清涼飲料水及びビール中のパラオキシ安息香酸ヘプチルの分析法の検討

鈴木　理央[a]，馬場　糸子[a]，伊藤　彩子[a]，渡邊　趣衣[a]，齋藤　美里[c]，安井　明子[b]，
下井　俊子[a]，中村　理奈[a]，大塚　健治[a]

アメリカで清涼飲料水及びビールに使用が許可されている指定外添加物のパラオキシ安息香酸ヘプチルについて，抽出・精製の検討とHPLCによる定量法，LC-MS/MSによる確認法を検討した．透析液を80%メタノールとして，透析によるパラオキシ安息香酸ヘプチルの抽出・精製を行ったところ80%以上の回収率を得た．HPLCによる定量法ついては，日常検査を行う9種保存料と同時分析できるようにパラオキシ安息香酸ヘプチルの分析条件を検討し，良好な結果が得られた．パラオキシ安息香酸ヘプチルは0.05~1.25 μg/mLの範囲で直線性を示し，検出限界は0.05 μg/mLであった．LC-MS/MSによる定性確認はMRMモードを用い，2種のプロダクトイオンによる観察を行い，確認方法として有用であることを明らかにした．

キーワード：食品添加物，保存料，パラオキシ安息香酸ヘプチル，透析法，HPLC，LC-MS/MS

は　じ　め　に

我が国で許可されていない食品添加物は指定外添加物と呼ばれ，食品中から検出された場合は食品衛生法違反となる．食の安全確保のため，輸入食品検査における指定外添加物の適切な試験法開発が不可欠である．図1に示すパラオキシ安息香酸ヘプチル(PHBA-Hp)は、日本では食品に使用することが許可されていない食品添加物であるが、米国では炭酸飲料を除く清涼飲料水や麦芽発酵飲料への使用が許可されている[1)]．現在までにPHBA-Hpによる違反事例は報告されておらず，食品中のPHBA-Hpの簡便な分析法及び確認法はほとんど報告されていない[2)]．しかし今後PHBA-Hpを使用した清涼飲料水，ビールの輸入がされる可能性がある．著者らは日常9種の保存料（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チル，パラオキシ安息香酸イソプロピル，パラオキシ安息香酸プロピル，パラオキシ安息香酸イソブチル，パラオキシ安息香酸ブチル）について透析による検査を行っている．これにPHBA-Hpを加えた10種の保存料の一斉分析を目的とし、今回，PHBA-Hpについて透析法を用いた抽出精製およびHPLCによる定量法，LC-MS/MSによる確認法についての検討を行ったので報告する．

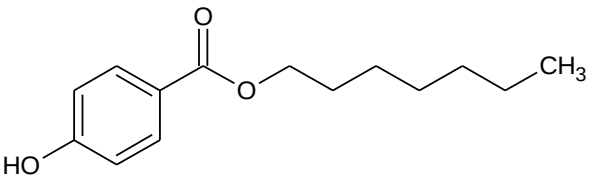

図1. パラオキシ安息香酸ヘプチルの構造式

実　験　方　法

1. 試料

保存料が使用されていないことを確認した市販の清涼飲料水5検体及び，ビール5検体を用いた．

2. 試薬及び試液

1) 標準品

安息香酸，ソルビン酸，パラオキシ安息香酸メチル，パラオキシ安息香酸エチル，パラオキシ安息香酸ブチル，パラオキシ安息香酸ヘプチルは富士フィルム和光純薬工業（株）製，デヒドロ酢酸，パラオキシ安息香酸イソプロピル，パラオキシ安息香酸プロピル，パラオキシ安息香酸イソブチルは東京化成工業（株）製を用いた．

2) メタノールおよびアセトニトリル

富士フィルム和光純薬工業（株）製の高速液体クロマトグラフ用を用いた．

3) 標準原液及び混合標準溶液

(1)標準原液：各標準品をそれぞれ100 mg量り，メタノールで100 mL としたものを標準原液（各1,000 μg/mL）とした．

(2)保存料10種一斉分析用混合標準溶液：各標準原液を適宜希釈して安息香酸，ソルビン酸，デヒドロ酢酸 50 μg/mL，7種のPHBAエステル（パラオキシ安息香酸エチル，パラオキシ安息香酸イソブチル，パラオキシ安息香酸プロピル，パラオキシ安息香酸イソブチル，パラオキシ安息香酸ブチル，パラオキシ安息香酸メチル，パラオキシ安息香酸ヘプチル） 25 μg/mLの10種混合標準溶液を調整した．これを30%メタノールで適宜希釈して安息

[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食品化学部食品成分研究科
[c] 当時：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

香酸，ソルビン酸，デヒドロ酢酸は 0.25～10.0 μg/mL，PHBAエステルは 0.05～5 μg/mLの範囲で保存料10種一斉分析用の混合標準溶液を調整した（LC分析用）．

(3)PHBA-Hp標準溶液：標準原液を適宜80%メタノールで希釈し，0.05～1.0 μg/mL の範囲で標準溶液を調整した（LC-MS/MS分析用）．

4) 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）を用いた．

3. 試験溶液の調製

粕谷らの透析法[3]に準じて行った．試料約10 gを採り，透析液(30%メタノールまたは80%メタノール)約50 mLを用いて透析膜に充てんし，上端を密封した後よく混和した．これをメスシリンダーに入れ，透析液で全量を200 mLとし，時々攪拌しながら室温で24時間透析を行った．得られた透析外液を水で2倍希釈し，メンブランフィルター(0.45 μm)でろ過したものをHPLC用試験溶液とした．LC-MS/MSには透析外液をメンブランフィルター(0.20 μm)でろ過したものを供した．

4. 装置

測定には以下の装置を用いた．

HPLC：Prominence-i LC-2030C 3D（(株）島津製作所製）

LC：ACQUITY UPLC I-Class PLUS，MS/MS：Waters Xevo TQ-S micro（Waters社製）

5. 測定条件

1) LC条件

カラム：Inertsil ODS-2（3.0 mm i.d.×150 mm，5 μm，ジーエルサイエンス社製），カラム温度：40℃，移動相：A液；5 mmol/L クエン酸緩衝液・メタノール・アセトニトリル（7:1:2），B液；メタノール・アセトニトリル（2:1），グラジエント条件：B液0%（0 min～5 min）→60%（20.6 min～28 min）→0%（28.1 min～33 min），流速：0.6 mL/min，注入量：5 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

表1に示した条件で測定した．

6. 添加回収試験

PHBA-Hpの米国での使用基準に即して清涼飲料水にはPHBA-Hpを10 μg/mL及び20 μg/mL，ビールには5 μg/mL及び10 μg/mLとなるようにPHBA-Hpを添加し，*n*=3で添加回収試験を行った．

表1. LC-MS/MS測定条件

カラム	ACQUITY UPLC HSS T3（Waters社）(2.1 mm i.d.×100 mm, 1.8 μm)
カラム温度	40℃
移動相	70%CH_3CN
流速	0.2 mL/min
注入量	1 μL
イオン化モード	ESI negative
測定モード	MRM
キャピラリー電圧	1.0 kV
デゾルベーションガス流量	N_2 1000 L/hr
コーンガス流量	50 L/hr
イオン源温度	150℃
デゾルベーション温度	400℃
コーン電圧	30 V
コリジョンエネルギー電圧	20 eV
プレカーサーイオン	*m/z* 235
プロダクトイオン	*m/z* 92（136）
	(　)は確認用イオン

結果及び考察

1. 透析液のメタノール濃度の検討

PHBAエステル類は油脂との親和性が水より高い．そのため高タンパク質，高脂質な食品については十分な回収率を得るために80%メタノールを用いて透析法が行われる．一方で清涼飲料水，しょう油，ジャム等の高タンパク質，高脂質でない一般的な食品については30%メタノールによる透析法でもPHBAエステル類の十分な回収率が得られることが報告されている[3,4]．

PHBA-Hpについては検査対象が清涼飲料水，ビールであることが想定される．そのため清涼飲料水としてオレンジジュースを用いて30%メタノールによる透析での添加回収を実施したところ，回収率が69%～73%であった．次に既報[3]の通り80%メタノールを用いて透析を行ったところ，回収率は90%以上となった．一方，当センターで日常の保存料検査の精度管理として用いているスポーツ飲料にPHBA-Hpを10 μg/mLとなるよう添加し，30%メタノールによる透析を行ったところ回収率は80%を超えた．オレンジジュースの30%メタノールによる透析での回収率が低い理由は不明であり，現在検討中である．現在，当センターの日常の保存料検査では，高脂質，高タンパク質食品の検査も行うことから透析液に80%メタノールを用いている．これらの理由および当分析法が保存料10種の一斉分析を目的としていることから，今回使用した試料は清涼飲料水及びビールであったものの，今回の検討ではいずれも回収率の良かった80%メタノールを透析液として採用した．

表2. 透析液の違いによる清涼飲料水中のパラオキシ安息香酸ヘプチルの添加回収結果(*n*=3)

透析液	30%メタノール		80%メタノール	
添加濃度(μg/mL)	10	20	10	20
回収率(%)	71.9	73.6	95.1	97.8
(RSD(%))	(2.3)	(1.1)	(0.8)	(0.7)

2. HPLC条件の検討

当センターで行っている9種保存料と同時分析が可能となるようにPHBA-Hpの分析法の検討を行った．現在日常の検査では岩越らの方法[5]を参考に，表3のHPLC分析条件で分析している．しかしこの条件でPHBA-Hpを分析に供したところ，移動相由来のピークとPHBA-Hpのピークが重なり測定が困難であった．そこで移動相B液の組成比率の検討を行ったところ，実験方法における5.測定条件の1) の条件で移動相由来のピークとPHBA-Hpのピークが分離し，その他の9種保存料についても良好な結果が得られた．このHPLC条件で作成したPHBA-Hpの検量線を図2に示した．検量線は0.05～1.25 μg/mLの範囲で決定係数は0.999と良好な直線性を示した．JISの高速液体クロマトグラフィー通則[6] に従い，*S/N*比10以上かつ変動係数が10%未満となる最小の濃度 0.05 μg/mLをLCの定量下限値とした．

表3. 日常の検査におけるHPLC分析条件

カラム	Inertsil ODS-2（ジーエルサイエンス社製）（3.0 mm i.d.×150 mm，5 μm）
カラム温度	40℃
移動相	A液；5 mmol/L クエン酸緩衝液・メタノール・アセトニトリル（7:1:2） B液；メタノール・アセトニトリル（1:2）
グラジエント条件	B液；0%（0 min～5 min）→50%（18.0 min～23 min）→0%（23.1 min～28 min）
流速	0.6 mL/min
注入量	5 μL
検出波長	230 nm（BA，SOAおよびDHA） 260 nm（PHBAエステル類）

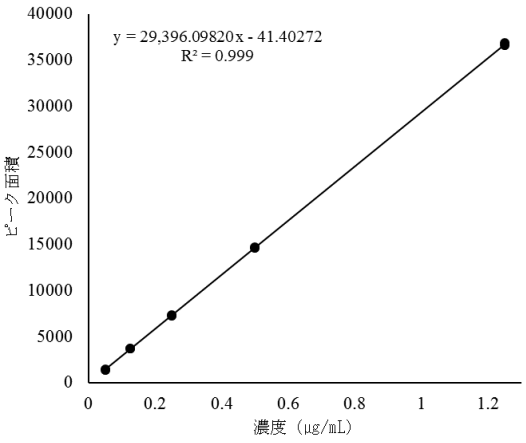

図2. パラオキシ安息香酸ヘプチルの検量線

3. 添加回収試験

PHBA-Hpの米国での使用基準は非炭酸清涼飲料および果実を原料とする飲料中に20 μg/mL以下，発酵麦芽飲料中に12 μg/mL以下と定められている．今回実施した添加回収試験(*n*=3)の結果を表4に示した．透析液のメタノール濃度の検討結果より80%メタノールを用いて透析を行った結果，いずれの試料，濃度においてもPHBA-Hpの回収率が80%以上と良好な結果であった．

表4. 清涼飲料水およびビールのパラオキシ安息香酸ヘプチル添加回収率(*n*=3)

試料	添加量 (μg/mL)	回収率(%) (RSD(%))
清涼飲料水		
野菜ジュース	10	99.1 (2.1)
	20	100.3 (0.0)
オレンジジュース	10	103.7 (5.6)
	20	100.4 (1.1)
リンゴジュース	10	98.6 (1.6)
	20	101.2 (1.6)
ぶどうジュース	10	96.0 (6.7)
	20	93.3 (5.0)
グレープフルーツジュース	10	99.7 (2.0)
	20	98.8 (1.1)
ビール		
ラガー	5	85.7 (1.5)
	10	85.9 (0.7)
ペールエール	5	85.5 (1.7)
	10	85.1 (0.6)
IPL	5	82.2 (1.0)
	10	80.7 (1.6)
IPA	5	85.3 (2.6)
	10	86.8 (1.1)
ポーター	5	86.3 (3.1)
	10	86.9 (1.1)

4. LC-MS/MSによる確認

LC-MS/MSによるPHBA-Hpの確認法の検討を行った．坂牧らの方法[4]を参考に移動相として水，アセトニトリルの2液で検討したところ，70%アセトニトリルでピーク形状と感度が良好かつ10分で分析可能であった．

イオン化には，エレクトロスプレーイオン化法(ESI法)のネガティブモードを選択したところ，*m/z* 235の脱プロトン化分子イオンを観察した．このときコーン電圧30 Vで感度が良好であった．

コリジョンエネルギー電圧（CE）が10 V，20 V，30 Vの場合それぞれのマススペクトルを図3に示した．CE10 Vでは*m/z* 235，CE20 Vでは*m/z* 235，*m/z* 92及び*m/z* 136，CE30 Vでは*m/z* 92が特徴的に生成された．この結果を踏まえコーン電圧，コリジョンエネルギー電圧等イオン化条件の検討を行った結果，表1に示した条件が最適であ

った．強度が最も強かった*m/z* 92と次に強い*m/z* 136を定性確認用イオンとした．

図4に標準溶液，添加試料，無添加試料のMRMクロマトグラムを示した．妨害となるピークは認められず，添加した試料について，試料溶液中のPHBA-Hpの保持時間，ピーク形状，面積比は標準溶液とよく一致した．

