

## ソルビン酸使用食品における水蒸気蒸留法と透析法との定量値の比較

### ならびに冷蔵下における混合標準溶液の保存安定性

小川 麻萌<sup>a</sup>, 日向 綾子<sup>b</sup>, 佐藤 千鶴子<sup>a</sup>, 坂牧 成恵<sup>a</sup>, 貞升 友紀<sup>a</sup>,  
門間 公夫<sup>c</sup>, 小林 千種<sup>a</sup>

食品中の保存料の分析における前処理方法には水蒸気蒸留法、直接抽出法および透析法が用いられている。当センターでは透析法を日常の分析法として用いており、既報では9種類の保存料について水蒸気蒸留法および透析法で添加回収試験を行い、透析法の方がおおむね良好な回収率を得られることを報告した。そこで今回は、ソルビン酸使用食品（漬物、ソーセージ、チーズ、菓子パン、果実酒、くん製いか、焼き竹輪、ニョッキ）について、前処理に水蒸気蒸留法と透析法を用いた場合のソルビン酸の定量値を比較した。その結果、ほとんどの食品において透析法の定量値が有意に高かった。これは既報の添加回収試験の結果とも一致した。また、安息香酸とソルビン酸の混合標準溶液について経時的な保存安定性を検討したところ、少なくとも1年間安定で使用できることが示唆された。

**キーワード：**保存料，ソルビン酸，水蒸気蒸留法，透析法，LC，標準溶液，安定性，食品添加物

#### はじめに

現在、食品中の保存料の分析における前処理方法は水蒸気蒸留法<sup>1)</sup>、直接抽出法<sup>2)</sup>や透析法<sup>3, 4)</sup>が用いられている。既報<sup>4)</sup>では9種類の保存料（安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類）について水蒸気蒸留法および透析法で添加回収試験を行い、透析法の方がおおむね良好な回収率を得られることを報告した。しかし、保存料が使用されている市販食品について定量データの比較は行っていなかった。そこで、保存料の中でも最も需要が高く、幅広い食品への使用が許可されているソルビン酸<sup>5)</sup>を使用した食品について、水蒸気蒸留法と透析法を用いてソルビン酸を抽出し、前処理方法による定量値の違いを比較した。

また、適正な標準溶液の管理を行うため、今回、30%メタノールで調製した安息香酸とソルビン酸の混合標準溶液の経時的な保存安定性についてあわせて検討を行った。

#### 実験方法

##### 1. 試料

市販のソルビン酸使用表示のある漬物（きゅうりの塩漬、たくあん漬、きゅうりとなすの酢漬）、食肉製品（ソーセージ3種）、チーズ（クリームチーズスプレッド）、菓子パン（フラワーペーストを使用したキャラメルデニッシュ）、果実酒（赤ワイン、甘味果実酒）、くん製いか、魚肉ねり製品（焼き竹輪）、ニョッキを用いた。

##### 2. 試薬等

1) **標準品：**安息香酸、ソルビン酸は和光純薬工業（株）製（試薬特級）を用いた。

2) **メタノールおよびアセトニトリル：**高速液体クロマトグラフ用を用いた。

3) **その他の試薬：**塩化ナトリウムは日本薬局方を、その他の試薬は特級を用いた。

4) **混合標準溶液：**安息香酸およびソルビン酸を各200 mg正確に秤量し、メタノールで溶かして200 mLとしたものを混合標準原液（1,000 μg/mL）とした。混合標準原液を30%メタノールで希釈して100 μg/mLおよび20 μg/mL溶液に調製した。20 μg/mL混合標準溶液を30%メタノールで希釈して1 μg/mLおよび0.5 μg/mL溶液を調製した。

5) **透析膜：**透析用セルロースチューブ36/32（平面幅44 mm，直径28 mm，壁厚0.0203 mm，分画分子量14,000，孔径50 Å，Viskase Sales社製）

##### 3. 試験溶液の調製

透析法による抽出精製は既報<sup>4)</sup>に準じた。試料10 gを採り、30%メタノール約50 mLを用いて透析膜に充てんし、よく混和して上端を密封した（有効長11~13 cm）。これをメスシリンダーに入れ、30%メタノールで全量を200 mLとし、時々揺り動かしながら室温にて24時間透析を行った。得られた透析外液を0.45 μmのメンブランフィルターでろ過した。なお、チーズのような高脂肪試料や食肉製品、く

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部

ん製いか、魚肉ねり製品などの高タンパク質試料については透析用溶液に80%メタノールを用いた。

また、水蒸気蒸留法による抽出精製を厚生労働省通知<sup>1)</sup>に準じて行った。この時、透析法と同一希釈倍率となるように試料採取量は25 gとし、留液を500 mLとした。これを0.45 μmのメンブランフィルターでろ過した。

#### 4. 装置

LC : Agilent Technologies社製1260 series

#### 5. LC測定条件

##### 1) ソルビン酸定量値の測定

カラム : Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), 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), 流速 : 0.6 mL/min, カラム温度 : 40°C, 注入量 : 20 μL, 検出波長 : 230 nm

##### 2) 混合標準溶液の経時的な保存安定性の検討

カラム, 移動相, カラム温度は5-1)と同一条件。流速 : 1.0 mL/min, 注入量 : 10 μL, 検出波長 : 230 nm (安息香酸), 258 nm (ソルビン酸)

#### 6. 混合標準溶液の保存条件および保存期間

2-4)で調製した混合標準溶液 (0.5 μg/mL, 1.0 μg/mL, 20 μg/mL, 100 μg/mL) 各100 mLもしくは200 mLを透明および褐色のガラス製標準試薬保存瓶 (各50 mL容, 中栓, 外栓共に透明摺り)に移し, 日常検査で使用している薬用冷蔵ショーケース内 (庫内温度平均6.2°C) に約2年間保存した。初めの3か月間は1週間ごと, 次の1か月間は2週間ごと, 続く8か月間は1か月ごと, その後12か月間は3か月ご

とに各濃度を各600 μLを採取し, 3回ずつ繰り返しLCで測定した。

### 結果および考察

#### 1. 水蒸気蒸留法と透析法との定量値の比較

ソルビン酸使用表示のある10種類の市販食品について, 水蒸気蒸留法および透析法を用いて5併行で試験し, 有意差検定を $t$ 検定によって行った (Table 1)。その結果, ほとんどの食品について, 前処理に水蒸気蒸留法よりも透析法を用いた場合の方がソルビン酸の定量値が高かった。これは, 既報<sup>4)</sup>での添加回収試験の結果とも一致していた。しかし, ニョッキと果実酒 (赤ワイン, 甘味果実酒) のソルビン酸の定量値については, 水蒸気蒸留法が透析法よりも高い結果となった。ニョッキは他の固形食品と異なり, 水蒸気蒸留法ではプラスチック内で試料が固まることなく分散しソルビン酸が効率良く抽出されたが, 透析法では試料に流動性がなく, 揺り動かしても透析膜内で内液と試料が上手く混和されなかったため, 定量値が低くなったものと考えられた。また, 既報<sup>4)</sup>では果実酒の添加回収試験を行っていないため, 既報<sup>4)</sup>と同様の条件で赤ワインの添加回収試験を行ったところ, 水蒸気蒸留法の回収率が98.8%, 透析法の回収率が95.2%と, 水蒸気蒸留法の方が透析法よりも高い回収率を示した。これは, Table 1に示した赤ワインのソルビン酸の定量値と同様の傾向であった。しかし既報<sup>4)</sup>において, 清涼飲料水は透析法の回収率が高く, 赤ワインと清涼飲料水で異なる結果を示した原因については明らかにすることができなかった。なお, いずれの食品もソルビン酸の濃度は食品衛生法の使用基準値以下だった。

Table 1. Quantitative Values of Sorbic Acid in Foods Using Sorbic Acid and Maximum Limits for Use of Sorbic Acid in Japan

Samples	Quantitative values (g/kg)		Maximum limits for use
	Steam distillation	Dialysis	
Pickle (Salted cucumber) <sup>a)</sup>	0.322 ± 0.002	0.326 ± 0.002*	1.0 g/kg
Pickle ( <i>Takuan-zuke</i> ) <sup>a)</sup>	0.796 ± 0.012	0.833 ± 0.010*	1.0 g/kg
Pickle (Vinegar-pickled cucumber and eggplant) <sup>a)</sup>	0.177 ± 0	0.182 ± 0.001*	0.50 g/kg
Sausage 1 <sup>b)</sup>	0.753 ± 0.004	0.784 ± 0.011*	
Sausage 2 <sup>b)</sup>	0.897 ± 0.008	0.923 ± 0.005*	2.0 g/kg
Sausage 3 <sup>b)</sup>	1.258 ± 0.010	1.326 ± 0.015*	
Cheese spread <sup>b)</sup>	0.238 ± 0.002	0.250 ± 0.005*	3.0 g/kg
Danish pastry <sup>a)</sup>	0.115 ± 0.001	0.116 ± 0*	1.0 g/kg
Wine (Red) <sup>a)</sup>	0.171 ± 0.001*	0.165 ± 0.001	0.20 g/kg
Fruit wine <sup>a)</sup>	0.129 ± 0.001*	0.126 ± 0.001	
Seasoned and smoked squid <sup>b)</sup>	0.833 ± 0.007	0.895 ± 0.006*	1.5 g/kg
Baked tubular kamaboko <sup>b)</sup>	1.243 ± 0.011	1.390 ± 0.015*	2.0 g/kg
Gnocchi <sup>a)</sup>	0.488 ± 0.001*	0.475 ± 0.004	1.0 g/kg

Mean±S.D. (n=5)

<sup>a)</sup> Samples were dialyzed against 30% methanol.

<sup>b)</sup> Samples were dialyzed against 80% methanol.

\* The values were significantly higher ( $p < 0.05$ ,  $p$ -values were calculated using  $t$ -test).

## 2. 混合標準溶液の経時的な保存安定性の検討

100%メタノールで調製したソルビン酸の標準原液は冷蔵保存で6か月間安定であることが報告されているが<sup>6)</sup>, 混合標準溶液についての保存安定性は不明である. そこで, 30%メタノールで調製した安息香酸とソルビン酸の混合標準溶液の経時的な保存安定性を検討した. 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 1.0  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  および 100  $\mu\text{g/mL}$  の各混合標準溶液について LC に注入し, ピーク面積値による評価を行った. 調製直後を 100% として変化した溶液中の安息香酸およびソルビン酸の面積百分率 (%) を Fig. 1 に示した. 試薬保存瓶の種類や混合標準溶液の濃度に関わらず安息香酸, ソルビン酸共に経時的な増減は認められず, 2 年間安定であった. したがって, メタノールで調製した安息香酸とソルビ

ン酸の混合標準溶液は冷蔵保存で少なくとも1年間安定で使用できることが示唆された.

また, 食品衛生検査指針2003<sup>7)</sup>や衛生試験法・注解2015<sup>8)</sup>では水酸化ナトリウム溶液を用いて標準原液を調製し, 検量線用標準液の作製には水で希釈すると記載されている. 今回, この方法により安息香酸とソルビン酸の混合標準溶液を調製し (0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 1.0  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  および 100  $\mu\text{g/mL}$ ), 経時的な保存安定性についても確認を行った. 20  $\mu\text{g/mL}$  および 100  $\mu\text{g/mL}$  は冷蔵保存で2年間安定であったが, 0.5  $\mu\text{g/mL}$  や 1  $\mu\text{g/mL}$  の低濃度混合標準溶液は3か月ほどで面積値が約7割まで減少した. したがって, 上記の方法で調製した混合標準溶液を使用する際は注意が必要と考えられる.

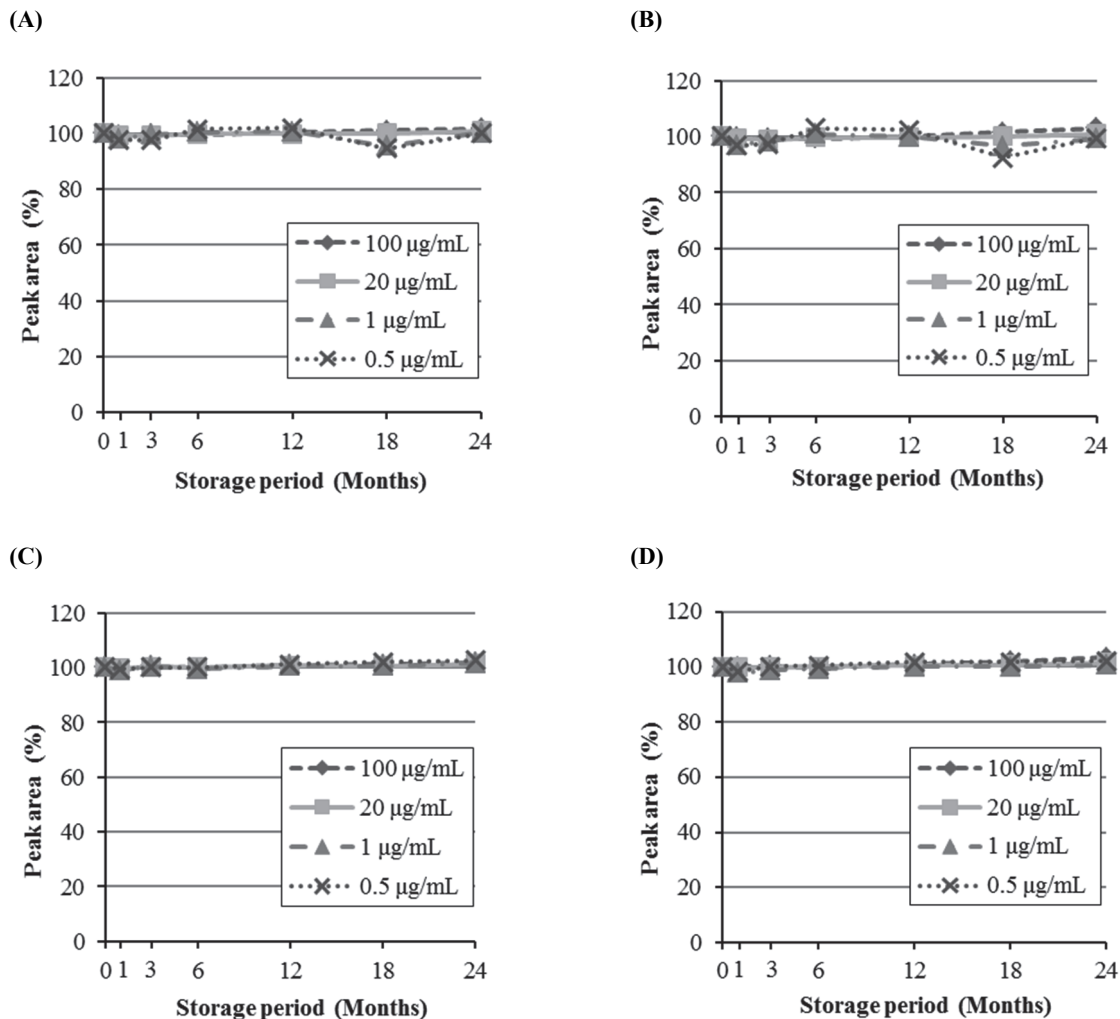


Fig. 1. Time -Dependent Change of Preservatives of Various Concentration in Standard Mixtures of Benzoic Acid and Sorbic Acid during Storage in Refrigerator.

(A) Benzoic acid in reagent bottle (clear), (B) Benzoic acid in reagent bottle (brown)

(C) Sorbic acid in reagent bottle (clear), (D) Sorbic acid in reagent bottle (brown)

Standard mixtures dissolved in 30% methanol. They were measured by LC with 230 nm(Benzoic acid), 258 nm(Sorbic acid). The peak area of preservatives was defined as 100% after the standard mixtures were prepared, and time-dependent change of preservatives of various density in a standard mixtures were described as percentages.

## ま と め

ソルビン酸使用表示のある食品について、水蒸気蒸留法と透析法を用いてソルビン酸を定量した。その結果、ほとんどの食品について透析法の定量値が有意に高かった。これは既報<sup>4)</sup>の添加回収試験の結果とも一致した。また、いずれの食品もソルビン酸の濃度は使用基準値以下だった。

安息香酸とソルビン酸の混合標準溶液について経時的な保存安定性を確認したところ、30%メタノールで希釈し冷蔵保存したものは少なくとも1年間安定で使用できることが示唆された。

これらの結果は、今後より適正な保存料の検査を行っていく上で役立つと考えられる。

## 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長：食安基発0528第3号，食品中の食品添加物分析法の改正。別添2（通知），平成22年5月28日。
- 2) 都田路子，山田洋子，天川映子，他：東京健安研七年年報，**55**, 101-106, 2004.
- 3) 粕谷陽子，松田敏晴，中里光男，他：東京健安研七年年報，**54**, 104-108, 2003.
- 4) 坂牧成恵，貞升友紀，松本ひろ子，他：東京健安研七年年報，**67**, 171-176, 2016.
- 5) 食品化学新聞，2017年1月12日付，「食品添加物マーケティングリサーチ2016」。
- 6) 土田千鶴子，宮本文夫，小野悦子，他：千葉衛研報告，**24**, 10-15, 2000.
- 7) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編2003，12-18, 2003，社団法人 日本食品衛生協会，東京。
- 8) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015，329-334, 2015，金原出版株式会社，東京。

**Comparison of Quantitative Values of Sorbic Acid in Foods determined by the Steam Distillation Method and the Dialysis Method, and the Stability of Standard Mixtures During Storage in a Refrigerator**

Asamoe OGAWA<sup>a</sup>, Ayako HYUGA<sup>a</sup>, Chizuko SATO<sup>a</sup>, Narue SAKAMAKI<sup>a</sup>, Yuki SADAMASU<sup>a</sup>,  
Kimio MONMA<sup>a</sup> and Chigusa KOBAYASHI<sup>a</sup>

The steam distillation method, direct extraction method, and dialysis method are used to analyze preservatives in foods. In a previous study, the recoveries of nine types of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid, methyl *p*-hydroxybenzoate, ethyl *p*-hydroxybenzoate, isopropyl *p*-hydroxybenzoate, propyl *p*-hydroxybenzoate, isobutyl *p*-hydroxybenzoate, and butyl *p*-hydroxybenzoate) from various types of foods using the dialysis method were generally better than the steam distillation method. In this study, the abilities of the steam distillation and dialysis methods to analyze sorbic acid in various types of foods were compared. As a result, in almost all types of foods, quantitative values of sorbic acid obtained from the dialysis method were larger than those determined by the steam distillation method. These results corresponded to the recoveries of sorbic acid from foods in our previous study. The stability of standard mixtures of benzoic acid and sorbic acid during storage in a refrigerator was investigated. It was found that standard mixtures of benzoic acid and sorbic acid remained stable enough to be used for at least one year.

**Keywords:** preservative, sorbic acid, steam distillation, dialysis, LC, standard mixture, stability, food additive

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

