

〔短 報〕

# HPLCによる食品中の保存料および甘味料の一斉分析法の検討

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 小澤 祐子・寺沢 蓉子・石本 聖  
吉村 瑞江

## 〔和文要旨〕

保存料9成分および甘味料2成分について、QuEChERS法を用いた同時抽出およびHPLCによる一斉分析法の検討を行った。強酸性物質である甘味料を効率よく抽出するために、アセトニトリルに水および酸を加えて抽出効率を比較した結果、0.4%ギ酸溶液を添加することで十分な回収率が得られた。分析にはフェニルカラムを用い、0.1%ギ酸とアセトニトリル/メタノール（1：1）のグラジエント条件によりHPLCで測定した。本法により、たくあん漬け、清涼飲料水、しょう油、ロースハム、ビスケットの5食品について添加回収試験を行ったところ、全ての成分で回収率は72.2～104.2%、RSDは0.1～4.1%と良好な結果を得ることができた。

キーワード：保存料，甘味料，一斉分析，高速液体クロマトグラフ

## 1 はじめに

食品添加物は、食品の製造過程または食品の加工・保存の目的で使用され、近年では食品の製造・流通に欠かせないものになっている。本県では、食品衛生監視指導計画に基づき、県内に流通する加工食品を収去し、使用基準<sup>1)</sup>への適合性のほか、食品表示との整合性を確認している。

当センターでの食品添加物検査は、保存料、着色料、甘味料、発色剤、酸化防止剤、防ばい剤等の食品添加物の種類ごとに「第2版 食品中の食品添加物分析法」<sup>2)</sup>（以下、通知分析法）に準拠した分析法を用いて個別に行っている。また、収去検査における検査依頼項目が複数の食品添加物の種類にまたがることも多く、1検体につき複数の分析法を用いる必要がある。一方、当センターで日常的に行っている食品添加物検査では液体クロマトグラフ（HPLC）を用いた分析法が多数を占めており、同時に検査できる項目が限られているため、検査が煩雑になっている。検査の効率化のためには、複数の食品添加物を同時に検査できる分析法の確立が望まれる。

食品添加物の中でも、保存料と甘味料は使用可能な食品が共通の場合が多いことから、これらの同時分析により検査の効率化が可能となる。

今回、保存料9成分と甘味料2成分についてQuEChERS法を用いて同時抽出し、HPLCによる一斉分析法を検討したのでその概要を報告する。

## 2 材料と方法

### 2.1 試料

既報<sup>3)</sup>の集計をもとに、収去検査で検体数の多かった漬物、清涼飲料水およびしょう油、保存料の対象外使用事例があった菓子、保存料の使用率が高かった食肉製品の5種類を対象食品とした。

添加回収試験には、分析対象添加物の表示がない、たくあん漬け、清涼飲料水、しょう油、ロースハムおよびビスケットを用いた。

### 2.2 分析対象添加物

アセスルファムカリウム（以下AK）、サッカリンナトリウム（Sa-Na）、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ステル類

---

Study of Simultaneous Determination of Preservatives and Sweeteners in Foods by HPLC. by OZAWA Yuko, TERASAWA Yoko, ISHIMOTO Takashi and YOSHIMURA Mizue (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Preservative, Sweetener, Simultaneous Determination, HPLC

(PHBA-Es : パラオキシ安息香酸イソブチル (PHBA-iBu), 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エチル (PHBA-Et), パラオキシ安息香酸ブチル (PHBA-Bu), パラオキシ安息香酸プロピル (PHBA-Pr), パラオキシ安息香酸メチル (PHBA-Me)) の 11 成分を分析対象とした。

### 2・3 試薬等

標準品は, AK (純度 98.0% 以上, 生化学用), Sa-Na 二水和物 (純度 99.0% 以上, 特級), BA (純度 99.5% 以上, 特級), SoA (純度 98.0% 以上, 特級), PHBA-Et (純度 99.0% 以上, 特級), PHBA-Me (純度 99.0% 以上, 特級) は富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。PHBA-Bu (純度 99.0% 以上, 特級), PHBA-Pr (純度 99.0% 以上, 特級) は関東化学(株)製を用いた。DHA (純度 98.0% 以上), PHBA-iBu (純度 99.0% 以上), PHBA-iPr (純度 99.0% 以上) は東京化成(株)製を用いた。

有機溶媒については高速液体クロマトグラフ用を使用した。その他試薬は試薬特級を使用した。水は超純水 (Milli-Q 水) を使用した。

### 2・4 標準溶液の調製

標準原液 (40mg/mL) は各標準品を秤量し, メタノールで溶解して調製した。また, AK および Sa-Na は 50% メタノールで溶解し調製した。なお, Sa-Na の標準原液は溶液 1mL あたり 47mg の Sa-Na 二水和物を秤量して調製した。

各標準原液を合わせとりメタノールで希釈して表 1 に示す濃度 (混合標準溶液中の各化合物の濃度は, 本表に示す濃度の比率によるものとし, 以下 AK の濃度のみを示す) の混合標準溶液を調製した。

混合標準溶液を 10% アセトニトリルで希釈し, 0.1 ~ 10µg/mL の検量線用標準溶液を調製した。

### 2・5 装置

HPLC は Agilent 製 1260 Infinity を, 遠心分離機は(株)久保田製作所製 テーブルトップ遠心機 8500 を, ホモジナイザーは IKA 製 ULTRA-TURRAX T25 Basic を用いた。

### 2・6 測定条件

分析カラム : Restek 製 Raptor Biphenyl (内径 2.1mm, 長さ 100mm, 粒子径 2.7µm), カラム温度 : 30°C, 移動相 : A ; 0.1% ギ酸溶液, B ; アセトニトリル / メタノール (1 : 1), グラジエント条件 : B3% (0 分) -B60% (10 分) -B60% (20 分) -B3% (20.01 分) -B3% (30

表 1 分析対象添加物

用途	略記	添加物名	濃度 (mg/mL)
甘味料	AK	アセスルファムカリウム	4
	Sa-Na	サッカリンナトリウム	
	BA	安息香酸	4
	SoA	ソルビン酸	
	DHA	デヒドロ酢酸	
保存料	PHBA-iBu	パラオキシ安息香酸イソブチル	2
	PHBA-iPr	パラオキシ安息香酸イソプロピル	
	PHBA-Et	パラオキシ安息香酸エチル	
	PHBA-Bu	パラオキシ安息香酸ブチル	
	PHBA-Pr	パラオキシ安息香酸プロピル	
	PHBA-Me	パラオキシ安息香酸メチル	

分), 流速 : 0.3mL/min, 注入量 : 5µL, 測定波長 : 235nm (AK, Sa-Na, BA), 254nm (SoA, PHBA-Es), 310nm (DHA), 妨害ピークが認められた場合の参考波長 : 254nm (AK), 励起 230nm, 蛍光 415nm (Sa-Na)

### 2・7 試験溶液の調製

固体試料は, フードプロセッサで細切して均一化し, 5g を 50mL 容 PP 製遠沈管にとり, 図 1 (a) に示す方法で試験溶液を調製した。液体試料は, 混和後 5g (しょう油は 5mL) を 50mL 容 PP 製遠沈管にとり, 図 1 (b) に示す方法で試験溶液を調製した。

## 3 結果と考察

### 3・1 測定条件の検討

通知分析法では AK, Sa-Na の測定には順相系カラム, 保存料の測定には逆相系カラムを用いている。これらすべてを一斉に分析するには逆相系カラムを用いることが

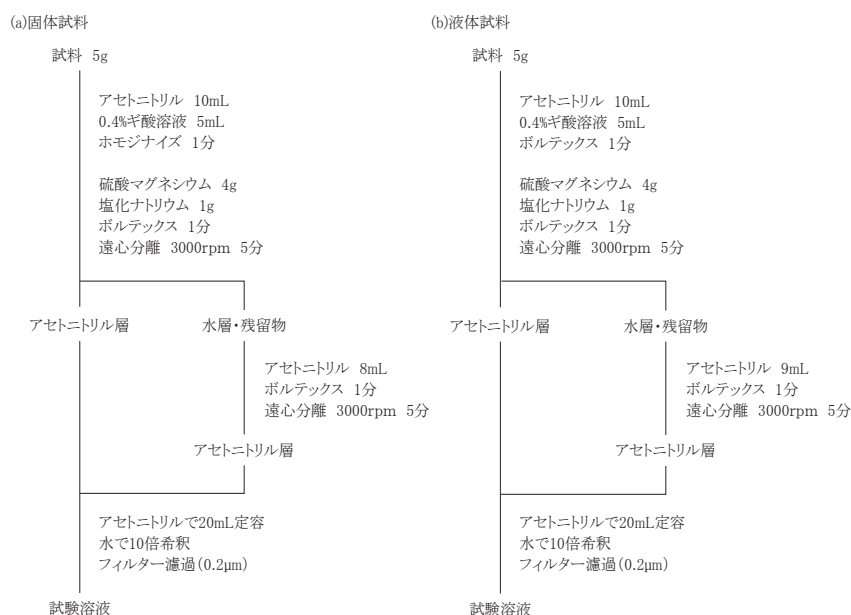


図 1 試験溶液の調製

適当と考えられた。また、使用基準に違反し行政処分の対象となる場合にはLC-MS/MSによる確認が必要とされることから、移動相はLC-MS/MSへ移行可能となるよう揮発性の酸または塩の使用について検討を行った。

はじめに、逆相系カラムのうち一般的に用いられているODSカラムを選択したが、AKとSa-Naについては良好な保持を得られなかった。鶴田ら<sup>9)</sup>は $\pi$ 電子相互作用を持つフェニルカラムを用いることでAKとSa-Naの保持が向上したと報告している。そこでフェニルカラムであるジーエルサイエンス製Inertsil Ph-3、Agilent製Poroshell 120 Phenyl-Hexyl、Restek製Raptor Biphenylを比較検討した結果、AKとSa-Naの保持が最も良好であったRaptor Biphenylを選択した。

次に、Raptor Biphenylカラムを用いて移動相条件を検討した。酸性化合物を保持させるため、ギ酸-メタノール系を選択したところ、PHBA-iPrとPHBA-Pr、PHBA-iBuとPHBA-Buの構造異性体同士の分離は良好であったが、SoAとBAの分離が困難であった。一方、移動相溶媒にアセトニトリルを用いると、SoAとBAの分離は向上したが、構造異性体は完全に分離できなかった。そこで、移動相溶媒にアセトニトリル-メタノール混液を用いたところ、SoAとBA、PHBA-Esともに良好な分離を得ることができた。ギ酸濃度や溶媒混合比を検討した結果、0.1%ギ酸とアセトニトリル-メタノール(1:1)のグラジエント分析により、11成分をベースライン分離しつつ、すべての成分を12分で溶出することができた。

測定にはフォトダイオードアレイ検出器(PDA)を用い、波長は各成分の極大吸収に近い235nm(AK, Sa-Na, BA)、254nm(SoA, PHBA-Es)および310nm(DHA)の3波長に設定した。また、保持時間の短いAKとSa-Naは食品由来の夾雑ピークの影響を受けやすいことから、妨害ピークにより定量が困難な場合、AKについては254nm、Sa-Naについては蛍光検出器を用い励起波長230nm、蛍光波長415nmで測定することとした。

以上の条件により、当初3グループに分けて測定していた保存料9成分および甘味料2成分を同時に測定することが可能となり、分析時間が大幅に短縮された。

### 3・2 試料溶媒の検討

HPLC測定では、試料溶媒の組成や注入量がピーク形状に影響することがある。当初、20%アセトニトリルで標準溶液を調製し測定していたが、保持時間の短いAKにショルダーピークが生じたことから、試料溶媒の組成について検討を行った。10%アセトニトリルで標準溶液を希釈し測定したところピーク形状が改善したことから、試料溶媒は10%アセトニトリルとすることとした。

