

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品添加物の安全性確保のための研究 平成 29 年度分担研究報告書

食品添加物公定書一般試験法の改良に関する調査研究
ローズマリー抽出物 JECFA 規格案の GC-MS 分析法の検証

研究分担者 多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部室長

研究要旨 食品添加物公定書一般試験法の改良に向けた検討を行うため、前年度、FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会(JECFA)規格や米国のFood Chemicals Codex (FCC)等に記載があり公定書の一般試験法では採用されていない試験法について調査した。その結果、一般試験法に優先的に追加検討すべき試験法として、質量分析計を用いる試験法が挙げられた。そこで今年度は、GC-MSを用いる試験法の妥当性を検討するため、具体的な試験法としてローズマリー抽出物のJECFA成分規格案に記載されているGC-MSを用いた揮発性成分定量法の検証を実施した。その結果、GC-MSを用いる試験法の分析精度は、食品添加物成分規格の一般試験法として妥当と考えられたが、定量に用いるイオンの選定が正確な定量を行う上で特に重要であることが示された。

研究協力者

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
鈴木一平 国立研究開発法人
医薬基盤・健康・栄養研究所

一般試験法の改良は、規格試験の質の向上ならびに規格基準の精度向上に貢献するものである。また、近年、欧米で認められている食品添加物等の指定要請が増加しており、その手続きの迅速化が求められているが、成分規格設定の迅速化のためには分析法の進歩に対応して一般試験法を改良するだけでなく、国際整合化を図ることが必須であると考えられる。

前年度は、食品添加物規格設定時に用いる試験法の国際整合性を確保するために、国際的な食品添加物規格の一般試験法には設定されているものの公定書の一般試験法には設定されていない試験法を新たに導入することを目指し、国際的な食品添加物規格の一般試験法と日本の食

A. 研究目的

食品添加物は、原則として、人の健康を損なうおそれのない場合として厚生労働大臣が定める場合に限り、その使用が認められ(指定)、その品質を担保するために純度や成分について遵守すべき項目(成分規格)が設定されている。成分規格に記載の各試験に用いられる試験法は、食品添加物公定書(公定書)の一般試験法の項にまとめられている。そのため、

品添加物公定書における一般試験法とを比較した。その結果、今後公定書に今後優先的に追加すべき試験法として質量分析計(MS)を用いる試験法が挙げられた。そこで今年度は、MSを用いる試験法を導入する場合を想定し、GC-MSを用いる分析法の妥当性について検討を行ったので報告する。JECFA (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)の成分規格各条について、MSを用いる試験が記載されている品目を調べ(表1)、その内、具体的な試験法として食品添加物ローズマリー抽出物のJECFA成分規格案の純度試験に記載されているGC-MSを用いた揮発性成分定量法の検証を実施し、妥当性について検討した。

B. 研究方法

GC-MSを用いる分析法の妥当性検証試験は、第82回JECFA会議にて審議されたローズマリー抽出物(Rosemary Extract)の成分規格案(Tentative規格)¹⁾の純度試験に記載されているGC-MSを用いた揮発性成分定量法に基づき、以下のとおりに行った。

1. 試料及び試薬

ローズマリー抽出物は、A社製2製品(以下A1及びA2)及びB社製1製品(以下B1)を用いた。

揮発性成分標品として、Sigma-Aldrich製の(-)-borneol(Lot. BCBR4601V)、(-)-bornyl acetate(Lot. BCBR2130V)、(-)-camphor(Lot. BCBS1142V)、eucalyptol(Lot. BCBS5646V)及びverbenone(Lot.

