

キャピラリー電気泳動による 食品中のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)分析法

宮本道彦

福岡市保健環境研究所保健科学課

Analysis Method of Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) in Foods by Capillary Electrophoresis

Michihiko MIYAMOTO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

食品中のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)について、試料前処理方法の改良とキャピラリー電気泳動による定量分析法を検討した。超音波を用いた直接抽出、陽イオン交換及び陰イオン交換ミニカラムによる精製を行う方法で、前処理操作の簡便化と迅速化が可能となった。複数の食品について添加回収試験を実施したところ、回収率は87~107%であり、ガイドラインの目標値を満たしていた。また、エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム(EDTA-Ca(II)・Na₂)使用の表示のあるカニ缶について、本法で定量したところ、0.026 g/kg(n=6, 2.7RSD%)であった。

Key Words : キャピラリー電気泳動 capillary electrophoresis, エチレンジアミン四酢酸 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 酸化防止剤 antioxidant, 超音波抽出 ultrasonic extraction, 固相抽出 solid phase extraction

1 はじめに

エチレンジアミン四酢酸(EDTA)は、様々な金属イオンと配位結合による錯体を形成するキレート剤である。わが国では、この性質を利用した食品の酸化防止を目的として、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA-Na₂)及びエチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム(EDTA-Ca(II)・Na₂)の2種が食品添加物として指定されている。

現在、福岡市保健環境研究所においては、食品衛生検査指針食品添加物編 2003 や衛生試験法・注解 2015 に記載されている試験法^{1, 2)}を参考に、食品中のEDTAを透析により抽出し、陰イオン交換ミニカラムで精製した後に、3価の鉄イオンを加えてEDTA-Na₂(遊離型)及びEDTA-Ca(II)・Na₂(キレート型)を区別せずにエチレンジアミン四酢酸鉄ナトリウム(EDTA-Fe(III)・Na)としたものをフォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-PDA)で定量し、その値をEDTA-Ca(II)・Na₂に換算した総EDTA含量として報告する方法を採用して

いる。

しかしながら、現行の分析法では、透析による抽出に長時間を要する点や、HPLC-PDAによる分析において、検体となる食品の種類によっては目的とするピークとそれに対する妨害成分を十分に分離しきれないといった課題を抱えている。

そこで、これらの課題を解決するため、試料前処理方法の改良及びHPLCとは分離原理の異なるキャピラリー電気泳動による分析条件の検討を実施したので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内で購入した缶入りオレンジジュース、ホールトマト缶詰、まぐろ油漬け缶詰及びEDTA-Ca(II)・Na₂使用表示のあるカニ缶詰を用いた。

2.2 標準品・試薬等

EDTA-Na₂標準原液：同仁化学研究所社製 エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 110.8 mg を水で溶解し、100 mL とした(EDTA-Na₂として 1000 µg/mL)。

EDTA-Ca(II)・Na₂標準原液：同仁化学研究所社製 エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム二水和物 109.6 mg を水で溶解し、100 mL とした(EDTA-Ca(II)・Na₂として 1000 µg/mL)。

EDTA-Fe(III)・Na 標準原液：同仁化学研究所社製 エチレンジアミン四酢酸鉄ナトリウム三水和物 114.7 mg を水で溶解し、100 mL とした(EDTA-Fe(III)・Na として 1000 µg/mL)。

0.0025 mol/L 塩化鉄(III)溶液：和光純薬工業社製 塩化鉄(III)六水和物(試薬特級)67.6 mg を 0.05 mol/L 塩酸で溶解し、100 mL とした。

0.2 mol/L トリス塩酸緩衝液(pH8.5)：メルク社製 トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 24.2 g を水 500 mL で溶解し、5 mol/L 塩酸で pH8.5 に調整した後、水を加えて 1000 mL とした。

陽イオン交換ミニカラム：アジレント・テクノロジー社製 BondElut LRC SCX(500 mg/10 mL)をメタノール 5 mL、水 10 mL でコンディショニングした後に用いた。

陰イオン交換ミニカラム：ジーエル・サイエンス社製 InertSep SAX-2(500 mg/6 mL)をメタノール 5 mL、水 10 mL でコンディショニングした後に用いた。

