

高速液体クロマトグラフィー及びキャピラリー電気泳動による食品保存料の分析

足立宏*, 井上純*, 廣瀬達也*, 氏原寛*

Analysis of Food Preservatives by High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis

Hiroshi Adachi*, Jun Inoue*, Tatsuya Hirose*, and Satoru Ujihara*

*Osaka Customs Laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka 552-0021 Japan

Two methods, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Capillary Electrophoresis (CE), were investigated for the analysis of food preservatives. HPLC, under conventional conditions, failed to detect propionate which was not UV absorptive. It was found that sorbate, dehydroacetate and benzoate could be determined in less than 30 minutes when methanol-acetonitrile-citrate buffer (1:2:7) was used as eluent, and also p-hydroxybenzoate esters in less than 35 minutes when methanol-citrate buffer was used as eluent. To analyze the first and second groups of preservatives, however, the time taken to replace an eluent with another must be taken into consideration (it takes about half a day). On the other hand, CE could determine propionate when basic anion buffer was used in electrophoretic solution. It could analyze simultaneously all food preservatives other than propionate when borate buffer was used. Analysis took less than 15 minutes for any of the compounds. The feature of this method, namely that it requires no pretreatment of samples such as steam distillation, makes it a fast and convenient analytical method.

1. 緒 言

近年、食生活の多様化、国際化が進む中で、食生活における加工食品の占める割合は年々増加している。こうした加工食品において、食品の腐敗防止のための食品保存料は重要な添加物の一種である。様々な化学物質が食品保存料として使用されているが、わが国においては、食品衛生法により、使用できる種類や濃度等の使用基準が細かく規定されており¹⁾、この基準に外れたものは、食品としては流通できないこととなっている。

近年、食品衛生法の使用基準に合致しない食品保存料を鳥肉や豚肉等に添加（不可食処理）することによって、食品ではなく動物用飼料として輸入されることがある。

飼料として輸入申告された鳥肉や豚肉は、食用に適するか否かによって分類が異なり、食用に適するものは関税率表第02類に分類され、食用に適さないものは第05類に、さらに調味等の調製をしたものは第23類に分類される。従って、輸入に際しては、食品衛生法の使用基準に合致しない保存料が添加さ

れているか否かを判別する必要がある。

食品保存料の分析は、水蒸気蒸留等の前処理後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）やガスクロマトグラフィー（GC）で分析する方法が一般的である²⁾が、これらの前処理にはかなりの長時間を要する。

今回、水蒸気蒸留等の煩雑な前処理を必要としないキャピラリー電気泳動（CE）による方法を検討した^{3) 4)}ので報告する。

2. 実 験

2. 1 分析試料

2. 1. 1 食品保存料

安息香酸ナトリウム（BA ナトリウム）

ソルビン酸カリウム（SoA カリウム）

デヒドロ酢酸ナトリウム（DHA ナトリウム）

プロピオン酸ナトリウム（PA ナトリウム）（以上キシダ化学製）

パラオキシ安息香酸メチル（PHB-M）

パラオキシ安息香酸エチル（PHB-E）

パラオキシ安息香酸プロピル (PHB-P)

パラオキシ安息香酸ブチル (PHB-B) (以上和光純薬製)

パラオキシ安息香酸イソプロピル (PHB-IP)

パラオキシ安息香酸イソブチル (PHB-IB) (以上東京化成製)

2. 1. 2 輸入品 (飼料として輸入申告されたもの)

乾燥鶏ササミ (ソルビン酸を添加したもの及びデヒドロ酢酸を添加したもの)

乾燥豚の耳 (デヒドロ酢酸を添加したもの及び無添加のもの)
干し魚 (無添加のもの)

2. 2 分析装置及び測定条件

2. 2. 1 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ²⁾

装置: HP1100 (Agilent Technologies 社製)

カラム: Luna 5u C18(2) [250×4.60mm]

カラム温度: 40℃

溶離液: メタノール - アセトニトリル - 5mM クエン酸緩衝液
(1:2:7)

メタノール - 5mM クエン酸緩衝液 (6:4)

[5mM クエン酸緩衝液 (pH4.0): クエン酸一水和物7.0g とクエン酸三ナトリウム二水和物6.0g を蒸留水に溶かして1000ml とし, 10倍希釈する。]

