

技術報告

高速液体クロマトグラフィーによる市販のリンゴ酸及びアップル飲料中のフマル酸の定量

善木 道雄[®], 伊藤 利之, 桐栄 恭二^{*}

(1990 年 1 月 19 日受理)

市販のリンゴ酸及びアップル飲料中に含まれるフマル酸について UV 検出器を使用した HPLC で定量する方法について検討した。分離カラムとして TSK-gel, ODS 120A を使用し、移動相としては 0.1 M 過塩素酸ナトリウム, 0.01 M リン酸二水素ナトリウム (pH 2.6) を用い、210 nm で検出した。フマル酸 $5.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ M の範囲で検量線は直線を示し、 4.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} M の 5 回繰り返しによる相対標準偏差は、それぞれ 0.35, 0.19% であった。又この方法によるフマル酸の定量限界 ($S/N = 2$) は 2.0×10^{-7} M 程度であり、リンゴ酸及びアップル飲料の回収率は 98.2~104.5% であった。本法を市販リンゴ酸及びアップル飲料 18 種の定量に応用した。

1 緒 言

フマル酸は代表的な不飽和ジカルボン酸であり、生体内でのクエン酸サイクルの中間生産物としても知られている。幾何異性体のマレイン酸は有害だが、フマル酸の毒性は弱いとされており¹⁾、食品添加物として認可されている。使用基準は設定されていないが、フマル酸の分析法を確立することは、食品の品質管理上からも重要であると考えられる。食品中のフマル酸定量法は、トリメチルシリル体として測定する GC、及びリンゴ酸脱水素酵素を用いる酵素法が公定法²⁾として採用されているが、操作が煩雑である。近年、HPLC が急速に普及し、その応用が検討されている。食品中のフマル酸の定量も HPLC を用いる方法が簡単で便利であると考えられるが、その定量に関する具体的な報告例は極めて少ない³⁾⁴⁾。カルボン酸類の HPLC による分離法には、カラム、検出方法などに数々の提案^{5)~11)}がなされているが、オクタデシルシリカ (ODS) カラムを用いる吸光光度検出逆相 HPLC は分離能、再現性に優れ、はん用性が高い。

今回、著者らはこの逆相 HPLC を用いるフマル酸の定量法について検討した。そして HPLC 法が、市販のリンゴ酸及びアップル飲料中の微量フマル酸の定量に十分応用できることを示した。

2 実 験

2・1 装 置

HPLC 装置は東ソー CCPD 型ポンプシステムに同社製 CO-8010 型カラムオープン及び UV-8000 型紫外可視検出器を接続し、シッククロマトコーダー 12 型でピーク面積を記録した。

2・2 試 薬

標準物質のフマル酸は和光純薬工業製特級を用いた。フマル酸は HPLC により純度を確認し、単一ピークとして溶出することを確認した。そして、その一定量を採り水に溶かして 1.0×10^{-2} M の標準溶液を調製し、適宜希釈して用いた。その他の試薬は、市販の特級をそのまま用いた。又、市販のリンゴ酸やアップル飲料 18 種を試料とした。

2・3 分析条件

カラムは東ソー製 TSKgel, ODS120A (4.6×150 mm) を使用し、溶離液は 0.1 M 過塩素酸ナトリウムと 0.01 M リン酸二水素ナトリウムの混合溶液を塩酸で pH 2.6 に調節したものを用いた。室温 (25°C) で操作し、流量は 0.8 ml/min、検出波長は 210 nm に設定した。又、試料注入量は 100 μ l とした。

2・4 定量操作

リンゴ酸については、市販品をそのまま水に溶かし

* 岡山理科大学理学部化学科: 700 岡山県岡山市理大町 1-1

て、DL-体は 8.0×10^{-4} M 溶液を、D- 及び L-体はそれぞれ 5.0×10^{-3} M, 1.0×10^{-2} M 溶液を作製した。又、アップル飲料は、 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過した後、いずれも 10~20 倍水で希釈し試料溶液とした。そして、その $100 \mu\text{l}$ をループインジェクターを用いてクロマトグラフ装置へ注入した。得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、あらかじめ作成した検量線からフマル酸量を求めた。

3 結果及び考察

3.1 HPLC 条件の検討

フマル酸の HPLC 分離に関しては、陰イオン交換⁸⁾、イオン排除⁹⁾¹⁰⁾及び逆相分配モード⁴⁾¹¹⁾の報告があるが、分離能、再現性の優れた逆相分配モードを選んだ。カラムは TSKgel, ODS 120A を使用した。溶離液はフマル酸と他のカルボン酸との分離を考慮して、フマル酸が 7~8 分で溶出する過塩素酸ナトリウム-リン酸二水素ナトリウム系を選んだ。過塩素酸ナトリウム及びリン酸二水素ナトリウムの濃度はフマル酸の溶離及び感度に大きな影響は及ぼさないが低濃度では溶離しなくなる。ベースラインの安定性を考慮して 0.1 M 過塩素酸ナトリウム-0.01 M リン酸二水素ナトリウムを用いることにした。一方、溶離液の pH はそれぞれのカルボン酸の溶離時間と感度に大きな影響を与える。すなわち pH の増加と共に、感度は増大し溶離時間は速くなる。フマル酸と溶離時間の近接するコハク酸、クエン酸との相互分離を考慮して、pH を 2.6 に調整して使用した。この組成の溶離液を用い、流量 0.8 ml/min, カラム温度 25°C の条件下で、リンゴ酸は 3.5 分、クエン酸 5.7 分、コハク酸 7.0 分、フマル酸は 7.8 分で溶出する (Fig. 2)。

3.2 感度

フマル酸は二重結合を持っているので、UV 吸光光度法での検出が容易で感度も高い。代表的なカルボン酸 11 種及び L-アスコルビン酸を単独で注入し、検出波長 210 nm で、それぞれの検量線を作成し、感度を比較した結果を Fig. 1 に示す。フマル酸及びマレイン酸は他の飽和カルボン類に比べ、モル濃度で約 100 倍以上高感度であった。

フマル酸標準溶液を用い、ピーク面積法によってフマル酸の検量線を作成したところ $5.0 \times 10^{-7} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ M の範囲で良好な直線 ($r=0.9999$) になった。検出限界 ($S/N=2$) は 2.0×10^{-7} M であった。又、 4.0×10^{-6} M、及び 1.0×10^{-5} M フマル酸標準溶液の連続 5

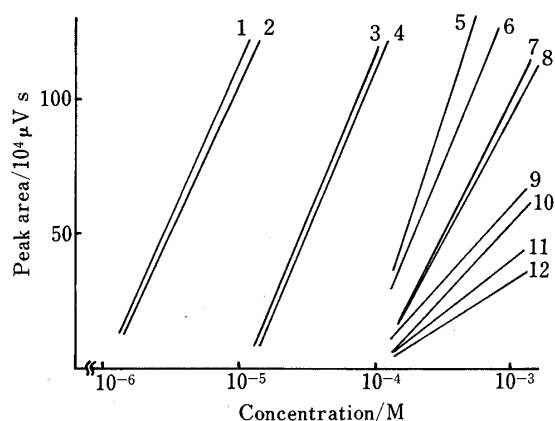


Fig. 1 Comparison of the sensitivities of several carboxylic acids

1: maleic acid; 2: fumaric acid; 3: L-ascorbic acid; 4: oxalic acid; 5: tartaric acid; 6: citric acid; 7: malic acid; 8: malonic acid; 9: succinic acid; 10: lactic acid; 11: formic acid; 12: acetic acid. Conditions — Column: TSK-gel 120 A (ODS, 4.6 mm i. d. $\times$ 120 mm); Mobile phase: 0.1 M sodium perchlorate-0.01 M sodium dihydrogenphosphate (pH 2.6); Wavelength: 210 nm; Temperature: 25°C ; Flow rate: 0.8 ml/min.; Sample volume: $100 \mu\text{l}$

Table 1 Recovery of fumaric acid in malic acids and apple drinks

Sample	Fumaric acid added/ 10^{-6} M	Amount found/ 10^{-6} M	R. S. D. ^{b)} , %	Recovery, %
D,L-Malic acid	0	4.49	—	—
	4.0	8.51	0.19	100.2
L-Malic acid	0	1.55	—	—
	4.0	5.45	0.40	98.2
D-Malic acid	0	5.28	—	—
	4.0	9.34	0.24	101.6
Apple drink ^{a)}	0	10.88	—	—
	2.0	12.88	0.58	100.0
30%	0	8.49	—	—
	4.0	13.05	1.46	104.5
70%	0	9.39	—	—
	4.0	13.25	0.32	99.0

a) content of apple juice; b) relative standard deviation ($n=3$).

回測定における相対標準偏差はそれぞれ 0.35, 0.19% であった。

3.3 添加回収実験

2.3 に示した HPLC 条件で市販リンゴ酸及びアップ

Table 2 Determination of fumaric acid in malic acids

Sample ^{a)}	Concentration of malic acid/M	Fumaric acid found/ 10^{-6} M	R. S. D. ^{b)} , %	Mole ratio ^{c)} (MA/FA)	Fumaric acid content/ $\mu\text{g g}^{-1}$
DL-Malic acid A	8.0×10^{-4}	4.49	0.44	178/1	4860
B	8.0×10^{-4}	5.18	0.56	154/1	5620
E	8.0×10^{-4}	7.32	0.41	109/1	7940
F	8.0×10^{-4}	6.48	0.13	123/1	7040
L-Malic acid A	1.0×10^{-2}	1.55	2.53	6450/1	134
B	1.0×10^{-2}	1.58	1.54	6330/1	137
C	1.0×10^{-2}	3.88	0.63	2580/1	336
D-Malic acid B	5.0×10^{-3}	0.23	0.28	21700/1	40
C	5.0×10^{-3}	0.74	1.73	13500/1	64
D	5.0×10^{-3}	5.28	0.15	947/1	914

a) A ~ D : analytical reagent grade, E & F : food additives; b) relative standard deviation ($n=3$); c) MA : malic acid, FA : fumaric acid

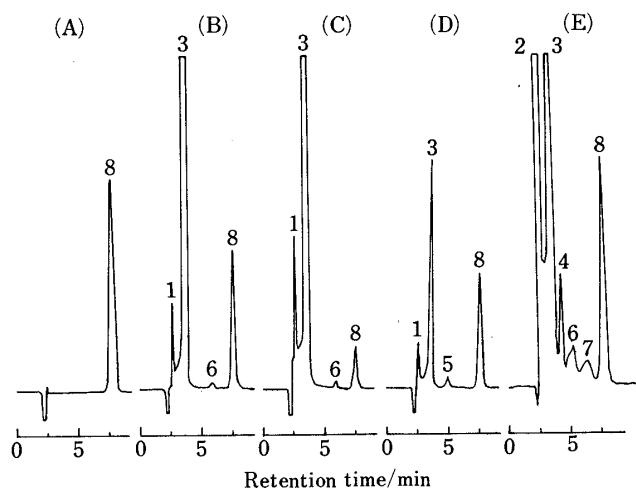


Fig. 2 Typical HPLC chromatograms of samples containing fumaric acid

(A) : fumaric acid standard solution (1.0×10^{-5} M); (B) : D-malic acid; (C) : L-malic acid; (D) : DL-malic acid; (E) : apple drink (30%). Peaks — 1: unknown; 2: tartaric acid; 3: malic acid; 4: L-ascorbic acid; 5: maleic acid; 6: citric acid; 7: succinic acid; 8: fumaric acid. Chromatographic conditions are the same as those in Fig. 1.

ル飲料中に一定量のフマル酸を添加し、本法による添加回収実験を行った。結果を Table 1 に示す。回収率はリンゴ酸、アップル飲料いずれの場合も 98.2~104.5% であり、良好な回収率が得られた。

3・4 リンゴ酸及びアップル飲料中のフマル酸の定量

リンゴ酸は食品添加物として認可されており、飲料、冷菓、加工食品などの酸味料として、又、色調保持、乳

Table 3 Determination of fumaric acid in apple drinks

Sample ^{a)}	Dil.	Fumaric acid found/ 10^{-6} M	R. S. D. ^{b)} , %	Fumaric acid content/ $\mu\text{g ml}^{-1}$
20%				
A	1/20	10.88	0.85	25.26
B	1/20	4.35	1.96	10.09
30%				
C	1/10	8.49	1.39	9.85
D	1/10	4.39	3.46	5.09
70%				
E	1/20	9.39	0.50	21.78
F	1/20	N. D. ^{c)}	—	—
100%				
G	1/10	N. D.	—	—
H	1/10	N. D.	—	—

a) content of apple juice; b) relative standard deviation ($n=3$); c) not detected

化安定、pH 調整剤として広く利用されている。天然から得られるリンゴ酸は L-体だけであるが、DL-リンゴ酸は、マレイン酸あるいはフマル酸を 160~200°C、加圧下で水を反応させて作られ、未反応原料に由来すると考えられる少量のフマル酸が常に残存している¹²⁾。2・3 に示した HPLC 条件で市販リンゴ酸中のフマル酸の分離定量を行った。結果を Table 2 に示し、フマル酸標準溶液、市販の D-, L- 及び DL-リンゴ酸のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。DL-体のフマル酸含有量は、他と比べて 1~2 けた大きい。又、L-リンゴ酸は発酵法により製造され¹²⁾、従ってフマル酸の含有量は極めて低いと考えられる。しかし実測してみるとかなりの量のフマル酸

が検出された。又、D-体のフマル酸含有量は、メーカーによってかなりのばらつきがあることが分った。

Table 3 に本法によるアップル飲料中のフマル酸の定量結果を示した。又、果汁 30% の市販アップル飲料のクロマトグラムを代表例として同様に Fig. 2 に示した。フマル酸は溶解度が低く (0.63 g/100 ml, 25°C) 食品添加物として単独で使用されることはほとんどない。又、食品中に存在する天然のフマル酸は非常に微量である²⁾。これらのことと、Table 3 の結果から、アップル飲料中に存在するフマル酸は添加された DL-リンゴ酸の不純物として混入したものと推定しても差し支えないと考えられる。

文 献

- 1) 藤井清次, 慶田雅洋: “解説食品添加物”, p. 93 (1979), (光生館).
- 2) 厚生省環境衛生局食品化学課編, “食品中の食品添加物分析法” p. 141 (1982), (講談社サイエンスティフィク).
- 3) C. Junge, C. Spadinger: *Fluess. Obst.*, **1982**, 57.
- 4) M. Eckert, G. Baumann, K. Gierschner: *Fluess. Obst.*, **1987**, 54, 134.
- 5) G. A. Harlow, D. H. Morman: *Anal. Chem.*, **36**, 2438 (1964).
- 6) 高田芳矩, 有川喜次郎: 分析化学, **23**, 1522 (1974).
- 7) C. Horvath, W. Melander, I. Molnar: *Anal. Chem.*, **49**, 142 (1977).
- 8) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一: 衛生化学, **31**, 317 (1985).
- 9) V. T. Turkelson, M. Richards: *Anal. Chem.*, **50**, 1420 (1978).
- 10) R. H. Evans, A. W. Soestbergen, K. A. Ristow: *J.*

Assoc. Off. Anal. Chem., **66**, 1517 (1983).

- 11) D. Tusseau, C. Benoit: *J. Chromatogr.*, **395**, 323 (1987).
- 12) 岸 真之輔: “食品添加物便覧”, p. 47 (1986), (食品と科学社).

☆

Determination of fumaric acid in commercially available malic acids and apple drinks by HPLC.

Michio ZENKI, Toshiyuki ITOH and Kyoji TÔEI (Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1, Ridai-cho, Okayama-shi, Okayama 700)

An application of HPLC to the determination of fumaric acid in commercially available malic acids and apple drinks was examined. The fumaric acid was separated on a TSK-gel 120A column (ODS C₁₈, 4.6 mm i.d.×150 mm) with an eluent of 0.1 M sodium perchlorate-0.01 M sodium dihydrogenphosphate (pH 2.6). The eluate was monitored with a UV detector at 210 nm. The sensitivity of the fumaric acid was quite good and sufficient separation could be achieved within 10 min. The calibration curve between peak area and fumaric acid concentration was linear up to 2.0×10^{-5} M. Recoveries of fumaric acid in malic acids and apple drinks were in the range of 98 ~ 105% with good reproducibilities (R. S. D., less than 1.5%). Fumaric acid in eighteen commercially available samples (D-, L- and DL-malic acids and apple drinks) were determined successfully by the proposed method.

(Received January 19, 1990)

Keyword phrases

separation and determination of fumaric acid by HPLC;
fumaric acid in malic acids and apple drinks.