

## 着色や変色の原因を調べる試験について

### はじめに

一般に、流通する食品や医薬品又はその容器などの色調が通常と異なる場合、着色又は変色とされ、異物の混入や不適切な保管などを想起し、食品やその容器などは食品衛生の観点からも問題となります。可視光の一部を吸収する性質を持つ物質＝色素が存在すると、その反射光では特定の波長領域が吸収されて欠けるため、人の目に色として認識されます。つまり着色は、身の回りの様々な色がついたモノ（食品や化粧品、インク、塗料など）の付着または混入といえます。一方、変色は本来の色と変わる事象であり、構成成分の変化といえます。そのほか、微生物が増殖することで産生される色素もしくは菌体そのものの色により、肉眼では変色したと認識されるようなケースもあります。このように、着色や変色は事例や原因物質が多岐に亘ることから、特定の試験を行えば原因が判るというものではありません。そのため、色調のみならずサンプルの状態、色調、色素の溶解性、発見時の状況など、あらゆる情報を駆使して、ターゲットとなる事象や物質を絞り込んでいきます。原因究明のためには、色素の分類に関する情報を収集する必要があります。

### 色素の分類

色素は、水や有機溶媒に溶ける「染料」と溶けにくい「顔料」に分けられます。「染料」には、溶解性を増すために人工的にスルホン酸基やカルボキシル基などの官能基を修飾した有機合成色素（タール系色素）と天然色素があります。タール系色素は色も安定で、ほとんどが単一物質であるため比較的特定しやすい色素です。



天然色素は種類が多く、構造が明確になっていないものや配糖体や脂肪酸エステルなど複数成分から構成される混合物も存在するため、特定がかなり困難となります。そのため溶解性やpHによる色調の変化、蛍光性の有無など、色素ごとに特徴的な性質を持つものがあるため、これらの性質をあらかじめ知っておくことが原因色素を推定するための鍵となります。

また、「顔料」は、鉱物からなる無機顔料と、有機顔料に分けられます。顔料は水や溶媒にあまり溶解しないため、分散して使用します。



参考として化粧品に使われる色材の一例を表-1に示しました。

表-1 化粧品に使われる色材<sup>1)</sup>の一例

染料 水や油，アルコールなどの溶媒に溶解し，溶解状態で彩色できる色材。	有機合成色素 (合成で作られたタール系染料)	アゾ系染料	サンセットイエローFCF(黄)
		キサントン系染料	ローダミンB(赤)
		キノリン系染料	キノリンイエローSS(黄)
		トリフェニルメタン系染料	ブリリアントブルーFCF(青)
		アンスラキノロン系染料	キニザリンググリーンSS(緑)
	天然色素 (動植物由来と微生物由来がある。着色力，耐光性，耐薬品性に劣るが，安全性や薬理の面から見直されている)	カロテノイド系	$\beta$ -カロテン(橙：ニンジン)
		フラボノイド系	カルタミン(赤：バナナ)
		フラビン系	リボフラビン(黄：酵母)
		キノン系	アリザリン(橙：西洋アカネ)
		ポルフィリン系	クロロフィル(緑：緑葉植物)
		ジケトン系	クルクミン(黄：ウコン)
		ベタシアニン系	ベタニン(赤：ビート)
	顔料 水や油などに溶解しない。分散して使用する色材。	無機顔料 (古くは天然鉱物を利用してはいたが現在は合成が主流。耐光・耐熱に優れるが鮮やかさが劣る)	体質顔料
白色顔料			二酸化チタン，酸化亜鉛
有色顔料			赤色酸化鉄，黄色酸化鉄，群青
パール剤			雲母チタン，魚鱗箔
機能性顔料			窒化ホウ素，フォトクロミック顔料
有機顔料 (構造内に可溶性基を持たない合成顔料)		アゾ系顔料	パーマトンレッド(赤)
		インジゴ系顔料	ヘリンドンピンクCN(赤)
		フタロシアニン系顔料	フタロシアニンブルー(青)
レーキ (染料を不溶化した色材)		レーキ顔料	リゾールルピンBCA(赤)
		染料レーキ	タートラジンALレーキ(黄)
高分子粉体 (球状は使用性良好。積層板状のものは干渉色が出る)		板状粉体	ポリエチレンテレフタレート-ポリメチルメタクリレート積層粉体
		球状粉体	ポリエチレン，ナイロン， ポリメタクリル酸メチル

