

## 酸化防止剤の分析における ゲル浸透クロマトグラフィーの適用について

西尾香奈子 河合正暁 木原敏博 久保下誠  
佐藤 稔\* 佐藤勇次 菊地由生子

### 要 旨

食品中の残留農薬分析における前処理法として汎用されつつあるゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)が、酸化防止剤の分析の前処理においても適用可能かどうか検討した。GPC操作をピロガロール存在下で行うことにより、3種のフェノール性酸化防止剤は効率よく回収され、また本法は種々の食品に適用できた。

### 1. 緒 言

食品中の残留農薬分析において、測定の際妨害となる油脂分や色素等のマトリックスを測定物質との分子量の差でふるい分けするGPCは、従来用いられていた液液分配法等とは原理の異なる有効な前処理法として近年注目を浴びている。しかも、GPCは装置の自動運転による省力化も可能とあって、ますますその有用性に期待がかけられている。

一方、食品添加物の分析においても、物質によっては同様にGPCが適用できると考えられる。そこで、油脂性食品等に使用されるフェノール性酸化防止剤の分析への適用を試みた。検討物質は、国内での使用が許可されてい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)、国内では不許可で輸入食品中での検出事例の多いtert-ブチルヒドロキシトルエン(TBHQ)の3種とした。これらの分析における前処理法としてこれまで、BHA、BHTについては蒸留法<sup>1)</sup>、直接抽出法<sup>2)</sup>、TBHQも同時に分析できるものとして冷凍法<sup>3)</sup>等が知られているが、食品によっては妨害物質が影響する場合もある<sup>4)</sup>。今回、前処理にGPCを導入し、ガスクロマトグラフィーで定量し

たところ、良好な結果が得られたので報告する。

### 2. 方 法

#### 2-1 試 料

魚介乾製品として煮干、いかくん製品、冷凍魚介類として冷凍えび、その他の食品としてクラッカー、チョコレート、冷凍ピザを試料とした。いずれも市販のものを使用した。

#### 2-2 試 薬

標準品：BHA、BHTはジーエルサイエンス(株)製、TBHQは和光純薬工業(株)製を用いた。

標準液：各酸化防止剤の1000  $\mu$ g/ml酢酸エチル溶液を作製し、標準原液とした。これらを酢酸エチルで希釈混合して100  $\mu$ g/mlとし、標準液とした。

ピロガロール溶液：ピロガロール(市販特級品)を酢酸エチルに溶解し、5mg/mlとした。

セップパックフロリジルプラス(Waters社製、以下フロリジルカラムと略す)：10mlのガラスシンジを取り付け、あらかじめアセトニトリル 5mlで洗浄して使用した。

コーン油：市販品を用いた。

その他の試薬：GPC移動相用の溶媒は液体クロ

\*札幌市厚別保健所

マトグラフ用, 他は残留農薬試験用を用いた。

### 2-3 装置

GPC装置: 山本ら<sup>5)</sup>の開発した自動GPC装置を使用した。カラムは内径20mm, 長さ500mmのものを用いた。

ガスクロマトグラフ: HP 5890 II (FID検出器付)

### 2-4 試験溶液の調製

#### (1) 魚介乾製品, 冷凍魚介類

粉碎した試料5gをホモジナイザー用カップに入れ, 無水硫酸ナトリウム10g, ピロガロール溶液1.5ml, 酢酸エチル50mlを加えて30秒間ホモジナイズした。抽出液をろ紙でろ過し, 残留物に酢酸エチル50mlを加え同様に処理した後, 抽出液を合わせ, ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し5mlとした。これにシクロヘキサン5mlを加えメンブランフィルターでろ過したものをGPC用試料溶液とした。GPC操作条件は山本ら<sup>5)</sup>に準じたが, 注入量は2ml, 移動相流速は4ml/分, 検出波長は280nm, 分取画分は90~120mlとした。分取した画分はロータリーエバポレーターで乾固直前まで濃縮し, アセトニトリル5mlを加え, フロリジルカラムを通過させた。さらにアセトニトリル5mlで洗浄後, 通過液と洗浄液を合わせ濃縮して1mlとし, これを試験溶液とした。

#### (2) その他の食品

ピロガロール溶液の添加量を0.2mlとした以外は

表1 ガスクロマトグラフの条件

カラム	: DB-210(0.25mm id×15m, 膜厚0.15 $\mu$ m, J&W社)
カラム温度	: 70°C(1分)–10°C/分–230°C(14分)
注入口温度	: 250°C
検出器温度	: 250°C
キャリアガス	: He 7.5psi(70°C)
注入方法	: スプリットレス
注入量	: 1 $\mu$ l

2-4(1)と同様に処理しGPC分取画分を得た。フロリジルカラムには通さずそのまま濃縮して1mlとし, これを試験溶液とした。

### 2-5 ガスクロマトグラフによる定量

試験溶液を表1の条件で定量した。定量はピーク高さにより行った。

### 2-6 検量線の作成

標準液を1~20 $\mu$ g/mlの範囲になるように酢酸エチルで希釈したものをを用いて検量線を作成した。

## 3. 結果および考察

### 3-1 検量線

BHA, BHTは1~20 $\mu$ g/ml, TBHQは5~20 $\mu$ g/mlの範囲で良好な直線性を示した。

### 3-2 GPC分取条件

#### (1) 分取画分

コーン油と標準液を移動相で希釈混合したものを注入したところ, 各酸化防止剤は90~120mlの画分に溶出された(図1)。

#### (2) 移動相の流速

移動相の最適流速を煮干を例に検討した。2-4(1)に従ってGPC用試料溶液を調製し注入した。このとき, 主に油脂分が溶出される0~90mlを画分1, 酸化防止剤の溶出される90~120mlを画分2としてそれぞれ分取し, 溶媒を留去して得られた残留物を油脂分とみなし, その重量を測定した。流速を変えて比較した結果, 4ml/分以下のとき, 画分2に混入する油脂分が少なく(表2), 油脂分と酸化防止

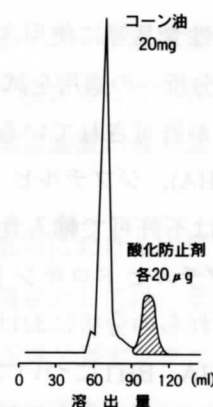


図1 GPC分取画分

表2 GPC移動相の流速と油脂の分離度

流速 (ml/分)	油脂分重量(%)	
	画分1	画分2
3	94.9	4.7
4	94.8	4.8
5	94.1	5.9

剤との分離度が大きいと言えることより、流速は4ml/分とした。

### 3-3 ピロガロールの添加が回収率に与える効果

煮干、冷凍えび、クラッカーに標準液を1mlずつ添加し、2-4に従って処理し回収率を求めた。まずピロガロール溶液を添加せずに行ったところ、BHA、BHTはいずれの試料でも80%前後であったが、TBHQは煮干と冷凍えびで低い値となった(表3)。この一因として、GPC操作中におけるTBHQの酸化が考えられた。注入から分取まで一検体あたり30分程度かかるうえ、自動運転で複数検体を処理する場合は試料溶液がより長時間室温放置される。これは酸化されやすいTBHQの回収率の低下を招くこととなるので、酸化を最小限に食い止めるために安定剤の添加を検討した。

安定剤として、蒸留法<sup>1)</sup>で試料に添加されるピロガロールについて検討した。ピロガロールは今回検討している3種の酸化防止剤と分子量が同程度であるため、GPCによる分画後も安定剤として有効に働くものと考えられた。

TBHQの回収率が最も低かった煮干を試料とし、まずピロガロール未添加のGPC用試料溶液を調製した。これに標準液1mlと種々の濃度のピロガロールを添加し、一夜放置後GPCに注入して以下2-4(1)により回収率を求めた。その結果、ピロガ

表3 添加回収率(%)

試料	BHA	BHT	TBHQ
煮干	82.1±0.8	75.3±2.8	48.2±5.3
冷凍えび	82.6±0.6	76.6±0.6	62.2±6.9
クラッカー	82.7±1.6	80.9±1.1	76.1±6.2

3試験の平均値±標準偏差  
各酸化防止剤を試料1gあたり20μg添加

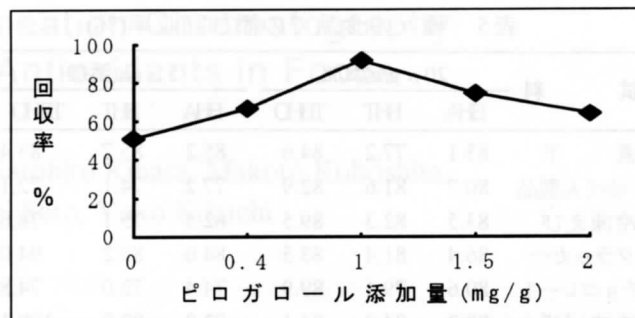


図2 ピロガロール添加量とTBHQの回収率(%)

ロール添加量の増加に伴いTBHQの回収率は上昇し、試料1gあたり1mgの添加では約90%となった(図2)。添加量をさらに増やすと回収率は逆に低下したが、BHA、BHTの回収率には影響しなかった。TBHQでのみ回収率が低下する原因として、フロリジルカラムへの吸着が考えられた。本法で過剰のピロガロールはほとんどフロリジルカラムに吸着された。従ってピロガロール同様極性の高いTBHQは、カラム内でピロガロールと相互作用し溶出されづらくなったものと考えられる。

### 3-4 ピロガロール添加量

3-3の結果よりピロガロールの効果が確認されたので、次に各試料への添加量を検討した。煮干と冷凍えびに標準液1ml、ピロガロール溶液を1mlあるいは1.5ml添加して各酸化防止剤の回収率を求めたところ、1.5mlでの回収率が高かった(表4)。クラッカーは無添加でも回収率は比較的良好だった(表3)が、変動が大きかった。そこで少量添加したところ、0.2mlのとき最も回収率が高く変動も少なかった(表4)。以上の結果より、魚介製品にはピロガ

表4 ピロガロール添加量と各酸化防止剤の回収率(%)

試料	添加量 (mg/g)	BHA	BHT	TBHQ
煮干	1.0	84.8±4.5	78.2±1.5	77.2±1.8
	1.5	85.1±4.5	77.2±4.4	84.6±4.3
冷凍えび	1.0	83.1±2.5	79.1±1.4	81.0±3.0
	1.5	83.5±1.9	82.3±3.2	89.5±2.7
クラッカー	0	82.7±1.6	80.9±1.1	76.1±6.2
	0.2	86.4±3.4	81.4±1.1	83.5±3.0
	0.4	87.4±5.0	82.3±4.4	80.9±2.2

3試験の平均値±標準偏差  
各酸化防止剤を試料1gあたり20μg添加

表5 種々の食品での添加回収率(%)

試料	20 $\mu$ g/g添加			5 $\mu$ g/g添加		
	BHA	BHT	TBHQ	BHA	BHT	TBHQ
煮干	85.1	77.2	84.6	85.2	85.7	85.4
いかくん製品	80.7	81.6	82.9	77.2	74.1	72.1
冷凍えび	83.5	82.3	89.5	82.5	75.1	78.6
クラッカー	86.4	81.4	83.5	84.6	85.2	94.0
チョコレート	80.6	79.1	89.9	74.4	72.0	74.8
冷凍ピザ	88.2	84.0	94.1	93.0	82.0	100.1
3試験の平均値						

ロール溶液を1.5ml, その他の食品には0.2ml添加することとした。なお後者の場合, フロリジルカラムを通さないためピロガロールは除去できないが, この添加量ではクロマトグラムへの影響が少なかった。

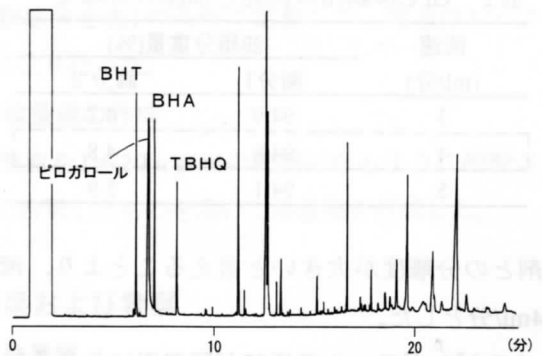
### 3-5 添加回収率

種々の食品に標準液を1ml(試料1gあたり20 $\mu$ g)あるいは0.25ml(試料1gあたり5 $\mu$ g)ずつ添加し, 本法により分析し回収率を求めた。いずれもほぼ80%以上の回収率が得られた(表5)。図3に添加試料のクロマトグラムを示す。クラッカーの場合, ピロガロールのピークがテーリングしていたが, 酸化防止剤のピークとは分離しており, 分析上問題はなかった(図3(a))。なお, 本法による検出限界は, 試料濃度で5 $\mu$ g/gであった。また, 本法はポテトチップス, クッキーなどの菓子類, マヨネーズ, ピーナッツバター, フライドポテトなどの食品についても適用可能であった。ニシンやサバなど一部の冷凍魚介類で, BHAと同じ位置に妨害ピークの見られることがあったが, ガスクロマトグラフ質量分析計での確認が可能であった。

GPCには, 液液分配のようなエマルジョンの生成による回収率の低下といった問題がない。また, 本法は他の前処理法と比較して多少時間を要するが, システムを組むことで自動運転による省力化も可能である。従って, 本法は酸化防止剤の分析における前処理法として有用な方法のひとつであると考えられる。

## 4. 結 語

(a) クラッカー



(b) 煮干

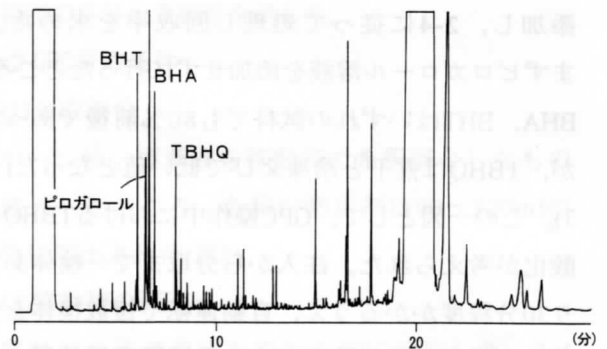


図3 添加試料のクロマトグラム

BHA, BHT, TBHQの3種の酸化防止剤の分析におけるGPCの適用について検討した結果, ピロガロール存在下で前処理を行うことにより高回収率が得られ, 種々の食品に適用が可能であった。本報の要旨は, 日本食品衛生学会第68回学術講演会(1994年10月, 千葉)において発表した。

## 5. 文 献

- 1)成田弘子, 他:食衛誌, 29, 47-51, 1988.
- 2)厚生省生活衛生局監修:食品衛生検査指針(食品中の食品添加物分析法), 54-57, 61-62 (社)日本食品衛生協会, 1989.
- 3)山田真記子, 他:食衛誌, 34, 535-541, 1993.
- 4)谷村顕雄, 他監修:食品中の食品添加物分析法解説書, 887-895, 講談社, 1992.
- 5)山本優, 他:札幌市衛生研究所年報, 20, 124-132, 1993.

## Application of Gel Permeation Chromatography to the Extraction of Antioxidants in Foods

Kanako Nishio, Masaaki Kawai, Satohiro Kihara, Makoto Kuboshita,  
Minoru Sato<sup>\*</sup>, Yuji Sato, Yuko Kikuchi

Gel permeation chromatography (GPC) has been popular as one of the purification methods in analysis of residual pesticides in foods. In this study, GPC was applied to the extraction of phenolic antioxidants in foods. The sample was extracted with ethyl acetate, concentrated, and then GPC fractionation was performed. Although the anti-oxidants, especially TBHQ, were easily oxidized at room temperature, addition of pyrogallol in the samples prevented oxidation. Fat was well removed from foods such as dried sardine and cookies, and recoveries of the antioxidants were satisfactory.

<sup>\*</sup>Atsubetsu Health Center of Sapporo City