

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3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
—一般試験法 質量分析法案の検討—

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 (MS) を用いる試験法を挙げ、その検討を行った。平成 29 年度から令和 2 年度に、GC/MS や LC/MS を用いる具体的な規格試験法の検証を行い、MS を用いたクロマトグラフィーによる定量法の課題について検討した。日本薬局方を参照して作成された食品添加物公定書の質量分析法の原案について検討し、本研究の検討により得られた結果等を基に変更及び追記を行い、食品添加物公定書一般試験法の質量分析法 (案) を作成した。

研究協力者

西崎雄三 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

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¹⁾。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 (表 1)。MS を用いる試験法を導入する場合を想定し、平成 29 年度²⁾及び平成 30 年度³⁾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 JECFA (the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 規格⁴⁾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⁵⁾。令和 2 年度は、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⁶⁾。今年度は、これまでの検討結果を踏まえ、食品添加物公定書一般試験法の質量分析法案の検討を行った。

B. 方法

平成 29 年度から令和 2 年度までにを行った、具体的な分析対象物質についての質量分析計を用いるクロマトグラフィーによる検討を以下に示す。

- 1) ローズマリー抽出物 JECFA 規格案の GC-MS 分析法²⁾

- 2) ヒドロキシプロピルメチルセルロース JECFA 規格 GC-MS 分析法³⁾

- 3) ステビオール配糖体の LC/MS によるグラジェント分析法⁵⁾

- 4) ステビオール配糖体の LC/MS によるアイソクラティック分析法⁶⁾

これらの検討で得られた結果を基に、食品添加物公定書一般試験法の質量分析法に記載すべきと考えられる内容について、文章案を検討した。

C. 結果及び考察

第十八改正日本薬局方⁷⁾ (以下、局方と略す) では、一般試験法に質量分析法が既に設定されている。そのため、局方の質量分析法を参照し、試験法記載の構成については食品添加物公定書の一般試験法の書きぶりに合わせ、まず、食品添加物公定書の質量分析法の原案が作成された。

そこで、B. 1) ~ 4) に示した、これまでの研究の結果等に基づき、食品添加物公定書の質量分析法の原案について検討し、その変更及び追記を行い、別紙 1 に示す質量分析法 (案) を作成した。主な変更・追記部分を以下に示す。なお、質量分析法の原案からの変更・追記箇所は、以下の記載及び別紙 1 の質量分析法 (案) に、下線を引いて示した。

- 1) 操作法(1)確認の試験の項 「クロマトグラフィー等の分離分析と組み合わせる」: 複数の成分を含む食品添加物を対象とする場合、質量分析法とクロ

マトグラフィーとの組み合わせは、被検成分の定量のみでなく、その確認を行う上でも有用であったため、追記した。

2) 操作法(2)純度及び定量の試験の項

・「純度及び定量の試験」：食品添加物公定書の成分規格では純度試験のみでなく定量法でも活用できることから、文言を追記した。

・「液体クロマトグラフィー質量分析で用いる移動相の条件はカラム分離とイオン化の両方に適した組成となるよう考慮する必要がある。」：質量分析法と液体クロマトグラフィーを組み合わせる上で留意すべき点について追記した。

・「より正確な値や精度のよい結果を得るために、測定対象とする被検成分の安定同位体標識化合物や類似化合物等を内標準物質として試験溶液に添加する方法も可能である。」：食品添加物中の被検成分を分析対象とする場合、安定同位体標識化合物の入手が困難な場合も多いため、内標準物質として類似化合物を追記した。内標準物質の無い場合、質量分析法による定量では、FIDやUVによる検出等に比べ精度が劣る傾向が見られたが、内標準物質を用いることで、精度が向上したため、この点を追記した。

・「被検成分や内標準物質の分析対象イオンには、純度試験及び定量に適したイオンを選択するよう留意する。また、標準溶液の分析結果から作成する検量線や、内標準物質に対する被検成

分の検出感度の比から得られる関係線は、純度試験及び定量に適した濃度範囲の値を用いるよう留意する。」：被検成分や内標準物質に由来するイオンが複数認められる場合、定量に用いるイオンの選択は結果に影響を及ぼしたため、この点について追記した。また、FIDやUVでの検出に比べ、検量線や関係線の直線性の得られる範囲の幅が狭い傾向にあり、被検成分の濃度に対して、検量線や関係線の範囲が適切であるよう留意すべき点について追記した。

