The Japan Society for Analytical Chemistry

BUNSEKI KAGAKU Vol. 45, No. 9, pp. 865-871 (1996)

報　文

カーボン充てんカラムを用いるイオンクロマトグラフィーによる色素中の塩化物，臭化物及び硫酸塩の定量

岡本　利光®*,**，磯崎　昭徳*，長島　潜**

Determination of chloride, bromide and sulfate in color additives by ion chromatography on ceramic carbon column

Toshimitsu OKAMOTO*,**, Akinori ISOZAKI* and Hisomu NAGASHIMA**

*Department of Industrial Chemistry, College of Science and Technology, Nihon University, 1-8-14, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101
**Product Development Laboratories, Sankyo Co., Ltd., 1-2-58, Hiro-machi, Shinagawa-ku, Tokyo 140

(Received 29 March 1996, Accepted 12 May 1996)

A method for the determination of chloride, bromide and sulfate in color additives used in drugs and cosmetics (D&C colors) by ion chromatography on a ceramic carbon column was developed; the method was applied to the determination of chloride, bromide and sulfate in D&C colors both by the direct injection method and by an oxygen-flask-combustion method. In the direct injection method, 50 mg of a sample was dissolved in 500 ml of water which was then passed through a Toyopak IC-SP cartridge. In the oxygen-flask-combustion method, several mg of a sample were burned in an oxygen-filled flask containing 20 ml of 2 mM NaOH and 100 μl of 5% NH_2NH_2 for determination of bromine, 20 ml of 2 mM NaOH, and 100 μl of 1% H_2O_2 as an absorbent for determination of sulfur, and water added to make 100 ml. A 20-μl aliquot of each sample solution was injected into a ceramic carbon column and eluted with 5% acetonitrile containing 2 mM Na_2CO_3 and 1 mM tetrabutylammonium hydroxide, under the following operating conditions: flow rate, 0.8 ml/min; column temperature, 40°C; scavenger, 12.5 mM H_2SO_4. The content of chloride, bromide and sulfate in D&C colors by the direct injection method was found to be lower than 4.3, 1.4 and 0.4%, respectively. The amount of dye molecules determined from total bromine or total sulfur by the oxygen-flask-combustion method was in good agreement with that determined by the titration method or the gravimetric method as directed in The Japanese Standard of Cosmetic Ingredients.

Keywords : chloride; bromide; sulfate; color additives; ceramic carbon column for ion chromatography; tetrabutylammonium.

1 緒　言

一般に，塩化物及び硫酸塩は食品衛生上，混入されていてもほとんど問題がない．しかし，色素製造の際塩析及び中和工程より混入し，精製の程度を知る指標として

* 日本大学理工学部工業化学科：101　東京都千代田区神田駿河台 1-8-14
** 三共(株)第一生産技術研究所：140　東京都品川区広町 1-2-58

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

重要である．又，臭化物に関しては多量に摂取した場合は，けん怠感やめまいを引き起こす原因となるが，色素中に残存する程度では塩化物及び硫酸塩と同様に精製の程度を知る指標と考えることができる．以上の理由により食用色素においては，食品添加物公定書によりイオンクロマトグラフィー（以下 IC と略記）による純度試験が定められている[1]．しかし，外用医薬品及び化粧品用色素を規制する，“医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令”（以下省令と略記）では[2]，塩化物及び硫酸塩の定量は煩雑な操作を伴う滴定法や重量法が用いられ，臭化物に関しては特に定量法が定められていない．又，通常の IC ではイオン交換樹脂カラムが用いられ，色素本体が基材及びサプレッサー[3]にかなり吸着し，カラム及びサプレッサー寿命の点でプレカラム法[3)4)]やカラムスイッチング法[5]などの解決策を必要とする．

