

アセトニトリル不足に対応した食品中のスーダン色素及びパラレッド試験法の検討

新藤 哲也，貞升 友紀，鈴木 敬子，田中 康一，高桑 智子，中里 光男，植松 洋子

An Alternative for the Notified Method of Sudan Dyes and Para Red Analysis in Food by Eliminating Acetonitrile Use

Tetsuya SHINDO, Yuki SADAMASU, Keiko SUZUKI, Yasukazu TANAKA, Tomoko TAKAKUWA,
Mitsuo NAKAZATO and Yoko UEMATSU

アセトニトリル不足に対応した食品中のスーダン色素及びパラレッド試験法の検討

新藤哲也*, 貞升友紀*, 鈴木敬子*, 田中康一*, 高桑智子*, 中里光男*, 植松洋子*

スーダンI～IV及びパラレッドをアセトニトリル以外の溶媒で抽出後, HPLCにより分析する方法について検討を行った. HPLC条件は移動相にメタノール・水 (49:1) を用い, 良好な分離を実現することができた. 抽出溶媒については, 油脂 (ラー油) 以外の食品ではアセトン, イソプロパノール及びエタノールを用いることでほぼ80%以上と通知法に近い回収率を得ることができた. しかし, 油脂 (ラー油) については検討した液々分配を用いた方法及び溶媒を冷凍処理する方法のいずれもスーダンIIIとIVで回収率が60%前後と低く, 今後さらなる検討が必要であると考えられた.

キーワード: アセトニトリル不足, 食品, スーダン色素, パラレッド, 未指定添加物, 通知法, 抽出溶媒, 液々分配, 高速液体クロマトグラフィー

はじめに

未指定添加物は国内では安全性に問題がある等の理由で許可されていない添加物であり, 食品中から検出されれば食品衛生法¹⁾違反となる. したがって, 輸入食品検査における未指定添加物のための適切な試験法の開発が不可欠となっている. 一方, 一昨年アセトニトリルの入手が困難な状況²⁾となり, 厚生労働省の通知法が示されている未指定添加物検査の中で, アセトニトリルを多用するサイクラミン酸³⁾やスーダン色素⁴⁾等の試験が実施困難な状況に陥った. アセトニトリル不足に対応した試験法としては, サイクラミン酸については箕川らの方法⁵⁾が報告されており, スーダン色素及びパラレッドの試験法については植松らにより抽出やHPLCの移動相にTHFを用い, 油脂を脂肪酸のトランスメチル化により除去する方法⁶⁾が示されている. 今回スーダン色素及びパラレッドの試験法として, アセトニトリル, THF以外の溶媒を用いて抽出後, HPLCで分析する方法について検討し, 若干の知見を得たので以下に報告する.

実験方法

1. 試料

東京都内で購入したカレールー, パブリカパウダー, ポテトチップス, キムチ, ラー油 (以上国産), とり唐揚げ (中国産), タンドリーペースト (オーストラリア産), チリソース (タイ産) を試料とした.

2. 標準品及び試薬

1) 標準品

スーダンI, II (以下図での表記はI及びII) は関東化学 (株) 製, スーダンIII, IV (以下図での表記はIII及びIV) 及びパラレッド (以下図での表記はP.R.) は東京化成工業 (株) 製を用いた.

2) 添加用標準溶液

標準品各10 mgを正確に量り, それぞれアセトンを加えて正確に100 mLとし, 添加用標準原液とした. 各標準原液10 mLを正確に量り混合した後, アセトンを加えて正確に100 mLとし, 添加用標準溶液とした (本液1 mLは各色素10 µgを含む).

3) 検量線用標準溶液

標準品各10 mgを正確に量り, それぞれエタノールを加えて正確に100 mLとし, 標準原液とした. なおスーダンIIIとIVはエタノールに溶けにくかったため, あらかじめ酢酸エチル20 mLに溶解後, エタノールで100 mLとした. 各標準原液5 mLを正確に量り混合した後, エタノールを加えて正確に100 mLとし, 検量線用標準原液とした. 検量線用標準原液5, 10, 20 mLを正確に採り, それぞれエタノールを加えて正確に100 mLとした (これらの液1 mLはそれぞれ各色素を0.25, 0.5, 1 µg含む).

4) 抽出溶媒 (ラー油以外の食品)

アセトン, 2-プロパノール, エタノール, メタノール及び通知法で使用されるアセトニトリルを含めた5種類を用いた.

5) 抽出溶媒 (ラー油)

液々分配を用いた方法 (以下液々分配法) 用の溶媒はメタノール, 溶媒を冷凍処理する方法 (以下凍結法) 用の溶媒はアセトン・エタノール混合溶媒 (1:1) 及び (2:3) を用いた.

また, HPLCの移動相にはHPLC用溶媒を, その他試薬は特級を用いた.

3. 装置

HPLC装置 (ポンプ, 脱気装置, カラムオーブン, オートサンプラー及びPDA検出器) はアジレントテクノロジー社製のAgilent 1200シリーズを用いた.

