

食品中に残留するエチレンクロロヒドリンのGC/ECDによる分析

山田洋子, 天川映子, 平田恵子,
永山敏廣, 牛山博文

食品中に残留するエチレンクロロヒドリンのGC/ECDによる分析

山田 洋子*, 天川 映子*, 平田 恵子*,
永山 敏廣**, 牛山 博文***

食品中に残留するエチレンクロロヒドリン (以下ECHと略す) の分析法を検討した. 超音波を用いてアセトニトリルで抽出後, C18およびグラファイトカーボン (以下GCBと略す) あるいはGCB/PSAカラムで精製した. 測定にはGC/ECDを用いた. 高麗にんじん加工品など18種類についての添加回収率は73.6-99.4%であり, 定量限界は5 µg/gであった. 本法を健康食品18種20試料に適用した結果, ECHはいずれの試料からも検出されなかった. また, 本法は健康食品以外の食品中のECHの分析にも有効に使用できると思われる.

キーワード: エチレンクロロヒドリン, エチレンオキシド燻蒸殺菌, 健康食品, GC/ECD, 食品

はじめに

ECHは, 工業用原料や医療用器具の燻蒸殺菌などに広く使用されているエチレンオキシド (以下EOと略す) の反応生成物である. 食品へのEOの燻蒸殺菌については, 香辛料, ハーブなどで報告事例^{1,2)}がある. 殺菌処理後, 使用したEOは揮散して食品からはほとんど消失するが, 食品中の塩素化合物と反応して生成されたECHは残留する^{1,3)}ことが報告されている. ECHの毒性についてはヒトに対する発ガン性が指摘されている^{4,5)}ため, 食品中の残留については問題がある. しかし, わが国における食品中のECHの残留実態に関する報告は, ここ数年間ほとんどない. 近年健康に対する関心の高まりにより, 多種多様の健康食品が市場に出現してきて, EOの過去の使用例から素材の燻蒸殺菌にEOが使われている可能性が考えられる. そこで, 著者らは, 食品中のECHの残留実態を把握するために健康食品を主な対象としたECHの簡便な分析法を検討した. ECHの分析には, GC/ECD^{6,7)}, GC/FID³⁾, GC/MS^{1,2)}などを使用する方法が報告されているが, いずれも複雑な操作を要する. 今回は汎用性の高いGC/ECDを用いる方法を検討し, 実用的な分析法を確立したので報告する.

実験方法

1. 試料

市販のギャバロン茶葉, ケール粉末 (青汁), 高麗人参加工品 (顆粒), 鉄錠剤, ゴーヤ茶葉, アガリスク粉末, ルテイン錠剤 (カロテノイドの一種), アスタキサンチン錠剤 (ヘマトコッカス藻含有食品), グルコサミン加工品 (カプセル), ローヤルゼリー加工品 (カプセル), ショウガ粉末, 根昆布粉末, 乳酸菌加工品 (顆粒), 霊芝加工品 (錠剤), 燕の巣加工品 (錠剤), 大豆菓子 (栄養食品), 以上各1試料. マカ根部粉末, キャッツクロー樹皮粉末, 以上各2試料. 計18種20試料を用いた.

2. 試薬及び試液

1) 標準品

ECH (2-クロロエタノール) は純度99.0%以上, 和光純薬工業 (株) 製を用いた.

2) 標準原液

ECH40 mgを正確に量り, アセトニトリルを加えて溶かし, 正確に20 mLとしたものを標準原液 (2 mg/mL) とした.

3) 標準溶液

ECH標準原液1 mLを正確に量り, アセトニトリルを加えて溶かし, 正確に20 mLとしたものを標準溶液 (100 µg/mL) とした.

その他の試薬はアセトニトリル, アセトン, ヘキサン, トルエンは残留農薬・PCB試験用を用い, 塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を用いた.

4) ミニカラム

(1) C18カラム Sep-Pack® Vac C18, 1 g, 6 mL, シリンジ型, Waters社製

(2) GCBカラム ENVI-Carb, SPE Tubes, 500 mg, 6 mL, シリンジ型, SUPELCO社製

(3) GCB/PSAカラム InertSep® GC/PSA, 500 mg/500 mg, 6 mL, シリンジ型, GL Sciences社製

3. 装置及び測定条件

1) GC/ECD測定条件

ECD検出器付きガスクロマトグラフ (GC) : GC-2010 (オートサンプラーAOC-20i付), 島津製作所製

(1) 操作条件 カラム: DB-FFAP 0.25 mm i.d.X30 m, 膜厚0.25 µm, J&W社製, キャリアガス: He, メイクアップガス: N₂ (流量30 mL/min) カラム温度: 60°C (1 min) →3°C/min→85°C (8 min) →10°C/min→100°C→20°C/min

* 東京都健康安全研究センター多摩支所食品衛生研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

** 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

*** 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

→170°C (5 min), 注入口温度: 200°C, 検出器温度: 250°C, 注入量: 2 µL

(2) 操作条件 カラム: DB-210 0.25 mm i.d.X30 m, 膜厚0.25 µm, J&W社製, キャリアガス: He, メイクアップガス: N₂ (流量30 mL/min), カラム温度: 45°C (8 min) →11°C/min→60°C (5 min) →20°C/min→230°C (0 min), 注入口温度: 170°C, 検出器温度: 230°C, 注入量: 2 µL

4. 試験溶液の調製

1) 粉末, 顆粒, 錠剤, 乾燥物等油脂分の少ない試料

乳鉢でよくすりつぶした試料2 gを50 mL用ガラス製遠沈管に正確に量り, アセトニトリル20 mLを加え, 時々振り混ぜながら5分間超音波抽出後, 冷暗所に一夜放置した. 室温が高い場合や連続使用等で超音波発生器の浴槽で温度上昇が見られる場合は, 氷等で浴槽を冷却しながら操作した. 次いで3,000回転, 5分間冷却遠心分離を行い, 上澄液4 mLを採取し, アセトニトリルで20 mLとした.

予めアセトニトリル10 mLで洗浄したC18ミニカラムに全量注入し, はじめの3 mLを捨て, 溶出液を10 mL採取した. 次に無水硫酸ナトリウム2.5 gを加え30秒間激しく振り, 15分間放置した. 放置後溶出液を予めアセトニトリル10 mLで洗浄したGCBカラムに注入し, はじめの3 mLを捨てた後, 溶出液を2 mL採取し試験溶液とした. 試験溶液につきGC/ECDを用いて定性及び定量を行った.

2) 種子の乾燥物等油脂分を含む試料

乳鉢でよくすりつぶした試料2 gを50 mL用ガラス製遠沈管に正確に量り, アセトニトリル20 mLを加え, 時々振り混ぜながら超音波で5分間抽出後, 冷暗所に一夜放置した. 温度上昇が見られる場合は, 1)と同様に氷等で浴槽を冷却しながら操作した. 冷凍庫に1時間以上放置後, 3,000回転, 5分間冷却遠心分離を行い, 油脂分を避け, 静かに上澄液を1 mL採取し, アセトニトリル9 mL加え, 10倍希釈とした. その溶液に無水硫酸ナトリウム2.5 g加え30秒間激しく振った後15分間放置後, さらに予めアセトニトリル10 mLで洗浄したGCB/PSAカラムに注入し, はじめの4 mLを捨て, 溶出液を2 mL採取し試験溶液とした. 試験溶液につきGC/ECDを用いて定性及び定量を行った.

5. GC/ECDによるECHの分析

1) 検量線の作成

0.1 µg/mL-1.0 µg/mLのうち, 3点以上の濃度の標準溶液を調製し, GC/ECDに各々1~2 µLを注入し, それぞれの標準溶液から得られたピーク面積または高さから検量線を作成した.

2) 定性, 定量

定性は検量線用標準溶液及び試験溶液の各々1~2 µLをGC/ECDに注入し, 得られたピークの保持時間を比較して行った. 定量は試験溶液から得られたピークの面積または高さを測定し, 予め0.1 µg/mL-1.0 µg/mLの範囲で作成した検量線により, 試料中の濃度を算出した.

結果及び考察

1. GC/ECD測定条件

GCカラムについて種々検討した結果, 再現性が良く, かつシャープなピークが得られたFFAP及びDB-210を用いることにした.

2. 試験溶液の調製方法

残留農薬の通知試験法⁸⁾を準用し, 抽出にはアセトニトリルを用い抽出効率を上げるために超音波を併用した. 試験溶液の精製としては, 油脂分の少ない試料ではC18およびGCBカラムを, 油脂分を多く含む試料についてGCB/PSAカラムを用いることで十分な精製効果により, 目的成分付近に妨害ピークのないクロマトグラムが得られた.

3. 検量線及び定量限界

検量線は0.1 µg/mL~1.0 µg/mLの範囲で $r=0.99$ 以上の良好な直線性を示した. 定量限界は, 試料換算で5 µg/gであった.

4. 添加回収率

原材料の滅菌にEOが使用される可能性のある高麗人参などを含有する18種類の健康食品にECHを10 µg/g添加し, 回収率と変動係数(以下CVと略す, %)を求めた.

表1. 加工品によるECHの添加回収率

試料	回収率(%)	CV(%)
ギャバロン茶葉	94.8	0.2
ケール粉末(青汁)	92.6	0.7
高麗人参加工品(顆粒)	79.5	2.4
鉄錠剤	92.9	8.6
ゴーヤ茶葉	73.6	5.1
アガリクス粉末	90.1	1.4
ルテイン錠剤	89.5	0.7
アスタキサンチン錠剤	88.4	0.6
グルコサミン加工品(カプセル)	86.6	2.3
ローヤルゼリー加工品(カプセル)	86.1	1.1
ショウガ粉末	89.3	2.2
根昆布粉末	99.4	1.0
乳酸菌加工品(顆粒)	95.7	0.9
霊芝加工品(錠剤)	94.7	1.9
燕の巣加工品(錠剤)	95.9	1.0
大豆菓子(栄養食品)	90.2	0.4
マカ根部粉末	84.9	4.5
キャッツクロー樹皮粉末	79.4	4.8

添加量10 µg/g, n=3

表1に示したように、回収率は73.6~99.4%、CV値は0.2~8.6%であった。回収率ではゴーヤ茶葉で73.6%と若干低めであり、CV値は鉄錠剤において8.6%とやや高く、バラツキが見られたが、その他は5.1%以下と良好であった。その他についても回収率79%以上で良好な結果であった。また、いずれの試料においても妨害ピークはみられなかった。

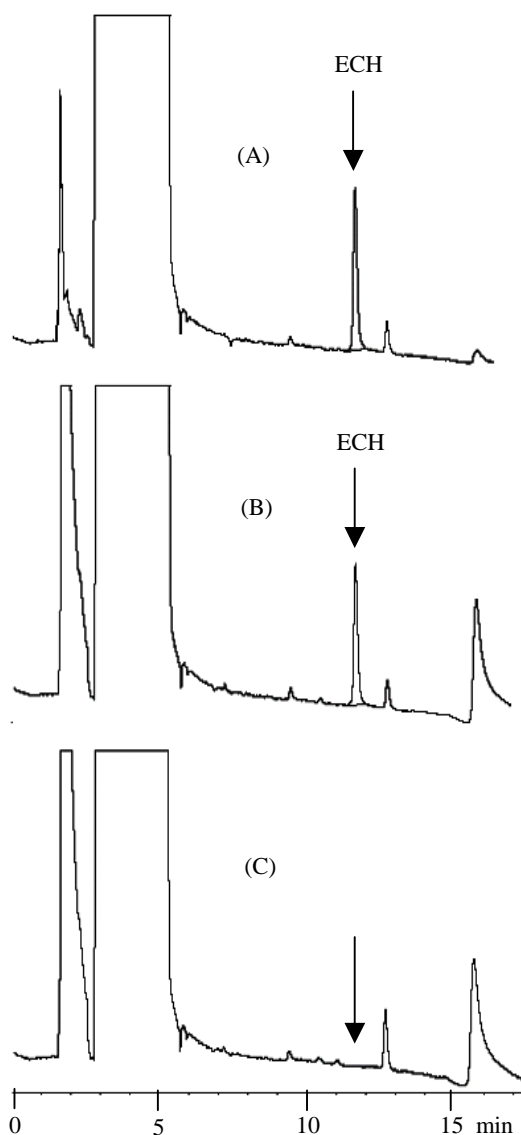


図1. ECHのガスクロマトグラム

- (A) : ECH標準溶液 (0.2 µg/mL)
 (B) : グルコサミン加工品の添加試料 (添加量10 µg/g)
 (C) : グルコサミン加工品の無添加試料

GC測定条件 : 実験方法 3. 1) (1)操作条件による

図1にグルコサミン加工品にECHを10 µg/gを添加した時のガスクロマトグラムを示した。標準溶液と試験溶液のリテンションタイムのずれはなく、良好なクロマトグラムを示した。また、クロマトグラムに妨害となる成分のほとん

どは6分以内に出現し、目的成分に対する妨害は見られなかった。また、実験に用いた健康食品の成分は多種にわたっていたが、定量に全く影響は見られなかったことから、本法は様々な食品中のECH分析にも適用できると考える。

5. 市販食品への適用

霊芝加工品など健康食品を中心に実験方法の1. 試料で示す18種20試料に本法を適用したところ、ECHは全ての試料からも定量限界値以下であった。しかし、EOは揮散しやすく素材への浸透性に優れ、低温で殺菌効果を有するという特徴がある⁹⁾ため今後も食品に使用される可能性があり、市販食品での残留実態調査を継続する必要があると考える。

ま と め

1. 食品に残留するECHの分析法を検討した。
2. アセトニトリルを用いて超音波で抽出後、油脂分の少ない試料についてはC18及びGCBカラムで、油脂分の多い試料はGCB/PSAカラムでそれぞれ精製しGC/ECDで測定した。
3. 健康食品を中心に添加回収率を測定した結果、回収率73.6~99.4%であり、定量限界は5 µg/gであった。
4. 健康食品など18種20試料に本法を適用したところ、いずれの試料からもECHは検出されなかった。
5. 本法は、食品中のECH分析に十分使用できると考える。

なお、本研究は健康安全部食品監視課と連携して実施したものである。

文 献

- 1) F. Tateo, M. Bonoti: Journal of Food Composition and Analysis, **19**, 83-87, 2006.
- 2) J. Fowles, J. Mitchell, H. McGrath: Food and Chemical Toxicology, **39**, 1055-1062, 2001.
- 3) W. G. Van Rillaer and H. Beernaert: Z. Lebensm. Unters. Forsch., **175**, 175-178, 1982.
- 4) <http://www.jaish.gr.jp/anzen/gmsds/0565.html> (2008年8月22日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) 植村振作, 河村 宏, 辻万千子: 農薬毒性の辞典 第3版, P278, 2006, 三省堂, 東京
- 6) N. A. BALL: Journal of Pharmaceutical Sciences, **73**, 9,1305-1307, 1984.
- 7) Karen. Gram. Jensen: Z. Lebensm. Unters. Forsch., **187**, 535-540, 1988.
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全基準審査課長通知: 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物医薬品の成分である物質の試験法について (一部改正), 平成17年11月29日付食安基発第1129002号(2005).
- 9) 細貝祐太郎: 食衛誌, **12**, 349-363, 1971.

Determination of Ethylene Chlorohydrin Residues in Foods by GC/ECD

Yoko YAMADA^{*}, Eiko AMAKAWA^{*}, Keiko HIRATA^{*},
Toshihiro NAGAYAMA^{**} and Hirofumi USHIYAMA^{**}

An analytical method on ethylene chlorohydrin (ECH) residues in foods was studied. A sample was extracted with acetonitrile by ultrasonication. The extract was cleaned using C18 and graphite carbon or graphite carbon/PSA columns. Determination of ECH was performed by GC/ECD. Recovery of ECH from processed foods that contain ginseng or something similar to crude drugs was 73.6–99.4%. The limit of determination was 5 µg/g. Twenty samples of 18 types of health foods were analyzed by this method, and ECH was not detected in all samples. This method was efficiently used to determine the level of ECH in foods.

Keywords: Ethylene Chlorohydrin , gas sterilization with ethylene oxide, health foods, GC/ECD, food

^{*} Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

^{**} Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan