

## 市販キットを用いた加工食品中の ソルビットの測定について

長 律子<sup>1</sup>・江崎 好美<sup>1</sup>・藤本 喬<sup>2</sup>

### Study on D-Sorbit in Processed Food By Commercial Enzymatic Analytical Kit.

Ritsuko CHO, Yoshimi ESAKI and Takashi FUJIMOTO

#### 要 旨

市販の酵素法用キットを用いたソルビットの分析法を検討し、加工食品 925 件での使用実態の調査を行った。測定にはベーリンガー・マンハイム株式会社製の F-キット D-ソルビトール/キシリトールを用いた。また、試験溶液としてサッカリンナトリウムなどの他の甘味料の測定で調製している抽出液（カルツ処理液）を利用することで検査時間を大幅に削減することができた。

カルツ処理液をそのまま測定に使用すると濁りが生じて測定できなかったため、50倍に希釈して使用することにした。また、測定に影響を及ぼすと思われる酵素反応条件及び還元物質について検討を行った。反応条件は、室温で30分間が適当であった。還元物質として、SO<sub>2</sub>、アスコルビン酸、エリソルビン酸について検討を行った結果、SO<sub>2</sub>は 2 g/kg（試料換算）でも測定に全く影響はなかったが、アスコルビン酸やエリソルビン酸は 2.5 g/kg（試料換算）以上含まれると E<sub>1</sub> を測定する段階で発色したため、このような場合にはアルカリ・過酸化水素処理を行なうこととした。検量線は 2 ~ 30 μg/キュベットの範囲で直線性を示し、添加回収率は 90.5 % ~ 103.1 %、検出下限は検体換算すると 0.1 % であった。この方法を加工食品に適用したところ、様々な食品から幅広い濃度でソルビットが検出され、多様な使用実態が明らかになった。

Key Words : D-ソルビット D-Sorbit, 酵素法 enzymatic analysis method  
加工食品 processed food, 市販キット commercial kit

#### I はじめに

近年、健康への意識の高まりや、甘さを控えようとする傾向から、砂糖に代わって様々な甘味料が使用されている。ソルビットはそうした甘味料の一種であり、ショ糖の約 6 割の緩和な甘味を持つ糖アルコールである。また甘味料としてだけではなく、食品の保湿やタンパク質の変性防止等、ソルビットの保湿性や安定性を活かした様々な目的で、多岐にわたる食品に用いられている<sup>1)</sup>。

ソルビットの定量法にはガスクロマトグラフィー法と酵素法が「食品中の食品添加物分析法」で定められているが<sup>2)</sup>、前者はアセチル化の操作があるため煩雑で時間もかかる。一方、酵素法は特別な分析機器や有機溶媒を用いることがなく、簡便でクリーンな分析法であり、多

数の試料を同時に測定することができる。また、サッカリンナトリウムなどの他の甘味料測定用に調製している溶液を用いることで、効率的な検査が期待される。

そこで今回、市販キットによるソルビット測定法の検討を行い、この方法を用いて加工食品におけるソルビットの使用実態を調査したところ若干の知見が得られたので報告する。

#### II 実験方法

##### 1. 試薬及び機器

分光光度計：島津製作所（株）UV-240

ソルビット標準品：東和化成工業（株）

市販キット：ベーリンガー・マンハイム（株）F-キット D-ソルビトール/キシリトール（No 670057）

キットの内容は次のとおりである。

溶液 I：緩衝液

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

2. 福岡市教育委員会学校給食センター

溶液Ⅱ：補酵素溶液

溶液Ⅲ：発色基質溶液

溶液Ⅳ：ソルビット脱水素酵素溶液

溶液の調製は説明書<sup>3)</sup>どおりに調製した。

その他の試薬は、全て市販特級を用いた。

## 2. 試料

平成7年4月から平成9年2月にかけて当試験所に検査依頼のあった福岡市内に流通する加工食品925件を試料として検査に供した。

## 3. 試験溶液の調製

フードカッターで細切した試料20gを精秤し、精製水を約150mlに加え30%炭酸ナトリウムを用いて弱アルカリ性にした。一夜放置後、固形物を取り除き、15%フェロシアン化カリウム、30%硫酸亜鉛を各5mlに加え混合後、精製水で全量を200mlとした。15分間放置後ろ紙(No5A)でろ過し、ろ液(この溶液をカルツ処理液とする)を50倍希釈したものを試験溶液とした。

