

高速液体クロマトグラフィーによる 食品中臭素酸カリウムの分析法

毛利 孝明・西岡 千鶴・石川 英樹・黒田 弘之

Determination of Potassium Bromate in Foods by High Performance Liquid Chromatography

Takaaki Mōri, Chizuru Nishioka, Hideki Ishikawa and Hiroyuki Kuroda
(Kagawa Prefectural Institute of Public Health: 17-28, Matsushimacho 1-chome, Takamatsu)

A method was developed for the determination of bromate in bread and fish paste products by high performance liquid chromatography(HPLC) with a post-column derivatization method. It is based on the formation of triiodide ion by the reaction of bromate and iodide.

Bromate was extracted with water from samples. The extract was cleaned up by the use of Bond Elut SAX column(perchlorate form) with 0.04M sodium perchlorate solution (pH 3.5, perchloric acid) as an eluent. Bromate was separated on a column packed with Zorbax SAX by using 0.04M sodium perchlorate solution (pH 3.5, perchloric acid) as a mobile phase with detection at 350nm.

The calibration curve was linear in the range from 2.5ng to 50ng. The recoveries were 79.0~87.3% from bread and 75.6~81.3% from fish paste products. The detection limit was 0.05ppm.

I 緒 言

臭素酸カリウムは、品質改良剤として小麦粉及び魚肉ねり製品に使用が認められていたが、ラットに発ガン性を有することが明らかになったため、使用基準が改められ、最終食品の完成前に分解または除去することという制限の下にパンのみに使用が認められることになった。

このため、従来の滴定法にかわって残存量をより低濃度まで正確に分析できる分析法が必要になっており、すでに、イオンクロマトグラフィー¹⁾、薄層クロマトグラフィー-デンシトメトリー²⁾、比色法³⁾、ECD-ガスクロマトグラフィー⁴⁾による方法が報告されているが、高価な機器の使用、操作の繁雑さ、感度不足、共存成分による妨害等の問題があり十分とはいえない。

我々は、Bond Elut SAX⁴⁾を用いてクリーンアップ後、検出感度及び選択性を高めるため、ポストカラム反応を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の適用を試みた。すなわち、臭素酸イオンとヨウ化カリウムを反応させ、生成する三ヨウ化物イオンを350 nmで測定したところ、良好な結果が得られたので報告する。

II 実験方法

1. 試 料

パンは市販の食パンを用いた。

魚肉ねり製品は、市販の焼ちくわ、ちくわ、かまぼこ、揚げかまぼこを用いた。

2. 試 薬

臭素酸イオン標準溶液：臭素酸カリウム(試薬特級)130.5 mgを精秤し、水に溶かして100 mlとしたもの(本液1 mlは臭素酸イオンとして1,000 μgを含む)を用時適宜希釈して用いた。

0.04 M過塩素酸ナトリウム溶液：過塩素酸ナトリウム(試薬特級)5.62 gを水に溶かして1,000 mlとし、過塩素酸でpHを3.5に調整した。

ヨウ化カリウム溶液：ヨウ化カリウム(試薬特級)5 g及びモリブデン酸アンモニウム(試薬特級)0.1 gを水500 mlに溶かし、過塩素酸でpHを2.0に調整した。この溶液は、用時調製した。

