ノート

LC-MSを用いた食品中の着色料検出法

(平成26年4月25日受理)

山口 瑞香* 梶村 計志

Analysis of Colorants in Foods Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Mizuka YAMAGUCHI* and Keiji KAJIMURA

Osaka Prefectural Institute of Public Health:
1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan;

* Corresponding author

A method using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) was developed for the simultaneous determination of colorants in foods. Twenty-five colorants were extracted from foods with water or methanol and ammonia water, and cleaned up with a solid-phase extraction column. Recovery rates were between 71 and 113%, and relative standard deviations were less than 10%. The detection limits of the colorants were 0.2–0.8 µg/g. The analytical method using LC-MS established in this study is suitable for the detection of colorants in processed foods.

(Received April 25, 2014)

Key words: 着色料 colorant; 固相抽出カラム solid-phase extraction column; ポリアミド polyamide

緒言

着色料は合成色素と天然色素に大別される。わが国では、12種類の合成色素および多数の天然色素の食品への使用が許可されている。しかし、表示されていない着色料の検出事例や輸入食品から指定外着色料が検出される事例が数多く発生しており、多種類の着色料に適応可能な迅速かつ正確な試験法が求められている。

当所では薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた着色料の検査を実施している。しかし、一部の試料において、使用量が少ないと推測される着色料の感度不足や試料由来の妨害成分によって R_f 値が一致しないなどの問題が生じた。着色料の分析方法としては TLC のほかに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が汎用されている^{1)~4)}。しかし、HPLC による多成分一斉分析の場合、類似するスペクトルを有する着色料が近接して検出すると同定が困難になる場合がある。最近では、さらに選択性の高い高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いた着色料分析法が報告されている^{5), 6)}。LC-MS を使用することにより、HPLC ではピークの分離が困難であった着色料が同時に分析でき、これまで以上に多種類の着色料を一斉に分析できると考えられた。前処理法では、食品分析の精製に利用されている市販の固相抽出カラムの着色料分析への使用が報告されて

いる⁴⁾。従来の精製法を固相抽出カラムにすることにより、前処理法の簡便化が期待できる。そこで今回、LC-MS による、12種類の許可合成色素を含む25種類の着色料を対象とした固相抽出カラム精製を用いた一斉分析法を検討した。

実験方法

試料

市販の菓子類、魚介類加工品等30検体を使用した。

試薬および器具

着色料標準品

許可色素: 食用赤色2号 (R2), 食用赤色3号 (R3), 食用赤色40号 (R40), 食用赤色102号 (R102), 食用赤色104号 (R104), 食用赤色105号 (R105), 食用赤色106号 (R106), 食用青色1号 (B1), 食用青色2号 (B2), 食用黄色4号 (Y4), 食用黄色5号 (Y5), 食用緑色3号 (G3) は医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団製を用いた。

天然色素: コチニール色素 (Co), ラック色素 (Lac) は和光純薬工業(株)製を使用した。

指定外色素: キノリンイエロー (QY) は MP Biomedicals, Inc. (a), 東京化成工業(株) (b) および Sigma-Aldrich 社製 (c) を使用した。アシッドバイオレット 6B (AV6B), アズルビン S (AZS), エオシン Y (ESY), オレンジ II (O2), ナフトールイエロー S (NYS), パテントブルー VF (PBVF), ボンソー 3R (PC3R) は和光純薬工業(株)製, アシッドグ

* 連絡先

大阪府立公衆衛生研究所: 〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

リーン3 (AG) は東京化成工業(株)製, ボンソー2R (PC2R) はChroma Gesellschaft Schmidt & Co.社製, パテントブルー V (PBV) はSigma-Aldrich社製を用いた.

標準溶液: 標準品をおのおの10 mg秤量し, 50%メタノール水溶液5 mLに溶解して2,000 µg/mLの標準原液を調製した. 各標準原液を等量混合し, 混合標準溶液を調製した. この混合標準溶液を水で希釈し, 0.5~20 µg/mLの検量線作成用標準溶液を作成した.

その他の試薬: アセトニトリルは和光純薬工業(株)製 LC/MS用, メタノールは和光純薬工業(株)製高速液体クロマトグラフィー用試薬, 酢酸エチルは和光純薬工業(株)製残留農薬・PCB試験用を用い, 酢酸, 25%アンモニア水および酢酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた. 水はメルクミリポア社製MQ-Advantageにより精製して用いた.

固相抽出カラム: Supelco Discovery DPA-6S 500 mg (以下DPAカラム) および和光純薬工業(株)Presep Polyamide C-200 Type M 2 g/25 mL (以下C-200カラム) は, あらかじめメタノール, 水各10 mLでコンディショニングして使用した.

メンブランフィルター: アドバンテック東洋(株)製 DISMIC (親水性PTFE, 13 mmφ, 0.2 µm) を使用した.

ろ紙: アドバンテック東洋(株)製 定量ろ紙5Aを用いた.

装 置

遠心分離器はModel 5922 ((株)久保田製作所製) を, LC-MSはLCMS-2020 ((株)島津製作所製) を用いた.

LC-MS測定条件

<HPLC条件>

分析カラム: 一般財団法人 化学物質評価研究機構 L-column HB (2.1×150 mm, 5 µm), カラム温度: 40℃, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 5 µL, 移動相: A液: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 B液: アセトニトリル, グラジエント条件: B液3% (0 min)→55% (30 min)→70% (35 min)→3% (43 min), PDA測定波長: 200~900 nm.

<MS条件>

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法, イオン化モード: Negative, 分析モード: SIR, Scan測定範囲: m/z 200~900, DL温度: 250℃, ネブライザーガス (N_2) 流量: 1.5 L/min, ヒートブロック温度: 200℃, ドライイングガス (N_2) 流量: 15 L/min, インターフェイス電圧: 4.5 kV. 物質ごとの条件はTable 1に示した.

TLC条件

薄層板: メルクミリポア社製 TLCガラスプレート シリカゲル60, 展開溶媒: 酢酸エチル-メタノール-25%アンモニア水 (2:1:1), 展開距離: 10 cm, スポット量: 5 µL.

試験溶液の調製

試料約5 gを採取し, タンパク質および糖質が多い試料にはメタノール, その他の試料には水を約50 mL加えてかくはんしながら加温した. 試料がなお着色しており抽出液の着色が十分でない場合は1%アンモニア水を添加してpHを8~9に調整し, さらにかくはんしながら加温して着色料を抽出した. 5℃, 3,000 rpmで10分間遠心分離し, 上清を水抽出液はそのまま, メタノール抽出液は半分程度に濃縮して同量の水を加えて着色料抽出液とした. この抽出液を4%酢酸でpHを3~4に調整し, ろ紙を用いてろ過後, DPAカラムに負荷した. 水で流出液が透明になるまで洗浄後, さらにメタノールで流出液が透明になるまで洗浄し, 1%アンモニア水-メタノール (1:1) 5 mLにより着色料を溶出した. その後溶出液を濃縮し, 水で2 mLに定容後, メンブランフィルターでろ過して試験溶液とした.

添加回収試験

着色料が使用されていない炭酸飲料およびゼリーおのおの5併行で, 2 µg/gとなるよう25種類の混合着色料標準溶液を添加し, 添加回収試験を実施した.

結果および考察

QY標準品の選定

QYは輸入品を対象とした検疫所の検査において違反が

Table 1. SIR conditions

Name	Color index	m/z	RT	Name	Color index	m/z	RT
R2	16185	268	6.7	PC3R	16155	449	18.3
R3	45430	834	20.0	PC2R	16150	435	16.7
R40	16035	451	12.4	AZS	14720	457	16.1
R102	16255	268	9.7	ESY	45380	646	17.4
R104	45410	784	23.2	AV6B	42640	710	25.4
R105	45440	972	25.3	NY	10316	313	10.8
R106	45100	557	22.3	QY	47005	432 (di)	11.4
Y4	19140	233	5.4			352 (mono)	18.4
Y5	15985	203	10.7	O2	15510	327	22.5
B1	42090	748	17.8	PBV	42051	559	23.1
B2	73015	421	7.4	PBVF	42045	543	21.2
G3	42053	764	17.1	AG	42085	685	25.3
Co	75470	491	6.7	Lac	75450	536	8.1

RT: Retention time (min)

見つかっており、指定外着色料の中でも検査の必要性が高い着色料である。QYはキノリルインダンジオン骨格にスルホン酸基が付加したものの混合物である²⁾。指定外着色料であるQYは食品添加物としての規格基準が存在しないため、その混合比率がメーカーにより大きく異なる可能性がある。そこで今回、3社のQYを測定し、混合比率を確認した。質量電荷比 (m/z) 352はスルホン酸基が1個 (QY-mono), 432は2個付加した化合物 (QY-di) の検出に用いた。測定の結果、(a) は主にQY-mono, (b) は主にQY-di, (c) はQY-monoおよびQY-diが確認でき、メーカーにより混合比率に違いがあることが分かった (Fig. 1)。また、同一 m/z でも複数のピークが確認できることからスルホン酸基の付加する位置によって、保持時間が変化すると考えられた。今回、QYの標準品としてQY-monoおよびQY-diが同程度混合されていたSIGMA社製を用い、 m/z 352および432で最も高感度であった18.4分および11.4分のピークにて検出を判断した。食品中からQYを検出する際は、 m/z 352または432のピークを確認する必要があると考えられる。

LC-MS条件の検討

イオン化にはESI法を選択し、各標準溶液を用いて測定条件の最適化を行った。関戸ら⁵⁾の測定条件を参考に、LCの移動相に酢酸アンモニウム水溶液およびアセトニトリル、分析カラムに同種の固定相のL-column HBを使用した。R2とR102は異性体であり m/z が同一であるため、分離で

きるグラジエント条件を構築した。その結果、25種類の着色料の同時測定が可能となった。R40, R3, R104, R105, G3, B1, B2, NYS, QY-di, AZS, ESY, PC2RおよびPC3Rは $[M-2Na+H]^-$, Y4, R2およびR102は $[M-3Na+H]^{2-}$, R106, QY-mono, O2, AV6B, PBVおよびPBVFは $[M-Na]^-$, Y5は $[M-2Na]^{2-}$ と考えられるスペクトルが最も高感度で検出されたため、これらを測定イオンとした。Scan測定およびPDA測定を同時に行い、スペクトルによる定性確認を実施した。Fig. 2に25種類の混合標準溶液のクロマトグラムを示した。一部の物質は保持時間が一致したため、SIRにてピークが確認できた場合は、Scan測定にて得られたMSスペクトルの確認を行った。また、PDAを用いて天然色素は254 nm, 青色系色素は610 nm, 赤色系色素は520 nm, 黄色系色素は450 nmのクロマトグラムを確認するとともにPDAスペクトルの確認も実施した。本法の検出限界は測定イオンから得られるクロマトグラムが $S/N \geq 3$ となる標準溶液の濃度から算出し、試料あたりB2は0.8 $\mu\text{g/g}$, AZSおよびQY-diは0.4 $\mu\text{g/g}$, その他を0.2 $\mu\text{g/g}$ とした。

前処理方法の検討

食品衛生検査指針¹⁾には、試料から水などにより抽出した着色料を、酸性条件下でポリアミドに吸着させて精製を行う分析法が掲載されている。しかし、この方法はポリアミド粉末のカラムへの充填操作と大量の洗浄液を必要とするため煩雑であった。そこで精製の原理を変えずに操作を

Fig. 1. Chromatograms of Quinoline Yellow

(a) MP Biomedicals, Inc.; (b) Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.; (c) Sigma-Aldrich

Fig. 2. Chromatograms of 25 colorants (20 µg/mL)

(a) Scan chromatogram; (b) PDA chromatograms

Table 2. Recoveries of colorants from samples

Name	Carbonated drink		Jelly		Name	Carbonated drink		Jelly	
Extract	Water		Methanol		Extract	Water		Methanol	
	Recovery	RSD	Recovery	RSD		Recovery	RSD	Recovery	RSD
R2	98	3	99	6	PC3R	100	3	94	4
R3	93	4	106	2	PC2R	94	3	87	4
R40	85	4	84	3	AZS	76	4	78	5
R102	105	4	93	4	ESY	97	3	103	2
R104	77	3	83	5	AV6B	91	3	101	3
R105	72	3	71	4	NY	82	3	80	3
R106	113	2	109	2	QY (di)	107	2	97	5
Y4	105	3	101	3	(mono)	105	4	94	3
Y5	109	6	104	2	O2	109	3	100	3
B1	99	4	98	4	PBV	104	2	103	3
B2	107	9	100	3	PBVF	113	3	108	3
G3	100	3	101	1	AG	95	4	99	3
Co	99	5	107	5	Lac	105	4	101	3

簡便化するため、市販のポリアミド固相抽出カラムであるDPAカラムとC-200カラムを用いて精製法の検討を行った。Y4, R2, R3およびR105が含まれるゼリー様食品から回収できる着色料を比較した。その結果、Y4, R2およびR3では大きな差はなかったが、R105では、DPAカラムはC-200カラムより1.5倍回収量が多かった。また、C-200

カラムは溶出操作を行った後もカラムが着色しており、R105がカラムに残存していると考えられた。このことから、精製にはDPAカラムを用いることとした。

次に抽出液について検討した。着色料が使用される食品は多岐にわたり、ゼリーや魚肉練り製品では、水を抽出液とした場合、カラムが詰まり精製が困難であった。水抽出

Table 3. Detection of colorants in commercial foods

sample	Food labeling	Extraction solvent	LC-MS not detected	TLC not detected
1. Candy	R102	Water	—	—
2. Gummi candy	Y4 R40 B1	Ammonia water	—	—
3. Marshmallow	Y4 Y5 R40 B1	Water or methanol	—	—
4. Minced and fried flesh	R106 B1	Methanol	—	—
5. Fish paste	R106	Methanol	—	—
6. Fish sausage	Co	Water	—	—
7. Rice cracker	Y4 Y5 R102 R106 B1	Ammonia water	—	R102
8. Shrimp cracker	Y5 R102	Ammonia water	—	—
9. Half-finished shrimp cracker	Y4 Y5 R102 B1	Ammonia water	—	B1
10. Fried rice cracker	Y4 Y5 R3 B1	Ammonia water	—	R3
11. Dry gluten	Y4 R106 B1	Ammonia methanol	—	—
12. Seasoned cod roe*	Y5 R3 R102	Methanol	—	R3
13. Chocolate 1	Y4 Y5 R40 B1	Water	—	—
14. Chocolate 2	Y4 Y5 R40 B1	Methanol	—	Y4
15. Chocolate 3*	Y4 B1	Methanol	—	Y4
16. Chocolate 4*	R40 B1	Methanol	—	B1
17. Biscuit	R102	Water	—	—
18. Cracker*	Y4 Y5 B1	Water	—	B1
19. Corn chips	Y4 Y5 B1	Methanol	—	—
20. Potato chips	Y4 Y5 R40	Methanol	—	—
21. Jelly	Y4 Y5 R102 R106 B1	Ammonia methanol	—	—
22. Jelly beans 1	Y4 Y5 B1 Lac	Methanol	—	Lac
23. Jelly beans 2	Y4 Y5 R40 B1 B2	Methanol	—	—
24. Mango pudding	Y4 R40	Methanol	—	—
25. Sweet pink rice cake	Co	Ammonia methanol	—	Co
26. Carbonated drink	R40 B1	Water	—	B1
27. Powder juice	Y4 R2 R3 B1 B2	Water	—	—
28. Caramel syrup	Y4 Y5 R40	Methanol	—	—

* Samples of 10 g were used.

—: All colorants were detected.

で精製が困難であった糖質やタンパク質を多く含む試料は、除タンパクおよび糖質の抽出量を低減する目的でメタノールによる抽出を行った。しかし、メタノールのみの抽出液をDPAカラムに負荷すると、青色系のB1, B2, PBVおよびPBVFの保持が低下した。そこで、メタノール抽出液を濃縮し、水を加えて50%メタノール水溶液として負荷することとした。

添加回収試験結果

炭酸飲料は水、ゼリーはメタノールによる抽出を行い、試験溶液は2 mLとした。その結果、平均回収率71~113%、相対標準偏差10%未満となり (Table 2)、着色料の検出に使用可能であると判断した。

実試料の分析

着色料が使用されている市販の菓子類、魚介類加工品など28検体から表示どおりに各着色料が検出できるかを検証した (Table 3)。No. 23のゼリービーンズの試験溶液は2倍に希釈して測定した。No. 15, 16のチョコレートは着色料がチョコレート内に練り込まれた製品であったため着色料の使用量が少ないと考えられた。そこで、着色部分のみを選別し、試料を10 g使用し、試験溶液の調製を行った。No. 4の揚げかまぼこには色調の異なる3種類のかまぼこが入っており、着色されていると考えられた2種類を別々に採取して分析した。その結果、表示どおりの着色料が検出

でき、マススペクトルおよびPDAスペクトルも確認できた。また、No. 18のクラッカーのB1, No. 12の明太子のR3, No. 28のキャラメルシロップのR40は試料5 gでは検出できなかったため試料量を10 gとして再分析を実施した。その結果、検出することが可能となった。

同一試験溶液をTLCにスポットして上記の条件で展開後、標準溶液と R_f 値を比較した。その結果、検出できた試料では R_f 値がすべて一致した。いくつかの試料ではスポットが確認できず表示の着色料が検出できなかった。

ま と め

LC-MSを用いた25種類の着色料の一斉分析法を検討した。試料精製に固相抽出カラムを用いることにより、迅速かつ簡便な前処理方法が構築できた。本法を用いて食品試料を分析した結果、表示どおりにすべての着色料を検出することができた。よって本法は食品中の着色料検出法として有用な方法であると考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針, 食品添加物編. 東京, 社団法人日本食品衛生協会, 2003, pp. 169-199.
- 2) Miyatake, N., Nagayama, T. Simultaneous Analytical Method of synthetic colours in food using TLC and HPLC.

- Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P. H., **56**, 145–151 (2005).
- 3) Ishikawa, F., Saito, K., Nakazato, M., Fujinuma, K., Moriyasu, T., Tomomatsu, T. Analytical method of 21 coal tar dyes in foods by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **37**, 281–287 (1996).
 - 4) Kawasaki, H., Onishi, Y., Tatebe, C., Sato, K., Akiyama, H., Kawamura, Y. Improved analytical method for tar dyes in food and application to market basket samples. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Japanese Journal of Food Chemistry and Safety)*, **19**, 136–140 (2012).
 - 5) Sekido, H., Kishi, H. Analysis of artificial colorant in foods using liquid chromatography/mass spectrometry. *Kanagawaken Eiseikenkyusho Houkoku*, **38**, 35–38 (2008).
 - 6) Ishikawa, F., Oishi, M., Shindo, T., Horie, M., Yasui, A., Ogino, S., Ito, K. Confirmation of non-permitted dyes detected in akasu (red vinegar) by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 228–233 (2005).