## 4. 測定法

10mlスピッツ管に試験溶液1.0ml、精製水1.0ml、溶液Ⅰ0.6ml、溶液Ⅱ0.2ml、及び溶液Ⅲ0.2mlを加え混合し5分間放置後、光路幅1cmのキュベットに移し波長492nmで吸光度( $E_1$ )を測定した。

溶液を先に使用したスピッツ管に戻し、溶液Ⅳ0.05mlを加え混合し室温で30分間放置後、先に使用したキュベットに移し同波長で吸光度( $E_2$ )を測定した。ブランクは試験溶液の代わりに精製水1.0mlを用いて同様に操作した。なお、 $E_1$ を測定する段階で発色した場合は、アルカリ・過酸化水素処理を行った後に測定し直した。

吸光度測定後、以下の式により $\Delta E$ を計算し、同時に測定した標準液から作成した検量線より濃度を求めた。検量線の範囲を超えたものについては試験溶液をさらに希釈して測定した。

$$\Delta E = (E_2 - E_1) \text{ 試料} - (E_2 - E_1) \text{ ブランク}$$

## 5. アルカリ・過酸化水素処理<sup>3)</sup>

カルツ処理液1mlを50ml比色管にとり、約30mlの精製水を加え、2mol/L水酸化カリウム溶液、0.3%過酸化水素水それぞれ1mlを加え、約70℃(水浴)で10分間放置した。1mol/L硫酸溶液でpHを7~8に調製した後、室温に戻し全量を精製水で50mlにし、試験溶液とした。

## Ⅲ 結果及び考察

### 1. 測定条件の検討

#### 1) カルツ処理液の使用について

サッカリンナトリウムなどの他の甘味料の測定用に調製しているカルツ処理液をそのまま測定に用いると、溶液Ⅰを加えた段階で白濁を生じ吸光度が高くなる傾向があった。

そこでまず、カルツ処理液を段階的に希釈した溶液を用いて、溶液Ⅰを加えた段階での白濁の状況を目視により確認した。カルツ処理液をそれぞれ1, 2, 5, 10, 25, 50倍希釈した溶液に溶液Ⅰを加えたところ、10倍以上希釈した溶液では白濁はみられなかった。

次に、10, 25, 50倍希釈した溶液について添加回収実験を行ったところ、全ての希釈溶液で回収率は100±1%と良好な結果が得られた。

以上の結果より、10倍以上希釈することでカルツ試薬の影響はなくなると思われたが、さらに危険率を加味して50倍希釈して試験溶液とし、測定を行うことにした。

#### 2) 酵素反応を行う条件

酵素反応は、反応温度によって平衡に達するのに要する時間と平衡状態を維持している期間が変わってくるため、反応温度の設定は重要である。キットによる測定のなかで主要な酵素反応は溶液Ⅳを加えた後に行われることから、溶液Ⅳを加えた後の反応条件について検討した。

ソルビット10ppm, 20ppm溶液各1mlを用いて、溶液Ⅳを加えた後、13℃, 30℃(水浴), 50℃(水浴)で反応させ、15分間ごとに $E_2$ を測定した。結果を図1に示す。

13℃及び30℃(水浴)での $\Delta E$ の経時変化には、ソルビットの濃度による違いはみられなかった。13℃では、30分後に反応は平衡に達し、60分までは平衡状態を維持していた。30℃(水浴)では、15分後に反応はほぼ平衡に達していた。 $\Delta E$ は、30分以降は徐々に下降したものの、60分まで比較的安定していた。しかし、50℃(水浴)では、ソルビットの濃度によって $\Delta E$ の経時変化が異なり、両濃度に共通した平衡状態の期間がみられなかった。また、高温のため酵素活性が落ちたのか、他の温度条件に比較して $\Delta E$ は低い値しか得られなかった。よって、正確な測定は困難であると考えられた。

以上の結果より、安定な測定値を得るには13℃から30℃の間の温度が適切であると考えられた。そこで温度は室温で充分であると判断し、溶液Ⅳ添加後の反応は室温で30分間行うこととした。また、冬場の室温が13℃を下回る場合には、加温することにした。

