ノート

5種の食用アゾ色素中の未反応原料、反応中間体及び副成色素の定量用 HPLC 条件の改良

(平成 12 年 7 月 31 日受理)

辻 澄子^{*†} 天倉吉章^{*} 岡田 舞^{*} 外海泰秀^{*}

Modification of HPLC Conditions for the Determinations of Raw Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in 5 Kinds of Food Azo Colors

Sumiko TSUJI[†], Yoshiaki AMAKURA, Mai OKADA and Yasuhide TONOGAI(Osaka Branch, National Institute of Health Sciences: 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; [†] Corresponding author)

Modification of HPLC conditions for the determinations of raw materials, intermediates and subsidiary colors (organic impurities) in 5 kinds of food azo colors were studied in order to analyze them simply and rapidly. The organic impurities were determined by HPLC using L-column ODS and a gradient system (0.02 mol/L ammonium acetate solution for 10 min, and a gradient with a mixture of acetonitrile and water (7:3)). The organic impurities in 163 samples of azo colors subjected to inspection in fiscal year 1999 were determined under the proposed HPLC conditions. It was found that the contents of organic impurities in 163 samples were less than the limit of Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 7th Edition.

(Received July 31, 2000)

Key words: アゾ色素 azo color; 未反応原料 raw material; 反応中間体 intermediate; 副成色素 subsidiary color; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 食用赤色 40 号 Food Red No. 40; 食用赤色 2 号 Food Red No. 2; 食用赤色 102 号 Food Red No. 102; 食用黄色 4 号 Food Yellow No. 4; 食用黄色 5 号 Food Yellow No. 5

緒言

食品添加物の安全性確保及び国際的な成分規格の整合性の観点から、平成 11 年 4 月に公布された第 7 版食品添加物公定書（食添 VII）¹⁾では、以前から規制されていた食用赤色 40 号（R-40; アルラレッド AC, CAS No. 25956-17-6, C.I. 16035, FD & C Red No. 40）及びそのアルミニウムレーキ²⁾以外に、食用赤色 2 号（R-2; アマランス, CAS No. 915-67-3, C.I. 16185）、食用赤色 102 号（R-102; ニューコクシン, CAS No. 2611-82-7, C.I. 16255, Ponceau 4R）、食用黄色 4 号（Y-4; タートラジン, CAS No. 1934-21-0, C.I. 19140, FD & C Yellow No. 5）、食用黄色 5 号（Y-5; サンセットイエロー FCF, CAS No. 2783-94-0, C.I. 15985, FD & C Yellow No. 6）においても未反応原料及び反応中間体について限度規格が設けられ、また、R-40 と同様に Y-5 では副成色素の限度規格も設けられ、HPLC を用いた分析法が指定された。

著者らは全国で生産された食用タール色素の製品検査を

業務として行っているため、1 年間の猶予期間を終え、平成 12 年度から、アゾ色素の HPLC 測定を実施している。規制対象となる有機性不純物の種類は色素ごとに異なるため、食添 VII の HPLC 条件では色素ごとに異なる移動相を採用している¹⁾。すなわち、R-40 の HPLC 条件^{1), 2)}は、移動相 A 液に 0.1 mol/L の酢酸アンモニウム溶液を、B 液にメタノールを用いている。一方、Y-5, R-2, R-102 及び Y-4 の食添 VII の HPLC 条件¹⁾は、A 液に 0.02 mol/L の酢酸アンモニウム溶液を、B 液にアセトニトリルを使用している。更に Y-4 は A 液に pH 4.0 に調整した 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液を使用している。また濃度勾配条件についてもそれぞれ異なった条件を採用している。よってこれらの方法により異なった種類の多数の検体を検査するには、色素ごとに移動相の交換が必要となり、同一のカラムで分析を行う場合カラムの安定化に長時間を要し、分析条件の再設定など、操作が煩雑になる。したがって、分析の省力化を考えると、5 種のアゾ色素中の有機性不純物について、同一の条件で定量できる HPLC 条件の確立が望まれる。

