

福神漬から使用表示のない着色料を検出した事例について

山本 直美、田畑 佳世、安藤 博子、藤原 遥香、池田 耕介、神藤 正則

要旨

指定着色料 12 種の収去検査において、検体（福神漬）より使用表示がある色素（赤色 102 号、黄色 4 号、黄色 5 号および赤色 106 号）とは別に、使用表示のない赤色 2 号を検出した。赤色 2 号が検出された原因として、①着色する目的で使用された場合、②赤色 102 号由来の付随色素として混入した場合の 2 つの可能性が考えられた。そこで、赤色 2 号以外の付随色素の検出および定量を試みたところ、ファストレッド E およびポンソー6R が福神漬より検出された。また検出された各色素は微量であり、赤色 102 号の含有量に対して比率で 1%以下であった。これは、JECFA 規格に定められた赤色 102 号の付随色素の限度値を下回る値であった。よって、赤色 2 号は福神漬を着色する目的で使用されたのではなく、赤色 102 号の付随色素として検出されたものと推定した。

キーワード：指定着色料 12 種、付随色素、HPLC、LC-MS/MS

1. はじめに

当所では、食品に使用できる指定着色料 12 種の検査を実施している。令和 2 年度に、収去された検体（福神漬）を検査したところ、使用表示のない赤色 2 号を検出した。使用表示がある色素は赤色 102 号、黄色 4 号、黄色 5 号および赤色 106 号の 4 つであり、すべて表示通り検出された。

赤色 2 号が検出された原因として、2 つの可能性が考えられた。1 つ目は、赤色 2 号が福神漬を着色する目的で使用された可能性である。2 つ目は、使用されていた赤色 102 号の付随色素として赤色 2 号が混入した可能性である。付随色素とは、原料中間体あるいは製造工程に起因して副

生する色素のことで、赤色 2 号は赤色 102 号の付随色素として知られており、赤色 102 号を使用している食品で検出されることがある¹⁾。この場合、赤色 2 号は着色の目的で使用されたものではなく、赤色 102 号の使用に伴い混入したということになる。

そこで、今回検出された赤色 2 号が着色する目的で使用されたものなのか、それとも付随色素として検出されたものなのか、原因を明らかにするために検証を試みた。一定の成果を得たので、その結果について報告する。

2. 材料および方法

1) 試料

令和 2 年度に収去された検体の福神漬 (中国産)、および測定対象色素が不検出であることを確認した市販の福神漬 (赤色 2 号およびファストレッド E の添加回収試験に使用)。

2) 測定対象色素

赤色 102 号の付随色素²⁾である赤色 2 号、ファストレッド E およびポンソー6R とした。

3) 標準品

赤色 2 号 (R2) は食品添加物公定書標準品 (医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団製)、ファストレッド E (FRE, C.I.No.16045) およびポンソー6R (P6R, C.I.No.16290) は東京化成工業製を用いた。

4) 試薬

アンモニア水 (28%) および酢酸は富士フィルム和光純薬製 (特級) を、エタノール、メタノールおよび酢酸アンモニウム溶液 (1 mol/L) は富士フィルム和光純薬製 (HPLC 用) を、ポリアミド C-100 は富士フィルム和光純薬製 (カラムクロマトグラフ用) を用いた。アセトニトリルは、HPLC での使用ではメルク製 (アイソクラティックグレード) を、LC-MS/MS での使用では富士フィルム和光純薬製 (LC-MS 用) を用いた。フィルターは、アドバンテック東洋製 0.45 μm フィルターを用いた。

アンモニア・エタノール溶液は、アンモニア水 14 mL、エタノール 200 mL および水を加えて 400 mL とした。エタノー

ル・アンモニア混液は、アンモニア水 5 mL に水を加えて 140 mL とした溶液にエタノール 140 mL を混和した。

5) 試験溶液の調製

文献³⁾の方法に準拠し調製した。操作フローを図 1 に示す。

均一化した試料 10 g にアンモニア・エタノール溶液 20 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過し、ろ液を得た。アンモニア・エタノール溶液 20 mL でホモジナイザーのシャフトジェネレーターを洗い、その液で珪藻土上の残渣を洗いこみ、先程のろ液と合わせた。その後ロータリーエバポレーターでエタノールを取り除き、水を加えて 20 mL とし検液とした。

検液に酢酸を加えて pH を 4~6 とした後、ポリアミドを充填し水 30 mL、酢酸 (1 \rightarrow 100) 20 mL を流出させた分離用カラムに静かに流し込んだ。液を流出させた後 (本操作における流出速度は約 2 mL/分となるように調整)、カラムを酢酸 (1 \rightarrow 100) で洗液がほとんど無色となるまで洗浄した。カラムに水 20 mL を流して洗浄した後、次いでエタノール・アンモニア混液 25~30 mL を加え、溶出液を得た。溶出液を 0.45 μm のフィルターでろ過し、酢酸 (3 \rightarrow 50) で中和した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。残留物にメタノール/水 (1 : 1) 1 mL を加えて溶かし、試験溶液とし、HPLC で測定した。ただし、ポンソー6R の分析をする場合は、ポンソー6R の極性が高いため、残留物にメタノール/水 (1 : 1) 1 mL を加える代わりに水を加え 4 mL に定容し、HPLC で

測定した。LC-MS/MS で測定する場合は、試験溶液を適宜水で希釈して測定した。

添加回収試験を行う際は、試料 10 g 秤量後に一定濃度の標準液を添加した。

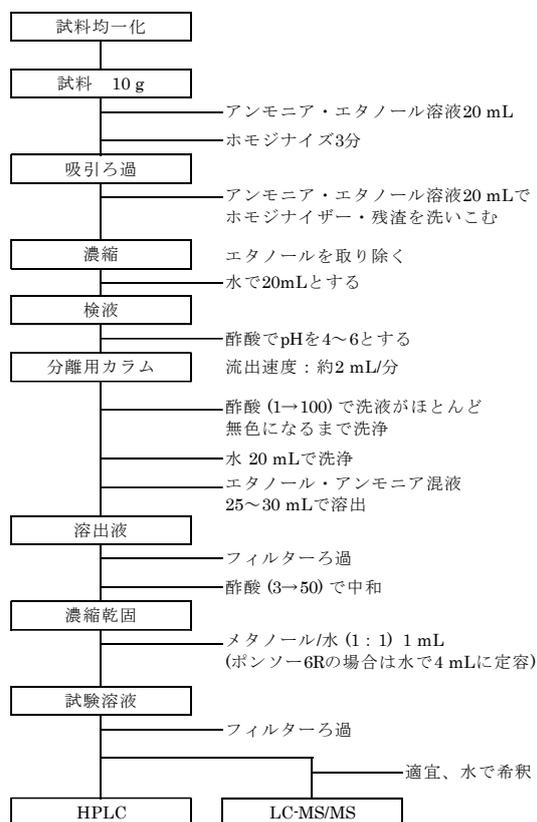


図 1 抽出操作フロー

6) 装置および測定条件

赤色 2 号およびファストレッド E は HPLC 条件① (表 1) で測定した。ポンスー6R は HPLC 条件② (表 2) で測定した。ポンスー6R は HPLC における感度を向上させるため、セル光路長を 10 mm から 60 mm に変更し、ポンスー6R の極大波長である 518 nm で測定を行った。

各色素の確認試験を LC-MS/MS で行った (ファストレッド E は定量も含む)。赤色 2 号およびファストレッド E は LC-

MS/MS 条件① (表 3) で測定した。ポンスー6R は LC-MS/MS 条件② (表 4) で測定した。ポンスー6R は MRM のネガティブモードで測定しているが、感度を向上させるために溶離液にアンモニアを使用して測定した。

表 1 HPLC 条件① (R2 および FRE)

装置	1260 Infinity II (Agilent製)
カラム	L-column2 ODS 5 μm (4.6 mm×150mm) (化学物質評価研究機構製)
移動相	A液: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液: アセトニトリル
グラジエント条件	B液 (%): 5% (0 min) → 50% (30 min) → 5% (30-40 min)
カラム温度	25°C
流量	1.0 mL/min
注入量	5 μL
測定波長	529 nm
セル光路長	10 mm

表 2 HPLC 条件② (P6R)

