

緑茶飲料中に混入した界面活性剤の LC-MS/MS法による測定事例

小林 浩, 今井秀美, 片岡ふみ, 堀内雅人, 望月恵美子

A Case Study of Surfactants in Green Tea Measured by High Performance
Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

Hiroshi KOBAYASHI, Hidemi IMAI, Fumi KATAOKA,
Masato HORIUCHI and Emiko MOCHIZUKI

キーワード：界面活性剤, LC-MS/MS, 緑茶飲料

はじめに

当所に、著しい発泡性を有した緑茶飲料が苦情品として保健所から搬入された。一般に、緑茶飲料は振とうにより泡立つことが知られ、その原因として緑茶中の茶葉サポニンが原因物質のひとつとされている^{1),2)}。しかし、苦情品は振とうによる発泡が著しく、また持続性があり、芳香臭が確認されたことから界面活性作用のある化合物の混入が疑われた。

食品中の化学物質の検査は、対象となる物質の分離・精製や濃縮、さらに誘導体化などの前処理などを行なった後、目的物質の性質に即した分析方法の選択が必要である。近年、急速に発展した質量分析法は、未知の有機化合物の推定や同定に有効な分析手法である。その内、GC/MS法による化合物の推定や同定は検索ソフト(ライブラリー)の充実により広く一般に利用されている。しかし、GC/MS法は一部の化合物には有効な分析手段であるが、難揮発性化合物や熱に不安定な化合物には有益な分析手法とはいえない。一方、液体クロマトグラフ質量分析法は難揮発性の化合物や熱分解しやすい化合物を、液体クロマトグラフにより分離し質量分析計に導入するため、誘導体化や熱分解性を危惧することなく同定や定量が可能である。しかし、化合物のイオン化方法などがメーカー間で異なるばかりでなく、溶媒条件や対象化合物の物性に合わせてキャピラリー電圧やコーン電圧、陰・陽イオン測定モードを設定するため、一定条件でのデータ蓄積が不十分であり、GC/MS法で一般的に利用されるようなマススペクトルのライブラリー化が難しく未知物質の検索は困難な点が多い。

以下、液体クロマトグラフ質量分析法を用いて緑茶飲料中の界面活性剤の同定、定量を試みたので報告する。

方 法

1. 試 料

当該試料(以下「苦情品」)は市販のペットボトル入り緑茶飲料(345ml)で、振とうにより明らかな発泡が認められた。この泡は24時間後も持続し、芳香臭が確認された。また、比較対照品として同一ロットの緑茶飲料製品(以下「対照品」)を測定した。

2. 試験方法

試料は孔径0.45 μ mのディスクフィルター(アクロディスク社製)でろ過した後、分析に供した。

測定機器はWaters社製(Alliance2695 Micromass Quatro Micro)液体クロマトグラフ質量分析計(以下「LC-MS/MS」)を用い、エレクトロスプレーイオン化(ESI)-質量分析法(以下「MS法」)のネガティブモードおよびポジティブモードで測定し、得られた各マススペクトルについてさらにタンデム質量分析法(以下「MS/MS法」)による同定試験を実施した。測定条件を表1-1、表1-2、表2に示した。

測定対象とした陰イオン界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム(以下「SDS」)、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩(以下「AES」)類およびアルキルベンゼンスルホン酸{デシルベンゼンスルホン酸(以下「C10」)、ウンデシルベンゼンスルホン酸(以下「C11」)、ドデシルベンゼンスルホン酸(以下「C12」)、トリデシルベンゼンスルホン酸(以下「C13」)、テトラデシルベンゼンスルホン酸(以下「C14」)}(以下「LAS」)類である。また、非イオン界面活性剤はN,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキッド(以下「AO」)およびヘプタエチレングリコールモノドデシルエーテルである。

