〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
30 (5) 322-327 (1984)〕

少量の有機溶媒を用いた保存料の簡易抽出法の検討 ソルビン酸、
デヒドロ酢酸、安息香酸及びパラオキシ安息香酸エステル類

宝井辰紀, 中村香代子, 日高利夫, 桐ヶ谷忠司
上条昌弥, 鈴木幸夫, 河村太郎
横浜市衛生研究所

Simple Extraction Method for Preservatives with Small Amount
of Solvent Sorbic Acid, Dehydroacetic Acid, Benzoic
Acid and *p*-Hydroxy Benzoic Acid Esters

TATSUTOSHI TAKARAI, KAYOKO NAKAMURA, TOSHIO HIDAKA,
TADASHI KIRIGAYA, MASAYA KAMIJO,
YUKIO SUZUKI and TARO KAWAMURA
*Yokohama City Institute of Health, 1-2-17, Takigashira,
Isogoku, Yokohama 235, Japan*

(Received April 19, 1984)

Extraction method for sorbic acid (SOA), dehydroacetic acid (DHA), benzoic acid (BA) and *p*-hydroxy benzoic acid-esters (PHBAs) with 0.5 ml of *n*-butyl acetate (AcoBu), compared with the official extraction procedure, was cheap, fast and simple.

Proper quantity (3–15 µg of SOA, 5–25 µg of DHA, BA and PHBAs determined by UV absorption of the distillate) of the distillate of food or 1 g of soft drinks was added to the test tube containing 0.1 ml of 10% of HCl and 3 g of NaCl.

The sample was made up to 10 ml with water, 0.5 ml of 90 ppm *n*-tridecanoic acid-AcoBu solution (in the case of PHBAs, AcoBu was used) was added to the tube, and the tube was shaken vigorously. Upper layer was applied to GC.

The recovery rates of the preservatives from the distillates of foods and from soft drinks were 95–102%.

The results of marketed foods by our method were almost the same as the results by the official method.

Keywords — sorbic acid; dehydroacetic acid; benzoic acid; *p*-hydroxy benzoic acid-ester

はじめに

合成保存料のソルビン酸 (SOA), デヒドロ酢酸 (DHA), 安息香酸 (BA) 及びパラオキシ安息香酸エステル類 (PHBAs) の日常検査業務において数多くの検体を検査するためにはスクリーニング法として水蒸気蒸留 UV 法¹⁾がすぐれていると思われるが, UV 吸収測定だけでは検査結果に疑問の生じる検体も数多くあり, それらの蒸留留液をガスクロマトグラフィー (GC) に

供して確認する必要がある。

GCを用いた方法は有機溶媒抽出法,¹⁻³⁾ 水蒸気蒸留抽出法¹⁾等があるが, これらは抽出溶媒として, 高価なエチルエーテルを多量に必要とし, 使用器具の種類も多く操作に長時間を要する。又, その廃液の処理など種々の問題点が挙げられる。

そこで, 試験に要する費用及び時間を大幅に軽減でき, 試験操作に伴う損失の少ない抽出法について種々検

討を行った結果、若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 試薬 BA, 酢酸 *n*-ブチル (AcoBu), NaCl 及び HCl は和光純薬工業 (株) の試薬特級, DHA-Na は関東化学 (株), PHBAs 及び *n*-トリデカン酸 ($C_{13}:0$) は東京化成 (株), ラウリン酸 ($C_{12}:0$) は P-L Biochemicals Inc., *n*-カプロン酸 ($C_6:0$) は小宗化学薬品 (株), 他の標準及び試薬は和光純薬工業 (株) の和光特級を用いた。水はイオン交換水を用いた。

2. 器具, 装置及び測定条件 1) 試験管はガラス製内径 13 mm × 長さ 15 cm の共栓付。

2) 装置 — a) FID 付 GC 日立 163, b) GC-MS 日立 M-80, データ処理 日立-M-003, EI-20 eV。

3) GC 及び GC-MS 用カラム — a) 5%-Thermon 1000 + 0.5% H_3PO_4 Chromosorb W (AW-DMCS) 80—100 メッシュ 3 mm × 2 m ガラスカラム, カラム温度 195°C, 注入口温度 220°C, 窒素 (GC-MS はヘリウム) 流量 40 ml/min., 注入量 2 μ l (GC-MS は 5 μ l)。

b) 5% SE-30 Chromosorb W (AW-DMCS), 60—80 メッシュ 3 mm × 2 m ガラスカラム, カラム温度 180°C, 注入口温度 220°C, 窒素流量 40 ml/min. 注入量 2 μ l。

3. 混合標準溶液の調製 a) SOA, DHA, BA 混合標準溶液の調製 SOA 及び BA は公定法に従い各 1000 ppm の水溶液, DHA は DHA-Na の 0.1238 g を水 100 ml に溶かして 1000 ppm とした。SOA, DHA, BA の各 1000 ppm 溶液から SOA は 0.3 ml, DHA 及び BA は 0.5 ml ずつを合わせて水で 100 ml とした。

b) PHBAs 混合標準溶液の調製 各エステル 0.1 g を AcoBu 100 ml に溶かして 1000 ppm とした。本液の 1, 3 及び 5 ml をそれぞれ AcoBu で 100 ml にした。

4. SOA, DHA, BA 抽出の溶媒調製 $C_{18}:0$ の 0.1 g を AcoBu 100 ml に溶かし 1000 ppm 溶液とした。この液 9 ml をとり AcoBu で 100 ml とした。

5. 試験溶液の調製 1) 蒸留留液からの抽出 — 衛生試験法注解に準拠して得た試料の蒸留留液の UV 測定値から保存料の濃度を概算し, NaCl 3 g 及び 10% HCl 0.1 ml を加えた試験管に, SOA では 3—15 μ g, DHA と BA では各 5—25 μ g, 又, PHBAs では各 5—25 μ g を含む留液又はその希釈液の適量を取り, 10 ml 未満の場合は水で 10 ml とした。次いで抽出溶媒 PHBAs の場合は AcoBu を 0.5 ml 加え, NaCl が溶解するまで振とう混合し, 上層を試験溶液として GC 又は GC-MS に供した。

2) 清涼飲料水からの直接抽出 — 清涼飲料水 1 g を 5-1) と同様に調製した試験管にとり, 水で 10 ml とした後, 5-1) と同様の操作を行い, 上層を試験溶液として GC に供した。

6. 検量線の作成 a) SOA, DHA, BA SOA, DHA, BA 混合標準溶液の 1, 3 及び 5 ml をそれぞれ 5-1) で調製した試験管にとり, 水を加えてそれぞれ 10 ml とした後, 5-1) と同様の操作を行い, 検量線を作成した。

b) PHBAs 5-1) で調製した試験管に水 10 ml を加え, さらに PHBAs 混合標準溶液各 0.5 ml を加えて振とう混合し, 上層を用いて検量線を作成した。

結果及び考察

1. 抽出用溶媒の検討

酸性 SOA 標準水溶液から各同量の溶媒で抽出した SOA ピーク高を AcoBu を用いた場合を 1 として比較した。

結果は Table I に示す通りで, この中で比が 1.0 を越える溶媒は, 水溶性の大きい溶媒であったため用いなかった。又, 各エステルは AcoBu とほぼ同じ比を示したが, 価格及び試薬の規格等を考慮して AcoBu を用いることにした。

又, 今回 PHBAs に関しても AcoBu を用いることにした。

2. NaCl 及び HCl の添加量の検討

Table II に NaCl 及び HCl の添加量による SOA のピーク高の比を示した。この結果より NaCl は 3 g, HCl は 5% 以上であれば良いことから 10% を 0.1 ml 用いる

TABLE I. Effect of Extracting Solvents for SOA

Solvent	Relative peak height ^{a)}
Ethyl ether	1.39
Hexane	0.05
Benzene	0.39
Toluene	0.33
Chloroform	0.70
Ethyl acetate	1.30
iso-Propyl acetate	1.10
tert-Butyl acetate	1.00
sec-Butyl acetate	1.03
iso-Butyl acetate	1.00
<i>n</i> -Amyl acetate	0.92
<i>n</i> -Butyl propionate	0.96
<i>n</i> -Propyl propionate	1.04
iso-Butyl propionate	0.98
Ethyl <i>n</i> -butyrate	1.04

a) Compared with extracted SOA with *n*-Butyl-acetate.

Fig. 1. Chromatogram of SOA, DHA, BA, and C_{13} on 5% theron 1000+0.5% H_3PO_4
A: SOA, B: DHA, C: BA, D: C_{13} (15, 25, 25 and 90 ppm respectively).

ことにした。

3. 内部標準の検討及び検量線

水と試料留液（互いに等しい量の SOA を含む）を試験溶液の調製の 5-(1) に従い $C_{13}:0$ を含まない AcoBu で抽出し、GC で SOA を測定した結果、SOA のピーク高は試料留液が水の約 1.4 倍の値を示した。

上記の現象が水と試料留液への AcoBu の溶解度の差により生じるかどうかを調べるため、水及び SOA 不抽出試料留液のそれぞれに AcoBu を加え振とう混合し、

TABLE III. Effect of Free Fatty Acid as Internal Standard

Free fatty acid Conc. (ppm)	Relative peak height ^{a)}			Distillate ^{b)} (sausage)
	C6	C12	C13	
10	1.2	1.1	1.2	
50	1.2	1.4	1.4	
100	1.4	1.4	1.4	1.4

a) Extracted SOA compared with free fatty acid-free-AcoBu.

b) Free fatty acid-free-AcoBu as extracting solvent.

TABLE II. Effect of NaCl and HCl

NaCl	1 g	2 g	3 g	3 g	3 g
HCl	-	-	-	5% 0.1 ml	25% 0.1 ml
Relative peak height ^{a)}	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2

a) Extracted SOA compared with NaCl and HCl-free-AcoBu.

Fig. 2. Calibration Curves of SOA, DHA, BA and PHBAs

—○—: SOA, —×—: DHA, —△—: BA, —●—: Ethyl PHBA, —▲—: iso-Propyl PHBA,
—□—: n-Propyl PHBA, —■—: iso-Butyl PHBA, —▽—: n-Butyl PHBA.

1) Mixed SOA, DHA and BA by GC using C_{13} as internal standard.

2) Mixed SOA, DHA and BA by GC-MS (m/z : 97, 168, 105 respectively).

3) PHBAs by GC.

Chart 1. Procedures of Ether Extract. and AcoBu Extract.

^{a)} Using AcoBu without C13 for PHBAs.

TABLE IV. Recovery of SOA, DHA, BA and PHBAs from the Distillates or Soft Drinks

		Added (μg) ^{b)}	Recovery (%)		
			GC	GC-MS	Direct extract. GC
SOA	Sausage	3	99	98	
	Kamaboko	3	102	112	
	Takuwan	3	100	116	
DHA	Margarine	5	101	99	
	Margarine	0.20 ^{c)}	95	105	
	Butter	5	100	104	
	Butter	0.20 ^{c)}	100	100	
BA	Soft drinks	5	101	98	
	Soft drinks	5	99	91	
	Soft drinks	5			100
	Soft drinks	5			101
PHBAs	Soy sauce	5, 10 ^{d)}	102		
	Sauce	5, 10 ^{d)}	99		
	Soft drinks	5, 10 ^{d)}	99		
	Soft drinks	5, 10 ^{d)}	97		
	Soft drinks	5, 10 ^{d)}			98
	Soft drinks	5, 10 ^{d)}			99

^{a)} Distilled sample weights for SOA, DHA, BA and PHBAs were 15, 30, 50 and 50 g respectively. Direct-extracted sample weight was 1 g.^{b)} Added to 10 ml of the distillate or to 1 g of sample.^{c)} DHA was added to the distillate to be 0.20 g/kg.^{d)} Acetone solution containing 10 μg of *n*-butyl ester and 5 μg of the other esters was added to the tube and dried up the solvent by N₂ jet. Then, the distillate or soft drinks was added to the tube, shaken vigorously and followed by the extracting procedures.

TABLE V. Analytical Results of SOA, DHA, BA and PHBAs in Foods

		Analytical data (g/kg)			
	Sample	UV	Ether GC	AcoBu GC	AcoBu GC-MS Direct extract. GC
SOA	Kamaboko	0.14	0.11	0.11	0.12
	Kamaboko	0.07	0.06	0.06	0.06
	Sausage	1.45	1.42	1.40	
	Sausage	1.27	1.22	1.26	
	Sausage	1.61	1.51	1.56	
	Sausage	1.49	1.40	1.46	
	Cheese biscuits	0.21	0.16	0.17	0.15
	Cheese crackers	0.20	0.15	0.15	0.15
	Cheese crackers	0.10	0.06	0.07	
	Mirinboshi (sardine)	0.38	0.22	0.24	
	Cake	0.02	0.02	0.02	
	Jam	0.16	0.13	0.14	
	Tukemono (radish)	1.00	0.81	0.93	
DHA	Cake		0.13	0.14	
	Cake		0.03	0.03	
BA	Conc. drinks	0.24	0.15	0.16	0.15
	Sauce		0.01	0.01	
	Grilled poak		0.02	0.02	
	Cheese		0.02	0.01	
	Kanroni (herring)		0.06	0.06	
	Tukudani (kounago)		0.09	0.09	
	Tukudani (kounago)		0.03	0.02	
	Tukudani (locust)		0.06	0.06	
PHBAs ^{a)}	Kikurage		0.25	0.26	
	Conc. drinks		0.012	0.013	0.013
	Soy sauce		0.072	0.078	

a) Results were converted to *p*-hydroxy benzoic acid.

それぞれ同量の AcoBu をはかりとり、それぞれ 6 ppm となるように SOA を加えて GC に供しても後者の約 1.4 倍のピーク高を示した。なお、本試料留液のブランクはクロマトグラム上に妨害ピークを示さない。

そこで、この現象は抽出溶媒の容積差に起因するのではなく、GC (カラム) に対して試料留液中のある物質が SOA のピーク高を高める効果を示すためと推定された。このような影響を与える物質としては、酸性下水蒸気蒸留で留出する遊離の脂肪酸が想定されるため、遊離の飽和脂肪酸として、GC 条件の a) でクロマトグラム上一連の SOA, DHA, BA のピークの前に検出される $C_6:0$ と後にピークを示す $C_{12}:0$ 及び $C_{13}:0$ の 3 種類を用いてこの現象が解消できるかを検討した。

SOA 水溶液を AcoBu のみで抽出した場合と $C_6:0$, $C_{12}:0$ 及び $C_{13}:0$ の脂肪酸を添加した AcoBu で抽出した場合の SOA のピーク高を比較した結果は Table III

に示した通りである。

また、これらの脂肪酸を添加した AcoBu で SOA 水溶液を抽出した場合の SOA ピーク高と、AcoBu のみ、あるいは、脂肪酸を加えた AcoBu で SOA 水溶液と SOA が同一濃度の試料留液を抽出した場合の SOA ピーク高は等しくなった。この現象は DHA 及び BA でもみられたが、脂肪酸を AcoBu に加えることで解消された。

以上 3 脂肪酸について検討したが、保持時間及び食品中に存在する妨害物質の影響を考慮して $C_{13}:0$ を内部標準としても用いることとし、その濃度は保存料の標準のピーク高及び Table III の結果から 90 ppm とした。Fig. 1 に GC 条件の a) における SOA, DHA, BA 及び $C_{13}:0$ のクロマトグラムを示した。なお、 $C_{13}:0$ は GC カラムに DEGS りん酸を用いた場合も Fig. 1 と同様に一連のピークの後に出了。

PHBAs に関しては SOA で見られた現象は起こらなかったため、AcoBu をそのまま抽出溶媒として用いた。又、PHBAs は水に難溶性であり、アルカリを加えて溶解させると、エステルの加水分解の可能性が生じるため AcoBu 溶液とした標準を用いた。

Fig. 2 に各標準の検量線を示した。Fig. 2-1) における標準 (SOA, DHA, BA それぞれ 9, 15, 15 ppm) と $C_{13}:0$ ピーク高との比のバラツキ CV (%) は SOA : 1.9, DHA : 2.1, BA : 0.6 であった (各12回測定)。

4. エーテル抽出法との操作の比較

本検討ではエーテル抽出を公定法に準拠した方法として Chart 1 に示した抽出法で行った。又、AcoBu 抽出法の操作を Chart 1 に示した。Chart 1 からわかる様に AcoBu による方法はエーテル抽出法に比べて時間、費用が大幅に軽減し、操作も簡単になった。

5. 添加回収試験

添加回収は合成保存料不検出試料蒸留留液又は清涼飲料水に標準水溶液を加えて行った。

Chart 1 に示した AcoBu 抽出法によるこれらの結果を Table IV に示した。各合成保存料の回収率は GC

では留液抽出、直接抽出のいずれにおいても 95—102% の範囲にあり満足のいく結果であった。

6. 市販品の試験結果

Table V に各市販品における留液 UV 法、留液エーテル抽出 GC 法、留液 AcoBu 抽出法、同 GC-MS 法及び直接 AcoBu 法における試験結果を示した。Table V が示す通り、各合成保存料の AcoBu 抽出法による測定値はエーテル抽出法とほぼ同様の結果であった。

ま と め

SOA, DHA, BA 及び PHBAs の GC による測定において、水蒸気蒸留留液及び清涼飲料水の抽出溶媒として AcoBu を用いた本法は迅速、簡易で安価な方法であり、エーテル抽出と同等の結果を示した。又、SOA でみられた回収率の異常現象は $C_{13}:0$ を加えることにより、みられなくなった。

SOA, DHA, BA の検査結果に MS を必要とする場合、検出限界とした濃度 (それぞれ 3, 5, 5 $\mu\text{g}/10\text{ml}$ 留液) でも添加回収した試料からのフラグメントグラムは標準のそれと一致し確認された。

引 用 文 献

- 1) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 金原出版, 東京, 1980, pp. 296—344.
- 2) Ricardo G. Coelho and David L. Nelson, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 209 (1983).
- 3) 静岡県衛生研究所編, “静岡県食品標準試験法,” 静岡県衛生部食品衛生課, 静岡, 1982, pp. 41—43.