BHT の 比 色 分 析 法 (その 2)

抗酸化剤混合物中の BHT および BHA の検出法

中村 直慎, 吉田 慰子, 楠本 俊治*

先に第1報において BHT の新呈色反応, すなわち, BHT をアルコール性塩酸処理後 *p*-ニトロベンゼンジアゾニウム塩と反応させることによって呈色させる方法を報告した。本法ではフェノールあるいはアミン系抗酸化剤混合物中の BHT ならびに BHA を, きわめて簡単な操作で分離検出する方法について述べる。抗酸化剤混合物を前報の方法で処理して得られた BHT および BHA のアゾ色素は水酸化アルミニウム処理を施したロ紙あるいは水酸化アルミニウムのカラムを用い, 石油エーテルで展開するクロマトグラフィーにより分離確認することができた。検出限界は BHT および BHA 各 $0.2 \mu\text{g}$, $0.16 \mu\text{g}$ であるが, アゾ色素をさらにアルカリジメチルホルムアミドで処理することによって一層感度を上げることができる。

1 緒 言

フェノールあるいはアミン系抗酸化剤混合物中の BHT を分析するのに直接クロマトグラフィーを行なう方法¹⁾があるが, 一般に分離および検出が困難で感度がわるい。著者らは先に BHT の新呈色反応として本品をアルコール性塩酸で処理後ジアゾ化 *p*-ニトロアニリンとカップリングさせる方法²⁾を報告したが, さらに抗酸化剤の混合試料を同法で処理し, 得られた各種アゾ色素の混合物をベンゼンに溶かし, これを水酸化アルミニウムで処理したロ紙あるいは水酸化アルミニウムのカラムを用い, 石油エーテルで展開するクロマトグラフィーによって着色スポットあるいは分別帯としてきわめて容易に BHT および BHA の存在が確認されることを認めた。

2 実 験

2.1 試 薬

塩酸：試薬特級。

ジアゾニウム塩溶液：塩化 *p*-ニトロベンゼンジアゾニウム溶液。Hilton³⁾に準拠し, 使用時調製。

炭酸水素ナトリウム：試薬特級。

ベンゼン：試薬特級。

BHT および BHA 溶液：それぞれ和光純薬製のものをエタノールに溶かし, $10^{-2}M$ とする。

エトキシフェノール, N-フェニル- α -ナフチルアミン, α -ナフトール溶液：いずれも和光純薬製のものをエタノールに溶かし, $10^{-2}M$ とする。

石油エーテル：試薬特級。

水酸化アルミニウム：アルミニウムイソプロピレートから製造**した水酸化アルミニウム⁴⁾を減圧乾燥したものに水を 20~30% 添加し, せんをして 30 分間放置したものを使用する。

水酸化アルミニウム処理ロ紙：アルミニウムイソプロピレートの 4% イソプロピルアルコール溶液にロ紙 (東洋, No. 54) を浸し, 手早く室温で風乾したのち, さらに乾燥器中で 140°C , 1 時間乾燥し, デシケーター中に保存したものをを用いる。

2.2 操作法

2.2.1 クロマト検液の調製 小型の試験管に検液 (抗酸化剤溶液それぞれ同容量を混合) 0.3ml をとり, これに塩酸 0.3ml を混和し, 冷却管をつけて水浴中で 20~30 分間加熱する。これを水冷し, ジアゾニウム塩溶液 0.5ml , 炭酸水素ナトリウム 0.5g を混和して 10 分間放置したのちベンゼン 1ml , 水 8ml を加えて振り混ぜ, 放置する。澄明に分離したベンゼン層につき次のいずれかの操作を行なう。

2.2.2 分離検出法

i) ペーパークロマトグラフィー：内径約 1.5cm , 長さ約 15cm の試験管に石油エーテル約 2ml を入れ,

* 武田薬品工業株式会社研究所：大阪市東淀川区十三西之町 4 丁目

** アルミニウムイソプロピレートと気体状の水とを反応させて水酸化アルミニウムを得る。

1×13 cm の水酸化アルミニウム処理口紙（ベンゼン溶液の検液 0.003 ml を下端から約 2 cm 上にスポットしたもの）をつるして放置する。

ii) カラムクロマトグラフィー：内径 0.4 cm，長さ 5 cm のガラス管の一端に約 0.4 cm 層の綿せんを施し，これに水酸化アルミニウム約 0.2 g をなるべく固くつめ，これに石油エーテル少量を加えて潤おす。このカラムの上端に検液（ベンゼン溶液）を 0.003 ml 添加して展開には石油エーテルを用いる。

この方法では BHT および BHA の検出ができると同時に前者の概量も簡易に求められる。すなわち，石油エーテルで十分展開して BHT に対応する色素が流下し完全に下部の綿せん部分に含まれたとき（石油エーテルは自然に蒸発し黄色色素のみが綿せん中に残る）綿せんを取出し，アルコールで抽出後前報の呈色処理に準じて水酸化ナトリウムでアルカリ性にしてその呈色度を測定する。

iii) 乾式薄層クロマトグラフィー：3×10 cm のガラス板に厚さ約 1mm の水酸化アルミニウム層を通常の乾式法⁵⁾でつくり，下端から約 1.5 cm の位置にベンゼン溶液の検体を 0.003 ml スポットし，このガラス板を内径 9 cm のペトリのシャーレ中に横たえ，密閉容器中石油エーテルで展開する。この場合抽出溶媒として石油エーテル・エーテル混液（80：20）を使用し，スポットの部分を集めると前記同様にして目的物を比色定量することができる。

3 考 察

BHT がエタノール-塩酸（1：1）によって 2-tert-ブチル-*p*-クレゾール(TBC)を生成し，これがジアゾ化された *p*-ニトロアニリンとカップリングして安定なアゾ色素をつくることについてはさきに報告した²⁾。BHA はエタノール-塩酸による処理で一部分解するが，BHT に比べると非常に不完全で大部分は不変のまま残る。また多くのフェノール，アミンなどでは同処理による影響がほとんど認められない。すなわち BHT，BHA および他の抗酸化剤の混合物に前処理を施すと 2-tert-ブチル-*p*-クレゾール，BHA および他の抗酸化剤に対応するアゾ色素の混合物が得られる。著者らはこのようなアゾ色素の混合物から BHT(2-tert-ブチル-*p*-クレゾールとして)，および BHA に対応する色素をクロマトグラフィーを利用して分別する方法について次のとおり検討した。

最初著者らは水酸化アルミニウムで処理した口紙を用いるペーパークロマトグラフィーで色素が分離できるこ

とを見いだした。つづいて水酸化アルミニウムのカラムを用いて石油エーテルで展開したところ，Fig. 1-c のように TBC および BHA からの色素はそれぞれ明確に分離することを認めた。ちなみにケイ酸マグネシウム，アルミナなどのカラムを用い水酸化アルミニウムと同一条件でクロマトグラフィーを行なった結果は Fig. 1-a，b で，いずれもいちじるしくティリングし BHA との分離が不良であった。一般に水酸化アルミニウムは製法により種々の不純物を含むとともに経時変化しやすい性質を持っているため品質が不均一になり，一定の大きさの粒子，良質の活性度のものが得られにくく再現性が期待できないことが多い。しかしながら，本法使用の水酸化アルミニウムは無定形の微粒子で（50～300Å）不純物を含まず活性度も一定で長期間の保存に耐えるものである。従って，ここに用いた水酸化アルミニウムは品質が均一で再現性がよく本研究の目的に沿う有用な吸着剤であり，特に口紙に処理する操作は従来の硫酸アルミニウムとアンモニア⁶⁾およびアルミニウム明バンとアンモニア⁷⁾から水酸化アルミニウムを包含する口紙を調製する操作に比べてきわめて簡単で，なお，水酸化アルミニウムの含有量がアルミニウムイソプロピレート⁸⁾のアルコール溶液の濃度を変えることによって，自由に変えられて便利であることを見いだした。そこで，さらにこれを BHT および BHA の検出のために簡易かつ実用的にする目的で検討した結果，次に示すようにペーパークロマトグラフィーその他の方法を設定しえた。

Fig. 1 Chromatograms obtained by mixtures of azo dyes derived resp. from 2-tert-butyl-*p*-cresol (corresp. to BHT), and other antioxidants

a : Adsorbent magnesium silicate(100~200 meshes)

b : " Al₂O₃ (")

c : " Al(OH)₃ (containing 20~30% H₂O)

Elluent : Petroleum ether Time : 5 minutes

① Azo dye derived from 2-tert-butyl-*p*-cresol (corresp. to BHT)

② Azo dye derived from BHA

③ Azo dye derived from mixture of other antioxidants

3.1 簡易ペーパークロマトグラフィー

実験の項で述べた方法によって、きわめて短時間に BHA および TBC (BHT) が検出される。その一例を Table I に掲げる。スポットがうすくて判別しにくいときは、エタノール性水酸化カリウム溶液(5%) およびジメチルホルムアミドを噴霧するといずれのスポットも青色を呈して明確となる。

Table I Result of chromatographic test using $\text{Al}(\text{OH})_3$ - impregnated filter paper

Corresponding antioxidant	Color of the separated spot	R _f
2-tert-Butyl- <i>p</i> -cresol (corresponding with BHT)	Yellow	0.81
BHA	Red	0.68
Mixture of other antioxidants	Red-brown (Not separated each other)	0~0.086
Elluent: petroleum ether Time: 5 minutes Amount detectable: each 0.2 μg of BHT and 0.16 μg of BHA in 0.003ml benzene		

3.2 カラム法

実験の項で述べた方法でアゾ色素液を展開すると数分間で BHA および TBC (BHT) の存在を示す分別帯が認められる。TBC からのアゾ色素は比較的速く展開されるので、それを溶出して吸光度を測定すれば半定量も可能である。なお、水酸化アルミニウムの含水量は分離に影響する (Table II)。

Table II Relation between separation state and amounts of H_2O in $\text{Al}(\text{OH})_3$

H_2O (%)	Separation state
0	None
2.8	Merely
4.8	"
10.0	Interval of 0.5 cm
15.0	Interval of 1.0 cm
20.0	Interval of 2.5 cm
25.0	"
30.0	"

水酸化アルミニウムを吸着剤とした乾式法による薄層クロマトグラフィーも前記のとおり実施でき、クロマトグラフィーの操作においてはほぼ定量的な結果が得られる。しかし BHT, 特に BHA を正確に定量するためにはさらに検討を必要とする。

終りに本研究について有益な御助言、御指導を賜った当研究所三部第一研究室長田部日出雄博士に深く感謝する。また、水酸化アルミニウムを合成してくださった同研究室の畠中義弘氏に厚く感謝する。

文 献

- 1) L. C. Mitchell : *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, **40**, 909 (1957).
- 2) 中村直慎, 吉田恵子, 楠本俊治: 本誌, **11**, 978 (1962).
- 3) C. L. Hilton : *Anal. Chem.*, **32**, 383 (1960); *Rubber Age.*, **84**, 263 (1958).
- 4) 田部 日出雄, 横尾 亮: 特許公報, 昭 38-11602 (38.7.9. 発行).
- 5) J. Davidek, J. Blatná : *J. Chromatog.*, **7**, 205 (1962).
- 6) S. P. Datta, B. G. Ouerell, M. Stack-Dunne: *Nature*, **164**, 673 (1949).
- 7) J. E. Bush : *ibid.*, **166**, 445 (1950).

☆

Colorimetric method for analyzing BHT (Part 2); Identification of BHT and BHA in antioxidant mixtures. Naohika NAKAMURA, Toshiko YOSHIDA and Shunji KUSUMOTO (Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd., Higashiyodogawa-ku, Osaka)

A new color reaction of BHT (butylated hydroxy toluene) was reported previously in Part 1, which comprized a reaction of BHT with *p*-nitrobenzene-diazonium salt after treating BHT with an alcoholic hydrogenchloride reagent. In this report the method was extended to the identification of BHT and BHA in mixtures of phenolic or amino-containing antioxidant by a simple procedure.

The azo dye which was obtained by the method previously reported could be separated on a sheet of paper treated with aluminum hydroxide or on a small aluminum hydroxide column, using petroleum ether as the developing solvent. The identification limit is 60 μg each of BHT and BHA in 0.3ml of a sample, but it can be made more sensitive by treating the dye with an alkaline dimethylformamide reagent.

(Received May 27, 1963)