

LC-MS/MSを用いた食品中指定外油溶性着色料の分析

安井 明子^a, 京小 ひと美^b, 坂牧 成恵^a, 貞升 友紀^a, 牛山 慶子^a, 小林 千種^a

我が国で許可されていない食品添加物が食品中から検出された事例が国内外で報告されている。食の安全確保のためには、輸入食品検査における適切な試験法の開発が不可欠である。そこで、食品中の指定外油溶性着色料（スーダンI~IV及びパラレッド、シトラスレッド2、スーダンオレンジG、スーダンレッドG、オイルオレンジSS、オイルバイオレット）の一斉分析法の検討を行った。アセトニトリルを用いて抽出を行い、シリカゲルカートリッジにより精製した後、LC-MS/MSにより測定する分析法を作成し、各着色料を1 µg/g 添加した食品を分析したところ、66.8~119.8%の回収率が得られた。本法は日常検査に適用できる方法であると考えられた。

キーワード：油溶性着色料, LC-MS/MS, 食品

はじめに

我が国で許可されていない食品添加物が食品中から検出された場合、食品衛生法違反となる。食の安全確保のため、輸入食品検査における指定外添加物の適切な試験法開発が不可欠である。油溶性着色料のスーダンI~IV及びパラレッドはわが国及びEU諸国等において食品添加物としての使用は許可されていないにもかかわらず、各種食品からの検出事例が国内外で多く報告されており^{1,3)}、厚生労働省通知法⁴⁾も整備されている。一方、米国で許可されているシトラスレッド2のほか、構造が類似し、諸外国でも使用が認められていないスーダンオレンジG、スーダンレッドG、オイルオレンジSS、オイルバイオレットなどの指定外油溶性着色料も食品から検出される可能性がある。そこでこれら10種の指定外油溶性着色料 (Fig. 1) について、高選択性、高感度が期待されるLC-MS/MSを用いた一斉分析法の検討を行ったので以下に報告する。

実験方法

1. 試料

市販の唐辛子、チリソース、ラー油を使用した。

2. 標準品及び試薬等

1) 標準品

スーダンI (Sudan I, C.I. 12055), スーダンII (Sudan II, C.I. 12140) は関東化学 (株) 製を用いた。スーダンIII (Sudan III, C.I. 26100), スーダンIV (Sudan IV, C.I. 26105), パラレッド (Para Red, C.I. 12070), オイルバイオレット (Oil Violet, C.I. 26050) は東京化成工業 (株) 製を用いた。シトラスレッド2 (Citrus Red 2, C.I. 12156), スーダンオレンジG (Sudan Orange G, C.I. 11920) はSigma-Aldrich社製を用いた。スーダンレッドG (Sudan

Red G, C.I. 12150), オイルオレンジSS (Oil Orange SS, C.I. 12100) はFluka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、酢酸エチルに溶解して10 mL (1,000 µg/mL標準原液) とした。これをアセトニトリルで段階的に希釈し、標準溶液とした。

3) その他の試薬

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。

4) シリカゲルカートリッジ

Waters社製 Sep-Pak Plus Silica 690 mgをヘキサン10 mLでコンディショニングしたものを用いた。

5) フィルター

Milllex-LG, 直径13 mm, 孔径0.20 µm (Merck Millipore社製) を用いた。

3. 装置

HPLC: Agilent Technologies社製 1260

質量分析装置: Agilent Technologies社製 6430

4. 試験溶液の調製

1) ラー油

試料約5 gを精密に量り、ヘキサンに溶解し正確に100 mLとした。100 mLの分液ロートにこの液10 mLを正確にとり、ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう後静置し、アセトニトリル層を分取した。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加えて同様の操作を行い、全アセトニトリル層を約40°Cで減圧濃縮後に窒素気流下で乾固した (以下、乾固)。残留物にヘキサン5 mLを加えて溶解し、シリカゲルカートリッジに負荷した。さらにヘキサン5 mLで容器を洗い、この洗液をカー

^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

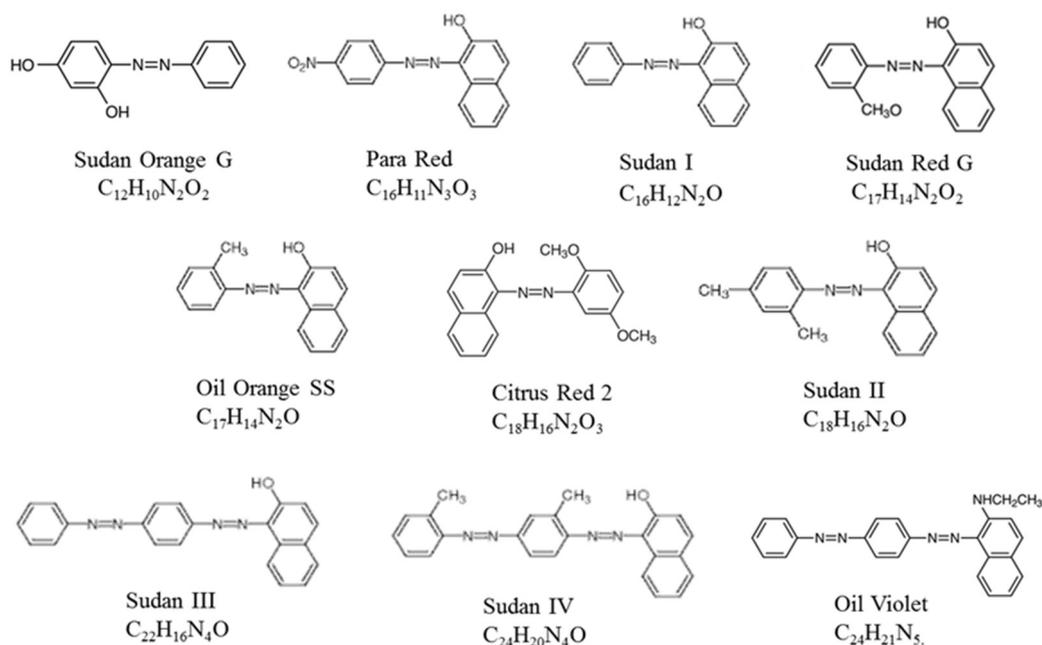


Fig. 1. Chemical Structures of 10 Dyes

Table 1. SRM Parameters of Dyes

Analyte	Precursor Ion (m/z)	Fragmentor (V)	Quantitative ion		Qualitative ion	
			Product Ion (m/z)	Collision Energy (V)	Product Ion (m/z)	Collision Energy (V)
Sudan Orange G	215	100	93	20	198	10
Para Red	294	100	156	10	128	30
Sudan I	249	100	93	30	128	20
Sudan Red G	279	100	123	10	108	30
Oil Orange SS	263	100	107	20	156	10
Citrus Red 2	309	100	153	10	138	30
Sudan II	277	100	121	30	106	40
Sudan III	353	100	77	30	92	40
Sudan IV	381	100	91	30	224	20
Oil Violet	380	100	183	10	115	40

トリッジに負荷した。次いで2-プロパノール-ヘキサン(1:49) 3 mLを通過させてその液を捨てた後、同溶液5 mLで着色料を溶出した。溶出液を乾固させた後、残留物にアセトニトリル5 mLを正確に加えて溶解し、フィルターを通して試験溶液とした。

2) ラー油以外の食品

細切した試料約5 gを遠沈管に精密に量り、アセトニトリル35 mL、無水硫酸ナトリウム10 gを加えてボルテックスミキサー及び手振りで約1分間ずつ振とうした。3,000

rpmで5分間遠心分離した後、アセトニトリル層をメスフラスコに分取した。残さにアセトニトリル35 mLを加え、同様に振とうした後、アセトニトリル層を先のメスフラスコに合わせ、アセトニトリルを加えて100 mLとした。この液4 mLを正確に量り、乾固させ、残留物(A)にヘキサン5 mLを加えて溶解し、シリカゲルカートリッジに負荷した。さらにヘキサン5 mLで容器を洗い、この洗液をカートリッジに負荷した。次いで、2-プロパノール-ヘキサン(1:49) 3 mLを通過させてその液を捨てた後、同溶液5 mL

で着色料を溶出した。溶出液を乾固させた後、残留物にアセトニトリル2 mLを正確に加えて溶解し、フィルターを通して試験溶液とした。

5. LC-MS/MS条件

分析カラム：ACQUITY UPLC HSS PFP (2.1 mm i.d.×100 mm, 粒径1.8 μm, Waters社製), 移動相：A液；アセトニトリル, B液；0.1%ギ酸溶液, グラジエント条件：A液 50% (0 min) →85% (15 min) →85% (20 min) →50% (20.1 min), アイソクラティック条件 (ラー油中スーダンIV分析時)：A:B (58:42), 流速：0.25 mL/min, カラム温度：30°C, 注入量：1 μL, ガス温度：300°C, ガス流量：11 L/min, ネブライザーガス：N₂ (15 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及びコリジョンエネルギーの各着色料の設定値はTable 1に示した。

結果及び考察

1. 分析条件の検討

1) HPLC条件

本法で目的とする着色料は互いに構造が類似するものもあるため、異性体の分離に適しているPFPカラムを用いて検討を行った。移動相については、通知法⁴⁾に示されているHPLC条件を参考に、アセトニトリル-0.1%ギ酸溶液を用いたアイソクラティック条件で検討を行ったが、すべての着色料を良好に分離するためには50分程度の時間を要した

上、保持時間が長いスーダンIV及びオイルバイオレットのピーク形状が悪化した。そこで、アセトニトリルと0.1%ギ酸溶液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、実験方法に示したグラジエント条件で測定することにより10種の油性着色料を20分以内で良好に分離することができた (Fig. 2)。

2) MS/MS条件

通知法⁴⁾に準じポジティブモードで測定を行った。また、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。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、各着色料とも100 Vで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、プロダクトイオンの中から最も感度が高いものを定量イオン、次に感度が高いものを確認イオンとして選択した (Table 1)。

2. シリカゲルカートリッジによる精製

通知法⁴⁾に準じ、10種の指定外油性着色料を添加したチリソースからの抽出を試みたところ、抽出溶媒に用いるアセトニトリルには全着色料が抽出されることがわかった。そこで、この抽出液を用いて精製法の検討を行った。

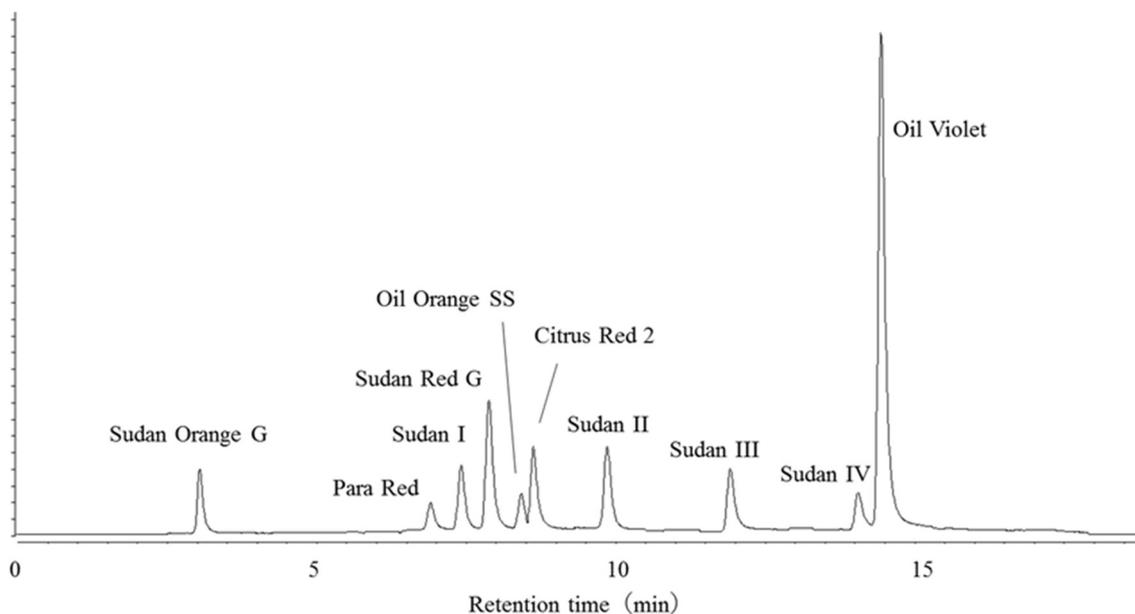


Fig. 2. Total Ion Chromatogram (TIC of SRM) of Standard 10 Dyes (0.2 μg/mL)

