カラムクロマトグラフィーによる食品中の遊離型 EDTA 及び金属キレート型 EDTA の分別定量法

(昭和 60 年 6 月 17 日受理)

浜野 孝^{*1}   三ツ橋幸正^{*1}   田中喜作^{*1}
松木幸夫^{*1}   外海泰秀^{*2}   中村恵三^{*2}
伊藤誉志男^{*2}

A Separative Determination of EDTA-2Na and EDTA-metals in Foods by Column Chromatography

Takashi HAMANO^{*1}, Yukimasa MITSUHASHI^{*1}, Kisaku TANAKA^{*1},
Yukio MATSUKI^{*1}, Yasuhide TONOGAI^{*2}, Keizo NAKAMURA^{*2}
and Yoshio ITO^{*2}

(*¹ Public Health Research Institute of Kobe City: 4-6, Minatojima Naka-machi,
Chuo-ku, Kobe, Japan; *² National Institute of Hygienic Sciences,
Osaka Branch: 1-1-43, Hoenzaka, Higashi-ku, Osaka, Japan)

A method for the separative determination of EDTA-2Na and EDTA-metals from various foods was developed. Food samples were dialyzed against 0.02 M Tris-hydrochloric acid buffer (pH 8.5) and the dialyzed sample solution was loaded on an anion-exchange column (cartridge). EDTA-metals except EDTA-Fe flowed through the column, but EDTA-2Na was quantitatively adsorbed on the column, and could be eluted with 0.2 N hydrochloric acid. EDTA-metals and EDTA-2Na were reacted with cupric sulfate solution at pH 2.5 and converted to EDTA-Cu. EDTA-Cu from EDTA-metals was concentrated and purified on a Dowex column, and EDTA-Cu from EDTA-2Na was purified on a Unicellex column. Then EDTA-Cu in each solution were separately determined by high performance liquid chromatography. Recoveries of EDTA-Ca (250 ppm) from various foods were more than 92.4% by the proposed method. Most of the EDTA-2Na added to samples was recovered as EDTA-metals caused by minerals in the foods, but the recoveries of total EDTA were more than 91.2%.

(Received June 17, 1985)

Key words: エチレンジアミン四酢酸 ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA); エチレンジアミン四酢酸金属キレート EDTA-metals; 透析 dialysis; イオン交換カラム ion-exchange column; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

緒 言

昭和58年8月27日付の食品, 添加物等の規格基準の改正により, エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリ

ウム (EDTA-Ca) 及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-2Na) が酸化防止剤として許可され, EDTA-2Na は最終食品の完成前に EDTA-Ca にしなければならないとされた¹⁾.

食品中の EDTA の定量法としては, メチルエステルとしてガスクロマトグラフィー^{2), 3)}, 銅または鉄キレートとして高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{4)~6)} 及び鉄キレートとして等速電気泳動⁷⁾ を用いる方法が報告さ

*¹ 神戸市環境保健研究所: 神戸市中央区港島中町 4-6

*² 国立衛生試験所大阪支所: 大阪市東区法円坂 1-1-43

れている。

しかし、これらはいずれも EDTA-2Na (遊離型 EDTA) と EDTA-Ca など (金属キレート型 EDTA) との分別はしておらず、すべて EDTA の総量を定量している。

山口ら* は遊離型 EDTA をビスマスキレートとし、一方金属キレート型 EDTA はすべて EDTA 銅キレートに変換して、両者をそれぞれ HPLC で分別定量している。

この方法は標準系では良好な結果が得られたが、各種の食品に遊離型 EDTA を添加したときその大部分は EDTA-Ca として回収され、遊離型としてはごく一部しか回収されなかったと報告されている。

そこで著者らは山口らの方法の問題点を検討すると共に、イオン交換型カラムを用いて遊離型及び金属キレート型 EDTA を分離し、両者を HPLC で分別定量する方法について検討した。

実験方法

1. 試料

オレンジジュース、サラダドレッシング (分離型及びエマルジョン型)、マヨネーズ、かに缶詰、たけのこ缶詰は市販品を用いた。

2. 試薬及び標準溶液

EDTA-2Na 標準溶液: EDTA-2Na・2 水塩 3.7225 g を秤取し、水を加えて 1,000 ml とし原液とする (0.01 M)。EDTA-2Na 標準原液 10 ml をとり、水を加えて 1,000 ml とし標準溶液とする (0.1 mM)。

