

資 料

食品添加物の分析に関する検討

栗本喜普, 林 典子, 遠藤利加

要 旨

食品の保存料として用いられるソルビン酸について、異性化を促進させる要因及び異性体を含む定量方法について検討を行ったところ、異性化を促進させることが知られている紫外線の他に、塩化ナトリウム、タンパク質、加熱等が複合的に作用し影響を与えていることが示唆された。また高速液体クロマトグラフにおいてソルビン酸標準物質のグループ検量を用いて異性体を定量する際の補正係数は、およそ 1.1 であった。

甘味料の使用実態に即して効率的に検査を行うことを目的とし、サッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム、アスパルテームの同時分析法の検討を行った。一部の食品については引き続き検討が必要であるものの、概ね良好な結果が得られ、検査項目の拡充に至った。

キーワード：ソルビン酸異性体、甘味料同時分析、HPLC、LC-MS

1 はじめに

保存料として用いられるソルビン酸は紫外線の影響で異性化することが知られており^{1), 2)}、当所の高速度液体クロマトグラフ(以下 HPLC)による分析で、ソルビン酸使用食品から高頻度にソルビン酸異性体が確認されている。食品の種類によっては、ソルビン酸のピーク面積の10%程度のピーク面積をもつ異性体が確認されることもあり、定量の際には無視できない値となる。ソルビン酸異性体には安定的な標準物質がないことから、定量方法が確立されておらず、自治体によって扱いが異なるのが現状である。当所では、食品添加物としてのソルビン酸の基準が使用基準であることから³⁾、ソルビン酸標準物質によるグループ検量により異性体を合算し定量を行っており、より精密な定量方法の確立が必要である。また、食品の種類によってソルビン酸定量値に占める異性体の割合(以下、異性体存在比率)や異性体検出率が異なるなど、ソルビン酸が食品中で異性化する要因についても不明な点が多いため、県内流通食品における異性体の検出率や異性化を促進させる要因に関するデータの集積、検討を行った。

近年の健康志向の高まりを背景に、カロリー低減を目的として食品に使用される人工甘味料の種類は増加傾向にある。当所では、甘味料検査としてサッカリンナトリウム(以下、SA)及びアセスルファムカリウム(以下、AK)を実施しているが、検査に係

る時間や費用などのコストを増やすことなく、使用実態に即して効率的に検査を行うことを目的とし、SA、AK 及びアスパルテーム(以下、APM)の同時分析法について検討した。

2 ソルビン酸異性体に関する検討

2.1 ソルビン酸異性体の検出状況

2.1.1 方法

平成27年度から令和3年度までに当所で実施した食品添加物検査検体のうち、ソルビン酸が検出された検体を対象に、異性体の検出率及び異性体存在比率を集計した。

2.1.2 標準品及び器材等

標準品は、関東化学(株)製(食品分析用)を用いた。透析には積水マテリアルソリューションズ(株)製の分画分子量12,000~14,000のセルロースチューブを用いた。分析装置は(株)島津製作所製 HPLC(LC-20A)、検出器はPDAを用いた。分析条件を表1に示す⁴⁾。なお、透析液は50%メタノール溶液(高脂質・高タンパク食品については60%)を使用し、透析時間は24時間とした。

表1 保存料分析条件

カラム	Shim-Pack FC-ODS 75×4.6 mm I.D. (粒子径3μm)
移動相	5 mmol/Lクエン酸緩衝液：アセトニトリル：メタノール= (7：2：1)
測定波長	230 nm, 260 nm
カラム温度	40℃
注入量	10 μL
流速	1.0 mL/min

2.1.3 結果

年度別及び食品分類別の異性体検出率を示す(表2, 3). ソルビン酸検出検体1249件のうち、異性体が検出されたものは778件(62.3%)であった。食品分類別では、魚肉練り製品などの高タンパク食品で検出率が高い傾向が見られた。漬物の中ではしょうゆ漬が83.3%と最も高値であった。

表2 年度別異性体検出率

	ソルビン酸 検出数	異性体 検出数(内数)	異性体 検出率(%)
平成27年度	170	145	85.3
平成28年度	165	95	57.6
平成29年度	168	103	61.3
平成30年度	195	115	59.0
平成31年度	186	111	59.7
令和2年度	176	89	50.6
令和3年度	189	120	63.5
合計	1249	778	62.3

