食用油脂中のクエン酸イソプロピル分析法

(昭和 62 年 1 月 6 日受理)

牛山博文* 西島基弘* 安田和男*
上村 尚* 田端節子* 二島太一郎*

Determination of Isopropyl Citrate in Edible Oil

Hirofumi USHIYAMA, Motohiro NISHIJIMA, Kazuo YASUDA, Hisashi KAMIMURA,
Setsuko TABATA and Taichiro NISHIMA

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 24-1, Hyakunin-cho,
3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan)

An analytical method was developed for the determination of isopropyl citrate in edible oil.

The sample was dissolved in ethyl acetate and mono- and diisopropyl citrate were extracted with 5% sodium bicarbonate. The aqueous layer was acidified with phosphoric acid and isopropyl citrates were extracted with ethyl acetate. The ethyl acetate layer was dried with anhydrous sodium sulfate and evaporated to dryness. The residue was fluorescence-labeled with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (Br-Mmc). Thin layer chromatography was used for the qualitative determination of fluorescence-labeled mono- and diisopropyl citrates.

Qualitative determination was carried out as follows. The sample was hydrolyzed with potassium hydroxide solution. The hydrolyzed solution was washed with hexane and applied to the Amberlite IRA-402 column. Citric acid was eluted with 1 N hydrochloric acid. The eluate was evaporated to dryness, and the residue was dissolved in water. High performance liquid chromatography was used for quantitative determination of citric acid.

The recoveries of isopropyl citrates added to edible oil were in the range from 84% to 93% and the detection limit of monoisopropyl citrate was 5 µg/g.

(Received January 6, 1987)

Key words: 食用油脂 edible oil; クエン酸イソプロピル isopropyl citrate; 酸化防止剤 anti-oxidant; 薄層クロマトグラフィー thin layer chromatography; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

クエン酸イソプロピルは昭和58年8月、食品衛生法で酸化防止剤として、食用油脂及びバターに使用することが許可された¹⁾。

クエン酸イソプロピルは、モノ、ジ及びトリイソプロピルの混合物で、微量の金属イオンを封鎖して不活性化

し酸化を防止するが、ジ及びトリイソプロピルではその効果はかなり低下するか、なくなる²⁾。

クエン酸イソプロピルの分析法は、ガスクロマトグラフィーを用いた方法が辻ら³⁾及び加藤ら⁴⁾によって報告されている。著者らは酸化防止剤として効果の認められる²⁾クエン酸モノ及びジイソプロピルを 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (Br-Mmc) を用いて蛍光ラ

* 東京都立衛生研究所：東京都新宿区百人町 3-24-1

ペル化を行い⁵⁾, 薄層クロマトグラフィー (TLC) で定性後, クエン酸モノ, ジ及びトリイソプロピルを加水分解してクエン酸とし, クエン酸を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量後, 食品衛生法に基づく使用基準に従いクエン酸モノイソプロピルに換算する方法を検討し, 良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

市販の食用植物油 (綿実油, 大豆油), マーガリン及びバターを用いた。

2. 試薬

1) 標準品: クエン酸モノ, ジ及びトリイソプロピルは辻らの報告³⁾に従って合成した。

2) Br-Mmc 溶液: Br-Mmc ((株)同仁化学研究所製) 50 mg をアセトン 40 ml に溶解したものを用いた。

3) 18-Crown-6: Aldrich 社製を用いた。

4) 水酸化カリウム溶液: 水酸化カリウム 9 g を水に溶解し 10 ml としたものを用いた。

5) 薄層用シリカゲルプレート: HPTLC Fertigplatten Kieselgel 60 (Merck 社製) を用いた。

6) 陰イオン交換樹脂カラム: 直径 1.5 cm のガラス管にアンバーライト IRA-402 (オルガノ (株) 製) を 15 cm の高さに充てんしたものを用いた。

その他の試薬は市販の試薬特級品を用いた。

3. 装置

1) 紫外線照射器: Ultra-Violet 社製 TL-33 型

2) 自記蛍光分光光度計: (株)日立製作所製 MPF-2A 型

3) 高速液体クロマトグラフ: (株)日本分光工業製 TRI-ROTAR-II 型

4) 検出器: (株)日本分光工業製 UVIDEC-100-III 型

5) 高速液体クロマトグラフ用カラム: (株)島津製作所製 Shim-pack CLC-ODS 6 mm i.d. × 150 mm

4. 試験溶液の調製

4.1 定性用試験溶液

試料 10 g を酢酸エチル 50 ml に溶解し, 5% 炭酸水素ナトリウム溶液 50 ml を加えて振とうし, 水層を分取した。酢酸エチル層に 5% 炭酸水素ナトリウム溶液 50 ml を加えて同様に操作し, 水層は合せた。水層にリン酸を加えて酸性とした後, 酢酸エチル 100 ml で 2 回抽出した。酢酸エチル層を合せ無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後, 40° 以下で減圧乾固した。

残留物に Br-Mmc アセトン溶液 4 ml, 18-Crown-6 2 mg 及び炭酸カリウム 4 mg を加え, 混和した後, 80~90° で 30 分間還流して, クエン酸モノ及びジイソプロピルを蛍光ラベル化し, 定性用試験溶液とした。

4.2 定量用試験溶液

試料 2 g を秤取し, 酢酸エチル 50 ml に溶解し, 5%

Table 1. Conditions of High Performance Liquid Chromatography for Citric Acid

Column	: Shim-pack CLC-ODS 6 mm i.d. × 150 mm
Mobile phase	: 0.1 M KH ₂ PO ₄ pH 2.8
Flow rate	: 0.8 ml/min
Detector	: 210 nm
Sample size	: 10 µl

炭酸水素ナトリウム溶液 30 ml を加えて振とうし, 水層を分取した。酢酸エチル層は 5% 炭酸水素ナトリウム溶液 30 ml を加え, 同様の操作をさらに 2 回繰り返した。水層は合せ, 塩化ナトリウム 40 g を加え, リン酸を加えて酸性とした後, 酢酸エチル 150 ml で 3 回抽出した。すべての酢酸エチル層は合せ, 40° 以下で減圧乾固した。

残留物にエタノール 30 ml 及び水酸化カリウム溶液 2 ml を加え, 沸騰水浴中で 30 分間還流し, 加水分解した。冷後, 加水分解物を, 水 10 ml を用いて分液漏斗に洗い込み, 塩酸で中和した後, ヘキサン 50 ml を加えて振とうし, 水層を分取した。水層は, あらかじめ作製した陰イオン交換樹脂カラムに負荷した。次いで水 200 ml で洗浄した後, 1 N 塩酸 120 ml でクエン酸を溶出した。溶出液は減圧乾固し, 残留物に水 2 ml を加え溶解したものを定量用試験溶液とした。

5. 薄層クロマトグラフィーによる定性

定性用試験溶液 20 µl, 及びクエン酸モノ及びジイソプロピルを同様に蛍光ラベル化した標準品を, シリカゲルプレートに塗布し, 展開溶媒クロロホルム-アセトン (95:5) 混液を用い約 6 cm 展開した。風乾後, 紫外線照射下で, スポットの R_f 及び蛍光の色調を比較し, 定性を行った。

6. HPLC による定量

定量用試験溶液を HPLC を用い, Table 1 に示した条件でクエン酸を定量し, クエン酸モノイソプロピルに換算した。

結果及び考察

1. Br-Mmc による蛍光ラベル化

クエン酸モノ及びジイソプロピルの蛍光ラベル化は, カルボン酸のラベル化剤である Br-Mmc を用い, Grushka らの方法⁵⁾に準じて行った。TLC で分離後, 励起スペクトル及び蛍光スペクトルを測定した。クエン酸モノ及びジイソプロピルのラベル化物はいずれも極大励起波長 346 nm, 極大蛍光波長 446 nm のほぼ同様のパターンを示した。Fig. 1 にクエン酸モノイソプロピルのラベル化物のスペクトルを示した。励起波長 346 nm のとき蛍光強度が極大となったが, 一般に用いられる紫外線照射器の波長である 365 nm では, 蛍光強度は 346 nm のときの約 65% であるが, 植物油及びバターに応用し

Fig. 1. Fluorescence excitation and emission spectra of monoisopropyl citrate derivative

Fig. 2. Relation between R_f values of isopropyl citrate derivatives and concentration of acetone in solvent system
solvent system: chloroform-acetone
●—●: Br-Mmc, ○—○: monoisopropyl, ○---○: diisopropyl

たときの確認限度は、スポットあたり、モノ及びジイソプロピル共に $0.2 \mu\text{g}$ で、定性試験としては実用上問題なかった。

2. TLC による定性

2.1. 展開溶媒

Dünges⁹⁾ は Br-Mmc でラベル化した脂肪酸の TLC による分離に、ベンゼン-酢酸エチル系の展開溶媒を用いているが、本法に応用したところ、特にラベル化物及び Br-Mmc の相互分離の点で満足いく結果は得られなかった。そこで種々の展開溶媒を検討したところ、クロロホルム-アセトン混液を用いたとき、スポットのまとまり及び相互分離の点で、良好な結果が得られたため、クロロホルム-アセトン混液について、最適の条件を検討した。Fig. 2 に示したようにアセトンの混合割合が増加するに従い、クエン酸モノ及びジイソプロピルのラベル化物及び Br-Mmc の R_f が大きくなる傾向を示した。クロロホルムとアセトンの比が 95:5 のとき、相互の分離が良好で、かつ食用油脂に応用した際の妨害物との分

Fig. 3. Thin layer chromatogram of Br-Mmc reaction mixtures of isopropyl citrates and sample extracts

a: Br-Mmc, b: diisopropyl, c: mono-isopropyl

1: mono and diisopropyl citrates, 2: cottonseed oil extract, 3: cottonseed oil extract+mono and diisopropyl citrates, 4: butter extract, 5: butter extract+mono and diisopropyl citrates

離が良かったことから、展開溶媒はクロロホルム-アセトン (95:5) を用いることにした。

綿実油及びバターに応用したときの薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。いずれの場合も、スポットの R_f 及び蛍光の色調から定性が可能であった。

3. 妨害物の検討

本法を用いた際、定性用試験溶液と同じ画分に分画される食品添加物、及び食用油脂及びバターに添加される可能性がある食品添加物あるいは成分として含まれる物質としてクエン酸、安息香酸、ソルビン酸、プロピオン酸、デヒドロ酢酸、BHA 及び BHT について検討した。クエン酸は定性用試験溶液の画分に分画されないため、妨害とはならなかった。安息香酸、ソルビン酸及びプロピオン酸は R_f がそれぞれ 0.9 以上で、クエン酸イソプロピルのラベル化物と明らかに異なるため区別ができた。また BHA、BHT 及びデヒドロ酢酸は定性用試験溶液の画分に分画されないか、あるいはラベル化されないため、いずれも妨害とはならなかった。

4. 陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

加水分解して得た溶液は、妨害物質により粘度が高く濃縮が困難で、そのままでは HPLC でクエン酸を分析することができなかった。そこで、共存する妨害物質の除去を検討した。クエン酸はカルボキシル基を有することから、陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーを検討した。

4.1. 陰イオン交換樹脂量

樹脂の量とクエン酸の回収率の関係を Fig. 4 に示した。カラムの高さが 12 cm 以上で、クエン酸はほぼ 100% 回収されることから、カラムの高さは 15 cm とす

Table 2. Recovery of Mono-, Di- and Triisopropyl Citrate Added to Cottonseed Oil and Butter

Sample	Added (μ g)	Recovery (%)		
		Monoisopropyl	Diisopropyl	Triisopropyl
Cottonseed oil	200	90 $\pm$ 2.4	91 $\pm$ 2.5	93 $\pm$ 1.8
	50	87 $\pm$ 3.3	88 $\pm$ 2.9	89 $\pm$ 2.1
Butter	200	87 $\pm$ 3.6	91 $\pm$ 3.3	90 $\pm$ 3.1
	50	84 $\pm$ 4.6	87 $\pm$ 3.8	86 $\pm$ 3.9

Sample: 2 g, average for 4 trials

Fig. 4. Recovery of citric acid by different resin volume in the column
resin: Amberlite IRA-402, column i.d.: 1.5 cm **Fig. 5.** Recovery of citric acid from an Amberlite IRA-402 column with 1N hydrochloric acid

ることとした。

4.2. 溶出溶媒量

溶出溶媒として 1N 塩酸を用いた場合のクエン酸の溶出パターンを Fig. 5 に示した。クエン酸は 100 ml でほぼ 100% 溶出することから、溶出に用いる 1N 塩酸の量は余裕をみて 120 ml とした。

Fig. 6. High performance liquid chromatograms of citric acid and sample extracts

5. HPLC の条件

5.1. カラムの選択

従来から HPLC による有機酸などのイオン性物質の分離には、イオン交換クロマトグラフィーが主として用いられているが⁷⁾、イオン交換クロマトグラフィーは、再現性や、カラムの寿命の点などいくつかの難点を持つ。そこで逆相クロマトグラフィーとして用いられるカラムである Shim-pack CLC ODS を用い、イオン化抑制法によるクエン酸の分析を検討した。

5.2. 移動相の検討

0.1 M リン酸二水素カリウム溶液を用い、リン酸で pH を 4 から 2.6 まで変化させ最適の条件を検討した。pH 4 ではクエン酸の保持が不十分で、分析できなかった。pH 3.2 から 2.6 のときクエン酸は良好に保持され、テーリングもなく良好なピークが得られた。また食品に適用した場合も良好な結果が得られたことから、移動相は 0.1 M リン酸二水素カリウム溶液をリン酸で pH を 2.8 に調整し、用いることにした。

6. 食用植物油及びバターへの応用

本法を綿実油及びバターへ応用したときのクロマトグラムを Fig. 6 に示した. 特に妨害は認められず, 良好な結果が得られた. また, 試料にクエン酸を 200 μ g 添加し, 本法に従って試験した場合でも, 特に影響は見られなかった.

7. 添加回収試験

あらかじめ, クエン酸イソプロピルが存在しないことを確認した綿実油及びバター 2 g に, クエン酸モノ, ジ及びトリイソプロピルをそれぞれクエン酸として50及び200 μ g 添加し, 本法に従って回収試験を行った結果を Table 2 に示した. 回収率は 84~93%, 標準偏差 1.8~4.6% と満足できる結果が得られた.

定量限界は試料中モノイソプロピルとして 5 μ g/g であった.

8. 市販品の使用実態調査

本法を用い, 市販の綿実油, 大豆油, マーガリン及びバターなど, 計13検体について使用実態調査を行ったが, いずれからもクエン酸イソプロピルは検出されなかった.

ま と め

食用油脂中のクエン酸イソプロピルの分析法を検討した.

試料から酢酸エチルで, クエン酸イソプロピルを抽出後, Br-Mmc で蛍光ラベル化を行い, TLC で定性を行

った. クエン酸イソプロピルを検出した場合, あるいは判定が困難なものについては, 試料に水酸化カリウム溶液を加え, 還流を行い加水分解して得たクエン酸を HPLC で定量した. 回収率は 84~93%, 定量限界は試料中モノイソプロピルとして 5 μ g/g であった.

市販の植物油, マーガリン及びバターについて調査したところ, いずれからもクエン酸イソプロピルは検出されなかった.

文 献

- 1) 仲本典正, 平山佳伸, 松田 勉, 山本芳子: 食品衛生研究 **33**, 831~889 (1983).
- 2) 太田静行: New Food Industry **25**, 44~49 (1983).
- 3) 辻 澄子, 外海泰秀, 伊藤誉志男, 原田基夫: 食衛誌, **26**, 357~364 (1985).
- 4) 加藤クニ, 中岡正吉, 伊藤和敏: 同上 **27**, 668~671 (1986).
- 5) Eli G., Stanley L., John C.: Anal. Chem. **50**, 1398~1399 (1978).
- 6) Wolfgang D.: *ibid.* **49**, 442~445 (1977).
- 7) 液体クロマトグラフ研究会 データ集積委員会編: “高速液体クロマトグラフィーデータ集” **92**, 96, 109, 1525, 1528, 1532, 2794, 3384, (1977) (株) アイピーシー.