

## 食用油脂中のチオジプロピオン酸の分析法

中里光男\*, 松本ひろ子\*, 安田和男\*

### Determination of Thiodipropionic Acid in Edible Oils and Fats

Mitsuo NAKAZATO\*, Hiroko MATSUMOTO\* and Kazuo YASUDA\*

A method for the determination of thiodipropionic acid in edible oils and fats by HPLC and GC/MS was developed.

Refined oils and fats, except sesame oil and seasoning oil such as cayenne pepper oil, were dissolved in *n*-hexane and extracted with acetonitrile-water (3:7). The extracts were separated on a Capcell Pak C18 MG column with a mobile phase of acetonitrile-0.02 %H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (8:92) and thiodipropionic acid was determined with a UV detector (210 nm). Sesame oil and seasoning oil were dissolved in *n*-hexane and extracted with acetonitrile-water (3:7), and the extracts were then treated with a Mega Bond Elut SAX cartridge and analyzed by HPLC under the above conditions. The thiodipropionic acid in the edible fats and oils was confirmed by means of GC/MS.

The recoveries of thiodipropionic acid added to various kinds of edible fats and oils were 92.5~95.4 %. The determination limit of thiodipropionic acid was 0.5 μg/g.

**Keywords** : チオジプロピオン酸 thiodipropionic acid, 食用油脂 edible oil, 酸化防止剤 antioxidant, シネルギスト synergist

#### はじめに

食用油脂に用いられる酸化防止剤にはBHAやBHTのようなラジカル阻害剤のほかに、銅や鉄などの酸化促進作用を阻害したり、ラジカル阻害剤と共存することでその作用を増強させる、いわゆるシネルギストと呼ばれるものがある。我が国ではシネルギストとしてクエン酸やクエン酸イソプロピルなどが用いられている。しかし、アメリカ<sup>1,2)</sup>やフィリピン<sup>3)</sup>などではシネルギストとして我が国では食品添加物として指定されていないチオジプロピオン酸(TDPA)の油脂への使用を認めている。

食品添加物としてのTDPAは米国の連邦規則(Code of Federal Regulations)の中でGRAS物質に規定され、合成保存料に分類されているが<sup>1)</sup>、その主要用途は食用油脂の酸化防止剤、すなわちシネルギストである<sup>2)</sup>。JECFAによる評価では、ADIは0~3 mg/kg/日とされている<sup>3)</sup>。

近年の食料輸入の増加と共にこのような指定外の酸化防止剤を使用した食用油脂が輸入される可能性が高まってきており、検査を行う必要が生じている。そこで、食用油脂中のTDPAの分析法を開発し、検査に供することにした。

TDPAの食用油脂からの分析法にはTLCによる定性分析法<sup>4,5)</sup>が報告されている以外はほとんど見られない。そこで、今回はHPLCを用いた定性及び定量法について検討すると共に、さらにGC/MSによる確認法についても合わせ

て検討した。その結果について報告する。

#### 実験方法

##### 1. 試料

市販のサフラワー油、ピーナッツ油、オリーブ油、ゴマ油、パーム油、ラード、ラー油、マーガリンを用いた。

##### 2. 試薬

1)標準溶液: TDPA(東京化成工業(株)製)100 mgを精秤し、アセトニトリル・水(3:7)混液に溶解し、全量100 mLとしたものを標準原液とした。これをアセトニトリル・水(3:7)混液で希釈し、1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50 μg/mLの濃度系列を調製してTDPAの標準溶液とした。

2)前処理用カートリッジカラム: Mega Bond Elut SAX(1 g/6 cc, Varian社製)を用いた。本カートリッジは使用前にメタノール10 mL及び水10 mLで洗浄した。

3)アセトニトリル: HPLC用

4)その他の試薬は市販特級品を用いた。

##### 3. 装置

高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業(株)製PU-980型ポンプ, 同UV-970型検出器, 同DG-980-50型デガッサー, 同AS-950型オートサンプラー, (株)島津製作所製CTO-6A型恒温槽及び同C-R6A型データ処理装置で構成したものをを用いた。

\* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科: 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

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

ガスクロマトグラフ/質量分析計：(株)島津製作所製 GC-17A ガスクロマトグラフ, 同 AOC-20i オートインジェクター, 同 GCMS-QP-5050A 質量分析計で構成したものをを用いた。