泳動用緩衝液(25 mmol/L 四ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.3))：片山化学工業社製 四ホウ酸ナトリウム十水和物(試薬特級)0.953 g を水に溶解して 100 mL とした後、1 mol/L 水酸化ナトリウムで pH9.3 に調整した。

メタノール：関東化学社製高速液体クロマトグラフ用を用いた。

水：水道水を超純水製造装置で処理した水(比抵抗 18.2 MΩ, TOC<2 ppb)を用いた。

2.3 装置・器具

フォトダイオードアレイ検出器付きキャピラリー電気泳動装置(CE-PDA)：アジレント・テクノロジー社製 7100 CE

CE-PDA 用冷却循環装置：トーマス社製 TRL108H

pH メーター：堀場製作所社製 LAQUA F-72

超純水製造装置：オルガン社製 PURELAB flex-UV

超音波洗浄機：アズワン社製 MCS-27

冷却遠心機：久保田商事社製 6200 及び 3780

ロータリーエバポレーター：日本ビュッヒ社製 R-300, V-300, B-300Base, 柴田科学社製 クールマン PAL C-331
ろ紙：アドバンテック東洋社製 定量ろ紙(No.5A, 15 cm)

遠心式限外ろ過フィルターユニット：メルクミリポア社製 Amicon Ultra-0.5(3 kDa)

2.4 測定条件

表 1 に示す条件で測定した。

表 1 キャピラリー電気泳動装置測定条件

キャピラリー	バブルセルヒューズドシリカキャピラリー (全長64.5 cm, 有効長56 cm, 内径75 µm, バブルファクター2.7, 光路長200 µm)
泳動液	25 mmol/L Na ₂ B ₄ O ₇ 緩衝液 (pH9.3)
サンプル温度	10°C
キャピラリー温度	20°C
注入量	50 mbar, 6秒
印加電圧	+25 kV
測定波長	255 nm (定量) 190-500 nm (スペクトル)
測定時間	17分
コンディショニング	分析前 泳動液 (300秒)
	分析後 0.1 mol/L NaOH 水溶液 (80秒)
	超純水 (160秒)

2.5 試験溶液の調製

食品中の EDTA 抽出法は、透析を用いず、超音波を利用した直接抽出による方法が複数報告されている^{3~6)}。これらの報告を参考に試験溶液を調製した。

すなわち、50 mL 容ポリプロピレン製遠沈管に均質化した試料 5.0 g を採り、0.2 mol/L トリス塩酸緩衝液(pH8.5) 5 mL 及び水を加え 50 mL に定容し、超音波水浴中で 10 分間抽出した後、4°C, 1500×g で 10 分間冷却遠心し、上清をろ紙でろ過したものを試料溶液とした(図 1)。

次に試料溶液中の EDTA を鉄錯体化するため、15 mL 容ポリプロピレン製遠沈管に試料溶液 5 mL を採り、0.0025 mol/L 塩化鉄(III)溶液 1 mL を加えて、よく混和した後、5 分間静置した。これに水 4 mL を加えてよく混和したものを陽イオン交換ミニカラムに負荷し、通過液を捕集、さらにミニカラムを水 5 mL で洗浄し、その洗液も合わせて捕集した。捕集した溶液を陰イオン交換ミニカラムに全量負荷し、ミニカラムを水 5 mL で洗浄し、通過液及び洗液は廃棄した。ミニカラムに保持された EDTA-Fe(III)・Na を 0.2 mol/L 塩酸 10 mL で溶出し、50 mL ナシ型フラスコに捕集した。溶出液はロータリーエバポレーターを用いて 60°C 水浴中で減圧乾固させ、フラスコ内の残留物に穏やかな窒素気流を吹き付けて塩酸蒸気を十分に除去した後、水 2.5 mL を加えて超音波水浴中で溶解させ、遠心式限外ろ過フィルターユニットでろ過したものを試験溶液とした(図 2)。

2.6 検量線用標準溶液の調製

EDTA-Fe(III)・Na 標準原液を水で希釈し, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした.

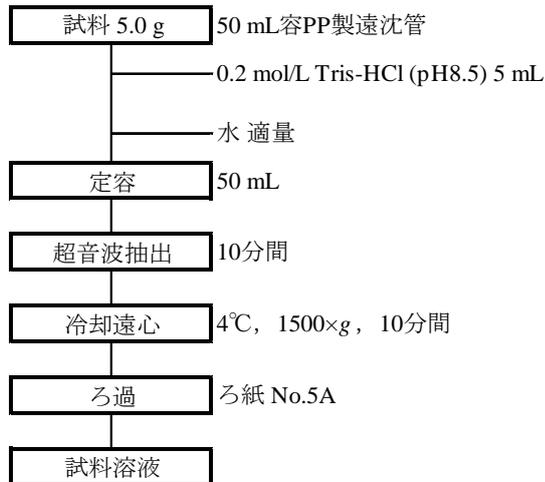


図1 試料溶液の調製

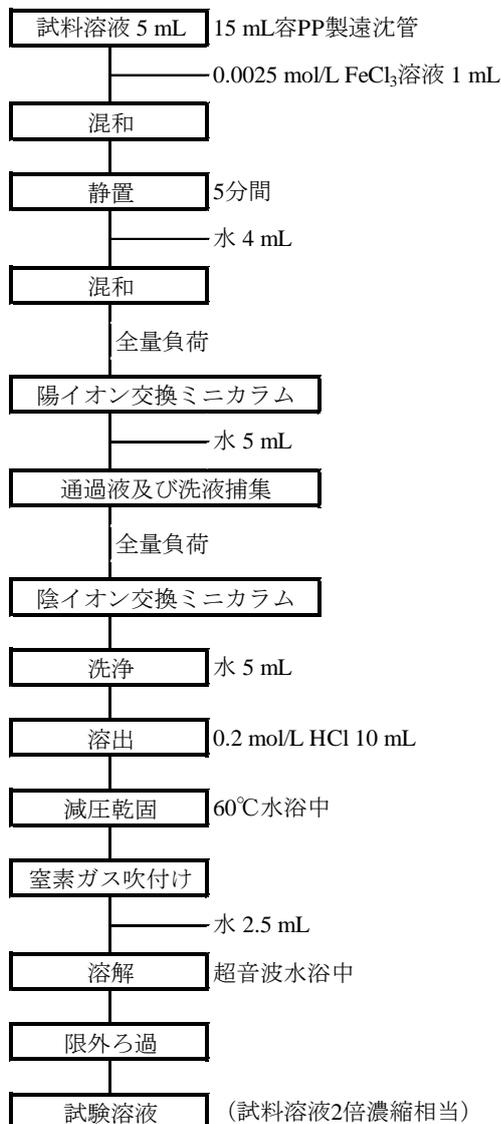


図2 試験溶液の調製

2.7 添加回収試験

缶入りオレンジジュース, ホールトマト缶詰及びまぐろ油漬け缶詰を均質化したものについて, EDTA-Na₂又はEDTA-Ca(II)・Na₂を基準値相当量(オレンジジュースは0.035 g/kg, それ以外は0.25 g/kg)添加し, 30分間静置したものを試料とした. これらについて, 2.5 試験溶液の調製に従い, それぞれ3並行で操作を行い, EDTA-Na₂及びEDTA-Ca(II)・Na₂の回収率を確認した.

3 実験結果及び考察

3.1 分析条件の検討

単一成分のみを対象とした分析であるため, 分析時間の短縮を目的とし, 分析に使用するキャピラリーは有効長56 cmのものを採用した. また, 感度を確保するため, キャピラリーの検出窓部分のみ内径が大きくなるバブルセルキャピラリーを採用した. 泳動液は陰イオン性物質の測定に適した四ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.3)とし, 10分程度でEDTA-Fe(III)・Naを検出するよう, 緩衝液の塩濃度及びキャピラリーへの印加電圧を検討した. 塩濃度を10, 25, 50 mmol/L, 印加電圧を+20, +25, +30 kVで測定を実施した結果, 塩濃度は25 mmol/L, 印加電圧は+25 kVが最適であった.

3.2 検量線

当所の検査実施標準作業書ではEDTA-Ca(II)・Na₂標準液に, 衛生試験法・注解2015ではEDTA-Na₂標準液に, それぞれ塩化鉄(III)溶液を加えてEDTA-Fe(III)・Naを生成させた溶液を測定することにより, 検量線を作成するが, 操作を簡便化するためEDTA-Fe(III)・Na標準原液を水で適宜希釈した溶液を用いた. 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で検量線を作成したところ, 決定係数(R^2)0.999以上の良好な直線性を示した(図3). 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロマトグラムを図4に示す.

また, EDTA-Na₂標準液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 5 mLに0.0025 mol/L塩化鉄(III)溶液1 mLを加え, EDTA-Fe(III)・Naを生成させ, 水で10 mLとした溶液を定量したところ, EDTA-Na₂の回収率は107~108%(n=3, 0.6RSD%)であった. EDTA-Ca(II)・Na₂標準液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)についても同様の操作を行い, 回収率は99~101%(n=3, 0.9RSD%)と良好な結果であったことから, 検量線はEDTA-Fe(III)・Na標準原液を用いて作成した.

3.3 試料前処理方法の検討

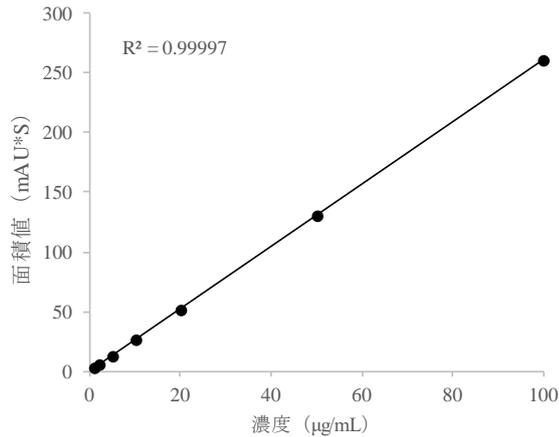


図3 EDTA-Fe(III)·Na 検量線

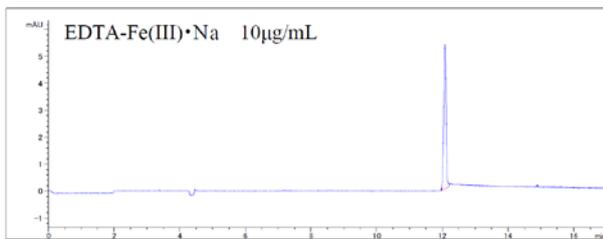


図4 EDTA-Fe(III)·Na のエレクトロフェログラム

3.3.1 陰イオン交換ミニカラムの検討

EDTA-Fe(III)·Na 標準液を用いて精製操作を行い、回収率を比較した。陰イオン交換ミニカラムは、ジーエル・サイエンス社製 InertSep MA-1(1 g/20 mL), MA-2(1 g/20 mL), SAX(1 g/6 mL), SAX-2(500 mg/6 mL), アジレント・テクノロジー社製 BondElut SAX(500 mg/6 mL)及び日本ウォーターズ社製 OASIS MAX(500 mg/6 mL)をそれぞれメタノール 5 mL 及び水 10 mL でコンディショニングしたものを用いた。寺田らの報告⁶⁾に倣い、標準液負荷後の洗浄操作を 0.02 mol/L 塩酸 10 mL で行ったところ、一部のミニカラムで十分な回収率が得られなかった。0.02 mol/L 塩酸による洗浄では、ミニカラムに保持された EDTA-Fe(III)·Na が溶出している可能性が考えられたため、水 5 mL による洗浄に変更したところ、いずれのミニカラムも良好な回収率が得られた(表 2)。通液速度は InertSep SAX-2, BondElut SAX 及び OASIS MAX の 3 製品が適当であったが、BondElut SAX はロットによる回収率のばらつきが報告されている点⁴⁾, OASIS MAX はコストの観点から、InertSep SAX-2 を採用した。

3.3.2 陽イオン交換ミニカラムの検討

ホールトマト缶詰を試料とし、添加回収試験の予備検討を実施したところ、陰イオン交換ミニカラムによる精製だけでは、EDTA-Fe(III)·Na のピークと分離できない妨害成分によるピークが確認された。妨害成分の除去の

表 2 陰イオン交換ミニカラムの回収率比較

		添加量 (µg)	回収率(%)	
			塩酸洗浄	水洗浄
InertSep	MA-1 (1 g/20 mL)	100	49	105
	MA-2 (1 g/20 mL)	100	62	100
	SAX (1 g/6 mL)	100	42	86
	SAX-2 (500 mg/6 mL)	100	79	100
BondElut	SAX (500 mg/6 mL)	100	83	101
OASIS	MAX (500 mg/6 mL)	100	36	99

(n=2)

ため、福田らの方法⁷⁾を参考に、陰イオン交換ミニカラムによる精製の前段階として、陽イオン交換ミニカラムによる精製を試みた。ジーエル・サイエンス社製 InertSep MC-1(250 mg/6 mL), MC-2(250 mg/6 mL), SCX(500 mg/6 mL), アジレント・テクノロジー社製 BondElut LRC SCX(500 mg/10 mL)及び SCX Jr.(500 mg)をそれぞれメタノール 5 mL, 水 10 mL でコンディショニングして用いた。基準値相当量(0.25 g/kg)の EDTA-Ca(II)·Na₂を添加したホールトマト缶詰について精製を行ったところ、BondElut LRC SCX 又は SCX Jr.と陰イオン交換ミニカラム InertSep SAX-2 の組み合わせた精製で妨害成分の除去が可能であり、回収率も良好であった。一方 InertSep MC-1, MC-2, SCX と陰イオン交換ミニカラムとの組み合わせでは分離は改善されず回収率は求められなかった(図 5, 表 3)。

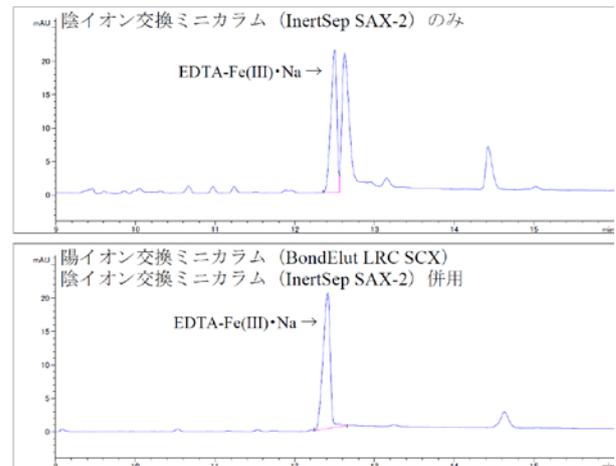


図5 ホールトマト抽出液のエレクトロフェログラム

表 3 陽イオン交換ミニカラムの回収率比較

		試料量 (g)	添加量 (µg)	回収率 (%)
BondElut	LRC SCX (500 mg/10 mL)	5	1250	97
	SCX Jr. (500 mg)	5	1250	97
InertSep	MC-1 (250 mg/6 mL)	5	1250	-
	MC-2 (250 mg/6 mL)	5	1250	-
	SCX (500 mg/6 mL)	5	1250	-

(n=2)

3.3.3 C18 ミニカラムによる脱脂の検討

高脂肪食品に本分析法を適用する場合における脱脂の必要性について検討した。他の報告ではヘキサンを用いた液-液分配による脱脂^{3, 4, 6)}が採用されているが、より操作を簡便化するため、オクタデシルシリル化シリカゲル(C18)ミニカラムによる脱脂を検討した。C18 ミニカラムは、ジーエル・サイエンス社製 InertSep C18FF(1 g/6 mL), C18(1 g/6 mL)又はC18(500 mg/6 mL)とし、これらをルアーデバイス型である BondElut SCX Jr. の上部に連結したものをメタノール 5 mL, 水 10 mL でコンディショニングして用いた。基準値相当量(0.25 g/kg)の EDTA-Ca(II)・Na₂ を添加したまぐろ油漬け缶詰について、2.5 試験溶液の調製に従い調製した試験溶液を定量し、回収率を比較した。その結果、脱脂を行わなかった場合であっても、エレクトロフェログラム上に定量を妨害するピークは認められず(図 6), C18 ミニカラムによる脱脂を行った場合と比較して、EDTA-Ca(II)・Na₂ の回収率に大きな差がなかったため(表 4), 脱脂操作は行わないこととした。

表 4 C18 ミニカラムの回収率比較

	試料量 (g)	添加量 (µg)	回収率 (%)
C18精製無し	5	1250	84
C18FF (1 g/6 mL)	5	1250	85
C18 (1 g/6 mL)	5	1250	91
C18 (500 mg/6 mL)	5	1250	83

(n=2)

表 5 EDTA-Na₂ 及び EDTA-Ca(II)・Na₂ の添加回収試験結果

試料量 (g)	EDTA-Na ₂					EDTA-Ca(II)・Na ₂			
	添加量 (µg)	回収量 (µg)	回収率 (%)	RSD%	添加量 (µg)	回収量 (µg)	回収率 (%)	RSD%	
缶入りオレンジジュース	5	175	186	106	1.5	175	163	93	1.3
ホールトマト缶詰	5	1250	1335	107	2.6	1250	1213	97	1.0
まぐろ油漬け缶詰	5	1250	1189	95	0.9	1250	1092	87	1.5

4 まとめ

食品中の EDTA 分析法として、超音波を用いた直接抽出後、EDTA-Na₂ 及び EDTA-Ca(II)・Na₂ を区別せずに EDTA-Fe(III)・Na を生成させ、陽イオン交換及び陰イオン交換ミニカラムによる 2 段階の精製処理後、CE-PDA で定量する方法を検討した。その結果、従来の方法と比

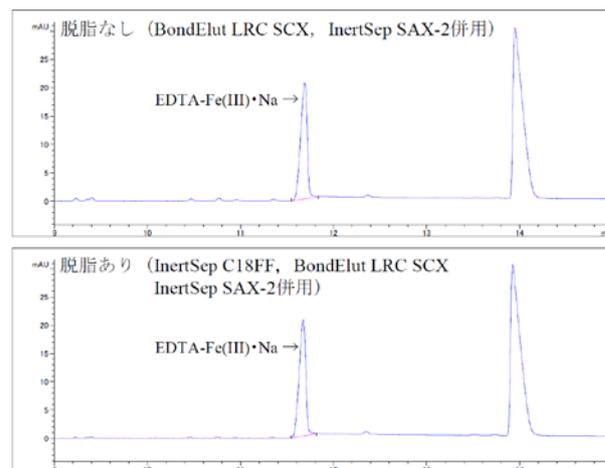


図 6 まぐろ油漬け缶詰抽出液のエレクトロフェログラム

3.4 添加回収試験

3 種類の食品についてそれぞれ 3 並行で添加回収試験を行った結果を表 5 に示す。EDTA-Na₂ の回収率は、缶入りオレンジジュースで 106%(1.5RSD%), ホールトマト缶詰で 107%(2.6RSD%), まぐろ油漬け缶詰で 95%(0.9RSD%), EDTA-Ca(II)・Na₂ の回収率は、缶入りオレンジジュースで 93%(1.3RSD%), ホールトマト缶詰で 97%(1.0RSD%), まぐろ油漬け缶詰で 87%(1.5RSD%)であった。いずれも精度管理の一般ガイドライン⁸⁾の回収率の目標値(70~120%)の範囲内であった。

また、EDTA-Ca(II)・Na₂ 使用表示のあるカニ缶詰について繰り返し試験(n=6)を実施したところ、定量値は 0.026 g/kg(2.7RSD%)であり、使用基準に適合していた。

較して前処理操作の簡便化が可能となり、妨害成分との分離が改善された。本法による複数の使用基準の対象食品を用いた添加回収試験では、いずれも良好な結果が得られた。つまり、これらの食品の検査法に本法を適用することで、迅速に信頼性の高い結果が得られる可能性が示唆された。

文献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編 2003，日本食品衛生協会，38～45，2003
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2015，金原出版，348～350，2015
- 3) 滝川香織，他：2017年度「食品添加物一日摂取量調査」エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム測定結果，札幌市衛生研究所年報，45，104～108，2018
- 4) 関戸晴子，他：食品中のエチレンジアミン四酢酸およびその塩類の分析法について，神奈川県衛生研究所研究報告，46，27～31，2016
- 5) 貞升友紀，他：HILIC カラムを用いた LC/MS による食品中の EDTA 分析法，東京都健康安全研究センター研究年報，62，133～137，2011
- 6) 寺田久屋，他：食品中 EDTA の分析法について，第 42 回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集(東京)，94～95，2005
- 7) 福田裕，他：食品中 EDTA の簡易分析，広島市衛生研究所年報，11，23～26，1992
- 8) 厚生労働省生活衛生局食品保健課長通知：食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について，別添精度管理の一般ガイドライン，衛食第 117 号，1997