

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

天川 映子*, 荻原 勉*, 都田 路子*, 永山 敏 廣*

Analysis of Sudan Dyes in Oyster Sauce Using TLC and HPLC

Eiko AMAKAWA*, Tsutomu OGIWARA*, Michiko MIYAKODA*
and Toshihiro NAGAYAMA*

Keywords: スダン色素 sudan dyes, パラレッド para red, オイスターソース oyster sauce, 薄層クロマトグラフィー TLC, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

はじめに

スダン色素は、タール系の油性アゾ色素であり橙赤色～深赤色を呈すものには、スダンⅠ、スダンⅡ、スダンⅢ、スダンⅣなどがある。また、パラレッドは図1に示したように、スダンⅠと類似した構造を有する橙赤色の色素である。これらはいずれも、油やワックス、印刷などの工業用染料として用いられている^{1, 2)}。スダンⅠ及びスダンⅡが、国際がん研究機関(IARC)により動物への弱い発癌性(カテゴリー3)が指摘されている^{3, 4)}こともあり、これら5色素は、ほとんどの国で食品への使用は認められていない。

わが国においても、食品への使用はこれらいずれの色素についても禁じられているが、化粧品用着色料として条件付きで使用が認められているものもある。すなわち、スダンⅢ(赤色 225 号)はすべての化粧品に、スダンⅡ(赤色 505 号)及びスダンⅣ(赤色 501 号)は粘膜に適用することのない化粧品に限定して使用できる。スダンⅡは、整髪料やシャンプーに、また、スダンⅣはマニキュアなどにそれぞれ比較的繁用されている⁵⁾。

このように世界的に食品への使用が禁じられているスダンⅠ、スダンⅣ、パラレッドが、2003年5月以来、EU諸国や中国において唐辛子を原料に用いたスパイス類やシーフードソースなどの調理用ソース類、あるいはこれらを使用したハンバーガーなどのファーストフードや冷凍食品から相次ぎ検出されている⁶⁻⁸⁾。我が国では多種多様な食品、食材を輸入しており、これらの色素が使われた食品が都内に流通していることが危惧される。そこで、都内で市販される輸入食品について、速やかにその使用の有無を試験し、実態を把握する必要がある。

食品中のスダン色素は、そのほとんどが HPLC^{9, 10)}あるいは LC/MS/MS^{11, 12)}を用いて分析されている。今回、これら分析手法のうち、比較的簡便で精度良く試験できる中里らが考案した HPLC 法⁹⁾に改良を加えた。調理用ソースとして繁用されているオイスターソースを対象として、より簡易な操作で妨害物を除去し、スダンⅠ～Ⅳ及びパラレ

ッドの5色素を、TLC 及び HPLC/PDA(多波長検出器)により高感度で分析する方法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

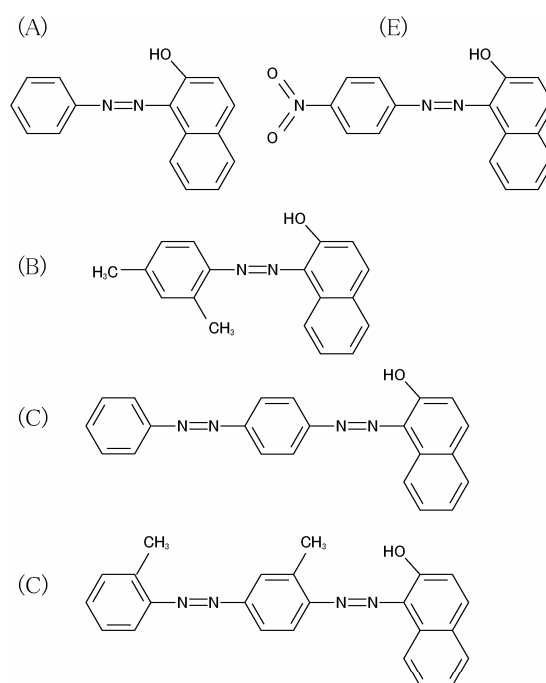


図1. スダン色素及びパラレッドの化学構造式
(A):スダンⅠ, (B):スダンⅡ, (C):スダンⅢ,
(D):スダンⅣ, (E):パラレッド

実験方法

1. 試料

スダン色素が使用される可能性が考えられる市販のオイスターソース7試料(国産品6試料, 中国産1試料), チリソース2試料(いずれもタイ産), トムヤムクンペースト1試料(タイ産), パスタソース3試料(いずれもイタリア産)及びマンゴー入りプリン1試料(マレーシア産)の計14試料を用いた。

* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

* Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

2. 試薬等

1) 標準品 スダン I (C.I.No.12055,和光純薬工業製), スダン II (C.I.No.12140,東京化成工業製), スダン III (C.I.No.26100,和光純薬工業製), スダンIV (C.I.No.26105,和光純薬工業製) 及びパラレッド(C.I.No.12070,東京化成工業製)

2) 標準溶液 標準品をそれぞれ 25 mg 精秤し, 酢酸エチルに溶解して 50 mL とした (500 µg/mL, 冷蔵保存).

3) TLC 用混合標準溶液 各標準溶液を混合し, 酢酸エチルで希釈して各色素 20 µg/mL の混合標準溶液を調製した.

4) HPLC 検量線用混合標準溶液 各標準溶液を混合し, エタノールで希釈して各色素 0.5~10 µg/mL の混合標準溶液を調製した.

5) その他の試薬 硫酸マグネシウム, エタノール, アセトンなどその他の試薬は市販の特級品, 水は精製水を用いた.

6) ミクロフィルター ミリポア製 JHPOW13 (径 13 mm, 孔径 0.45 µm) を用いた.

3. 装置

1) 冷却遠心機 佐久間製作所製 IV-160

2) HPLC 装置 アジレント社製 1100 型のポンプ, カラムオープン, オートサンプラー, PDA, 脱気装置及びデータ処理機

4. TLC 測定条件

1) TLC プレート メルク社製 RP-18, F254S アルミニウムシート 20 cm×20 cm を缺で 10 cm×10 cm あるいは 10 cm×5 cm に切って使用した.

2) 展開液 アセトニトリル : 水 (85:15)

5. HPLC 測定条件

中里ら⁹⁾の方法に準じた.

カラム : カプセルパック C18UG120, 0.5 µm, 4.6 mm i.d. ×260 mm, 移動相 : アセトニトリル : 水 (85:15), 流速 : 1 mL/min, カラム温度 : 40°C, 検出波長 : 500 nm, 注入量 : 10 µL

6. 試験溶液の調製

1) 抽出 よく混和した試料から 5 g をホモジナイザーカップに秤取し, これに水 5 mL を加え混和後, エタノールを正確に 50 mL 加えた. 硫酸マグネシウム 10 g を加え, 直ちにホモジナイズし (10,000 rpm, 5 min), 色素を抽出した. 得られたエタノール抽出液から約 20 mL をポリプロピレン製遠心管にとり, 冷却遠心分離 (3,000 rpm, 5 min, 0°C) を行い, 上澄を抽出液とした.

2) 精製 抽出液 10 mL を 100 mL 用ナシ型フラスコに正確に分取し, 40°C 以下で減圧濃縮後, エタノール臭がなくなるまで窒素ガスを吹き付けた. 残留物に酢酸エチル 10 mL 及び飽和食塩水 5 mL を加え溶解した後, ナシ型フラス

コに蓋をし, 手で激しく約 30 秒間振とうした. 静置後, 分離した水層を 5 mL の駒込ピペットで吸い取り除去した. この飽和食塩水による洗浄を 3 回行った.

有機層を別の駒込ピペットで 50 mL の三角フラスコに移した. 酢酸エチル約 2 mL で 2 回, ナシ型フラスコを洗い洗液も同三角フラスコ内の溶液に合わせた. これに少量の硫酸マグネシウムを加え, 静かに手で振り混ぜ脱水後, ガラス綿でろ過した. 酢酸エチル少量で三角フラスコを洗い, 洗液をろ液と合わせ減圧濃縮した. 残留物をエタノール 1 mL に溶解した後, ミクロフィルターでろ過した. ろ液から 200 µL をマイクロピペットで分取し HPLC 用試験溶液とした. 残りのろ液を減圧濃縮後, 酢酸エチル約 0.1 mL を加え残留物を溶解し, TLC 用試験溶液とした.

7. TLC による定性

アルミニウムシートの下端から 1.5 cm のところに TLC 用標準溶液及び試験溶液 3 µL をスポットし風乾後, 展開した. 約 7 cm 展開した後, 色調と R_f 値を標準の色素と比較し定性確認した.

8. HPLC による測定

TLC で測定した結果, 分析対象のスダン色素あるいはパラレッドが検出された場合は, さらに HPLC により定性し定量した.

定性は, HPLC でのピークの保持時間及び PDA で測定した吸収スペクトルについて標準品の色素と比較し, 一致することを確認した.

定量は, ピーク面積あるいはピークの高さを測定し, あらかじめ 0.5~10 µg/mL の濃度範囲で作成した検量線を用い試験溶液の濃度を求めた.

結果及び考察

1. 抽出

スダン色素の抽出には, 抽出液への油脂分の移行を抑えるために, 比較的極性の大きいアセトニトリル¹⁰⁾やエタノール⁹⁾が抽出溶媒として用いられている. 今回は, 劇物であるアセトニトリルの使用を避け, エタノールを使用した.

水分を含む試料から有機溶媒を用いて油性成分を効率的に抽出するには, 抽出時の水分を十分に取り除くことが必要である. 中里らは, 抽出時の脱水に一般に繁用されている無水硫酸ナトリウムを用いている⁹⁾が, 今回は硫酸ナトリウムより脱水効率の良い硫酸マグネシウム¹³⁾の使用を試みた. オイスターソース 5 g 中の水分と水 5 mL を合わせた水分量に対し, 10 g の硫酸マグネシウムで十分脱水できた. 同じ水分量に対し硫酸ナトリウムでは約 3 倍量が必要であった. このことから, 本法では抽出時の脱水に, 硫酸マグネシウムを用いることにした.

2. 精製

着色料の確認には, 一般的に TLC あるいはペーパークロ

マトグラフィーにより、視覚での判定がなされている。

今回のオイスターソースの場合、高感度での分析を行うために、エタノール抽出液を10倍に濃縮し直接TLCに負荷して検討を加えた。その結果、粘調性のある妨害物質のため3 μ Lをスポットできなかつた。妨害物質はオイスターソース中のエタノールに可溶性糖類などと推察した。

そこで、これら妨害物質を除くため、エタノール溶液を酢酸エチルに転溶後、飽和食塩水で有機層を水洗することにした。水洗は、操作の簡便性と迅速性を考慮してナシ型フラスコ内で行い、洗液は駒込ピペットを用いて取り除くこととした。

3回の水洗により、TLCでの妨害物質が除去され、エタノール抽出液を約80倍濃縮し、その3 μ Lをスポットして、図2に示したように明確なクロマトグラムが得られた。

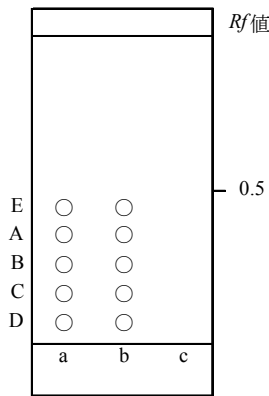


図2. スダン色素及びパラレッドのTLCクロマトグラム
a: 標準色素, b: オイスターソース (標準色素添加),
c: オイスターソース (標準色素無添加)
A: スダンI, B: スダンII, C: スダンIII,
D: スダンIV, E: パラレッド

3. TLC 測定条件

薄層板の種類、展開液などについて種々検討した結果、薄層板に逆相系のRP-18を塗布したアルミニウムシートを使用し、展開液にはアセトニトリル:水(85:15)を用いた条件が、10分間弱の短時間で5色素を明確に分離でき良いことが分かった(図2)。Rf値はスダンIは0.35, IIは0.22, IIIは0.15, IVは0.07, パラレッドは0.44であった。

4. HPLC 測定条件

HPLC/PDAで測定したスダン色素の吸収スペクトルを図3に示した。可視部の極大吸収波長は、スダンIは475 nm, スダンIIは495 nm, スダンIIIは505 nm, スダンIVは515 nm, パラレッドは483 nmであったことから、検出波長は500 nmとした。

カラム及び移動相については、アイソクラテックの条件で5色素を30分以内に分析できる条件を検討した。その結果、カプセルパックC18UG120(4.6 mm i.d.×26 cm)を用い、TLCの展開液と同じ組成のアセトニトリル:水(85:15)を移動相としたとき、各色素は25分以内に分離できることがわかった(図4)。

5. 添加回収率

市販のオイスターソース1gに対し、スダン色素及びパラレッドをそれぞれ50 μ gあるいは20 μ g添加し、回収率を求めた。結果を表1に示した。

回収率は、スダン色素ではいずれの場合も80%以上、パラレッドは70%以上と良好であった。図4にオイスターソースに標準色素を添加した時のHPLCクロマトグラムを示した。

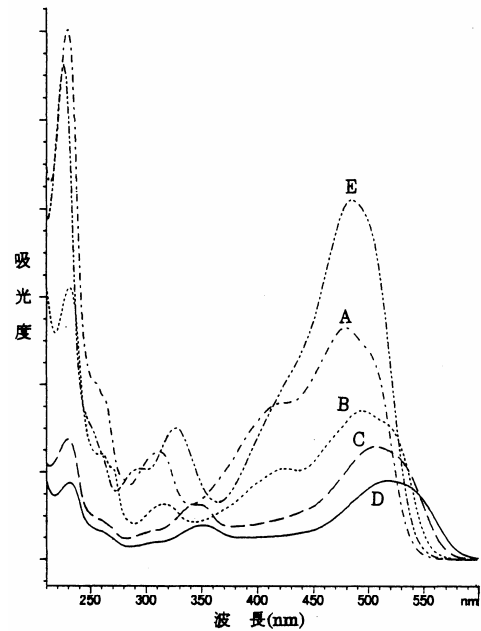


図3. スダン色素及びパラレッドの吸収スペクトル
A: スダンI, B: スダンII, C: スダンIII,
D: スダンIV, E: パラレッド

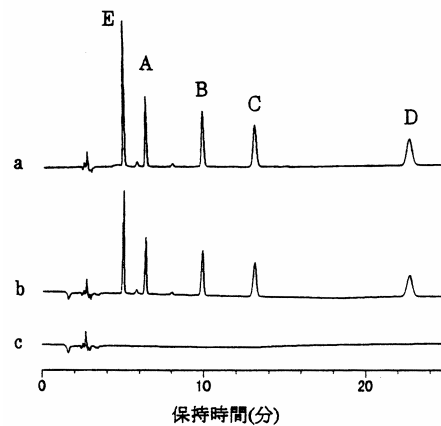


図4. スダン色素及びパラレッドのHPLCクロマトグラム
a: 標準色素(各5 μ g/mL), b: オイスターソース (試料中濃度として, 各標準色素20 μ g/g添加),
c: オイスターソース (標準色素無添加)
A: スダンI, B: スダンII, C: スダンIII,
D: スダンIV, E: パラレッド

表1. オイスターソース中のスダン色素及びパラレッドの添加回収率

添加量		スダン I	スダン II	スダン III	スダン IV	パラレッド
50 µg/g	回収率 (%)	85.9	86.2	86.5	87.0	70.2
	CV (%)	0.7	0.2	0.8	0.8	3.7
20 µg/g	回収率 (%)	88.7	89.1	87.8	86.2	74.8
	CV (%)	2.2	2.4	1.8	0.4	3.8

n=3

6. 検出限界

本法における検出限界はいずれの標準色素の場合も、TLCで30 ng, HPLCでは5 ngであった。また、試料1 g当たり TLC, HPLCでそれぞれ2 µg及び0.5 µgであった。

7. 市販食品への適用

本法を用いて、市販のオイスターソース7試料について分析した結果、いずれの試料からも分析対象の5色素は検出されなかった。また、チリソース2試料、トムヤムクンペースト1試料、パスタソース3試料、マンゴー入りプリン1試料について本法を適用したところ、いずれからも5色素とも検出されなかった。

ま と め

オイスターソース中のスダン I, スダン II, スダン III, スダン IV及びパラレッドについて TLC 及び HPLC/PDA を用いた分析法を検討した結果、

- 抽出時の脱水に硫酸マグネシウムを使用することにより、脱水効率が上がり、良好に抽出することができた。
- 抽出液を酢酸エチルに転溶後、有機層を飽和食塩水で水洗することにより、TLCでの妨害物質を除去できた。
- RP-18 アルミニウムシートを用いアセトニトリル：水(85:15)で展開したところ、短時間に5色素を明確に分離できた。
- HPLC カラムにカプセルパック C18UG120 を用いることでアイソクラテックな条件下で25分以内に5色素を分離できた。
- 本法における添加回収率は、スダン色素はいずれの場合も80%以上、パラレッドは70%以上と良好であった。
- 検出限界は、いずれの色素についても試料1 g 当たり TLCで2 µg, HPLCでは0.5 µgであった。
- 市販食品中からは、スダン色素は検出されなかった。分取する抽出液量を増やすことにより、さらに高感度での分析が可能と考える。

以上の結果から、本法はオイスターソース中のスダン I ~IV及びパラレッドの分析に十分使用できると考える。

文 献

- Food Standards Agency: Sudan dyes, <http://www.food.gov.uk/safereating/sudani/>
- Food Standards Agency: Para Red: your questions answered, <http://www.food.gov.uk/safereating/parared/pararedqa/>
- International Agency for Research on Cancer: Search results for sudan, <http://www.cie.irac.fr/htdocs/monographs/vol08/sudani.html>
- International Agency for Research on Cancer: Search results for sudan, <http://www.cie.irac.fr/htdocs/monographs/vol08/sudanii.html>
- 日本化粧品工業連合会編：法定色素ハンドブック改訂版, 104-235, 2004, 薬事日報社, 東京。
- Food Standards Agency: Sudan 1 product list 18 February 2005, <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2005/feb/sudanlist>
- Food Standards Agency: Para Red: latest news, advice and recalls, <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2005/may/parared>
- RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED: Week 2005/33, http://europa.eu.int/comm/food/food/rapidalert/reports/week33-2005_en.pdf
- 中里光男, 粕谷陽子, 松本ひろ子, 他：東京健安研7年報, 55, 107-110, 2004.
- 四方田千佳子：食衛誌, 45, J-229-230, 2004.
- Calbiani, F., Careri, M., Elviri, L., et al: J. Chromatog. A, 1042, 123-130, 2004.
- Mazzetti, M., Fascioli, R., Mazzoncin, I., et al: Food Additives and Contaminants, 21, 935-941, 2004.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., et al: J. AOAC Int., 86, 412-431, 2003.