#### 4. 試験溶液の調製

サフラワー油, ピーナッツ油, オリーブ油, パーム油, ラード及びマーガリン: 試料 10 g を n-ヘキサン 50 mL に溶解したのち, アセトニトリル・水(3:7)混液 45 mL でよく振り混ぜて抽出した。抽出液を分取し, アセトニトリル・水(3:7)混液で全量 50 mL にメスアップしたのち, メンブレンフィルターでろ過し, HPLC 用の試験溶液とした。

ゴマ油及びラー油: 試料 5 g を n-ヘキサン 50 mL に溶解したのち, アセトニトリル・水(3:7)混液 45 mL でよく振り混ぜて抽出した。抽出液を分取し, アセトニトリル・水(3:7)混液で全量 50 mL にメスアップしたものをクリーンアップ用試料溶液とした。次にクリーンアップ用試料溶液の 10 mL を取り, Mega Bond Elut SAX カートリッジに負荷し, 水 10 mL 及びアセトニトリル 10 mL で洗浄したのち, 0.1 mol/L 塩酸 5 mL で溶出し, HPLC 用の試験溶液とした。

#### 5. HPLC による定性及び定量

各試験溶液を高速液体クロマトグラフに付し, TDPA 標準品の保持時間と比較して定性を行った。また, TDPA の標準溶液を用いて作成した検量線によって試験溶液中の TDPA 濃度を求めた。

##### HPLC 条件

カラム: Capcell Pak C18 MG (5  $\mu$ m, 4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm, SHISEIDO(株)製), 移動相: アセトニトリル・0.02%リン酸(8:92), 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40  $^{\circ}$ C, 検出波長: UV 210 nm, 注入量: 10  $\mu$ L

#### 6. GC/MS による TDPA の確認

サフラワー油, ピーナッツ油, オリーブ油, パーム油, ラード及びマーガリンについては, HPLC 用に調製した試験溶液の一定量(20~30 mL)をとり, これにリン酸 1 mL を加えて酢酸エチル 50 mL で 2 回抽出した。酢酸エチル層を合わせ, これに 1%炭酸水素ナトリウム溶液 50 mL を加えてよく振り混ぜたのち, 水層を分取した。次に水層に塩酸を加えて酸性を確認したのち, 酢酸エチル 50 mL で 2 回抽出した。酢酸エチル層を合わせ, 無水硫酸ナトリウムで脱水したのち, ろ紙でろ過し, 溶媒を留去した。得られた残留物にジアゾメタン・エチルエーテル溶液の黄色が十分持続するまで加え, 30 分間放置した。次いでエーテルを減圧留去し, 残留物に酢酸エチル 2 mL を加えて溶解したものを GC/MS 用の試験溶液とした。

ゴマ油及びラー油についてはクリーンアップ用試料の一定量(20~30 mL)をとり, 以下 サフラワー油等と同様に処理して GC/MS 用の試験溶液を調製した。

##### GC/MS 条件

カラム: BPX35(0.25 mm i.d.  $\times$  30 m, 膜厚 0.25  $\mu$ m, SGE International 社製), カラム温度 80 (2 min) 10

/min 220, 注入口温度: 200  $^{\circ}$ C, インターフェース温度: 230  $^{\circ}$ C, キャリヤーガス: He 80 kPa, 注入量: 1  $\mu$ L (スプリット比 20:1), イオン化電圧: 70 eV, 検出器電圧: 1.2 kV, 測定モード: スキャン, スキャン範囲:  $m/z$  35~300

#### 結果及び考察

##### 1. 抽出条件

TDPA の各種食用油脂からの抽出について検討した。TDPA は強酸性物質で水やアルコール等の極性溶媒に良く溶け, また, エーテルや酢酸エチル等の有機溶媒にも比較的良く溶解する。しかし, n-ヘキサンにはほとんど溶解しないことから, n-ヘキサンと水あるいはアルコール等の極性溶媒との液液分配によって抽出する方法について検討した。

