

割り箸中の亜硫酸分析におけるイオンクロマトグラフ用溶離液の検討

羽石 奈穂子, 金子 令子, 中里 光男

割り箸中の亜硫酸分析におけるイオンクロマトグラフ用溶離液の検討

羽石 奈穂子*, 金子 令子*, 中里 光男*

割り箸中の亜硫酸塩類分析試験法（厚生労働省の通知法）の2種類のイオンクロマトグラフィー（IC）の測定条件を検討したところ、感度に大きな違いが認められた。その原因解明のために、IC用溶離液である炭酸ナトリウム及び炭酸水素ナトリウム混液の比率、濃度、流速と亜硫酸の感度との関係を比較した。その結果、溶離液の比率及び濃度は感度に影響を与えないが、流速を下げることで感度が上昇することが判明した。この結果に基づき測定条件を改良した結果、通知法で示される測定条件の約2倍の感度を得ることができた。亜硫酸の定量限界として0.3 µg/mLが確保できた。

キーワード：割り箸、亜硫酸、イオンクロマトグラフィー、溶離液、感度

はじめに

平成19年11月に厚生労働省より通知された「割りばしに係る監視指導について」¹⁾により、漂白剤（二酸化硫黄又は亜硫酸塩類）の溶出限度値が引き下げられ、試験法が改正された。試験法は、割り箸を熱水抽出し、生成した亜硫酸イオンを、電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフ（IC）あるいはUV検出器を用いた液体クロマトグラフで測定する方法である。分析カラムは、第4級アンモニウム基をイオン交換基とした2種類の陰イオン交換カラムが指定されている。カラムに対する溶離液は、組成比の異なる炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムの混液2種類が示されており、流速を調節して用いることになっている。分析法の解説²⁾によると、陰イオン交換カラムとしてIonPac AS12AおよびTSKgel Super IC-AZを推奨している。そこで、これらのカラムを用いて最適な溶離液条件について検討した。その結果、両者のカラムを同じ組成比の溶離液を用いて電気伝導度検出器で測定した場合には感度に特段の違いは見られなかったが、一方のカラムを用いて組成比の異なる2種類の溶離液について比較したところ感度に大きな違いがあることがわかった。このことから、溶離液などの測定条件が感度に影響を及ぼしていることが推察された。

通知¹⁾に示されている亜硫酸の定量限界は1膳当たり0.12 mgであり、限度値4 mgに十分対応している。しかし割り箸の亜硫酸含有量は、試料によって約100倍程度異なることがあり、その実態を把握するためにもより高感度の分析法が必要である。そこで、溶離液条件が感度に及ぼす影響について詳細な検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

漂白処理を施した市販の竹製割り箸1種類。

2. 試薬および標準溶液

1) 試薬

水は超純水（用時採取）、トリエタノールアミン、亜硫酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム及び炭酸水素ナトリウムは試薬特級（和光純薬(株)製）を用いた。

2) 標準溶液

亜硫酸水素ナトリウム152 mgを1%トリエタノールアミン溶液に溶かして100 mLとしたものを標準原液とし、標準原液を適宜希釈したものを、標準溶液とした。

3. 装置

イオンクロマトグラフ：DIONEX社製DXc-500、オートサプレッサー（エクスターナルモード）付。

4. 測定条件

カラム：IonPac AS12A(4 mm i.d.× 200 mm,DIONEX社製)及びTSKgel SuperIC-AZ(4.6 mm i.d.×150 mm,東ソー(株)製)、ガードカラム：IonPac AG12A(4 mm i.d.× 50 mm,DIONEX社製)及びTSKguardcolumn SuperIC-AZ(4.6 mm i.d.×10 mm,東ソー(株)製)、溶離液：炭酸ナトリウム及び炭酸水素ナトリウムの混液、カラム温度：35°C、検出器：電気伝導度検出器、オートサプレッサー電流値(mA)：[炭酸ナトリウム濃度(mmol/L)×2+炭酸水素ナトリウム濃度(mmol/L)×1]×流速(mL/min)×2.47の計算式で示される値、流速：0.7～1.5mL/min、注入量：25 µL。

5. 試験溶液の調製

25 mL共栓付試験管に水20 mLを入れて95°Cに加温する。試料の割り箸1本を2つに切断して浸漬し、95°Cで30分間溶出を行い試料を除いた。冷後、その5 mLを採り水を加えて25 mLとし、ろ過したものを試験溶液とした。

結果及び考察

1. 通知に示された2種類のIC条件の比較

通知¹⁾に示された割り箸中の亜硫酸分析法はICによる測定法が提示されているが、測定条件として具体的なカラム

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

Table 1. IC Conditions for Analysis of Sulfite

	1	2
Column	IonPac AS12A(4 mm i.d.×200 mm)	TSKgel SuperIC-AZ(4.6 mm i.d.×150 mm)
Guardcolumn	IonPac AG12A(4 mm i.d.×50 mm)	TSKguardcolumn SuperIC-AZ(4.6 mm i.d.×10 mm)
Elution Solvent	2.1 mmol/LNa ₂ CO ₃ +0.8 mmol/LNaHCO ₃	3.2 mmol/LNa ₂ CO ₃ +1.9 mmol/LNaHCO ₃
Flow Rate	1.5 mL/min	0.8 mL/min
Electric Current	19 mA	17 mA
Column Temperature	35°C	35°C
Injection Volume	25 μL	25 μL

等が明示されておらず、詳細は別途その解説²⁾に示されている。Table 1.に、解説に基づいたIC測定条件を示した。

カラムは通知で示された長さ200mmのカラムとして、DIONEX社製 IonPac AS12A (以下DIONEX製カラム)及び150mmのカラムとして東ソー(株)製TSKgel SuperIC-AZ (以下東ソー製カラム)の2種類を用いた。流速は試料からの妨害物質の影響を除くために亜硫酸が10~15分で流出する値を設定した。また、今回の分析ではバックグラウンド低減のためにサブレッサー方式を用いているため、溶離液にあわせたサブレッサー電流値を設定した。これらの条件にしたがい亜硫酸標準溶液(10 μg/mL)を分析したときのイオンクロマトグラムをFig. 1に示した。DIONEX製カラムを用いた測定条件1の亜硫酸の面積値は、東ソー製カラムを用いた測定条件2で測定した時の約1/2と感度に大きな違いが認められた。そこで、DIONEX製のカラムを用いて、カラム条件を除き測定条件2にしたがい測定したところ、面積値は東ソー製カラムを用いた測定条件2に近い値を示すことがわかった。このことから、測定感度の増減は、使用するカラムの種類よりも溶離液の種類、流速、サブレッサー電流値等が影響することが示唆された。そこでこの原因を解明するためにDIONEX製カラムを用い、測定条件1を基本として溶離液の比率、溶離液組成の総モル数(濃度)、流速を変化させたときの亜硫酸の面積値を比較した。

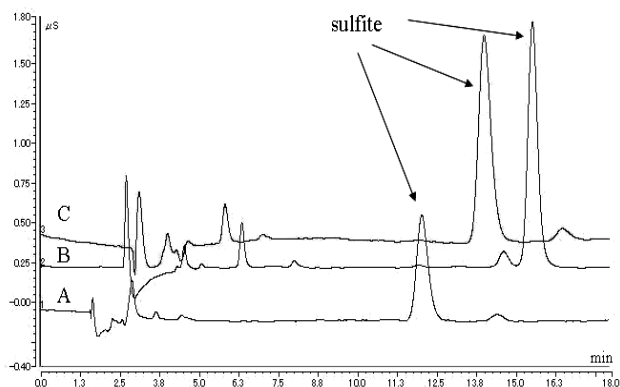


Fig. 1. Ion Chromatograms of Sulfite Standard (10 μg/mL) by Conditions shown in Table 1

A: IC condition 1 B: IC condition 2

C: Kind of column in IC condition 2 changed to Dionex column

2. 溶離液の比率の検討

溶離液の組成成分である炭酸ナトリウム及び炭酸水素ナトリウムの総モル数を測定条件1における2.9 mmol/Lとし、その比率を変化させたときの亜硫酸標準溶液(100 μg/mL)の面積値をFig. 2に示した。流速は1.5 mL/minに固定し、電流値は前述の式に従い算出した。炭酸ナトリウムの濃度を0.7~5.07 mmol/Lに変化させたときの亜硫酸面積値は4.67~5.07 μS×minを示した。炭酸水素ナトリウムの割合が増加するに従い面積値が減少する傾向にあるものの、通知に示されている炭酸水素ナトリウム濃度(総モル数に占める割合が測定条件1: 27.6%, 測定条件2: 37.3%)付近では大きな変動はなかった。しかし炭酸水素ナトリウムの増加により亜硫酸の保持時間は長くなり³⁾、炭酸水素ナトリウムが2.2 mmol/L以上(75.8%以上)では亜硫酸はカラムに保持されたまま溶出されなかった。

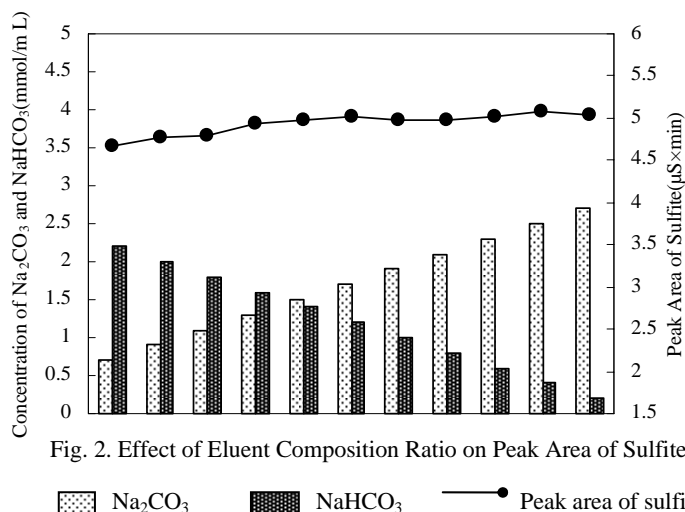


Fig. 2. Effect of Eluent Composition Ratio on Peak Area of Sulfite

□ Na₂CO₃ ▨ NaHCO₃ —● Peak area of sulfite

3. 溶離液の総モル数の検討

溶離液の比率を測定条件1と同じ炭酸ナトリウム72.4%、炭酸水素ナトリウム27.6%に固定し、総モル数を変化させたときの亜硫酸標準溶液(100 μg/mL)の面積値をFig. 3に示した。流速は1.5 mL/min、電流値は前述の式に従い算出した。総モル数2.9~5.8 mmol/Lのとき亜硫酸面積値は4.98~5.33 μS×minとほとんど変動はなかった。一般に溶離液中のイオン濃度が高いとS/N比が低下するといわれている³⁾が、今回設定した最大モル数5.8 mmol/Lでは特にS/N比は低

下せずベースラインの変動は認められなかった。しかし、保持時間は総モル数にほぼ反比例し、溶離液の濃度が高いと亜硫酸の溶出が早まり妨害物質の影響を受ける可能性が推測された。

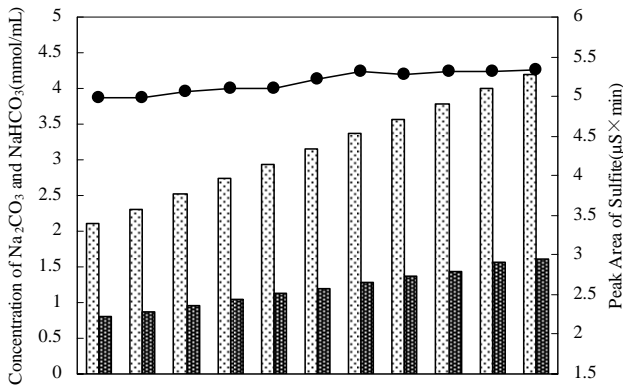


Fig. 2. Effect of Total Molar Concentration on Peak Area of Sulfite

4. 流速の検討

溶離液の比率と総モル数は測定上の大きな変動要因とは考えられなかったため、溶離液の流速について検討を行った。Fig. 4に、溶離液の流速と亜硫酸標準溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)の面積値との関係を示した。溶離液は、測定条件1と同じ比率で、総モル数を2倍としたもの(炭酸ナトリウム4.2 mmol/L, 炭酸水素ナトリウム1.6 mmol/L)とし、電流値は前述の式に従い算出した。流速を1.5 mL/min~0.7 mL/minに変化させると面積値は5.00 $\mu\text{S} \times \text{min}$ ~11.57 $\mu\text{S} \times \text{min}$ へ増加したことから、流速が感度に与える影響が大きいことが判明した。

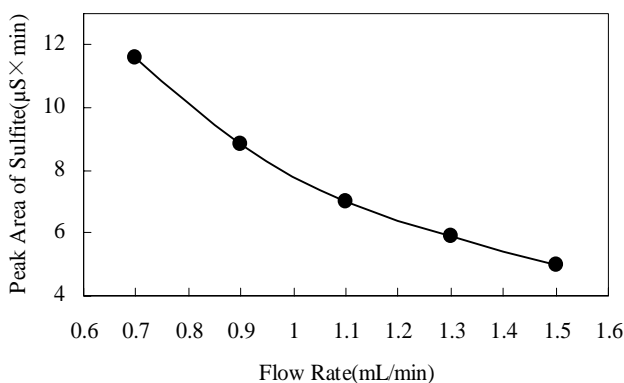


Fig. 4. Effect of Flow Rate on Peak Area of Sulfite Standard

以上のことから、電気伝導度検出器を用いた亜硫酸のIC測定条件では、流速を遅く設定することが感度を高めるために有効であると考えられた。解説²⁾では、DIONEX製カラムの流速は1.5 mL/minに設定されているが、0.7 mL/minにすると感度は上昇し、実際の測定にも支障はなかった。しかし、保持時間が約2倍になるため、溶離液の総モル数を高く

することにより保持時間を短縮する必要があると考えられた。炭酸ナトリウムと炭酸水素ナトリウムの比率は感度に大きな影響を与えないが、炭酸水素ナトリウムの比率が75%以上では保持時間が長くなり亜硫酸が溶出されない可能性があるため、通知に記載された2種類の溶離液の比率に近い値が適当であると考えられた。以上の結果を踏まえ、総モル数を2倍に、流速を1.5から0.7 mL/minに測定条件を改良した結果、通知で示される測定条件の約2倍の感度を得ることができた。Fig. 5に、改良後の測定条件を用いた亜硫酸標準溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)及び亜硫酸を含有する市販の割り箸の試験溶液のクロマトグラムを示した。これにより定量限界も0.3 $\mu\text{g/mL}$ が十分確保できた。

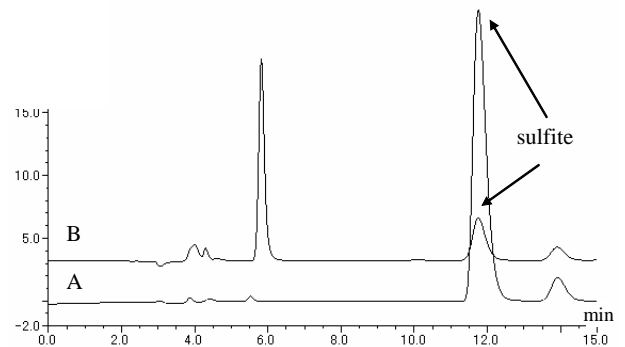


Fig. 5. Ion Chromatograms of Sulfite Standard(A) and Sample Extract(B)

Column: IonPac AS12A(4 mm i.d. \times 200 mm), Eluent: 4.2 mmol/L Na_2CO_3 -1.6 mmol/L NaHCO_3 , Electric Current: 19 mA, Flow Rate: 0.7 mL/min, Column Temperature: 35°C, Injection Volume: 25 μL

まとめ

割り箸中の亜硫酸分析における、IC測定条件の検討を行った。溶離液の炭酸ナトリウム及び炭酸水素ナトリウムの比率及び濃度は、感度に大きな影響を与えなかった。しかし、流速は感度に反比例し、妨害物質との分離に支障のない限り低流量で測定することが、低濃度の亜硫酸分析に効果的であることが分かった。

文献

- 厚生労働省医薬品局食品保健部監視安全課：割りばしに係る監視指導について、食安監発第1113001号、2007。
- 河村葉子：食品衛生研究，58，21-26，2008。
- 社団法人日本分析化学会イオンクロマトグラフィー研究懇談会編：イオンクロマトグラフィーデータブック，40-81，1991，(株)科学新聞社，東京。

Examination of Elution Solvent of Ion Chromatograph for Detection of Sulfite in Disposable Bamboo Chopsticks

Nahoko HANEISHI*, Reiko KANEKO* and Mitsuo NAKAZATO*

Elution conditions of ion chromatography(IC) for detection of sulfite in disposable bamboo chopsticks notified from ministry of health,labour and welfare was examined. The separation of sulfite was performed on a anion exchange column with a mixture of sodium carbonate and sodium bicarbonate as eluent. Ratio and concentration of sodium carbonate and sodium bicarbonate in the eluent did not influence on sensitivity but influenced on retention time. Flow rate influenced to sensitivity and retention time, in particular, low flow rate lead to high sensitivity and long retention time. After changing concentration and flow rate of eluent, detection limit of sulfite increased at 2 times.

Keywords: disposable bamboo chopsticks, sulfite, ion chromatography, eluent, sensitivity

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan