

## 透析および固相抽出による食品中の保存料および甘味料の分析

澤崎加奈恵・平井知里・山岸 浩

Analysis of the preservatives and sweeteners in food by the dialysis method  
and the solid phase extraction method

Kanae SAWAZAKI, Chisato HIRAI, Hiroshi YAMAGISHI

食品中の 8 種類の保存料（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プロピル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸イソブチル）および 2 種類の甘味料（サッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム）の試験溶液調製を同時に行う方法について検討した。粉碎均一化した試料を 10%塩化ナトリウム-0.01mol/L 塩酸とともに透析膜に移し、透析外液として 70%メタノールを使い 24 時間透析した。得られた透析外液は Oasis HLB で精製し、HPLC で測定した。添加回収試験を行ったところ、回収率は 83.0~102.2%であった。また、定量限界は、アセスルファムカリウムが 30  $\mu$ g/g、その他の化合物が 20  $\mu$ g/g であった。本法は、簡単に 8 種類の保存料と 2 種類の甘味料を同時に抽出・精製できる方法であり、様々な試料の一斉処理に有用であると考えられる。

## 1. はじめに

指定添加物の保存料および甘味料には、食品衛生法により使用基準が定められているものもあり、毎年行政検査が行われている<sup>1)</sup>。

食品中の保存料の分析には、一般的に水蒸気蒸留-高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法<sup>2,4)</sup>が使われているが、留液を得るのに時間がかかる上、一度に処理できる検体数も少ない。また、装置を構成する器具の種類も多く、洗浄操作が煩雑といった欠点がある。さらに、粕谷ら<sup>5)</sup>の報告にあるように、高タンパク食品および高脂肪食品については、水蒸気蒸留法では低回収率であるため、これらの食品については、通知法<sup>2)</sup>では溶媒抽出-HPLC 法を用いるとされており、また、衛生試験法・注解<sup>3)</sup>および食品衛生検査指針<sup>4)</sup>では、試料をメタノール・水(1:1)混液でホモジナイズし、遠心後の上澄液で水蒸気蒸留を行う旨の注解が追加されているが、いずれも操作が煩雑であり、加工食品の外観から成分組成を見極めることも困難である。

一方、甘味料の分析には、透析抽出-HPLC 法<sup>3,4,6-9)</sup>または溶媒抽出-HPLC 法<sup>4)</sup>が用いられている。このうち透析抽出法は、透析に時間を要するが、操作が簡便で、一度に多数の試料を処理できる。また、汎用的な器具で一連の操作を行える利点がある<sup>9)</sup>。

行政検査においては、同時に複数の検査を行わなければならない状況にあることから、同時に複数の添加物を検査する方法の確立が望まれる。そこで、透析法を応用し、食品中の保存料および甘味料の試験溶液を同時に調製する方法を検討したので報告する。

## 2. 方法

## 2. 1 試料

福井県内に流通している保存料および甘味料表示のないハム、みそ、しょう油、漬物、清涼飲料水、マーガリン、ジャムを用いた。

## 2. 2 対象化合物

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チル(PHBA-Et)、パラオキシ安息香酸プロピル(PHBA-Pr)、パラオキシ安息香酸イソプロピル(PHBA-iPr)、パラオキシ安息香酸ブチル(PHBA-Bu)、パラオキシ安息香酸イソブチル(PHBA-iBu)、サッカリンナトリウム(SA)およびアセスルファムカリウム(AK)について検討した。

## 2. 3 試薬等

標準品：BA、SoA、PHBA-Et、PHBA-Bu、SA、AK は和光純薬工業(株)製を用いた。DHA は関東化学(株)製を用いた。PHBA-Pr、PHBA-iPr、PHBA-iBu は東京化成工業(株)製を用いた。

BA,SoA,DHA 混合標準原液：BA、SoA、DHA の各標準品をそれぞれ 200mg 量り、メタノールに溶かし正確に 100mL とした。

PHBA エステル類混合標準原液：PHBA-Et、PHBA-Pr、PHBA-iPr、PHBA-Bu、PHBA-iBu の各標準品をそれぞれ 200mg 量り、メタノールを加えて正確に 100mL とした。

SA,AK 混合標準原液：SA 二水和物を 235mg と AK を 200mg 量り、水を加えて正確に 100mL とした。

各標準溶液：各混合標準原液をメタノールで希釈し、1~20  $\mu$ g/mL の範囲で検量線用標準溶液を調製した。

透析内液用溶液：塩化ナトリウム 100g を 0.01mol/L 塩酸に溶解して 1,000mL とした。

透析外液用溶液：70%メタノールを用いた。

その他の試薬：HPLC 用、特級等を用いた。

透析膜：Viskase 社製透析用セルロースチューブ 36/32 (透過分子量 14,000、孔径 50Å)を用いた。

ミニカラム：Waters 製 Oasis HLB (60mg)を用いた。あらかじめメタノール 3mL および水 3mL で洗浄して使用した。

メンブランフィルター：Merck Millipore 社製 Millex-LG (孔径 0.20  $\mu$ m)を用いた。

2. 4 装置

HPLC 装置：(株)島津製作所製 Nexera XR

2. 5 測定条件

(1) BA, SoA, DHA

分析カラム：TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> (4.6mmI.D.×150mm 粒子径 5 μm)、移動相：0.02mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0)・メタノール・アセトニトリル (60：20：20)、カラム温度：40℃、流速：0.5mL/min、注入量：15 μL、検出波長：230nm (BA)、260nm (SoA)、310nm (DHA)

(2) PHBA エステル類

分析カラム：TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> (4.6mmI.D.×150mm、粒子径 5 μm)、移動相：水・0.2mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0)・メタノール (37：5：58)、カラム温度：40℃、流速：0.5mL/min、注入量：15 μL、検出波長：260nm

(3) SA, AK

分析カラム：YMC-Pack NH2 (4.6mmI.D.×150mm、粒子径 5 μm)、ガードカラム：YMC-Guardpack NH2 (4.0mmI.D.×10mm、粒子径 5 μm)、移動相：1%リン酸・メタノール (40：60)、カラム温度：40℃、流速：1.0mL/min、注入量：20 μL、検出波長：210nm (SA)、230nm (AK)

2. 6 試験溶液の調製

2. 6. 1 透析

液状のものはそのまま、固形状のものはフードプロセッサーで均一化し、その約 10g を精密に量り、透析内液用溶液 20mL を用いて透析膜に移した後、空気を出来るだけ追い出して透析膜の上端をひもで縛り、200mL のメスシリンダーに入れ、透析外液用溶液で 200mL とした。このメスシリンダーを時々揺り動かしながら室温で 24 時間透析した。

2. 6. 2 精製

透析後、得られた透析外液のうち 5mL を 0.1mol/L リン酸で希釈して、全量を 20mL とし混和した。この 2mL をミニカラムに負荷し、水 3mL で洗浄後、メタノールで溶出して 4mL とし、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

3. 結果および考察

3. 1 抽出

3. 1. 1 透析

甘味料の試験溶液調製法である透析法は、簡便で一度に多数の検体を処理できる特長がある点、汎用的な器具で一連の操作を行える点、さらに、甘味料試験は保存料試験との重複検体数も多い点に着目し、この透析法を保存料の試験溶液調製に応用することを検討した。粕谷ら<sup>5)</sup>は、透析用溶液にメタノール・水 (8：2) を用いることで、PHBA エステル類の透析用溶液への移行率が高まり、良好な回収率が得られることを報告している。これを参考に、透析外液用溶液にメタノール-水混合液を用いることとし、粕谷らの報告において、水蒸気蒸留法での PHBA エステル類の回収率が不良とされている高タンパク・高脂肪食品のハムを試料として、透析外液用溶液の最適メタノール濃度について検討した。

その結果、表 1 に示すように、メタノール濃度が増えるにしたがって PHBA エステル類の回収率が上昇し、70% メタノールで最良になった。

これより、透析外液用溶液を 70%メタノールとし、他の食品についても回収率を確認したところ、表 2 に示すように、DHA および PHBA エステル類についてはいずれの食品においても良好な回収率が得られた。しかし、ハム、みそ、しょう油、漬物の BA、およびしょう油の SoA では、標準液の保持時間よりも早く溶出し、クロマトグラム上で同定できなかった。また、図 1 に示すように、SA および AK は、ピーク形状が崩れ、正確な濃度を求めることができなかった。

