報 文

HPLC による粉末スープ中のポリソルベートの分析法

(平成 12 年 10 月 10 日受理)

武田由比子*[†] 阿部有希子* 石 綿 肇* 山 田 隆*

Determination Method of Polysorbates in Powdered Soup by HPLC

Yuiko TAKEDA[†], Yukiko ABE, Hajimu ISHIWATA and Takashi YAMADA(National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan; [†]Corresponding author)

A method for qualitative and quantitative analyses of polysorbates in powdered soup by HPLC was studied. Polysorbates in samples were extracted with acetonitrile after rinsing with *n*-hexane to remove fats and oils. The extract was cleaned up using a Bond Elut silica gel cartridge (500 mg). The cartridge was washed with ethyl acetate and polysorbates were eluted with a small amount of acetonitrile-methanol (1:2) mixture. The eluate was treated with cobalt thiocyanate solution to form a blue complex with polysorbate. In order to determine polysorbate, the complex was subjected to HPLC with a GPC column, using a mixture of acetonitrile-water (95:5) as a mobile phase, with a detection wavelength of 620 nm.

The recoveries of polysorbate 80 added to powdered soups were more than 75% and the determination limit was 0.04 mg/g.

When the proposed method was applied to the determination of polysorbates in 16 commercial samples of powdered soup for instant noodles and seasoning consomme, no polysorbates were detected in any sample.

(Received October 10, 2000)

Key words: ポリソルベート polysorbate; 粉末スープ powdered soup; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; チオシアン酸コバルト cobalt thiocyanate; GPC カラム GPC column

緒 言

乳化剤の一種であるポリソルベートは、ソルビトール無水物の脂肪酸エステルにエチレンオキシドを付加した化合物で、製品としてポリソルベート 20, 40, 60, 80 などがあり、FAO/WHO によると、これらの ADI は 0~25 mg/kg である¹⁾。米国, EU, その他各国で種々の食品に食品添加物として使用されているが、我が国では食品への使用が認められていない²⁾。このため、我が国の輸入食品での違反事例となる頻度が極めて高い³⁾。使用基準のない添加物として使用が認められている諸国では、分析法の開発がほとんど行われていないが、食品添加物として指定されていない我が国では、分析法の開発を必要としている。従来のポリソルベート分析法は食品からジクロロメタンで抽出後、TLC⁴⁾や GC による定性分析⁵⁾、チオシアン酸アンモニウム・硝酸コバルト試薬や、ドラージェンドルフ試薬による比色法^{6), 7)}が使われている。しかし、これらの方法は、食品中の妨害物質の影響で正確な定性・定量が困難な

場合が多いばかりでなく、ジクロロメタンを大量に使用することから、環境汚染の原因や、分析者の健康影響として問題となる。また、LC/MS/MS による定性分析の報告例^{*1}もあるが、定量法については記載がない。

そこで、ジクロロメタンの使用を極力減らす抽出溶媒及び、抽出液の精製方法を検討し、更に定量法として、チオシアン酸コバルトとの反応生成物の HPLC について検討した。

実験方法

1. 試 料

粉末スープ: 平成 11 年 11 月から 12 年 2 月の間に東京都内で購入した即席麺添付スープ 8 種及び、顆粒状スープ 8 種の計 16 検体を用いた。

2. 試薬及び試液

ポリソルベート 20 (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート), ポリソルベート 40 (ポリオキシエチ

[†] 連絡先

* 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*1} 中西 資, 野村孝一, 足立忠夫. LC/MS/MS によるポリソルベートの分析, 日本食品衛生学会第 74 回学術講演会講演要旨集, p. 52 (1997).

レン (20) ソルビタンモノパルミテート), ポリソルベート 60 (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノステアレート), ポリソルベート 80 (ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオレート): 和光純薬工業(株)製, 化学用

ポリソルベート標準溶液: ポリソルベート 80, 500 mg を正確に量り, メタノールを加えて正確に 100 mL とした. この液 10 mL を正確に量り, メタノールを加えて正確に 50 mL とし, ポリソルベート標準溶液とした. この液 1 mL はポリソルベート 1 mg を含む.

ボンドエルトシリカゲルカートリッジ: LRC, 10 mL/500 mg (Varian Sample Preparation Products 社製) の上部に無水硫酸ナトリウム 1 g を積層した.

チオシアン酸コバルト試液: チオシアン酸コバルト (ICN Biochemicals Inc. 社製) に水を加えて溶解し, 20% 溶液とした.

メンブランフィルター: Millex[®]-LH, 0.45 μ m, サイズ 4 mm, 日本ミリポア(株)製

その他の試薬はすべて市販特級品を用いた.

3. 装置

レシプロシューカー: タイテック(株)製 SR-2W 型

遠心機: コクサン(株)製 H-103RS 型

ミキサー: ヤマト(株)製タッチミキサー, MT-51 型

ロータリーエバポレーター: 東京理化機械(株)製

超音波装置: シャープ電気(株)製 UT-51N

HPLC 装置: (株)島津製作所製 LC-6A システム

(ポンプ: LC-6A; UV-VIS 検出器: SPD-6AV)

分光光度計: (株)島津製作所製 UV-1600

4. HPLC 条件

カラム: 昭和電気(株)製 Asahipak GF-310 HQ 7.6 mm ϕ ×300 mm; 移動相: アセトニトリル-水 (95:5); 流速: 0.8 mL/min; カラム温度: 40°C; 試験溶液注入量: 100 μ L; 測定波長: 620 nm

5. 試験溶液の調製

5.1 抽出と精製

試料 10 g を 50 mL の共栓遠心管に採り, 水 10 mL を加えて溶解又は懸濁し, *n*-ヘキサン 20 mL を加えて 5 分間振とう (300回/分) した後, 遠心分離 (3,000 rpm) し, ヘキサン層を捨てた. 更に *n*-ヘキサン 10 mL を加え, 同様の操作を行った. 水層と沈殿物にアセトニトリル 30 mL を加えて 5 分間振とうした後, 遠心分離し, 上澄液を分取した. 更にアセトニトリル 15 mL を加え, 同様の操作を行った. 全上澄液を合わせ, ロータリーエバポレーターを用いて 40°C 減圧下で濃縮乾固した. 残留物に 4 mL の酢酸エチルを加え, 超音波装置を使用して溶解し, その溶液をボンドエルトシリカゲルカートリッジに負荷した. カラムを酢酸エチル 8 mL で洗浄した後, アセトニトリル-メタノール (1:2) 6 mL で溶出した. この溶出液を減圧乾固後, 2 mL のジクロロメタンで溶解し, 試料液とした.

Sample 10 g

add 10 mL of water

rinse with *n*-hexane (20 and 10 mL)

Aqueous layer and precipitates

extract with acetonitrile (30 and 15 mL) by shaking

Acetonitrile layer

evaporate to dryness

Residue

dissolve with *ca.* 4 mL of ethyl acetate

apply to Bond Elut Silica gel Cartridge (500 mg)

wash with *ca.* 4 mL of ethyl acetate

elute with 6 mL of acetonitrile-methanol (1:2)

Eluate

evaporate to dryness

Residue

dissolve with *ca.* 2 mL of dichloromethane

add 0.5 mL of 20% cobalt thiocyanate solution

mix for 1 min

Dichloromethane layer

evaporate to dryness in a stream of nitrogen gas

Residue

dissolve in 0.4 mL of acetonitrile, accurately

HPLC

Scheme 1. Analytical procedure of polysorbates in powdered soup

5.2 試料液とチオシアン酸コバルト試液の反応

試料液にチオシアン酸コバルト試液 0.5 mL を加えて約 1 分間ミキサーで混和し, 遠心分離後, 下層 (ジクロロメタン層) を分取した. この液を 40°C 水浴中, 窒素気流で蒸発乾固した. 残留物をアセトニトリルに溶解し, 正確に 0.4 mL とした. 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し, ろ液を HPLC の試験溶液とした.

6. 定量

試験溶液 100 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し, 得られたピーク高さ又はピーク面積から作成した検量線により試験溶液中のポリソルベート濃度を求め, 試料中の含量を算出した.

ポリソルベート標準溶液 0.4, 0.8, 及び 1.2 mL を正確に量り, 溶媒を窒素気流中で除去した. 次に, それぞれに約 2 mL のジクロロメタンを加えて溶解し, 試料液と同様の操作で HPLC 用の試験溶液を調製し, それらを高速液体クロマトグラフに 100 μ L 注入し, 検量線を作成した.

以上の操作手順を Scheme 1 に示した.

7. 各種ポリソルベートとチオシアン酸コバルトとの反応生成物について

ポリソルベート 20, 40, 60 及び 80 各 2 mg にジクロロメタンを正確に 2 mL 加えて溶かし, チオシアン酸コバルト試液 0.5 mL と混和し, 遠心分離後, 下層を分取し, 極大吸収波長とその吸光度を測定した. 測定後, それぞれの液を窒素気流下で乾固し, アセトニトリルに溶解し,

Fig. 1. HPLC chromatograms of the cobalt thiocyanate complex of polysorbate extracted from a powdered soup
 (A) Spiked sample (0.1 mg/g, Beef consommé), (B) Beef consommé, (C) Powdered soup attached with an instant noodle, (D) Chicken consommé
 HPLC operating conditions were as follows.
 Column: Asahipak GF-310 HQ (7.6 mm i.d.×300 mm); mobile phase: acetonitrile–water (95:5); column temp.: 40°C; flow rate: 0.8 mL/min; detector: 620 nm; injection size: 100 μ L

Table 1. Recoveries of Polysorbate Extracted from Powdered Soup with Three Extraction Solvents

Extraction solvent	Volume (mL)	Recovery (%)
Dichloromethane–ethanol (1:1)	30, 30, 30	100 $\pm$ 2
Acetonitrile	30, 15	97 $\pm$ 5
<i>n</i> -Hexane	20, 10	0 $\pm$ 0

Polysorbate 80 was added to a sample (10 g) at the level of 0.1 mg/g.

Recoveries were shown in the mean $\pm$ S.D. of 3 trials.

After polysorbate 80 was extracted with each extraction solvent, the solvent was removed by evaporation. The residue was treated by the method described in Scheme 1.

HPLCを行い、保持時間を測定した。

結果と考察

1. HPLC 条件の検討

ポリソルベートとチオシアン酸コバルトとの反応生成物の HPLC 測定条件を検討したところ、順相系のシリカゲルカラムや、逆相系のオクタデシル基及びシアノプロピル基結合型のカラムでは、これらの反応生成物は移動相、カラム長さ、温度及び流速を変えても保持されず、試料中の妨害ピークとの分離が不可能であった。そこで、GPC カラムの Asahipak GF-310 HQ を用い、移動相としてアセトニトリルと水の比率を検討した。アセトニトリルと水の比率が 95 対 5 で 19 分付近にシャープなピークが得られ

た。更に保持時間を短縮するために水の比率を高くしたところ、反応生成物が分解し、検出不能となった。この条件を用いて分析したときの HPLC クロマトグラム例を Fig. 1 に示した。ポリソルベートのピーク付近には、食品由来の妨害ピークはなく、良好なクロマトグラムが得られた。

2. ポリソルベートの抽出及び精製溶媒の検討

従来法⁷⁾はジクロロメタン–エタノール (1:1) 混液 30 mL で 3 回抽出するもので、精製操作がなく、しかもジクロロメタンが約 60 mL 必要である。ジクロロメタンに代わる抽出溶媒を検討した結果、Table 1 に示すように、アセトニトリル 30 及び 15 mL の 2 回抽出で平均回収率 97% と良好であった。また、*n*-ヘキサン 20、及び 10 mL の 2 回抽出では、ポリソルベートの抽出率が 0% であった。そこで粉末試料に水を加えて懸濁し、ヘキサンを加えて振とうし、脱脂操作を行った後、アセトニトリルにポリソルベートを移行させた。本法は乳化剤分析であり、試料に多くの乳化剤が含まれる場合には、抽出時にエマルジョンを形成し、抽出液と残さの分離が不十分であるため、全行程で振とう操作後は、遠心分離し、澄明な液層を分取することとした。これらの操作により、有害な塩素系有機溶媒から非塩素系の溶媒の使用に改善された。

3. カラムによるクリーンアップの検討

前記の溶媒による振とうのみでは精製が不十分であるため、カラムによるクリーンアップを検討した。従来法⁷⁾は、シリカゲル 10 g を詰めたガラスカラムにジクロロメタン抽出液を負荷した後、酢酸エチル 100 mL で夾雑物

Table 2. Comparison of Recoveries of Polysorbate under the Different Column Chromatographic Conditions

Column	Solvent	Volume (mL)	Recovery (%)
Silica gel ^{a)}	Ethyl acetate	100	0
	Dichloromethane-MeOH (2:1)	100	100±5
Silica gel ^{a)}	Ethyl acetate	30	0
	Acetonitrile-MeOH (1:2)	70	98±5
Bond Elut ^{b)}	Ethyl acetate	8	0
	Acetonitrile-MeOH (1:2)	6	93±6

Polysorbate 80 was added to a sample (10 g) at the level of 0.1 mg/g.

Recoveries were shown in the mean±S.D. of 3 trials.

^{a)} Ten grams of silica gel and 5 g of anhydrous sodium sulfate were packed into a glass column (1.5 cmφ×30 cm).

^{b)} Bond Elut Silica gel Cartridge (500 mg) packed with 1 g of anhydrous sodium sulfate on the top.

を除き、ジクロロメタン-メタノール (2:1) 混液 100 mL でポリソルベートを溶出するものである。そこで、大量の塩素系有機溶媒に代わる方法を検討した。Table 2 に示すように、従来法と同じカラムで溶出液をアセトニトリル-メタノール (2:1) 混液 70 mL に代えたところ、平均回収率 98% と良好であったが、更に、使用溶媒量を極力減らすため、検討を加えた。500 mg のボンデルートシリカゲルカートリッジに代え、酢酸エチル 8 mL で夾雑物を除いた後、アセトニトリル-メタノール (2:1) 混液 6 mL でポリソルベートを溶出したところ、Fig. 1 で示したように妨害ピークがなく、90% 以上の回収率であった。このように、ジクロロメタンから、他の溶媒への代替が可能となり、それらの総使用量も 200 mL であったものが 15 mL と、10 分の 1 以下に少量化することができた。また、シリカゲルを詰める操作も省け、簡便化された。

4. ポリソルベートとチオシアン酸コバルトとの反応条件の検討

ポリソルベートは紫外部及び可視部吸収がなく、また蛍光もないため、これらの分光学的検出法では困難である。従来法⁷⁾はドラーゲンドルフ試液発色反応後 500 nm で吸光度を測定する比色法及びチオシアン酸アンモニウム-硝酸コバルト試液発色反応後 620 nm で吸光度を測定する比色法を採用している。この方法は、抽出したポリソルベートにジクロロメタンを加えて溶かし、その一部に発色試液を加え、反応生成物を溶解したジクロロメタン液を、発色試液を加えないジクロロメタン液を対照として比色するものである。しかし、この方法では、ポリソルベートの界面活性作用の影響などで、対照液の方が発色反応後の液より吸光度が高いことがある。あるいは、吸光度測定用検液はジクロロメタンの揮発性のため、測定中に吸光強度が変わるなどの問題点がある。

そこで発色反応条件と反応生成物の有機溶媒への転溶について検討した。発色試薬は、従来法のチオシアン酸アンモニウムと硝酸コバルトを混合して調製する試液から単一組成のチオシアン酸コバルト試液に変更し、試薬の使用量も 0.5 mL と、従来の 10 分の 1 とした。反応生成物の転溶溶媒として、ジクロロメタンの代替となる塩素系以外の各種溶媒を検討したが、転溶率はトルエンで 3%、シクロ

Table 3. Recoveries of Polysorbate from Powdered Soup by the Proposed Method

Sample	Recovery (%)
Powdered soup attached with instant noodle	
Salt soup	86.2±2.9
Soy sauce soup	79.7±6.1
Miso soup	78.9±3.8
Seasoning	
Chinese consomme A ^{a)}	89.3±2.7
Chinese consomme B ^{b)}	74.8±2.3
Chicken consomme	101 ±9.8
Beef consomme	89.2±8.0

Polysorbate 80 was added to a sample (10 g) at the level of 0.1 mg/g.

Recoveries were shown in the mean±S.D. of 3 trials.

^{a)} Salt type. ^{b)} Soy sauce type

ヘキサン、*n*-ヘキサン、ペンタン、*n*-ヘプタンは 0% と転溶率が悪く、適当な代替溶媒は得られなかった。極性がやや高いエーテルや酢酸エチルは溶媒自身がチオシアン酸コバルトと反応し発色するため、使用不可能であった。したがって、この反応生成物の転溶溶媒のみはジクロロメタンを使用せざるをえなかったが、使用量は従来法では 5 mL であったものを 2 mL に少量化した。この溶媒を窒素気流中で乾固後、アセトニトリルに溶解し、HPLC 用の試験溶液とした。

5. 添加回収実験

各種粉末スープ 7 種類について、ポリソルベート 80 を 0.1 mg/g になるように添加した試料につき、上記分析法により回収実験を行った。その結果、Table 3 に示すように平均回収率 74.8~101% と良好であった。ポリソルベートの添加により乳化剤としての抽出効果のため、添加試料と無添加と若干異なったクロマトグラムを示すことがある (Fig. 1 の (A) と (B)) が、ポリソルベートの測定値に影響を与えることはなかった。

6. 各種ポリソルベートとチオシアン酸コバルトとの反応生成物について

各種ポリソルベートとチオシアン酸コバルトとの反応生成物の極大吸収波長はいずれも 625 nm を示し、ポリソルベート 4 種類の吸光強度の差は 10% 以内であった。

GPC カラムを用いた前記の条件下での 4 種類の HPLC の保持時間の差は 0.1 分以内であった。吸光強度はオキシエチレン基の数によって左右されることが報告⁸⁾されているが、上記のポリソルベートのオキシエチレン基の数は、いずれも 20 個であるため、ほぼ同じ吸光強度を示し、また、分子量も約 1,200 で、反応生成物もほぼ同じと推定されることから、同じ保持時間を示す結果になったと考えられた。したがって、4 種の分別定量は難しいが、現在、その必要はなく、これらのいずれのポリソルベートが存在する場合でも、ポリソルベート 80 のみを標準品として用いても定量は可能であった。本法による定量限界は粉末スープで 0.04 mg/g であった。

7. 市販粉末スープの分析結果

平成 11 年 11 月から平成 12 年 2 月の間に東京都内で入手した即席麺添付スープ 8 試料（塩味、醤油味、みそ味など）、顆粒状スープ 8 試料（鶏がら、牛、豚骨及び、それらの混合品など）でいずれもポリソルベートは検出されなかった（定量限界 0.04 mg/g）。

ま と め

HPLC による粉末スープ中のポリソルベートの分析法を検討し、更に塩素系有機溶媒の使用を極力減らす分析法の開発を試みた。

- 1) 試料中の油脂を *n*-ヘキサンで除去後、ポリソルベートをアセトニトリルで抽出し、ボンドエルトシリカゲルカートリッジを使用して、酢酸エチルで妨害物を流去した後、アセトニトリル-メタノール (1:2) で溶出した。
- 2) ポリソルベートとチオシアン酸コバルトとの反応生成物を GPC カラム使用の HPLC により、食品由来の妨害成分との分離も良好で、定量分析が可能になった。
- 3) 本法の開発により、従来、大量のジクロロメタンを

使用していたものが、非塩素系有機溶媒に代替可能となり、使用する溶媒の量も極力、少量化することができた。

- 4) 粉末スープ中の定量限界は 0.04 mg/g であり、ポリソルベート分析法として、使用できるものと考えられる。

文 献

- 1) “Shokuhin Tenkabutsu Manyuaru”, Nihon Shokuhin Tenkabutsu Kyoukai, 1991, p. 242.
- 2) “The food additives in the world, food additive lists in individual countries”, Food Chemical-Special Issue 6, Shokuhin Kagaku Shinbunsha, 1994, p. 165-263.
- 3) Higuchi, S., Yunyu Shokuhin Ihan Jirei Ni Tsuite, Pori-sorubeto Ga Kensyutsu Sareta Yunyu Shokuhin Ni Tsuite. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **40**, J-393-J-394 (1999).
- 4) Ishiwata, H., Watanabe, H., Hayashi, T., Tanimura, A., Studies on the detection of polysorbate in foods. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **14**, 425-430 (1973).
- 5) Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Fujinuma, K., Nishima, T., Determination of polysorbates in powdered soup packed in commercially imported instant noodles. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **28**, 372-377 (1987).
- 6) Tonogai, Y., Nakamura, Y., Tsuji, S., Ito, Y., Detection and determination of polysorbate in powdered soup of instant noodles by colorimetry. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **28**, 427-435 (1987).
- 7) Tanimura, A., *et al.*, eds., “Shokuhinchu No Shokuhin Tenkabutsu Bunsekihou Kaisetsusho”, Tokyo, Kodan-sha, 1993, p. 912-919.
- 8) Brown, E. G., Hayes, T. J., The absorptiometric determination of polyethyleneglycol mono-oleate. Analyst, **80**, 755-767 (1955).