Mass Spectrometry による製剤分析 (第13報)¹⁾

食品添加剤 その3

p-オキシ安息香酸エチルの定量

Analysis of Mixed Drugs by Mass Spectrometry. XIII
Food Additives (3).

Quantitative Determination of Ethyl p-hydroxybenzoate.

立松 晃*・灘井種一*・吉住秀夫*・内藤国博*・後藤俊夫**
AKIRA TATEMITSU, TANEKAZU NADAI, HIDEO YOSHIZUMI, KUNIHIRO NAITO AND TOSHIO GOTO

(1970年2月5日受理)

Quantitative analysis of ethyl p-hydroxybenzoate by means of mass spectrometry was established by using benzoic acid as an internal standard. Thus, the amount of ethyl p-hydroxybenzoate can be calculated from the ratio of the peak heights of m/e 121 (base peak, ethyl p-hydroxybenzoate) to m/e 105 (base peak, benzoic acid), as the ratio was found to be proportional to the amount of ethyl p-hydroxybenzoate. This method made possible to determine ethyl p-hydroxybenzoate between 40 μ g and 200 μ g within the error of $\pm 3\%$.

1. 緒 言

前報²⁾において、質量分析計による食品よりの防腐剤の検出法について検討を行ない、簡単な前処理のみで混在する種々の防腐剤を同時に確認する方法について報告したが、今回はこれらの物質の定量法について検討し、2~3の知見を得たので報告する。

質量分析計による定量法には、内部標準法、同位体希釈法、低電圧加速電圧法、全イオン和法など³⁾があるが、われわれは過去において内部標準法によるリン酸コデインの定量⁴⁾について検討を行ない、ほぼ満足すべき結果を得ているので、今回も内部標準法により、防腐剤として使用されているp-オキシ安息香酸エチルの定量法を日立RMU-7型二重収束質量分析計を用いて検討を試みた。

内部標準物質としては、試料と蒸気圧、構造が似ているという条件を考慮に入れて安息香酸を選び、一定量の安息香酸が示す主なピークの高さと、p-オキシ安息香酸エチルのピークの高さの比がp-オキシ安息香酸エチルの量に比例することを見い出し、またこのうち

両者のベースピークの高さの比から得た検量曲線を使用して、p-オキシ安息香酸エチルの定量を行なったところ $\pm 3\%$ の誤差で定量できることを見い出した。

2. 実験の部

2.1 定 量 法

p-オキシ安息香酸エチルとして40~200 μ g/mlとなるように試料をクロロホルムに溶解し、この0.5mlを検液としてマス測定用試料瓶にとり、別に標準物質として200 μ g/mlの安息香酸のクロロホルム溶液0.5mlを加え減圧下でクロロホルムを留去させる。ついでイオン加速電圧1800V、イオン化電圧70eV、全放射電流80 μ A、試料加熱温度200°、イオンソース温度250°にて試料導入後25分以内にマススペクトルを測定し、これより m/e 105に対する m/e 121のスペクトルの高さの比を測定し、ついでこの値より下記の方法にしたがって求めたブランクの値を差し引き、別に作成した検量曲線に照合してp-オキシ安息香酸エチルの量を求める。

2.2 ブランク値の測定

* 名城大学薬学部 (名古屋市昭和区)
Faculty of Pharmacy, Meijo University. (Showa-ku, Nagoya)

** 名古屋大学農学部 (名古屋市千種区)
Faculty of Agriculture, Nagoya University. (Chikusa-ku, Nagoya)

200 μ g/ml の安息香酸のクロロホルム溶液 0.5ml をマス測定用試料瓶にとり、定量法に記載の条件でその質量スペクトルを測定し m/e 105 に対する m/e121 のピークの高さの比を求め、この値をブランク値とする。

$$\frac{\sum_{i=1}^{n=10} m/e \ 121}{\sum_{i=1}^{n=10} m/e \ 105} = \frac{0.58\text{mm}}{81.59\text{mm}} = 0.00710$$

2.3 検量曲線の作成

検液として 40~200 μ g/ml のp-オキシ安息香酸エチルのクロロホルム溶液を調製し、その 0.5ml を試料として定量法にしたがって操作し、検量曲線を作製した。Fig.1 に検量曲線を示す。

2.3 装置の調整

測定にあたり、まず標準物質を用い測定条件下でイオン流量が最大となるようにイオン加速電圧、リベラ電圧、レンズ電圧を充分調整する。なおスキャンニングスピードはできるだけ遅くし、得られたピークの先端が正しく矩形となるように調整する。

3. 定量法に関する検討

3.1 イオン流量におよぼすイオン加速電圧、リベラ電圧、レンズ電圧の影響

質量分析計で測定を行なう場合、そのピークの高さは同量の試料を用いた場合でも捕捉するイオン流量によって大きく変化することが知られている。

そこでイオン流量におよぼすイオン加速電圧、リベラ電圧、レンズ電圧について検討し再現性のあるピークの高さを得るための測定条件について検討した。

Fig.2 は試料として p-オキシ安息香酸エチルを用い、定量法中に記載した測定条件にしたがって、スペクトルを測定した場合イオン加速電圧の変化がイオン流量にいかなる変化をもたらすかを検討したもので、グラフの縦軸はイオン流量を、横軸はイオン加速電圧を示す。なお便宜上グラフではアクセルファインの目盛りで示した。

またリベラ電圧、レンズ電圧についても検討した結果 Fig.3,4 に示す如くイオン加速電圧の場合と同様の結果が得られた。

これによれば、いずれの場合も電圧が測定中多少変動してもイオン流量が変化しない範囲の存在することが示され、測定にはこの範囲、すなわちイオン流量が最大となる点を選んで行なった。

3.2 定量に使用するピークの組合せについての検討

3.2.1 イオンピークの高さの比の安定性についての検討

質量分析計でスペクトルを測定する場合、常に排気ならびに電子衝撃が行なわれているため分析管中のイオン流量の減少が生じ、これにともなってピークの高さが変化してゆく。

しかしながら、内部標準法にて定量を行なうためには得られるピークの高さは少なくとも測定時間内では、

Fig.1. Calibration curve of ethyl p-hydroxybenzoate

標準物質と試料とが同一割合で変化する必要がある。

そこでこれらのことを検討するため、標準物質である安息香酸のベースピークである m/e 105 に対する p -オキシ安息香酸エチルの m/e 166, m/e 121 また両者の親イオンである m/e 122, m/e 166, のピークの高さの比の時間に対する変化について検討した。検討

は安息香酸 $100\mu\text{g/ml}$, p -オキシ安息香酸エチル $100\mu\text{g/ml}$ を用い、定量法にしたがってスペクトルを測定して行なった。

Fig. 5. はこれらの結果を示したもので、縦軸にはそれぞれの組合せのピークの高さの比を、横軸は測定迄の時間を取ったものである。

Fig. 2. Relation between ion current and graduation of accel. fine.

Fig. 3. Relation between ion current and graduation of repel.

Fig. 4. Relation between ion current and graduation of lens

Fig. 5. Stability of ratio of peak heights

これによると、試料導入後10～30分はいずれのピークの組合せについても常に安定したピークの高さの比が得られることが見出された。

したがって測定は試料導入後25分以内に行なうこととした。

3.2.2 ピークの高さの比とp-オキシ安息香酸エチルの量との関係について

Fig. 6 は標準物質として使用した安息香酸のスペクトルであり、Fig. 7 は p-オキシ安息香酸エチルのスペクトルを示したもので、多くの特徴あるピークが観察される。

しかしながら、これら両者のどのピークの組合せに

ついてもすべてが定量に使用できるとは限らない。そこでピーク比が測定後30分間は安定であったイオンの組合せについて、イオンの高さの比と試料量との関係について、イオンの高さの比と試料量との関係について検討を行なった。

検討方法は、200 μ g/ml の安息香酸のクロロホルム溶液 0.5ml をマス測定用試料瓶にとり、これに 20 μ g/ml ～200 μ g/ml の p-オキシ安息香酸エチルのクロロホルム溶液 0.5ml を加え減圧下でクロロホルムを留去し、その後定量法にしたがってスペクトルを測定して行なった。

Fig. 8, 9 が得られた結果で 20～200 μ g/ml までは

Fig. 6. Mass spectrum of benzoic acid

Fig. 7. Mass spectrum of ethyl p-hydroxybenzoate

Fig. 8. Relation between the amount of ethyl p-hydroxybenzoate and ratio of peak heights

(○) $\frac{m/e\ 166}{m/e\ 105}$ (●) $\frac{m/e\ 166}{m/e\ 122}$

Fig.9. Relation between the amount of ethyl p-hydroxybenzoate and ratio of peak heights

Table 1. Relation between the amount of ethyl p-hydroxybenzoate and ratio of peak heights

(a) $\frac{m/e\ 166}{m/e\ 122}$ (b) $\frac{m/e\ 166}{m/e\ 105}$ (c) $\frac{m/e\ 121}{m/e\ 105}$

(a)	Amount of ethyl p-hydroxybenzoate in 0.5ml of CHCl ₃				
	20 μg	40 μg	60 μg	80 μg	100 μg
Mean	0.068	0.141	0.214	0.276	0.340
Calcd.	0.071	0.139	0.207	0.275	0.343
Error (%)	- 4.2	+ 1.4	+ 3.4	- 0.4	- 0.9

(b)	Amount of ethyl p-hydroxybenzoate in 0.5ml of CHCl ₃				
	20 μg	40 μg	60 μg	80 μg	100 μg
Mean	0.056	0.119	0.191	0.251	0.317
Calcd.	0.056	0.121	0.187	0.252	0.318
Error (%)	0	- 1.7	+ 2.1	- 0.4	- 0.3

(c)	Amount of ethyl p-hydroxybenzoate in 0.5ml of CHCl ₃									
	10 μg	20 μg	30 μg	40 μg	50 μg	60 μg	70 μg	80 μg	90 μg	100 μg
Mean	0.17	0.33	0.50	0.68	0.83		1.19	1.38		1.76
Calcd.	0.15	0.33	0.50	0.68	0.86	1.03	1.21	1.39	1.56	1.74
Error (%)	+13.3	0	0	0	- 3.5		- 1.7	- 0.7		+ 1.1

ほぼ直線となり、これらピークの高さの比がp-オキシ安息香酸エチルの濃度と良く比例することが見い出された。しかしながら得られた直線はわずかに原点を通らず、低濃度側ではわん曲してくるものと考えられるがこの点については、今後さらに検討する予定である。

Table 1 はこれらの結果をさらに表にしたもので、

表中の計算値は最小二乗法によって得られた直線の式より計算したもので、 $\pm 3\%$ の誤差範囲で実測値と計算値が一致することが認められ、検討したピークの組合せについては、低濃度側を除いては、得られたピークの高さの比はp-オキシ安息香酸エチルの濃度に比例し、検量曲線として使えることが認められた。し

かしながらベースピークどうしを用いた方がピークの高さが高く処理しやすく、また検討した試料については濃度による差も大きな値となるので今回は標準物質である安息香酸のベースピーク m/e 105 と試料としての p-オキシ安息香酸エチルのベースピーク m/e 121 とを使って定量を行なった。

なおこの場合、標準物質の安息香酸の親イオンピーク m/e 122 の M-1 に相当する m/e 121 がわずかであるが、試料の p-オキシ安息香酸エチルのベースピーク m/e 121 に重なるので、標準物質単独の質量スペクトルを測定し m/e 105 に対する m/e 121 の割合を求め、これをブランク値として補正することにより M-1 の影響を除いた。

3.3 水溶液中の p-オキシ安息香酸エチルの定量について

試料として p-オキシ安息香酸エチルの 40, 80, 120,

160, 200 $\mu\text{g/ml}$ の水溶液を調製し、前記記載の定量法にしたがって定量した。

Fig.10 はこの結果を示したもので、m/e 105 と m/e 121 のピークの高さの比は、良く p-オキシ安息香酸エチルの量と比例することが見い出された。なお Table 2 はこの結果を表にしたもので、表中の計算値は実測値の最小二乗法によって得られた直線の式から計算して求めた値で、誤差は計算値からのずれを示している。

これによると p-オキシ安息香酸エチルについては、40 $\mu\text{g/ml}$ から 200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲においては約 $\pm 3\%$ 以内の誤差でよく計算値と一致することが見い出され、この定量法が充分実用に適することが見い出された。しかしながら 60 $\mu\text{g/ml}$ より低濃度については計算値よりずれ、直線性を示さないことが見い出された。

Fig.10. Relation between the amount of ethyl p-hydroxybenzoate and ratio of peak heights

Table 2. Relation between the amount of ethyl p-hydroxybenzoate and ratio of peak heights

	Amount of ethyl p-hydroxybenzoate in 0.5ml CHCl ₃									
	10 μg	20 μg	30 μg	40 μg	50 μg	60 μg	70 μg	80 μg	90 μg	100 μg
Mean		0.35	0.51	0.66		1.03		1.36		1.68
Calcd.	0.17	0.34	0.50	0.67	0.84	1.01	1.18	1.35	1.52	1.69
Error (%)		+ 2.9	+ 2.0	- 1.5		+ 2.0		+ 0.7		- 0.6

4. 考 察

以上の結果より、質量分析計を使用して定量分析を行なう場合には、記載に従って分析計を十分に調整しておけばほとんど他の試薬類を使用することなく簡便に、しかも迅速に定量でき、しかも分析計は長期にわたって再現性のある値を示すことが見い出された。

さらに製剤中あるいは食品中の成分を定量する際に、混在する他の物質に起因するピークが、目的とする物質のピーク、あるいは標準物質のピークと重なる場合も生じると考えられるが、標準物質の量を一定としておけば、両者のピークの高さの比は、どのピークの組合せを取っても試料の量に比例すると考えられ、また重なったとしても本定量法のごとくその比が非常に小さい

ものであれば補正すればよく、したがって多くの成分が混在していても目的とする物質を複雑な操作を必要とすることなく、定性と同時に定量が可能になるものと思われる。今後はさらに多くのものについてこれらの可能性を検討する予定である。

文 献

- 1) 前報, 質量分析, **17**, 844~853 (1969).
- 2) 立松 晃, 灘井種一, 吉住秀夫, 内藤国博, 後藤俊夫, Mass Spectrometry による製剤分析, 第11報, 質量分析, **17**, 773 (1969).
- 3) 土屋利一著, 質量分析(共立) p. 92
- 4) 立松 晃, 後藤俊夫, Mass Spectrometry による製剤分析, 第5報, 薬誌 **85**, (9) 786 (1965).