

# 食用タール色素検査における検体前処理法の検討

山上隆也\* 矢崎礼子

## Extraction Method of Food Coal-Tar Dyes in Foods for High Performance Liquid Chromatography

Takaya YAMAGAMI\*, Ayako YAZAKI

キーワード：食用タール色素、検体前処理法、高速液体クロマトグラフィー

食用タール色素はさまざまな食品の着色料として使用されており、食品衛生法で 12 種類の使用が許可されている。当所では、食品に含まれる食用タール色素の定性試験をルーチン検査として行っており、「第 2 版食品中の食品添加物分析法」<sup>1)</sup> に準じた方法で実施している。すなわち、食品から抽出したタール色素を高速液体クロマトグラフィーで測定する方法であるが、検出目的とする食用タール色素の種類によっては検出され難かったり、再現性の得られ難いことがあった。この要因として、食品試料からタール色素を抽出・精製する検体前処理の影響が考えられたので、若干の検討を行った。

### 検査方法

#### 1. 検体前処理法（公定法）

「第 2 版食品中の食品添加物分析法」に準じた検体前処理法であるポリアミド固相カラム精製法を公定法とした。すなわち、試料 10g に 4 倍量の溶出液を加えて色素を抽出した。抽出液を遠心、ろ過し、酢酸もしくは水酸化ナトリウムで中和した後、温浴（40℃）でアンモニア、エタノールを蒸発させて水で 20ml とした。これを酢酸で酸性としてポリアミド固相カラムに負荷し、エタノール・アンモニア混液で溶出した。酢酸で中和した後、エバポレーターで濃縮乾固（40℃）し、蒸留水 10ml で溶解したものを試料液とした。

\*：現 山梨県立中央病院

#### 2. 高速液体クロマトグラフィー

得られた試料液 10  $\mu$ l をフォトダイオードアレイ検出器 SPD（島津）付高速液体クロマトグラフ LC10 AD（島津）で測定した。分析カラムは TSKgel ODS 80-Tm（東ソー）を用い、カラム温度は 40℃とした。移動相は A 液を 0.01M 酢酸アンモニウム、B 液をアセトニトリルとし、A 液：B 液（95：5）から（50：50）までの直線濃度勾配を 30 分行った。

測定波長は食用黄色 4 号（Y4）は 428nm、食用黄色 5 号（Y5）は 482nm、食用青色 1 号（B1）、食用青色 2 号（B2）、食用緑色 3 号（G3）は 630nm、食用赤色 2 号（R2）、食用赤色 3 号（R3）は 526nm、食用赤色 40 号（R40）、食用赤色 102 号（R102）は 508nm、食用赤色 104 号（R104）は 538nm、食用赤色 105 号（R105）は 548nm、食用赤色 106 号（R106）は 566nm とした。

#### 3. 回収率の算出法

食用タール色素 12 色の各標準液（1000  $\mu$ g/ml）を 0.5ml ずつ混合して水で 10ml としたものを混合標準液（各 50  $\mu$ g/ml）とした。混合標準液を測定して得られた各色素のピーク面積に対する試料液で得られた各色素のピーク面積の割合を回収率（%）とした。

### 検討事項と結果

#### 1. 溶出液の比較

公定法では溶出液として①水、②50%エタノール、③アンモニア・エタノール混液を食品試料の種類によって使い分けることとなっているが、測定対象とするタール色素の種類ごとによる指定はない。

表 1 溶出液別の回収率

	溶出液		
	①	②	③
Y4	91.0	98.7	92.3
R2	88.4	97.7	95.7
B2	59.0	100.4	110.4
R102	97.3	98.8	97.2
Y5	84.0	96.3	95.6
R40	97.8	99.6	98.5
G3	89.9	94.1	99.7
B1	95.3	97.3	93.2
R3	71.6	78.7	72.6
R106	90.7	95.3	96.1
R104	73.9	76.6	77.7
R105	38.8	59.1	52.1

①アンモニア・エタノール混液

②水・エタノール混液 (50%エタノール)

③水

しかし、用いる溶出液とタール色素の組み合わせによっては回収率に差が生じるのではないかと考え、混合標準液を試料に、①から③の各溶出液を用いて測定し、回収率を比較した。

その結果、溶出液としてアンモニア・エタノール混液を用いたときの回収率は、水、50%エタノールを用いた場合よりも全ての色素で低く、特にB2で顕著であった。水、50%エタノールでは、それぞれ回収率に大きな差は認められなかった(表1)。インジゴイド系色素であるB2は耐アルカリ性の低いことが知られており<sup>2)</sup>、B2を含む食品試料の場合には抽出液としてアンモニア・エタノール混液は適していないことが示唆された。

## 2. ポリアミド固相カラムからの溶出順

筆者らは、ポリアミド固相カラムから色素を溶出させた後に、ポリアミドに若干の着色が残っていることを経験していた。このように、タール色素がカラムへ残存すれば回収率が低下すると考えられることから、食用タール色素12色の溶出順を調べて、最後までカラムに残存する色素を特定することとした。そこで、混合標準液をポリアミド固相カラムに負荷してエタノール・アンモニア混液約30mlで溶出した。溶出液を溶出順に約2mlずつ採取して全14分画とし、

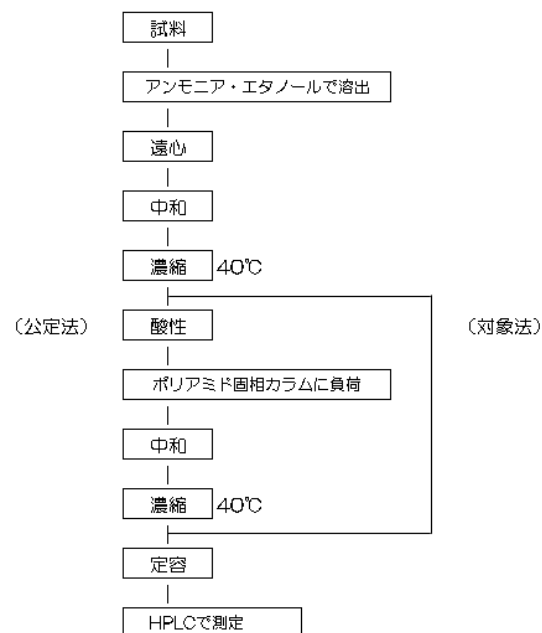


図 1 検体前処理法

それぞれの分画についてタール色素を測定した。

その結果、Y4, Y5, R2, R40, R106, R102, G3, B1, B2 は分画1~6に検出された。R104は分画1~9、R3, R105は分画2~10に検出された。キサンテン系色素であるR3, R104, R105は他のタール色素よりもポリアミド固相カラムからの溶出が遅く、ポリアミド固相カラムに残存してしまう可能性のあることが示唆された。

## 3. ポリアミド固相カラム精製を省略した方法(対照法)

公定法では夾雑物を取り除くために試験液をポリアミド固相カラムによって精製する工程がある。これが、回収率を左右する要因の一つではないかと考え、検体前処理法としてポリアミド精製を省略した方法(対照法)を行って、公定法と結果を比較した。

対照法は図1に示したとおり、試料10gに4倍量の溶出液を加えて色素を抽出し、遠心、ろ過して酢酸もしくは水酸化ナトリウムで中和した。エバポレーターで濃縮乾固(40°C)して蒸留水10mlで溶解したものを試料液とした。

ポリアミド固相カラム精製によって回収率の低下する色素を特定するため、試料には混合標準液を用い、溶出液は水・エタノール混液とした。

表 2 公定法と対象法との回収率の比較

	SOP 法	対象法
Y4	98.7	98.1
R2	97.7	98.1
B2	100.4	93.7
R102	98.8	98.4
Y5	96.3	98.0
R40	99.6	97.9
G3	94.1	98.8
B1	97.3	98.4
R3	78.7	98.7
R106	95.3	98.7
R104	76.6	98.5
R105	59.1	98.0

その結果、公定法ではキサントレン系色素である R3, R104, R105 の回収率が特に低かったが、対照法ではどの色素もほぼ同等で良好な回収率であった(表 2)。公定法ではポリアミド固相カラムに負荷する前に検液を酸性化するが、キサントレン系色素は酸性溶液中では不溶化して沈殿を生じることが知られている<sup>2)</sup>。このため、公定法では回収率が低かったものと思われる、キサントレン系色素を検出対象とする際には、対象法や既報<sup>3)</sup>など液性を酸性化しない方法を併行して実施することが必要であろうと考えられた。

## まとめ

食品からタール色素を抽出する際の溶出液としては、B2 を測定対象とする際にはアンモニアを含まない溶出液が適していることが示唆された。

キサントレン系色素である R3, R104, R105 はポリアミド固相カラム精製を行うことで回収率が低下したことから、対照法などを併せて実施することが必要と思われた。

今回の結果は混合標準液を試料としたことから、食品成分による影響は考慮されていない。今後は食品を試料とした場合について比較検討していくことが課題である。

## 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課：第 2 版食品中の食品添加物分析法、平成 12 年 3 月 30 付け衛化第 15 号通知別添
- 2) 三栄源エフ・エフ・アイ：タール色素の性質, <http://www.saneigenffi.co.jp/color/color13.html>
- 3) 林都香、千葉美子、柳茂、山口友美、氏家愛子、濱名徹：食用酸性タール色素の抽出および精製法の検討、宮城県保健環境センター年報、97-99, 27, 2009