

平成 13 年度

食品等試験検査費

食品添加物規格基準及び試験法の設定

食用赤色 104 号及び 105 号中の
不純物ヘキサクロルベンゼン含有量実態調査

国立医薬品食品衛生研究所

大阪支所 食品試験部

海野 有紀子

中村 優美子

辻 澄子

外海 泰秀

要 旨

食用赤色 104 号 (R-104) 及び 105 号 (R-105) は、重合するとダイオキシンになる可能性があると言われている第一種特定化学物質のヘキサクロルベンゼン (HCB) を不純物として含有しており、これまでの報告例でも、測定検体すべてから HCB が検出されている。

現在の第 7 版食品添加物公定書では「食用赤色 104 号」及び「食用赤色 105 号」は純度試験として、水不溶物、液性、塩化物・硫酸塩、重金属、ヒ素、他の色素に係わる規格値が設定されているが、HCB に対する規格は設けられていない。近年製造されたこれらの色素中の HCB 残留濃度を把握する為、平成 10 ～ 13 年度の R-104 及び R-105 の製品検査合格検体について HCB 含量実態調査を行った。

その結果、R-104 及び R-105 の全検体から HCB が検出された。しかし、HCB 含量は、近年になるにつれ減少している傾向が見られた。また、実態調査から色素由来の HCB 一日摂取量を算出し、水質基準に基づいて算出した飲料水由来の HCB 摂取量と比較したところ、色素由来の HCB 摂取量は非常に少ない量であり問題のない量であった。

目 次

目的	1
実験方法	1
1. 試料	1
2. 試薬及び溶媒	1
3. 標準原液及び標準溶液の調製	2
4. 試験溶液調製法	2
4-1) 簡易法	2
4-2) フロリジルカラム精製法	2
5. GC-MS 条件	2
6. GC-ECD 条件	3
7. 色素由来の HCB 一日摂取量の算出法	3
実験結果及び考察	3
1. 試験溶液調製法の検討	3
2. GC-MS (SIM) 及び GC-ECD による測定	3
3. 添加回収試験	4
4. 実態調査	4
5. R-104 及び R-105 由来の HCB 摂取量	4
まとめ	5
引用文献	5
図 1 ～ 6	7
表 1 ～ 3	13

目的

食用タール色素である食用赤色 104 号 (R-104 ; フロキジン) 及び赤色 105 号 (R-105 ; ローズベンガル) は、図 1 に構造を示したように、レゾルシンと有機塩素系化合物であるテトラクロロ無水フタル酸から合成されており (食添 VII 解説書, 1999), 特にテトラクロロ無水フタル酸中に不純物としてヘキサクロルベンゼン (HCB, 図 2) が混入する可能性があると言われている (Andrzejewski et al., 1999). HCB は第一種特定化学物質である上に、重合するとダイオキシンになる可能性があるとも言われている. R-104 及び R-105 中に, Andrzejewski らは 0.2 ~ 244.3ppm (Andrzejewski et al., 1999), 堀らは 0.55 ~ 78ppm (堀ら, 1998) の HCB が含有することを報告している. 現在, 第 7 版食品添加物公定書では「食用赤色 104 号」及び「食用赤色 105 号」は純度試験として, 水不溶物, 液性, 塩化物・硫酸塩, 重金属, ヒ素, 他の色素に係わる規格値が設定されているが, HCB に対する規格は設けられていない. 近年製造されたこれらの色素中の HCB 残留濃度を把握する為, 平成 10 ~ 13 年度の R-104 及び R-105 の製品検査合格検体について HCB 含量実態調査を行ったので報告する.

実験方法

1. 試料

平成 10 ~ 13 年度製品検査合格検体 R-104 : 27 検体, R-105 : 5 検体の計 32 検体.

2. 試薬及び溶媒

HCB 標準品 (残留農薬試験用) は和光純薬工業 (株) 製を, n-ヘキサン, ジエチルエーテルは残留農薬試験用を用いた. SEP-PAK[®] PLUS フロリジルカートリッジ (Waters 社製) は, あらかじめ 10 % ジエチルエーテル/n-ヘキサン及び n-ヘキサンにて洗浄を行って, 用いた.

3. 標準原液及び標準溶液の調製

HCB 標準品約 20.0 mg を精密に量り, n-ヘキサンを加えて溶かし正確に 20 mL とし, 標準原液 (1000 µg/mL) とした. 標準原液を n-ヘキサンの希釈して 1 µg/mL になるように調製したものを標準溶液とした.

標準溶液を 1, 1.5, 2, 3 mL 及び 5 mL をそれぞれ正確に量り n-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とし, 検量線用標準溶液 (0.01, 0.015, 0.02, 0.03 µg/mL 及び 0.05 µg/mL) とした.

4. 試験溶液調製法

1) 簡易法

試料 100 mg に超純水 150 mL を加え色素を溶解した後, n-ヘキサン 50 mL を加え 5 分間機械振とうを行った. n-ヘキサン層を分取し, ろ紙ろ過を行った後, ロータリーエバポレーター (約 40 °C, 減圧) にて濃縮し, n-ヘキサンの 5 mL に定容した.

