

パラオキシ安息香酸エステル類と保存料及び甘味料の 系統的分析法の検討

中尾朱美¹・藤本喬¹

Systematic Determination of p-Hydroxy-benzoate ester, Preservatives and Sweeteners

Akemi NAKAO, Takashi FUJIMOTO

要約

食品中の保存料及び甘味料の分析を簡便に行うための前処理法を検討した。パラオキシ安息香酸エステル類の使用基準のある食品を中心に、醤油、果実ソース、果汁、つゆ、ウスターソースについてエタノールで抽出し、カートリッジカラム処理または希釈後、移動相を変えて HPLC で測定した結果、パラオキシ安息香酸エステル類(PHBA-R)、甘味料アセスルファム K (Aces-K) およびサッカリン Na(Sac-Na)、保存料ソルビン酸(SOA)、安息香酸(BA)、デヒドロ酢酸(DHA)を妨害なく系統的に分析することができた。添加回収実験の結果、コーヒー牛乳のパラオキシ安息香酸エステル類の回収率は6割程度であったが、それ以外の食品については回収率、相対標準偏差(RSD)ともにスクリーニング法として十分であり、実用的であった。

Key Words：パラオキシ安息香酸エステル類 p-hydroxy-benzoate esters, 保存料 Preservative, 甘味料 Sweetener

I はじめに

パラオキシ安息香酸エステル類（以下 PHBA-R）および保存料ソルビン酸(SOA)、安息香酸(BA)、デヒドロ酢酸(DHA)の分析法は公定法においては水蒸気蒸留した後、HPLC に供する。当所においても PHBA-R の分析については前処理として水蒸気蒸留法を行っている。

水蒸気蒸留法に代わる PHBA-R の簡便な前処理方法を検討し、これを用いて他の保存料および甘味料を系統的に分析することができたので報告する。

II 実験方法

1 試料

市販食品（醤油、果実ソース、果汁、コーヒー牛乳、つゆ、ウスターソース、みそ）

2 試薬

・10mM リン酸液：リン酸二水素カリウム 1.36g を蒸留

水で 1000mL とした。

・C18 カートリッジカラム：

Waters 社製 Sep-Pak Plus C18 Cartridges

・PSA カートリッジカラム：

VARIAN 社製 BOND ELUT JR-PSA 1000MG

・ろ紙：TOYO No.5A

・その他の試薬：市販特級または HPLC 用を使用した。

3 機器および測定条件

高速液体クロマトグラフ

＜パラオキシ安息香酸エステル類分析時＞

ポンプ：JASCO PU-980 Intelligent HPLC Pump

UV 検出器：JASCO UV-970 Intelligent UV/VIS

Detector

オートサンプラー：JASCO AS-950 Intelligent Sampler

カラム：Inertsil Ph 5 μ m 4.6mmI.D. 150mm

(GL Sciences Inc 製)

移動相：アセトニトリル：10mM リン酸液 = 30：70
(pH3.1)

流量：0.8mL/min.

検出波長：UV230nm

1.福岡市保健環境研究所衛生化学部門

注入量：20 μ L

< Aces-K, Sac-Na, SOA, BA および DHA 分析時 >

ポンプ：HITACHI L-7100

UV 検出器：HITACHI L-7400

オートサンプラー：HITACHI L-7200

カラム：Inertsil Ph 5 μ m 4.6mmI.D. 150mm

(GL Sciences Inc 製)

移動相：アセトニトリル：水 = 15：85 (pH3.0)

流量：1mL/min.

検出波長：UV230nm

注入量：14 μ L

4 検査方法

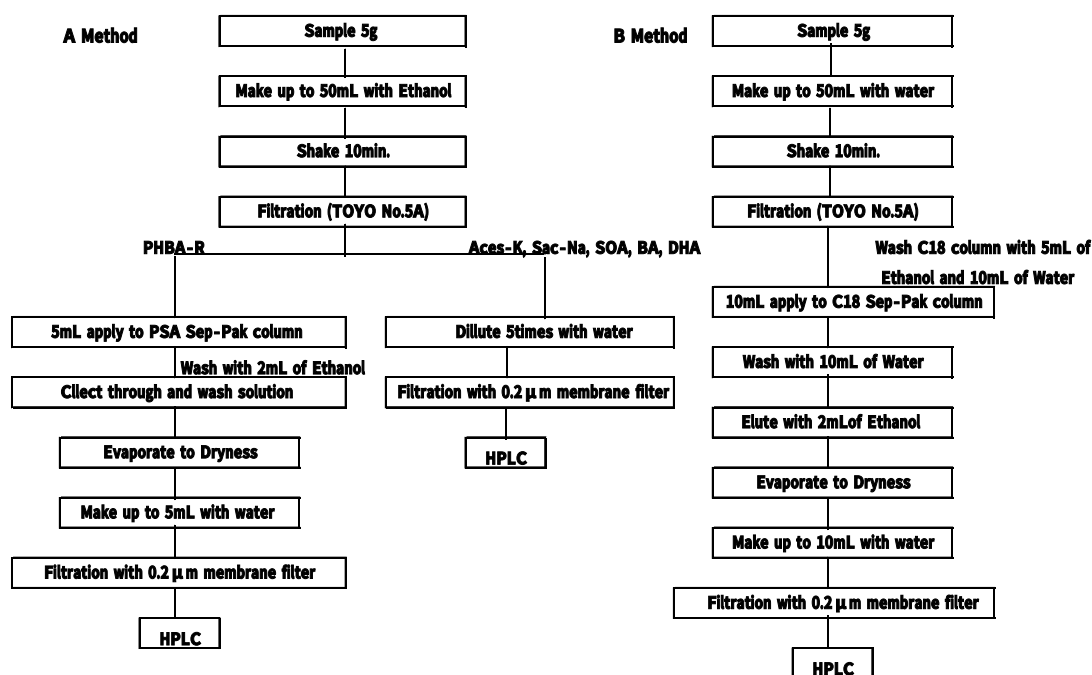
Scheme 1. に検査のフローチャートを示す。

PHBA-R 分析の前処理法として A 法および B 法を検討した。エタノールでタンパク質を沈殿させ、色素や妨害物質を取り除くために PSA カートリッジカラムを通過させる方法を A 法とし、C18 カートリッジカラムに

負荷し、エタノールで目的物質を溶出させる方法を B 法とした。

A 法は、試料 5g を量りとり、エタノールで 50mL に定容し、10 分間振とうした後、ろ過 (TOYO No.5A) した。PHBA-R 分析には、ろ液 5mL をあらかじめエタノールで洗浄した PSA カートリッジカラムに負荷し、通過液を採取した。EtOH2mL でカラムを洗浄し、洗液も併せて採取した。エバポレーターで濃縮・乾固し水で 5mL に定容し、0.2 μ m メンブランフィルターでろ過し HPLC に負荷した。Aces-K, Sac-Na, SOA, BA および DHA 分析は、ろ液を水で 5 倍希釈後、0.2 μ m メンブランフィルターでろ過し HPLC に負荷した。

B 法は、試料 5g を量りとり、水で 50mL に定容し、10 分間振とうした後、ろ過 (TOYO No.5) した。ろ液 10mL をあらかじめエタノール 5mL および水 10mL で洗浄した C18 カートリッジカラムに負荷し、水 10mL で洗浄した後、エタノール 2mL で溶出し、溶出液を採取した。エバポレーターで濃縮・乾固し水で 10mL に定容し、0.2 μ m メンブランフィルターでろ過し HPLC に負荷した。



Scheme 1. Analytical procedure for Preservatives and Sweeteners

III 実験結果及び考察

1 PHBA-R 分析の前処理法の検討

醤油、コーヒー牛乳、清涼飲料水 5g に各 PHBA-R を 500 μ g 添加した時の添加回収率を Table 1. に示す。

醤油には PHBA-R のうち iso-Pr, iso-Bu および n-Bu が使用される。A 法において三つのエステルに良好な回収率と相対標準偏差 CV% が得られた。Fig. 1.(A) に醤油

に添加した時の PHBA-R の HPLC チャートを示す。

また、清涼飲料水の中でも、コーヒー牛乳においては回収率、CV% ともに B 法の方が若干上回ったが、PHBA-R は醤油で使用される頻度が高いこと、簡便さ等の理由と併せて、スクリーニング法として A 法を用いることにし、以下の実験に際しては A 法で検討した。

果実ソース、果汁、つゆ、ウスターソースについて

PHBA-R 分析を行った結果を Table 2. に示す. それぞれの食品 5g に各 PHBA-R を 500 μg 添加した.

コーヒー牛乳以外の食品については回収率 80.6 ~ 122%, CV% 9.16 以下であった.

また, 実際にこれらを含む醤油およびソースを水蒸気蒸留法を用いて分析した結果と A 法を用いて分析した結果の相関を Table 3. に示す. 検出された PHBA-isoPr, -isoBu, -nBu いずれも相関係数 0.97 以上であった.

2 Aces-K, Sac-Na, SOA, BA, DHA 分析の前処理法の検討

エタノールで抽出した後, 蒸留水で希釈する方法で甘味料 Aces-K および Sac-Na, 保存料 SOA, BA, DHA の添加回収実験を行った. 各食品 5g に Aces-K, Sac-Na を各 500 μg , SOA, BA, DHA を各 750 μg 添加し, PHBA-R と同様にエタノール抽出した後 5 倍希釈し, 移動相の異なる HPLC に負荷した. Fig. 1.(B) に醤油に添加した時の保存料・甘味料の HPLC チャートを示す.

いずれについても妨害ピークもなく, Table 4. に示すように回収率 100 ~ 125%, CV% 6.12 以下であった.

Table 1. Recoveries of PHBA-R from Various Foods with A Method or B Method (n =3)

Foods	Method	PHBA-Et Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$	PHBA-isoPr Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$	PHBA-nPr Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$	PHBA-isoBu Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$	PHBA-nBu Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$
Soy sauce	A	80.6 $\pm$ 1.25	89.9 $\pm$ 6.04	92.0 $\pm$ 9.16	89.3 $\pm$ 6.96	93.6 $\pm$ 4.12
Soy sauce	B	89.4 $\pm$ 18.96	87.9 $\pm$ 8.34	85.9 $\pm$ 3.15	75.2 $\pm$ 8.16	75.3 $\pm$ 9.50
Milk coffee	A	67.8 $\pm$ 17.37	66.5 $\pm$ 13.17	67.8 $\pm$ 13.37	66.3 $\pm$ 6.03	65.7 $\pm$ 2.71
Milk coffee	B	86.5 $\pm$ 3.07	78.4 $\pm$ 6.14	77.8 $\pm$ 10.24	76.6 $\pm$ 17.48	73.1 $\pm$ 19.74
Soft drink	A	97.7	93.2	95.7	86.3	86.9
Soft drink	B	97.6	97.4	97.3	101.8	101.5

Table 2. Recoveries of PHBA-R from Various Foods (n=5) *n=3

Foods	PHBA-Et Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$	PHBA-isoPr Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$	PHBA-nPr Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$	PHBA-isoBu Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$	PHBA-nBu Recovery(%) $\pm\text{CV}(\%)$
* Soy sauce	80.6 $\pm$ 1.25	90.0 $\pm$ 6.04	92.0 $\pm$ 9.16	89.3 $\pm$ 6.96	93.6 $\pm$ 4.12
Fruit sauce	117 $\pm$ 2.78	119 $\pm$ 3.30	110 $\pm$ 1.31	122 $\pm$ 1.78	116 $\pm$ 6.90
Fruit juice	94.8 $\pm$ 4.68	95.4 $\pm$ 2.65	98.1 $\pm$ 2.38	99.5 $\pm$ 0.54	98.9 $\pm$ 0.55
* Milk coffee	67.8 $\pm$ 17.37	66.5 $\pm$ 13.17	67.8 $\pm$ 13.37	66.3 $\pm$ 6.03	65.7 $\pm$ 2.71
Tuyu	104 $\pm$ 2.27	82.1 $\pm$ 4.57	111 $\pm$ 3.50	110 $\pm$ 1.44	109 $\pm$ 2.31
Sauce	113 $\pm$ 3.97	109 $\pm$ 6.18	107 $\pm$ 6.06	114 $\pm$ 5.52	115 $\pm$ 6.36

Table 3. Correlation of PHBA-isoPr, -isoBu, -nBu in Soy sauce and Sauce between with Steam Distillation and with A Method

	PHBA-Et	PHBA-isoPr	PHBA-nPr	PHBA-isoBu	PHBA-nBu
Correlation	—	0.9743	—	0.9760	0.9826

3 考 察

食品中の保存料及び甘味料の分析を簡便に行うための前処理法を検討した. エタノールで抽出後, PSA カラム処理し PHBA-R を, さらに希釈およびフィルターろ過し甘味料 Aces-K および Sac-Na, 保存料 SOA, BA, DHA を, 抽出液をそれぞれ移動相の異なる HPLC に負荷することで系統的に分析することができた.

醤油, 果実ソース, 果汁, コーヒー牛乳, つゆ, ウスターソースに PHBA-R を添加したところコーヒー牛乳以外の食品についてはいずれの PHBA-R も回収率は 80.6 ~ 122%, CV% 9.16 以下であった. また, 醤油およびソースを水蒸気蒸留法を用いて分析した結果と A 法を用いて分析した結果の相関は, 検出された PHBA-isoPr, -isoBu, -nBu のいずれの場合も相関係数

0.97 以上であった。

醤油，果実ソース，果汁，コーヒー牛乳，みそについて甘味料 Aces-K および Sac-Na，保存料 SOA，BA，DHA の添加回収実験を行ったところ，回収率は Aces-K 102 ～ 112%，Sac-Na 102 ～ 115%，SOA 102 ～ 125%，BA 101 ～ 111%，DHA 100 ～ 119%であり，いずれにおいても

CV% 6.12 以下と良好であった。

コーヒー牛乳についてはいずれの PHBA-R も回収率は 65%ほどであったが，PHBA-R は乳飲料にはほとんど使用されていないので，本法は保存料・甘味料のスクリーニング法として簡便で実用的であると思われる。

Table 4. Recoveries of Aces-K, Sac-Na, SOA, BA, DHA from Various Foods (n=5)

Foods	Aces-K	Sac-Na	SOA	BA	DHA
	Recovery(%)	Recovery(%)	Recovery(%)	Recovery(%)	Recovery(%)
	±CV(%)	±CV(%)	±CV(%)	±CV(%)	±CV(%)
Soy sauce	109 ± 2.08	115 ± 2.13	125 ± 2.42	111 ± 5.19	108 ± 1.22
Fruit sauce	110 ± 0.95	110 ± 0.29	102 ± 0.20	105 ± 0.47	108 ± 3.34
Fruit juice	106 ± 1.65	105 ± 2.42	103 ± 2.15	109 ± 3.17	119 ± 4.15
Milk coffee	112 ± 1.03	105 ± 1.67	103 ± 0.32	101 ± 0.52	106 ± 1.89
Miso	102 ± 2.86	102 ± 3.28	113 ± 2.59	104 ± 6.12	100 ± 1.23

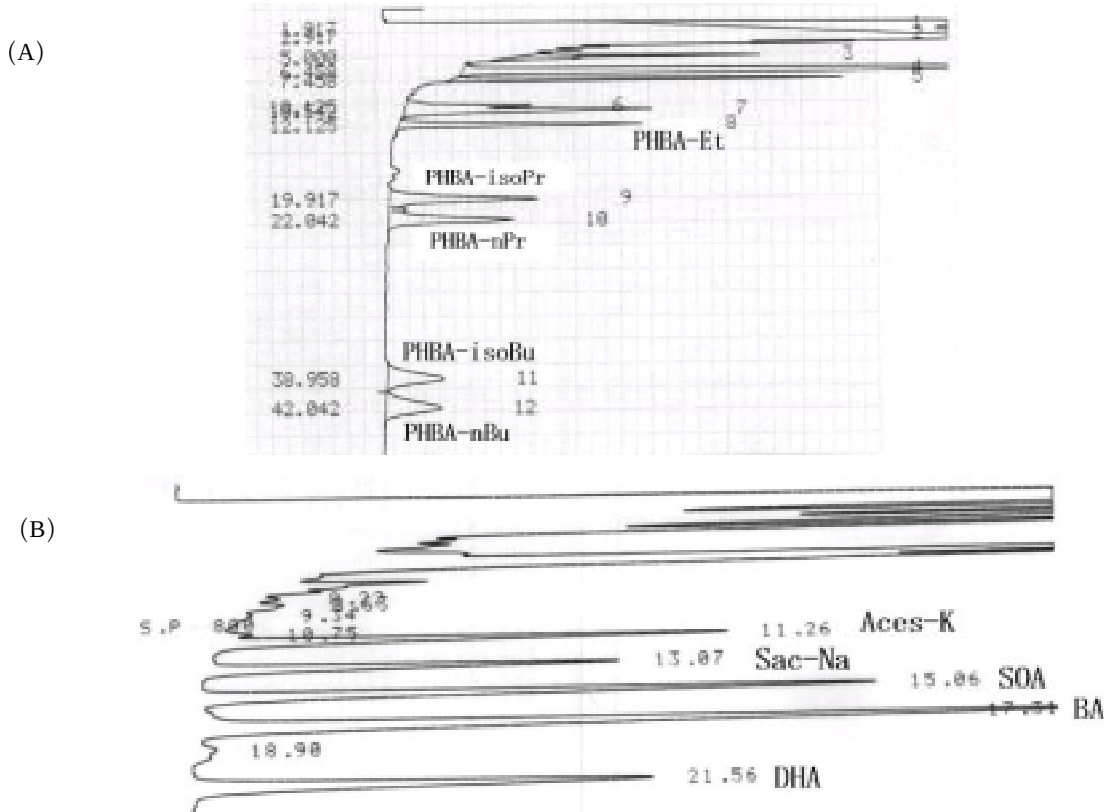


Fig.1.HPLC chromatograms (A) PHBA-R, (B)Preservatives and Sweeteners

文 献

1) 河野美幸， 他 5 名：食品中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析法，東京衛研年報，51，80 ～ 84，2000
2) 松井久仁子， 中嶋昌徳：アセスルファム K の迅速分

析法の検討，福岡市保健環境研究所報，25，127 ～ 130，2000
3) 渡辺美千代， 中村正規， 中西和道：高速液体クロマトグラフィーによる食品中の合成保存料の同時分析法と保存料の使用状況について，福岡市衛生試験報，14，60 ～ 67，1989