



食品添加物 残留農薬 加工生成物質の 前処理 及び 分析システム

エムエス機器 株式会社



内容

前処理 (固相抽出) の必要性と自動化の意味

GILSON社

全自動固相抽出システム を使用したアプリケーション

食品添加物 (人工甘味料)
残留農薬 (チアベンダゾール)
加工生成物質 (アクリルアミド)





前処理 (固相抽出) の必要性



前処理 (固相抽出) の必要性

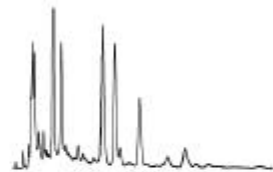
試料収集



分析 (HPLC, LC/MS, GC/MS)



データ



食品試料を処理したものはそのままの状態では分析に適さない場合がある

- ✓ 分析を妨害する様々な物質の存在
- ✓ 目的物質の濃度が低い
- ✓ カラムの劣化が早い



前処理が必要



固相抽出 自動化の意味



固相抽出 自動化の意味

手動で固相抽出を実施するときの障壁

- ✓ ヒューマンエラー
 - ✓ 再現性問題
 - ✓ 身体的負担
- 試薬の種類や量、処理ステップの勘違いによるミス
処理した日や処理操作スキルの違いによる結果の相違
連続処理による負担、生産性の低下



自動化ですべて解決

さらに
有害物質からオペレーターを隔離
抽出プロトコル検討の自動化
部署間でプロトコルの共有・移植
固相抽出処理後の分析自動化



すべて可能



固相抽出 自動化の意味

GILSON社 全自動固相抽出システム (GX-ASPEC™)

ASPEC = Automated Solid Phase Extraction Cartridges



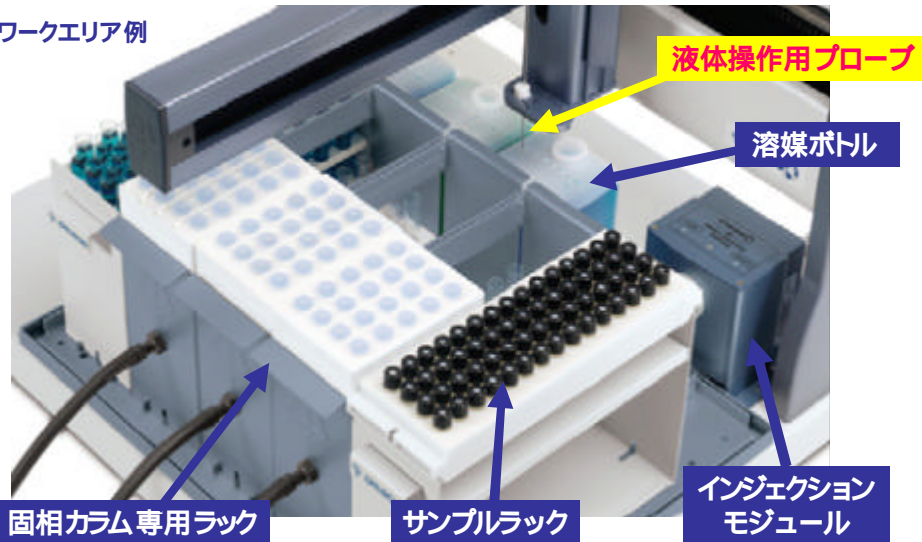
7



固相抽出 自動化の意味

GILSON社 全自動固相抽出システム (GX-ASPEC™)

ワークエリア例

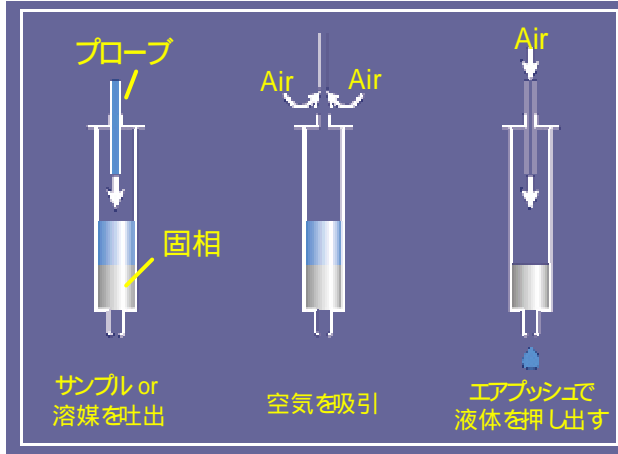


8



固相抽出 自動化の意味

GILSON社 全自動固相抽出システム (GX-ASPEC™)



加圧方式による液体交換システム
(各固相カラムに対しての液体流速制御が容易)

Model 406 Syringe Pump



圧力トランスデューサー装備

配管内の圧力を常時モニタリング

サンプルやその他の原因による
流路の詰まりを検知可能



GILSON社
全自動固相抽出システム を使用したアプリケーション例

食品添加物 (人工甘味料)
残留農薬 (チアベンダゾール)
加工生成物質 (アクリルアミド)

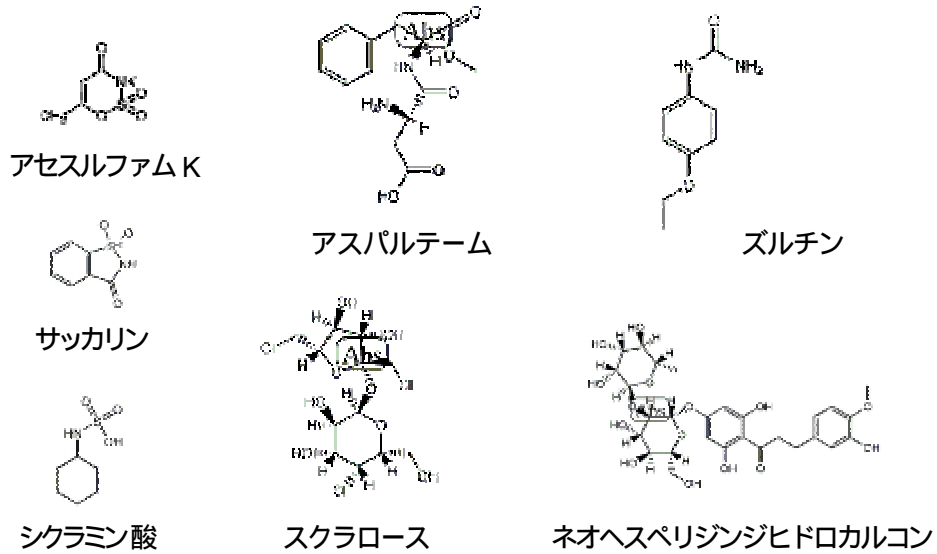


食品添加物 (人工甘味料)

固相抽出 (ASPEC) & HPLC-ELSD システム





食品添加物 (人工甘味料)





人工甘味料使用基準

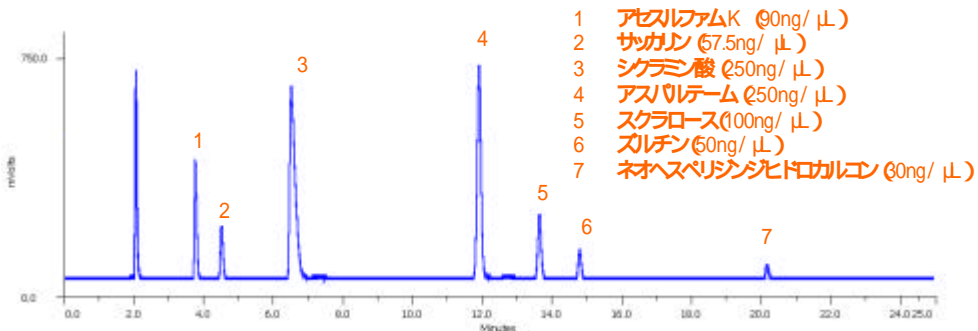
 	EU	EU	日本	日本
	最大使用量 (mg/L = ppm) 飲料	最大使用量 (mg/kg = ppm) 缶詰	最大使用量 (mg/L = ppm) 飲料	最大使用量 (mg/kg = ppm) 缶詰
アセスルファムK	350	350	500	350-1500
サッカリン	80	200	制限つき使用のみ	
シクロミン酸	250	1000	使用不可	
アスパルテーム	600	1000	使用基準なし	
スクラロース	300	400	400	580-1800
ズルチン	-	-	使用不可	
ネオヘスペリジンジヒドロカルコン	-	-	-	-

出典 http://www.irmm.jrc.be/html/activities/food_additives/EUR22727EN.pdf

http://www.city.yokohama.jp/me/kenkou/eiken/food_inf/alldata.ht ml 13



7種類の人工甘味料 一斉分析



標準物質混合物 分析条件

カラム ; SepaxGP C18 5μm, 120 , 3x250mmL

カラム温度 ; 30 インジェクション量 ; 10μL

移動相 ; A MeOH : 緩衝液 : Acetone ; 110:820:70
 (グラディエント溶出) B MeOH : 緩衝液 : Acetone ; 690:240:70

