

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研究
令和2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 (2)—

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

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、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、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について検討を行っている。令和元年度に、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、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 のグラジエント条件を参照し、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。今年度は、同様にしてアイソクラティック条件での検討を行った。その結果、LC/MS では選択性が高く S/N 比も良好であり、 σ 値を基にして求めた検出限界や定量下限値も、LC/MS の方が LC/UV より 4~6 倍検出感度が高い結果となった。また、グラジエント条件での定量結果と比較したところ、LC/UV では、精度は許容範囲ではあるものの低く、定量値も低かった。LC/MS の場合は、精度は同程度か少し良好であったが、定量値はグラジエント条件より低い傾向が見られ、特定のイオンを用いた場合のみ同程度の定量値となった。アイソクラティック条件での分析は、多検体の迅速分析に有用であるが、高い真度や精度を求める場合は、適切なイオンや適切な濃度範囲の検量線等を用い、ピーク分離、精度及び定量値をグラジエント条件の場合と比較し、より良好な条件を選択すべきであることが示唆された。

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

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、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。

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、平成 29 年度及び平成 30 年度にガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）を用いる試験法による定量法の注意点について検討を行った。令和元年度には、LC/MS を用いる定量法の精度について調べるため、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 JECFA（the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives）規格¹⁾の Method of assay（定量法）として記載されている溶媒グラジェントによる LC/MS 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。今年度は、同様にしてステビオール配糖体のアイソクラティック LC/MS 条件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、ステビア抽出物のアイソクラティック LC/MS 定量条件により得られたピーク面積から、絶対検量線法及び内標準法で定量計算を行い、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。また、令和元年度に実施した溶媒グラジェントによる LC/MS 条件での検討結果と比較した。

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] (富士フイルム和光純薬製) を用いた。

2. 装置

グラジェント条件での研究と同じ装置を用いた。

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-20A_{3R}、カラムオーブン: CTO-20AC、オートサンプラー: SIL-20AC_{HT}、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: LCMS-2020)

3. 標準原液、標準液及び内標準液の調製

グラジェント条件での研究と同じ方法で調製した。具体的には下記の通りである。

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、20 mL 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

ステビア抽出物のアイソクラティック LC/MS 定量条件として、適切な条件を検討し、最終的に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及びレバウジオシド A とステビオシドのピーク分離を考慮し、グラジェント条件の 2 µL から 1 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 Inertsil ODS-3 (150 mm × 2.1 mm、3 µm、GL Sciences 製)
- ・カラム温度 40°C
- ・流速 0.3 mL/分

- ・ 注入量 1 μ L
- ・ 移動相：0.1 vol% ぎ酸水溶液 / 0.1 vol% ぎ酸含有アセトニトリル溶液 (7:3)

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 500~1050) 及び SIM (定量時、表 1)

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。 m/z 803 はレバウジオシド A とステビオシド両方で認められ、アイソクラティック条件で両化合物のピーク保持時間が近い本研究では、SIM に使用しないこととした。

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、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

データの解析は、グラジェント条件での研究と同様にして行った。

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。

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、ピークの選択性、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 (5 及び 10 $\mu\text{g/mL}$ (試料導入量がグラジェント条件の場合は 2 倍の 2 μL であったため、試料導入総量としては、それぞれグラジェント条件での 2.5 及び 5 $\mu\text{g/mL}$ に相当)) を求めたところ、LC/MS では、レバウジオシド A (m/z 965) で 332 及び 662、ステビオシド (m/z 641) で 256 及び 542 であった。また、レバウジオシド A (m/z 1011、 $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$) で 392 及び 918、ステビオシド (m/z 849、 $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$) で 793 及び 1380 であった。一方、LC/UV では、レバウジオシド A (210 nm) で 0.2 及び 1.7、ステビオシド (210 nm) で 0.3 及び 2.1 であった。LC/MS での S/N 比は LC/UV での S/N 比の 250 倍以上であった。

LC/MS での S/N 比は、グラジェント条件の場合と同程度であったが、LC/UV での S/N 比は、グラジェント条件の場合の約 7 分の 1 であり、そのため、アイソクラティック条件では LC/MS と LC/UV での S/N 比の差がより大きかった。

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 2 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 250 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²⁾及び高速液体クロマトグラフィー質量分析計通則³⁾の確率的手法を参考に、測定値の標準偏差 (σ) 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 より低値となり、LC/UV の 4 分の 1 以下となった。今回の分析法で、LC/MS は LC/UV より S/N 比が 250 倍以上と非常に良好であったが、精度を考慮した検出限界、定量下限の差は LC/MS と LC/UV で 4~6 倍であった。

