

(別添)

パラオキシ安息香酸メチル試験法

1. 試験法の概要

食品中のパラオキシ安息香酸メチル¹⁾は、メタノール抽出液を逆相カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジでクリーンアップした後、紫外外部吸収検出器付高速液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

「食品中の食品添加物分析法」（厚生省生活衛生局食品化学課）の一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

① 液体食品²⁾

試料約 2 g を精密に量り、95vol%メタノールを加え、十分に混合後、正確に 20 ml とした後、3,000rpm, 10 分間遠心分離する。上清 5 ml を正確に分取し、0.1mol/Lリン酸 20 ml を加えて混和した後³⁾、逆相カートリッジに全量を負荷する⁴⁾。水 20 ml について 50vol%メタノール 10 ml で洗浄後⁵⁾、メタノール 10 ml を正確に量り、これを用いて溶出する。溶出液を強塩基性陰イオンカートリッジ及び弱塩基性陰イオン交換カートリッジをこの順番に直結したものに負荷し⁶⁾、初流液 5 ml を捨てた後、溶出液を採取し試料液とする。

② カプセル⁷⁾

カプセルの内容物を除去し⁸⁾、試料約 0.5g を精密に量る。0.1mol/Lリン酸 5 ml を加え、80℃の水浴中で溶解させ、これにメタノール 5 ml を加えて混和する。0.1mol/Lリン酸 15 ml を加えて混和した後³⁾、加温し⁹⁾、逆相カートリッジに全量を負荷する⁴⁾。80℃の水 20 ml について 50vol%メタノール 10ml で洗浄後⁵⁾、メタノール 10ml を正確に量り、これを用いて溶出する。溶出液を強塩基性陰イオンカートリッジ及び弱塩基性陰イオン交換カートリッジをこの順番に直結したものに負荷し⁶⁾、初流液 5 ml を捨てた後、溶出液を採取し試料液とする。

③ その他の食品

試料約 5 g を精密に量り、95vol%メタノール 20ml を加え、ホモジナイザー¹⁰⁾を用いて 1～2 分間ホモジナイズした後¹¹⁾、3,000rpm, 10 分間遠心分離し、上清をろ過する。更に残渣に 95vol%メタノール 15～20ml を加えて同様の操作を繰り返し¹²⁾、先のろ液と合わせ、95vol%メタノールでろ紙を洗浄するとともに 50ml に定容する。抽出液 5 ml を正確に分取し、0.1mol/Lリン酸 20ml を加えて逆相カートリッジに全量を負荷する⁴⁾。水 20ml について 50vol%メタノール 10ml で洗浄後⁵⁾、メタノール 10ml を正確に量り、これを用いて溶出する。溶出液を強塩基性陰イオンカートリッジ及び弱塩基性陰イオン交換カート

リッジをこの順番に直結したものに負荷し⁶⁾，初流液 5 ml を捨てた後，溶出液を採取し試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

パラオキシ安息香酸メチル 50 mg を正確に量り，60vol%メタノールを加え正確に 50 ml とする。この液 2 ml を正確に採り，60vol%メタノールを加えて正確に 100ml とし，パラオキシ安息香酸メチル標準液とする（この液 1 ml はパラオキシ安息香酸メチル 20 μ g を含む）。パラオキシ安息香酸メチル標準液 0，1，2，10，及び 50ml を正確に量り，60vol%メタノールを加えて正確に 100ml とし，検量線用標準液とする（これらの液 1 ml はそれぞれパラオキシ安息香酸メチル 0，0.2，0.4，2 μ g 及び 10 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収検出器付高速液体クロマトグラフを用い，次の条件によって測定する。

カラム充てん剤¹³⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル，粒径 5 μ m

カラム管：内径 4.6mm，長さ 150 - 250mm

移動相：メタノール/5mmol/L クエン酸（6：4）

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

流速：1.0 ml/分

測定波長：254nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 10 μ l ずつを正確に採り，高速液体クロマトグラフに注入し，ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量¹⁴⁾

試料液 10 μ l を正確に採り，高速液体クロマトグラフに注入し，得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のパラオキシ安息香酸メチルの濃度 (μ g/ml) を求め，次式によって試料中のパラオキシ安息香酸メチル含量 (g/kg) を計算する。

1) 液体食品

$$\text{パラオキシ安息香酸メチル含量(g/kg)} = \frac{C}{25 \times W}$$

C：試料液中のパラオキシ安息香酸メチル濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

2) カプセル

$$\text{パラオキシ安息香酸メチル含量(g/kg)} = \frac{C}{100 \times W}$$

C：試料液中の各パラオキシ安息香酸メチル濃度 (μg/ml)

W：試料の採取量 (g)

3) その他の食品

$$\text{パラオキシ安息香酸メチル含量(g/kg)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C：試料液中の各パラオキシ安息香酸メチル濃度 (μg/ml)

W：試料の採取量 (g)

3. 試薬・試液等

1. パラオキシ安息香酸メチル：[特級]
2. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
3. リン酸：[特級 K9005]
4. クエン酸：クエン酸・一水和物 [特級 K8283]

[注]

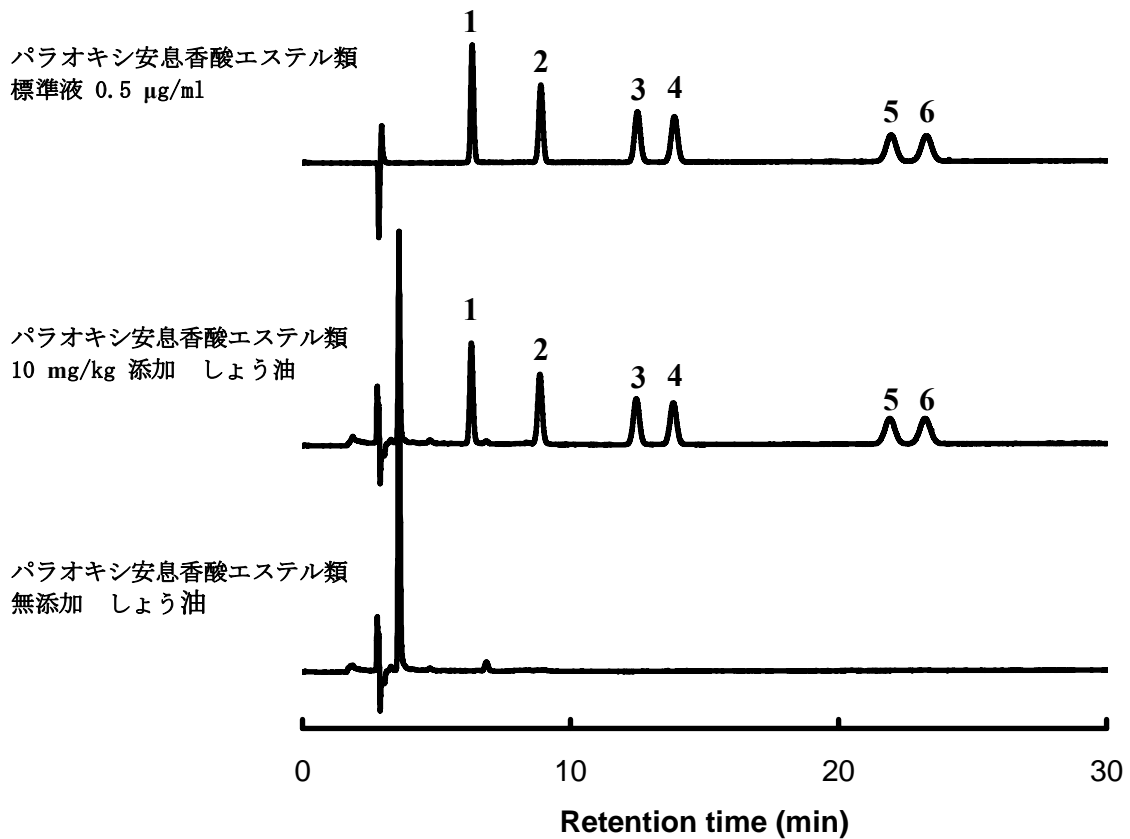
- 1) 本法により、他のパラオキシ安息香酸エステル類(パラオキシ安息香酸イソブチル，パラオキシ安息香酸イソプロピル，パラオキシ安息香酸エチル，パラオキシ安息香酸ブチル及びパラオキシ安息香酸プロピル)も同時に抽出，測定が可能である(以下の注についても他のパラオキシ安息香酸エステル類について該当する)。
- 2) ドレッシング類等，固形分の入った液体試料は，③その他の食品の調製法により調製する。
- 3) メタノール濃度が高いと，パラオキシ安息香酸メチルが溶出するため，希釈の目的で0.1mol/L リン酸 20ml を加える。
- 4) 逆相カートリッジとして，Oasis HLB 500mg が使用できる。カートリッジは，あらかじめメタノール 10ml 及び水 10ml でコンディショニングしておく。
- 5) 50vol%メタノールを全量溶出し，カートリッジ内部を空気で置換する。
- 6) 強塩基陰イオン交換カートリッジとして Bond Elut SAX 500mg，弱塩基陰イオン交換カートリッジとして Bond Elut PSA 500mg が使用できる。カートリッジは，あらかじめメタノール 10ml でコンディショニングしておく。逆相カートリッジからの溶出液について高速液体クロマトグラフィーによる分析を実施し，妨害ピークが見られない場合には，強塩基及び弱塩基陰イオン交換カートリッジによるクリーンアップを省略できる。
- 7) ゼラチンを主成分とするもの
- 8) カプセルの内容物はスパーテル等で丁寧に取り除く。水や溶媒等による洗浄は行わない。
- 9) 溶液の温度が下がると，ゼラチンが固まり，カートリッジが詰まることがあるので，

カートリッジに負荷する前に加温しておく。

- 10) バイオミキサー，ウルトラタラックス，ポリトロン等が使用できる。
- 11) マヨネーズなど固形分を含まず，振とうにより混和する試料については，1～2分間のホモジナイズを，10分間の振とうに代えることができる。
- 12) 振とうにより混和する場合は，2回目のホモジナイズを，10分間の振とうに代えることができる。
- 13) 市販の充填カラムとして，Inertsil ODS-3V，L-Column ODSなどが使用できる。
- 14) 本法における定量限界は0.005 g/kgである。

(参考1)

食品中のパラオキシ安息香酸メチルを含むパラオキシ安息香酸エステル類の
HPLCによる分析例



1 : パラオキシ安息香酸メチル 2 : パラオキシ安息香酸エチル 3 : パラオキシ安息香酸イソプロピル 4 : パラオキシ安息香酸プロピル 5 : パラオキシ安息香酸イソブチル
6 : パラオキシ安息香酸ブチル

(参考2)

パラオキシ安息香酸メチル確認試験法

1. 試験法の概要

食品中のパラオキシ安息香酸メチル¹⁾は、メタノール抽出液を逆相カートリッジ及び陰イオン交換カートリッジでクリーンアップし、濃縮し、アセトンに溶解した後、質量検出器付ガスクロマトグラフ (GC/MS) 又は水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ (GC/FID) により確認を行う。

2. 試験法 (ガスクロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

「食品中の食品添加物分析法」(厚生省生活衛生局食品化学課) の一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

パラオキシ安息香酸メチル試験法を準用し、濃縮後、アセトン溶液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

パラオキシ安息香酸メチル試験法を準用する。ただし、アセトン溶液とする。

(4) 測定法

①測定条件²⁾

GC/MS又はGC/FIDを用い、次の条件によって測定する。

カラム³⁾：内径 0.25 mm、長さ 30 mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用 5%フェニル 95%メチルポリシロキサンを 0.25 μmの厚さで被覆したもの。

カラム温度：40℃(1分) - (15℃/分) - 300℃(10分)

注入口温度：260℃

トランスファーライン (インターフェース) 温度：280℃

注入量：2 μl (スプリットレス)

イオン化法：EI

SIM選択イオン： m/z 121, 152⁴⁾

②定性確認⁵⁾

試料液をGC/MS又はGC/FIDに注入し、クロマトグラフ上に検出されたピークが検量線用標準液の保持時間と一致するか、あるいは、マススペクトル上の主要ピークの強度比が検量線用標準液と一致することを確認する。

3. 試薬・試液等

1. アセトン 残留農薬試験用

その他の試薬は、パラオキシ安息香酸メチル試験法を準用する。

[注]

- 1) 本法は、パラオキシ安息香酸メチルの確認試験法であり、定量分析は目的としない。本法により、他のパラオキシ安息香酸エステル類（パラオキシ安息香酸イソブチル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル及びパラオキシ安息香酸プロピル）も同時に確認できる（以下の注についても他のパラオキシ安息香酸エステル類について該当する。）。
- 2) その他の測定条件は各測定機器に従い、検量線用標準液の強度が最大となるように予め最適化を行う。
- 3) 市販のキャピラリーGC カラムとしてDB-5ms(J&W Scientific)等が使用できる。
- 4) m/z 152 は、パラオキシ安息香酸メチルのみで観察される。他のパラオキシ安息香酸エステル類では m/z 138 が観察される
- 5) GC/MS を用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑成分によるマトリクス効果により確認を見誤る恐れがあるため、別途、対象試料の試料液に検量線用標準液を添加し、ピークが検出されることを確認する。

GC/MS においてマススペクトラムによる確認が不可能である場合、SIM モードにて測定を行い、クロマトグラム上に検出されたピークが検量線用標準液と一致することを確認する。

GC/FID では、食品中の夾雑成分の影響により確認が不明瞭となる場合がある。その場合はGC/MS により確認を行う。