

コチニール色素を使用した輸入マシュマロの4-アミノカルミン酸検出事例

吉田 あゆむ^a, 森川 麻里^a, 小林 千種^a, 佐々木 隆宏^a, 山嶋 裕季子^a, 大塚 健治^a

2022年に収去されたコチニール色素の表示がある米国産マシュマロ（ピンク色）から、コチニール色素とは異なる赤紫色の不明色素をTLC上で検出した。過去の事例から、不明色素は4-アミノカルミン酸（耐酸性コチニール）であると考え、通知法に準じてHPLC及びLC-MSにより分析を行い、検査体制を整備して当該色素が4-アミノカルミン酸であることを確認した。当センターにおいて同色素の検出事例は初であった。近年、国内外で4-アミノカルミン酸の検出事例が報告されていることから、今後も最新情報や事例についての情報を蓄積し、日常検査に活かしていくことが必要であると考えられた。また、4-アミノカルミン酸を高選択・高感度に分析するため、LC-MS/MS条件の検討と最適化もあわせて実施し、新規項目に対応できる体制の強化を図った。

キーワード：4-アミノカルミン酸，耐酸性コチニール，コチニール色素，カルミン酸，着色料，TLC，HPLC，LC-MS/MS，食品添加物

はじめに

コチニール色素は、エンジムシの乾燥体から抽出して得られるカルミン酸を主成分とする橙～赤紫色の着色料であり、我が国では既存添加物名簿に収載され、清涼飲料水、菓子、食肉製品、かまぼこ等に使用されている¹⁾。一方、4-アミノカルミン酸は、コチニール色素を原料として化学的処理により合成され、カルミン酸の4位の水酸基がアミノ基に置き換わった構造をしており（図1）、コチニール色素に比べて安定した色調が保てるという利点がある^{2,3)}。4-アミノカルミン酸は耐酸性コチニールとも呼ばれ、コチニール色素に該当しない指定外添加物である²⁾。欧州（EU）では、「4-アミノカルミン酸の含有量はカルミン酸の3%未満」というカルミン酸の成分規格が2018年に設定されている⁴⁾。また、米国（FDA）では、コチニール抽出物について4-アミノカルミン酸の含有量に関する規制が存在しない⁵⁾。そのため、これらの国ではカルミン酸の不純物として4-アミノカルミン酸が含まれることが許容される可能性がある。加えて、近年、国内外で検出事例が複数報告されている^{3,6-9)}。このような状況下、2022年、当センターにおいて、コチニール色素の表示がある米国産マシュマロのうちピンク色のマシュマロから、初めて4-アミノカルミン酸が検出された。本報では、検査結果の根拠としたTLC、HPLC及びLC-MSによる分析事例について報告する。また、4-アミノカルミン酸を高選択・高感度に分析するためLC-MS/MS条件の検討と最適化も実施し、良好な結果を得たのであわせて報告する。

実験方法

1. 試料

2022年に都内で収去された、着色料としてウコン、コチニール、食用青色1号の表示がある米国産のマシュマロ

（ピンク色，緑色，オレンジ色，黄色の4色が一袋に入った商品）。都内で購入した着色料表示のない白いマシュマロ（ブランク及び添加回収試験に使用）。

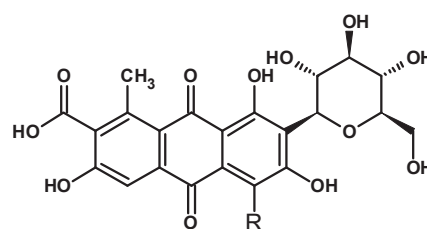


図1. 色素の構造式

R=OH：カルミン酸，R=NH₂：4-アミノカルミン酸

2. 試薬等

1) 標準品

食用赤色2号（R2），食用赤色3号（R3），食用赤色40号（R40），食用赤色102号（R102），食用赤色104号（R104），食用赤色105号（R105），食用赤色106号（R106），食用黄色4号（Y4），食用黄色5号（Y5），食用緑色3号（G3）及び食用青色1号（B1）は一般社団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団製を、コチニール色素及びクルクミン（ウコン）色素は富士フイルム和光純薬（株）製を、4-アミノカルミン酸は国立医薬品食品衛生研究所分与品（純度52%）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標準溶液）とした。また、R2，R102，Y5及びR106の標準溶液を各1 mL採り混合したものをTLC用混合標準溶液1（0.025%，st1），R3，R104，R105及びR106の標準溶液を各1 mL採り混合したものをTLC用混合標準溶液2（0.025%，st2）とした。HPLC用及びLC-

^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

MS/MS用標準溶液は、標準溶液を水で適宜希釈して使用した。ただし、クルクミン（ウコン）色素については溶解及び希釈する溶媒をメタノールとした。

3) その他の試薬

メタノール、アセトニトリルはHPLC用、酢酸エチル、酢酸、28%及び25%アンモニア水は試薬特級、塩酸は精密分析用、ギ酸はLC/MS用を、エタノールは日本薬局方を使用した。ポリアミドは富士フイルム和光純薬（株）製カラムクロマトグラフィー用C-100を用いた。Mega Bond Elut C18（2 g, 12 mL）はAgilent Technologies社製を用いた。水はメルクミリポア社製Milli-Q Integral 5で製造したものをを用いた。

3. 装置

HPLC：（株）島津製作所製 SHIMADZU Prominence

LC-MS/MS：Waters社製 ACQUITY UPLC I-Class PLUS
及びXevo TQ-S micro

4. 測定条件

1) TLC分析条件

TLC分析条件は既存の酸性タール色素試験法^{10,11)}に準じた。

（条件1）薄層板：MERCK社製TLCアルミニウムシート RP-18F₂₅₄S（20 cm×20 cm）を10 cm×10 cmに切断したもの、展開溶媒：メタノール・アセトニトリル・5%硫酸ナトリウム溶液（3：3：10）

（条件2）薄層板：MERCK社製TLCアルミニウムシート シリカゲル60F₂₅₄（20 cm×20 cm）を10 cm×10 cmに切断したもの、展開溶媒：酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア水（10：3：3）

2) HPLC分析条件

HPLC分析条件は4-アミノカルミン酸通知法²⁾に準じた。

カラム：COSMOSIL 5C₁₈-MS-II（2.0 mm i.d.×150 mm, 粒径5 µm, ナカライテスク（株）製）、移動相：A液；0.1%ギ酸、B液；アセトニトリル、グラジエント条件：B液10%（0 min）→90%（10 min）→90%（13 min）→10%（13.01 min）→10%（30 min）、流速：0.7 mL/min、カラム温度：40°C、注入量：1 µL、検出器：フォトダイオードアレイ、検出波長：490 nm

3) LC-MS条件

LC-MS分析条件は4-アミノカルミン酸通知法²⁾に準じた。

カラム：ACQUITY UPLC BEH C18（2.1 mm i.d.×100 mm, 粒径 1.7 µm, Waters社製）、移動相：A液；0.1%ギ酸、B液；アセトニトリル、グラジエント条件：B液10%（0 min）→90%（10 min）→90%（13 min）→10%（13.01 min）→10%（21 min）、流速：0.2 mL/min、カラム温度：40°C、注入量：1 µL、キャピラリー電圧：3 kV、コーン電圧：40 V、ソース温度：110°C、脱溶媒温度：500°C、脱溶媒ガス流量：1000 L/hr、コーンガス流量：30 L/hr、測定モード：SIM； $m/z=492$ 【ESI（+）】、 $m/z=490$ 【ESI（-）】

4) LC-MS/MS条件

カラム：COSMOSIL 5C₁₈-MS-II（2.0 mm i.d.×150 mm, 粒径5 µm, ナカライテスク（株）製）、移動相：A液；0.1%ギ酸、B液；アセトニトリル、グラジエント条件：B液10%（0 min）→90%（12 min）→90%（15 min）→10%（15.01 min）→10%（25 min）、流速：0.2 mL/min、カラム温度：40°C、注入量：2 µL、キャピラリー電圧：3 kV、コーン電圧：14 V、ソース温度：110°C、脱溶媒温度：500°C、脱溶媒ガス流量：1000 L/hr、コーンガス流量：30 L/hr、イオン化モード：ESI（+）、SRMにおける4-アミノカルミン酸及びカルミン酸の設定値は表1に示した。

5. 試験溶液の調製

衛生試験法・注解¹⁰⁾の毛糸染色法及び第2版食品中の食品添加物分析法¹¹⁾のポリアミドカラム法に準じて操作し、得られた試験溶液をTLCで測定した。また、4-アミノカルミン酸通知法²⁾に準じて図2により試験溶液を調製し、HPLC、LC-MS及びLC-MS/MSで測定した。

試料1 g
10%塩酸 10 mL
振とう（10分間）
遠心分離（1000 rpm（160 ×g）、10分間）
上清
Mega Bond Elut C18（2 g, 12 mL）
（コンディショニング）
メタノール 4 mL、水 4 mL）
洗浄 水 2 mL
溶出 メタノール 5 mL
溶出液
1～2 mLに濃縮（エバポレーター、40°C）
水で5 mLに定容
ろ過（0.45 µmメンブランフィルター）
試験溶液

図2. 試験溶液の調製方法

表1. LC-MS/MSのSRM条件

化合物名	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (V)
4-アミノカルミン酸	491.8	354.0	14	26
		372.0		18
		378.0		26
カルミン酸	493.0	355.1	14	26
		379.0		26

結果及び考察

1. TLCによる分析

4色のマシュマロを色別に取り出し、毛糸染色法で処理して条件1及び2でTLCを行った（写真1）。その結果、ピンク色のマシュマロから、カルミン酸とは色調及び R_f 値の異なる赤色系の不明色素を検出した（点線で囲んだ部分）。緑色、オレンジ色、黄色のマシュマロからはウコン色素と思われる淡黄～茶色のスポットを、緑色のマシュマロからは食用青色1号を表示どおりに検出した。

コチニール色素の表示があったことから、過去の事例^{3,6-9)}より4-アミノカルミン酸を疑い、再検査を行うこととした。ピンク色のマシュマロを改めて採取しポリアミドカラム法で処理して同様にTLCを行った（写真2）。その結果、色調及び R_f 値がカルミン酸とは異なり、4-アミノカルミン酸とは一致した。以上の結果から、ピンク色のマシュマロの不明色素は4-アミノカルミン酸であることが考えられた。

2. HPLC及びLC-MSによる確認

赤系色素を含むと考えられるピンク色及びオレンジ色のマシュマロのほか、市販の白いマシュマロ（無添加及び500 µg/gになるよう4-アミノカルミン酸を添加（ $n=2$ ））についてHPLC用試験溶液を調製した。添加試料については濃度が高いため水で10 mLに定容したものを試験溶液とした。通知法²⁾で分析した結果を図3に示した。ピンク色のマシュマロから検出されたピークは4-アミノカルミン酸標準溶液と、オレンジ色のマシュマロから検出されたピークはカルミン酸標準溶液とそれぞれ保持時間が一致していた。また、ピンク色のマシュマロのピークについてPDAスペクトルを確認したところ、4-アミノカルミン酸標準溶液と一致しており、カルミン酸標準溶液とは異なっていた。なお、無添加の白いマシュマロからは両物質とも検出せず、添加試料における4-アミノカルミン酸の $n=2$ の平均回収率は86.2%であった。

さらに、HPLC用試験溶液を適宜水で希釈してLC-MSで分析した。SIMの2条件についてピークを確認したところ、いずれもピンク色のマシュマロと4-アミノカルミン酸標準溶液の保持時間が一致した（図4）。また、無添加の白いマシュマロからは4-アミノカルミン酸を検出せず、添加試料ではピークを確認した。

HPLC及びLC-MS測定の結果より、ピンク色のマシュマロから検出された不明色素は指定外着色料である4-アミノカルミン酸であることが確認された。オレンジ色のマシュマロについては、HPLC測定においても表示のとおりカルミン酸が検出された。なお、検査開始前に通知に基づく試験法の検査実施標準作業書を作成して検査体制を整備した。その上で、「4-アミノカルミン酸を検出する」として本試料の検査成績を報告した。

