

高速液体クロマトグラフィーを用いたフェロシアン化物中の フェリシアン化塩試験法の検討

建部千絵[#], 久保田浩樹, 大槻崇, 多田敦子, 河村葉子, 穂山浩, 佐藤恭子

Study on the determination of ferricyanide in ferrocyanide using high performance liquid chromatography

Chiye Tatebe[#], Hiroki Kubota, Takashi Ohtsuki, Atsuko Tada, Yoko Kawamura,
Hiroshi Akiyama, Kyoko Sato

Ferrocyanides of calcium, potassium, and sodium are widely used in the EU and the USA as anticaking agents for food grade salts. The purity test for ferrocyanides requires the detection of ferricyanide, which is quantified using benzidine blue, the meriquinoid oxidation product of benzidine. Benzidine is carcinogenic; therefore, determination methods for ferricyanide that do not use this compound are of great value. We have developed a simple and safe method for detecting ferricyanide in ferrocyanide without using hazardous substances such as benzidine. The separation of ferrocyanide and ferricyanide was achieved using ion-pair high-performance liquid chromatography (HPLC) on an octadecylsilyl column. A 35% acetonitrile in 25mM phosphate buffer (pH 7) containing 10mM of tetra butyl ammonium phosphate was used as the mobile phase and the detection wavelength was 205nm. The concentration of the ferrocyanide sample solution for the proposed HPLC method was chosen as 100 µg/ml because the detection limit of ferricyanide in the conventional purity test is approximately 2% (1 µg/50 µg) and the limit of quantitation for ferricyanide in the HPLC method was 2 µg/ml (S/N=10). In the recovery test (spike level: 2%) for ferricyanide from two commercial ferrocyanide samples using the HPLC method, the average recoveries were 100.1 ± 2.6 (n=6) and 104.0 ± 0.8% (n=3). The proposed HPLC method is simple, safe, and useful as an alternative to the conventional purity test using benzidine for the detection of ferricyanides in the specification of ferrocyanides.

Keywords: ferrocyanide, ferricyanide, ion-pair chromatography, HPLC

1. 緒言

フェロシアン化物 (Ferrocyanide) (フェロシアン化カリウム ($K_4[Fe(CN)_6]$), フェロシアン化カルシウム ($Ca_2[Fe(CN)_6]$), フェロシアン化ナトリウム ($Na_4[Fe(CN)_6]$)) は, 黄血塩とも呼ばれ, 塩の固結防止効果から, 米国, EU 諸国等において食塩への添加が認められており¹⁻³⁾, 日本においても, 平成14年に指定された食品添加物 (固結防止剤) である⁴⁾.

日本を始め諸外国では食品添加物の一定の品質を保持するために, 指定されている添加物に対して様々な規格が設定されている. それらの規格試験法については, 科学技術の進歩に伴った高精度化や国際的な整合化が望まれ, これらに対応した試験法が使用されている. また, 作業者の人体や環境に有害な試薬の排除が望まれ, それらに向けての試験法改正が進められている.

2007年に刊行された第8版食品添加物公定書⁵⁾におけるフェロシアン化物の成分規格の純度試験には, FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA) 規格を参考に不純物として「フェリシアン化塩 (Ferricyanide)」が規定されており, その試験法 (現行法) は, フェロシアン化物の水溶液に, 硝酸鉛溶液を加え, フェロシアン

[#] To whom correspondence should be addressed:
Chiye Tatebe; Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel:+81-3-3700-1411 ext 267; Fax:+81-3-3700-9403; E-mail: c-sasaki@nihs.go.jp

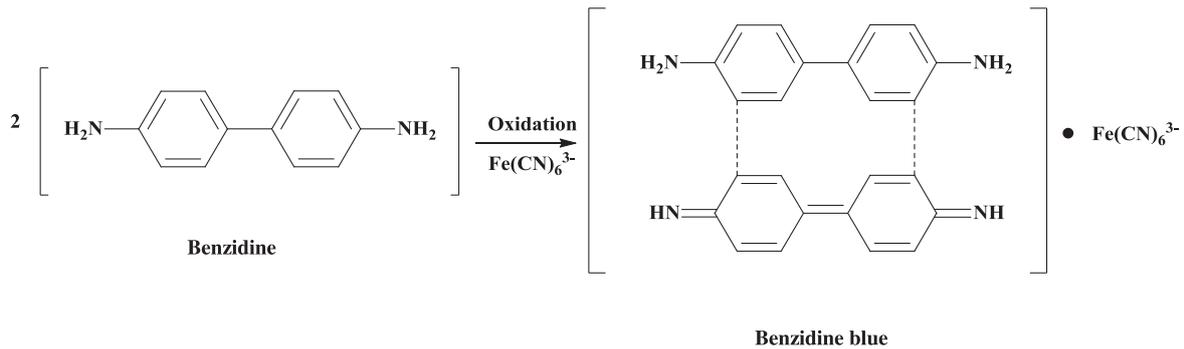


Fig. 1.

Generation of benzidine blue from benzidine and ferricyanide anion ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$).

化鉛を沈殿させた上で、ベンジジン酢酸溶液数滴を滴下し、青色を呈するか否か（又は、青色の呈色を）試験する方法である。これは、フェリシアン化物により、ベンジジンが酸性下で酸化され、酸化物であるベンジジンブルーの沈殿が析出することを原理としている (Fig.1)⁶⁾。しかし、ベンジジンは国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer, IARC) によってヒトに対する発がん性が認められる化学物質に分類されており⁷⁾、日本においては、労働安全衛生法で試験研究のため製造、輸入又は使用する場合のみベンジジンの使用が許されているが⁸⁾、試験者の安全のためにもベンジジンを使用しない代替試験法が求められている。

本研究では、食品添加物の規格試験における有害試薬排除への取り組みとして、イオンペア高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、ベンジジンを用いない安全で簡便なフェロシアン化物中のフェリシアン化塩試験法について確立したので報告する。

2. 材料及び方法

2.1 試薬・試液

フェロシアン化カリウム (ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム三水合物, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) は和光純薬工業製特級試薬, フェリシアン化カリウム (ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 及びフェロシアン化ナトリウム十水和物 (ヘキサシアノ鉄 (II) 酸ナトリウム十水和物, $\text{Na}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) は関東化学製特級および一級試薬を用いた。

リン酸二水素カリウム (特級) はシグマアルドリッチジャパン社製, リン酸水素二ナトリウム無水物 (特級) は関東化学社製, 0.5mol/L リン酸テトラブチルアンモニウム (TBA-P) 及び10%水酸化テトラブチルアンモニウム (TBA-OH) (いずれもイオンペア試薬HPLC用) は東京化成製, アセトニトリル (HPLC用) はメルク社製を用いた。

100mM リン酸水素二ナトリウム溶液は、リン酸水素二ナトリウム無水物4.2gを水で溶解し、1000mlとし調製した。

250mM リン酸緩衝液 (pH7) は、リン酸二水素カリウム6.8g, リン酸水素二ナトリウム無水和物10.6gを水で溶解し、1000mlとし調製した。

移動相Aは、100mM リン酸水素二ナトリウム溶液65mlに水を400ml加え、そこへ10% TBA-OH 13mlを加え、さらにアセトニトリル350mlを加えた後、水で1000mlとし調製した。

移動相Bは、250mM リン酸緩衝液 (pH7) 60mlに水を400ml加え、そこへ0.05mol/L TBA-P 20mlを加え、さらにアセトニトリル400mlを加えた後、水で1000mlとし調製した。

移動相Cは、250mM リン酸緩衝液 (pH7) 65mlに水を400ml加え、そこへ0.05mol/L TBA-P 20mlを加え、さらにアセトニトリル350mlを加えた後、水で1000mlとし調製した。

2.2 方法

2.2.1 フェロシアン化塩及びフェリシアン化塩の分析

フェリシアン化カリウム10mgを量り、水を加えて100mlとしフェリシアン化カリウム溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とした。別に、フェロシアン化カリウム10mgを量り、そこへフェリシアン化カリウム溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 2mlを加え、水を加えて100mlとし、2%フェリシアン化カリウム添加フェロシアン化カリウム溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とした。各溶液を2.2.3 HPLC測定条件に示す条件により分析した。

2.2.2 紫外可視分光光度計測定

フェリシアン化カリウム溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を水で5倍希釈したものを試験溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とし、紫外可視分光光度計 (日本分光製, V-560) により紫外外部吸収

ペクトル (200-300nm) を測定した。

2.2.3 HPLC測定条件

HPLC装置：Agilent1100 series (アジレントテクノロジー社製), カラム：L-Column2 ODS 4.6mm i.d. × 150 mm (化学物質評価研究機構製), 流速：1 ml/min, カラム温度：40°C, 注入量：10 μL

条件① 移動相：移動相A, 検出波長：205nm

条件② 移動相：移動相B, 検出波長：215nm⁹⁾

条件③ 移動相：移動相C, 検出波長：205nm

2.2.4 添加回収試験

フェロシアン化カリウム及びフェロシアン化ナトリウム10mgを量り, それぞれにフェリシアン化カリウム溶液(100 μg/ml)2mlを正確に加え, 水を加えて100mlとし, 試験溶液とした。別に, フェリシアン化カリウム溶液(100 μg/ml)2mlを正確に量り, 水で100mlとし, 比較溶液とした。試験溶液及び比較溶液について, 上記の2.2.1フェロシアン化塩及びフェリシアン化塩の分析に従い試験し, 条件③により分析した。比較溶液のフェリシアンイオンのピーク面積に対する試験溶液中のフェリシアンイオンのピーク面積比から回収率を算出した。

3. 結果及び考察

3.1 HPLC測定条件の検討

金属シアン錯体塩の分離分析にはイオン交換カラムで分析する方法が報告されているが¹⁰⁾, 本検討では, イオン交換カラムと比べ汎用性が高く, 規格試験で多く採用されているオクタデシル化シリカゲル (ODS) カラムを用いることとした。陰イオン化物は容易にイオン化してしまうため, フェリシアンイオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) とフェロシアンイオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) がODSカラムに保持されるようにイオンペア試薬を用いた移動相で検討することとした。条件①では, フェリシアン化カリウム溶液 (100 μg/ml) を注入すると, フェリシアンイオンだけでなく, フェロシアンイオンが生成しピークとして検出された (Fig.2 A)。2%フェリシアン化カリウム添加フェロシアン化カリウム溶液 (100 μg/ml) を注入すると, フェリシアンイオンのピークは確認できたが感度は低く (Fig.2 B, C), 複数回分析を行った際に各ピークの保持時間が変動することも確認された。これらの原因は移動相のpH (8.5-8.9) が関係していると考えられた。

そこで, 条件②⁹⁾を検討したところ, フェリシアン化カリウム溶液 (100 μg/ml) を注入すると, フェロシアンイオンは検出されなくなった。しかし, Fig.3に示すように, フェロシアン化カリウム溶液 (100 μg/ml) を注入すると, フェロシアンイオンは保持時間の近傍にある

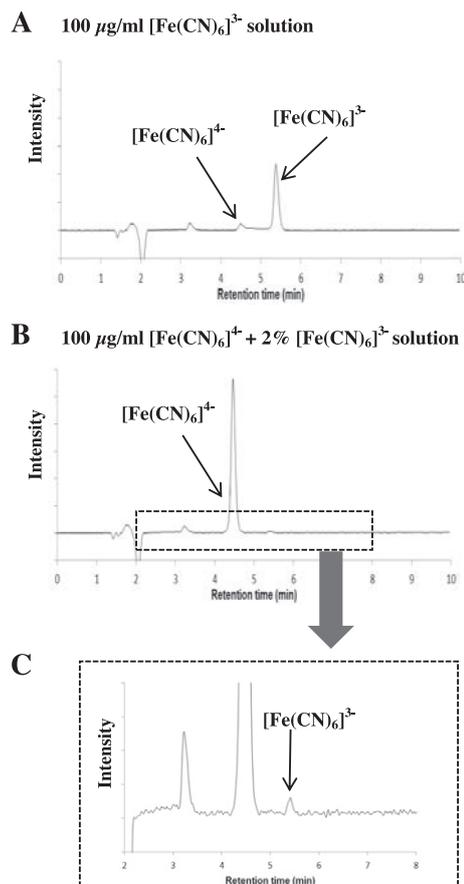


Fig. 2.

HPLC chromatograms of (A) 100 μg/ml ferricyanide anion ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) solution; (B) 100 μg/ml ferrocyanide anion ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) solution fortified with 2% $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$; and (C) an enlarged view of the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ peak in Fig. 2(B). HPLC conditions: mobile phase: 35% acetonitrile in 10mM disodium hydrogen phosphate containing 5mM TBA-OH, wavelength: 205 nm.

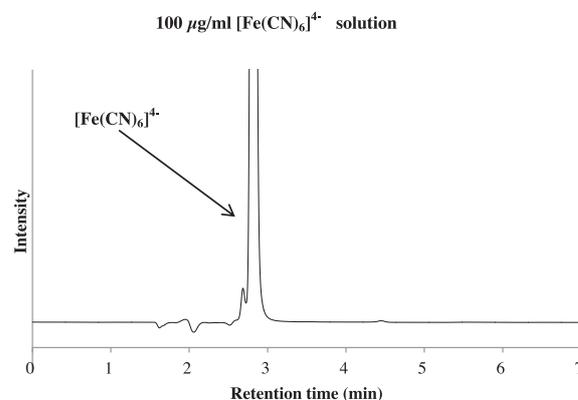


Fig. 3.

HPLC chromatogram of 100 μg/ml ferrocyanide anion ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) solution. HPLC conditions: mobile phase: 40% acetonitrile in 25mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 10mM TBA-P, wavelength: 215 nm.

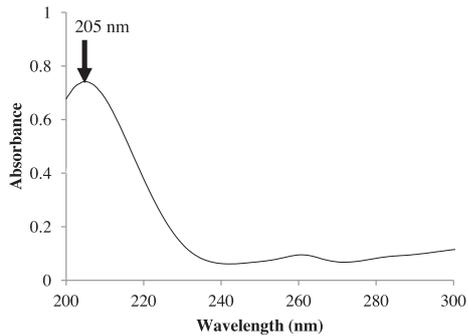


Fig. 4.

UV spectrum of 20 µg/ml ferrocyanide anion $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ solution.

移動相由来と思われる妨害ピークと重なってしまった。

そこで、フェロシアンイオンと妨害ピークが分離するように移動相のアセトニトリル濃度を35%に下げ、また検出波長をフェリシアン化カリウムの極大吸収である205nm (Fig. 4) とした条件③について検討した。

その結果、フェリシアン化カリウム溶液 (100 µg/ml) にフェロシアンイオンは検出されなかった (Fig.5 A)。また、2%フェリシアン化カリウム添加フェロシアン化カリウム溶液 (100 µg/ml) 中のフェロシアンイオンに移動相由来の妨害ピークが重ならず、単一のピークとして分析が可能であり、いずれのピークにおいても保持時間の変動は認められなかった (Fig.5 B, C)。さらに、フェロシアンイオンの感度は条件①で分析したときよりも向上した (Fig.2 C, Fig.5 C)。

以上の結果から、試験法として条件③を採用することとした。また、条件③でのフェロシアンイオン及びフェリシアンイオンの分離度を以下の式 (1) から求めたところ、分離度は13.37であり、良好な分離度が得られた。

$$Rs = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}} \quad (1)$$

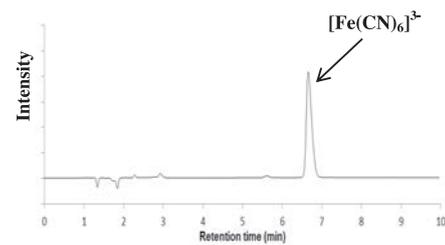
t_{R1} , t_{R2} : 分離度測定に用いる二つの物質の保持時間。ただし、 $t_{R1} < t_{R2}$

$W_{0.5h1}$, $W_{0.5h2}$: それぞれのピークの高さの midpoint におけるピーク幅 (半値幅)

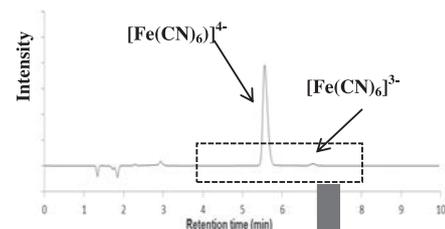
3.2 試験溶液濃度の設定

現行法では、フェロシアン化物 1mg/ml 水溶液 1滴 (フェロシアン化物 50 µg 相当) に硝酸鉛溶液 (1→100) 1滴及びベンジジン飽和酢酸溶液を滴下し、青色を呈することとされている。定性試験におけるフェロシアンイオンの検出限界はフェリシアン化カリウムとして 1 µg とされており¹¹⁾、現行法でのフェロシアン化物に対する検

A 100 µg/ml $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ solution



B 100 µg/ml $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ + 2% $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ solution



C

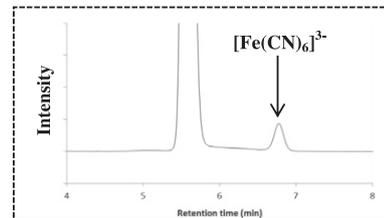


Fig. 5.

HPLC chromatograms of (A) 100 µg/ml ferricyanide anion $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ solution; (B) 100 µg/ml ferrocyanide anion $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ solution fortified with 2% $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$; and (C) an enlarged view of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ peak in Fig. 4(B). HPLC conditions: mobile phase: 35% acetonitrile in 25 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 10 mM TBA-P, wavelength: 205 nm.

出限界は 1 µg/50 µg, すなわち 2% 相当となる。そこで、HPLC法による分析の際もフェロシアン化カリウム中のフェリシアン化カリウムとして 2% 以上の含量 (濃度) を分析可能にするように検討した。

条件③でのフェリシアン化カリウムの定量下限 ($S/N > 10$) を求めたところ、2 µg/ml であったことから、HPLC分析におけるフェロシアン化物の試験溶液濃度を 100 µg/ml とした。

3.3 添加回収試験

フェロシアン化カリウム及びフェロシアン化ナトリウムに、それぞれフェリシアン化カリウムを 2% 添加し添加回収試験を行ったところ、平均回収率及び標準偏差はそれぞれ $100.1 \pm 2.6\%$ ($n=6$) 及び $104.0 \pm 0.8\%$ ($n=3$) であり、回収率、測定値の変動とも良好であった (Table 1)。

Table 1.

Recovery test for ferricyanide ions in potassium or sodium ferrocyanide

Ferrocyanide	Recovery(%)
Potassium Ferrocyanide (n=6)	103.7
	101.2
	99.8
	98.2
	96.2
	101.5
Sodium Ferrocyanide (n=3)	103.9
	103.2
	104.9

3.4 おわりに

本研究において、フェロシアン化物の純度試験において、有害試薬であるベンジジンを使用しないフェリシアン化塩試験法を確立した。本法は安全性の高い試験法であることから食品添加物公定書の規格試験法として適切な方法であると考えられた。

引用文献

- 1) Compendium of food additive specification, Combined specifications from the first to the thirty-seventh meeting 1956-1990, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Vol.1, pp. 651 (1981)
- 2) COMMISSION DIRECTIVE 2008/84/EC, Official Journal of the European Union, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:253:0001:0175:EN:PDF> (2016.5.13 accessed)
- 3) Code of Federal Regulation, Title 21, Section 172.490, Yellow prussiate of soda
- 4) 食発第0801001号, 食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件について (平成14年8月1日), 厚生労働省 (2002)
- 5) 高木誠司著, 新訂定性分析化学, 中巻・イオン反応編, 南江堂, 東京, pp348, pp559 (1990)
- 6) 第8版食品添加物公定書 厚生労働省 (2007)
- 7) Benzidine IARC Monographs 100F:53-63. (2012) <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-7.pdf> (2016.5.13 accessed)
- 8) 労働安全衛生法 (昭和47年6月8日法律第57号) <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S47/S47HO057.html> (2016.5.13 accessed)
- 9) 「イオンペア試薬を用いたHPLCによるフェロシアン化カリウムとフェリシアン化カリウムの分析」L-column2 ODS Application No.2026 (財) 化学物質評価研究機構 http://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/L-column_application_data/L2026.pdf (2016.5.23 accessed)
- 10) EPA Method 9015 METAL CYANIDE COMPLEXES BY ANION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY AND UV DETECTION <http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-9015.pdf> (2016.5.23 accessed)
- 11) 石館守三著, 微量定性分析 理論と実験, 南山堂, 東京, pp264 (1979)