

折り紙からの赤色 201 号の検出事例

佐多建一・小出石千明・近藤芳和子・宮崎悦子*・坂本智徳

福岡市保健環境研究所保健科学課

*福岡市保健環境研究所環境科学課

Determination of Red No.201 Eluted from Origami

Kenichi SATA , Chiaki ODEISHI , Kanako KONDO , Etsuko MIYAZAKI*
and Tomonori SAKAMOTO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

*Environmental Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

折り紙のうち 6 歳未満の乳幼児を対象としたものについては、製造基準で着色料の使用が規制されており、化学的合成品たる着色料を使用する場合は、食品衛生法施行規則で定める着色料以外の着色料が溶出してはならないと定められている。

福岡市で令和 4 年度に収去した折り紙の溶出試験において、着色料の溶出が認められた事例があった。溶出液を薄層クロマトグラフ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で分析したところ、食品衛生法施行規則で定める着色料ではないことが確認された。そこで、高速液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計を用いて、未知着色料の構造推定を行ったところ、化粧品や外用の医薬品等に使用が認められている赤色 201 号であると推定されたため、赤色 201 号の標準品を用いて確認試験を行い、溶出した着色料が赤色 201 号であると同定した。

通常の定性分析法では、食品衛生法施行規則で定める着色料以外の着色料を同定することは困難であるが、本事例では高速液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計を用いて、精密質量から化合物を推定し、赤色 201 号を見出すことができた。この事例から、未知着色料を同定する手法として高速液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計が有用であることが示された。

Key Words: 赤色 201 号(R201) Red No.201, 薄層クロマトグラフ法 thin-layer chromatograph, 高速液体クロマトグラフ high performance liquid chromatograph (HPLC), 液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計 liquid chromatograph quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOFMS)

1 はじめに

着色料は、多くの食品用の器具・容器包装及びおもちゃに使用されている。しかし、これらから着色料が溶出すると、人の体内に摂取されて健康に影響をおよぼす可能性がある。そこで、食品衛生法のおもちゃの規格基準では、乳幼児を対象としたおもちゃ（以下、「指定おもちゃ」とする。）には、乳幼児が接触することにより健康を損なうことがないよう、食品衛生法に基づき規格及び製造基準が設定されている。折り紙については、製造基準で着色料の使用が規制されており、化学的合成品たる着色料を使用する場合は、食品衛生法施行規則別表第

1 に掲げる着色料（以下、「法定着色料」とする。）以外の着色料の溶出が認められてはならないと定められている。

福岡市保健環境研究所では、着色料の試験法として、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⁾に記載の分析法（以下、「公定法」とする。）に準じて、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。）を併用し、TLC で判定困難な場合等に HPLC-PDA を用いて確認し、結果を報告している。

令和 4 年度に福岡市で収去した指定おもちゃである折

り紙から，着色料の溶出が認められた事例があった．溶出液を TLC 及び HPLC-PDA で分析した結果，法定着色料ではない着色料であった．公定法では，法定着色料以外の着色料を同定することは困難であるが，今回，高速液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計（以下，「LC-QTOFMS」とする．）を用いて，着色料の同定を試みたので報告する．

2 実験方法

2.1 試料

令和 5 年 3 月に福岡市内で収去された指定おもちゃである折り紙を試料とした．一包装中の 5 種類の絵柄それぞれについて検査を行った．

2.2 標準品及び試薬

法定着色料のうち酸性タール色素 12 種類の標準品（赤色 2 号（R2），赤色 3 号（R3），赤色 40 号（R40），赤色 102 号（R102），赤色 104 号（R104），赤色 105 号（R105），赤色 106 号（R106），黄色 4 号（Y4），黄色 5 号（Y5），緑色 3 号（G3），青色 1 号（B1），青色 2 号（B2））：東京化成工業（株）製を用いた．

赤色 201 号（R201）の標準品：大和化工（株）製を用いた．

着色料標準溶液：各着色料の標準品 10 mg を量り，蒸留水 10 mL を加えて標準原液（1000 µg/mL）を調製した．法定着色料 12 種類及び R201 の標準原液を蒸留水で段階的に希釈し，各着色料の標準溶液を調製した．

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．

2.3 溶出試験

試料の着色されている部分を，その表面積 1 cm²につき 2 mL の割合の 40℃に加温した水に浸した後，40℃に保ちながら時々かき混ぜて 10 分間放置し，これを試験溶液とした．試験溶液 50 mL を，内径 20 mm，外径 24 mm のネスラー管に採り，着色料の溶出の有無を確認した．

2.4 TLC

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

溶出試験で着色料の溶出が認められた試験溶液について，エバポレーターで濃縮し，メンブレンフィルターでろ過したものを測定溶液とした．TLC 用プレートに各着色料の標準溶液及び測定溶液をスポットし，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．

2.5 HPLC-PDA

装置は，（株）島津製作所製 ポンプ LC-30AD 及び PDA 検出器 SPD-M20A を用いて，各着色料の標準溶液及び測定溶液を表 1 の条件で測定した．

表 1 HPLC-PDA 測定条件

分析カラム	Inertsil ODS-2, 2.1 mm×150 mm, 5 µm (GL サイエンス (株) 製)
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	B：4% (0 min) - 70% (30 min)
条件	- 70% (35 min)
流速	0.2 mL/min
注入量	4 µL
サンプル温度	4℃
測定波長	黄系色素：450 nm，赤系色素：520 nm， 青系色素：620 nm
	吸収スペクトル：190 ～ 700 nm

2.6 LC-QTOFMS

装置は，（株）エービー・サイエックス製 Exion LC 及び X500R QTOF システムを用いて，各着色料の標準溶液及び測定溶液を測定した．測定条件は，LC 条件を表 1 と同一とし，MS 条件を表 2 のとおりとした．

表 2 LC-QTOFMS の MS 条件

イオン化モード	ESI-Negative
データ取得モード	IDA
ヒーター温度	500℃
スプレー電圧	-4500 V
TOFMS	
Declustering Potential	-80 V
Collision Energy	-5 V
スキャン範囲	m/z 100 ～ 1000
TOFMS/MS	
Declustering Potential	-80 V
Collision Energy	-35 V
スキャン範囲	m/z 30 ～ 1000

3 実験結果及び考察

3.1 未知着色料の検出

溶出試験で、2 種類の絵柄の試験溶液が赤色に着色した。この 2 つの試験溶液から測定溶液を調製し、以降の測定を行った。なお、以降のデータは、2 つの測定溶液の結果が同一であったため、1 つの測定溶液の結果のみを示す。

法定着色料標準溶液及び測定溶液を TLC で測定した結果を図 1 に示す。測定溶液において、1 種類の赤色スポットが認められたが、色調及び移動度は法定着色料のいずれのスポットとも一致しなかった。

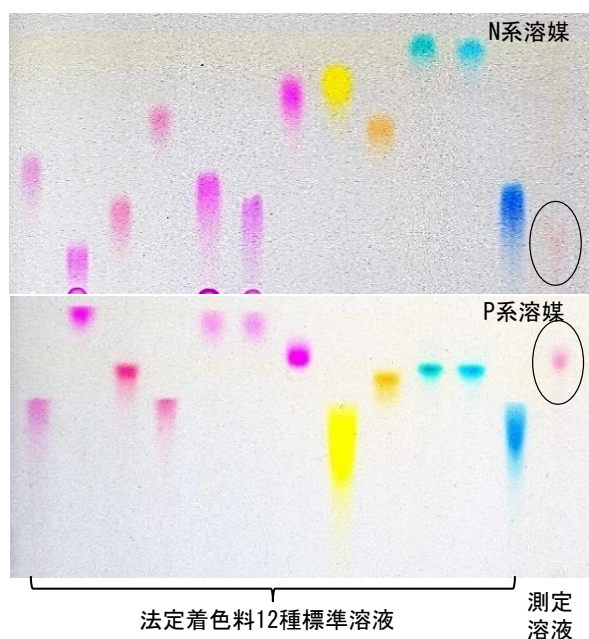


図 1 法定着色料標準溶液及び測定溶液の TLC

法定着色料標準溶液及び測定溶液を HPLC-PDA を用いて測定したクロマトグラムを図 2 に示す。通常当所で用いている赤系色素の測定波長である 520 nm において、R3 の近傍である保持時間 15.4 分付近に未知のピークが認められた。このピークのピークトップにおける吸収スペクトルは図 3 のとおりで、495 nm 付近に極大吸収波長を有していた。未知ピークの保持時間及び吸収スペクトルが法定着色料のいずれとも一致しなかったため、TLC の結果と合わせて、法定着色料以外の未知着色料のピークであると判断した。そこで、この未知着色料について LC-QTOFMS を用いて構造推定を試みた。

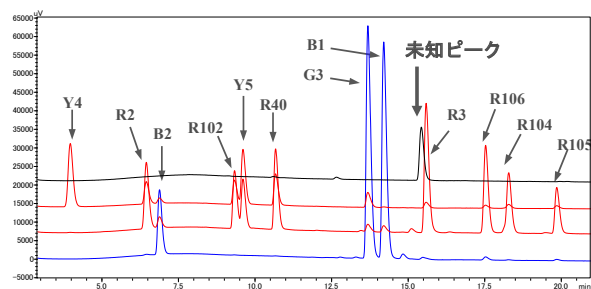


図 2 法定着色料標準品及び測定溶液の HPLC クロマトグラム

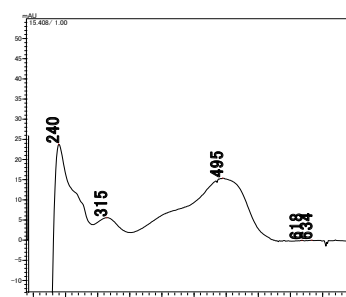


図 3 未知ピークのピークトップにおける吸収スペクトル

3.2 LC-QTOFMS 法 (PDA 付き) による未知着色料の推定

測定溶液を LC-QTOFMS で測定したところ、装置に付属する PDA 検出器のクロマトグラム (図 4) において、保持時間 15.7 分付近に、HPLC-PDA において確認された未知着色料の吸収極大波長 (495 nm) に吸収を持つ化合物のピークが検出された。このピークの MS スペクトルを図 5 に示す。特に強度が高い m/z 385.0503 のイオンをプリカーサーイオンとするプロダクトイオンスペクトルを図 6 に示す。これらのスペクトルについて、(株) エービー・サイエックス製の解析ソフト (SCIEX OS Software) で化合物の組成式を推定した結果、 $C_{18}H_{14}N_2O_6S$ (モノアイソトピック質量 386.05726) と推定された。この組成式について化学データベースである Chemspider (<http://www.chemspider.com/>) で検索した結果、組成式 $C_{18}H_{14}N_2O_6S$ の候補化合物から、赤系色素として R201 (図 7) が見出された。検出されたプロダクトイオンを R201 の構造に帰属させたところ、その構造に対してプロダクトイオンの約 95% が帰属された (図 8)。

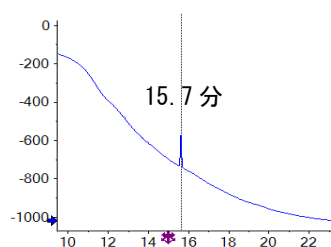


図4 測定溶液の吸収波長 495 nm における抽出クロマトグラム

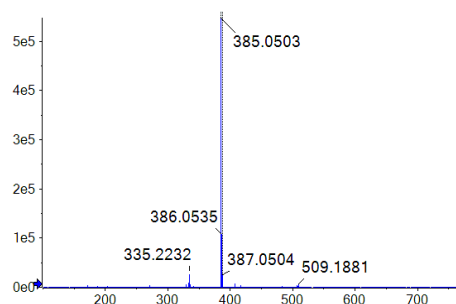


図5 15.7 分の未知ピークの MS スペクトル

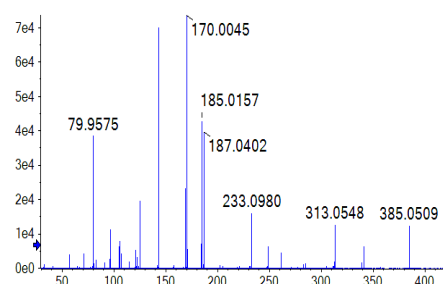


図6 15.7 分の未知ピークの m/z 385.0503 のプロダクトイオンスペクトル

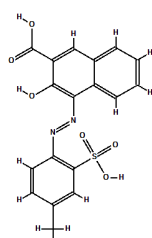


図7 R201 の構造 ($C_{18}H_{14}N_2O_6S$)

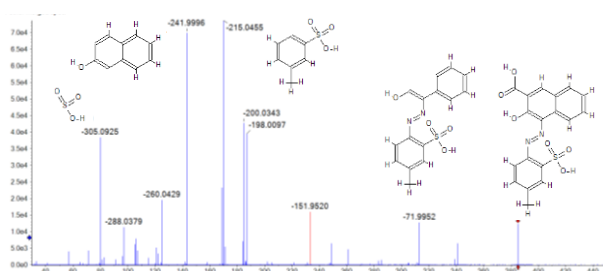


図8 プロダクトイオンの帰属

3.3 R201 標準品を用いた確認試験

未知着色料が R201 であることを確認するため、R201 の標準溶液と測定溶液を TLC, HPLC-PDA 及び LC-QTOFMS で測定した。

TLC では、N 系展開溶媒及び P 系展開溶媒ともに、測定溶液と R201 標準溶液のスポットの色調及び移動度が一致した (図 9)。

HPLC-PDA では、測定波長 495 nm において、測定溶液と R201 標準溶液ともに、保持時間 15.4 分付近にピークが認められた (図 10)。また、ピークトップの吸収スペクトルについても一致していた (図 11)。

LC-QTOFMS で測定した結果、R201 標準溶液及び測定溶液ブリカーサーイオンスペクトル及びプロダクトイオンスペクトルのいずれも一致した (図 12 及び図 13)。

これらの結果から、未知着色料は R201 であると判断した。

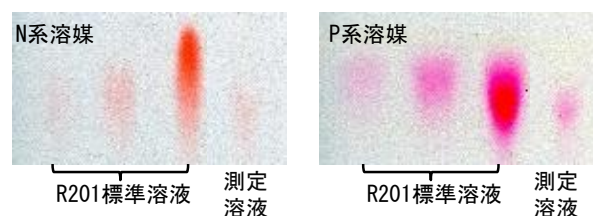


図9 R201 標準溶液及び測定溶液の TLC

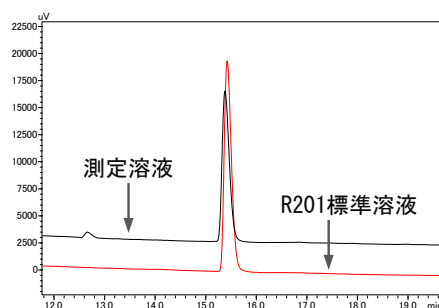


図10 R201 標準溶液及び測定溶液の 495 nm におけるクロマトグラム

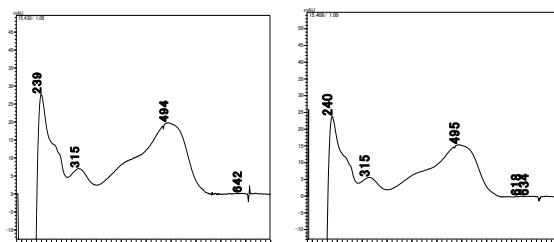


図11 未知ピークのピークトップの吸収スペクトル (左) と R201 標準溶液のピークトップの吸収スペクトル (右)

4 まとめ

令和4年度に本市で収去した指定おもちゃである折り紙の溶出試験において、着色料の溶出が認められた事例があった。指定おもちゃについては、製造基準で着色料の使用が規制されており、法定着色料以外の着色料が溶出してはならないと定められているため、通常の着色料の検査同様、溶出液を TLC 及び HPLC-PDA で分析し、法定着色料であるか否かを確認したところ、法定着色料ではない未知の着色料であることが分かった。そこで、LC-QTOFMS を用いて構造推定を試みたところ、溶出した着色料は R201 であることが分かった。R201 は化粧品や外用の医薬品等に使用が認められているタール色素であるが、指定おもちゃから溶出してはならない。

R201 の分析法は、公定法では示されておらず、通常は着色料を同定することは困難であるが、本事例では LC-QTOFMS を用いて、精密質量から化合物を推定し、R201 を見出すことができた。この事例から、未知着色料を同定する手法として LC-QTOFMS が有用であることが示された。

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，169～199，2003
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知 衛化第 15 号：食品中の食品添加物分析法について 別添「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」，平成 12 年 3 月 30 日

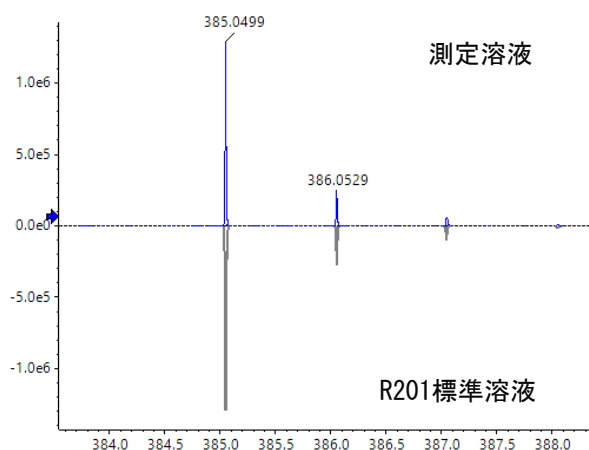


図 12 R201 標準溶液及び測定溶液のプリカーサーイオンスペクトル

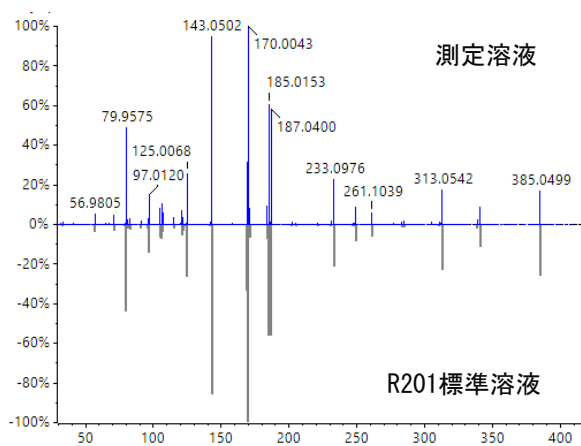


図 13 R201 標準溶液及び測定溶液の m/z 385.0503 のプロダクトイオンスペクトル