾG塩色素 (SA-G)、スルファニル酸アゾR塩色素 (SA-R)、スルファニル酸アゾβ-ナフトール色素 (Orange II, C.I.No. 15510) は富士フィルム和光純薬工業 (株) 製を用いた。対象とした指定着色料4種類と副成色素10種類をTable 1にまとめた。

2) 標準溶液及び混合標準溶液

標準品をそれぞれ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採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採り混合したものを混合標準溶液2 (0.025%, st2) とした。HPLC、LC-MS/MS用標準溶液は、標準溶液を水で適宜希釈して使用した。

3) その他の試薬

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、その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. 装置

HPLC : Agilent Technologies社製 1260シリーズ

LC-MS/MS : Agilent Technologies社製 6430

3. 測定条件

1) TLC分析条件

^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

^c 東京都健康安全研究センター食品化学部

TLC分析条件は衛生試験法・注解²⁾に準じた。

TLC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-18F_{254s} (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)

TLC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 (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 (10 : 3 : 3)

展開溶媒は，展開槽中に30分放置して槽内を飽和させた後展開を行った。6 cmまで展開した後風乾し，展開距離と各色素スポットの移動距離を測定しR_f値を求めた。スポット量はいずれの条件でも，標準溶液，混合標準溶液ともに0.5 μLとした。

2) HPLC分析条件

HPLC分析条件は衛生試験法・注解²⁾に準じた。

カラム：COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (4.6 mm i.d.×250 mm，粒径5 μm，ナカライテスク (株) 製)，移動相：A液；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，グラジエント条件：A液10% (0 min) →100% (30 min) →100% (40 min) →10% (41.1 min) →10% (55 min)，流速：1.0 mL/min，カラム温度：40°C，注入量：10 μL，

検出器：フォトダイオードアレイ，検出波長：450 nm，520 nm (スペクトル波長200~800 nm)

3) LC-MS/MS条件

LC-MS/MSによる分析は安井らの方法¹⁰⁾により行った。

カラム：CAPCELL CORE C₁₈ (2.1 mm i.d.×150 mm，粒径2.7 μm，(株)大阪ソーダ製)，移動相：A液；0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液，B液；アセトニトリル，グラジエント条件：A液 98% (0 min) →40% (20 min)，流速：0.25 mL/min，カラム温度：40°C，注入量：2 μL，ガス温度：350°C，ガス流量：10 L/min，ネブライザーガス：N₂ (50 psi)，イオン化モード：ESI (-)，キャピラリー電圧：4,000 V，フラグメンター電圧及びコロリジョンエネルギーの各色素の設定値はTable 2に示した。

結果及び考察

R2, R102, R40 及び Y5 の副成色素標準品について，TLCのR_f値，HPLCの保持時間をTable 3に，TLCクロマトグラムをFig. 1，HPLCクロマトグラム及びUV-VisスペクトルをFig. 2，プロダクトイオンスペクトルをFig. 3に示した。TLCのR_f値はn=3の平均から算出し，相対標準偏差3.5%以下と再現性は良好であることを確認した。HPLCの保持時間も同様にn=3の平均から算出し，相対標準偏差0.34%以下であった。

Table 1. Information of Colorant Standard Product

No.	Colorants	Abbreviation	C.I.No.	CAS.No.	Molecular Weight (g/mol)
1	Food Red No.2 (Amaranth)	R2	16185	915-67-3	604.48
2	Food Red No.102 (New Coccine)	R102	16255	2611-82-7	604.48
3	Fast Red E	FRE	16045	2302-96-7	502.42
4	Ponceau 6R	P6R	16290	5850-44-2	706.52
5	Food Red No.40 (Allura Red AC)	R40	16035	25956-17-6	496.42
6	Cresidine Azo Schaeffer's Salt Color	CR-S	-	61660-28-4	394.38
7	Cresidine Sulfonic Acid Azo β-Naphthol Color	CSA-2N	-	61660-27-3	394.38
8	Cresidine Sulfonic Acid Azo G Salt Color	CSA-G	-	374784-31-3	598.47
9	Cresidine Sulfonic Acid Azo R Salt Color	CSA-R	-	61660-30-8	598.47
10	Food Yellow No.5 (Sunset Yellow FCF)	Y5	15985	2783-94-0	452.37
11	Sulfanilic Acid Azo G Salt Color	SA-G	-	84030-17-1	554.41
12	Sulfanilic Acid Azo R Salt Color	SA-R	-	50880-65-4	554.41
13	Aniline Azo Schaeffer's Salt Color	Orange RN	15970	1934-20-9	350.32
14	Sulfanilic Acid Azo β-Naphthol Color	Orange II	15510	633-96-5	350.32

