保存料の薄層クロマトグラフィーの二波長デンスト メトリーによる定量分析 (第2報)

(昭和48年10月24日受理)

寺田 志保子* 木村 庄治*

Studies on Analysis of Preservatives in Foods by the Dual Wave Length Densitometry of Ultraviolet Ray (2)

Shihoko TERADA, Shoji KIMURA

(Shizuoka Public Health Laboratory: 6-2, Takajo 3-chome, Shizuoka)

A simple method for the determination of the preservatives (dehydroacetic acid, benzoic acid, butyl *p*-hydroxybenzoate) in foods was studied. The food preservatives were isolated from food by steam distillation, extracted by ethylether and separated by thin layer chromatography. Each spot on the thin layer chromatogram was scanned by a dual wave length densitometer under ultraviolet ray. The recoveries of preservatives in foods were 85~102%.

(Received October 24, 1973)

まえがき

食品添加物の保存料は種々の加工食品に使用されている。分析法もガスクロマトグラフィー¹⁾、薄層クロマトグラフィー²⁾、紫外吸収法³⁾などがあるが、操作が複雑である。著者ら⁴⁾はさきにデンストメトリーによる酸化防止剤の定量法について報告したが、今回は保存料としての利用が多く、定量分析の困難なデヒドロ酢酸(以下DHA)、安息香酸(以下BA)、パラオキシ安息香酸ブチルエステル(以下POB-Bu)について、薄層クロマトグラフィーで分離したのち、直接、二波長デンストメトリーによる紫外吸収法で測定することにより、迅速に定量することができたので報告する。

装置および試薬

①デンストメーター: 島津製作所, 二波長クロマトスキャナー CS-900 型

②紫外線照射器: 大沢紫外線工業研究所, LS-DELUXE 型, 2537 Å

③薄層板: シリカゲルガラスプレート(けい光剤入り, メルク社製, 厚さ 0.25 mm, 20×20 cm), アルミナ, セルローズ, およびキーゼルゲルガラスプレート(けい光剤入り, メルク社製, 厚さ 0.25 mm, 20×20 cm)

④展開剤

- 1) リグロイン: 氷酢酸 (5:1)
- 2) シクロヘキサン: メタノール: 氷酢酸 (100:1:5)
- 3) ペンタン: 氷酢酸 (10:1)
- 4) ヘキサン: 氷酢酸 (20:0.7)
- 5) ベンゼン: メタノール: 氷酢酸 (20:0.2:0.5)
- 6) *n*-ペンタン: メタノール: 氷酢酸 (100:1:5)
- 7) ヘキサン: メタノール: 氷酢酸 (100:1:5)

⑤標準液

a) DHA 標準液: DHA 1g をエタノールに溶かして 100 ml とし, 希釈して 1, 2, 3, 4, および 5 mg/ml の溶液とする。

b) BA 標準液: BA 1g をエタノールに溶かして 100 ml とし, 希釈して 1, 2, 5, および 7.5 mg/ml の溶液とする。

c) POB-Bu 標準液: POB-Bu 1g をエタノールに溶かして 100 ml とし, 希釈して 0.5, 1, 2, および 3 mg/ml の溶液とする。

d) ソルビン酸(SOA) 標準液: SOA 1g をエタノールに溶かして 100 ml とし, 希釈して 2 mg/ml の溶液とする。

e) サリチル酸(SA) 標準液: SA 1g をエタノールに溶かして 100 ml とし, 希釈して, 5 mg/ml の溶液と

* 静岡県衛生研究所: 静岡市鷹匠3丁目6-2

Table 1. *R_f* Values of Food Preservatives

Solvent system* Compound	Silica gel thin layer chromatography					Cellulose thin layer chromatography		
	①	②	③	④	⑤	③	⑥	⑦
Dehydroacetic acid	0.34	0.20	0.40	0.10	0.50	0.9	1.0	0.62
Benzoic acid	0.58	0.32	0.77	0.18	0.28	0.9	1.0	0.85
Sorbic acid	0.49	0.25	0.72	0.13	0.25			
Salicylic acid	0.36	0.09	0.50	0.08	0.20			
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.08	—	0.08	—	0.09			
Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	0.19	0.05	0.23	0.03	0.22	0.66	0.81	0.41
Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate						0.29	0.43	0.16
Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate						0.54	0.68	0.29

- * ① ligroin : acetic acid = 5 : 1
② cyclohexane : methyl alcohol : acetic acid = 100 : 1 : 5
③ pentane : acetic acid = 10 : 1
④ hexane : acetic acid = 20 : 0.7
⑤ benzene : methyl alcohol : acetic acid = 20 : 0.2 : 0.5
⑥ pentane : methyl alcohol : acetic acid = 100 : 1 : 5
⑦ hexane : methyl alcohol : acetic acid = 100 : 1 : 5

Fig. 1. Calibration curves of preservatives
Solvent
Dehydroacetic acid: Cyclohexan : Methyl alcohol : Acetic acid (100 : 1 : 5)
Benzoic acid: Ligroin : Acetic acid (5 : 1)
Butyl *p*-hydroxy benzoate: *n*-Pentan : Acetic acid (10 : 1)

Fig. 2. Integration and profile curves of UV densitometry
Sample: Dehydro acetic acid
Solvent: Ligroin : Acetic acid = 5 : 1
A: Linear scan
B: Zig-zag scan
Chart speed: 2 mm/min
Recorder sensitivity: Integration×1, profile×1

する。

f) パラオキシ安息香酸 (POBA) 標準液: POBA 1 g をエタノールに溶かして 100 ml とし、希釈して 2 mg/ml の溶液とする。

g) パラオキシ安息香酸 エチルエステル (POB-Ety) 標準液 および パラオキシ安息香酸 プロピルエステル (POB-Pro) 標準液: POB-Ety および POB-Pro それぞれ 1 g をエタノールに溶かして 100 ml とし、希釈して 2 mg/ml の溶液とする。

試薬および標準試薬はすべて特級を使用した。

操 作

a) 検液調製³⁾

試料 5~20 g を秤取し、硫酸マグネシウム 30 g, 5% 硫酸 5 ml および水 50 ml を加えて蒸留し、留液が 50 ml になったとき、さらに水 50 ml を加えて蒸留して留液が 100 ml となるまで蒸留を続ける。留液 50 ml を分液漏斗にとり、食塩 10 g, 10% 塩酸 5 ml を加えて、エーテル 50 ml で 3 回抽出し、全抽出液を合わせて水洗し、脱水したのち、ロータリーエバポレーターを用いて常温でゆるやかに溶媒を除去したのち、残留物をエタノール 2 ml に溶かして検液とする。

b) 薄層クロマトグラフィーによる分離および測定

DHA, BA, SOA, POB-Bu, POBA, POB-Ety, および POB-Pro の各標準液 および 試料から調製した検液を、プレートの下端から 2.5 cm の位置に 3 cm 間隔で、5 μ l のマイクロシリンジを用いて 2 μ l ずつスポットする。上昇法により 20° ($\pm 2^\circ$) の展開槽内で 15 cm の距離まで展開したのち、プレートを 100° で 15 分間乾燥し、紫外線を照射してスポットの位置を確認する。デンストメーターでプレートを右から左に走査させ、紫外吸収法により、それぞれスポットのピーク面積と濃度の記録図を描き、面積積分値を求める。

測定条件

スリット: 1.25 $\times$ 1.25 mm

スキャンスピード: 10 mm/min

チャートスピード: 2 mm/min

モード: 反射式, ジグザグスキャン (± 1.5 cm)

波長: $\lambda_R = 400$ nm

$\lambda_S =$ DHA 310 nm, BA 230 nm, POBA-Bu 260 nm, POBA 255 nm

実験結果および考察

1) 薄層クロマトグラフィーによる保存料の分離⁵⁾

保存料を単離する条件として、吸着剤および展開剤について検討した結果、Table 1 に示すものが良好であった。吸着剤はけい光剤入りシリカゲルが分離後のスポットもよくまとまり、紫外線照射による判別にも良好な感度を示した。他の吸着剤のアルミナは R_f 値が全体に低く、キーゼルゲルはテーリングしやすく、ポリアミドは相互の分離はよいが、スポットが大きく広がり、感度が低下するなど、良好な結果は得られなかった。パラオキシ安息香酸エステル類の分離は、セルローズで Table 1 に示す展開剤を用いて分離した。定量は DHA, BA および POB-Bu について検討したが、展開剤によってスポットのまとまりや検出感度がやや異なり、DHA および BA は展開剤①および②、POB-Bu は①および③を用いたとき、それらの R_f 値は再現性があり、スポットもよくまとまった。ただし POB-Bu は吸着剤にセルローズを用いる場合は、スポットが広がるために、定量にはシリカゲルを使用した。

2) 測定条件の選定と検量線

スキャンング方法の比較において、リニヤスキャンングの場合は、光束の選び方によって (大きい方のスポットに合わせるか、小さい方のスポットに合わせるか) 積分値が異なったが、光束を小さく絞るジグザグスキャンングの場合は、ほとんど一致していた。また、紫外部測定の場合はシボリを合わせやすいなどの利点があるので、今回の実験はすべてジグザグスキャンング法によった。次に測定における再現性を検討するため、一枚のプレート上に DHA 溶液 (3 μ g/ μ l) を 2 μ l ずつ 8 個スポットして展開した場合の面積積分値の標準偏差は 1.80% であった。またスポット誤差を除くために POBA を内部標準物質として比をとって比較したがほとんどその差を認

Table 2. Recovery Test of Preservatives

Concentrator		Kudernaer Danishue evaporator				Rotary evaporator			
Method		Spectrophotometry		Densitometry		Spectrophotometry		Densitometry	
		Recovery		Recovery		Recovery		Recovery	
Added compound	mg	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Dehydroacetic acid	2 mg	1.75	87.5	1.76	88.0	1.91	95.5	1.92	96.0
Benzoic acid	5 mg	4.87	97.4	4.90	98.0	4.86	97.2	4.88	97.6
Butyl- <i>p</i> -hydroxy benzoate	2 mg	1.98	99.0	1.99	99.7	1.98	99.2	1.99	99.5

Table 3. Recovery of Preservative in Various Food

Food	g	Preservatives mg	Develop- ing solvent	Recovery	
				mg	%
Butter	5 g	DHA 4 mg	①	3.44	86.0
"	"	"	②	3.66	91.5
Bean-jam	10 g	"	①	3.40	85.0
"	"	"	②	3.56	89.0
Orange juice	20 g	BA 10 mg	①	8.62	86.2
"	"	"	②	8.99	89.9
Soy sauce	20 g	"	①	9.50	95.0
"	"	"	②	9.72	97.2
Soy sauce	20 g	POBA-Bu 4 mg	①	3.92	98.0
"	"	"	③	4.10	102.5
Vinegar	20 g	"	①	3.92	98.0
"	"	"	③	3.93	98.2
Orange juice	20 g	"	①	4.05	101.2
"	"	"	③	4.03	100.7
Worcester sauce	20 g	"	①	4.10	102.5
"	"	"	③	4.00	100.00

めなかった。

検量線は縦軸にピーク面積値を、横軸にスポット量の平方根（平方根にとらない場合は曲線性を示す）をとってプロットすることにより、かなり高濃度の範囲まで直線性を示したが、(DHA: $1 \sim 30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, BA: $1 \sim 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, POB-Bu: $0.5 \sim 30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) 食品の使用基準に適合する範囲で作成した検量線を Fig. 1 に示す。

Fig. 2 は DHA のスキニングの積分曲線と濃度の記録図を示す。

3) 回収実験

実験操作過程の損失を調べるために、水 20 ml にそれ

ぞれ DHA 2 mg, BA 5 mg, POB-Bu 2 mg を含むエタノール液を添加し、水酸化ナトリウム微アルカリ性で水浴上でエタノールを蒸発させた試料について、検液調製と同じ方法で得たエーテル抽出液をクデルナ・ダニッシュ濃縮器と、ロータリーエバポレーターでエーテルを除去し、分光光度計による紫外吸収法³⁾とクロマトスキャナーによる薄層クロマトグラフ法で定量した結果を Table 2 に示す。BA および POB-Bu はほとんど差がなかったが、DHA はロータリーエバポレーターを用いて室温 ($25 \sim 30^\circ$) でゆるやかに除去したほうが良い回収率を示した。食品について同様の方法で添加実験を行った。

結果を Table 3 に示す。データは 3 回の平均値を示した。

要 約

食品中の DHA, BA, および POB-Bu の定量に関して、薄層クロマトグラフィーで分離したのちに、二波長デンストメーターで直接紫外吸収を測定することにより $85 \sim 102\%$ の回収率を得た。ただし、POB-Bu の場合には、プラスの誤差を生じる傾向があった。スキニングの方法はジグザグスキニング法が積分値の再現性が良く、紫外吸収法の場合に光束にスポットを合わせやすいなどの利点があった。以上の結果、薄層クロマトグラフィーのデンストメトリーによる紫外吸収測定法は、保存料のうち特にパラオキシ安息香酸エステル類の迅速定量法として、十分応用し得ると思われる。

終わりに、本実験に当たり御指導いただいた当衛生研究所長本間達二博士ならびに御協力いただいた島津製作所中野清和技師に深謝いたします。

文 献

- 1) 藤井清次, 細貝裕太郎: “食品衛生の化学” 12 p. 170 (1967), 恒星社厚生閣。
- 2) 同上, p. 168.
- 3) 日本薬学会編: 衛生試験法注解, p. 174 (1973).
- 4) 木村庄治, 寺田志保子: 食衛誌, 14, 91 (1973).
- 5) 竹下隆三, 坂上末次: 同上, 8, 31 (1967).