Operating conditions:

Column: ACQUITY UPLC HSS PFP (2.1 mm i.d.×100 mm, 1.8 μm), Column temperature: 30 °C

Mobile phase: A ; acetonitrile, B ; 0.1%formic acid, A 50%(0 min)→85%(15min)→85%(20min)→50%(20.1min)

Flow rate: 0.25 mL/min, Injection volume: 1 μL

実験方法に示した方法に従って調製した残留物 (A) をヘキサン5 mLに溶解させ、シリカゲルカートリッジに負荷したところ、着色料が確認されなかったことから、カートリッジには全着色料が保持されていると考えられた。

次に、溶出液の検討を行った。通知法で用いられている溶出溶媒ジエチルエーテル-ヘキサン (1:9) 15 mLで溶出を行ったところ、スーダンオレンジGやシトラスレッド2などの着色料が溶出されなかった。そこでジエチルエーテルよりも極性が高い、酢酸エチルや2-プロパノールとヘキサンとの混液を調製し、溶出溶媒の検討を行った。溶出の確認は、溶出液を乾固させた後、アセトニトリルに溶解した溶液中の着色料をLC-MS/MSで測定して行った。

溶出液に酢酸エチル-ヘキサン (1:9) 5 mLを用いた場合、10種すべての着色料は溶出されなかった。2-プロパノール-ヘキサン (1:9) を用いた場合、4 mLですべての着色料が溶出された。しかし、溶出液中に油分も含まれていることから、さらに検討を行ったところ、2-プロパノール-ヘキサン (1:49) を用い、最初の3 mLは捨て、次の5 mLを溶出液とすることで油分の溶出を抑え、かつすべての着色料を溶出させることができた。

3. 標準溶液の分析

各着色料の標準溶液を用い、SRMによる分析を行ったところ、いずれの着色料も0.005 µg/mLの濃度でS/N比は7以上得られ、十分に確認が可能であった。

4. マトリックス効果

0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 µg/mLの5点で、絶対検量線

とマトリックス検量線の傾きを比較した。マトリックス検量線は唐辛子、チリソース、ラー油を用い、実験方法に示した方法に従って得られたブランク溶液から調製した。両者の傾きの比からマトリックス効果について以下の評価指標を用いて評価した^{5,6)}。

<評価指標>

マトリックス効果 $a=b/c$

b =マトリックス検量線の傾き, c =絶対検量線の傾き

ラー油中のスーダンIVを除くそれぞれの着色料のマトリックス効果はイオン化効率への影響がないとされる0.8~1.2の範囲に抑えられた (Table 2) ため、重大なマトリックス効果はないことが推測できた。よって、操作が簡便な絶対検量線による定量が0.01~0.2 µg/mLの範囲で可能であることがわかった。

ラー油中のスーダンIVに関しては、マトリックス効果によるイオンエンハンスメントが観察された。そこで、アイソクラティック条件でアセトニトリル-0.1%ギ酸溶液の組成比を変化させて移動相条件を検討した。組成比が(60:40)の場合はイオンエンハンスメントが観察されたが、(58:42)や(55:45)の場合はラー油中スーダンIVのマトリックス効果 $a=0.99$ となり、マトリックスの影響を受けることなく定量ができると考えられた。また、アセトニトリル-0.1%ギ酸溶液 (55:45) の場合、スーダンIVの保持時間は約40分と、分析に時間を要するため、スーダンIVの保持時間が約26分であったアセトニトリル-0.1%ギ酸溶液 (58:42) をラー油中スーダンIVの定量用移動相とすることとした。

Table 2. Evaluation of Matrix Effects*

Linear range (µg/mL)	Analyte	Chili pepper		Chili sauce		Chili oil	
		r^2	a	r^2	a	r^2	a
0.01-0.2	Sudan Orange G	0.999	0.95	0.999	0.96	0.999	0.95
	Para Red	0.976	1.08	0.999	0.99	0.998	0.98
	Sudan I	0.999	1.08	0.999	0.99	0.998	1.02
	Sudan Red G	0.999	1.07	0.999	1.02	0.999	1.01
	Oil Orange SS	0.999	1.07	0.999	1.05	0.995	1.16
	Citrus Red 2	0.999	1.02	0.999	1.00	0.999	0.99
	Sudan II	0.999	1.05	0.999	1.00	0.998	0.98
	Sudan III	0.999	1.07	0.999	0.99	0.990	0.95
	Sudan IV	0.991	1.06	0.997	1.16	0.991	4.67
	Oil Violet	0.998	1.05	0.998	1.05	0.980	1.02

