

LC-MS/MSを用いた食品中着色料の確認法

安井 明子^a, 加藤 妙子^b, 坂牧 成恵^a, 貞升 友紀^a, 門間 公夫^c, 小林 千種^a

食品中の着色料は通常、TLCやHPLCを組み合わせて検査を実施しているが、TLCでは R_f 値や色調、HPLCでは保持時間が近似する着色料が複数存在するため同定が困難なことがある。LC-MS/MSによる方法は、選択性が高く、同じ質量数の物質でもフラグメンテーションを起こして異なるプロダクトイオンを生じる場合があるため、多くの異性体が存在する着色料の確認法として有用である。そこで、LC-MS/MSを用いて、着色料（食用赤色2号、食用赤色3号、食用赤色40号、食用赤色102号、食用赤色104号、食用赤色105号、食用赤色106号、食用青色1号、食用青色2号、食用黄色4号、食用黄色5号、食用緑色3号、オレンジG、ファーストレッドE、アゾルビン、パテントブルーVF）の確認法について検討を行ったところ、プロダクトイオンスキャンおよび選択反応モニタリング（SRM）による分析が可能となった。さらにコアシェルカラム（CAPCELLPAK CORE C18）を用いたことにより、大幅に迅速化でき、従来の分析時間を半分程度にすることができた。

キーワード：LC-MS/MS、合成着色料、食品

はじめに

食品中の着色料は通常、TLCやHPLCを組み合わせて検査を実施している。TLCでは R_f 値や色調、HPLCでは保持時間が近似する着色料が複数存在するため同定が困難なこともあり、より確実な確認法の開発が必要となっている。近年、高選択性、高感度の特徴としたLC-MSが普及してきており、着色料の分析法もいくつか報告されている¹⁻³⁾。しかし、LC-MSによる分析の場合、スペクトルパターンを比較するスキャンモードによる方法¹⁾では感度が十分でなく、1種類のイオンによるピークを確認する選択イオンモニタリング（SIM）による方法²⁾では夾雑物の影響を受ける可能性がある。また、フラグメントイオンが生成する条件を設定し、SIMで高感度に分析する方法³⁾も報告されているが、キサンテン系着色料に絞って検討されており、他の着色料に適用できるか不明である。

一方、LC-MS/MSによる方法は、選択性が高く、LC-MSでは判別が難しい同じ質量数の物質でも、フラグメンテーションを起こすことで異なる質量数のプロダクトイオンを生じて判別が可能になる場合もある。そのため、異性体も多く存在する着色料の分析には、確認法として有用であると考えられた。そこで今回、指定色素12種および指定外色素4種（Fig. 1）についてLC-MS/MSを用いた確認法の検討を行った。さらに、コアシェルカラムを用いた分析時間の迅速化の検討も行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

市販のゼリービーンズ、福神漬、清涼飲料水を使用した。

2. 標準品および試薬等

1) 着色料標準品

(1) 指定色素 すべての国立医薬品食品衛生研究所標準品を用いた。食用赤色2号（Amaranth, C.I. 16185, R2）、食用赤色3号（Erythrosine, C.I. 45430, R3）、食用赤色40号（Allura Red AC, C.I. 16035, R40）、食用赤色102号（New Coccine, C.I. 16255, R102）、食用赤色104号（Phloxine, C.I. 45410, R104）、食用赤色105号（Rose Bengal, C.I. 45440, R105）、食用赤色106号（Acid Red, C.I. 45100, R106）、食用青色1号（Brilliant Blue FCF, C.I. 42090, B1）、食用青色2号（Indigo Carmine, C.I. 73015, B2）、食用黄色4号（Tartrazine, C.I. 19140, Y4）、食用黄色5号（Sunset Yellow FCF, C.I. 15985, Y5）、食用緑色3号（Fast Green FCF, C.I. 42053, G3）

