

## クエン酸イソプロピル確認試験法の確立

古庄紀子, 大槻崇, 建部(佐々木)千絵, 久保田浩樹, 佐藤恭子<sup>#</sup>, 穂山浩

### Development of identification method for isopropyl citrate

Noriko Furusho, Takashi Ohtsuki, Chiye Tatebe-Sasaki, Hiroki Kubota, Kyoko Sato<sup>#</sup>, Hiroshi Akiyama

In Japan's Specification and Standards for Food Additive, 8th edition, two identification tests involving isopropyl citrate for detecting isopropyl alcohol and citrate are stipulated. However, these identification tests use mercury compound, which is toxic, or require a time-consuming pretreatment process. To solve these problems, an identification test method using GC-FID for detecting isopropyl alcohol was developed. In this test, a good linearity was observed in the range of 0.1–40 mg/mL of isopropyl alcohol. While investigating the pretreatment process, we found that isopropyl alcohol could be detected using GC-FID in the distillation step only, without involving any reflux step. The study also showed that the citrate moiety of isopropyl citrate was identified using the solution remaining after conducting the distillation of isopropyl alcohol. The developed identification tests for isopropyl citrate are simple and use no toxic materials.

Keywords: Isopropyl citrate, Identification, GC-FID, food additives

#### 1. 緒言

食品添加物のクエン酸イソプロピルは、クエン酸イソプロピル（モノイソプロピル、ジイソプロピル、トリイソプロピル）とグリセリン脂肪酸エステルの混合物であり、FAO/WHO合同食品添加物専門家会議（JECFA）では、酸化防止剤として規格され、一日摂取許容量（ADI）を14 mg/kg体重以下と設定されている<sup>1)</sup>。わが国では昭和58年8月に食品添加物に指定され、油脂、バター中にクエン酸モノイソプロピルとして0.10 g/kg以下での使用が認められている<sup>2)</sup>。

日本における食品添加物としての指定にあたり、成分規格はJECFAの規格を参考に設定され、食品添加物公定書に収載された。現在の第8版食品添加物公定書（公定書）に定められているクエン酸イソプロピルの確認試験法では、イソプロピルアルコールの確認に際して、水銀化合物（酸化水銀（Ⅱ）（黄色））を含有する硫酸第二水

銀試液を用いた試験法が設定されている<sup>2)</sup>。しかし、このような有害試薬の使用は、実験者の健康や環境に対して大きな問題である。また、近年、水銀及び水銀化合物の人為的な排出及び放出から人の健康及び環境を保護することを目的とした『水銀に関する水俣条約<sup>3)</sup>』に、日本が調印したことも鑑みると、水銀含有試薬を使用した試験法の早急な改正が必要である。

そこで本研究では、食品添加物の規格試験における有害試薬の排除に関する取り組みの一環として、水銀化合物を使用しないクエン酸イソプロピルの確認試験法について検討した。また、試験法の前処理操作の簡略化についても併せて検討した。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 試料

クエン酸イソプロピルは、東京化成工業(株)製を使用した。

##### 2.2 試薬及び試液

イソプロピルアルコールは関東化学(株)製試薬特級品を、水酸化ナトリウム、過マンガン酸カリウム、硫酸及び臭素は和光純薬工業(株)製試薬特級品をそれぞれ使用した。臭素試液は、栓にワセリンを塗布した共栓瓶に臭

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:

Kyoko Sato; Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext.333; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: ksato@nihs.go.jp

素2～3 mLを入れ、冷水100 mLを加え、密栓して振り混ぜて調製し、冷暗所に保存し、水層を用いた。水は、超純水装置（メルクミリポア（株）製Milli-Q<sup>®</sup> Gradient A10型）により精製した比抵抗値が18.2 MΩ・cm以上の水を用いた。

### 2.3 器具及び装置

ガスクロマトグラフィー用カラムは、ジーエルサイエンス（株）製InertCap<sup>®</sup> AQUATIC-2（内径0.25 mm、長さ60 m、膜厚1.40 μm）を用いた。

水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ（GC-FID）は、アジレント・テクノロジー（株）製7890Aを使用した。

### 2.4 イソプロピルアルコール確認試験用標準液の調製

メスフラスコにあらかじめ水約10 mLを加えた後、10.0 gのイソプロピルアルコールを量り、水を加えて50 mLに定容したものをイソプロピルアルコール確認試験用標準液（濃度：200 mg/mL）とした。

### 2.5 イソプロピルアルコール検量線用標準液の調製

イソプロピルアルコール確認試験用標準液を、段階的に希釈して0.1～40.0 mg/mLの範囲で調製した5濃度の溶液をイソプロピルアルコール検量線用標準液とした。

### 2.6 イソプロピルアルコールの確認

#### 2.6.1 留液の調製

調製法(1) クエン酸イソプロピル2 gに水酸化ナトリウム溶液（1→25）50 mLを加えて1時間還流した後、蒸留した。留液は5 mLずつ採取し5画分（Fr.1～5）を得た。

調製法(2) クエン酸イソプロピル2 gに水酸化ナトリウム溶液（1→25）50 mLを加えた後、蒸留した。留液は5 mLずつ採取し5画分（Fr.6～10）を得た。

#### 2.6.2 GC-FIDによる分析

イソプロピルアルコール確認試験用標準液、イソプロピルアルコール検量線用標準液及び留液それぞれ1 μLを以下の条件でGC-FIDに注入し、各検体のイソプロピルアルコールを測定した。なお、留液のFr.1及び6については、検量線の範囲に入るよう、10倍に希釈して分析した。

#### 2.6.3 GC-FIDの操作条件

Tatebeらの分析条件<sup>4)</sup>を準用した。すなわち、カラム温度は40℃で6分間保持した後、毎分5℃で110℃まで昇

温し、10分間保持した。注入口温度は200℃、検出器温度は250℃、キャリアーガスはヘリウム、カラム流量は1.0 mL/min、注入方式はスプリット（スプリット比 1：100）で測定した。

### 2.7 クエン酸塩の定性反応

留液調製法（2）で蒸留を行った際の残液を、希硫酸で中和した後2～3 mLとり、更に希硫酸2～3 mLを加え、過マンガン酸カリウム溶液（1→300）4～6 mLを加え、液の色が消えるまで加熱した後、臭素試液を滴加し、白色の沈殿が生じることを確認した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 イソプロピルアルコールのGC-FID分析

クエン酸イソプロピルは、クエン酸とイソプロピルアルコールのエステルであり、その構成成分であるイソプロピルアルコールを確認することを目的として、GC-FIDを用いて分析を行った。なお、本分析ではイソプロピルアルコールを含む様々なアルコール類の分離が可能なInertCap<sup>®</sup> AQUATIC-2を使用した<sup>5)</sup>。まず、今回の測定条件におけるイソプロピルアルコールの保持時間を確認するため、イソプロピルアルコール確認試験用標準液1 μLを分析に供した。その結果、Fig. 1に示すように、10.4分付近にイソプロピルアルコールに由来するピークが観察された。

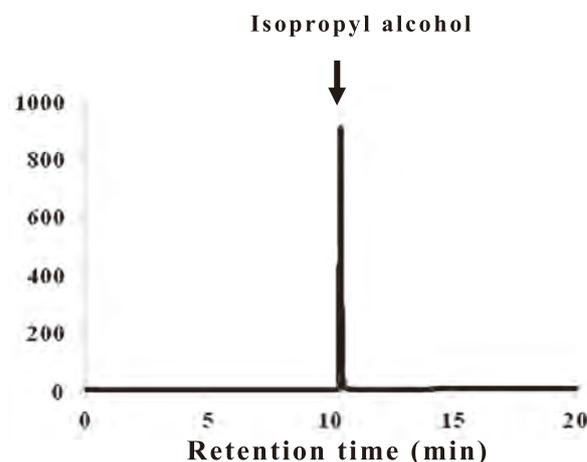


Fig.1 GC chromatogram of isopropyl alcohol

GC conditions  
column:AQUATIC-2 (0.25mm i.d.× 60m ; 1.40 μm), initial temperature: 40℃, initial time:6min., rate: 5℃/min., final temperature: 110℃, final time:10min., injection temperature: 200℃, detector temperature: 250℃, carrier gas: Helium, flow rate: 1.0mL/min., split ratio: 100:1

### 3.2 検量線

イソプロピルアルコール検量線用標準液を用い、本法

に従って検量線を作成したところ、0.1~40 mg/mLの範囲で良好な直線性 ( $R^2=0.9996$ ) を示した。

### 3.3 イソプロピルアルコールの確認試験に関する検討

現行のクエン酸イソプロピルの確認試験法は、クエン酸イソプロピルを還流、蒸留後に得られる留液を用いてイソプロピルアルコールを、また別途試料を還流して得られる溶液を用いてクエン酸塩をそれぞれ確認することが規定されている。特に、イソプロピルアルコールの確認では、クエン酸イソプロピル2 gに水酸化ナトリウム溶液 (1→25) 50 mLを加え、1時間還流した後、蒸留で得られた留液について、酸性下で酸化クロムにより酸化してケトンとし、人の健康及び環境に有害な酸化 (II) 水銀 (黄色) を使用する硫酸第二水銀試液とともに加熱し、白~黄色の沈殿の生成を確認する方法が設定されている。そこで、有害試薬を使用しない方法として、蒸留で得られた留液及びイソプロピルアルコール確認試験用標準液をGC-FIDにより分析し、その保持時間からイソプロピルアルコールを同定することとした。また、前処理操作における還流の必要性について併せて検討した。

まず、蒸留前の1時間の還流の必要性を確認するため、調製法(1) (還流後に蒸留) により得られた留液 (Fr.1~5), 調製法(2) (還流を行わずに蒸留) より得られた留液 (Fr.6~10) 及びイソプロピルアルコール確認試験用標準液について、GC-FIDにより分析を行った。各留液より得られたクロマトグラムをFig. 2 及びFig. 3 に示した。還流の有無にかかわらず、Fig. 1 に示した標準液のイソプロピルアルコールのピークと保持時間の一致するピークが得られた。また、最初の5 mLにイソプロピルアルコールの大部分が留出し、20 mL以降はイソプロピルアルコールが検出されなかった。調製法(1)の留液と調製法(2)の留液について、検量線から各フラクションにおけるイソプロピルアルコール濃度を、さらにイソプロピルアルコールの収量を求めた後、クエン酸イソプロピルに対するイソプロピルアルコールの割合 (%) を算出したところ (各3試行)、調製法(1)の場合、平均30.6%, 相対標準偏差16.9%であったのに対し、調製法(2)の場合は、平均36.8%, 相対標準偏差5.9%と、調製法(2)の方が高く、再現性も良好であった (Table 1)。これは、調製法(1)には還流操作が含まれており、還流から蒸留へ移行する際のイソプロピルアルコールの揮散によるものと推定された。調製法(2)では、蒸留操作のみであることから、このような揮散は生じないと考えられた。

一般にクエン酸イソプロピルは、クエン酸モノ、ジ及びトリイソプロピルの混合物であり、その組成は、クエン酸とイソプロピルアルコールをエステル化反応におけ

る条件によって変動する<sup>2)</sup>。クエン酸モノイソプロピル、ジプロピル、トリイソプロピルは各々、1分子、2分子、3分子のイソプロピルアルコールを生じる。今回試料として使用したクエン酸イソプロピルの組成 (私信) から、計算して得られるイソプロピルアルコール量の理論値は約43.8%であった。今回の検討において、調製法(2)は理論値の約84%のイソプロピルアルコール量を検出できたことから、確認試験法として実用上問題がないと考えられた。

Table 1 Comparison of the content of isopropyl alcohol separated from isopropyl citrate by the different pretreatment methods

	Content (%) <sup>a)</sup>	RSD (%)
Reflux and distillation	30.6	16.9
Distillation	36.8	5.9

<sup>a)</sup> Values represent the mean of three independent experiments.

### 3.4 クエン酸塩の確認試験に関する検討

公定書において、クエン酸イソプロピルのクエン酸塩の確認試験は、イソプロピルアルコールの確認試験とは別に、クエン酸イソプロピル3 gに水酸化ナトリウム溶液 (1→25) 50 mLを加え、1時間還流し、室温に冷却後、硫酸 (1→20) で中和した液を2~3 mLとり、希硫酸2~3 mLを加え、過マンガン酸カリウム溶液 (1→300) 4~6 mLを加え、液の色が消えるまで加熱した後、臭素試液を滴加し、白色の沈殿が生じることを確認を行うこととされている。一方、前項で検討した蒸留後の残液には、試料由来のクエン酸塩の多くが残存していると予想され、この残液をそのまま利用することにより、クエン酸塩の確認が可能と考えられた。そこで、イソプロピルアルコールの確認試験で用いた蒸留後の残液についてクエン酸塩の確認試験を行ったところ、白色の沈殿が生じることが確認された (Fig. 4)。このことから、クエン酸塩の確認試験には、イソプロピルアルコールの確認試験で使用した蒸留後の残液を使用できることが明らかとなった。

## 4. おわりに

我々は食品添加物の規格試験における水銀化合物などの有害試薬の排除に関する取り組みの一環として、クエン酸イソプロピルの確認試験法の確立について検討した。イソプロピルアルコールの確認試験では、GC-FIDを

用いた方法を確立し、水銀化合物を使用せず本試験に適用できることが確認された。また、本試験の前処理操作では、蒸留前の還流操作を省略しても、イソプロピルアルコールの確認は可能であり、再現性も良好であった。

さらに、本試験で用いた蒸留残液を、クエン酸塩の確認試験に供用できることが明らかとなった。以上の結果より、確立したクエン酸イソプロピルの確認試験法では、従来法に比べ少ない試料量で迅速な分析が可能となった。

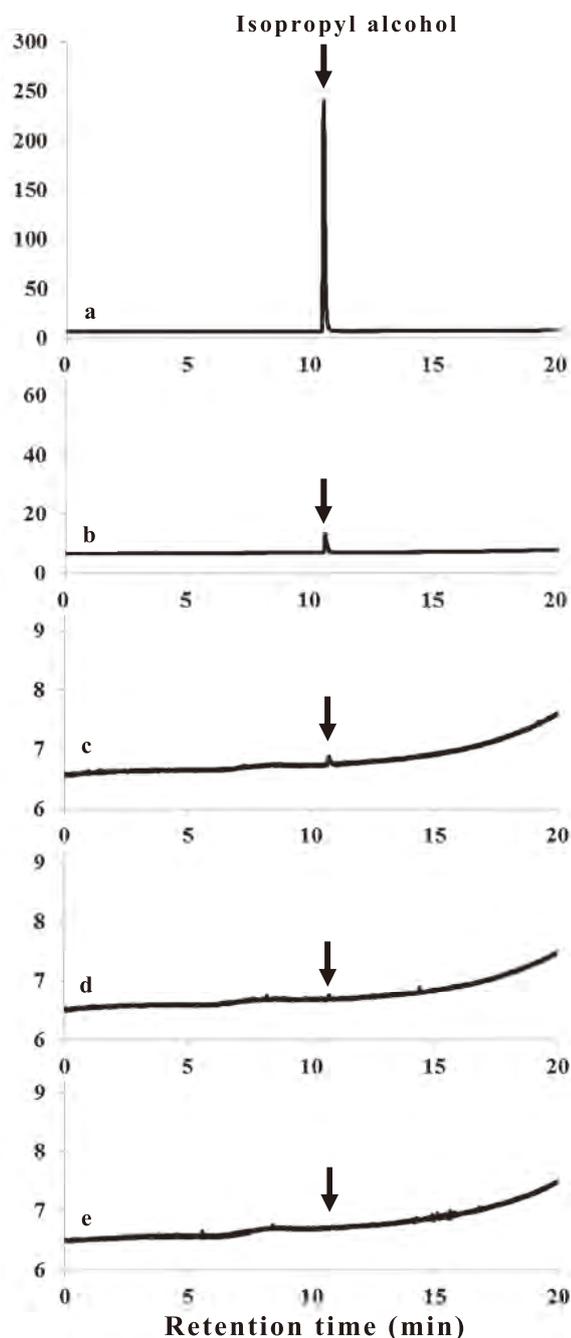


Fig.2 GC chromatograms of each test solution from reflux and distillation

a: Fr.1, b: Fr.2, c: Fr.3, d: Fr.4, e: Fr.5

In Fr.1, the ten-fold dilution was used as test solution GC conditions were similar to those described in Fig.1

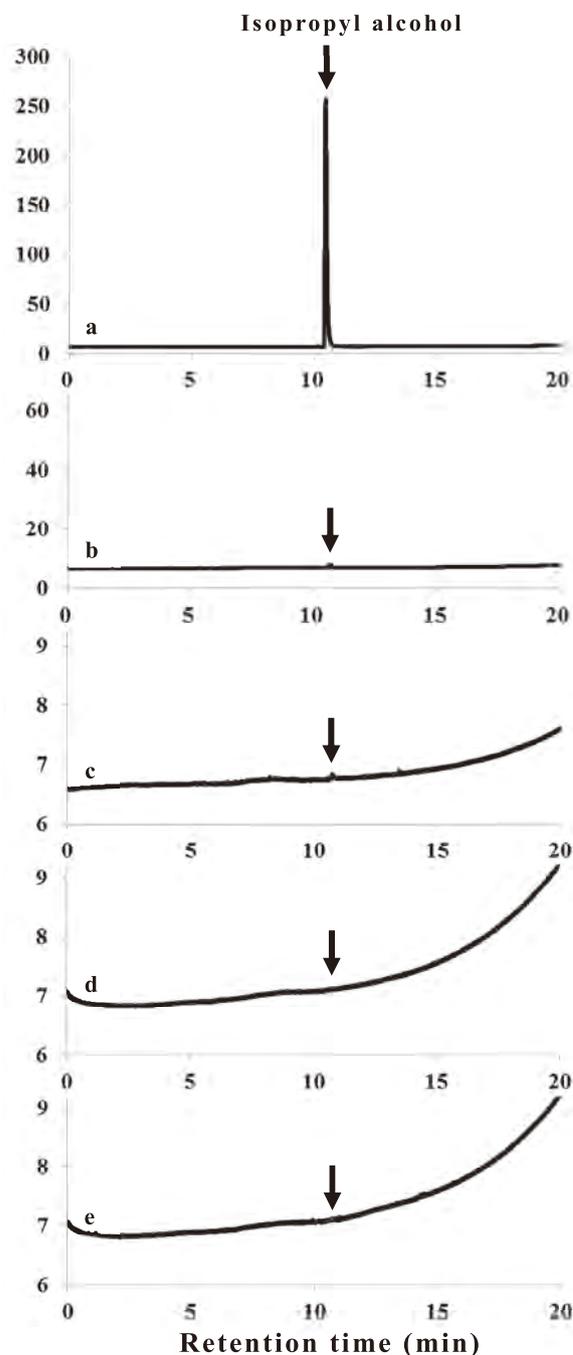


Fig.3 GC chromatograms of each test solution from distillation

a: Fr.6, b: Fr.7, c: Fr.8, d: Fr.9, e: Fr.10

In Fr.6, the ten-fold dilution was used as test solution GC conditions were similar to those described in Fig.1

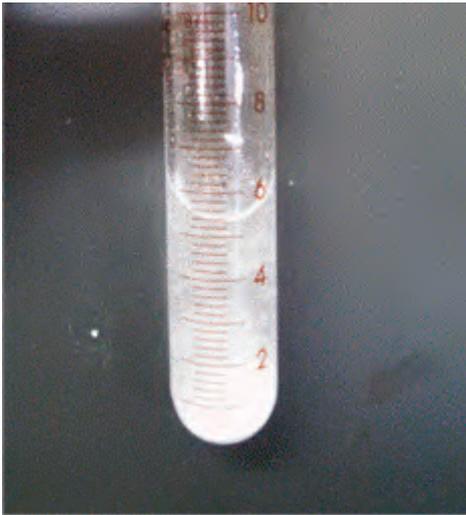


Fig.4 Reaction of citrate

#### 引用文献

- 1) JECFA "Compendium of Food Additive Specifications, Volume 2", Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp.815-816(1992)
- 2) 谷村顕雄, 棚元憲一監修, "第8版食品添加物公定書解説書", 東京, 廣川書店, pp.D-455-456(2007)
- 3) 外務省HP, 外交政策, 条約, "水銀に関する水俣条約" [http://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/page3\\_000477.html](http://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/page3_000477.html)
- 4) Tatebe C, Kawasaki H, Kubota H, Sato K, Tanamoto K, Kawamura Y: *Jpn. J. Food Chem. Safety* 2009;16:78-83.
- 5) Sato K, Uematsu Y, Isagawa S, Tateba H, Tomizawa M, Oosaki K, Hasebe A, Shibuya S, Nii H, Higashinaka R, Watabe I, Yamazaki T, Tanamoto K, Maitani T: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2004;45:302-306.