

加工食品からの食用赤色 102 号の副成色素の検出事例

近藤芳和子・宮崎悦子・吉田聖・小出石千明

福岡市保健環境研究所保健科学課

Detection of the Subsidiary Color of Food Red No.102 from a Processed Food

Kanako KONDOU , Etsuko MIYAZAKI , Kiyoshi YOSHIDA
and Chiaki ODEISHI

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

食用赤色 102 号を使用している旨の表示がある魚介加工品から、表示にない食用赤色 2 号の検出事例があったため報告する。本事例では、魚介加工品の試験溶液を、フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフで測定し、食用赤色 2 号と保持時間及び吸収スペクトルが一致する未知ピークを検出した。測定条件を変更した場合でも食用赤色 2 号の標準品と保持時間が一致したため、当該未知ピークは食品由来の夾雑物ではなく、食用赤色 2 号であると判断した。検出した食用赤色 2 号のピーク面積は食用赤色 102 号の約 0.07%であったことから、魚介加工品に使用された食用赤色 102 号の副成色素であると考えられた。なお、当所で所有している 9 本の食用赤色 102 号の標準品のうち、3 本から食用赤色 2 号を検出した。食用赤色 102 号は、副成色素として食用赤色 2 号を含むものがあり、表示のない食用タール色素が検出された場合に直ちに表示違反とする等の誤判定を防ぐために食用タール色素中の副成色素について情報を蓄積していくことは重要である。

Key Words : 食用赤色 102 号 food red no. 102, 副成色素 subsidiary color, 高速液体クロマトグラフ high performance liquid chromatograph (HPLC)

1 はじめに

福岡市保健環境研究所では食品中の着色料の試験に際して、食品衛生検査指針¹⁾及び第2版食品中の食品添加物分析法²⁾に準じ、試料から抽出した着色料を、ポリアミドカラムで精製後、薄層クロマトグラフ(以下、「TLC」とする。)及びフォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフ(以下、「HPLC-PDA」とする。)を用いて検出している。加工食品中の着色料の試験では、着色料に含まれる副成色素及び着色料が変化して生成した色素などの不明色素が検出されることがある^{3~5)}。第9版食品添加物公定書⁶⁾及び解説書⁷⁾では、食用赤色 102 号(以下、「R102」とする。)純度試験において、副成色素の含量は1%以下と定められている。今回、R102を使用している旨の表示がある魚介加工品の試験溶液をHPLC-PDAで測定した結果、表示にはない食用赤色 2 号(以下、「R2」とする。)と保持時間が一致するピーク

を検出したことから、その由来について検討するとともに、標準品における副成色素の有無を確認したので報告する。

2 方法

2.1 試料

市販の魚介加工品(サバみりん表面の着色部分)を用いた。着色料として R102 及びカラメルを使用している旨の表示があった。

2.2 試薬等

R2 標準品: 東京化成工業(株)製を用いた。

R2 標準原液: R2 標準品 10 mg を量り、超純水に溶解して 10 mL とした (1,000 µg/mL)。

TLC 用 R2 標準溶液: R2 標準原液を 70%エタノールで

希釈して標準溶液 (100 µg/mL) を調製した。

HPLC 用 R2 標準溶液: R2 標準原液を超純水で適宜希釈して標準溶液 (1 µg/mL, 10 µg/mL 及び 500 µg/mL) を調製した。

R102 標準品: 東京化成工業 (株) 製を用いた。

R102 標準原液: R102 標準品 10 mg を量り, 超純水に溶解して 10 mL とした (1,000 µg/mL)。

TLC 用 R102 標準溶液: R102 標準原液を 70%エタノールで希釈して標準溶液 (100 µg/mL) を調製した。

HPLC 用 R102 標準溶液: R102 標準原液を超純水で希釈して標準溶液 (500 µg/mL) を調製した。

Sample No. 1~8: 前述の R102 標準品以外で当所で保管していた 3 社 8 種類の R102 標準品を用いた。

Sample No. 1~8 溶液: Sample No. 1~8 をそれぞれ 10 mg 量り, 超純水に溶解して 10 mL としたものを, 超純水で希釈して 500 µg/mL に調製した。

ポリアミド: 富士フィルム和光純薬 (株) 製ポリアミド C-200 を用いた。

ポリアミドカラム: あらかじめ水洗したポリアミド 0.5 g を内径 1 cm, 長さ 25 cm のコック付きガラス製クロマト管に湿式充填し, 1%酢酸 10 mL でコンディショニングした。