食添 VII の Y-5 の有機性不純物の HPLC 条件¹⁾では副

[†] 連絡先^{*} 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所: 〒540-0006 大阪市中央区法円坂 1-1-43

成色素スルファニル酸アゾ G 塩色素 (SA-G) と反応中間体 4,4'-(ジアゾアミノ)ジベンゼンスルホン酸=二ナトリウム塩 (DAADBS) がクロマトグラム上同一保持時間を示すことが多く^{3), 4)}, DAADBS の含量測定に誤差を生じやすい。

したがって、前報⁵⁾では Y-5 中の SA-G 及び DAADBS を分離・定量できる HPLC 条件を報告した。本報は、前述した背景から、5 種のアゾ色素中の有機性不純物の定量法について、食添 VII の HPLC 条件を改良し、同一の HPLC 条件で、食添 VII で規格値のある有機性不純物が定量できることを示した。更に本法を用いて製品検査に応用したのでその結果も併せて報告する。

実験方法

1. 試料

平成 11 年度製品検査試料のうちアゾ色素 163 検体 (R-2:5 検体, R-40:3 検体, R-102:44 検体, Y-4:73 検体, Y-5:38 検体)。

2. 試薬

4-アミノベンゼンスルホン酸 (SA; スルファニル酸) は JIS 試薬特級品を、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸=一ナトリウム塩 (NS; ナフチオン酸塩)、4-アミノ-5-メトキシ-2-メチルベンゼンスルホン酸 (CSA; クレシジンスルホン酸)、6,6'-オキシビス (2-ナフタレンスルホン酸)=二ナトリウム塩 (DONS), DAADBS, 4-ヒドラジノベンゼンスルホン酸 (HBSA), 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 (PyA), 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 (RS; R 塩), 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 (GS; G 塩), 7-ヒドロキシ-1,3,6-ナフタレントリスルホン

酸=三ナトリウム塩 (TS), 6-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸=一ナトリウム塩 (SS; シェファー塩), アニリンアゾシェファー塩色素 (AN-S; C.I.15970, Orange RN), 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 G 塩色素 (CSA-G), クレシジンスルホン酸アゾ R 塩色素 (CSA-R), クレシジンスルホン酸アゾβ-ナフトール色素 (CSA-2N), SA-G, スルファニル酸アゾ R 塩色素 (SA-R; CAS No. 50880-65-4), スルファニル酸アゾβ-ナフトール色素 (SA-2N; C.I.15510, Orange II) 及びナフチオン酸アゾシェファー塩色素 (FRE; ファストレッド E, C.I.16045) は三栄源エフ・エフ・アイ (株) より提供して頂いた標品^{*1}を使用した。アマランス色素標準品 (R-2 標準品), アルラレッド AC 色素標準品 (R-40 標準品), サンセットイエロー FCF 色素標準品 (Y-5 標準品), タートラジン色素標準品 (Y-4 標準品), ニューコクシン色素標準品 (R-102 標準品) は国立医薬品食品衛生研究所標準品を使用した。また、ボンソー 6R (P6R; C.I.16290) は東京化成工業 (株) 製を用い、アセトニトリルは HPLC 用を用い、その他の試薬はすべて JIS 試薬特級品を使用した、実験に供した水は蒸留水を更に Milli-Q SP TOC (日本ミリポア (株)) で精製したものをを用いた。

3. 標準原液

R-2, R-40, R-102, Y-4 及び Y-5 の各色素標準品, 各有機性不純物 (CSA, DAADBS, DONS, GS, HBSA, NS, PyA, RS, SA, SS, TS, AN-S, CR-S, CSA-G, CSA-R,

*1 現在、食添 VII で規制されている有機性不純物 19 種類 (CSA, DAADBS, DONS, GS, HBSA, NS, PyA, RS, SA, SS, TS, AN-S, CR-S, CSA-G, CSA-R, CSA-2N, SA-G, SA-R, SA-2N) は和光純薬工業 (株) より「合成色素純度試験用標準品」として販売されている。

Fig. 1. (Title and footnotes represent as the next page.)

CSA-2N, SA-G, SA-R, 及び SA-2N) 及び規制対象外副成色素 FRE 及び P6R について, 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液に溶解して, 食添 VII¹⁾ に準じて, 各々 100 µg/mL の標準原液を調製した. なお, HBSA は酸性及び塩基性下ともに不安定であるため, 用時, 標準原液を調製した. また, DAADBS は中性以下では分解しやすいので, 前報⁵⁾と同様, 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて調製した.

4. 検量線用標準液

標準原液を用い, 食添 VII¹⁾ に準じて, 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液で希釈して, 食添 VII で規格値のある有機性不純物の検量線用標準液 (0.5, 1, 2, 5 及び 10 µg/mL) を調製した. いずれの有機性不純物についても検量線は直線性を示した. ただし, DAADBS 及び HSBA の

検量線は, 調製 20 時間以内に HPLC 測定を行って作成した.

5. 各アゾ色素用標準混液

標準原液を用い, 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液で希釈して, R-2 及び R-102 用 (GS, NS, RS, SS, TS, FRE 及び P6R 並びに R-2 及び R-102 の 9 種), R-40 用 (CSA, DONS, SS, CSA-G, CSA-R, CSA-2N 及び CR-S 並びに R-40 の 8 種), Y-4 用 (DAADBS, HSBA, PyA 及び SA 並びに Y-4 の 5 種), Y-5 用 11 種 (DAADBS, DONS, GS, RS, SA, SS, AN-S, SA-G, SA-R 及び SA-2N 並びに Y-5 の 11 種, pH 8.0) 及び Y-5 用 10 種 (DONS, GS, RS, SA, SS, AN-S, SA-G, SA-R 及び SA-2N 並びに Y-5 の 10 種) の標準混液 (各 1 µg/mL) を調製した. ただし, 分解しやすい Y-4 用及び Y-5 用 11 種標準混液は調製 20 時

Fig. 1. High performance liquid chromatograms of standard solutions of food azo colors and their organic impurities under HPLC conditions I

1. SA: sulfanilic acid, 4-aminobenzenesulfonic acid
2. GS: G salt, disodium salt of 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid
3. RS: R salt, disodium salt of 3-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid
4. SA-R: sulfanilic acid azo R salt, trisodium salt of 3-hydroxy-4-(4-sulfophenylazo)-2,7-naphthalenedisulfonic acid
5. SA-G: sulfanilic acid azo G-salt, trisodium salt of 7-hydroxy-8-(4-sulfophenylazo)-1,3-naphthalenedisulfonic acid
6. DAADBS: disodium salt of 4,4'-(diazamino)-dibenzene-sulfonic acid
7. SS: Schaeffer's salt, sodium salt of 6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid
8. Y-5: Food Yellow No. 5, Sunset Yellow FCF, disodium salt of 6-hydroxy-5-(4-sulfophenylazo)-2-naphthalenedisulfonic acid
9. DONS: disodium salt of 6,6'-oxybis(2-naphthalenesulfonic acid)
10. SA-2N: sulfanilic acid azo β -naphthol, sodium salt of 4-(2-hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonic acid
11. AN-S: aniline azo Schaeffer's salt, sodium salt of 6-hydroxy-5-phenylazo-2-naphthalenesulfonic acid
12. PyA: 5-hydroxy-1-(4-sulfophenyl)-3-pyrazolecarboxylic acid
13. HBSA: 4-hydradinobenzenesulfonic acid, phenylhydrazine-*p*-sulfonic acid
14. Y-4: Food Yellow No. 4, Tartrazine, trisodium salt of 5-hydroxy-1-(4-sulfophenyl)-1-(4-sulfophenylazo)-3-pyrazole carboxylic acid
15. TS: trisodium salt of 7-hydroxy-1,3,6-naphthalenetrisulfonic acid
16. P6R: Ponceau 6R, trisodium of 3-hydroxy-4-(4-sulfonaphthylazo)-2,7-naphthalenedisulfonic acid
17. NS: sodium salt of naphthionic acid, sodium salt of 4-amino-1-naphthalenesulfonic acid
18. R-2: Food Red No. 2, Amaranth, trisodium salt of 3-hydroxy-4-(4-sulfonaphthylazo)-2,7-naphthalenedisulfonic acid
19. R-102: Food Red No. 102, New Coccine, trisodium salt of 7-hydroxy-8-(4-sulfonaphthylazo)-1,3-naphthalenedisulfonic acid sesquihydrate
20. FRE: Fast Red E, trisodium salt of 3-hydroxy-4-(4-sulfonaphthylazo)-2,7-naphthalenedisulfonic acid
21. CSA: cresidine-*p*-sulfonic acid, 4-amino-5-methoxy-2-methylbenzenesulfonic acid
22. CSA-R: cresidine sulfonic acid azo R salt, trisodium salt of 3-hydroxy-4-(2-methoxy-5-methyl-4-sulfophenylazo)-2,7-naphthalenedisulfonic acid
23. CSA-G: cresidine sulfonic acid azo G salt, trisodium salt of 7-hydroxy-8-(2-methoxy-5-methyl-4-sulfophenylazo)-1,3-naphthalenedisulfonic acid
24. R-40: Food Red No. 40, Allura Red AC, disodium salt of 6-hydroxy-5-(2-methoxy-5-methyl-4-sulfophenylazo)-2-naphthalenesulfonic acid
25. CR-S: cresidine azo Schaeffer's salt, sodium salt of 6-hydroxy-5-(2-methoxy-5-methylphenylazo)-2-naphthalenesulfonic acid
26. CSA-2N: cresidine sulfonic acid azo β -naphthol, sodium salt of 4-(2-hydroxy-1-naphthylazo)-5-methoxy-2-methylbenzenesulfonic acid

HPLC conditions I is as follows. Column: L-column ODS (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm); flow rate: 1.0 mL/min; detection: 239 nm (all azo colors) and 482 nm (Y-5), 510 nm (R-40, R-2 and R-102) or 428 nm (Y-4); sample size: 20 µL; concentration of standard solution: each, 1.0 µg/mL; mobile phase: 0.02 mol/L ammonium acetate solution (solvent A) and a mixture of acetonitrile and water (7:3) (solvent B); gradient profile: 0~50 min, a linear gradient from 100% to 42% A in B, 50~60 min, 42% A in B; column temperature: 30°C

Column was allowed equilibrium with the solvent A for 15 min before determination.

Fig. 2. High performance liquid chromatograms of standard solutions of food azo colors and their organic impurities under HPLC conditions II

Peak number: food azo colors and their organic impurities, see footnotes in Fig. 1

HPLC conditions II is as follows. Column, flow rate, detection, sample size, concentration of standard solution and mobile phase are in the same manner as HPLC conditions I. Gradient profile: 0~10 min, 100% A; 10~50 min, a linear gradient from 100% to 42% A in B, 50~60 min, 42% A in B, column temperature: 40°C

Column was allowed equilibrium with the solvent A for 15 min before determination, similarly to the HPLC conditions I.

間以内に使用した。

6. 試料溶液

各試料約 100 mg を精密に量り、0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液を加えて、全量を正確に 100 mL とし、試料溶液とした。ただし、Y-5 は pH 8.0 に調整した 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液を用い、Y-4 及び Y-5 の試料溶液は調製後 20 時間内に使用した。

7. HPLC 装置及び条件

7.1 HPLC 装置

前報⁵⁾と同様の装置を用いた。

7.2 HPLC 条件

前報⁵⁾と同様、移動相 A 液に 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム溶液を、B 液にアセトニトリル-水混液 (7:3) を用い、前報に準じた HPLC 条件 I 及び II を用いた。分析に際して、あらかじめ、Y-5 用 10 種標準混液を用いて HPLC システムの再現性を確認した。前報と異なる HPLC 条件は次に示した。

検出波長: 239 nm (全色素) 及び 428 nm (Y-4), 482 nm (Y-5) 又は 510 nm (R-40, R-2 及び R-102)

