高速液体クロマトグラフィーによるパン中の プロピオン酸の分析

(昭和 58 年 1 月 25 日受理)

矢部 芳枝* 丹 茂*
二宮 隆博* 岡田 太郎*

Determination of Propionic Acid in Bread by High Performance Liquid Chromatography

Yoshie YABE, Shigeru TAN, Takahiro NINOMIYA
and Taro OKADA

(Institute of Food Hygiene, Japan Food Hygiene Association: 6-1, Jingu-mae,
Shibuya-ku, Tokyo, Japan)

A method was developed for the determination of propionic acid in bread by high performance liquid chromatography. Propionic acid in bread was extracted with methanol and converted to phenacyl ester by treatment with *p*-bromophenacyl bromide, with 18-crown-6 (1, 4, 7, 10, 13, 16-hexaoxacyclooctadecane) as a catalyst. The product was injected into a high performance liquid chromatograph equipped with a Nucleosil 5C₁₈ column; the eluent was methanol-tetrahydrofuran-water (20:40:40). Phenacyl ester of propionic acid was determined at 254 nm.

Recoveries of propionic acid added to white bread at levels of 2.5 and 5.0 mg/5 g were 98.7 and 99.2%, respectively. By this method, no propionic acid (less than 10 µg/g) was detected in commercial breads.

(Received January 25, 1983)

Key words: プロピオン酸 propionic acid; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; フェナシルエステル phenacyl ester; 18-クラウン-6 18-crown-6 (1, 4, 7, 10, 13, 16-hexaoxacyclooctadecane)

プロピオン酸カルシウム及びプロピオン酸ナトリウムは我が国では食品添加物としてパン、洋菓子への使用が認められており、その使用基準はプロピオン酸として 2.5 g/kg 以下である。一般に、食品中のプロピオン酸の測定については、水蒸気蒸留により分離後、ガスクロマトグラフィーによる定量法が多く用いられている¹⁾。また、菅野ら²⁾は熱検出液体クロマトグラフィーにより測定を行っている。

著者らは高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略す) を用いプロピオン酸の分析を試みたが、プロピオン酸は 205~210 nm に弱い吸収を示すのみで満足な

感度は得られなかった。一方、Durst ら³⁾は脂肪酸のカルシウム塩が 18-クラウン-6 (1, 4, 7, 10, 13, 16-hexaoxacyclooctadecane) 触媒下、*p*-ブROMフェナシルブロマイド (以下 PBPB と略す) と速やかに反応し、254 nm において HPLC により検出されることを見出している。

このようなことから、著者らは HPLC を用いフェナシル化によるプロピオン酸の分析について検討した。抽出法は試料にメタノールを加えホモジナイズを行うことにより簡略化し、パン中のプロピオン酸の分析へ応用したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

食パン、ロールパン、菓子パン及び洋菓子はいずれも

* (社) 日本食品衛生協会食品衛生研究所: 東京都渋谷区神宮前 2-6-1

市販品を用いた。

2. 試 薬

プロピオン酸標準原液：プロピオン酸ナトリウム（東京化成工業(株)製）を 105° で1時間乾燥後、1.2967 g をメタノールに溶解し 100 ml とし、プロピオン酸標準原液とする。なお本液 1 ml はプロピオン酸として 10 mg を含む。

プロピオン酸標準溶液：プロピオン酸標準原液を適宜メタノールで希釈する。

反応試液：PBPB（(株)同仁化学研究所製）400 mg 及び 18-クラウン-6（Aldrich 社製）20 mg をアセトニトリルに溶解し 100 ml とする。

0.1 N 硫酸・メタノール溶液：硫酸（試薬特級）1.5 ml にメタノールを加え 500 ml とする。

0.1 N 水酸化カリウム・メタノール溶液：水酸化カリウム（試薬特級）3.5 g を水 10 ml に溶解しメタノールを加え 500 ml とする。

フェノールフタレイン試液：フェノールフタレイン（試薬特級）1 g にエタノール 100 ml を加え溶解する。

アセトニトリル，テトラヒドロフラン：いずれも和光純薬工業(株)製，液体クロマトグラフ用

3. 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製，LC-3A 型

検出器：(株)島津製作所製，SPD-2A 型

ブレンダー：日本精機製作所(株)製

4. 試験溶液の調製

操作の概略を Scheme 1 に示した。

すなわち，試料 5 g にメタノール 50 ml を加えホモジナイズした後，ろ紙（東洋濾紙 No. 5C）を用いてろ過する。ろ液は 250 ml のメスフラスコにとり，メタノールで定容とする。このろ液 10 ml をとり，これに 0.1 N 硫酸・メタノール溶液 1 ml を加え振り混ぜ，次にフェノールフタレイン試液 1 滴を加え，0.1 N 水酸化カリウム・メタノール溶液で中和する。 40° 減圧下で溶媒を除去し，残留物をメタノール 1 ml に溶解し，さらに反応試液 5 ml を加え， 80° の水浴中で15分間反応させる。反応後，20 ml のメスフラスコに移しアセトニトリルで定容にし，試験溶液とする。

5. HPLC の測定条件

Table 1 に示した。

6. 定量 操 作

試験溶液 10 μ l を高速液体クロマトグラフに注入して得られたクロマトグラムピーク高さを測定し，あらかじめ作成した検量線により定量を行う。

7. 検量線の作成

プロピオン酸標準溶液（20～400 μ g/ml）1 ml に 0.1 N 硫酸・メタノール溶液 1 ml を加え，以後 4. 試験溶液の調製同様に操作し標準系列とする。この標準系列のそれぞれ 10 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し，絶

Scheme 1. Analytical procedure of propionic acid in bread

Table 1. Operating Conditions for Analysis of Propionic Acid by High Performance Liquid Chromatography

Column	: Nucleosil 5C ₁₈ (250×4.6 mm id)
Eluent	: methanol-tetrahydrofuran-water (20:40:40)
Flow rate	: 0.7 ml/min
Detector	: UV (254 nm)
Attenuation	: 0.16 AUFS
Chart speed	: 5 mm/min
Injection volume	: 10 μ l

対検量線法により検量線の作成を行う。

結果及び考察

1. フェナシル化反応条件について

1.1 溶媒についての検討

Durst ら³⁾は 18-クラウン-6 触媒下、脂肪酸のフェナシル化を行う際の溶媒として、アセトニトリル又はベンゼンを用いている。一方、カルボン酸類のフェナシル化では、アセトニトリルの方がベンゼンに比べて反応が迅速であるといわれている⁴⁾。そこでプロピオン酸 200 μ g (200 μ g/ml のプロピオン酸標準溶液 1 ml) を用いて、検量線の作成に従い操作し、40° 減圧下で溶媒を留去した後、残留物に反応試液のみを加えて反応を行ったところ、クロマトグラム上のピーク高さはわずかで、フェナシルエステル生成率は非常に低い結果となった。次に残留物をメタノール 1 ml に溶解し、反応試液 5 ml を加え反応させたところ、フェナシルエステルの生成率はクロマトグラム上のピーク高さで比較して約 20 倍に増加した。

1.2 PBPB 添加量の検討

脂肪酸のフェナシル化において、反応試液の PBPB と 18-クラウン-6 の混合モル比は通常 10:1~20:1 とされている³⁾。このため、今回の実験においても、モル比が約 20:1 となるように反応試液を調製することにした。

PBPB 添加量を検討するにあたり、PBPB 量が 0.2~5.0 mg/ml、またこれに対応する 18-クラウン-6 量が 0.01~0.25 mg/ml の混合溶液を調製した。プロピオン酸 200 μ g 及びこの混合溶液を用い、実験方法 7 に従い操作し反応を行った。このとき添加された PBPB 量は 1~25 mg であり、Fig. 1 に示したように 1 mg ではフェナシルエステルの生成率は低く、5 mg において増加し 25 mg まで一定で増加がなかった。油脂等の試料中の脂肪酸を分析する際、PBPB は過剰に添加されること⁵⁾、またクロマトグラム上プロピオン酸のフェナシルエステルと PBPB の保持時間がやや近いこと、妨害とならない量であることを考慮し、反応試液として PBPB 4 mg/ml を含むものを 5 ml 加えることとした。

1.3 反応温度及び時間の検討

プロピオン酸 200 μ g を用い、水浴の温度 60, 70, 80

Fig. 1. Effect of *p*-bromophenacyl bromide on the formation of phenacyl ester of propionic acid (0.2 mg)

Operating conditions are shown in Table 1.

及び 90° において、それぞれ 15 分間反応を行った。この結果 60~90° ではプロピオン酸のフェナシルエステル生成率は一定であったが、今回の実験では反応温度を 80° に定めた。

また、反応温度を 80° と一定にして、反応時間を 5, 10, 15 及び 20 分間とし反応を行ったところ、フェナシルエステル生成率は一定であったが、食品分析への応用を考慮し、このときの反応を十分に行うため反応時間は 15 分間とした。

2. 溶離液の検討

ODS 系のカラム (Nucleosil 5C₁₈) を用い、アセトニトリル-水系、メタノール-水系さらにメタノール-テトラヒドロフラン-水系について溶離液の検討を行った。アセトニトリル-水系及びメタノール-水系の溶離液については、試験溶液中の未知物質のため、プロピオン酸のフェナシルエステルの保持時間に妨害物質が認められた。メタノール-テトラヒドロフラン-水系では、それぞれの混合比が 20:40:40 において妨害物質と分離することができた。

また酢酸、酪酸及び乳酸はプロピオン酸と炭素数が近く、これらはクロマトグラム上妨害となることも考えられる。そこで、酢酸、酪酸、乳酸及びプロピオン酸それぞれ 200 μ g をとりフェナシル化を行い、さきのメタノール-テトラヒドロフラン-水系の溶離液を用い、HPLC により分析したところ、いずれも妨害とならないことがわかった。

以上より、溶離液としてメタノール-テトラヒドロフラン-水 (20:40:40) を以後の実験に用いた。

3. 検量線及び検出限界

実験方法 7 に述べた方法に従って検量線を作成した結果、プロピオン酸として 10~200 ng の範囲で良好な直線性を示した (Fig. 2)。また本実験での検出限界は 10 μ g/g であった。

4. 添加回収実験

食パン 5 g にプロピオン酸 2.5 及び 5.0 mg を添加後、実験方法 4 に従って操作し、回収率を求め Table 2

Fig. 2. Calibration curve of propionic acid
Operating conditions are shown in Table 1.

Table 2. Recovery of Propionic Acid Added to White Bread

Added (mg/5 g)	Found (mg/5 g)	Recovery (%)	Average (%)
2.5	2.46	98.3	98.7 (1.7) *
2.5	2.49	99.5	
2.5	2.51	100.5	
2.5	2.41	96.5	
5.0	4.93	98.6	99.2 (0.9) *
5.0	4.96	99.2	
5.0	5.02	100.4	
5.0	4.92	98.4	

Operating conditions are shown in Table 1.

* Coefficient of variation (%) in parentheses

に示した。また、このとき得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示した。回収率はそれぞれ 98.7, 99.2% であり、ほぼ満足すべき結果となった。

食パンと同様に、チョコレートケーキのスポンジについても添加回収実験を行ったが、約 60% と低い回収率であった。操作中 40° 減圧下で溶媒を留去した時点で、油滴状物質がナスフラスコ内に多く残ったことから、これがプロピオン酸のフェナシル化を妨害していることも考えられ、油脂を除く操作を行う等の検討が必要である。

Fig. 3. High performance liquid chromatogram of extract of white bread added propionic acid (5.0 mg/5 g)

Operating conditions are shown in Table 1.

5. 市販品への応用

市販の食パン (8 件)、ロールパン (4 件)、菓子パン (4 件) について本法を適用した結果、いずれからもプロピオン酸は検出されなかった。

ま と め

HPLC を用いフェナシル化によるパン中のプロピオン酸の分析について検討した。抽出法は試料にメタノールを加えホモジナイズを行うことにより簡略化した。本法による回収率は 98.7~99.2% (C.V. 0.9~1.7), 検出限界は 10 μ g/g であり、ほぼ良好な結果が得られた。

本法はプロピオン酸が 18-クラウン-6 触媒により短時間でフェナシル化でき、従来の方法と比較して抽出操作も簡単であり、さらにクリーンアップを省略して分析に供することができるため日常試験として用い得る方法であると考えられる。

なお、本研究の要旨は日本食品衛生学会第44回学術講演会 (1982年11月, 福岡) において発表した。

文 献

- 1) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解” p. 323~325 (1980) 金原出版。
- 2) 菅野三郎, 和田 裕, 川名清子: 食衛誌. 10, 371~375 (1969).
- 3) Durst, H. D., Milano, M., Kikta, E. J., Connelly, S. A., Grushka, E.: Anal. Chem. 47, 1797~1801 (1975).
- 4) Durst, H. D.: Tetrahedron Lett. 2421~2424 (1974).
- 5) Tweeten, T. N., Wetzal, D. L.: Cereal Chem. 56, 398~402 (1979).