これらを解決するために，既報[6)7)]ではあらかじめドデシルベンゼンスルホン酸（以下 DBS と略記）をカーボン充てんカラムにコーティングし，カーボン充てん剤の吸着性を抑え，有機化合物中及び食用色素中のヨウ素の定量を行い良好な結果を得た．本研究では，これまでの基礎研究[8]及び既報[6)7)]を基に食用色素より種類の豊富な，外用医薬品及び化粧品用色素中の微量塩化物，臭化物及び硫酸塩の定量を行った．その結果，試料の前処理カートリッジでは捕集しきれなかった大部分の色素本体を，カーボン充てんカラムに捕集し，前処理法を補うことができた．又，酸素フラスコ燃焼法を用いて総臭素及び硫黄を定量し，間接的に純色素含量を求めた．得られた純色素含量は，省令による滴定法又は重量法の値とよく一致した．更に，数か月に一度カラムをアセトニトリル 100% を用いて洗浄することによって，約 1 年間にわたり精度よく色素中の塩化物，臭化物及び硫酸塩の定量をすることができたので報告する．

2 実　　験

2・1 装　置

イオンクロマトグラフは，東亜電波製 5200 型イオンクロマトグラフ，カラム恒温槽に同社製 ICA-5032 型カラム恒温槽，分離カラムに Bio Tech Research 製カーボン充てんカラム Carbon BI-01（4.6 mm i.d.×10 cm，粒子径平均 3 μm，炭素含量 99.5% 以上），サプレッサーに Dionex 製アニオンマイクロメンブランサプレッサー（AMMS-MPIC）及び日立製作所製データ処理装置 D-2500 を用いて構成した．又，試料前処理カートリッジは東ソー製 Toyopak IC-SP（強陽イオン交換ゲル充てん，ゲル量 1 ml），酸素燃焼フラスコは白金製バスケット付き，500 ml パイレックス製フラスコを用いた[9]．

Table 1 Operating conditions for ion chromatography

Column	Carbon BI-01 (4.6 mm i.d.×10 cm, Bio Tech Research)
Eluent	1 mM TBA-2 mM Na_2CO_3-5%CH_3CN
Column temperature	40°C
Flow rate	0.8 ml/min
Injection volume	20 μl
Suppressor	AMMS-MPIC (Dionex)
Scavenger	12.5 mM H_2SO_4
Detection	conductivity

TBA: tetrabutylammonium hydroxide

2・2 試　薬

溶離剤の炭酸ナトリウム溶液は和光純薬製特級品より調製し，適当な濃度に希釈して使用した．又，アセトニトリルは同社製 HPLC 用を，抱水ヒドラジンは同社製特級品を用いた．

標準試料溶液（Cl^-，Br^- 及び SO_4^{2-}）はいずれも和光純薬製特級品のナトリウム塩を用いて調製した．

イオン対試薬は Dionex 製 0.1 M 水酸化テトラブチルアンモニウム（TBA）をその都度，希釈して用いた．

2・3 測定条件

IC の測定条件を Table 1 に示す．なお，今回の実験では I^- を含まないため，DBS によるカラムコーティングは省略した．又，塩化物，臭化物及び硫酸塩含量は，あらかじめ既知濃度の標準溶液より最小二乗法に基づき作成した検量線から求めた．

2・4 定量操作

2・4・1 試料溶液の直接導入法　色素中に塩（解離型）として存在する塩化物，臭化物及び硫酸塩の定量は，次の方法により行った．試料 50 mg を 500 ml メスフラスコに正確に量り取り，水で溶解及び定容とした後，この液約 3 ml を取り，あらかじめ水洗した Toyopak IC-SP カートリッジを通し，最初の 1 ml を捨て，次いで得た液を試料溶液とした．

2・4・2 酸素フラスコ燃焼法　解離型及び色素構造式中の Br 及び S（結合型）を含む総量を求めるために，試料 4～11 mg を正確に量り取り，あらかじめ吸収

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

液を加えた酸素フラスコ中で燃焼後，よく振り混ぜ，20 分間放置して吸収させた．次いで，水を加えて 100 ml とし，試料溶液とした．なお吸収液は，有効な種々な溶液が知られているが[3]，臭素の定量は抱水ヒドラジンを添加した水酸化ナトリウム溶液（5% $NH_2NH_2 \cdot H_2O$ 100 μl-2 mM NaOH 20 ml），硫黄の定量では過酸化水素溶液（1% H_2O_2 100 μl-2 mM NaOH 20 ml）を用いた．

3　結果及び考察

3・1　塩化物，臭化物及び硫酸塩の分析精度

各イオンにつき，0.2，1.0，10.0，20.0 及び 50.0 μg/ml（計 5 点）の標準溶液 20 μl を，ループインジェクターにより注入し，検量線を作成するとともに，各 20 μg/ml の標準溶液を繰り返し 10 回注入したときの再現性をピーク面積法により調べた．又，検出限界は，注入量 20 μl，$S/N=3$ とし，それぞれ標準溶液濃度を下げていったときのピーク高さ（S）と，ベースラインのノイズ幅（N）の比より求めた．得られた結果を Table 2 に示す．3 種イオンの相関係数（r）はいずれも 0.9995 以上の良好な直線性が得られ，繰り返し注入による相対標準偏差（RSD, $n=10$）は 0.46～0.78%，検出限界においては 0.5～2.0 ng/ml であった．

Table 2　Precision of ion chromatography on peak area measurements

Anion	Concentration/ μg ml^{-1}	Linearity/ $r(n=5)$	Reproducibility		Detection limit/ ng ml^{-1}
			μg ml^{-1}	RSD, % ($n=10$)	
Cl^-	0.2～50.0	0.9997	20	0.78	0.5
Br^-	0.2～50.0	0.9995	20	0.46	2.0
SO_4^{2-}	0.2～50.0	0.9997	20	0.53	2.0

3・2　添加回収率

試料溶液の直接導入法において，溶解・定容前にそれぞれ試料に塩化物，臭化物及び硫酸塩の既知量を添加し，回収率を求めた．試料濃度は，当初，食品添加物公定書に定められたタール色素試験法の塩化物及び硫酸塩に準じ，1 mg/ml となるように調製した．又，回収率に用いた標準溶液は試料に対し 1% 相当量添加した．繰り返し 6 回の測定を行った結果，塩化物及び臭化物では 100% と良好な結果を示したが，硫酸塩のみ 90～95% と低めの値を示した．又，前処理カートリッジを使用しない場合の回収率も同様に測定したが，同じ値を示した．

硫酸塩のみ回収率が低い原因は，色素本体への吸着が考えられる．そこで解離を促進させれば回収率は改善されると考え，0.01 M NaOH 溶液を溶媒とし，pH を

Table 3　Recovery tests of chloride, bromide and sulfate by direct injection method

Sample	Cl^-			Br^-			SO_4^{2-}		
	Added/ μg ml^{-1}	Found/ μg ml^{-1}	Recovery, %	Added/ μg ml^{-1}	Found/ μg ml^{-1}	Recovery, %	Added/ μg ml^{-1}	Found/ μg ml^{-1}	Recovery, %
Acid red 92	0	1.512		0	0.724		0	0.010	
	0.25	1.766	101.6	0.05	0.773	98.0	0.05	0.056	92.0
	1.50	3.042	102.0	0.30	1.023	99.7	0.30	0.301	97.0
	7.50	9.027	100.2	1.50	2.227	100.2	1.50	1.482	98.7
Acid red 87	0	2.198		0	1.433		0	0.125	
	0.25	2.453	102.0	0.05	1.482	98.0	0.05	0.169	88.0
	1.50	3.695	99.8	0.30	1.732	99.7	0.30	0.411	95.3
	7.50	9.736	100.5	1.50	2.932	99.9	1.50	1.595	98.0
Acid red 33	0	0.793		0	0		0	0.126	
	0.25	1.048	102.0	0.05	0.05	100.0	0.05	0.171	90.0
	1.50	2.288	99.7	0.30	0.298	99.3	0.30	0.415	96.3
	7.50	8.278	99.8	1.50	1.533	102.2	1.50	1.584	97.2
Food red 1	0	1.332		0	0		0	0.431	
	0.25	1.585	101.2	0.05	0.049	98.0	0.05	0.474	86.0
	1.50	2.830	99.9	0.30	0.298	99.3	0.30	0.723	97.3
	7.05	8.907	101.0	1.50	1.503	100.2	1.50	1.901	98.0

Color additives solution: 100 μg/ml in water.　Each value represents average of 3 trials.

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

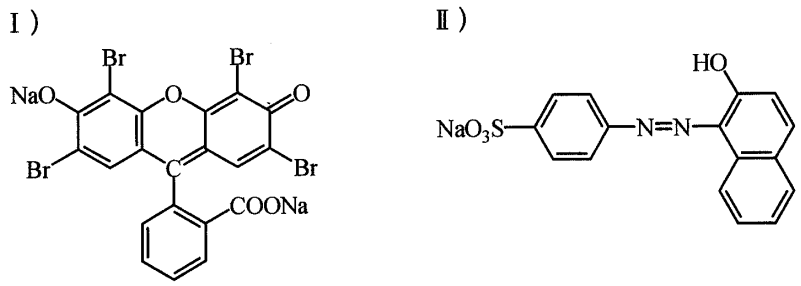

Fig. 1 Structures of color additives for drugs and cosmetics (D&C colors)
I) Acid red 87, II) Acid orange 7

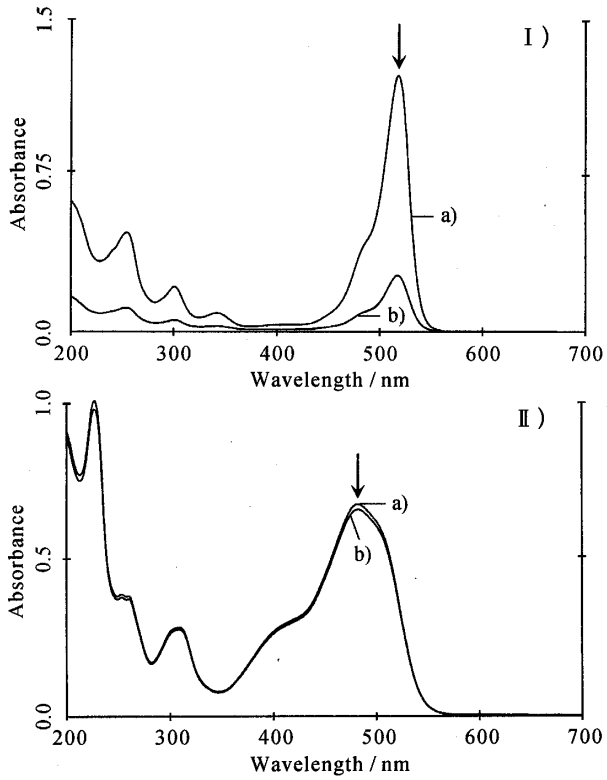

Fig. 2 Absorption spectra of D&C colors
I) Acid red 87: concentration 10.7 μg/ml; II) Acid orange 7: concentration 10.9 μg/ml. a) sample solution (not treated), b) sample solution passed through a Toyopak IC-SP cartridge.

約 12 に保って回収率を求めた．しかし，水を溶媒とした場合と変わらず 90～95% であった．次に吸着現象は，試料に対する水量の比を上げれば色素量の減少に伴い吸着が抑制され，改善されると考えた．試料濃度は定量限界や操作性などを考慮し，0.1 mg/ml となるように調製し，標準添加量を変化させて回収率を再度求めた．結果を Table 3 に示す．塩化物及び臭化物は，各濃度においてほぼ 100% と良好な結果を示した．又，

Table 4 Experiments for the removal of D&C colors on a Toyopak IC-SP cartridge

Sample	Absorbance†) I) Sample solution not treated	II) Sample solution passed through a cartridge	(I−II)/I ×100, %
Acid red 92	0.403	0.137	66.0
Acid red 87	1.225	0.270	78.0
Acid red 33	0.639	0.631	1.3
Food red 1	0.516	0.500	3.1
Acid orange 20	0.876	0.859	1.9
Acid orange 7	0.670	0.656	2.1
Acid yellow 1	0.448	0.423	5.6
Acid black 1	0.820	0.797	2.8

†: The absorbance is determined at λ_{max} for about 10 μg/ml aqueous solution of each sample.

硫酸塩は試料に対し 0.05% 相当量添加の場合，86～92% と低めの値を示したが，0.3～1.5% 相当量では 95～99% と改善され，含量 1% 前後の純度試験における定量であることを考えると十分な結果が得られたと言える．

3・3 試料溶液の直接導入法による分析結果

3・3・1 前処理カートリッジの捕集率 解離型の塩化物，臭化物及び硫酸塩の定量は，カラム劣化を防ぐために Toyopak IC-SP カートリッジを用いて色素本体を捕集した．その結果，用いた色素 8 品目中，R-SO_3Na 塩である 6 品目はカートリッジ前後での液の色に変化が見られなかった．そこでカートリッジ前後での液を約 10 μg/ml に希釈した後，紫外-可視吸収スペクトルを測定し，吸光度からカートリッジの捕集率を調べた．試料として用いた色素の構造式の一例を Fig. 1 に，得られた吸収スペクトルを Fig. 2 に，捕集率を Table 4 に示

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

Table 5 Effect of repeated analysis on retention time, theoretical plate number and resolution

Anion	Retention time/min			Theoretical plate number			Resolution		
	I)	II)	III)	I)	II)	III)	I)	II)	III)
Cl^-	3.7	3.4	3.8	2320	2300	2310	5.2	5.1	5.2
Br^-	5.9	5.6	5.9	2910	2850	2880	11.0	10.8	10.9
SO_4^{2-}	13.0	12.7	13.1	4580	4450	4480			

I) Start injection, II) After 80 analyses of the sulfonated azo dyes, III) After column cleaning by acetonitrile

す．Acid red 92 及び Acid red 87 は，フルオレセイン骨格で R-COONa 塩である．従って，カートリッジを通すことにより，カートリッジ中で Na^+ が除去され，水に不溶な色素酸を形成し，カートリッジに捕集される．カートリッジに色素本体が捕集されることによって吸光度が大きく下がり，66% 以上もの色素本体をカートリッジに捕集することができた．しかし，ほかの R-SO_3Na 塩ではカートリッジ前後の吸光度はほとんど差がなく，大部分の色素本体がカートリッジを通り抜けてしまうことが分かった．

3・3・2 カーボン充てんカラムの耐久性 カラム充てん剤は，前処理カートリッジにより除去できなかった大部分の色素本体がカラムに導入され，大きな付加を受けることになる．しかしカーボン充てん剤は耐有機溶媒性に優れ，吸着した色素本体をアセトニトリル 100% を用いて洗浄することができる．このため定期的に洗浄することによって，繰り返し使用することができる可能性がある．そこで検討開始時の標準溶液と，カートリッジに色素本体が捕集されない R-SO_3Na 塩である色素を 80 回分析した後の標準溶液と，80 回分析終了後カラムをアセトニトリル 100% で洗浄した後の標準溶液の，保持時間，理論段数及び分離度をそれぞれ比較した．結果を Table 5 に示す．なお初期条件への平衡化に要する時間は，移動相を流してから約 30 分であり，極めて迅速に平衡化することができた．保持時間，理論段数及び分離度は，いずれの場合も差が見られなかった．更にバックグラウンドは一定で変化が見られなかったことから，カーボン充てんカラムは有機色素をカラム内に捕集し，前処理法を補いかつ色素によるサプレッサーの劣化を防ぐことができたものと考える．なおカラム洗浄時に溶出された液の色は，試料として用いた色素水溶液を濃縮したような赤褐色を発していた．

3・3・3 試料溶液の直接導入法による定量結果 8 種類の外用医薬品用及び化粧品用色素中の塩化物，臭化物及び硫酸塩は，直接導入法を用いて定量した．得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3 に，定量結果を

Table 6 Determination of chloride, bromide and sulfate in D&C colors by direct injection method

Sample	Cl^-, %	Br^-, %	SO_4^{2-}, %
Acid red 92	1.52	0.71	trace
Acid red 87	2.16	1.43	0.12
Acid red 33	0.80	n.d.	0.09
Food red 1	1.26	n.d.	0.37
Acid orange 20	1.01	n.d.	trace
Acid orange 7	1.63	n.d.	trace
Acid yellow 1	1.49	n.d.	0.41
Acid black 1	4.32	n.d.	0.18

Each sample solution of D&C colors was prepared by being passed through a Toyopak IC-SP cartridge.

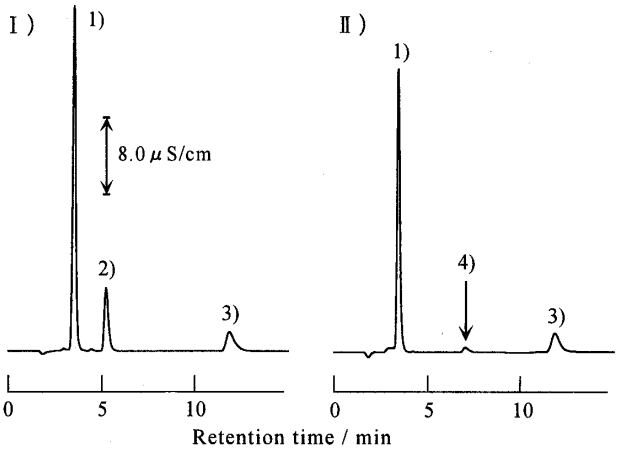

Fig. 3 Ion chromatograms of anions in D&C colors by direct injection method

I) Acid red 87; II) Acid yellow 1; Ions: 1) Cl^-, 2) Br^-, 3) SO_4^{2-}, 4 NO_3^-

Table 6 に示す．いずれの色素も塩化物が検出され，硫酸塩はほとんど検出されないものもあり，特に化合物間の傾向は見られなかった．塩化物及び硫酸塩においては必ずしも構造式と結びついた結果を示さなかった．例えば，塩化物において結合塩素を持つ Acid red 92 が

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

Table 7 Analytical results of bromine and sulfur (sulfate) in D&C colors by oxygen flask combustion method

Absorbent	Sample	Calcd., %	Found., %	Content, %	JSCI, %†	Dev., %
a)	Acid red 92	38.5(Br)	34.1	88.5	88.8	−0.3
	Acid red 87	46.2(Br)	40.4	87.5	85.3	+2.2
b)	Acid red 33	13.7(S)	11.7	85.7	87.4	−1.7
	Food red 1	13.3(S)	12.7	95.6	94.9	+0.7
	Acid orange 20	9.2(S)	8.8	95.6	94.5	+1.1
	Acid orange 7	9.2(S)	8.8	95.6	93.9	+1.7
	Acid yellow 1	9.0(S)	8.1	89.6	89.8	−0.2
	Acid black 1	10.4(S)	9.1	87.2	88.5	−1.3

a) 2 mM NaOH 20 ml+5%$NH_2NH_2 \cdot H_2O$ 100 μl, b) 2 mM NaOH 20 ml+1%H_2O_2 100 μl
† Dates obtained from the titration method or the gravimetric method of The Japanese Standard of Cosmetic Ingredients (JSCI).

1.5% なのに対し，結合塩素を持たない Acid black 1が 4.3% であった．従って，特に塩化物に関しては塩析及び中和工程より混入したものと考えられる．しかし，通常混入し得ない臭化物に関しては，製造工程のほぼ最終段階で臭素が使用される Acid red 87 及び Acid red 92 のみにおいて検出された．省令による塩化物及び硫酸塩の限度値は，Na 塩として合計値で規制され，Acid red 92，87，Food red 1，Acid orange 7 及び Acid yellow 1 の 5 品目は 5%，Acid red 33 は 10%，Acid orange 20 は 4%，Acid black 1 では 15% である．いずれの色素も省令で定められた限度値以下であった．又，前処理カートリッジを使用しない場合も同様に測定してみたが，同じ値を示した．

3・4 酸素フラスコ燃焼法による分析結果

計算に用いた元素は，使用した沪紙に含まれる塩化物の影響を避けるために臭素及び硫黄とし，酸素フラスコ燃焼法を用いて測定した．得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示す．結合臭素及び硫黄のみによる定量結果は，直接導入法によって得られた解離型の臭化物及び硫酸塩を差し引いて求めた．定量結果を Table 7 に示す．

その結果，純色素含量はそれぞれ省令による滴定法又は重量法のデータとほとんど差がなく，臭素及び硫黄含量より間接的に求めることが可能である．なお，繰り返し測定時の吸湿による変動を避けるために，直接導入法及び酸素フラスコ燃焼法共に乾燥物換算を行っている．乾燥物換算は，省令で定められた条件（135℃，6 時間）で乾燥減量を測定し，無水物に換算した．

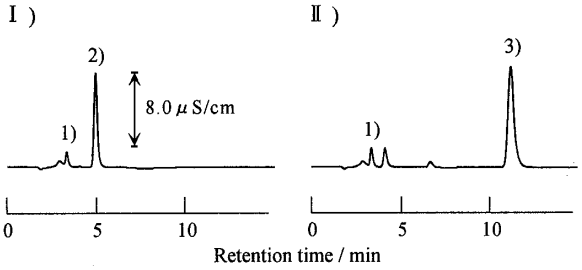

Fig. 4 Ion chromatograms of anions in D&C colors by oxygen flask combustion method
I) Acid red 87; II) Acid yellow 1; Ions: 1) Cl^-, 2) Br^-, 3) SO_4^{2-}

カーボン充てんカラムは，使用を開始して 3 年，色素に適用して 1 年を経過するが，バックグラウンドは一定で，保持時間及び理論段数等，全体的な溶離挙動に変化は認められなかった．又，耐久性の面で従来困難とされる色素など，有機化合物中の微量無機陰イオンに対し，極めて有効であることが確認された．

本研究を行うに当たり，外用医薬品及び化粧品用色素を提供していただいた癸巳化成(株)に感謝致します．

（1995 年 10 月，第 12 回イオンクロマトグラフィー討論会において一部発表）

文　献

1) 石館守三，鈴木郁生，谷村顕雄 監修，第六版食品添加物公定書解説書編集委員会編：“第六版食品添加物公定書解説書”，p. B-2 (1992)，(廣川書店)．
2) 医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令：厚生省令第 55 号 (1972)．
3) E. Sawicki, J. D. Mulik, E. Wittgenstein: “*Ion Chromatographic Analysis of Environmental Pollutants*”,

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

p. 152, 169, 171 (1978), (Ann Arbor Science Publishers, Collingwood).
4) 木村実加，梅本美佳，辻　澄子，柴田　正，山田真紀子，加藤喜昭，井上哲夫，中村幹雄，伊藤誉志男：食品衛生学雑誌，**36**, 717 (1995).
5) 山田真紀子，宮田政明，中村幹雄，柴田　正，伊藤誉志男：食品衛生学雑誌，**32**, 548 (1991).
6) 岡本利光，磯崎昭徳，長島　潜：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 65 (1996).
7) 岡本利光，磯崎昭徳，長島　潜：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 101 (1996).
8) 長島　潜，岡本利光：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 105 (1995).
9) 日本公定書協会編："第十二改正日本薬局方解説書", p. B-160 (1991), (廣川書店).

要　旨

吸着性及び耐久性の面で優れたカーボン充てんカラムを用いた IC によって，外用医薬品及び化粧品用色素中の微量塩化物，臭化物及び硫酸塩の定量を行った．Acid red 92 など，8 種実試料の塩化物，臭化物及び硫酸塩の測定結果は，それぞれ 4.3，1.4 及び 0.4% 以下であり，"医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令" で定められた限度値以下であった．又，酸素フラスコ燃焼法によって，総臭素及び総硫黄を定量し，純色素含量を求めたところ，省令による滴定法，又は重量法の値とよく一致した．カーボン充てん剤の吸着性を利用して，前処理カートリッジに捕集できなかった色素をカラム内に捕集し，前処理法を補い，かつサプレッサーの劣化を防ぐことができた．更に，数か月に一度，アセトニトリルを用いてカラム内の色素を溶出，洗浄することによって，約 1 年間にわたり精度よく測定することができた．

NII-Electronic Library Service