

## HPLCによる指定外着色料の定性試験法について

石綿 肇<sup>#</sup>・長田正大<sup>\*1</sup>・関口幸弘<sup>\*2</sup>・鎌倉和政<sup>\*2</sup>  
 杉田たき子・山田 隆

## A qualitative analytical method for nonpermitted food colors by HPLC

Hajimu Ishiwata<sup>#</sup>, Masahiro Nagata<sup>\*1</sup>, Yukihiro Sekiguchi<sup>\*2</sup>, Kazumasa Kamakura<sup>\*2</sup>  
 Takiko Sugita and Takashi Yamada

The Ministry of Health and Welfare has been proposed an analytical method for food colors by HPLC. Conditions in the method and modified conditions of the proposed method were applied for permitted and nonpermitted food colors, and relative retention times were obtained. The relative retention times would be a clue of the confirmation of these nonpermitted colors by other method.

**Keywords:** food color, nonpermitted food color, qualitative test, HPLC

## はじめに

## 方 法

わが国における食品の輸入量は増加の一途をたどっている。輸入食品の中には、輸出国においては食品添加物として許可されているが、わが国では許可されていないものが使用されている場合がある。食用着色料もその一例であり、許可状況は国ごとに大きく異なる<sup>1,2)</sup>。

HPLCによる特定の指定外着色料の分析法については、すでにいくつか報告されている<sup>3-6)</sup>。これらの方法は、いずれも独自のHPLC条件を開発して用いている。一方、わが国で許可されている12種類の合成着色料のHPLCによる一斉分析法が既に報告され、指針<sup>7)</sup>として取り入れられており、通常、着色料の定性・定量は、指針の分析条件<sup>7)</sup>、あるいはその解説書の分析条件<sup>8)</sup>により行われている。しかしながら、指針あるいはその解説書によるHPLC条件下での各種指定外着色料の保持時間について系統的に調査した報告は不十分である。指針あるいはその解説書による方法で検出された未知着色料の種類の推定ができれば、上記<sup>3-6)</sup>のどの方法により確認試験を行ったらよいかの判断が容易となる。

そこで、輸入食品中に検出される可能性のある指定外着色料について、指針<sup>7)</sup>およびその解説書<sup>8)</sup>の方法でHPLCを行い、許可着色料の保持時間との相関性を求め、指定外着色料の種類の推定を容易にすることを目的に研究を行った。

## 1. 着色料

## 1) 指定着色料

食用赤色2号(アマランス: C.I. 16185): 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

食用赤色3号(エリスロシン: C.I. 45430): 国立医薬品食品衛生研究所標準品

食用赤色40号(アルラレッドAC: C.I. 16035): 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

食用赤色102号(ニューコクシン: C.I. 16255): 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

食用赤色104号(フロキシン: C.I. 45410): 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

食用赤色105号(ローズベンガル: C.I. 45440): 国立医薬品食品衛生研究所標準品

食用赤色106号(アシッドレッド: C.I. 45100): 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

食用黄色4号(タートラジン: C.I. 19140): 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

食用黄色5号(サンセットイエローFCF: C.I. 15985): 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所)

\*1 横浜検疫所輸入食品検疫・検査センター

\*2 神戸検疫所輸入食品検疫・検査センター

# To whom correspondence should be addressed: Hajimu Ishiwata; 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501

## 所標準品適合品)

緑色3号(ファストグリーンFCF : C.I. 42053) : 東京化成工業製

食用食用青色1号(ブリリアントブルーFCF : C.I. 42090) : 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

食用青色2号(インジゴカルミン : C.I. 73015) : 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

## 2) 指定外着色料

アシッドエロー(C.I. 13015) : アルドリッチ製

アシッドバイオレット6B(C.I. 42640) : 保土谷化学工業製

アシッドブルー3(C.I. 42051) : 東京化成工業製

アズールブルーVX(C.I. 42045) : 大和染料製, 和光純薬工業製

アゾルビンエキストラ(C.I. 14720) : 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

エオシン(C.I. 45380) : 東京化成工業製

オレンジI(C.I. 14600) : 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

オレンジII(C.I. 15510) : 和光純薬工業製

オレンジG(C.I. 16230) : 東京化成工業製

オレンジRN(C.I. 15970) : 東京化成工業製

キノリンエロー(C.I. 47005) : シグマ製,

ギネアグリーンB(C.I. 42085) : 東京化成工業製

グリーンS(C.I. 44090) : 東京化成工業製

クリソインS(C.I. 14270) : アルドリッチ製

ナフトールエローS(C.I. 10316) : 国立医薬品食品衛生研究所標準品

パテントブルーV(C.I. 42051) : シグマ社製

ファストレッドE(C.I. 16045) : 東京化成製

ファストレッドS(C.I. 15620) : 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

ブリリアントブラックBN(ブリリアントブラックPN : C.I. 28440) : 東京化成製

ブリリアントミリンググリーン(C.I. 42100) : 東京化成工業製

ベンジルバイオレット4B(C.I. 42640) : 関東化学工業製

ボンソー3R(C.I. 16155) : 国立医薬品食品衛生研究所標準品

ボンソー6R(C.I. 16290) : 東京化成工業製

ボンソーR(C.I. 16150) : 国立医薬品食品衛生研究所標準品

ボンソーSX(C.I. 14700) : 三栄源エフ・エフ・アイ社製(国立医薬品食品衛生研究所標準品適合品)

マーチウスエロー(C.I. 10315) : 東京化成製

レッド2G(C.I. 18050) : アルドリッチ製

レッド6B(C.I. 18055) : 和光純薬工業製

## 2. 装置及びその条件

1) 指針の方法<sup>7)</sup>による場合

高速液体クロマトグラフ : LC-10A(検出器はSPD-M10VP)(島津製作所)

カラム : 東ソーTSK-gel ODS-80Ts(4.6mm x 150mm)

カラム温度 : 40℃

移動相 : A液 0.01 mol/l リン酸二アンモニウム溶液

B液 メタノール

グラジエント条件 : 0.01 mol/l リン酸二アンモニウム溶液-メタノール混液(9:1)から(2:3)までの直線濃度勾配を25分間行い, 以後, 混合比(2:3)を維持した。

流速 : 1 ml/分

注入量 : 5  $\mu$ l

測定波長 : 指針では, 着色料ごとに個別の波長を用いているが, 本法では254 nm及び200-700 nmで測定した。

2) 解説書の方法<sup>8)</sup>による場合

高速液体クロマトグラフ : LC-9A(検出器はSPD-6AV)

カラム : Zorbax C8(4.6mm x 150mm)(島津製作所製)

カラム温度 : 40℃

移動相 : A液 0.02 mol/l 酢酸アンモニウム溶液

B液 メタノール

グラジエント条件 : 0.02M 酢酸アンモニウム溶液-メタノール混液(100:0)から(0:100)までの直線濃度勾配を30分間行い, 以後, 混合比(0:100)を維持した。

流速 : 1 ml/分

注入量 : 10  $\mu$ l

測定波長 : 510 nm

## 3. 標準溶液の作製

各着色料100 mgを秤取し, 水を加えて溶かして100 mlとした。この液を水で希釈して一定濃度の標準液, および標準混合溶液を調製し, HPLCに注入した。

## 結果および考察

HPLCによる指定外着色料を分析, 確認する方法は, 前述のようにいくつか報告<sup>3-6)</sup>されている。しかし, これらの方法は, 着色料の種類がある程度推定されているときに有効な方法である。従って, 通常の検査時に未知のピークが出現したときにある程度の着色料の種類推定が必要になる。そこで, 定性試験の一助とするために, 指針<sup>7)</sup>およびその解説書<sup>8)</sup>のHPLC条件を変えずに, そのまま準用したときの指定外着色料の保持時間の調査を行った。

Table 1 に指針<sup>7)</sup>及び解説書<sup>8)</sup>のHPLC条件下における

Table 1. Relative retention times of food colors and nonpermitted colors by HPLC

Color	C.I. Number	Relative retention time by HPLC	
		Conditions A * <sup>1</sup>	Conditions B * <sup>2</sup>
Food red No.2 (Amaranth)	C.I. 16185	1.49	1.29
Food red No.3 (Erythrosine)	C.I. 45430	5.59	4.51
Food red No.40 (Allura red AC)	C.I. 16035	3.45	2.85
Food red No.102 (New coccine)	C.I. 16255	2.05	2.01
Food red No.104 (Phloxine)	C.I. 45410	6.50	4.87
Food red No.105 (Rose bengale)	C.I. 45440	7.01	4.95
Food red No.106 (Acid red)	C.I. 45100	5.48	4.46
Food yellow No.4 (Tartrazine)	C.I. 19140	1.00	1.00
Food yellow No.5 (Sunset yellow FCF)	C.I. 15985	2.63	2.32
Food green No.3 (Fast green FCF)	C.I. 42052	4.25	3.79
Food blue No.1 (Brilliant blue FCF)	C.I. 42090	4.41	3.86
Food blue No.2 (Indigo carmine)	C.I. 73015	1.76	1.46
Acid yellow	C.I. 13015	1.05	
Acid violet 6B	C.I. 42640		4.79
Acid blue 3	C.I. 42051	5.42	
Azule blue VX	C.I. 42045	4.03	
Azo rubine extra	C.I. 14720	4.14	3.71
Eosin	C.I. 45380	5.12	
Orange I	C.I. 14600	4.47	4.06
Orange II	C.I. 15510	5.55	
Orange G	C.I. 16230	2.50	
Orange RN	C.I. 15970	5.57	4.60
Guinea green B	C.I. 42085	6.15	
Quinoline yellow	C.I. 47005	4.73	
Green S	C.I. 44090	3.81	
Chrysoin S	C.I. 14270	1.39	
Naphthol yellow S	C.I. 10316	1.82	
Patent blue V	C.I. 42051	5.49	4.33
Fast red E	C.I. 16045	4.02	
Fast red S	C.I. 15620		4.95
Brilliant black BN	C.I. 28440	2.95	2.41
Brilliant milling green	C.I. 42100	5.27	
Benzyl violet 4B	C.I. 42604	6.30	
Ponceau 3R	C.I. 16155	4.64	
Ponceau 6R	C.I. 16290	0.30	0.21
Ponceau R	C.I. 16150	4.19	
Ponceau SX	C.I. 14700	4.45	3.91
Martius yellow	C.I. 10315	4.32	
Red 2G	C.I. 18050	3.18	
Red 6B	C.I. 18055	2.95	

\*<sup>1</sup> HPLC conditions proposed by the Ministry of Health and Welfare<sup>7)</sup>

Column: TSK-gel ODS-80Ts (4.6 mm x 150 mm); mobile phase: a mixture of 0.01 mol/l diammonium hydrogenphosphate and methanol (9:1), linear gradient (0 to 25 min) to the ratio (2:3), and held the ratio; flow rate: 1 ml/min; detection: 254 nm (or 200-700 nm)

\*<sup>2</sup> HPLC condition<sup>8)</sup> modified the above conditions (see Fig. 1)

食用黄色4号の保持時間を1.00としたときのその他の指定着色料及び指定外着色料の相対保持時間を示した。また、Fig. 1に解説書<sup>8)</sup>のHPLC条件下における着色料のクロマトグラム(510 nmで測定)を示した。指定着色料12種類は、既報<sup>7,8)</sup>のように相互に十分に分離できた。

指定外着色料は、指針の方法では、20~30分の間に、解説書の方法では、25~30分の間に集中的に出現した。この時間帯では、許可着色料と指定外着色料、あるいは指定外着色料の間での相互分離が不十分であった。しかし、フォトダイオードアレーを用いることにより、相互の区別は可能であった。

解説書<sup>8)</sup>の測定条件(測定波長 510 nm)では、キノリンイエローは吸収を示さず、本実験条件下では見逃す可能

性があった。ただし、415 nmで測定することにより検出可能であった。また、食用赤色105とファストレッドSとの分離が不十分であった。

指針の測定条件では、オレンジRNとオレンジIIとの、アズールブルー-VXとエオシンとの、ポンソー-SXとオレンジIとの、また、緑色3号の前後にアゾルビンエキストラ、ポンソー-Rおよびマーチウスエローが出現し、相互分離はできなかった。しかしながら、これらの結果は、輸入食品中における着色料の試験において比較的検出率の高い、アゾルビンエキストラ、ファストレッドE、オレンジI、ポンソー-SX、ポンソー-6R、オレンジII、ブリリアントブラックBN、パテントブルー-V、アズールブルー-VX、およびアシッドバイオレット6Bなどの検出が可能であるこ

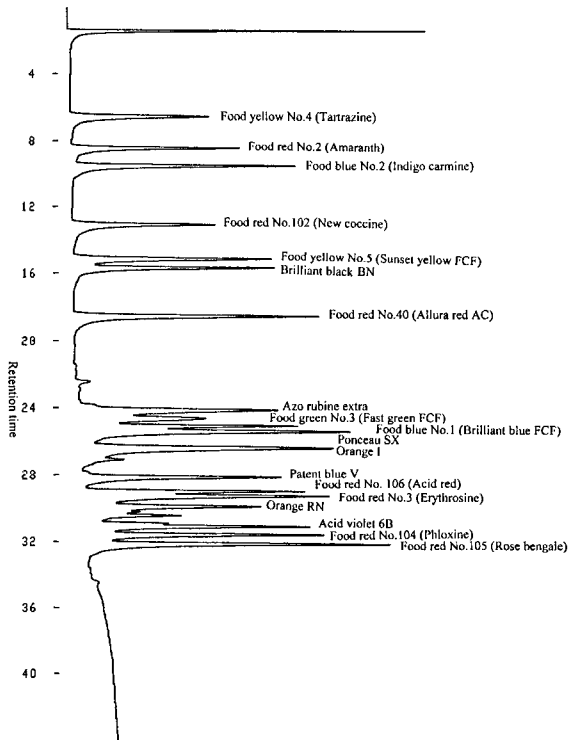


Fig. 1. High-performance liquid chromatogram of permitted and some nonpermitted food colors

#### HPLC conditions<sup>8)</sup>

Column : Zorbax C8 (4.6 mm × 150 mm) ; Mobile phase : 0.02 mol/l ammonium acetate solution-methanol (0 to 100%) linear gradient (0 to 30 min), and held 100% methanol; flow rate: 1 ml/min; detection: 510 nm

とを示している。許可着色料以外のピークを認めた場合、表1に示した相対保持時間とフォトダイオードアレーの併用によるスペクトル分析を参考に指定外着色料の推定が可能である。推定された着色料については、前述の文献<sup>3,6)</sup>の条件で定性が可能となる。黄色系着色料の使用が疑われる場合には、HPLC条件のうち、検出波長のみを変更して、あるいは254 nmを用いてクロマトグラフィーを行う必要がある。

## 結 論

指定外着色料の定性を容易にするために、指針およびその解説書による条件下での指定外着色料のHPLC分析を行い相対保持時間を求めた。指針や解説書の分析条件下で未知のピークが出現した場合に、他の方法で定性試験を行うための参考として利用することができ、指定外着色料の種類推定が容易となる。

## 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局検疫業務管理室監修：輸入食品1993，日本食品衛生協会（1995）
- 2) 日本薬学科編：衛生試験法・注解1990，pp.500-509，金原出版（1990）
- 3) 宮川弘之ら：東京衛研年報，**47**，75-77（1996）
- 4) 中沢久美子ら：同上，**46**，108-114（1995）
- 5) 石川ふさ子ら：同上，**42**，141-146（1991）
- 6) 石川ふさ子ら：同上，**41**，101-107（1990）
- 7) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針食品中の食品添加物の分析法，pp.142-166，食品衛生協会（1989）
- 8) 谷村顕雄他監修：食品中の食品添加物分析法解説書，p. 899，講談社サイエンティフィック（1992）