

HPLCによるフェノール系酸化防止剤の一斉分析法の検討

佐々木珠生 小串 恭子^{*1} 宮野 高光 中島 三恵
福田 裕 山名 正史 末田 義博 山本 修^{*2}
松井 俊治 長谷川宏行

フェノール系酸化防止剤9種の高速度液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた分析法について検討した。フォトダイオードアレイ検出器及び蛍光検出器で同時測定することにより、選択的に定量することができた。また、2種類のHPLC用カラム(オクタデシル基結合シリカゲル及びフェニル基結合シリカゲル)を使用することにより、妨害物との分離が可能であった。標準液及び抽出液にアスコルビン酸を加えることにより、標準液の安定性と添加回収率が向上した。添加回収率は73.8~100.1%と良好であった。

キーワード： フェノール系酸化防止剤，食品，高速液体クロマトグラフィー，tert-ブチルヒドロキノン，2,4,5-トリヒドロキシブチロフェノン，4-ヒドロキシメチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール，没食子酸オクチル，没食子酸ラウリル，ブチルヒドロキシアニソール，ジブチルヒドロキシトルエン，ノルジヒドログアヤレチック酸，没食子酸プロピル

はじめに

昨年(平成14年)，国内では使用が認められていない食品添加物 tert-ブチルヒドロキノン(TBHQ)を含む肉まんを販売していたという食品衛生法違反事件があり，その後も，台湾産飲茶やブラジル産唐揚げなど検出事例が相次いだ。

TBHQは日本では食品添加物として使用が認められていないが，米国や中国等では油脂の酸化防止剤として使用が認められている。フェノール系酸化防止剤としては，2,4,5-トリヒドロキシブチロフェノン(THBP)，4-ヒドロキシメチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール(HMBP)，没食子酸オクチル(OG)，没食子酸ラウリル(DG)も日本では許可されていないが，欧米では使用が認められおり，これらの酸化防止剤を使用した食品が輸入される可能性がある。

そこで，上記の酸化防止剤5種に，日本で使用が許可されている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)，ノルジヒドログアヤレチック酸(NDGA)，没食子酸プロピル(PG)の4種を加えたフェノール系酸化防止剤9種の一斉分析法について検討したので報告する。

*1：現 環境局施設課

*2：現 環境局環境保全課

方 法

1 試料

市販のパーム油，魚介乾製品(アジ)，スナック菓子(コーン)及び冷凍えびを試料とした。

2 試薬

BHA，BHT，TBHQ：関東化学製，NDGA，PG，HMBP，OG，DG：東京化成製，THBP：シグマ社製

標準原液：各酸化防止剤100mgをメタノールに溶かし100mlとした(1000µg/ml)。

混合標準液：標準原液1.0mlを取り，アスコルビン酸(AsA)1mg/ml含有混合液(AsA混合液)を加えて100mlとした(10µg/ml)。

混合液：アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール(2:1:1)

3 装置

高速液体クロマトグラフ(HPLC)：島津製 LC-10A
フォトダイオードアレイ検出器(PDA)：

島津製 SPD-M10AV_p

蛍光検出器(FL)：島津製 RF-10AX_L

4 HPLC測定条件

カラム： Mightysil RP-18 GP(4.6 × 150mm，5µm)(関東化学製) Inertsil PH(4.6 × 150mm，5µm)(ジーエルサイエンス社製)

