

短報

輸入食品中の着色料, スーダン, パラレッドの分析

岸 弘子

Analysis of Dyes, Sudan I, II, III, IV and Para Red in imported foods

Hiroko KISHI

はじめに

スーダン色素およびパラレッドは油溶性の赤色色素で、工業用や化粧品用に用いられ、食品への使用は認められていない。2003年5月にフランスで唐辛子製品からスーダンIが検出され、その後、EU諸国や中国、日本で多くの検出事例が報告され^{1,2)}、食品中の分析法も報告されている^{3,4)}。平成18年5月1日には、厚生労働省から試験法が通知された⁵⁾。当所では、輸入食品中の指定外添加物の検査を行っており、検査項目にスーダン色素およびパラレッドを追加するために、通知法を検討し、一部試験法の改良を行ったので報告する。

方法

1. 試薬等

標準品：スーダンI, II, IVおよびパラレッドはシグマ・アルドリッチ社製、スーダンIIIは東京化成工業(株)製を用いた。

逆相HPLC用標準液：スーダンI, IIおよびパラレッドは各10mgにアセトニトリルを加え100mlとし、スーダンIIIおよびIVは各10mgを20mlの酢酸エチルに溶解後、アセトニトリルを加え100mlとし、標準原液とした。各色素の標準原液5mlを採り、アセトニトリルを加えて100mlとし、逆相HPLC用混合標準液とした(各5 μ g/ml)。

順相HPLC用標準液：スーダンI, II, IIIおよびIVは各10mgを20mlの酢酸エチルに溶解後、ヘキサンを加えて100mlとし、パラレッドは10mgに酢酸エチルを加えて100mlとし、標準原液とした。各色素の標準原液2mlを採り、ヘキサンを加えて100mlとし、混合標準液とした(各2 μ g/ml)。

神奈川県衛生研究所 理化学部

〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

TLC用混合標準液：順相HPLC標準原液各2mlを混合し、TLC用混合標準液とした(各20 μ g/ml)。

前処理用カートリッジカラム：Sep-Pak Plus シリカ(690mg, Waters社製)は使用前にヘキサン10mlで、Sep-Pak Plus フロリジル(910mg, Waters社製)およびSep-Pak Plus C18(360mg, Waters社製)はアセトニトリル10mlでコンディショニングして用いた。

オクタデシル化シリカゲル(ODS)薄層板：RP-18 F254s, 10 \times 10cm, Merck社製

シリカゲル薄層板：Kieselgel 60, 10 \times 10cm, Merck社製

2. 装置

ホモジナイザー：ポリトロンPT-3100 KINEMATICA社製

吸引マニホールド：GL-SPE ジーエルサイエンス(株)社製

HPLC装置：Agilent Technologies社製1100シリーズ

3. HPLC条件

1) 逆相用

カラム：Inertsil ODS-3V 4.6mm i.d. \times 250mm(ジーエルサイエンス社製)、移動相：アセトニトリル/水(95:5)、流速：1.0ml/min、検出：フォトダイオードアレイ(PDA)検出器(波長範囲350~600nm、測定波長500, 540nm)、カラム温度：40 $^{\circ}$ C、注入量：50 μ l

2) 順相用

カラム：Inertsil SIL 4.6mm i.d. \times 250mm(ジーエルサイエンス社製)、移動相：ヘキサン/酢酸エチル(95:5)、流速：1.0ml/min、検出：PDA検出器(波長範囲350~600nm、測定波長480nm) カラム温度：40 $^{\circ}$ C、注入量：20 μ l

4. TLC条件

条件1

薄層板：ODS、展開溶媒：アセトニトリル/酢酸エチル/25%アンモニア水(80:10:10)

条件2

薄層板：ODS、展開溶媒：アセトニトリル/水(9:1)

条件3

薄層板：シリカゲル、展開溶媒：ヘキサン/キシレン/ジエチルエーテル(90:10:5)

条件4

薄層板：シリカゲル、展開溶媒：アセトニトリル飽和ヘキサン/ジエチルエーテル(9:1)

5. 試料液の調製

(1) 逆相HPLC用

油脂は、試料5gをヘキサンに溶解し100mlとした。この液10mlにヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加え5分間振とう、アセトニトリル層を分取した。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加えて同様の操作を繰り返す、全アセトニトリル層を減圧濃縮した。残

留物にヘキサン5mlを加え、Sep-Pak Plus シリカに負荷し、ヘキサン5mlで容器を洗い、この洗液を同カートリッジに負荷した。ヘキサン/ジエチルエーテル(9:1) 15mlを用いて容器を洗い、洗液を同カートリッジに負荷し、全溶出液を減圧濃縮し、窒素気流下で乾固させた後、残留物にアセトニトリル5mlを加え、0.45 μm のフィルターに通して試料液とした。

