

資料

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

小川正彦, 林克弘, 富森聡子, 橋爪清

Examination method transduction in problem generate (1); Determination of Polysorbates in curry in hygienic retort pouch

Masahiko OGAWA, Katuhiro HAYASHI, Satoko TOMIMORI and Kiyoshi HASHIZUME

ポリソルベートは、食品添加物として国内で使用が認められていない化学物質である。これが県内事業者が輸入したレトルトカレーから検出された。そのため緊急にポリソルベートを検査することが求められた。そこで試験法を検討し、併せてG L Pに対応したS O Pの作成及び実検体への適用を行ったところ、次のような知見を得た。

- 1) 公定法の導入とそれ以外の試験法の導入に至る手法の違いが明らかとなった。
- 2) 薄層クロマトグラフを用いた限度試験としてのポリソルベート定性試験法が確立できた。
- 3) チオシアン酸コバルト発色による吸光度を測定する定量試験法が確立できた。
- 4) これらの試験法の限界を明確にし、精度管理を行うことで、G L Pに適合したS O Pを作成できた。

以上のことから、緊急に試験法を導入する場合のモデル化を行うことができた。

キーワード：ポリソルベート(ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル), 食品添加物, G L P, S O P(標準作業書)

はじめに

ポリソルベート(ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル)は、食品添加物として国内では使用が認められていない。が、海外では食品添加物として認めている国もあり、また、国内でも化粧品の乳化剤等での使用が認められている化学物質である。平成13年7月、タイで製造され輸入されたレトルトカレーから、このポリソルベートが検出された。この商品は三重県に本社をもつ事業者により輸入されており、県はこの商品の回収を命令した。これにあわせて緊急に、行政として対象商品を含む類似食品のポリソルベート含有の有無の確認を行う必要がでてきた。しかし、これまで当部ではポリソルベートを測定することはなく、G L P(Good Laboratory Practice:食品衛生検査における信頼性を確保するための業務管理)¹⁾に対応できるS O P(標準作業書)を持ってはいなかった。そこで著者らは緊急に試験法を検討し、試験法の導入とG L Pに適合したS O Pの作成及び実検体への適用を行うにあたり検討した結果、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 試料

試料には、とうがらし成分を含む又は含まないレトルトカレー及びカレーを用いた。

2. 標準試薬等

各ポリソルベート標準品：ポリソルベート 20, 40, 60, 80(Tween20, 40, 60, 80)は和光純薬工業(株)製化学用を、ポリソルベート 85(Tween85)は(株)ナカライテスク社製を、ポリソルベート 65(Tween65)はシグマアルドリッチ社(株)製を用いた。

類縁物標準品：ポリオキシエチレンセチルエーテル(Brij58)は和光純薬工業(株)製化学用を、ポリエチレングリコールモノオレイルエーテルは東京化成工業(株)製(n=20)を用いた。

ポリソルベート、ポリオキシエチレンセチルエーテル及びポリエチレングリコールモノオレイルエーテル標準溶液：ポリソルベート 80, ポリオキシエチレンセチルエーテル又はポリエチレングリコールモノオレイルエーテル 100mg を、それぞれジクロロメタン 100mL に溶かしたもの(各 1mg/mL)

チオシアン酸コバルト試薬:(定量用)チオシアン

酸アンモニウム 50 g , 硝酸コバルト 6 水塩 15 g 及び塩化ナトリウム 25 g を水に加え 250mL としたもの .

(定性用) チオシアン酸アンモニウム 3.5 g , 硝酸コバルト 6 水塩 0.56 g を水に加え 20mL としたもの .

ドラージェンドルフ試薬 : 塩基性硝酸ピスマス 1.7 g を 20 % 酢酸に加えて 100mL としたのから 10mL をとり , 40 % ヨウ化カリウム試液 10mL 及び酢酸 40mL を水に加え 250mL としたもの .

T L C 展開溶媒 : ジクロロメタン 110mL , メタノール 40mL , アセトン 30mL 及び水 8 mL を混合したもの . クロロホルム 160mL , イソプロパノール 20mL , メタノール 20mL 及び 28 % アンモニア 4 mL を混合したもの . n-プロパノール 100mL , クロロホルム 100mL , メタノール 30mL 及び 28 % アンモニア 10mL を混合したもの . クロロホルム 220mL , メタノール 24mL , 酢酸 24mL 及び水 6 mL を混合したもの .

T L C 洗浄溶媒 : ジクロロメタン 200mL , 及びアセトン 100mL を混合したもの .

シリカゲル薄層板 : メルク社製キーゼルゲル 60 (200 × 200mm) . 使用前にジエチルエーテルで上端まで展開し乾燥させる .

カラムクロマトグラフィー用アルミナ : メルク社製アルミナ 90

アルミナカラム : 135 で 12hr 活性化したアルミナ 10 g をガラスカラム (20mmi.d. × 300mm) に酢酸エチルで湿式充填し , 無水硫酸ナトリウム 10 g を層積したもの .

3 . 分光光度計および測定条件

装置 : (株)島津製作所製 UV 1 6 0 0 P C

光源 : タングステンハロゲンランプ

測定モード : A B S

測定波長 : 6 2 4 nm

対照液 : ジクロロメタン

4 . 試験溶液の調製方法

1) 試験溶液の調製

試料 10 g に無水硫酸ナトリウム 25 g , 5 % メタノール酢酸エチル溶液 50mL を加え , ホモジナイズ (5000rpm, 5min) 後 , 遠心分離 (3000rpm, 10min) し , 上澄液を分取する . この残さに 5 % メタノール酢酸エチル溶液 50mL を加え再度抽出を行う . これを 2 度行う . 分取した上澄液をあわせ , 無水硫酸ナトリウムによる脱水後濃縮乾固し , n-ヘキサン 30mL に溶解し , n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30mL による抽出を 2 度行う . アセトニトリルをあわせて濃縮乾固し , 酢酸エチル 5 mL に溶解し , これを酢酸エチル 100mL で洗浄したアルミナカラムに添加し , 酢酸エチル 100mL で洗浄した後 , 酢酸エチル・メタノール (1+1) 150mL

で溶出させる . この流出液を濃縮乾固し , ジクロロメタンで 1 mL としたものを試験溶液とする .

2) 吸光度用試験溶液の調製

試験溶液 0.5mL を採り , ジクロロメタンで 10mL とした後 5 mL を分取し , チオシアン酸コバルト試液 (定量用) 5 mL を加え , 5 分振とうし , 静置後ジクロロメタン層を分取し試験溶液とする . このとき試験溶液が清澄でない場合はフィルターを過す .

3) 吸光度検量線用標準液の調製

ポリソルベート標準溶液を 0 ~ 2.5mL を分取しジクロロメタンで 5 mL とした後吸光度試験溶液の調製と同様に処理する .

4) T L C 定性試験

T L C 薄層板にポリソルベート , ポリオキシエチレンセチルエーテル及びポリエチレングリコールモノオレイルエーテル標準溶液 , 及び試験溶液をそれぞれ 20 μ L スポットし T L C 展開溶媒で 130mm 以上展開を行った後乾燥させる . 発色は , ドラージェンドルフ試薬を噴霧してスポット確認し , その後 , チオシアン酸コバルト試液 (定性用) を噴霧してスポットを確認する .

実験結果および考察

1 . G L P / I S O 9 0 0 2 が求める試験法の条件及びその他の条件

試験方法を検討するに当たって考慮すべき , 食品衛生法に基づく G L P 基準は表 1 * 1 に示す からの法令であり , I S O 9 0 0 2 のそれは「 I S O 9 0 0 2 に基づいて作成された」品質マニュアル以下の文書である .

