

LC-MS/MS による食品中のフェノール系酸化防止剤の分析

脇山ひとみ・赤木浩一

福岡市保健環境研究所保健科学課

Determination of Phenolic Antioxidants in Foods by LC-MS/MS

Hitomi WAKIYAMA and Kouichi AKAKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

没食子酸プロピル (PG), 2,4,5-トリヒドロキシブチロフェノン (THBP), ノルジヒドログアヤレチック酸 (NDGA), ブチルヒドロキシアニソール (BHA), 2,6-ジ-tert-ブチルフェノール (HMBP), 没食子酸オクチル (OG), ジブチルヒドロキシトルエン (BHT), 没食子酸ドデシル (DG) の 8 種類のフェノール系酸化防止剤について, LC-MS/MS による定性確認法を検討した. LC 移動相として, LC-UV 法と同様に 5% 酢酸およびアセトニトリル:メタノール=(1:1)を用いてグラジエント分析を行うと, BHT と BHA 以外の 6 種類は良好なピーク形状と感度が得られた. 一方 BHT と BHA は, 酢酸の濃度を 0.05% に変更することで定性に必要な感度が得られた. 一般に酸化防止剤が使用される 5 種類の食品について, 添加回収試験を行ったところ回収率は 71%~148%であった.

Key Words : 液体クロマトグラフタンデム質量分析計 LC-MS/MS, フェノール系酸化防止剤 phenolic antioxidants, 食品 food

1 はじめに

酸化防止剤は, 食品に含まれる油脂成分の酸敗を防止するために用いられる添加物である. 酸化防止剤には, アスコルビン酸・エリスルビン酸など水溶性のものと α -トコフェロールやフェノール系酸化防止剤など脂溶性のものがある.

フェノール系酸化防止剤の中で, PG, BHA, BHT の 3 種類については, 日本国内において使用基準が定められている. 一方 THBP, TBHQ, HMBP, OG, DG は欧米では食品への使用が認められており, そのため TBHQ 等は輸入食品の検査で検出されている.

本所でのフェノール系酸化防止剤の分析方法は, 食品衛生検査指針¹⁾(以下, 検査指針)に準じて HPLC-UV/FL 法を用いている. この方法では, 目的物質と同じ保持時間で食品由来の妨害ピークが検出されることがあり, その場合にはカラムや移動相, または機器を変更して分析している.

検査指針には BHA および BHT についてのみ GC/FID による方法が示されている. 他の方法として辻らによる LC-MS を用いた方法²⁾や本所で検討した TBHQ について

検討した LC-MS/MS による方法³⁾があるが, OG や DG を含めた定性確認方法の報告はない.

そこで, フェノール系酸化防止剤 8 種について LC-MS/MS による定性確認法を検討したので報告する.

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内で購入したピーナッツバター&チョコクリーム, トマトソース, チューイングガム, クッキー, オリーブオイルの 5 検体を用いた.

2.2 試薬等

PG 標準品: 関東化学(株)製, M.W. 212.20

THBP 標準品: Fluka 社製, M.W. 196.21

NDGA 標準品: 関東化学(株)製, M.W. 302.4

BHA 標準品: 関東化学(株)製, M.W. 180.24

HMBP 標準品: 東京化成工業(株)製, M.W. 236.35

OG 標準品: 関東化学(株)製, M.W. 282.34

BHT 標準品: 関東化学(株)製, M.W. 220.35

DG 標準品：関東化学（株）製，M.W. 338.34

標準原液（1,000 μ g/mL）：標準品 100 mg をエタノールで溶解し 100 mL に定容した。

混合標準溶液（10 μ g/mL）：各標準原液を混合し，アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混合溶媒で 10 μ g/mL となるよう調製し，さらに混液で適宜希釈した。