### 着色の原因を調べる試験

合成タール系色素による着色が疑われる場合は，抽出した色素と各種タール系色素標準品との薄層クロマトグラフィー(TLC)上での挙動(Rf値)を比較します。また，代表的な天然色素であるアントシアニン系色素が付着した場合は，酸性下で赤色，アルカリ性下で青色と，pHにより色調が変化する性質があるため，着色部分をアルカリや酸に浸すことによる色調の変化を観察します。



無機顔料や微細な金属末等(鉄, 銅, 亜鉛, クロム等)の付着による着色などの場合は, X線分析装置による元素分析を用います。

塗料の破片やインクの塊などの付着物そのものを直接測定できる場合は, フーリエ変換型赤外分光光度計(FT/IR)により付着物の赤外吸収スペクトルを測定することで, その主要構成成分の吸収波長をライブラリー検索することにより塗料やインクに含まれる色素や顔料の種類を判定します(図-1)。

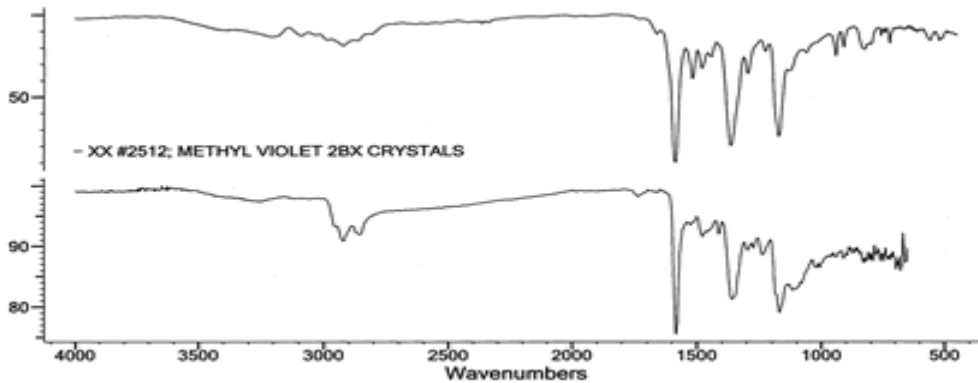


図-1 赤外吸収スペクトルのライブラリー検索の一例  
[メチルバイオレット(上段)及び食品に認められた紫色付着物(下段)]

### 変色の原因を調べる試験

変色は含有成分の変化によるもののため, 変色機構を明らかにする, あるいは色の着いた変化生成物を検索する試験となり, 着色よりも原因究明が困難です。

ポリフェノール類といわれる無色のカテキンやタンニン, 黄色のフラボン, 赤～紫色のアントシアニンなどは, 保存中に酵素酸化や自動酸化による褐変, 金属イオンや窒素化合物などとの反応による変色, アスコルビン酸による退色, pHによる色調の変化などを起こすことがあります。また, クロロフィルは酵素, 熱もしくは酸による分解を受け緑色の消失をやすく, カロテン類は酸化などにより変色または退色します<sup>2), 3)</sup>。このように, 天然色素は反応性が高く不安定なことから, 想定される変色の機構は複雑で多岐に亘ります。

上記以外の変色原因としては, 非酵素的褐変であるカルボニル基とアミノ基から成るアミノ-カルボニル反応(メイラード反応)が知られています。糖の分解や脂肪の酸化によって二次的に生成するカルボニル化合物が, ペプチド, タンパク質, アミン類などと反応するもので, あらゆる食品において生じる可能性があります。その反応生成物は多種多様で, 褐色色素(メラノイジン)の化学構造の全容はいまだ明らかにされていません。そのためメイラード反応の中間生成物であるフルフラールやヒドロキシメチルフルフラール(HMF)が反応の指標成分とされることがあります<sup>2)</sup>。そのほかにもタンパク質が加熱され, その構成単位である含硫アミノ酸から発生する硫化水素が銅などの金属イオンと反応して, 硫化銅などの金属硫化物を生じることにより黒変する事例も良く知られています。このような場合は, 正常部分と変色部分についてX線エネルギースペクトルなどの元素分析を行い, スペクトルを比較し硫黄や銅などのピークの違いを確認します(図-2)。食品以外では, 容器包装に添加された酸化防止剤の酸化により変色する事例が知られています。

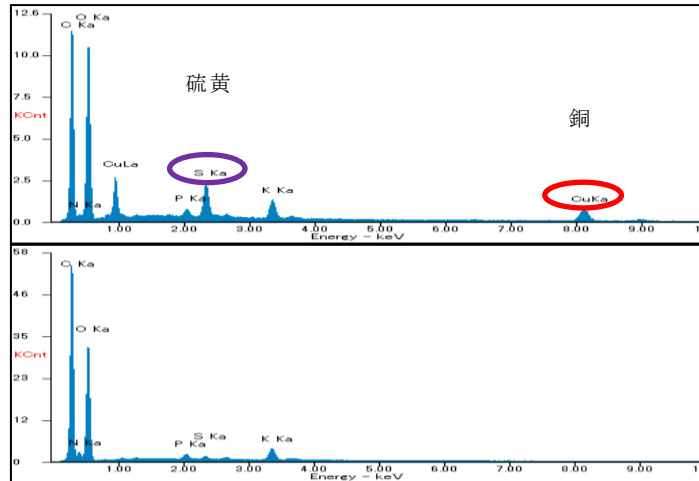


図-2 変色部分(上段)及び正常部分(下段)の元素分析例(X線エネルギースペクトル)

### 微生物由来の変色を調べる試験

微生物による変色の可能性が考えられる場合は、培地もしくは正常部分へ変色部分から分離された微生物を接種し、コロニーそのものやその周囲に見られる色素の色調を確認します。微生物が死滅している場合は培養による確認ができませんが、微生物の産生した色素を特定することで原因微生物の推定ができる場合があります。

微生物が産生する色素の標準品は市販されていないことが多いため、既知の微生物を培養することで得られる色素を抽出して標品とし、変色部分から抽出した色素の液体クロマトグラフィーにより保持時間、紫外可視吸収スペクトル、マスペクトルなどを比較します。弊財団では、この手法によりセラチア属の細菌が産生した赤色色素のプロジギオシンや、マシリア属の細菌が産生した青紫色色素のピオラセインを確認できた事例がありました。

### LC-PDA-TOF/MS 法による色素の検索例

弊財団では、着色・変色の原因調査において、HPLC に紫外～可視領域の吸収が確認できるフォトダイオードアレイ検出器(PDA)と、精密質量が測定できる飛行時間型質量分析計(TOF/MS)をつないだシステム(LC-PDA-TOF/MS)も利用しています。サンプルから得られる様々な情報から、水溶性、油溶性もしくは天然色素程度にターゲットを絞り込んだ上で、このシステムを用いることにより測定対象物質を設定することなく、既存の方法に比べて高感度に分析することが可能となります。具体的には、クロマト分離された多数のピークの中から PDA を利用して着色物質のピークを特定し、そのピークについて TOF/MS から得られる精密質量情報を用いてどのような物質であるかを推定します。分析例を図-3～5 に示します。PDA により青色に特徴的な吸収波長である 500～650 nm に測定領域を絞り込むことで、複雑なマトリックス(図-3 のベースピークイオンクロマトグラム)から、ごく微量の青色色素由来の単一ピーク①(図-3 の PDA)を確認することができました。TOF/MS によるマスペクトル(図-5)から、ピーク①から検出された  $m/z$  749.2 及び 766.2 が青色 1 号の脱金属体(モノアイソピック質量数: 748.15)の $+H^+$ 体(749.2)及び $+NH_4^+$ 体(766.2)と一致したことから、青色一号であることを特定しました。弊財団では、検索性をあげるために合成色素の MS で観測される組成式のデータベースを作成しています。

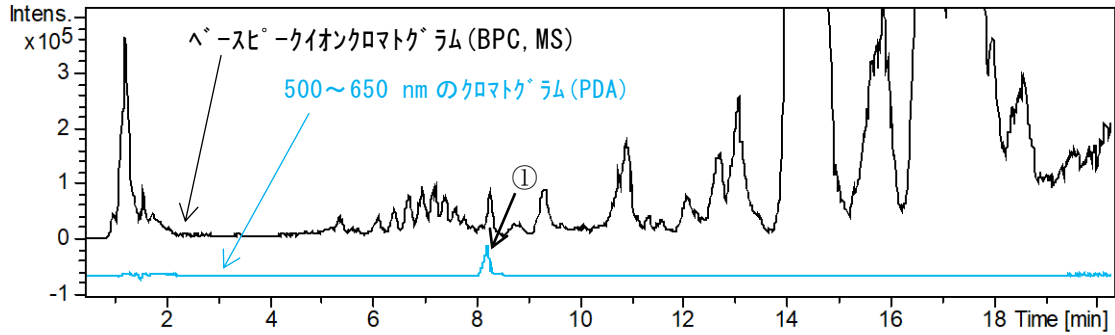


図-3 BPC (MS) 及び青色に特徴的な吸収波長 500~650 nm のクロマトグラム

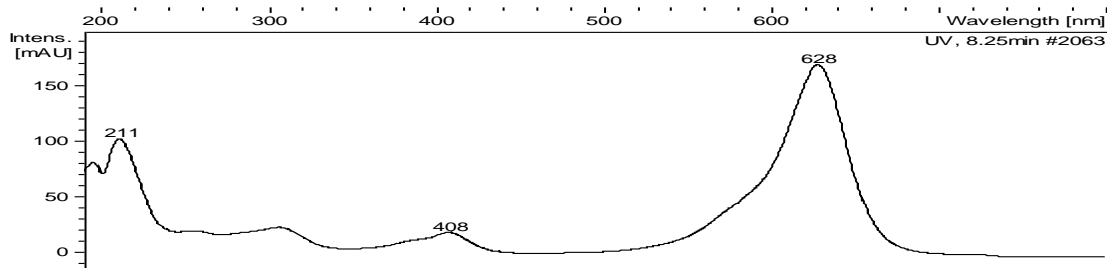


図-4 ピーク①の紫外可視吸収スペクトル

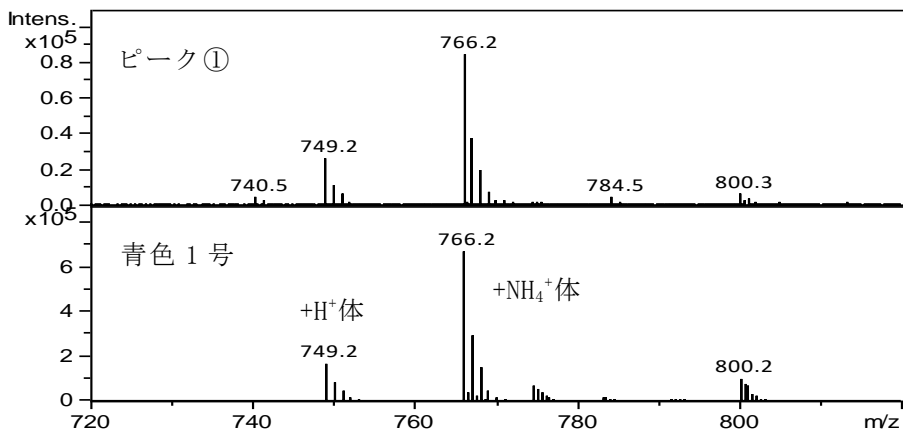
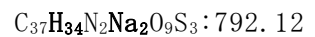
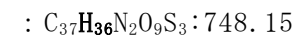


図-5 ピーク①及び青色 1 号のマスペクトル

青色 1 号の組成式<sup>4)</sup>及び  
モノアイソトピック質量



脱金属塩組成式及び  
モノアイソトピック質量



### ダイレクトプローブ-TOF/MS 法による有機顔料の検索例

通常、有機顔料の分析には FT/IR や元素分析が利用されます。その他、微量のサンプルをガラス棒の先端につけ、APCI(大気圧化学イオン化)プローブ内で加熱し、気化させた後、コロナ電流により直接イオン化するダイレクトプローブ-TOF/MS 法が適用できる場合があります。一例として、青色のポリエチレン (PE) 樹脂を加熱還流により樹脂ごと強制溶出し、青色部分を取り出してダイレクトプローブ-TOF/MS 法により確認した事例を示します。得られた溶解物を 350℃に加熱してイオン化したところ、ポリエチレン (PE) などの樹脂成分由来のピークが多数イオン化され、色素由来の情報が明確に確認できませんでした (図-6)。そこで、樹脂成分の影響を除くためあらかじめ 350℃で樹脂成分を熱脱着させた後、イオン源温度を 390℃に上げてマスペクトルを測定することで、青色 404 号由来のイオン(青色 404 号の組成式  $C_{32}H_{16}CuN_8$ <sup>4)</sup> から求めたモノアイソトピック質量:575.0794)を確認することができました (図-7)。

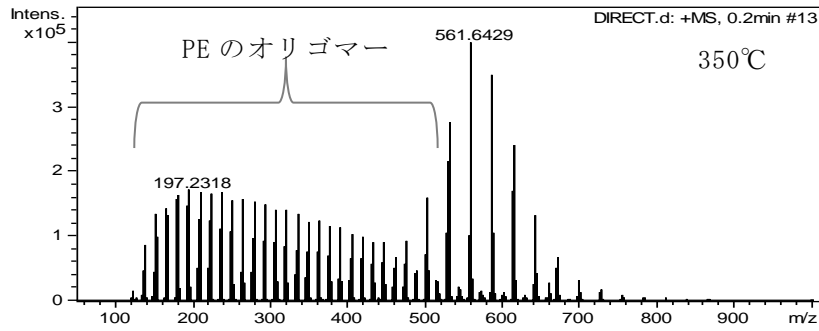


図-6 青色ポリエチレン樹脂由来のマススペクトル

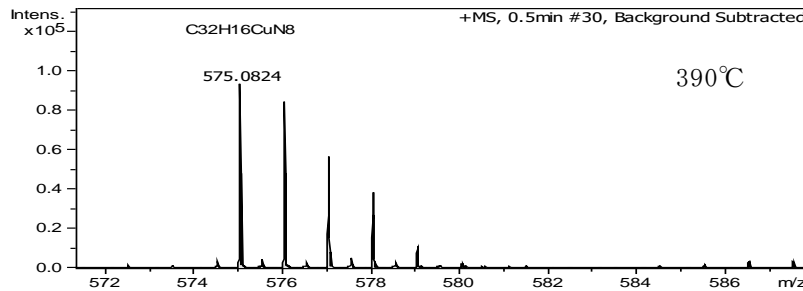


図-7 青色ポリエチレン樹脂の熱脱着後のマススペクトル ( $m/z$  575 付近の拡大)

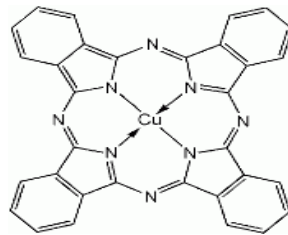


図-8 フタロシアニンブルー(青色 404 号)の構造式<sup>4)</sup>

## おわりに

着色や変色には様々な要因が想定されるため、原因究明に至らないことも多い難易度の高い試験です。弊財団では、これまで培ってきた、微生物から有機、無機に至るまでの既存の分析手法に加えて、色について選択性の高い LC-PDA-TOF/MS といった最新の分析機器を駆使し、着色や変色の原因究明率の向上に努めております。

着色や変色の発生でお困りの際には、是非ご相談ください。サンプルをお預かりできれば、より具体的な試験内容をご説明させて頂くことができます。

## 参考資料

- 1) 中澄博行, 福井寛 著: トコトンやさしい染料・顔料の本, 日刊工業新聞社
- 2) 藤井正美 監修, 清水孝重, 中村幹雄 著: 新版・食用天然色素, 光琳
- 3) 木村進, 中林敏郎, 加藤博通 編著: 食品の変色の化学, 光琳テクノブックス 18
- 4) 日本化粧品工業連合会 編: 法定色素ハンドブック 改訂版, 薬事日報社(2004)