

液体クロマトグラフ - 質量分析計による

食品中ステビオシド及びレバウジオシドAのスクリーニング分析法の検討

林 真輝^a, 中村 理奈^a, 羽石 奈穂子^a, 塩澤 優^a
石井 悦子^a, 高木 優子^a, 牛山 慶子^a, 大塚 健治^a
(外部機関査読者: 笹本 剛生^b)

甘味料ステビオシド (SS) 及びレバウジオシドA (RA) の分析に, アセスルファムカリウム等他の甘味料6種類の検査で用いている液体クロマトグラフ - 質量分析計 (LC-MS) による確認分析法の適用を図った. SS及びRAを含め, ワンサイクルでの分析を可能とするため, 移動相のグラジエント条件を最適化した. 分析条件を変更するにあたり, 透析法で得られた透析外液をフィルターろ過のみでLC-MSに注入することとした. 令和5~6年に当科に搬入された検体を用いて, 本法の性能評価を行った. 349品目の食品において, 食品由来成分による定性定量への影響は見られなかった. また, 過去10年間の検体情報を解析し, 搬入数が多い5種類のグループの代表食品について妥当性確認を実施した. いずれの食品においても, 各評価パラメーターは妥当性確認ガイドラインの目標値を満たした. 16回の検査におけるSSの内部品質管理結果も良好で, 本法と従来法の管理基準は同程度であった. 以上のことから, 本法が種々の食品中SS及びRAのスクリーニング分析法として有用であることが確認できた. また, SS及びRAと他の甘味料6種類を同時分析できる本法を従来法の代替として日常検査に導入することで, 甘味料のより効率的な検査の実施が可能なることを示唆した.

キーワード: ステビオシド, レバウジオシドA, LC-MS, 同時分析, 妥当性確認, 甘味料

はじめに

ステビオシド (SS) 及びレバウジオシドA (RA) はキク科植物のステビア (*Stevia rebaudiana*) から得られるステビア甘味料の主成分である^{1,2)}. ステビア甘味料は, ノンカロリーで血糖管理に役立つため, 昨今の健康志向の高まりから世界的に需要が高まっている^{1,3)}. 日本では既存添加物名簿に収載され飲料や漬物等広範囲の食品に使用されている^{1,2)}. また, 甘味料として食品に添加した場合, 表示の義務がある.

食品中のSS及びRA分析法として, 食品中の食品添加物分析法⁴⁾では薄層クロマトグラフィーによる定性分析法が示され, 他に, 紫外可視吸光光度検出器 (PDA) や質量分析計 (MS) を備えた液体クロマトグラフ (LC) を用いた定量分析等多くの方法^{5,6)}が報告されている. 現在, 当センターの日常検査においては, 山本らが報告した迅速透析法を用いて定量分析を行っている (従来法)⁵⁾. これは, SS及びRAを試料から迅速透析法により抽出し, その透析液をC18固相カラムで精製して得られた試験溶液をLC-PDAで測定する分析法である. SS及びRAのUV吸収スペクトルは210 nmであり特徴的なUV吸収ではない. C18固相カラムによる精製のみでは, SS及びRAと分離が不十分な食品由来成分による擬似ピークが検出される頻度が高い. そのため, 標準品との重ね打ちやLC-MSを用いた再測定等確認作業に時間を費やしている.

一方, 他6種類の甘味料, スクラロース, アセスルファムカリウム, サッカリン, アスパルテーム, ゼルチン及びサイクラミン酸の検査では, 従来法の抽出工程で得られた透析液を未精製のまま試験溶液とし, LC-PDA-MSで分析・確認を行っている (日常スクリーニング法)⁷⁾. SS及びRAの日常検査では, これらと同時に検査することが求められることも多く, 同時分析可能となれば効率化が図れる. そこで, 日常スクリーニング法のLC-MS条件を改良し, SS及びRAにも適用可能なように最適化した. 東京都では年間900食品を超える多種多様な加工食品を検査する. そこで, 改良した試験法を種々の食品に適用し, 定性及び定量が可能であることを確認した. また, 令和6年3月に食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン⁸⁾が通知されたことから, 過去10年間の検査実績を踏まえて選択した5食品について妥当性を検証した.

実験方法

1. 試料

妥当性確認用試料: 東京都内で市販されていた, ステビアが使用されていないスポーツ飲料, 浅漬け, ドレッシング, キャンディ, 煮豆を用いた.

定性定量における食品由来成分の影響確認用試料: 令和6年4月1日から同年7月31日の期間に, 甘味料の検査依頼があった336食品及び令和5年度に当科に搬入された食品のう

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都食品技術研究所

ち、高たんぱくまたは高脂質であった13食品の、計349食品を用いた。当センター広域監視部及び都保健所による食品分類とその内訳は、菓子類75食品、そうざい類及びその半製品60食品、野菜・果物及びその加工品39食品、冷凍食品37食品、調味料26食品、肉・卵類及びその加工品17食品、乳製品16食品、酒精飲料14食品、穀類及びその加工品12食品、魚介加工品12食品、乳類加工品4食品、缶詰・びん詰食品2食品、魚介類1食品、レトルト食品1食品、清涼飲料水1食品及びその他の食品32食品であった。これらのうちステビア表示のある食品は、菓子類1種類、冷凍食品1食品、野菜・果物及びその加工品6食品の計8食品であった。

各食品は、一般試料採取法⁹⁾に従い均質化して用いた。

2. 標準品及び標準溶液

SS及びRA：食品添加物分析用、富士フィルム和光純薬（株）製

添加用標準原液（1,000 µg/mL）：SS及びRA 20 mgをそれぞれ個別に精密に量り、30%メタノールに溶解し、全量を20 mLとした。

添加用標準溶液（100 µg/mL）：SS及びRAの添加用標準原液を10 mLずつ分取して100 mL容メスフラスコに入れ、30%メタノールで定容した。

検量線用標準原液（500 µg/mL）：SS及びRA 10 mgをそれぞれ個別に精密に量り、30%メタノールに溶解し、全量を20 mLとした。

検量線用標準溶液：SS及びRAの検量線用標準原液を4 mLずつ分取して200 mL容メスフラスコに入れ、30%メタノールで定容した（10 µg/mL）。これを30%メタノールで適宜希釈し、濃度0.5, 1, 2, 5, 8, 10 µg/mLの検量線用標準溶液を調製した。

3. 試薬及び試液

メタノール：HPLC用、富士フィルム和光純薬（株）製

ギ酸：LC-MS用、富士フィルム和光純薬（株）製

水：Merck Millipore社製 Milli-Q[®]超純水装置で精製された超純水を用いた。

4. 器具等

透析膜、遠心管、フードプロセッサー、恒温振とう水槽及びメンブレンフィルターは、日常スクリーニング法⁷⁾に従った。

5. LC-MS及び測定条件

LC-MSの装置及び測定条件は、Table 1に示す通りである。同型式のLC-MS 2台を用いた（以降、LC-MS 1及び2と区別して表記する）。

Table 1. LC-MS conditions for 8 sweeteners

HPLC system	ACQUITY UPLC [®] H-Class (Waters Co.)
HPLC column	ACQUITY UPLC CSH TM Phenyl-Hexyl (1.7 µm, 2.1 mm i.d.×100 mm, Waters Co.)
Column temperature	40 °C
Flow rate	0.3 mL/min
Mobile phase	(A) 0.1% formic acid in 20% methanol (B) 0.1% formic acid in methanol
Gradient	(A% : B%) = 0 min (100 : 0) → 15 min (100 : 0) → 15.01 min (40 : 60) → 21 min (40 : 60) → 21.01 min (100 : 0) → 27 min (100 : 0)
Injection volume	1 µL
MS system	ACQUITY QDa (Waters Corporation)
Ionization	ESI, negative
Probe temperature	600 °C
Capillary voltage	0.8 kV
Cone voltage	SS: 24, RA: 28
monitor ion (SIM)	SS: m/z = 641, RA: m/z = 965

