

透析法を応用した食品中の保存料の一斉分析

粕谷陽子*, 松田敏晴*, 中里光男*, 安田和男*

Simultaneous Determination of Preservatives in Foods Using Dialysis on Extraction Step

Yoko KASUYA*, Toshiharu MATSUDA*, Mitsuo NAKAZATO* and Kazuo YASUDA*

An analytical method for 10 kinds of preservatives, benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid, salicylic acid, methyl p-hydroxybenzoate, ethyl p-hydroxybenzoate, n-propyl p-hydroxybenzoate, isopropyl p-hydroxybenzoate, n-butyl p-hydroxybenzoate and isobutyl p-hydroxybenzoate, in foods was developed. Chopped or pulverized samples were packed into cellulose tubing with a small quantity of methanol-water (8:2) and were dialyzed against methanol-water (8:2) for 24 hours. The dialyzate was passed through a OASIS HLB cartridge, and the cartridge was washed with water and methanol-water (1:1).

Preservatives were eluted from the cartridge with methanol. Benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid and salicylic acid in the eluate were separated on an Inertsil ODS-80A column with a mobile phase of methanol-acetonitrile-5 mmol/L citrate buffer (pH 4.0)(1:2:7), and detected at 230 nm. Six kinds of esters of p-hydroxybenzoic acid in the eluate were separated on an Inertsil ODS-80A column with a mobile phase of methanol-acetonitrile-5 mmol/L citrate buffer (pH 4.0)(6:2:9), and detected at 254 nm.

The recoveries of 10 preservatives from various kinds of foods spiked at 100 µg/g ranged from 71.8~109%. The detection limits of the preservatives were 10 µg/g in the samples. The proposed method was especially useful for analysis of esters of p-hydroxybenzoic acid in foods containing oils and fats.

Keyword: 保存料 preservative, 安息香酸 benzoic acid, ソルビン酸 sorbic acid, デヒドロ酢酸 dehydroacetic acid, サリチル酸 salicylic acid, パラオキシ安息香酸エステル類 esters of p-hydroxybenzoic acid, 透析 dialysis, 高速液体クロマトグラフィー HPLC,

はじめに

我が国で消費される食品は諸外国に大きく依存し、その輸入は年々増加の一途をたどっているが、同時に未許可の食品添加物を使用した食品が摘発される頻度も増加している。保存料として諸外国で許可されているパラオキシ安息香酸メチルもその中の1つであり、東南アジア諸国からの輸入品での違反が目立っている¹⁻⁴⁾。そこで、パラオキシ安息香酸メチルを含めた保存料の一斉分析法の開発を行うことにした。さらに、かつて我が国で清酒の保存料として許可されていたサリチル酸が魚のかす漬けから検出されたとの報告⁵⁾もあることからサリチル酸も含めて検討することにした。

食品中の保存料の分析は水蒸気蒸留 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による方法^{6,7)}が一般的であるが、チーズやマヨネーズなどの脂質の多い食品ではパラオキシ安息香酸エステル類の回収率が低いなどの欠点がある。そこで、回収率を高めるために衛生試験法・注解⁸⁾あるいは食品衛

生検査指針⁷⁾では、これらの食品においては水蒸気蒸留を行う前に、メタノール・水(1:1)混液でホモジナイズし、遠沈した上清を水蒸気蒸留に付すようにとの注解が追加されている。しかし、加工食品では外観から成分組成を知ることは困難であり、抽出操作を行うかどうかの判断は極めて難しい。そこで近年、メタノール⁹⁾あるいはエチルエーテル⁹⁾による直接抽出と固相抽出を併用した方法、また、透析法と固相抽出を組み合わせた前処理法¹⁰⁾などが開発されている。しかし、有機溶剤による抽出法は操作が繁雑となるなどの欠点があった。そこで、簡便性の点から透析法を応用し、多種の食品に対応できる一斉分析法について検討したところ良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