2) フロリジルカラム精製法

堀らの試験溶液調製法 (堀ら, 1998) を準用し, 試料 100 mg に超純水 150 mL を加え色素を溶解した後, n-ヘキサン 50 mL を加え 5 分間機械振とうを行った. n-ヘキサン層を分取し, ロータリーエバポレーター (約 40 °C, 減圧) にて濃縮し, 濃縮液をフロリジルミニカラムに付加し, 10 % ジエチルエーテル/n-ヘキサン 10 mL で溶出した. 溶出液を濃縮 (約 40 °C, 減圧) 後, n-ヘキサンの 5 mL に定容した.

5. GC-MS 条件

装置: (株) 島津製作所製 Shimadzu QP-5050 (質量分析計), GC-17 (ガスクロマトグラフ), AOC-20i (オートインジェクター); カラム: J&W DB-5 (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 µm); 気化室温度: 260 °C; カラム温度: 50 °C (1 min) → 20 °C/min → 300 °C (7min); キャリアガス: 高純度ヘリウム, 圧力 100 kPa, 全流量 20 mL/min; 注入方法: スプリットレス; インターフェー

ス温度：260℃；測定イオン： $m/z = 284$ ；注入量：1 μL

6. GC-ECD 条件

装置：(株)島津製作所製 Shimadzu GC-17A, AOC-17；カラム：DB-1（内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm ）；注入口温度：260℃；カラム温度：60℃（2 min）→ 20℃/min → 250℃（5 min）→ 5℃/min → 260℃（15 min）；キャリアガス：高純度ヘリウム，圧力 110 kPa，全流量 100 ml/min；検出器：ECD（電子捕獲型検出器）；検出器温度：300℃；注入方法：スプリットレス；注入量：2 μL

7. 色素由来の HCB 一日摂取量の算出方法

R-104 及び R-105 の成人一日摂取量に各色素中の HCB 含量最大値を乗じ，各色素からの HCB 摂取量を算出し，その合計値を色素由来の HCB 一日摂取量とした。

実験結果及び考察

1. 試験溶液調製法の検討

フロリジルカラムによる精製を試みたが，使用した検体量が少ない為，フロリジルカラムによる精製過程を省略しても精製時と同等の結果が得られた。しかし表 1 に示したように，試験溶液を保存した場合には，精製過程を省略した試験液は HCB 含量が増加する傾向が見られたので，以下簡易法により試験液を調製し，調製直後に測定を行うこととした。

2. GC-MS (SIM) 及び GC-ECD による測定

同一試験溶液を GC-MS 及び GC-ECD で測定し，両者の結果を比較した。両者とも実験方法の項で述べた各条件で高感度に測定できた。HCB の GC-MS スペクトルは図 3 のようであり，ピーク感度の高い $m/z = 284$ (M^+) を測定イオンとして用いて，SIM 法で測定した。検量線は，図 4 に示したとおり GC-MS 及び GC-ECD とともに 0.01 ～ 0.05 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で直線性を示し，感度，精度，操

作性ともほぼ同等であった。

図 5 には GC-MS, 図 6 には GC-ECD における HCB 標準溶液及び試験溶液のクロマトグラムを示した。GC-ECD では HCB 以外にも多くの不純物ピークの認められる検体があった。

3. 添加回収試験

色素に対して HCB が 1 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加し添加回収試験を行った。各回収率は表 2 に示したとおり、GC-ECD については 72.5 %, GC-MS については 95.96 % 以上の良好な値が得られた。GC-MS と比較して GC-ECD が低回収率を示したのは、ピークのテーリングの影響と考えられる。

4. 実態調査

平成 10 ～ 13 年度製品検査合格検体の R-104 及び R-105 の計 32 検体について HCB 含量実態調査を行った結果、全検体より HCB が検出された。各検体の色素に対する HCB 含量を算出し、表 3 に示した。GC-MS では 0.16 ～ 32.86 $\mu\text{g/g}$ の範囲で HCB が検出された。GC-ECD についてもほぼ同等の結果が得られたので、HCB に関しては妨害ピークの少ない GC-MS で測定することで十分であると考えられる。

R-104 では平成 10 年度は、他年度に比べ高い濃度の HCB が検出され、堀らが報告している比較的高い濃度 (30 $\mu\text{g/g}$ 以上) (堀ら, 1998) と同程度検出された検体もあった。しかし平成 11 年度以降のほとんどの検体では、微量程度の検出であった。また、R-105 についても突出した HCB 含量を検出した検体はなく、平成 13 年度の検体については他年度に比べ、HCB 含量が非常に低かった。これらの事から、色素製造の原料や合成過程で何らかの改善が行われたのではないかと考えられる。しかし、1 社については近年の検体についても比較的高い HCB 含量が高値であったことから、引き続き監視する必要があると考えられる。

