SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS™-8050

質量分析計を用いた食品および飲料中の食品添加物（亜硫酸塩）の分析

前島　希

ユーザーベネフィット

- ◆ 酸化防止剤としてさまざまな食品や飲料に添加される亜硫酸塩の高速分析が可能です。
- ◆ 本分析法では定量範囲が広いため、亜硫酸塩濃度が高いサンプルにおける再分析の回数を削減できます。
- ◆ FDAが発行するメソッド（C-004.03）を参考にしており、良好な定量が可能です。

■はじめに

亜硫酸塩は、酸化防止剤および漂白剤として使用される最も一般的な食品添加物の一つであり、ドライフルーツや野菜、冷凍エビ、ジュース、ワインなどのさまざまな製品に添加されています。非常に有用な食品添加物ですが、亜硫酸塩を含む製品の摂取によりアレルギーのような反応を引き起こすことが知られています。そのため、SO_2換算で10 mg/kg以上の亜硫酸塩を含む食品には世界的に表示が義務付けられていますが、一部の食品メーカーで未申告によりリコールが増加しています。また、米国では亜硫酸塩で処理されたサラダの摂取により亜硫酸塩が原因のぜんそくが多数確認され、生食を目的とする果物や野菜への亜硫酸塩の使用が基本的に禁止されています[1)]。

本稿ではFDAが提案する分析法を参考にした、LC-MS/MSを用いた食品および飲料中の亜硫酸塩の定量分析についてご紹介します。亜硫酸塩は0.2%ホルムアルデヒド抽出液と混合し、ヒドロキシメチルスルホネート（HMS）に変換して検出しました。検量線用標準試料には亜硫酸ナトリウムNa_2SO_3を、内部標準には同位体標識した$Na_2{}^{34}SO_3$を、それぞれホルムアルデヒド抽出液に溶解しHMSに変換して使用しました[2,3)]。ドライフルーツおよびワインにて添加回収試験を行い、良好な回収率を得ました。

■前処理と分析条件

0.2%ホルムアルデヒド抽出液：2%ホルムアルデヒド抽出液として、50 mM酢酸アンモニウムを含む2%ホルムアルデヒド溶液（酢酸でpH 4.5に調整）を調製しました。これを水で10倍に希釈し、0.2%ホルムアルデヒド抽出液として使用しました。

ドライフルーツ抽出物の調製：ドライフルーツ25 gに0.2%ホルムアルデヒド抽出液50 mLを加え、ブレンダーで2分間破砕しました。破砕液15 gをとり、シェーカーで10分間撹拌後、超音波処理を8分間行いました。4000x*g*で10分間遠心後、デカンテーションで上清を回収しました。沈殿に再度抽出液を20 mL加え、撹拌と超音波処理、遠心を繰り返し、上清を先ほどの上清と混合しました。抽出液を加えて50 mLにしました。

ワイン抽出物の調製：ワイン1 gを0.2%ホルムアルデヒド抽出液で希釈し、10 mLにしました。

SPEカートリッジ精製および熱処理：SPEカートリッジ（InertSep C18, 500 mg/6 mL, GL Sciences）を用いてドライフルーツおよびワインの抽出物から脂質成分の除去を行いました。SPEバキュームマニホールドを使用し、それぞれ3 mLのジクロロメタン、メタノールおよび0.2%ホルムアルデヒド抽出液でSPEカートリッジをあらかじめコンディショニングしました。次にドライフルーツまたはワインの抽出物をSPEカートリッジに通液し、最初の2 mLは廃棄後、次の2 mLを回収しました。回収した溶出液は80℃で30分間熱処理を加えたあと、室温まで冷却しました。

LC-MS/MS分析：溶出液を100 µLをとり、5 µg/mLの内部標準溶液50 µLおよびアセトニトリル350 µLと混合し、フィルターろ過した溶液をLC-MS/MSにて分析しました。LC-MS/MS分析条件およびMRM条件は表1、2に示します。

表1　LC-MS/MS分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X3)	
Column	: SeQuant ZIC HILIC (150 mm x 2.1 mm I.D., 5 µm)
Mobile phase A	: 10 mM ammonium acetate / 90 % Acetonitrile / Water
Mobile phase B	: 10 mM ammonium acetate / 50 % Acetonitrile / Water
Flow rate	: 0.3 mL/min
Gradient program	: B conc. 30 % (0-1 min) – 70 % (3-5.5 min) – 100 % (5.51-7.75 min) - 30% (8-12 min) The flow was loaded into the mass spectrometer between 3 to 5.5 min using a flow switching valve.
Column temp.	: 40 ℃
Injection volume	: 2 µL
[MS conditions] (LCMS-8050)	
Ionization	: ESI, negative mode
Nebulizing gas	: 2.5 L/min
Drying gas	: 10 L/min
Heating gas	: 10 L/min
DL temp.	: 150 ℃
Interface temp.	: 200 ℃
Heat block temp.	: 500 ℃
Probe position	: +4 mm

表2　MRM条件

Compound	MRM transition	Collision (V)	Purpose
HMS	111.00>81.00	13.0	Quantification
	111.00>80.00	27.0	Reference
HMS (^{34}S)	113.00>83.00	13.0	Quantification
	113.00>82.00	27.0	Reference

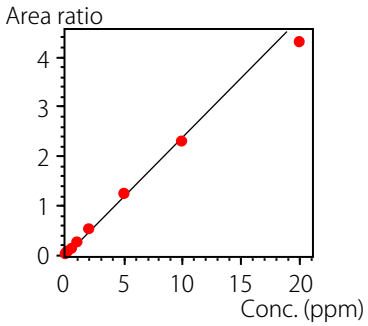

図1　HMSの検量線

■検量線およびマスクロマトグラム

検量線を図1に示します。また、標準試料および添加回収試験におけるHMSのマスクロマトグラムを図2に示します。プローブ位置を調整することにより0.01～20 ppmまでの広いダイナミックレンジを有する検量線を作成することが可能となりました。本分析法では亜硫酸塩濃度が高いサンプルにおける希釈作業を削減できます。

■定量結果および添加回収試験

レーズン、アプリコットおよび2種類のマンゴーのドライフルーツと、2種類の赤ワインおよび2種類の白ワインについて亜硫酸塩の定量を行いました。結果を表3に示します。アプリコットはSPEカートリッジ溶出液を0.2%ホルムアルデヒド抽出液で10倍希釈後、内部標準およびアセトニトリルと混合した溶液をLC-MS/MS分析しました。その他のサンプルについては追加の希釈をせずLC-MS/MSにて分析できました。

亜硫酸塩が添加されていないと思われる、または亜硫酸塩添加量が低かった4点のサンプルについて、添加回収試験を行いました。Na_2SO_3を添加後、抽出処理または希釈を行い、SPEカートリッジでクリーンアップを行いました。結果を表4に示します。すべてのサンプルにおいて、表示義務となる10 µg SO_2/g food以下の添加量で良好な回収率を得ました。赤ワインでは10分の1の1 µg SO_2/g foodにおいても優れた回収率を達成しました。

■まとめ

ドライフルーツおよびワイン中の亜硫酸塩分析について紹介しました。表示義務のある10 mg/kg以下で良好な回収率を得ました。また、本分析法は定量範囲が広いため亜硫酸塩濃度が高いサンプルにおける希釈作業を削減できます。

表3　ドライフルーツおよびワイン中の亜硫酸塩定量結果

Food/ Beverage	HMS濃度 (ppm)	SO_2換算値 (µg/g food)
Raisin	(0.000)	(0.00)
Mango 1	(0.004)	(0.11)
Mango 2	16.27	413
Apricot	40.97*	1041*
Red wine 1	(0.001)	(0.02)
Red wine 2	1.40	36
White wine 1	1.51	38
White wine 2	3.96	101

*希釈サンプルの結果から換算しています。

表4　添加回収試験における回収率 (%)

Food/ Beverage	添加量 (µg SO_2/g food)		
	1	5	10
Raisin		99.2	96.3
Mango 1		84.9	91.2
Red wine 1	99.7	104.0	103.0
White wine 1		95.2	100.5

参考文献
1) U.S. Food and Drug Administration (2016). Code of federal regulations: Part 101.100(a)(4), Title 21. Washington DC: Office of the Federal Register.
2) Carlos, K. S., & de Jager, L. S. (2017). Determination of sulfite in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Collaborative study. Journal of AOAC International, 100(6), 1785–1794.
3) U.S. Food and Drug Administration (2021). Method number: C-004.03, Determination of Sulfites in Food using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

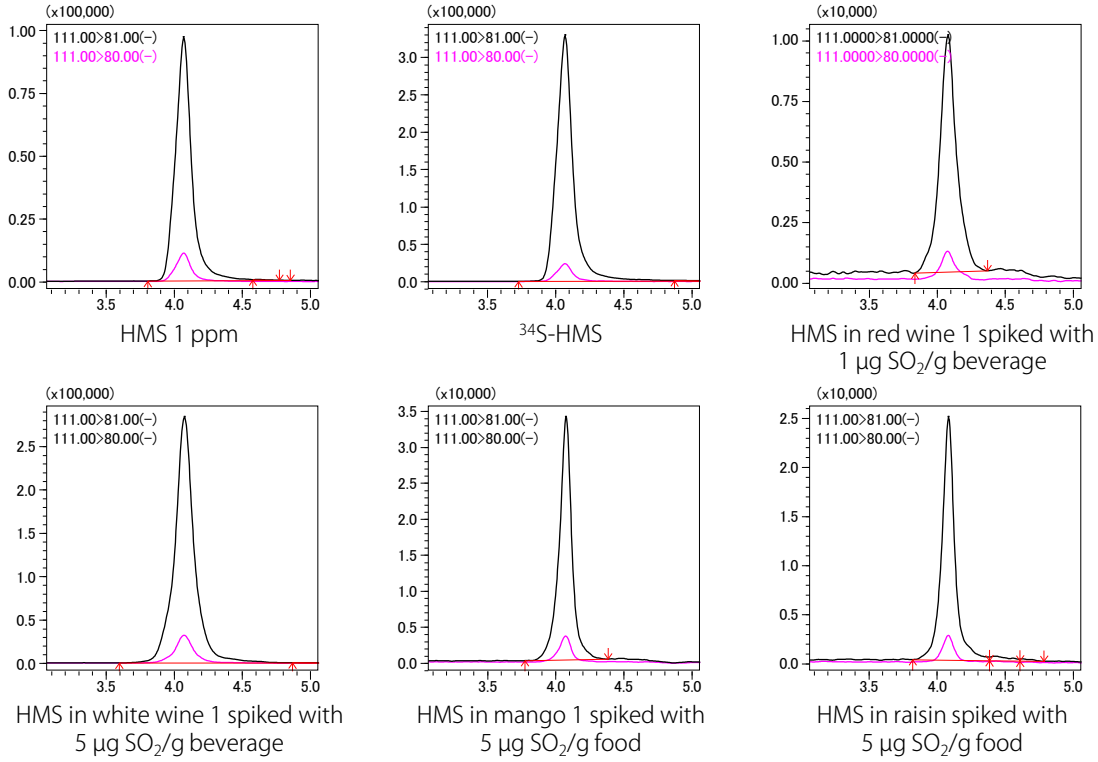

図2　HMSおよび内部標準^{34}S-HMSのマスクロマトグラム

LCMSおよびNexeraは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

初版発行：2022年 11月
01-00450A-JP　A改訂版発行：2023年　1月

島津コールセンター　0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、https://solutions.shimadzu.co.jp/ よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022