

HILICカラムを用いたLC/MSによる食品中のEDTA分析法

貞升 友紀, 新藤 哲也, 鈴木 敬子, 田中 康一, 外川 明子, 植松 洋子

Qualitative Analysis of EDTA in Foods by LC/MS Using HILIC Column

Yuki SADAMASU, Tetsuya SHINDO, Keiko SUZUKI,
Yasukazu TANAKA, Akiko TOGAWA and Yoko UEMATSU

HILICカラムを用いたLC/MSによる食品中のEDTA分析法

貞升 友紀^a, 新藤 哲也^a, 鈴木 敬子^a, 田中 康一^a, 外川 明子^a, 植松 洋子^a

酸化防止剤の1つであるエチレンジアミン四酢酸をFe³⁺でキレート型にした後、陰イオン交換固相抽出カラムで前処理し、LC/MSで分析する方法を検討した。LC条件としてHILICカラム及び移動相20 mmol/L ギ酸アンモニウム-アセトニトリル (4:6) を用いることにより、良好な分離を得ることができた。また、MS条件はキャピラリー電圧2.5 kV, コーン電圧30 Vのときにもっとも良好な感度が得られた。Fe-EDTAは分子量348であることから、SCANモード (*m/z* 50~420) による測定を行ったところ、マススペクトル上で[FeEDTA-4H]⁻ (*m/z* 344) が確認できた。

キーワード: HILICカラム, 液体クロマトグラフ/質量分析計, EDTA, Fe³⁺キレート型EDTA, 陰イオン交換固相抽出カラム

はじめに

エチレンジアミン四酢酸 (以下, EDTA と略す) は, 各種の金属イオンと結合し, キレートを形成する性質を持っている。この性質を利用して米国, EU, 中国などで酸化防止剤や変色防止剤として食品に使用されており, わが国でも酸化防止の目的に限って缶詰及び瓶詰食品に EDTA・Ca2Na 及び EDTA・2Na の使用が許可されている¹⁾。

現在, EDTAの分析には食品衛生検査指針食品添加物編 2003 (以下, 検査指針と略す)²⁾ 及び衛生試験法・注解 2010 (以下, 衛生試験法と略す)¹⁾ に記載されている HPLCによる定量法を用いているが, 確認法についての記載はない。また, 確認法としてEDTAを誘導体化後GC/MSで分析する方法³⁾が報告されているが, 操作が煩雑で誘導体化率も不安定なため, 日常検査に適用するには難点がある。

そこで, 食品中のEDTAをキレート安定度定数¹⁾の高い Fe³⁺でキレート型にし, LC/MSで分析する方法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

東京都内で購入したオレンジジュース, ツナ缶詰, ドレッシング, アスパラガス缶詰及びマヨネーズを用いた。

2. 試薬

1) EDTA 標準原液及び標準溶液

衛生試験法に従って, EDTA・2Na・2H₂O (同仁化学研究所製) を 80°C で 30 分以上乾燥し, その 110.8 mg を水で 100 mL としたものを標準原液 (EDTA・2Na 1,000 µg/mL) とした。これを適宜希釈したものを EDTA 標準溶液として用いた。

2) 0.2 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH8.5)

検査指針に従って, トリス (ヒドロキシメチル) アミノ

メタン 24.2 g を量り, 水 500 mL を加えて溶解した後, 2 mol/L 塩酸で pH8.5 に調整し, 水で 1,000 mL とした。

3) 2.5 mmol/L 塩化鉄溶液

寺田らの方法 (以下, 寺田法と略す)⁴⁾ に従って, FeCl₃・6H₂O 0.04 g を 50 mmol/L 塩酸溶液に溶解して 100 mL とした。

4) 陰イオン交換固相抽出カラム

Bond Elut® SAX jr. (Agilent Technologies 社製, 500 mg/6 cc) をあらかじめメタノール及び水各 5 mL でコンディショニングして用いた。

