

保存料・甘味料 15 成分一斉分析法の検討

新宅沙織, 庄真理子, 高井靖智

Study on Simultaneous Analysis of 15 Preservatives and Sweeteners

Saori Shintaku, Mariko Sho and Yasutomo Takai

キーワード: 保存料, 甘味料, 高速液体クロマトグラフ

Key Word: Food preservatives, Artificial sweeteners, HPLC

はじめに

保存料は、食品の変敗を防ぐ目的で、甘味料は食品に甘みをつける目的で使用される食品添加物である。

当センターでは、行政検査において、保存料は9成分（ソルビン酸(SOA), 安息香酸(BA), デヒドロ酢酸(DHA), パラオキシ安息香酸エステル類 (PHBA 類) (メチル(-Me), エチル(-Et), イソプロピル(-isoP), プロピル(-P), イソブチル(-isoB), ブチル(-B)), 甘味料は4成分（アセスルファムカリウム(AK), サッカリンナトリウム(SA-Na), アスパルテーム(APM), ズルチン(DU))の計13成分を分析対象としている。分析法はどちらも透析法(図1のとおり)を用いて前処理を行っているが、課題として、①条件(内液, 外液, 振とう時間, 測定条件)が両分析法で統一されていないこと, ②測定成分数が13成分から近年増加していないことなどがあつた。

そこで、上記課題の解決を目的に、保存料・甘味料一斉分析法を検討したので結果を報告する。

方法

1. 試料

和歌山県内に流通している分析対象成分が含まれていないことを確認したみそ, ドーナツ, 魚肉ソーセージ, ベーコン, じゃがいも, ゼリー, アジの開き, バター, サイダー, しょうゆ, ジャム, 梅干, 白菜

漬および麦茶の14品目を使用した。

2. 標準品および試薬

標準品および溶媒は、関東化学(株)製および富士フィルム和光純薬(株)製を使用した。透析膜は、富士フィルム和光純薬(株)製ダイアラシスメンブラン36を使用した。

3. 装置条件等

HPLCの測定条件は、表1のとおりである。振とう器は、(株)タイテック製ストロングシェイカーSR-ESを使用し、振とうは300r/minにて行った。

表1. 装置条件

HPLC測定条件
LC: Agilent HP1100
カラム: Osaka Soda CAPCELL PAK MGII C18 4.6×150 mm, 3 μm
カラム温度: 40 °C 注入量: 10 μL 流速: 1.0 mL/min
移動相: A液 20 mMリン酸緩衝液(pH3.5) B液 アセトニトリル
B液(%)(min): 4(0-3) → 15(10-18) → 23(25) → 43(33) → 45(38-41) → 70(42-49) → 4(50-59)
測定波長: UV 210 nm(APM, AD, NEO) 230 nm(SA-Na, DU, BA) 240 nm(AK), 254 nm(SOA, PHBA -Me, -Et, -isoP, -P, -isoB, -B) 300 nm(DHA)

4. 分析法

分析法は、図1のとおりである。250mL遠沈管に外液を入れ、そこに試料および内液を加えた透析チューブを加え、振とう器にて振とうを行った。また、測定対象成分数を増加させるために、甘味料であるアドバンテーム(AD)およびネオテーム(NEO)を新たに分析対象成分に含めた。

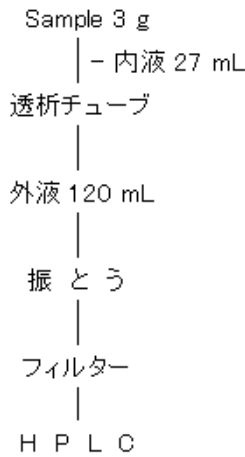


図1. 分析法フロー

結果 および 考察

1. HPLC 条件の検討

従来から分析対象としていた 13 成分および今回新たに追加する甘味料 2 成分 (AD および NEO) の計 15 成分を一斉に測定できる HPLC 条件を検討した。

その結果, 表 1 に示した条件で 15 成分をピーク形状および分離ともに良好に分析できた。(図 2.)

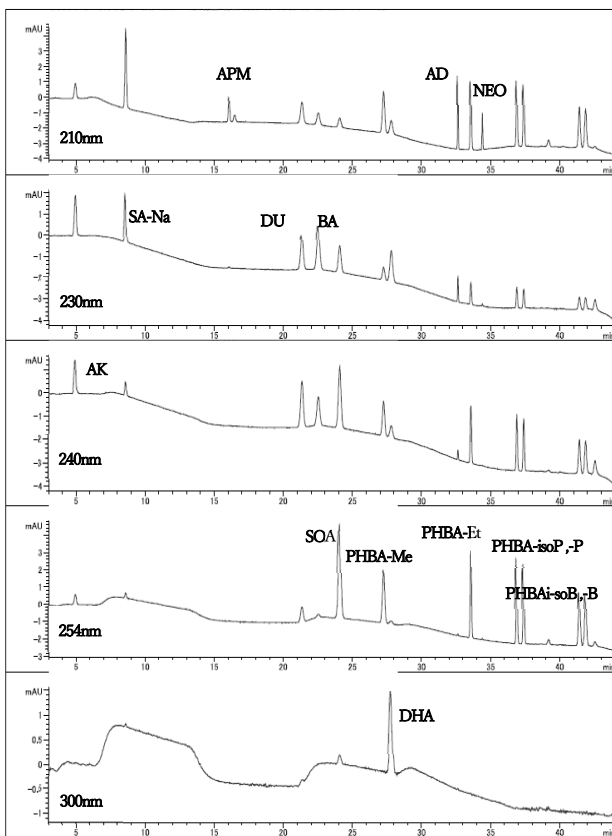


図 2. 標準溶液のクロマトグラム (1 µg/mL)

2. 前処理条件の検討

既存の保存料および甘味料分析法では, 図 3 のとおり分析条件が異なっていたため, 条件の統一化を図ることとした。

	保存料分析法	甘味料分析法
内液	蒸留水または 60%メタノール	10%塩化ナトリウム 含有 10mM 塩酸
外液	上記に同じ	10mM 塩酸
振とう 時間	75 分または 4 時間	4 時間

図 3. 透析法の条件 (既存の方法)

1) 内液・外液の検討

(1)メタノール濃度

過去の検討^{1) 2) 3)}より対象食品の脂溶性が高い場合, 内液・外液に 60%メタノールを使用すると, パラオキシ安息香酸エステル類の回収率が向上することが分かっていたため, 甘味料成分についても, 同様の傾向があるか検討した。なお, 以降の検討において, 回収率の目標値は, 残留農薬等試験法の妥当性評価ガイドライン⁴⁾で示されている 70~120%とした。メタノール濃度を, 0%, 10%, 30%, 60%, 80%とし, ドーナツ等に対し, 添加回収試験を実施したところ, メタノール濃度が低い場合, 一部成分の回収率低下が認められた。(表 2. のとおり)メタノール濃度を 60%以上とするとすべての成分で良好な回収率を得ることができたが, 80%メタノールを使用すると, AK および SA-Na のピーク形状悪化が認められた。よって, 脂溶性が高い, あるいは不明の試料に対しては, 60%メタノールを使用することとした。

表 2. メタノール濃度による添加回収試験結果 (回収率 70%未満の成分のみを記載)

	みそ	カステラ	ドーナツ
10%	PHBA- isoB, B	PHBA- isoP, P, isoB, B	PHBA- isoP, P, isoB, B
30%	-	PHBA-isoB, -B	-
60%	-	-	-
80%	-	-	-

(2) 10mM 塩酸の有無

甘味料の分析では、内液および外液に 10mM 塩酸を使用していたため、この使用の有無により、回収率にどのような影響がでるのか検討したところ、添加しない場合、一部の食品について、APM の回収率が大幅に低下することが確認された。このため、引き続き 10mM 塩酸を使用することとした。

(3) 10%塩化ナトリウムの有無

甘味料の分析では、内液に 10%塩化ナトリウム 10mM 塩酸を使用していたため、10%塩化ナトリウムの有無により、回収率にどのような影響がでるのか検討したところ、添加を行うことで AK および SA-Na で若干の回収率の向上が認められた。しかし、操作性や試液調製の時間等を考慮し、今回検討した食品に対しては、10%塩化ナトリウムの添加を行わないこととした。

2) 振とう時間の検討

1) の検討結果より、内液および外液には、脂溶性が比較的高いと考えられる試料に対しては、60%メタノール/40%10mM 塩酸 (条件A) を、それ以外の食品には、10mM 塩酸 (条件B) を使用し、振とう時間による回収率の経時変化を検討した。

振とう時間 1, 2, 4 時間での回収率は、表 3 のとおりとなった。条件Aの場合は、2時間の振とう時間でも一部食品で十分な回収率が得られず、4 時間の振とうにより 70%以上の回収率を得ることができた。条件Bの場合は、2時間の振とう時間で、70%以上の回収率を得ることができた。以上の結果より、条件Aでは4時間、条件Bでは2時間の振とう時間が必要であることが示唆された。

2. 添加回収試験

1. で検討した条件により、14 品目の試料に対し、添加回収試験を実施した。試験は 5 併行で行い、添加濃度は、すべての成分で 50mg/kg とした。条件は、内液および外液に 60%メタノール/40%10mM 塩酸、振とう 4 時間 (条件①)、内液および外液に 10mM 塩酸、振とう 2 時間 (条件②) とした 2 種類を食品の性状に

より使い分けた。(図 4.) 結果を表 4 に示した。検討した 14 品目について、回収率 77~105%, 変動係数 5.8%以下の良好な結果が得られた。ただし、みそおよびしょうゆについては、若干の妨害成分の検出が認められたため、減算して回収率を算出した。

この方法により、新たに追加した AD, NEO を含む様々な食品に対する保存料・甘味料 15 成分の一斉分析が可能となり、分析の効率化を図ることができた。

	条件①	条件②
内液	60%メタノール	10mM 塩酸
外液	/40%10mM 塩酸	
振とう時間	4 時間	2 時間

図 4. 検討した保存料・甘味料一斉分析法の条件

ま と め

今回、①保存料と甘味料を一斉に分析でき (分析条件統一)、②測定対象成分の増加 (2 成分) を実現した、HPLC のみを使用した保存料・甘味料 15 成分一斉分析法を確立できた。

参 考 文 献

- 1) 東嶋祐興, 他: 迅速透析法による保存料一斉分析の検討, 第 52 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 94, 2015
- 2) 山本純代, 他: 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, 東京都健康安全研究センター年報, 70, 143-147, 2019
- 3) 徳永佑亮, 他: 透析-LC/MS 法を用いた食品中の甘味料 7 種類の一斉分析, 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所研究年報, 6, 52-58, 2022
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知
平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号
「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」

表3. 振とう時間の検討結果

食品名	振とう時間	APM	AD	NEO	SANa	DU	BA	AK	SOA	PHBA-Me	PHBA-Et	PHBA-isoP	PHBA-P	PHBA-isoB	PHBA-B	DHA	条件
魚肉ソーセージ	1h	78	65	69	86	96	100	90	101	99	97	93	94	91	91	98	A
	2h	94	82	88	91	106	102	95	106	105	105	103	103	102	102	102	
	4h	101	96	98	97	105	104	100	105	105	105	105	105	104	104	102	
ベーコン	1h	81	64	67	92	95	100	95	96	99	97	93	93	90	90	99	
	2h	94	82	83	99	102	104	101	103	107	105	103	103	99	99	102	
	4h	99	94	97	97	104	104	96	102	105	105	104	104	102	101	100	
どら焼き	1h	66	49	51	56	78	86	63	86	82	80	73	74	70	68	89	
	2h	85	69	75	71	97	96	84	97	95	94	92	93	88	85	97	
	4h	96	88	90	83	97	98	87	101	98	99	98	98	95	94	99	
白菜漬	1h	87	63	66	93	96	97	97	93	95	91	88	88	80	78	94	
	2h	98	83	86	95	95	99	99	95	95	96	94	93	86	84	96	
	4h	94	91	95	96	95	96	98	95	96	96	94	94	91	90	94	
梅干	1h	82	65	68	90	94	101	98	94	95	91	86	86	75	72	91	
	2h	92	85	89	93	98	102	102	95	97	95	92	92	83	79	94	
	4h	94	93	93	98	94	102	101	95	96	96	94	95	85	81	97	
ジャム	1h	82	64	66	92	91	92	100	98	93	90	87	87	77	77	91	
	2h	96	84	87	96	97	97	101	102	95	95	94	95	85	85	94	
	4h	97	93	92	94	97	97	105	102	96	95	95	94	91	89	93	

内液・外液 条件A:60%メタノール/40% 10 mM HCl aq 条件B:10 mM HCl aq 回収率(n=1)

表4. 添加回収試験結果 (n=5)

食品名	APM	AD	NEO	SANa	DU	BA	AK	SOA	PHBA-Me	PHBA-Et	PHBA-isoP	PHBA-P	PHBA-isoB	PHBA-B	DHA	条件
回収率 (%)	みそ	104	95	102	97	102	100	100	103	104	102	104	103	102	100	105
	ドーナツ	99	89	93	91	100	101	96	104	102	104	103	103	100	99	104
	魚肉ソーセージ	101	96	98	97	99	100	100	103	104	104	104	104	102	101	99
	ベーコン	99	94	97	97	101	102	96	102	103	104	104	104	101	101	98
	どら焼き	95	88	96	87	101	102	88	102	101	102	102	102	100	98	102
	ゼリー	94	77	80	98	102	99	98	101	102	101	99	100	98	95	101
	アジの開き	89	80	90	89	100	102	96	91	101	100	99	98	97	96	99
	バター	100	95	97	83	103	98	96	98	100	100	99	98	95	92	94
	サイダー	96	88	89	96	100	97	99	95	98	97	96	95	92	91	95
	しょうゆ	96	88	88	96	98	103	100	98	100	97	98	95	94	93	99
	ジャム	93	85	87	97	98	95	99	98	98	96	95	93	90	89	95
	梅干	92	86	87	93	97	102	99	96	97	95	93	90	83	80	93
	白菜漬	99	89	92	94	99	96	98	95	98	98	95	93	90	88	93
	麦茶	96	89	91	95	100	96	99	97	100	98	98	96	93	92	94
CV (%)	みそ	1.8	2.7	1.5	1.0	4.1	1.2	1.5	0.9	1.8	0.6	0.6	0.5	1.7	1.3	2.0
	ドーナツ	0.9	1.5	2.2	1.1	1.9	1.6	1.0	0.4	0.6	0.7	0.5	0.4	0.5	0.6	1.0
	魚肉ソーセージ	2.9	4.6	3.3	1.8	1.9	1.0	1.0	1.2	1.1	1.1	1.4	1.1	0.9	0.9	0.4
	ベーコン	1.0	3.8	2.9	1.3	1.0	0.8	1.9	0.9	0.8	0.6	0.6	0.6	1.0	0.6	0.9
	どら焼き	2.0	2.0	2.4	2.8	0.8	0.6	3.4	0.2	1.3	0.3	0.5	0.9	1.1	0.6	1.2
	ゼリー	2.9	5.0	3.9	1.4	1.0	4.8	2.4	0.6	1.2	0.8	1.9	1.1	1.5	1.3	0.9
	アジの開き	2.2	2.9	1.0	0.9	2.2	1.1	1.2	0.3	1.5	0.5	0.5	0.5	4.5	4.2	1.6
	バター	1.1	2.2	2.4	5.1	0.9	5.3	1.6	0.6	1.8	0.7	0.7	1.1	2.7	5.8	4.0
	サイダー	2.7	1.6	1.0	1.2	1.6	2.4	1.2	1.5	1.4	1.5	1.1	1.1	0.5	0.4	3.3
	しょうゆ	1.6	1.1	1.2	0.6	3.4	2.9	2.4	1.1	3.9	0.4	0.6	0.3	1.9	0.9	2.2
	ジャム	0.7	1.8	1.2	1.3	1.5	1.4	3.3	1.1	1.5	0.7	1.6	1.1	1.7	1.9	0.8
	梅干	1.2	1.7	0.9	2.0	1.7	1.2	2.1	0.9	0.4	0.6	0.8	0.9	1.7	1.5	1.2
	白菜漬	1.5	2.4	3.7	1.0	1.3	2.8	2.3	1.3	2.2	1.7	1.7	1.5	3.2	3.5	1.5
	麦茶	0.5	0.7	1.3	1.4	1.6	1.1	1.1	1.1	3.7	0.9	0.9	1.3	0.8	1.3	1.9

条件①: 内液・外液 60%メタノール/40% 10 mM HCl aq 振とう時間 4時間 条件②: 内液・外液 10 mM HCl aq 振とう時間 2時間