報 文

赤色 102 号中に微量存在するアゾ化合物の構造解析

(平成 24 年 9 月 3 日受理)

合田麻美^{1*,#} 堀川 学^{2,#} 岩下 孝² 澤田元充¹ 塚 寄 大 輔³
橘 津 義³ 菅 根 克 己³ 原 田 雅 己⁴

Structural Analysis of Subsidiary Tar Dyes Contained in Food Red No. 102

Mami GODA^{1*,#}, Manabu HORIKAWA^{2,#}, Takashi IWASHITA², Motomitsu SAWADA¹, Daisuke TSUKAZAKI³,
Tsuyoshi TACHIBANA³, Katsumi SUGANE³ and Masami HARADA⁴¹ Safety Science Institute, Quality Assurance Division, Suntory Business Expert Limited:
Suntory Research Center, 1-1-1 Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun,
Osaka 618-8503, Japan; ² Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences:
1-1-1 Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japan;
³ Minato City Minato Public Health Center: 1-4-10 Mita, Minato-ku,
Tokyo 108-8315, Japan; ⁴ Quality Strategy Planning Division, Suntory Holdings Limited:
Suntory World Headquarters, 2-3-3 Daiba, Minato-ku, Tokyo 135-8631, Japan;

* Corresponding author

Three unknown colors (A1, A2 and A3) in Food red No. 102 (R102) were identified by LC-MS and NMR analysis. Red dye A1 was azo rubine (AZO), which is not designated as a coloring agent in Japan. Red dye A2 was a structural isomer of Fast Red E (FRE), which is also not designated as a coloring agent in Japan. Red dye A3 was predicted to be an overreaction product of R102, possessing the R102 structural framework. Furthermore, AZO, which was assumed to have been produced by dimerization of a diazonium salt used as a synthetic intermediate of R102, was also identified in Food red No. 2 (R2).

(Received September 3, 2012)

Key words: 食用赤色 102 号 food red No. 102; アゾルビン azo rubine; 食用赤色 2 号 food red No. 2; タール色素 tar dye; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC-MS; 核磁気共鳴 NMR

結 言

わが国で食品の着色料として認められている合成着色料のほとんどはタール系色素であり、現在 12 種類が許可されているが、許可されている色素の種類は国によって異なる。タール系色素の 1 種であるアゾルビン (AZO) はヨーロッパなどのほかの国では食品への使用が認められている

が、日本では指定外着色料であり、輸入食品等の検査でしばしば違反の事実が確認され、代表的な違反事例として挙げられている。

分析技術の進歩により、合成着色料中に存在する微量の不純物であっても容易に同定することが可能になっている^{1),2)}。そこで、著者らも自社で取り扱う製品に使用する合成着色料を対象に、安全性評価および食品衛生法への適合性確認を目的として HPLC, LC-MS, NMR 等の分析法を用いた不純物調査を実施した。

本研究では、赤色 102 号 (R102) 中の不純物の解析を行い、これまでに R102 の不純物として報告されていない指定外着色料である AZO を含む 3 種の不純物 (A1, A2, A3; Fig. 1) の化学構造を LC-MS, NMR および化学合成等により明確にし、さらに推定される化学反応を検証することによって R102 の製造工程中に副次的に生成した可能性が高いことを明らかにした。また、AZO は、R102 と同

* Mami_Gouda@suntory.co.jp

These authors contributed equally to this study.

¹ サントリービジネスエキスパート株式会社 品質保証本部
安全性科学センター: 〒618-8503 大阪府三島郡島本町若
山台 1-1-1 サントリー研究センター² 公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究
所: 〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1³ 港区みなと保健所: 〒108-8315 東京都港区三田 1-4-10⁴ サントリーホールディングス株式会社 品質戦略部: 〒135-
8631 東京都港区台場 2-3-3 サントリー ワールド ヘッ
ドクォーターズ

Fig. 1. Chemical structures of R102, R2 and their subsidiary colors; FRE, SubB, A1, A2 and A3

じ合成原料を使用するR2中にも微量存在することを明らかにした。

実験方法

1. 試料

食品添加物として入手可能な海外製R102を1種、国内製造メーカー社製R102を3種、国内製造メーカー社製R2を1種使用した。

2. 標準品・試薬

色素標準品：AZOの標準品は、国立医薬品食品衛生研究所標準品を使用した。

LC-MSの移動相にはLC-MS用の溶媒を使用した。その他の試薬および溶媒は市販品の特級試薬を使用した。

3. 装置

HPLC: (株) 島津製作所製Prominence, および, LC10Aシリーズ

LC-MSおよびLC-MS/MS: (株) 島津製作所製LCMS-IT-TOF, LC部分はProminence

NMR: クライオプローブを装備したBruker TopSpin 社製 750 MHz

4. HPLC条件

共通条件。

検出波長: 190~700 nm; カラム温度: 40℃; 移動相: A液, 0.02 mol/L酢酸アンモニウム水溶液, B液, 90%アセトニトリル水溶液

分析条件1.

カラム: Unison UK-C18 (4.6 mm i.d.×250 mm, 3 μm, インタクト社製); B液20→40→20→20% (0→40→41→51分)のグラジエント溶出; 流速: 1 mL/min; 注入量: 10 μL

分析条件2.

カラム: DaisoPak SP-120-5-ODS-AP (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm, ダイソー社製); B液10→30→80→80→10→10% (0→15→20→25→26→35分)のグラジエント溶出; 流速: 1.5 mL/min; 注入量: 20 μL

5. 分取HPLC条件

検出波長, カラム温度, 移動相: 実験方法4. HPLC条件の共通条件と同様; カラム: DaisoPak SP-120-5-ODS-AP (20 mm i.d.×250 mm, 5 μm, ダイソー社製); B液20→40→80→80→20→20 (0→40→45→50→51→60分)のグラジエント溶出; 流速: 9.99 mL/min; 注入量: 1 mL (R102: 20 mg)

6. LC-MSおよびLC-MS/MS分析条件

検出波長, カラム温度: 実験方法4. HPLC条件の共通条件と同様; カラム: Cadenza CL-C18 (2.0 mm i.d.×100 mm, 3 μm, インタクト社製); 移動相: A液, 0.01 mol/L酢酸アンモニウム水溶液, B液, アセトニトリル, B液20→30→80→80→20→20% (0→4→5→8→8.01→12分)のグラジエント溶出; 流速: 0.6 mL/min; 注入量: 2 μL; イオン化法: ESI (-); 測定質量 (*m/z*): 150~1,000.

7. NMR測定

¹H-NMR (750.13 MHz), ¹³C-NMR (188.62 MHz), ¹H-¹H COSY, TOCSY, HSQC, HMBCスペクトルを測定した。

8. 試料溶液の調製

R102のHPLC, 分取HPLC, LC-MSおよび, LC-MS/MS用試験溶液は, 試料1 gを100 mLの蒸留水に溶解したものを用いた。R2のHPLC用試験溶液も同様に, 試料1 gを100 mLの蒸留水に溶解したものを用いた。

NMR用試験溶液の調製は分取HPLCにより精製した画分を凍結乾燥後、重メタノール (CD_3OD) に溶解し、NMR用試験溶液とした。

9. 化学反応の条件

(1) A2の化学合成

(i) 市販の4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム (1) (22.3 mg, 0.1 mmol) を1%水酸化ナトリウム水溶液 (0.4 mL) に溶解し、室温で撹拌した。そこに亜硝酸ナトリウム (6.9 mg, 0.1 mmol) を加え、さらに6 mol/L塩酸水溶液 (60 μL) を加え、室温で15分間撹拌した。

(ii) (i) の反応溶液に2-ナフトール-7-スルホン酸ナトリウム (2) (24.6 mg, 0.1 mmol) を加えた後、10%水酸化ナトリウム水溶液でpH 8に調整し、さらに室温で30分間撹拌した。反応溶液を20%酢酸アンモニウム水溶液 (4 mL) で希釈し、実験方法5に示した分取条件により精製し、得られたA2画分を凍結乾燥することによりA2 (24 mg, 47.8 μmol , 収率48%) を得た。

(2) ジアゾニウム塩の二量化反応

上記の (1) A2の合成反応で示した (i) の反応溶液を10%水酸化ナトリウム水溶液でpH 10に調整し、所定の温度で1時間撹拌した。反応溶液に20%酢酸アンモニウム水溶液を加え、10 mLの希釈液を調製し、実験方法4、分析条件2に示したHPLC分析により得られる生成物 (A1; AZO) のピーク強度から収率を見積もった。

結 果

1. 海外製R102中の新規不純物の精製

実験方法4、分析条件1で示した条件で、海外製R102のHPLC分析を行ったところ、Fig. 2に示すように、指定外着色料であるAZOと同じ溶出時間 (12.8分) 近傍に3種の不純物 (溶出時間順にA1, A2, A3とする) の存在を確認した。なお、A1はAZOと溶出時間が一致していた。

これら3種の不純物の化学構造を明らかにするために、分取HPLC条件を検討し、実験方法5で示した条件で、R102 (540 mg) から3種の化合物をそれぞれ単一の化合物として単離精製した。得られた各サンプル量はHPLCクロマトグラムのピーク強度から、A1が8.3 μg (溶出時間: 19.3分), A2が6.9 μg (19.9分), A3が7.4 μg (20.8分) であると見積もった。なお、A1に関してはAZOの国立医薬品食品衛生研究所標準品、A2に関しては後に得られた合成品、A3に関しては後に再度0.32 mg単離精製したものをを用いて検量線を作成し、定量した。以下、A1, A2およびA3に関する定量結果を記載している場合は、同様の定量方法を使用した。

2. 不純物A1の構造解析

精製した3種の不純物のうち、AZOとLCの溶出時間が一致したA1は、Fig. 3aに示したとおり、LC-MSによる測定の結果、AZO (Fig. 3d) と同一のMSスペクトルパターンを示した。また、二価イオン m/z 228.0に由来する

Fig. 2. HPLC chromatograms of Foreign R102 and Foreign R102 with AZO (520 nm)

(a) Foreign R102 Lot1. (b) Foreign R102 Lot1+AZO (10 ppm). (c) Foreign R102 Lot2. (d) Foreign R102 Lot2+AZO (10 ppm).

Fig. 3. MS spectra of R102-subsidary colors, A1, A2, A3, AZO and FRE, and synthetic A2

(a) A1. (b) A2. (c) A3. (d) AZO. (e) Synthetic A2. (f) FRE.

Fig. 4. ^1H NMR spectrum of A1 (AZO) and A2

(a) A1. (b) AZO. (c) A2. (d) Synthetic A2. *Signals due to impurities.

ピークの精密質量 ($[\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2]^{2-}$; 実測値 228.0051, 計算値 228.0048, 質量誤差 1.32 ppm) から, A1 が Na 塩である場合の組成式は AZO と同様に $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$ であると推測された. ^1H NMR の化学シフト値および結合定数 (J 値) も AZO の標準品と一致した (Fig. 4a, b). 以上より, A1 は指定外着色料である AZO (Fig. 1) と同定した. また, AZO の NMR シグナルの詳細な帰属は標準品に

より行った (Table 1).

3. 不純物 A2 の構造解析

A2 は, Fig. 3b に示したとおり, LC-MS による測定の結果, AZO (Fig. 3d) と同一の MS スペクトルパターンを示したが, 溶出時間が AZO と異なることから AZO の構造異性体であることが示唆された.

NMR データの解析では, 精製された A2 が微量のため,

Table 1. ^1H NMR (750.13 MHz, CD_3OD) and ^{13}C NMR (188.62 MHz, CD_3OD) spectral data of A1 (AZO)

Position ^{a)}	A1 (AZO)			
	^{13}C -NMR	^1H -NMR		
	δ ppm	δ ppm (J in Hz)	TOCSY	HMBC
1	136.33			
2	128.49	8.08 (br s)		C-4,8a
3	134.12			
4	176.14			
4a	131.81			
5	128.02	8.57 (br d, $J=7.9$ Hz)	H-6, H-7, H-8	C-4, C-7, C-8a
6	127.98	7.59 (br t, $J=7.9$ Hz)	H-5, H-7, H-8	C-4a, C-8
7	133.74	7.77 (br t, $J=7.9$ Hz)	H-5, H-6, H-8	C-5, C-8a
8	128.87	8.64 (br d, $J=7.9$ Hz)	H-5, H-6, H-7	C-1, C-4a, C-6
8a	134.16			
1'	141.78			
2'	111.68	8.13 (d, $J=8.2$ Hz)	H-3'	C-3', C-4', C-8'a
3'	127.52	8.31 (d, $J=8.2$ Hz)	H-2'	C-1', C-2', C-4'a
4'	141.00			
4'a	131.45			
5'	128.98	9.01 (br d, $J=8.6$ Hz)	H-6', H-7', H-8'	C-4', C-7', C-8'a
6'	128.30	7.73 (br t, $J=8.6$ Hz)	H-5', H-7', H-8'	C-4'a, C-8'
7'	128.45	7.78 (br t, $J=8.6$ Hz)	H-5', H-6', H-8'	C-5', C-8'a
8'	121.37	8.40 (br d, $J=8.6$ Hz)	H-5', H-6', H-7'	C-1', C-4'a, C-6'
8'a	126.53			

^{a)} See numbering of the structures in Fig. 1.

Table 2. ^1H NMR (750.13 MHz, CD_3OD) and ^{13}C NMR (188.62 MHz, CD_3OD) spectral data of A2 and FRE

Position ^{a)}	A2				FRE	
	^{13}C -NMR	^1H -NMR			^{13}C -NMR	^1H -NMR
	δ ppm	δ ppm (J in Hz)	TOCSY	HMBC	δ ppm	δ ppm (J in Hz)
1	120.75	9.15 (br s)	H-3, H-4	C-2, C-3, C-4a, C-8	123.30	8.74 (d, $J=8.6$ Hz)
2	147.03				127.78	8.05 (br d, $J=8.6$ Hz)
3	124.92	7.89 (br d, $J=8.2$ Hz)	H-1, H-4	C-1, C-4a	144.52	
4	130.67	7.78 (d, $J=8.2$ Hz)	H-1, H-3	C-2, C-5, C-8a	127.59	8.17 (br s)
4a	130.49				129.16	
5	141.95	7.95 (d, $J=9.3$ Hz)	H-6	C-4, C-7	142.51	7.97 (d, $J=9.3$ Hz)
6	127.26	6.99 (d, $J=9.3$ Hz)	H-5	C-4a, C-8	126.76	6.99 (d, $J=9.3$ Hz)
7	175.38				175.08	
8	132.86				132.62	
8a	134.41				135.79	
1'	142.53				142.71	
2'	112.24	8.34 (d, $J=8.2$ Hz)	H-3'	C-4', C-8'a	112.19	8.25 (d, $J=8.2$ Hz)
3'	127.60	8.36 (d, $J=8.2$ Hz)	H-2'	C-1', C-2', C-4'a	127.59	8.35 (d, $J=8.2$ Hz)
4'	141.17				141.27	
4'a	131.49				131.49	
5'	129.04	9.01 (br d, $J=8.6$ Hz)	H-6', H-7', H-8'	C-7', C-8'a	129.02	9.01 (br d, $J=8.2$ Hz)
6'	128.27	7.72 (br t, $J=8.6$ Hz)	H-5', H-7', H-8'	C-4'a, C-8'	128.31	7.73 (br t, $J=8.2$ Hz)
7'	128.49	7.76 (br t, $J=8.6$ Hz)	H-5', H-6', H-8'	C-5', C-8'a	128.52	7.76 (br t, $J=8.2$ Hz)
8'	121.32	8.32 (br d, $J=8.6$ Hz)	H-5', H-6', H-7'	C-4'a, C-6'	121.37	8.32 (br d, $J=8.2$ Hz)
8'a	126.71				126.83	

^{a)} See numbering of the structures in Fig. 1.

HSQCやHMBCのデータから有用な情報は得られず、一義的にA2の化学構造を決定できなかった。しかし、TOCSYのデータから、芳香環上にあるすべての水素（11個）の内訳は、独立し連続する2個の水素が2組（H-5, H-6およびH-2', H-3'）、独立し連続する4個の水素が1組

（H-5', H-6', H-7', H-8'）、独立し1,2,4-置換の関係にある3個の水素が1組（H-1, H-3, H-4）であることが確認できた。A2のこのような芳香環上の水素の結合様式はR102の不純物として報告されているファストレッドE（FRE）の結合様式と同じであったが、化学シフト値が一致しな

かった (Table 2). 特に, 独立した1,2,4-置換の関係にあると推測された3個の水素の化学シフト値に大きな相違があったことから, A2はFREのこの部分に存在するナトリウムスルホ基 ($-\text{SO}_3\text{Na}$) の位置異性体である可能性が示唆された. また, R102の合成工程から想定される不純物の構造を考察した結果, FREのC-3のナトリウムスルホ基がC-2に結合したA2 (Fig. 1) が最も可能性の高い構造であると考えた.

A2の推定構造が正しいことを確認するために, Scheme 1に示すように市販の4-アミノ-1-ナフトルスルホン酸ナトリウム (1) と2-ナフトール-7-スルホン酸ナトリウム (2) から, 一般的なアゾ色素合成法^{3), 4)} (実験方法9 (1)) に従って, 推定された化合物A2を合成し¹H NMR データを比較したところ, A2と合成物は完全に一致した (Fig. 4c, d). また, R102から単離したA2と合成したA2の精密質量 (単離したA2: m/z 228.0 [$\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$]²⁻; 実測値228.0054, 計算値228.0048, 質量誤差2.63 ppm, 合成したA2: m/z 228.0 [$\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$]²⁻; 実測値228.0053, 計算値228.0048, 質量誤差2.19 ppm) もほぼ

一致した. 以上の結果から, 合成品は単離したA2と同一の化合物と判断した.

次に, 合成したA2を用いNMRシグナルの詳細な帰属を行った (Table 2). A2は炭素数が20であることから2組のナフトレン環の存在が予想された. 上記で示したTOCSYのデータにて相関が観測された4組の水素が, ど

Scheme 1. Synthesis of A2

Table 3. ¹H NMR (750.13 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (188.62 MHz, CD₃OD) spectral data of A3 and R102

Position ^{a)}	A3		R102	
	¹ H-NMR		¹³ C-NMR	¹ H-NMR
	δ ppm (J in Hz)	TOCSY	δ ppm	δ ppm (J in Hz)
1			143.20	
2	9.28 (d, $J=2.0$ Hz) ^{b)}	H-4	130.93	9.08 (d, $J=1.6$ Hz)
3			142.46	
4	8.01 (d, $J=2.0$ Hz) ^{b)}	H-2	130.46	8.21 (d, $J=1.6$ Hz)
4a			131.04	
5	7.82 (d, $J=9.6$ Hz) ^{c)}	H-6	143.24	7.95 (d, $J=9.5$ Hz)
6	6.98 (d, $J=9.6$ Hz) ^{c)}	H-5	128.21	6.95 (d, $J=9.5$ Hz)
7			179.44	
8			133.07	
8a			133.07	
1'			140.90	
2'	9.29 (d, $J=8.4$ Hz) ^{d)}	H-3'	115.77	9.24 (d, $J=8.2$ Hz)
3'	8.37 (d, $J=8.4$ Hz) ^{d)}	H-2'	128.01	8.33 (d, $J=8.2$ Hz)
4'			140.27	
4'a			131.17	
5'	9.01 (br d, $J=7.8$ Hz) ^{e)}	H-6', H-7', H-8'	129.02	8.99 (br d, $J=8.5$ Hz)
6'	7.70 (br t, $J=7.8$ Hz) ^{f)}	H-5', H-7', H-8'	127.82	7.68 (br t, $J=8.5$ Hz)
7'	7.76 (br t, $J=7.8$ Hz) ^{f)}	H-5', H-6', H-8'	128.21	7.74 (br t, $J=8.5$ Hz)
8'	8.31 (br d, $J=7.8$ Hz) ^{e)}	H-5', H-6', H-7'	121.04	8.30 (br d, $J=8.5$ Hz)
8'a			125.96	
1''				
2''	7.39 (d, $J=8.4$ Hz) ^{g)}	H-3''		
3''	8.13 (d, $J=8.4$ Hz) ^{g)}	H-2''		
4''				
4''a				
5''	8.82 (br d, $J=7.8$ Hz) ^{h)}	H-6'', H-7'', H-8''		
6''	7.55 (br t, $J=7.8$ Hz) ⁱ⁾	H-5'', H-7'', H-8''		
7''	7.51 (br t, $J=7.8$ Hz) ⁱ⁾	H-5'', H-6'', H-8''		
8''	7.95 (br d, $J=7.8$ Hz) ^{h)}	H-5'', H-6'', H-7''		
8''a				

a) See numbering of the structures in Fig. 1.

b)–i) Signals may be interchanged.

のような組み合わせでナフタレン環上に配置されているかについて、HSQCより各炭素に結合している水素を帰属した後、HMBCデータより検討した。その結果、HMBCスペクトルにおいてH-4 (7.78 ppm) からC-2 (147.03 ppm), C-5 (141.95 ppm) およびC-8a (134.41 ppm), H-5 (7.95 ppm) からC-4 (130.67 ppm), C-7 (175.38 ppm) およびC-8a, H-3 (7.89 ppm) からC-1 (120.75 ppm) およびC-4a (130.49 ppm), H-6 (6.99 ppm) からC-8 (132.86 ppm) およびC-4aにそれぞれ相関が観測されたことから、H-1, H-3, H-4, H-5およびH-6が同じナフタレン環上に存在し、C-2, C-7およびC-8に置換基が存在することが判明した。2組のナフタレン環上には11個の水素が観測されたことから、残りの5か所には置換基が存在すると考えられた。組成式から考えると、2か所がアゾ基、2か所がナトリウムスルホ基、1か所が水酸基であると予想された。アゾ色素のアゾ基の隣のフェノール性水酸基が結合する炭素の化学シフト値は低磁場にシフトし175~180 ppmの値を示した(R102のC-7: 179.44 ppm (Table 3), FREのC-7: 175.08 ppm (Table 2)) ことから、C-7に水酸基、C-8にアゾ基が結合していると推測された。アゾ基はもう一方のナフタレン環と結合していることから、C-2の置換基はナトリウムスルホ基であると推測された。さらに、もう一方のナフタレン環上の解析により、アゾ基はC-1'またはC-4'に結合していると考えられた。そこで、アゾ基の結合位置を明確にするため ^1H - ^{15}N HMBC測定を行ったところ、H-2' (8.34 ppm) からアゾ基の窒素(439.0 ppm)への相関が観測された。したがって、C-1'はアゾ基と結合し、C-4'はナトリウムスルホ基と結合していることが判明した。よって、A2の構造はFig.1に示すFREの構造異性体であると決定した。

4. 不純物A3の構造解析

LC-MS測定の結果、Fig. 3cに示す二価イオン m/z 371.0に由来するピークの精密質量($[\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{S}_4]^{2-}$; 実測値370.9840, 計算値370.9851, 質量誤差2.97 ppm)から、A3がNa塩である場合の組成式は $\text{C}_{30}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}_4$ であると推測された。A3は炭素数が30であることから、3つのナフタレン環の存在が予想された。また、 ^1H NMR (Table 3)より芳香環上の水素が16個であることから、残りの8か所は置換基が存在する。そのうち、2か所はアゾ基で、4か所はナトリウムスルホ基であると仮定すると、残りの2か所は酸素1つで賄うことができる芳香環同士のエーテル結合を想定することができる。A3の ^1H NMRにおける9.28 (H-2), 8.01 (H-4), 7.82 (H-5), 6.98 (H-6), 9.29 (H-2'), 8.37 (H-3'), 9.01 (H-5'), 7.70 (H-6'), 7.76 (H-7') および8.31 (H-8')の化学シフト値と J 値はR102のそれらの値と非常に良い一致を示し、A3のTOCSYのデータは、対応するR102における水素同士の相関と一致した(Table 3)。したがって、A3はその構造中にR102の骨格を含んでいることが想定された。また、7.39 (H-2''), 8.13 (H-3''), 8.82 (H-5''), 7.55 (H-6''), 7.51

