食品中の酸化防止剤に関する研究 (第1報)

食品中のジブチルヒドロキシトルエンおよびブチルヒドロキシアニソールの分離法について

(昭和 46 年 8 月 4 日受理)

佐藤 洋子* 河村 太郎*

Studies on the Antioxidant in the Foods (I)

Studies on the Separating Methods of Dibutylhydroxytoluene and Butylhydroxyanisole from Foods

Yoko SATO and Taro KAWAMURA

(Yokohama City Institute of Health:1-2-17, Takigashira, Isogo-ku, Yokohama)

Steam distillation and extractions with several kinds of solvents were investigated as the separating method of dibutylhydroxytoluene (BHT) and butylhydroxyanisole (BHA) from fatty foods. The results obtained are as follows.

1. The method of steam distillation is available only for lower fatty foods.
2. *n*-Hexane-acetonitrile system extraction is recommended for practical use for high fatty foods.
3. For the concentration of solvent containing BHT or BHA, Kuderna-Danish concentrator is available.
4. BHT and BHA are separated easily from each other by alumina column.

(Received August 4, 1971)

I. ま え が き

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) およびブチルヒドロキシアニソール (BHA) は許可された酸化防止剤の中ではもっとも広く使用されている。ここ数年来、ラード、コーンオイル、大豆油、綿実油、ピーナッツ油、マッシュポテトなどへの添加回収実験が報告されている¹⁻⁶⁾。しかし、食品からの抽出に、いずれも特殊な装置および多量の試薬を要し、日常の検査業務にとり入れ難い方法であった。そこで、今回は比較的簡単な操作でガスクロマトグラフィーまたは比色法により定量を行なうための試験溶液の調製法について検討を行なった。

II. 実験方法

1. 食品からの分離法

BHT および BHA はとくに油脂性食品に使用されることが多い。従来、油脂からの分離法については溶媒抽出法、水蒸気蒸留法などが種々検討されている¹⁻⁶⁾。そこでこれらの方法について、硬化油に BHT および BHA を添加した試料を用い実験を行なった。

* 横浜市衛生研究所：横浜市磯子区滝頭 1-2-17

(1) 溶媒抽出法

油脂溶解溶媒 50 ml に硬化油 またはなたね油 10 g を溶かし、BHT または BHA 2 mg を添加し、抽出溶媒 50 ml で 3 回抽出を行ない、BHT、BHA の回収率および硬化油の除去率をみた。油脂溶解溶媒としては石油エーテル、*n*-ヘキサンおよび *n*-ペンタンを用い、抽出溶媒としては含水エタノールおよびアセトニトリルを用いた。ただし、Table 1 の石油エーテル含水エタノール系溶媒抽出では石油エーテルは 100 ml を用い、含水エタノールによる抽出は 45, 25, 20 ml で 3 回行なった。

定量はいずれも紫外外部吸収スペクトルをとり、極大吸収波長 (BHT: 278 m μ , BHA: 294 m μ) における吸光度を測定し、同様に操作した空試験抽出液で BHT または BHA の標準溶液を調製し、この吸光度と比較して行なった。

(2) 水蒸気蒸留法

1L の水蒸気蒸留フラスコに硬化油 2~10 g、アルブミン 10 g または小麦粉 10 g および BHT または BHA

Table 1. Recovery of Added BHA in Hydrogenated Oil and Removal of Hydrogenated Oil by Petroleum Ether-aqueous Ethanol Extraction

Concentration of ethanol %	(UV method)	
	Recovery of BHA, 2 mg %	Removal of hydrogenated oil, 10 g %
50	52.0	99.8
	45.5	
	42.8	
	Av. = 46.7	
60	60.0	99.5
	63.7	
	62.5	
	Av. = 62.0	
70	90.0	98.6
	95.0	
	83.0	
	Av. = 89.3	
80	85.4	97.6
	99.0	
	96.0	
	Av. = 93.0	

2~10mg をとり、水 200 ml を加え、食塩 80 g で飽和させ、20% リン酸 5 ml で酸性としたの水蒸気蒸留を行なった。留液 500~1000 ml を留取し、BHT または BHA の留出量を定量し、硬化油、アルブミンまたは小麦粉の影響を調べた。定量は BHT は溶解度が小さく留液が混濁するので同量のエタノールを加えたものについて、BHA は留液そのままについて紫外吸光度法または比色法により行なった。

2. 試験溶液の調製

試料溶液中の BHT および BHA をガスクロマトグラフィーまたは比色法により定量するための試験溶液の調製について検討を行なった。

(1) 試料溶液の濃縮

試料から抽出した試料溶液は BHT または BHA の希薄溶液となっていることが多いので濃縮操作が必要となる。

n-ヘキサン、エタノールおよびアセトニトリル 50~85 ml 中の BHT または BHA 1 mg を Kuderna-Danish 濃縮装置で濃縮した場合と通常の装置で減圧濃縮を行なった場合の回収率を比較した。

