

食品中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析法

河野美幸*, 中里光男**, 小林千種***,
山嶋裕季子***, 大野郁子***, 安田和男***

Determination of *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters in Foods

MIYUKI KAWANO*, MITSUO NAKAZATO**, CHIGUSA KOBAYASHI***,
YUKIKO YAMAJIMA***, IKUKO OHNO*** and KAZUO YASUDA***

The concentrations of six kinds of *p*-hydroxybenzoic acid esters (PHBA-Es), namely, PHBA-methyl ester, PHBA-ethyl ester, PHBA-propyl ester, PHBA-isopropyl ester, PHBA-butyl ester and PHBA-isobutyl ester, were determined in various foods by high performance liquid chromatography. PHBA-Es were extracted from samples using a mixture of acetonitrile-isopropanol-ethanol(2:1:1). The crude extract was stored in a freezer set up at -20°C for 1 hr., and separated into an organic layer and the residue. The organic layer was concentrated to 1~2 ml, then the concentrated solution was diluted ten times with water. The solution was cleaned up on a Sep-Pak Vac C18 cartridge. The cartridge was washed with water and a mixture of methanol-water(1:9). The PHBA-Es were eluted from the cartridge with the methanol-water(8:2)mixture. The six of PHBA-Es were separated on a Cosmosil 5C18-AR II column with a mobile phase of methanol-5 mmol/L citrate buffer (6:4), and detected at 254 nm.

Recoveries of the PHBA-Es from various kinds of foods were 90.8~106%. The detection limits of the PHBA-Es were 10 μ g/g in the samples. The proposed method was useful on analysis of PHBA-Es in foods containing oils and fats.

Keywords : パラオキシ安息香酸エステル類 *p*-hydroxybenzoic acid esters, 保存料 preservative, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒言

パラオキシ安息香酸エステル類 (PHBA-Es) は食品の保存料として我が国では醤油 (パラオキシ安息香酸として0.25g/L以下), 果実ソース (同0.20g/kg以下), 清涼飲料水及びシロップ (同0.10g/kg以下), 酢 (同0.10g/L以下), 果実または果菜の表皮部分 (同0.012g/kg以下) に限って使用が認められている。しかし, 国によってはこれら以外の食品への使用も認めており, 例えば, ビスケット, ジャム, マーマレード, 加工果実, 魚肉練り製品, チーズ類, 油脂類, ワイン, 菓子類, 各種調味料, スープ, タレ類等への使用を認めてい

る国もある¹⁾。したがって, 輸入食品の監視にあたっては, これらの食品についても検査を行う必要がある。PHBA-Esの分析法としては, 水蒸気蒸留法あるいは有機溶媒による直接抽出法によって前処理を行い, ガスクロマトグラフィー²⁾あるいは高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{3,4)}によって定性及び定量を行う方法が一般的である。特に我が国で許可対象となっている食品については水蒸気蒸留法とHPLCを組み合わせた方法が簡便であり, 安息香酸やソルビン酸等と一斉分析を行うにも便利である。しかしながら, この方法を許可対象外の食品に適用した場合, 特に油脂を含有する食品において極

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 (現千葉大学薬学部臨床化学教室) 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

** The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

*** 東京都立衛生研究所多摩支所

**** 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

端に回収率が低下することが指摘されている⁵⁾。そこで、いくつかの方法を比較検討したところ、衛生試験法⁶⁾の油脂中の酸化防止剤の分析法の項で抽出溶媒として用いられているアセトニトリル-イソプロパノール-エタノールの混合溶媒で抽出後、冷却して油脂類等を除き、HPLCで定量する方法が簡便で多種の食品に適用できることが分かったので報告する。

実験方法

1. 試料

市販のフレンチドレッシング、果実ソース、マヨネーズ、ウエハース、ココナッツミルク、キュウリの酢漬、オリーブの水煮、マーガリン、ラードを用いた。

2. 試薬

1) 混合標準原液：パラオキシ安息香酸メチル(PHBA-ME)、同エチル (PHBA-ET)、同イソプロピル (PHBA-IP)、同*n*-プロピル (PHBA-NP)、同イソブチル (PHBA-IB)、同*n*-ブチル (PHBA-NB) (以上東京化成工業(株)製、特級品) 40mgを各々正確にはかり、60%メタノールに溶解してそれぞれ100mlとした。これらの各5mlを取り、60%メタノールを加えて100mlとしたものを混合標準原液とした。この液1mlは各PHBAのエステル20 μ gを含有する。

2) 前処理用カートリッジカラム：Sep-Pak Vac C18 (充填量1g, Waters社製)を用いた。本カートリッジはメタノール5ml及び水10mlで洗浄して用いた。

3) メタノール：HPLC用 (ナカライテスク(株)製)を用いた。

4) 抽出溶媒：アセトニトリル-イソプロパノール-エタノール (2:1:1) 混液 (ナカライテスク(株)製、特級品)を用いた。

その他の試薬はすべて特級品を用いた。

3. 装置

1) HPLC装置：日本分光工業(株)製880-PU型ポンプ、同851-AS型オートインジェクター、(株)島津製作所製SPD-10AV型UV検出器、同C-R4A型データ処理装置により構成した。

2) ホモジナイザー：(株)日音医理工科機械製作所製ヒストロン

4. 試験溶液の調製方法

試料は必要に応じて細切あるいはホモジナイズして均一化したのち、その10gを遠心沈殿管にとり、適量の無水硫酸ナトリウム及びアセトニトリル-イソプロパノール-エタノール (2:1:1) 混液50mlを加え、5分

間ホモジナイズした。これを遠心分離して有機層を分取したのち、更に残さに抽出溶媒50mlを加えて同様の操作を繰り返し、有機層を合わせた。次いで有機層を-20℃の冷凍庫のなかで1時間冷却したのち、すばやくろ紙でろ過し、残さをあらかじめ-20℃で冷却した少量の抽出溶媒で洗浄し、先のろ液と合わせた。得られた溶液は1~2mlに減圧濃縮したのち、メタノールで全量を25mlとした。この5.0mlをとり、水で50mlとしたのち、その25mlをSep-Pak Vac C18カートリッジに負荷した。カートリッジを水10ml及びメタノール・水 (1:9) 混液10mlで洗浄後、メタノール・水 (8:2) 混液で溶出し、その10mlを捕集した。これを0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。

5. HPLC条件

カラム：Cosmosil 5C18-ARII (4.6 mm i.d.×150mm, 5 μ m, ナカライテスク(株)製)、移動相：メタノール-5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (6:4) 混液、流速：0.8ml/min、カラム温度：40℃、検出：UV 254nm、注入量：20 μ l、

結果及び考察

1. 抽出法の検討

PHBA-Esの食品中の抽出法については衛生試験法⁴⁾に水蒸気蒸留法、食品衛生検査指針³⁾には水蒸気蒸留法及びエチルエーテルによる直接抽出法²⁾が記載されており、その他、メタノールによって抽出する方法⁷⁾も報告されている。著者らは油脂を含有する食品中のPHBA-Esの分析法を作製するにあたり、これらの方法を比較検討し、さらに、アセトニトリル-イソプロパノール-エタノール混液で抽出する方法についても併せて検討した。

その結果、Table 1に示したように水蒸気蒸留法は我が国で添加が許可されている清涼飲料水、果実ソース、醤油などの液状食品ではPHBA-MEを除いて80%以上の回収率が得られた。また、PHBA-MEも留液を1,000mlとすることで、これらの食品では80%前後の回収率が得られることがわかった。しかし、諸外国で使用が許可されているビスケットやウエハース等でクリームをサンドした製品やマーガリン等油脂分を多く含む食品についてはすべてのPHBA-Esで回収率の著しい低下がみられた。これは油脂中にPHBA-Esが吸収されたため水蒸気蒸留の効率が低下したものと考えられる。一般に試料 (50g) に対して5%以上の油脂が存在すると回収率が低下するといわれている⁵⁾。これらのことから上記のような液状食品については操作の簡便性から水蒸気蒸留法が適していると考えられたが、油脂含量の不明な固形食品やマヨ

Table 1. Recoveries of 6 Kinds of *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters from Foods by Steam Distillation

Sample	Recovery (%)					
	PHBA-ME	PHBA-ET	PHBA-IP	PHBA-NP	PHBA-IB	PHBA-NB
Fruit sauce	53.6	80.9	91.1	89.6	91.3	88.8
Soy sauce	63.2	88.4	95.7	93.8	94.7	94.2
Lemon juice	66.1	92.1	98.1	98.1	97.2	95.3
Strawberry jam	37.4	66.0	85.6	80.3	85.5	83.2
Biscuit*	36.6	39.8	44.8	30.4	25.5	19.1
Wafer*	28.9	33.9	38.0	25.3	20.6	16.5
Margarine	26.9	24.4	23.3	15.4	11.1	8.4

Added 0.20g/kg

* : Cream was sandwiched

ネーズ、マーガリン等の油脂高含有食品については有機溶剤による直接抽出法が適当と考えられた。そこで、抽出溶剤としてエチルエーテル、酢酸エチル、メタノール及び酸化防止剤の試験の際に抽出溶剤として用いられるアセトニトリル-イソプロパノール-エタノール(2:1:1)混液を用いて比較検討した。

その結果、PHBA-Esの回収率はいずれの抽出溶剤を用いてもおおむね80%以上と良好であったが、エチルエーテル及び酢酸エチルはほとんど油脂分も溶解し、アルカリによる再抽出操作を行って精製する必要があり操作が繁雑であった²⁾。また、ホモジナイズの際、溶媒の揮散や引火に注意をする必要があり、多数の検体を同時に処理するには不相当であると思われた。

メタノールによる抽出では比較的油脂分の移行が少ないが、少量であっても油脂分がカラムに吸着保持されるとHPLC測定の際に妨害となることから、あらかじめこれを除く必要があった。また、メタノール濃度を60~70%にすると油脂分は減少したが、マーガリン等の高油脂含有食品においてPHBA-IB及びPHBA-NBの回収率が低下した。

次にアセトニトリル-イソプロパノール-エタノール

(2:1:1)混液で検討したところ、油脂分の移行率はメタノールと同じ程度であり、PHBA-IB及びPHBA-NBの回収率も良好であった。しかし、この場合にも油脂分を除く操作が必要であるので冷凍庫中で油脂分を析出除去する方法(凍結法)を併用することにした。そこで、酸化防止剤の抽出精製法⁶⁾に準拠して抽出溶媒にアセトニトリル-イソプロパノール-エタノール(2:1:1)混液を用い、凍結法により油脂を分離することにした。凍結時間は酸化防止剤の試験法に準じ、1時間としたが、この操作で油脂はほとんど除去され、さらに、凍結によってその他の成分もかなり析出除去されるため、大きな精製効果が得られた。なお、PHBA-Esの凍結による回収率の低下は5%以下と僅かであった。

2. C18カートリッジによるクリーンアップ

凍結法によって得られた抽出液の溶媒を留去し、残留物をメタノール等に溶解してそのままHPLCに注入してもほとんどの試料でPHBA-Esの妨害となるピークは観察されなかったが、発酵食品等では夾雑ピークがあって判別の困難なものもあった。そこで、さらにC18カートリッジによるクリーンアップを検討した。

C18カートリッジの洗浄にはまず水を用いたが、さら

Table 2. Recoveries of 6 Kinds of *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters from Foods

Sample	Recovery (%)*					
	PHBA-ME	PHBA-ET	PHBA-IP	PHBA-NP	PHBA-IB	PHBA-NB
Fruit sauce	102±1.5	103±1.2	101±0.6	102±1.5	103±3.1	101±2.3
Coconut milk	94.9±2.2	95.9±2.3	94.8±2.7	94.1±2.9	93.9±2.1	95.2±2.7
Wafer	92.0±4.7	93.1±5.0	92.1±4.7	91.3±5.0	91.0±5.8	90.8±6.4
Olive (boil plain)	102±4.0	103±4.5	103±3.8	101±3.9	99.8±4.7	99.6±3.4
Cucumber (pickle)	100±3.0	101±3.0	99.7±3.1	99.2±3.5	101±3.4	99.9±2.9
Mayonnaise	106±3.5	106±3.2	104±2.1	104±3.1	105±5.3	101±1.6
Margarine	96.3±7.6	101±10.4	94.0±6.5	94.6±8.8	94.9±9.0	92.2±6.2
French dressing	101±2.3	102±2.8	101±2.0	100±2.3	101±2.3	100±2.8
Lard	104±6.4	104±3.1	103±6.0	102±4.8	102±5.6	101±4.6

* Mean±S.D.(n=3); added 0.20 g/kg

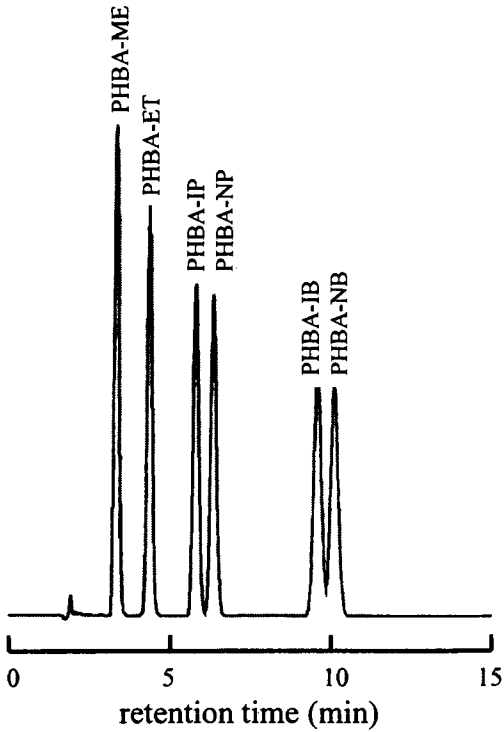


Fig. 1. HPLC Chromatogram of Standard Mixture of *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters

HPLC conditions : column, Cosmosil 5C18-AR II ($5\mu\text{m}$, $4.6\text{mm i.d.} \times 150\text{mm}$); mobile phase, methanol-5 mmol/L citrate buffer (6:4); flow rate, 0.8ml/min; detect, UV 254 nm; column temp., 40°C ; injection volume, $20\mu\text{l}$

に、クリーンアップ効果を増すためにメタノール-水混液の使用について検討した。その結果、メタノール-水混液の比率が0:10から2:8までは20mlの負荷でもPHBA-Esの溶出は認められなかったが、3:7混液ではPHBA-MEが20%程度溶出することが分かった。そこで、洗液としてはカートリッジのロット間の差違も考慮し、1:9混液を用いることにした。溶出には同様にメタノール-水混液を用いることにしたが、PHBA-IBやPHBA-NBのように分子量の大きいものを溶出させるためにはメタノールの比率を大幅に増加させる必要があり、6種すべてのPHBA-Esを8~9 ml程度で溶出させるために8:2混液を用いることとした。

これらのクリーンアップ操作によりクロマトグラム上での夾雑ピークが大幅に減少した。

3. 添加回収実験

市販の果実ソース、ココナッツミルク、ウエハース、オリーブの水煮、キュウリの酢漬、マヨネーズ、マーガリン、フレンチドレッシング及びラードにPHBA-Esを0.20g/kgとなるように添加し、本法に従って添加回収実験を行った。

その結果はTable 2に示したとおりであり、PHBA-MEで92.0~106%、PHBA-ET 93.1~106%、PHBA-IP 92.1~104%、PHBA-NP 91.3~104%、PHBA-IB 91.0~

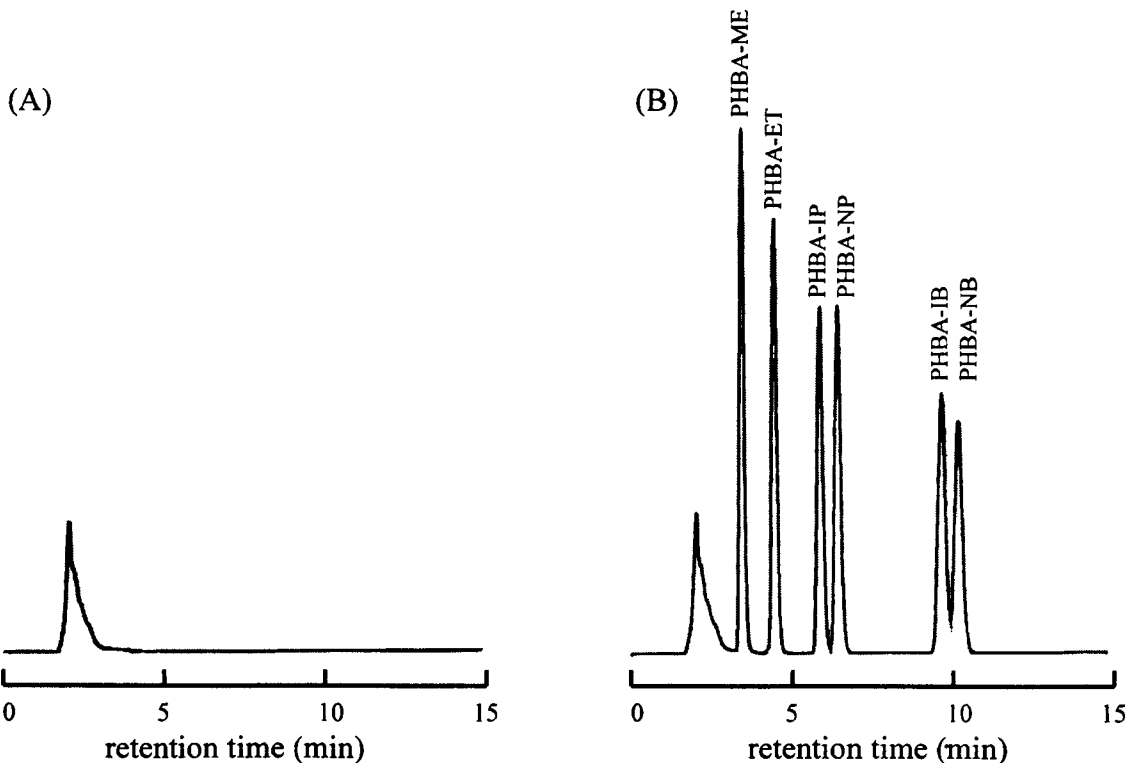


Fig. 2. HPLC Chromatograms of *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters in Fruit Sauce
(A) blank sample, (B) spiked sample (0.20g/kg)

HPLC conditions were the same as described in Fig.1

105%, PHBA-NB 90.8~101%であり、いずれも良好な結果を示した。Fig. 1 に標準品のクロマトグラムを、Fig. 2 に果実ソースに添加した場合のクロマトグラムを示した。特に妨害ピークもなく、本法は実用上十分使用できるものと思われる。なお、検出限界は $10\mu\text{g/g}$ であった。

ま と め

1. 食品中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析法について検討した。
2. パラオキシ安息香酸エステル類をアセトニトリル - イソプロパノール - エタノール (2 : 1 : 1) 混合溶媒に抽出し、次いで凍結操作により油脂分を除去し、さらに、C18カートリッジにより精製してHPLC試験溶液を調製した。
3. HPLCによる分離ではカラムにCosmosil 5C18-AR II, 移動相にメタノール - 5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (6 : 4) 混液を用いたが、夾雑ピークとの分離も十分であり、再現性も良好であった。
4. 本法により添加回収実験を行った結果、各エステル

類の回収率は90.8~106%であった。

文 献

- 1) 金山龍男：別冊フードケミカル6，世界の食品添加物，92-118，1994，食品化学新聞社，東京。
- 2) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針，食品中の食品添加物分析法，25-32，1989，日本食品衛生協会，東京。
- 3) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針追補1，食品中の食品添加物分析法，25-32，1989，日本食品衛生協会，東京。
- 4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解1990，付.追補(1995)，441-451，1995，金原出版，東京。
- 5) 西山 修，栗田礼子，黒塚幹子：食衛誌，36，495-500，1995。
- 6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解1990，付.追補(1995)，1531-1535，1995，金原出版，東京。
- 7) 岸 弘子，川名清子，谷 孝之：第35回全国衛生化学技術協議会年会 (1998)。