表1-1 SDS および AES 測定条件

| HPLC条件 | | | | |
|-----------|--|------------|------|-----|
| 分析装置: | Waters(株) Alliance2695 Micromass Quatro Micro API | | | |
| 移動相: | アセトニトリル:水 (0.01%ギ酸含有) | | | |
| 流速: | 0.2ml/分 | | | |
| | 分 | アセトニトリル(%) | 水(%) | カーブ |
| グラジエント条件: | 0 | 40 | 60 | 1 |
| | 5 | 90 | 10 | 6 |
| | 25 | 95 | 5 | 6 |
| | 25.1 | 40 | 60 | 11 |
| 分析時間: | 25分 (カラム平衡時間 15分) | | | |
| 試料注入量: | 10 μ l | | | |
| 分離カラム: | Atlantis dC18 2.1mm i.d. \times 3 μ m \times 150mm | | | |
| カラム温度: | 40 $^{\circ}$ C | | | |

| MS/MS (MRM) 条件 | | | | |
|---|------------------|--------------|-----------|-------------|
| ESI: | ネガティブモード | | | |
| キャピラリー電圧: | 2.5KV | | | |
| ソース温度: | 110 $^{\circ}$ C | | | |
| デソルベーション温度: | 350 $^{\circ}$ C | | | |
| コーンガス流量: | 50L/Hr | | | |
| デソルベーションガス流量: | 500L/Hr | | | |
| 化合物名 | プリカーサー イオン | プロダクト イオン | コーン 電圧 | コリジョン 電圧 |
| ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) C ₁₂ H ₂₅ O-(CH ₂ CH ₂ O) _n -SO ₃ Na (AES) | 265 | 96.7 | 45 | 30 |
| n=1 | 309 | 96.7 | 45 | 33 |
| n=2 | 353 | 96.7 | 45 | 35 |
| n=3 | 397 | 96.7 | 45 | 38 |
| n=4 | 441 | 96.7 | 45 | 40 |
| n=5 | 485 | 96.7 | 45 | 43 |
| n=6 | 529 | 96.7 | 45 | 45 |
| n=7 | 573 | 96.7 | 45 | 48 |
| n=8 | 617 | 96.7 | 45 | 50 |

標準品および使用溶媒類は和光純薬(株)および関東化学(株)製を使用した。

結果および考察

1. 定性試験

1) 陰イオン界面活性剤

発泡が認められた苦情品と対照品および AES 類の MS 法ネガティブモードによるマススペクトルを図1に示した。陰イオン界面活性剤はネガティブモードで測定される場合が多く³⁾, 苦情品のネガティブモード測定でも多数のフラグメントピークが得られた。苦情品と対照品のマススペクトルを比較すると, 苦情品には質量数 265 から 44 質量数ずつ規則的に現れるフラグメントピーク (図1の苦情品フラグメントピークを「□」で囲んだ) が認められた。また, MS/MS 法により質量数 265 \rightarrow 96.7 のフラグメントピークが観察された。このフラグメントピークは SDS のフラグメントピークに一致した (図2)。さらに, 苦情品の 309.0, 353.0, 397.1, 441.1 などのフラグメントピーク (図1) も MS/MS 法によ

表1-2 LAS 測定条件

| HPLC条件 | | | | |
|-----------|--|------------|------|-----|
| 分析装置: | Waters(株) Alliance2695 Micromass Quatro Micro API | | | |
| 移動相: | アセトニトリル:水 (0.01%ギ酸含有) | | | |
| 流速: | 0.2 ml/分 | | | |
| | 分 | アセトニトリル(%) | 水(%) | カーブ |
| グラジエント条件: | 0 | 80 | 20 | 1 |
| | 15 | 90 | 10 | 6 |
| | 20 | 95 | 5 | 6 |
| | 30 | 95 | 5 | 6 |
| | 30.1 | 80 | 20 | 11 |
| 分析時間: | 30分 (カラム平衡時間 15分) | | | |
| 試料注入量: | 10 μ l | | | |
| 分離カラム: | Atlantis dC18 2.1mm i.d. \times 3 μ m \times 150mm | | | |
| カラム温度: | 40 $^{\circ}$ C | | | |

