

LC-MS による食品中の保存料 8 種類の分析

山口瑞香* 梶村計志*

保存料は、食品の腐敗や変質の原因となる微生物の増殖を抑制する目的で、加工食品およびその原材料の製造時に使用されている。保存料が使用される食品は多種多様であることから、測定時に保存料と妨害成分の分離が困難になる場合があった。

今回、当所にて検査を行っている保存料 8 種類の高速液体クロマトグラフィー／質量分析計 (LC-MS) を用いた分析方法について検討を行った結果、一斉分析が可能となった。

キーワード: 保存料、水蒸気蒸留、高速液体クロマトグラフィー／質量分析計

Key words: preservative, steam distillation, LC-MS

保存料は、食品の腐敗や変質の原因となる微生物の増殖を抑制する目的で、加工食品およびその原材料の製造時に使用されている。

当所では、食品への使用が許可されている保存料の安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類を対象とした検査を実施している。分析は水蒸気蒸留による抽出および HPLC 測定により行われているが、保存料が使用される食品は多種多様であることから、測定時に保存料と妨害成分の分離が困難になる場合があった。そこで今回、選択性向上のために、8 種の保存料を対象とした高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いた測定法を検討した。

実験方法

1 試料

保存料が使用されていない炭酸飲料および寒天菓子を添加回収用試料、ソフトキャンディを実試料として用いた。

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課
Determination of Eight Preservatives in Food by LC-MS
by Mizuka YAMAGUCHI and Keiji KAJIMURA

2 試薬等

2-1 標準品

安息香酸(BA)、ソルビン酸(SOA)は和光純薬工業(株)製、デヒドロ酢酸(DHA)、パラオキシ安息香酸エチル(PHBA-Et)、パラオキシ安息香酸プロピル(PHBA-nPr)、安息香酸ブチル(PHBA-nBu)は関東化学(株)製、パラオキシ安息香酸イソプロピル(PHBA-iPr)、パラオキシパラオキシ安息香酸イソブチル(PHBA-iBu)は東京化成工業(株)製を用いた。

2-2 標準溶液等

標準品各 50 mg をメタノールで溶解し、全量を 50 mL とし標準原液を作成した(1,000 µg/mL)。各標準原液 10 mL を混合し、水で 100 mL として混合標準溶液を作成した(100 µg/mL)。

2-3 試薬等

メタノールは和光純薬工業(株)製 LC/MS 用および HPLC 用、ぎ酸は和光純薬工業(株)製 HPLC 用、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液は和光純薬工業(株)製容量分析用、硫酸アンモニウム、りん酸およびりん酸一カリウムは和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。フィルターは ADVANTEC DISMIC-13HP 0.2 µm を使用した。

3 装置

LC-MS は(株)島津製作所製 Prominence UFLC および LCMS-2020、HPLC は Waters 社製 alliance e2695、

2998 を使用した。

結果および考察

4 測定条件

4-1 LC-MS 条件

分析カラム：Supelco Ascentis Express C18 (2.1x150 mm、2.7 μ m)、カラム温度：40℃、流速：0.2 mL/min、注入量：5 μ L、移動相：A 液；0.05% 酸水溶液、B 液；メタノール、グラジエント条件：B 液 30%(0 min)→50%(10 min)→55%(21 min)→90%(23 min)。イオン化法：ESI、測定モード：SIR、DL 温度：250℃、ネブライザーガス流量(N₂)：1.5 L/min、ヒートブロック温度：200℃、ドライイングガス(N₂)：15 L/min、インターフェイス電圧：4.5 kV、各物質の条件は表 1 に示した。

表 1 保存料測定条件

	Target ion		Qualifier ion		Retention time (min)
	+/-	m/z	+/-	m/z	
BA	-	121			8.4
SOA	+	113	+	114	8.4
DHA	+	169	+	170	7.9
PHBA-Et	-	165	+	167	11.9
PHBA-iPr	-	179	+	181	15.6
PHBA-nPr	-	179	+	181	16.6
PHBA-iBu	-	193	+	195	22.7
PHBA-nBu	-	193	+	195	23.5

4-2 HPLC 条件

分析カラム：GL Sciences Inertsil ODS-4 (4.5x150 mm、5 μ m)、カラム温度：40℃、流速：1 mL/min、注入量：20 μ L、移動相：A 液 25 mmol/L リン酸緩衝液 B 液 メタノール、グラジエント条件：B 液 5%(0 min)→25%(8 min)→60%(10 min)→60%(21 min)→90%(25min)→90%(26 min)、測定波長：BA235nm、DHA305nm、その他 255nm。

5 試験溶液の調製

厚生労働省通知¹⁾(通知法)を参考に一部を変更して実施した。試料 10 g を採取し、硫酸アンモニウム 100 g および 10%りん酸水溶液 10 mL とともに 1 L の丸底フラスコに移した。水蒸気蒸留を行い、留液が 480 mL 程度になったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に 500 mL とした。この留液をフィルターろ過して試験溶液とした。

1 LC-MS 条件の検討

通知法を参考にイオン化法は ESI を使用し、感度が最も良好であったイオンを選択した。

一般的に、保存料の HPLC 測定には ODS 系の逆相カラムが使用される。しかし、MS 分析に用いられる移動相では DHA のピークがテーリングし、良好なクロマトグラムが得られない場合があった²⁾。そこで複数のカラムを検討した結果、Fused-Core カラムの Ascentis Express C18 では良好なピーク形状が得られた。このカラムを用い、移動相、グラジエント条件を検討した。PHBA-nPr および-iPr、-nBu および-iBu は異性体であるため保持時間により識別しなければならない。移動相にメタノールを使用し、グラジエントの勾配を緩やかにすることにより分離することができた。よって、8 種の保存料を同時に測定することが可能となった(図 1)。

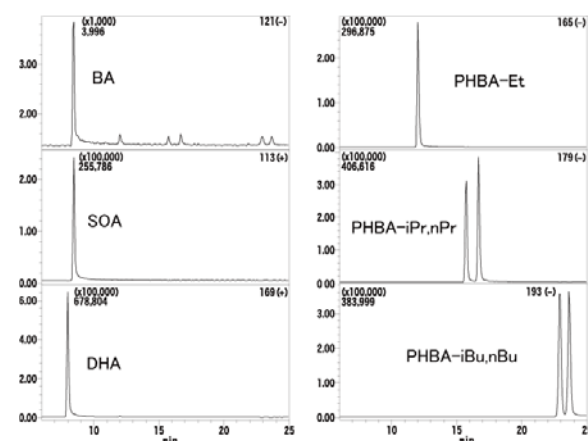


図 1 保存料のクロマトグラム(10 μ g/mL)

2 検量線および定量下限

本法の定量下限(S/N $\geq$ 10)は BA、SOA、DHA は 0.01 g/kg、PHBA エステル類は 0.005 g/kg とした。検量線は、BA は 0.2~10 μ g/mL、SOA および DHA は 0.1~10 μ g/mL、PHBA エステル類は 0.1~5 μ g/mL の範囲で相関係数 0.99 以上の良好な直線性が得られた。

3 添加回収試験

保存料が使用されていない炭酸飲料および寒天菓子を用いて添加回収試験を実施した。各試料に混合

標準溶液を 20 µg/g となるよう添加し、それぞれ 5 併行で上記方法にて分析を実施した。表 2 に示した良好な結果が得られた。

表 2 添加回収試験結果

	炭酸飲料		寒天菓子	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
BA	95	3.0	88	7.4
SOA	97	1.4	86	6.0
DHA	86	4.4	81	1.8
PHBA-Et	91	4.4	88	5.1
PHBA-iPr	90	3.0	96	2.7
PHBA-nPr	89	2.7	93	2.1
PHBA-iBu	89	1.8	92	2.4
PHBA-nBu	93	2.1	91	1.3

4 実試料での分析例

ソフトキャンディを上記 HPLC 条件で測定したところ、PHBA-iBu と同一保持時間にピークが検出された。このピークが PHBA-iBu であるかを、検討した LC-MS 条件で確認した。その結果、LC-MS では検出されず、PHBA-iBu ではないと確認できた。LC-MS 測定によって選択性が向上し HPLC で分離が不十分であったピークが妨害成分であると確認できた。

5 まとめ

LC-MS を用いた食品中の保存料分析法を検討した。Ascentis Express C18 を用いることにより良好なピーク形状のクロマトグラムが得られた。LC-MS により、実試料の妨害成分を保存料と分離して測定することができた。本法は保存料の分析に利用可能と考えられる。

参考文献

- 1) 平成 22 年 5 月 28 日付け食安基発 0528 第 3 号「食品中の食品添加物分析法」の改正について
- 2) 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, 食品衛生学雑誌, 54, 204-212 (2013)