

学位論文の内容の要旨

横田 あずさ 印

Sensitive and simple determination of bromate in foods disinfected with hypochlorite reagents using high performance liquid chromatography with post-column derivatization

(次亜塩素酸により殺菌処理を施された食品中に残留する臭素酸のポストカラム誘導体化 HPLC による高感度定量法の開発)

(目的)

臭素酸は国際がん研究機関 (IARC) においてグループ 2B (発がん性が疑われる) に分類されている。この物質は、次亜塩素酸ナトリウム溶液製造工程中、副生成物として生成される。次亜塩素酸ナトリウムは、水道水をはじめ、生鮮食品の殺菌消毒にも利用されている。水道水においては、臭素酸の残留量が 10 ng/mL 以下と規定されているのに対し、食品に対してはこのような規制値は設けられていない。

臭素酸の分析法は、イオンクロマトグラフィー (IC) -ポストカラム誘導体化法 (三臭素イオン法) ならびに逆相クロマトグラフィー-ポストカラム誘導体化法

(*o*-dianisidine 法) が報告されている。ただし、*o*-dianisidine は発がん性を有することが知られている。しかし、これらの方法を生鮮食品に応用するためには、多段階に渡る前処理法を必要とし、臭素酸の回収率が著しく低く、定量が困難である。そこで本研究では、生鮮食品に対して応用可能で、より簡便かつ安全な臭素酸分析法の開発を行なうことを目的とした。

(方法)

臭素酸の定量は、分離カラムに強陰イオン交換樹脂を用い、検出にはテトラメチルベンジジン (TMBz) との反応による可視分光光度法を用いたポストカラム誘導体化法により行なった。生鮮食材は、細かく裁断し水に懸濁した後、ポリトロンによりホモジナイズした。ホモジネート 50 mL を 5000 xg で 15 分間遠心分離し、その上清 15 mL を Amicon Ultra-15 により限外濾過 (5000 xg, 90 分間, 4°C) した。その濾液 10 mL をムロマック 1 x 8 (ムロマチテクノス株、5 mm i.d. x 6 mm) による固相抽出に供し、得られた画分を HPLC に供した。

(結果および考察)

食品中臭素酸の分析を行なうには、多種の夾雑マトリックスから分離分析するために、再現性および汎用性のあるポストカラム誘導体化 HPLC 法が有用である。これまで報告されているポストカラム誘導体化 HPLC 法としては、三臭素イオン法ならびに *o*-dianisidine 法が報告されている。前者は紫外部吸光光度法を用いる手法であり、環境水中臭素酸分析に用いられている。一方、後者は可視部吸光光度法を用いる手法であり、パン中に含まれる臭素酸の測定法として開発され、現在、感度の面でも優れた方法とされている (定量下限 2 ng/mL)。しかしながら、*o*-dianisidine は発がん

ん性の疑いのある試薬であり、試験者の安全性の観点からその利用が問題視されている。また、いずれの方法においても、食品中の臭素酸の分析への適用に複雑な前処理等が必要になり、困難が予想された。

まず、HPLC 検出系については、食品への適用を考慮し、比較的選択的に検出できる可視分光光度法を用いることにした。そこで、発がん性の疑いのある *o*-dianisidine の代替試薬として ELISA における検出系として汎用され、安全性の面で問題の無い TMBz について検討した。その結果、250 mg/L TMBz および 10 g/L KBr を含む 0.15 mol/L 硫酸溶液を反応溶液とし、試料溶液と反応溶液を 2:1 で混和し、80 °C で 2 分間加温することで、臭素酸を高感度検出することを可能とした。

次いで、HPLC 分離系については、前処理との関連を考慮しなくてはならない。近年、無機系陰イオンの分離は低イオン交換容量の IC 用カラム が一般的に用いられている。この理由は電気伝導度検出器を用いることで複数のイオンを一斉分析可能な IC が広く普及したためと考えられる。IC では、溶離液並びに試料溶液中の陰イオン濃度は極力低くする必要がある。この条件のため、夾雑物質を多く含む食品への IC の適用を困難なものにしている。そこで、本研究では、高塩濃度の溶離液を用いることが可能なイオン交換クロマトグラフィーによる分離系について検討した。その結果、東ソー社製陰イオン交換樹脂である TSKgel SAX (粒径 5 μ m, 交換容量 1.0 eq/L, 内径 4.6 mm, 長さ 50 mm) を用い、溶離液に 0.3 mol/L 塩化ナトリウム水溶液を用いることで、臭素酸イオンを 10 分以内で分離検出することを可能とした。

以上の検討結果より、TMBz を検出試薬とするポストカラム誘導体化 HPLC 法を構築した。臭素酸イオンを 0.3 mol/L 塩化ナトリウム溶液に希釈して標準溶液を調製し、試料容量を 200 μ L として検量線を作成したところ、臭素酸として 2 ng/mL まで良好な直線性 ($R^2=1.000$) が得られ、検出限界は 0.6 ng/mL ($S/N=5$) であった。

食品の前処理として、クリーンアップと濃縮のために陰イオン交換樹脂を用いた固相抽出が必須である。そこで、比較的イオン交換容量が大きい高純度 AG イオン交換樹脂ムロマック 1x8, 200-400 mesh (ダウ・ケミカル社製 Dowex 1x8 に相当) を用いた前処理法について検討した。その結果、カラムサイズを内径 5 mm、長さを 6-7 mm とし、溶出液を 0.3 mol/L 塩化ナトリウム水溶液とすることで、臭素酸イオン含む溶出画分を 1 ml とすることができた。さらに、キャベツ、鶏肉および小アジの 10% ホモジネートに対して添加回収実験を行なった。固相抽出に先立ち、ホモジネートの限外濾過を行なったところ、限外濾過による臭素酸イオンの消失は認められなかった。添加濃度を 0.2 ng/mL (食品グラム当たり 2 ng に相当) とし、限外濾過後、濾液 10 mL を固相抽出に供したところ、回収率は 82.9-90.7% であった。本前処理操作を用いたポストカラム誘導体化 HPLC 法により、食品中の臭素酸イオンを定量下限 2 ng/g 湿重量で測定することが可能となった。本法は、生鮮食材中臭素酸イオンの分析を可能とせしめた世界で最初の方法である。