5. R-104 及び R-105 由来の HCB 一日摂取量

平成 11 年度の色素の成人一日摂取量 (Ishiwata, 2001) は, R-104, R-105 の摂取量がいずれも 0 であったので, R-104 及び R-105 を摂取している近年のデータ (平成 6 年度) を用いて HCB の一日摂取量を算出した。色素の成人一日摂取量 (Koh et al., 1995) は, R-104 : 0.0276 mg/day, R-105 : 0.0009 mg/day であり, 今回検出された各色素の HCB 含量の最大値は R-104 : 32.86 $\mu\text{g/g}$, R-105 : 11.35 $\mu\text{g/g}$ であった。その結果, 色素 (R-104+R-105) 由来の HCB 一日摂取量は 0.92 ng/day と算出された。この値を, WHO の飲料水水質ガイドライン ((財)水道技術研究センター, 2002) から算出した飲料水由来の HCB 一日摂取量 (2 $\mu\text{g/g}$) と比較したところ, 色素由来の HCB 摂取量は非常に少なく, 問題のない量であることが分かった。

まとめ

近年製造された R-104 及び R-105 中の HCB 含量を把握する為, 平成 10 ~ 13 年度製品検査合格検体 (R-104, R-105) の計 32 検体について HCB 含量実態調査を行った。その結果, 全検体から HCB が検出された。しかし, HCB 含量は近年になるにつれ非常に減少していた。また色素由来の HCB 一日摂取量は水質基準に基づいて算出した飲料水由来の HCB 摂取量と比較したところ, 色素由来の HCB は非常に少ない量であり, 問題のない量である事がわかった。

引用文献

- Andrzejewski, D., Weisz, A., Rapid quantification of hexachlorobenzene in the color additives D&C Red Nos.27 and 28 (phloxine B) using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography (J.Chromatogr.A), 863, 37-46 (1999)
- Ishiwata, H., Estimation of the Daily Intake of Food Additives., Shokuhin Eisei Kenkyu, 51 (3), 83-101 (2001)

- ・ Koh, T., Yada, T., Tobimatsu, Y., Hamasaki, N., Tabuchi, Y., Fujii, M., Semma, M.,
Tsuji, S., Shibata, T. and Ito, Y., Studies on Daily Intake of Food Coal-tar Dyes in Japan.,
Nihon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food. Chem) , 2(1), 64- 68 (1995)
- ・ 財団法人 水道技術研究センター, WHO 飲料水水質ガイドライン,
<http://ygnet.mizudb.or.jp/Ippan/YugaiHoukoku/Asp/IsseiFrame.asp> (2002)
- ・ 第 7 版食品食品添加物公定書解説書, p.D713-727 (1999)
- ・ 堀 伸二郎, 小西 良昌, 尾花 裕孝, 石光 進, 日本食品化学学会第 4 回講
演要旨集, p.63 (1998)

