

しょう油のパラオキシ安息香酸エステル類一斉試験法の 妥当性確認

栗屋真紀・大木望・吉田聖*・佐多建一・
近藤芳和子・江副サハラ・坂本智徳

福岡市保健環境研究所保健科学課

*博多区地域整備部生活環境課

Validation of an Analytical Method for Parahydroxybenzoic Acid Esters in Soy Sauce

Maki AWAYA, Nozomi OKI, Kiyoshi YOSHIDA, Kenichi SATA,
Kanao KONDOU, Sahara EZOE and Tomonori SAKAMOTO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

*Living Environment Section, Hakata Ward Regional Development Department

要約

食品中の食品添加物分析法については、「食品中の食品添加物分析法について」（平成 12 年 3 月 30 日付け衛化第 15 号厚生省生活衛生局食品化学課長通知）の別添「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」により定められている。今般、「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」（令和 6 年 3 月 8 日付け健生食基発 0308 第 1 号・健生食監発 0308 第 1 号 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長・食品監視安全課長通知）が策定され、各試験所で導入している試験法についても、当該ガイドラインに示される性能の基準を満たせば、「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」に定められた分析法の代わりに用いることができるとされた。そこで、福岡市保健環境研究所で実施している、カレーズ抽出によるしょう油のパラオキシ安息香酸エステル類一斉試験法（指定添加物 5 成分）について、当該ガイドラインに基づき妥当性確認を実施した結果、選択性は良好であり、真度、併行精度及び室内精度は、すべてガイドラインの性能基準を満たし、本試験法の妥当性が確認された。

Key Words : パラオキシ安息香酸エステル類 parahydroxybenzoic acid esters, しょう油 soy sauce, 妥当性確認 validation

1 はじめに

厚生省告示において、パラオキシ安息香酸エチル（以下、「PHBA-Et」とする。）、パラオキシ安息香酸プロピル（以下、「PHBA-Pr」とする。）、パラオキシ安息香酸イソプロピル（以下、「PHBA-iPr」とする。）、パラオキシ安息香酸ブチル（以下、「PHBA-Bu」とする。）、パラオキシ安息香酸イソブチル（以下、「PHBA-iBu」とする。）はしょう油の保存料として使用が認められており、その使用基準は、「パラオキシ安息香酸として、しょう

油にあつてはその 1 L につき 0.25 g 以下でなければならない。」と定められている¹⁾。

使用基準への適合を判定するための分析法については、平成 12 年 3 月 30 日付け衛化第 15 号厚生省生活衛生局食品化学課長通知「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」（以下、「通知分析法」とする。）²⁾により定められている。ただし、令和 6 年 3 月 8 日付け健生食基発 0308 第 1 号・健生食監発 0308 第 1 号 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長・食品監視安全課長通知「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」³⁾（以

下, 「ガイドライン」とする。) が策定されたことにより, ガイドラインに基づき妥当性が確認された分析法については, 通知分析法の代わりに用いることのできる同等以上の性能を有する試験法とみなすこととされた。

パラオキシ安息香酸エステル類の通知分析法は, 高タンパク食品及び高脂肪食品以外の食品では, 水蒸気蒸留法が採用されている²⁾ が, 福岡市保健環境研究所では, しょう油の保存料として使用が認められている5成分を対象とした一斉分析を, カレーズ抽出により実施している⁴⁾。本報告では, 当該ガイドラインに基づき, カレーズ抽出を用いた試験法の妥当性確認を行った結果について報告する。

2 実験方法

2.1 試料

性能評価には, 分析対象物質を含まないしょう油(以下, 「ブランク試料」とする。)を用いた。

2.2 標準品及び試薬

標準品: p-ヒドロキシ安息香酸エチル(特級)及びp-ヒドロキシ安息香酸ブチル(特級)は富士フイルム和光純薬(株)製を用いた。

p-ヒドロキシ安息香酸プロピル(特級), p-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル(特級)及びp-ヒドロキシ安息香酸イソブチル(特級)は東京化成工業(株)製を用いた。

標準原液(検量線及び定量下限値相当添加用): 標準品各250 mgをエタノールに溶解し, 正確に100 mLとした(2,500 µg/mL)。

混合標準溶液(検量線及び定量下限値相当添加用): 標準原液(検量線及び定量下限値相当添加用)各10 mLを混合し, 蒸留水で正確に250 mLとした(100 µg/mL)。

検量線標準溶液: 混合標準溶液(検量線及び定量下限値相当添加用)(100 µg/mL)を蒸留水で希釈し, 0.025 µg/mL, 0.05 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.2 µg/mL, 0.5 µg/mL及び1 µg/mLの溶液を調製した。