(2) 指定外色素 オレンジG（Orange G, C.I. 16230, OG）、ファーストレッドE（Fast Red E, C.I. 16045, FRE）、アゾルビン（Azorubine, C.I. 14720, AZO）は東京化成工業（株）を用いた。パテントブルーVF（別名：アズールブルーVX, Patent Blue VF, C.I. 42045, PBVF）はACROS ORGANIC社製を用いた。

2) 標準溶液

標準品をそれぞれ10 mgずつ正確に量り、水に溶解して10 mL（1,000 µg/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。

3) その他の試薬

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。

^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 当時：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

^c 東京都健康安全研究センター食品化学部

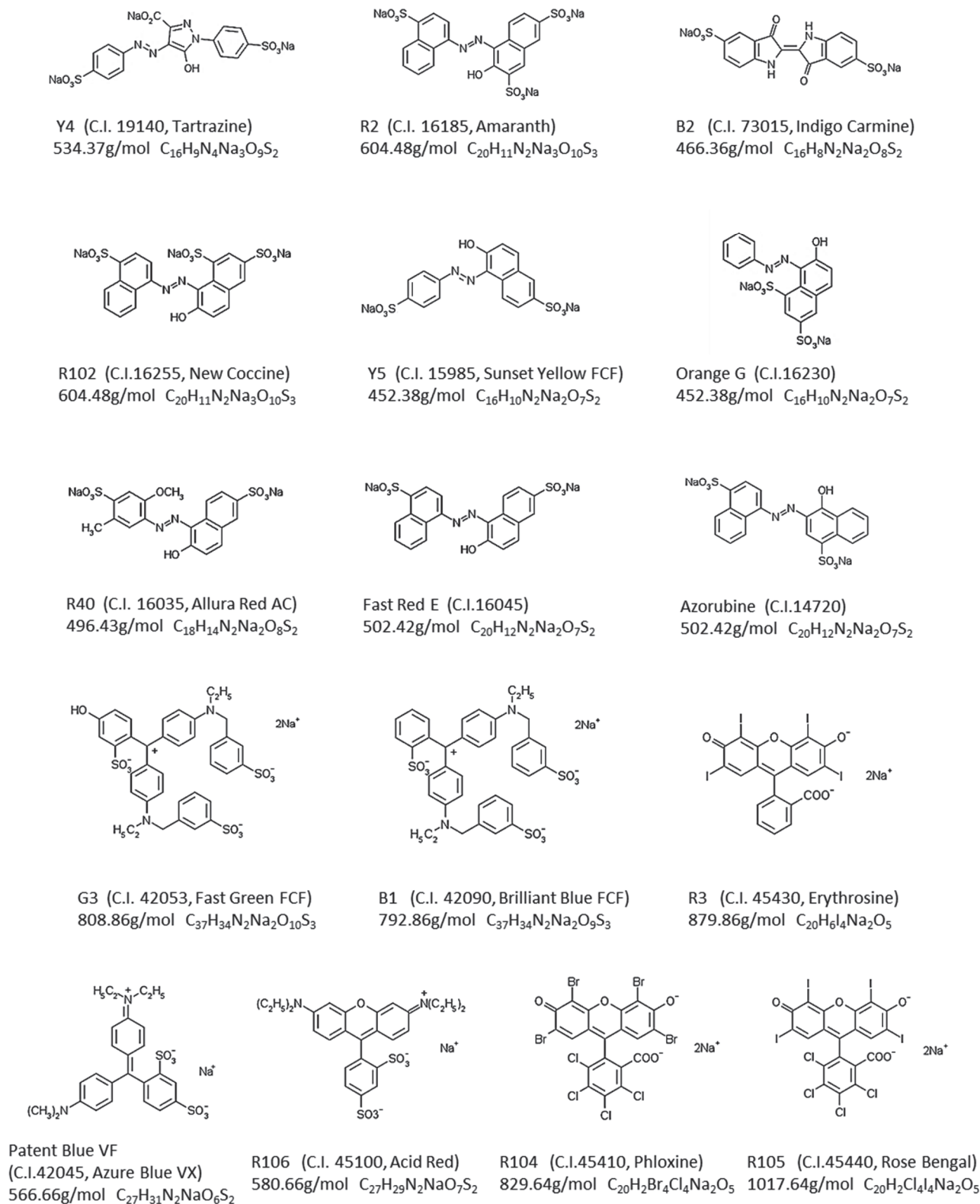


Fig. 1. Chemical Structures of 16 Colorants

4) ろ紙

アドバンテック東洋（株）製定量ろ紙5Aを用いた。

5) クロマト管

Bio-Rad Laboratories社製 フィルター付きカラム（0.8 cm i.d. × 4 cm）を用いた。

3. 装置

HPLC：Agilent Technologies社製 1260 シリーズ

質量分析装置：Agilent Technologies社製 6430

4. 試験溶液の調製

試験溶液の調製は衛生試験法・注解2015⁴⁾に準じた。細切した試料10 gに水50 mL、0.5%アンモニア水20 mL、エタノール50 mLを加えて40°Cで加温しながらかくはんし、抽出を行った。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、事前に

水で洗浄したポリアミド1 gを加えて色素を吸着させた。

着色したポリアミドを水でクロマト管に充てんし、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）混液で溶出した。得られた溶出液を水浴上（80°C）で乾固し、水2 mLで溶解後に適宜希釈してメンブランフィルター（0.20 μm）でろ過したものをLC-MS/MS用試験溶液とした。

5. LC-MS/MS条件

分析カラム：CAPCELL CORE C₁₈（2.1 mm i.d. × 150 mm、粒径2.7 μm、（株）資生堂製）、移動相：A；0.01 mol/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：A液 98%（0 min）→40%（20 min）、流速：0.25 mL/min、カラム温度：40°C、注入量：2 μL、PDA検出波長：450 nm、520 nm、620 nm、ガス温度：350°C、ガス流量：10 L/min、ネブライザーガス：N₂（50

Table 1. Product Ion Scan Parameters of 16 colorants

