－研究報告－

大阪府立公衛研所報
第50号　平成24年（2012年）

ピーナッツあるいはゴマを含む食品中 TBHQ 分析法の検討

野村千枝*　粟津薫*　清田恭平*　吉光真人*　阿久津和彦*

tert-ブチルヒドロキノン（TBHQ）は欧米で使用される酸化防止剤であるが、日本国内では食品添加物として認められておらず、輸入食品の抜き取り検査等において違反事例が報告されている。大阪府においても TBHQ の収去検査を行ってきたが、今回ピーナッツあるいはゴマを含む一部の食品において、食品由来の妨害成分により分析が困難となる事例があった。そこで試料の前処理方法について検討し良好な結果が得られたので報告する。

キーワード：TBHQ、ゴマ、ピーナッツ、固相抽出法、AC-2 カートリッジカラム
key words: TBHQ, sesami, peanut, solid-phase extraction, AC-2 cartridge column

tert-ブチルヒドロキノン（TBHQ）は米国や中国などでは酸化防止剤として用いられているが日本では使用が許可されておらず、輸入食品から検出される違反事例が報告されている [1)]。従来の TBHQ の分析は食品中の食品添加物分析法 [2)] に基づいて行われてきたが、平成 17 年 3 月に厚生労働省より改良法が通知された [3)]。改良法は TBHQ を L-アスコルビン酸パルミチン酸エステルを含むアセトニトリルで抽出後、n-ヘキサンを用いて油脂分を除去し、蛍光検出器付 HPLC により定量する。当所においては、この改良法を一部変更した変法（以下 SOP 法）を用いて検査を行ってきたが、ピーナッツあるいはゴマを含む一部の食品において食品由来の成分により分析が妨害される事例があった。通知法の改良法として、活性炭カートリッジカラムを利用し、食品中 TBHQ の簡易・迅速分析を試みた祭原らの報告がある [4)]。そこで今回、祭原らの方法 [4)] を参考に試料の前処理方法を改良し蛍光検出器付 HPLC を用いて検討を行った。

方法

1.　試料

市販のピーナッツバター、ピーナッツクリーム、ピーナッツ油、ハニーローストピーナッツ、ゴマビスケット、ゴマ油、コーン油、オリーブ油 2 種類（エキストラバージン）を用いた。

2.　試薬等

試薬 : TBHQ 標準品、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル（AP）は和光純薬工業（株）製の特級品を用いた。無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用、アセトニトリル、n-ヘキサン、酢酸エチルは HPLC 用を用いた。水は Millipore 社製 Milli-Q 超純水製造装置で製造した。その他試薬は市販の特級試薬を用いた。抽出に用いるアセトニトリルは n-ヘキサンで飽和させたものを用いた。標準溶液の希釈および抽出に用いる有機溶剤（アセトニトリル、酢酸エチル）には、抽出操作や減圧濃縮操作等に伴う TBHQ の酸化分解を抑制するために、AP を 0.01%w/v の濃度となるように添加した（以下 AP アセトニトリル、AP 酢酸エチル）。

標準溶液：TBHQ50.0 mg を精秤し、通知法 [3)] に従って AP アセトニトリルに溶解して 50 mL に定容し、TBHQ 標準原液とした（1 mg/mL）。この液を AP アセトニトリルで適宜希釈して標準溶液を調製した。

固相抽出カートリッジカラム：高純度活性炭カラムである Waters 社製 Sep-Pak Plus AC-2（充填量 400 mg）を用いた。使用前にアセトニトリル 4 mL および精製水 5 mL で平衡化した。

ディスポーザブルメンブランフィルター（PTFE、0.45 µm）、分析用ろ紙（No.5A、150 mmφ）は Advantec 社製を用いた。

*大阪府立公衆衛生研究所　衛生化学部　食品化学課
Studies on a Method for the Determination of TBHQ in Sesami and Peanut Products by Chie NOMURA, Kaoru AWAZU, Kyohei KIYOTA, Masato YOSHIMITSU and Kazuhiko AKUTSU

3. 装置および測定条件

装置：島津製作所製 LC-10A シリーズ（RF-10VP 型蛍光検出器付）、カラム：Tosoh 製 TSK gel ODS-100V（5 µm、φ4.6×150 mm）、移動相：5%酢酸・アセトニトリル混液（3:2）、カラム温度：40℃、流速：1.0 mL/min、励起波長：293 nm、蛍光波長：332 nm、注入量：20 µL

4. 試験液の調製

4.1 試験液の調製（SOP 法）

4.1.1 液状または固形の油脂

均一化した試料約 1 g に無水硫酸ナトリウム 1 g と n-ヘキサン 10 mL を加え試料を溶解した。正確に AP アセトニトリル 10 mL を加え、1 分間振とうした。遠心分離した後、n-ヘキサン層を除き、アセトニトリル層に n-ヘキサン 10 mL を加え、よく振り混ぜた後、遠心分離した。抽出液（アセトニトリル層）を採り、フィルターでろ過し、試験液とした（図 1-1）。

4.1.2 その他の食品

細切均一化した試料約 5 g に無水硫酸ナトリウム 5 g と AP 酢酸エチル 30 mL を加え、1 分間振とうまたは高速ホモジナイズした。5 分間遠心分離した後、酢酸エチル層をろ過した。残留物に AP 酢酸エチル 30 mL を加え同様に操作し、ろ液を合わせ、酢酸エチルを留去した。残留物に n-ヘキサンを加えて溶解し、50 mL に定容した。この溶液を遠心分離した後、10 mL を正確に採り、正確に AP アセトニトリル 10 mL を加え、1 分間振とう後、遠心分離した。n-ヘキサン層を除き、アセトニトリル層に n-ヘキサン 10 mL を加えよく振り混ぜた後、遠心分離した。抽出液（アセトニトリル層）を採り、フィルターでろ過し、試験液とした（図 1-2）。

遠心操作はすべて室温下 3,000 回転で 5 分間行った。

4.2 AC-2 カートリッジカラムによる精製法（本法）

SOP 法に”AC-2 カートリッジカラムによる精製法”を加えたものを本法とした（図 2）。SOP 法により得られた抽出液 5 mL を正確に採り、水 5 mL を加えて混和した後、AC-2 カートリッジカラムに通して TBHQ を吸着させた。次にアセトン・水混液（1:1）10 mL および水 10 mL で洗浄し、10%アスコルビン酸水溶液・アセトン混液（1:9）25 mL で溶出した。溶出液を完全に乾固させずに減圧濃縮した後、AP アセトニトリルを用いて 5 mL に定容し、フィルターでろ過し、試験液とした。

5. 定量

標準溶液および試験液 20 µL を HPLC に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。検量線は 0.1～0.4 µg/mL の範囲で良好な直線性が得られた（0.1，0.2，0.3，0.4 µg/mL の 4 点検量線、決定係数 R^2=0.9999）。本法の検出下限値は、通知法と同じ 1 µg/g（試験液として 0.1 µg/mL に相当）とした。定量下限値は検出下限値と同じ 1 µg/g とした。

6. 添加回収試験

通知法では「TBHQ 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では良好な回収率が得られない。精度管理では 20 µg/g での添加回収実験を実施することで充分な精度を維持できる」としている[3)]。しかし TBHQ は不検出基準の食品添加物であるため、検出下限値付近における添加濃度での精度管理が望ましいと考えた。そこで添加濃度は検出下限値の 2 倍である 2 µg/g とした。

また分析法の妥当性を確認するために「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン」[5)]を参考に、1 日 2 併行、5 日間の枝分かれ実験モデルで精度管理試験を実施した。

結果および考察

1. 抽出・精製方法の検討

抽出方法は通知法を一部変更した。抽出効率を上げるためにアセトニトリル分配の回数を 1 回から 2 回に増やし、高速ホモジナイズ法も選択可能とした。このとき、抽出操作や減圧濃縮操作に伴う TBHQ の酸化分解を抑制するために、AP を添加した酢酸エチルを抽出溶媒に使用することにした（図 1-1, 1-2）。精製法は祭原らの方法[4)]を準用した（図 2）。

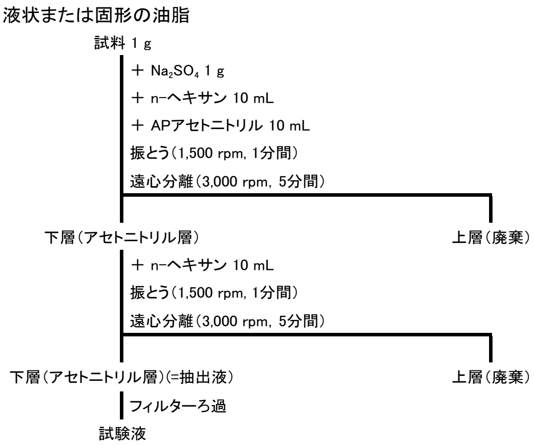

図 1-1 液状又は固形の油脂（SOP 法）のフローシート

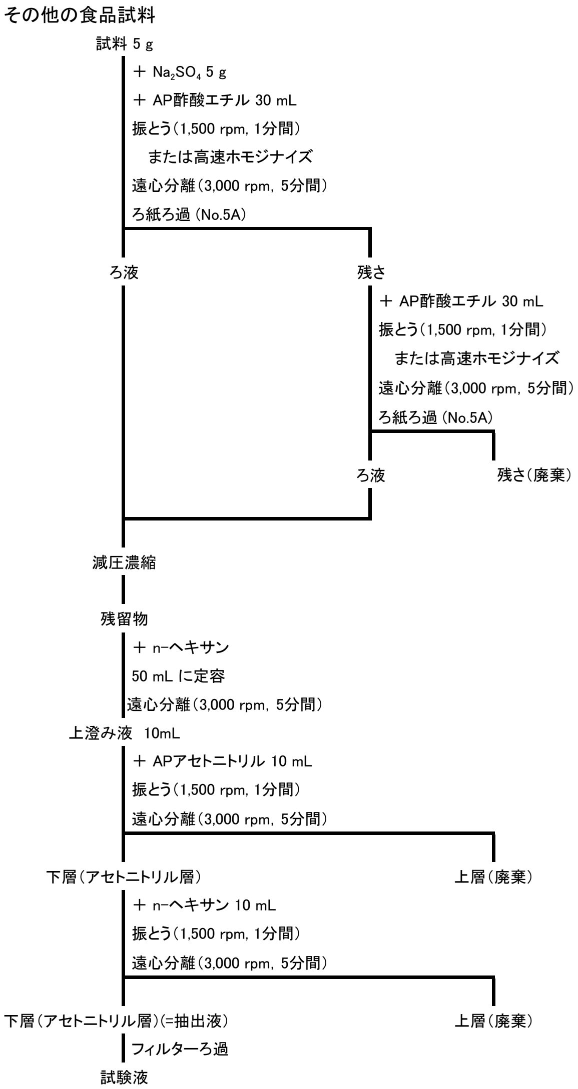

図 1-2 その他の試料（SOP 法）のフローシート

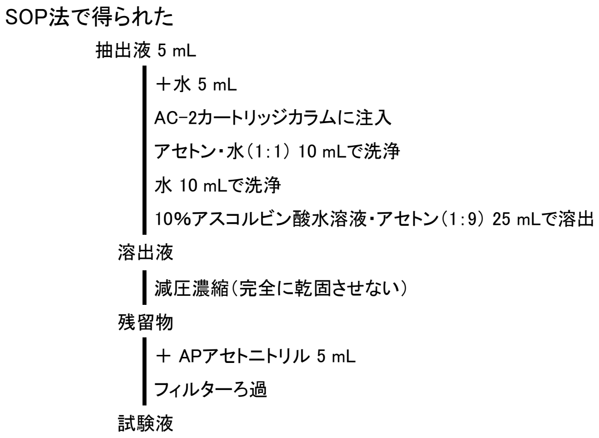

図 2 AC-2 カートリッジカラムによる精製方法（本法）のフローシート

2. 測定条件の検討

測定条件は通知法を一部変更した。通知法の検出下限を確保するために、試料注入量を 10 μL から 20 μL にした。通知法条件で試料注入量を 2 倍にした場合、10 μL 注入時と異なり、TBHQ ピークの著しいリーディングが生じた。リーディングの原因について、標準溶液（AP アセトニトリル）と移動相（5%酢酸・メタノール・アセトニトリル混液（3:1:1））の溶媒組成のマッチングが悪いためと考え、移動相のメタノールをアセトニトリルで置き換え 5%酢酸・アセトニトリル混液（3 : 2）としてピーク形状の改善を図った。その結果、20 μL 注入時のピーク形状が改善し、通知法の 2 倍以上の検出感度を得ることができた。通知法の測定条件のうち、注入量および移動相組成を各々、20 μL および 5%酢酸・アセトニトリル混液 （3 : 2）に変更した。（データ未掲載）

3. 添加回収試験

SOP 法と本法を比較するために、実験方法 1.試料に記述の 7 種類の食品を用いて 3 併行で添加回収試験を行った。コーン油、オリーブ油、ゴマ油、ピーナッツ油、ピーナッツバターの 5 種類は“液状または固形の油脂”、ハニーローストピーナッツ、ゴマビスケットの 2 種類は“その他の食品”の抽出・精製法を用いた。図 3-1、図 3-2 にクロマトグラムを示した。TBHQ の RT は 5.8～5.9 分であるが、ピーナッツバターおよびハニーローストピーナツに共通する夾雑ピークは 6.2 分、6.7 分に見られた。この夾雑ピークの RT は TBHQ と最小でも

0.3 分のずれがあったものの、ピーク面積が非常に大きいため、TBHQ の同定・定量の妨害となった。また 6.2 分と 6.7 分の夾雑ピークは粒コーンや甘栗にも見られたがピーク面積が TBHQ の定量下限値以下であったことから定量は可能であった。ゴマ油およびゴマビスケットに共通するゴマ由来の主な夾雑ピークは 5.6 分、24.5 分および 34.4 分に見られた。ゴマビスケットにおける 5.6 分のピーク面積は定量下限値以下であり、TBHQ 定量値の算出は可能であった。しかし、HPLC の分析時間を 20 分間としているため、ゴマ由来の 24.5 分および 34.4 分のピークが、次の試験品注入時の妨害となっていた。

ゴマ油、ピーナッツバター、ハニーローストピーナッツは、SOP 法では夾雑ピークが測定の妨害となり、定量不能であったが、本法では定量が可能となった。添加回収率は 81～100%、RSD は 1～6%と良好な結果を示した。真度は 70～120%の範囲に収まり、SOP 法よりも良好な値であった。

4. 真度と精度

1 日 2 併行、5 日間の枝分かれ実験モデルで本法の精度管理試験を実施し、併行精度および室内精度を算出した（表 2）。試料は“液状または固形の油脂”代表としてピーナッツバター、その他食品の代表としてハニーローストピーナッツを用いた。真度は 70～120%の範囲に収まり、併行精度が 10%以下、室内精度が 15%以下と良好な結果が得られた。

まとめ

ゴマおよびピーナッツを含む食品に関しては、改良法[3]を一部変更した当所の SOP 法に AC-2 カートッジカラムによる精製法を追加した本法を用いることで、定量が不能であった試料においても測定が可能となり、良好な精度と回収率が得られた。TBHQ の検査を行うとき、ゴマおよびピーナッツを含む食品の場合は、本法を用いる必要があると考えられた。

AC-2 カートリッジカラムを貸与して頂いた生活環境課の皆様に深謝いたします。

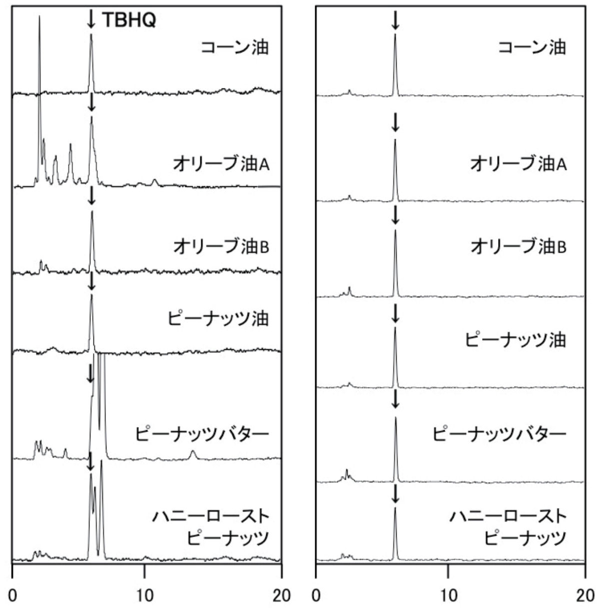

図 3-1 SOP 法と本法のクロマトグラムの比較
（左）SOP 法、（右）本法
添加濃度：2 μg/g、縦軸：相対強度、横軸：RT（分）

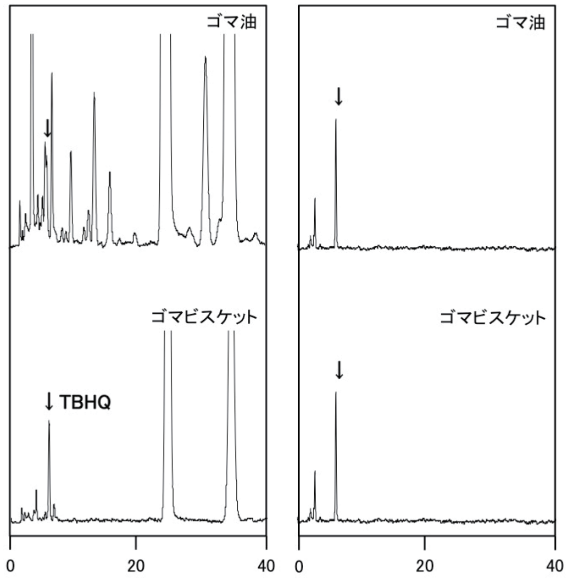

図 3-2 SOP 法と本法のクロマトグラムの比較（ゴマを含む食品）
（左）SOP 法、（右）本法
添加濃度：2 μg/g、縦軸：相対強度、横軸：RT（分）

表 1　SOP 法と本法の回収率の比較

試料	試料採取量	添加濃度	平均回収率, %（RSD, %）, n=3	
	g	μg/g	SOP法	本法
コーン油	1	2	95（5)	96（6）
オリーブ油	1	2	95（2）	99（2）
ごま油	1	2	算出不能*	99（1）
ピーナッツ油	1	2	101（3）	92（2）
ピーナッツバター	1	2	算出不能*	100（6）
ハニーローストピーナッツ	5	2	算出不能*	81（4）
ごまビスケット	5	2	116（8)	86（2）

* 食品由来の妨害ピークがTBHQのピークに重なり定量値の算出は不能

表 2　本法の併行精度と室内精度

試料	試料採取量	添加濃度	平均回収率	併行精度	室内精度
	g	μg/g	%	%	%
ピーナッツバター	1	2	100	2	5
ハニーローストピーナッツ	5	2	82	3	5

文献

1） 輸入食品監視業務ホームページ http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/tp0130-1.html
2） 平成 12 年 3 月 30 日付衛化第 15 号厚生省生活衛生局食品化学課長通知別添「第 2 版食品中の食品添加物分析法」（2000）.
3） 平成 17 年 3 月 3 日付食安監発第 0303001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「tert-ブチルヒドロキノン（TBHQ）に係る試験法について」（2005）.
4） 祭原ゆかり, 三橋隆夫：活性炭カートリッジを用いた食品中 tert-ブチルヒドロキノン（TBHQ）の HPLC 簡易分析法, 兵庫県立健康環境科学研究センター紀要 5 号, 61-64（2008）.
5） 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について”平成 22 年 12 月 24 日, 食安発第 1224 第 1 号 (2010).