デヒドロ酢酸の鉄ミョウバン溶液による比色定量法 と水蒸気蒸留による分離法について (第2報)

デヒドロ酢酸の水蒸気蒸留による分離法について

(昭和 39 年 12 月 7 日 受 理)

中 村 幸 男*

Colorimetric Determination of Dehydroacetic Acid with Iron Alum Solution and Recovery by Steam Distillation (II) Recovery of Dehydroacetic Acid by Steam Distillation

Yukio NAKAMURA

(Fukuoka Prefectural Institute of Public Health: 1, Tenjin, Fukuoka)

It has been reported already that dehydroacetic acid reacted with ferric iron to produce a chelate compound. The reaction was so sensitive and quantitative that it was utilized for the colorimetric determination of dehydroacetic acid.

Suitable amount of the distillate from foods, which was made by the steam distillation method reported on *Shokuhin Eiseigaku Zashi*, 5, 148 (1965), was transferred into a 25-ml flask, added with 5 ml of iron alum solution and diluted to the mark with water. The absorbance of the solution was measured at 440 m μ . More than 10 μ g/ml of dehydroacetic acid in the distillate could be determined by this method. Sorbic acid and salicylic acid interfered with this method, but other food preservatives did not interfere within the regular amount. Nitrofurazone, nitrofurylacrylamide, artificial sweetners and coloured substances did not appear in the distillate.

(Received December 7, 1964)

1. はじめに

食品中からデヒドロ酢酸 (以下 DHA と略称) を定量的に分離回収する方法は、その量が一般に少ないのできわめて困難であり、それがうまくゆけば定量操作の大半は成功したと言っても過言ではない。従来より用いられている方法は、他の大部分の保存料と同じく有機溶媒による抽出法である¹⁾²⁾。この方法は多量の溶媒を要すること、かなりの時間と手間を要すること、また食品によっては往々にして乳化を起こし溶媒の分離が困難になるなどの欠点がある。そこで DHA が水蒸気により揮散しやすい性質を利用して水蒸気蒸留を試みた。水蒸気蒸留については川城ら³⁾の簡単な報告があり、水溶液の場合リン酸酸性で最高84%の DHA を回収している。筆者の追試でも pH 3.8 のクエン酸酸性で回収率 71%にすぎな

かった。

そこで試料液に塩化ナトリウムを飽和させ水蒸気蒸留を試みた。この場合 DHA の溶解度は小さくなり、かつ塩化ナトリウム混合溶液の蒸気圧は同温度における純粋の水の蒸気圧より小さくなり、したがって混合溶液の沸騰点は塩化ナトリウムを加えないときより高くなる。そしてその混合蒸気の各成分の分量の割合は分子量と分圧との相乗積の比に等しいから⁴⁾、この場合の蒸気は DHA を多く含み、したがって留液中の DHA の濃度も高くなる。そして水溶液の場合、pH 3.8 のクエン酸酸性で、ほとんど100%の DHA を分離回収することができる。

2. 実験装置、試薬および実験方法

DHA の比色定量法に関することは省略する (第1報参照)。

2・1 実験装置

* 福岡県衛生研究所：福岡市天神1丁目5番3号

2・1・1 水蒸気蒸留装置は1 Lの平底丸フラスコ、300 mlのケルダールフラスコ、長さ45 cmのリービッヒ冷却管を組み合わせて作成した。

2・1・2 pH測定は堀場製 MODEL-M3型 pHメーターによった。

2・2 試薬

2・2・1 DHA標準液：DHA（食品添加物規格合格品）をエタノールおよび水で再結晶し、その250 mgを1 N水酸化ナトリウム溶液5 mlに溶かし、フェノールフタレインを指示薬として塩酸で中和し、全量100 mlとする。本液1 mlはDHA 2.5 mgを含む。

2・2・2 10%水酸化ナトリウム溶液、10%炭酸ナトリウム溶液、30%クエン酸溶液はいずれも特級試薬を用いて作成した。

2・3 実験操作

2・3・1 試料の調製：液体試料（炭酸ガス、アルコールを含むものはアルカリ性にし、加熱して除く）は20～40 g（DHA濃度1.5～17 mg）を、半流動体試料、固体試料はよくすりつぶしてその10～15 gをビーカーにとり、水を加え約35 mlとし塩化ナトリウムを適量（約10 g）を加え、よくまぜて飽和させ、過剰の塩化ナトリウムが少し残る程度にしてガラス電極をそう入し、10%水酸化ナトリウム溶液1 ml以上を加えアルカリ性にする。つぎに30%クエン酸溶液を滴下しpH 3.7～3.8に調整する。過剰の水酸化ナトリウムを用いるのはそれをクエン酸で中和することにより、緩衝性を持たせるためである。これを水約10～12 mlであらかじめ塩化ナトリウム12～15 gを入れた蒸留フラスコに定量的に洗入れる。以上の操作で沈殿を析出したり、あるいはとくに固体試料の場合、水に不溶のため定量的に蒸留フラスコに移しにくいとき、または試料を多量に用いたいときは上記の操作を予備操作として必要な試薬量を算出し、本試験では試料を直接蒸留フラスコに投入し、あらかじめ算出した試薬量を蒸留フラスコに入れて蒸留を行なう。脂肪を含む試料は少し加温すれば処理しやすい。

2・3・2 蒸留：冷却による水量の増大を防ぐため、あらかじめ試料液を沸騰点近くまで加熱したのち蒸気を通じ水蒸気蒸留を行なう。この際フラスコ内の液量はあまり変化のないよう注意する。

100 mlのメスフラスコに留液約95 mlを集め、冷却器を水で洗い全量を100 mlとする。約30分で終了する。発泡しやすい試料液には流動パラフィン5～6滴を加え蒸留する。

2・3・3 比色定量：留液は必要あれば過し、その20 mlを25 mlのメスフラスコにとり、2%鉄ミョウバン溶液5 mlを加え、10分後440 m μ における吸光度を測定する。定量法の詳細は第1報を参照されたい。

2・4 妨害物の除去

筆者は第1報で鉄ミョウバンによる比色定量が多くの

共存物の妨害を受けることを述べた。そのうち無機酸およびアルカリ類、酢酸を除く有機酸類、ニトロフラゾン、ニトロフリルアクリル酸アミド、色素、合成甘味料、その他食品一般成分などは2・3の方法により除去できる。また食品によっては第1報で述べた比色定量の際、比較的高いブランク値を示し（Table 3参照）、DHAの低濃度のとき誤差を大きくするものがある。それを除く方法はなお検討中であるが、発酵乳、しょう油、みそなどおもに発酵によって製造した食品については2・4・1の方法で、酢酸を含む食品については2・4・2の方法で行なえばブランクを1/2以下に下げることができる。

2・4・1 留液100 mlを蒸発ザラに移し、10%炭酸ナトリウム溶液数mlを加えアルカリ性とし（指示薬フェノールフタレイン）水浴上で約30 mlに濃縮する。その液をあらかじめ塩化ナトリウム約25 gを入れた蒸留フラスコに水20 mlで流し込み、BCGを指示薬として30%クエン酸溶液でpH 3.8～3.5とし、水蒸気蒸留を繰返し留液100 mlをとり、2・3・3により定量する。DHAの損失はほとんどない。

2・4・2 酢酸を含む食品では酢酸が同時に留出し、これが鉄ミョウバン法による比色に影響する。2・4・1と同様に蒸発ザラで濃縮し、これを分液ロートに移しクエン酸酸性とし（pH 3.5～3.8）約50 mlとしたのち、30 mlのエーテル・石油エーテル等量混液で4回抽出し水洗後0.1 N水酸化ナトリウム溶液15, 15, 10 mlと振りまぜてDHAを転溶させ、これを蒸留フラスコに入れ水浴上で加温して溶媒を追いつ出したのち、2・4・1と同様に水蒸気蒸留を繰返す。DHAの損失は2%以下である。

3. 蒸留条件の検討

3・1 塩化ナトリウムの添加

はじめに述べたように試料液に塩化ナトリウムを飽和させることにより、はじめて約90%以上のDHAを回収できる。なお塩化ナトリウムの溶解度は温度による差があまりないので都合がよい。

3・2 pHの回収率への影響

蒸留水50 mlにつき10%水酸化ナトリウム溶液1 mlの割合で入れたのち塩化ナトリウムで飽和する。その液にガラス電極をそう入し30%クエン酸溶液でpHを調整する。このようにしてTable 1の各緩衝液を作り、その48 mlをあらかじめ塩化ナトリウム10 gを入れた蒸留フラスコに注ぎ入れ、つぎにDHA標準液2 mlを添加し2・3・2により蒸留し回収率を検討した。

Table 1のように試料液のpHが低くなるに従い回収率は高くなる。しかし、たとえばTable 2のようにDHAの比色定量に妨害を及ぼす物質の留出がpHが低くなるに従い多くなることがあるので、あまり低くすることは適当でない。したがって検討の結果pH 3.8をとるこ

とにした。なお酸性にするには、緩衝性が高くかつ不揮発性弱酸であるクエン酸が適当である。

Table 1. Effects of pH on Recovery of DHA

pH	4.5	4.2	4.0	3.8	3.5
Recovery (%)	92	97	100	100	100

Table 2. Effects of pH on the Distillation of Fermented Milk

pH		4.5	4.0	3.8	3.5	3.0
Absorbance*	440 m μ	0.007	0.009	0.010	0.018	0.023
	420 m μ	0.010	0.015	0.015	0.028	0.047

* colored by Fe-Alum Method

4. 食品からの DHA の回収

DHA を含まない各種食品を10~40 g とり、あらかじめ DHA 標準液 1 ml および 6 ml (DHA 2.5~15 mg) を添加し、2・3の方法に従って吸光度を測定し、DHA を添加しない食品について同様に操作して得た吸光度をブランクとして DHA の量を求め回収率を検討した結果が Table 3 である。

5. 考 察

食品はきわめて種類が多く、そのすべてについて上記の方法が応用できるかどうか、なお多くの事例について検討する必要があるが、Table 3 のような各種食品について試験を行なった結果、かなりの好結果を得ることができた。とくに液体食品についてはきわめて高い回収率を示し、加えて試料を多量にとることができるのですぐれた分離法ではないかと考える。固体食品についても、そのまま水にうすめて試験できるので便利であり、かなりの回収率を示すが試料を多量に使えない欠点がある。また留液中に紫外部に吸収を示す妨害物がない場合は紫外部吸収による定量も可能である。DHA は蒸留水中で 305 m μ および 225 m μ 附近に大きな吸収部分をもっている。

留液をそのまま、あるいは濃縮して DHA の定性反応に用いることも可能である。

終りに臨み、ご指導を賜った真子憲治衛生研究所長、

Table 3. Recovery of DHA from Various Foods

Sample	Weight of sample	Blank value of distillate (440m μ)	Recovery of DHA (%)	
			2.5 mg	15 mg
Water	50	0.0	100.0	99.6
Orange juice	40	0.0	100.0	99.6
Pine juice	40	0.003	100.0	98.7
Tomato juice	40	0.0	100.0	99.6
Soft drink(CO ₂)	30	0.0	100.0	97.8
Milk	40	0.003	94.0	93.3
Fermented milk (A)	20	0.012	96.2	95.3
" (B)	30	0.01	97.0	94.0
<i>Lactbacillus</i> sol.	40	0.0	93.1	92.7
Shōyu (Soy)	30	0.03	96.0	90.6
Miso	10	0.015	98.0	94.8
Ketchup (A)	20	0.012	98.1	96.7
" (B)	10	0.005	99.2	97.0
Instant nama-udon	10	0.0	100.0	93.3
" nama-sōmen	10	0.0	100.0	95.3
" nama-champon	15	0.017	100.0	93.3
" yaki-gyōza	10	0.005	97.0	95.3
Fish sausage	15	0.0	90.2	88.0
Winna sausage	15	0.0	94.0	—
Kamaboko	10	0.01	98.0	94.0
Apple jam	15	0.005	100.0	96.7
Boiled beans (sugar)	15	0.007	96.3	93.6
Manjū	10	—	98.0	95.7
Vinegar	20	0.027	98.4	94.7
Laver's tsukudani	10	0.007	98.1	98.8

大田寿化学試験課長に感謝する。

文 献

- 1) 日本薬学会編：“衛生試験法注解” 97(1956~7)。
- 2) 厚生省編：“衛生検査指針Ⅲ食品衛生検査指針(Ⅱ)” 18 (1963)。
- 3) 川城外：衛生試験，70, 44 (1952)。
- 4) 緒方外：“化学実験操作法” 221 (1951) 南江堂。