

短報

ポリソルベート分析における飛行時間型
高速液体クロマトグラフ質量分析計
(LC/TOFMS) を用いた確認法の検討

関戸 晴子, 田中 由紀子, 清水 碧, 岸 弘子

Examination of the confirmatory method
using Liquid Chromatography/Time
of Flight Mass in polysorbates analysis

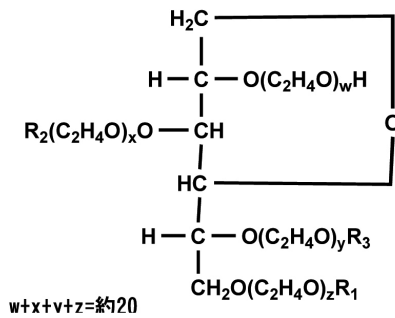
Haruko SEKIDO, Yukiko TANAKA, Midori
SHIMIZU and Hiroko KISHI

はじめに

ポリソルベート (PS) 類は現在、米国、EUをはじめとする諸外国で、乳化、分散化、可溶化剤としてケーキミックス、サラダドレッシング、ショートニングオイル、チョコレート等に広く利用されている。我が国でも平成20年4月30日に食品添加物としてPS20、60、65、80

が許可 (指定) された。しかし、EUで許可されているPS40は許可されていない (指定外)。これまではPSが検出されれば、種類や検出量にかかわらず、全てが違反とされていたが、現在では検出された場合には、正確な定量値はもとより指定外のPSとの判別が不可欠となっている。(図1)

現在の通知法¹⁾は、抽出液の精製が煩雑であるうえに、確認試験法としてのLC/MS法は、PSが構成脂肪酸の種類および結合数が異なる分子種の混合物のため、同一成分を含むものがあり、混合標準液の使用が困難で6種類の標準液を各々測定しなければならないこと、1回の分析時間に40分程度を必要とすること等から、測定が長時間に及んでいる。また、その他の食品に分類される検体の基準値は0.02g/kg (通知法の定量限界) であることから、LC/MS法における検出下限も低く設定しなければならない。建部ら²⁾の報告によると四重極型の質量分析装置 (LC/MS) を用いた場合のスキャン測定は100 μg/mL、SIM測定は5~10 μg/mLまで測定可能であった。通知法における定量限界は、試料液を濃縮しない場合は10 μg/mLとなることから、定量限界付近のPSが検出された場合は、スキャン測定とSIM測定の両方を実施しなければ確認できない可能性があり、測定に際し長時間を要する。通知に記載されている条件は、選択するPS類のSIMターゲットイオンを、ポリオキシエチレン基が



PS類	構成脂肪酸	分子式	精密質量
PS20	R ₁ =ラウリン酸 (CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-), R ₂ =R ₃ =H	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	1226.7598
PS40	R ₁ =パルミチン酸 (CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO-), R ₂ =R ₃ =H	C ₆₂ H ₁₂₂ O ₂₆	1282.8224
PS60	R ₁ =ステアリン酸 (CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO-), R ₂ =R ₃ =H またはR ₁ =パルミチン酸 (CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO-), R ₂ =R ₃ =H	C ₆₄ H ₁₂₆ O ₂₆	1310.8537
PS80	R ₁ =オレイン酸 (CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CO-), R ₂ =R ₃ =H	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	1308.8381
PS65	R ₁ =R ₂ =R ₃ =ステアリン酸 (CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-) またはR ₁ =R ₂ =R ₃ =パルミチン酸 (CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-)	C ₁₀₀ H ₁₉₄ O ₂₈	1843.3757
PS85	R ₁ =R ₂ =R ₃ =オレイン酸 (CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CO-)	C ₁₀₀ H ₁₈₈ O ₂₈	1837.3287

ただし、すべてのPSIにおいて上記は主たる脂肪酸を示し、他の脂肪酸も含む

図1 ポリソルベート(PS)の構造

20分子縮合したものに、ナトリウム 1 分子が付加したもの（ナトリウム (Na) 付加イオン）としているが、これは感度の高いものではない。そのため当所では、感度を担保するため定量限界付近でPSが検出された検体の確認時には、試料液を濃縮するなどの操作を実施し、ターゲットとしているNa付加イオンを測定している。

そこで今回、LC/MS法における測定時間の短縮とPS類の検出感度の改善に向けて、分析カラムの検討およびナトリウム付加イオン以外のターゲットイオンの検索を実施し、1回の測定でスキャンを行った上で、高い分解能によりマスペクトルの確認ができるLC/TOFMSを用いた確認法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

方 法

1. 試薬および試液

PS20,40,60,85：和光純薬工業株製（化学用）、PS65：株ワコーケミカル製、PS80は日油株製を使用した。メタノールはLC/MS用、その他の試薬はすべて特級品を使用した。

2. 標準溶液の調製

LC/MS用標準溶液：各PS50mgを精密に量り、メタノールに溶解して1.0mg/mLに調製した。更にメタノールで50 μ g/mL, 10 μ g/mLに希釈した。

3. 試料液の調製

通知法に準じた。すなわち試料を抽出溶媒で抽出し、アルミナカラム及びシリカゲルミニカラムでクリーンアップした後、試料液を作製した。LC/TOFMS測定には試料液を減圧濃縮しメタノールに溶解したものをを用いた。

4. 装置および測定条件

LC/TOFMS: Agilent社製 6230 Accurate-Mass TOF LC/MS システム

<LC条件>

条件1（通知法：Na付加イオン測定）

カラム：YMC Pack C8 S-5 (2.0 $\times$ 150mm 5 μ m

30nm)

移動相：0.1v/v%ギ酸溶液(A), 0.1v/v%ギ酸メタノール溶液(B),

グラジエント条件：A : B=50:50(0min)→30:70(5min)→1:99(25~35min)のリニア溶出グラジエント, 流速：0.2mL/min, カラム温度：40℃, 注入量：5 μ L

条件2（Na付加イオン測定）

カラム：Shim-pack XR-C8 (2.0 $\times$ 75mm 2.2 μ m 12nm),

移動相：0.1v/v%ギ酸溶液(A), 0.1v/v%ギ酸メタノール溶液(B)

A : B=50:50(0min)→30:70(1.5min)→1:99(8.9~13.3min)のリニア溶出グラジエント, 流速：0.45mL/min, カラム温度：40℃, 注入量：5 μ L

条件3（アンモニウム (NH₄) 付加イオン測定）

カラム：Shim-pack XR-C8(2.0 $\times$ 75mm 2.2 μ m 12nm),

移動相：5mM酢酸アンモニウム溶液(A), メタノール(B)

グラジエント条件, 流速, カラム温度, 注入量は条件2と同様

<MS条件>イオン化モード：ESI(+), VCap : 3500V, Fragmentor : 100V, Gas Temp : 350℃, Gas Flow : 10L/min, Nebulizer : 50psi, SheathGas Temp : 350℃, SheathGas Flow : 7.5L/min

リファレンスマス：121.0509 (Purine) および922.0098 (HP-0921：アジレントテクノロジー社製)

スキャン範囲：m/z300-2,000

ターゲットイオン：表1 参照（質量幅 $\pm$ 0.01Da）

結果及び考察

1. 通知法との比較

測定時間を短縮するため、まず分析カラムの変更を検討した。充填剤は通知法と同様のC8とし、高速分析用のカラムを選択した。ACQUITY UPLC BEH C8(2.1 $\times$ 50mm 1.7 μ m 13nm)とShim-pack XR-C8(2.0 $\times$ 75

表1 ターゲットイオン

PS類	Na付加イオン		NH ₄ 付加イオン		
	分子式	精密質量	分子式	精密質量	
指定	20	[C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆ +Na] ⁺	1249.7491	[C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆ +NH ₄] ⁺	1244.7937
	60	[C ₆₄ H ₁₂₆ O ₂₆ +Na] ⁺	1333.8430	[C ₆₄ H ₁₂₆ O ₂₆ +NH ₄] ⁺	1328.8910
	80	[C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ +Na] ⁺	1331.8273	[C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆ +NH ₄] ⁺	1326.8719
	65	[C ₁₀₀ H ₁₉₄ O ₂₈ +Na] ⁺	1866.3649	[C ₁₀₀ H ₁₉₄ O ₂₈ +NH ₄] ⁺	1861.4095
指定外	40	[C ₆₂ H ₁₂₂ O ₂₆ +Na] ⁺	1305.8117	[C ₆₂ H ₁₂₂ O ₂₆ +NH ₄] ⁺	1300.8563
	85	[C ₁₀₀ H ₁₈₈ O ₂₈ +Na] ⁺	1860.3179	[C ₁₀₀ H ₁₈₈ O ₂₈ +NH ₄] ⁺	1855.3625

mm 2.2 μ m 12nm)を用いて検討したところ、ACQUITY UPLC BEH C8はPS65, 85が検出できなかったため、Shim-pack XR-C8を採用することとした。

通知¹⁾および建部らの方法²⁾に記載されているカラムY

MC Pack C8 S-5を用いた方法(条件1)と、今回新たに選択したカラムShim-pack XR-C8を用いた方法(条件2)で測定した各標準液10 μ g/mLの保持時間と面積値を表2に示す。

表2 標準液10 μ g/mLにおける保持時間と面積値

PS類	条件1			条件2		条件3	
	YMC Pack C8			Shim-pack XR-C8			
	Na付加イオン		Na付加イオン		NH ₄ 付加イオン		
	保持時間	面積値	保持時間	面積値	保持時間	面積値	
指定	20	12.060	80631	3.691	258697	3.800	303307
	60	20.280	49215	6.132	210492	6.210	340491
	80	18.501	22735	5.689	106039	5.765	151340
	65	34.495	6038	13.231	7013	14.171	27867
指定外	40	17.698	171537	5.442	589460	5.527	967450
	85	32.990	17940	11.153	13464	11.647	47825

通知法では、1検体当たりの分析時間が40分程度かかっていたのに比べ、条件2では15分程度とかなりの時間を短縮することができた。また、PS6種類の分離も良く、ピーク的面積値もPS65, 85を除いた4種類は3~5倍増加した良好なクロマトグラムが得られた。

今回使用したShim-pack XR-C8は、PS6種類すべてを検出することができた。条件2の方法は、PS6種類が全て検出され、通知法とほぼ相違ない結果が得られたことから、測定時間の短縮には大変有用であると思われる。

2. ターゲットイオンの検討

通知法のSIMターゲットイオンは、ポリオキシエチレン基が20分子縮合したものに、ナトリウム1分子が付加した、Na付加イオンであるが、感度の高いものではないことから、移動相に酢酸アンモニウムを添加し、NH₄付加イオンをターゲットとした測定(条件3)を検討した。分析カラムは、条件2で使用したものを採用した。Fragmentor電圧等の条件は、Na付加およびNH₄付加イオンとも標準液のピーク強度が最大となるように最適化を行った。各標準液10 μ g/mLの保持時間及びピーク面積値を表2に示す。

NH₄付加イオンは、条件2で検出されたNa付加イオンよりも1.5~3倍高感度に検出された。PS65, 85においても面積値の増加が認められた。また、スペクトル上では1価のNH₄付加イオンのほかに2価のNH₄付加イオンも検出された。条件2よりもSN比は3倍に改善し、さらに高感度にPS6種類が検出されたことから、条件3を用いることにより、以前実施していた濃縮操作は必

要ないことが示唆された。

市販品への適用にあたり、当所で以前PSが検出されたコチュジャン(PS80検出, PS80として0.25g/kg)、カレースープ(PS60検出, PS80として0.22g/kg検出)、およびパスタソースにPS6種類を0.1g/kg添加したものについて、条件2および3を用いて測定を実施した。どちらの条件でも、検出されたPSおよび添加したPSを確認することができた。カレースープについて、各PS類(20,40,60,80,65,85)のマスキロマトグラムを図2, 4にマスペクトルを図3, 5に示す。図2においては、PS60に相当するNa付加イオンのピーク以外にPS40とPS65に相当するNa付加イオンのピークが確認されている。これは、PS60はステアリン酸の他にパルミチン酸(PS40の構成脂肪酸)を構成脂肪酸としているため¹⁾²⁾、PS40に相当するピークが確認されたものであり、試薬のPS60のマスキロマトグラムにも同様に確認された。PS65に相当するピークも、試薬のPS60から確認されていること、またPS60の試薬とよく似た検出パターンを示していることから、検出されたPSは、PS60であることが確認できた。図4においては、PS40およびPS65由来のNH₄付加イオンのピークは検出されなかったが、PS60の試薬からも同様に検出されず、検出パターンはよく似ていたことから、PS60であることが確認できた。

PS6種類を添加したパスタソースについては、NH₄付加イオン測定の方が、感度の良い良好な結果が得られた。感度改善が顕著に表れたPS65添加のパスタソースのマスキロマトグラムを図6, 7に示す。

NH₄付加イオン測定はNa付加イオンよりも感度良く

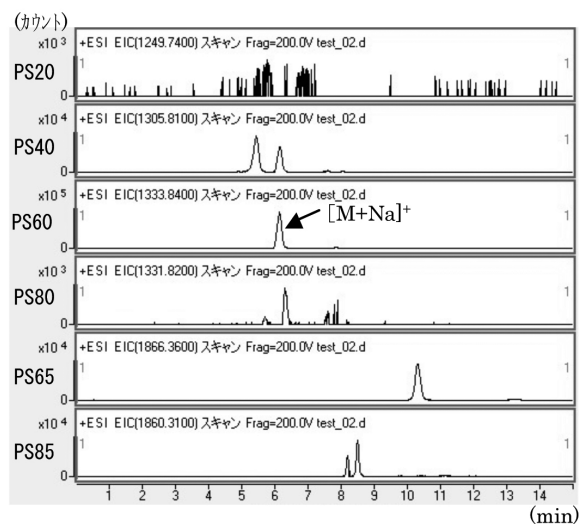


図2 PS検出のカレースープにおける各PS類のマスクロマトグラム (Na付加イオン)

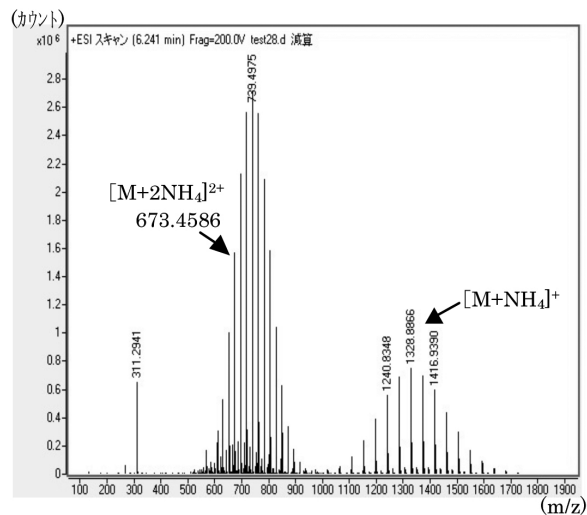


図5 PS検出のカレースープで確認されたPS60のピークの保持時間におけるマススペクトル

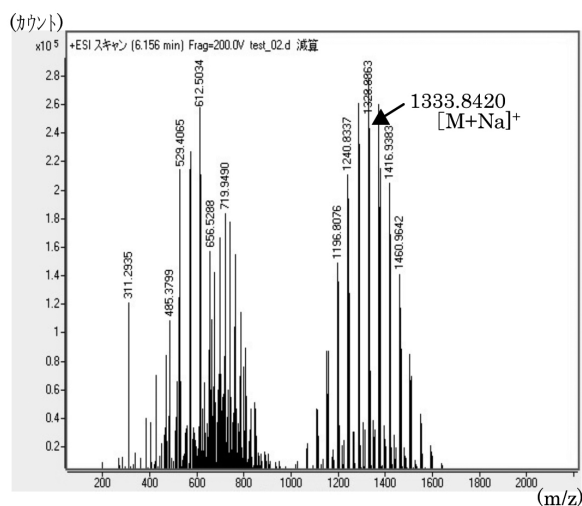


図3 PS検出のカレースープで確認されたPS60のピークの保持時間におけるマススペクトル

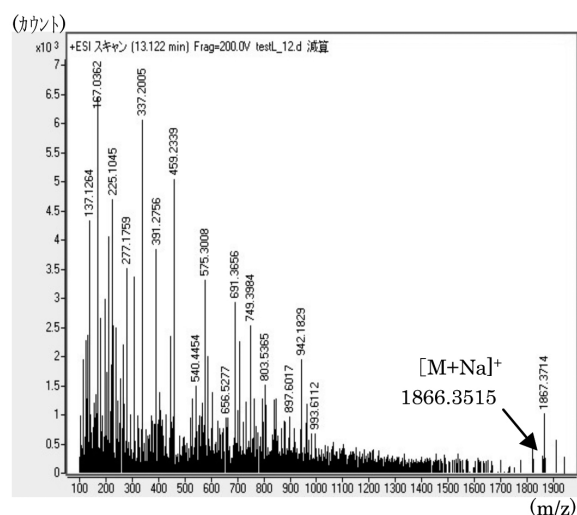


図6 PS65添加パスタソースのマススペクトル (Na付加イオン)

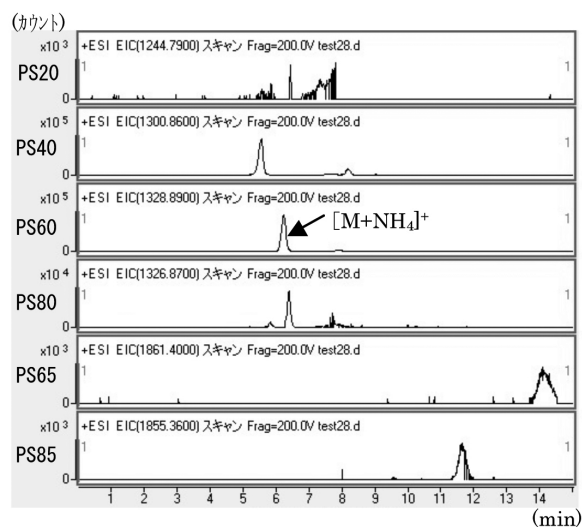


図4 PS検出のカレースープにおける各PS類のマスクロマトグラム (NH_4 付加イオン)

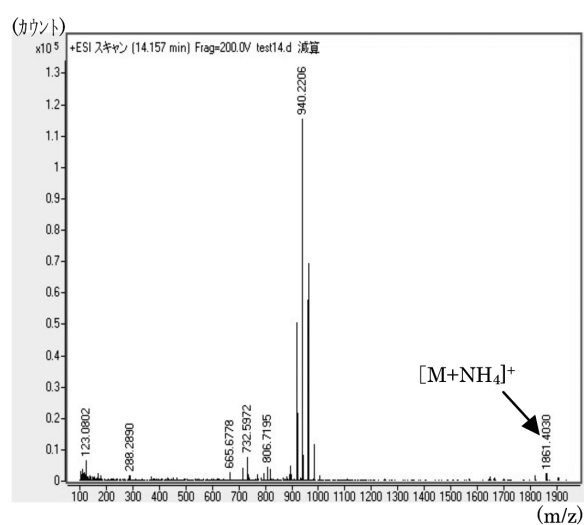


図7 PS65添加パスタソースのマススペクトル (NH_4 付加イオン)

確認できることから、定量限界付近の濃度の確認には、 NH_4 付加イオン測定の場合3が適していると思われた。

また、得られたマススペクトルから組成推定（相対質量誤差は $\pm 10\text{ppm}$ とした）を行ったところ、コチュジャンおよびカレーペーストについては、 Na 付加イオン、 NH_4 付加イオンともに組成式候補の上位3個以内にPS80およびPS60が提示された。ペーストソースにPS6種類を 0.1 g/kg 添加したものについては、PS65を除いた5種類について上位3個以内に添加したPS類が提示された。PS65を添加したものについては、 Na 付加イオンでは組成式候補は提示されず、 NH_4 付加イオンにおいて組成式候補の11個めに提示された。PS65標準液 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ において、得られたマススペクトルから組成推定を実施したところ、ペーストソースに添加したものと同様の結果を示した。PS65は、他のPS類と比べ、標準液においても測定で得られた精密質量と理論上（計算上）の精密質量との差が大きく、 Na 付加イオンでは $\pm 10\text{ppm}$ を超えていた。

以上の結果からPS類の確認は、PS類が混合物であり理論上（計算上）の成分がメインのピークではないこと等を考慮し、標準液との比較が必要不可欠であることが示唆された。

まとめ

ポリソルベート類の確認試験法としてのLC/MS法における測定時間の短縮と検出感度の改善に向けて、分析

カラムおよびターゲットイオンの検討を実施した。

装置にLC/TOFMSを用いることにより、1回のスキャン測定で、試料液を濃縮することなく、使用されている可能性のあるPS類のマススペクトルを確認することができた。また、得られたマススペクトルから組成式を推定し、PS類の標準液から得られたものと比較した結果、ほぼ一致し、ポリソルベート6種類の同定が可能であることが推測された。

カラムにShim-pack XR-C8($2.0\times 75\text{mm}$ $2.2\text{ }\mu\text{m}$ 12nm)、移動相に 5mM 酢酸アンモニウム溶液-メタノールを用いて、 NH_4 付加イオンをターゲットイオンとしたところ、通知法よりも分析時間が短縮でき、且つ感度良くPS類を確認することが可能であった。

今回のLC/TOFMSを用いた確認法は、通知法と比べて測定時間が短縮され、検出感度も上昇し、組成推定も可能であったことから、日常の行政検査において、大変有用な確認法で適用可能であると思われた。

(平成26年8月1日受理)

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知「食品中の食品添加物分析法」の改正について（食安基発第0430001号、平成20年4月30日）
- 2) 建部千絵他：LC/MSによるポリソルベート類の分析、日本食品化学学会誌、15(3)、129-134（2008）