食品中 BHT 及び BHA の簡易、分別比色定量法

小林加代子*・辻 澄子*・外海泰秀*・伊藤誓志男*・田辺弘也**

A Rapid and Separative Colorimetry for the Determination of BHT and BHA in Foods

Kayoko KOBAYASHI*, Sumiko TSUJI*, Yasuhide TONOGAI*,
Yoshio ITO* and Hiroya TANABE**

* National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch,
1-1-43, Hoenzaka, Higashi-ku, Osaka 540

** The Faculty of Education and Liberal Arts, Sagami Women's
University, 2-1-1, Bunkyo, Sagamihara 228

A rapid and separative colorimetry for the determination of BHT and BHA in foods was developed. By shaking sample with methanol, BHT and BHA were quantitatively extracted into methanol solution and isolated from such food components in sample as fats, protein, inorganic salts, etc. The suitable conditions for the reaction of BHT with *o*-dianisidine and BHA with 2,6-dichloroquinonechloroimide were studied and separative colorimetry for them was established. Recoveries of them added to foods at 50 and 200 ppm were more than 72.5% and 92.6%, respectively. Detection limit of them in foods were 2~4 ppm. Time consumption for analysis of BHT and BHA in foods by the proposed method was within 30 min.

(Received Mar. 5, 1986)

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) はブチルヒドロキシアニソール (BHA) と共に、食用油脂、バター、魚介乾製品、同塩蔵品その他の食品に酸化防止剤として繁用されている。

著者らは前報¹⁾で、BHA を試料からヘキサン抽出し、ついで特異的反応試薬である 2,6-ジクロロキノンクロロイミド (2,6-Q) を用いて選択的に水層へ分離し、比色定量する方法について報告した。しかし、実試料では BHA は BHT との混合状態で使用されることが多いため、両者を分別定量することが望ましい。

BHT の場合は特異的反応試薬として *o*-ジアニジンがある²⁾³⁾ が、試料からのヘキサン抽出液を *o*-ジアニジン及び亜硝酸水溶液と振り混ぜても BHT は反応せず、BHA の様に水層へは移行しない。ゆえに従来の分析法⁴⁾⁵⁾ ではヘキサン抽出液から BHT をアセトニトリ

ル分配した後 *o*-ジアニジンと比色している。

本法で著者らは簡易比色定量法を目的とするので、*o*-ジアニジン及び亜硝酸水溶液と反応可能な溶剤を用いて BHT 及び BHA を試料から抽出し、この抽出液を直接比色反応する方法について検討した。試料からの BHT 及び BHA の抽出溶剤にメタノールを用いたところ、両者の抽出、呈色とも良好な結果が得られ、簡易化色定量法を確立できたので報告する。

実験方法

1. 試料

食用油、バター、ニボシ、冷凍魚、ポテトチップスはいずれも前報と同様の市販品を用いた。

2. 試薬・試液

BHT, BHA, *o*-ジアニジン, 2,6-Q は和光純薬工

* 国立衛生試験所大阪支所 (〒540 大阪市東区法円坂 1-1-43)

** 相模女子大学 (〒228 相模原市文教 2-1-1)

業(株)製の試薬特級を用いた。

BHT 及び BHA 標準溶液: BHT または BHA をそれぞれ 1 g 正確にはかり、メタノールを加えて溶かし 1000 ml とし、標準原液とする。標準原液 2 ml をとり、メタノールで 100 ml とし、標準溶液とする (この液 1 ml は BHT または BHA を 20 μ g 含む)。

o-ジアニシジン溶液: *o*-ジアニシジン 0.25 g をとり 50% メタノール 100 ml に溶かし、活性炭 0.2 g を加えて 5 分間振り混ぜてからろ過し、HCl (1+9) 10 ml を加える。本液は冷暗所に保存する。

2,6-Q 溶液: 2,6-Q 0.02 g をとり、エタノールに溶かして 100 ml とする。本液は冷暗所に保存する。

ホウ酸緩衝液: ホウ酸 3.1 g、塩化カリウム 3.5 g を適量の水に溶かし、1 N 水酸化ナトリウム溶液 32 ml を加えて水で全量を 2000 ml とする (pH 9.0)。

3. 装置

分光光度計: 日立(株)製、二波長自記分光光度計 556 型。

4. 分析操作法

4-1 試料への BHT 及び BHA の添加方法

BHT 及び BHA 標準原液の 2 ml (2000 μ g) または 0.5 ml (500 μ g) をそれぞれ試料 10 g に添加し、暗所で一夜放置したものを試料とした。

