

キャピラリー電気泳動による食品中の パラオキシ安息香酸エステル類の分析

坂本智徳・肥前昌一郎

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Determination of *p*-Hydroxy benzoic acid esters in Foods by Capillary Electrophoresis

Tomonori SAKAMOTO and Shoichiro HIZEN

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

キャピラリー電気泳動法による食品中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析法を開発した。泳動液にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を添加することで標準液について良好なエレクトロフェログラムが得られた。また、本所でソルビン酸やサッカリンナトリウム等の抽出に用いている Carrez 法で除タンパクしたのち、抽出液をさらに溶媒抽出することで妨害を受けず測定が可能であった。泳動時間およびピーク面積の相対標準偏差はそれぞれ 0.5% 未満、5% 未満と良好であり、HPLC 法との相関性も良好であった。

Key Words: パラオキシ安息香酸エステル類 *p*-hydroxy benzoic acid esters, 保存料 preservative, キャピラリー電気泳動 capillary electrophoresis, 食品 foods

I はじめに

パラオキシ安息香酸エステル類 (以下 PHBA-R) は醤油、ソース、清涼飲料水などに使用される保存料であり、日本ではエチル、イソプロピル、プロピル、イソブチルおよびブチルの 5 種のエステルの使用が認められている。食品衛生検査指針¹⁾ では、試料を水蒸気蒸留により抽出した後 HPLC で測定することとなっているが、水蒸気蒸留は抽出に時間を要するうえ蒸留速度の調整が必要であり、再現性の確保が困難である。また不許可添加物であるメチルエステルは水蒸気蒸留法では回収率が低く、高タンパクまたは高脂肪食品では前処理としてメタノールによる除タンパクが必要となる²⁾。そこで、本所で保存料・甘味料の分析に用いている Carrez 法による除タンパクを行い、抽出液を溶媒抽出してキャピラリー電気泳動法 (以下 CE 法) による測定法を検討したので報告する。

II 実験方法

1. 試料

市内流通する食品 (醤油、ソース等)

2. 試薬

標準品: 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

全て和光純薬工業(株)製を用いた。

標準原液: 標準品をメタノールで溶解し 10000 µg/mL に調製した。

混合標準溶液: 各標準原液を混合しメタノールで 1000 µg/mL に調整した後、適宜蒸留水で希釈した。

n-ヘキサン/酢酸エチル混液：n-ヘキサンと酢酸エチルを等量混合した。

その他試薬：特級試薬を使用した。

3. 装置及び測定条件

1) HPLC 法

- ・装置：Agilent 社製 HP 1100 シリーズ
- ・カラム：GL サイエンス社製 Inertsil Ph (4.6 ×150 mm)
- ・移動相：CH₃CN・10 mM KH₂PO₄ (30:70) (pH3.1)
- ・カラム温度：25 °C ・流速：1.0 mL/min
- ・検出波長：230 nm ・注入量：20 µL

2) CE 法

- ・装置：Agilent 社製 HP-3DCE システム
- ・カラム：フューズドシリカキャピラリーG1600-61332 (内径 50µm, 有効長 72 cm, 全長 80.5cm)
- ・泳動液：20 mmol/L ドデシル硫酸ナトリウム含有 20 mmol/L 四ホウ酸ナトリウム (pH9.0)
- ・電圧：25 kV (4 min) →30 kV (8 min)
- ・キャピラリー温度：25 °C
- ・注入圧：300 mbar・sec ・検出波長：270 nm
- ・分離モード：ミセル導電クロマトグラフィー

4. 抽出方法

1) Carrez 抽出

均一にした試料 20 g に水 100mL を加え、10%炭酸ナトリウムで弱アルカリに調整後 3 時間放置した。15%フェロシアン化カリウム溶液及び 30%硫酸亜鉛溶液を 5mL ずつ加え軽く振とうした後、水で 200mL に定容し 15 分間放置後ろ紙ろ過した。

