高速液体クロマトグラフィーによる食用赤色 40 号中の副成色素の分析^{*1}

(平成4年7月24日受理)

武田由比子^{*2} 神蔵美枝子^{*2} 柴田 正^{*3}
伊藤誉志男^{*3} 義平邦利^{*4}

Determination of Subsidiary Colors in Food Red No. 40 by High Performance Liquid Chromatography

Yuiko TAKEDA^{*2}, Mieko KAMIKURA^{*2}, Tadashi SHIBATA^{*3}, Yoshio Ito^{*3}
and Kunitoshi YOSHIHARA^{*4}

(^{*2}National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158,
Japan; ^{*3}National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch: 1-1-43,
Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; ^{*4}Toua University: 2-1,
Ichinomiya-gakuen-cho, Shimonoseki-shi, Yamaguchi 751, Japan)

A simple method for the simultaneous determination of the lower- and higher-sulfonated subsidiary colors in Food Red No. 40 by high performance liquid chromatography was developed.

The sample solution was directly chromatographed on an ODS-column with a gradient of 0% to 100% methanol in 0.1 M ammonium acetate over 50 min. Detection was achieved with a VIS monitor set at 515 nm.

In analysis of commercial Food Red No. 40, the sum of lower-sulfonated subsidiary colors was 0.28% to 1.31%, and the sum of higher-sulfonated ones was 0.14% to 0.60%. The detection limits of quantitative determination by the proposed method were 0.02% for each compound. These techniques enable us to monitor rapidly some subsidiary colors in commercial samples.

(Received July 24, 1992)

Key words: 純度試験 purity test; 食用赤色 40 号 food red No. 40; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 副成色素 subsidiary colors; クレシジンスルホン酸アゾβ-ナフトール塩色素 cresidine sulfonic acid-azo-β-naphthol salt (CSA-β); クレシジンアゾシェファー塩色素 cresidine-azo-Schaeffer's salt (CR-S); クレシジンスルホン酸アゾG塩色素 cresidine sulfonic acid-azo-G salt (CSA-G); クレシジンスルホン酸アゾR塩色素 cresidine sulfonic acid-azo-R salt (CSA-R)

緒 言

食用赤色 40 号 (Food Red No. 40: 以下 R-40 と略す) が食品添加物として告示され¹⁾, 同時に規格基準の純度試験において, 副成色素, 原料並びに中間反応物質の

限度規格が定められた。今まで我が国で, 使用が認められている食用色素の副成色素については, 一定濃度溶液のペーパークロマトグラフィー (PC) による限度試験により規制されていたが²⁾, 今回許可された R-40 については, 不純物の混在量が数値により規制されることになった。R-40 は 4-アミノ-5-メトキシ-2-メチルベンゼンスルホン酸 (*p*-cresidine sulfonic acid, 以下 CSA と略す) 及び 6-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸ナトリウム塩 (Schaeffer's Salt, 以下 SS と略す) を原料として

^{*1} 食用赤色 40 号の不純物の分析 (第 1 報)

^{*2} 国立衛生試験所: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*3} 国立衛生試験所大阪支所: 〒540 大阪市中央区法円坂 1-1-43

^{*4} 東亜大学: 〒751 山口県下関市一宮学園町 2-1

Fig. 1. The procedure for synthesis of Food Red No. 40

Higher sulfonated subsidiary colors

Lower sulfonated subsidiary colors

Fig. 2. Structures of subsidiary colors

CR-S: cresidine-azo-Schaeffer's salt

CSA-β: cresidine sulfonic acid-azo-β-naphthol salt

CSA-R: cresidine sulfonic acid-azo-R salt

CSA-G: cresidine sulfonic acid-azo-G salt

ジアゾ化反応により合成される (Fig. 1). 夾雑物としては未反応原料³⁾である CSA と SS, 更に原料不純物質として 6,6'-オキシビス (2-ナフトレンスルホン酸) ニナトリウム塩 (以下 DONS と略す)⁴⁾ があり, 規制値は CSA 0.2% 以下, SS 0.3% 以下, DONS 1.0% 以下となっている。また, 原料中の主な不純物, 例えば CSA 中の *p*-クレジジンや SS 中の β-ナフトール, R-塩, G-塩などの反応物質である数種の副成色素があげられる⁵⁾。R-40 は米国でも許可されている食用色素であるため, PC や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析例もあるが^{6)~8)}, HPLC 条件で特殊なカラムや移動相などが複雑で, しかも分析項目の対象が限られている。

本研究は, 比較的含量の高い副成色素として, 低スルホン化副成色素 (総量規制値 1.0% 以下) であるクレジジンスルホン酸アゾ β-ナフトール塩色素 (CSA-β) 及びクレジジンアゾシェファール塩色素 (CR-S), また高スルホン化副成色素 (総量規制値 1.0% 以下) であるクレジジンスルホン酸アゾ G 塩色素 (CSA-G) 及びクレジジンスルホン酸アゾ R 塩色素 (CSA-R) の HPLC による分

離, 定量分析法について検討を行ったので, その結果を報告する。なお, 本研究に用いた副成色素の構造式を Fig. 2 に示した。

実験方法

1. 試料及び試薬

試料: 市販の R-40 を用いた。

標品: R-40, CSA-β, CR-S, CSA-G, CSA-R は FDA 及び日本食品添加物協会を通じて三栄化学(株)より供与されたものであり, 純度は官報規格¹⁾に適應するものを使用した。

検液及び標準液の調製: 試料 10.0 mg を量り, 0.1 M 酢酸アンモニウム溶液を加えて溶解し, 100 ml としたものを, 検液とした。各々の標品は同様に調製した (ただし, CSA-β は先にメタノール 5 ml を加え溶かした) ものを標品溶液とした。これらの標品溶液 10 ml をとり, 0.1 M 酢酸アンモニウム溶液を加え 100 ml とし, これを吸収極大波長測定用の試験溶液とした。これらの試験溶液を各々 10.0, 5.0, 2.0 及び 1.0 ml を量り, 正確に 100 ml として標準液とした。その他の試薬はいずれ

Table 1. HPLC Conditions for Determination of Colors

Column	ODS 4.6 mm ϕ × 15 cm
Column temp.	40°C
Detection	515 nm
Flow rate	1.0 ml/min
Injection vol.	20 μ l
Sensitivity	0.01 AUFS
Mobile phase [1]	Isocratic elution system A=ammonium acetate sol. B=methanol A:B [85:15, 60:40, 30:70]
Mobile phase [2]	Gradient elution system A=ammonium acetate sol. B=methanol [0% to 100% solvent B in solvent A over 50 min, and then the column is reequilibrated with 100% solvent A]

Fig. 3. UV-VIS spectra of Food Red No. 40 and higher sulfonated subsidiary colors

も市販特級品を用いた。

2. 装 置

自記分光光度計: (株)島津製作所製 UV-240

高速液体クロマトグラフ: 島津 LC-6A, UV-VIS Spectrophotometric Detector SPD-6AV

3. 吸収スペクトルの測定

自記分光光度計により、各試験溶液について 190 nm から 700 nm の吸収スペクトルを測定し、吸光度及び吸収極大波長を求めた。

4. 高速液体クロマトグラフィーによる定量分析

Table 1 に示す測定条件で行った。それぞれのピーク高さ、またはピーク面積から、検量線を作成し、検液中の副成色素の濃度を求めた。移動相は酢酸アンモニウム溶液とメタノールの混液による isocratic elution 系と

Fig. 4. UV-VIS spectra of Food Red No. 40 and lower sulfonated subsidiary colors

gradient elution 系を検討した。

結果と考察

1. 吸収スペクトルの測定

R-40 及び副成色素のスペクトルを Fig. 3, 4 に示した。R-40 の可視部領域の吸収極大波長は 500 nm 付近にあり、紫外部領域では 215 nm 付近に大きなピークがあり、315 nm 付近に小さなピークが観察された。

また 4 種の副成色素は Fig. 3, 4 に示すように、ほぼ R-40 に類似したスペクトルを示し、可視部吸収極大波長は 498 nm から 517 nm の間にあった。すなわち、CSA-β は 499~503, CR-S は 498~502, CSA-G は 498~502, CSA-R は 513~517 nm であり、紫外部領域では 4 種とも 210 nm 付近に最大のピークがあり、310~330 nm 付近に小さなピークがみられた。このように骨格となる構造が同じであるこれらの化合物は、ほぼ同じスペクトルを示した。

