

高速液体クロマトグラフィーによる食品中の ソルビン酸, 安息香酸分析法について

山上隆也 矢崎礼子 根津浩子

Analysis of Sorbic Acid and Benzoic Acid in Foods
by High Performance Liquid Chromatography

Takaya YAMAGAMI, Ayako YAZAKI and Hiroko NEDU

キーワード: ソルビン酸, 安息香酸, 高速液体クロマトグラフィー

ソルビン酸, 安息香酸は保存料として利用される食品添加物であり, その使用基準は食品衛生法によって定められている。当所では食品中のソルビン酸, 安息香酸が使用基準に適合しているかどうかの試験検査を行っており, 「食品中の食品添加物分析法」¹⁾および衛生試験法・注解²⁾に準じた方法(以下, 従来法)で行ってきた。従来法は測定対象とする食品の種類によっては回収率の低いことが指摘^{3,4)}されていたが, 平成 22 年 5 月 28 日付け厚生労働省通知⁵⁾でその分析法が改正され(以下, 改正法), 改良が図られた。

改正法は従来法と同様, 水蒸気蒸留で食品に含まれるソルビン酸, 安息香酸を抽出し, 高速液体クロマトグラフィー(以下, HPLC)で定量測定する方法であるが, 反応条件を変更することで食品の種類によらず高い回収率を実現している⁴⁾。

今回, ルーチン検査に改正法を導入するため, 当所の分析機器における条件検討ならびに従来法との比較検討を行った。

分析方法

1. 改正法

食品試料中のソルビン酸, 安息香酸を水蒸気蒸留法により抽出して試料液とし, HPLC により定量測定した。改正法と従来法との分析条件の主な相違点を表 1 に示すとともに, 以下に改正法の概要を記した。

(1) 水蒸気蒸留

細切した食品試料 5g を 500ml ナス型フラスコに入れ, 塩化ナトリウム 60g, 蒸留水 100ml, 15% 酒石酸溶液 10ml を加えて毎分 10ml の流速で水蒸気蒸

表 1 改正法と従来法の分析条件の主な相違点

		改正法	従来法
水蒸気蒸留	試料	5g	20g
	塩化ナトリウム	60g	40g
	水	100ml	150ml
	シリコン油	不要	要
	15% 酒石酸溶液	10ml	5ml
高速液体 クロマトグラフィー	移動相	メタノール: 水: 0.2mol/Lリン酸緩衝液 = 36: 59: 5	メタノール: アセトニトリル: 5mmol/Lクエン酸緩衝液 = 1: 2: 7
	試料注入量	20 μ l	5 μ l
	検量線	5点	4点
		(0.1, 1, 2, 5, 10 μ g/ml)	(1, 10, 30, 50 μ g/ml)

留を行った。留出液を 500ml まで採取して良く混和し、メンブランフィルター（日本ミリポア、マイレクスLH, 0.45 μ m）でろ過したものを試料液とした。

(2) HPLC 分析条件

フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M10Avp 付き高速液体クロマトグラフ LC10-AD（島津）を使用した。測定波長は 230nm, カラムはオクタデシルシリル化シリカゲルカラム TSKgel ODS-80Ts（東ソー, 内径 4.6mm, 長さ 150mm), 移動相はメタノール:水:0.2mol/L リン酸緩衝液混液(36:59:5), 流速は毎分 1ml, カラム温度は 40℃とした。

標準液（ソルビン酸, 安息香酸各 0.1, 1, 2, 5, 10 μ g/ml）を 20 μ l ずつ測定して得られたピーク面積から検量線を作成し, 試料液 20 μ l を測定して得られたピーク面積と検量線から試料液濃度 (μ g/ml) を求め, 試料中のソルビン酸, 安息香酸含有量 (g/kg) を算出した。

2. 従来法

食品試料中のソルビン酸, 安息香酸を水蒸気蒸留法により抽出して試料液とし, HPLC で定量測定した。以下にその概要を記した。

(1) 水蒸気蒸留

細切した食品試料 20g を 500ml ナス型フラスコに入れ, 塩化ナトリウム 40g, 蒸留水 150ml, 15% 酒石酸溶液 5ml, 消泡剤 1 滴を加えて毎分 10ml の流速で水蒸気蒸留を行った。留出液を 500ml まで採取して良く混和し, メンブランフィルター（日本ミリポア, マイレクスLH, 0.45 μ m）でろ過したものを試料液とした。

(2) HPLC 分析条件

フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M10Avp 付き高速液体クロマトグラフ LC10-AD（島津）を使用した。測定波長は 230nm, カラムはオクタデシルシリル化シリカゲルカラム Shim-pack CLC-ODS（島津, 内径 6.0mm, 長さ 150mm), 移動相はメタノール:アセトニトリル:5mol/L クエン酸緩衝液混液(1:2:7), 流速は毎分 1ml, カラム温度は 40℃とした。

標準液（ソルビン酸, 安息香酸各 1, 10, 30, 50 μ g/ml）を 5 μ l ずつ測定して得られたピーク面積から検量線を作成し, 試料液 5 μ l を測定して得られたピーク面積と検量線から試料液濃度 (μ g/ml) を求め, 試料中のソルビン酸, 安息香酸含有量 (g/kg) を算出した。

結果と考察

1. HPLC 分析条件の検討

改正法の分析条件に従い標準液を測定したときのクロマトグラム例を図1に示した。ソルビン酸は約 7.9 分, 安息香酸は約 5.9 分に目的ピークが検出された。

検量線はピーク面積, ピーク高さのどちらでも良好な直線性を示したが, 従来法ではピーク面積で測定していたことから, 改正法でもピーク面積によることとした。

測定結果の再現性を確認するため, 同一試料を同時に3回以上測定して測定値の変動係数を求めた。検量線作成用標準液 (0.1~10 μ g/ml) を試料として測定した結果, ソルビン酸で 2.0% 以下, 安息香酸で 1.5% 以下と良好な再現性が確認された。また, 検量用標準液の最低濃度 (0.1 μ g/ml) を測定した時の標準偏差の3倍を検出限界値とした場合, ソルビン酸で 0.006 μ g/ml, 安息香酸で 0.005 μ g/ml であった。

高濃度標準液 (100 μ g/ml) の段階希釈列を試料として測定した結果, 0.1~100 μ g/ml の範囲で直線性が確認された。このときの測定値と理論値との百分率誤差は, ソルビン酸で $\pm 3.3\%$ 以内, 安息香酸で $\pm 5.1\%$ 以内であった。

改正法は従来法よりも試料採取量が少なく, 試料液中に含まれる目的成分が従来法よりも相対的に低濃度となる。このため, HPLC 測定量を増量するなど, 改正法では従来法よりも低濃度域の測

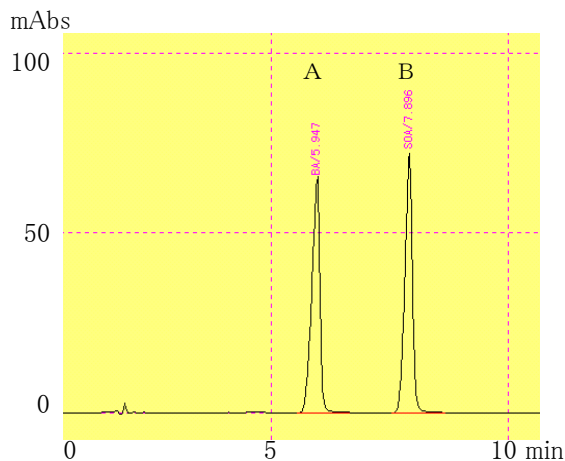


図1 改正法によるHPLCクロマトグラム
A: 安息香酸 B: ソルビン酸

定を目的とした分析条件となっている。そこで、改正法の分析条件が当所の分析機器に適應できるかどうかを検討したが、今回の結果から適應性に問題はないものと考えられた。

2. 水蒸気蒸留の検討

水蒸気蒸留の抽出効率を改正法と従来法とで比較するため、標準液(0.1g/kg)を試料として各法で水蒸気蒸留を行い、100ml ごとの分画に分けて600ml まで留出液を採取した。各分画についてソルビン酸、安息香酸濃度を測定して回収率を求め、各成分の留出パターンを比較した(図2)。

従来法では 500ml 以降の分画でもソルビン酸、安息香酸が検出され、留出液採取の規定量である 500ml では抽出が不十分であることが示唆された。また、このことはソルビン酸よりも安息香酸で顕著に認められた。これに対し、改正法ではソルビン酸、安息香酸ともに 400ml までの分画でほぼ抽出が終わっていた。

改正法は従来法よりも試料採取量を減量して食品成分の影響を抑えるとともに、試薬の添加量を増やしたことで塩析効果が高まり、抽出効率が向上したものと考えられた。

3. 回収率及び相関性

(1) 添加回収率

試料とする食品の種類によって回収率に違いがあるかどうかを調べるため、標準液を添加

(0.1g/kg)した食品試料(n=13)について改正法と従来法とで測定し、回収率を比較した(表2)。

その結果、従来法では食品によって回収率は大きく異なり、ソルビン酸で 67.2~91.4%、安息香酸で 34.4~78.6%であった。安息香酸は食品GLP⁶⁾で規定する 70%の回収率を満たしたのは約半数だけであり、その中で「するめいか」はソルビン酸、

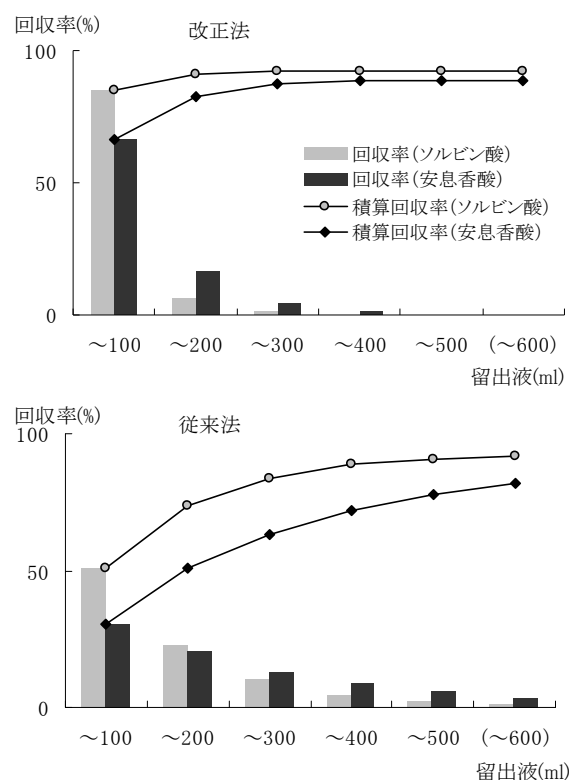


図2 改正法と従来法の水蒸気蒸留パターン

表2 食品別の添加回収率の比較 (単位:%)

試料	ソルビン酸		安息香酸	
	改正法	従来法	改正法	従来法
ブルーン	93.9	86.1	96.0	73.7
チーズ	94.5	82.8	96.5	67.5
ウインナー	84.1	77.8	84.3	66.6
ベーコン	88.4	88.8	98.9	67.3
ちくわ	84.2	80.3	91.3	73.3
さつまあげ	80.8	78.9	90.9	70.7
しょう油	90.2	86.2	89.4	60.4
赤ブドウ酒	93.5	89.5	91.1	72.2
白ブドウ酒	91.6	91.4	88.7	78.6
イチゴジャム	93.7	90.7	90.5	76.2
マーガリン	89.3	84.5	92.5	62.8
するめいか	90.2	67.2	94.6	34.4
水	89.5	88.3	97.0	78.0

安息香酸ともに他の食品よりも特に低い回収率であった。「するめいか」と同じ魚介乾製品である「さきいか」など高タンパク質食品では回収率の低いことが報告されており⁴⁾、今回も同様の結果と思われた。

これに対し、改正法の回収率はソルビン酸で 80.8～94.5%、安息香酸で 84.3～97.0%と従来法よりも高く、食品によっても大きな違いはみられなかった。改正法は従来法よりも効率よく目的成分を抽出できることが示唆された。

(2)測定値の相関性

原材料表示にソルビン酸もしくは安息香酸を含む市販の食品試料について改正法と従来法の測定値を比較して相関性を確認した。

その結果、改正法をY軸とした場合、ソルビン酸 (n=32) では回帰式 $y=1.02x+0.01$ 、相関係数 $r=0.997$ 、安息香酸 (n=17) では $y=1.13x+0.01$ 、 $r=0.990$ と良好な相関性が認められた。しかし、改正法による安息香酸の測定値は従来法よりも若干高値となる傾向にあるため、時系列的に比較する際には注意が必要と思われた。

従来法で回収率の低かった魚介乾製品は今回、ソルビン酸の測定試料として3件含まれていたが、改正法と従来法とでその測定値に大きな違いはみられなかった。今後も多くの食品について検討し、データを蓄積していくことが必要と思われる。

結 語

改正法は試料の種類に関わらず、食品中のソルビン酸、安息香酸を効率よく測定でき、有用性の高い分析法であると考えられた。今後は標準作業書等を改訂し、ルーチン検査法として採用する予定である。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課:第2版食品中の食品添加物分析法,平成12年3月30日付け衛化第15号通知別添
- 2) 日本薬学会編:衛生試験法・注解 2000, 285～290, 金原出版(2000)
- 3) 関戸晴子ら:精度管理における保存料検査の問題点, 神奈川衛研報告, 37, 38～40(2007)
- 4) 佐藤恭子:食品中の保存料およびステアロイル乳酸類の分析法, 食品衛生研究, 60, 7～14(2010)
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課:「食品中の食品添加物分析法」の改正について,平成22年5月28日付け食安基発0528第3号通知
- 6) 厚生省生活衛生局食品保健課:食品衛生検査施設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日付け衛食第117号通知