

食品中のフェノール系酸化防止剤分析法の検討と性能評価

佐藤 絵里^a, 伊藤 彩子^a, 安井 明子^b, 中村 理奈^a, 大塚 健治^a

我が国で許可されていないフェノール系酸化防止剤である2,4,5-トリヒドロキシブチロフェノン及び2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノールについて、HPLC及びLC-MS/MSの測定条件の検討を行った。前処理法及びHPLC-UV測定は、国から通知されている「食品中の食品添加物分析法」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」の分析法を適用した。HPLC-UV (275 nm) での測定に加え、定性及び定量能向上にはHPLC-FL測定及びLC-MS/MS測定の併用が効果的であることを示した。HPLC-UV及びHPLC-FL測定を用いて、クラッカーとマヨネーズにおける分析法の性能評価を行った。指定添加物3種と指定外添加物である*tert*-ブチルヒドロキノンを加えた6種の2濃度 (0.02及び0.2 g/kg)、2名2併行3日間の添加回収試験を実施した。6種いずれも、2食品における選択性は十分確保でき、真度90.5–103%、併行精度4.8%以下、室内精度6.6%以下であり、妥当性確認ガイドラインの定める目標値に適合した。本検討により、当分析法は日常検査法として有用であることを示した。

キーワード：酸化防止剤，2,4,5-トリヒドロキシブチロフェノン，2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール，HPLC-UV，HPLC-FL，LC-MS/MS

はじめに

酸化防止剤は、食品の品質を保持し、酸化による劣化を防ぐために使用される添加物である。酸化防止剤には様々な種類があるが、フェノール系酸化防止剤は、油脂、バター及び魚介乾製品等に用いられる。日本で指定されているのは、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT)、ブチルヒドロキシアニソール (BHA) 及び没食子酸プロピル (PG) である。一方、アメリカ合衆国等では食品への使用が認められているものの、日本では使用が認められていない指定外添加物がある¹⁾。そのうち、*tert*-ブチルヒドロキノン (TBHQ) は輸入食品から検出される違反事例が多く報告されている^{2,3)}。厚生労働省通知⁴⁾中の「BHT, BHA及びPG」の分析法 (通知法) にTBHQの同時分析が記載され、当科でも日常検査を行っている。一方、食品中の2,4,5-トリヒドロキシブチロフェノン (THBP) 及び2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール (HMBP) は、衛生試験法・注解等^{5,6)}にTBHQ等との一斉分析法が示されているのみである。現在、様々な食品が輸入されていることから、これら2種についても適切な試験法を開発し、検査を行っていくことが重要である。

最初に、BHT等と同じ前処理法の適用を図った。しかしながら、HPLC-UV測定では、HMBPは感度が他の酸化防止剤と比較して低く、THBPは保持時間が短かった。そのため、精製操作のない通知法等^{4,5,6)}の試験溶液では、種類によって、食品由来の妨害成分と標準物質のピークの分離が困難なことがあった。そこで、高選択性、高感度測定が可能なHPLC-FL及びLC-MS/MSを用いた測定に用いることが可能かについての検討を行った。

さらに、食品の分析法の国際整合性に鑑み、令和6年3月に「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」(ガイドライン)⁷⁾が発出された。そこで、ガイドラインに従い、検査の効率化を図るため指定添加物3種と指定外添加物のTBHQを加えた6種について、TBHQの違反事例が多い菓子類からクラッカーと油脂食品の代表としてマヨネーズにおいて、HPLCによる定量法の性能評価を実施した。

実験方法

1. 試料

市販のクラッカー、マヨネーズ、煮干し及びオリーブオイルを用いた。試料は、あらかじめ分析対象の酸化防止剤が含まれていないことを確認して用いた。

2. 標準品及び試薬等

1) 標準品

THBPはCombi-Blocks社製、HMBP及びPGは東京化成工業 (株) 製、TBHQ、BHA及びBHTは富士フィルム和光純薬 (株) 製を用いた。

2) 標準溶液

(1) 標準原液

添加回収試験用：THBP及びHMBPの標準品各々50 mgを正確に量り、メタノール (MeOH) に溶解して50 mLとした (1,000 µg/mL)。

性能評価用：各標準品各々40 mgを正確に量り、MeOHに溶解して20 mLとしたもの (2,000 µg/mL) 及び各々400 mgを正確に量り、MeOHに溶解して20 mLとしたもの (20,000 µg/mL) を作製した。