| MS/MS (MRM) 条件 | | | | |
|-----------------------|------------------|--------------|-----------|-------------|
| ESI: | ネガティブモード | | | |
| キャピラリー電圧: | 2.5KV | | | |
| ソース温度: | 110 $^{\circ}$ C | | | |
| デソルベーション温度: | 350 $^{\circ}$ C | | | |
| コーンガス流量: | 50L/Hr | | | |
| デソルベーションガス流量: | 500L/Hr | | | |
| 化合物名 | プリカーサー イオン | プロダクト イオン | コーン 電圧 | コリジョン 電圧 |
| デシルベンゼンスルホン酸 (C10) | 297.1 | 182.9 | 45 | 40 |
| ウンデシルベンゼンスルホン酸 (C11) | 311.1 | 182.9 | 48 | 38 |
| ドデシルベンゼンスルホン酸 (C12) | 325.1 | 182.9 | 50 | 40 |
| トリデシルベンゼンスルホン酸 (C13) | 339.1 | 182.9 | 50 | 40 |
| テトラデシルベンゼンスルホン酸 (C14) | 353 | 182.9 | 55 | 42 |

表2 N, N-ジメチルデシルアミン=N-オキシドとヘプタエチレングリコールモノデシルエーテルの測定条件

| HPLC条件 | | | | |
|-----------|---|------------|------|-----|
| 分析装置: | Waters(株) Alliance2695 Micromass Quatro Micro API | | | |
| 移動相: | アセトニトリル:水 (0.01%ギ酸含有) | | | |
| 流速: | 0.2ml/分 | | | |
| | 分 | アセトニトリル(%) | 水(%) | カーブ |
| グラジエント条件: | 0 | 25 | 75 | 1 |
| | 3 | 60 | 40 | 6 |
| | 7 | 75 | 25 | 6 |
| | 10 | 80 | 20 | 6 |
| | 30 | 85 | 15 | 6 |
| | 30.1 | 25 | 75 | 11 |
| 分析時間: | 30分 (カラム平衡時間 15分) | | | |
| 試料注入量: | 10 μ l | | | |
| 分離カラム: | Atlantis dC18 2.1mm i.d. \times 3 μ m \times 50mm | | | |
| カラム温度: | 40 $^{\circ}$ C | | | |

| MS/MS (MRM) 条件 | | | | |
|-----------------------|------------------|--------------|-----------|-------------|
| ESI: | ポジティブモード | | | |
| キャピラリー電圧: | 2.5KV | | | |
| ソース温度: | 110 $^{\circ}$ C | | | |
| デソルベーション温度: | 350 $^{\circ}$ C | | | |
| コーンガス流量: | 50L/Hr | | | |
| デソルベーションガス流量: | 500L/Hr | | | |
| 化合物名 | プリカーサー イオン | プロダクト イオン | コーン 電圧 | コリジョン 電圧 |
| N,N-ジメチルデシルアミン=N-オキシド | 230 | 57.7 | 30 | 25 |
| ヘプタエチレングリコールモノデシルエーテル | 495 | 132.9 | 40 | 20 |

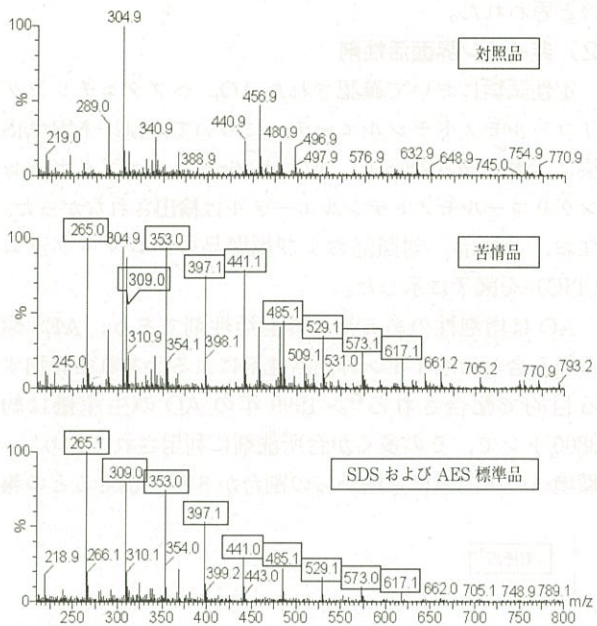


図1 ネガティブモードによるマススペクトル

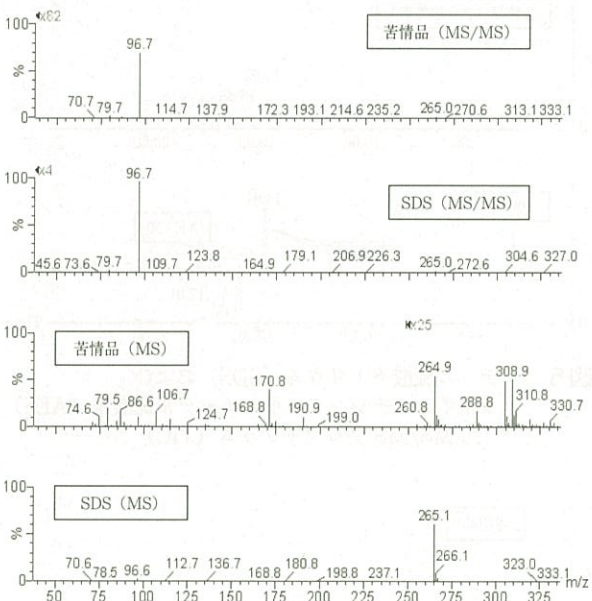


図2 SDSと苦情品のマススペクトル

り96.7もしくは96.8のフラグメントピークが測定された。AES類をMS法で測定したところ、質量数265から質量数44 [CH₂CH₂Oと考えられる] ずつ増加するフラグメントピークが測定され、これらのフラグメントピークは苦情品に含まれるフラグメントピークに一致した(図1)。また、MS/MS法によりこれらのフラグメントピークには96.7もしくは96.8のフラグメントピークが確認できた。このことから、苦情品には陰イオン界面活性剤としてSDSやAES類が含まれているものと推定された。

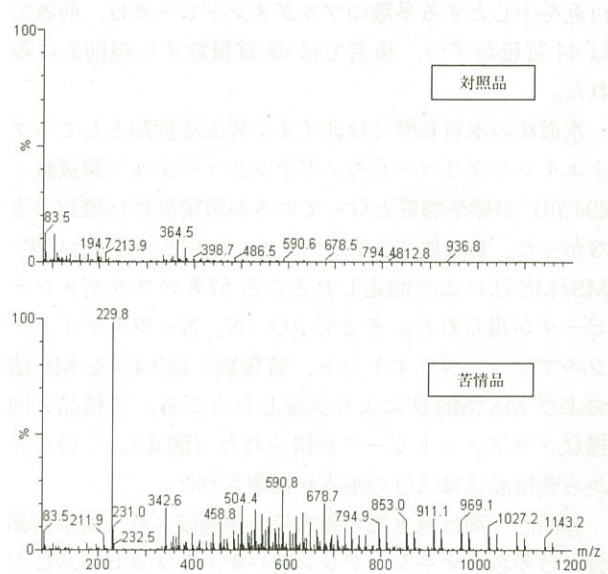
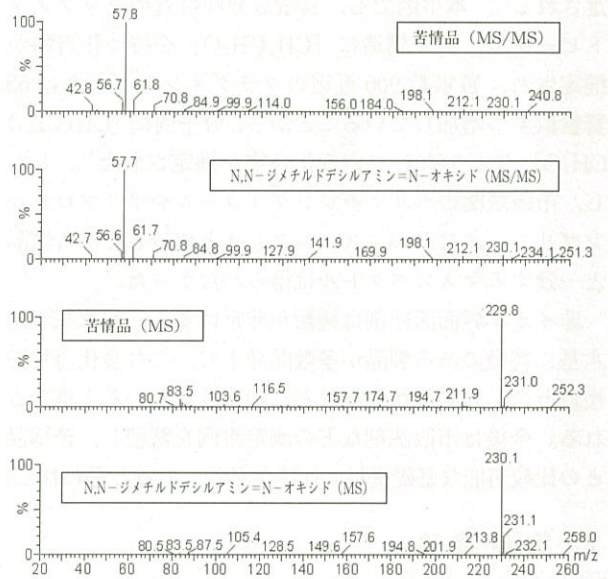


図3 ポジティブモードによるマススペクトル



注：()内は測定方法

図4 N,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシドと苦情品のマススペクトル

一方、水道法の測定対象項目となっているLAS類は質量数297から14質量数ずつ増加するフラグメントピーク [CH₂と考えられる] に特徴があるが、苦情品にはこれらのフラグメントピークは確認できなかった。

2) 非イオン界面活性剤

苦情品と対照品のMS法ポジティブモードによるマススペクトルを図3に示した。非イオン界面活性剤はポジティブモードで測定される場合が多く⁴⁾、苦情品のポジティブモード測定でも多数のフラグメントピークが得られた。苦情品には、質量数229.8と、質量数600付近および質量数900付近を中心とする多数のフラグメントピークが観察された。質量数600付近および質量数900

付近を中心とする多数のフラグメントピークは、前者では44質量数ずつ、後者では58質量数ずつ規則的に現れた。

水道法の水質基準では非イオン界面活性剤としてヘプタエチレングリコールモノドデシルエーテル（質量数：494.70）が標準物質となっているが苦情品には確認できなかった。質量数229.8のフラグメントピークについて、MS/MS法により測定したところ57.8のフラグメントピークが得られた。そこでAO（N，N-ジメチルドデシルアミン=N-オキド，質量数：229.4）をMS法およびMS/MS法により測定したところ、苦情品と同様なフラグメントピークが得られた（図4）。このことから苦情品にはAOの混入が推定された。

界面活性剤は疎水基と親水基から構成され、親水基部分には多数のオキシエチレン基やオキシプロピル基などが存在する⁵⁾。そのため、質量分析計による測定では一定の質量数ずつ規則的に現れるフラグメントピークが測定される⁵⁾。本事例でも、質量数600付近のフラグメントピークは、分子構造に $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]$ を持つ化合物が推定され、質量数900近辺のフラグメントピークは58質量数ずつ増加していることから、分子内に $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O}]$ などを有している化合物が推定された⁵⁾。しかし、市販試薬のポリエチレングリコールやポリプロピレングリコールなどのマススペクトルと比較したが苦情品と一致するマススペクトルは得られなかった。

非イオン界面活性剤は種類が非常に多く、親水基や疎水基に特徴のある製品が多数開発され、これら化合物を複数混合した製品が洗剤などに利用されていると推定される。今後は市販洗剤などの測定事例を蓄積し、苦情品との比較可能な基礎資料の作成が必要であると思われる。

2. 定量試験

1) 陰イオン界面活性剤

定性試験において確認されたSDS，AES類，また水道法水質基準項目のLAS類について、LC-MS/MS法により定量を行った。SDSは6.0mg/L，AES類は23mg/L検出されたが、水道法の標準物質のLAS（C10～C14）類は不検出（0.004mg/L未満）であった。なお、苦情品，対照品および標準品のクロマトグラム（TIC）を図5，6に示した。

陰イオン界面活性剤は広く洗剤などに利用され、AOと共に台所洗剤としても利用されている⁶⁾。SDSやAES類のラットによる毒性試験では約1.2～1.8g/kg（LD₅₀）の値が示されており⁵⁾，本苦情品の毒性はほとんど無いと考えられた。また、水試料中の陰イオン界面活性剤は約0.2mg/Lを超えると、振とうにより発泡することが報告されている⁷⁾。このことから、苦情品の発泡には、これら陰イオン界面活性剤が深く関係しているも

のと思われた。

2) 非イオン界面活性剤

定性試験において確認されたAO，ヘプタエチレングリコールモノドデシルエーテルについて、LC-MS/MS法により定量を行った。AOは26mg/L，ヘプタエチレングリコールモノドデシルエーテルは検出されなかった。なお、苦情品，対照品および標準品のクロマトグラム（TIC）を図7に示した。

AOは増泡性のある補助界面活性剤であり、AES類と組み合わせ陰イオン界面活性剤による手あれを緩和する目的で配合される⁶⁾。1999年のAOの生産量は約3800トンで、その多くが台所洗剤に利用されており⁶⁾，環境への排出量は家庭からの割合が8割を超えとの報

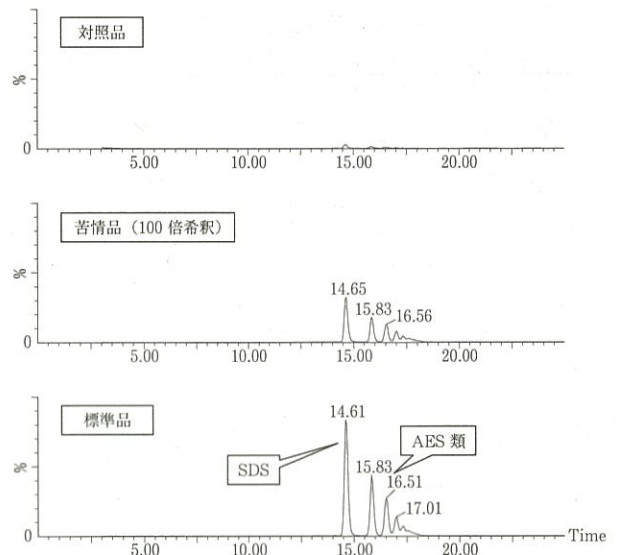


図5 ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）およびポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩（AES）のLC-MS/MSクロマトグラム（TIC）

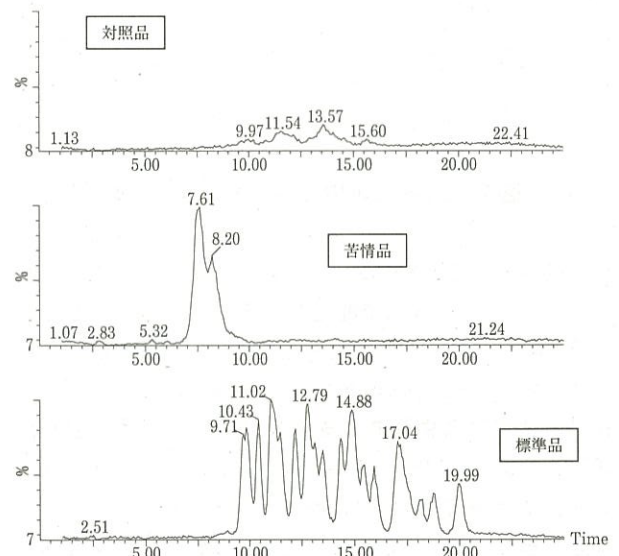


図6 アルキルベンゼンスルホン酸（LAS）類のLC-MS/MSクロマトグラム（TIC）

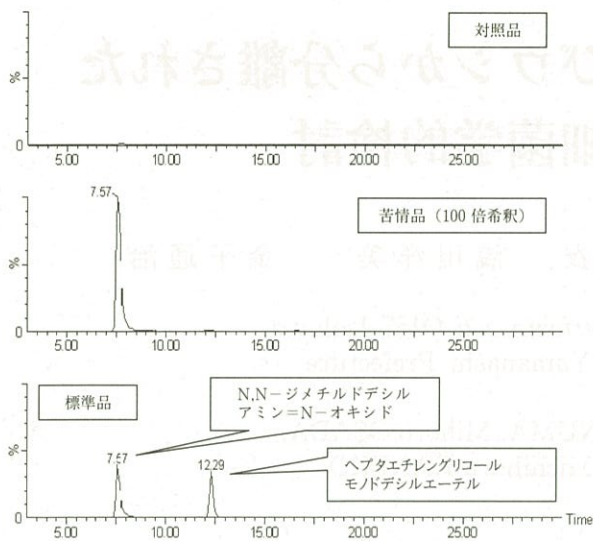


図7 N,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシドおよびヘプタエチレングリコールモノドシルエーテルのLC-MS/MS クロマトグラム (TIC)

告がある⁸⁾。一方、誤飲時の急性毒性としては、ラットやマウスによる実験値では約1.2~2.1g/kg (LD₅₀)とされ、本事例で測定された濃度では誤飲があったとしても毒性はほとんど無いと推定される⁷⁾。

今回の事例では、陰イオン界面活性剤としてSDSやAES類が検出され、非イオン界面活性剤ではAOが検出された。一方、MS法ポジティブモードで認められた質量数600以上の多数のフラグメントピークの原因物質は特定できなかった。本事例の緑茶飲料は臭気や振とう時の性状が通常のものとは異なり、誤飲される可能性は低いと考えられた。検出された陰イオンや非イオン界面活性剤の種類から、人為的に台所洗剤が混入された可能性が高いと思われた。

ま と め

今回の苦情品の特徴と測定事例をまとめると、

1. 苦情品は通常の緑茶飲料とは異なり、振とうにより著しく発泡し、芳香臭を有していた。
2. その原因物質についてESI法のポジティブモードおよびネガティブモードによる測定とLC-MSおよび

LC-MS/MS法による分析から、SDS, AES類, AOを定性・定量した。

3. LC-MSおよびLC-MS/MS法の有効性としては、前処理や濃縮操作が簡易で済み、難揮発性化合物や熱に不安定な化合物の「特徴的な化学物質情報」を得ることができ、高感度な定性・定量が可能である。
4. 界面活性剤は多種類が使用されているが、定量用標準品はごく一部の化合物しか販売されていない。これらの標準品の整備が必要と思われた。
5. 洗剤等には多種類の界面活性剤が混合されていることから、市販洗剤などの測定事例を増やし、苦情品への対応に役立つ必要があると思われた。

文 献

- 1) 島田和子：緑茶浸出液中の茶葉サポニンと水溶性ペクチンの分析, 日本家政学会誌, 54, 957~962 (2003)
- 2) 寺田雅子ら：抹茶の低分子性気泡成分について, 武庫川女子大紀要, 30, 1~5 (1982)
- 3) 宮前裕太, 吉澤賢一, 土屋順子：液体クロマトグラフィー/質量分析法による陰イオン界面活性剤および両性界面活性剤の定量, 分析化学, 50, 61~67 (2001)
- 4) 宮前裕太, 松本剛, 吉澤賢一, 土屋順子：液体クロマトグラフィー/質量分析法による陽イオン界面活性剤および非イオン界面活性剤の定量, 分析化学, 51, 921~927 (2002)
- 5) 吉田時行ら：新版 界面活性剤ハンドブック (第4版), 工学図書(株) (2000) p1~2, p13~23, p370, p590
- 6) 日本石鹼洗剤工業会：N, N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシドのヒト健康影響および環境影響に関するリスク評価, 日本石鹼洗剤工業会 (2001)
- 7) 田畑彰久ら：界面活性剤の発泡特性に関する研究, 水道協会誌, 71 (10), 2~11 (2002)
- 8) 日本石鹼洗剤工業会：PRTR法指定化学物質である代表的界面活性剤の人の健康および環境影響に関するリスク評価について, 日本石鹼洗剤工業会, 環境・安全専門委員会編 (2004)