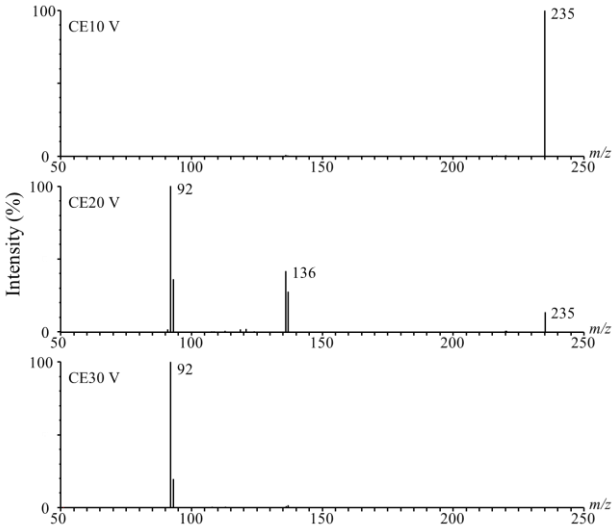

図 3. パラオキシ安息香酸ヘプチルのプロダクトイオン

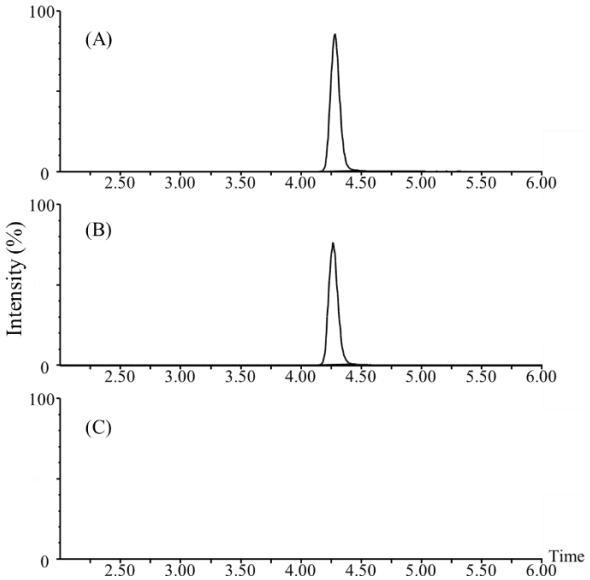

図4. MRMクロマトグラム(*m/z* 235→92)
(A) パラオキシ安息香酸ヘプチル 標準溶液0.25 μg/mL
(B) ビール(パラオキシ安息香酸ヘプチル10 μg/mL相当添加)
(C) ビール(Blank)

ま と め

指定外添加物のPHBA-Hpについて透析法での抽出・精製の検討を行い，HPLCによる定量法とLC-MS/MSによる確認法を検討した．

80%メタノールを用いた透析で80%以上の回収率を得た．HPLCの測定条件について，9種保存料と同時分析できるようにPHBA-Hpの分析条件を検討し，PHBA-Hpの検量線は良好な直線性を示した． LC-MS/MSによる確認はMRMモードを用い，2種のプロダクトイオンの観察を行うことができ，確認方法として有用であった．

本法を用いることでPHBA-Hpを含む保存料10種の迅速な分析が可能となり，食品衛生の一助となることが期待される．

文 献

1) 新 世界の食品添加物概説 第三版，一般社団法人日本食品添加物協会．
2) 松野伸広，加藤文秋，石橋 亨，他：日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集，**83**, 53, 2002.
3) 粕谷陽子，松田敏晴，中里光男，他：東京健安研セ年報，**54**, 104–108, 2008.
4) 坂牧成恵，貞升友紀，松本ひろ子，他：東京健安研セ年報，**67**, 171–176, 2016.
5) Keiko Iwakoshi, Yu Shiozawa, Yukiko Yamajima, *et al.*: *Food Addit Contam Part A.*, **36**, 1020-1031, 2019 .
6) 日本規格協会：高速液体クロマトグラフィー通則 JIS K0124, 1983年制定・2011年改訂．

Investigation of analytical method for Heptyl para-hydroxybenzoate in soft drinks and beer

Rio SUZUKI[a], Itoko BABA[a], Ayako ITO[a], Shui WATANABE[a], Misato Saito[b], Akiko YASUI[a],
Toshiko SHIMOI[a], Rina NAKAMURA[a], and Kenji OTSUKA[a]

Heptyl para-hydroxybenzoate, an undesignated additive approved for use in soft drinks and beer in the USA, was analyzed for extraction and purification, quantified by high-performance liquid chromatography, and confirmed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. The extraction and purification of heptyl para-hydroxybenzoate by dialysis using 80% methanol as the dialysate solution yielded a recovery rate of >80%, and the analytical conditions for heptyl para-hydroxybenzoate determination by HPLC were evaluated to allow simultaneous analysis with nine preservatives that are routinely tested. Heptyl para-hydroxybenzoate showed a linearity of 0.05–1.25 μg/mL with a detection limit of 0.05 μg/mL.

Keywords: Food additive, preservative, Heptyl para-hydroxybenzoate, dialysis, HPLC, LC-MS/MS

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

[b] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out