3. 4-アミノカルミン酸検出の原因について

カルミン酸をアンモニア水中で加熱することで4-アミノカルミン酸が得られる^{2,3)}ことから、検査中に4-アミノカルミン酸が生成する可能性が考えられた。しかし、オレンジ色のマシュマロから表示どおりカルミン酸だけが検出されたため、検査工程では4-アミノカルミン酸は生成しないことが示された。

輸入者を管轄する自治体を通じた海外製造者に対する製造工程の調査の結果、4-アミノカルミン酸を使用した事実が確認されず、本事例は食品衛生法違反に該当しないと判定された。4-アミノカルミン酸を検出した原因については不明であった。

4. LC-MS/MSを用いた高選択・高感度測定への取り組み

高選択・高感度に分析するため、4-アミノカルミン酸とカルミン酸についてLC-MS/MS条件を検討し最適化した。

本研究で使用した純度52%の4-アミノカルミン酸標準品を使用した場合、LC-MSによる検出限界は0.05 µg/mL（4-アミノカルミン酸として約0.025 µg/mL）であったが、最適化したLC-MS/MS条件では0.01 µg/mLまで検出が可能となった。なお、検出限界はS/N比3以上を基準とした。標準溶液とマシュマロを分析したクロマトグラムを図5に示した。

2024年に改正された第10版食品添加物公定書の成分規格では、コチニール色素（カルミン酸色素）の純度試験に「4-アミノカルミン酸のピークを認めない」という項目が新設された¹²⁾。そのため、今後、成分規格で含有を認めない物質となった4-アミノカルミン酸の検査は、食の安全確保のため更に重要となり、LC-MS/MSによる測定が活用できると思われる。

ま と め

2022年、当センターでは初の検出事例として米国産のピンク色のマシュマロから、4-アミノカルミン酸を検出した。TLC上で不明色素を検出し、HPLC及びLC-MSで4-アミノカルミン酸であることを確認した。本事例に関する製造工程の調査の結果、4-アミノカルミン酸を添加した事実は認められなかった。

また、LC-MS/MS条件を検討し最適化した結果、通知法のLC-MS法より高選択・高感度である0.01 µg/mLまで検出が可能となった。4-アミノカルミン酸の有無を確認するために、今後活用できると考えられた。

近年、国内外で4-アミノカルミン酸の検出事例が報告されていることから、今後も最新情報や事例についての情報を蓄積し、日常検査に活かしていくことが必要であると考ええる。