移動相：A液；5%酢酸：(アセトニトリル・メタノール(1:1)) = 95:5，B液；5%酢酸：(アセトニ

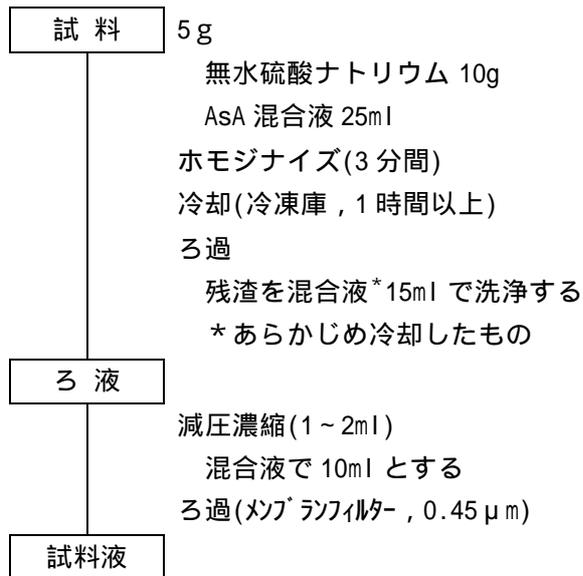


図1 分析方法のフローチャート

トリル・メタノール(1:1)) = 5 : 95
 グラジエント : B 液を 15 分間で 45% から 95%
 まで変化させ、そのまま 5 分間保持した。
 流速 : 1.0 ml/min
 カラム温度 : 40 , 注入量 : 10 μl
 測定波長 : PDA ; 280nm, FL ; Ex275nm, Em365nm
 FL は PG, TBHQ, NDGA, BHA, OG 及び DG の 6 種
 について測定した。
 定量はピーク面積により行った。

5 試験溶液の調製

「食品衛生検査指針(食品添加物編)2003」¹⁾に準じた。

パーム油は加温溶解し、魚介乾製品、スナック菓子及び冷凍えびは粉碎し、その 5g に無水硫酸ナトリウム 10g 及び AsA 混合液 25ml を加え、3 分間ホモジナイズする(パーム油はよく振り混ぜる)。ガラス製の容器に移し替え、密栓して冷凍庫(-20)で 1 時間以上冷却後、すばやくろ過する。残渣はあらかじめ冷凍庫で冷却した混合液 15ml で洗い込む。ろ液を減圧濃縮し、1~2ml とした後、混合液を加え 10ml とする。これを 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、試料液とする。(不溶成分がある場合は遠心分離後、上澄み液をメンブランフィルターでろ過する。)

分析方法のフローチャートを図 1 に示す。

結果と考察

1 AsA の効果

酸化防止剤は標準液及び試料溶液中で化学変化しやすいことから、安定剤の添加を検討した。辻

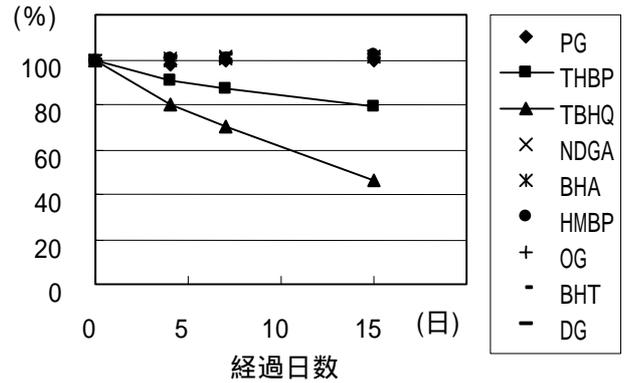


図2 標準液(AsA なし)の経日変化

ら²⁾は標準液及び抽出液に AsA を加えることにより安定化している。当所においても AsA について、その効果を検討した。

(1) 標準液

AsA を 1mg/ml となるように添加した混合液を用いて、10 μg/ml の 9 種混合標準液を調製した。冷蔵庫(-5)で 15 日間保管し、HPLC により定量した。

AsA を添加した標準液のピーク高さは、ほぼ一定であったが、AsA を添加していない標準液では TBHQ 及び THBP のピーク高さが徐々に減少した。AsA を添加していない標準液のピーク高さの経日変化を図 2 に示す。

(2) 試験溶液の調製

抽出液における AsA の効果を検討するため、パーム油、魚介乾製品、スナック菓子及び冷凍えびを用いて添加回収実験を行った。すなわち、細切(パーム油については加温溶解)した試料 5g に 9 種の酸化防止剤をそれぞれ 100 μg (試料 1g あたり 20 μg)添加し、AsA を添加した混合液と、AsA を添加していない混合液を抽出液として用いて試験溶液を調製し、回収率を比較した(表)。試験溶液の調製後、すみやかに HPLC 測定を行った。

