

保存料

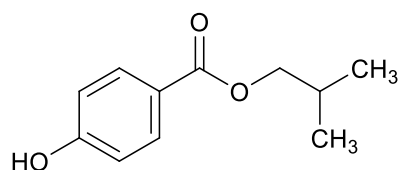
パラオキシ安息香酸エステル類

p-Hydroxybenzoic Acid Esters

パラオキシ安息香酸イソブチル

Isobutyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸イソブチル

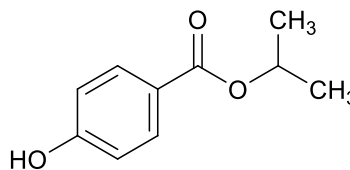


$C_{11}H_{14}O_3$: 194.23

パラオキシ安息香酸イソプロピル

Isopropyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸イソプロピル

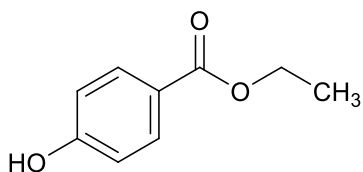


$C_{10}H_{12}O_3$: 180.20

パラオキシ安息香酸エチル

Ethyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸エチル

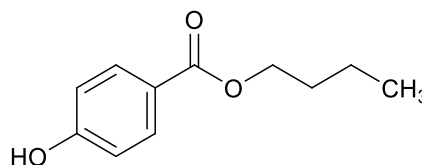


$C_9H_{10}O_3$: 166.17

パラオキシ安息香酸ブチル

Butyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸ブチル

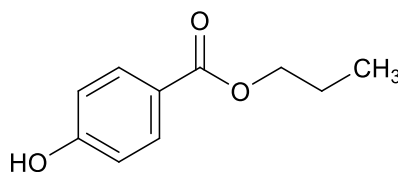


$C_{11}H_{14}O_3$: 194.23

パラオキシ安息香酸プロピル

Propyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸プロピル



$C_{10}H_{12}O_3$: 180.20

1. 分析法の概要

パラオキシ安息香酸エステル類は、高タンパク食品及び高脂肪食品からは溶媒抽出法により、その他の食品からは水蒸気蒸留法により抽出精製した後¹⁾、パラオキシ安息香酸エステル類の構成成分をそれぞれ液体クロマトグラフィーにより測定後、分子量比を乗じて、パラオキシ安息香酸として定量する。

パラオキシ安息香酸エステル類を特定する必要がある場合には、安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム分析法の参考として示す確認分析法を準用することができる。(2010年改正、2019年改正、2021年改正)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

① 高タンパク食品及び高脂肪食品(溶媒抽出法)

(a) 抽出

試料を細切又はすりつぶした後、その約5gを精密に量り、95vol%メタノール20mLを加え、ホモジナイザー²⁾を用いて1~2分間ホモジナイズした後³⁾、遠心(10分間、3000回転/分)し、上清をろ過する。さらに沈殿物に95vol%メタノール15~20mLを加えて同様の操作を繰り返し⁴⁾、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に定容し、抽出液とする。

(b) 精製

ポリマー固相抽出カラムに、aで得られた抽出液5mLに0.1mol/Lリン酸20mLを加えて混和した液を負荷し、流出液は捨てる。次いで容器を水20mLで洗い、洗液をカラムに負荷し、流出液は捨てる。次いで50vol%メタノール10mLを通して洗浄する⁵⁾。次いで、メタノール10mLを正確にとってカラムに通し、得られた溶出液を強陰イオン交換固相抽出カラム及び弱陰イオン交換固相抽出カラムをこの順番に直結したものに負荷し、最初の溶出液5mLを捨てた後、溶出液を採取する。この液2mLを正確に量り、50vol%メタノールを加えて正確に10mLとし、試験溶液とする^{6~8)}

② その他の食品(水蒸気蒸留法)

しょう油及び酢については、試料5mLを正確にとり、その他の食品については、試料を細切又はすりつぶした後、その約5g^{9, 10)}を精密に量り、500~1000mLの丸底フラスコに入れる。これに水100mL、酒石酸溶液(15→100)10mL¹¹⁾、塩化ナトリウム60gを加え、毎分約10mLの留出速度で水蒸気蒸留を行う。留液が480~490mLになったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に500mLとし、この留液を試験溶液とする^{6, 12)}。

(3) 検量線用標準溶液の調製¹³⁾

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各 20.0mg を量り、それぞれ60vol%メタノールに溶かして正確に100mLとする。これらの液5mLずつを正確にとり、60vol%メタノールを加えて正確に100mLとし、混合標準溶液とする（各濃度10 μ g/mL）。

混合標準溶液1mLを正確にとり、60vol%メタノールを加えて正確に200mLとし、また、混合標準溶液1、2、5mL及び10mLを正確にとり、60vol%メタノールを加えて正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする（各濃度0.05~10 μ g/mL）。

(4) 測定法

① 測定条件¹⁴⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹⁵⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径4.6mm、長さ50~250mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相¹⁶⁾：メタノール/水/0.2mol/Lリン酸緩衝液（pH4.0）混液（12：7：1）

流速：0.5~1.0mL/分

測定波長：260nm¹⁷⁾

注入量：20 μ L¹⁸⁾

② 検量線¹⁹⁾

検量線用標準溶液を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

試験溶液を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験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度（ 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エステル含量（g/L又はg/kg）を計算する。

(a) 溶媒抽出法²⁰⁾

$$\text{パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{CV}{W \times 20}$$

C：試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度（ μ g/mL）

W：試料の採取量（g）

V：試験溶液の量（mL）

(b) 水蒸気蒸留法

しょう油及び酢

$$\text{パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/L)} = \frac{CV}{W_1 \times 1000}$$

その他の食品

$$\text{パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{CV}{W_2 \times 1000}$$

C : 試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 (µg/mL)

W₁ : 試料の採取量 (mL)

W₂ : 試料の採取量 (g)

V : 試験溶液の量 (mL)

また、それぞれのパラオキシ安息香酸エステル含量からパラオキシ安息香酸含量を求めて合計し、試料中の全パラオキシ安息香酸含量 (g/L又はg/kg) を計算する。

しょう油及び酢の場合

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸イソブチル含量 (g/L)} \times 0.7111$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸イソプロピル含量 (g/L)} \times 0.7665$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸エチル含量 (g/L)} \times 0.8312$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸ブチル含量 (g/L)} \times 0.7111$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸プロピル含量 (g/L)} \times 0.7665$$

上記以外の食品の場合

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸イソブチル含量 (g/kg)} \times 0.7111$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸イソプロピル含量 (g/kg)} \times 0.7665$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸エチル含量 (g/kg)} \times 0.8312$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸ブチル含量 (g/kg)} \times$$

0.7111

パラオキシ安息香酸含量 (g/kg) = パラオキシ安息香酸プロピル含量 (g/kg) ×
0.7665

④ 定量限界 0.005 g/L 又は 0.005 g/kg

試薬・試液等

1. パラオキシ安息香酸イソブチル：市販品を用いる。
2. パラオキシ安息香酸イソプロピル：市販品を用いる。
3. パラオキシ安息香酸エチル：市販品を用いる。
4. パラオキシ安息香酸ブチル：市販品を用いる。
5. パラオキシ安息香酸プロピル：市販品を用いる。
6. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
7. ポリマー固相抽出カラム：ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体固相抽出カラム (500mg)。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。
8. リン酸：[特級又は日局]
9. 0.1mol/L リン酸：リン酸 11.5 g を量り、水を加えて 1000mL とする。
10. 強陰イオン交換固相抽出カラム：トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル固相抽出カラム (500mg)。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。
11. 弱陰イオン交換固相抽出カラム：エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル固相抽出カラム (500mg)。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。
12. 酒石酸：[特級]
13. 塩化ナトリウム：[特級]
14. リン酸一カリウム：リン酸二水素カリウム [特級]
15. 0.2mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0)：リン酸一カリウム 27.0 g とリン酸 0.2 g に水を加えて溶かして 1000mL とする。

[注]

- 1) 高タンパク食品及び高脂肪食品については水蒸気蒸留法では低回収率であるため、これらの食品には溶媒抽出法を用いる。安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸も同一の留液あるいは抽出液で分析可能である。なお、水蒸気蒸留法では分子量の小さいパラオキシ安息香酸エステルは、回収率が低い場合がある。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 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。

- 5) 50vol%メタノールを全量溶出し、固相抽出カラム内部を空気で置換する。
- 6) 試験溶液の濁りは分析カラムの目詰まりの原因となる。分析カラムの保護のため、試験溶液に濁りが観察されない場合でも、試験溶液を水系ポリテトラフルオロエチレン製メンブランフィルター (0.45 μ m) 等を用いてろ過を行うことが望ましい。最初のろ液5 mLを捨てた後、ろ液を採取し、試験溶液とする。
- 7) ポリマー固相抽出カラムからの溶出液について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、強陰イオン交換固相抽出カラム及び弱陰イオン交換固相抽出カラムによる精製を省略できる。
- 8) 装置の感度が不十分な場合は、ポリマー固相抽出カラムからの溶出液を試験溶液としてもよい。
- 9) 装置の感度が不十分な場合は、試料採取量を増やしてもよい。固形試料 50 g の場合は、水が足りないので、水を 100~200mL とし、飽和となるよう塩化ナトリウムを 60~80 g に変更する。さらに、混和後、酸性であることを確認する。ただし、試料採取量が多いと十分な回収率が得られないことがある。
- 10) 試料採取量を 5 g とする場合、泡立ちやすい豆類等の一部食品を除き、シリコーン樹脂の添加は必要ない。シリコーン樹脂を添加する場合には、食品添加物グレードのものを使用し、保存料を含む製剤等は使用しない。
- 11) 塩基性の食品では酸性とならない場合がある。そのような場合には、さらに酒石酸溶液 (15 \rightarrow 100)を加えて酸性にする。
- 12) テフロンチューブを使用したオートサンプラーでは、吸着する場合がある。その場合は、パラオキシ安息香酸エステル類が吸着しない素材のチューブに交換するか、留液にメタノールを加え、50vol%メタノール溶液とするとよい。
- 13) 直線性が確認できれば、適宜、検量線用標準溶液の数を調整してもよい。
- 14) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。また、夾雑物との分離等のためにグラジエント分析を行ってもよい。
- 15) 分析の際は、被験物質のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 16) その他、下記の移動相及びグラジエント溶離等が使用できる。
 - ・メタノール/5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (6 : 4)
 - ・水/メタノール/0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (17 : 2 : 1) 及び水/メタノール/0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (5 : 14 : 1) によるグラジエント溶離
 - ・5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (pH4.0) /アセトニトリル/メタノール混液 (7 : 2 : 1) 及び5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (pH4.0) /アセトニトリル/メタノール混液 (11 : 4 : 5) によるグラジエント溶離 (移動相の調製方法:アセトニトリルは高速液体クロマトグラフィー用を使用すること。5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (pH4.0) は、クエン酸一水和物 7.0 g 及びクエン酸三ナトリウム二水和物 6.0 g に水を加えて溶かして 1000mL とし、用時水で 10 倍に希釈して調製すること。)

- 17) 測定条件に示した移動相中でのパラオキシ安息香酸エステル類の吸収極大は 260nm 付近である。安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸と同じ 230nm でも測定可能であるが、260nm の方が感度が高い。
- 18) 安息香酸、ソルビン酸あるいはデヒドロ酢酸を同時に測定する場合は、試験溶液のメタノール濃度が高いと、保持時間に影響を与え、標準溶液における保持時間とずれが生じることがある。また、ピーク形状にも影響を与え、測定値に誤差が生じるおそれがある。このような現象は、保持時間の小さいピークに認めやすく、注入量が多くなると著しくなる。その場合には、標準溶液も同じ組成にし、良好なピーク形状が得られるように、注入量を調整する。アイソクラティック溶離を用いた内径 4.6mm の高速液体クロマトグラフィー用カラムによる分析の場合は、注入量が 20 μ L では、いずれの試験溶液においても差異はみられないが、グラジエント溶離を用いて安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸を同時に測定する場合は、10 μ L 以上で差異がみられる。
- 19) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 20) 式の説明：

抽出液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

$$C (\mu\text{g}/\text{mL}) \times V (\text{mL}) \times \text{固相抽出カラム溶出液量} (10\text{mL})$$

$$= \frac{\quad}{\text{希釈に用いた固相抽出カラム溶出液量} (2\text{mL}) \times \text{精製に用いた抽出液量} (5\text{mL})}$$

$$= CV$$

パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/kg)

$$\text{抽出液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度} (\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{抽出液量} (50\text{mL}) \quad 1$$

$$= \frac{\quad}{W (\text{試料の採取量} (\text{g}))} \times \frac{\quad}{1000*}$$

$$CV$$

$$= \frac{\quad}{W \times 20}$$

* $\mu\text{g}/\text{g}$ から g/kg に変更するために、1000 で除す。