ノート

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

(平成 13 年 11 月 6 日受理)

大石 充男^{*1,†} 松田 敏晴^{*2} 野尻 宗子^{*2} 斉藤 和夫^{*1}

Simultaneous Determination of Five Antioxidants in Food by HPLC with Fluorescence Detection

Mitsuo OISHI^{*1,†}, Toshiharu MATSUDA^{*2}, Shuko NOJIRI^{*2} and Kazuo SAITO^{*1}

(^{*1}Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjyuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; ^{*2}Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-16-25, Shibazaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023, Japan; [†]Corresponding author)

An HPLC method with fluorescence detection was developed for the determination of propyl gallate, nordihydroguaiaretic acid, butylated hydroxyanisole (2- and 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole), *tert*-butylhydroquinone and octyl gallate in edible oils and foods.

The antioxidants in edible oil were isolated directly with acetonitrile saturated with *n*-hexane. The antioxidants in food were extracted with ethyl acetate and the extract was concentrated under vacuum. They were isolated from the residue with acetonitrile saturated with *n*-hexane. The acetonitrile layer was centrifuged at 5,000 rpm for 10 min. The HPLC separation was performed on a Symmetry C18 column (3.5 μ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm) using a mixture of 5% acetic acid-acetonitrile-methanol (4:3:3, v/v/v) as the mobile phase and monitored by using a fluorescence detector with time programming. Sample peaks were identified by comparison of the fluorescence spectra with those of antioxidant standards. Average recoveries of fortified antioxidants at 100 μ g/g were 72.1~99.6%. Coefficients of variation were 0.7~7.2%.

(Received November 6, 2001)

Key words: 食用油 edible oil; 酸化防止剤 antioxidant; 没食子酸プロピル propyl gallate (PG); *tert*-ブチルヒドロキノン *tert*-butylhydroquinone (TBHQ); ノルジヒドログアヤレチック酸 nordihydroguaiaretic acid (NDGA); ブチルヒドロキシアニソール butylated hydroxyanisole (BHA); 没食子酸オクチル octyl gallate (OG); 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 蛍光検出 fluorescence detection

緒言

我が国への輸入食品は年々増加傾向を示しており、また消費者の嗜好性の多様化を反映し、流通する食品の種類も多種多様となっている。このような状況下、我が国で使用が許可されていないフェノール系酸化防止剤である *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) は、輸入加工食品から毎年のように検出されており、検疫所における違反事例^{1)~4)}の特に多い食品添加物である。TBHQ が検出される食品としてはビスケット、クッキー、油菓子、スナック菓子、野菜調製品、スープの素、中華調味料、調理用ミックスなど多岐に及んでいる。これらの食品の輸入相手国は過去ではほとんど米国のみであったが、近年では米国のほか、中

華人民共和国、タイ、インド、台湾、香港、フィリピン、インドネシア、ベトナム、ブラジル、コロンビア及びオーストラリアなどの多地域に及んでいる。著者らの検査においても、都内に流通する食品から TBHQ が時折検出され食品衛生上問題となっている。

食品中の TBHQ 分析法としては GC^{5)~17)} や HPLC^{18)~32)} が多数報告されている。近年では、HPLC による報告が特に多く見られ、紫外検出器 (UV)^{18)~28)}、蛍光検出器 (FLD)^{29), 30)}、電気化学検出器 (ECD)^{28), 31), 32)} を用いた方法が報告されている。これらの報告のうち UV を用いた方法では、試料中に共存する非極性の油脂などがカラムに吸着し、溶出するまでに長時間を要する難点があった。また、FLD 及び ECD で測定する方法では、試料が油脂だけであったり、適用できる食品が限られたものであった。そこで今回、油脂などによる妨害が少なく、油脂及び菓子など多種類の加工食品に適用できる FLD 付 HPLC を用いた、TBHQ をはじめとする蛍光を有する酸化防止剤

[†] 連絡先^{*1} 東京都立衛生研究所 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1^{*2} 東京都立衛生研究所多摩支所 〒190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

の没食子酸プロピル (PG), ノルジヒドログアヤレチック酸 (NDGA), ブチルヒドロキシアニソール (BHA), 没食子酸オクチル (OG) について同時分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

植物油, バター, マーガリン, ポテトチップス及びクラッカーを用いた。

2. 試薬

1) 標準原液 TBHQ (東京化成工業(株)製), NDGA (Aldrich 社製), BHA (和光純薬工業(株)製), PG (東京化成工業(株)製) 及び OG (東京化成工業(株)製) のそれぞれ 100 mg をひょう取しメタノールに溶解して 100 mL とし, それぞれ標準原液とした。

2) 混合標準溶液 PG 及び OG の標準原液はそれぞれ 10 mL, TBHQ, NDGA 及び BHA はそれぞれ 1 mL を採り, メタノールで 100 mL としたものを混合標準溶液とした。

3) 検量線用標準溶液 混合標準溶液をメタノールで適宜希釈して用いた。

3. 装置

Hewlett Packard 社製高速液体クロマトグラフ HP 1100 シリーズ, G1312A 型ポンプ, G1313A 型オートサンプラー, G1316A 型カラム恒温槽, G1321A 型プロگرامブル 3D 蛍光検出器及び HP1100 3D ケミステーションによるデータ処理を使用した。

4. HPLC 測定条件

カラム: Waters 社製 Symmetry C18 (3.5 μ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm), ガードカラム: Merck 社製 LiChrospher 100 RP-18 (4 mm i.d. $\times$ 4 mm), 移動相: 5% 酢酸-アセトニトリル-メタノール (4:3:3), 流速: 0.7 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出波長 (タイムプログラム): 0 分 (Ex 274 nm, Em 365 nm) $\rightarrow$ 4 分 (Ex 285 nm, Em 330 nm) $\rightarrow$ 12 分 (Ex 274 nm, Em 365 nm), 注入量: 10 μ L

5. 試験溶液の調製

植物油: 試料 1 g を栓付き 10 mL 容ガラス製試験管にひょう取して, *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを加えて 10 mL とし, 1 分間激しく振とうした。約 30 分間放置後, 上層を採り, アセトニトリルで 10 mL とした後, その一部を遠心分離 (5,000 rpm, 10 分間, 5°C) し, 得られた上澄液をメンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを試験溶液とした。

バター及びマーガリン: 試料を加温溶解後, 2 g を栓付き 25 mL 容ガラス製試験管にひょう取し, 無水硫酸ナトリウム 2 g を加えた。これに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを加えて 20 mL とし, 1 分間激しく振とうした。約 30 分間放置後, 上層を採り, アセトニトリルで 20 mL とした後, 以下植物油と同様に操作した。

固形食品: 試料 10 g をホモジナイザーカップにひょう

取し, 無水硫酸ナトリウム 10 g を加え, これに酢酸エチル 70 mL を加えて 3 分間かくはん抽出した。酢酸エチル層をろ紙 (アドバンテック東洋(株), No. 5A) でろ過し, 残さに更に酢酸エチル 70 mL を加えて同様に操作した。ろ液を合わせ, 50°C 以下で減圧濃縮した。残留物に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル約 90 mL を加えて 1 分間激しく振とうした後, アセトニトリル層をメスシリンダーに移し, アセトニトリルで 100 mL とし, 以下植物油と同様に操作した。

結果及び考察

1. 試験溶液の調製

1.1 抽出溶媒及び液-液抽出溶媒

油脂を含む加工食品 (固形食品) 中から酸化防止剤を抽出する溶媒の検討を行った。ポテトチップス 10 g に各酸化防止剤それぞれ 5 mg を添加し, 酢酸エチル, *n*-ヘキサン, *n*-ペンタン及びジクロロメタンの各溶媒 70 mL で 2 回かくはん抽出した。その結果, 各酸化防止剤の抽出率は酢酸エチルを用いた場合が最も高く, OG の 83.3% を除いて, 他の酸化防止剤はいずれも 90% 以上であった。

次に抽出溶媒を除去後, 得られた油脂から酸化防止剤を分離するには液-液分配^{5), 9), 11), 18), 25)}あるいは直接抽出^{10), 12), 16), 26)}が用いられている。そこで, 液-液分配を用いることにし, 抽出溶媒の組合せについて検討した。各酸化防止剤を 100 μ g/g になるように添加した植物油 5 g をメスシリンダーに採り, *n*-ヘキサン 5 mL で溶解後, これにアセトニトリル, *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及びメタノールでそれぞれ 100 mL とした。これを 1 分間振とうし, 上層を遠心分離後, 上澄液中の酸化防止剤を測定した。その結果, いずれの溶媒でもすべての酸化防止剤は 95% 以上の高い回収率を示した。このとき, 抽出液のアセトニトリル層は上になるため, 上層を分取し次の操作に移るには油脂の混入がなく都合が良いが, 試料によっては油層が上になる場合があった。これは, アセトニトリルの比重が油脂よりも小さいため通常は上層となるが, 油脂をアセトニトリルより比重の小さな *n*-ヘキサンで溶解することによって, 比重が逆になったものと思われる。この現象はバター及びマーガリンでも認められることがあった。

そこで, あらかじめ *n*-ヘキサンで油脂を溶解せずに抽出溶媒で直接, 振とう抽出する方法を検討した。液-液分配と同様に各酸化防止剤を添加した植物油にアセトニトリル, *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及びメタノールを加えて酸化防止剤を抽出した結果, 上記の *n*-ヘキサンとの液-液分配の場合とほぼ同様の回収率が得られた。このとき, 植物油や他の油脂試料においてもアセトニトリル層は油層の上に分離した。したがって, これらの溶媒による直接抽出が後の操作にも都合が良いため, あらかじめ油脂を *n*-ヘキサンに溶解せずに, 抽出溶媒で直接抽出することにした。

Table 1. Amounts of Lipids Co-extracted from Lipid Sources to Extracting Solvents

Sample	Solvent		
	Methanol	Acetonitrile	Acetonitrile saturated with <i>n</i> -hexane
	Lipid (%)	Lipid (%)	Lipid (%)
Margarine	3.4	2.1	1.1
Butter	9.9	8.5	4.4
Olive oil	7.1	3.9	1.9
Corn oil	3.0	3.5	2.0

Data are averages of 3 determinations.

1.2 油脂の移行率

試験溶液のカラムへの注入回数が多くなるに従い、試験溶液中に混入する油脂によりカラム寿命が短くなることが懸念される。したがって、試験溶液中の油脂含量はできるだけ少なくすることが望ましい。そこで、上記の溶媒による油脂の移行率を測定した結果、Table 1 に示したようにオリーブ油では *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルへの移行率が 1.9% であったのに対して、アセトニトリルは 3.9%、メタノールは 7.1% であり、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルはメタノールの 1/3 以下であった。また、衛生試験法²⁸⁾ では油脂からの抽出溶媒にアセトニトリル-2-プロパノール-エタノール (2:1:1) 混液を使用しているが、この溶媒への油脂の移行率は 11% であった。

以上の結果から、試料が油脂である場合の酸化防止剤の抽出は *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで直接抽出することにした。また、固形食品からの酸化防止剤の抽出は酢酸エチルを用い、溶媒留去後の油脂からの抽出は *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで行うこととした。

2. HPLC 条件の検討

HPLC による数種類の酸化防止剤の分析は主に C18 カラムを用いたグラジェント溶出法^{18), 20), 25)~30)} で行われている。Page¹⁸⁾ は酢酸とアセトニトリル、また山田ら²⁷⁾ 及び衛生試験法²⁸⁾ は酢酸とアセトニトリル-メタノール (1:1) とのグラジェント溶出を行い、9 種類の酸化防止剤を分析している。グラジェント溶出法は極性の異なる比較的多数の酸化防止剤の同時分析には適しているが、再現性の良いデータを得るためには 1 回の分析後、初期状態で安定化させるまでに時間を要する。そこで、今回対象とした 5 種類の酸化防止剤のアイソクラティック溶出条件による測定について検討した。分離カラムは Symmetry C18 を用い、移動相は衛生試験法²⁸⁾ の 5% 酢酸-アセトニトリル-メタノール系を採用し、溶媒の組成比を検討した。その結果、5% 酢酸-アセトニトリル-メタノール (4:3:3) にすることで、Fig. 1 に示したように 20 分以内に 5 種類の酸化防止剤を相互分離することができた。

各酸化防止剤の極大励起波長は、PG 274 nm, TBHQ 293 nm, NDGA 285 nm, BHA 290 nm 及び OG 274 nm で、極大蛍光波長は、PG 365 nm, TBHQ 332 nm, NDGA 323 nm, BHA 322 nm 及び OG 365 nm であった。PG 及び OG は蛍光波長 330 nm では、365 nm で測

Fig. 1. High performance liquid chromatogram of anti-oxidant standards

Propyl gallate (PG, 100 μ g/mL) and octyl gallate (OG, 100 μ g/mL), *tert*-butylhydroquinone (TBHQ, 10 μ g/mL), nordihydroguaiaric acid (NDGA, 10 μ g/mL) and butylated hydroxyanisole (BHA, 10 μ g/mL)

HPLC conditions

Column: Symmetry C18 column (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm); mobile phase: 5% acetic acid-acetonitrile-methanol (4:3:3, v/v/v); flow rate: 0.7 mL/min; column temp.: 40°C; detection: fluorescence detection with time programming at 0 min Ex 274 nm, Em 365 nm, at 4 min Ex 285 nm, Em 330 nm, at 12 min Ex 274 nm, Em 365 nm; injection volume: 10 μ L

定した場合の蛍光強度の約 1/5 以下に低下した。そこでそれぞれの酸化防止剤が高感度に測定できるように、タイムプログラムにより励起及び蛍光波長を自動的に設定して測定することとした。すなわち、励起波長は TBHQ, NDGA 及び BHA では 285 nm, PG 及び OG では 274 nm に設定した。蛍光波長は TBHQ, NDGA 及び BHA では 330 nm, PG 及び OG では 365 nm に設定した。また、Yankah ら³⁰⁾ は励起波長 276 nm 及び蛍光波長 304 nm に設定して BHT を測定しているが、励起波長 274~285 nm, 蛍光波長 330~365 nm, その他は本 HPLC 条件下で BHT を分析したところ、溶出するのに 120 分間以上を要し、10 μ g/mL を注入した際の S/N 比は 1.5 以下とほとんどピークとして検出することができなかった。したがって、今回は BHT を分析対象としなかった。仮に試料中に BHT が存在していた場合でも、これら酸化防止剤の測定には妨害とならないものと思われる。

3. 検量線

TBHQ, NDGA 及び BHA は 0.01~5 μ g/mL, PG 及び OG は 0.1~50 μ g/mL の範囲で原点を通る直線性 ($r=0.999$) を示した。

4. 添加回収実験

オリーブ油、バター、マーガリン、ポテトチップス及びクラッカーに各酸化防止剤を 100 μ g/g の濃度になるように添加し、本法に従って測定した。その結果、Table 2 に示したようにクラッカーが 72.1~81.1% とやや低い回収率を示したが、他の試料は 83.3~99.6%, 変動係数は 0.7~7.2% と良好な結果が得られた。ポテトチップスに

Table 2. Recoveries of Antioxidants from Fortified Oil, Fat and Food

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	PG		TBHQ		NDGA		BHA		OG	
		Recovery* ¹ (%)	CV* ² (%)	Recovery* ¹ (%)	CV* ² (%)	Recovery* ¹ (%)	CV* ² (%)	Recovery* ¹ (%)	CV* ² (%)	Recovery* ¹ (%)	CV* ² (%)
Olive oil	100	99.6	1.8	91.8	3.4	97.8	1.6	95.2	1.3	95.0	4.7
Butter	100	99.3	2.0	97.8	1.5	95.5	2.2	98.3	0.8	94.5	7.2
Margarine	100	97.1	0.8	90.0	2.2	95.6	2.0	92.5	0.8	94.4	2.7
Potato chips	100	94.1	2.3	94.6	1.7	90.3	3.4	94.2	0.7	93.3	5.7
Cracker	100	75.9	4.0	81.4	1.3	75.7	2.5	81.1	1.9	72.1	1.9

PG: propyl gallate, TBHQ: *tert*-butylhydroquinone, NDGA: nordihydroguaiaretic acid, BHA: butylated hydroxyanisole, OG: octyl gallate

*¹ Values are means of 5 trials.

*² Coefficient of variation

Fig. 2. High performance liquid chromatograms of extracts of potato chips (A) and potato chips fortified with antioxidants (B)

PG (100 $\mu\text{g/g}$), OG (100 $\mu\text{g/g}$), TBHQ (5 $\mu\text{g/g}$), NDGA (10 $\mu\text{g/g}$) and BHA (10 $\mu\text{g/g}$)

酸化防止剤を添加したときのクロマトグラムを Fig. 2 に示した。ほとんど妨害のないクロマトグラムが得られた。

5. 蛍光スペクトルによる確認

従来の FLD では、設定した励起波長及び蛍光波長から得られた試料ピークの保持時間を標準品ピークと比較することにより定性確認を行っていた。しかしながら、FLD は UV よりも高い選択性を有するが、保持時間だけの情報では定性確認の信頼性に乏しい。今回使用した FLD はオンラインで蛍光スペクトルの測定が可能であることから、標準品の蛍光スペクトルと試料ピークの蛍光スペクトルとを比較することにより定性確認することができる。Fig. 2 のポテトチップスに添加した TBHQ の蛍光スペクトルと標準品の蛍光スペクトルを Fig. 3 に示した。両者のスペクトルは 332 nm に極大蛍光を示し良く一致した。試料中酸化防止剤の蛍光スペクトルを標準品のスペクトルと比較した場合、TBHQ、NDGA 及び BHA は 1 $\mu\text{g/g}$ 、PG 及び OG は 10 $\mu\text{g/g}$ で相関係数が約 0.95 以上であり、この値を検出限界とした。

本法は従来の紫外可視部吸収領域の測定で汎用されているフォトダイオード検出器のように、オンラインで蛍光スペクトルを測定し、定性確認する新しい確認法として有益な方法であると考えられる。

Fig. 3. Fluorescence spectra of the peak (at 4.9 min shown in Fig. 2) and TBHQ standard (2 $\mu\text{g/mL}$)
---- TBHQ standard; — Extract of potato chips

ま と め

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を検討した。

油脂中の酸化防止剤は *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで抽出した。また、他の食品中の酸化防止剤は酢酸エチルで抽出し、減圧留去後得られた油脂を *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで更に抽出した。

HPLC の分析条件は移動相に 5% 酢酸-アセトニトリル-メタノール (4:3:3) を用いたアイソクラティック条件で 5 種の酸化防止剤を分離することができた。また、励起及び蛍光波長はタイムプログラムを設定して測定した。

酸化防止剤のピークの確認はオンラインで蛍光スペクトルを測定し、標準品と比較することで可能となった。

本法により油脂及び菓子などへの添加回収実験を行った結果、回収率は 72.1~99.6% で、変動係数は 0.7~7.2% であった。

本法による検出限界は TBHQ、NDGA 及び BHA は 1 $\mu\text{g/g}$ 、PG 及び OG は 10 $\mu\text{g/g}$ であった。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局検疫所業務管理室, 厚生省輸入食品衛生監視員協議会編 “輸入食品 1992” 東京, 日本食品衛生協会, 1993, p. 150-211.
- 2) 厚生省生活衛生局検疫所業務管理室, 厚生省輸入食品衛生監視員協議会編 “輸入食品 1993” 東京, 日本食品衛生協会

- 会, 1994, p. 220-355.
- 3) Hisai, S., Tsurumi, K., Yamanaka, S., Violation of food additive regulations of imported foods in recent years. *Shokuhin Eisei Kenkyu (Food Sanitation Research)*, **47**(2), 19-35 (1997).
 - 4) 厚生省生活衛生局食品保健課, 検疫所における輸入食品等の食品衛生法違反事例 (平成 11 年 1 月~5 月分) について. *食衛誌*, **41**, J-138-J-144 (2000).
 - 5) Stoddard, E. E., Flame ionization gas-liquid chromatographic determination of antioxidants in vegetable oil. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **55**, 1,081-1,084 (1972).
 - 6) Page, B. D., Kennedy, B. P. C., Rapid determination of butylated hydroxyanisole, *tert*-butylhydroquinone, and propyl gallate in edible oils by electron capture gas-liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **59**, 1,208-1,212 (1976).
 - 7) Kline, D. A., Joe, F. L. Jr., Fazio, T., A rapid gas-liquid chromatographic method for the multidetermination of antioxidants in fats, oils, and dried food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**, 513-519 (1978).
 - 8) Toyoda, M., Ogawa, S., Tonogai, Y., Ito, Y., Iwaida, M. Gas-liquid chromatographic determination of tertiary-butylhydroquinone (TBHQ) in dried fish, frozen shrimp, vegetable oils, butter, and margarine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 1,135-1,137 (1980).
 - 9) Nakazato, M., Kanmuri, M., Ariga, T., Fujinuma, K., Simultaneous determination of *tert*-butylhydroquinone, BHA and BHT in edible oil. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **21**, 64-69 (1980).
 - 10) Austin, R. E., Wyatt, D. M., A rapid method for analysis of refined vegetable oils for TBHQ by gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **57**, 422-424 (1980).
 - 11) Nakazato, M., Kanmuri, M., Ariga, T., Fujinuma, K., Naoi, Y., Systematic detection and determination of antioxidants in edible oil. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **22**, 239-245 (1981).
 - 12) Wyatt, D. M., Simultaneous analysis of BHA, TBHQ, BHT and propyl gallate by gas chromatography as extracted from refined vegetable oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 917-920 (1981).
 - 13) Min, D. B., Ticknor, D., Schweizer, D., Analysis of antioxidants in oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 378-380 (1982).
 - 14) Min, D. B., Schweizer, D., Gas chromatographic determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and tertiary butylhydroquinone in soybean oil. *J. Food Sci.*, **48**, 73-74 (1983).
 - 15) Stijve, T., Gas chromatographic determination of butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) and *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) in milk products. *Deut. Lebensm. Rundschau*, **79**, 108-111 (1983).
 - 16) Yu, L. Z., Inoko, M., Matsuno, T., A gas chromatographic method for rapid determination of food additives in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 681-683 (1984).
 - 17) Ohta, M., Narita, M., Miyoshi, T., Itoyama, T., Kimura, M., Kobayashi, M., Ochi, R., Sekiguchi, Y., Koiguchi, S., Hirahara, Y., Hasegawa, M., Miyata, M., Kamakura, K., Maeda, K., Otomasu, M., Ishiwata, H., Analysis of BHA, BHT and TBHQ in chewing gum by GC and GC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **38**, 78-84 (1997).
 - 18) Page, B. D., High performance liquid chromatographic determination of nine phenolic antioxidants in edible oils, and shortenings. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 1,239-1,246 (1979).
 - 19) Doeden, W. G., Bowers, R. H., Ingala, A. C., Determination of BHA, BHT and TBHQ in edible fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 12-14 (1979).
 - 20) Archer, A. W., The determination of phenolic antioxidants in edible oils and fats by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **128**, 235-237 (1981).
 - 21) Kitada, Y., Tamase, K., Mizobuchi, M., Sasaki, M., Tanigawa, K., Yamamoto, M., Nakazawa, H., Simplified determination of *tert*-butylhydroquinone in vegetable oils, butter, and margarine. *Bunseki Kagaku*, **33**, E33-E35 (1984).
 - 22) Kitada, Y., Tamase, K., Mizobuchi, M., Sasaki, M., Tanigawa, K., Komiyama, S., Nakazawa, H., Determination of *tert*-butylhydroquinone in oily foods and dried fish. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **25**, 209-213 (1984).
 - 23) Indyk, H., Woollard, D. C., Antioxidants analysis in edible oils and fats by normal phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **356**, 401-408 (1986).
 - 24) Anderson, J., Niekerk, P. J. V., High-performance liquid chromatographic determination of antioxidants in fats and oils. *J. Chromatogr.*, **394**, 400-402 (1987).
 - 25) Page, B. D., Charbonneau, C. F., Liquid chromatographic determination of seven antioxidants in dry foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 259-265 (1989).
 - 26) Andrikopoulos, N. K., Brueschweiler, H., Felber, H., Taeschler, Ch., HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 359-364 (1991).
 - 27) Yamada, M., Miyata, M., Kato, Y., Nakamura, M., Nishijima, M., Shibata, T., Ito, Y., Determination of nine phenolic antioxidants in foods by high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **34**, 535-541 (1993).
 - 28) Nippon Yakugakukai, ed., "Eisei Shikenhō Chukai (Standard method of analysis for hygienic chemists), 1990", Tokyo, Kanehara Shuppan, 1995, p. 1,531-1,535. (ISBN4-307-47031-1)
 - 29) Niekerk, P. J. V., Plessis, L. M. D., High-performance liquid chromatographic determination of *tert*-butylhydroquinone in vegetable oils. *J. Chromatogr.*, **187**, 436-438 (1980).
 - 30) Yankah, V. V., Ushio, H., Ohshima, T., Kizumi, C., 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**, 1,139–1,145 (1998).
- 31) King, W. P., Joseph, K. T., Kissinger, P. T., Liquid chromatography with amperometric detection for determining phenolic preservatives., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 137–142 (1980).
- 32) Kitada, Y., Ueda, Y., Yamamoto, M., Shinomiya, K., Nakazawa, H., Determination of phenolic antioxidants in edible oil by high-performance liquid chromatography with amperometric detector., *J. Liquid Chromatogr.*, **8**, 47–57 (1985).