

Sep-pak C₁₈ カートリッジを前処理に用いた 高速液体クロマトグラフィーによる食品中の ブチルヒドロキシアニソールおよびジブチル ヒドロキシトルエンの定量

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene in Foods Using Sep-pak C₁₈ Cartridge for Clean-up

長南 隆夫

Takao Chonan

緒 言

酸化防止剤ブチルヒドロキシアニソール (BHA) およびジブチルヒドロキシトルエン (BHT) は鉄などの金属イオンによる着色がなく、安定性、製品への効力移行性などに優れているため、食品に広く使用されてきた。しかし、BHA に発ガン性の疑いが指摘された¹⁾ことから、これら酸化防止剤についての関心が高まり、食品中の BHA, BHT を迅速かつ精度よく定量する方法が望まれている。

食品中の BHA, BHT の定量にはガスクロマトグラフィー (GLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などが多いられ、クリーンアップ法としては n-ヘキサン-アセトニトリル系などによる分配法²⁻⁵⁾、精油定量器を用いる蒸留法⁶⁻⁸⁾、カラムクロマトグラフ法^{9,10)}などが報告されている。しかし、これらの方法は迅速性または精度についての問題点がある。

今回、著者はクリーンアップに Sep-pak C₁₈ カートリッジを用い、HPLC でサラダ油、ラード、バターおよび煮干中の BHA, BHT を迅速に定量する方法を検討したところ、良好な結果が得られたのでその結果を報告する。

実験方 法

1. 試料

石狩町内の食品販売店で入手し、予め BHA, BHT を含まないことを確認したサラダ油、ラード、バターおよび煮干を用いた。添加回収実験および抽出溶媒の検討には、これらの試料に BHA, BHT 含量がそれぞれ 100 μg/g となるように n-ヘキサン溶液として添加し、調製した。なお、煮干は、粉碎後 BHA, BHT を添加し、暗所で 48 時間風乾後

使用した。

2. 試薬

BHA, BHT は東京化成製試薬(純度は、それぞれ 98%, 99% 以上)を標準品として用いた。有機溶媒は、試薬一級品を蒸留して用い、その他の試薬は、試薬特級品を用いた。水は脱イオン水を用いた。

Sep-pak C₁₈ カートリッジ (Waters 社製、以下 C₁₈ カートリッジと略す) : 10ml のガラス製注射器にセットし、予め n-ヘキサン 10ml, メタノール 20ml で順次洗浄して使用した。

アルミナカラム：アルミナ (Woelm 社製、中性) 10g を内径 2 cm のカラム管に乾式法で充てんした。

3. 試験溶液の調製

(1) サラダ油

試料 0.5g を注射筒に精密に秤取し、C₁₈ カートリッジへ注入後、メタノール 10ml (5 ml × 2、以下同じ) で溶出した。C₁₈ カートリッジを前述の方法で洗浄後、C₁₈ カートリッジから漏出した試料および溶出液をあわせてこの C₁₈ カートリッジへ注入し、次いでメタノール 10ml で溶出した。溶出液をあわせて 40°C の水浴上で減圧下 1 ~ 2 ml に濃縮し、メタノールで 3 ml にメスアップ後、東洋ろ紙 No.5 C でろ過し、ろ液を HPLC 用試験溶液とした。

(2) ラード、バター

40°C で加温、融解した試料 0.5g を注射筒に精密に秤取し、ドライヤーで注射筒を加温しながら C₁₈ カートリッジへ注入後、メタノール 10ml で溶出した。C₁₈ カートリッジを前述の方法で洗浄後、C₁₈ カートリッジから漏出した試料および溶出液をあわせて、この C₁₈ カートリッジへ注入し、次いでメタノール 10ml で溶出した。C₁₈ カートリッジを前述

の方法で再び洗浄後、溶出液をあわせて40°Cの水浴上で3～4 mlに濃縮し、濃縮液をさらにこのC₁₈カートリッジへ注入し、次いでメタノール10mlで溶出した。溶出液をあわせて40°Cの水浴上で減圧下1～2 mlに濃縮し、メタノールで3 mlにメスアップ後、ろ紙でろ過し、ろ液をHPLC用試験溶液とした。

(3) 煮干

粉碎した試料2 gを共栓付遠沈管に精密に秤取し、エタノール40mlを加え、室温で15分間、超音波処理後、遠心分離(3,000rpm、5分間)し、エタノール層を分取した。残渣にエタノール40mlを加え、同様の操作を繰り返してエタノール層をあわせ、アルミナカラムへ注入し、次いでエタノール30mlで溶出した。溶出液をあわせ、40°Cの水浴上で減圧下4～5 mlに濃縮後、C₁₈カートリッジへ注入、次いでメタノール4 mlで溶出し、溶出液をあわせ、メタノールで10mlにメスアップしてHPLC用試験溶液とした。

4. 検量線

BHA, BHT各100mgをメタノールに溶解して100mlとし、これをメタノールで25, 50, 100, 200, 400倍に希釈して検量線を作成した。

定量は、ピーク面積を測定する絶対検量線法を行った。

5. HPLCの条件

高速液体クロマトグラフは紫外波長可変検出器付日立655型装置を、記録計は島津クロマトパックC-R3Aを、カラムはNucleosil 5C₁₈(Nagel社製、4.6mm I.D.×250mm)を用いた。

分析の条件は、下記のとおりである。

移動相：メタノール：0.1%リン酸一アンモニウム水溶液=84:16

流速：0.6ml/min

検出：紫外検出 280nm 0.16AU

カラム温度：40°C

注入量：20μl

6. C₁₈カートリッジに保持されるサラダ油量の検討

サラダ油0.30, 0.40, 0.50gをそれぞれ、注射筒に精密に秤取し、C₁₈カートリッジへ注入後、メタノール10mlを流した。C₁₈カートリッジに保持されなかったサラダ油と溶出液をあわせて40°Cの水浴上で減圧濃縮してメタノールを完全に留去し、残留するサラダ油を秤量してC₁₈カートリッジに保持されるサラダ油量を求めた。

7. 試験溶液中へ移行する脂質量の検討

3. 試験溶液の調製と同様に操作して最終のクリーンアップを行った後、溶出液中の溶媒を40°Cの水浴上で減圧下完全に留去し、残留する脂質を秤量した。

8. 抽出溶媒の検討

BHA, BHTを添加した煮干2 gを精密に秤取し、Table 3に示した溶媒を用いて、前述の煮干の場合と同様に操作し、BHA, BHTを定量した。

9. GLCによるBHA, BHTの確認

ガスクロマトグラフは、島津GC-6A型装置(水素炎イオン化検出器付)を用いた。

標準溶液は、BHA, BHT各100mgをn-ヘキサンに溶解して100mlとし、これをn-ヘキサンで25, 50, 100倍に希釈して調製した。

GLC用試験溶液は、HPLC用試験溶液2 mlにn-ヘキサン20mlを加え、40°Cの水浴上で減圧下約1 mlに濃縮し、n-ヘキサンで2 mlにメスアップして調製した。

分析の条件は、下記のとおりである。

(1) サラダ油、ラード、バター中のBHA, BHTおよび煮干中のBHT

カラム：2% OV-17/Gaschrom Q (60～80mesh)

4 mm I.D.×1.5m ガラスカラム

(以下2% OV-17と略す)

カラム温度：165°C

注入口温度：200°C

検出器温度：200°C

キャリアーガス：N₂ 60ml/min

注入量：2 μl

(2) 煮干中のBHA

カラム：5% DC-200/Gaschrom Q (60～80mesh)

4 mm I.D.×1.5m ガラスカラム

(以下5% DC-200と略す)

カラム温度等の条件は(1)と同じ。

実験結果および考察

1. 試験溶液の調製

(1) サラダ油、ラード、バター

はじめに、サラダ油中のBHA, BHTの試験溶液の調製法を検討した。BHA, BHTを添加したサラダ油0.2gをC₁₈カートリッジへ注入し、メタノール10mlを流すと、BHA, BHTは溶出するが、サラダ油はC₁₈カートリッジに保持されることが認められた。そこで、メタノールを溶出液として用いたときC₁₈カートリッジに保持されるサラダ油量の検討を行った。結果は、Table 1に示すとおりで、この方法でC₁₈カートリッジに保持されるサラダ油の最大量は0.34gであることがわかった。この結果から、試験溶液の調製に用いるサラダ油量は、BHA, BHTの検出限界、操作性などを考慮して0.5gとし、これをC₁₈カートリッジで2回クリーンアップすることとした。C₁₈カートリッジでクリーンアップした溶出液は、BHA, BHTの揮発性が高い

ため乾固しないように40°Cの水浴上で減圧下1~2mlに濃縮し、メタノールで3mlにメスアップして試験溶液とした。

Table 1 Elution of Salad Oil from Sep-pak C₁₈ Cartridge with Methanol

Charged amount (g)	Adsorbed amount (g)*
0.30	0.29
0.40	0.34
0.50	0.34

*Salad oil was introduced to Sep-pak C₁₈ Cartridge, then the cartridge was washed with methanol. The methanol solution was concentrated *in vacuo* to afford unadsorbed oil.

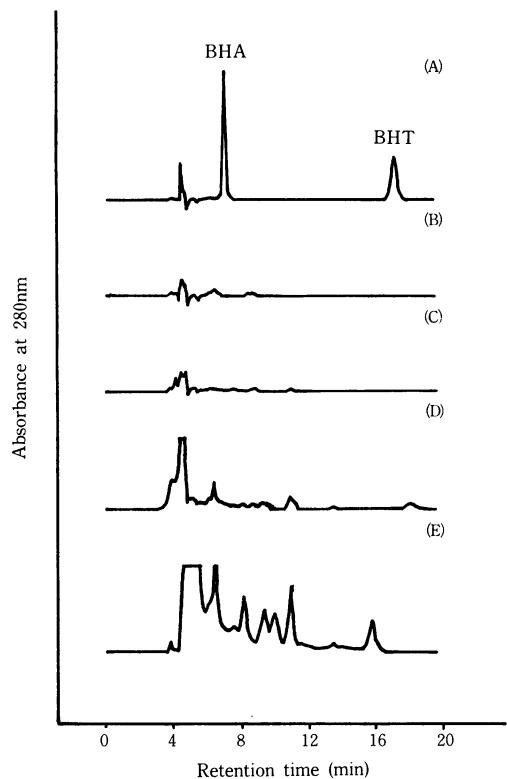


Fig. 1 High Performance Liquid Chromatograms of Butylated Hydroxyanisole (BHA) and Butylated Hydroxytoluene (BHT)

- (A) standard solution (each 5 µg/ml)
 - (B) extract of salad oil
 - (C) extract of lard
 - (D) extract of butter
 - (E) extract of boiled and dried sardines
- column : Nucleosil 5C₁₈ (4.6 mm I. D. x 250 mm)
mobile phase : CH₃OH : 0.1% NH₄H₂PO₄ = 84 : 16

次に、ラード、バターの試験溶液の調製法を検討した。40°Cの水浴上で融解させた試料0.5gを凝固しないようにドライヤーで加温しながらC₁₈カートリッジへ注入し、サラダ油と同様の方法でクリーンアップ、濃縮を行ったところ、濃縮液中には、なお相当量の脂質が認められた。このため、濃縮液をさらにC₁₈カートリッジでクリーンアップして試験溶液を調製したところ良好な結果が得られた。

サラダ油、ラード、バター試験溶液のクロマトグラムはFig. 1 (B)~(D)に示すとおりで、この条件で妨害ピークは認められなかった。

本法によりサラダ油、ラード、バターから試験溶液中へ移行する脂質量は、Table 2に示すとおり、それぞれ15, 8, 38mgであり、移行率は、3.0, 1.6, 7.6%であった。n-ヘキサン(ベンタン)-アセトニトリル分配法による試料から試験溶液への脂質の移行率は、サラダ油が8.7%, バターが10.3%と報告^{3,9)}されており、本法は、分配法より脂質を効率よく除去できることが判明した。

Table 2 Removal of Lipid by Using Sep-pak C₁₈ Cartridge

Sample	Charged amount (mg)	Residue* (mg)
Salad oil	500	15
Lard	500	8
Butter	500	38
Boiled and dried sardines	2000	44

*Amount of lipid in the test solution after Sep-pak C₁₈ cartridge clean-up

(2) 煮干

試料にベンタン(n-ヘキサン)を加えてホモジナイズし、BHA、BHTを抽出する方法(厚生省法)では、BHAの回収率が低い(15~24%)とされている¹¹⁾ため、はじめに、超音波処理(室温で15分間)による抽出溶媒の検討を行った。結果は、Table 3に示すとおりである。

BHA、BHTの抽出溶媒としては、n-ヘキサン-エタノール(1:1), アセトン、エタノールが良好であることが認められた。一方、BHA、BHTとともに抽出される脂質量は、エタノールを用いた場合が最も少なかったため、抽出溶媒はエタノールとした。抽出液は、溶離液としてエタノールを用いるアルミナカラムクロマトグラフィーでクリーンアップした後、減圧濃縮し、さらにC₁₈カートリッジによるクリーンアップを行い、試験溶液を調製した。

Table 3 Amounts of BHA and BHT Extracted from Boiled and Dried Sardines with Various Solvents

Extraction solvent (s)	BHA ($\mu\text{g}/2\text{g}$ of sample)			BHT ($\mu\text{g}/2\text{g}$ of sample)		
	Added	Found	Recovery (%)	Added	Found	Recovery (%)
n-Hexane	200	123	61.5	200	187	93.5
n-Hexane-Ethanol (1: 1)	200	184	92.0	200	183	91.5
Acetone	200	190	95.0	200	179	89.5
Ethanol	200	188	94.0	200	183	91.5

BHA and BHT were extracted from the samples with above solvents by sonication for 15 min.

煮干試験溶液のクロマトグラムは Fig. 1 (E)に示すとおりである。

なお, C₁₈カートリッジは、上記の洗浄を行うことにより、サラダ油、ラード、煮干では5試料の、バターでは3試料のクリーンアップに繰り返し使用できた。

2. HPLC の条件の検討

逆相系の樹脂 Nucleosil 5C₁₈をカラム管に充てんし、移動相としてメタノール: 0.1%リン酸一アンモニウム水溶液=84: 16を用いたときの BHA, BHT 標準溶液のクロマトグラムは Fig. 1 (A)に示すとおりである。このとき、検量線は、BHA, BHT 濃度2.5~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間で原点を通る直線となり、検出限界は、BHA, BHT とも 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (サラダ油、ラード、バター中の含量として 6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、煮干中の含量として 5 $\mu\text{g}/\text{g}$) であった。

3. 添加回収実験

BHA, BHT 含量が、それぞれ100 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるように添加したサラダ油、ラード、バター、煮干を用いて本法によ

Table 4 Recoveries of BHA and BHT Added to Salad Oil, Lard, Butter and Boiled and Dried Sardines by Sep-pak C₁₈ Cartridge Clean-up

Sample	Recovery (%)*	
	BHA	BHT
Salad oil	101.4±1.2	100.3±2.7
Lard	97.0±2.9	95.4±2.5
Butter	101.4±0.7	95.6±0.2
Boiled and dried sardines	93.7±1.5	92.9±2.1

