

LC-QTOFMS によるフェノール系酸化防止剤一斉分析法

小出石千明・戸渡寛法・宮崎悦子

福岡市保健環境研究所保健科学課

Simultaneous Qualitative Analysis of Phenolic Antioxidants in Foods by LC-QTOFMS

Chiaki ODEISHI, Hironori TOWATARI and Etsuko MIYAZAKI

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

福岡市保健環境研究所では、食品中のフェノール系酸化防止剤 9 種（没食子酸プロピル、ブチルヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキシトルエン、2,4,5-トリヒドロキシブチロフェノン、*tert*-ブチルヒドロキノン、ノルジヒドログアヤレチック酸、4-ヒドロキシメチル-2,6-*di-tert*-ブチルフェノール、没食子酸オクチル、没食子酸ラウリル）について、HPLC を用いて一斉分析を行っている。しかし、HPLC を用いた方法では、検査対象化合物と妨害成分のピーク分離が難しいことが多く、化合物毎に異なる機器を用いて定性確認を行っており、検査終了までに時間を要している。そこで、定性確認の迅速化を目的として、LC-QTOFMS を用いてフェノール系酸化防止剤 9 種を一斉に定性分析が可能かを検討した。その結果、8 種のフェノール系酸化防止剤を LC-QTOFMS で一斉分析が可能と確認された。ジブチルヒドロキシトルエンは、測定条件を変更することで分析可能であった。植物油を用いて添加回収試験を実施したところ、7 種のフェノール系酸化防止剤の回収率は 74～103% ($n=3$) であり、精度管理の一般ガイドラインの目標値を満たしていた。その他 2 種のフェノール系酸化防止剤の回収率は 83～152% ($n=3$) であった。

Key Words : 液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析計 liquid chromatograph quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOFMS), 食品添加物 food additives, フェノール系酸化防止剤 phenolic antioxidants, 定性分析 qualitative analysis

1 はじめに

フェノール系酸化防止剤（以下、「酸化防止剤」とする。）は、食品に含まれる油脂の酸化防止を目的として広く使用されている食品添加物である。福岡市保健環境研究所では、食品中の酸化防止剤について、食品衛生検査指針¹⁾に準じ、HPLC による一斉分析（以下、「HPLC 法」とする。）を行っている。当所 HPLC 法による検査を行っている酸化防止剤は、指定添加物 3 種（没食子酸プロピル（以下、「PG」とする。）、ブチルヒドロキシアニソール（以下、「BHA」とする。）、ジブチルヒドロキシトルエン（以下、「BHT」とする。））及び指定外添加物 6 種（2,4,5-トリヒドロキシブチロフェノン（以下、「THBP」とする。）、*tert*-ブチルヒドロキノン（以下、「TBHQ」とする。）、ノルジヒドログアヤレチック酸（以下、「NDGA」とする。）、4-ヒドロキシ

メチル-2,6-*di-tert*-ブチルフェノール（以下、「HMBP」とする。）、没食子酸オクチル（以下、「OG」とする。）、没食子酸ラウリル（以下、「DG」とする。））の計 9 種である。HPLC 法では、検査対象化合物と妨害成分のピーク分離が難しい場合が多い。当所では、過去にピークの完全分離を必要としない LC-MS/MS を用いた酸化防止剤の定性分析方法を検討しており^{2, 3)}、当所以外にも、GC-MS や LC-TOFMS 等を用いた酸化防止剤の分析方法について検討されているが^{4~6)}、9 種を一斉に定性分析できる方法は報告されていない。現在、当所では、HPLC 法で一斉分析をした際に検出されたピークについて上記の報告を参考に定性確認を行っているが、化合物毎に異なる機器を用いており、前処理方法も異なるため、検査終了までに時間を要している。そこで、検査の迅速化を目的とし、LC-QTOFMS を用いて、酸化防止剤 9 種を一斉に定性分析することが可能かを検討したので報告

する.