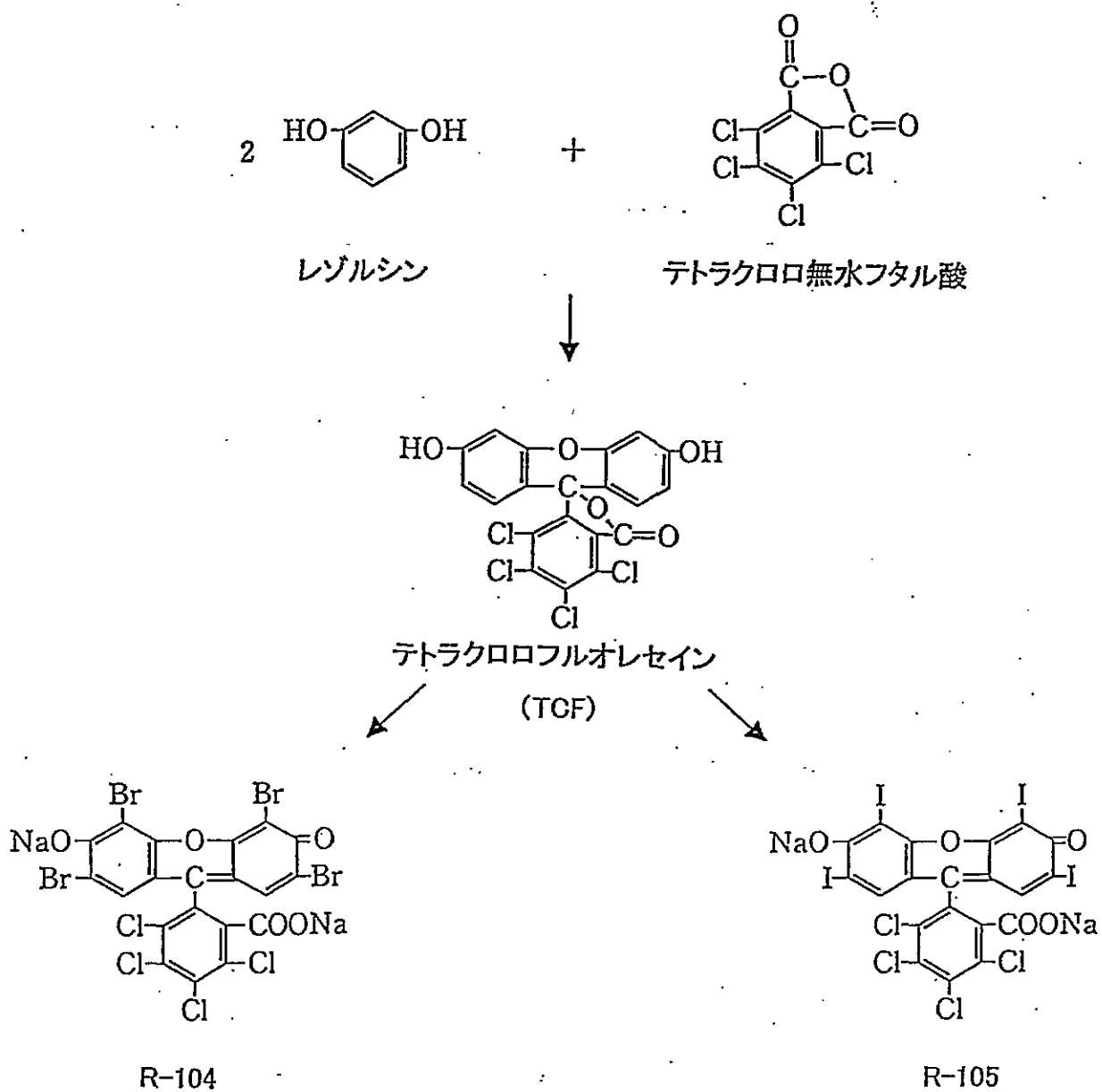


図1 R-104及びR-105の合成法

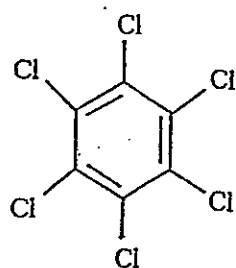


図2 HCB

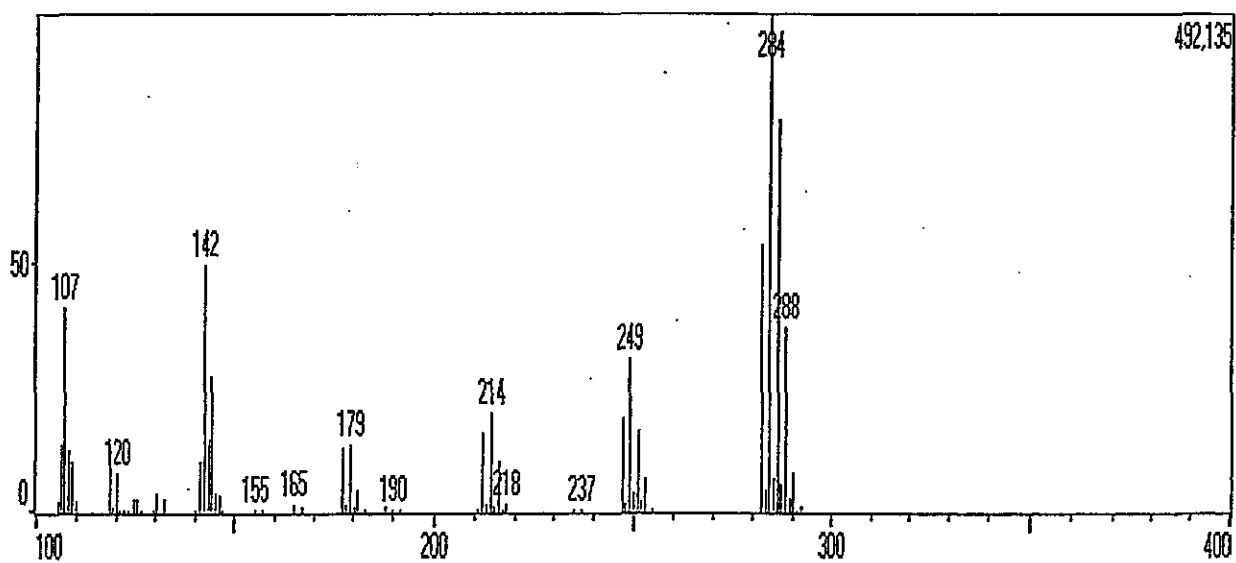


図3 HCB標準品のマススペクトル

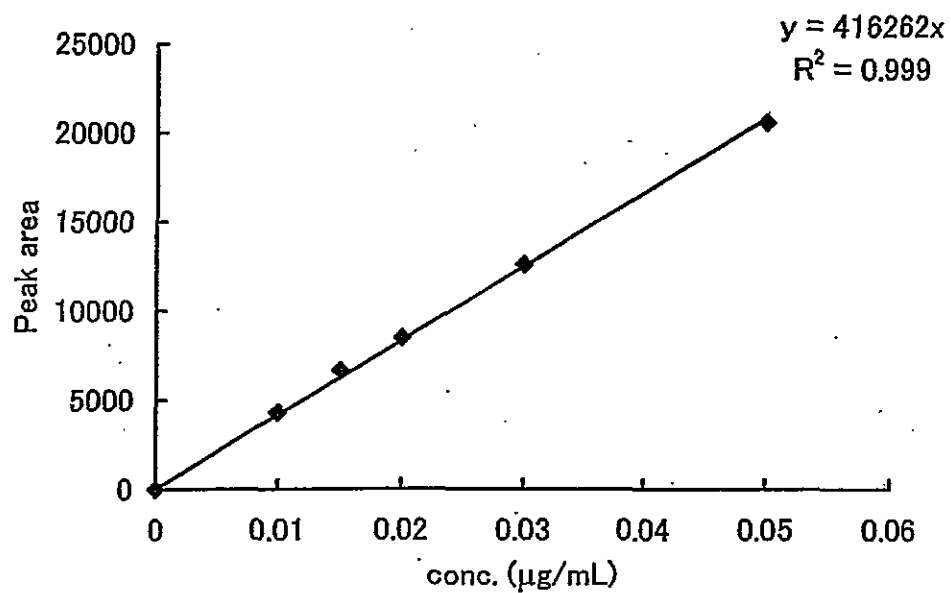


図4-1 GC-MSによるHCBの検量線

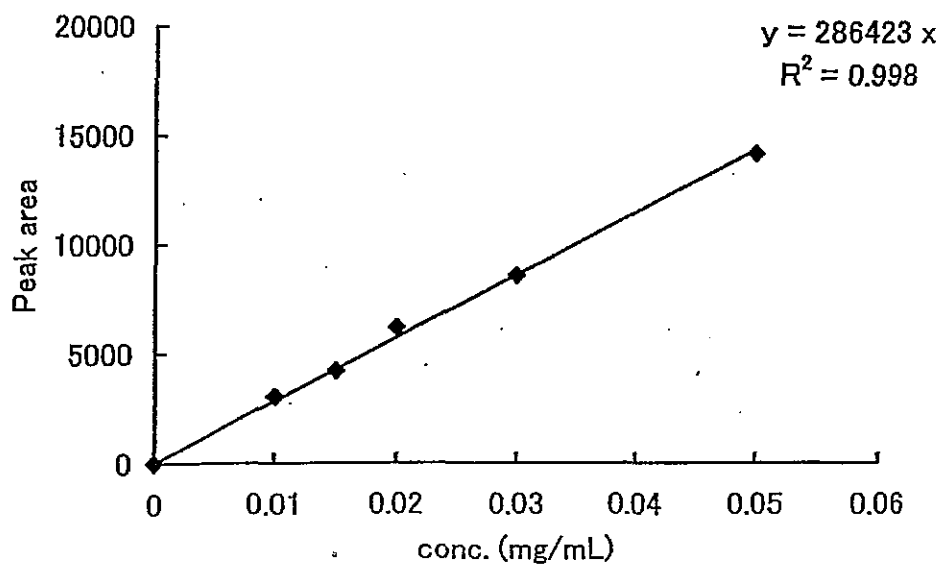


図4-2 GC-ECDによるHCBの検量線

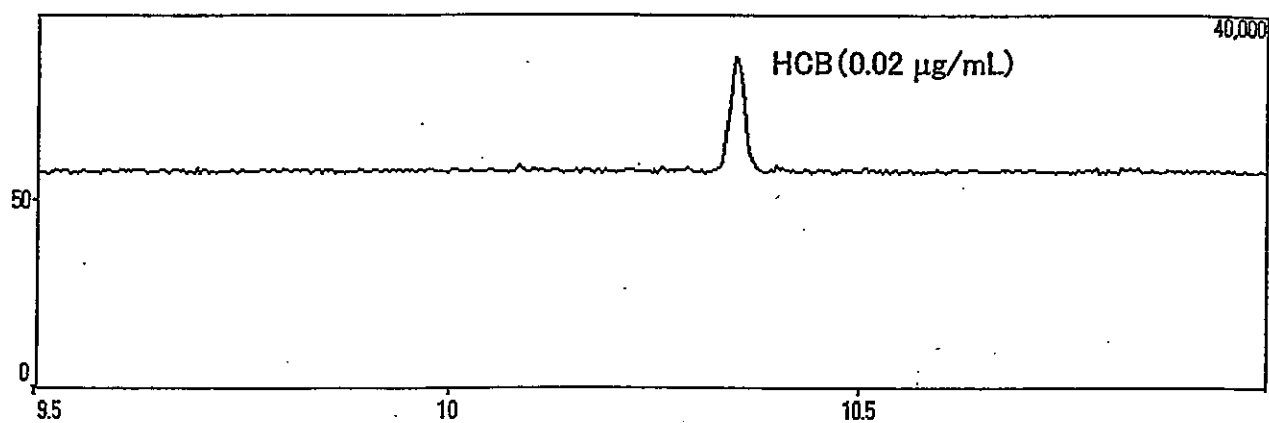


図5-1 GC-MS(SIM)によるHCB標準溶液のクロマトグラム

