ノート

固相抽出及び HPLC を用いた高タンパク食品中の
21 種タール色素の分析法

(平成 11 年 9 月 24 日受理)

石川ふさ子* 重岡捨身* 長嶋真知子* 高橋美佐子*
上村 尚* 大西和夫* 西島基弘*Analytical Method of 21 Coal-Tar Dyes in Protein-rich Foods by
Solid-phase Extraction and HPLCFusako ISHIKAWA, Sutemi SHIGEOKA, Machiko NAGASHIMA, Misako TAKAHASHI,
Hisashi KAMIMURA, Kazuo ONISHI and Motohiro NISHIJIMA(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1,
Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan)

A method of cleaning up coal-tar dyes in protein-rich foods, e.g. processed fish and meat, was investigated.

The dyes were extracted with 4 mol/L urea and with a mixture of 28% ammonia solution-methanol-4 mol/L urea (7 : 80 : 20) from foods, and cleaned with a Sep-Pak Vac C₁₈ cartridge in the ion-pair mode. The dyes were eluted with 0.025 mol/L ammonium acetate (containing 0.01 mol/L tetrabutylammonium bromide (TBA))-acetonitrile (1 : 1) 2 mL and ammonium acetate (containing TBA)-2-propanol (1 : 1) 2 mL from the cartridge. The eluate was adjusted with 0.1 mol/L TBA to 5 mL and analyzed by isocratic HPLC with a photo-diode array detector.

The recoveries of dyes from boiled fish paste, ham and cod roe at 10 µg/g were more than 91.0, 85.5 and 85.4%, respectively, except for green S (GS), erythrosine (R3) and phloxine (R104). Using the proposed method, these dyes were detected in commercial foods.

(Received September 24, 1999)

Key words: タール色素 coal-tar dye; 高タンパク食品 protein-rich food; 固相抽出法 solid-phase extraction; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; フォトダイオードアレー検出器 photo-diode array detector; 不許可色素 non-permitted dye; セップパックバック C₁₈ Sep-Pak Vac C₁₈; イオンペア試薬 ion pair reagent

緒 言

食品中のタール色素の分析法はこれまで数多く報告されている^{1)~14)}。しかし魚肉、獣肉加工食品など、タンパク質を多く含む食品中の色素の分析は、抽出やクリーンアップの段階で困難を伴うことが多い。著者らは前報¹⁴⁾で食品中のタール色素の分析法として、前処理に固相抽出法、分離・定量にアイソクラティック HPLC を用いる方法を報告したが、高タンパク食品にその前処理法を適応するのは困難であった。そこで今回、高タンパク食品中の色素を分析する際の前処理法について検討したので、その結果を報告する。なお、高速液体クロマトグラフにフォトダイオードアレー検出器を接続し、分析対象は許可色素 12 種に不許可色素 9 種を加えた計 21 種とした。

実験方法

1. 試 料

都内で市販されていたたらこ、かまぼこ、ハム、さけフレーク及びでんぶを用いた。

2. 標準品及び試薬・試液

色素標準品

許可色素: アマランス (以下 R2), エリスロシン (R3), ニューコクシン (R102), フロキシン (R104), ローズベンガル (R105), アシッドレッド (R106), タートラジン (Y4), サンセットイエロー FCF (Y5), ファストグリーン FCF (G3), ブリリアントブルー FCF (B1) 及びインジゴカルミン (B2) は国立医薬品食品衛生研究所標準品を, FD & C レッド 40 号 (R40) は東京化成工業(株)製を用いた。

不許可色素: アゾルビン (AZO, C.I. No. 14720), ファーストレッド E (FRE, C.I. No. 16045) は東京化成工業(株)製を, パテントブルー V (PBV, C.I. No. 42051), アズール

* 東京都立衛生研究所: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

ブルー (AZU, C.I. No. 42045) 及びグリーン S (GS, C. I. No. 44090) は Sigma 社製を, レッド 2G (R2G, C.I. No. 18050), キノリンイエロー (QY, C.I. No. 47005), ブラック PN (BPN, C.I. No. 28440) 及びオレンジ II (ORII, C.I. No. 15510) は Chroma 社製を用いた。

試薬・試液

TBA: 臭化テトラブチルアンモニウム (ナカライテスク (株) 製イオンペア用)

C₁₈ カートリッジ: Waters 社製 Sep-Pak Vac C₁₈ (0.5 g) をあらかじめメタノール 5 mL, 水 5 mL, 0.01 mol/L TBA 5 mL でコンディショニングしたもの。

TBA/酢酸アンモニウム溶液: 0.025 mol/L 酢酸アンモニウムに 0.01 mol/L になるように TBA を溶かした。

その他の試薬は市販特級品を用いた。

3. 装 置

高速液体クロマトグラフ: ポンプは PU-980, 検出器は MD-915, オートサンプラーは AS-950, カラムオーブンは 860-CO, 脱気装置は DG-980-50, 及びデータ処理用ソフトは BOWIN (以上日本分光 (株) 製) を用いて構成した。

ミキサー: ULTRA-TURRAX (JANKE & KUNKEL 社製)

振とう機: VERTICAL SHAKER ((株) 杉山元医理器製)

遠心分離機: Avant.TMHP-25 (ベックマン社製)

吸引マニホールド: GL-SPE 吸引マニホールドキット (ジーエルサイエンス社製)

4. 試験溶液の調製

たらこ: 試料 2.0 g を 50 mL 容の共栓遠心沈殿管にひょう取し, 4 mol/L 尿素 30 mL を加えて 10 分間振とう後, 遠心分離 (10,000 rpm, 30 分間) し, 上澄液を分取した (抽出液 A)。残さについて 28% アンモニア-メタノール-4 mol/L 尿素 (7:80:20) 混液 30 mL 及び 20 mL を加えて同様に 2 回操作し, 上澄液を合した (抽出液 B)。抽出液 B に 4 mol/L 尿素 10 mL を加えて 60~65°C の水浴上で約 2/3 量になるまで濃縮し, 1/10 容の 0.1 mol/L TBA を加えて吸引ろ過 (桐山ろ紙 No. 4) し, ろ液を 3~4 mL/min で C₁₈ カートリッジに負荷した。更に抽出液 A に同量の水を加え, 1/10 容の 0.1 mol/L TBA を加えて吸引ろ過し, 同じカートリッジに負荷した後, TBA/酢酸アンモニウム溶液 10 mL で洗浄した。TBA/酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (1:1) 2 mL, 次いで同溶液-イソプロパノール (1:1) 2 mL で色素を溶出し, 0.1 mol/L TBA で溶出液を 5 mL とし, これを HPLC 用試験溶液とした。

ハム・さけフレーク: 細切した試料 2.0 g に 4 mol/L 尿素 30 mL を加えてホモジナイズし, たらこと同様に操作し抽出液を得た。これにヘキサソ 10 mL を加えて 10 分間振とう後, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) し, ヘキサソ層を吸引して除去し, 水層を抽出液 A とした。以下

たらこと同様に操作した。

かまぼこ, でんぶ: 細切した試料 2.0 g に 4 mol/L 尿素 30 mL を加えてホモジナイズし, 以下たらこと同様に操作した。

5. HPLC の測定条件

前報¹⁴⁾ に準じ, 次の条件で分析した。

HPLC A; カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR (4.6 mm i.d. × 250 mm, ナカライテスク (株) 製), 移動相: TBA/酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル-メタノール (62:28:10), 検出波長: 380 nm~650 nm, 流速: 1 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 10 µL

HPLC B; 移動相: TBA/酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル-メタノール (50:40:10), その他は HPLC A と同じ。

結果及び考察

1. 抽出法の検討

食品中のタール色素の抽出溶媒は, 水又は 1% アンモニア水あるいは 1% アンモニア/70% エタノールなどが繁用されている^{1)~3)}。しかし, タンパク質を多く含む魚肉, 獣肉加工食品などは色素がタンパク質と結合あるいは吸着して良好な抽出率が得られないことが多い。さらには抽出率を高めるためにタンパク分解酵素を作用させる方法を報告している¹³⁾。しかしこの方法は分析に長時間を要すること, タンパク分解酵素が高価であることから, 他の方法を検討した。

最初に可溶性のタンパク質を多量含有するたらこを用いて抽出法を検討した。各標準色素を添加し, 水及びアンモニア性メタノールで抽出したところ, 大部分の色素が抽出され, たらこからの抽出はほぼ良好であった。しかし, 水抽出液を室温で放冷するときやアンモニア及びメタノールを温浴上で蒸発させるときに沈殿が生じ, これにキサンテン系色素などが吸着される現象が観察された。この生じた沈殿物を加水分解し, アミノ酸アナライザーで分析すると多量のアミノ酸類が検出されたことから, この沈殿物はタンパク質であることが示唆された。そこで抽出後の沈殿物の生成を少なくするために, タンパク質の可溶化法を検討した。可溶化法としては界面活性剤や尿素を用いる方法などがある¹⁵⁾。まず界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTB) を用いたところ, 可溶化効果は認められたが, SDS は色素の C₁₈ カートリッジへの保持を妨害し, CTB は HPLC の保持時間を長くし分析時間に影響を与えた。

次に尿素の効果^{15), 16)} を検討した。4 mol/L 尿素を抽出溶媒としたとき, 抽出液は室温に放置しても澄明さが保たれ, タンパク質可溶化効果が認められた。しかし, 尿素抽出のみではキサンテン系色素の一部が抽出されず, 大部分の色素を抽出するためには更にアンモニア性メタノールで抽出する必要があった。なおタンパク質の可溶化には一般的には 8 mol/L 尿素が用いられるが, 1, 4 及び 8 mol/L

Table 1. Effect of Load Solution on Dyes Recovery

Dye	Recovery (%) [*]		
	I ^{**}	II ^{**}	III ^{**}
R2	57.8±6.5	92.7±1.0	92.3±2.3
R40	98.4±6.2	93.8±3.0	97.6±2.2
R102	100.0±6.5	99.1±1.6	100.1±2.5
R3	75.1±7.5	52.4±5.9	69.4±6.4
R104	93.0±2.0	58.6±8.3	90.5±2.3
R105	68.7±4.8	12.7±7.0	63.9±6.0
R106	98.1±4.2	96.2±5.5	96.9±3.0
Y4	52.2±1.0	93.0±1.6	91.9±1.4
Y5	103.0±1.4	101.0±0.3	100.0±1.5
B1	91.3±3.1	92.6±0.7	99.4±2.1
B2	45.5±5.0	78.2±8.3	88.7±4.2
G3	94.4±6.1	92.6±1.0	97.9±0.6
R2G	90.8±7.0	96.9±3.0	92.6±6.1
FRF	99.0±1.0	89.9±4.7	93.0±4.2
AZO	82.7±5.5	87.6±1.9	85.4±2.9
QY	86.9±2.2	96.4±2.8	92.8±1.1
OR II	98.4±4.5	96.3±6.5	92.1±3.9
GS	47.5±7.3	68.2±3.2	68.2±2.7
AZU	96.1±4.1	91.0±3.2	98.9±2.0
BPN	93.5±2.4	85.5±3.3	85.9±5.9
PBV	92.9±2.1	97.2±7.3	97.9±3.7

^{*} Mean±S.D., n=3

^{**} I: The extract with 4 mol/L urea was added to the extract with a mixture of 28% ammonia solution-methanol-4 mol/L urea (7:80:20).

II: The extract with 4 mol/L urea was added to the extract with a mixture of 28% ammonia solution-methanol-4 mol/L urea (7:80:20) evaporated ammonia and methanol.

III: The extract with 4 mol/L urea and the extract with a mixture of 28% ammonia solution-methanol-4 mol/L urea (7:80:20) evaporated ammonia and methanol to pH 9.0.

尿素で比較検討した結果、4 mol/L と 8 mol/L 尿素で有意差は認められなかった。そこで 4 mol/L 尿素を抽出溶媒として用いることとした。

以上の結果から、たらこ中の色素の抽出は、試料 2.0 g を 50 mL 容の共栓遠心沈殿管にひょう取し、4 mol/L 尿素 30 mL を加え 10 分間振とう後、遠心分離 (10,000 rpm, 30 分間) し、上澄液を分取し、アルカリ性で不安定な B2 などの色素を抽出した (抽出液 A)。更に残さについて 28% アンモニア-メタノール-4 mol/L 尿素 (7:80:20) 混液 30 mL 及び 20 mL で 2 回同様に操作し、主にキサンテン系色素を抽出した (抽出液 B)。

その他の食品は細切後、4 mol/L 尿素 30 mL を加えてホモジナイズし、同様に操作した。しかしハム、さけフレークは抽出液 A が白濁した。これは食品中の脂肪によると考えられるためヘキサン 10 mL で 10 分間振とうし、遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) した後、ヘキサン層を吸引して除去し、水層を抽出液 A とした。残さはたらこ同様に操作し、抽出液 B を得た。

2. 前処理方法の検討

調製した色素抽出液中の可溶性タンパク質は色素と結合

し、クリーンアップ操作に影響を及ぼすことが懸念されるため、除タンパク法を検討した。色素のイオンペアを形成し有機溶媒へ転溶する方法、透析、限外ろ過などを試みたがいずれもキサンテン系色素が抽出液中のタンパク質と結合あるいは吸着して満足できる結果は得られなかった。そこで夾雑物のクリーンアップと除タンパクも期待できる C₁₈ カートリッジを用い、たらこを試料としてカートリッジへ負荷する試料溶液、カートリッジからの溶出溶媒の検討を行った。

試料溶液の検討

Lawrence らが報告⁵⁾ しているイオンペア法を参考に、以下の検討をした (Table 1)。各色素標準液を添加した試料 2.0 g から得た抽出液 A と抽出液 B を合し、TBA を加えて C₁₈ カートリッジに負荷したとき (I) はキサンテン系色素の保持はほぼ良好であったが、R2, Y4, B2 及び GS の保持が悪く、試料溶液中のメタノールとアンモニアがこれらの色素の保持に悪影響を及ぼしていると推定された。そこでアンモニアとメタノールを留去した抽出液 B と抽出液 A を合し、TBA を加えて負荷したところ (II), R2, Y4, B2 及び GS の保持は良好であったがキサンテン系色素の一部がカートリッジに保持されずに溶出した。これらの色素とタンパク質の結合がカートリッジへの保持を妨げていることが推察された。(I) でキサンテン系色素の保持が良好であり (II) では保持されなかったことから、これらの色素とタンパク質との結合は液性に影響されると考えた。

そこで抽出液 B に 4 mol/L 尿素 10 mL を加え、タンパク質が変性しない 60~65°C の水浴上で約 2/3 量まで濃縮し pH 9 付近とし、1/10 容の 0.1 mol/L TBA を加えて、吸引ろ過したろ液を C₁₈ カートリッジに負荷した。更に抽出液 A に同量の水を加えて希釈し、1/10 容の 0.1 mol/L TBA を加え、吸引ろ過したろ液を同じカートリッジに負荷した (III)。その結果、GS, R3, R105 の回収率は 68.2, 69.4, 63.9% と若干低かったが、他の色素は良好な回収結果が得られた。

溶出溶媒の検討

前報¹⁴⁾ で報告した 2 種のアイソクラティック HPLC で定量するために、色素をカートリッジからの溶出溶媒で分画することを試みた。しかしイオンペア試薬を加えているため分画は困難であったので、全色素を同時に溶出する溶媒を検討した。

まずメタノール・水系、アセトニトリル・水系で溶出を試みたが、全色素の溶出は困難であった。次いで HPLC の移動相の水相として用いた TBA/酢酸アンモニウム溶液とアセトニトリルの混液を用いたところ、多くの色素は溶出されたがキサンテン系色素はいずれの組成でも完全には溶出されなかった。種々検討した結果、TBA/酢酸アンモニウム溶液とイソプロパノールの混液で溶出されることが分かった。しかしイソプロパノールの割合が高くなると Y4, GS の溶出が悪くなり、また HPLC において B2, Y4

Fig. 1. Chromatograms of 21 standard dyes [A], [B] and cod roe [C] by HPLC with a photo-diode array detector

Operation conditions: column, COSMOSIL 5C₁₈-AR (4.6 mm i.d.×250 mm); mobile phase, 0.025 mol/L ammonium acetate (containing 0.01 mol/L tetrabutylammonium bromide)-acetonitrile-methanol (50:40:10) for [A], and (62:28:10) for [B] [C]; detection wavelength, 380~650 nm; injection volume, 10 µL; column temp., 40°C; flow rate, 1.0 mL/min; concentration of each dye, 4 µg/mL.

Dyes: 1, B2; 2, QY; 3, GS; 4, Y5; 5, Y4; 6, R40; 7, R2; 8, G3; 9, R2G; 10, B1; 11, FRE; 12, AZU; 13, R102; 14, R106; 15, BPN; 16, AZO; 17, PBV; 18, OR II; 19, R3; 20, R104; 21, R105.

などの保持時間が短い色素の保持時間が更に短く、かつピーク形状が悪くなった。

そこでカートリッジからの溶出と HPLC の保持時間及びピーク形状を考慮して、TBA/酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (1:1) 2 mL, 次いで同溶液-イソプロパノール (1:1) 2 mL で全色素を溶出し、0.1 mol/L TBA で 5 mL にメスアップし、これを HPLC 用試験溶液とした。

3. HPLC

フォトダイオードアレー検出器を接続したときの色素標準液のクロマトグラムを Fig. 1 の [A], [B] に示した。R3, R104 及び R105 以外の 18 種の色素は同時に分析できた。

R2G と B1, AZU と R102 の分離は不完全であったがピークの前後の吸収スペクトルでそれぞれの 2 色は分別できた。またカラムのロット差で前報¹³⁾と比較して保持

Table 2. Dyes Recovery from Various Protein-rich Foods*

Dye	Recovery (%)**		
	Boiled fish paste	Ham	Cod roe
R2	92.7±0.1	92.2±2.6	92.3±2.3
R40	95.4±3.2	96.3±3.6	97.6±2.2
R102	93.6±4.2	92.7±3.6	100.1±2.5
R3	66.6±2.6	82.2±3.1	69.4±6.4
R104	91.0±1.3	98.3±1.7	90.5±2.3
R105	66.0±2.7	75.0±7.0	63.9±6.0
R106	96.0±0.8	98.2±4.1	96.9±3.0
Y4	91.1±3.1	93.9±3.3	91.9±1.4
Y5	95.6±4.9	96.5±1.7	100.0±1.5
B1	93.9±2.4	100.4±1.7	99.4±2.1
B2	91.3±5.6	96.7±7.3	88.7±4.2
G3	92.9±2.5	101.4±2.3	97.9±0.6
R2G	94.4±5.0	89.1±2.9	92.6±6.1
FRE	93.4±5.3	89.1±2.9	93.0±4.2
AZO	92.9±2.1	88.8±2.4	85.4±2.9
QY	99.5±4.2	95.6±3.1	92.8±1.1
OR II	95.1±3.5	85.5±2.4	92.1±3.9
GS	65.4±0.3	67.6±5.0	68.2±2.7
AZU	95.4±1.7	100.4±1.7	98.9±2.0
BPN	98.5±2.3	97.1±1.9	85.9±5.9
PBV	96.4±1.9	98.5±1.7	97.9±3.7

* The 10 µg/g of each dye was added to foods.

** Mean±S.D., n=3

Table 3. Analysis of Dyes in Commercial Protein-rich Foods

Food	Indication dye	Method	
		C ₁₈ Cartridge*	Polyamide**
Cod roe	R102	3.3	1.5
	R106	2.4	1.2
	Y5	11.8	5.9
Mentaiko	R3	1.5	—
	R102	31.8	7.4
	Y5	26.5	12.9
Salmon flakes 1	R102	33.7	5.5
	Y5	63.4	39.2
Salmon flakes 2	R102	33.1	7.6
	Y5	33.5	20.0
Boiled fish paste	R3	97.7	1.3
	R106	1.0	0.3
Mushed and seasoned fish	R106	29.0	12.0

* The proposed method (µg/g)

** The Standard Method of Analysis for Hygienic Chemist—with commentary—(µg/g)

時間が短くなったが分離に大きな影響はなかった。

4. 添加回収実験

タール色素の検出されないかまぼこ、ハム及びたらこ、それぞれ 2.0 g に各色素標準液 (20 µg/mL) 1 mL を添加し、本法で分析したときの回収率を求め、その結果を Table 2 に示した。GS, R3, R105 はかまぼこで 65.4~66.6%, ハムで 67.6~82.2%, たらこでは 63.9~69.4%

Fig. 2. Spectra of dyes in commercial cod roe by HPLC with a photo-diode array detector
—, standard spectrum; ---, sample spectrum
Dyes: 4, Y5; 13, R102; 14, R106
Number of peaks were same as described in Fig. 1.

と若干低かったが他の色素はそれぞれ 91.0, 85.5 及び 85.4% 以上と良好な結果が得られた。

5. 市販食品の分析及び他の方法との比較

都内で購入した色素添加表示のあるたらこ、明太子、さけフレーク (2 種)、かまぼこ及びでんぶの計 6 検体に本法を適用した。また衛生試験法・注解によるポリアミド法¹⁾と比較し、その結果を Table 3 に示した。本法ではそれぞれ表示と検出された色素は一致したが、ポリアミド法では明太子の R3 が検出されなかった。また本法で得られた定量値は、ポリアミド法に比し、かまぼこの R3 は 75 倍、その他の食品から検出された色素も約 1.6~6 倍であり、明らかに色素の抽出及びクリーンアップが良好であった。このことから高タンパク食品中の色素、特にキサンテン系色素の分析に本法は有用であると考えられる。

また本法で分析したときの Y5, R102 及び R106 が検出されたたらこの HPLC のクロマトグラムを Fig. 1 の [C] に、吸収スペクトルを Fig. 2 に示した。図のようにスペクトルは一致し、それぞれの色素の同定が可能であった。

ま と め

魚肉、獣肉加工品など、タンパク質を多く含む食品中の 21 種のタール色素分析用の前処理法について検討した。抽出溶媒として 4 mol/L 尿素、28% アンモニア-メタノール-4 mol/L 尿素 (7:80:20) 混液を用いた。クリーンアップは C₁₈ カートリッジを用いてイオンペア法で行い、溶出溶媒は TBA/酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (1:1) 2 mL、同溶液-イソプロパノール (1:1) 2 mL を用い、0.1 mol/L TBA で 5 mL とし、2 種の移動相のフォトダイオードアレー検出器付きアイソクラティック HPLC で分析した。かまぼこ、ハム及びたらこに各色素 10 µg/g を添加し、回収実験を行った結果、それぞれの回収率は GS, R3, R105 を除いて 91.0, 85.5, 85.4% 以上と良好であった。

また本法とポリアミド法を用いて市販食品を分析したところ、本法では表示と一致する色素が保持時間とスペクトルで確認・定量できた。以上の結果から、高タンパク食品中の色素分析の前処理法として本法は有用であると考えられる。

文 献

- 1) Nippon Yakugaku Kai (Pharmaceutical Society of Japan) ed., "Eisei Shikento Chukai 1990 (Standard methods of analysis for hygienic chemists with commentary 1990)", Tokyo, Kanehara Shuppan, 1990, p. 500-547. (ISBN 4-307-47028-1)
- 2) 厚生省生活衛生局監修 "食品衛生検査指針—食品中の添加物分析法—" 東京, 日本食品衛生協会, 1989, p. 135-177.
- 3) Tanimura, A., *et al.*, eds., "Shokuhincho No Shokuhintenkabutsu Bunsekiho Kaisetsusho", Tokyo, Koudan-sha, 1992, p. 260-307. (ISBN 4-06-153705-9)
- 4) Puttemans, M. L., Dryon, L., Massart, D. L., Ion-pair high performance liquid chromatography of synthetic water-soluble acid dyes. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 1-8 (1981).
- 5) Lawrence, J. F., Lancaster, F. E., Conacher, H. B. S., Separation and detection of synthetic food colors by ion-pair high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **210**, 168-173 (1983).
- 6) Kuwano, K., Mitamura, T., Ion-pair high performance liquid chromatographic separation and determination of food coal-tar dyes. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **27**, 278-282 (1986).
- 7) Chonan, T., Hori, Y., Determination of coal-tar dyes in processed foods by high performance liquid chromatography. *Hokkaidoritsu Eiseikenkyujyo Ho (Report of the Hokkaido Institute of Public Health)*, **36**, 1-8 (1986).
- 8) Young, M. L., Rapid identification of color additives, using the C₁₈ cartridge: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 458-462 (1988).
- 9) Ohto, M., Matunaga, A., Yamamoto, A., Saitou, Y., Mizu-

- kami, E., Simultaneous determination of food coal-tar dyes by ion-pair high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **29**, 192–198 (1988).
- 10) Ishikawa, F., Saito, K., Nakazato, M., Fujinuma, K., Moriyasu, T., Nishima, T., Simultaneous determination of color additives by ion-pair high performance liquid chromatography. *Tokyotoritsu Eisei Kenkyujo Nenpo (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.)*, **41**, 101–107 (1990).
- 11) Ishikawa, F., Saito, K., Nakazato, M., Fujinuma, K., Moriyasu, T., Nishima, T., Determination of food colors by high performance liquid chromatography—identification of food colors detected from commercial food—. *Tokyotoritsu Eisei Kenkyujo Nenpo (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.)*, **42**, 141–146 (1991).
- 12) Hayashi, T., Fukaya, Y., Tanaka, H., Kunimatsu, M., Hotta, I., Ikai, Y., Oka, H., Hayakawa, J., Suzuki, R., A novel method for clean-up of coal-tar dyes using aquaternary amine cartridge. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **34**, 398–408 (1993).
- 13) Tsuji, S., Shibata, T., Okamoto, K., Takeda, K., Fujiwara, Y., Ito, Y., Preparation of sample solution using pronase treatment for determination of food coal-tar dyes in foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **36**, 68–76 (1995).
- 14) Ishikawa, F., Saito, K., Nakazato, M., Fujinuma, K., Moriyasu, T., Tomomatsu, T., Analytical method of 21 coal-tar dyes in food by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **37**, 281–287 (1996).
- 15) Anan, K., *et al.* eds., “Kiso Seikagaku Jikkenho (2)” Tokyo, Maruzen, 1983, p. 9–28.
- 16) Simpson, N., Van Home, K. C. (Sato, S. trs.), “Solvent extraction technology handbook (Saishin Kosochushutsuho Gaidobukku)”, Tokyo, GL Science, 1996, p. 46, p. 144.