

## 食品中合成着色料（キサントレン系色素）のLC-MSを用いた高感度な確認法の検討

新藤 哲也<sup>a</sup>, 貞升 友紀<sup>b</sup>, 小川 麻萌<sup>b</sup>, 京小 ひと美<sup>b</sup>, 植松 洋子<sup>b</sup>, 門間 公夫<sup>b</sup>

食品中の合成着色料検査はペーパークロマトグラフィー(PC), 薄層クロマトグラフィー(TLC)および液体クロマトグラフィー(LC)で行い, これらを組み合わせて確認検査を実施しているのが現状である. 今回, LCよりもさらに信頼性の高いLC-MSの選択イオンモニタリング(SIM)測定を用いた高感度な確認法の検討を行った.

感度の良い3種のフラグメントイオンを生成するコーン電圧と質量の組合せを検討し, R3は80V(*m/z* 537, 663, 835), R104は50V(*m/z* 705, 741, 785), R105は50V(*m/z* 891, 929, 973), R106は100V(*m/z* 477, 513, 557)を選択した. その条件で, それぞれSIM測定を行った結果, R3, R104, R106は0.1~50 µg/mL, R105は0.5~50 µg/mLの間で, ほぼ同様の面積比が得られた. 検出下限は0.5 µg/mL, LC-MSのスキャンと比較してR3, R104, R106は10倍, R105は5倍の高感度であった.

また, 得られた確認法を用いて, すあま(餅菓子)中のR3の分析を行ったところ, 精度良く確認できることが明らかとなった.

**キーワード:** 着色料, キサントレン系色素, LC-MS, SIM, すあま(餅菓子)

### はじめに

食品中の合成着色料検査はペーパークロマトグラフィー(PC), 薄層クロマトグラフィー(TLC)および液体クロマトグラフィー(LC)で行うのが一般的である<sup>1-3)</sup>. また, 検査の過程において指定外着色料の使用や表示違反が疑われる場合には確認検査が必要となる<sup>4,7)</sup>. 近年, LCよりもさらに信頼性の高いLC-MSを用いた確認法が普及し始め, 保存料の通知法<sup>8)</sup>等でLC-MSによる確認法が記載されているものもある. しかしながら, 着色料については確認法が定められておらず, PC, TLCおよびLCを組み合わせて確認検査を実施しているのが現状である.

LC-MSによる着色料の検査法も報告されているが, スキャンモードによるスペクトルパターンを比較する方法<sup>9)</sup>や, 選択イオンモニタリング(SIM)測定で1種類のイオンピークを確認する方法<sup>10)</sup>である. しかしながら, 違反検体ではしばしば食品に含まれる含有量が著しく低いケースが少なくないため, 前者では感度が, また後者では精度が十分とはいえず, 妨害成分の影響も受けやすい.

そこで, LC-MSを用いた合成着色料の高感度な確認法の確立を試みた. 今回, 日本で使用が許可されている合成着色料のうち, LCにおける検出感度が低い, 食用赤色3号(R3), 食用赤色104号(R104), 食用赤色105号(R105), 食用赤色106号(R106)の4種について検討を行うこととした. 各標準溶液についてLC-MSのコーン電圧を変化させ, 感度の良い3種の測定質量を決定した. 次に決定した3種の質量でSIM測定を行い, 面積値の比を算出することにより, 各着色料を高感度かつ精度良く確認することができたので以下に報告する.

### 実験方法

#### 1. 試料

東京都内のスーパーマーケットで市販されていた国産すあまを試料とした.

#### 2. 標準品および試薬

R3, R104, R105, R106標準溶液: 国立医薬品食品衛生研究所標準品をそれぞれ10 mg正確に量り, 水に溶解して10 mL(1 mg/mL標準原液)とした. これを水で段階的に希釈し, それぞれ0.1~50 µg/mL標準溶液とした.

ポリアミドは和光純薬工業(株)製ポリアミドC-100(カラムクロマトグラフィー用), アセトニトリルはHPLC用, その他の試薬は市販特級品を用いた.

#### 3. 装置

LC-MS: Waters社製のACQUITY UPLC/TQDを用いた.

#### 4. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は衛生試験法・注解2010<sup>2)</sup>に準じた. 試料10 gに1%アンモニア水30 mLを加えてホモジナイズ後, エタノール60 mLを加えて混和した. グラスウールでろ過し, 水浴上(80°C)でエタノールを留去後, 10%酢酸でpH3~4とし, ポリアミド1 gを加えて色素を吸着させた. 水10 mL, メタノール20 mLで順次洗浄した後, 2%アンモニア-エタノール(1:1)溶液15 mLを加えて色素を溶出した. 得られた溶出液を水浴上(80°C)で乾固し, 20%メタノール1 mL

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 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

で溶解後にメンブランフィルター(0.22  $\mu\text{m}$ )でろ過したものをLC-MS用試験溶液とした。

## 5. LC-MS条件

カラム: Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d.  $\times$  150 mm, 粒径5  $\mu\text{m}$ , ジーエルサイエンス社製), 移動相: (A液)アセトニトリル, (B液) 0.01 mol/L酢酸アンモニウム溶液, A液の5-55-55-5% (0-30-35-52min)のグラジエント溶出, 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$ , イオン化: ESI(-), キャピラリー電圧: 3.5 kV, イオン源温度: 120 $^{\circ}\text{C}$ , デソルベーション温度: 400 $^{\circ}\text{C}$ , 測定モード: スキャン; コーン電圧30~120 V,  $m/z$  100~1,000, SIM; R3(コーン電圧80V,  $m/z$  537, 663, 835), R104(コーン電圧50V,  $m/z$  705, 741, 785), R105(コーン電圧50V,  $m/z$  891, 929, 973), R106(コーン電圧100V,  $m/z$  477, 513, 557)

## 結果及び考察

### 1. 分析条件の検討

#### 1) LC条件

R3, R104, R105, R106について, 食品衛生検査指針<sup>1)</sup>に示されているLC条件を参考にして, LC-MSにおけるLCの分離条件を検討した。

移動相にアセトニトリルと0.01 mol/L酢酸アンモニウムを用いて両者の比率を変化させるグラジエント分析を行った。その結果, 実験方法の5. LC-MS条件に設定することにより, 4種を良好に分離することができた(Fig.1)。

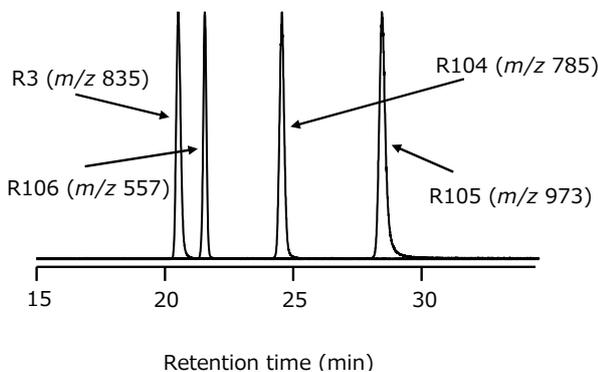


Fig.1. SIM chromatogram of standard solutions (50  $\mu\text{g/mL}$ )

#### 2) MS条件

R3, R104, R105, R106のLC-MSスキャン測定では, イオンピークが1本しか観察されない場合が多く, 同定能力が低い。また, スキャン測定ではデータポイント数が多くなるため, SIM測定に比べて感度が低い。そこで, 高感度なSIM測定を用い, 同定感度を上げるため, R3, R104, R105, R106のそれぞれが感度の良い3種程度のフラグメントイオンを生成する条件の検討を行った。キャピラリー電圧を3.5V, イオン源温度を120 $^{\circ}\text{C}$ , デソルベーション温度を400 $^{\circ}\text{C}$ とし, コーン電圧を30~120Vまで変化させて, スキャンモードで測定を行った。

その結果, 4種の着色料とも, 分子量に関連したさまざまなマススペクトルパターンが得られることがわかった。これらのうち, 感度の良い3種のフラグメントイオンが得られるコーン電圧と質量について, 実験方法5. LC-MS条件に示した組合せを選択した。R3, R104, R105, R106の代表的なマススペクトルをFig.2に, 構造式をFig.3にそれぞれ示した。

### 2. 標準溶液による分析

4種の着色料(R3, R104, R105, R106)について, 決定したコーン電圧と質量の組合せで, 0.1~50  $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で, それぞれSIM測定を行った。最大質量の面積値と他の2種の質量の面積値の比を求めたところ, R3, R104, R106は0.1~50  $\mu\text{g/mL}$ , R105は0.5~50  $\mu\text{g/mL}$ の間で, ほぼ同様の面積比(50  $\mu\text{g/mL}$ の面積値に対して $\pm 30\%$ )<sup>11)</sup>が得られた(Fig.4)。このことから, それぞれの濃度範囲で, 4種の着色料が精度良く確認できることがわかった。この方法による確認限度は, 同一装置でのLC-MSのスキャンによる確認限度(R3, R104, R106は1 $\mu\text{g/mL}$ , R105は2.5  $\mu\text{g/mL}$ )と比較してR3, R104, R106は10倍, R105は5倍の高感度であった。

なお, LC-MS/MSによるMRM測定についても検討したが, SIM測定より感度が低い上, 面積値の比が濃度により大きく異なった。

以上の結果から, R3, R104, R105, R106については, 今回確立したLC-MSのSIM測定により, PDAスペクトルやLC-MSのスキャン測定が困難な濃度でも, 各着色料を精度良く確認できることが明らかとなった。

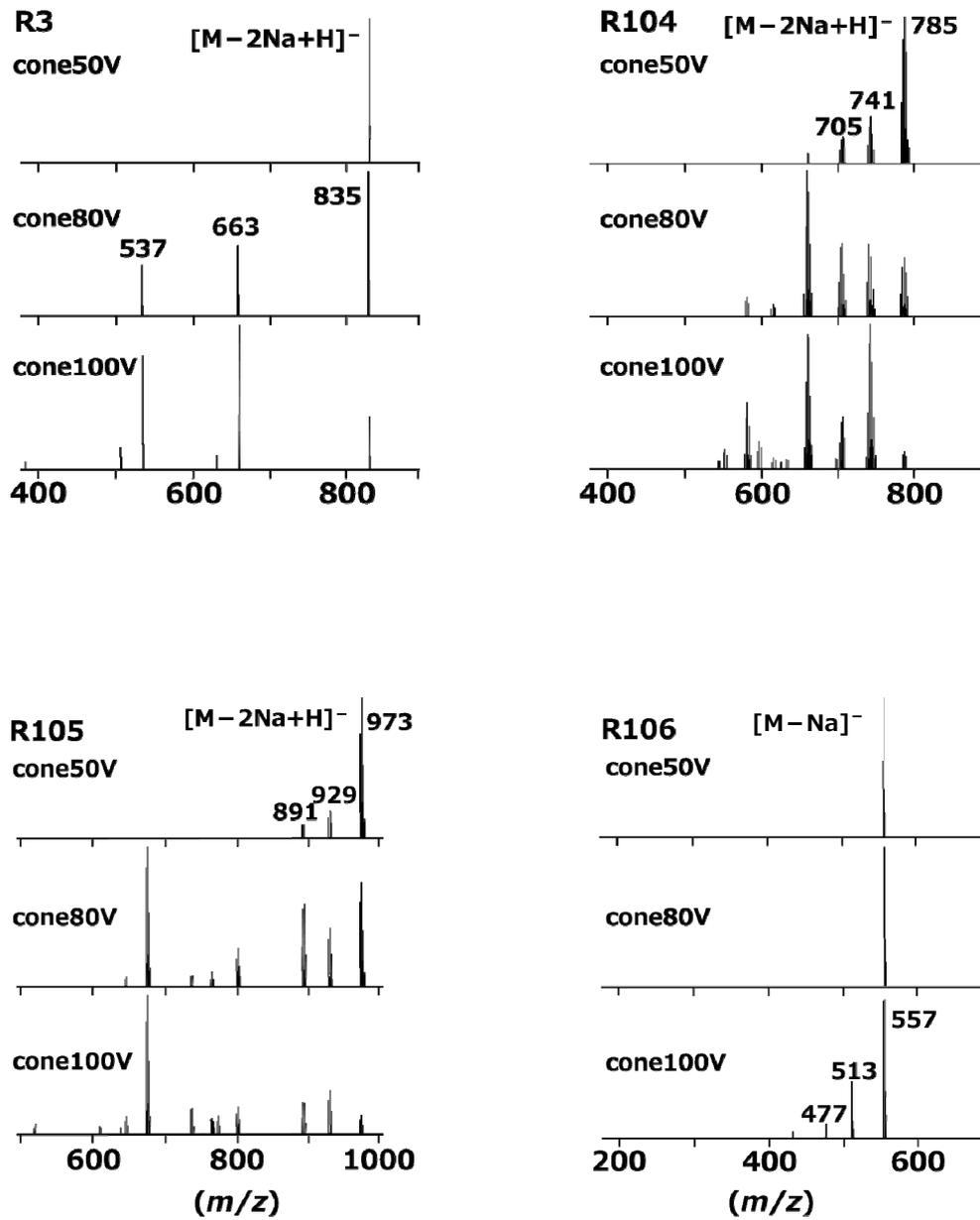
### 3. 食品中の着色料の分析

市販のR3表示のあるすあまから, 衛生試験法・注解2010<sup>2)</sup>に従って抽出した試験溶液について, 今回作成したLC-MSによるSIM測定を行った(Fig.5)。その結果, 試験溶液中のR3濃度がSIM測定( $m/z$  835)で0.25  $\mu\text{g/mL}$ と低濃度でありながら, R3標準溶液と同様の面積比が得られ(Fig.6), 精度良くR3であることが確認できた。

## ま と め

日本で使用が許可されている合成着色料のうち, R3, R104, R105, R106の4種について, LC-MSのSIM測定を用いた高感度な確認法を検討した。感度の良い3種のフラグメントイオンを生成するコーン電圧と質量の組合せを決定し, その条件で, それぞれSIM測定を行った。その結果, R3, R104, R106は0.1~50  $\mu\text{g/mL}$ , R105は0.5~50  $\mu\text{g/mL}$ の間で, ほぼ同様の面積比が得られた。検出下限は, LC-MSのスキャンと比較してR3, R104, R106は10倍, R105は5倍の高感度であった。

また, 得られた確認法を用いて, すあま中のR3の分析を行ったところ, 精度良く確認できることが明らかとなった。

Fig.2. Mass spectra of standard solutions (50  $\mu\text{g/mL}$ )

