

短報

高速液体クロマトグラフィー/ 質量分析法を用いた 食品中の合成着色料の分析

関戸晴子, 岸 弘子

Analysis of artificial colorant in foods using liquid chromatography/ mass spectrometry

Haruko SEKIDO, Hiroko KISHI

はじめに

わが国の食品市場では年々輸入食品の占める割合が増加する一方であり、食品中においてわが国では食品添加物として許可されていない色素である指定外色素の検出事例がしばしば報告されている。

食品中の合成着色料の試験は、通常薄層クロマトグラフィー (TLC) あるいは液体クロマトグラフィー (HPLC) で定性による試験を実施している。TLCは試料液のスポットの色調とRf値から色素を同定する試験法である。操作は簡便ではあるが、TLC条件によっては展開後の試料液のスポット形状が悪く、標準液とRf値が異なり判定が困難となる場合や添加された色素が少量であった場合は検出できないという問題点がある。HPLCはグラジェントで一斉分析するのが主流であるが、グラジェント条件や分析カラムによって分離の仕方が微妙に異なり、保持時間が近接したり、検出する色素の順番が逆転したりするため、吸収スペクトル確認が必須となる。また、色素によっては吸収スペクトルが類似したものが多く、試料液の調製方法により保持時間の変動が顕著にみられたりすることもあるので¹⁾、吸収スペクトル確認だけでは判定が困難となる場合もある。

そこで今回、合成着色料 (酸性タール色素) の検査法として、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) を使用し、マススペクトル照合による確実な同定のできる確認方法としての一斉分析法を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

方 法

1. 色素標準品

指定色素12種類および指定外色素5種類を対象とした。表1に色素名、Color Index Number (C.I.No.) 等について示した。指定色素 (Y4, Y5, R2, R3, R102, R103, R104, R105, R106, R40, B1, B2, G3) は国立衛生試験所標準品または食品添加物公定書標準品を使用した。指定外色素はアゾルビン, グリーンS, オレンジIIは東京化成製, パテントブルーVは関東化学製, キノリンイエローはシグマ社製を使用した。

表1 色素標準品

指定色素12種					
略号	食品添加物名	C.I.No.	分子式	分子量	吸収極大波長(nm)
R2	食用赤色2号	16185	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	604.47	520
R3	食用赤色3号	45430	C ₂₀ H ₆ I ₄ Na ₂ O ₅	879.86	526
R40	食用赤色40号	16035	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	496.42	501
R102	食用赤色102号	16255	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	604.47	508
R104	食用赤色104号	45410	C ₂₀ H ₂ Br ₄ Cl ₄ Na ₂ O ₅	829.63	538
R105	食用赤色105号	45440	C ₂₀ H ₂ Cl ₄ I ₄ Na ₂ O ₅	1017.64	548
R106	食用赤色106号	45100	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	580.65	566
Y4	食用黄色4号	19140	C ₁₆ H ₉ N ₂ Na ₃ O ₉ S ₂	534.36	428
Y5	食用黄色5号	15985	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	452.37	482
B1	食用青色1号	42090	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	792.85	630
B2	食用青色2号	73015	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	466.35	612
G3	食用緑色3号	42053	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₁₀ S ₃	808.75	628
指定外色素5種					
色素名	C.I.No.	分子式	分子量	吸収極大波長(nm)	
アゾルビン	14720	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	502.43	516	
グリーンS	44090	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₇ S ₂	554.63	635	
オレンジII	15510	C ₁₆ H ₁₁ N ₂ NaO ₅ S	350.32	484	
パテントブルーV	42051	C ₂₇ H ₃₁ N ₂ NaO ₇ S ₂	582.66	638	
キノリンイエロー(モノ体)	47005	C ₁₈ H ₁₀ NNaO ₅ S	375.33	414	
(ジ体)		C ₁₈ H ₉ NNa ₂ O ₈ S ₂	477.38	416	

2. 試薬

アセトニトリルは和光純薬製HPLC用を用いた。その他の試薬は、すべて市販特級品を使用した。

3. 色素標準溶液の調製

各種標準品 (Y4, Y5, R2, R3, R102, R103, R104, R105, R106, R40, B1, B2, G3, アゾルビン, パテントブルー, グリーンS, オレンジII) 10mg, キノリンイエローは20mgを正確に量り、各々水を加えて正確に10mlとし、標準原液とした。各々の標準原液を1mlとり、指定色素12種を混合したものに水を加えて20mlとしたもの (12種混合標準溶液) と、指定外色素5種を混合したものに水を加えて20mlとしたもの (5種混合標準溶液) の2種類を作製し、LC/MS用標準溶液とした。