TDPA を 100  $\mu$ g/g となるように添加したサフラワー油 10 g 及びゴマ油 5 g の各々を n-ヘキサン 50 mL に溶解し, 抽出溶媒については 水, メタノール・水(3:7)混液, アセトニトリル・水(3:7)混液, 1%炭酸水素ナトリウム溶液の各 50 mL を用いてそれぞれ抽出率を求めたところ 1 回の抽出でいずれも 97%以上の抽出率が得られた。しかしながら, 水及び 1%炭酸水素ナトリウム溶液では特にゴマ油においてエマルジョンをおこし, 液層の分離の点で難があった。一方, アセトニトリル・水及びメタノール・水混液ではエマルジョンも少なく, 分離も容易であった。特にアセトニトリル・水混液での分離が最も良かったので本法ではアセトニトリル・水(3:7)混液で抽出することにした。

##### 2. クリーンアップ

サフラワー油, ピーナッツ油, オリーブ油, パーム油, ラード及びマーガリンからの抽出液はそのまま HPLC に付しても夾雑ピークは少なく, あえてクリーンアップ操作を行う必要は認められなかった。しかし, ゴマ油やゴマ油と唐辛子を主原料とするラー油では夾雑ピークが多く, 定性及び定量は不可能であった。また, HPLC のクロマトグラム上に 1 時間以上もピークが出現し, 次の試料の注入間隔が長くなるなどの欠点があった。そこで, これらの点を改善するために簡便なクリーンアップ用カートリッジを用いた精製法について検討した。その結果, 強陰イオン交換タイプのカートリッジで処理した場合に, 極めて大きなクリーンアップ効果が得られることが分かった。すなわち, Mega Bond Elut SAX カートリッジに試料溶液を負荷し, 水及びアセトニトリルを用いて洗浄したところ, ほとんどの夾雑物が除去されることが分かった。そこで, ゴマ油やラー油のように妨害物の多い試料については, 陰イオン型カートリッジで処理する工程を追加することにした。ゴマ油におけるクリーンアップ前後のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

##### 3. HPLC 条件

HPLC での分離にはカラムに ODS を用い, 移動相にはアセトニトリル・水(8:92)を用いて検討した。TDPA は酸性物質であり, 移動相中では解離した状態にあるため, 安

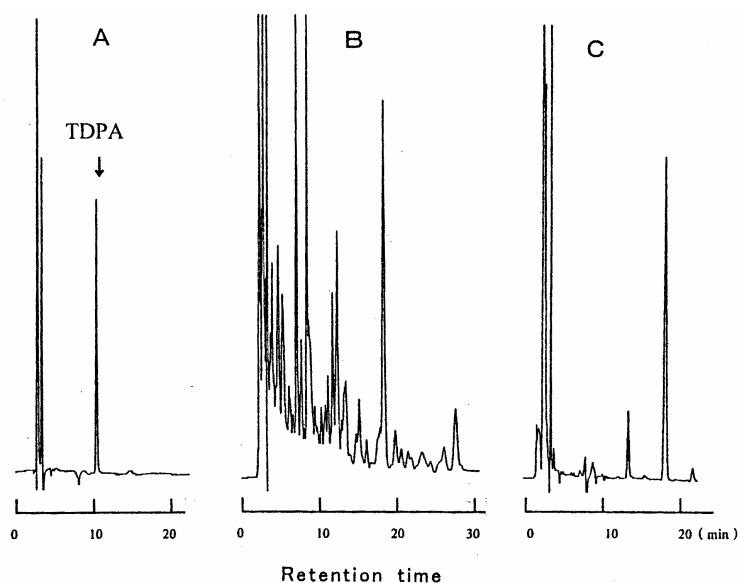


Fig.1. Chromatograms of Sesame Oil before and after SAX Cartridge Treatment.

A : thiodipropionic acid standard (5  $\mu$ g/mL)

B : before SAX cartridge treatment

C : after SAX cartridge treatment

HPLC conditions : column, Capcell Pak C18 MG (5  $\mu$ m, 4.6mm i.d.  $\times$  250mm) ;

mobile phase, acetonitrile-0.02% $H_3PO_4$  (8:92) ; flow rate, 1.0mL/min ; column temp., 40 ;

detection, 210nm

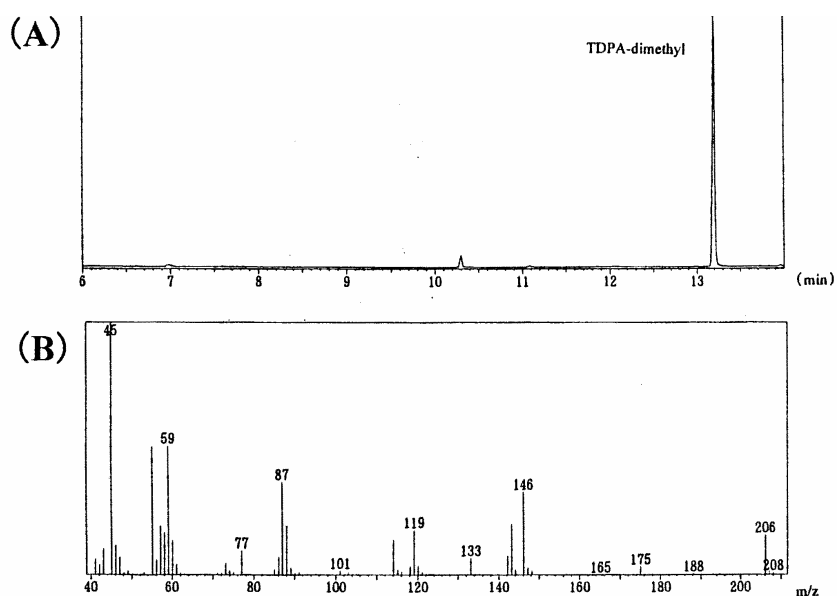


Fig.2. GC/MS Chromatogram (A) and GC/MS Spectrum (B) of Methyl Derivative of Thiodipropionic Acid Extracted from Sesame Oil

GC/MS conditions : column, SGE International BPX35 (0.25mm i.d.  $\times$  30m,

0.25  $\mu$ m film thickness) ; column temp., 80 (2min) 10 /min 220 ;

injection temp., 200 ; detector temp., 230

定した分離の良いシャープなピークを得るためには、移動相の pH を 3.5 以下とし、TDPA のイオン化を抑制する必要があった。そこで、移動相組成成分の水を 0.02 %リン酸に変更し、移動相の pH を 3.0 に調整することにした。

移動相のアセトニトリルと 0.02 %リン酸の比率を 8:92

としたところ、TDPA の保持時間は 10 分前後であり、分析時間も 25 分程度で終了することができた。また、本条件下では加工油脂成分やシネルギストとして試験溶液中に混在する可能性のある酢酸、プロピオン酸、クエン酸、酒石酸、乳酸等のオキシ酸は保持時間で 7 分以前に出現し、

その他、特に妨害となるようなピークも認められなかった。

#### 4. 検量線

検量線は TDPA の 1 ~ 50  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で直線性 ( $r=0.999$ ) が得られた。定量限界は試料中濃度として 0.005 g/kg であった。

#### 5. GC/MS による確認

HPLC で TDPA が検出された場合の確認法として GC/MS による方法について検討した。しかしながら、TDPA は極性の高い気化しにくい物質なので、メチル化剤等により誘導体化する必要がある。そこで、酢酸エチルに抽出した TDPA を一旦炭酸水素ナトリウム溶液で水層に転溶し、再び酢酸エチル層に抽出することで精製を行い、夾雑物の除去を行った後、メチル化を行った。本操作での TDPA の回収率はおおよそ 90 % であった。メチル化にはカルボン酸等のメチル化に良く使用されるジアゾメタンを用いた。

TDPA のメチル化体のマススペクトルを Fig. 2 に示した。  $m/z$  206 に TDPA のジメチルエステル分子量に相当するピークが検出され、その他、  $m/z$  59, 87, 119, 146 等のフラグメントイオンが検出された。これは NIST62 ライブラリーの TDPA ジメチルエステルのスペクトルと一致した。GC/MS 法は TDPA の確認に最適であると思われる。

#### 6. 添加回収率

市販のサフラワー油、ピーナッツ油、オリーブ油、パーム油、ラード、ゴマ油、ラー油及びマーガリンに 0.02 及び 0.10 g/kg となるように TDPA を添加し、本法にしたがって添加回収実験を実施した。結果は Table 1 に示したように回収率はいずれも 92 % 以上であった。

ラー油についての HPLC クロマトグラムを Fig. 3 に示

した。

本法は食用油脂の TDPA の分析法として十分使用できるものと思われる。

Table 1. Recoveries of Thiodipropionic Acid Added to Various Kinds of Oils and Fats

Sample	Recovery (%) *	
	0.02 g/kg	0.10 g/kg
Safflower oil	93.4 $\pm$ 1.2	95.1 $\pm$ 1.3
Peanut oil	93.9 $\pm$ 0.7	95.4 $\pm$ 0.6
Olive oil	94.3 $\pm$ 0.5	94.4 $\pm$ 1.0
Palm oil	94.2 $\pm$ 0.5	95.2 $\pm$ 1.2
Sesame oil	93.4 $\pm$ 1.9	93.4 $\pm$ 2.7
Lard	93.6 $\pm$ 1.1	94.3 $\pm$ 0.9
Cayenne pepper oil	92.5 $\pm$ 1.0	93.2 $\pm$ 1.0
Margarine	93.2 $\pm$ 1.8	92.4 $\pm$ 2.5

\* Mean  $\pm$  SD (n = 3)

#### まとめ

食用油脂中の TDPA の分析法について検討した。

食用油脂からの TDPA の抽出には液液分配法を用いて試験溶液を調製したが、ゴマ油やラー油などの一部の油脂については、さらに陰イオン型カートリッジで精製を行った。

HPLC による TDPA の定性及び定量はカラムに ODS を用い、イオン抑制法で夾雑物を分離し、UV 210 nm で測定することによって行った。

確認は TDPA をメチル化したのち、GC/MS を行い、標準品のスペクトルと比較することによって行った。

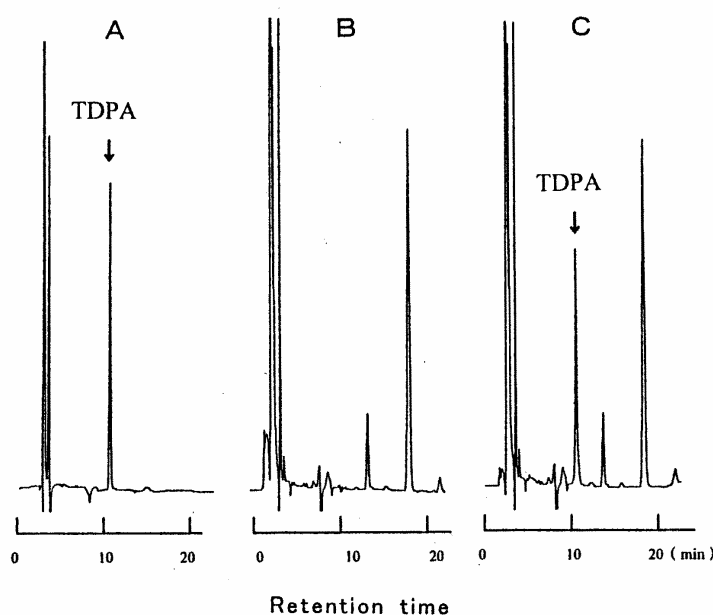


Fig.3. Chromatograms of Thiodipropionic Acid in Test Solution Prepared from Cayenne Pepper Oil

A : standard (5  $\mu\text{g/mL}$ )

B : control sample

C : spiked sample (20  $\mu\text{g/g}$ )

本法を各種食用油脂に適用したときの回収率は 92 %以上であり、定量限界は試料濃度として、0.005 g/kg であった。

本研究は、平成 13 年度厚生科学研究費補助金、食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究事業の「食品中の未許可添加物の分析法の開発」の一環として行った。

#### 文 献

- 1) 日本食品添加物協会食品添加物マニュアル編集委員会 編：2001 年度版 食品添加物マニュアル，379-429，2000，日本食品添加物協会，東京
- 2) 太田静行，日下兵衛：油化学，**28**，747-759，1979
- 3) 日本食品添加物協会食品添加物マニュアル編集委員会 編：2001 年度版 食品添加物マニュアル，281-352，2000，日本食品添加物協会，東京
- 4) Van Peteghem, C. H. and Dekeyser, D. A. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* , **64** , 1331-1335 , 1981
- 5) Gertz, C. and Herrmann, K. : *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* , **177** , 186-192 , 1983