アセトン：和光純薬特級を用いた。

銀カラム：Amberlite CG-120を褐色カラムに充

III 結果及び考察

1. 臭素酸イオンの分離

本法ではHPLCのカラムに交換容量の比較的大きなものをを用いているため塩素イオンの影響をあまり受けず、食品からの抽出液を直接HPLCに供しても分析は可能であった(検出限界0.5 μ g)が、カラムの劣化を防ぎ検出限界を向上させるためにクリーンアップを行った。永山らのDEAE-Sephadex A-25を用いる方法²⁾及び日高らのAmberlite IRA-47を用いる方法³⁾は塩濃度やpHの高い溶出液を使用しており、HPLCのための前処理としては不適当であるため、化学結合型シリカゲルを充てんしたミニカラムBond Elut SAXを用いて検討を行った。Bond Elut SAXの交換容量は約0.6meq/gであり、食品からの抽出液を負荷した場合、多量に含まれる塩素イオンのためにこの容量を超えてしまうため、銀カラムによって塩素イオンを除去した。銀カラムの目づまりを避けるため、あらかじめアセトンによる除タンパクを行った。食パンに臭素酸イオンを1 μ gの濃度になるように添加し、実験方法4に従ってBond Elut SAXに負荷し、0.04M過塩素酸ナトリウム溶液で溶出させた場合の溶出パターンをFig. 1. に示した。

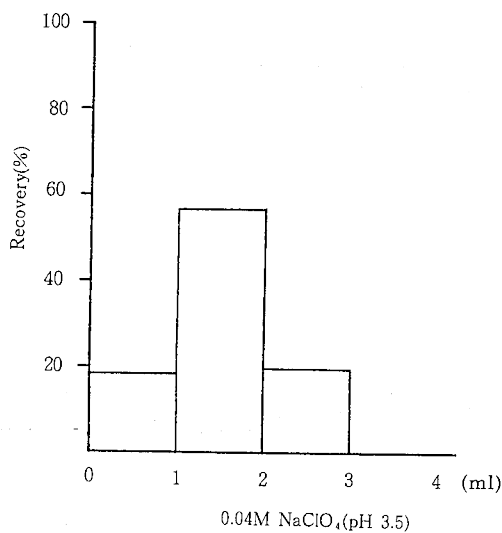


Fig. 1. Elution pattern of bromate from Bond Elut SAX(CIO₃⁻ form), 0.5g

臭素酸イオンは3mlで完全に溶出した。Bond Elut SAXを用いたクリーンアップによって、カラム劣化の原因となる高分子及びポストカラム反応の際妨害となる銀イオンを除去することができ、同時に臭素酸イオンの分離及び濃縮が可能であった。Bond Elut SAXは、焼

きちくわを処理した場合を除き、使用后0.04M過塩素酸ナトリウム溶液及び水で洗浄することにより、くり返し使用することができた。なお、Bond Elut SAXからの溶出は注射器による加圧方式で行った。

2. HPLC 測定条件の検討

カラムは、Zipax SAX及びZorbax SAXについて検討した結果、理論段数が高く食品成分との分離が良好なZorbax SAXを使用した。移動相として、ポストカラム反応時のpH調整が容易で紫外部吸収のない過塩素酸ナトリウム溶液を用いた。過塩素酸でpHを調整した0.04M過塩素酸ナトリウム溶液を用いて検討した結果、pH 4以上では、チクワ及びパンにおいて臭素酸イオンと同じ位置に妨害ピークが出現したため、pHを3.5としたところ臭素酸イオンと妨害ピークは分離したのでこれを移動相とした。

三ヨウ化物イオンの紫外部吸収スペクトルはFig. 2. に示したように、288 nm及び350 nmの2つの吸収極大を持っているが、ノイズの少ない350 nmを測定波長とした。

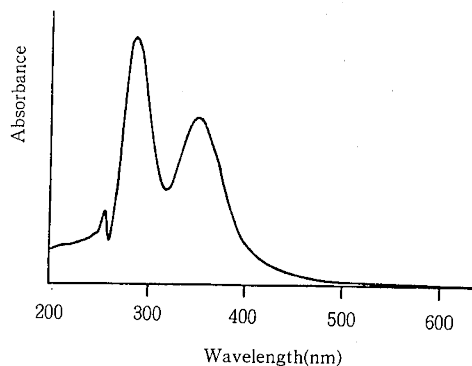


Fig. 2. Absorption spectrum of triiodide ion (I₃⁻)

3. ポストカラム反応条件の検討

臭素酸イオンは、室温ではpH1付近で過剰のヨウ化カリウムとすみやかに反応し三ヨウ化物イオンを生成する。この反応は滴定法の原理として用いられており、反応速度も速くポストカラム反応として利用可能と思われたので検討を行った。本研究では、反応コイルにステンレスを使用したため、pHは2を下限とし、温度を上げ、反応促進剤としてモリブデン酸アンモニウムを添加して反応させることとした。反応速度に影響を与える変数は多数あり最適条件を決めるのは困難であるが、温度、反応試薬の流量、モリブデン酸アンモニウムの濃度、ヨウ化カリウムの濃度及びpHの五つの変数を固定し他の一つの変数を変化させることによって条件を検討した。

1) 温 度

反応槽の温度とピーク高の関係を Fig. 3 に示した。臭素酸イオンのピーク高は温度上昇と共に増加し 120℃ 以上で一定になったので、温度は 120℃ とした。一方、亜塩素酸イオンのピーク高は温度上昇と共に減少した。

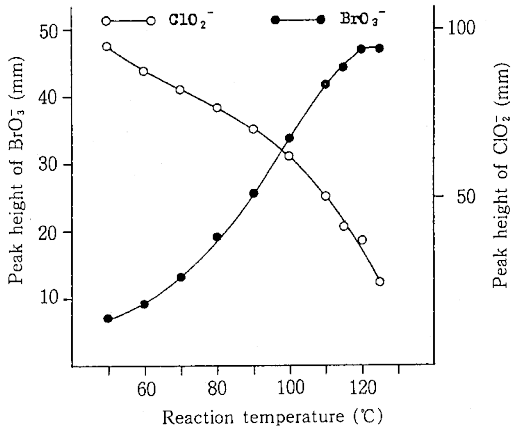


Fig. 3. Effect of reaction temperature on the detection of bromate(20ng) and chlorite(200ng)

reaction reagent flow rate 1.2ml/min
 (NH₄)₆ Mo₇ O₂₄ · 4H₂O concentration 0.02%
 KI concentration 1%
 reaction reagent pH 2.0

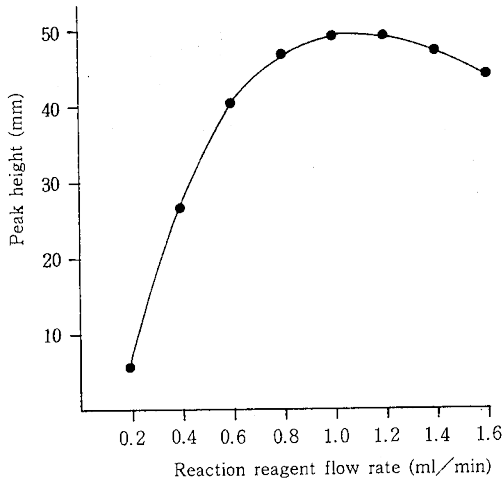


Fig. 4. Effect of reaction reagent flow rate on the detection of bromate(20ng)

reaction temperature 120°C
 (NH₄)₆ Mo₇ O₂₄ · 4H₂O concentration 0.02%
 KI concentration 1%
 reaction reagent pH 2.0

2) 反応試薬の流量

反応試薬の流量とピーク高の関係を Fig. 4 に示した。流量 1.0 及び 1.2 ml/min でピーク高は最高となったので、流量は 1.2 ml/min とした。

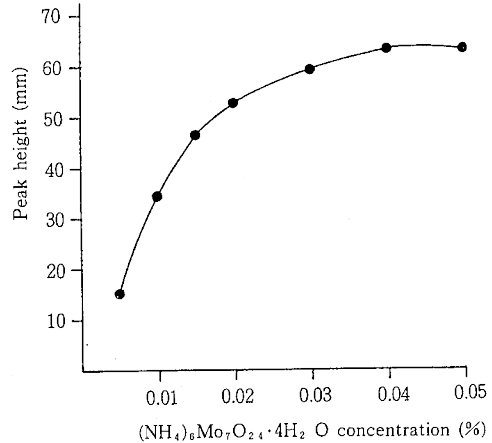


Fig. 5. Effect of (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O concentration on the detection of bromate(20ng)

reaction temperature 120°C
 reaction reagent flow rate 1.2 ml/min
 KI concentration 1%
 reaction reagent pH 2.0

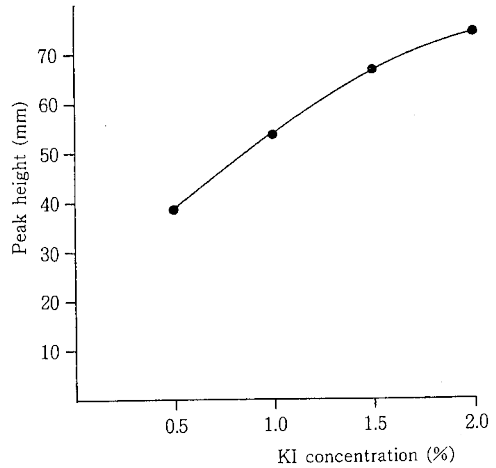


Fig. 6. Effect of KI concentration on the detection of bromate(20ng)

reaction temperature 120°C
 reaction reagent flow rate 1.2 ml/min
 (NH₄)₆ Mo₇ O₂₄ · 4H₂O concentration 0.02%
 reaction reagent pH 2.0

3) モリブデン酸アンモニウムの濃度

モリブデン酸アンモニウムの濃度とピーク高の関係を Fig. 5 に示した。濃度の増加と共にピーク高は増加し、0.04% 以上ではほぼ一定となったが、ノイズも共に大きくなるため濃度を 0.02% とした。

4) ヨウ化カリウムの濃度

ヨウ化カリウムの濃度とピーク高の関係を Fig. 6 に示した。濃度の増加と共にピーク高は増加するが、ノイズも共に大きくなるため濃度を 1% とした。

5) pH

反応試薬の pH とピーク高の関係を Fig. 7 に示した。pH の減少と共にピーク高は増加したが、反応コイルにステンレスを使用しているため、pH を 2.0 とした。

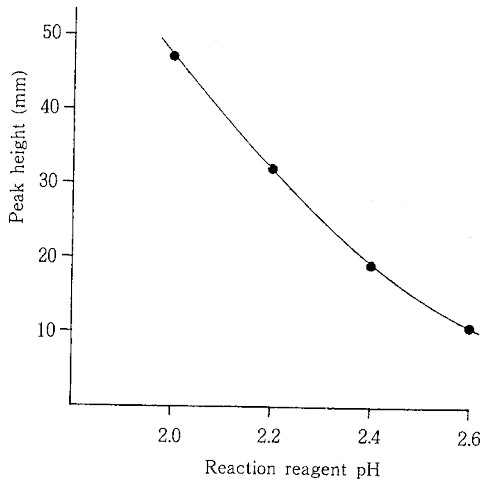


Fig.7. Effect of reaction reagent pH on the detection of bromate(20ng)

reaction temperature 120°C
 reaction reagent flow rate 1.2 ml/min
 (NH₄)₆ Mo₇ O₂₄ · 4H₂O concentration 0.02%
 KI concentration 1%

このポストカラム反応により、臭素酸イオン、ヨウ素酸イオン、亜塩素酸イオンの検出が可能であった。このクロマトグラムを Fig. 8 に示した。次亜塩素酸イオンはカラム中で分解するため、また、塩素酸イオンは反応速度が非常に遅く、ピークは検出されなかった。小麦粉等改良剤の過硫酸アンモニウム及び過酸化ベンゾイルのピークも検出されなかった。

4. 再現性

1冊の臭素酸標準溶液 50 μl を HPLC に注入し 5 回繰り返し測定したところ、Table 3 に示したように変動係数 0.51% と良好な再現性を示した。

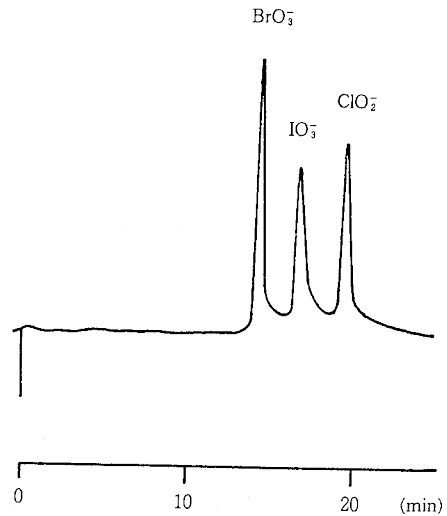


Fig.8. Liquid chromatogram of bromate, iodate and chlorite

Table 3. Reproducibility of Peak Height of Standard Bromate by HPLC

No	Peak height (cm) BrO ₃ ⁻ 50 ng
1	14.50
2	14.65
3	14.48
4	14.54
5	14.43
\bar{x}	14.52
σ	0.074
C.V.(%)	0.51

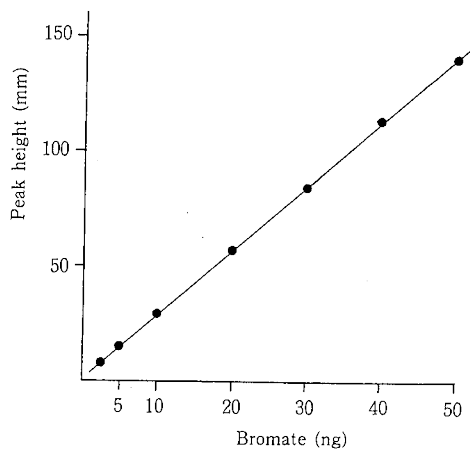


Fig.9. Calibration curve of bromate

5. 検量線

0.05～1.0 ppmの臭素酸イオン標準溶液 50 μl をHPLCに注入し、ピーク高により検量線を作成した。Fig. 9に示したように、臭素酸イオンとして2.5～50 ng の範囲で原点を通る直線となる。

6. 添加回収実験

食パン及び焼きちくわに臭素酸イオンを1.0及び0.2 ppmの濃度になるように添加し、本法に従って添加回収率を求めた。その結果はTable 4に示したように、食パンで79.0～87.3%、焼きちくわで75.6～81.3%であった。本法による検出限界は0.05 ppmであった。

Table 4. Recovery of Bromate from Bread and Fish Paste Products

Sample	Bromate added (ppm)	Recovery (%)			Mean (%)
Bread	1.0	85	88	89	87.3
	0.2	77	78	82	79.0
Yaki - chikuwa	1.0	85	82	77	81.3
	0.2	71	78	78	75.6

Table 5. Concentrations of Bromate in Bread and Fish Paste Products

No.	Sample	Bromate (ppm)	No.	Sample	Bromate (ppm)
1	Bread	ND*	11	Yaki - chikuwa	0.28
2	Bread	ND	12	Yaki - chikuwa	ND*
3	Bread	ND	13	Yaki - chikuwa	ND
4	Bread	ND	14	Chikuwa	ND
5	Bread	ND	15	Chikuwa	ND
6	Bread	ND	16	Kamaboko	ND
7	Bread	ND	17	Kamaboko	ND
8	Bread	ND	18	Kamaboko	ND
9	Bread	ND	19	Fried Kamaboko	ND
10	Bread	ND	20	Fried Kamaboko	ND

ND* < 0.05 ppm

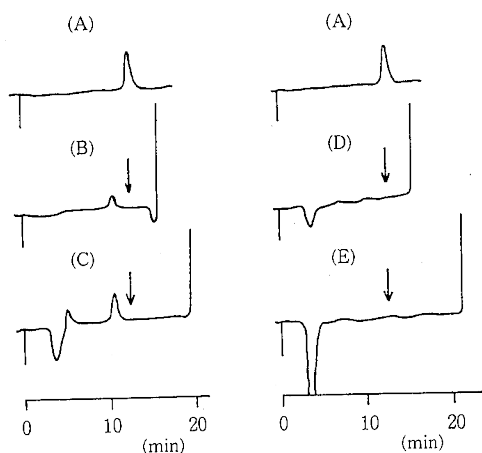


Fig.10. Liquid chromatograms of bread extract and fish paste products extracts (A) bromate (B) bread (C) chikuwa (D) kamaboko (E) fried kamaboko

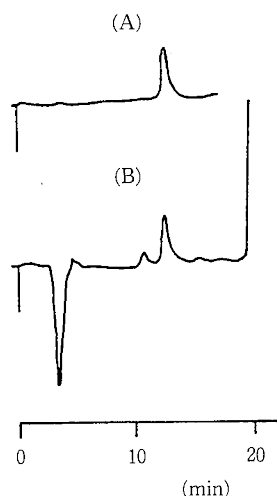


Fig.11. Liquid chromatogram of yaki-chikuwa extract (A) bromate (B) yaki-chikuwa

7. 市販食品の分析結果

本法を用いて市販の食パン10検体及び魚肉ねり製品10検体を分析した結果を Table 5 に示した。Fig. 10 に代表的なクロマトグラムを示した。どの検体でも、保持時間約22分の位置に大きなピークが出現したが、その場合、反応試薬の送液を止め移動相の流量を大きくすることによって迅速な分析が可能であった。

臭素酸イオンは食パンでは検出されなかったが、魚肉ねり製品では、焼きちくわ1検体から0.28 μmol の臭素酸イオンが検出された。このクロマトグラムを Fig. 11 に示した。この検体にECD-GC法⁴⁾を適用したところ、本法と同じ値(0.28 μmol) が得られた。

IV ま と め

1) 前処理に Bond Elut SAX を用いることにより、臭素酸イオンの迅速、簡便な分離、精製及び濃縮が可能であった。

2) 臭素酸イオンとヨウ化カリウムを反応させ、生成する三ヨウ化物イオンを検出するポストカラム反応を用いたHPLCにより、臭素酸イオンの高感度かつ選択性の高い分析法を確立した。本法による検出限界は0.05 μmol であった。

3) 本法を用いて添加回収実験を行った結果、食パンで79.0~87.3%、焼きちくわで75.6~81.3%の回収率

が得られた。

4) 本法を用いて食パン10検体及び魚肉ねり製品10検体を分析した結果、臭素酸イオンは食パンでは検出されなかったが、魚肉ねり製品のうち焼きちくわ1検体から0.28 μmol 検出された。

以上の結果より、本法はパン及び魚肉ねり製品中の臭素酸カリウムの試験法として、十分適用できるものと思われる。また、本法により亜塩素酸ナトリウムの分析も可能である。

なお、本研究の要旨は、日本食品衛生学会第47回学術講演会(1984年5月、東京)において発表した。

文 献

- 1) 渡辺功, 田中涼一, 榎本隆: 食衛誌. 23, 135~141 (1982).
- 2) 永山敏廣, 西島基広, 上村尚, 安田和男, 斉藤和夫, 井部明広, 牛山博文, 直井家壽太: 同上. 23, 253~258 (1982).
- 3) 日高利夫, 桐ヶ谷忠司, 上條昌弥, 鈴木幸夫, 河村太郎: 同上. 24, 376~382 (1983).
- 4) 小山田則孝, 久保田かほる, 上野清一, 石崎睦雄: 同上. 24, 563~568 (1983).
- 5) 厚生省食品化学課: 食品衛生研究28, 11~14 (1978).