報　文

清酒中の安息香酸の分析

北田善三*・蓮池秋一*・佐々木美智子*・谷川　薫*

Analysis of Benzoic Acid in Sake

Yoshimi KITADA*, Shuichi HASUIKE*, Michiko SASAKI* and Kaoru TANIGAWA*

* *Nara Prefectural Institute of Public Health, 57-6, Ohmori-cho, Nara-shi, Nara*

Benzoic acid was detected by ten ppb level in sake and identified using a gas chromatograph-mass spectrometer. A method for measuring the benzoic acid content of sake and raw materials was investigated. This method was based on liquid-liquid extraction with ether, cleaning up by silica gel column chromatography and gas chromatographic analysis with Thermon 1000-H_3PO_4 (5+0.5%) glass column. The origin of benzoic acid in sake was investigated through the manufacturing process. It was suggested that the greater amount of benzoic acid came from polished rice as raw material, but a small part of benzoic acid might be produced by microbe in koji and moromi. Benzoic acid in whole rice extremely decreased in proportion to the increase of polishing of rice and the decrease of crude lipid.

(Received Jun. 25, 1981)

食品添加物の合成保存料の一つである安息香酸 (BA) は，食品中に広く分布している。すなわち，発酵乳に 5～20 ppm[1]，脱脂粉乳に 1～60 ppm[2]，チーズに 1.6～40.6 ppm[3]，みそに 0.35～11.6 ppm，しょう油に 4.30 ppm，大豆に 0.81～2.00 ppm,，米に 0.3 ppm[4]それぞれ含まれている。著者らも食品中の BA の分布を調べていく過程で，清酒に BA の含有を認めた。清酒から BA を検出した報告はまだない。そこで，清酒中の BA をガスクロマトグラフィー-マススペクトル(GC-MS)で同定し，分析法を検討し，BA 含量を調査するとともに，その由来についても，原料および製造過程での生成の両方について検討した。また，米中の BA についても若干の知見を得たので報告する。なお，食品中に分布する BA として，従来より遊離型の BA を対象としており，今回，著者らも金属塩を含めた遊離型BA を調査対象とした。

実験方法

1. 試料

試料として，清酒およびその中間製品ならびに原料の米と種麹を用いた。原料米は一般米として奈良県産の秋津穂を，酒造好適米として兵庫県産の山田錦を用いた。

2. 装置

ホモジナイザー：(株)日本精機製作所製 AM-7 型

ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製 GC-4 CM 型 (FID 検出器付)

ガスクロマトグラフィー質量分析装置：(株)島津製作所製 7000 型および 6020 型 (SCAP 1123 データ処理機付)

3. GC 条件

カラム：Thermon 1000-H_3PO_4 (5+0.5%) Chromosorb W (AW/DMCS) 60～80 メッシュ，3 mm×2 m ガラス製，カラム温度：210℃，注入口温度：250℃，キャリヤーガス (N_2) 流速：50 ml/min, Sensitivity：10^2 MΩ, Range：0.01V，注入量：4 μl

4. GC-MS 条件

(1) 原料米抽出物の場合

* 奈良県衛生研究所 (〒630 奈良市大森町 57-6)

装置: 7000 型, カラム: DEGS-H_3PO_4 (2+0.5%) Chromosorb W (AW/DMCS), 80～100 メッシュ, 3 mm×3 m ガラス製, カラム温度: 170℃. 注入口温度: 250℃, セパレーター温度: 270℃, キャリヤーガス(He) 流速: 30 ml/min, イオン化エネルギー: 20/70 eV, イオン化電流: 60 μA

(2) 清酒抽出物の場合

装置: 6020 型, カラム: Thermon 1000-H_3PO_4 (5+0.5%) Chromosorb W (AW/DMCS), 80～100 メッシュ, 2 mm×2 m ガラス製, カラム温度: 180℃, 注入口温度: 250℃, セパレーター温度: 300℃, キャリヤーガス (He) 流速: 25 ml/min, イオン化エネルギー: 20/70 eV, イオン化電流: 60 μA

5. BA の分析方法

試料をホモジナイザーカップにとり, 必要に応じ等量～2倍量の水を加え, ホモジナイザーで均質化したのち, ホモジネートを 10% 塩酸で酸性とし, ホモジネートと同量のエーテルで3回抽出, 各回に遠心分離を行なった。集めたエーテル層を1%炭酸水素ナトリウム溶液で3回抽出, 中性脂肪や長鎖の脂肪酸を除いた。水層は10%塩酸で酸性とし, 食塩を飽和したのち, エーテルで3回抽出, 集めたエーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水, 減圧下エーテルを留去した。次に, 残渣を 2～3 ml のベンゼンに溶解し, シリカゲルカラム (15 mm×30 cm に 15 g のヤトロン社製, イヤトロビーズ 6 RS 80100 をベンゼンで充てん) に通し, ベンゼン 100 ml で洗浄したのち, ベンゼン-メタノール (95/5) で溶出, 最初の 80 ml を捨て, 次の 40 ml をとった。このフラクションを減圧下溶媒留去し, アセトンに溶解, これを試験溶液とした。定量は GC で行なった。この方法による定量限界は 0.01 ppm であった。

6. 清酒における BA の由来の検討

清酒原料としての米, 種麹および清酒製造行程での中間物質中の BA 量を調べることにより, 清酒中の BA の由来を検討した。また, 一般米の場合,「ふくれ」から「休」および「留」から「留後10日目」にかけて, 多少の BA の増加傾向がみられたことから, 製造中の新たな生成も考えられるため,「酛」と「添」を用い, BA 量の変化を調べた。なお,「酛」では最初の6日間を 12℃, その後 15℃ で,「添」では最初の4日間を 12℃, その後 15℃ でそれぞれ発酵させた。

実験結果および考察

1. BA の分析方法

食品中の BA 抽出法として, 衛生試験法[5]は, 水蒸気蒸留法と溶媒抽出法を定めているが, 水蒸気蒸留法では金属塩を含めた遊離型 BA の他に, 結合型 BA も同時に測定されることが知られている[6]。今回, 著者らは遊離型 BA の測定を目的とし, 溶媒抽出法を用いた。また, 今回対象とした試料中の BA は微量であり, 定量に際し, 数十～数百倍の濃縮が必要となる。しかし, 濃縮に伴ない, 共存成分による GC での妨害も大きくなる。そこで, 試料からの抽出物の精製法を検討した。精製法としては, ポリアミドカラム[7], イオン交換樹脂カラム[1], シリカゲルカラム[8][9], フロリジルカラム[8]等がある。著者らは, シリカゲルカラムを用い, ベンゼン-メタノール(95/5)を溶離液として, 妨害物質の除去を行なった。図1に「留後10日目」を用いたカラムの精製効果を示した。

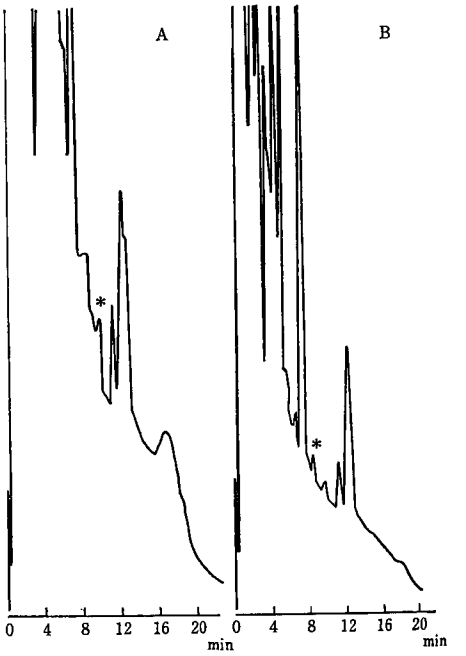

図 1　シリカゲルカラムを用いたもろみの精製効果
*: 安息香酸　A: 精製前　B: 精製後

GC カラムは, DEGS-H_3PO_4 (5+1%) を用いた時, 清酒製造中に生成するコハク酸モノエチルのピークが BA のピークと重なる。そこで, Thermon 1000-H_3PO_4 (5+0.5%) を用いたところ, この問題は解決した。この方法で, 清酒および麹に 0.5 μg/g 濃度となるように BA を添加して回収率を求めたところ, それぞれ 98.8 と 98.4% であった。

2. 原料米および清酒中の BA の同定

米および清酒抽出物中の BA を GC-MS で同定した。結果を図2および図3に示した。米では，分子イオンピーク m/z 122 のほか，M^+-OH m/z 105，M^+-COOH の m/z 77 の代表的なフラグメントピークが得られ，BA が確認された。清酒では，共存成分によるバックグランウンド値があまりにも大きいため，マスクロマトグラフィーを検討した。すなわち，BA の分子イオンピーク m/z 122，m/z 105，m/z 77 の各フラグメントピークに着目し，マスクロマトグラムを求めたところ，BA が確認された。

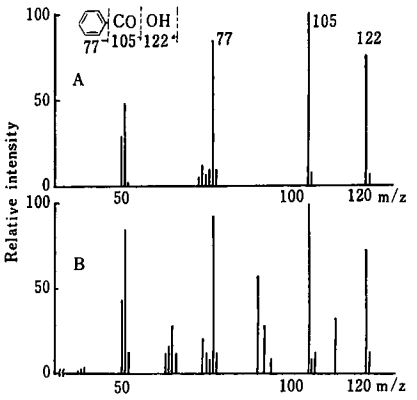

図 2　GC-MS による米抽出物中の安息香酸の同定
A: 安息香酸標準品　B: 米抽出物

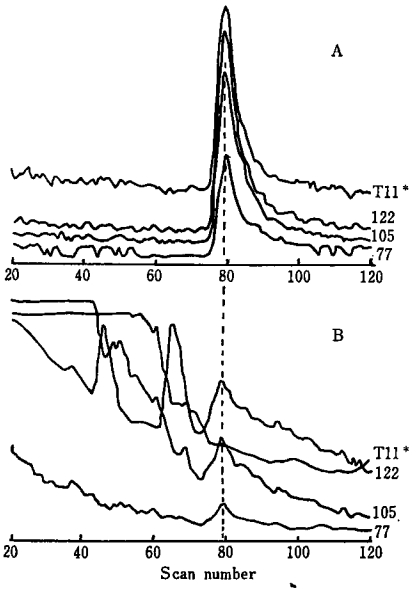

図 3　GC-マスクロマトグラフィーによる清酒抽出物中の安息香酸の同定
A: 安息香酸標準品　B: 清酒抽出物　*: 総イオン強度

3. 清酒中の BA 量

市販清酒5点について測定したところ，0.02 ppm が1件，0.01 ppm が2件，0.01 ppm 未満が2件であった。

4. 清酒中の BA の由来

原料中の BA 量を表1に，製造行程での BA 量の変化および単位米重量当りに換算した BA 量の変化を図4に示した。その結果，各行程について，原料配合割合よりその行程での米の重量を求め，米重量単位当りに換算したときの BA 量を比較したとき，大部分が原料の米に由来していることがうかがえる。しかし，一般米の「ふくれ」から「休」および「留」から「留後 10 日目」にかけてみられた増加傾向を追試したところ，図5に示したように「酛」を用いた実験で BA の緩やかな増加がみられた。また，表1で種麹が異状に高い値を示したため，当所で一般家庭用米を用い，これに 1/500 の麹菌を均一に混合し，種麹を作製したところ，3週間で 6.5 倍の BA が検出された。しかし，種麹の使用量は精白米に比べ極端に少なく，種麹からの由来は問題にならなかっ

表 1　原料中に含まれる安息香酸

(μg/g)

	秋津穂	山田錦
玄　米	0.72	0.61
精白米*	0.10	0.09
種　麹	8.84	

* 精米歩合: 秋津穂 72%，山田錦 70%

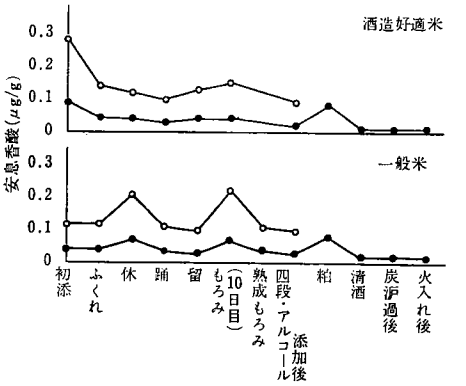

図 4　製造行程中の安息香酸の変化
●—●: 実測値　○—○: 米重量単位当りに換算した値

表 2　米の精白度に伴なう安息香酸量および粗脂肪の変化

精白歩合 (%)	乾燥減量 (%)	安息香酸 (μg/g)	乾物当り		玄米を100とした時	
			安息香酸 (μg/g)	粗脂肪 (%)	安息香酸の割合	粗脂肪の割合
玄　米	12.9	0.71	0.82	1.94	100	100
90	14.9	0.46	0.54	0.54	65.9	27.8
85	14.6	0.24	0.28	0.19	34.1	9.8
80	14.3	0.11	0.13	0.10	15.9	5.2
75	14.2	0.06	0.07	0.07	8.5	3.6
72	13.8	0.05	0.06	0.03	7.3	1.5

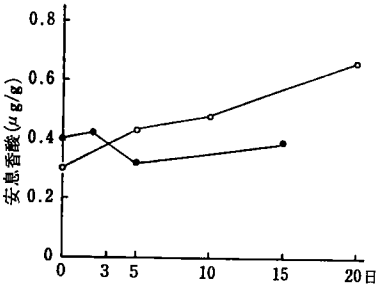

図 5　酛および添中の安息香酸量の変化
○—○: 酛　●—●: 添

た。以上2つの実験より，その量はわずかであるが，製造過程での微生物によると思われる新たな産生も考えられるため，現在さらに検討中である。なお，BA の微生物による産生としては，脱脂粉乳中，乳酸菌による報告[2] 等がある。

5.　米中の BA

酒造りには，一般に 70～75%歩留りの精白米が用いられる。その理由の1つとして，酒造上好ましくない脂肪の除去があげられる。ここで，BA は脂肪と同じように玄米の表層に分布していると考えた場合，精白により粗脂肪とともに BA も急激に減少すると思われる。今回，一般米の秋津穂を用い，精白度に伴なう BA および粗脂肪の変化を調べた。その結果，表2に示したように，BA と粗脂肪はほぼ同じ挙動を示し，72% 精白米中の BA は玄米の 7～8% になっていた。このことから，BA が粗脂肪と同様に玄米粒の表層に存在することを認めた。なお，粗脂肪および乾燥減量の測定はそれぞれ衛生試験法[10)11)]によった。

要　　約

清酒中に 10 ppb 前後の BA が含まれることを確認した。その大部分が原料の精白米に由来していることがうかがえた。しかし，一部製造中の生成の可能性もあるため，現在検討中である。また，米中の BA を調べたところ，精白により極端に減少し，これは粗脂肪の減少とよく一致した。

終りに，GC-MS 分析に協力いただいた(株)島津製作所大西氏，清酒試料の提供をいただいた(株)今西清兵衛商店今西氏，貴重な助言をいただいた奈良文化女子短大奥井氏ならびに奈良県工業試験所食品課の方々に深謝いたします。

文　　献

1)　西本孝男・上田雅彦・田植　栄:　食衛誌，**9**, 60 (1968).
2)　西本孝男・上田雅彦・田植　栄: 食衛誌，**10**, 410 (1969).
3)　栗橋純一・笹子謙治・津郷友吉・山内邦男: 食衛誌，**14**, 25 (1973).
4)　西島基弘・冠　政光・高橋尙子・上村　尙・中里光男・渡利優子・木村康夫:　東京衛生研究所年報，**26-1**, 187 (1975).
5)　日本薬学会編:　衛生試験法注解，(金原出版，東京)，p. 298 (1980).
6)　小川俊次郎・鈴木英世・外海泰秀・伊藤誉志男・慶田雅洋: 食衛誌，**21**, 301 (1980).
7)　NAGASAWA, K. and YOSHIDOME, H.: *J. Chromatogr.*, **43**, 463 (1969).
8)　KATZ, S. and BURTIS, C.A.: *J. Chromatogr.*, **40**, 270 (1969).
9)　児玉雅信・別所康守・久保　進: 日食工誌，**22**, 228 (1975).
10)　日本薬学会編:　衛生試験法注解，(金原出版，東京)，p. 177 (1980).
11)　日本薬学会編:　衛生試験法注解 (金原出版，東京)，p. 139 (1980).

(昭和56年6月25日受理)