

## 短報

# 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

関戸晴子, 田中由紀子, 岸弘子

## Determination of ethylene diamine tetra- acetic acid and its salts in foods

Haruko SEKIDO, Yukiko TANAKA  
and Hiroko KISHI

### はじめに

エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム (EDTA-CaNa<sub>2</sub>) およびエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-Na<sub>2</sub>) は、種々の金属イオンと結合し、塩を作るキレート剤である。この性質を利用して変色の防止、酸化防止の目的で、缶・瓶詰清涼飲料水およびその他の缶・瓶詰食品について我が国でも食品添加物として使用が認められている。また、EDTA-Na<sub>2</sub>については人体に摂取されたとき、体液中に比較的多く、かつイオンの形で存在するCaと結合して体外に排泄する作用があり、体内Caの減少を起こす危険性があるため最終食品完成前にキレート型であるEDTA-CaNa<sub>2</sub>にしなければならぬとされている<sup>1)</sup>。

食品中のEDTA-CaNa<sub>2</sub>およびEDTA-Na<sub>2</sub>の分析法として、食品衛生検査指針食品添加物編2003 (検査指針)<sup>2)</sup>では透析法により抽出し、カラムクロマトグラフィーによりEDTA-CaNa<sub>2</sub> (キレート型EDTA) とEDTA-Na<sub>2</sub> (遊離型EDTA) を分別し、銅を加えてCu-EDTAとして各々を液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量する方法を採用している。しかし、透析に時間を要する、操作が煩雑であり遊離型EDTAの回収率が悪い等の問題点がある。衛生試験法・注解2010 (衛生試験法)<sup>1)</sup>では、水を加えてホモジナイズしたもの (直接抽出法) をカラムクロマトグラフィーにより妨害物を除去した後に、キレート型EDTAと遊離型EDTAを分別せずに鉄を加えて鉄キレート (Fe-EDTA) として定量する方法を採用している。しかし、分別しないため最終製品に遊離型EDTAが存在するかどうかの確認はできない。

神奈川県衛生研究所 理化学部  
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

そこで、寺田らの方法<sup>3)</sup>を元にトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を用いた直接抽出法を採用し、市販の固相抽出カラムを用いて、遊離型EDTAとキレート型EDTAを合算してFe-EDTAとして定量する方法を検討した。さらに、EDTA-Na<sub>2</sub>使用表示のある試料における遊離型EDTAの残存確認法として、遊離型のみをCu-EDTAとして検出する方法も検討した。日常検査に適用可能な分析法が確立できたので報告する。

### 方法

#### 1. 試料

神奈川県内で購入したマヨネーズ、リンゴジュース、マッシュルーム缶詰、キャベツの酢漬け (瓶詰)、カニ缶詰 (EDTA-CaNa<sub>2</sub>表示有)、ドレッシング (EDTA-CaNa<sub>2</sub>表示有) を用いた。

#### 2. 試薬および試液等

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-Na<sub>2</sub>) · 2H<sub>2</sub>O, エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム (EDTA-CaNa<sub>2</sub>) · 2H<sub>2</sub>O, エチレンジアミン四酢酸鉄ナトリウム (EDTA-FeNa) · 3H<sub>2</sub>O : (株) 同仁化学研究所製を使用した。メタノールは和光純薬社製のHPLC用、水は水道水を超純水製造装置で処理した水、その他の試薬はすべて和光純薬社製の特級品を使用した。標準溶液および主な試液の調製法は以下のとおりである。

##### (1) 標準溶液

EDTA-Na<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 276mg およびEDTA-CaNa<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 274.0mgを水に溶かしてそれぞれ全量50mLとした (各5000 μg/mL)。EDTA-FeNa · 3H<sub>2</sub>O 114.7mgを水に溶かして100mLとした (1000 μg/mL)。これらの溶液を標準原液とし、適宜水で希釈して使用した。

##### (2) 0.2mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5)

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン24.2gを量り、水500mLを加えて溶かし、2mol/L塩酸でpH8.5に調整した後、水を加えて1,000mLとした。

##### (3) 0.0025mol/L塩化第二鉄0.05mol/L塩酸溶液

塩化第二鉄 · 6水塩0.68gに0.5mol/L塩酸100mLを加えて溶かした後、この液10mlを量り、水を加えて100mLとした。

##### (4) 0.25%硫酸銅溶液

無水硫酸銅0.25gを水に溶解して100mLとした。

##### (5) 0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0)

0.2mol/Lリン酸一カリウム水溶液を調製した後、0.2mol/Lリン酸を加えてpH4.0に調整した。

##### (6) 固相抽出カラム : OASIS MAX (6mL, 150mg)

Waters社製

あらかじめメタノール5mL, 水5mL, 0.02mol/Lトリ

ス塩酸緩衝液 (pH8.5) 10mLの順でコンディショニングした後使用した。

#### (7) ガラスフィルター：ワットマン934AHフィルター 3. 装置および測定条件

装置：Waters社製 Alliance 2695/2996

カラム：Inertsil ODS-3V (4.6×150mm, 5 $\mu$ m), 移動相：メタノール・水・0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) を2：7：1に混合した後、臭化テトラ-n-ブチルアンモニウムを0.005mol/Lになるように溶解した。

流速：1.0mL/min, カラム温度：40℃, 注入量：20 $\mu$ L, 検出：フォトダイオードアレイ検出器 (検出波長210~370nm, 定量255nm)

#### 4. 試料液の調製

寺田らの方法<sup>3)</sup>に従った。

<高脂肪食品 (マヨネーズ・油性ドレッシング等)>

試料約5gを精密に量り、50mLの遠沈管に入れ、0.2mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 10mL, 水20mLおよびヘキサン15mLを加え超音波水浴中に10分間放置後、2,500rpmで5分間遠心分離を行い、水層を駒込ピペットで分取した。残ったヘキサン層に水25mLを加えて混和し、超音波水浴中に10分間放置後、2,500rpmで5分間遠心分離を行い、水層を駒込ピペットで分取した。この操作を2回繰り返して、分取した水層を100mLのメスフラスコ中に合わせて水で全量100mLとした。この溶液をガラスフィルターでろ過し、試料抽出液とした。

<低脂肪食品 (清涼飲料水・魚・野菜等)>

固形の食品はフードプロセッサーで粉砕したものを試料とした。試料約5gを精密に測り100mLの共栓メスシリンダーに入れ、0.2mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 10mL及び水を加え全量100mlとした。これを超音波水浴中に10分間放置後ガラスフィルターでろ過し、試料抽出液とした。

#### 5. 定量用試料液の調製

試料抽出液5mLに0.0025mol/L塩化第二鉄0.05mol/L塩酸溶液1mLを加えて混和し、5分間放置した後0.2mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 1mLおよび水3mLを加え混和した。OASIS MAXに負荷後、0.02mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 5mLを流してカートリッジを洗浄し、0.2mol/L塩酸10mLでEDTA-Feキレートを出した。溶出液を100mLのナス型フラスコに採り、50℃に加温しながらロータリーエバポレータで塩酸を蒸発乾固し、残った塩酸蒸気を窒素気流を用いて十分除去し、水2.5mLを加えて超音波水浴中で溶解したものを定量用試料液 (Fe-EDTA) とした。

#### 6. 遊離型EDTA確認用試料液の調製

試料抽出液10mLをOASIS MAXに負荷後0.1mol/Lト

リス塩酸緩衝液 (pH8.5) 15mLを流してカートリッジを洗浄し、0.2mol/L塩酸10mLで遊離型EDTAを溶出した。溶出液に0.25%硫酸銅溶液0.5mLを加え、EDTA-Cuキレートとした後、50℃に加温しながらロータリーエバポレータで塩酸を蒸発乾固し、残った塩酸蒸気を窒素気流を用いて十分除去し、水5mLを加えて超音波水浴中で溶解したものを遊離型EDTA確認試料液 (Cu-EDTA) とした。

## 結果および考察

### 1. 試料液の調製

寺田らの方法<sup>3)</sup>に従った。トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を抽出溶媒として、低脂肪食品は超音波水浴中に放置して抽出し、ガラスフィルター濾過後使用した。マヨネーズ等の高脂肪食品はヘキサンを加えて脱脂後、超音波抽出、遠心分離して水層を分取し、ガラスフィルター濾過後使用した。EDTA-CaNa<sub>2</sub>使用の表示のあるカニ缶詰を用いて、低脂肪食品の抽出を行い、定量用試料液調製法により作製したFe-EDTAおよびEDTA-FeNa標準溶液 (10 $\mu$ g/mL) をそれぞれHPLC測定したところ、どちらも8分付近にピークを検出した。透析法よりも短時間で抽出できるため、検査にかかる時間短縮が示唆された。

### 2. HPLC条件

寺田らの条件<sup>3)</sup>は、ODSカラム (4.6×250mm, 5 $\mu$ m) を用いて、メタノール・水・0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) の混合比率を6：39：5としたものに、臭化テトラ-n-ブチルアンモニウムを0.005mol/Lになるように溶解した移動相でFe-EDTAを測定していた。同条件を用いてFe-EDTAとCu-EDTAを測定したところ、Fe-EDTAのピークは8分付近で良好なピーク形状を示したが、Cu-EDTAを測定したところ、30分以降にピークが出現し、形状も悪かった。そこでFe-EDTAとCu-EDTAの両ピークが良好に検出できる条件を検討することにした。カラムにInertsil ODS-3V (4.6×150mm, 5 $\mu$ m) を採用し、移動相のメタノール・水・0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) の混合比率を6：39：5から2：7：1に変更し、臭化テトラ-n-ブチルアンモニウムを0.005mol/Lになるように溶解した溶液で測定したところFe-EDTAの保持時間が少し早めではあるが3分付近に、Cu-EDTAの保持時間は10分付近に検出でき、2つの成分を分析条件を変えずに測定することが可能であった。そこでこの条件を採用することにした。検出器としては吸収スペクトルによるピーク確認が可能なフォトダイオードアレイを使用し、定量には255nmの波長を選択した。HPLCクロマトグラムを図1、2に示す。

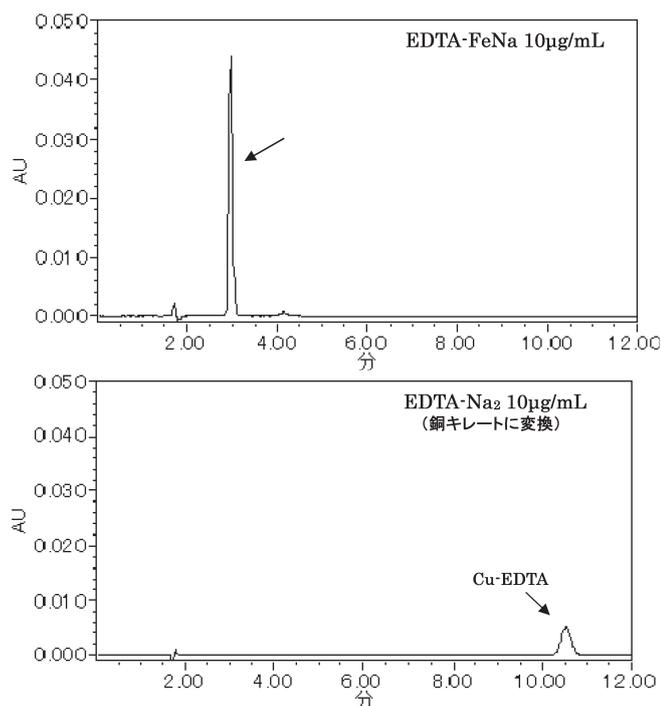


図1 HPLCクロマトグラム (UV255nm)

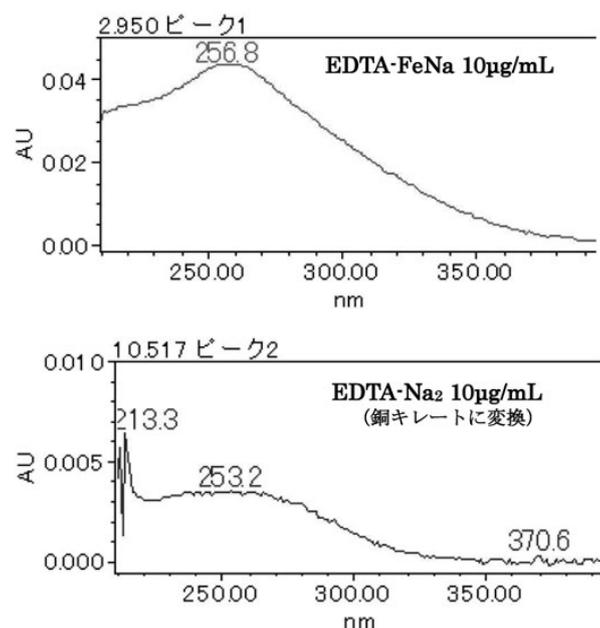


図2 UV吸収スペクトル

### 3. 検量線

衛生試験法<sup>1)</sup>ではEDTA-Na<sub>2</sub>標準原液を希釈後、塩化鉄によりFe-EDTAを生成させた溶液を用いて検量線を作成していた。しかし、操作が煩雑であることから、ピーク形状および保持時間に相違なかったEDTA-FeNa標準原液を希釈したものを使用することを検討した。EDTA-FeNa検量線を作成し、EDTA-Na<sub>2</sub>およびEDTA-CaNa<sub>2</sub>

表1 EDTA-CaNa<sub>2</sub>の各種食品での添加回収率

食品	試料量 (g)	添加量 (g/kg)	検出量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
マヨネーズ	5	0.25	0.199	79.6	5.5
リンゴジュース	5	0.035	0.029	82.9	1.1
マッシュルーム缶詰	5	0.25	0.244	97.6	4.6
キャベツの酢漬け(瓶詰)	5	0.25	0.209	83.6	5.5

\* 5 試行の平均値

表2 EDTA-Na<sub>2</sub>の各種食品での添加回収率

食品	試料量 (g)	添加量 (g/kg)	検出量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
マヨネーズ	5	0.25	0.183	73.2	6.1
リンゴジュース	5	0.035	0.029	82.9	1.8
マッシュルーム缶詰	5	0.25	0.242	96.8	4.6
キャベツの酢漬け(瓶詰)	5	0.25	0.209	83.6	3.6

\* 5 試行の平均値

標準溶液 (各10 µg/mL) より調製したFe-EDTAを測定後、換算して回収率を求めたところ、96.5%および108%とほぼ良好な結果が得られたことから、EDTA-FeNaを検量線に使用することとした。0.1~30 µg/mLの溶液を調製し、検量線を作成したところ相関係数(R) 0.999以上の良好な直線性を示した。

### 4. 定量用試料液調製法の検討

寺田らの方法<sup>3)</sup>に従い、EDTA-Na<sub>2</sub>およびEDTA-CaNa<sub>2</sub>標準溶液 (各10 µg/mL) を試料抽出液として、Bond Elute SAX (3 mL, 500mg) による精製を行ったところ、ロットの違いにより回収率にばらつきが見られた。そこで、湿潤性があり操作しやすい、イオン交換と逆相のモードを併せ持つOASIS MAX (6 mL, 150mg) を用いて再検討することにした。Fe-EDTAとして定量する際、寺田ら<sup>3)</sup>はBond Elute SAXに負荷した後、0.02mol/L塩酸10mLで洗浄して妨害物質及び過剰な鉄を除去し0.2mol/L塩酸で溶出していた。しかし、OASIS MAXで同様の操作を行ったところ0.02mol/L塩酸10mLの洗浄時にFe-EDTAが溶出してしまった。洗浄溶液のpHに原因があると考え、水および0.01~0.2 mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 10mLを用いて洗浄を実施したところ、水を用いた場合のみ溶出が認められた。トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を用いた場合はFe-EDTAの溶出は認められなかったことから、トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) の濃度と液量を検討した。液量を10mLとして、0.02, 0.05, 0.1mol/Lの3濃度で検証したところ、ほぼ相違ない結果が得られたため、試料抽出液の液性と同一0.02mol/Lトリス塩酸緩衝液 (pH8.5) とすることにした。しかし、液量が10mLの場合、わずかではあるがFe-EDTAの溶出が認められたため5 mLに変更した。洗浄液量を変更しても、HPLCクロマトにおけるFe-EDTAのピーク形状等に影響は認められなかった。

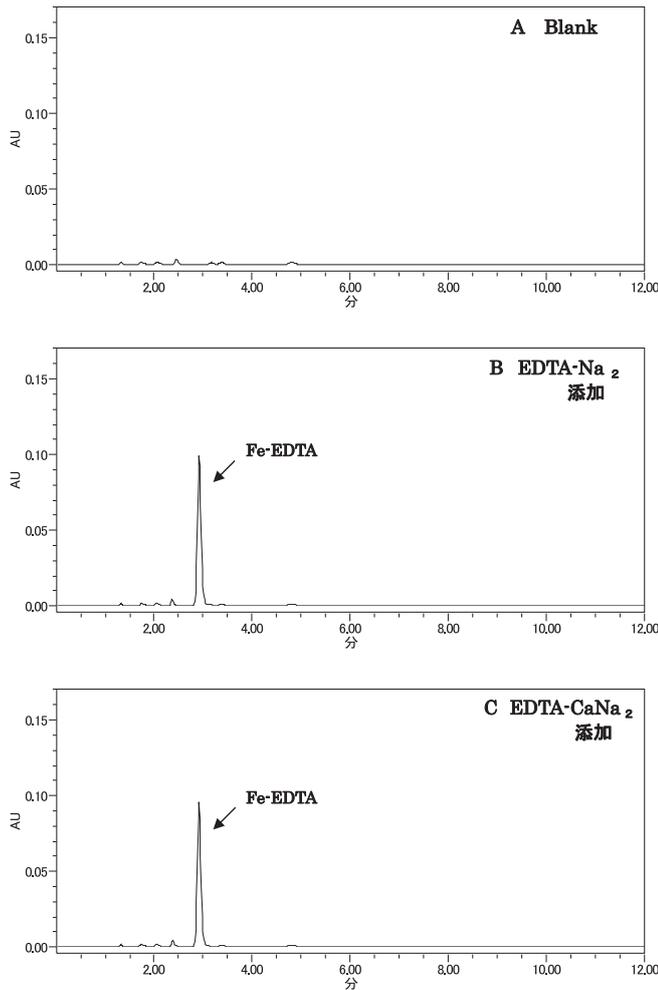


図3 マヨネーズのクロマトグラム（鉄キレートとして測定）

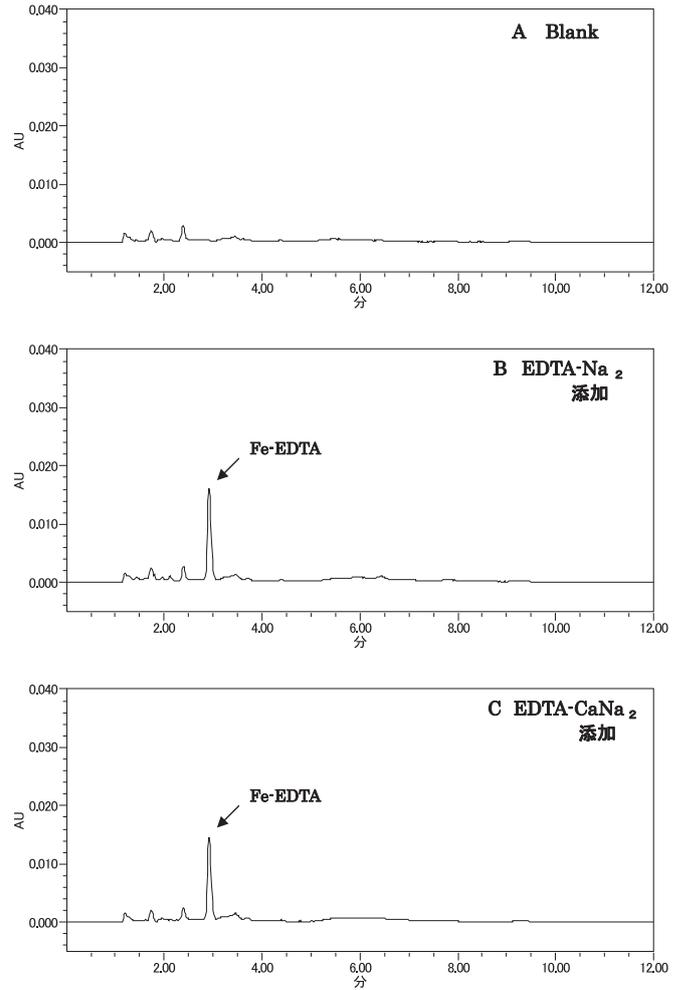


図4 リンゴジュースのクロマトグラム（鉄キレートとして測定）

5. 添加回収試験

高脂肪食品としてマヨネーズ，低脂肪食品としてリンゴジュース，マッシュルーム缶詰，キャベツの酢漬け（瓶詰）を用いて添加回収試験を実施した．EDTA-CaNa<sub>2</sub>およびEDTA-Na<sub>2</sub>を各試料に基準値量を添加することとし，清涼飲料水であるリンゴジュースは0.035g/kg，それ以外は0.25g/kgとした．添加回収の結果を表1，2にマヨネーズおよびリンゴジュースのHPLCクロマトグラムを図3，4に示す．回収率はEDTA・CaNa<sub>2</sub>が79.6～97.6%（RSD1.1～5.5%），EDTA・Na<sub>2</sub>が73.2～96.8%（RSD1.8～6.1%）とほぼ満足できる値であった．実際にEDTA-CaNa<sub>2</sub>使用表示のあったカニ缶詰およびドレッシングについて繰り返し試験（n=5）を実施したところ，カニ缶詰0.097g/kg（RSD4.2%），ドレッシング0.030g/kg（RSD6.8%）という良好な結果が得られた．

本法における定量は0.005g/kgから可能であったが，食品によっては妨害成分と分離しにくい可能性があるため定量下限を0.01g/kgとした．

6. 遊離型EDTAの確認

EDTA-CaNa<sub>2</sub>およびEDTA-Na<sub>2</sub>の標準溶液（各10μg/mL）を負荷しOASIS MAXによるキレート型と遊離型の分別を検討した．試料中には種々の金属とキレート化したEDTAの存在が考えられる<sup>1)</sup>．もともと試料中に存在しているFe-EDTAとの分別をはかるため，遊離型の確認は硫酸銅を用いてCu-EDTAとすることとした．試料抽出液をOASIS MAXに負荷し0.1mol/Lトリス塩酸緩

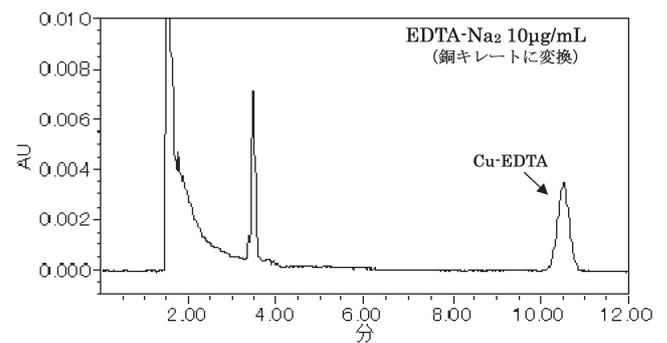


図5 遊離型EDTA標準液のクロマトグラム（銅キレートとして測定）

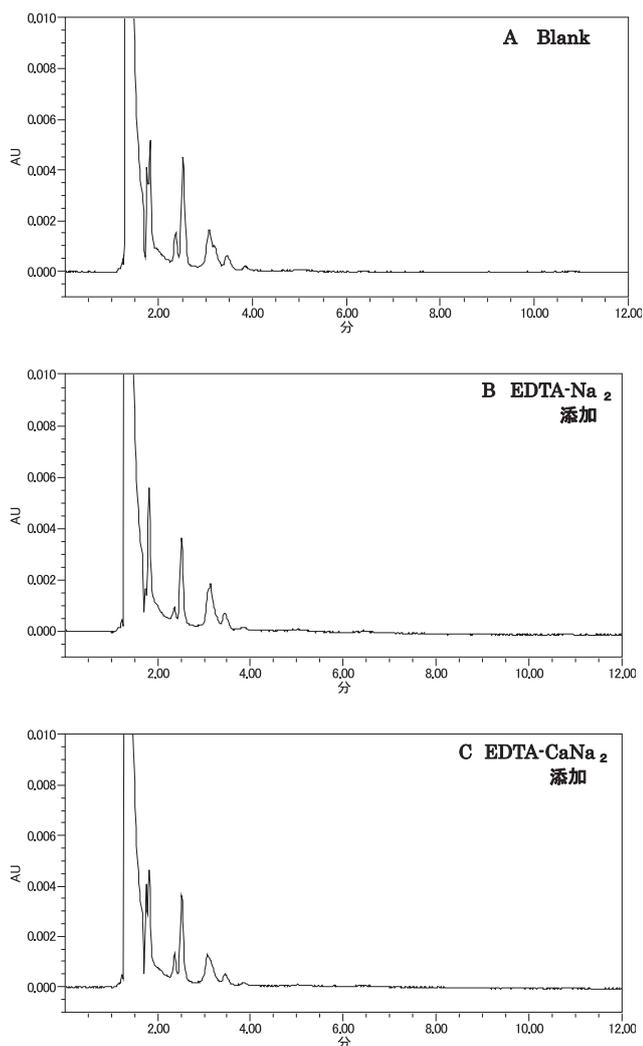


図6 マヨネーズのクロマトグラム（銅キレートとして測定）

衝液（pH8.5）で洗浄後、0.2mol/L塩酸で溶出した液に0.25%硫酸銅溶液を加えてCu-EDTAとしたものをHPLCで測定した。

洗浄に用いたトリス塩酸緩衝液（pH8.5）は、0.02, 0.05, 0.1mol/Lの3濃度で検討し、EDTA-CaNa<sub>2</sub>の洗浄に要した液量が最も少量であった0.1mol/Lを採用した。

試料抽出液の代わりにEDTA-Na<sub>2</sub>（10 $\mu$ g/mL）標準溶液をOASIS MAXに負荷し、同様の操作を実施して得られたCu-EDTAと比較した。

添加回収試験で用いたEDTA-CaNa<sub>2</sub>およびEDTA-Na<sub>2</sub>を添加した試料ならびにEDTA-CaNa<sub>2</sub>使用の表示のあるカニ缶詰およびドレッシングの試料抽出液を用いて遊離型EDTAの確認操作を行ったところ、すべての試料からCu-EDTAのピークは検出されず、遊離型EDTAの残存は認められなかった。EDTA-Na<sub>2</sub>標準溶液を負荷したものはCu-EDTAのピークが検出された。EDTA-Na<sub>2</sub>標準溶液、マヨネーズ、カニ缶詰のHPLCクロマトグラ

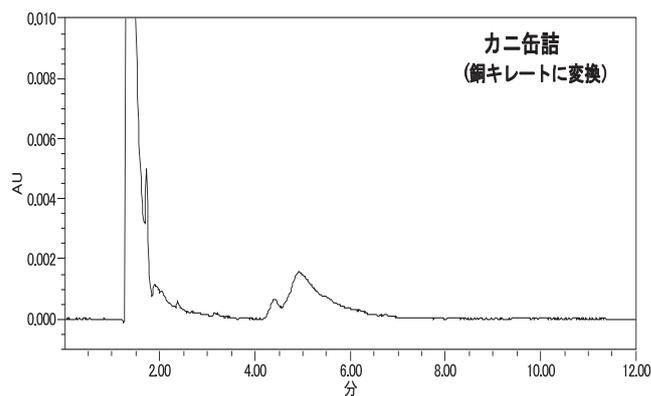


図7 カニ缶詰のクロマトグラム（銅キレートとして測定）

ムを図5～7に示す。本確認法における検出限界は0.01g/kgであった。

EDTA-Na<sub>2</sub>を添加した試料から遊離型EDTAは確認されなかったことから、食品にEDTA-Na<sub>2</sub>を添加しても、食品中では遊離型EDTAとしては存在しないことが推測された。

#### まとめ

食品中のEDTA-CaNa<sub>2</sub>およびEDTA-Na<sub>2</sub>の分析法として、2種類を分別せずに、トリス塩酸緩衝液（pH8.5）を加えて直接抽出後、鉄キレート（Fe-EDTA）を生成させ、市販のイオン交換と逆相のモードを併せ持つ固相抽出カラムによる前処理後、HPLCで定量する方法を検討した。検査指針<sup>2)</sup>と比べて、前処理操作が簡便となり、短時間で結果を出すことができた。検量線用標準液はEDTA-FeNa標準原液を希釈したものを使用することが可能であった。検討した試験法は、行政検査に十分適用できると考えられた。

また、遊離型EDTAの確認法として、固相抽出カラムを用いて遊離型のみを銅キレート（Cu-EDTA）として検出する方法を検討した。本確認法は最終製品に残存するEDTA-Na<sub>2</sub>の確認が可能であった。しかし今回、使用したすべての試料からCu-EDTAが検出されなかったことから、食品中では遊離型EDTAとしては存在しないことが推測された。

#### 参考文献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，337-338，2010，金原出版(株)
- 2) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編2003，38-45，2003，日本食品衛生協会
- 3) 寺田久屋，田村征男：食品中EDTAの分析法について，名古屋市衛生研究所事業年報，第14号，63，平成17年度