

(別添)

スーダン色素及びパラレッド試験法

1. 試験法の概要

食品中のスーダンⅠ，スーダンⅡ，スーダンⅢ，スーダンⅣ及びパラレッドは，アセトニトリル抽出液をシリカゲルカートリッジでクリーンアップした後，可視部吸収検出器付高速液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

「第2版 食品中の食品添加物分析法」（厚生省生活衛生局食品化学課）の一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

①油脂¹⁾

試料約5gを精密に量り，ヘキサンに溶解し，正確に100mlとする。この液10mlを100mlの分液漏斗に正確に量り入れる。これにヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加え，5分間振とうした後，静置し，アセトニトリル層を減圧濃縮容器に移す。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し，全アセトニトリル層を減圧濃縮容器に合わせ，40℃以下で減圧濃縮する。残留物にヘキサン5mlを加え，シリカゲルカートリッジ²⁾に負荷する。さらに，ヘキサン5mlで減圧濃縮容器を洗い，この洗液をシリカゲルカートリッジに負荷する。その後，ジエチルエーテル／ヘキサン(1：9)15mlを用いて減圧濃縮容器を洗い，洗液を同カートリッジに負荷し，全溶出液を別の減圧濃縮容器にとる。40℃以下で減圧濃縮し，窒素気流下で乾固させた後，残留物にアセトニトリル5mlを正確に加え，0.45µmのフィルターに通して試料液とする。³⁾

②その他の食品

試料約5gを精密に量り，100mlの遠沈管に入れ，アセトニトリル50ml，無水硫酸ナトリウム10gを加えて約1分間ホモジナイズする。3,000rpmで5分間遠心分離した後，アセトニトリル層をメスフラスコにとる。残渣にアセトニトリル30mlを加え，約1分間ホモジナイズする。3,000rpmで5分間遠心分離した後，アセトニトリル層を先のメスフラスコに合わせ，アセトニトリルを加えて100mlとする。この4mlを正確に量り，40℃以下で減圧濃縮し，さらに窒素気流下で乾固し，ヘキサン5mlに溶解する。全量をシリカゲルカートリッジに負荷する。さらに，ヘキサン5mlで減圧濃縮容器を洗い，この洗液をシリカゲルカートリッジに負荷する²⁾。その後，ジエチルエーテル／ヘキサン(1：9)15mlを用いて減圧濃縮容器を洗い，洗液を同カートリッジに負荷し，全溶出液を合わせ，40℃以下で減圧濃縮し，窒素気流下で乾固させた後，残留物にアセトニトリル2mlを正確に加え，0.45µmのフィルターに通して試料液とする³⁾。

(3) スーダン色素及びパラレッド検量線用標準液の調製⁴⁾

スーダンⅠ，スーダンⅡ，スーダンⅢ，スーダンⅣ及びパラレッド各10mgを正確に量り，それぞれ

れアセトニトリルを加え、正確に 100 mlとし、標準原液とする。各標準原液 5mlを正確に量り、混合した後、アセトニトリルを加えて正確に 100 mlとし、検量線用標準原液とする(本液 1 mlは各色素 5 µgを含む)。検量線用標準原液 1,2, 5, 10mlを正確に採り、それぞれアセトニトリルを加えて正確に 100mlとし、検量線用標準液とする(これらの液 1mlはそれぞれ各色素を 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 µgを含む)。

(4) 測定法

①測定条件

可視部吸収検出器付高速液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤⁵⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル、粒径 5 µm

カラム管：内径 4.6 mm, 長さ 150 - 250 mm

移動相：アセトニトリル／水混液(95:5)

カラム温度：40℃

流速：1.0 ml/分

測定波長：500nm⁶⁾

②検量線

検量線用標準液それぞれ 20 µl ずつを正確に採り、高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③定量⁷⁻⁹⁾

試料液 20 µl を正確に採り、高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中の各色素濃度(µg/ml)を求め、次式によって試料中の各色素含量(µg/g)を計算する。

$$\text{各色素含量 } (\mu\text{g/g}) = \frac{C \times 50}{W}$$

C: 試料液中の各色素濃度 (µg / ml)

W: 試料の採取量 (g)

試薬・試液等

1. スーダンⅠ
2. スーダンⅡ
3. スーダンⅢ
4. スーダンⅣ
5. パラレッド
6. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフ用]
7. ヘキサン[特級]
8. ヘキサン飽和アセトニトリル：ヘキサンとアセトニトリルを混ぜ、分液漏斗にてよく振とうし、

分離後，下層を採取する．

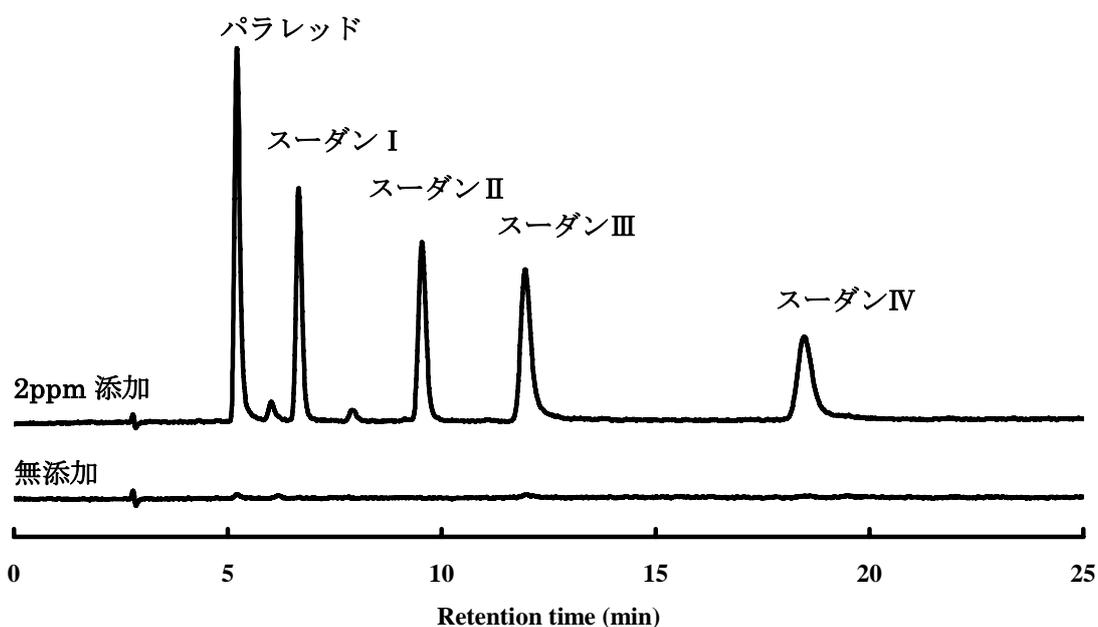
9. ジエチルエーテル[特級]
10. 酢酸エチル[特級]
11. フィルター：孔径 0.45 μm ，有機溶媒系

[注]

- 1) ラー油，パーム油等に用いる．その他の食品は試料液の調製②に従う．
- 2) シリカゲルカートリッジとして，Sep-Pak Plus シリカ (690mg) もしくはその同等品が使用できる．Sep-Pak は使用前にヘキサン 10 ml を通過させコンディショニングを行う．
- 3) 減圧濃縮により色素が塊として析出することがある，この場合，塊をアセトニトリルによく溶解させ試料液を調製する．溶解しにくい場合は超音波を用いるとよい．
- 4) 純度の低い試薬もあるため注意する．市販の試薬として，関東化学(株)製，東京化成工業(株)製，シグマ・アルドリッチ製の試薬が使用できる．また，スーダンⅢ及びⅣは，アセトニトリルに溶解しにくいいため，あらかじめ少量(約 20ml)の酢酸エチルを用いて溶解させるとよい．
- 5) 市販の充填カラムとして Inertsil ODS-3 が使用できる．
- 6) カロテノイド色素などが多く含まれる試料では，スーダンⅢ及びⅣのピークが食品中の夾雑成分の影響により妨害をうけることがある．この場合，測定波長を 520 – 540 nm に変更するとよい．
- 7) 本法における検出限界は，特に妨害ピークを認めない場合，0.5 $\mu\text{g/g}$ である．
- 8) 精度管理では 5 $\mu\text{g/g}$ での添加回収率を求めることとする．
- 9) 注入量は，必要に応じて変更する．

食品中のスーダン色素及びパラレッドのHPLCによる分析例

チリソースのHPLCクロマトグラフ



参考

スーダン色素及びパラレッド確認試験法

1. **試験法の概要**：食品中のスーダンⅠ，スーダンⅡ，スーダンⅢ，スーダンⅣ及びパラレッドは，アセトニトリル抽出液をシリカゲルカートリッジでクリーンアップした後，フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフィー，薄層クロマトグラフィー又は液体クロマトグラフィー質量分析法により確認を行う¹⁾。

2. 試験法

1) フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフィー(逆相クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

「第2版 食品中の食品添加物分析法」(厚生省生活衛生局食品化学課)の一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

スーダン色素及びパラレッド試験法の試料液を準用し，適宜，濃縮などを行う²⁾。

(3) 検量線用標準液の調製

スーダン色素及びパラレッド試験法を準用する。

(4) 測定法

①測定条件³⁾

フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフ(HPLC-PDA)を用い，次の条件によって測定する。

測定波長：350～600nm

その他の条件は，スーダン色素及びパラレッド試験法を準用する。

②定性確認

試料液をHPLC-PDAに注入し，クロマトグラフ上に検出されたピークの保持時間及びPDAスペクトルが検量線用標準液のいずれかの色素と一致することを確認する。

2) フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフィー(順相クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

「第2版 食品中の食品添加物分析法」(厚生省生活衛生局食品化学課)の一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

スーダン色素及びパラレッド試験法の試料液をオクタデシルシリル化シリカゲルカートリッジに負荷し，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容器にとる。40℃以下で減圧濃縮し，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，0.45μmのフィルターに通して試料液とする。

(3) 標準液の調製

スーダンⅠ，スーダンⅡ，スーダンⅢ，スーダンⅣ及びパラレッド各 20mg を正確に量り，それぞれヘキサンを加え，正確に 100 ml とし，標準原液とする．各標準原液 1ml を正確に量り，混合した後，ヘキサンを加えて正確に 100 ml とし，標準液とする(本液 1 ml は各色素 2 µg を含む)．

(4) 測定法

①測定条件³⁾

フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフ (HPLC-PDA) を用い，次の条件によって測定する．

カラム充てん剤：シリカゲル，粒径 5 µm

カラム管：内径 4.6 mm，長さ 250 mm

移動相：ヘキサン／酢酸エチル混液(95:5)

カラム温度：40℃

流速：1.0 ml/分

測定波長：350～600nm(保持時間の確認は 480nm)

②定性確認

試料液を HPLC-PDA に注入し，クロマトグラフ上に検出されたピークの保持時間及び PDA スペクトルが標準液のいずれかの色素と一致することを確認する．

3) 薄層クロマトグラフィー

(1) 検体の採取と試料の調製

「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」(厚生省生活衛生局食品化学課) の一般試料採取法を準用する．

(2) 試料液の調製

スーダン色素及びパラレッド試験法を準用し，濃縮後，ヘキサン溶液とする．

(3) 標準液の調製

スーダンⅠ，スーダンⅡ，スーダンⅢ，スーダンⅣ及びパラレッド各 20mg を正確に量り，それぞれヘキサンを加え，正確に 100 ml とし，標準原液とする．各標準原液 1ml を正確に量り，混合した後，ヘキサンを加えて正確に 100 ml とし，標準液とする(本液 1 ml は各色素 2 µg を含む)．

(4) 分析法

①測定条件

試料液と標準液 20µl ずつを量り，次に示す条件で薄層クロマトグラフィーを行う．

・条件 1

薄層板：オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板⁴⁾

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：オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板⁴⁾

展開溶媒：アセトニトリル／水（9：1）

・条件 3

薄層板：シリカゲル薄層板⁵⁾

展開溶媒：ヘキサン／キシレン／ジエチルエーテル(90：10：5)⁶⁾

・条件 4

薄層板：シリカゲル薄層板⁵⁾

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)⁶⁾

②定性確認

検出されたスポットのR_f値及び色調が、標準液のいずれかの色素と一致することを確認する⁷⁾。

4) 液体クロマトグラフィー質量分析法

(1) 検体の採取と試料の調製

「第2版 食品中の食品添加物分析法」（厚生省生活衛生局食品化学課）の一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

スーダン色素及びパラレッド試験法を準用する。

(3) 検量線用標準液の調製

スーダン色素及びパラレッド試験法を準用する。

(4) 測定法

①測定条件⁸⁾

カラム充てん剤⁹⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル，粒径 5 μm

カラム管：内径 2.0-2.1 mm，長さ 150 mm

移動相¹⁰⁾：0.1%ギ酸／アセトニトリル混液(15：85)

カラム温度：40℃

流速：0.2 ml/分

測定波長：500 nm

イオン化法：ESI正イオンモード

測定質量(m/z) スキャン 90－400

SIM モニターイオン	スーダン I	249
	スーダン II	277
	スーダン III	353
	スーダン IV	381
	パラレッド	294

②定性確認¹¹⁾

試料液を液体クロマトグラフィー質量分析装置(LC-MS)に注入し、クロマトグラフ上に検出された

ピークの保持時間が検量線用標準液と一致するか、あるいは、マススペクトルの強度比が検量線用標準液と一致することを確認する。

試薬・試液等

アンモニア水[特級 K8085]

キシレン[特級]

ギ酸[高速液体クロマトグラフ用]

その他の試薬はスーダン色素及びパラレッド試験法を準用する。

[注]

- 1) 本法は、スーダン色素及びパラレッドの確認試験法であり、定量分析は目的としない。また、確認は、誤認のないように慎重に行うものとし、複数の試験法により行うことが望ましい。
- 2) 試料液の濃度が薄く、ピークの確認が不明瞭である場合は、試料液を濃縮して用いる。
- 3) 移動相の溶媒及びカラムの条件は、各分析機器において最適となるように設定する。
- 4) オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板として、メルク製 RP-18 が使用できる。
- 5) シリカゲル薄層板として、メルク製シリカゲル 60 及びシリカゲル 60 アルミニウムシートが使用できる。
- 6) 脂肪分を多く含む試料液では、あらかじめ 1 次展開溶媒としてヘキサンを用いて脂肪成分を分離した後、2 次展開溶媒として、ヘキサン/キシレン/ジエチルエーテル混液で各色素を分離させるとよい。
- 7) 脂肪分を多く含む試料液では、試料液の R_f 値が標準液とずれる場合がある、この場合、試料液と標準液を重ねて塗布したスポットを、試料液及び標準液のスポットと同時に展開させ R_f 値を観察すると良い。
- 8) その他の測定条件は各測定機器に従い、検量線用標準液のピーク強度が最大となるようにあらかじめ最適化を行う。

参考としてフラグメント確認の測定条件を示す。

装置：Shimadzu LCMS-2010A

通常条件

プローブ電圧：チューニングファイル（固定）

CDL 電圧：チューニングファイル（固定）

Q-array 電圧：電圧スキャンを行う

ドライングガス：0.1MPa

フラグメント確認条件

プローブ電圧：チューニングファイル（固定）

Q-array 電圧：	CDL	DC	RF	フラグメントイオン
パラレッド	70V	70V	150V	m/z 156, 277
スーダン I	70V	70V	150V	m/z 93, 156, 232

スーダンⅡ	70V	70V	150V	m/z 121, 156, 260
スーダンⅢ	100V	100V	150V	m/z 156, 197
スーダンⅣ	100V	100V	150V	m/z 106, 156, 225

装置 : Waters alliance 2695 + Quattro Micro (LC/MS/MS)

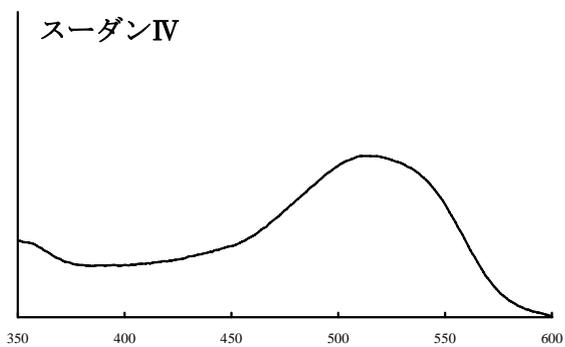
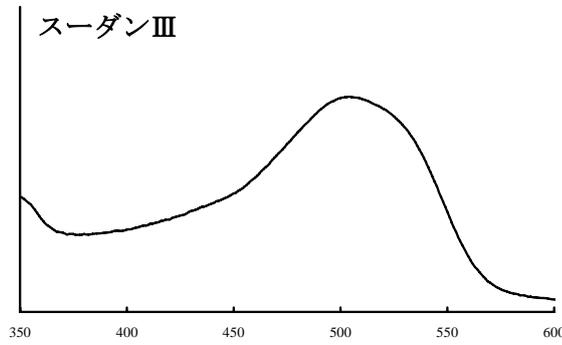
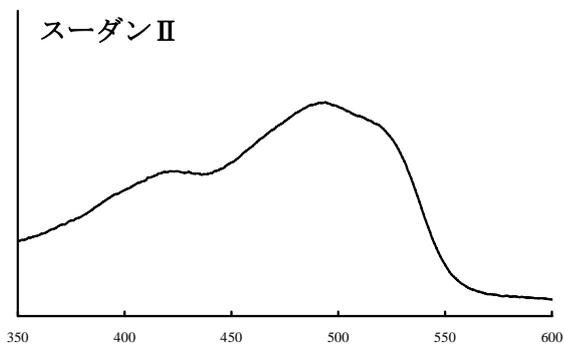
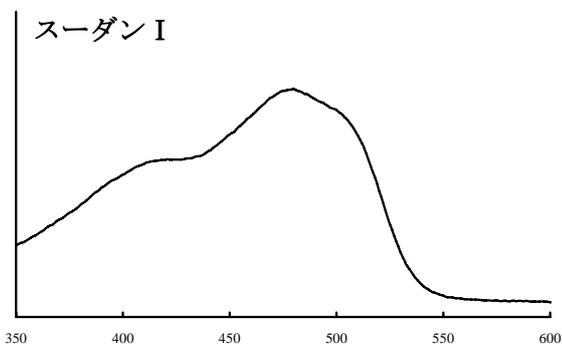
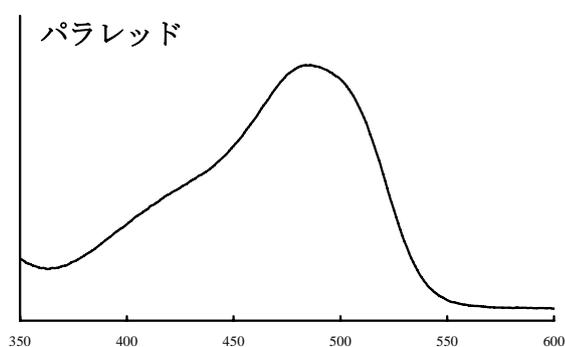
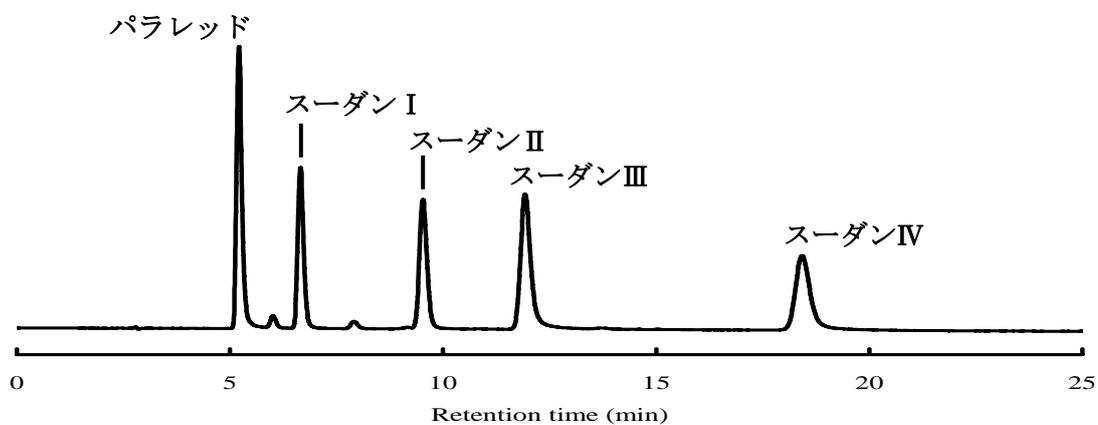
	MRM モニターイオン	コーン電圧	Collision energy
パラレッド	294.3→128.1	30V	30eV
	294.3→156.2	30V	20eV
スーダンⅠ	249.0→92.8	20V	20eV
	249.0→155.9	20V	20eV
スーダンⅡ	277.0→120.9	20V	20eV
	277.0→155.9	20V	20eV
スーダンⅢ	353.0→76.8	30V	30eV
	353.0→94.8	30V	30eV
スーダンⅣ	381.0→90.8	30V	30eV
	381.0→105.8	30V	30eV

9) 市販のカラムとして Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス)等が使用できる。

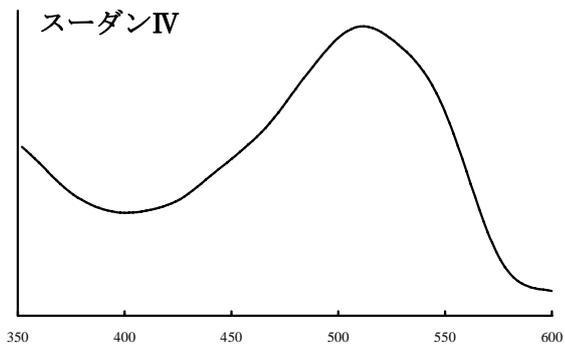
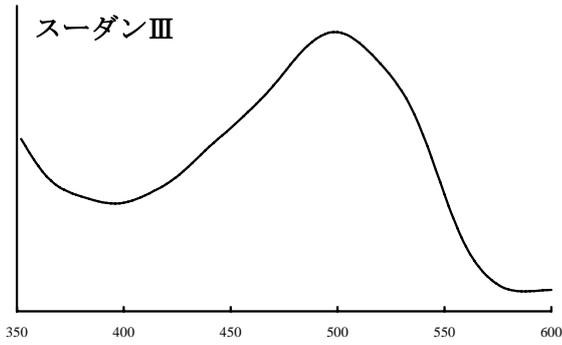
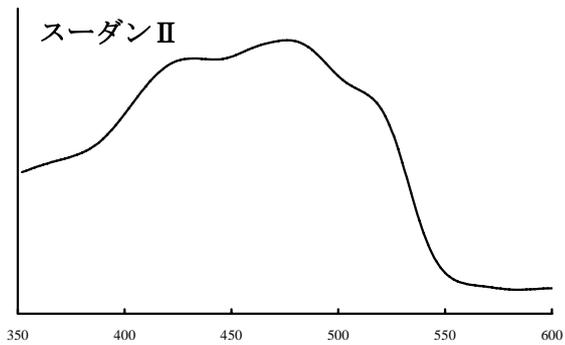
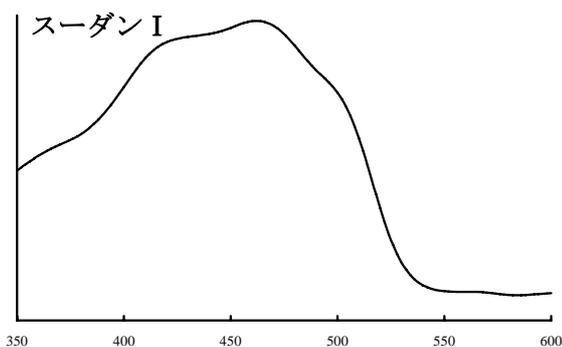
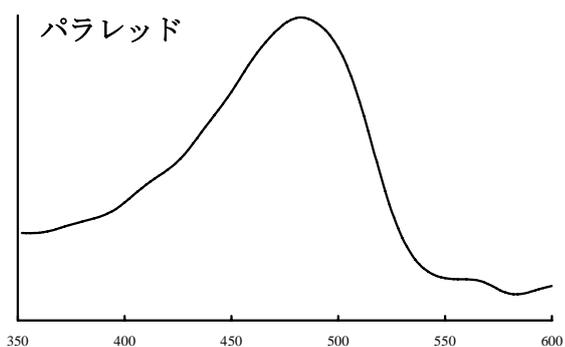
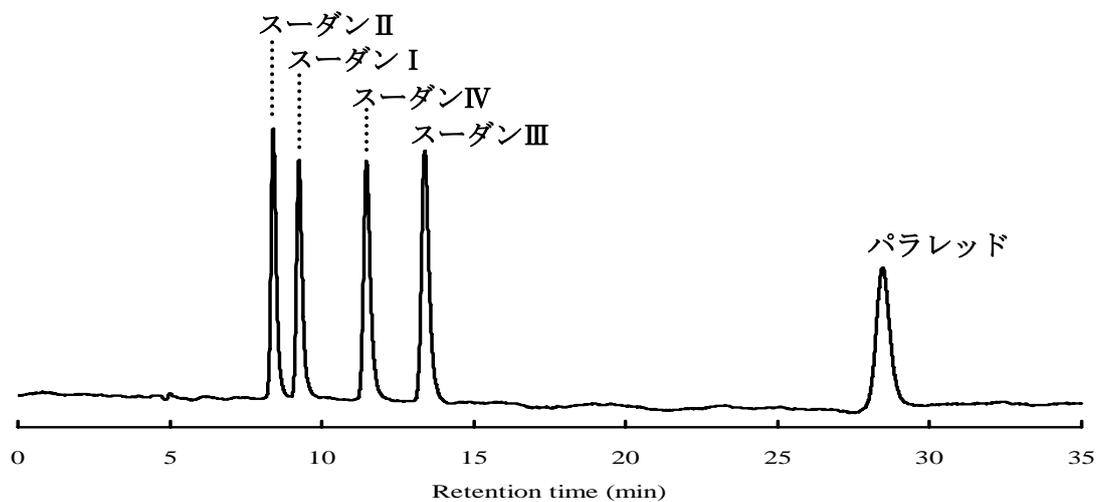
10) 移動相中のアセトニトリル濃度を増やすとスーダンⅢ及びⅣのイオン化効率が著しく低下するため注意する。移動相の条件は、各測定機器に従い検量線用標準液のピーク強度が最大となるようにあらかじめ最適化を行う。

11) LC-MSを用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑成分によるイオン阻害等の影響により検出感度が低下することがあるため、別途、対象試料の試料液に検量線用標準液を添加し、ピークが検出されることを確認する。また、マススペクトルによる確認が不可能である場合には、SIMモードにて測定を行い、クロマトグラム上に検出されたピークが検量線用標準液と一致することを確認する。

スーダン色素及びパラレッドのLC-PDAによる分析例(逆相クロマトグラフィー)



スーダン色素及びパラレッドのLC-PDAによる分析例（順相クロマトグラフィー）



スーダン色素及びパラレッドのLC-MSによる分析例