（本研究の概要は第60回全国衛生化学技術協議会年会、2023年11月、において発表した。）

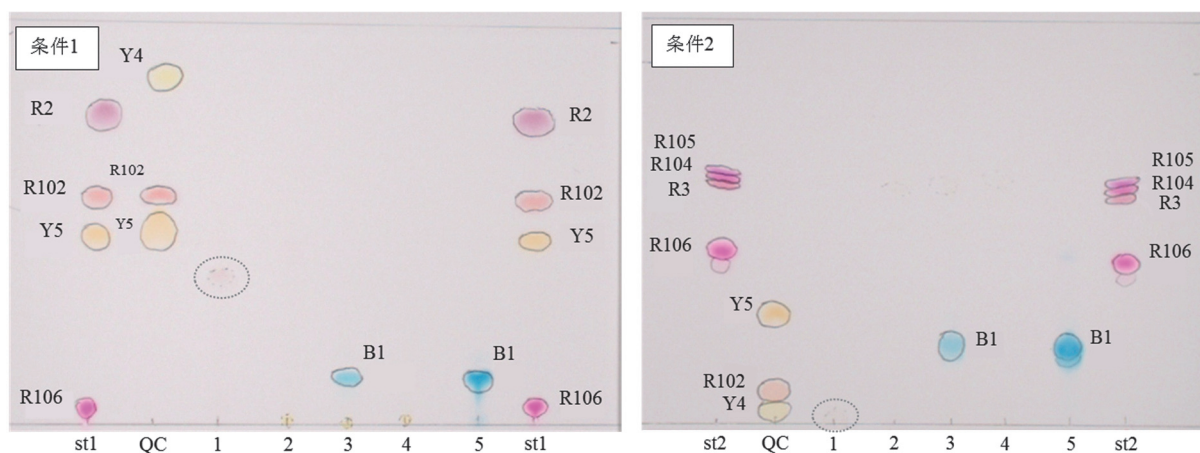


写真1. 酸性タール色素試験法によるTLCクロマトグラム（毛糸染色法）

st1：混合標準溶液 1（R2, R102, Y5, R106），st2：混合標準溶液 2（R3, R104, R105, R106）

QC：清涼飲料水に R102, Y4, Y5 を添加したもの

1：マシュマロ（ピンク色），2：マシュマロ（オレンジ色），3：マシュマロ（緑色），4：マシュマロ（黄色），5：B1 標準溶液

条件 1：薄層板；MERCK 社製 TLC アルミニウムシート RP-18F_{254S},

展開溶媒；メタノール・アセトニトリル・5%硫酸ナトリウム溶液（3：3：10）

条件 2：薄層板；MERCK 社製 TLC アルミニウムシート シリカゲル 60F₂₅₄,

展開溶媒；酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア水（10：3：3）

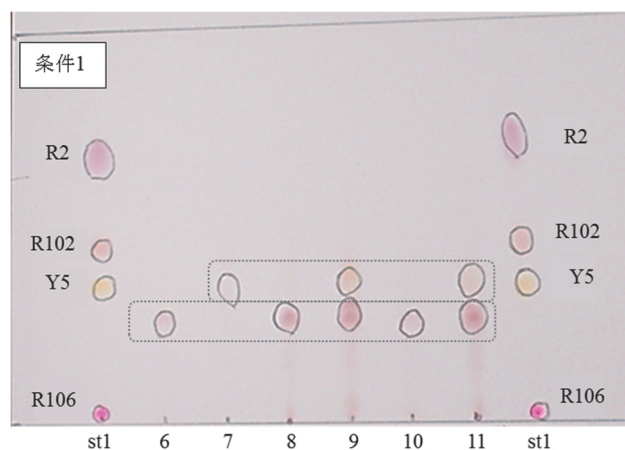


写真2. 酸性タール色素試験法によるTLCクロマトグラム（ポリアミドカラム法）

st1：混合標準溶液 1（R2, R102, Y5, R106），6：4-アミノカルミン酸標準溶液，7：カルミン酸標準溶液，

8：マシュマロ（ピンク色）ポリアミドカラム法，

9：マシュマロ（ピンク色）ポリアミドカラム法（カルミン酸標準溶液を添加して試験溶液を調製），

10：マシュマロ（ピンク色）毛糸染色法

11：マシュマロ（ピンク色）ポリアミドカラム法（カルミン酸，4-アミノカルミン酸標準溶液を重ね打ち）

条件 1：薄層板；MERCK 社製 TLC アルミニウムシート RP-18F_{254S},

展開溶媒；メタノール・アセトニトリル・5%硫酸ナトリウム溶液（3：3：10）

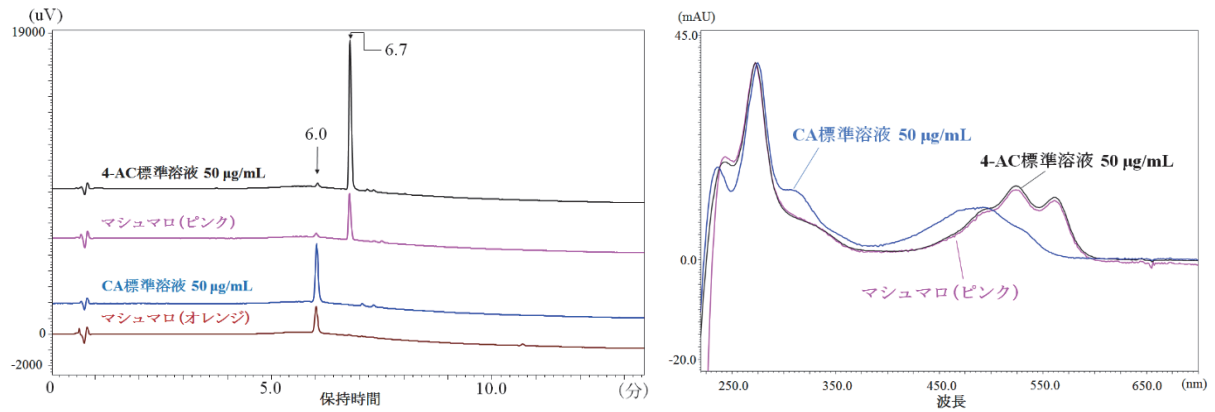


図3. 4-アミノカルミン酸通知法によるHPLCクロマトグラム (左) とスペクトル (右)

4-AC : 4-アミノカルミン酸, CA : カルミン酸

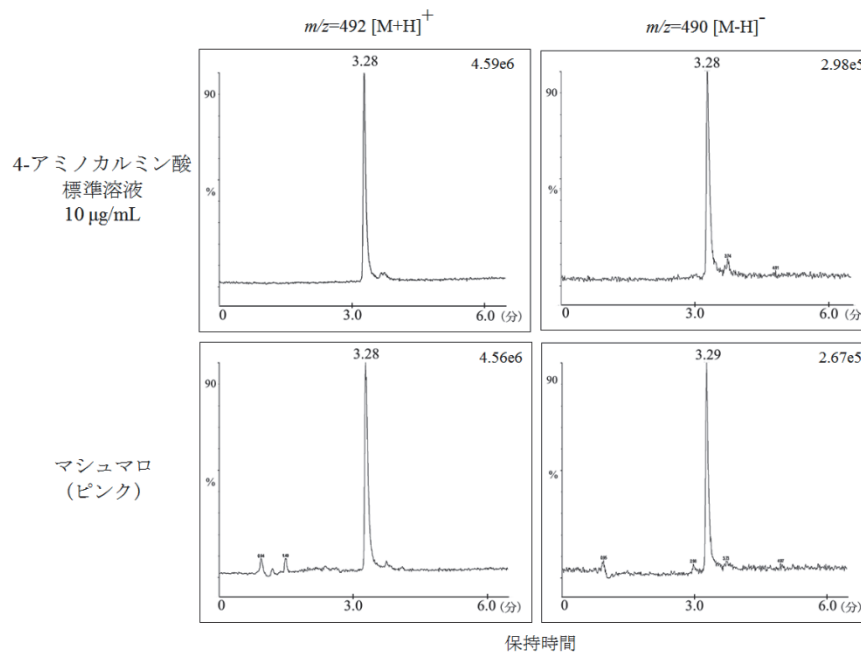


図4. 4-アミノカルミン酸通知法によるLC-MSクロマトグラム

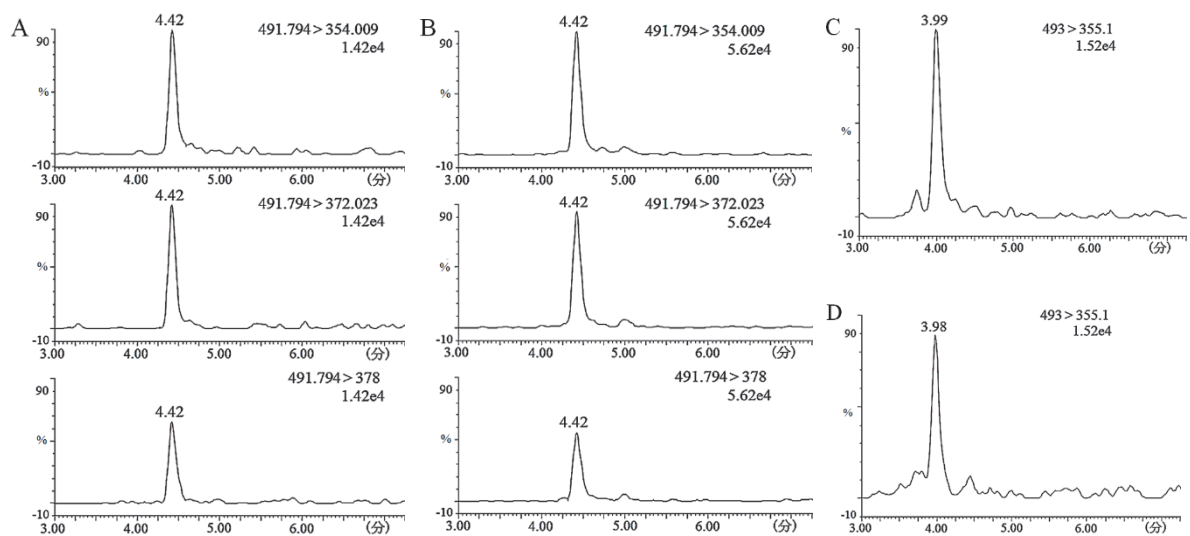


図5. LC-MS/MSクロマトグラム

A : 4-アミノカルミン酸標準溶液 0.01 µg/mL, B : マシュマロ (ピンク色),

C : カルミン酸標準溶液 0.01 µg/mL, D : マシュマロ (オレンジ色)

文 献

- 1) 東京都保健医療局：食品衛生の窓，
<https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/shokuten/chakushokuryo.html>（2024年7月31日現在．なお本URLは変更または抹消の可能性はある）
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：食安監発0402第1号，食品中の4-アミノカルミン酸の試験法について，平成25年4月2日．
- 3) 川崎洋子，杉本直樹，佐藤恭子，他：食衛誌，**43**，191–195，2002．
- 4) 食品安全委員会：食品安全関係情報詳細，2018年10月3日，
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu05020120305>（2024年7月31日現在．なお本URLは変更または抹消の可能性はある）
- 5) FDA：Cochineal extract;carmine.,
<https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-A/part-73/subpart-A/section-73.100>（2024年7月31日現在．なお本URLは変更または抹消の可能性はある）
- 6) 池野恵美，越智直樹，本田裕子，櫻井有里子，濟田清隆，刈込高子：食品中の4-アミノカルミン酸の分析と実態調査，第52回全国衛生化学技術協議会（静岡），2015年12月．
- 7) 食品安全委員会：食品安全関係情報詳細，2018年8月27日，
<https://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu0500080469>（2024年7月31日現在．なお本URLは変更または抹消の可能性はある）
- 8) Sabatino, L., Scordino, M., Gargano, M., *et al.*: *Food Additives and Contaminants:PartB*. **5**, 295–300, 2012.
- 9) Atwa, M.A.: *J. Agric. Chem. and Biotechn., Mansoura Univ.* **6**, 177–190, 2015.
- 10) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2020，403–413，2020，金原出版，東京．
- 11) 日本食品衛生協会編：第2版食品中の食品添加物分析法2000，113–131，日本食品衛生協会，東京．
- 12) 厚生労働省・消費者庁：第10版食品添加物公定書，
<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/001208056.pdf>
（2024年7月31日現在．なお本URLは変更または抹消の可能性はある）

Example of Detection of 4-Aminocarminic Acid in Imported Marshmallows Using Cochineal Extract

Ayumu YOSHIDA^a, Mari MORIKAWA^a, Chigusa KOBAYASHI^a, Takahiro SASAKI^a, Yukiko YAMAJIMA^a, and Kenji OTSUKA^a

An unknown reddish-purple dye different from cochineal extract was detected by TLC from marshmallows (pink) made in the USA labeled with cochineal extract collected for inspection in 2022. Based on previous cases, we hypothesized that the unknown dye was 4-aminocarminic acid (acid-stable carmine) and analyzed it using HPLC and LC-MS according to the notification method. We then established an inspection system and confirmed that the dye was 4-aminocarminic acid. This is the first time that 4-aminocarminic acid has been detected in our institute. In recent years, 4-aminocarminic acid has been reportedly detected both in Japan and foreign countries, and thereby, accumulation of the latest information and examples and utilization of this information in a routine inspection are warranted. Additionally, to analyze 4-aminocarminic acid with high selectivity and sensitivity, we also examined and optimized the LC-MS/MS conditions, strengthening our system to handle new items.

Keywords: 4-aminocarminic acid, acid-stable carmine, cochineal extract, carminic acid, coloring agent, TLC, HPLC, LC-MS/MS, food additives

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