Colorants	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	Fragmentor Voltage (V)	Collision Energy (V)	Colorants	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	Fragmentor Voltage (V)	Collision Energy (V)
Y4	467	250	20	AZO	457	250	30
R2	537	250	30	G3	763	250	40
B2	421	250	30	B1	747	250	40
R102	537	250	20	R3	834.5	250	40
Y5	407	250	30	PBVF	543	250	45
OG	407	250	30	R106	557	250	45
R40	451	250	30	R104	784.5	250	30
FRE	457	250	30	R105	972.5	250	45

Table 2. SRM Parameters of 16 colorants

Colorants	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	Product Ion* (<i>m/z</i>)	Fragmentor Voltage (V)	Collision Energy (V)	Colorants	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	Product Ion* (<i>m/z</i>)	Fragmentor Voltage (V)	Collision Energy (V)
Y4	211	198 134	75	10 10	AZO	457	377 221	200	20 30
R2	537	317 237	150	20 30	G3	763	170 577	250	45 45
B2	421	341 261	250	30 45	B1	747	561 587	250	45 45
R102	537	302 429	250	30 20	R3	834.5	536.5 662	250	45 45
Y5	407	207 327	250	30 20	PBVF	543	419 463	250	45 30
OG	407	302 207	250	30 20	R106	557	513 433	250	45 45
R40	451	207 371	225	30 20	R104	784.5	704 658.5	125	30 30
FRE	457	377 207	200	20 30	R105	972.5	675 126.6	200	30 45

* Upper row product ion is higher sensitivity than under row product ion.

psi), イオン化モード: ESI (-), キャピラリー電圧: 4,000 V, フラグメンター電圧およびコリジョンエネルギーの各色素の設定値はTable 1およびTable 2に示した。

結果および考察

1. 分析条件の検討

1) HPLC条件

現在, 高分解能・高感度で, 分析時間の短縮, 溶媒使用量の削減を可能とするコアシェルカラムが開発されている。今回, 分析の迅速化を目指し, そのひとつであるCAPCELL CORE C₁₈を用いた。移動相については, 食品衛生検査指針⁵⁾に示されているHPLC条件を参考に, 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条件の検討を行った。