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科

4. 試料への添加方法

添加用標準溶液2.5 mLを分析毎に各試料へ添加後、水浴60°Cで30分加熱してアセトン除去し、分析に供した。

なお、試料当たりの添加量はいずれも5 µg/g (n=3) とした。

5. 試験溶液の調製

1) ラー油以外の食品

Fig. 1に示した。試料約5 gを100 mLの遠沈管に精密に量り、抽出溶媒50 mL、無水硫酸ナトリウム10 gを加えて約1分間ホモジナイズした。3,000 rpmで5分間遠心分離した後、溶媒層をメスフラスコに分取した。残渣に抽出溶媒30 mLを加え、約1分間ホモジナイズした後、3,000 rpmで5分間遠心分離した。溶媒層を先のメスフラスコに合わせ、抽出溶媒を加えて100 mLとした。この液4 mLを10 mLのナスフラスコに正確に量り、40°Cで減圧濃縮した。残留物にヘキサン5 mLを加え、あらかじめ10 mLのヘキサンを通してコンディショニングしたシリカゲルカートリッジ (Sep-Pak Plus Silica 690 mg) に負荷した。さらにヘキサン5 mLでナスフラスコを洗い、この洗液を同カートリッジに負荷した。その後、ジエチルエーテル・ヘキサン (1:9) 15 mLを用いてナスフラスコを洗い、洗液をカートリッジに負荷し、全溶出液を合わせた。40°Cで減圧濃縮し、窒素気流下で乾固させた後、残留物にエタノール2 mLを正確に加え、0.45 µmのフィルターを通して試験溶液とした。

2) ラー油

(1) 液々分配法

Fig. 2に示した。試料約5 gを精密に量り、ヘキサンに溶解し、正確に100 mLとした。この液10 mLを100 mLの分液ロートに正確に量り入れた。これにヘキサン飽和メタノール30 mLを加え、5分間振とうした後、静置し、メタノール層を200 mLのナスフラスコに移した。ヘキサン層にヘキサン飽和メタノール30 mLを加えて同様の操作を繰り返し、全メタノール層を先のナスフラスコに合わせ、40°Cで減圧濃縮した。残留物にヘキサン5 mLを加え、あらかじめ10 mLのヘキサンを通してコンディショニングを行ったシリカゲルカートリッジ (Sep-Pak Plus Silica 690 mg) に負荷した。さらにヘキサン5 mLでナスフラスコを洗い、この洗液を同カートリッジに負荷した。その後、ジエチルエーテル・ヘキサン (1:9) 15 mLを用いてナスフラスコを洗い、洗液をカートリッジに負荷し、全溶出液を合わせた。40°Cで減圧濃縮し、窒素気流下で乾固させた後、残留物にエタノール5 mLを正確に加え、0.45 µmのフィルターを通して試験溶液とした。

(2) 凍結法

Fig. 3に示した。試料約5 gを精密に量り、凍結法用溶媒に溶解し、正確に100 mLとした。-20°Cで一晩放置後、この液10 mLを正確に量り、40°Cで減圧濃縮した。残留物

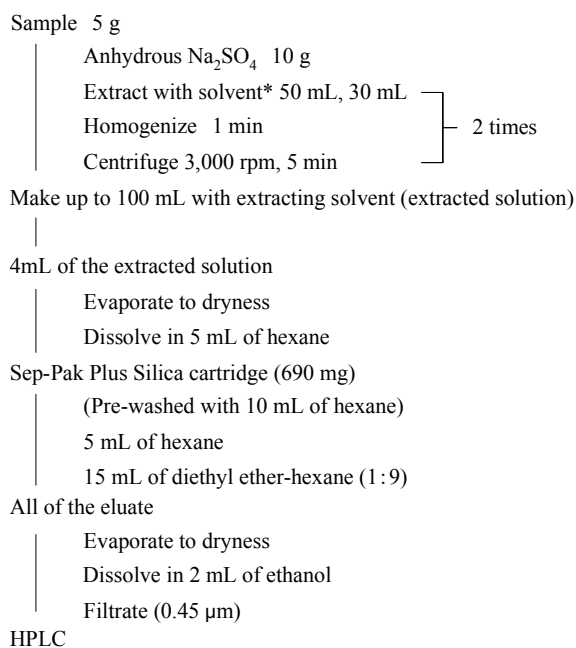


Fig. 1. Analytical Procedure of Sudan Dyes and Para Red in Food Except Spicy Oil

*Extracting solvent : methanol, ethanol, isopropanol or acetone

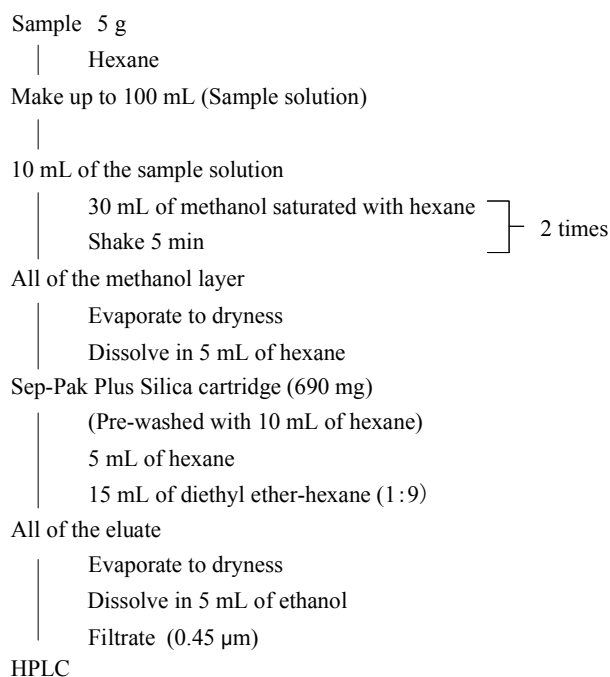


Fig. 2. Analytical Procedure of Sudan Dyes and Para Red in Spicy Oil (Liquid-liquid Distribution Cleanup)

