

## 食品中ポリソルベートのHPLCによる分析法

粕谷陽子, 中里光男, 天川映子, 松本ひろ子,  
永山敏廣, 牛山博文

The footnote of this article has been already revised by the errata.

この論文は正誤表により訂正済です．訂正箇所は脚注です．

## 食品中ポリソルベートのHPLCによる分析法

粕谷陽子\*, 中里光男\*\*, 天川映子\*, 松本ひろ子\*,  
永山敏廣\*\*, 牛山博文\*\*

ポリソルベート (PS) の HPLC による分析法について検討した。試料からの PS の抽出には、酢酸エチル・メタノール (19:1) 混液を用い、クリーンアップにはシリカゲルカートリッジカラムを用いた。次いでチオシアン酸アンモニウム-硝酸コバルト試薬を用いて PS との複合体を作製した。これをジクロロメタンで抽出した後、濃縮乾固し、アセトニトリルに溶解したものを HPLC 用試験溶液とした。HPLC ではカラムに Asahipak GF-310 HQ を用い、移動相には 2% チオシアン酸アンモニウム溶液・アセトニトリル (1:1) 混液を用いることにより、再現性の良いクロマトグラムが得られた。食品からの回収率は 50-83%, 定量限界は 50 µg/g であった。

**キーワード:** ポリソルベート, 食品, 高速液体クロマトグラフィー, チオシアン酸アンモニウム, コバルトチオシアン酸錯体, 薄層クロマトグラフィー, 赤外吸収スペクトル法

### はじめに

平成 20 年 4 月に食品用乳化剤として新たにポリソルベート (PS) が食品添加物として許可された<sup>1)</sup>。PS は米国ではすでに 1960 年代初めに、EU では 1995 年 2 月の閣僚理事会指令によって食品添加物として認められており、その他多くの国々でも使用が認められている<sup>2)</sup>。このため、これまで我が国の輸入食品の検査において、最も違反の多い添加物の一つであった<sup>3)</sup>。したがって、検査も定性と確認試験に重点がおかれていたが、今回の我が国での許可に際しては、使用基準が設定され、すなわち使用対象食品とそれぞれに使用量が設定されたため、検出量が基準に合致しているかどうかの検証が重要な問題となる。

分析法については、従来から定性法として薄層クロマトグラフィー (TLC)<sup>4,7)</sup>、定量法として比色法<sup>4,6-8)</sup>が一般的に用いられ、今回厚生労働省から通知された分析法<sup>1)</sup>も定性と定量についてはこれらの手法を採用している。しかし、後者については疑似物質の発色によって定量値が上乘せされることを極力避けるため、クリーンアップが複雑となり、さらに TLC での定性試験が必須であり、操作としては極めて繁雑である。一方、今回定量法として採用されなかったが、試験液を発色させた後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定する方法<sup>9)</sup>が報告されており、精度の高い、比較的簡便な定量法として期待されたが、再現性等に問題があり、実用性に乏しいとの指摘があった。そこで、我々は定量法として、この HPLC 法に着目し、この問題点を検討し、精度よく定量できる方法を確立した。さらに定性法としての TLC と赤外吸収スペクトルによる確認法についても検討したので併せて報告する。

### 実験方法

#### 1. 試薬等

1) PS 標準液 PS 80 (オレイン酸純度 99 %) 1,000 mg をメタノールに溶解して 100 mL とし、さらにメタノールで 10 倍希釈したものを標準液とした (1,000 µg/mL)。これを適宜メタノールで希釈して使用した。

2) チオシアン酸アンモニウム-硝酸コバルト試薬 チオシアン酸アンモニウム 17.4 g 及び硝酸コバルト・6 水塩 2.8 g を水に溶解し 100 mL とした。

3) ドラーゲンドルフ試薬 塩基性硝酸ピスマス 0.85 g を氷酢酸 10 mL 溶解し、水 40 mL 加えて A 液とした。また、ヨウ化カリウム 8 g を水 20 mL に溶解し、B 液とした。A 液及び B 液は遮光して保存し、用時、A 液、B 液及び氷酢酸のそれぞれ等量を混合して用いた。

