

食品中の保存料に関する研究

1 デヒドロ酢酸の定量

安井市治* 森真理子*

Studies on the Chemical Preservatives in Foods

1 Determination of DHA

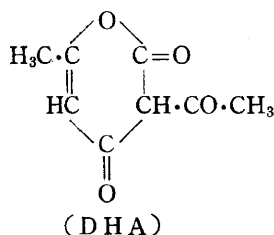
Ichiji Yasui Mariko Mori

I ま え が き

現在わが国で食品の添加物として使用することが法的にみとめられている殺菌剤、保存料としては、過酸化水素、次亜塩素酸、2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリル酸アミド、安息香酸、サリチル酸、ジフェニール、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、プロピオン酸塩、ラウリルトリメチルアンモニウム-2, 4, 5-トリクロルフェノキサイド、サラシ粉などとなっている。これらのうち 2, 3 を除きそれぞれ健康上の安全性を確保するための量的規制が法的拘束力をもった所謂使用基準として定められているが、現実社会の実態は、今日までの多数の実例が示す如く、この基準が守られない場合が多い。特に殺菌剤や保存料のなかには、健康上の安全性に関し問題点を有するものが少なくない。

そこで食品中のこれらの物質につき、より適確な、より迅速な検出方法、定性定量試験方法の開発が必要である。著者らは、食品添加物のうち特に安全性に関する問題点が多いと思われる殺菌剤、保存料について、より有効な試験法に関する研究を行なっているが、ここに、Dehydroacetic Acid (以下 DHA と記す) の新定量法に関する実験結果について報告する。

II DHA について



DHA は1953年(昭和28年)食品衛生法の規定により、そのナトリウム塩とともに食品添加物として使用することが認められたものである。

現在定められている使用基準によれば、「DHA およびこれを含む製剤は、チーズ、バター、マーガリンおよびあん類以外の食品に使用してはならない」とされている。又その使用量は「DHA としてチーズ、バターおよびマーガリンにあってはその1kgにつき0.5g以下、あん類にあってはその1kgにつき0.2g以下でなければならぬ」と規定されている。DHA の抗菌作用は糸状菌、酵母および大部分の細菌に対して有効である。またその作用は、pH、熱および光線に対して安定であるという。

DHA は多くの無機化合物と塩¹⁾を作ることが知られているが、それらのなかで銅塩²⁾は定性反応に利用されている。DHA は反応性に富んでおり各種の誘導体が知られている。また DHA は酸には比較的安定であるといわれているが、クエン酸溶液中では次第に変化して2, 6-dimethyl-4-pyrone³⁾を生成するという報告がある。アルカリで加水分解すると酢酸、アセトン、二酸化炭素などが生成される。

試験法としては、DHA の構造中のメチルケトン基を利用するものが多く、このものの検出には多くの方法⁴⁾があるが、芳香属アルデヒドの作用によるもの⁵⁾、次亜臭素酸反応²⁾⁵⁾などが知られている。又無機塩の生成反応を利用する方法も報告されている⁹⁾。この場合銅塩⁶⁾生成反応がよく用いられるが他に鉄塩を生成する反応を利用するものもある⁷⁾。このうち芳香族アルデヒドによる反応は、チーズ、魚肉ねり製品などの食品中からの検出定量に関する報告があり広く用いられている方法である。

薬学会協定衛生試験法では、チーズ、バター、マーガリンおよび清涼飲料水などのなかに含まれる DHA の定性定量試験法として、ポーラログラフイーによるものおよびサリチルアルデヒドと反応して生ずる色調

* 本学食品衛生学研究室

を利用する比色定量法などがあげられている。現在一般に後者の方法が広く用いられているようである。又 AOAC協定試験法⁴⁾としては、定性試験法として、サリチルアルデヒドによる法を、又定量法として 307 m μ における吸光度測定法を採用している。

Ⅲ 実 験

食品中の DHA の比色定量法として今日広く採用されているサリチルアルデヒドによる呈色は、DHA の構造中のメチルケトン基を目的としたものである。この点から考えれば種々の成分を含む食品の中には、DHA を添加しなくてもこの反応を呈する場合が予想される。又実際に醤油中サリチルアルデヒド呈色反応陽性物質の確認の報告⁹⁾がみられる。又この方法は 98°C ~ 100°C の水浴中で 20 分間加熱後水浴から取り出し、更に 20 分間室温に放置するなど試験方法としても改良の余地があるものと認められる。

著者らは、本品のアルコール溶液に酒石酸カリウムナトリウム試液および強酢酸第二銅試液を加えて生ずる帯白紫色の沈殿¹⁰⁾がクロロホルムに澄明に溶解しクロロホルム層が青色を呈することを確認し得たので、この呈色液の吸光度を測する方法により DHA の新定量法を設定することを試み次の実験を行ない良好な結果を得ることができた。

Ⅲ-1 呈色液の吸収スペクトル

〔試液〕

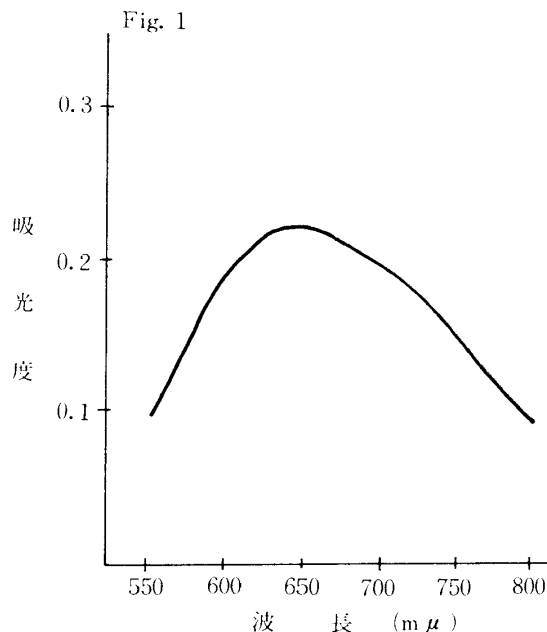
(1) 酒石酸カリウムナトリウム試液

酒石酸カリウムナトリウム 14.1g を水 100ml に溶かす。

(2) 強酢酸第二銅試液

酢酸第二銅 13.3g に酢酸 5ml および水 195ml を加えて溶かす。

DHA—Na の水溶液 (1→100) 1ml に水 1ml、酒石酸カリウムナトリウム試液 0.5ml および強酢酸第二銅試液 0.3ml を加えて振り混ぜ帯白紫色の沈殿を生じた液にクロロホルム 12ml およびエタノール 3ml を加えてよく振り混ぜ静置して得られた青色透明のクロロホルム層の呈色の吸収極大を知るため可視部における吸収スペクトルを、空試験で得たクロロホルムを対照として、分光光度計により調べた。その結果は Fig. 1 に示すとおりであり、640m μ における吸収が最高であることを示している。そこで以後の測定には 640m μ の波長を用いることとした。



Ⅲ-2 呈色の安定性

上記Ⅲ-1の試験操作を室温において行ない、発色直後から一定時間毎に吸光度を測定した結果、測定値がかなり移動することがわかったので、反応促進の目的で加熱することとした。即ち上記の帯白紫色の沈殿を生じたものを 80°C の水浴中で 5 分間、10 分間、15 分間加熱したものにつき、冷後Ⅲ-1に示す方法によりクロロホルムで抽出し、各クロロホルム層の吸光度を測定しその経時変化をしらべた結果は Table 1 のとおりである。

Table 1

	5分間浸漬	10分間浸漬	15分間浸漬
5分後	—	—	0.22
10分	0.24	0.24	0.22
15分	0.24	0.24	0.22
20分	0.24	0.24	0.22
25分	0.24	0.24	0.22
30分	0.24	0.24	0.22
40分	0.25	0.24	—
45分	0.25	0.24	—

また沸騰水浴中で 0 分間、3 分間、5 分間、10 分間、15 分間加熱し、上と同様に各クロロホルム層の吸光度を測定した結果は Table 2 のとおりである。又加熱温

度については、80°Cおよび100°Cに加熱したものをそれぞれ試薬を加えて呈色せしめクロホルム層の吸光度を測定することにより調査した結果沸騰水浴中加熱の方が適当であることわかった。又呈色の経時安定性は Table 3 のとおりである。

Table 2

沸騰水浴中加熱 (分)	吸光度
0	0.20
3	0.20
5	0.24
10	0.22
15	0.22

Table 3

経過時間 (分)	吸光度 (沸騰水浴中5分加熱)
5	0.16
10	0.16
15	0.16
20	0.16
25	0.16
30	0.16
40	0.16

以上の結果から呈色の安定性については、帯白紫色の沈でんを生じたものを加熱することにより呈色の安定化傾向が認められる。加熱の方法については沸騰水浴中で5分間加熱が最も適当な加熱方法と認められる。

III-3 DHA と呈色試薬の量的関係

上記の呈色反応が十分に進行するためには一定量のDHA に対し、酒石酸カリウムナトリウム試液および強酢酸第二銅試液の添加適量がどれだけであるかを知る目的で、試薬の添加量を段階的に変えて呈色せしめ吸光度を測定した結果は Table 4 に示すとおりである。

Table 4

	1	2	3	4	5
酒石酸 K. Na (ml)	0.05	0.10	0.30	0.50	0.70
銅試液 (ml)	0.03	0.06	0.20	0.33	0.46
吸光度	0.06	0.07	0.32	0.45	0.45

この結果によれば呈色反応が十分に行なわれるため

には、DHA—Na 50mg に対して、酒石酸カリウムナトリウム試液 0.5ml, 強酢酸第二銅試液 0.33ml を用いるのが最も適当であると認められる。

III-4 本試験法による反応の鋭敏度

上記のとおり DHA の使用基準として、法的に定められている使用量は、チーズ、バター、マーガリンでは、それぞれ 1kg 中 0.5g 以下、あん類では、1kg 中 0.2g 以下でなければならないと規定されている。実際市販の食品中にはその最高量に近い量が添加されている場合が多いものと推定すれば、食品中からの抽出操作中におけるロスを考慮に入れたとしても、市販食品中からの DHA の試験法として、衛生上の安全性という立場からの実用的なものとしては、要求される鋭敏度はあまり高くないものであるといえることができると思われる。本定量法が鋭敏度においてこの実用法としての目的に適するか否かをみるために、その鋭敏度を測定したところ Table 5 のとおりである。

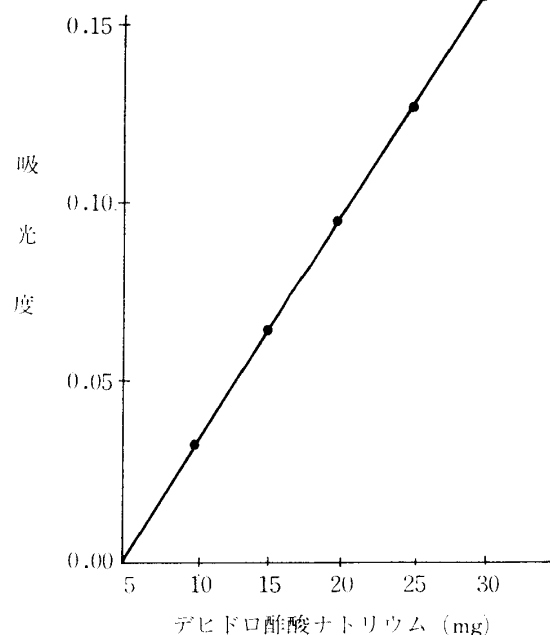
Table 5

	1	2	3	4	5	6
DHA-Na (mg)	0	0.1	0.5	1.0	5	10
透過率	100	99.9	99.8	99.6	95.0	87.7

上の表から本法は一般市販食品中の DHA の定量法として十分使用できるものと思われる。

III-5 検量線

Fig. 2 検量線



上記の各条件を考慮に入れて操作を行ない DHA の各含量毎の呈色クロロホルムについて、 $640\text{m}\mu$ における吸光度を測定することにより検量線を作製すれば Fig. 2 のとおりとなり、DHA の量において 5mg から 30mg の間においては直線関係となり、Beer の法則に従うことがわかる。

Ⅲ—6 反応防害物質

同一食品に食品添加物として化学的合成品が数種類同時に添加されることはあり得ることである。従って DHA の試験の際その抽出操作中において、DHA と他の化学的合成品が同時に混合されて抽出される場合もあり得るわけである。そこで DHA と同時に使用される可能性があると思われる食品添加物が共存した場合、この試験法の測定値に影響が現れるかどうかをみるため次の実験を行なった。DHA—Na を含む検液に対しソルビン酸、パラオキシン安息香酸のエチル、ブチル、プロピルの各エステル、サッカリン、サリチル酸をそれぞれ 10mg ずつ添加して発色せしめ、クロロホルム層の吸光度を測定したところ、ソルビン酸、サリチル酸およびサッカリンは反応を防害しないものと思われるが、安息香酸とパラオキシン安息香酸のエステル類はある程度反応を防害するものと思われる。

Ⅳ 総 括

上記の各実験の結果を総合して考察すれば、本法は DHA の新定量法として適当なものと認められるので、次のように試験法を設定した。

試 液

(1) 酒石酸カリウムナトリウム試液

酒石酸カリウムナトリウム 14.1g を水 100ml に溶かす

(2) 強酢酸第二銅試液

酢酸第二銅 13.3g に酢酸 5ml および水 195ml を加え

て溶かす

試験操作

水溶液とした試料 3ml を共栓試験管又は共栓小三角フラスコにとり、蒸留水 3ml 、酒石酸カリウムナトリウム試液 0.5ml 、強酢酸第二銅試液 0.3ml を加えよくふり混ぜ、帯白紫色の沈殿を生じたものを、沸騰水浴中で 5 分間加熱し、冷後これにクロロホルム 12ml およびエタノール 3ml を加えよくふり混ぜて沈殿を溶かし、青色に着色したクロロホルム層を分光光度計用のセルにとり、空試験で得たクロロホルム層を対照として、 $640\text{m}\mu$ における吸光度を測定する。別に DHA 純品を用い各濃度の水溶液を数種類作り、上記のとおり操作して、クロロホルム層をとって、 $640\text{m}\mu$ における吸光度を測定し検量線を作っておき、これにあてはめて DHA の量を求め、検体中の DHA の含量を算出する。

考 察

本法は操作簡単であり、呈色が安定である点および DHA の法定使用基準の量からみた場合その鋭敏度が十分である点などからみて、市販食品の検査にあたり、多数の検体を短時間に処理しなければならない場合などに、十分実用に供し得るものと思われる。

参 考 文 献

- 1) Collie et al.; J. Chem. Soc. **65** 259
- 2) 川城巖, 他; 衛生試報 **70**, 41
- 3) 佐々木清司; 食衛誌 **10**, 6, 365
- 4) Methods of Analysis of the A. O. A. C. (1970)
- 5) 川城巖, 他; 衛生試報 **72**, 163
- 6) 中村幸男; 食衛誌 **6**, 2, 148
- 7) C. F. Bruening; J. A. O. A. C. **36**, 83
- 8) 川城巖, 他; 衛生試報, **72**, 163
- 9) 岩原滋利, 他; 食衛誌, **6**, 6, 502
- 10) 第二版食品添加物公定書