食品中のフェノール系酸化防止剤分析法の信頼性確保に向けた性能評価

佐藤　絵里[a]，伊藤　彩子[a]，安井　明子[b]，大塚　健治[a]，神田　真軌[a]

令和 5 年に改正された「第 2 版食品中の食品添加物分析法」のフェノール系酸化防止剤「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）及び没食子酸プロピル（PG）」の分析法 A を対象に，高速液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出法（HPLC-PDA）及び高速液体クロマトグラフ-蛍光検出法（HPLC-FL）を用い，キャノーラ油，クラッカー，煮干し，ポテトチップス，バター及びマヨネーズ 6 食品で性能評価を行った．対象は指定添加物の 3 種及び指定外添加物の *tert*-ブチルヒドロキノン（TBHQ）の 4 種とし，2 名 3 併行 3 日間の添加回収試験を実施した．その結果，いずれも選択性は十分で，真度 79.1–107%，併行精度 8.7%以下，室内精度 12%以下であり，妥当性確認ガイドラインの目標値に適合した．また，日常検査で食品由来成分の影響により再測定や確認分析が必要となることから，これらに用いる試験溶液の再調製の要否判断のため，試験溶液中の安定性を検討した．全食品で調製後 4 週間まで，BHT，BHA 及び PG は定量用途に，TBHQ はスクリーニング用途に使用できた．一方，TBHQ の定量用途ではクラッカー，ポテトチップス及びバターの 3 食品でのみ使用可能であった．さらに，HPLC 試験溶液を用いたガスクロマトグラフ-質量分析計による確認分析では，アセトンへの転溶操作なしに，BHT，BHA 及び TBHQ を確認できた．本法は日常検査に適用可能であり，試験溶液再調製の要否判断及び確認分析にも有用なことを示した．

キーワード：酸化防止剤，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，*tert*-ブチルヒドロキノン，没食子酸プロピル，HPLC-PDA，HPLC-FL，GC-MS

は　じ　め　に

フェノール系酸化防止剤は酸化による食品の劣化を防ぎ，品質を保持するために用いられる食品添加物である．日本で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）が指定されている．BHT 及び BHA は魚介冷凍品，鯨冷凍品，油脂，バター，魚介乾製品，魚介塩蔵品，乾燥裏ごしいもへの使用が許可されている．加えて，BHT はチューインガム，PG は油脂とバターへの使用が許可されている．一方，*tert*-ブチルヒドロキノン（TBHQ）は日本では食品への使用が許可されていない酸化防止剤であるが，欧米等では使用が許可されている [1]ため，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]．また，令和 5 年に改正された「第 2 版食品中の食品添加物分析法」[4]（以下，通知法と略す）の「BHT，BHA 及び PG」の分析法に TBHQ の同時分析が 2 法記載されている．

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」[5]（以下，ガイドラインと略す）が発出された．そこで，ガイドラインに従い，4 種の酸化防止剤について性能評価を行った．分析法は，当所で日常検査に用いており，1 回の抽出で十分な回収率を得ることのできる分析法 A を選出した．食品は，指定添加物の使用が許可されている食品群に該当する食品に加え，当所への搬入実績及び TBHQ の違反事例がある輸入加工食品等を踏まえ，キャノーラ油，クラッカー，煮干し，ポテトチップス，バター及びマヨネーズを対象とした．

通知法は抽出及びろ過操作のみの精製操作がない方法であり，食品によっては食品由来の妨害ピークにより，定性及び定量が困難なことがある．その場合，試験溶液調製後数日を経て，他条件で高速液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出法（HPLC-PDA）及び高速液体クロマトグラフ-蛍光検出法（HPLC-FL）による再測定や，ガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）での確認分析を実施することがある．しかし，酸化防止剤は保存条件や食品成分の影響により減少する可能性があり，試験溶液の再調製が必要か考慮しなければならない．標準溶液の安定性を検討した報告 [6,7]はあるが，試験溶液中には試料由来の食品成分が含まれるため，それらの影響を含めた酸化防止剤の安定性を検討し，再測定又は確認分析時における試験溶液再調製の要否判断に資する知見を得ることを目的とした．

また，通知法の「TBHQ」の分析法の確認分析法では，GC-MS測定に適した試験溶液とするため，試験溶液をアセトンに転溶する操作が記載されている．しかし，この操作は手間と時間を要し，溶媒留去に伴う酸化防止剤の減少も懸念される．そこで，迅速化を目的として転溶操作を行

[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

わずにHPLC試験溶液をそのまま用い，GC-MSによるBHT，BHA及びTBHQの確認分析が可能かどうかも検討した．

実　験　方　法

1. 試料

試料には，市販のキャノーラ油，クラッカー，煮干し，ポテトチップス，バター及びマヨネーズを用いた．固形試料は粉砕又は細切して均質化し，液状又は半固形試料は十分に混和した．バターは 40°C で融解後，操作を開始した．

各試料は，分析対象の酸化防止剤を含まないことを事前に確認して用いた．

2. 標準品及び試薬等

1) 標準品

BHT，BHA及びTBHQは富士フイルム和光純薬（株）製，PGは東京化成工業（株）製を用いた．

2) 標準溶液

(1) 標準原液

各標準品50 mgを正確に量り，メタノール（MeOH）に溶解して50 mLとしたもの（1,000 µg/mL）を調製した．

(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1–80 µg/mL）．

(3) 添加用標準溶液：各標準原液を混合してMeOHで希釈した（各200 µg/mL）．

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：富士フイルム和光純薬（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：富士フイルム和光純薬（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) ろ紙

桐山ロート用ろ紙No. 5C（桐山製作所製）

5) メンブランフィルター

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[4]の分析法 A に従って行った．

1) キャノーラ油

試料 5 g に混合溶媒 50 mL を加え，十分に振とうした．これを－20°C の冷凍庫で 1 時間以上冷却後，上層を速やかに分取して抽出液とした．抽出液を 40°C で減圧濃縮し，1–2 mL とした後，混合溶媒で 5 mL に定容した．これをメンブランフィルターでろ過し，HPLC 試験溶液とした．

2) キャノーラ油以外の試料

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°C の冷凍庫で 1 時間以上冷却した後，ろ紙で速やかに吸引ろ過した．残さを，あらかじめ冷凍庫で冷却した混合溶媒 15 mL で洗浄し，洗液をろ過した．各ろ液を合わせて抽出液とした．抽出液を 40°C で減圧濃縮し，1–2 mL とした後，混合溶媒で 5 mL に定容した．これをメンブランフィルターでろ過し，HPLC 試験溶液とした．

4. 装置

1) HPLC

HPLC-PDAシステム：Prominence-i LC-2030C 3D（（株）島津製作所製）

蛍光検出器：RF-20Axs（（株）島津製作所製）

2) GC-MS

GCシステム：7890B（Agilent Technologies社製）

質量分析装置：5977B MSD（Agilent Technologies社製）

5. 測定条件

1) HPLC条件

分析カラム：Cosmosil 5C18-ARII（4.6 mm i.d.×250 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；5%酢酸，グラジエント条件：A液 40%（0 min）→95%（20 min）→95%（35 min）→40%（35.1 min）→40%（40 min），流速：1.0 mL/min，カラム温度：40°C，注入量：5 µL，PDA測定波長：190–350 nm（定量波長：280 nm），蛍光波長：PG；Ex. 274 nm, Em. 365 nm，TBHQ；Ex. 293 nm, Em. 332 nm，BHA；Ex. 293 nm, Em. 385 nm，BHT；Ex. 285 nm, Em. 317 nm

2) GC-MS条件

分析カラム：DB-5MS（0.25 mm i.d.×30 m，膜厚 0.25 µm，Agilent Technologies 社製），カラム温度：40°C（0 min），40°C→300°C（15°C/min），300°C（3 min），注入量：1 µL，注入方法：スプリット，スプリット比：5:1，注入口温度：200°C，キャリアガス：ヘリウム，イオン化法：EI，イオン源温度：230°C，イオン化電圧：70 eV，検出法：スキャン（*m/z* 50–300）及び SIM；BHT（*m/z* 220，205），BHA（*m/z* 180，165，137），TBHQ（*m/z* 166，151，123）