BCBR0511V)を用いた。また、内標準物質(IS)として、Sigma-Aldrich製の4-heptanon(Lot. STBG5567V)を用いた。

さらに、抽出溶媒として、高速液体クロマトグラフィー用Tetrahydrofuran(THF、関東化学)を用いた。

2. 標準液及び試料溶液の調製

内部標準液(ISS): 4-heptanon 20 mgを精密に量り、THFを加えて50 mLに定容した。

標準液: 標品((-)-borneol、(-)-bornyl acetate、(-)-camphor、eucalyptol及びverbenone)をそれぞれ20 mgずつ精密に量り、THFを加えて50 mLに定容し、標準原液とした。これを、標品の濃度がそれぞれ約0~200 µg/mLになるようTHFで希釈し、濃度6点の標準液を調製した。なお、これら標準液には4-heptanonの終濃度が約20 µg/mLになるよう予めISSを正確に加えた。

試料溶液: 2.5 gまたは250 mgの試料を精密に量り、ISS 500 µLを加え、さらに全量が10 mLとなるようにTHFを加えて定容した。10分間の超音波処理の後、1000×gで10分間の遠心分離を行い、上清を試料溶液とした。

3. GC-MS分析条件

ガスクロマトグラフ・質量分析計(GC-MS)による測定は、以下の条件で行った。測定は、標準液及び試料溶液それぞれ調製n=1につき2回ずつ行った。また、試料溶液中の化合物は、スキャンモード測定時に標準液から得られる標品のピークと、保持時間及びマススペクトルを比較することにより同定した。

GC 部

・装置 6890N Network GC system (Agilent 製)

・カラム HP-5MS (30 m×0.25 mm、膜厚 0.25 μm、Agilent 製)

・カラム昇温条件

70 で 1 分間保持したのち、毎分 5 で 130 まで昇温する。その後、さらに毎分 10 昇温し、240 に到達後 1 分間保持する。

・注入口温度 250

・キャリアーガス He

・流量 1 mL/min

・スプリット比 100 : 1

・注入量 1.0 μL

MS 部

・装置 5973 Network MSD (Agilent 製)

・温度条件

四重極 150 、イオン源 230 、インターフェース 250

・イオン化法 EI

・イオン化エネルギー 70 eV

・測定モード スキャン (確認時) 及び SIM (定量時、表 2)

4. 各揮発性成分含量の算出

JECFA の成分規格案に記載の含量算出式は誤りがあると思われた。試料溶液には内標準物質を添加していることから、内標準法にて各揮発性成分含量を算出することとした。すなわち、5 種の揮発性成分((-)-borneol、(-)-bornyl acetate、(-)-camphor、eucalyptol 及び verbenone) それぞれについて、縦軸に IS のピーク面積に対する被検成分のピーク面積の比を、横軸に IS の濃度に対する被検成分濃度の比をとった検量線を作成した。

JECFA の規格案には、定量イオンについて指定がなかったため、あらゆるイオンの組み合わせで検量線を作成した。試料に含まれる各成分の含量 (mg/kg) は以下の式で算出した。

$$\text{成分含量 (mg/kg)} = \frac{A_S/A_{IS}-b}{a} \times C_{IS} \times \frac{V}{W}$$

ただし、 A_S は試料溶液中の成分のピーク面積、 A_{IS} は試料溶液中の内標物質のピーク面積、 a 、 b はそれぞれ検量線の傾きと切片、 C_{IS} は試料溶液における内標物質の濃度(μg/mL)、 V は試料溶液量(mL)、 W は用いた試料の質量(g)である。

5. 試験法の妥当性評価

目的成分の定量法として GC-MS を用いた方法が妥当かどうかを、参考文献^{2, 3)}に従い評価した。すなわち、分析者 2 名が 1 日につき 2 回分析試料を調製し、3 日間行った。このとき、検量線作成のための標準液作成は 3 日間にわたって同じ分析者が担当し、1 日 1 回調製した。得られた定量値 12 個について、一元配置分散分析を行い、試験法の評価に必要な精度を算出した。得られた精度が表 3 に示す基準を満たす場合に、目的成分の定量法として妥当であると評価することとした³⁾。

C, 結果及び考察

GC-MS による揮発性成分の確認

JECFA 成分規格案において、Rosemary Extract は *Rosmarinus officinalis* L. の乾燥葉をアセトンまたはエタノールにより抽出したのものとして定義されている。一方、日本で入手可能

である、本研究で用いたローズマリー抽出物 3 製品のうち、A1 及び A2 の抽出溶媒には含水アルコール、B1 にはヘキサンがそれぞれ使用されており、JECFA 成分規格案で想定されるものとは異なる。そこで、GC-MS による揮発性成分の定量を行う前に、測定対象としている 5 種の揮発性成分 ((-)-borneol、(-)-bornyl acetate、(-)-camphor、eucalyptol 及び verbenone)が、これら製品に含まれているかを確認した。その結果、試料溶液 25 mg/mL を用いて分析したところ、B1 及び A2 からはこれら 5 種が検出されたが、A1 ではいずれの化合物も検出されなかった (検出限界 0.118 ~ 1.97 $\mu\text{g/mL}$ 、図 1)。

揮発性成分の確認の際、JECFA 成分規格案に従いローズマリー抽出物 2.5 g から試料溶液を作製したが、試料全量を規格案が指定する量の THF に溶解することは困難であり、どの製品でも多くの溶け残りがみられた。規格案には THF に溶解した液をそのままフィルターを過すよう記載されていたが、溶け残りがフィルターに詰まる恐れがあったため、1000 \times g で 10 分間の遠心分離を行い上澄液のみを分析に用いた。その結果、揮発性成分が確認された B1、A2 において、含まれる (-)-camphor、(-)-borneol、verbenone の濃度が、作成した検量線の濃度範囲を超える結果となった。そこで、用いるローズマリー抽出物の量を 250 mg に減じ、JECFA 規格案に従って試料溶液を作製したところ、溶け残りもほとんど見られず、各成分の濃度も作成した検量線の範囲内であった。このことから、

試料中の揮発性成分含量は、試料量を 250 mg に変更して算出することとした。

以上のことから、JECFA 成分規格案記載の GC-MS による定量法の妥当性評価は、対象の揮発性成分が含まれている A2 を用い、試験開始時の試料量を 250 mg として行うこととした。

GC-MS による揮発性成分定量法の妥当性評価

a) ピークの形状

標準液 (濃度 20 $\mu\text{g/mL}$) を分析し、検出イオンごとにクロマトグラムを抽出し、定量に用いるピークを切り取ったものを図 2 に示す。4-heptanone と eucalyptol の検出イオンである m/z 43 で抽出したクロマトグラムでは、他のイオンの場合と比較してベースラインが乱れていた。さらに、 m/z 95 で抽出したクロマトグラムでは、標準液の濃度が濃くなると bornyl acetate のピークの直後に別のピークが検出され、このピーク分離は不良であった。それ以外のピークは、いずれもわずかなテーリングが認められたものの対称度 (シンメトリー係数) は 1.5 以下であり、また良好に分離していた。

b) 検量線の直線性

JECFA の成分規格案に記載の揮発性成分含量算出式は誤りがあると思われたため、方法の項に記載のとおり内標準法により定量値を算出することとした。また、JECFA の規格案には、定量イオンについての指定がなかったため、あらゆるイオンの組み合わせ (内標準物質である 4-heptanone では 3 つのイオンが設定されているため、同じく 3 つのイオンを検

出するよう設定されている eucalyptol と(-)-bornyl acetate は、それぞれ 9 組ずつ、2 つのイオンを検出するよう設定されている(-)-borneol、(-)-camphor 及び verbenone はそれぞれ 6 組ずつ)で定量することを想定した。そこで、上記イオンの組み合わせで検量線を作成したところ、各検量線の直線性は eucalyptol では $R^2=0.9994 \sim 0.9999$ 、(-)-camphor では $R^2=0.9980 \sim 0.9991$ 、(-)-borneol では $R^2=0.9956 \sim 0.9979$ 、verbenone では $R^2=0.9939 \sim 0.9958$ 、(-)-bornyl acetate では $R^2=0.9959 \sim 0.9984$ であり、どのイオンの組み合わせで検量線を作成するかで R^2 値に多少の変動があった。

c) 検出限界と定量下限

各化合物の検出限界及び定量下限は、JIS 通則 K0114:2012 に従って求めた S/N 比が、それぞれ S/N=3 及び S/N=10 となることとした。検出限界または定量下限付近の濃度で 6 回繰り返し測定を行い、検出限界と定量下限を推定した結果を表 4 に示す。どのイオンを定量用に選択するかによって、検出限界や定量下限値に最大で 10 倍程度の違いがあった。なお、今回妥当性評価に用いた試料では、どの化合物も最も高い定量下限値以上の量が含まれていた。

d) 精度

妥当性評価は、参考文献^{2,3)}に従い、分析者 2 名が 1 日につき 2 回分析試料を調製・分析し、これを 3 日間繰り返して得たデータに対し行った。先述の検量線を用いて試料中の各揮発性成分含量を算出し、得られた値に対し一元配置分散分析を行い、精度を算出した(表 4)。各成

分の含量はすべて 100 ppm (mg/kg) を超えていたため、表 3 の基準(食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン³⁾)に従い試験法の適否を判定したところ、いずれの化合物のいずれのイオンの組み合わせにおいても試験法としては適と判定された。

定量に用いるイオンの違いによる定量値の違いの検証

JECFA 規格案では、揮発性成分の定量に用いるイオンの m/z 値が設定されていなかったため、本研究ではあらゆるイオンの組み合わせについて定量値を算出した。そこで、用いるイオンによって得られる定量値に違いがあるかどうかを調べるため、1 つのイオンの組み合わせを 1 つの群とみなし(eucalyptol と(-)-bornyl acetate は、それぞれ 9 群ずつ、(-)-borneol、(-)-camphor 及び verbenone はそれぞれ 6 群ずつ、各群 12 個のデータ(1日2データ×3日間×分析者2名))群間で定量値に差があるかどうかを一元配置分散分析により検定した。その結果(表 5)、eucalyptol、borneol、(-)-camphor 及び verbenone については危険率 5%のとき F 値は棄却域に無く、本検定においては定量イオンの違いによる定量値に差があるとはいえないと考えられた。しかし、bornyl acetate では危険率を 1%としても F 値が棄却域にあり、定量イオンの違いによる定量値の差があると考えられた。Bornyl acetate 由来の m/z 95 のイオンを使用して定量した群を除くと、その F 値は危険率を 5%にしても棄却域から外れた。ピーク形状の項

でも述べたとおり、 m/z 95 では、標準液の濃度が濃くなると bornyl acetate のピークの直後に別のピークが検出され、かつ、そのピーク分離が不良であった。これが、 m/z 95 のイオンを用いた bornyl acetate の定量値に影響し、他のイオンで定量した値と比べてずれが大きくなった可能性が考えられた。以上のことから、GC-MS 分析法においては定量イオンの選択が定量値に大きな影響を与えるため、その吟味の重要性が GC-MS 分析法を試験法として導入する際の課題として挙げられた。

JECFA 成分規格案の規格値との比較

JECFA の成分規格案において、ローズマリー抽出物に含まれる 5 種の揮発性成分量は、ローズマリー抽出物中のカルノシン酸及びカルノソール含量との比により規定されている。すなわち、カルノシン酸とカルノソールの総量 (w/w%) を 5 種の揮発性成分の総量 (w/w%) で除した値が 15 より大きいこと、とされている。A2 についてカルノシン酸とカルノソールの総量 (w/w%) を JECFA 成分規格案に準じて HPLC にて求めたところ、13.7% であった。一方、A2 の揮発性成分は、eucalyptol が 0.0124% (全イオンの組み合わせから算出した定量値の平均値。以下同じ。ただし、bornyl acetate は m/z 95 由来のイオンで測定した定量値を除いた平均値)、camphor が 0.1476%、borneol が 0.2857%、verbenone が 0.0812%、bornyl acetate が 0.0357% であり、5 種の総量 (w/w%) は 0.563% であった。従って、カルノシン酸とカルノ

ソールの総量 (w/w%) を 5 種の揮発性成分の総量 (w/w%) で除した値は 24.4 であり、これは JECFA の成分規格値 (15 より大きいこと) を満たしていた。

D . 結論

食品添加物公定書の一般試験法の 1 つとして、濃度測定を目的とした GC-MS 分析法を導入することを想定し、その妥当性の評価を行った。具体的な試験法としてローズマリー抽出物の JECFA 成分規格案に記載されている GC-MS を用いた揮発性成分定量法を選択し、国内で入手したローズマリー抽出物を用いて試験法の検証を実施した。その結果、分析精度は試験法として妥当と考えられる範囲内であった。しかし、定量用イオンとして選択する m/z によって定量下限や検出限界が大きく変わり、また、内標準物質と測定化合物の定量に用いるイオンの組み合わせによって定量値が異なる例も認められたため、質量分析計による定量法においてはイオンの選択が重要であることが示された。本研究により得られた知見は、今後 GC-MS を用いる試験法を食品添加物公定書の一般試験法に導入し、添加物各条規格で設定する際の有用な基礎情報となると考えられる。

E . 研究発表

なし

F . 知的財産権の出願・登録状況

なし

G . 参考文献

- 1) Rosemary Extract (Tentative).
Compendium of Food Additive Specifications. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 82nd meeting 2016. FAO JECFA Monographs 19.
- 2) 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” 平成 22 年 12 月 24 日
- 3) 医薬食品局食品安全部長（食安発第 0926003 号）“食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン” 平成 20 年 9 月 26 日

表1 JECFA 各条規格で質量分析計を用いる試験を適用している添加物品目

JECFA添加物品目名	JECFA Monograph	収載項目	質量分析計 使用試験	質量分析計 使用機器	日本語名	第9版食品 添加物公 定書収載	公定書内試験
Ethyl Hydroxyethyl Cellulose	Monograph 1 (2006)	PURITY TESTS	Ethylene oxide, dioxane, ethylene chlorohydrin	head space gas chromatography with mass selective detection (GC-MSD)	エチルヒドロキシエチルセルロース	-	-
Hydroxypropylmethyl cellulose	Monograph 11 (2011)	PURITY TESTS	Propylene chlorohydrins	Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) (Vol. 4)	ヒドロキシプロピルメチルセルロース	○	純度試験 (塩化物試験)
Propylene Glycol Esters of Fatty Acids	Monograph 1 (2006)	METHOD OF ASSAY	Identification:--Identify peaks by comparison of retention time with known substances or apply coupled GC/MS	GC-MS	プロピレングリコール脂肪酸エステル	○	確認試験 (TLC)
Rosemary Extract (Tentative)	Monograph 19 (2016)	IDENTITY TESTS	Antioxidant/Reference Volatiles Ratio	Reference Volatile Ratio: Total % w/w of (-)-borneol, (-)-bornyl acetate, (-)-camphor, 1,8-Cineole (eucalyptol) and verbenone is determined using GC-MSD	ローズマリー抽出物	-	-
Steviol Glycosides From <i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni	Monograph 20 (2017)	METHOD OF ASSAY	Method B: Determination of Minor Steviol Glycosides by HPLC-MS	HPLC-MS	ステビオール配糖体	○	HPLC-UV

表2 SIM モード測定時の検出イオン条件

検出イオン (<i>m/z</i>)	保持時間 (分)	目的化合物
43, 71, 114	3.0-3.5	4-Heptanon
43, 139, 154	5.0-6.5	Eucalyptol
95, 107, 110, 135, 152	8.0-11.0	(-)-Camphor (-)-Borneol Verbenone
95, 154, 196	11.0-13.0	(-)-Bornyl acetate

表3 定量値の濃度における精度の基準³⁾

濃度 (ppm)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.01 < ~ 0.1	15 >	20 >
0.1 < ~ 1	10 >	15 >
1 < ~ 10	10 >	15 >
10 < ~ 100	10 >	15 >
100 <	10 >	15 >

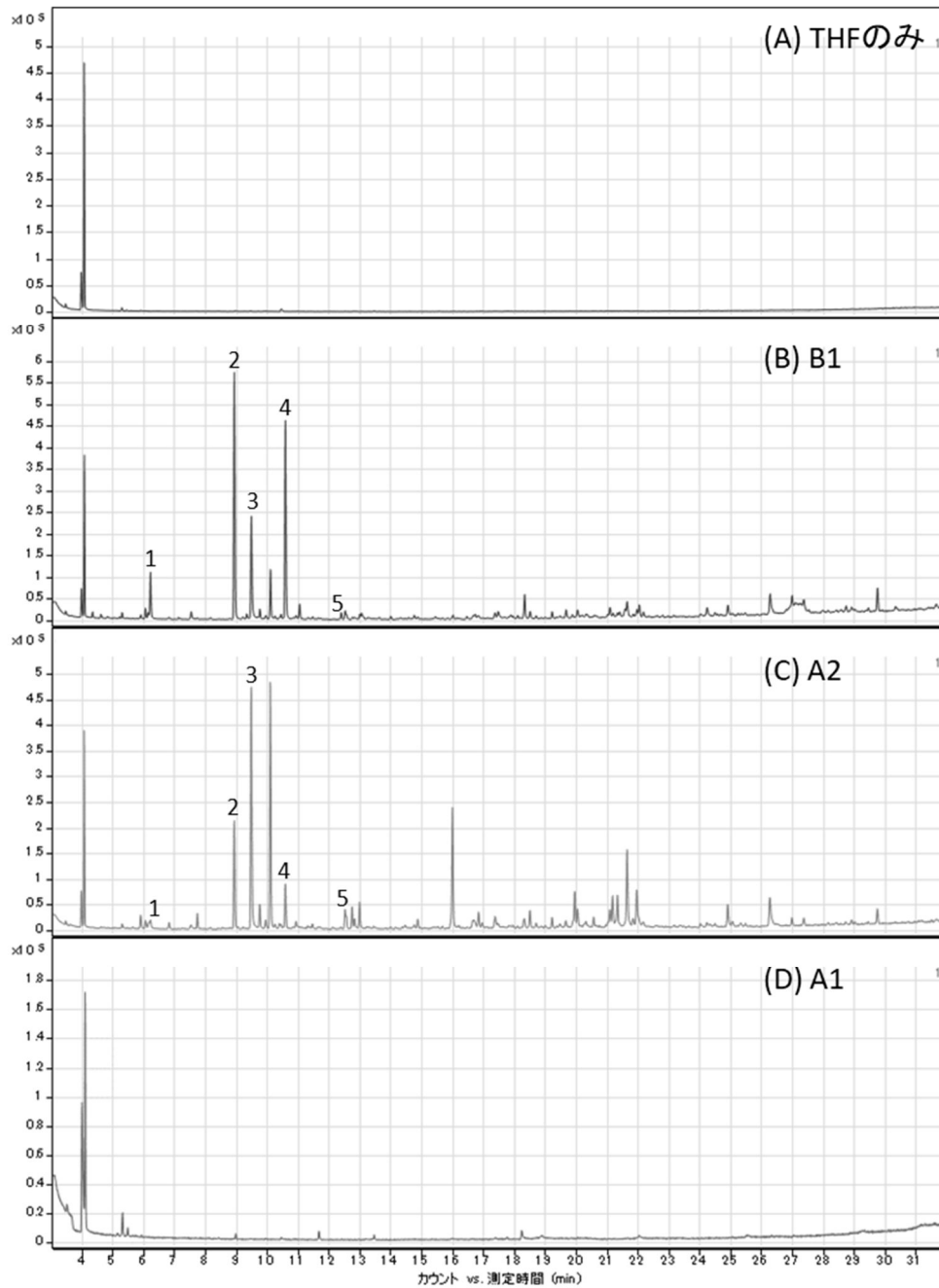


図1 ローズマリー抽出物の GC/MS クロマトグラム (TIC)。 (A) THF のみ、 (B) B1、 (C) A2、 (D) A1。 ピーク 1: eucalyptol、 ピーク 2: (-)-camphor、 ピーク 3: (-)-borneol、 ピーク 4: verbenone、 ピーク 5: (-)-bornyl acetate。

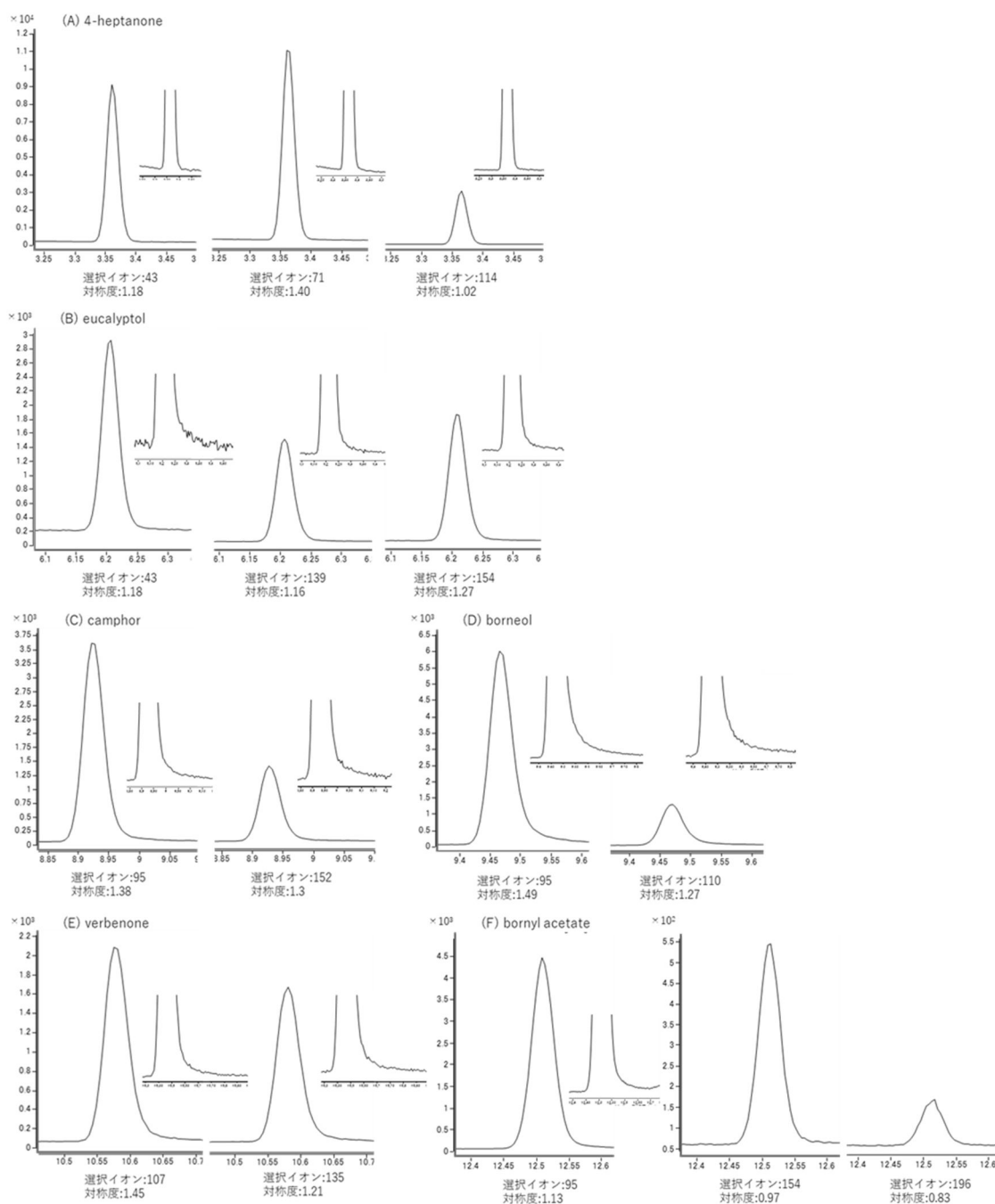


図2 各化合物の定量用イオンのピーク形状(対称度)。ピークは各化合物の濃度が 20 $\mu\text{g/mL}$ となるように調製したときのもの。(A) 4-Heptanol、(B) eucalyptol、(C) camphor、(D) borneol、(E) verbenone、(F) bornyl acetate。各ピークの右上に、ベースライン付近を拡大表示している。

表 4 定量に用いるイオン別の各化合物の検出限界および定量下限

イオン	検出限界 (S/N=3)		定量下限 (S/N=10)	
	溶液濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試料中含量 ^{a)} (mg/kg)	溶液濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試料中含量 ^{a)} (mg/kg)
Eucalyptol				
43	0.507	20.3	1.69	67.6
139	0.249	9.96	0.830	33.2
154	0.240	9.62	0.802	32.0
Camphor				
95	0.168	6.72	0.560	22.4
152	0.394	15.7	1.31	52.5
Borneol				
95	0.118	4.74	0.395	15.8
110	0.298	11.9	0.993	39.7
Verbenone				
107	0.391	15.6	1.30	52.1
135	0.542	21.7	1.81	72.3
Bornyl acetate				
95	0.159	6.38	0.532	21.3
154	0.963	38.5	3.21	128
196	1.97	78.8	6.58	263

a) 今回の方法で測定したときに検出または定量可能な試料中含量を計算した。

表 5 GC/MS を用いた揮発性成分定量法の妥当性評価結果

(A) Eucalyptol

イオンの 組み合わせ (成分/IS)	定量値 (AV, mg/kg)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	判定
43/43	122	1.10	7.77	適
43/71	123	1.06	6.99	適
43/114	119	1.09	9.35	適
139/43	127	0.82	6.72	適
139/71	128	0.81	6.34	適
139/114	124	0.81	8.37	適
154/43	125	1.05	8.24	適
154/71	126	1.03	7.82	適
154/114	122	1.05	9.98	適

(B) (-)-Camphor

イオンの 組み合わせ (成分/IS)	定量値 (AV, mg/kg)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	判定
95/43	1488	0.67	1.95	適
95/71	1481	0.66	2.12	適
95/114	1478	0.64	2.09	適
152/43	1476	0.73	2.01	適
152/71	1469	0.73	2.15	適
152/114	1466	0.73	2.14	適

(C) (-)-Borneol

イオンの 組み合わせ (成分/IS)	定量値 (AV, mg/kg)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	判定
95/43	2882	1.35	1.90	適
95/71	2867	1.49	2.15	適
95/114	2865	1.44	2.09	適
110/43	2854	0.94	1.70	適
110/71	2839	1.06	1.97	適
110/114	2837	0.97	1.89	適

(D) Verbenone

イオンの 組み合わせ (成分/IS)	定量値 (AV, mg/kg)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	判定
107/43	814	1.11	2.22	適
107/71	811	1.21	2.43	適
107/114	808	1.14	2.36	適
135/43	815	1.16	2.06	適
135/71	813	1.27	2.26	適
135/114	810	1.20	2.21	適

(E) (-)-Bornyl acetate

イオンの 組み合わせ (成分/IS)	定量値 (AV, mg/kg)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	判定
95/43	345	0.44	1.69	適
95/71	345	0.52	1.82	適
95/114	342	0.45	2.14	適
154/43	355	0.71	2.85	適
154/71	355	0.75	2.96	適
154/114	352	0.72	3.34	適
196/43	361	1.26	3.75	適
196/71	360	1.26	3.85	適
196/114	357	1.23	4.17	適