*Evaluation of matrix effects comparing the ratio of slopes derived from the standard solution and matrix-matched calibration curves derived five types peak areas in matrix-matched standards to solvent-based standard.

r^2 : Correlation coefficient of matrix-matched calibration curve

a: Matrix effect= b/c , b: slope of matrix calibration curve, c: slope of absolute calibration curve

Mean of three replications.

Table 3. Results of Recovery Test

Analyte	Chili pepper		Chili sauce		Chili oil	
	Recovery (%)	C.V.(%)	Recovery (%)	C.V.(%)	Recovery (%)	C.V.(%)
Sudan Orange G	68.1	2.0	78.6	1.9	66.8	0.7
Para Red	93.6	4.4	92.6	4.9	94.9	1.2
Sudan I	82.2	0.5	90.7	5.9	98.0	0.8
Sudan Red G	119.8	1.6	98.0	3.4	116.0	1.6
Oil Orange SS	105.8	1.7	100.4	2.3	105.8	1.0
Citrus Red 2	93.0	3.8	99.4	5.3	108.2	1.6
Sudan II	84.1	5.1	88.2	1.8	100.4	2.7
Sudan III	79.8	5.5	81.5	2.8	89.1	2.2
Sudan IV	91.4	0.6	115.2	5.6	98.5	3.6
Oil Violet	86.3	0.8	91.4	8.0	95.7	4.6

spiked level: 1 µg/g (n=3)

5. 食品への適用

検疫所及び海外で違反事例のあった食品である唐辛子製品を用いて添加回収試験を行った。10種の指定外油溶性着色料が含まれていないことを確認した市販の唐辛子、チリソース、ラー油に、各着色料をそれぞれ通知法の検出限界の2倍である1 µg/g添加し、本法を用いて分析したところ、すべての着色料をSRMクロマトグラムにおいて確認することができた。また、Table 3に示したように、66.8～119.8%の回収率 (C.V. 0.5～8.0%) が得られた。

ま と め

LC-MS/MSを用いたスーダンI など10種の指定外油溶性着色料の一斉分析法を検討した。本法を用いて各着色料を1 µg/g添加した食品を分析したところ、66.8～119.8%の回収率が得られ、日常検査に適用できる方法であると考えられた。

文 献

- 1) 伊藤澄夫：食品衛生学雑誌, J-273-275, 47, 2006.
- 2) 厚生労働省：輸入食品監視業務, 違反事例,
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html
(2020年8月3日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所：食品に関する情報ホームページ, 食品安全情報, <http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/index.html>
(2020年7月31日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長：食

安監発第0501007号, 食品中のスーダン色素及びパラレッドの試験法について(通知), 平成18年5月1日.

- 5) Iwakoshi, K., Tahara, S., Uematsu, Y. et al.: J. of Chromatogr.A, 1592, 64-70, 2019.
- 6) 岩越景子, 大塚健治, 田村康宏, 他：食品衛生学雑誌 57, 150-154, 2016.

Analysis of Nonpermitted Oil Soluble Dyes in Foods by LC-MS/MS

Akiko YASUI^a, Hitomi KYOKO^b, Narue SAKAMAKI^a, Yuki SADAMASU^a, Keiko USHIYAMA^a,
and Chigusa KOBAYASHI^a

There have been worldwide reports of food additives that are not permitted in Japan being detected in foods. The development of analysis methods for the inspection of imported foods is essential to ensuring food safety.

Therefore, we developed a methodology for analyzing nonpermitted oil soluble dyes (Sudan I, Sudan II, Sudan III, Sudan IV, Para Red, Citrus Red 2, Sudan Orange G, Sudan Red G, Oil Orange SS, and Oil Violet) in foods. The samples were extracted with acetonitrile, cleaned up using a silica gel column and analyzed by LC-MS/MS. The recoveries from food samples, fortified at the level of 1 µg/g, were between 66.8% and 119.8%.

Keywords: Oil soluble dyes, LC-MS/MS, 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