食用青色 1 号の付随色素の構造並びに高速液体 クロマトグラフィーによる分離定量^{*1}

(昭和 60 年 7 月 26 日受理)

神蔵美枝子^{*2}

Structures of Subsidiary Colors in Food Blue No. 1 and Their Separation and Determination by High Performance Liquid Chromatography (Studies on Subsidiary Colors in Synthetic Food Colors I)

Mieko KAMIKURA

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga
1-chome, Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

Food Blue No. 1 (Brilliant Blue FCF, Colour Index No. 42090, FD & C Blue No. 1) is prepared by condensation of 1 mol of *o*-sulfobenzaldehyde(OSBA) with 2 mol of *N*-ethyl-*N*-benzylaniline sulfonic acid (EBASA). This color contains many kinds of subsidiary colors. In this work, the preparation of two kinds of main lower-sulfonated subsidiary colors of Food Blue No. 1, the identification of two lower-sulfonated subsidiary colors in commercial Food Blue No. 1, and the separation and determination of the subsidiary colors by high performance liquid chromatography were investigated.

One of the subsidiary colors, EA-subsidiary color was prepared by condensation of 1 mol of *N*-ethylaniline (EA), 1 mol of OSBA and 1 mol of EBASA. Another one, EBA-subsidiary color was obtained by condensation of 1 mol of *N*-ethyl-*N*-benzylaniline (EBA), 1 mol of OSBA and 1 mol of EBASA. The infrared (IR) spectra of EA- and EBA-subsidiary colors agreed with those of Bell's EA- and EBA-subsidiary colors. The absorption maxima of EA- and EBA-subsidiary colors in 0.02 *N* ammonium acetate solution were at 629 nm and 612 nm, respectively (Table 1 and Fig. 3).

Food Blue No. 1, EA- and EBA-subsidiary colors were able to be separated by high performance liquid chromatography (HPLC) on a reversed-phase system under the following conditions. Column, Zorbax ODS; eluant, primary 0.5% ammonium carbonate solution, secondary methanol (40-100% methanol linear gradient at 5%/min), detector, 628 nm for Food Blue No. 1, 618 nm for EA-subsidiary color, 633 nm for EBA-subsidiary color, and 253.7 nm. The retention times of Food Blue No. 1, EA- and EBA-subsidiary colors were about 7 min, 9 min and 11 min, respectively (Fig. 7). The peak area of each color determined at the maximal absorbance wavelength was about 4 times that at 253.7 nm. Linear calibration curves were obtained in the range of 10-100 ppm (50-500 ng) for Food Blue No. 1 standard, and EA- and EBA-subsidiary colors (Figs. 8-10). The ratio of the peak areas of EA-subsidiary color at 618 nm and 628 nm was 1.512 (Table 2). The minimum detectable amount was 2.5 ng for Food Blue No. 1 standard, 5 ng for EA-subsidiary color and 3 ng for EBA-subsidiary color (Fig. 11). The recoveries of EA- and EBA-subsidiary colors added to pure Brilliant Blue FCF (free of subsidiary colors) at levels of 1-10% were 92.7-105.4% and 95.8-103.3%, respectively. (Table 3).

^{*1} 食用色素に含まれる付随色素に関する研究 (第 1 報)

^{*2} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

The main lower-sulfonated subsidiary colors isolated from commercial Food Blue No. 1 were identified as EA- and EBA-subsidiary colors from their IR and absorption spectra and chromatographic behavior. Ten commercial samples of Food Blue No. 1 were analyzed by this method. EA-subsidiary color content was determined to be 2.7-10.4%, but EBA-subsidiary color was detected at only a trace level in one of the samples (Table 4 and Fig. 12). This method is considered to be suitable for the analysis of EA- and EBA-subsidiary colors in Food Blue No. 1.