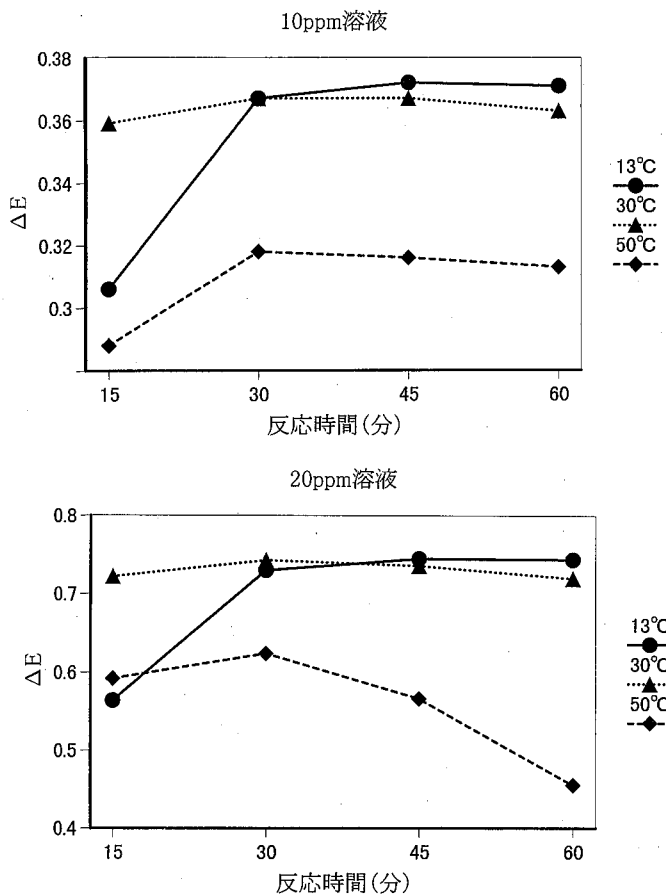


図1 反応温度の違いによる $\Delta E$ の経時変化

### 3) 還元物質の影響

キットの発色基質は還元物質と反応し、 $E_1$ を測定する段階で発色することがあるため、食品中に還元物質が含まれる場合は測定誤差の要因となる<sup>3)</sup>。測定に使用する試験溶液はかなり希釈されているものの、 $SO_2$ やアスコルビン酸のように食品添加物として多量に含まれる場合には測定への影響が心配された。そこで、 $SO_2$ 、アスコルビン酸、エリソルビン酸の測定への影響を確認した。

$SO_2$ に関しては、食品中に含有される可能性のある0.025～2.0 g/kg (試料換算)の濃度範囲で試験溶液を調製し測定を行った。 $E_1$ 、 $E_2$ を2分間ごとに測定し、それぞれの吸光度と吸光度の経時変化を、ブランクの値と比較した。その結果、 $SO_2$ を含有していても、 $E_1$ 、 $E_2$ の値及び経時変化はブランクと大差なく、 $SO_2$ は2.0 g/kg (試料換算)という高濃度でも、測定に影響を与えないことが確認された。

アスコルビン酸、エリソルビン酸についても $SO_2$ と同様0.1～10 g/kg (試料換算)の濃度範囲で試験溶液を調製し、測定を行った。その結果、アスコルビン酸、エリソルビン酸ともに2.5 g/kg (試料換算)以上の濃度になると、 $E_1$ を測定する段階で発色し、測定に影響を与える可能性が考えられた。

そこで、このような還元物質による影響を除去するため、アルカリ・過酸化水素処理を試みた。あらかじめアルカリ・過酸化水素処理を行ったアスコルビン酸又はエリソルビン酸20 ppm溶液 (試料換算すると10 g/kg) 1 mlにソルビット2 ppm, 10 ppm, 20 ppm溶液各1 mlを添加し回収率を調べた。結果を表1に示す。

アルカリ・過酸化水素処理を行うことで、アスコルビン酸、エリソルビン酸ともに $E_1$ を測定する段階での発色をおさえることができた。また、全てのソルビット濃度で回収率は90%以上と良好であった。よって、 $E_1$ を測定する段階で発色した場合には、カルツ処理液をアルカリ・過酸化水素処理した後に測定することにした。

表1 アルカリ・過酸化水素処理を行ったアスコルビン酸、エリソルビン酸溶液での添加回収率

(n = 3)		
ソルビット添加量 ( $\mu$ g/キューベット)	回収率 (%)	
	アスコルビン酸	エリソルビン酸
2	91.3	92.7
10	99.0	98.7
20	99.6	99.5

## 2. 添加回収実験

試験溶液にソルビット溶液を添加し、添加回収実験を行った。試料には魚介類加工品、食肉製品、漬物、麺類、調味料、果実加工品等16件を用い、各試験溶液に5～20 ppmのソルビット溶液1 mlを添加し、回収率を調べた。

その結果、回収率は90.5%～103.1%と全ての試料でおおむね良好であり、試験溶液中に共存すると思われる還元物質その他の様々な物質もキットによる測定に影響を及ぼさないことが確認された。

## 3. 検量線および検出下限

0.3, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ppmのソルビット溶液各1 mlを用いて測定法に従って検量線を作成したところ、2～30  $\mu$ g/キューベットの範囲でソルビット濃度と $\Delta E$ の関係は良好な直線性を示した。なお、0.3～1  $\mu$ g/キューベットでは $\Delta E$ がブランクの $E_2 - E_1$ よりも低くなったため定量圏外と判断した。検量線を図2に示す。これらの濃度は検体換算すると0.1～1.5%となる。よってこの測定法の検出下限は0.1%とした。

## 4. 加工食品の検査結果

加工食品925件を検査し、次のような結果を得た。食品ごとの検出状況を表2に示す。

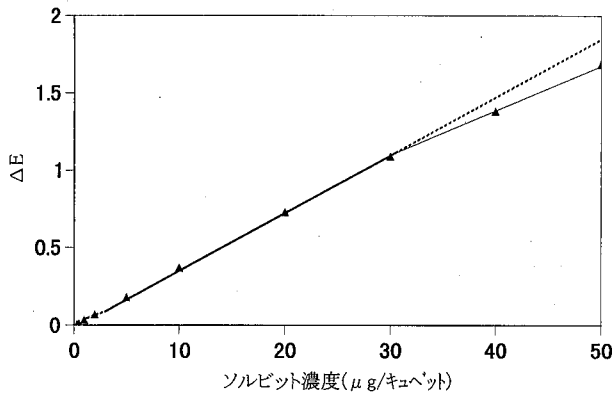


図2 ソルビットの検量線

魚介類加工品では全般的に高い検出率が窺えた。乾製品では検出濃度が全て1%以上であり、特にさきいか、イカの薫製品は10件検査したうち全ての検体から検出され、平均検出濃度は約5%と高濃度であった。これらの製品では、甘味を与えるだけでなく、浸透圧を高めることで、旨味成分の浸透を促進したり、また、ソルビットは砂糖と異なり褐変反応を起こさない<sup>1)</sup>といった効果を期待して使用されていると考えられた。みりん干しか

らは0.1~2%台の濃度で検出されたが、同じ干物でも一夜干しからは全く検出されなかった。魚肉練り製品では大部分の製品から1%前後の濃度で検出された。ソルビットは、魚肉タンパク質の冷凍変性防止の目的で魚肉練り製品の主原料である冷凍すり身に加えられることがあるため<sup>1)</sup>、検出率が80%以上と高かったものと思われた。その他魚介類加工品からも、全体的に高い使用頻度が窺えた。塩辛や珍味では5%以上の高い検出濃度を示す製品があったが、旨味の付与だけではなく製品のつや出しや保湿の効果も狙って、使用量もやや多くなっているのではないかと考えられた。

食肉製品や乳製品はソルビットの特徴から考えて使用の可能性があったと思われたが、他の食品に比べると検出率が低かった。検出された検体は食肉製品がソーセージ類から、乳製品はアイスクリームからであった。

麺類では生麺、ゆで麺、餃子の皮について検査し、およそ3分の1の製品から検出された。ゆで麺からは検出されなかった。ソルビット単独の使用より、同様の保湿効果を持つプロピレングリコールとの併用が多くみられた。

野菜漬物では1%以下の比較的低濃度の検体が多かった。また、サッカリンナトリウムやステビアなどの他の

表2 加工食品におけるソルビットの検出状況

	件数	検出数	検出率 (%)	濃度 (%) ランクごとの検体数															
				20	15	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0.5	0.3	≥0.1	
魚介類	魚介類乾製品	24	14	58			1	1		2	1	1		3	3	2			
	みりん干し	18	12	67										3	1	2	3	3	
	一夜干し	11	0	0															
加工品	魚肉練り製品	87	72	81									1		8	24	18	10	11
	辛子明太子・たらこ	112	44	39									1	4	8	12	8	2	9
	その他魚介類加工品	52	29	56			1		2		2	1	2	2	2	8	2	6	1
食肉製品	29	3	10														2		1
乳・乳製品	78	3	4							1	1						1		
穀類	麺類	36	13	36												2	4	2	5
	生ふ	5	0	0															
野菜	野菜漬物	139	29	17				1		3			2	1	4	7	3	8	
	野菜缶, 瓶詰	2	0	0															
豆類	豆腐類	11	0	0															
	煮豆	12	8	67	1		1			2				1	2			1	
佃煮	18	15	83	1	2	2		3	1			2	1	2					
惣菜	72	17	24				1	1	1	3		2	1	1	2	2	2	1	
味噌・醤油・ソース類	67	0	0																
菓子	和菓子	34	11	32									1		2	3	1		4
	洋菓子	36	11	31										1		1	1	3	5
清涼飲料水	39	2	5															2	
果実加工品	栗甘露煮	3	2	67										1	1				
	ジャム	21	3	14							1			1				1	
	果実缶詰	8	4	60													1	2	1
	乾燥果実(ブルーベリー)	4	4	100			3	1											
乾燥果実(その他)	7	6	86			1										1		4	
計	925	302	33																

甘味料とともに検出されることが多かった。こうした背景には消費者の嗜好の多様性にあわせて様々な甘味料混合製剤が製造、使用されていることが考えられた。

煮豆、佃煮では検査した検体の7～8割から検出され、平均検出濃度も約8%と高濃度であった。なかには20%以上検出された製品もあり、ソルビット自体の上品な甘味の付与の他に、優れた保湿効果に起因する乾燥防止、でんぷんの老化防止作用などの効果を期待して多量に添加されていると思われた。惣菜では、昆布巻きのようなある程度の甘味と保存性を必要とするものからの検出が多くみられた。

味噌・醤油・ソース類からは全く検出されなかった。このような調味料にはステビアやグリチルリチンなどの高甘味度甘味料が使用されることが多いために低甘味度甘味料であるソルビットは使用されることがほとんどないと思われた。

菓子類では約3割の製品から検出され、検出濃度も低濃度のもが多かったが、これは本調査での検体の大部分が生菓子であったためであり、使用の可能性の高いガムやミント菓子などを検査すると検出率、検出濃度も高くなると考えられた。

清涼飲料水では100%リンゴジュース2件から検出された。乾燥果実では、ほとんどの検体から検出され、ブルーのように10%台の濃度で検出されたものもあった。リンゴやスモモは天然のソルビットを含むという報告があり<sup>1)</sup>、リンゴ(生菓)を測定したところ0.3%のソルビットが検出された。よってリンゴジュースから検出されたものは天然由来であると判断した。同様に、梨

(生菓)からも1.9%のソルビットが検出された。

ソルビットが2%以上検出されたマーマレード2件では、「甘さをおさえた」との表現がされていた。全く検出されないマーマレードも数件あったことから、検出されたものは天然由来のものではなく、添加されたものと考えられ、砂糖の代替としてのソルビットの使用状況が窺えた。

#### IV ま と め

市販のソルビット測定用酵素キットを使用して簡便且つ効率的にソルビットの測定を行うことができた。また試験溶液として他の甘味料を測定するのに調製した溶液を利用することで、前処理の効率化にもなった。この方法を加工食品に適用しソルビットの使用実態を調査したところ、様々な食品から幅広い濃度で検出されその使用目的も多岐にわたっていることが予想された。

なお、本研究の一部は第55回日本公衆衛生学会総会(1996, 大阪府)で発表した。

#### 参 考 文 献

- 1) 早川幸男編著: 糖アルコールの新知識, 126～145, 食品化学新聞社(東京), 1996
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課編: 食品中の食品添加物分析法, 196～202, 1989
- 3) ベーリンガー・マンハイム(株): F-キット(No. 670057)説明書, 1993