

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に資するための研究  
令和元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  
—ステビオール配糖体の LC/MS による分析法の検討—  
分担研究者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

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。そこで液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/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ステビオール配糖体の JECFA 規格として記載されている LC/MS の条件を参照し、絶対検量線法及び内標準法により分析を行い、分析精度について調べた。その結果、LC/MS では、選択性が高く S/N 比も良好であったが、測定値のばらつきが大きく、検出限界や定量下限は  $\sigma$  値を基にして求める方が良いものと考えられた。LC/MS では、対象化合物の検出感度と検出濃度に適した検量線や関係線の濃度範囲を用いる必要があり、定量対象濃度に対して広すぎないことが重要と示唆された。本研究では、内標準と対象化合物の  $m/z$  値が異なる場合、内標準法の精度は絶対検量線法とほぼ同じであったが、同一  $m/z$  値を用いる内標準法では約 10 倍精度が高かった。そのため、内標準と対象化合物とで検出感度の変化が同じ傾向を示す場合には、内標準法が精度の向上に有効と推察された。

研究協力者

寺見祥子 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  
中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所

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、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

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

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。

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、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 (MS) を用いる試験法が挙げられた。MS を用いる試験法を導入する場合を想定し、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) を用いる試験法として平成 29 年度にローズマリー抽出物の JECFA 規格の試験法、平成 30 年度にヒドロキシプロピルメチルセルロースの JECFA 規格の試験法を用い、GC/MS による定量法の注意点について検討を行った。そこで今年度は、LC/MS を用いる定量法の精度について調べた。表 1 は、the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) の成分規格各条として、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、具体的な試験法として食品添加物ステビオール配糖体 (Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni) の規格<sup>1)</sup>の Method of assay (定量法) として記載されている LC/MS の条件を参照し、LC/MS による絶対検量線法及び内標準法による分析

精度について調べた。

## B. 研究方法

本研究では、第 87 回 JECFA 会議にて審議されたステビオール配糖体<sup>1)</sup>規格の定量法として記載されているグラジェントによる LC/MS 条件を参照し、下述の通りに行った。JECFA 規格の定量法では、LC/MS を定性とピークの分子量推定の目的に使用し、定量計算は紫外吸光光度検出 (UV) によるピーク面積を基に行うこととなっているが、本研究では、LC/MS での課題抽出のため、LC/MS によるピーク面積を用い、絶対検量線法及び内標準法により定量計算を行い、液体クロマトグラフィー紫外吸光光度検出 (LC/UV) によるピーク面積を用いた場合と比較した。

### 1. 試料及び試薬

ステビオール配糖体の食品添加物製品は、主にステビオシド又はレバウジオシド A を含有するが、本研究では、主にレバウジオシド A を含有する (成績書記載レバウジオシド A : 97.6%、乾燥減量 0.5%) 1 社 1 製品を用いた。

ステビオール配糖体標品として、レバウジオシド A 及びステビオシドの市販試薬 (富士フィルム和光純薬製の [食品分析用] を用いた。ステビオシド市販試薬は内標準物質としても用いた。

標準原液及び標準液の調製にはアセトニトリル [高速液体クロマトグラフィー用] (富士フィルム和光純薬製) を用いた。

## 2. 装置

島津製作所製 LCMS-2020 システム (送液ユニット: LC20AD、オンラインデガッサ: DGU-20A3R、カラムオーブン: CTO-20AC、オートサンプラー: SIL-20ACHT、システムコントローラ: CBM-20A、フォトダイオードアレイ検出器: SPD-M20A、MS: MS-2020)

## 3. 標準原液、標準液及び内標準液の調製

標準原液: レバウジオシド A 及びステビオシドの標品を約 50 mg ずつ精密に量りとり、それぞれ水・アセトニトリル混液 (7:3) で 100 mL に定容し、各標準原液とした (500 µg/mL)。

標準液: レバウジオシド A 及びステビオシドの標準原液 1 mL ずつを正確に量り、水・アセトニトリル混液 (7:3) を加えて 25 mL に定容し、混合標準液とした (20 µg/mL)。

検量線用標準液: 混合標準液を正確に量り、各標品の濃度が 1、5、10 及び 20 µg/mL になるようにそれぞれ水・アセトニトリル混液 (7:3) を加えて正確に希釈し、濃度 4 点の検量線用標準液を調製した。

内標準液: ステビオシドの標準原液 1 mL を正確に量り、水・アセトニトリル混液 (7:3) を加えて 25 mL に定容し、内標準液とした (20 µg/mL)。

試料原液: 試料約 10 mg をビーカーに精密に量り、約 15 mL の水・アセトニトリル混液 (7:3) を加え、超音波処理により試料を溶解した後、20mL メスフラスコに移し、ビーカーの内壁を

水・アセトニトリル混液 (7:3) で洗って合わせた後定容した (試料 500 µg/mL)。この液 1 mL を正確に量り、水・アセトニトリル混液 (7:3) を加えて 25 mL に定容し、試料原液とした (試料 20 µg/mL)。

試料液: 試料原液 5.0 mL と内標準液 5.0 mL をそれぞれ正確に量り、混合した液を試料液とした (試料 10 µg/mL)。

## 4. LC/MS の条件

JECFA 規格として記載されている条件に基づき、一部適切な条件に変更し、以下の条件で行った。注入量は、予備検討により検量線で直線性が得られる範囲を推定し、10 µL から 2 µL に変更した。また、SIM での選択イオンはスキャン測定結果に基づき選択した。

### LC 条件

- ・カラム ODS AQ (250 mm×4.6 mm、5 µm、ワイエムシィ製)
- ・カラム温度 50°C
- ・流速 0.3 mL/分
- ・注入量 2 µL
- ・移動相: 溶媒グラジエント

時間 (分)	A 液: 水、B 液: アセトニトリル		流速 (mL/分)
	移動相 A (%)	移動相 B (%)	
0.00	85.0	15.0	0.3
40.0	70.0	30.0	0.3
60.0	55.0	45.0	0.3
70.0	55.0	45.0	0.3

### 検出条件

MS:

- ・イオン化法 ESI(-)
  - ・測定モード スキャン（確認時、 $m/z$  50~1150）及び SIM（定量時、表 2）
- スキャン測定により得られた MS スペクトル（図 1）を基に SIM に用いるイオンを選択した。

UV : 210 nm

同一測定について MS と UV での検出を行った。試料液は、各 6 回の繰り返し測定を行った。

#### 5. 標準液の分析におけるピーク形状、ピークを選択性及び検出感度

LC/MS 及び LC/UV の混合標準液の測定結果で観察されるレバウジオシド A とステビオシドのピーク形状、ピークを選択性及び検出感度について調べた。

#### 6. 試料中のレバウジオシド A の定量

試料中のレバウジオシド A の定量は、LC/MS 及び LC/UV の測定結果で得られるピーク面積を基に、絶対検量線法及び内標準法で行った。

絶対検量線法では、検量線用標準液の濃度 4 点の内、直線性の得られる範囲の濃度を用いて検量線を作成した。試料液におけるレバウジオシド A のピーク面積と検量線の式とから、試料液中のレバウジオシド A の濃度を求め、乾燥物換算を行い、試料中のレバウジオシド A 含量を算出した。

内標準法では、検量線用標準液におけるピーク面積から、内標準ステビオシドのピーク面積に対するレバウジオシド A の面積の比を求め、関係線を作

成した。検量線用標準液の濃度 4 点の内、直線性示す範囲の濃度少なくとも 3 点を用いて関係線を作成した。試料液における内標準ステビオシドに対するレバウジオシド A のピーク面積比と関係線の式とから、試料液中のレバウジオシド A の濃度を求め、乾燥物換算を行い、試料中のレバウジオシド A 含量を算出した。

#### 7. 定量精度

レバウジオシド A の定量法として LC/MS での絶対検量線法、内標準法、LC/UV での絶対検量線法、内標準法を実施し、各方法での 6 回繰り返し測定時のレバウジオシド A 含量の相対標準偏差 (RSD) (%) を求め、精度について調べた。

（倫理面への配慮）

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

### C. 結果及び考察

#### 1. 標準液の分析におけるピーク形状、ピークを選択性及び検出感度

LC/MS の絶対検量線法、内標準法、LC/UV の絶対検量線法、内標準法で標準液を分析し、各方法でのレバウジオシド A 及びステビオシドの検出結果から、ピーク形状、ピークを選択性、検出感度について調べた。

図 2 に結果を示すように、ピーク形状は、レバウジオシド A 及びステビオシド共に、LC/UV より LC/MS の方がシャープであり、良好であった。

ピークの選択性は、LC/UVでは、ステビオシドとレバウジオシド A の様に保持時間が近い場合は、ピークの分離が重要となる。一方、LC/MSでは、 $m/z$  803 では両化合物が検出されるため分離が重要となるが、レバウジオシド A は  $m/z$  965、ステビオシドは  $m/z$  641 で検出した場合は、それぞれ対象化合物のピークのみが検出され、選択性は良好であった。

検出感度として S/N 比 (1 及び 5  $\mu\text{g/mL}$ ) を求めたところ、LC/MS では、レバウジオシド A ( $m/z$  965) で 339 及び 1087、ステビオシド ( $m/z$  641) で 281 及び 819 であった。また、レバウジオシド A ( $m/z$  803) で 176 及び 521、ステビオシド ( $m/z$  803) で 319 及び 1028 であった。一方、LC/UV では、レバウジオシド A (210 nm) で 2.4 及び 13、ステビオシド (210 nm) で 3.1 及び 14 であった。LC/MS での S/N 比は LC/UV での S/N 比の 40 倍以上であった。

各分析方法での測定時の検出限界及び定量下限の値を算出した結果を表 3 に示す。検出限界及び定量下限を S/N 比の値を基に S/N=3 及び S/N=10 相当として求めたところ、LC/MS では LC/UV の 40 分の 1 以下の値となった。一方、6 回繰り返し測定を行い、日本産業規格 (JIS) 高速液体クロマトグラフィー通則<sup>2)</sup>及び高速液体クロマトグラフィー質量分析計通則<sup>3)</sup>の確率的手法を参考に、測定値の標準偏差 ( $\sigma$ ) に倍率  $t$  (4.03) を掛け、濃度に換算した値を検出限界とし、定量下限を検出限界

の 3 倍として求めたところ、LC/MS では LC/UV より低値となったが、その差は大きくは無く、2 分の 1 以内であった。今回の分析法で、LC/MS は LC/UV より S/N 比が良好であったが、繰り返し測定精度が劣ることから、精度を考慮した検出限界、定量下限の値はほぼ同レベルとなったと考えられる。

## 2. 試料中のレバウジオシド A の定量

LC/MS での検量線 ( $m/z$  965) 及び関係線 ( $m/z$  965/  $m/z$  641) はレバウジオシド A 標品の濃度 3 点 (1~10  $\mu\text{g/mL}$  及び 5~20  $\mu\text{g/mL}$ ) により、LC/UV での検量線及び関係線はレバウジオシド A 標品の濃度 4 点 (1~20  $\mu\text{g/mL}$ ) により直線性が得られ、それぞれ  $R^2$  は 0.9724 及び 0.9843 と 0.9988 であり、これら範囲の検量線及び関係線を定量計算に用いた。その結果 (表 4)、LC/MS での絶対検量線法、内標準法から算出したレバウジオシド A の含量 (%) は、1~10  $\mu\text{g/mL}$  の検量線及び関係線を用いた場合はそれぞれ 88.0 及び 85.6%、5~20  $\mu\text{g/mL}$  の検量線及び関係線を用いた場合はそれぞれ 95.8 及び 91.6% であった。LC/UV での絶対検量線法、内標準法から算出したレバウジオシド A の含量 (%) は、1~20  $\mu\text{g/mL}$  の検量線及び関係線を用いて算出し、それぞれ 94.6 及び 95.1% となった。LC/MS では測定対象濃度を中心となるような検量線を用いる方が、LC/UV に近い値となった。表 4 には、LC/MS の  $m/z$  803 を用いた場合の定量値も参考に示したが、1~10  $\mu\text{g/mL}$  の関係線を用いた内標

準法以外は、LC/UV より高い値となり、100%を超える場合もあった。

### 3. 定量精度

LC/MS での絶対検量線法、内標準法、LC/UV での絶対検量線法、内標準法での6回繰り返し測定時の定量精度として、各方法での相対標準偏差 (RSD) (%) を求めた。その結果 (表 4)、LC/MS の絶対検量線法、内標準法での RSD は、1~10  $\mu\text{g/mL}$  の検量線 ( $m/z$  965) 及び関係線 ( $m/z$  965/  $m/z$  641) を用いた場合はそれぞれ 3.9 及び 3.1%、5~20  $\mu\text{g/mL}$  の検量線 ( $m/z$  965) 及び関係線 ( $m/z$  965/  $m/z$  641) を用いた場合はそれぞれ 6.5 及び 5.3%であった。LC/UV での絶対検量線法、内標準法の RSD は、それぞれ 3.9 及び 3.1%であった。LC/MS では LC/UV での 3.5 及び 3.0%と比較し、検量線の濃度 1~10  $\mu\text{g/mL}$  を用いた場合はほぼ同じであったが、5~20  $\mu\text{g/mL}$  では大きい傾向がみられた。表 4 には、LC/MS の  $m/z$  803 を用いた場合の精度も示したが、絶対検量線法での精度は、 $m/z$  965 を用いた場合とほぼ同じであったが、内標準法では、1~10  $\mu\text{g/mL}$  及び 5~20  $\mu\text{g/mL}$  の濃度範囲の関係線を用いた場合、それぞれ RSD は約 10 分の 1 の 0.33 及び 0.50%と非常に低い値となり、内標準物質と同じ  $m/z$  による検出では、選択性は低くなるものの、精度は良好になることが示唆された。

### 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 LC/MS を導入することを想定し、分析精度について調べた。今年度は具体的な試験法としてステビオール配糖体の JECFA 規格に記載されている LC/MS の条件を基に、絶対検量線法及び内標準法により分析を行い、検討した。その結果、LC/MS を用いる試験法では、選択性が高く S/N 比も良好である一方、定量値のばらつきが大きく、検出限界や定量下限は  $\sigma$  値を基にして求める方が良いものと考えられた。LC/MS では、対象化合物の検出感度と検出濃度に適した検量線や関係線の濃度範囲を用いる必要があり、定量対象濃度に対して広すぎないことが重要と示唆された。本研究では、内標準と対象化合物の  $m/z$  値が異なる場合、内標準法の精度は絶対検量線法とほぼ同じであったが、同一  $m/z$  値を用いる内標準法では約 10 倍精度が高かった。そのため、内標準と対象化合物とで検出感度の変化が同じ傾向を示す場合には、内標準法が精度の向上に有効と推察された。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 1) Atsuko Tada, Fuyuko Hioki, Noriko Furusho, Naoko Masumoto, Chiye Tatebe, Hiroki Kubota, Kyoko Sato, Validation of a quantification method using gas chromatography-mass spectrometry. -Intra-laboratory

validation for specifications of  
food additive-, ICoFF2019,  
2019.12 (Kobe)

#### F. 参考文献

- 1) Steviol Glycosides From *Stevia Rebaudiana* Bertoni, (Framework for) Steviol Glycosides. Compendium of Food Additive Specifications. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 87th meeting 2019. FAO JECFA Monographs 23.
- 2) 日本規格協会：高速液体クロマトグラフィー通則 JIS K0124, 1983 年制定・2011 年改正
- 3) 日本規格協会：高速液体クロマトグラフィー通則 JIS K0136, 2004 年制定・2015 年改正

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 ( $m/z$ )		検出時間 (分)	化合物	保持時間 (分)
定量用 1	定量用 2			
965	803	0~70	レバウジオシド A	63.2
641	803	0~70	ステビオシド	63.8



表 3 各化合物の検出限界及び定量下限

1)

	検出限界(S/N=3)	定量下限((S/N=10)
	溶液濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	溶液濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
レバウジオシド A (LC/MS) ( <i>m/z</i> 965)	0.019	0.062
レバウジオシド A (LC/MS) ( <i>m/z</i> 803)	0.041	0.14
レバウジオシド A (LC/UV)	1.2	3.9
ステビオシド (LC/MS) ( <i>m/z</i> 641)	0.025	0.083
ステビオシド (LC/MS) ( <i>m/z</i> 803)	0.022	0.072
ステビオシド (LC/UV)	1.1	3.5

2)

	検出限界*	定量下限**
	溶液濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	溶液濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
レバウジオシド A (LC/MS) ( <i>m/z</i> 965)	1.3	3.9
レバウジオシド A (LC/MS) ( <i>m/z</i> 803)	1.3	3.8
レバウジオシド A (LC/UV)	1.4	4.3
ステビオシド (LC/MS) ( <i>m/z</i> 641)	0.80	2.4
ステビオシド (LC/MS) ( <i>m/z</i> 803)	1.2	3.7
ステビオシド (LC/UV)	1.5	4.5

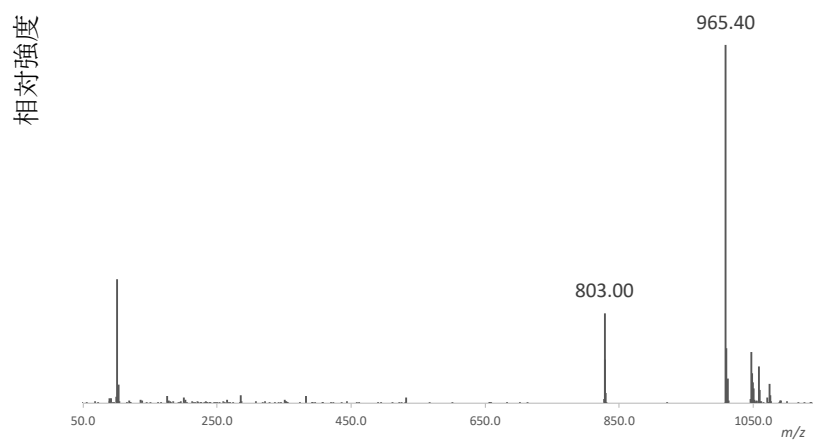
\*検出限界：日本産業規格（JIS）の通則<sup>2),3)</sup>を参考に、6回繰り返し測定値の標準偏差（ $\sigma$ ）に 4.03 を掛け、濃度に換算した。

\*\*定量下限：検出限界の 3 倍として求めた。

表 4 LC/MS を用いたレバウジオシド A 定量値と精度

	検量線標準液 採用濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	1, 5, 10 ( $\mu\text{g/mL}$ )	5, 10, 20 ( $\mu\text{g/mL}$ )
	$R^2$	0.9724	0.9843
レバウジオシド A (LC/MS( $m/z$ 965), 絶対検量線法)	定量値 (%)	88.0	95.8
	精度 (RSD%)	3.9	6.5
レバウジオシド A (LC/MS( $m/z$ 965/ $m/z$ 641), 内標準法)	定量値 (%)	85.6	91.6
	精度 (RSD%)	3.1	5.3
	$R^2$	0.9507	0.9859
レバウジオシド A (LC/MS( $m/z$ 803), 絶対検量線法)	定量値 (%)	98.0	112.5
	精度 (RSD%)	3.7	5.7
レバウジオシド A (LC-MS( $m/z$ 803/ $m/z$ 803), 内標準法)	定量値 (%)	94.3	106.0
	精度 (RSD%)	0.33	0.50
	検量線標準液 採用濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	1, 5, 10, 20 ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	$R^2$	0.9988	
レバウジオシド A (LC/UV, 絶対検量線法)	定量値 (%)	94.6	
	精度 (RSD%)	3.5	
レバウジオシド A (LC/UV, 内標準法)	定量値 (%)	95.1	
	精度 (RSD%)	3.0	

1)



2)

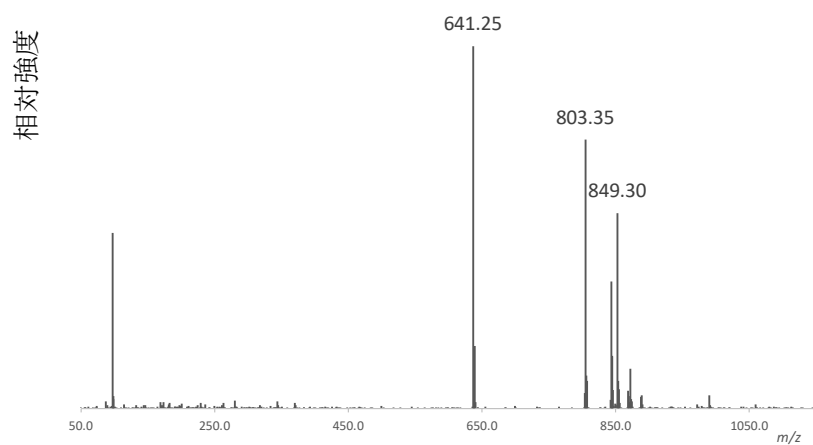


図1 レバウジオシド A 及びステビオシド混合標準液 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) の  
レバウジオシド A 及びステビオシドの LC/MS 測定時の MS スペクトル  
1) 保持時間 63.2 分のピーク 1 (レバウジオシド A)  
2) 保持時間 63.8 分のピーク 2 (ステビオシド)

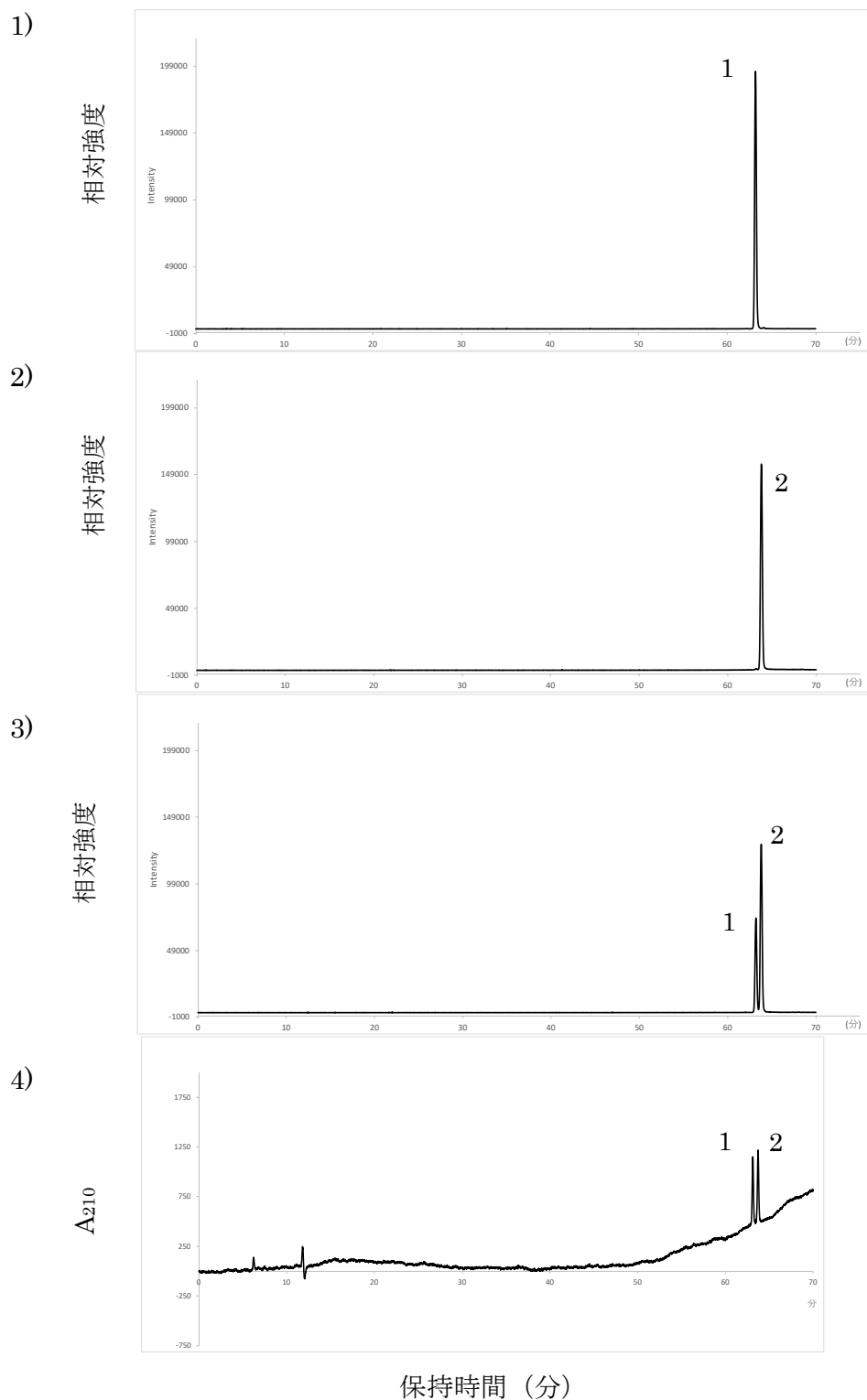


図2 標準液のクロマトグラム

1) LC/MS  $m/z$  965 (SIM)、2) LC/MS  $m/z$  641 (SIM)、  
 3) LC/MS  $m/z$  803 (SIM)、4) LC/UV 210 nm  
 1: レバウジオシド A、2: ステビオシド