ノート

食品添加物クエン酸中のイソクエン酸の分析法

(平成12年7月7日受理)

岸 弘子^{*†} 川名 清子^{*}

Determination Method of Isocitric Acid in Food Additive Citric Acid

Hiroko KISHI[†] and Kiyoko KAWANA(Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory: 1-1-1, Nakao, Asahi-ku,
Yokohama 241-0815, Japan; [†] Corresponding author)

A simple and rapid method using HPLC was developed for the determination of isocitric acid in food additive citric acid. One gram of sample was dissolved in 100 mL of water. HPLC separation was performed on an Inertsil ODS-3 column (4.6 mm i.d.×250 mm) using 0.1% phosphoric acid as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. Isocitric acid was detected at 210 nm. The calibration graph was rectilinear from 5 to 100 µg/mL. The recoveries of isocitric acid from sample at the levels of 0.1% and 0.4% were 98% and 99%, respectively, and the determination limit was 0.05%.

(Received July 7, 2000)

Key words: クエン酸 citric acid; 食品添加物公定書 the Japanese Standards of Food Additives; イソクエン酸 isocitric acid; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

クエン酸は酸味料や pH 調整剤として、清涼飲料水や菓子などに使用されている食品添加物である。食品添加物公定書 (公定書)¹⁾に、クエン酸の純度試験の1つとしてイソクエン酸の規格が設けられている。これはクエン酸をノルマルパラフィンを原料とする発酵法で製造するときに、少量副生するイソクエン酸を規制するための試験である。

公定書に定められた試験法 (公定法) はイソクエン酸を加熱処理し、生成するイソクエン酸ラク톤を加熱により変化しないクエン酸とろ紙クロマトグラフィー (PC) で分離、検出する方法である。公定法では検出限界は定められていないが、第七版食品添加物公定書解説書 (解説書)²⁾に、イソクエン酸として0.4%であると記載されている。そこで、実際にイソクエン酸ラク톤溶液をスポットして展開し、検出限界の確認を行った。その結果、試料中2%以上のイソクエン酸に相当するイソクエン酸ラク톤の量で、黄色のスポットが認められた。また、薄層クロマトグラフィー (TLC) についても検討を行ったが、検出限界は0.8%であった。これらの結果より、PC及びTLCは分析感度が低く、0.4%の検出限界を確保できないことが明らかになったため、新たな分析法を開発する必要があると考えられた。

近年、一部の食品添加物の純度試験に HPLC が用いら

れている。有機酸は HPLC による高感度の分析が可能であるが、クエン酸中の不純物としてのイソクエン酸を分析対象とした HPLC の報告はない。そこで、今回 HPLC による食品添加物クエン酸中のイソクエン酸の高感度分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬及び標準溶液

イソクエン酸三ナトリウム *n* 水和物、イソクエン酸ラク톤は和光純薬工業 (株) 製を用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

イソクエン酸標準溶液: イソクエン酸三ナトリウム *n* 水和物を 180°C で2時間加熱乾燥し、デシケータ中で放冷した後、134.2 mg を正確に量り、水に溶解して 100 mL とした。この液 10 mL を量り、水を加えて 100 mL とした (この液 1 mL はイソクエン酸 100 µg を含む)。

クエン酸及びイソクエン酸ラク톤標準溶液: クエン酸 (無水) 及びイソクエン酸ラク톤各 100 mg を正確に量り、それぞれ水に溶解して 100 mL とした。この液各 10 mL を量り、それぞれ水を加えて 100 mL とした。

2. HPLC 装置及び測定条件

HPLC 装置: ポンプ 655 A-11, 紫外可視検出器 L-4200, カラムオープン 655A-52, クロマトデータ処理装置 D-2000 ((株) 日立製作所製)

カラム: Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5

[†] 連絡先^{*} 神奈川県衛生研究所: 〒241-0815 横浜市旭区中尾 1-1-1

μm , ジーエルサイエンス(株)製), 移動相: 0.1%リン酸, 流速: 1 mL/min, 測定波長: 210 nm, カラム温度: 40°C, 注入量: 20 μL

3. 検量線の作成

イソクエン酸標準溶液を水で希釈し, 5, 25, 50 及び 100 $\mu\text{g/mL}$ の溶液を調製した. その 20 μL を HPLC に注入し, 得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め, 絶対検量線法により検量線を作成した.

4. 定 量

試料 1 g を量り, 水に溶解して 100 mL とし, 試験溶液とした.

試験溶液 20 μL を HPLC 装置に注入し, 得られたクロマトグラムのピーク面積から, あらかじめ作成した検量線より試験溶液中のイソクエン酸濃度を求め, 試料中の含量を算出した.

結果及び考察

1. 標準品及び標準溶液の調製

規格試験に用いる標準品は, 高純度で入手しやすく, 安定に使用できることが条件である. イソクエン酸は現在市販されていないため, イソクエン酸ナトリウムが標準品として使用可能であるかを検討した.

イソクエン酸ナトリウムは水和物として市販されているが, 結晶水の数是不明であり, 標準品として使用するためには乾燥して無水物にする必要がある. 公定書¹⁾のクエン酸三ナトリウムの乾燥減量試験では, 180°C, 2 時間の加熱乾燥を行っており, この条件で, イソクエン酸三ナトリウムは無水物になると考えられる. 一方, イソクエン酸は 105°C で 3 時間加熱することにより, イソクエン酸ラクトンに変化するが, イソクエン酸ナトリウムでも加熱により同様に構造が変化する可能性が考えられる. そこで, イソクエン酸ナトリウム n 水和物を 180°C で 2 時間乾燥し, 乾燥前後の HPLC クロマトグラムを比較した. その結果,

乾燥後もイソクエン酸ラクトンのピークは認められず, 構造の変化はないと推定できた. また, 乾燥後のイソクエン酸ナトリウム n 水和物について, 公定書¹⁾のクエン酸三ナトリウムの定量法に準じて過塩素酸溶液で滴定してイソクエン酸ナトリウム含量を求めたところ, 99.5% 以上であり, 乾燥することにより無水物になったと推定できた. 以上の結果より, イソクエン酸三ナトリウム n 水和物は, この条件下で加熱乾燥することにより, イソクエン酸の標準品として使用できることが示唆された.

2. HPLC 条件の検討

測定波長を決定するため, クエン酸, イソクエン酸, イソクエン酸ラクトンの各標準溶液について 190~340 nm の紫外吸収スペクトルを測定したところ, いずれも類似のスペクトルを示したが, 極大吸収は認められなかった. そこで, 測定波長は有機酸の HPLC 分析に一般的に用いられている 210 nm^{3), 4)}を用いることにした.

有機酸の分析には, 有機酸分析用カラム^{3), 4)}又は逆相分配系カラム³⁾が用いられている. 有機酸分析用カラムの Shodex RSpak KC-811 (昭和電工(株)製)でクエン酸, イソクエン酸, イソクエン酸ラクトンの分離を検討したが, 相互分離はできなかった. そこで, カラムに逆相分配系の Inertsil ODS-3, 移動相に 0.1% リン酸を用いたところ, 3 物質を良好に分離することができた.

3 種の標準溶液の HPLC クロマトグラムを Fig. 1 に示した. クエン酸, イソクエン酸及びイソクエン酸ラクトンの保持時間は, それぞれ約 10, 5, 7 分であった. 本条件下では 3 物質が完全に分離検出できるため, 公定法のように加熱によりイソクエン酸をイソクエン酸ラクトンにする必要がなく, イソクエン酸を直接検出することができた.

3. 検 量 線

標準溶液を用いて, ピーク面積からイソクエン酸の検量線を作成した. その結果, 5~100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性を示し, 相関係数は 0.999 であった.

Fig. 1. HPLC chromatograms of standard solutions of citric acid (A), isocitric acid (B) and isocitric acid lactone (C) (each 100 $\mu\text{g/mL}$)
HPLC conditions: column; Inertsil ODS-3 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, mobile phase; 0.1% phosphoric acid, flow rate; 1 mL/min, detection; UV 210 nm, column temp.; 40°C, injection volume; 20 μL

Fig. 2. HPLC chromatogram of sample spiked with isocitric acid (0.4%)

4. 添加回収実験及び実試料の分析

あらかじめイソクエン酸を検出しないことを確認したクエン酸 1 g に、イソクエン酸標準溶液を 0.1% 及び 0.4% になるように添加し、本法に従って分析を行った。その結果、回収率は 0.1% 添加で 98% (CV = 1.5%, $n = 5$), 0.4% 添加で 99% (CV = 0.5%, $n = 5$) と満足できる結果が得られた。0.4% 添加の HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に示した。なお、本法の定量限界は、0.05% であった。

1996 年に市販された食品添加物クエン酸（無水）1 検体を本法で分析したところ、イソクエン酸は検出されなかった。

ま と め

食品添加物クエン酸中に不純物として含まれる可能性のあるイソクエン酸の分析法を検討し、HPLC による方法

を確立した。イソクエン酸三ナトリウム n 水和物を 180°C で 2 時間加熱乾燥したものをイソクエン酸の標準品として使用することができた。カラムに Inertsil ODS-3、移動相に 0.1% リン酸を用いた HPLC により、クエン酸、イソクエン酸及びイソクエン酸ラク톤を良好に分離、検出することができた。

クエン酸にイソクエン酸として 0.1% 及び 0.4% 添加した際の本法による回収率は、それぞれ 98% (CV = 1.5%), 99% (CV = 0.5%) であり、定量限界は 0.05% であった。

本法はイソクエン酸を加熱によりイソクエン酸ラク톤にすることなく、HPLC で高感度に分析が可能で、再現性も優れているため、クエン酸の純度試験法として日常試験に使用できると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、平成 8 年度三栄源食品化学研究振興財団の助成金により行った。

文 献

- 1) The Japanese Standards of Food Additives, 7th Ed., Ministry of Health and Welfare, Japan (1999), p. 218.
- 2) Tanimura, A., *et al.* eds., "Shokuhin Tenkabutsu Koteisho Kaisetsusho, 7th Ed.", Tokyo, Hirokawa Shoten, 1999, D-364-D-368. (ISBN 4-567-01852-4)
- 3) Koseki, M., Takahashi, I., Yasuno, T., Ogino, S., Tsuda, Y., Kazama, M., Determination of organic acids in the presence of metal ion. J. Assoc. Off. Anal. Chem., **72**, 775-776 (1989).
- 4) Kishi, H., Kawana, K., Tani, T., Determination of organic acids in food additive preparations. Kanagawaken Eiseikenkyusho Kenkyuhokoku (Bull. Kanagawa P. H. Lab.), **28**, 43-46 (1998).