

GC及びGC/MSによる食品中のジエチレングリコール、 エチレングリコール及びプロピレングリコールの分析

小林千種*, 早藤知恵子*, 安井明子*, 藤原卓士*, 高桑智子*, 中里光男*

食品中のジエチレングリコール、エチレングリコール及びプロピレングリコールのGC及びGC/MSによる一斉分析法を検討した。試料を*n*-ヘキサンで脱脂してメタノールで抽出後、固相抽出カートリッジ (SAX/PSA) を用いて精製したものを試験溶液とした。各成分はGC/FIDで定量をし、GC/MSを用いて確認を行った。カラムにはいずれもDB-WAXを用いた。各種食品を用いた添加回収試験において82~109%の回収率が得られ、GC/MSによる確認が可能であった。検出限界値は試料あたり10 µg/gであった。

キーワード : ジエチレングリコール, エチレングリコール, プロピレングリコール, GC, GC/MS, 食品

はじめに

2006年に発生したパナマにおける風邪薬シロップ剤のジエチレングリコール (DEG) 混入による多数の死者を伴う中毒事件及び2007年における米国等で中国製練り歯磨きへのDEG混入による輸入禁止措置などDEGに関する事件が相次いで発生し大きな問題となった¹⁾。また、わが国でも1985年に国産及び輸入ワインでのDEGの大規模な混入事件が発生した経緯もあることから²⁾、特に輸入食品についてDEG混入の可能性があるため、行政上の監視・検査の必要性が増している。

DEG混入の原因は、溶剤としてのグリセリンの代替として、あるいは甘味があることから甘みを付けるために故意に使用したものであった。このようなことから、DEGと同じグリコール類であり、甘味があり化学的性質と毒性も類似するエチレングリコール (EG) もDEGと同様に使用される可能性がある。

一方、グリコール類の中でもプロピレングリコール (PG) は食品添加物として麺類、餃子の皮等の品質保持剤または香料製剤の溶剤として広く使用されているが、この代替品としてDEGやEGが使用される可能性もある。また、近年、食品添加物としてのPGにも表示の無い焼菓子からの検出事例³⁾や、PGの表示の無いハーブティーにおける使用基準超過等の食品衛生法違反による自主回収事例があった。食品の安全確保の面からDEG及びEGと同様に、PGも行政上重要な検査項目であると考えらる。

従来から報告のある食品中のDEG分析法は、分析対象がワイン中^{4,6)}のDEGの1成分のみ、またはDEG、EG等のグリコール類について対象食品がワイン^{7,8)}またはチョコレート⁹⁾に限定されたものであった。そこで、DEGに加えてDEGと毒性が類似するEG及び食品添加物として使用されるPGの3成分のグリコール類を一斉に分析し、対象食品を液状および固形食品に拡大した方法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬

- 1) **標準品** : DEG, EG, PG (特級, 和光純薬工業 (株) 製)
- 2) **標準溶液** : DEG, EG, PGを各100 mg精秤し、メタノールに溶解して全量100 mLとしたものを混合標準原液とした (濃度 : 1,000 µg/mL)。これを適宜メタノールで希釈して混合標準溶液とした。
- 3) **固相抽出カートリッジ** : Bond Elut SAX/PSA (充填量 : 各500 mg, Varian社製) : 使用前にメタノール10 mLを用いて洗浄した。
- 4) **その他の試薬** : 市販特級品を用いた

2. 装置, GC条件及びGC/MS条件

- 1) **ガスクロマトグラフ** : (株) 島津製作所製GC-17A (FID検出器付き)
- 2) **ガスクロマトグラフ質量分析計** : (株) 島津製作所製GC-17Aに (株) 島津製作所製QP-5000を接続したものをを用いた。

