

グレープフルーツ缶詰から検出された不明色素の同定

小出石千明・大木望・宮崎悦子*・坂本智徳

福岡市保健環境研究所保健科学課

*福岡市保健環境研究所環境科学課

Identification of Unknown Dyes Detected in Canned Grapefruit

Chiaki ODEISHI, Nozomi OKI, Etsuko MIYAZAKI* and Tomonori SAKAMOTO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

*Environmental Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

令和元年（2019年）7月に実施した輸入食品の収去検査において、グレープフルーツ缶詰から、薄層クロマトグラフ法及び液体クロマトグラフ法により、指定外食品添加物であるキノリンイエローと類似した不明色素を検出した。しかし、検体の試験溶液を液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計で測定した結果、キノリンイエローは検出されなかった。今後の収去検査で同様の色素を検出した場合に、誤判定を行うおそれがあることから、液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計を用いて当該不明色素の構造推定を試みた。その結果、グレープフルーツ缶詰から検出された不明色素は、柑橘類に含まれるフラノクマリン類であるベルガブトールと推定された。

Key Words : グレープフルーツ缶詰 canned grapefruit, 不明色素 unknown dyes, 高速液体クロマトグラフ high performance liquid chromatograph (HPLC), 液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計 liquid chromatograph quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOFMS)

1 はじめに

福岡市保健環境研究所では、食品衛生検査指針¹⁾及び第2版食品中の食品添加物分析法²⁾に準じ、国内で食品への使用が認められている法定タール色素12種及び国内で使用が認められていない指定外タール色素9種（アゾルビン、ファストレッドE、ポンソー6R、オレンジRN、オレンジII、キノリンイエロー（以下、「QY」とする。）、グリーンS、パテントブルーV及びブラックBN）の検査を実施している。検査においては、食品から抽出した着色料を、ポリアミドカラムで精製後、薄層クロマトグラフ（以下、「TLC」とする。）及びフォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下、「HPLC-PDA」とする。）を用いて分析している。加工食品中の着色料の試験では、着色料に含まれる副成色素、着色料が変化して生成した色素等が不明色素として検出された事例が報告されている^{3~8)}。不明色素が検出された場合、指定外着色料であるか判別することは収去検査において非常に重要となる。当所で、令和元年度（2019

年度）に輸入食品のグレープフルーツ缶詰の着色料の検査を実施したところ、TLC法及びHPLC-PDA法により、指定外タール色素であるQYと類似した色素（以下、「不明色素」とする。）を検出した。不明色素がQYであった場合には、グレープフルーツ缶詰は、食品衛生法違反の食品となることから、不明色素がQYであるか確認を行った結果、QYではないことが判明した。今回、今後の収去検査で同様の色素を検出した場合に、速やかに正しく判定できるよう液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計（以下、「LC-QTOFMS」とする。）を用いて不明色素の構造推定を試みたので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内を流通していた、着色料を使用した旨の表示がないグレープフルーツ缶詰の固形部分を均質化したもの及びシロップ部分をそれぞれ試料とした。

2.2 試薬等

QY 標準品：東京化成工業（株）製（官封食用色素）
ベルガブートル（以下，「BT」とする．）標準品：富士フイルム和光純薬（株）製（純度≧60%）

QY 標準溶液：QY 標準品 10 mg を量り，蒸留水に溶解して 10 mL とし，標準原液とした．標準原液を蒸留水で適宜希釈して標準溶液（100 μg/mL）を調製した．

BT 標準溶液：BT 標準品 10 mg を量り，蒸留水に溶解して 10 mL とし，標準原液とした．標準原液を蒸留水で適宜希釈して標準溶液（10 μg/mL）を調製した．

ポリアミド：富士フイルム和光純薬（株）製ポリアミド C-200

ポリアミドカラム：あらかじめ水洗したポリアミド 0.5 g を内径 1 cm，長さ 25 cm のコック付きガラス製クロマト管に湿式充填し，10%酢酸 10 mL でコンディショニングした．