(Received July 26, 1985)

Key words: 食用青色 1 号 food blue No. 1; 食用色素 food color; 付随色素 subsidiary color; ブリリアントブルー FCF brilliant blue FCF; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 薄層クロマトグラフィー thin layer chromatography; トリフェニルメタン色素 triphenylmethane color

食用色素の有機性不純物としては既報¹⁾のような中間体、反応副生成物があり、そのほか、原料中間体あるいは製造工程に起因して副生する付随色素がある。我が国の食品添加物公定書では食用色素の純度試験項目に“他の色素”の項を設けて付随色素のチェックを行っているが、規格値は特に示していない²⁾。現行の規定は、規格制定時の市販製品の実態調査並びに主として米国における規制値³⁾を参考としながら定められた。

著者は食用色素の安全性確保のための品質面の検討を進めており、その研究のなかで、今回は比較的付随色素の検出量の多い食用青色 1 号 (ブリリアントブルー FCF, Colour Index No. 42090⁴⁾) につき、2 種の付随色素を調製してその構造を確認し、食用青色 1 号市販製品から単離した付随色素の同定を行った。ついで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による付随色素の分離定量法を検討して市販製品に適用し、良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

食用青色 1 号: 市販製品 10 試料

2. 試薬及び試液

アセトニトリル, エタノール, *n*-ブタノール, 過塩素酸ナトリウム, 炭酸アンモニウム, ホウ酸, ホウ酸ナトリウム, 酢酸アンモニウム, アンモニア水 (比重約 0.90) などはいずれも試薬特級品を用いた。

メタノールは和光純薬 (株) 高速液体クロマトグラフ用を用いた。

N-ethylaniline (EA), *N*-ethyl-*N*-benzylaniline (EBA), *N*-ethyl-*N*-benzylaniline sulfonic acid (EBASA), *o*-sulfo benzaldehyde (OSBA) は (株) アイゼンより提供されたものを用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 用担体: アビセル SF (微結晶セルロース), フナコシ薬品 (株)

アビセル薄層板: アビセル SF, フナコシ薬品 (株)

HPLC 用カラム: ①強アニオン交換樹脂 Zipax SAX 2.1 mm i.d.×50 cm (島津-デュポン社)。なお、長さ

100 cm の場合は 50 cm を 2 本, 200 cm では 4 本連結して用いた。

② Zorbax ODS 4.6 mm i.d.×15 cm (島津-デュポン社)

食用青色 1 号標準品: ブリリアントブルー FCF 国立衛生試験所標準品を用いた。色素含量は 96.5% (三塩化チタン法) であった。

0.02 *N* 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム 1.54 g を水に溶かして 1 L とする。

薄層の調製: TLC 用担体アビセル SF を用い、常法により厚さ 0.25 mm の薄層 (20×20 cm) を調製した後、1 夜風乾した。ついで 80° で 20 分間乾燥した。

3. 標準溶液

食用青色 1 号標準溶液: 食用青色 1 号標準品を用い、0.1~100 ppm の 40 v/v% メタノール溶液を調製した。

EA-, EBA-付随色素標準溶液: 5. により調製した EA-及び EBA-付随色素を用い、それぞれ 0.5~100 ppm の 40 v/v% メタノール溶液を調製した。

4. 装置

自記分光光度計: バリヤンテクトロン 635 型

赤外分光光度計: 日本分光 (株) DS 301 型

高速液体クロマトグラフ: 島津-デュポン 830 型, LC 2 型. 検出器 島津ダブルビーム分光光度計 UV-202, SPD-1, クロマトパック E1A 付属

自動薄層作製装置: ケメトロン社製

5. 付随色素の調製

Bell の方法⁵⁾に従って EA, OSBA 及び EBASA から EA-付随色素を, EBA, OSBA 及び EBASA から EBA-付随色素を調製した。両色素の 0.1% 溶液は, 8.2. 及び 11. に従って HPLC 及び TLC を行い, それぞれ単一ピーク並びにスポットを示すことを確認した。

6. 食用青色 1 号の単離

食用青色 1 号標準品の 2% 溶液につき、常法に従って調製した薄層を用い、線状に塗布し、11. に従って TLC を行い、食用青色 1 号の着色帯をかきとり、50 v/v% エ

Table 1. Structures and Absorption Maxima of Food Blue No. 1 and Subsidiary Colors

