

LC/MS/MSを用いた食品中のサイクラミン酸分析

山口之彦、吉田秋比古、清水 充

Determination of Cyclamate from Various Kinds of Foods Performed LC/MS/MS

Yukihiko YAMAGUCHI, Akihiko YOSHIDA and Mituru SHIMIZU

Abstract

The recoveries of cyclamate from various kinds of foods were 23-109% using standard method. So, we modified to method had higher recovery and been more rapid performed LC/MS/MS.

Cyclamate was extracted with hot water at 100°C, and the extract was cleaned up on a Oasis HLB column cartridge, and elute was filtered for injection into the LC/MS/MS. Using modified method, the recoveries of cyclamate from various kinds of foods were 57-98%. Compared with standard method, modified method had higher performance.

Keywords: cyclamate, LC/MS/MS, Oasis HLB

I 緒言

わが国においてサイクラミン酸は、FDAより発がん性、催奇形性が指摘されたため、1969年11月以降、使用が禁止されている。しかし、一方では発がん性、催奇形性を否定する研究もあり、中国、台湾、EU諸国など55カ国以上で現在でも甘味料として使用されている。そのため、わが国では輸入食品に検出される事例が起きている。

本市では、2008年2月に起きた中国製餃子農薬混入事件を受けて、2009年度より輸入食品の検査強化を行っている。その一環として、サイクラミン酸の検査を行っており、2009年度は、漬物、チョコレート、その他の様々な加工食品について検査を行った。試験法としては、厚生労働省通知法[1]および中里ら[2]の方法がある。両者で異なるのは抽出法で、前者は加熱抽出法、後者は透析法を用いている。当所では、2009年度の検査において、多試料に対応するために時間を要する透析法ではなく、加熱抽出法を用いた。

2009年度の検査において種々の食品について添加回収試験を行ったところ、食品によって回収率がよいものと悪いものが極端で、ばらつきが見られた。そこで、種々の食品において回収率にばらつきの見られない

方法を検討した。サイクラミン酸は、化学的性状から、分析機器としてガスクロマトグラフ(GC)より液体クロマトグラフ(LC)が向いている。しかし、LCの一般的な検出器であるUVおよび蛍光検出器には、吸収波長および蛍光波長を持たないため検出されない。そこで、上記試験法[1,2]においては塩素化を行い、サイクラミン酸をUVの吸収波長をもつ物質に変換したあとで、UV検出器で測定している。サイクラミン酸を塩素化することなく、測定が可能であれば、塩素化の工程を省くことができ、迅速化につながる。サイクラミン酸を直接測定する方法として松本ら[3]は、電気伝導度検出器を試みている。良好な結果が得られているが、今回は、定性および定量が同時にでき、サイクラミン酸の直接分析が可能なタンデム質量分析計(MS/MS)の適用を考えた。LC/MS/MSを定量に使用することを前提に分析法を検討した結果、迅速分析が可能となり、従来法と比較して回収率の向上、ばらつきの低減を可能にしたので報告する。

II 方法

1) 試料

ビスケット、チョコレート、さきいか、ワイン、キャベツの酢漬、たくあん漬、しば漬、奈良漬、キムチなどの9食品。

2) 試薬

(1) 標準溶液

サイクラミン酸ナトリウム(和光純薬) 56.15mgを精製水に溶解し、50mLとし、1000 μ g/mL水溶液を作成した。これを順次希釈し、カートリッジカラム検討用の10 μ g/mL、添加回収試験用の5 μ g/mL、検量線作成用の0.005~0.1 μ g/mLを作成した。

(2) 固相カートリッジカラム

① Sep Pak tC₁₈ + Bond Elute SAX カートリッジカラム

Sep Pak tC₁₈ Enviroment (Waters) および Bond Elute SAX (Varian, 6cc, 1g) カートリッジカラムを連結し、アセトニトリル10mL、精製水10mLでコンディショニングした。

② Oasis HLB カートリッジカラム

Oasis HLBカートリッジカラム (Waters, 6cc, 500mg) をメタノール5mL、精製水5mLでコンディショニングした。

(3) アセトニトリル、メタノール

HPLC用を用いた。

(4) 20%塩酸溶液

濃塩酸(和光純薬、特級、35%)を20%水溶液になるように精製水で希釈した。

(5) 精製水-メタノール(1:1)混液

精製水およびメタノールが1:1になるように十分混合した。

(6) 0.1%ギ酸溶液

ギ酸(和光純薬、特級、99%)を0.1%になるように精製水で希釈した。

3) LC/MS/MS装置および測定条件

(1) LC/MS/MS 装置

LC:Agilent LC1100シリーズ

MS/MS:Applied Biosystems API2000

(2) 測定条件

カラム:MightySil RP-18GP(2.1mm×150mm)

粒径 5 μ m

カラム温度:40℃

移動相:A: 0.1%ギ酸 B: メタノール

A/B 95/5→10分→5/95

流量:0.2mL/min

注入量:5 μ L

イオン化モード:ESIネガティブ

イオン源温度:550℃

モニターイオン: m/z 178→80(定量用)

m/z 178→64, 178→96(確認用)

4) 試験溶液の作成

均一化した試料を10g採取し、精製水30mLを用いて、100℃で15分間加熱抽出した。ただし、ビケット類は、膨潤するため、試料量を5gとし、精製水40mLで抽出した。冷却後、50mLに定容し、4℃、7000rpmで10分間、遠心分離した。上清を、ろ紙でろ過した。これを抽出液とする。

Sep Pak tC₁₈ + Bond Elute SAXカートリッジカラムによる精製は、コンディショニングを行ったカートリッジカラムに10mLの抽出液を負荷し、Sep Pak tC₁₈カートリッジカラムを取り外し、Bond Elute SAXカートリッジカラムに吸着したサイクラミン酸を1%ギ酸および0.1%ギ酸で溶出することで行った。

Oasis HLBカートリッジカラムによる精製は、コンディショニングを行ったカートリッジカラムに塩酸濃度を0.1mol/Lに調製した10mLの抽出液を負荷し、5mLの精製水で洗浄した後、5mLの精製水-メタノール(1:1)混液を用いて溶出することで行った。

それぞれのカートリッジカラムからの溶出液をメンブランフィルター(0.45 μ m)でろ過したものをLC/MS/MS定量用試験溶液とした。

5) LC/MS/MSによる定量

0.005~0.1 μ g/mLに調製した検量線作成用標準溶液を用いて、先のLC/MS/MSの測定条件で測定し、検量線を作成した。

III 結果および考察

1) LC/MS/MS 測定における条件の最適化

サイクラミン酸を用いてLC/MS/MS条件の最適化を行った。1 μ g/mLのサイクラミン酸標準溶液を直接MS/MSに導入し、付属のソフトウェアを用いて、サイクラミン酸に最適なMS/MSの測定条件を求めた。イオンモードは、正イオンおよび負イオンの両方で最適化を行い、感度の高いイオンモードを採用した。最適化の結果としてプレカーサーイオン(Q1)、プロダクトイオン(Q3)、デクラスターポテンシャル(DP)、コリジョンエネルギー(CE)を表1に示す。

表1 サイクラミン酸のLC/MS/MS における最適条件

物質名	電荷	Q1(m/z)	DP(V)	Q3(m/z)	CE(eV)
サイクラミン酸	-	178	-46	80	-34
				64	-108
				96	-26

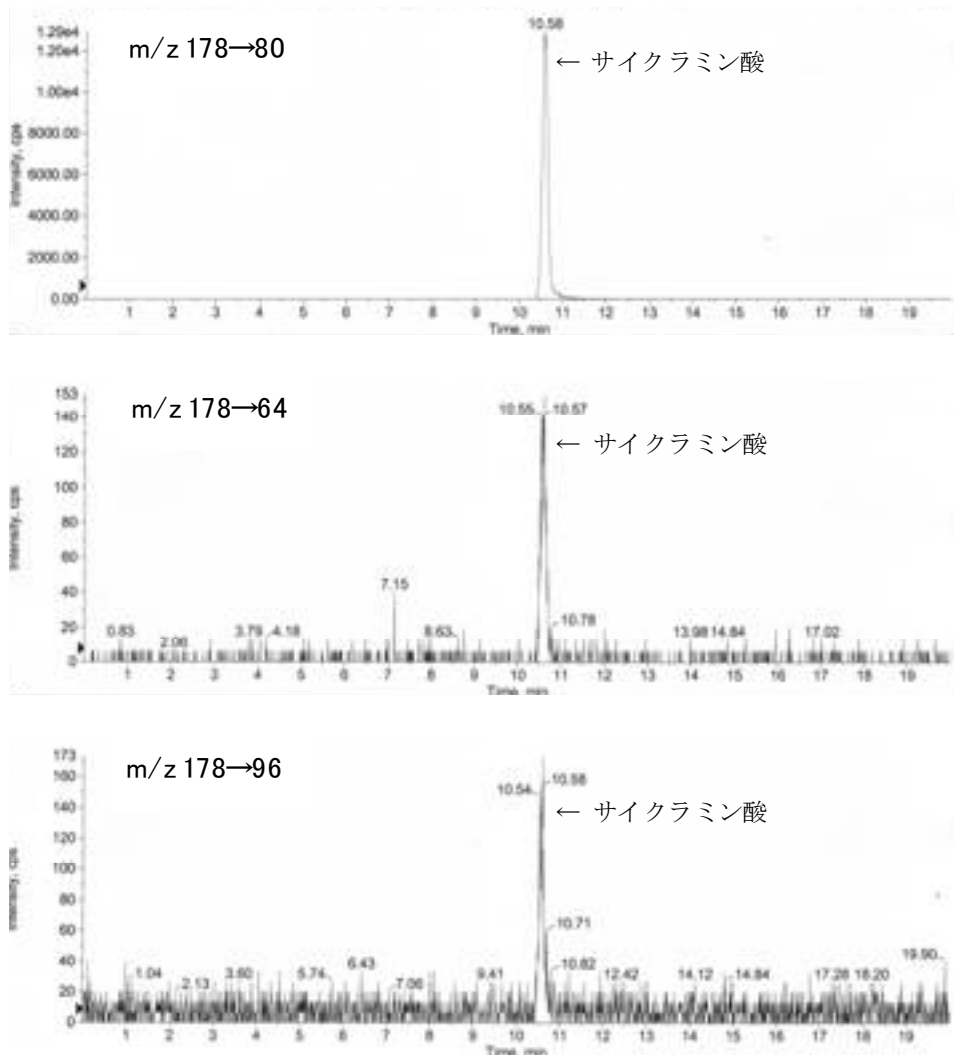


図1 0.1µg/mLのサイクラミン酸標準溶液におけるMRMクロマトグラム

サイクラミン酸は、負イオンモードにおいてのみ感度があり、Q1として、分子イオンである[M-H]⁻(m/z 178)が採取できた。これをもとにQ3を生成させたところ、m/z 80、64、96のイオンが採取できた。しかし、m/z 64、96はm/z 80の1/80程度の強度しかなく、定量には不向きであった。そのため、定量にはm/z 80を用い、m/z 64、96は確認用とした。

最適化されたMS/MS条件を用いて、移動相を0.1%ギ酸-メタノール(95/5%から5/95%のグラジエント)とし、サイクラミン酸の検出を試みた。0.1µg/mLの標準溶液におけるMRMクロマトグラムを図1に、検量線を図2に示す。検量線は、 $r^2=1.00$ であり、また、乖離度についても-6.9~3.7%と良好であった。検出下限は、0.005µg/mLでS/N比10以上であったことから、0.005µg/mLとした。

2) 精製法の検討

精製法の検討は、2009年度の検査方法[1](従来法とする)に用いたSep Pak tC₁₈ + Bond Elute SAXカートリッジカラムおよびOasis HLBカートリッジカラムの2種類

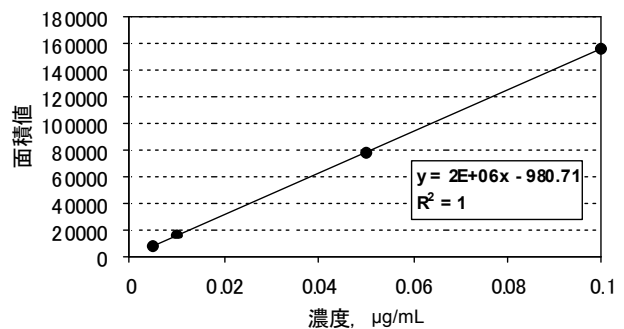


図2 サイクラミン酸の検量線(0.005-0.1µg/mL)

で行った。

定量にLC/MS/MSを用いることを前提に分析方法を構築するため、塩素化の必要がなく、精製後の溶液をLC/MS/MSに直接注入することになる。従来法においては、Sep Pak tC₁₈ + Bond Elute SAXカートリッジカラムからの溶出に塩酸溶液(1→100)を使用している。今回用いたイオン源はESIであり、イオン化の原理上、揮

発性の酸および塩は、使用できない。そこで、塩酸溶液(1→100)の代替として、移動相に用いた揮発性のギ酸を0.1%および1%の2濃度で検討した。

Bond Elute SAXのようなイオン交換系のカートリッジカラムを用いる場合は、サイクラミン酸の性質上、酸を使用する必要があり、必ず上記の問題が生じてくる。そこで、他の種類のカートリッジカラムも同時に検討することとした。松本ら[4]は、LC/MS/MSによる確認を行うためにOasis HLBカートリッジカラムを用い、良好な結果を得ている。そこで、Oasis HLBカートリッジカラムを用いることとした。

ここで検討したカートリッジカラムのコンディショニング法、溶出溶液ならびにその溶出液量については、既存の報告[1,4]があることから、それらの条件を踏襲した。そのため、ここでは実際のマトリックス存在下で十分な回収率が得られるかを検証した。

カートリッジカラムの検討に用いた溶液は、従来法に従って抽出したさきいか、ビスケット、チョコレートの抽出液を10mL採取し、10 μ g/mLのサイクラミン酸標準溶液を1mL添加したものである。

それぞれのカートリッジカラムについて回収率を求めた。Sep Pak tC₁₈ + Bond Elute SAXカートリッジカラムでは、1%および0.1%ギ酸のいずれにおいても、回収されなかった。従来法で用いた塩酸溶液(1→100)は濃度に換算すると約0.3%となる、検討したギ酸濃度では、回収されなかったことから、ギ酸1%においても塩酸約0.3%より、弱いと考えられ、回収するためにはギ酸の濃度を高くする必要があると考えられた。

Oasis HLBカートリッジカラムでは、1回の試行においてさきいかで94%、ビスケットで80%、チョコレートで77%であった。検討したすべてにおいて75%以上の回収率が得られ、良好な結果であった。

これらの結果から、精製には、Oasis HLBカートリッジカラムを用いることがよいと考えられた。

3) 添加回収試験

先の精製法の検討において結果が良好であったOasis HLBカートリッジカラムを用いて、添加回収試験を行った。

従来法において、食品によって、回収率が大きく異なり、特に漬物類において、漬物の種類で異なったことから、試料として漬物類を中心にビスケット、チョコレート、さきいか、ワイン、キャベツの酢漬、たくあん漬、しば漬、なら漬、キムチを用いた。

添加回収試験は、試料10gないし5gに対し、2.5 μ gのサイクラミン酸を添加し、上述の方法に従って行った。

添加回収試験の結果を表2に、また、ビスケットおよびチョコレートのMRMクロマトグラムを図3に示す。

回収率は、しば漬(69.8%)、なら漬(57%)を除く7食品でさきいかの70.8%からキムチの97.7%と妥当な回収率範囲(70–120%)に含まれた。また相対標準偏差(CV%)は10%以下であり、良好な結果が得られた。MRMクロマトグラムでは、ビスケットにおいて、サイクラミン酸以外のピークは見られず、LC/MS/MSの選択性の高さが伺われた。他の食品においてもチョコレート以外は同様のMRMクロマトグラムが得られた。チョコレートにおいては、図3に示すように、サイクラミン酸のピークより少し早い保持時間を持つピークが見られた。定量の妨害にはならないが、同定を間違わないように、保持時間および確認イオンの有無を確認する必要があった。

表2 サイクラミン酸の回収試験結果

食品名	回収率, %	CV%
ビスケット	79.5 \pm 4.8	6.0
チョコレート	94.6 \pm 4.5	4.8
さきいか	70.8 \pm 2.1	3.0
ワイン	85.2 \pm 5.2	6.1
キャベツの酢漬	79.6 \pm 3.1	3.9
しば漬	69.8 \pm 3.4	4.8
たくあん漬	93.3 \pm 3.8	4.1
なら漬	57.0 \pm 1.8	3.2
キムチ	97.7 \pm 2.6	2.7

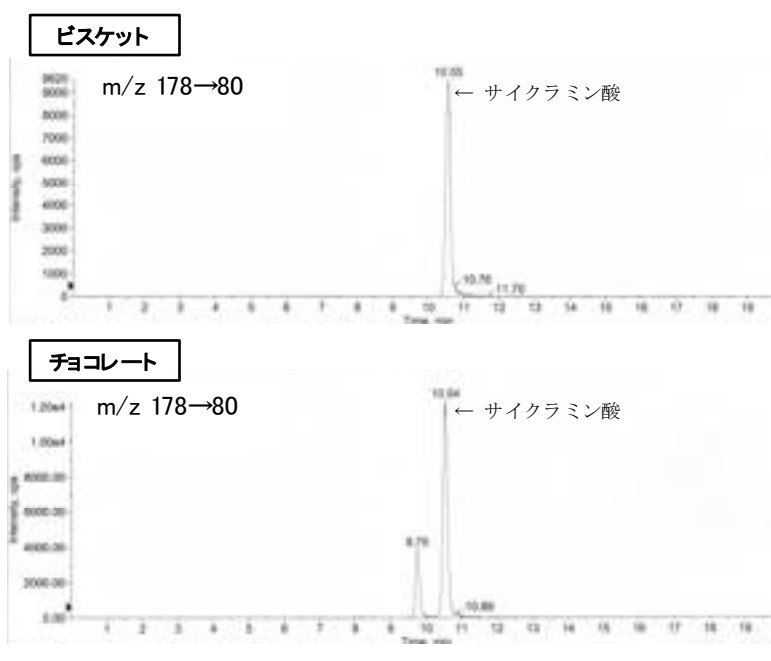


図3 ビスケットおよびチョコレートにおけるサイクラミン酸回収試験のMRMクロマトグラム

4) 従来法との比較

LC/MS/MS使用を前提に構築した今回の方法において、いくつかの種類の異なる食品における回収試験で良好な結果が得られた。この結果を、従来法と比較するために、平均回収率およびばらつきをもとに図4を作成した。従来法で使用した食品と改良法で使用した食品は、同一の試料ではないが(従来法と改良法で同じビスケットと書かれていても同一の試料ではない)、傾向を把握するには十分であると考ええる。

従来法において12の食品について添加回収試験を行っているが、妥当な添加回収率範囲に入るものは、5食品のみであり、これらの平均回収率は80~110%と良好であった。残りの7食品は70%以下であり、漬物類はすべて含まれた。また、CV%は、10%以上の食品がいくつか見られた。

これに対して、改良法においては、9食品のうち、妥当な添加回収率範囲(70-120%)内に7食品、平均回収率が69.9%であったしば漬を含めると8食品で良好な結果が得られた。CV%は10%以下であった。

従来法を行った12食品の平均回収率の範囲は、しょう油漬の23.0%からキャンディの109.1%であったのに対して、改良法では検討した9食品のなら漬の57.0%からキムチの97.7%と狭い範囲に収まった。しかし、漬物類で比較すると、従来法では23.0-62.4%の範囲であったのに対して、改良法では57.0%-97.7%であり、改良法で回収率は高くなっているが、範囲の幅に大きな差

は見られなかった。このことから、漬物類に関しては、漬物の種類によって回収率が異なるものと考えられた。

5) 分析方法の構築

以上の結果より、構築した改良法を従来法と合わせて、図5に示す。従来法と比較して改良法は、添加回収率が高く、繰り返し試験に対する安定性に優れていた。改良法の装置における検出下限は、0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、これを試料換算し、定量下限を求めると0.013 $\mu\text{g}/\text{g}$ となる。通知法の定量下限が $5\mu\text{g}/\text{g}$ であることから、改良法の試験溶液を100倍に希釈することが可能である。種々の夾雑物が抽出されるものと考えられる加熱抽出法を用いていること、精製法においてもOasis HLBのみであることなどを考えると、LC/MS/MS装置への負担は大きいものと考えられる。この負担を低減するためにも、LC/MS/MSが高感度であることを利用して、試験溶液を100倍に希釈し、種々の食品に対応することが望ましい。

IV まとめ

種々の食品からのサイクラミン酸分析において、従来法では、食品による回収率のばらつきがみられ、より食品によるばらつきがない方法への改良を試みた。LC/MS/MSを適用することで、従来法の塩素化の工程を省き、迅速化を可能とした。

精製法について検討を行い、Oasis HLBを用いるこ

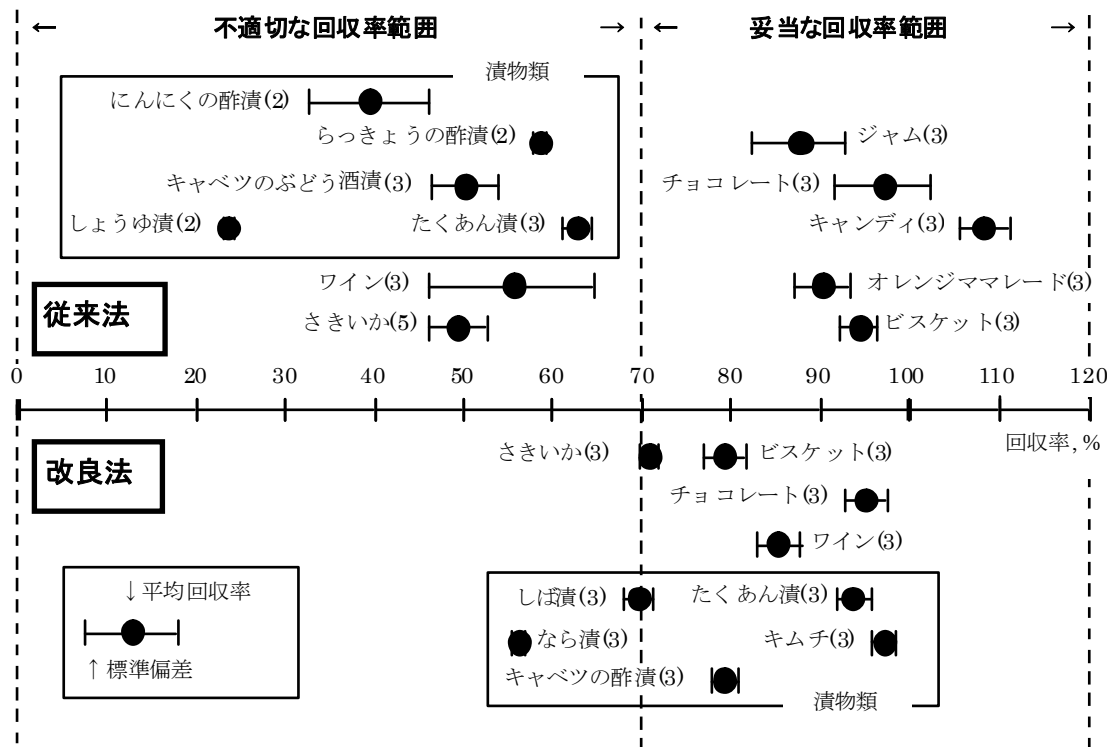


図4 従来法と改良法の各食品に対する添加回収試験における平均回収率および標準偏差の比較 ()内は、添加回収試験の回数

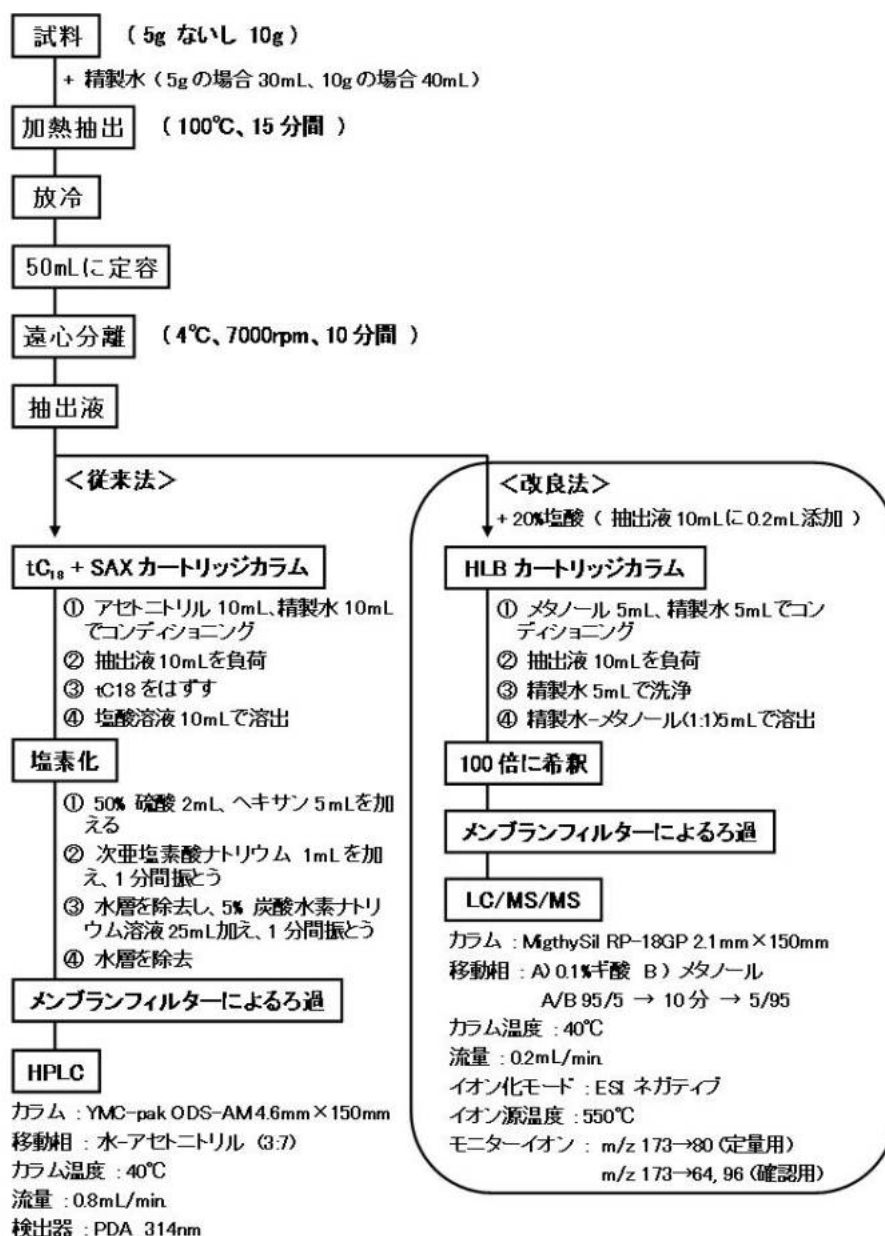


図5 従来法および改良法の概要

とで、マトリクスの存在下においても良好な回収率が得られた。改良法として、加熱抽出→Oasis HLBによる精製→LC/MS/MSによる定量を構築し、種々の食品について添加回収試験を行ったところ、従来法と比較して、回収率は良好であり、食品による回収率のばらつき、繰り返し試験のばらつきも小さくなり、良好な結果が得られた。

参考文献

- 1) 厚生労働省. サイクラミン酸に係る試験法. 食安監発第0829009号 2003.
- 2) 中里光男, 斉藤和夫, 石川ふさ子, 藤沼賢司, 守安貴子, 二島太郎. 高速液体クロマトグラフィー

による食品中のサイクラミン酸の分析. 食品衛生学雑誌 1993; 34: 248-253.

- 3) 松本ひろ子, 萩野賀世, 坂牧成恵, 粕谷陽子, 永山敏広. 電気伝導度検出器付きHPLCによる食品中サイクラミン酸の直接分析と7種甘味料の系統分析. 東京都健康安全研究センター年報 2005; 56: 153-156.
- 4) 松本ひろ子, 平田恵子, 坂牧成恵, 萩野賀世, 牛山博文. サイクラミン酸、ズルチンのHPLCによる定量及びLC/MS/MSによる確認と8種甘味料の系統的分析. 東京都健康安全研究センター年報 2008; 59: 129-135.