EDTA-Ca 標準溶液: EDTA カルシウム二ナトリウム・4 水塩 4.4633 g を秤取し、水を加えて 1,000 ml とし原液とする (0.01 M)。EDTA-Ca 標準原液 10 ml をとり、水を加えて 1,000 ml とし標準溶液とする (0.1 mM)。

その他 EDTA-Cu, -Fe, -Mn, -Zn, -Pb, -Mg などいずれも和光純薬工業(株)製の試薬特級を用い、上記と同様の方法で標準溶液を作製した。

硫酸銅溶液: 硫酸銅 24.968 g を秤取し、水を加えて 1,000 ml とする (0.1 M)。

トリス-塩酸緩衝液: トリス (ヒドロキシメチル) アミノエタン 24.2 g を水 500 ml に溶解し、2 N 塩酸で pH 8.5 に調整した後 1,000 ml とする (0.2 M)。本液 100 ml または 250 ml に水を加えてそれぞれ 1,000 ml とする (0.02 M または 0.05 M)。

リン酸塩緩衝液: リン酸二水素カリウム 4.536 g/L 溶液とリン酸水素二ナトリウム・2 水塩 5.937 g/L 溶液を用いて pH 7.0 に調整する (0.1 M)。リン酸二水素カリ

ウム 22.680 g/L 溶液とリン酸水素二ナトリウム・2 水塩 29.688 g/L 溶液を用いて pH 7.0 に調整する (0.5 M)。

ジチゾン溶液: ジチゾン 1 g をクロロホルムに溶かして 1,000 ml とする (0.1%)。

その他の試薬も、いずれも市販特級品を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ: (株)島津製, LC-3A 型

検出器: (株)島津製, SPD-1 型

HPLC 用カラム: DuPont 社製, Zorbax ODS (4.6 mmφ×15 cm)。

分離用陰イオン交換型カラム: J. T. Baker Chemical 社製, "BAKER 10 SPE" の第 4 アンモニウム型 (0.9 cmφ×5 cm)。

Dowex カラム: Dow Chemical 社製, Dowex 1×4 (陰イオン交換型: 100~200 mesh) を 1 N 塩酸に懸濁し、中性になるまで水洗した後、内径 1 cm のコック付きガラスカラムに 5 cm の高さにつめる。

過剰 Cu²⁺ 除去用陽イオン交換型カラム: 同仁化学研究所製, Unicellex A-50 型 (1 cmφ×5 cm)。

透析用セロファンチューブ: 和光純薬工業(株)製のセロファンチューブ 36/32 inch, 30 m を至適サイズに切って用いた。

4. 分析操作

4-1. 検液の調製法

試料 20 g に 0.2 M トリス-塩酸緩衝液 30 ml を加え、テフロンホモジナイザーで磨碎する。同緩衝液で 50 ml の定容とし、その 25 ml をセロファンチューブにつめて透析内液とし、外液に 0.02 M トリス-塩酸緩衝液 175 ml を用い、38° で 15 時間透析する。この透析外液を検液とした。

4-2. 遊離型と金属キレート型 EDTA の分離

検液 40 ml を分離用陰イオン交換カラムに流し、ついで 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 60 ml で洗浄し、溶出液及び洗液を合わせ、金属キレート型 EDTA (EDTA-Fe は含まない) の試料溶液 A-1 とした。

一方、カラムに吸着している遊離型 EDTA (EDTA-Fe を含む) を 0.2 N 塩酸 8 ml で溶出し、遊離型 EDTA の試料溶液 B-1 とした。

4-3. 遊離型及び金属キレート型 EDTA の EDTA-Cu への変換

遊離型及び金属キレート型 EDTA の試料溶液 A-1 または B-1 を、それぞれ 1 N 水酸化ナトリウム溶液または 1 N 塩酸で pH 2.5 に調整し、硫酸銅溶液 1 ml をそれぞれに加え、室温で 5 分間放置し EDTA-Cu に変換した (EDTA-Fe は変換されない)。

4-4. 試料溶液の濃縮と過剰 Cu²⁺ の除去

EDTA-Cu に変換された金属キレート型 EDTA の試料溶液 A-1 の全量 (約 100 ml) はフェノールフタレ

* 山口昭弘, 山口敏幸, 白石由美子, 清水良夫, 高杉信男: 日本食品衛生学会第48回学術講演会要旨集, p. 35 (1984年10月, 福井)

Table 1. Effect of pH on the Recoveries of EDTA-2Na, EDTA-Ca and EDTA-Fe by Dialysis

pH	EDTA-2Na	EDTA-Ca	Relative amount of EDTA dialyzed (%)*	
			EDTA-Fe as EDTA-Fe	as EDTA-2Na
5	52.5	86.2	85.0	0
6	72.0	94.1	92.5	0
7	84.8	97.6	98.6	0
8	99.9	99.8	100.1	0
9	100.0	100.3	100.0	0
10	99.5	99.5	89.3	10.1
11	99.6	99.1	54.8	40.9
12	98.5	98.7	0	99.7

* average of three trials

Note: EDTA in 25 ml of 0.2 M buffer (Each 10 μ mole) was dialyzed against 0.02 M buffer (175 ml) for 24 hrs at 25°C.

Phosphate buffer: pH 5.0-7.0; Tris-HCl buffer: pH 7.0-9.0; Glycine-NaOH buffer: pH 9.0-12.0

インを指示薬として 1 N 水酸化ナトリウム溶液で中和後 Dowex のカラムに流し、水 10 ml で洗浄し溶出液はすてる。つぎに 0.2 N 塩酸 10 ml を流し、HPLC 用の試験溶液 A-2 とした。

一方、EDTA-Cu に変換された遊離型 DETA と変換されない EDTA-Fe の試料溶液 B-1 の全量 (約 8 ml) は、0.5 M リン酸塩緩衝液 1 ml を加えて pH 7.0 とした後 Unicellex カラムに通し、カラムからの溶出液を HPLC 用の試験溶液 B-2 とした。

4-5. HPLC 条件

逆相分配型の Zorbax ODS カラムを用い、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を溶離液として 1 ml/min の流速で流し、HPLC 用試験溶液それぞれ 50 μ l ずつ注入し、波長 254 nm で検出した。

4-6. 検量線の作製

EDTA-2Na 及び EDTA-Ca 標準溶液をそれぞれ 1, 2, 3, 4 及び 5 ml を別々の試験管にとり、1 N 塩酸で pH 2.5 に調整後硫酸銅溶液 0.5 ml をそれぞれに加え、10 ml の定容とする。各試験溶液 50 μ l を HPLC に注入し、横軸に EDTA-2Na または EDTA-Ca 濃度を取り、縦軸にピーク高を取り検量線を作製した。EDTA-2Na を遊離型 EDTA の検量線とし、EDTA-Ca を金属キレート型 EDTA の検量線とした。

5. 遊離型及び金属キレート型 EDTA 含量の計算

HPLC 用試験溶液は、遊離型及び金属キレート型 EDTA とも 10 ml/試料 2 g に相当する。試料中の遊離型及び結合型 EDTA 濃度は次式のごとく求められる。

$$\text{試料中の遊離型または金属キレート型 EDTA } (\mu\text{g/g}) = \frac{x \times 10 \text{ ml}}{2 \text{ g}}$$

x: 検量線から求めた試験溶液中の遊離型または金属

キレート型 EDTA 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

遊離型及び金属キレート型 EDTA とも実際には EDTA-Cu として測定し、金属キレート型 EDTA はすべて EDTA-Ca として算出した。

ただし、試料中に EDTA-Fe が検出された場合には、別個に EDTA-Fe 標準溶液を用いて検量線を作製し、含量を EDTA-Ca に換算し、金属キレート型 EDTA 含量に加算した。

結果と考察

1. 透析条件の検討

金属との接触を避けるため、テフロン製のホモジナイザーを用いて試料を磨砕後、透析により精製する方法について検討した。

EDTA-2Na, EDTA-Ca 及び EDTA-Fe の透析効率に及ぼす透析補助液の pH の影響を調べ Table 1 に示した。

EDTA-2Na 及び EDTA-Ca は酸性側では透析効率が悪く、pH 8 以上で良好に透析されたが、pH 10 以上の強アルカリ性では EDTA-Fe が透析膜を通過する際に鉄イオンが脱離し、水酸化鉄が透析膜内に沈殿として残り EDTA-2Na となり透析された。

従って透析は pH 8.5 で行うことにし、透析液にはトリス-塩酸緩衝液を用いることにした。

次に EDTA-2Na 及び EDTA-Ca の透析効率に及ぼす透析温度及び時間について検討し、Fig. 1 に示した。

透析効率は EDTA-2Na 及び EDTA-Ca ではいずれも温度が高くなるに従い漸次上昇し、38° では15時間で十分であった。また EDTA-Mn, -Mg, -Pb, -Zn 及び -Cu についても、本条件下でほぼ同様の結果がえられた。

Fig. 1. Effect of temperature and period on the recoveries of EDTA-Ca and EDTA-2Na by dialysis

Note: 10μ mole EDTA-2Na and -Ca in $0.2 M$ Tris-HCl buffer (pH 8.5) 25 ml was dialyzed against $0.02 M$ Tris-HCl buffer (pH 8.5, 175 ml).

Fig. 2. Comparison for the adsorption of EDTA-2Na on three types of columns

Note: 10μ mole EDTA-2Na and EDTA-Ca in $0.05 M$ Tris-HCl buffer (40 ml) were loaded on the anion-exchange column (cartridge).

2. 遊離型と金属キレート型 EDTA の分離

2-1. 分離用カラムの選択

遊離型 EDTA と金属キレート型 EDTA を分離するためのカラムについて検討した。

分離用カラムにはカートリッジタイプの官能基の異なる 3 種の陰イオン交換カラムを用いて簡易に分離することを試み、EDTA-2Na 及び EDTA-Ca の吸着率を調べ比較した。

$0.05 M$ トリス-塩酸緩衝液を用い、3 種のカラムについて EDTA-2Na の吸着性と EDTA-Ca の溶出性を調べ

Fig. 3. Elution patterns of EDTA-metals from anion-exchange column

Column: Baker 10-SPE (0.9×5 cm, N^{+4} form)

Eluant: Tris-HCl ($50 mM$, pH 8.5).

たところ、前者は pH 8~9 において第 4 アンモニウム型カラムを用いたとき、最も吸着率が高かった。後者はいずれのカラムにも吸着されなかった。

しかし、透析補助液である トリス-塩酸緩衝液の濃度を $0.1 M$ 以上に高くしたり、ホウ酸緩衝液を用いた場合には、第 4 アンモニウム型カラムにおいても EDTA-2Na の吸着能の低下が見られた。

2-2. 金属キレート型 EDTA の溶出

第 4 アンモニウム型カラムを用いて、各種金属キレート EDTA の溶出率を調べた。透析外液 40 ml に各種 EDTA を添加してカラムに流し、ついで $0.05 M$ トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) で洗浄したときの溶出率を測定し、Fig. 3 に示した。

溶出されやすい金属キレートは $Ca > Mn > Mg > Pb > Zn > Cu$ の順となった。比較的溶出され難い EDTA-Cu でも洗浄液 50 ml で完全にカラムから溶出できたが、EDTA-Fe は EDTA-2Na と共に、全く溶出されなかった。

2-3. 遊離型 EDTA 及び EDTA-Fe の溶出

金属キレート型 EDTA を溶出後、カラムに吸着された EDTA-2Na 及び EDTA-Fe を溶出するために塩酸を用いた。試料の濃縮を考慮して $0.2 N$ 塩酸 8 ml を用いたところ、両者とも定量的に回収された。

3. 各種 EDTA の EDTA-Cu への変換

EDTA-2Na は直接 HPLC で測定すると操作中に各種の金属と接触しキレートを生成する可能性があるため、遊離の形で測定することは困難である。また各種の金属キレート EDTA を個別に HPLC で定量することは極めて煩雑となる。

Table 2. Formation Ratio of EDTA-Bi, EDTA-Fe and EDTA-Cu from Various Kind of EDTA-metals

kind of EDTA	Stability constant (log K)	Formation of EDTA-Bi (%)*		Formation of EDTA-Fe (%)*		Formation of EDTA-Cu (%)*	
		pH (2.5)	(10.0)	(2.5)	(10.0)	(2.5)	(10.0)
EDTA-2Na	1.66	97.9	87.0	99.5	65.0	99.6	30.8
EDTA-Mg	8.69	95.4	5.3	99.7	2.5	99.8	0
EDTA-Ca	10.96	96.1	0	99.8	0	99.8	0
EDTA-Zn	16.50	93.5	0	99.5	0	99.7	0
EDTA-Pb	18.04	90.8	0	99.6	0	99.5	0
EDTA-Cu	18.80	91.5	0	99.5	0	—	—
EDTA-Fe	25.10	82.0	0	—	—	0	0
EDTA-Bi	27.90	—	—	0	0	0	0

Note: One ml of 10 mM Bi(NO₃)₃ or FeCl₃ or CuSO₄ solution was added to 10 ml of 0.1 mM EDTA-metals at pH 2.5 and 10.

* mean value of five trials

そこでカラムから溶出した EDTA をキレート生成定数の大きい一定の金属キレートに変換し、HPLC で分別定量する方法について検討した。

EDTA とのキレート生成定数の比較的大きい⁸⁾ 硝酸ビスマス、塩化第二鉄及び硫酸銅を用いて、各種 EDTA のビスマス、鉄及び銅キレートへの変換率を pH 2.5 と 10 で調べた。

pH 10 においては、EDTA-2Na 及び微量の EDTA-Mg 以外はいずれの金属にもほとんど変換されなかった。

pH 2.5 においては、硝酸ビスマス水溶液は懸濁状となるためか、各種 EDTA のビスマス化率は他の方法に比して小さく、再現性も乏しいように思われた。塩化第二鉄及び硫酸銅は各種金属キレート EDTA を良好に鉄または銅に変換したが、著者らの方法では鉄に変換した場合には分離用カラムで EDTA-2Na と EDTA-Fe が同一画分に溶出するため、両者の区別ができなかった。

従って、遊離型及び金属キレート型 EDTA はそれぞれ pH 2.5 で銅キレートにすることにした。本条件下で EDTA-Fe は全く銅に変換されず安定であったので、食品中に EDTA-Fe が存在した場合には HPLC 上で分離定量した。

4. 試験溶液の濃縮と過剰 Cu²⁺ の除去

EDTA を銅化または鉄化して HPLC で測定する際、過剰の硫酸銅や塩化第二鉄が試験溶液中に残存すると HPLC のカラムをつまらせたり、分離能を悪くすることがある。

分離用カラムからの溶出液中の各種 EDTA を銅に変換した後、HPLC 用試験溶液の濃縮と精製をかねて簡単なカラム処理を行うことにし、Dowex 及び Unicellex カラムについて検討した。

Table 3. Elution of EDTA-Cu, EDTA-Fe and CuSO₄ from Dowex or Unicellex column Elution (%)

Column	Dowex 1×4		Unicellex
Eluant	H ₂ O	0.2 N HCl	25 mM K-p (pH 7.0)
EDTA-Cu	0	99.7	99.8
EDTA-Fe	20.5	79.1	99.5
CuSO ₄	100.0	0	0

Column size: 1.0×5 cm; K-p: potassium phosphate buffer; volume of each eluant: 10 ml; Dowex 1×4: anion-exchange column; Unicellex: cation-exchange column; sample: 10 μ mole each

Table 3 に示したように、陰イオン交換樹脂である Dowex を通して水 10 ml で洗浄し、ついで 0.2 N 塩酸を流したとき、EDTA-Cu はカラムに吸着され塩酸で定量的に回収されたが、EDTA-Fe は水洗浄により一部溶出した。また過剰の Cu²⁺ はカラムに全く吸着されず、水により除去することができた。このことから、銅に変換した金属キレート型 EDTA の試験溶液は Dowex カラムを通し、少量の塩酸で溶出することにより濃縮と精製が可能となった。

一方、銅に変換した EDTA-2Na と EDTA-Fe の画分は溶出液が 10 ml とすでに濃縮されているので、無機金属イオンのみを吸着する性質を持つ Unicellex カラムを通すことにより、過剰の硫酸銅を除去することにした。Table 3 に示したとおり、硫酸銅は完全に Unicellex カラムに吸着された。

5. HPLC 条件の検討

5-1. 溶離液

広渡ら⁹⁾は逆相分配型のカラム、pH 3 の溶離液を用

Fig. 4. Effect of pH on the elution patterns of EDTA-Cu and EDTA-Fe by HPLC

HPLC conditions, column: Zorbax ODS (4.6 mm ϕ $\times$ 15 cm); flow rate: 1 ml/min; detection: 254 nm; concentration of EDTA-Cu and -Fe: 0.025 mM; sensitivity: 0.08 AUFS

いた HPLC により EDTA-Bi, -Fe 及び -Cu の相互分離を行っている。また Perfetti⁴⁾ は pH 4.5, 矢部⁹⁾ は pH 7, 西島⁸⁾ は pH 3 のそれぞれ溶離液を用いて EDTA-Cu または -Fe の測定を行っている。

著者らは試験溶液中の EDTA-Cu 及び -Fe を HPLC で分離定量する条件を求めるため、溶離液の pH を変えて両者を同時測定し比較した。

Fig. 4 に示したように、pH 3 のとき EDTA-Cu がテーリングし、pH 8.5 では EDTA-Cu と -Fe の分離が不十分であった。また pH 6 では分離度は比較的良好であったが、両者の混液を注入して測定したとき、カラム中に残った Fe³⁺ のためか、破線で示したように EDTA-Cu が一部 EDTA-Fe に変換する現象が見られた。ゆえに、安全を期すため溶離液には pH 7 のリン酸塩緩衝液を用いることにした。

5-2. 検量線

本条件下における EDTA-Cu 及び -Fe の検量線は 0.005~0.025 mM の範囲で良好な直線性を示し、検出限界はいずれも 0.001 mM であった。

Table 4. Recovery of EDTA-Ca from Several Foods by the Proposed Method

Food	Added (μ g/g)	Found (μ g/g)	Recovery (%)
Mayonnaise	100	93	93.0
	250	231	92.4
	500	475	95.0
Salad dressings (separate type)	100	103	103.0
	250	245	98.0
	500	496	99.2
Salad dressings (emulsion type)	100	94	94.0
	250	245	97.0
	500	503	100.6
Canned crab meat	100	98	98.0
	250	249	99.6
	500	497	99.4
Canned bamboo shoot	100	96	96.0
	250	255	102.0
	500	498	99.6
Orange juice	100	101	101.0
	250	247	98.8
	500	506	101.2

EDTA-Ca added was not recovered as EDTA-2Na from any food tested.

6. 各種食品から EDTA-Ca 及び EDTA-2Na の添加回収

6-1. 本法による回収率

数種の食品につき本法により EDTA-Ca 及び EDTA-2Na の添加回収を行い、結果を Table 4 と 5 に示した。

EDTA-Ca の回収率は、いずれも 92.4% 以上の良好な結果が得られた。

EDTA-2Na の回収率は、一部の食品については遊離型として回収されたが、大多数の食品では金属キレート型として回収された。両者の合計はいずれの場合でも 91.2% 以上となることから、試料に添加したとき食品中に含有される金属と EDTA-2Na がキレートを生成したためと推定された。

また EDTA-2Na の添加量が多いほど遊離型としての回収率が高くなることは、カラム法による遊離型 EDTA の分別が良好に行われていることが予想され、もし食品成分がカラムによる分別に影響しているとするならば、この比例性は見られないものと考えられた。

6-2. 他の方法との比較

EDTA-2Na が使用される代表的な 3 種の食品に添加し、3 つの方法で回収率を測定し比較した。

Table 6 に示したように A 法は本法によるもの、B 法はホモジナイズした食品をジチゾン溶液と振り混ぜ、試料中の大多数の金属をあらかじめ除去した後に EDTA-2Na を添加し、以下 A 法と同一操作を行ったものであ

Table 5. Recovery of EDTA-2Na from Several Foods by the Proposed Method

Food	Added ($\mu\text{g/g}$)	As EDTA-2Na		As EDTA-metal chelate	
		Found ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	Found ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)
Mayonnaise	100	0	0	94	94.0
	250	0	0	255	102.0
	500				
Salad dressings (separate type)	100	0	0	98	98.0
	250	33	13.2	200	80.0
	500	278	55.6	215	43.0
Salad dressings (emulsion type)	100	0	0	93	93.0
	250	0	0	245	98.0
	500	0	0	510	102.0
Canned crab meat	100	0	0	93	93.0
	250	0	0	250	100.0
	500	0	0	487	97.4
Canned bamboo shoot	100	0	0	94	94.0
	250	0	0	254	101.6
	500	65	13.0	430	86.0
Orange juice	100	0	0	104	104.0
	250	46	18.4	182	72.8
	500	295	59.0	210	42.0

Table 6. Comparison for the Recoveries of EDTA-2Na added to Samples Determined by the Three Methods

Sample	Added (ppm)	Recovery (%)		
		Method A	Method B	Method C
Salad dressings (separate type)	100	0	75.5	0
	250	13.2	82.0	0
	500	55.6	90.7	7.0
Canned bamboo shoot	100	0	63.4	0
	250	0	69.0	0
	500	13.0	87.5	0
Orange juice	100	0	84.5	0
	250	18.4	88.1	0
	500	59.0	96.0	16.3

Method A: determined by the proposed method

Method B: determined by the proposed method after eliminating minerals from the samples

Method C: determined by the EDTA-Bi method

る。またC法は山口ら¹⁰⁾の方法の原理に従い、EDTA-2NaをpH 10で硝酸ビスマスを用いてビスマスキレートに変換して測定したものである。

試料中の金属をあらかじめ除去したB法ではA法に比して明らかにEDTA-2Naの回収率は高くなっており、食品に遊離型を添加しても試料中の含有金属のため大部分は金属キレート型に変化してしまうことが明らかとなった。またpH 10でEDTA-2NaのみEDTA-Biにする方法では、A法よりもさらに遊離型としての回収率

はいずれの食品でも低い結果を与えた。この原因としては3, で述べたように、硝酸ビスマス水溶液が懸濁状であるため、食品に応用したときEDTA-2Naとの反応性が低いことによるものと考えられた。このことはビスマス水酸化懸濁液を用いたときも同様であった。

総 括

1. ホモジネートとした食品をトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)で38°, 15時間透析し、EDTA-2Na, -Ca, -Mn -Mg, -Pb, -Zn, -Cu及び-Feを定量的に回収し

た。

2. 各種の EDTA を分離用イオン交換カラムに流し、0.05 M トリス-塩酸緩衝液 60 ml で洗浄することにより、EDTA-Fe を除く金属キレート型 EDTA を溶出し、EDTA-2Na を選択的にカラムに吸着させた。ついで後者を 0.2 N 塩酸で溶出し、遊離型及び金属キレート型 EDTA を分離した。

3. 遊離型及び金属キレート型 EDTA 溶液を pH 2.5 に調整後硫酸銅溶液を加え、それぞれ銅キレートに変換した。EDTA-2Na, -Ca, -Mg, -Pb, -Zn は定量的に変換されたが、EDTA-Fe は全く変換されず安定であった。

4. 金属キレート型 EDTA は Dowex カラム (陰イオン交換)、遊離型 EDTA (EDTA-Fe を含む) は Unicellex カラム (陽イオン交換) で、それぞれ試験溶液の濃縮と過剰 Cu^{2+} の除去を行った。

5. カラムとして逆相分配型カラム、溶離液としてリン酸塩緩衝液 (pH 7) を用いて HPLC を行い、EDTA-Cu 及び EDTA-Fe を良好に分離定量した。それぞれの検量線は 0.005~0.025 mM の範囲で良好な直線性を示し、検出限界はいずれも 0.001 mM であった。

6. 各種食品に EDTA-Ca 250 ppm 添加したときの回収率は 92.4% 以上であった。EDTA-2Na の場合は大部分が金属キレート型 EDTA として回収されたが、遊離型との合計は 91.2% 以上であった。

7. あらかじめ試料中の金属を除去した後 EDTA-

2Na を添加したとき、遊離型としての回収率は 63.4% 以上と高くなったことから、添加した EDTA-2Na の大部分は食品中で各種の金属とキレート型 EDTA に変換することが明らかとなった。しかし残存する微量の遊離型 EDTA は本法で定量することが可能であった。

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) 三原 翠, 天野立爾, 近藤龍雄, 田辺弘也: 食衛誌. **11**, 88~92 (1970).
- 3) Williams, D. T.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **57**, 1383~1385 (1974).
- 4) Perfetti, G. A.: *ibid.* **62**, 1092~1095 (1979).
- 5) 矢部芳枝, 丹 茂, 二宮隆博, 岡田太郎: 食衛誌. **24**, 220~224 (1983).
- 6) 日本薬学会編 (西島ら): 公衆衛生協議会資料 p. 6~8 (金沢市, 昭和60年4月3日).
- 7) Ito, Y., Toyoda, M., Suzuki, H., Iwaida, M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63**, 1219~1223 (1980).
- 8) 上野景平編: “EDTA コンプレキサン of 化学” p. 33~36 (1977) 南江堂.
- 9) 広渡和生, 甲村善博, 熊本和夫, 服部荘寛, 青色昭三: 分析化学 **30**, 534~537 (1981).
- 10) 山口昭弘, 山口敏幸, 白石由美子, 清水良夫, 高杉信男: 食衛誌. **26**, 253~259 (1985).