竹の皮に塗布された第四級アンモニウム塩の検出と定量

金田吉男, 慶田雅洋

国立衛生試験所 大阪支所¹⁾

Detection and Determination of Quaternary Ammonium Compounds applied on Bamboo Sheath

YOSHIO KANEDA and MASAHIRO IWAIDA

National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch¹⁾

(Received May 1, 1976)

Quaternary ammonium chloride is being used increasingly to give a glossy appearance on the surface of bamboo sheath, which is used as a food wrapping. Extraction of this quaternary ammonium chloride is rather difficult because it may have combined with some constituents of the bamboo sheath. A method was therefore devised to isolate and determine the quaternary ammonium chloride. Bamboo sheath is cut into small pieces, heated with 0.1 N HCl for 30 min, and then the acidic solution is extracted with two 30 ml portions of ethanol. Ethanol is steam distilled from this extract and quaternary ammonium chloride in the residual aqueous solution is determined by the Bromophenol Blue method, the amount being expressed as mole of benzethonium chloride.

実験の部

第四級アンモニウム (以下 QAC と称す) は殺菌剤として広く食品工業の各分野で使用されている。最近になって、竹の皮に QAC を塗布し色つやを増したものが輸入されていることがわかった。

竹の皮は食品を直接包装するのに用いるので、その表面にある QAC は食品を通じて人体に摂取されることもあると考えられる。そこで QAC の検出および定量法について検討した。

分析操作の 3 行程、すなわち抽出、クリンアップおよび定量のうち、抽出がもっとも困難であると考えられたので、本報ではそれに重点を置いて検討した。抽出が難しいのは、QAC の水溶液を竹の皮に塗布すると、表面の小孔を通じて内部にも浸透するためと考えられる。

抽出は QAC 全般の溶剤として知られているエタノールを用いて、また定量はブロムフェノールブルー (BPB) -QAC 複塩をジクロロエタン (DE) 溶液中で比色定量する方法²⁾で行なった。

1. 試薬 Benzethonium chloride (以下 B と称す, 東京化成製), hexadecyltrimethylammonium chloride (以下 H と称す, 東京化成製) および Zephiramine (以下 Z と称す, 同仁薬化学製) を使用, 1,2-dichloroethane (以下 DE と称す, 和光純薬製) および bromophenol blue (以下 BPB と称す, 片山化学製) を使用。

2. 機器 日立 139 型 UV-VIS 分光光度計。

3. 竹の皮に塗布された QAC の定量法 (スクリーニングテスト) 竹の皮 (10×10cm) を細切 (1×1cm) して 50 ml の共せんフラスコにとり, 0.1 N 塩酸 10 ml を添加, 還流冷却器を付して 30 分間弱い直火で加熱したのち室温まで放冷し, ついでフラスコ内容物をエタノール 30 ml ずつで 2 回振とう抽出し, さらに 60 ml の水で洗い, 抽出液および洗液を合わせて 500 ml の蒸留フラスコに移し, 水蒸気蒸留を行なって留液 160 ml をとり, 留液は廃棄する。蒸留フラスコ内の残留液を室温まで放冷後, 200ml のメスフラスコに移し定容として検液とす

1) Location: No. 6, Hoenzaka-cho, Higashi-ku, Osaka, 540, Japan (大阪市東区法門坂町 6)。

2) Association of Official Analytical Chemists, "Official Methods of Analysis of The A.O.A.C.", 12th ed., 1975, 20.084.

る。

検液 50 ml を分液ロート (300 ml) に正確にとり、BPB 溶液 (0.04→100) 3 ml, 塩酸 (1→2) 2 ml および DE 50 ml を加えて 4 分間振とうし、分離した下層(DE) を第 2 の分液ロート (100 ml) に移し、1%炭酸ナトリウム溶液 10 ml を加えて 4 分間振とうし、下層 (DE) に無水硫酸ナトリウムを加えて 30 分間放置したのち、その呈色を波長 610 nm で比色する。

Fig. 1. Calibration Curves for QAC

B : benzethonium chloride

H : hexadecyltrimethylammonium chloride

Z : Zephiramine

○—○ : B (μM)=35.27 (OD)₆₁₀+1.56

□—□ : H (μM)=36.55 (OD)₆₁₀+3.03

▲—▲ : Z (μM)=33.69 (OD)₆₁₀+1.75

別に B の 0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 および 25.0 μM 溶液各 50 ml ずつを分液ロートにとり、以下検液と同様の操作を行って検量線を作製し、これを用いて検液中の QAC 含量を定量する。この方法での最低検出限度は B として 0.4 μmole (224 μg)/(竹の皮 200 cm², 表と裏), 検液 200 ml 全量を用いて操作するときは 0.1 μmole (44.8 μg)/200 cm² である。

結果と考察

1. QAC の検量線

A.O.A.C. 法³⁾に従って操作した B, H および Z (Chart 1 参照) の検量線を Fig. 1 に示す。

3つの QAC の検量線のかたむきはほぼ等しく、またそれらを用いた等モル濃度の検量値の間にも有意差はないとみられる。すなわち、Table I に示すように、3つの検量線でもっとも吸光度の差異の大きい濃度 (25 μM) における吸光度 (各 3 試行) の平均値および偏差 2 乗和を用いて *t*-test 検定を行なったところ、B, H および Z の吸光度の間には有意差が認められなかった。

一方、この吸光度と QAC 側鎖鎖長との間には相関関係はなく、³⁾ また微量の QAC を同定するにはかなり複雑な手法⁴⁾ を要する。

このように個々の QAC を同定したのち定量することは困難であり、また 3 種の異なる QAC のモル表示検量線の間には有意差を認めなかったため、竹の皮に塗布された未知の QAC の定量には容易に高純度標品がえられる B の検量線を用いて行ない、その量は B として表示することにした。なお竹の皮に用いられるのは benzalkonium chloride [C₆H₅CH₂N(CH₃)₂R] Cl, R=C₈H₁₇—C₁₈H₃₇ であるといわれている。

Chart 1. Chemical Structure of Three Quaternary Compounds

3) J.B. Wilson, *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, **29**, 311 (1946).

4) T. Kojima, H. Oka, *Kogyo Kagaku Kai-shi*, **71**, 86 (1968); L.D. Metcalfe, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **40**, 25 (1963).

TABLE I. Examination of Significance among the Three QAC's Optical Densities at 25 μM

Sample	OD ₆₁₀ ^{a)}	Sum of squares, S	t-ratio		Evaluation ^{b)}
			Between	t_0	
B	0.653	0.0038	B and H	1.234	not significant
H	0.596	0.009	B and Z	1.634	not significant
Z	0.694	0	H and Z	2.532	not significant

a) mean value of three trials

b) $t(f, 0.05)$, $n_B=n_H=n_Z=3$, $f=3+3-2=4$, so that $t(4, 0.05)=2.776$

2. エタノールの留去

抽出に用いたエタノールの存在は QAC の界面活性剤としての性質に影響する⁵⁾ので, BPB-QAC 複塩形成にも何らかの影響を与えると推定される. そこでエタノール (0.1–10%) を含む B の 25 μM 溶液を調製し, 前項に準じて発色させたときの吸光度とエタノール濃度との関係を Fig. 2 に示す. エタノール含量 0 % のときの吸光度を 100 とすると, エタノール 0.1% (95.5), 0.2% (92.5), 0.5% (88.7) と吸光度は漸減し, 10% (66.9) にいたる. このように共存エタノールは B の定量値に負の妨害を与えることがわかったので, 検液からエタノールを除去する方法を検討した.

はじめに, 沸とう水浴中で検液を半量まで濃縮することを試みた. B (3 μmole , 60 ml) に 60 ml のエタノールを加え, 約 60 ml まで濃縮したのちメスフラスコ (200 ml) に移して水で定容とした. このときの回収率は Table II に示すように, 理論値の約 $1/3$ であった. なお, 濃縮後の器壁に若干の結晶よう物質の沈着およびアルコール臭の残存をみた.

ついで $1/4$ 量までの濃縮を試み, 器壁は熱水で洗浄, 濃縮液と洗液を合わせて 200 ml としたものにおける回収率は理論値の $1/2$, 検液にはなおアルコール臭の残存があった.

この実験における低い回収率の原因の 1 つはエタノールによる呈色妨害 (Fig. 2 参照) であり, いまひとつは沈着した QAC が少量の熱湯では充分に溶出しないためと考えられる.

そこで水にやや難溶な QAC を熱水中に溶解保持させるとともに, エタノールをほぼ完全に留去できる水蒸気蒸留法の利用を検討した. すなわち, B の 3 μmole を含む 60 ml をとり, これにエタノール 60 ml を加えた混液を水蒸気蒸留に付し 160 ml の留出液をとり, フラスコ中の残留液について調べたところ, ほぼ 100% の回収率がえられた. したがって, エタノール留去は水蒸気蒸

TABLE II. Recoveries of B^{a)} (3 μmole) after Removal of EtOH by Three Different Methods

Removal method	Recovery (%)
Condensed to 60 ml in boiling water bath	36.0
Condensed to 30 ml in boiling water bath	44.6
Combine the concentrate and rinsing (hot water)	99.7
Steam distillation ^{b)}	99.7

a) EtOH (60 ml) was added to water solution of benzethonium chloride (60 ml).

b) distilled off 160 ml of EtOH-water mixture

Fig. 2. Effects of EtOH Content on Color Development of BPB-QAC Complex

留法で行うこととした.

3. 竹の皮からの QAC の抽出

竹の皮 (10×10cm) の裏側に B (3 μmole , 1344 μg) の水溶液をのせ, 室温で風乾したのち 1×1cm に細切して検討試料とした.

この試料をエタノール (30 ml) 中に 24 または 48 時間浸漬したのち 10 分間振とう抽出し, つづいて 30 ml のエタ

5) 篠田耕三, “溶液と溶解度,” 丸善, 東京, 1966, p. 167.

Fig. 3. Recoveries of Benzethonium Chloride from Bamboo Sheath after Dipping in Several Ethanolal Solution

Benzethonium chloride (3μ mole) applied on the reverse side of bamboo sheath was extracted by several ethanolal solution. Steam distilled off ethanol from the extract. Recoveries were obtained from the residual water solution.

□ : dipt for 24 hr ▨ : dipt for 48 hr

ノールでいまいちど10分間振とう抽出した。抽出液を合わせ、水 60 ml を加えて前項にのべた方法でエタノール留去を行ない、回収率を求めた結果は約 10% (Fig. 3) であった。エタノールのみで長時間浸漬してもよい抽出の効率はえられないことがわかった。

一方、アルカロイドのような塩基性物質の抽出には、しばしば弱アルカリまたは酸性アルコール溶液が用いられている。そこで 0.1 N 塩酸、0.1 N 水酸化ナトリウムおよび 1% 炭酸ナトリウム溶液のそれぞれ 10 ml を含むエタノール溶液 (40 ml) による抽出を試みた。

どの溶液を用いた場合も、Fig. 3 に示すように、24 時間よりは 48 時間浸漬した方がよい回収率がえられた。また回収率は塩酸酸性溶液による場合がもっとも秀れ、ついで水、1% 炭酸ナトリウムおよび 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液の順であった。なかでも、塩酸溶液に 48 時間浸漬するとほぼ定量的に回収されることがわかった。

QAC は食品成分と結合する⁶⁾ことが知られているが、竹の皮の成分と B との間にも弱い結合が存在するとみられ、そのため QAC をイオン化して結合を切断しやすくする含水エタノールでは抽出が容易であるが、エタノール

TABLE III. Recoveries of B^{a)} from Reverse Side of Bamboo Sheath after Heating with 0.1 N HCl

Heating time (min)	Recovery (%)	Separation of color developed DE ^{b)} layer
10	81.62	good
20	64.86	difficult, it should be centrifuged
30	102.43	good

Small pieces of bamboo sheath (10×10 cm) after application of B (3μ mole), were heated with 10 ml of 0.1 N HCl. Extracted with two portions of 30 ml EtOH. EtOH was steam distilled off. Recoveries were obtained from the residual in the distilling flask.

a) benzethonium chloride

b) 1,2-dichloroethane

ルのみではそれが困難であると推定される。

さらに塩酸溶液中の QAC の ($-N^+$)Cl 塩とアルカリ溶液中の遊離 ($-N^+$) との違いが回収率に影響していると考えられる。すなわち遊離 ($-N^+$) はある程度竹の皮の陰イオン成分に吸着されるため、アルカリ溶液によっては低い回収率がえられたと推定される。

ひきつづきより迅速に抽出を行うため、還流冷却器を付したフラスコに試料と塩酸エタノール溶液 (40 ml) を入れて直火で加熱することを試みた。この操作によって竹の皮への水分浸透が促進され、成分との結合切断も速やかになると考えられる。加熱時に繊維状物質が竹の皮から遊離したこともこのことを支持している。

加熱放冷したのち、30 ml ずつのエタノールで 2 回よく振りまぜて抽出し、エタノールを水蒸気蒸留で留去してえた検液における回収率は、Table III に示すように、10、20 および 30 分間加熱したときそれぞれ 81.62、64.86 および 102.43% であった。

20 分間加熱したときの低い回収率は先述の繊維状物質によってもたらされたゲル形成に由来すると推定され、発色した DE 層を遠心分離しても回収率の改善はみられなかった。しかし 30 分間加熱したところ、繊維状物質の変性のためか DE 層の分離は容易となり、回収率もほぼ定量的な値となった。

したがって、この操作にはクリンアップを追加する必要はない。また B のように安定な化合物⁷⁾はこの操作で分解されない。

4. 竹の皮の表および裏からの QAC の抽出

竹の皮の表および裏からの B の回収率は、Table IV に示すように、1.0—5.0 μ mole の範囲内ではほぼ定量的

6) 小竹無二雄, "新版有機化学," 理工学出版社, 東京, 1951, p. 1484.

7) 日本公定書協会, "第八改正日本薬局方第一部解説書," 廣川書店, 東京, 1971, C-307.

TABLE IV. Recoveries of B^{a)} from Fortified Bamboo Sheath

Applied (μ mole)	Recovery (%) ^{b)}	
	Right side	Reverse side
1.0	93.15	109.15
3.0	101.35	101.35
5.0	99.71	99.13

a) benzethonium chloride

b) Mean value of three trials. Method used was shown in Table III. Minimum detectable were 0.1 μ mole (44.8 μ g) of benzethonium chloride per 200 cm² of bamboo sheath.

であった。使用した検討試料は Table III の実験と同様にして作製した。

5. 市販竹皮の QAC

大阪市内で購入した検体5件のうち1件に、Bとして

0.2 μ mole (89.6 μ g)/200cm² の QAC が見出された。他の4件には QAC は認められなかった。

要 約

つや出しの目的で竹の皮に塗布された QAC は竹の皮の成分と結合するため抽出が困難であった。塩酸エタノール溶液で加熱するとその結合は容易に切断されることがわかった。また BPB 比色法による QAC の定量は共存エタノールで妨害されるのでエタノールの除去について検討した結果、水蒸気蒸留法で留去するのがよいことがわかった。

以上の結果を総合して、竹の皮に塗布された QAC の簡便なスクリーニング法を確立した。

市販品5件について調べたところ、1件に QAC を検出した。

謝辞 実験の一部を担当して下さった松本陽子氏に感謝する。