流速 ; 0.5mL/min 検出 ; ELSD SofTA Model300s



緩衝液 : 酢酸2.4mL, TEA7.5mL, H₂O 3L pH4.5 14



人工甘味料 定量のためのキャリブレーションデータ

検出器 ELSD インジェクション量 10 μ L n = 3 (濃度上限はEU基準の1.25倍程度)	検出限界 (ng/ μ L = ppm)	Area [*] CV%	保持時間 CV%	相関係数
アセスルファムK	5.4	0.19-1.12	0.33	0.9995
サッカリン	6.9	0.38-2.19	0.32	0.9990
シクロミン酸	7.5	0.31-2.43	1.18	0.9991
アスパルテーム	7.5	0.48-2.78	0.09	0.9966
スクラロース	6.0	0.09-0.82	0.10	0.9991
ズルチン	6.0	0.28-2.12	0.09	0.9989
ネオヘスペリジンジヒドロカルコン	6.0	0.56-3.73	0.04	0.9978

*ELSDの計算式に基づく

各人工甘味料の定量で使用に耐えるデータを得た

15



固相抽出自動化プロトコル (EU法 変法)

自動化しても特別な工程が必要となるわけではない...

固相抽出カラム (Varian BondElut C18 500mg/3mL)

ステップ	工程	試薬	容量	流速	平衡化時間	エアプッシュ
1	コンディショニング	メタノール	3.0mL	3mL/min	-	-
2	コンディショニング	緩衝液	2.5mL	1mL/min	0.1min	-
3	コンディショニング	緩衝液	2.5mL	1mL/min	0.2min	0.1mL
4, 5	サンプルロード	-	2.5mL	1mL/min	0.2min	-
6	洗浄	緩衝液	3.0mL	1mL/min	0.2min	-
7	溶出	メタノール	2.0mL	1mL/min	1.0min	2.0mL

緩衝液 : ギ酸2.4mL, TEA7.5mL, H₂O 3L pH4.5

EU法では カラムを枯らさない ことが条件とされている

一方で **作業を厳密にコントロールできる** ようになる

16



人工甘味料 一斉分析

予備実験 無添加いちごジャムを使用した添加回収実験

原材料：いちご、砂糖、ブドウ糖、ペクチン、酸味料



+ 既知量の下記水溶液 固相抽出 濃縮 (手動) 分析

	? ジャムに 既知量添加 + 固相抽出 (mg/L = ppm)	? 既知量 標準物質 (mg/L = ppm)	? /? 回収率 (%)
アセスルファミンK	78	85	91.8
サッカリン	52	51	102
シクロアミン酸	229	228	100

良好な回収率を示すデータを得た

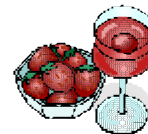


人工甘味料 一斉分析

一般市販品の分析 具体例



ダイエットコーク
クランベリージュース
フルーツ缶詰



ヨーグルト
スナック菓子

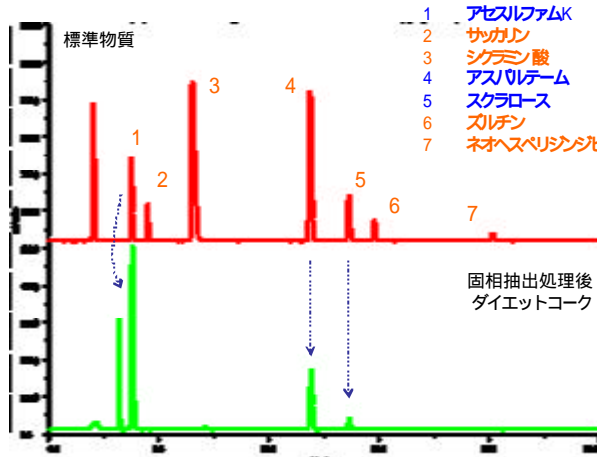




人工甘味料 一斉分析

ダイエットコーク

原材料： カラメル色素、酸味料、香料、保存料、カフェイン
 甘味料 (アスパルテーム、Lフェニルアラニン化合物、アセスルファムK、スクラロース)



- 1 アセスルファムK
- 2 サッカリン
- 3 シンナム酸
- 4 アスパルテーム
- 5 スクラロース
- 6 スレチン
- 7 ネオヘスペリジンジヒドロカルコン



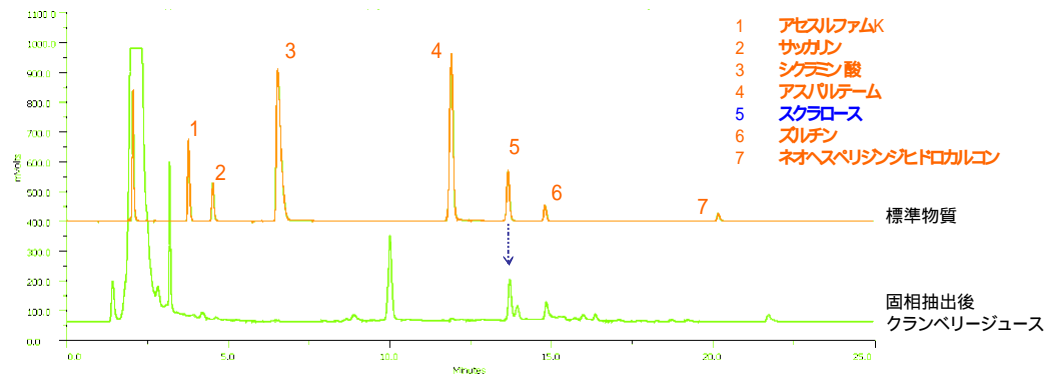
	推定含有量 (mg/L)
アセスルファムK	125.0
アスパルテーム	128.0
スクラロース	43.7



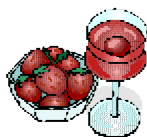
人工甘味料 一斉分析

クランベリージュース

原材料： 果汁80%、果糖ブドウ糖液糖、マルトオリゴ糖、ヒアルロン酸、甘味料 (スクラロース)



- 1 アセスルファムK
- 2 サッカリン
- 3 シンナム酸
- 4 アスパルテーム
- 5 スクラロース
- 6 スレチン
- 7 ネオヘスペリジンジヒドロカルコン



	推定含有量 (mg/L)
スクラロース	101.4



人工甘味料 一斉分析

フルーツ缶詰

原材料： みかん、果糖ブドウ糖液糖、ガラクトオリゴ糖、クエン酸、香料、甘味料 (アセスルファムK、スクラロース)

アセスルファムK	27mg/L (シロップ)	21mg/kg (フルーツ)
スクラロース	31mg/L (シロップ)	23mg/kg (フルーツ)



ヨーグルト

原材料： 脱脂粉乳、生乳、ガラクトオリゴ糖、乳タンパク、ゼラチン、寒天、香料、甘味料 (スクラロース)

スクラロース	90mg/L
--------	--------



スナック菓子

原材料： ポテト、デンプン、植物油脂、オニオンパウダー、食塩、肉エキスパウダー、砂糖、デキストリン、粉末しょうゆ、酵母エキスパウダー、粉末油脂、香辛料、タンパク質加水分解物、粉末ソース、にんじんエキスパウダー、トマトパウダー、香味油、香料、酸化防止剤 (ビタミンE)、乳化剤、カラメル色素、香辛料抽出物、甘味料 (スクラロース)

スクラロース	19mg/kg
--------	---------



21



残留農薬 (チアベンダゾール)

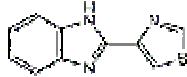
固相抽出 (ASPEC) & HPLC-DAD 自動分析システム

22



残留農薬 (チアベンダゾール)

鶏ささみを使用した添加回収実験



チアベンダゾール
用途：殺菌剤・駆除剤



固相抽出

オンライン
自動分析



HPLC

システムの妥当性を評価するために
添加回収実験を実施

構造式 出典 http://nikkajiweb.jst.go.jp/nikkaji_web/pages/top.html 23



固相抽出自動化プロトコル と分析条件 (チアベンダゾール)

サンプルを適宜 粉砕 攪拌 遠心分離などで調製 (厚生労働省 資料 参考)

固相抽出

オンライン
自動分析

HPLC

固相抽出カラム (Sepax Generik C18 500mg/3mL)

ステップ	工程	試薬	容量	流速
1	エディショニング	メタノール	5mL	8mL/min
2	エディショニング	超純水	5mL	8mL/min
3	エディショニング	炭酸緩衝液	5mL	8mL/min
4	サンプルロード	-	4mL	2mL/min
5	洗浄 (+ ガスパージ)	超純水	3mL	6mL/min
6	溶出	メタノール	2mL	3mL/min

チアベンダゾール 分析条件

カラム ; SepaxHP C18 3 μm, 120 , 2.1x100mmL

カラム温度 ; 40 インジェクション量 ; 5 μ Total Loop 法

移動相 ; アセトニトリル : 0.05mol/L 酢酸アンモニウム = 1:4 (v/v)

流速 ; 0.2mL/min 検出 ; DAD Model172 295nm/500nm

HPLCは、畜水産物中のチアベンダゾール測定における公定法に基づいて実施
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-170.html>



チアベンダゾールの添加回収実験結果

✖	チアベンダゾール(TBZ)
---	---------------

- ? 1ppm TBZ/H₂O を直接 HPLCで分析したもの
- ? 1ppm TBZ/H₂O 固相抽出 HPLC
- ? 鶏ささみ + 1ppm TBZ/H₂O 固相抽出 HPLC

	?	?	?
Area	40.38	38.28	39.17
n = 3	40.26	37.95	39.14
	41.31	38.23	39.69
平均	40.65	38.15	39.33
CV%	1.41%	0.46%	0.79%
回収率		93.86%	96.76%

**本システム
および
固相抽出処理の
妥当性を証明**

25



加工生成物質 (アクリルアミド)

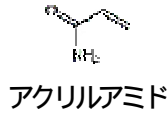
固相抽出 (ASPEC) & HPLC-DAD 自動分析システム

26



加工生成物質 (アクリルアミド)

コーンフレーク・ポテトチップスを使用した多段階抽出実験



固相抽出

オンライン
自動分析



HPLC

多段階抽出

固相カラムからの溶出作業を複数の試薬でおこなったり
同じ試薬で何度かに分けて溶出する抽出方法



固相抽出自動化プロトコル と分析条件 (アクリルアミド)

サンプルを適宜 粉碎 攪拌 遠心分離などで調製 (食品総合研究所 資料 参考)

固相抽出

オンライン
自動分析

HPLC

固相抽出カラム (Varian SAX150mg SCX150mg ODS200mg カスタムパッキング 3mL)

ステップ	工程	試薬	容量	流速	
1	コンディショニング	メタノール	1mL	5mL/min	
2	コンディショニング	超純水	2mL	5mL/min	
3	サンプルロード	-	1mL	1mL/min	
4	8	溶出	超純水	0.5mL x5	1mL/min

アクリルアミド 分析条件

カラム ; SepaxHP C18 3 μm, 120 , 2.1x100mmL

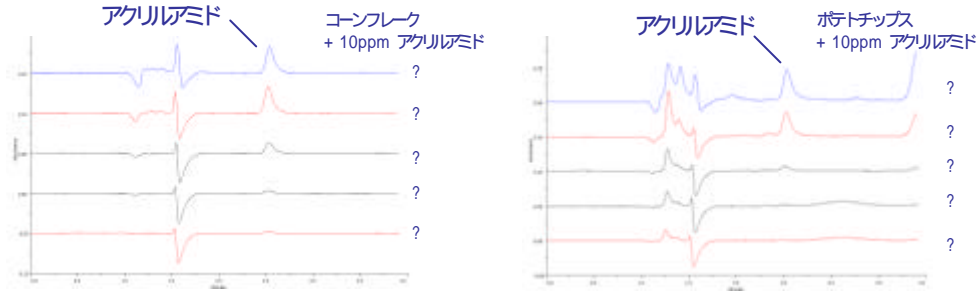
カラム温度 ; 30 インジェクション量 ; 5 μ Total Loop 法

移動相 ; 0.1% TFA/H₂O

流速 ; 0.2mL/min 検出 ; DAD Model172 205nm/500nm



アクリルアミドの添加多段階抽出実験結果



500 μ L 抽出	コーンフレーク + 10ppm アクリルアミド	ポテトチップス + 10ppm アクリルアミド	参考	10ppm アクリルアミド
?	Area 366.23 (39%)	462.86 (52%)	Area n = 3	587.41
?	364.67 (39%)	340.19 (38%)		591.30
?	150.15 (16%)	60.52 (7%)		592.20
?	44.05 (5%)	16.30 (2%)	平均	590.30
?	13.12 (1%)	7.48 (1%)	CV%	0.43%



まとめ

固相抽出作業 自動化の意味

手動時の障壁 ヒューマンエラー、再現性問題、身体的負担



すべて解決
すべて可能

有害物質からオペレーターを隔離
抽出プロトコル検討の自動化
部署間でプロトコルの共有 移植
固相抽出処理後の分析自動化

GILSON社

全自動固相抽出システム を使用したアプリケーション例

食品添加物 (人工甘味料)
残留農薬 (チアベンダゾール)
加工生成物質 (アクリルアミド)



固相抽出を強力にサポートするシステム