Fig. 5. Fragment ions of A3 in LC-MS/MS

(H-7'') および7.95 (H-8'')の化学シフト値と J 値、TOCSYにおける水素間の相関およびR102の製造工程で副次的に生成する不純物の構造を考慮した結果、C-4が置換した1-ナフトレンスルホン酸構造の存在が示唆された。R102はフェノール性水酸基を持っていることから、1-ナフトレンスルホン酸のC-4がR102のフェノール性水酸基を介してエーテル結合していると考えられた。別の可能性として、アゾ化合物の共鳴寄与構造の1つであるヒドラゾン構造の場合に窒素と結合することが考えられた。また、R102に存在するナトリウムスルホ基とのエステル結合の可能性も考えられたが、A3のLC-MS/MS測定 (Fig. 5)において、R102のフェノール性水酸基を介して1-ナフトレンスルホン酸のC-4でエーテル結合していると仮定したときに生成する可能性があるフラグメントイオン m/z 507.96および348.05が観測されたことから、R102と1-ナフトレンスルホン酸がC-4で縮合したA3 (Fig. 1)が最も可能性の高い構造であると推定した。

考 察

Fig. 2に示した海外製R102中のAZO (A1) およびA2, A3を定量したところ、ロットによる差はあるものの、色素粉末中にAZO (A1) は24~43 mg/kg, A2は28~80 mg/kg, A3は102~1010 mg/kgであった。また、国内の異なる製造メーカー3社のR102 (3点)について同様に、実験方法4、分析条件1で示した条件でHPLC分析を行ったところ、Fig. 6に示すように、いずれの色素においても、AZO (A1) および、A2, A3が検出された。製造メーカーやロットによる差はあるものの、その定量値は色素粉末中にAZO (A1) は21~90 mg/kg, A2は23~82 mg/kg, A3は23~134 mg/kgであった。この結果から、今回同定された化合物はいずれもR102中に不純物として普遍的に存在するものと考えられ、その含有量は、AZO (A1) およ

Fig. 6. HPLC chromatograms of domestically produced R102 (520 nm)

(a) AZO (A1) + A2 + A3 (1 ppm). (b) Domestically produced (1) R102. (c) Domestically produced (2) R102. (d) Domestically produced (3) R102.

Fig. 7. Reaction of diazonium salt (I) under alkaline conditions

(a) Scheme of reaction of diazonium salt (I). (b) HPLC analysis of the reaction mixture at 90°C. (c) HPLC analysis of AZO. (d) UV spectrum of product (3). (e) UV spectrum of product (A1'). (f) UV spectrum of AZO.

びA2に関しては、海外製と同程度、もしくは国内製造メーカー社製のほうが多い場合もあり、A3に関しては、海外製より少ないことが判明した。

不純物A2およびA3は、R102の製造工程において生成した可能性が高いことをすでに述べているが、AZO (A1) もR102の製造工程での副成が推測された。

そこで、実験方法9 (2) に従って、実際に化合物(1)

から誘導したジアゾニウム塩 (I) をアルカリ性条件下で攪拌したところ、微量ではあるがAZOが生成することを確認した (Fig. 7)。

また、実験方法4、分析条件2で示した条件でのHPLC分析の結果 (Fig.7b, c) から、本反応では、アルカリ性条件下にすると瞬時に原料であるジアゾニウム塩が消失し、その二量体と考えられる化合物 (3) を主生成物として得

Fig. 8. Proposed mechanism of AZO production from diazonium salt (I)

Fig. 9. HPLC UV chromatograms of domestically produced R2 and R2 with AZO and A2 (520 nm)

(a) AZO (A1)+A2+A3 (1 ppm). (b) Domestically produced R2. (c) Domestically produced R2+AZO and A2 (1 ppm).

られることが分かった。化合物 (3) は、LC-MSによる測定の結果、AZOと同一のMSスペクトルパターンを示すことから、AZOの構造異性体である可能性も考えられた。しかし、化合物 (3) を分離精製し、アルカリ性条件下に

したところ、微量ではあるがAZOが生成したことから、化合物 (3) はAZOの前駆体であると推測された。これまでにLewisらは、さまざまなジアゾニウム塩がアルカリ性条件下で容易にジアゾテート体を生成することを報告して

いる⁵⁾。したがって、一部のジアゾニウム塩 (I) から生成したジアゾテート体 (II) あるいはその共鳴寄与構造であるN-ニトロソ体 (III) は求核性を示すと考えられるため、これが系中に存在し求電子性を示すジアゾニウム塩 (I) に付加し、反応中間体 (IV) を経て化合物 (3) を生成する反応機構が示唆された (Fig. 8)。

化合物 (3) のジアゾテート構造は熱分解性を示すことが予想されるので、LC-MSではAZO (A1) と同じMSスペクトルパターンを示したと推測した。本反応の反応温度を上げることにより、AZOの生成量が増加することからも、二量体主生成物が化合物 (3) であることが示唆された。また、化合物 (3) がR102中に不純物として微量含有されていることも、両者のUVスペクトルが一致することから確認した。

今回同定した不純物色素 (A1, A2, A3) は、合成原料の混合比やアルカリ反応条件によって、生成量が変化したと考えられる。AZOは日本では指定外着色料であるが、ヨーロッパなどでは使用が認められている場合が多く、輸入食品の食品衛生法違反事例としてしばしば取り上げられている。そのため、AZOの混入に注目された場合、R102を添加している食品ではAZO陽性と判断される可能性がある。また、AZOの副成が危惧される色素はR102にかぎられるものではなく、化合物 (1) を原料とするタール系色素の合成過程で副次的に生成する可能性がある。実際に、化合物 (1) を原料に用いる赤色2号 (R2) について、実験方法4、分析条件1で示したHPLC分析を行ったところ、Fig. 9に示すように、AZO (A1) やA2と考えられる成分を観測することができた。その定量値は色素粉末中にAZO (A1) は11 mg/kg、A2は13 mg/kgであり、海外製および国内製造メーカー社製R102の含有量の1/2程度以下であった。

R102やR2中には製造工程の性質上、AZOが普遍的に含有される可能性が高く、食品中のタール系色素検査のHPLC法⁶⁾ およびLC-MS等による高感度分析を行った場合、AZO陽性と判断される可能性があると考えられた。

なお、R102中には不純物としてSubB⁷⁾ やFRE⁸⁾ など

指定外着色料の存在が知られているが、それらの含有量に比べて、新たに同定された化合物群は、国内外製のR102のいずれにおいても色素粉末中に数十～1,000 ppmレベルの微量であり、食品添加物の規格試験において純度を満たすレベルであった。

文 献

- 1) Ishikawa, F., Oishi, M., Shindo, T., Horie, M., Yasui, A., Ogino, S., Ito, K. Confirmation of non-permitted dyes detected in akasu (red vinegar) by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 228–233 (2005).
- 2) Shindo, T., Sadamasu, Y., Suzuki, K., Tanaka, Y., Togawa, A., Nakajima, J., Nakazato, M., Uematsu, Y. Structural analyses of unknown red dyes detected in dried strawberry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.)*, **53**, 1–7 (2012).
- 3) Conant, J. B., Lutz, R. E., Corson, B. B. *Organic Syntheses, Collective Volume I*, John Wiley & Sons, New York, 1941, p. 49–52.
- 4) Jurlina, J. L., Lindsay, A., Packer, J. E., Baguley, B. C., Denny, W. A. Redox chemistry of the 9-anilinoacridine class of antitumor agents. *J. Med. Chem.*, **30**, 473–480 (1987).
- 5) Lewis, E. S., Hanson, M. P. Reaction of diazonium salts with nucleophiles. XII. Equilibria, rates, and mechanisms in the acidification of anti-diazotates. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 6268–6272 (1967).
- 6) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針, 食品添加物編, 東京, 社団法人日本食品衛生協会, 2003, p. 169–177, 182–183.
- 7) Yamada, M., Kato, Y., Nakamura, M., Yamada, T. Structural determination of unknown subsidiary colors in commercial Food Red Nos. 2 and 102. *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 494–499 (1998).
- 8) Yamada, M., Kato, Y., Nakamura, M., Ishimitsu, S., Shibata, T., Ito, Y. Determination and survey of starting material and subsidiary colors in new coccine by high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **36**, 417–422 (1995).