カレー粉は、試料5gをアセトニトリル50ml、無水硫酸ナトリウム10gを加えて約1分間ホモジナイズ、3000rpmで5分間遠心分離した後、アセトニトリル層を分取した。残渣にアセトニトリル30mlを加え、同様にホモジナイズ、遠心分離した後、アセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルを加えて100mlとした。この4mlをSep-Pak Plus フロリジルに負荷、アセトニトリル15mlで溶出した。全溶出液を合わせ、減圧濃縮、さらに窒素気流下で乾固し、ヘキサン5mlに溶解した。全量をSep-Pak Plus シリカに負荷し、油脂と同様に操作し、残留物にアセトニトリル2mlを加え、0.45 μm のフィルターに通して試料液とした。

その他の食品は、試料5gをカレー粉と同様にアセトニトリル抽出を行い、この4mlを減圧濃縮し、さらに窒素気流下で乾固、ヘキサン5mlに溶解し、全量をSep-Pak Plus シリカに負荷し、油脂と同様に操作し、残留物にアセトニトリル2mlを加え、0.45 μm のフィルターに通して試料液とした。

(2) 順相HPLCおよびTLC用

逆相用試料液をSep-Pak Plus C18に負荷し、さらにアセトニトリル15mlをカートリッジに負荷し、全溶出液を減圧濃縮し、窒素気流下で乾固させた後、残留物をヘキサン適量に溶解し、0.45 μm のフィルターに通して試料液とした。

6. 定 量

逆相HPLC用混合標準液にアセトニトリルを加えて0.05~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の検量線用標準液を調製した。検量線用標準液および試料液の各50 μl をHPLCに注入し、得られたピーク面積と検量線から、試料液中の各色素濃度を求めた。

7. 確 認

(1) TLC

TLC用混合標準液および試料液2 μl ずつ(試料液中の着色料の濃度により塗布量を増減)をスポットし、4種の条件で展開した後、Rf値と色調を比較して定性を行った。

(2) 順相HPLC

混合標準液および試料液の各20 μl をHPLCに注入し、得られたピークの保持時間と吸収スペクトルを比較し、定性を行った。

結果および考察

1. 標準溶液の調製

順相HPLC用およびTLC用標準原液：通知に従いヘキサンのみでの溶解を試みたが、溶解できなかった。平成17年5月11日付けの事務連絡⁵⁾では、ヘキサンやアセトニトリルに溶けにくいスーダン色素を酢酸エチルに溶解している。そこで、スーダン I, II, IIIおよびIVはあらかじめ酢酸エチルを用いて溶解させ、ヘキサンを加えて定容とした。パラレッドは酢酸エチルのみで定容とした。

TLC用混合標準液：通知ではTLCに20 μl をスポットするとされているが、20 μl では操作に時間がかかり、また、スポットが広がり形状が悪くなるため、2 μl でスポットできるように濃度を20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

2. HPLC条件の検討

通知では逆相HPLCの注入量が20 μl であるが、低濃度でのスペクトルの確認もできるように注入量を50 μl とした。注入量50 μl でもピーク形状の悪化は認められなかった。

順相HPLCでは、各色素濃度が0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でピークの保持時間とスペクトルの確認が可能であった。試料液のヘキサンを0.5mlとすると、検出限界の0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ まで確認可能となった。

3. 試料液の調製法の検討

通知法に従い、添加回収試験を行った。添加濃度は通知の検出限界0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ の2倍、1 $\mu\text{g}/\text{g}$ と精度管理濃度の5 $\mu\text{g}/\text{g}$ とした。ラー油、パーム油は油脂の方法、チリソース、カレー粉、タバスコ、中濃ソースはその他の食品の方法で試料液を調製した。結果を表1に、タバスコのHPLCクロマトグラムを図1に示した。

表1 食品からのスーダン色素及びパラレッドの回収率 (通知法)

食品	添加量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	回収率(%) [*]				
		スーダン I	スーダン II	スーダン III	スーダン IV	パラレッド
ラー油	1	85.1	93.2	92.2	87.9	87.0
	5	83.2	96.5	93.7	90.3	88.8
タバスコ	1	93.6	94.4	93.2	90.8	84.9
	5	96.3	98.7	96.8	95.6	94.7
カレー粉	1	38.0	75.6	67.9	54.6	55.0
	5	34.8	65.3	64.3	55.0	58.6
パーム油	1	97.0	95.1	90.3	95.5	94.8
	5	95.6	95.7	92.2	104.7	109.4
チリソース	1	82.2	92.6	91.5	86.9	74.2
	5	97.3	99.0	98.7	92.8	90.6
中濃ソース	1	85.7	91.5	89.8	84.6	85.3
	5	86.2	95.1	93.3	89.9	89.4