アセトニトリル及びメタノールはHPLC用溶媒を, その他の試薬は特級品を用いた。

3. 装置

1) 液体クロマトグラフ/質量分析計

ACQUITY UPLC/TQD (Waters 社製)

2) フォトダイオードアレイ検出器-高速液体クロマトグラフ (PDA-HPLC)

1100 システム (Agilent Technologies 社製)

4. 測定条件

1) LC 条件

カラム; Atlantis HILIC Silica (5 µm, 2.1 mm i.d.×150 mm, Waters 社製), 移動相; 20 mmol/L ギ酸アンモニウム-アセトニトリル (4:6), 流速; 0.2 mL/min, カラム温度; 40°C, 注入量; 5 µL,

ただし, PDA-HPLC の条件は流速を 1 mL/min に, 注入量を 20 µL に変更して行った。また, PDA 検出器の測定波長は 254 nm に設定した。

2) MS 条件

イオン化法; ESI (-), キャピラリー電圧; 2.5 kV, コーン電圧; 30 V, 測定モード; 定性-SCAN (*m/z* 50~420), 定量-SIR (*m/z* 344)

^a 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

5. 試験溶液の調製

均一にした試料 10.0 g に水約 30 mL を加えて 10 分間超音波抽出した後、水で 100 mL にメスアップした。これをガラス繊維ろ紙 (Whatman 社製 GF/A) でろ過した後、ろ液 5.0 mL に 2.5 mmol/L 塩化鉄溶液 1 mL を加えてよく混和し、5 分間放置した。これに 0.2 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 2 mL 及び水 2 mL を加えてよく混和した後、Bond Elut® SAX jr. に負荷した。0.01 mol/L 塩酸溶液 10 mL で洗浄した後、0.2 mol/L 塩酸溶液 10 mL で溶出した。この溶出液を沸騰水浴上で乾固し、さらに窒素気流で塩酸蒸気を除去した後、水 2.0 mL を加えてよく溶解し、孔径 0.2 µm のフィルターでろ過して試験溶液とした (Fig.1)。

なお、EDTA 標準溶液も同様に操作して用いた。

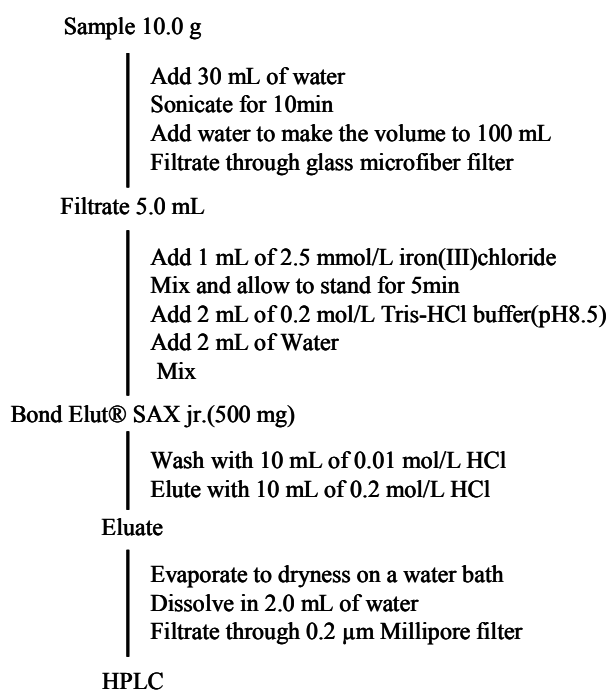


Fig. 1. Analytical Method of EDTA

結果及び考察

1. 試験溶液調製法の検討

検査指針²⁾では食品から EDTA を抽出するために透析を行っているが、この操作だけで 24 時間を要する。そこで、分析時間を短縮するために、衛生試験法¹⁾及び寺田法⁴⁾に従って直接抽出法を検討した。はじめに、試料 10.0 g に 0.10 g/kg になるように EDTA 標準溶液を添加し、よく混和した後、1 時間室温で静置した。次に水約 30 mL を加えて衛生試験法と同様に 5 分間ホモジナイズした後、水で 100 mL にメスアップした。この抽出液をろ過後、Bond Elut® SAX jr. で精製し、実験方法 4 の測定条件を用いて LC/MS で分析したところ、良好な添加回収率が得られたが、マヨネーズでは 20~30% しか得られなかった。そこで、試料 10.0 g に水約 30 mL を加えた後、寺田法に従って超音波抽出を 10 分間行ったところ、添加回収率 110%

と良好な結果が得られた。また、衛生試験法及び寺田法のいずれも抽出時にヘキサンを加えて脱脂を行っているが、脱脂操作がなくてもその後の操作に問題がなく、添加回収率にも影響がなかったことから、本法では脱脂操作は行わないことにした。さらに、寺田法では水で 100 mL にメスアップした後のろ過にガラスフィルターを用いているが、簡便なガラス繊維ろ紙を用いることにした。

次に、寺田法に従って Bond Elut® SAX jr. を用いて精製を行ったところ、測定値のばらつきがみられた。この原因として、寺田法では洗浄液に 0.02 mol/L 塩酸溶液を用いており、この塩酸溶液の濃度に一因があるのではないかと考えた。そこで、負荷液に 10 µg/mL Fe³⁺キレート型 EDTA 標準溶液、洗浄液に 0.01 mol/L 塩酸溶液を用いて検討したところ、添加回収率 75%、変動係数 3% 以上と良好な結果が得られた。洗浄液の塩酸濃度を薄くしてもその後の操作に問題がなかったことから、Bond Elut® SAX jr. の洗浄は 0.01 mol/L 塩酸溶液 10 mL で行うことにした。また、試験溶液の調製には通常移動相を用いるが、感度の低下がみられたことから水で溶解することにした。

以上の結果から、食品中の EDTA を水で超音波抽出し、ガラス繊維ろ紙でろ過した後、Fe³⁺でキレート型にしてから Bond Elut® SAX jr. で精製し、0.01 mol/L 塩酸溶液で洗浄後、0.2 mol/L 塩酸溶液で溶出し、水浴上で乾固した後、水で溶解して試験溶液の調製を行うことにした。

2. LC条件の検討

従来の HPLC 法^{1,2,4)}では ODS カラムを用いて分析を行っているが、移動相にイオンペア試薬を用いているため LC/MS に同じ条件を適用することができなかった。そこで、イオンペア試薬を使用しなくても高極性物質の保持が可能な HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) カラムに着目し、10 µg/mL Fe³⁺キレート型 EDTA 標準溶液を用いて移動相の検討を行った。

まず、HILIC カラムで通常用いられているアセトニトリル-水 (1:1) で測定したが、ピークが出現しなかったため、ギ酸アンモニウムを加えたところ、ピークを確認することができた。さらに、ギ酸アンモニウムの液性を検討したところ、pH4.0 に調整したとき、もっともピーク形状が良好となることがわかった。また、数種類の HILIC カラムを検討したところ、保持時間やピーク形状から EDTA の測定には Waters 社製の Atlantis HILIC Silica がもっとも適していることがわかった。

次に、ギ酸アンモニウム溶液とアセトニトリルの組成比の違いがピーク保持時間及び感度に及ぼす影響を検討した。有機溶媒の割合が多いとカラムへの保持が強いことから、妨害ピークとの分離をよりよくするため、ギ酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (2:8) で試みたところ、ピークを確認できなかった。そこで、実験方法 4 の測定条件を用いて PDA-HPLC で分析したところ、ピークが出現していることがわかった。この原因として MS 検出器ではアセト

ニトリルによるイオン化抑制が起こっていると推測し、アセトニトリルの割合を検討した。その結果、ギ酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (3:7) のときは約 18.8 分, (4:6) のときは約 6.5 分にピークを確認することができた。さらに、有機溶媒の割合を多くしたままアセトニトリルの量を減らすため、メタノールを加えて、ギ酸アンモニウム溶液-アセトニトリル-メタノール (2:6:2), (3:5:2), (4:4:2) で試みたところ、それぞれ約 30.3 分, 約 8.9 分, 約 4.3 分にピークが出現した。しかし、Fig.2 に示したように有機溶媒の割合が多いと良好な保持が得られる一方で感度は低下することがわかったため、感度が良好で一定の保持が得られたギ酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (4:6) を用いることにした。また、ギ酸アンモニウムの濃度を 10, 20, 30 mmol/L と変化させてその影響を調べたところ、保持時間はどの濃度でもほぼ一定であったが、感度は 20 mmol/L のときがもっとも良好であった。

以上の結果から、分析カラムには Atlantis HILIC Silica を、移動相には 20 mmol/L ギ酸アンモニウム(pH 4.0)-アセトニトリル (4:6) を用いることにした。

3. MS条件の検討

Fe-EDTA は分子量 348 であることから、SCAN (m/z 50~420) モードによる測定を行ったところ、マススペクトル上で[FeEDTA-4H]⁻ (m/z 344) が確認できた。

さらに、10 $\mu\text{g/mL}$ Fe³⁺キレート型 EDTA 標準溶液を用いて、キャピラリー電圧及びコーン電圧の検討を行った。その結果、キャピラリー電圧 2.5 kV, コーン電圧 30 V のときにもっとも良好な感度が得られた。

以上の結果から、イオン化法はESI (-), キャピラリー電圧 2.5 kV, コーン電圧 30 V, SCANモード (m/z 50~420) で測定を行うことにした。Fig. 3にFe³⁺キレート型 EDTA標準溶液 (10 $\mu\text{g/mL}$) 及びドレッシングのマスキングマトグラム (m/z 344) 及びマススペクトルをそれぞれ示した。

なお、コーン電圧を 50 V にすると、感度は約 1/4 に低下するが、マススペクトル上で[FeEDTA-4H]⁻ (m/z 344) 以外にもさらにCO₂が脱離した⁵⁾ m/z 300及び256等を確認することができた (Fig.4)。試料中のEDTA濃度が0.10 g/kg程度あればコーン電圧を 50 V にし複数のマススペクトルを確認することで、より定性の精度を向上させることができることもわかった。

4. 添加回収試験

あらかじめEDTAが検出されないことを確認したオレンジジュース、ツナ缶詰、ドレッシング、アスパラ缶詰及びマヨネーズに0.10及び0.01 g/kgになるようにEDTA標準溶液を添加し、よく混和した後、一晚冷蔵庫内で静置した。

その後、本法を適用したところ、Table に示したとおり 0.10 g/kg 添加では全ての食品で回収率92~115%, 変動係数2%以下であった。一方、0.01 g/kg添加では回収率120~

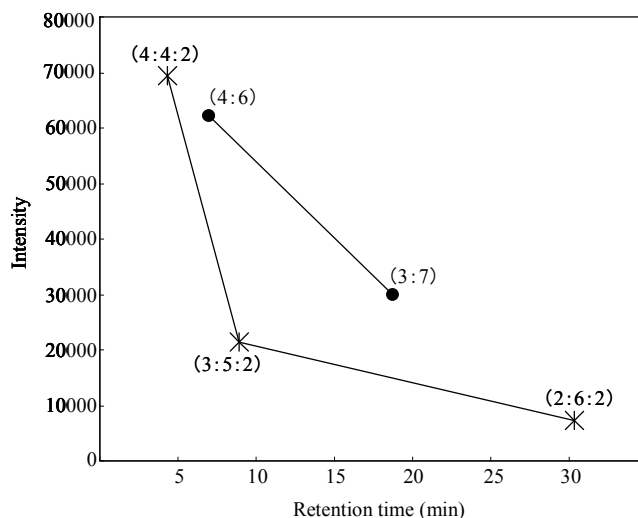


Fig. 2. Effect of Organic Solvent Content in Mobile Phase on The Sensitivity and Retention Time of Fe-EDTA in LC/MS

● : Ammonium Formate-CH₃CN (A:B)
* : Ammonium Formate-CH₃CN-CH₃OH (A:B:C)

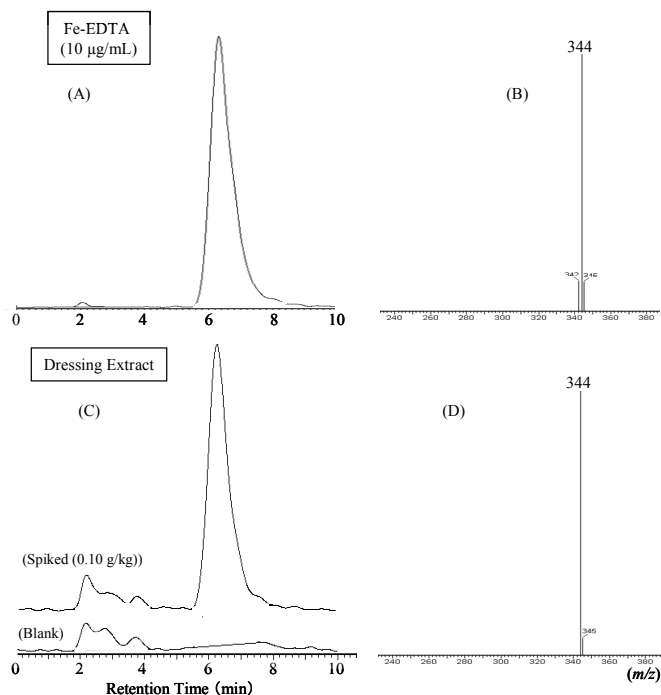


Fig. 3. LC/MS(m/z 344) Chromatograms (A,C) and Mass Spectrum (B,D)

142%, 変動係数はドレッシングで18%であったが、それ以外の食品では2%以下であった。これらの結果から、本法は定性・確認法として行政検査に十分適用できるものと考えられる。

なお、本法での検出限界は検査指針の定量下限と同様の 0.01 g/kgであった。

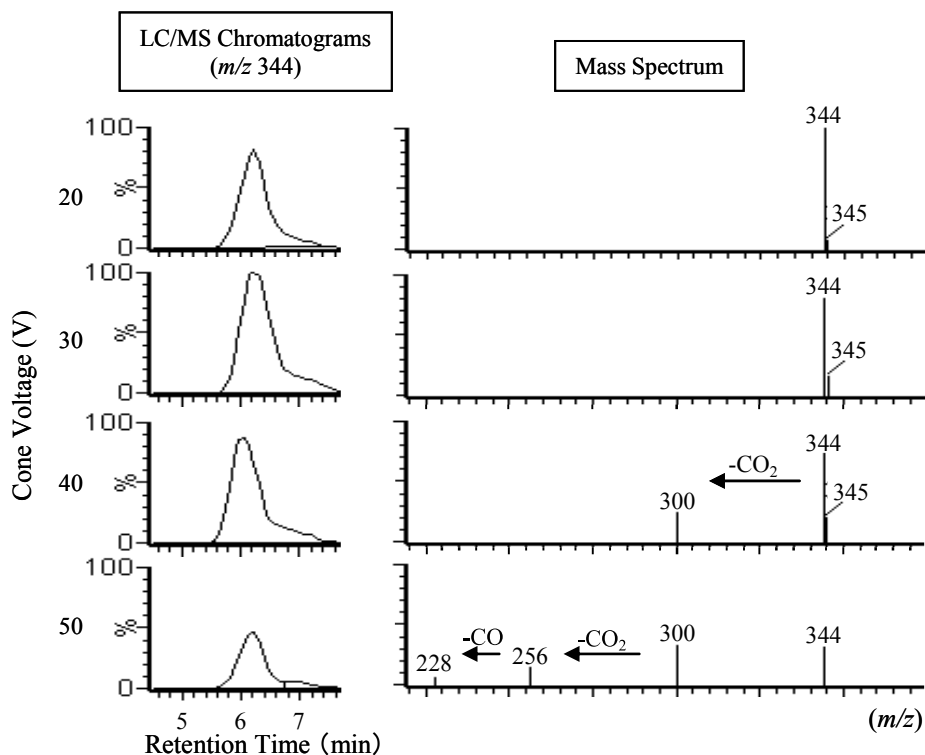


Fig. 4. Effect of Cone Voltage on The Sensitivity and Mass Spectrum of Fe-EDTA (10 µg/mL) in LC/MS

Table. Recoveries of EDTA·2Na Spiked in Foods

Sample	Spiked at 0.10 g/kg		Spiked at 0.01 g/kg	
	Recovery (%)	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
Orange juice	115	1.3	142	0.4
Canned tuna	92	1.4	127	1.2
Dressing	112	1.2	120	18
Canned asparagus	99	1.2	134	1.7
Mayonnaise	110	0.2	138	1.0

(n=3)

ま と め

酸化防止剤の1つであるエチレンジアミン四酢酸を食品から水抽出した後、Fe³⁺でキレート型にし、陰イオン交換固相抽出カラムで前処理してLC/MSで分析する方法を検討した。LC条件はHILICカラム及び移動相20 mmol/L ギ酸アンモニウム-アセトニトリル (4:6) を用いることにより、良好な分離を得ることができた。また、MS条件はキャピラリー電圧2.5 kV、コーン電圧30 Vのときにもっとも良好な感度が得られた。Fe-EDTAは分子量348であることから、SCANモードによる測定を行ったところ、マススペクトル上で[FeEDTA-4H]⁻ (m/z 344) が確認できた。

本法における添加回収率は92~115%、変動係数2%以下で、検出限界は0.01 g/kgであった。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2010, 337-338, 2010, 金原出版, 東京.
- 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, 東京.
- 3) 三原翠, 天野立爾, 近藤龍雄, 他：食衛誌, **11**, 88-92, 1970.
- 4) 寺田久屋, 田村征男：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.
- 5) J. B. Quintana and T. Reemtsma: *J. Chromatogr. A.*, **1145**, 110-117, 2007.

Qualitative Analysis of EDTA in Foods by LC/MS Using HILIC Column

Yuki SADAMASU^a, Tetsuya SHINDO^a, Keiko SUZUKI^a, Yasukazu TANAKA^a, Akiko TOGAWA^a and Yoko UEMATSU^a

A simple method for qualitative analysis of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in foods using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) was developed. EDTA in food samples was extracted with water. The extract was treated with iron (Fe) (III) chloride solution to convert various EDTA complexes to a single Fe-EDTA complex. The treated extract was cleaned up with an anion-exchange solid phase extraction column. The qualitative analysis of Fe-EDTA was performed using the scan mode (m/z 50–420) of LC/MS. The LC/MS conditions were as follows: analytical column, HILIC column; mobile phase, 20 mmol/L ammonium formate-CH₃CN (4:6); ionization mode, electrospray ionization (ESI) negative; capillary voltage, 2.5 V; cone voltage, 30 V. Fe-EDTA gave m/z 344 corresponding to [FeEDTA-4H]⁻ in the MS spectrum.

The recoveries of EDTA from 5 kinds of foods added at the level of 0.10 g/kg were in the range of 92%–115%. The detection limit was 0.01 g/kg.

Keywords: HILIC column, LC/MS, EDTA, complex of Fe³⁺ with EDTA, anion-exchange solid phase extraction column

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