表3 食品分類別異性体検出率

分類	ソルビン酸 検出数	異性体 検出数(内数)	異性体 検出率(%)
漬物	901	527	58.5
食肉製品	86	78	90.7
つくだ煮	79	69	87.3
果実酒	37	2	5.4
魚肉練り製品	28	28	100.0
煮豆	25	22	88.0
ジャム	23	3	13.0
菓子(餡使用)	15	10	66.7
いかくん たこくん	12	12	100.0
チーズ	8	8	100.0
そうざい	8	4	50.0
みそ	8	4	50.0
シロップ	6	4	66.7
干しすもも	5	1	20.0
ニョッキ	5	5	100.0
清涼飲料水	2	0	0.0
ケチャップ	1	1	100.0
漬物内訳	ソルビン酸 検出数	異性体 検出数(内数)	異性体 検出率(%)
しょうゆ漬	348	290	83.3
たくあん漬	290	119	41.0
塩漬	98	31	31.6
酢漬	72	32	44.4
こうじ漬	54	28	51.9
味噌漬	28	19	67.9
かす漬	11	8	72.7

食品分類別の異性体存在比率では、漬物、食肉製品、魚肉練り製品などで10%を超過する検体が確認されたほか、検体数は少ないものの、いかくん・たこくん及びニョッキの異性体存在比率の平均値は10%前後と高値であった(図1)。

食品の種類により検出率、異性体存在比率に差が見られたことから、食品の成分等がソルビン酸の異性化に影響していることが推測された。

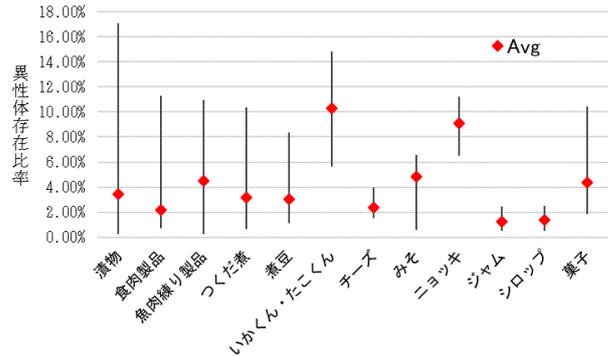


図1 食品分類別異性体存在比率

2.2 塩化ナトリウム, pH, 紫外線及び太陽光が異性化に与える影響について

2.2.1 方法

100 μg/mL ソルビン酸水溶液を以下の条件で調製し、異性体存在比率の経時的変化を確認した(表4). 試料調製後、10日程度経過するごとにHPLCにて分析し、異性体存在比率を算出した。

表4 試料の検討条件

	塩化Na濃度 (w/v%)	pH	保存条件	保存温度	
1	15	—	遮光	常温	
2	5	—			
3	0	3.0			
4		5.0			
5		10.0			
6		—			紫外線(253.7nm)常時照射
7	—	—			太陽光暴露
8	—	—			遮光

2.2.2 標準品及び器材等

2.1.2に同じ。

2.2.3 結果と考察

塩化ナトリウムを添加した試料では、濃度が高いほど異性体存在比率が高値となった(図2). 紫外線照射した試料では、10日で2%程度の割合で異性体存在比率が上昇し続けているのに対し、太陽光に暴露した試料では、上昇の割合は一定でなく、夜間は太陽光の影響が無いにも関わらず、紫外線照射した

試料よりも異性体存在比率が高くなった (図3)。これは、紫外線照射が 253.7 nm の単波長であるのに対し、太陽光には様々な波長が含まれていることや、季節や天候の変化により異性化への影響も変化するためでは無いかと推測された。また、どちらも異性体存在比率が 10 % を上回り、紫外線が SOA の異性化に影響を与えていることが改めて確認された。一方、pH を調整した試料及びび遮光保存した試料では異性化は確認されなかった。

これらのことから、ソルビン酸の異性化には紫外線、塩化ナトリウムが影響を与えている事が示唆された。

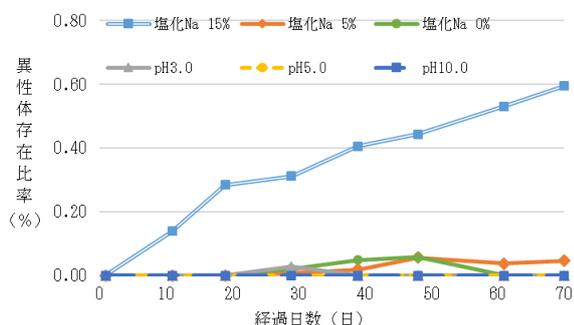


図2 ソルビン酸異性体存在比率の経時的変化 (塩化ナトリウム, pH)

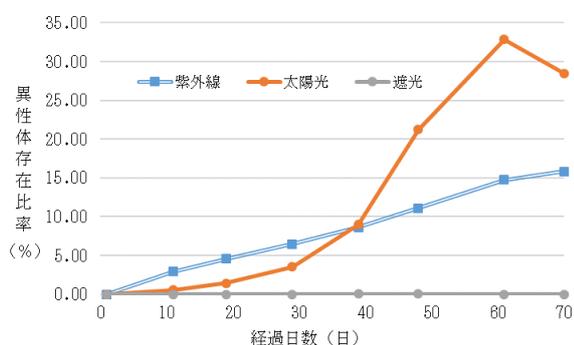


図3 ソルビン酸異性体存在比率の経時的変化 (紫外線・太陽光・遮光)

2.3 食品中のタンパク質と塩化ナトリウムが異性化に与える影響について

2.3.1 方法

2.1 及び 2.2 の結果から、食品中のタンパク質、塩化ナトリウムが異性化に影響を及ぼしている可能性が示唆されたため、表 5 の条件となるよう試料を調製し、異性体存在比率の経時的変化を確認した。

表5 試料の調製

食品	ソルビン酸添加濃度	塩化Na添加	試料中の推定塩化Na濃度(%)※	試料中の推定タンパク質濃度(%)
食肉製品	0.4g/kg		2.5	15.4
食肉製品		○	17.5	15.4
魚肉練り製品			2.4	10.6
魚肉練り製品		○	17.4	10.6
しょうゆ漬			2.2	2.2
しょうゆ漬		○	17.2	2.2
しょうゆ			13.8	7.8

しょうゆ	○	28.8	7.8
プロテイン(大豆)		3.1	12.4
プロテイン(大豆)	○	18.1	12.4
プロテイン(乳)		1.3	12.4
プロテイン(乳)	○	16.3	12.4

※食品中に元々含まれる塩化Naを含む

2.3.2 標準品及び器材等

2.1.2 に同じ。

2.3.3 結果と考察

試料調製から約 60 日経過までの各食品における異性体存在比率の経時的変化を図 4 に示す。魚肉練り製品、しょうゆ漬及びプロテイン(乳)では、塩化ナトリウムを添加しなかった試料に比べ、添加した試料の方で異性体存在比率が高くなる傾向が見られた。食肉製品では、塩化ナトリウムを添加した試料に比べ、添加しなかった試料の方で異性体存在比率が高くなった。プロテイン(大豆)では、50 日経過ごろまで塩化ナトリウム添加の有無で大きな差は見られなかった。しょうゆは塩化ナトリウム添加の有無による差は見られなかった。これはしょうゆの塩分濃度が元々 14 % 程度と高値であるためではないかと推測された。試料中の推定タンパク質濃度が高い食品よりも低い食品で異性体存在比率が高くなる食品があること、タンパク質濃度を同じにしたプロテインの、乳と大豆では異性体存在比率の増加の仕方が異なる等、塩化ナトリウムやタンパク質が異性化に及ぼす影響は、食品の種類により異なった。