No.	Substance	Structure	$\lambda_{\max}$ (nm)		Reference
			in 0.02 <i>N</i> ammonium acetate solution	in 40 v/v% methanol	
1	Food Blue No. 1 Brilliant Blue FCF C.I. 42090 C.I. Food Blue 2		630	628	
2	EA-subsidiary color		612	618	Bell ³⁾ 612 nm, in aqueous solution
3	EBA-subsidiary color		629	633	Bell ³⁾ 626 nm, in aqueous solution

タノールで抽出し、遠心分離後上澄液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。残留物の 2,000 ppm 40 v/v% メタノール溶液につき HPLC を行い、単一ピークを示すことを確認した。

7. 試料溶液の調製

1. の試料を用い、1,000 ppm の 40 v/v% メタノール溶液を調製した。

8. HPLC

標準溶液及び試料溶液を用い、下記の分析条件に従って操作した。

8.1. Zipax SAX カラムを用いる場合

カラム: HPLC 用カラム①

溶離液: 第 1 液 0.01 *M* ホウ酸ナトリウム溶液, 第 2 液 0.05 *M* 過塩素酸ナトリウム溶液+0.01 *M* ホウ酸ナトリウム溶液

グラジエント: 1~5%/min, linear, 第 2 液 0~100%

圧力: 100 kg/cm²

流速: 1.2 ml/min

測定波長: UV 253.7 nm, UV-202, 628 nm

注入量: 5 μ l

8.2. Zorbax ODS カラムを用いる場合

カラム: HPLC 用カラム②

溶離液: 第 1 液 0.5% 炭酸アンモニウム溶液, 第 2 液 メタノール

グラジエント: 1~5%/min, linear, 第 2 液 0~100%

圧力: 70 kg/cm²

流速: 0.7 ml/min

測定波長: UV 253.7 nm, UV-202, 628 nm

注入量: 5 μ l

9. 検量線及び最小検出量

8. に従って操作し、修正百分率法によるピーク面積により検量線を作成した。ただし、最小検出量はピーク高さによった。

10. 吸収スペクトルの測定

標準溶液につき 200~750 nm の吸収スペクトルを測定した。

11. TLC

標準溶液及び試料溶液はその 2 μ l をアビセル薄層板上に塗布し、風乾した後、*n*-ブタノール-エタノール-1% アンモニア溶液 (6:2:3) の混液で原点より 10 cm 展開した。なお、付随色素を単離する場合は、単離する付随色素が他の色素と十分に分離するまで展開した。

実験結果及び考察

1. 食用青色 1 号の付随色素

食用青色 1 号は 1 mol の OSBA と 2 mol の EBASA との縮合、酸化などの反応によってつくられる。その構造式は Table 1, No. 1 に示すように *meta* 体であるが、中間体 EBASA⁶⁾ に起因する *ortho* 及び *para* 体も副生してくる。これらの異性体の存在については Jones ら⁷⁾ によって指摘されている。また、低スルホン化色素の存在については Dolinsky⁸⁾ によって検討されており、EBASA の代りに 1 mol の EA から得られる色素は

Fig. 1. Infrared absorption spectrum of EA-subsidiary color synthesized from *N*-ethyl-*o*-sulfolbenzaldehyde and *N*-ethyl-*N*-benzylaniline sulfonic acid (KBr)

Fig. 2. Infrared absorption spectrum of EBA-subsidiary color synthesized from *N*-ethyl-*N*-benzylaniline, *o*-sulfolbenzaldehyde and *N*-ethyl-*N*-benzylaniline sulfonic acid (KBr)

FD & C Blue No. 1 の製造中にアルカリによって分解生成するとしている。Stein⁹⁾ は FD & C Blue No. 1 の主な付随色素は 2 種のジスルホン化色素であるとした。これらの報告を参考として、本研究では 2 種の低スルホン化付随色素を調製した。

実験方法 5. により調製した EA- 及び EBA-付随色素の赤外吸収 (IR) スペクトルは Fig. 1 及び 2 に示した。いずれも Bell⁵⁾ のスペクトルと一致した。また、構造式と吸収極大波長は Table 1 に、吸収スペクトルを Fig. 3 に示した。

EA- 及び EBA-付随色素の 1 ppm 0.02 *N* 酢酸アンモニウム溶液の吸光度は、それぞれ 0.11 及び 0.13 であった。Bell⁵⁾ はそれぞれ 0.142 及び 0.18 としているが、測定を水溶液で行っており、また、TLC のクロマトグラムが示されていないなど、本研究の測定値との相違について言及することは難しい。

EA- 及び EBA-付随色素は TLC によって食用青色 1 号と分離できる (Fig. 4)。試料 (Table 4 の sample C)

の 0.05% 溶液 (現行法で規定されている濃度)、食用青色 1 号標準品の 0.2% 溶液では付随色素は検出されなかった。しかし、試料の 0.5% 溶液では EA-付随色素が検出されたため、付随色素の検出量の多い Table 4, sample A の 2% 溶液につき、実験方法 6. に従って付随色素を単離し、IR 及び吸収スペクトル、HPLC、TLC の結果を EA- 及び EBA-付随色素のそれらと比較してそれぞれ付随色素を同定した。

2. HPLC による付随色素の分離

2.1. Zipax SAX カラムによる分析条件の検討

米国の FD & C Color の中間体等の分析には主に Zipax SAX が用いられている¹⁰⁾。そこで、このカラムを用い、実験方法 8.1. に従って第 2 液を 2%/min の割合で混和し、HPLC を行った。この条件で食用青色 1 号と EA-付随色素の分離は良好であったが、EBA-付随色素は食用青色 1 号と分離できなかった (Fig. 5)。

そこで、カラムの長さを 200 cm とし、溶出液を、第 1 液 0.2 *M* ホウ酸溶液 + 0.002 *M* 過塩素酸ナトリウム

Fig. 3. Absorption spectra of Food Blue No. 1 standard, EA- and EBA-substituted colors
Curves: —, Food Blue No. 1 standard; ---, EA-substituted color; - · -, EBA-substituted color

Solvent: 0.02 *N* ammonium acetate solution

Concentration: unknown

Fig. 4. Thin layer chromatogram of Food Blue No. 1, EA- and EBA-substituted colors

Substance: 1, Commercial Food Blue No. 1 (sample C in Table 4) 0.5% solution; 2, 0.1% solution; 3, 0.05% solution; 4, Food Blue No. 1 standard 0.2% solution; 5, EA-substituted color 200 ppm solution; 6, EBA-substituted color 200 ppm solution

Condition: Avicel SF plate; developing solvent, *n*-butanol-ethanol-1% ammonium hydroxide solution (6:2:3)

Sample size: 2 μ l

Fig. 5. High performance liquid chromatogram of Food Blue No. 1 standard (B1), EA-(A) and EBA-(B) substituted colors

Chromatographic condition: Column, Zipax SAX 2.1 mm i.d. $\times$ 100 cm; eluant, primary, 0.01 *M* sodium borate solution, secondary, 0.05 *M* sodium perchlorate solution + 0.01 *M* sodium borate solution; gradient (G), 2%/min linear, secondary 0-100%; pressure, 100 kg/cm²; injection, 5 μ l

Liquid chromatograph: Shimadzu DuPont Model 830, detector Shimadzu UV202 at 628 nm, AUFS 0.01 $\times$ 8

Fig. 6. High performance liquid chromatogram of Food Blue No. 1 standard (B1), EA-(A) and EBA-(B) substituted colors

Chromatographic condition: Column, Zipax SAX 2.1 mm i.d. $\times$ 200 cm; eluant, primary 0.02 *M* boric acid + 0.002 *M* sodium perchlorate solution (pH 8.5), secondary, 0.1 *M* sodium perchlorate solution (600 ml acetonitrile + 400 ml water); gradient, 1%/min linear, secondary 0-100%; pressure, 120 kg/cm²; injection, 5 μ l

Liquid chromatograph: Shimadzu DuPont LC 2 detector SPQ 1 at 410 nm, AUFS 0.01 $\times$ 8

溶液 (10% 水酸化ナトリウム溶液で pH 8.5 に調整), 第 2 液 0.1 *M* 過塩素酸ナトリウム溶液 (アセトニトリ

ル 600 ml 及び水 400 ml を用いて調製)を用い、1%/min の割合で第2液を 0~100% 混和し、HPLC を行った。この条件で食用青色1号、EA- 及び EBA-付随色素の分離が可能となった (Fig. 6)。しかし、定量法として採用するには適当でなかった。

2.2. Zorbax ODS カラムによる分析条件の検討

2.1. の方法では分離が十分でなかったため、逆相分配型 Zorbax ODS カラムによる検討を行った。溶離液としてメタノール-水の 種々な割合の 混液を用いたが、メタノール濃度が低いと展開に時間を要し、濃度が高いと色素相互の分離が良好でなかった。そこで、実験方法 8.2. に示す条件を設定し、種々検討した。食用青色1号はグラジエント速度に関係なく、ほぼ同一保持時間 (t_R) を示し、また、EA-付随色素も同様な傾向を示したが、EBA-付随色素はグラジエント速度によって t_R が変化した。また、ピーク高さは食用青色1号並びに EA-付随色素はグラジエント速度に比例して高くなる傾向がみられたが、この傾向は特に EBA-付随色素の場合に著しく、両者の関係は直線性を示した。そのため、グラジエ

Fig. 7. High performance liquid chromatogram of Food Blue No. 1 standard (B1), EA- (A) and EBA- (B) subsidiary colors

Chromatographic condition: Column, Zorbax ODS 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm; eluant, primary, 0.5% ammonium carbonate solution, secondary, methanol; gradient, 5%/min linear, secondary 40-100%; pressure, 70 kg/cm²; injection, 5 μ l

Liquid chromatograph: Refer to Fig. 5

Fig. 8. Calibration curves of Food Blue No. 1 standard

Chromatographic condition and liquid chromatograph: Refer to Fig. 7, Chromatograph E1A

Fig. 9. Calibration curves of EA-subsidary color

Chromatographic condition and liquid chromatograph: Refer to Fig. 7, Chromatopack E1A

Fig. 10. Calibration curves of EBA-subsidary color

Chromatographic condition and liquid chromatograph: Refer to Fig. 7, Chromatopack E1A

Table 2. Comparison of the Peak Areas of EA-Subsidiary Color determined at $\lambda_{\max}$ of EA-Subsidiary Color, 618 nm, and at $\lambda_{\max}$ of Food Blue No. 1, 628 nm and the Ratio of 618 nm/628 nm

No.	EA-Subsidiary color (ppm)	Peak area (integrator counts)		Ratio: 618 nm/628 nm
		at 628 nm	at 618 nm	
1	10	484	740	1.529
2	20	941	1412	1.500
3	40	1934	2881	1.490
4	60	2973	4737	1.593
5	80	3859	5804	1.504
6	100	4721	6872	1.456
				Av. 1.512

ント速度として 5%/min を選んだ。

以上の検討結果から、実験方法 8.2. に示す条件の一部をつぎのように変更した。すなわち、第 2 液のメタノールを 5%/min の割合で第 1 液に混和し、HPLC を行った。食用青色 1 号、EA-付随色素、EBA-付随色素の順に 3 色素は極めて良好な分離を示すことをみいだした (Fig. 7)。 t_R はそれぞれ約 7 分、9 分及び 11 分であった。

3. 定量条件の検討及び検量線

Table 1 に示す各色素の 40 v/v% メタノール溶液における吸収極大波長並びに UV 253.7 nm の各波長を用

いて検討した。その結果、各色素共、吸収極大波長を用いた方が、UV 253.7 nm の約 4 倍の感度があり、食用青色 1 号、EA- 及び EBA-付随色素の微量分析に適することがわかった (Fig. 8, 9, 10)。

なお、EBA-付随色素の 633 nm における検量線は、食用青色 1 号の吸収極大波長を用いた場合のそれとほぼ一致したが、EA-付随色素では 618 nm における検量線の方が 1.5 倍高い値を示した (Table 2)。

検量線は 3 色素ともに 10~100 ppm (絶対量として 50~500 ng) の範囲でいずれも直線性を示した。

4. 最小検出量

標準溶液を用い HPLC による最小検出量を求めたところ、食用青色 1 号は波長 628 nm で 2.5 ng (0.5 ppm, 5 μ l 注入)、EA-付随色素は 618 nm で 5 ng (1 ppm, 5 μ l 注入) 及び EBA-付随色素は 633 nm で 3 ng (1 ppm, 3 μ l 注入) であった (Fig. 11)。

5. 添加回収試験

実験方法 6. で得た食用青色 1 号純品を用い、EA-付随色素並びに EBA-付随色素をそれぞれ 1~10% 添加して HPLC による回収率を調べた。EA-付随色素は 92.7~105.4%、EBA-付随色素は 95.8~103.3% と良好な回収を示した (Table 3)。

6. 食用青色 1 号市販製品中の EA- 及び EBA-付随色素の定量

食用青色 1 号市販製品 10 試料につき、2.2. 及び 3. に

Fig. 11. High performance liquid chromatograms of Food Blue No. 1 standard, EA- and EBA-subsidiary colors

Substance: Food Blue No. 1 standard; peak (1) 60 ppm, 5 μ l, (2) 1 ppm, 10 μ l

EA-subsidiary color; peak (1) 60 ppm, 5 μ l, (2) 1 ppm, 10 μ l

EBA-subsidiary color; peak (1) 80 ppm, 5 μ l, (2) 1 ppm, 10 μ l

Chromatographic conditions and liquid chromatograph: Refer to Fig. 7

Fig. 12. High performance liquid chromatograms of commercial Food Blue No. 1 (B1)
 Sample: Refer to Table 4
 Peak A: EA-subsidary color
 Chromatographic condition and liquid chromatograph: Refer to Fig. 7

Table 3. Recoveries of EA- and EBA-Subsidiary Colors added to Pure Brilliant Blue FCF, by High Performance Liquid Chromatography

Substance	Pure Brilliant Blue FCF (mg)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery* (%)
EA-subsidary color	100	1.0	0.99	99.0
	100	2.0	1.96	98.0
	100	4.0	4.00	100.0
	100	6.0	5.56	92.7
	100	10.0	10.54	105.4
EBA-subsidary color	100	1.0	0.99	99.0
	100	2.0	1.96	98.0
	100	4.0	3.96	99.0
	100	6.0	5.75	95.8
	100	10.0	10.33	103.3

* Values are averages of triplicate data.

従って付随色素を分析した。全試料から EA-付随色素は 2.7~10.4%, EBA-付随色素は 1 試料からこん 跡 程 度 検出された (Table 4)。なお、食用青色 1 号標準品は分析用標準品として、特に精製された中間体を用いて製造されており、精製も行われているため、EA-付随色素は市販製品の約 1/10 量と少なかった。米国の The Code

Table 4. Amounts of Subsidiary Colors in Commercial Food Blue No. 1, Determined by High Performance Liquid Chromatography

No.	Sample	EA-subsidary color (%) ^{*1}	EBA-subsidary color (%) ^{*1}
1	Food Blue No. 1 A	10.4	trace
2	B	5.4	ND ^{*2}
3	C	3.3	ND ^{*2}
4	D	5.0	ND ^{*2}
5	E	5.1	ND ^{*2}
6	F	4.3	ND ^{*2}
7	G	2.7	ND ^{*2}
8	H	5.2	ND ^{*2}
9	I	2.9	ND ^{*2}
10	J	4.0	ND ^{*2}
11	Food Blue No. 1 standard	0.5	ND ^{*2}

^{*1} Values are averages of triplicate data.

^{*2} ND<0.06%

of Federal Regulations (CFR) の FD & C Blue No. 1 の規格¹¹⁾では付随色素 6.0% 以下, WHO の Brilliant blue FCF の規格¹²⁾では同じく 3.0% 以下とされており、今回分析した試料中の EA- 及び EBA-付随色素に関する定量値はおおむね CFR の規格値に適合した。な

お、試料の色素含量は 88~93% であった。

Fig. 12 に EA-付随色素の検出量の多い sample A, 少ない sample C 及び一般的な sample D につきクロマトグラムを示した。Sample C 及び D のクロマトグラムで食用青色 1 号のすぐあとに検出される色素は未確認であるが, sample A ではこの色素は検出されていない。本色素の付随色素につき, HPLC により分離定量を試みた例は未だないが, 付随色素の種類と存在量は製品によって若干異なるため, すべての付随色素を同定し, 定量することは難しく, 本研究によって主付随色素の存在量を明らかにすることができた。

ま と め

食用青色 1 号の付随色素として *N*-ethylaniline (EA), *o*-sulfobenzaldehyde (OSBA), *N*-ethyl-*N*-benzylaniline sulfonic acid (EBASA) から EA-付随色素を, *N*-ethyl-*N*-benzylaniline (EBA), OSBA, EBASA から EBA-付随色素を調製して種々な特性を明らかにした。また, 食用青色 1 号市販製品中の付随色素をこの 2 種の付随色素と同定した。

食用青色 1 号, EA-及び EBA-付随色素は Zorbax ODS カラムを用いる 逆相型高速液体 クロマトグラフィーにより, それぞれ保持時間は約 7 分, 約 9 分及び約 11 分で 3 色素は良好な分離を示した。測定波長としては各色素の吸収極大波長が UV 253.7 nm の約 4 倍の感度があり, 微量分析に適することがわかった。最小検出量は食用青色 1 号 2.5 ng, EA-付随色素 5 ng, EBA-付随色素 3 ng であった。また, 添加回収試験は EA-付随色素で 92~105.4%, EBA-付随色素で 95.8~103.3% であった。

本法による食用青色 1 号市販製品の分析結果は, 10 試料から EA-付随色素を 2.7~10.4%, 1 試料から EBA-付随色素をこん跡程度検出した。

本法は食用青色 1 号中の EA- 及び EBA-付随色素の定量法として極めて有効であると考ええる。

終りに, 本研究に際し, 種々御指導いただきました谷村顕雄副所長に厚く御礼を申し上げます。また, 種々御

協力いただきました食品添加物部江口浩子氏, (株)アイゼン後藤力雄氏並びに(株)島津製作所分析センター岡田英二氏に対し, 厚く御礼を申し上げます。

なお, 本研究の要旨は日本食品衛生学会第37回学術講演会 (1979年 5月, 東京) において発表した。

文 献

- 1) 神蔵美枝子: 食衛誌. 26, 243~252, 643~650 (1985)
- 2) 食品添加物公定書: 第 4 版 (1978) p. 210~235, 厚生省.
- 3) U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Food and Drug Administration: "Complication of Regulations for Color Certification" 7-9, (1959); Federal Register May 14, (1959) 24 F. R. 3851.
- 4) "Colour Index" 3rd Ed., (1971) Society of Dyers and Colourists and American Association of Textile Chemists and Colorists.
- 5) Bell, S.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56, 947~949 (1973).
- 6) Wilson, C. H., Dolinsky, M.: J. Assoc. Off. Agr. Chem. 47, 1153~1157 (1964).
- 7) Jones, J. H., Dolinsky, M., Harrow, L. S., Heino, K. S. Jr., Staves, M. C.: *ibid.* 38, 977~1010 (1955).
- 8) Dolinsky, M.: *ibid.* 38, 359~365 (1955).
- 9) Stein, C.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 52, 34~40 (1969).
- 10) Singh, M.: *ibid.* 60, 173~175 (1977); Marmion, D. M.: *ibid.* 58, 719~724 (1975).
- 11) Code of Federal Regulations (1983) Title 21, U. S. Government Printing Office, Whashington, D. C. sec. 74.101.
- 12) FAO/WHO: "Specifications for Identity and Purity and Toxicological Evaluation of Food Colours" p. 27~30 (1966).