

ノート

[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
衛生 生 化 学
40 (5) 467-471 (1994)

—Notes—

4-Phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione との Diels-Alder 反応を利用し た食品中のソルビン酸の定量

野島一宏, 磯上千穂, 小橋美奈子
城西大学薬学部

Application of 4-Phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione for the Analysis of Sorbic Acid in Foods

KAZUHIRO NOJIMA, CHIHO ISOGAMI and MINAKO KOBASHI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1, Keyakidai,
Sakado, Saitama, 350-02, Japan*

(Received January 21, 1994)

Sorbic acid isolated from foods through steam distillation was extracted with ether, followed by the addition of dioxane and concentration under reduced pressure until the ether vapor was removed. Sorbic acid in the resulting solution was treated with 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione in dioxane at 70°C, followed by methylation of the resultant Diels-Alder adduct with an ethereal diazomethane to give the corresponding methyl ester as a volatile compound for the determination using the GC method.

Compared with the detection by FID, that by FTD was found to be about 100 times, since the volatile compound has three nitrogen atoms which are characteristic for FTD in the molecule. Accordingly, the GC method using 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione is applicable to the microanalysis of sorbic acid

Keywords — sorbic acid; 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione; Diels-Alder reaction; diazomethane; gas chromatography (FID); gas chromatography (FTD)

緒 言

食品中のソルビン酸の定量法については、すでに「衛生試験法・注解」の中に紫外外部吸収スペクトル法とガスクロマトグラフ法の二つの方法が収載されている。¹⁾ いずれの方法も、水蒸気蒸留によって食品からソルビン酸を分離する方法がとられている。この蒸留時にソルビン酸以外の保存料（デヒドロ酢酸，安息香酸，4-ヒドロキシ安息香酸エステル類）も同時に分離されるので，分析試料中にはこれらの保存料が混合物として存在することになる。したがって，ソルビン酸を定量するために紫外外部吸収スペクトル法を適用すれば，他の保存料に由来する紫外外部吸収のために必然的にその妨害を受けることになる。また，ガスクロマトグラフ法を適用すれば，食品中に

含まれていて，水蒸気蒸留されうる共存物質の影響も無視できない。

そこで，本研究では，これらの影響を考慮しないですむ，食品中のソルビン酸の分析法として 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione を用い，この試薬とソルビン酸を Diels-Alder 反応させたのち，得られた付加体をメチル化してガスクロマトグラフ法を適用する方法を検討した。

実 験 方 法

1. 試料及び試薬 試料として，市販されている京みず菜 [Kyomizuna (T 社製)]，甘口昆布 [Amakuchikombu (H 社製)]，メンマ [Memma (S 社製)] 及びちくわ [Chikuwa (K 社製)] を用いた。メタノール，ジエチルエーテル（以下，エーテル）

ベンゼン, アセトン及び1,4-ジオキサン (以下, ジオキサン) は和光純薬工業製液体クロマトグラフ用を, また無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業製残留農薬試験用を使用した。ソルビン酸, デヒドロ酢酸, 安息香酸, 4-ヒドロキシ安息香酸及び4-ヒドロキシ安息香酸エステル類は和光純薬工業製特級を使用した。

2. 反应用試薬の調製 ジアゾメタン・エーテル溶液は, *N*-methyl-*N*-nitroso-*p*-toluenesulfonamide (和光純薬工業製) を用いて調製した。²⁾ 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione³⁾ のジオキサン溶液は次のようにして調製した。4-phenylurazole (Aldrich 社製) (0.66 g, 3.7 mmol) ジオキサン 40 ml に溶かしたのち, 攪拌しながら, 室温で *t*-butyl hypochlorite (東京化成工業製) (0.5 ml, 4.4 mmol) を滴下し, 1 時間反応させた。得られた反応液を濃縮乾固し, さらに真空デシケータ中で乾燥し赤色結晶を得た。この赤色結晶をジオキサンに溶かし 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione のジオキサン溶液とした。

3. ソルビン酸定量用標準溶液の調製 ソルビン酸 170 mg (1.5 mmol) をジオキサン 30 ml に溶かしたのち, 攪拌しながら 70°C で 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione のジオキサン溶液をピンク色になるまで滴下した。得られた反応液を減圧下に留去, さらに真空デシケータ中で乾固し, オイル残渣を得た。このオイル残渣をアセトンとベンゼンの混合溶液で結晶化し, 融点 176–177°C (分解) の針状結晶をほぼ定量的に得た。C₁₄H₁₃N₄O₄ の理論値: C, 58.54; H, 4.53; N, 14.63. 元素分析値: C, 58.77; H, 4.62; N, 14.74. MS *m/z* (%): M⁺ (20.6), M⁺–164 (100). IR (KBr): 1773, 1750, 1730, 1693, 1500, 1400, 1295, 1262, 1212 cm⁻¹.

上記化合物 128 mg をメタノール 3 ml に溶かし, ジアゾメタン・エーテル溶液を加えたのち, 室温で一晩放置した。得られた反応液を濃縮し, メタノールを加えて 100 ml とした。この溶液 1 ml は, 「衛生試験法・注解」記載のソルビン酸標準溶液 1 ml に含

まれるソルビン酸 500 µg に相当する。なお, ソルビン酸誘導体の合成過程を Chart 1 に示す。

4. 装置及び条件 ガスクロマトグラフィー: 島津製作所製 GC 9 A ガスクロマトグラフ。カラム: 1.5%Silicone SE-30/Chromosorb WAW-DMCS (60–80 mesh), 1.1 m × 3 mm i.d. 温度: 注入口, 240°C; カラム, 230°C. キャリヤーガス: He, (30 ml/min). 注入量: 2 µl. 検出器: FID, FTD. データ処理装置: 島津製作所製クロマトパック C-R 3 A.

ガスクロマトグラフィー質量分析計: 日本電子製 DX-300. カラム: 1.5%Silicone SE-30/Chromosorb WAW-DMCS (60–80 mesh), 2 m × 3 mm i.d. 温度: 注入口, 240°C; カラム, 220°C. キャリヤーガス: He, (30 ml/min). イオン化方法: 電子衝撃イオン化法. イオン化エネルギー: 70 eV. イオン化電流: 60 µA. イオン源温度: 250°C. データ処理装置: 日本電子製 TMA-DA 5000.

赤外分光光度計: 日本分光工業製 FT/IR-5300. 測定方法: KBr ディスク法。

5. 分析方法 食品試料 50 g をとり, 「衛生試験法・注解」に従って水蒸気蒸留した。得られた蒸留液全量を分液ロートに移し, 「衛生試験法・注解」と同一条件下でエーテル抽出処理したのち, このエーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水した。ろ過して得られたエーテル溶液を減圧下で濃縮しジオキサンを加え, 再び濃縮してエーテル分を除いたのち, ジオキサンを加えて正確に 10 ml とした (各試料から得られたジオキサン溶液 2 µl を「衛生試験法・注解」に従うガスクロマトグラフィー用試験溶液とした)。このジオキサン溶液を攪拌しながら 70°C に加温したのち, 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione のジオキサン溶液をピンク色になるまで滴下した。得られた反応液を減圧下に乾固したのち, メタノール 3 ml を加えて溶かし, さらにジアゾメタン・エーテル溶液を発泡 (窒素の発生) しなくなるまで加えた。この溶液を室温で 30 分間放置したのち, 減圧下で濃縮しメタノールを加えて 50 ml とし, これをガ

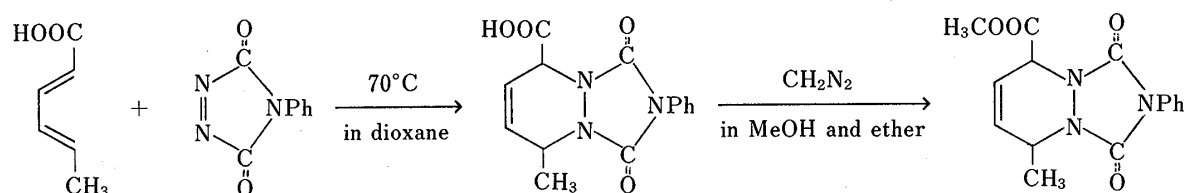


Chart 1 Derivation of Sorbic Acid through Diels-Alder Reaction and Methylation

スクロマトグラフィー用試験溶液とした。

結果及び考察

1. 分析方法の検討

ソルビン酸と 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione との反応が、定量的に進行することが分析法として確立されるべき一つの条件となる。そこで、反応溶媒と反応温度について検討を行った。反応溶媒としてはベンゼン、酢酸エチル、エーテル及びジオキサンを検討した。ベンゼンの場合、ソルビン酸のベンゼンに対する溶解度が極めて小さい。⁴⁾ 酢酸エチルの場合、一部加水分解により生じるエタノールが 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione を分解することが認められた。エーテルの場合、反応温度をエーテルの沸点以上に上げることができない。以上の欠点を補って反応溶媒として適切なものはジオキサンであることが判明した。一方、反応温度として分析上取り扱いやすいのは室温であり、これについて調べたが反応速度が遅く、室温での反応は実用的でないことが判明した。Diels-Alder 反応において、反応にあずかるジエン側に電子供与性基が存在することが、反応速度を上げる要因であることはよく知られている事実である。⁵⁾ これに反して、ジエン側のソルビン酸では分子中に電子吸引基のカルボキシル基が存在し、室温での反応が進行しなかったことはその事実と一致する。そこで、反応時間 30 分で、反応温度を 50°C と 70°C に上げて検討したところ、Table I に示す結果を得た。このように、反応温度を 70°C にすると、4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione の滴下時間も含めて 30 分で定量的に反応することが判明した。この実験結果に基づき、本法では Diels-Alder 反応の温度を 70°C に設定することとした。

ところで、食品に保存料を使用する場合、2 種類以上が同時に使用されることもあり、ソルビン酸以

外の保存料であるデヒドロ酢酸、安息香酸あるいは 4-ヒドロキシ安息香酸エステルの共存による分析への影響が考えられた。そこで、ソルビン酸単独で存在する場合と、他の保存料すなわちデヒドロ酢酸、安息香酸及び 4-ヒドロキシ安息香酸（「衛生試験法・注解」による食品からの保存料の分離段階で、4-ヒドロキシ安息香酸エステル類は 4-ヒドロキシ安息香酸として抽出する）が共存する場合について検討を行い、Table I の結果を得た。この結果によれば、Diels-Alder 付加体生成に及ぼす他の保存料の影響は認められなかった。ところで、食品からのソルビン酸の分離操作、すなわち水蒸気蒸留してエーテル抽出するまでの添加回収については、「衛生試験法・注解」ですでに確立されているので、特に本法ではその後の誘導化 (Diels-Alder 反応とメチル化) について検討し、上述したように良好な回収率 (反応率) を得た。さらに、Fig. 1 には試料 (ちくわ)、ソルビン酸単独及び他の保存料が共存した場合の FID-GC によるクロマトグラムを示した。これらのクロマトグラムから、目的の Diels-Alder 付加体のメチルエステルのピークの判別及びピーク面積の算定に対して妨害を与えるピークの出現は認められなかった。また、目的ピークから得られたマスペクトルを Fig. 2 に示した。m/z 301 はソルビン酸と 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione との Diels-Alder 反応による付加体のメチルエステルの親ピークイオンである。

一方、「衛生試験法・注解」の中で、水蒸気蒸留して得られた蒸留液の一部を用い、エーテル抽出したのち、紫外外部吸収スペクトル法とガスクロマトグラフ法による定量を行っているが、蒸留液を観察すると結晶が蒸留液水面上に浮遊しているケースが認められた。そこで、この結晶がソルビン酸である可能性もあるので、分析誤差を避けるため、蒸留液全量を用いることとした。

2. 検出感度

本法による検出感度と「衛生試験法・注解」の中でのガスクロマトグラフ法による検出感度を FID を用いて比較したところ、本法の方が 2 倍強の検出感度 (5 µg/g) があった。一方、Diels-Alder 付加体を生成させる本法では、分子中に窒素原子 3 個を導入する結果となり、窒素原子を含む化合物に対して特異的な検出器である FTD を用いて微量定量が可能になると考えられた。そこで、本法で得られた Diels-Alder 付加体のメチルエステルに対する FTD と FID の検出感度を比較したところ、FTD の方が

TABLE I.^{a)} Overall Yield^{b)} of Diels-Alder Reaction and Methylation

Reaction temp. ^{c)}	Sorbic acid only	Sorbic acid in the presence of other antiseptics
50°C	58.5±1.7%	59.2±1.6%
70°C	96.5±1.5%	97.4±1.6%

Data reported represents the mean±S.D. of three experiments.

a) Sorbic acid, 0.2 mmol; each antiseptic, 0.2 mmol.

b) Yields are based on the quantity of methylated Diels-Alder adduct.

c) Temperature in the Diels-Alder reaction of sorbic acid and 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione.

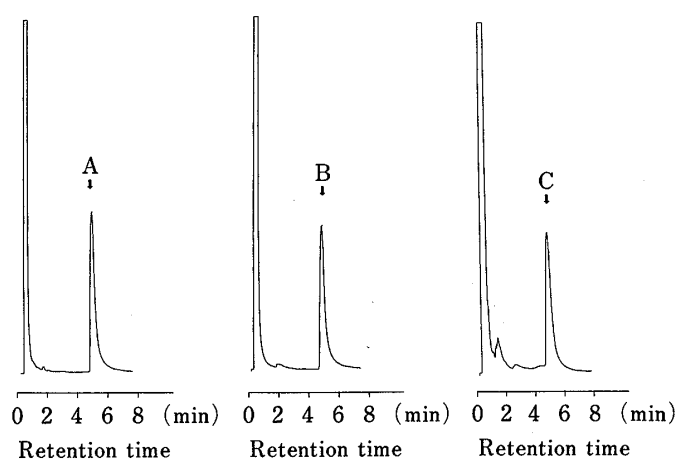


Fig. 1. Gas Chromatogram (FID) of Methyl Ester of Diels-Alder Adduct by Reaction of Sorbic Acid with 4-Phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione

Arrows show the retention time of methyl ester of adduct.

A: Sample (Chikuwa); B: Sorbic acid only; C: Sorbic acid in the presence of other antiseptics.

GC Conditions: column, 1.5% Silicone SE-30/Chromosorb WAW-DMCS (60–80 mesh), 1.1 m × 3 mm i.d.; column temp., 220°C; injection temp., 240°C; carrier gas, He (30 ml/min).

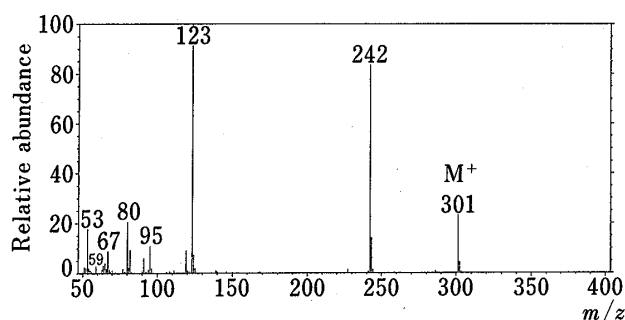


Fig. 2. Mass Spectrum of Methyl Ester of Diels-Alder Adduct by Reaction of Sorbic Acid with 4-Phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione

GC-MS Conditions: column, 1.5% Silicone SE-30/Chromosorb WAW-DMCS (60–80 mesh), 2 m × 3 mm i.d.; column temp., 220°C; injection temp., 240°C; carrier gas, He (30 ml/min); ion source temp., 250°C; ionizing voltage, 70 eV; trap current, 60 μ A.

FID に比べて約 100 倍検出感度の高いことが判明した (50 ng/g). したがって, ソルビン酸の微量定量が必要なときは, 検出器として FTD を使用すればそれが可能である.

3. 食品中のソルビン酸の分析結果

食品試料として用いた京みず菜, 甘口昆布, メンマ及びちくわの本法による分析結果を Table II に示した. Table II 中の数値は, 食品添加物である保存料表示のソルビン酸カリウムに換算して示したものである.

TABLE II. Contents of Potassium Sorbate in Food

Sample	Proposed method ^{a)}	Standard method ^{b)}
Kyomizuna	25.2 mg/50 g	26.5 mg/50 g
Amakuchikombu	23.1 mg/50 g	22.4 mg/50 g
Memma	40.6 mg/50 g	41.5 mg/50 g
Chikuwa	47.6 mg/50 g	46.9 mg/50 g

a) GC method using 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione.

b) "Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists—With Commentary" authorized by the Pharmaceutical Society of Japan.

一方, 本法のデータと「衛生試験法・注解」記載の方法の中で水蒸気蒸留して得られた蒸留液の一部を用いてエーテル抽出する代わりに, その蒸留液の全量を用いてエーテル抽出したのち, ジオキサン溶液とし, 「衛生試験法・注解」の中の記載にあるガスクロマトグラフ法のカラム 5%DEGS+1% H_3PO_4 を用いて定量したデータを併記した. Table II から明らかなように, 本法と「衛生試験法・注解」の一部変更法から得られたデータについては, よい一致がみられた. また, 水蒸気蒸留を通して必然的に蒸留されてエーテル抽出されうる種々の共存物質が, ガスクロマトグラム上の妨害ピークとなることが考えられた. しかし, 食品試料から得られたガスクロマトグラムを観察する限り, 妨害ピークの出現は認

められなかった。

結 論

1. 本法によって得られたガスクロマトグラムから、ソルビン酸を定量すべき誘導体を妨害するピークは見当たらなかった。

2. 「衛生試験法・注解」収載の FID・GC 法と本

法の FID・GC 法との検出感度を比較したところ、本法の方が 2 倍強の検出感度があった。なお、ソルビン酸と 4-phenyl-1, 2, 4-triazoline-3, 5-dione との付加体のメチルエステル中には 3 個の窒素原子が存在するので、FTD 検出器を用いれば微量分析にも応用可能で、その検出限界はおおむね 50 ng/g であり、FID・GC 法の検出限界の 100 倍であった。

引 用 文 献

- 1) 日本薬学会編, “衛生試験法・注解,” 金原出版, 東京, 1990, pp.445—451.
- 2) Th. J. DE Boer, H.J. Backer, “*Organic Syntheses*.” Coll. Vol. IV, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1963, p.250.
- 3) R.C. Cookson, S.S.H. Gilani, I.D.R. Stevens, *Tetrahedron Lett.*, **1962**, 615.
- 4) “食品添加物公定書解説書 (第六版),” 廣川書店, 東京, 1992, pp.D-693—701.
- 5) J. Sauer, D. Lang, A. Mielert, *Angew. Chem.*, **74**, 352 (1962).