

短報

飲料中の指定外甘味料ズルチンのHPLCによる定量試験法及び

LC-qTOF/MSによる簡便かつ迅速な確認試験法の検討

佐藤環・小木曾俊孝・新谷依子・堀就英・梶原淳睦

赤ワインを試料として、飲料中の指定外甘味料ズルチンの定量及び確認試験法の検討を行った。定量試験法は、イオンペア試薬を用いない、より簡便な分析法を検討し性能評価を行った。その結果、定量下限付近の濃度(0.02 g/kg)における真度及び再現性は、平均回収率が98.6%、相対標準偏差が6.3%であり良好な結果であった。また、LC-qTOF/MSを用いて確認試験法の検討を行ったところ、試料の前処理操作を必要とせず希釈のみで定性が可能であった。以上のことから、本試験法は飲料中のズルチンの定量及び確認試験法として有用であると考えられた。

[キーワード：指定外甘味料、ズルチン、HPLC、LC-qTOF/MS]

1 はじめに

食品添加物は保存料、甘味料、着色料、香料など、食品の製造過程や食品の加工・保存の目的で使用される化学物質である。これらは様々な食品に使用されており、消費者の食品添加物に対する関心は高い。これら化学物質の試験法を簡便で迅速なものに改良することは、検査の効率性向上に繋がり、県民の“食の安全性確保”に資するものである。

また、分析法の簡便・迅速化は健康危機管理の観点からも重要である。食品による健康被害が生じた場合、拡大防止のために正確かつ迅速な対応が求められる。地方衛生研究所においては、既存の機材・施設で対応可能な分析手法の準備と定期的な見直しが推奨されている¹⁾。そのため当所においても、様々な化学物質を健康被害の原因として想定し試験法の整備を図っている。

今回、対象物質として選んだ指定外甘味料ズルチン(図1)は、過去に食中毒事例²⁾が報告されている食品添加物の一つである。

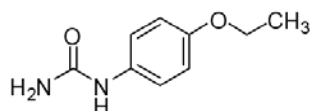


図1 ズルチンの構造式(分子量: 180.21)

ズルチンの一般的な定量試験法^{3) 4)}は、試料を透析後、固相カラム精製を行いHPLCにより分析する方法であるが、イオンペア試薬を用いるやや煩雑なものとなっている。また、ズルチンを分析対象とした食品中の食品添加物の確

認試験法は、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)により分析する方法が報告されている^{3), 5) -7)}。しかし、LC-MS/MSを用いた分析では、試料由来のマトリックスの影響により分析が困難な場合がある⁸⁾。一方、液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計(LC-qTOF/MS)は高い分解能を有しており、マトリックスの影響を受けずに目的物質の分析が可能になると考えられる。このことから、LC-qTOF/MSを用いた分析法は確認試験法として非常に有用であると考えられる。しかし、これまでに、食品中の食品添加物についてLC-qTOF/MSを用いて分析した報告はない。

そこで本研究ではまず、イオンペア試薬を用いない、より簡便なズルチンの定量試験法を検討し分析法の性能評価を行った。さらに、LC-qTOF/MSを用いてズルチンの簡便かつ迅速な確認試験法の検討を行った結果について報告する。

2 方法

2・1 試料

予めズルチンを含まないことを確認した赤ワインを試料として検討に用いた。

2・2 標準物質

ズルチン標準物質(食品分析用)は関東化学社製を用いた。ズルチン標準物質20 mgを精秤後、メタノールで20 mLに定容し標準原液(1000 µg/mL)とした。この標準原液をメタノール:水(1:1)混液で適宜希釈し、試料への標準物質の添加及び検量線の作成に用いた。

2・3 試薬

メタノール (LC/MS 用)、蒸留水 (LC/MS 用)、アセトニトリル (LC/MS 用)、りん酸水素二ナトリウム (特級)、りん酸二水素ナトリウム (特級) は関東化学社製を用いた。1 mol/L 塩酸、塩化ナトリウム (特級)、1 mol/L ぎ酸アンモニウム溶液 (高速液体クロマトグラフ用) は和光純薬社製を用いた。Sep-Pak C18 (充填量 1 g) 固相カートリッジカラムは Waters 社製、透析膜 (分画分子量 12000~14000) は Thermo Fisher Scientific 社製、フィルター (孔径 0.45 μm) 付きバイアルは GE ヘルスケア社製を用いた。

2・4 HPLC による定量試験法

2・4・1 装置及び分析条件

HPLC 条件は表 1 に示した。

表 1 HPLC 条件

LC装置	: LC-10ADvp (SHIMADZU)
UV検出器	: SPD-10AV (SHIMADZU)
分析カラム	: Inertsil ODS-2 (GL Sciences, 4.6×250 mm, 5 μm)
カラム温度	: 40°C
移動相	: 25% メタノール (アイソクラティック)
移動相流量	: 1.0 mL/min
注入量	: 10 μL
検出波長	: 230 nm