流速: 0.6ml/min

検出器: DAD

検出波長: Signal=230/16nm, Reference=360/100nm

2. 2. 2 キャピラリー電気泳動 (CE) ⁵⁾

装置: HP3D CE (Agilent Technologies 社製)

キャピラリー: フューズドシリカキャピラリー

50 μ mL.D.×56cm, 104cm (Bubble-cell)

50 μ mL.D.×72cm

泳動液: Borate Buffer(BB), Basic Anion Buffer (BAB)

(いずれも Agilent Technologies 社製)

試料注入法: 加圧法 (50mbar, 2sec)

印加電圧: .30KV 及び25KV

キャピラリー温度: 25℃及び20℃

検出器: DAD

検出波長: Signal=192/2nm, Reference=450/100nm

Signal=230/20nm, Reference=450/100nm

Signal=350/20nm, Reference=275/10nm

2. 3 実験方法

2. 3. 1 HPLC による分析条件の検討

2. 1. 1 に示す食品保存料のうち, プロピオン酸ナトリウムを除く 9 種類の食品保存料について, 各々100ppm の濃度になるように蒸留水に溶解し, ポアサイズ0.2 μ m のメンブランフィルターでろ過した後, 等量ずつ混合した液を検液とした。この食品保存料混合溶液を HPLC により分析を行った。

2. 3. 2 CE による分析条件の検討

2. 3. 1 で調製した食品保存料混合溶液を CE により分析を行った。

2. 3. 3 輸入品の分析

輸入品約10g を細かく切断し, 蒸留水100ml を加え30分間振とうし, しばらく静置した後, 除たん白操作を行い, ポアサイズ0.2 μ m のメンブランフィルターでろ過し, そのろ液を検液として, HPLC 及び CE により分析を行った。

なお, HPLC は, 2. 2. 1 の条件 (溶離液: メタノール - アセトニトリル - 5mM クエン酸緩衝液[1:2:7]) で, CE は 2. 2. 2 の条件 (キャピラリー: 50 μ mL.D.×72cm, 泳動液: Borate Buffer, 検出波長: 230nm) で測定した。

2. 3. 4 輸入品への食品保存料の添加回収実験

輸入品を100ppm の濃度に調製した各種食品保存料の水溶液に約5分間浸し, 充分に天日乾燥したものについて, 2. 3. 3 と同様の前処理を行い, 得られた検液を HPLC (測定条件は 2. 3. 3 と同様) 及び CE (測定条件は 2. 3. 3 と同様) により分析を行った。

2. 3. 5 プロピオン酸の分析条件の検討

プロピオン酸 (以下 PA と略する。) は UV 吸収をもたないため, HPLC 及び CE とともに, これまでの条件では検出できなかった。そこで, PA が検出可能な分析条件について検討した。

2. 3. 6 輸入品へのプロピオン酸の添加回収実験

輸入品を100ppm の濃度に調製したプロピオン酸ナトリウム水溶液に約5分間浸し, 充分に天日乾燥したものについて, 2. 3. 3 と同様の前処理を行い, 得られた検液を CE により 2. 2. 2 の測定条件 (キャピラリー: 50 μ mL.D.×72cm, 泳動液: Basic Anion Buffer, 検出波長: 350nm) で分析を行った。

3. 結果と考察

3. 1 HPLC による分析条件の検討

溶離液として, メタノール - アセトニトリル - 5mM クエン酸緩衝液 (1:2:7) を用いて分析した結果を Fig.1に示す。カラム温度40℃, 流速0.6ml/min の分析条件では, パラオキシ安息香酸ブチル (以下 PHB-B と略記する。) の保持時間が約195分とかなりの時間を要した。そこで, カラム温度55℃, 流速0.8ml/min に変更した結果, PHB-B の保持時間は約100分と短縮されたが, 保持時間の短い安息香酸 (以下 BA と略記する), パラオキシ安息香酸メチル (以下 PHB-M と略記する), ソルビン酸 (以下 SoA と略記する) 及びデヒドロ酢酸 (以下 DHA と略記する) のピークの分離が悪くなった。

次に, 溶離液として, メタノール - 5mM クエン酸緩衝液 (6:4) を用いて, カラム温度40℃, 流速0.6ml/min で分析した結果を Fig.2に示す。分析時間は, 約32分と短縮できたものの, 保持時間の短い4本のピークの分離はさらに悪い結果となった。

以上のことから, SoA, DHA, BA には, 溶離液として, メタノール - アセトニトリル - 5mM クエン酸緩衝液 (1:2:7) を用い, パラオキシ安息香酸エステル類には, 溶離液として, メタノール - 5mM クエン酸緩衝液 (6:4) を用いて分析することが望ましいと考えられる。

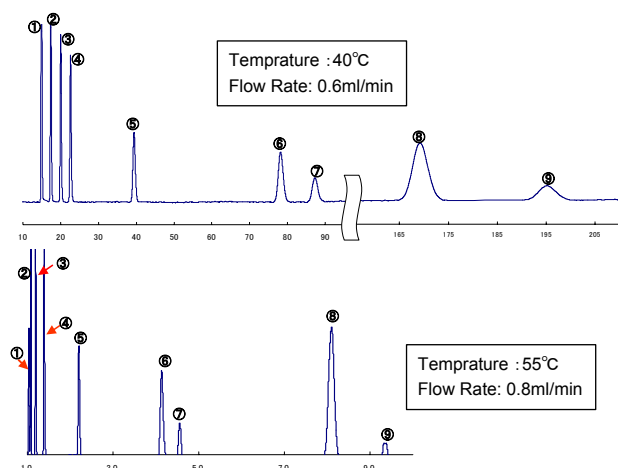


Fig.1 Liquid chromatograms of standard preservatives solution by HPLC (Methanol/Acetonitrile/5mM citrate buffer=1/2/7)
① : BA, ② : PHB-M, ③ : SoA, ④ : DHA, ⑤ : PHB-E, ⑥ : PHB-IP, ⑦ : PHB-P, ⑧ : PHB-IB, ⑨ : PHB-B

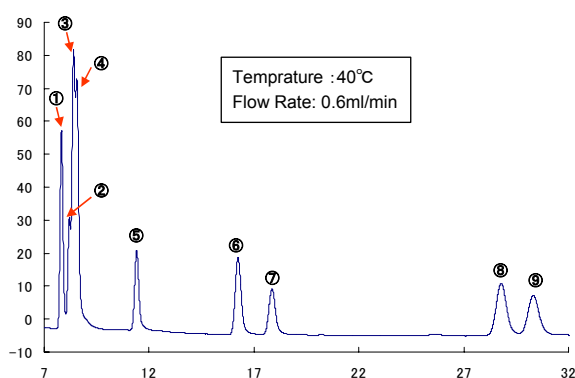


Fig.2 Liquid chromatogram of standard preservatives solution by HPLC (Methanol/ 5mM citrate buffer=6/4)
① : BA, ② : PHB-M, ③ : SoA, ④ : DHA, ⑤ : PHB-E, ⑥ : PHB-IP, ⑦ : PHB-P, ⑧ : PHB-IB, ⑨ : PHB-B

3. 2 CE による分析条件の検討

56cm のバブルセルキャピラリーを用いて、検出波長192nm で分析した結果、ピークは7本しか検出しなかった (Fig.3)。PHB-B とパラオキシ安息香酸イソブチル (以下 PHB-IB と略記する。) のピークが重なっており (Fig.3 - ①), またパラオキシ安息香酸プロピル (以下 PHB-P と略記する。) とパラオキシ安息香酸イソプロピル (以下 PHB-IP 略記する。) のピークが重なっている (Fig.3 - ②)。そこで、電圧を30KV から25KV に下げて分析した結果、ピークは7本から8本になった (Fig.4) が、PHB-B と PHB-IB のピークが重なっており (Fig.4 - ①), 56cm のキャピラリーでは、これらを分離するのは困難と考えられる。

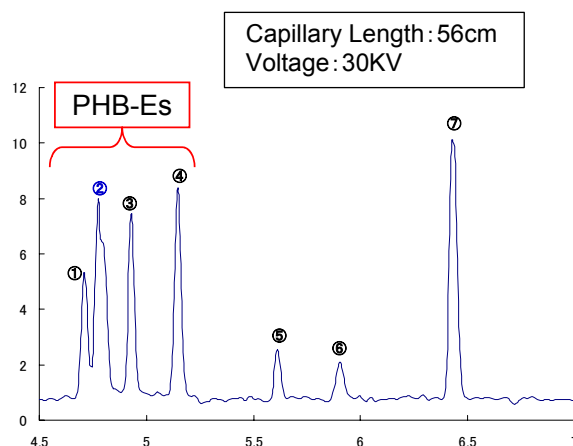


Fig.3 Electropherogram of standard preservatives solution by CE.
① : PHB-IB + PHB-B, ② : PHB-IP + PHB-P, ③ : PHB-E, ④ : PHB-M, ⑤ : DHA, ⑥ : SoA, ⑦ : BA

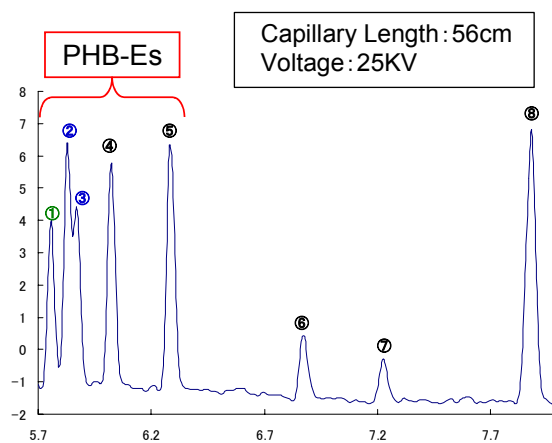


Fig.4 Electropherogram of standard preservatives solution by CE.
① : PHB-IB + PHB-B, ② : PHB-IP, ③ : PHB-P, ④ : PHB-E, ⑤ : PHB-M, ⑥ : DHA, ⑦ : SoA, ⑧ : BA

次に、キャピラリーを72cm のキャピラリーに、また検出波長を230nm に変更して分析した結果を Fig.5に、更に104cm のバブルセルキャピラリーを用いて検出波長230nm で分析した結果を Fig.6に示す。また、電圧を30KV から25KV に下げて、分析した結果 Fig.7に示す。すべて、ピークは8本と変わらず、PHB-B と PHB-IB とを分離することはできなかった。両者の分離のためには、さらなる条件の検討が必要と考えられる。ただし、食品衛生法では、「パラオキシ安息香酸エステル類」として一括して規制されていることから、これらを分離する必要はないため、以上の条件においても、パラオキシ安息香酸エステル類 (PHB-Es) としての分析は可能と考えられる。

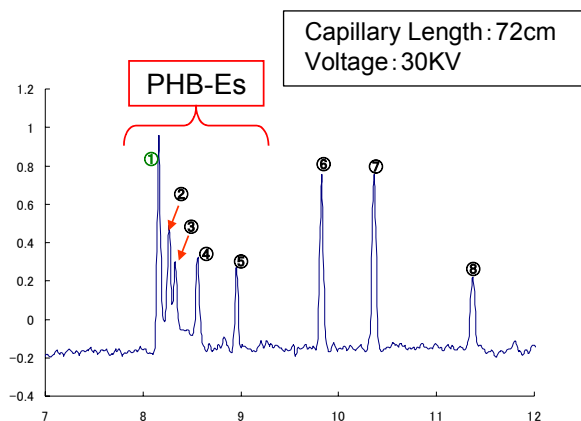


Fig.5 Electropherogram of standard preservatives solution by CE.

① : PHB-IB + PHB-B, ② : PHB-IP, ③ : PHB-P, ④ : PHB-E,
⑤ : PHB-M, ⑥ : DHA, ⑦ : SoA, ⑧ : BA

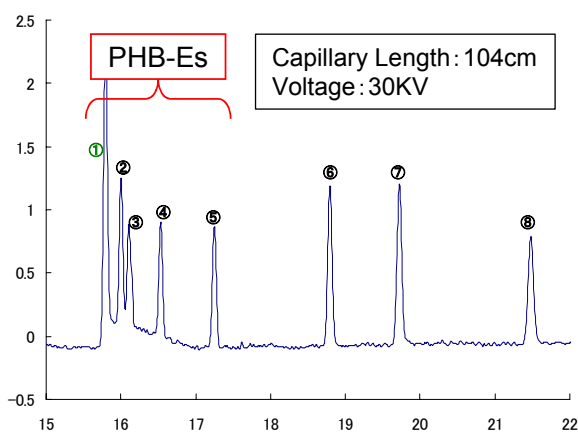


Fig.6 Electropherogram of standard preservatives solution by CE.

① : PHB-IB + PHB-B, ② : PHB-IP, ③ : PHB-P, ④ : PHB-E,
⑤ : PHB-M, ⑥ : DHA, ⑦ : SoA, ⑧ : BA

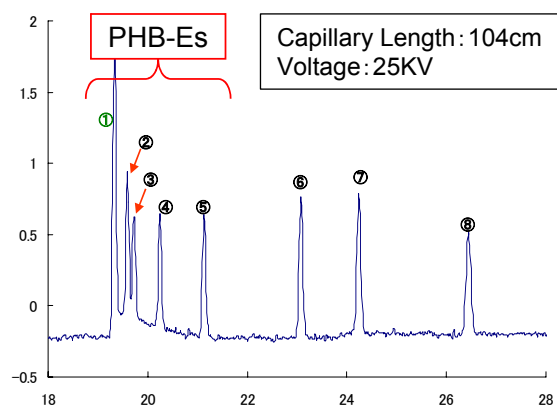


Fig.7 Electropherogram of standard preservatives solution by CE.

① : PHB-IB + PHB-B, ② : PHB-IP, ③ : PHB-P, ④ : PHB-E,
⑤ : PHB-M, ⑥ : DHA, ⑦ : SoA, ⑧ : BA

3. 3 輸入品の分析

DHA を添加したものとして申告された鶏ササミ（輸入品）を HPLC により溶離液として、メタノール - アセトニトリル - 5mM クエン酸緩衝液（1 : 2 : 7）を用いて分析した結果、DHA を検出したが、鶏ササミ由来と考えられる多数のピークによってベースラインが乱れ、非常に判別しづらい結果となった（Fig.8）。同じ鶏ササミ輸入品を CE により 72cm のキャピラリーを用いて、検出波長を 230nm で分析した結果、DHA が検出され、HPLC に比べ非常に良好な分離結果が得られた（Fig.9）。

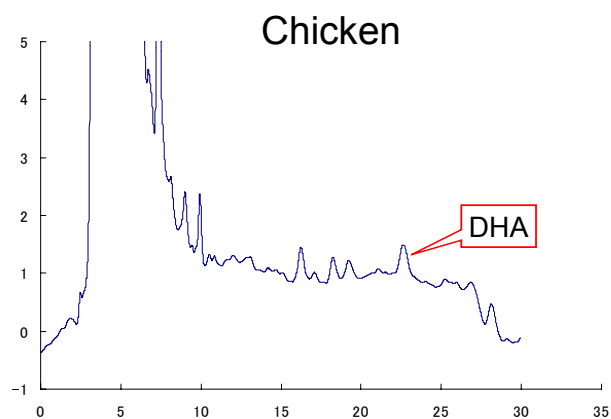


Fig.8 Liquid chromatogram of extracts of imported good (dried chicken) by HPLC.

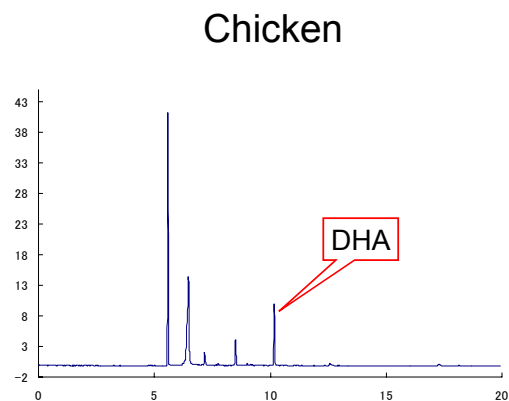


Fig.9 Electropherogram of extracts of imported good (dried chicken) by CE.

次に、DHA を添加したものとして申告された豚の耳（輸入品）を HPLC により、上記と同様の条件で分析した結果、DHA を検出した（Fig.10）。また、同じ豚の耳輸入品を CE により、上記と同様の条件で分析した結果、DHA が検出された（Fig.11）。

Ears of Pig

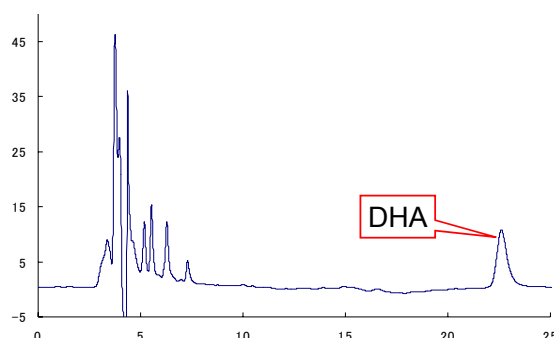


Fig.10 Liquid chromatogram of extracts of imported good (dried pig ears) by HPLC.

Ears of Pig

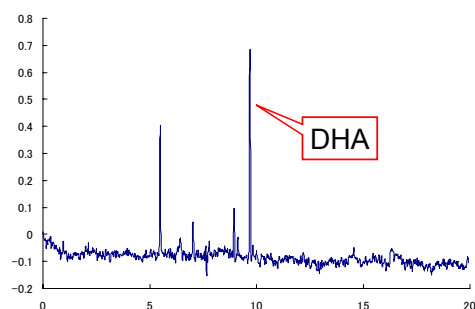


Fig.11 Electropherogram of extracts of imported good (dried pig ears) by CE.

3. 4 輸入品への食品保存料の添加回収実験

SoA を添加したものとして申告された鶏ササミ（輸入品）を HPLC により分析した結果，SoA が検出された（Fig.12）。この

Chicken

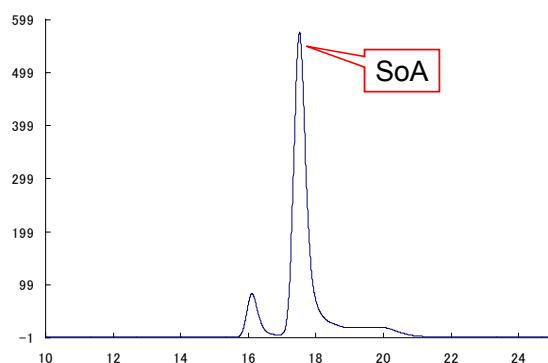


Fig.12 Liquid chromatogram of extracts of imported good (dried chicken) by HPLC.

鶏ササミ輸入品を安息香酸ナトリウムとデヒドロ酢酸ナトリウムの混合水溶液に浸し，充分に天日乾燥し，2. 3. 3と同様に処理した試料を HPLC により分析した結果，BA，SoA 及び DHA が検出された（Fig.13）。同様に，PHB-M，パラオキシ安息香酸エチル（以下 PHB-E と略記する。），PHB-P 及び PHB-B の混合水溶液に浸し，充分に天日乾燥し，2. 3. 3と同様に処理した試料を HPLC により分析した結果，PHB-M 及び PHB-E は良好に分離できたが，PHB-P と PHB-B は，ベースラインが乱れ，非常に判別しづらい結果となった（Fig.14）。同じ試料につ

Chicken +BA,DHA

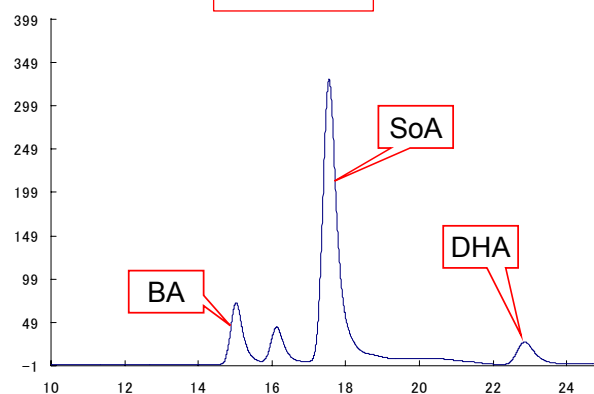


Fig.13 Liquid chromatogram of extracts of imported good (dried chicken) added BA and DHA by HPLC.

Chicken +PHB-B,P,E,M

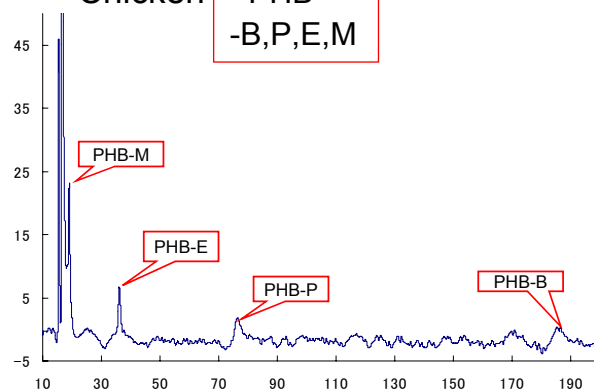


Fig.14 Liquid chromatogram of extracts of imported good (dried chicken) added PHB-M, PHB-E, PHB-P and PHB-B by HPLC.

いて CE により分析した結果，いずれも HPLC に比較すると分離も良好でシャープなピークが得られた（Fig.15, 16）。

Chicken

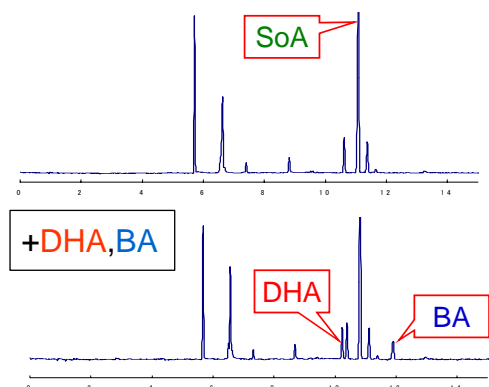


Fig.15 Electropherograms of extracts of imported good (dried chicken) by CE.

Chicken

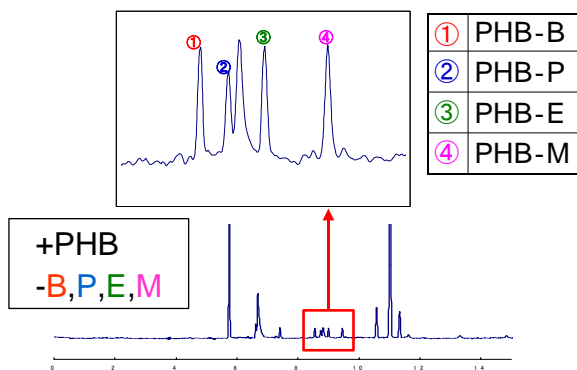


Fig.16 Electropherogram of extracts of imported good (dried chicken) added PHB-M, PHB-E, PHB-P and PHB-B by CE.

次に、食品保存料無添加の干し魚輸入品に上記と同様の食品保存料を添加したものを CE により分析した結果を Fig.17に、ま

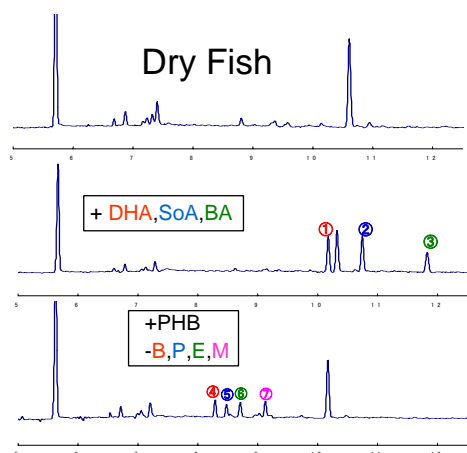


Fig.17 Electropherograms of extracts of imported good (dried fish) by CE.

① : DHA, ② : SoA, ③ : BA, ④ : PHB-B, ⑤ : PHB-P, ⑥ : PHB-E, ⑦ : PHB-M

た、食品保存料無添加の豚の耳輸入品に上記と同様の食品保存料を添加したものを CE により分析した結果を Fig.18に示す。いずれも、添加したすべての食品保存料について良好な分離結果が得られた。

Ears of Pig

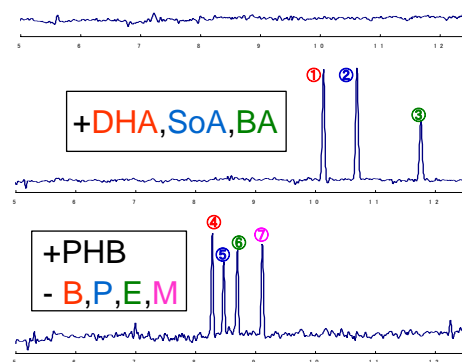


Fig.18 Electropherograms of extracts of imported good (dried pig ears) by CE.

① : DHA, ② : SoA, ③ : BA, ④ : PHB-B, ⑤ : PHB-P, ⑥ : PHB-E, ⑦ : PHB-M

3. 5 プロピオン酸の分離条件の検討

CE により、泳動液として Basic Anion Buffer を用い、2. 2. 2の条件 (キャピラリー : 50 μ mL.D. \times 72cm, 検出波長 : 230nm) で分析した結果、PA を検出した (Fig.19)。

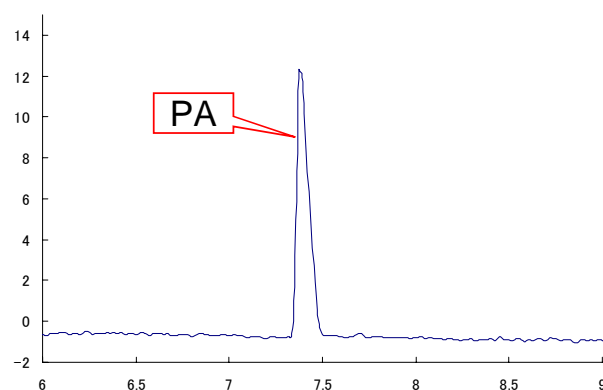


Fig.19 Electropherogram of standard PA solution by CE using BAB.

3. 6 輸入品へのプロピオン酸の添加回収実験

3. 4と同様に処理して PA を添加した試料 (鶏ササミ, 豚の耳及び干し魚) を CE により3.5の測定条件で分析した結果を Fig.20に示す。いずれも、PA を検出することができた。

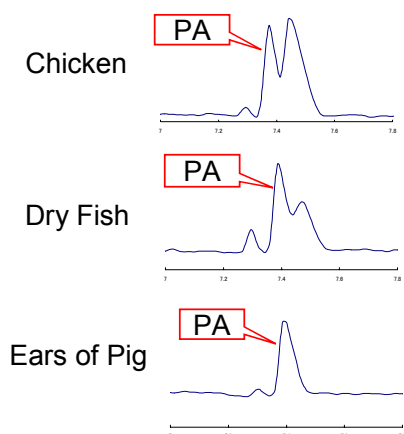


Fig.20 Electropherograms of extracts of imported goods added PA by CE using BAB.

4. 要 約

HPLC 及び CE を用いて、食品中の食品保存料を分析した。

今回検討した HPLC の条件では、UV 吸収を持たないプロピオン酸は検出できなかったが、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、安息香酸については、溶離液にメタノール - アセトニトリル - クエン酸緩衝液 (1:2:7) を用いて、約30分で分析が可能であり、パラオキシ安息香酸エステル類については、溶離液にメタノール - クエン酸緩衝液 (6:4) を用いて、約35分で分析が可能であった。ただし、溶離液の交換にはかなりの時間 (約6時間) が必要であった。

CE では、プロピオン酸については、泳動液に Basic Anion Buffer を用いる条件で検出が可能であり、その他の食品保存料については、Borate Buffer を用いて一斉分析が可能であった。検出時間は、いずれも15分以内と短時間であり、水蒸気蒸留等の前処理も省略できることから、より迅速な分析が可能となった。

なお、今回検討した CE の条件では、パラオキシ安息香酸ブチルとパラオキシ安息香酸イソブチルの検出ピークを分離することはできなかった。両者の分離、定量が必要であれば、さらなる条件の検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) 鈴木郁生, 野島庄七, 谷村顕雄監修: “第7版食品添加物公定書解説書”, (1999), (廣川書店).
- 2) 菅原劉幸, 前川昭男監修: “新食品分析ハンドブック”, (2000), (建帛社).
- 3) 本田進, 寺田茂編: “キャピラリー電気泳動 基礎と実際”, (1995), (講談社サイエンティフィク).
- 4) “キャピラリー電気泳動用分析キット取扱説明書 (有機酸, 無機陰イオン, めっき液, 糖)”, (横河アナリティカルシステムズ株式会社).
- 5) “飲料中の人工甘味料と保存料の分析”, (1995), (横河アナリティカルシステムズ株式会社).