

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

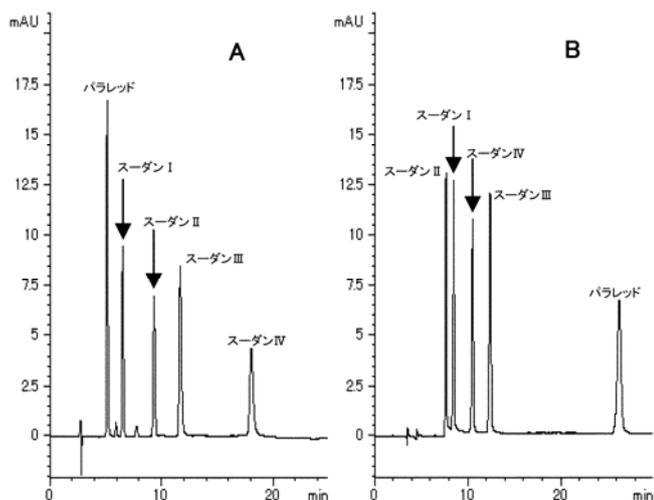


図1 タバコ中のスーダン色素及びパラレッドのHPLCクロマトグラム 添加量：各5 μ g/g

(A 逆相HPLC)

カラム:Inertsil ODS-3V (4.6 mm i.d.×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 μ l

(B 順相HPLC)

カラム:Inertsil SIL 100A (4.6 mm i.d.×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 μ l

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 μ g/gと5 μ 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(μ 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 μ g/mlの標準液20 μ l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

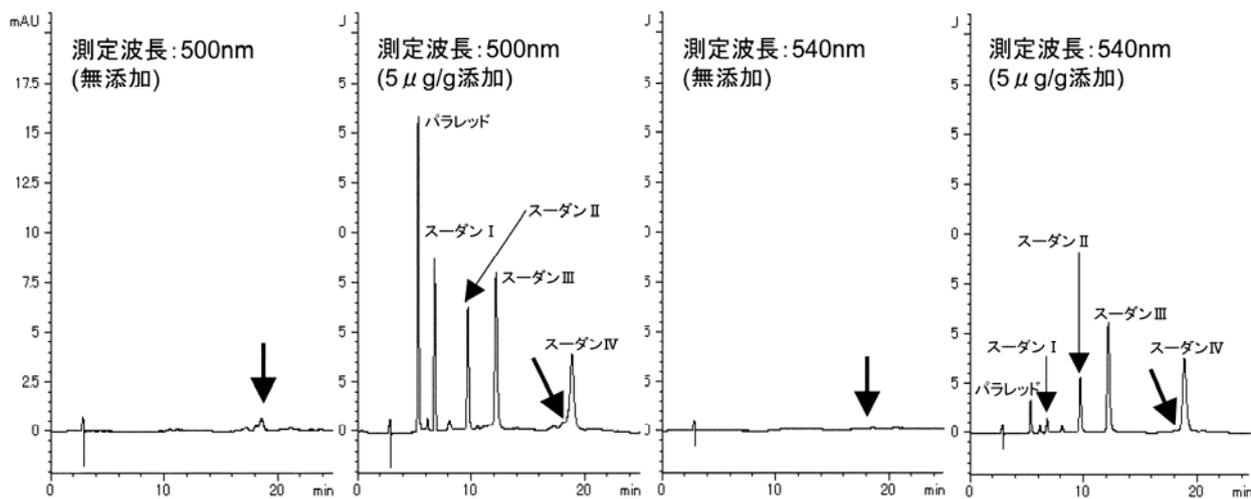


図2 パーム油のHPLCクロマトグラム(逆相HPLC)

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)