調査資料

精油定量器による食品中の BHA, BHT の分析

(昭和 51 年 10 月 20 日受理)

丸山 武紀* 村上 千秋* 兼松 弘*
新谷 勲* 今村 正男*A Method for Determination of BHA and BHT in Food
by Essential Oil DistillatorTakenori MARUYAMA, Chiaki MURAKAMI, Hiromu KANEMATSU,
Isao NIIYA and Masao IMAMURA(Japan Institute of Oils & Fats, Other Foods Inspection, Foundation:
27-8, Nihonbashi-Hamachō 3-chome, Chūō-ku, Tokyo)

緒 言

油脂および油脂食品に用いられるブチルヒドロキシアニソール (BHA), ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の定量はラード、マーガリンなどのような油脂食品では *n*-ヘキサノールアセトニトリルによる液-液抽出法が用いられ¹⁾、またインスタントラーメンや揚げせんべいなどのような油脂含有食品ではあらかじめ油脂を抽出し、前記の液-液抽出法を適用するか、あるいは水蒸気蒸留法が用いられている²⁾。*n*-ヘキサノールアセトニトリルによる液-液抽出法は BHA の回収率は高いものの、BHT は低く、油脂の移行も避けられない。油脂含有食品では油の抽出に長時間を要するとともに抽出時での抗酸化剤の酸化による減少が懸念される。また水蒸気蒸留では BHA, BHT の揮散に伴う再現性の低下はまぬがれない。このように分析対象食品によって前処理方法を選択しなければならないにもかかわらず、いずれの方法とも欠点を有するため満足すべき方法とはいえない。

そこで食品の形態にとらわれず、一律に行える前処理方法の確立と簡略化ならびに分析作業環境の衛生上から要求される使用薬品量の少量化を図ることを目的として、精油定量器による前処理方法について検討した。

実験方法

1. 実験材料

市販の大豆天ぷら油、ラード、マーガリン、バター、マヨネーズ、チーズ、カレールウ、チョコレート、ポテトチップ、ポップコーン、揚げせんべい、ドーナツ、インスタントラーメンおよび煮干の14品目。

2. 試 薬

BHA, BHT: 和光純薬(株)製、食品添加物規格品
ヘキサデカン: 東京化成(株)製

n-ヘプタン: 和光純薬(株)製、試薬特級

BHA, BHT 標準液: *n*-ヘキサノール 1 ml 中に BHA, BHT をそれぞれ 500 μg 含む。

内部標準溶液: *n*-ヘプタン 1 ml 中にヘキサデカン 500 μg を含む。

その他の試薬はいずれも試薬特級を用いた。

3. 装 置

精油定量器: 食品衛生法³⁾記載の熱媒体試験法用精油定量器(改良型)

マントルヒーター: (株)入江商会製マントルヒーター HF-3 型にスライダック付

濃縮器: クデルナ・ダニッシュ型濃縮器

4. 実験操作

4.1 ガスクロマトグラフィーの条件

機種: (株)日立製作所製073型 (FID 検出器付)
カラム管: 内径 3 mm×2 m のステンレス鋼製

* (財)日本食品油脂検査協会: 東京都中央区日本橋浜町 3-27-8

Fig. 1. Effect of the volume of collected solvent on the recovery rate of BHA and BHT added to frying oil for Tempura

Sample, 10 g; added BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg; distilling time, 90 min; distilling speed, 3.2 ml/min

—●—, BHA; —○—, BHT

Fig. 2. Effect of distillation time on the recovery rate and shifted oil to collecting solvent

Sample, Tempura oil 10 g; added BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg; distilling speed, 3.2 ml/min; collected solvent, *n*-heptane 4 ml

—●—, BHA; —○—, BHT; —×—, shifted oil

充てん剤: 10% SE-30/クロモソルブ W (80~100メッシュ)

温度: 試料注入口および検出器 (FID) 280°, カラム恒温槽 180°

キャリアーガス: 窒素ガス (40 ml/min)

4.2 蒸留方法

4.2.1 天ぷら油, ラード

容量 300 ml のナス型フラスコに試料 5 g を秤取, 水 100 ml, 塩化ナトリウム 20 g および少量の消泡剤 (シリコーン樹脂) を入れ精油定量器を付す. 蒸留器には内標準溶液 2 ml と *n*-ヘプタン 2 ml の計 4 ml を捕集液として加え, 冷却器をつけ, マントルヒーターで加熱しながら蒸留速度 3.2~4.5 ml/min で 90 分間蒸留する. 蒸留後約 5 ml のエチルエーテルを冷却器上部から注いで洗い流し, 装置下部のコックを用いて水層を除去する. *n*-ヘプタン抽出層は少量の無水硫酸ナトリウムで脱水し, 必要に応じてクデルナ・ダニッシュ型濃縮器を用いて 60° 以下, 減圧状態で約 2 ml に濃縮した後 GLC 検液とする.

4.2.2 マーガリン, バター, マヨネーズ, チーズ, カレールウ, チョコレート, ポテトチップ, ポップコーン, 揚げせんべい, ドーナツおよびインスタントラーメン

容量 300 ml のナス型フラスコに試料 5 g を秤取する (粉碎できる試料は粉碎した後採取する). 水 100 ml, 塩化ナトリウム 20 g, 硫酸 2 ml および少量の消泡剤を入れ, 精油定量器を付す. 以下, 4.2.1 と同様に蒸留した後, 油脂含有量の少ない食品はクデルナ・ダニッシュ型濃縮器を用いて 60° 以下の減圧状態で約 0.5 ml まで濃縮し, GLC 検液とする.

4.2.3 煮 干

容量 300 ml のナス型フラスコに粉碎した試料 2.5 g を秤取し, *n*-ヘプタン 4 ml を加えて 1 夜放置した後, 水 100 ml, 塩化ナトリウム 20 g および少量の消泡剤を入れ精油定量器を付す. 蒸留器には内部標準溶液 1 ml を捕集液として加え, 以下 4.2.1 と同様に蒸留し必要に応じて約 0.5 ml に濃縮し GLC 検液とする.

Fig. 3. Effect of distillation speed on the recovery rate

Sample, Tempura oil 10 g; added BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg; distilling time, 90 min; collected solvent, *n*-heptane 4 ml

—●—, BHA; —○—, BHT

Fig. 4. Effect of amount of sample on the recovery rate

Sample, Tempura oil; collected solvent, *n*-heptane 4 ml; distilling time, 90 min; distilling speed, 4.5 ml/min

Table 1. Effect of the Position of Addition of Internal Standard on the Recovery Rate

Recovery (%)			
Method I		Method II	
BHA	BHT	BHA	BHT
82.04	94.40	83.21	95.95
80.09	92.56	81.40	93.23
87.39	93.00	81.29	93.39
82.74	96.15	84.87	96.61
84.71	98.58	81.47	95.76
$\bar{x}$	83.39	94.94	82.45
σ	2.78	2.47	1.57
cv (%)	3.33	2.60	1.90

Sample, frying oil for Tempura (5 g); added BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg

Method I, internal standard was added to collected solvent after distillation; Method II, internal standard was added to collected solvent before distillation

Table 2. Effect of Concentration of *n*-Heptan on the Recovery Rate

Recovery (%)		
BHA	BHT	
97.96	97.80	
100.07	98.92	
100.70	99.13	
100.72	99.75	
99.95	99.27	
$\bar{x}$	99.88	98.97
σ	1.13	0.72
cv (%)	1.13	0.73

n-Heptan, 50 ml; added antioxydants, BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg

4.3 定量操作

4.1 のガスクロマトグラフィー部の条件に従って操作して得たガスクロマトグラムから内部標準物質（ヘキサデカン）に対する BHA, BHT のピーク面積比を求め、あらかじめ求めたヘキサデカンに対する補正係数で補正し、試料に含まれる濃度を算出する。

実験結果および考察

1. 蒸留操作

1.1 蒸留条件

精油定量器による有機塩素系農薬⁴⁾, PCB⁵⁾ およびフ

Table 3. Effect of Amount of Sodium Chloride Added on the Recovery Rates from Frying Oil for Tempura and Margarine

Added NaCl (g) in 100 ml H ₂ O	Recovery (%)			
	Frying oil for Tempura		Margarine	
	BHA	BHT	BHA	BHT
0	67.9	98.2	55.1	74.7
10	76.6	98.5	62.1	94.6
20	85.9	99.0	66.3	95.1
35	88.1	98.7	69.3	100.0
40	89.6	98.3	67.4	96.9

Sample, 5 g; added antioxydants, BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg

Table 4. Effect of Amount of Sulfuric Acid Added on the Recovery Rate from Margarine

Added H ₂ SO ₄ (ml) in water (100 ml)	Recovery (%)	
	BHA	BHT
0	66.3	104.1
0.5	81.7	99.5
1.0	83.6	102.3
1.5	81.4	101.6
2.0	81.2	99.0

Sample, 5 g; NaCl, 20 g; added BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg

タル酸エステル^{*1}の定量は、水溶液で高い回収率を得ることは容易である。しかし水溶液での条件をそのまま有機物、とりわけ油脂を含む試料に適用すると回収率は著しく低下することが報告されている。そこで蒸留に際しての基礎条件の検討を次のようにして行った。

300 ml ナス型フラスコに BHA, BHT 標準液 2 ml (1.0 mg 相当量) を正確にとり、室温で *n*-ヘキサンを注意深く揮散した後、天ぷら油 10 g を加え、さらに水 100 ml および塩化ナトリウム 35 g を加えて蒸留し、回収率と捕集溶媒量、蒸留時間、速度および試量との関連について検討した。Fig. 1~4 はその結果である。捕集溶媒量についてみると BHA, BHT の回収率は溶媒量の増加に従って増大するものの 4~7 ml ではほぼ一定状態になり、BHA で約70%、BHT で約95%であった。蒸留時間による影響は0.5時間蒸留後で BHA 約64%、BHT 約98%である。蒸留時間をさらに1.0、1.5および2.0時間に増加しても回収率に大きな向上はみられない。

^{*1} 兼松 弘, 丸山武紀, 牛草寿昭, 新谷 勲, 今村正男: 第30回日本食品衛生学会学術講演会 (1975年10月, 金沢)

蒸留時間が長くなるにつれて捕集液への油の移行量は増加するものの、2時間後でも4%と少量である。蒸留速度の変化により回収率は影響を大きく受けるが、3.2~4.5 ml/min ではほぼ安定した回収率を得ることができる。試料量についてみると試料量の減少に伴って回収率は増大し、その傾向は BHA において著しい。このように蒸留条件の変化により BHA, BHT の回収率は変化し特に BHA への影響は BHT に比べて大きいことが認められた。

1.2 内標準物質の添加について

大豆天ぷら油を用いて内部標準物質の添加を 1) 蒸留後捕集液 (*n*-ヘプタン) へ加える、2) あらかじめ捕集液に加えてから蒸留、の2方法について行い、定量精度への影響について比較した。結果は Table 1 に示すように、方法 1) および 2) とほぼ等しい値が得られたが変動係数は方法 2) が小さく、したがって内部標準物質はあらかじめ捕集液に加えた後、蒸留することにより、安定した回収率を得ることができる。

1.3 濃縮方法について

GLC 検液の調製に際して *n*-ヘプタンの留去による濃縮過程での BHA, BHT の揮散が懸念されるため次の条件で検討した。

クデルナ・ダニッシュ濃縮器に *n*-ヘプタン 50 ml および BHA, BHT 標準液 2 ml (BHA, BHT それぞれ 1 mg) を加え約60°の水浴中でアスピレーターにより減圧状態を保ちながら *n*-ヘプタンが約 0.5 ml になるまで蒸留濃縮し、次いで内部標準溶液 2 ml (ヘキサデカン 1.0 mg) を加え GLC で分析した。なお蒸留に要する時間は約20分であった。Table 2 はその結果である。BHA, BHT はいずれもほぼ全量回収することができた。したがって蒸留濃縮は60°以下の減圧状態で行えば、BHA, BHT の損失は起こらないため、油脂含有量の少ない食品では、GLC 検液を適度に濃縮することによって定量限界値の向上を計ることができる。

Table 5. Effect of Amount of Sulfuric Acid Added on the Recovery Rate from Various Foods

Foods	Antioxydants	Recovery (%)			
		Added H ₂ SO ₄ (ml) in water (100 ml)			
		0	1.0	1.5	2.0
Mayonnaise	BHA	55.1	74.4	76.3	74.0
	BHT	96.6	98.8	98.0	95.3
Cheese	BHA	77.0	85.9	81.2	83.7
	BHT	77.6	80.3	78.6	81.3
Chocolate	BHA	78.4	83.3	82.3	86.9
	BHT	85.8	84.9	84.1	79.8
Curry roux	BHA	86.7	95.6	92.6	93.7
	BHT	94.2	94.7	101.9	96.1
Doughnuts	BHA	91.0	99.3	103.1	97.6
	BHT	93.1	90.5	89.8	90.5
Potato chips	BHA	83.9	80.7	80.6	78.5
	BHT	95.8	96.1	96.3	96.4
Fried rice crackers	BHA	84.8	86.5	83.3	88.1
	BHT	95.1	94.4	91.4	96.3
Instant ramen	BHA	90.0	90.6	90.2	95.5
	BHT	91.6	92.5	93.9	92.8

Sample, 5 g; NaCl, 20 g; added BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg

Table 6. Effect of Amount of the Sample Taken and Heptane Added on the Recovery Rate from Niboshi (Boiled and Dried Fish)

Amount of sample (g)	<i>n</i> -Heptane (ml)	Recovery (%)	
		BHA	BHT
5	2	86.5	64.6
5	4	84.1	68.3
2.5	4	92.3	81.5

Added BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg

2. 回収率の検討

以上のような条件をもとに、各種油脂および油脂食品へ適応し回収率の向上と分析操作の統一化について検討した。まず天ぷら油の場合の回収率と塩化ナトリウムの関連について検討し Table 3 に示した。塩化ナトリウムの添加量は増加に従って回収率は向上し 20 g で BHA 85.9%, BHT 99.0% である。しかし 35, 40 g と添加量を増してもそれほどの効果は得られない。同様の現象はラードにもみられた。

マーガリンの場合は Table 3 に付記したように天ぷら油と同様の傾向を示すものの、BHA の回収率は天ぷら油に比べて低い。そこで塩化ナトリウム 20 g を加えた 100 ml の蒸留水にさらに硫酸を加え硫酸酸性水溶液

で蒸留し、回収率の検討をした。結果は Table 4 に示すように、0.5 ml の硫酸を 100 ml の水に加えることにより回収率は大幅に向上する。

次いで対象試料を拡大しマヨネーズ、チーズ、チョコレート、カレールウ、ドーナッツ、ポテトチップ、揚げせんべいおよびインスタントラーメンへ適用した。結果は Table 5 に示すように一般に乳化型食品では硫酸水溶液で高い回収率が得られた。これは少量の硫酸を加えて蒸留することによりエマルジョンが壊れたことによるものと考えられる。また、使用油脂が非乳化型食品では、硫酸濃度にかかわらず高い回収率が得られる。しかし煮干ではこのような条件では高い回収率は得られないため、300 ml ナス型フラスコにあらかじめ *n*-ヘプタン 4

Table 7. Reproducibility of the Recovery Rate of Antioxydants from Various Foods ($n=5$)

Foods	Antioxydants	Recovery		
		$\bar{x}$ (%)	σ	cv (%)
Frying oil for Tempura	BHA	81.9	1.47	1.80
	BHT	95.4	1.41	1.48
Lard	BHA	82.5	1.57	1.90
	BHT	95.0	1.58	1.66
Margarine	BHA	81.2	1.40	1.72
	BHT	98.4	3.95	4.02
Butter	BHA	81.1	3.22	4.01
	BHT	97.0	0.63	0.65
Mayonnaise	BHA	75.1	1.06	1.41
	BHT	98.1	1.75	1.78
Cheese	BHA	83.3	2.23	2.68
	BHT	79.7	1.88	2.36
Curry roux	BHA	92.9	1.88	2.02
	BHT	95.8	4.12	4.30
Chocolate	BHA	85.0	2.12	2.49
	BHT	85.1	3.93	4.62
Potato chips	BHA	82.8	2.69	3.25
	BHT	96.6	0.81	0.84
Pop corn	BHA	86.7	4.65	5.36
	BHT	86.6	3.18	3.67
Doughnuts	BHA	98.6	3.58	3.63
	BHT	90.2	0.33	0.37
Fried rice crackers	BHA	86.3	2.35	2.72
	BHT	94.5	2.20	2.32
Instant ramen	BHA	92.3	2.74	2.97
	BHT	92.8	0.84	0.91
Niboshi	BHA	93.5	1.82	1.95
	BHT	82.3	1.95	2.32

Added BHA 1.0 mg, BHT 1.0 mg

ml を加え試料 2.5 g とよく混和し、蒸留を行うことによって BHA, BHT の回収率を Table 6 に示すように 92%, 82% にすることができた。

3. 添加回収率の再現性

天ぷら油、ラード、マーガリン、バター、マヨネーズ、チーズ、チョコレート、カレールウ、ドーナッツ、ポテトチップ、ポップコーン、揚げせんべい、インスタントラーメンおよび煮干の14品目について5回の添加回収実験結果を Table 7 に示した。回収率は BHA で 75.1 (マヨネーズ)~98.6% (ドーナッツ), BHT は 79.7 (チーズ)~98.4% (マーガリン) であった。変動係数の最高は BHA で 5.4%, BHT で 4.6% である。

むすび

BHA, BHT の分析を食品の形態にとらわれず一律に行える前処理方法について検討した。精油定量器を用いて水 100 ml, 塩化ナトリウム 20 g および少量の硫酸を加えて90分間蒸留する。油脂および油脂含有食品14品目からの添加回収率は BHA で 75.1% (マヨネーズ)~98.6% (ドーナッツ), BHT で 79.7% (チーズ)~98.4% (マーガリン) であった。特に従来前処理方法に問題点の多かった油脂含有食品に対しては効果的である。

なお、本研究の要旨は日本食品衛生学会第32回学術講演会 (1976年10月, 岡山) において発表した。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局監修：食品衛生検査指針 I，
p. 495, (昭和48年) 日本食品衛生協会.
- 2) 谷村顕雄：「食品添加物の分析 1」p. 52, (1970),
講談社.
- 3) 厚生省告示第339号 (昭和49年12月 4 日).
- 4) 松本 浩, 岡 尚男, 河村典久, 樋府直大：食
衛誌. **16**, 165 (1975).
- 5) 岡 尚男, 松本 浩, 河村典久, 樋府直大：同
上. **17**, 283 (1976).