

# フェノール性酸化防止剤の同時分析

## — 高速液体クロマトグラフ法, キャピラリー電気泳動法および ガスクロマトグラフ法による比較 —

河辺聡子\*<sup>1</sup> 藤井俊子\*<sup>1</sup>

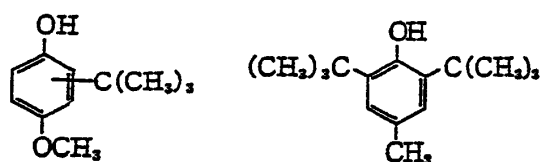
## 要 約

代表的な2種類のフェノール性酸化防止剤であるブチルヒドロキシアニソール (BHA) とジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の標準混合溶液を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフ法 (HPLC), ミセル動電クロマトグラフ法 (MEKC) およびキャピラリーガスクロマトグラフ法 (GC) により同時分析した。その結果, 分析時間は HPLC では22分, MEKC および GC では10分以内であった。ピーク面積で求めた回帰直線は3方法すべてで良好な直線性を示した ( $R^2 > 0.99$ )。検出限界量は3方法のうち MEKC が  $10^{-14}$  moles で最も小さかった。併行精度 (同一日の繰り返し性) または室内再現精度 (日を変えて測定する) についてみると, 併行精度を示す相対変動係数 (R.S.D., %) は移行または保持時間はすべて1%以下であった。ピーク面積の併行精度を示す R.S.D. は HPLC と GC では5%以下であったが MEKC では5%以上であった。室内再現精度 (R.S.D., %) は移行時間が MEKC では5%以下であったが, HPLC と GC では1%以下であった。ピーク高の室内再現精度を示す R.S.D. は MEKC で5%以下であった。以上の成績から, これら3方法はいずれも食品中の BHA と BHT の同時分析に適用できると思われる。

## 緒 言

我が国では, 食品添加物の酸化防止剤として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), 没食子酸プロピル, その他の計11種類が指定されている<sup>1)</sup>。酸化防止剤は油脂の酸敗を防止する目的で食品に添加されるものであるが, ある濃度を超えて食品に加えられたとき酸化促進剤となる傾向があることが知られている<sup>2,3)</sup>。酸化防止剤のうち, BHA についてみるとラットに高濃度に投与した場合胃ガンを引き起こすことが報告され<sup>4)</sup>, 厚生省は1982年に BHA の使用禁止を一度は通知した。しかし, 翌年になって使用禁止の施行が延期され, 現在にいたっている<sup>5)</sup>。最近では, BHA の投与が雌ラットの性ホルモン代謝に影響を及ぼすという報告<sup>6)</sup> もみられる。このように BHA は毒性等について疑問視されているので使用禁止措置をとる国もみられるが<sup>7)</sup>, 我が国では依然として比較的よく使用されている<sup>7,8)</sup>。一方, BHT は非発がん性物質であるとの結論がなされており, 比較的よく使用されている酸化防止剤であるが, これも使

用禁止措置をとる国がみられる<sup>7)</sup>。ところで, BHA と BHT (図1参照) はそれぞれ単独で用いられる場合と併用される場合があるので, 併用する場合には両方の和で使用量が制限されることになっている<sup>1)</sup>。したがって, 食品中の BHA と BHT の濃度を正確に把握することは, 食品衛生行政機関, 食品加工業者, 流通業者および消費者にとってきわめて重要である。



BHA

BHT

図1 Chemical structures of BHA and BHT.