6. 性能評価

各試料に添加用標準溶液 0.5 mL を添加し，4 物質を HPLC-PDA 及び HPLC-FL で測定し，定量値を算出した．添加濃度はガイドライン及び通知法に従い 0.02 g/kg とし，分析者 2 名，3 併行，3 日間の枝分かれ実験を行った．対象物質の分解を防ぐため，添加後直ちに操作を開始した．

得られた定量値から，真度，併行精度及び室内精度を算出した．選択性は，ブランク試料のクロマトグラムにおいて，対象物質の保持時間付近に認められる妨害ピークの信号強度が，添加試料で得られる対象物質の信号強度の 1/10 未満であることを確認して評価した．目標値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．

7. 試験溶液中の安定性

性能評価で調製した添加試料のうち，油脂を含む食品や魚介乾製品など，食品成分による影響が想定されるキャノーラ油，クラッカー，煮干し，ポテトチップス及びバターの HPLC 試験溶液（20 µg/mL 相当）を，調製後速やかに測定用の褐色ガラス製バイアルに分注し，−20°C の冷凍庫で遮光保存した．4 物質について約 4 週間，経時的に HPLC-PDA で測定し，試験溶液調製日のピーク面積値を 100%として残存率を算出した．

8. HPLC試験溶液を用いたGC-MSによる確認分析

BHT，BHA 及び TBHQ の確認に際し，以下の方法で GC-MS による分析を行った．なお，PG は GC-MS による測定が困難であることから検討の対象外とした．性能評価で調製した添加試料の HPLC 試験溶液（20 µg/mL 相当）を GC-MS に注入した．標準溶液（20 µg/mL）と比較し，SIM で得られた対象イオンのピーク保持時間及びスキャンで得られたマススペクトルパターンが一致することを確認し，BHT，BHA 及び TBHQ を定性した．さらに，煮干しのブランク試験溶液に，濃度が 1 µg/mL となるように標準溶液を添加し，測定した．

結果及び考察

1. 酸化防止剤 4 種における本法の性能評価

通知法の分析法 A を当所の日常検査に適用するには，評価対象食品において定量に必要な検量線の直線性，選択性，真度及び精度が確保されることを確認する必要がある．そこで，ガイドラインに基づき，キャノーラ油，クラッカー，煮干し，ポテトチップス，バター及びマヨネーズを対象に，BHT，BHA，PG 及び TBHQ の性能評価結果を以下に示す．

1) 検量線の直線性及び定量限界

添加回収試験濃度及び通知法で定めた定量限界付近を含む範囲で定量性を確認するため，絶対検量線を作成した．検量線濃度は，TBHQ では 1，5，10，20，40 及び 80 µg/mL，BHT，BHA 及び PG では 5，10，20，40 及び 80 µg/mL とした．いずれも決定係数は 0.995 以上であり，評価濃度範囲で良好な直線性が確認された．

定量限界はガイドライン及び通知法に従い，BHT，BHA 及び PG は 0.005 g/kg，TBHQ は 0.001 g/kg とした．各定量限界濃度における *S/N* は 10 以上であり，定量に十分な感度を有していた．

2) 選択性

食品由来成分による定量への影響を確認するため，ブランク試料における対象物質保持時間付近の妨害ピークを評価した．その結果，いずれの試料においても，分析対象物質以外に由来する信号強度は，添加試料で得られた対象物質の信号強度の 1/10 未満であり，ガイドラインの基準内であった．したがって，本法は今回検討した食品において，食品由来成分の影響を受けずに対象物質を定量できると考えられた．

3) 真度及び精度

ガイドライン及び通知法の精度管理濃度に従い，0.02 g/kg で添加回収試験を実施した結果を Table 1 に示す．真度は 79.1–107%，併行精度は 1.7–8.7%，室内精度は 2.4–12%であり，すべての項目でガイドラインの目標値に適合した．

Table 1. Validation results for the determination of antioxidants in foods by HPLC-PDA and HPLC-FL

Detector	Analytes	Canola oil			Cracker			Dried small sardine		
		Trueness (%)	RSDr (%)	RSD_{WR} (%)	Trueness (%)	RSD_r (%)	RSD_{WR} (%)	Trueness (%)	RSD_r (%)	RSD_{WR} (%)
PDA (UV 280 nm)	PG	104	2.1	3.2	93.4	2.3	5.2	81.8	2.2	12
	TBHQ	102	2.9	7.2	88.0	3.6	6.9	79.1	1.9	6.0
	BHA	99.3	1.9	3.0	96.6	1.8	4.9	99.1	2.0	3.4
	BHT	84.4	2.8	4.0	96.5	1.7	4.3	101	2.1	4.6
Fluorescence	PG	107	2.1	3.8	96.3	2.2	5.2	91.5	2.1	12
	TBHQ	104	2.9	7.5	89.3	3.7	7.1	79.5	1.9	6.1
	BHA	100	1.9	3.1	97.9	1.8	4.5	98.2	2.0	4.5
	BHT	84.9	2.2	4.1	95.3	2.4	5.4	95.5	1.9	3.2
Detector	Analytes	Potato chips			Butter			Mayonnaise		
		Trueness (%)	RSD_r (%)	RSD_{WR} (%)	Trueness (%)	RSD_r (%)	RSD_{WR} (%)	Trueness (%)	RSD_r (%)	RSD_{WR} (%)
PDA (UV 280 nm)	PG	94.0	2.9	3.9	94.4	3.6	5.3	89.6	8.1	10
	TBHQ	96.5	2.4	3.6	89.5	3.2	5.1	86.5	7.5	8.8
	BHA	93.6	2.3	3.8	96.1	3.0	4.8	91.9	5.0	8.4
	BHT	90.9	2.3	3.5	93.9	3.3	6.0	85.8	4.8	8.1
Fluorescence	PG	95.9	3.1	3.8	96.8	3.8	5.8	93.7	8.7	11
	TBHQ	97.3	2.3	3.6	90.1	3.2	5.2	85.3	7.7	8.9
	BHA	94.4	2.4	4.1	96.6	3.1	5.0	92.6	5.1	8.6
	BHT	90.2	2.2	2.4	95.9	2.7	5.0	85.6	4.9	7.5

RSDr：RSD of repeatability.

RSD_{WR}：RSD of within laboratory reproducibility.

以上より，通知法の分析法Aは，今回検討した6食品において，BHT，BHA，PG及びTBHQの定量法として必要な性能を有することが示された．

2. HPLC試験溶液中の酸化防止剤の安定性の検討

HPLC による再測定又は GC-MS による確認分析を実施する際の試験溶液再調製の要否を判断するため，試験溶液中の酸化防止剤の安定性をキャノーラ油，クラッカー，煮干し，ポテトチップス及びバターを対象として検討した．

性能評価で得られた試験溶液を HPLC-PDA で経時的に測定し，調製日のピーク面積値に対する各測定時点の面積比の推移を Fig. 1 に示す．BHT，BHA 及び PG は，いずれの食品の試験溶液中でも調製後 4 週間まで残存率が 96%以上であり，良好な安定性を示した．TBHQ は，クラッカー，ポテトチップス及びバターの試験溶液中では調製後 4 週間まで残存率が 99%以上であり，安定であった．一方，キャノーラ油及び煮干しの試験溶液中では，残存率がそれぞれ 69%及び 72%まで低下したことから，試料由来の食品成分が TBHQ の安定性に影響した可能性が示唆された．

以上より，BHT，BHA 及び PG については，今回検討したいずれの食品の試験溶液も，調製後 4 週間まで定量に使用可能であると判断された．TBHQ については，クラッカー，ポテトチップス及びバターの試験溶液は，調製後 4 週間まで定量に使用可能であった．一方，キャノーラ油及び煮干しの試験溶液では，TBHQ の残存率が低下したため，定量値の信頼性を確保するには，定量時に試験溶液を再調製する必要があると考えられた．ただし，スクリーニング検査では対象物質の有無の確認が主目的であり，ピーク検出が可能であれば一定の実用性がある．日常検査では，定量限界の 1/2 濃度の標準溶液を分析し，安定に検出できることを確認している．このため，キャノーラ油及び煮干しの試験溶液についても，調製後 4 週間までスクリーニング用途には使用可能と判断できた．

3. HPLC試験溶液を用いたGC-MSによる確認分析法

日常検査における確認分析の迅速化，操作の簡略化及びそれに伴う酸化防止剤の減少防止を目的として，アセトンへの転溶操作を行わず，HPLC 試験溶液をそのまま GC-MS に供する方法により，BHT，BHA 及び TBHQ を確認できるか検討した．なお，GC-MS への注入方法を工夫し，気化容量がアセトンより大きい，本 HPLC 試験溶液がうまく測定できるようにした．キャノーラ油，クラッカー，煮干し，ポテトチップス及びマヨネーズの HPLC 試験溶液を GC-MS で測定した結果，スキャン及び SIM のいずれの測定でも，BHT，BHA 及び TBHQ のピークが検出された．なお，バターでは TBHQ の保持時間付近に食品由来と考えられる妨害ピークを認めたため，TBHQ の確認は困難であった．バターを除く 5 試料では，3 物質の保持時間は標準溶液と一致し，得られたマススペクトルにおいても主要フラグメントイオン及びその相対強度は標準溶液と同様のパターンを示したことから，HPLC 試験溶液を用いても確認分析が可能であることが示された．さらに，食品由来成分の影響を受けやすい試料の一例として煮干しを選び，ブランク試験溶液に 1 μg/mL になるように標準溶液を添加して測定したところ，スキャン測定において対象物質のピークが検出され，得られたマススペクトルから主要フラグメン

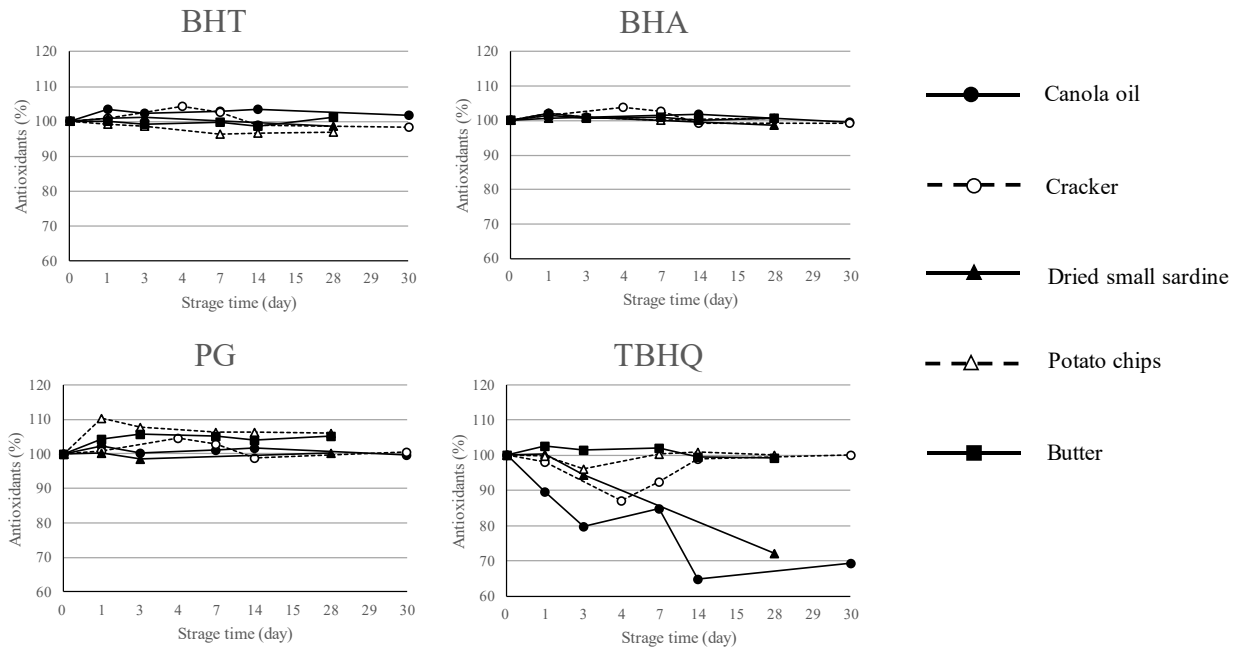


Fig. 1. Stability of antioxidants in HPLC test solutions prepared from canola oil, crackers, dried small sardines, potato chips, and butter during storage at −20ºC in the dark.
The peak area ratios were calculated relative to the peak area on the day of preparation, which was defined as 100%.

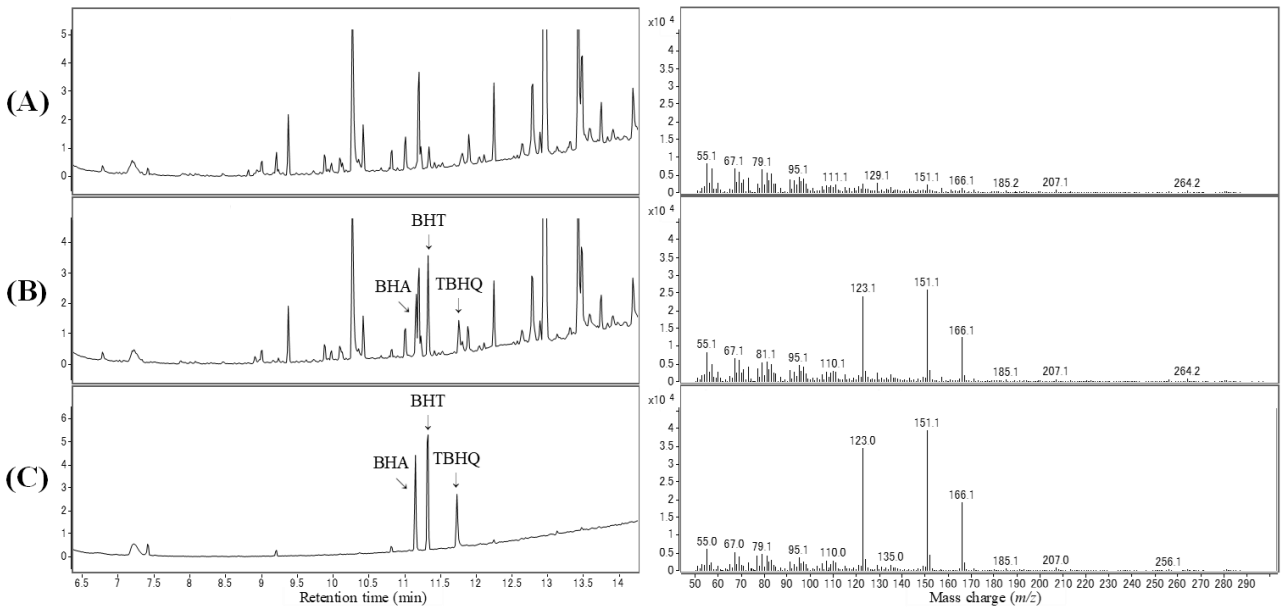


Fig. 2. GC-MS chromatograms and mass spectra of TBHQ in sample solutions
(A) HPLC test solution prepared from dried small sardines
(B) HPLC test solution prepared from dried small sardines and spiked with antioxidant standard solution (1 μg/mL)
(C) antioxidant standard solution (1 μg/mL)

トイオンを確認できた（Fig. 2）.

以上の結果から，保持時間及びマススペクトルの一致を確認基準とすることで，通知法で必要とされるアセトンへの転溶操作を省略しても，HPLC試験溶液を用いたGC-MS確認分析が適用可能であると考えられた．また，転溶操作に伴う酸化防止剤の減少を回避できる可能性が示された．ただし，食品マトリックスによっては対象物質の保持時間付近に妨害ピークを生じる可能性があるため，確認分析時には SIM クロマトグラム及びスキャンスペクトルを併用して判定することが重要である.

本法は転溶操作を省略できることから確認分析の迅速化及び省力化に寄与し，HPLC 測定で判定が困難な場合や違反が疑われる場合の確認分析として有用であることを示した.

ま　と　め

当所でフェノール系酸化防止剤の日常検査で用いている通知法の分析法Aを用いて，HPLC-PDA及びHPLC-FLによる定量法の性能評価を6食品対象に行った．その結果，すべての分析対象物質でガイドライン[5]の目標値を満たし，定量法として必要な性能を有することが確認された.

加えて，試験溶液の再調製の要否を判断する目的で，試験溶液中の酸化防止剤の安定性を検討した結果，BHT，BHA及びPGはいずれの食品の試験溶液中でも調製後4週間まで安定であることが確認された．TBHQは，クラッカー，ポテトチップス及びバターでは調製後4週間まで定量に使用可能であり，キャノーラ油及び煮干しでは定量時に再調製が必要であったが，スクリーニング用途では全食品で使用可能であった．さらに，HPLC試験溶液をアセトンへ転溶せずにGC-MSに供した場合でも，BHT，BHA及びTBHQを確認可能であった.

以上より，本法は食品中フェノール系酸化防止剤の日常検査に適用可能であり，試験溶液中の安定性を確認することで，再測定又は確認分析時における試験溶液再調製の要否判断に有用な知見が得られた．また，HPLC 試験溶液を用いた GC-MS 確認分析は，HPLC 測定で判定が困難な場合や違反が疑われる場合の確認分析として有用であることを示した.

謝　　辞

本研究の一部は，厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課からの令和4年度支出委任経費事業によって行われたものである．関係各位に深謝いたします.

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>，280–416, 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_iryou/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html （2026年10月23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RCL202501074，https://i2fas.mhlw.go.jp/faspub/IO_S020501.do?_ACtion_=a_sel02ACtion （2026年10月23日現在．なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
4) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長，厚

生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長：薬生食基発0529第1号，薬生食監発0529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5月29日.

5) 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.

6) 見上葉子，高木優子，宮川弘之，他：食衛誌，**63**，12–19，2022.

7) 小出石千明，江副サハラ，常松順子，他：福岡市保健環境研究所報，**47**，121–128，2022.

利 益 相 反（COI）

本研究において，開示すべき利益相反はない.

Performance Evaluation of an Analytical Method for Determining Phenolic Antioxidants in Foods

Eri SATO[a], Ayako ITO[a], Akiko YASUI[a], Kenji OTSUKA[a], and Maki KANDA[a]

Method A, described in the revised 2023 edition of "Analytical Methods for Food Additives in Foods," enables the simultaneous determination of butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), propyl gallate (PG), and tert-butylhydroquinone (TBHQ). This study evaluates the performance of Method A using high-performance liquid chromatography (HPLC)–photodiode array detection and HPLC–fluorescence detection in six food matrices: canola oil, crackers, dried small sardines, potato chips, butter, and mayonnaise. Two analysts conducted triplicate recovery tests at 0.02 g/kg over three days, obtaining satisfactory selectivity for all analytes in all matrices. The trueness, repeatability, and within-laboratory reproducibility were 79.1%–107%, ≤8.7%, and ≤12%, respectively, meeting the acceptance criteria in the validation guidelines. To determine whether fresh HPLC test solutions are required before reanalysis or confirmatory analysis, the stabilities of the antioxidants were evaluated in the test solutions. The BHT, BHA, and PG antioxidants remained stable for up to four weeks in all matrices. TBHQ could be quantitatively analyzed for up to four weeks in crackers, potato chips, and butter, but was markedly degraded in canola oil and dried small sardines, indicating that fresh test solutions are required for reliable TBHQ quantification in these matrices. However, for screening purposes, all test solutions were considered usable for up to four weeks. In addition, the HPLC test solutions were subjected to a simplified gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) confirmatory analysis without transfer to acetone. BHT, BHA, and TBHQ were successfully confirmed from their retention times and mass spectral patterns, which matched those of the corresponding standard solutions. These results demonstrate the applicability of Method A to routine analysis of phenolic antioxidants in foods. The stability results are helpful for determining when fresh test solutions are required, and the simplified GC–MS approach can serve as a confirmatory method when HPLC results are affected by food-derived interfering components and can also be used to verify suspected cases of non-compliance.

Keywords: antioxidant, butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole, *tert*-butylhydroquinone, propyl gallate, HPLC–PDA, HPLC–FL, GC–MS

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