

HPLC を用いた清涼飲料中のサッカリン, ソルビン酸, 安息香酸, パラオキシ安息香酸 エステル類の同時定量について

恵花 孝昭 河合 正暁 阿部 敦子 木原 敏博
佐藤 稔 前田 博之* 菊地由生子

要 旨

輸入清涼飲料の中には、国内では使用が禁止されているソルビン酸の使用例が報告されており、同一の前処理で同時に多項目の食品添加物を定量できる分析法が望まれる。

サッカリン, ソルビン酸, 安息香酸, パラオキシ安息香酸エステル類の同時定量は HPLC によって可能であるが, グラジエント法やイオンペア法が使われている。より簡便な条件 (ODS 系カラム, 均一な移動相, イオン抑制法, 一波長 UV 検出器, 分析時間が 30 分以内) の分析法を検討した結果, カラムに TSK-gel ODS-80 TM, 移動相に MeCN・THF・*i*-BuOH・水・リン酸 (27・13・2・58・0.02) を用いると同時に定量が可能となることが判った。各添加物とも濃度 1 µg/g は十分に検出でき, 添加回収率も 90.6%~102% と良好な結果が得られた。

1. 緒 言

輸入食品の増加によって添加物の対象外使用が見受けられるようになり, 清涼飲料についてもソルビン酸の使用が報告¹⁾されている。検査の効率を考えると, 同一の前処理および分析条件で多項目の食品添加物を定量できる分析法が望まれる。

現在, サッカリン, ソルビン酸, 安息香酸, パラオキシ安息香酸エステル類の定量法にはガスクロマトグラフィー (GC) 法²⁾や高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{3,4,5,6,7)}法があるものの, GC 法は前処理が同一ではあるが使用するカラムが異なり, 同時定量ができない。さらに, サッカリンの定量には危険を伴うジアゾメタン法によるメチル化の操作が必要である。一方, HPLC 法では移動相の濃度グラジエントやイオンペア法, または, これらの方法の併用によってサッカリンも同時に定量できるが, グラジエント装置や移動相には pH 調製の操作のあるリン酸緩衝液を必要としている。

そこで, HPLC を用いてより簡便な条件 (ODS 系カラム, 均一な移動相, イオン抑制法, 一波長 UV 検出器, 分析時間が 30 分以内) で 8 種類の添加物の同時定量が可能となるカラムと移動相の選択, さらに, 実試

料を用いて添加回収率の検討をおこなった。なお, 清涼飲料は比較的妨害物質が少ないので, 液-液抽出法を用いた。

2. 方 法

2-1 使用機器 (日立製作所製)

ポンプ・L-6200
UV 検出器・L-4200
データ処理装置・D-2500

2-2 分析条件

カラム・TSK-gel ODS-80 TM
4.6 mm×250 mm
移動相・アセトニトリル・テトラヒドロフラン・
イソブチルアルコール・水・リン酸 (27・13・
2・58・0.02)
検出波長・235 nm 流量・0.8 ml/min

2-3 添加物の種類

サッカリン (SA), ソルビン酸 (SOA), 安息香酸 (BA), パラオキシ安息香酸エステル類・エチル (PHBA-Et), イソプロピル (PHBA-*i*-Pr), *n*-プロピル (PHBA-*n*-Pr), イソブチル (PHBA-*i*-Bu), *n*-ブチル (PHBA-*n*-Bu)

*札幌市白石保健所

2-4 前処理

試料 10 g を分液ロートにとり、飽和食塩水 10 ml と (1+9) 硫酸 1 ml を加え酸性とし、ジエチルエーテルを 50 ml 加え、2 分間振とうした後、エーテル層を受器に移した。さらに、残った水槽にエーテル 50 ml を加え、同様に操作し、2 回繰り返した。

受器に合わせたエーテル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、乾固しない程度に濃縮した後、アセトニトリルで 5 ml に定溶した。

