

高速液体クロマトグラフィーによる食品中の7種の保存料の 同時分析について

保健化学室 城間博正 大城善昇

Simultaneous Determination of Seven Kinds of Preservatives in Foods by High Performance Liquid Chromatography

Hiromasa SHIROMA Zensho OSHIRO

I はじめに

近年、食品添加物の分析に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が広く用いられるようになってきた。特に保存料については、逆相分配系カラムを用いた方法が多く報告されている^{1)~5)}。その移動相としては、メタノールと緩衝液の混合液が多く用いられているが¹⁾²⁾³⁾⁵⁾⁶⁾、緩衝液の混合比が増すにつれてカラム圧も高くなる傾向にあったため、サンプリングバルブの耐圧の面から手持ちの装置では分析が困難であった。そこで、メタノール混合液にかわる移動相を検討したところ、アセトニトリル・酢酸緩衝液の混合液を使用した場合にカラム圧が低くなり、7種の保存料についても良好な分離が得られた。

また、HPLCによる分析は、多くの場合前処理操作を簡略化しているため、実試料の分析の際には他の分析法による定性確認が必要と考え、薄層クロマトグラフィー(TLC)による簡易定性法についても検討した。

II 実験方法

1. 試料

市販のみそ、しょう油、漬物、かまぼこ、漬涼料水を用いた。

2. 試薬

1) 標準液①HPLC用標準液—BA、SOA及びPHBA—エステル100mgを精秤し、BA、SOAは少量の0.1N水酸化ナトリウムで溶解、PHBA—エステルは50mlのエタノールで溶解後水でそれぞれ100mlとした。この液を原液とし、適宜水で希釈して用いた。②TLC用標準液—SOA、PHBA—エステル20ppm、BA、DHA100ppmの混合液(アセトン溶液)を用いた。

2) 透析膜: UNION CARBIDE社製

Seamless Celulose Tubing

3) 透析補助液: NaCl2.5g、ホウ酸2g(防腐剤として)を0.01NHClに溶かし100mlとする。

4) 薄層: ポリアミドFMプレート5×10cm和光純薬工業(株)製。

5) アセトニトリル: 高速液クロ用

その他の試薬は、すべて特級品を用いた。

3. 装置

日立高速液体クロマトグラフ635A、同638—41形波長可変UVモニタ、同高圧サンプリングバルブ、紫外線ランプ(東京光学製PUV—1B型)

4. HPLCの測定条件

カラム: LiChrosorb RP-18 粒径5 μ m (ϕ 4×150mm)

移動相: アセトニトリル: 0.05M酢酸緩衝液(PH4.4) = 38:62

流速: 1.0ml/分

測定波長: 240nm

カラム温度: 室温

試料注入量: 5 μ l

5. 試験溶液の調整

液体試料はそのまま、固体試料はすりつぶした後、その10gを透析補助液20mlとともに透析膜中に入れ、あらかじめ透析液が200mlとなるように水を入れた広口びんにひたし、20~24時間透析する⁷⁾。それをミリポアフィルター(0.45 μ m)でろ過し、5 μ lをHPLCに注入した。また、透析液10mlを共栓付試験管にとり、NaCl2g、10% H₂SO₄2滴、酢酸エチル1mlを加え、約1分間振とう後静置し、酢酸エチル層10 μ lを薄層にスポットした。

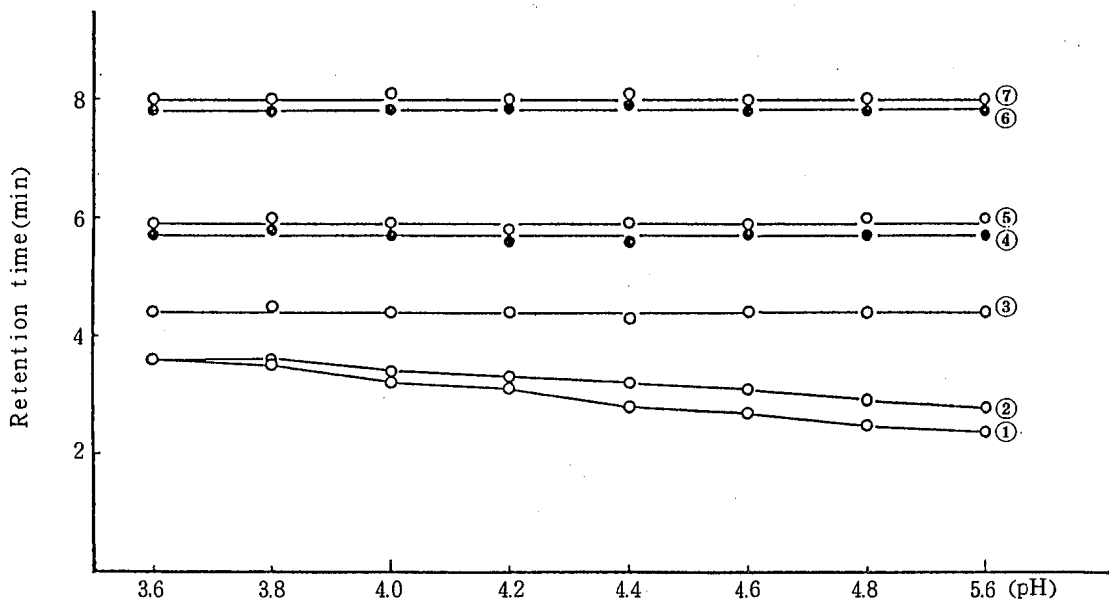


図-1 酢酸緩衝液のpHと溶出時間の関係

- ① Benzoic acid ② Sorbic acid ③ PHBA-Ethyl ④ PHBA-iso-propyl
 ⑤ PHBA-n-propyl ⑥ PHBA-iso-Butyl ⑦ PHBA-n-Butyl

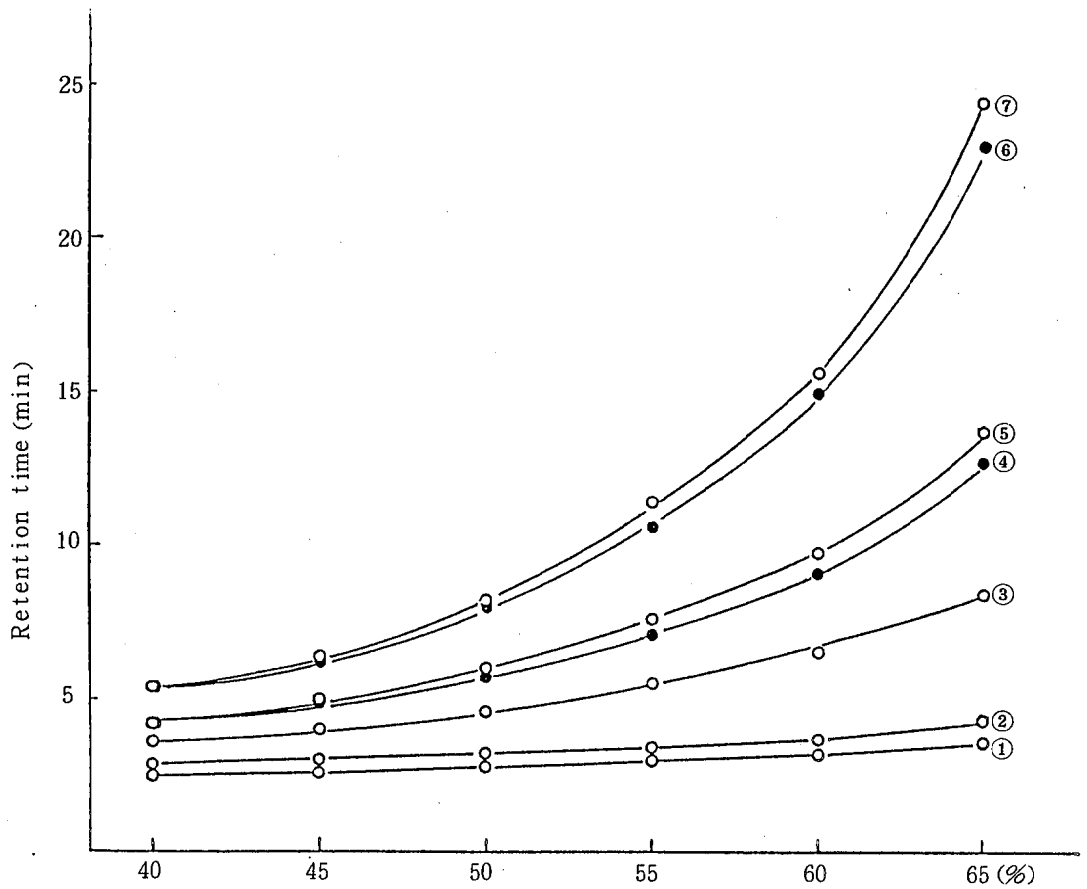


図-2 酢酸緩衝液の混合比と溶接時間の関係

III. 結果と考察

1. HPLCの測定条件

カラムにLichrosorb RP-18、移動相として酢酸緩衝液・アセトニトリル混合液を用いて条件を検討した。最初に、酢酸緩衝液とアセトニトリルの混合比を1:1とし、酢酸緩衝液のPHを変化したところ、BAとSOAはPH4.4付近で良好に分離した(図-1)。しかし、極性の小さいPHBA-エステルは、PHの影響を受けず、特にPHBA-isoプロピルとn-プロピル及びPHBA-isoブチルとn-ブチルは、ほとんど分離していない。そこで次に、酢酸緩衝液のPHを4.4とし混合比を変化したところ、図-2のように酢酸緩衝液の混合比が増すにつれてPHBA-エステルの溶出時間は長くなり、分離も良くなった。すべての溶出時間を20分以内とするため、酢酸緩衝液とアセトニトリルの混合比は68:32とした。

測定波長は、同濃度で同程度の吸光度が得られる240nmとした³⁾⁴⁾。これらの条件におけるクロマトグラムを図-3に示した。

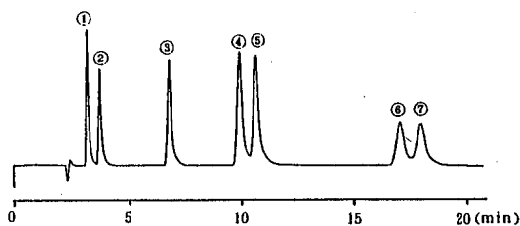


図-3 標準溶液のクロマトグラム

①Benzoic acid ②Sorbic acid ③PHBA-Ethyl ④PHBA-iso-Propyl ⑤PHBA-n-Propyl ⑥PHBA-iso-Butyl ⑦PHBA-n-Butyl

2. TLCによる簡易定性法

現在のところ、一種類の薄層、展開溶媒によりBA、SOA、DHA、PHBA-エステルを分離する方法は、衛生試験法注解、その他にも見当たらない。そこでポリアミドFMプレートを用い、展開溶媒を検討したところ、ヘキサン:ベンゼン:酢酸=15:7:2のとき良好に分離した。そのクロマトグラムを図-4に示した。この方法は操作が簡便で迅速性があるため、HPLC注入前のスクリーニングテストとして有用であった。また、本法を併用することによりHPLCにおいて定性的により信頼性の高い結核が得られた。

検出限界は、試料濃度としてSOA・PHBA-エステル0.01 g/kg、BA・DHA0.05 g/kgであった。

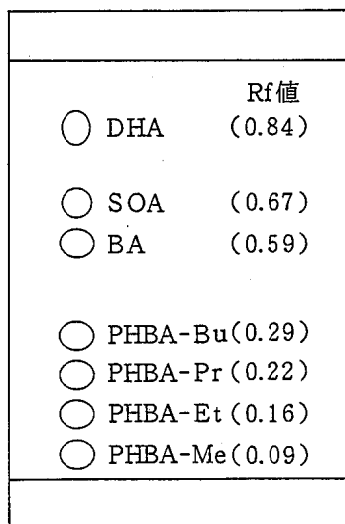


図-4 TLCのクロマトグラム

表-1 添加回収実験

	添加量 (g/kg)	定量値 (g/kg)	回収率 (%)	CV (%)	みそ		しょう油		漬物	
					定量値 (g/kg)	回収率 (%)	CV (%)	定量値 (g/kg)	回収率 (%)	CV (%)
BA	0.5	0.487	97.4	5.0	0.468	93.6	0.3	0.483	96.9	3.8
	0.05	0.046	92.6	1.6	0.046	92.0	0.7	0.048	95.2	0.6
SOB	0.5	0.468	93.6	4.7	0.459	91.8	0.3	0.472	94.4	2.7
	0.05	0.046	92.4	2.3	0.045	90.0	0.4	0.047	93.2	0.4
PHBA-Et	0.5	0.472	94.4	3.0	0.470	92.4	0.6	0.479	95.8	3.8
	0.05	0.047	93.4	3.5	0.047	93.4	2.0	0.048	95.8	1.7
PHBA-Pr	0.5	0.472	94.4	3.0	0.462	92.5	1.6	0.458	91.6	4.7
	0.05	0.045	91.0	1.3	0.046	92.6	2.7	0.047	94.6	1.9
PHBA-Bu	0.5	0.471	94.2	2.4	0.452	90.4	2.6	0.486	97.2	8.0
	0.05	0.045	90.4	1.4	0.048	96.4	4.8	0.045	90.2	2.0

3. 添加回収実験

保存料を含まないことを確認した市販のみそ、しょう油、漬物にBA、SOA、PHBA—エステル(エチル、プロピル、ブチル)を0.05 g/kg及び0.5 g/kgとなるように添加し、回収実験を行った。

その結果を表—1に示した。いずれも回収率90%以上、変動係数8%以下と良好であった。

なお、検出限界値は、試料濃度としてSOA、PHBA—エステル0.01 g/kg、BA0.02 g/kgであった。

4. 他の測定法との比較

市販の保存料を含有する食品(漬物、かまぼこ、しょう油、清涼飲料水)について、本法及びGC法^{a)}(SOA、BA)、分光光度法^{b)}(PHBA—エステル)で定量した。表—2に示すように両法の定量値はよく一致した。

表—2 他の測定法との比較

試料名	保存料	HPLC (g/kg)	Std. method ^{a)} (g/kg)
漬物	SOA	0.84	0.80
かまぼこ	SOA	1.00	0.98
清涼飲料水	BA	0.080	0.084
しょう油	PHBA— Esters ^{b)}	0.064	0.060

a): SOA BA…GC法、PHBA—ester…分光光度法

b): iso-propyl, n-butyl, iso-butyl

IV まとめ

1) 移動相に酢酸緩衝液・アセトニトリル混液を用いることにより、メタノール混液と比較してカラム圧を下げる事ができた。

2) TLCによる簡易定性法を確立した。本法は展開時間が、5～6分と短時間でありスクリーニングテストとして有用であった。また、本法と併用することによりHPLCにおいて定性的により信頼性の高い結果が得られた。

3) 市販食品への添加回収実験では、90%以上と良好であった。また、他の測定法による定量値との比較でもよく一致した。

4) DHAは感度が悪くまたピークもブロードであったため、本法では測定できなかった。

V 参考文献

- 1) 中態他：“第10回九州衛生技術協議会” p29—30 (1985)
- 2) 村上他：“食品衛生学雑誌”26(4) p385—388 (1985)
- 3) 寺団他：“衛生化学”29(5) p297—302 (1983)
- 4) 松永他：“衛生化学”31(4) p269—273 (1985)
- 5) 野沢他：“東京都衛研年報”33 p259—269
- 6) 波多野他訳“逆相高速液体クロマトグラフィ”東京化学同人
- 7) 厚生省環境衛生局監修：“食品衛生検査指針 I” p361～ (1973)
- 8) 日本薬学会編：“衛生試験法注解” (1980)