HPLC 条件 I: カラム温度 30°C で、A: B (100:0) から (42:58) までの直線濃度勾配を 50 分間行い、そのまま 10 分間保持した。

HPLC 条件 II: カラム温度 40°C で、A 液 100% で 10

分間保持した後、A: B (42:58) 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。

8. 添加回収実験

前報⁵⁾と同様に、各アゾ色素について規制対象不純物を色素に対して 0.1% 濃度になるよう添加し、回収率を求めた。

実験結果及び考察

1. HPLC 条件の検討

HPLC 条件 I (Fig. 1) では、Y-5 用 11 種の有機性不純物のうち DAADBS と SA-G のピークが重なり、R-40 用の有機性不純物では SS と CSA-R のピークが重なった。また Y-4 用の有機性不純物を分析したクロマトグラム上 DAADBS と Y-4 との分離度は 3.78 を示した。R-2 及び R-102 用のものでは規制対象外の副成色素 P6R 及び FRE の 2 種を加えた 9 種のいずれのピーク間で 2.7 以上の良好な分離度を示し、主色素とは 4 以上の分離度であった。

一方、HPLC 条件 II (Fig. 2) では Y-5 用 11 種の有機性不純物のうち、DAADBS と SA-G のピークが分離でき、Y-5 以外の他の各アゾ色素用標準混液についても、各成分の 2 種間の分離度は 1.03 以上を示した。ただし、Y-4 用の HBSA と SA との分離度は 1.40 であったが、食添 VII の pH 4.0 の HPLC 条件に比して HPLC 条件 II ではやや

Table 1. Recoveries of Raw Materials, Intermediates and Subsidiary Colors Added to Each Standard of Food Azo Colors

			Recovery (%)	RSD (%)
R-40	Raw materials and intermediates	CSA	96.1	5.2
		SS	100.9	2.0
		DONS	96.1	0.2
	High sulfonated subsidiary colors	CSA-R	96.8	0.3
		CSA-G	84.3	0.9
	Low sulfonated subsidiary colors	CR-S	92.5	0.4
		CSA-2N	92.3	0.5
R-2	Raw materials and intermediates	NS	99.0	3.4
		RS	98.0	0.1
		GS	84.3	0.2
		SS	92.8	0.8
		TS	97.1	0.5
R-102	Raw materials and intermediates	NS	91.5	7.2
		GS	94.5	1.3
		RS	91.2	2.0
		SS	92.0	1.9
		TS	99.3	0.2
Y-4	Raw materials and intermediates	SA	101.8	0.9
		PyA	102.3	7.3
		HBSA	96.4	1.9
		DAADBS	97.4	0.5

HPLC condition II: see footnotes in Fig. 2

Each 100 μ g of organic impurities was added to 100 mg of each standard food azo color.

RSD (%): relative standard deviation of three determinations

テーリングする傾向が見られた。

また、前報⁵⁾でも示したように、Y-5用のSA-2NとAN-SはHPLC条件I及びIIのいずれの条件においても分離できないため、食添VII¹⁾と同様に、同一ピークとして取り扱った。更に、P6Rはいずれの条件においても速く溶出してくるため、TSと間違えやすく、可視部でのピークの存在の有無を確認しながら、分析を行う必要があった。

以上の結果から、HPLC条件IIを用いることにより、Y-5用のDAADBSとSA-Gのピークが分離できるだけでなく、Y-5以外のアゾ色素の規制対象不純物もすべて分離できることが確認できた。そこで、以下ではHPLC条件IIを用い分析を行うことにした。

2. 添加回収率

前報⁵⁾で、Y-5に有機性不純物を添加した場合の回収率(89.9%以上)を報告した。同様にY-5以外の各アゾ色素についても、HPLC条件IIを用いたときの回収率を求めた。

Table 1に示したように、2例を除き回収率は91%以上であった。しかし、R-40に添加したCSA-G及びR-2に添加したGSの回収率は84.3%を示した。したがって、これらの不純物は、若干カラムへ吸着される可能性が示唆された。

相対標準偏差(RSD)についてはほとんどが2%以下であったが、ブロードなピークを示したR-2及びR-102のNS、R-40のCSAや溶媒ピークに近いY-4のPyAのRSDはそれぞれ3.4、7.2、5.2及び7.3%を示した。CSA及びPyAについてはそれらの極大波長(CSA: 250 nm

及びPyA: 261 nm)で測定することにより若干のばらつきが減少が期待できる。また、NSの場合はシャープなピークが得られたHPLC条件I(Fig. 1)で測定すれば、ばらつきを減少させることが可能である。

以上の結果、HPLC条件IIを用いることにより、5種のアゾ色素すべてについて、その中の有機性不純物を定量できることが判明した。しかし、NSに関しては、食用色素としての適否の判定が難しい場合には、条件Iで再測定する必要性が示唆された。

3. 実態調査

次に本法により、平成11年度の製品検査試料のうちアゾ色素163検体中の有機性不純物の含有量を測定した。測定結果をTable 2に、各アゾ色素試料溶液のクロマトグラム例をFig. 3に示した。

試料中の有機性不純物の含有量は各アゾ色素で規制されている規格限度内で、これまで報告されている結果^{3), 6)~11)}に比して低い量であった。規制対象副成色素は原料中の不純物から生成する色素であり、これらの減少が顕著であったことから、原料中の不純物量が減少してきたことが示唆された。しかし、Fig. 3に見られるように、いずれの検体からも、既知の副成色素と異なる保持時間を示す未知の副成色素の存在が認められた。これらは、製造工程中に過剰に反応して生成した副成色素^{3), 11)~13)}と考えられる。JECFA規格¹⁴⁾ではろ紙クロマトグラフィー(PPC)/分光測光法によるR-2中の総副成色素量を3%以下と規定している。また、食添VIIではPPCによる規制のみ¹⁾である。いずれもHPLCより感度は低い。今後は感度が高く分離度の良いHPLCによるR-2、R-102及び

Table 2. Contents of Raw Materials, Intermediates and Subsidiary Colors in Food Azo Colors Tested under HPLC Conditions II (Unit: %)

			Average	Minimum	Maximum	Legal limits
R-40 (<i>n</i> ^a)=3)	Raw materials	CSA	0.02	0.02	0.02	Not more than 0.2
		SS	ND ^b	ND	0.01	Not more than 0.3
	Intermediates	DONS	0.08 (0.02) ^c	ND (ND)	0.15 (0.04)	Not more than 1.0
	High sulfonated subsidiary colors (HSSC)	CSA-R	0.07	ND	0.15	
		CSA-G	0.03	ND	0.09	
	Total of HSSC in sample ^d		0.10			Not more than 1.0
	Max. ~Min. of total in sample ^e		0.15~0.05			
	Low sulfonated subsidiary colors (LSSC)	CR-S	ND	ND	0.01	
		CSA-2N	0.05	0.02	0.09	
	Total of LSSC in sample		0.05			Not more than 1.0
	Max. ~Min. of total in sample		0.09~0.02			
R-2 (<i>n</i> =5)	Raw materials	NS	0.08	0.03	0.13	
		RS	0.02	ND	0.09	
		GS	ND	ND	ND	
		SS	0.02	ND	0.06	
	Intermediates	TS	0.03	0.02	0.06	
	Total of raw material etc. in sample		0.15			Not more than 0.5
	Max. ~Min. of total in sample		0.21~0.10			
R-102 (<i>n</i> =44)	Raw materials	NS	0.02	ND	0.08	
		GS	0.15	ND	0.36	
		RS	ND	ND	0.02	
		SS	ND	ND	0.03	
	Intermediates	TS	0.01	ND	0.05	
	Total of raw material etc. in sample		0.19			Not more than 0.5
	Max. ~Min. of total in sample		0.40~0.02			
Y-4 (<i>n</i> =73)	Raw materials	SA	0.03	ND	0.12	
		PyA	0.03	ND	0.20	
	Intermediates	HBSA	ND	ND	0.01	
		DAADBS	0.01	ND	0.11	
	Total of raw material etc. in sample		0.07			Not more than 0.5
	Max. ~Min. of total in sample		0.24~0.01			
Y-5 (<i>n</i> =38)	Raw materials	SA	0.02	ND	0.12	
		SS	0.07	ND	0.18	
		RS	ND	ND	ND	
		GS	ND	ND	ND	
	Intermeidates	DONS	0.01	ND	0.19	
		DAADBS	0.04	ND	0.15	
	Total of raw materials etc. in sample		0.14			Not more than 0.5
	Max. ~Min. of total in sample		0.33~0.02			
	Subsidiary colors	SA-R	0.11	ND	1.23	
		SA-G	0.01	ND	0.43	
		SA-2N+AN-S	0.04	ND	0.29	
	Total of 3 colors other than SA-R in sample		0.05			Not more than 2
	Max. ~Min. of total in sample		0.46~0.00			
	Total of 4 colors in sample		0.16			Not more than 5
	Max. ~Min. of total in sample		1.69~0.00			