3. 結果および考察

3-1 検出波長について

フォトダイオードアレー検出器を用いて各添加物の吸収スペクトルを測定した結果を図 1 に示した。また、PHBA エステル類は PHBA-Et と同様のスペクトルを示した。最大吸収波長は SA は 209 nm、BA は 233 nm、SOA と PHBA エステル類が 260 nm 付近と大きく異なっているが、ともに 235 nm~240 nm に吸収があることから検出波長を 235 nm とした。この波長域では最大吸収波長にほぼ一致している BA と、モル吸光度計数が大きい SOA が検出には有利ではあるが、他の添加物についても $2 \mu\text{g/ml}$ の濃度で検出可能であった。

3-2 カラムについて

移動相にアセトニトリル (MeCN) : 水 : 酢酸 (35 : 65 : 0.3) を用いて TSK-gel, マイクロボンダパック, ユニシルの ODS 系カラムについて溶出時間を測定した結果、TSK-gel 80-TM は SA の溶出時間が最も長

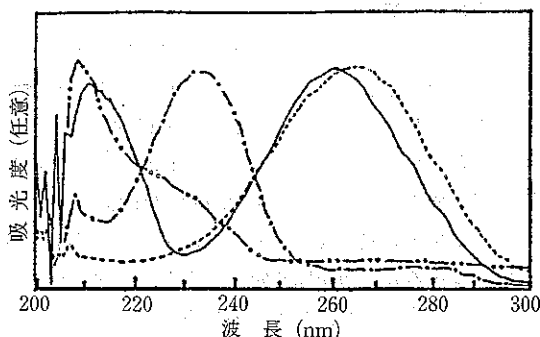


図 1 各添加物の吸収スペクトル

SA max 209 nm SOA max 265 nm
BA max 233 nm PHBA-Et max 260 nm

く、SOA-BA の分離も良好であったので、TSK-gel を用いて移動相の検討をおこなった。

3-3 移動相について

MeCN : 水 : 酢酸 ($x : z : 0.3$) の移動相を用いて、MeCN (x) の比率と SOA-BA の溶出時間の差の関係を図 2 に示した。MeCN (x) の比率が小さいほど、SOA-BA の差は増加したが、最終成分の PHBA-n-Bu の溶出時間が遅くなり、SOA-BA の差が最も大きい MeCN (x) が 25% では 1 時間経過してもカラムに保持されたままであった。

次にメタノール (MeOH)、エタノール (EtOH)、イソプロパノール (*i*-PrOH)、イソブタノール (*i*-BuOH)、テトラヒドロフラン (THF) とジオキサン の 6 種類の有機溶媒を用いて MeCN : 有機溶媒 : 水 : 酢酸 (30 : 10 : 60 : 0.3) の移動相で、SOA-BA の溶出時間の差の変化を調べた結果を図 3 に示した。THF が最もその差は大きかったが、他の有機溶媒と同様に PHBA-n-Bu の溶出時間は 40 分以上と長かった。しかし、*i*-BuOH の場合は 25 分と比較的短時間で溶出した。

THF (y) の比率と SOA-BA の溶出時間の差の関係を、MeCN : THF : 水 : 酢酸 (30 : y : z : 0.3) の移動相を用いて調べた結果を図 4 に示した。THF (y) の比率が 8% 付近でその差は最大になったが、10% 以上になると大きく減少した。しかし、MeCN (x) と THF (x) の比率の和が一定な移動相の MeCN : THF : 水 : 酢酸 ($x : y : 60 : 0.3$) では、THF (y) の比率を多くすると SOA-BA の溶出時間の差は増加する傾向が見られた。

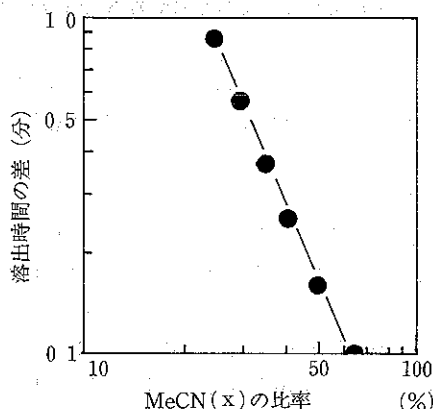


図 2 MeCN の比率と SOA-BA の溶出時間の差

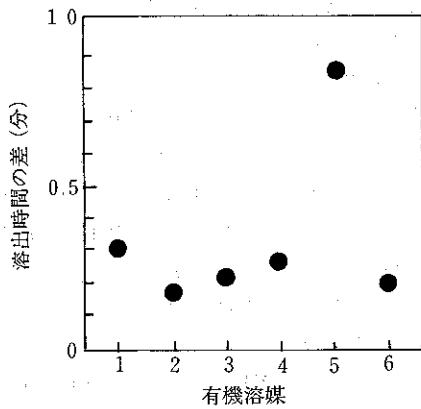


図3 各有機溶媒と SOA-BA の溶出時間の差

- 1: MeOH 2: EtOH 3: *i*-PrOH
 4: *i*-BuOH 5: THF 6: Dioxane

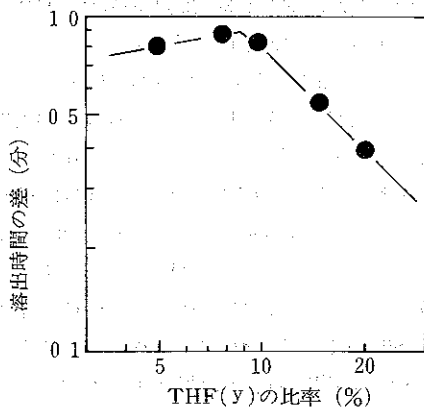


図4 THF の比率と SOA-BA の溶出時間の差

このように、THF の添加は SOA-BA の溶出時間の差を増加させ、*i*-BuOH は溶出時間を短縮する効果があることが判った。

移動相に酢酸を加えなければ SOA-BA は分離されず、移動相に対して 0.1% 加えると分離が可能であった。酢酸を 0.3% にすると SOA-BA の溶出時間の差は増大したが、1% では逆に減少した。また、酢酸ではベースラインにディブが生じたが、リン酸を用いるとディブも小さくなり、0.02% 程度の添加で SOA-BA は分離ができた。

しかし、MeCN・THF・水・リン酸の移動相では各成分の比率を変えても、PHBA-*n*-Bu の溶出時間は 40

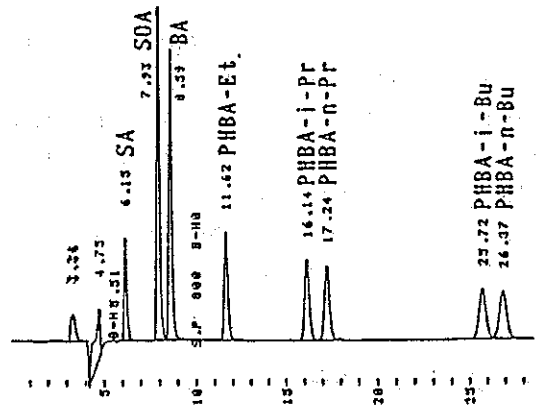


図5 濃度 20 μg/ml のクロマトグラム

検出器: AUFS: 0.1 データ処理装置 ATT: 3

分以上になった。そこで、溶出時間を短縮する効果のある *i*-BuOH を 2% 加えた、MeCN・THF・*i*-BuOH・水:リン酸の (27:13:2:58:0.02) の移動相を用いると、30 分以内の分析が可能となった。この移動相を用いたときの各添加物の標準物質 20 μg/ml のクロマトグラムを図 5 に示した。なお、各添加物 (サッカリンはナトリウム塩として) とともに濃度 1 μg/g は十分に検出できた。

3-3 添加回収率について

果汁入りジュース、スポーツドリンク、シロップ、植物性発酵飲料に各添加物の標準物質を 100 μg/g になるように加え、2-2 の分析条件と 2-4 の前処理に従って 2 回繰返して添加回収率を求めた結果を表 1 に示した。ともに 90.6%~102% と良好な結果が得られた。なお、試料中からソルビン酸は検出されなかった。

4. 結 語

アセトニトリル:水系の移動相に THF とイソブタノールを加えることによって、ソルビン酸と安息香酸の分離を保ちながら、分析時間が 30 分以内で終わる移動相を調製することができた。この移動相は比較的簡単に調製でき、かつ、基本的な構成の HPLC でサッカリン、ソルビン酸、安息香酸、パラオキシ安息香酸エステル類の 8 種類が同時定量できた。前処理の方法によっては他の食品にも応用できると思われる。

5. 文 献

- 1) 日本食品衛生協会・輸入食品 1989 (統計に見る輸

表1 添加回収率

(%)

試料名	SA	SOA	BA	PHBA				
				Et	<i>i</i> -Pr	n-Pr	<i>i</i> -Bu	n-Bu
果汁入りジュース	98.7	97.6	98.2	98.0	97.4	96.1	91.9	94.6
	97.1	92.9	94.0	92.8	92.1	94.3	90.6	93.2
スポーツドリンク	102.0	98.0	98.9	98.9	98.1	100.0	96.8	99.6
	100.0	99.8	100.0	98.1	97.3	99.3	95.8	98.7
シロップ	101.0	94.4	91.2	95.9	95.5	97.8	93.9	96.2
	102.0	94.6	91.7	95.6	94.8	96.9	93.0	94.4
植物性発酵飲料	101.0	98.2	99.4	97.3	96.6	98.6	94.7	97.7
	98.9	94.5	95.7	93.4	96.3	96.5	96.1	93.8

各添加物の添加量 100 µg/g n=2

- 入食品の実態) 193, 1990.
- 2) 厚生省生活衛生局監修: 食品衛生検査指針(食品中の食品添加物分析法), 190-195 19-21 14-18 25-32, 1989.
- 3) 北田善三, 他: 食衛誌, 21, 480-484, 1980.
- 4) 寺田久屋, 他: 衛生化学, 29, 297-302, 1983.
- 5) 松永明信, 他: 衛生化学, 31, 269-273, 1985.
- 6) 西山良子, 他: 東京都立衛生研究所研究年報, 38, 189-202, 1987.
- 7) 木内佳伸: 福岡市衛生試験所年報, 14, 47-52, 1989.

Simultaneous Determination of Saccharin, Sorbic Acid, Benzoic Acid and Esters of *p*-Hydroxybenzoic Acid in Soft Drinks by High Performance Liquid Chromatography

Takaaki Ebana, Masaaki Kawai, Atsuko Abe, Satohiro Kihara, Minoru Sato, Hiroyuki Maeda* and Yuko Kikuchi

ABSTRACT

The use of sorbic acid which is prohibited in Japan was reported in imported soft drinks. A simultaneous determination method is required as it can measure many kinds of food additives at the same time.

Simultaneous determination of saccharin, sorbic acid, benzoic acid and esters of *p*-hydroxybenzoic acid is possible with HPLC, but in fact the gradient method and the ionpair method are used. After the investigation of the analyzing method with simple conditions (ODS column, isocratic mobile phase, ion control method, mono wave UV detector and 30-mins or less analysis time), it was found that the simultaneous determination was possible when TSK-gel ODS-80TM was used for column and MeCN: THF: *i*-BuOH: H₂O: H₃PO₄ (27: 13: 2: 59: 0.02) was used for mobile phase. Sufficient 1 µg/g was detected on each food additives, and the recoveries of them in soft drinks were 90.6%–102%.

* Sapporo Shiroishi Health Center