*Average±standard deviation of 3 experiments

る回収率を求めた。結果は、Table 4 に示すとおりである。

BHA, BHT の回収率はいずれも92.9%以上と高く、変動係数も3.0%以下と良好な結果が得られた。

4. GLC による BHA, BHT の確認

順相系のカラム (Partisil Pac, Nucleosil 5 NH₂, Nucleosil 5 CN) を用いて HPLC で各試験溶液中の BHA, BHT

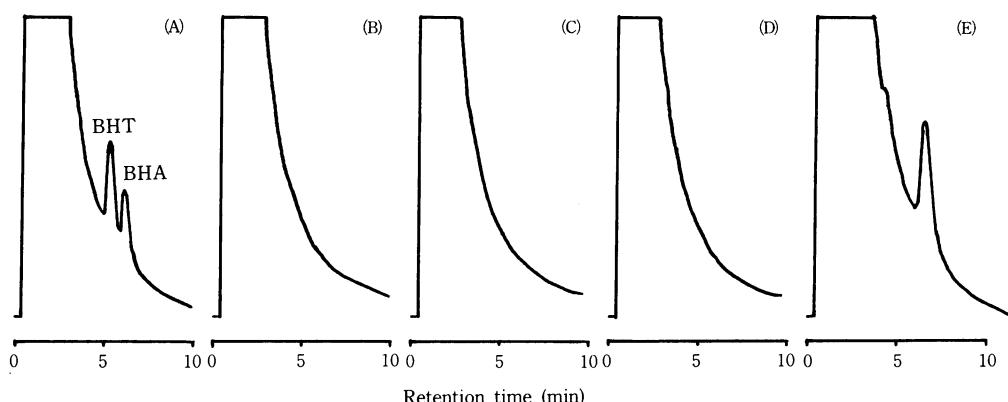


Fig. 2 Gas Chromatograms of BHA and BHT

- (A) standard solution (each 20 $\mu\text{g}/\text{g}$)
 - (B) extract of salad oil
 - (C) extract of lard
 - (D) extract of butter
 - (E) extract of boiled and dried sardines
- column: 2% OV-17 (4.0 mm I. D. x 1.5 m) column temp.: 165°C
carrier gas: N₂ 60ml/min

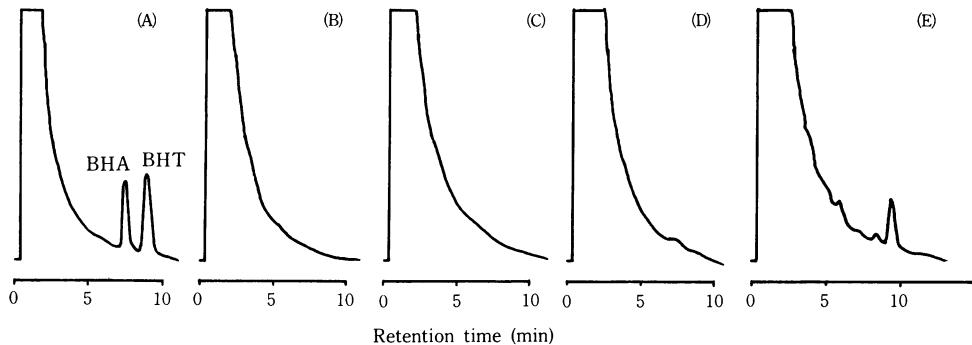


Fig. 3 Gas Chromatograms of BHA and BHT

(A) standard solution (each 20 µg/g) (B) extract of salad oil
 (C) extract of lard (D) extract of butter

(E) extract of boiled and dried sardines
 column: 5% DC-200 (4.0 mm I.D. x 1.5 m) column temp.: 165°C
 carrier gas: N₂ 60ml/min

を確認する条件を検討したが、いずれのカラムにも BHT のリテンションタイム付近に妨害ピークが認められ、両者を分離することは困難であった。そこで、GLC を用いて、BHA, BHT を確認する条件を検討した。

GLC に HPLC 用試験溶液を用いたところ、メタノールのテーリングが大きく、BHA, BHT の確認が困難であった。従って、GLC 用試験溶液は、HPLC 用試験溶液中の溶媒を n-ヘキサンに置換することとした。

カラムに 2% OV-17 を用いたときの BHA, BHT 標準溶液および各試験溶液のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

サラダ油、ラード、バター中の BHA, BHT および煮干中の BHT は、この GLC 条件で確認できることがわかった。しかし、この条件では、煮干中の BHA の確認は妨害ピークのため困難であった。そこで、煮干中の BHA の確認に 5% DC-200 カラムを用いたところ、Fig. 3 に示すように、BHA と妨害ピークを分離できた。

以上の結果から、本法は、サラダ油、ラード、バターおよび煮干中の BHA, BHT を迅速に精度よく定量でき、使用基準値 (BHA, BHT とも 0.2g/kg 以下) の 1/30 まで検出できることから、実用的な定量法と考えられる。

結 語

- クリーンアップに Sep-pak C₁₈ カートリッジを用い、高速液体クロマトグラフィーでサラダ油、ラード、バターおよび煮干中のブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を迅速に定量する方法を検討し、良好な結果が得られた。
- 本法は簡便で、BHA, BHT の回収率は 92% 以上と高

く、検出限界は 6 µg/g であることから実用的な定量法と考えられる。

3. BHA および BHT の確認には、カラムの充てん剤として 2% OV-17 または 5% DC-200 を用いるガスクロマトグラフィーが有効であった。

文 献

- Ito, N. et al.: Gann, 73, 332 (1982)
- 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, 221, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1982)
- 兼松 弘他：食衛誌, 14, 357 (1973)
- 中里光男他：食衛誌, 21, 64 (1980)
- Page, B. D.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62, 1239 (1979)
- 丸山武紀他：食衛誌, 18, 283 (1977)
- 成田弘子他：静岡県衛生研究所年報, 19, 55 (1976)
- Hashizume, K. et al.: Eiseikagaku, 34, 550 (1988)
- 八木正博他：第23回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 40 (1986)
- 日本薬学会編：衛生試験法・注解, 346, 金原出版, 東京 (1980)
- 蕨 由美他：日本食品衛生学会第49回学術講演会講演要旨集, 60 (1985)

英 文 要 約

A simple and rapid clean-up method for the determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in salad oil, lard, butter and

boiled and dried sardines was developed by use of Sep-pak C₁₈ cartridge.

After being added BHA and BHT (each 100 µg/g), salad oil, lard and butter were adsorbed on Sep-pak C₁₈ cartridge, and then eluted with methanol. The methanol solution which contained BHA and BHT was concentrated *in vacuo* to give analytical solution for HPLC.

BHA and BHT in boiled and dried sardines were extracted with ethanol by sonication. The extracts were purified by column chromatography on alumina using ethanol as an eluent. The effluent was concentrated *in vacuo*, then introduced to Sep-pak C₁₈ cartridge. BHA and BHT were eluted successively with ethanol and methanol.

Separated BHA and BHT were determined quantitatively on a column packed with Nucleosil 5 C₁₈ by using methanol/0.1% NH₄H₂PO₄ (84 : 16) as a mobile phase with detection at 280 nm. The recoveries of BHA and BHT from samples at level of 100 µg/g were more than 92.9%, and the detection limits were 6 µg/g, respectively. Furthermore, separation and identification of BHA and BHT were carried out by GLC on two different columns packed with 2% OV-17 or 5% DC-200.

This method was found to be very suitable to determine BHA and BHT in foods.

Key Words: butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, Sep-pak C₁₈ cartridge, alumina column chromatography, salad oil, lard, butter, boiled and dried sardines, high performance liquid chromatography, gas chromatography