* n=1

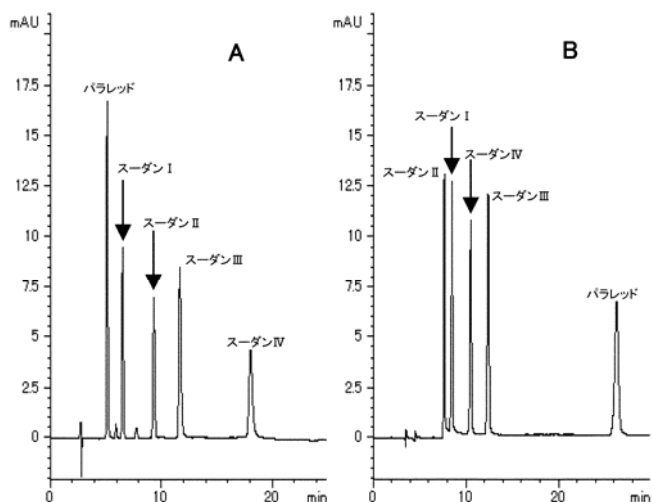


図1 タバコ中のスーダン色素及びパラレッドのHPLCクロマトグラム 添加量：各5 $\mu\text{g/g}$

(A 逆相HPLC)

カラム: Inertsil ODS-3V (4.6 mm i.d. \times 250 mm)
 移動相: アセトニトリル/水混液(95:5) カラム温度: 40°C
 流速: 1.0ml / min 測定波長: 500 nm (350~600 nm) 注入量: 50 μl

(B 順相HPLC)

カラム: Inertsil SIL 100A (4.6 mm i.d. \times 250 mm)
 移動相: ヘキサン/酢酸エチル混液(95:5) カラム温度: 40°C
 流速: 1.0ml / min 測定波長: 480 nm(350~600 nm) 注入量: 20 μl

カレー粉では回収率が低かったが、アセトニトリル抽出物にヘキサンに不溶の成分が多く、これが妨害していると推定された。フロリジルカートリッジによる処理を追加したところ、妨害成分が除かれ回収率が向上した。そこで、カレー粉については、フロリジルカートリッジを追加した前処理を行うこととした。

パーム油の500nmのクロマトグラムではスーダンIVの保持時間付近に妨害ピークがあったが(図2矢印)、540nmではピークが認められず、スペクトルの比較によりスーダンIVと異なることが確認できた。

4. 添加回収実験

ラー油、タバスコは通知法、カレー粉はフロリジル処理を追加した改良法で3回繰り返しの添加回収実験を行った。添加濃度は1 $\mu\text{g/g}$ と5 $\mu\text{g/g}$ とした。回収率は77.9~109.7%で、良好な結果が得られた(表2)。

表2 食品からのスーダン色素及びパラレッドの回収率(改良法)

食品	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率(%)*				
		スーダン I	スーダン II	スーダン III	スーダン IV	パラレッド
ラー油	1	109.7 \pm 4.9	99.5 \pm 3.3	95.6 \pm 1.5	86.0 \pm 2.2	89.5 \pm 4.0
	5	101.8 \pm 1.8	96.3 \pm 1.0	95.6 \pm 1.8	87.9 \pm 1.3	90.0 \pm 3.4
タバスコ	1	103.7 \pm 3.6	103.2 \pm 3.1	96.2 \pm 0.4	98.1 \pm 1.6	98.3 \pm 1.0
	5	103.2 \pm 2.1	102.0 \pm 1.4	99.2 \pm 0.2	101.5 \pm 0.4	99.5 \pm 0.5
カレー粉	1	96.6 \pm 0.8	90.3 \pm 0.8	82.8 \pm 1.7	86.3 \pm 1.4	85.5 \pm 3.6
	5	93.8 \pm 1.5	90.3 \pm 1.5	81.6 \pm 1.6	84.6 \pm 2.5	77.9 \pm 3.4

* 平均 \pm S.D. n=3

5. TLC

Rf値および検出限界の確認を行った。各条件でのRf値を表3に示した。通知では2 $\mu\text{g/ml}$ の標準液20 μl を使用するため、各40ngでRf値および色調を試料液と比較する。標準液を用いて、目視で確認可能な色素量を求めた

表3 スーダン色素及びパラレッドのRf値

色素名	Rf値			
	条件1	条件2	条件3	条件4
スーダン I	0.48	0.32	0.31	0.49
スーダン II	0.31	0.18	0.31	0.54
スーダン III	0.22	0.12	0.16	0.35
スーダン IV	0.13	0.07	0.19	0.42
パラレッド	0.61	0.45	0.09	0.18

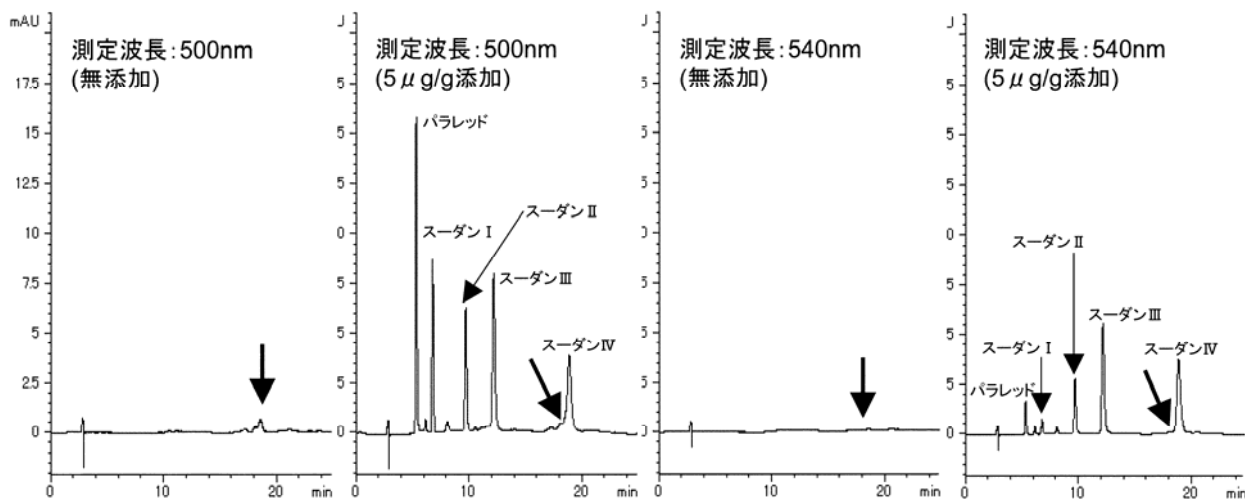


図2 パーム油のHPLCクロマトグラム(逆相HPLC)

ところ、各20ngから確認が可能であった。試料中の色素濃度が定量限界の0.5 $\mu\text{g/g}$ の時、試料液全量中に油脂では250ng、カレー粉とその他の食品では100ngの色素が含まれるため、20ng以上となるように塗布量の調整を行った。

ラー油、パーム油、チリソース、カレー粉、タバスコ、中濃ソースに、試料中1 $\mu\text{g/g}$ 濃度となるように標準液を添加した場合、食品由来妨害を受けずに確認が可能であった。

6. 市販食品の検査結果

平成17～18年度に神奈川県内で市販されていた調味料5検体、カレー2検体、カレー粉1検体、ラー油2検体、パーム油1検体についてスーダンⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳおよびパラレッドの分析を行ったところ、すべて不検出であった。

まとめ

食品中のスーダンⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳおよびパラレッドの分析法について検討した。通知法を検討し、カレー粉にフロリジルカートリッジ精製を加える等の改良法を作成した。逆相HPLCでの回収率は75%以上、定量限界は0.5 $\mu\text{g/g}$ であった。

まず、逆相HPLCで定量とピークの吸収スペクトルの

比較を行い、さらに、順相HPLCとTLCを確認に用いることにより、多様な食品への適用が可能となった。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) 四方田千佳子：唐辛子製品中の違反色素Sudan, 食品衛生学雑誌, **45**, J-229-230 (2004)
- 2) 伊藤澄夫：スーダンレッドの違反事例について, 食品衛生学雑誌, **47**, J-273-275 (2006)
- 3) 中里光男, 粕谷陽子, 松本ひろ子, 安田和夫：唐辛子を使用した加工食品中のスダンⅠ及びその同族体の分析, 東京都健康安全研究センター研究年報, **55**, 107-110(2004)
- 4) 天川映子, 萩原勉, 都田路子, 永山敏寛：TLC及びHPLCによるオイスターソース中のスダン色素の分析, 東京都健康安全研究センター研究年報, **56**, 141-144 (2005)
- 5) 「食品中のスーダン色素およびパラレッドの試験法について」(食安監発第0501007号, 平成18年5月1日付)
- 6) 「着色料の試験法について」(厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課事務連絡, 平成17年5月11日付)