2・4・2 試験溶液の調製

試料 20 g を量り取り、約 20 mL の透析内液 (10% 塩化ナトリウム含有 0.01 mol/L 塩酸) とともに透析膜に充てんした。これを 200 mL のメスシリンダーに入れ、透析外液 (0.01 mol/L 塩酸) で全量を 200 mL とし、ときどき揺り動かしながら室温で約 18–20 時間透析した。透析外液 10 mL を分取し、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH5.0) で 20 mL に定容した。よく混和した後、C18 (1 g) 固相カートリッジカラムに 10 mL を負荷し、流出液は捨てた。蒸留水 30 mL、メタノール：水 (1：9) 混液 5 mL で順次洗浄した後、メタノール：水 (1：1) 混液 10 mL で溶出し、10 mL に定容した。溶出液を 0.45 μm のフィルターでろ過したものを HPLC 試験溶液とした。

2・4・3 定量

HPLC の検量線用標準溶液は、メタノール：水 (1：1) 混液を用いて、0.5–10 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で調製した。標準溶液濃度及びピーク面積から検量線を作成し、絶対検量線法により定量を行った。定量下限は、検量線の最低濃度を試料中濃度に換算した 0.01 g/kg とした。

2・4・4 添加回収試験

採取した試料 20 g に、試料中濃度として 0.02 g/kg となるように標準溶液を添加後、上記 2・4・2 に従い試験溶液を調製し定量を行った。試験溶液の調製は 5 併行で実施した。

2・4・5 試料マトリックスの測定値への影響の確認

採取した試料 20 g に、試料中濃度として 0.025 g/kg となるように標準溶液を添加後、上記 2・4・2 に従い試験溶液を調製し定量を行った。試験溶液の調製は 3 併行で実施した。続いて、0.5–10 $\mu\text{g/mL}$ の範囲でマトリックス標準溶液を調製し、マトリックス検量線による定量を行った。得られた定量結果を溶媒検量線による定量結果と比較した。マトリックス標準溶液は以下に示す方法により調製した。まず、濃度 50、100、200、500 及び 1000 $\mu\text{g/mL}$ のズルチン標準溶液をメタノールで調製した。続いて、標準品未添加の赤ワインから調製した試験溶液 1 mL ずつを 5 本の試験管に分取し、各濃度の標準溶液を 10 μL ずつ添加して 0.5、1、2、5 及び 10 $\mu\text{g/mL}$ のマトリックス標準溶液とした。

2・5 LC-qTOF/MS による確認試験法

2・5・1 装置及び分析条件

LC-qTOF/MS 条件は表 2 に示した。

2・5・2 試験溶液の調製

試料 10 mL (10 g) に、試料中濃度として 0.02 g/kg となるように標準溶液を添加した。この試料をメタノール：水 (1：1) 混液で 200 倍に希釈したものを試験溶液とした。

2・5・3 定性

同位体分布計算ツールソフトウェア (Agilent 解析ソフトウェア Mass Hunter) を用いて、ズルチンの $[\text{M}+\text{H}]^+$ の精密質量を計算しプレカーサーイオン (m/z 181.0972) を決定した。 m/z 181.0972 のプロダクトイオンスキャンにより得られた試験溶液のマススペクトルを標準溶液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$) のマススペクトルと比較した。

3 結果及び考察

3・1 HPLC による定量試験法の検討

3・1・1 イオンペア試薬の使用について

衛生試験法・注解 2015³⁾ のズルチンの試験法はイオンペア試薬として、HPLC 測定時は水酸化テトラ-*n*-プロピルアンモニウムを、C18 固相カラム精製時は臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウムを用いている。イオンペア試薬は、カラムに保持しにくい解離性の物質を分析する際に非常に

有効である。一方で、カラムの平衡化に時間を要する、機器を汚染しやすいといった欠点もある。そこで、イオンペア試薬を用いずにズルチン分析が可能であるか検討した。HPLC 測定においてイオンペア試薬を含まない移動相(25%メタノール)を用いて、標準溶液(0.5 µg/mL)を5回繰り返し測定したところ、ピーク面積の相対標準偏差(RSD)は4.0%であり、良好な再現性が得られた。また、C18 固相カラム精製において、イオンペア試薬を用いた場合と用いない場合を比較したところ、測定値に差が見られなかったことから、イオンペア試薬を用いずに分析可能であると考えられた。そこで、以下の検討ではイオンペア試薬を用いないこととした。

3・1・2 クロマトグラム及び検量線

ズルチン標準溶液(5 µg/mL)及びマトリックス標準溶液(5 µg/mL)をHPLCで測定した際のズルチンのクロマトグラムを図2に示した。保持時間はほぼ一致しており、試料マトリックス共存下においても測定が十分に可能であった。

また、検量線は図3に示したように0.5-10 µg/mLの範囲で良好な直線性が得られた。

3・1・3 添加回収試験結果

分析法の真度及び再現性を評価するため、5併行で添加回収試験を実施した結果、ズルチンの平均回収率は98.6±6.2%(RSD=6.3%)であり、目標値である70%-120%⁹⁾を満足した。精度はHorwitzの修正式から算出した併行精度の許容範囲¹⁰⁾内(RSD<6.7%)であった。

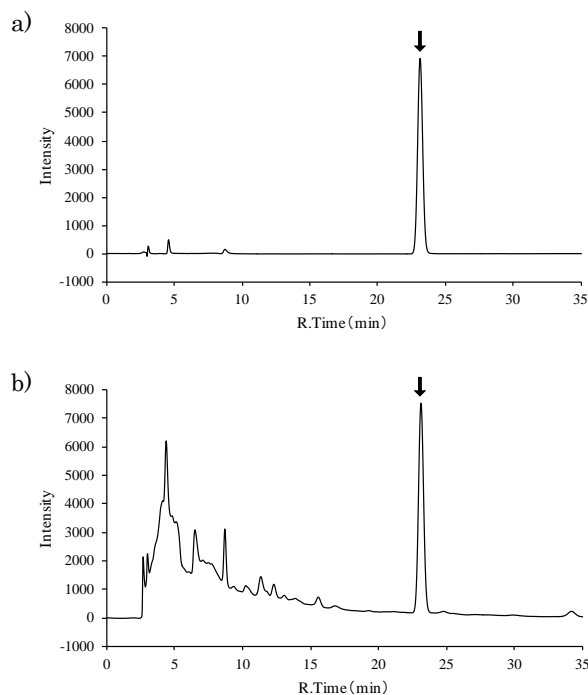


図2 ズルチンのHPLCクロマトグラム

a) 標準溶液(5 µg/mL)

b) マトリックス標準溶液(5 µg/mL)

3・1・4 試料マトリックスの測定値への影響

試験溶液中の試料マトリックスが、測定値に影響しているかを確認するため同じ試験溶液について、溶媒検量線及びマトリックス検量線を用いて定量し測定値を比較した。その結果、溶媒検量線における試料中濃度の平均値は

表2 LC-qTOF/MS条件

LC装置	: LC1290 Infinity(Agilent Technologies)
qTOF/MS装置	: 6540 UHD Accurate-Mass-Q-TOF LC/MS(Agilent Technologies)
分析カラム	: Atlantis T3 (Waters、2.1×75 mm,3 µm)
カラム温度	: 40°C
移動相	: A液(10 mM ギ酸アンモニウム溶液(pH3)) B液(アセトニトリル)
グラジエント条件	: A/B 95/5(2.5min)-17.5min-0/100(2.5min)
移動相流量	: 0.2 mL/min
注入量	: 1 µL
イオン化法	: ESI法(ポジティブモード)
乾燥ガス温度	: 300°C
乾燥ガス流量	: 12 L/min
ネブライザガス圧	: 50 psig
シースガス温度	: 400°C
キャピラリー電圧	: 4000 V
コリジョン電圧	: 20 eV
プレカーサーイオン	: m/z 181.0972
測定モード	: プロダクトイオンスキャン

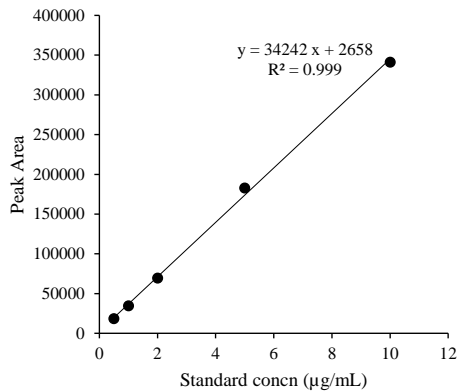


図 3 ズルチンの検量線

0.023 g/kg、マトリックス検量線における試料中濃度の平均値は 0.024 g/kg であり、ほぼ同等の結果であった。このことから、試料マトリックスは測定値に影響しないと考えられた。

3・2 LC-qTOF/MS による確認試験法の検討

健康被害発生時においては、原因物質の損失を防ぐため試料の前処理を行わない分析法が望ましい。そこで、試料の希釈のみでズルチンを分析可能であるか検討した。

プロダクトイオンスキャンによるズルチンの標準溶液及び試験溶液中のマススペクトルを図 4 に示した。試験溶液中のプロダクトイオン同士の強度比は標準溶液と比較してほぼ同等であり、マススペクトルの一致度は高かった。本試験法は試料の前処理操作を必要とせず、希釈のみで定量下限付近のズルチンの定性が可能であった。

4 まとめ

飲料中の食品添加物の正確、簡便かつ迅速な試験法の整備を目的とし、赤ワインをモデル試料として飲料中のズルチンの定量及び確認試験法の検討を行った。イオンペア試薬を用いない、より簡便な定量試験法を検討し分析法の性能評価を行った。定量下限の 2 倍濃度 (0.02 g/kg) における真度及び再現性は、平均回収率が 98.6%、RSD が 6.3% であり良好な結果であった。また、LC-qTOF/MS を用いてズルチンの確認試験法の検討を行ったところ、試料の前処理操作を必要とせず、希釈のみで定性が可能であった。

以上のことから、今回検討した試験法は飲料中のズルチンの定量及び確認試験法として有用であると考えられた。今後は、赤ワイン以外の飲料及びズルチン以外の食品添加物について検討し、適用範囲を確認する必要がある。

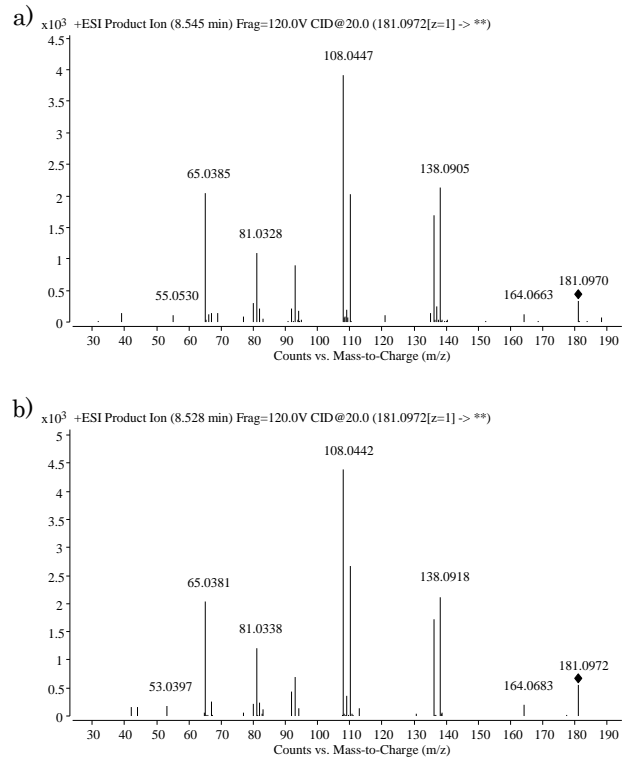


図 4 ズルチンのマススペクトル
a) 標準溶液 (0.1 µg/mL)
b) 試験溶液

文献

- 厚生労働省：地域における健康危機管理について～地域健康危機管理ガイドライン～，<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/kenkou/guideline/index.html>，平成 29 年 4 月 3 日
- 斎藤孝一：食品衛生学雑誌，10 (2)，112-113，1969
- 衛生試験法・注解 2015，(日本薬学会)，p.375，2015 (金原出版、東京)
- 小林千種ら：食品衛生学雑誌，40 (2)，166-171,1999
- 小山政道ら：食品衛生学雑誌，46 (3)，72-78，2005
- 松本ひろ子ら：東京都健康安全研究センター年報，59，129-135，2008
- 鶴田小百合ら：食品衛生学雑誌，54 (3)，204-212，2013
- 望月直樹：YAKUGAKU ZASSHI，131 (7)，1019-1025，2011
- 厚生省生活衛生局食品保健課長通知：衛食第 117 号，平成 9 年 4 月 1 日，1997
- Codex Alimentarius Commission：CODEX STAN (193-1995)，1995

(英文要旨)

Development of a Quantitative HPLC Method and a Simple and Rapid Qualitative Method Using LC-qTOF/MS for Dulcin in Beverages

Tamaki SATO, Toshitaka KOGISO, Yoriko SHINTANI, Tsuguhide HORI and Jumboku KAJIWARA

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,

Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

We studied quantitative and qualitative analytical methods for dulcin, an unspecified sweetener that previously caused food-poisoning case, in beverages using red wine as a representative sample. A simple quantitative method without ion-pair reagents at the purification and measurement was developed and evaluated. The recovery rate with a dulcin concentration of 0.02 g/kg was 98.6% with satisfactory repeatability. We also developed a qualitative method using LC-qTOF/MS. As a result, the only sample preparation step required was dilution in this method. The methods developed in this study will be useful for quantitative and qualitative analysis of dulcin in beverages.

[Key words ; unspecified sweeteners, dulcin, HPLC, LC-qTOF/MS]