にヘキサン5 mLを加え、あらかじめ10 mLのヘキサンを通してコンディショニングを行ったシリカゲルカートリッジ (Sep-Pak Plus Silica 690 mg) に負荷した。さらにヘキサン5 mLでナスフラスコを洗い、この洗液を同カートリッジに負荷した。その後、ジエチルエーテル・ヘキサン (1:9) 15 mLを用いてナスフラスコを洗い、洗液をカートリッジに負荷し、全溶出液を合わせた。40°Cで減圧濃縮し、窒素気流下で乾固させた後、残留物に2-プロパノール5 mLを正確に加え、0.45 μ mのフィルターを通して試験溶液とした。

Sample 5 g
 | Acetone-ethanol (1:1) or (2:3)
 Make up to 100 mL (Sample solution)
 | Keep at -20°C overnight
 10 mL of the sample solution
 | Evaporate to dryness
 | Dissolve in 5 mL of hexane
 Sep-Pak Plus Silica cartridge (690 mg)
 | (Pre-washed with 10 mL of hexane)
 | 5 mL of hexane
 | 15 mL of diethyl ether-hexane (1:9)
 All of the eluate
 | Evaporate to dryness
 | Dissolve in 5 mL of isopropanol
 Filtrate (0.45 μ m)
 HPLC

Fig. 3. Analytical Procedure of Sudan Dyes and Para Red in Spicy Oil (Cleanup by solidification of oil at -20°C)

6. HPLC条件

Table 1に示した。

Table 1. HPLC Conditions of Sudan Dyes and Para Red

Column	Inertsil ODS-3*(4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μ m)
Mobile phase	Methanol-water (49:1)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	40°C
Detector	PDA (520 nm)
Injection volume	20 μ L

*: GL science

結果及び考察

1. HPLC条件の検討

1) 分析カラムの検討

はじめにカラムの選択を行うため、通知法に示されたアセトニトリル・水 (95:5) を移動相とし、Cosmosil 5C18-AR-II (ナカライテスク)、L-column ODS (化学品検査協会) 及びInertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス) の3種の分析カラム (いずれも4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μ m) を用いて検討を行った。その結果、Fig. 4に示したようにCosmosil 5C18-AR-II及びL-column ODSを用いた場合、スーダンIII及びIVでピークにテーリングがみられたため、分析カラムはInertsil ODS-3を用いることとした。

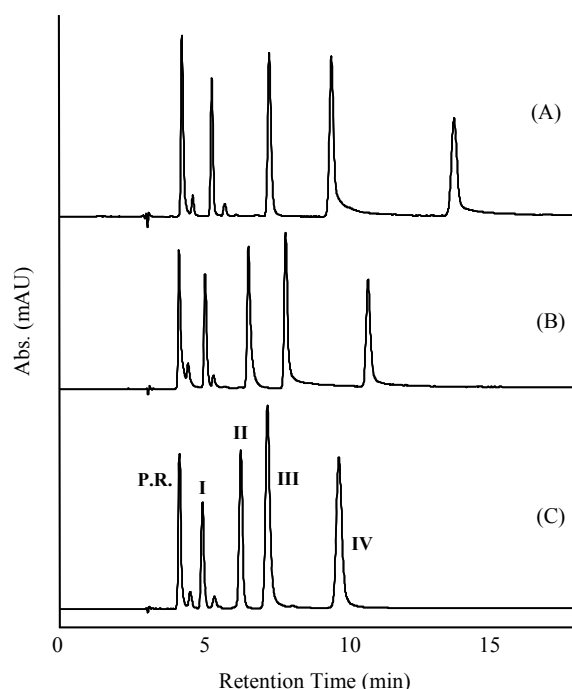


Fig. 4. Effect of HPLC Column on HPLC Chromatograms of Sudan I ~ IV and Para Red
 Concentration of dyes : 1 μ g/mL
 HPLC column : Cosmosil 5C18-AR-II (A), L-column ODS (B), Inertsil ODS-3 (C) (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μ m)
 Mobile phase : acetonitrile-water (95:5), other HPLC conditions were same as Table 1.

2) 移動相の検討

移動相溶媒としてのエタノールや2-プロパノールはカラムの圧力が高くなるため、カラム圧が低く抑えられる溶媒として一般的によく使われるメタノールを主溶媒として検討 (以下、流速はいずれも1 mL/min) を行った。はじめにメタノール・水 (95:5) を用いて分析を行ったところ、スーダンI~IV及びパラレッドが溶出するのに40分以上を要した。次に、Fig. 5(A)に示したようにメタノールのみを移動相に用いて分析したところ、いずれも20分以内に溶出され、5種のピークの分離も良かったが、

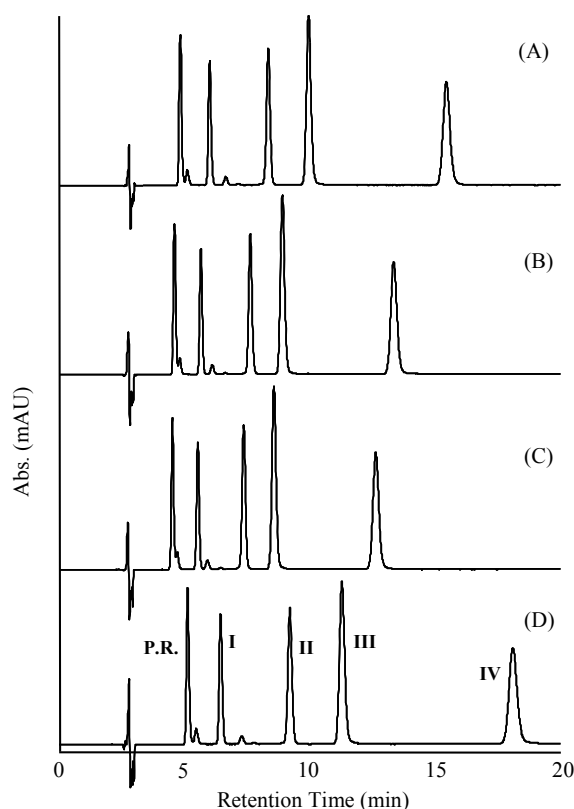


Fig. 5. Effect of Mobile Phase on HPLC Chromatograms of Sudan I ~ IV and Para Red
Concentration of dyes : 1 $\mu\text{g/mL}$
Mobile phase : methanol (A), methanol-ethanol (9:1) (B), methanol-isopropanol (9:1) (C), methanol-water (49:1) (D), other HPLC conditions were same as Table 1.

パラレッドとそのすぐ後に溶出されるスーダンIIIに含まれる副成分と思われるピークとの分離がやや不十分であった。そこで、Fig. 5 に示したようにメタノール・エタノール系(B)，メタノール・2-プロパノール系(C)，メタノール・水系(D)で検討したところ、パラレッドとスーダンIIIに含まれる副成分と思われるピークとの分離はエタノール、2-プロパノールを混合することによりさらに悪化した。水を混合することにより分離は良好となった。その組成について種々検討した結果から、20分以内に5種のピークが溶出される、メタノール・水(49:1)を移動相として用いることとした。

以上の結果から、移動相にメタノール・水(49:1)を用いて、再度3種の分析カラムで検討を行ったところ、Fig. 6に示したようにInertsil ODS-3を用いた場合に、ピークの形状及びスーダンIIIとIVに含まれる副成分と思われるピークとの分離が良好であった。

3) 検出限界及びスペクトルによる確認限度

本法における検出限界は通知法と同様に試験溶液として0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、試料当たり0.5 $\mu\text{g/g}$ であった。

また、PDAスペクトルによる確認限度はスーダンI~IV及びパラレッドのいずれも試験溶液として0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、

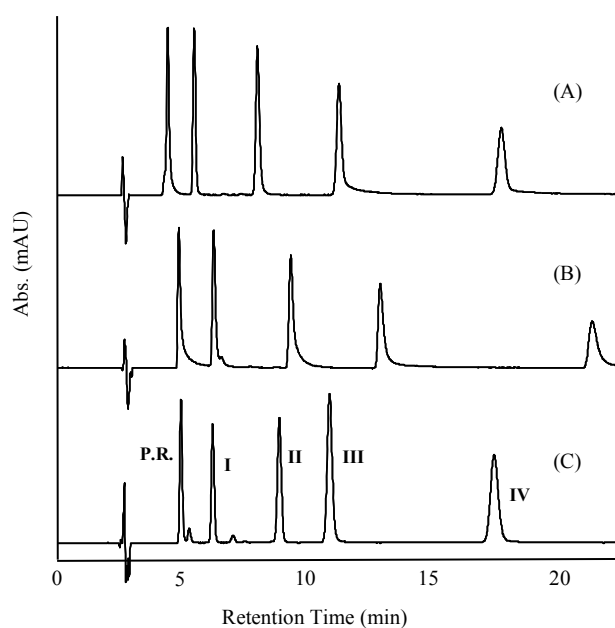


Fig. 6. Effect of HPLC Column on HPLC Chromatograms of Sudan I ~ IV and Para Red
Concentration of dyes : 1 $\mu\text{g/mL}$
HPLC column : Cosmosil 5C18-AR-II (A), L-column ODS (B), Inertsil ODS-3 (C) (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm)
HPLC conditions were same as Table 1.

試料当たり1 $\mu\text{g/g}$ であった。Fig. 7に本法と通知法におけるPDAスペクトルを示した。いずれの色素も極大吸収波長がやや異なったが、スペクトルパターンはほぼ一致した。

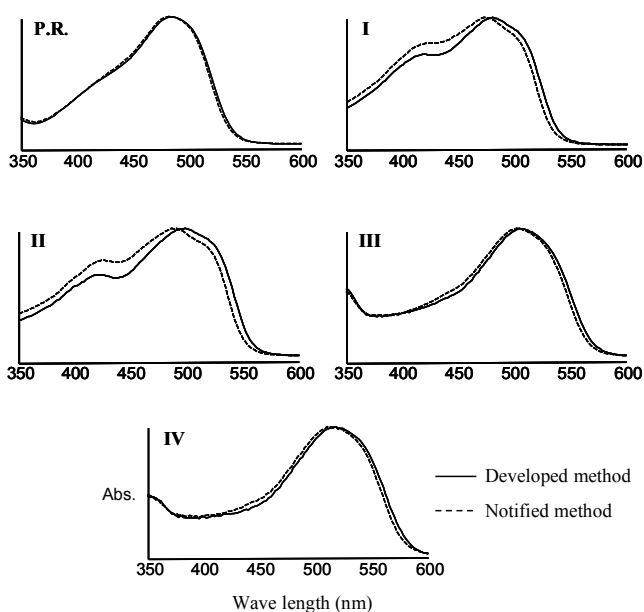


Fig. 7. PDA Spectra of Sudan I ~ IV and Para Red
Concentration of dyes : 1 $\mu\text{g/mL}$
Mobile phase : methanol-water (49:1) (developed method), acetonitrile-water (95:5) (notified method), other HPLC conditions were same as Table 1.

Table 2. Recoveries of Sudan Dyes and Para Red Spiked to Various Foods

		Acetone		Isopropanol		Ethanol		Methanol		Acetonitrile*	
		Recoveries	CV	Recoveries	CV	Recoveries	CV	Recoveries	CV	Recoveries	CV
Curry roux	Para Red	92.9	4.7	92.1	4.4	94.4	5.2	75.8	9.8	91.4	4.3
	Sudan I	93.4	0.8	92.7	4.3	93.1	3.8	80.3	6.7	96.7	1.3
	Sudan II	91.8	2.1	92.7	3.2	89.6	4.6	80.1	5.4	93.8	2.8
	Sudan III	96.7	0.7	89.4	4.9	94.2	2.3	80.1	6.9	94.5	0.6
	Sudan IV	96.6	1.3	89.6	4.1	90.2	1.7	79.7	8.4	93.2	1.8
Tandoori paste	Para Red	96.2	0.2	89.1	3.4	96.0	1.6	70.4	9.8	93.9	3.2
	Sudan I	95.4	1.7	91.1	2.2	97.1	1.0	72.1	6.8	94.5	0.5
	Sudan II	93.3	1.2	90.3	2.6	91.2	5.1	71.2	7.7	91.3	0.6
	Sudan III	98.3	2.0	91.3	1.4	98.1	1.3	67.7	6.4	94.0	1.2
	Sudan IV	97.8	1.3	91.8	2.1	96.2	2.2	60.5	5.5	90.7	1.2
Chili sauce	Para Red	78.8	5.8	77.1	7.5	71.1	5.4	22.0	12.5	82.1	4.7
	Sudan I	78.3	5.5	81.3	5.2	73.0	5.2	24.7	5.1	84.5	0.2
	Sudan II	78.7	5.2	83.0	3.3	75.7	8.4	27.8	9.2	84.7	1.7
	Sudan III	81.8	5.4	81.8	6.0	76.9	6.4	28.6	14.2	84.7	2.7
	Sudan IV	81.7	6.6	81.6	4.6	81.2	3.4	31.4	12.4	84.8	1.8
Paprika powder	Para Red	91.6	2.1	82.5	2.5	87.1	1.8	68.5	3.1	91.8	2.1
	Sudan I	92.1	5.2	86.6	3.0	87.8	3.0	75.9	4.3	90.5	2.2
	Sudan II	90.3	2.5	87.6	2.1	86.8	3.3	76.6	0.9	88.4	2.5
	Sudan III	97.1	2.3	87.4	1.0	89.3	2.4	78.5	2.8	93.5	2.9
	Sudan IV	91.3	3.3	86.3	4.6	86.4	1.5	71.4	2.8	88.8	1.7
Potato chips	Para Red	88.5	1.6	92.6	4.4	87.5	3.1	84.4	4.0	95.9	2.4
	Sudan I	90.7	2.4	94.9	3.5	91.7	1.7	82.6	1.3	94.7	2.5
	Sudan II	88.3	1.6	95.4	3.5	90.6	4.1	74.2	1.7	91.6	3.0
	Sudan III	86.5	2.4	94.9	2.6	89.7	1.2	61.4	1.7	84.7	7.8
	Sudan IV	84.6	0.4	95.5	2.9	85.6	4.8	46.9	4.2	75.5	2.9
Fried chicken	Para Red	92.9	3.2	86.7	4.5	82.6	2.1	80.9	4.2	96.1	3.9
	Sudan I	95.4	2.0	85.7	4.6	83.4	3.4	86.6	2.8	96.4	1.5
	Sudan II	94.8	1.4	83.4	4.3	81.4	2.8	82.9	2.3	95.2	0.6
	Sudan III	96.9	5.0	87.4	7.8	76.8	5.7	72.0	4.0	91.3	6.8
	Sudan IV	97.6	3.2	85.1	5.2	76.3	6.4	60.3	3.3	87.9	3.9
Korean pickles	Para Red	78.4	8.3	80.4	3.2	78.2	5.8	78.4	4.9	90.0	1.3
	Sudan I	81.0	4.8	84.5	2.9	82.7	4.2	87.1	2.9	92.7	1.8
	Sudan II	80.8	4.4	84.9	0.4	81.9	3.9	89.6	0.3	91.2	3.1
	Sudan III	86.1	4.3	86.6	1.9	81.7	6.9	87.2	4.1	91.9	0.4
	Sudan IV	88.2	3.9	87.4	2.0	82.7	7.5	85.6	1.3	93.5	0.9

*: notified method, spiked level: 5 µg/g

(%, n=3)

2. 抽出溶媒の検討及び添加回収試験

1) ラー油以外の食品

今回はアセトニトリルを使用しないという主旨から、検討事項は抽出溶媒の検討を主とし、それ以外の固相抽出等の操作は通知法と同様の操作とした。

抽出溶媒の検討を行うにあたり、各抽出溶媒によるブランク試験を行った。その結果、いずれの試料においても各抽出溶媒におけるピークはほとんど確認されなかった。パプリカパウダーでは各抽出溶媒とも、わずかにピークが観察されたが分析に支障はなかった。

次に、各抽出溶媒による添加回収試験を行った。Table2に示したように、アセトン、2-プロパノール及びエタノールで抽出した場合の回収率は7種の試料について、わずかに80%を下回ったものもあったが、おおむね通知法のアセトニトリルで抽出した場合と大差なく、いずれも良好な回収率が得られた。しかし、メタノールで抽出した場合はカレー、キムチを除く試料ではいずれも70%を下回る色素があり、特にチリソースでは20～30%と回収率が低かった。

なお、チリソースの抽出操作の過程で通知法のアセト

ニトリルを用いた場合、無水硫酸ナトリウムを倍量の20g入れた場合でも残渣が固まって硬くなる傾向がみられたが、他の抽出溶媒ではそのような傾向はみられなかった。

抽出溶媒にアセトン及び2-プロパノールを用いると油脂分を多く抽出してしまうため、ポテトチップス、とり唐揚げでは冷却付オートサンプラーで分析を行うと、分析中にHPLC試験溶液中で油脂分が沈殿して分離してしまう傾向がみられた。そこで、室温で分析したところ、油脂分の沈殿はみられなかった。

また、最終的な試験溶液の溶媒については移動相組成の極性に近く、5種の標準溶液を溶解することができるエタノールを用いた。

カレールー、チリソース、パプリカパウダー抽出物にスーダンI～IV及びパラレッドを試料あたり5 µg/g添加した場合のHPLCクロマトグラムをFig. 8～10に示した。

以上の結果から、ラー油以外の食品では、今回検討した抽出溶媒の中でアセトン、2-プロパノール及びエタノールを用いることにより、通知法とほぼ同等な結果が得られることがわかった。

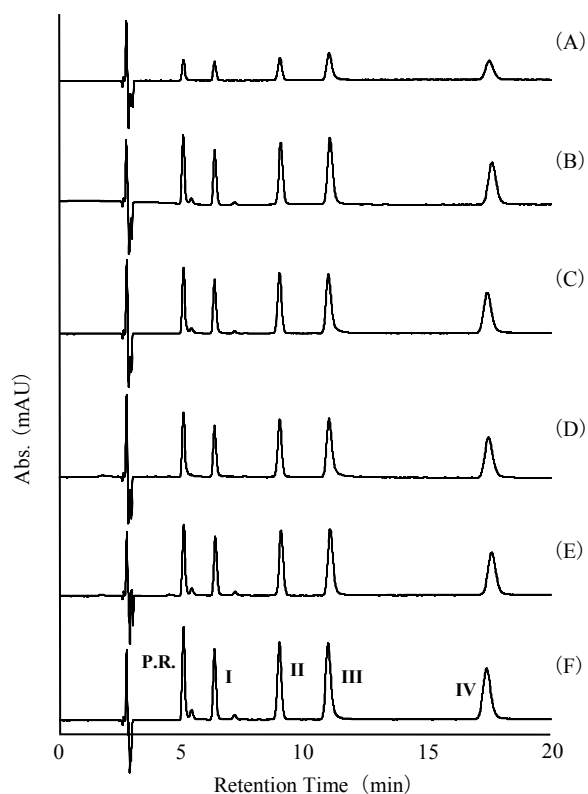


Fig. 9. HPLC Chromatograms of Sudan Dyes and Para Red Spiked to Chili Sauce

Extracting solvent : methanol (A), ethanol (B), 2-propanol (C), acetone (D), acetonitrile (E), mix standard solution : 0.5 µg/mL (F), Spiked level : 5 µg/g

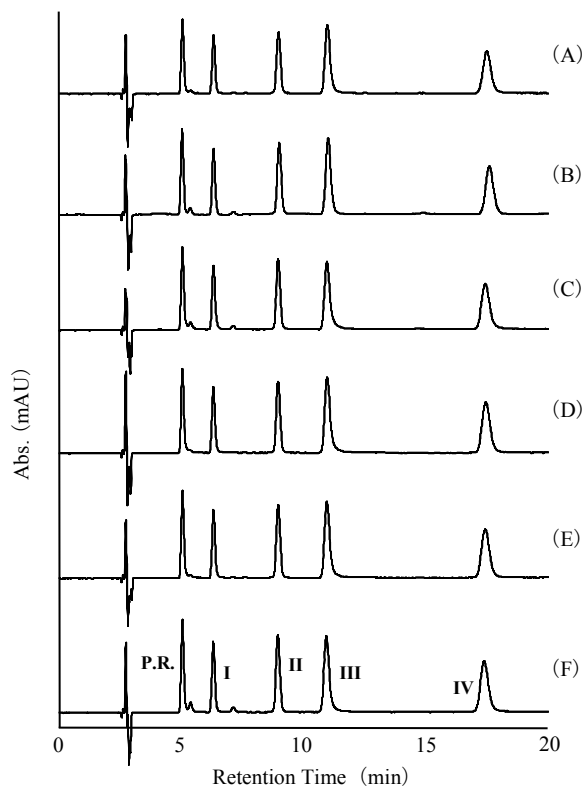


Fig. 8. HPLC Chromatograms of Sudan Dyes and Para Red Spiked to Curry Roux

Extracting solvent : methanol (A), ethanol (B), 2-propanol (C), acetone (D), acetonitrile (E), mix standard solution : 0.5 µg/mL (F), Spiked level : 5 µg/g

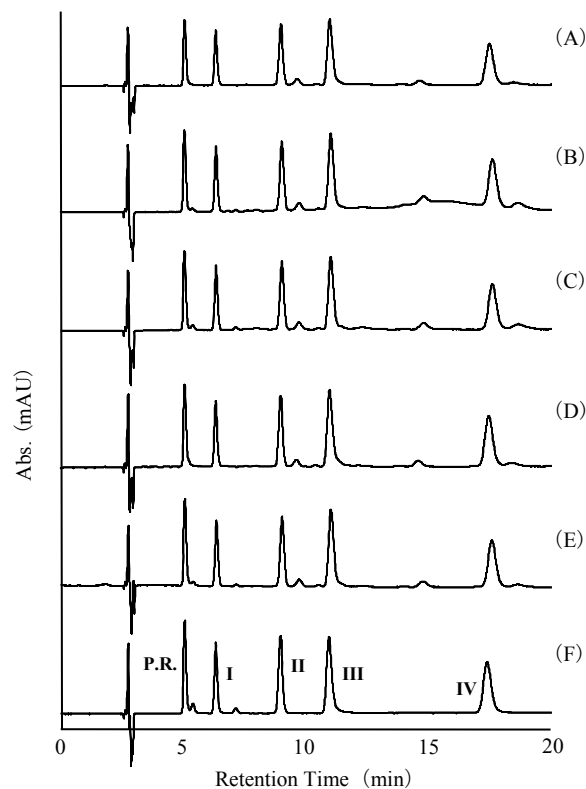


Fig. 10. HPLC Chromatograms of Sudan Dyes and Para Red Spiked to Chili Powder

Extracting solvent : methanol (A), ethanol (B), 2-propanol (C), acetone (D), acetonitrile (E), mix standard solution : 0.5 µg/mL (F), Spiked level : 5 µg/g

Table 3. Recoveries of Sudan Dyes and Para Red Spiked to Spicy Oil

Cleanup procedure	Liquid-liquid distribution		Solidification at -20°C				Notified method	
			Acetone-ethanol (1:1)		Acetone-ethanol (2:3)			
	Recoveries	CV	Recoveries	CV	Recoveries	CV	Recoveries	CV
Para Red	80.4	1.9	70.3	1.0	72.1	2.3	92.8	3.5
Sudan I	80.6	1.8	79.0	0.9	80.0	0.8	95.4	2.0
Sudan II	78.2	7.1	77.4	1.6	77.7	0.1	93.5	7.3
Sudan III	65.4	1.4	59.4	1.0	60.3	0.9	93.8	0.5
Sudan IV	57.5	4.0	55.5	0.9	57.6	0.7	90.2	2.0
(%, n=3)								

(% , n=3)

2) ラー油

(1) 液々分配法

検討は通知法で示されているヘキサン飽和アセトニトリルによる液々分配の部分と最終的な試験溶液に用いる溶媒について行い、それ以外の固相抽出等の操作は通知法と同様の操作とした。

アセトニトリルに代わる溶媒として、2-プロパノール、エタノール及びメタノールについて検討を行ったが、メタノール以外はヘキサンと分離しなかったため、メタノールを用いて試験を行った。その結果をTable 3に示した。通知法ではスーダンI～IV及びパラレッドのいずれも90%以上と高い回収率が得られたのに対して、メタノールを用いた場合にはパラレッド及びスーダンIは80%以上であったが、スーダンIIIとIVでは60%前後と低い回収率であった。最終的な試験溶液は油脂（ラー油）以外の食品と同様にエタノールを用いた。Fig. 11 (A) にHPLCクロマトグラムを示した。なお、ブランク試験を行った結果、ピークは観察されなかった。

(2) 凍結法

液々分配法における油脂の除去の別法として、油脂を溶媒に溶解した後、冷凍 (-20°C) することにより油脂分を沈殿させる方法を検討した。

溶媒には油脂を完全に溶かし、且つ冷凍時に沈殿しやすい組成が好ましいことから、アセトン、2-プロパノール、エタノールを用いて、種々検討した。その結果、アセトン・エタノール混液を用いた場合、比較的良好であることがわかったが、最終的な試験溶液は油脂が残るため、より極性の低い2-プロパノールを用いることとした。Table 3にアセトン・エタノール (1:1) 及びアセトン・エタノール (2:3) を用いたときの回収率を示した。いずれもメタノールを用いた液々分配法と大きな差はなく、通知法と比較すると低い回収率であった。Fig. 11 (B, C) にHPLCクロマトグラムを示した。

これらの結果から、ラー油についてはいずれの抽出方

法においてもスーダンIIIとIVで良好な回収率が得られず、今後さらに検討が必要なものと考えられた。

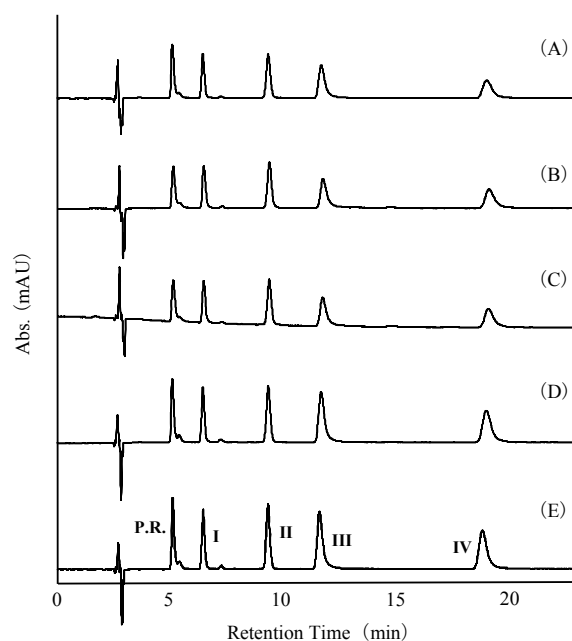


Fig. 11. HPLC Chromatograms of Sudan Dyes and Para Red Spiked to Spicy Oil obtained by various cleanup procedure
Liquid-liquid distribution (A), Solidification at -20°C :
acetone-ethanol (2:3) (B), acetone-ethanol (1:1) (C),
Notified method (D), mix standard solution : 0.5 µg/mL (E)
Spiked level : 5 µg/g

まとめ

スーダンI～IV及びパラレッドをアセトニトリル以外の溶媒による抽出後、HPLCにより分析する方法について検討を行った。HPLC条件は移動相にメタノール・水 (49:1) を用い、良好な分離を実現するとともに、20分以内に分析することができた。本法における検出限界は通知法と同様に試験溶液として0.05 µg/mL、試料当たり0.5

μg/gであった。試験溶液の検討については、油脂（ラー油）以外の食品としてカレー粉、タンドリーペースト、チリソース、パプリカパウダー、ポテトチップス、とり唐揚げ及びキムチの7種を用い、アセトン、2-プロパノール、エタノール及びメタノールの4種の抽出溶媒でアセトニトリルを用いた通知法と比較検討した。その結果、アセトン、2-プロパノール及びエタノールで抽出した場合の回収率は7種の試料について、わずかに80%を下回ったものもあったが、通知法と大きな差はなく、いずれも良好な回収率が得られた。また、油脂（ラー油）については検討した液々分配法及び凍結法の2つの方法いずれにおいても、回収率はパラレッド及びスーダンIIは80%以上であったが、スーダンIIIとIVでは60%前後と低く、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

文献

- 1) 食品衛生研究会編集：食品衛生小六法・平成22年版，2009，新日本法規出版，東京。
- 2) Chemical & Engineering News November 24, 2008.
- 3) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長通知“サイクラミン酸に係る試験法について”平成15年8月29日 食安監発第0829009号(2003).
- 4) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長通知“食品中のスーダン色素及びパラレッドの試験法について”平成18年5月1日 食安監発第0501007号(2006).
- 5) 箕川 剛，久保田浩樹，佐藤恭子，他：日本食品化学学会誌，17(1), 62-64, 2010.
- 6) Uematsu, Y., Ogimoto, M., Kabashima, J. *et al.*: *J. of AOAC. Int.*, 90(2), 437-445, 2007.

An Alternative for the Notified Method of Sudan Dyes and Para Red Analysis in Food by Eliminating Acetonitrile Use

Tetsuya SHINDO*, Yuki SADAMASU*, Keiko SUZUKI*, Yasukazu TANAKA*, Tomoko TAKAKUWA*,
Mitsuo NAKAZATO* and Yoko UEMATSU*

A high-performance liquid chromatography (HPLC) method for analysis of 4 Sudan dyes and Para Red dye was developed, focusing on the substitution of acetonitrile with other organic solvents.

Acetonitrile is a mobile phase component of HPLC and is used as an extraction solvent in the notified method. Mutual separation of dyes within 20 min was achieved with methanol-water (49:1) as an alternative HPLC mobile phase. Use of acetone, 2-propanol, or ethanol as an extraction solvent for foods, excluding spicy oil, can substitute for acetonitrile as shown by greater than 80% recovery of spiked dyes. Dye quantitation limits is 0.5 µg/g from foods and 0.05 µg/mL from the HPLC test solution, both of which were the same as indicated in the notified method. A liquid-liquid extraction procedure using hexane-acetonitrile is specified in the notified method for cleanup of spicy oil. Substitution of acetonitrile with a different organic solvent or removing oil by solidification at low temperature was not successful, as shown by the low recovery (below 60%) of Sudan III and IV.

Keywords: acetonitrile shortage, food, Sudan dye, Para Red, non-permitted food additives, notified method, extracting solvent, liquid-liquid distribution processing, HPLC

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan