ノート

試料濃縮法を用いた逆相 TLC/スキャニングデンシトメトリー
による食品中の微量のタール色素の同定

(平成 10 年 2 月 18 日受理)

上野 英二*¹ 大野 勉*¹ 大島 晴美*¹
斎藤 勲*¹ 伊藤 裕子*¹ 岡 尚男*¹
加賀美忠明*¹ 木島 秀雄*² 岡崎 清朗*²Identification of Small Amounts of Coal Tar Dyes in Foods by Reversed-Phase
TLC/Scanning Densitometry with Sample Concentration TechniquesEiji UENO*¹, Tsutomu OHNO*¹, Harumi OSHIMA*¹, Isao SAITO*¹, Yuko ITO*¹, Hisao OKA*¹,
Tadaaki KAGAMI*¹, Hideo KIJIMA*² and Kiyoaki OKAZAKI*²(*¹Aichi Prefectural Institute of Public Health: 7-6, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya
462-8576, Japan; *²Hokubu Market Food Inspection Office, Aichi Prefecture: 107,
Hattan, Toyoba, Toyoyama-cho, Nishikasugai-gun, Aichi 480-0202, Japan)

We have investigated the applicability of TLC/scanning densitometry (TLC/SCAN) to the analysis of small amounts of coal tar dyes in foods. The use of a combination of reversed-phase C₁₈ TLC and sample concentration techniques on the TLC plate enabled us to measure the visible absorption spectra of small amounts of coal tar dyes in foods with good accuracy. The sample concentration techniques improved the detection limits 10~20-fold. The TLC/SCAN was successfully applied to the identification of coal tar dyes in 48 food samples which were suspected to be in violation of the Japanese Food Sanitation Law. The present method is convenient for the rapid identification of small amounts of coal tar dyes in foods.

(Received February 18, 1998)

Key words: タール色素 coal tar dye; 薄層クロマトグラフィー/スキャニングデンシトメトリー TLC/scanning densitometry; 逆相薄層クロマトグラフィー reversed-phase TLC; 試料濃縮法 sample concentration technique; 可視部吸収スペクトル visible absorption spectrum

緒言

輸入食品の増加に伴い、我が国の食品衛生法により食品添加物として指定されていない色素、いわゆる指定外色素の検出例もしばしば報告され¹⁾、これら色素の迅速かつ的確な同定が要求されている。現在、食品中タール色素の分析法としては、ろ紙クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (TLC) 及び HPLC が一般に用いられている^{2)~4)}。このうち TLC は、手法が簡単で、短時

間の展開で比較的良好な分離が達成できることなどから汎用されている。著者らも、TLC を用いて食用タール色素のルーチン分析を行っているが、特に *R_f* 値の再現性に優れた逆相 TLC を主として使用している^{5), 6)}。しかし、TLC から直接得られる情報は *R_f* 値と色調のみであり、指定外色素などの場合には、それらのみにより色素を同定することは大きな危険を伴う。そこで、従来から TLC により分離された目的の色素スポットをかきとり、溶媒で再抽出して色素を単離し、可視部吸収スペクトルを測定することにより同定が行われているが、これらの操作は煩雑で長時間を要する。そのうえ、食品によっては微量の色素が混入しているものも見受けられ、

*¹ 愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6*² 愛知県北部市場食品衛生検査所: 〒480-0202 愛知県西春日井郡豊山町大字豊場字八反 107

Fig. 1. Procedure for condensation techniques

A) Normal condensation technique, B) Trapezoid condensation technique

その場合には、操作中の試料の損失や夾雑物の混入なども無視できない。

著者らは、TLCを用いてタール色素を分離し、更に色素を単離せずにスキャニングデンシトメータを用いてプレート上の目的の色素スポットの可視部吸収スペクトルを迅速に測定する手法（以下：TLC/SCAN法と略す）を報告している⁷⁾。そこで今回、市販食品中のタール色素、特に微量の色素を感度よく確実に同定する目的でTLC/SCAN法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

1993年4月から1997年3月までの4年間に名古屋市中心部市場北部市場内を流通していた食品約600検体のうちで食品衛生法違反の疑われた48検体（ちりめん・こうなご・たらこなど魚介類加工品、かまぼこ・はんぺんなど魚肉ねり製品、高菜漬・たくあん漬など漬物、だんご・ようかんなど菓子類、穀類加工品、清涼飲料水、そうざい類、食肉製品及び野菜加工品）を用いた。

2. 標準品及び試薬

指定色素標準品：東京化成工業（株）製のアマランス（R2, C.I. No. 16185）、エリスロシン（R3, C.I. No. 45430）、アルラレッドAC（R40, C.I. No. 16035）、ニューコクシン（R102, C.I. No. 16255）、フロキシシン（R104, C.I. No. 45410）、ローズベンガル（R105, C.I. No. 45440）、アシッドレッド（R106, C.I. No. 45100）、タート

ラジン（Y4, C.I. No. 19140）、サンセットエローFCF（Y5, C.I. No. 15985）、ブリリアントブルーFCF（B1, C.I. No. 42090）、インジゴカルミン（B2, C.I. No. 73015）、ファストグリーンFCF（G3, C.I. No. 42053）を用いた。

指定外色素標準品：東京化成工業（株）製のアゾルビン（AZO, C.I. No. 14720）、キノリンエロー（QY, C.I. No. 47005）、パテントブルーV（PBV, C.I. No. 42051）、ブリリアントブラックBN（BBB, C.I. No. 28440）、オレンジRN（O-RN, C.I. No. 15970）、ファストレッドE（FRE, C.I. No. 16045）、和光純薬工業（株）製のオレンジI（O-I, C.I. No. 14600）、オレンジII（O-II, C.I. No. 15510）及びアルドリッチ社製のウールグリーンBS（WGB, C.I. No. 44090）を用いた。

その他の試薬は試薬特級を用いた。

3. 装置及び測定条件

スキャニングデンシトメータは（株）島津製作所製CS-9000を使用した。波長走査範囲370~700 nm、スリットサイズ0.4×0.4 mmに設定し、測定は反射吸光法により行った。測定されたスポットのスペクトルデータはバックグラウンド補正を行い、可視部吸収スペクトルとした。

4. TLC条件

プレートは、メルク社製RP-18 F_{254s} TLC（Art. 15389）を用いた。展開溶媒はA) メチルエチルケトン-メタノール-5%硫酸ナトリウム溶液（1:1:1）、B) アセトニトリル-メタノール-5%硫酸ナトリウム溶液（3:3:

Table 1. *R_f* Values, Maximum Wavelengths and Detection Limits of Standard Coal Tar Dyes

Dye	<i>R_f</i> Value			Maximum wavelength (nm)	Detection limit (ng/Spot)
	Solvent system A ^{a)}	Solvent system B ^{b)}	Solvent system C ^{c)}		
R2	1.00	0.71*	1.00	527	10
R3	0.40*	0.00	0.33	535	10
R40	1.00	0.34*	0.97	498	10
R102	1.00	0.58*	1.00	505	10
R104	0.15*	0.00	0.16	547	10
R105	0.19*	0.00	0.18	558	10
R106	0.77*	0.04	0.65	405 565	5
Y4	1.00	0.79*	1.00	422	10
Y5	1.00	0.45*	0.98	478	10
G3	1.00	0.17*	0.92	428 627	5
B1	1.00	0.14*	0.91	407 635	5
B2	1.00	0.66*	1.00	605	10
AZO	0.88	0.19*	0.86	513	10
QY	0.77	0.18	0.65*	414	10
PBV	0.76	0.07	0.62*	410 643	5
BBB	1.00	0.47*	1.00	573	10
WGB	0.90	0.22*	0.85	393 635	5
O-I	0.75	0.11	0.69*	474	10
O-II	0.61*	0.05	0.53	485	10
O-RN	0.61*	0.05	0.53	410 485	10
FRE	0.91	0.24*	0.89	503	10

^{a)} Methyl ethyl ketone-methanol-5% aqueous sodium sulfate solution (1:1:1)

^{b)} Acetonitrile-methanol-5% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

^{c)} Acetonitrile-methanol-5% aqueous sodium sulfate solution (1:1:1)

* These solvent systems were used for the measurement of VIS spectra.

10) 及び C) アセトニトリル-メタノール-5%硫酸ナトリウム溶液 (1:1:1) を用いた^{5)~7)}。

5. 色素の抽出・精製法

細切した試料 5~100 g を採り、ポリアミド法を用いて色素を精製した^{2), 8)}。

6. TLC/SCAN 法用試料濃縮法

前記 4 の条件により展開されたプレート上の目的の色素スポットを、Fig. 1 に示す 2 種類の方法を用いて濃縮した。

A) 標準濃縮法: 通常の試料スポットに用いた、スポットの周りにメタノールを塗布した (Fig. 1(1))。スポットの中心に向かって浸透するメタノールは展開溶媒のように働き、スポットはメタノールとともに移動する。そして、メタノールが蒸発したあとにこの操作を数回繰り返すことにより、スポットは線状あるいは点状に濃縮された (Fig. 1(2))。その後、プレートを試料ステージに載せ、濃縮色素スポットの可視部吸収スペクトルを測定した。

B) 台形濃縮法: 複数の色素がプレート上に認められ、それぞれの色素の *R_f* 値が近接している場合に用いた。Fig. 1(3) のように片側固定相をはがし取り、一方

からメタノールを塗布した。浸透するメタノールとともにスポットは反対側の固定相の角へと移動する。そして、メタノールが蒸発したあとにこの操作を数回繰り返すことにより、スポットは点状に濃縮された (Fig. 1(4))。その後、同様に操作し測定した。

結果及び考察

1. 試料濃縮法の検討

分析対象は指定タール色素 12 種類に加えて、指定外色素として最近数年間に輸入食品から検出例¹⁾があるものなど検討の必要性が高いと考えられるもの 9 種類 (AZO, QY, PBV, BBB, WGB, O-I, O-II, O-RN 及び FRE) を含めた、計 21 種類とした。

TLC は *R_f* 値の再現性に優れ、特に試料由来の夾雑物にほとんど *R_f* 値が影響を受けないという特徴を有する逆相 *C₁₈* TLC プレートを用いた^{5), 6)}。

TLC/SCAN 法において、感度良く可視部吸収スペクトルを得るために必要な色素量は、色素により若干の差が認められるが通常 TLC プレート上 50~200 ng/スポットであり、ほとんどの試料について、展開された色素スポットの可視部吸収スペクトルを直接測定することが可能であった。しかし、試料の中にはごく微量の色素

Fig. 2. TLC chromatograms (A) and VIS spectra (B) of coal tar dye extracted from a sample (processed fry Chirimen) and standard of coal tar dye under TLC/SCAN method conditions

a: Standard of B1, b: Extract of a sample

1) Standard of B1, 2) Unknown sample spot, 3) Condensate of unknown sample spot
TLC conditions

Plate: RP-18 F_{254S}, Solvent system: acetonitrile-methanol-5% aqueous sodium sulfate solution (3:3:10)

が混入しているものもあり、微量の色素スポットの測定ではバックグラウンドの影響から可視部吸収スペクトルの精度は低下する。そこで、プレート上の単位面積当たりの色素の濃度を高くするために、実験方法に示した二つの試料濃縮法を検討した。両試料濃縮法を用いて測定したところ、TLC プレート上 5~10 ng/スポットで感度良く可視部吸収スペクトルを得ることができ、約 10~20 倍の感度向上が認められた。Table 1 に、本手法によって得られた色素標準品の R_f 値、極大吸収波長及び検出限界を示した。

両濃縮法に検出感度上の差は認められなかったので、標準濃縮法は通常の試料スポットに用い、台形濃縮法は複数の色素がプレート上に認められ、それぞれの色素の R_f 値が近接している場合に操作中にスポットが重なるのを防ぐ目的で、必要により使用することとした。すべての色素の可視部吸収スペクトルは文献²⁾と一致しており、色素を確実に同定することが可能であった。

2. 市販食品への応用

本法を収去食品約 600 検体のうち、違反が疑われた 48 検体に適用したところ、通常の色素含有量であればそのまま、微量のタール色素の場合には TLC プレート上で色素スポットの濃縮を行う試料濃縮法を用いることにより、すべての試料中タール色素の可視部吸収スペクトルを感度よく測定することができた。そこで、それ

らのうちの代表例として以下に、ちりめん中の B1、高菜漬中の指定外色素 O-II 及びようかん中の R2 の付随色素 FRE への TLC/SCAN 法の適用例を詳述する。

1) ちりめん中の B1

ちりめん、こうなごなどの魚介類加工品の中には、商品価値を高めるために見た目には判断できない程度にごく微量に色素が使用されているが、その旨の表示のないものが一部見受けられる。また、精製操作を行っても少なからずの夾雑物が混入し、シリカゲル TLC では R_f 値が色素標準品のそれよりも低くなることに加えて、シリカゲル TLC/SCAN 法ではバックグラウンドの影響から可視部吸収スペクトルの精度が低下する。そこで、試料溶液を逆相 TLC に供したところ、形状が縦長で痕跡程度のうすい青色スポットが観察され、 R_f 値は B1 標準品のそれとほぼ一致した (Fig. 2A)。この色素スポットを濃縮せずにそのままスペクトルを測定したところ極大吸収波長を含め正確なスペクトル情報を得ることはできなかった。次に、この色素スポットを夾雑物と重なるのを防ぐために台形濃縮法により濃縮してスペクトルを測定したところ、635 及び 407 nm に極大吸収を示すスペクトルが得られた。これは B1 標準品のスペクトルと一致し、試料中色素は B1 と同定された (Fig. 2B)。

Fig. 3. TLC chromatograms (A) and VIS spectra (B) of coal tar dyes extracted from a sample (pickled vegetable Takana-zuke) and standard of coal tar dyes under TLC/SCAN method conditions

a: Standards of O-I, O-II and Y4; b: Standard of O-RN; c: Extract of a sample

1) Standard of O-II, 2) Standards of O-RN, 3) Unknown sample spot, 4) Condensate of unknown sample spot

TLC conditions

Plate: RP-18 F_{254S}, Solvent system: methyl ethyl ketone-methanol-5% aqueous sodium sulfate solution (1 : 1 : 1)

Fig. 4. TLC chromatograms (A) and VIS spectra (B) of coal tar dyes extracted from a sample (Japanese-style confectionery Yōkan) and standard of coal tar dyes under TLC/SCAN method conditions

a: Standards of R2, R3, Y4, Y5, B1, B2 and FRE; b: Extract of a sample

1) Standard of FRE, 2) Unknown sample spot, 3) Condensate of unknown sample spot

TLC conditions

Plate: RP-18 F_{254S}, Solvent system: acetonitrile-methanol-5% aqueous sodium sulfate solution (3 : 3 : 10)

2) 高菜漬中の O-II

著者らは、輸入原料を使用した高菜漬中の O-II の検出例について報告している⁹⁾。O-II には水酸基あるいはスルホン酸基の結合位置の異なる O-I 及び O-RN と称する異性体が存在し、その化学的性質が酷似していることから、TLC の *R_f* 値により同定することは難しい。そこで、本法をこの高菜漬中の O-II の分析に応用した。Fig. 3A に逆相 TLC を示したが、得られた色素スポットの *R_f* 値は O-I のそれとは異なり、試料中色素が O-I である可能性は否定され、O-II あるいは O-RN の可能性が残った。次に、標準濃縮法によりこの色素スポットを点状に濃縮して測定したところ、485 nm のみに極大吸収を示すスペクトルが得られたが、これは O-II 標準品のスペクトルと完全に一致した (Fig. 3B)。一方、O-RN 標準品は 485 nm 及び 410 nm に極大吸収を示すスペクトルが得られたことから、試料中色素は O-II と同定された。

3) ようかん中の R2 の付随色素 FRE

試料溶液に逆相 TLC を適用したところ、Fig. 4A に示すように着色料使用表示のあった R2, R3, Y4, Y5, B1 及び B2 に加えて赤色系不明色素スポットを検出した。不明色素は当該品に使用されている R2, R3, Y4, Y5, B1 及び B2 のいずれかの付随色素ではないかと考え、TLC 上にこれら色素標準品を多量にスポットし展開して得られたクロマトグラムと比較した結果、不明色素と *R_f* 値及び色調が近似している R2 の付随色素である可能性が考えられた。試料溶液から得られた不明色素及び R2 標準品から得られた付随色素は共に微量であったために、それぞれの色素スポットを台形濃縮法により濃縮して測定したところ、両者ともに 503 nm に極大吸収を示すスペクトルが得られ、スペクトルは完全に一致した。文献^{2), 10)}により、付随色素は FRE である可能性が考えられたので FRE 標準品を入手して同様に測定したところ、得られたスペクトルは不明色素のスペクトルと一致し (Fig. 4B)、試料中色素は FRE と同定された。

まとめ

試料濃縮法を用いた逆相 TLC/SCAN 法による食品中のタール色素、特に微量の色素の確実な同定を実施するために種々の検討を行い、以下の知見を得た。

逆相 TLC 条件を用いることによりバックグラウンドの

影響が低く抑えられ、通常の色素含有量であればそのまま、必要により試料濃縮法を用いることにより、感度よく可視部吸収スペクトル情報を得ることができ、色素を確実に同定することができた。本 TLC/SCAN 法は、手法が簡単なこと、迅速性を有すること及び成分の見落としがないことなど TLC の利点をそのまま生かしながら、更に同定能力を付加することができ、特に、大量消費地を控えた流通の拠点である中央卸売市場の衛生検査所など、分析結果をすこしでも速く市場へフィードバックし、違反食品を効果的に排除する必要性の高い分析行政機関などでは、有効な同定手段になると考えられる。

なお、本報告の一部は、日本食品衛生学会第 74 回学術講演会 (1997 年 10 月、福岡) において発表した。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局検疫所業務管理室、厚生省輸入食品衛生監視員協議会編：“輸入食品 1992” (1993), “輸入食品 1993” (1995) 日本食品衛生協会。
- 2) 日本薬学会編：“衛生試験法・注解 1990” p. 500~547 (1990) 金原出版。
- 3) 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. 135~178 (1989) 日本食品衛生協会。
- 4) 厚生省生活衛生局監修：“食品衛生検査指針—追補 II—” p. 303~314 (1996) 日本食品衛生協会。
- 5) Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Yamada, M., Inoue, M., Ohno, T., Inagaki, K., Kuno, A., Yamamoto, N.: J. Chromatogr. **441**, 437~444 (1987)。
- 6) 尾関尚子, 岡 尚男, 猪飼誉友, 大野 勉, 早川順子, 林 智子, 青山富彦, 櫛引康和, 佐藤猛男, 伊藤 求, 鈴木亮而: 食衛誌. **34**, 542~545 (1993)。
- 7) 大野 勉, 伊藤裕子, 三上栄一, 猪飼誉友, 岡 尚男, 早川順子, 中川利久: 衛生化学 **42**, 53~59 (1996)。
- 8) 愛知県衛生部保健所試験検査技術者用手引書編集委員会編：“保健所試験検査技術者用手引書「食品理化学関係の検査法」第 4 版” p. 20~47 (1997) 愛知県衛生部環境衛生課。
- 9) 上野英二, 中島秀隆, 高倉謙造, 岡崎清朗, 永井宏明, 岡 尚男, 猪飼誉友, 早川順子, 石川直久: 食衛誌. **37**, 226~230 (1996)。
- 10) 日本薬学会編：“衛生試験法注解 1973” p. 351~387 (1973) 金原出版。