薄層クロマトグラフィーによる合成保存料 およびズルチンの分析

(昭和40年10月18日受理)

貞松厚子^{*1} 喜納健夫^{*2}
有吉敏彦^{*2} 高畠英伍^{*2}

Detection of Food Preservatives and Dulcin by Thin Layer Chromatography

Atsuko SADAMATSU^{*1}, Takeo KINA^{*2}, Toshihiko ARIYOSHI^{*2},
and Eigo TAKABATAKE^{*2}

(^{*1}Nagasaki Prefectural Public Health Laboratory: 128, Nakagawa-machi,
Nagasaki; ^{*2}Pharmaceutical Faculty, Nagasaki University:
4-23, Bunkyo-machi, Nagasaki)

Thin layer chromatography was applied to the detection of benzoic, salicylic, dehydroacetic, and sorbic acids, ethyl, propyl and butyl esters of *p*-hydroxybenzoate and dulcin. Kieselgel G activated at 80°C for 30 minutes or Wakogel B-5 activated at 100°C for 30 minutes was used. For the detection of the spots, 1% ferric chloride solution, 0.1% bromocresolgreen alcohol solution and 1% potassium permanganate solution were successively sprayed. The chromatoplate was developed with chloroform-propionic acid (4:1) mixture for the group separation of the esters, the acids and dulcin.

Chloroform-ethyl acetate (9:1) mixture was used for the separation of sorbic acid from benzoic acid and dehydroacetic acid, and also for the identification of esters (as *p*-hydroxybenzoic acid). The preservatives were clearly separated with *n*-heptane-propionic acid (4:1) mixture, by which the good separation of dehydroacetic acid from benzoic acid and sorbic acid has been achieved.

(Received October 18, 1965)

緒 言

さまざまな食品に多種の食品添加物が使用されている現在、その系統的簡易検出法の確立が望まれている。合成保存料の検出には従来ペーパークロマトグラフィー^{1)~4)}およびろ紙電気泳動法が用いられ、最近薄層クロマトグラフィー^{5)~8)}による検出法もいくつか報告されている。われわれも本法を用いて食品中の合成保存料(安息香酸、サリチル酸、パラオキシ安息香酸ならびにそのエステル類、デヒドロ酢酸、ソルビン酸)および合成甘味料(ズルチン)について、これらの添加物が同時に使用されている場合を考慮して系統的に検出する方法を検討し、比較的良好な結果を得たので報告する。

実験方法

(1) 試料

安息香酸(BAと略記する、以下同じ)、サリチル酸(SA)、パラオキシ安息香酸(PA)、パラオキシ安息香酸エチルエステル(PE)、プロピルエステル(PP)、ブチルエステル(PB)、デヒドロ酢酸(DHA)、ソルビン酸(SOA)、ズルチン(DLC)を用いた。BAおよびSAは市販品(一級)を水から2回、PA、PE、PP、PB、DHA、SOA(それぞれ一級品)およびDLC(添加物用)はエタノールから3回再結晶したものをそれぞれ0.1%エタノール溶液とした。

(2) 吸着剤

吸着剤A. キーゼルゲルG(メルク製、ギブス13%)
20gに水40mlを加え激しく振りまぜ使用した。

吸着剤B. ワコゲルB-5(和光純薬製・ギブス5

^{*1} 長崎県衛生研究所: 長崎市の中川町128

^{*2} 長崎大学薬学部: 長崎市文教町4-23

%) 20 g に水 30 ml を加え激しく振りまぜ使用した。

Camag 製アブリケーターを用いて平滑なガラス板上に厚さ約 0.25 mm の吸着層を作り, 30 分放置後, 吸着剤 A では 80°, 30 分, 吸着剤 B では 100°, 30 分加熱し活性化したプレートを使用した。

(3) 展開溶媒

I. クロロホルム-プロピオン酸 4 : 1

II. クロロホルム-酢酸エチル 9 : 1

III. *n*-ヘプタン-プロピオン酸 4 : 1

(4) 展開

試料の 0.1% エタノール溶液約 5 μ l を下端より 3 cm のところに付し原点とし, 24 cm $\times$ 11 cm $\times$ 23 cm の展開槽で上昇法により原点から約 10 cm まで展開する。展開に要する時間は溶媒により差があるが 30~50 分 (たとえば, 溶媒 I, 室温 12° で 35 分, 溶媒 II, 13° で 40 分, 溶媒 III, 14° で 40 分) を要する。

(5) 発色剤

① 1% 塩化第二鉄溶液

② 0.1% プロムクレゾールグリーン (BCG) ・エタノール溶液 緑色を呈するまで希水酸化ナトリウム溶液

を滴加する。

③ 1% 過マンガン酸カリウム溶液

実験結果

1. 保存料およびズルチンの薄層クロマトグラフィー

(1) 発色剤について

各試料を展開したプレートに, まず 1% 塩化第二鉄溶液を噴霧すると, SA は特有の紫色を呈し, PA, DHA, SOA は多量に存在すれば黄色を, BA も淡かっ色を呈する。つぎに BCG 溶液を噴霧すると BA が暗かっ色~淡紫色を呈し, その上に続けて 1% 過マンガン酸カリウム溶液を噴霧すると BA は消えて, 他の PA, PE, PP, PB, DHA, SOA, DLC が黄かっ色を呈する。この場合, BA の検出に BCG 溶液を噴霧するので展開溶媒に酸を用いたときにはプレートの酸を十分に揮散させる必要がある。以上のように 1% 塩化第二鉄溶液, BCG 溶液および 1% 過マンガン酸カリウム溶液の順に噴霧することにより 1 枚のプレート上で同時に各種の添加物を検出できる。発色剤による呈色およびそれぞれの検出限度を Table 1 に示す。

Table 1. Color of Spots of Food Preservatives and Dulcin on Thin Layer Plate

Food Preservative and Dulcin \ Reagent	1% FeCl ₃	1% FeCl ₃ , 0.1% BCG	1% FeCl ₃ , 1% KMnO ₄
Benzoic acid	light brown	dark brown light purple (50 μ g) purple	
Salicylic acid	purple		dark purple (1 μ g)
Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	yellow*		yellow brown (0.5 μ g)*
Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	yellow*		yellow brown (0.5 μ g)*
Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	yellow*		yellow brown (0.5 μ g)*
Dehydroacetic acid	yellow		yellow brown (1 μ g)
Sorbic acid	yellow		yellow (0.5 μ g)
Dulcin			yellow brown (0.5 μ g)

(): The values shown in parentheses represent the minimum amount capable of being detected on thin layer plate

* Color of the spot of *p*-hydroxybenzoic acid obtained from the ester

(2) 展開溶媒について

i) 溶媒 I を用いるとき (Fig. 1-a): PA 以外の酸性保存料 (BA, SA, DHA, SOA) は Rf 0.9 以上, パラオキシン安息香酸およびそのエステル類 (PA, PE, PP, PB) は 0.6~0.8, ズルチンは 0.4 に大別して展開される。

ii) 溶媒 II を用いるとき (Fig. 1-b, -c): Fig. 1-b に示すように PA 以外の酸性保存料 (BA, SA, DHA, SOA) は tailing し分離困難であるが, Fig. 1-c にみられるように吸着剤 B では, BA と SOA ならびに DHA と SOA がそれぞれよく分離される。このように同じ溶

媒を用いても吸着剤に含まれるギブスの含有量により保存料の分離に著しい差が認められる。SA は特有の発色のために容易に SOA と区別して検出でき, ズルチンはいずれの場合も原点にとどまり他の保存料と分離しうる。

エステル類のアルコール基の炭素数がますますともに, いずれの吸着剤でも Rf 値は大きくなるが, その差はさほど著しくはなく同定は困難である。

パラオキシン安息香酸エステル類 (PE, PP, PB) の確認には, 試料の一部を 10% NaOH 溶液 2~3 ml に溶かし, 水を 3 ml 加えて, 還流冷却器を付け石綿金網上で 15 分間

Fig. 1. Chromatograms of food preservatives and dulcin

Adsorbent	Solvent
(a) Wakogel B-5 (B)	Chloroform-Propionic acid 4-1 (I)
(b) Kieselgel G (A)	Chloroform-Ethylacetate 9-1 (II)
(c) Wakogel B-5 (B)	Chloroform-Ethylacetate 9-1 (II)
(d) Kieselgel G (A)	<i>n</i> -Heptane-Propionic acid 4-1 (III)

BA; Benzoic acid	PE; Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
DHA; Dehydroacetic acid	PP; Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
SOA; Sorbic acid	PB; Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
SA; Salicylic acid	DLC; Dulcin
PA; <i>p</i> -hydroxybenzoic acid	

煮沸し、加水分解したのち、希塩酸で酸性としエーテル抽出し、エーテル留去後 PA と並行して展開すればよい。

ズルチンは原点にとどまり、他の物質と分離しうる。とくに PA の定性反応である Millon-Lintner 反応でズルチンも紅色を呈し、PA の判定に困難であったが、両者の分離に十分活用しうる。

iii) 溶媒Ⅲを用いるとき (Fig. 1-d): Fig. 1-d に示すように、スポットが小さくまとまり、酸性保存料が併用されている場合、あるいは、酸性保存料からエステル類またはズルチンを分離するのに比較的よい溶媒である。とくに BA と DHA ならびに DHA と SOA の分離によい。

以上の2種の吸着剤と3種の展開溶媒における展開値をまとめると Table 2 のごとくなる。

2. 食品中の保存料およびズルチンの分離検出法 食品よりの抽出法

抽出法: 日本薬学会協定衛生試験法、保存料試験法の溶媒による抽出分離法に準じて、エーテル50~100 ml を用いて1回抽出した。得られたエーテル抽出液を水洗後1%炭酸水素ナトリウム溶液20 ml で2回抽出し酸性保存料を抽出する。エーテル層をとりエーテルを留去し残留物をフラクションXとする。水層は塩酸性としエーテル50 ml で1回抽出し、水洗し、エーテルを留去し残留物をフラクションYとする。

Table 2. Rf Values of Food Preservatives and Dulcin

Compound	Solvent* ¹	I		II		III
	Adsorbent* ²	B	A	B	A	A
Benzoic acid		0.87	0.42	0.83		0.82
Salicylic acid		0.97	0.20	0.34		0.63
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid		0.63	0.47	0.02		0.22
Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate		0.76	0.56	0.73		0.21
Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate		0.78	0.61	0.76		0.25
Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate		0.81	0.67	0.79		0.28
Dehydroacetic acid		0.88	0.33	0.84		0.27
Sorbic acid		0.99	0.35	0.22		0.72
Dulcin		0.41	0	0		0.13

*¹ I ; Chloroform-Propionic acid (4 : 1)

II ; Chloroform-Ethylacetate (9 : 1)

III ; *n*-Heptane-Propionic acid (4 : 1)*² A ; Kieselgel G

B ; Wakogel B-5

Thin layer chromatography

Fraction	Adsorbent	Solvent
For group separation		
X, Y	A or B	I
For detection of individuals		
Y	B	II
	A or B	III
Z	B	II

Fig. 1. A scheme of separation of food preservatives and dulcin in foods

フラクシオンX, Yをそれぞれエタノール5 ml に溶解し、内径約1 mmの毛細管で薄層を剝離しないように径2~3 mmにスポットし、さらに同じプレート上に対照品の0.1%エタノール液をつけて、溶媒Iで展開すると、PA以外の酸性保存料はRf 0.9~1.0の位置に、パラオキシ安息香酸類はRf 0.6~0.8に、ズルチンはRf 0.4に検出された。

PA以外の酸性保存料の存在が考えられるときは、吸着剤Bと溶媒IIおよび吸着剤Aと溶媒IIIにより展開し、対照品のRf値と比較して判定した。

パラオキシ安息香酸エステル類の存在が考えられるときは、フラクシオンXの一部を加水分解し、フラクシオンZとする。フラクシオンXとZならびにエステル類とPAの対照品とを並行展開して確認した。

ズルチンは溶媒IおよびIIIで展開して確認することができた。

以上の方法でみそ漬、かす漬、きざみ漬、乳酸菌飲料からDHA、きざみ漬、煮豆からSOA、みそ漬、らっきょう漬、海茸漬、醤油からエステル類および乳酸菌飲料からズルチンが検出された。

結 論

保存料(BA, SA, PA, PE, PP, PB, DHA, SOA)およびズルチンを薄層クロマトグラフィーにより分離検出を試み、つぎの結果を得た。

1. 同じプレート上に発色剤として1%塩化第二鉄溶液、BCG溶液および1%過マンガン酸カリウム溶液を続けて噴霧することにより精度よく各保存料およびズルチンを検出することができた。

2. クロロホルム-プロピオン酸(4:1)を用いて展開し、PA以外の酸性保存料(BA, SA, DHA, SOA)、パラオキシ安息香酸ならびにそのエステル類(PA, PE, PP, PB)およびズルチンに大別し、クロロホルム-酢酸

エチル(9:1)および*n*-ヘプタン-プロピオン酸(4:1)で展開し、各保存料およびズルチンをそれぞれ分離確認した。

3. PAの定性反応であるMillon-Lintner反応はズルチンでも紅色を呈し、食品にパラオキシ安息香酸エステル類とズルチンが併用されている場合、あるいはズルチン単独でもPAの判定に疑問を生ぜしめるが、著者らの方法で容易に分離検出できた。

4. 以上の方法で食品中の保存料およびズルチンを系統的に容易に検出することができた。

終りに臨み、本研究を行なう機会を与えられ、また終始ご支援を賜った長崎県衛生研究所 高橋克巳所長に深謝する。

本報の概要は、第20回日本薬学会大会(昭和40年4月7日、福岡市)で発表。

文 献

- 1) 菰田太郎, 竹下隆三: 食衛誌. **2**, No. 4, 72 (1961).
- 2) 菰田太郎, 竹下隆三: 食衛誌. **3**, 374 (1962).
- 3) 菰田太郎, 竹下隆三, 他: 第17回日本薬学会発表 43~59 (1963).
- 4) 菅野三郎, 他: 第17回日本薬学会発表 43~64 (1963).
- 5) 菰田太郎, 竹下隆三: 第19回日本薬学会発表 6 I, 51 (1964).
- 6) J. W. Copuis-Peereboom, H. W. Beekes: J. Chromatog. **4**, 417 (1964).
- 7) H. Ganshirt, K. Morianz: Arch. Pharm. **293**, 1065 (1964).
- 8) K. Randerath: "Dunschicht Chromatographie" p. 175, 163 (1963), Verlag Chemie, Academic.