4-2 試料溶液の調製

試料 10 g をブレンダーカップにとり、水分含量の多い試料の場合には無水硫酸ナトリウム 15 g を加え、メタノール 50 ml を加えて 3 分間ホモジナイズする。メタノール層を分取し、残渣にメタノール 50 ml を加えて同様に操作し、メタノール層を合わせて 100 ml の定容として試験溶液とする。

4-3 比色定量

1) BHT: 試験溶液 10 ml を分液ロートにとり *o*-ジアニシジン溶液 3 ml 及び 0.1% 亜硝酸ナトリウム溶液 7 ml を加えて 5 分間放置する。つぎにジクロロメタン 5 ml を加えて振り混ぜジクロロメタン層を分取する。水層にジクロロメタン 5 ml を加えて同様に操作し、ジクロロメタン層を合わせ、メタノールで 10 ml の定容とする。空試験溶液を対照として、波長 525 nm の吸光度を測定する。なお本操作は全て遮光下で行なう。

2) BHA: 試験溶液 5 ml を分液ロートに取り、ホウ酸緩衝液 10 ml 及び 2,6-Q 溶液 5 ml を加えて 5 分間放置する。つぎに酢酸ブチル 10 ml を加えて振り混ぜ、酢酸ブチル層を分取する。水層に酢酸ブチル 5 ml を加えて同様に操作し、酢酸ブチル層を合わせ、エタノール

で 20 ml の定容とする。空試験溶液を対照として波長 610 nm の吸光度を測定する。

4-4 検量線の作成

4-3 の試験溶液の代わりに BHT 標準溶液 1, 2, 3, 4, 5 ml およびメタノール 9, 8, 7, 6, 5 ml をとり、以下 4-3 の 1) と同様に操作し、横軸に BHT 濃度、縦軸に吸光度をとり検量線を作成する。また BHA 標準溶液 1, 2, 3, 4, 5 ml およびメタノール 4, 3, 2, 1, 0 ml をとり、以下 4-3 の 2) と同様に操作し、横軸に BHA 濃度、縦軸に吸光度をとり検量線を作成する。

結果と考察

1. メタノールによる BHT 及び BHA の抽出

食品衛生検査指針⁴⁾や衛生試験法⁵⁾ではペンタンやヘキサンを用いて試料から抽出し、アセトニトリル分配により脂肪との分離を行なうことが多い。しかし、ニボシ等の固形食品ではペンタンやヘキサンが食品の内部まで十分に浸透しないため抽出率が低いと言われている⁶⁾。またアセトニトリル分配では BHT の極性が低い⁷⁾ためアセトニトリル層への移行性が悪く⁷⁾、BHT と BHA について今まで満足すべき回収率を得る方法が見当たらなかった。

本報では抽出溶液にメタノールを用い、BHT 及び BHA の抽出と同時に食品成分との分離を試みた。

各種食品から BHT 及び BHA のメタノールによる抽出率を調べ Table 1 に示した。

いずれも 93.9% 以上の回収率を示した。

メタノールを抽出剤に用いた場合、極性が大きい⁸⁾ため食品の内部への浸透性は充分であり、かつ食品成分である脂肪はメタノールにはほとんど溶解しないため、BHT や BHA を選択的に抽出することができた。食用油やバ

Table 1 Recoveries of BHT and BHA in foods by solvent extraction with methanol

Sample	Extraction (%)*	
	BHT	BHA
Edible oil	93.9	95.2
Butter	94.5	96.6
"Niboshi"	94.7	95.9
Frozen fish	95.5	96.8
Potato chips	97.1	98.5

* 2000 μ g of BHT and BHA were added to 10 g of sample.

** Mean value of three trials.

ターをメタノールと振り混ぜても両者の分離は可能であった。なおメタノール抽出液を減圧濃縮すると BHT 及び BHA が酸化分解されるため回収率が低下したので、抽出液は濃縮せず、直接比色定量に用いた。

2. *o*-ジアニシジンによる BHT の呈色

2-1 BHT 呈色物の抽出条件

BHT は *o*-ジアニシジンと 50% アルコール溶液中において亜硝酸存在下橙赤色に発色し、この呈色物は塩素を持つ有機溶媒で抽出することにより赤色となり吸光度が大きくなる⁹⁾。食品衛生検査指針⁴⁾では 50% メタノール溶液から反応呈色物をクロロホルム抽出しているが、より呈色至適条件を得るためにアルコールと塩素系溶媒の種類を変え、BHT の呈色度を比較し Table 2 に示した。

アルコールは炭素数が多くなるほど、塩素系溶媒は塩

Fig. 1 Stability of BHT chromogen with and without interception of light

Dichloromethane (O) and chloroform (●) solution containing 100 μ g of BHT.

— with interception of light

---- without interception of light

素数が多くなるほど、すなわちいずれも極性の小さくなるほど呈色物の吸光度は小さくなった。したがって以後の実験にはアルコールとして原法通りのメタノール、呈色物の抽出溶剤とし原法のクロロホルムの代りにジクロロメタンを用いることにした。

2-2 呈色物の安定性

アルコールとしてメタノールを用い、抽出溶剤としてジクロロメタン及びクロロホルムを用いたとき、BHT 呈色物の安定性を遮光した場合と室内放置の場合について調べた。

Fig. 1 に示したように、遮光しないときはすみやかに退色が起こるのに対して、分液ロート及び試験管を遮光した場合には 90 分後も安定であり、クロロホルムよりもジクロロメタンの方がより安定性が優れていた。

3. 2,6-Q による BHA の呈色

3-1 アルコールの種類の影響

BHA はアルカリ性下 50% エタノール溶液中で 2,6-Q により最も良好に発色するといわれている⁹⁾。

試料から BHT 及び BHA の抽出剤にメタノールを用いた場合、Table 2 に示したように BHT は 50% メタノール中で良好に発色したが BHA に関しては不明である。

そこで BHA の 2,6-Q との呈色反応に及ぼすアルコールの種類の影響を検討した。水層中の総アルコール濃度を 50% とし、メタノール、メタノール・エタノール (1+1) 混液及びエタノールを用いたときの BHA の呈色度はそれぞれ 0.112, 0.245, 0.490 であった。

BHA の呈色度はエタノールでは良好であるがメタノールでは低下し、メタノール・エタノール (1+1) 混液ではその中間の値を示した。

したがって 2,6-Q との呈色反応に用いるメタノール抽出液量を多くすると呈色度が低下し、少なくすると定量限界が高くなる関係となった。ゆえに、メタノール抽

Table 2 Effects of reaction medium on color development of BHT with *o*-dianisidine (Absorbance at 525 nm)*

Solvent used for extraction of BHT chromogen	Kind of alcohol in aqueous layer		
	Methanol	Ethanol	Propanol
Dichloromethane	0.390	0.147	0.015
Chloroform	0.375	0.135	0.005
Carbon tetrachloride	0.002	0.001	0.001

* 100 μ g of BHT in aqueous layer (alcohol 10 ml, 0.25% *o*-dianisidine 3 ml and 0.1% sodium nitrite 7 ml) was shaken with three kind of organic solvent 10 ml, then absorbances of organic layer was measured at 525 nm.

出液は 5 ml を用いることとし, 2,6-Q のエタノール溶液 5 ml 及び ホウ酸緩衝液 10 ml の組成で呈色させることにした。

3-2 BHA 呈色物の再抽出溶剤の検討

水層中で生成した BHA と 2,6-Q 呈色物は, 水層が混濁しているため直接比色することはできず, 一旦有機層へ再抽出する必要がある。

再抽出溶剤としては前報¹⁾で検討したように, 酢酸ブチルを用い, 抽出した有機層を比色定量した。

4. BHT 及び BHA 呈色物の吸収スペクトル

o-ジアニジンによる BHT の呈色物及び 2,6-Q による BHA の呈色物の吸収スペクトルを Fig. 2 に示した。

いずれも 100 $\mu\text{g}/\text{tube}$ であり, それぞれの極大吸収

波長は前者では 525 nm, 後者では 610 nm であった。

5. BHT 及び BHA の検量線

BHT 及び BHA の比色法による検量線はいずれも 20 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{tube}$ の範囲において良好な直線性を示した。すなわち BHT は 2 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (試料中 20 ~ 100 ppm), BHA は 1 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (試料中 40 ~ 200 ppm) において検量線が作成できた。試料中の検出限界はいずれも 2 ~ 4 ppm であった。

6. 呈色に及ぼす共存物質の影響

BHT 及び BHA の呈色反応に及ぼす他の抗酸化剤の影響を検討し Table 3 に示した。

いずれも 1 000 $\mu\text{g}/\text{tube}$ 添加したときの吸光度を示す。

BHT 及び BHA はそれぞれ選択的な呈色反応であり

Fig. 2 Absorption spectra of BHT and BHA chromogen
Concentration of BHT was 100 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$ and 100 $\mu\text{g}/20\text{ ml}$, respectively.

Table 3 Color developments of various antioxidants with *o*-dianisidine and 2,6-dichloroquinonechloroimide

Antioxidant	<i>o</i> -Dianisidine method*	2,6-Dichloroquinone chloroimide method**
Dibutyl hydroxytoluene	3.900	0.031
Butyl hydroxyanisol	0.038	4.900
<i>tert</i> -Butyl hydroquinone	0.056	0.052
Erythorbic acid	0.045	0.040
Propyl gallate	0.061	0.055
Ethyl protocatechuic acid	0.046	0.037

* Absorbance at 525 nm (Antioxidant: 1 000 $\mu\text{g}/\text{tube}$)

** Absorbance at 610 nm (Antioxidant: 1 000 $\mu\text{g}/\text{tube}$)

Table 4 Recoveries of BHT and BHA in foods by solvent extraction with methanol and two colorimetries Recovery (%)*

Sample	BHT added**		BHA added***	
	50 ppm	200 ppm	50 ppm	200 ppm
Edible oil	72.5	92.8	82.8	94.0
Butter	75.4	93.5	81.5	94.7
"Niboshi"	76.3	92.6	78.9	94.1
Frozen fish	84.0	94.9	79.6	95.5
Potato chips	78.1	96.5	84.2	97.6

* Mean value of three trials.

** Determined by *o*-dianisidine method.

*** Determined by 2,6-dichloroquinonechloroimide method.

他の抗酸化剤が共存しても影響のないことが明らかであった。

7. 全工程における添加回収

BHT 及び BHA 無添加試料に両者を 50 及び 200 ppm 添加したときの、本法による全工程における回収率を求め Table 4 に示した。なお使用許可量は魚介冷凍品で 1 000 ppm, 油脂・バター等で 200 ppm である。

BHT 及び BHA の 50 ppm 添加のとき、前者では 72.5%, 後者では 78.9% 以上であり、200 ppm 添加のときは両者とも 92.6% 以上であった。また 3 回の測定における変動係数は、いずれも 6.2% 以下であった。

要 約

(1) 試料を直接メタノールと振り混ぜることにより、食品成分である脂肪、蛋白等と分離して BHT 及び BHA を定量的に抽出した。

(2) メタノール抽出液中の BHT を *o*-ジアニジン、BHA を 2,6-Q とそれぞれ反応させ比色するための至適条件を検討し、分別比色定量法を確立した。

(3) BHT 及び BHA を試料に 50 及び 200 ppm 添加したときの本法による回収率は、それぞれ 65.9 及び 92.6% 以上であった。また試料中の検出限界はいずれも 2~4 ppm であった。

(4) 本法によれば分析所要時間は 1 検体 約 30 分以内

と短く、食品中の BHT 及び BHA を簡易に分別定量することができる。

文 献

- 1) 小林加代子・外海泰秀・伊藤蒼志男: 日食工誌, **33**, 134 (1986).
- 2) SLOMAN, K. G., ROMAGNOLI, R. J. and CAVAGNOL, J. C.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **45**, 76 (1962).
- 3) STUCKEY, B. N. and OSBORNE, C. E.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **42**, 228 (1965).
- 4) 厚生省環境衛生局監修: "食品衛生検査指針 I", (日本食品衛生協会), p. 492~497 (1973).
- 5) 日本薬学会編: "衛生試験法・注解", 金原出版(株), p. 345~350 (1980).
- 6) 藤 由美・佐賀順子・山本恵子・遠藤和子・増井武・田川優子・小池一富・村木慧三: 日本食品衛生学会 第 49 回 学術講演会, p. 60 (昭和 60 年 5 月, 東京).
- 7) 石川雅章・山本政利・向後勝成・増井俊夫・成田弘子・木村庄治・渡辺武明・金崎逸子・佐原由利子・十河隆之・木村育子・松浦裕司・浅岡公江・山本 豊・門名嘉則: 静岡県衛生研究所報告, **21**, 39 (1978).
- 8) SZALKOWSKI, C. R. and GARDNER, J. B.: *J. Agr. Food Chem.*, **10**, 490 (1962).
- 9) 佐藤洋子・河村太郎: 食衛誌, **13**, 53 (1972).

(昭和 61 年 3 月 5 日受理)