

食品添加物の機能及び安全性確保を目的とした

新規分析技術に関する研究

Studies on New Analytical Techniques Aimed at Ensuring the
Function and Safety of Food Additives

令和 2 年度 論文博士申請者 岩越 景子 (Iwakoshi, Keiko)

指導教員 高野 伊知郎

食品添加物は、ヒトの健康維持のために不可欠な食品の安全性を確保する上で、その保存や加工において重要な機能を果たしている。一方で、食品添加物は医薬品同様に化学物質であり、過量摂取や適用外使用によってヒトの健康に影響を及ぼす可能性があるため、その機能を果たす適切な量・用途で使用されなければならない。そこで、本研究では、レギュラトリーサイエンスの観点から、新規技術による食品添加物の効率的な分析法の構築に取り組んだ。

まず、近年の健康意識の向上や生活習慣病予防の目的から、使用が増加している新規高甘味度甘味料の分析法を開発し、市販加工食品中の実態を調査した。次に、日本国内では指定外添加物であるものの、海外の一部で飲料中の乳化剤として使用され、輸入食品に含まれる可能性のある臭素化植物油 (BVO) の分析法を開発した。さらに、国内で汎用される保存料の分析を効率化することは、多種、多数の食品の検査が求められる食品衛生分野において有用であることから、食品のフードロス対策、食中毒予防の目的で重要な役割を果たしている 9 種保存料の迅速な一斉分析法を確立した。

1. 加工食品中の新規高甘味度甘味料についての研究 1)

近年開発された高甘味度甘味料であるアドバンテーム (Ad) 及びネオテーム (Neo) について検討を行った。加工食品中の Ad と Neo を同時に測定するための新しい高感度な分析法を開発するとともに、使用表示のある市販加工食品における実態調査を行った。

Table 1. Survey results of Advantame and Neotame usage

Analyte	Sample	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
Advantame	Dense liquid diet (beverage)	0.02
	Soft drink (containing mixed fruit juice)	0.03
	Soft drink (jelly drink containing amino-acid)	0.03
	Instant cup noodle	0.04
	Instant cup noodle	0.04
	Fruit juice drink	0.04
	Candy	0.34
Neotame	Candy	0.01
	Sencha Latte Tea Bag	0.01
	Curry	0.06
	Bacon	0.30
	Rice confectionery	0.54
	Pungent seasoning	0.68
	Soft drink	0.96
	Roast ham	0.96
	Ham	1.14
	Western sweets	1.47
	Soft drink	1.48
	Cereal processed goods	1.51
	Toast sauce	2.96
	Crisps	4.03
	Powdered soft drink	31.7
Amino acid · Protein containing food	37.5	
Tablet type fresh candy	75.6	

分析には液体クロマトグラフー3連四重極型質量分析計 (LC-MS/MS) を使用して、高感度かつ高精度な2成分同時分析法を構築した。試験溶液は、160 rpm、50°C に設定した恒温振とう機中で30%メタノール溶液を使用して迅速に透析することにより調製した。加工食品中のマトリックスは、煩雑な固相抽出等による精製操作を要することなく除去できた。また、すべてのサンプルにおいて本法の定量限界 (LOQ) は 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、試行回数2回、5日間の

添加回収試験の結果、平均回収率は 76.1～103%、併行精度 (RSD_r) は 2.55～12.5%、室内精度 (RSD_{wr}) は 2.89～12.5%であり、良好な結果が得られた。

次に、本法を用いて 24 種の市販加工食品中の Ad 及び Neo を測定した。その結果、全ての食品において表示された通りの Ad 及び Neo が検出された (Table 1)。これらの高甘味度甘味料は、食品への添加量が少ないことから、より微量での定性を可能とし、擬陽性を回避するために、選択反応モニタリングとプロダクトイオンスクリーンを同時に行う MRM (=SRM)-IDA-EPI 法を検討した。種々の分析条件を最適化することで、食品中 Ad 及び Neo の識別能力がさらに高まり、より精確な定性が可能となった。また、MRM 条件と定量値の比較の結果から、本法の定量性についても検証し、その有用性を確認することができた。

2. 飲料中乳化剤 BVO の分析法の開発²⁾

市販の飲料中に含まれる BVO (Fig.1) に対する新規分析法を開発した。分析にはガスクロマトグラフー水素炎イオン化検出器 (GC-FID) (定量用) と大気圧ガスクロマトグラフー四重極・飛行時間型質量分析計 (APGC-QTOF) (定性用) の双方に、高温で使用可能な VF-5ht™ カラムを用いることで、簡便かつ正確な分離技術を開発した。サンプル前処理には、有機溶媒を多く使用する液々分配法ではなく、逆相固相抽出カートリッジ (PoraPak™ RxnRP) で固相抽出する効率的な方法を選択し、最適化条件を検討した。さらに、三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液を用いたエステル交換反応条件を最適化した後、GC-FID による分析を行った。本法の添加回収試験を試行回数 5 回で行ったところ、BVO の LOQ は

7.5 µg/mL、回収率は 82.2~99.9%、相対標準偏差は 1.2~4.3% となり、良好な結果が得られた。

さらに、本法により BVO をメチル化して得られるブロモステアリン酸メチルエステル (9,10-ジブロモステアリン酸メチルエステル(DBS) (Fig.2)、9,10,12,13-テトラブロモステアリン酸メチルエステル(TBS)、及びヘキサブロモステアリン酸メチルエステル(HBS)) を高分解能質量分析計である APGC-QTOF を用いて分析したところ、精度よく定性確認することができた。同位体ライブラリーと比較したところ、誤差範囲は 3 ppm 以内であった (Fig.3)。また、本法では、アンモニウムイオン付加体が確認されたため、イオン化を促進するために、0.5%アンモニア水をバイアルマウントに設置した結果、感度の上昇が認められた。これまで APGC-QTOF におけるアダクトイオンとして、アンモニウムイオンの報告例は少なく、新規な知見が得られた。

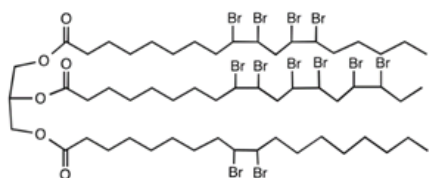


Fig.1 One of the structure of BVOs

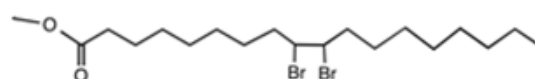


Fig.2 Structure of DBS

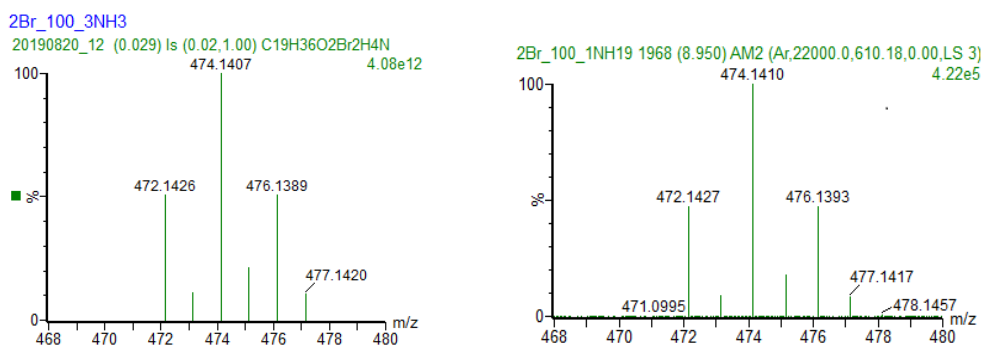


Fig.3 MS spectra of the left is DBS isotope library.
The right is acquired from this method.

3. 効率的かつ迅速な 9 種保存料の分析法の開発 3)

安息香酸(BA)、ソルビン酸(SOA)、デヒドロ酢酸(DHA)、パラオ

キシ安息香酸エステル類 (PHBAs; パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸イソブチル及びパラオキシ安息香酸ブチル)の 9 種の保存料について高効率かつ迅速な一斉分析法について検討した。

これまで保存料の検査では、直接溶媒抽出法、水蒸気蒸留法、透析法などが採用されてきたが、いずれの方法でも極性の異なる 9 種の保存料を同時に、かつ十分な回収率で抽出することは困難であった。そこで本研究では、迅速、簡便、安価、効果的、堅牢で安全な方法として知られる QuEChERS 法⁴⁾を改良することで、サンプルの抽出並びに精製の迅速化と効率化を図ることとした。

改良法では、サンプル 10 g を、セラミックホモジナイザー (セラミックストーン) を使用して 20 mL のアセトニトリル/水 (1:1) により抽出した。その際に、塩析効果並びに緩衝作用を得るために食塩、硫酸マグネシウム、クエン酸塩を加えた。抽出液を遠心後、得られた上清液を 10 倍または検出量に応じて希釈し、液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ (LC-PDA) を用いて測定した。

本法の妥当性を検証したところ、LOQ は、BA、SOA、及び DHA で 10 mg / kg、PHBAs で 5 mg / kg であり、これらは厚生労働省通知の試験法と同等であった。試行回数 2 回、5 日間での添加回収試験の結果、平均回収率は 77.0~99.6%、RSD_r は 0.7~5.3%、RSD_{wr} は 2.3~8.4% の範囲であり、検量線の相関係数 (r^2) はいずれも 0.999 以上で良好な直線性を示した。これらの結果から、本法は、保存料の日常検査に適用できるものと考えられた。

4. 総括

本研究では、レギュラトリーサイエンスの観点から、食品添加物の適正使用を評価するための最新技術による効率的な分析法を確立した。まず、高甘味度甘味料(Ad 及び Neo)の分析法を開発し、市場加工食品中の実態調査を行った。一日許容摂取量(ADI)を超える食品はないものの、これらが使用されている食品は多種類にわたっており、引き続き注視していく必要性が示唆された。次に、飲料中の乳化剤(BVO)の分析法に関する研究では、前処理法に固相抽出を採用し、APGC-QTOFの高分解能を活かした高感度なBVOの定性を可能にした。さらに、食品に汎用される保存料をより広範囲かつ効率的に分析するため、簡便な9種保存料の迅速な一斉分析法を開発した。本法は、保存料の適正使用評価を行う上で有用である。

以上の成果は、食品添加物の効率的な分析を可能にするとともに、分析困難とされている類似化合物の分析にも応用可能な技術である。今後、本研究で確立された技術が、衛生薬学分野における食の安全性確保に貢献することが期待される。

《参考文献》

1. Iwakoshi K., Tahara S., Uematsu Y., Yamajima Y., Miyakawa H., Monma K., Kobayashi C., Takano I., *J. Chromatogr. A.*, 1592, 64-70 (2019).
2. Iwakoshi K., Ogawa A., Iwakoshi K., Nakajima J., Kobayashi C., Sasamoto T., *Food Chem.*, 338, 127712 (2021) in press.
3. Iwakoshi K., Shiozawa Y., Yamajima Y., Baba I., Monma K., Kobayashi C., Sasamoto T., *Food Addit. Contam. Part A.*, 36, 1020-1031 (2019).
4. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher D., Schenck. F. J., *J. AOAC Int.*, 86, 412-431 (2003).