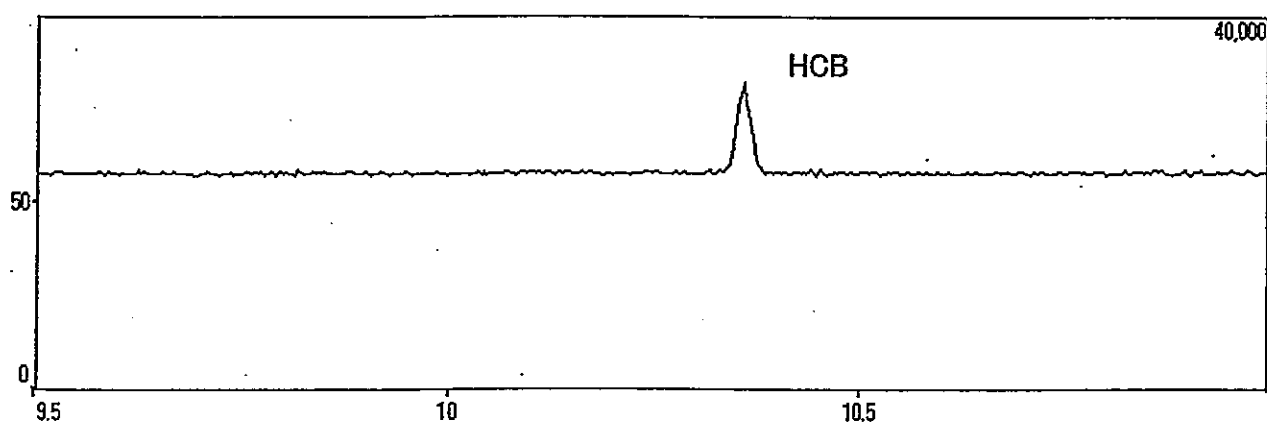


図5-2 GC-MS(SIM)によるR-104試験溶液のクロマトグラム

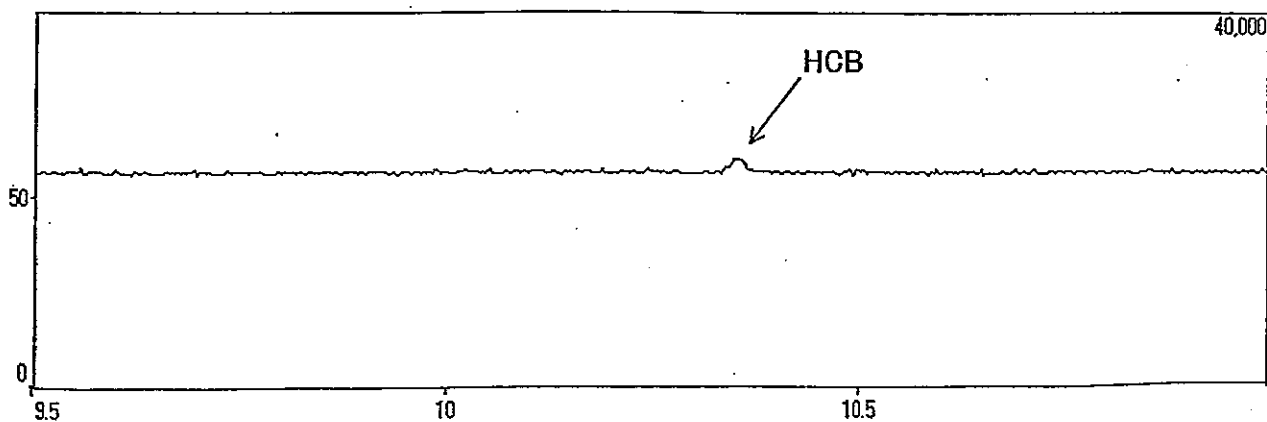


図5-3 GC-MS(SIM)によるR-105試験溶液のクロマトグラム

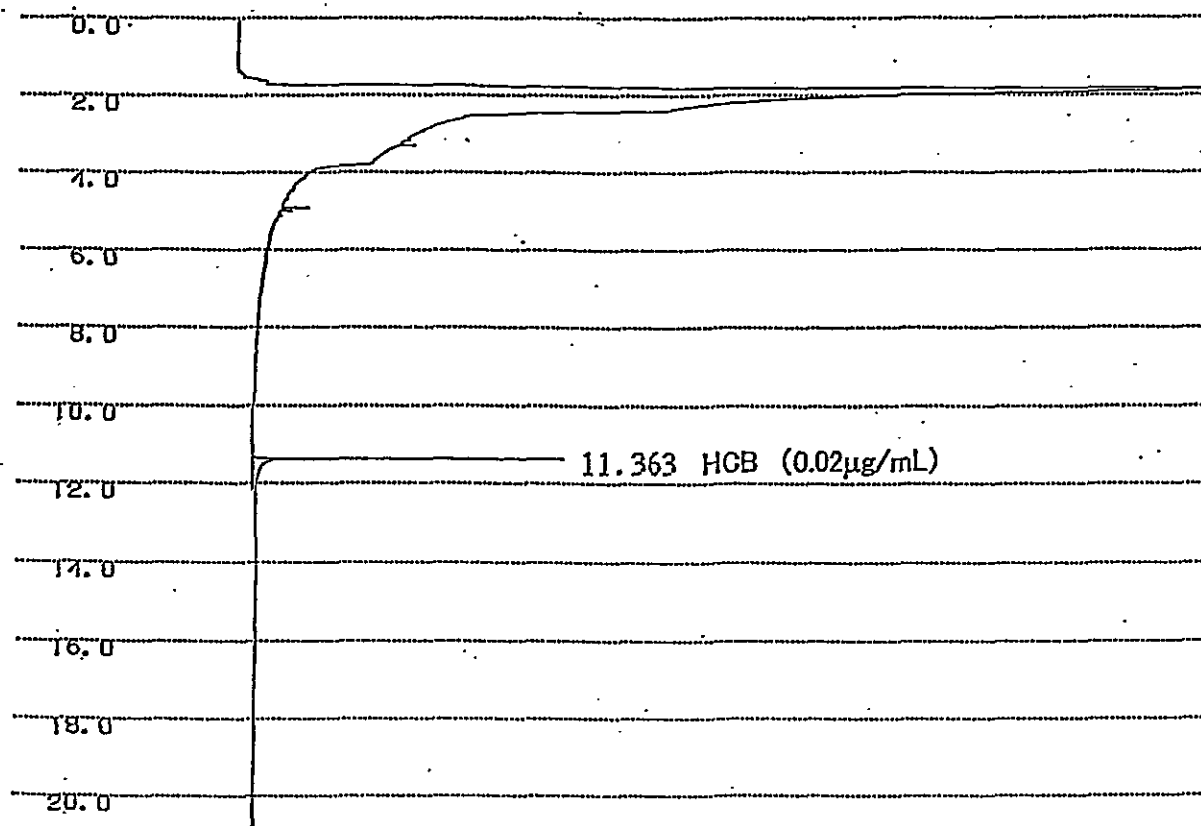


図6-1 GC-ECDによるHCB標準溶液のクロマトグラム

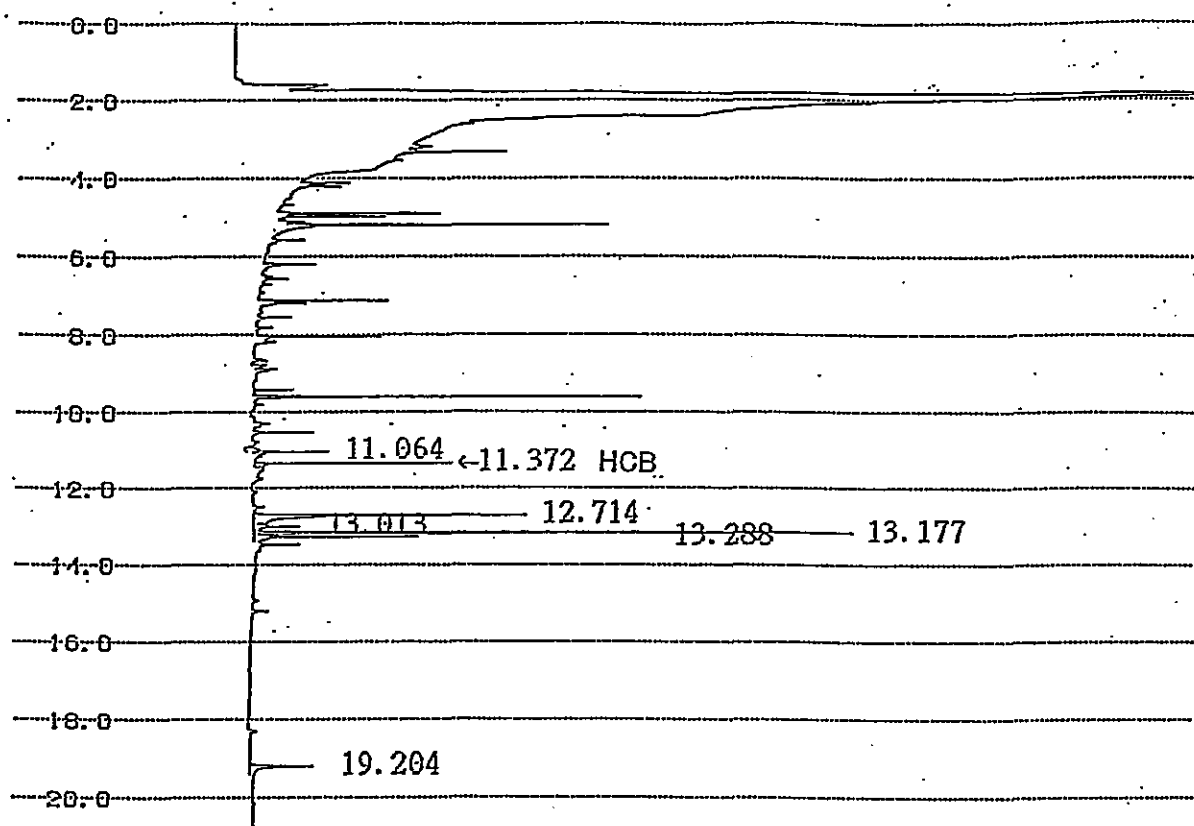


図6-2 GC-ECDによるR-104試験溶液のクロマトグラム

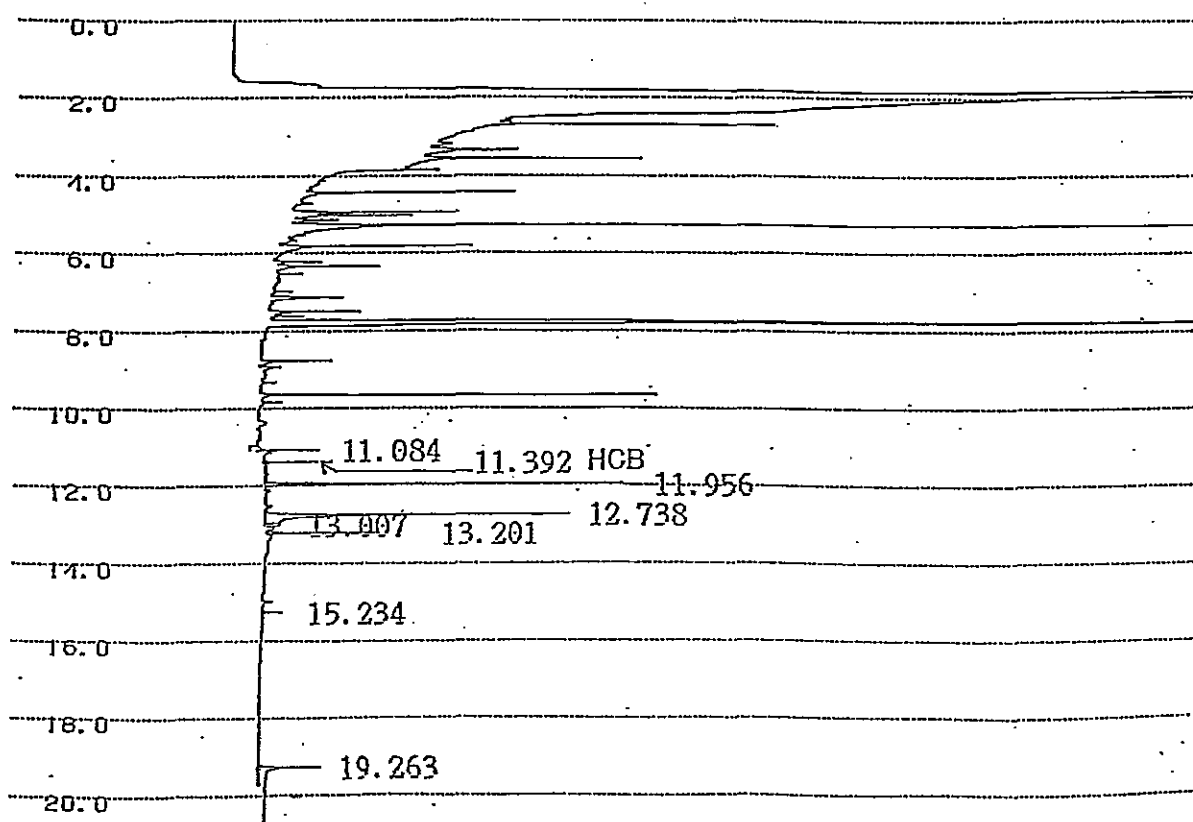


図6-3 GC-ECDによるR-105試験溶液のクロマトグラム

