

短報

食品中の乳化剤，ポリソルベートの分析

岸 弘子

Analysis of emulsifier, polysorbate in foods

Hiroko KISHI

はじめに

ポリソルベート (PS) は、ソルビトールの水酸基の一部を脂肪酸でエステル化し、酸化エチレン約20分子を縮合させたもので、アメリカ、EU、韓国、タイ等で乳化、分散化、可溶化剤として広く使用されている。日本ではPS20、60、65、80が、平成20年4月30日に食品添加物として指定され¹⁾、使用基準の設定、食品中の分析法の通知が行われた²⁾。しかし、EUで許可されているPS40は指定されていない。これまでは、PSが検出されれば、種類や検出量によらず、すべて違反となっていた。今後は、指定外のPSとの判別及び食品中からの正確な定量が必要となる。当所ではこれまでに、PSの種類による検出感度や薄層クロマトグラフィー (TLC) の分離パターンの差を検証しながら、分析法の検討を行ってきたので報告する。

方法

1. 試料

ココナッツミルク、タイカレー、トマトソース、ケーキミックス、ビスケットは市販品を、粉末ラーメンスープは東洋水産株式会社より分与されたものを用いた。

2. 試薬等

PS20、40、60、65、80、85：アルドリッチ、シグマ、関東化学、東京化成、和光純薬工業の化学用を使用した。さらに、PS60は国立医薬品食品衛生研究所より分与された食品添加物規格(案)適合品 (N1、N2) も使用した。

PS溶液：各PSをジクロロメタンで溶解し、適宜希釈して使用した。

ドラージェンドルフ試薬 (TLC・比色共通)：A液は次硝

酸ビスマス (塩基性硝酸ビスマス) 0.85gを水40mlと酢酸10mlの混液に溶かした。B液はヨウ化カリウム8gを水20mlに溶かした。使用前にA液5ml、B液5ml、酢酸20ml及び水100mlを混和した。

比色用チオシアン酸コバルト試薬：チオシアン酸アンモニウム50g、硝酸コバルト六水塩15g及び塩化ナトリウム25gを水に溶かして250mlとした。

TLC用チオシアン酸コバルト試薬：チオシアン酸アンモニウム17.4g及び硝酸コバルト六水塩2.8gを水に溶かして100mlとした。

薄層板：Silica gel 60 HPTLC plates, 10×10cm, Merck社製

アルミナカートリッジカラム：Waters社製Sep-PakアルミナA、N、B (2g)

グラファイトカーボンカートリッジカラム：シグマアルドリッチジャパン社スペルコ事業部製スペルクリンENVI-Carb(500mg)

3. 固相抽出による試料抽出液の精製法検討

カートリッジカラムを用いた精製法を検討し、PSの保持をアルミナA、N、Bについて比較した。さらに、クロロフィル除去のため、グラファイトカーボンによる精製の有効性を、粉末ラーメンスープにPS60を添加し検討した。

4. 試験溶液の調製

試料10gを採取し、5%メタノール含有酢酸エチル100ml、無水硫酸ナトリウム50g (粉末スープ、ケーキミックス等の水分の無い物は不要)を加えホモジナイズし、吸引ろ過した。残渣に5%メタノール含有酢酸エチル50mlを加え再度抽出した。ろ液を合わせ減圧濃縮し、残留物をヘキサン30ml、ヘキサン飽和アセトニトリル30mlで分液ロートに洗い込み、振とうして下層を分取した。ヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加え、再度振とう抽出し、下層を合わせ減圧濃縮した。酢酸エチル5mlで溶解し、試料抽出液とした。Sep-PakアルミナB (2g)に無水硫酸ナトリウム2gを積層し、酢酸エチル10mlで洗浄し、試料抽出液を負荷した。酢酸エチル20mlで洗浄し、酢酸エチル・メタノール (1:1) 20mlで溶出した。溶出液を減圧濃縮し、ジクロロメタン2mlで溶解し、TLC用試験溶液とした。さらに、TLC用試験溶液0.5mlにジクロロメタンを加えて5mlとして比色用試験溶液とした。

試料がクロロフィルを含む場合は、試料抽出液の負荷、酢酸エチル20mlで洗浄までは同様に行い、酢酸エチル・メタノール (1:1) 5mlで予め洗浄したスペルクリンENVI-Carb (500mg)をSep-PakアルミナBの下に接続し、酢酸エチル・メタノール(1:1)20mlを流した。ス

ペルクリンENVI-Carbを取り外し、通気乾燥した後、ジクロロメタン9mlで溶出し、ジクロロメタンを加えて10mlとして比色用試験溶液とした。その5mlを減圧濃縮し、ジクロロメタンを加えて0.5mlとし、TLC用試験溶液とした。

5. TLCによる定性

試験溶液と各PS溶液(1mg/ml) 各10 μ lを2枚のTLCプレートに塗布し、展開溶媒としてジクロロメタン・メタノール・アセトン・水(55:20:15:4)を用いて展開した。風乾後、それぞれのプレートにドラージェンドルフ試薬またはTLC用チオシアン酸コバルト試薬を噴霧し、検出されたスポットを観察した。

6. 比色による定量

各PS溶液 5ml及び比色用試験溶液に、ドラージェンドルフ試薬または比色用チオシアン酸コバルト試薬5mlを加え、5分間振り混ぜ、ジクロロメタン層を分取した。自記分光装置は日立U-3100を用い、ドラージェンドルフ試薬による発色は波長500nm、チオシアン酸コバルト試薬による発色は波長620nmで吸光度を測定した。

添加回収試験は、PSが使用されていないことを確認した食品に、PS60を試料中濃度として0.1g/kg及び0.5g/kgになるように添加して行った。

結果および考察

1. PSの種類及びメーカーの比較

PSは、ドラージェンドルフ試薬及びチオシアン酸コバルト試薬による発色の吸光度が、種類により異なることが報告されている³⁾。試薬として市販されているPSは、オキシエチレン基の含量が明確にされておらず、各脂肪酸の割合や酸化エチレンの分子数も不明であるが、定性、定量には、成分が明確な標準品が必要である。そこで、各メーカーの試薬について、TLCと比色で比較を行った。

1) TLC

TLCによる分離例を図1に示した。PS溶液では、それぞれ複数のスポットが検出され、3スポットが全種類に共通した。共通する3スポットの内では、脂肪酸が1カ所でエステル化しているPS20, 40, 60, 80は、いちばんRf値の小さいスポットの発色が強く、3カ所でエステル化しているPS65, 85はいちばんRf値の大きいスポットの発色が強かった。メーカーによるパターンの差は認められなかった。TLCは、クロロフィル等食品由来の着色の影響を受けにくく、PSの定性法として有効であった。

2) 比色

ドラージェンドルフ試薬及びチオシアン酸コバルト試薬による方法で発色した各種PS溶液の吸光度を比較した。

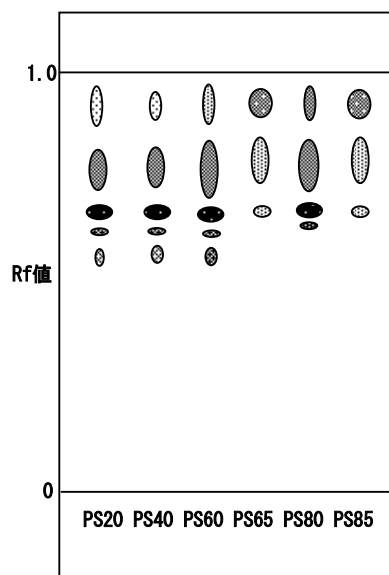


図1 TLC分離例
各PS：和光純薬工業製

表1 ポリソルベートの試薬メーカー別吸光度比較

	メーカー名	試薬	
		ドラージェンドルフ	チオシアン酸コバルト
PS20	A	0.623	0.430
	K	0.494	0.442
	T	0.600	0.430
	W	0.550	0.434
PS40	K	0.502	0.399
	S	0.594	0.409
	T	0.542	0.427
PS60	W	0.470	0.406
	K	0.534	0.401
	N1	0.671	0.430
PS65	N2	0.664	0.415
	S	0.635	0.411
	T	0.688	0.435
	W	0.536	0.407
PS80	S	0.198	0.273
	W	0.165	0.281
PS85	A	0.826	0.410
	K	0.740	0.404
	T	0.753	0.413
	W	0.772	0.396
	A	0.202	0.258
	K	0.185	0.246
	T	0.224	0.223
	W	0.164	0.234

A: アルドリッチ, S: シグマ, K: 関東化学,
T: 東京化成, W: 和光純薬工業,
N: 国立医薬品食品衛生研究所分与品

PS溶液の濃度は、PS60で吸光度が0.5付近となるように、ドラージェンドルフ試薬法では0.1mg/ml、チオシアン酸コバルト試薬法では0.2mg/mlとした。結果を表1に示した。PS65とPS85は両試薬で吸光度が低い傾向が認められた。

なお、PSはロット毎に品質が異なる製品があるといわれているが、この結果は各製品1ロットのみの比較であり、ロット間の差は検討していない。

チオシアン酸コバルト試薬による発色は、ドラージェンドルフ試薬に比べて吸光度は低い、同一濃度での種類による吸光度の差が少ない。食品に使用されているPSの種類が不明な場合、標準品として使用したPSと種類が異なっても、定量誤差を減少させることができる。また、食品の抽出物は黄色から赤を示す場合が多く、500nmで比色するドラージェンドルフ試薬法では、吸光度にプラスの誤差を与える場合が多かった。したがって、定量にはチオシアン酸コバルト試薬による発色が適していると考えられた。

2. 試験溶液の調製法の検討

有機溶媒での試料抽出時に水分が含まれると、糖等の水溶性成分により後の濃縮操作が困難となった。そこで、無水硫酸ナトリウムで脱水して抽出する必要があった。

精製に用いる固相抽出カラムについて、アルミナカートリッジA、N、Bについて比較した結果、Nは保持が弱く、AとBは同等であった。また、当所ではこれまでのPSの検査で、アルミナカラムによる精製法⁴⁾を採用し、塩基性のアルミナを使用していた。カートリッジカラムでは、類似した性質のアルミナBを使用することとした。

TLCでは食品由来の着色成分とPSの分離が可能であったが、比色では試験溶液の着色が発色後の測定溶液にも移行した。その結果、着色した試験溶液の発色後の吸光度は、添加したPS濃度に相当する吸光度より高くなった。測定波長付近に吸収のある試験溶液は、発色操作前

に、着色を除く精製操作が必要であった。クロロフィルを含む食品（ネギを含む粉末スープ等）は、アルミナBの精製のみでは、着色が残り、620nm付近に妨害があった。色素の除去に有効とされるグラファイトカーボン処理を追加したところ妨害が除かれ、PS溶液と同様の吸収スペクトルが得られるようになった。（図2）

3. 添加回収試験

試料に添加するPSは、純度等の品質が確認されていることが望ましいが、市販のPSは純度が不明であった。PS60については、食品添加物規格（案）適合品と比較が可能であり、4製品共にチオシアン酸コバルト法で食品添加物規格（案）適合品とほぼ同等の吸光度を示すことが確認できた。その中から、和光純薬工業のPS60を添加用の標準品として用いた。他のPSについては、品質が確認できなかったため定量には使用しなかった。

ココナッツミルク、タイカレー、ビスケットで良好な回収率が得られた。トマトソース、粉末スープは回収率が低かった（表2）。トマトソースは水分が多く、無水硫酸ナトリウムを加えると塊となったことにより、抽出効率が下がり回収率が低下したと考えられた。粉末スープは、アルミナBに加えてグラファイトカーボンによる精製を行うため、回収率が低下したと考えられた。

まとめ

PSの分析法として、TLCによる定性、比色による定量を検討し、精製にアルミナB及びグラファイトカーボンのカートリッジカラムを用いる分析法を作成した。TLCのスポットのパターンは、PS20、40、60、80のグループとPS65、85のグループの二つに分類された。TLCでは、PSの種類は確認できず、指定外のPSとの判別はできなかった。

比色の吸光度はPSの種類、メーカーにより差が認められた。このため、用いる標準品により食品中のPSの

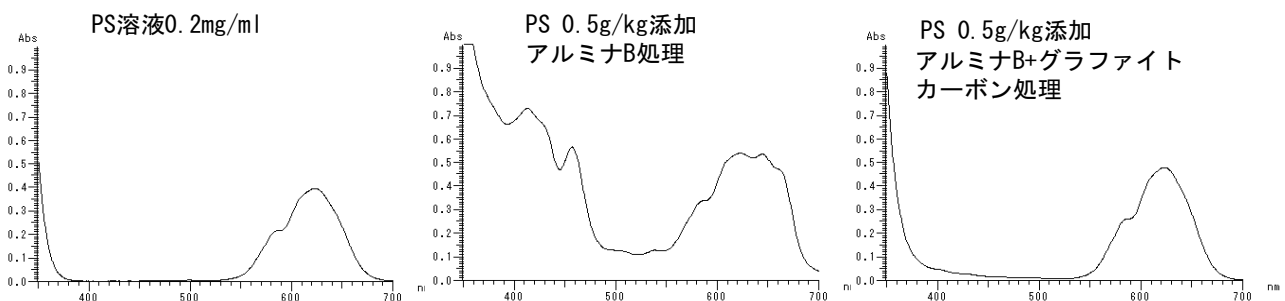


図2 グラファイトカーボン処理による試料抽出液の精製効果
試料：粉末ラーメンスープ（醤油味）
PS：PS60（和光純薬工業製）

表2 食品からのポリソルベート60の添加回収

試料名	添加濃度(g/kg)	回収率(%)
ココナッツミルク	0.1	82.0
	0.5	82.0
タイカレー	0.1	113.6
	0.5	100.2
トマトソース	0.1	54.3
	0.5	62.8
ケーキックス	0.1	70.2
	0.5	79.4
ビスケット	0.1	99.8
	0.5	79.1
醤油スープ*	0.1	42.6
	0.5	48.3
みそスープ*	0.1	48.7
	0.5	43.6
タンタンスープ*	0.1	43.7
	0.5	50.3
塩スープ*	0.1	55.8
	0.5	54.2

* : 粉末ラーメンスープ, グラファイトカーボン処理

分析値が異なる。市販食品の分析を行う場合は、添加されたPSの種類や純度が不明であり、添加量の正確な定量は困難である。定量には、品質の確認された標準品を用い、使用基準との比較はこの標準品と比較する方法が実用的であると考えられた。

この結果は、「食品中の食品添加物分析法の設定」事業で、国立医薬品食品衛生研究所に報告を行った。この結果を反映し、通知法のTLCによる定性には、PS65とPS80を使用するように規定された。また、PSの使用基準はPS80として設定され、比色法に用いるPS80の標準品が指定された。

さらに、通知法には確認試験法として液体クロマトグラフィー質量分析法が採用され、PSの種類を判別し、使用が許可されていないPS40及びPS85の確認が可能となった。

今後は、通知法にこれまでの検討成果を加え、行政検査に活用して行く予定である。

(平成20年7月28日受理)

文 献

- 1) 「食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について」(食安発第0430001号, 平成20年4月30日付)
- 2) 「「食品中の食品添加物分析法」の改正について」(食安基発第0430001号, 平成20年4月30日付)
- 3) 小川正彦, 林 克弘, 富森聡子, 橋爪 清: 問題発生時の試験法導入(1)-レトルトカレー中のポリソルベート試験法, 三重保環研年報, 47, 169-176(2002)
- 4) 川口徹, 飯塚太由, 伊藤一夫, 吉川礼次: 薄層クロマトグラフィーによる食品中ポリソルベートの分析, 日本食品衛生学会第70回学術講演会講演要旨集, 68 (1995)