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

(2) 検量線用混合溶液：各標準原液を混合して混合標準原液を調製し、MeOHで段階的に希釈した（濃度0.1–80 µg/mL）。

(3) 添加用標準溶液：各200 µg/mL及び各2,000 µg/mLの混合標準溶液を用いた。

3) その他の試薬

MeOH, アセトニトリル (MeCN), 2-プロパノール及びエタノール：富士フィルム和光純薬（株）製高速液体クロマトグラフ用

無水硫酸ナトリウム及び酢酸：富士フィルム和光純薬（株）製試薬特級

混合溶媒：MeCN, 2-プロパノール及びエタノールを容量比2:1:1で混合した。

4) フィルター

LC-MS/MS測定用：Millex-LG（直径13 mm, 孔径0.20 µm, Merck Millipore社製）

HPLC測定用：Millex-LH（直径13 mm, 孔径0.45 µm, Merck Millipore社製）

3. 試験溶液の調製

通知法の分析法Aに準じて行った。試料5 gに無水硫酸ナトリウム10 g及び混合溶媒50 mLを加え、5分間ホモジナイズした。これを−20℃の冷凍庫で1時間以上冷却した後、すばやくろ紙でろ過した。残さはあらかじめ冷凍庫で冷却した混合溶媒15 mLで洗い、洗液をろ過した。ろ液を合わせ、抽出液とした。抽出液を40℃で減圧濃縮し1–2 mLとした後、混合溶媒で5 mLに定容し、試験溶液とした。これをメンブランフィルター（0.45 µm）でろ過し、HPLC試験溶液とした。試験溶液をMeOHで20倍希釈し、メンブランフィルター（0.20 µm）でろ過したものをLC-MS/MS試験溶液とした。

4. 装置

1) HPLC

LCシステム：Nexera X2（（株）島津製作所製）
フォトダイオードアレイ（PDA）検出器：SPD-M20A（（株）島津製作所製）

蛍光検出器：RF-20Axs（（株）島津製作所製）

2) LC-MS/MS

LCシステム：ACQUITY UPLC I-Class PLUS FL（Waters社製）

質量分析装置：Xevo TQ-S micro（Waters社製）

5. 測定条件

1) HPLC条件

分析カラム：L-Column2 ODS（3.0 mm i.d.×250 mm, 粒子径5 µm, 化学物質評価研究機構社製）, ガードカラム：L-Column2 ODS（2.0 mm i.d.×5 mm, 粒子径5 µm, 化学物質評価研究機構社製）, 移動相：A液；MeOH・MeCN（1:1）, B液；5%酢酸, グラジエント条件：A液 40%（0 min）→90%（15 min）→90%（20 min）→40%（20.1 min）→40%（25 min）, 流速：0.5 mL/min, カラム温度：40℃, 注入量：5 µL, PDA測定波長：190–350 nm（定量波長：275 nm）, 蛍光波長：TBHQ・BHA；Ex. 293 nm Em. 332 nm, HMBP・BHT；Ex. 275 nm Em. 307 nm

2) LC-MS/MS条件

分析カラム：COSMOSIL 5C₁₈-MS-II（2.0 mm i.d.×150 mm, 粒子径5 µm, ナカライテスク（株）製）, 移動相：A液；MeOH・MeCN（1:1）, B液；1%酢酸, グラジエント条件：A液 25%（0 min）→90%（15 min）→25%（15.1 min）→25%（20 min）, 流速：0.3 mL/min, カラム温度：40℃, 注入量：3 µL, イオン源温度：150℃, デソルベーション温度：500℃, コーンガス流量：50 L/hr, 脱溶媒ガス流量：1000 L/hr, イオン化モード：ESI(-), キャピラリー電圧：2.00 kV, マルチプルリアクションモニタリング（MRM）モードの設定値はTable 1に示す。

6. 添加回収試験

クラッカー及びマヨネーズに添加用標準溶液を添加し、本法で分析した（n=3）。添加濃度は0.02 g/kgとした。対象物質の分解を防ぐために、添加後直ちに操作を開始した。絶対検量線から得られた定量値と添加量の比から回収率（%）を求め、平均値及びRSDを算出した。

7. 性能評価

クラッカー及びマヨネーズに添加用標準溶液を添加し、HPLC-UV及びHPLC-FLを用いて測定した。添加濃度は通知法及びガイドラインに従い、使用基準値相当濃度の0.2 g/kg及び0.02 g/kgと2濃度について分析者2名、2併行、3日間の枝分かかれ実験を行った。対象物質の分解を防ぐために、添加後直ちに操作を開始した。

定量値から、真度、併行精度及び室内精度を算出した。選択性は、ブランク試料から得られたクロマトグラムで評価した。0.2 g/kg添加した試料の試験溶液は、検量線の濃度範囲内に入るよう混合溶媒で5倍希釈した。目標値につ

Table 1. MRM conditions of LC-MS/MS for THBP and HMBP

Analytes	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Quantitative ion		Qualifier ion	
			Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (V)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (V)
THBP	195.2	40	125.1	18	151.1	18
HMBP	235.3	40	160.2	25	145.2	30

いては、ガイドラインに従い、真度70–120%、併行精度10%未満、室内精度15%未満とした。

結果及び考察

1. THBP及びHMBPのHPLC条件の検討

当所でフェノール系酸化防止剤 (TBHQ, BHA及びBHT) の日常検査に使用している測定条件を適用した結果、THBPは6.7 min, HMBPは13.3 minに溶出し、形状が良好なピークが得られた。HPLC-UVにおいてTHBPの極大吸収波長は279 nm, HMBPの極大吸収波長は275 nmであったが、感度の低いHMBPに合わせて275 nmを定量波長とした。日常検査における3種の酸化防止剤のHPLC-FLによる測定では、見上らの報告⁸⁾の波長を用い、2波長を目的物質の保持時間毎に切り替えて分析している。そこで、Ex. 293 nm, Em. 332 nm及びEx. 275 nm, Em. 307 nmについてTHBP及びHMBPが検出可能か検討した。その結果、THBPはいずれも検出しなかったが、HMBPはEx. 275 nm Em. 307 nmで検出が可能であった。さらに、TBHQ, BHA, BHT及びPGを加えた6種混合標準溶液を測定した。クロマトグラムをFig. 1に示す。対象の化合物すべてのピークの分離は良好で、HPLC-UVで6種、HPLC-FLで4種の酸化防止剤について、1サイクル20 minでの分析が可能であった。

2. THBP及びHMBPのLC-MS/MS条件の検討

高感度での分析が期待できるMRMモードにより確認できるように、コーン電圧及びコリジョンエネルギーなどのパラメータ、移動相の酢酸濃度、分析カラム及び注入量について条件の検討を行った。文献調査により得た情報⁹⁾を参考に、ESI(-)のMS Scanモード (m/z 50–240) で測定したところ、THBP (m/z 195.2) 及びHMBP (m/z 235.3) のピーク及びスペクトルが得られた。コーン電圧を検討し、感度の低いHMBPに合わせて40 Vとした。次に、コリジョンエネルギーを検討し、プロダクトイオンの中から最も感度が高いものを定量イオン、次に感度が高いものを確認イオンとして選択した。報告されている条件⁹⁾では移動相のB液に5%酢酸が用いられているが、装置への負担軽減を図り、酢酸濃度について検討した。1%酢酸を用いたところ、高感度にTHBP及びHMBPを検出することが可能であった。0.5%酢酸についても検討したが、1%酢酸を用いた場合の方が高感度であったため、1%酢酸を採用した。分析カラムはMightysil RP-18 GP, L-column2 ODS, Inertsil C4, Inertsil ODS-3, COSMOSIL 5C₁₈-AR- II 及びCOSMOSIL 5C₁₈-MS- IIについて検討した。THBPのテーリングが少なく、ピーク形状が良好なCOSMOSIL 5C₁₈-MS- IIを用いることとした。また、注入量については5 μ L, 3 μ L及び1 μ L

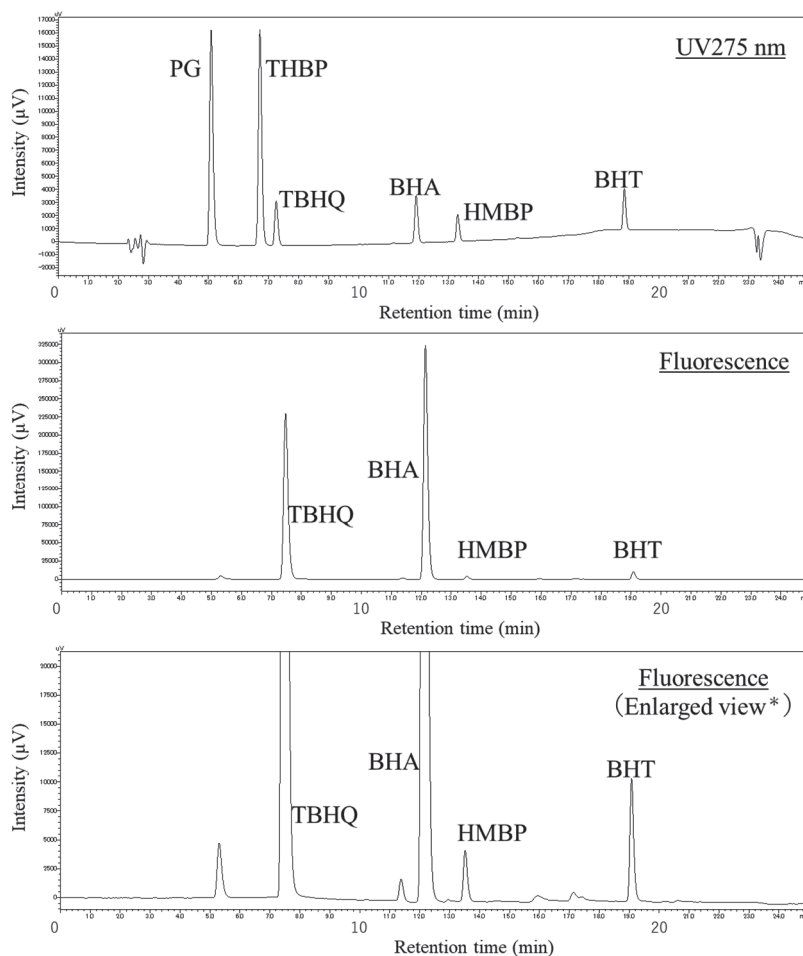


Fig. 1. HPLC chromatograms of antioxidant standard solution at the concentration of 5 μ g/mL

* This figure is enlarged 16 times compared to the figure above

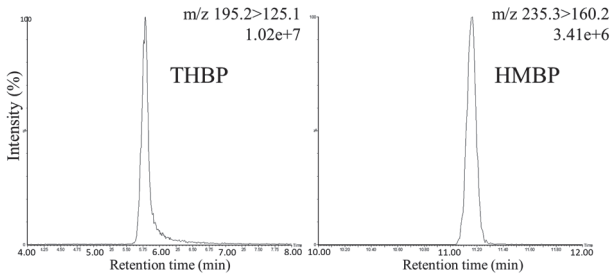


Fig. 2. MRM chromatograms of THBP and HMBP standard solution at the concentration of 0.5 µg/mL

で比較し、検量線が良好な直線となる3 µLとした。測定した際のクロマトグラムをFig. 2に示す。

3. THBP及びHMBPの検量線及び定量限界

THBP及びHMBPについて、HPLC-UV及びHPLC-FLは5, 10, 20, 40及び80 µg/mL, LC-MS/MSは0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1, 1.5及び2 µg/mLで絶対検量線を作成し、いずれも相関係数が0.998以上の良好な直線であることを確認した。

定量下限は、検量線の下限濃度がいずれも、S/N10以上であることを確認し、これを試料中の濃度に換算して0.005 g/kgとした。

4. THBP及びHMBPの定性及び定量性能の検証

HPLC-UVにおいてHMBP付近に食品由来の妨害ピークを検出した煮干し及びTHBP付近に妨害ピークを検出したオリーブオイルについて、HPLC-FL及びLC-MS/MSによる測定を行った。標準溶液と煮干しのクロマトグラムをFig. 3に示す。HPLC-FL (Fig. 3-B-2) 及びLC-MS/MS (Fig. 3-B-3) では妨害ピークが検出されず、定性性能の向上を確認できた。また、オリーブオイルについてもLC-MS/MSでは妨害ピークは検出されず判定が可能であった。

添加回収試験 (n=3) の結果をFig. 4に示す。THBPについてHPLC-UVでは91.5–111%, LC-MS/MSでは97.0–106%, HMBPについてHPLC-UVでは94.7–106%, HPLC-FLでは98.3–108%, LC-MS/MSでは85.2–92.7%の回収率が得られ、ほとんど差がなかった。

以上のことより、HPLC-UVにおいて食品由来の妨害成分により定性及び定量が困難な場合は、HPLC-FLもしくはLC-MS/MSによる測定が有用であることを示した。

5. 酸化防止剤6種における本法の性能評価

1) 検量線の直線性

THBP及びHMBP以外の4種, TBHQは1, 5, 10, 20, 40及び80 µg/mL, BHT, BHA及びPGは5, 10, 20, 40及び80 µg/mLで絶対検量線を作成し、いずれも相関係数が0.999以上の良好な直線であることを確認した。

2) 選択性

使用した試料は、あらかじめ分析対象物質以外に由来する信号強度が分析対象物質の添加により得られる信号強度

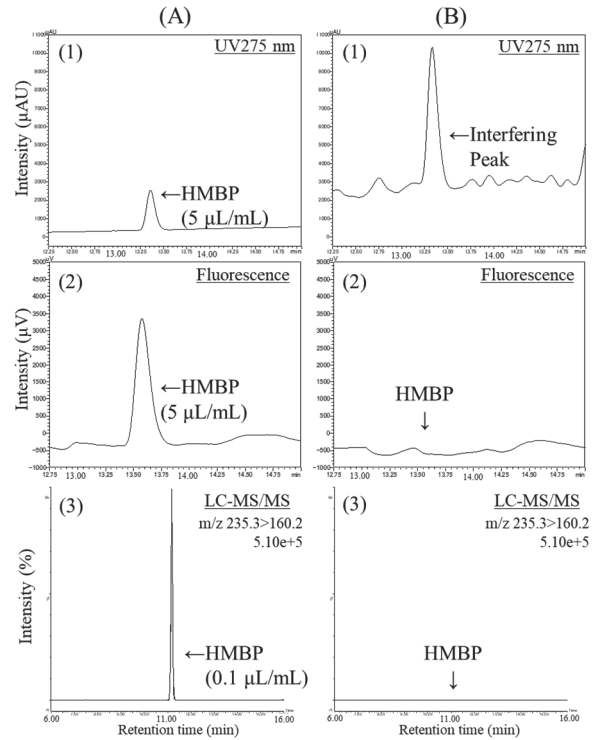


Fig. 3. Chromatograms of (A) antioxidant standard solution and (B) sample solution of dried small sardine

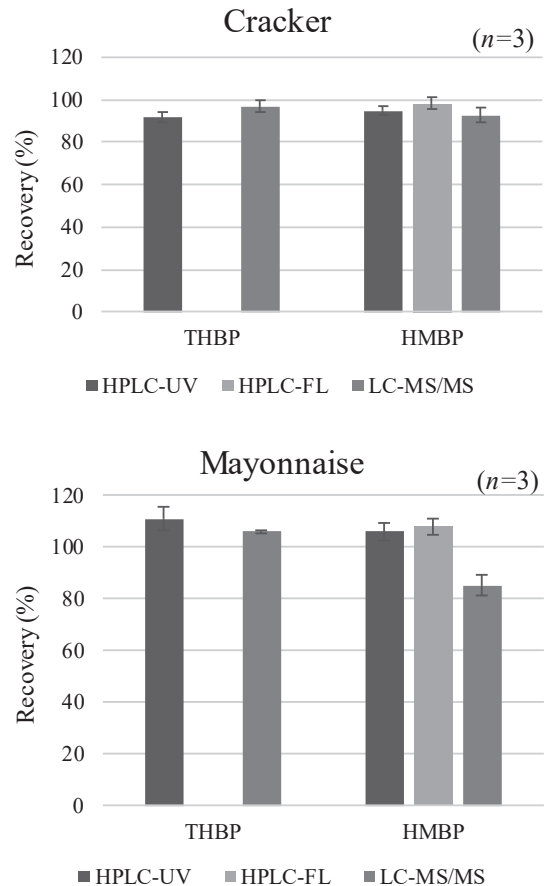


Fig. 4. Effect of analytical methods on each recovery of THBP and HMBP from foods

Table 2. Validation results of antioxidants in foods with PDA and fluorescence detector

Detector	Analytes	Spiked concentration (g/kg)	Cracker			Mayonnaise			
			Trueness (%)	RSD _F (%)	RSD _{WR} (%)	Trueness (%)	RSD _F (%)	RSD _{WR} (%)	
PDA (UV 275 nm)	PG	0.02	95.6	1.2	2.4	98.1	3.7	3.9	
		0.2	98.0	1.5	1.5	99.7	3.1	3.2	
	THBP	0.02	97.7	1.3	2.4	99.5	3.0	3.4	
		0.2	99.1	1.4	1.5	101	3.1	3.2	
	TBHQ	0.02	94.6	1.8	4.4	97.6	2.7	6.2	
		0.2	99.7	1.6	1.6	99.7	3.5	3.5	
	BHA	0.02	98.3	1.3	2.3	99.1	2.2	2.7	
		0.2	99.8	1.4	1.4	101	3.2	3.2	
	HMBP	0.02	98.6	1.4	2.3	99.9	2.3	2.8	
		0.2	99.9	1.4	1.5	102	3.2	3.2	
	BHT	0.02	96.0	1.2	2.4	90.5	2.8	4.7	
		0.2	98.6	1.7	1.7	94.4	3.7	3.7	
	Fluorescence	TBHQ	0.02	95.4	1.5	4.2	95.4	2.7	5.9
			0.2	101	1.6	1.6	100	3.4	3.4
BHA		0.02	99.4	1.3	2.4	100	2.2	2.9	
		0.2	101	1.3	1.4	103	3.1	3.1	
HMBP		0.02	101	0.8	2.1	101	4.8	6.6	
		0.2	101	1.4	2.3	102	3.6	3.6	
BHT		0.02	95.3	1.6	3.1	91.8	2.7	5.1	
		0.2	99.8	1.7	1.7	95.9	3.6	3.6	

RSD_F : RSD of repeatability.

RSD_{WR} : RSD of within laboratory reproducibility.

の1/10未満であり、選択性に問題がないことを確認した。

3) 真度及び精度

0.02 g/kg及び0.2 g/kgで添加回収試験を実施した結果をTable 2に示す。添加濃度0.02 g/kgで真度90.5–101%、併行精度0.8–4.8%、室内精度2.1–6.6%、添加濃度0.2 g/kgで真度94.4–103%、併行精度1.3–3.7%、室内精度1.4–3.7%とすべての項目でガイドライン⁷⁾の目標値に適合した。

ま と め

輸入食品中の指定外添加物の検査体制を強化するため、油脂を含む食品中のTHBP及びHMBPの分析法について検討した。HMBPは、TBHQ同様HPLC-UVとHPLC-FLの併用により高感度で検出可能となり、定量限界を0.005 g/kgに設定することが可能となった。LC-MS/MS測定条件を検討したことで、THBPのピーク形状改善や良好な直線性のある検量線を得た。検討した条件でHPLC-UV、HPLC-FL及びLC-MS/MSを用いて添加回収試験を行ったところ、いずれの検出器においても良好な回収率であった。HPLC-UVによる測定で食品由来の妨害成分により判定が困難な場合には、HPLC-FL及びLC-MS/MSによる定性及び定量が有用であることを示唆した。また、酸化防止剤6種についてHPLC-UV及びHPLC-FLによる定量法の性能評価を行った結果、すべての分析対象物質でガイドライン⁷⁾の目標値を満たし、定量法として信頼性が担保されていた。以上より、本法は日常検査への導入が可能であることを示した。

文 献

1) 日本食品添加物協会編：新世界の食品添加物概説<第3版>、362–416, 2022, 日本食品添加物協会, 東京。

- 2) 厚生労働省：違反事例,
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html (2025年7月31日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) 厚生労働省：回収情報, 整理番号RCL202500352,
https://ifas.mhlw.go.jp/faspub/IO_S020501.do?_Action=_a_sel02Action (2025年7月31日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長, 厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長：健生食基発1023第1号, 健生食監発1023第1号, 「食品中の食品添加物分析法」の改正について, 令和5年10月23日。
- 5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2020, 367–370, 2020, 日本薬学会, 東京。
- 6) 日本食品衛生協会編：第2版食品中の食品添加物分析法2000, 371–372, 2000, 日本食品衛生協会, 東京。
- 7) 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長, 厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長：健生食基発0308第1号, 健生食監発0308第1号, 「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」の作成及び「第2版 食品中の食品添加物分析法」の改正について, 令和6年3月8日。
- 8) 見上葉子, 高木優子, 宮川弘之, 他：食衛誌, **63**, 12–19, 2022。
- 9) 脇山ひとみ, 赤木浩一：福岡市保健環境研究所報, **39**, 95–97, 2014。

Examination and Validation of an Analytical Method for Detecting Phenolic Antioxidants in Foods

Eri SATO^a, Ayako ITO^a, Akiko YASUI^a, Rina NAKAMURA^a, and Kenji OTSUKA^a

Using high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), we determined the levels of two phenolic antioxidants (2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP) and 2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxymethylphenol (HMBP)) in food samples. The use of neither antioxidant is permitted in Japan. Pretreatment was performed and an HPLC-ultraviolet (UV) method was employed following the “butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole, and propyl gallate” analytical method outlined in the “Analytical Methods for Food Additives in Foods” issued by the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan. The recovery test results showed good qualitative and quantitative capabilities of HPLC-UV (275 nm), HPLC-fluorescence (FL), and LC-MS/MS methods. The HPLC-UV and HPLC-FL methods were validated via recovery tests of crackers and mayonnaise conducted by two analysts. Two parallel runs were executed over three consecutive days using two concentration values (0.02 and 0.2 g/kg) of six antioxidants, including three antioxidants permitted in Japan and THBP, HMBP and *tert*-butylhydroquinone, which are forbidden in Japan. The selectivities were sufficient with trueness, repeatability, and within-laboratory reproducibility estimates of 90.5%–103%, <4.8%, and <6.6%, respectively. These values meet the criteria set in the validation guidelines for food-additive analysis in Japan, suggesting that the analytical method is suitable for routine testing.

Keywords: antioxidant, 2,4,5-trihydroxybutyrophenone, 2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxymethylphenol, HPLC-UV, HPLC-FL, LC-MS/MS

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan