報 文

食品中L-アスコルビン酸およびエリソルビン酸のHPLC定量法
およびLC-MS/MS確認法

(平成29年7月31日受理)

貞升友紀* 森川麻里 坂牧成恵 門間公夫 小林千種

Quantitative Analysis of L-Ascorbic Acid and Erythorbic Acid in Foods
by HPLC, and Confirmation Method by LC-MS/MS

Yuki SADAMASU*, Mari MORIKAWA, Narue SAKAMAKI, Kimio MONMA and Chigusa KOBAYASHI

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health:
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan;

*Corresponding author

Analysis of L-ascorbic acid (AsA) and erythorbic acid (ErA) in foods is generally performed by HPLC measurement after extraction with metaphosphoric acid solution. But this method can not always measure the concentrations of AsA and ErA precisely due to the presence of interfering compounds, and the reproducibility of retention time is poor. We considered that quantitative analysis by HPLC and confirmation by LC-MS/MS using an identical extraction solvent might be an effective approach for AsA and ErA analysis. Chelate fiber was added to the sample, followed by extraction with acetic acid solution containing ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, purification with Oasis MCX, and 2-fold dilution with methanol. The resulting solution was used for quantification by HPLC using a ZIC-HILIC column and identification by LC-MS/MS. In recovery tests with 8 kinds of foods, the recovery of AsA was over 91%, and that of ErA was over 88%. The RSD was 5.1% or less for both analytes. Analysis of 8 kinds of foods by both methods showed that this method gave better RSD values than the conventional method. AsA and ErA in all samples were confirmed by product ion scanning and selected reaction monitoring of LC-MS/MS.

(Received July 31, 2017)

Key words: L-アスコルビン酸 L-ascorbic acid; エリソルビン酸 erythorbic acid; エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt; キレート繊維 chelate fiber; 親水性相互作用クロマトグラフィー hydrophilic interaction liquid chromatography; 液体クロマトグラフィー HPLC; 液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 LC-MS/MS

緒 言

L-アスコルビン酸 (AsA) およびエリソルビン酸 (ErA) は水溶性酸化防止剤であり、飲料、食肉製品等をはじめとするさまざまな食品に使用されている。互いに立体異性体であるこの2つの酸化防止剤には使用対象食品や使用基準は設けられていないが、製造現場におけるAsAとErAの誤記載と思われる食品表示法違反が散発している。また、変色した古い食肉に噴霧・塗布するなどして新鮮に見せるための偽装に使用された事例^{*1}もあり、迅速

かつ高精度な分析法が求められている。これまでに報告されている分析法^{1)~4)}は試料からAsAおよびErAをメタリン酸溶液で抽出し、HPLCで測定する方法で簡便である。しかし、精製操作がないため夾雑成分の影響を受けて判定に苦慮する事例が多く、アミノプロピルカラムによる分析で保持時間、ピーク面積値およびピーク高さ値の再現性に難点がある等問題点が多い。さらに、抽出液にメタリン酸溶液、移動相にリン酸緩衝液を用いているが、いずれも不揮発性であり、LC-MSの検出器内に析出を生じるため使用することができない。また、LC-MS/MSによる分析法^{5),6)}も報告されているが、対象食品がフルーツジュースに限られている方法や飲料およびサプリメント中のAsAを分析する方法である。そこで、幅広い食品に適用が可能で、かつ同一試験溶液でHPLCによる定量およびLC-MS/MSによる確認を行うことができる分析法を検討したの

* 連絡先 Yuki_Sadamasu@member.metro.tokyo.jp
東京都健康安全研究センター：〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

*1 福岡市保健環境研究所, “食品衛生情報メサージュ No. 147” (2004年11月) <http://www.city.fukuoka.lg.jp/data/open/cnt/3/25190/1/message147.pdf>

で、報告する。

実験方法

1. 試料

抽出および精製条件の検討：ソーセージ、レバーペーストおよび魚肉ソーセージを用いた。

添加回収試験：ソーセージ、ハム、魚肉ソーセージ、炭酸飲料、ブルーベリージャム、白桃缶詰、ワインおよびアスパラガス水煮缶詰を用いた。

従来法との比較：ソーセージ、ハム、ベビーフード（果実および野菜を使用）、清涼飲料水、あんずジャム、白桃缶詰、ビールおよびマッシュルーム水煮を用いた。

上記の試料はいずれも東京都内で購入した。

2. 試薬等

AsAおよびErA標準品：和光純薬工業(株)製特級試薬を用いた。

EDTA・二ナトリウム二水和物（EDTA・2Na）：同仁化学研究所製を用いた。

アセトニトリルおよびメタノールは高速液体クロマトグラフ用、その他の試薬は市販特級品を用いた。

AsAおよびErA標準原液：AsAおよびErA標準品各0.05 gを正確に量り、25 µg/mL EDTA・2Na含有2%酢酸溶液を加えて正確に50 mLとした。（本液1 mLはAsAおよびErA各1,000 µgを含む。）

AsAおよびErA標準溶液：AsAおよびErA標準原液を適宜25 µg/mL EDTA・2Na含有2%酢酸溶液で希釈した。なお、標準溶液は試験溶液と同様にメタノールで2倍希釈したものをHPLCおよびLC-MS/MSに供した。

25 µg/mL EDTA・2Na含有2%酢酸溶液（EDTA酢酸溶液）：EDTA・2Naを110.8 mg量り、水で100 mLにした（本液1 mLはEDTA・2Naを1,000 µgを含む。）この溶液25 mLに酢酸20 mLを加えて水で1,000 mLとした。

キレートファイバー MetaSEP CH-1：ジーエルサイエンス社製を用いた。あらかじめ十分量の水を加えて時々攪拌しながら1時間以上放置した後、ろ過して余分な水分を除去したものをを用いた（含水CH-1）。含水CH-1は乾燥状態と比較して約2.5倍の重量である。

Oasis MCX（60 mg, 粒径30 µm）：Waters社製を用いた。あらかじめメタノールおよびEDTA酢酸溶液各3 mLでコンディショニングし、使用した。

3. 装置

振とう機：エルビス EL（株式会社スギヤマゲン製）

ICP：Optima 7300DV（Perkin Elmer社製）

HPLC：1100 シリーズ（Agilent Technologies社製）

LC-MS/MS：ACQUITY UPLC/TQD（Waters社製）

4. ICP条件

測定波長：259.939 nm，サンプル導入量：1.0 mL/min，プラズマガス流量：15 L/min，補助ガス流量：0.2 L/min，キャリアーガス流量：0.7 L/min，RF出力：1,300 W，観測方向：軸方向

Scheme 1. Analytical method of AsA and ErA

5. HPLC条件

カラム：ZIC-HILIC（2.1 mm i.d.×150 mm，粒径3.5 µm，細孔径200 Å，SeQuant社製），移動相：40 mmol/L酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル（20：80），流速：0.1 mL/min，検出：UV260 nm，カラム温度：25℃，注入量：2 µL

なお、抽出溶媒の検討では、井部らが報告⁴⁾しているHPLC条件に従った。

6. LC-MS/MS条件

カラム，移動相，流速，カラム温度および注入量はHPLC条件と同様である。イオン化法：ESI（－），キャピラリー電圧：2.5 kV，コーン電圧：30 kV，イオン源温度：120℃，デソルベーション温度：350℃，デソルベーションガス流量：600 L/hr，コリジョン電圧：12 eV，測定モード：プロダクトイオンスキャン（プリカーサーイオン m/z 175，プロダクトイオンスキャン m/z 50～200）および選択反応モニタリング（SRM，測定イオン m/z 175>115）

7. 試験溶液の調製

液状食品はそのまま，固形食品は細切した後，約10 gを採取した。含水CH-1を5 g加えた後，EDTA酢酸溶液で50 mLに定容した。20分間振とう抽出した後，遠心分離（2,330×g，10分）し，その上清5 mLをOasis MCXに流速約6～8 mL/minで負荷した。流出した液の最初の3 mLを捨てた後，次の1 mLを正確に採取し，メタノール1 mLを加えて良く混和した。これを0.2 µmのメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とし，HPLCおよびLC-MS/MSにより分析した（Scheme 1）。

結果および考察

1. 抽出溶媒の検討

AsAおよびErAは酸性で安定だが，共存する金属イオンにより酸化されやすいことが知られている^{7),8)}。そのため，従来の試験法^{1)～4)}では金属封鎖効果のあるメタリン酸溶液⁹⁾を用いて食品から抽出している。しかし，メタリン酸溶液は不揮発性であることからLC-MS/MSでの分析には使用できないため，新たな抽出溶媒の検討を行った。

Fig. 1. Time courses of recovery of AsA and ErA with various extraction solvents

Sample: sausage, spiked level: 0.10 g/kg.

- ◆ 50 µg/mL EDTA containing 2% acetic acid solution,
- 10 µg/mL EDTA containing 2% acetic acid solution,
- ▲ 5 µg/mL EDTA containing 2% acetic acid solution,
- * 2% acetic acid.

まず、抽出溶媒に用いる酸性溶媒の検討を行った。LC-MS/MS分析に汎用されている揮発性の酢酸およびギ酸を、食品衛生検査指針^{1),2)}に記載されているメタリン酸溶液濃度に合わせて2%溶液とし、これらを用いてAsAおよびErAの20 µg/mL溶液を調製し、HPLCで分析した。その結果、2%ギ酸溶液で調製した20 µg/mL溶液ではマイナスピークが出現してErAのピークに影響を及ぼす一方、2%酢酸溶液で調製した20 µg/mL溶液は特に問題なく分析することがわかった。また、酢酸溶液の濃度を0.5, 1, 2%と変化させたところ、2%溶液のピーク形状が最も良好であった。酢酸濃度が高いほどピーク形状が良好になると推測されたが、分析カラムに及ぼす影響を考慮し、本法では2%溶液とすることにした。

次に、金属イオンをマスキングする目的で、抽出溶媒に添加するキレート剤の検討を行った。AsAおよびErAは各種金属イオンの中でも特に銅イオンおよび鉄イオンの存在下で分解が促進される^{7),8)}ことから、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 等とのキレート安定度定数が高く、水溶性のキレート剤であるEDTA・2Na¹⁰⁾を用いることとし、濃度を0, 5, 10, 25, 50 µg/mLと変化させたEDTA・2Na含有2%酢酸溶液を調製した。ソーセージ10 gに各濃度のEDTA・2Na含有2%酢酸溶液を加えて50 mLとし、超音波で30分抽出後、遠心分離 ($2,330 \times g$, 10分) して得た上清にAsAおよびErAを20 µg/mLとなるように添加し、その安定性について経時変化を観察した (Fig. 1)。その結果、5日間経過後もAsAおよびErA共に80%以上の回収率が得られた抽出溶媒は10, 25, 50 µg/mL EDTA・2Na含有2%酢酸溶液であった。EDTA濃度が高いほど金属イオンをマスキングする効果が期待できる一方、過剰なEDTAがLC-MS/MSを汚染する恐れを考慮し、本法では25 µg/mL EDTA・2Na含有2%酢酸溶液 (EDTA酢酸溶液) を抽出溶媒として用いることにした。

2. キレート繊維の検討

抽出溶媒にEDTA酢酸溶液を用いてAsAが使用されている食品を分析したところ、食肉製品や缶詰製品等でRSDが10%以上になる事例が見られた。その原因の1つとして、抽出溶媒のEDTA・2Naだけで金属イオンをマスキングすることが難しいのではないかと考えた。そこで、抽出時にキレート繊維のキレートファイバーMetaSEP CH-1を添加することとし、添加量について検討を行った。キレート繊維はセルロース繊維の表面にキレート官能基を化学修飾した金属の吸着材である。まず、含水CH-1を直接試料に添加して金属を除去することが可能であるか検証を行った。AsAの酸化をもっとも促進する金属イオンは Cu^{2+} であるが⁸⁾、AsAおよびErAが汎用されている食品中には銅より鉄の含有量が高いこと、また Fe^{3+} はAsAにより還元されて Fe^{2+} になることから、検証には硫酸第一鉄アンモニウム・六水和物を用いた。また、日本食品標準成分表2015年版 (七訂)¹¹⁾を参考に鉄を多く含む食品を10 g採取して50 mLに定容したときの鉄濃度として30 µg/mLを想定した。EDTA酢酸溶液で調製した40 µg/mL硫酸第一鉄アンモニウム溶液40 mLに含水CH-1を2.5, 5, 7.5 g添加し、EDTA酢酸溶液で50 mLに定容した後、30分緩やかに振とうした。10分間静置後、上清をEDTA酢酸溶液で10倍希釈し、ICPで鉄の量を測定した。その結果、含水CH-1の量が2.5, 5, 7.5 gのとき、溶液中の鉄残存量はそれぞれ16.3, 10.0, 7.2 µg/mLとなり、含水CH-1の添加量が多いほど鉄の残存量は少なくなった。

次に、実際の食品を用いて検討を行った。銅や鉄を多く含む食品であるレバーペースト10 gにErAを0.10 g/kgとなるように添加し、含水CH-1 2.5, 5, 7.5 gを加えた後、EDTA酢酸溶液で50 mLにした。30分緩やかに振とう抽出した後、遠心分離 ($2,330 \times g$, 10分) し、上清をHPLCで測定してErAの回収率を求めたところ、含水

CH-1の量が2.5, 5, 7.5 gのとき, それぞれ80, 83, 79% ($n=5$ の平均値)であった。また, RSDはそれぞれ5.9, 5.4, 4.0%と良好な結果が得られた。含水CH-1の添加量が多いほどRSDが小さくなる傾向が見られたが, 含水CH-1は嵩張るため添加量を増やすと試料によっては振とうが十分に行えない恐れがあった。以上の結果から, 含水CH-1の添加量はErAの回収率が最も良く, 振とうを十分に行うことが可能で, かつ一定量の金属をマスキングできる5 gとすることにした。

3. 抽出条件の検討

食品衛生検査指針^{1),2)}では試料に抽出溶媒を入れた後, 振とうおよび超音波による抽出を行っている。しかし, 「2. キレート繊維の検討」で述べた硫酸第一鉄アンモニウム溶液による検証実験を行った際, 超音波抽出では含水CH-1に金属イオンを吸着させるために振とう抽出と比較し時間を要することが分かった。これは含水CH-1の表面にあるキレート官能基と試料中の金属イオンが振とうにより多く接触するため, 金属イオンが吸着されやすくなると推測された。そこで, 振とうによる抽出時間の検討を行った。含水CH-1を5 gとし, 「2. キレート繊維の検討」と同様に操作して, 振とう時間を0, 10, 20, 30分と変化させたところ, 鉄の残存量は12.6, 11.6, 10.8, 10.0 $\mu\text{g/mL}$ と振とう時間が長いほど少なくなった。次に, AsA使用表示のあるソーセージを細切して10 gを採取し, 含水CH-1を5 g添加した後, EDTA酢酸溶液で50 mLにした。振とう時間を0~40分の範囲で変化させて抽出した後, 遠心分離 (2,330 $\times g$, 10分) し, 上清をHPLCで測定してAsA含有量を求めたところ, 10~40分振とうではAsA含有量に変化が認められなかった。以上の結果から, 含水CH-1の金属除去効率とAsAおよびErAの安定性を考慮し, 振とう時間は20分とすることにした。

4. 固相抽出カラムによる精製法の検討

従来の試験法^{1)~4)}では試料からメタリン酸溶液で抽出した後, 精製操作を経ずAsAおよびErAをHPLCで分析しているが, 夾雑ピークが多数出現し, AsAおよびErAのピークを判別することが困難な事例も多い。そこで, 簡便な精製方法を検討した。AsAおよびErAは逆相系固相には保持されないことから, 妨害成分を固相抽出カラムに保持させて除去することを目的に, 逆相系固相抽出カラムであるSep-Pak C₁₈ (500 mg) およびOasis HLB (150 mg), イオン交換と逆相系をミックスしたOasis MAXおよびOasis MCX (いずれも150 mg)での精製を試みた。まず, 夾雑成分が多い試料の1つである魚肉ソーセージを10 g採取し, EDTA酢酸溶液で50 mLにした。振とう抽出後, 遠心分離 (2,330 $\times g$, 10分) し, 上清を用いて40 $\mu\text{g/mL}$ AsA・ErA混合溶液を調製した。この溶液を2.5 mL採り, 前述の各固相抽出カラムに通過させ, 流出液を採取した。さらにEDTA酢酸溶液を2.5 mL通過させ, 流出液を先の流出液に合わせて5 mLとし, HPLCで測定した。その結果, いずれの固相抽出カラムも回収率に差はなかったが,

妨害成分の除去が良好であったのはSep-Pak C₁₈およびOasis MCXであった。AsAおよびErAは非常に酸化されやすいため, 精製操作を迅速に行うことが重要となる。そこで, Sep-Pak C₁₈より固相充てん量の少ないOasis MCXを用いて, 通液量を少なくし操作の迅速化を試みた。まず, 固相充てん量60 mgのカラムを用いて上記と同様に操作し分析したところ, 妨害成分の除去が十分可能であることが分かった。次に, 通液量の検討を行った。固相抽出カラムはメタノールおよびEDTA酢酸溶液各3 mLであらかじめコンディショニングして用いているため, 試料溶液を負荷するとカラム内に残存した溶媒に希釈されてしまう。そこで, 試料溶液を一定量通過させた後の流出液を採取して分析に用いることとし, EDTA酢酸溶液で調製した200 $\mu\text{g/mL}$ AsA・ErA混合標準溶液7 mLをOasis MCX (60 mg)に負荷し, 流出液を1 mLずつ分画した。各分画についてHPLCで測定したところ, 2~7 mLではAsA, ErA共に回収率95%以上であった。よって, 負荷量は5 mLとし, 最初に流出した3 mLを捨てた後の1 mLを用いることとした。

5. HPLC条件の検討

従来の試験法^{1)~4)}では分析カラムにアミノプロピルカラムを用いているが, 保持時間の変動がしばしば見られる上, AsAおよびErAが分析カラムに吸着してピーク面積値の再現性が悪いなどの難点がある。また, 移動相にリン酸緩衝液を用いているため, 同条件でLC-MS/MSの分析を行うことはできない。そこで, 鶴田らの報告¹²⁾を基に, これらの難点を解消し, かつLC-MS/MSでの分析も可能なHPLC条件の検討を行った。

鶴田ら¹²⁾は分析カラムに親水性化合物の分離に有効とされている親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラムを用いている。そこで, 3社5種類のHILICカラム (SeQuant社製ZIC-HILIC (粒径3.5 μm および5 μm), ナカライテスク(株)製Cosmosil HILIC, Waters社製Atlantis HILIC SilicaおよびACQUITY UPLC BEH Amide)について比較検討を行った。その結果, 最も感度が良好で保持時間も適切でありAsAおよびErAのピーク面積値およびピーク高さ値のバランスが良好であったZIC-HILIC (2.1 mm i.d. $\times$ 150 mm, 粒径3.5 μm , 細孔径200 Å)を用いることとした。

また, HILICカラムは, 親水性相互作用により分離が行われ, 順相モードに近い特性があるため, 試料溶液中に水を高濃度を含むと, ピークがブロードになり, 分離度も低下すると考えられた。そこで, メタノール, アセトニトリル, アセトン, 2-プロパノールおよびエタノールで25 $\mu\text{g/mL}$ 標準溶液を希釈し, HPLCおよびLC-MS/MSで測定したところ, HPLCクロマトグラムにおける溶媒ピークが小さく, LC-MS/MSの感度も良好なメタノールが最も適していた。そこで, 試料溶液をメタノールで希釈することとし, 希釈倍率はHPLCでの感度を考慮して2倍にすることとした。

Fig. 2. Comparison of retention time, height and peak area on HPLC at various concentrations of $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

次に移動相の検討を行った。鶴田らの方法¹²⁾では100 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (28:72) を用いているが、LC-MS/MSで分析するには塩濃度が高すぎると考え、酢酸アンモニウム濃度の検討を行った。酢酸アンモニウム溶液とアセトニトリルの比率はAsAとErAの分離が良好な (20:80) とした。さらに酢酸アンモニウムの濃度を20~50 mmol/Lの範囲で変化させ分析を行ったところ、40 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液を用いたときが最も分離、感度が良好でAsAおよびErAのピーク面積値およびピーク高さ値のバランスも良好であった (Fig. 2)。以上の結果から、移動相は40 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (20:80) とした。

6. 検量線

本HPLC定量法に従い検量線を作成したところ、1~500 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性 ($r=0.9999$) を示した。また、 S/N 比が10以上となる濃度は2 $\mu\text{g/mL}$ であった。

7. 添加回収試験

AsAおよびErAが汎用されている8種類の食品を試料とし、AsAおよびErAが0.10 g/kgとなるように添加して回収試験を行った。なお、試料はAsAおよびErAの使用表示がないものを入手したが、AsAは野菜や果実等天然に含まれていることから、添加回収試験と同時にAsAの含有量測定およびErAが検出されないことの確認を行った ($n=5$)。天然由来と考えられるAsAが検出されたものについては含有量をブランクとして差し引きし添加回収率を求めた。その結果をTable 1に、クロマトグラム例をFig. 3に示した。本法による8食品の添加回収率はAsA 91%以上、ErA 88%以上であり、RSDはいずれも5.1%以下と良好な結果が得られた。

8. 市販食品を用いた従来法との比較

AsAおよびErAが使用されている8種類の食品 (ソーセージはAsAおよびErA両方の使用表示あり) を試料とし、食品衛生検査指針に示されている還元型AsAおよびErAの分析法 (指針法)¹⁾と本法を用いて分析し、その定量値およびRSDを求めた (Table 2)。結果についてF検

Table 1. Recoveries of AsA and ErA from 8 foods

Sample	AsA		ErA	
	Recovery* (%)	RSD* (%)	Recovery* (%)	RSD* (%)
Sausage	99.6	2.1	94.9	2.3
Ham	91.2	4.0	88.0	1.4
Fish sausage	95.2	2.0	90.6	2.8
Carbonated beverage	98.9	1.7	98.9	1.5
Blueberry jam	97.8	3.0	93.5	3.8
Peaches canned in syrup	99.5	2.2	98.4	1.4
Wine	93.7	1.7	94.2	1.6
Asparagus canned	99.4	5.1	89.3	4.3

*Sample were spiked with 0.10 g/kg of each compound, $n=5$.

Fig. 3. HPLC chromatograms of AsA and ErA spiked in fish sausage at the level of 0.10 g/kg

(A) 10 $\mu\text{g/mL}$ standard solution

(B) Sample solution of fish sausage spiked with AsA and ErA

(C) Sample solution of unspiked fish sausage

定を行ったところ、ビール、清涼飲料水のAsA定量値およびソーセージのErA定量値 (各 $n=5$) については有意差があり ($p<0.05$)、指針法の方がRSDの値が大きいことが分かった。また、F検定でRSDに有意差はないと判定したハム、ソーセージのAsAなど6試料についてt検定を行ったところ、5試料は両者に有意差が認められなかったが、マッシュルームの水煮では有意差が認められ ($p<0.05$)、本法のほうが約1割高い値が得られた。そこで本法で測定したHPLCクロマトグラムのPDAスペクトルを確認したが、妨害成分の影響は認められなかった。日本食品標準成分表¹¹⁾によるとマッシュルーム水煮缶詰の銅および鉄はそれぞれ19, 8 $\mu\text{g/g}$ と金属含有量が比較的高い食品であり、測定値に影響している可能性も考えられたが、有意差が認められた明確な原因は不明であった。以上の結果から、本法は指針法と同等以上の良好な分析法であることが分かった。

9. LC-MS/MSによる確認法

原材料使用表示のない食品でAsAおよびErAが検出された場合、誤りなく同定することが重要となる。そこで、LC-MS/MSによる確認法を検討した。HPLC条件は定量法と同条件とし、ESIネガティブモードで最適化を行った。AsAおよびErAのプロトン脱離分子である $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 175をプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスキャンによる測定を行ったところ、 m/z 175>115のプ

Table 2. Comparison of analytical values of AsA and ErA in foods by conventional method and considered method

Indication of food	Sample	Conventional method		Considered method	
		Analytical value (g/kg)	RSD (%)	Analytical value (g/kg)	RSD (%)
AsA	Sausage ^a	0.28	2.9	0.27	1.5
	Ham	0.63	5.6	0.66	2.4
	Baby food (fruits and vegetable paste)	0.05	6.3	0.05	3.5
	Fruit juice beverage	2.2	7.3*	2.6	1.7
	Apricot jam	0.20	6.8	0.20	2.7
	Peachs canned in syrup	0.08	9.0	0.07	3.8
	Beer	0.15	4.9*	0.15	0.8
	Mushroom in brine	0.57**	5.0	0.62	2.0
	Sausage ^a	0.45	8.9*	0.41	1.5

$n = 5$

^a: Sausage in which AsA and ErA were also used.

* $p < 0.05$ in F -test

** $p < 0.05$ in t -test

Fig. 4. SRM chromatogram (m/z 175>115) (A) and product ion spectra (B)

ロダクトイオンが得られた。また、SRM (m/z 175>115) による測定を行ったところ、SRMクロマトグラムの取得が可能であった (Fig. 4)。なお、 S/N 比が3以上となる濃度はプロダクトイオンスキャンで2 µg/mL、SRMでは1 µg/mLであった。

また、「8. 市販食品を用いた従来法との比較」で用いたAsAおよびErAが使用されている8種類の食品に本LC-MS/MS確認法を適用したところ、標準溶液と同様のプロダクトイオンスペクトルおよびSRMクロマトグラムが得られ、確認を行うことができた。

ま と め

食品中のAsAおよびErAについて、同一試験溶液でHPLCによる定量およびLC-MS/MSによる確認を行うことができる分析法を検討した。試料に含水CH-1を添加しEDTA酢酸溶液で抽出後、Oasis MCXで精製し、HPLCおよびLC-MS/MSにより測定した。分析カラムにはZIC-HILIC、移動相には40 mmol/L酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (20:80) を用い、定量はHPLC、確認はLC-MS/MSを用いたプロダクトイオンスキャンおよびSRMモードで行った。8種の食品で添加回収試験を行ったところ、回収率はAsA 91%以上、ErA 88%以上であ

り、RSDはいずれも5.1%以下と良好な結果が得られた。また、AsAおよびErAの使用表示のある8種の食品で指針法との比較を行ったところ、定量値にはほとんど有意差はないが、RSDは本法のほうが小さく、精度が良好な試験法であることが分かった。さらに、LC-MS/MSでプロダクトイオンスキャンおよびSRMによる測定を行ったところ、いずれの試料においてもAsAおよびErAを確認することができた。本法はこれまでに報告されている分析法^{1)~4)}にみられた夾雑成分の影響や再現性等の問題点を解消し、LC-MS/MSによる確認が可能であることから、効率的かつ高精度な日常検査法として十分適用できるものとする。

本論文の一部は、日本食品衛生学会第110回学術講演会 (2015, 京都) において発表した。

文 献

- 1) 厚生労働省監修. “第2章 酸化防止剤”. 食品衛生検査指針 食品添加物編. 東京, 日本食品衛生協会, 2003, p. 46-52. (ISBN 978-4-88925-005-3)
- 2) 厚生労働省監修. “第17章 強化剤”. 食品衛生検査指針 食品添加物編. 東京, 日本食品衛生協会, 2003, p. 400-407. (ISBN 978-4-88925-005-3)
- 3) The Pharmaceutical Society of Japan ed. “2.1.6 Bitamin. 3) Bitamin C”. Eiseishikenho Chukai 2015 (Methods of Analysis Health Science 2015), Tokyo, Kanehara Shuppan, 2015, p. 250-254. (ISBN 978-4-307-47043-8)
- 4) Ibe, A., Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Fujinuma, K., Nishima, T. Simultaneous detection and determination of erythorbic acid and L-ascorbic acid by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography and survey of their contents in commercial foods. Tokyotoritsu Eisei Kenkyusyo Kenkyu Nenpo (Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health), **36**, 168-173 (1985).
- 5) Somchai, B., Sasiwimon, L., Yaneenart, S., Supaluk, P., Virapong, P. Analysis of ascorbic acid and isoascorbic

- acid in orange and guava fruit juices distributed in Thailand by LC-MS/MS. *Food Anal. Methods*, **9**, 1616–1626 (2016).
- 6) Kakitani, A., Inoue, T., Matsumoto, K., Watanabe, J., Nagatomi, Y., Mochizuki, N. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in beverages and dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants : Part A*, **31**, 1939–1948 (2014).
- 7) Kamiya, S., Nakabayashi, T. Studies on the decomposition of ascorbic acid (III) Decomposition of ascorbic acid by metal ion. *Vitamin*, **13**, 384–386 (1957).
- 8) 安部由香, 森園由美, 岡田真理, 重西恵美, 高橋美紀, 八木朝子, 山口真澄, 阿曾沼由美, 藤井厚江, 重政弘美, 市川 昭. L-アスコルビン酸の酸化分解反応 (第1報) L-アスコルビン酸の銅イオンおよび, 鉄イオン存在下における酸化分解反応. *家政学会誌*, **22**, 33–36 (1983).
- 9) Hirata, A. Studies on the poly phosphates as the additives for foods (Part 1) On the effect of phosphates as a preservative for vitamin C. *Kaseigaku Zasshi*, **19**, 162–164 (1968).
- 10) The Pharmaceutical Society of Japan ed. “2.3.5 Sankaboushizai. 2) Echirenjiaminyonsakusan oyobi Sonoenrui”. *Eiseishikenho Chukai 2015 (Methods of Analysis Health Science 2015)*, Tokyo, Kanehara Shuppan, 2015, p. 349. (ISBN 978–4–307–47043–8)
- 11) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会. *日本食品標準成分表2015年版 (七訂)*. 東京. 全国官報販売協同組合, 2015. (ISBN 978–4–86458–118–9)
- 12) Tsuruda, S., Akaki, K. Simultaneous determination of ascorbic and erythorbic acid by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). *Fukuokashi Hokenkankyokenkyusyo Ho*, **36**, 47–50 (2010).