

海苔中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析

川崎洋子[#], 四方田千佳子, 棚元憲一Determination of Six *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters in Laver (Nori) by HPLCYoko Kawasaki[#], Chikako Yomota, Kenichi Tanamoto

A rapid and simple method was developed for simultaneous determination of methyl, ethyl, isopropyl, *n*-propyl, isobutyl and *n*-butyl *p*-hydroxybenzoic acid esters (PHBA-Es) in laver by HPLC. Six PHBA-Es were extracted from laver with *n*-hexane-ethyl acetate (1:1) by shaking. The extract was evaporated. The residue was dissolved in methyl alcohol and determined by HPLC. Recoveries of six PHBA-Es spiked in laver were 93.6-101.2 % at the level of 2 µg/g.

Key Words: *p*-hydroxybenzoic acid esters (PHBA-Es), HPLC, laver

はじめに

化学的合成品の食品添加物は安全性確保の観点からその成分規格を定め、また、特定の添加物については使用基準を設けて使用されている。添加物の使用基準の設定に関する検討の一環として、海苔中のパラオキシ安息香酸エステル (PHBA・Es) 類の分析を行った。

5種のPHBA・Es類すなわちエチル (PHBA・Et), イソプロピル (PHBA・isoPr), プロピル (PHBA・Pr), イソブチル (PHBA・isoBu), ブチル (PHBA・Bu) はしょう油, 果実ソース, 清涼飲料水, シロップ, 酢, 果実又は果菜に対し許可されている保存料であるが、海苔には使用が認められていない。従って、使用が認められる食品からの分析例¹⁻⁴⁾はあるものの海苔中からの分析法は確立されていない。そこで、わが国では不許可添加物であるパラオキシ安息香酸メチルエステル (PHBA・Me) を含めた6種類のPHBA・Es類の海苔中からの一斉分析法を検討し、市販海苔中のPHBA・Es類の測定を行った。

実験方法

1. 試料

都内のスーパーマーケットで購入した焼き海苔4検体, 味付け海苔1検体を用いた。

2. 試薬・試液

PHBA・Me, PHBA・Et, PHBA・Bu (和光特級),

PHBA・Pr (和光一級), PHBA・isoBu, PHBA・isoPr (東京化成特級)。

クエン酸緩衝液: クエン酸一水和物 7.0 g 及びクエン酸三ナトリウム二水和物 6.0 g を水に溶かし, 1,000 ml とし用時水で10倍に希釈して用いた。

n・ヘキサン/酢酸エチル混液: *n*・ヘキサン (試薬特級) 及び酢酸エチル (試薬特級) を等容量混合した。

メタノール: HPLC用メタノール

その他の試薬は市販の試薬特級品を用いた。

3. HPLC装置及び測定条件

HPLC装置: LC-10A (株式会社島津製作所製)

カラム: TOSOH TSK-GEL ODS-100S 4.6 i.d. × 250 mm, 5 µm

カラム温度: 35

移動相: メタノール/5 mmol/l クエン酸緩衝液 (6:4)

流速: 0.7 ml/分。

注入量: 10 µl

検出波長: 254 nm

4. 試験溶液の調製

試料を粉砕機で粉砕後, 1.0 g を採取し, *n*・ヘキサン/酢酸エチル混液 20 ml を加え, 1分間超音波で抽出した。静置後, 上清をろ紙 (5C) でろ過した。残渣に *n*・ヘキサン/酢酸エチル混液 10 ml を加えよく振り混ぜろ過した。更に同じ操作を繰り返し, ろ液を集め, 溶媒を減圧留去した。残留物にメタノールを加えて溶解し, 必要ならろ紙 (5A) でろ過後, メタノールで10 mlの定容とし, HPLC用試験溶液とした。

[#]To whom correspondence should be addressed: Yoko Kawasaki ; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501 Japan ; Tel; 03-3700-1141 ext. 267 Fax:03-3700-9403 E-mail: yoko@ nihs.go.jp

結果及び考察

1. HPLC 分析条件の検討

分析カラムに汎用性の高い逆相分配系の YMC J' sphere ODS・H80, YMC ODS・Ph, TOSOH TSK・GEL ODS・100S を用いて PHBA・Es 類の分離を検討した。移動相に粘度が比較的低いアセトニトリル/水混液 (6:4) を用い、カラム温度 40℃, 流速 0.7 ml/分の条件では、いずれのカラムも PHBA・Es 類の分離が不十分であり、特に PHBA・isoPr と PHBA・Pr 及び PHBA・isoBu と PHBA・Bu は全く分離しなかった。

移動相にメタノールを使用したところ、YMC ODS・Ph ではクロマトグラムに変化は見られなかったが、YMC J' sphere ODS・H80 では PHBA・Me と PHBA・Et は良好に分離した。しかし、PHBA・isoPr と PHBA・Pr 及び PHBA・isoBu と PHBA・Bu の分離が不十分であり、またカラム圧が高かった。TOSOH TSK・GEL ODS・100S では、PHBA・isoPr と PHBA・Pr 及び PHBA・isoBu と PHBA・Bu の分離は完全では無かったが、カラム圧も低く、検討したカラムの中では最も良い分離が得られた。

次に、TOSOH TSK・GEL ODS・100S を用い、カラム温度及び移動相について検討した。その結果、カラム温度 35℃, 移動相にメタノール/5 mmol/l クエン酸緩衝液 (6:4) を使用し、流速 0.7 ml/分の場合が 6 種類の PHBA・Es 類を分離するのに最適条件であった (Fig.1)。

2. 試料溶液の調製

「食品中の食品添加物分析法」¹⁾ では食品中の PHBA・Es 類は試料を水蒸気蒸留し、HPLC で測定する方法であるが、試料の採取量は 50 g と多く、嵩高い海苔には不向

きであると考えられた。海苔は脂肪やタンパクが非常に少ない食品であり、簡便な溶媒抽出法²⁾ を検討した。試料 1 g から 80% メタノールを用いて抽出したところ、抽出液は濃い緑色であり、海苔の原料である海草中のクロロフィル等が溶出されたと考えられた。OASIS HLB カートリッジ、カーボンカートリッジでクリーンアップを検討したが、HPLC での PHBA・Me, PHBA・Et の保持時間付近に多くの夾雑物と思われるピークが出現し、PHBA・Me 並びに PHBA・Et との分離は困難であった。

Maeda ら⁵⁾ は化粧品中の PHBA・Es 類の分析にフロリジルカートリッジを用い、n・ヘキサン/酢酸エチル混液で溶出を行い、HPLC で測定し良好な結果を報告している。そこで、n・ヘキサン/酢酸エチル混液 (1:1) を抽出溶媒として検討した。

抽出液の溶媒を減圧留去後、残留物をメタノールに溶解し、HPLC を行ったところ、PHBA・Es 類の保持時間に妨害ピークは観察されなかった。また、カートリッジカラムによるクリーンアップ操作の必要は無いと考えられた。

3. 検量線

各種濃度の PHBA・Es 類の標準液を調製し、検量線を作製したところ、0.5・5 ppm の範囲で良好な直線性が得られた。

4. 添加回収実験

PHBA・Es 類の保持時間にピークの見られなかった海苔に 2 µg/g 濃度に PHBA・Es 類を添加し、本法に従って n = 5 で添加回収実験を行ったところ、回収率は 93.6 %

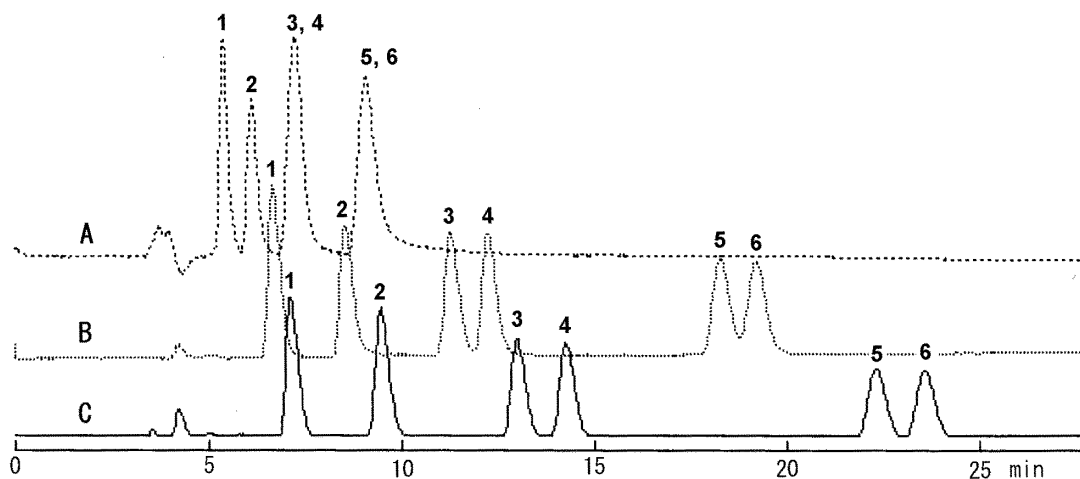


Fig.1 HPLC chromatograms of PHBA-Es

Column: TOSOH TSK-GEL ODS 100S (4.6 i.d. × 250 mm, 5 µm)

Mobil phase: A; acetonitrile/water (6:4), B; methanol/water (6:4), C; methanol/5 mmol citric buffer (6:4).

Flow rate: 0.7 ml/min.

Column temp: A, B; 40℃, C; 35℃.

1: PHBA-Me 2: PHBA-Et 3: PHBA-isoPr 4: PHBA-Pr 5: PHBA-isoBu 6: PHBA-Bu

Table 1. Recoveries of PHBA-Es in laver

表1. 海苔中からの PHBA-Es 類の添加回収率

PHBA-Es ¹⁾	回収率(%) ²⁾	変動係数(%)
メチルエステル	93.6	4.4
エチルエステル	100.0	4.5
イソプロピルエステル	95.5	4.6
プロピルエステル	97.1	4.4
イソブチルエステル	101.2	4.4
ブチルエステル	96.4	4.9

1)添加量: 2 µg/g, 2) n=5

から 101.2 % であり, 変動係数 (CV %) も 4.4 % から 4.9 % と良好な結果が得られた. なお, 検出限界は 1 µg/g であった (Table.1).

5. 市販海苔中の PHBA-Es 類の測定

本法に従い, 市販品の焼き海苔 4 検体及び味付け海苔 1 検体に付き PHBA-Es 類の測定を行ったところ不許可添加物である PHBA-Me を含め, いずれの製品からも検出されなかった.

まとめ

海苔中の不許可添加物の PHBA-Me を含む PHBA-Es

類の HPLC による一斉分析法を確立した.

本法は溶媒抽出による簡便で迅速な分析法であり, 添加回収率, 変動係数ともに良好であった.

本法を用いて, 市販の海苔中の PHBA-Es 類の分析を行ったところ, PHBA-Es 類は検出されなかった.

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課監修: 第2版 食品中の食品添加物分析法 p.17-20 (2000)
- 2) Kitada, Y., Tamase, K., Sasaki, M., Nisikawa, Y., Tanikawa, K.: J. Food Hyg. Soc. Japan, 21, 480-484 (1980).
- 3) Matsunaga, A., Yamamoto, A., Makino, M.: EISEI KAGAKU, 31, 269-273 (1985).
- 4) Okayama, A., Tanaka, K., Tamaki, M.: Jpn. J. Food Chem., 5, 153-158 (1998).
- 5) Y. Maeda, M. Yamamoto, K. Owada, S. Sato, T. Masui: HPLC Determination of six p-Hydroxybenzoic acid esters in Cosmetics Using Sep-pak Florisil Cartridges for Sample Pre-treatment, J. Chromatogr. 410, 413-415 (1987).