

HPLCによる食用アゾ色素中の未反応原料，反応中間体および付随色素の定量法とその実態調査

石光 進[#]・三島 郁子・辻 澄子・柴田 正

Determination and Survey of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in Food Color of Azo Dye by High Performance Liquid Chromatography

Susumu Ishimitsu[#], Ikuko Mishima, Sumiko Tsuji and Tadashi Shibata

A method for determination of starting materials, intermediates and subsidiary colors in food color of azo dye was developed by use of HPLC. The following conditions were used for analysis: column, L-column ODS (4.6mmφ×250mmL); mobile phase, 0.02M ammonium acetate (A), acetonitrile (B); concentration gradient, perform the linear concentration gradient from A:B (100:0) to (60:40) for 40min; detection, starting materials and intermediates at 239nm, and subsidiary colors at 510nm.

Standard material, domestic product and imported product were analyzed by the present HPLC method and impurities were measured. Recoveries of each impurity from azo dye averaged 99.1~103.5%. The detection limit was 0.05μg/g for each impurity.

Keywords: azo dye, starting materials, intermediates, subsidiary colors, HPLC

(Received May 30, 1997)

はじめに

わが国では食用タール色素として，食用赤色40号 (allura red AC:R-40) およびそのアルミニウムレーキが追加され¹⁾，現在はタール色素12品目と，そのアルミニウムレーキ8種が食品添加物として指定されている。

食用タール色素は，第六版食品添加物公定書²⁾ (公定書)において含量，性状，確認試験，純度試験 (水不溶物，塩化物および硫酸塩，重金属，ヒ素，他の色素) および乾燥減量の規格値並びに試験法が定められている。この中で，R-40においてのみ純度試験として，未反応原料，反応中間体および付随色素の規格値並びに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による試験法が設定されているが，他の11種類のタール色素には，これらの規格及び試験法が設定されていない。

HPLCを用いた食用タール色素の未反応原料，反応中間体および付随色素の分析法として，陰イオン交換カラムを用いる方法³⁻⁷⁾，C₁₈カラムを用いて移動相にカウンターイオンを加えるイオンペアクロマトグラフィーによる方法⁸⁻¹¹⁾および逆相系カラムを用いる方法¹²⁻¹⁵⁾などが報告されている。

近年，わが国では国際貿易の拡大のために諸外国との規

制の違いを調整する必要性が増大している。食用タール色素に関しても，各国で指定されている品目数が異なっており，指定されている品目でも規格が異なるため使用できないことがある。そこで，現在改訂中の第七版食品添加物公定書においてはR-40のみに設定されている未反応原料，反応中間体および付随色素の試験法を他のアゾ色素にも適用するため，個々のアゾ色素についての定義並びに限度規格の項が検討されている。

今回，食用タール色素の内R-40を含む5種類のアゾ色素について，分析法の検討を行うとともに市販品の実態調査を行った。

実験方法

1. 試料，製法および標品

試料：食用黄色4号 (tartrazine:Y-4) は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品6社16試料，インド産品1試料およびパキスタン産品1試料；食用黄色5号 (sunset yellow FCF:Y-5) は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品6社16試料およびパキスタン産品1試料；食用赤色2号 (amaranth:R-2) は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品3社6試料；R-40は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品3社5試料；食用赤色102号 (new coccine:R-102) は国立医薬品食品衛生研究所標準品並びに市販国産品7社17試料を用いた。

[#] To whom correspondence should be addressed: Susumu Ishimitsu; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1907; Fax: 06-942-0716; E-mail: ishimitsu@nihs.go.jp

製法：食用アゾ色素の一般的な製法として以下に示す方法が考えられる。

R-2；ナフチオン酸 (NT) をジアゾ化し、3-ヒドロキシナフタレン-2,7-ジスルホン酸 (RS) とカップリングさせた後、塩析し、精製して得られたものであり、3-ヒドロキシ-4-(4-スルホナフチルアゾ)-2,7-ナフタレンジスルホン酸=三ナトリウム塩 ($C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$) を主成分とする。

R-40；p-クレシジンスルホン酸 (CSA) をジアゾ化し、シェファール塩 (SS) とカップリングさせた後、塩析し、精製して得られたものであり、6-ヒドロキシ-5-(2-メトキシ-5-メチル-4-スルホフェニルアゾ)-2-ナフタレンスルホン酸=二ナトリウム塩 ($C_{18}H_{14}Na_2O_8S_2$) を主成分とする。

R-102；ナフチオン酸 (NT) をジアゾ化し、7-ヒドロキシナフタレン-1,3-ジスルホン酸 (GS) とカップリングさせた後、塩析し、精製して得られたものであり、7-ヒドロキシ-8-(4-スルホナフチルアゾ)-1,3-ナフタレンジスルホン酸=三ナトリウム塩=1½水和物 ($C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$) を主成分とする。

Y-4；スルファニル酸 (SA) をジアゾ化し、5-ヒドロキシ-1-(4-スルホフェニル)-3-ピラゾールカルボン酸 (PyT) とカップリングさせた後、塩析し、精製して得

られたものであり、5-ヒドロキシ-1-(4-スルホフェニル)-4-(4-スルホフェニルアゾ)-3-ピラゾールカルボン酸=三ナトリウム塩 ($C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$) を主成分とする。

Y-5；スルファニル酸 (SA) をジアゾ化し、シェファール塩 (SS) とカップリングさせた後、塩析し、精製して得られたものであり、6-ヒドロキシ-5-(4-スルホフェニルアゾ)-2-ナフタレンスルホン酸=三ナトリウム塩 ($C_{16}H_{10}N_2Na_3O_7S_2$) を主成分とする。

標品：これらの製法では不純物として、下記の未反応原料、反応中間体および付随色素が考えられる。

①未反応原料：ナフチオン酸 (NT)、シェファール塩 (SS)、7-ヒドロキシナフタレン-1,3-ジスルホン酸 (GS)、3-ヒドロキシナフタレン-2,7-ジスルホン酸 (RS)、p-クレシジンスルホン酸 (CSA)、スルファニル酸 (SA) および 5-ヒドロキシ-1-(4-スルホフェニル)-3-ピラゾールカルボン酸 (PyT)

②反応中間体：6,6'-オキシビス(2-ナフタレンスルホン酸) (DONS)、7-ヒドロキシ-1,3,6-ナフタレントリスルホン酸 (TSA)、4-ヒドラジノベンゼンスルホン酸 (HS) および 4,4'-(ジアゾアミノ)-ジベンゼンスルホン酸 (DAADBSA)

③付随色素：クレシジンスルホン酸アゾβ-ナフトール (CSA-2N)、クレシジンアゾシェファール塩 (CR-S)、クレ

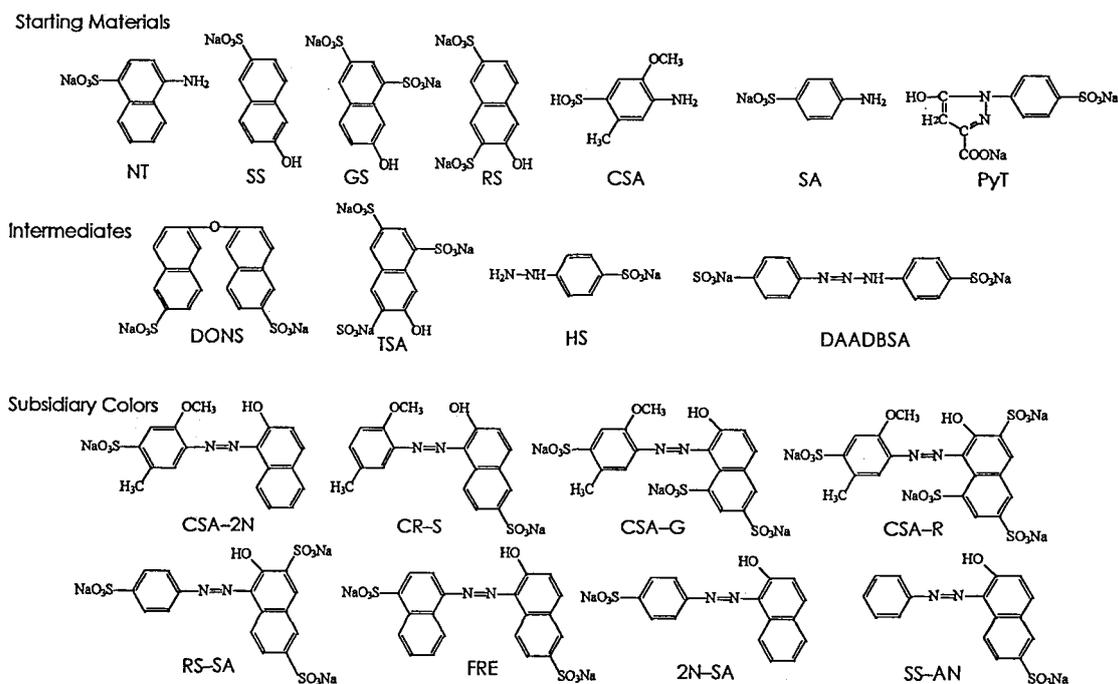


Fig. 1. Structures of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors

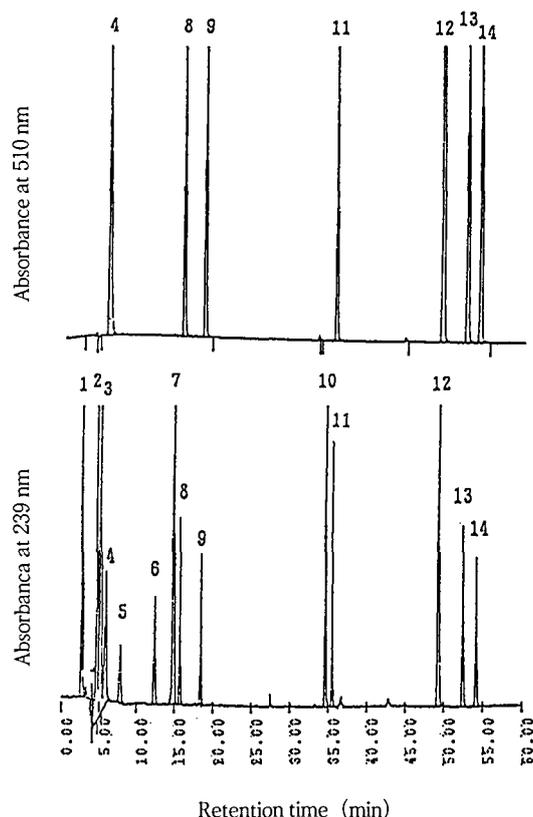


Fig. 2. Chromatogram of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors

1 : PyT + TSA	2 : GS	3 : RS	4 : RS-SA	5 : CSA
6 : DAADBSA	7 : SS	8 : CSA-R	9 : CSA-G	10 : DONS
11 : FRE	12 : 2 N-SA + SS-AN	13 : CR-S	14 : CSA-2 N	

Forty μ l of solution containing approximately 0.2 μ g each of compounds was injected to HPLC.

シジンスルホン酸アゾ G (CSA-G), クレシジンスルホン酸アゾ R (CSA-R), 3-ヒドロキシ-4-[(4-スルホフェニル)アゾ]-2,7-ナフトレンジスルホン酸 (RS-SA), ファーストレッド E (FRE), 4-[(2-ヒドロキシ-1-ナフトレニル)アゾ]ベンゼンスルホン酸 (2 N-SA) および 6-ヒドロキシ-5-(フェニルアゾ)2-ナフトレンスルホン酸 (SS-AN)

それらの構造を Fig. 1 に示した。

2. 装置

高速液体クロマトグラフ：日本分光 (株) 製 880-PU 型ポンプ, 802-SC 型システムコントローラ, 851-AS 型オートサンプラー, 870-UV 型 UV/VIS 検出器, Sic 社製 Labchart 180 型データ処理器

3. HPLC 条件

カラム：化学品検査協会製 L-column ODS (4.6mm ϕ × 250mmL), 移動相；0.02M 酢酸アンモニウム溶液 (A),

アセトニトリル (B), 濃度勾配；A:B (100 : 0) から (60 : 40) までの直線濃度勾配を 40 分間行い, そのまま 10 分間保持した¹⁰⁾. 流速；1.0ml/min, 検出波長；紫外；239nm, 可視；510nm, 注入量；40 μ l, 温度；30 $^{\circ}$ C

4. 試験溶液および標準溶液の調製

各試料は 24 時間硫酸デシケーターで減圧 (2.0kPa 以下) 乾燥したものを 250.0mg 量り, 0.02M 酢酸アンモニウム溶液を加えて溶解し, 全量を 100ml とした. また, 各標品は 10.0mg 量り, 0.02M 酢酸アンモニウム溶液を加えて溶解し, 全量を 100ml とした.

5. 検量線の作成

標準原液はそれぞれ 1.0~10.0 μ g/ml の範囲になるように, 0.02M 酢酸アンモニウム溶液で希釈し, その 40 μ l を HPLC に注入した. 検量線は各ピーク面積より絶対検量線法により作成した.

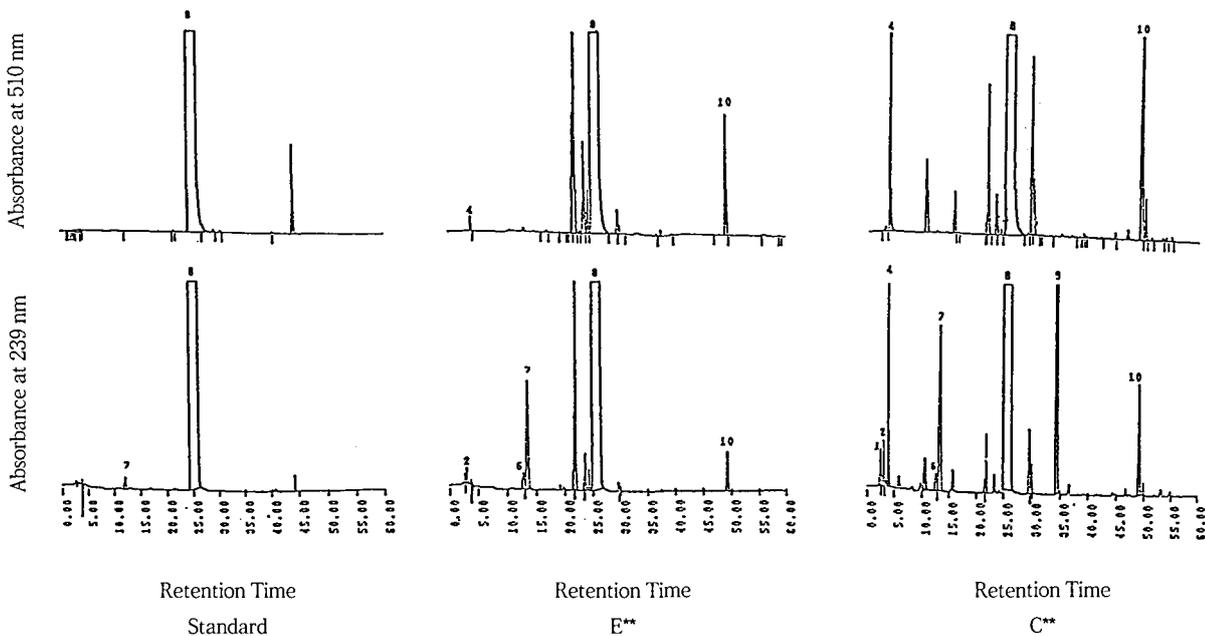


Fig. 3. Chromatograms of Standard and Commercial Sunset Yellow FCF

Peaks; 1:TSA 2:SA 3:GS 4:RS-SA 5:RS 6:DAADBSA 7:SS 8:Y-5 9:DONS 10:SS-AN+ 2N-SA

結果

1. カラムおよび溶離液の検討

公定書では、R-40の不純物分析用の充填剤として ODS を用いると記載されている。そこで、カラムとして L-column ODS および Inertsil ODS-2 (4.6mmφ×250mmL) を用いて分離能を検討した。両カラムとも良好な分離結果を示した。L-column ODS を用いて得られたクロマトグラムを Fig. 2 に示した。しかし、PyT と TSA 並びに 2N-SA と SS-AN は両カラムを用いても分離できなかった。そこで、PyT と TSA は別個に検討し、2N-SA と SS-AN は両者の総和として定量した。また、3.02分、3.22分および 8.80 分に溶出する HS, SA および NT は別個に検討した。

一方、移動相に関しては、R-40 に用いられているメタノールを溶離液としてグラジエントを行ったところ、アセトニトリルを溶離液として用いた時と比較してベースラインシフトが大きくなるクロマトグラムが得られた。

2. 標準品および市販品の実態調査

Y-4 は未反応原料の SA と PyT 並びに反応中間体の DAADBSA と HS、Y-5 は未反応原料の SA と SS、未反応原料夾雑物の GS と RS 並びに反応中間体の DONS, DAADBSA と TSA および付随色素の RS-SA, SS-AN と 2N-SA について検討した。また、R-2 は未反応原料の NT と RS、未反応原料夾雑物の SS と GS 並びに反応中間体の TSA および付随色素の FRE について、R-40 は公定書に記載されてい

る未反応原料の SS と CSA 並びに反応中間体の DONS および付随色素の CSA-R, CSA-G, CSA-2N と CR-S、他に未反応原料夾雑物並びに反応中間体の GS, RS と TSA について、また、R-102 は未反応原料の NT と GS、未反応原料夾雑物の SS と RS 並びに反応中間体の TSA および付随色素の FRE について検討した。

FAO/WHO⁹⁾ および米国の The Code of Federal Regulations (CFR)⁹⁾ の規格値と比較したところ、Y-5 において、FAO/WHO の規格では未反応原料 (SA と SS) および反応中間体 (TSA と DAADBSA) との総量は 0.5% 以下、また、CFR では反応中間体である DONS は 1.0% 以下と規定している。標準品、E 社製品および C 社製品を用いた時に得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示した。その結果、市販品 3 検体 (C** ; 1, 2 および 3) において規格の上限を越えていた (Table 1)。

また、R-102 の市販品 2 検体 (C** ; 1 および 3) において、FAO/WHO の未反応原料 (NT と GS) の総量 (0.5% 以下) の規格値を上回る結果が得られた (Table 2)。

Y-4, R-2 および R-40 の検体においてはすべて規格値以下であった。それらの結果を Table 3, 4 および 5 に示した。

なお、HPLC を用いて得られた主色素の溶出時間は、R-2 ; 15.86分、R-40 ; 28.59分、R-102 ; 23.56分、Y-4 ; 12.14分および Y-5 ; 25.15分であった。

Table 1. Contents of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in Sunset Yellow FCF

Sample	Contents (%)									
	SA	SS	GS	RS	TSA	DAADBSA	DONS	RS-SA	SS-AN+2N-SA	
Standard	ND	0.010	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
A*	1	0.110	0.093	ND	ND	0.041	0.037	6	0.001	0.018
	2	0.160	0.251	ND	ND	0.030	ND	ND	0.003	0.025
	3	0.033	0.101	ND	ND	0.028	ND	ND	0.015	0.017
B*	1	0.115	0.311	ND	ND	0.045	0.178	1.274	0.996	0.394
	2	0.040	0.299	ND	ND	0.034	0.196	1.362	1.025	0.387
	3	0.038	0.296	ND	ND	0.034	0.196	1.340	1.018	0.381
C*	1	ND	0.297	ND	ND	ND	ND	ND	0.149	0.099
	2	0.013	0.177	ND	ND	ND	ND	ND	0.012	0.051
	3	0.013	0.179	ND	ND	ND	ND	ND	0.012	0.052
D*	1	0.048	0.159	ND	ND	ND	ND	ND	0.117	0.102
	2	0.023	0.300	ND	ND	ND	0.010	ND	ND	0.064
	3	0.021	0.227	ND	ND	ND	0.008	ND	0.014	0.210
E*	1	0.013	0.025	ND	ND	ND	0.119	0.002	0.145	0.061
F*	1	0.048	0.161	ND	ND	ND	ND	ND	0.008	0.102
	2	0.039	0.036	ND	ND	ND	ND	0.103	ND	0.038
	3	0.023	0.016	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.090
G*	1	0.080	0.048	ND	ND	0.037	0.052	0.054	0.720	0.211
H**	1	0.080	0.048	ND	ND	0.037	0.052	0.054	0.720	0.211
Average***		0.046	0.183	ND	ND	0.013	0.047	0.255	0.255	0.213

ND: Not detected (<0.00001%)

*: Domestic product **: Imported product

***: Average of domestic products

Table 3. Contents of Starting Materials and Intermediates in Tartrazine

Sample	Contents (%)				
	SA	PyT	DAADBSA	HS	
Standard	ND	ND	—	ND	
A*	1	0.060	ND	—	ND
	2	0.043	ND	—	ND
	3	0.120	ND	—	ND
B*	1	0.052	ND	—	ND
	2	0.015	0.027	—	ND
	3	0.013	0.062	—	ND
C*	1	0.032	0.052	—	ND
	2	0.013	0.052	—	ND
	3	0.011	0.062	—	ND
D*	1	0.048	0.148	—	ND
E*	1	ND	0.086	—	ND
	2	0.010	0.084	—	ND
	3	0.011	0.056	—	ND
F*	1	0.055	ND	—	ND
	2	0.033	0.094	—	ND
	3	0.055	ND	—	ND
G**	1	0.062	ND	—	ND
H**	1	0.052	0.076	—	ND
Average***		0.035	0.045	—	ND

ND: Not detected (<0.00001%) —: Same retention time to azo color

*: Domestic product **: Imported product

***: Average of domestic products

Table 2. Contents of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in New Coccine

Sample	Contents (%)						
	NT	SS	GS	RS	TSA	FRE	
Standard	ND	ND	0.033	ND	0.017	0.005	
A*	1	ND	ND	0.159	ND	0.065	0.034
	2	0.018	ND	0.172	ND	0.035	0.027
	3	0.023	ND	0.163	ND	0.040	0.039
B*	1	0.267	ND	0.258	ND	0.122	0.024
	2	0.131	ND	0.167	ND	0.039	0.014
	3	0.269	ND	0.321	ND	0.102	0.025
C*	1	0.036	ND	0.151	ND	0.061	0.035
	2	0.029	ND	0.251	ND	0.090	0.053
	3	0.029	ND	0.252	ND	0.079	0.035
D*	1	0.091	ND	0.106	ND	0.029	0.004
E*	1	ND	ND	0.169	ND	0.063	0.035
	2	0.036	ND	0.227	ND	0.031	0.144
	3	0.031	ND	0.198	ND	0.029	0.123
F*	1	0.049	ND	0.103	ND	0.035	0.004
	2	0.120	ND	0.117	ND	0.014	0.004
	3	0.058	ND	0.073	ND	0.012	0.003
G*	1	ND	ND	0.141	ND	0.078	0.049
Average**		0.070	ND	0.178	ND	0.054	0.038

ND: Not detected (<0.00001%)

*: Domestic product **: Average of domestic products

Table 4. Contents of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in Amarance

Sample	Contents (%)						
	NT	SS	GS	RS	TSA	FRE	
Standard	ND	ND	ND	0.020	0.013	0.004	
A*	1	0.200	ND	ND	0.034	0.063	0.046
	2	0.078	ND	ND	0.024	0.018	0.060
	3	0.024	ND	ND	0.025	0.005	0.026
B*	1	0.358	ND	ND	0.008	0.120	0.180
	2	0.067	ND	ND	0.015	0.020	0.035
C*	1	0.118	ND	ND	0.051	0.025	0.292
Average**		0.141	ND	ND	0.026	0.042	0.107

ND: Not detected (<0.00001%)

*: Domestic product **: Average of domestic products

Table 5. Contents of Starting Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in Allura Red AC

Sample	Contents (%)										
	SS	GS	RS	TSA	CSA	DONS	CSA-R	CSA-G	CSA-2N	CR-S	
Standard	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.017	ND	0.003	ND	
A*	1	ND	0.048	ND	ND	0.010	0.021	0.209	0.047	0.043	0.003
	2	ND	0.039	ND	ND	0.090	0.019	0.011	0.002	0.005	ND
B*	1	0.039	0.017	ND	ND	ND	0.167	0.180	0.040	0.383	0.010
	2	0.080	0.046	ND	ND	ND	0.011	0.013	0.001	0.024	0.001
C*	1	ND	0.061	ND	ND	ND	0.098	0.164	ND	0.111	0.015
Average**		0.024	0.042	ND	ND	0.020	0.063	0.115	0.018	0.113	0.006

ND: Not detected (<0.00001%)

*: Domestic product **: Average of domestic products

考 察

- (1) すべての標準品は市販品と比較して不純物量は著しく少なかった。
- (2) DAADBSA と Y-4 は溶出時間が一致したことから、分析条件を検討する必要がある。
- (3) 外国産品は国産品と比較して不純物量に顕著な差は認められなかった。
- (4) 市販の食用色素 (Y-4, Y-5, R-2, R-40及びおよび R-102) の実態調査を行ったところ、Y-5色素の3検体およびR-102色素の2検体については、米国およびFAO/WHOの規格以上の未反応原料および反応中間体を含有していた。

謝 辞

本実験を行うに際して貴重な反応中間体および付随色素を提供して下さいました三榮源エフ・エフ・アイ (株) に感謝致します。

文 献

- 1) 厚生省告示第1号:官報(号外第4号),平成3年1月17日付,p.1~2,p.5~6(1991).
- 2) 厚生省編:“第六版食品添加物公定書”p.307~333(1992).
- 3) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives:

“Specifications for Identity and Purity of Food Colours, FAO Food and Nutrition Paper31/1”, p. 131~132(1984) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- 4) Assoc. Off. Anal. Chem.: “Official Methods of Analysis”, 15th Ed, p. 1130~1132 (1990).
- 5) Cox, E. A., McCluxe, F. D.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 933~940 (1982).
- 6) Cox, E. A., Reed, G. F.: *ibid.*, **64**, 324~331 (1981).
- 7) Tonogai, Y., Ito, Y., Iwaida, M.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **24**, 275~281 (1983).
- 8) Lancaster, F. E., Lawrence, J. F.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 1305~1310 (1982).
- 9) Lancaster, F. E., Lawrence, J. F.: *ibid.*, **66**, 1424~1432 (1983).
- 10) 植松洋子, 広門雅子, 中島和雄, 高橋 巖, 松井敬子, 風間成孔:東京衛研年報, **38**, 245~252 (1987).
- 11) 植松洋子, 広門雅子, 中島和雄, 高橋 巖, 松井敬子, 風間成孔:同上, **39**, 151~155 (1988).
- 12) Goldbelg, A. L., Calvey, R. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 103~107 (1982).
- 13) Calvey, R. J., Goldbelg, A. L.: *ibid.*, **65**, 1080~1085 (1982).
- 14) Bailey, J. E.: *ibid.*, **63**, 565~571 (1980).
- 15) Cox, E. A., Richfield-Fratz, N., Bailey, J. E., Albert, R. H.: *ibid.*, **67**, 240~249 (1984).
- 16) 山田真記子, 井上哲夫, 加藤喜昭, 中村幹雄, 柴田正, 木村美加, 辻 澄子, 伊藤誉志男:食衛誌, **34**, 239~247 (1993).