

マーケットバスケット方式による BHT, BHA, 没食子酸プロピルの摂取量調査* — 2008年度 —

古謝あゆ子・大城直雅・佐久川さつき・玉城宏幸

Studies on Daily Intake of BHT, BHA and Propyl Gallate by Market Basket Method (2008)*

Ayuko KOJA, Naomasa OSHIRO, Satsuki SAKUGAWA and Hiroyuki TAMAKI

要旨: 国立医薬品食品衛生研究所および6つの地方衛生研究所の共同研究「食品添加物の一日摂取量調査」の一環として、酸化防止剤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)、没食子酸プロピルの調査を行った。マーケットバスケット試料を調査した結果、BHTの一日摂取量は0.0077 mg/人となった。BHA、没食子酸プロピルは全ての試料で定量限界以下となった。

Abstract: Daily intakes of artificial antioxidants, butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA) and propyl gallate were studied as a part of the collaborative research, studies of daily intake of food additives with National Institute of Health Sciences and six local public health institutes in fiscal year 2008. The market basket samples were analyzed. The concentrations of BHA and propyl gallate of all samples were lower than quantification limits. The daily intake of BHT was estimated as 0.0077 mg/person.

Key word: 食品添加物 food additive, 酸化防止剤 antioxidant, ジブチルヒドロキシトルエン butylated hydroxytoluene, ブチルヒドロキシアニソール butylated hydroxyanisole, 没食子酸プロピル propyl gallate, マーケットバスケット方式 market basket method, 一日摂取量 daily intake

I はじめに

マーケットバスケット方式による食品添加物の一日摂取量調査は厚生省食品化学課、国立衛生試験所大阪支所が中心となって1981年度から継続実施されており、2000年度から2年間の中断を経た後、2002年度より、厚生労働省食品保健部基準課の事業として国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研)および6つの地方衛生研究所が参加して再開された。その後、2006年度からは食品リストを改め、特定保健食品を追加して調査を続けている。

2008年度は酸化防止剤、防ばい剤、品質保持剤の一日摂取量調査を実施し、沖縄県は酸化防止剤である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)、没食子酸プロピルを担当した。

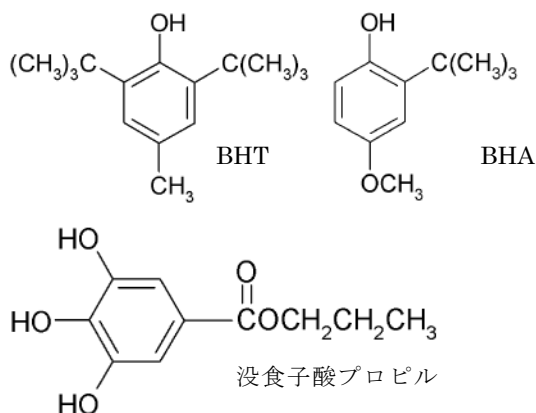


図1. BHT, BHA, 没食子酸プロピルの構造式

*本研究は厚生労働省医薬局食品保健部食品添加物一日摂取量調査費によって実施した。

表 1. 食品群の分類および一日喫食量

群番号	食品群名	食品数	品目数	一日喫食量
1群	調味嗜好飲料	41	83	511.7
2群	穀類	37	48	107
3群	いも類・豆類・ 種実類	26	30	86.1
4群	魚介類・肉類	33	53	57.6
5群	油脂・乳類	21	43	44.5
6群	砂糖類・菓子類	27	53	17.9
7群	果実類・野菜類 ・海草類	29	33	26.6
8群	特定保健用食品	3	7	3.9
	合計	217	350	855.3

ており、これまでの調査で試験に用いるプラスチックからの溶出がたびたび指摘されてきた¹²⁾ため、今回は事前に溶出状況について確認した。また、試験法についても検討および見直しを行い、これらをもとに BHT, BHA, 没食子酸プロピルの一日摂取量を求めたので報告する。

