

#### 4) 酵素法及びヒドラジン法の測定結果

##### (a) ドールグレープフルーツ

##### (a) 酵素法による総 L-アスコルビン酸の測定結果

表 87. 総 L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.06	6.38	1.68	
8.57	6.91	1.66	
8.31	6.64	1.67	1.67

##### (b) 酵素法による L-アスコルビン酸の測定結果

表 88. L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.93	7.29	1.64	
8.61	6.95	1.66	
8.71	7.08	1.63	1.64

##### (c) ヒドラジン法によるアスコルビン酸の測定結果

表 89. L-アスコルビン酸の吸光度

	吸光度
A 試験管	0.331
B 試験管	0.022
C 試験管	0.046
D 試験管	0.024

$$A - B = 0.309 \quad C - D = 0.022$$

(b) デルモンテグレープフルーツ

(a) 酵素法による総 L-アスコルビン酸の測定結果

表 90. 総 L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.01	6.28	1.73	1.77
7.56	5.75	1.81	
7.61	5.84	1.77	

(b) 酵素法による L-アスコルビン酸の測定結果

表 91. L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.61	7.21	1.40	1.32
8.42	7.15	1.27	
7.95	6.65	1.30	

(c) ヒドラジン法によるアスコルビン酸の測定結果

表 92. L-アスコルビン酸の吸光度

	吸光度
A 試験管	0.229
B 試験管	0.088
C 試験管	0.042
D 試験管	0.023

$A - B = 0.191$     $C - D = 0.019$

## 6) その他のジュースの測定

### 1) 使用したジュース

- (1) デルモンテパイナップルジュース
- (2) ドールパイナップルジュース
- (3) サントリーの銘茶 品質本位 茶 緑茶
- (4) 伊藤園 おーいお茶 一番茶使用 緑茶
- (5) 特選野菜 ふくれん 緑の野菜&フルーツ 九州産旬野菜

### 2) 酵素法

#### ① 試料調整

- (a) デルモンテパイナップルジュースは、0.2%メタリン酸で 10 倍希釈したものを試料とし低濃度測定を行った。
- (b) サントリーの銘茶、おーいお茶、緑の野菜&フルーツは、2%メタリン酸で 2 倍希釈したものを試料とした。
- (c) ドールパイナップルジュースは、0.2%メタリン酸で 40 倍希釈したものを試料とし低濃度測定を行った（この程度まで、希釈しないと ASOD の反応 pH までこなかった）。

#### ② 測定操作

酵素法で測定を行った。

### 3) ヒドラジン法

#### ① 試料調整

- (a) デルモンテパイナップルジュース は、ジュース 20mL を 5%メタリン酸で 100mL にしたものを試料とした。
- (b) サントリーの銘茶、おーいお茶は、お茶 5mL を 5%メタリン酸で 100mL にし試料とした。
- (c) 緑の野菜及びフルーツジュースは、各ジュース 20mL を 5%メタリン酸で、それぞれ 100mL にし試料とした。

#### ② 測定操作

ヒドラジン法で測定を行った。

#### 4) 酵素法及びヒドラジン法の測定結果

##### (a) デルモンテパイナップルジュース

##### (i) 酵素法による総 L-アスコルビン酸の測定結果

表 93. 総 L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
7.75	6.45	1.30	
8.06	6.78	1.28	
7.94	6.63	1.31	1.30

##### (ii) 酵素法による L-アスコルビン酸の測定結果

表 94. L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
7.14	6.15	0.99	
7.10	6.11	0.99	
7.24	6.25	0.99	0.99

##### (iii) ヒドラジン法によるアスコルビン酸の測定結果

表 95. L-アスコルビン酸の吸光度

	吸光度
A 試験管	0.120
B 試験管	0.071
C 試験管	0.073
D 試験管	0.057

$$A - B = 0.049 \quad C - D = 0.016$$

(b) サントリーの銘茶 品質本位 茶 緑茶

(i) 酵素法による総 L-アスコルビン酸の測定結果

表 97. 総 L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
7.51	3.91	3.60	3.38
7.56	4.26	3.30	
6.90	3.65	3.25	

(ii) 酵素法による L-アスコルビン酸の測定結果

表 98. L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
7.94	5.52	2.44	2.36
8.23	6.06	2.17	
7.77	5.31	2.46	

(iii) ヒドラジン法によるアスコルビン酸の測定結果

表 99. L-アスコルビン酸の吸光度

	吸光度	
A 試験管	0.269	A - B = 0.253 C - D = 0.004
B 試験管	0.016	
C 試験管	0.022	
D 試験管	0.018	

(c) 伊藤園 おーいお茶 一番茶使用 緑茶

(i) 酵素法による総 L-アスコルビン酸の測定結果

表 100. 総 L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.11	5.18	2.93	3.16
8.33	5.24	3.09	
8.25	4.78	3.47	

(ii) 酵素法による L-アスコルビン酸の測定結果

表 101. L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.76	7.37	1.39	1.46
8.15	6.63	1.52	
8.34	6.86	1.48	

(iii) ヒドラジン法によるアスコルビン酸の測定結果

表 102. L-アスコルビン酸の吸光度

	吸光度
A 試験管	0.215
B 試験管	0.047
C 試験管	0.036
D 試験管	0.041

$$A - B = 0.168 \quad C - D = -0.005$$

(d) 特選野菜 ふくれん 緑の野菜&フルーツ 九州産旬野菜

(i) 酵素法による総 L-アスコルビン酸の測定結果

表 103. 総 L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
8.33	7.12	1.21	
8.08	6.87	1.21	
8.30	7.18	1.12	1.18

(ii) 酵素法による L-アスコルビン酸の測定結果

表 104. L-アスコルビン酸の消費酸素量 (ppm)

初期値	終点値	差	差の平均
7.65	6.81	0.84	
7.99	7.05	0.94	
7.59	6.68	0.91	0.90

(iii) ヒドラジン法によるアスコルビン酸の測定結果

表 105. L-アスコルビン酸の吸光度

	吸光度
A 試験管	0.111
B 試験管	0.017
C 試験管	0.047
D 試験管	0.014

$A - B = 0.084$      $C - D = 0.033$

12.3.1 市販食品における酵素法による測定値一覧

表 106 酵素法による測定一覧 (mg/100g)

試料名	酵素法 VC 量			製品のビタミン C 表示量	
	総 L-アスコルビン酸	L-アスコルビン酸	デヒドロアスコルビン酸		
温州みかん	28.8	29.4	-1.4		
富有柿 JA	65.2	76.3	-11.1		
富有柿塩田	69.8	78.8	-10.0		
くだもの好きの 100%ジュース (オレンジ)	31.3	41.2	-9.9		
デルモンテオレンジ	37.2	37.3	-0.1		
トロピカーナオレンジ	33.1	31.2	-0.9		
ドールオレンジ	44.2	49.4	-5.2		
こたつで蜜柑	21.9	26.4	-4.5		
スヌーピーオレンジ	36.3	34.0	-1.7		
ベルチャンオレンジ	43.8	38.0	5.8		
バヤリースオレンジ	21.4	12.8	8.6		
スヌーピーりんご	70.0	71.5	-1.5		
デルモンテアップル	47.3	62.0	-14.7		
ドールアップル	19.2	21.8	-2.6		
トロピカーナアップル	36.8	32.0	4.8		
ベルチャンアップル	2.11	0.91	1.20		
アップル 30 ポケモン	31.2	31.2	0.0	20	
ドールグレープフルーツ	26.9	38.8	-11.9		
デルモンテグレープフルーツ	28.5	30.7	-2.2		
デルモンテパイナップル	3.62	4.16	-0.54		
サントリー品質本位 茶	56.2	57.0	-0.8		
おーいお茶	50.7	34.2	-0.8		
緑の野菜&フルーツ	19.0	20.0	-1.0		32



表 107. ヒドラジン法による測定一覧 (mg/100g)

試料名	ヒドラジン法 VC 量			製品の ビタミン C 表 示量
	総 L-アスコルビン酸	L-アスコルビン酸	デヒドロアスコルビン酸	
温州みかん	23.9	22.6	1.3	20
富有柿 JA	108	101	7.0	
富有柿塩田	86.9	79.9	9.0	
くだもの好きの 100%ジュース (オレンジ)	43.1	39.2	3.7	
デルモンテオレンジ	31.9	29.5	2.4	
トロピカーナオレンジ	31.6	28.6	3.0	
ドールオレンジ	43.8	40.1	3.7	
こたつで蜜柑	22.1	21.0	1.1	
スヌーピーオレンジ	32.5	27.2	5.3	
ベルチャンオレンジ	42.4	37.4	5.3	
バヤリースオレンジ	12.5	7.7	4.8	
スヌーピーりんご	60.5	56.8	3.7	
デルモンテアップル	52.4	52.0	0.4	
ドールアップル	32.8	18.3	14.5	
トロピカーナアップル	43.0	28.1	14.9	
ベルチャンアップル	0	0	0	
アップル 30 ポケモン	30.0	27.7	2.3	
ドールグレープフルーツ	38.0	35.2	2.7	
デルモンテグレープフルーツ	23.4	21.0	2.4	
	1.51	1.01	0.50	
デルモンテパイナップル	31.7	31.2	0.5	
サントリー品質本位 茶	20.6	20.6	0	
おいお茶	25.8	21.7	4.1	32
緑の野菜&フルーツ				

#### 12.4.考察

酵素法では、ほぼすべての試料で、総 L-アスコルビン酸が還元型 VC である L-アスコルビン酸の測定量が多くなった。

市販食品の酵素法の数値がよくない。特に総 L-アスコルビン酸の測定がうまくいっていないため DL-アスコルビン酸定量ができていない。やはり食品中の成分が還元剤や酵素に悪い影響を及ぼしていると考えられる。

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書  
食品中のルチン関連物質の HPLC による定量法の改良

分担研究者 伊藤誉志男（武庫川女子大学薬学部）

**研究要旨** 我が国の「食品中の食品添加物の定量法」は、ほとんど全ての食品に適用できる事を目標にし、指定添加物に関しては1970～1980年にかけて作成できた。

しかしながら、既存添加物に関する定量法については、未だ不備な点が数多く残っている。

今年度は、昨年度から着手した酸化防止剤として既存添加物名簿に記載されているルチン並びにその類縁化合物であるイソクエルシトリンおよびクエルセチン（以下ルチン関連物質）の各種食品からの簡便、迅速な定量法として LC/MS による分析法を作成することにした。

## A. 研究目的

ルチン並びにその類縁化合物であるイソクエルシトリンおよびクエルセチン（以下ルチン関連物質）は既存添加物名簿に記載されている酸化防止剤で、食用油、マーガリン、菓子、加工品および飲料などに使用が許可されている。しかし、化学的合成品以外の添加物については、食品中からの分析法が現在まだ確立されていないものが大部分である。そこで、これら3種のルチン関連物質について、UV-HPLC 及び LC/MS を用いた食品中からの一斉分析法を作製した。更に、日本で使用許可されているフェノール系酸化防止剤4種 [没食子酸プロピル (PG)、ジブチルヒドロキシルエン (BHT)、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ノルジヒドログアヤレチック酸 (NDGA)] の本分析における影響についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試験法の概要

食品中のルチン関連物質は、最も一般に汎用されている UV-HPLC 及び定性にすぐれた LC/MS を用いて一斉分析を行う。

### 2. 試験法

#### (1) 検体採取および試料の調製

一般試料採取法を準用する。

#### (2) 試料液の調製

試料約 5.0g を精密に量り採り、アセトニトリル:エタノール:2-プロパノール (2:1:1) 混液 50.0mL および無水硫酸ナトリウム 10g を加え、5 分間ホモジナイズ後、5 分間超音波処理する。続いて、脂肪含有量の多い食品のみ冷凍冷却 (-20 度、2 時間) による脱脂操作を行う。ろ紙 (5A) を用いてろ過後、ろ液を減圧濃縮する。残渣をメタノールに溶解して全量 5.0mL とする。メンブランフィルター (0.20 $\mu$ m) でろ過したものを HPLC 用測定試験溶液とする。

#### (3) 検量線用標準液の調製

各標準品をメタノールに溶解して標準原液 (1mg/mL) を調製した後、さらにメタノ

ールを用いて適宜希釈した。

#### (4) 測定法

##### 測定条件

1) UV-HPLC にて、次の条件によって測定する。

充填剤：オクタデシル基結合シリカゲル

カラム：Inertsil ODS-3 粒子径 3 $\mu$ m

(150 $\times$ 4.6 mmI.D.)

ガードカラム：Inertsil ODS-3

(5 $\times$ 4.6 mmI.D. GL カート)

以上 GL サイエンス社製

移動相：(A) アセトニトリル

(B) pH2.4 に調整したリン酸

を以下のリニアグラジエントプログラムにて使用する。

0 ~ 6 分 ; 20%、6 ~ 15 分 ; 20% $\rightarrow$ 70%

15 ~ 22 分 ; 70% $\rightarrow$ 100% (A の比率)

流速：1.0 mL/min

波長：254nm

カラム温度：室温

装置：ポンプ PU-980、検出器 UV-970

日本分光(株)製

2) LC/M にて次の条件によって測定する。

充填剤：オクタデシル基結合シリカゲル

カラム：Inertsil ODS-3 粒子径 3 $\mu$ m

(150 $\times$ 2.1 mmI.D.)

ガードカラム：Inertsil ODS-3

(5 $\times$ 2.1 mmI.D. GL カート)

以上 GL サイエンス社製

移動相：(A) アセトニトリル

(B) pH2.4 に調整したギ酸

を以下のリニアグラジエントプログラムにて使用する。

0 ~ 20 分 ; 20% $\rightarrow$ 80%、20 ~ 25 分 ; 80%

(A の比率)

流速：0.2 mL/min

Source block temperature : 120  $^{\circ}$ C

Desolvation temperature : 350  $^{\circ}$ C

イオン化モード：ESI (positive mode)

装置：ポンプ PU-980、検出器 MS

日本分光(株)製

#### 3. 検量線

各標準原液 (1mg/mL) を種々の濃度に希釈し、その 10 $\mu$ L を HPLC に注入した。得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、絶対検量線法により作成した。

#### 4. 試薬

(1) ルチン

(2) イソクエルシトリン

(3) クエルセチン

三栄源エフ・エフ・アイより恵与

(4) メタノール：HPLC 用

(5) アセトニトリル：HPLC 用

(6) エタノール：特級

(7) 2-プロパノール：特級

(8) 無水硫酸ナトリウム：特級

(9) リン酸：特級

(10) リン酸二水素ナトリウム：特級

(11) ギ酸：特級

(12) 試液の調製

1) 混合溶媒

アセトニトリル、エタノールおよび 2-プロパノールを 2 : 1 : 1 に混合する。

2) 0.05mol/L リン酸緩衝液

リン酸二水素ナトリウム二水和物 7.80g を水に溶かし、リン酸で pH を 2.4 に調整し、水を加えて全量を 1000mL とする。

#### 5. フェノール系酸化防止剤の影響

3 種のルチン関連物質に、日本で使用許可されているフェノール系酸化防止剤 4 種 [没食子酸プロピル (PG)、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT)、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ノルジヒドログアヤレチック酸 (NDGA)] を UV-HPLC 及び LC/MS を用いて分析する。

## C. 研究結果

### 1. 操作のフローチャートを下記に示す。

試料 5.0g
混合溶媒 50.0mL <sup>①</sup>
無水硫酸ナトリウム 10g <sup>②</sup>
ホモジナイズ、5分間
超音波処理、5分間
ろ過（ろ紙） <sup>③</sup>
ろ液
減圧濃縮
残渣
メタノールにて全量 5.0mL とする。
メンブランフィルター（0.20 $\mu$ m）
HPLCによる定量

### 2. 検量線

検量線から得られた定量範囲、相関係数および検出限界を示す。（n=5）

検出	酸化防止剤	定量範囲 ( $\mu$ g/mL)	相関係数	検出限界 ( $\mu$ g/mL)
UV	ルチン	1.0~1000	0.9996	0.4
	イソクエルシトリン	0.4~500	0.9999	0.1
	クエルセチン	0.4~300	0.9995	0.1

### 3. 本法による添加回収実験の結果を示す。

#### (1) UV-HPLC

試料	酸化防止剤	回収率 (%)
食用油	ルチン	94.7 $\pm$ 1.13
	イソクエルシトリン	97.2 $\pm$ 0.80
	クエルセチン	98.0 $\pm$ 1.30
マーガリン	Rutin	92.6 $\pm$ 0.85
	Isoquercitrin	92.7 $\pm$ 0.78
	Quercetin	94.6 $\pm$ 0.87
生菓子	Rutin	80.9 $\pm$ 1.47
	Isoquercitrin	80.9 $\pm$ 1.81
	Quercetin	79.6 $\pm$ 0.45

## D. 考察

食品からのルチン関連物質の抽出操作において、①抽出溶媒については、油脂試

料の場合、メタノールも使用できたが、食品によっては夾雑物が共に抽出されるため混合溶媒を用いた方が良かった。②ろ過操作において、油脂試料の場合、無水硫酸ナトリウムを加えずに操作し、分液ろ紙を用いてろ過した方が高い回収率であった。③脂肪含有量の多い食品試料の場合、超音波処理後に冷凍冷却（-20度、2時間）による脱脂操作を加えた方がろ過しやすかった（フローチャート中の①、②、③参照）。

ルチン関連物質の HPLC 分析に関して、1) 粒子径 3 $\mu$ m の Inertsil ODS-3 は粒子径 5 $\mu$ m のカラムに比べて、3種の化合物を短時間で良好に分離することが出来た。2) 移動相にメタノールを用いた場合、ルチンとイソクエルシトリンの分離が不充分であったため、アセトニトリルを用いた。3) LC/MS の移動相にはリン酸は適さないため、ギ酸を使用した。また、イオン化は ESI で negative mode よりも positive mode による検出の方が高感度であった。ルチン、イソクエルシトリン、クエルセチンはそれぞれ *m/z* 611、465、449 の分子イオンピークを確認することが出来た。LC/MS による定量範囲及び検出限界については今後求める予定である。

## E. 結論

各種食品中のルチン関連物質を有機溶剤により抽出し、UV-HPLC 及び LC/MS を用いて一斉分析する定量法を作成することが出来た。添加回収率は、再現性良く 80% 以上の良好な結果であった。

## F. 健康危機管理情報

本研究で得られた結果において、上記に関する特筆すべき知見は特に無かった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

美甘江利子、岡田安代、扇間昌規、伊藤誉志男、日食化誌、**6(1)**、38-42(1999)

### 2. 学会発表

美甘江利子、岡田安代、扇間昌規、伊藤誉志男、日本食品衛生学会第76回学術講演会

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

食品中の未許可添加物の分析法の開発  
分担研究者 川崎洋子 国立医薬品食品衛生研究所

**研究要旨** 1. 保存料のうち未許可添加物であるパラオキシ安息香酸メチル及び指定外となったサリチル酸を含む10種類の保存料の食品中からの定量分析法を試みた。特に高蛋白食品並びに脂肪含有食品は従来測定法では低回収率が指摘されていたが、これらの食品にも適用できる一斉分析法を検討した。

試料を細切または粉碎後透析膜に充填し、80%メタノールを用いて透析した。更に、OASIS HLBカートリッジでクリーンアップし、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により定量した。この前処理法により、発酵食品、乳製品等を含む広範囲の食品に適用できる分析法が開発された。また、保存料を前処理法にエーテルによる抽出後、多孔性ケイソウ土カラム及び逆相型カラムを用いる方法も合わせて検討した。

2. 輸入食品中で着色料は違反件数の多い添加物である。わが国で許可されていない着色料以外に新たな色素が合成され使用されている可能性もあり、食品に使用された着色料を分離、精製し、同定することは輸入食品検査にとって不可欠である。輸入食品中の未確認の着色料を食品中からの分析法を検討し、精製、単離した後、予想される色素を合成し、薄層クロマトグラフィー（TLC）及びHPLCを用いて同定した。

協力研究者  
中里光男（東京都立衛生研究所）  
石橋 亨（東京顕微鏡院）

I. 食品中の保存料の一斉分析法

A. 研究目的

我が国で消費される食品は諸外国に大きく依存し、その輸入は年々増加の一途をたどっているが、一方、我が国で未許可の食品添加物を使用した食品が摘発される頻度も増加している。保存料として

諸外国で許可されているパラオキシ安息香酸メチル（PHBA-Me）もそうした中の1つであり、EU諸国や東南アジア諸国からの輸入品での違反が目立っている<sup>1)</sup>。そこで、PHBA-Meを含めた保存料の一斉分析法の開発を行うことにしたが、さらに、かつて我が国で清酒の保存料として許可されていたサリチル酸（SA）が近年、魚のかす漬けから検出された事例<sup>2)</sup>もあることからSAも含めて検討することにした。

ところで、食品中の保存料の分析は水蒸気蒸留 - 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法が一般的であるが、魚の佃煮のような蛋白性食品やマヨネーズなどの高脂肪食品ではパラオキシ安息香酸エステル類の回収率が低いなどの欠点がある。そこで、衛生試験法・注解 (2000年版) ではこれらの食品では回収率を高めるために水蒸気蒸留を行う前に、メタノール・水 (1:1) 混液で抽出してから水蒸気蒸留に付すようにとの注解が追加されている<sup>3)</sup>。しかし、加工食品では外観から成分組成を知ることが困難であり、抽出操作を行うかどうかの判断は極めて難しい。そこで近年、メタノール<sup>4)</sup>あるいはエチルエーテル<sup>5)</sup>による直接抽出と固相抽出を併用した方法、また、透析法と固相抽出を組み合わせた前処理法<sup>6)</sup>などが考案されている。そこで、前処理に 1) 透析法 2) 溶媒抽出法について多種の食品に対応できる一斉分析法を検討した。

### 1) 透析法を応用した食品中の保存料の一斉分析

#### B. 研究方法

##### 1. 試料

市販のしょう油、ロールケーキ、ロースハム、チーズ、マヨネーズ、ピーナッツバターを用いた。

##### 2. 試薬

1) 安息香酸 (BA), ソルビン酸 (SoA), デヒドロ酢酸 (DHA) 及び SA 混合標準溶液: 各標準品 100.0 mg をはかり、メタノールで 100 mL

としたものを標準原液とし、適宜希釈して使用した。

2) パラオキシ安息香酸エチル (PHBA-Et), 同 *n*-プロピル (PHBA-Pr), 同 イソプロピル (PHBA-iP), 同 *n*-ブチル (PHBA-Bu), 同 イソブチル (PHBA-iB) 及び PHBA-Me 混合標準溶液: 各 100.0 mg をはかり、メタノールで 100 mL としたものを標準原液とし、適宜希釈して使用した。

3) 透析膜: 透析用セロチューブ膜 27/32 (平面幅 33 mm, 膜厚 0.0229 mm, 分画分子量 12,000 ~ 14,000 Viskase Sales 社製) を用いた。

4) 透析用溶液: メタノール・水 (8:2) 混液を用いた。

5) 前処理用カートリッジカラム: OASIS HLB (500 mg, Waters 社製) を用いた。本カートリッジはメタノール 5 mL 及び水 5 mL で洗浄して用いた。

#### 3. 試験溶液の調製

1) 透析: 液状試料はそのまま、固形試料はよく粉砕あるいはホモジナイズした後、その 10 g を取り、約 50 mL の透析用溶液を加えて攪拌した後、透析膜に充てんした。これをメスシリンダー中に入れ、透析用溶液を用いて 150 mL にメスアップし、時々揺り動かしながら室温で 24 時間透析した。

2) クリーンアップ: 透析終了後、透析外液 5 mL を分取し、これに 0.1 mol/L リン酸を用いて全量を 20 mL とし、十分に混和した。この 10 mL を分取し、OASIS HLB カートリッジに負荷し、水 10 mL 及びメタノール・水 (1:1) 混液 10 mL で順次洗浄した後、メタノールで



溶出し，溶出液 5 mL を取り試験溶液とした。

#### 4. HPLC 条件

1) BA, SoA, DHA 及び SA: カラム, Inertsil ODS-80A (4.6 mm i.d. × 150 mm); 移動相, メタノール・アセトニトリル・5 mmol クエン酸緩衝液 pH 4.0 (1:2:7) 混液; 流速, 0.7 mL/min; 検出, 230 nm; 温度, 35 °C; 注入量, 10 µL

2) PHBA エステル類: カラム, Inertsil ODS-80A (4.6 mm i.d. × 150 mm); 移動相, メタノール・水 (6:4) 混液; 流速, 0.7 mL/min; 検出, 254 nm; 温度, 35 °C; 注入量, 10 µL

### C. 結果及び考察

今回, 分析対象とした保存料は我が国で許可されている BA, SoA, DHA 及び 5 種の PHBA エステル類, 輸入食品からしばしば検出される不許可の PHBA-Me 及び過去に我が国で清酒の保存料として許可されていた SA の合計 10 種である。

#### 1. 抽出

##### 1) 水蒸気蒸留

試料からの保存料の抽出は, 通常行っている水蒸気蒸留法では, 表 1 に示したように蛋白性食品及び脂質含有食品において PHBA-Me を含め PHBA エステル類の回収率が極めて悪かった。また, ロールケーキも挟んであるクリームのお脂分による影響が大きく回収率は低かった。

PHBA エステル類は諸外国では菓子類など, 油脂類が比較的使用されている食品も使用対象食品になっていることがあり, このような食品にも対応できる簡便な分析

法を作成する必要があることが分かった。また, SA も一部の食品を除いて回収率が悪いことが分かった。

#### 2) 透析

操作の簡便性から透析法について各種の食品への適応性を検討した。透析条件については岡山ら<sup>5)</sup>の方法に準拠し, 透析用溶液に水を用いて各種食品に適用したところ, 油脂含有食品での PHBA エステル類の回収率が極めて悪く, この現象は分子量が大きくなるほど顕著であった。これは PHBA エステル類が油脂との親和性が水より高いため, これに移行し, 回収率の低下をもたらしたものと思われる。そこで, 透析用溶液にメタノールを加えて PHBA エステル類の透析溶媒への移行率を高めることにした。その際のメタノール濃度について, ロールケーキ及びピーナッツバターを用いて検討した結果を表 2 に示した。

回収率はメタノール含量が増えるに従って, 特に PHBA エステル類で顕著な増加が見られた。油脂含量の多いピーナッツバターでは 80% で最高値に達し, 油脂含量の少ないロールケーキでは 50% 以上で良好な結果が得られた。次にピーナッツバターを試料として 80% メタノールを用いて透析時間の検討を行った。その結果, 図 1 に示したように透析時間は 24 時間で十分であった。

#### 2. クリーンアップ

透析外液をそのまま HPLC に負荷しても大半の試料では, 妨害もなく十分定量が可能であった。し

かし、チーズやヨーグルトあるいはしょう油などの発酵食品ではリテンションタイムの早い SA において夾雑ピークとの分離が十分ではなく、定量の困難な場合が多かった。そこで、固相抽出カートリッジを用いたクリーンアップについて検討した。本法では BA や SoA のような強酸性物質から PHBA エステル類のような弱酸性物質まで、物性の大きく異なるものを分析対象としている。そこで、これらを一括処理することができること、さらに、透析試料のメタノール濃度が高いことを考慮して検討した結果、カートリッジには N-ビニルピロリドンとジビニルベンゼンの共重合体である OASIS HLB が最適であることが分かった。すなわち、本カートリッジは負荷試料のメタノール濃度を 25%以下に調整することでいずれの保存料も保持することが可能であり、また、洗浄溶媒にメタノール・水(1:1)混液を使用しても保存料が溶出することは無く、大きなクリーンアップ効果を得ることができた。また、溶出にはメタノールを用いたが、5 mL の使用ですべての保存料を溶出することができた。図 2 にしょう油を試料とした時のカートリッジで処理する前後のクロマトグラムを示した。特にリテンションタイムの早い SA 付近の夾雑物の低減効果は極めて大きかった。

### 3. HPLC

カートリッジカラムを用いてクリーンアップすることにより、発酵食品なども衛生試験法に採用さ

れている一般的な HPLC 条件を変更せずに用いることが可能であった。また、発酵食品以外の食品は透析外液を直接注入しても夾雑ピークと各保存料のピークとの分離は良好であり、分析時間は約 20 分であった。

### 4. 添加回収率

6 種類の食品に各保存料を 100  $\mu\text{g/g}$  となるように添加し、24 時間放置した後、本法を用いて分析したときの回収率を表 3 に示した。蛋白性食品及び脂肪含有食品のいずれにおいても 71.8~109% と良好な回収率を示した。なお、定量限界は 10  $\mu\text{g/g}$  であった。

### D. 結論

未許可添加物 PHBA-Me 及び SA を含む 10 種の保存料の一斉分析法を開発した。

本法は抽出に透析法を用いることにより、水蒸気蒸留法の PHBA エステル類の蛋白性食品や脂肪含有食品における低回収率を解決した点で有用であった。

また、発酵食品ではさらに、カートリッジカラムによるクリーンアップを行うことにより、衛生試験法・注解などに採用されている一般的な HPLC 条件での分析が可能となった。

添加回収率は 71.8 ~ 109% であり、定量限界は 10  $\mu\text{g/g}$  であった。

本法は簡便であることから多数の試料を一括処理するのに適しているものと考えられる。

### E. 文献

1) 厚生省生活衛生局食品保健課

：検疫所における輸入食品等の  
食品衛生法違反事例

2)立花光雄，青山光雄，穴吹公  
子，熊谷 郁，井上典子：ラボ  
・レポート，第 14 号，34-38，  
1993.

3)日本薬学会編：衛生試験法・  
注解 2000，286-288，2000，金  
原出版，東京.

4)岸 弘子，川名清子，谷 孝  
之：第 35 回 全国衛生化学技術  
協議会年会講演要旨集， p82-83  
(1998)

5)松野伸広，加藤文秋，石橋  
亨，伊藤 武，坂井千三，川崎  
洋子，石綿 肇，山田 隆：日  
本食品衛生学会第 78 回学術講演  
会講演要旨集，p52(1999)

6)岡山明子，田中 健，玉置守  
人：日食化誌， 5， 153-158  
(1998).

#### F. 研究発表

平成 12 年度地方衛生研究所全  
国協議会関東甲信支部理化学研究  
部会で発表

表1 水蒸気蒸留による各種食品からの保存料の回収率

試料	回収率 (%)										
	SA	BA	SoA	DHA	P-Me	P-Et	P-iP	P-Pr	P-iB	P-Bt	
味噌	38.4	98.1	104	103	235	39.2	53.4	37.4	34.5	26.5	
しょう油	85.9	101	99.1	93.3	59.1	91.1	99.7	97.9	93.8	92.5	
こしあん	83.1	102	95.6	90.6	38.0	64.4	90.9	75.8	85.3	75.5	
ロースム	11.0	68.7	94.5	90.6	10.6	18.5	30.6	20.2	22.1	16.8	
粒ウニ	34.4	84.3	82.4	99.3	16.2	23.9	32.7	21.0	18.4	13.2	
ロールケーキ	30.1	78.6	90.5	96.5	12.2	18.4	24.8	15.6	14.0	10.4	
マロンズ	50.9	96.1	103	92.5	20.6	19.3	19.2	12.3	10.7	7.8	
ピーナツバター	27.7	75.1	87.6	83.2	13.2	17.0	20.5	13.0	12.1	8.4	