また , これら以外に考慮すべきは , 対象物質の基準の有無及び基準値である (これは , I S O 9 0 0 2 ではデータの利用者 (顧客) の要求事項に該当する) . これらを整理したものを表 1 に示す . これを , 今回のポリソルベート試験法で具体的に表現すると , 1) 検査実施までに試験法が作成され承認を受けていること . 2) 対象試験品に「カレー」を含むこと . 3) 作成した試験法で添加回収試験 (n = 5 以上) を行うこと . 4) 定量法にあつては 70 ~ 120 % の範囲に極力あること . 5) 不許可添加物であるため同定性に優れていること . 6) 試験に用いる機械器具 (測定機器や前処理に用いる精製カラム等) の条件が明確であること . 6) 検出限界が 0.1mg/mL より優れていること (顧客の要求事項) . 7) 2 週間以内に実施可能となること (顧客の要求事項) . となる .

これらを踏まえて試験法の検討を行った .

表 1 GLP/ISO9002等が試験法に求める内容

項 目	内 容	根拠規格	根拠規格の種類 ^{*1}
1 文 書 化 ^{*2}	試験法標準作業書（SOP）の作成 試験品受入れの文書化 記録の様式（作成方法） SOP構成要件の記載方法	GLP/ISO GLP/ISO GLP/ISO ISO	, , , ,
2 審査・承認	試験法の審査承認	ISO	
3 精度管理	添加回収試験	GLP	
4 通知書記載事項	検出限界又は定量限界	GLP/ISO	,
5 適用範囲	対象試験品	GLP	
6 SOP構成要件	試薬等の選択及び調製の方法 試料の調製方法 機械器具の測定条件（操作方法） 検査の実施方法	GLP GLP GLP GLP	
7 統計的手法	Zスコア 標準偏差	GLP/ISO GLP/ISO	, ,

*1 食品衛生法施行規則第18条の2の2
食品衛生検査施設における検査等の業務管理について（平成9年1月16日衛食第8号）
食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について（平成9年4月1日衛食第117号）
ISO9002：1994に基づく三重県科学技術振興センター保健環境研究部品質マニュアル
本試験法による結果を利用する顧客の要求事項（ISO9002：1994による）

*2 その他の文書は既存のもの併用

2. 試験法の検討経過

ポリソルベート試験法を検討するにあたって、まず、過去の文献を検索した。幸いにもポリソルベートは、過去の「激辛ブーム」のとき、同様の問題を発生させていたため、当時の論文²⁾³⁾を容易に入手できた。また近年でも、いくつかの発表⁴⁾が行われている。

これらを踏まえポリソルベート試験法を検討する場合注意すべき事項としては1) 公定法はない、2) 不許可添加物であるため検出されれば、法的処置が必要になる、3) ポリソルベートは1種類ではなく、結合数及び脂肪酸の種類により多くの種類がある、4) それぞれの標準品にも、副生成物として脂肪酸エステル（Span）を含む、5) 類縁物質が多く、それらのなかには海外で食品添加物として使用されているものもある。という点である。これらの問題に対応するため、a) ポリソルベートの1つの標準品に対する「当量」を考える、b) 個別のポリソルベートを測定して総和を出すのではなく、反応基（ポリオキシエチレン基）の反応を測定することで総和とする、3) 類縁物質の区別のため薄層クロマトグラフィーを利用する、4) そのため定性試験法及び定量試験法の2つを考える、5) 同定性の信頼度を高めるため複数の確認手法を実

施できるようにする、6) 定性試験法と定量試験法の検出限界は同一とする、7) 期限内に作成するため、文献を重視し対象試験品も目的のものに限る、とした。図1には、一般的な試験法検討の流れを示す。今回もこれに従い検討を行った。

3. 標準添加限度試験（定性法）

ポリソルベート 80、類縁物質のポリオキシエチレンセチルエーテル（Brij58）及びポリエチレングリコールモノオレイルエーテルをそれぞれ 0.2mg/mL となるようジクロロメタンで調製したものを 10, 20, 30 µL スポットし、あわせて標準溶液（1.0mg/mL）を 10, 20, 50, 100, 200 µL スポットし、TLC 展開溶媒 を用いて薄層クロマトグラフを行い、これをチオシアン酸コバルト試薬（定性用）及びドラージェンドルフ試薬による発色を行った。

発色は、いずれも類縁物質のほうが良好であった。ポリソルベート 80 の発色は、ドラージェンドルフ試薬では標準溶液 10 µL で定常的に発色が確認できた。ただ、チオシアン酸コバルト試薬を用いた発色は、判定するのに困難であった。そこで 20 µL（2.0mg）を検出限度とした。

これは、図1中の試験方法の検討（2）及び（8）に

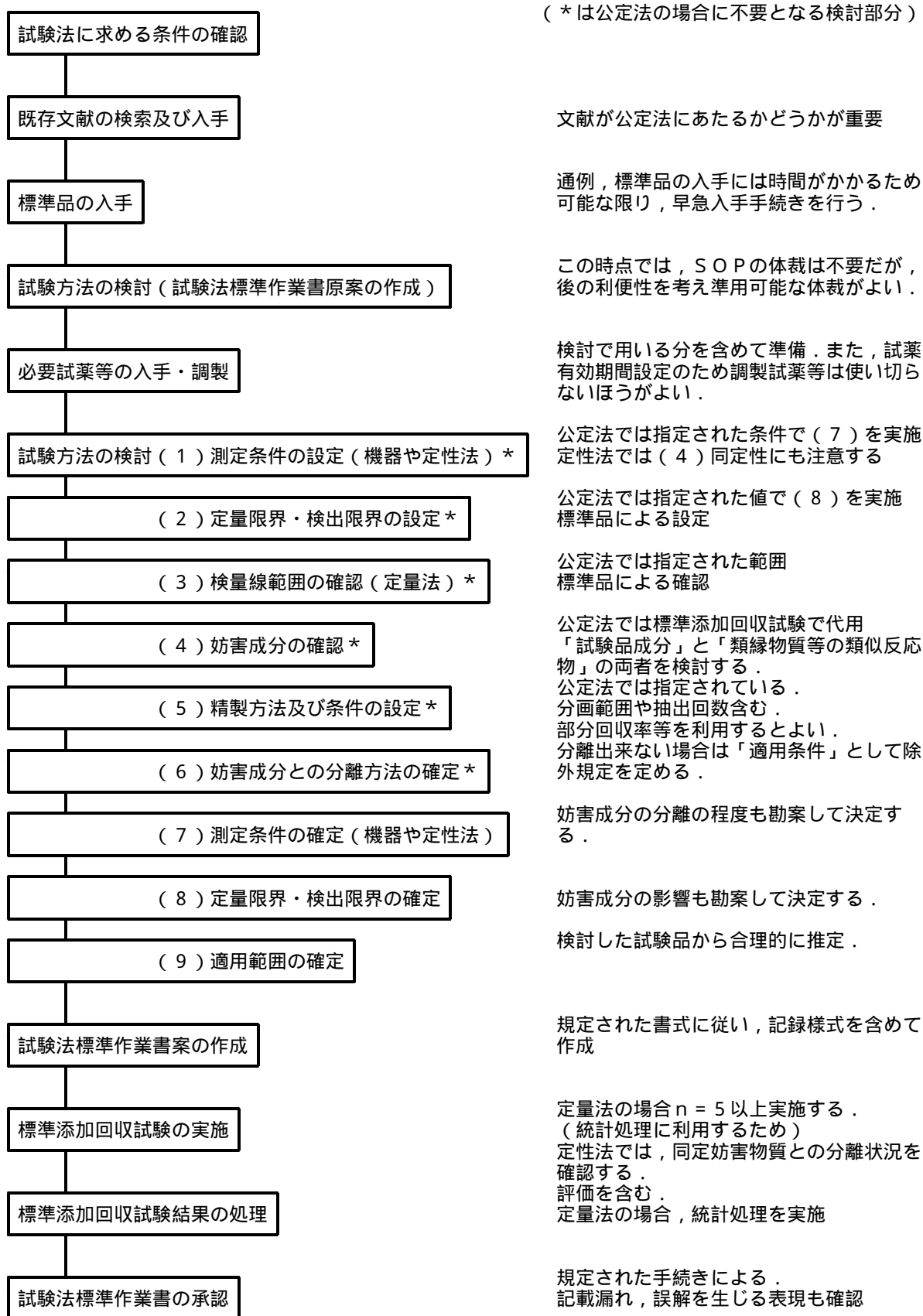
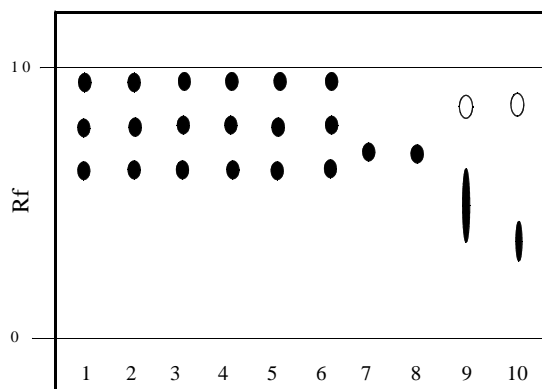


図 1 試験法検討の手順

該当する。

4. 薄層クロマトグラフにおける分離

ポリソルベートとして主に流通しているポリソルベート 20,40,60,65,80,85,類縁物質のポリオキシエチレンセチルエーテル (Brij58) 及びポリエチレングリコールモノオレイルエーテルの分離条件を検討した。すなわちTLC展開溶媒 から 及びTLC洗浄溶媒でポリソルベートと類縁物質とのRfを比較した。その結果, 展開溶媒のすべてでポリソルベート 20,40,60,65,80,85 のRfは, ほぼ同一であった。TLC洗浄溶媒ではポリソルベート, 類縁物質ともにほとんど移動しなかった。ポリソルベートと類縁物質との分離は, 展開長を長くすれば展開溶媒 から 可能であったが展開溶媒 で最も良好であった。このことから展開溶媒 及び他の展開溶媒を用いることにより複数の薄層クロマトグラフによる定性が可能であった。ポリソルベート, 類縁物質を展開後, ドラージェンドルフ試薬で発色させたクロマトグラムを図2に示す。これは, 図1中の試験方法の検討(4)(5)(6)及び(7)に該当する。



薄層：キーゼルゲル60(200×200mm)
 展開溶媒：ジクロロメタン：メタノール：アセトン：水
 (110:40:30:8)
 1:ポリソルベート20 (Tween20)
 2:ポリソルベート40 (Tween40)
 3:ポリソルベート60 (Tween60)
 4:ポリソルベート65 (Tween65)
 5:ポリソルベート80 (Tween80)
 6:ポリソルベート85 (Tween85)
 7:ポリオキシエチレンセチルエーテル(Brij58)
 8:ポリエチレングリコールモノオレイルエーテル
 9:カラー (対照品)
 10:タイカラー (対照品)

図 2 薄層クロマトグラフィ

5. チオシアン酸コバルトによる吸光度曲線及び検量線

ポリソルベートの吸収波長をみると, 表2に示すとおりチオシアン酸コバルト試液による場合は 623.50 - 624.00nm に極大吸収波長が, ドラージェンドルフ試薬では 494.00 - 497.50nm にあり, ややドラージェンドルフ試薬のばらつきが大きかった。また, 吸光度はドラージェンドルフ試薬が, チオシアン酸コバルト試液に

よる方法より良好であったが, 試料によっては試験溶液が黄色のものがあるため, 吸光度はチオシアン酸コバルト試液によるものとした。類縁物質は, 定性法による場合と同じくポリソルベートより高感度であった。0.1 - 0.5mg/mLの範囲でポリソルベート 80, 85, 類縁物質の検量線を作成したところ表3に示すとおり良好な直線関係が得られた。これは, 図1中の試験方法の検討(1),(2)及び(3)に該当する。

表 2 ポリソルベート等の吸光度

標準試薬	チオシアン酸コバルト試薬による発色		DD試薬による発色 (参考値)	
	測定波長 (nm)	吸光度 (ABS)	測定波長 (nm)	吸光度 (ABS)
ポリソルベート 80	624.00	0.959	494.00	3.612
ポリソルベート 60	623.50	0.948	496.00	3.010
ポリソルベート 40	623.50	0.963	496.50	3.010
ポリソルベート 20	623.50	0.993	496.50	2.737
ポリソルベート 85	624.00	0.547	497.50	1.327
< 類縁物質 >				
ポリオキシエチレンセチルエーテル	623.00	1.945		
ポリエチレングリコールモノオレイルエーテル	624.00	1.962		

表 3 ポリソルベート等の検量線

標準試薬	チオシアン酸コバルト試薬による発色		DD試薬による発色 (参考値)	
	測定波長 (nm)	相関係数 (r=)	測定波長 (nm)	相関係数 (r=)
ポリソルベート 8 0	624.00	1.000	496.00	0.998
ポリソルベート 8 5	624.00	1.000	496.00	0.995
< 類縁物質 >				
ポリオキシエチレン セチルエーテル	624.00	1.000		
ポリエチレングリコール モノオレイルエーテル	624.00	1.000		

6. アルミナカラムの溶出画分及び回収率

文献²⁾³⁾から、シリカゲルカラムよりアルミナカラムで良好な分離結果が得られるとのことであったので前処理にはアルミナカラムを用いることとした。このカラムの溶出画分及び回収率について検討を加えた。ポリソルベート 20,40,60,65,80,85,ポリオキシエチレンセチルエーテル及びポリエチレングリコールモノオレイルエーテルの溶出画分とポリソルベート 65,80 の回収率を表 4 に示す。酢酸エチル 100mL ではいずれの物質も溶出されなかった。酢酸エチル：メタノール(1

: 1) では標準によりやや違いはあるものの 100mL までにすべてが溶出し、回収率も良好な結果であった。ただ、ポリソルベートと類縁物質の分離はできなかった。前述のとおり薄層クロマトグラフによる定性では分離が可能であったが、比色法による定量では分離できないことから、定量法の適用には定性法の実施が必要となった。これは、図 1 中の試験方法の検討(5)、(6)及び(9)に該当する。

表 4 アルミナカラムの溶出条件

溶出試薬	酢酸エチル 100mL	酢酸エチル：メタノール (1 : 1)					回収率 (%)
		40mL	40mL	20mL	20mL	20mL	
ポリソルベート 8 0	×	92.5	5.0	2.5	×	-	96.0
ポリソルベート 6 0	×	97.4	2.6	+	×	-	-
ポリソルベート 4 0	×	100	+	+	×	-	-
ポリソルベート 2 0	×	90.4	6.4	3.2	×	-	-
ポリソルベート 8 5	×	100	+	+	×	-	-
ポリソルベート 6 5	×	100	+	+	×	-	94.3
< 類縁物質 >							
ポリオキシエチレン セチルエーテル	×	100	+	+	×	×	-
ポリエチレングリコール モノオレイルエーテル	×	100	+	+	×	×	-

注) + : 0.1%以下で検出, × : 不検出, - : 測定せず

7. 定量法の検出限界

比色法の検出限界は、試験溶液の状態を含めて検討する必要がある。そこでカレー及びカレーペーストの妨害の確認を行った。その結果を表 5 に示す。その結果から表 5 の注 2 の式⁵⁾を用いて検出限界を 0.05mg/mL とした。この検出限界濃度を添加した結果も良好であった。この吸光度曲線を図 3 に示す。これは、図 1 中の試験方法の検討(4)及び(8)に該当する。

ここまでの結果から「試験法標準作業書案」を作成し、これにあわせて標準添加回収試験をおこなった。ここでは試験法標準作業書の記入不足や誤記入を確認する意味もある。

実施した標準添加回収試験は、試料 10 g にポリソルベート 80 標準溶液を 4 mL (0.4mg/g) 添加し十分に溶媒を揮散させた後、4. 試験溶液の調製方法に従って処理し、比色法によって測定した(n=6)。その平均値は 93.36% 標準偏差は 5.57 % で良好な結果が得ら

8. 標準添加回収試験 (定量法)

表 5 カレー（ペースト）の妨害の確認

サンプル	原産国	吸光度		検出限界濃度添加(0.05mg/mL)		
		発色処理前 (abs)	発色処理後 (abs)	試験溶液 (abs)	ポリソルベート (mg/mL)	換算値発色 ブランク補正 (mg/mL)
1 カレー	国内産	0.002	0.026	0.108	0.058	0.044
2 カレー	国内産	0.002	0.010	0.095	0.051	0.046
3 カレー	タイ	0.002	0.016	0.095	0.051	0.043
4 カレー	タイ	0.001	0.024	0.113	0.061	0.048
5 カレー	タイ	0.001	0.025	0.114	0.062	0.048
6 カレーペースト	マレーシア	0.005	0.022	0.111	0.060	0.048
7 カレーペースト	マレーシア	0.005	0.011	0.096	0.052	0.046

注1) 対象：ジクロロメタン

注2) 検出限界：0.026 * 2.3 = 0.0901 (ABS) 0.0474 (mg/mL) 0.05 (mg/mL)

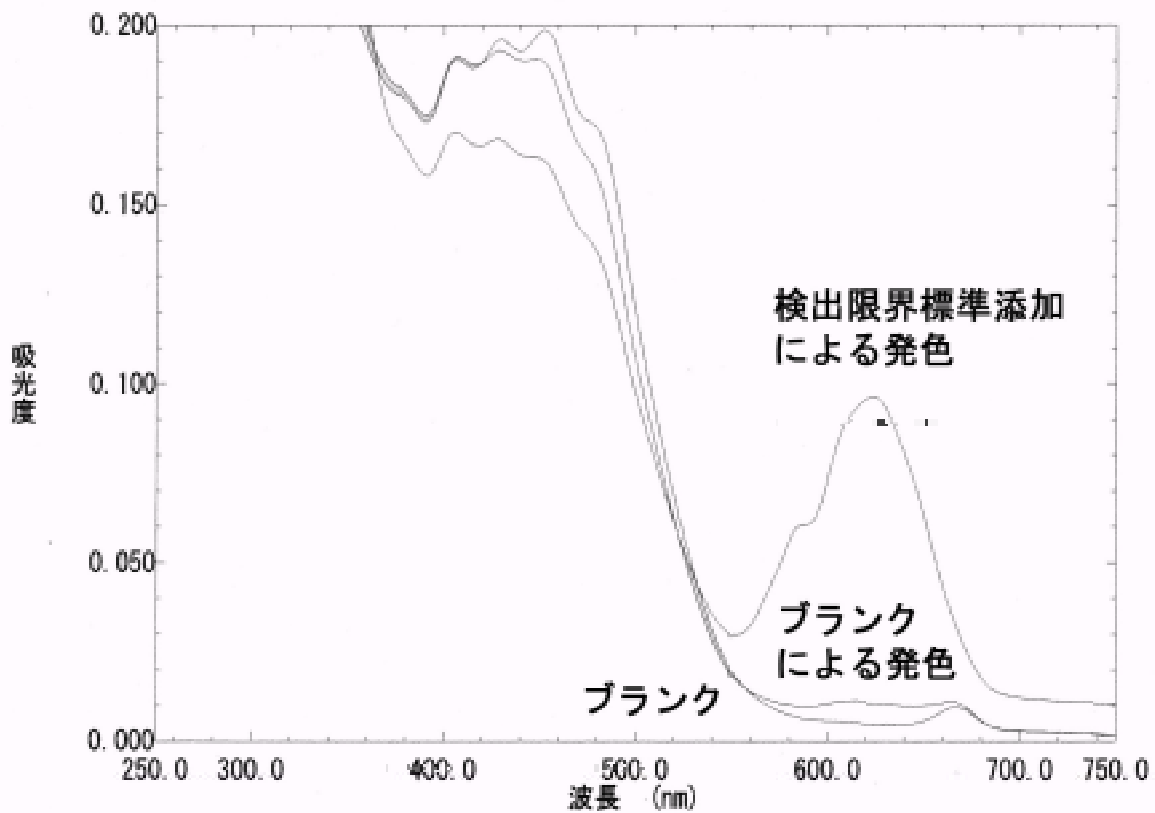


図3 カレーへの検出限界標準添加の吸光度曲線

れた。これらの結果から、Zスコア⁶⁾演算式を設定すると、

$$z = |x - 93.4| / 5.57$$

となる。これは、試料の種類や繰返し回数が少ないため、以後に修正する必要があるが、だいたいの目安としては十分な式である。

これは、図1中の「試験法標準作業書案の作成」から

「標準添加回収試験結果の処理」に該当する。

3から8までの事項が、試験法を具体化するのに必要な検討内容である。ポリソルベート試験法では、これを2週間で行う必要があった。今回、最も時間的に大きかったのは、標準品の入手であった。そのため他の項目の検討期間が短くなった。このことは、緊急的な試験法導入の問題点と言える。しかしながら、その

時間を利用して導入計画や文書化の準備等を行うことで、最終的な時間の短縮が可能であった。

9. 実検体への適用

本法をレトルトカレー 8 件，カレーペースト 2 件及びポリソルベートが添加されていることが既知のカレー 5 件に適用したところ，レトルトカレー及びカレーペーストからポリソルベートは検出されなかった。また，ポリソルベートが添加されていることが既知のカレーのすべてからポリソルベートが検出された。その値は，製造レシピから求めたポリソルベート含量と，ほぼ一致した。なお，ポリソルベートは原料のパプリカ色素に添加されていたとのことであった。

まとめ

ポリソルベートの試験法を検討し，併せて G L P に対応した S O P の作成及び実検体への適用を行ったところ，次のような結果を得た。

- 1) 公定法の導入とそれ以外の試験法の導入に至る手法の違いが明らかとなった。
- 2) 薄層クロマトグラフを用いた限度試験としてのポリソルベート定性試験法が確立できた。
- 3) チオシアン酸コバルト発色による吸光度を測定する定量試験法が確立できた。
- 4) これらの試験法の限界を明確にし，精度管理を行うことで，G L P に適合した S O P を作成できた。

文 献

- 1) 荒木恵美子：食品分析と G L P ，食衛誌，37(6) ,J-267-272 (1996)
- 2) 外海泰秀，中村優美子，辻澄子，伊藤誉志男：比色法による即席めん粉末スープ中ポリソルベートの検出・定量法，食衛誌，28(6),427-435 (1987)
- 3) 斉藤和夫，中里光男，菊池洋子，藤沼賢司他：輸入即席めん添付粉末スープ中のポリソルベート分析法及び市販品の調査，食衛誌，28(5),372-377 (1987)
- 4) 川口徹，飯塚太由，伊藤一夫，吉川礼次他：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，68 (1995)
- 5) 矢野雄幸，三木正博：水質測定誤差とデータ処理，45-50,東京，公害対策センター (1974)
- 6) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知：食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について，衛食第 1 1 7 号，1997 年 4 月 1 日