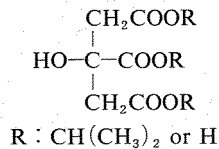


## 9 クエン酸イソプロピル

Isopropyl Citrate



クエン酸モノイソプロピル

$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_7$  : 234.21

クエン酸ジイソプロピル

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_7$  : 276.29

クエン酸トリイソプロピル

$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_7$  : 318.37

### 1. 試験法の概要

食品中のクエン酸イソプロピル<sup>1)</sup>は、クエン酸モノ及びジイソプロピルをメチル化体にした後、またクエン酸トリイソプロピルは直接、ガスクロマトグラフィーにより測定し、クエン酸モノイソプロピルとして求める。

### 2. 試験法 (ガスクロマトグラフィー)

#### (1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

#### (2) 試料液の調製

##### ① 食用油

試料約 20g を精密に量り、*n*-ヘキサン 100ml を加えて溶かす<sup>2)</sup>。この液を定量的に分液漏斗に入れ、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を加えて振り混ぜ、アセトニトリル層を分取する。更に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を用い、同様の操作を繰り返す。全アセトニトリル層を合わせ、減圧乾固した後、ジアゾメタン試液 2ml を加えてメチル化し<sup>3)</sup>、減圧下で乾固した後、残留物をアセトン 4ml に溶かし試料液とする。

##### ② バター及びその他の食品

試料約 20g を精密に量り、飽和食塩水 10ml 又は 20ml 以下<sup>4)</sup>、5mol/l 硫酸 2ml 及び酢酸エチル 75ml を加えてホモジナイズした後、ろ過する。残留物は酢酸エチル 50ml ずつを用いて 2 回ホモジナイズした後、ろ過する。全ろ液を合わせ<sup>5)</sup>無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、ろ過した後、減圧乾固する<sup>6)</sup>。残留物に *n*-ヘキサン 100ml を加えて溶かし、この液を定量的に

分液漏斗に入れる。更に残留物に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を加えて溶かし<sup>7)</sup>、この液を定量的に先の分液漏斗に合わせて振り混ぜ、アセトニトリル層を分取する。更に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を用い、同様の操作を繰り返す。全アセトニトリル層を合わせ、減圧乾固した後、ジアゾメタン試薬 2ml を加えてメチル化し、溶媒を留去する。残留物を *n*-ヘキサン 2ml に溶解した後、フロリジルカラムに負荷し *n*-ヘキサン・エチルエーテル混液 (4:1) 80ml (流速 2ml/分) で洗浄する。次いで *n*-ヘキサン・エチルエーテル混液 (1:1) 100ml (流速 2ml/分) で溶出し、減圧乾固後アセトン 4ml に溶かし試料液とする。

### (3) 検量線用標準液の調製<sup>8)</sup>

クエン酸 2-モノイソプロピル (クエン酸モノイソプロピル a) 及び 1-モノイソプロピル (クエン酸モノイソプロピル b)<sup>9)</sup>、クエン酸 1,2-ジイソプロピル (クエン酸ジイソプロピル a) 及び 1,3-ジイソプロピル (クエン酸ジイソプロピル b)、及びクエン酸トリイソプロピル 0.100g ずつを正確に量り、合わせてアセトンを加えて溶かし、正確に 100ml とし、標準液とする (この液 1ml は、クエン酸モノイソプロピル a 及び b、クエン酸ジイソプロピル a 及び b、及びクエン酸トリイソプロピルそれぞれ 1mg ずつを含む)。標準液 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5ml 及び 2ml を正確に量り、それぞれにジアゾメタン試液 2ml ずつを加えてメチル化し、減圧乾固した後アセトンを加えてそれぞれ正確に 4ml ずつとし、検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれクエン酸モノイソプロピル a 及び b、クエン酸ジイソプロピル a 及び b、及びクエン酸トリイソプロピルをそれぞれ 0, 62.5, 125, 250, 375 $\mu$ g 及び 500 $\mu$ g ずつを含む)。

### (4) 測定法

#### ① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：60~80 メッシュのガスクロマトグラフィー用ケイソウ土をシラン処理した担体にシリコーン OV-330 を 1% の割合でコーティングしたもの。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 3m

カラム温度：160 $^{\circ}$ C

注入口温度：210 $^{\circ}$ C

検出器温度：210 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：窒素ガス、30ml/分

#### ② 検量線

検量線用標準液 5 $\mu$ l ずつをそれぞれ正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたそれぞれの成分のピーク面積からクエン酸モノイソプロピル a 及び b 用、クエン酸ジイソプロ

ピル a 及び b 用及びクエン酸トリイソプロピル用検量線を作成する。

③ 定量<sup>10)</sup>

試料液 5 $\mu$ l を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたそれぞれの成分のピーク面積と対応する検量線から試料液中のクエン酸モノイソプロピル a 及び b、クエン酸ジイソプロピル a 及び b、及びクエン酸トリイソプロピル濃度それぞれ  $A_{a1}$ 、 $A_{b1}$ 、 $A_{a2}$ 、 $A_{b2}$  及び  $A_3$  ( $\mu$ g/ml) を求め、次式によって試料中のクエン酸イソプロピル含量 C (g/kg) をクエン酸モノイソプロピルとして計算する。

$$\text{クエン酸イソプロピル C (g/kg)} = \frac{A_{a1} + A_{b1} + 0.8477(A_{a2} + A_{b2}) + 0.7357A_3}{250 \times W}$$

$A_{a1}$  : 試料液中のクエン酸モノイソプロピル a 濃度 ( $\mu$ g/ml)

$A_{b1}$  : 試料液中のクエン酸モノイソプロピル b 濃度 ( $\mu$ g/ml)

$A_{a2}$  : 試料液中のクエン酸ジイソプロピル a 濃度 ( $\mu$ g/ml)

$A_{b2}$  : 試料液中のクエン酸ジイソプロピル b 濃度 ( $\mu$ g/ml)

$A_3$  : 試料液中のクエン酸トリイソプロピル濃度 ( $\mu$ g/ml)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液

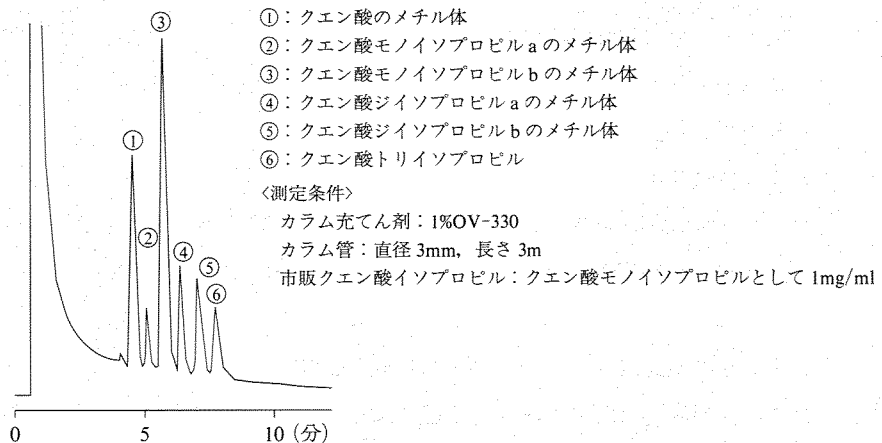
1. *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル: アセトニトリル 1,000ml に、*n*-ヘキサン 200ml を加え、よく振り混ぜた後静置し、アセトニトリル層を分取する。
2. ジアゾメタン試液<sup>11)</sup>: *N*-メチル-*N*-ニトロソ-*p*-トルエンスルホンアミド 4.3g をエチルエーテル 26ml に溶かし、あらかじめ水酸化カリウム 1g を水 1.6ml 及びエタノール 5ml に溶かした溶液を入れたフラスコ中に注意して加え、水浴上 65°C において蒸留して留液約 20ml を採る。ただし、受器にはエチルエーテル 5ml を入れた共栓フラスコを用い、冷却器の先端は受器のエチルエーテルの液面下に浸し、受器は氷水中に浸して冷却する。ドラフト内で操作する。用時調製する。
3. *N*-メチル-*N*-ニトロソ-*p*-トルエンスルホンアミド: [特級]
4. 飽和食塩水: 水 100ml を量り、食塩 40g を加え、よく振り混ぜた後静置し、上澄液を用いる。
5. フロリジルカラム: 130°C で 15 時間活性化したフロリジルをデシケーター中で放冷後、共栓フラスコに移し、含水率 15% になるよう水を加えて密栓し激しく振り混ぜた後、1 時間放置する。この 5g を内径 10mm、長さ 30mm のクロマト管に *n*-ヘキサンを用いて湿式充てんし、更に無水硫酸ナトリウム 2g を積層する。
6. クエン酸モノイソプロピル a 及び b、クエン酸ジイソプロピル a 及び b、クエン酸トリイソプロピルは次の合成法によってそれぞれ単品を得る<sup>12)</sup>。

- (i) クエン酸トリイソプロピル：無水クエン酸 10g を量り，イソプロピルアルコール 100ml を加えて溶かし，無水硫酸ナトリウム 15g 及び硫酸 2ml を加え，水浴上で 3 時間還流した後，温時ろ紙でろ過する。ろ紙を水酸化ナトリウム溶液 (3 → 10) 約 8ml で中和した後，減圧下でイソプロピルアルコールを留去する。残留物に炭酸水素ナトリウム溶液 (1 → 20) 50ml 及び *n*-ヘキサン 100ml を加えて溶かして分液漏斗に入れ，10 分間振とうした後，*n*-ヘキサン層を分取する。水層に再度 *n*-ヘキサン 100ml を加えて振とうし，*n*-ヘキサン層を分取する。水層は(ii)の操作に用いる。分取し両有機層を合わせ，水 50ml で洗い，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，溶媒を減圧下で留去し，クエン酸トリイソプロピルの液体を得る。
- (ii) クエン酸ジイソプロピル b：(i)の *n*-ヘキサン分配後の水層を塩酸で中和する。更に 1mol/l 塩酸で pH を約 4 に調整した後，酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 200ml を加え，10 分間振とうし，有機層を分取する。水層は(iii)の操作に用いる。分取した有機層を水 50ml で洗い，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，溶媒を減圧下で留去し，残留物をエーテル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 2) から結晶化させ，クエン酸ジイソプロピル b を得る。
- (iii) クエン酸モノイソプロピル b：(ii)の酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 分配後の水層を，酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 50ml を加えて洗う。更に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 50ml でクエン酸ジイソプロピルがなくなるまで洗う<sup>13)</sup>。水層に塩酸を加え，pH を約 1 に調整し，酢酸エチル 200ml を加え，10 分間振とうし，有機層を分取する。分取した有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後，溶媒を減圧下で留去し，残留物をエーテル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 2) から結晶化させ，クエン酸モノイソプロピル b を得る。
- (iv) クエン酸ジイソプロピル a：(i)で得られたクエン酸トリイソプロピル 100mg をイソプロピルアルコール 100ml に溶解し，0℃で 60% 水酸化カリウム溶液 1ml を加え，ときどき振とうし，30 分後，濃硫酸約 0.3ml を加えて pH 1 に調整する。これを 30% 水酸化ナトリウム溶液で中和後，減圧下でイソプロピルアルコールを留去する。残留物に炭酸水素ナトリウム溶液 (5 → 100) 50ml を加えて溶かし，この液を順次 *n*-ヘキサン 100ml 及び 50ml で洗う。水層は 1mol/l 塩酸で pH を 4 に調整後，酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 3) 200ml を加え，10 分間振とうし，有機層を分取する。水層は(v)の操作に用いる。分取した有機層を水 25ml で洗い，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，溶媒を減圧下で留去し，残留物をエーテル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 2) から結晶化させ，クエン酸ジイソプロピル a を得る。
- (v) クエン酸モノイソプロピル a：(iv)の酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 3) 分配後の水層を酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 3) 50ml を加えて洗う。更に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 3) 50ml でクエン酸ジイソプロピルがなくなるまで数回洗う。水層を濃

塩酸でpH約2に調整し、酢酸エチル200mlを加え、10分間振とうし、有機層を分取する。分取した有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧下で留去し、残留物をエチルエーテル・*n*-ヘキサン混液(1:2)から結晶化させ、クエン酸モノイソプロピルaを得る。

## [注]

- 1) 食品添加物のクエン酸イソプロピルには、クエン酸も混入している。
- 2) 水洗するとクエン酸モノ及びジイソプロピルがすべて損失するので、水洗をしてはならない。
- 3) 室温でジアゾメタンを加えるだけで、短時間でメチル化される。この条件下ではクエン酸トリイソプロピルはメチル化されない。
- 4) 食塩水は、クリーム状になるまで飽和食塩水を加える。ソフトマーガリンのようなクリーム状のものには加えない。液状食品の場合は、食塩水を加えないで酢酸エチルを用いて抽出を行う。
- 5) 水洗するとクエン酸モノ及びジイソプロピルがそれぞれ79.5%、11.4%を損失するので、水洗してはならない。
- 6) 酢酸エチルが微量でも残ると*n*-ヘキサン、アセトニトリル分配率が異なる。
- 7) クエン酸モノ及びジイソプロピルは、*n*-ヘキサンに溶けにくいのでこの操作を行う。
- 8) 標準品として、組成のわかっている市販クエン酸イソプロピルを用いてもよい。
- 9) クエン酸モノイソプロピルには、1-モノイソプロピルエステル及び2-モノイソプロピルエステルの2種の異性体がある。このガスクロマトグラフィー条件では保持時間の短いaが2-モノイソプロピルエステルであり、長いbが1-モノイソプロピルエステルである。
- 10) 本法によるガスクロマトグラフの一例を図に示す。



注図9-1 クエン酸イソプロピルのガスクロマトグラム

- 11) ジアゾメタン ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) は黄色のガス体 (沸点 $-23^\circ\text{C}$ ) でエーテルに溶け、溶液は低温でも徐々に分解する。鮮黄色を呈する溶液は密栓して冷蔵庫に保存すれば1~2週間は使用できる。激しい反応性を有する有毒なガスであるので取り扱いには注意を要する。廃棄するときには、酢酸中に少量ずつ加えて、消費させた後廃棄する。
- 12) この合成法でクエン酸モノイソプロピルa及びb、クエン酸ジイソプロピルa及びb、クエン酸トリイソプロピルがそれぞれ単品として得られる。
- 13) ジアゾメタン試液でメチル化して、ガスクロマトグラフィーを用いて確認する。