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 3 点 (5~20 $\mu\text{g/mL}$) によ

り直線性が得られ、それぞれ R^2 は 0.9985 及び 0.9994 と 0.9705 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。 R^2 は、グラジエント条件での結果と比較し、LC/MS ではより高値となったが、LC/UV では低値となった。定量の結果 (表 3)、LC/MS での絶対検量線法 (m/z 965)、内標準法 (m/z 965/ m/z 641) 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 85.6 及び 90.5%、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 86.7 及び 94.2%であった。表 3 には、LC/MS の m/z 1011/ m/z 849 を用いた場合の定量値も示したが、LC/MS の m/z 965/ m/z 641 と定量値はほぼ同じであり、精度はより良好であった。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、5~20 $\mu\text{g/mL}$ の検量線及び関係線 (アイソクラティック条件では、グラジエント条件の場合より感度が低く 1 $\mu\text{g/mL}$ でのピーク検出ができなかったため 5 $\mu\text{g/mL}$ 以上を使用) を用いて算出し、それぞれ 77.5 及び 63.8%と LC/MS より低い値となった。

本研究のアイソクラティック条件での定量結果を、令和元年度のグラジエント条件での定量結果と比較した。その結果、LC/MS の場合は、グラジエント条件の場合より絶対検量線法と内標準法との値の差が大きく、絶対検量線法ではグラジエント条件の場合より低かった。内標準法の場合はグラジエント条件の場合とおよそ同程度であった

が、検量線等の濃度範囲により 4%程度値が異なり、適切な濃度範囲の検量線等を用いることが重要であることが示された。今回の分析では 5~20 $\mu\text{g/mL}$ の検量線等を用いれば、グラジエント条件の LC/UV 内標準法の定量値 95.1%に近い値となった。今回のアイソクラティック条件の LC/UV の場合は、絶対検量線法、内標準法での定量値はそれぞれグラジエント条件の場合の 82%及び 67%と低値となった。

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 3)、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 1.1 及び 1.8%、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 1.1 及び 2.0%であった。LC/MS の m/z 1011 を用いた場合の精度は、絶対検量線法では m/z 965 を用いた場合とほぼ同じであったが、内標準法 (m/z 1011/ m/z 849) では数倍良い精度が得られた。LC/UV での絶対検量線法、内標準法の RSD は、それぞれ 5.9 及び 11.0%であった。

本研究のアイソクラティック条件での結果を、令和元年度のグラジエント条件での結果と比較した結果、LC/MS の場合は、精度は同程度か少し良好に

なった。LC/UV の場合は、精度は許容範囲ではあるもののグラジエント条件より低下した。

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、令和元年度のグラジエント条件での検討と同様にして、ステビオール配糖体のアイソクラティック LC/MS 条件での分析法について、絶対検量線法及び内標準法により検討を行った。その結果、LC/MS では選択性が高く S/N 比も良好であり、 σ 値を基にして求めた検出限界や定量下限値も、LC/MS の方が LC/UV より 4~6 倍検出感度が高い結果となった。また、グラジエント条件での定量結果と比較したところ、LC/UV では、精度は許容範囲ではあるものの低く、定量値も低かった。LC/MS の場合は、精度は同程度か少し良好であったが、定量値はグラジエント条件より低い傾向が見られ、特定のイオンを用いた場合のみ同程度の定量値となった。アイソクラティック条件での分析は、多検体の迅速分析に有用であるが、高い真度や精度を求める場合は、適切なイオンや適切な濃度範囲の検量線等を用い、ピーク分離、精度及び定量値をグラジエント条件の場合と比較し、より良好な条件を選択すべきであることが

示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 寺見祥子、多田敦子、増本直子、中島馨、建部千絵、久保田浩樹、佐藤 恭子、食品添加物公定書一般試験法に関する研究—ステビオール配糖体の LC-MS による分析法の検討—、第 57 回全国衛生化学技術協議会年会（誌上発表）

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 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 (JECFA), 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 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	1011	0~20	レバウジオシド A	4.9
641	849	0~20	ステビオシド	5.2

表 2 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)	0.045	0.15
レバウジオシド A (LC/MS) (<i>m/z</i> 1011)	0.33	0.11
レバウジオシド A (LC/UV)	17	57
ステビオシド (LC/MS) (<i>m/z</i> 641)	0.055	0.18
ステビオシド (LC/MS) (<i>m/z</i> 849)	0.022	0.072
ステビオシド (LC/UV)	15	49

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)	0.5	1.4
レバウジオシド A (LC/MS) (<i>m/z</i> 1011)	0.4	1.1
レバウジオシド A (LC/UV)	2.7	8.1
ステビオシド (LC/MS) (<i>m/z</i> 641)	0.5	1.6
ステビオシド (LC/MS) (<i>m/z</i> 849)	0.6	1.8
ステビオシド (LC/UV)	2.4	7.3

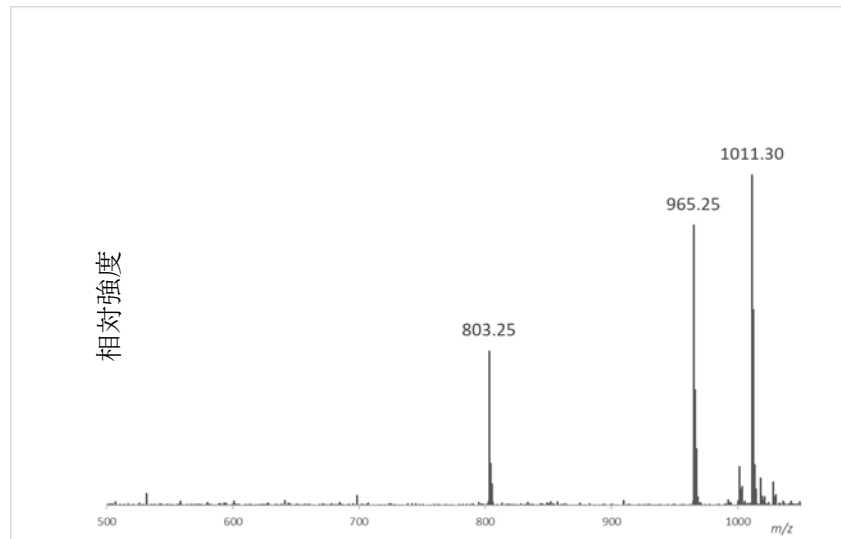
*検出限界：日本産業規格（JIS）の通則^{2),3)}を参考に、6回繰り返し測定値の標準偏差（ σ ）に 4.03 を掛け、濃度に換算した。

**定量下限：検出限界の 3 倍として求めた。

表 3 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	0.9985	0.9994
レバウジオシド A (LC/MS(m/z 965), 絶対検量線法)	定量値 (%)	85.6	86.7
	精度 (RSD%)	1.1	1.1
レバウジオシド A (LC/MS(m/z 965/ m/z 641),内標準法)	定量値 (%)	90.5	94.2
	精度 (RSD%)	1.8	2.0
	R ²	0.9979	0.9990
レバウジオシド A (LC/MS(m/z 1011), 絶対検量線法)	定量値 (%)	85.1	86.4
	精度 (RSD%)	0.71	0.71
レバウジオシド A (LC/MS(m/z 1011/ m/z 849),内標準法)	定量値 (%)	91.6	95.9
	精度 (RSD%)	0.46	0.50
	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	-	0.9705
レバウジオシド A (LC/UV, 絶対検量線法)	定量値 (%)	-	77.5
	精度 (RSD%)	-	5.9
レバウジオシド A (LC/UV,内標準法)	定量値 (%)	-	63.8
	精度 (RSD%)	-	11.0

1)



2)

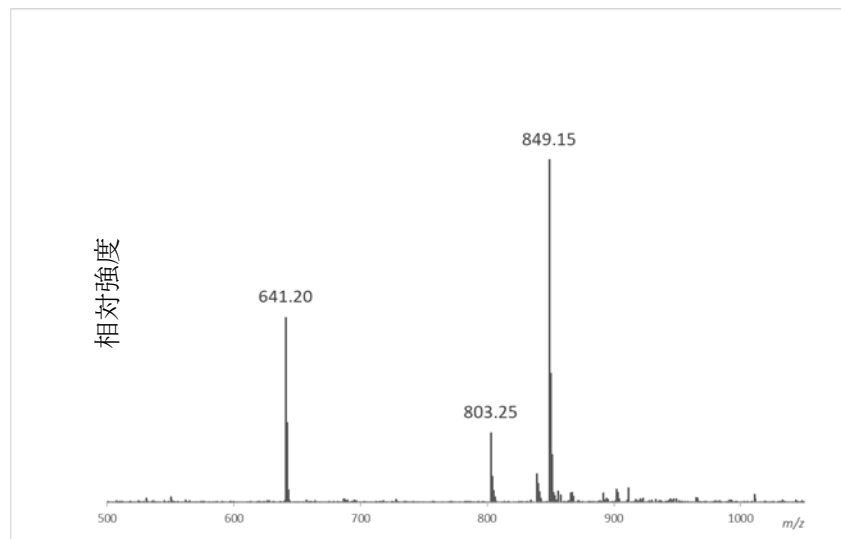
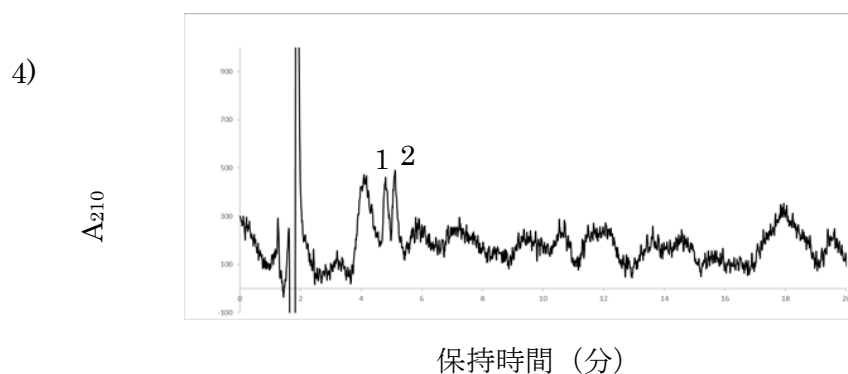
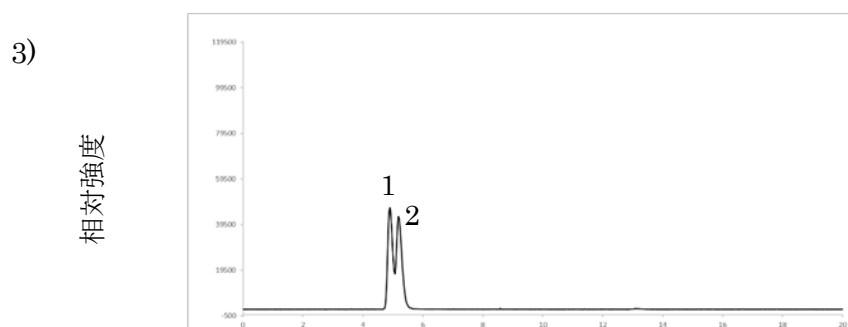
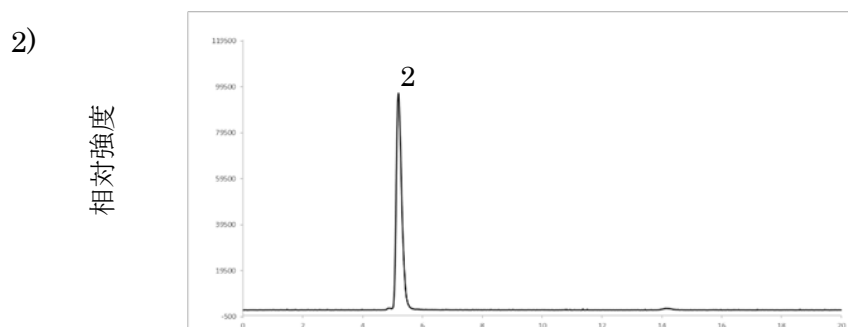
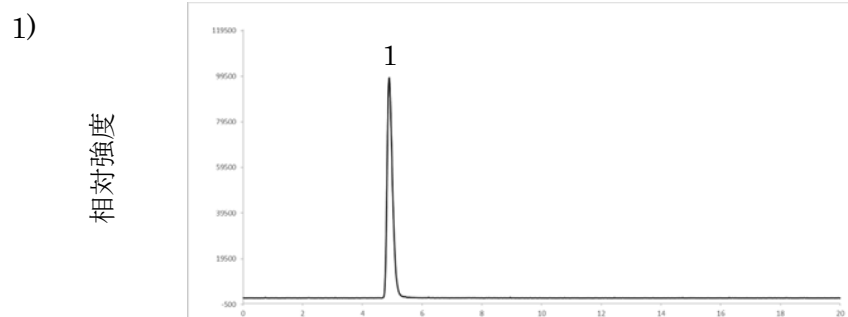


図1 レバウジオシド A 及びステビオシド混合標準液 (各 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の
レバウジオシド A 及びステビオシドの LC/MS 測定時の MS スペクトル
1) 保持時間 4.9 分のピーク 1 (レバウジオシド A)
2) 保持時間 5.2 分のピーク 2 (ステビオシド)



保持時間 (分)

図2 レバウジオシド A 及びステビオシド混合標準液 (各 10 $\mu\text{g/mL}$) 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