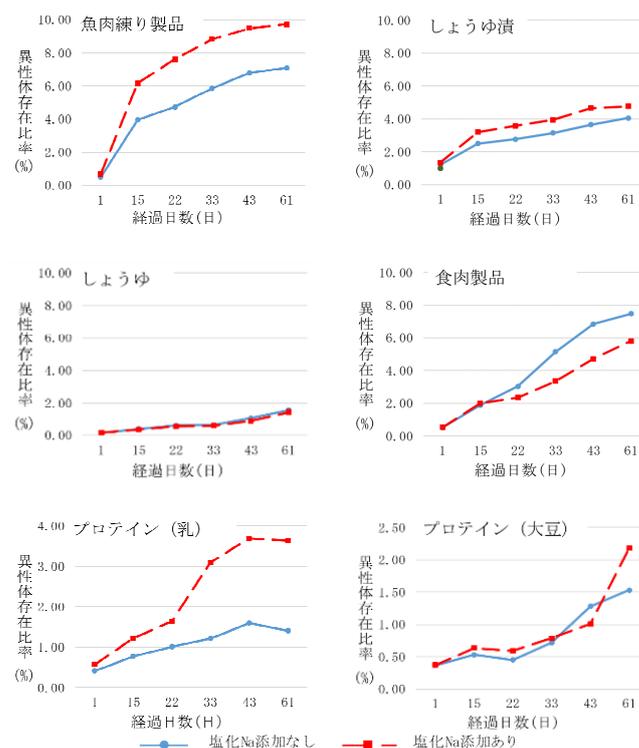


図4 塩化Na添加による異性体存在比率の経時的変化

また、ジャムや果実酒など、一般に塩化ナトリウムやタンパク質を含まない食品からもわずかながら異性体は検出されることから、異性化には食品中の成分が複合的に影響を及ぼしていると共に、他にも異性化を促進させる要因が存在する可能性が考えられた。

2.4 食品中の成分、添加物及び加熱が与える影響について

2.4.1 方法

2.3 の結果から、タンパク質及び塩化ナトリウム濃度以外の要因も異性化に影響を及ぼしていることが推測されたため、2.1 の結果において検体数が多く、異性体検出率と異性体存在比率高値であった食肉製品としょうゆ漬について、製造工程における加熱とその他の添加成分に着目し、豚肉、小松菜を用いて、表6の条件により疑似試料を調製後、7日程度ごとに各試料の異性体存在比率の経時的変化を比較した。

表6 試料の調製

	食品	加熱 (80°C2h)	塩化Na (15%)	醤油 (10%)	亜硝酸Na (0.050g/kg)
1	豚肉 90g + 水60g	○			
2		○	○		
3		○			○
4		○	○		○
5					
6			○		
7					○
8			○		○
9	小松菜90g + 水60g	○			
10		○	○		
11		○		○	
12		○	○	○	
13					
14			○		
15				○	
16			○	○	

※「加熱なし」は食品を加熱・冷却した後、ソルビン酸、塩化Na、亜硝酸Naを添加

※「加熱あり」はソルビン酸、塩化Na、亜硝酸Naを食品に添加後加熱

2.4.2 標準品及び器材等

2.1.2に同じ。

2.4.3 結果

加熱の有無による異性体存在比率の経時的変化を図に示す(図5, 6)。

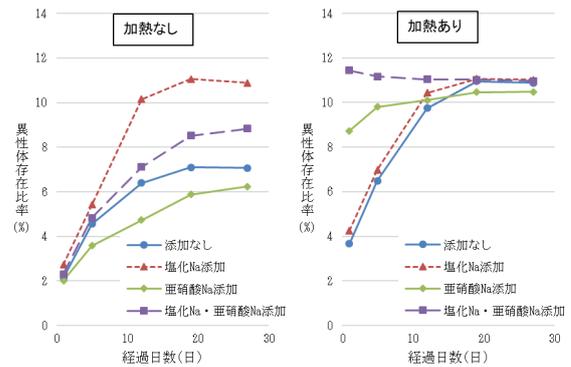


図5 食肉試料の異性体存在比率の経時的変化

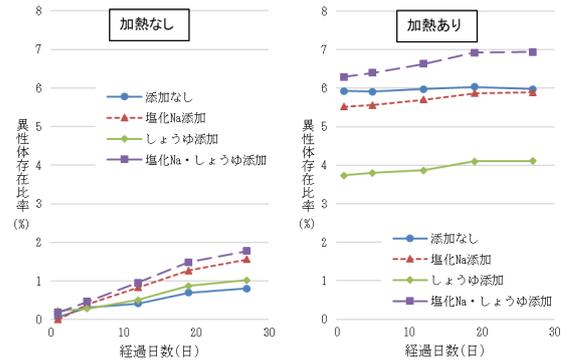


図6 野菜試料の異性体存在比率の経時的変化

食肉試料、野菜試料ともにすべての条件において加熱した試料の方で異性体存在比率高い傾向が見られた。加熱なしの場合、塩化ナトリウムを添加したものの方が添加していないものよりも異性体存在比率高くなる傾向が見られた。

加熱した食肉試料では、亜硝酸ナトリウムを添加した試料で調製直後から異性体が高比率に出現した。一方食塩のみ添加した試料は加熱の有無による差が少なかった(図5)。

加熱した野菜試料では、調製直後から異性体が高比率で出現し、その後は1%以上の変動がなかった。塩化Na・しょうゆを加えた試料の異性体存在比率が最も高かった(図6)。

これらの結果から、食品中に元々含まれる成分、製造工程における加熱、及び添加される物質が複雑に作用しながら異性化の促進に影響を及ぼしていることが示唆された。

2.5 異性体定量方法の検討について

2.5.1 方法

食品添加物検査検体のうち、ソルビン酸が使用されているものを対象に西山ら¹⁾の方法を参考とし、HPLCと高速液体クロマトグラフ質量分析装置(以下、LCMS)による分析を行い、それぞれの異性体とソルビン酸のピーク面積比から異性体の補正係数を算出した。

2.5.2 標準品及び器材等

標準品及び透析器材は2.1.2に同じ。分析装置は

上記に加えて LCMS Agilent 1100 series を用いた. 分析条件を表7に示す.

表7 LCMS 分析条件

カラム	Waters Xbridge C18 3.5 μm 2.1×150mm
移動相	A液 0.1%ギ酸溶液 B液 MeCN
グラデーション	0min(5%)→1min(20%)→20min(25%)→21min(95%) →26min(95%)→27min(5%)
測定波長	230nm
流速	0.2mL/min
カラム温度	40℃
注入量	5 μL

2.5.3 結果

LCMS と HPLC の分析結果から異性体とソルビン酸のピーク面積比をそれぞれ算出し, 補正係数を求めたところ, 約 1.1 となった (図7).

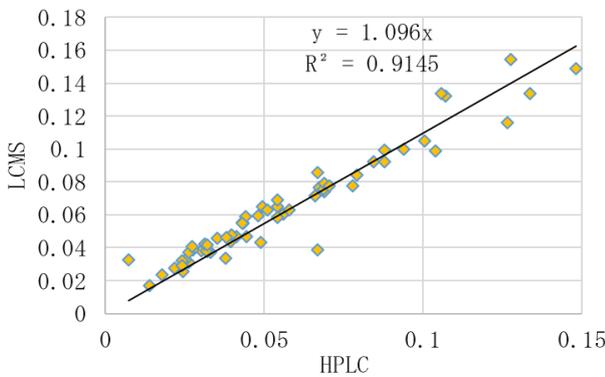


図7 HPLC 分析時の異性体の補正係数

3 人工甘味料同時分析法に関する検討

3.1 人工甘味料の使用状況について

平成26年度から令和2年度までの甘味料検査検体のうち, 使用表示のある 858 件の人工甘味料使用状況を示す (図8). 当所が分析を実施していないものの中では, ソルビトール, スクラロース, APM の順に使用割合が多かったが, ソルビトール及びスクラロースは UV 吸収がなく^{5), 6)}, HPLC での同時分析の条件に適さないため, 今回の検討では APM を対象とした.

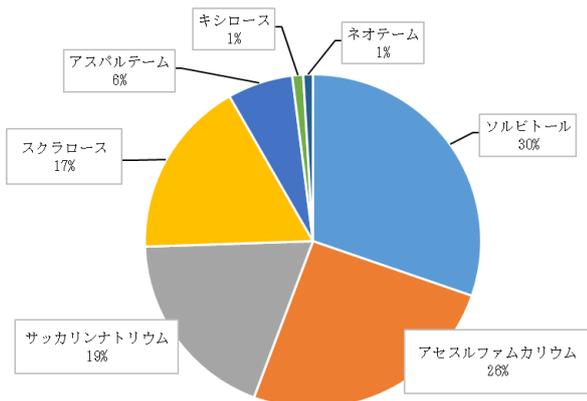


図8 人工甘味料使用状況

3.2 SA, AK, APM の同時抽出について

3.2.1 方法

APM の通知法⁴⁾では, 固形食品と液状食品それぞれに異なる透析条件が設定されている. なお, 液状食品の透析条件は当所で実施している SA, AK の透析条件と同様である. また, SA 分析では, 魚肉練り製品などの高タンパク食品の透析液に 0.1~0.01 mol/L の水酸化ナトリウム溶液を用いていることから, 表8の条件により抽出した透析液を HPLC にて分析し, 回収率を比較した. なお, 甘味料分析における透析時間は 24~48 時間とした.

表8 APM 透析条件及び検討食品

条件	透析内液	透析外液	食品	備考
1	10%塩化Na含有 0.01mol/L塩酸	0.01mol/L塩酸	魚肉練り製品	APM 液状食品 SA, AK の現行透析条件
2	1%リン酸	0.01mol/L塩酸	煮豆, 菓子	APM 固形食品の透析条件
3	0.01mol/L水酸化Na溶液	蒸留水	魚肉練り製品	SA 高タンパク食品の透析条件

3.2.2 標準品及び器材等

標準品は, すべて関東化学 (株) 製 (食品分析用) を用いた. 透析器材及び分析装置は 2.1.2 に同じ. APM の分析条件を表9に示す.

表9 APM の HPLC 分析条件

カラム	Shim-Pack FC-ODS 75×4.6mm
移動相	0.02mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) : MeOH=3 : 1
測定波長	210nm
流速	1.0mL/min
カラム温度	40℃
注入量	10 μL

3.2.3 結果

各食品の回収率は条件 1, 2 で 70 % から 100 % の範囲であった (表10). また, 条件3では APM は検出されなかった. APM は pH6 以上で不安定であり, 水酸化ナトリウム溶液中で分解されたものと推測される.

以上の結果から, 高タンパク食品含め APM の抽出には条件1を用いることとした.

表10 食品別 APM 回収率

食品	平均回収率 (%) n=3		
	条件1	条件2	条件3
魚肉練り製品1	92.3	89.4	0.0
魚肉練り製品2	84.0	90.6	0.0
煮豆	92.5	94.5	0.0
菓子	87.0	77.5	0.0

3.3 SA, AK, 及び APM の同時分析について

3.3.1 方法

しょうゆ漬, たくあん漬, 魚肉練り製品, 清涼飲料水, ジェム, 菓子に SA, AK, APM を 0.1 g/kg 及び通知法の定量下限値である 0.01 g/kg となるよう添加し, 表 8 の条件 1 により抽出したものを HPLC で分析した。

3.3.2 標準品及び器材等

標準品, 器材等は 3.2.2 に同じ。分析条件を表 11 に示す。

表 11 甘味料3項目分析条件

分析装置	SHIMADZU LC-20A
カラム	Shim-Pack FC-ODS 75×4.6mm
移動相	A液 50mmol/Lりん酸緩衝液: MeCN=98.5:1.5 B液 50mmol/Lりん酸緩衝液: MeCN=85:15
グラジエント	3min(0%)→5min(100%)→13min(100%)→15min(0%)
測定波長	210nm, 230nm
流速	1.0mL/min
カラム温度	40℃
注入量	20μL

3.3.3 結果

分析した試料のクロマトグラムを示す(図9)。AK, SA, APM の保持時間は 2 min から 10 min の範囲であり, それぞれ分離は良好であったが, 食品によっては夾雑物のピークが APM のピークに重なることがあったため, 引き続き検討が必要である。0.1 g/kg 及び 0.01 g/kg に調製した試料における回収率は 70~120% の範囲であり, S/N 比 > 10 と良好であったため, 本法における定量限界値を 0.01 g/kg とした。

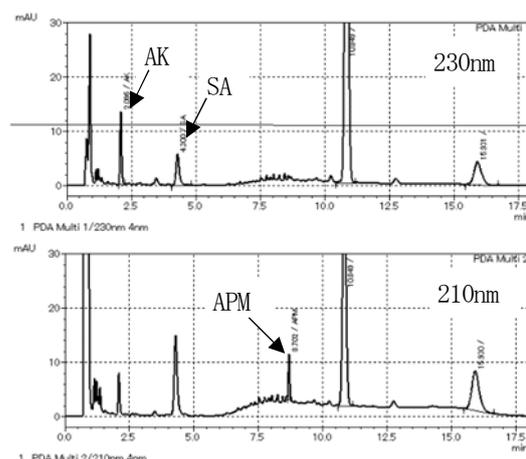


図9 HPLCクロマトグラム (0.01g/kg: ジェム)

文 献

- 1) 西山良子: 食品中で生成するソルビン酸の異性体について, 衛生化学 37(2), 89-96, 1991.
- 2) 功刀 彰: ソルビン酸の光分解及び含硫アミノ酸との相互作用, 食衛誌 vol.25, No.3, 246-250, 1983.
- 3) 通知(食品, 添加物等の規格基準(昭和34年12月28日厚生省告示第370号))
- 4) 第2版 食品中の食品添加物分析法2000, 社団法人日本食品衛生協会.
- 5) 守安貴子: HPLCによる食品中のアセスルファムK, サッカリン及びアスパルテームの分析法, 1995.
- 6) 平尾美子: HPLCによる糖類の分析, 2016.
- 7) 食品衛生検査指針 食品添加物編, 社団法人日本食品衛生協会, 2003.

Consideration of food additive analysis

Yoshihiro KURIMOTO, Noriko HAYASHI, Rika ENDO

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan