保存剤の安定性に関する研究 (I)

とくにデヒドロ酢酸の水溶液中における分解機構について

(昭和 41 年 9 月 30 日 受 理)

青 山 敏 信* 井 口 定 男* 山本孫兵衛*

Stability of Preservatives (I) Degradation Mechanism of Dehydroacetic Acid in Acidic Aqueous Solution

Toshinobu AOYAMA, Sadao IGUCHI
and Magobei YAMAMOTO

(Faculty of Pharmaceutical Science, Kyushu University: Katakasu, Fukuoka)

The degradation mode of sorbic acid, dehydroacetic acid, methyl- and propyl-*p*-hydroxybenzoate in aqueous solution respectively was studied, using gas chromatographic assay method. It was noted that sorbic acid both in acidic and alkaline region was the most stable of these preservatives, whereas dehydroacetic acid was rapidly decomposed either in acidic or in strong alkaline and, hydrolysis of *p*-hydroxybenzoate was observed in alkaline region.

The simultaneous detection of 2,6-dimethyl-4-pyrone, 2,6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid, triacetic acid lactone and 2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one (diacetylacetone) as presumable degradation products of dehydroacetic acid could be readily implemented with direct injection gas chromatography.

The degradation mechanisms of dehydroacetic acid and 2,6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid, both in acidic solution at 60° respectively, were followed by gas chromatography at a given time interval. As degradation products of dehydroacetic acid and 2,6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid, 2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one (diacetylacetone) and 2,6-dimethyl-4-pyrone were identified with direct injection gas chromatography, and 3-carboxy-2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one was separable newly as the ester.

According to the degradation products, the degradation pathway of dehydroacetic acid in acidic solution was considered to be the fact that of the lactone ring dehydroacetic acid was first broken to produce 3-carboxy-2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one, and then its decarboxylation immediately following the reaction yielded 2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one, which was dehydrated finally to 2,6-dimethyl-4-pyrone.

(Received September 30, 1966)

1. ま え が き

保存剤の安定性を検討するための定量手段は、単独および複合系試料のいかに問わず、保存剤そのものを直接定量できる分離分析法であることが最も望ましい。その有力な手段の一つはガスクロマトグラフィー (GLC) である。GLC による実験結果の一部についてはすでに報告したが^{1)~3)}、今回はさらに GLC を活用して、保存剤の安定性検討の問題をとりあげた。保存剤としては繁

用されるソルビン酸 (SOA)、パラオキシニン安息香酸メチル (MHB)、プロピル (PHB) およびデヒドロ酢酸 (DHA) 等を選び、とくにそれらの水溶液中の残存量を経時的に定量して検討を進めた。その結果、中性、アルカリ域では MHB, PHB が不安定で、酸性域では DHA が不安定であった。さらにこの際の MHB, PHB および DHA の分解物も同時に GLC で検出することができた。今回はとくに DHA の酸性条件による分解に注目することにした。その理由は従来 DHA の抗黴性は酸性領域におい

* 九州大学薬学部：福岡市大字堅粕1276

Fig. 1.

て最も有効であるとされているゆえ, DHA 使用上の至適条件と溶液における安定性とは相反するという結果が示されることになったからである。

DHA の酸分解については, 非常に古くから Collie⁴⁾⁵⁾, Feist⁶⁾ らによってかなり詳細な研究がすでに報告され, Fig. 1 に示す過程が一応認められている。すなわち DHA を 90% 硫酸と加熱すれば triacetic acid lactone (TAL) に変化するが (I → V), つぎに硫酸濃度が 85 % では主として 2,6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid (DMP-COOH) が生成されている (I → II → III)。また一方濃塩酸との加熱では, 2,6-dimethyl-4-pyrone を生成する (I → II → IV)。これらはいずれも相当苛酷な条件で行なわれた反応ばかりであるが, これらの DHA の分解反応は当然一般化学反応と同様に熱力学的諸定数で規制されるわけであるから, 比較的緩和な反応条件, たとえば食品ならびに医薬品製剤等に一般に保存剤を使用する場合等の pH, 温度および濃度等でも当然 DHA の酸分解は熱力学に基づく規制量だけ進行するはずである。佐々木⁷⁾ も保存剤使用条件において DHA の変化を検討しているが, その結果によれば DHA の分解過程を Fig. 1 (I → II → III → IV) であるとし, 中間体として DMP-COOH (III) の存在を発表している。そこでわれわれは DHA の分解反応のより詳細な検討を進めるべくガスクロマトグラム上に検出される DHA 分解物の変動から DHA の分解機構の解明を実施し, 酸性領域における DHA の分解機構を新しく確認することができたのでこれについても一部報告する。

2. 実験方法

2.1 保存試料溶液作成と保存法

保存剤試料を pH 3.3 (クエン酸緩衝液), 5.0 (クエン酸緩衝液), 7.0 (リン酸緩衝液), 9.2 (ホウ砂緩衝液) および 12.0 (ホウ砂緩衝液) の 5 水準の緩衝液に溶解し, MHB および PHB は 0.5 mg/ml, SOA および DHA は 1.0 mg/ml の濃度に正確に調製し, 経時保存用試料溶液とした。

各試料溶液を 25 ml ずつアンプル内に封入し, 完全にシャ光して室温 (15~20°), 37° および 47° の三条件で 20 日間にわたり経時保存した。

2.2 保存剤の抽出

経時保存試料溶液 20 ml を正確にとり, 塩酸酸性で最初エーテル 30 ml, ついで 20 ml を用いて 2 回抽出し, 少量の水で 2 回水洗, 脱水後エーテルをそのまま加温留去する。しかし DHA の場合はその分解生成物である DMP がエーテルに不溶であるため, 抽出溶媒としてクロロホルムを用い, さらに溶媒留去の際に DHA の揮散損失を防ぐ意味で蒸発乾固を極力避けるよう留意した。なおこの抽出法の平均回収率はそれぞれ MHB: 100.3 (±0.3), PHB: 100.7 (±1.4), SOA: 99.2 (±0.7), DHA: 99.4 (±1.3) であり, 保存剤はほとんど定量的に抽出されていることが確かめられた。

2.3 GLC 定量法

2.3.1 条件: 島津製 GC-1B 型ガスクロマトグラフ (水素炎イオン化検出器 HFD-1 型) を使用した。

長期間にわたる多数検体の測定には多液相短分離管に

よると非常にすぐれた再現性を与えるので、今回はこの方式に従い、U形ステンレスカラム 4 mm×75 cm に充填剤として 30% DC 550 silicone oil/celeite 545 (80~100メッシュ)をつめ、温度170~205°, N₂ ガス 30 ml/min (P_i 2 kg/cm²) とした。

2.3.2 保存剤および予想 DHA 分解物質の検量線:
3,4-dimethylphenol を内部標準 (IS) に用いるいわゆる IS 法に従い、Table 1 に示す条件で作製した。いずれも検討範囲内においてピーク高比と重量比の間に直線関係が成立した。しかし、DMP-COOH は気化室温度を

Table 1. Calibration Curve Data^{a)}

	Sampling ^{b)} mg	Standard ^{c)} %	Column temp. °C	Coeff. K ^{d)}
Methyl- <i>p</i> -hydroxybenzoate (MHB)	5~20	0.3	205	0.570
Propyl- <i>p</i> -hydroxybenzoate (PHB)	5~20	0.3	205	0.147
Sorbic acid (SOA)	5~15	1.2	170	0.925
Dehydroacetic acid (DHA)	10~40	0.5	190	0.166
2,6-Dimethyl-4-pyrone (DMP)	5~15	0.5	190	0.510
DMP-3-carboxylic acid (DMP-COOH)	10~40	0.5	190	0.060

- a) GLC conditions were as follows: Shimadzu model GC-IB gas chromatograph equipped with double column and dual flame ionization detector system, stainless U shaped column, 0.4×75 cm, packed with 30% W/W DC 550 silicone oil on celeite 545, 80~100 mesh, column temperature, 170~205°C, nitrogen flow rate 30 ml/min at inlet pressure 2 kg/cm²
b) Final solution for injections were made with 1 ml of internal standard in acetone
c) 3,4-Dimethylphenol was used as internal standard
d) Coefficient K = $\frac{\text{Peak height unknown} \times \text{Weight of standard}}{\text{Peak height standard} \times \text{Weight of unknown}}$

Table 2. Percentage of Preservative Remained in Solution

pH	3.3						5.0						7.0					
Temp. (°C)	Room (15~20)		37		47		Room		37		47		Room		37		47	
Time (day)	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20
MHB	100	100	100	98	100	97	100	99	100	99	97	97	100	99	100	98	99	87
PHB	100	100	100	100	100	100	99	99	101	98	100	97	99	99	100	98	100	96
SOA	100	100	100	100	98	97	100	101	99	98	99	99	100	100	98	100	97	97
DHA	100	92	81	79	60	50	98	94	76	77	57	40	98	98	98	98	95	90

9.2						12.0					
Room		37		47		Room		37		47	
10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20
98	95	92	74	51	20	—	—	—	—	—	—
99	96	89	89	74	63	—	—	—	—	—	—
100	100	100	100	100	98	100	100	97	96	93	94
98	98	98	95	96	94	97	94	87	85	75	72

Preparation of solution for aging and estimation procedure were as follows: Solutions of 0.5 mg/ml for MHB and PHB, and of 1.0 mg/ml for SOA and DHA were made with citrate buffer pH 3.3, 5.0, phosphate buffer pH 7.0 and borate buffer pH 9.2, 12.0, respectively. Approximately 25 ml of each solution was pipetted out and sealed into an ampule which was stored at known temperature avoiding from light. Accurately 20 ml of each solution at given aging time was taken, acidified with N HCl and extracted with 30 ml of ether or chloroform twice. After evaporated the solvent to dryness, to the residue, 1 ml of internal standard in acetone solution was added to make a solution for GLC injection.

200°以下に規制すれば一応検量線が得られはするが、温度が上昇すると脱炭酸反応が著しく進行し、DMP の生成が増大するので、直接法よりさらに安全性の高いエステル化法の検討も行なった。すなわちあらかじめジアゾメタンエーテル溶液約 2 ml を用いてメチルエステル化し、溶媒を留去し、0.5% IS アセトン溶液 1 ml を正確に加えて GLC 試料として検量線の作成を行なったところ、直接法の場合より良好な検量線 ($K = 0.131$) を得ることができた。

3. 実験結果と考察

3.1 保存剤の経時変化

10日および20日経過後の保存剤残存率(%)を GLC で測定した結果は Table 2 に示した。まず SOA は酸性、アルカリ性の両域にわたって残存率が比較的高く、今回検討した保存剤のうちでは最も安定なものといえる結果を示した。

つぎに MHB および PHB は酸性領域ではきわめて安定であるが、アルカリ側になると当然のことながら加水分解のため残存率は温度および時間と反比例して低下し、ガスクロマトグラムには加水分解生成物であるパラ

オキシ安息香酸のピークの逐次増加が認められた (rt_R : 3.69)。

DHA については酸性領域においてとくに分解反応が著しく進行し、非常に不安定である事実がまず明らかになった。

3.2 DHA の酸性水溶液中における分解

まず DHA の分解生成物と目されている各化合物の標品については GLC による分離条件をしらべ、いずれも分離定量できる条件を見いだすことができた。その基本的分離チャートを Fig. 2 に示す。この GLC を応用すれば DHA の水溶液中における分解物の同定はきわめて容易になると考えられる。つぎに DHA 分解試料として、最も分解の著しい酸性領域において保存した検体を用い検討を行なった。

たとえば pH 4 (酢酸緩衝液) で 60°, 104時間放置試料の例をあげると、クロロホルム抽出物をそのまま前処置なしに GLC により検索した結果として、Fig. 3 (a) に示すごとく残存 DHA ならびに分解生成物と考えられる DMP が確認されるとともに、これ以外に diacetyl-

Peak (relative retention time)

1. Diacetylacetone (0.74)
2. Internal standard IS (1.00)
3. 2,6-Dimethyl-4-pyrone (1.55)
4. Dehydroacetic acid (2.44)
5. Triacetic acid lactone (3.18)
6. 2,6-Dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid methyl ester (5.92)
7. 2,6-Dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid (8.15)

For conditions see Table 1

Fig. 2. Separation of a mixture of dehydroacetic acid and related compounds

Peak

1. Diacetyl acetone
2. Internal standard
3. 2,6-Dimethyl-4-pyrone
4. Dehydroacetic acid

For conditions see Table 1. 0.1% Dehydroacetic acid and 2,6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid in pH 4 acetate buffer were stored at 60°C for 104 and 94 hr. respectively. Sample for analysis was made by extraction with chloroform

Fig. 3. Chromatogram of degradation product of dehydroacetic acid (a) and 2,6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid (b) in acidic aqueous solution

For conditions see Table 1. 0.1% 2,6-Dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid in pH 4 acetate buffer was stored at 60°C, 12 hr.

Sample for injection for (a) was extraction with chloroform and for (b) further treated with diazomethane ethereal solution.

Fig. 4. Chromatogram of degradation product of 2,6-dimethyl-4-pyrone-3-carboxylic acid in acidic aqueous solution with (b) and without (a) methylation

acetone (DAA) を新たに分離同定することができた。

一方 DHA から DMP への反応の中間体としては従来 DMP-COOH が推定されているが今回保存試料からは DMP-COOH は全く検出されなかった。そこでわれわれは DMP-COOH が検出の過程で分解するために捕捉されなかったのか、または今回の保存試料中には実際に生成されなかったのかという疑問点を検討することとした。すなわち、別途合成した DMP-COOH 標品を pH 4、酢酸緩衝液に溶解し、DHA について適用した実験条件と全く同一条件で保存したのち、クロロホルム抽出物を前処理なしに GLC による検索を行なった。

今回の GLC の条件は気化器温度を 200°以下にコントロールしたが、DMP-COOH の場合も GLC に得られる分解生成物ピークは DAA と DMP のみであった。Fig. 3 (b) にその代表例をあげるが、これは DMP-COOH を pH 4 (酢酸緩衝液) で 60°, 94 時間放置の場合ですでに DMP-COOH の残存は認められない。これは DMP-COOH 保存溶液試料抽出物をエステル化せずそのまま GLC にかけて得られた結果であるが、一方この同一保存試料をジアゾメタンエーテルでエステル化処

理を行ってから GLC にかけた結果は Fig. 4 (b) に示す。DAA 相当ピーク (rt_R : 0.74) 高は (a) の場合より大部分減少し、その代りに新たに DMP と IS の中位に新ピーク (rt_R : 1.27) の出現がみられた。われわれはこのピークに該当する物質はラクトン環が開環した 3-carboxy-2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one のメチルエステルと想定している。その理由としては DAA そのものはジアゾメタン処理を行なっても GLC には全く変化が認められないことを確認しているので、エステル化処理後も依然として DAA はもとの t_R のところにピークを示すはずであり、したがって Fig. 4 (b) に示されるピークがもともと DAA そのものであると考えることができる。エステル化処理を行わない前処理なしの場合に認められた DAA 相当ピーク (Fig. 4 (a)) には、DAA と今 1 つの化合物、すなわち気化器中で熱分解して DAA となる化合物の合計 2 種類の物質がこの保存試料溶液中には含まれていたと推論するものである。

なお DHA 保存溶液試料のクロロホルム抽出物をジアゾメタンエーテルでエステル化を行なった GLC の結果は Fig. 5 に示すが、前処理なしの直接法の場合には認

Peak

1. Diacetylacetone
2. Internal standard
3. 3-Carboxy-2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one methyl ester
4. 2,6-Dimethyl-4-pyrone
5. Dehydroacetic acid

For conditions see Table 1. 0.1% Dehydroacetic acid in pH 4 acetate buffer was stored at 60°C, 72 hr. Sample for injection for (a) was extraction with chloroform and for (b) further treated diazomethane etheral solution.

Fig. 5. Chromatogram of degradation product of dehydroacetic acid in acidic aqueous solution with (b) and without (a) methylation

Fig. 6. Degradation mechanism of dehydroacetic acid in acidic aqueous solution

められなかった新ピーク (rt_R : 1.27) が新たに検出され, DMP-COOH の場合と全く同様な結果が得られた。

これらの事実からわれわれは前述のごとくジアゾメタンエステル化法により検知される物質 (rt_R : 1.27) は, DHA が酸性水溶液中でラクトン環の開環を行なったときまず生成すると考えられる 3-carboxy-2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one (DAA-COOH) (VII) であり, このものは前処理なしで直接 GLC を行なう場合には気化器内で熱分解を受け DAA として検出されるもの

と想定した。しかしメチルエステルは安定で, 単一ピーク (rt_R : 1.27) として定量的に分離検知されるものとして理解したのである。

以上の実験結果を総合して, DHA の酸性溶液中における比較的緩和な条件での分解反応機構はつぎのとおりであろうと考えられる。すなわち Fig. 6 にその過程を示すが, DHA は開環してまず DAA-COOH (VII) となり, つづいて脱炭酸して 2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one (DAA) (VI) を生成し, DAA はさらに脱水閉環して最終的に DMP (IV) を形成するものと考えるのである。

従来 DHA の分解による DMP 生成の中間体として DMP-COOH の存在を推定している説があるが, 今回われわれの行なった DHA の保存試料溶液からは DMP-COOH は全く捕捉されなかった。したがって今回の条件においては DHA の酸性分解反応の主要中間体として DMP-COOH を考えることは適当でないと思われる。しかし DHA の分解が逐次反応型で進行する場合には, 反応中間体として DAA-COOH および DAA の存在は当然であるが, 逐次反応型以外に平衡を含む反応を仮定する場合には中間体として DMP-COOH の存在を全く否定するわけにはいなくなる。このような問題点については, われわれは速度論的検討によって解決をはかるべく目下研究続行中である。

4. 結 論

- 1) 常用保存剤であるソルビン酸, パラオキシ安息香酸メチルおよびプロピルならびにデヒドロ酢酸の水溶液中における安定性を再検討するため, 各種 pH の単味溶液を調製し経時的に溶液中の残存保存剤を GLC を用い定量した。その結果酸性およびアルカリ性両域のいずれにおいてもソルビン酸が最も安定であった。パラオキシ安息香酸エステル類はアルカリ性領域では当然加水分解のため分解が著しい。デヒドロ酢酸は酸性領域ではとくに減量が著明であったが強アルカリ性においてもまた同様に不安定であった。最も不安定な様相を呈したデヒ

ドロ酢酸についてはとくに酸性領域における分解機構を検討した。

- 2) デヒドロ酢酸の分解機構はつぎのごとく考えられる。まずデヒドロ酢酸のラクトン環が開環し 3-carboxy-2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one になり, つづいて脱炭酸が起こり 2,6-dihydroxy-2,5-heptadien-4-one を生成する。これがさらに脱水閉環して最終的に 2,6-dimethyl-4-pyrone を生成する。

文 献

- 1) 井口定男, 山本孫兵衛, 青山敏信: 薬誌, **83**, 721 (1968).
- 2) 井口定男, 山本孫兵衛, 青山敏信: 衛生化学**10**, 42 (1964).
- 3) 井口定男, 山本孫兵衛, 青山敏信: 薬剤学 **24**, 41 (1964).
- 4) J. N. Collie: J. Chem. Soc. **59**, 607 (1891).
- 5) J. N. Collie, T. P. Hilditch: *ibid.* **91**, 787 (1907).
- 6) F. Feist: Ber. **25**, 1067 (1892).
- 7) 佐々木清司, 他: 日本食品衛生学会第10回学術講演会発表, 東京 (1965).