4) シリカゲルカートリッジカラム Sep-Pak Vac silica 1g (Waters 社製)

5) TLC 用プレート Kieselgel 60, 20×20cm (Merck 社製)

6) 展開溶媒 i) クロロホルム・メタノール・0.1 N 硫酸 (80:19:1), ii) ジクロロメタン・メタノール・アセトン・水 (55:20:15:4)

#### 2. 試料

市販の粉末カレールー、バタークッキー、乳状ドレッシング、ココナッツミルクおよびアイスクリームを用いた。

#### 3. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業(株)製 GULLIVER series, 送液ポンプ, デガッサー, UV/Vis 検出器, 恒温槽およびオートサンプラーおよびデータ処理装置

\* 東京都健康安全研究センター多摩支所食品衛生研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\*\* 東京都健康安全研究センター食品化学部 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

として(株)島津製作所製 クロマトパックCR-7Aプラスから構成するシステムを用いた。

HPLC条件：カラム，昭和電気(株)製 Asahipak GF-310 HQ (7.6 mm i.d.×300 mm)；移動相，2%チオシアン酸アンモニウム溶液・アセトニトリル(1:1)混液；流速，0.8 mL/min；測定波長，620 nm；注入量，50  $\mu$ L；カラム温度，40°C  
赤外吸収分光光度計：パーキンエルマー社製 SUPECTRUM 2000

#### 4. 試験溶液の調製

##### 1) 抽出

乾燥試料は，粉碎しその10 gを取り無水硫酸ナトリウム20 gを加えた。半固形食品はその10 gを取り無水硫酸ナトリウム60 gを加えた。液状食品はその10 gを取りホットプレート上でゆるやかに加温して水分を揮散させクリーム状にした後無水硫酸ナトリウム60 gを加えた。これらをいずれも均一に混和した後，メタノール・酢酸エチル(1:19)混液70 mLを加えて3分間ホモジナイズし，3,000rpmで遠心分離し，有機溶媒層を分取した。さらに，これを繰り返し，得られた有機溶媒層を合わせ，必要があればろ過し，溶媒を留去した。残留物は酢酸エチル10 mLで溶解し，これを試料抽出液とした。

##### 2) 精製

あらかじめ酢酸エチル3 mLで洗浄したシリカゲルカートリッジカラムに試料抽出液を負荷した。次いで酢酸エチル10 mLを用いて濃縮容器を洗浄しながらカラムに注入し，さらにエーテル10 mL，エーテル・エタノール(2:1)混液10 mLで，カラムを順次洗浄した後，アセトニトリル・エタノール(1:2)混液10 mLでPSを溶出し，溶出液を濃縮乾固した。残留物にチオシアン酸アンモニウム-硝酸コバルト試液2 mLを加えPSを発色させた。さらに超音波水槽中で混和し，ジクロロメタン約5 mLを加え振り混ぜて発色物を抽出した。フラスコ内容物を分液ロートに移し，静置後，ジクロロメタン層の全量を水層が入らないように注意しながら分取した。これをエバポレーターで濃縮乾固後，得られた残留物にアセトニトリル2.0 mLを加えて溶解したものをHPLC用試験溶液とした。

#### 5. HPLCによる定量

HPLC用試験溶液50  $\mu$ LをHPLCに注入し，得られたピーク面積を，あらかじめ作成した検量線から計算して試験溶液中のPS濃度を求めた。検量線は，標準液の0.5, 2.0, 5および10 mLを濃縮フラスコに採り，エバポレーターで乾固後，本法に従って操作し得られたものをHPLC用標準溶液とし，その各50  $\mu$ LをHPLCに注入して作成した。この時のHPLC用標準溶液のPS濃度は250, 1000, 2500, 5,000  $\mu$ g/mLである。

#### 6. TLCによる定性

HPLC用試験溶液1 mLをエバポレーターで乾固後，メタノール0.4 mLに溶解し，その20  $\mu$ Lをシリカゲル薄層板に塗布した。対照として1,000  $\mu$ g/mL 標準液の5.0 および10  $\mu$ L

を塗布し，展開液 i) 又は ii) で展開した。展開後の薄層板にドラージェンドルフ試薬を噴霧して対照と同じ位置 (*R<sub>f</sub>* 値) にスポットが現れることを確認して判定した。また発色したスポットの色が対照の標準溶液5  $\mu$ Lより薄い場合は陰性(試料中20  $\mu$ g/g未満)とした。

#### 7. IR スペクトルの測定

PSの存在が疑われる時等，必要に応じてIRスペクトルを測定した。

シリカゲルカートリッジでクリーンアップして得られた残留物をメタノール1 mLに溶解し，これを片端にPS標準品を塗布したシリカゲル薄層板に帯状に塗布し，まず，エーテルで上端まで展開し，風乾した後，さらに展開溶媒 ii) で同様に展開した。展開後，薄層版の片端の標準品部分ともう片端の試験品部分の一部を空けてアルミ箔で覆い，ドラージェンドルフ試薬を噴霧し，標準品の発色部位と試験品の発色部位を照合した。アルミ箔を取り除いて発色試薬の噴霧されていないPSに相当する箇所をかきとった。これにメタノール10 mLを加えて超音波にかけながら振とう抽出後，ろ紙ろ過し，エバポレーターで濃縮乾固した。残留物を0.5 mLのジクロロメタンに溶解し，赤外分光光度計用臭化カリウム板上に塗布し，風乾後，赤外分光光度計で透過法により測定し，標準品のスペクトルと比較した。

## 結果及び考察

### 1. 抽出溶媒の検討

PS使用の可能性のある食品に幅広く適用出来る抽出溶媒について，環境への負荷を減じるべく，ジクロロメタンを用いない方法を検討した。

川口ら<sup>10)</sup>及び武田ら<sup>9)</sup>の方法を参考に抽出溶媒について検討した。油脂の多い食品からヘキサンによりあらかじめ脱脂する方法<sup>9)</sup>は，エマルジョンを生じるためヘキサン層の除去が困難であった。

そこで，抽出溶媒は，川口ら<sup>10)</sup>が用いた酢酸エチル・メタノール(19:1)混液とした。この際，水分を多く含む食品に対し，抽出助剤として無水硫酸ナトリウムを用いたが，水分のほとんど無い食品への添加は溶媒層の分離が良くなるという効果があった。

### 2. シリカゲルカートリッジカラムによる精製

シリカゲルカートリッジカラムの洗浄溶媒については，当初，斉藤ら<sup>6)</sup>が用いたエーテル・エタノール(3:1)混液を用いて検討したが，エタノールの比率を上げると，疑似発色物質の洗浄効果がさらに高まることがわかった。そこでエーテル・エタノールの比率を(2:1)とした。カラムからの溶出溶媒については，酢酸エチル・メタノール(1:1)混液<sup>10)</sup>とアセトニトリル・メタノール(1:2)混液<sup>9)</sup>と比較したが，いずれも食品由来の疑似発色物質の溶出が多く認められた。そこで，後者のメタノールをエタノールに代えて検討したところ，疑似物質の溶出が減ることができたことから，溶出液はアセトニトリル・エタノール(1:2)混液とした。

3. PSの発色液

武田ら<sup>9)</sup>は発色液に20%チオシアン酸コバルト溶液を用いているが、チオシアン酸コバルトの水への溶解性が悪く、この濃度の溶液は調製が困難であった。また、発色物のジクロロメタン溶液と発色試液との分離には遠心分離が必要であり、発色試薬が混入するなどジクロロメタン層のみを分取することは困難であった。そこで発色には分離操作が容易なチオシアン酸アンモニウム-硝酸コバルト試液を用いることとした。

4. HPLC 分析条件

HPLCについて移動相の検討をおこなった。武田ら<sup>9)</sup>のアセトニトリル・水からなる移動相は繰り返しの分析の中で、Fig.1に示すようにピーク面積の再現性が得られなかった。また、全くピークが出現しない場合や、保持時間が一定しないなどの現象も観察された。

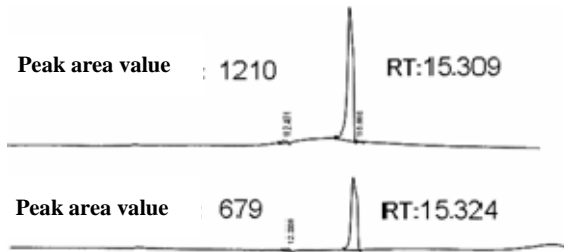


Fig.1. Disagreement of Peak Area

Column : Asahipak GF-310 (7.6 mm i.d.×300 mm)  
 Mobile phase : acetonitrile・water(19 : 1),  
 RT : retention time (min)

そこでピーク面積および保持時間の再現性を高めるために、HPLC分析条件について種々検討した。PSのチオシアン酸コバルト反応生成物の呈色は、アセトニトリル溶液中では深い青色を示すが水を加えることにより減衰する。このことから、この物質は移動相中の水により呈色が不安定となり、ピーク面積値に再現性が得られなかったものと推測した。種々検討の結果、呈色は発色試薬に使用されているチオシアン酸アンモニウムにより安定化することがわかった。そこでHPLC移動相にチオシアン酸アンモニウムを添加することとした。使用するHPLCカラムはその性質上、高極性の移動相を用いる必要があることから、アセトニトリルの含有量は50%とし、移動相に混合するチオシアン酸アンモニウム溶液の濃度について検討した。添加するチオシアン酸アンモニウム濃度を0.2%から2.5%の範囲で変化させ、ピークの形状と感度を観察した。

その結果、Fig. 2に示すとおり、チオシアン酸アンモニウム濃度が高くなるほどピーク面積・高さは大きくなることがわかった。しかし、高濃度の塩類の添加はカラムを劣化させることから、チオシアン酸アンモニウムの濃度は2%とし、HPLCの移動相は2%チオシアン酸アンモニウム溶液・アセトニトリル(1:1)混液を用いることとした。

この移動相を用いることにより、HPLCクロマトグラムはFig.3に示すとおり良好なピーク形状と安定した保持時間を得ることができた。流速 0.8 mL/min で保持時間は約13分であった。

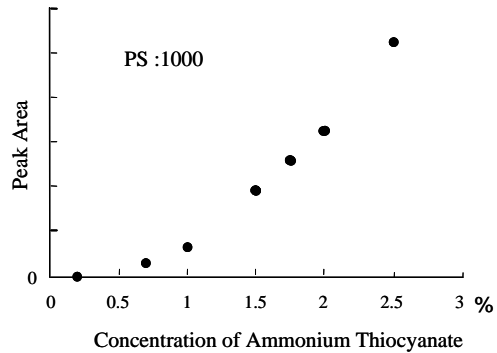


Fig.2. Effect of Concentration of Ammonium Thiocyanate in Aqueous Portion on Peak Area

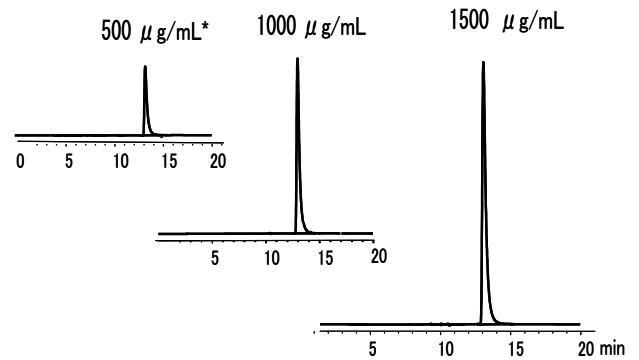


Fig.3. HPLC Chromatograms of PS Treated with this Method  
 Mobile phase : 2% ammonium thiocyanate・acetonitrile (1 : 1)  
 \* PS standard solution

5. 測定原理

HPLC用試験溶液 (A) と発色試薬であるチオシアン酸アンモニウム-硝酸コバルト試薬 (B) をHPLCに注入した際のクロマトグラムとピークのスペクトルをFig.4 及びFig.5に示した。いずれも同一の保持時間と可視吸収スペクトルを示した。