市販の醤油、チーズ、ロースハム、ロールケーキ、ピーナツバター、マヨネーズ等を用いた。

* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

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

2. 試薬

1) 標準品: 安息香酸(BA), ソルビン酸(SoA), デヒドロ酢酸(DHA)及びサリチル酸(SA)は和光純薬工業(株)製, パラオキシ安息香酸エチル(PHBA-Et), 同 *n*-プロピル(PHBA-Pro), 同イソプロピル(PHBA-isoPro), 同 *n*-ブチル(PHBA-Bu), 同イソブチル(PHBA-isoBu)及び同メチル(PHBA-Me)は東京化成工業(株)製を用いた.

2) 標準原液: 各標準品のそれぞれ 100 mg をはかり, メタノールで 100 mL としたものを標準原液とした. 各標準原液はそれぞれ 1,000 µg/mL を含有する.

3) BA, SoA, DHA 及び SA 混合標準溶液: 各標準原液を適宜メタノールで希釈し, 各 0.5, 1.0, 3.0 及び 5.0 µg/mL の濃度系列の混合標準溶液を調整した.

4) PHBA-エステル類混合標準溶液:

PHBA-Et, PHBA-Pro, PHBA-isoPro, PHBA-Bu, PHBA-iso Bu 及び PHBA-Me 標準原液を適宜メタノールで希釈し, 各 0.5, 1.0, 3.0 及び 5.0 µg/mL の濃度系列の混合標準溶液を調整した.

5) 透析膜: 透析用セロチューブ膜 35/32 (分画分子量 12,000~14,000 Viskase Sales 社製)を用いた.

6) 透析用溶液: メタノール・水(8:2)混液を用いた.

7) 前処理用カートリッジ: OASIS HLB(500 mg, Waters 社製)を用いた. あらかじめメタノール 5 mL 及び水 5 mL で洗浄して使用した.

3. 装置

1) HPLC 装置: 日本分光工業(株)製 PU-2089 型ポンプ, 同 2075 型紫外可視検出器, 同 CO-2065 型カラムオープン, 東ソー(株)製 AS-8020 型オートサンプラー (株)島津製作所製 C-R7A 型データ処理装置により構成したものをを用いた.

2) 粉碎器: Oster 社製 Osterizer

4. 試験溶液の調製

1) 透析: 液状試料はそのまま, 固形試料は細切又は粉碎した後, その 10 g を取り, 約 50 mL の透析用溶液を加えて攪拌した後, 透析膜に充てんした. これをメスシリンダー中に入れ, 透析用溶液を用いて 200 mL にメスアップし,

時々揺り動かしながら室温で 24 時間透析した.

2) クリーンアップ: 透析終了後, 透析外液 5 mL を分取し, これに 0.1 mol/L リン酸を用いて全量を 20 mL とし, 十分に混和した. この 10 mL を分取し, 前処理用カートリッジに負荷し, 水 10 mL 及びメタノール・水(1:1)混液 10 mL で順次洗浄した後, メタノールで溶出し, 10 mL としたものを試験溶液とした.

5. HPLC 条件

1) BA, SoA, DHA 及び SA: カラム, Inertsil ODS-80A(4.6 mm i.d. × 150 mm); 移動相, メタノール・アセトニトリル・5 mmol/L クエン酸緩衝液 pH 4.0 (1:2:7)混液; 流速, 0.7 mL/min; 検出波長, 230 nm; 温度, 35 °C; 注入量, 20 µL

2) PHBA エステル類: カラム, Inertsil ODS-80A(4.6 mm i.d. × 150 mm); 移動相, メタノール・アセトニトリル・5 mmol/L クエン酸緩衝液 pH 4.0 (6:2:9)混液; 流速, 1.0 mL/min; 検出波長, 254 nm; 温度, 35 °C; 注入量, 20 µL

結果及び考察

今回, 分析対象とした保存料は我が国で許可されている BA, SoA, DHA 及び 5 種の PHBA エステル類, 輸入食品からしばしば検出される不許可の PHBA-Me 及び過去に我が国で清酒の保存料として許可されていた SA の合計 10 種である.

1. 抽出

1) 水蒸気蒸留 試料に各保存料を 100 µg/g になるように添加し, 水蒸気蒸留法^{6,7)}により抽出を行った. Table 1 に示したように脂質の多い食品において PHBA-Me を含め PHBA エステル類の回収率が極めて低かった. また, 菓子類のロールケーキも挟みであるクリームの影響と思われるが低い回収率であった.

PHBA エステル類は諸外国では菓子類など, 油脂類が用いられる食品も使用対象食品になっていることがあり, このような食品にも対応できる簡便な分析法を作成する必要がある. また, SA も一部の食品を除いて回収率は低いこ

Table 1 Recoveries of 10 Kinds of Preservatives Added to Foods by Steam Distillation

Sample	Recovery (%)									
	SA	BA	SoA	DHA	PHBA -Me	PHBA -Et	PHBA -isoPro	PHBA -iPr	PHBA -isoBu	PHBA -Bu
Miso	38.4	98.1	105	104	23.5	39.2	53.4	37.4	34.5	26.5
Soy sauce	85.9	101	99.1	93.3	59.1	91.1	99.7	97.9	93.8	92.5
Bean jam	83.1	103	95.6	90.6	38	64.4	90.9	75.8	85.3	75.5
Ham	11.0	68.8	94.5	90.6	10.6	18.5	30.6	20.2	22.1	16.8
Tsubu uni	34.4	84.3	82.4	99.3	16.2	23.9	32.7	21.0	18.4	13.2
Rolled cake	30.1	78.6	90.5	96.5	12.2	18.4	24.8	15.6	14.0	10.4
Mayonnaise	50.9	96.1	103	92.5	20.6	19.3	19.2	12.3	10.7	7.8
Peanut butter	27.7	75.2	87.6	83.2	13.2	17.0	20.5	13.0	12.1	8.4
Cheese	24.3	85.4	73.3	61.4	21.4	26.3	33.2	25.1	27.8	24.4

Samples were spiked at 100 µg/g.

Table 2 Effect of Concentration of Methanol in Dialyzing Solution on Recoveries of Preservatives

sample	Conc. MeOH	Recovery (%)									
		SA	BA	SoA	DHA	PHBA -Me	PHBA -Et	PHBA -isoPro	PHBA -Pro	PHBA -isoBu	PHBA -Bu
Peanut butter	0	95.3	95.0	94.8	95.4	82.4	65.6	48.6	41.8	23.6	21.2
	30	96.7	97.0	96.5	94.3	91.2	75.9	63.0	57.2	38.7	36.2
	50	96.5	96.3	93.0	96.2	96.4	93.7	87.5	84.1	72.6	69.9
	80	96.9	101	98.6	96.8	102	101	101	101	100	99.5
Rolled cake	0	101	99.0	93.5	98.2	91.5	73.7	55.6	44.7	24.2	21.6
	30	99.0	101	101	97.5	101	99.6	92.9	88.2	72.1	68.6
	50	100	99.0	99.2	98.8	98.8	99.6	96.9	96.6	93.5	93.0
	80	101	101	97.4	99.3	100	99.3	95.2	95.9	93.7	94.0
Miso	0	88.0	92.5	90.0	79.0	78.2	79.5	60.8	54.0	28.8	26.0
	30	93.1	93.4	91.4	84.7	97.5	91.4	86.0	82.7	68.6	65.6
	50	97.8	97.4	96.5	89.4	96.9	98.8	96.5	95.2	91.9	91.2
	80	98.4	99.3	98.3	85.4	97.7	101	98.7	97.5	96.1	95.6

Samples were spiked at 100 μ g/g.

とが分かった。

2) 透析 抽出法には、操作の簡便性から岡山ら¹⁰⁾の透析法を用いることとした。試料に各保存料を 100 μ g/g になるように添加し、各種の食品への適応性を検討した。透析用溶液に水を用いたこの方法は SA, BA, SoA 及び DHA については回収率はおおむね良好であったが、脂質の多い食品での PHBA エステル類の回収率は極めて低く、その分子量が大きくなるほど顕著に低下した。これは PHBA エステル類が油脂との親和性が水より高く、透析外液に移行しにくいいため、回収率の低下をもたらしたものとされる。

そこで、PHBA エステル類の透析用溶液への移行率を高めるために透析用溶液にメタノールを加えることにした。透析用溶液の最適メタノール濃度について、メタノール濃度が 30, 50 及び 80 % となるように設定し、各種食品を用いて検討した。そのうち、ピーナッツバター、ロールケーキ及び味噌についての結果を Table 2 に示した。回収率はメタノール濃度が増えるにしたがっていずれの保存料もおおむね上昇した。特に脂質の多い食品で PHBA エステル類

の回収率の顕著な上昇が見られた。脂質含量の多いピーナッツバターでは 80 %メタノールで各 PHBA-エステル類の回収率はほぼ 100 %であった。特に表には示していないがマヨネーズ、チーズ等でも 95%以上の回収率が得られた。脂質含量の比較的少ないロールケーキや味噌ではメタノール濃度が 50 %以上で回収率は 90%以上の良好な結果が得られた。また、これら以外の清涼飲料水、醤油、果実ソースあるいはジャム等の油脂をほとんど含まない食品ではいずれの保存料とも 30 %メタノールでも十分な結果が得られた。

これらの結果から、80 %メタノールを用いると脂質含量に関わらず高い回収率を得ることが出来たため、透析用溶液のメタノール濃度は 80 %とした。

次に 80 %メタノールを用いて透析時間の検討を行った。Fig. 1 にピーナッツバターを用いたときの透析時間と回収率の関係を示したが、透析時間は室温、24 時間で十分であった。

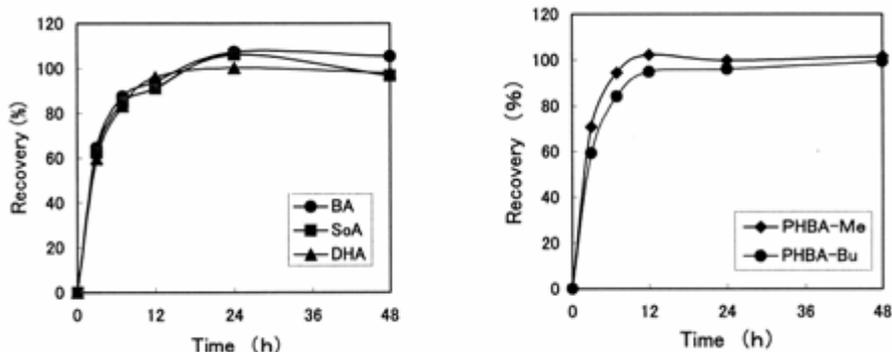


Fig.1 Effect of the Period of Dialysis on Recoveries of the Preservatives

Sample : peanut butter

Dialysis temp : room temperature

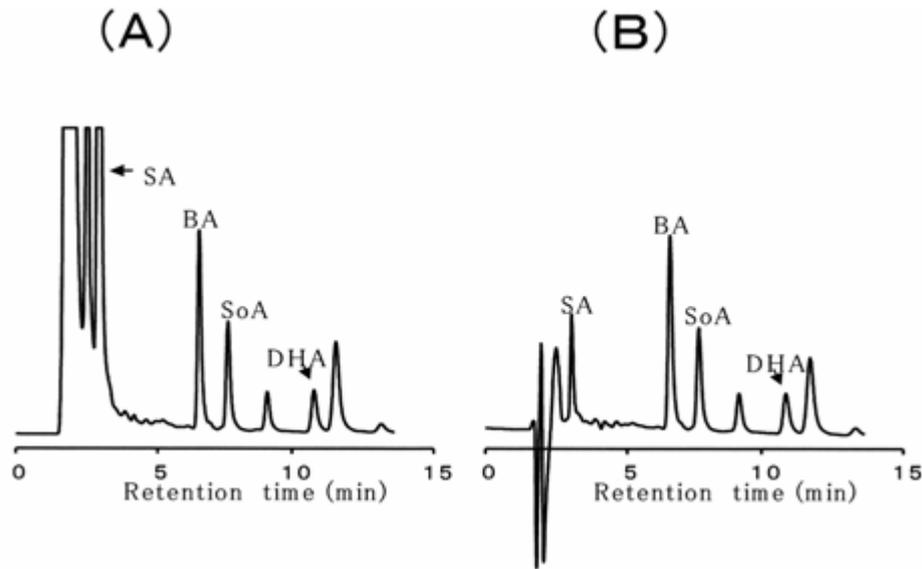


Fig.2 Chromatograms of SA, BA, SoA and DHA in Test Solution before and after Treatment with OASIS HLB Cartridge
 (A): before treatment with OASIS HLB cartridge
 (B): after treatment with OASIS HLB cartridge
 Sample was soy sauce.

2. クリーンアップ

透析外液をそのまま HPLC に負荷しても大半の試料では、クロマトグラム上妨害もなく十分定量が可能であった。しかし、特に味噌や醤油などの発酵食品ではリテンションタイムの早い SA において夾雑ピークとの分離が十分ではなく、定量の困難な場合が多かった。そこで、固相抽出カートリッジを用いたクリーンアップについて検討した。本法では BA や SoA のような強酸性物質から PHBA エステル類のような弱酸性物質まで、物性の大きく異なるものを分析対象としている。そこで、これらを一括処理することができること、さらに、透析用溶液のメタノール濃度が高いことを考慮して検討した結果、カートリッジには N-ビニルピロリドンとジビニルベンゼンの共重合体である OASIS HLB が最適であることが分かった。本カートリッジは、負荷溶液をリン酸酸性としメタノール濃度を 25 % 以下に調整することでいずれの保存料も保持することが可能であり、また、洗浄溶媒にメタノール・水(1:1)混液を使用しても保存料が溶出することは無く、大きなクリーンアップ効果を得ることができた。Fig. 2 にしょう油を試料とした時のカートリッジでの処理前(A)と処理後(B)のクロマトグラムを示した。特にリテンションタイムの早い SA 付近の夾雑物の低減効果は大きかった。

溶出に要するメタノール量は、SA, BA, SoA 及び DHA のカルボン酸型保存料では 5 mL でほぼ全量の溶出が可能であった。しかし、PHBA-エステル類ではカルボン酸型保存料と比べてやや溶出し難く、すべての PHBA-エステル類を溶出するのに 8 mL を必要とした。したがって、溶出液量は 10 mL とした。

3. HPLC

カートリッジカラムを用いてクリーンアップすることにより、発酵食品なども衛生試験法^⑥に採用されている一般的な HPLC 条件を準用することで良好なクロマトグラムが得られた。また、分析時間は 1 検体あたり約 20 分であった。

4. 添加回収率

6 種類の食品に各保存料を 100 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し、24 時間透析した後、本法にしたがって分析したときの回収率を Table 3 に示した。脂肪含有食品において水蒸気蒸留で回収率の低かった SA 及び PHBA-エステル類を含め、71.8~109 % と良好な回収率を示した。なお、定量限界は 10 $\mu\text{g/g}$ であった。

ま と め

未許可添加物 PHBA-Me 及び SA を含む 10 種の保存料の一斉分析法を開発した。

抽出に 80%メタノールを使用した透析法を用いた本法は、水蒸気蒸留法においては油脂含有食品中の PHBA エステル類の回収率が低いという点を大幅に改善できたことで有用であった。

また、発酵食品ではさらに、カートリッジカラムによるクリーンアップを行うことにより、一般的な HPLC 条件での分析が可能となった。

添加回収率は 71.8 ~ 109 % であり、定量限界は 10 $\mu\text{g/g}$ であった。

本法は簡便であることから多数の試料を一括処理するのに適しているものと考えられる。

本研究は平成 12 年度厚生科学研究「食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究」の一環として行った。

Table 3 Recoveries of Preservatives Added to Foods

Sample	Recovery (%)									
	SA	BA	SoA	DHA	PHBA -Me	PHBA -Et	PHBA -isoPro	PHBA -Pro	PHBA -isoBu	PHBA -Bu
Soy sauce	85.0 ± 1.1	96.9 ± 1.1	93.5 ± 0.6	89.5 ± 3.5	97.0 ± 3.4	94.8 ± 3.3	94.3 ± 5.4	97.4 ± 3.3	97.4 ± 3.2	97.7 ± 5.1
Rolled cake	101 ± 0.7	101 ± 1.5	96.5 ± 1.2	97.1 ± 2.8	99.6 ± 1.7	99.3 ± 1.8	97.7 ± 2.2	97.3 ± 2.4	95.1 ± 3.0	94.0 ± 6.4
Cheese	71.8 ± 2.0	96.3 ± 4	98.4 ± 3.7	77.7 ± 3.2	108 ± 5.0	107 ± 5.4	105 ± 5.6	105 ± 5.6	102 ± 6.2	101 ± 6.4
Ham	101 ± 1.2	96.1 ± 3.7	98.7 ± 3.2	83.2 ± 3.2	105 ± 4.0	105 ± 4.4	102 ± 5.1	104 ± 4.9	100 ± 5.6	101 ± 5.6
Mayonnaise	109 ± 0.4	98.7 ± 0.8	102 ± 3.1	96.3 ± 0.9	104 ± 1.9	102 ± 2.1	99.5 ± 2.2	99.1 ± 2.2	95.3 ± 2.1	95.2 ± 2.9
Peanut butter	96.9 ± 3.8	101 ± 2.0	98.6 ± 1.2	96.8 ± 2.0	100 ± 1.0	99.0 ± 1.9	99.0 ± 1.7	98.3 ± 1.2	98.3 ± 1.6	98.1 ± 1.6

Mean ± S.D., n=3, 100 μg spiked

Samples were dialyzed against 80 % methanol.

文 献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部企画課検疫所業務管理室：食品衛生研究，**51**(10)，113-167，2001．
- 2) 厚生労働省医薬局食品保健部企画課検疫所業務管理室：食品衛生研究，**52**(11)，113-167，2002．
- 3) 東京都健康局食品医薬品安全部食品監視課：平成 10 年度食品衛生関係違反処理集計表，32，2000，東京都健康局食品医薬品安全部食品監視課，東京．
- 4) 東京都健康局食品医薬品安全部食品監視課：平成 12 年度食品衛生関係違反処理集計表，32，2002，東京都健康局食品医薬品安全部食品監視課，東京．
- 5) 立花光雄，青山光雄，穴吹公子他：ラボ・レポート，第 14 号，34-38，1993．
- 6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2000，286-288，2000，金原出版，東京．
- 7) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編 2003，12-25，2003，日本食品衛生協会，東京．
- 8) 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講演要旨集，82-83，1998．
- 9) 松野伸広，加藤文秋，石橋 亨，伊藤 武，坂井千三，川崎洋子，石綿 肇，山田 隆：日本食品衛生学会第 78 回学術講演会講演要旨集，52，1999．
- 10) 岡山明子，田中 健，玉置守人：日食化誌，5，153-158，1998．