

酸化防止剤

ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール

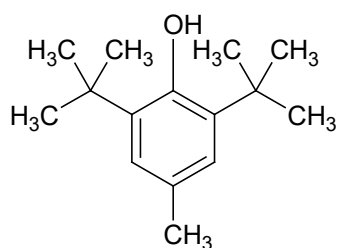
及び没食子酸プロピル

Butylated Hydroxytoluene, Butylated Hydroxyanisole and Propyl Gallate

ジブチルヒドロキシトルエン

Butylated Hydroxytoluene

略名：BHT

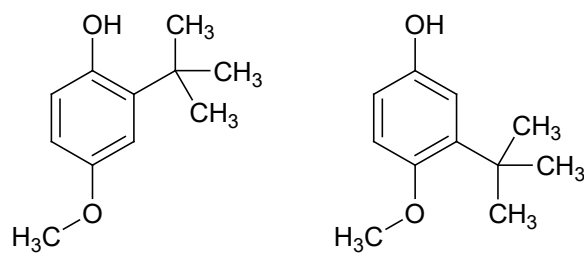


$C_{15}H_{24}O$: 220.35

ブチルヒドロキシアニソール

Butylated Hydroxyanisole

略名：BHA

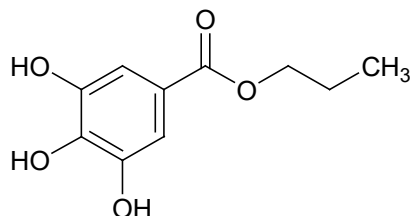


$C_{11}H_{16}O_2$: 180.24

没食子酸プロピル

Propyl Gallate

略名：PG



$C_{10}H_{12}O_5$: 212.20

1. 分析法の概要

食品中のジブチルヒドロキシルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルを分析する方法である。分析法Aでは、アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混合溶媒（2：1：1）で抽出し、 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。分析法Bでは、0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリルで抽出し、 $-30\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。（2008年改正、2023年統合設定）

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）¹⁾

分析法A^{文献1、文献2)}

（1）検体の採取と試料の調製

一般試験採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

① 植物油等

試料約5gを精密に量り、混合溶媒50mLを加えてよく振り混ぜた後、 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、上層を分取して抽出液とする。抽出液を減圧濃縮し1～2mLとした後、混合溶媒を加えて正確に5mLとする。これをメンブランフィルター（0.45 μm 、親水性ポリテトラフルオロエチレン）でろ過し、試験溶液とする。

② その他の食品²⁾

試料約5gを精密に量り、ホモジナイザーのカップにとる。これに無水硫酸ナトリウム10g及び混合溶媒50mLを加え、ホモジナイズ³⁾する。 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で1時間以上冷却した後、すばやくろ紙でろ過する。残さはあらかじめ冷蔵庫で冷却した混合溶媒15mLで洗い、洗液をろ過する。ろ液を合わせ、抽出液とする。抽出液を減圧濃縮し1～2mLとした後、混合溶媒を加えて正確に5mLとする。これをメンブランフィルター（0.45 μm 、親水性ポリテ

トラフルオロエチレン) でろ過し、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピル各 0.100 g を量り、メタノールを加えて溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする (各濃度 1000 μ g/mL)。標準原液 10mL を正確にとり、メタノールを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする (各濃度 100 μ g/mL)。標準溶液 0.5、1、2、5 及び 10mL を正確にとり、混合溶媒を加えてそれぞれ正確に 10mL とし、検量線用標準溶液とする (各濃度 5~100 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件⁵⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6~6.0mm、長さ 150~250mm

カラム温度：室温

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液 (1 : 1)

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件⁶⁾

分	A (%)	B (%)
0	40	60
15	90	10
45	90	10

流速：1.0mL/分

測定波長：280nm

注入量：5 μ L

② 検量線

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量⁷⁾

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中のジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの濃度を求め、次式によって試料中の含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ジブチルヒドロキシトルエン含量 (g/kg)} = \frac{C_1 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{ブチルヒドロキシアニソール含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{没食子酸プロピル含量 (g/kg)} = \frac{C_3 \times 5}{W \times 1000}$$

C_1 : 試験溶液中のジブチルヒドロキシルエンの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_2 : 試験溶液中のブチルヒドロキシアニソールの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_3 : 試験溶液中の没食子酸プロピルの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.005 g/kg

分析法B (分析法Aで対象添加物が回収されにくい食品等)⁸⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試験採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

① 固形食品

試料⁹⁾約5gを精密に量り、ホモジナイザーのカップにとる。これに無水硫酸ナトリウム10～15g及び0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル¹⁰⁾30mLを加え、1～2分間ホモジナイズする。ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過し¹¹⁾、残さに0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル30mLを加え、同様の操作を2回繰り返す。ろ液を合わせ、減圧下40℃で溶媒を留去する。残留物に0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾を正確に5mL加えてよく振り混ぜた後、-30～-5℃の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、すばやくメンブランフィルター(0.45 μm 、親水性ポリテトラフルオロエチレン)¹³⁾でろ過し、得られたろ液を試験溶液とする。

② 液状食品

試料約5gを精密に量り、50mLの耐溶媒遠沈管にとる。これに0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル¹⁰⁾30mLを加え、振とうした¹⁴⁾後、3500回転/分で10分間遠心分離する。上清を分取し、残さに0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル30mLを加え、同様の操作を2回繰り返す。上清を合わせ、減圧下40℃で溶媒を留去する。残留物に0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾を正確に5mL加えてよく振り混ぜた後、-30～-5℃の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、すばやくメンブランフィルター(0.45 μm 、親水性ポリテトラフルオロエチレン)¹³⁾でろ過し、得られたろ液を試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピル各0.100gを量り、それぞれ0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール^{12, 15)}に溶かして正確に100mLとし、各標準原液とする(各濃度1000 μ g/mL)。各標準原液をそれぞれ10mLずつ正確にとり、0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールを加えて正確に100mLとしたものを標準溶液とする(各濃度100 μ g/mL)。標準溶液0.5、1、2、5及び10mLを正確にとり、0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールを加えてそれぞれ正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする(各濃度5~100 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件⁵⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフ¹⁶⁾を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹⁷⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径5 μ m)

カラム管：内径2.1mm、長さ150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液(1:1)

B液 5 vol%酢酸溶液¹⁸⁾

グラジエントの条件¹⁹⁾

分	A (%)	B (%)
0	20	80
5	20	80
20	90	10
35	90	10

流速：0.2mL/分

測定波長：280nm

注入量：5 μ L

② 検量線

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積から検量線を作成する²⁰⁾。

③ 定量^{21~23)}

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中のジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの濃度を求め、次式によって試料中の含量(g/kg)を計算する。

$$\text{ジブチルヒドロキシトルエン含量 (g/kg)} = \frac{C_1 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{ブチルヒドロキシアニソール含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{没食子酸プロピル含量 (g/kg)} = \frac{C_3 \times 5}{W \times 1000}$$

C_1 : 試験溶液中のジブチルヒドロキシルエンの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_2 : 試験溶液中のブチルヒドロキシアニソールの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_3 : 試験溶液中の没食子酸プロピルの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.005 g/kg

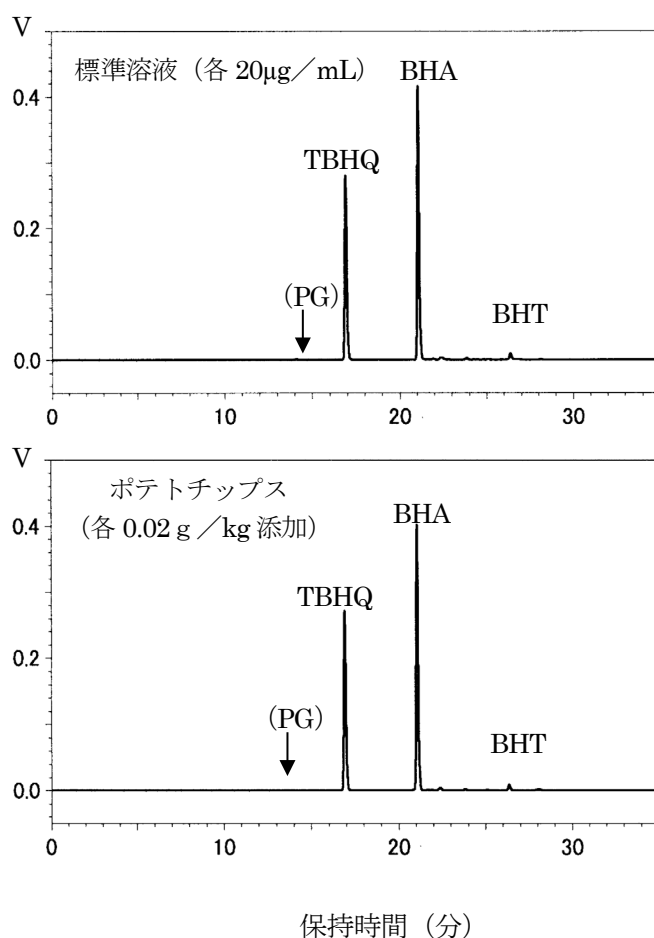
試薬・試液等

1. ジブチルヒドロキシルエン : 市販品を用いる。
2. ブチルヒドロキシアニソール : 市販品を用いる。
3. 没食子酸プロピル : 市販品を用いる。
4. アセトニトリル : [特級] 又は [高速液体クロマトグラフィー用]
5. 2-プロパノール : [特級]
6. エタノール : [特級]
7. 混合溶媒 : アセトニトリル、2-プロパノール及びエタノールを容量比 2 : 1 : 1 で混合する。
8. 無水硫酸ナトリウム : 硫酸ナトリウム [特級]
9. メタノール : [特級] 又は [高速液体クロマトグラフィー用]
10. 酢酸 : [特級]
11. 5 vol% 酢酸溶液 : 酢酸 50mL を量り、水を加えて 1000mL とする。
12. L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル : 市販品を用いる。
13. ヘキサン : [特級]
14. L (+) -アスコルビン酸 : [特級]
15. 0.01 w/v % アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル :
ヘキサンとアセトニトリルを分液漏斗で振とうし、静置する。2層に分離した後、下層を採取する。この液 1000mL に L (+) -アスコルビン酸パルミチン酸エステル 0.1 g を溶解する。
16. 0.1 w/v % アスコルビン酸含有メタノール : L (+) -アスコルビン酸 0.1 g を量り、メタノールで 100mL に定容する。

[注]

- 1) 本法は未指定添加物 *tert*-ブチルヒドロキノンの同時分析が可能である。
- 2) バター、ドレッシング、魚介乾製品、魚介冷凍品、チップス、クッキー、チョコレート等における分析に用いることができる。バター等は 40℃で加温融解した後、秤量する。
- 3) 5～10 分間ほどホモジナイズする。試料を十分混合できる場合は、ホモジナイズ時間を短くすることでホモジナイズ時の熱の負荷等を減らすことができ、添加回収率の向上につながる場合もある。
- 4) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、調整してもよい。
- 5) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量などを調整する。
- 6) 各試料を分析終了後ごとに移動相Aのみを約 30 分間流すことにより、ほとんどの油脂成分を溶出することができる。また、移動相を初期状態に戻したのち、そのまま 20 分間移動相を流しカラムの安定化を図るとよい。なお、ODS系のカラムでも種々の性質のものがあるため、移動相Aの初期の割合を 40～50%、最終の割合を 90～95%の間で調整する。
- 7) 分析法Aによる 0.1 g/kg の濃度でのジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの添加回収率 (n = 3 の平均) は、植物油で 88～95%、バターで 91～95%、煮干しで 72～85%、冷凍えびで 81～88%である^{文献1)}。
- 8) 煮干し等は、分析法Bの方が分析法Aより良好な場合がある。
- 9) バターは、①固形食品の調製法では、ろ液に試料の混入が見られたため、40℃で加温融解し、②液状食品の調製法を適用する。
- 10) 分析操作中のジブチルヒドロキシトルエン等の酸化による減少を防止するために、アスコルビン酸パルミチン酸エステルを抽出溶媒に添加する。
- 11) ろ紙を用いたろ過でも、問題の無い場合もある。
- 12) 試験溶液中のジブチルヒドロキシトルエン等の酸化による減少を防止するため、アスコルビン酸を試験溶液の溶媒に添加している。ただし、0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールの代わりにメタノールを用いても十分な回収率や精度が得られる場合もある²⁵⁾、^{文献3)}。
- 13) ガラス器具類を試験溶液と同様に冷凍庫で冷却したものをを用いるとよい。
- 14) 1～10 分間ほど振とうする。
- 15) 冷蔵保管の場合、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソールをアスコルビン酸含有液では数か月保管時に減少が見られ、アスコルビン酸無添加の方がより長期間安定であったが、冷凍保管の場合は、アスコルビン酸含有、非含有によらず長期間安定であったとの報告がある^{文献3)}。
- 16) ブチルヒドロキシアニソールは、蛍光検出器付液体クロマトグラフを用い、励起波長 280nm、蛍光波長 325nm で測定することができる²⁴⁾。蛍光検出器は、紫外可視吸光度検

出器に比較してブチルヒドロキシアニソールの検出感度が高いので、検量線用標準溶液の濃度範囲（5～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で直線性が得られない場合は、検量線用標準溶液及び試験溶液を0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾で、適宜、希釈してもよい。蛍光検出器付液体クロマトグラフによるクロマトグラムの一例を注図1に示す。また、ブチルヒドロキシアニソールに比べて感度は低い、ジブチルヒドロキシルエンは励起波長 285nm、蛍光波長 317nm で、没食子酸プロピルは励起波長 274nm、蛍光波長 365nm で測定することもできる²⁴⁾。



PG：没食子酸プロピル、TBHQ：*tert*-ブチルヒドロキノン、
BHA：ブチルヒドロキシアニソール、BHT：ジブチルヒドロキシルエン

注図1 蛍光検出器付液体クロマトグラフによるクロマトグラム

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm ）

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm、

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$ 、流速：0.2mL/分、注入量：5 μL

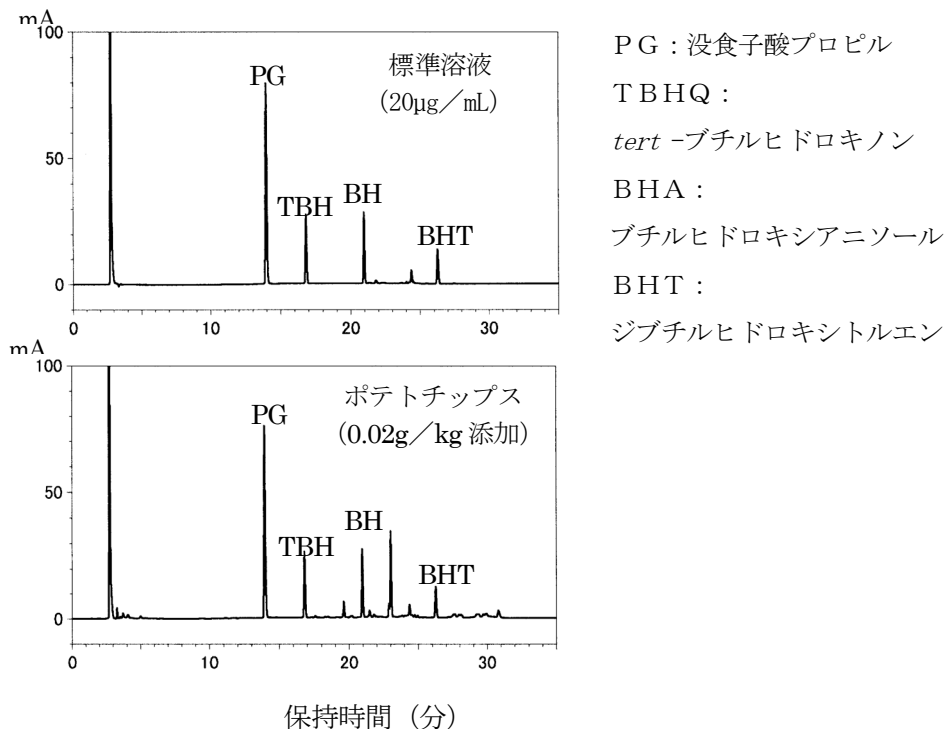
移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件		
時間(分)	A (%)	B (%)
0	20	80
5	20	80
20	90	10
35	90	10

検出器：蛍光検出器（励起波長：280nm、蛍光波長：325nm）

- 17) 分析の際は、ジブチルヒドロキシルエン等のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 18) 移動相B液として、0.2vol%酢酸溶液を用いることもできる。ただし、各ピークの保持時間が数分程度長くなる傾向がある。
- 19) 各試料を分析終了後ごとに移動相Aのみをしばらく流すことにより、油脂成分を溶出することができる。また、移動相を初期状態に戻した後、初期移動相を流してカラムの安定化を行った後、次の分析を行う。
- 20) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 21) 試験溶液中のジブチルヒドロキシルエン等の濃度が高く、検量線の濃度範囲を逸脱する場合は、試験溶液を0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾で適宜希釈して定量をやり直し、計算式に希釈倍率を乗じて含量を求める。
- 22) 本法による液体クロマトグラムの一例を注図2に示す。



注図2 紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラムによるクロマトグラム

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm）、カラム温度：40℃

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm、流速：0.2mL/分、注入量：5 μL

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件		
時間(分)	A (%)	B (%)
0	20	80
5	20	80
20	90	10
35	90	10

検出器：紫外可視吸光光度検出器（280nm）

23) 本法の添加回収試験結果を注表 1～注表 3 に示す。

注表 1 ジブチルヒドロキシトルエンの各種食品での添加回収率（n = 5）

食 品	添加量 ²⁵⁾ (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
バター	0.02	81	4.2
オリーブ油	0.02	84	5.0
ポテトチップス	0.02	96	9.2
煮干し	0.02	96	6.6

注表 2 ブチルヒドロキシアニソールの各種食品での添加回収率（n = 5）

食 品	添加量 ²⁵⁾ (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
バター	0.02	91	4.7
オリーブ油	0.02	88	5.7
ポテトチップス	0.02	99	6.0
煮干し	0.02	94	7.3

注表 3 没食子酸プロピルの各種食品での添加回収率（n = 5）

食 品	添加量 ²⁵⁾ (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
バター	0.02	96	3.6
オリーブ油	0.02	95	4.9
ポテトチップス	0.02	98	7.0
煮干し	0.02	78	13.0

24) 0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールの代わりにメタノールを用いた分析法Bで、0.02 g/kg の濃度²⁵⁾でのジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び

没食子酸プロピルの添加回収試験（2名、n = 3 × 3日）をしたところ、紫外可吸光光度検出器での検出による真度は、なたね油で86～96%、クラッカーで89～93%、蛍光検出器での検出による真度は、なたね油で85～99%、クラッカーで89～96%、煮干しで71～92%であった。なお、この時の測定条件を以下に示す。

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μm）、流速：1.0 mL/分

カラム管：内径4.6mm、長さ250mm、カラム温度：40℃、注入量：5 μL

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	40	60
20	95	5
35	95	5

検出器：(A) 紫外可視吸光光度検出器（測定波長280nm）

(B) 蛍光検出器

ジブチルヒドロキシルエン（励起波長：285nm、蛍光波長：317nm）

ブチルヒドロキシアニソール（励起波長：280nm、蛍光波長：325nm）

没食子酸プロピル（励起波長：274nm、蛍光波長：365nm）

25) ジブチルヒドロキシルエン等は、酸化還元性の分解しやすい化合物で、低濃度では容易に分解するため、低濃度の添加では良好な回収率が得られない。また、酸化した食品に添加すると良好な回収率が得られない。精度管理では、0.02 g/kg の標準添加濃度で添加回収試験を実施する。

[文献]

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2020、367（2020）、金原出版
- 2) 山田真記子ら：食衛誌、34、535（1993）
- 3) 見上葉子ら：食衛誌、63、12（2022）