

Quantitative analysis of 4-hydroxy-2E-nonenal and 4-hydroxy-2E-hexenal in heated cooking oil

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 箭田, 浩土, 亀山, 真由美 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002892

技術報告

食用油の加熱によって生じる有害アルデヒド4-hydroxy-2*E*-nonenal
およびその類縁化合物4-hydroxy-2*E*-hexenal の定量分析

箭田 浩士, 亀山 眞由美

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Quantitative analysis of 4-hydroxy-2*E*-nonenal
and 4-hydroxy-2*E*-hexenal in heated cooking oil

Hiroshi Yada and Mayumi Ohnishi-Kameyama

National Food Research Institute (NFRI), National Agriculture and Food Research Organization (NARO)

Abstract

A cytotoxic aldehyde, 4-hydroxy-2*E*-nonenal (4-HNE), is formed by lipid peroxidation in cells. In order to investigate formation of 4-HNE and the related aldehyde, 4-hydroxy-2*E*-hexenal (4-HHE) in cooking oil, we developed a quantitative analytical method for the aldehydes using synthesized deuterium labeled aldehydes as the internal standards. The cooking oil including internal standards was clean-upped by a cartridge-type silica-gel column, and the hydroxyl groups of 4-HNE and 4-HHE were derivatized to trimethylsilyl ether for the GC/MS measurement. Commercial cooking oils were heated and analyzed using the developed isotope-dilution method. 4-HNE levels increased according to heating time, and the final concentrations differed about five times among analyzed cooking oils. In the oil repeatedly used by tempura cooking, 4-HNE increased following the rise of peroxide value (POV) in the first several use, and then its concentration reached a plateau.

Keywords : 4-hydroxy-2*E*-nonenal (4-HNE), 4-hydroxy-2*E*-hexenal (4-HHE), 内部標準法, GC/MS, 定量分析

緒 言

近年, 加熱加工・調理によって食品中にヒトに対して有害な化合物が生成することが報告されている。加熱加工食品に含まれるアクリルアミドは, 2002年にスウェーデン政府が炭水化物を多く含む食材を焼いたり, 炒めたり, 揚げたりして製造した食品にアクリル

アミドが含有されていると発表したことから広く知られるようになり, 現在でも世界的に大きな関心を集めているⁱ⁾。アクリルアミド以外にも, 缶詰や瓶詰等の密閉状態で加熱殺菌された食品中のフランⁱⁱ⁾や, 燻製食品等に含まれる多環芳香族化合物 (PAHs) 等ⁱⁱⁱ⁾は, ヒトへの健康影響が懸念され, 食品中の濃度が調べられている。

多価不飽和脂肪酸由来の過酸化脂質が分解して生成

する4-hydroxy-2E-nonenal (4-HNE, 図1) は, 変異原性および細胞毒性を有することが知られており¹⁾, 生体内における疾病関連シグナル物質として膜脂質由来4-HNE について数多くの研究がある²⁾. その4-HNE が大豆油でジャガイモを揚げるといった通常の調理で生成することが, 2004年にミネソタ大学の Seppanen らにより報告³⁾された. 経口摂取した4-HNE のヒトの健康に対する影響については, 有害性を示す濃度を含めてまだ明らかにされていないが, 健康影響のリスクが生じる可能性があることから, 我が国でも天ぷら等の調理における4-HNE の生成の有無や濃度について調べることにした. *n*-6系の多価不飽和脂肪酸から生じる4-HNE に加え, DHA や EPA などの *n*-3系の多価不飽和脂肪酸の酸化によって生じる4-hydroxy-2E-hexenal (4-HHE) も4-HNE と同様の作用を有することが示唆されている⁴⁾ことから, 4-HHE も測定対象とした.

Seppanen らは試料油に含まれる4-HNE および類似構造を持つアルデヒドを2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 誘導体化して抽出し, TLC による精製の後に紫外可視吸光度を指標とする HPLC で分析している³⁾. また, 韓国の Surh と Kwon は水で抽出して逆相前処理カラムで精製してからトリメチルシリル (TMS) 誘導体として GC/MS により外部検量線法で定量分析して, 油および市販の食品に含まれる4-HNE, 4-HHE の濃度を調べている⁵⁾. 筆者らは4-HNE, 4-HHE を定量分析するにあたり, 目的成分を他成分と十分分離することと回収率の影響を最小限にすることを目指し, 安定同位体で標識した内部標準を用いて TMS 誘導体を GC/MS で定量分析する方法を開発した. この方法を用いて市販の食用油を加熱した場合の4-HNE, 4-HHE 濃度と, 繰り返し天ぷら油を使用した際の4-HNE, 4-HHE 濃度と油の劣化指標を調べたので, ここに報告する.

実験材料及び方法

(1) 4-HNE, 4-HHE の分析方法

i) 重水素標識化4-HNE, 4-HHE の合成

2,3-²H₂-4-HNE は文献記載の方法⁶⁾に従って化学合成した (図2). プロピオールアルデヒドジエチルアセタール **1** (東京化成工業製) とエチルマグネシウムブロマイド (13 %THF 溶液, 東京化成工業製) の反応により調製したグリニヤ試薬 **2** をヘキサナール (関東化学製) と反応させて, 4-ヒドロキシ-2-ノニナルジエチルアセタール **3** を得た. **3** の三重結合を重水素化

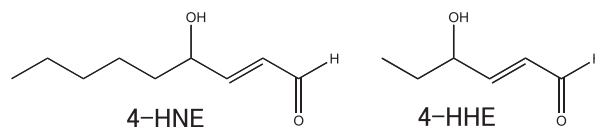


図1. 有害アルデヒド4-HNE, 4-HHE の化学構造

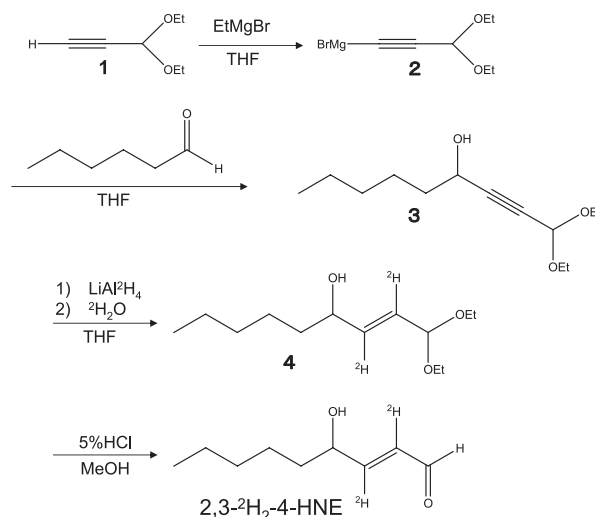


図2. 2,3-²H₂-4-HNE の合成経路

リチウムアルミニウム (和光純薬製) でトランス二重結合に還元し, 重水により反応を停止して, トランス二重結合に重水素が導入された **4** を得た. **4** を5 %塩酸/メタノール中30分間室温で攪拌してアセタールを加水分解し, シリカゲル60 (ナカライ製) によるカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒30 %酢酸エチル/*n*-ヘキサン) で精製して, 2,3-²H₂-4-HNE を86.5 mg 得た (プロピオールアルデヒドジエチルアセタール **1** からの収率は44 %).

2,3-²H₂-4-HHE の化学合成は, 2,3-²H₂-4-HNE と同様の方法で行った. すなわち, グリニヤ試薬 **2** をプロパナール (東京化成工業製) と反応させて4-ヒドロキシ-2-ヘキシナルジエチルアセタールを得て, 以下同様に三重結合のトランス二重結合への還元と重水素の導入, アセタールの加水分解を行って, 2,3-²H₂-4-HHE を73.1 mg 得た (プロピオールアルデヒドジエチルアセタール **1** からの収率は11 %).

合成した2,3-²H₂-4-HNE および2,3-²H₂-4-HHE の¹³C-NMR は以下の通り (2,3-²H₂-4-HNE : δ^c 14.0 (C-9), 22.5 (C-8), 24.9 (C-7), 31.6 (C-6), 36.4 (C-

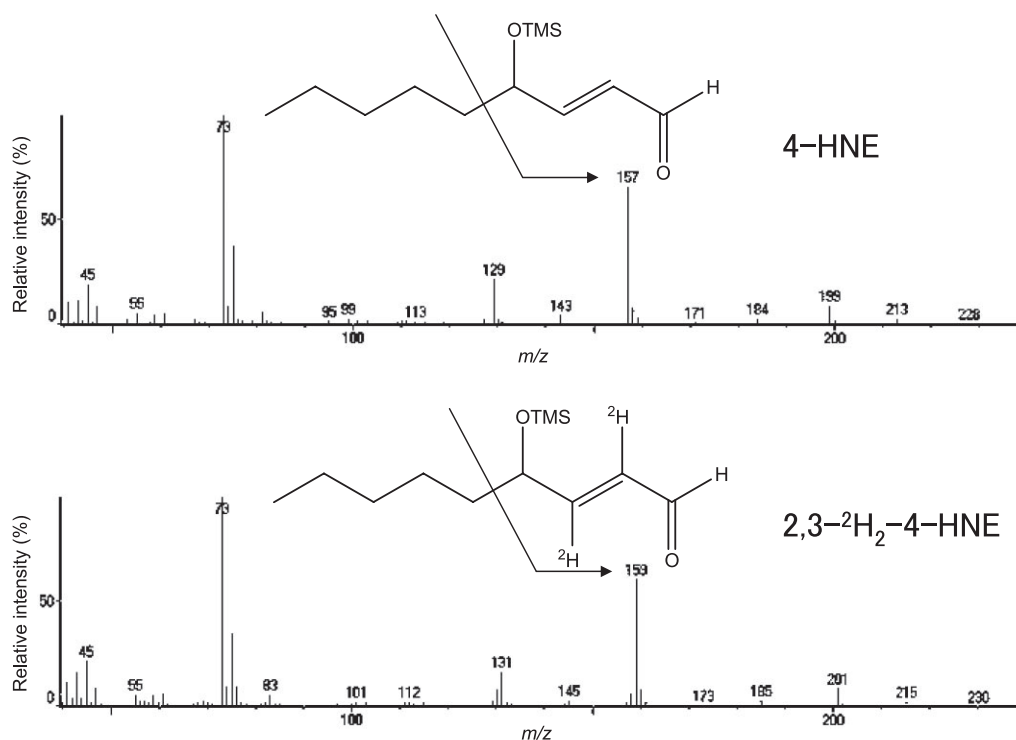


図3. 4-HNE および2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HNE のマススペクトル

5), 71.0 (C-4), 130.2 (C-2), 158.9 (C-3), 193.8 (C-1)) ; 2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HHE : δ^c 9.5 (C-6), 29.5 (C-5), 72.2 (C-4), 130.5 (C-2), 158.1 (C-3), 193.6 (C-1)) であり, それぞれ期待する構造を有することを確認した. オレフィン炭素のシグナルが重水素とのカップリングにより分裂していることから, 重水素標識導入位置を2, 3位と確認した. さらに, 2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HHE および2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HNE を TMS 誘導体化 (後述) して GC/MS で分析したところ, それぞれ市販の4-HHE, 4-HNE の TMS 誘導体と保持時間が完全に一致した. 9.2分に検出された2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HHE の TMS 誘導体は m/z 188, 13.2分に検出された2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HNE の TMS 誘導体は m/z 230に分子イオンピークを与えた. また, 両者のマススペクトルには m/z 159に強度の大きいフラグメントイオンが観測された. これは TMS 化4-ヒドロキシ-2-アルケナールの C-4-C-5間が開裂したイオンに相当し, その m/z 値は非標識体のフラグメントイオンよりも2大きかった (図3に4-HNE および2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HNE のマススペクトルを示す). 従って GC/MS での選択イオンモニタリング (SIM) により, 合成した2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HHE および2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HNE が非標識体と区別して検出できることから, これらを4-HHE, 4-HNE の定量分析の内部標準として利用可能であることが判明した.

ii) 油試料の前処理法

前処理では, 油試料0.5~1 gを正確に秤量して内部標準 (2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HHE および2,3- $^2\text{H}_2$ -4-HNE) を各1 μg と, 10 mLの溶出溶媒A (4%酢酸エチル/ n -ヘキサン (酸化防止剤として100 μM のブチルヒドロキシトルエン (BHT) を含む)) を添加して十分に溶解し, あらかじめ6 mLの n -ヘキサンで平衡化しておいたシリカゲル前処理カラム (Sep-Pak Plus Silica (シリカゲル充填量690 mg), Waters 製) に負荷した. シリカゲル前処理カラムを16 mLの溶出溶媒A, 次いで1 mLの溶出溶媒B (20%酢酸エチル/ n -ヘキサン (100 μM の BHT を含む)) で洗浄し, 9 mLの溶出溶媒Bで4-HNE, 4-HHEを溶出した. 溶出液の溶媒を減圧留去し, 100 μL の酢酸エチル (100 μM の BHT を含む) に再溶解後, 100 μL の N,O -bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA, ジーエルサイエンス製) を加え, 85 $^{\circ}\text{C}$ で10分反応させて4-HNE, 4-HHEをTMS誘導体化した. 反応液を放冷後, 酢酸エチル (100 μM の BHT を含む) を加えて全量を1 mLとして, GC/MSの分析試料とした.

iii) GC/MSによる定量分析法

TMS誘導体化した4-HNE, 4-HHEは, 以下に示す条件でGC/MS分析を行った.

装置: QP5000 (島津製作所製), カラム: DB-5MS (ア

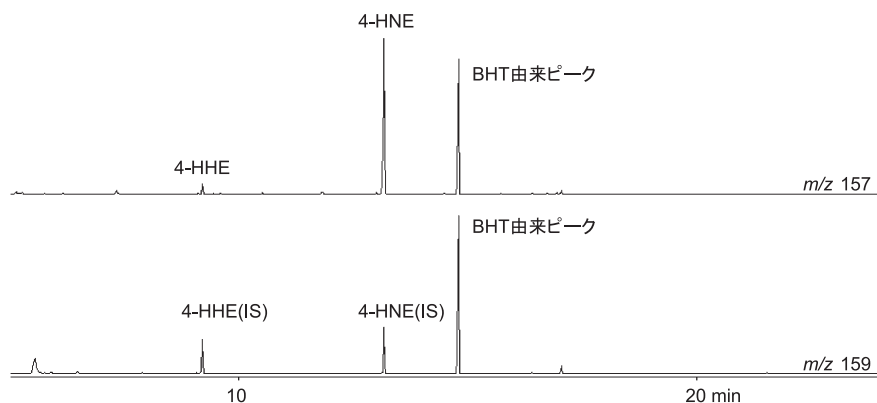


図4. 180℃で60分加熱したサラダ油の選択イオンクロマトグラム

ジレント製), 30 m×0.25 mm (i.d.), 0.25 μm (膜厚), 気化室温度: 200 °C, カラム温度: 50 °C (2 min)-10 °C/min-220 °C (5 min), インターフェース温度: 240 °C, 注入方法: スプリットレス注入, 注入量: 1 μL, MS: EI (70 eV), 検出: SIM m/z 157 (ターゲット), m/z 159 (内部標準).

4-HHE は9.2 min 付近, 4-HNE は13.2 min 付近に溶出され, 他のピークと十分に分離した (図4).

iv) 検量線

検量線の作成には, 内部標準各1 μg に対して市販の4-HHE (Cayman Chemical Company 製) および4-HNE (Cayman Chemical Company 製) をそれぞれ0.5, 3.0, 10.0 μg 添加した標準試料ならびに4-HHE, 4-HNE を添加しない標準試料を用いた. m/z 159 に検出される非標識の4-HHE および4-HNE の m/z 157 のフラグメントイオンの同位体ピークの影響を排除するため, 炭素とケイ素の同位体存在割合 (^{13}C (1.10 %), ^{29}Si (4.67 %), ^{30}Si (3.10 %)) に基づき非標識化合物のピーク比を $157:159 = 1:0.0402$ と算出して, m/z 157 面積 / (159 面積 - 157 面積 × 0.0402) の値と標準試料の4-HNE, 4-HHE 添加量から検量線を作成した.

v) 添加回収試験

添加回収試験は, 低濃度の4-HNE, 4-HHE を含む油 1 g に対して4-HHE を0.2 μg, 4-HNE を0.3 μg 添加した試料3点を分析して求めた4-HHE および4-HNE の濃度から, 添加量に対する回収量を計算して求めた.

(2) 食用油の加熱処理及び調理によって生成する

4-HNE, 4-HHE

i) 食用油の加熱処理

市販の油10種類について, バイアル瓶 (22 mL 容) に油9 mL を加え, 栓をせずにアルミブロック中180 °C で30分および60分加熱した. 加熱実験は3連で行い, 加熱後油を室温まで放冷した後, 4-HNE, 4-HHE を分析した.

ii) 天ぷら調理による油の繰り返し使用と油に含まれる4-HNE, 4-HHE

サラダ油 (大豆油と菜種油の調合油) を繰り返し天ぷら調理に使用し, 生成する4-HNE, 4-HHE の変化を調べた. 天ぷら調理には, 市販のIH調理器 (KZ-PH5: パナソニック製) とIH調理器対応の天ぷら鍋 (KZ-TT2 (1 L 容量): パナソニック製) を用いた. 水道水で洗ったジャガイモ500 g を皮付きのまま8 mm 厚にスライスし, 市販の天ぷら粉 (昭和天ぷら粉: 昭和産業製) 100 g に対して水道水160 mL を加えて調製した衣をつけた. 天ぷら調理はIH調理器の油揚げ機能により温度を180 °C に設定し, 油1000 g が180 °C になってから衣をつけたジャガイモを油に投入して行った. 油の温度を一定に保てるように温度計で確認しながら1回にジャガイモを5-8枚ずつ, 全量を4回に分けて投入し, 投入開始から調理終了までは約45分とした. 調理後は油が冷えるまで1時間程度放置し, 油の一部をサンプリングした後, 1 L のビーカーに入れてアルミ箔で覆い遮光して室温で次回の調理まで保存した. 次回の調理では, 油が1000 g になるように新しい油を約150 g 注ぎ足して, 同様の手順で行った. この天ぷら調理は独立した2連の実験で161日間, 15回にわたり油を繰り返し使用した.

繰り返し使用した油について, 4-HNE, 4-HHE に加えて劣化指標として過酸化価 (POV) と酸化 (AV) を, いずれも日本油化学会制定の基準油脂分析試験

表 1. 市販の油を加熱した際の4-HNE, 4-HHE 濃度

油の種類	4-HNE mg/kg (CV %)			4-HHE mg/kg (CV %)		
	180 ℃加熱条件			180 ℃加熱条件		
	加熱なし	30分加熱	60分加熱	加熱なし	30分加熱	60分加熱
サラダ油 (大豆油+菜種油)	nd	6.33(5.4)	10.57 (3.8)	nd	0.33(3.6)	0.52(2.7)
特定保健用食品 (B 1)*	nd	2.92(6.7)	5.07 (1.8)	nd	0.23(5.6)	0.30(1.4)
特定保健用食品 (B 2)*	<0.19	2.89(3.7)	5.52 (3.7)	nd	0.23(3.2)	0.34(2.2)
特定保健用食品 (B 3)	nd	5.53(7.6)	9.94 (5.3)	<0.04	0.33(2.5)	0.49(4.2)
特定保健用食品 (B 4)*	nd	2.87(9.0)	5.08 (3.8)	nd	0.57(2.8)	0.82(0.2)
特定保健用食品 (B 5)	nd	2.79(23.5)	4.14 (3.8)	nd	0.19(13.7)	0.27(1.6)
菜種油	nd	2.27(15.2)	4.59 (9.8)	nd	0.55(4.6)	0.82(1.8)
栄養機能食品 (菜種油+ビタミンE)*	nd	1.98(1.1)	3.11 (8.5)	nd	0.44(1.9)	0.69(5.7)
栄養機能食品 (紅花油+ビタミンE)*	nd	5.06(4.7)	8.80 (9.3)	nd	<0.04	0.06(1.2)
綿実油	<0.19	10.13(2.4)	14.96 (4.3)	nd	<0.04	0.05(7.2)

*：ビタミンEを含む油，nd：not detect，加熱実験は3連で実施した平均値

法^{7,8)}により測定した。

実験結果および考察

(1) 分析方法の評価

加熱した油に生成する微量の4-HNE, 4-HHE を高感度で定量分析するためには，食用油に多量に存在する低極性夾雑成分のトリグリセリドを除去する必要がある。そこで前処理において，シリカゲル前処理カラムに4-HNE, 4-HHE を選択的に保持させて夾雑成分を可能な限り溶出，除去した。また，精度の高い定量を行えるよう，重水素標識化4-HNE, 4-HHE を合成し，内部標準として油試料に一定量添加して前処理操作を行った。夾雑成分を除去した後に4-HNE, 4-HHE をシリカゲル前処理カラムから溶出し，TMS 誘導体化してGC/MSにより定量分析した。

i) 検量線

一連の分析試料の前後に分析した標準溶液4点（ターゲット／内部標準の範囲は0-10に相当し，油0.5 gを処理した場合では0-20 mg/kgに相当）より検量線を作成し，4-HHE, 4-HNE 共に r^2 は0.9999以上であった。

ii) 定量限界と添加回収試験

開発した定量分析法により低濃度の4-HNE, 4-HHE を含む油について繰り返し分析($n = 8$)を実施した。標準偏差から推定した検出限界 (LOD) は4-HHE で0.01 mg/kg, 4-HNE で0.06 mg/kg であり，定量限界 (LOQ) は，4-HHE で0.04 mg/kg, 4-HNE で0.19 mg/kgであった。

添加回収試験（添加量：油1 gに対して，4-HHE 0.2 μ g, 4-HNE 0.3 μ g）の結果，回収率は4-HHE で

88 %, 91 %, 93 %, 4-HNE で89 %, 109 %, 91 % であり，いずれも85～110 %の範囲に入り良好であった。

(2) 食用油の加熱処理及び調理によって生成する4-HNE, 4-HHE

開発した方法を用いて，市販の食用油を加熱した場合と繰り返し天ぷら油を使用した際の4-HNE, 4-HHE 濃度を分析した。繰り返し使用した天ぷら油については，劣化指標としてPOVとAVについても測定した。

i) 食用油の加熱処理

表1に市販の油10種類を180 ℃で30分および60分加熱した際の4-HNE, 4-HHE の濃度を示した。それぞれの油において，加熱時間に応じて4-HNE, 4-HHE の濃度が増加し，油の種類によって4-HNE 濃度には5倍程度の差があった。加熱により4-HNE 濃度が大きく増加した油は，大豆油を使用した特定保健用食品B 3，サラダ油，綿実油の3点であった。サラダ油は大豆油と菜種油の調合油であることから，大豆油，菜種油および綿実油に注目して，4-HNE や4-HHE の由来となる n -6系ならびに n -3系多価不飽和脂肪酸の量を比較した。五訂増補日本食品標準成分表脂肪酸成分表編⁹⁾によると，油100 g中の n -6系多価不飽和脂肪酸の量は，大豆油では49.67 g，綿実油では53.51 gであり，菜種油 (18.59 g) よりも多かった。従って， n -6系不飽和脂肪酸の含有量は4-HNE の生成量に影響すると考えられた。一方，油100 g中の n -3系多価不飽和脂肪酸の量は，菜種油(7.52 g)よりも大豆油(6.1 g)と綿実油 (0.34 g) の方が少なかった。4-HHE の生成量は綿実油では低く，菜種油と特定保健用食品B 4で高かった。4-HHE は，分析した全ての油で4-

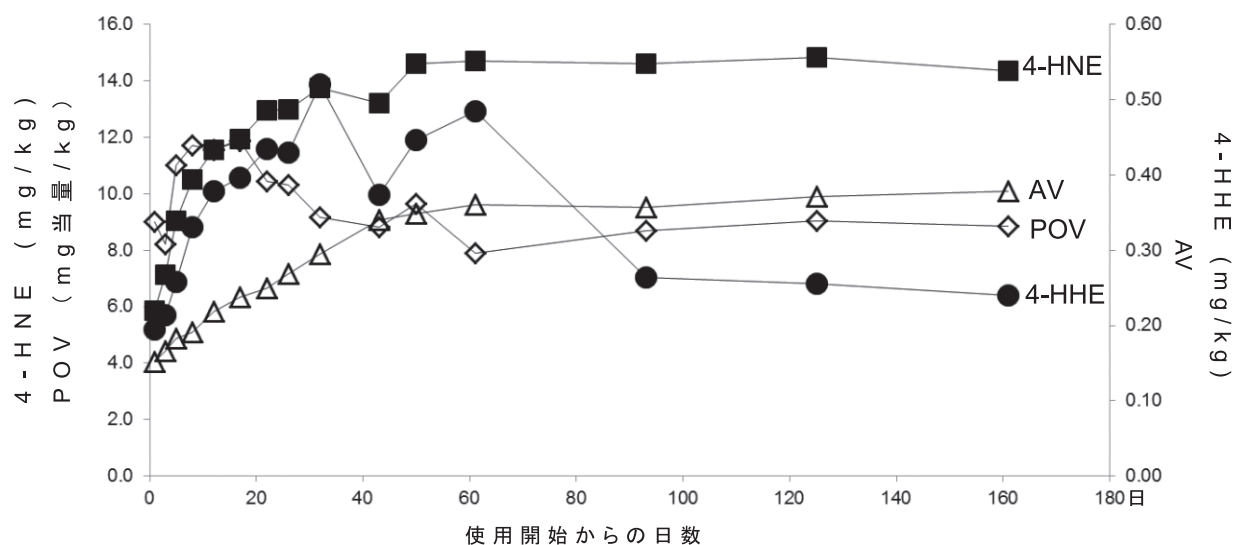


図5. 繰り返し天ぷら調理に使用したサラダ油の4-HNE, 4-HHE, 過酸化物質 (POV), 酸価 (AV)

サラダ油1000 g (180 ℃) でジャガイモ500 g の天ぷら調理を繰り返した。使用後のサラダ油は遮光室温保存し、次回使用時に約150 g の未使用サラダ油を注ぎ油した。分析値は2連で実施した油の平均を示した。

HNE に比べて低濃度であったが、*n*-3系多価不飽和脂肪酸の含有量と4-HHE の生成量には相関があると考えられた。4-HNE および4-HHE が多価不飽和脂肪酸の過酸化脂質から生成することから、ビタミンEなどの抗酸化剤を含む食用油では4-HNE や4-HHE の生成量が低くなることが期待された。しかしながら、ビタミンE添加が明示されている油において添加量は示されておらず、今回の分析結果からビタミンE添加と4-HNE, 4-HHE 濃度の間に明確な関連性は認められなかった。

Seppanen らが大豆油を185 ℃で1時間加熱した後の4-HNE は2.27 mg/kg, 4-HHE は0.40 mg/kg であり、表1のサラダ油 (大豆油+菜種油) と比べると低い値であった¹⁰⁾。この原因は不明であるが、加熱条件 (Seppanen らは5 L の油をステンレス製のディープフライヤーで加熱) や分析法の違いが影響している可能性が考えられた。

ii) 天ぷら調理による油の繰り返し使用と油に含まれる4-HNE, 4-HHE

サラダ油を使用開始から161日間、15回繰り返し天ぷら調理に使用して、4-HNE, 4-HHE に加えて POV と AV を測定した結果を図5に示す。4-HNE, 4-HHE は繰り返し使用の初期に POV の上昇に遅れて増加しているが、これは4-HNE, 4-HHE が過酸化脂質の分解により生成することと一致している。4-HNE はや

がて頭打ちとなりほぼ一定の値を示したが、4-HHE は頭打ちとなった後に減少傾向が認められた。これは、分子量が小さい4-HHE が揮発や他成分との反応によって失われている可能性や、含有量の少ない *n*-3系多価不飽和脂肪酸が酸化により減少したこと等が考えられた。今回の結果からは、4-HNE, 4-HHE の増加をより一般的な油の劣化指標である POV や AV で評価することは困難であると考えられた。

4-HNE および4-HHE を経口摂取した際の体内動態や反応性に関する情報が無いため、今回得られた4-HNE, 4-HHE の油中の濃度がヒトの健康に与える影響については不明である。Surh らは韓国の大人が植物油 (未加熱)、魚介類 (未加熱) および油揚げ食品から1日に摂取する4-HNE と4-HHE の合計を16.1 μg と推定している⁵⁾。本報告で油を12回繰り返し使用した場合、一食の天ぷらから摂取する油の量を約10 g とすると、4-HNE と4-HHE の合計摂取量は150 μg 程度となり、Surh らの報告した1日摂取量の10倍程度であった。

要 約

油の加熱によって生成する有害アルデヒド、4-HNE, 4-HHE を安定同位体で標識した内部標準を用いて定量分析する方法を開発した。この方法を用いて、

様々な食用油を加熱した際に生成する4-HNE, 4-HHE量を調べた。その結果, 4-HNE も4-HHE も加熱時間に応じて増加した。油の種類により4-HNE の生成量は5倍程度の差があり, *n*-6系多価不飽和脂肪酸の含有量の影響が大きいと考えられた。サラダ油を繰り返し天ぷら調理に使用した場合には, 4-HNE, 4-HHE共に繰り返し使用の初期にPOVの上昇に遅れて増加した。その後, 4-HNE はやがて頭打ちとなりほぼ一定の値を示したが, 4-HHE は減少した。

参考文献

- 1) Eckl, P.M., Ortner, A. and Esterbauer, H., Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes, *Mutation Research*, **290**, 183-192(1993)
- 2) Petersen, D. R. and Doorn, J. A., Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets, *Free Radical Biology & Medicine*, **37**, 937-945(2004)
- 3) Seppanen, C. M. and Csallany, A. S., Incorporation of the toxic aldehyde 4-hydroxy-2-*trans*-nonenal into food fried in thermally oxidized soybean oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **81**, 1137-1141 (2004)
- 4) Long, E. K. and Picklo, M. J. Sr., Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of *n*-3 fatty acid peroxidation: make some room HNE..., *Free Radical Biology and Medicine*, **49**, 1-8(2010)
- 5) Surh, J. and Kwon, H., Estimation of daily exposure to 4-hydroxy-2-alkenals in Korean foods containing *n*-3 and *n*-6 polyunsaturated fatty acids, *Food Additives and Contaminants*, **22**, 701-708(2005)
- 6) Kinter, M., Trace quantitation of 4-hydroxy-2-nonenal in biological samples as its oxim-bis-*tert*.-butyldimethyl silyl derivative using 3-hydroxynonanal as an internal standard, *J. Chromatogr.*, **578**, 9-16(1992)
- 7) 「基準油脂分析試験法」, 日本油化学会制定, 1996年版, 過酸化物質価 (酢酸-イソオクタン法) 2.5.2-1996
- 8) 「基準油脂分析試験法」, 日本油化学会制定, 1996年版, 酸価2.3.1-1996
- 9) 「五訂増補日本食品標準成分表脂肪酸成分表編」, 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会編集, 2005年発行, 油脂類 p 270-271
- 10) Seppanen, C. M. and Csallany, A. S., The effect of intermittent and continuous heating of soybean oil at frying temperature on the formation of 4-hydroxy-2-*trans*-nonenal and other α -, β -unsaturated hydroxyaldehydes, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **83**, 121-127(2006)

引用URL

- i) <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0286tr.pdf>
(2011.10.28)
- ii) ftp://ftp.fao.org/codex/cccf5/cf05_13e.pdf
(2011.10.28)
- iii) <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/724.pdf>
(2011.10.28)