

## 食品中タール色素のHPLCによる一斉分析の検討

神尾典子 柳沼 幸 吉田加寿子 國井 敏 伊藤岩夫  
 県中支所

### 要 旨

現在当支所での食品添加物のタール色素の分析には、ペーパークロマトグラフ法及び薄層クロマトグラフ法を用いているが、これに加え高速液体クロマトグラフ法による分析を可能とするため、グラジェント法及びイオンペア試薬を用いてのアイソクラティック法について検討した。その結果、移動相の工夫でグラジェント法が可能となった。また、アイソクラティック法での分析の可能性も見出すことができた。しかし254nmでの一斉分析では、吸収曲線の確認が必要であることが明らかになった。

キーワード：タール色素，HPLC法，グラジェント法，アイソクラティック法，イオンペア試薬

### はじめに

食品添加物であるタール色素の試験法として、ペーパークロマトグラフィー（PC法）、薄層クロマトグラフィー（TLC法）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC法）がある。

当支所では、タール色素の収去検査はPC法及びTLC法を併用して結果を報告している。添加量が微量なため、検出感度が低いPC法、TLC法で判定困難な場合、結果確認のため本所でHPLCによる分析を行っている。

食品衛生検査指針（2003）<sup>1)</sup>に許可色素の分析法としてHPLC法も示されていることから、2006年2月に福島県衛生研究所検査実施標準作業書<sup>2)</sup>「着色料(酸性タール色素の定性)HPLC法による確認」を新規作成した。SOPに追加されたことに伴い当支所でも実施を検討したが、当支所のHPLC装置は検出波長域が600nmまでしかなく、緑色3号（624nm）、青色1号（630nm）および青色2号（612nm）の波長域まではカバーしていない。また混合標準液を用い、グラジェント法、検出波長254nmでの一斉分析を試みたが、再現性が得られなかったことから支所におけるHPLC法はまだ実施していない。そこでPC法やTLC法と併用して感度の高い分析を構築したいと考え、当支所に整備されている装置で分析可能な方法を検討したので報告する。

### 方 法

#### 1 試料

食用着色料検査用対照A液セット（東京化成工業（株））

平成18年度4月から12月にタール色素の収去検査として調整した試験溶液

#### 2 試薬

酢酸アンモニウム（和光・特級）

リン酸一アンモニウム（和光・特級）

リン酸（和光・特級）

アセトニトリル（和光・HPLC用）

メタノール（和光・HPLC用）

蒸留水（和光・HPLC用）

臭化テトラn-ブチルアンモニウム (TBABr)  
 （和光）

塩化n-ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTA)（関東化学・1級）

#### 3 装置

高速液体クロマトグラフ装置（JASCO）

ポンプPU-2089Plus

オートサンプラーAS-2059Plus

カラムオープンCO-2065Plus

検出器UV-2075Plus

#### 4 HPLC条件

カラム：TSKgel-ODS80Ts 4.6×150mm（東ソー）  
 移動相流量：1mL/min  
 注入量：10 μL  
 カラム温度：40℃  
 検出波長：254nm

#### 5 移動相

##### 1) グラジエント法

0.01M-酢酸アンモニウム：アセトニトリル混液（95：5）～（1：1）まで30分のリニアグラジエント

##### 2) アイソクラティック法

(1) 0.01M-TBABr含有0.025M-酢酸アンモニウムとアセトニトリルの混液

(2) 0.05M-リン酸一アンモニウムとアセトニトリルの混液に0.006M濃度にCTA添加，pH3

ンモニウム：アセトニトリルを（95：5）から（1：1）まで30分の直線勾配で変化させる方法で，検出波長は各色素毎に示されている（可視部）．今回の検討では，指針の注釈に示されているクロマトグラムを参考にして検出波長254nmによる一斉分析とした<sup>1)</sup>．

まず，移動相溶液にA液：0.01M-酢酸アンモニウム，B液：アセトニトリルを準備し，A：B（95：5）→（50：50）30分の直線勾配として実施したが，再現性が得られなかった．原因は，移動相溶媒の混合に問題があったのではないかと思われた．そこではじめから混液の状態の移動相で検討した．A液0.01M酢酸アンモニウム：アセトニトリル＝95：5，B液0.01M酢酸アンモニウム：アセトニトリル＝50：50とそれぞれ混液とし，A：B（100：0）→（0：100）30分の直線勾配とした結果，12成分混合標準液の分析では分離も良好で，再現性の高い結果が得られた．

また，グラジエント分析では一分析ごとにカラム及びシステム平衡化時間が必要で，この時間はカラムサイズやシステム，流量により異なるので，分析時間はこの時間により決まってくる．今回は最終ピーク検出後20分程度時間をとり，一分析45分とした．

表1に10ppmの混合標準液を5回繰り返し分析した時の各ピーク保持時間の平均及び標準偏差を示した．検量線は，0.25～10 μg/mLの範囲で直線性を示した（図1）．図2に分析例を示す．

#### 結果及び考察

##### 1 グラジエント法

グラジエント法は，経時的に溶媒組成割合を変化させて目的物質を溶出させる手法で，システムの違いで低圧グラジエントシステムと高圧グラジエントがある．当支所のシステム（日本分光）は，低圧グラジエントシステムで，一台のポンプで4液までセットでき，電磁弁の切り替えで溶媒の割合を変え，送液ポンプの吸引側，すなわち圧のかからない箇所溶媒が混合される．

指針の着色料のHPLC法は，0.01M-酢酸ア

表1 グラジエント法による色素のピーク保持時間

色素名	Rt. ± SD (min)	色素名	Rt. ± SD (min)
Y4	2.4 ± 0.006	G3	15.6 ± 0.012
R2	3.2 ± 0.019	B1	16.3 ± 0.019
B2	4.4 ± 0.013	R3	19.0 ± 0.013
R102	6.9 ± 0.016	R106	21.6 ± 0.019
Y5	8.1 ± 0.012	R104	22.4 ± 0.025
R40	10.1 ± 0.020	R105	24.7 ± 0.022

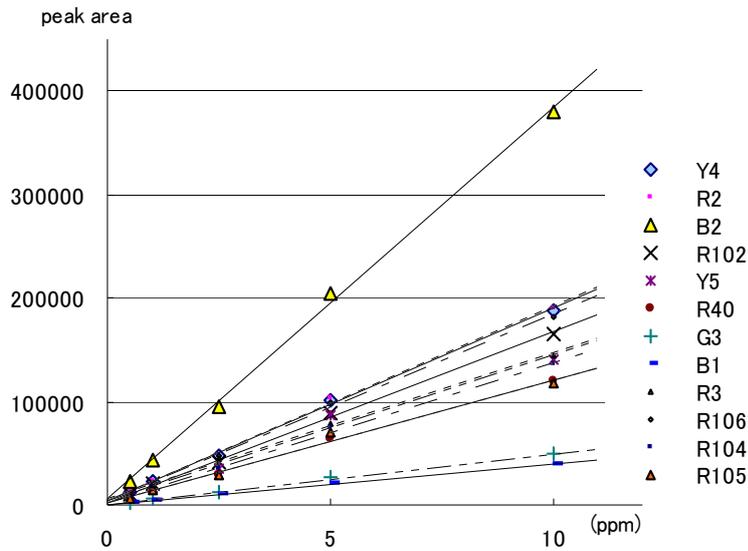


図1 検量線

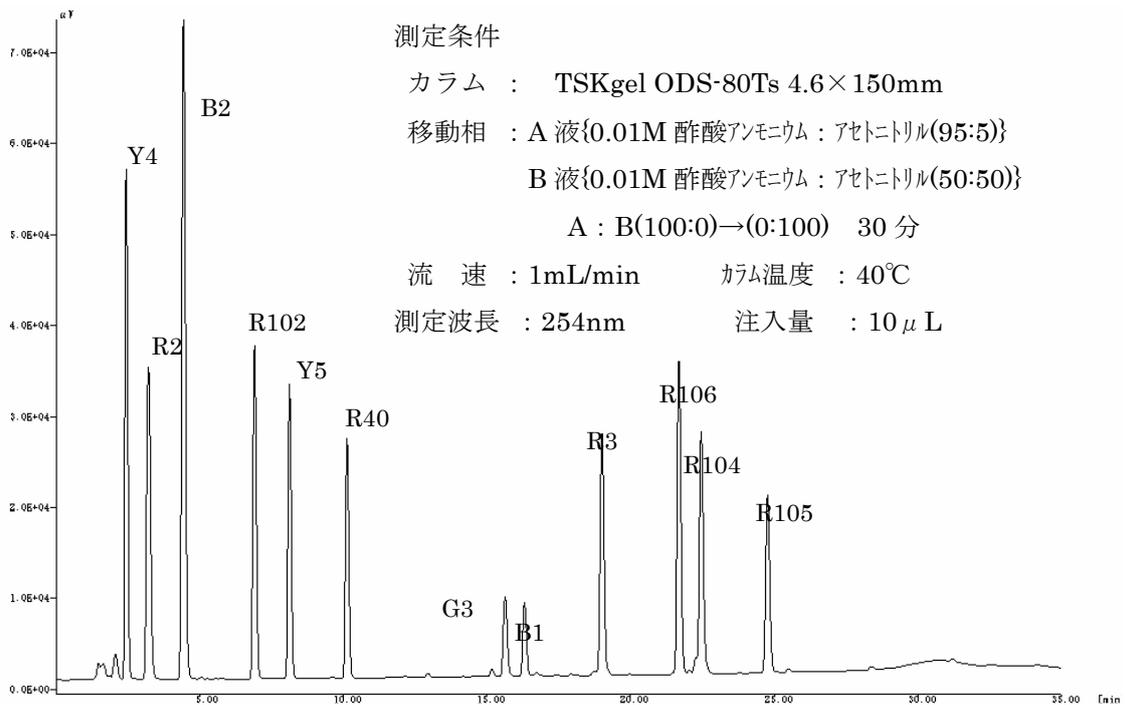


図2 標準液のクロマトグラム

## 2 イオンペア試薬を用いたアイソクラティック法

アイソクラティック法は、時間を要するグラジェント法に対し、簡便でかつ保持時間の再現性に優れ、日常検査に向いている方法である。

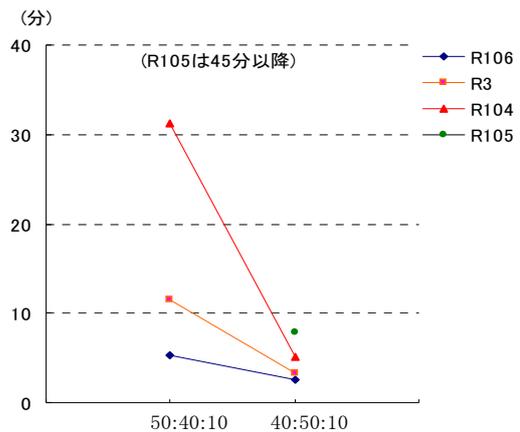
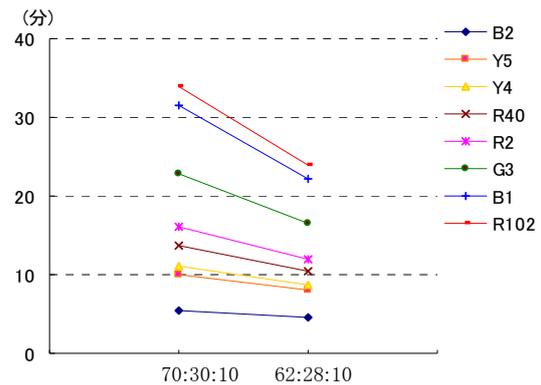
イオンペア試薬を用いたアイソクラティック法によるタール色素の分析の報告<sup>3-6)</sup>を参考に条件を検討した。

移動相以外の条件は、前記グラジェント法の時の条件と同一とした。移動相に添加するイオンペア試薬として①臭化テトラn-ブチル

アンモニウム (TBABr), ②塩化n-ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTA) について検討した.

1) TBABrの検討

宮武らの報告<sup>3)</sup>を参考に0.025M酢酸アンモニウム溶液にTBABr0.01M濃度になるよう添加した. この溶液とアセトニトリル, メタノールの混液を移動相とし, タール色素12成分の分離に最適な条件を検討した. 0.025M酢酸アンモニウム溶液 (0.01M-TBABr含有): アセトニトリル: メタノール=7: 3: 1で実施したところ, キサンテン系 (R3, R104, R105) 及びR106を除く8成分は, 35分以内に溶出し, 分離も良好であった. R106は40分頃にピークがあり, キサンテン系は50分までに溶出してこなかった. 一方石川ら<sup>4)</sup>は組成比62: 28: 10で良好な結果を得たと報告しており, 同様の組成で溶出の遅かった4成分を除く8成分を分析した. 各成分の分離は良好であり, 溶出の遅いR102が25分と全体的に溶出が早まった (図3, 4). そこで, キサンテン系及びR106を除く8成分の分析条件は分析時間の短縮が得られる62: 28: 10とした (条件 I).



(移動相0.025M-NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub> (0.01M-TBABr) : CH<sub>3</sub>CN : CH<sub>3</sub>OH)

図3 移動相組成割合と溶出時間の変化

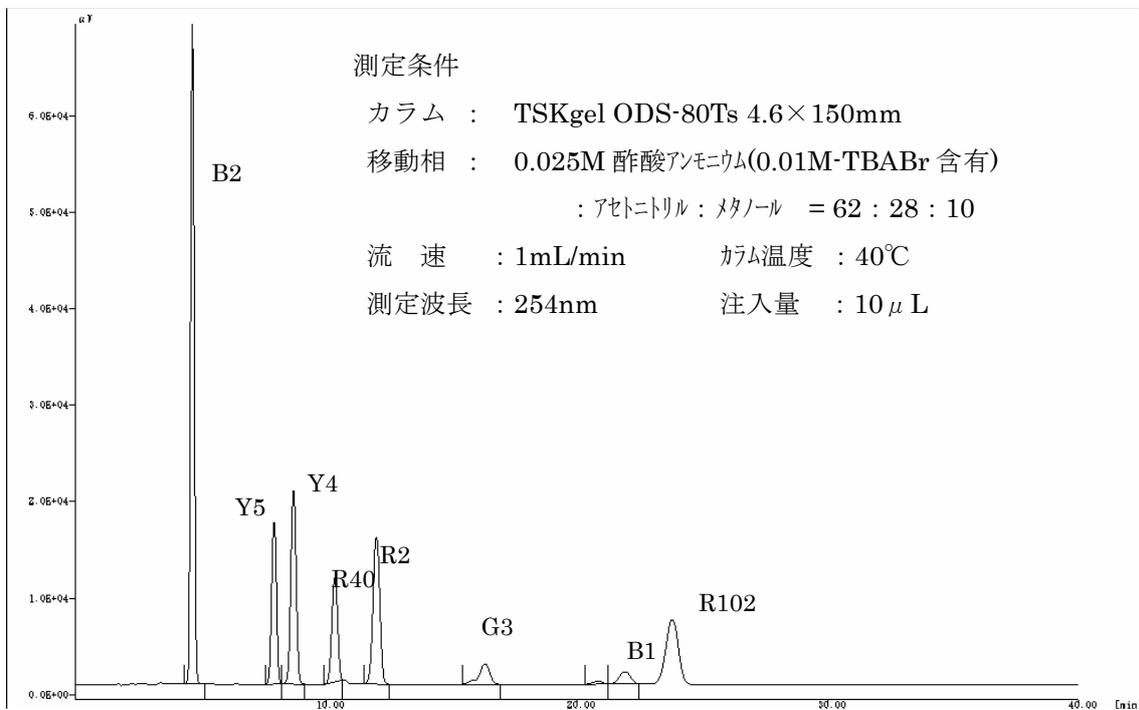


図4 標準液 (8成分) のクロマトグラム (条件 I)



条件Ⅰでは溶出に時間のかかるキサントレン系及びR106の4成分については、メタノールの割合は変えずに0.025M酢酸アンモニウムに対しアセトニトリルの割合を増やしてみることにした。50：40：10ではR105は45分でも溶出してこなかった。40：50：10としたところ4成分は10分以内に全て溶出し、分離も良かった(図3, 5)。12成分を分析すると、これら4成分以外の8成分は、2分以内に一つのピークとして溶出してしまうのでこの条件をキサントレン系及びR106分析用とし条件Ⅱとした。各条件でそれぞれの色素毎の検量線を求めた。条件Ⅰでは0.5～10 $\mu$ g/mLの範囲で、条件Ⅱで0.1～10 $\mu$ g/mLの範囲で直線性が得られた。しかし、実試料分析には条件Ⅰで溶出しにくい4成分が次の分析にかぶってくる可能性もあり、カラム洗浄の操作を加える等の工夫が必要と思われた。

## 2) CTAの検討

次にCTAについて大戸ら<sup>5)</sup>及び渡邊ら<sup>6)</sup>の文献を参考に実施した。移動相組成をアセトニトリル：0.05Mリン酸一アンモニウム=3：2とし、これに0.006M濃度となるようCTAを添加し、リン酸でpH3に調整して、12成分混合の標準液を分析した。5分前後に溶出してくる成分のピークが若干近接しているが、35分以内に全ての成分が溶出した(図6)。検量線は0.5～10 $\mu$ g/mLの範囲で直線性が得られた。

## 3 実試験溶液の分析

平成18年度に収去検査で調整した色素試験溶液を用いて前述した手法(グラジェント法及びアイソクラティック法)で分析した。

いずれの条件でも表示のある成分は、ほぼ検出された。しかし一波長(254nm)での一斉分析のため、標準液溶出時間に一致するピークを検出したり、わずかな溶出時間のズレで他の成分と認識されたりした。食品中には目的とするタール色素の他にも紫外部に吸収を持つ成分が様々あるので、溶出時間のみでの判断は難しい。それらがタール色素のピークか否かを判断するには、やはりそれぞれのピークの吸収スペクトルの確認が必要である。しかし当支所の装置では、吸収スペクト

ル測定のためにモード切替が必要であり、再度分析しなくてはならないなど機能的に問題がある。

## まとめ

タール色素標準液の分析では移動相の作成を工夫したことでグラジェント法でのタール色素12成分一斉分析が可能となった。また、CTAをイオンペア試薬として用いたアイソクラティック法で合成タール系色素12成分を40分で良好に分離する条件が得られた。

しかし、254nmを検出波長とする一斉分析では、実試料は色素のピーク以外に多くの夾雑ピークがあるため、判定が困難な例があり、吸収スペクトル確認が必要となる。

今後各色素をグループ分けし可視部で分析する条件などを検討し、当支所でのHPLC分析を実現したい。

## 参考文献

- 1)厚生労働省監修. 衛生検査指針「食品中の添加物分析法」: 日本食品衛生協会2003; 169-177.
- 2)福島県衛生研究所. 検査実施標準作業書「食品添加物, 着色料(酸性タール色素)の定性, 高速液体クロマトグラフィー法による確認」; 2006.
- 3)宮武ノリエ, 永山敏廣. TLCとHPLCの併用による食品中合成着色料の一斉分析. 東京都健康安全研究センター年報 2005; 56: 145-151.
- 4)石川ふさ子, 斎藤和夫, 中里光男, 他. HPLCによる食品中の21種のタール色素の分析法. 食品衛生学雑誌 1996; 37: 281-287.
- 5)大戸幹也, 松永明信, 山本敦, 他. イオン対高速液体クロマトグラフィーによる食用タール色素の一斉分析法. 食品衛生学雑誌1988; 29: 192-197.
- 6)渡邊久芳, 青山吉一, 坂川信昭, 他. フォトダイオードアレイ検出器を用いたHPLCによる合成着色料分析法の検討. 農林水産消費技術センター調査研究報告2003; 17: 85-97.