

## 6 愛がん動物用飼料中のソルビン酸の液体クロマトグラフによる定量法

矢野 愛子\*

### Determination of Sorbic Acid in Pet Foods by LC

Aiko YANO\*

(Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center)

An analytical method for sorbic acid in pet foods using liquid chromatography (LC) was developed. Sorbic acid was extracted from the sample with methanol. The extract was diluted and subjected to LC for determination of sorbic acid. The LC separation was carried out on an ODS column (L-column L-C18, 4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm (Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan(CERI))) using 5 mmol/L citrate solution-acetonitrile-methanol (7:2:1) as a mobile phase. A recovery test was conducted using five kinds of pet foods (complete and balanced semi-dry type for adult dogs, complete and balanced dry type for adult dogs, that for adult cats, complete and balanced wet type for adult dogs and that for adult cats) spiked with 2,000 mg/kg (2,000 and 10 mg/kg for dry type for adult dogs and that for adult cats, 500 and 10 mg/kg for wet type for adult dogs and that for cats) of sorbic acid. The mean recoveries of sorbic acid were in the range of 92.6~99.4 % and the relative standard deviations (RSD) were within 3.0 %. A collaborative study was conducted at nine laboratories using complete and balanced semi-dry type for dogs, complete and balanced dry type for adult dogs and complete and balanced wet type for adult cats spiked with 1,000, 20 and 400 mg/kg of sorbic acid, respectively. The mean recovery of complete and balanced semi-dry type for dogs was 94.9 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat were 2.6 %, 4.6 % and 0.80, respectively. These values were 99.1 %, 0.8 %, 4.3 % and 0.42 for complete and balanced dry type for adult dogs and 92.5 %, 1.4 %, 2.7 % and 0.41 for complete and balanced wet type for adult cats, respectively.

Key words: additives ; sorbic acid ; pet food ; collaborative study

キーワード：添加物；ソルビン酸；愛がん動物用飼料；共同試験

### 1 緒 言

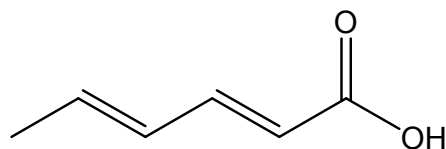
ソルビン酸はナナカマドの未熟な果実より発見された不飽和脂肪酸であり、カビ、酵母、好気性菌等の微生物に対して発育抑制作用を示す。加工食品の保存料としてソーセージ、かまぼこ、チーズなどに広く使用されており、食品中では使用基準<sup>1)</sup>も設定されている。しかし、国内では飼料及び愛がん動物用飼料での使用基準等は定められていない。

ソルビン酸の定量法としては、財団法人日本食品分析センターが、平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業において開発した方法<sup>2)</sup>（以下「分析センター法」という。）がある。

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

今回、この分析センター法を基に、愛がん動物用飼料等の検査法<sup>3)</sup>への適用の可否について検討した。その概要を報告する。

なお、ソルビン酸の構造式を Fig.1 に示した。



Sorbic acid

(2,4-Hexadienoic acid)

$C_6H_8O_2$  MW: 112.1

CAS No.: 110-44-1

Fig.1 Chemical structure of Sorbic acid

## 2 実験方法

### 2.1 試料

愛がん動物用飼料成犬用ドライ製品，成犬用セミドライ製品，成犬用ウェット製品，成猫用ドライ製品，成猫用ウェット製品を，ドライ製品及びセミドライ製品についてはそれぞれ 1 mm の網ふるいを通して粉砕し，ウェット製品はフードプロセッサーで粉砕して供試試料として用いた。それぞれに表示されていた原材料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Dry type for adult dogs	Grains (Corn, Wheat, Corn gluten feed, Wheat bran, Soybean meal, Corn gluten meal, Defatted rice bran), Meat(Chicken meal, Chicken extract, Breast meat powder, Beef powder), Vegetables ( Beet pulp, Spinach, Carrot, Pumpkin), Animal fat, Bean(Defatted soybean, Soybean extract), Fish(Fish meal, Dried fish), Roast linseed, Coloring agents (Titanium dioxide, Red-102, Red-106, Yellow-4, Yellow-5 Blue-1), Vitamins (A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , C, D, E, K, Choline, Niacin, Pantothenate, Biotin, Folic acid), Minerals (Cl, Co, Cu, Fe, I, K, Mn, Zn), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Semi-dry type for adult dogs	Grains (Corn, Wheat), Meat (Chicken meal, Breast meat powder), Sugar(High-fructose corn syrup, Oligosaccharide), Animal fat, Beer yeast, Vegetables ( Beet pulp, Spinach, Carrot, Pumpkin), Soybean meal, Herb, Dried small fish, Propyleneglycol, Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Minerals (Cl, Cu, I, K, Zn), Malic acid, Vitamins (A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , C, D, E, K, Choline, Pantothenate), Glucosamine hydrochloride, Coloring agents(Titanium dioxide, Red-106, Yellow-4, Yellow-5 Blue-1), Chondroitin sulfate, Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Wet type for adult dogs	Meat (Chicken), Vegetables, Vitamins (E, A, B <sub>1</sub> ), Minerals (K, Ca, Zn, S), Polysaccharide, Coloring agents (Titanium dioxide), pH regulator, Coloring agent (Sodium nitrite)
Dry type for adult cats	Grains, Plant protein extracts, Fish (Tuna, Salmon), Meat (Chicken, Chicken liver), Animal fat, Minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), Vitamins (A, D, E, K, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , Pantothenate, Niacin, B <sub>6</sub> , Folic acid, Biotin, B <sub>12</sub> , Choline, Taurine, C), Methionine, Coloring agents(Red-102, Red-106, Yellow-4, Yellow-5), Antioxidants (Mixed tocopherol)
Wet type for adult cats	Fish (Bonito, Tuna, Boiled fish paste, Crab extract), Starch, Oligosaccharide, Minerals, Vitamins, Monascus color, Carminic acid, Spice

## 2.2 試薬

### 1) ソルビン酸標準液

ソルビン酸標準品（関東化学製，純度 100.0 %）100 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてソルビン酸標準原液を調製した（この液 1 mL は，ソルビン酸として 1 mg ( $f=1.000$ ) を含有する．）．

使用に際して，標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中にソルビン酸として 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 及び 100  $\mu\text{g}$  を含有する各標準液を調製した．

### 2) 5 mmol/L クエン酸溶液

クエン酸一水和物 0.7 g とクエン酸三ナトリウム二水和物 0.6 g に水を加え溶かして 1,000 mL とした．

### 3) メタノール，アセトニトリルは液体クロマトグラフ用を用いた．その他，特記している以外の試薬は特級を用いた．

## 2.3 装置及び器具

### 1) 液体クロマトグラフ：Agilent Technologies 製 1100series

### 2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

### 3) 遠心分離機：久保田製作所製 5100

### 4) メンブランフィルター：東洋濾紙製 DISMIC-13HP（親水性 PTFE，孔径 0.45 $\mu\text{m}$ ，直径 13 mm）

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，メタノール 100 mL を加え，15 分間振り混ぜて抽出した．抽出液を 10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ，2,000  $\times$  g (3,800 rpm) で 10 分間遠心分離した．上澄み液の一定量をメタノールで正確に 10 倍希釈し，メンブランフィルター（孔径 0.45  $\mu\text{m}$  以下）でろ過し，液体クロマトグラフによる測定に供する試料溶液とした．

### 2) 液体クロマトグラフィー

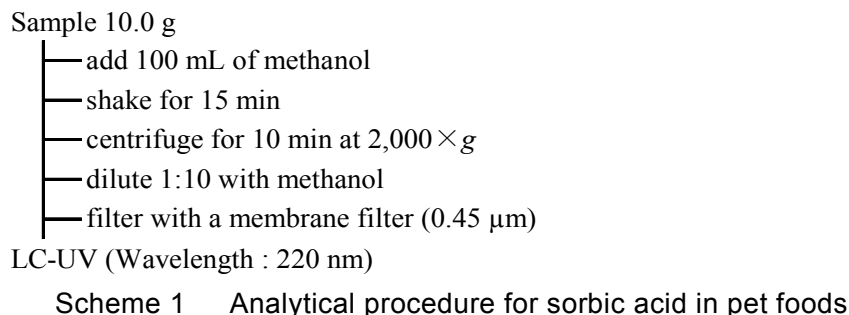
試料溶液及び各ソルビン酸標準液各 10  $\mu\text{L}$  を液体クロマトグラフに注入し，Table 2 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た．

### 3) 計算

得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し，試料中のソルビン酸量を算出した．なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した．

Table 2 Operating conditions of LC for sorbic acid

Column	CERI L-column L-C18 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ )
Mobile phase	5 mmol/L citrate solution-acetonitrile-methanol (7:2:1)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	UV detector (Wavelength: 220 nm)
Column temperature	40 $^{\circ}\text{C}$



### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 1)に従って調製した標準液各 10 μL を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。Fig. 2 に示したように、検量線はソルビン酸として 0.05~100 μg/mL (注入量として 0.5~1,000 ng) の範囲で直線性を示した。

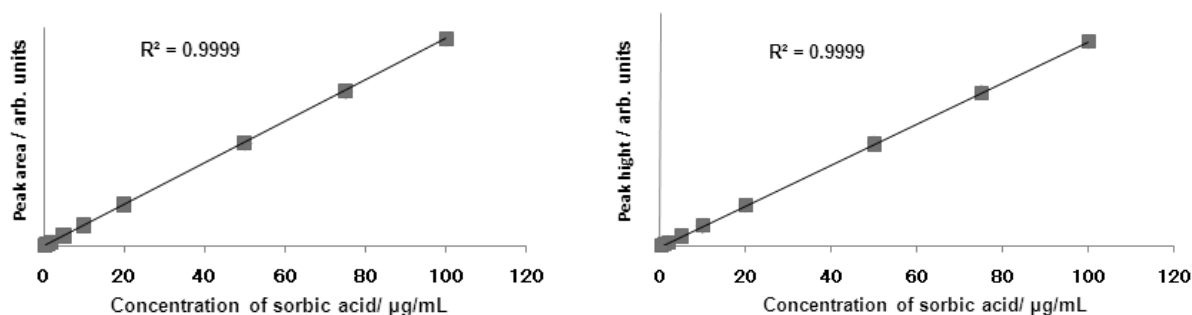


Fig. 2 Calibration curves of Sorbic acid by peak area (left) and peak height (right)

#### 3.2 抽出方法の検討

分析センター法ではホモジナイズ抽出と振とう抽出を併用しているが、作業の省力化の観点から、飼料分析基準<sup>4)</sup>で汎用されている振とう抽出法が適用可能か否かについて検討した。

2.1 で調製した成猫用ドライ製品にソルビン酸として 5,000 mg/kg 相当量、成犬用ウェット製品にソルビン酸として 1,000 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用いて分析センター法及び本法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。その結果を Table 3 に示したが、本法による添加回収試験結果は分析センター法と同等以上であった。

また、ソルビン酸が添加されている市販の犬用セミドライ製品 5 製品を試料として用い、分析センター法及び本法に従って抽出し試料中のソルビン酸含量を求めた。その結果、Table 4 のとおり、分析値に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、本法による抽出法を採用することとした。

Table 3 Recoveries of sorbic acid by two methods

Method	Pet food types (Spiked level)			
	Dry type for adults cats (5,000 mg/kg)		Wet type for adults dogs (1,000 mg/kg)	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)
Method of JFRL <sup>c)</sup>	93.0	2.7	91.8	4.1
This method	95.9	1.1	91.8	0.7

a) Mean ( $n=5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Japan Food Research Laboratories

Table 4 Quantitative value of sorbic acid by two methods

Pet food types	This method (mg/kg)	Method of JFRL (mg/kg)
Semi-dry type for adult dogs 1	3,590	3,680
Semi-dry type for adult dogs 2	3,200	3,250
Semi-dry type for dogs 1	900	910
Semi-dry type for dogs 2	1,850	1,850
Semi-dry type for dogs 3	1,100	1,170

### 3.3 妨害物質の検討

市販の愛がん動物用飼料（成犬用ドライ製品 1 種類，成犬用ウェット製品 2 種類，成猫用ドライ製品 2 種類，成猫用ウェット製品 3 種類）を用い，本法に従って調製した試料溶液を液体クロマトグラフに注入し，定量を妨げるピークの有無を確認したところ，妨害ピークは認められなかった．セミドライ製品については，通常，ソルビン酸が添加されていることから，検討を行わなかった．

なお，妨害物質の検討で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3(B)に示した．

### 3.4 添加回収試験

2.1 で調製した成犬用ドライ製品、成猫用ドライ製品にソルビン酸として 2,000 及び 10 mg/kg 相当量、成犬用ウェット製品及び成猫用ウェット製品にソルビン酸として 500 及び 10 mg/kg 相当量、セミドライ製品にソルビン酸として 2,000 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用いて、本法により 5 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。なお、セミドライ製品については試料のブランク値を求めて補正を行った。

結果を Table 5 に示した。平均回収率 92.6~99.4 %，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 3.0 %以下の成績が得られた。

なお、添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 3(C)に示した。

Table 5 Recoveries of sorbic acid from five kinds of pet foods

Spiked level (mg/kg)	Pet food types									
	Dry type for adult dogs		Dry type for adult cats		Semi-dry type for adult dogs		Wet type for adult dogs		Wet type for adult cats	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)
2,000	97.1	1.1	98.7	2.6	97.8	2.1	–	–	–	–
500	–	–	–	–	–	–	92.6	1.6	94.8	0.7
10	99.4	3.0	97.5	1.3	–	–	95.3	1.3	96.8	0.9

a) Mean ( $n=5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

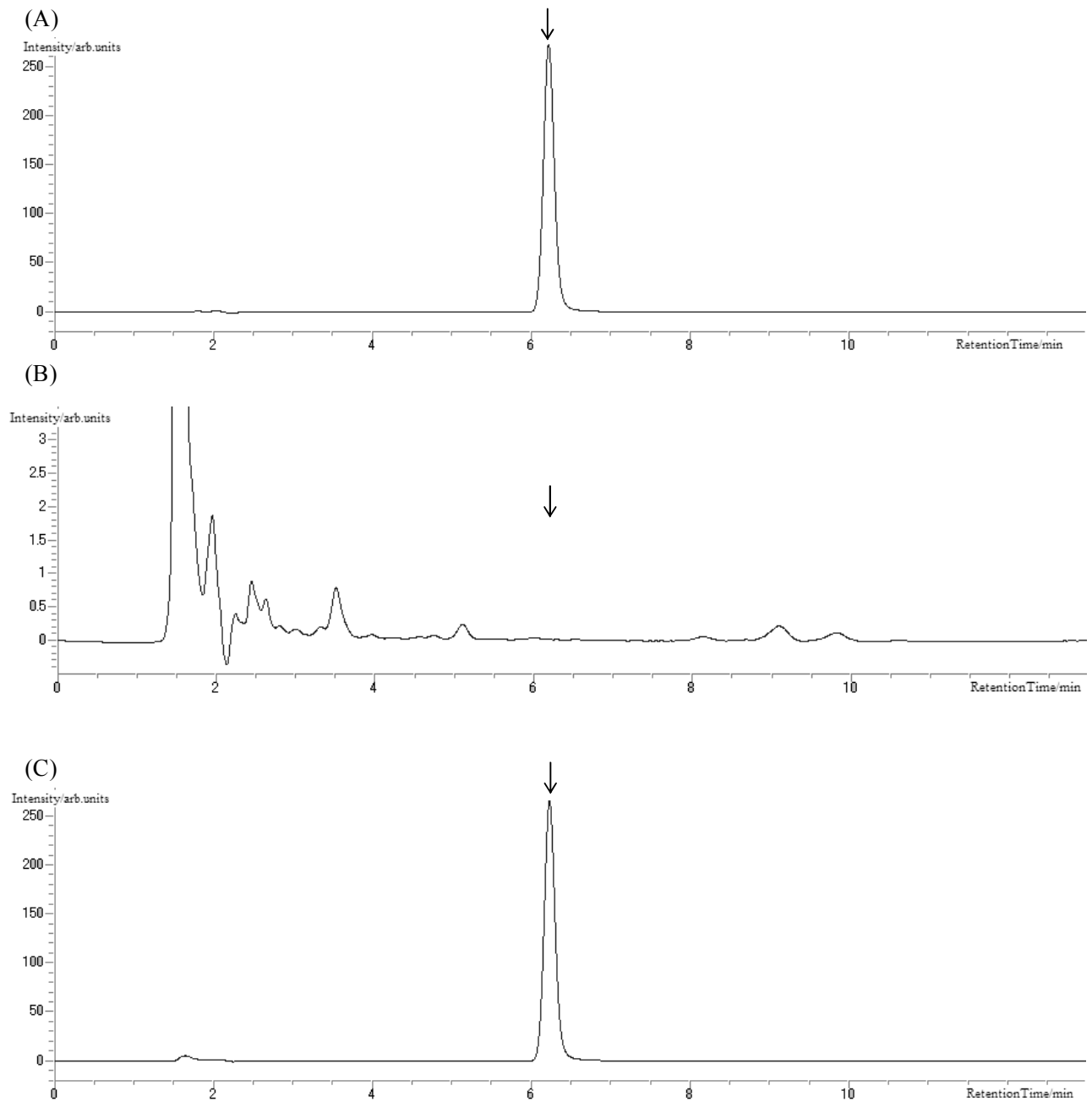


Fig. 3 Chromatograms of sorbic acid and blank solution

LC conditions are shown in Table 2.

(A) Standard solution of sorbic acid (The amount is 200 ng)

(B) Sample solution of complete and balanced dry type for adult dogs (not spiked)

(C) Sample solution of complete and balanced dry type for adult dogs spiked with 2,000 mg/kg of sorbic acid

(Arrows indicate the retention time of sorbic acid.)

### 3.5 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、成犬用ドライ製品にソルビン酸を添加し、添加

回収試験により得られるピークの  $SN$  比が 10 及び 3 になる濃度を求めた。

その結果、得られたピークの  $SN$  比が 10 以上となる濃度は 10 mg/kg であった。

確認のために、成犬用ドライ製品、成猫用ドライ製品、成犬用ウェット製品及び成猫用ウェット製品にソルビン酸として 10 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法により 5 点併行で定量を行った結果は Table 5 のとおりであり、平均回収率は 99.4, 97.5, 95.3 及び 96.8 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 3.0, 1.3, 1.3 及び 0.9 % であった。

また、 $SN$  比が 3 となる濃度は 3 mg/kg であった。

以上の結果から、本法の定量下限は 10 mg/kg, 検出下限は 3 mg/kg であった。

### 3.6 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

全成長段階犬用セミドライ製品にソルビン酸として 1,000 mg/kg 相当量, 成犬用ドライ製品にソルビン酸として 20 mg/kg 相当量, 及び成猫用ウェット製品にソルビン酸として 400 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 株式会社日清製粉グループ本社 QE センター, 日本ハム株式会社中央研究所, 財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 同札幌センター, 同仙台センター, 同名古屋センター, 同神戸センター及び同福岡センター (計 9 試験室) において本法に従って共同試験を実施した。

その結果を Table 6 に示した。全成長段階犬用セミドライ製品では平均回収率は 94.9 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_r$  及び  $RSD_R$ ) として 2.6 % 及び 4.6 % であり, HorRat は 0.80 であった。成犬用ドライ製品では平均回収率は 99.1 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 0.8 % 及び 4.3 % であり, HorRat は 0.42 であった。成猫用ウェット製品では, 平均回収率は 92.5 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  として 1.4 % 及び 2.7 % であり, HorRat は 0.41 であった。

参考のため, 各試験室で使用した液体クロマトグラフの機種等を Table 7 に示した。



Table 6 Collaborative study results of Sorbic Acid

Lab.No.	Semi-dry type for dogs		Dry type for adults dogs		Wet type for adults cats	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	883	919	19.2	19.3	363	364
2	922	930	18.3	17.9	355	365
3	967	977	20.4	20.2	380	383
4	923	921	19.7	19.7	364	365
5	960	970	19.7	19.7	355	372
6	966	950	20.4	20.8	377	380
7	1,040	1,030	20.4	20.3	363	368
8	911	956	20.6	20.4	382	383
9	885	969	18.7 <sup>e)</sup>	21.0 <sup>e)</sup>	346 <sup>e)</sup>	388 <sup>e)</sup>
Spiked level (mg/kg)	1,000		20		400	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	949		19.8		370	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	94.9		99.1		92.5	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.6		0.8		1.4	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	4.6		4.3		2.7	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	5.7		10		6.6	
HorRat	0.80		0.42		0.41	

- a) Semi-dry type for adult dogs:  $n=18$ , Dry type for adult dogs and wet type for adult cats:  $n=16$  (without Lab. No. 9)
- b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
- c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
- d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation
- e) Data excluded by Cochran test

Table 7 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	Instruments	LC column (i.d.× length, particle size)
1	Agilent Technologies LC-1100 Series	Chemicals Evaluation and Research Institute L-column L-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
2	HITACHI L-7000	GL Sciences Inertsil ODS-3V (4.6×150 mm, 5 μm)
3	Agilent Technologies LC-1100 Series	Chemicals Evaluation and Research Institute L-column L-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
4	Agilent Technologies LC-1100 Series	Shiseido CAPCELL PAK C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies LC-1100 Series	KANTO Chemical Mightysil RP-18 GP (4.6×150 mm, 5 μm)
6	Hewlett Packard HP 1100 series	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)
7	Waters Waters 2487	Shiseido CAPCELL PAK C18 (4.6×150 mm, 3 μm)
8	Agilent Technologies LC-1100 Series	Showa Denko Shodex C18M4E (4.6×250 mm, 5 μm)
9	Shimadzu Prominence	KANTO Chemical Mightysil RP-18GP (4.6×150 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

愛がん動物用飼料に添加されているソルビン酸について、分析センター法を基に、液体クロマトグラフを用いた定量法の愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否を検討したところ、次の結果を得た。

- 1) 検量線はソルビン酸として 0.05~100 μg/mL (注入量として 0.5~1,000 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 15 分間振とう抽出した結果、良好に測定が可能であった。
- 3) 市販の愛がん動物用飼料 (成犬用ドライ製品 1 種類, 成犬用ウェット製品及び成猫用ドライ製品各 2 種類並びに成猫用ウェット製品 3 種類) について本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、ソルビン酸の定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 成犬用ドライ製品及び成猫用ドライ製品にソルビン酸として 2,000 及び 10 mg/kg 相当量, 成犬用ウェット製品及び成猫用ウェット製品にソルビン酸として 500 及び 10 mg/kg 相当量並びに成犬用セミドライ製品にソルビン酸として 2,000 mg/kg 相当量をそれぞれ添加し、本法に従って添加回収試験を実施したところ、平均回収率は 92.6~99.4 %, その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 3.0 %以下の成績が得られた。
- 5) 本法によるソルビン酸の定量下限は試料中で 10 mg/kg, 検出下限は 3 mg/kg であった。
- 6) 全成長段階犬用セミドライ製品, 成犬用ドライ製品及び成猫用ウェット製品に、ソルビン酸として 1,000, 20 及び 400 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料を用いて、9 試験室において本法に従い共同試験を実施した。その結果、全成長段階犬用セミドライ製品では平均回収率は 94.9

%, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 ( $RSD_f$  及び  $RSD_R$ ) として 2.6 %及び 4.6 %であり, HorRat は 0.80 であった. 成犬用ドライ製品では, 平均回収率は 99.1 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_f$  及び  $RSD_R$  として 0.8 %及び 4.3 %であり, HorRat は 0.42 であった. 成猫用ウェット製品では, 平均回収率は 92.5 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ  $RSD_f$  及び  $RSD_R$  として 1.4 %及び 2.7 %であり, HorRat は 0.41 であった.

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた株式会社日清製粉グループ本社 QE センター, 日本ハム株式会社中央研究所, 財団法人日本食品分析センター多摩研究所の試験室の各位に感謝の意を表します.

## 文 献

- 1) 厚生省告示: 食品, 添加物等の規格基準, 昭和 34 年 12 月 28 日, 告示第 370 号 (1959).
- 2) 財団法人日本食品分析センター: 平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業ペットフード中の有害物質の分析法の開発 (2009).
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知: 「愛がん動物用飼料等の検査法」の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).