抽出液：アンモニア水 35 mL を量り，99.5%エタノール 700 mL を加え，これに蒸留水を加え 1000 mL とした．

溶出液：アンモニア水 18 mL を量り，蒸留水を加えて 500 mL とした液に，99.5%エタノールを加え 1000 mL とした．

TLC 用展開溶媒（N 系展開溶媒）：アンモニア水，2.5 %クエン酸ナトリウム水溶液及び 99.5%エタノールを 2：7：1 で混合した．

TLC 用展開溶媒（P 系展開溶媒）：1-プロパノール，酢酸エチル及び蒸留水を 6：1：3 で混合した．

0.1 mol/L 酢酸アンモニウム水溶液・アセトニトリル混液（99：1）：酢酸アンモニウム 7.7 g を量り，超純水で溶解し 1000 mL とし，その 990 mL にアセトニトリル 10 mL を加えた．

アセトニトリル：富士フイルム和光純薬（株）製 HPLC 用又は Honeywell International Inc. 製 LC/MS 用を用いた．

超純水：水道水を超純水製造装置で処理したもの（比抵抗>18.2 MΩ・cm，TOC<5 ppb）を用いた．

蒸留水：水道水を蒸留水製造装置で処理したものを用いた．

その他の試薬：富士フイルム和光純薬（株）製及び関東化学（株）製試薬特級品を用いた．

2.3 器具

TLC 用プレート：MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG 製 Cellulose MN 400（AVICEL®），CEL 400-10，10×20 cm，層厚 0.10 mm．メタノールで空展開後，乾燥機にて 120℃，15 分間処理したものを用いた．

メンブランフィルター：アドバンテック東洋（株）製 DISMIC-13HP，親水性 PTFE，孔径 0.20 μm 及び 0.45 μm

2.4 装置

HPLC-PDA：（株）島津製作所製 ポンプ；LC-30AD，検出器；SPD-M20A

LC-QTOFMS：LC 部；（株）エービー・サイエックス製 Exion LC AC システム，

MS 部；（株）エービー・サイエックス製 X500R QTOF システム

超純水製造装置：オルガノ（株）製 PURELAB flex-UV

蒸留水製造装置：アドバンテック東洋（株）製 RFD240NA

2.5 試験溶液の調製

試料 10 g を 50 mL 遠沈管に採取し，抽出液 40 mL を加え，60℃で 30 分間加温抽出した．氷冷後，10000×g，4℃で 10 分間遠心分離した．上清をろ紙ろ過後，6%酢酸を適宜加えて中和後，減圧濃縮した．これに 6%酢酸を適宜加えて pH 4 程度としたものを 10000×g，4℃で 10 分間遠心分離した．上清をろ紙ろ過後，ろ液をポリアミドカラムに負荷し，1%酢酸 50 mL，熱蒸留水 50 mL 及び 70%エタノール 10 mL で順次洗浄した．溶出液 15 mL で溶出させ，6%酢酸で中和後，減圧乾固し，適宜蒸留水に溶解させ，メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした．

2.6 測定条件

2.6.1 TLC 法

TLC 用プレートに QY 標準溶液及び試験溶液をスポットし，風乾後，N 系及び P 系展開溶媒を用いて展開し，色調及び移動度を観察した．

2.6.2 HPLC-PDA 法

HPLC-PDA の測定条件を表 1 に示す．

表 1 HPLC-PDA の測定条件	
カラム	Inertsil ODS-2 2.1×150 mm，5 μm
カラム温度	40℃
移動相 A	0.1 mol/L 酢酸アンモニウム水溶液・アセトニトリル混液（99：1）
移動相 B	アセトニトリル
グラジエント条件	B：4%（0 分）-70%（30 分） -75%（35 分）
ポストラン	15 分
流速	0.2 mL/min
注入量	4 μL
サンプル温度	4℃
測定波長	190～700 nm

2.6.3 LC-QTOFMS 法

LC-QTOFMS の測定条件は LC 条件を表 1 と同一とし、MS 条件を表 2 のとおりとした。

表 2 LC-QTOFMS の MS 条件

イオン化	ESI-Negative
データ取得モード	IDA
カーテンガス流量	30 psi
ヒーター温度	500℃
ネブライザガス流量	60 psi
ターボガス流量	60 psi
スプレー電圧	-4500 V
コリジョン電圧	TOF MS : -5 V
	TOF MSMS : -35 V
TOFMS scan 範囲	m/z 100~1000
TOFMSMS scan 範囲	m/z 30~1000

3 実験結果及び考察

3.1 試験溶液及び QY の測定及び定性確認

3.1.1 TLC 法

2.6.1 に従って試験溶液を測定した結果、N 系展開溶媒では、QY と移動度及び色調が類似した不明色素を検出した。しかし、P 系展開溶媒では、同様の色素は検出なかった。

3.1.2 HPLC-PDA 法

2.6.2 に従って QY 標準溶液及び試験溶液を HPLC-PDA で測定し、波長 450 nm におけるクロマトグラムを比較した (図 1)。QY は複数の化合物であるため、複数のピークが検出されると報告されており²⁾、本測定でも QY 標準溶液で 2 つのピークが検出された (QY① : 14.493 分, QY② : 14.936 分)。試験溶液は保持時間 14.513 分にピークが検出されたが、ピークトップの吸収スペクトルが QY①及び QY②と異なる吸収スペクトルを示した (図 2)。このことから、不明色素は QY と異なる物質であると考えられた。

3.1.3 LC-QTOFMS 法

2.6.3 に従って試験溶液を LC-QTOFMS で測定した結果、QY は検出されなかった。

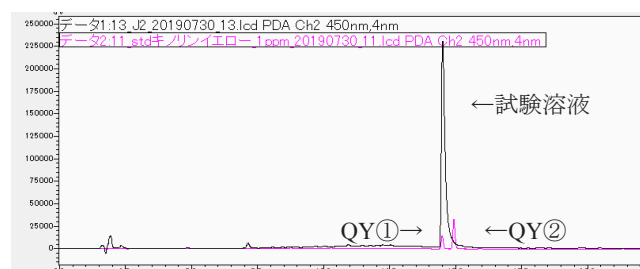


図 1 クロマトグラム

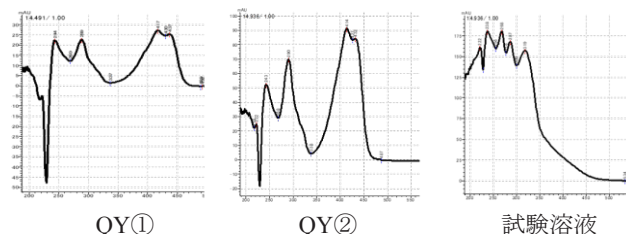


図 2 ピークトップの吸収スペクトル

3.2 不明色素の構造推定

不明色素は、QY と異なる物質と判断されたため、LC-QTOFMS を用いて不明色素の構造推定を行った。

3.2.1 LC-QTOFMS 法

2.6.3 に従って試験溶液を LC-QTOFMS で測定した結果、不明色素に相当する保持時間のピークのプリカーサーイオンスペクトルから m/z 201.0189 のイオンが見出され、そのプリカーサーイオンスペクトル及びプロダクトイオンスペクトルから組成式 $C_{11}H_6O_4$ が推定された (図 3)。この組成式について PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、ChemSpider (<http://www.chemspider.com>) 等の化学物質データベースで検索したところ、フラノクマリン類の BT (図 4) が該当した。不明色素のプロダクトイオンはこの構造に対して約 80% が帰属された。BT は、グレープフルーツ等の柑橘類及びその加工品に含まれていると報告されている⁹⁾。これらのことから、不明色素は BT と推定された。

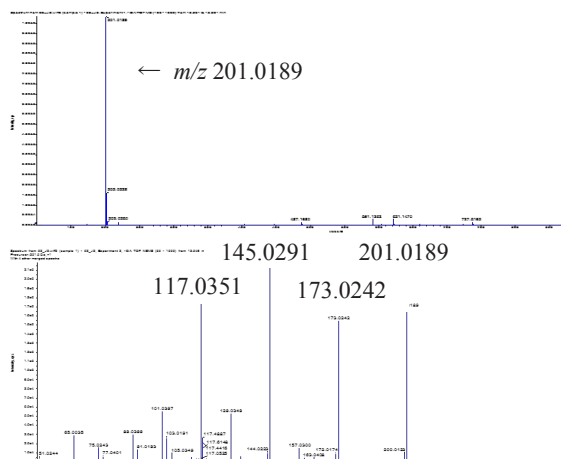


図3 試験溶液の LC-QTOFMS 測定の結果
(上：プリカーサーイオンスペクトル
下：プロダクトイオンスペクトル)

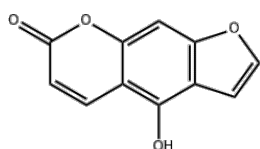


図4 BT の構造 ($C_{11}H_6O_4$)

3.3 試験溶液及び BT の測定及び定性確認

不明色素は BT と推定されたことから、TLC、HPLC-PDA 及び LC-QTOFMS を用いて定性確認を行った。

3.3.1 TLC 法

2.6.1 に従って試験溶液を測定した結果、N 系展開溶媒では、BT と移動度及び色調が類似したスポットを検出した。P 系展開溶媒では、色調が変化する特徴も類似していた。

3.3.2 HPLC-PDA 法

2.6.2 に従って試験溶液を HPLC-PDA で測定した結果、試験溶液から測定波長 450 nm で保持時間 13 分付近に BT と類似したピークを検出した (BT 10 ppm : 13.271 分, シロップ部分 : 13.475 分, 固形部分 : 13.354 分) (図 5)。また、ピークトップの吸収スペクトルについては、BT は検体のシロップ部分と類似していた (図 6)。

3.3.3 LC-QTOFMS 法

2.6.3 に従って試験溶液を LC-QTOFMS で測定した結果、試料のシロップ及び試料の固形部分からプリカーサーイオンスペクトル及びプロダクトイオンスペクトルのいずれからでも BT と一致するピークが検出された。(図 7)。BT の構造に対して、検体のプロダクトイオンは、シロップ部分で 99.3%, 固形部分で 96.8% が帰属された。これらのことから、検出された不明色素は BT と認められた。

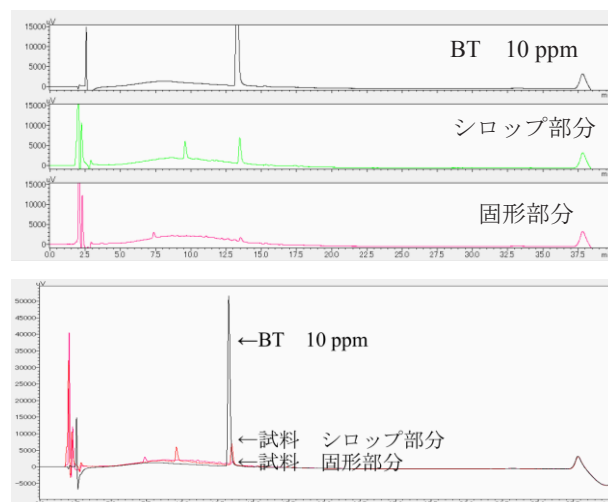


図5 クロマトグラム (PDA 450 nm)

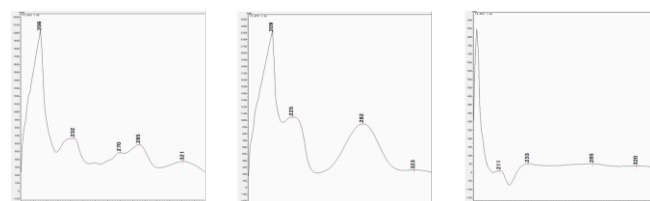


図6 ピークトップの吸収スペクトル

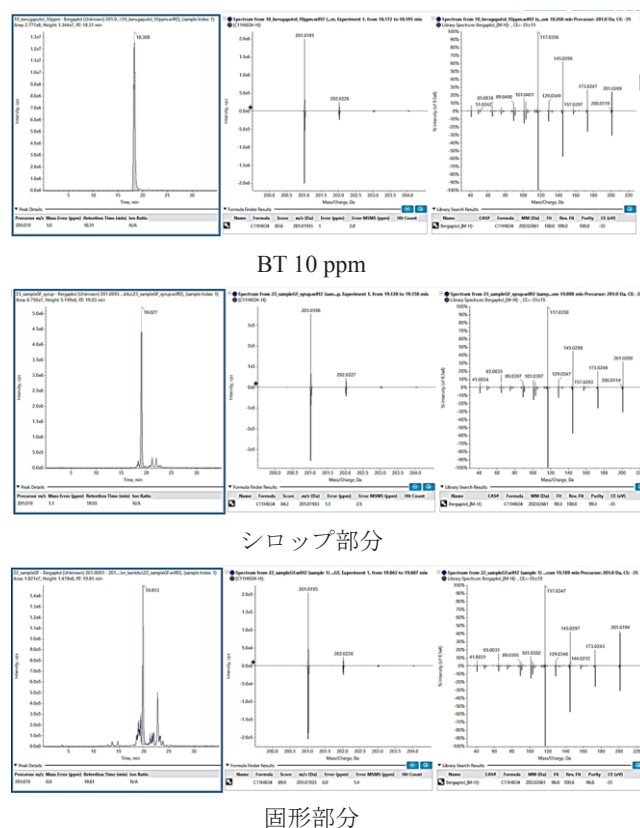


図7 LC-QTOFMS 測定の結果

(左: m/z 201.020 のクロマトグラム, 中央: プリカーサーイオンスペクトル, 右: プロダクトイオンスペクトル)

4 まとめ

令和元年度（2019 年度）の収去検査において、グレープフルーツ缶詰から TLC 法及び HPLC-PDA 法により、指定外食品添加物である QY と類似した不明色素を検出した。不明色素が QY であった場合には違反食品となるため、確認を行った結果、QY ではないことが判明した。今回、今後の収去検査で同様の色素を検出した場合に、速やかに正しく判定できるよう不明色素を LC-QTOFMS 法により構造推定を行った結果、フラノクマリン類の BT と推定された。その後、BT 標準品を用いて TLC 法、HPLC-PDA 法及び LC-QTOFMS 法により組成式 $C_{11}H_6O_4$ の BT と確認した。

グレープフルーツ及びその加工品から不明色素が検出された際に、当該色素が BT の色素であるか LC-QTOFMS 法により迅速に判別することが可能となった。

文献

1) 社団法人 日本食品衛生協会 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編 2003, 169～199, 2003

- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課：第 2 版食品中の食品添加物分析法, 113～131, 2000
- 3) 川西徹, 他：第 9 版食品添加物公定書解説書, D-1217～D-1222, (株) 廣川書店（東京）, 2019
- 4) 石川ふさ子, 他：はじかみ（生姜）から検出された不明色素の構造, 食品衛生学雑誌, 46 (3), 93～98, 2005
- 5) 新藤哲也, 他：乾燥いちごから検出された不明赤色色素の構造解析, 食品衛生学雑誌, 53 (1), 1～7, 2012
- 6) Naoki Ochi, *et al.* : Identification of the monobrominated derivative of Acid Red 52 (Food Red No. 106) in pickled vegetables, Food Additives & Contaminants : Part A, 33 (9), 1387～1395, 2016
- 7) 小出石千明, 他：食品からの食用赤色 106 号の副成色素の検出, 福岡市保健環境研究所報, 47, 113～120, 2022
- 8) 近藤芳和子, 他：加工食品からの食用赤色 102 号の副成色素の検出事例, 福岡市保健環境研究所報, 48, 55～59, 2023
- 9) グレープフルーツジュースおよび健康食品中のフラノクマリン類含有量調査, 食品衛生学雑誌, 49 (4), 326～331, 2008