アンモニア水: 富士フィルム和光純薬 (株) 製アンモニア水 (28.0~30.0%) を用いた。

抽出液: アンモニア水 35 mL を量り, 99.5%エタノール 700 mL を加え, これに蒸留水を加え 1,000 mL とした。

溶出液: アンモニア水 18 mL を量り, 蒸留水を加えて 500 mL とした液に, 99.5%エタノールを加え 1,000 mL とした。

N 系展開溶媒: アンモニア水, 2.5%クエン酸ナトリウム水溶液及び 99.5%エタノールを 2:7:1 で混合した。

P 系展開溶媒: 1-プロパノール, 酢酸エチル及び蒸留水を 6:1:3 で混合した。

0.1 mol/L 酢酸アンモニウム水溶液・アセトニトリル混液 (99:1): 酢酸アンモニウム 7.7 g を量り, 超純水で溶解し 1,000 mL とし, その 990 mL にアセトニトリル 10 mL を加えた。

アセトニトリル: 富士フィルム和光純薬 (株) 製 HPLC 用を用いた。

超純水: 水道水を超純水製造装置で処理したもの (比抵抗 > 18.2 M Ω · cm, TOC < 5 ppb) を用いた。

蒸留水: 水道水を蒸留水製造装置で処理したものを用いた。

その他の試薬: 富士フィルム和光純薬 (株) 製及び関東化学 (株) 製試薬特級品を用いた。

2.3 器具

TLC 用プレート: MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG 製 Cellulose MN 400 (AVICEL®), CEL 400-10, 10 × 20 cm, 層厚 0.10 mm. メタノールで空展開後, 乾燥機にて 120°C, 30 分間処理したものを用いた。

メンブランフィルター: アドバンテック東洋 (株) 製 DISMIC-13HP, 親水性 PTFE, 孔径 0.20 µm 及び 0.45 µm.

2.4 装置

HPLC-PDA: (株) 島津製作所製 ポンプ; LC-30A, 検出器; SPD-M20A

超純水製造装置: オルガノ (株) 製 PURELAB flex-UV

蒸留水製造装置: アドバンテック東洋 (株) 製 RFD240NA

2.5 試験溶液の調製

試料約 10 g を 2 併行で 50 mL 遠沈管に採取し, 抽出液 30 mL を加え, 60°C で 30 分間加温抽出した。氷冷後, 10,000 × g, 4°C, 10 分間遠心分離した。2 併行の抽出液を合わせてろ紙ろ過後, ろ液に *n*-ヘキサン 20 mL を加え, 10 分間振とう後, 水層を分取した。水層を少量になるまで減圧濃縮後, 6%酢酸を適宜加えて pH 4 程度としたものをポリアミドカラムに負荷し, 1%酢酸 50 mL, 熱蒸留水 50 mL 及び 70%エタノール 10 mL で順次洗浄した。溶出液 15 mL で溶出させ, 6%酢酸で中和後, 減圧乾固し, 適宜超純水に溶解させ, メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

2.6 測定条件

2.6.1 TLC 法

TLC 用プレートに TLC 用 R2 標準溶液, TLC 用 R102 標準溶液及び試験溶液をスポットし, 風乾後, N 系展開溶媒及び P 系展開溶媒を用いて展開し, 色調及び移動度を確認した。

2.6.2 HPLC-PDA 法

HPLC-PDA の測定条件①を表 1 に示す。

表 1 HPLC-PDA の測定条件①

カラム	Inertsil ODS-2 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
カラム温度	40℃
移動相 A	0.1 mol/L 酢酸アンモニウム水溶液・アセトニトリル混液 (99 : 1)
移動相 B	アセトニトリル
グラジエント条件	B : 4% (0 min) -70% (30 min) -70% (35 min)
ポストラン	15 min
流速	0.2 mL/min
注入量	4 μL
サンプル温度	4℃
測定波長	190~700 nm

測定条件②は、グラジエント条件を表 2 のとおりとし、その他の条件は測定条件①と同一とした。

表 2 HPLC-PDA の測定条件②

グラジエント条件	B : 4% (0 min) -4% (10 min) -70% (25 min) -70% (35 min)
----------	---

3 実験結果及び考察

3.1 試験溶液

3.1.1 TLC 法

試験溶液を測定したところ、R102 以外の赤系色素は検出されなかった（データ示さず）。

3.1.2 HPLC-PDA 法

試験溶液を表 1 の条件で測定し、得られた 520 nm におけるクロマトグラムを図 1 に示す。試験溶液において R102 のピークの他に、R2 の保持時間である 6.9 min に未知ピークを検出した。検出された未知ピークの 520 nm におけるピーク面積は R102 のピーク面積の約 0.07% であった。未知ピークのピークトップにおける吸収スペクトルを図 2 に、試験溶液の未知ピーク及び HPLC 用 R2 標準溶液の R2 の保持時間及び極大吸収波長を表 3 に示す。吸収スペクトル、保持時間及び極大吸収波長が R2 標準溶液の R2 のピークと一致していることから、未知ピークは R2 と考えられたが、未知ピークが食品由来の夾雑物である可能性を考慮し、グラジエント条件を表 2 のとおり変更し測定した。測定条件を変更した際の試験溶液及び HPLC 用 R2 標準溶液のクロマトグラムを図 3 に示す。試験溶液の未知ピークは HPLC 用 R2 標準溶液の R2 のピークと保持時間が一致したことから、未知ピークは夾雑物由来ではなく R2 であると考えられた。以上のことから、未知ピークは R2 であるが、520 nm にお

けるピーク面積比が R102 の約 0.07% であったことから、R102 の副成色素の可能性があると考えられた。

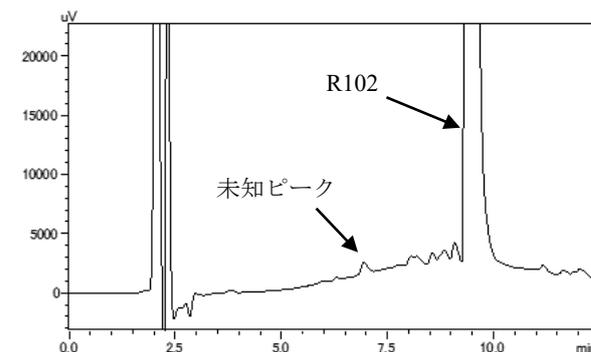


図 1 試験溶液のクロマトグラム (520 nm)

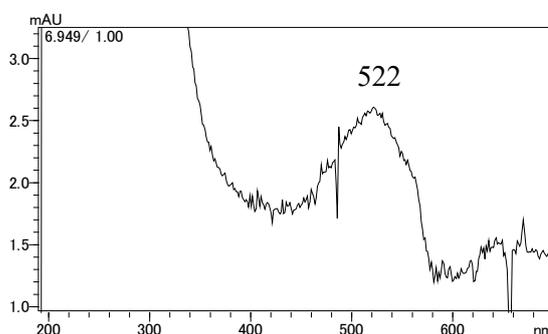


図 2 試験溶液の未知ピークのピークトップにおける吸収スペクトル

表 3 試験溶液の未知ピーク及び HPLC 用 R2 標準溶液 (1 μg/mL) の R2 の保持時間及び極大吸収波長

測定溶液	ピーク	R.T. *1 (min)	λ _{max} *2 (nm)
試験溶液	未知ピーク	6.9	522
HPLC 用 R2 標準溶液	R2	6.9	522

*1 : 保持時間, *2 : 極大吸収波長

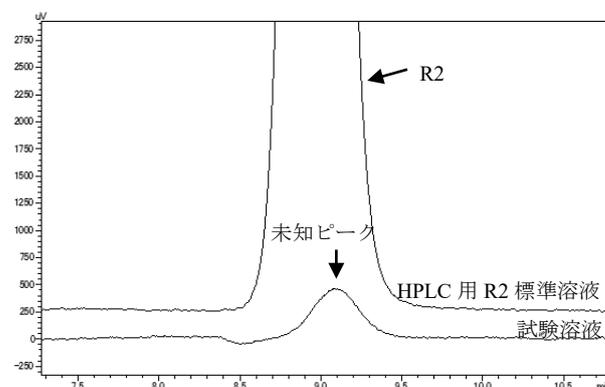


図 3 測定条件②で測定した HPLC 用 R2 標準溶液 (10 μg/mL) 及び試験溶液のクロマトグラム (520 nm)

3.2 標準溶液

3.1.2のとおり, 魚介加工品から R102 の副成色素と考えられる R2 が検出されたため, R102 標準品及び Sample No. 1~8 における R2 の検出の有無を確認した. 当所では, 通常, 着色料の試験において, 10 µg/mL の標準溶液を上限として測定しており, これまでに副成色素のピークが検出されたことはなかった. R102 に含まれる副成色素は, 成分規格における上限値から 1%以下と想定し, 通常測定している上限濃度の 50 倍である 500 µg/mL を測定濃度とした. そこで, HPLC 用 R102 標準溶液及び Sample No. 1~8 溶液を表 1 の測定条件で測定した. その結果, Sample No. 5, 7 及び 8 溶液において R2 の保持時間に未知ピークを検出した. HPLC 用 R102 標準溶液及び Sample No. 1~8 溶液の R102 のピークに対する未知ピークの面積比を表 4 に示す. 未知ピークが検出された Sample No. 5, 7 及び 8 溶液について, 保持時間及び極大吸収波長を表 5 に, 520 nm におけるクロマトグラムを図 4 に示す. また, HPLC 用 R2 標準溶液の R2 のピークトップにおける吸収スペクトルを図 5 に, Sample 5, 7 及び 8 溶液の未知ピークのピークトップにおける吸収スペクトルを図 6~8 に示す. Sample No. 5, 7 及び 8 溶液の未知ピークの保持時間, 極大吸収波長及び吸収スペクトルから, 未知ピークは R2 であると判断した. 以上のことから, 当所保管の 9 種類の R102 標準品のうち 3 種類に副成色素の R2 が含まれていることが分かった.

表 5 各測定溶液の保持時間及び極大吸収波長

測定溶液	ピーク	R.T.*1 (min)	λ _{max} *2 (nm)
HPLC 用 R2 標準溶液	R2	7.0	522
Sample No. 5 溶液	未知ピーク	6.8	522
Sample No. 7 溶液	未知ピーク	6.9	523
Sample No. 8 溶液	未知ピーク	6.9	522

*1: 保持時間, *2: 極大吸収波長

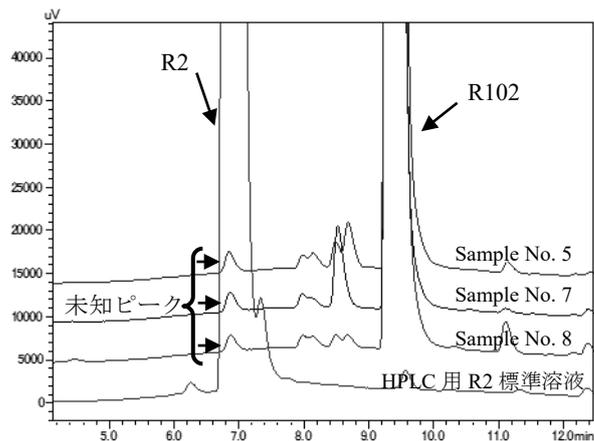


図 4 Sample No. 5, 7 及び 8 溶液並びに HPLC 用 R2 標準溶液 (500 µg/mL) のクロマトグラム (520 nm)

表 4 HPLC 用 R102 標準溶液 (500 µg/mL) 及び Sample No. 1~8 溶液の R102 のピークに対する未知ピーク的面積比

測定溶液	メーカー	面積比 (%)
R102 標準溶液	東京化成工業(株)	0
Sample No. 1 溶液	A 社	0
Sample No. 2 溶液	A 社	0
Sample No. 3 溶液	B 社	0
Sample No. 4 溶液	B 社	0
Sample No. 5 溶液	C 社	0.14
Sample No. 6 溶液	C 社	0
Sample No. 7 溶液	C 社	0.17
Sample No. 8 溶液	C 社	0.10