標準原液(基準値相当添加用): 標準品各625 mgをエタノールに溶解し, 正確に50 mLとした(12,500 µg/mL)。

混合標準溶液(基準値相当添加用): 標準原液(基準値相当添加用)各10 mLを混合した。(2,500 µg/mL)。

10%炭酸ナトリウム水溶液: 炭酸ナトリウム(特級)100 gを蒸留水に溶解して1 Lとした。

15%フェロシアン化カリウム水溶液: ヘキサシアニド鉄(II)酸カリウム三水合物(特級)172 gを蒸留水に溶

解して1 Lとした。

30%硫酸亜鉛水溶液: 硫酸亜鉛七水和物(特級)534 gを蒸留水に溶解して1 Lとした。

10 mmol/L リン酸二水素カリウム緩衝液: リン酸二水素カリウム1.09 gを蒸留水で800 mLに溶解し, リン酸272 µLを蒸留水で400 mLに溶解した溶液でpH2.7に調整した。

エタノール: 関東化学(株)高速液体クロマトグラフ用を用いた。

アセトニトリル: 富士フイルム和光純薬(株)高速液体クロマトグラフ用を用いた。

2.3 器具及び装置

蒸留水製造装置: RFD240ND アドバンテック東洋(株)製

pHメーター, 電極: HORIBA, Ltd.製

メンブランフィルター: DISMIC-13HP, 0.20 µm アドバンテック東洋(株)製

ろ紙: No.5A, 18.5 cm アドバンテック東洋(株)製
高速液体クロマトグラフ(HPLC): Vanquish Duo UHPLC システム 送液ポンプ; Dual Pump C, オートサンプラー; Dual Split Sampler FT, カラム恒温槽; Column Compartment C, フォトダイオードアレイ検出器; Diode Array Detector CG (すべて Thermo Fisher Scientific 社製)

2.4 試験溶液の調製

試料20 mLを200 mLのベースなし共栓付シリンダーにホールピペットで採取後, 蒸留水を加えて全体を120 mLとした。これを転倒混和(上下反転20回以上)し, 10%炭酸ナトリウム水溶液を加えてpH8~9に調整後, 再度転倒混和し, 1時間静置した。静置後, 15%フェロシアン化カリウム水溶液を5 mL加えて, 転倒混和し, さらに30%硫酸亜鉛水溶液を5 mL加え, 再度転倒混和した後, 20分間静置した。静置後, 蒸留水を加えて200 mLに定容し, 転倒混和後, ろ紙ろ過し, ろ液を蒸留水で10倍希釈した。これをメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。また, 採取した試料に標準溶液を添加せずに同様の操作をしたものをブランク試料の試験溶液とした。

添加試料溶液は使用基準値相当0.25 g/Lとなるようにブランク試料20 mLに, 混合標準溶液(基準値相当添加用)を2 mL添加した。また, 定量下限値相当添加用試料溶液は, 定量下限値相当0.005 g/Lとなるようにブランク試料20 mLに, 混合標準溶液(定量下限値相当添加用)を1 mL添加した。

2.5 測定方法

フォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフで測定を行った。LC 条件を表 1 に示す。

表 1 HPLC-PDA の測定条件

カラム	Inertsil Ph 2.1×150 mm, 5 μm
カラム温度	30℃
移動相	アセトニトリル：10 mmol/L リン酸二水素カリウム緩衝液（3：7）（pH3.1）（アイソクラティック）
流速	0.2 mL/min
注入量	4 μL
サンプル温度	4 ℃
測定波長	270 nm

2.6 妥当性確認の方法

ガイドラインに基づき妥当性確認を実施した。検査員 5 名が、1 日 2 併行で添加回収試験を行ったデータを用いて、選択性、真度、併行精度及び室内精度を求め、試験法の性能を評価した。

3 結果及び考察

3.1 検量線

検量線標準溶液を測定したところ、すべての成分で決定係数 (R^2) 0.999 以上の良好な直線性を示した。検量線を図 1 に示す。

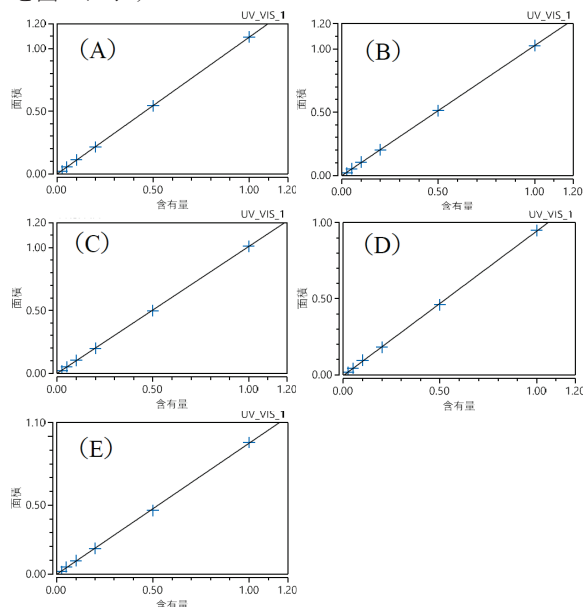


図 1 検量線

- (A) PHBA-Et (B) PHBA-Pr (C) PHBA-iPr
(D) PHBA-Bu (E) PHBA-iBu

3.2 選択性

高速液体クロマトグラフによる測定において、ブランク試料の各成分のクロマトグラム上の保持時間付近に、分析対象物質以外に由来するピークがないことを確認した。クロマトグラムを図 2 に示す。