その結果, 実験方法に示した条件に設定することにより, 指定色素12種と指定外色素4種 (OG, FRE, AZO, PBVF) を20分以内で良好に分離することができた (Fig.2)。従来の分析法^{4,5)}では1回の分析に1時間程度を要するが, 本条件により大幅な迅速化と溶媒使用量の削減を図ることができた。

2) MS/MS条件

まず, 複数イオンの確認ができ, 定性能力が高いプロダクトイオンスキャンについて検討した。今回検討した色素については, LC-MSで一斉分析できること^{1,2)}が報告されているネガティブモードで測定を行うこととした。MS測定でフラグメンター電圧を100~250 V の間で変化させ, 得られたスペクトルの中から最も強度が強い基準ピークを選択してプリカーサーイオンとした。その結果, 各色素で250Vにおいて基準ピークが得られた。さらにコリジョンエネルギーを5~50 Vで変化させ, MS/MSによるプロダクトイオンスペクトルを確認したところ, Table 1に示したイオン化条件が最適であった。また, このときのプロダクトイオンスペクトルをFig. 3に示した。R2とR102, Y5と

OG, FREとAZOは異性体であり, MSによる分析では同じイオンが検出されて判別がつかないが, MS/MSによる分析では, フラグメンテーションの違いにより異なるスペクトルを検出でき, これらの異性体を判定することができた。

つぎに, 色素濃度が低く, プロダクトイオンスキャンで確認できない場合に, 高感度での分析が期待できる選択反応モニタリング (SRM) により確認できるように条件の最適化を行った。プロダクトイオンは感度が高いほうから2つ選択した (Table 2)。SRMにおいても, R2とR102, Y5とOG, また, FREとAZOの異性体を, 異なるイオンにより検出することができ, 判別が可能であった。

2. 標準溶液の分析

各色素の標準溶液を用い, プロダクトイオンスキャンによる分析を行ったところ, スペクトルを確認できる最低濃度は, R105で10 µg/mL, Y4, R40, R102, R104, G3, OG, AZO, FRE, PBVFでは5 µg/mL, Y5, R2, B1, B2で2 µg/mL, R3とR106で1 µg/mLだった。また, SRMでは今回分析した各色素は, 0.1 µg/mLの濃度まで十分に確認が可能であった。本法は着色料の確認法として, 既報のTLC, HPLC, LC-MSの方法¹⁻⁵⁾よりも高感度であると考えられた。

3. 食品中の着色料の分析

市販のゼリービーンズ (Y5, B2の表示あり) および福神漬 (Y4, Y5, R106の表示あり) から表示どおりに各着色料が検出できるかを検証した。いずれの食品からも, 表示通りすべての着色料を検出することができた。また, プロダクトイオンスペクトルも確認することができた (Fig.4)。また, 着色料を使用していないことを確認した清涼飲料水に, 指定色素12色および指定外色素4色 (OG, FRE, AZOおよびPBVF) をそれぞれ1 µg/gとなるように添加し, 本法を用いて分析したところ, すべての色素をSRMクロマトグラムにおいて確認することができた。

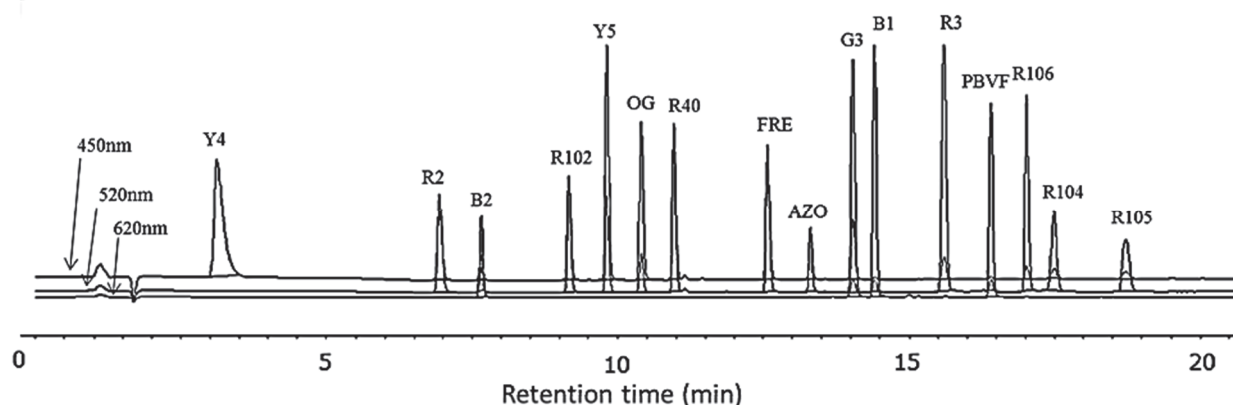


Fig. 2. HPLC Chromatogram of standard 16 colorants (10 µg/mL)

Operating conditions:

Column : CAPCELL PAK CORE C₁₈ (2.1 mm i.d.×150 mm, 2.7µm),

Mobile phase : A; 0.01 mol/L Ammonium acetate, B; Acetonitrile, A98%(0min)→40% (20min),

Flow rate : 0.25 µL/min, Detector : PDA, Injection volume : 2 µL

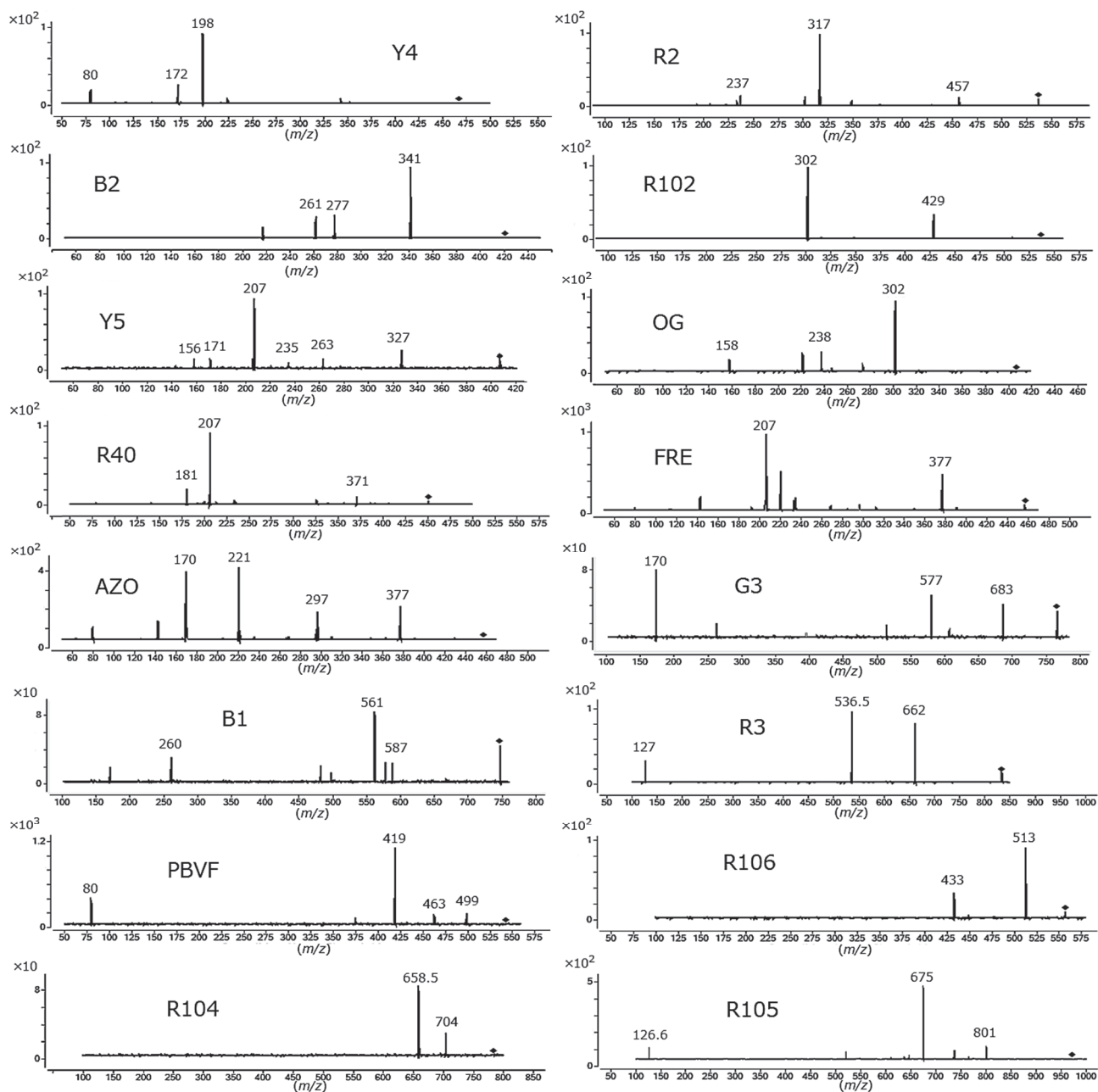


Fig. 3. LC-MS/MS Product Ion Spectra of 16 Colorants (10 µg/mL)

Operating conditions:

Column : CAPCELL PAK CORE C₁₈ (2.1 mm i.d.×150 mm, 2.7µm),

Mobile phase : A; 0.01 mol/L Ammonium acetate, B; Acetonitrile , A 98%(0min)→40% (20min),

Flow rate : 0.25 mL/min, Injection volume : 2 µL

◆ precursor ion

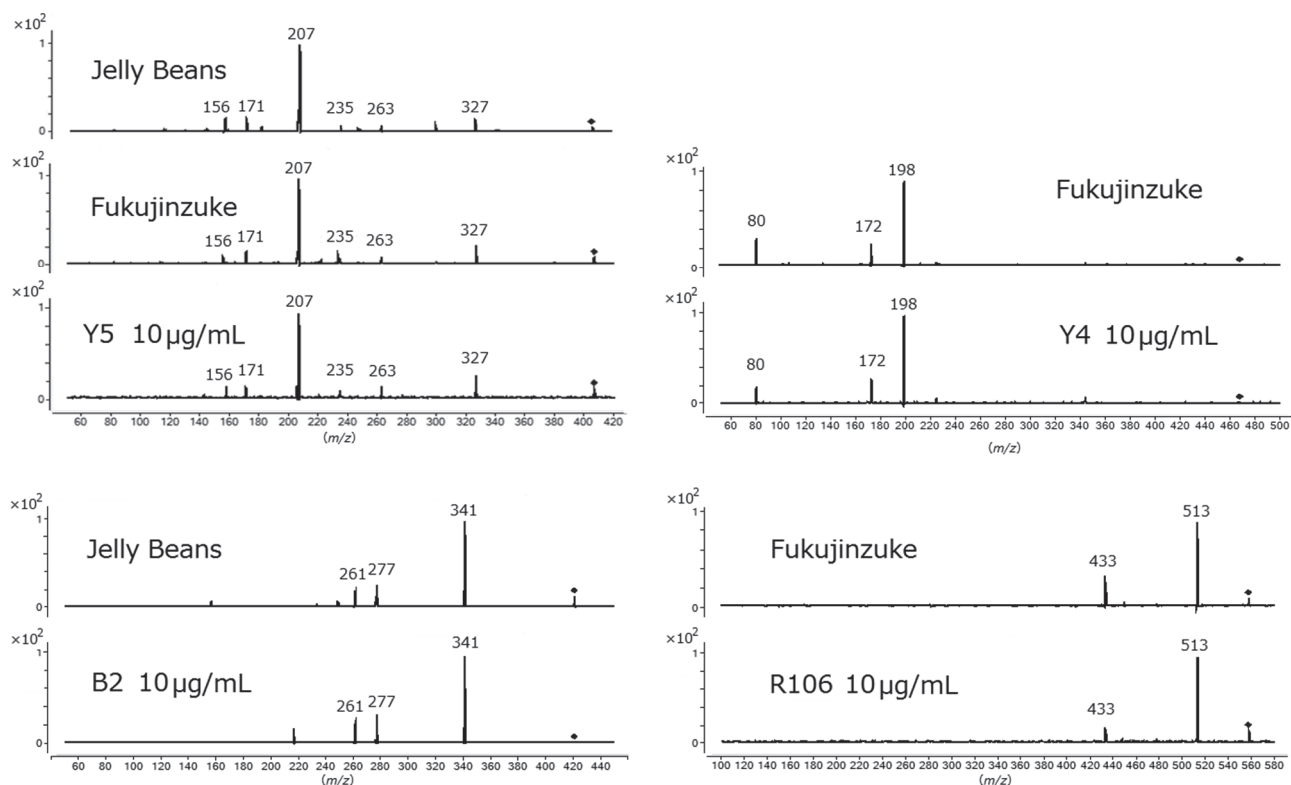


Fig. 4. LC-MS/MS Product Ion Spectra of Jelly Beans, Fukujinzuke(pickles) and Standard Solution.

Operating conditions:

Column : CAPCELL PAK CORE C₁₈ (2.1 mm i.d.×150 mm, 2.7µm),

Mobile phase : A; 0.01 mol/L Ammonium acetate, B; Acetonitrile , A 98%(0min)→40% (20min),

Flow rate : 0.25 mL/min, Injection volume : 2 µL

◆ precursor ion

ま と め

LC-MS/MSを用いた着色料の確認法を検討した。本法を用いて着色料使用の表示がある食品を分析した結果、表示どおりにプロダクトイオンスペクトルにより確認することができた。また低濃度の着色料添加試料についてもSRMクロマトグラムで確認が可能であった。

従来法と比べ、より高感度の分析が可能となり、さらにHPLC分析時間を大幅に短縮することができた。本法は食品中の着色料確認法として有用な方法であると考えられる。

文 献

- 1) 関戸晴子, 岸弘子: 神奈川県衛生研究所報告, **38**, 35-38, 2008.
- 2) 山口瑞香, 梶村計志: 食衛誌, **56**, 8-13, 2015.
- 3) 新藤哲也, 貞升友紀, 小川麻萌, 他: 東京健安研七周年報, **66**, 183-188, 2015.
- 4) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解2015, 380-388, 2015, 金原出版, 東京.
- 5) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針食品添加物編 2003, 169-199, 日本食品衛生協会, 東京.

Confirmation Method of Colorants in Foods Using LC-MS/MS

Akiko YASUI^a, Taeko KATO^b, Narue SAKAMAKI^a, Yuki SADAMASU^a, Kimio MONMA^a and Chigusa KOBAYASHI^a

Colorants in food are analyzed by TLC and HPLC; at present, the analysis is conducted using a combination of confirmatory methods. However, identification is sometimes difficult because some colors exhibit similar behavior on TLC and HPLC.

In this work, a high-sensitivity confirmation method was developed using product ion scan and SRM with LC-MS/MS instead of TLC and HPLC for better reliability.

The method using LC-MS/MS was developed for the simultaneous confirmation of 16 colorants (Amaranth, Erythrosine, Allura Red AC, New Coccine, Phloxine, Rose Bengal, Acid Red, Brilliant Blue FCF, Indigo Carmine, Tartrazine, Sunset Yellow FCF, Fast Green FCF, Orange G, Fast Red E, Azorubine, Patent Blue VF) in foods.

The confirmation method using LC-MS/MS established in this study is suitable for the detection of colorants in processed foods. Moreover, it is possible to speed up analysis of colorants using a core-shell column.

Keywords: LC-MS/MS, colorants, foods

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

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