II 方法

1. 参加機関

国立衛研、札幌市衛生研究所、仙台市衛生研究所、東京都健康安全研究センター、香川県環境保健研究センター、長崎市保健環境試験所、沖縄県衛生環境研究所

2. 試料

調査は、2005 年、2006 年の国民栄養調査及び平成 15 年の国民健康・栄養調査データに基づき国立衛研が作成した加工食品分別リストを元に行った。使用した食品数は 217、製品の総数は 350 で、これを表 1 に示した 8 つの食品群に分類した。各群の食品は国立衛研を除く地方衛生研究所 6 機関が地元で購入、それぞれの食品の規定量を採取して 1 群と 8 群はそのまま、2～7 群は同量の水を加えて、ミキサーで食品群ごとに混合均一化し、プラスチック容器に小分けし、-20℃で保存した。また、試料購入の際、表示に調査対象項目がある製品については、混合用試料とは別に購入して個別試料とし、それぞれ担当機関に送付した。なお、個別試料の中に、BHT, BHA, 没食子酸プロピルの表示がある製品はなかった。

3. 試薬

標準品として、関東化学(株)製の BHT 標準品、BHA 標準品、没食子酸プロピル標準品を用いた。C18 カートリッジカラムは Waters 製 SepPak Vac 3 cc (500 mg) を用いた。試薬は、特級アセトニトリルに微量の BHT が

含まれている可能性があるため²⁾、アセトニトリル、メタノール、蒸留水については高速液体クロマトグラフ用を、エタノール、2-プロパノール、無水硫酸ナトリウムについては残留農薬測定用(5000 倍)を用いた。

4. 容器等からの BHT 溶出の確認

(1) プラスチック容器

BHT はポリプロピレンなどのプラスチック中に酸化防止剤として添加されており、1991 年度に行われた一日摂取量調査の報告書¹⁾によれば、プラスチック容器から試料への BHT の移行が示唆されている。今回、調査に先立ち、調査に用いるプラスチック容器(国立衛研より配布)からの BHT の溶出について簡易的に確認試験を行った。溶出溶媒として n-ヘキサン(残留農薬用 5000 倍濃縮)を用い、容器の内部に 100ml を満たし、1 時間放置後、ヘキサン中の BHT 濃度を調べた。

(2) カートリッジカラム

2004 年度の調査では、精製に用いたカートリッジカラムからの BHT の溶出が確認されている²⁾。今回、調査に用いるカートリッジカラムについて、洗浄無し、アセトニトリルで洗浄、アセトンで洗浄の三つの条件で、アセトニトリルを通過させ、BHT の濃度を調べた。

5. 前処理法の検討

(1) カートリッジカラムによる精製

カートリッジカラムによる精製について、既報²⁾では、抽出試料を 10 ml の水で希釈してカラムに負荷し、水 10 ml でカラムを洗浄した後、0.5%酢酸含有 30%アセトニトリル 9 ml で没食子酸プロピルを溶出させ、さらにアセトニトリル 9 ml で BHA, BHT を溶出させる。今回、予備試験と同条件で各酸化防止剤の添加回収試験を行ったところ、一部試料の回収率が低下した。そのため、カートリッジカラムにおける精製条件を検討した。

(2) 低脂肪群における前処理法

予備試験において、1 群(調味嗜好飲料)、7 群(果実類、野菜類、海草類)、8 群(特定保健用食品)といった油脂分の少ない試料(以下低脂肪群とする)において、添加回収率がそれぞれ 19%、69%、31%と低くなった。そこで、最も低回収率となった 1 群を用いて、BHT の減少する原因について検討を行った。

6. 分析条件

定量は、没食子酸については HPLC/DAD(ダイオードアレイ検出器)を、BHT および BHA については GC/MS を用いた。HPLC、GC/MS の分析条件を表 2 および表 3

表 2. HPLC 測定条件

装置 : Agilent 1100 series DAD G1315B
カラム : Inertsil ODS-2 (5 μm, φ4.6×150 mm)
移動相 : A 液 アセトニトリル・メタノール混液(1:1)
B 液 5%酢酸
A 液・B 液混液(3:7)
流速 : 1.0 ml/分 温度 : 40 °C
測定波長 : 280 nm, 310 nm
注入量 : 20 μl

表 3. GC/MS 測定条件

装置 : 日本電子 JMS-K9
カラム : HP-5MS(30 m×0.25 mm 膜厚 0.25 μm)
注入口温度 : 250 °C 検出器温度 : 250 °C
カラム温度 : 100 °C-25 °C/分-250 °C(15 分)
キャリアガス : He 0.9 ml/分
試料注入法 : パルスドスプリットレス
注入量 : 2 μl
モード : SIM
定量イオン m/z 165(BHA), m/z 220(BHT),
確認イオン m/z 180,137 (BHA),
m/z 205,206(BHT)

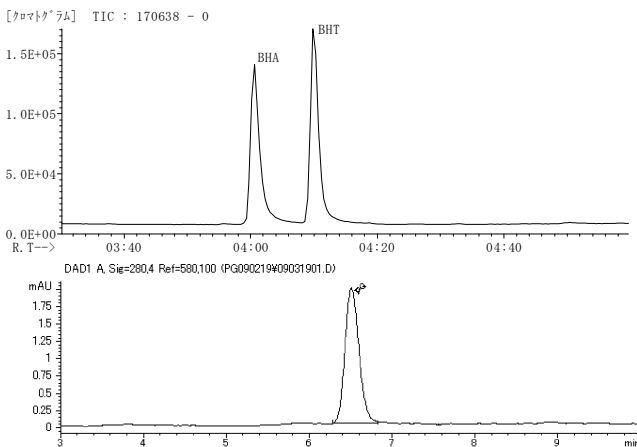


図 2. BHT, BHA 標準液(0.05μg/ml)の GC/MS クロマトグラム(上)および没食子酸プロピル標準液(0.5μg/ml)の HPLC/DAD クロマトグラム(下)

に、標準液のクロマトグラムを図 2 に示した。

7. 検出限界および定量限界

日本工業規格(JIS) 高速液体クロマトグラフィー通則に従い、標準溶液の繰り返し注入により検出限界および定量限界を求めたところ、試験液濃度として、BHT で

検出限界 0.00008 μg/ml, 定量限界 0.0004 μg/ml, BHA で検出限界 0.0001 μg/ml, 定量限界 0.0006 μg/ml, 没食子酸プロピルで検出限界 0.01 μg/ml, 定量限界 0.07 μg/ml となった。

III 結果および考察

1. 容器等からの BHT 溶出の確認

(1) プラスチック容器

プラスチック容器からの BHT 溶出について検討を行った。容器に 100ml のヘキサンを満たし、1 時間放置してヘキサン中の BHT を測定したところ、BHT は検出限界以下となった。そのため、今回の試験においてはプラスチック容器の影響は少ないものと思われた。なお、前処理においても、用いる器具はガラスもしくは金属製とし、プラスチックの使用を控えた。

(2) カートリッジカラム

前処理に使用するカートリッジカラムカートリッジカラム(2008 年 4 月購入品)からの BHT の溶出について検討したところ、結果は表 4 のとおりとなった。カラムを洗浄せずに、アセトニトリル 3ml を通過させたところ、アセトニトリル中の BHT 濃度は、0.03 μg/ml となり、カラムから微量の BHT が溶出することが確認された。しかし、アセトニトリルまたはアセトン 20 ml でコンディショニングを行った後の溶出液の BHT 濃度は定量限界(0.0004 μg/ml)未満となり、前回の調査時(約 0.05 μg/ml)と比較して減少した。これらの結果から、現在販売されているカートリッジカラムは以前のものよりも BHT の溶出量が下がっていることが確認された。

なお、試料測定時において、試料と同じ条件下でブランクテストを行ったが、痕跡量程度(0.00008 μg/ml ~ 0.0004 μg/ml)のピークは確認されたものの、定量限界を超えるピークは見られなかった。

表 4. カートリッジカラムを通したアセトニトリル(3ml)中の BHT 濃度

洗浄	濃度
なし	0.03 μg/ml
アセトニトリル 20 ml	<0.0004 μg/ml
	0.05 μg/ml*
アセトン 20 ml	<0.0004 μg/ml

*2004 年調査時²⁾

2. 前処理法の検討

(1) カートリッジカラムによる精製

予備試験において、BHT および没食子酸プロピルの回収率が一部試料で低下したため、カートリッジカラムの精製条件について検討を行った。

没食子酸プロピルについては、2 群試料への添加回収試験において、回収率が 1 回目で 79%、2 回目で 45% となり、大きなばらつきが見られた。そのため、カラム負荷時に試料液を希釈する蒸留水の量が、没食子酸プロピルのカラム吸着に十分ではないと考え、蒸留水の量を 10 ml から 20 ml に増やしたところ、回収率は 83 ~ 93% と向上した。

BHT については、3 群試料への添加回収試験において、既報に従いアセトニトリル 9 ml で溶出したところ、添加量の 75% が回収された。さらに溶出後のカートリッジカラムにアセトニトリル 10 ml を通過させたところ、アセトニトリル中に添加量の 12% が含まれていることが確認された。そこで、BHT の回収率向上のため、

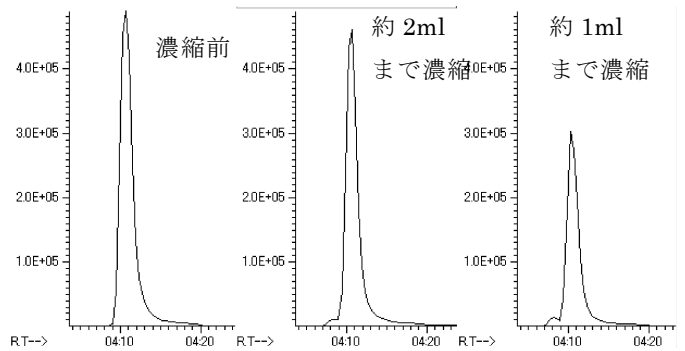


図 3. 1 群中に添加した BHT の濃縮時の減少

溶出に用いるアセトニトリルの量を 9 ml から 19 ml へ変更した。

(2) 低脂肪群における前処理法

予備試験において BHT の回収率が著しく低くなった 1 群試料について、前処理の各過程における BHT の含量の変化を調べたところ、BHT の減少は抽出後の濃縮時に起きていることが示唆された。抽出液 10 ml を濃縮

混合試料 5.0g

- アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール(2:1:1)混液(以下混合溶媒とする)50ml
- 無水硫酸ナトリウム 10g
- ホモジナイズ(10分)

(2 ~ 6 群)

(1,7,8 群)

- 20℃の冷凍庫内で2時間以上冷却
- ガラス繊維ろ紙(whatman GMF-150 46mm)で素早く冷時減圧ろ過
- 残渣を混合溶媒 5 ml×3 で洗浄
- 減圧濃縮(<1ml)
- 蒸留水 20ml

- ガラス繊維ろ紙(whatman GMF-150 46 mm)で減圧ろ過
- 残渣を混合溶媒 5 ml×3 で洗浄
- 減圧濃縮(2 ~ 3 ml まで)
- 4 ml に定容
- 2 ml 採取し、蒸留水で 25 ml に希釈

SepPak Vac C18 500 mg(waters) に負荷 (あらかじめアセトニトリル 20 ml, 蒸留水 10 ml で洗浄)

- 蒸留水 10 ml でカートリッジを洗浄
- 0.5%酢酸含有 30%アセトニトリル 9 ml で容器を洗浄しながら溶出(画分1)
- アセトニトリル 19 ml で容器を洗浄しながら溶出(画分2)

画分1

画分2

- 0.5%酢酸含有 30%アセトニトリルで
- 正確に 10 ml とする

- アセトニトリルで正確に 20 ml とする

没食子酸プロピル溶出液

BHT・BHA 溶出液

HPLC 分析

GC/MS 分析

図 4. BHT, BHA, 没食子酸プロピルの試験液調製法

後、再び10 mlに定容してBHT濃度を比較したところ、2～3 mlまでの濃縮では、BHTの量にあまり変化はなかったが、1 mlほどまで濃縮すると、5割近く減少した(図3)。

これら低脂肪群については、抽出時に脱水を行うが、抽出後も若干の水分が残存する。そのため、濃縮の進行に伴い有機溶媒が蒸発し水分のみが残ることで、水に難溶で揮発性の高いBHTが失われた可能性がある。脂肪の多い群については、抽出時に冷却およびろ過による脱脂を行うが、抽出後も若干の油分が残っており、これが濃縮時に残存し、BHTの揮発を抑えていると考えられる。

これらのことから、今回、低脂肪群では濃縮を有機溶媒が完全に蒸発しない範囲にとどめ、2～3 mlまでとした。さらに、これら低脂肪群については、脂肪が多少

含まれる方がBHTの揮発を防ぐことができると考え、脱脂のための冷却操作を省略した。最終的な試験法を図4に示す。

3. 添加回収率

当所で調製したマーケットバスケット試料(1～8群)に、BHT, BHAの濃度が4µg/g、没食子酸プロピルの濃度が40µg/gとなるように添加し、添加回収試験を行った(n=3)。添加回収率はBHTで75.5～93.1%、BHAで87.8～97.5%、没食子酸プロピルは87.3～100.0%と良好な値となった(表5)。

4. 検出限界および定量限界

検出限界および定量限界は、BHTで検出限界0.0006 µg/g、定量限界0.003 µg/g、BHAで検出限界0.001 µg/g、定量限界0.005 µg/g、没食子酸プロピルで検出限界0.06µg/g、定量限界0.3 µg/gとなった(7群はその2倍の

表5. 添加回収試験の結果(n=3)

食品添加物名	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群	第8群	平均
	調味嗜好飲料	穀類	いも・豆・種実類	魚介類肉類	油脂類乳類	砂糖類菓子類	果実・野菜・海草類	特定保健用食品	
BHT	77.8	82.6	83.1	85.4	86.0	93.1	92.0	75.5	84.4
BHA	93.5	88.7	93.0	93.6	92.6	97.5	94.7	87.8	92.7
没食子酸プロピル	100.0	87.3	95.8	89.5	90.0	93.2	99.2	95.6	93.8

単位：%

表6. 各機関別・群別BHT含有量

機関名	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群	第8群
	調味嗜好飲料	穀類	いも・豆・種実類	魚介類肉類	油脂類乳類	砂糖類菓子類	果実・野菜・海草類	特定保健用食品
札幌	0.000	0.004	0.006	0.236	0.014	0.043	0.007	0.000
仙台	0.003	0.005	0.007	0.036	0.014	0.027	0.008	0.000
東京	0.000	0.005	0.006	0.051	0.010	0.045	0.000	0.000
香川	0.000	0.016	0.018	0.045	0.017	0.024	0.008	0.000
長崎	0.000	0.004	0.006	0.047	0.019	0.015	0.008	0.003
沖縄	0.005	0.004	0.014	0.018	0.016	0.049	0.000	0.000
平均値	0.001	0.006	0.009	0.072	0.015	0.034	0.005	0.001

単位：µg/g

表7. 各機関別・群別BHT一日摂取量

機関名	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群	第8群	総摂取量
	調味嗜好飲料	穀類	いも・豆・種実類	魚介類肉類	油脂類乳類	砂糖類菓子類	果実・野菜・海草類	特定保健用食品	
札幌	0.0000	0.0004	0.0005	0.0136	0.0006	0.0008	0.0002	0.0000	0.0160
仙台	0.0018	0.0005	0.0006	0.0021	0.0006	0.0005	0.0002	0.0000	0.0062
東京	0.0000	0.0005	0.0005	0.0030	0.0004	0.0008	0.0000	0.0000	0.0052
香川	0.0000	0.0017	0.0016	0.0026	0.0007	0.0004	0.0002	0.0000	0.0072
長崎	0.0000	0.0005	0.0005	0.0027	0.0009	0.0003	0.0002	0.00001	0.0050
沖縄	0.0024	0.0005	0.0012	0.0011	0.0007	0.0009	0.0000	0.0000	0.0067
平均値	0.0007	0.0007	0.0008	0.0042	0.0007	0.0006	0.0001	0.000002	0.0077

単位：mg

濃度)。

5. マーケットバスケット試料測定結果(表6～7)

BHTはすべての食品群から微量検出された。今回購入した食品にBHTの表示のあるものはなく、BHTは天然には存在しないため、原料のキャリーオーバーもしくは加工に用いた器具や容器からの移行が原因として考えられる。含有量は4群(魚介類・肉類)が最も高く、次いで6群(砂糖・菓子類)が高い値を示した。1群(調味嗜好飲料)、8群(特定保健用食品)の含有量は低く、定量限界を上回ったのは6機関中1～2試料のみだった。また、札幌4群は、BHTの含有量が0.236 µg/gと他機関4群の含有量(0.018～0.051 µg/g)よりも一桁高い値となった。なお、今回カートリッジカラムからのBHT溶出が定量限界以下となったため、ブランクの差引は行わなかったが、試料からの検出が定量限界(0.003 µg/g)と同程度のもも多く、カートリッジカラムからの溶出(<0.002 µg/g)が寄与している可能性がある。

BHAはいずれの食品群からも検出されなかった。

没食子酸プロピルは、HPLCの測定において一部の試料にピークが検出されたが、UVスペクトルが標準品と異なるため、LC/MS/MSによる確認を行ったところ、ピークの主成分が夾雑物であることが確認された。

マーケットバスケット試料の含有量から求めたBHTの一日摂取量は0.0077 mg/人となった。BHT摂取量で最も寄与率の高い食品群は4群(魚介類・肉類)であり、全体の5割強を占めた。機関別に見ると、4群試料の含有量の高かった札幌が最も摂取量が高く、他の機関の摂取量の間に大きな差は見られなかった。BHA、没食子酸プロピルはそれぞれ0 mg/人となった。

6. 一日摂取量の推移

BHT、BHAのマーケットバスケット試料から求めた一日摂取量と過去のデータ^{1)~3)}との比較を図5に示した。

BHTの一日摂取量は1991年に増加し、その後は減少傾向にある。文献¹⁾によると、1991年の増加については、検出限界値が1987年の1 µg/gから0.05 µg/gに引き下げられ、定量感度の上昇により、これまで検出限界以下とされていた試料中のBHTの測定が可能になったためとしている。

BHAの摂取量に関しては、2004年度を除くと低水準で移行しており、今年は全く検出されず、0 mgとなった。2004年度は4群試料の一つが極端に高い値を示したため、全体の摂取量が引き上げられ、ほかの年と比較して高い値となっている²⁾。

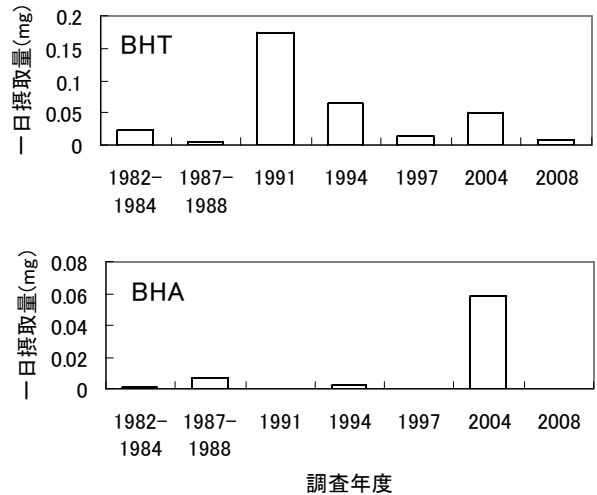


図5. BHT, BHA 摂取量の年次推移

(1997年以前のデータは文献³⁾による)

2004年度から測定を始めた没食子酸プロピルは前年に引き続き摂取量0 mgとなった。

7. ADI との比較

BHTのADIは0.3 mg/kg 体重/dayであり、体重50 kgの成人に対する一日許容量は15 mgである。本調査で求めたBHT一日摂取量0.0077 mgはADIのおよそ0.05%となり、人の健康に対して問題ない値と言える。

IV まとめ

酸化防止剤BHT, BHA, 没食子酸プロピルの一日摂取量を調査した。BHTは全ての食品群から検出され、一日摂取量は0.0077mg/人となった。これはBHTのADIの0.05%であり、人の健康に影響を及ぼす量ではない。また、BHA、没食子酸プロピルは全ての食品群で定量限界以下となった。

V 参考文献

- 1) 厚生省生活環境局食品化学課(1994)平成3年度及び平成4年度食品添加物の1日摂取量調査に関する研究, 324pp.
- 2) 古謝あゆ子・玉那覇康二(2005)マーケットバスケット方式によるBHT, BHA, 没食子酸プロピルの摂取量調査. 沖縄県衛生環境研究所報, 39: 121-127.
- 3) 食品添加物学会編(2001)各論I マーケットバスケット調査対象食品添加物の摂取量. あなたが食べている食品添加物, 食品添加物協会, pp12-58.