表1 試料(R-104)中HCB含量に及ぼすフロリジルカラム精製の有無及び試験液保存の影響

	フロリジルカラム 精製過程	HCB含量($\mu\text{g/mL}$) [*]	
		液調製直後	液調製2週間後
SampleA	あり	23.30 $\pm$ 1.34	24.52 $\pm$ 0.78
	なし	23.71 $\pm$ 1.80	29.14 $\pm$ 2.77
SampleB	あり	27.72 $\pm$ 1.59	25.35 $\pm$ 1.28
	なし	25.87 $\pm$ 1.84	31.56 $\pm$ 0.99

*4試行の平均値 $\pm$ S.D.

表2 R-104, R-105に添加したHCBの回収率

色素	添加量 (ppm)	回収率 (%) [*]	
		GC-MS(SIM)	GC-ECD
R-104	1	95.96 $\pm$ 5.46	72.50 $\pm$ 3.50
R-105	1	100.97 $\pm$ 7.23	84.50 $\pm$ 5.89

*3試行の平均値 $\pm$ S.D.

表3-1 色素検体(R-104)中のHCB含量実態調査

申請年度 (平成)	製造者	HCB含量 (μg/g) *	
		GC-MS	GC-ECD
10	A	32.86	32.12
10	A	30.93	32.36
10	A	30.08	32.73
10	A	32.73	30.95
10	B	28.91	28.54
10	A	31.69	31.60
10	C	0.83	0.72
10	C	1.64	1.29
10	D	0.94	0.82
10	A	19.20	20.24
11	A	0.63	0.56
11	B	0.48	0.49
11	B	2.81	2.28
11	A	0.83	0.71
11	C	0.38	0.44
11	A	0.76	0.69
11	E	5.54	5.19
12	A	0.73	0.67
12	A	0.35	0.26
12	B	0.46	0.27
12	B	0.24	0.21
13	A	0.42	0.36
13	A	0.74	0.74
13	C	0.39	0.41
13	E	24.92	24.56
13	F	0.42	0.47
13	D	0.52	-

* 2試行の平均値

表3-2 色素検体(R-105)中のHCB含量実態調査

申請年度 (平成)	製造者	HCB含量 (μg/g) *	
		GC-MS	GC-ECD
10	B	6.74	5.06
10	D	11.35	9.78
11	F	5.55	5.83
12	F	1.69	0.84
13	A	0.16	0.14

* 2試行の平均値