なお、GC条件及びGC/MS条件はTable 1 に示した。

3. 試験溶液の調製

Fig. 1 に試験溶液の調製方法を示した。

- 1) **試料** : 固形試料の場合はミキサーまたはホモジナイザーを用いて均質化したものを容量50 mLの遠心管に5 gをとった。酒精飲料の場合は5 gをとり水浴上で加温してアルコール分を除去した。
- 2) **脱脂操作** : 1)の試料に*n*-ヘキサン30 mLを加えて10分間振とうし、3,000 rpmで5分間遠心分離後、ヘキサン層を除去した。さらに残渣あるいは水層に*n*-ヘキサン30 mLを加えて10分間振とうし、3,000 rpmで5分間遠心分離後ヘキサン層を捨て、残留した少量のヘキサンは40°Cの水浴上に放置して十分に除去した。
- 3) **抽出・精製** : 脱脂操作後、メタノールを加えて50 mL

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

にメスアップし、30分間超音波洗浄機にかけて抽出した。3,000 rpmで10分間遠心分離後、上清20.0 mLをSAX/PSAカートリッジに注入し、メタノール10 mLを用いて溶出した。カートリッジからの流出液と溶出液を合わせて減圧濃縮し、メタノールに溶かして2.0 mLとしたものをGC及びGC/MS用の試験溶液とした。

4. GCによる定量

10~500 µg/mLの混合標準溶液1 µLをGCに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液1 µLをGCに注入して得られたピーク面積から検量線を用いて計算し、試験溶液中のDEG, EG, PGの濃度を求めた。

5. GC/MSによる確認

試験溶液1 µLをGC/MSに注入し、得られたピークの保持時間及びマススペクトルのパターンを標準溶液と比較してそれらが一致することにより、DEG, EG, PGの確認とした。

結果及び考察

1. 試験溶液の調製

食品からDEG, EG及びPGの3成分を抽出する溶媒は、これらの溶解性が高いこと及びDEGとPGの個別分析法でも採用されていることから、メタノールを用いることとした。しかし、メタノールで抽出する際、脂肪分を多く含む食品

