

クーロメトリック検出器を用いる高速液体クロマトグラフィーによる商品中に含まれるスーダン色素の分析法に関する研究

村上 和雄*, 渡邊 快記**
(平成 24 年 1 月 31 日査読受理日)

Study on Sudanese Pigmentary Determination in Products by the High Performance Liquid Chromatography Using Coulometric Detector

MURAKAMI, Kazuo and WATANABE, Hayaki
(Accepted for publication 31 January 2012)

キーワード：スーダン色素, HPLC, 電気化学的検出, クーロメトリック検出器, 固相抽出

Key words : sudan pigmentary, HPLC, electrochemical detection, coulometric detector, solid phase extraction

1. はじめに

食品添加物の使用目的には、①色合いの悪い食品を美味しく見せる②微生物の繁殖を抑え、食物の日持ちを良くする③うま味を増す、食物を分離させない、とろみ、歯ごたえ、のどごしをよくする等である。

食品の色合いをよくするために種々の天然、合成着色料が使われているが、健康へ影響するものは、後者が問題になることが多い。日本では、赤色合成着色料は現在12品目が許可されているが、輸入品の中には許可されていない着色料を含む製品が日本に入り込んでいることがある。その例として、スーダン色素と呼ばれる赤色着色料がある。スーダン色素はスーダンⅠ、スーダンⅡ(赤色505号)、スーダンⅢ(赤色225号)、スーダンⅣ(赤色501号)4種がある。これらの色素は食品には使用禁止になっているが、輸入品中には含まれている可能性がある。スーダン色素は、2003年、インド産の唐辛子がスーダン色素で着色されていることをフランス当局が分析、また2005年イギリス国内でスーダンレッド含有の食品300種類以上が回収され、その後、シンガポール、中国、ベトナム、日本など多くの国々で食品中にスーダン色素が含まれていることが判明し^{1)~4)}、各国当局は、食品中にスーダン色素が含まれていないかを監視している。現在、我が国では、スーダン色素は、印刷インク、化粧品などには使用されている。

著者らは、日用品、食品に添加されているフェノール系化合物の高速液体クロマトグラフィーによる分析法を検討している^{5)~7)}。検出器には、電気化学的検出法を用いており、本検出法は、スーダン色素のようなフェノール基を有する電気化学的に活性な物質のみに応答する選択的で高

感度な方法である。さらに、本研究で使用しているクーロメトリック検出器は電解効率が100%であるので通常の電気化学検出器より数十倍感度が高いと言われている。本報では、固相抽出法を用いるスーダン色素の分析法を確立し、市販輸入食品、化粧品など商品中のスーダン色素へ応用した。

2. 実験

2.1 試薬

本研究で標準品として用いた スーダンⅠ、スーダンⅡ(赤色505号)、スーダンⅢ(赤色202号)、スーダンⅣ(赤色501号)はすべて和光純薬製のものであった。移動相に用いたアセトニトリル、メタノール、エタノールは和光純薬製HPLC用、酢酸緩衝液に用いた酢酸、酢酸ナトリウムはいずれも和光純薬製特級であった。その他用いた試薬はすべて特級である。移動相、緩衝溶液を調製した水は、ミリポア製Milli-Q純水装置から得たものを使用した。

2.2 装置

クーロメトリック検出器装備高速液体クロマトグラフの構成は、ポンプが日立製ポンプL-2130型、クーロメトリック検出器がESA製CoulomⅢ、データ処理装置はSICクロマトコーダー21であった。この検出器は、作用電極が多孔性炭素電極、参照電極がパラジウム(Pd)電極、対極が白金であった。分離カラムは、昭和電工製逆相カラムShodexC18M 4D(5 μ m, 4.6mm \times 150mm)、インジェクターはRheodyne7125(20 μ L, ループ)を用いた。

2.3 移動相

移動相はアセトニトリル・エタノール(1:1)–0.1mol dm^{-3} 酢酸ナトリウム溶液(90:10,vol%)で、流量は0.8mL min^{-1} であった。

* 環境教育学科環境分析研究室

** 東京都医学総合研究所

2.4 試料および測定試料の調製

試料からスーダン色素を抽出する前処理は、水溶性試料と油性試料で異なった固相抽出法で行った。

2.4.1 水溶性試料の固相抽出

試料0.2gを精秤し、それを10mLのメタノールに溶解し、30分間超音波をかけて抽出、抽出液をろ過した。ろ液をメタノールでコンディショニングした、日立ハイテクノロジーズ製固相抽出チップNOBIAS RP-001Lに、GLサイエンス製固相抽出装置を用いて、スーダン色素類を吸着させる。その後アセトニトリル10mLで溶出させる。アセトニトリルを蒸発乾固後、メタノール1mLで溶解、定容とした。このメタノール溶液をHPLCに注入した。

2.4.2 油性試料の固相抽出

試料0.2gを精秤し、それを20mLのヘキサンに溶解し、30分間超音波をかけて抽出する。その抽出液をろ過後、分液ロートに移し、アセトニトリル10mLを加え2回振とうし、アセトニトリル層を集める。アセトニトリル層を蒸発乾固後、メタノール10mLに溶解する。メタノールでコンディショニングした上記の固相抽出チップにメタノール溶液を通過させ、スーダン色素を吸着させる。その後、アセトニトリル10mLで溶出させ、その溶出液を蒸発乾固後、メタノール1mLで溶解、定容とした。このメタノール溶液をHPLCに注入した。

3. 結果および考察

3.1 HPLCの分離条件

スーダン色素I～IVの分離条件を、有機溶媒アセトニトリル、メタノールと緩衝溶液(H₂O)の混合割合を変えて4物質が分離よく、ピークの形の良い移動相を検討したが、単一の有機溶媒では、良好な分離条件が見つからなかった。そこで、アセトニトリルとエタノールを1:1に混合、この有機溶媒と酢酸緩衝溶液の割合を変えて、4物質の分離と溶出時間を検討した。図1は、移動相のアセトニトリル・エタノール(1:1)濃度の保持時間への影響を示した。通常、有機溶媒濃度が高いとピークが接近するが、アセトニトリル・エタノールの濃度が50%を越える、溶質時間が遅くなり、90%になると、15分以内に4物質が溶出、分離のよいシャープなピークであった。また、酢酸緩衝液のpHを3.6～5.6の範囲を変化させて、保持時間、ピークの形、ピーク面積について検討したが、pHの影響はほとんど無かった。また、0.1mol dm⁻³酢酸ナトリウム溶液でもピークの分離は、同じ結果であったので、0.1mol dm⁻³酢酸ナトリウム溶液を用いた。酢酸ナトリウム濃度は、カラムの寿命と、電気化学的検出への影響を考慮し、比較低い濃度0.1mol dm⁻³とした。以上より移動相はアセトニトリル・エタノール(1:1)-0.1mol dm⁻³酢酸ナトリウム溶液(90:10, v/v)とした。

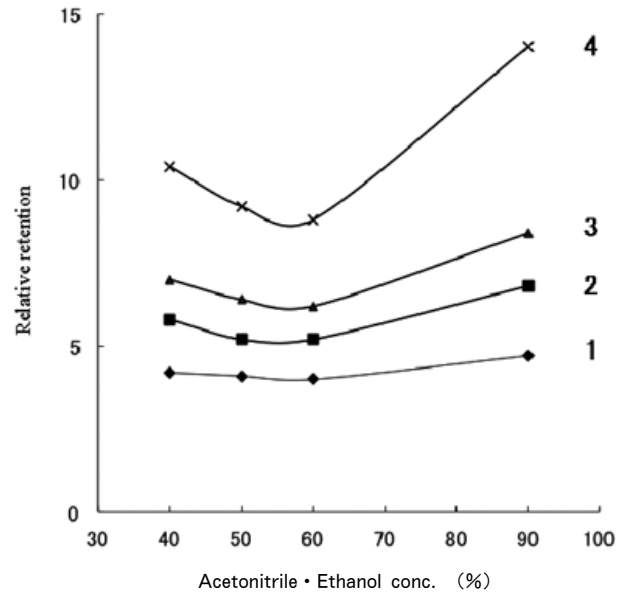


Fig. 1 Effect of Acetonitrile-Ethanol(1:1) in mobile phase on the retention time of four sudanese pigmentaries (10 ng injected), 1. sudan I, 2. sudan II, 3. sudan III, 4. sudan IV, HPLC conditions : ShodexC 18 M 4D(150 mm × 4.6 mmID), Column temperature 40°C, mobile phase: Acetonitrile-Ethanol(1:1)-0.1 mol dm⁻³(90:10, v/v), flow rate 0.8 mL min⁻¹, Coulometric detector : applied pot. E1 300 mV vs Pd, E2 600 mV vs Pd.

3.2 クーロメトリック検出器の設定電位

クーロメトリック検出器は、選択的に応答し、しかも感度高く測定できる特徴がある。分析成分は、検出器中で電解酸化あるいは電解酸化し、そのときの電流量を測定している。スーダン色素はフェノー化合物であるのでキノン構造に電解酸化されるとき電流量を測定している。分析成分を検出するには、適切な酸化電位に設定する必要がある、設定電位が大きいとベースラインの安定性、感度への影響がある。図2は、4種のスーダン色素の検出器設定電位と

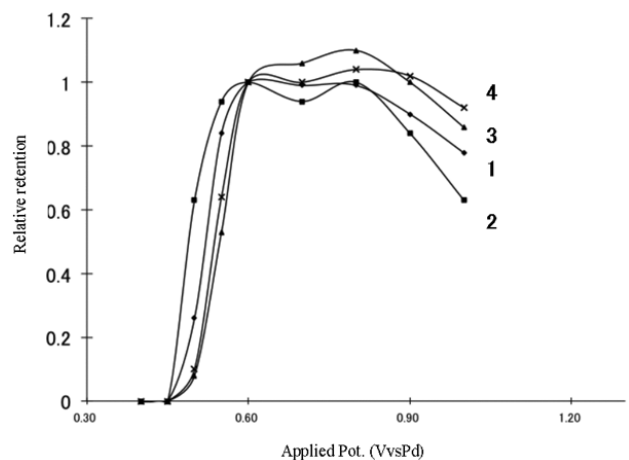


Fig. 2 Hydrodynamic voltammograms of four sudanese pigmentaries with coulometric detection (10 ng injected) 1. sudan I 2. sudan II 3. sudan III 4. sudan IV. HPLC conditions are as in Fig. 1.

ピーク高さ(加電位0.6Vのピーク高さを1とした相対感度)の関係を示したヒドロダイナミックボルタモグラムである。一般に、検出器の設定電位が高くなるに従いピーク高さは大きくなり、ある電位以上になるとほぼ一定の高さ(プラトー)になる。スーダン色素4物質の場合、ピークの相対感度がプラトーになる最も低い電位は0.6Vであったので、この電位を設定とした。

3.3 スーダン色素4種のクロマトグラム

3.1, 3.2の検討結果の測定条件(移動相アセトニトリル・エタノール(1:1)-0.1mol dm^{-3} 酢酸ナトリウム(90:10v/v))で得られたスーダン色素4種のクロマトグラムを示した。溶出順序は、スーダンI, II, III, IVで、15分以内にシャープで分離の良いピークが検出できた。図3には、4種スーダン色素の典型的なクロマトグラムを示した。

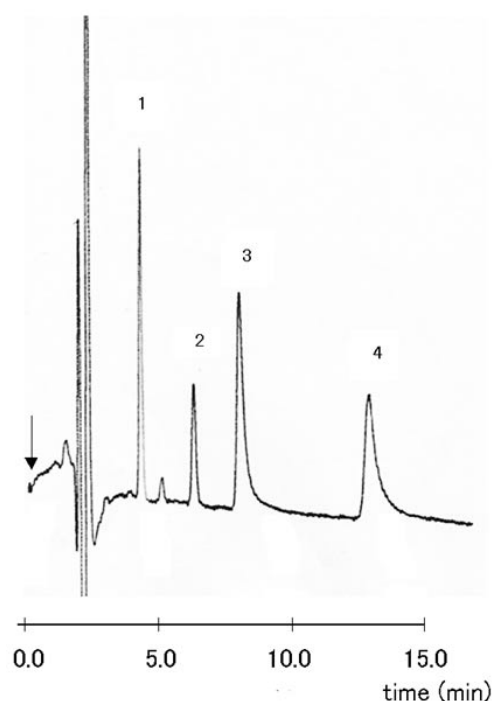


Fig. 3 Typical chromatogram of sudanese pigmentaries with coulometric detection (10 ng injected)
1. sudan I 2. sudan II 3. sudan III 4. sudan IV
HPLC conditions are as in Fig.1 Integrator sensitivity 32, Detector sensitivity 5 μA

3.4 スーダン色素4種標準溶液の測定

スーダン色素4種の濃度とピーク高さの直線性(検量線)を検討した。4種の物質の濃度範囲は $5.0 \times 10^{-11} \sim 5.0 \times 10^{-9}$ (g)で、4物質とも相関係数 $r=0.999$ の良好の直線性を示した。各スーダン色素の検量線の式は、スーダン色素I $Y=3.0 \times 10^7 X + 7.0 \times 10^6$, スーダン色素II $Y=3.0 \times 10^7 X + 7.0 \times 10^6$, スーダン色素III $Y=2.0 \times 10^7 X + 3 \times 10^6$, スーダン色素IV $Y=2.0 \times 10^7 X + 7.1 \times 10^6$ であった。

最小検出量は $S/N=3$ としたとき、保持時間の小さいスー

ダンI 20 pg, IIは40 pg 大きいIII, IVは100 pg, 200 pgであった。また、試料注入の4種色素のピーク再現性(=20 μL 注入)は、20 μL (2 ng)を10回繰り返し注入したときのばらつきの相対標準偏差は5%以下であった。

3.5 添加回収試験

2.4.1と2.4.2に従い、固相抽出法によりスーダン色素を含まない化粧品、唐辛子、印刷インクで添加回収試験を行った。添加量は4種のスーダン色素を、各10 ng, 1 ng添加した($n=5$)。回収率はいずれも、80~95%であった。この結果は妥当な分析法といえる。

3.6 実試料への応用

これまで述べてきた分析方法で、化粧品6種(外国品)、食品(糸唐辛子, 粒, 粉唐辛子輸入品)3種, 印刷インク1種を定量した。その結果を表1に示した。主に、スーダンI, IIIが多く利用されていることがわかった。

Table.1 Concentrations (%) of Sudanese pigmentaries determined in samples

試料	スーダン I	スーダン III
チーク(頬紅)A	4.1×10^{-6}	—
チーク B	2.5×10^{-7}	—
チーク C	1.2×10^{-7}	—
チーク D	3.2×10^{-7}	—
リップクリーム	3.2×10^{-8}	3.9×10^{-7}
糸唐辛子	—	3.3×10^{-7}
粒唐辛	—	1.3×10^{-7}
粉唐辛子	2.1×10^{-7}	4.0×10^{-7}
印刷インク	4.9×10^{-6}	—

スーダンII, IVは測定したすべての試料で検出されなかった。

図4はリップクリーム、図5はチリパウダーの前処理後に測定したクロマトグラムである。国内では、スーダン色素の食料品への使用は厳しく規制されているので検出されないが、輸入品中には量的には非常に少ないが、本データが示すように利用されているようである。

3.6 他の分析法との比較

平成18年に厚生労働省医薬食品局食品安全監視安全課長より「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」の通達⁸⁾がある。ここで示されている方法は、紫外可視検出器を利用するHPLCによる分析法である⁹⁾。提示された分析法で、上記の試料を測定したところほぼ同じ分析結果が得られた。著者らの方法は、電気化学検出器が高選択性、高感度であるため試料採取量は提示された分析法より1/25でよいのが大きな特徴である。

3.7 おわりに

これまで述べてきたように、本分析法は逆相カラムにODSを用い、移動相にアセトニトリル・エタノール(1:1)-0.1mol dm^{-3} (90:10v/v)を用いることによりスーダンI~

IVの4物質を15分以内に分離でき、クロマトリック検出器の使用で高感度、高選択的に検出できた。本分析法は、スーダン色素の定量に応用できる。

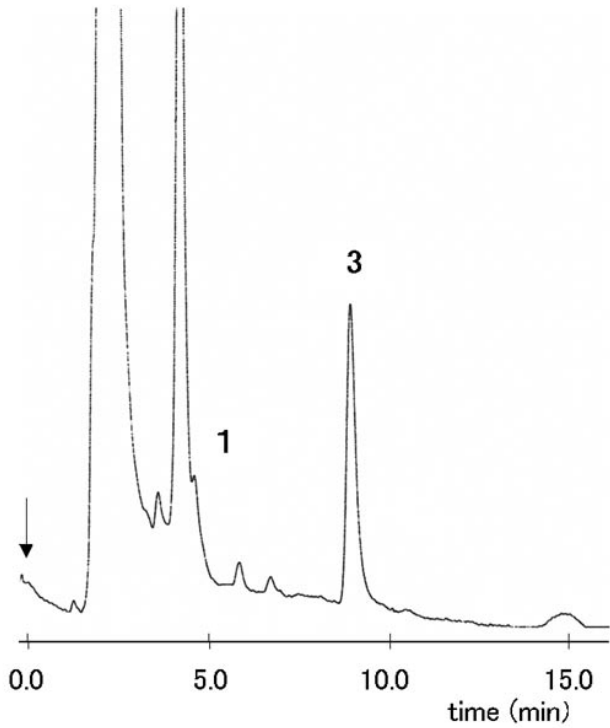


Fig. 4 Chromatogram of two sudenese pigmentaries in lip clean
1. sudan I 3. sudan III
Integrator sensitivity 512, Detector sensitivity 5 μ A

最後に、本研究にご協力いただいた環境情報学科分析研究室卒業研究生鈴木布美君、渡邊 梓君に感謝します。

文献

- 1) blog.livedoor.jp/gochagocha/archives/54468882.html 20110906
- 2) business.nikkeibp.co.jp/article/world/20070404/122242/ 20110906
- 3) www.sasayama.or.jp/wordpress/p=234 20110906
- 4) blog.livedoor.jp/gochagocha/archives/54468882.html 20110906
- 5) Motoko Narita, Kazuo Murakami and Jean-Michel Kauffmann, *Analytica Chimica Acta* **588** (2007) 316-320
- 6) 村上和雄、渡邊快記, 館野つや子, 東京家政大学研究紀要 **49**(2),45-49(2009).
- 7) Kazuo Murakami, Hayaki Watanabe, Tsuyako Tateno and Jean-Michel Kauffmann, *Electroanalysis* **2010**, 22, No 15, 1702-1706.
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全監視安全課『食品中スーダン レッド色素及びパラレッド試験法について』2006.5.1.
- 9) 岸 弘子, 神奈川県衛生試験所報告 **37**, 31(2007)

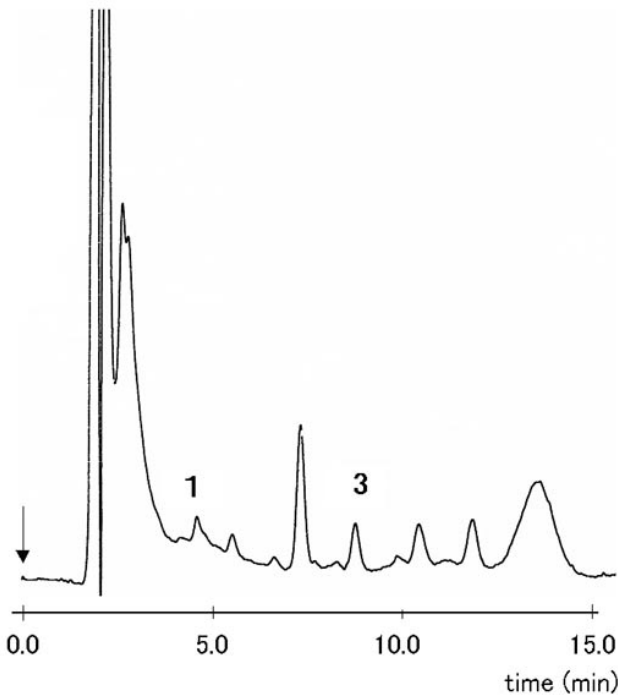


Fig. 4 Chromatogram of three sudenese pigmentaries in powder chilli pepper
1. sudan I 3. sudan III
Integrator sensitivity 512, Detector sensitivity 5 μ A

Abstract

Simultaneous determination of four Sudanese pigments (Sudan I~IV) in cosmetics, foods and print ink was studied by high performance liquid chromatography (HPLC) with coulometric detection. The Sudan I~IV were separated on ODS reversed phase column by isocratic elution with a mobile phase based on acetonitrile•ethanol (1:1) - 0.1 mol dm⁻³ CH₃COONa (90:10, v/v) at a flow rate of 0.8 ml min⁻¹. The limit of detection (S/N=3) for the analytes was in the 20-100 pg (injected mass) range at an applied potential 0.600 V vs Pd. using coulometric detector. The relationship of Sudan I~IV injection amounts and analyte peak heights showed good linearity in a range of 1 ng from 50 pg (r=0.999). The determination of four Sudan I~IV in cosmetics, foods and print ink was realized.