

[ノート]

活性炭カートリッジを用いた食品中 *tert*-ブチルヒドロキノン (TBHQ) の HPLC 簡易分析法

祭原 ゆかり* 三橋 隆夫

Simple Determination of *Tert*-Butylhydroquinone (TBHQ) in Foods by Using an Activated Carbon Cartridge with HPLC

Yukari SAIHARA* and Takao MITSUHASHI

Health Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

A simple and rapid HPLC method for determining *tert*-Butylhydroquinone (TBHQ) in foods was developed with an activated carbon cartridge. TBHQ in food samples was extracted with acetonitrile, the extract was applied to an activated carbon cartridge (AC-2). The cartridge was washed, adsorbed TBHQ was eluted with 25mL of acetone-10% ascorbic acid solution (9:1), and the eluting solution was injected into the HPLC with fluorescence detection. Recoveries of spiked TBHQ in food samples (vegetable oil, margarine, instant noodles, bouillon cubes and wafers) at the level of 20µg/g ranged from 88.6 to 96.7%. The determination limit was 1µg/g in the sample.

I はじめに

tert-ブチルヒドロキノン (TBHQ) は米国や中国などでは酸化防止剤として用いられているが、わが国では使用が許可されておらず、輸入食品から検出される違反事例が見受けられる^{1,2)}。TBHQは空気酸化を受けやすいため、分析操作は簡単で迅速であることが望ましい。従来のTBHQの分析は、食品中の食品添加物分析法³⁾に基づいて行われていたが、平成17年3月に厚生労働省より改良法⁴⁾が通知された。この改良法は、TBHQをアセトニトリルで抽出し、*n*-ヘキサンを用いて油脂分を除去するもので、従来の分析法に比べてクリーンアップが十分に行われるようになった。しかし、溶媒の濃縮過程が含まれ、この段階でのTBHQの空気酸化による分解が危惧される。

活性炭やグラファイトカーボンなどの炭素系物質

は吸着力が強いため、固相抽出の充填剤としての有用性が認められつつある。固相抽出の適用は、抽出溶媒の減量化やクリーンアップ操作の迅速化などを可能とすることから、環境分野では活性炭カートリッジを用いた環境水中のアミトロール⁵⁾や1,4-ジオキサン⁶⁾の分析などに利用されている。一方、食品分野では残留農薬のアセフェート分析⁷⁾に用いられているが、この分野での報告例は少ない。今回、活性炭カートリッジを利用した食品中のTBHQの簡易・迅速分析を試みたところ、良好な結果が得られたので報告する。

II 材料と方法

1. 試料

市販の植物油、マーガリン、インスタント麺、固形ブイヨンおよびウエハースを用いた。

2. 試薬等

試薬：*tert*-ブチルヒドロキノン (TBHQ) 標準品は和光純薬工業(株)製の特級品を用いた。アセトンおよび

健康科学部

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター
健康科学部 祭原 ゆかり

アセトニトリルは和光純薬工業(株)製の高速液体クロマトグラフ用試薬を、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル(AP)は和光純薬工業(株)製の一級試薬を、その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

標準溶液：標準品50.0mgを精秤し、通知法⁴⁾に従って0.01%w/v AP アセトニトリル溶液に溶かして全量を50mLとし、標準原液とした(1mg/mL)。この液をアセトニトリルで適宜希釈して、標準溶液を調製した。なお、検量線用の標準溶液は、アスコルビン酸を1%の濃度になるように添加した。

炭素系カートリッジ：活性炭系カートリッジであるウォーターズ製Sep-Pak Plus AC-2(充填量400mg)、グラファイトカーボン系のスペルコ製ENVI-carb(充填量250mg)、カーボンモレキュラーシーブ系のスペルコ製 Carboxen-1016(充填量 220mg) および Carboxen-1000(充填量200mg)を用いた。各カートリッジは使用前に、アセトニトリル4mLおよび精製水5mLで調整した。

精製水：Milli-Q純水製造装置(ミリポア社製)により調製したものをを用いた。

3. 装置および測定条件

装置：島津製作所製LC-10Aシリーズ (RF-10A_{XL}型 蛍光検出器付)

カラム：Myghtysil RP-18 GP (関東化学製, 4.6mm i. d. ×150mm, 5 μ m), 移動相：5%酢酸・メタノール・アセトニトリル混液(6:2:2), カラム温度：30 $^{\circ}$ C, 流速：1.0mL/分, 励起波長：293nm, 蛍光波長：332nm

4. 試料溶液の調製

試料5.0gにアセトニトリル50mLを加えて5分間振とうし、アセトニトリル層をろ紙(5A)でろ過した。ろ液を冷凍庫(-30 $^{\circ}$ C)で30分間放置した後、再びろ紙(5A)でろ過した。このろ液10mLを共栓付試験管に取り、精製水10mLを加えて混和した後、活性炭カートリッジに通してTBHQを吸着させた。次に50%アセトン水溶液10mLおよび精製水10mLで洗浄し、アセトン・10%アスコルビン酸水溶液の混液(9:1)25mLで溶出したものをHPLC試験溶液とした。

5. 定量

標準溶液および試験溶液各10 μ LをHPLCに注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積から絶対検量線法により定量した。

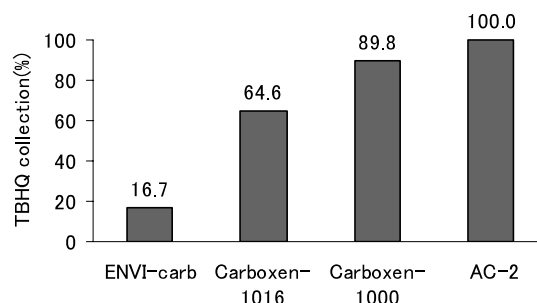


Fig.1 Collection efficiency of TBHQ with 4 kinds of solid-phase columns
20 μ g TBHQ in 10mL acetonitrile was loaded.

III 結果および考察

1. 固相抽出カートリッジによる TBHQ の保持

炭素系の4種固相抽出カートリッジを用いて、アセトニトリル抽出液中のTBHQの分離を検討した。まず、各カートリッジに標準溶液10mL(TBHQを20 μ g含む)を通し、TBHQの保持力を調べた。各カートリッジにおけるTBHQの保持率をFig.1に示した。グラファイトカーボン系のENVI-carbの保持率が最も低く20%以下であった。カーボンモレキュラーシーブ系のCarboxen-1016とCarboxen-1000が90%以下であったのに対し、活性炭系のAC-2の保持率は100%であった。これより、本法では固相抽出カートリッジとしてTBHQの保持力の大きいAC-2を用いた。なお、本法ではTBHQの保持を強固とするために、アセトニトリル抽出液に等量の精製水を加えたものをカラムに負荷した。

2. TBHQ の溶出溶媒

次にAC-2からのTBHQの溶出条件を検討した。標準溶液10mL(TBHQを20 μ g含む)をAC-2カートリッジへ負荷し、水、メタノール、アセトニトリルおよびアセトンの4種溶媒を各40mL流したところ、いずれもTBHQはほとんど溶出しなかった。ところが、理由は不明であるが、アスコルビン酸を溶出溶媒に添加すると、TBHQの溶出性が向上した。同濃度のアスコルビン酸の添加では、TBHQの溶出率はアセトン>アセトニトリル>メタノールの順であった。これより、溶出液として、アセトン・アスコルビン酸水溶液の混液を用いることとした。なお、アスコルビン酸の添加効果は、その還元作用が原因と推定されたため、アスコルビン酸(10%, pH2.2)の代わりに、アスコルビン酸ナトリウム(10%, pH7.5)、水素化ホウ素ナトリウム(1%)およびチオ硫酸ナトリウム(1%)な

どの還元剤の添加を検討した。結果は、アスコルビン酸ナトリウムではアスコルビン酸よりやや弱い溶出性の向上が見られたが、他の2種ではほとんど効果は認められず、アスコルビン酸の添加が最適であった。

次に、アスコルビン酸の添加条件（濃度および混合比）を検討した。3種濃度のアスコルビン酸水溶液（5%、10%、および20%）を調製し、アセトンと3種の水溶液を19:1、9:1、および4:1の割合で混合したアセトン・アスコルビン酸水溶液を調製した。これらの溶液（各40mL）を用いて、TBHQの溶出を調べたところ、アセトンと20%アスコルビン酸水溶液を19:1で混合した場合、およびアセトンと10%アスコルビン酸水溶液を9:1で混合した場合の溶出率が97~98%の高い溶出率であった（Fig.2）。本法では、溶出したアセトン・アスコルビン酸水溶液をそのままHPLCのODSカラムに注入することから、カラムの劣化などを防ぐためにアセトン濃度が低い方が望ましい。これより、本法の溶出溶媒として、アセトンと10%アスコルビン酸水溶液を9:1で混合したものをを用いることとした。

3. 溶出液量

上記の溶出溶媒を用いて、AC-2カートリッジからのTBHQの溶出パターンを調べた（Fig.3）。溶出液を5mLごとのフラクションに分けて溶出率を求めたところ、溶出液量10mLでTBHQの90%以上が溶出され、溶出液量25mLでは99.8%に達した。これより、本法の溶出液量を25mLとした。

4. 検量線

本法に従って検量線を作成したところ、TBHQの濃度範囲が0.5~4.0 µg/mLにおいて良好な直線性を示し、相関係数は1.000であった（Fig.4）。

5. 添加回収実験

実試料を用いて本法での添加回収実験を行った。TBHQを含有していないことを確認した5種試料（植物油、マーガリン、インスタント麺、固形ブイヨンおよびウエハース）各々5gに、試料濃度として20 µg/gとなるように標準溶液を添加し、回収率を求めた。いずれの試料においても試験溶液のクロマトグラム上には妨害となるピークは認められなかった（Fig.5）。回収率は固形ブイヨンがやや低く88.6%であったが、それ以外の試料は全て90%以上の高値であった（Table1）。なお、本法の定量下限値は1µg/g

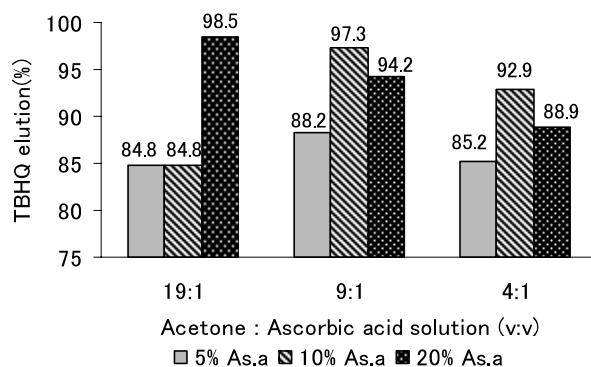


Fig.2 Effects of ascorbic acid solution (As.a) concentrations and volumes on TBHQ eluting from AC-2 cartridge
20 µg TBHQ was loaded and eluted with 40ml acetone·ascorbic acid solution.

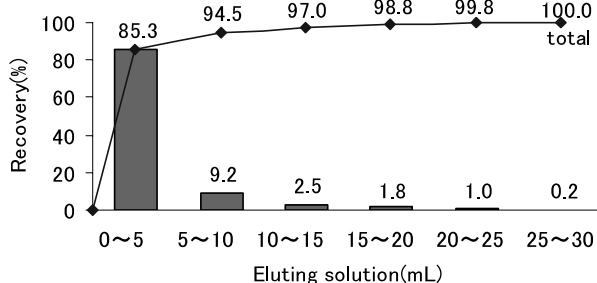


Fig.3 Recoveries of TBHQ in each fraction from AC-2 cartridge
Each fraction volume was 5 mL.
20 µg TBHQ was loaded and eluted with acetone·10% ascorbic acid solution (9:1).

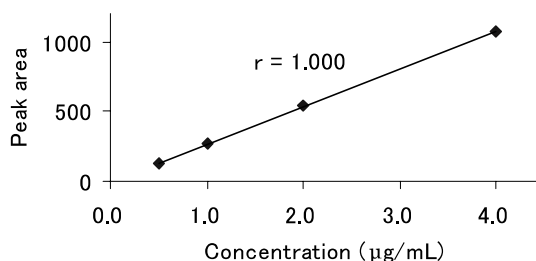


Fig.4 Calibration curve of TBHQ

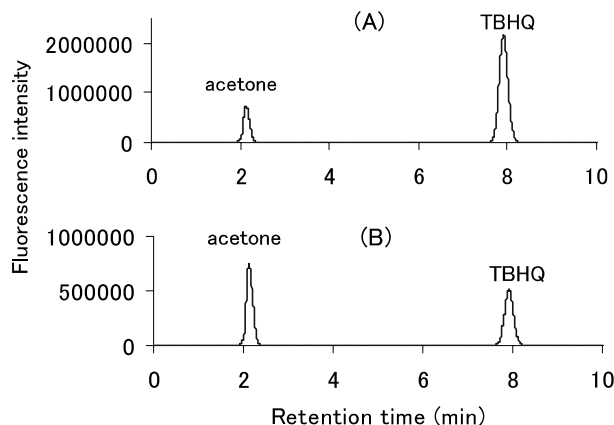


Fig.5 HPLC chromatograms in recovery tests
(A) 2µg/g TBHQ standard solution
(B) Instant noodles spiked with 20µg/g TBHQ

Table 1 Recoveries of TBHQ in various food samples

samples*	recovery (%) **	
	proposed method	notified method
vegetable oil	93.7±1.1	100.7±0.1
margarine	91.3±0.9	105.9±0.6
instant noodles	96.7±0.6	85.2±1.8
bouillon cubes	88.6±3.7	89.1±1.3
wafers	95.1±1.5	89.0±0.6

* spiked with 20 µg/g TBHQ

** n=3, average±S.D.

であった。

6. 従来法との比較

上記の TBHQ 添加回収実験の試料を、厚生労働省の通知法⁴⁾を用いて分析し、両法の測定値を比較した (Table 1)。植物油およびマーガリンでは、本法に比べて通知法での回収率が高値であった。一方、インスタント麺およびウェハースは本法が高く、固形ブイヨンでは両法で同程度であった。

IV まとめ

- 炭素系の 4 種の固相抽出カートリッジについて TBHQ 分析への適用性を検討したところ、活性炭系の AC-2 の保持力が最も強く、アセトニトリル溶液として通した場合、TBHQ をほぼ完全に保持できた。
- TBHQ の溶出は、溶出溶媒にアスコルビン酸を添加することで向上した。溶出溶媒として、アセトン・10%アスコルビン酸水溶液の混液 (9:1) 25mL を流すことで、TBHQ はほぼ 100% 溶出した。
- 試料として植物油、マーガリン、インスタント麺、固形ブイヨンおよびウェハースを用いた添加回収実験では、85% 以上の高い回収率が得られた。

従来法である通知法と比較した結果、ほぼ同程度の測定値であった。なお、本法の定量下限値は通知法と同じく 1 µg/g であるが、カートリッジへの負荷量を増やすことなどにより、さらに定量下限値を下げる事が可能と考えられる。

- 本法は活性炭カートリッジを用いた簡易な試験法であり、試験溶液調製の所要時間は従来法に比べて 1/2 程度であった。本法は、迅速性の求められる食品中の TBHQ の分析に有効に適用できると考えられる。

文献

- 畑中久勝, 秋山由美: 輸入食品より検出された法定外酸化防止剤(TBHQ), 兵庫県立衛生研究所年報, **32**, 184-187(1997)
- 福岡市保健環境研究所: メッセージ, 113(2002)
- 厚生省生活衛生局食品化学課長: 食品中の食品添加物分析法について, 衛化第 15 号, 平成 12 年 3 月 30 日
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: *tert*-ブチルヒドロキノン(TBHQ)にかかる試験法について, 食安監発第 0303001 号, 平成 17 年 3 月 3 日
- 上堀美知子: LC/MS/MS による環境水中のアミトロールの分析, 全国環境研会誌, **28**(4), 222-228 (2003)
- 西岡信浩, 三好益美, 久保正弘: 固相抽出による 1,4-ジオキサンの分析法について, 香川県環境研究センター所報, **23**, 51-53(1998)
- 山下幸宏: ゴルフ場農薬の分析-親水性農薬および HPLC 対象農薬の同時固相抽出-, 和歌山市衛生研究所報, **12**, 62-67(2000)