

多検体自動固相抽出装置による食品中の保存料の分析法の開発

○小西賢治¹⁾、島三記絵¹⁾、伊藤里恵²⁾、佐々野僚一¹⁾²⁾、穂山浩²⁾

¹⁾株式会社アイスティサイエンス、²⁾星薬科大学薬学部

【目的】食品中の食品添加物分析法において、保存料（安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸およびパラオキシ安息香酸エステル類）の分析には水蒸気蒸留法を用いた方法が制定されている。水蒸気蒸留法は精製効果が高く定量性が良いが、操作が煩雑で時間もかかるため多検体の分析には困難を要する。本研究では、簡易で迅速に多検体処理可能な分析を目的に、充填量が少ない新型固相抽出ミニカートリッジと多検体同時処理型固相抽出装置を用いた食品中の保存料の一斉分析法を開発したので報告する。

【方法】

装置：多検体自動固相抽出装置ST-R100（アイスティサイエンス社製）、器具：固相カートリッジ：Smash-SPE PBX（アイスティサイエンス）、試料：清涼飲料水（スポーツドリンク）図1に前処理、表1にHPLC条件を示す。

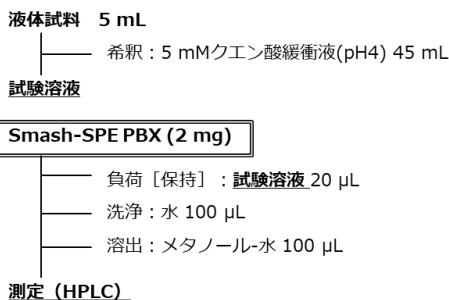


図1. 前処理フロー

表1. 測定条件

HPLC：Prominence-i（島津製作所）
カラム：Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6 \times 150 mm (GLサイエンス)
検出器：UV (230 nm, 260 nm)
移動相：
A) 5 mmol/Lクエン酸緩衝液(pH4.0)/アセトニトリル/メタノール混液 (7 : 2 : 1)
B) 5 mmol/Lクエン酸緩衝液(pH4.0)/アセトニトリル/メタノール混液 (11 : 4 : 5)

【結果と考察】逆相固相抽出による前処理の

検討：試料液を5 mMクエン酸緩衝液(pH4)で希釈して固相へ負荷することで安息香酸、ソルビン酸の解離が抑えられて固相への保持が良好になることが確認できた。デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類は負荷液のpHにかかわらず固相への保持が可能であった。溶出条件の検討では、有機溶媒(メタノール)比率を変化させて溶出挙動を調査したところ、メタノール比率が高くなるほど溶出量も増え、メタノール-水(9/1)以上で一定となったため、溶出溶媒にメタノール-水(9/1)を選択した(図2)。

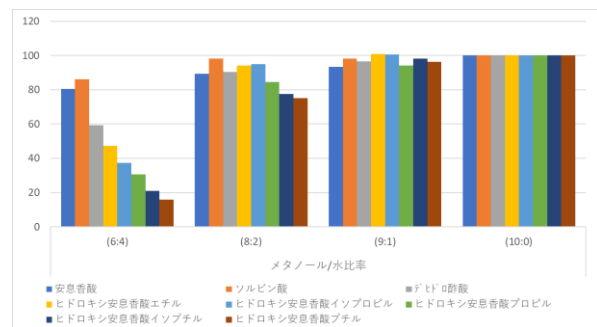


図2. 溶出溶媒のメタノール比率と回収率
液体試料における添加回収試験：原材料表示に保存料が記載されていない市販の清涼飲料水を用いて0.01 g/kg になるように保存料を添加し添加回収試験を実施した。安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類について回収率92-104%、RSD4.6%(n=7)以内の良好な結果が得られた。現在、他の試料への適用性を検討している。

(A1-10)
多検体自動固相抽出装置による食品中の
保存料の分析法の開発

○小西賢治¹⁾ , 島三記絵¹⁾ , 伊藤里恵²⁾ , 佐々野僚一¹⁾²⁾ , 穂山浩²⁾

1) 株式会社アイスティサイエンス 2) 星薬科大学



本発表に関連して、開示すべきCOI

○発表者 3 人の所属企業の自社製品を用いている。

○共同発表者 1 人が星薬科大学大学院博士課程所属である。

Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

目的

【経緯】

食品添加物の保存料は表示も義務付けられており、安全性確保の観点から使用基準が設定されている。そのため食品の品質管理や行政監視のため食品中の保存料の分析法が必要である。

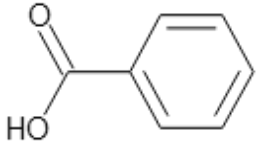
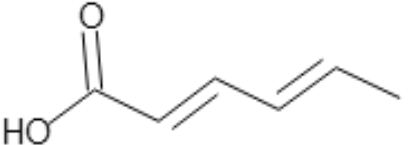
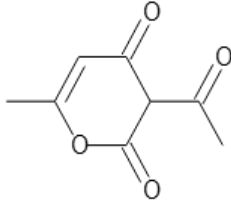
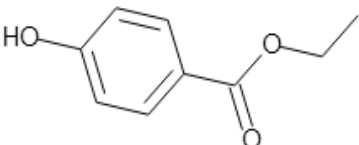
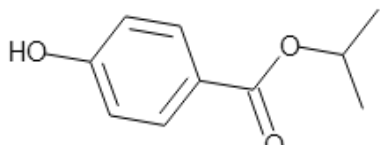
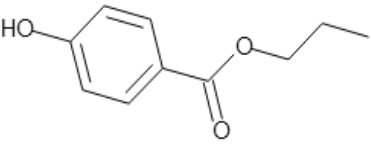
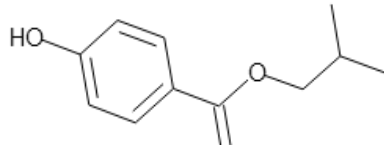
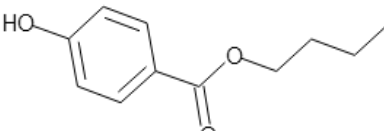
【従来法の課題】

食品中の保存料（安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類）の分析法には水蒸気蒸留法が用いられているが、操作が煩雑で時間もかかるといった課題があり、多検体の分析には労力を要する。

【本研究の目的】

本研究では前処理操作の時間短縮と簡便化を目的として多検体自動固相抽出装置及び極小固相を用いた手法を開発した。

分析対象成分

| | | | | | |
|-----|--|---|--|--|--|
| 成分名 | 安息香酸 | ソルビン酸 | デヒドロ酢酸 | | |
| 構造式 |  |  |  | | |
| 物性 | LogP:1.83 pKa : 4.21 | LogP : 1.33 pKa : 4.76 | LogP : 0.78 pKa : 5.3 | | |
| 成分名 | パラオキシ安息香酸 エチル | パラオキシ安息香酸 イソプロピル | パラオキシ安息香酸 プロピル | パラオキシ安息香酸 イソブチル | パラオキシ安息香酸 ブチル |
| 構造式 |  |  |  |  |  |
| 物性 | LogP : 1.96 pKa : 8.31 ± 0.13 | LogP : 2.34 pKa : - | LogP : - pKa : 8.4 | LogP : 3.4 pKa : - | LogP : 3.6 pKa : 8.47 |

方法 : HPLC 測定条件

HPLC : Prominence-i (島津製作所)

カラム : Inertsil ODS-3 (内径4.6 mm×長さ150 mm×粒径5 μm) GLサイエンス

移動相 :

A) 5 mM クエン酸緩衝液(pH4.0)/アセトニトリル/メタノール混液 (7 : 2 : 1)

B) 5 mM クエン酸緩衝液(pH4.0)/アセトニトリル/メタノール混液 (11 : 4 : 5)

グラジエント条件 : B.Conc 0 %(0-10 min)→100 %(15-27 min)→0 %(27-30 min)