パーム油、魚介乾製品、スナック菓子については、回収率に差はなかったが、冷凍えびについては、回収率が若干向上した。

AsA を添加した試験溶液では数日後(冷蔵保管)の HPLC 測定においても、各酸化防止剤の濃度にほとんど変化がなかったが、AsA を添加しなかった試験溶液では、冷凍えびの場合 2 週間後には TBHQ が 3 割程度分解していた。

検体数が多く試験溶液の調製に時間を要したり、確認試験など、試験溶液調製後数日経過して HPLC 測定する場合もあることから、抽出液にも AsA を添加することとした。

2 HPLC による定量及び同定

(1) フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) 及び蛍光検出器 (FL)

検査指針¹⁾では紫外外部吸収検出器(UV)により定量することとなっているが、単波長(280nm)のみの測定では妨害ピークとの区別が困難である。そこで、PDA 検出器および FL 検出器による定量及び同定方法を検討した。

PDA 検出器では、検出ピークのスペクトルを標準品のスペクトルと比較することにより、同定することができた。各酸化防止剤の UV スペクトルを図 3 に示す。

FL 検出器では、PG, TBHQ, NDGA, BHA, OG 及び DG の 6 種について測定することができた。各酸化防止剤の励起波長 280nm における FL スペクトルを図 4 に示す。TBHQ, NDGA, BHA の 3 種については蛍光波長を短波長にすることにより、感度が向上した。

(2) HPLC 用カラム

結合基の異なる 2 種類のカラムについて溶出パターンを比較した。オクタデシル基結合シリカゲル (ODS) の Mightysil RP-18 GP とフェニル基結合シリカゲル(PH)の Inertsil PH を用いて HPLC 測定

表 添加回収率 (%)

試料 抽出液	パーム油		魚介乾製品		スナック菓子		冷凍えび	
	AsA なし	AsA 含有						
PG	92.5	92.6	92.9	89.0	99.4	100.1	86.5	93.6
THBP	89.6	87.7	89.3	87.1	97.0	93.1	88.4	91.5
TBHQ	91.7	90.3	85.1	85.9	120.0	91.6	93.4	92.9
NDGA	92.2	92.5	90.4	87.6	99.7	95.6	85.7	91.2
BHA	86.0	84.2	88.2	86.0	90.6	90.3	90.8	92.8
HMBP	88.5	87.9	79.4	76.7	90.8	89.7	90.5	94.5
OG	89.9	90.4	91.8	88.7	97.9	99.4	87.4	91.5
BHT	75.7	73.8	87.8	88.8	92.5	90.2	84.4	89.8
DG	84.4	84.5	92.5	89.7	94.1	91.6	86.2	90.9

