

## 高速液体クロマトグラフィーによる食品中の プロピオン酸及びソルビン酸の同時定量

### Simultaneous Determination of Propionic Acid and Sorbic Acid in Food by High Performance Liquid Chromatography.

米森 宏子 恵花 孝昭 阿部 敦子 木原 敏博  
大内 格之 富澤 政 菊地由生子 高杉 信男

Hiroko Yonemori, Takaaki Ebana, Atuko Abe, Satohiro Kihara,  
Kakuyuki Ōuchi, Masashi Tomisawa, Yuko Kikuchi and Nobuo Takasugi

#### 要 旨

洋菓子、チーズなど脂肪分の多い食品に添加されているプロピオン酸の定量を4-ブロモメチルー7-メトキシマリリン (以下「Br-Mmc」) にて蛍光誘導体化し蛍光検出-高速液体クロマトグラフィーによる定量を検討し、さらにチーズにおいてプロピオン酸と同時に使用される可能性のあるソルビン酸との同時定量を検討した。

#### 1. 緒 言

プロピオン酸は合成保存料としてパン、洋菓子、チーズへの使用が認められており、パン、洋菓子においては2.5g/kg以下、チーズではソルビン酸との合計値が3.0g/kg以下の使用基準が定められている。食品中のプロピオン酸の定量法としてこれまでガスクロマトグラフによる方法<sup>1,2,3,4,5)</sup> (以下「GC法」)、滴定法<sup>6)</sup>、熱検出液体クロマトグラフによる方法<sup>7)</sup>などが報告されている。しかしこれらは水蒸気蒸留をはじめとする煩雑な前処理操作が必要である。一方、HPLC法としてフェナシル誘導体を利用した方法も報告されている<sup>8)</sup>が、脂肪分の多い検体の場合十分な回収率が得られないなどの問題があった。

そこで今回、前処理操作が簡便で精度が良く、かつ脂肪分の多い食品にも適応可能な分析法の確立を目的とし、Br-Mmcを用いた蛍光誘導体化による

プロピオン酸とソルビン酸との同時定量を蛍光検出-HPLCにて検討したところ良好な結果が得られたので報告する。

#### 2. 方 法

##### 2-1 試 料

パン、洋菓子、チーズ類はいずれも札幌市内で市販されているものを使用した。

##### 2-2 試薬及び試液

プロピオン酸標準液・プロピオン酸ナトリウム (東京化成工業<sup>株</sup>製) 1.2967g を水に溶解し100ml としたものを標準原液 (プロピオン酸として10,000 $\mu$ g/ml) とし、試験目的に合わせて準じ希釈して使用した。

ソルビン酸標準液・ソルビン酸カリウム (東京化成工業<sup>株</sup>製) 1.3497g についてプロピオン酸標準液と同様に調製し使用した。

反応試液・4-プロモメチルー7-メトキシクマリ  
ン(同仁化学研究所製) 100mg及び18-クラウン-6  
(Aldrich Chem. 社製) 20mgをアセトンに溶解し  
100mlとした。

内部標準溶液: アントラセン(東京化成工業(株)製)  
をアセトンに溶解し 200 $\mu$ g/mlとした。

アセトニトリル, メタノール・HPLC用

その他の試薬: 市販特級品

### 2-3 装置

蛍光検出-HPLC・日立製作所(株)製 L-6200型ポ  
ンプ, 同 F-1150型蛍光検出器, (株)島津製作所製  
C-R5A データ処理装置, 及びレオダイン社製 7125  
型インジェクターにより構成した。

### 2-4 HPLC条件

分析用カラム・東洋曹達 TSK-gel, ODS-80  
Tm( $\phi$  4.0  $\times$  250mm)

移動相: アセトニトリル: 水 (65: 35) 混液

流速: 1.0 ml/min

検出波長: 蛍光波長 400nm 励起波長 329nm

注入量: 3 $\mu$ l

カラム温度: 室温

### 2-5 試験溶液の調製

概略を Fig. 1 に示した。

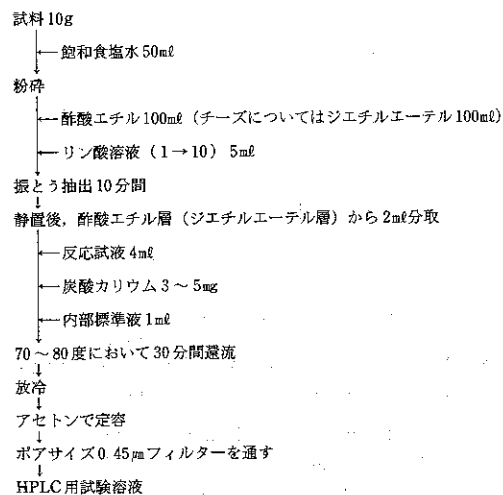


Fig 1

すなわち試料 10g を 200ml コニカルビーカーに採  
取し, 飽和塩化ナトリウム溶液 50ml を加えポリト  
ロンにて 1~2 分間ホモジナイズしたものに, パン,  
洋菓子の場合には酢酸エチル, チーズの場合にはジ  
エチルエーテルを 100ml, 及びリン酸溶液 (1→10)  
5ml を加え 10 分間振とう抽出を行った。静置後上  
層の酢酸エチル層, ジエチルエーテル層から 2ml を  
25ml ナス型フラスコに正確に分取し, 反応試液 4ml,  
炭酸カリウム 3~5mg, 内部標準溶液 1ml を加え  
70~80 $^{\circ}$ C において 30 分間還流した。放冷後, アセ  
トンで定容とし, ポアサイズ 0.45 $\mu$ m のフィルター  
を通したものを HPLC 用試験溶液とした。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 Br-Mmc による蛍光誘導体化

蛍光誘導体化は Dünge<sup>9)</sup> の Br-Mmc による脂肪  
酸のラベル化法, 及び Grushuka らの  $\alpha$ -ケト酸の  
分析方法<sup>10)</sup> を参考とした。

還流の温度, 及び時間の最適条件について検討を  
行った。プロピオン酸の標準液 2ml (100 $\mu$ g/ml) に  
ついて, 40 $^{\circ}$ C から 10 $^{\circ}$ C ごとに 100 $^{\circ}$ C までの温度で  
反応を行った結果 Fig. 2 に示したように 70 $^{\circ}$ C 以上  
ではほぼ一定の反応率となった。時間については 10  
分間隔で 80 分までの反応時間について検討を行っ  
たところ, 10 分間でかなり反応が進行し, 20 分以  
上で最高となり 40 分を越えると減少傾向がみられ  
た。また温度は 90 度以上, 時間は 1 時間を越える  
と試料が乾固する危険が生じ, 乾固させた場合の反

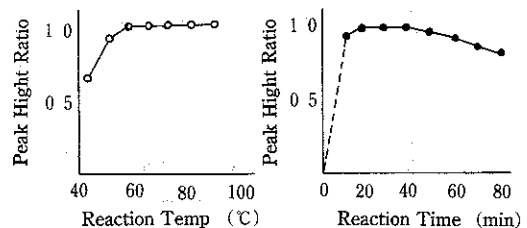


Fig 2 Effect of reaction temperature and time on the formation of derivatives of Propionic Acid.

応率は50%以下に低下した。これらの結果から還流は70~80℃にて30分間とした。

### 3-2 抽出液の検討

Br-Mmcによる反応はアセトン及び酢酸エチル中で回収率が良いことから試料がパン、洋菓子の場合には酢酸エチルで抽出を行った。しかしチーズの場合は酢酸エチル抽出でエマルジョンを生成しやすいため、ジエチルエーテルにて抽出を行った。ジエチルエーテル抽出液では、還流時に乾固の危険性が増し注意が必要であるが、反応の回収率は酢酸エチル抽出液の場合とはほぼ一致した。

### 3-3 測定条件についての検討

- (1) 測定波長：これらの条件にて蛍光誘導体化したものをHPLCにて分離後、励起スペクトル、蛍光スペクトルを測定したところ、プロピオン酸、ソルビン酸の誘導体はどちらも蛍光極大波長400nm、励起極大波長329nmのFig. 3のようなスペクトルパターンを示した。このことから本法の測定波長は蛍光側400nm、励起側329nmに設定した。
- (2) 移動相の組成：メタノール-水系にて検討を行ったところ、プロピオン酸及びソルビン酸誘導体のピークを適当な溶出時間で得るためには、カラム圧の上昇により負荷がかかりすぎ、

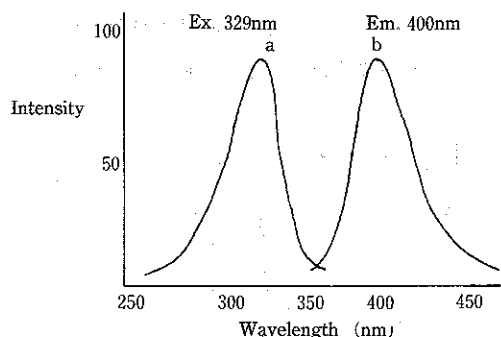


Fig. 3 Fluorescence excitation and emission spectra of Propionic Acid.  
a: excitation b: emission

カラムの劣化が懸念された。

そこでアセトニトリル-水系にて検討を行ったところ、混合比(65:35)のとき溶出時間、

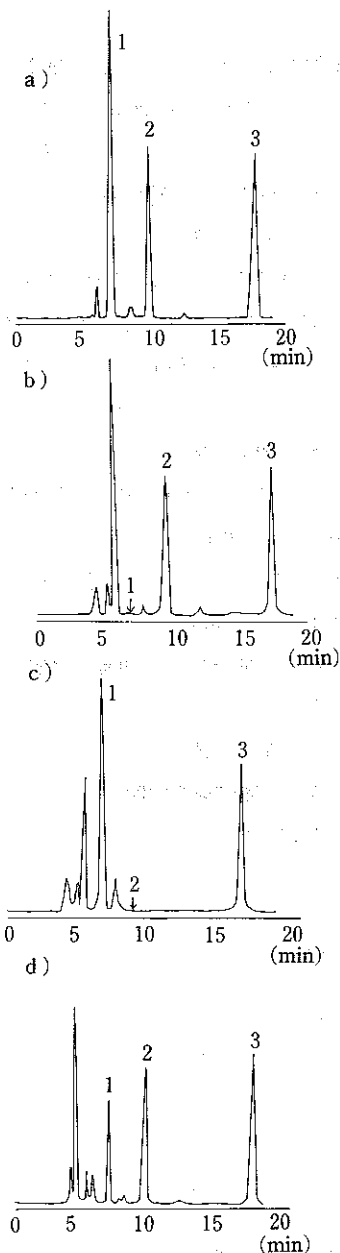


Fig. 4 HPLC chromatograms of prepared solution obtained from some foods  
1 Propionic Acid 2 Sorbic Acid  
3. Internal standard  
a) Standard (100µg/ml) b) Cream Puff  
c) Pound Cake d) Natural Cheese

ピーク形状などについて良好なクロマトグラムを得ることができた。実試料のクロマトグラムを Fig. 4 に示した。

### 3-4 共存する有機酸の影響

食品中に存在する他の有機酸による妨害を検討するため、ギ酸、酢酸、酪酸、乳酸、イソ吉草酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、フマル酸、酒石酸、安息香酸について同様な方法で蛍光誘導体化を行い分析したところ、プロピオン酸のピークを妨害するものはなかったが、ソルビン酸のピークの直前でイソ吉草酸のピークが若干重なることが解った。しかし今回用いた食品中でイソ吉草酸が検出されたものはなく測定上の問題とはならないと考えられる。

### 3-5 検量線

プロピオン酸は1~100g/kg, ソルビン酸は2~200g/kgの範囲において蛍光誘導体化したものをアセトンにて10mlにメスアップしたのち、以上の測定条件で分析を行い内部標準法により検量線を作成したところ原点を通る良好な直線が得られた。

10, 50, 100 $\mu$ g/mlの標準液について3回ずつ蛍光誘導体化を繰り返した結果、その変動係数(CV(%))はプロピオン酸が0.6~2.3%, ソルビン酸が1.2~2.0%となった。

また検出限界はアセトンにて10mlにメスアップした時、試料濃度としてプロピオン酸が0.01g/kg, ソルビン酸が0.02g/kgであった。

Table 1 Recovery of Propionic Acid and Sorbic Acid Added to Commercial Foods

| Sample*2 | Added   | Recovery*1 and S. D.(%) |                |
|----------|---------|-------------------------|----------------|
|          |         | Propionic Acid          | Sorbic Acid    |
| Bread    | 0.1g/kg | 85.0 $\pm$ 2.8          | 89.0 $\pm$ 2.9 |
|          | 1.0g/kg | 86.3 $\pm$ 2.5          | 91.3 $\pm$ 2.0 |
| Cake     | 0.1g/kg | 93.5 $\pm$ 1.9          | 92.9 $\pm$ 2.0 |
|          | 1.0g/kg | 95.5 $\pm$ 1.5          | 98.3 $\pm$ 1.9 |
| Cheese   | 0.1g/kg | 89.1 $\pm$ 2.2          | 88.0 $\pm$ 3.1 |
|          | 1.0g/kg | 90.3 $\pm$ 3.0          | 92.7 $\pm$ 2.4 |

\*1 Average of 3 trials

\*2 Bread · Chocolate Bread · Cake · Pound Cake  
Cheese · Cream Cheese

### 3-6 添加回収実験

プロピオン酸, ソルビン酸が含まれていないチョコレートパン, バウンドケーキ, ナチュラルチーズにそれぞれ試料濃度としてプロピオン酸, ソルビン酸が0.1g/kg, 1.0g/kgとなるように添加し本法に従って分析を行ったところ, Table 1 に示すようにすべて80%以上の良好な結果が得られた。

### 3-7 実態調査

合成保存料の表示のある市販品についてプロピオン酸, ソルビン酸の使用実態を調べた結果を Table 2 に示した。パンのうちプロピオン酸が検出されたものはなかったが, すべてからソルビン酸が検出された。これらのソルビン酸はパンに塗布あるいは充填されているジャム, フラワーペーストにあらかじめ添加されていたものであった。洋菓子ではプロピオン酸が検出されたものがあり, これらは原料の小麦粉に由来するものと考えられる。またシュークリームなどフラワーペーストが用いられている洋菓

Table 2 Propionic Acid and Sorbic Acid Found in Commercial Foods

| Kind of foods    | Propionic Acid (g/kg) | Sorbic Acid (g/kg) |
|------------------|-----------------------|--------------------|
| Bread (Cream)    | A                     | ND                 |
|                  | B                     | 0.18               |
|                  | C                     | 0.30               |
| Bread (Jam)      | ND                    | 0.32               |
|                  | (Chocolate)           | 0.14               |
| Cream Puff       | ND                    | 0.44               |
|                  | A                     | 0.75               |
|                  | B                     | 0.88               |
| Waffle           | ND                    | 0.36               |
|                  | B                     | 0.30               |
| Roll Cake        | A                     | 1.12               |
|                  | B                     | ND                 |
| Chocolate Cake   | A                     | 0.61               |
|                  | B                     | 0.92               |
| Pound Cake       | 1.06                  | ND                 |
| Process Cheese   | 1.37                  | ND                 |
|                  | A                     | 0.31               |
| Camembert Cheese | B                     | 0.92               |
|                  | ND                    | ND                 |
| Cream Cheese     | ND                    | ND                 |
|                  | ND                    | ND                 |
| Natural cheese   | A                     | 0.08               |
|                  | B                     | 0.05               |

子ではパンと同様にソルビン酸が検出された。

チーズではプロピオン酸、ソルビン酸の両方が検出されたものがありそれらの合計値は1.23g/kgであった。

今回使用した試料をもとに本法と公定法との定量値の比較を行った。その結果両方の相関は、プロピオン酸における回帰直線の傾きが0.930、相関係数が0.985、またソルビン酸では0.965、0.993とほぼ満足すべき良好な結果が得られた。

#### 4. 結 語

以上脂肪分、さらにタンパク質の多い食品中のプロピオン酸及びソルビン酸を溶媒で直接抽出したのち Br-Mmc により蛍光誘導体とし、蛍光検出-HPLC にて定量することにより簡略な同時定量が可能となった。

#### 5. 文 献

1) Mykolajewycz, R. : Anal. Chem., **129**, 1300,

1957.

2) Ruth N. Shelly. et al : J. Assoc. Offic. Agr. Chemists., **46**(3), 486, 1963.

3) M. H. Grosjean : Rev. Ferment. Ind. Aliment., **22**(6), 211, 1967.

4) 竹下隆三, 他 : 食衛誌, **11**(3), 143-146, 1970

5) 能勢憲英, 他 : 食衛誌, **17**(4), 290-294, 1975.

6) Assoc. Offic. Agr. Chem. Official Methods of Analysis 12th Ed., 1975

7) 菅野三郎, 他 : 食衛誌, **10**(6), 371-375, 1969.

8) 矢部芳枝, 他 : 食衛誌, **24**(3), 329-332, 1983.

9) Wolfgang Dinges : Anal. Chem., **49**(3), 442-445, 1977.

10) Eli Grushuka. et al : Anal. Chem., **50**(9), 1398-1399, 1978.