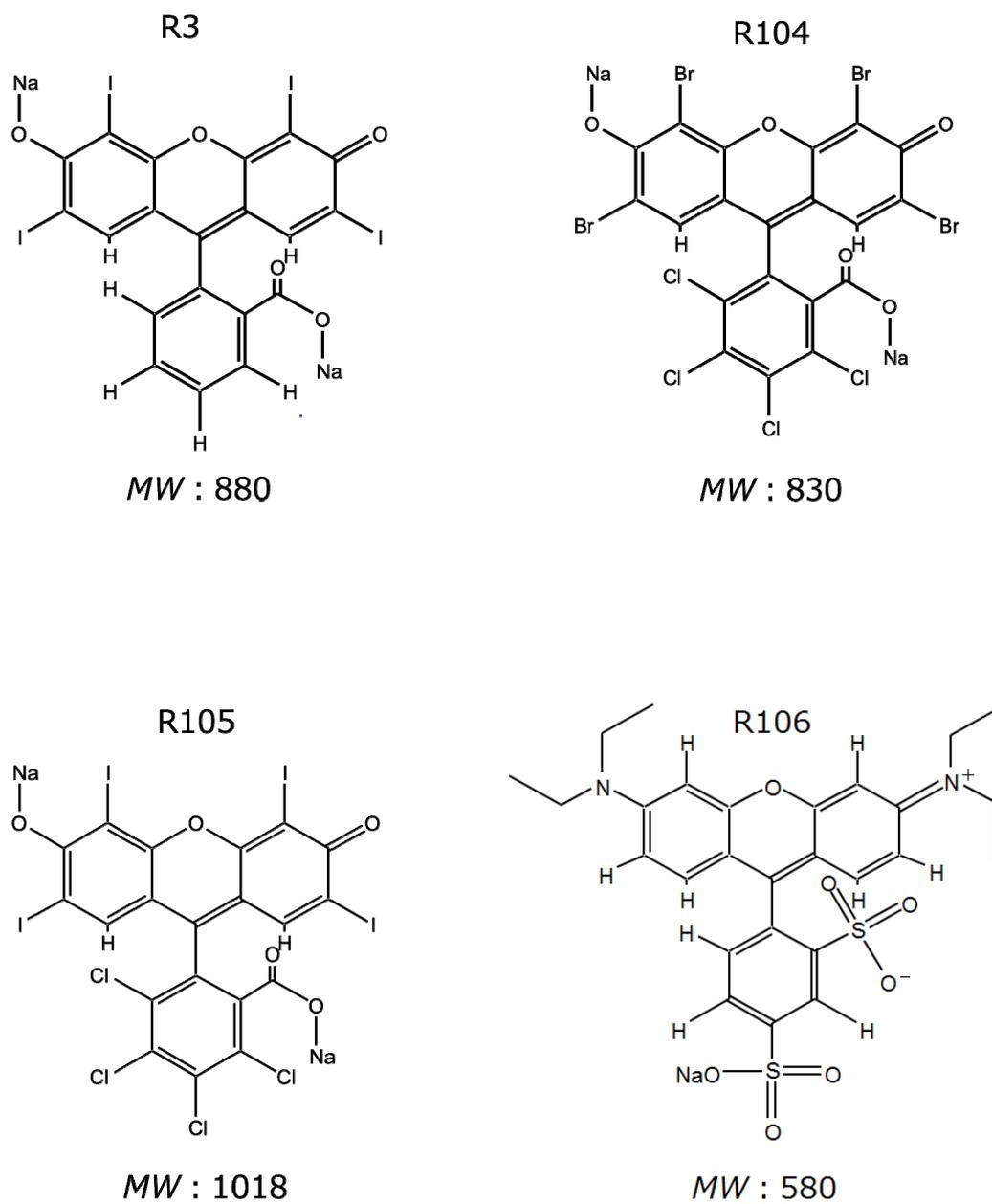


Fig.3. Chemical structure of dyes

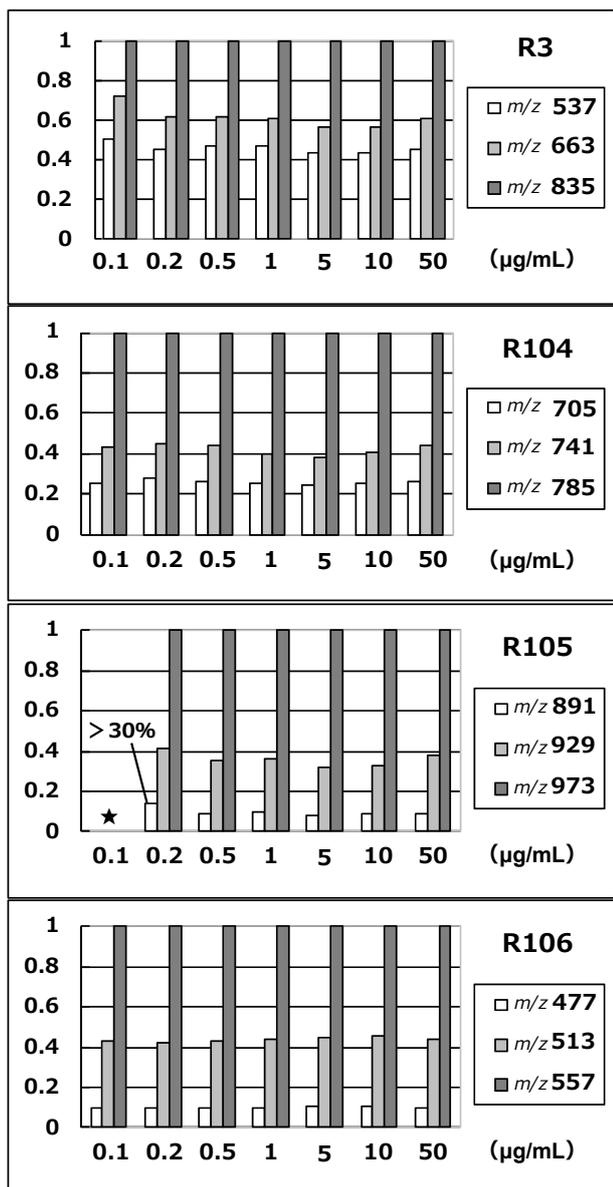


Fig.4. Area ratio of SIM chromatograms of standard solutions  
★ : undetectable

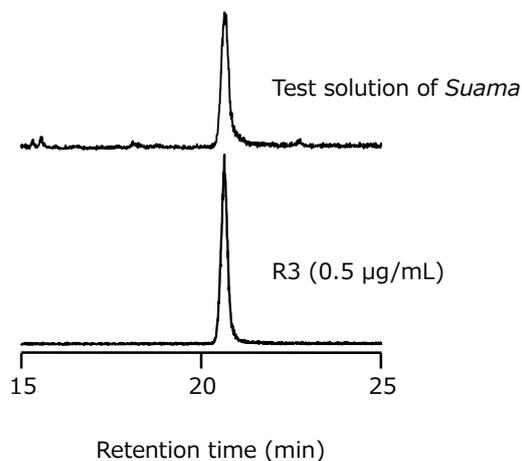


Fig.5. SIM chromatograms of extracted solution from *Suama* and standard solution (*m/z* 835)

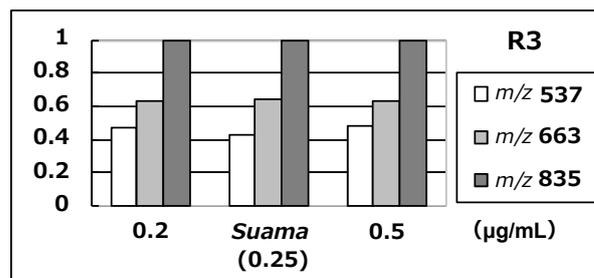


Fig.6. Area ratio of SIM chromatogram of standard solutions and extracted solution from *Suama*

文 献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編，169-199, 2003, 日本食品衛生協会, 東京.
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2010, 370-381, 2010, 金原出版, 東京.
- 3) 宮武ノリエ, 永山敏廣：東京健安研七 年 報, **56**, 145-151, 2005.
- 4) 宮川弘之, 堀井昭三, 井草京子, 他：東京健安研七 年 報, **47**, 75-77, 1996.
- 5) 荻原勉, 青柳陽子, 天川映子, 他：東京健安研七 年 報, **53**, 153-156, 2002.
- 6) 松田敏晴, 松本ひろ子, 粕谷陽子, 他：東京健安研七 年 報, **53**, 157-160, 2002.
- 7) 石川ふさ子, 大石充男, 新藤哲也, 他：食衛誌, **46**(5), 228-233, 2005.
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長：食安基発0528第3号, 「食品中の食品添加物分析法」の改正について (通知), 2010.
- 9) 関戸晴子, 岸弘子：神奈川衛研研究報告, **38**, 35-38, 2008.
- 10) 山口瑞香, 梶村計志：食衛誌, **56**(1), 8-13, 2015.
- 11) *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues in food and feed*, European Commission, Document No. SANCO/12571/2013.

### Study of a High Sensitivity Confirmation Method Using LC-MS for Dyes (Xanthene Dyes) in Food

Tetsuya SHINDO<sup>a</sup>, Yuki SADAMASU<sup>a</sup>, Asamoe OGAWA<sup>a</sup>, Hitomi KYOKO<sup>a</sup>, Yoko UEMATSU<sup>a</sup>, and Kimio MONMA<sup>a</sup>