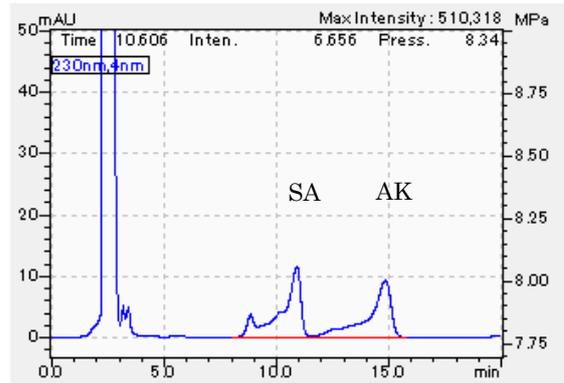


図 1 SA および AK の透析外液のクロマトグラム (食品試料：ハム)

表 1 メタノール濃度と PHBA エステル類の回収率 (%) の関係

メタノール濃度	PHBA-Et	PHBA-iPr	PHBA-Pr	PHBA-iBu	PHBA-Bu
0%	51.6	40.5	36.1	23.7	22.4
20%	59.1	49.2	45.2	32.6	31.0
40%	74.3	68.5	65.2	55.3	53.5
60%	80.6	77.1	75.0	68.0	66.7
70%	100.4	99.4	98.9	96.5	97.3
80%	94.3	84.8	87.2	76.9	78.8
90%	68.9	55.7	58.6	46.5	47.9
100%	79.1	68.0	70.2	60.1	61.9

添加量：200 μg/g

表 2 透析外液用溶液を 70%メタノールとした場合の回収率 (%)

食品試料	BA	SoA	DHA	PHBA-Et	PHBA-iPr	PHBA-Pr	PHBA-iBu	PHBA-Bu	SA	AK
ハム	-	97.9±0.2	97.3±0.4	99.2±0.2	97.9±0.2	97.4±0.3	94.6±0.6	94.8±0.5	-	-
みそ	-	96.8±0.9	91.2±0.5	92.2±0.8	92.1±0.9	91.0±0.9	83.6±1.3	81.4±1.4	-	-
しょう油	-	-	90.6±0.5	98.8±0.3	98.9±0.2	99.3±0.2	97.7±0.3	99.3±0.3	-	-
漬物	-	99.1±0.2	98.8±0.4	100.9±0.3	100.3±0.2	100.8±0.2	99.4±0.3	100.5±0.5	-	-
清涼飲料水	100.8±0.6	100.8±0.6	100.7±0.5	100.7±0.2	100.4±0.2	100.7±0.4	99.4±0.3	100.8±0.3	-	-
マーガリン	93.0±0.4	98.4±0.2	90.6±0.4	100.7±0.9	98.4±1.0	97.0±1.0	92.3±0.9	91.3±0.8	-	-
ジャム	100.7±0.7	99.6±0.8	99.8±0.6	99.5±0.4	98.3±0.5	98.8±0.4	98.2±0.5	99.0±0.5	-	-

Mean±S.D., n=3, 添加量: 200 µg/g

### 3. 1. 2 SA および AK におけるピーク形状不良の原因検証

SA および AK において、透析後の透析外液から得られたクロマトグラムのピーク形状が崩れた原因の検証を行った。

#### (1)標品のみを用いた透析

食品試料の代わりに水を用い、最終試験溶液中濃度が 10 µg/mL になるように添加した標品のみを含む溶液について透析を行い、得られた透析外液におけるピーク形状およびピーク面積値を確認した。得られたクロマトグラムは、図 1 と同様に、目的化合物のピークにショルダーが見られるものの、それらのピーク面積値は 10 µg/mL 標準液のピーク面積値とほぼ合致した (図 2)。また、各ピークの UV 吸収スペクトルはいずれも、標準液の UV 吸収スペクトルと一致していた。このことから、透析後の試料溶液には添加した分の目的化合物は含まれていると考えられた。なお、標品のみを用いた透析におけるピーク形状不良の原因については、増田ら<sup>10)</sup>が報告しているように、透析内液用溶液中の塩化物イオンの影響が考えられた。

#### (2)マトリックス添加試験

標準液にマトリックスを添加することにより、マトリックスの影響について検証を行った。マトリックスとしては、食品試料にみそを用いて透析して得られた透析外液を用いた。添加するマトリックスの比率を変えてピーク形状を

確認したところ、図 3 に示すようにマトリックスの比率が高くなるにつれ、目的化合物のピーク形状は崩れていった。

以上の検証結果から、目的化合物の透析は行われているが、透析内液用溶液中の塩化物イオンや食品中の夾雑イオンと目的化合物がカラムとの相互作用において競合し、そのことによりピーク形状の崩れを引き起こしていることが推定された。

### 3. 1. 3 BA および SoA の溶出時間のずれの原因検証

一部の食品試料において、BA および SoA がカラムから溶出する時間が標品より早くなった原因について、前項と同様に、前項の(1)および(2)の検証を行った。

その結果、(1)標品のみを用いた透析の検証については、標準液よりも溶出が早まることはなく、回収率もほぼ 100%であり、透析後の試料溶液には添加した分の目的化合物が含まれていることが確認できた。

また、(2)マトリックス添加試験の検証については、図 4 に示すように、マトリックスの比率が高くなるにつれて、BA および SoA がカラムから溶出する時間は早くなった。

これらのことから、BA および SoA についても、SA および AK と同様に、目的化合物の透析は行われているが、食品中の夾雑物と目的化合物がカラムとの相互作用において競合することにより、本来の溶出時間より早く溶出することが推定された。

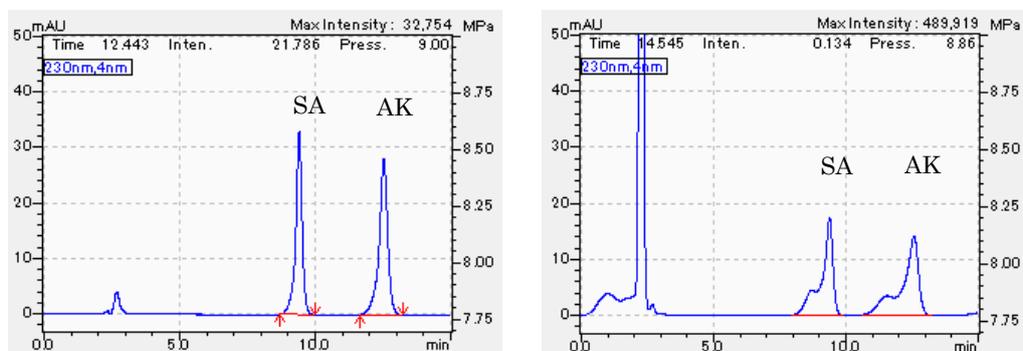


図 2 10 µg/mL 標準液 (左) と標品のみを含む溶液について透析して得られた透析外液 (右) のクロマトグラム

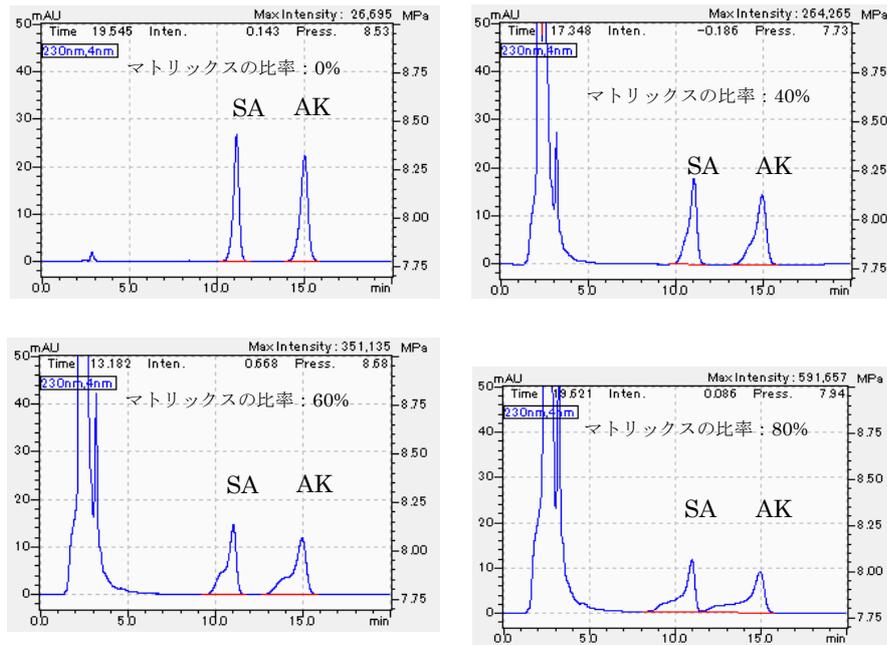


図3 添加するマトリックスの比率の変化に伴うSAおよびAKのピーク形状の変化

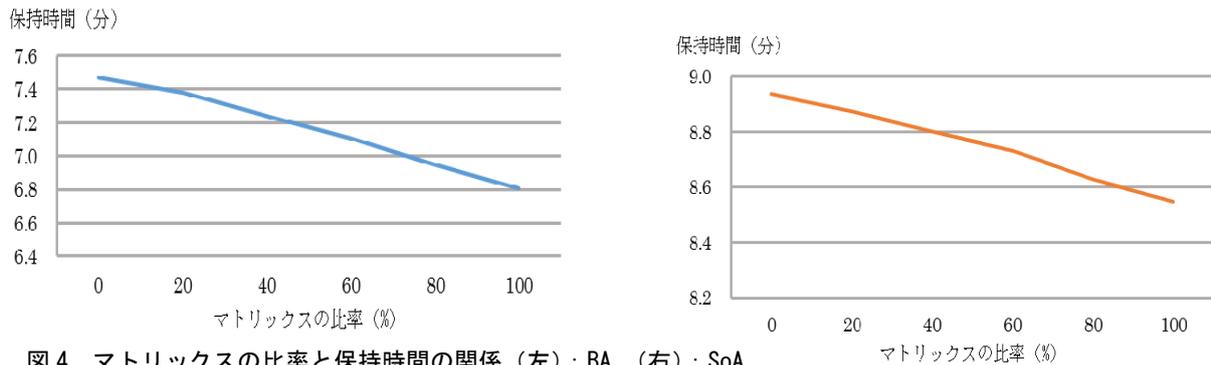


図4 マトリックスの比率と保持時間の関係 (左) : BA、(右) : SoA

### 3.2 精製

一部の目的化合物について、ピーク形状が崩れたり、本来の溶出時間より早く溶出してしまったりした原因として、得られた透析外液に含まれる夾雑物の影響が考えられたため、ミニカラムを用いた精製を検討した。