### 3・3 抽出条件の検討

保存料と甘味料を同時に抽出する方法として、透析法<sup>4)5)</sup>や直接抽出法<sup>6)10)</sup>が報告されている。しかしながら、透析法は抽出に長時間を要し、低分子の食品夾雑物も透析膜を通過するため食品の種類によっては追加精製が必要となる。また、直接抽出法は溶媒使用量が多く、溶媒濃縮や固相抽出による精製などの操作が煩雑である。

一方、五十嵐ら<sup>11)</sup>は6種甘味料および10種保存料についてQuEChERS法を用いた一斉抽出法を検討し、良好な結果が得られたと報告している。そこで、同報を参考に、保存料および甘味料を同時抽出する方法について検討を行った。

11成分を添加した水5gを試料とし、アセトニトリル10mLを加えて1分間激しく混和し、これに塩析剤として硫酸マグネシウム4gおよび塩化ナトリウム1gを加えて1分間混和した後、遠心分離してアセトニトリル層を採った。水層および残留物にアセトニトリル9mLを加え1分間混和した後、遠心分離してアセトニトリル層を採った。得られたアセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルを加えて20mLに定容したものを抽出液とし、水で10倍希釈して測定溶液とした。その結果、回収率は保存料9成分でいずれも97.4~103.9%と良好であったが、AKで92.0%、Sa-Naで88.9%とやや低かった(表2)。

表2 ギ酸溶液添加による抽出効率の比較

ギ酸濃度	回収率(%)				
	AK	Sa-Na	保存料9成分		
			平均	最小値	最大値
ギ酸溶液添加なし	92.0	88.9	99.2	97.4	103.9
0.1%	93.7	97.1	99.4	98.1	100.2
0.2%	94.9	99.2	99.9	99.1	101.0
0.4%	96.3	98.9	100.1	99.4	101.2

そこで、強酸性物質であるAK、Sa-Naの回収率を改善するため、アセトニトリルに水を加えて抽出溶媒の極性を高めること、酸を添加して水層のpHを低下させることの2点について検討を行った。上述の水を試料とした添加回収試験において、1回目の抽出時に0.1%、0.2%または0.4%ギ酸溶液を各5mL加えて同様に操作したところ、表2に示すように甘味料の回収率が向上した。ギ酸濃度については、検討した濃度範囲で最も回収率が良好であった0.4%とすることとした。

なお、抽出の方法については、QuEChERS法では一般的に振とう法が用いられているが、PP製50mL遠沈管に適応した振とう機を保有していないことから、液体試料はボルテックスミキサーでの混合、固体試料はホモジナイズ法で行うこととした。

### 3・4 添加回収試験

5種類の対象食品に、試料中濃度が0.2g/kgになるよ

表 3 添加回収試験結果

	たくあん漬け		清涼飲料水		しょう油		ロースハム		ビスケット	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
AK	90.3	0.8	96.3	2.9	88.0	2.1	84.9	3.2	75.7	0.3
Sa-Na	93.1	1.1	101.6	4.1	92.4	1.3	76.3	2.9	72.2	0.1
BA	91.7	1.1	100.2	3.7	98.5	0.5	100.4	3.5	99.3	0.6
SoA	90.6	1.0	99.5	4.0	100.3	0.6	99.6	3.5	99.1	0.4
DHA	91.9	1.1	98.8	3.5	104.2	0.7	98.9	3.4	98.1	0.6
PHBA-iBu	89.9	1.3	97.1	4.0	97.3	0.4	97.3	3.2	95.8	0.7
PHBA-iPr	90.5	0.8	99.0	3.7	98.6	1.5	99.3	3.4	98.6	0.7
PHBA-Et	90.4	0.9	98.2	2.6	98.8	0.5	99.4	3.1	98.7	1.0
PHBA-Bu	89.9	0.5	96.5	3.4	96.8	0.7	97.2	2.8	95.4	0.3
PHBA-Pr	89.4	1.2	98.2	3.5	101.8	0.8	102.5	3.4	97.3	0.3
PHBA-Me	90.4	1.4	99.6	3.3	99.7	2.6	102.1	3.8	98.2	0.7

うに標準溶液を添加し添加回収試験 (n = 3) を行った。なお、ビスケットについては、試料の 2 倍量の水を加えて浸潤させたのち、抽出操作を行った。

その結果、表 3 に示すように回収率は 72.2~104.2%、RSD は 0.1~4.1% と良好な結果を得ることができた。なお、ビスケットの AK については、ブランク試料の保持時間にネガティブピークが認められたため、254nm で測定し回収率を算出した。それ以外の食品では分析の支障となるピークは認められなかった。

食品別では、たくあん漬けの回収率が 11 成分で 89.4~93.1% と他の食品に比べてやや低い傾向が見られた。成分別では、AK がビスケットで 75.7%、Sa-Na がロースハムで 76.3%、ビスケットで 72.2% と他の成分より低かった。このことから、固体試料についてはアセトニトリルと水の比率やギ酸濃度など抽出条件を改良する必要があると思われた。

#### 4 まとめ

保存料 9 成分および甘味料 2 成分について、QuEChERS 法を用いた同時抽出および HPLC による一斉分析法の検討を行った。

強酸性物質である甘味料を効率よく抽出するために、アセトニトリルに水および酸を加えて抽出効率を比較した結果、0.4% ギ酸溶液を添加することで十分な回収率が得られた。

分析に逆相系のフェニルカラムを用いることで、0.1% ギ酸とアセトニトリル-メタノール (1:1) のグラジエント条件により 11 成分を同時に測定することが可能となった。

検討した方法を用いて、たくあん漬け、清涼飲料水、しょう油、ロースハム、ビスケットの 5 食品について添加回収試験を行ったところ、全ての成分で回収率は 72.2~104.2%、RSD は 0.1~4.1% と良好な結果を得ることができた。

本法は、従来の水蒸気蒸留法、透析法に比べ操作が簡便であり、多検体の同時処理も可能であることから、食品添加物検査の効率化に有効な手法であると考えられる。

#### 文 献

- 1) 厚生省告示第 370 号：食品、添加物等の規格基準、昭和 34 年 12 月 28 日
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知：食品中の食品添加物分析法について、平成 12 年 3 月 30 日付け衛化第 15 号
- 3) 寺沢蓉子, 吉村瑞江, 西森健：石川県における収去食品中の食品添加物の検査状況 (2017 年度~2021 年度), 石川県保健環境センター研究報告書, **59**, 55-58 (2022)
- 4) 麻生花苗, 武田亮, 林由美, 森崎澄江, 長谷川昭生：LC/MS/MS による食品中の保存料及び甘味料の一斉分析, 大分県衛生環境研究センター年報, **39**, 41-47 (2011)
- 5) 澤崎加奈恵, 平井知里, 山岸浩：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, 福岡県衛生環境研究センター年報, **14**, 40-44 (2015)
- 6) 中尾朱美, 藤本喬：パラオキシ安息香酸エステル類と保存料及び甘味料の系統的分析法の検討, 福岡市保健環境研究所報, **28**, 148-151 (2002)
- 7) 多田裕之, 永井宏幸, 白木康一, 出屋敷喜宏：炭酸水素ナトリウム水溶液抽出による食品中の保存料, 甘味料の分析, 岐阜県保健環境研究所報, **15**, 6-12 (2007)
- 8) 氏家愛子, 長谷部洋, 千葉美子, 柳田則明：食品中 7 種の保存料およびサッカリンの HPLC による一斉分析と LC/MS/MS による同定, 食品衛生学雑誌, **48** (6), 163-169 (2007)
- 9) 鶴田小百合, 坂本智徳, 赤木浩一：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**(3), 204-212 (2013)
- 10) 岡部亮, 平間祐志, 竹脇優太郎, 青柳光敏: LC-MS/MSを用いた食品中の甘味料及び保存料の多成分一斉分析法, 北海道立衛生研究所報, **71**, 37-43 (2021)
- 11) 五十嵐友希, 佐々木隆宏, 森川麻里, 山嶋裕季子, 牛山慶子, 貞升友紀, 小林千種: QuEChERS法を用いた食品中食品添加物の一斉抽出法に関する検討 1~6種甘味料・10種保存料~, 第117回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, 41 (2021)