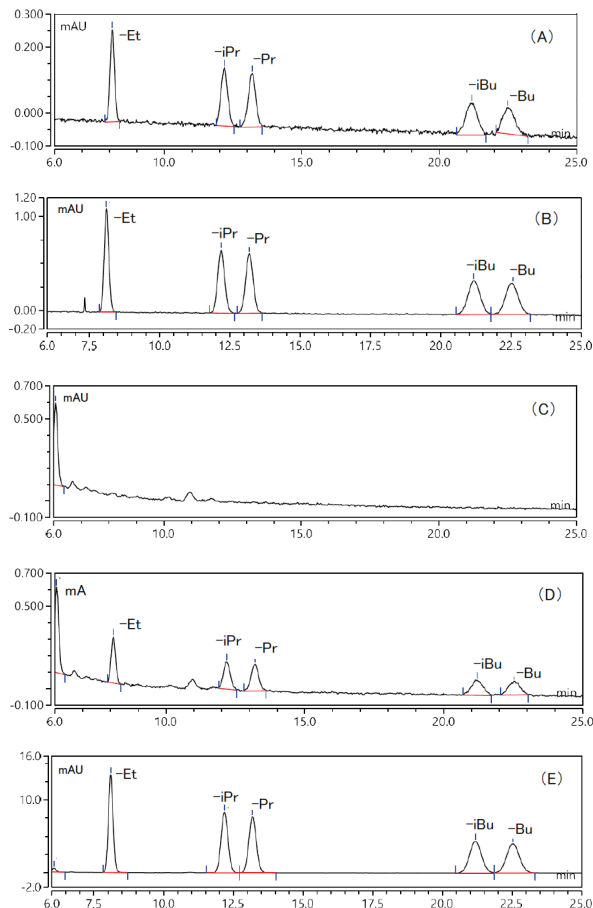


図 2 検量線標準溶液及び各試料のクロマトグラム

- (A) 0.05 μg/mL 検量線標準溶液
(B) 0.2 μg/mL 検量線標準溶液
(C) ブランク試料
(D) 添加試料（定量下限値相当）
(E) 添加試料（基準値相当）

3.3 真度

妥当性確認の結果を表 2 に示す。基準値相当及び定量下限相当を添加した試料において添加濃度と比較した真度はすべての成分で、ガイドラインの目標範囲である 70～120%を満たしており、良好な結果であった。

3.4 精度

表 2 に示すとおり、基準値相当及び定量下限相当を添加した試料において、すべての成分で、ガイドラインの

目標範囲である併行精度 10RSD%未満及び室内精度 15RSD%未満を満たしており，良好な結果であった．選択性，真度及び精度の結果から，本試験法の妥当性が確認された．

表 2 性能評価結果

評価パラメーター		検査結果					目標値
		PHBA-Et	PHBA-Pr	PHBA-iPr	PHBA-Bu	PHBA-iBu	
真度 (%)	基準値相当濃度	97	97	97	90	91	70~120
	定量下限値相当濃度	103	103	97	106	96	
併行精度 (RSD%)	基準値相当濃度	0.6	0.4	0.6	1.3	0.7	<10
	定量下限値相当濃度	2.2	5.1	1.1	5.7	2.9	
室内精度 (RSD%)	基準値相当濃度	1.4	1.0	1.0	6.3	5.0	<15
	定量下限値相当濃度	2.1	6.1	1.4	5.7	7.2	

4 まとめ

ガイドラインに基づき，カレージ抽出法によるしょう油のパラオキシ安息香酸エステル類一斉試験法（指定添加物 5 成分）の妥当性を確認した．その結果，ガイドラインに示された選択性，真度及び精度の目標値を満たしており，本試験法の妥当性が確認された．

文献

1)厚生省告示第 370 号：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日

- 2)厚生省生活衛生局食品化学課長通知 衛化第 15 号：食品中の食品添加物分析法について 別添「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」，平成 12 年 3 月 30 日
- 3)厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長及び厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長通知 健生食基発 0308 第 1 号及び健生食監発 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」，令和 6 年 3 月 8 日
- 4)坂本智徳，他：キャピラリー電気泳動による食品中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析，福岡市保健環境研究所報，32，74-77，2007