4. 装置

Agilent1100シリーズ LC/MSD SL(アジレント社製)

5. LC/MS条件

カラム: Inertsil ODS-2 2.1mmi.d.×150mm 粒子径

3 μ m (GLサイエンス社製)；移動相：0.01mol/l 酢酸アンモニウム溶液 (A) 及びアセトニトリル (B) をA:B=95:5(0min)→30:70(40min)→95:5(45~55min)の条件でグラジエント分析；流速：0.2ml/min；注入量：5 μ l；カラム温度：40°C；UV検出波長：254nm；イオン化法：ESI Negative；フラグメンター電圧：0~10.5min 60V, 10.5~16.5min 150V, 16.5min~55.0min 200V；ネブライザーガス：N₂ (35psi)；乾燥ガス：N₂ (12.0 l/min, 350°C)；キャピラリー電圧：4000V；SCAN： m/z =200~1100

結果及び考察

1. LC条件の検討

指定色素12種及び指定外色素5種ともに日常当所でHPLC分析の際使用している, 0.01mol/l酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリルを使用したグラジエント条件²⁾で再現性よく良好に分離したためこの条件を採用した.

2. MS条件の検討

今回使用した色素17種 (指定色素12種及び指定外色素5種) はESI法, ネガティブモードでイオン化が可能であった. 各色素の脱プロトン化イオンの出現に適したフラグメンター電圧を測定したところ, それぞれの色素で異なる最適電圧を示したため, HPLCの保持時間を考慮して3グループに分けそれぞれの色素が最適条件近くになるよう設定した.

指定色素12種のLC/MSによる分析結果を図1に, またそれぞれの色素のMSスペクトルを図2に示した. 12種類すべての色素から脱プロトン化イオンを確認することができた. キサンテン系色素のうちR3, R104, R105からは $[M-2Na+H]^-$, R106からは $[M-Na]^-$ が確認され, アゾ系色素のうちY4, R2, R102からは $[M-3Na+2H]^-$, Y5, R40とインジゴイド系色素であるB2, トリフェニルメタン系色素であるB1, G3からは $[M-2Na+H]^-$ が確認された⁴⁾. また, R104とR105は特徴のあるMSスペクトルが検出されたので図3に拡大したものを示した. R105は塩素原子を4個含むため, $m/z=972.4$ が最も強度が高く, 次に970.4, 974.4, 976.4の順の強度比で塩素由来の特徴的な同位体イオンが確認された. R104は塩素原子と臭素原子4個ずつ含むため, $m/z=784.5$ が最も強度が高く, 次に782.5, 786.5, 780.5, 788.5の順の強度比で特徴的な同位体イオンが確認された. これら複数のイオンの出現は, 化合物の構造情報を反映しているため, 定性分析の際の成分同定に有力な情報となる.

指定外色素5種のLC/MSによる分析結果を図4に, それぞれの色素のMSスペクトルを図5に示した. 5種類す

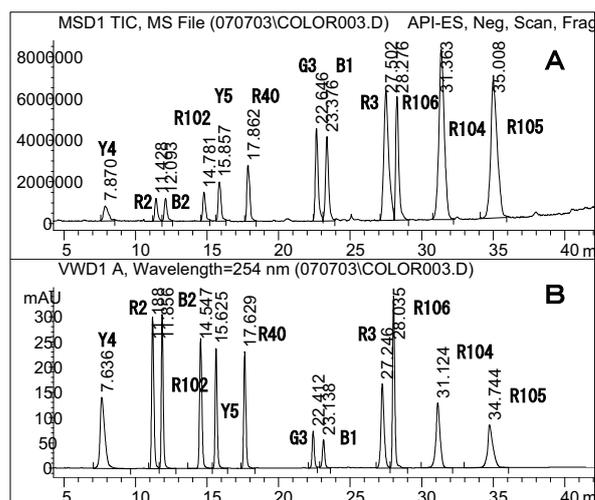


図1 指定色素12種のLC/MSクロマトグラム
A:MS(TIC)クロマトグラム B:UV254nmクロマトグラム

べての色素から脱プロトン化イオンを検出することができ, アゾルビンからは $[M-2Na+H]^-$, オレンジII, パテントブルーVからは $[M-Na]^-$, グリーンSからは $[M-H]^-$ が確認された. キノリンイエローはキノリルインダンジオン骨格にスルホン酸基 (ナトリウム塩) が付加したもので, その数が1個から3個のものの混合物であることは知られている⁵⁾. 使用したシグマ社のキノリンイエローからUV254nmにおいて3本のピークが認められた. MSスペクトルを確認すると, 保持時間24.333分にモノスルホン化体由来の $[M-Na]^-$ である $m/z=352.0$ が, 14.580分にジスルホン化体由来の $[M-2Na+H]^-$ である $m/z=431.9$ が確認された. 今回使用したシグマ社製のもの以外に当所に保管してある別のキノリンイエロー4検体 (東京化成工業株製ロット違い3検体, アルドリッチ社製1検体) について同様に測定したところ, それぞれUV254nmにおけるピーク数は1本から複数本と様々な検出された. MSスペクトルではすべての検体から保持時間24.5分付近にモノスルホン化体由来の $[M-Na]^-$ である $m/z=352.0$ が確認され, 複数本ピークが検出されたものからは, 保持時間14.5分付近にジスルホン化体由来の $[M-2Na+H]^-$ である $m/z=431.9$ も確認された. このことから, キノリンイエローについては, 標準品に用いる製品によって, 異性体であるモノ体, ジ体の存在する割合が異なり, モノ体とジ体由来の2つのMSスペクトルを確認に用いるのが有効であることが示唆された.

市販品への適用にあたり, 平成19年度の外部精度管理試験 (漬物中のR102,R106) と当所で以前キノリンイエローが検出されたりキュールの2検体を用いて本法を確認手段として活用したところ, 2検体ともマススペクトル照合による確実な同定結果を得ることができた. リ

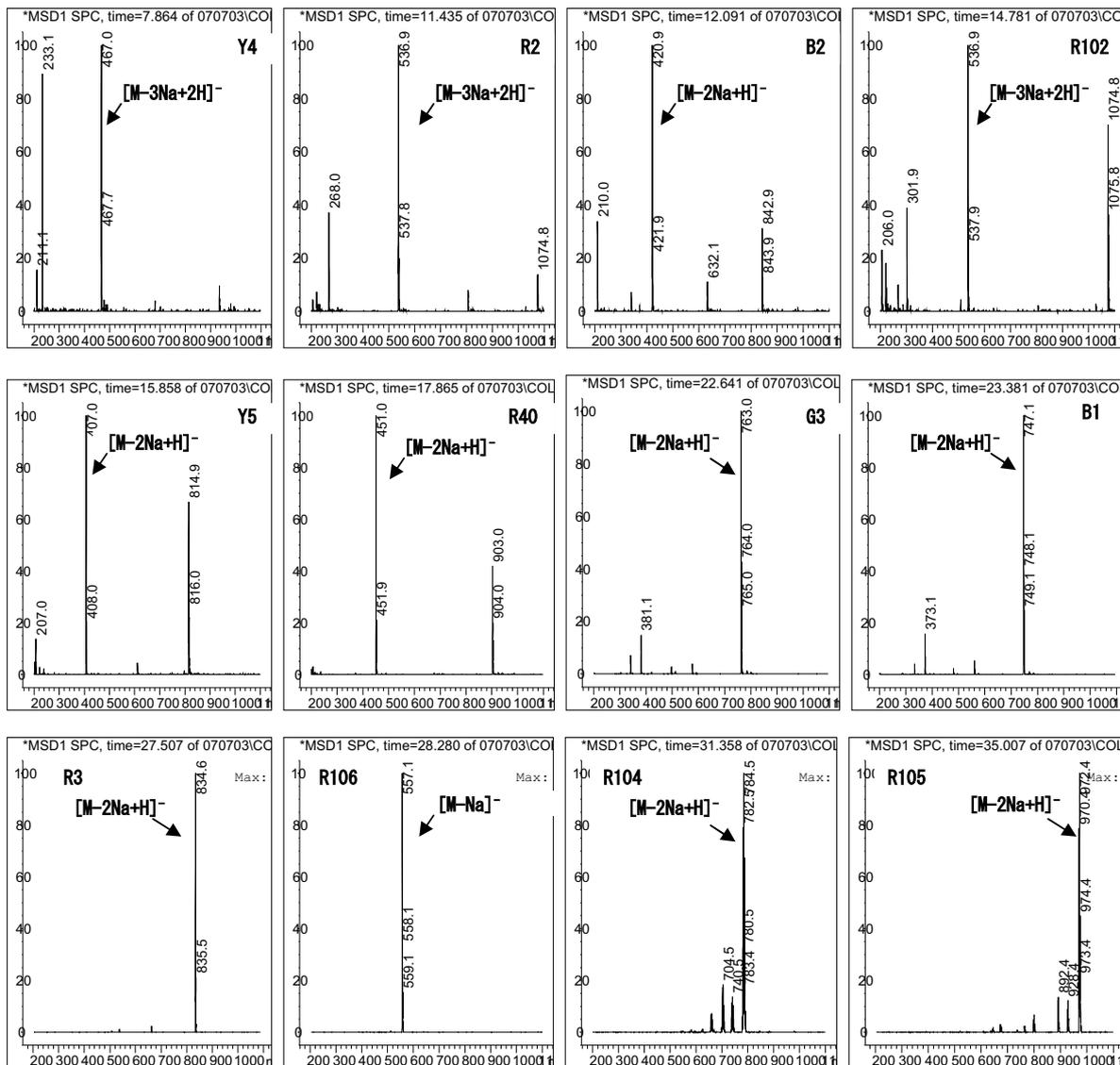


図2 指定色素12種のMSスペクトル

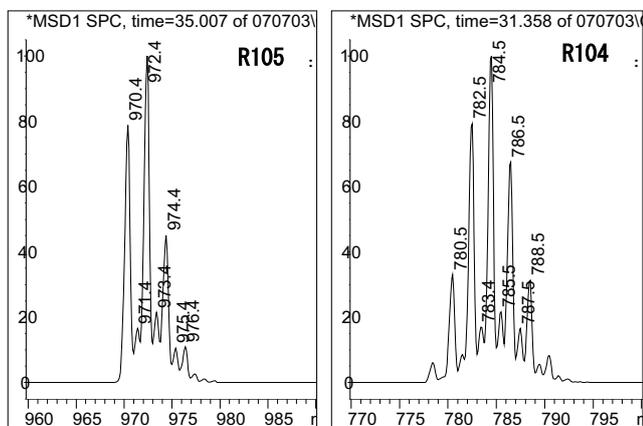


図3 R105, R104における [M-2Na+H]⁻のMSスペクトル(拡大)

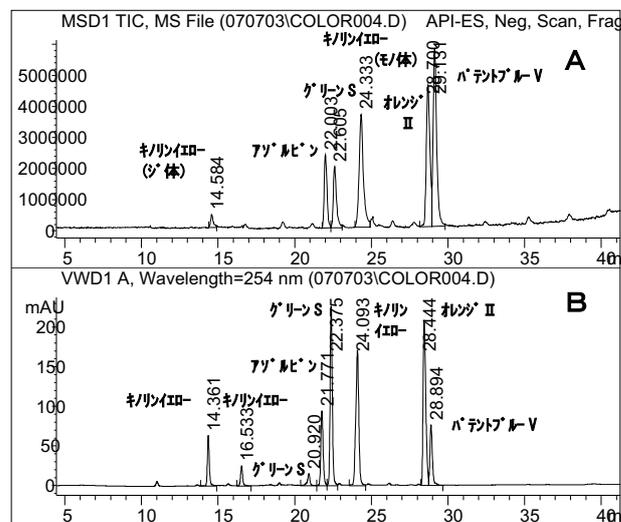


図4 指定外色素5種のLC/MSクロマトグラム
A:MS(TIC)クロマトグラム B:UV254nmクロマトグラム

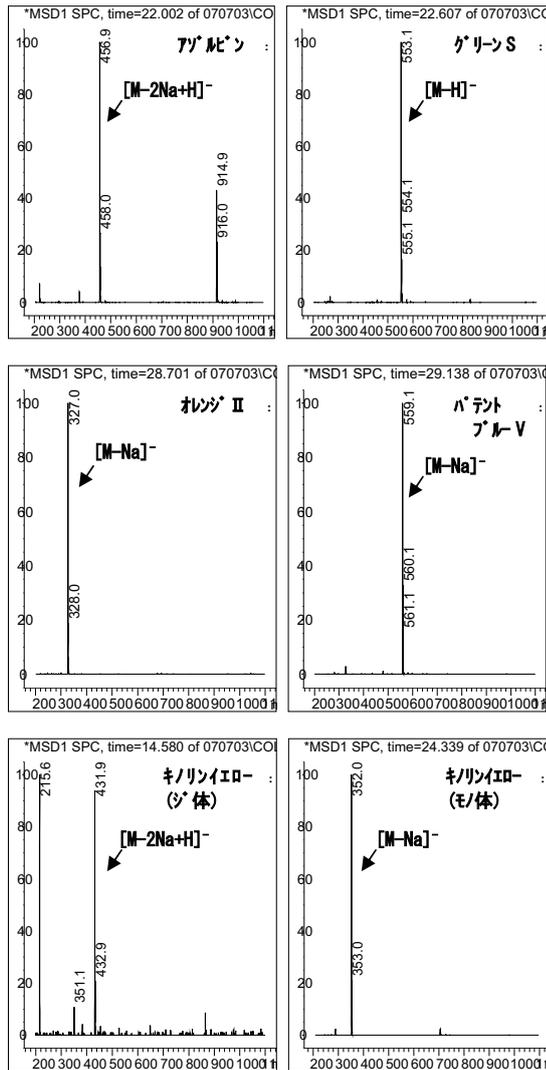


図5 指定外色素5種のMSスペクトル

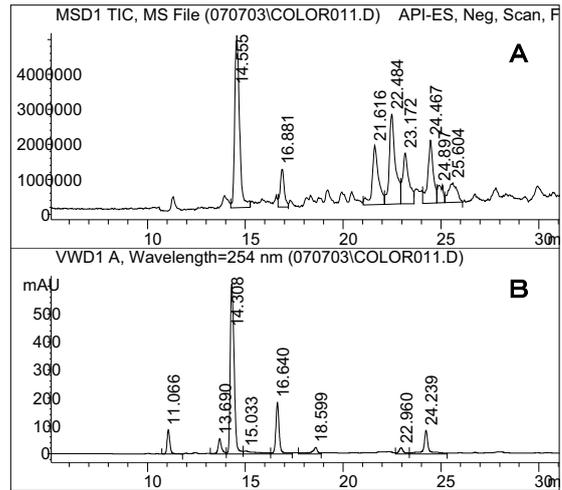


図6 リキュールのLC/MSクロマトグラム
A:MS(TIC)クロマトグラム B:UV254nmクロマトグラム

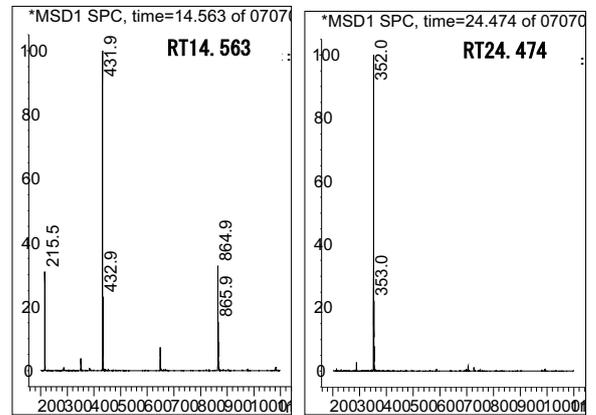


図7 リキュールのMSスペクトル

キュールのLC/MSクロマトグラムを図6に、MSスペクトルを図7に示した。UV254nmにおけるクロマトグラムからは複数本のピークが検出されたが、MSスペクトルを確認すると、保持時間24.474分にモノ体由来の $m/z=352.0$ が、14.563分にジ体由来の $m/z=431.9$ が確認された。標準品としたキノリンイエローからも同様のMSスペクトルが確認され、リキュールから検出された色素がキノリンイエローであることが証明された。

まとめ

合成着色料（酸性タール色素）について、LC/MSを用いた確認方法の実用化を検討した。その結果、指定色素12種、指定外色素5種について今回検討したLC/MSを用いた一斉分析法は、マススペクトル照合による確実な同定のできる確認方法として日常の行政検査に十分適用可能であることが確認された。

(平成20年7月28日受理)

参考文献

- 1) 新藤哲也, 大石充男, 石川ふさ子, 堀江正男, 安井明子, 伊藤弘一: 食用黄色4号のHPLC分析における保持時間の変動, 平成17年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第18回理化学研究部会総会・研究会資料, 40-43 (2005)
- 2) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針, 食品添加物編, pp.169-199, 社団法人日本食品衛生協会, 東京(2003)
- 3) 石井ふさ子, 大石充男, 新藤哲也, 堀江正男, 安井明子, 上原真一ほか: はじかみ(生姜)から検出された不明色素の構造, 食品衛生学雑誌, 46, 93-98 (2005)
- 4) 辻 澄子, 中野真希, 古川みづき, 吉井公彦, 外海泰秀: LC/MSおよびHPLCによる食用青色2号(インジゴカルミン)中の異性体および副成色素の同定・定量, 食品衛生学雑誌, 46, 116-119 (2005)
- 5) 宮武ノリエ, 永山敏廣: TLCとHPLCの併用による食品中合成着色料の一斉分析法, 東京衛研年報, 56, 145-151 (2005)