2. 高速液体クロマトグラフィーによる定量分析

(1) 検出波長の選択

前記の吸収スペクトルの測定結果 (Fig. 3, 4) から、全種を同時に検出する波長として、220 nm 付近が最も良いと推定されたが、この領域ではカラムによってはベースラインが不安定なものが多く (ただし、ベックマン社の Ultra-Sphere-ODS 4.0 × 250 mm は比較的良好)、不適当であった。また、R-40, CSA-β, CR-S, CSA-G, CSA-R は可視部吸収波長 500 nm から 515 nm で 5 色素ともほぼ同程度の強さ ($E_{1\%}^{1\text{cm}} \approx 500$) を示した。しかし、個々の色素では Table 1 に示す直線濃度勾配の移動相を用いるため、保持時間差が大きいものではメタノール含量が変わり、極大波長のシフトも若干みられたが、5 色素の検出波長として 515 nm を採用した。

(2) 移動相の検討

アゾ色素を分離するための移動相としては、従来のリン酸二アンモニウム溶液-メタノール混液の濃度勾配

Table 2. Effect of Mobile Phase [1]* on Retention Time

Mobile phase		Retention time (min)				
Methanol (%)	Ammonium-acetate (M)	CSA-R	CSA-G	R-40	CR-S	CSA-β
15	0.005	4.52	5.16	**	***	***
	0.01	5.06	6.06	**	***	***
	0.05	6.59	8.42	**	***	***
	0.1	6.95	9.26	**	***	***
40	0.005	—	—	3.50	**	**
	0.01	—	—	4.85	**	**
	0.05	—	—	5.95	**	**
	0.1	—	—	6.10	**	**
70	0.005	—	—	—	4.90	6.35
	0.01	—	—	—	5.73	6.94
	0.05	—	—	—	6.57	8.86
	0.1	—	—	2.33	7.20	9.48

* Refer to Table 1

— No separate (less than 2 min)

** Broad peak (more than 20 min)

*** Broad peak (more than 60 min)

Fig. 5. Effect of ammonium acetate content to elution time of Food Red No. 40 and subsidiary colors

法⁹⁾があるが、これは我が国で許可されている食用色素の同時分析法として開発されたものであり、色素中の不純物分析には不十分であった。食品添加物の規格基準試験の中で色素溶液として従来より酢酸アンモニウム溶液が使われ、タール色素の安定を保ち、しかもメタノールとの溶解性も優れていることから、酢酸アンモニウム-メタノールの混液が適当であることが分かった。

① Isocratic elution 系の移動相

前記〔実験方法〕の Table 1 に示す mobile phase [1] を用いた分離分析の結果を Table 2 に示した。酢酸アンモニウム水溶液 (0.005~0.1 M)-メタノール混液 (85:15) では高スルホン化副成色素の CSA-R, CSA-G が 10 分以内に良好な分離を示したが、他の色素は保持時間が

長く、ブロードなピークで検出感度も悪く、定量不可能であった。また、(60:40) では R-40 のみ良好で、(30:70) の混合比では低スルホン化副成色素の CSA-β, CR-S は良好な分離を示したが他の色素は 2 分以内に溶解し、分離不可能であった。また、酢酸アンモニウム濃度により保持時間がわずかに変化することが認められたが、0.05 M から 0.1 M の間では良好な相互分離が得られた。このように isocratic elution 系でも各副成色素の定量は可能であるが、副成色素を低スルホン化色素と、高スルホン化色素に分けて分析する必要があった。

② Gradient elution 系の移動相

前記〔実験方法〕の Table 1 の mobile phase [2] に示したように酢酸アンモニウム溶液-メタノール混液

Fig. 6. Chromatogram of Food Red No. 40 and subsidiary colors
(Each subsidiary color content was made 1.0% by its addition to Food Red No. 40)

(100:0) から (0:100) の直線濃度勾配を 50 分間とする条件では, Fig. 5 に示すような分離結果となり, R-40 と 4 種類の副成色素を同時に分離定量することが可能となった. そのクロマトグラムは Fig. 6 に示すように保持時間は, CSA-R が 14.2 分, CSA-G が 15.1 分, R-40 が 24.1 分, CR-S が 37.6 分, CSA-β が 39.2 分と良好な分離が得られた. また, 試料中の 4 種の副成色素の確認も可能であった. なお, 酢酸アンモニウム溶液の濃度については, 0.005 M から 0.1 M 濃度で検討したが, 混合比が急激に変動する Grandient 系では, カラムによって 0.1 M の高濃度ではカラム圧が上昇し, 長時間連続使用に適さないものもあった. また, 0.005 M の低濃度でも相互の分離が可能であったが, CSA-R, CSA-G の保持時間差が短くなる傾向が見られた. なお, 使用したカラムは Shim-pack CLC-ODS (M), Inertsil ODS-2, Senshu Pak ODS-1251-N (4.6 mm×15 cm, あるいは 25 cm) など, いずれも良好な分離を示した.