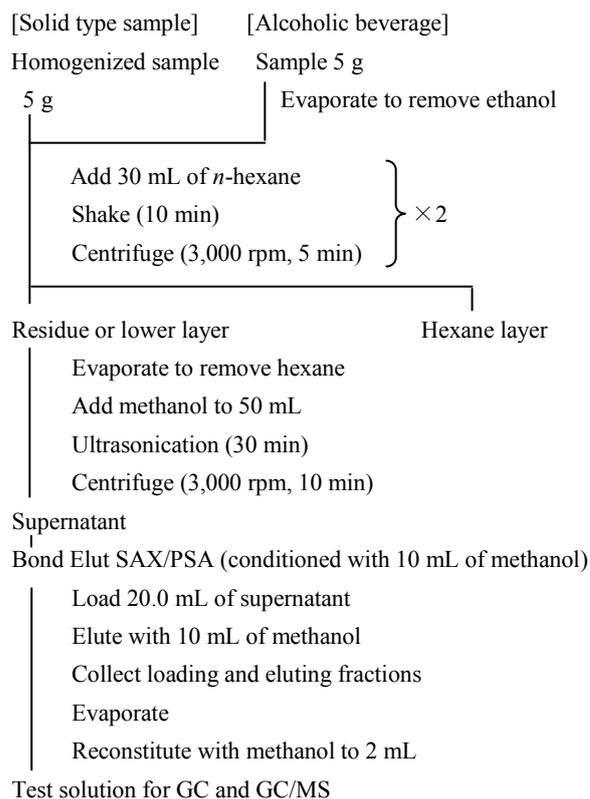


Fig. 1. Analytical Procedure for Glycols in Foods

Table 1. Operating Conditions of GC and GC/MS

GC Conditions	
Equipment	GC : Shimadzu GC-17A
Detector	FID
Column	DB-WAX (0.25 mm i.d.×30 m, film 0.25 µm, J&W Scientific)
Injector Temperature	250°C
Detector Temperature	250°C
Injection Mode	Splitless (Sampling Time : 1 min)
Injection Volume	1 µL
Carrier Gas Pressure	150 kPa (He)
Oven Program	70°C (1 min)→5°C /min→180°C (0 min)→30°C /min→250°C (10 min)
GC/MS Conditions	
Equipment	GC : Shimadzu GC-17A, MS : Shimadzu QP-5000
Column	DB-WAX (0.25 mm i.d.×30 m, film 0.25 µm, J&W Scientific)
Injector Temperature	250°C
Interface Temperature	250°C (Ion Source Temperature : 250°C)
Injection Mode	Splitless (Sampling Time : 1 min)
Injection Volume	1 µL
Carrier Gas Pressure	100 kPa (He)
Oven Program	60°C (1 min)→5°C /min→180°C (0 min)→30°C /min→250°C (10 min)
MS Mode	EI (70 eV), Full Scan (<i>m/z</i> 33-150)
Detector Gain	1.5 kV

から抽出する場合に脂肪を含む層が分離するため、あらかじめ脱脂することが必要であった。そこで、脱脂をするための溶媒について検討を行った。DEG, EG, PGはジエチルエーテル、酢酸エチルに溶解するが*n*-ヘキサンには溶解しないこと、及び脱脂に*n*-ヘキサンを用いるDEGの分析法の報告⁹⁾があることから、脱脂用の溶媒には*n*-ヘキサンを用いることにした。また、脂肪分の比較的小さい食品についても脱脂操作を行ったところ、クロマトグラム上の夾雑ピークが減少したため、全ての食品について脱脂操作を行うことにした。

しかし、脱脂後の試料からメタノールを用いて抽出し、抽出液を濃縮してメタノールで定容したものをGCに注入したところ、分析対象物質3成分の定量妨害となる夾雑ピークの除去は充分ではなかった。そこで、固相抽出カートリッジを用いた精製法を検討した。メタノール溶液中のDEG, EG, PGを保持せず高極性の夾雑物を保持する性質を持つアルミナについて、また、GCによる分析で夾雑ピークとなる揮発性遊離脂肪酸類等を除去する目的で陰イオン交換系の固相を検討対象とした。アルミナカラムは、Sep-Pak Alumina-N, Sep-Pak Alumina-A, Sep-Pak Alumina-Bについて、陰イオン交換系カラムは、Bond Elut PSA (1 g), Bond Elut SAX (1 g), Bond Elut NH₂ (1 g), Bond Elut SAX/PSA (各500 mg), Oasis MAX plus (225 mg) を用いて検討した。これら各種カートリッジに50 µg/mLの混合標準溶液20 mLを負荷し、メタノール10 mLで溶出したときの流出液及び溶出液を合わせたものについて回収率を調べた。その結果、DEGについてはいずれのカラムにおいても80%以上の回収率が得られたが、3種類のアルミナカラムとNH₂カラムにおけるPG及びEGの回収率は50%以下であった。PSA, SAX, MAX及びSAX/PSAにおける3成分の回収率はいずれも80%以上得られた。SAX/PSAの場合、3成分の回収率は95~96%で最も高い回収率が得られた。そこで、これら4種類のカートリッジを紹興酒のメタノール抽出液の精製に用い

たところ、SAX/PSAを用いた場合に夾雑ピークが最も減少したのでこれを用いることとした。

2. GC条件

GC及びGC/MS条件は、米国FDAの練り歯磨き中のPG, EG, DEGを含む5成分のグリコール類分析法のGC/MS条件¹⁰⁾を参考とし、昇温条件等は夾雑成分との分離を考慮し変更を加えた (Table 1)。本条件で分析したところ、PG, EG, DEGの各成分の分離やピーク形状は良好であった。3成分の検量線は、10~500 µg/mLに調製した混合標準溶液を用い絶対検量線法で検量線を作成したところ、いずれも原点を通る直線を示した。一般的にGCによる定量は内部標準を用いた定量法を採用するが多い。食品衛生検査指針¹¹⁾及び衛生試験法¹²⁾のPG分析法ではトリメチレングリコール (TMG) を内部標準物質として使用する方法を採用している。しかし、紹興酒やワインからGC/MSにより10 µg/g以上のTMGを検出したので、TMGを内部標準に使用できないことがわかった。また、各種食品を分析した場合、GCクロマトグラム上には多くのピークが検出される場合が多いこと

Table 2. Recoveries of Glycols from Foods

Sample	Recovery (%) [*]		
	DEG	EG	PG
Biscuit	106±4.5	103±3.4	94.0±1.9
Jelly	108±5.7	107±5.6	108±7.0
Shao Xing Rice Wine	81.6±4.0	84.0±3.6	93.4±4.2
Wine	103±0.2	82.6±4.4	108±13.0
Buckwheat Noodles	106±4.1	84.4±9.0	89.0±6.2
Frozen Chinese Dumpling	109±1.5	83.2±2.9	89.5±6.8

^{*} Mean±SD (n=3) ; Added 50 µg/g

DEG : Diethylene Glycol

EG : Ethylene Glycol

PG : Propylene Glycol

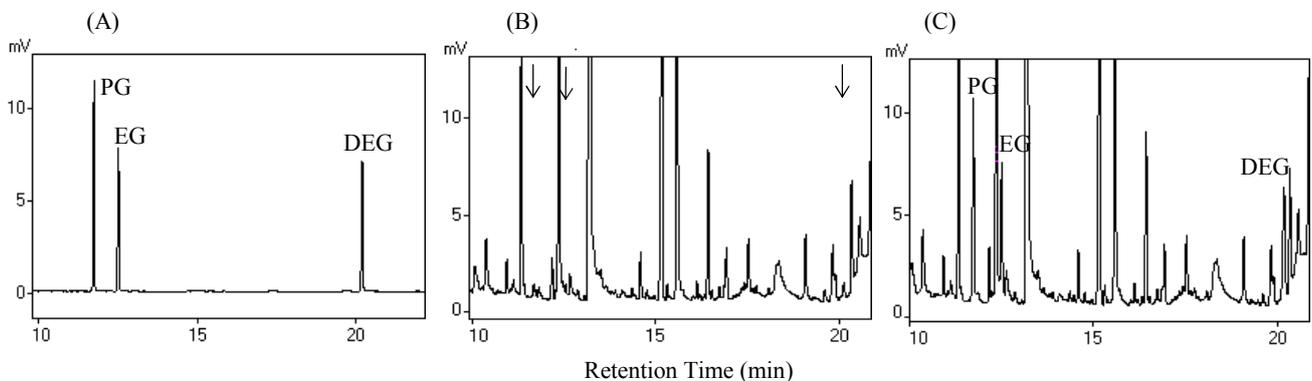


Fig. 2. GC/FID Chromatograms of Glycols in Standard Solution and Sample Extracts

(A) : Standard (50 µg/mL)

(B) : Frozen Chinese Dumpling (Control)

(C) : Frozen Chinese Dumpling (Added 50 µg/g)

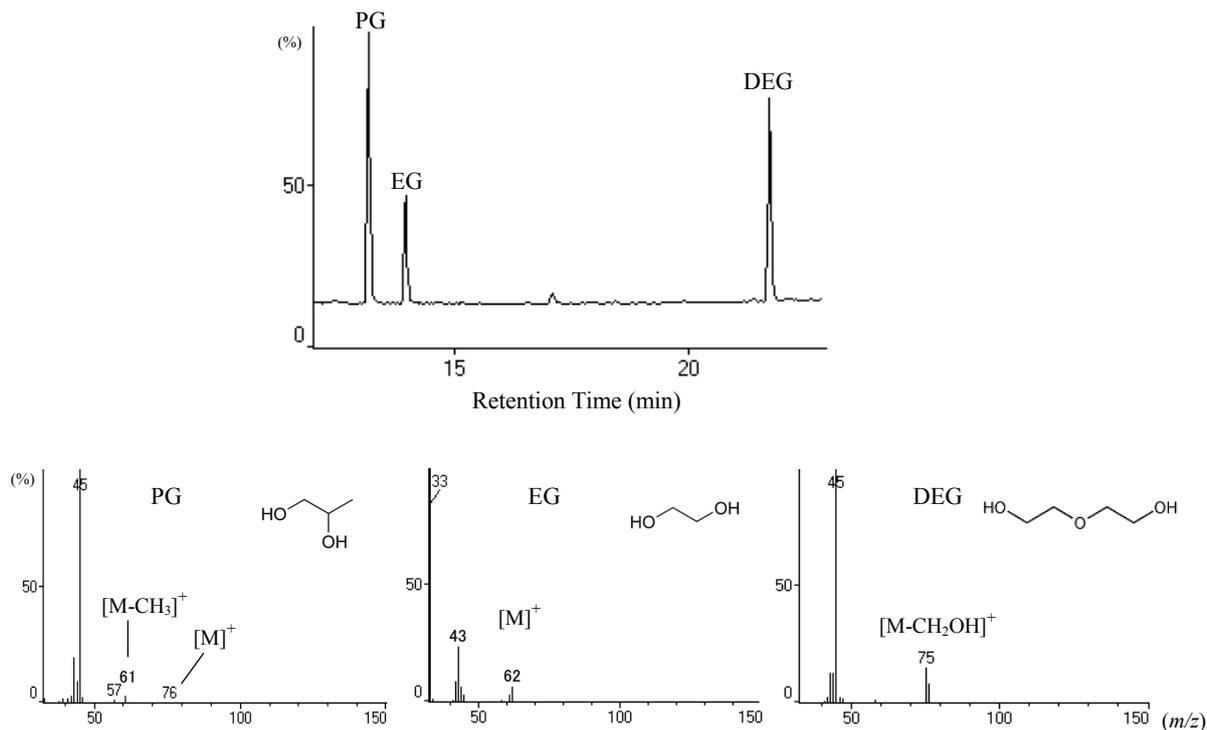


Fig. 3. GC/MS(TIC) Chromatogram and Mass Spectra of Glycols in Standard Solution

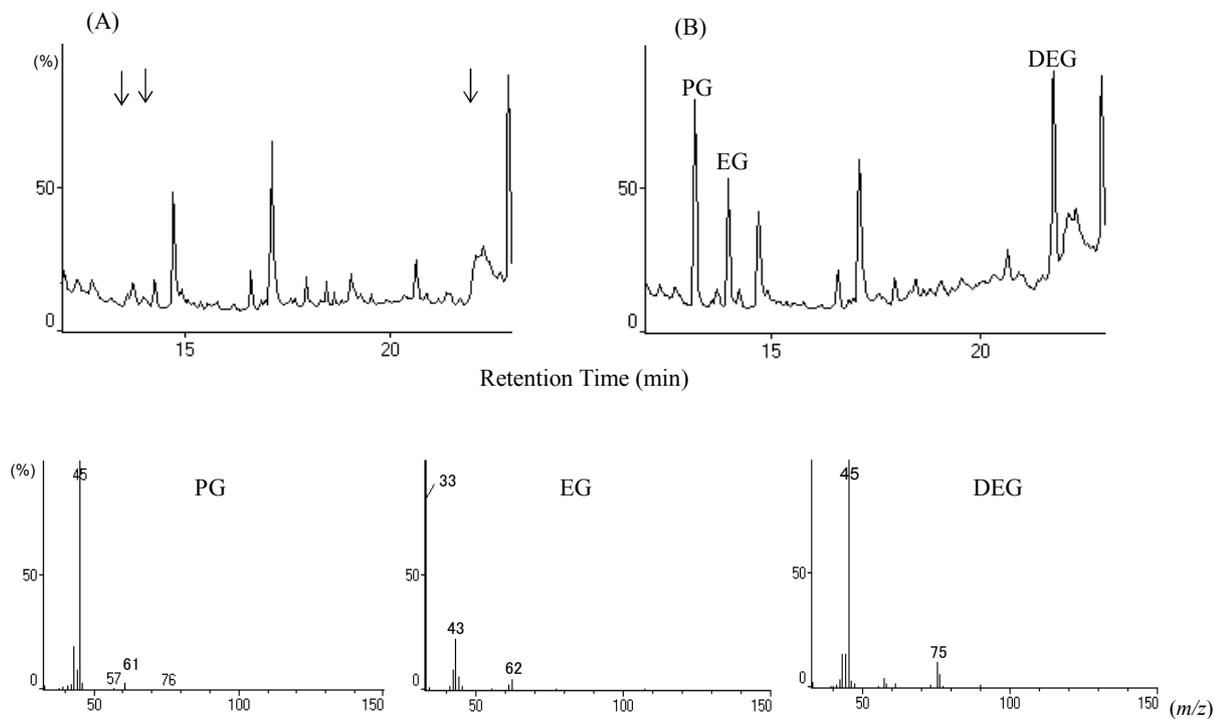


Fig. 4. GC/MS(TIC) Chromatograms and Mass Spectra of Glycols in Sample Extracts

(A) : Biscuit (Control) (B) : Biscuit (Added 50 µg/g)

から内部標準法は用いず、絶対検量線法を採用することにした。

3. 添加回収試験

市販のビスケット、ゼリー、紹興酒、ワイン、ゆでそば及び冷凍餃子にDEG, EG, PGの3成分を50 µg/gとなるように添加し、本法に従って分析した。冷凍餃子のGCクロマトグラムをFig. 2に示した。無添加のゼリー、紹興酒及びワインからPGが検出されたので、添加食品中の含有量から無添加食品の含有量を差し引いて回収率を計算した。添加回収試験結果をTable 2に示した。回収率の平均値は81.6~109%、標準偏差は0.2~13という結果が得られた。定量下限値は試料中濃度として10 µg/gであった。

4. GC/MSによる確認

定性的な確認を行うため、フルスキャンによるTICクロマトグラム上のピークの保持時間の一致及びMSスペクトルのパターン的一致をみる方法を採用した。分析対象成分の分子量は、EGは62, PGは76, DEGは106であること及びEGのフラグメントイオンである m/z 33を確認するため、スキャン範囲を m/z 33~150とした。Fig. 3に標準品のTICクロマトグラムとDEG, EG, PGの3成分のマススペクトルを示した。添加回収実験に用いた各食品の試験溶液をGC/MSを用いて分析したところ、試料中の3成分のマススペクトルのパターンは標準品とよく一致した。Fig. 4に例としてビスケットを用いた場合のTICクロマトグラムとDEG, EG, PGの3成分のマススペクトルを示した。以上のことから、GC/MS法はこれら3成分の確認手段として有用なことが認められた。確認試験の検出限界は試料あたり10 µg/gであった。

5. 添加回収試験に用いた食品中のグリコール類について

添加回収実験に用いた6種類の市販食品を分析したところ、いずれもEG及びDEGは検出されなかった。ゆでそば、冷凍餃子及びビスケットからはPGが検出されなかったが、ワイン、紹興酒及びゼリーから37, 50, 150 µg/gのPGを検出し、いずれもGC/MSによりPGと確認した。6食品のうち、ゼリーにのみ香料の添加表示があったことから、検出されたPGは香料製剤の溶剤由来と考えられた。また、17種類のワインからPG, TMG等の各種ジオール類を検出し、そのうちPGについては12~137 mg/L検出されたというSponholzらの報告¹³⁾があることから、添加回収実験に用いたワイン、紹興酒から検出されたPGも発酵による天然由来成分であると思われる。また、最近TMGについても、ワインから分離された乳酸菌がTMGを産生することがPasterisらにより報告されたので¹⁴⁾、添加回収実験に用いたワイン、紹興酒から検出されたTMGも、PGと同様に発酵過程で生成されたものと考えられた。

ま と め

1. 食品中のDEG, EG及びPGの3成分をGC及びGC/MSによって一斉に分析する方法について検討した。
2. 試験溶液の作製は、*n*-ヘキサンによる脱脂、メタノールによる抽出、固相抽出カートリッジ (SAX/PSA) による精製を組み合わせることにより行った。
3. GC/FIDによる定量法では、3成分の回収率は81.6~109%という結果が得られた。定量下限値は試料あたり10 µg/gであった。
4. GC/MSによって得られたピークの保持時間及びマススペクトルのパターン的一致により試料中のDEG, EG及びPGの確認を行うことができた。検出限界値は試料あたり10 µg/gであった。

文 献

- 1) TU Anthony. T. : 現代化学, **458**, 64-66, 2009.
- 2) 田村行弘, 安田和男, 橋本秀樹, 他 : 東京衛研年報, **37**, 187-196, 1986.
- 3) 東京都福祉保健局健康安全室食品監視課 : 平成18年度食品衛生関係違反処理集計表, 2007.
- 4) 厚生労働省監修 : 食品衛生検査指針・理化学編, 481-484, 2005, 日本食品衛生検査協会, 東京.
- 5) Uchiyama S., Kawamura Y., Maitani S. : 食衛誌, **27**, 283-287, 1986.
- 6) 堀義宏, 長南隆夫, 西沢信 : 食衛誌, **27**, 187-189, 1986.
- 7) 安藤徹, 坂江博見, 中嶋茂, 他 : 食品衛生研究, **40**, 65-70, 1990.
- 8) 野沢竹志, 大石充男, 平田恵子, 他 : 東京衛研年報, **37**, 197-202, 1986.
- 9) Raurence C., Cloke H.R., Startin J.R. : *Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 499-502, 1988.
- 10) <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/DrugChemicalResiduesMethodology/ucm113209.htm> (2009年9月1月現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 11) 厚生労働省監修 : 食品衛生検査指針・食品添加物編, 519-524, 2003, 日本食品衛生検査協会, 東京.
- 12) 日本薬学会編 : 衛生試験法・注解2005, 312-314, 2005, 金原出版, 東京.
- 13) Sponholz W.R., Dittrich H.H., Munro H. : *Wein-Wissenschaft*, **49**, 23-26, 1994.
- 14) Pasteris S.E. and Strasser de Saad A.M. : *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 3853-3858, 2009.

Determination of Diethylene Glycol, Ethylene Glycol, and Propylene Glycol in Foods by GC and GC/MS

Chigusa KOBAYASHI*, Chieko HAYAFUJI*, Akiko YASUI*,
Takushi FUJIWARA*, Tomoko TAKAKUWA* and Mitsuo NAKAZATO*

An analytical method for determining diethylene glycol (DEG), ethylene glycol (EG), and propylene glycol (PG) in various foods using GC and GC/MS was developed. Food was defatted with *n*-hexane, and DEG, EG, and PG were extracted with methanol by ultrasonication. After extraction, the methanol layer was purified with a Bond Elut SAX/PSA cartridge, and the extract was determined by GC/FID and identified by GC/MS. The recoveries of DEG, EG, and PG from 6 types of food were between 82% and 109%. The limit of detection of these compounds in the different foods was 10 µg/g.

Keywords: propylene glycol, ethylene glycol, diethylene glycol, GC, GC/MS, food

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