粕谷ら<sup>5)</sup>は保存料のサリチル酸も対象化合物として分析しており、発酵食品において、保持時間の早いサリチル酸と夾雑ピークの分離が十分でないことから、透析外液についてミニカラムを用いた精製を行っている。この報告を参考に、Oasis HLBを用いた精製を検討した。Oasis HLBは、ジビニルベンゼンとビニルピロリドンの共重合体であることから、ジビニルベンゼンによる $\pi$ 電子効果とビニルピロリドンによる極性化合物保持能により、一般的な逆相固相に比べて、負荷試料の希釈率を低く抑えることができると考えられる。得られた透析外液を0.1mol/Lリン酸で4倍希釈し負荷したところ、親水性のSAおよびAKを含む全ての化合物を保持できた。粕谷らの報告では、洗浄溶媒に水、続いてメタノール・水(1:1)混液を使用しているが、メタノール・水(1:1)混液での洗浄では、保存料

は溶出しなかったものの、SAおよびAKが溶出してしまい、メタノールの比率を下げてこれら化合物は溶出してしまった。一方、負荷および水洗浄で溶出した溶液のクロマトグラムを確認したところ、夾雑物の多くは、これらの溶液のクロマトグラムに見られ、負荷および水洗浄の段階で、大半の夾雑物については除去されたと考えられた。そのため、ミニカラムの洗浄は水のみで行うこととした。

また、ミニカラムの洗浄後、メタノールで溶出したところ、3mLで全ての化合物のほぼ全量を溶出できた。従って、メタノールで溶出し4mLとすることとした。

### 3.3 添加回収試験

7種類の試料(ハム、みそ、しょう油、漬物、清涼飲料水、マーガリン、ジャム)に各保存料および甘味料を200 $\mu$ g/gとなるように添加し、本法に従って分析したところ、回収率は表3のようになり、全ての化合物において83.0~102.2%の良好な回収率を示した。

透析法のみでは保持時間のずれが生じたBAおよびSoAについては、Oasis HLBによる精製を行うことにより、

表 3 Oasis HLB で精製後の添加回収率(%)

食品試料	BA	SoA	DHA	PHBA-Et	PHBA-iPr	PHBA-Pr	PHBA-iBu	PHBA-Bu	SA	AK
ハム	98.9±0.4	97.5±0.2	97.9±0.7	96.7±0.4	97.6±0.3	97.4±0.4	94.0±0.2	93.5±0.4	89.1±1.2	90.3±1.7
みそ	98.0±0.1	96.9±0.8	92.1±0.5	94.7±0.3	95.8±0.7	95.6±0.7	84.3±1.6	83.0±1.3	93.1±0.4	94.8±0.7
しょう油	97.8±0.4	99.9±0.3	96.0±1.0	98.6±0.6	100.7±0.5	101.6±0.6	97.1±0.6	100.6±1.0	96.7±0.6	98.3±0.6
漬物	100.7±0.7	98.9±0.6	99.2±0.9	99.5±0.7	101.2±0.6	101.5±0.8	97.6±0.6	100.5±1.1	96.2±1.3	98.3±1.1
清涼飲料水	101.8±1.3	101.5±1.4	102.2±1.0	99.8±1.1	101.1±1.0	101.3±1.0	98.3±1.6	100.7±1.3	96.1±1.5	97.0±2.6
マーガリン	92.1±1.3	97.1±1.3	91.4±1.1	99.6±1.6	97.6±1.7	96.3±1.6	91.5±1.6	89.6±1.2	92.1±4.0	99.9±4.2
ジャム	100.2±0.5	99.0±0.6	100.3±0.9	99.2±0.3	98.4±0.4	98.9±0.4	97.8±0.2	97.6±0.3	87.8±2.4	91.3±0.6

Mean±S.D., n=3, 添加量:200 µg/g

表 4 水蒸気蒸留法との比較

	水蒸気蒸留法				本法			
	BA		SoA		BA		SoA	
	濃度 (g/kg)	RSD (%)						
しょう油	0.54	0.5	N.D.	—	0.55	0.6	N.D.	—
漬物	N.D.	—	0.71	0.3	N.D.	—	0.74	0.7
ドライソーセージ	N.D.	—	0.61	1.5	N.D.	—	0.64	0.4
かまぼこ	N.D.	—	1.23	2.3	N.D.	—	1.37	0.6

n=3

本来の溶出時間で溶出されるようになった。また、SA および AK についても、ピーク形状不良が解消された。

なお、定量下限値は AK が 30 µg/g、その他の化合物が 20 µg/g であった。

### 3. 4 水蒸気蒸留法との比較

保存料表示のある 4 種類の食品（しょう油、漬物、ドライソーセージ、かまぼこ）を試料とし、本法と水蒸気蒸留法との比較を行った。なお、水蒸気蒸留法は通知法<sup>2)</sup>に準じた。表 4 に示したように、全ての試料について、本法と水蒸気蒸留法のいずれにおいても、表示どおりに各保存料が検出された。本法の測定値は、水蒸気蒸留法の測定値に対して 100.7~111.9%となり、ほぼ同等の値を示した。

## 4. まとめ

8 種類の保存料および 2 種類の甘味料の試験溶液を同時に調製する方法を検討した。

透析外液に 70%メタノールを用いることにより PHBA エステル類で良好な抽出率が得られた。

一部の目的化合物については、クロマトグラム上でのピーク形状の崩れや保持時間のずれが生じたが、これは、得られた透析外液中の夾雑物の影響により、目的化合物のカラムへの保持が妨げられたためと推定された。

Oasis HLB による精製を行うことにより、ピーク形状の崩れや保持時間のずれは解消され、全ての化合物について 83.0~102.2%の良好な回収率が得られた。

## 参考文献

- 1) 鶴田小百合他：固相抽出—LC-MS/MS 法による食品中の甘味料 12 種および保存料 9 種の一斉分析，食品衛生学雑誌，**54**，204-212(2013)
- 2) 医薬食品局食品安全部基準審査課長通知：「食品中の食品添加物分析法」の改正について，食安基発 0528 第 4 号，平成 22 年 5 月 28 日
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2015，金原出版，東京(2015)
- 4) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編 2003，日本食品衛生協会，東京(2003)
- 5) 粕谷陽子他：透析法を応用した食品中の保存料の一斉分析，東京都健康安全研究センター年報，**54**，104-108(2003)
- 6) 守安貴子他：食品中のアセスルファム K，サッカリン及びアスパルテームの分析法，衛生化学，**37**，97-102(1991)
- 7) 守安貴子他：HPLC による食品中のアセスルファム K，サッカリン及びアスパルテームの分析法，食品衛生学雑誌，**37**，91-96(1996)
- 8) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長通知：食品中のアセスルファムカリウム分析法について，食基発第 58 号，平成 13 年 12 月 28 日
- 9) 岡山明子他：高速液体クロマトグラフ法による食品中の 8 種の保存料及びサッカリンナトリウムの一斉分析法，日本食品化学学会誌，**5**，153-158(1998)
- 10) 増田治樹他：シリカゲル NH<sub>2</sub> カラムを用いた甘味料一斉分析法における透析液の組成が与える影響について，姫路市環境衛生研究所報，**23**，60-64(2015)