アセトニトリル：関東化学（株）製，HPLC 用

2-プロパノール：関東化学（株）製，HPLC 用

エタノール：関東化学（株）製，HPLC 用

混合溶媒：アセトニトリル 400mL，2-プロパノール 200mL，エタノール 200mL を混和して作成した。

その他の試薬：特級試薬を使用した。

2.3 装置

ホモジナイザー：KINEMATICA 社製 POLYTRON PT3100

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1100

質量分析装置：AB SCIEX 社製 API4000

2.4 試験溶液の調製

検査指針を参考に試験溶液の調製を行った。粉碎した試料 5g を精密に量り取り混合溶媒 30mL および無水硫酸ナトリウム 5g を加えてホモジナイズした。少量の混合溶媒で洗い入れ，4°C の冷蔵庫で 1 夜静置し，吸引ろ過後，混合溶媒を加え 50mL とした。-30°C の冷凍庫で 1 時間以上冷却した後，5C ろ紙及びメンブレンフィルターでろ過し，試験検液とした。

2.5 測定条件

LC-MS/MS の測定条件を Table1 に示す。移動相は PG, THBP, NDGA, HMBP, OG, DG 測定時に 5% 酢酸とアセトニトリル：メタノール=(1:1)，また BHA, BHT に 0.05% 酢酸とアセトニトリル：メタノール=(1:1)を用いた。

2.6 定量

標準溶液の各濃度における測定対象物質の面積から作成した絶対検量線により，試験溶液中のフェノール系酸化防止剤の濃度を求めた。

3 結果および考察

3.1 LC 移動相の検討

移動相は酢酸，ギ酸，酢酸アンモニウム，アセトニトリル，メタノールを用いて，カラムは，shimPack FC-ODS, Mightysil RP-18GP II, Inertsil ODS-3, Inertsil ODS-SP, Inertsil C8, Inertsil C4 について検討した。

カラムは前報⁴⁾では C4 を用いたが，DG や OG のテーリングが少ない FC-ODS を用いることとした。また移動相は 5% 酢酸とアセトニトリル：メタノール=1:1 溶液を用いて，Table1 に示すグラジエント条件で分析を行った。BHA と BHT は 5% 酢酸でなく 0.05% 酢酸に変更することにより感度が上昇した。一方他の物質は酢酸濃度を 0.05% にするとピーク形状が悪くなるため 5% とした。(Fig.1)

Table 1. LC-MS/MS conditions for determination of antioxidant

LC : Agilent 1100 series MS/MS : AB SCIEX API4000				
Column : shim-Pack FC-ODS (SHIMADZU 75×2 mm)				
Column temperature : 40°C				
Flow rate : 0.2 mL/min				
Mobile phase A: 5% Acetic acid or 0.05% Acetic acid / B: Acetonitrile:Methanol=1:1				
Injection volume : 1 μ L				
Gradient profile : 10%B(0 min)→95(15min)→95(30min)→10(30.01min)→10(45min)				
Ionization : ESI, negative				
Ion spray voltage : -4,500 V				
Monitor ions	Precursor ions (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)	Retention time (min)
Propyl gallate (PG)	211.1	123.9	-30	8.25
2,4,5-Trihydroxybutyrophenone (THBP)	195.0	124.9	-26	9.76
Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)	301.3	121.9	-38	12.75
Butylated Hydroxyanisole (BHA)	179.1	164.0	-18	14.04
4-Hydroxymethyl-2,6-di-tert-butylphenol (HMBP)	235.3	160.1	-36	14.49
Octyl gallate (OG)	281.1	123.9	-38	15.04
Butylated hydroxytoluene (BHT)	219.1	202.9	-30	17.92
Dodecyl gallate (DG)	337.2	123.9	-44	17.89

なお, カラムに Inertsil ODS-SP, Mightysil RP-18GP II, Inertsil C8 を用いても感度の差はあるが, Table1 と同様の条件で検出することができた. NDGA, HMBP は, いずれのカラムにおいても大きな差はなく, この2物質およびBHAは移動相に酢酸でなく2mM酢酸アンモニウム溶液を用いても定性が可能であった.

没食子酸類のOG, DGは, テーリングする傾向があり, カラムと移動相の組み合わせによりピーク幅が2分以上になるものもあった.

またアセトニトリルでなくアセトニトリル:メタノール=1:1 溶液を使用することで感度が10倍程度上昇した.

3.2 MS/MS 条件の検討

MS/MSの条件はAPI4000 付属のAnalyst softwareによりオートチューニングした. BHTは, 他のフェノール系酸化防止剤と比べ感度が低いため, Q1, Q3を同一としてコリジョンエネルギーを調整しベースラインを下げS/N比が高い条件にした. これにより他の酸化防止剤と同等の感度が得られた.

3.3 添加回収試験

酸化防止剤が使用される可能性のあるピーナツバター&チョコクリーム, トマトソースチューイングガム, クッキー, オリーブオイルの5食品について, 添加回収試験を行った結果をTable2に示す. 酸化防止剤8項目の回収率は71%~148%であった.

る定性分析法を検討した. 本分析法は検査指針に従ってHPLC-UV/FL法で分析した際に検出したピークが, フェノール系酸化防止剤か食品成分由来の妨害ピークかどうか定性確認をするために有効である.

Table2. Recovery from antioxidant from food

Antioxidant	Recovery(%)	
	0.001g/kg	0.01g/kg
PG	103~113	97~117
THBP	113~132	124~148
NDGA	103~116	103~117
BHA	80~100	89~107
HMBP	86~126	94~118
OG	118~136	108~127
BHT	—	82~122
DG	71~134	107~144

文献

- 1) 食品衛生検査指針 2003 食品添加物: 厚生労働省 監修 社団法人日本食品衛生協会 65-70
- 2) 辻澄子, 他: LC/MS および GC/MS による食品中 5 種類のフェノール系酸化剤の定量・確認, 食品衛生学雑誌 46 (3), 63-71, 2005
- 3) 佐野由紀子, 他: 食品中のフェノール系酸化防止剤の実態調査, 福岡市保健環境研究所報, 29, 139-142, 2004
- 4) 脇山ひとみ, 他: LC-MS/MS によるフェノール系酸化防止剤の分析, 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会講演集 50, 86-87, 2013

4 まとめ

食品中のフェノール系酸化防止剤の LC-MS/MS によ

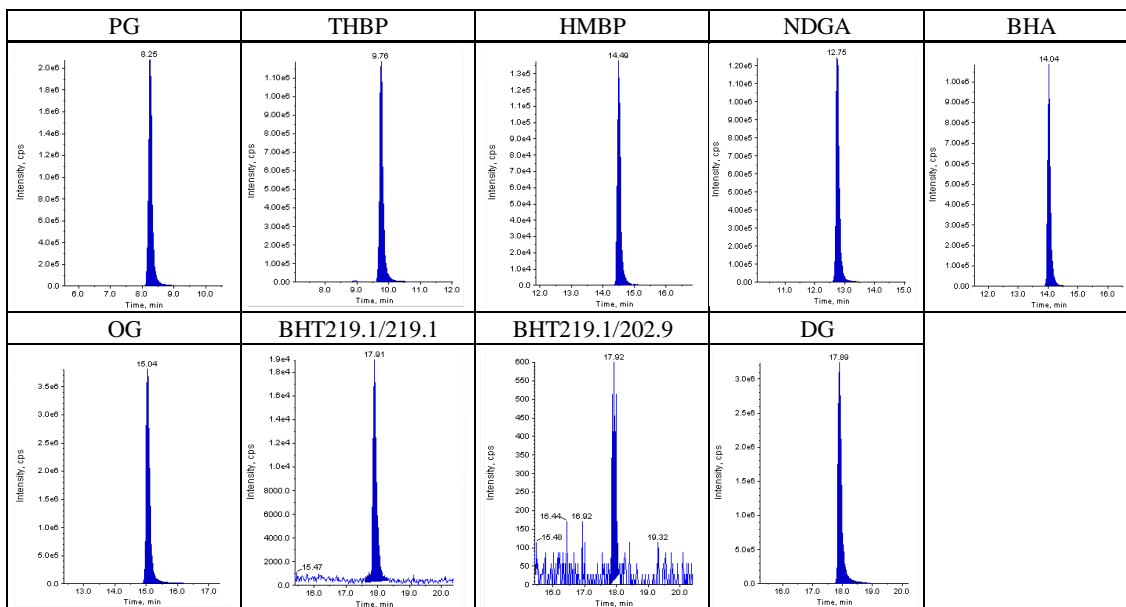


Fig.1 Chromatograms of antioxidant standard solution(1µg/mL)