

迅速透析法を用いた食品中保存料・甘味料同時抽出の検討

山本 純代^a, 田原 正一^a, 塩澤 優^a, 高橋 夏生^a, 石井 悦子^a, 馬場 糸子^a,
山嶋 裕季子^a, 坂牧 成恵^a, 小林 千種^a

食品中の6種甘味料分析用に開発した迅速な改良透析条件を保存料分析にも適用可能かどうか検証した。保存料として安息香酸、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（メチル、エチル、イソプロピル、プロピル、イソブチル及びブチル）の9種について、透析液に30%メタノール、水温50°Cに設定した恒温振とう水槽中で1時間透析し、HPLCで測定した。添加回収試験では、従来法（透析液30%メタノール、常温、透析24時間）と同等の回収率が得られた。保存料を使用する市販食品を用い、本法と従来法を比較した結果、定量値は同等であった。従来法の透析条件を改良透析条件に替えるだけで迅速化が達成された。さらに、これまで別々に行っていた甘味料と保存料の前処理を統合することで、日常の検査業務のより一層の効率化が可能となることが示された。

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，甘味料，透析，HPLC，食品

はじめに

食品中の保存料の抽出において、厚生労働省の通知¹⁾では水蒸気蒸留法（蒸留法）等が示されているが、同時に多数の検体を扱うことが困難である。そこで当センターでは、操作が簡便かつ、多検体を同時に処理可能な透析法をスクリーニング目的で採用し、検査不能または違反を疑う場合は、通知に基づき検査を行っている。透析法では、食品により最適な透析液組成は異なるが^{2,4)}、スクリーニング分析としては30%メタノールで十分対応可能である³⁾（従来法）。しかし常に効率化が求められる行政検体処理において、従来法は透析終了まで24時間要する点で課題を有している。

一方、我々は食品中の6種甘味料、すなわちアスパルテーム、アセスルファムカリウム、サイクラミン酸ナトリウム、サッカリンナトリウム、ズルチン、スクラロースの分析において、従来法と同様の30%メタノールを透析液に採用し、透析終了まで1時間となる透析条件（改良透析条件）を確立した⁵⁾。

今回、行政検体処理のより一層の効率化を目的とし、改良透析条件が保存料にも適用可能かどうか検討を行った。

なお、本研究では、安息香酸（BA）、ソルビン酸（SoA）、デヒドロ酢酸（DHA）、パラオキシ安息香酸エステル類（P-Es）、すなわち、パラオキシ安息香酸メチル（P-Me）、同エチル（P-Et）、同イソプロピル（P-iP）、同プロピル（P-nP）、同イソブチル（P-iB）及び同ブチル（P-nB）を検討項目とした。

実験方法

1. 試料

1) 透析条件の検討及び添加回収試験用試料

東京都内で購入し、あらかじめ対象の保存料を含まない、清涼飲料水、しょう油、ジャム、しょう油漬け漬物、ビスケットを試料として用いた。

2) 保存料含有試料

東京都内で流通し、原材料名に安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、パラオキシ安息香酸エステル類の簡略名の表示がある清涼飲料水、食肉加工品、漬物、合計104検体を試料として用いた。

2. 標準品・試薬等

1) 標準品

BA：富士フィルム和光純薬工業（株）製、試薬特級、SoA：富士フィルム和光純薬工業（株）製、和光特級、DHA：東京化成工業（株）製、東京化成1級、P-Me、P-Et、P-iP、P-nP、P-iB、及びP-nB：東京化成工業（株）製、東京化成特級。

2) 標準溶液

(1) 標準原液 BA、SoA、DHA、P-Me、P-Et、P-iP、P-nP、P-iB及びP-nB 50 mgを精密に量り、メタノールに溶解し、各々全量を50 mLとした（各々の濃度は1,000 µg/mL）。

(2) 添加用混合標準溶液 BA、SoA、DHA標準原液各5 mL及びP-Me、P-Et、P-iP、P-nP、P-iB、P-nB標準原液2.5 mLをメタノールで50 mLとした（各々の濃度はBA、SoA、DHA：100 µg/mL、P-Me、P-Et、P-iP、P-nP、P-iB、P-nB：50 µg/mL）。

3) 透析液

30% (V/V) メタノール

4) その他の試薬

メタノールはHPLC用を、その他の試薬は特級を用いた。

^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

3. 器具及び装置

1) 透析膜

透析用セルロースチューブ36/32 (透過分子量14,000, 孔径50 Å, 平面幅44 mm, 直径28 mm, 壁厚0.0203 mm, Viskase社製) を, あらかじめ65 cmに切り, 精製水で数回水洗した. 一端を止め結びにして, 使用時まで透析液中で冷蔵保管した.

2) 透析容器

遠沈管 (100 mL, レーザーマーカ目盛り付き, AGCテクノグラス (株) 製)

3) メンブランフィルター

Millex®-LG (孔径0.20 µm, 親水性, PTFE, 直径13 mm, メルク (株) 製)

4) HPLC

Prominence-i LC-2030C 3D (島津製作所製)

4. HPLC条件

カラム: Cosmosil 3C18-AR-II (3.0 mm i.d.×100 mm, 3 µm), カラム温度: 40°C, 移動相: A液; 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液; メタノール・アセトニトリル (1:2), グラジエント条件: A液 100% (0-6分) →70% (10.5-25分) →100% (25.1-35分), 流速: 0.8 mL/min, 注入量: 10 µL, 測定波長: 230 nm (BA, SoA及びDHA), 260 nm (P-Es) 及び310 nm (DHA, 230 nmで夾雑ピークが認められた場合の参考波長).

5. 試験溶液の調製

液体試料はそのまま, 固形試料はフードプロセッサーで細切し均質化した. その10.0 gを採取し, 透析液30 mLを用いて透析膜に充填し, 空気が入らないよう止め結びで密封した (有効長50 cm). 内容物を全体に行き渡らせ, あらかじめ透析液を約50 mL入れておいた透析容器に緩く4つに折り畳むように入れた. 透析膜に挟まっている空気をガラス棒やスパテルで除去しながら透析液で全量を100 mLとした. 透析容器を密栓して, 透析膜が全体に行き渡るよう上下に約10回振った後, 水温50°C, 160 rpmに設定した恒温振とう水槽に, 透析容器が縦になるよう設置し, 1時間透析した. 室温まで放冷した後, 透析膜外側の溶液を0.20 µmのメンブランフィルターでろ過し, 試験溶液とした. 従来法は, 坂牧らの報告³⁾に準じた. ただし, 試料の充填には透析液20 mLを用い, 透析膜の有効長を15 cm

とした. 全量200 mLに定容後, メスシリンダーの口を密封した. 透析開始直後から1時間ごと (日中) に約10回上下反転に混和して24時間透析を行った. 透析膜外側の溶液を0.45 µmのメンブランフィルターでろ過し, 試験溶液とした.

6. 検量線

標準原液を30%メタノールで希釈し, BA, SoA, DHAが0.5 (P-Esが各0.25), 1 (0.5), 2.5 (1.25), 5 (2.5), 10 (5) µg/mLの検量線用混合標準溶液を調製した. これらの溶液をHPLCに注入し, ピーク面積による絶対検量線法を用いて検量線を作成した. 定量下限値は厚生労働省通知¹⁾に示された0.01 g/kg (BA, SoA, DHA), 0.005 g/kg (P-Es) とした.

7. 添加回収試験

1) 添加方法

試料10.0 gをビーカーに採取し, 添加用混合標準溶液を定量下限値の倍量濃度, すなわち, BA, SoA, DHAが0.02 g/kg, P-Esが0.01 g/kgになるよう添加した. スパテルで混和した後, 30分間以上室温に静置した.

2) 添加回収率の算出方法

各添加回収試験時に, 試料に添加した標準溶液の同量を透析容器に入れ, 透析液で100 mLに定容した溶液を調製した. これらの溶液中の各保存料のピーク面積を100%として, 平均値および相対標準偏差 (RSD%) で表した. 試行回数は5回で行った.

結果及び考察

1. 改良透析条件における回収率の経時変化

当センターにおける保存料分析の対象となる行政検体は, 甘味料とほぼ共通である. 我がが甘味料分析の効率化を目的に開発した改良透析条件が保存料にも適用可能ならば, 甘味料および保存料を同時に抽出することで, さらなる効率化が図れると考えた. そこで, 保存料含有試料として搬入されるウインナーを用いて, 改良透析条件における回収率の経時変化を確認した. なお, 測定は各保存料の分離が良好な山嶋ら⁴⁾の方法に準じた. Table 1に示したとおり, BA, SoA, DHAの回収率は良好であったが, P-Esの回収率は低く, 特にP-iP, P-nP, P-iB, P-nBは約70%以下であった. しかし, 透析1時間及び2時間の回収率に変化は無かったことから, 透析開始後1時間でプラトーに達している

Table 1. Effect of Dialyzing Time on Recoveries of Preservatives Spiked in Sausage by Using the Developed Method

dialyzing time (hr)	Recovery (%)								
	BA	SoA	DHA	P-Me	P-Et	P-iP	P-nP	P-iB	P-nB
1	102.6 (0.91)	112.2 (0.91)	98.5 (0.91)	90.8 (0.44)	82.1 (0.33)	70.0 (1.22)	65.1 (1.77)	26.7 (1.00)	38.5 (1.01)
2	100.5 (1.26)	109.3 (1.13)	94.7 (1.33)	90.4 (1.40)	82.7 (1.77)	70.7 (3.37)	64.9 (5.45)	27.8 (3.83)	40.6 (3.25)

BA, SoA, DHA were spiked at 0.02 g/kg, P-Me, P-Et, P-iP, P-nP, P-iB, P-nB were spiked at 0.01 g/kg. Each value represents the mean (RSD) (%) of five experiments.

Table 2. Recoveries of Preservatives Spiked in Various Foods

Food	Recovery (%)								
	BA	SoA	DHA	P-Me	P-Et	P-iP	P-nP	P-iB	P-nB
Soft drink	98.9 (1.52)	98.6 (1.55)	99.4 (1.48)	99.1 (1.43)	98.3 (1.46)	98.9 (1.43)	98.6 (1.42)	97.6 (1.55)	97.4 (1.48)
Soy souce	100.8 (0.62)	100.4 (0.60)	97.3 (0.75)	100.3 (0.80)	100.9 (0.93)	100.9 (0.78)	100.5 (0.66)	100.3 (0.74)	99.8 (0.76)
Jam	97.9 (1.44)	100.2 (1.34)	96.6 (1.47)	98.3 (1.06)	97.6 (1.31)	97.3 (1.19)	97.9 (1.22)	96.5 (1.43)	96.3 (1.38)
Pickles (Fukujin-zuke)	99.4 (1.75)	99.1 (1.84)	96.8 (1.78)	100.1 (1.64)	98.4 (1.83)	96.6 (1.93)	98.1 (1.94)	95.0 (2.17)	95.5 (2.12)
Biscuit	103.3 (1.06)	106.6 (1.12)	104.1 (1.11)	93.1 (1.19)	86.6 (1.67)	78.8 (2.35)	74.5 (2.51)	58.1 (3.78)	54.6 (4.27)

BA, SoA, DHA were spiked at 0.02 g/kg, P-Me, P-Et, P-iP, P-nP, P-iB, P-nB were spiked at 0.01 g/kg. Each value represents the mean (RSD) (%) of five experiments.

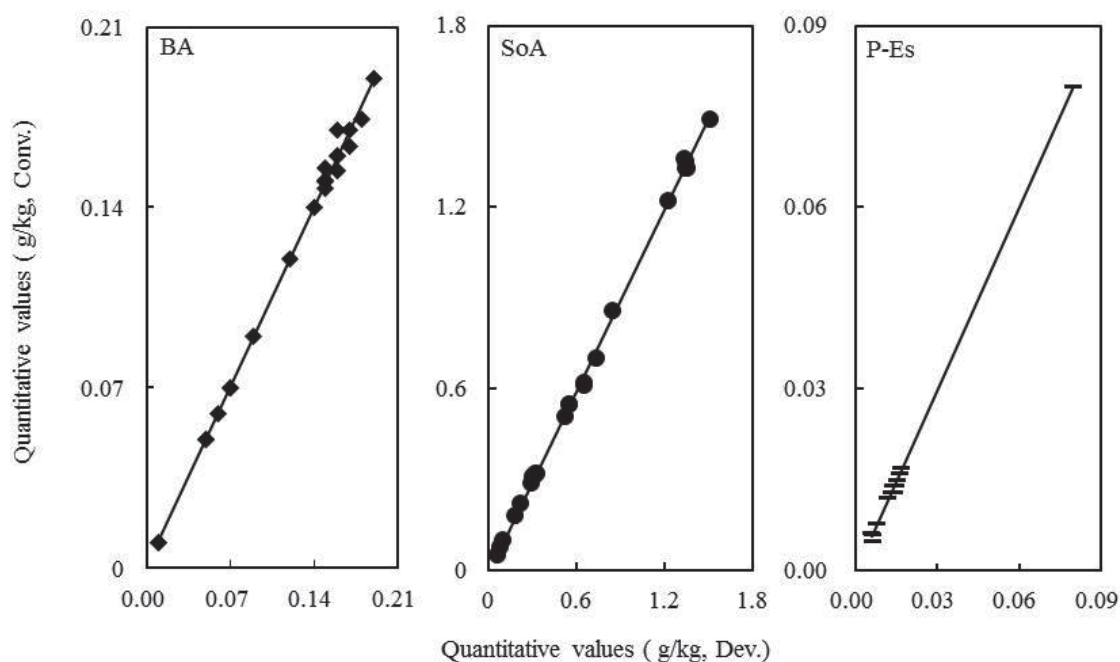


Fig. 1. Comparison of Conventional Method and Develop Method Using Commercial Foods

“Conv.” indicates the conventional method of the Sakamaki's report³⁾.

“Dev.” indicates the developed method in this report.

ことが示された。

坂牧らの報告³⁾にもあるように、高タンパク質試料や高脂肪試料からのP-Es回収率は低く、本検討で行った振とう回数増加や振とう時の加熱⁵⁾が回収率に影響することはなかった。しかし、従来法と同様の運用であれば、30%メタノールで十分対応可能である。従って、保存料の抽出にも透析1時間の改良透析条件が適用可能であることが示された。以上の結果、改良透析条件と山嶋らの測定条件を本法として、以降の検討を行った。

2. 添加回収試験

従来透析法と本法との同等性を比較するため、坂牧らの報告を参考に清涼飲料水、しょう油、ジャム、しょう油漬け漬物、ビスケットの5種の食品を用いて添加回収試験を

行った。Table 2に示したとおり、回収率は検討に用いた全ての食品、全ての保存料で坂牧らの報告³⁾と同程度の値が得られた。以上の結果より、従来法と本法との同等性が示された。

3. 従来透析法及び迅速透析法との比較

従来法と本法の比較を、市販の保存料含有食品計104品を試料として行った(試行回数1回)。Fig. 1には、表示があった安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、パラオキシ安息香酸の定量値を全て用いた散布図を作成した。最小二乗法による回帰直線を求めたところ、傾き0.95~1.00、相関係数0.998~0.999となり両定量値に差は認められなかった。

今回用いた市販食品で、P-Esを含有していたのは清涼飲

料水のみで、当センターでの検出事例も清涼飲料水やしょう油に限られている⁴⁾。また、検出事例のない高タンパク質食品や高脂肪食品において、30%メタノールを用いた透析法は、BA、SoA、DHA検出の有無を目的として検査が行われる。従って、通常、保存料の検出・定量には、本法を用い、必要に応じて高タンパク質食品および高脂肪食品には、透析液に80%メタノールを用いる方法^{2,3)}で判定が十分に可能である。

なお、DHA及び食品添加物として使用が認められていないP-Meを使用した食品は入手できなかった。

結 語

食品中の6種甘味料分析の前処理として開発された改良透析条件が、食品中の9種保存料分析にも条件を変更することなく、スクリーニング分析法として適用可能であることを確認した。従来、保存料の分析時間は、食品の細切から分析まで約2日要していたところ、本法により最短で半日程度と、大幅に短縮することが可能となる。さらに、従来別々に行っていた保存料と甘味料の透析工程を統合することで、15種の食品添加物が一度に抽出でき、年間あたり2,000本を超える透析処理数も半減できる。本研究成果により、日常の検査業務のより一層の効率化が可能となることが示された。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長：薬生食基発0628第1号，食品中の食品添加物分析法の改正について（通知），令和元年6月28日。
- 2) 粕谷陽子，松田敏晴，中里光男，他：東京健安研七年报，**54**, 104-108, 2003.
- 3) 坂牧成恵，貞升友紀，松本ひろ子，他：東京健安研七年报，**67**, 171-176, 2016.
- 4) 山嶋裕季子，岩越景子，田中麻梨恵，他：東京健安研七年报，**69**, 149-155, 2018.
- 5) 田原正一，山本純代，山嶋裕季子，他：食衛誌，**58**, 124-131, 2017.

Simultaneous Extraction of Preservatives and Sweeteners from Foods Through the Rapid Dialysis

Sumiyo YAMAMOTO^a, Shoichi TAHARA^a, Yuu SHIOZAWA^a, Natsumi TAKAHASHI^a, Etsuko ISHII^a, Itoko BABA^a,
Yukiko YAMAJIMA^a, Narue SAKAMAKI^a, and Chigusa KOBAYASHI^a

The rapid dialysis has been developed for the analysis of six sweeteners in foods. This method validated whether the rapid dialysis could be applied for the analysis of nine 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). We dialyzed preservatives in foods for 1 hour at a constant temperature of 50°C in a shaking water bath against 30% methanol as the dialysate. We analyzed the dialyzed samples using high-performance liquid chromatography. We conducted the recovery test on commercial foods with nine preservatives added. The recovery rate was the same as the rapid dialysis and the conventional method (which involves dialysis against 30% methanol at 23-25°C for 24 hours). The rapid dialysis allowed the time of dialysis to be reduced. To date, samples has been prepared separately for the analysis of sweeteners and preservatives, but our results indicated that integrating these analyses is feasible and may improve the efficiency of daily inspection work.

Keywords: preservative, benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid, esters of *p*-hydroxybenzoic acid, sweetener, dialysis, HPLC, food

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