カラム温度 : 40 °C

流速 : 1.0 mL/min

検出器 : UV

測定波長 : 230 nm , 260 nm

注入量 : 20 μL

方法：装置・器具

多検体自動固相抽出装置：ST-R100（株式会社アイスティサイエンス製）

固相抽出カラム：Smash-SPE PBX[※]（株式会社アイスティサイエンス製）

※ポリマーベース：無極性相互作用（HLB相当）



多検体自動固相抽出装置
ST-R100



固相抽出カラム
Smash-SPE

結果：検討内容

検討A：希釈液の選定

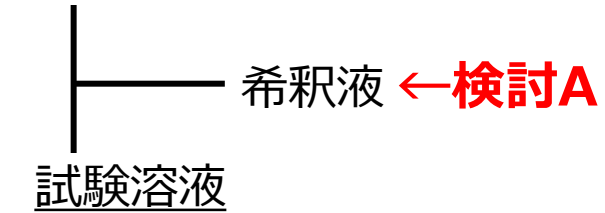
検討B：固相への負荷量の検討

検討C：溶出溶媒量の検討

検討D：溶出溶媒比の検討

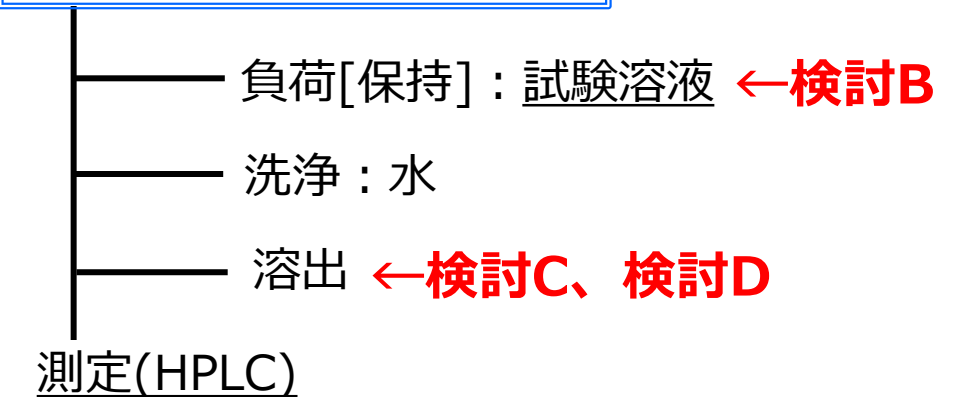
試料の希釈

液体試料



自動処理

固相：Smash-SPE PBX



前処理フローの概略

結果：検討A 希釈液の選定

試料の希釈

標準液 100 μ L

希釈液 900 μ L

試験溶液

【希釈液】

- ① 10 %ギ酸 (pH1.5)
- ② 5 mMクエン酸 (pH4.0)
- ③ 0.2 Mリン酸 (pH4.0)
- ④ 超純水

自動処理

Smash-SPE PBX

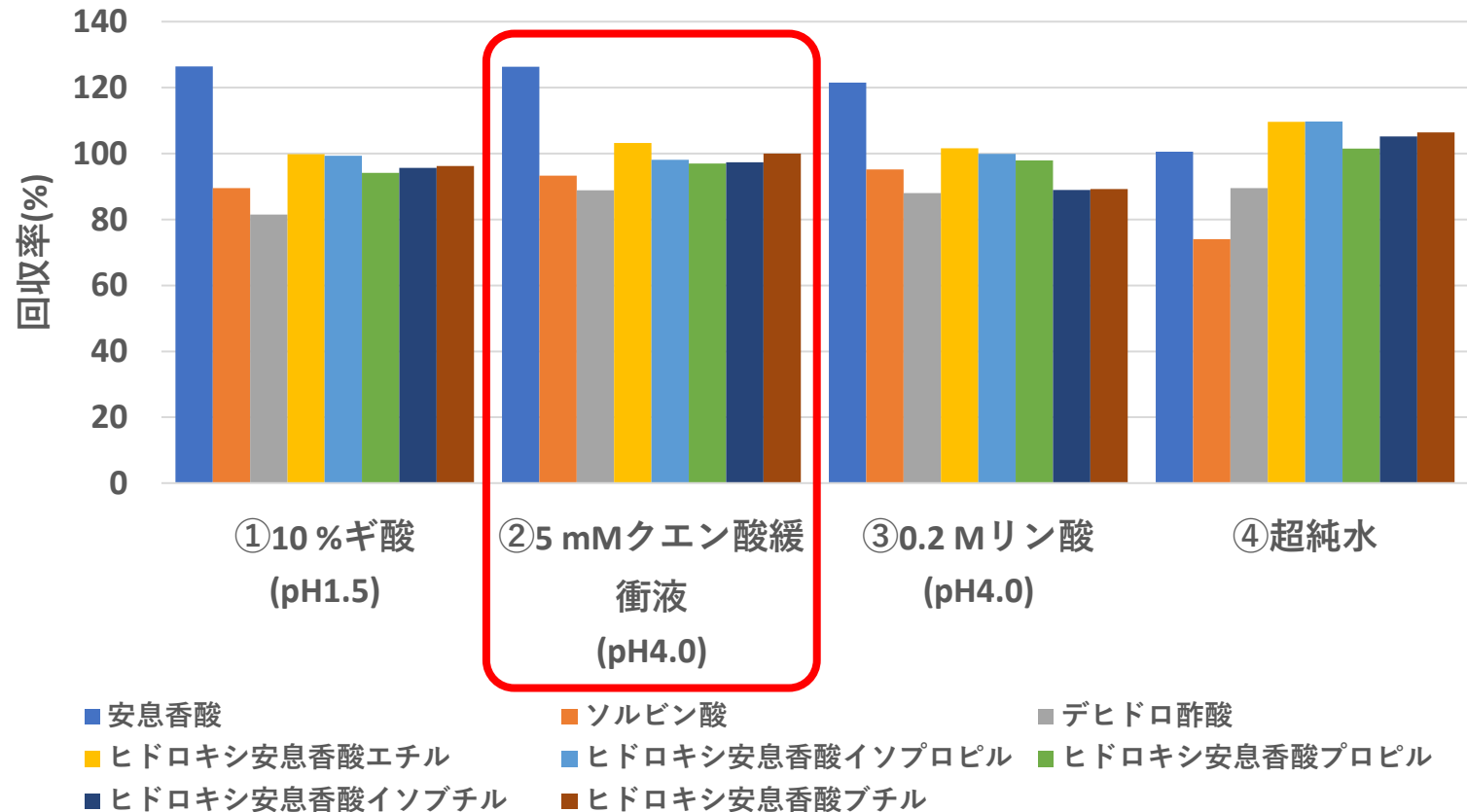
負荷[保持]：試験溶液 20 μ L

洗浄：水 100 μ L

溶出：メタノール 100 μ L

測定(HPLC)

希釈液の違いによる各成分の挙動



移動相に用いている

② 5 mMクエン酸 (pH4.0) を選択

結果：検討B 固相負荷量の検討

試料の希釈

標準液 100 μL

5 mMクエン酸(pH4.0) 900 μL

試験溶液

自動処理

Smash-SPE PBX

負荷[保持]：試験溶液

洗浄：水 100 μL

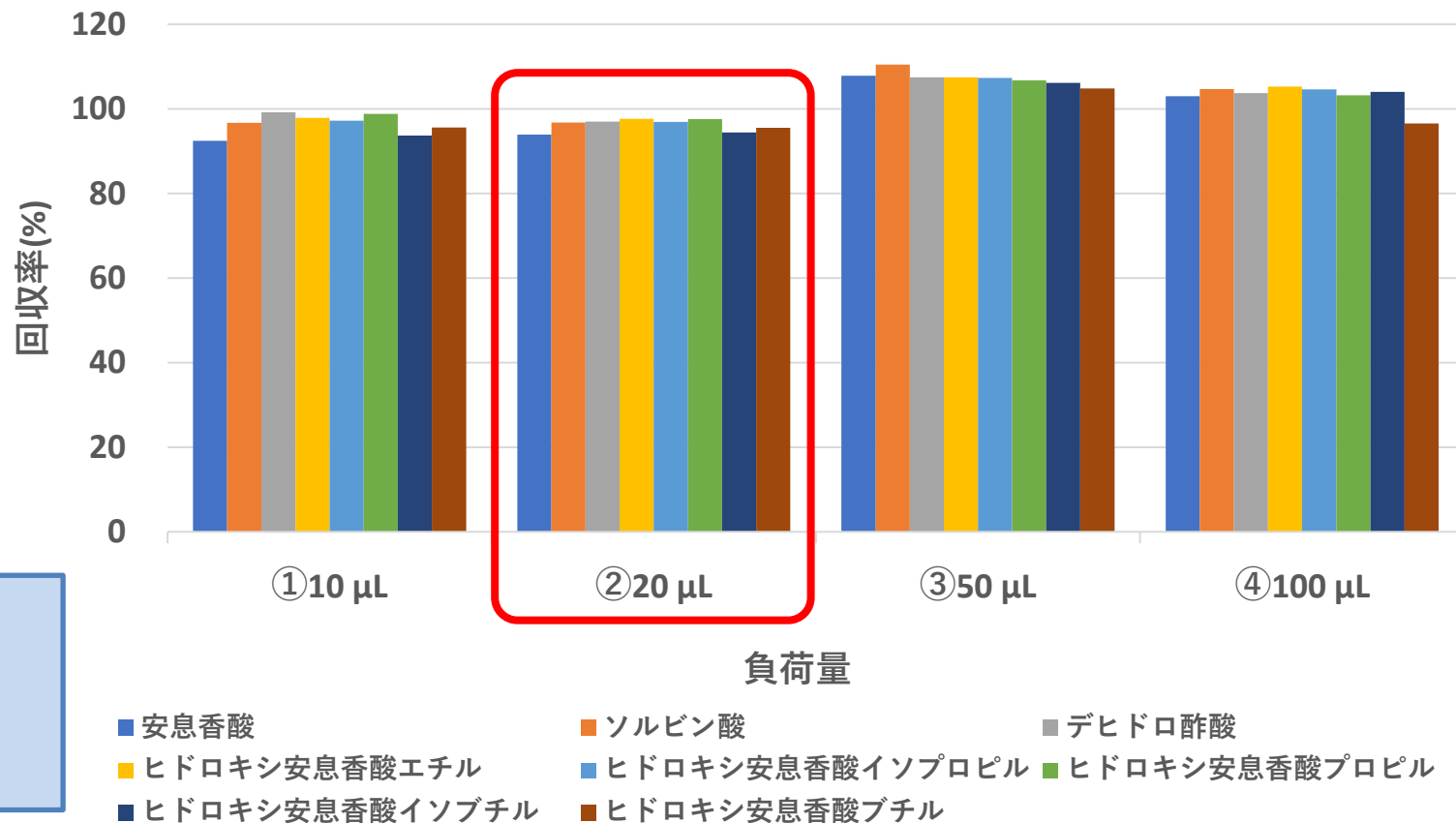
溶出：メタノール 100 μL

測定(HPLC)

【負荷量】

- ① 10 μL
- ② 20 μL
- ③ 50 μL
- ④ 100 μL

負荷量の違いによる各成分の回収率



マトリクス量に左右されないように
②20 μL を選択

結果：検討C溶媒溶出量の検討

試料の希釈

標準液 100 μL

5 mMクエン酸(pH4.0) 900 μL

試験溶液

自動処理

Smash-SPE PBX

負荷[保持]：試験溶液 20 μL

洗浄：水 100 μL

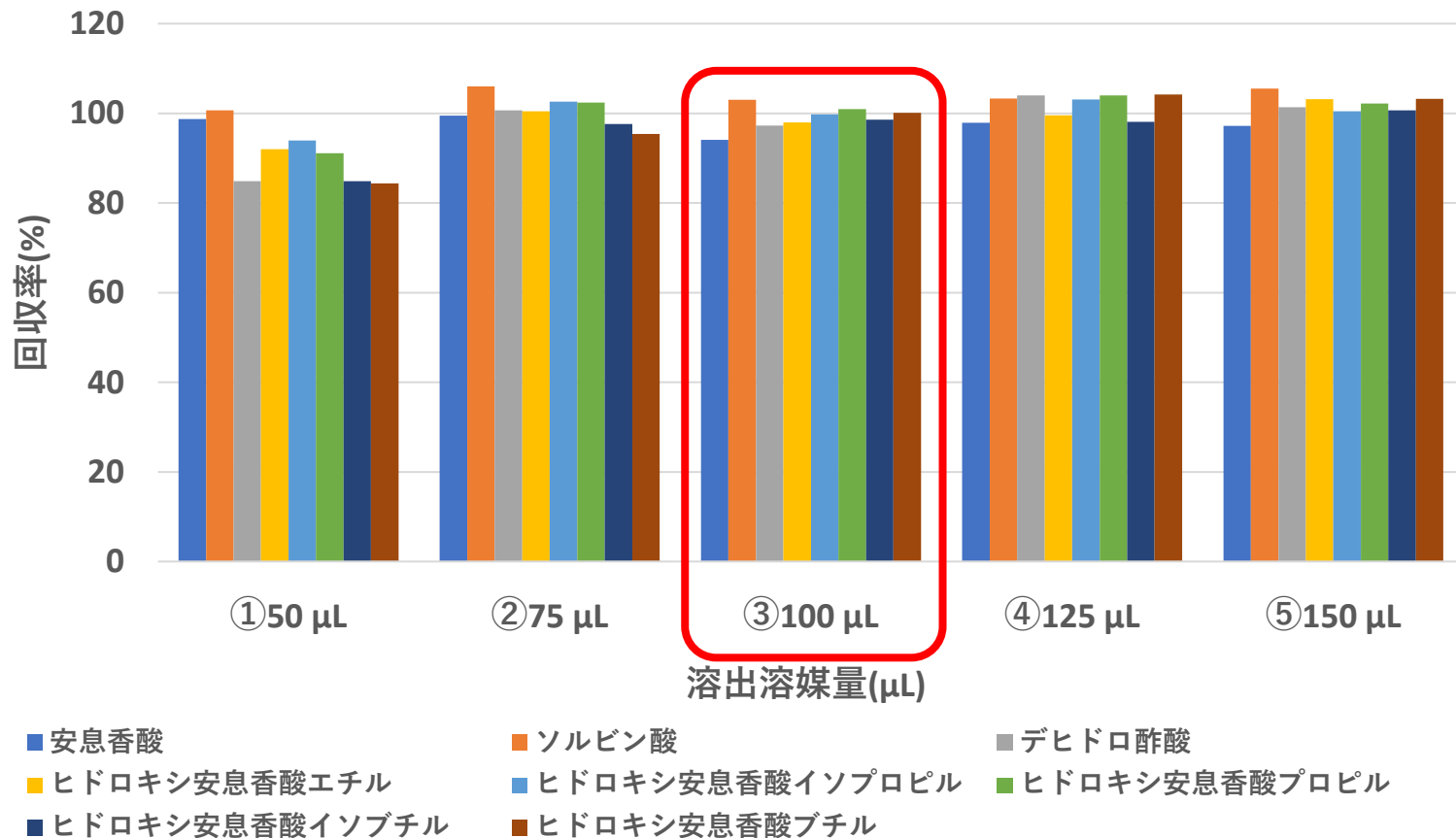
溶出：メタノール

測定(HPLC)

【溶出量】

- ① 50 μL
- ② 75 μL
- ③ 100 μL
- ④ 125 μL
- ⑤ 150 μL

溶出溶媒量の違いによる各成分の回収率



全量溶出可能で濃度計算が容易な

③ 100 μL を選択

結果：検討D 溶媒溶出比の検討

試料の希釈

標準液 100 μ L

5 mMクエン酸(pH4.0) 900 μ L

試験溶液

自動処理

Smash-SPE PBX

負荷[保持]：試験溶液 20 μ L

洗浄：水 100 μ L

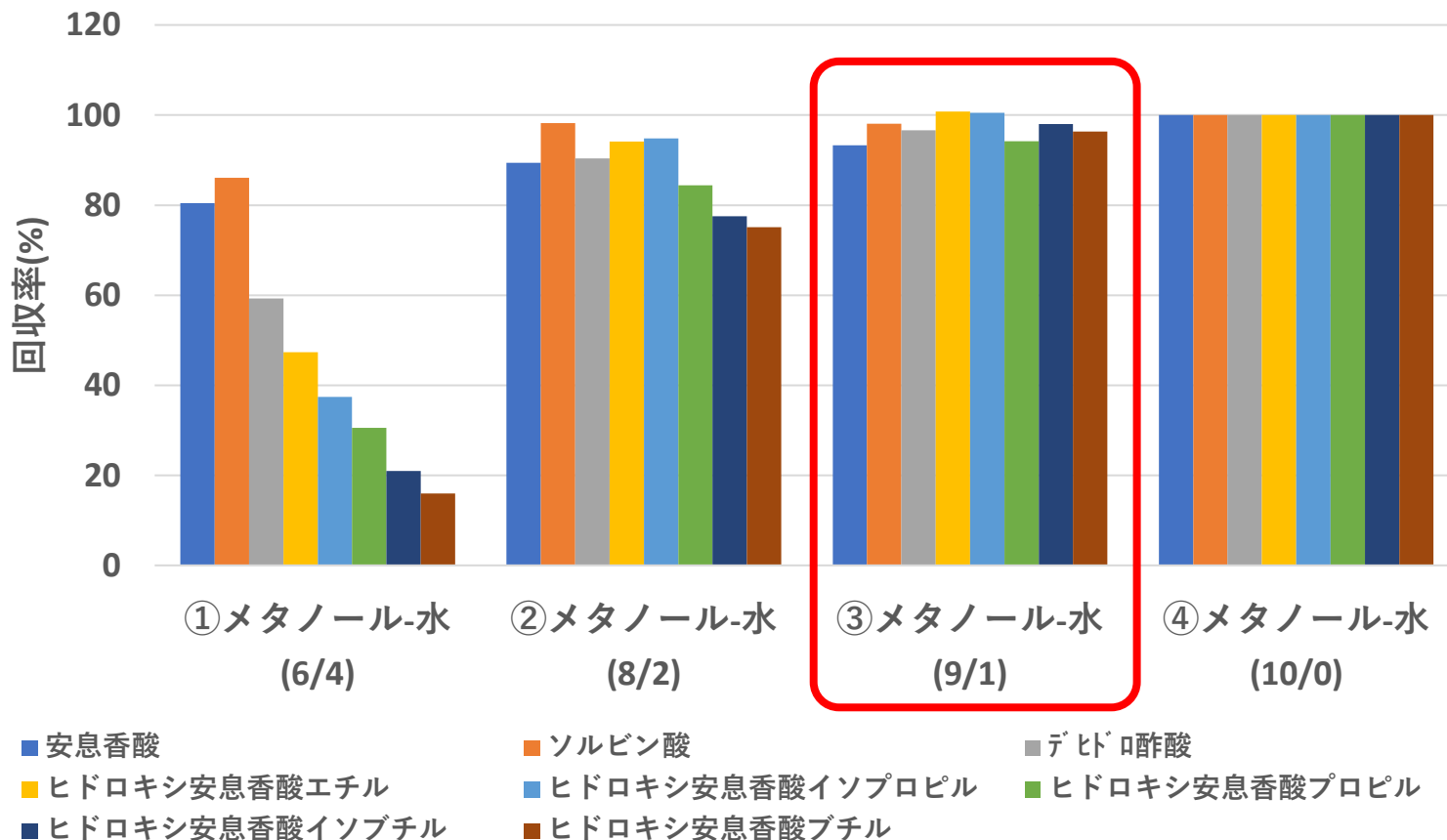
溶出：溶出溶媒 100 μ L

測定(HPLC)

【溶出溶媒】

- ①メタノール-水(6/4)
- ②メタノール-水(8/2)
- ③メタノール-水(9/1)
- ④メタノール-水(10/0)

メタノール-水(10/0)に対する他の溶媒の面積値の比率



夾雑物の溶出抑制を期待して
③メタノール-水(9/1)を選択

結果：添加回収試験

※通知試験法定量限界

安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸：0.01 g/kg

パラオキシ安息香酸エステル類：0.005 g/kg

試料：スポーツドリンク、ジュース、ガムシロップ、ケーキシロップ

試料の希釈

試料

添加濃度：試料中0.01 g/kg※

希釈：5 mMクエン酸緩衝液(pH4.0)

試験溶液(10倍希釈液)

自動処理 — ST-R100 約20分/8検体

固相：Smash-SPE PBX-2 mg

負荷[保持]：試験溶液 20 μ L

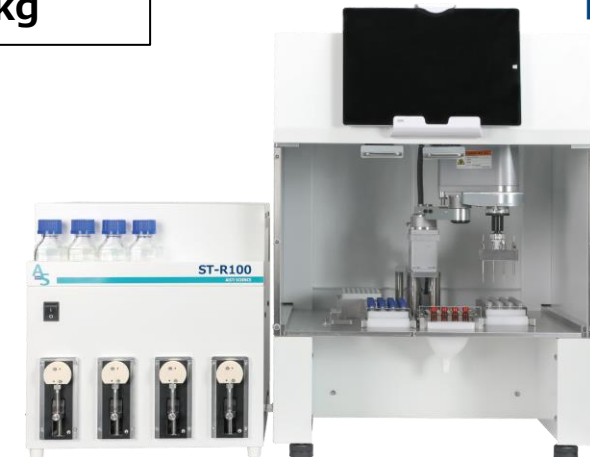
洗浄：水 100 μ L

溶出：メタノール-水(9/1) 100 μ L

測定(HPLC)

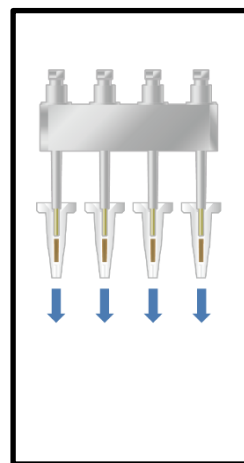


固相抽出カラム
Smash-SPE

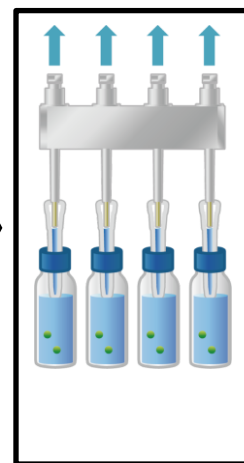


多検体自動固相抽出装置
ST-R100

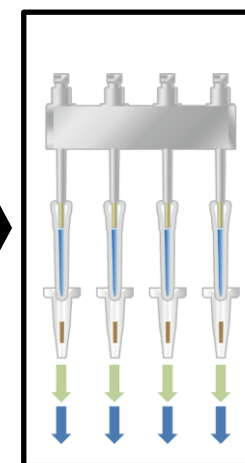
工程①
コンディショニング



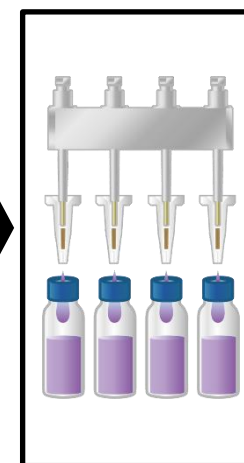
工程②
試料吸引



工程③
負荷・洗浄

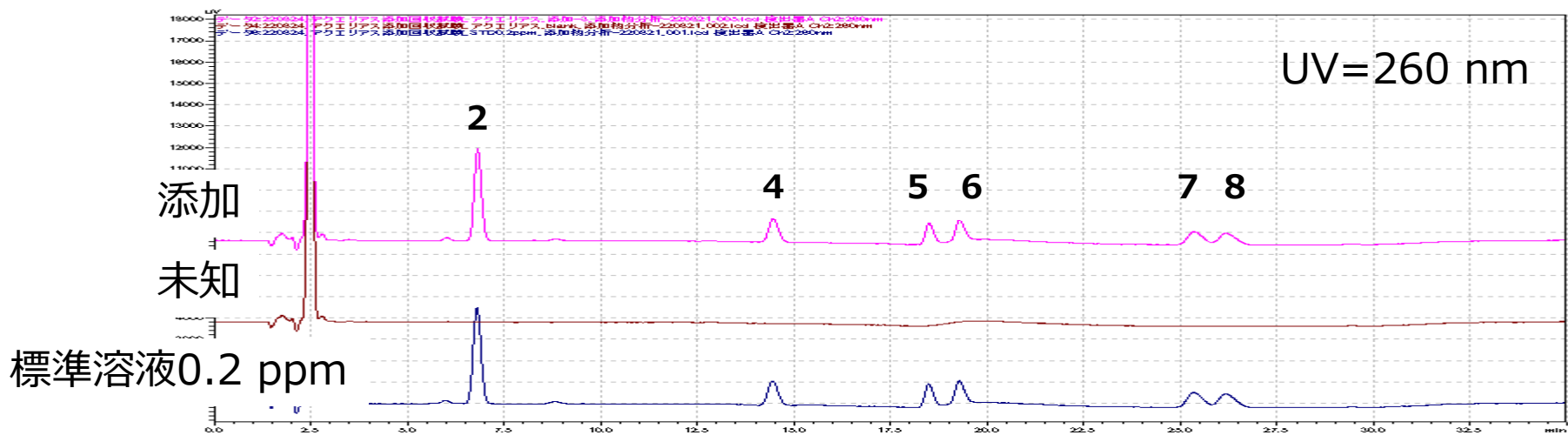
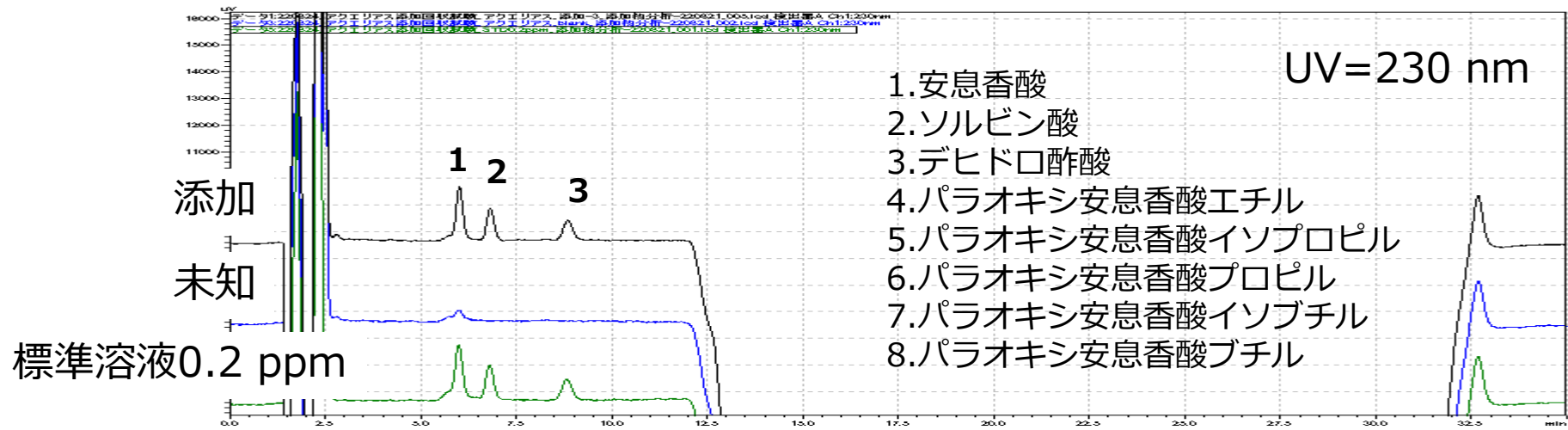


工程④
溶出



多検体自動固相抽出装置 ST-R100の分析イメージ

結果：スポーツドリンク中の保存料分析のクロマトグラム



今回試験した試料において妨害ピークはみられず良好なクロマトグラムが得られた。

結果：添加回収試験結果

添加濃度：試料中10ppm、併行数：n=8

| 成分名 | RT(min) | 波長 (nm) | スポーツドリンク | | ひやしあめ | | ガムシロップ | | ケーキシロップ | |
|-------------------|---------|------------|------------|-----|------------|-----|------------|-----|------------|-----|
| | | | 平均 | RSD | 平均 | RSD | 平均 | RSD | 平均 | RSD |
| | | | 回収率(%) | (%) | 回収率(%) | (%) | 回収率(%) | (%) | 回収率(%) | (%) |
| 1 安息香酸 | 6.1 | 230 | 93 | 4.6 | 118 | 4.1 | 115 | 2.8 | 105 | 4.0 |
| 2 ソルビン酸 | 6.9 | 260 | 103 | 2.7 | 110 | 3.7 | 107 | 3.1 | 99 | 2.7 |
| 3 デヒドロ酢酸 | 8.9 | 230 | 97 | 4.5 | 105 | 3.8 | 102 | 3.3 | 94 | 3.3 |
| 4 ヒドロキシ安息香酸エチル | 14.5 | 260 | 100 | 2.1 | 108 | 4.2 | 104 | 3.1 | 97 | 2.7 |
| 5 ヒドロキシ安息香酸イソプロピル | 18.6 | 260 | 104 | 2.3 | 106 | 4.5 | 103 | 3.1 | 97 | 3.3 |
| 6 ヒドロキシ安息香酸プロピル | 19.4 | 260 | 93 | 2.3 | 105 | 4.6 | 102 | 3.0 | 97 | 4.1 |
| 7 ヒドロキシ安息香酸イソブチル | 25.5 | 260 | 98 | 2.9 | 100 | 5.9 | 97 | 3.2 | 93 | 3.7 |
| 8 ヒドロキシ安息香酸ブチル | 26.3 | 260 | 92 | 3.6 | 96 | 8.8 | 92 | 3.3 | 89 | 4.0 |

4 食品の添加回収試験において保存料 8 成分すべて真度、精度ともに良好であった。

まとめ

- 今回用いた試料では妨害ピークはみられず良好なクロマトグラムが得られた。
- 通知試験法に示されている定量限界0.01 g/kgで添加回収試験を実施したところ真度（回収率）、精度ともに良好であった
- 8検体の前処理時間は約20分であった。
- 多検体自動固相抽出装置を使用することで水蒸気蒸留法を用いることなく簡便・迅速に保存料の前処理を行うことができた。
- 今後は他の食品試料を含めた妥当性評価を行う予定である。