装置	1260 Infinity II (Agilent製)
カラム	L-column2 ODS 5 μm (4.6 mm×150mm) (化学物質評価研究機構製)
移動相	A液: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液: アセトニトリル
グラジエント条件	B液 (%): 5% (0 min) → 50% (30 min) → 5% (30-40 min)
カラム温度	25°C
流量	1.0 mL/min
注入量	5 μL
測定波長	518 nm
セル光路長	60 mm

表 3 LC-MS/MS 条件① (R2 および FRE)

装置	Exion LC AC / QTRAP5500 (SCIEX製)
カラム	L-column2 ODS 3 μm (2.0 mm×150mm) メタルフリー (化学物質評価研究機構製)
移動相	A液: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液: アセトニトリル
グラジエント条件	B液 (%): 5% (0 min) → 50% (30 min) → 90% (35-40 min) → 5% (40-50 min)
カラム温度	25°C
流量	0.2 mL/min
注入量	5 μL
イオン化法	ESI (-)
測定モード	MRM
測定イオン (m/z)	Q1: 268.0 Q3: 205.8 (定量) 79.8 (定性) (R2) Q1: 228.0 Q3: 206.9 (定量) 141.8 (定性) (FRE)

表 4 LC-MS/MS 条件② (P6R)

装置	Exion LC AC / QTRAP5500 (SCIEX製)
カラム	XBridge BEH C18 2.5 μm (2.1 mm×150mm) (Waters製)
移動相	A液: 10 mmol/L アンモニア溶液 B液: アセトニトリル
グラジエント条件	B液 (%): 2% (0-3 min) → 95% (14-17 min) → 2% (17-25 min) → 5% (40-50 min)
カラム温度	25°C
流量	0.2 mL/min
注入量	5 μL
イオン化法	ESI (-)
測定モード	MRM
測定イオン (m/z)	Q1: 204.9 Q3: 79.8 (定量) 116.0 (定性)

3. 結果

1) 赤色 2 号の検出および定量

赤色 2 号の HPLC におけるクロマトグラムを図 2 に示す。HPLC において、標準品を検出した RT 5.6 分に試験溶液からもピークが確認された。

確認試験として、LC-MS/MS で測定を行った結果、標準品と同じ保持時間に試験溶液からもピークが検出され、試料から検出された成分は、赤色 2 号であることが確認された (図 3)。

通常、着色料検査は定性試験であるが、今回検量線を $0.5 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ の範囲で作成し、HPLC において定量を行った。結果、赤色 2 号は $0.15 \pm 0.011 \text{ mg/kg}$ (3 併行平均) 検出された。また、同じ条件で測定対象色素が不検出であることを確認した市販の福神漬に添加回収試験 (試料 10 g に対し標準品 2 μg 添加) を行ったところ、回収率は 58% であった。

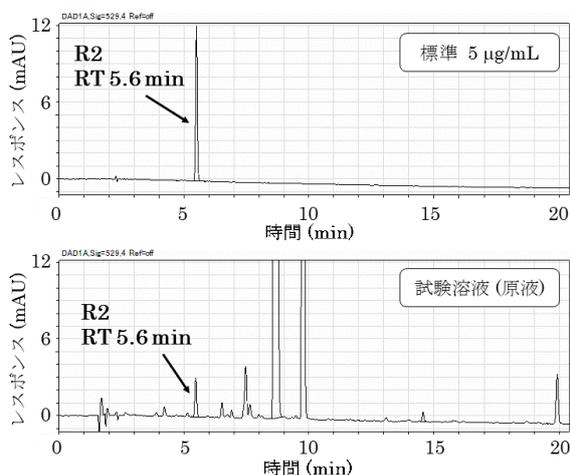


図 2 HPLC クロマトグラム (R2)

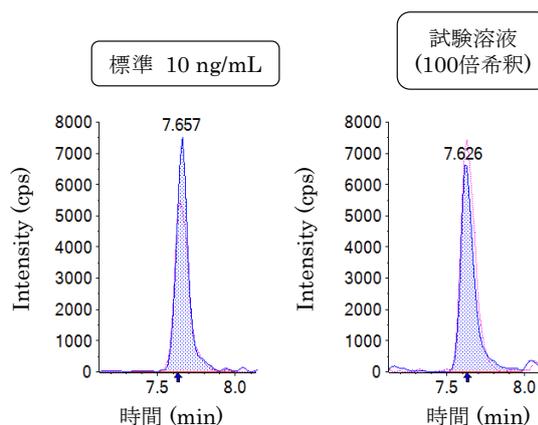


図 3 LC-MS/MS クロマトグラム (R2)

2) ファストレッド E の検出および定量

ファストレッド E の HPLC におけるクロマトグラムを図 4 に示す。HPLC において、標準品を検出した RT 14.6 分に試験溶液からもピークが確認された。

確認試験として、LC-MS/MS で測定を行った結果、標準品と同じ保持時間に試験溶液からもピークが検出され、試料から検出された成分は、ファストレッド E であることが確認された (図 5)。

HPLC で検出されたピークが小さく定量を行うには十分ではなかったため、LC-MS/MS で定量を行うこととした。検量線を $1 \sim 100 \text{ ng/mL}$ の範囲で作成し、定量を行った。結果、ファストレッド E は $0.034 \pm 0.0018 \text{ mg/kg}$ (3 併行平均) 検出された。また、同じ条件で測定対象色素が不検出であることを確認した市販の福神漬に添加回収試験 (試料 10 g に対し標準品 2 μg 添加) を行ったところ、回収率は 60% であった。

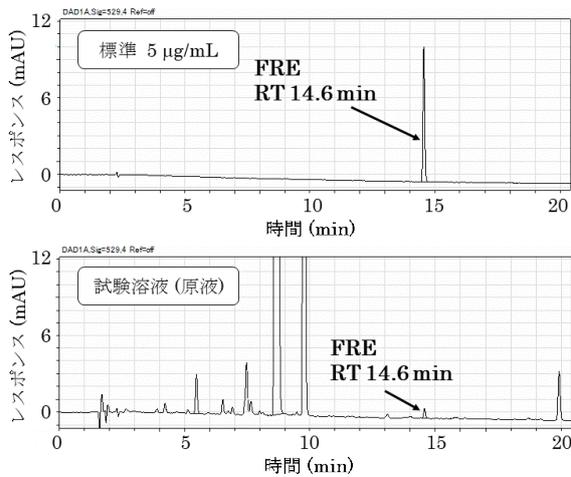


図4 HPLCクロマトグラム (FRE)

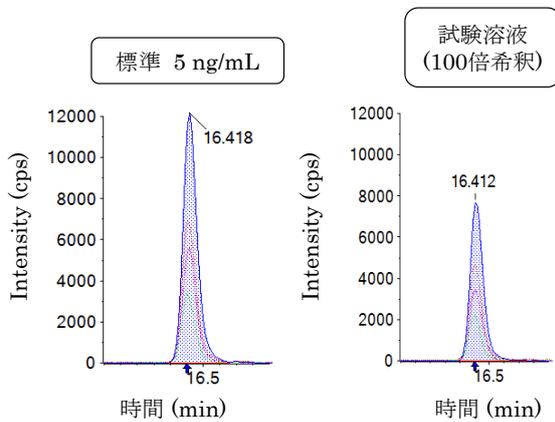


図5 LC-MS/MSクロマトグラム (FRE)

3) ポンソー6Rの検出および定量

ポンソー6RのHPLCにおけるクロマトグラムを図6に示す。HPLCにおいて、標準品のピークがRT 1.4分に確認された。試験溶液からはRT 1.6分にピークが確認され、標準品とは0.2分保持時間の差が見られた。検出されたピークがポンソー6Rであるかを確認するため、検体の福神漬に標準品を添加し、添加回収試験を行ったところ、RTが1.6分となり、試験溶液と同様に保持時間のずれが確認された。よって、試験溶液から検出されたRT 1.6

分のピークは、ポンソー6Rである可能性が考えられた。

確認試験として、LC-MS/MSで測定を行った。試験溶液を測定したところ、ピーク形状がいびつながらもピークが認められた。検体の福神漬に標準品を添加し、添加回収試験を行った添加試験溶液に関しても、試験溶液と同じような形状のピークが見られた。以上の結果から、試験溶液から確認されたピークはポンソー6Rであることが示唆され、試料から検出された成分は、ポンソー6Rであることが確認された(図7)。

検量線を0.05~10 µg/mLの範囲で作成し、HPLCにおいて定量を行った。結果、ポンソー6Rは0.13 ± 0.0040 mg/kg (3 併行平均) 検出された。また、同じ条件で令和2年度に収去された福神漬(中国産)に添加回収試験(試料10gに対し標準品20 µg 添加)を行ったところ、回収率は79%であった。

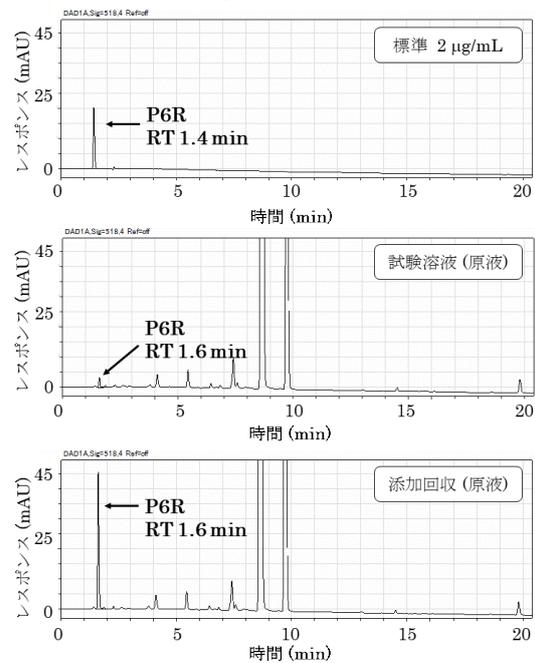


図6 HPLCクロマトグラム (P6R)

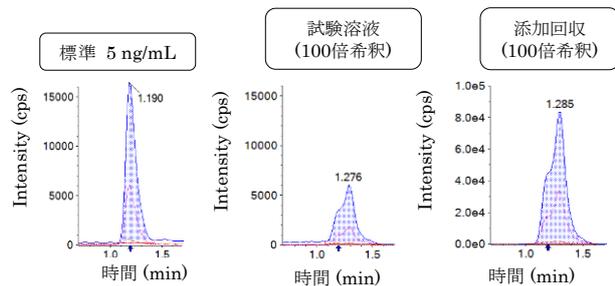


図7 LC-MS/MS クロマトグラム (P6R)

4. 考察

上述のとおり、赤色 2 号が検出された福神漬より赤色 102 号由来の他の付随色素であるファストレッド E およびポンソー 6R も検出された。今回検出された赤色 2 号、ファストレッド E およびポンソー 6R について、福神漬から検出された赤色 102 号に対する比率を算出した。結果を表 5 に示す。

表 5 検出された各色素の赤色 102 号に対する比率

	定量値 (mg/kg)	赤色102号に対する 比率 (%)
赤色102号	46	—
赤色2号	0.15	0.3
ファストレッドE	0.034	0.07
ポンソー6R	0.13	0.3

赤色 102 号に対する赤色 2 号の比率は 0.3%、ファストレッド E の比率は 0.07%、ポンソー 6R の比率は 0.3% となった。ここで、食品添加物の国際規格である JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議) 規格では、着色料に含まれる付随色素の限度値を定めている。JECFA 規格によると、赤色 102 号の付随色素の限度値は 1% 以下と定められている⁴⁾。今回検

出された色素の比率はこの規格に適合していた。また、3 種類の色素が同時に検出された点も踏まえると、赤色 2 号は福神漬を着色する目的で使用されたのではなく、赤色 102 号の付随色素として検出されたものと推定した。

5. まとめ

福神漬から使用表示のない赤色 2 号を検出した事例について、使用されていた赤色 102 号の付随色素として混入した可能性が示唆された。

6. 参考文献

- 1) 貞升友紀,他: 赤色 102 号を使用したシロップから付随色素を検出した事例について, 東京都健康安全研究センター年報, **68**, 177-181 (2017).
- 2) 谷村顕雄,他: 第 8 版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, D857-D866 (2007).
- 3) 食品衛生検査指針 食品添加物編, 169-177 (2003).
- 4) Compendium of food additive specifications, FAO JECFA Monographs 11 (2011).

