

タール色素の化学構造と HPLC 保持時間との関係

本間 啓子 馬渡 一浩

KEY WORDS

Coal - tar dyes, retention time, high performance liquid chromatography,
gradient elution method, reversed phase column,

はじめに

我が国で、現在食品に添加することが認められている食用タール色素は12種類ある^{1)~4)}。これらの色素はその構造から、アゾ系、キサントゲン系、トリフェニル系、インジゴイド系に分類される³⁾。

前報⁵⁾で、我々は高速液体クロマトグラフィー法(HPLC法)で逆相系カラムを用いるグラジエント溶出法で12種類の食用タール色素が分離できること、ピークの保持時間だけでなく吸収スペクトルを同時に分析すると色素の同定ができることを示した。

今回これらの色素に加えて類似構造の合成着色料を使い、色素の構造と置換基の種類や数が保持時間に与える影響について検討したので報告する。

方 法

1) 試薬

実験に使用した食用タール系色素はアゾ系5種(黄色4号, 赤色2号, 赤色102号, 黄色5号, 赤色40号), インジゴイド系1種(青色2号), トリフェニル系2種(緑色3号, 青色1号), キサントゲン系4種(赤色3号, 赤色104号, 赤色105号, 赤色106号)の12種類とアゾ系色素と類似構造を持つポンソーR, ポンソー3R, ポンソー6R, ファストレッドE, オレンジIIの5種類であった。これらは東京化成の市販試薬を用いた。

リン酸一水素二アンモニウム, リン酸二水素一アンモニウム, メタノールは和光純薬特級を用いた。試料の調整, 移動相の調整などに必要な水はすべてミリポア社のMILLI-Qシステムで精製したものを使用した。

2) 試料の調整

色素溶液は1 mg/mlの原液を10mMリン酸アンモニウム緩衝液で20倍に希釈し, 分析用サンプル中では, どの色素も50 μ g/mlとなるように調整した。

3) HPLC 装置と分析条件

逆液ポンプは, 日立L-6000とL-6200を, 検出器は日立 Diode Array Detector L-4500を, カラムオーブンは日立L-5030を使用した。分析機器の制御とデータ処理は, 日立D-6500三次元クロマトシステムにより行った。HPLC用カラムには逆相系のC18カラム(cosmosil 5-C18, 4.6mm ϕ \times 15cm)を使用した。移動相は, 10mMリン酸アンモニウム緩衝液(pH6.3)とメタノールを脱気して用いた。溶出はメタノールの濃度を10%から100%まで変化させる, グラジエント溶出法で行った⁵⁾。まず, 0分から5分で, メタノールの濃度を10%から20%に, 次に20分までに70%に上げ, さらに25分に100%にし, 30分まで持続させた。その後, 直ちに, メタノールの濃度をもとの10%に戻し, カラムを再平衡化させる。移動相の流速は1 ml/分, カラムの温度は50度でサンプルの注入量は20 μ lとした。溶出液の吸収スペクトルは測定波長200 nm-700nmの範囲を0.8秒間隔で, 40分間分のデータを記録保持し, 測定後に解析した。分析中のクロマトグラムは245nmでモニターした。

結果および考察

1) タール色素の構造と保持時間の関係

12種類の食用タール色素の混合物を分析したところ, 保持時間の短いものから, 黄色4号, 赤色2号, 青色2号, 赤色102号, 黄色5号, 赤色40号, 緑色3号, 青色1号, 赤色106号, 赤色3号, 赤色104号,

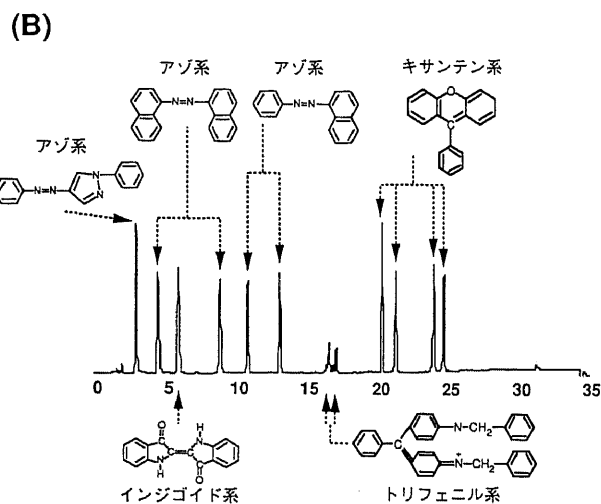
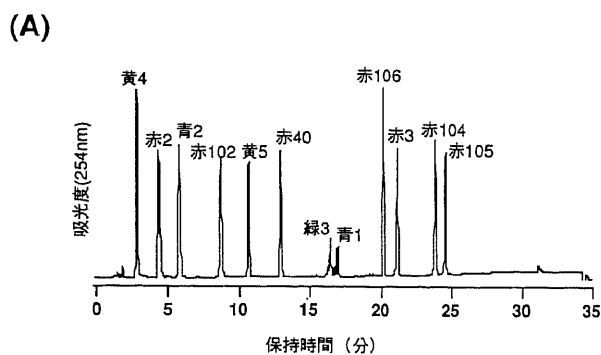


図1 食用タール色素の保持時間と化学構造との関係
 A) 食用タール色素の HPLC 溶出パターン
 B) 溶出位置と構造との関係

赤色105号の順であった (図1A)。

図1Bに示すように、アゾ系色素は4~14分頃、インジゴイド系色素は8分頃、トリフェニル系色素は16~17分頃、キサンテン系色素は20~24分頃にまとまって溶出した。このことから、タール色素の構造と保持時間との間に相関があることが示唆された。

アゾ系色素は保持時間の短いものから、黄色4号、赤色2号、赤色102号、黄色5号、赤色40号であった。保持時間が最も短い黄色4号は、ジアゾ結合の一方がベンゼン核で他方はピラゾール核にベンゼン核が結合した構造をしている (図1B)。次に保持時間が短かった赤色2号と赤色102号は、ジアゾ結合の両側がナフタレン核を持った構造である (図1B)。保持時間が長かった黄色5号と赤40号はジアゾ結合の一方がベンゼン核で他方はナフタレン核である (図1B)。このことから、アゾ系色素はジアゾ結合の両側の芳香環や複素環が異なると、保持時間に違いが見られることがわかった。

また、アゾ系色素で保持時間が長かった赤色40号

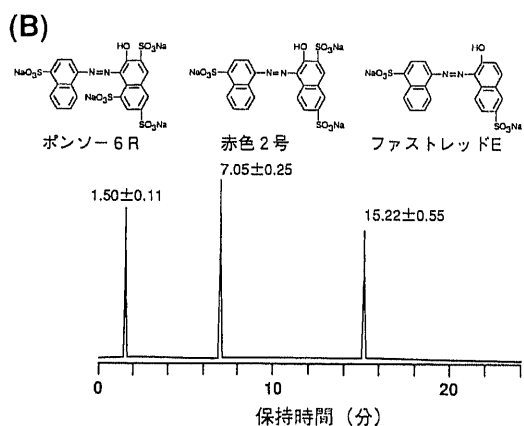
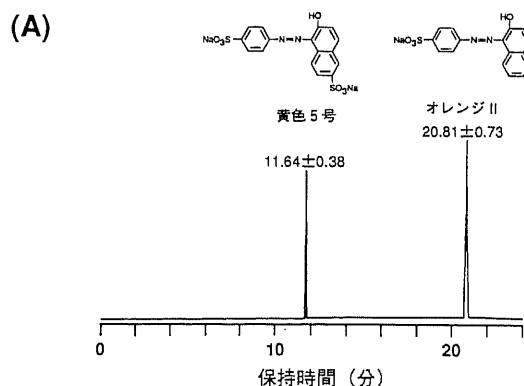


図2 アゾ系色素の保持時間に対するスルホン基の影響
 A) 黄色2号とオレンジII
 B) 赤色2号と類似色素

と黄色5号は、保持時間が2~3分違った。この2つの違いは黄色5号はメトキシ基とメチル基がベンゼン核に余分に結合していることである。このために赤色40号は黄色5号より保持時間が大きくなったと考えられる。

トリフェニル系では、緑色3号と青色1号の保持時間が1分ほど異なった。この場合は緑色3号が硫酸基を1つ多く持っているために青色1号より早く溶出したと考えられる。

以上の結果は、タール色素の置換基の種類や数が保持時間に影響することを強く示唆している。

そこで、次にアゾ系色素の保持時間がスルホン基やメチル基のような置換基によってどのように変わるかについて検討した。

2) アゾ系色素の保持時間に与える置換基の影響

まず、スルホン基の影響について調べるために、アゾ系色素でスルホン基の数だけが異なる2つの色素のグループについて調べた。

ジアゾ結合の一方がベンゼン核で他方がナフタレ

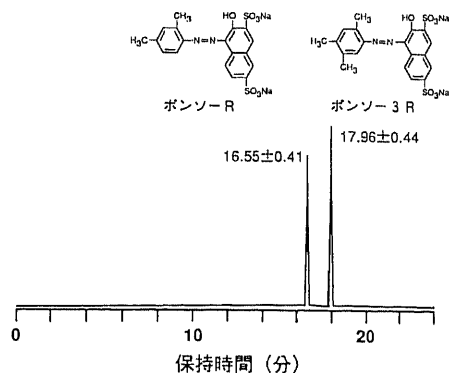


図3 アゾ系色素の保持時間に対するメチル基の影響

ン核のアゾ系色素のグループには黄色5号とオレンジIIがある。スルホン基の数は黄色5号は2つ、オレンジIIは1つである。これらの色素を HPLC 分析したところ、保持時間は黄色5号が 11.64 ± 0.38 分、オレンジIIが 20.81 ± 0.73 分であった(図2A)。

赤色2号、ボンソー6R、ファストレッドEの3つはジアゾ結合の両側にナフタレン核を持つアゾ系色素である。赤色2号はスルホン基が3つあり、これよりスルホン基が1つ多いのがボンソー6R、逆に1つ少ないものがファストレッドEである。これら3種類の色素を分析したところ、保持時間はボンソー6Rで 1.50 ± 0.11 分、赤色2号で 7.05 ± 0.25 分、ファストレッドEで 15.22 ± 0.55 分であった(図2B)。

これらの結果から、スルホン基が1つ増えると、保持時間が5~10分短くなることがわかった。また、黄色5号(図2A)とファストレッドE(図2B)との比較から、ジアゾ結合の片側のベンゼン核をナフタレン核に置換すると保持時間が長くなることもわかった。

次に、ジアゾ結合の一方がベンゼン核で他方がナフタレン核のアゾ系色素であるボンソーRとボンソー3Rを用い、アゾ系色素の保持時間に対するメチル基の影響を調べた。この2つの色素はベンゼン核に結合しているメチル基の数が1つ違うだけである。その結果、ボンソーRの保持時間は 16.55 ± 0.41 分、ボンソー3Rは 17.96 ± 0.44 分であった(図3)。

このことから、メチル基が1つ増えると1~2分保持時間が延長することがわかった。

以上の結果から、アゾ系色素の芳香環にスルホン基を導入すると保持時間が短くなり、メチル基では逆に延長することがわかり、置換基の数が保持時間に影響していることがわかった。

まとめ

1. 12種類の食用色素の構造が保持時間と関係していた。
2. アゾ系色素については、スルホン基の導入は保持時間を短縮させ、メチル基は保持時間を延長させた。

文献

- 1) 厚生省環境衛生局食品化学課監修：食品中の食品添加物分析法，485-516，1982。
- 2) 厚生省環境衛生局監修：食品衛生検査指針，食品中の食品添加物分析法，142-166，1989。
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法 注解，500-545，1990。
- 4) 厚生省告示第1号：官報(号外第4号)，平成3年1月17日付，1-2，5-6，1991。
- 5) 本間啓子，馬渡一浩：高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による食用タール色素の分析，金大医短紀要，19：157-160，1995。

Correlations between chemical structures and HPLC retention times of coal-tar dyes

Keiko Homma, Kazuhiro Mawatari