Table 2. Product Ion Scan Parameters of 4 Colorants and Subsidiary Colors

No.	Colorants	Precursor Ion (m/z)	Fragmentor Voltage(V)	Collision Energy(V)	No.	Colorants	Precursor Ion (m/z)	Fragmentor Voltage(V)	Collision Energy(V)
1	R2	537	250	30	8	CSA-G	531	350	30
2	R102	537	250	20	9	CSA-R	531	250	30
3	FRE	457	250	30	10	Y5	407	250	30
4	P6R	308	100	25	11	SA-G	487	350	30
5	R40	451	250	30	12	SA-R	487	250	30
6	CR-S	371	150	40	13	Orange RN	327	200	40
7	CSA-2N	371	150	30	14	Orange II	327	200	30

Table 3. *R_f* value and HPLC Retention Time of 4 Colorants and Subsidiary Colors

No.	Colorants	<i>R_f</i> value		HPLC Retention time (min)
		Condition 1	Condition 2	
1	R2	0.79	0.03	7.6
2	R102	0.58	0.07	11.0
3	FRE	0.23	0.29	18.3
4	P6R	0.96	0.01	2.5
5	R40	0.35	0.23	14.9
6	CR-S	0.02	0.51	29.6
7	CSA-2N	0.02	0.52	31.1
8	CSA-G	0.78	0.03	7.6
9	CSA-R	0.83	0.03	6.8
10	Y5	0.48	0.2	12.3
11	SA-G	0.89	0.04	5.5
12	SA-R	0.96	0.02	3.9
13	Orange RN	0.05	0.54	27.2
14	Orange II	0.06	0.54	27.3

Condition 1 : TLC plate ; Silicagel RP-18F_{254S}(MERCK, Aluminium sheet), Developing solvent ; Methanol-Acetonitrile-5% Sodium sulfate (3:3:10)

Condition 2 : TLC plate ; Silicagel 60F₂₅₄(MERCK, Aluminium sheet), Developing solvent ; Ethyl acetate-Methanol-28%Ammonia (10:3:3)

