ガスクロマトグラフィーによる食品中の プロピオン酸の定性および定量

(昭和 45 年 3 月 11 日受理)

竹 下 隆 三^{*1} 赤 木 洋 勝^{*1}
谷 村 顕 雄^{*2} 菅 野 三 郎^{*3}

Qualitative and Quantitative Analysis of Propionic Acid from Foods by Gas-chromatography

Ryuzo TAKESHITA^{*1}, Hirokatsu AKAGI^{*1}, Akio TANIMURA^{*2}
and Saburo KANNO^{*3}

(*1 Institute of Public Health: 4-6-1, Shiroganedai, Minato-ku, Tokyo:

*2 National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo;

*3 Kanagawa Prefectural Public Nuisance Center: 3-185, Nakamura-cho, Minami-ku, Yokohama)

Propionic acid was separated by steam distillation from samples acidified with phosphoric acid and collected into alkaline solution.

An aliquot of the distillate containing from 2.5 mg to 10 mg of propionic acid was evaporated to dryness. The acid was then liberated through a cation exchange resin, Dowex 50 X₈-H type, column (1 cm×3 cm).

One to two microliters of the eluate containing propionic acid and trans-crotonic acid as an internal standard was injected directly into the gas-chromatographic column (φ-4 mm ×3 m) with Chromosorb 101. The lower determination limit was 0.002 ppm.

Recovery of propionic acid added at 1250, 2500 and 5000 ppm levels to bread and sponge cake were 96.3~100.6%.

(Received March 11, 1970)

は し が き

プロピオン酸は防ばい効果があることから食パン、洋菓子等の食品にプロピオン酸カルシウム、プロピオン酸ナトリウムの形で添加が認められており、最大添加許容量 5g/kg (プロピオン酸として) の使用基準が設定されている¹⁾。また、FAO/WHO 合同専門委員会は人体一日摂取許容量(条件付き)を 10~20 mg/体重 kg と定めている²⁾。このようなプロピオン酸の食品への添加の制限にともない、食品中のプロピオン酸の定性定量法が必要となっている。

食品中のプロピオン酸の分離法として広く行なわれている方法は食品を水蒸気蒸留に付し、他の揮発性脂肪酸と共にプロピオン酸を分離している。この分離されたプロピオン酸をカラムクロマトグラフィーにより単離して滴定法で定量する方法³⁾、留液を中和後濃縮し、プロピ

オン酸ナトリウムをアセトン中でジクロロ酢酸と置換し、プロピオン酸をガスクロマトグラフィーにより定量する方法⁴⁾、同様プロピオン酸ナトリウムをプロピルアルコールと硫酸で加熱還流してプロピルエステルとしたのち、ガスクロマトグラフィーにより定量する方法⁵⁾、また著者らの一人は留液そのままを熱伝導型検出器を有する液体クロマトグラフィーによる A. O. A. C. 改良法として簡便性をもたせた⁶⁾。

われわれはさらにガスクロマトグラフィーを用いる方法に改良を加えることを試みた。

すなわち、留液をプロピオン酸ナトリウムとして濃縮し、イオン交換樹脂による置換を試み、さらにプロピオン酸水溶液の分析に適用でき、優れた分離能と分析時間短縮に役立つガスクロマトグラフィー充填剤を選定し、ガスクロマトグラフィーによりプロピオン酸の定性および定量を行ない、きわめて良好な結果を得たので報告する。

実験方法

〔試薬〕

① Dowex 50 X₈ (100-200 メッシュ): H 型にする。

*1 国立公衆衛生院: 東京都港区白金台 4-6-1

*2 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1 丁目18番 1 号

*3 神奈川県公害センター: 神奈川県横浜市南区中村町 3 の 185

②ガスクロマトグラフィー用カラム充てん剤: Chromosorb 101, 80-100 メッシュ (Johnsman Ville 社製)

③内部標準物質溶液: trans-クロトン酸をメタノールで再結晶し, さらに水で再結晶を繰返したのち, 五酸化リン上で減圧乾燥する. その 2g を精密に量り, 水に溶かして 100 ml とする.

④プロピオン酸標準溶液: プロピオン酸を 3 回蒸留したもの 1g を精密に量り, 水に溶かして 100 ml とする. [装 置]

①イオン交換樹脂カラム: 内径 1 cm のガラス管の先端を細くし, 下部にガラス綿または脱脂綿をつめ, これにイオン交換樹脂を水と共に流し入れ, 高さ 3 cm に充てんする.

②ガスクロマトグラフィー用カラム: ガラスカラム (直径 4 mm × 長さ 3 m) にカラム充てん剤をつめ, 250° でエージングを行なう.

③水蒸気蒸留装置: 冷却器の下端部を引延ばし, 500 ml メスフラスコの底部に接するようにしたもの.

④ガスクロマトグラフィー: 島津ガスクロマトグラフィー, 4 APFE 型, 水素炎イオン化検出器を使用する.

[操 作]

試料溶液の調製

食品を細切し, その 40 g を蒸留フラスコに入れ, 水 100 ml, 塩化ナトリウム 40 g および 10% リン酸 10 ml を加えて水蒸気蒸留する. 留液はあらかじめ 1% 水酸化ナトリウム 20 ml を入れた 500 ml メスフラスコ中に捕集し, 全量約 500 ml を採取する. 留液を正確に 500 ml としたのち, 正確に 25 ml をとり, 減圧下に濃縮乾固する. フラスコ中の残留物に水約 1 ml を加えて溶かし, これをイオン交換樹脂カラムにのせ, 1 ml/1-2 min. の速度で溶出させる. 溶出液はあらかじめ内部標準物質溶液 1.0 ml を入れた 10 ml メスフラスコ中に受ける. イオン交換樹脂カラム上部の過量の液が流出してから水約 1 ml でフラスコ内壁を洗い, その液を同様イオン交換樹脂カラムにのせる. この操作を繰返し, 流液で全量 10.0 ml とし, 試料溶液とする.

ガスクロマトグラフィーの条件

試料注入口温度: 230°

カラム温度: 200°

検出器温度: 250°

キャリアガス (N₂) 流速: 40 ml/min.

検量線の作成

プロピオン酸標準溶液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 および 1.5 ml をそれぞれ 10 ml メスフラスコにとり, さらにそのおのおのに内部標準物質溶液 1.0 ml を加えて水で正確に 10 ml とする. そのおのおのの 1-2 μ l をカラムに注入し, 得られたクロマトグラムより, それぞれの高さを測定し, 縦軸にプロピオン酸と内部標準物質とのピーク高比を, 横軸に 10 ml メスフラスコ中のプロピオン酸の

mg 数をとって検量線を作成する.

プロピオン酸の定性および定量

試料溶液の 1-2 μ l をガスクロマトグラフィー条件により測定し, 得られたクロマトグラムから各ピークの trans-クロトン酸に対する相対保持時間を求める. あらかじめ, プロピオン酸の trans-クロトン酸に対する相対保持時間を求めておき, これと比較して定性を行なう.

また, 得られたプロピオン酸ピークにつき, trans-クロトン酸とのピーク高比を求め, 検量線よりプロピオン酸の定量を行なう.

実験方法の検討

1. プロピオン酸および内部標準物質のガスクロマトグラム

低級脂肪酸の辛酸, 酢酸, プロピオン酸, ノルマルおよびイソ酪酸および吉草酸の各 0.1% 溶液と 0.2% trans-クロトン酸標準溶液について, 実験方法に従ってガスクロマトグラフィーを行なったところ, Table 1 に示すような結果を得た.

Table 1. Relative Retention Time of Lower Fatty Acids

Lower fatty acids	Retention time (min.)	Relative retention time
Formic acid	3.40	0.23
Acetic acid	4.40	0.30
Propionic acid	6.84	0.47
iso-Butyric acid	9.20	0.63
n-Butyric acid	10.70	0.73
trans-Crotonic acid	14.60	1.00
Valeric acid	14.82	1.01

低級脂肪酸および trans-クロトン酸のピークはシャープであり, また低級脂肪酸はそれぞれよく分離し, プロピオン酸の定性および定量に他の脂肪酸は何ら影響を与えないことを認めた. しかしながら, 内部標準物質のピークは吉草酸のピークと重なり, この存在は定量試験に妨害となる.

2. 検量線について

プロピオン酸の定性および定量における内部標準物質として, trans-クロトン酸を選び, 実験方法ガスクロマトグラフィー条件により検量線を作成したところ, Fig. 1 に示す結果を得た.

3. プロピオン酸のイオン交換樹脂カラムからの溶出

プロピオン酸 50 mg を正確にはかり, これに 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 1 ml を加えて振り混ぜた溶液を調製した. これを内径 1 cm, 高さ 3 cm のイオン交換樹脂カラムにのせ, 実験方法に従って水 1 ml ずつで容器を洗浄しつつカラムにのせ, 溶出液 1 ml ずつを分取した. 各分画液について, ガスクロマトグラフィー条件に

Fig. 1. Calibration curve of propionic acid

Fig. 2. Elution pattern of propionic acid from Dowex 50 X₈ (H-form) column (1 cm × 3 cm)

従い、溶出液中のプロピオン酸の存否および溶出状況を調べた。その結果を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 に示すように、プロピオン酸 50 mg のナトリウム塩からプロピオン酸をイオン交換樹脂より流出させるには、6 ml までの溶出で十分であることを認めた。したがって、10 ml までの洗浄操作を繰返せば、完全にプロピオン酸を流出させうるものと考えられる。

また、0.01 N-水酸化ナトリウム溶液 1 ml 中プロピオン酸 5 mg あるいは 10 mg を含む溶液を調製し、この 1 ml についてイオン交換樹脂処理を行ない、以下実験方法に従って操作し、それらの回収率を求めた。実験回数

3 回における平均回収率はプロピオン酸 5 mg については 94.60%、10 mg については 99.89% の結果を得た。

すなわち、イオン交換樹脂カラムへの吸着はほとんど認められなかった。

4. プロピオン酸の水蒸気蒸留曲線

プロピオン酸 200 mg に水 100 ml、塩化ナトリウム約 40 g および 10% リン酸 10 ml を加えて水蒸気蒸留を行ない、留液 20 ml ずつを分取し、そのおのおのについて、フェノールフタレインを指示薬として、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて滴定し、プロピオン酸の留出曲線を作成したところ、Fig. 3 に示すような結果を得た。

Fig. 3. Steam distillation curve of propionic acid

Fig. 3 に示すように、プロピオン酸 200 mg を留出させるためには、留出液 300 ml 程度を捕集すれば十分であると考えられる。しかしながら、食品の種類により、それ以上のプロピオン酸含量を摂取する結果になることを考慮し、実験方法に示したように、留出液 500 ml を捕集することにした。

また、プロピオン酸 100 mg および 200 mg を含む水溶液 10 ml を実験方法にしたがって、それぞれ 3 回の平均回収率を求めた。

その結果、100 mg については 98.6%，200 mg については 99.4% であった。

5. 食品中からのプロピオン酸の定性および定量について

プロピオン酸無添加の食パンおよび洋菓子のスポンジ部分を細切し、実験方法にしたがって操作したところ、trans-クロトン酸に対するプロピオン酸の相対保持時間に影響を及ぼすピークは認められなかった。

また、このプロピオン酸無添加食パン 40 g に 50, 100 あるいは 200 mg のプロピオン酸を添加し、その回収率を求めたところ、Table 2 に示すような結果を得た。なお、本法における食パンおよび洋菓子中のプロピオン酸の検出限界は 0.002 ppm である。

Table 2. Recovery of Propionic Acid Added to Breads

Exp. No.	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
1	50.0	48.14	96.3
2	50.0	49.89	99.8
3	50.0	49.01	98.0
4	100.0	98.49	98.5
5	100.0	100.63	100.6
6	100.0	97.00	97.0
7	200.0	200.41	100.2
8	200.0	195.20	97.6
9	200.0	199.08	99.6

ま と め

食品中のプロピオン酸を水蒸気蒸留し、その一部をプロピオン酸ナトリウムとして濃縮乾固後、イオン交換樹脂処理して遊離のプロピオン酸となし、その水溶液をクロモソルブ 101 をカラム充てん剤とし、trans-クロトン酸を内部標準物質としてガスクロマトグラフィーを行ない、プロピオン酸の定性および定量法を検討した。

その結果、他の低級脂肪酸はプロピオン酸の定量に何ら影響を与えないが、吉草酸の存在は妨害となることを認めた。また、水蒸気蒸留での留液捕集量は 300 ml 以上で十分であり、その一部を濃縮したプロピオン酸ナトリウムのイオン交換樹脂カラム処理には 1 ml ずつ 10 ml の流出で完全に回収しうることを認めた。プロピオン酸無添加食品に 50, 100 および 200 mg のプロピオン酸を添加し、実験方法に従って、それらの平均回収率を求めたところ、それぞれ 98.02, 98.71, 99.01% であった。

文 献

- 1) 食品添加物公定書注解編集委員会：“第二版食品添加物公定書注解” p. 779 (1968) 金原出版。
- 2) Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser. No. 339, 19 (1966).
- 3) Association of Official Agricultural Chemists, “Official Methods of Analysis”, 10th Ed. Washington, D. C. (1965) Sec. 13.083 and 13.084.
- 4) Ruth N. Shelly, Harold Salwin and William Horwitz: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 46 (3), 486 (1963).
- 5) M.H. Grosjean, A. Fouassin: Rev. Ferment. Ind. aliment. 22(6), 211 (1967).
- 6) 菅野三郎, 和田 裕, 川名清子: 食衛誌, 10(6), 371 (1969).