Each sample was determined under HPLC conditions II (see footnotes in Fig. 2).

^a) *n*: number of samples

^b) ND: not detected < 0.01%

^c) A value in parentheses represents the value determined under HPLC conditions I (see footnotes in Fig. 1).

^d) The average was calculated from the total values of organic impurities' contents in individual sample.

^e) The maximum and minimum values among total values of organic impurities' contents in individual sample represent.

Fig. 3. High performance liquid chromatograms of sample solutions of food azo colors tested under HPLC conditions II

Peak number: food azo colors and their organic impurities, see footnotes in Fig. 1.

U: Unknown

HPLC conditions II: See footnotes in Fig. 2

Concentration of sample solution: 1.0 mg/mL

Y-4 中の副成色素総量の規制が必要であると考えられる。

未反応原料では R-102 中の GS が規格値の半分以上を示した検体があった。また、Table 2 には個々の検体のデータを示していないが、同じ製造業者においてロット間の未反応原料の含量に大きな差異があることが判明した。

R-40 の 1 検体 (Fig. 3 の R-40) において、510 nm 及び 239 nm の両波長で DONS に対応する保持時間にピークが検出され、239 nm の波長クロマトグラムのピーク面積に基づいた DONS の見かけの含量は 0.15% と算出された。しかし、DONS は、510 nm では検出されないことから、未知の副成色素の存在が考えられた。そこで、別途 HPLC 条件 I を用いた分析を行ったところ、DONS と未知のピークは分離することが明らかになり、DONS の含量は 0.04% 以下であることが判明した。なお HPLC 条件 I を用いても、2 つの成分の保持時間は非常に近似していたことから、R-40 の DONS の測定時には、可視部でのピークの存在の有無の確認が必須であることが判明した。

また、Y-4 についても、Fig. 3 の Y-4 の検体のように、428 nm 及び 239 nm の両波長で DAADBS に対応する保持時間にピークが検出され、239 nm の波長クロマトグラムのピーク面積に基づいた DAADBS の見かけの含量は 0.11% と算出された。DAADBS は 428 nm では検出されないことから、R-40 と同様、未知の副成色素の存在が考えられた。しかし、R-40 の場合と異なり、この検体について、別途 HPLC 条件 I 及び食添 VII の HPLC 条件を用いた分析を行ったが、クロマトグラム上 DAADBS と未

知の副成色素との分離はできず、358 nm の検出波長での分析でも改善は認められなかった。したがって、この Y-4 中の DAADBS の含量は真の値より多めに算出している可能性も考えられた。いずれにしてもこの検体の未反応原料及び反応中間体の合計値 (0.17%) は規格値の限度内であり、食用色素としての適否の判定上で、問題はなかった。

以上の結果、HPLC 条件 II を用いた 5 種のアゾ色素中の有機性不純物の定量法は製品検査に十分利用でき、判定上問題になっても、HPLC 条件 I を用いた簡単な再検査により、より正確な測定ができることが判明した。

ま と め

製品検査に要する時間の短縮化を図る目的で、5 種のアゾ色素中の有機性不純物の HPLC 条件を検討した結果、HPLC 条件 II で測定できることが判明した。この条件を用いて平成 11 年度の製品検査試料のうちアゾ色素 163 検体について、有機性不純物の含有量を測定した。その結果、いずれの検体についても規格値の限度内であった。

内容の一部を日本食品衛生学会第 78 回学術講演会で発表した*2。

文 献

- 1) Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 7th Ed., Japanese Version, Ministry of Health

*2 辻 澄子, 天倉吉章, 岡田 舞, 外海泰秀: 日本食品衛生学会第 78 回学術講演会講演要旨集, p. 33 (1999).

- and Welfare, Japan, 1999, p. 25-34, 294-295, 298-302, 305-306, 308-309.
- 2) The Japanese Standards for Food Additives, 6th Ed., Japanese Version, Ministry of Health and Welfare, Japan, 1992, p. 311-317.
 - 3) Yamada, M., Nakamura, M., Yamada, T., Maitani, T., Goda, Y., Survey of raw materials, intermediates and subsidiary colors in food yellow No. 5 (sunset yellow FCF). *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi* (Jpn. J. Food Chem.), **3**, 151-155 (1996).
 - 4) Tanimura, A., *et al.* eds., "Shokuhin Tenkabutsu Koteisho Kaisetsusho, 7th Ed.", Tokyo, Hirokawa Shoten, 1999, D-746-D-757. (ISBN 4-567-01852-4)
 - 5) Tsuji, S., Matsumura, I., Nakamura, Y., Tonogai, Y., Studies on separation and determination of subsidiary colors, raw materials and intermediates in food yellow No. 5 (sunset yellow FCF). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **41**, 357-363 (2000).
 - 6) Yamada, M., Inoue, T., Kato, Y., Nakamura, M., Shibata, T., Kimura, M., Tsuji, S., Ito, Y., Determination and survey of starting materials, intermediates, and subsidiary colors in sunset yellow FCF. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **34**, 239-247 (1993).
 - 7) Uematsu, Y., Hirokado, M., Nakajima, K., Takahashi, I., Matsui, K., Kazama, M., High performance liquid chromatographic determination of impurities in amaranth, new coccine and sunset yellow FCF. *Tokyo Toritsu Eisei Kenkyusho Kenkyu Nenpo* (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.), **38**, 245-252 (1987).
 - 8) Uematsu, Y., Hirokado, M., Nakajima, K., Takahashi, I., Matsui, K., Kazama, M., New coccine and sunset yellow FCF. II. Determination of subsidiary colors. *Tokyo Toritsu Eisei Kenkyusho Kenkyu Nenpo* (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.), **39**, 151-155 (1988).
 - 9) Takeda, Y., Kamikura, M., Shibata, T., Ito, Y., Yoshihira, K., Determination of subsidiary colors in food red No. 40 by high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **34**, 39-44 (1993).
 - 10) Ishimitsu, S., Mishima, I., Tsuji, S., Shibata, T., Determination and survey of starting materials, intermediates, and subsidiary colors in food color of azo dye by high performance liquid chromatography. *Kokuritsu Iyaku-hin Shokuhin Eiseikenkyusho Hokoku* (Bulletin of National Institute of Health Sciences), **115**, 175-180 (1997).
 - 11) Yamada, M., Kato, Y., Nakamura, M., Yamada, T., Maitani, T., Goda, Y., Survey of raw materials and subsidiary colors in commercial food red No. 2 and 102. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi* (Jpn. J. Food Chem.), **4**, 107-113 (1997).
 - 12) Yamada, M., Nakamura, M., Yamada, T., Maitani, T., Goda, Y., Structural determination of unknown subsidiary colors in food yellow No. 5 (sunset yellow FCF). *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1624-1627 (1996).
 - 13) Yamada, M., Kato, Y., Nakamura, M., Yamada, T., Maitani, T., Goda, Y., Structural determination of unknown subsidiary colors in commercial food red No. 2 and 102. *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 494-499 (1998).
 - 14) Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), "Compendium of Food Additives Specifications", Vol. 1, Vol. 2, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1992.