(3) 検量線について

Fig. 7 に示すように, いずれも 0.01 μg/ml から 1.0 μg/ml の範囲で原点を通る直線関係が得られた. なお, ピーク面積及び高さとも良好な直線性を示した.

(4) 最少検出量と定量限界

副成色素 CSA-β, CR-S, CSA-G, CSA-R は 515 nm で, それぞれ感度 0.005 AUFS で測定したところ, いずれの場合も 0.02 μg/ml を 20 μl (0.4 ng 相当) 注入した時の S/N 比が 5 以上であり, 色素検体中の 0.02% の微

Fig. 7. Calibration curves of subsidiary colors

量定量分析が可能であった.

(5) 食用赤色 40 号中の副成色素含有量について

作成した本法を市販品に適用した. 試料 (No. 2) 検液のクロマトグラムを Fig. 8 に示した. R-40 中, CSA-R (14.1 分) は 0.45%, CSA-G (15.0 分) は 0.15%, CR-S (37.7 分) は 0.10%, 及び CSA-β (39.2 分) は 1.08% 検出されており, 低スルホン化副成色素の総量規制値

Fig. 8. Chromatogram of a commercial Food Red No. 40 (Sample No. 2 in Table 3)

Table 3. Subsidiary Colors in Commercial Food Red No. 40

Sample	Subsidiary colors (%)					
	CSA-β	CR-S	CSA-β +CR-S	CSA-G	CSA-R	CSA-G +CSA-R
1	0.22	0.06	0.28	tr	0.16	0.16
2	1.08	0.10	1.18	0.15	0.45	0.60
3	0.42	0.04	0.46	0.02	0.25	0.27
4	1.28	0.03	1.31	tr	0.14	0.14
5	0.86	tr	0.86	0.12	0.30	0.42

CSA-β+CR-S: Sum of lower sulfonated subsidiary colors

CSA-G+CSA-R: Sum of higher sulfonated subsidiary colors

tr: <0.02

(1.0%以下)を越える値(1.18%)であった。このクロマトグラムから分かるように市販品の中にはこの4種以外の未知の副成色素もピークとして検出され、今後の検討課題である。入手した5試料について、これら4種の副成色素の定量結果をTable 3に示した。

高スルホン化副成色素に比べ、低スルホン化副成色素が全試料で高い値を示し、その中でもCR-SよりCSA-βが多く検出された。これは原料である Schaeffer's salt 中の不純物β-naphtholに由来するものと推定される。

作成した本法により、高スルホン化副成色素2種と、

低スルホン化副成色素2種について市販の食用赤色40号中の定量分析限界は各々0.02%であった。各々の総量規制値が1%以下であることから、本法は品質規格試験法として十分応用できる。

まとめ

HPLCによる食用赤色40号中の4種の副成色素の同時定量分析法を作成した。移動相としてメタノールと酢酸アンモニウム溶液の直線濃度勾配条件で、規制の副成色素のうち、CSA-β、CR-S、CSA-G及びCSA-Rについては、それぞれ0.02%の同時定量分析が可能となり、市

販品の純度規格試験法として簡便, かつ良好である. また, isocratic な移動相条件で, 保持時間差の小さい高スルホン化副成色素 2 種は 15% メタノールで相互の分離がよく, また, 40% メタノールで R-40 とその近傍の妨害物の分離が良好になるなど, それぞれの副成色素の確認と未知の副成色素の同定に応用できるものと思われる.

文 献

- 1) 厚生省告示第 1 号: 官報 (号外第 4 号), 平成 3 年 1 月 17 日付, p. 1~2, p. 5~6 (1991).
- 2) 厚生省編: “第五版食品添加物公定書” p. 28~29, p. 32 (1986).
- 3) Marmion, D. M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **54**, 131~136 (1971).
- 4) Marmion, D. M., White, R. G., Cashion, F. W., Whitcomb, B. B.: *ibid.* **54**, 137~140 (1971).
- 5) Bell, S. J.: *ibid.* **59**, 1,294~1,311 (1976).
- 6) Singh, M.: *ibid.* **57**, 219~220 (1974).
- 7) Cox, E., Reed, G.: *ibid.* **64**, 324~330 (1981).
- 8) Bell, S.: AOAC Official Method of Analysis, 15th Color Additives p. 1,115~1,132 (1990).
- 9) 厚生省生活衛生局監修: “食品衛生検査指針・食品中の食品添加物分析法” p. 142~166 (1989).