2) 溶媒抽出

Carrez 抽出液 10mL を分取し 10%炭酸ナトリウム溶液 0.5mL を加え微アルカリ性に調整したのち、n-ヘキサン/酢酸エチル混液 10mL で 3 回抽出した。全抽出液をあわせ減圧濃縮後、残留物をメタノール 2mL に溶解し、蒸留水で 10mL に定容したものを限外ろ過し試験溶液とした。実験操作のフローチャートを Fig.1 に示した。

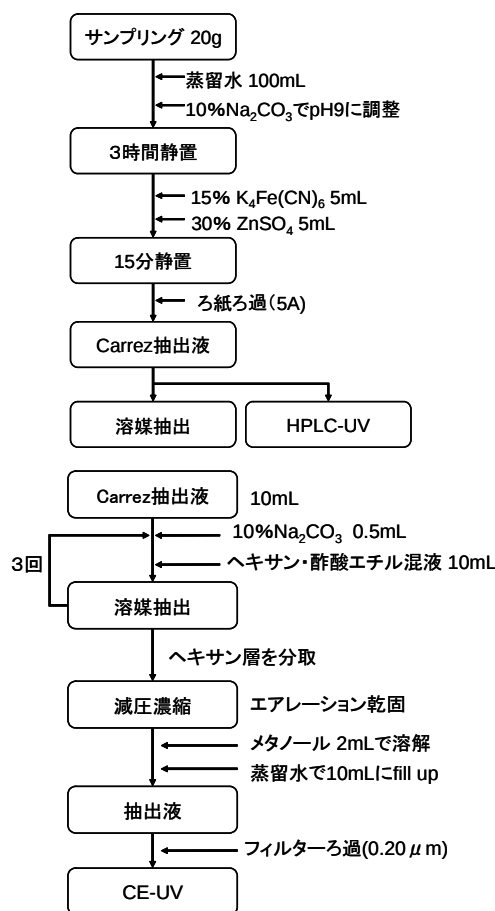


Fig.1 実験操作のフローチャート

III 結果および考察

1. 装置条件の検討

本所では CE 法により保存料のソルビン酸、安息香酸、デヒドロ酢酸および甘味料のサッカリンナトリウム、アセスルファムカリウムの一斉分析を行っている^{3) 4)}が、同様の条件で PHBA-R を測定すると泳動されず検出されなかった。これは PHBA-R が電荷をもたないことが原因と考えられ、電荷をもたせるために界面活性剤の添加によるミセルの形成を検討した。そこで泳動液にドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を添加すると各エステルを泳動し分離することができた。さらに pH・電圧を調整すると良好なエレクトロフェログラムが得られた。しかし、本条件では上記の保存料・甘味料のピークと PHBA-R のピークが重なるため、溶媒抽出時の pH を調整して夾雑成分の除去を検討した。

2. 抽出条件の検討

食品中の PHBA-R の抽出には水蒸気蒸留法のほか、試料を塩酸酸性下ジエチルエーテルで抽出する方法⁵⁾や除たんぱくを目的にメタノールで希釈する方法⁶⁾など様々な抽出法が報告されているが、これらの抽出法により CE で測定したところ夾雑成分が多く良好なエレクトロフェロ

グラムを得ることができなかった。そこで、Carrez 法による除タンパク⁷⁾を行い、さらにその抽出液を n-ヘキサン/酢酸エチル混液で溶媒抽出⁸⁾することで安定したエレクトロフェログラムが得られた (Fig.2)。また、溶媒抽出を行う際の条件を検討したところ、酸性では夾雑成分が多くなった一方、強アルカリ性では夾雑成分が減少するが、メチル及びエチルエステルの回収率が低下する傾向が見られた。そこで溶媒抽出時に 10%炭酸ナトリウムを 0.5mL 添加して微アルカリ性に調整することで夾雑成分は除去され回収率も良好であった。

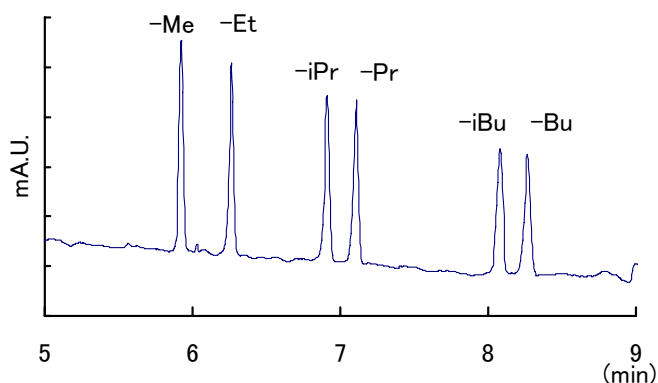


Fig.2 PHBA-R 混合標準液のエレクトロフェログラム

3. 定量下限と検量線の直線性

1 μ g/mL の PHBA-R 混合標準溶液を繰り返し測定(n=7)したときの泳動時間およびピーク面積の相対標準偏差は、泳動時間では1%未満、ピーク面積では5%未満であった。また 1~100 μ g/mL の濃度範囲での各エステル類のピーク面積と濃度との相関係数は 0.999~1.000 と良好な直線性を示した。標準溶液 1 μ g/mL での S/N 比は 10 以上であったので定量下限は 1 μ g/mL とした。なお、この定量下限は検体中の含量として 0.01g/kg に相当する。

4. 添加回収試験

醤油、ソース及び清涼飲料水 20g に PHBA-R を各 1000 μ g 添加し回収試験を行った。回収率はいずれのエステルでも 90~104%と良好であった。回収率の相対標準偏差も 0.7~4.9%とばらつきも小さかった(Table 1)。

Table 1 各種食品における PHBA-R の回収率

食品	回収率	相対標準偏差
醤油	91~98%	1.1~2.0%
ソース	95~101%	0.7~1.9%
清涼飲料水	90~104%	2.6~4.9%

5. 実態調査および HPLC 法との比較

市内に流通する醤油、ソースなど 24 件について本法及び HPLC 法による結果を比較した (Table 2)。

検出されたのはイソプロピル、イソブチル、ブチルエステルのみであり不許可添加物のメチルエステルは検出されなかった。基準値を超えて PHBA-R が検出された検体はなく、検出された検体はすべて「保存料 (パラオキシ安息香酸)」と表示があった。また、検出されたエステルの CE 法と HPLC 法の測定値には大きな差は見られず相関性も良好であった (Fig.3)。

IV まとめ

泳動液にドデシル硫酸ナトリウムを添加することで 6 種の PHBA-R を CE で測定することができた。各エステルの定量下限は 1 μ g/mL で、標準溶液 1~100 μ g/mL の濃度範囲で良好な直線性を示した。1 μ g/mL の標準溶液の繰り返し試験(n=7)における泳動時間及びピーク面積の相対標準偏差はそれぞれ 0.1~0.5%、2.6~4.8%と良好な結果であった。また、醤油、ソースなどにおける回収試験の回収率は 6 種すべてのエステルで 90~104%であった。HPLC 法による測定値とも高い相関がとれており、大きな差異は見られなかった。

本法は HPLC 法と異なる原理による検査法であり、食品中の PHBA-R のスクリーニング検査や確認試験として有用である。

文献

- 1)食品衛生検査指針食品添加物編，社団法人日本食品衛生協会，2003
- 2)衛生試験法注解，日本薬学会編，2005
- 3)松井久仁子，他：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
- 4)中嶋昌徳，他：キャピラリー電気泳動による食品中のプロピオン酸の迅速分析について，福岡市保健環境研究所報，25，71~74，1999
- 5)北田善三，他：高速液体クロマトグラフィーによる醤油中のサッカリン，安息香酸，パラオキシ安息香酸エステル類の分析，食品衛生学雑誌，vol.21，480~484，1980
- 6)大西英幸，他：HPLC によるしょう油中のサッカリン Na，安息香酸，パラオキシ安息香酸エステル類の一斉・迅速分析法の検討，農林水産消費技術センター，109~117，1994
- 7)衛生検査指針Ⅲ，日本公衆衛生協会，1963
- 8)川崎洋子，他：海苔中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析，国立衛研報，121，48~50，2003

Table 2 PHBA-R の CE 法及び HPLC 法による測定値の比較

検体	含量(g/kg)											
	-R		-Me		-Et		-iPr		-Pr		-iBu	
	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC	CE	HPLC
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	0.053	0.051	(-)	(-)	0.038	0.035	0.035	0.033
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	0.078	0.075	(-)	(-)	0.053	0.052	0.051	0.049
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	0.070	0.067	(-)	(-)	0.050	0.049	0.050	0.048
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	0.060	0.060	(-)	(-)	0.045	0.044	0.045	0.044
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	0.052	0.051	(-)	(-)	0.033	0.031	0.030	0.028
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	0.022	0.023	(-)	(-)	0.019	0.017	0.017	0.016
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
醤油	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ソース	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.096	0.094
ソース	(-)	(-)	(-)	(-)	0.067	0.070	(-)	(-)	0.047	0.045	0.044	0.043
ソース	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
つゆ	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
つゆ	(-)	(-)	(-)	(-)	0.024	0.024	(-)	(-)	0.020	0.017	0.020	0.018
ドレッシング	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ドレッシング	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ドレッシング	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
たれ	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
たれ	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
たれ	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

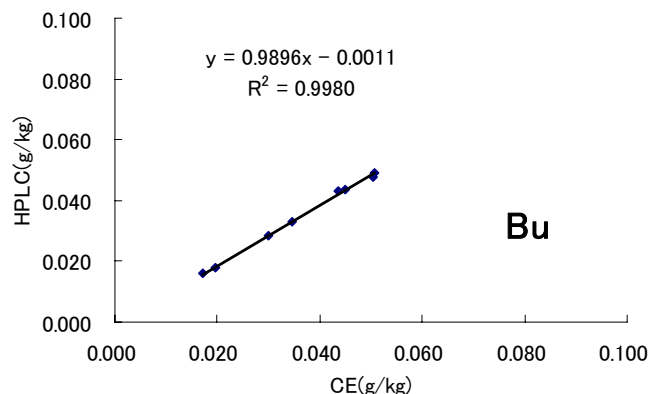
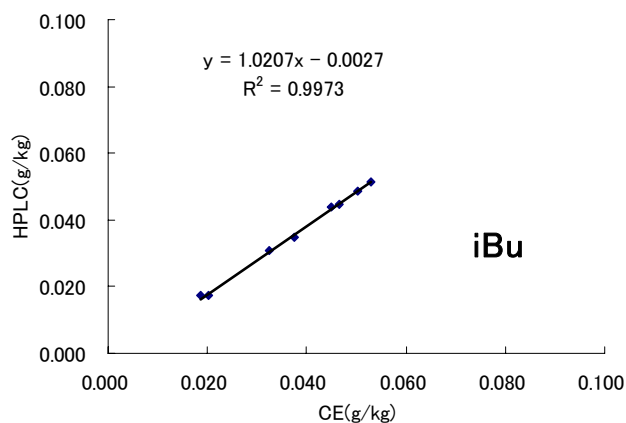
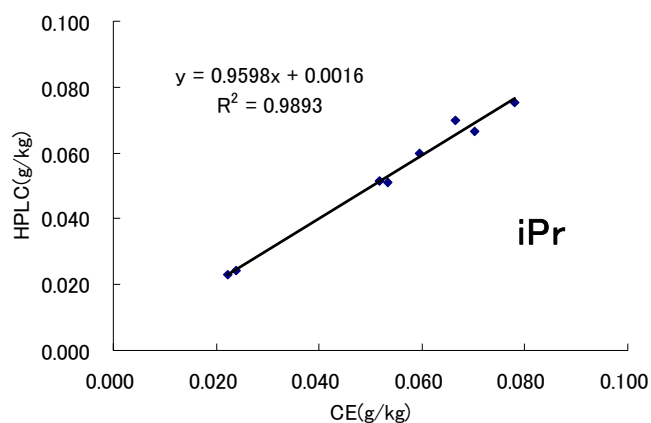


Fig.3 CE 法と HPLC 法による PHBA-R の測定値の相関性