

LC-MSによるサイクラミン酸分析法の検討

山口瑞香* 尾花裕孝*

サイクラミン酸の分析法を高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC-MS)を用いて検討した。試料を透析し、透析外液を LC-MS を用いて測定した。妥当性評価の結果、良好な精度が得られた。本法は簡便で高感度な分析法であるため、サイクラミン酸の検査業務に有用であると考えられる。

キーワード: サイクラミン酸、透析、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計

Key words: Cyclamic acid, Dialysis, LC-MS

サイクラミン酸は別名チクロと呼ばれる砂糖の30倍の甘さをもつ人工甘味料である。発がん性の疑いがあり、日本では1969年から使用が禁止されているが、EU、中国では使用が許可されており、輸入食品から検出される事例がある。サイクラミン酸の試験法は複数報告されているが、平成15年8月29日に厚生労働省より試験法が通知された(以下、通知法)¹⁾。当所においても輸入食品中のサイクラミン酸の検査を実施しており、通知法の妥当性評価を行った。また、当所の検査精度向上を目的として分析法の検討を行ったので報告する。

実験方法

1 試料

過去に違反のあった食品を参考に大阪府内で市販されていた乾燥プルーン、いちごジャム、らっきょう甘酢漬、米酢、穀物酢、リンゴ酢、バルサミコ酢、レモンティーおよびピクルスを用いた。

2 試薬等

2-1 標準品

サイクラミン酸は東京化成(株)製を用いた。

2-2 試薬等

・アセトニトリル、ぎ酸、メタノール：和光純薬工業(株)

製高速液体クロマトグラフ用試薬

・塩化ナトリウム、酢酸、炭酸水素ナトリウム：

和光純薬工業(株)製試薬特級

・塩酸、硫酸：和光純薬工業(株)製有害金属測定用

・n-ヘキサン：和光純薬工業(株)製残留農薬分析用

・水：ミリポア社製MQ-Advantageにより精製して用いた。

・次亜塩素酸ナトリウム溶液：化学用、有効塩素5.0%以上

・透析膜：和光純薬工業(株)製Dialysis Membrane, Size 36

・固相抽出カラム：Waters Sep-Pak tC18 Environment

900 mg(ODS)、Varian Bond Elut SAX 500 mg/3 mL(SAX)

・硫酸溶液：硫酸を水で2倍に希釈した。

・次亜塩素酸Na試液：次亜塩素酸ナトリウム溶液を水で2倍に希釈した。

・5%炭酸水素Na溶液：炭酸水素ナトリウム50gを水に溶かして1Lとした。

・塩酸溶液：塩酸を水で100倍に希釈した。

3 装置

(株)島津製作所製Prominence UFLCおよびLCMS-2020を用いた。

4 測定条件

4-1 LC-MS条件

分析カラム：ジーエルサイエンス(株)製Inertsil ODS-4 (2.1×100 mm, 3 μm)

カラム温度：40°C、流速：0.2 mL/min、注入量：5 μL

移動相：0.1%ぎ酸水溶液/アセトニトリル (92 : 8)

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Determination of Cyclamic acid in Processed foods Using
Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

by Mizuka YAMAGUCHI, Hirota OBANA

イオン化モード：ESI(-)、測定モード：SIR、測定イオン：
m/z=178

4-2 HPLC 条件

分析カラム：ジールサイエンス(株)製 Inertsil ODS-4
(4.6×150 mm, 5 μm)

カラム温度：40℃、流速：1 mL/min、注入量：10 μL

移動相：水/アセトニトリル (3 : 7)

測定波長：314 nm

5 試験溶液の調製

5-1 通知法

・抽出

厚生労働省通知¹⁾に従い実施した。試料 10 g をそのまま、あるいは細切後、水 40 mL を加えて沸騰水浴中で 15 分間加熱した。冷却後、水を加えて 100 mL とした後、3,000 rpm、5 分間遠心分離を行った。上澄液をろ紙でろ過し、抽出液とした(以上までの操作で得られた抽出液を誘導体化し、分析する方法をスクリーニング法とする)²⁾。

・精製

SAX カラムの上に ODS カラムを連結し、メタノール 10 mL および水 10 mL でコンディショニング後、抽出液 10 mL を負荷した。水 10 mL で洗浄後、ODS カラムを除去し、SAX カラムから塩酸溶液 10 mL でサイクラミン酸を溶出して精製液とした。

・誘導体化

抽出液および精製液各 10 mL に硫酸溶液 2 mL、n-ヘキサン 5 mL および次亜塩素酸 Na 試液 1 mL を加えて 1 分間振とう後、3,000 rpm、5 分間遠心分離した。n-ヘキサン層を分取し、5%炭酸水素 Na 溶液 25 mL を加えて 1 分間振とう後、3,000 rpm、5 分間遠心分離した。n-ヘキサン層を分取し試験溶液とした。この試験溶液を HPLC にて測定した。

5-2 検討法

試料 10 g をそのまま、あるいは細切後、透析膜に充填し、塩化ナトリウム 2 g および水を加え、透析膜を密封した。これを 500 mL のビーカーに吊るし、全量 500 mL となるよう水を加え、一晚攪拌、透析を行った。この透析外液を試験溶液とし、LC-MS を用いて測定を行った。

6 検量線

標準品 50 mg を秤量し、水で溶解して全量を 50 mL とし標準原液とした(1000 μg/mL)。LC-MS 測定では標準原液を水で希釈し、0.05、0.1、0.2、0.5 μg/mL の検量線用標準溶液を作成した。HPLC 測定では 5、10、20、30 μg/mL 検量線用標準溶液を作成し、各々 10 mL を上記方法で誘導体化し、検量線用標準溶液とした。

結果および考察

1 通知法の確認

通知法の検出限界は 5 μg/g とされているため、試験溶液中の検出限界濃度である 5 μg/mL 検量線用標準溶液を用いて測定条件の検討を行った。上記の HPLC 条件で検出限界値のピークは確認可能であった。また、検量線は 5~30 μg/mL の範囲で $r^2=0.995$ 以上の直線性が得られた。よって HPLC/UV による通知法の測定は可能であった。

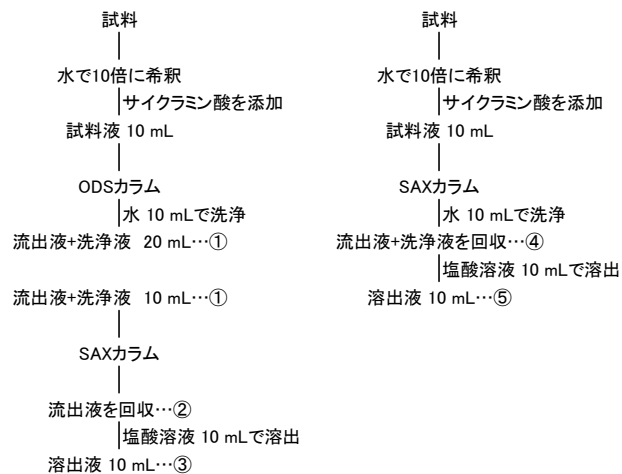
厚生労働省通知に従い、乾燥プルーン、いちごジャム、米酢およびらつきょう甘酢漬け各 5 検体にサイクラミン酸が 20 μg/g となるよう添加し、添加回収試験を実施した。米酢を除き、通知法およびスクリーニング法の平均回収率は 89~106%、相対標準偏差(RSD)は 6%以下であった(Table 1)。米酢は通知法の精製過程で回収率が低下し、ばらつきも大きくなった。しかし、その他の試料では良好な結果が得られた。スクリーニング法で得られた抽出液は、誘導体化時に糖分の多い試料ではエマルジョンができやすく回収できた n-ヘキサンの量が減少したが、定量結果に差は認められなかった。以上の結果より、米酢以外は通知法およびスクリーニング法での分析が可能であることが確認された。また、抽出液を希釈し、上記 LC-MS 条件により測定した結果、同様の回収率および RSD であった(Table 1)。

2 食酢の通知法での回収率低下原因の解明

通知法を用いた米酢の添加回収試験の結果、5 検体での平均回収率が 41%であった。低回収率であった原因を確認するため、4%酢酸水溶液、米酢、穀物酢およびリンゴ酢を用いて原因を調査した(Scheme 1)。各試料を 10 倍に希釈後、サイクラミン酸を添加し、10 mL を ODS カラムに負荷した。ODS カラムを水 10 mL で洗浄し、流出液および洗浄液を合わせて回収した(試験液①)。この液 10 mL を SAX カラムに負荷し、流出液を回収した(試験液②)。SAX カラムから塩酸溶液 10 mL でサイクラミン酸を溶出した(試験液③)。ま

た、10 倍に希釈してサイクラミン酸を添加した試料 10 mL を SAX カラムに負荷後、水 10 mL で洗浄し、流出液および洗浄液を合わせて回収した(試験液④)。さらに SAX カラムから塩酸溶液 10 mL でサイクラミン酸を溶出した(試験液⑤)。上記操作で得られた SAX カラムからの流出液(試験液②、④)にサイクラミン酸は認められなかった。また、SAX カラムのみで前処理した 4 試料の溶出液(試験液⑤)は良好な回収率であった。しかし、米酢および穀物酢の ODS カラムからの流出液および洗浄液はサイクラミン酸の回収率が 20%以下であった(試験液①)。よってこの流出液および洗浄液を SAX カラムに負荷し、得られた溶出液においても同程度の回収率であった(試験液③)。4%酢酸およびリンゴ酢では ODS カラムからの流出液および洗浄液(試験液①)のサイクラミン酸の回収率は 70%以上であった。増田ら³⁾は、通知法で使用される ODS カラムでは食酢を精製することによりサイクラミン酸がカラムに吸着することを報告している。今回用いた食酢も同様の現象が起きたものと考えられた。よって、食酢ではカラム精製を行わなくても良好な回収率が得られるスクリーニング法等による分析が望ましいと考えられる。

Scheme 1



3 検討法の前処理方法の検討

通知試験法では試料を沸騰水浴中で加熱抽出し、固相抽出カラムで精製後、誘導体化して HPLC/UV にて測定を行う。この方法は加熱操作や強酸、有機溶媒を用いた誘導体化が必要なため煩雑で危険性が高い。また、固相抽出カラムでの精製では 2 種類のカラムを使用する等煩雑であり、米酢等、試料によっては良好な回収率が得られなかった。そこで、より安全かつ簡便な前処理方法の検討を行った。加熱抽出では糖分の多い試料等では抽出液を遠心分離しても残渣が多く、固

相抽出カラムの目詰まりの原因となる場合があった。残渣を減らすため、衛生試験法で用いられている透析による抽出を行うこととした⁴⁾。透析膜内に試料とともに塩化ナトリウムを加えることによりサイクラミン酸を効率良く透析することが可能であった。透析外液は通知法の抽出液より希釈されており、誘導体化・HPLC/UV では測定できなかった。しかし、LC-MS を用いることにより十分な感度が得られた。これにより煩雑な固相抽出カラムでの精製および誘導体化を行わずにサイクラミン酸を分析することが可能となった。

4 LC-MS 条件の検討

サイクラミン酸は酸性化合物であり、ESI でのイオン化では $[M-H]^-$ が最も高感度に検出された。また、高極性化合物であるため移動相にぎ酸を添加し、pH を低下させ、カラムへの保持を行った。これにより保持時間約 5 分に良好なピーク形状のサイクラミン酸が確認できた(Fig. 1)。

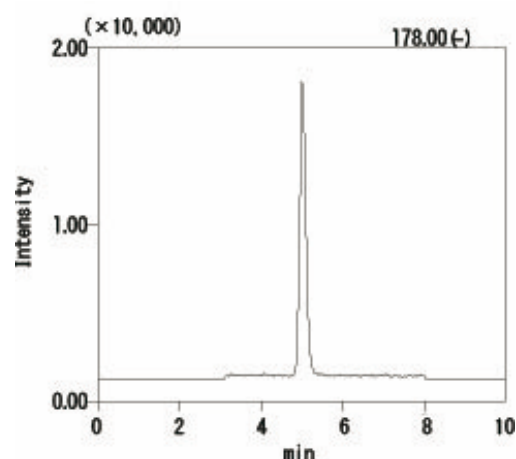


Fig. 1. サイクラミン酸クロマトグラム(0.05 g/mL)

5 LC-MS 測定における検量線および定量限界

0.05~0.5 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製し、絶対検量線を作成した。決定係数(r^2)=0.999 以上の良好な直線性が得られた。

定量限界は、サイクラミン酸通知試験法の検出限界である 5 $\mu\text{g/g}$ とした。

6 添加回収試験

あらかじめサイクラミン酸が含有していないことを確認した乾燥プルーン、いちごジャム、米酢、バルサミコ酢およびらっきょう甘酢漬各 5 検体にサイクラミン酸を 5、20 $\mu\text{g/g}$ 添加し、添加回収試験を実施した。平均回収率は 86~115%で、相対標準偏差は 5%以下と良好な結果が得られた(Table 2)。また、ピクルス、レモンティーを用いて試験法の

参考文献

- 1) 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、食安監発第 0829009 号
- 2) 食品衛生検査指針 食品添加物編 2003 p580-585
- 3) 増田治樹、佐想善勇（姫路市環境衛生研究所）：食酢のサイクラミン酸分析について、平成 22 年度 地方衛生研究所 全国協議会 近畿支部理化学部会研修会 講演要旨集
- 4) 衛生試験法・注解 2010 p385-361
- 5) 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、食安発 1224 第 1 号

妥当性評価を行った。各試料にサイクラミン酸を 5、20 µg/g 添加し、試験者 1 名が 2 併行で 5 日間試験を実施した。平均回収率は 94～96%、併行精度は 4%以下、室内精度は 7%以下と良好な結果が得られた。通知法では精度管理で 20 µg/g での添加回収率を求めているが、サイクラミン酸は検出されてはならない添加物であり、検出限界が 5 µg/g と定められているため 5 µg/g での試験法の評価も行った。乾燥プルーンではばらつきが大きく、バルサミコ酢では回収率が 100%以上であったが、農薬等の試験法妥当性評価ガイドライン⁵⁾の目標値を満たしていたため、本試験法は十分な定量精度があると考えられる。

Table 1. 通知法添加回収試験結果 (n=5) 単位：%

	通知法		スクリーニング法	
	回収率	RSD	回収率	RSD
乾燥プルーン	89	3	106	3
イチゴジャム	90	6	98	3
らっきょう甘酢漬	91	1	94	5
米酢	41	67	95	3
スクリーニング-MS法				
	回収率	RSD (%)		
乾燥プルーン	94	3		
イチゴジャム	101	2		
らっきょう甘酢漬	91	3		
米酢	99	2		

Table 2.

検討法添加回収試験結果 (n=5) 単位：%

	添加濃度 5µg/g		添加濃度 20µg/g	
	回収率	RSD	回収率	RSD
乾燥プルーン	86	5	89	1
イチゴジャム	97	1	94	1
らっきょう甘酢漬	97	2	95	2
米酢	90	1	99	2
バルサミコ酢	115	1	98	1

検討法室内併行精度試験結果 (n=2, 5days)

	レモンティー		ピクルス	
	5µg/g	20µg/g	5µg/g	20µg/g
回収率	96	96	95	94
併行精度	1	2	4	2
室内精度	6	4	7	4

7 まとめ

以上より、本検討法は簡易で十分な定量精度が得られることから、日常分析法として利用できると考えられる。