ガスクロマトグラフィーによる食品中のトリアセチンの分析法

(昭和62年11月11日受理)

小川時彦^{*1} 藤井令子^{*1} 田中幸生^{*1}
森田一郎^{*1} 森悦男^{*1} 原田忠彦^{*1}
坂口洋^{*2}

A Method for Determination of Triacetin in Foods by Gas Chromatography

Tokihiko OGAWA^{*1}, Reiko FUJII^{*1}, Kouki TANAKA^{*1}, Ichirou MORITA^{*1},
Etsuo MORI^{*1}, Tadahiko HARADA^{*1} and Hiroshi SAKAGUCHI^{*2}

(*¹Public Health Research Institute of Kawasaki City: 5-13-10, Ohshima, Kawasaki-ku,
Kawasaki-shi, Kanagawa, Japan; *²School of Hygienic Sciences, Kitasato University:
Sagamihara-shi, Kanagawa, Japan)

An analytical method for triacetin in foods by gas chromatography (GC) was developed. The extraction method from foods is as follows. Samples including water and emulsifier were completely dried and solidified by the use of anhydrous sodium sulfate, and oily dry samples were ground to fine powder. These samples were homogenized in 100 ml of ethyl ether and centrifuged two times. The centrifuged solution containing triacetin was employed for GC analysis. The analysis on a GC column of 25% PEG-20M was interfered with ethyl caprate and *o*-ethylphenol, which are flavour constituents in foods, but this interference was successfully removed by use of a silica gel column. Analytical recovery of triacetin from various foods by this method was 82.1~91.8%. The detection limit was 10 ppm.

(Received November 11, 1987)

key words: トリアセチン triacetin; グリセリントリアセテート glyceryl triacetate; 1,2,3-プロパントリオールトリアセテート 1,2,3-propanetriol-triacetate; ガスクロマトグラフィー (FID) gas chromatography (FID); ジエチレングリコールモノエチルエーテル diethylene glycol monoethyl ether; 食品添加物 food additive; マススペクトル mass spectrum

緒言

トリアセチン (TAc)¹⁾ はニシネギ (*Evonymus europaea* 科) の種子に含有されているグリセリン酢酸エステルで、FAO/WHO の A(1) リスト²⁾ の可溶性溶媒の項目に記載されている。米国などでは以前から、食品添加物として許可されていることから食品香料の溶剤などに用いられている。昭和57年11月、米国から我が国に対し食品添加物の指定が少ないとして許可を求める方向で、A(1) リストのうち128品目のリスト³⁾ が提出されたが、TAc もその中に含まれていた。我が国ではグリセリン脂肪酸エステルは既に食品添加物として許可されていたが、TAc は除外されていた (TAc は分類上グリセリン脂肪酸エステルに含まれるが、乳化剤としての性質を

持たない)。厚生省告示第二百七号 (昭和61年11月) で規格が改正されるに伴い TAc の使用が認められるようになった。第5版食品添加物公定書⁴⁾ の定義に記載されている8種類のグリセリン脂肪酸エステル (脂肪酸とグリセリンのエステル及びその誘導体) のうち、一般に食品添加物として用いられるグリセリン酢酸エステルは、トリグリセリドである TAc が主成分であり、それ以外はモノグリセリドを主成分としたものである。既に報告されている食品中のグリセリン脂肪酸エステルの分析法^{5)~8)} (トリメチルシリル誘導体化してガスクロマトグラフィー (GC) を行う) は、モノ及びジグリセリドを対象としたものであり、この分析条件では TAc の分析は不可能である。また食品中の TAc 分析法⁹⁾ についての報告もありみられない。そこで著者らは、TAc 含有の可能性のある食品 (アイスクリーム、チョコレート、キャ

^{*1} 川崎市衛生研究所: 川崎市川崎区大島 5-13-10

^{*2} 北里大学衛生学部: 神奈川県相模原市北里 1-15-1

Scheme 1. Analytical procedure for TAc in foods and flavours

Sample A: cream, ice cream, nectar-type juice, water soluble flavour

Sample B: chocolate, cookie, oil soluble flavour

Sample C: candy

ンディーなど) 及び食品香料について、GC による分析法の検討を試み若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

TAc が含有される可能性のある市販食品及び香料として次のものを用いた。

① チョコレート, ② アイスクリューム, ③ キャンディー, ④ クッキー, ⑤ クリーム, ⑥ ジュース, ⑦ 食品香料 (a: 水溶性香料, b: 油溶性香料), ⑧ 香料成分 (a: エチルカプレート, b: o-エチルフェノール)

2. 試薬及び標準溶液

TAc: 和光純薬工業(株)製特級

シリカゲル: kiesel gel 60 (70~230 mesh Merck 社製)

エチルエーテル: 和光純薬工業(株)製残留農薬用, 他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

TAc 標準溶液: TAc 100 mg を精秤してエーテルに溶解し, 全量を 100 ml として 1 mg/ml の濃度の原液を作成し, 適宜希釈して用いた。また同様にジクロロメタンで調製した標準溶液も作成した。

3. 装置

ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製 7AG (FID)
ガスクロマトグラフ-質量分析計: (株)島津製作所製 GC/MS-QP1000

ホモジナイザー: 日本精密工業(株)製 ヒスコトロン
シリカゲルカラム: 内径 15 mm のクロマト管にジクロロメタンによる湿式充てん法で, 110° で 24 時間乾燥させたシリカゲル 10 g, ついで無水硫酸ナトリウム 0.5 g を積層させたカラムを作成した。

4. 前処理

1) 抽出溶液の調製

(1) 水分及び乳化剤を含む試料 (アイスクリーム,

Table 1. Recovery of TAc from Juice with some Extraction Solvents

Extraction solvent	Recovery (%)
1. Acetonitrile	13.9±2.7
2. Ethyl ether	82.6±2.0
3. Dichloromethane	81.0±3.0
4. Chloroform	88.0±3.0
5. Benzene	78.3±2.2
6. Hexane	30.4±3.7

(n=5)

クリーム, ネクタータイプジュース, 水溶性香料): 試料 5 g を採り, 無水硫酸ナトリウム約 10~60 g を, かき混ぜながら砂状になるまで加えて乾燥後, エーテル 100 ml を加え 2 分間ホモジナイズし, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離後エーテル層を採取した. 同様に, この抽出操作を繰り返しエーテル層を合わせた. この溶液を 40°以下で減圧乾固し, ジクロロメタンで全量を 4~10 ml としたものを抽出溶液とした.

(2) 油脂を含む乾燥試料 (チョコレート, クッキー): 試料 5 g を採り, 細かく砕きエーテル 100 ml を加えて 2 分間ホモジナイズし, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離後エーテル層を採取した. この抽出操作を繰り返してエーテル層を合わせた. 以下 (1) と同様の操作により抽出溶液とした.

(3) その他の試料

(a) キャンディー: 試料 5 g を採り, 水または温湯 30 ml で溶解し, 冷後エーテル 100 ml を加え 5 分間振とう抽出した. この抽出操作を繰り返してエーテル層を合わせた. 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 以下 (1) と同様の操作により抽出溶液とした.

(b) 油溶性香料: 試料 2 g を採り, ジクロロメタンに溶解し全量を 10 ml とした.

2) クリーンアップ

抽出溶液を直接 GC 分析したとき, TAc と同じ保持時間をもつピークが出現した場合は以下のクリーンアップ操作を行う. 抽出溶液 2 ml をシリカゲルカラムに負荷し, まずジクロロメタン 100 ml で妨害成分を除き, ジクロロメタン, クロロホルム混液 (1:1) 60 ml で TAc を溶出させる. この溶液を 40°以下で減圧乾固した後エーテルで全量を 5 ml とし, GC 用試験溶液とした.

以上の操作を Scheme 1 に示す.

5. GC による定量

試験溶液をガスクロマトグラフに供し, 得られたクロマトグラムピーク高を計測し, あらかじめ作成した検量線から試料中の TAc 含量を算出した.

GC 条件は以下のとおりである.

カラム: 25%PEG-20M, Chromosorb W/AW DMCS (60~80 mesh) 3.1 m×2.6 mm, glass

カラム温度: 220°

注入口及び検出器温度: 250°

キャリアーガス: N₂, 50 ml/min

検出器: FID, 注入量: 2 μl

6. 検量線の作成

TAc の 10~50 μg/ml の標準系列を用いて検量線を作成した.

7. ガスクロマトグラフ-質量分析計測定条件

カラム: 25%PEG-20M, Chromosorb W/AW DMCS (60~80 mesh) 3.1 m×2.6 mm, glass

カラム温度: 220°

キャリアーガス: He, 流量 50 ml/min

セパレーター温度: 250°

イオン電流: 60 μA

イオン電圧: 70 eV

結果及び考察

1. 抽出方法及び抽出溶媒の検討

食品から TAc を抽出する方法及び抽出溶媒を検討するため, ジュース 50 ml に TAc 1 mg を添加し, 各種の溶媒 100 ml で 5 分間振とう後, TAc を抽出してガスクロマトグラフに供した. その結果を Table 1 に示す.

6 種類の溶媒のうちクロロホルム, エーテル, ジクロロメタンは, 80.0%以上の抽出率があった. 次に, チョコレート及びアイスクリーム各 5 g をそれぞれ水 50 ml で溶解後 TAc 1 mg を添加し, ジュースからの抽出率が 80.0%以上あった 3 種類の溶媒 (クロロホルム, エーテル, ジクロロメタン) を用いて振とう抽出したが, エマルジョン状態となり分離が困難であった. また遠心分離を試みたがゼリー状となり, この方法でも水層と有機溶媒との分離は困難であった. 次に前報¹⁾のアイスクリーム中のジェチレングリコールモノエチルエーテルの分析で用いたのと同様のアルカリ処理を行い, 溶媒で抽出後 GC で分析したが TAc のピークは検出できなかった. そこでチョコレートは溶媒 (クロロホルム, エーテル, ジクロロメタン) に溶かし, またアイスクリームは約 60 g の無水硫酸ナトリウムを, かき混ぜながら砂状になるまで加えて乾燥後, 溶媒を加えホモジナイズし, 遠心分離して抽出溶液を得た. その結果, ジュースでの抽出率が最も高かったクロロホルムでは, 抽出液が懸濁してろ過が困難であった. 残りの 2 種類の溶媒のうちエーテルでの抽出率は 82.6±2.0%, ジクロロメタンは 81.0±3.0% (n=5) と抽出率に有為の差はなかったが, 若干ジクロロメタンの方がエマルジョンになりやすかったので, 以後抽出溶媒としてエーテルを用いることにした. 次に抽出回数を検討するため, ジュース 50 ml に TAc 1 mg を添加し抽出回数を変えて TAc の抽出を行った. その結果, TAc 抽出率はエーテル 100 ml×2 回抽出では 83.5±1.1%, エーテル 100 ml×3 回抽出では 84.1±2.2% (n=5) と有為の差はなかったので, 以後 2 回抽出で行う

Fig. 1. Gas chromatograms of TAc and extracts of samples (A: chocolate, B: juice, C: cream, D: ice cream, E: TAc, F: candy, G: ethyl caprate H: *o*-ethylphenol, I: cookie)

Column: 25%PEG-20M on Chromosorb W/AW DMCS (60~80 mesh), 3.1 m×2.6 mm, 220°; carrier gas: N₂, 50 ml/min; detector: FID

Fig. 2. Mass spectrum of the TAc, ethyl caprate and *o*-ethylphenol

Column: 25%PEG-20M on Chromosorb W/AW DMCS (60~80 mesh) 3.1 m×2.6 mm, 220°; carrier gas: He 50 ml/min; separator temperature: 250°; trap current: 60 μ A; electron energy: 70 eV

ことにした。本法の抽出方法をアイスクリーム中のジェチレングリコールモノエチルエーテルの分析¹⁾に応用したところ、抽出率 94.3%となり、アルカリ処理による方法よりも抽出率が約 10%も高く、また操作も簡易であった。

2. GC 条件の検討

カラムは、一般に香料及びプロピレングリコール、ジェチレングリコールモノエチルエーテル⁸⁾などの分析に多用されている PEG-20M カラム（極性が高くピークがシャープになる）を用い、GC 条件を検討した。

TAc の検量線を作製したところ原点をとる直線性を示した。実験方法の 5 に示す GC 条件で各種食品からのエーテル抽出液及び香料をガスクロマトグラフに供したが、TAc の保持時間と一致するピークが認められた。そこで GC/MS で確認したところ香料成分のエチルカプレート及び *o*-エチルフェノールであった。それぞれのクロマトグラム及びマスペクトルを Fig. 1, 2 に示す。

3. シリカゲルカラムによる精製

香料成分（エチルカプレート及び *o*-エチルフェノール）などが TAc の分析を妨害する可能性があるため、シリカゲルカラムを用いてそれらの除去の検討を行った。TAc、エチルカプレート及び *o*-エチルフェノール各 1 mg をカラムに負荷し、まず溶出溶媒としてエーテル、

Table 2. Recovery of TAc Added from Food Stuff and Flavour

Food stuff	Recovery (%)
1. Chocolate	87.3±1.6
2. Ice cream	83.8±1.9
3. Cream	88.5±2.6
4. Juice	82.1±2.1
5. Candy	91.0±1.7
6. Flavour	99.4±3.1

Added 1,000 µg (n=5)

アセトンを用いたが、いずれの成分も同一画分中に溶出し分離ができなかった。次にジクロロメタンで行ったところ、エチルカプレートは最初の 40 ml までに溶出し、*o*-エチルフェノールは溶出画分 40~80 ml 中に溶出した。TAc は 120~180 ml 中に溶出し、妨害する香料成分との分離はできたが抽出率が 80% と TAc が十分に溶出しなかった。そこで溶出溶媒に、ジクロロメタン-クロロホルム混液 (1:1) を用いると 60 ml で TAc がほぼ 100% 溶出した。なおフロリジルカラムでは TAc の吸着が強く溶出が困難であった。またアルミナカラムでは TAc は吸着しにくく妨害成分との分離が困難であった。

4. 食品及び香料からの添加回収実験

各種食品及び香料 5 g に TAc を 1 mg 添加し、Scheme 1 に示す方法により回収実験を行った。回収率は Table 2 に示すように 82.1~99.4% と良好な結果を得た。なお本法での検出限界は 10 ppm であった。

ま と め

1. 各種食品及び香料中のトリアセチン (TAc) の分析法について検討した。

2. 抽出溶媒はエーテルを用いた。また抽出方法として、水分を含む試料は無水硫酸ナトリウムをかき混ぜながら、砂状になるまで加えて乾燥後、油脂を含む乾燥試料は細かく砕いた後、エチルエーテルを加えてホモジナイズし、遠心分離により抽出した。

3. 香料成分のエチルカプレート及び *o*-エチルフェノールの妨害が認められたが、シリカゲルカラムを用いることにより取り除くことができた。

4. GC 用カラムは極性が高くピークがシャープになる 25% PEG-20M を用いた。

5. 各種食品及び香料の添加回収実験では 82.1~99.4% と良好な結果を得た。

6. 本法を、香料などの可溶化剤としてイタリアなどで許可されているジエチレングリコールモノエチルエーテルの、アイスクリーム中における分析 (前法¹⁰⁾) に応用したところ抽出率は 94.3% となり、既法のアルカリ処理法よりも約 10% 以上も高かった。

謝 辞

終わりに当たり、本実験に協力していただいた北里大学衛生学部昭和 62 年度卒研究生、大金園美、江村京子嬢に感謝致します。

文 献

- 1) 化学大辞典編集委員会編: “化学大辞典” p. 126 (1963) 共立出版。
- 2) 日本食品添加物協会編: 食品添加物マニュアル p. 184 (1986)。
- 3) 藤井正美: JAFAN. 22, 4 (1963)。
- 4) 厚生省編: “第 5 版 食品添加物公定書” p. 208~210 (1986), 廣川書店。
- 5) 厚生省環境衛生局食品化学課編: “食品中の食品添加物分析法” p. 158~164 (1982), 講談社。
- 6) 四方田千佳子, 豊田正武, 伊藤善志男: 食衛誌. 27, 37~43 (1986)。
- 7) Aitzetmuller, K.: J. Chromatogr. Sci. 13, 454~461 (1975)。
- 8) Sahasrabudhe, M. R.: J. Am. Oil Chem. Soc. 44, 379~380 (1967)。
- 9) Kissinger L. D., Robins, R. H.: J. Chromatogr. 321, 353~362 (1985)。
- 10) 小川時彦, 藤井令子, 田中幸生, 森田一郎, 小野勝美, 原田忠彦, 坂口 洋: 食衛誌. 27, 656~661 (1986)。