(2) アルミナカラムによる BHT および BHA の分離

n-ヘキサン-アセトニトリル系溶媒による抽出を行なうとき、試料中に共存する BHT および BHA は試料溶液中に同時に抽出される。比色法で定量を行なう場合、 α, α' -ジピリジルは BHT と同時に BHA も発色するため、この試薬を用いるときは予め BHT と BHA を分別しておかなければならない。そこでアルミナカラムを用いて BHT および BHA の分別を行なうと同時に、この分離操作で試料抽出液中に抽出される油脂分の吸着除去効果についても検討した。

i) 充てん剤および溶出液

500°, 3時間活性化したアルミナを *n*-ヘキサンにけん濁させ、内径 1 cm のカラムクロマト管に充てんし、層長を 10 cm に調製した。BHT または BHA 2 mg, 硬化油 1 g を含む *n*-ヘキサン 50 ml をこのカラムに流し、*n*-ヘキサン 20 ml で 2 回洗い流し、通過液および洗液とした。ついで無水エタノールを流し溶出液とした。

これら通過液、洗液および溶出液中の BHT および BHA の含量を紫外吸光度法により測定した。

またアルミナ中の水分含量と BHT および BHA の分離回収率との関係について調べた。

アルミナを 500° で 3 時間活性化した直後のもの (水分 0 %), 活性化後塩化カルシウムデシケーター中で 1 週間保存したもの (水分 2.6%), まったく活性化しないもの (水分 5.6%) について BHT および BHA 0.1, 0.5, 1.0 mg を前述した方法で分別し、比色法により回収率を測定した。

Table 2. Recovery of Added BHT and BHA in Hydrogenated Oil and Removal of Hydrogenated Oil by *n*-Hexane-aqueous Ethanol Extraction.

Concentration of ethanol %	Recovery		Removal of hydrogenated oil
	BHT, 2 mg, %	BHA, 2 mg, %	
72	0.5	97.9	99.4
	0.5	95.8	
	0.5	96.4	
	Av. = 0.5	Av. = 96.7	Av. = 99.4
90	73.0	100	84.0
	78.5	103	
	80.0	98.5	
	Av. = 77.2	Av. = 100	Av. = 83.8

Table 3. Recovery of Added BHT and BHA from Hydrogenated Oil and Removal of Hydrogenated Oil by Extraction with *n*-Hexane or *n*-Pentane-acetonitrile

Oils	Dissolved in <i>n</i> -hexane			Dissolved in <i>n</i> -pentane		
	Recovery, %		Removal of hydrogenated oil	Recovery, %		Removal of hydrogenated oil
	BHT, 2 mg	BHA, 2 mg		BHT, 2 mg	BHA, 2 mg	
Hydrogenated oil 10 g	76.4	92.4	93.6	78.2	107.2	91.4
	75.4	92.9	94.6	85.2	109.2	90.6
		93.0	95.3	75.0	103.0	91.3
	Av. = 75.9	Av. = 92.8	Av. = 94.5	Av. = 79.5	Av. = 106.5	Av. = 91.1
Rape-seed oil 10 g	64.3	86.7		79.4	83.1	
	66.8	86.0		79.4	81.3	
	66.8	90.0		76.6	83.1	
	Av. = 66.0	Av. = 87.9		Av. = 78.5	Av. = 82.5	

ii) BHT および BHA のアセトニトリル溶液から *n*-ヘキサン溶液への再抽出

アルミナカラムにより BHT および BHA を分別するとき、アセトニトリル溶液を通すと両者ともにカラムを通過し分別ができない。したがって試料溶液は *n*-ヘキサン溶液を用いなければならない。そこで、BHT および BHA をアセトニトリル溶液から *n*-ヘキサン溶液へ移す抽出条件の検討を行なった。

BHT または BHA 1 mg を含むアセトニトリル 5~50 ml を水 50 ml で希釈し、*n*-ヘキサン 50 ml で 3 回抽出しそれぞれの抽出率をみた。

III. 実験結果および考察

1. 溶媒抽出による分離

石油エーテル-含水エタノール系抽出においては Table 1 に示すように、BHA はエタノール濃度が 80% 以上でないと定量的な抽出ができない。一方、抽出液中に溶け込む硬化油量はエタノール濃度の増大と共に増加する。

Fig. 1. Recovery of added BHT and BHA from hydrogenated oil by steam distillation. (H. oil: Hydrogenated oil)

n-ヘキサン-含水エタノール系溶媒による抽出では Table 2 に示したように 72% エタノールで BHA は 96.7%, BHT は 0.5% の抽出率であるが、90% エタノールでは BHT は 77.2% まで抽出される。したがって BHT と BHA が共存する試料では 72% および 90% エタノールを使い分けることにより BHT および BHA を分別抽出することができる。しかし、90% エタノール抽出では 16.2% の硬化油が抽出液中に溶け込む。

n-ヘキサンまたは *n*-ペンタン-アセトニトリル系溶媒抽出においては Table 3 に示したように抽出率は BHT, BHA ともに *n*-ペンタン溶解の方が *n*-ヘキサン溶解より良好である。しかし抽出液中への硬化油の溶け込みは *n*-ヘキサン溶解の方が少ない。

これら溶媒抽出法の検討結果から、BHT および BHA の抽出率がよく、しかも抽出液中への硬化油の移行が少なく、かつ、抽出液の濃縮操作が容易なことも考慮して油脂性食品中からの BHT および BHA の分離法としては、*n*-ヘキサン-アセトニトリル系溶媒抽出法が適当である。

2. 水蒸気蒸留法による分離

硬化油の影響については Fig. 1 に示すように硬化油が 2 g 以下の場合には BHT, BHA ともに留出液 500 ml 中にほぼ定量的に回収できるが、硬化油が 5 g になると留出液を 1000 ml とする必要がある。さらに硬化油量が 10 g, 50 g と増加すると留出液 1000 ml 中でも回収率は 50% 以下になり多量の油脂分は BHT, BHA の留出を強く低下させる。

また、アルブミンおよび小麦粉は Table 4 に示したとおり硬化油ほどの妨害はみられなかった。ただ、小麦粉の紫外外部吸光度法で測定したも

Table 4. Recovery of Added BHT and BHA from Albumin and Flour

	Recovery of BHT, 10 mg, %		Recovery of BHA, 10 mg, %	
	UV method	Colorimetry	UV method	Colorimetry
Albumin				
10 g	73.5 79.0 Av. = 75.7	66.2 75.7 Av. = 70.8	98.3 96.2 95.1 Av. = 96.5	97.0 99.1 96.3 Av. = 96.4
Flour				
10 g	51.6 178 184 Av. = 138	56.0 63.4 74.3 Av. = 64.5	98.6 89.7 129.3 Av. = 94.1	98.9 97.8 101.5 Av. = 98.3

Table 5. Recovery of BHT and BHA Concentrated by Use of Kuderna-Danish Apparatus

	Kuderna-Danish Concentration						Vacuum concentration	
	BHA 1 mg, %			BHT 1 mg, %			BHT 1 mg, %	
	<i>n</i> -Hexane	Ethanol	Acetonitrile	<i>n</i> -Hexane	Ethanol	Acetonitrile	Acetonitrile	
Temper- ature of water bath, °C	90	90~95	90~95	90	90~95	90~95	30~33	43~45
Concentrat- ed to 5ml	104.6 100.0 97.7 Av. = 100.8	95.8 92.1 94.5 Av. = 94.1	94.9 97.5 Av. = 96.2	101.2 104.9 95.1 Av. = 100.4	105.8 102.9 102.9 Av. = 103.8	102.0 102.9 104.4 Av. = 103.1	26.3 21.7 17.1 Av. = 21.7	34.4 21.0 32.0 Av. = 29.0
Concentrat- ed to 2.5 ml	91.0 95.5 97.8 Av. = 94.8			107.2 97.0 99.5 Av. = 101.2				
Concentrat- ed to 0~1.5ml	33.0 42.1 Av. = 37.6			26.8 35.2 Av. = 31.0				

のにバラツキがみられるのは糖質が蒸留中にこげやすく、280 m μ 付近⁷⁾に強い妨害吸収を示すためである。

水蒸気蒸留法に関しては、イソプロピルアルコール添加蒸留²⁾、過熱水蒸気蒸留^{1), 6)}、留出液からの有機溶媒抽出^{2), 6)}などの諸報告があるが、通常の水蒸気蒸留法でも食品成分の組成を考慮し、適当な定量法を選択すれば利用する価値がある。

3. 試料溶液の濃縮

Table 5 に示すように、液量を 5 ml まで濃縮するとき、通常の減圧濃縮では BHT の回収率が 30% 以下であるが Kuderna-Danish 濃縮装置による場合は定量的に回収できる。しかし、同装置を用いたときでも定量的に回収できるのは液量が 2.5 ml までであり、0~1.5 ml になると BHT, BHA とともに回収率は 30~40% と急激に低下する。したがって、試験溶液の濃縮には Kuderna-Danish 濃縮装置を用い、濃縮液量は 2.5~5 ml にとどめなければならない。

4. アルミナカラムによる BHT および BHA の分離

Table 6 に示すとおりアルミナカラムを用いるとき、BHT は通過液および洗液中にほとんど流出するが BHA は流出しない。カラムに吸着された BHA はエタノール溶出液 50 ml 中に大部分が溶出する。したがってアルミナカラムにより BHT と BHA を分別することができ、充てん剤としてシリカゲルを用いるときは BHT, BHA の通過、吸着、溶出ともに不完全で両者の分別には適さなかった。

また、カラムに吸着した BHA をアセトニトリルで溶出を行なうときは 100 ml の液量を要した。硬化油の吸着については、アルミナカラムで約 0.3 g の硬化油を吸着するがエタノール溶出により速やかに溶出する。したがって試料抽出液中の油脂分が 0.3 g 以内であれば、アルミナカラムに吸着され BHT 分割中の油脂分の除去ができるが、吸着された油脂分はエタノール溶液中に溶出するので、BHA の分割部分中への油脂の混入はさけられない。

5. アルミナの水分含量と回収率との関係

Fig. 2 に示すように、BHT については活性化、非活

Table 6. Separation of BHT and BHA by Use of Either Alumina or Silica Gel Column (UV method)

Column	Column effluent	BHT, 2 mg, eluted, %	BHA, 2 mg, eluted, %
Alumina 1 cm × 10 cm	<i>n</i> -Hexane 70 ml	95.6 95.6 95.6 Av. = 95.6	0 0 0 Av. = 0
	Ethanol 50 ml	0 0 0 Av. = 0	94 92 90 Av. = 92
Silica gel 1 cm × 10 cm	<i>n</i> -Hexane 70 ml	81	14
	Ethanol 50 ml	14	67

Fig. 2. Influence of moisture in alumina on the recovery of BHT and BHA

- - - - activated (moisture: 0%)
 stored for one week in a desiccator after activation (moisture: 2.6%)
 ——— not activated (moisture: 5.6%)

性化による回収率の差は少ないが、BHA では活性化アルミナは吸着力が強く、非活性化アルミナの約 1/2 のみを溶出する。したがってアルミナカラムで BHT および BHA を分別する時は活性化しないアルミナを用いる方がよい。

6. BHT および BHA のアセトニトリル溶液から *n*-ヘキサン溶液への再抽出

Table 7 に示すように、BHT はアセトニトリル 50 ml に同量の水を加え、*n*-ヘキサン 50 ml, 1 回でほとんど抽出できる。しかし、BHA の定量的抽出にはアセトニトリルの液量を水で 5~10 倍に希釈したのち抽出を行わなければならない。

III. ま と め

1. 食品中からの BHT および BHA の分離法として、日常検査に使いやすい溶媒抽出法および水蒸気蒸留法について検討を行なった。

2. 水蒸気蒸留法は油脂分の少ない試料にのみ用いる。

3. 溶媒抽出法では *n*-ヘキサン-アセトニトリル系溶媒抽出が回収率、油脂分の除去率、抽出液の濃縮操作の容易さなどから実際的な方法であった。

Table 7. Extraction of BHT and BHA with *n*-Hexane from Acetonitrile Solution (UV method)

	Acetonitrile ml	Water added ml	3 times extraction with <i>n</i> -hexane, 50 ml %			
			1st. Extract	2nd. Extract	3rd. Extract	Total
BHT, 1 mg	50	50	95.7	0	0	95.7
BHA, 2 mg	50	50	15.1	14.1	11.8	40.9
	25	50	61.2	24.8	9.5	95.8
	10	50	91.2	7.0	0	98.2
	5	50	98.3	2.4	0	100.7

4. BHT または BHA を含む溶液の濃縮には Kuder-na-Danish 濃縮装置を用いる必要がある。

5. アルミナカラムにより BHT と BHA を分別し、両者共存の試料中からそれぞれを比色定量することができる。

6. アルミナは活性化しないで用いる。

7. 試料溶液をアルミナカラムに通すときは *n*-ヘキサン溶液としておく。

本研究にご協力をいただいた北里大学・衛生学部化学科 荒川怜子嬢ならびに初谷美矢子嬢に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Szalkowski, C. R., Garber, J. B.: J. Agr. Food. Chem. **10**, 491 (1962).
- 2) Sloman, K.G., Romagnoli, R.J., Cavagnol, J.C.: Journal of the A. O. A. C. **45**, 76 (1962).
- 3) Schwien, W.G., Miller, B.J., Conroy, H.W.: ibid. **49**, 809 (1966).
- 4) 天野立爾, 川田公平, 川城 巖: 食衛誌, **5**, 333 (1964).
- 5) 早川順子, 檜府直大, 高橋弘明, 石田康雄, 築城多佳子: 同上, **10**, 190 (1969).
- 6) 酒井; 東京都衛研年報 **20**, 159 (1968).
- 7) 井上哲男, 河村太郎, 上条昌弥, 浅倉倫子: 衛生化学 **10**, 26 (1964).