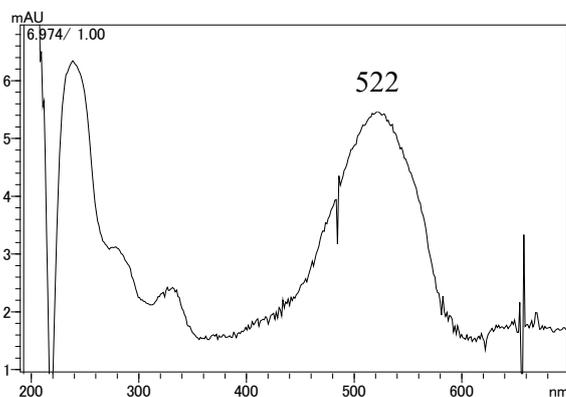


図 5 HPLC 用 R2 標準溶液 (1 µg/mL) の R2 のピークトップにおける吸収スペクトル

4 まとめ

R102 を使用している旨の表示がある魚介加工品の試験溶液を HPLC-PDA にて分析した結果、表示にはない R2 が検出され、R102 に対するピーク面積比から R102 の副成色素の可能性があると考えられた。当所で保管していた 9 種類の R102 の標準品を HPLC-PDA を用いて確認したところ、3 種類から R2 が検出された。R102 標準品について、520 nm における R102 のピーク面積に対する R2 のピーク面積の比はいずれも 1% 以下であり、副成色素であると判断した。着色料の試験では、着色料に含まれる副成色素や着色料が変化して生成した色素などの不明色素が検出されることがあり、表示のない食用タール色素が検出された場合に直ちに表示違反とする等の誤判定を防ぐためにも、食用タール色素中の副成色素について情報を蓄積していくことは重要である。

文献

- 1) 社団法人 日本食品衛生協会 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編 2003, 169～199, 2003
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課：第 2 版食品中の食品添加物分析法, 113～131, 2000
- 3) 小出石千明, 他：食品からの食用赤色 106 号の副成色素の検出, 福岡市保健環境研究所報, 47, 113～120, 2022
- 4) 武森真由美, 他：食品着色料分析において見出される副成色素について, 東京健康安全センター年報, 72, 233～239, 2021
- 5) 貞升友紀, 他：赤色 102 号を使用したシロップから付随色素を検出した事例について, 東京健康安全センター年報, 68, 177～181, 2017
- 6) 厚生労働省：第 9 版食品添加物公定書, 平成 30 年 2 月 1 日
- 7) 川西徹, 他：第 9 版食品添加物公定書解説書, D-1190～D-1200, (株) 廣川書店 (東京), 2019

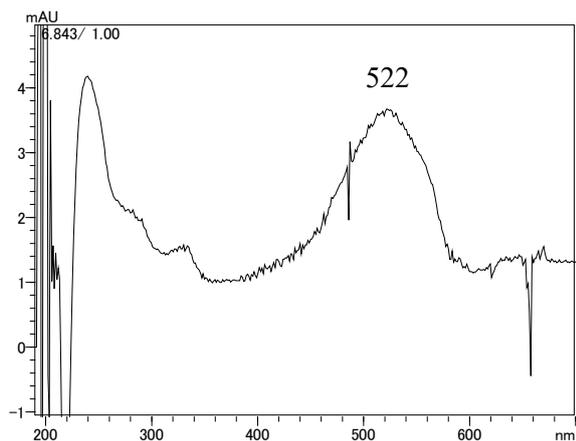


図 6 Sample No. 5 溶液の未知ピークのピークトップにおける吸収スペクトル

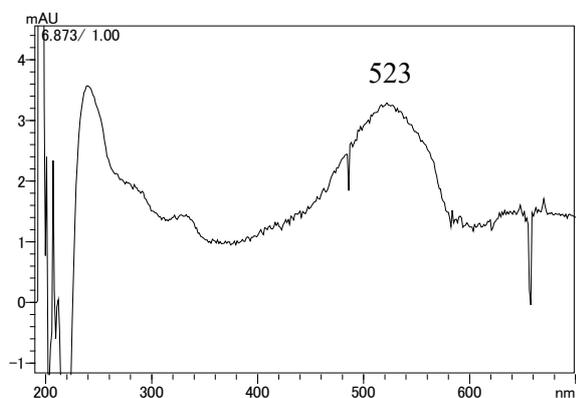


図 7 Sample No. 7 溶液の未知ピークのピークトップにおける吸収スペクトル

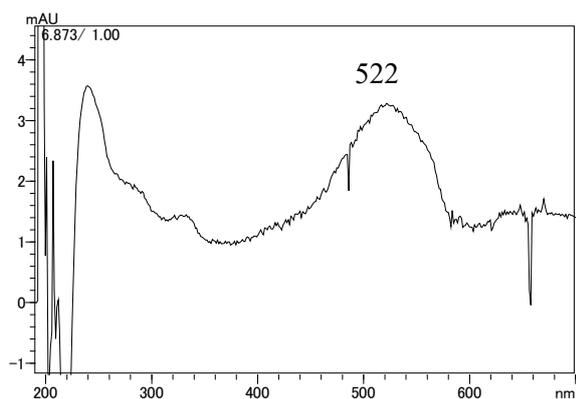


図 8 Sample No. 8 溶液の未知ピークのピークトップにおける吸収スペクトル