2 試験の平均値

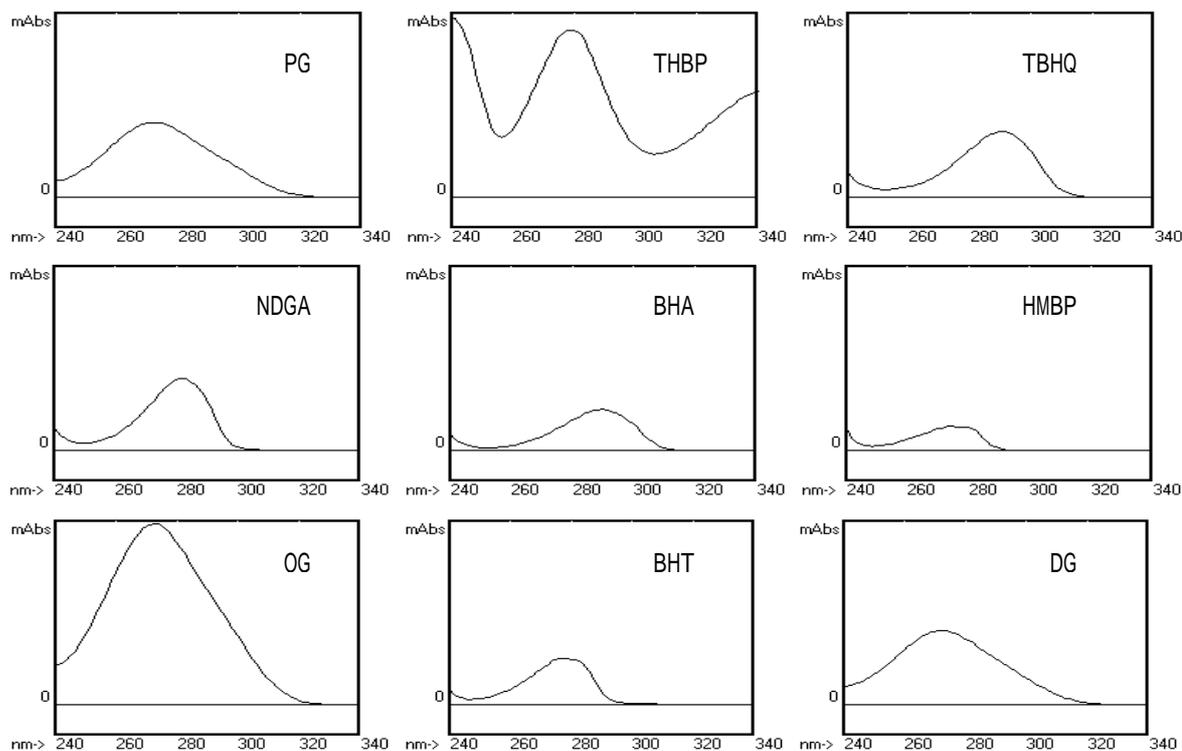


図 3 各酸化防止剤の UV スペクトル

したところ、HMBP と OG、BHT と DG の溶出順位が入れ替わるなど、溶出パターンに変化が見られた。

2 種類のカラムを用いることは、妨害ピークとの分離に有効であった。標準液のクロマトグラムを図 5 に示す。

今回、フェノール系酸化防止剤 9 種の HPLC による一斉分析法について検討した。標準液及び抽出液に AsA を添加することにより、標準液の安定性と添加回収率が向上した。PDA 検出器及び FL 検出器を用いることにより、各酸化防止剤を定量及

び同定することができた。2 種類のカラム(ODS 及び PH)を用いることにより、妨害物との分離が可能であった。

文 献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針（食品添加物編），65～70，595～597，（社）日本食品衛生協会(2003)
- 2) 辻 澄子 他：食品中のフェノール系酸化防止剤の定量・確認試験について，日本食品衛生学会要旨集，77(2002)

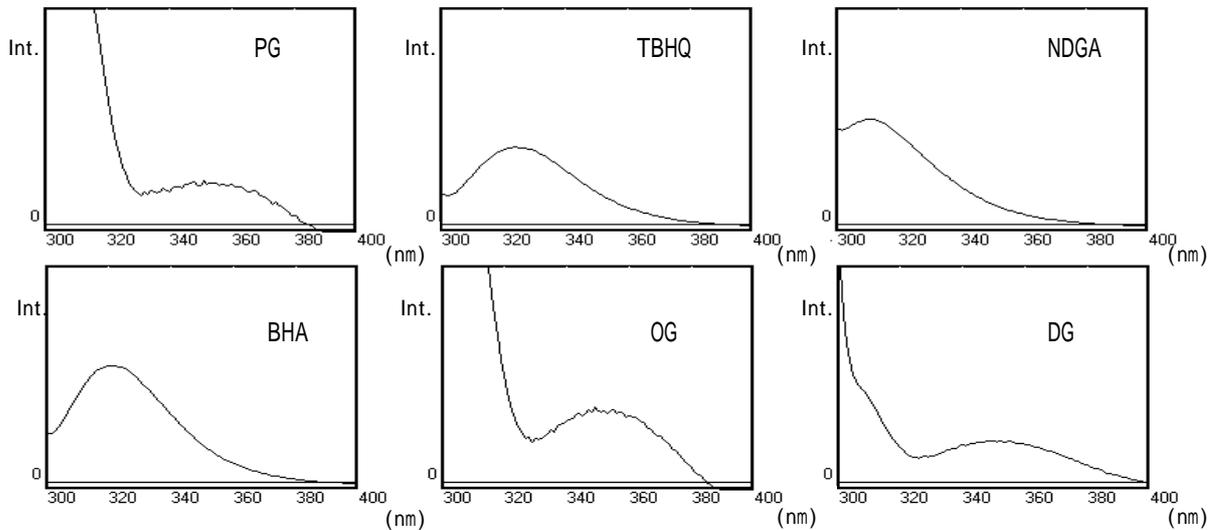


図 4 各酸化防止剤の FL スペクトル

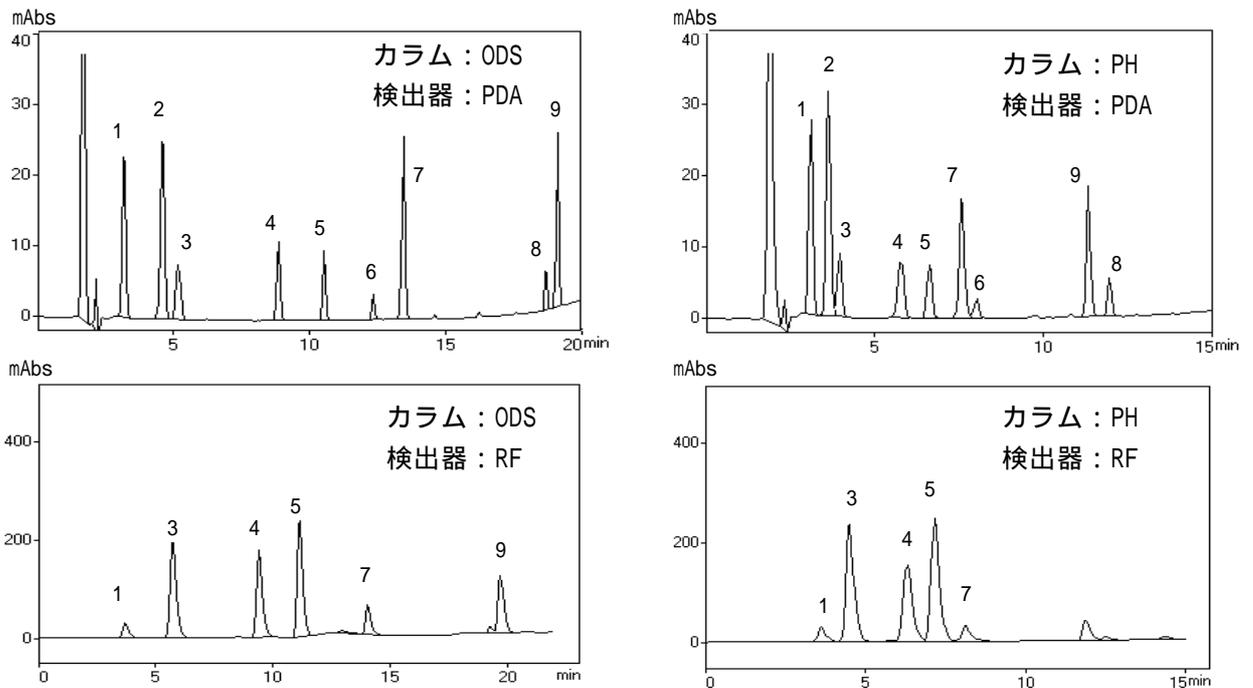


図 5 各酸化防止剤のクロマトグラム

[1.PG, 2.THBP, 3.TBHQ, 4.NDGA, 5.BHA, 6.HMBP, 7.OG, 8.BHT, 9.DG]