

大豆製品中のジメチルイエロー及びジエチルイエローの超高速LC-PDAによる分析

山嶋 裕季子^a, 水町 敏子^a, 藤原 卓士^a, 植松 洋子^b, 門間 公夫^c, 小林 千種^a

大豆製品中のジメチルイエロー, ジエチルイエローを含む油溶性色素10成分を超高速型LC-PDAで分析するために, 国産の大豆製品にこれらの色素を添加し, 既存の油溶性色素を含む色素分析法を準用して前処理を行い, 定量する方法を検討した. 分析カラムにAcquity UPLC CSH Phenyl-Hexylを用いて, 添加した10成分について良好な分離を得ることができた. この方法を用いて台湾産・中国産の大豆製品6製品を購入して分析したところ, いずれの製品からもジメチルイエロー及びジエチルイエローは検出されなかった.

キーワード: 油溶性色素, ジメチルイエロー, ジエチルイエロー, 大豆製品, 超高速型LC-PDA

はじめに

油溶性色素は工業製品や化粧品に用いられているが, 世界的に食品への使用は認められていない. しかし, 2003年5月にフランスで唐辛子製品から油溶性色素スーダンIが検出された事例をはじめ, 食品への違法添加事例が散見されている¹⁾.

2014年以降, シンガポールや香港において台湾産乾燥豆腐等の大豆製品から油溶性色素のジメチルイエロー(以下MYと略す)が検出され, リコールや調査が行われた²⁾. これらの調査では, MYと同様に食品への使用が認められていないジエチルイエロー(以下EYと略す)についてもLC-MS/MSを用いた分析法が用いられた³⁾.

一方, 食品中のさまざまな色素の分析にはTLCやLC-PDAを用いた方法が広く普及しており, LC-PDAでは, 保持時間とPDAスペクトルにより簡易的な色素の同定が可能である. 色素は食品の着色または色調の調整を目的に食品に添加されるため, 検出された色素の色み・色相の情報の一つとしても, PDAスペクトルの測定は有効な手段である. また, 近年ではより高分離, 高感度の分析が可能な超高速型のLCが用いられている.

そこで超高速型のLC-PDAを用いてMY, EY, 他の油溶性色素8成分を含めた計10成分についての測定条件を検討した. これらの色素を市販の大豆製品に添加して, 食品中の油溶性色素, 塩基性色素及び酸性色素計10成分の違法色素の一斉分析法⁴⁾を準用して前処理を行い, 添加回収試験を行った. また, 東京都内の中国製食品販売店で購入した台湾産, 中国産の大豆製品計6製品について本法を用いて分析を行ったのでこれらの結果を報告する.

実験方法

1. 試料

添加回収試験には, 東京都内で購入した国産の大豆製品(木綿豆腐, 大豆たんぱく, 乾燥ゆば及び高野豆腐)を用いた.

市販食品の調査には, 東京都内で購入した台湾産・中国産の大豆製品を用いた. 内訳は, 押し豆腐(台湾産・中国産, 各1製品), 味付け押し豆腐(台湾産1製品, 中国産2製品)及び乾燥ゆば(中国産1製品)であった. なお, 押し豆腐は豆腐干とも呼ばれ, 5cm程度のブロック状であり, 原材料は大豆, 硫酸マグネシウム, カラメル色素等であった. そのまま食べたり, 料理の材料として使用される. 味付け押し豆腐は, 押し豆腐を2~3cm角にスライスしてしょうゆや香辛料で味付けした製品であった. 乾燥ゆばは長さ30cm程度の棒状で国産の乾燥ゆばに比べて厚く大きいものであった. 押し豆腐, 味付け押し豆腐は茶色, 乾燥ゆばは黄色を呈していた.

2. 試薬等

1) 標準品: MY (methyl yellow), EY (4-(diethylamino) azobenzene), ファストガーネット(以下FGと略す, 2-amino azotoluene), オイルオレンジSS(以下OOと略す)は東京化成工業(株)製, スーダンI, スーダンII, スーダンIII及びスーダンIV(以下S-I, S-II, S-III及びS-IVと略す)はSigma-Aldrich製, バラレッド(以下PRと略す)はAcros Organics製, トルイジンレッド(以下TRと略す)はFluka製を用いた.

2) 標準溶液: TRを除く各色素10mgをテトラヒドロフラン(以下THFと略す)で溶解して10mLとしたものを標準原液とした(1,000 µg/mL). 各標準原液1mLずつ取り, THFで10mLとしたものを混合標準溶液とした(100 µg/mL). TRは10mgをTHFで溶解して50mLとしたものを標準原液とした(200 µg/mL). これを5mL取り, THFで10mLとしたものをTR標準溶液とした(100 µg/mL). 100

^a 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
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 当時: 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

^c 東京都健康安全研究センター食品化学部

μg/mL 濃度の標準溶液をメタノールで適宜希釈して標準溶液とした。

3) THF : HPLC 用, 安定剤不含を用いた。

4) 5.6%ナトリウムメチラート溶液 : 28%ナトリウムメトキシド・メタノール溶液 (和光純薬工業 (株) 製) をメタノールで 5 倍に希釈して用いた。

5) クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 : 試薬一級を用いた。

6) ヘキサン, ジエチルエーテル : 試薬特級を用いた。

7) メタノール : HPLC 用を用いた。

8) 固相抽出カラム : Bond Elut SI (1 g/6 mL, アジレントテクノロジー (株) 製) をあらかじめヘキサン 10 mL でコンディショニングしたものを使用した。

3. 試験溶液の調製

既報の一斉分析法⁴⁾に準じた。クッキングカッターまたはミルで試料を均一化し、木綿豆腐、大豆たんぱく、押し豆腐及び味付け押し豆腐は 1 g、ゆば及び高野豆腐は 0.5 g を 50 mL 容遠心管に採取した。60°C の水浴で加熱しながら、温湯 4 mL 及びメタノール 2 mL を加えて混和し、さらに THF 4 mL を加えて混和した後、5.6%ナトリウムメチラート溶液 4 mL を加え、90 秒間激しく振り混ぜた後、ヘキサン 10 mL を加えて振り混ぜ、15%クエン酸水素二ナトリウム溶液 10 mL を加えて振り混ぜた。これを 14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上層を 100 mL 容ナス型フラスコに分取した。下層及び残渣に、前述の「5.6%ナトリウムメチラート溶液 4 mL 添加」以降の操作を繰り返し、上層を先のナス型フラスコに合わせた。得られた溶液を減圧下で溶媒を留去し、少量のヘキサンで溶解後、固相抽出カラムに負荷し、ヘキサン 10 mL を用いてフラスコを洗いながらカラムに負荷・洗浄後、ヘキサン・ジエチルエーテル (7 : 3) 15 mL で溶出した。得られた溶出液を窒素気流下 (40~50°C) で溶媒が蒸発するまで濃縮した。残留物に THF 0.5 mL を加えて溶解し、メタノールで 1 mL としたものをメンブランフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過し、試験溶液とした。

4. 測定条件

1) LC : 島津製作所製 Nexera X2 シリーズ

2) LC 条件 : カラム : Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1.7 μm, 2.1 mm i.d. x 150 mm), カラム温度 : 40°C, 移動相 : A 液 ; 10 mmol/L 酢酸アンモニウム, B 液 ; THF・メタノール (1 : 1), グラジエント条件 ; A 液 45% (0 分) →40% (10 分) →20% (12→18 分) →5% (20→25 分) →45% (25.1 →35 分), 流速 : 0.2 mL/min, 注入量 : 2 μL, 測定波長 : 400 nm (MY, EY 及び FG), 520 nm (その他の色素)

5. 添加回収試験 : 木綿豆腐, 大豆たんぱく, 各々 1 g に, 10 μg/mL または 100 μg/mL の混合標準溶液 50 μL (試料あたり 0.5 または 5 μg/g) 及び乾燥ゆば, 高野豆腐, 各々 0.5 g に, 100 μg/mL の混合標準溶液 25 μL (試料あたり 5 μg/g) を添加後, よく混和して 30 分間以上放置した後, 本法に従って試験溶液を調製した。LC の測定結果から, 添加した濃度に相当する標準溶液のピーク面積と比較して回収率を求めた。

結果及び考察

1. LC 条件の検討

既報⁴⁾では, C8 充填剤のコンベンショナルタイプの分析カラムを用いて, 水溶性の指定外色素 10 成分と油溶性色素 8 成分 (S-I, S-II, S-III, S-IV, PR, MY, OO, FG) を 48 分で分離する条件で測定している。今回は上記油溶性色素 8 成分に EY 及び香辛料に添加された事例⁵⁾のある TR を加えた 10 成分についての分離, 分析時間の短縮, 溶媒使用の少量化を図るため, 高分離カラムでの条件を検討した。C8, C18, フェニル及びフェニルヘキシル充填剤の分析カラムを試したところ, Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl カラムで, 良好な分離を得ることができた。また, MY, EY, FG, S-III 及び S-IV の定量下限値は 0.1 μg/mL, その他の色素は 0.25 μg/mL であった。

2. 試験溶液の調製

既法⁴⁾に従って試験溶液の調製を行ったところ, ゆば及

表1. 大豆製品における各色素の添加回収試験の結果

色素	木綿豆腐				大豆たんぱく				ゆば		高野豆腐	
	0.5 μg/g		5 μg/g		0.5 μg/g		5 μg/g		5 μg/g		5 μg/g	
	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
ジメチルイエロー	107.2	0.6	84.9	11.7	103.5	3.1	87.7	3.5	77.1	10.2	75.0	8.3
ジエチルイエロー	101.0	0.7	72.5	7.4	100.5	0.2	79.2	3.3	75.1	8.6	79.1	6.5
ファストガーネット	100.2	1.5	81.1	14.1	26.4	8.9	54.6	13.9	20.7	56.3	6.3	26.6
スーダンI	102.6	0.8	79.8	11.6	101.5	1.6	87.3	4.0	66.1	10.8	61.3	9.7
トルイジンレッド	100.2	0.2	32.5	9.3	95.6	0.2	29.6	2.2	58.0	10.1	58.6	3.3
オイルオレンジSS	100.3	0.8	72.0	10.6	100.2	0.8	85.2	2.9	72.1	9.6	62.8	9.6
パラレッド	100.6	0.6	75.7	11.8	98.5	2.8	79.4	3.1	66.5	11.3	61.8	7.7
スーダンII	102.3	0.2	70.4	11.6	101.9	0.5	85.1	2.9	65.3	8.2	55.9	9.0
スーダンIII	98.9	1.5	70.1	11.4	96.7	2.3	79.9	3.8	73.5	11.1	73.9	8.6
スーダンVI	97.8	1.5	59.9	11.0	98.0	1.3	75.5	2.9	69.4	9.9	67.8	10.1

回収率は3回試行の平均, 回収率およびRSDの単位(%)

び高野豆腐では、時間が経つにつれ油滴状の沈殿物が生じ、LC 上でのピーク形状がブロードになる場合があった。固相抽出カラムによる精製後の濃縮残留物を溶解する際に、既報⁴⁾では少量 (0.1 mL) の THF に溶解してからメタノールで 1 mL としていたところを、THF を 0.5 mL まで増量することで沈殿物が溶解し、ピーク形状も良好になった。

試験溶液の調製に適用した既法⁴⁾は、試料中の夾雑物である脂質を、ナトリウムメチラートにより脂肪酸メチルとグリセリンに変換し、油性色素と脂肪酸メチルをヘキサンで抽出し、シリカゲルカートリッジで色素と脂肪酸メチル等の夾雑物を分離精製する方法である。対象食品は主に香辛料であり、それらの脂質の含有量が 10% 前後であったのに比べ、試験溶液中の油滴状物質が多量に認められたゆばと高野豆腐の脂質含有量は 100 g あたり各々 32.1, 34.1 g であった⁹⁾。油滴状物質がほとんど見られなかった大豆たんぱくの原材料は脱脂大豆で、脂質含有量は 100 g あたり 0.4 g と少なかった。大豆製品の原料である大豆は脂質を多く含み、大豆等豆類中の残留農薬の分析においては、粘性の高い油滴の除去にジルコニア結合型シリカゲルカラムを用いる方法が報告されている⁷⁾。今回は THF の比率を高めることで油滴状物質を溶解させたが、今後これらを除去するための検討が必要であると考えた。

3. 添加回収試験

各試料の回収率を表 1 に示した。MY, EY については 70% 以上の回収率が得られ、LC のクロマトグラムでの保持時間及び PDA スペクトルは標準溶液のそれとよく一致した

(図 1, 2)。あわせて他の 8 成分についても添加回収を行ったところ、FG 及び TR の回収率が特に低い傾向にあった。

0.5 µg/g を添加した場合、大豆たんぱくの FG を除き、回収率、RSD とともに良好であった。MY, EY についてはスペクトルの類似度 (1 に近いほど一致) も 0.997, 0.991 と高く、低濃度においても LC-PDA での検出及び確認が可能であると考えられた。

5 µg/g の添加ではいずれの食品においても TR の回収率が低かったため、使用する溶媒への TR の溶解性を確認した。TR は、クロロホルムには 500 µg/mL の濃度で、THF には 300 µg/mL の濃度で溶解したが、メタノール、ジエチルエーテル、ヘキサンには 100 µg/mL の濃度でも完全に溶解しなかった。TR の回収率低下の一因として、添加した TR が抽出-精製操作の過程で、使用する溶液や溶媒に溶解しなかったことが考えられた。一方で、油滴状物質が多かったゆば及び高野豆腐では、大豆たんぱくに比べて TR の回収率が高かったことから、油滴状物質に TR の一部が溶解して、試験溶液調製の過程で油滴とともに移行したのではないかと考えられた。

FG, TR を除き、油分の少ない大豆たんぱくでの回収率、RSD が比較的良好であったことから、ナトリウムメチラートで処理できなかった油滴状物質等の夾雑成分の存在が回収率の低下に影響したと考えられた。

これらの回収率を加味した検出下限値を、FG は 3 µg/g, TR は 0.9 µg/g, MY, EY を含むその他の色素は 0.5 µg/g とした。

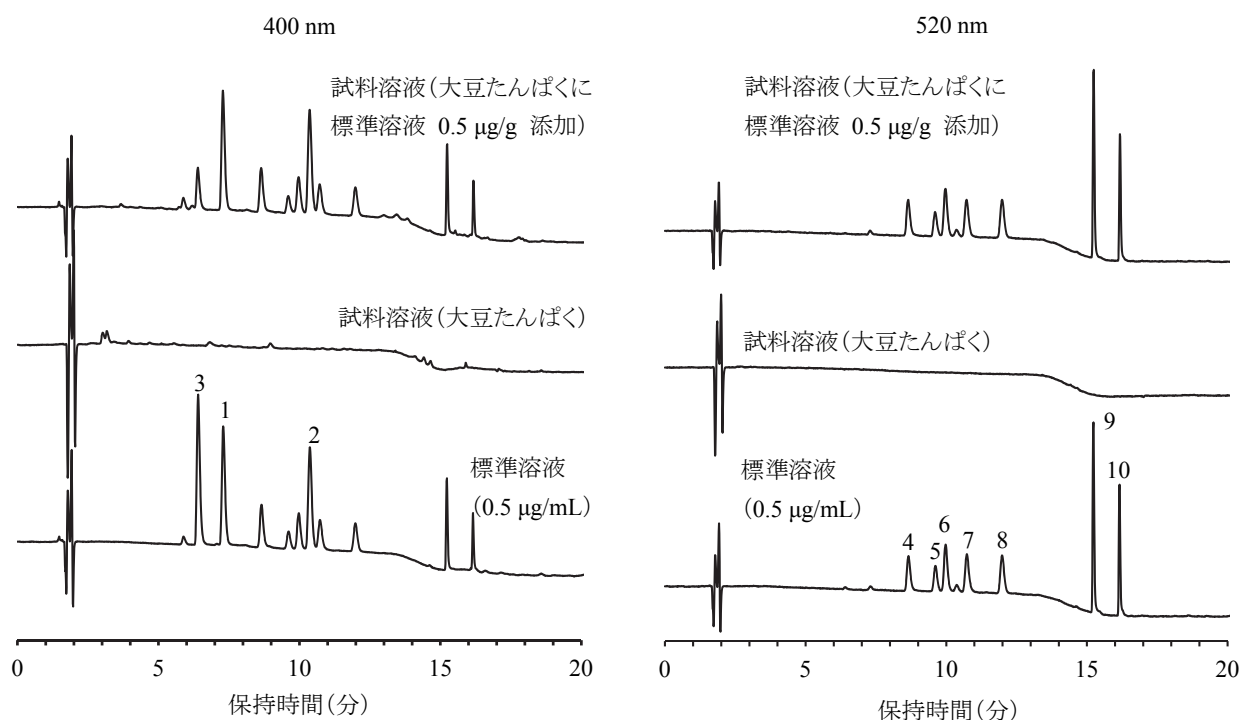


図 1. 各色素の LC クロマトグラム

1 : MY, 2 : EY, 3 : FG, 4 : S-I, 5 : TR, 6 : OO, 7 : PR, 8 : S-II, 9 : S-III, 10 : S-IV

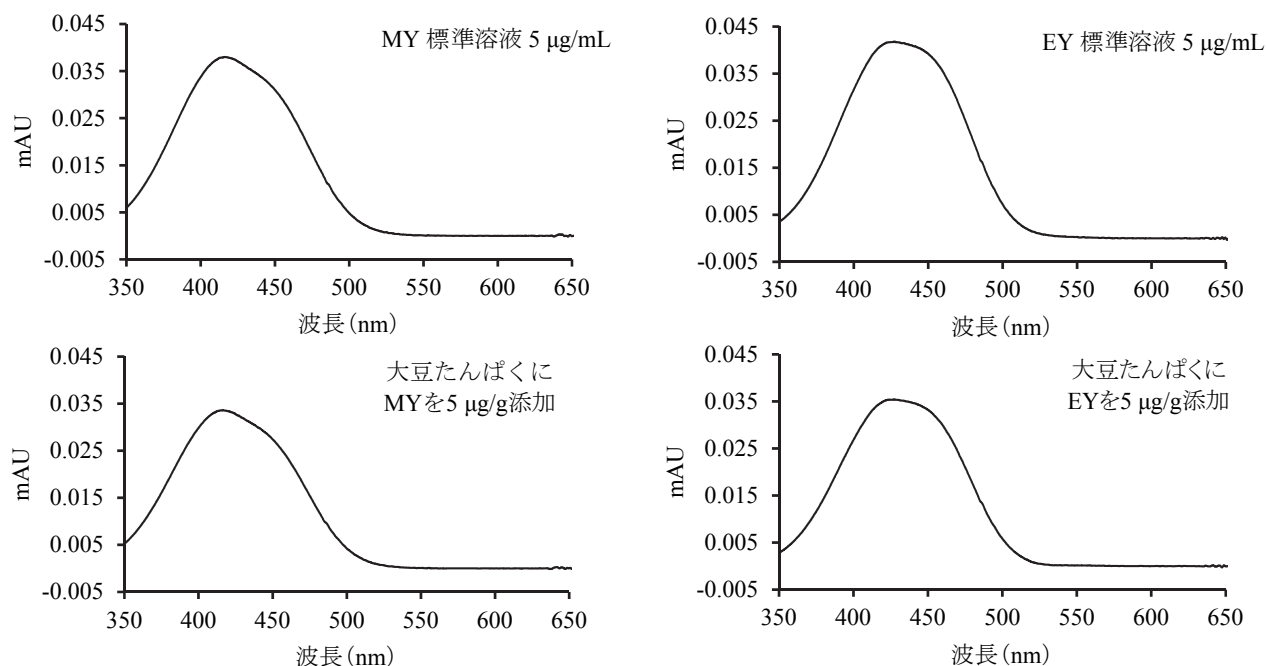


図2. 大豆たんぱくにMYとEYを添加した時のLC-PDAスペクトル

4. 市販食品の調査

市販食品計 6 製品について本試験法を用いて分析を行ったところ MY 及び EY は検出されなかった。また今回検討したその他の 8 成分の色素についても検出されなかった。

しかし諸外国で検出された事例もあり、日本において食のグローバル化により食材の輸入やネット販売が進んでいることから、これらの食品について引き続き検査をする必要があると考えられる。

ま と め

国産の大豆加工品に MY, EY を含む油溶性色素計 10 成分を添加し、既存の油溶性色素分析法⁴⁾により前処理を行い、LC-PDA を用いた測定条件を検討した。フェニルヘキシル充填剤の Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl カラムを用いて、添加した色素 10 成分について良好な分離を得ることができた。MY, EY では 70%以上の回収率であったが、FG や TR では特に回収率の低い食品があった。前処理については、油滴状物質を除去しきれず、さらに別の方法を検討することにより、回収率を改善することが可能であると考えられた。本法を用いて、台湾・中国産の大豆製品 6 製品について分析したところ、MY, EY 及び他の 8 成分の油溶性色素は検出されなかった。

文 献

- 1) 田端節子, 小林千穂, 羽石奈穂子, 他: 東京健安研セ年報, **66**, 23-25, 2015.
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部: 食品安全情報 (化学物質) No.1/2015.
[http:// www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/2015](http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/2015)

/foodinfo201501c.pdf (2017 年 8 月 4 日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)

- 3) 台湾衛生福利部食品薬物管理署: Method of Identification for Dimethyl Yellow and Diethyl Yellow in Foods
【Date: 2014-12-24】
<https://www.fda.gov.tw/EN/lawContent.aspx?cid=169&id=1704> (2017 年 8 月 4 日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)
- 4) Uematsu, Y., Mizumachi, T., Monma, K., et al.: *J. AOAC Int.* 100, (4), 2017.
- 5) 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部: 食品安全情報 (化学物質) No. 7 / 2006 (2006. 03.31).
<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/2006/foodinfo200607.pdf> (2017 年 8 月 4 日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性はある)
- 6) 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会編: 日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂), 56-59, 2015, 全国官報販売協同組合, 東京.
- 7) 岩越景子, 大塚健治 田村康宏, 他: 食衛誌, **57**, 150-154, 2016.

Determination of Dimethyl Yellow and Diethyl Yellow in Soy Products by UHPLC-PDA

Yukiko YAMAJIMA^a, Toshiko MIZUMACHI^a, Takushi FUJIWARA^a, Yoko UEMATSU^b, Kimio MONMA^a,
and Chigusa KOBAYASHI^a

A method for determination of ten oil-soluble dyes, including dimethyl yellow (MY) and diethyl yellow (EY), in soy products by UHPLC-PDA was developed. Components were extracted from soy products by an existing method for identifying illegal dyes, including oil-soluble dyes in spices, and determined by UHPLC-PDA. Good separation conditions were obtained by using an Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl column. Six types of soy products made in Taiwan and China were tested using this method, and none of these dyes were detected.

Keywords: oil-soluble dyes, dimethyl yellow, diethyl yellow, soy products, UHPLC-PDA

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

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