3) その他、食品添加物公定書の一般試験法として変更や追記が必要と考えられた点

・全体 食品添加物試料は、単一成分ではなく、多種成分の混合物であることも多く、測定対象はその中の一部の成分であると考えられることから、測定対象の表現を「試料」ではなく「被検成分」とした。

・操作法の項 「成分規格・保存基準各条等に従って検液を調製し、規定された操作条件に従って測定する。質量分析は、分子の質量や構造情報に基づく特異的な検出法として、確認、純度や定量等の試験に用いられる。」：食品添加物公定書の一般試験法として必要な記載を追記した。

D. 結論

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、JECFA規格や米国の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、MS を用いる試験法を挙げ、その検討を行った。平成 29 年度から令和 2 年度に、GC/MS や LC/MS を用いる具体的な規格試験法の検証を行い、MS を用いたクロマトグラフィーによる定量法の課題について検討した。日本薬局方を参照して作成された食品添加物公定書の質量分析法の原案について検討し、本研究の検討により得られた結果等を基に変更及び追記を行い、食品添加物公定書一般試験法の質量分析法（案）を作成した。この質量分析法の案は、第 10 版食品添加物公定書検討会において議論され、合意が得られた。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金 食品添加物の安全性確保に資する研究、平成 28 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
- 2) 厚生労働科学研究費補助金 食品添加物の安全性確保に資する研究、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
- 3) 厚生労働科学研究費補助金 食品添加物の安全性確保に資する研究、

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

- 4) 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.
- 5) 厚生労働科学研究費補助金 食品添加物の安全性確保に資する研究、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
- 6) 厚生労働科学研究費補助金 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
- 7) 第十八改正日本薬局方（令和 3 年 6 月 7 日厚生労働省告示第 220 号）

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 JECFA 各条規格で質量分析計を用いる試験が適用されている添加物品目

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

別紙1 食品添加物公定書一般試験法 質量分析法（案）

（下線部は、食品添加物公定書用に、局方を参照して作成した原案の表現を変更又は追記した部分）

質量分析法（案）

質量分析（Mass spectrometry：MS）は、分子をイオン化させ、統一原子質量単位に対する比で表したイオンの相対質量（ m ）をイオンの電荷数（ z ）で割って得られる無次元量の m/z 値に応じてイオンを分離検出する方法であり、被検成分の確認、純度の試験等に用いる。統一原子質量単位は基底状態の ^{12}C の12分の1の質量であり、原子、分子及びイオンの質量を表す際に用いられる。測定結果は、イオンの m/z 値を x 軸に、それに対する信号の相対強度を y 軸に示したマススペクトルとして示される。被検成分の分子を構成する各元素の単一同位体（通常、天然存在比が最大の同位体）だけからなる分子又はイオンの精密質量をモノアイソトピック質量という。通常、マススペクトル上には、モノアイソトピックイオンとともにその同位体イオンが存在する。分子質量関連イオンの m/z 値から被検成分の分子の質量を求めることが可能であり、フラグメントイオンが観測される場合には、フラグメントイオンの質量、分子質量関連イオンとフラグメントイオンの質量差等から構造の確認や推定を行うことが可能である。タンデム質量分析（MS/M S）は、 m/z 値により選択されたプリカーサーイオンを解離させ、生じたプロダクトイオンを質量分析に供する手法である。観測したプロダクトイオンの m/z 値により、構造の確認や推定を行うことが可能である。概略は次の図による。

（図は省略）

装置

質量分析計は、通常、試料導入部、イオン化部（イオン源）、質量分離部、検出部及びデータ処理部からなる。また、質量分離部等を高真空に保つための排気系を備える。イオン化部への試料の導入法としては、被検成分を含む溶液等をシリンジポンプやキャピラリーチップ等を利用してイオン化部に導入する直接注入法、また、被検成分を含む液体や固体をガラス管等に詰め、イオン化部の電子線や反応イオン雰囲気のごく近傍まで導入する直接導入法等がある。さらに、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動等の分離分析法により分離した各成分を連続的にイオン化部に導入する方法等がある。質量分析計に導入された被検成分はイオン化部においてイオン化され、正又は負の電荷を有するイオンを生成する。質量分析法には様々なイオン化法があり、イオン化法の選択は、生成するイオン種及び相対強度に影響を及ぼす。測定対象となる被検成分の極性や分子量及び目的等に応じて、最適なイオン化法を選択することが重要となる。質量分離部では、イオン化部において生成したイオンが m/z 値に基づいて分離される。その結果、対象とする被検成分に由来するイオンの質量や相対存在量を測定することがで

きる。質量分離部を通過したイオンは、通常、検出部において電子を放出させることにより電気信号として記録される。

一段階目の質量分離部でプリカーサーイオンを選択し、イオンを解離させ生じたプロダクトイオンを二段階目の質量分離部で分離し、検出するタンデム質量分析計がある。イオンの構造の確認又は推定、特異的及び高感度な分析に用いられる。タンデム質量分析は、プリカーサーイオンの選択、イオンの解離及びプロダクトイオンの分離を、それぞれ前段の質量分離部、中間領域及び後段の質量分離部で行う空間的タンデム質量分析と、同一の質量分離部の異なる時間区分で行う時間的タンデム質量分析とに分類される。前者の質量分析計として、三連四重極型、四重極飛行時間型、飛行時間型等がある。後者の質量分析計として、イオントラップ型があり、プリカーサーイオンの選択、解離及びプロダクトイオンの分離を複数回繰り返すことにより、MSⁿが可能である。

操作法

装置の指示に従って、適当な標準物質を用い、質量分析計の質量校正を行う。また、イオン化部、質量分離部、検出器のガス圧、温度、電圧値等の設定パラメータを調整し、検出されるイオンピークの形状、感度、相対強度を最適化する。イオン化部の各種パラメータは、生成するイオン種、質量分離部に輸送されるイオン種及び相対強度に影響し、質量分離部に関連するパラメータは、ピーク幅、質量真度、質量分解能、感度等に影響し、検出器のパラメータは信号強度及びシステム感度に影響する。代表的なイオン化法として、電子イオン化 (Electro ionization : E I) 法、化学イオン化 (Chemical ionization : C I) 法、エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization : E S I) 法、大気圧化学イオン化 (Atmospheric pressure chemical ionization : A P C I) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix-assisted laser desorption/ionization : M A L D I) 法等がある。また、質量分析の測定法として、全イオンモニタリング (Total ion monitoring : T I M)、選択イオンモニタリング (Selected ion monitoring : S I M)、選択反応モニタリング (Selected reaction monitoring : S R M) 等、被検成分の確認、純度や定量等の試験に必要とされるデータを得ることができる様々な手法がある。成分規格・保存基準各条等に従って検液を調製し、規定された操作条件に従って測定する。質量分析は、分子の質量や構造情報に基づく特異的な検出法として、確認、純度や定量等の試験に用いられる。

- (1) 確認の試験 質量分析による被検成分の確認試験は、通例、被検成分の分子の質量の確認により行われる。通例、標準被検成分を用いて、測定値が各条で規定された値の範囲内であること、又は規定されたイオンが検出されることを確認した後試験を行う。ただし、標準被検成分がない場合、規定されたイオン化法や質量範囲に応じて、装置の各構成ユニットの測定パラメータを最適化する必要がある。クロマトグラフィー等の分離分析と組み合わせる確認試験を実施することもできる。装置の質量分解能及び被検成分の分子の質量に応じて、質量分析で求めた被検成分の分子の質量は、モノアイソトピック質量や分子量に対応させることができる。通常、モノアイソトピックピークより主同

位体のみからなる分子の質量を求めるが、分子量が大きい又は分解能が十分でない等の理由でモノアイソトピックピークが確認できない場合は、ピークの加重平均等から分子の平均質量を求める。タンパク質等の分子量が大きな被検成分をESI/MSで分析した場合、多数の多価イオンとして観測されるので、デコンボリューション処理により平均質量を求める。被検成分の分子より生じた特徴的な部分構造情報を含むフラグメントイオンやプロダクトイオンの検出と組み合わせることもある。

- (2) 純度及び定量の試験 質量分析による被検成分の純度及び定量の試験は、通例、試料中の被検成分の規格値に対応する濃度の標準溶液等を用いて、クロマトグラフィー等の分離分析と組み合わせて行われる。液体クロマトグラフィー質量分析で用いる移動相の条件はカラム分離とイオン化の両方に適した組成となるよう考慮する必要がある。試験溶液中の特定の成分より生じる分子質量関連イオン若しくは特徴的なフラグメントイオンやプロダクトイオンのピーク面積又は高さを測定し、標準溶液中の対象とする成分より生じるイオンのピーク面積又は高さと比較する。より正確な値や精度のよい結果を得るために、測定対象とする被検成分の安定同位体標識化合物や類似化合物等を内標準物質として試験溶液に添加する方法も可能である。被検成分や内標準物質の分析対象イオンには、純度試験及び定量に適したイオンを選択するよう留意する。また、標準溶液の分析結果から作成する検量線や、内標準物質に対する被検成分の検出感度の比から得られる関係線は、純度試験及び定量に適した濃度範囲の値を用いるよう留意する。クロマトグラフィー等と質量分析を組み合わせて試験を行う場合には、クロマトグラフィーに準じたシステム適合性が求められる。