BHA, BHT の同時分析法としては, 一般にガスクロマトグラフ法 (GC) が用いられ, パックドカラムによる BHA と BHT の同時分析<sup>9,10)</sup> 等があるが, 最近ではキャピラリーカラムを用いる場合が多い。しかし, キャピラリー GC による BHA と

\*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科  
(連絡先) 河辺聡子 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

BHTの同時分析<sup>12)</sup>はきわめて少ない。高速液体クロマトグラフ法(HPLC)では、紫外検出(UV)<sup>13,14,15)</sup>、蛍光検出<sup>16)</sup>および電気化学検出(ECD, electrochemical detector)<sup>17,18)</sup>等によるものが数多く報告されているが、分析操作、分析時間等を考慮するとECD検出に利点が多い<sup>17,18)</sup>。また、近年発展しているキャピラリー電気泳動法(HPCE)では、4種類のフェノール性酸化防止剤の同時分析<sup>14)</sup>を実施して、HPCEはHPLCよりも分析時間が短く、分析効率が高いことを報告している。しかしながら、BHAとBHTの同時分析法についてHPLC、HPCEおよびGCの分析法バリデーション等を比較した報告は見られない。

本研究では、食品中のBHAとBHTの濃度を測定する基礎資料を得る目的でHPLC-ECD、HPCEおよびキャピラリーGCによりBHAとBHTの標準溶液を同時分析し、ICH(日米EU三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議)による分析法バリデーション<sup>19)</sup>のうち直線性(Linearity)、検出限界(Detection limit)、併行精度(Repeatability)および室内再現精度(Intermediate precision)を測定し、分析法別に比較したので報告する。

## 方 法

1) 試薬: 四ほう酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , MW = 381.37, 試薬特級),  $\beta$ -シクロデキストリン [ $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_7$ , MW = 1135.00, 試薬一級,  $\beta$ -CD], ドデシル硫酸ナトリウム [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ , MW = 288.38, 試薬一級, SDS] およびりん酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , MW = 136.09, 試薬特級) およびエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (MW = 372.24, EDTA-2Na), ブチルヒドロキシアニソール [A mixture of 2- and 3-isomers,  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$ , MW = 180.25] およびジブチルヒドロキシトルエン [2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol,  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ , MW = 220.35] は和光純薬工業株式会社製を、蒸留水(HPLC用), 1mol/Lおよび0.1 mol/L水酸化ナトリウム(NaOH, MW = 40.00), アセトニトリル( $\text{CH}_3\text{CN}$ , MW = 41.05, HPLC用), メタノール( $\text{CH}_3\text{OH}$ , MW = 32.04, HPLC用), アセトン( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , MW = 58.08, HPLC用) およびりん酸( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , MW = 98.00, 試薬特級)はナカライテスク株式会社製を用いる。

### 2) 標準試料の調製

(1) HPLC: 各BHA, BHT原液は、いずれも1.0mg/mLとする。すなわち、BHAとBHTをそれぞれ10.0mg精秤し、70%メタノールで

10.0mLに定容する。標準溶液は、分析時に原液から70%メタノールで各濃度に希釈する。その後、メンブランフィルター(DISMIC-25HP, 0.02 $\mu\text{m}$ , 東洋濾紙株式会社製、以後フィルターはこれを用いる)を用いて濾過し、超音波洗浄器で10分間脱気したものをを用いる。

- (2) HPCE: 各BHA, BHT原液は、いずれも1.0mg/mLとする。すなわちBHAとBHTをそれぞれ100.0mg精秤し、少量のメタノールで溶解後、メタノールで100mLに定容する。標準溶液は、分析時に原液から最終的に50%メタノール溶液になるように水で希釈し、メンブランフィルターを用いて濾過し、超音波洗浄器で10分間脱気したものをを用いる。
- (3) GC: 原液は、BHA, BHTのいずれも1.0mg/mLとする。すなわちBHAとBHTを各10.0mg精秤し、アセトンで10mLに定容する。標準溶液は、分析時に原液からアセトンで希釈したものをを用いる。

### 3) 移動相および泳動溶液の調製法

- (1) HPLC用移動相: 蒸留水: アセトニトリル: メタノール: りん酸 = 300: 350: 350: 5の混合液に、EDTA-2Naを0.1mMになるように加える。
- (2) HPCE用泳動溶液: HPCEでは泳動溶液にSDSを入れない中空キャピラリー電気泳動法(CZE)とSDSを入れるミセル動電クロマトグラフ法(MEKC)のモードがある。本研究はMEKCモードで行う。MEKCに用いる泳動溶液は、四ほう酸ナトリウム0.763g(20mM)に少量の蒸留水を入れてスターラーを用いて溶解し、100mLに定容する(pH9.35)。この液に $\beta$ -シクロデキストリン1.703g(15mM)を加えてスターラーを用いて溶解する。この液100mLにSDSを0.721g(25mM)添加し、スターラーを用いて溶解する。その後、メンブランフィルターを用いて濾過し、超音波洗浄器で30分間脱気したものを泳動溶液とする。

### 4) 分析装置および分析条件

- (1) HPLC 分析装置: 島津製作所株式会社製 CLASS-LC10/M10A; 送液ユニット, LC-9A; 脱気装置, DGU-14A; カラムオーブン, CTO-10A; オートインジェクター, SIL-10ADVP; コミュニケーションバスモジ

ユール, CBM-10A; 検出器, 電気化学検出器 SI-2/3005 (electrochemical detector, ECD, 資生堂株式会社製); カラム, CAPCELLPAK C18 MG 5 $\mu$ m (3.0mm I.D.×250mm L, 資生堂株式会社製). 分析条件: 測定温度, 50 $^{\circ}$ C; 流速, 0.7mL/min; 電圧, 800mV.

- (2) HPCE 分析装置: フォトダイオードアレイ検出器 (512ch) 付きキャピラリー電気泳動装置 (CAPI-3001, 大塚電子株式会社製); キャピラリー, 熔融シリカ製 (75 $\mu$ m I.D.×500mm L). 分析条件: 印加電圧, 15kV; 測定温度, 25 $^{\circ}$ C; 測定波長, 200nm; 注入量, 約10nL (落差方式 15mm×30sec).
- (3) GC 分析装置: Hewlett Packard 社製 6890 Series; 検出器, FID; キャピラリーカラム, HP-5 [Crosslinked 5% PH ME Siloxane, Hewlett Packard 社製 (膜厚0.25 $\mu$ m, 内径0.32mm, 長さ30m)]. 分析条件: 注入方法, スプリットレス; カラム温度, 120 $^{\circ}$ C (1min)  $\rightarrow$  (7 $^{\circ}$ C/min)  $\rightarrow$  170 $^{\circ}$ C (2min); 注入口および検出器温度, 300 $^{\circ}$ C; キャリアガス, He; 注入量, 1 $\mu$ L.

## 5) 分析法バリデーション

- (1) 検量線の作成: HPLC では BHA が 0.05~0.8 $\mu$ g/mL, BHT が 0.5~8 $\mu$ g/mL の濃度範囲で, MEKC では BHA, BHT とともに 10~50 $\mu$ g/mL および 2~10 $\mu$ g/mL の濃度範囲で, GC では BHA, BHT 共に 0.5~8 $\mu$ g/mL の濃度範囲でピーク面積による 5 点検量を行い回帰直線と相関係数を求める.
- (2) 検出限界 (LOD): ノイズの平均値の 3 倍値をシグナルとして, 検量線より検出限界濃度を算出する. 検出限界量は検出限界濃度に注入量に乗じたものとする.
- (3) 併行精度 (Repeatability): HPLC では, BHA の 0.2 $\mu$ g/mL と BHT の 2 $\mu$ g/mL の混合溶液を, MEKC ではともに 10 $\mu$ g/mL の混合溶液を, GC ではともに 2 $\mu$ g/mL の混合溶液について, 分析法の全操作をつづけて 9 回測定する. 時間, ピーク面積およびピーク高について相対変動係数 (R.S.D., %) を算出し併行精度とする.
- (4) 室内再現精度 (Intermediate precision): HPLC は BHA の 0.1 $\mu$ g/mL と BHT の 1 $\mu$ g/mL の混合溶液を, MEKC ではともに 10 $\mu$ g/mL の混合溶液を, GC ではともに 1 $\mu$ g/mL の混合溶液について測定日また測

定時間帯を変えて HPLC と GC は 7 回測定 (1 測定 3 回施行), MEKC は 3 回測定 (1 測定 3 回施行) し, 時間, ピーク面積, ピーク高について相対変動係数 (R.S.D., %) を算出し室内再現精度とする.

