

## 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<sup>#</sup>, 四方田千佳子, 棚元憲一

### Determination of Six *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters in Laver (Nori) by HPLC

Yoko Kawasaki<sup>#</sup>, 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<sup>1~4)</sup>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),

<sup>#</sup>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

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)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

試料を粉碎機で粉碎後、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。

## 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/min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つたが、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つた。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つたが、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/min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」<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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ケ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<sup>5)</sup>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つた。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つた海苔に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つたところ、回収率は93.6%

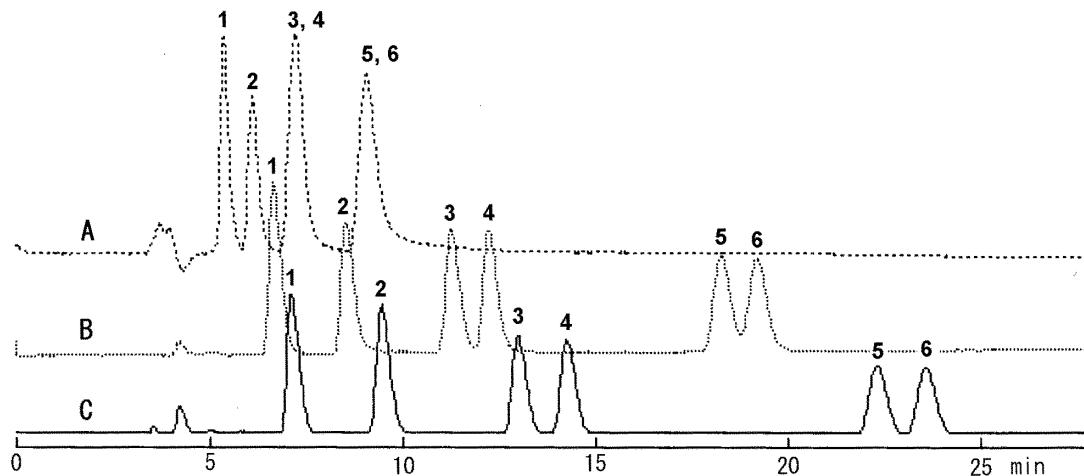


Fig.1 HPLC chromatograms of PHBA-Es

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 <sup>1)</sup>	回収率(%) <sup>2)</sup>	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 , 变動係数 ( 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 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 , 变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 ).