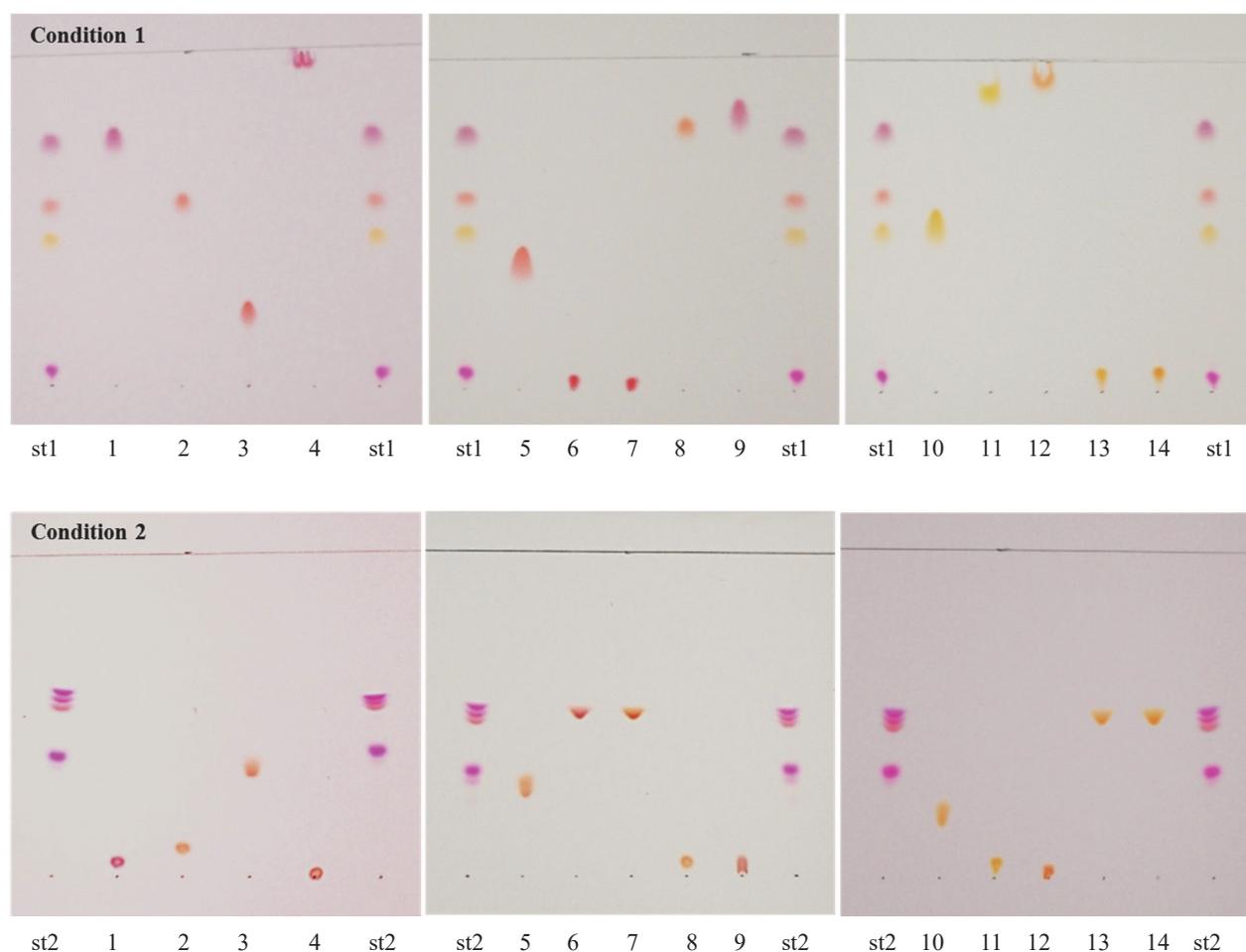


Fig. 1. TLC Chromatograms of 4 Colorants and Subsidiary Colors

st1 : mixed standard solution of R2, R102, Y5 and R106 st2 : mixed standard solution of R105, R104, R3 and R106

1 : R2 2 : R102 3 : FRE 4 : P6R 5 : R40 6 : CR-S 7 : CSA-2N 8 : CSA-G 9 : CSA-R 10 : Y5 11 : SA-G

12 : SA-R 13 : Orange RN 14 : Orange II

Condition 1 and condition 2 used the same conditions as in Table 3

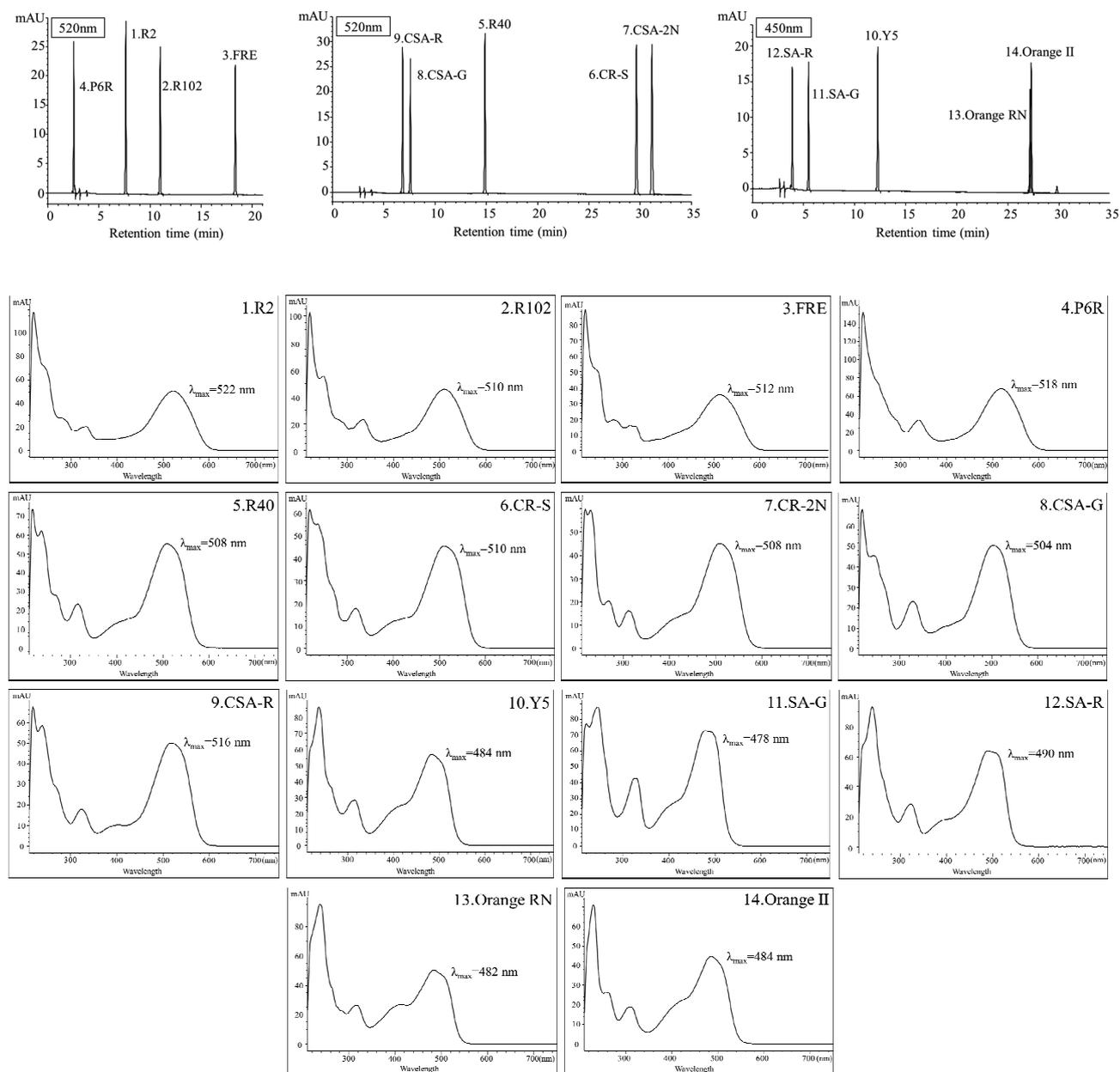


Fig. 2. HPLC Chromatograms and UV-VIS Spectra of 4 Colorants and Subsidiary Colors (10 µg/mL)

HPLC condition : Column ; COSMOSIL 5C₁₈-AR-II(4.6 mm i.d.×250 mm, 5µm),

Mobile phase ; (A) Methanol-Acetonitrile-Water Containing 0.5% Ammonium acetate,

(B) 0.5% Ammonium acetate , A : B(10 : 90)→30min→(100 : 0) Keep for 10min,

Flow rate ; 1.0 mL/min, Column temp ; 40°C, Injection volume ; 10 µL, PDA detector ; 200~800nm

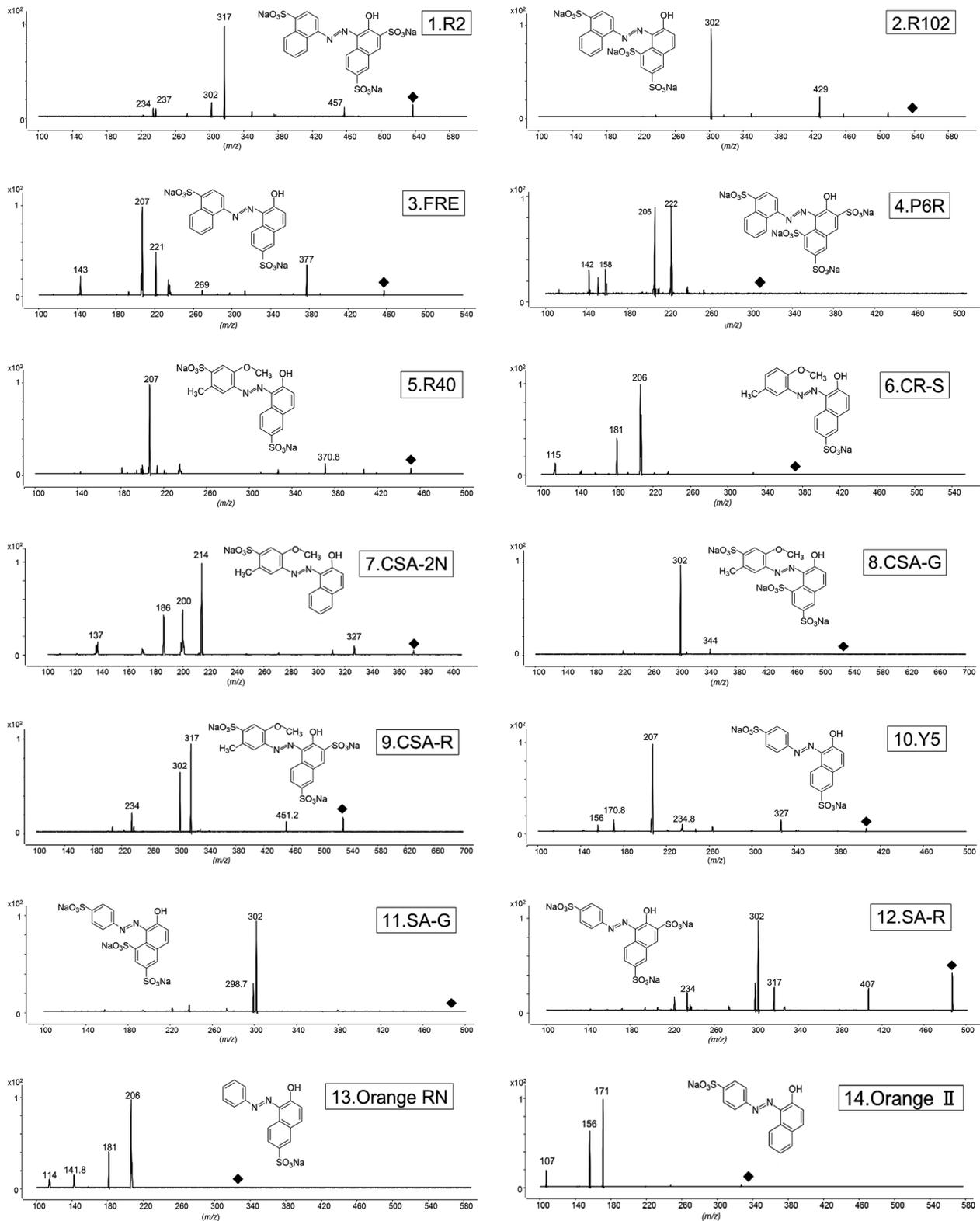


Fig. 3. LC-MS/MS Product Ion Spectra of 4 Colorants and Subsidiary Colors (20 µg/mL)

LC-MS/MS Condition : Column ; CAPCELL CORE C₁₈ (2.1 mm i.d. × 150 mm, 2.7 µm),

Mobile phase ; (A) 0.01 mol/L Ammonium acetate, (B) Acetonitrile, A 98% (0min) → 40% (20min),

Flow rate ; 0.25 mL/min, Column temp ; 40°C, Injection volume ; 2 µL

◆ Precursor ion

1. R2 及び R102 の副成色素

R2の製造原料であるナフチオン酸塩と3-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸二ナトリウム塩中に存在する不純物から、FRE, R102, P6Rを副成するとされている⁷⁾。また、R102では、製造原料であるナフチオン酸塩と7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸二ナトリウム塩中の不純物から、FRE, R2, P6Rを副成することが特定されている⁷⁾。いずれの色素についても、それぞれTLCの R_f 値及びHPLCでの分離が良好であることから、判別は容易であると考えられた。

2. R40 の副成色素

R40の副成色素は、低スルホン化色素と高スルホン化色素が存在する。低スルホン化色素としては、製造原料であるアゾ基を有する成分の未スルホン化体由来するCR-Sと、アゾ基を有する成分の不純物由来するCSA-2Nが特定されている⁷⁾。また、高スルホン化色素としては、アゾ基を有する成分の不純物由来するCSA-G, CSA-Rが特定されている⁷⁾。いずれの色素も主色素であるR40との判別は容易であった。各副成色素について比較すると、CR-SとCSA-2Nは色調が酷似しており、TLCの R_f 値が2条件ともに近接しているが、HPLCでは分離でき、判別が可能であると考えられた。また、CSA-GとCSA-Rは、色調は異なるものの、TLCでの R_f 値及びHPLCでの保持時間が近接していた。一方、プロダクトイオンスペクトルが異なることから、LC-MS/MSにより判別できると考えられた。

3. Y5の副成色素

Y5の副成色素としては、製造原料であるシェファー塩の不純物由来するSA-G, SA-R, Orange IIと、スルファニル酸の不純物由来するOrange RNが特定されている⁷⁾。いずれの色素も主色素であるY5との判別は容易であった。各副成色素間については、高スルホン化色素のSA-GとSA-Rは、TLCの R_f 値と色調が異なり、HPLCのピークも分離することから、判別可能であると考えられた。低スルホン化色素のOrange RNとOrange IIは、TLCの R_f 値及びHPLCでの保持時間が近接しているため、LC-MS/MSによるプロダクトイオンスペクトルでの判別が有効であった。

4. 副成色素・指定外着色料の判別

FRE, P6R, Orange RN, Orange IIは日本では使用が許可されていない指定外着色料でもあり、食品衛生法違反の扱いとなる食品からの検出事例がある。一方、指定着色料の副成色素と判別できれば適法となる。これらの色素を検出した場合、指定着色料の副成色素であるのか、指定外着色料であるのかの判別が行政判断上必要となる。

指定着色料について、食品添加物の成分規格⁷⁾には、主色素に対する副成色素の含有比率の規格値が定められており、R2は3%以下、R102は1%以下、R40は低スルホン化副

成色素1.0%以下、Y5は5%以下（ただしSA-R以外の色素は2%以下）とされている。

食品から主色素及び上記FRE等の色素を検出した場合は、成分規格のHPLC条件を用いて食品からの試験溶液を分析し、副成色素の規格値以下であれば副成色素と判別できると考える。副成色素の規格値を超える場合は成分規格に適合しない着色料使用の疑いが考えられ、主色素が検出されない場合は指定外着色料使用の疑いが推測される。

これらのプロセスを検査業務に導入することにより、詳細情報を食品監視部門に提供可能となり、検査結果の信頼性が向上すると考える。

ま と め

R2, R102, R40及びY5の副成色素について標準品を入手し、TLC, HPLC及びLC-MS/MSによる分析結果をまとめた。その結果、R2及びR102の副成色素は、いずれの色素もTLCでの R_f 値が異なる上、HPLCでの分離も良好であり、判別は容易であることがわかった。R40及びY5の副成色素については、主色素と副成色素の分離は良好であったが、各副成色素間では、TLCの R_f 値、HPLCでの保持時間が近接している色素があった。いずれの色素もLC-MS/MSによるプロダクトイオンスペクトルが異なることから、LC-MS/MSでの判別が可能であると考えられた。

これらのデータは、食品中着色料の試験で検出される不明色素の判定に有用な資料として活用でき、判定の迅速化と検査の信頼性向上が期待される。

文 献

- 1) 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。
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2020, 405-411, 2020, 金原出版, 東京。
- 3) 石川ふさ子, 大石充男, 新藤哲也, 他：食衛誌, **46**, 93-98, 2005。
- 4) 新藤哲也, 貞升友紀, 鈴木敬子, 他：食衛誌, **53**, 1-7, 2012。
- 5) 小川麻萌, 新藤哲也, 京小ひと美, 他：食衛誌, **58**, 26-31, 2017。
- 6) 貞升友紀, 京小ひと美, 坂牧成恵, 他：東京健安研七周年報, **68**, 177-181, 2017。
- 7) 川西 徹, 穂山 浩, 河村葉子, 佐藤恭子：第9版食品添加物公定書解説書, B96-97, D1148-D1158, D1176-D1186, D1190-D1199, D1236-D1247, 2019, 廣川書店, 東京。
- 8) 辻 澄子, 松村郁子, 中村優美子, 他：食衛誌, **41**, 357-363, 2000。
- 9) 植松洋子, 広門雅子, 中島和雄, 他：東京衛研年報, **38**, 245-252, 1987。
- 10) 安井明子, 加藤妙子, 坂牧成恵, 他：東京健安研七周年報, **68**, 117-123, 2017。

Study of Subsidiary Colors Detected by Colorant Analysis in Food

Mayumi TAKEMORI^a, Eri SATO^a, Hitomi KYOKO^b, Yuki SADAMASU^a, Narue SAKAMAKI^a, Keiko USHIYAMA^a
and Chigusa KOBAYASHI^a

We summarized the test results of colorant- derived subsidiary colors, as analyzed by colorant analysis method in food. R2, R102, R40, and Y5 subsidiary colors, available as standard products, were analyzed by TLC, HPLC, and LC-MS/MS; analytical information, such as *R_f* value, retention time, HPLC chromatograms, and PDA spectra were collected. The subsidiary colors derived from R2 and R102 were easily distinguished. For the subsidiary colors derived from R40 and Y5, separation from the main color was good, but some colors had subsidiary colors that were difficult to distinguish by TLC or HPLC, analysis by LC-MS/MS was considered effective. These data are useful for measuring unknown colors detected by colorant analysis in food, and contribute to speeding up judgment and improving the reliability of the analysis.

Keywords: Colorants, Subsidiary color, High performance liquid chromatograph (HPLC),
Liquid chromatograph / Tandem mass spectrometer (LC-MS/MS)

^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