

誘導体化HPLC法による生めん類中の品質保持剤 (プロピレングリコール)分析法の検討

中山恵理子

Determination of Quality Retaining Agent (Propylene Glycol) in Raw Noodles by HPLC

Eriko NAKAYAMA

目的: プロピレングリコール (PG) は品質保持剤や製造用剤として様々な用途で使用され、摂取量が比較的多い食品添加物である。当所ではPGの分析法として、パックドカラム GC 分析法を用いてきたが、装置の老朽化により分析法の見直しが必要となった。そこで、PDA 検出器付き HPLC による分析法の検討を行った。

紫外吸収の乏しいPGはこれまでもUVラベル化剤を用いて誘導体化してHPLC分析する方法が報告されている。村上ら[1]はプロピレングリコール脂肪酸エステルに3,5-ジニトロ塩化ベンゾイルを用いてUVラベル化してHPLC分析を行った。一方、吉田ら[2]はプロピレングリコールに塩化ベンゾイルを用いて誘導体化して高感度GC/MS分析に供している。今回PGをUVラベル化剤として塩化ベンゾイルを用い、PDA検出器付きHPLCで測定する手法について検討したところ、比較的簡便な操作で誘導体化し、感度良く検出測定できる処理法を確立することができたので、その概要を報告する。

材料及び方法：

1. 試料：市販の生中華めん、ぎょうざの皮について検討した。

2. 標準品及び試薬等

標準品：PG（特級、和光純薬工業(株)製）

標準溶液：PGを2 g 精秤し、精製水に溶解して20 mLとしたものを標準原液とした（濃度：10%, w/v）。これを適宜精製水で希釈し、標準溶液とした。

その他の試薬：塩化ベンゾイル（純度98%以上、東京化成工業(株)製）、水酸化ナトリウム（特級）、アセトニトリル（HPLC用）、n-ヘキサン（残留農薬試験用）を用いた。精製水は日本ミリポア(株)製の超純水装置 Milli-Q Direct 8で精製し

た水を使用した。

固相抽出カラム：GLサイエンス社製 InertSep C18 (1 g) は予めアセトニトリル及びアセトニトリル/水混合溶媒 (1:1) 各 10 mL で順次コンディショニングした。GLサイエンス社製 InertSep SCX (500 mg) 及び Waters 社製 Oasis MAX (500 mg) は連結して予めアセトニトリル 10 mL でコンディショニングして用いた。

3. 装置及び測定条件

HPLC 装置：(株)日立製作所製ポンプ：L-2100 型、オートサンプラー：L-2200 型、ダイオードアレイ検出器：L-2450 型、東ソー(株)製：カラムオープン CO-8011 型を組み合わせ使用した。

分析カラム及び測定条件を表1に示す。

表1. 測定条件

カラム：	Symmetry C18 4.6 mmφ × 150 mm 粒径 5 μm
移動相：	水/アセトニトリル グラジエント (A:水, B: アセトニトリル) 流速=1.0 mL/min 0分 50%B→ 17.5分 50%B→ 20分 70%B → 24分 50%B→ 30分 50%B
カラム温度：	40 °C
検出器：	PDA 検出波長：230 nm
試料注入量：	20 μL

4. 測定用試料液の調製 (図1)

1) 試料からの抽出及び精製

細切した生めん類試料 5 g に水 2 mL とアセトニトリル約 30 mL を加えて1分間ホモジナイズした後、アセトニトリルを加えて50 mL とし、振とうした。これを3,000 rpm で10分間遠心分離し、上澄み液を採取して試料抽出液 (A) とした。

この抽出液(A) 10 mL に水 10 mL を加えて混合し、InertSep C18 固相に通液した。通過液の最初の3 mL を廃棄し、その後の全量を採取した

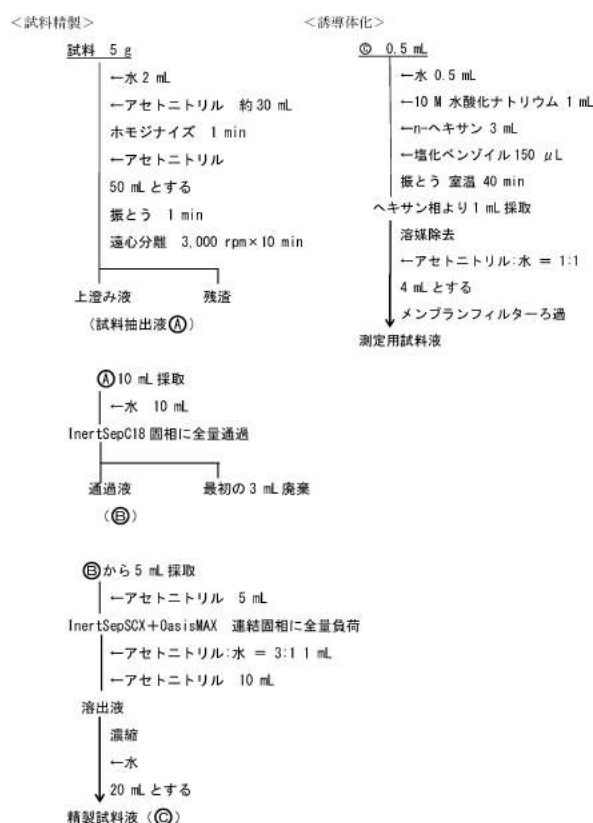


図 1. 前処理法の概要

(②). この通過液② 5 mL に対してアセトニトリル 5 mL を加えて混合し、InertSep SCX と Oasis MAX の連結固相に全量負荷した。続いてアセトニトリル/水 (3:1, v/v) 混合溶媒 1 mL およびアセトニトリル 10 mL を順次連結固相に通し、すべての非吸着画分を回収した。回収された溶液を減圧下で留去した後、水で 20 mL として精製試料液 (C) とした。

2) 誘導体化

精製試料液② 0.5 mL をねじ口キャップ付き試験管に採取し、精製水 0.5 mL 及び 10M 水酸化ナトリウム 1 mL を加えて混合し、n-ヘキサン 3 mL を加えた。そこへ塩化ベンゾイル (原液) 150 μL を加え、室温で 40 分間激しく振とうした。10 分以上静置した後、ヘキサン層から 1 mL をホールピペットで採取し、窒素気流下 40℃ で溶媒を除去し、アセトニトリル/水混合溶媒 (1:1, v/v) に溶解して 4 mL とした。これを孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過して測定用試料液とした。

結果と考察：

1. 試料からの抽出溶媒

PG は食品衛生検査指針 [5] や衛生試験法 [6] で

は食品からの抽出にメタノールが用いられている。しかし、メタノールの場合、均質化処理後に遠心分離を行っても液相の濁りが残った。

抽出溶媒として極性の高いアセトニトリルを用いたところ、食品成分由来のタンパク質等がメタノールを用いた場合に比べ沈殿しやすく分離が容易であったため、アセトニトリルを用いた。

2. 固相精製

生中華めに試料中 0.1% 相当量の PG を添加し、試料抽出液の誘導体化を行ったところ、回収率は 50% を下回った。

今回行った誘導体化は PG 分子内の二つの水酸基をベンゾイル化する反応を用いている (図 2)。

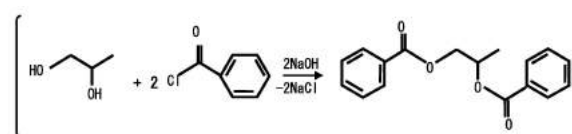


図 2. 反応機構の推定 (Schotten-Baumann 反応)

塩化ベンゾイルは非常に反応性が高く、試料中に含まれるアミノ基や水酸基を有するアミノ酸や脂肪酸等とも反応して消費されてしまい、誘導体化 PG の生成量を下げると考えられた。そこでマトリックス成分の除去を目的として固相精製について検討した。

PG 試料抽出液①に等量の水を加え、InertSep C18 (1 g) 逆相固相で精製を行い誘導体化後の回収率を確認したところ 58% だった。

イオン交換固相による精製を行っている小林ら [3] を参考にして、もう一段階の精製法を検討した。種々のイオン交換固相を用いて検討したところ、InertSep SCX と Oasis MAX の連結固相を用いた場合に回収率は 92% と最も良い結果であったため、これを使用することとした。

3. 誘導体化

誘導体化は厚生労働省の化学物質ばく露量評価検討会資料 [4] を参考に検討した。この報告書では、試料水溶液と誘導体化試薬を混合したものを室温で 60 分間振とうして誘導体化反応を行い、その後、反応生成物をヘキサンで抽出していた。今回は、反応時に試料と試薬にヘキサンも加えて二相系とし、反応と同時に抽出させたところ、PG の誘導体化生成物のピーク面積値の増加が認められた。これはベンゾイル化 PG が低極性の有機溶媒との親和性が高く、その生成と同時にヘキサンへ溶解するため化学平衡が生成方向に偏ったこと

によると考えられた。そこで、反応時にヘキサンを加えた二相系溶媒で振とうする方法を用いた。

誘導体化の際の反応温度について室温と50℃で比較した。その結果、後者の場合、誘導体化PGのピーク面積の変化はみられなかったが副生成物と思われる大きなピークが出現し、誘導体化PGに重なりが見られたため、室温で反応させることとした。

反応時間について検討したところ、PG標準液の場合には、室温では20分でピーク面積が一定となった。精製不十分の試料溶液では、生成物量は反応時間40分ではほぼ最大となった。そこで、反応時間は40分とした。

マトリックス成分共存下での誘導体化試薬の添加量について検討を行った。塩化ベンゾイルを100～200 μ L添加したところ、添加量の増加に伴いPGの回収率は高くなったが、150 μ Lを超えると塩化ベンゾイルの加水分解生成物等が大量に析出したことから添加量は150 μ Lとした。

誘導体化後の測定用試料液についてHPLC－PDAによる測定を実施した。複数の副生成物が確認できるが、それらのピークと誘導体化PGはクロマトグラム上で分離可能であった(図4)。測定の定量下限値は試料中PG濃度0.1%で0.1%～3%の範囲で検量線の直線性 ($r^2 > 0.999$) が認められた。

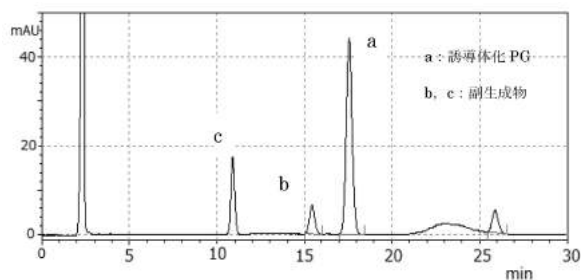


図 3. 誘導体化後のクロマトグラム

4. 試験法の妥当性確認

確立した試験法について、食品中に残存する農薬等の試験法の妥当性評価ガイドライン[7]を参考にし、PGを添加した生中華めん(試料中2%相当)、ぎょうざの皮(試料中0.5%相当)について一日一回2併行の試験を5日間実施し、真度及び精度を求めた(表2)。

評価目標は真度：回収率70～120%，併行精度

表 2. 真度(回収率)及び精度

	真度(回収率) [%]	併行精度 [RSD%]	室内精度 [RSD%]
生中華めん	93.0	3.2	3.7
ぎょうざの皮	93.9	4.6	4.9

[RSD%]: 10%未満, 室内精度[RSD%]: 15%未満であり, 2食品とも評価目標値を満たしていた。また, 基準値の1/10を超える妨害ピークは見られないことから, 選択性についても問題なく, 実試料への適用が可能であった。

まとめ: 生めん中のPG測定において, GC法に代わる手法として誘導体化-HPLC測定法について検討を行った。確立した試験法について妥当性を確認したところ, 真度, 精度とも妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしていた。

本試験法はPGのガスクロマトグラフ試験法と比較し, 固相精製など処理に時間を要するものの, 測定感度は良好であり, HPLCを利用した測定法として活用できると思われた。

文 献

1. 村上千秋, 丸山武紀, 新谷 勲. (1997). 食品衛生学雑誌, 38, 105-109
2. 吉田具弘, 上田重実. (2012). 東レリサーチセンターTRC News No.115 (May. 2012)
3. 小林千種, 早藤知恵子, 安井明子, 他. (2009). 東京都健康安全研究センター年報, 60, 113-118
4. 厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課化学物質評価室. (2015). 平成27年度第3回ばく露評価小検討会資料 資料2-11
5. 社団法人 日本食品衛生協会 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針・食品添加物編 (2003). 519-524
6. 公益社団法人日本薬学会 編. 衛生試験法・注解 (2015). 344-345
7. 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(最終改正: 平成22年12月24日付け 食安発第1224第1号)