ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の衛生化学的研究 (第1報)
ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) のガスクロマトグラフィーによる微量定量法¹⁾

水谷民雄,^{2a)} 大江 武^{2b)}

京都府立大学家政学部,^{2a)} 京都市衛生研究所^{2b)}

Hygienic Chemical Studies on 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT). I.
Microdetermination of 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene
(BHT) by Gas Chromatography¹⁾

TAMIO MIZUTANI^{2a)} and TAKESHI OHE^{2b)}

Faculty of Living Science, Kyoto Prefectural University^{2a)}
and Kyoto City Institute of Public Health^{2b)}

(Received February 12, 1976)

A derivation method for the specific and sensitive analysis of 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) by gas chromatography has been developed. BHT was treated with ethanolic hydrochloric acid at 95° for 1 hr. The resulting 2-*tert*-butyl-*p*-cresol was extracted with benzene and further treated with 2,4-dinitrofluorobenzene and sodium hydride at 95° for 1 hr to form the electron-capturing ether derivative (DNPE). The reaction was successfully applied to the gas chromatographic determination of a micro-amount of BHT in the range of 0.05–10 µg.

緒 言

ジブチルヒドロキシトルエン (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene, BHT) は酸化防止剤の一種であり、食品添加物として使用されるほかに、ゴム、プラスチック、合成繊維、ガソリン、潤滑油など各種の工業製品に安定剤として添加されることも少なくない。³⁾

ところで BHT は脂溶性が高く、ラットに投与した場合、その排泄は比較的緩慢であり、投与量の多い時には体脂肪中に蓄積されることが知られている。⁴⁾ ヒトについても Collings ら⁵⁾ による英米人の皮下脂肪組織の分析結果によって、その蓄積性が確認されている。

また、Güsten ら⁶⁾ は Rhine 川の水の中に BHT が存在

することを定性的に確認しているが、このことは、工場排水や工業製品廃棄物にともなう環境中へ放出された BHT が魚介等の食品汚染を介して非意図的にヒトに摂取される可能性をも示唆するものである。

以上の諸点から BHT の環境中における分布、動態の究明、ヒトおよびその他の生物における蓄積の実態の把握などが重要な課題と考えられる。このような観点から著者らは、まず BHT の微量分析法を確立することとした。

BHT の分析は主として比色法⁷⁾ や水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフィー (GLC)^{7b), 8)} によって行なわれてきたが、これらの方法は、環境試料や生体試

1) 第1回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム (大阪, 1974年11月) で講演。

2) Location: a) Shimogamo, Sakyo-ku, Kyoto (京都市左京区下鴨); b) 1-2, Mibu Higashitakada-cho, Nakakyo-ku, Kyoto (京都市中京区壬生東高田町1-2)。

3) 猿渡健市, 有合化, **23**, 734 (1965); 桜井徳寿 (編), "5072の化学商品," 化学工業日報社, 東京, 1972。

4) J.W. Daniel, J.C. Gage, *Fd Cosmet. Toxicol.*, **3**, 405 (1965); D. Gilbert, L. Golberg, *Fd Cosmet. Toxicol.*, **3**, 417 (1965)。

5) A.J. Collings, M. Sharratt, *Fd Cosmet. Toxicol.*, **8**, 409 (1970)。

6) H. Güsten, W. Kölle, K.H. Schweer, L. Stieglitz, *Environ. Lett.*, **5**, 209 (1973)。

7) a) C.R. Szalkowski, J.B. Garber, *J. Agr. Food Chem.*, **10**, 490 (1962); b) 佐藤洋子, 河村太郎, 食衛誌, **13**, 53 (1972)。

8) D.M. Takahashi, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **53**, 39 (1970)。

Chart 1. Formation of 2-*tert*-Butyl-*p*-cresol 2,4-Dinitrophenyl Ether (DNPE) from BHT

料の分析法としては、その検出限界や特異性の点で不十分である。著者らはこの点を解決するため BHT をエレクトロンキャプチャー検出器 (ECD) 検出性の誘導体としたのち、ECD 付き GLC によって分析することとした。しかし、BHT は典型的な立体障害フェノールであり、その水酸基を利用して ECD 検出性の誘導体を形成することは困難である。したがって、ニトロ化、ブロム化、クロルメチル化など芳香環に対する置換反応によって ECD 検出性の誘導体とすることを試みたが、いずれの場合も単一の生成物を得ることができなかった。そこで BHT がプロトンの存在下、加熱によって *tert*-butyl 基の 1 つを脱離する反応⁹⁾に着目し、Chart 1 に示したように、この反応で生成した 2-*tert*-butyl-*p*-cresol (BC) を対応する 2,4-dinitrophenyl ether (DNPE) として ECD-GLC で分析する方法について検討し、満足すべき結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試薬および装置 *n*-ヘキサン、ベンゼンおよびエタノール：残留農薬試験用。

2,4-ジニトロフルオロベンゼン：特級品。

水素化ナトリウム：Ventron 社製品 (50%油性) をベンゼンで洗浄して使用した。

BHT 標準品：市販品をメタノールから再結晶して精製した。mp 70—71°。

2-*tert*-Butyl-*p*-cresol (BC) 標準品：市販品をエーテルから再結晶して精製した。mp 50°。

2-*tert*-Butyl-*p*-cresol 2,4-dinitrophenyl ether (DNPE) 標準品：BC 1.0 g, 2,4-ジニトロフルオロベンゼン 1.2 g および トリエチルアミン 0.2 ml をジメチルホルムアミド-ベンゼン (1:1) 30 ml 中で 5 時間還流して合成し、メタノールより再結晶して精製した。淡黄色針状晶。mp 135—136°。Anal. Calcd. C₁₇H₁₈O₅N₂: C, 61.81; H, 5.49. Found: C, 61.56; H, 5.54。

薄層クロマトグラフィー用プレート：和光純薬社製 Wako-gel FM プレート。

薄層クロマトグラフィー用展開溶媒：ベンゼン。

その他の試薬は、すべて特級品を使用した。

紫外線発生装置：東京光学機械社製 PAN UV LAMP。

ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC-5APE (³H 線源付き)。

ガスクロマトグラフ—質量分析計：島津製作所製 Shimadzu-LKB 9000。

2. 定量方法 1) 脱ブチル化反応——試料のエタノール溶液 (BHT 0.05—10 μg/1.5 ml) 1.5 ml を共通すり合せ試験管にとり、これに塩酸 1.5 ml およびグリセリン 2 ml を加え、マイクロ還流冷却器を付して 95°, 1 時間加熱する。冷却後、反応液を分液漏斗に移し、水 20 ml を加え、ベンゼン 3 ml ずつで 2 回抽出する。抽出液を合わせ、水 20 ml ずつで 2 回洗浄したのち、無水硫酸ナトリウムで脱水する。

2) 2,4-ジニトロフェニル化——前項で得たベンゼン溶液 5 ml を共通すり合せ試験管にとり、これに水素化ナトリウム 5 mg および 2,4-ジニトロフルオロベンゼンのベンゼン溶液 (10 mg/ml) 0.2 ml を加え、マイクロ還流冷却器を付して 95°, 1 時間加熱する。冷却後、反応液を分液漏斗に移し、1 N 水酸化ナトリウム液 20 ml ずつで 2 回、続いて水 20 ml ずつで 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水する。

3) GLC——前項で得たベンゼン溶液を、必要に応じて適当な一定倍率の濃度に調整したのち、その 5 μl をガスクロマトグラフに注入する。BHT の定量は別に作成した検量線に基づいて行なう。GLC による分析条件は次のとおりである。カラム：1% OV-1/Chromosorb W AW-HMDS (60—80 メッシュ) を充填したガラスカラム (0.3 cm × 200 cm)。カラム温度：200°。試料注入口温度：230°。検出器温度：220°。キャリアーガス：N₂ (1.0 kg/cm²)。

4) 検量線の作成——エタノール 1.5 ml 中に BHT 標準品 0.05—0.25 μg, 0.2—1.0 μg または 2.0—10.0 μg

9) 中村直慎, 吉田慰子, 楠本俊治, 分析化学, 11, 978 (1962)。

を含む溶液について定量方法 1) — 3) の操作を行ないガスクロマトグラムにおける DNPE のピーク高さをとって各区分の絶対検量線を作成する。

結果と考察

1. BHT の脱ブチル化反応

1) 反応成績体の検討 BHT 5mg について定量方法 1) に準じた操作を行ない、ベンゼン抽出液を検液とした。

この検液について薄層クロマトグラフィーを行ない、広領域紫外線を照射して検出した結果、BC 標準品と一致するスポット ($R_f=0.69$) のみを認めた。

また、検液についてガスクロマトグラフ-質量分析計による分析を行なった結果、トータルイオンモニタークロマトグラムは単一のピークを与え、その保持時間およびマススペクトルは、BC 標準品のそれらと完全に一致した。

以上の結果から BHT の脱ブチル化反応は分析的に利用できることを確認した。

2) 反応温度と反応時間の検討 BHT の脱ブチル化反応において、反応温度と反応時間が BC の生成率に及ぼす影響を検討した。すなわち、数段階の温度および時間の組み合わせ条件を設定し、この条件のもとで BHT 10 μg について定量方法 1) に準じて操作を行なった。生成した BC の量は定量方法 2) によって DNPE に変換し、DNPE 標準品を用いて作成した検量線に基づいて GLC で測定した。その結果は Table I に示すとおりで、反応収率は 95°, 0.5—1 時間において最高の値を示した。

TABLE I. Effect of Reaction Temperature and Time on the Conversion of BHT to 2-*tert*-Butyl-*p*-cresol (BC)

Reaction temp. (°C)	Reaction time (hr)	Yield ^{a)} (%)
80	0.5	35
80	1.0	42
80	1.5	62
95	0.5	78
95	1.0	79
95	1.5	64

a) Values are means of three trials at the 10 μg level of BHT.

BC was determined after being converted to its 2,4-dinitrophenyl ether (DNPE), therefore values represent overall yield of the two successive reactions.

なお、BHT および BC はともに極めて揮発性に富む化合物であるため、反応はキーパーとしてグリセリン

2 ml を添加して行なうこととした。グリセリンを添加しない場合の反応収率は著しく低下した。

2. 2,4-ジニトロフェニル化反応

BHT の脱ブチル化反応で生成した BC を ECD 検出性の誘導体に変換する方法は種々のものが考えられる。著者らは、BC に比してより高沸点で、化学的にも安定な誘導体に変換して、分析操作中の揮散や分解による損失を少なくすること、また、適度の極性を備えた誘導体に変換することによって、環境試料や生体試料の分析の際に妨害が予測される有機塩素農薬、塩化ビフェニル (PCB) など、低極性化合物とのカラムクロマトグラフィーによる分離を容易にすることの 2 点を考慮して、BC を 2,4-ジニトロフェニルエーテルに導いて分析することとした。なお、これらの条件を満たすものとして、他に *p*-ニトロベンゾイルエステルまたは 3,5-ジニトロベンゾイルエステルに変換する方法についても検討を行なったが、いずれの場合も変換の収率は 40 % 以下であり、再現性も良好でなかった。

1) 反応成績体の検討 BHT 5mg について定量方法 1), 2) に準じた操作を行ない、ベンゼン抽出液を検液とした。

この検液について薄層クロマトグラフィーを行なった結果、過剰の試薬に由来するスポット以外には DNPE 標準品と一致するスポット ($R_f=0.79$) のみを検出した。

また、検液についてガスクロマトグラフ-質量分析計による分析を行なった結果、クロマトグラムは過剰の試薬に由来するピーク以外に 1 本のピークを与え、その保持時間およびマススペクトルは DNPE 標準品のそれらと完全に一致した。

2) 反応温度と反応時間の検討 DNPE の生成率に及ぼす反応温度と反応時間の影響を検討した。すなわち数段階の温度および時間の組み合わせ条件を設定し、この条件のもとで BC のベンゼン溶液 (10 $\mu\text{g}/5\text{ ml}$) について定量方法 2) に準じて操作を行ない、生成した DNPE の量を DNPE 標準品を用いて作成した検量線に基づいて GLC で測定した。その結果は Table II に示すとおりであり、反応収率は 80°, 1.5 時間または 95°, 1 時間において最も良好であり、ばらつきも小さかった。

3) 試薬量の検討 2,4-ジニトロフルオロベンゼンおよび水素化ナトリウムの使用量が DNPE の生成率に及ぼす影響を検討した。すなわち、数段階の 2,4-ジニトロフルオロベンゼン量および水素化ナトリウム量の組み合わせ条件のもとで、BC のベンゼン溶液 (10 $\mu\text{g}/5\text{ ml}$) について定量方法 2) に準じて操作を行ない、生成した DNPE の量を GLC で測定した。その結果は Table III

TABLE II. Effect of Reaction Temperature and Time on the Conversion of 2-*tert*-Butyl-*p*-cresol (BC) to Its 2,4-Dinitrophenyl Ether (DNPE)

Reaction temp. (°C)	Reaction time (hr)	Yield ^{a)} (%)
80	0.5	95±20
80	1.0	90±17
80	1.5	94±4
95	0.5	99±18
95	1.0	95±4
95	1.5	91±11

a) Values are means ± S.D. of three trials at the 10 µg level of BC.

TABLE III. Effect of Amounts of NaH and 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) on the Conversion of 2-*tert*-Butyl-*p*-cresol to Its 2,4-Dinitrophenyl Ether (DNPE)

2,4-Dinitrofluorobenzene (mg)	NaH (mg)	Yield ^{a)} (%)
20	20	67±5
20	5	77±8
5	20	72±8
5	5	94±3
2	5	95±4
1	5	87±16

a) Values are means ± S.D. of three trials at the 10 µg level of BC.

に示すとおりであり、反応収率は 2,4-ジニトロフルオロベンゼン 2—5 mg、水素化ナトリウム 5 mg において最も良好であった。ただし、ガスクロマトグラム上で試薬由来のピークをできるだけ小さくするためには、過剰の試薬の使用は好ましくないので、2,4-ジニトロフルオロベンゼンの使用量は 2 mg とすることにした。

3. ガスクロマトグラフィーについて

ECD は DNPE に対して極めて良好な応答を示し、定量方法 3) の条件において DNPE の 1,1-dichloro-2,2-bis (*p*-chlorophenyl) ethylene (DDE) に対する相対感度は 0.2 であった。また、この条件のもとで、DNPE 0.05—0.4 ng の範囲で注入量とピーク高さとの間に直線関係が成立した。

カラム溶相に関しては、OV-1 の他に OV-17, QF-1/SE-30, diethyleneglycol succinate polyester (DEGS)-H₃PO₄ などについても検討を行なった。その結果、一般に非極性液相では良好なクロマトグラムが得られたが、DEGS-H₃PO₄ の場合にはピークが出現しなかった。各カラムにおける DNPE の DDE に対する相対保持時間

TABLE IV. Retention Times, Relative to *p,p'*-DDE, of DNPE on Various Gas Chromatographic Columns

	<i>p,p'</i> -DDE	DNPE
OV-1	1.0	2.6
OV-17	1.0	3.3
QF-1/SE-30	1.0	5.4
DEGS-H ₃ PO ₄	1.0	not eluted

Fig. 1. Calibration Curve for BHT

GLC conditions: 3 mm i.d. × 2 m glass column packed with 1% OV-1 on Chromosorb W (AW-HMDS), column temp.; 200°, injection port temp.; 230°, detector temp.; 220°, carrier gas: N₂ (1.0 kg/cm²), sensitivity, range: 10² × 16

を Table IV に示した。

OV-1 をカラム液相とした場合について DNPE と有機塩素農薬および PCB との分離状況を検討したところ、1,1,1-trichloro-2,2-bis (*p*-chlorophenyl) ethane (DDT), 1,1-dichloro-2,2-bis (*p*-chlorophenyl) ethane (DDD), DDE, dieldrin および hexachlorocyclohexane (BHC) の各異性体とは完全に分離されたが、PCB 成分の 1 つとは保持時間がほぼ一致した。したがって、実際試料の分析に際して PCB の共存が予測されるときは、あらかじめ適当な方法で DNPE と PCB の分離を行なう必要がある。著者らはシリカゲルマイクロカラムによる両者の分離法について検討を行なったが、その結果については次報で述べる。

4. 検量線について

定量方法 4) に従って作成した各区分の検量線は、いずれも良好な直線性を示した。検量線の 1 例を Fig. 1 に示した。

また、BHT 10 µg について定量法に従って 5 回の操作を行ない、ピーク高さの再現性を検討したところ、変

動係数は9.1%であった。

結 語

環境試料や生体試料の分析に適用する目的で BHT の特異性と検出感度に優れた分析法について検討し、次のような結果を得た。

1. BHT をエタノール性塩酸と加熱し、脱ブチル化

反応によって BC とし、これにナトリウム水素の存在下 2,4-ジニトロフルオロベンゼンを反応させることにより BHT を定量的に DNPE に変換することができた。

2. 生成した DNPE を ECD-GLC で定量することにより、0.05—10 μg の BHT の定量を行なうことができた。