

甲殻類に残留する4-ヘキシルレゾルシノールのLC/MSによる分析

貞升 友紀^a, 青山 照江^a, 田中 康一^a, 新藤 哲也^a, 坂牧 成恵^a, 安井 明子^a,
岩崎 由美子^a, 早藤 知恵子^a, 丸山 玄^b, 遠藤 真理子^c, 植松 洋子^a

4-ヘキシルレゾルシノール (4-HR) は、エビやカニなどの甲殻類に対して、カナダ、中国、EU などの諸外国で黒変防止目的に使用されている。しかし、わが国では食品添加物としての使用が許可されていない。今回、4-HR について既報 (HPLC 法) の前処理用カートリッジカラム溶出液や LC の移動相を検討し、LC/MS による確認法を確立した。LC/MS 法では SCAN モード (m/z 50~300) でマススペクトル上、[M-H]⁻ (m/z 193) が確認できた。さらに、LC/MS 法の試験溶液についてそのまま HPLC でも分析できることを確認した。あらかじめ 4-HR を検出しないことを確認した試料に 0.01 g/kg となるように 4-HR 標準溶液を添加し、添加回収試験を行ったところ、SIR モード (m/z 193) 及び HPLC 法で回収率 80%以上、変動係数 5%以下と良好な結果が得られた。なお、LC/MS 法での検出限界は SCAN モードで 0.005 g/kg, SIR モードで 0.001 g/kg, HPLC 法での定量限界は 0.002 g/kg であった。本法を用いて、2012 年度に都内で購入したエビ 27 試料及びカニ 7 試料を分析したところ、4-HR を検出した試料はなかった。今回、4-HR を検出した試料はなかったが、同じ目的で添加される亜硫酸塩を使用している製品はあることから、引き続き調査を行っていく必要があると考える。

キーワード : 4-ヘキシルレゾルシノール, 液体クロマトグラフ/質量分析計, 甲殻類, エビ, カニ, 黒変, 亜硫酸塩

はじめに

エビやカニなどの甲殻類では、水揚げ後、組織に内在するポリフェノールオキシターゼによりメラニンが生成して身肉及び甲殻表面に黒変を生じることがあり、商品価値を下げの一因となっている¹⁾。この黒変を防止するために、カナダ、中国、EU などの諸外国ではポリフェノールオキシターゼ阻害剤である 4-ヘキシルレゾルシノール (以下、4-HR と略す) を甲殻類に使用することが認められている²⁾ が、わが国では使用が許可されていない。2012 年のわが国における全水産物輸入金額は 1兆 5,048 億円、そのうちエビ類についてはエビ調製品も含めて 2,455 億円と全水産物中第 2 位、カニ類についてもカニ調製品を含めて 844 億円³⁾ と、輸入品が多く流通している。こうした状況から 4-HR が使用された甲殻類がまぎれて輸入されている可能性が考えられるが、使用実態については明らかにされていない。

一方、エビ・カニ類に残留する 4-HR の分析法としては HPLC 法⁴⁻⁷⁾ が報告されているが確認法はない。そこで、既報の HPLC 法のうち、中里らの方法 (以下、中里法)⁷⁾ に準じて LC/MS による 4-HR の確認法を確立するとともに、LC/MS 法の試験溶液をそのまま HPLC 法に適用できるよう新たな HPLC 条件も検討した。また、確立した試験法を用いて市販されている輸入エビ・カニ類に残留する 4-HR について分析を行った。さらに、わが国をはじめ多くの国で甲殻類の黒変防止に使用が認められている亜硫酸塩についても調査したので、あわせて報告する。

実験方法

1. 試料

2012 年 6 月~2013 年 2 月に東京都内で購入したエビ 27 試料及びカニ 7 試料を用いた。内訳は Table 1 に示した。

2. 試薬

1) 4-HR 標準溶液

4-HR (アルドリッチ社製, 純度 99% 以上) 50.0 mg を正確に量り、アセトニトリル 50 mL に溶解した後、0.1% ギ酸を加えて全量 100 mL としたものを 4-HR 標準原液 (500 µg/mL) とした。これを適宜 0.1% ギ酸-アセトニトリル (45 : 55) で希釈して用いた。

