

電気化学検出器付HPLCによる数種食品中の微量ヨウ素の 定量

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	桑平, 秀夫 浅居, 良輝
巻/号	35巻3号
掲載ページ	p. 253-257
発行年月	1994年6月

電気化学検出器付 HPLC による数種食品中の微量ヨウ素の定量

(平成 5 年 9 月 7 日受理)

桑平秀夫* 浅居良輝*

Determination of Iodine in Foods by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection

Hideo KUWAHIRA and Yoshiteru ASAI

(Food Research Laboratory, Quality Assurance Department, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.: 1-1-2, Minamidai, Kawagoe-shi, Saitama 350, Japan)

An HPLC-ECD (electrochemical detector) method for determination of low levels of iodine in foods was developed. As compared with a conventional GC-ECD (electron capture detector) method, the proposed method is simpler and easy to use.

Each sample was treated with 4 N KOH and 25% KNO₃, and pre-incinerated by gently heating at approx. 100°C. Then it was completely incinerated at 550°C for 5 hours in an electric furnace. Iodine was extracted from the incinerated sample by ultrasonic extraction with distilled water. Twenty microliters of the extractant was used for HPLC analysis. Conditions of HPLC were as follows: column, Shodex IC-524A; eluent, 100 mM NaH₂PO₄ containing 5 mM ethylenediamine; flow rate, 1.5 ml/min; detector, ECD (working electrode, Ag; applied voltage, 60 mV vs. Ag/AgCl).

The determination range was between 0.005 and 0.1 µg/g. Recoveries and repeatabilities on dairy and other foods were more than 95% and 2~3% as coefficient of variation (CV), respectively. The proposed method should be useful for iodine determination in many kinds of foods.

(Received September 7, 1993)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography (HPLC); ガスクロマトグラフィー gas chromatography (GC); 質量分析法 mass spectrometry (MS); 電気化学検出器 electrochemical detector; ヨウ素 iodine; 牛乳 milk; 乳製品 dairy products; 乳児用調製粉乳 infant formula; 人乳 human milk; 卵 egg

緒言

微量栄養元素であるヨウ素は、甲状腺ホルモンの必須構成元素である。ヨウ素の過剰摂取又は極端な欠乏は、発育不全や精神障害を引起すと言われている。最近、食餌中のヨウ素含量が低い熱帯地域ではしばしば甲状腺障害が報告されている^{1), 2)}。このことからヒトは日頃どの程度ヨウ素を食餌より摂取しているかが重要であり、すでに多くの調査が行われてきている^{3)~15)}。現在、食品中の微量ヨウ素の分析法としては主に ECD 付ガスクロマトグラフ (GC) による方法 (以下 GC-ECD と略) が一般的に行われている^{16)~20)}。放射化分析法^{21)~27)}や ICP/

MS²⁸⁾ (質量分析器付誘導結合型プラズマ発光分析計) による分析例も報告されている。しかし、これらの方法は前者では、ヨウ素を揮発性誘導体に変化させ、有機溶媒で抽出する操作の煩雑性や、検出器の ECD の汚染による感度低下や再現性が非常に悪くなる問題がある。更に、ECD 検出器は一度汚染されると一般の分析室では洗浄が困難である。一方、後者では特殊な機器を用い高価なことなどの問題がある。

今回、一般に普及している高速液体クロマトグラフ²⁹⁾ (HPLC) にイオンクロマトグラフィー用電気化学検出器 (ECD) を装着した HPLC-ECD を用いた乳、乳製品及び一般食品中のヨウ素の簡便な分析方法を検討した。その結果、従来法の GC-ECD と比べ感度的には同感度を有し、且つ操作が簡便であるなど食品中の微量ヨウ素の分

* 雪印乳業(株)分析センター: 〒350 埼玉県川越市南台 1-1-2

Table 1. Effect of Concentrations of Alkaline Melting Agent on Recoveries of Added Iodine

Added 4 N KOH (ml)	Added 25% KNO ₃ (ml)	Added iodine (μg)	Recovered iodine (μg)
4.0	2.0	100	99.9
3.0	1.5	100	99.9
2.0	1.0	100	98.0
1.0	0.5	100	99.9
0.5	0.25	100	98.5
0.25	0.1	100	78.7

Potassium iodide (as 100 μg of iodine) was added to each sample.

Table 2. Recoveries of Iodine Added to Infant Formula

Added iodide (iodine μg)	Recovered iodine (μg)	Recovery (%)
Potassium iodide (100)	97~101	97~101
<i>o</i> -Iodobenzoic acid (5.1)	4.9	96.7
(11)	10.6	96.3
(180)	185	102.7
(325)	340	104.6
(532)	550	103.3

Each added quantity in parenthesis indicated as the amount of iodine in each iodide.

析法として有用性が認められたので報告する。

実験方法

1. 試料

調製粉乳, 牛乳, 脱脂粉乳, ヨーグルト, 人乳, 全粉乳, チーズ, 川越市内で購入した一般食品。

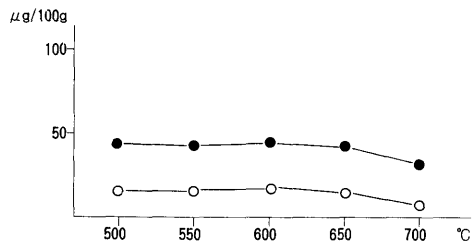
2. 試薬

1) 4 N 水酸化カリウム (KOH) 溶液: 水酸化カリウム 22.44 g を水に溶かして全量 100 ml とした。

2) 25% 硝酸カリウム (KNO₃) 溶液: 硝酸カリウム 25.0 g を水に溶かして全量 100 ml とした。

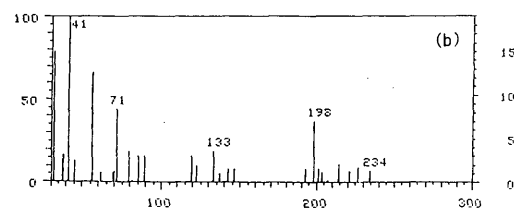
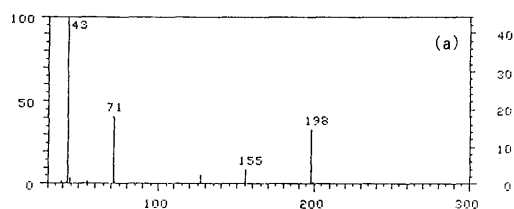
3) ヨウ素標準原液: ヨウ化カリウム 1.308 g を精ひょうし, 水に溶かして全量 1,000 ml とした (ヨウ素 1,000 μg/ml)。冷暗所に保存することで数か月は安定であった。

4) ヨウ素標準液: ヨウ素標準原液を水で 1,000 倍に希釈し (ヨウ素 1,000 ng/ml), これを標準添加法に用いた。

**Fig. 1.** Effect of incineration temperature on iodine content of samples

○—○: milk; ●—●: infant formula

3-1600BUTANE-2-ONE
SAMPLE NO.: 90412 SCAN NO.: 144-135 RT(MIN.): 3.6

**Fig. 2.** Mass-spectra of 2-butanone-iodine derivatives (a), derived from iodobenzoic acid, (b), derived from an infant formula

5) クロマトディスク: クラボウ(株)製イオンクロマトグラフィー用 (0.45 μm, φ25 mm) を用いた。試薬はすべて和光純薬工業(株)製特級品を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業(株)製 PU-980, 860-C0; ECD 検出器: 昭和電工(株)製 EC-1; インテグレーター: (株)日立製作所製 D-2500; 記録計: 日本電子科学(株)製 U-228; ダンパー: (株)島津製作所製 High Sensitivity Filter Unit (228-16250-91) 超音波抽出器: BRANSON 2200; 電気炉: MUFFLE FURANCE FP-41; プレートヒーター: タイガー CGJ-1200

4. 試験溶液の調製

ニッケルるつぽに試料 (調製粉乳, 脱脂粉乳は 2~3 g, 人乳は 5~10 g, 牛乳は 10~20 g, 一般食品 2~10 g) を精ひょうしアルカリ溶融剤として 4 N KOH 1 ml, 25% KNO₃ 0.5 ml を加えた。なお, 粉体などは水であらかじめ湿潤させてからアルカリ溶融剤を加えた。次にプレートヒーター上で乾固させ, ガスコンロ上で炭化させ

Table 3. Repeatability of Determination of Iodine in Milk and Infant Formula

No.	Milk ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Infant formula ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
1	5.1	41
2	5.2	39
3	5.1	41
4	5.0	42
5	5.0	39
6	5.4	39
7	5.1	41
Average	5.12	40.2
CV (%) ^{*1}	2.69	3.11

*¹ Coefficient of variation**Table 4.** Comparison of Iodine Concentration Determined by the GC-ECD Method and the HPLC-ECD Method

Sample No.	Iodine concentration ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	
	GC-ECD method	HPLC-ECD method
1	49	49
2	43	46
3	39	44
4	80	82
5	35	39
6	26	28
7	16	16
8	36	39
9	42	39
10	46	46

Each sample number indicates different human milk.

た. 更に, 電気炉 (550° で 5 時間) で灰化させた. 炭化終了後, 灰化物に水 5 ml を加えテフロン棒で細砕し, その半溶解物を 50 ml のメスフラスコに移して水で定容し, 超音波抽出器で 30 分間抽出した. 次にクロマトディスクでろ過したものを試料溶液として用いた.

5. 測定

試料溶液を HPLC に注入してヨウ素のピークを測定し, 標準添加法によりヨウ素の含量を求めた.

HPLC 条件

カラム: Shodex IC-524A (4.6 ϕ × 100 mm); 移動相: 100 mM NaH₂PO₄ 5 mM エチレンジアミン; 流量: 1.5 ml/min; 注入量: 20 μ l; 検出器: Shodex EC-1 [作用電極, Ag 印加電圧, 60 mV] 20nAFS; カラム温度: 40°

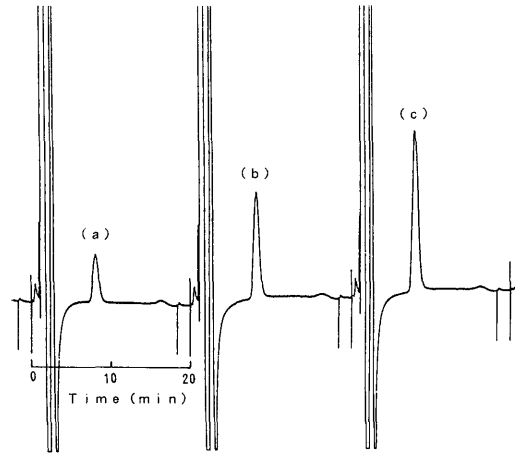


Fig. 3. Typical chromatograms of infant formula samples by HPLC-ECD method
(a): control; (b): spiked sample (0.025 $\mu\text{g}/\text{g}$); (c): spiked sample (0.050 $\mu\text{g}/\text{g}$)

実験結果

1. HPLC-ECD による分析

HPLC-ECD による高感度分析では, 送液ポンプの微脈流によりベースラインにノイズが発生した. 今回, ポンプの脈流を取り除く方法としてダンパーを設置した. 更に, 試料を乾式灰化することで試料中の ECD に検出されるチオシアン酸イオンなどの不純物も取り除かれ良好なベースラインが得られた. なお, ヨーグルトでは, 乳酸菌によって生成した過酸化水素によるヨウ素の酸化が起こる. HPLC-ECD では酸化されたヨウ素は検出されない. しかし, 乾式灰化された試料を水溶液にすることでイオン化され検出される. また, 乾式灰化により試料中のタンパクや脂肪などが取り除かれ, HPLC-ECD 注入前のクロマトディスク処理操作が簡便になった.

2. アルカリ溶融剤の添加量

調製粉乳をニッケルつばに 3 g 精ひょうし, あらかじめ水で希釈したヨウ化カリウム溶液を, ヨウ素量として 100 μg 添加した. この時のアルカリ溶融剤の添加量は 4 N KOH 0.25~4.0 ml, 25% KNO₃ は 0.1~2.0 ml とし, 添加ヨウ素の回収率を比較した. その結果を Table 1 に示した.

添加した 4 N KOH 0.5~4.0 ml 及び 25% KNO₃ 0.25~2.0 ml で回収率 98.5% 以上の結果が得られた. そこで, アルカリ溶融剤の添加量としては試験溶液のカラムに対する影響などを考慮し, 4 N KOH 1.0 ml, 25% KNO₃ 0.5 ml とした. なお, 灰化温度, 時間について検討した結果, 通常元素分析で行われている乾式灰化温度である, 550° で 5 時間が最適条件であることを確認した. なお今回, このアルカリ溶融剤がやや少ないにもか

Table 5. Iodine Concentration in Milk and Dairy Foods ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)

Sample	n^{*1}	Averages	Ranges
Infant formula	20	28.9	12.3~64.6
Milk	20	8.4	2.9~15.1
Skim milk powder	20	47.9	30.2~78.3
Skim milk powder ^{*2}	20	37.5	30.5~75.4
Whole milk powder	10	35.2	25.1~75.8
Whey powder	20	7.5	4.9~17.6
Cheese	15	8.7	7.8~ 9.4
Cheese ^{*2}	20	13.9	2.3~20.1
Yogurt	10	7.7	5.4~10.7

*¹ Number of samples*² Imports**Table 6.** Iodine Concentration in Human Milk

The days elapsed after parturition	Number of samples	Iodine ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
3~ 5 day	51	49
6~ 15	110	45
16~ 30	192	82
31~ 60	319	39
61~120	120	28
121~240	91	16
241~481	65	39
Area		
Hokkaido	30	39
Touhoku	44	46
Kantoh·Koushin'etsu	58	19
Chuubu·Tokai	59	42
Kin'ki	30	34
Chugoku·Shikoku	55	40
Kyushu·Okinawa	80	48

かわらず、高温度においても良好な回収率であったことは、乳製品中に多量のナトリウムやカリウムなどのアルカリ金属が含まれていることが原因と考えられた。なお、乾式灰化法での分解温度を700°にした場合でも、灰化段階でのヨウ素の損失はほとんどみられなかった。その結果を Fig. 1 に示した。

3. 添加回収試験

乳製品中のヨウ素は遊離型及び一部乳タンパクと結合型で存在していると考えられる³⁰⁾。そこで添加回収試験には無機態のヨウ化カリウム及び有機態のヨード安息香酸について検討した。あらかじめ水で希釈したヨウ素溶液を調製粉乳に添加した。ヨウ素量としてヨウ化カリウ

Table 7. Iodine Concentration in Foodstuff

Sample	n^{*1}	Iodine ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
Tangle, dried	3	466,000
Lavar, dried (Yakinori)	3	850
Sea urchin	2	310
Lavar (Iwanori)	3	260
Egg white	5	1.6
Egg yolk	5	40
Jod egg Egg white	3	51
Jod egg Egg yolk	3	7,500

*¹ Number of samples

ム溶液は100 μg (試料100 g 当たり5 mg)、ヨード安息香酸溶液は5.1~532 μg (試料100 g 当たり0.255~26.6 mg) 添加した。この時のアルカリ溶融剤は4 N KOH 1.0 ml, 25% KNO₃ 0.5 ml とした。また、灰化は550°で5時間行った。その結果を Table 2 に示した。

ヨウ素の形態及び添加量にかかわらずいずれも95%以上の回収率が得られた。

なお、ヨード安息香酸、ヨウ化カリウム及び調製粉乳より得られたヨウ素誘導体はGC/MSで2-ブタノン・ヨウ素(M⁺ m/z 198)であることを確認した。その結果を Fig. 2 に示した。

本法により牛乳及び調製粉乳を試料とし、それぞれ連続7回定量し、繰り返し精度を確認した結果を Table 3 に示した。

変動係数(CV値)は牛乳では2.69%、調製粉乳で3.11%と良好な結果が得られた。

4. GC-ECD との比較

試料はヨウ素量の固体差の大きい人乳を用いた。HPLC-ECDでは試料溶液をそのまま注入し、GC-ECDではヨウ素を2-ブタノン・ヨウ素誘導体とし、それを n -ヘキサンで抽出したものを注入した¹⁶⁾。その結果を Table 4 に示した。

1~10までの試料はいずれも異なった母親から入手した人乳を用いた。1~10までの試料中のヨウ素含量は非常に良く一致した結果が得られ、1%で有意差はなかった。

5. 検量線について

検量線の作成は標準添加法で行った。調製粉乳をアルカリ溶融した試料溶液中にヨウ素を0, 0.025, 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ の範囲で添加した結果、良好な直線性が得られた。この時得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示した。

6. HPLC-ECD による食品中のヨウ素含量の分析

本法を用いて乳・乳製品中のヨウ素含量について調査した。その結果を Table 5 に示した。

調製粉乳中では12~64 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、平均値で28.6

$\mu\text{g}/100\text{ g}$, 牛乳中のヨウ素含量は $2.9\sim 15\ \mu\text{g}/100\text{ g}$, 平均値で $8.4\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ であった。脱脂粉乳及び全粉乳のヨウ素含量は牛乳中の 10 倍程度であり, これは水分揮散による濃縮と考えられた。国産チーズのヨウ素含量は $7.8\sim 9.4\ \mu\text{g}/100\text{ g}$, 平均値 $8.7\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ であった。一方, 輸入チーズのヨウ素含量は $2.3\sim 20.1\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ 平均値 $13.9\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ であり, 国産チーズに比べ, ヨウ素含量に幅があった。なお, 牛乳中のヨウ素の 10~20% 程度がチーズ中に移行していた³⁰⁾。人乳中のヨウ素含量は Table 6 に示した。

人乳には牛乳に比べ, 10 倍程度ヨウ素が多く含まれていた。今回, 泌乳期別のコンポ及び食習慣による人乳への影響を考慮し, 地域別のコンポに分けて調査を行った。泌乳期別では分娩からの日数が短いほどヨウ素含量は高い傾向がみられた。地域別では関東・甲信越で若干低い値が得られた。

本法を用いて一般食品中のヨウ素について, ヨウ素が比較的多く含まれている食品を重点的に調査した。その結果を Table 7 に示す。

海藻類にはヨウ素が多く含まれており, 特に昆布は海藻類の中で非常に多く, ヨウ素は $450\text{ mg}/100\text{ g}$ 含まれていた。また, それを食する生物中にも多く含まれていた。

鶏卵のヨウ素は一般に市販されているもの及びヨウ素強化鶏卵ともに卵黄に多く, 卵白には少なかった。また, ヨウ素強化鶏卵の卵黄は一般品の 100 倍以上多くヨウ素が含まれていた。

ま と め

HPLC-ECD による微量ヨウ素の定量法を検討し, 従来行われている GC-ECD と比較した。その結果, 以下の結論が得られた。

1) HPLC-ECD は誘導体化の操作を必要とせず, 試料の前処理が簡便であった。HPLC-ECD に用いる検出器は, 試料の汚染による感度低下時, 機器の保守が容易であった。

2) GC-ECD はヨウ素誘導体化及び有機溶媒による溶媒抽出操作が必要であり, 前処理が煩雑であった。

3) HPLC-ECD によるヨウ素の定量法は, 一般的に用いられている GC-ECD の値と良く一致した。

4) 調製粉乳に対する添加回収率は 95% 以上であり, 繰り返し精度は, CV 値 3.11% と良好な結果が得られた。

本研究の概要は, 日本食品衛生学会第 64 回学術講演会 (1992 年 10 月, 奈良) で発表した。

文 献

- 1) Recommended Dietary Allowances 10th Edition: p. 213 ~217 (1989), National Academy Press.
- 2) 羽賀正信, 赤木満州雄訳: "食品の毒性" p. 31 (1978), 講談社.
- 3) 山本良郎, 米久保明得, 飯田耕司, 高橋 断, 土屋文安: 小児保健研究 **40**, 468~475 (1981).
- 4) Wenlock, R. W., Buss, D. H., Moxon, R. E., Bunton, N. G.: Br. J. Nutr. **47**, 381~390 (1982).
- 5) Varo, P., Koivistoinen, P.: Int. J. Vitam. Nutr. Res. **52**, 80~89 (1982).
- 6) Cerutti, G., Finoli, C., Vecchio, A., Mannino, S.: Brauwissenschaft **35**, 284~286 (1982).
- 7) Bruhn, J. C., Franke, A. A.: J. Dairy. Sci. **66**, 1,396~1,398 (1983).
- 8) Dellavalle, M. E., Barbano, D. M.: J. Food Prot. **47**, 678~686 (1984).
- 9) Bruhn, J. C., Franke, A. A.: *ibid.* **48**, 397~399 (1985).
- 10) Fischer, P. W. F., Giroux, A.: Can Inst. Food Sci. Technol. **20**, 166~169 (1987).
- 11) Sutcliffe, E.: Food Tech. N. Z. **25**, 32~34, 38 (1990).
- 12) Pennington, J. A. T.: J. Dairy. Sci. **73**, 3,421~3,427 (1990).
- 13) Pennington, J. A. T., Young, B.: J. Food Compos. Anal. **3**, 166~184 (1990).
- 14) Yang, S., Fu, S., Wang, M.: Anal. Chem. **63**, 2,970~2,973 (1991).
- 15) Lois, M., Elwood, W. S.: 酪農科学・食品の研究 **42**, 59~66 (1993).
- 16) Bakker, H. J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **60**, 1,307~1,309 (1977).
- 17) 竹葉和江, 村上 一: 都衛研年報 **31-1**, 166~169 (1980).
- 18) 山野辺秀夫, 鎌田国広, 鈴木助治, 原田裕文: 同上 **31-1**, 137~141 (1980).
- 19) Stijve, T., Diserens, J. M., Blake, C.: Deutsch Lebensm. Rundsch. **84**, 341~344 (1988).
- 20) Mitsuhashi, T., Kaneda, Y.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73**, 790~792 (1990).
- 21) 高城裕之, 木村敏正, 岩島 清, 山縣 登: 分析化学 **32**, 512~516 (1983).
- 22) Fardy, J. J., Meorist, G. D.: J. Radioanal Nucl. Chem. **87**, 239~246 (1984).
- 23) Alfassi, Z. B., Vavi, N.: *ibid.* **90**, 395~400 (1985).
- 24) Stroube, W. B. Jr., Jutz, G. J.: Am. Nucl. Soc. **49**, 164~165 (1985).
- 25) Greenburg, R. R.: Anal. Chem. **58**, 2,511~2,516 (1986).
- 26) Dermelj, M., Slejkovec, Z., Byrne, A. R., Stegnar, P.: Fresenius J. Anal. Chem. **338**, 559~561 (1990).
- 27) Rao, R. R., Chatt, A.: Anal. Chem. **63**, 1,298~1,303 (1991).
- 28) Baumann, H.: Fresenius J. Anal. Chem. **338**, 809~812 (1990).
- 29) Hurst, W. J., Snyder, K. P., Martin, R. A. Jr.: J. Liq. Chromatogr. **6**, 2,067~2,077 (1983).
- 30) (社)全国農協乳業プラント協会: ミルクのサイエンス **1**, 29 (1991).