

## 直接抽出法による食品中の保存料の分析

都 田 路 子<sup>\*</sup>, 山 田 洋 子<sup>\*</sup>, 天 川 映 子<sup>\*</sup>, 安 田 和 男<sup>\*</sup>

### Determination of Preservatives in Foods by Direct Extraction

Michiko MIYAKODA<sup>\*</sup>, Yoko YAMADA<sup>\*</sup>, Eiko AMAKAWA<sup>\*</sup>  
and Kazuo YASUDA<sup>\*</sup>

**Keywords:** 保存料 preservatives, 安息香酸 benzoic acid, デヒドロ酢酸 dehydroacetic acid, サリチル酸 salicylic acid, パラオキシ安息香酸エステル類 esters of *p*-hydroxy benzoic acid, 直接抽出 direct extraction, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

#### はじめに

現在我が国では、食品の多くを輸入に頼り、なかでも東南アジア諸国からの輸入食品が増加し、パラオキシ安息香酸メチル(PHBA-Me)など指定外添加物の使用<sup>1)</sup>による違反事例が数多く報告されている<sup>2-5)</sup>。また国産食品においても、過去に許可されていたものの現在では使用の認められていないサリチル酸(SA)が魚の粕漬けから検出された事例もある<sup>6)</sup>。

一方、食品中の保存料の分析には、一般的に水蒸気蒸留-高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が用いられている<sup>7,8)</sup>。しかし、この方法は、いくつかの問題点が指摘されている。

その一例として、こしあんにおいてパラオキシ安息香酸エステル(以下 PHBA-Er と略す)類の回収率が低いとの報告がなされている<sup>9)</sup>。また、チーズやマヨネーズなどのタンパク性食品や脂質の多い食品においても同様の報告があり、これらの難点を改善するために有機溶媒での抽出<sup>10,11)</sup>、透析法<sup>12)</sup>などが試みられている。しかし、これらの方法は操作が煩雑で分析に時間を要し、妨害物を取り除くための前処理に使い捨てるの固相抽出カートリッジを使用するなどランニングコストが高くなるなどの欠点がある。

そこで PHBA-Me 及び SA も含めた保存料 10 種類について簡便で、迅速な汎用性の高い一斉分析法を検討した。その結果、メタノールによる直接抽出<sup>13)</sup>を応用し、多種類の食品に対応できる良好な分析法を確立したので報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料

市販の清涼飲料水、いちごジャム、福神漬、つくだ煮(昆布)、さつま揚げ、チーズ、ウインナーソーセージ、するめ、マヨネーズ、あずき生こしあん、ピーナッツバター、ドレ

ッシング、ノンオイルドレッシング、洋生菓子(チョコレート入り)等を用いた。

##### 2. 試薬及び試液

1) 標準品: 安息香酸(BA), ソルビン酸(SoA), デヒドロ酢酸(DHA)及び SA は和光純薬工業(株)製, パラオキシ安息香酸エチル(PHBA-Et), 同プロピル(PHBA-Pr), 同イソプロピル(PHBA-isoPr), 同ブチル(PHBA-Bu), 同イソブチル(PHBA-isoBu)及び PHBA-Me は東京化成工業(株)製を用いた。

2) 標準原液: 各標準品 100 mg をそれぞれ精秤し、メタノール 50 mL を加えて溶解した後、50 %メタノールで全量を 100 mL としたものを標準原液とした。各標準原液はそれぞれ各成分 1000 µg/mL を含有する。

3) 定性用混合標準溶液: 10 種類の標準原液を混合し、50 %エタノール(以下 EtOH と略す)で各成分 1.0 µg/mL となるように希釈し、定性用混合標準溶液とした。

4) BA, SoA, DHA 及び SA 混合標準溶液: 各標準原液を 50 %EtOH で希釈し、0.5, 1.0, 3.0, 及び 5.0 µg/mL の濃度系列の混合標準溶液を調製した。

5) PHBA-Et, PHBA-Pr, PHBA-isoPr, PHBA-Bu, PHBA-isoBu 及び PHBA-Me 混合標準溶液: 各標準原液を 50 %EtOH で希釈し、0.5, 1.0, 3.0, 及び 5.0 µg/mL の濃度系列の混合標準溶液を調製した。

6) SA 標準溶液: SA 標準原液を 50 %EtOH で希釈し、0.5, 1.0, 3.0 及び 5.0 µg/mL の濃度系列の標準溶液を調製した。

7) EtOH は局方品, アセトニトリル, メタノールは、試薬特級を用いた。

8) メンブランフィルター: 0.45 µm, 13mm 径あるいは 0.22 µm, 33mm 径

9) ろ紙: TOYO No.5C

\* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\* Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

### 3. 装置及び器具

HPLC 装置:日本分光工業(株)製 PU-980 型ポンプ,同 UV-970 型紫外可視検出器,同 CO-965 型カラムオープン,同 AS-950i 型オートサンプラー,(株)島津製作所 C-R7A 型データ処理装置により構成したものをを用いた.

ホモジナイザー:(株)日本精機製

### 4. HPLC 測定条件

1) 定性試験:カラム, Inertsil ODS-2(4.6mm i.d. × 150 mm);移動相,アセトニトリル・5 mmol/L クエン酸緩衝液, pH 4.0 (3:7)混液;流速,1.1 mL/min;検出波長,245 nm;カラム温度,40 ;注入量,20 µL

2) BA,SoA,DHA 及び SA:カラム, Inertsil ODS-2(4.6mm i.d. × 150 mm);移動相,メタノール・アセトニトリル・5 mmol/L クエン酸緩衝液, pH4.0 (1:2:7)混液;流速,0.7 mL/min;検出波長,235 nm;カラム温度,40 ;注入量,20 µL

3) PHBA・Er 類:カラム, Inertsil ODS-2(4.6mm i.d. × 150 mm);移動相,メタノール・5 mmol/L クエン酸緩衝液, pH4.0 (6:4)混液;流速,0.7 mL/min;検出波長,245 nm;カラム温度,40 ;注入量,20 µL

4) SA:カラム, Inertsil ODS-80A(4.6mm i.d. × 250 mm);移動相,メタノール・アセトニトリル・5 mmol/L リン酸緩衝液, pH 2.5 (16:16:68)混液;流速,1.0 mL/min;検出波長,237 nm;カラム温度,40 ;注入量,20 µL

### 5. 試験溶液の調製

液状食品はそのまま,固形試料は細切又は粉碎した後,その 5~10 g を 200 mL ホモジナイザー用カップに秤取し

た.これに洋生菓子(チョコレート入り)等の油脂含有量の多い食品には 80 %EtOH を,その他の食品の場合は,あらかじめ約 50 に温めた 50 %EtOH (以下 50 %EtOH(50 )と略す)約 30 mL を加え,5 分間ホモジナイズを行い,全量を 50 %EtOH 又は 80 %EtOH でそれぞれ 50~100 mL の定容とした.混和後,これを冷蔵庫内に 1~2 時間放置し,析出する脂肪を除去した後,ろ紙でろ過し,得られたろ液をメンブランフィルターを通して試験溶液とした.

### 6. HPLC による測定

試験溶液について,HPLC 測定条件の 1) を用いて定性試験を行い,検出された保存料に応じ,測定条件 2) あるいは 3) で定量した.SA は測定条件 1) で妨害ピークと重なって判定不可の場合は,測定条件 4) を用いて定性,定量した.

### 結果及び考察

#### 1. あずき生こしあんにおける直接抽出法と水蒸気蒸留法による回収率の比較

赤城ら<sup>9)</sup>は,こしあんの場合水蒸気蒸留法では PHBA・Er 類の回収率が低下すると報告している.そこで,あずき生こしあん保存料 10 種を添加して,水蒸気蒸留法と直接抽出法による回収率を比較した.

図 1 に示すように水蒸気蒸留法では特に PHBA・Er 類の回収率が 18.3%~45.4%と著しく低く,SA も 37.6%と低かった.一方,直接抽出法ではいずれの保存料も回収率は 81.9~105%(CV 0.4~1.3%,n=3)と良好な結果を示した.

水蒸気蒸留法での抽出は酸性下で高熱を利用して回収する方法であるため,加熱形成されたあん粒子が SA 及び

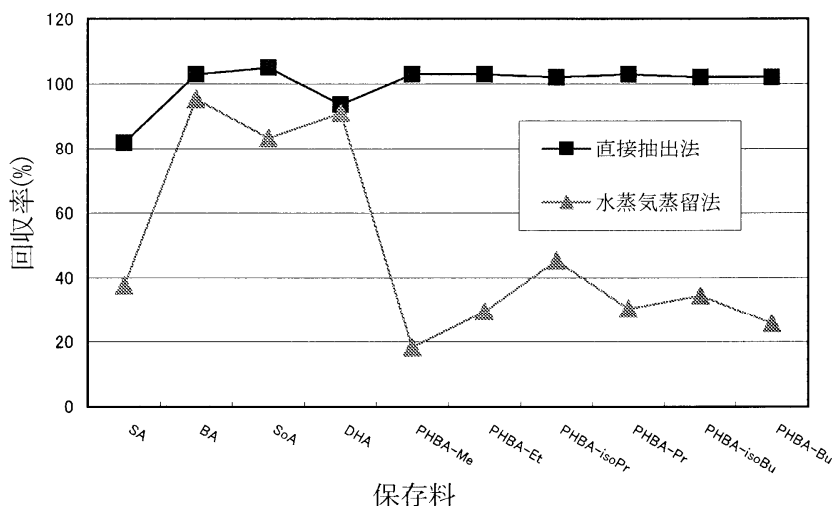


図 1. あずき生こしあんにおける直接抽出法と水蒸気蒸留法による回収率の比較

SA: サリチル酸, BA: 安息香酸, SoA: ソルビン酸, DHA: デヒドロ酢酸  
 PHBA-Me: パラオキシ安息香酸メチル, PHBA-Et: パラオキシ安息香酸エチル  
 PHBA-isoPr: パラオキシ安息香酸イソプロピル, PHBA-Pr: パラオキシ安息香酸プロピル  
 PHBA-isoBu: パラオキシ安息香酸イソブチル, PHBA-Bu: パラオキシ安息香酸ブチル

PHBA・Er 類を吸着し、回収率の低下を引き起こした可能性が考えられる。

2. 抽出条件の検討

脂質の多い食品は、水蒸気蒸留では SA<sup>12)</sup>、PHBA・Er 類が十分に抽出されない。そこで、これらを含めた保存料 10 種類について EtOH による直接抽出法を検討した。

EtOH はメタノールに比べ極性が低いため、HPLC の妨害物となる油脂の移行が多い。そこで、これら妨害物の移行を防ぐため EtOH 濃度を低くし、脂質の多い洋生菓子(チョコレート入り)、乳化剤を使用したノンオイルドレッシング等は 80%，飲料水やタンパク質の多い食品は 50%，にして抽出率の検討を行った。

SoA 添加の表示のあるウインナーソーセージを使用して、50%EtOH による抽出を試みたところ、蒸留法による定量値が 1.09 g/kg である試料が 0.69 g/kg と低い値となった。抽出効率を上げるため 50%EtOH をあらかじめ電子レンジにより約 50 に加温して用いたところ 1.20 g/kg となり、良好に抽出されたと考えられた。そこで抽出時の 50%EtOH の温度ならびに抽出時間の抽出効率に及ぼす影響について検討を加えた。

試料として、SoA 添加の表示のあるウインナーソーセージ、さきいか、サラムソーセージの 3 種を使用した。抽出温度を 25、50、70 としたときの検討結果を、表 1 に示した。70 における抽出率を 100%とした場合、50 では試料間での抽出率の差は 5%以内であった。しかし、25 での抽出率ではウインナーソーセージ 57%，さきいか 84%，サラムソーセージ 92%と試料の違いによる大きな差が認められた。図 2 に示すように抽出時間による差は 3 分のホモジナイズで若干低くなるものの 5 分、10 分ではほとんど差はなかった。よって本法では、抽出溶媒の EtOH の温度は 50、抽出時間は 5 分とした。

表 1. ソルビン酸の抽出効率に及ぼす温度の影響

試料	温度(°C)	抽出効率*(%)
ウインナーソーセージ	25	57
	50	98
	70	100
さきいか	25	84
	50	94
	70	100
サラムソーセージ	25	92
	50	97
	70	100

抽出溶媒：50%エタノール n=3

\* 抽出温度70°Cのときの抽出率を100としたときの抽出率の比

3. SA 測定用 HPLC 移動相の検討

SA は、HPLC 測定条件 1) 及び 2) では、保持時間(Rt)

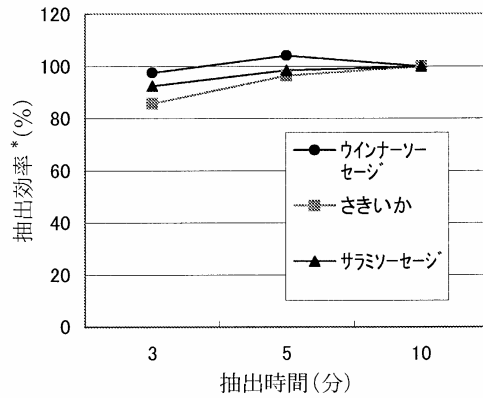


図 2. ソルビン酸の抽出効率に及ぼす抽出時間の影響

\* 抽出時間10分のときの抽出効率を100としたときの抽出率の比

がいずれの場合も 4 分以内と短い。図 3(A)に測定条件 1) での定性用混合標準液の場合を示したが SA の Rt は 2.5 分と短く食品中の夾雑物の影響を受けやすい。図 3(B)にブルーベリージャムの定性試験におけるクロマトグラムを示したが夾雑物に完全に妨害され確認することが出来なかった。そこで、D.C.Mays ら<sup>14)</sup>による尿中の SA 分析法を参考に、移動相として 5 mmol/L リン酸緩衝液の使用を試みた。その結果、図 4 に示すように SA のピークは Rt 16.3 分となり、ブルーベリージャム試験溶液でも夾雑物と十分に分離することがわかった。また、測定条件 1) 及び 2) では SA の測定が困難なみそ、しょうゆなどについても容易に測定でき、添加回収実験でも、良好な回収率を示した(表 2)。

表 2. 移動相に 5 mmol/L リン酸緩衝液を用いた時の SA の添加回収率

試料	回収率*(%)
魚醤スープの素	106±5.1
みそ	88.0±2.8
ブルーベリージャム	91.0±4.4
しょうゆ	94.0±2.1
さしみしょうゆ	106±0.6

添加量 200 μg/g \* 平均値±SD (n=3)

以上の結果から SA の HPLC には移動相として、メタノール・アセトニトリル・5 mmol/L リン酸緩衝液、pH2.5(16:16:68)混液を用いることとした。

4. 添加回収実験

市販の清涼飲料水、いちごジャム、福神漬、つくだ煮(昆布)、さつま揚げ、チーズ、ウインナーソーセージ、するめ、マヨネーズ、あずき生こしあん、ピーナッツバター、ドレ

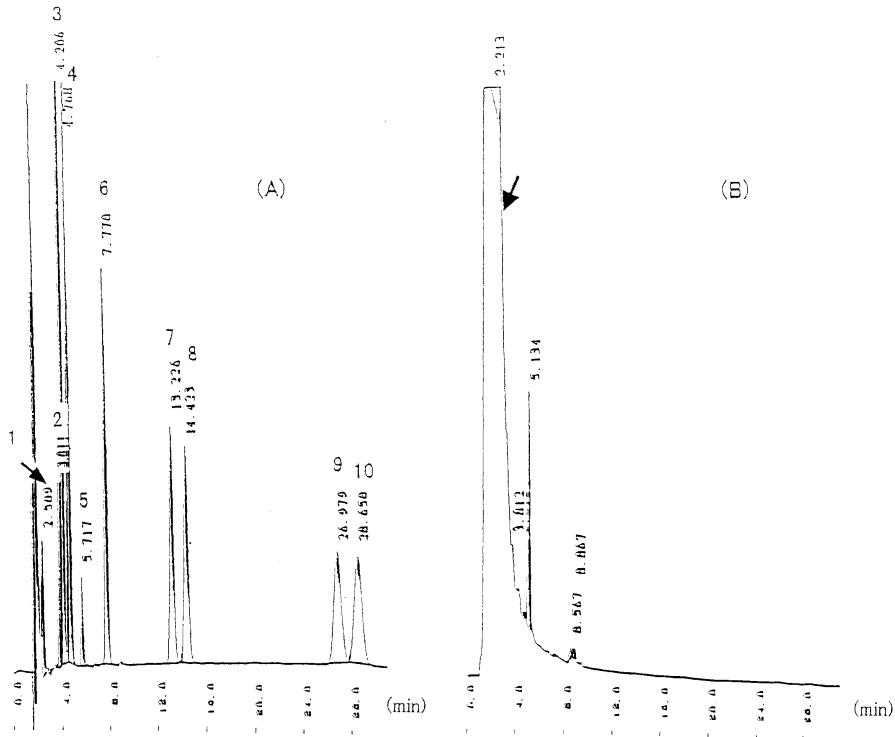


図3．測定条件1)におけるHPLCクロマトグラム  
 (A): 定性用混合標準液 (B): ブルベリージャム試験溶液  
 1. SA\* 2. BA 3. SoA 4. PHBA-Me 5. DHA 6. PHBA-Et  
 7. PHBA-isoPr 8. PHBA-Pr 9. PHBA-isoBu 10. PHBA-Bu  
 \* 略称は図1. に示した.

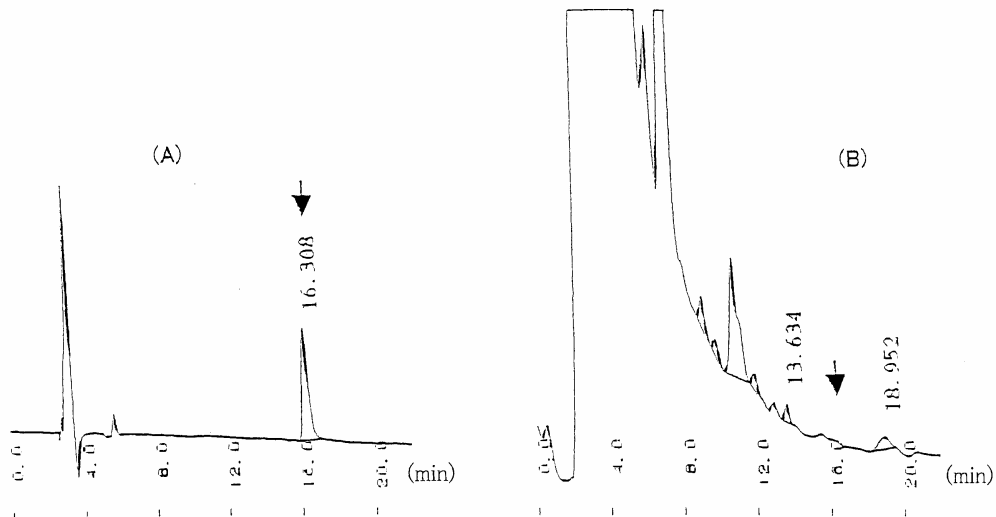


図4．測定条件4)におけるHPLCクロマトグラム  
 (A): サリチル酸標準液 (B): ブルベリージャム試験溶液

ッシング, ノンオイルドレッシング及び洋生菓子(チョコレート入り)に各保存料を 200 μg/g となるように添加し, 本法に従って添加回収実験を行った.

表3に示した通り各保存料の回収率及び変動係数は SA: 73.0~105%(CV 0.4~5.5%), BA: 85.9~108%(CV 0.4

~5.2%), SoA: 89.5~105%(CV 0.4~4.8%), DHA: 81.7~106%(CV 0.9~4.6%), PHBA-Me: 91.9~105%(CV 0.5~4.0%), PHBA-Et: 85.4~103%(CV 0.5~4.2%), PHBA-isoPr: 80.8~103%(CV 0.6~3.8%), PHBA-Pr: 80.9~103%(CV 0.7~3.8%), PHBA-isoBu: 75.9~102%

表 3. 市販品を用いた添加回収率

試料	回収率 (%)																			
	SA		BA		SoA		DHA		PHBA-Me		PHBA-Et		PHBA-isoPr		PHBA-Pr		PHBA-isoBu		PHBA-Bu	
	回収率	CV	回収率	CV	回収率	CV	回収率	CV	回収率	CV	回収率	CV	回収率	CV	回収率	CV	回収率	CV	回収率	CV
清涼飲料水	100	0.8	95.0	1.2	108	1.5	98.9	1.6	96.2	2.3	93.0	2.5	95.2	2.1	95.7	2.1	96.6	2.1	97.3	2.0
いちごジャム	80.9	2.4	90.0	3.6	101	1.0	91.0	3.1	91.9	3.0	87.5	3.2	89.3	3.1	89.9	3.2	91.4	2.7	92.5	2.9
福神漬	99.1	2.0	97.3	1.8	97.2	1.6	95.6	1.6	95.1	1.5	93.5	1.4	93.5	1.3	93.1	1.4	91.4	1.2	91.7	1.4
つくだ煮(昆布)	90.4	3.2	95.9	3.2	94.5	3.1	92.9	3.0	97.3	0.8	96.6	0.8	96.2	0.6	95.8	0.7	93.9	0.9	93.5	0.5
さつま揚げ	88.3	1.8	85.9	1.2	99.5	2.2	106	1.7	98.8	1.5	102	1.7	103	1.8	103	2.0	89.3	2.3	87.2	2.4
チーズ	85.1	2.7	108	3.3	101	2.8	94.5	1.8	101	2.3	103	2.5	103	2.1	100	1.7	101	1.6	101	1.7
ウインナーソーセージ	89.4	3.7	90.6	4.9	102	4.8	97.3	4.6	100	4.0	101	4.2	102	3.8	99.5	3.8	101	3.8	101	3.9
すゝめ	73.0	5.5	101	0.4	102	1.8	87.8	1.7	98.6	3.4	97.5	3.5	99.7	3.4	100	3.6	101	3.7	102	3.7
マヨネーズ	96.1	1.3	95.1	1.3	101	0.5	105	1.4	100	0.5	102	0.5	102	0.8	98.9	0.7	99.9	0.2	99.2	0.2
あずき生こしあん	81.9	1.1	103	0.9	105	0.4	93.6	0.9	103	1.3	103	0.9	102	0.9	103	0.9	102	0.9	102	0.9
ピーナッツバター	98.4	1.1	86.1	5.2	89.5	0.7	81.7	4.0	105	2.1	85.4	2.4	80.8	2.8	80.9	2.7	75.9	3.0	76.5	3.0
ドレッシング *	93.2	3.0	103	0.8	104	1.4	100	1.9	98.3	0.5	97.2	0.8	95.8	1.0	95.0	0.9	92.6	1.0	92.1	1.0
ノンオイルドレッシング *	105	0.4	102	2.4	103	0.9	86.7	1.5	94.0	3.0	89.2	3.3	88.9	3.4	88.5	3.4	87.4	3.6	88.5	3.5
洋生菓子(チョコレート入り)*	87.7	1.9	101	1.6	99.3	2.4	108	2.4	101	2.1	102	2.1	103	2.3	103	2.3	89.3	2.4	87.2	2.4

\*: 80%エタノールによる抽出

n=3

(CV 0.2~3.8%), PHBA-Bu: 76.5~102%(CV 0.2~3.9%)  
であり、いずれも良好な結果を示した。

ピーナッツバター(50%の脂肪を含む)<sup>15)</sup>に 80%EtOH  
を使用したところ、食品が固まり 10 種類の保存料の回収

率が 50%以下と十分な抽出を行うことが出来なかった。そ  
こで、50% EtOH(50%)を用いたところ 10 種類すべての  
保存料で回収率 75.9~105%(CV 0.7~5.2%)とほぼ良好  
な結果が得られた。抽出率低下の原因として、ピーナッツ

表 4. 直接抽出法と水蒸気蒸留法での測定値の比較

保存料	試料	測定値 (g/kg)	
		直接抽出法	水蒸気蒸留法
安息香酸	清涼飲料水	0.45	0.44
	調味小梅漬-1	0.01	0.01
	調味小梅漬-2	0.02	0.02
	のりのつくだ煮	0.09	0.09
	こいくちしょうゆ	0.47	0.48
ソルビン酸	洋菓子(ケーキ)	0.05	0.02
	ソーセージ	0.37	0.36
	サラミソーセージ	0.58	0.56
	ウインナーソーセージ	1.13	1.04
	ポークソーセージ	1.15	1.05
	梅干し	0.42	0.44
	だいこん(しょうゆ漬)	0.65	0.77
	さくら漬	0.21	0.22
	味付けザーサイ	0.34	0.34
	しば漬	0.70	0.68
	たくあん漬	0.47	0.50
	なると巻	1.30	1.32
	PHBA-Bu	さしみしょうゆ	0.06
PHBA-Et	清涼飲料水	0.09	0.06

定量限界 0.01 g/k g

n=1

バターでは含まれるタンパク質の量が 25.4 %<sup>15)</sup> と高く、さらに水分含量が 0.6 %<sup>15)</sup> と低いため、80 % EtOH ではタンパク質が変性して凝固したことによることが考えられる。なお、本法における検出限界はいずれの保存料についても 0.1 µg/g であった。また定量限界は試料換算で 10 µg/g であった。

#### 5. 市販食品への適用

平成 15 年度に入手した試料で保存料が検出された食品について本法と、水蒸気蒸留法との比較を行った結果を表 4 に示した。

BA が検出された食品の場合には、水蒸気蒸留法と直接抽出法で、ほとんどの食品で差が認められなかった。SoA では水蒸気蒸留法において脂質の多い洋菓子が直接抽出法のほぼ 40.0 % と著しく低い値を示した。またビタミン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> や水に溶けにくいビタミン E などの添加物を多く含む清涼飲料水で PHBA・Et が水蒸気蒸留法では直接抽出法の約 66 % と低い値であり、直接抽出法の優位性が示された。他の食品については、直接抽出法と水蒸気蒸留法との間でほぼ同じ測定値が得られた。

以上の結果から本法は、幅広い食品に適用可能な簡便で迅速な、また、使い捨ての固相抽出カートリッジなどを使用する必要のない低コストの保存料の分析法として有用な方法であると考えられる。

#### ま と め

1. 水蒸気蒸留法において PHBA・Et 類の回収率が低いあずき生こしあんや、高タンパク高脂質の食品に対し、抽出溶媒として 50 % EtOH (50 ) 及び 80 % EtOH を用いた直接抽出法を使用することで、回収率を向上させることができた。
2. SA の測定に際し、リン酸緩衝液を移動相に用いることにより妨害物の影響を受けることなく測定できた。
3. 10 種の保存料について多種類の食品に適用できる簡便で迅速な分析法を確立した。また、本法は固相抽出カートリッジなどを使用しないことでランニングコストを低く抑

えることが出来、抽出操作にメタノールなど有害物質を使用しないことで環境に配慮した試験法となつた。

#### 文 献

- 1) 金山龍男:別冊フードケミカル 6, 世界の食品添加物, 92-118, 1994 食品化学新聞社, 東京.
- 2) 厚生労働省医薬局食品保健部企画課検疫所業務管理室:食品衛生研究, 51(11),113-167,2001.
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部企画課検疫所業務管理室:食品衛生研究, 52(11),113-167,2002.
- 4) 東京都健康局食品医薬品安全部食品監視課:平成 10 年度食品衛生関係違反処理集計表, 32, 2000, 東京都健康局食品医薬品安全部食品監視課, 東京.
- 5) 東京都健康局食品医薬品安全部食品監視課:平成 12 年度食品衛生関係違反処理集計表, 32, 2002, 東京都健康局食品医薬品安全部食品監視課, 東京.
- 6) 立花光男, 青山光男, 穴吹公子:ラポレポート, 14, 34-38, 1993.
- 7) 厚生労働省監修:食品衛生検査指針食品添加物編 2003.12-252003, 日本食品衛生協会, 東京.
- 8) 日本薬学会編:衛生試験法・注解 2000, 286-288, 2000, 金原出版, 東京.
- 9) 赤城理恵, 博多幸子, 金澤順子, 他:福島県衛生公害研究所年報 17, 95-97, 1999.
- 10) 中尾朱美, 藤本喬:福岡市保環研報 28, 148-151, 2003.
- 11) 河野美幸, 中里光男, 小林千種, 他:東京衛研年報 51, 80-84, 2000.
- 12) 粕谷陽子, 松田敏晴, 中里光男, 他:東京健安研七年報 54, 104-108, 2003.
- 13) 大西英幸, 竹内康貴, 山中勝弘:農林水産消費技術センター「調査研究報告」18, 1994.
- 14) D.C.Mays, D.E.Sharp, et al: J.Chromatogr., 311, 301-309, 1984.
- 15) 香川芳子監修:5 訂食品成分表 2001.女子栄養大学出版部, 東京.