2 実験方法

2.1 試料

酸化防止剤の表示がなく、HPLC法で酸化防止剤が検出されないことを確認した、市販の食用植物油（なたね油）を用いた。

2.2 標準品・試薬等

各標準原液：PG, BHA, BHT, TBHQ及びDGは関東化学社製, THBPはFluka社製, NDGAはMP Biomedicals社製, HMBP及びOGは東京化成工業社製を用いた。各々100 mgをエタノールに溶解して正確に100 mLとした。

混合標準溶液：各標準原液を、アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール（2:1:1）混合溶媒（以下、「混合溶媒」とする。）で0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 µg/mLとなるよう適宜調製した。

酢酸：富士フイルム和光純薬社製試薬特級を用いた。

メタノール、アセトニトリル及びエタノール：関東化学社製高速液体クロマトグラフ用を用いた。

2-プロパノール及び1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：

富士フイルム和光純薬社製高速液体クロマトグラフ用を用いた。

水：水道水を超純水製造装置で処理した水（比抵抗18.2 MΩ, TOC<2ppb）を用いた。

2.3 その他の装置・器具

LC-QTOFMS：LC部；AB SCIEX社製 Exion LC AC, MS部；AB SCIEX社製 X500R Q TOF システム

超純水製造装置：オルガノ社製 PURELAB flex-UV

フィルター：ADVANTEC社製 DISMIC 13HP PTFE (0.45 µm)

カラム：島津製作所社製 ShimPack FC-ODS (75×2 mm, 3 µm)

2.4 測定条件

LC-QTOFMSの測定条件について、一斉分析の条件をTable 1に、BHTの測定条件をTable 2に示す。また、データ解析の際に検出したイオン種及び精密質量をTable 3に示す。

2.5 試験溶液の調製

試料5 gに対し、混合溶媒を50 mL加えて攪拌し、-20°Cで1時間以上静置後、上層を分取し、フィルターろ過(0.45 µm)したものを試験溶液とした。

Table 1 LC-QTOFMS conditions for simultaneous qualitative analysis of antioxidants

LC conditions			
Column	ShimPack FC-ODS (75×2 mm, 3 µm)		
Column temperature	40°C		
Mobile Phase A	5% Acetic acid		
Mobile Phase B	Methanol : Acetonitrile (1:1)		
Gradient profile	B : 10% (0 min) - 95% (15 min) - 95% (30 min) - Post time 15 min		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	2 µL		
QTOFMS conditions			
Ionization	ESI-		
Data acquisition mode	IDA		
TOF-MS		IDA criteria	
Scan range	<i>m/z</i> 100~1000, 0.1 sec	Maximum candidates ion	20
Ionspray voltage	-4500 V	Intensity threshold exceeds	50 counts/s
Declustering potential	-80 V	Dynamic background subtraction	Selected
Collision energy	-5 V	Exclude former candidate ions	For 5 sec, After 20 occurrences
Curtain gus	30 psi	TOF-MS/MS	
Ion source gus 1	60 psi	Scan range	<i>m/z</i> 50~350, 0.05sec
Ion source gus 2	60 psi	Ionspray voltage	-4500 V
Ion source temperature	350°C	Declustering potential	-80±20 V
		Collision energy	-30±15 V

Table 2 LC-QTOFMS conditions for qualitative analysis of BHT

LC conditions		IDA criteria	
Column	ShimPack FC-ODS (75×2 mm, 3 μm)	Maximum candidates ion	20
Column temperature	40°C	Intensity threshold exceeds	50 counts/s
Mobile Phase A	0.01% Acetic acid, 10 mmol/L Ammonium acetate	Dynamic background subtraction	Selected
Mobile Phase B	Methanol : Acetonitrile (1:1)	Exclude former candidate ions	For 5 sec, After 20 occurrences
Gradient profile	B : 10% (0 min) - 95% (15 min) - 95% (30 min) - Post time 15 min	Advanced Criteria	
Flow rate	0.2 mL/min	Inclusion list	
Injection volume	5 μL	<i>m/z</i>	219.175
QTOFMS conditions		Retention time	16.57 min ± 60 sec
Ionization	ESI-	TOF-MS/MS	
Data acquisition mode	IDA	Scan range	<i>m/z</i> 50~350, 0.05 sec
TOF-MS		Ionspray voltage	-4500 V
Scan range	<i>m/z</i> 150~350, 0.1 sec	Declustering potential	-80±20 V
Ionspray voltage	-4500 V	Collision energy	-30±15 V
Declustering potential	-80±20 V		
Collision energy	-5 V		
Curtain gas	40 psi		
Ion source gas 1	50 psi		
Ion source gas 2	70 psi		
Ion source temperature	550°C		

Table 3 Ion species and exact mass of antioxidants

Antioxidant	Chemical Formula	Adduct / Charge	Exact mass
PG	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	[M-H]-	211.061
BHA	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	[M-H]-	179.108
BHT	C ₁₅ H ₂₄ O	[M-H]-	219.175
THBP	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	[M-H]-	195.066
TBHQ	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	[M-H]-	165.092
NDGA	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	[M-H]-	301.145
HMBP	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	[M-H]-	235.170
OG	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	[M-H]-	281.139
DG	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	[M-H]-	337.202

3 実験結果及び考察

3.1 LC 及び MS 条件の検討

既報^{3, 6)}を参考に, 移動相は, 酢酸, ギ酸, 酢酸アンモニウム, アンモニア, メタノール及びアセトニトリルについて, カラムは, ShimPack FC-ODS 及びジーエルサイエンス社製 InertSustain C18 PEEK (2.1×150 mm, 3 μm) について検討を行った。

没食子酸類の PG, OG 及び DG については, 検討した移動相のうち, 移動相 A の酸の濃度が低い場合 (0.001

%ギ酸 12.5 mmol/L 酢酸アンモニウム, 0.001~0.5%酢酸等) ではピークのテーリングが認められ, ピーク幅が 2 分間以上になるものもあったが, 移動相に 5%酢酸を用い, Table 1 の条件で測定を行ったところ, BHT を除く 8 種類の酸化防止剤については良好なピークが得られた (Fig. 1) . BHT は, 他の酸化防止剤と比較すると検出強度が低く, 移動相に 5%酢酸を用いた場合には, 10 μg/mL の標準溶液でもピークが全く認められなかった (Fig. 1) .

そこで, BHT については, 他の化合物とは異なる条件で測定することとした. すなわち, 移動相の酢酸の濃度を 0.01%とし, 更に 10 mmol/L となるよう酢酸アンモニウムを加え, サンプルの注入量を増やした (Table 2) . また, MS 条件も BHT の測定に最適化したことで (Table 2) 検出強度が上がり, 1 μg/mL でピークが認められ, S/N 比は 10 以上であった (Fig. 2) . また, 各標準溶液 1 μg/mL (BHT は 10 μg/mL) を Table 1 又は Table 2 の条件で測定してプロダクトイオンスペクトルを取得し (Fig. 3) , ライブラリに登録した。

なお, 検討したカラムについては, いずれのカラムでもピーク形状等に大きな差は認められなかったため, 既報³⁾と同一のカラムを採用した。

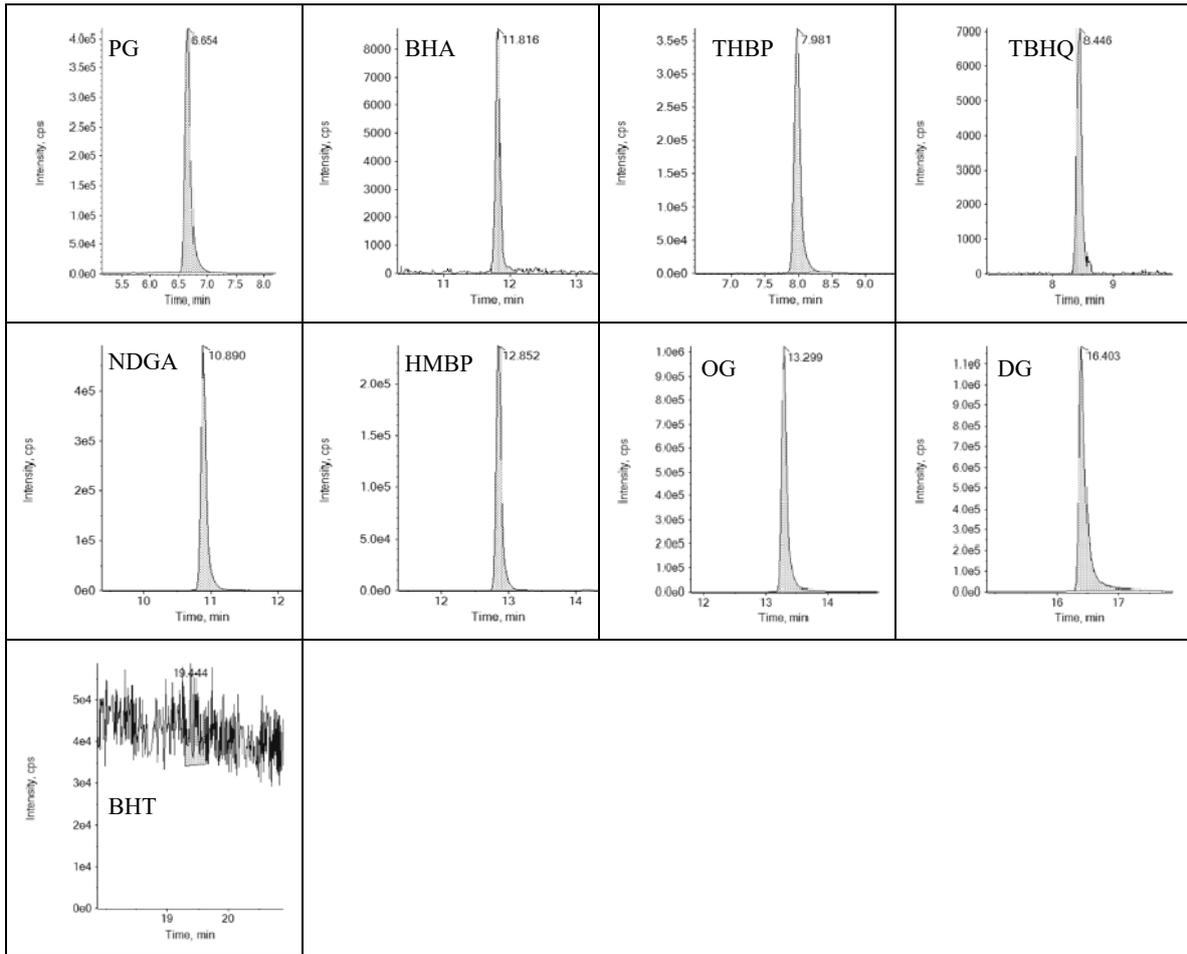


Fig. 1 Chromatograms of antioxidant standard solution (Except for BHT : 1 $\mu\text{g/mL}$, BHT : 10 $\mu\text{g/mL}$)

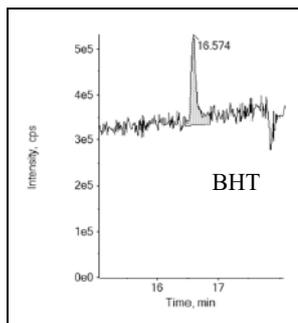


Fig. 2 Chromatogram of BHT standard solution (1 $\mu\text{g/mL}$)

なお、過去の報告^{2, 3)}で確認されたプロダクトイオンも検出されており、検査対象試料から得られるプロダクトイオンスペクトルを、今回登録した標準溶液のプロダクトイオンスペクトルと比較することで、より信頼性の高い定性確認が可能である。

3.2 添加回収試験

9種の酸化防止剤のうち、指定添加物3種の使用基準

値（設定されているものに限る）は0.1~1 g/kgであり、当所では、HPLC法の定量下限値を0.01 g/kgとしている。また、指定外添加物の定量下限値については、TBHQ以外は0.01 g/kg、TBHQは0.001 g/kgと設定している。指定外添加物については、定量下限値を超えて検出された場合は食品衛生法違反疑いとして報告している。

そこで、定量下限値付近での回収率を確認するため、添加濃度はTBHQ以外の定量下限値相当濃度及びその2倍相当濃度とした。すなわち、試料に混合標準溶液を0.01 g/kg又は0.02 g/kgとなるよう添加し、30分間静置後、「2.5 試験溶液の調製」に従って、3併行で操作を行い、試験溶液を調製した。ただし、BHTについては、検出強度が低かったため、0.02 g/kgのみ評価を行った。

各試験溶液について、Table 1又はTable 2の条件で測定した際の回収率及び回収率の計算の際に用いた検量線の範囲をTable 4に示す。BHT及びTHBPを除いた7種の酸化防止剤の回収率は74~103% (n=3)であり、精度管理の一般ガイドライン⁷⁾（以下、「ガイドライン」とする。）の回収率の目標値(70~120%)の範囲内であ

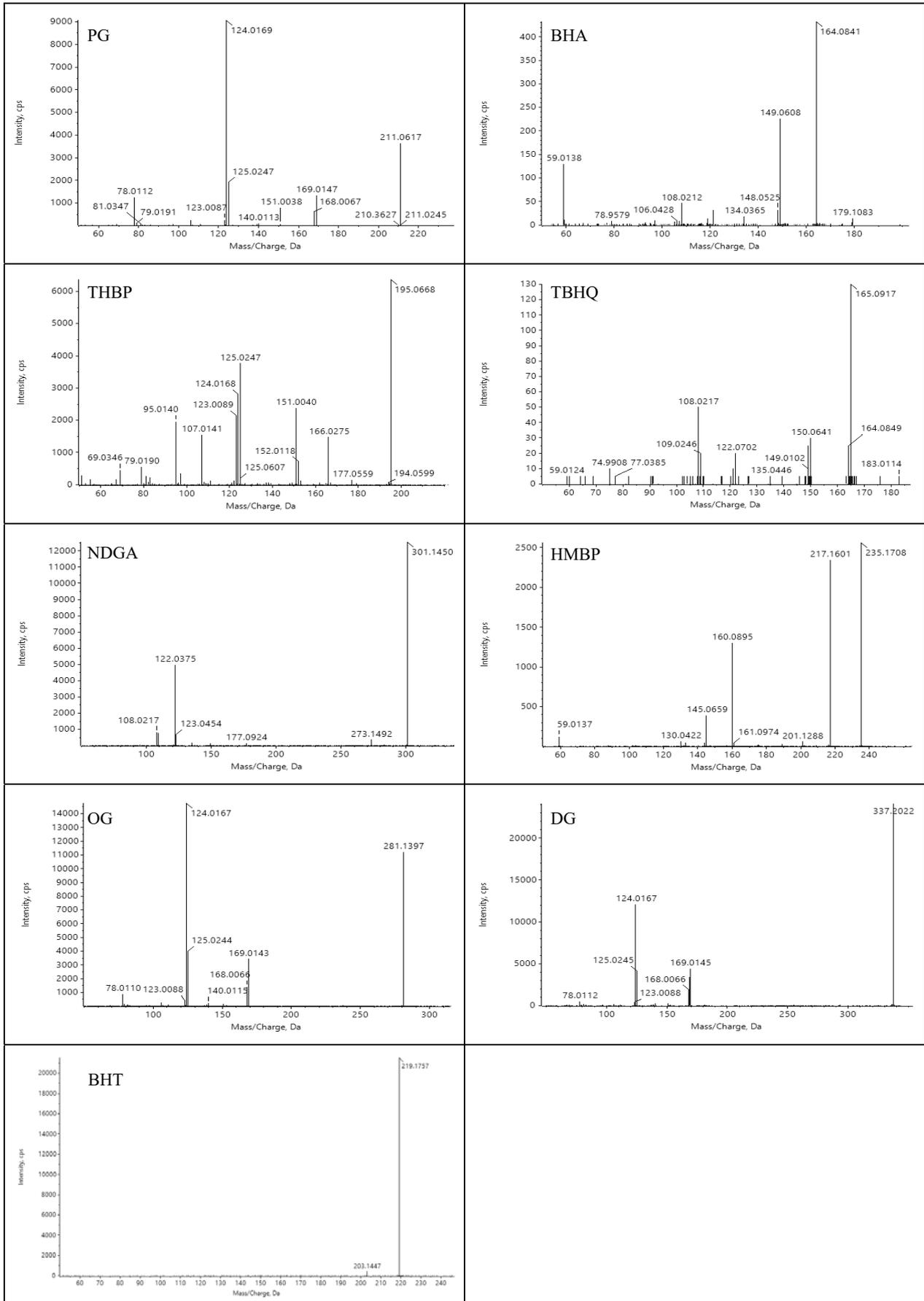


Fig. 3 Production spectrums of antioxidant (Except for BHT : 1 µg/mL, BHT : 10 µg/mL)

った。BHT の回収率は、83~133%で、ガイドラインの回収率の目標値から若干外れていた。THBP の回収率は、131~152%であり、100%を大きく超えていたが、植物油由来の成分による測定時のイオン化促進が要因と考えられた。

また、各試験溶液から得られたプロダクトイオンスペクトルを、「3.1 LC 及び MS 条件の検討」で登録したライブラリ中の各標準物質のプロダクトイオンスペクトルデータと比較したところ、AB SCIEX 社製の解析ソフト (SCIEX OS Software) の自動計算によるスペクトル一致率は 94~100%であった。

TBHQ については、繰り返し測定を行う中で、プロダクトイオンスペクトルが取得できないことがあった。TBHQ は、BHT を除いたその他の酸化防止剤と比較すると、検出強度が低いためにプロダクトイオンスペクトルが取得できない可能性が考えられたが、詳細は不明であり、今後検討の余地があると考ええる。

Table 4 Linear range and recovery from edible vegetable oil

Antioxidant	Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Recovery (%)	
		0.01 g/kg	0.02 g/kg
PG	0.1~2	96~99	89~93
BHA	0.1~2	79~88	74~88
BHT	1~10	—	83~133
THBP	0.1~2	147~152	131~132
TBHQ	0.1~2	86~103	91~91
NDGA	0.1~2	92~99	87~90
HMBP	0.1~2	84~87	82~84
OG	0.1~2	86~88	85~86
DG	0.1~2	88~94	87~88

4 まとめ

9 種のフェノール系酸化防止剤 (PG, BHA, BHT, THBP, TBHQ, NDGA, HMBP, OG 及び DG) を

LC-QTOFMS により定性分析する方法を検討した。その結果、8 種の酸化防止剤を LC-QTOFMS で一斉に定性分析することが可能であった。また、検出強度が低い BHT については、測定条件を変更することで分析可能であった。また、本分析法は、食用植物油中の酸化防止剤の検査において、HPLC 法で検出されたピークの定性確認に有用であると考えられた。

本報告は、第 56 回全国衛生化学技術協議会年会で一部発表済みである。

文献

- 1) 社団法人日本食品衛生協会：食品衛生検査指針 2003 食品添加物編，65~70，2003
- 2) 佐野由紀子，他：食品中のフェノール系酸化防止剤の実態調査，福岡市保健環境研究所報，29，139~142，2004
- 3) 脇山ひとみ，他：LC-MS/MS による食品中のフェノール系酸化防止剤の分析，福岡市保健環境研究所報，39，95~97，2014
- 4) 辻澄子，他：LC/MS 及び GC/MS による食品中 5 種類のフェノール系酸化防止剤の定量・確認，食品衛生学雑誌，46 (3)，63~71，2005
- 5) Li, X.Q., *et al.* : Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS, Food Chemistry, 113, 692~700, 2009
- 6) 西名武士，他：LC/MS/MS による食品中食品添加物の迅速一斉分析法の開発，熊本県保健環境科学研究所報，47，33~41，2017
- 7) 厚生労働省生活衛生局食品保健課長通知：食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について，衛食第 117 号，1997