用語

- (1) 電子イオン化 (Electron ionization : EI) 法 : 気化した被検成分の分子Mが熱電子のエネルギー (通常は70 eV) によりイオン化し、分子イオン M^+ や分子の構造情報を持つフラグメントイオンを生じるイオン化法である。分子量が1000程度以下の低分子量で揮発性試料や気体試料等の非極性分子をイオン化するのに適している。再現性の高いフラグメンテーションパターンを有するマススペクトルが得られることから、データライブラリーを利用した化合物の同定等に利用される。
- (2) 化学イオン化 (Chemical ionization : CI) 法 : 気化した被検成分の分子が、イオン化室に導入したメタンやイソブタン、アンモニア等のガスから熱電子のエネルギーにより生成した反応イオンとのイオン分子反応によりイオン化し、プロトン付加分子 $[M+H]^+$ や脱プロトン分子 $[M-H]^-$ あるいは反応イオン付加分子等が生じる。EI法に比べて生成するイオンの内部エネルギーが小さくなるので、フラグメンテーションは起こりにくい。
- (3) エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization : ESI) 法 : 試料液又は検液を先端が高電圧に印加されたキャピラリーに通し噴霧すると帯電した霧状の液滴が生成する。さらに、溶媒の蒸発に伴い液滴の電荷密度が増大した後、試料分子がイオン化

し、 $[M+H]^+$ や $[M-H]^-$ あるいはアルカリ金属イオン付加分子等が生じる。比較的高極性の低分子から高分子量の被検成分のイオン化に利用され、 $[M+nH]^{n+}$ や $[M-nH]^{n-}$ 等のような多価イオンを生成しやすい性質を利用してペプチドやタンパク質、多糖等の生体高分子の測定にも応用される。

- (4) 大気圧化学イオン化 (Atmospheric pressure chemical ionization : A P C I) 法 : 試料液又は検液を加熱キャピラリーに通し窒素ガスによる気化・噴霧を行い、高電圧の針電極によるコロナ放電を起こすと溶媒分子がイオン化する。この溶媒イオンとのイオン分子反応によって被検成分の分子がイオン化し、 $[M+H]^+$ や $[M-H]^-$ あるいはアルカリ金属イオン付加分子等が生じる。分子量 1500 程度以下の非極性から高極性化合物のイオン化に適している。
- (5) マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix-assisted laser desorption/ionization : M A L D I) 法 : 試料と α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸やシナピン酸等のマトリックスを混合したものにパルスレーザーを照射するとマトリックスの電子励起に伴い試料中の被検成分の分子が瞬時に気化・イオン化する。このときマトリックスと被検成分の分子の間でプロトンの授受が起こり、 $[M+H]^+$ や $[M-H]^-$ あるいはアルカリ金属イオン付加分子等が生じる。適切なマトリックスを選択することにより、数百の低分子量から数十万の高分子量までの化合物のイオン化が可能である。測定に必要な試料量が微量であることからペプチドやタンパク質等の生体由来の被検成分のイオン化に利用される。
- (6) 全イオンモニタリング (Total ion monitoring : T I M) : フルスキャンモードとも呼ばれる。選択した m/z 値の範囲のイオンを全て検出し記録する手法であり、各走査のイオン量の積算値を全イオン電流 (Total ion current : T I C) という。
- (7) 選択イオンモニタリング (Selected ion monitoring : S I M) : 選択した特定の m/z 値を持つイオンの信号量のみを記録する手法である。液体クロマトグラフィー質量分析 (L C / M S) やガスクロマトグラフィー質量分析 (G C / M S) 等を用いた、被検成分の定量や高感度検出を行うために用いられる。
- (8) 選択反応モニタリング (Selected reaction monitoring : S R M) : 特定の m/z 値のプリカーサーイオンを解離させて生じる特定の m/z 値のプロダクトイオンを検出する方法である。S I Mと同様に被検成分の定量や高感度検出を行うために用いられる。