Analysis of dyes in food is performed by paper chromatography, thin-layer chromatography, and liquid chromatography (LC), at present, the analysis is conducted using a combination of confirmatory tests. In this work, a high-sensitivity confirmation method using selected ion monitoring (SIM) measurement with LC-MS instead of LC for better reliability was developed.

The combination of cone voltage and mass to generate a high sensitivity three types of fragment ions was examined, R3 was selected at 80V ( $m/z$  537, 663, 835), R104 was selected at 50V ( $m/z$  705, 741, 785), R105 was selected at 50V ( $m/z$  891, 929, 973) and R106 was selected at 100V ( $m/z$  477, 513, 557). Under these conditions, SIM measurement obtained almost similar area ratios: between 0.1 and 50  $\mu\text{g/mL}$  (R3, R104, R106), and between 0.5 and 50  $\mu\text{g/mL}$  (R105), the detection limit was 0.5  $\mu\text{g/mL}$  and was 10 times (R3, R104, R106) or 5 times (R105) greater compared to that obtained via scanning by LC-MS.

Also, R3 was analyzed in *Suama* (rice-cake sweets) using the obtained confirmed method, therefore, it is revealed that it can be accurately confirmed by this method.

**Keywords:** dye, xanthene dye, LC-MS, SIM, *Suama* (rice-cake sweets)

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan