

酸化防止剤

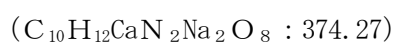
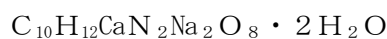
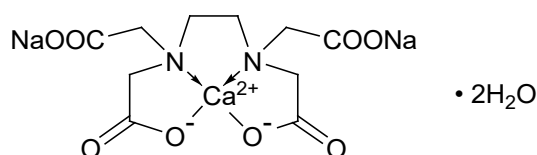
エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム

及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム

Calcium Disodium Ethylenediaminetetraacetate and  
Disodium Ethylenediaminetetraacetate

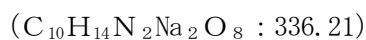
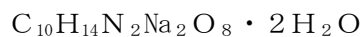
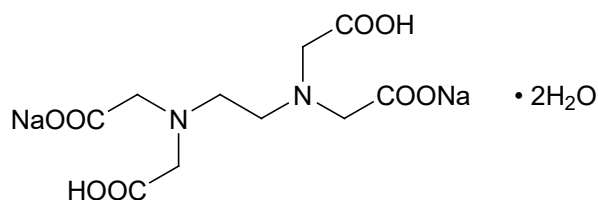
エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム

別名：EDTAカルシウム二ナトリウム



エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム

別名：EDTA二ナトリウム



### 1. 分析法の概要<sup>1)</sup>

食品中のエチレンジアミン四酢酸（EDTA）カルシウム二ナトリウム及びEDTA二ナトリウムは、トリス・塩酸緩衝液により抽出し、テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物を加えて逆相固相抽出カラムで精製した後、塩化鉄（Ⅲ）と反応させEDTA鉄ナトリウムとし、液体クロマトグラフィーにより定量する。分子量比を乗じてEDTAカルシウム二ナトリウムの量として求める。（2023年改正）

### 2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

#### （1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

## (2) 抽出液の調製

### ① 高脂質食品<sup>2)</sup>

試料約 5 g を精密に量り、50mL の遠心管に入れ、トリス・塩酸緩衝液 (0.2mol/L、pH8.5) 10mL、水 20mL 及びヘキサン 15mL を加え、10 分間超音波処理し、遠心 (5 分間、3000 回転/分) を行い、水層を 100mL のメスフラスコに入れる。残ったヘキサン層に水 25mL を加え、10 分間超音波処理した後、遠心 (5 分間、3000 回転/分) を行い、水層を先のメスフラスコに合わせる。この操作を 2 回繰り返す、分取した水層に水を加えて正確に 100mL とする。この液をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を抽出液とする。

### ② その他の食品<sup>3)</sup>

試料約 5 g を精密に量り、トリス・塩酸緩衝液 (0.2mol/L、pH8.5) 10mL 及び水約 80mL を加え、10 分間超音波処理を行い、水層を 100mL のメスフラスコに入れ、水を加えて正確に 100mL とする。この溶液をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を抽出液とする。

## (3) 試験溶液の調製

抽出液 2mL を正確にとって 10mL の試験管に入れ、0.05mol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 1mL を加えて混和し、水を加えて 10mL とする。この液全量を、逆相固相抽出カラムに負荷し、毎分 2mL の速度で流す。水 20 mL、7.5vol%メタノール 10mL、水 10mL を順次通してカラムを洗浄し、塩酸含有 30vol%メタノール 7.5mL で EDTA を溶出する。溶出液を 10mL の試験管で受け、80°C に加温しながら窒素を吹きつけて 2mL 以下になるまで濃縮する。残った溶液に塩化鉄 (III)・メタノール試液を 10 $\mu$ L 加え、よく振り混ぜた後に 5 分間放置し、水を加えて正確に 2mL とする<sup>4)</sup>。この液をメンブランフィルター (0.45 $\mu$ m) でろ過したものを試験溶液とする。

## (4) 検量線用標準溶液の調製<sup>5)</sup>

EDTA 鉄ナトリウム三水和物 114.7mg を量り、水を加えて溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする (濃度 EDTA 鉄ナトリウムとして 1000 $\mu$ g/mL)。標準原液 10mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする (濃度 100 $\mu$ g/mL)。標準溶液 0.5、1、2、5、及び 10mL を正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に 100mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度 EDTA 鉄ナトリウムとして 0.5~10 $\mu$ g/mL)。

## (5) 測定法

### ① 測定条件<sup>6)</sup>

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5 $\mu$ m)

カラム管：内径 4.6mm、長さ：150~250mm

カラム温度：40°C

移動相：5 mmol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物含有 水/メタノール/リン酸  
緩衝液 (0.2 mol/L、pH4.0) 混液 (78 : 12 : 10)

流速：0.8 mL/分

測定波長：254 nm

注入量：20 µL

## ② 検量線

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積又はピーク高さから検量線を作成する。

## ③ 定量<sup>7~9)</sup>

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、標準品で得られるピークの保持時間が一致するピーク面積又はピーク高さから検量線により EDTA 鉄ナトリウムの濃度を求め、次式によって試料中の EDTA カルシウム二ナトリウム含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{EDTAカルシウム二ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100 \times a}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中の EDTA 鉄ナトリウムの濃度 (µg/mL)

a : 1.020 (換算係数)<sup>10)</sup>

W : 試料の採取量 (g)

## ④ 定量限界 EDTA カルシウム二ナトリウムとして 0.01 g/kg

### 試薬・試液等

- EDTA 鉄ナトリウム三水和物 : エチレンジアミン-*N, N, N', N'*-四酢酸鉄 (III) ナトリウム塩三水和物 (分子量 : 421.09)
- トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン : 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3プロパンジオール [特級]
- 塩酸 : [特級]
- トリス・塩酸緩衝液 (0.2 mol/L、pH8.5) : 塩酸 180 mL を量り、水を加えて 1000 mL とし、2 mol/L 塩酸とする。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 を加えて溶かし、2 mol/L 塩酸で pH8.5 に調整した後、水を加えて 1000 mL とする。
- ヘキサミン : [特級]
- テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 : [特級]
- 0.05 mol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 : テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 1.61 g を量り、水を加えて 100 mL とする。
- 逆相固相抽出カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム (約 820 mg)。あ

らかじめメタノール 10mL、水 10mL、0.05mol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物を 10 倍希釈して調製した 5mmol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 10mL を、順次通してコンディショニングしたものを用いる。

9. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
10. 7.5vol%メタノール：メタノール 7.5mL に水を加えて 100mL とする。
11. 20%塩酸：[精密分析用] 又は市販のものを用いることができる。
12. 塩酸含有 30vol%メタノール：20%塩酸 1 mL を水で 1000mL とし、この液 1 mL に水を加えて 410mL として塩酸溶液を調製する（pH は 約 5 である）。メタノール 30mL に塩酸溶液を加えて 100mL とする。
13. 塩化鉄（Ⅲ）六水和物：[特級]
14. 塩化鉄（Ⅲ）・メタノール試液：塩化鉄（Ⅲ）六水和物 0.27 g にメタノール 2 mL を加えて溶かす（濃度 0.5mol/L）。
15. リン酸二水素カリウム：[特級]
16. リン酸：[特級]
17. リン酸緩衝液（0.2mol/L、pH4.0）：リン酸二水素カリウム 27.2 g を量り、水を加えて 1000mL とし、0.2mol/L リン酸二水素カリウム溶液とする。リン酸 23.1 g を量り、水を加えて 1000mL とし、0.2mol/L リン酸溶液とする。0.2mol/L リン酸二水素カリウム溶液に 0.2mol/L リン酸溶液を加えて pH4.0 に調整する。
18. 5 mmol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物含有 水/メタノール/リン酸緩衝液：水、メタノール及びリン酸緩衝液（0.2mol/L、pH4.0）を 78：12：10 の容量比で混合し、水/メタノール/リン酸緩衝液（0.2mol/L、pH4.0）混液（78：12：10）とする。テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 1.61 g を量り、水/メタノール/リン酸緩衝液（0.2mol/L、pH4.0）混液（78：12：10）を加えて溶かし 1000mL とする。

#### [注]

- 1) 本法は食品中の EDTA カルシウム二ナトリウムと EDTA 二ナトリウムを EDTA 鉄キレートに変換して定量する方法である<sup>文献1)</sup>。EDTA 鉄キレートを特定する必要がある場合には、参考に示す分析法を用いることができる。
- 2) マヨネーズ、油性ドレッシング等に用いる。
- 3) 清涼飲料水、野菜、果実等の缶詰、瓶詰に用いる。
- 4) 逆相固相抽出カラムからの溶出液を受ける試験管に定容可能な目盛精度を有する試験管を用いて定容するか、あるいは、塩化鉄（Ⅲ）・メタノール試液を加えてよく振り混ぜ 5 分間放置した液を、少量の水で容器を洗いながらマイクロメスフラスコ(台付メスフラスコ)に移し、水を加えて定容する。
- 5) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。

6) 測定条件は例示である。分析の際はEDTAのピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。

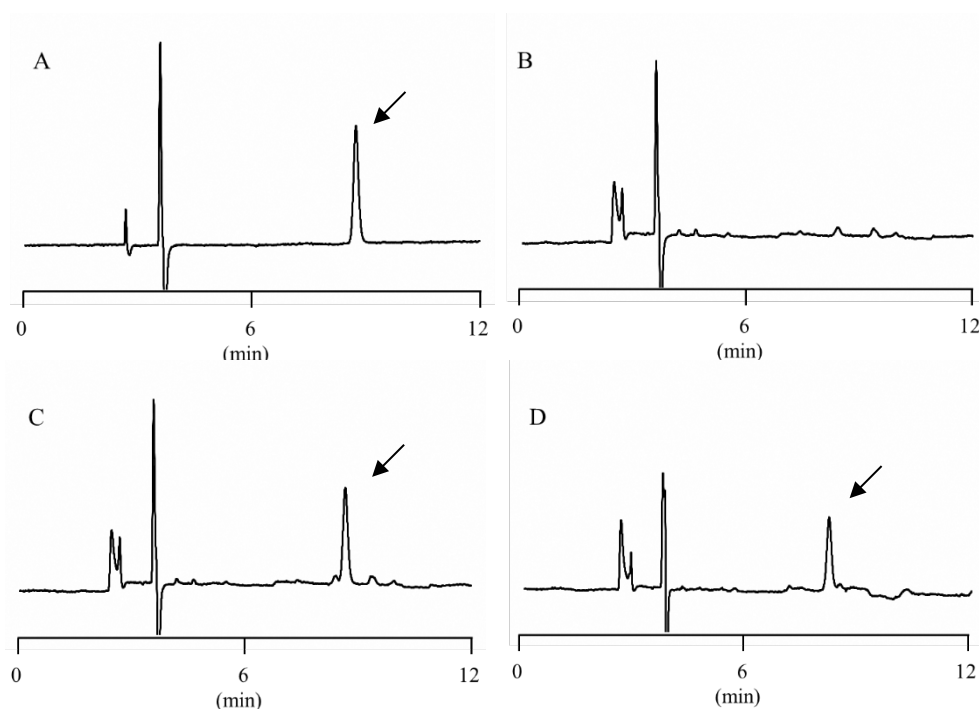
7) 添加回収試験の結果を注表1に、標準品とマヨネーズの液体クロマトグラムを注図1に示す。

注表1 EDTA塩類の各種食品での添加回収率

試料	試料量 (g)	添加量 * <sup>1</sup> (g/kg)	EDTAカルシウム 二ナトリウム		EDTA 二ナトリウム	
			回収率 (%) * <sup>2</sup>	相対標準偏差 (%)	回収率 (%) * <sup>2</sup>	相対標準偏差 (%)
マヨネーズ	5	0.02	82	1.8	73	5.9
		0.25	91	1.9	84	4.7
まぐろ油漬け 缶詰	5	0.02	73	0.5	71	7.4
		0.25	83	4.5	86	2.2

\*<sup>1</sup>EDTAカルシウム二ナトリウムとして、\*<sup>2</sup>5試行の平均値

(ただし、逆相固相抽出カラムへの負荷液量及び溶出後の最終定容量を2.5mLで実施した。)



A : 標準溶液 EDTA鉄ナトリウム 1 μg/mL

B : マヨネーズ ブランク

C : マヨネーズにEDTAカルシウム二ナトリウム 0.02 g/kg 添加

D : マヨネーズにEDTA二ナトリウム 0.018 g/kg 添加 (EDTAカルシウム二ナトリウムとして 0.02 g/kg 相当)

注図1 標準品とマヨネーズの液体クロマトグラム (EDTA鉄キレートとして測定)

注図1の測定条件を以下に示す。

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 $\mu$ m）

カラム管：内径4.6mm、長さ250mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

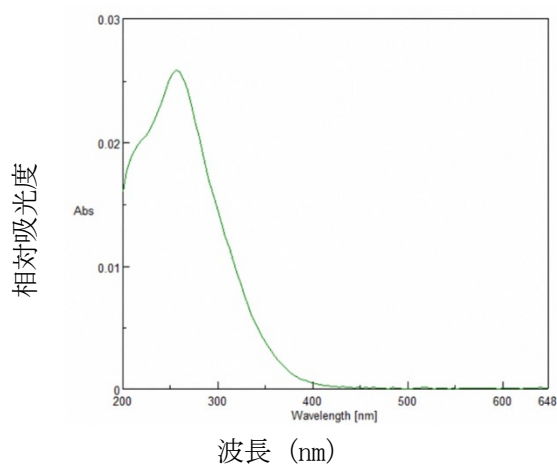
流速：0.8mL/分

測定波長：254nm

注入量：20 $\mu$ L

移動相：水/メタノール/0.2mol/Lリン酸緩衝液（pH4.0）混液（78：12：10）に、テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物を5mmol/Lとなるように溶解する。

8) EDTA鉄ナトリウムのUVスペクトルを注図2に示す。



注図2 EDTA鉄ナトリウム（10 $\mu$ g/mL）のUVスペクトル

9) フォトダイオードアレイ検出器を用いて検出されたピークについてUVスペクトルにより確認し、疑義がある場合には、確認分析法を行う。

10) 換算係数=374.27（EDTAカルシウム二ナトリウム（無水物）の分子量） $\div$ 367.05（EDTA鉄ナトリウム（無水物）の分子量）=1.020

[文献]

1) 関戸晴子ら：神奈川県衛生研究所研究報告、**46**、27、(2016)

## 参考

### エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及び エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム確認分析法

#### 1. 分析法の概要

食品中のエチレンジアミン四酢酸（EDTA）カルシウム二ナトリウム及びEDTA二ナトリウムを、EDTA鉄ナトリウムとし、液体クロマトグラフィー質量分析又は液体クロマトグラフィータンデム型質量分析により確認を行う。（2023年設定）

#### 2. 分析法<sup>1)</sup>（液体クロマトグラフィー質量分析又は液体クロマトグラフィータンデム型質量分析）

##### （1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

##### （2）試験溶液の調製

エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム分析法（2）抽出液の調製及び（3）試験溶液の調製を準用する。ただし、試験溶液は、必要に応じて適宜希釈して用いる。

##### （3）標準溶液の調製

エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム分析法（4）検量線用標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度の標準溶液を調製する。

##### （4）測定法

###### ① 測定条件

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）又は液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用い、次の条件によって測定する<sup>1)</sup>。

カラム充填剤<sup>文献1)</sup>：親水性相互作用クロマトグラフィー用シリカゲル

カラム管：内径2.0～2.1mm、長さ100～150mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル／20mmol/Lギ酸アンモニウム溶液（pH3.0）混液（75：25）

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI（-）

検出法：①LC-MS 選択イオンモニタリング（SIM）

②LC-MS/MS 選択反応モニタリング（SRM）

主なイオン<sup>2)</sup>：①LC-MS  $m/z$  344

- ② LC-MS/MS プリカーサーイオン： $m/z$  344、  
プロダクトイオン： $m/z$  300

注入量：5  $\mu$ L

② 定性<sup>3~5)</sup>

試験溶液及び標準溶液を LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されることを確認する。

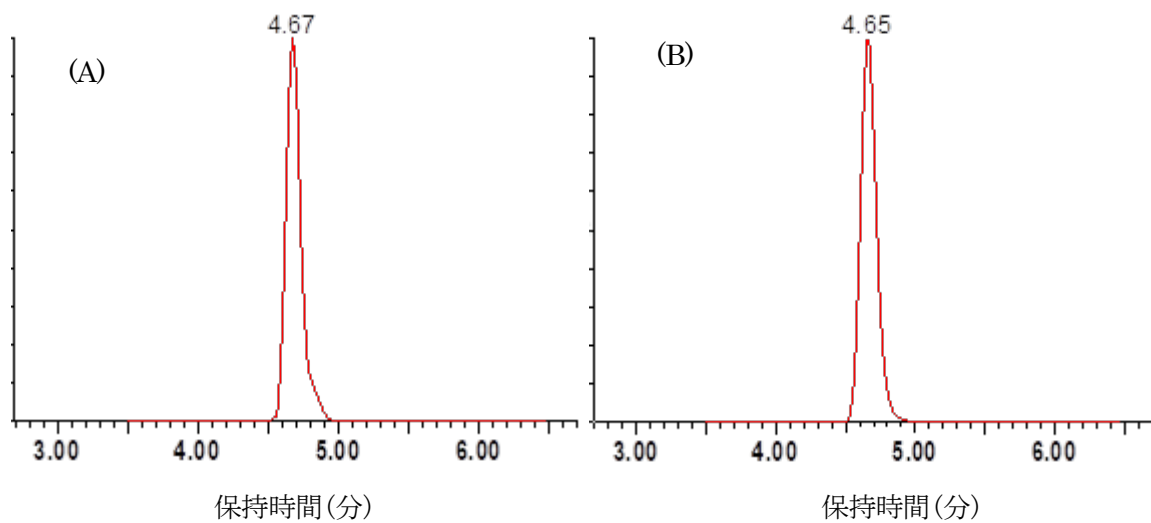
試薬・試液等

1. ギ酸アンモニウム：[特級]
2. ギ酸：[98%、特級]
3. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフ用]
4. アセトニトリル/20mmol/L ギ酸アンモニウム (pH 3.0) 混液 (75:25)：ギ酸アンモニウム 0.63 g を量り、水で 500mL とし、ギ酸で pH3.0 に調整して 20mmol/L ギ酸アンモニウム (pH 3.0) とする。アセトニトリルと 20mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH3.0) を 25:75 の比率で混合し、0.2 $\mu$ m のフィルターでろ過する。

[注]

- 1) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量などを調整する。また、その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 2) [Fe(III)EDTA-4H]<sup>-</sup>： $m/z$  344
- 3) LC-MS 又は LC-MS/MS を用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑成分等により妨害ピークの影響を受ける場合があるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークの検出感度やマススペクトルの変化について確認する。
- 4) スキャン測定により、[Fe(III)EDTA-4H]<sup>-</sup>： $m/z$  344 を確認することができる。バックグラウンドが高い場合は補正する。
- 5) EDTA のマスクロマトグラムを注図 1 に示す。





(A) EDTA鉄ナトリウム 0.5 $\mu$ g/mL

(B) ミックスジュース試験溶液にEDTAカルシウム二ナトリウムとして  
0.01 g/kg となるようにEDTA鉄ナトリウムを添加した液

<測定条件>

カラム充填剤：親水性相互作用クロマトグラフィー用シリカゲル（粒径 5  $\mu$ m）

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm      カラム温度：40 $^{\circ}$ C      流速：0.2mL/分

移動相：アセトニトリル/20mmol/L ギ酸アンモニウム溶液（pH3.0）混液（75：25）

イオン化モード：ESI（-）      検出法：選択反応モニタリング（SRM）

主なイオン：プリカーサーイオン  $m/z$  344、プロダクトイオン  $m/z$  300

注入量：5  $\mu$ L

注図1 EDTAのマスキロマトグラム（SRM）

[文献]

- 1) 貞升友紀ら：東京健安研セ年報、62、133（2011）