## 結果および考察

### 1) HPLC の電圧の設定

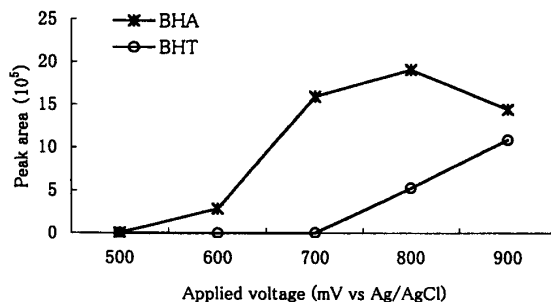


図2 Response of BHA and BHT to electrochemical detector in different potentials applied.

HPLC の最適電圧を設定するために, BHA が 0.8 $\mu$ g/mL, BHT が 8.0 $\mu$ g/mL の標準溶液について 100mV 間隔で 500mV から 900mV までのピーク面積を測定し図 2 に示す. BHA, BHT の同時分析が可能である 800mV と 900mV のうち, 設定時間が短い 800mV を測定電圧とした.

### 2) BHA と BHT の分離

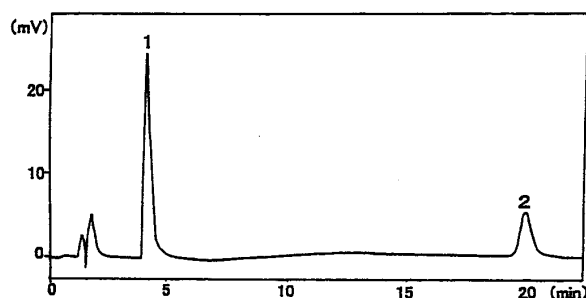


図3 High-performance liquid chromatogram of BHA and BHT.

Sample: 0.2 $\mu$ g/mL of BHA and 2.0 $\mu$ g/mL of BHT.  
 Buffer: 0.1mM EDTA-2Na in the mixtures of H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN : CH<sub>3</sub>OH : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 300 : 350 : 350 : 5.  
 Peaks: 1; BHA, 2; BHT.

図 3 に HPLC のクロマトグラムを示す. BHA と BHT の分析感度を UV, ECD, 蛍光の 3 種類で比較した結果, ECD が最も高かったという報告<sup>17)</sup> がみられたので, 本研究では, ECD 検出を用いた. これまで BHA と BHT の同時分析は, UV 検出では溶媒のグラジエント溶出を行う場合が多く, 分析

時間が約16~25分程度<sup>13,14,15)</sup>であった。本 HPLC の分析時間は約25分要するが、グラジエント法を用いずに同時分析が可能である点が分析の簡便化に寄与すると思われる。また、本研究に用いた移動相は、LC アプリケーションデータ集 (資生堂, LC アプリケーションセンター, 1998年発行, 非売品) に記載されている他の化学物質分析用の移動相の組成を参考に数種類の組み合わせを施行した結果, BHA と BHT の同時分析用に試行したものである。しかし, 図3にみられるように, BHT の保持時間が長いので, 今後, 移動相の組成等をさらに検討する必要がある。また, 今回は, 微量分析に適したカラムとして直径3mm のマイクロカラムを用いたが, カラムの種類, サイズについても他のカラムと比較検討する必要があると思われる。

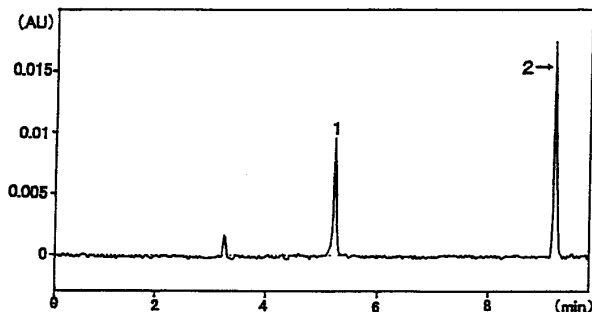


図4 Electropherogram of BHA and BHT.  
Sample: 40 $\mu$ g/mL of BHA and BHT.  
Buffer: 15mM $\beta$ -cyclodextrin and 25mM SDS in a 20mM sodium tetraborate.  
Peaks: 1; BHA, 2; BHT.

図4に BHA と BHT の MEKC フェログラムを示す。BHA と BHT は CZE モードで泳動した場合ほぼ同じ移行時間 (BHA が3.33分, BHT が3.37分) であったが, MEKC モードでは BHA と BHT は分離泳動した。一般に HPCE では, 加電圧と分析時間は反比例するので<sup>14)</sup>, 分析時間の短縮のためには, 加電圧を検討する必要がある。

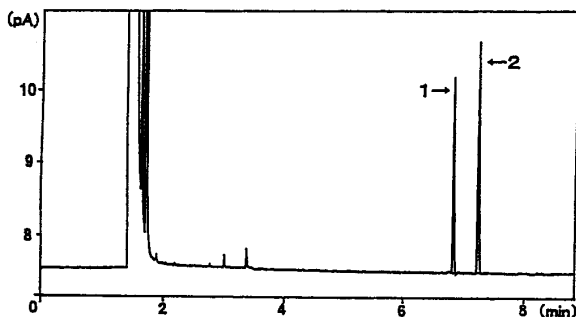


図5 Capillary gas chromatogram of BHA and BHT.  
Sample: 8 $\mu$ g/mL of BHA and BHT was injected.  
Conditions: see experimental.  
Peaks: 1; BHA, 2; BHT.

図5に, BHA と BHT の GC クロマトグラムを示す。BHA の保持時間は6.9分, BHT は7.3分であ

り, BHT が約16分, BHA が約17.3分とする報告<sup>12)</sup>に比して本法の方が分析時間は短かった。その理由は, カラム内径, 昇温プログラム等の差によるものと考えられる。

### 3) 分析法バリデーション

表1 Calibration graphs for BHA and BHT using HPLC-ECD, MEKC and GC.

	Regression Line	r	$\mu$ g/mL
BHA HPLC	$y = 2.9 \times 10^6 x - 0.006 \times 10^6$	0.9998	0.05~0.8
MEKC	$y = 3.9 \times 10^{-5} x + 1.9 \times 10^{-5}$	0.9975	10~50
GC	$y = 0.5674 x - 0.0075$	0.9999	0.5~8.0
BHT HPLC	$y = 0.11 \times 10^6 x - 0.0023 \times 10^6$	0.9999	0.5~8.0
MEKC	$y = 6.5 \times 10^{-5} x + 6.2 \times 10^{-5}$	0.9983	10~50
GC	$y = 0.6985 x + 0.0047$	0.9999	0.5~8.0

r: correlation coefficient.

表1に分析法別の BHA と BHT の回帰直線と相関係数を示す。表1に示す濃度範囲で BHA と BHT はともにいずれの分析方法でもきわめて良好な直線性を示したので, 3方法のいずれを用いても食品中の BHA と BHT の同時定量が可能であると考えられる。しかしながら, HPLC における BHT の濃度範囲は BHA に比して10倍大きいので, 両者が同程度の濃度範囲で測定するための方法を設定電圧, 移動相組成, カラムなどについて検討しなければならない。MEKC では試料の濃度範囲が HPLC や GC に比して大きいので, 2~10 $\mu$ g/mL の濃度範囲についても測定した結果, BHA は  $r=0.9951$ , BHT は  $r=0.9812$  の検量線が得られた。MEKC の場合には試料の注入量がきわめて少量 (10nl) であることにより, 希薄溶液調製にあたっては注意が必要である。

表2 Limits of detection of BHA and BHT.

Methods	Concentrations ( $\mu$ M)		Amounts detected (moles)	
	BHA	BHT	BHA	BHT
HPLC	0.03	0.53	$2 \times 10^{-13}$	$3 \times 10^{-12}$
MEKC	3.6	1.5	$3.6 \times 10^{-14}$	$1.5 \times 10^{-14}$
GC	0.16	0.03	$2 \times 10^{-13}$	$2.7 \times 10^{-14}$

Amounts detected calculated by multiplying injection volume times concentrations.

表2に BHA と BHT の検出限界濃度と検出限界量を示す。BHA の検出限界濃度は HPLC の0.03 $\mu$ M が最も低く, 次いで GC の0.16 $\mu$ M であった。一方, MEKC は3.6 $\mu$ M と最も高い値を示した。BHT の検出限界濃度は GC の0.03 $\mu$ M が最も低く, HPLC では0.53 $\mu$ M であった。MEKC では1.5 $\mu$ M で3方法のうち最も高い検出限界濃度を示した。

検出限界量 (moles) は検出限界濃度に注入量乗じて算出されるが, 検出限界量では MEKC が

BHA, BHT とともに最も少量であった。また、検出限界量については BHA が 93pg (0.5 picomoles), BHT が 810pg (3.7 picomoles) とする報告<sup>16)</sup> と比して, BHT の HPLC による値以外は本研究の成績が 1~2 桁小さかった。

表3 Repeatability of the results.

		$\mu$ g/mL	R. S. D. (%)		
			Time	Area	Height
HPLC	BHA	0.2	0.06	1.90	1.55
	BHT	2.0	0.08	2.86	2.16
MEKC	BHA	10.0	0.81	6.78	3.37
	BHT	10.0	0.92	9.73	5.34
GC	BHA	2.0	0.02	2.28	—
	BHT	2.0	0.02	1.92	—

—: not determined

表3に併行精度 (R.S.D.,%) を示す。分析時間は3方法のいずれも併行精度が1.0%以下であった。ピーク面積の併行精度は BHA, BHT とともに HPLC と GC では5.0%以下であったが, MEKC ではピーク高が BHA は5.0%以下であるのに対して BHT はそれより若干高かった。

表4 Intermediate precision of the results.

		$\mu$ g/mL	R. S. D. (%)		
			Time	Area	Height
HPLC	BHA	0.1	0.35	11.09	11.19
	BHT	1.0	0.79	9.64	8.28
MEKC	BHA	10.0	1.24	6.43	3.34
	BHT	10.0	2.24	4.27	2.74
GC	BHA	1.0	0.12	13.09	—
	BHT	1.0	0.10	17.05	—

—: not determined

表4に室内再現精度 (R.S.D.,%) を示す。分析時間の室内再現精度は3方法のいずれも5.0%以下であった。MEKCでは BHA と BHT のピーク高の室内再現精度が5.0%以下であったが, HPLC や GC では1%以下であった。BHA と BHT のピーク面積の室内再現精度は, 5%以下となったので, 今後例数をあげて検討したい。

## ま と め

食品中のブチルフトロキシアニソール (BHA) とジブチルフトロキシトルエン (BHT) の含有量を把握するための基礎資料を得る目的で, 電気化学検出器による高速液体クロマトグラフ法 (HPLC), ミセル動電クロマトグラフ法 (MEKC) およびキャピラリーガスクロマトグラフ法 (GC) により BHA と BHT の同時分析を実施した。その結果, 移行または保持時間は, HPLC では BHA が4.1分, BHT が20.0分, MEKC では BHA が5.4分, BHT が9.3分, GC では BHA が6.9分, BHT が7.3分であった。

分析法バリデーションの成績は以下に示す通りである。

①回帰直線は, 濃度範囲が HPLC では BHA が 0.05~0.8 $\mu$ g/mL, BHT が0.5~8.0 $\mu$ g/mL, MEKC ではいずれも 10~50 $\mu$ g/mL, GC ではいずれも 0.5~8.0 $\mu$ g/mL ですべて良好な直線性を示した。 ( $R^2 > 0.99$ ).

②検出限界濃度 ( $\mu$ M) は, HPLC では BHA が0.03, BHT が0.53, MEKC では BHA が3.6, BHT が1.5, GC では BHA が0.16, BHT が0.03であった。

③併行精度が高いことが認められたのは, BHA と BHT の移行または保持時間が3方法のすべて, ピーク面積では HPLC と GC, ピーク高では HPLC と MEKC であった。

④室内再現精度が高いことが認められたのは, 3方法すべてで BHA と BHT の移行または保持時間, MEKC の BHT のピーク面積と BHA および BHT のピーク高であった。

以上の成績から, 本 HPLC-ECD, MEKC, GC は食品中の BHA と BHT の同時分析に適用できると考えられる。

本研究は, 本学臨床栄養学科学学生の 葛原志織, 揚井理恵, 中江崇文の3氏のご協力を頂きました。ここに感謝いたします。

## 文 献

- 1) 日本食品衛生学会 (2000) 食品・食品添加物等規格基準 (抄). 食品衛生学雑誌, 41(1), j87-j88.
- 2) Kochhar SP and Rossell JB (1990) Elsevier applied science. London-New York, pp19-64. DETECTION, ESTIMATION AND EVALUATION OF ANTIOXIDANTS IN FOOD SYSTEMS, *FOOD ANTIOXIDANTS* (Hudson, B. J. F., ed.)
- 3) Lundberg WO, Dockstander WB and Halvorson HO (1947) The Kinetics of the Oxidation of Several Antioxidants in Oxidizing Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 24, 89-92.
- 4) Ito N, Hagiwara A, Shibata M, Ogiso T and Fukushima S (1982) Induction of squamous cell carcinoma in

- the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole. *Gann*, **73**(2), 332-334.
- 5) 鈴木郁生, 野島庄七, 谷村顕雄 (1999) 食品添加物公定書. 第7版, 廣川出版, 東京, pp1171-1176.
  - 6) Bao TZ, Joseph L, Robert TR and Allan HC (1997) Effect of Dietary 2 (3) -*tert*-Butyl-4-hydroxyanisole on the Metabolism and Action of Estradiol and Estrone in Female CD-1 Mice. *Cancer Research*, **57**, 2419-2427.
  - 7) 日本薬学会編 (1999) 衛生試験法・注解2000, 金原出版, 東京, pp463-473.
  - 8) Ishiwata H, Fukushima A, Abe Y, Yamada T, Nishijima M and Fukasawa Y (2000) Estimation of BHA, BHT, Propylene Glycol and Sodium Saccharin Concentrations in Foods and Their Daily Intake Based on Official Inspection Results in Japan in Fiscal Year 1996. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **41**(1), 86-93.
  - 9) Kenneth TH, Lucien CR and Frito-Lay RD (1970) A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of BHA and BHT in Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chemists. Soc.*, **47**, 7-10.
  - 10) Sergio D and Kevin R (1977) Comparative gas chromatographic behaviour and detection limits of 2,6-di-*tert*.-butyl-4-methylphenol, 3-*tert*.-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), and the trifluoroacetate of BHA. *J. Chromatogr.*, **133**, 363-366.
  - 11) 社団法人日本油化学会編集 (1996) 基準油脂分析試験法 (I), 社団法人日本油化学会, 東京, pp1-4.
  - 12) 大田光恵, 成田美加子, 三好智子, 糸山智子, 木村実加, 小林美穂, 越智礼子, 関口幸弘, 鯉口 智, 平原嘉親, 長谷川眞住, 宮田昌弘, 鎌倉和政, 前田憲二, 乙益道隆, 石綿 肇 (1997) GC 及び GC/MS によるチューインガム中の BHA, BHT 及び TBHQ の分析法, 食品衛生学雑誌, **38**(2), 78-84.
  - 13) Refecas M, Francesc G, Miquel I, Rafael C and Josep B (1998) Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. *J. Chromatogr. A*, **822**, 305-309.
  - 14) Clifford AHIII, An Z and Michael GZ (1994) Comparison between Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography Separation of Food Grade Antioxidants, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 919-921.
  - 15) 山田真記子, 宮田政明, 加藤喜昭, 中村幹雄, 西島基弘, 柴田 正, 伊藤誉志男 (1993) 高速液体クロマトグラフフィーによる食品中の9種類のフェノール性酸化防止剤の一斉分析法. 食品衛生学雑誌, **34**(6), 535-541.
  - 16) Yankah VV, Ushio H, Ohshima T and Koizumi C (1998) Quantitative Determination of Butylated Hydroxyanisole, Butylated Hydroxytoluene, and *tert*-Butyl Hydroquinone in Oils, Foods, and Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Lipids*, **33**(11), 1139-1145.
  - 17) Kitada Y, Ueda Y, Yamamoto M, Shinomiya K and Nakazawa H (1985) DETERMINATION OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS IN EDIBLE OIL BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH AMPEROMETRIC DETECTOR. *J. Liq. Chromatogr.*, **8**(1), 47-57.
  - 18) Masoud A N and Young Nam Cha (1982) Simultaneous Use of Fluorescence, Ultraviolet, and Electrochemical Detectors in High Performance Liquid Chromatography-Separation and Identification of Phenolic Antioxidants and Related Compounds. *HRC. Cc. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **5**, 299-305.
  - 19) 厚生省医薬安全局審査管理課長 (1997) 分析法バリデーションに関するテキスト (実施方法) について. 医薬審338号, 1-9.

(平成13年5月24日受理)

# Comparison Among High-performance Liquid Chromatography, High-performance Capillary Electrophoresis and Gas Chromatography for the Simultaneous Determination of Phenolic Antioxidants

Satoko KAWABE and Toshiko FUJII

(Accepted May 24, 2001)

Key words : 2- AND 3-TERT-BUTYL-4-HYDROXYANISOLE (BHA),  
3,5-DI-TERT-BUTYL-HYDROXYTOLUENE (BHT),  
HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC),  
MICELLAR ELECTROKINETIC CAPILLARY ELECTROPHORESIS (HPCE),  
GAS CHROMATOGRAPHY (GC)

## Abstract

Two major phenolic antioxidant food additives, 2- and 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and 3,5-di-tert-butyl-hydroxytoluene (BHT) in standard solutions were determined using high-performance liquid chromatography with an electrochemical detector (HPLC-ECD), micellar electrokinetic capillary electrophoresis (MEKC) and capillary gas chromatography (GC). Analysis time was 22 minutes by HPLC-ECD and ten minutes by both MEKC and GC. Calibration curves obtained by comparing peak areas against concentrations showed high degrees of linearity ( $R^2 > 0.99$ ) in all three methods. Of the three methods, BHA and BHT were detectable in the smallest amounts ( $10^{-14}$  moles) by MEKC. Variation in retention or migration time was  $< 1.0\%$  (R.S.D.,%) on any given day, but was slightly higher than  $1.0\%$  (R.S.D.,%) by MEKC on separate days. Repeatability in peak-area of the antioxidants also varied by  $< 5.0\%$  (R.S.D.,%) for both HPLC-ECD and GC, but varied by  $> 5.0\%$  (R.S.D.,%) for MEKC. Intermediate precision in peak-height of the antioxidants varied by  $< 5.0\%$  (R.S.D.,%) for MEKC. These methods are suitable for the simultaneous determination of BHA and BHT concentrations in foods.

Correspondence to : Satoko KAWABE

Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medical Professions  
Kawasaki University of Medical Welfare  
Kurashiki, 701-0193, Japan  
(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.11, No.1, 2001 133-139)