

TBHQ と紛らわしいトマト加工食品中の妨害物質について

橋本貴弘¹，梶政彦¹，福本智也¹，新美達也¹，
野村剛¹，森田恵一¹，川上雅弘¹，辻由起¹，川勝剛志¹

Obstacle compounds similar to Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ) in Tomato products

Takahiro HASHIMOTO, Masahiko KAJI, Tomoya FUKUMOTO, Tatsuya NIIMI,
Go NOMURA, Keiichi MORITA, Masahiro KAWAKAMI, Yoshiki TSUJI, Tsuyoshi KAWAKATSU

Abstract : We generally quantify TBHQ in foods by HPLC with PDA detection procedures. In tomato products, we detected an obstacle compound distinct from TBHQ. To detect TBHQ clearly separated from this obstacle compound, we tested two analyzing methods in the examination of tomato, whole tomato and tomato puree. We determined the usefulness of one analyzing method using HPLC with FL detection for this purpose.

Key Words : トマト加工食品 tomato product, ターシャリーブチルヒドロキノン tertiary butylhydroquinone(TBHQ), 妨害物質 obstacle, フォトダイオードアレイ検出 photo diode array(PDA) detection 蛍光検出 fluorescence(FL) detection 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography(HPLC)

はじめに

TBHQ は酸化防止剤として、米国など10数カ国で使用が許可されているが、日本では使用が認められていない指定外添加物である。近年、急増する輸入食品の中には、誤って TBHQ が使用され、検疫所などで検出される事例¹⁾も少なくない。当所では輸入食品の TBHQ の検査を平成14年度より実施している。

TBHQ の検査は平成12年3月30日付衛化第15号別添「第2版 食品中の食品添加物分析法」(以下、従来法と示す)に従い、PDA 検出器を用いて HPLC 測定を行い、単波長280nm により定量を行っているが、トマト加工食品の場合は毎回、TBHQ の保持時間近くに、TBHQ の UV スペクトルに酷似した妨害物質を検出するため、HPLC 測定時間を長めに変更し、TBHQ と妨害物質を区別してきた。

なお、TBHQ の試験法については、厚生労働省から従来法よりさらに検出感度の高い試験法として、平成17年3月3日付食安監発第0303001号「tert-ブチルヒドロキノン (TBHQ) に係る試験法について」(以下、新法と示す)の通知があった。

今回、トマト及びトマト加工食品(ホールトマト・トマトピューレ)について、従来法及び新法で抽出を行い、それぞれについて PDA 及び FL 検出器を用いて HPLC 測定

を行った。今回、これらのデータから TBHQ と妨害物質の比較を行い、得られた知見について報告を行う。

方法

抽出は、従来法及び新法で行った。従来法では、単波長280nm により定量を行うことになっているが、今回は PDA 及び FL 検出器を用いた。また新法では、定量法として FL 検出器を用いることになっているが、従来法との比較のため、PDA 検出器も用いた。

1. サンプル

サンプルは市販のトマト及び、トマト加工食品として市販のホールトマト、トマトピューレを用いた。

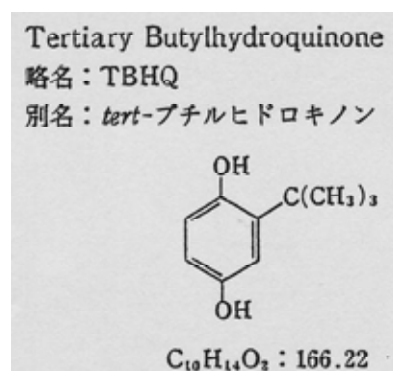


図1 TBHQの構造式

¹ 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門

2．抽出

1) 従来法

試料 5 g を精密に量りホモイザーのカップに採る。これに無水硫酸ナトリウム 10g 及びアセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液 (2 : 1 : 1) (以下、混合溶媒と示す) 50ml を加え、10分間ホモジナイズする。-20 ~ -5 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。残渣はあらかじめ冷蔵庫で冷却した混合溶媒 15 ml で洗い洗液をろ過する。ろ液は合わせ、検液とする。検液を減圧濃縮し 1 ~ 2 ml とした後、混合溶媒を加え正確に 10ml (従来法の原文では最終液量は 5 ml であるが、当所ではサンプルの洗いこみ、希釈の目的で最終液を 10ml に変更している) とする。これを 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過し、試料液とする。

添加サンプルは試料 5 g に対して TBHQ 標準を 100 µg 添加した。試料液 1 ml は、0.5g 相当の試料マトリックスを含み、添加した TBHQ を全量回収した場合は、10 µg の TBHQ を含む。

2) 新法

試料 5 g を精密に量り、硫酸ナトリウム 5 g を加えて混ぜ、酢酸エチル 30ml を加え、1分間振とうする。酢酸エチル層をろ紙 (5A) でろ過する。残渣に酢酸エチル 30ml を加え同様に操作し、ろ液を合わせ、酢酸エチルを留去する。残留物に n-ヘキサンを加えて溶解し、50ml に定容する。この 10ml を正確に採り、正確に L-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混ぜ、分液ロートにてよく振とうし、分離後、下層を採取し、この液 1L に L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル 100mg を溶解したもの。以下、飽和アセトニトリルと示す) 10ml を加え、1分間振とう後、3,000rpm で5分間遠心分離した後 n-ヘキサン層を除き、さらに、アセトニトリル層に n-ヘキサン 10ml を加えよく振り混ぜた後、アセトニトリル層を採り 0.45 µm のメンブランフィルターを通して、試料液とする。

添加サンプルは、従来法との比較のため PDA 検出器による定量を行うため、FL 検出器のみを用いて定量を行う新法の原文よりも高い添加量を加える必要があり、試料 5 g に対して TBHQ 標準を 500 µg 添加した。試料液 1 ml は、0.1g 相当の試料マトリックスを含み、添加した TBHQ を全量回収した場合は、10 µg の TBHQ を含む。

3．通常の HPLC 測定条件

測定装置 : SHIMADZU LC-20AD
カラム : TSKgel ODS-80TM (4.6×250mm)
TOSOH 製

カラム温度 : 40
移動相 : A 5 % 酢酸水溶液
B メタノール・アセトニトリル (1:1)

グラジエント	(min)	B (%)
	0.01	40
	20.00	40
	20.01	100
	45.00	100
	45.01	40
	60.00	40

流速 : 1.0ml/min

注入量 : 10 µl

測定波長 (PDA) : 200-600nm

検出波長 (PDA) : 280nm

測定時間 (PDA) : 20min

測定波長 (FL) : 励起波長 (以下、Ex と示す) 293nm,
蛍光波長 (以下、Em と示す) 332nm

測定時間 (FL) : 20min

4．測定時間を延長した HPLC 測定条件

測定装置 : SHIMADZU LC-20AD

カラム : TSKgel ODS-80TM (4.6×250mm)
TOSOH 製

カラム温度 : 40

移動相 : A 5 % 酢酸水溶液
B メタノール・アセトニトリル (1:1)

グラジエント	(min)	B (%)
	0.01	30
	5.00	30
	50.00	55
	50.01	100
	75.00	100
	75.01	30
	90.00	30

流速 : 1.0ml/min

注入量 : 10 µl

測定波長 (PDA) : 200-600nm

検出波長 (PDA) : 280nm

測定時間 (PDA) : 50min

測定波長 (FL) : Ex293nm, Em332nm

測定時間 (FL) : 50min

試験結果

1．従来法抽出液の PDA 検出器での測定結果

従来法の抽出方法では、混合溶媒を加えた検液を -20 ~ -5 に冷却して、油脂分を凝固させて検体の狭雑物質を取り除き、HPLC で測定する方法を用いている。

しかし今回、従来法で抽出を行ったトマト、ホールトマ

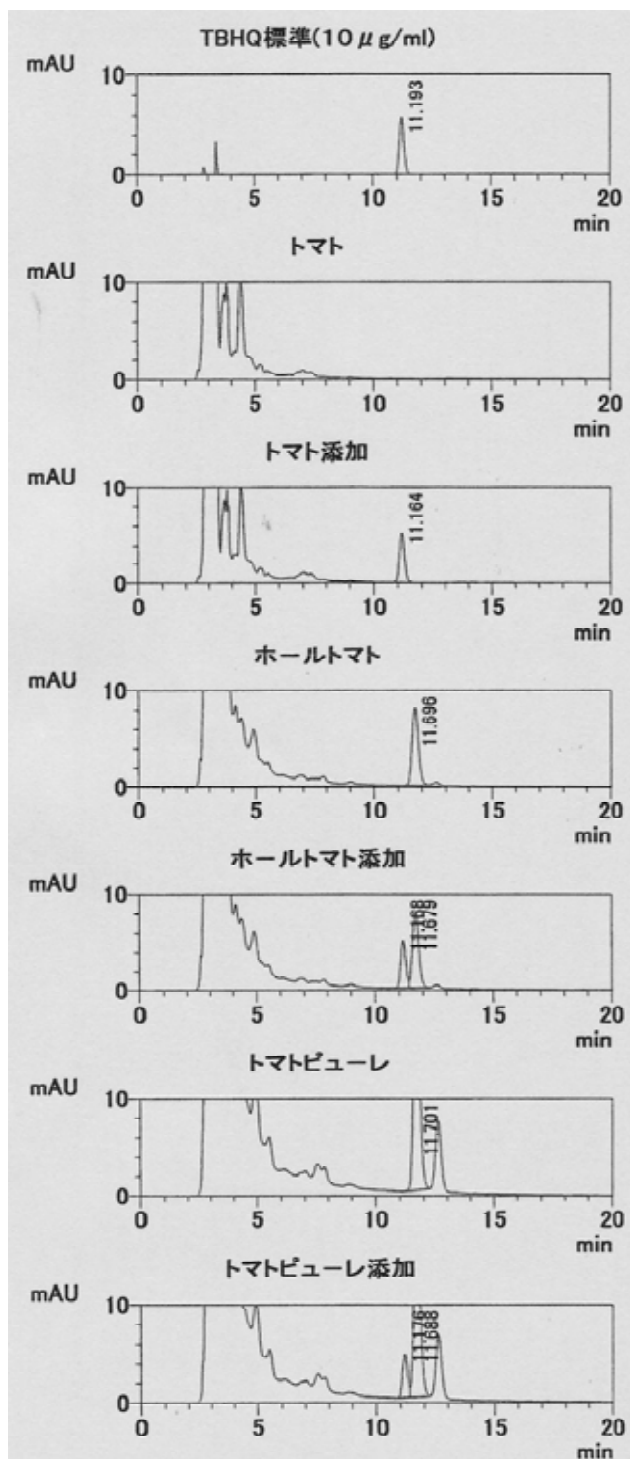


図2 TBHQ標準(10 µg/ml)とトマト, ホールトマト, トマトピューレとそれぞれに標準を添加し従来法で抽出したサンプル (通常のHPLC条件で測定した場合のPDAクロマトグラム: UV;280nm)

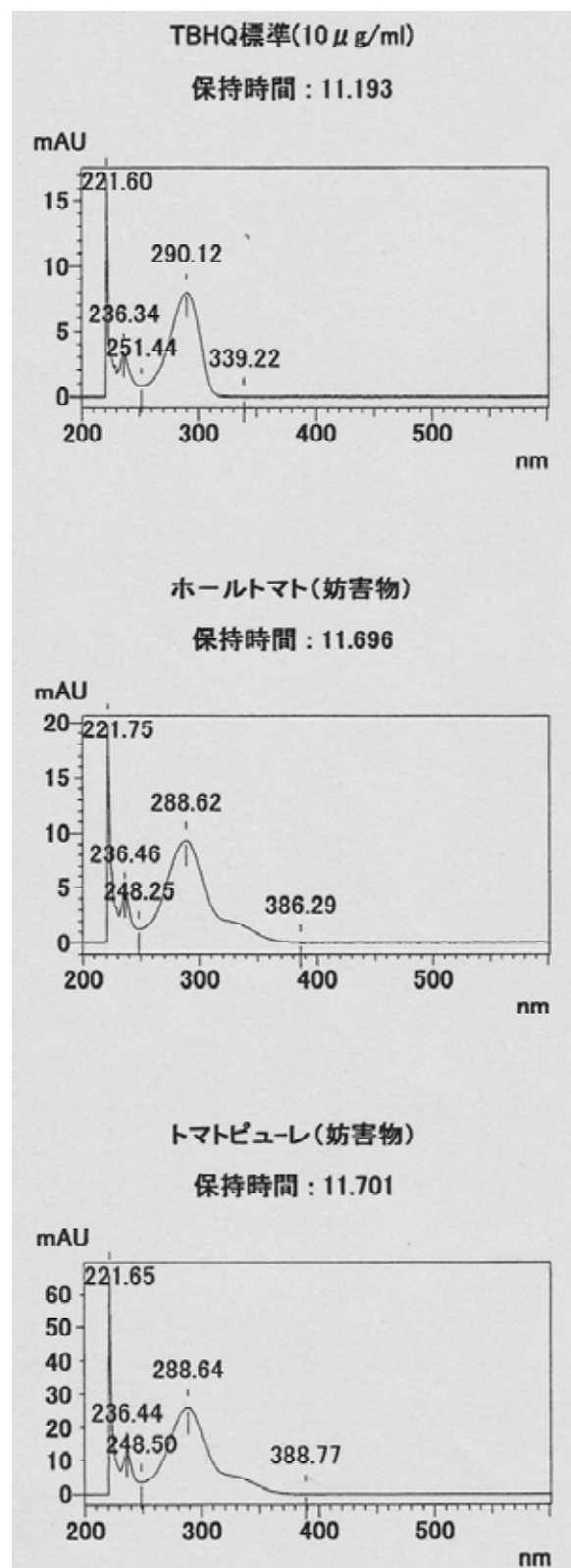


図3 従来法で抽出したホールトマト, トマトピューレを通常のHPLC条件で測定した場合のそれぞれの妨害物質とTBHQ標準(10 µg/ml)のUVスペクトル

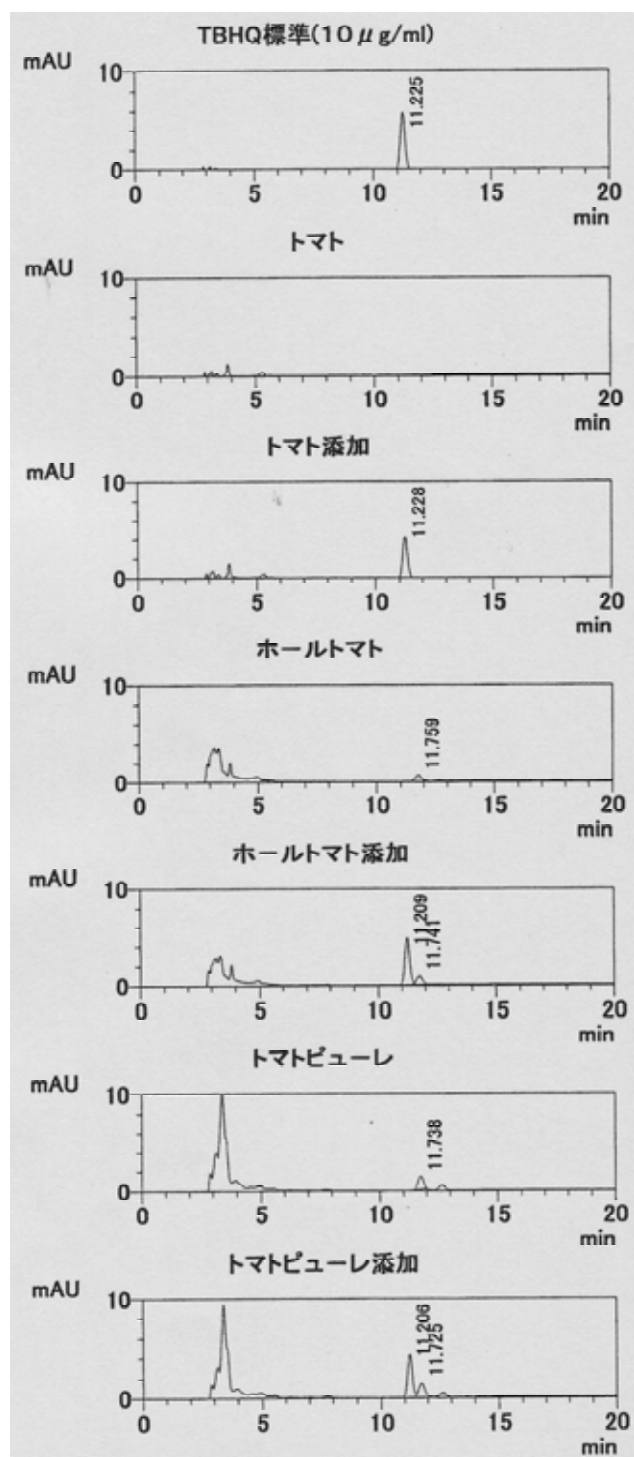


図4 TBHQ標準(10 µg/ml)とトマト、ホールトマト、トマトピューレとそれぞれに標準を添加し新法で抽出したサンプル(通常のHPLC条件で測定した場合のPDA/UVグラフ: UV; 280nm)

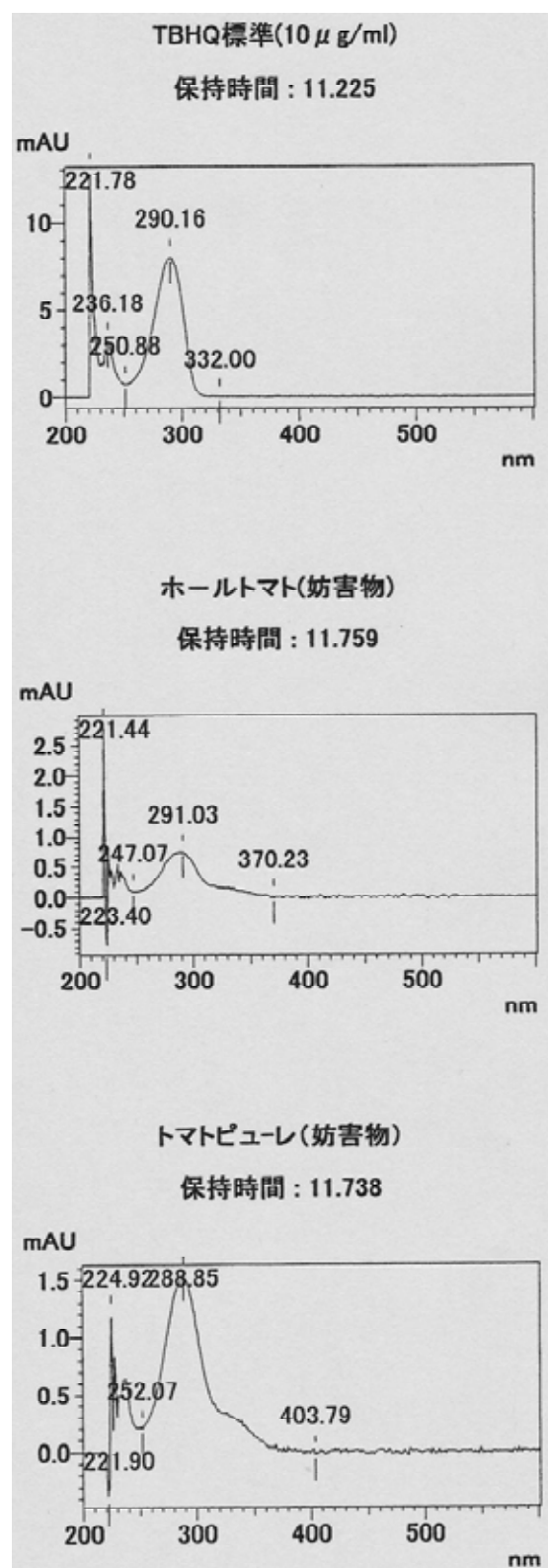


図5 新法で抽出したホールトマト、トマトピューレを通常のHPLC条件で測定した場合のそれぞれの妨害物質とTBHQ標準(10 µg/ml)のUVスペクトル

ト、トマトピューレについては、図2に示す PDA クロマトグラムでの HPLC 測定時間前半に、マトリックス由来のピーク群が見られるため、HPLC 測定液にはかなりの量の狭雑物質が含まれていると思われる。

また、標準 TBHQ の保持時間付近には、ホールトマト、トマトピューレでは、以前の検査時同様の妨害物質が検出されたが、トマトでは検出されなかった。また、図3で示すホールトマト及びトマトピューレの妨害物質の UV スペクトルは、標準 TBHQ の UV スペクトルとの類似度がそれぞれ96%、97%であり、高い類似性を示した。

2．新法抽出液のPDA検出器での測定結果

新法の抽出方法では、試験溶液中に存在する油脂の移行率の低い n-ヘキサン飽和アセトニトリル²⁾を抽出溶媒として用いている。なお、酸化防止剤である TBHQ は溶液中で化学変化しやすい³⁾ため、安定剤として L-アスコルビン酸パルミチン酸エステルが抽出溶媒中に加えられている。

図4に示すとおり、PDA クロマトグラムでの HPLC 測

定時間前半では、マトリックス由来のピーク群が少なく、従来法と新法の抽出時の希釈率の違いを考慮しても、新法は従来法よりも狭雑物質が良く取り除かれていると思われる。

しかし、ホールトマト、トマトピューレでは、標準 TBHQ の保持時間付近に、従来法同様の妨害物質を検出した。トマトでは従来法同様検出されなかった。

図5で示すホールトマト及びトマトピューレの妨害物質の UV スペクトルは、標準 TBHQ の UV スペクトルとの類似度がそれぞれ87%、94%であり、従来法同様高い類似性を示した。

3．HPLC 測定時間を延長した場合の結果

トマト加工食品を従来法で抽出し、通常の HPLC 測定条件で測定し、TBHQ に似た妨害物質を検出した場合には、別条件での確認として、HPLC の測定時間を延長した条件で再測定を行い TBHQ との比較を行ってきた。

今回、従来法で抽出したホールトマト、トマトピューレを測定時間を延長した HPLC 測定条件で測定した結果、

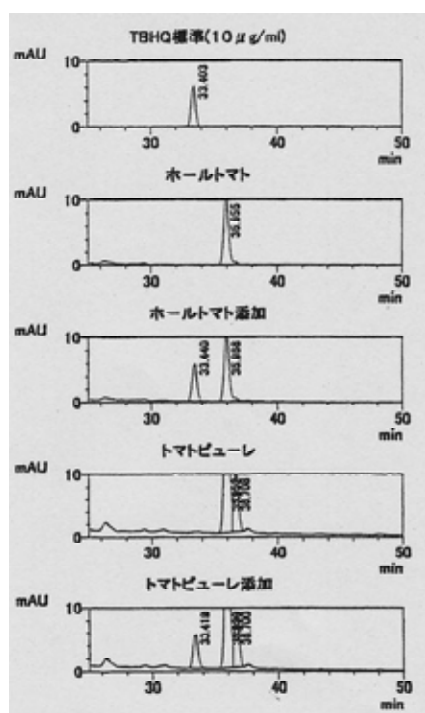


図6 TBHQ標準(10 µg/ml)とホールトマト、トマトピューレとそれぞれに標準を添加し従来法で抽出したサンプル(測定時間を延長したHPLC条件で測定した場合のPDAクロマトグラム: UV; 280nm)

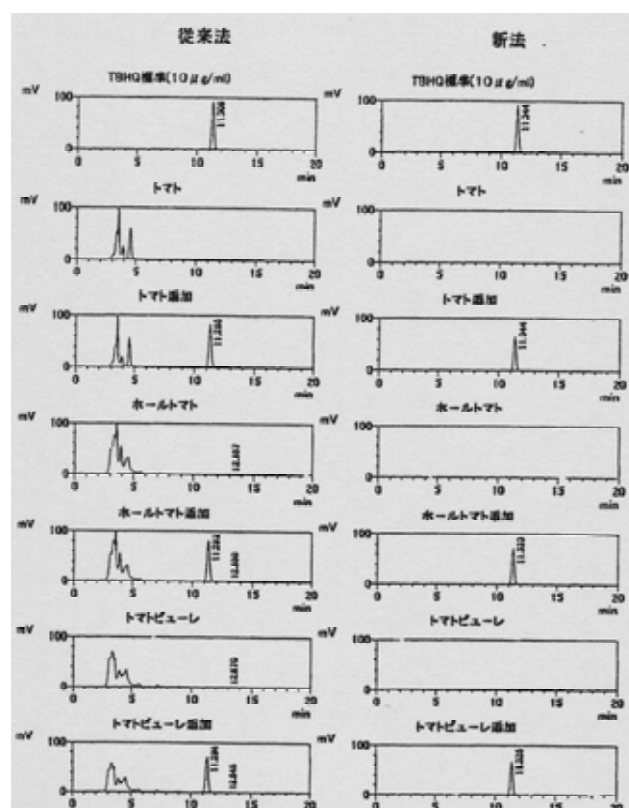


図7 TBHQ標準(10 µg/ml)とトマト、ホールトマト、トマトピューレとそれぞれに標準を添加し、従来法及び新法で抽出したサンプル(通常のHPLC条件で測定した場合のFLDクロマトグラム: EX293nm, Em332nm)

図6に示すとおり、それぞれの妨害物質とTBHQが良好に分離していることが確認できた。

4．従来法抽出液のFL検出器での測定結果

図7に示すとおり、従来法抽出でのトマト、ホールトマト、トマトピューレのFLクロマトグラムでは、従来法のPDAクロマトグラムと同様にHPLC測定時間前半に、マトリックス由来のピーク群を検出した。

また、ホールトマト、トマトピューレでは、標準TBHQの保持時間付近は、従来法のPDAクロマトグラムのような標準の保持時間に近接した大きな妨害物質は検出されなかったが、やや標準の保持時間に遅れて微量のマトリックス由来成分が検出された。トマトでは従来法のPDAクロマトグラム同様、検出されなかった。

5．新法抽出液のFL検出器での測定結果

図7に示すように、新法抽出でのトマト、ホールトマト、トマトピューレのFLクロマトグラムでは、従来法抽出のFLクロマトグラムで検出したHPLC測定時間前半のマトリックス由来のピーク群及び、標準TBHQの保持時間付近の妨害物質が、全く検出されることなく、最も良好に測定されていることが分かった。

考察

1．従来法と新法の比較

今回のトマト及びトマト加工食品の場合、従来法では新法に比べ、簡易な抽出操作である反面、多くの油脂性狭雑物をHPLC測定液に取り込んでいていると思われる。

そのため、今回の通常のHPLC測定条件及び、測定時間を延長したHPLC測定条件では、PDA・FL検出器の測定時間終了後にカラムの洗浄工程を設定した。

今回、初めて新法の抽出液をHPLCで測定を行ったが、従来法に比べて妨害物質の取り込みが極めて少ないことが分かったため、今後、新法での抽出液の測定では、カラムの洗浄工程を除いてもカラムの損傷には問題はないと思われる。

なお、トマト、ホールトマト、トマトピューレの回収率は、従来法がそれぞれ、94.8%、92.9%、82.4%であったのに対し、新法ではそれぞれ、78.8%、87.6%、68.5%と低い回収率を示した。新法では、夾雑物の取り込みを抑えた分、TBHQの取り込み分も減少したように思われる。

2．トマト加工食品中の妨害物質

今までのTBHQの検査では、様々な加工食品のうち、トマト加工食品の場合に限って、TBHQの保持時間に近接し、TBHQに近似したUVスペクトルを持つ妨害物質を

検出したことから、当初、妨害物質はトマトの特有成分であるリコペンでないかと推定していた。これまでのTBHQの検査では、PDA検出器の測定波長は200-350nmであったが、図8に示すリコペンのUVスペクトルから、今回の調査時のPDA検出器の測定波長を200-600nmに変更を行った。

その結果、図3で示すホールトマト、トマトピューレで検出した妨害物質のUVスペクトルは、図8に示すリコペンのUVスペクトルと一致せず、妨害物質はリコペンでないことが分かった。

また、今回の検討の結果、以前のTBHQの検査で検出した妨害物質は従来法、新法ともに、ホールトマト、トマトピューレでは検出されたが、トマトでは予想に反し、検出されなかった。

妨害物質はトマトからホールトマト及びトマトピューレへの加工の工程で加えられたものか、トマト成分が加工工程の中で何らかの化学変化を起こしたものであるかは、現段階では不明である。

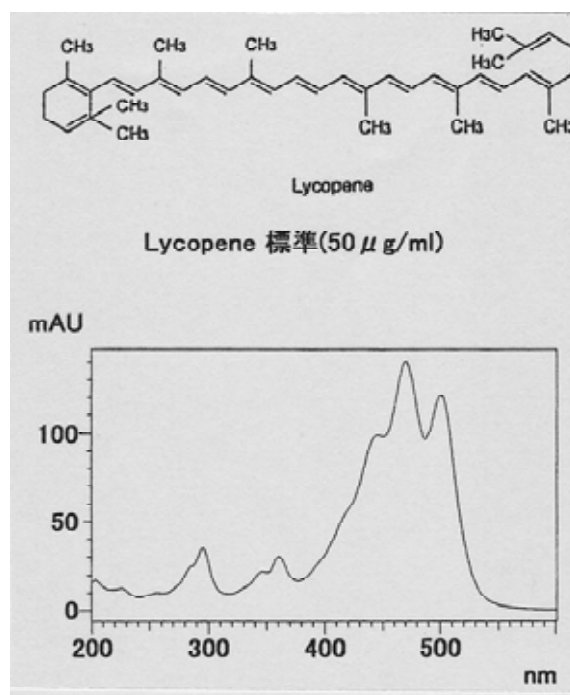


図8 リコペンの構造式⁴⁾とUVスペクトル

3．確認方法

今回のトマト加工食品中の妨害物質の確認は、新法でのFL検出器を用いた測定がTBHQ検出の適否判断の決め手となったが、さらに様々な食品の中には今回以上に、判断に苦慮する場合があると思われる。

新法の原文では、定量法は今回、当所が行ったFL検出

器により測定する方法であり，確認法は質量検出器付ガスクロマトグラフ（GC/MS），または水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）により測定する方法となっている。

今回の場合に限らず，検査で擬陽性の場合は，複数の異なる方法で速やかにかつ正確に確認をする必要性を強く実感した。

参考文献

- 1) 福岡市保健環境研究所：輸入スナック菓子からのTBHQ 検出事例，メサージュ，No113 （2002）
- 2) 大石充男 他：蛍光検出 HPLC による食品中5種の酸化防止剤の同時分析法，食衛誌，43 （2002）
- 3) 佐々木珠生 他：HPLC によるフェノール系酸化防止剤の一斉分析法の検討，広島市衛生研究所年報，22 （2002）
- 4) 島津アプリケーションニュース ：トマト中リコペン，β-カロチンの分析 L321