6. 試験溶液の調製

日常スクリーニング法に従い、試料10 gを30%メタノール100 mLで透析処理し、得られた透析膜外側の溶液を0.20 µmメンブレンフィルターでろ過し、試験溶液とした。

7. 検量線

検量線用標準溶液をLC-MSに注入し、ピーク面積による絶対検量線法を用いて検量線を作成した。

8. 分析法の性能評価

1) 定性定量における食品由来成分の影響確認

本法に従って調製した349食品の試験溶液（ブランク試験溶液）を測定した。選択性については、ステビア表示のない341食品のブランク試験溶液と標準溶液の各クロマトグラムを比較し評価した。定量下限値相当（1 µg/mL）における検出への影響について、各食品のブランク試験溶液1 µLと濃度1 µg/mLの標準溶液1 µLを共注入し（以降、マトリックス標準溶液と表記する）、得られたクロマトグラムの確認と定量値の算出より評価した。ステビア表示のある8食品については、マトリックス標準溶液からブランク試験溶液の定量値を差し引いて定量値を算出した。

2) 妥当性確認

妥当性確認ガイドライン⁸⁾に従い、5食品に0.01 g/kg相当の濃度を添加し、分析者2名、2併行、3日間の回収試験を実施した。各定量値から真度、併行精度及び室内精度を算出し、妥当性確認ガイドラインで定める目標値、すなわち0.01 g/kg添加では真度70–120%、併行精度10%未満、室内精度15%未満への適否を判断した。

3) 内部品質管理による従来法との比較

スポーツ飲料にSSを0.025 g/kgとなるように添加した試料を2併行作成し、349食品の検査毎（試行回数=16）に、本法と従来法により調製した試験溶液を分析して濃度を算出し、Xbar-R管理図をそれぞれ作成して濃度とばらつきの管理限界を比較した。

結果及び考察

1. LC-MSによる同時分析条件の検討

LC-MSを用い、SS及びRAと他の6種類の甘味料が同時分析可能な条件を検討した。日常スクリーニング法の条件では、SS及びRAは分析時間を150分に延長してもピークを検出できなかった。移動相を0.1%ギ酸含有60%メタノールとしてアイソクラティックで分析すると保持時間がSS 6.33分及びRA 6.50分でピークを得ることができた。これは、SSとRAが他の甘味料より強い π 電子相互作用を有し、Phenyl-Hexylカラムへの保持力が高いためと考えられた。

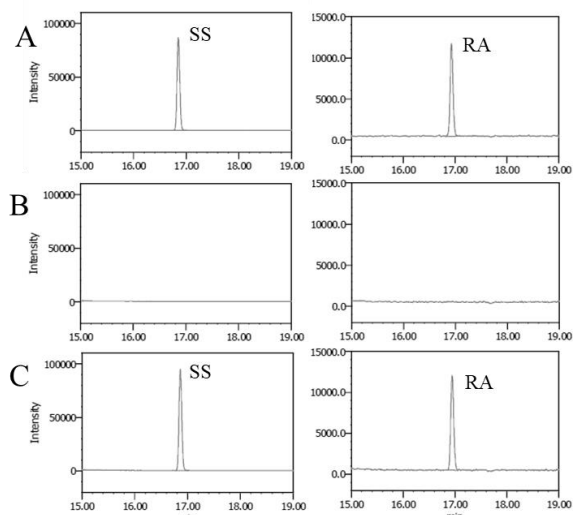


Fig. 1. Chromatograms of SS and RA

HPLC conditions; HPLC column: ACQUITY UPLC[®] CSH[™] Phenyl-Hexyl (1.7 μ m, 2.1 mm i.d. x 100 mm, Waters Co.), Column temperature: 40 $^{\circ}$ C, Mobile phase (A) 0.1% formic acid in 20% methanol, (B) 0.1% formic acid in 20% methanol, Gradient (A% : B%, Flow rate) = 0 min (100 : 0, 0.3) $\rightarrow$ 14.50 min (100 : 0, 0.3) $\rightarrow$ 14.51 min (45 : 55, 0.3) $\rightarrow$ 21 min (45 : 55, 0.3) $\rightarrow$ 21.01 min (100 : 0, 0.4) $\rightarrow$ 22 min (100 : 0, 0.4) $\rightarrow$ 22.01 min (100 : 0, 0.3) $\rightarrow$ 24 min (100 : 0, 0.3), Injection volume : 1 μ L
A: Standard solution of SS and RA (1 μ g/mL)
B: Blank solution for chocolate source
C: Spiked solution for chocolate source with SS and RA (1 μ g/mL)

保持時間を早め、測定時間を短縮し効率的なスクリーニングにするため、他6種類の甘味料の溶出後、移動相の溶媒比率を20%から60%以上となるよう設定した。その結果、6種類の甘味料の保持時間は変わらず分離が良好なまま、SS及びRAをそれぞれ16.85分及び16.90分で溶出することができた (Fig. 1A)。

LC-MS1及び2で得られたSS及びRAの検量線は、0.5–10 μ g/mLの範囲で相関係数0.990以上の直線性を示した。本法におけるSS及びRAの定量下限値は従来法と同じ0.01 g/kgとした。

2. 分析法の性能評価

1) 定性定量における食品由来成分の影響確認

ステビア表示のない341食品のクロマトグラムにおいて、SS及びRAのピークと分離不能な各食品由来成分による擬似ピークは検出しなかった。ブランク試験溶液の一例として、従来法のLC-PDAで擬似ピークを検出したチョコレートソースのクロマトグラムを示す (Fig. 1B)。以上の結果は、本法の選択性が十分なことを示した。

349食品のマトリックス標準溶液では、SS及びRAのピークのS/N比は10以上であり、マトリックス存在下でも定量下限値0.01 g/kgを十分検出可能であった。マトリックス標準溶液の一例として、チョコレートソースのクロマトグラムを示す (Fig. 1C)。定量値は、SSについては0.88–1.25 μ g/mL、RAについては0.73–1.39 μ g/mLであった。RAが0.73 μ g/mLとなったものは冷凍食品に分類された、ステビア表示のあるパスタ用ソースであった。このパスタ用ソース1食品を除き、SS、RAともに理論値1 μ g/mLと比較して80%以上であることから、マトリックスによるサプレッションがほぼなく、偽陰性と判定しないことを示した (Fig. 2)。

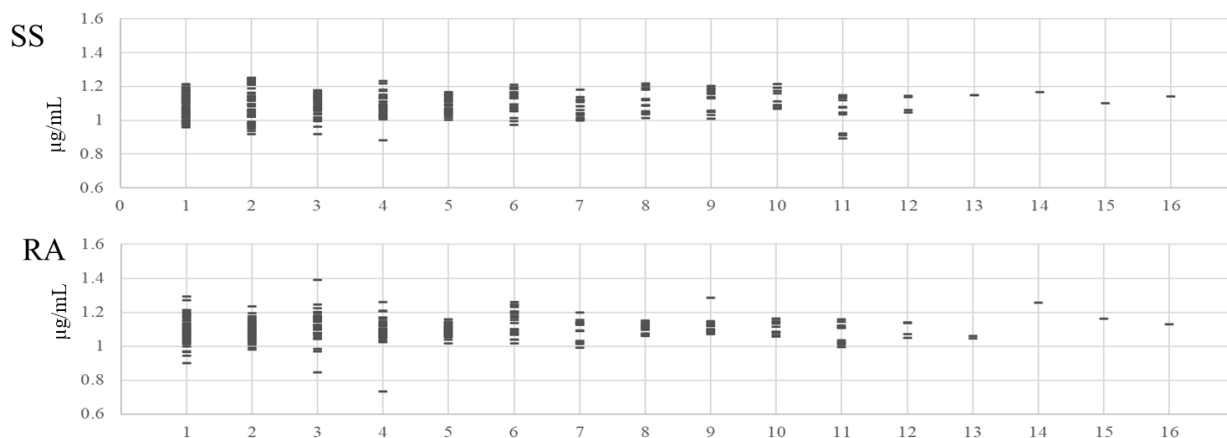


Fig. 2. Evaluation of the matrix effects in foods

The quantitative values of samples spiked at the limit of quantification level (1 μ g/mL) were plotted.

HPLC conditions; HPLC column: ACQUITY UPLC[®] CSH[™] Phenyl-Hexyl (1.7 μ m, 2.1 mm i.d. x 100 mm, Waters Co.), Column temperature: 40 $^{\circ}$ C, Mobile phase (A) 0.1% formic acid in 20% methanol, (B) 0.1% formic acid in 20% methanol, Gradient (A% : B%, Flow rate) = 0 min (100 : 0, 0.3) $\rightarrow$ 14.50 min (100 : 0, 0.3) $\rightarrow$ 14.51 min (45 : 55, 0.3) $\rightarrow$ 21 min (45 : 55, 0.3) $\rightarrow$ 21.01 min (100 : 0, 0.4) $\rightarrow$ 22 min (100 : 0, 0.4) $\rightarrow$ 22.01 min (100 : 0, 0.3) $\rightarrow$ 24 min (100 : 0, 0.3), Injection volume : 1 μ L

1: Confectionery, 2: Prepared foods and semi-finished foods, 3: Vegetables, fruits, and their processed products, 4: Frozen foods, 5: Other foods, 6: Seasonings, 7: Meat, eggs, and their processed products, 8: Dairy products, 9: Alcoholic beverages, 10: Grains and their processed products, 11: Processed seafood products, 12: Processed dairy products, 13: Canned and bottled foods, 14: Seafoods, 15: Retort foods, 16: Soft drinks

精度2–4%, 室内

Table 2. Validation results for SS and RA in foods

Sample	SS						RA					
	LC-MS 1			LC-MS 2			LC-MS 1			LC-MS 2		
	Recovery ^a (%)	RSD _r ^b (%)	RSD _{WR} ^c (%)	Recovery ^a (%)	RSD _r ^b (%)	RSD _{WR} ^c (%)	Recovery ^a (%)	RSD _r ^b (%)	RSD _{WR} ^c (%)	Recovery ^a (%)	RSD _r ^b (%)	RSD _{WR} ^c (%)
Candy	109	3	8	104	3	5	104	4	8	103	3	6
Dressing	104	2	4	105	2	2	101	3	7	107	1	5
Lightly pickled vegetables	112	2	4	106	1	2	110	3	4	109	2	3
Simmered beans	114	2	5	107	1	4	112	3	10	105	2	4
Sports drink	112	1	4	114	0.4	2	109	2	4	114	2	3

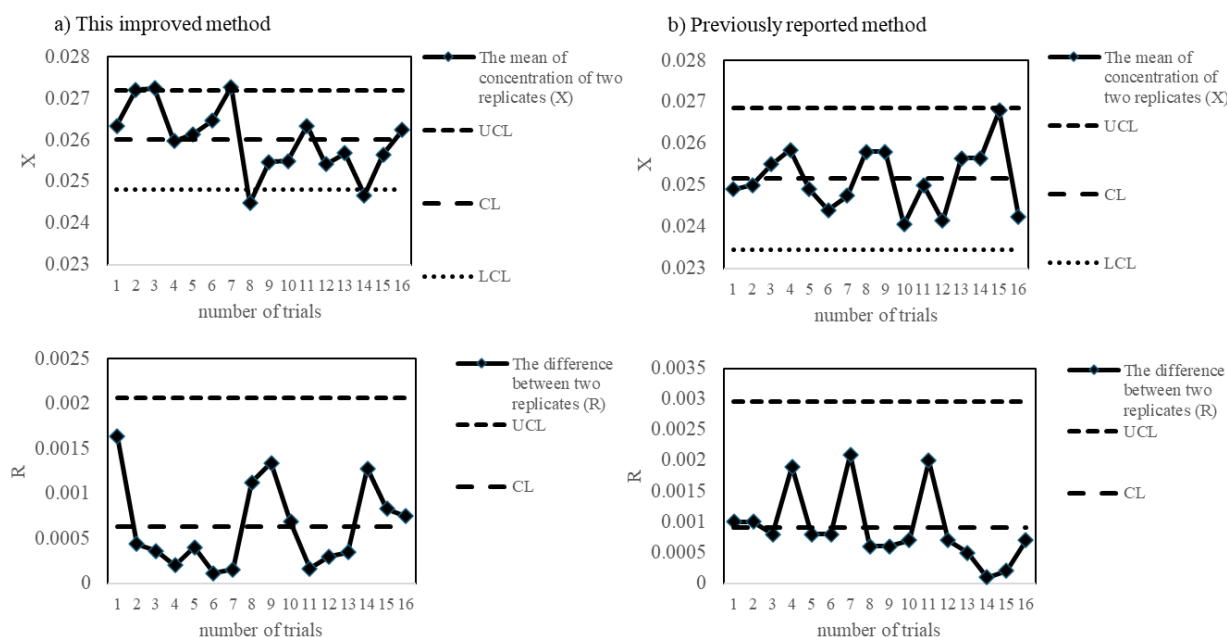
^a Mean recovery rates^b Relative standard deviation of repeatability^c Relative standard deviation of within laboratory reproducibility

Fig. 3. Internal quality control of this improved method and previously reported method using an Xbar-R control chart

よって、C18固相カラムによる精製操作を行う必要がなく、透析液をフィルター過のみでLC-MSに注入し測定する本法で、簡便かつ迅速にスクリーニングが可能なことを示唆した。

2) 妥当性確認

食品添加物分析法の性能評価を行うにあたり、対象食品の選択が一つの課題である。そこで我々は、依頼元による食品分類に基づいて過去10年間の検体搬入実績を解析し、搬入数の多い5種類の食品分類から各々代表的な食品として、清涼飲料水からスポーツ飲料、野菜・果実及びその加工品から浅漬け、調味料からドレッシング、菓子類からキャンディ及びその他の食品（そうざい類等）から煮豆について、妥当性を確認することとした。

装置ごとに、SS及びRAの真度、併行精度及び室内精度の結果をTable 2に示した。SSについては、LC-MS1では真度104–114%、併行精度1–3%、室内精度4–8%で、LC-MS2では真度104–114%、併行精度0.4–3%、室内精度2–5%であった。RAについては、LC-MS 1では真度101–112%、併行

精度4–10%で、LC-MS 2では真度103–114%、併行精度1–3%、室内精度3–6%であった。LC-MS 1及び2に顕著な差がみられず、いずれも妥当性確認ガイドラインの目標値に適合した。また、いずれの装置においてもこれら5食品における選択性は良好であった。以上のことから、5食品においては、本法で調製した試験溶液を LC-MS1あるいはLC-MS 2で測定し、標準溶液による絶対検量線を用いて定量下限値0.01 g/kgレベルでの定量検査が可能であることを示した。

3) 内部品質管理による従来法との比較

2併行の濃度の平均 (X) と差 (R) 及び各平均 (XbarまたはRbar) を算出した。管理限界はJIS Z 9020-2: 2023¹⁰⁾に基づき、下記のように設定した。

Xの上限管理限界: $UCL = Xbar + 1.88Rbar$

Xの下限管理限界: $LCL = Xbar - 1.88Rbar$

Rの上限管理限界: $UCL = 3.27Rbar$

Xbar-R管理図をFig. 3に示した。本法と従来法を比較して、濃度とばらつきの管理限界はそれぞれ同程度であり、点の配置に偏りが無いことから、本法の品質は、統計的管理限界内にあることを確認した。

ま と め

他の6種類の甘味料と同時分析可能なLC-MSによるSS及びRAスクリーニング分析法を開発し、方法の性能評価を行った。本法の成果は次のとおりである。

- 1) LCに用いる移動相のグラジエント条件を最適化した。6種類の甘味料の溶出後、溶媒比率を高めたことで、これらの保持時間を変えることなく、SS及びRAのピークを得ることができた。
- 2) LC-MSで測定し、その選択性を活かすことで、前処理におけるC18固相カラムの精製工程の省略が可能となった。
- 3) 分析法の性能評価を行ったところ、ステビア表示のない341食品において、食品由来の擬似ピークは検出されず、マトリックス存在下における定量下限値相当 (1 µg/mL) の検出感度及び定量への影響は見られなかった。
- 4) 当科で搬入実績の多い5種類の食品分類から選定した5食品について、定量下限値0.01 g/kgで妥当性確認を実施したところ、各パラメーターはガイドラインの基準を満たしていた。
- 5) 従来法との同等性を、内部品質管理の管理パラメーターが同一であることの確認で行った。検査の工程管理も十分可能であった。

以上のことから、本法は、従来法より時間及びコストの縮減が図れた。加えて、分析法としての定性定量能、妥当性及び検査時における堅牢性、従来法との同等性は担保されていることを証明した。

文 献

- 1) 竹本彩乃：食品と開発, **60**, 72–74, 2025.
- 2) 田中富久：月間フードケミカル, **38**(6), 66–69, 2022.
- 3) Wazir, M., Verma, H., Singh, J., *et al.*: *Curr. Res. Nutr. Food Sci. Jour.*, **13**(1), 24–45, 2025.
- 4) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針 食品添加物編, 555–556, 2003, 社団法人日本食品衛生協会, 東京.
- 5) 山本純代, 田原正一, 杉木幹雄, 他：食衛誌, **57**, 155–159, 2016.
- 6) 宮川弘之, 杉木幹雄, 田原正一, 他：食衛誌, **59**, 213–219, 2018.
- 7) 山本純代, 田原正一, 石井悦子, 小林千種：日本食品化学学会誌, **27**(2), 111–117, 2020.
- 8) 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長, 厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長：健生食基発0308第1号, 健生食監発0308第1号, 「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」の作成及び「第2版 食品中の食品添加物分析法」の改正について (通知), 令和6年3月8日.
- 9) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針 食品添加物編, 6–8, 2003, 社団法人日本食品衛生協会, 東京.
- 10) 日本産業標準調査会編集, ”JIS Z 9020: 2023「管理図 第2部：シェーハート管理図」”, 2023.

Screening Analysis Using Liquid Chromatograph–Mass Spectrometer of Stevioside and Rebaudioside A in Foods

Masaki HAYASHI^a, Rina NAKAMURA^a, Nahoko HANEISHI^a, Yu SHIOZAWA^a,
Etsuko ISHII^a, Yuko TAKAGI^a, Keiko USHIYAMA^a, and Kenji OTSUKA^a
(Reviewed by Takeo SASAMOTO^b)

We applied a liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) confirmation method that has been used to analyze six sweeteners, including acesulfame potassium, to analyze the sweeteners stevioside (SS) and rebaudioside A (RA). With the goal of simultaneously analyzing SS, RA, and the six other sweeteners in a single chromatographic run, we optimized the mobile-phase gradient conditions of the existing method. One change made during optimization was to inject the dialysate from dialysis into the LC-MS instrumental system after only performing filtration. Using food samples brought to our department in 2023–2024 period, we then evaluated the performance of this revised method. In 349 food samples, there was no effect from the food-derived components on the qualitative or quantitative analysis when using the optimized method. We also reviewed sample information from the past 10 years and conducted a validation study for representative foods from five groups that were frequently delivered. In all tested foods, each validation parameter met the criteria of the Guideline for the Validation of Analytical Methods for Food Additives in Foods set by the Ministry of Health, Labour, and Welfare in Japan. The results of internal quality control for SS in 16 tests were also favorable, and the control criteria for both this improved method and the previously reported method were at the same levels. These results confirmed that the new LC-MS method was effective as a screening analysis method for SS and RA in various foods. We concluded that more efficient testing of sweeteners could be achieved by replacing the conventional method with the improved method, which enables simultaneous analysis of SS, RA, and six other sweeteners, for routine testing.

Keywords: Stevioside, Rebaudioside A, LC-MS, Simultaneous Analysis, Validation, Sweeteners

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

^b Tokyo Food Hygiene Association Tokyo Research Laboratory