

透析法を用いた食品中9種保存料のLC-PDA一斉分析およびLC-MS/MS確認試験法

坂牧 成恵^{a,b}, 貞升 友紀^a, 松本 ひろ子^b, 前 潔^b, 門間 公夫^a

食品中の保存料の分析は水蒸気蒸留法が一般的であるが、当センターでは簡便性と多検体一括処理・同時分析が可能であることから、透析法を日常の分析法として用いている。今回、透析法による9種保存料（安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類）のLC一斉分析とLC-MS/MSを用いた確認法を検討した。透析には30%メタノールを用い、食品から保存料を抽出した。高脂質・高タンパク試料では80%メタノールを使用し透析を行った。本法を用いて各種食品の添加回収試験を実施したところ、いずれの保存料も90%以上の回収率が得られた。LC-MS/MSによる確認はProduct ion scanning法を用い、ESI（-）モードにより9種保存料のいずれも[M-H]⁻の脱プロトン化分子イオンを観察することができた。

キーワード：保存料, 安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸, パラオキシ安息香酸エステル類, 透析, LC, LC-MS/MS, 食品, 食品添加物

はじめに

食品中の保存料の分析は水蒸気蒸留-LCによる方法が一般的であるが、水蒸気蒸留による抽出ではパラオキシ安息香酸（PHBA）エステル類の回収率が低いといった欠点があり、その点を改良すべく直接抽出や固相抽出との併用等各種抽出法が開発されている¹⁻⁵⁾。食品衛生検査指針⁶⁾あるいは衛生試験法・注解2015⁷⁾では、高タンパク質食品および高脂肪食品においては蒸留操作の前にメタノール・水（1：1）混液でホモジナイズした上清を水蒸気蒸留に付すとの注解が示されている。また、衛生試験法・注解2015および平成22年5月の厚生労働省通知⁸⁾では、対象をPHBAエステル類の試験法に限って溶媒抽出法が記載されている。

当センターでは、簡便性と多検体一括処理・同時分析が可能といった点から、粕谷らの方法¹⁾による透析法を日常の分析法として採用しているが、80%メタノールを用いた方法であり透析膜が硬化して扱いにくいことや使用溶媒量が多い等の欠点がある。そこで今回、30%メタノールを用いた透析法による9種保存料の一斉分析およびLC-MS/MSを用いた確認法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

東京都内で購入した清涼飲料水、しょうゆ、漬け物、ビスケット、ジャム、ピーナッツバター、マヨネーズ、くん製いか、ウインナーを用いた。

2. 試薬等

1) 標準品：安息香酸（BA）、ソルビン酸（SoA）、パラオキシ安息香酸メチル（PHBA-M）パラオキシ安息香酸エチル（PHBA-E）、パラオキシ安息香酸ブチル（PHBA-

nB）は和光純薬工業（株）製、デヒドロ酢酸（DHA）、パラオキシ安息香酸イソプロピル（PHBA-*i*P）、パラオキシ安息香酸プロピル（PHBA-*n*P）、パラオキシ安息香酸イソブチル（PHBA-*i*B）は東京化成工業（株）製を用いた。

2) メタノール：高速液体クロマトグラフ用を用いた。

3) アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用あるいはLC-MS用を用いた。

4) その他の試薬：塩化ナトリウムは局方を、その他の試薬は特級を用いた。

5) 標準原液および混合標準溶液：各標準品をそれぞれ100 mg量り、メタノールで100 mLに定容したものを標準原液（各1,000 μg/mL）とした。各標準原液をメスフラスコに採り30%メタノールで希釈して100 μg/mL混合標準溶液を作製し、30%メタノールで適宜希釈して0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg/mLの系列の混合標準溶液を調製した。水蒸気蒸留法では、混合標準溶液を水で希釈して調製した。

6) 透析膜：透析用セルロースチューブ36/32（平面幅44 mm, 直径28 mm, 壁厚0.0203 mm, 分画分子量12,000～14,000, Viskase Sales社製）

3. 添加方法

液体試料はそのまま、固形試料については粉碎・細切し、均一化したものに混合標準溶液を試料あたり各保存料が0.10 g/kgとなるよう添加し、十分に混和した後、室温下で一昼夜（24時間）以上放置した。

4. 試験溶液の調製

試料10.0 gを採り、30%メタノール約30～50 mLを用いて透析膜に充てんし、よく混和して上端を密封した。これを

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター多摩支所食品衛生研究科（当時）

Table1. Operating Conditions of LC-MS/MS

	BA	SoA	DHA	PHBA-M	PHBA-E	PHBA-iP	PHBA-nP	PHBA-iB	PHBA-nB
Column	ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm i.d.×100 mm, 1.8 μm)								
Column temperature	40°C								
Mobile phase	45% CH ₃ CN								
Flow rate	0.2 mL/min								
Injection volume	1 μL								
Ionization	ESI negative								
Analysis mode	Product ion scanning (m/z 50-250)								
Capillary voltage	3.5 kV								
Desolvation gas flow	N ₂ 800 L/hr								
Cone gas flow	N ₂ 50 L/hr								
Source temperature	120°C								
Desolvation temperature	400°C								
Cone voltage	25 V	20 V	15 V	30 V	35 V	30 V	35 V	35 V	30 V
Collision voltage	10 eV	10 eV	10 eV	15 eV	15 eV	15 eV	15 eV	20 eV	15 eV
Precursor ion	m/z 121	m/z 111	m/z 167	m/z 151	m/z 165	m/z 179	m/z 179	m/z 193	m/z 193

メスシリンダーに入れ、30%メタノールで全量を200 mLとし、時々揺り動かしながら室温にて24時間透析を行った。得られた透析外液を0.45 μmのメンブランフィルターでろ過し、LC試験溶液とした。LC-MS/MSには、透析外液を水で希釈し0.2 μmのメンブランフィルターでろ過したものを供した。なお、ピーナッツバター、マヨネーズ等の高脂肪試料あるいはくん製いか、ウインナー等の高タンパク質試料については透析用溶液に80%メタノールを用いることとした。

比較のため、水蒸気蒸留法による抽出精製を厚生労働省通知⁸⁾に準じて行った。その際、透析法と同一希釈倍率となるように試料採取量は25.0 gとし、留液を500 mLとした。これを0.45 μmのメンブランフィルターでろ過したものをLC試験溶液、水で希釈後0.2 μmメンブランフィルターでろ過したものをLC-MS/MS試験溶液とした。

5. 装置

1) LC

Agilent Technologies社製1100series

2) LC-MS/MS

Waters社製ACQUITY UPLC/ Quattro Premier XE

6. 測定条件

1) LC条件

カラム：Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm), 移動相：A；メタノール・アセトニトリル・5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (1：2：7), B；メタノール・アセトニトリル・5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (5：4：11), A液 100→100→0→0→100% (0→10→15→27→30分) のグラジエント溶出, 流速：1.0 mL/min, カラム温度：40°C, 注入量：20 μL, 検出波長：230 nm (BA, SoAおよびDHA), 260 nm (PHBAエステル類)

2) LC-MS/MS

カラム：Waters社製 ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm (2.1 mm i.d.×100 mm), 移動相：45%アセトニトリル,

流速：0.2 mL/min, カラム温度：40°C, 注入量：1 μL, イオン化モード：ESI (-), デソルベーション温度：400°C, その他の条件はTable 1に示した。

結果および考察

1. 透析用メタノール溶液濃度の検討

高脂肪試料, 高タンパク質試料では透析法でも PHBA エステル類の回収率が低いため¹⁾, 透析用メタノール溶液の濃度について検討を行った。

マヨネーズを用いて, メタノール濃度が 30, 50, 60, 70, 80 および 90%の透析用溶液で 9 種保存料の添加回収試験を行った。Fig.1 に示したとおり, メタノール濃度 30%の場合, BA, SoA, DHA および PHBA-M については回収率が 75%以上であったが, その他の PHBA エステル類についてはアルキル基の炭素数が増えるほど回収率が低下し, PHBA-nB および PHBA-iB では 25%程度の回収率であった。メタノール濃度が高くなるにしたがい, PHBA エステル類の回収率が上昇し, メタノール濃度 80%以上で 9 種保存料の回収率が 90%以上得られたことから, 高脂肪試料について透析用メタノール溶液の濃度を 80%とした。漬け物やしょうゆ等の一般的な食品についてはメタノール濃度が 30%でも 9 種保存料いずれも良好な結果が得られたことから, スクリーニングには, 30%メタノールを用いた透析法で十分対応可能であった。

2. 添加回収試験

あらかじめ保存料を含有していないことを確認した市販の9種類の食品に, BA, SoA, DHA およびPHBAエステル類をそれぞれ0.10 g/kgとなるように添加して回収試験 (n=3) を行った。

水蒸気蒸留法による結果をTable 2に, 透析法による結果をTable 3に示した。粕谷らの方法では, 透析に80%メタノールを用いているが, 今回, 一般的な食品として清涼飲料水, しょうゆ, 漬け物, ビスケットおよびジャムには, 30%メタノールを透析用溶液として用いた。またピーナツ

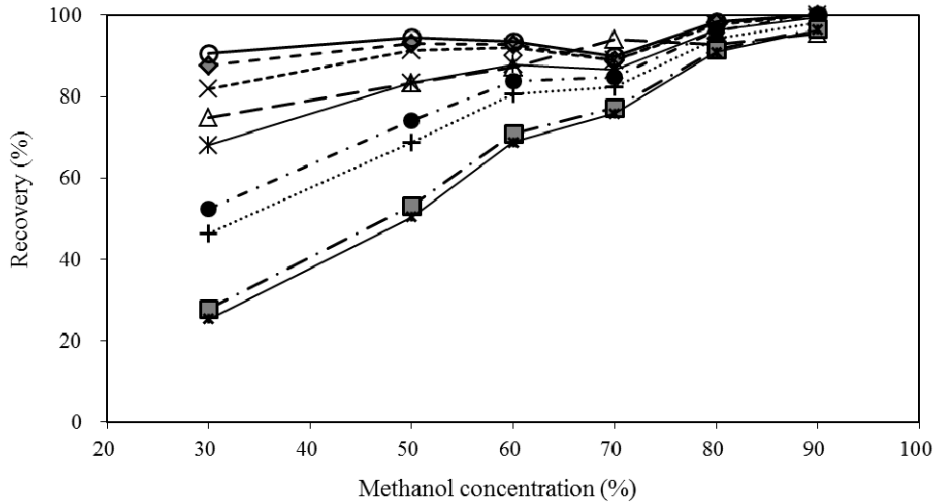


Fig.1. Effect of concentration of methanol on the recoveries of preservatives by dialysis

The sample was mayonnaise spiked with BA, SoA, DHA, PHBA-M, PHBA-E, PHBA-i P, PHBA-n P, PHBA-i B and PHBA-n B, 0.10g/kg each.

-◇- BA -○- SoA -△- DHA -x-x- PHBA-M -*- PHBA-E
 -●- PHBA-iP -+... PHBA-nP -■- PHBA-iB -*- PHBA-nB

Table2. Recoveries of Preservatives from Various Foods by Steam Distillation

Samples	Recovery (%)								
	BA	SoA	DHA	PHBA-M	PHBA-E	PHBA-iP	PHBA-nP	PHBA-iB	PHBA-nB
Beverage	94.4±0.8	95.7±0.5	90.4±1.6	53.3±1.3	88.2±1.8	99.0±0.6	96.7±0.8	97.7±0.4	97.1±0.4
Soy souse	97.8±1.0	92.1±12	93.9±1.3	53.9±1.6	87.7±0.9	101±1.3	98.7±1.1	98.2±1.6	97.7±1.7
Pickle	100±0.9	102±1.5	87.3±6.2	49.6±3.5	79.2±3.3	92.8±1.3	86.5±1.9	82.3±1.6	77.4±1.7
Biscuit	95.2±3.6	94.3±3.5	90.8±0.7	31.6±1.1	46.3±0.8	59.6±0.7	43.5±0.4	40.6±0.2	32.1±0.1
Jam	97.0±0.9	96.3±0.6	90.7±1.2	46.2±2.3	78.6±2.4	95.7±1.2	92.2±1.5	95.8±1.1	94.9±1.2
Peanut butter	90.7±1.2	84.5±1.0	87.0±1.0	24.9±0.7	26.9±0.7	28.7±0.9	18.4±0.6	14.1±0.5	10.0±0.3
Mayonnaise	93.9±0.2	94.6±1.2	84.2±3.4	24.9±0.2	22.9±0.3	23.5±0.3	14.4±0.2	10.5±0.2	7.5±0.1
Seasoned and smoked squid	86.3±1.3	86.3±1.3	80.1±2.5	26.4±1.1	37.9±0.7	49.5±0.6	37.2±0.2	36.4±0.5	30.1±0.3
Sausage	90.5±2.2	106±2.1	75.6±2.1	28.9±1.0	34.6±0.4	38.4±0.2	27.1±0.2	22.4±0.4	17.3±0.4

Mean±S.D.(n=3); spiked at 0.10 g/kg

Table3. Recoveries of Preservatives from Various Foods by Dialysis

Samples	Recovery (%)								
	BA	SoA	DHA	PHBA-M	PHBA-E	PHBA-iP	PHBA-nP	PHBA-iB	PHBA-nB
Beverage*	99.3±0.6	99.1±0.5	98.9±0.7	99.0±0.6	98.7±0.6	98.1±0.7	97.6±0.7	95.5±1.0	95.0±1.1
Soy souse*	101±1.0	98.1±14	91.3±0.7	99.5±0.7	98.8±0.7	97.6±0.6	97.3±0.6	95.1±0.8	94.6±0.9
Pickle*	102±1.5	102±0.6	98.7±0.5	99.8±0.2	99.3±0.6	98.0±0.7	96.8±0.8	91.0±0.9	89.3±1.0
Biscuit*	102±1.2	102±2.1	102±1.6	90.7±0.8	84.3±1.3	74.3±1.9	68.2±2.0	48.8±3.0	44.3±2.9
Jam*	97.5±0.7	96.5±0.6	95.7±0.8	98.1±0.7	97.3±0.8	96.7±1.1	96.4±1.1	94.6±1.8	94.1±2.0
Peanut butter**	103±0	97.9±0.3	97.8±0.5	100±0.6	99.6±0.5	98.6±1.3	98.2±0.9	95.8±1.5	95.2±1.3
Mayonnaise**	101±1.4	101±1.2	94.9±1.8	100±1.1	99.8±1.3	101±2.1	98.7±1.6	96.9±1.5	96.5±1.5
Seasoned and smoked squid**	97.8±1.2	97.4±1.3	84.6±1.0	99.6±0.6	99.4±0.7	99.9±1.2	99.3±0.9	99.0±1.1	99.0±1.2
Sausage**	103±0.6	114±0.6	91.9±0.6	101±0.6	99.6±0.2	101±0	102±1.0	99.1±0.5	98.8±0.5

Mean±S.D.(n=3); spiked at 0.10 g/kg

*; Samples were dialyzed against 30% methanol.

**; Samples were dialyzed against 80% methanol.

ツバター、マヨネーズ、くん製いか、ウインナーには80%メタノールを透析に用いた。ビスケットでPHBA-*n*P, PHBA-*i*B, PHBA-*n*Bの回収率がそれぞれ68.2%, 48.8%, 44.3% (水蒸気蒸留法回収率: 43.5%, 40.6%, 32.1%)であり、十分な回収率とはいえ今後検討を要する結果であった。しかし水蒸気蒸留法ではPHBAエステル類の回収率が10%未満~30%程度と低値であったピーナツバター、マヨネーズ、くん製いか、ウインナー等の試料において、透析法では回収率84.6%以上と良好な結果が得られた。特にPHBA-Mに関しては、水蒸気蒸留法では24.9~53.9%であった回収率が、いずれの試料についても90%以上と良好な結果が得られた。なお、LC定量限界は試料あたり0.005 g/kgであった。

3. LC-MS/MSによる確認

透析外液を用いてLC-MS/MSによる確認法の検討を行った。

LC条件はT3カラムを用いた逆相系の分析条件を用いることとした。移動相には水、アセトニトリルの2液を用い、混合比を検討したところ、50%アセトニトリルではSoAとDHAの分離が十分でなかったが、45%、40%および35%アセトニトリルではクロマト上良好な分離が得られた。しかし、移動相のアセトニトリルの比率が低くなるとピーク強

度が低下していく傾向があり、アセトニトリル比が45%のときが9種保存料の分離・ピーク強度とも良好であり、1分析あたり7分で全ての成分を検出することができたことから、45%アセトニトリルを移動相とした。

MS/MSによる測定は、確認を目的とすることからProduct ion scanning法を用い、標準品と試料から生成されたプロダクトイオンのマスペクトルを比較することで同定を行うこととした。イオン化には、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のネガティブモードを選択したところ、9種保存料のいずれも[M-H]⁻の脱プロトン化分子イオンを観察することができた。そこでBAは m/z 121, SoAは m/z 111, DHAは m/z 167, PHBA-Mは m/z 151, PHBA-Eは m/z 165, PHBA-Pは m/z 179, PHBA-Bは m/z 193をプリカーサーイオンとし、プロダクトイオンを観察するためのコーン電圧およびコリジョンエネルギー等の検討を行った結果、Table 1に示したイオン化条件が最適であった。Fig.2にBA, SoA, DHA, PHBA-M, PHBA-E, PHBA-*i*P, PHBA-*n*P, PHBA-*i*B, PHBA-*n*B各標準溶液のマスペクトルを示した。添加した試料について、試料溶液の保持時間、ピーク形状およびマスペクトルは、標準溶液とよく一致した。なお、MS/MSによる測定について、Product ion scanningモードでは1 $\mu\text{g/mL}$ まで、MRMモードでは0.01 $\mu\text{g/mL}$ までの分析が可能であった。

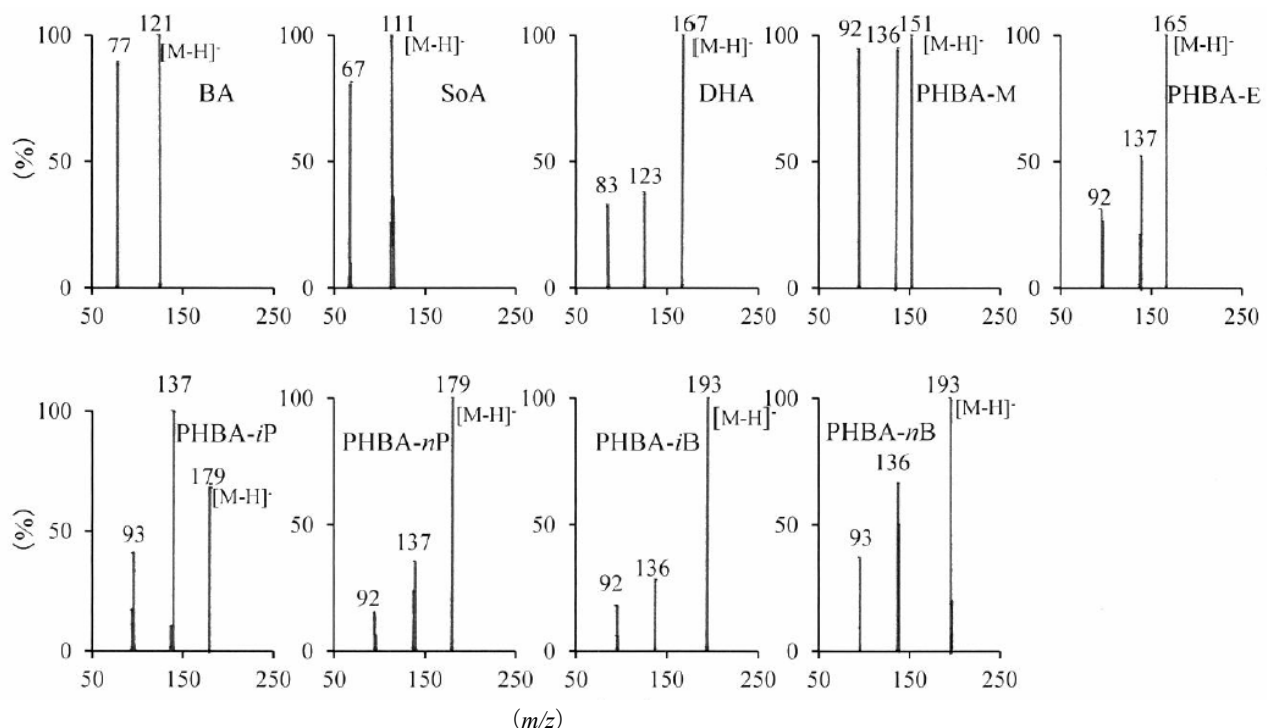


Fig.2 Mass Spectra of Product Ion Scanning of BA, SoA, DHA and PHBA Esters Standard Solution

ま と め

食品中の保存料について、30%メタノールを用いた透析法により抽出を行い、LC分析とLC-MS/MSによる確認法を検討した。ピーナッツバターやマヨネーズ、くん製いか・ウインナーといった高脂肪あるいは高タンパク食品ではメタノール濃度を80%とすることで十分な回収率が得られた。特にPHBA-Mでは、蒸留法で25~54%程度であった回収率が、透析法を用いることでいずれの試料についても90%以上と良好な結果であった。定量限界は、試料あたり0.005 g/kgであった。LC-MS/MSによる確認はProduct ion scanning法を用い、ESI (-) モードにより9種保存料のいずれも[M-H]⁻の脱プロトン化分子イオンを観察することができ、確認法として有用であった。

文 献

- 1) 粕谷陽子, 松田敏晴, 中里光男, 他: 東京健安研七 年 報, **54**, 104-108, 2003.
- 2) 都田路子, 山田洋子, 天川映子, 他: 東京健安研七 年 報, **55**, 101-106, 2004.
- 3) 岸 弘子, 山田利治: 食衛誌, **48**, 58-63, 2007.
- 4) 氏家愛子, 長谷部 洋, 千葉美子, 他: 食衛誌, **48**, 163-169, 2007.
- 5) 多田浩之, 永井宏幸, 白木康一, 他: 岐阜県保健環境研究所報, **15**, 6-12, 2007.
- 6) 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.
- 7) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解2015, 329-334, 2015, 金原出版, 東京.
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長: 食安基発0528第3号, 食品中の食品添加物分析法の改正, 別添2 (通知), 平成22年5月28日.

Determination of Nine Preservatives in Foods by LC-PDA and LC-MS/MS Using the Dialysis MethodNarue SAKAMAKI^{a,b}, Yuki SADAMASU^a, Hiroko MATSUMOTO^b, Kiyoshi MAE^b and Kimio MONMA^a

Steam distillation is the official method used to analyze the preservative contents of foods. However, dialysis is also a commonly used method that is efficient and can be applied simultaneously. In this study, the ability to detect the presence of nine kinds of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid, methyl *p*-hydroxybenzoate, ethyl *p*-hydroxybenzoate, isopropyl *p*-hydroxybenzoate, propyl *p*-hydroxybenzoate, isobutyl *p*-hydroxybenzoate and butyl *p*-hydroxybenzoate) by liquid chromatography-photo diode array (LC-PDA) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using dialysis extraction was investigated. These preservatives were extracted by dialysis against 30% methanol for all foods except high-protein and high-fat foods, which were dialyzed against 80% methanol. The recovery of preservatives from the various kinds of foods was above 90%. The mass spectral acquisition was conducted in electrospray ionization (ESI) negative ion mode by product ion scanning, which corresponded to the $[M-H]^-$ of the nine kinds of preservatives.

Keywords: preservative, benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid, esters of *p*-hydroxybenzoic acid, dialysis, LC, LC-MS/MS, food, food additive

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out.