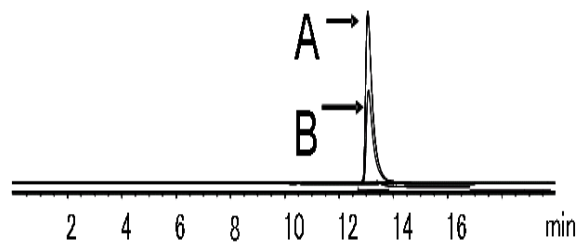


Fig.4. HPLC Chromatograms of Test Solution (A) and Color-producing Reagent (B)

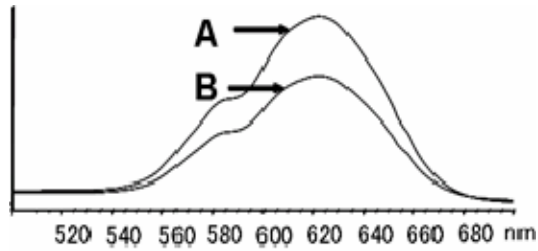


Fig.5. Visible Absorption Spectrums of Test Solution (A) and Color-producing Reagent (B)

このことから、PS発色物はHPLC分析中にPSとコバルトチオシアン酸錯体に分離し、測定しているのはこの分離したコバルトチオシアン酸錯体であると推定した。そこでHPLCカラムからの溶出液を分画採取し、定性試験を行ったところ、PSは検出ピークより早い分画に出現しコバルトチオシアン酸錯体と分離していることが確認された。これはシラン処理シリカゲル薄層板によるTLCにおいても確認された。青く呈色したHPLC試験溶液を薄層板に塗布して展開すると、発色試薬の噴霧前にコバルトチオシアン酸錯体の青色のスポットが観察されたが、発色試薬を噴霧すると、Fig.6に示すとおり、展開プレート上にPSのスポットが出現した。このことから実際に測定しているのはPSではなく、コバルトチオシアン酸錯体であることが確認された。

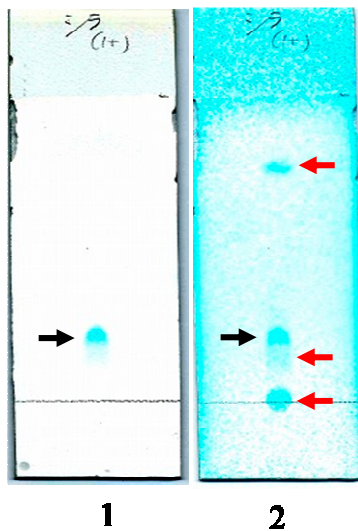


Fig.6. TLC Chromatograms of PS and Cobalt-thiocyanate Complex

1 : before spraying , 2 : after spraying

TLC plate : silanized silicagel plate

Development solvent : 5% ammonium thiocyanate aq.sol. · acetonitrile(1:1)

← : Cobalt-thiocyanate complex

← : PS

以上の結果からHPLCで出現するピークはコバルトチオシアン酸錯体に基づくことを確認した。

武田ら<sup>9)</sup>の方法でHPLCクロマトに再現性が得られなかった原因は、コバルトチオシアン酸錯体に配位しているチオシアン酸イオンが、HPLC移動相中でコバルトから乖離し、錯体維持が出来なくなったため褪色したことによるものと推定された。そこで移動相に配位子を供給すればピークの再現性が得られるのではないかと考え、チオシアン酸アンモニウムを添加したところ再現性あるHPLCクロマトを得ることができた。

次に、検出されたコバルトチオシアン酸錯体をPS量とすることの可否について検討した。

PSと複合体を形成し抽出されたコバルトチオシアン酸錯体は、その後PSと分離してもFig.7に示すように、PSとの等量関係は変わらず、このコバルトチオシアン酸錯体を測定することでPS量が算出できることを確認した。

本法による標準品の検量線は250~5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で直線性を示した (Fig.7)。

定量限度は試料中PS量として 50  $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

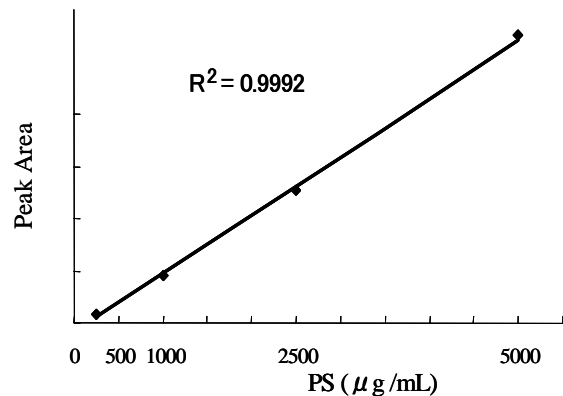


Fig.7. Correlation between Concentration of PS and Extracted Cobalt-thiocyanate Complex

本HPLC法は検出ピークの再現性に優れているが、発色はPSの特異反応ではないことから、TLCやIRによる定性試験と組み合わせることが必要と考える。

## 6. TLCおよびIRによる定性試験

### TLCによる定性試験

TLCにHPLC用試験溶液を使用したところ、従来報告の方法<sup>4,7)</sup>より妨害の少ないクロマトグラムを得ることができた。これはHPLC試験溶液にはカートリッジカラムによるクリーンアップ操作だけではなく、その後のチオシアン酸アンモニウム-硝酸コバルト試薬と反応させ抽出するという操作が加味されており、この段階で試料がさらに精製されるためと思われる。その結果、狭雑物質による発色がほとんど見られなくなり、陽性・陰性の判定がしやすくなった。

### IR による定性試験

PS陽性の判定にさらに定性試験が必要とされる場合があるため、簡易な確認試験としてIRスペクトルの測定を試みた。過去、著者らはIR試料の作成にあたり、TLCでPSを展開した後、PS位置をヨウ素蒸気に暴露して把握し、薄層板からPSを掻き取る方法を用いていたが、ヨウ素は腐食性および刺激性を有し管理が困難であるため、本法ではドラージェンドルフ試薬を用いることとした。まずTLCをエーテルで展開して油脂成分と分離した後、次に展開溶媒 ii) で展開を行い、風乾後、ドラージェンドルフ試薬で展開位置を確認し、PS部位をかき取る方法を採用した。これにより、ヨウ素蒸気を用いないIRスペクトル測定用試料の調製が可能となった。

### 7. 添加回収試験

粉末カレー、バタークッキー、乳状ドレッシング、ココナッツミルクおよびアイスクリーム10gに、それぞれPSを200 µg/gになるように添加し、回収試験を行った結果をTable 1に示した。乾燥した試料である粉末カレー、バタークッキーの回収率は50, 63%と低かった。一方水分の多い乳状ドレッシングについては水浴上でゆるやかに水分を除去しクリーム状にした後抽出操作をおこなったことで回収率が高くなった。全般的に今回の添加回収では回収率はやや低い傾向にあるが、これは通知法の回収率53.6-76.2%とほぼ同程度であり、PS分析法として十分使用できるものと考えられる。

Table 1. Recovery of PS added to Processed Foods

Sample	Recovery (%)
Curry roux (powder)	50
Butter Cookie	63
Emulsified dressing	83
Coconut milk	65
Ice cream	65

### ま と め

ポリソルベート (PS) に関して広範囲の食品に適用できる HPLC 法の検討を行った。

1. 試料からの抽出溶媒に酢酸エチル・メタノール (19:1) を用い、シリカゲルミニカラムで抽出物を精製することにより妨害物を除去した。
2. HPLC の移動相に 2%チオシアン酸アンモニウム溶液・アセトニトリル (1:1) を用いることにより、再現性に優れたクロマトグラムが得られた。本法は、PS から分離したコバルトチオシアン酸錯体を測定することにより、PS 量を把握する分析法であることを確認した。
3. HPLC での定量限界は試料中 1g 当たり 50 µg、検量線は 250~5,000 µg/mL で直線性が得られた。

4. TLC では、HPLC 用試験溶液を用いることで妨害物の影響のない明確なクロマトグラムが得られることがわかった。確認は 5 µg から可能であった (試料中 1g 当たり 20 µg)。

5. IR 用試験溶液調製の際に、TLC 板上の PS スポットの位置確認を従来のヨウ素暴露法からアルミ箔で TLC 板を覆いドラージェンドルフ試薬を噴霧する方法に変更することにより、腐食性および刺激性の強いヨウ素の使用を避けることが出来た。

6. HPLC での市販食品を用いた添加回収率は 50-83 % であった。

以上の結果から、本法は食品中のポリソルベートの分析に十分使用できるものと考えられる。

### 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について” 平成 20 年 4 月 30 日食安発第 0430001 号 (2008)
- 2) 日本食品添加物協会国際専門委員会編：世界の食品添加物概説 (改訂版), 86-400, 2007, 日本食品添加物協会, 東京。
- 3) 厚生労働省：輸入食品監視業務ホームページ, 過去の違反事例,  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/tp0130-1ae.html>  
(2008 年 8 月 29 日現在, なお, 本 URL は変更または抹消の可能性がある)。
- 4) 石綿 肇, 渡辺晴美, 林 敏夫, 他: 食衛誌, **14**, 425-430, 1973.
- 5) 田村行弘, 井部明広, 橋本秀樹, 他: 東京衛研年報, **38**, 209-215, 1987.
- 6) 斉藤和夫, 中里光男, 菊地洋子, 他: 食衛誌, **28**, 372-377, 1987.
- 7) 外海泰秀, 中村優美子, 辻澄子, 他: 食衛誌, **28**, 427-435, 1987.
- 8) 谷村顕雄, 藤井正美, 義平邦利, 他 (監修): 食品中の食品添加物分析法解説書, 913-919, 1992, 講談社, 東京
- 9) 武田由比子, 阿部有希子, 石綿 肇, 他: 食衛誌, **42**, 91-95, 2001.
- 10) 川口徹, 飯塚太由, 伊藤一夫, 他: 日本食品衛生学会 第 70 回学術講演会講演要旨集, **64**, 1995.

**Analytical Method of Determinating Polysorbates in Foods by HPLC**

Yoko KASUYA<sup>\*</sup>, Mitsuo NAKAZATO<sup>\*\*</sup>, Eiko AMAKAWA<sup>\*</sup>, Hiroko MATSUMOTO<sup>\*</sup>,  
Toshihiro NAGAYAMA<sup>\*\*</sup> and Hirofumi USHIYAMA<sup>\*\*</sup>

An analytical method of measuring polysorbates (PS) in foods by HPLC was studied. PS was extracted from foods with ethyl acetate-methanol (19:1). The extract was condensed under vacuum, subsequently made into a test solution with ethyl acetate, and then applied to a silica gel cartridge column. After the column was washed with ethyl acetate, diethyl ether, and diethyl ether:ethanol (2:1) successively, PS was eluted with acetonitrile:ethanol (1:2). The solvent was removed by evaporation. PS was complexed with ammonium thiocyanate-cobalt nitrate reagent. The complex(PS·Co-complex) was extracted with dichloromethane. The dichloromethane was evaporated to dryness; subsequently, the test solution was obtained to dissolve the residue in acetonitrile. PS was determined by HPLC using 2% ammonium thiocyanate:acetonitrile (1:1) as the mobile phase. Qualitative analysis of PS was performed by TLC. If necessary, the IR spectrum was measured to confirm the presence of PS. It was suggested that the PS·Co-complex was dissociated to PS and Co-complex in the test solution; however, the Co-complex was stable in the presence of ammonium thiocyanate in the mobile phase. PS was analyzed by determination of the Co-complex because PS was quantitatively associated with the Co-complex. The recoveries of PS by this method were 50–83%. The limit of quantification was 50 µg/g in HPLC and the limit of detection was 20 µg/g in TLC. This method was satisfactorily applied to various types of processed foods.

**Keywords** : polysorbates, foods, HPLC, ammonium thiocyanate, cobalt-thiocyanate complex, TLC, IR,

---

<sup>\*</sup> Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

<sup>\*\*</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan