

透析法を用いた食品中の甘味料及び保存料の 同時抽出法の検討

浅野由紀子 林優一 井戸浩之 網本智一 大野智也佳

Keywords: sweetener, preservative, dialysis method, constant shaking, HPLC

食品中の甘味料2種と保存料8種の検査について、透析法を用いた同時抽出法を検討した。その結果、振とう器を用いて常時振とうしながら室温下で2時間透析を行うことで、同時抽出が可能であった。また、透析内液を10%塩化ナトリウム含有0.01 mol/L塩酸、透析外液を70%メタノール、若しくは、内液と外液のメタノール濃度を上げることで全10成分の抽出が可能であった。なお、4種類の食品を用いた甘味料2種と保存料8種の添加回収試験では77.0~117.4%と良好な回収率を得た。

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・保存の目的に使用されるもので、甘味料は食品に甘味を付与するほか、品質劣化を防止し保存性を高めるものや、糖尿病、肥満、虫歯などの予防のための砂糖の代替品として使用されるものがある。保存料はカビや細菌などの発育を抑制し、食品の保存性を高める目的で使用される。

愛媛県では愛媛県食品衛生監視指導計画に基づき県内で製造・販売される食品の行政検査を実施し、添加物が適切に使用されているかを確認しているが、公定法^{1,2)}に準じた現行の分析法(現行法)では、個々の物質ごとに抽出方法や分析方法が異なり、作業が煩雑で検査に時間を要するなどの問題点がある。

そこで、行政検査のより一層の効率化を目的として、複数の甘味料の分析法として用いられている透析法を応用し、甘味料と保存料を同時抽出し分析する方法(同時抽出法)を検討したので報告する。

材料と方法

1 標準品・試薬

標準品:アセスルファムカリウム(AK)、サッカリンナトリウム二水和物(SA)、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チル(PHBA-Et)、パラオキシ安息香プロピル(PHBA-Pr)、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ブチル(PHBA-Bu)、パラオキシ安息香酸イソブチル(PHBA-iBu)は富士フィルム和光純薬(株)製を用い

た。

試薬:メタノール及びアセトニトリルは富士フィルム和光純薬(株)製のHPLC用を用い、その他の試薬・試液は特級以上のものを使用した。

2 器具及び装置

透析膜:透析用セルロースチューブ 36/32(透過分子量14000,孔50 Å,平面幅44 mm,直径28 mm,壁厚0.0203 mm,Viskase社製

固相カラム:OasisHLB, 3 cc Vac Cartridge, 60 mg, Waters社製

メンブランフィルター:孔径0.20 µm,Merck社製

振とう器:SHAKER SA-31,ヤマト科学(株)製

HPLCシステム:Alliance e2695,日本ウォーターズ(株)製, 1260 Infinity II,アジレント・テクノロジー(株)製

遠沈管:100 mLレーザーマーカー目盛付遠沈管,AGCテクノガラス(株)製

3 試料

愛媛県内に流通している、分析対象物質の表示のない漬物、清涼飲料水、しょう油、クッキー、食肉製品を用いた。また、食肉製品は高タンパク食品及び高脂肪食品として用い、タンパク質量は100 gあたり12.1 g、脂質量は100 gあたり34.6 gであった。

4 添加回収試験

クロマトグラム上の分析対象物質のピーク出現位置に妨害ピークがない漬物、食肉製品、清涼飲料水、しょう油に分析対象物質の標準品を添加し添加回収試験を行った。添加濃度は食品中の食品添加物分析法の妥当性確

認ガイドライン³⁾に従い、対象食品に基準値が規定されている場合は基準値相当濃度、使用基準が「使用してはならない」場合は定量下限濃度、パラオキシ安息香酸エステル類(以下PHBAエステル類)については各物質につき合計基準値相当濃度及び定量下限濃度の2濃度とした(表1)。

表1 添加濃度(g/kg)

分析対象物質	漬物(たくあん漬)	食肉製品	清涼飲料水	しょう油
SA	2.0	0.01	0.3	0.5
AK	1.0	0.35	0.5	0.35
BA	0.01	0.01	0.6	0.6
SoA	1.0	2.0	0.01	0.01
DHA	0.01	0.01	0.01	0.01
PHBA類	0.01	0.01	0.1	0.25
			0.01	0.01

5 標準溶液の調製

AK標準品を0.100 g量り、水を加えて溶かして正確に100 mLに定容し、標準原液とした(濃度1000 µg/mL)。

SA標準品を120 °Cで4時間乾燥したものを0.100 g量り、水を加えて溶かして正確に100 mLに定容し、標準原液とした(濃度1000 µg/mL)。

BA, SoA, DHA, PHBA-Et, PHBA-Pr, PHBA-iPr, PHBA-Bu, PHBA-iBuをそれぞれ0.100 g量り、メタノールを加えて溶かして正確に100 mLに定容し、標準原液とした(濃度1000 µg/mL)。

また、検量線用標準溶液は標準原液を適宜希釈し調製した。

6 HPLC条件(表2)

7 試験溶液の調製

液状試料はそのまま、固形試料はフードプロセッサーで均一化した。試料10 gを精密に量り、透析内液30 mLとともに透析膜に充填し、空気を追い出してから透析膜の上端を密封し、透析膜の実効長を50 cmとした。内容物を透析膜内全体に行き渡らせた後、透析膜を緩く4つに折りたたんで100 mLのレーザーマーカ付き遠沈管に入れ、透析外液を加えて全量を正確に100 mLとした。遠沈管の蓋部分を上、底部分を下として縦に振とう器にセットし、左右に揺れるように常時振とうしながら透析を行った。

透析後、透析外液5 mLを正確に量り、0.1 mol/Lりん酸を加え全量を正確に20 mLとし抽出液とした。固相カラムをメタノール3 mLと水3 mLであらかじめコンディショニングした後、抽出液2 mLを固相カラムに負荷し、水3 mLで洗浄後、メタノールで溶出して4 mLとし、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

なお、固相カラムについては、澤崎ら⁴⁾の方法によりOasisHLBを用いた。

結果及び考察

1 検量線

分析対象物質の標準溶液において、検量線は0.005～4 g/kgの範囲内で決定係数0.999以上の良好な直線関係を示した。

2 透析方法の検討

(1) 現行法に加えて必要な諸条件の設定

甘味料分析における透析法は広く使用されているが、透析終了までに時間を要することが課題であり、当所においても24～48時間を要する。田原ら⁵⁾は、透析膜の実効長の延長による透析時間の短縮の可能性を示唆した。さらに山本ら⁶⁾は、加温・振とう条件下で透析することにより透析時間の短縮の可能性を示唆した。そこで、当所の甘味料分析で用いている実効長15 cmの透析膜を、50 cmまで延長し、室温で常時振とうしながら透析することを検討した。透析内液は現行法で用いている10%塩化ナトリウム含有0.01 mol/L塩酸とし、透析外液は保存料の抽出のため70%メタノールとした。

(2) 透析時間の検討

検討試料は、分析対象物質が添加物として多用される清涼飲料水を用いた。また、甘味料分析において透析効率が低いとされているクッキーについても検討試料とした。添加濃度を0.1 g/kg、透析時間を0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8時間とし、それぞれ3試行で添加回収率の平均値を算出した(図1,2)。

この結果、清涼飲料水、クッキーともに、10種すべての分析対象物質において0.5～8時間のいずれの透析時間においても70～110%の回収率を得た。清涼飲料水については、透析時間1時間までは10種の分析対象物質において回収率が上昇するものの、1時間が経過すると上昇と低下を繰り返す大きな変化が見られなくなったため、透析時間は1時間と示唆された。また、クッキーについては、AKは0.5～8時間で回収率に変化がみられず、SAは2時間が経過すると上昇と低下を繰り返す大きな変化が見られなくなったため、透析時間はAKが0.5時間、SAは2時間と示唆された。

以上の結果から、透析時間は2時間とした。

(3) 高タンパク食品及び高脂肪食品における透析内液と透析外液の検討(図3)

高タンパク食品及び高脂肪食品における、PHBAエステル類の抽出については、公定法¹⁾により溶媒抽出法が示されている。しかし、高タンパク食品及び高脂肪食品について明確な定義がないことや、その他の食品と同じ水蒸気蒸留法を用いることができないことで作業が煩雑にな

っている。そこで、透析法を用いた場合の透析内液と透析外液の条件の検討を行った。

透析内液を10%塩化ナトリウム含有0.01 mol/L塩酸、透析外液を70%メタノールとし、添加濃度を0.01 g/kgとしたところ、PHBA-Pr, PHBA-iBu, PHBA-Buにおいて回収率は70%未満であった。また、PHBAエステル類の回収率を比較したところ、物質の極性が低くなるほど回収率が低下する傾向がみられた。そこで、PHBAエステル類は水に対する溶解度が小さいことから、透析内液及び透析外液のメタノール濃度を上げて回収率を比較した。

この結果、透析内液30 mLのうち10 mLを95%メタノール、透析外液を95%メタノールとした場合、PHBAエステル類いずれも87.2～101.9%の回収率を得た。PHBAエステル類が溶解しやすいメタノールを内液に添加し、さらに、外液のメタノール濃度を上げることで高タンパク食品及び高脂肪食品に含まれるPHBAエステル類が透析外液に効率よく移行することが示唆された。

3 添加回収試験

2で検討した条件で、漬物、食肉製品、清涼飲料水、しよ油を用いた試験を実施した結果、77.0%～117.4%の良好な回収率が得られた(表3)。

4 保存料における現行法と透析法との比較

(1) 水蒸気蒸留法と透析法との回収率の比較

試料に、検査検体数の多いしよ油を用い比較したところ、水蒸気蒸留法で74.6～97.5%の回収率のところ、透析法では94.5～117.4%となり水蒸気蒸留法と比べ透析法の方が良好な回収率が得られた。特にPHBAエステル類の0.01 g/kg添加において、水蒸気蒸留法より透析法の方が回収率が高く、透析法が低濃度における定量に有用であることが示唆された(表4)。

(2) 溶媒抽出法と透析法との回収率の比較

試料に食肉製品を用い、PHBAエステル類の回収率を比較したところ、溶媒抽出法と透析法で大きな差異はみられず、いずれの方法においても70～120%の回収率を得た(表5)。

表 2 HPLC 条件

甘味料 AK, SA	
装置	: Alliance e2695/PDA2998, 日本ウオーターズ(株)製
カラム	: Cosmosil 5NH2-MS (4.6 mm i.d. × 250 mm, 粒径5 μm) ナカライテスク(株)製
カラム温度	: 40 °C
流速	: 1 mL/min
注入量	: 10 μL
移動相	: メタノール・1%リン酸(6:4)
測定波長	: 230 nm(AK), 210 nm(SA)
保存料 BA, SoA, DHA, PHBA-Et, PHBA-Pr, PHBA-iPr, PHBA-Bu, PHBA-iBu	
装置	: 1260 Infinity II /1260 DAD HS, アジレント・テクノロジー(株)製
カラム	: Cosmosil 5C18-MS- II (3.0 mm i.d. × 10 mm, 粒径5 μm) ナカライテスク(株)製
カラム温度	: 40 °C
流速	: 0.4 mL/min
注入量	: 10 μL
移動相A	: メタノール: アセトニトリル: 5mMクエン酸緩衝液 = 1:2:7
移動相B	: メタノール: アセトニトリル: 5mMクエン酸緩衝液 = 5:4:11
グラジエント条件	: (B) 0%(0 min) → 0%(10 min) → 100%(15 min) → 100%(37 min)
測定波長	: 230 nm(BA, SoA, DHA), 255.6 nm(PHBA-Et, PHBA-Pr, PHBA-iPr, PHBA-Bu, PHBA-iBu)

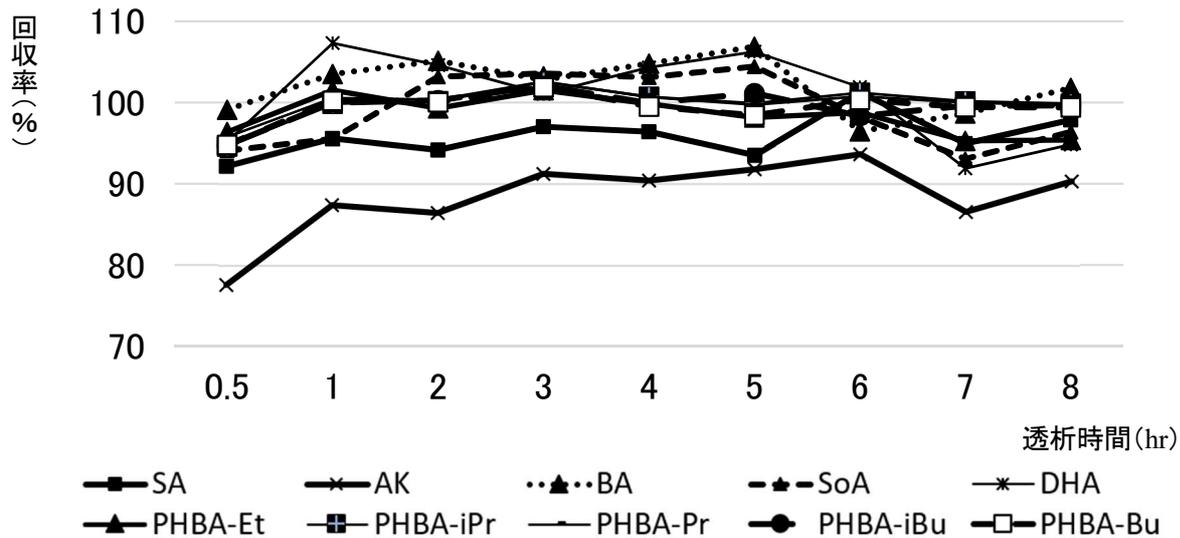


図1 清涼飲料水における回収率の経時変化 (n=3)

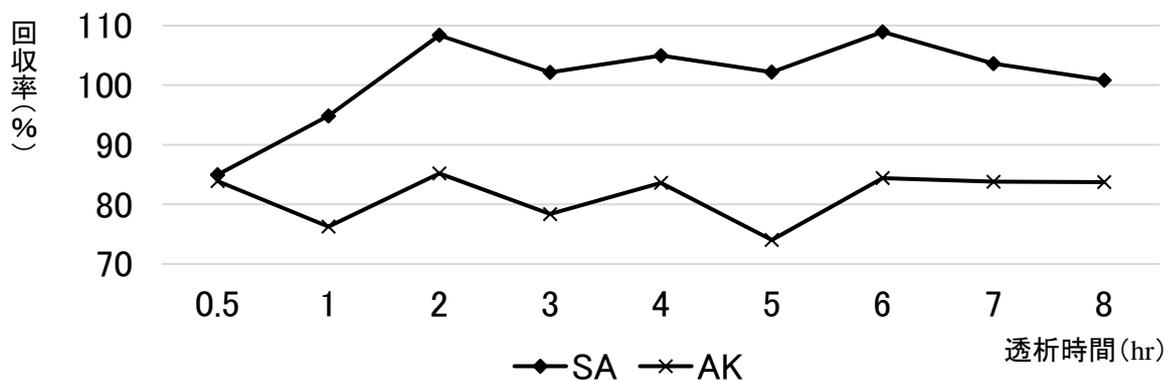


図2 クッキーにおける回収率の経時変化 (n=3)

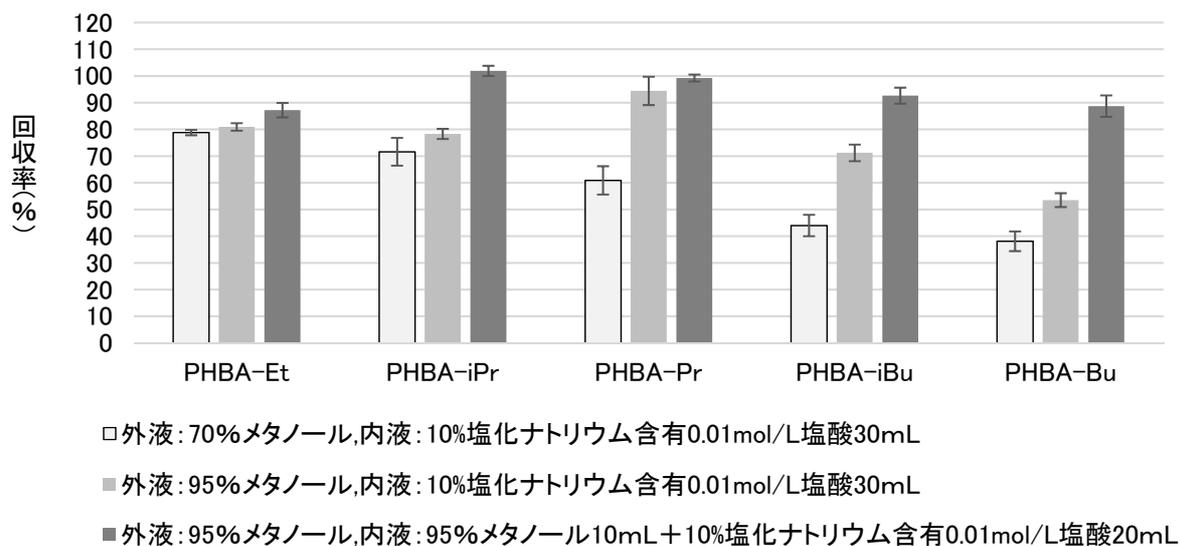


図3 透析外液及び透析内液の組成ごとの PHBA エステル類の回収率 (n=3)

表 3 添加回収試験結果 (n=3)

PHBA エステル類について、上段は合計基準値濃度添加、下段は 0.01 g/kg 添加

分析対象物質	漬物(たくあん漬)		食肉製品		清涼飲料水		しょう油	
	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
SA	100.8	3.0	101.8	13.3	99.3	1.7	97.5	3.2
AK	77.0	14.8	97.2	1.9	96.5	2.0	87.2	5.4
BA	102.3	2.8	80.4	6.0	100.9	2.0	98.9	1.3
SoA	95.2	0.8	91.0	7.6	102.6	4.0	117.4	6.2
DHA	81.8	6.1	84.3	7.9	104.2	2.3	102.6	6.8
PHBA-Et	—	—	—	—	99.3	0.4	102.3	0.8
	101.4	3.5	87.2	3.1	108.3	4.3	105.8	3.1
PHBA-iPr	—	—	—	—	100.2	0.5	102.3	2.0
	99.7	1.4	101.9	1.8	97.0	3.7	103.6	1.7
PHBA-Pr	—	—	—	—	100.4	0.8	101.2	1.9
	97.5	3.1	99.2	1.3	115.1	3.7	105.0	1.3
PHBA-iBu	—	—	—	—	100.3	0.5	101.5	2.1
	93.7	1.7	92.6	3.2	95.6	7.0	103.5	2.7
PHBA-Bu	—	—	—	—	100.0	0.8	103.0	2.2
	92.8	2.7	88.7	4.5	83.3	9.5	94.5	4.6

表 4 水蒸気蒸留法と透析法の回収率の比較 (n=3)

分析対象物質	添加濃度	水蒸気蒸留法		透析法	
		回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
BA	0.6 g/kg	97.5	1.3	98.9	1.3
SoA	0.01 g/kg	81.6	6.4	117.4	6.2
DHA	0.01 g/kg	81.1	8.3	102.6	6.8
PHBA-Et	0.25 g/L	84.6	3.6	102.3	0.8
	0.01 g/kg	74.6	5.7	105.8	3.1
PHBA-iPr	0.25 g/L	92.6	1.8	102.3	2.0
	0.01 g/kg	80.7	4.4	103.6	1.7
PHBA-Pr	0.25 g/L	90.7	6.5	101.2	1.9
	0.01 g/kg	79.8	3.4	105.0	1.3
PHBA-iBu	0.25 g/L	94.1	1.3	101.5	2.1
	0.01 g/kg	75.8	3.4	103.5	2.7
PHBA-Bu	0.25 g/L	95.7	1.7	103.0	2.2
	0.01 g/kg	75.3	6.8	94.5	4.6

表 5 溶媒抽出法と透析法の回収率の比較 (n=3)

分析対象物質	添加濃度	溶媒抽出法		透析法	
		回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
PHBA-Et	0.01 g/kg	90.1	1.6	87.2	3.1
PHBA-iPr	0.01 g/kg	73.2	4.3	101.9	1.8
PHBA-Pr	0.01 g/kg	100.2	5.6	99.2	1.3
PHBA-iBu	0.01 g/kg	83.7	5.6	92.6	3.2
PHBA-Bu	0.01 g/kg	105.2	3.5	88.7	4.5

まとめ

- 1 甘味料2種と保存料8種を、透析法を用いて抽出する方法を検討した。透析膜の実効長を50 cm、透析内液を10%塩化ナトリウム含有0.01 mol/L塩酸30 mL、透析外液を70%メタノールとし、振とう器を用いて常時振とうしながら室温下で2時間透析を行った。また、高タンパク食品及び高脂肪食品については、透析内液と透析外液の条件を変えて検討し、この結果、透析内液を10%塩化ナトリウム含有0.01 mol/L塩酸20 mL及び95%メタノール10 mL、透析外液を95%メタノールとした場合に、PHBAエステル類において良好な回収率が得られた。
- 2 同時抽出法を用いた添加回収試験の結果、検討した4種類の食品において良好な回収率が得られた。これにより、現行法の検査時間が短縮され、簡便に甘味料と保存料の試験溶液を同時に調製することが可能となった。また、本研究では透析容器として100 mLの遠沈管を用いており、同時に多数の検体を扱うことも可能となった。
- 3 保存料について、現行法と透析法の回収率を比較したところ、溶媒抽出法と透析法で大きな差異は見られなかったものの、水蒸気蒸留法と透析法では、透析法の方が良好な回収率が得られた。

文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長, 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長通知: 「食品中の食品添加物分析法」の改正について, 薬生食基発0624第1号, 薬生食監発0624第1号, 令和3年6月24日, 別添3
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長, 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長通知: 「食品中の食品添加物分析法」の改正について, 薬生食基発0529第1号, 薬生食監発0529第1号, 令和5年5月29日, 別添2・3
- 3) 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長, 厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長通知: 「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」の作成及び「第2版 食品中の添加物分析法」の改正について, 健生食基発0308第1号, 健生食監発0308第1号, 令和6年3月8日, 別添1
- 4) 澤崎加奈恵ほか: 福井県衛生環境研究センター年報, 14, 40-44(2015)
- 5) 田原正一ほか: 食衛誌, 55, 13-18(2014)
- 6) 山本純代ほか: 食衛誌, 57, 155-159(2016)

Simultaneous extraction and analysis of sweeteners and preservatives in foods using dialysis method.

Yukiko ASANO, Yuichi HAYASHI, Hiroyuki IDO, Tomokazu AMIMOTO, and Chiyaka
OHNO

A simultaneous extraction method using a dialysis technique was studied for testing two sweeteners and eight preservatives in food products. Simultaneous extraction was possible by performing dialysis for 2 hours at room temperature with constant shaking using a shaker. All 10 components could be extracted by using 0.01 mol/L hydrochloric acid containing 10% sodium chloride as the dialysate inner solution and 70% methanol as the dialysate outer solution, or by increasing the concentration of methanol in the inner and outer solutions. In addition, the recovery test for the addition of two sweeteners and eight preservatives using four types of food obtained good recovery rates ranging from 77.0% to 117.4%.