2) 前処理用カートリッジカラム

Sep-Pak Vac C18 (1 g/6 cc, Waters 社製) をあらかじめメタノール及び水各 10 mL でコンディショニングして用いた。アセトニトリル及びメタノールは高速液体クロマトグラフ用を、その他の試薬は特級品を用いた。

3. 装置

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 (HPLC/PDA)

1100 システム (Agilent Technologies 社製)

2) 液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS)

ACQUITY UPLC/TQD (Waters 社製)

^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 東京都福祉保健局健康安全部食品監視課
163-8001 東京都新宿区西新宿 2-8-1

^c 東京都健康安全研究センター広域監視部食品監視第一課

Table 1. Summary of Samples

Sample	Country of Origin								
	Canada	India	Thailand	Russia	Indonesia	China	Vietnam	Others	unknown
White leg shrimp		1	5				1		1
Jumbo tiger prawn		1			1		1	Madagascar (1)*	1
Pink shrimp	2			1					
The skinned shrimp					2				1
Prawn and Shrimp (27)	1							New Caledonia (1)*	
Japanese tiger prawn									
Botan shrimp									
Indian white prawn		1							
Poovalan		1							
Argentine red shrimp								Argentina (1)*	
Yellow-leg shrimp								Mexico (1)*	
Scampi								New Zealand (1)*	
Kalicady		1							
Crab (7)	2			1		1			
Queen crab				1					
King crab				1					
Blue king crab				1					
Swimming crab						1			
Total	5	5	5	4	3	2	2	5	3

*(): Number of samples

4. 測定条件

1) HPLC/PDA条件

カラム : L-Column ODS (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 250 mm, 財団法人化学物質評価研究機構製), 移動相 : 0.1% ギ酸-アセトニトリル (4 : 6), 流速 : 1.0 mL/min, カラム温度 : 40°C, 注入量 : 20 μ L, 検出波長 : 210 nm.

2) LC/MS条件

カラム : TSK-gel 80TS (5 μ m, 2.1 mm i.d. \times 150 mm, 関東化学(株)社製), 移動相 : 水-アセトニトリル (4 : 6), 流速 : 0.2 mL/min, カラム温度 : 40°C, 注入量 : 2 μ L, イオン化法 : ESI (-), キャピラリー電圧 : 3.0 kV, コーン電圧 : 50 V, 脱溶媒ガス流量 : 700 L/hr, 測定モード : 定性-SCAN (m/z 50~400), 定量-SIR (m/z 193).

5. 分析方法

1) 4-HR

中里法⁷⁾に準じて調製した。

細切した試料 10.0 g をホモジナイザーカップにとり, メタノール 50 mL を加えて 10 分間ホモジナイズした後, 遠心分離し (3,000rpm, 10 分), 得られた上清を共栓メスシリンダーに分取した。遠心後の残渣にメタノール 40 mL を加え, 同様に処理した後, 得られた上清をさきの共栓メスシリンダーにあわせ, メタノールで 100 mL にメスアップした。これを 5.0 mL 採り, 水 15 mL を加えてよく混和した後, 全量を前処理用カートリッジカラムに負荷した。水 10 mL 及びメタノール-水 (4 : 6) 混液 10 mL で順次洗浄し, 次いで 0.1% ギ酸-アセトニトリル (45 : 55) 10.0 mL で溶出し, 試験溶液とした。この試験溶液を 0.45 μ m のフィルターでろ過したものを HPLC/PDA で, 0.2 μ m のフィルターでろ過したものを LC/MS で分析した (Fig.1).

2) 亜硫酸塩

衛生試験法・注解2010⁸⁾に従って, ヨウ素酸カリウムデンプン試験紙法による定性を行い, 検出したものについてアルカリ滴定法及び比色法により定量した。

Sample 10.0 g

Add methanol (50, 40 mL)
Homogenize for 10min
Centrifuge (3,000rpm, 10min)

Supernatant

Add methanol to make the volume to 100 mL

Extract 5.0 mL

Add 15 mL of water
Mix

Sep-pak Vac C₁₈ (1 g/6 cc)

Wash with 10 mL of water
Wash with 10 mL of methanol-water (4:6)
Elute with 10 mL of 0.1% formic acid-acetonitrile (45:55)

Eluate

Filtrate

HPLC or LC/MS

Fig. 1. Analytical Method of 4-HR

結果及び考察

1. 4-HRの分析

1) 試験溶液調製法の検討

中里法ではHPLCクロマトグラム上のきょう雑ピーク除去のため, 逆相系前処理用カートリッジカラムのSep-Pak Vac C₁₈で前処理を行っており, 溶出液には0.1%リン酸-アセトニトリル溶液を用いている。しかし, リン酸は難揮発性物質でありLC/MS分析に不向きであることから, 前処理用カートリッジカラム溶出液の検討を行った。リン酸の代わりに揮発性物質でLC/MS分析に汎用されるギ酸を用いたところ, 中里法で妨害物質の流出がないとされているpH 3.0以下にはならないが, HPLCクロマトグラム上で20分以降のきょう雑ピークはなく, 回収率も良好であったことか

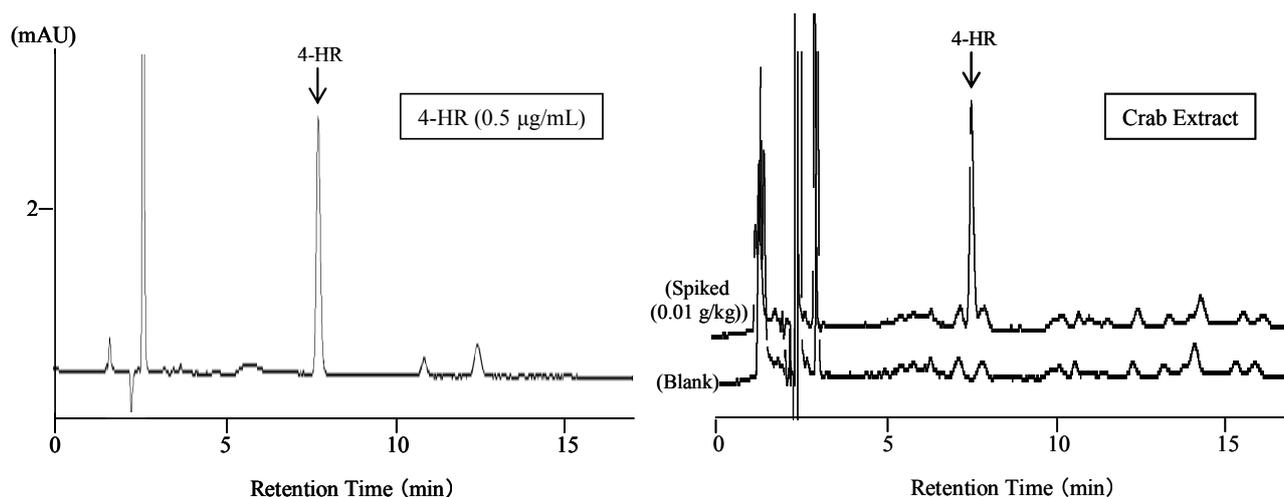


Fig. 2. HPLC Chromatograms of crab

HPLC conditions: column, L-Column (4.6 mm i.d. × 250 mm); mobile phase, 0.1% formic acid-acetonitrile (4:6); flow rate, 1.0 mL/min; column temp., 40°C; injection vol., 20 µL; UV 210 nm

ら、溶出液にはpH 3.5付近を示す0.1%ギ酸-アセトニトリル (45 : 55) 10.0 mLを用いることにした。

また、カニの試料で定量値に影響を及ぼすほどではないがHPLCクロマトグラム上で4-HRのピークと非常に近接した保持時間に妨害ピークが出現する事例がみられたため

(Fig.2), この妨害ピークの除去を目的として前処理用カートリッジカラムについても検討を行った。中里らによると妨害ピークはペプチド系物質と推測されている⁷⁾ことから、中里法で用いられているSep-Pak Vac C18の他、C18と類似の挙動を示すポリマー系逆相充填剤のOasis HLB (30 mg, 60 mg及び200 mg), ペプチド系物質がイオン性であることからその保持を期待してポリマー系逆相-イオン交換ミックスモードのOasis MAX (150 mg) 及びOasis MCX (150 mg) と全部で6種類の前処理用カートリッジカラムについて検討した。その結果、Oasis HLB (200 mg), Oasis MAX及びOasis MCXでは4-HRの保持が強く、100%アセトニトリルまたはメタノールで溶出しないと回収できないが、妨害成分も一緒に溶出されるため、これらの前処理用カートリッジカラムで精製することは難しいことがわかった。また、Oasis HLB 30 mg及び60 mgでは4-HRに近接する妨害ピークもHPLCクロマトグラム上で40分以降に出現するきょう雑ピークもともに除去できず、洗浄液のメタノール濃度を4-HRが溶出しないメタノール-水 (5 : 5) まで増やして分析したが除去効果は向上しなかった。これらの結果から、HPLCクロマトグラム上でみられる4-HR近接の妨害ピークについてはSep-Pak Vac C18で除去できないものの定量に影響のない程度に分離できており、HPLC/PDA及びLC/MSのいずれもクロマトグラム上で20分以降のきょう雑ピークは見られず、回収率も良好であったため、前処理用カートリッジカラムは中里法同様にSep-Pak Vac C18を用いることとした。

2) 移動相の検討

中里法では移動相にリン酸が用いられているが、LC/MSでは使用できない。そこで、前処理用カートリッジカラムの溶出液同様、ギ酸を用いて検討を行った。その結果、LC/MSではギ酸濃度が薄くなるほど感度が上がることがわかったため、アセトニトリルの比率は変えずにギ酸濃度を0~0.5%まで変化させて感度を検討したところ、ギ酸を入れず、水-アセトニトリル (4 : 6) を用いたときがもっとも感度が良好であった。さらに、この条件がHPLC/PDAでも適用できるか確認したところ、水-アセトニトリル (4 : 6) を用いるとクロマトグラム上に妨害ピークが多数出現し、分析に影響することがわかったため、ギ酸濃度を同様に変化させて検討を行った。その結果、HPLC/PDAでは0.1%ギ酸-アセトニトリル (4 : 6) のときがもっとも妨害ピークとの分離が良好であった。以上のことから、HPLC/PDAでは移動相に0.1%ギ酸-アセトニトリル (4 : 6) を、LC/MSでは水-アセトニトリル (4 : 6) を用いて分析することとした。

3) MS条件の検討

4-HRは分子量194であることから、SCAN (m/z 50~400) モードによる測定を行ったところ、マススペクトル上で[M-H]⁻ (m/z 193) が確認できた。

さらに、4-HRの10 µg/mL標準溶液を用いて、キャピラリー電圧及びコーン電圧の検討を行った。その結果、キャピラリー電圧3.0 kV, コーン電圧50 Vのときにもっとも良好な感度が得られた。

以上の結果から、イオン化法はESI (-), キャピラリー電圧3.0 kV, コーン電圧50 V, SCANモード (m/z 50~400) で測定を行うことにした。Fig.3に10 µg/mL標準溶液及びエビの抽出イオンクロマトグラム (m/z 193) 及びマススペクトルをそれぞれ示した。

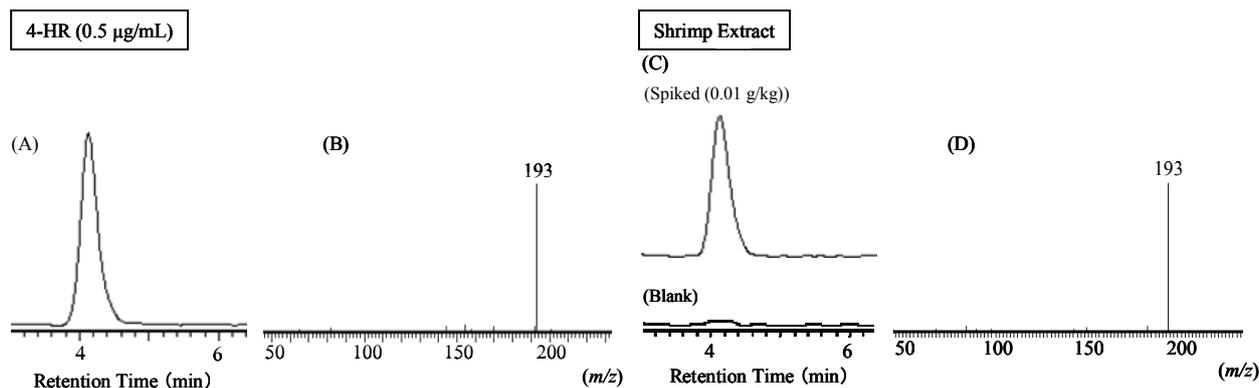


Fig. 3. LC/MS Extracted Ion Chromatograms(m/z 193) (A,C) and Mass Spectra (B,D)

LC/MS conditions: column, TSK-gel 80TS (2.1 mm i.d. \times 150 mm); mobile phase, water-acetonitrile (4:6); flow rate, 0.2 mL/min; column temp., 40°C; injection vol., 2 μ L; ionization mode, ESI negative; capillary voltage, 3.0 kV; cone voltage, 50 V; desolvation gas flow, 700 L/hr

4) 検量線

HPLC/PDA法における検量線は4-HRの0.1~10 μ g/mLの範囲で、またLC/MS (SIR) 法における検量線は0.05~0.5 μ g/mLの範囲で直線性 ($r=0.999$) が得られた。HPLC/PDA法での定量限界は0.002 g/kg, LC/MS法での検出限界はSCANモードで0.005 g/kg, SIRモードで0.001 g/kgであり、EUでの残留基準 2 mg/kg⁹⁾を確認することが可能であった。

5) 添加回収試験

あらかじめ4-HRを検出しないことを確認したエビ4試料及びカニ4試料に0.01 g/kgとなるように4-HR標準溶液を添加し、よく混和した後、冷蔵庫内で30分静置した。その後、本法を適用したところ、Table 2に示したとおりHPLC/PDA法では添加回収率81.4~91.1%, 変動係数4.6%以下であった。また、LC/MS法でもSIR (m/z 193) モードで測定した

ところ、添加回収率81.0~86.7%, 変動係数4.8%以下であり、いずれの方法とも良好な結果であった。

6) 市販品の分析

本法を用いて、エビ27試料及びカニ7試料について4-HRを測定したところ、いずれの試料からも検出されなかった。

2. 亜硫酸塩の分析

エビ27試料及びカニ6試料について亜硫酸塩を測定したところ、Table 3に示したとおり表示のあったエビ1試料、表示のなかったエビ1試料からそれぞれ0.05及び0.03 g/kgの二氧化硫を検出した。今回の試料は生鮮品であることから表示義務はなく¹⁰⁾、どちらの測定値も食品衛生法の使用基準¹¹⁾に適合していた。

Table 2. Recoveries of 4-HR Spiked in Prawn, Shrimp and Crab

Sample	Country of Origin	HPLC/PDA		LC/MS SIR (m/z 193)		
		Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)	
Prawn and Shrimp	White leg shrimp	Thailand	85.0	4.6	83.0	1.3
	White leg shrimp	India	81.8	0.9	81.0	2.8
	Pink shrimp	Russia	83.0	3.1	83.5	3.5
	Jumbo tiger prawn	Unknown	84.0	1.8	83.9	2.4
Crab	Queen crab	Russia	91.1	2.2	84.4	4.8
	Queen crab	Canada	87.4	1.2	86.7	2.3
	King crab	Russia	81.4	0.3	85.3	1.5
	Swimming crab	China	87.9	1.6	83.2	4.7

Spiked at 0.01g/kg (n=3)

Table 3. Sulfite Residues in Samples

Sample	Indication	Number of Sample	Detected Number of Sample
Prawn and Shrimp	(+)	4	1 (0.05)*
	(-)	23	1 (0.03)*
Crab	(-)	6	ND**

*: concentration (g/kg)

**ND: <0.01 g/kg

ま と め

エビやカニなどの甲殻類に対してわが国では使用が許可されていないが、カナダ、中国、EU などの諸外国で黒変防止目的に使用されている 4-HR の分析法について、中里法⁷⁾に準じて LC/MS による確認法を確立するとともに、LC/MS 法の試験溶液をそのまま HPLC 法に適用できるような前処理用カートリッジカラムの溶出液や HPLC 条件を改良した。その結果、同じ試験溶液で定量から確認まで行うことが可能となった。

今回、4-HR を検出した試料はなかったが、同じ目的で添加される亜硫酸塩を使用している製品はあることから、引き続き調査を行っていく必要があると考える。

本研究の概要は、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会(2013 年 11 月)で発表した。

文 献

- 1) 大島敏明：食品と容器, **52**(7), 432-438, 2011.
- 2) 日本食品添加物協会編：世界の食品添加物概説改訂版, 86-400, 日本食品添加物協会, 東京.
- 3) 水産白書 第 3 章平成23年度以降の我が国水産の動向 http://www.jfa.maff.go.jp/e/annual_report/2012/pdf/07_3shou1setu.pdf (2013年7月19日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) Jonker, K. M., Dekker, C. P. : J. AOAC Int., **83**, 241-244, 2000.
- 5) King, J. M., Mcevilly, A. J., Iyengar, R. : J. Assoc. Off. Anal. Chem., **74**, 1,003-1,005, 1991.
- 6) Smallwood, A. W., Ranieri, T. L., Satzger, R. D. : J. AOAC Int., **81**, 488-491, 1998.
- 7) 中里光男, 松本ひろ子, 粕谷陽子, 他 : 食衛誌, **46**(6), 282-285, 2005.
- 8) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2010, 340-345, 2010, 金原出版, 東京.
- 9) Official Journal of the European Union, L204/10, 26. 7. 2006. : Directive 2006/52/EC of the European Parliament and of the Council of 5 July 2006.
- 10) 食品衛生研究会編：食品衛生小六法I 平成24年度版, 24-36, 新日本法規出版, 東京
- 11) 食品衛生研究会編：食品衛生小六法II 平成24年度版, 1,986-1,987, 新日本法規出版, 東京

Determination of 4-Hexylresorcinol Residue in Crustaceans by LC/MS

Yuki SADAMASU^a, Terue AOYAMA^a, Yasukazu TANAKA^a, Tetsuya SHINDO^a, Narue SAKAMAKI^a, Akiko YASUI^a,
Yumiko IWASAKI^a, Chieko HAYAFUJI^a, Gen MARUYAMA^a, Mariko ENDO^a and Yoko UEMATSU^a

4-hexylresorcinol (4-HR), is used as a melanosis inhibitor in crustaceans, such as shrimp, prawn and crab, in many countries, including Canada, China and the EU. It is not permitted as a food additive in Japan. We established an LC/MS method for qualitative analysis by modifying the elution solvent from a solid phase extraction column, and the mobile phase of LC described in a previously reported HPLC method. Qualitative analysis of 4-HR was performed using the scan mode (m/z 50-400) of LC/MS. 4-HR gave an ion at m/z 193, that corresponds to [M-H]⁻. Moreover, it was confirmed that the test solution prepared for LC/MS could be applied to HPLC. Recoveries of 4-HR from commercial shrimp, prawn and crab added at the level of 0.01 g/kg, and determined by both HPLC and SIR (m/z 193) mode of LC/MS were over 80%, and the coefficients of variation were below 5%. The detection limits of 4-HR by LC/MS were 0.005 g/kg and 0.002 g/kg by SCAN mode and SIR, respectively. The quantitative limit of 4-HR by HPLC was 0.002 g/kg. A survey of 4-HR in crustaceans distributed in the Japanese market was performed in 2012 using this method. No 4-HR was detected in the 27 commercial shrimp, prawn and 7 commercial crabs surveyed. Since crustacean melanosis is inevitable, there is a demand for a melanosis inhibitor. In fact, sulfite, which is an alternative melanosis inhibitor to 4-HR, and is permitted as a food additive in Japan, was found in the samples in this survey. Since 4-HR is used in some countries, crustaceans with a 4-HR additive might be imported. Further surveys would be needed to prevent the distribution of crustaceans with illegal 4-HR additives in the Japanese market.

Keywords: 4-hexylresorcinol, LC/MS, crustacean, shrimp, crab, melanosis, sulfite

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

^b Food Safety Control Section, Health and Safety Division, Bureau of Social Welfare and Public Health,
Tokyo Metropolitan Government
2-8-1, Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8001, Japan