食品中の EDTA の分析

—薄層クロマトグラフィーについての検討—

(昭和 44 年 3 月 11 日 受理)

山 縣 翠* 天 野 立 爾*
近 藤 龍 雄* 田 辺 弘 也*

Analysis of EDTA in Foods

Studies on Thin Layer Chromatography of EDTA

Midori YAMAGATA, Ryuji AMANO, Tatsuo KONDO
and Hiroya TANABE

(National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1,
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

Thin layer chromatography was applied for the simplified detection of ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) in foods, and for the separation of EDTA from the interfering substances for its determination, such as α -amino acids.

Spotted sample on the thin layer prepared with cellulose powder (Avicel SF), was developed with a solvent system of *n*-butanol + glacial acetic acid + water (1:2:2 v/v). After development, the thin layer plate was dried and sprayed with glacial acetic acid, cobaltous chloride and hydrogen peroxide. The R_f value of EDTA was about 0.7 and the limit of detection was about 1.5 μ g.

By use of this method EDTA could be separated from many kinds of α -amino acid, especially aspartic acid which interfered strongly EDTA detection.

(Received March 11, 1969)

緒 論

エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) は、まだわが国では食品添加物として指定されていないが、1964年アメリカでは州により EDTA 二ナトリウム (EDTA- Na_2)、EDTA カルシウム錯塩 (EDTA-Ca) の使用が許可されている。EDTA は強力な金属封鎖作用をもち、また無味無臭無色等の利点から将来わが国でも食品添加物として認められる可能性がある。その毒性は Oser ら¹⁾の報告によると、EDTA-Ca の経口投与による LD_{50} がラットで 10 g/kg、ウサギ、イヌでは 7~12 g/kg と非常に低く、紫田²⁾の報告による EDTA- Na_2 投与ではウサギの LD_{50} は 2.3 g/kg といわれている。また Forman ら³⁾は EDTA-Ca が人体内で変化しないで排泄されることを証明している。

アメリカにおいて食品添加物として使用される EDTA は酸化防止剤の作用を増強し、果物・野菜類の貯蔵中の変色およびアスコルビン酸の酸化を防止し、ミルクやビ

ールにおける微量金属による変質を防ぐ作用を有するという。

EDTA の定性および定量反応はある種の金属と EDTA とのキレート形成あるいはキレート形成阻害をみるものが主であり、必然的に他の金属あるいは EDTA 以外のキレート剤がこの反応を妨害する。とくに食品中の EDTA を問題とする場合は α -アミノ酸の妨害が大きいことが、佐々木ら⁴⁾により指摘されている。われわれは食品中の EDTA を分析する場合におけるこれらの妨害物の影響および除去法を種々検討した結果、薄層クロマトグラフィーにより EDTA を分離同定することが有効であることを認めたのでここに報告する。なお従来 EDTA の研究に薄層クロマトグラフィーを応用した報告⁵⁾⁶⁾はあるが、いずれも金属錯塩相互における変化をみたものであって、アミノ酸との分離を目的としたものは見あたらない。

実験方法

薄層用粉末(セルロースパウダーおよびシリカゲル)を

* 国立衛生試験所：東京都世田谷区上用賀 1-18-1

常法に従い適量の水にけん濁し厚さ 0.25 mm の薄層を作り一夜放置後使用する。つぎに薄層に試料（固体の場合は水を加えて水浴上で浸出した夜、液体の場合は透析し濃縮した液）をスポットし、適当な溶媒で展開したのち加温乾燥し発色試薬（氷酢酸, 0.1MCoCl₂, 30 % H₂O₂）を順次噴霧し加温する。発色後 Rf 値を測定する。

実験結果

実験に際しては α -アミノ酸中最も妨害の強いアスパラギン酸 (Asp.) を分離の指標とし、これと EDTA との Rf 値を比較して検討を行なった。

1. シリカゲルプレートによる検討

シリカゲル（シリカゲル G）はアミノ酸の分離において頻繁に使われているものであり、展開溶媒もアミノ酸分離に使われているものを基本としさらにこれらを適宜変更して実験に供した。その結果を Table 1 に示す。発色状態、展開状態等を検討すると表から明らかなごとく、Solvent 5 が最も良くこの条件でさらに検討を加えたところ、EDTA 濃度を高めるとスポットが2つ生

じることが認められた。種々の金属キレートで同定した結果、さきに生じたスポットは EDTA-Ca でありシリカゲル G 中のカルシウムが結合したものと思われる。あらたに生じたスポットは多分 EDTA-Na₂ であり濃度が高いとカルシウム不足でナトリウム塩のままの形をとるものと思われる。この影響を除くためのギブス量を増加したり層を厚くしたりあるいは脱カルシウムを行なったが、それぞれ他の欠点が生じるため実用的ではなかった。

2. セルロースプレートによる検討

カルシウムを多量に含まない吸着剤としてセルロースパウダー（アビセル SF）について検討し、Table 2 に示す結果をえた。これから明らかなごとく分離能の最もすぐれている溶媒系は solvent 7 であったのでつぎにこれを用いて各種 α -アミノ酸を展開しその結果を Fig. 1 に示す。また EDTA 鉄錯塩, EDTA 銅錯塩, EDTA マグネシウム錯塩・EDTA-Ca を同一条件下に展開して得た結果を Fig. 2 に示す。図中鉄錯塩は正常な発色を示さないが、これはコバルトよりも鉄の方がキレート生

Table 1. Rf values of EDTA and Aspartic Acid on Silica Gel G Layer

	Solvents	Rf values	
		EDTA	Aspartic acid
1	Methanol : Acetic acid : Water = 2 : 2 : 1	0.75	0.80
2	Acetone : Acetic acid : Water = 2 : 2 : 1	0.68	0.83
3	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 3 : 1 : 1	0.10	0.30
4	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 2 : 1 : 1	0.10	0.25
5	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 2 : 2 : 1	0.15	0.40
6	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 1 : 1 : 1	0.45	0.50
7	99% Ethanol : 28% Ammonia Water = 7 : 3	0.22	0.25
8	Chloroform : Methanol : 28% Ammonia water = 2 : 2 : 1	0.20	0.10
9	<i>n</i> -Butanol : Hydrochloric acid = 5 : 3	0	0.35
10	<i>iso</i> -Propanol : 3N Hydrochloric acid = 2 : 1	0.80	0.80
11	<i>iso</i> -Propanol : Hydrochloric acid = 8 : 1	0.68	0.50

Table 2. Rf values of EDTA and Aspartic Acid on Avicel SF Layer

	Solvent	Rf value	
		EDTA	Aspartic acid
1	Methanol : Acetic acid : Water = 2 : 1 : 2	0.75	0.60
2	Methanol : Acetic acid : Water = 1 : 2 : 2	0.75	0.70~0.40
3	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 3 : 1 : 1	0.13	0.20
4	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 2 : 2 : 1	0.57	0.47
5	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 1 : 1 : 1	0.39	0.40
6	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 1 : 1 : 2	0.72	0.65
7	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 1 : 2 : 2	0.68	0.50
8	<i>n</i> -Butanol : Acetic acid : Water = 1 : 3 : 2	0.80	0.65

Fig. 1. Thin layer chromatogram of EDTA and amino acids by solvent 7 on an Avicel SF layer

Blackened spots were alike to EDTA in color

Fig. 2. Thin layer chromatogram of metal-EDTA complexes

Blackened spot was observed abnormally

成定数が大きいためコバルトによる発色が妨害されるものと考えられるので、鉄を多量に含有する検体においてはあらかじめ鉄除去処理を行なう必要がある。

3. 発色法についての検討

EDTA 検出法数種についてプレート上において十分な発色を行なうかどうか検討した。

3-1) EDTA-Co (III) 形成法

プレート上に氷酢酸・0.1MCoCl₂・30% H₂O₂を順次噴霧し加温する。EDTA の存在で紫赤色を呈し一部アミノ酸の存在でも弱いが同様の発色をする。検出限度 1.5 μ g

3-2) EDTA-Cr (III) 形成法

5% K₂CrO₄, アスコルビン酸飽和溶液を順次噴霧し加温すると EDTA の存在で赤紫色を呈し、また一部アミノ酸においても類似の赤色を呈する。検出限度 15 μ g

3-3) 色素・金属結合阻害をみる方法

エリオクローム BT 試薬と Zn²⁺ の混合液を噴霧すると EDTA の存在で赤紫色のバックにスポットが緑色に現われる。多くのアミノ酸においても同様の反応が認められ色調によっては両者の区別はできない。検出限度 0.01 μ g 以下

本法はかなり鋭敏であるが特異性が低く、実際の食品に利用するにはなお詳細な検討が必要である。

上記の結果から現在のところ 3 方法中検出限度がよく比較的妨害が少ない EDTA-Co (III) 法が EDTA の検出法として最も優れていると思われるので食品中の EDTA の分析に本法を用いることとした。

4. 食品への応用

佐々木ら⁴⁾が指摘したスルメ抽出液についてこの方法を応用した結果、Fig. 3 に示すごとく明らかに EDTA の存在しないことが証明できた。

Fig. 3. Thin layer chromatogram of dried squid, "Surume", extract

考 察

以上の結果から薄層クロマトグラフィーによる EDTA の分析には、アビセル SF・プレートにおいて *n*-ブタノール：酢酸：水の 1:2:2 v/v 混合溶媒を用いて展開したのち、氷酢酸・0.1MCoCl₂・30% H₂O₂を噴霧して加温する方法が最も優れており、本法によれば Rf 値 0.7~0.6 の位置で紫赤色の発色をみることにより、EDTA の存在を 1.5 μ g まで確認することができる。

しかしながら多くの食品においては食品中の常成分あるいは食品添加物等の混入により EDTA を確認限度以上の濃度まで濃縮することが、はなはだ困難なため個々の食品について適当な抽出法を検討することが必要である。また食品添加物として指定されるときは当然定量法も必要となるのでこれについても今後検討を重ねていきたい。

文 献

- 1) B. L. Oser, Mond Oser, Howard C. Spencer: Toxi. applied pharm. **5**, 142 (1963).
- 2) 柴田章次: 日本薬理学雑誌 **52**, 113 (1956).
- 3) H. Forman, T. T. Trujillo: J. Lab. Clin. Med. **43**, 566 (1954).
- 4) 佐々木清司, 岡村一弘, 川北兵藏: 食衛誌, **5**, 395 (1964).
- 5) 角田義和, 竹内俊夫, 吉野諭吉: 日化, **85**, 275 (1964).
- 6) 角田義和, 竹内俊夫, 吉野諭吉: 東大教養自然科学誌 **14** (1), 63 (1964); 日本化学総覧 **38**, 9818551 (1964).