プレカラム法ガスクロマトグラフィーによる 油脂中の BHT, BHA および熱媒体の分析

高 木 徹・山 崎 恵*・福住 一雄・秋谷 年見*・青山 正博

名古屋大学工学部 (名古屋市千種区不老町)

* 農林省食品総合研究所 (東京都江東区塩浜)

Gas Chromatographic Analysis of BHT, BHA and Heat Transfer Medium in Fatty Oils by Precolumn method

Toru TAKAGI, Megumi YAMAZAKI*, Kazuo FUKUZUMI, Toshimi AKIYA*

and Masahiro AOYAMA

Faculty of Engineering, Nagoya University (Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya)

* Food Research Institute, Agricultural and Forestry Ministry (Shiohama, Koto-ku, Tokyo)

Procedures for the rapid determination of BHT, BHA, Dowtherm and Neo-SK-oil in fatty oil were presented by authors. Fatty oils containing antioxidants or heat transfer medium are directly injected into precolumn which is attached to gas chromatograph to protect the main column from contamination with the unvolatiles. Each analysis takes only 20 min. at maximum. Gas chromatograph-mass spectroscopy system was found useful for the final identification of the antioxidant peaks. Investigation of the change of BHT and BHA contents in heated oils by the precolumn method showed the monotonical decrease of the contents under the effective stirring at 180~210°C.

1 緒 言

不揮発性油状検体中の微量揮発性成分のガスクロマトグラフ分析は実際にしばしば要求される。検体が油状物質であるときはもちろん、検体が固体であっても抽出などの操作により油状物質が分析試料となることもあり、このような要求が生ずる。従来は、このような場合には溶剤分別、蒸留、昇華、カラムクロマトグラフィーもしくは薄層クロマトグラフィーなどやこれらの組合せにより、定量しようとする目的の成分を濃縮、分離してガスクロマトグラフ分析するか、ヘッドスペース法などで分析されてきた。

著者らは、最近 Hartman, Rose¹⁾ がガスクロマトグラフの注入口に、カラムを保護するためのプレカラムを取り付けて、これに油脂を直接注入して、プレカラム中で油脂中の抗酸化剤のみを気化して、その迅速定量を行っていることに注目し、このプレカラム法による油脂中の添加剤、混入物についての分析法を研究したので報告する。

BHT, BHA は比色法²⁾、紫外線吸収スペクトル法³⁾、ガスクロマトグラフィー⁴⁾ によって定量されてきたが、これらの方法では、目的成分を濃縮あるいは妨害物質を除去する前処理を行ってから定量操作を行ない、前処

理に長時間を要し、多くの熟練した労力がかかり、しかも操作中に目的成分が一部損失するおそれがあった。また比色法、紫外線吸収スペクトル法では検体中に共存するフェノール性物質により定量が妨害される欠点があった。この研究ではプレカラム法を用いて油脂中の BHT, BHA の分析を行ない、油脂中の BHT, BHA の減少の傾向を迅速に求めることができた。BHT, BHA ピークの判定は、純品を対照物質として用い、数種のカラムを用いてガスクロマトグラフ分析すれば、保持時間の一致によって行なうことができるが、なお精度の高い確認手段が要求される場合に、ガスクロ質量スペクトルが使用できるように BHT, BHA の質量スペクトルを測定した。その結果、この方法がきわめて有効な手段であることが認められた。

さきに著者の一人、高木は油脂中に微量存在する熱媒体 (ジフェニル、ジフェニルエーテル混合物) のガスクロマトグラフィーによる定量法を発表したが⁵⁾、その際にガスクロマトグラフへの不ケン化物直接注入法と不ケン化物を薄層クロマトグラフィーにより分離した濃縮部の注入分析法を述べた。前者では装置の注入口およびカラムを油脂で汚染するのが欠点の一つであった。そこで今回、プレカラム法を用いたガスクロマトグラフ分析を試みて良好な結果を得た。前回は熱媒体としてダウサー

ム A を用いて実験を行なったが、今回はそのほかに Neo-SK-Oil KSK-Oil についても定量分析、定性分析を行なった。

2 実験と結果

2.1 試 料

原料油脂としては市販ナタネ白絞油を用いた。BHT, BHA および内部標準として用いた *trans*-スチルベン は市販品を再結晶精製し、ガスクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーで不純物の検出されないものを用いた。実験に使用した溶剤類はすべて蒸留して精製して用いた。

2.2 装 置

島津-4 APF (水素炎イオン化検出器使用) ガスクロマトグラフの試料注入口に、分離カラムの汚染を防止するために、Fig-1 に示したプレカラムを取り付けて分析を行なった。プレカラムの管部分はステンレスで、これとシンチュウ製のねじを銀ロウづけてプレカラム本体を作製した。これにアスベスト布を巻いて、その上に直径 0.5 mm の鉄クロム線を 3 mm 間隔で巻き、さらにその上にアスベストひもを巻いて加熱できるようにした。スライダックを用いて 20~50 V で電流を流すと、数分でカラム温度を 300°C 以上にすることができた。プレカラム温度は熱電対を用いて測定した。注入口にはテフロン製パッキングを用いた。キャリアガスは通常の注入口の裏側をめくらぶたし、前面よりステンレス管でプレカラムへ導いた。プレカラムは島津 4 APF 装置のカラム直接注入用の穴の部分に取り付け、支持金具によって固定した。プレカラムは 100 検体ごとに取

Fig-1 Design of precolumn for rapid analysis.

Fig-2 Gas chromatogram of BHT and BHA.

て洗浄した。

2.3 油脂中抗酸化剤のガスクロマトグラフィー

BHA, BHT および内部標準として *trans*-スチルベンを油脂に加えてプレカラムに直接注入して得られたガスクロマトグラムの一例を Fig-2 に示した。プレカラム内管に充てんする物は、ガラスビーズ (80~120 mesh), ガラスウール, セライトなどを試験, 検討した結果, 得られるピークの形状およびプレカラムの耐用時間からみて, ガラスウール, ガラスビーズが最も適していた。両者の間では充てんしやすい点でガラスビーズがすぐれている。

検量線を求めるために市販ナタネ油 1 g に既知量の BHT または BHA を加え, これに *trans*-スチルベン 0.0050% wt/vol を含有する二硫化炭素溶液 1 ml を加え, マイクロシリンジでその 2~3 ml をとり, プレカラムに注入してガスクロマトグラフ分析した。0.0010% から 0.0800% の抗酸化剤の油中濃度の範囲では抗酸化剤添加量と検出量の間には良好な直線関係が得られた。BHA および BHT の含量は ppm 単位で次式により求めることができる。1 検体を約 15 min で分析することができる。

$$\text{BHA}(\text{ppm}) = (\text{スチルベン量/試料量}) \times (\text{BHA ピーク面積/スチルベンピーク面積}) \times 1.19 \times 10^6$$

$$\text{BHT}(\text{ppm}) = (\text{スチルベン量/試料量}) \times (\text{BHT ピーク面積/スチルベンピーク面積}) \times 0.99 \times 10^6$$

1.19 および 0.99 は抗酸化剤含量既知の油脂を用いて実験した場合の測定値から算出した定量のための補正係数である。

Fig-3 に補正係数を求めるために使用した図を示した。図中の直線のコウ配から補正係数を算出した。この分析法の再現性を調べるために BHA 添加油脂検体を繰り返して 5 回分析した結果を Table-1 に示した。標準

$$\Lambda = (\text{wt of stilben/wt of sample}) \left(\frac{\text{Area of antioxidant peak}}{\text{Area of stilben peak}} \right) \times 10^6$$

Fig-3 Relation of peak area and antioxidant contents.

Table-1 Reproducibility of determination in gas chromatography of BHA with precolumn method.

No.	1	2	3	4	5	Average*
Determined value	156.4	137.6	138.4	165.0	162.9	152.0

* Standard deviation 13.2, BHA added; 150 ppm.

偏差 13.2 で、再現性は必ずしもよくないが、BHA と *trans*-スチルベン のピーク形が多少相違し、ピークの高さが相対的に異なってくると、ピーク面積の算出に影響してくるのが原因ではないかと考えられる。

2.4 比色法⁶⁾とガスクロマトグラフ法

比色法とプレカラム-ガスクロマトグラフ法による BHA 添加油脂中の BHA 定量値を比較した。試料油脂 10 g をヒョウ取し、アセトン-*n*-ヘキサン 1:9 容量比混合溶液 50 ml に溶解し、100 ml の分液漏斗に入れ、これに亜硝酸ナトリウム水溶液 (0.5% wt/vol) 5 ml と 3 N-塩酸 5 ml を加えてニトロソ化し、ただちにせんをして 30 sec 激しくふりまぜ、上層に水酸化ナトリウム-

Table-2 Comparison of gas chromatographic and colorimetric determination of BHA in fatty oil.* (ppm)

BHA added	Gas chromatographically determined	Colorimetrically determined
10	3.6	2.1
25	16.8	22.8
50	42.3	50.0
100	99.6	84.3
200	197.9	190.0
400	417.4	387.0
800	812.0	736.4

* The values shown are average values of triple measurements.

メタノール水溶液 (水酸化ナトリウム 40 g を水 500 ml に溶解し、メタノール 500 ml を加え、さらに水を加えて 1 l とする。) 20 ml を加えたのち、せんをして 30 sec 激しく振ってニトロソ化合物を抽出した。放置して二層に分離、下層が澄んでから、下層を 1 cm セルに取り 480 m μ における吸光度を測定した。対照セルには前記水酸化ナトリウム-メタノール水溶液を入れた。**Table-2** 比色法測定値をガスクロマトグラフ法測定値と比較して示した。両法とも濃度 10 ppm では定量値が非常に低く出るが、25 ppm 以上では定量法として用いる測定値を与えた。全般的傾向としては、100 ppm 以上ではガスクロマトグラフ法測定値の方が実際に添加した BHA 量に近かった。フェノール性物質を混入させた場合には比色法では測定値

は BHA 量過大となったが、ガスクロマトグラフ法では同じ精度で、妨害を受けることなく BHA の定量が可能であった。妨害物質によってはガスクロマトグラフカラムを SE-30 にして分析した。

2.5 加熱による油脂中抗酸化剤の減少

500 ml ビーカーに原料油脂 200 g を採取した。油層の深さ約 4 cm、空気との接触面積は約 55 cm² であった。ナタネ油の組成はパルミチン酸 3.1%、ステアリン酸 1.1%、オレイン酸 29.6%、リノール酸 19.4%、リノレン酸+アラキジン酸 10.4%、エイコセン酸 8.4%、エルシン酸 27.8% であった。油脂に抗酸化剤を 0.02% 添加し、160°C、185°C、210°C に加熱し、所定温度に達したのち、30 min、60 min、120 min 後に油脂試料を取り出した。加熱時は 2 min おきにカクハン棒で 1 min 66 回転でかくはんした。基準油脂分析法⁷⁾にしたがって各試料油脂の酸価、過酸物価および屈折率の変化を測定し

Table-3 Variation of characteristics of fatty oils in heating.

Antioxidant*	Temp. (°C)	Time (min)	A.V.	Peroxide value	n_D^{20}
BHA	160	180	0.08	4.5	1.4697
	185	180	0.09	3.6	1.4698
	210	180	0.13	2.1	1.4699
BHT	160	180	0.05	4.4	1.4697
	185	180	0.09	2.6	1.4697
	210	180	0.13	2.1	1.4698
BHA	210	0	0.09	4.2	1.4697
	210	30	0.09	3.9	1.4697
	210	60	0.09	4.2	1.4698
	210	120	0.10	3.9	1.4698
	210	180	0.13	2.1	1.4699

* Contents: 0.02% in fatty oils.

Fig-4 Loss of BHA in heated oil under effective stirring. **Fig-5** Loss of BHT in heated oil under effective stirring.

て Table-3 の結果を得た。Fig.-4 および 5 に加熱中の BHT および BHA の減少の傾向を示した。減少速度は時間に対して一様ではないが、全体としてみると、油脂中に残存する抗酸化剤量に比例して減少するのでなく、減少量は時間に比例する傾向がみられる。210°C では 4 hr (240 min) 加熱後には抗酸化剤はほとんど消失した。抗酸化剤は加熱温度が上昇するとともに急激に減少するようになるが、食品の揚げ物をつくる温度の近辺では、Fig.-4 および 5 に示されるように BHA, BHT とともに、おおよそ 10°C の温度上昇により抗酸化剤減少量は 5% 増加する。180°C では毎時間 20% ずつ減少し、5 hr 後には抗酸化剤は大部分消失する。加熱時における油脂よりの抗酸化剤の減少速度はカクハン速度に関係があり、この実験ではかなりカクハンを効率的に行なったが、もっとカクハンの効果を低くすれば、抗酸化剤の減少する傾向は異なってくるであろう。油脂の表面から抗酸化剤が減少すると考えると、油中における抗酸化剤の拡散因子が影響するようになり、抗酸化剤減少速度が低下し、抗酸化剤が低濃度になるほど、この傾向が顕著になるであろう。

2.6 BHA および BHT のガスクロ-質量スペクトル分析

分析に使用した装置は日立 K-53 ガスクロマトグラフと日立 MRS-4 質量スペクトルをピーマンタイプのセバレータで接続したものである。ガスクロマトグラフにおけるカラム充填物は Shimalite(60~80 mesh) 担体に固定液相 XE-60 を 5% 付着したものをを用いた。分析条件はカラム温度 180°C、試料注入口温度 200°C、質量スペクトル部のイオン化電圧 80 eV、イオン化室温度 200°C、走査速度 1~300(m/e)/10 sec であった。

Fig.-6 および 7 に BHA および BHT を含有する油脂または BHA, BHT のみをガスクロマトグラフ分離、質量スペクトル分析した場合の得られるスペクトルの例を示した。Fig.-6 の BHA のピークでは m/e 180 は分子イオンによる親ピークである。 m/e 165 は(親ピーク) -15(CH_3)、 m/e 137 は(親ピーク) -43($\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_4$)に相当し、2-*trans*-ブチルベンゼンで認められた⁸⁾と同様の分裂経路である。 m/e 107 は m/e 137 のイオンのエーテル結合の切断による CH_2O の脱離で生ず

Fig.-6 Mass spectrum of BHT.

Fig.-7 Mass spectrum of BHA.

るイオンピークであり⁹⁾、 m/e 91 はさらに酸素が脱離して生ずるベンジルイオン、 m/e 65 は m/e 91 のピークのイオンより $\text{CH}\equiv\text{CH}$ が脱離して生成したイオンのピークである。 m/e 57 は 2 あるいは 3 位置より脱離した第三ブチルイオンピーク、 m/e 55 および 53 は m/e 107 のイオンの水素の転位ののちのベンゼン環の開裂¹⁰⁾により生成したイオンのピークであると考えられる。Fig.-7 の BHT のスペクトルでは m/e 220 は親ピークである。 m/e 205 は(親ピーク) -15(CH_3)、 m/e 177 は(親ピーク) -43($\text{CH}_3 + \text{C}_2\text{H}_4$)に相当し、これらは BHA において認められた型の切断によるピークである。BHT の場合には m/e 57 の第三ブチルイオンピークの強度は著しく強く、この実験の条件ではベースピークであった。これらのスペクトルの型を利用して未知試料中の BHT, BHA の存在の確認が可能である。

2.7 油脂中の熱媒体のガスクロマトグラフィー

さきに油脂中のダウサーム A をガスクロマトグラフィーで検出、定量する方法について報告したが⁵⁾、その方法では油脂の一定量をケン化して不ケン化物を抽出分離し、二硫化炭素溶液としてガスクロマトグラフへ注入して分析するか、不ケン化物を薄層クロマトグラフィーで分別し、炭化水素区分を二硫化炭素溶液として注入分析する。これらの方法では油脂の直接注入による装置の汚染を防止するために熱媒体成分の濃縮を行なう。今回のプレカラム法を熱媒体の分析に適用したところ、定量の精度は多少劣るが、単なる検出には 0.5 ppm の含量の場合でも検出可能で、多数試料の迅速分析法としてはすぐれていることが認められた。

ダウサーム A, Neo-SK-oil 260, KSK-oil 260 のガスクロマトグラムの例をそれぞれ Fig.-8, 9, 10 に示した。分析条件は図中に示した。ダウサーム A はジフェニル 26.5%, ジフェニルエーテル 73.5% の共融混合物で、SE-30 カラムを用いると Fig.-8 に示すように、カラム温度 150°C 以下では 2 ピークに分かれるが、150°C 以上では高温になるほど次第にピークが接近して、180°C 以上では単一ピークとなる。DEGS, XE-60 などの極性液相カラムでは、ジフェニルとジフェニルエーテルのピークは条件に関係なく、重なって単一ピークとなる。このように SE-30 カラムはダウサーム A の検出に便利で、

Fig.-8 Gas chromatogram of Dowtherm A.

Fig.-9 Gas chromatogram of Neo-SK-oil-260.

Fig.-10 Gas chromatogram of KSK-oil-260.

Table-4 Response ratio of heat transfer medium to *trans*-stilben (f).

	Dowtherm A	Neo-SK-oil 260	KSK-oil 260
Response ratio	1.082	1.016 ^{a)}	1.071 ^{b)}

a) Calculated from area of five large peaks,

b) Calculated from area of four large peaks,

Heat transfer medium : HTM.

$$\text{HTM(ppm)} = \left(\frac{\text{stilben wt}}{\text{Sample wt}} \right) \times \left(\frac{\text{HTM peak area}}{\text{stilben peak area}} \right) \times f \times 10^6$$

Table-5 Determination of heat transfer medium in fatty oil by precolumn method.

Dowtherm A (ppm)		Neo-SK-oil 260 (ppm)		KSK-oil 260 (ppm)	
Added	Found	Added	Found	Added	Found
1.20	1.09 $\pm$ 0.46	1.53	1.45 $\pm$ 0.39	1.70	1.75 $\pm$ 0.19
2.91	3.01 $\pm$ 0.15	4.87	4.92 $\pm$ 0.32	5.96	6.07 $\pm$ 0.35
10.85	10.92 $\pm$ 0.43	14.29	15.10 $\pm$ 0.57	12.16	13.05 $\pm$ 0.50

Average of triplicate analysis.

寿命がながいので、この実験ではおもに SE-30 を用いて分析を行なった。Neo-SK-oil 260 は 2,6- および 1,6-ジメチルナフタレンを主成分とし、そのほかに 2,3- および 1,2-ジメチルナフタレン、 α - および β -メチルナフタレン、ナフタレン、ジフェニル、ジフェニルエテル、アセナフテンよりなるが、それらのピークはクロマトグラム上で重なるために、ピーク数は最も多いときで、大小あわせて 9 ピークであった。Fig.-9 では 5 ピークが現われている。KSK-oil-260 はモノイソプロピルテトラヒドロナフタレン 33.6%、モノイソプロピルナフタレン 31.3% の二主要成分のほかに、ジイソプロピルナフタレン、ジイソプロピルテトラヒドロナフタレン計 32.8% とジフェニル 2.3% を含有すると述べられており¹⁾、Fig.-10 に示すように 5 ピークが現われる。Fig.-9, 10 では Fig.-8 の場合と異なってカラム温度を変化させてもピークの相対的位置は大きな変化はないが、ピークの保持時間が接近するとピークが重なる。

Table-6 Limits of Dowtherm A concentration for gaschromatographic determination in various solvents.

Solvent	Temperature (°C)	150			130			
	Conc. ($\times 10^{-6}$ %wt/vol)	1000	500	100	1000	500	100	10
Nonane		×	×	×	△	×	×	×
DMSO		×	×	×	△	×	×	×
Hexane		△	×	×	○	△	×	×
Acetonitril		○	△	×	○	○	△	×
CCl ₄		○	△	×	○	○	△	×
Acetone		○	△	×	○	○	△	×
CS ₂ ^{a)}		○	○	○	○	○	○	○

○ possible, × impossible, △ border line.

a) 150°C 10 $\times 10^{-6}$ % △, 1 $\times 10^{-6}$ % △ (5 μ l injected).Sensitivity, (Shimadzu 4 APF) 1000 $\times 10^{-6}$ %, 0.8 $\times 10^3$, 500 $\times 10^{-6}$ % 0.4 $\times 10^3$, 100 $\times 10^{-6}$ % 0.8 $\times 10^4$, 10 $\times 10^{-6}$ % 0.2 $\times 10^4$ 1 μ l injected. Column, SE-30 5% on Chromosorb (W 60-80 mesh)injection 220°C, detector 240°C, N₂ 30 ml/min, H₂ 35 ml/min, air 1.1 kg/cm².

試料油はほぼ等容積の二硫化炭素溶液として注入した。

trans-スチルベンを内部標準として用いた場合の **Fig.-8, 9, 10** の条件における補正係数と、それを利用して熱媒体の含量を算出する式を **Table-4** に示した。

Table-5 に定量の精度を示した。

熱媒体の分析の場合には、抗酸化剤の分析の場合に比べて、検出限界濃度が低いことが要求されるので、プレカラム法で油脂を直接分析するには **Fig.-8~10** に示すように、水素炎検出器をきわめて高感度で使用しなければならない。注入検体量 $5\ \mu\text{l}$ のときには、100 検体注入したのちも、ベースラインの特別な乱れは認められなかったが、プレカラムを交換した。**Fig.-8** の条件では、市販油脂の大部分が保持時間 9 min の位置に小さなピークを示したが、分析の妨害とはならなかった。プレカラムに直接注入する場合の溶剤を選択するための実験結果を **Table-6** に示した。△は溶剤ピークがベースラインにほとんどもどる近辺に、熱媒体ピークが現われた場合を示す。この結果は、熱媒体を濃縮しないで、きわめ

て低濃度の状態でプレカラムに注入する場合には、二硫化炭素以外には、溶剤として使用できないことを示す。

(昭和 48 年 4 月 10 日受理)

文 献

- 1) C.H. Anglin, *J. Agr. Food Chem.*, **4**, 1018 (1956); C.R. Szalkowski, J.B. Garber, *ibid.*, **10**, 490 (1962)
- 2) N.J. Alicino, *J. Agr. Food Chem.*, **11**, 496 (1963); T.K. Choy, *ibid.*, **11**, 349 (1963)
- 3) K.T. Hartman, L.C. Rose, *J. Amer. Oil Chemist' Soc.*, **47**, 7 (1970)
- 4) 高木, 油化学, **19**, 279 (1970)
- 5) 高木, 油化学, **18**, 235 (1969)
- 6) D.P. Johnson, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **50**, 1298 (1967)
- 7) 日本油化学協会編“基準油脂分析試験法”(1960)朝倉書店
- 8) A.N.H. Yeo, D.H. Williams, *Organic Mass Spectrometry*, **5**, 135 (1971)
- 9) M.M. Bursey, *Organic Mass Spectrometry.*, **1**, 31 (1968)
- 10) T. Aczel, H.E. Lumpkin, *Anal. Chem.*, **32**, 1819 (1960)
- 11) 綜研化学株式会社資料