

# LC-MS/MS を用いた食品中の甘味料及び保存料の多成分一斉分析法

## Simultaneous Determination of Sweeteners and Preservatives in Foods Using LC-MS/MS

岡部 亮 平間 祐志 竹脇優太郎 青柳 光敏

Ryo OKABE, Yuji HIRAMA, Yutaro TAKEWAKI and Mitsutoshi AOYAGI

**Key words** : LC-MS/MS (液体クロマトグラフータンデム質量分析計); sweetener (甘味料); preservative (保存料); simultaneous determination (一斉分析法)

### 緒 言

食品添加物は、原則として食品衛生法に基づき安全性と有効性が確認され、指定された添加物のみが認められている。また、各添加物を使用可能な食品の種類や使用限度量は「食品、添加物等の規格基準」(昭和34年厚生省告示第370号)により定められており、これらの基準は国産及び輸入品を問わず、国内に流通するすべての食品に対して適用される。一方、外国の食品添加物に関する規制は日本のものと異なるため、輸入食品においては、指定添加物の使用基準超過や対象外食品への使用、日本では使用が認められていない指定外添加物の検出など、食品添加物に関わる食品衛生法違反がたびたび判明している<sup>1)</sup>。

食品添加物の甘味料及び保存料は加工食品への使用頻度が高く、同時に使用されることも多い。一方、食品中の甘味料及び保存料の多成分を測定する場合には、厚生労働省通知の食品中の食品添加物分析法<sup>2-6)</sup>や「衛生試験法・注解<sup>7)</sup>」に記載されている分析法を複数組み合わせる必要がある、検査が非常に煩雑となる。そのため、これまでも甘味料及び保存料の多成分を対象とした一斉分析法の開発が検討されてきた<sup>8,9)</sup>。今回、著者らは、これら報告を参考に、輸入食品から検出された事例のある指定外添加物を含む甘味料8種及び保存料9種をLC-MS/MSを用いて迅速かつ省力的に一斉分析する方法を開発した。開発した分析法について、厚生労働省通知の「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン<sup>10)</sup>」(以下妥当性評価ガイドラインとする)を準用し、5種類の加工食品に対する妥当性評価を実施したところ、良好な結果が得られたので報告する。

### 方 法

#### 1. 分析対象物質

分析対象物質17種は、表1に示した甘味料8種及び保

表1 甘味料8種及び保存料9種

略記	分析対象物質	用途
AD	アドバンテーム	甘
AK	アセスルファムカリウム	甘
ASP	アスパルテーム	甘
CYC	サイクラミン酸ナトリウム	甘*
DU	ズルチン	甘*
NEO	ネオテーム	甘
SAC	サッカリンナトリウム	甘
SUC	スクラロース	甘
BA	安息香酸	保
DHA	デヒドロ酢酸	保
PHBA-Bu	パラオキシ安息香酸ブチル	保
PHBA-Et	パラオキシ安息香酸エチル	保
PHBA-iBu	パラオキシ安息香酸イソブチル	保
PHBA-iPr	パラオキシ安息香酸イソプロピル	保
PHBA-Me	パラオキシ安息香酸メチル	保*
PHBA-Pr	パラオキシ安息香酸プロピル	保
SOA	ソルビン酸	保

甘：甘味料  
保：保存料  
\*：指定外添加物

存料9種(以下、各物質名は略記を用いる)とした。

#### 2. 試料

アイスクリーム、ウイナーソーセージ、しょうゆ、清涼飲料水及びたくあん漬は道内小売店で購入した。アイスクリーム、しょうゆ及び清涼飲料水はそのまま、ウイナーソーセージ及びたくあん漬はフードプロセッサで細切均一化したものを試料とした。

#### 3. 試薬・試液

標準品は、次の17種を用いた。AD(食品分析用)、AK(高速液体クロマトグラフ用)、ASP(食品添加物試験用)、BA(試薬特級)、CYC(和光特級)、DHA(和光特級)、DU(食品分析用)、PHBA-Bu(和光特級)、PHBA-Et(和光特級)、PHBA-Me(和光特級)、SAC・二水和物(和光特

級)、SOA (和光特級) 及び SUC (高速液体クロマトグラフ用) は富士フイルム和光純薬(株)製を用いた。PHBA-iBu (食品分析用)、PHBA-iPr (食品分析用) 及び PHBA-Pr (鹿特級) は関東化学(株)製を用いた。NEO (純度 98% 以上) は東京化成工業(株)製を用いた。

標準原液 (40 g/L) は各標準品をひょう量し、AD、BA、DHA、DU、PHBA-Bu、PHBA-Et、PHBA-iBu、PHBA-iPr、PHBA-Me、PHBA-Pr 及び SOA はメタノール、AK、CYC、SUC、SAC・二水和物及び NEO は 50 vol% メタノール、ASP は 3 vol% ギ酸に溶解して調製した。なお、SAC の標準原液は溶液 1 mL あたりに 40 mg の SAC が含まれるように、47 mg の SAC・二水和物をひょう量して調製した。

添加用混合標準溶液は、各標準原液、または各標準原液を 50 vol% メタノールで適宜希釈して調製した標準溶液を混合し、50 vol% メタノールで希釈して調製した。

検量線用混合標準溶液は、添加用混合標準溶液を後述の希釈用溶媒または 0.25 vol% ギ酸含有 0.1 mol/L 酢酸アンモニウム・70 vol% メタノール溶液で適宜希釈して調製した。

アセトニトリル及び *n*-ヘキサンは関東化学(株)製の残留農薬試験・PCB 試験用を、メタノールは関東化学(株)製の LC/MS 用を、水は関東化学(株)製の高速液体クロマトグラフ用または LC/MS 用を、ギ酸は富士フイルム和光純薬(株)製の試薬特級を、酢酸アンモニウムは純正化学(株)製の試薬特級を、硫酸マグネシウム・七水和物は関東化学(株)製の試薬特級を用いた。フィルター (0.20  $\mu$ m、親水性) は東洋濾紙(株)製 DISMIC-13 HP を用い、精製用固相ミニカラムは Agilent Technologies 社製 MEGA BE-C 18 (1000 mg、6 mL) (以下 C 18 ミニカラムとする) 及び Agilent Technologies 社製 Bond Elut Jr-PSA (500 mg)

(以下 PSA ミニカラムとする) をメタノール 5 mL 及び水 5 mL でコンディショニングし、用いた。希釈用溶媒は、0.4 vol% ギ酸・アセトニトリル水 (2:1) 混液 40 mL に 0.25 vol% ギ酸を加えて 100 mL として調製した。

#### 4. 装置

振とう機はタイテック(株)製レシプロシェーカー SR-2w を、遠心分離機は久保田商事(株)製ユニバーサル冷却遠心機 5930 を、LC-MS/MS の LC 部は(株)島津製作所製 Prominence 高圧グラジエントシステムを、MS/MS 部は(株)島津製作所製 LCMS-8050 を用いた。

#### 5. LC-MS/MS の測定条件

##### 1) LC 条件

カラムはジーエルサイエンス(株)製 Inertsil ODS-4 (2.1  $\times$  150 mm、3  $\mu$ m) を用いた。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、移動相は 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (A 液) 及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (B 液)、流量は 0.2 mL/min、グラジエント条件は B 液 5% (0 分)  $\rightarrow$  B 液 65% (13 分)  $\rightarrow$  B 液 65% (25 分)  $\rightarrow$  B 液 95% (25.01 分)  $\rightarrow$  B 液 95% (35 分)  $\rightarrow$  B 液 5% (35.01 分)  $\rightarrow$  B 液 5% (45 分)、注入量は 2  $\mu$ L とした。

##### 2) MS/MS 条件

イオン化法は electrospray ionization (ESI)、測定モードは multiple reaction monitoring (MRM) とした。脱溶媒管 (DL) 温度は 250 $^{\circ}$ C、ヒートブロック温度は 400 $^{\circ}$ C、ネブライザーガス流量は 3.0 L/min、ドライガス流量は 10.0 L/min、ヒーティングガス流量は 10.0 L/min、インターフェイス温度は 300 $^{\circ}$ C、インターフェイス電圧は 6 kV に設定した。また、各対象物質の定量イオン及び定性イオンを表 2 に示した。

表 2 分析対象物質 17 種の MS/MS 測定イオン

分析対象物質	+/-*	プリカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン			
			定量イオン		定性イオン	
			<i>m/z</i>	CE	<i>m/z</i>	CE
AD	+	459.0	102.1	-28	252.1	-20
AK	-	161.8	82.0	15	78.0	32
ASP	-	293.1	261.1	11	200.1	15
CYC	-	178.1	80.0	25		
DU	-	179.0	107.2	20	150.2	14
NEO	-	377.2	200.2	20	345.3	15
SAC	-	182.0	106.0	19	42.1	29
SUC	+	415.9	201.0	-16	85.1	-31
BA	-	121.1	77.2	14		
DHA	-	166.9	83.0	16	123.1	13
PHBA-Bu	-	193.1	92.2	24	93.1	23
PHBA-Et	-	165.2	92.1	23	93.2	22
PHBA-iBu	-	193.1	92.2	24	136.2	19
PHBA-iPr	-	179.1	93.2	23	92.1	24
PHBA-Me	-	151.3	92.1	22	136.1	19
PHBA-Pr	-	179.1	92.1	23	93.1	22
SOA	-	111.1	67.1	13		

\* : positive mode (+) /negative mode (-)

## 6. 試験溶液調製法

### 1) 脂質の少ない試料（しょうゆ、清涼飲料水及びたくあん漬け）

試料 5 g をガラス製遠沈管に量り採り、0.4 vol% ギ酸・アセトニトリル水（2：1）混液 45 mL 及び硫酸マグネシウム・七水和物 4 g を加えた。5 分間激しく振とうした後、遠心分離（3,000 rpm、5 分間）し、アセトニトリル層を採った。水層及び残留物に 0.4 vol% ギ酸・アセトニトリル水（2：1）混液 45 mL を加え、5 分間激しく振とうした後、遠心分離（3,000 rpm、5 分間）し、アセトニトリル層を採った。得られたアセトニトリル層を合わせ、0.4 vol% ギ酸・アセトニトリル水（2：1）混液を加えて正確に 100 mL とし、抽出液とした。

清涼飲料水及びたくあん漬けについては、抽出液を 0.25 vol% ギ酸で 2.5 倍希釈した後、フィルターでろ過し、試験溶液とした。

しょうゆについては、以下の操作を行った。抽出液 8 mL を採り、減圧濃縮して約 1.5 mL とした後、水 9 mL を加えた。この液を、C 18 ミニカラムの下に PSA ミニカラムを連結したもの（以下 C 18+PSA ミニカラムとする）に負荷した後、10 vol% メタノール 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、0.25 vol% ギ酸含有 0.1 mol/L 酢酸アンモニウム・70 vol% メタノール溶液 20 mL を注入し、全溶出液を採り、0.25 vol% ギ酸含有 0.1 mol/L 酢酸アンモニウム・70 vol% メタノール溶液で正確に 20 mL とし、試験溶液とした。

### 2) 脂質の多い試料（ウインナーソーセージ及びアイスクリーム）

試料 5 g をガラス製遠沈管に量り採り、0.4 vol% ギ酸・アセトニトリル水（2：1）混液 45 mL 及び硫酸マグネシウム・七水和物 4 g を加えて混和した後、*n*-ヘキサン 25 mL を加えた。5 分間激しく振とうした後、遠心分離（3,000 rpm、5 分間）し、アセトニトリル層を採った。*n*-ヘキサン層、水層及び残留物に 0.4 vol% ギ酸・アセトニトリル水（2：1）混液 45 mL を加え、5 分間激しく振とうした後、遠心分離（3,000 rpm、5 分間）し、アセトニトリル層を採った。得られたアセトニトリル層を合わせ、0.4 vol% ギ酸・アセトニトリル水（2：1）混液を加えて正確に 100 mL とし、抽出液とした。抽出液を 0.25 vol% ギ酸で 2.5 倍希釈した後、フィルターでろ過し、試験溶液とした。

## 7. 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試料を方法 6. 試験溶液調製法に従って操作し、しょうゆを除く 4 食品では、抽出液を 0.25 vol% ギ酸で希釈する際に、しょうゆでは溶出液を 20 mL に定容する際に標準溶液を適宜添加し、定量下限値濃度（表 5）の回収率 100% 相当となるようにマトリックス添加標準溶液を調製した。同濃度の溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比（各 2 回測定の前平均値）を求めて試料マトリックスの測定への影響を検討した。

## 8. 定量

検量線は、各対象物質の添加回収試験における回収率 50%、75%、100%、125%、150% 相当の検量線用混合標準溶液 2  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積により作成した。試験溶液についても同様に操作し、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により各対象物質を定量した。なお、検量線用混合標準溶液は、アイスクリーム、ウインナーソーセージ、清涼飲料水及びたくあん漬けでは希釈用溶媒、しょうゆでは 0.25 vol% ギ酸含有 0.1 mol/L 酢酸アンモニウム・70 vol% メタノール溶液を用いて添加用混合標準溶液を希釈して調製した。

## 9. 添加回収試験（妥当性評価）

対象物質 17 種を含まないブランク試料に添加用混合標準溶液を 0.2 g/kg または定量下限値濃度（表 5）で添加し、室温で 30 分間放置したものを添加試料とした。添加試料を方法 6. 試験溶液調製法に従って操作し、試験溶液を調製した。添加回収試験は妥当性評価ガイドラインの実施方法を参考に、実施者 1 名で 1 日 2 併行を 5 日間行い、選択性、真度、精度（併行精度及び室内精度）及び定量限界について評価を行った。

## 結果及び考察

### 1. LC-MS/MS 条件の検討

LC の分析カラム及び移動相については、当所が開発した残留農薬一斉分析法<sup>11)</sup>において多成分分析に実績のある分析カラム（Inertsil ODS-4）及び移動相（A 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液）を用いることとした。

上述した移動相を用いて、対象物質 17 種について MRM の最適化を行った。その結果から、AD 及び SUC はポジティブモード、その他の対象物質 15 種はネガティブモードで得られたプリカーサーイオンに対し、最も高い強度で得られたプロダクトイオンを定量イオンとし、次に高い強度で得られたプロダクトイオンを定性イオンとした（表 2）。なお、BA、CYC 及び SOA はプロダクトイオンが 1 つしか得られなかったため、定量イオンのみとした。

グラジエント条件として、残留農薬一斉分析法<sup>11)</sup>で採用されている A 液及び B 液（90：10）から（5：95）までの 20 分間のグラジエントを用いたところ、定量イオン及び定性イオンが共通している PHBA-Bu と PHBA-iBu のピークの分離が不十分であり、それぞれの同定が困難であった。そこで、これらのピークの分離を改善するために、種々のグラジエント条件について検討した。その結果、A 液及び B 液（95：5）から（35：65）までの 13 分間のグラジエント後、（35：65）で 12 分間保持する条件において、PHBA-Bu と PHBA-iBu のピークが十分に分離したことから、本グラジエント条件を用いることとした。以上の条件で得られた対象物質 17 種のクロマトグラムを図 1 に示した。

### 2. 定量範囲の確認

対象物質 17 種について、表 2 に示した定量イオンを用

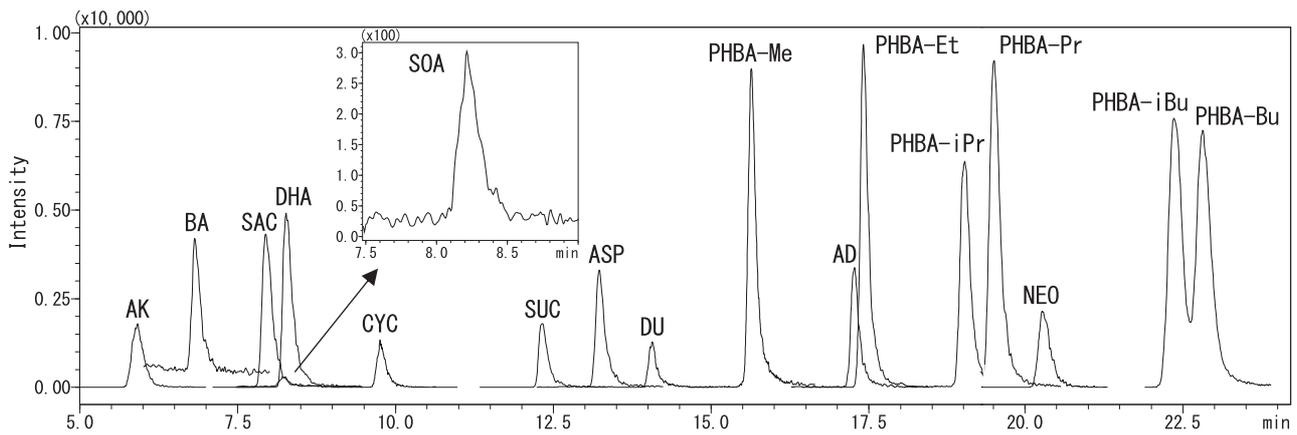


図1 分析対象物質 17種のクロマトグラム (定量イオン)

定量下限濃度の回収率 100% 相当 (mg/L)

BA、DHA、SOA : 0.2、DU : 0.1、ASP、SAC : 0.05、NEO、SUC : 0.02

PHBA-Bu、Et、iBu、iPr、Me、Pr : 0.01、CYC : 0.005、AK : 0.002、AD : 0.0005

表3 分析対象物質 17種の定量範囲

分析対象物質	濃度範囲 (mg/L)	相関係数
AD	0.0002 ~ 1	0.998
AK	0.001 ~ 1	0.995
ASP	0.02 ~ 5	0.997
CYC	0.002 ~ 1	0.997
DU	0.05 ~ 5	1.000
NEO	0.01 ~ 5	0.997
SAC	0.02 ~ 0.6	0.997
SUC	0.01 ~ 5	1.000
BA	0.1 ~ 5	1.000
DHA	0.1 ~ 5	1.000
PHBA-Bu	0.005 ~ 5	0.999
PHBA-Et	0.005 ~ 5	0.998
PHBA-iBu	0.005 ~ 5	0.998
PHBA-iPr	0.005 ~ 5	0.999
PHBA-Me	0.005 ~ 5	0.998
PHBA-Pr	0.005 ~ 5	0.999
SOA	0.1 ~ 5	1.000

いて検量線を作成した。表3に示したとおり、対象物質 17種において、それぞれの濃度範囲で得られた相関係数は 0.995 以上であり、良好な直線性を示した。

### 3. 抽出の検討

甘味料及び保存料の多成分を同時に抽出する方法として、透析法<sup>12)</sup>やホモジナイズ法<sup>8,9,13,14)</sup>、振とう法<sup>15)</sup>が報告されている。今回開発する分析法では、迅速性に優れ、多検体同時処理も可能な振とう法を採用し、抽出溶媒は残留農薬一斉分析法<sup>11)</sup>において多成分抽出に実績のあるアセトニトリルを使用することとした。

アセトニトリルによる振とう抽出について、対象物質 17種を添加したウインナーソーセージを用いて検討した。その結果、アセトニトリルのみで振とう抽出を行った場合に比べて、水も加えた方が ASP 及び CYC の回収率が高い傾向が認められた。そのため、振とう抽出時においては試

料に対する加水が必要であると考えた。一方、清涼飲料水を試料とした場合、アセトニトリル及び水を加えて振とうしても、試料と抽出溶媒が均一に混和するのみであり、試料夾雑成分との分離効果は期待できなかった。そこで、塩析剤を加えたところ、アセトニトリル層と分離した水層へ着色成分が移行し、着色成分を効果的に除去することが可能となった。これらの結果から、今回開発する分析法では、試料にアセトニトリル、水及び塩析剤を加えて振とうし、抽出と同時に液-液分配による精製を行う抽出法を選択し、最適な抽出条件を検討することとした。

使用する塩析剤について、残留農薬一斉分析法<sup>11)</sup>の塩析操作で用いられている硫酸マグネシウム・七水和物及び塩化ナトリウムの適用性を検討した。対象物質 17種を添加した水に対して、アセトニトリル及び各塩析剤を加えて塩析したところ、塩化ナトリウムを加えた場合には、甘味料である AK、ASP、CYC 及び SAC、保存料である BA、DHA 及び SOA の回収率が低下する傾向が認められた。そのため、塩析剤として硫酸マグネシウム・七水和物のみを用いることとした。

塩析において発生する水層の量を十分に確保するために、試料 5g に対して水 15 mL 及び硫酸マグネシウム・七水和物 4g を加えることとし、水に対するアセトニトリルの量 (比率) について検討した。対象物質 17種を添加した水 5g に対し水 15 mL 及び硫酸マグネシウム・七水和物 4g を加えた後、アセトニトリル 15 mL または 30 mL を加えて振とうし、遠心分離した後、アセトニトリル層を採り、回収率を求めた。その結果、30 mL の方が 15 mL に比べて対象物質 17種の回収率が 1~13% 高い値となったことから、水 15 mL に対して 2倍量のアセトニトリル 30 mL を加えることとした。

酸性の対象物質の回収率向上と、中性~アルカリ性で不安定な ASP<sup>14,16)</sup>の分解抑制のために、アセトニトリルへのギ酸添加について検討した。上述した水を試料とした添加回収試験において、アセトニトリルの代わりに 0.05 vol%

表4 ギ酸・アセトニトリル溶液による抽出結果

ギ酸濃度	回収率 (%)			ASP
	対象物質 17 種			
	最小値	最大値	平均値	
ギ酸添加無し*	78	91	87	78
0.05%	84	96	93	84
0.2%	92	101	97	92
0.4%	96	102	100	96

\*：アセトニトリル 30 mL による抽出

ギ酸・アセトニトリル溶液、0.2 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液または0.4 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を各30 mL 加えて振とうし、遠心分離した後、アセトニトリル層を採り、回収率を求めた。その結果、表4に示したとおり、ギ酸濃度を増やすことにより、ASPをはじめとして、対象物質17種の回収率が向上する傾向が認められた。検討したギ酸濃度の中で、0.4 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を用いた場合に、対象物質17種の回収率が96~102%と最も良好であったことから、試料5gに対して水15 mL及び0.4 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液30 mLを加えることとした。なお、操作を簡易化するために、これらの溶媒をあらかじめ混合した抽出溶媒、すなわち0.4 vol%ギ酸・アセトニトリル-水(2:1)混液45 mLを用いることとした。

本抽出溶媒を用いて、脂質の少ない試料として、しょうゆからの回収状況を確認した。すなわち、対象物質17種を添加したしょうゆ5gに抽出溶媒45 mL及び硫酸マグネシウム・七水和物4gを加えて振とうし、遠心分離した後、アセトニトリル層を採った。水層及び残留物に抽出溶媒45 mLを加えて振とうし、遠心分離した後、アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせた。マトリックス添加標準溶液により対象物質17種の回収率を求めたところ、CYCでは約80%、他の対象物質では90%以上の良好な回収率が得られたことから、本法を脂質の少ない試料、すなわち、しょうゆ、清涼飲料水及びたくあん漬を対象とした抽出方法として採用することとした。

ウインナーソーセージ及びアイスクリームについては、脂質からの抽出効率向上と脂質の除去を目的として、*n*-ヘキサン25 mLも加えることとし、方法6. 試験溶液調製法2) 脂質の多い試料(ウインナーソーセージ及びアイスクリーム)に示した方法により抽出を行うこととした。対象物質17種を添加したウインナーソーセージを用いて、本法による回収状況を確認したところ、マトリックス添加標準溶液により求めた回収率はすべての対象物質において90%以上と良好であった。また、本法による実試料からの抽出効率を確認するために、SOA使用の表示があるウインナーソーセージを試料として抽出を行った。比較のために、厚生労働省から通知試験法として示されている高タンパク食品及び高脂肪食品からの保存料の抽出法<sup>3)</sup>、すなわち、試料5gに対して95 vol%メタノール20 mLで2回ホモジナイズする方法(以下通知試験法とする)でも抽出

を行った(*n*=2)。その結果、今回開発した方法では1.5 g/kg、通知試験法では1.4 g/kgの定量値が得られたことから、今回開発した方法による実試料からの抽出効率は通知試験法と同等であることが確認できた。

#### 4. 精製の検討

アイスクリーム、ウインナーソーセージ、しょうゆ、清涼飲料水及びたくあん漬のブランク試料5gを方法6. 試験溶液調製法に従って操作し、各ブランク抽出液を得た。各ブランク抽出液を0.25 vol%ギ酸で2.5倍に希釈した溶液を用いて、定量下限値濃度(表5)の添加回収試験における回収率100%相当となるようにマトリックス添加標準溶液を調製し、同濃度の溶媒標準溶液とピーク面積を比較した。その結果、しょうゆ以外の試料では、すべての対象物質において顕著なイオン化抑制は認められなかったが、しょうゆではSACにおいて約40%のイオン化抑制が認められた。そこで、C18ミニカラム及びPSAミニカラムを併用した精製について検討した。

ミニカラムからの溶出状況を確認するため、水で調製した対象物質17種の混合標準溶液をC18ミニカラム及びPSAミニカラムにそれぞれ負荷し、5~70 vol%メタノール各10 mLを順次通液した。その結果、C18ミニカラムにおいて、10 vol%メタノールまでにAK、BA、CYC、SAC及びSOA(以下AK等とする)が、15 vol%メタノールから残りの対象物質12種が溶出し始め、70 vol%メタノールまでに対象物質17種のほぼ全量が溶出した。一方、PSAミニカラムにおいては、10 vol%メタノールまでにAK等以外の対象物質12種は溶出したが、5~70 vol%メタノールでは酸性物質であるAK等の溶出は認められなかった。そこで、PSAミニカラムからAK等を溶出させるために、鶴田らの方法<sup>9)</sup>を参考として、揮発性塩である酢酸アンモニウムによる溶出を検討した。その結果、0.1 mol/L酢酸アンモニウム・70 vol%メタノール溶液15 mLによりAK等を含む対象物質17種をほぼ全量溶出させることができた。しかし、PSAミニカラムからの溶出液を20 mLに定容した後、そのままLC-MS/MSに注入すると、ミニカラム精製していないしょうゆ以外の試料に比べて、LC-MS/MS測定におけるBA、DHA及びSOAの保持時間にずれが認められた。この原因として、PSAミニカラム精製後の溶液は中性であるのに対し、しょうゆ以外の試料の試験溶液はギ酸を含む酸性溶液であることが考えられた。そのため、同程度のギ酸濃度となるように、あらかじめギ酸を0.25 vol%の濃度で0.1 mol/L酢酸アンモニウム・70 vol%メタノール溶液に加えることとしたところ、保持時間のずれは解消された。なお、ギ酸を加えたことによる溶出への影響は認められなかった。

各ミニカラムの溶出状況が確認できたことから、次にC18ミニカラムの下にPSAミニカラムを連結したC18+PSAミニカラムでの溶出状況を確認した。0.25 vol%ギ酸で調製した対象物質17種の混合標準溶液をC18+PSAミニカラムに負荷し、10 vol%メタノール10 mLを注入したとこ

表5 妥当性評価の結果

分析対象物質	添加濃度 (g/kg)*	アイスクリーム			ウインナーソーセージ			しょうゆ			清涼飲料水			たくあん漬け		
		真度 %	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	真度 %	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	真度 %	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	真度 %	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%	真度 %	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%
AD	0.000025	102.4	7.1	7.1	98.9	3.4	6.3	94.8	2.2	5.1	98.6	5.5	5.5	95.8	9.9	9.9
	0.2	98.2	1.0	4.1	99.0	4.2	4.2	99.6	1.3	1.7	97.9	1.6	2.9	92.7	2.4	5.1
AK	0.0001	87.2	2.6	4.1	91.7	2.8	4.3	81.1	3.1	3.6	90.0	1.5	3.8	86.4	4.0	4.9
	0.2	88.9	1.3	3.8	93.7	1.5	2.3	95.4	2.0	2.3	96.4	1.8	3.1	94.3	2.3	4.9
ASP	0.0025	89.0	3.7	4.5	93.1	4.1	4.1	93.9	3.6	4.9	96.7	3.8	4.2	93.2	2.1	3.6
	0.2	85.3	1.8	6.3	92.6	1.9	2.7	89.2	0.9	4.0	96.7	1.5	2.0	88.1	2.5	4.9
CYC	0.00025	82.4	2.8	5.0	84.7	1.8	6.2	78.7	2.1	3.5	98.1	2.7	3.9	93.6	3.6	4.3
	0.2	85.1	1.0	4.1	90.6	1.3	2.1	80.4	2.6	3.1	98.6	2.0	2.3	95.6	3.0	5.3
DU	0.005	98.3	5.9	6.3	102.5	6.6	6.6	92.4	7.2	7.2	101.8	5.1	5.4	97.0	4.9	5.2
	0.2	93.7	1.9	5.3	96.7	2.6	2.9	97.3	1.5	2.7	98.1	2.9	2.9	94.7	2.6	3.4
NEO	0.001	96.9	2.5	4.0	99.7	2.2	3.9	94.1	2.9	4.3	96.9	2.0	2.5	90.0	2.1	3.9
	0.2	93.5	1.1	3.7	96.8	2.5	2.5	97.2	2.3	2.3	98.8	1.2	1.4	89.4	1.8	3.0
SAC	0.0025	87.9	3.1	5.4	93.5	4.9	4.9	85.2	5.4	8.1	94.4	2.8	5.3	93.0	2.8	2.8
	0.2	86.3	1.5	5.2	91.7	2.7	5.9	92.1	3.6	3.6	94.6	1.8	4.1	95.0	2.1	7.7
SUC	0.001	97.5	6.4	6.4	99.5	5.2	6.5	79.6	2.7	2.7	98.2	5.6	5.6	90.5	2.3	2.9
	0.2	96.6	1.6	4.6	98.4	3.4	3.4	92.8	1.6	1.6	98.3	1.3	3.5	94.8	2.8	4.1
BA	0.01	101.6	4.4	5.7	110.1	1.7	3.0	108.6	2.7	2.7	100.3	6.8	6.8	99.8	6.2	6.8
	0.2	93.2	3.8	3.9	99.7	2.7	2.7	98.1	4.9	4.9	98.1	3.0	3.0	97.2	4.0	4.0
DHA	0.01	97.4	3.5	3.5	97.7	4.6	4.6	87.0	2.4	8.0	97.8	1.4	2.5	94.3	5.4	5.4
	0.2	91.0	4.2	4.9	97.5	2.7	2.8	91.8	1.5	1.9	98.8	2.9	2.9	95.0	4.0	4.0
PHBA-Bu	0.0005	98.7	2.6	4.1	98.2	4.0	4.6	98.0	2.5	4.8	99.1	2.5	3.0	91.0	2.8	2.8
	0.2	93.6	1.5	2.2	98.2	2.0	4.1	99.2	3.1	3.1	98.2	1.6	1.7	92.4	1.8	1.8
PHBA-Et	0.0005	98.6	2.3	2.5	101.4	1.8	4.1	108.5	2.1	2.9	99.3	2.4	2.9	96.2	2.7	3.2
	0.2	95.9	0.7	2.4	99.0	1.0	1.3	99.5	1.3	1.3	100.0	1.2	1.5	95.0	2.4	2.4
PHBA-iBu	0.0005	100.3	3.2	3.2	99.9	2.3	3.9	97.0	1.8	2.9	100.0	1.3	2.2	92.4	1.8	2.2
	0.2	94.8	2.2	2.7	97.2	1.0	1.3	99.4	1.7	1.7	98.6	1.4	2.4	92.6	2.8	2.8
PHBA-iPr	0.0005	98.6	3.2	3.4	99.1	1.9	3.3	96.7	1.5	3.4	99.1	1.9	1.9	93.7	2.5	2.5
	0.2	95.5	0.8	1.7	98.8	0.8	1.2	99.1	1.2	1.2	98.8	0.9	1.6	94.0	2.2	2.3
PHBA-Me	0.0005	101.0	2.4	2.9	101.5	2.3	2.6	98.7	2.4	2.9	100.2	2.4	3.3	95.2	2.6	3.1
	0.2	96.1	0.8	2.5	99.0	1.0	1.5	99.6	1.4	1.4	99.7	1.5	1.6	96.3	2.3	2.3
PHBA-Pr	0.0005	99.8	1.9	3.0	100.6	2.3	2.8	97.5	0.7	2.4	100.4	4.0	4.0	93.1	2.4	2.4
	0.2	94.7	1.6	3.0	98.4	2.0	2.0	98.5	1.3	1.3	99.5	1.2	1.4	94.2	2.1	2.3
SOA	0.01	98.5	5.4	6.4	101.4	7.7	7.7	96.6	5.4	5.5	101.8	5.7	5.7	94.3	6.7	9.8
	0.2	92.4	4.3	4.6	96.2	4.1	5.2	96.9	3.5	4.3	97.3	4.8	4.8	96.0	4.8	4.8

\*：上段が定量下限濃度 (g/kg)

妥当性評価ガイドラインの目標値

0.0001 &lt; 添加濃度 (g/kg) …真度 70~120%, 併行精度 &lt; 10 RSD%, 室内精度 &lt; 15 RSD%

0.00001 &lt; 添加濃度 (g/kg) ≤ 0.0001 …真度 70~120%, 併行精度 &lt; 15 RSD%, 室内精度 &lt; 20 RSD%

ろ、各物質の溶出は認められなかった。引き続き、0.25 vol %ギ酸含有 0.1 mol/L 酢酸アンモニウム・70 vol%メタノール溶液 20 mL を注入したところ、対象物質がすべて回収された。

上述した C 18+PSA ミニカラムを用いた精製条件により、しょうゆ抽出液を精製したところ、対象物質 17 種すべてで良好な回収率が得られ、イオン化抑制の低減効果も認められたことから、しょうゆについては本ミニカラム精製を行うこととした。

#### 5. 試料マトリックスの測定への影響

マトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液のピーク面積比は、アイスクリームでは 0.94~1.07、ウインナーソーセージでは 0.94~1.10、清涼飲料水では 0.89~1.07、しょうゆでは 0.81~1.10、たくあん漬けでは 0.91~1.05 であった。これらの結果から、各対象物質に対する試料マトリックスの測定への影響は少ないと考え、マトリックス添加標準溶液ではなく、溶媒標準溶液で定量を行うこととした。

#### 6. 妥当性評価

開発した分析法を用いて妥当性評価を行った結果を表 5 に示した。添加濃度は 0.2 g/kg 及び定量下限濃度の 2 濃度とした。なお、添加濃度 0.2 g/kg では、AD、AK、CYC 及び SAC の検量線において良好な直線性が得られなかったため、試験溶液を 10 倍希釈して定量した。アイスクリーム、ウインナーソーセージ、しょうゆ、清涼飲料水及びたくあん漬けの 5 食品において、対象物質 17 種の真度は 78.7~110.1%、併行精度は 0.7~9.9%、室内精度は 1.2~9.9% であり、妥当性評価ガイドラインの目標値（表 5）を満たした。各食品のブランク試験溶液において、定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。また、本法の定量下限値 ( $S/N \geq 10$ ) は 0.000025 g/kg~0.01 g/kg であり、十分な検出感度が得られた。

以上の検討結果から、今回開発した分析法は、食品中の甘味料 8 種及び保存料 9 種の一斉分析法として十分な性能を有していると考え。また、抽出操作が簡便であり、当所の設備を用いた場合には、最大 6 検体の同時処理も可能であることから、食品添加物検査の迅速化及び省力化に寄与すると考える。

## 文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ：輸入食品等の食品衛生法違反事例（2020 年度分），<https://www.mhlw.go.jp/content/000790312.xls>（確認：2021 年 6 月 29 日）
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知衛化第 15 号「食品中の食品添加物分析法について」，平成 12 年 3 月 30 日
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長通知薬生食基発 0628 第 1 号，厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長通知薬生食監発 0628 第 1 号「食品中の食品添加物分析法」の改正について」，令和元年 6 月 28 日
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長通知食基発第 58 号「食品中のアセスルファミウム分析法について」，平成 13 年 12 月 28 日
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発第 0829009 号「サイクラミン酸に係る試験法について」，平成 15 年 8 月 29 日
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知食安監発第 1207003 号「食品中のパラオキシ安息香酸メチルの分析法について」，平成 17 年 12 月 7 日
- 7) 公益社団法人日本薬学会：衛生試験法・注解 2015，金原出版，東京，2015，pp.329-406
- 8) 西名武士，中原優子，富永純司，松本理世，山口奈穂，松村光紗：LC/MS/MS による食品中食品添加物の迅速一斉分析法の開発。熊本県保健環境科学研究所報，47，33-41（2017）
- 9) 鶴田小百合，坂本智徳，赤木浩一：固相抽出-LC-MS/MS 法による食品中の甘味料 12 種および保存料 9 種の一斉分析。食衛誌，54(3)，204-212（2013）
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発 1224 第 1 号「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」，平成 22 年 12 月 24 日
- 11) 柿本洋一郎，岡部 亮，久保田晶子，渡邊涼太，青柳光敏：農産加工食品の残留農薬試験に係る検査品目の拡充について。道衛研所報，69，13-38（2019）
- 12) 澤崎加奈恵，平井知里，山岸 浩：透析および固相抽出による食品中の保存料および甘味料の分析。福井県衛生環境研究センター年報，14，40-44（2015）
- 13) 岸 弘子，山田利治：HPLC による食品中の 9 種保存料の一斉分析。食衛誌，48(3)，58-63（2007）
- 14) 小山政道，吉田和郎，内堀伸健，和田伊知朗，秋山和幸，佐々木珠美：LC/MS による食品中の 9 種甘味料の一斉分析法。食衛誌，46(3)，72-78（2005）
- 15) 氏家愛子，長谷部洋，千葉美子，柳田則明：食品中 7 種の保存料およびサッカリンの HPLC による一斉分析と LC/MS/MS による同定。食衛誌，48(6)，163-169（2007）
- 16) 中村圭寛：ダイエット甘味料アスパルテーム。醸協，86(3)，200-207（1991）