

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 30 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

—ヒドロキシプロピルメチルセルロース JECFA 規格の 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第一室長

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、平成28年度に、Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (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GC-MSを用いる試験法の妥当性を検討するため、今年度は具体的な試験法としてヒドロキシプロピルメチルセルロースのJECFA成分規格に記載されているGC-MSを用いた純度試験であるプロピレンクロルヒドリン量分析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。検量線用標準溶液の最低濃度が定量下限濃度に比べて十分高く、また、検量線用標準液の濃度範囲が広すぎない点などが、有効であったのではないかと推察された。

研究協力者

古庄 紀子 国立医薬品食品衛生研究所

日置 冬子 国立医薬品食品衛生研究所

増本 直子 国立医薬品食品衛生研究所

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、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。

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標とし、平成 28 年度に、国際的な食品添加物規格の一般試験法と日本の食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、平成 29 年度のローズマリー抽出物の分析法に引き続き、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。表 1 は、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示したものである。その内、平成 30 年度は、具体的な試験法として食品添加物ヒドロキシプロピルメチルセルロース (Hydroxypropylmethyl Cellulose、HPMC) の規格<sup>1)</sup>の純度試験に記載されている GC-MS を用いたプロピレンクロロヒドリン (Propylene chlorohydrins、PCHs) 量分析法の検証を実施し、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 74 回 JECFA 会議にて審議された HPMC の成分規格<sup>1)</sup>の純度試験に記載されている PCHs 量分析法に基づき、以下のとおりに行った。

### 1. 試料及び試薬

HPMC 試料として、食品添加物製品の代わりに市販試薬 3 社 3 製品 (A :

Aldrich (株) 型番 423173、B : Alfa Aesar (株) 型番 44779、及び C : Santa Cruz Bio. (株) 型番 Sc-279197) を用いた。添加回収試験及び妥当性の検証には、予備検討の結果、A を用いて検討を行った。

PCHs 標品として、東京化成 (株) 製の 1-chloro-2-propanol (1C2P) [1 級] (純度 75.3%、2-chloro-1-propanol (2C1P) 含有、型番 A6S5K) を用いた。また、内標準物質 (IS) として、ISOTEC 製の  $\sigma$ -xylene- $d_{10}$  (型番 JA7LC) を用いた。

さらに、抽出溶媒として、ジエチルエーテル [特級] (関東化学 (株)) (図 1、2、3 用) 又はジエチルエーテル [残留農薬試験用] (ナカライテスク (株)) (図 1、2、3 以外用) を、内部標準原液 (ISS) 調製にメタノール [高速液体クロマトグラフィ用] (関東化学 (株)) を用いた。

### 2. 内部標準液、標準液及び試料溶液の調製

内部標準原液 :  $\sigma$ -xylene- $d_{10}$  0.1 g を精密に量りとり、メタノールで 100 mL に定容した後、この液 5 mL を正確に量り、メタノールで 50 mL に定容した。さらにこの液 1 mL を正確に量り、メタノールで 25 mL に定容し、この液 1 mL を正確に量り、ジエチルエーテルを加えて 250 mL に定容し、内部標準原液とした (約 16 ng/mL)。

内部標準液 (ISS) : 内部標準原液 25 mL を正確に量り、ジエチルエーテルを加えて 50 mL に定容し、内部標準液とした (約 8 ng/mL)。

標準原液 : PCHs 標品 0.1 g を精密に

量りとり、ジエチルエーテルで 100 mL に定容し、この液 5 mL を正確に量り、ジエチルエーテルで 50 mL に定容した。さらに、この液 5 mL を正確に量り、ジエチルエーテルで 50 mL に定容し、標準原液とした (約 10 µg/mL)。

標準液: 標準原液 5 mL を正確に量り、ジエチルエーテルを加えて 100 mL に定容し、標準液とした (約 500 ng/mL)。

検量線用標準液: 標準液 0.5、1、2、4 及び 5 mL を正確に量り、それぞれ内部標準原液 5.0 mL ずつを正確に加え、標品の濃度が 25、50、100、200 及び 250 ng/mL、内部標準の *o*-xylene-*d*<sub>10</sub> の濃度が 8 ng/mL になるようにジエチルエーテルで正確に希釈し、濃度 5 点の検量線用標準液を調製した。

標準添加試料液: ねじ口試験管に試料 A を 1 g 精密に量りとり、標準原液 100 µL をマイクロピペットを用いて加えた後、内部標準液 5.0 mL を加えた。超音波処理を行って 10 分間抽出し、3000 rpm で 5 分間遠心した後、上清をとり標準添加試料液とし、ガスクロマトグラフ (GC) に 5 µL ずつ注入した。(標準添加試料液 1.0 mL は、試料 0.2 g に相当し、PCHs 標品 0.2 µg を含むことになる。)

試料溶液: 試料 1 g を精密に量り、内部標準液 5.0 mL を正確に加えた。超音波処理を行って 10 分間抽出し、3000 rpm で 5 分間遠心した後、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。

標準添加試料液及び試料溶液はそれぞれ 1 日につき n=3 で調製し、測定した。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 a 6890N Network GC system (Agilent (株)) (図 1、2、3 用)
- ・装置 b 7890 Network GC system (Agilent (株)) (図 1、2、3 以外用)
- ・カラム DB-624 (30 m×0.25 mm、膜厚 1.4µm、Agilent (株))
- ・カラム昇温条件  
40°C で 5 分間保持したのち、毎分 10°C で 80°C まで昇温する。80°C で 3 分保持した後、さらに毎分 25°C で昇温し、230°C に到達後 5 分間保持する。
- ・キャリアーガス He
- ・流量 1.4 mL/min
- ・注入方式 パルスドスプリットレス
- ・注入量 5 µL

#### MS 部

- ・装置 c 5973 Network MSD (Agilent (株)) (図 1、2、3 用、装置 a に接続して用いた。)
- ・装置 d 5977 Network MSD (Agilent (株)) (図 1、2、3 以外用、装置 b に接続して用いた。)
- ・温度条件  
四重極 150°C、イオン源 230°C、トランスファーライン 260°C
- ・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、*m/z* 30 ~ 200) 及び SIM (定量時、表 2)

#### 4. 各 PCH 量の算出

標品として用いた PCH は成績書より 1C2P を 75.3 %含有しており、残りの 24.7%を 2C1P 含有値として算出した。1C2P 及び 2C1P について横軸に IS の濃度に対する被検成分濃度比を、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とった検量線を作成した。PCHs 量算出のためのピーク面積の測定は、JECFA の成分規格に準拠し、1C2P、2C1P 及び内標  $\sigma$ -xylene- $d_{10}$  (IS) それぞれ  $m/z$  79、58 及び 116 を用い、 $m/z$  81、31、98 は定性のための確認に用いた。

試料に含まれる 1C2P 及び 2C1P の量 (mg/kg) は以下の式で算出した。

成分含量 (mg/kg)

$$= \frac{A_s/A_{IS} - b}{a} \times C_{IS} \times \frac{V}{W} \\ \times \frac{1}{1000}$$

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、 $C_{IS}$  は試料溶液中における内標物質の濃度 (ng/mL)、 $V$  は試料溶液量 5.0 (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<sup>2,3)</sup>に従い評価した。すなわち、実施者 1 名が 1 日につき 3 回分析試料を調製し、5 日間行った。この時、検量線作成のための標準液作成も 1 日 1 回調製した。得られた定

量値 15 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<sup>3)</sup>。

#### C. 結果及び考察

##### 1. GC-MS によるプロピレンクロロヒドリンの確認

JECFA の HPMC 成分規格の純度試験では、PCHs 量について、1 mg/kg 以下 (Not more than 1 mg/kg) と規定されており、GC-MS による PCHs 分析法が記載されている。本研究では、この分析法に準拠して実施したが、まず、PCHs 試薬に IS を添加し、scan モードにより  $m/z$  30~200 のトータルイオンクロマトグラム (TIC) 及び分析対象ピークの MS スペクトルを確認した。

図 1-1)には IS を含む検量線用 PCHs 標準液 (200 ng/mL) の TIC を示す。保持時間 9.1 分、10.0 分及び 14.1 分にピーク 1、2 及び 3 が認められ、ピーク 3 は IS のピーク、s は溶媒由来のピークを示す。ピーク 1 及び 2 の MS スペクトルは図 2-1) 及び 2)の通りであり、それぞれ 1C2P 及び 2C1P であると確認された。また、各 MS スペクトルから、1C2P 及び 2C1P の各分子量関連イオンとしてそれぞれ  $m/z$  79、81 及び  $m/z$  31、58 が認められ、JECFA 規格で定量用イオンにそれぞれ  $m/z$  79 及び  $m/z$  58、定性イオンに  $m/z$  81 及び  $m/z$  31 を設定していることは妥当と考えられた。IS についても MS スペクトルに JECFA 規格で定量用イオンに  $m/z$  116、定性イオンに  $m/z$  98 を設定してい

ることは妥当と考えられた（データは示していない。）本研究でもこれらイオンを検出イオンとし、同様に定量及び定性に用いることとした。表 2 に示す SIM モード測定条件でジエチルエーテル、検量線用 PCHs 標準液（25 ng/mL 及び 200 ng/mL）を測定した結果を、図 1-2)、3)及び 4)に示す。ジエチルエーテルではピークは検出されず、検量線用標準液では明確なピークとして検出できた。

## 2. GC-MS によるプロピレンクロロヒドリン定量法の妥当性評価

### a) 検量線の直線性

JECFA 規格の定量用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 1C2P では  $R^2=0.99994\sim 0.99996$ 、2C1P では  $R^2=0.99970\sim 0.99997$  であった。昨年度のローズマリー抽出物では、化合物により、 $R^2$ が 0.9990 未満の場合も認められ、検量線用に用いる濃度範囲を狭くすることで値が改善されたが、今回はいずれも 0.9997 以上と良好な結果が得られた。測定対象化合物や分析条件の性質にもよると思われるが、検量線の濃度範囲が元々 10 倍以内であることも直線性が良好な理由の一つと推測された。

### b) 検出限界と定量下限

検量線用 PCHs 標準液の最低濃度（25 ng/mL）の液を用いて、6 回繰り返し測定を行い、各化合物の検出限界と定量下限を推定した結果を表 4 に示す。表 4-1)には 6 回繰り返し測定時の標準偏差（ $\sigma$ ）の 3 倍及び 10 倍として推定した検出限界と定量下限を、表 4-2)には  $S/N=3$  及び

$S/N=10$  に相当する濃度として推定した検出限界と定量下限を算出した値を示す。いずれの定量下限値も、検量線用 PCHs 標準溶液の最低濃度として設定されている 25 ng/mL 未満であり、検量線の最低濃度として 25 ng/mL が十分妥当であることが確認された。

### c) 添加回収率

添加回収率試験に用いる試料としては、測定対象化合物を含まない試料を用いて標準添加試料液を調製することが望ましい。そのため、まず、試料選択のため、HPMC 試料 3 社 3 製品中の 1C2P 及び 2C1P を GC-MS の SIM モード測定により確認した。その結果、図 3-1)に示す様に試料 A では 2C1P が検出されず、1C2P も定量下限未満 (0.03 mg/kg) であったが、試料 B 及び C (図 3-2)及び 3)) では 1C2P も 2C1P も明確に検出され、更に試料 C では 2C1P の直前にトルエンと同様の保持時間及び同様の  $m/z$ 91 イオンを示す不純物ピークも認められた。そのため、標準添加試料液の作製には試料 A を用いることとした。

標準添加試料液を調製し ( $n=6$ )、試料 A に含まれる 1C2P を差し引いて添加回収率を調べた結果を表 5 に示す。その結果、1C2P 及び 2C1P の添加回収率の平均はそれぞれ 84.0%及び 85.8%と良好であり、いずれも表 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<sup>3)</sup>）の真度（回収率）70~120%の範囲を満たし、適と判断された。

### d) 精度

妥当性評価は、参考文献<sup>2,3)</sup>に従い、分析者 1 名が 1 日につき 3 回標準添加試料

液を調製・分析し、これを 5 日間繰り返して得たデータに対し行った。各分析日用に調製した検量線用 PCHs 標準液の分析結果から作成した検量線を用い、試料中の各 PCHs 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、併行精度及び室内精度を算出した（表 6）。2 成分の含量はすべて 0.1ppm (mg/kg) 以上であるため、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<sup>3)</sup>）に従い試験法の適否を判定したところ、両化合物において併行精度及び室内精度は良好であり、試験法としては適と判定された。

#### 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。今年度は具体的な試験法として HPMC の JECFA 成分規格に記載されている GC-MS を用いた純度試験である PCHs 量分析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。検量線用標準溶液の最低濃度が定量下限濃度と比べて十分高く、また、検量線用標準液の濃度範囲が広すぎない点などが、有効であったのではないかと推察された。

#### E. 参考文献

- 1) Hydroxypropylmethyl Cellulose. Compendium of Food Additive Specifications. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 74th meeting 2011. FAO JECFA Monographs 11.
- 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 ( <u>Tentative</u> )	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		検出時間	目的化合物	保持時間
(m/z)		(分)		(分)
定量用	定性用			
79	81	3.0~9.8	1-Chloro-2-propanol	9.1
58	31	9.8~11.0	2-Chloro-1-propanol	10.0
116	98	11.0~15.0	o-Xylene-d <sub>10</sub>	14.1

表 3 定量値の濃度における精度の基準<sup>3)</sup>

濃度 (ppm)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度(回収率) (%)
0.01<~≤0.1	15>	20>	70~120
0.1<~≤1	10>	15>	70~120
1<~≤10	10>	15>	70~120
10<~≤100	10>	15>	70~120
100<	10>	15>	70~120

表 4 各化合物の検出限界および定量下限

1)

イオン	検出限界(3σ)		定量下限(10σ)	
	溶液濃度 (ng/mL)	試料中含量 <sup>a)</sup> (μg/kg)	溶液濃度 (ng/mL)	試料中含量 <sup>a)</sup> (μg/kg)
1C2P				
79	2.30	11.5	7.68	38.4
2C1P				
58	1.62	8.11	5.41	27.1

2)

イオン	検出限界(S/N=3)		定量下限((S/N=10)	
	溶液濃度 (ng/mL)	試料中含量 <sup>a)</sup> (μg/kg)	溶液濃度 (ng/mL)	試料中含量 <sup>a)</sup> (μg/kg)
1C2P				
79	2.59	13.2	8.62	44.0
2C1P				
58	4.76	24.3	15.9	81.0

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 添加回収率測定結果

	添加回収率	
	1C2P (%)	2C1P (%)
n-1	82.0	78.6
n-2	80.5	84.6
n-3	84.0	86.7
n-4	82.0	83.0
n-5	87.8	91.6
n-6	87.8	90.2
Ave.	84.0	85.8
RSD(%)	3.76	5.59

表 6 GC-MS を用いた PCHs 量分析法の妥当性評価結果

	定量値 (AV, mg/kg)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	判定
1C2P	0.640	1.77	4.22	適
2C1P	0.217	2.80	4.74	適



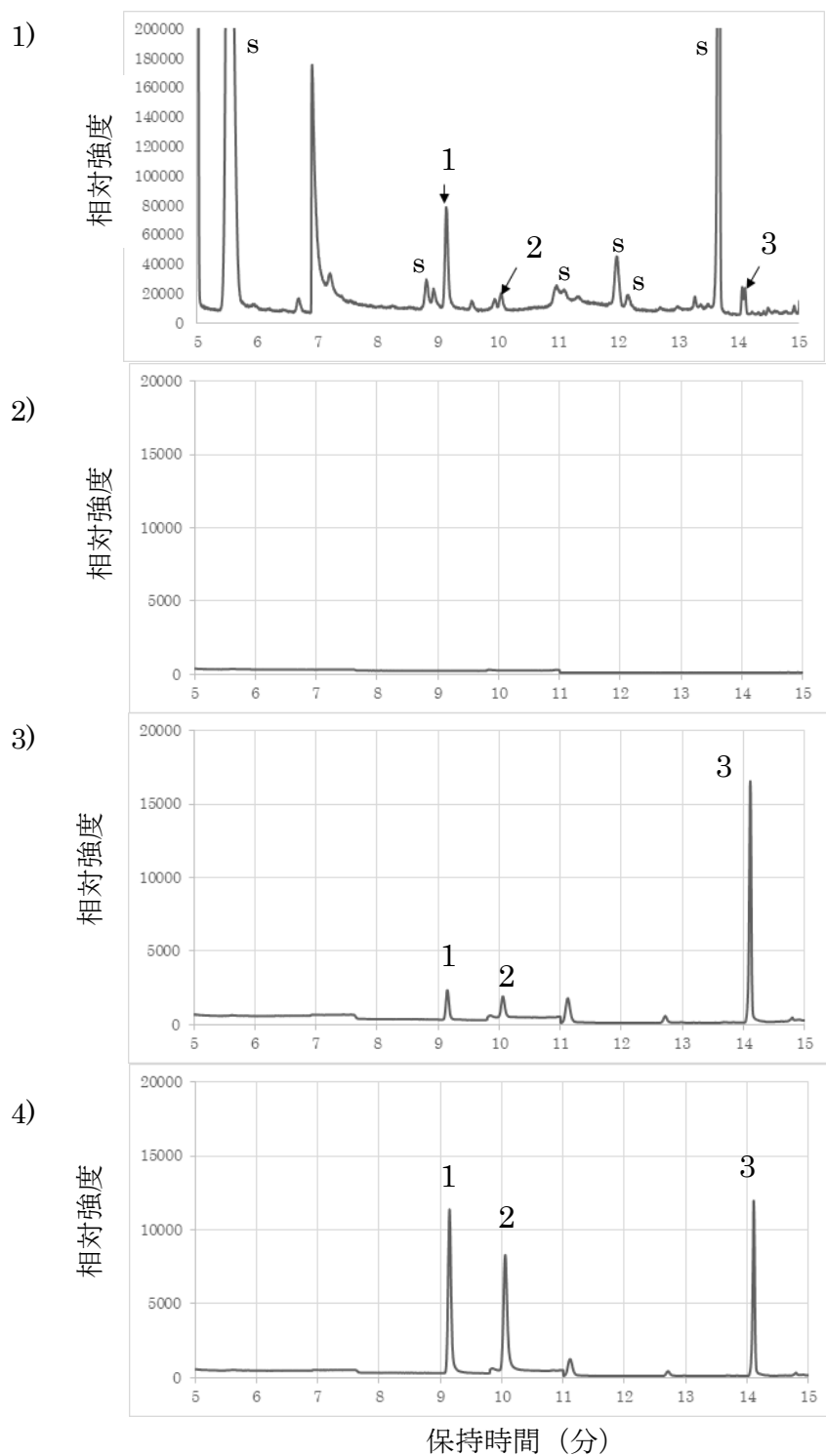
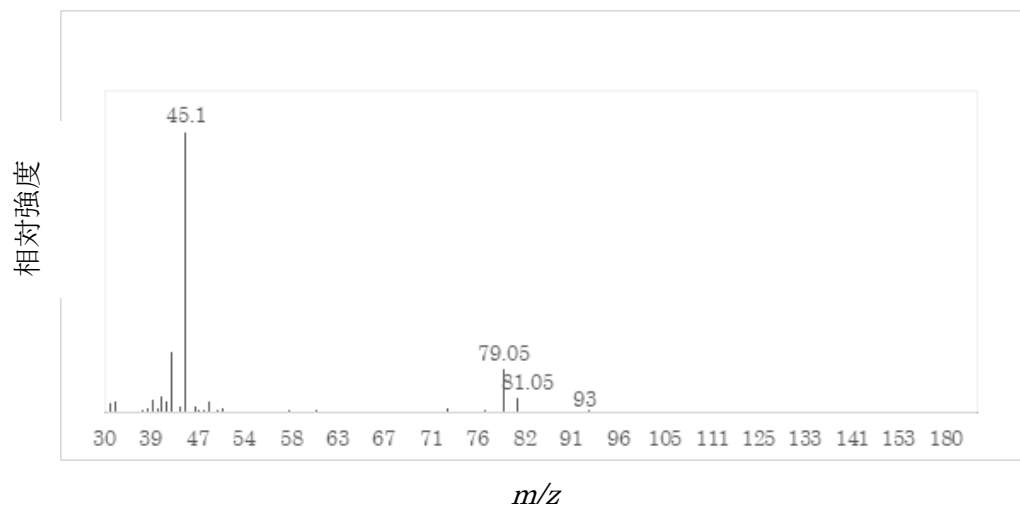


図1 GC-MS クロマトグラム

1) 検量線用 PCHs 標準液 (200 ng/mL) (TIC)、2) ジエチルエーテル (SIM)、  
 3) 検量線用 PCHs 標準液 (25 ng/mL) (SIM)、4) 検量線用 PCHs 標準液 (200 ng/mL) (SIM)

1: 1C2P、2: 2C1P、3:  $\sigma$ -xylene- $d_{10}$  (IS)、s: 溶媒由来

1)



2)

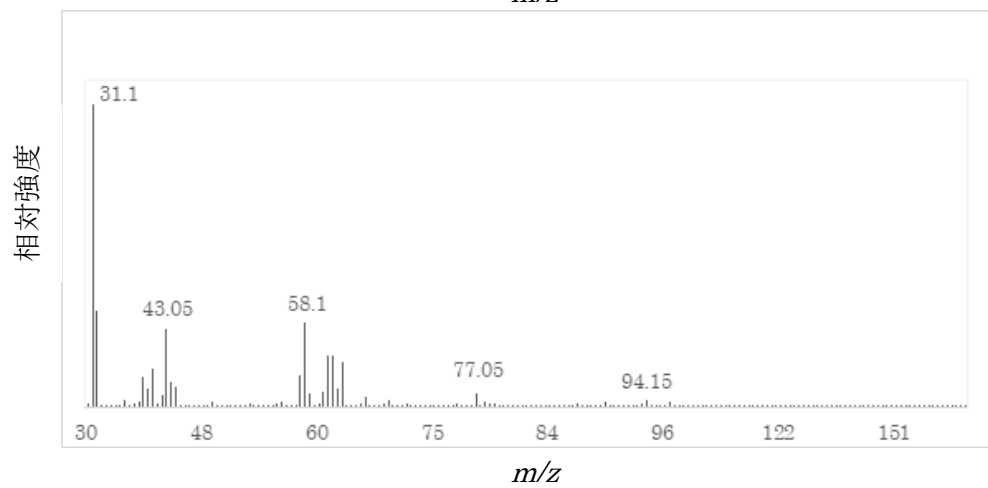


図2 PCHs 標準液 (500 ng/mL) の MS スペクトル

- 1) 保持時間 9 分のピーク 1 (1C2P) の MS スペクトル
- 2) 保持時間 10 分のピーク 2 (2C1P) の MS スペクトル

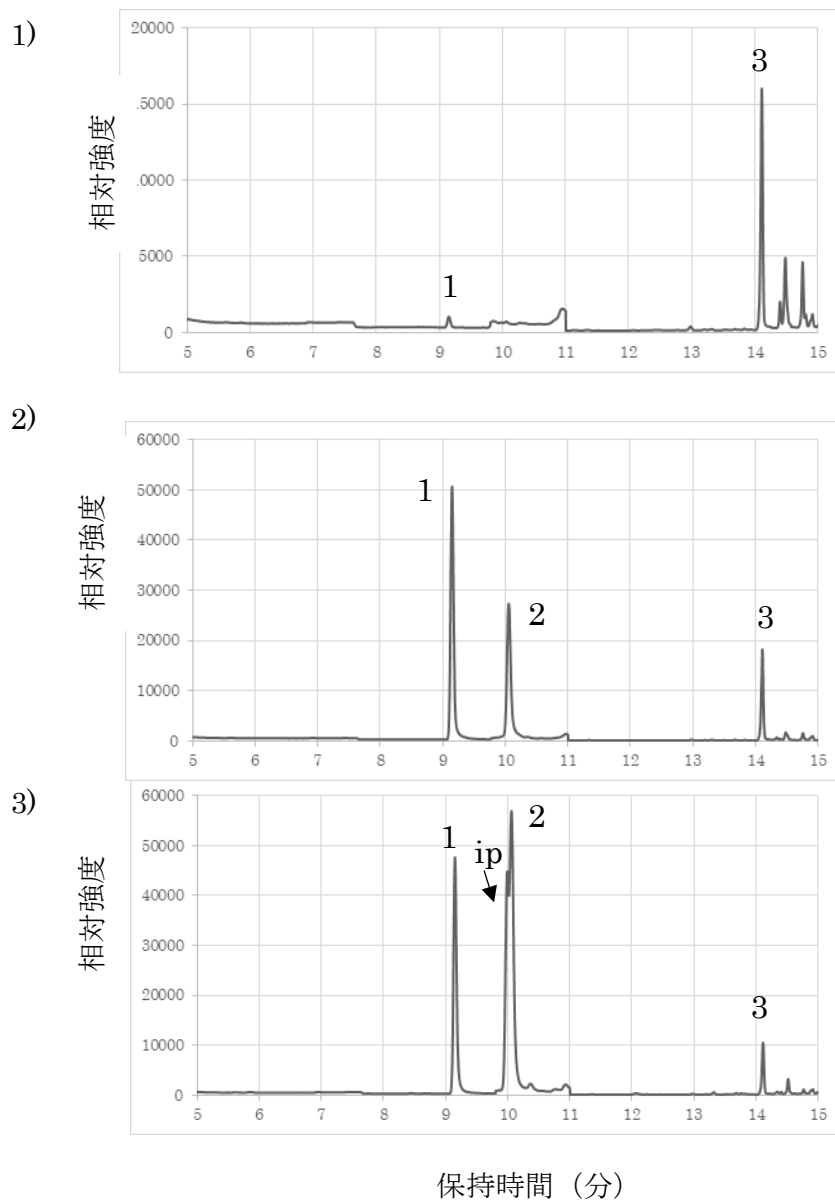


図3 GC-MS クロマトグラム (SIM)  
 1) 試料 A、2) 試料 B、3) 試料 C  
 1: 1C2P、2: 2C1P、3:  $\sigma$ -xylene- $d_{10}$ (IS)、ip : 不純物

