

加工食品由来のパラオキシ安息香酸エステル類 及びノルビキシンの1日摂取量について

毛利 孝明・藤田 久雄・西岡 千鶴・吉田 明美・黒田 弘之

Daily Intake of p-Hydroxybenzoate Esters and Norbixin from the Processed Foods

Takaaki MOURI, Hisao FUJITA, Chizuru NISHIOKA, Akemi YOSHIDA and Hiroyuki KURODA

I 緒 言

日本人が一人一日摂取している食品添加物の種類と量を明らかにするため、昭和51年より平成8年まで厚生科学研究費により「食品添加物1日摂取量実態調査研究班」が組織されて調査解析が行われてきた。平成9年度からは、ほぼ同じ内容で厚生省の委託事業として「食品添加物マーケットバスケット調査」が実施されている。

平成9年度は加工食品由来のパラオキシ安息香酸エステル類及びノルビキシンの摂取量について調査を行ったので、その結果について報告する。

II 実験方法

1. 試料

平成9年8月、マーケットバスケット方式により、全国9機関（札幌市衛研、仙台市衛研、東京都衛研、長野県衛公研、武庫川女子大、鳥根県衛公研、香川県衛研、北九州市環研、沖縄県公衛研）で344種類の食品を購入し、表1に示した7食品群に分け、等量の水を加えて均質磨砕したもの（1群は希釈なし）をさらに3機関ごとに混合し、それぞれ東部グループ（札幌市、仙台市、長野の各衛生研究所）、中部グループ（東京、鳥根の各衛生研究所及び武庫川女子大）、西部グループ（香川、北九州市、沖縄の各衛生研究所）としたものを分析に供し

た。

2. 分析方法

①パラオキシ安息香酸エステル類

パラオキシ安息香酸エステル類については、衛生試験法の水蒸気蒸留-HPLC法¹⁾の一部を改良して分析を行った。衛生試験法は塩析剤としてNaClを使用しているが、この方法ではパラオキシ安息香酸エチルの回収率が50~60%と低いとため、西山ら²⁾の塩析剤として硫酸アンモニウムを用いる方法を採用した。

図1に示すように、試料10g（実質試料として）を500mlの丸底フラスコに採り、リン酸（1→10）10ml、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100g、水80ml及びシリコン樹脂1滴を加え、毎分10mlの留出速度で水蒸気蒸留を行い、留液500mlをとる。この留液100mlをとり、エーテル100mlで3回抽出し、エーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧濃縮し、メタノール：水（6：4）で10mlとし、試験溶液とした。試験溶液をHPLCに注入し、ピーク面積により定量を行った。図2に標準のクロマトグラム、表2にHPLC条件を示す。

表1 試料群及び食品の分類

群名	大 分 類	状 態	主 成 分	総重量
1	調味し好飲料	液 体	水, アルコール	374.7g
2	穀類	固 体	澱 粉	103.8g
3	いも類 17.5g, 豆類 70.8g, 種実類 0.8g	固 体	澱 粉	89.1g
4	魚介類 39.3g, 肉類 13.2g	固 体	蛋白質	52.5g
5	油脂類 18.0g, 乳類 49.2g	半固体	脂 肪	67.2g
6	砂糖類 1.1g, 菓子類 43.7g	固 体	炭水化物	44.8g
7	果実類 4.7g, 野菜類 28.1g, 海草類 3.0g	含水固体	繊 維	35.8g

第1, 2, 3, 7群

試料 10g (実質試料)
 10%リン酸 10ml
 (NH₄)₂SO₄ 100g
 水 80ml
 水蒸気蒸留
 500ml 定容
 100ml 分取
 エーテルで3回抽出
 100ml×3
 エーテル層
 無水硫酸ナトリウムで脱水
 減圧濃縮
 メタノール：水=6：4
 10ml定容
 HPLC

第4, 5, 6群

試料 2g (実質試料)
 15%硫酸でpH1
 エーテル70, 50, 50ml
 ホモジナイズ (氷冷)
 エーテル層
 飽和食塩水20mlで洗浄
 0.4NKOH・メタノール混液 (1：1) で
 抽出 25ml×2
 0.4NKOH・メタノール層
 水 100ml
 15%硫酸でpH1
 エーテルで抽出 100ml×3
 エーテル層
 無水硫酸ナトリウム10gで脱水
 減圧濃縮
 メタノール：水=6：4
 10ml定容
 HPLC

図1 パラオキシ安息香酸エステル類の分析法

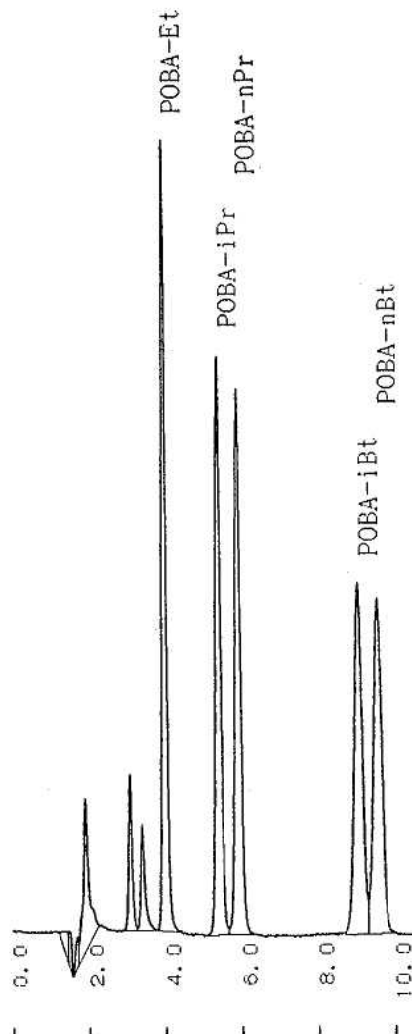


図2 パラオキシ安息香酸エステル類のクロマトグラフ

表2 パラオキシ安息香酸エステル類のHPLC分析条件

機種	島津LC-6A
column	Inertsil ODS-2 (4.6×150mm)
column温度	40℃
移動相	メタノール：5mMクエン酸緩衝液(pH4)=6：4
流量	1.0ml/min
検出器	UV (260nm) , フォトダイオードアレイ検出器

第1群及び第7群では良好な結果が得られたが、第2群及び3群では十分な結果が得られなかった。このため、第2群及び3群でパラオキシ安息香酸エステル類が検出された場合は水蒸気蒸留の留液を1000mlとすることとした。第4群、第5群、第6群については、「食品中の食品添加物分析法」(溶媒抽出法)³⁾を用いた。すなわち、図3に示すように、試料2g(実質試料として)をホモジナイザーカップにいれ、15%硫酸を加えてpH1とし、エチルエーテル70, 50, 50mlを加え氷冷しながらホモジナイズする。全エチルエーテル層を合わせ、飽和NaCl20mlで洗浄後、0.4NKOH・メタノール混液(1：1)25mlで2回抽出する。下層に水100mlを加え、15%硫酸でpHを1とし、エチルエーテル100mlで3回抽出を行う。エチルエーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧濃縮し、メタノール：水(6：4)で10mlとし、試験溶液とした。試験溶液をHPLCに注入し、ピーク面積により定量を行った。

パラオキシ安息香酸エステル類が検出された試料については、フォトダイオードアレイ検出器によって確認を行った。

②ノルビキシン

ノルビキシンについては、平成6年度本研究班の調査で採用されている分析法⁴⁾を用いた。標準液の調製は「食品中の食品添加物分析法」⁵⁾に準拠した。

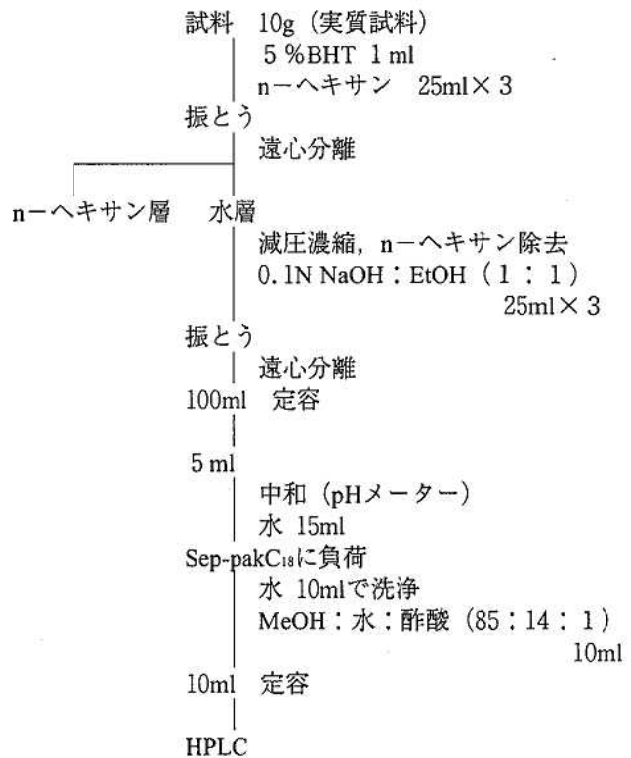


図3 ノルビキシンの分析法

図3に示すように、試料10g(実質試料として)を遠沈管に採り、5%BHTメタノール溶液1mlを加えた後、n-ヘキサン25mlを加え5分間振とうし、3000rpmで10分遠心分離を行う。n-ヘキサンを捨て、さらにn-ヘキサン25mlずつを加えて2回同様な操作を行い、脱脂及びβ-カロチンを除去する。ロータリエバポレータでn-ヘキサンを除去した後、0.1N NaOH・EtOH(1：1)25mlを加え5分間振とうし、3000rpmで10分遠心分離を行う。さらに、0.1N NaOH・EtOH(1：1)25mlずつを加えて2回抽出を行い抽出液をあわせて水で100mlとする。この抽出液5mlを採り水15mlを加えてpHメーターで中和後、Sep-pak C₁₈カートリッジに負荷する。水10mlで洗浄後、メタノール：水：酢酸(85：14：1)10mlでノルビキシンを溶出させ、HPLCに注入し定量を行った。図4に標準のクロマトグラム、図5に検体のクロマトグラム、表3にHPLC条件を示す。

ノルビキシンが検出された試料について、フォトダイオードアレイ検出器によって確認を行った。図6にフォトダイオードアレイ検出器による標準と検体のスペクトルパターンの比較を示した。

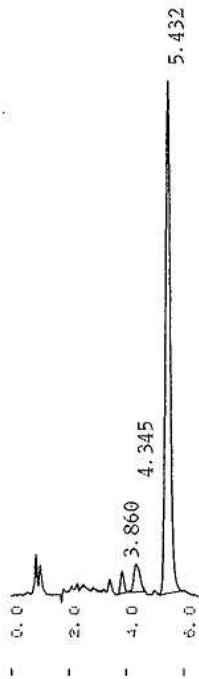


図4 ノルビキシンのクロマトグラフ

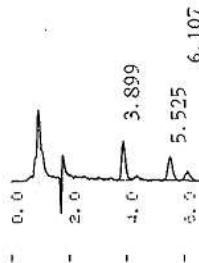


図5 検体（4群）のクロマトグラフ

表3 ノルビキシンのHPLC分析条件

機種	島津LC-6A
column	Inertsil ODS-2 (4.6×150mm)
column温度	40℃
移動相	メタノール：水：酢酸 (85：14：1)
流量	1.0ml/min
検出器	可視部(453nm), フォトダイオードアレイ検出器

3. 添加回収実験並びに定量限界

①パラオキシ安息香酸エステル類

西部グループ1, 2, 3, 4, 5, 6, 7群を用い、水蒸気蒸留法については、25 μg/g (実質試料)、溶媒抽出法については、5 μg/g (実質試料) 添加レベルで回収率を求め、その結果を表4及び表5に示す。水蒸気蒸留法で41.3~100.1% (第1, 2, 3, 7群)、溶媒抽出法で81.6~92.0% (第4, 5, 6群) の回収率が得られた。本法によるパラオキシ安息香酸エステル類の定量限界は、それぞれのエステルにつき0.1 μg/gであった。

スペクトル
Similarity:0.9924 Threshold:0.9936

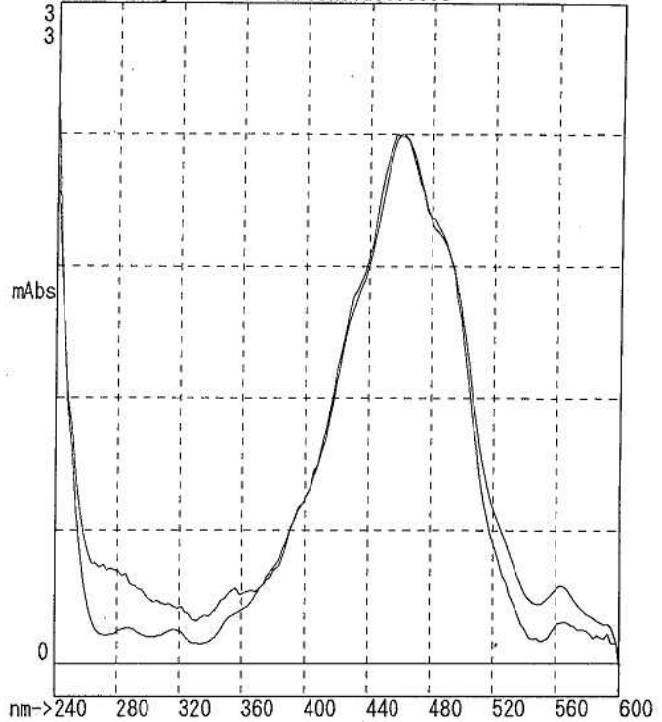


図6 ノルビキシンのスペクトルの比較(標準及び検体)

表4 パラオキシ安息香酸エステル類の回収率 (水蒸気蒸留法)

食品群	POBA-Et	POBA-iPr	POBA-nPr	POBA-iBt	POBA-nBt
1	98.3	100.1	100.0	98.1	98.2
2	66.0	76.0	59.0	50.6	41.3
3	76.4	80.9	63.7	51.0	41.6
7	96.4	98.5	94.6	86.2	79.6

n=3

表5 パラオキシ安息香酸エステル類の回収率 (溶媒抽出法)

食品群	POBA-Et	POBA-iPr	POBA-nPr	POBA-iBt	POBA-nBt
4	81.6	89.9	85.5	86.4	85.5
5	85.5	89.2	87.6	84.7	84.4
6	92.0	91.1	90.8	89.3	87.8

n=3

②ノルビキシシン

西部グループ1, 2, 3, 4, 5, 6, 7群を用い、20 μg/g (実質試料) 添加レベルで回収率を求め、その結果を表6に示す。ノルビキシンの回収率は、60.8~84.8%であった。また、図7に示すように試料に添加した標準のピークは2~3 (Rt=3.9, 5.5, 6.1分) に分かれるため、回収率は各ピーク面積を合計して求めた。本法によるノルビキシンの定量限界は、0.1 μg/gであった。

表6 ノルピキシンの回収率

食品群	回収率
1	84.8
2	70.1
3	62.3
4	60.8
5	67.7
6	80.2
7	66.7

n = 3

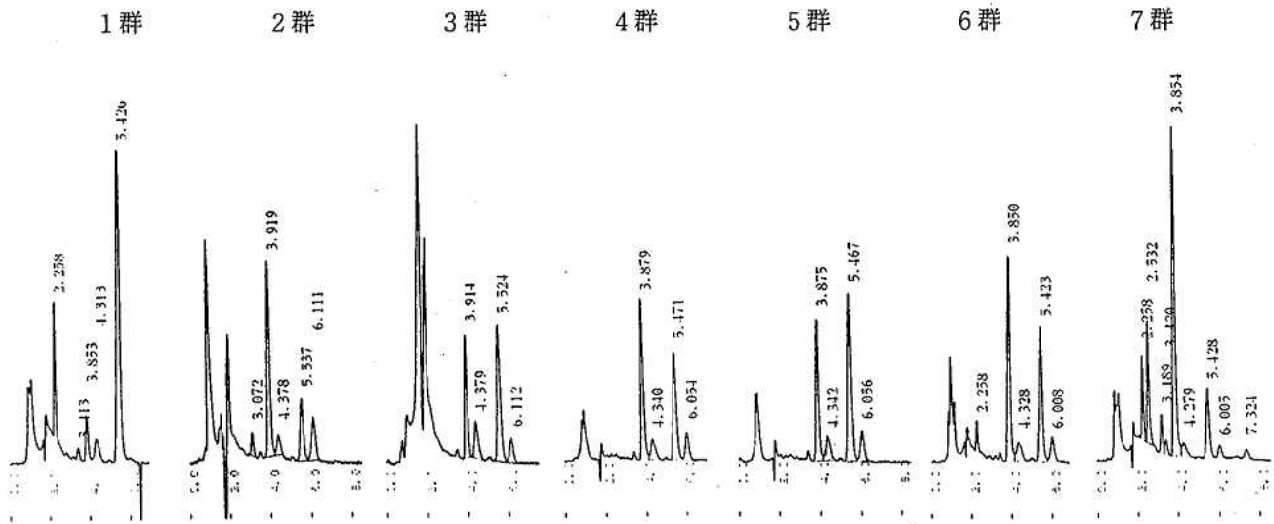


図7 標準を添加した各群のクロマトグラフ

Ⅲ 結果及び考察

①パラオキシ安息香酸エステル類

各試料につき、パラオキシ安息香酸エステル類の分析

法に従って試料中のパラオキシ安息香酸エステル類の含有量を求めた結果を表7に示す。各群試料の1日喫食重量から加工食品由来の1日摂取量を算出した結果を表8に示した。

表7 加工食品中のパラオキシ安息香酸エステル類の食品群別含有量 (μg/g)

食品群	1群	2群	3群	4群	5群	6群	7群
パラオキシ安息香酸エチル	0	0	0	0	0	0	0
パラオキシ安息香酸イソプロピル	0.10	0	0	0	0	0	0
パラオキシ安息香酸プロピル	0	0	0	0	0	0	0
パラオキシ安息香酸イソブチル	0.07	0	0	0	0	0	0
パラオキシ安息香酸ブチル	0.47	0	0	0	0	0	0.27

表8 加工食品中のパラオキシ安息香酸エステル類の食品群別摂取量 (mg/day)

食品群	1群	2群	3群	4群	5群	6群	7群	総摂取量
パラオキシ安息香酸エチル	0	0	0	0	0	0	0	0
パラオキシ安息香酸イソプロピル	0.037	0	0	0	0	0	0	0.037
パラオキシ安息香酸プロピル	0	0	0	0	0	0	0	0
パラオキシ安息香酸イソブチル	0.026	0	0	0	0	0	0	0.026
パラオキシ安息香酸ブチル	0.176	0	0	0	0	0	0.010	0.186

パラオキシ安息香酸エチル及びパラオキシ安息香酸プロピルはすべての試料から検出されなかった。パラオキシ安息香酸イソプロピルは、第1群の1試料から検出され、1日摂取量は、0.037mgであった。パラオキシ安息香酸ブチルは、第1, 7群の全試料から検出され、1日摂取量は、0.186mgであった。パラオキシ安息香酸イソブチルは、第1群の1試料から検出され、1日摂取量は、0.026mgであった。パラオキシ安息香酸エステル類の1日総摂取量は、0.249mgであり、これまでの調査の1日総摂取量(0.1mg前後)の約2倍になった。ADI(mg/kg×日本人の平均体重50kg)は500mgであるので、これと比較すると0.05%と非常に少ない値である。

②ノルビキシン

各試料につき、ノルビキシンの分析法に従って試料中のノルビキシンの含有量を求めた結果を表9に示す。各群試料の1日喫食重量から加工食品由来の1日摂取量を算出した結果を表10に示した。ノルビキシンは、第4, 5, 6, 7群から検出され、1日総摂取量は、0.144mgであった。

アナトー色素(2%溶液)の国内需要量は、550t(推定)⁶⁾である。これから1日摂取量を計算すると0.24mgとなり、今回の調査結果とほぼ一致している。コロッケ、魚介漬物、いか調味品、冷凍エビフライ、ソーセージ、アイスマイルク、ラクトアイス、かりんとう、アメ、クラッカー、さくらんぼ(缶詰)等に使用の表示があり、かなり広範囲に使用されているようである。

ノルビキシンのADIは設定されていないが、ビキシンのADIは3.25mgとなっているので、これと比較するとADIに対する割合は4.4%となる。

表9 加工食品中のノルビキシンの食品群別含有量(μg/g)

食品群	1群	2群	3群	4群	5群	6群	7群
ノルビキシン	0	0	0	1.07	0.60	0.53	0.67

表10 加工食品中のノルビキシンの食品群別摂取量(mg/day)

食品群	1群	2群	3群	4群	5群	6群	7群	総摂取量
ノルビキシン	0	0	0	0.056	0.040	0.024	0.024	0.144

IV 結 論

食品添加物の1日摂取量に関する研究について、本年度は加工食品由来のパラオキシ安息香酸エステル類及びノルビキシンの摂取量について調査を行った。調査に用いた試料は、9分担研究機関において調製した食品の混合物をさらに3機関ごとに混合したもの、第1~7群の合計21試料である。パラオキシ安息香酸エステル類は、水蒸気蒸留または溶媒抽出後、HPLCによって分析を行った。ノルビキシンは、HPLCによって分析を行った。

パラオキシ安息香酸エステル類の1日総摂取量は0.249mgであった。

ノルビキシンの1日総摂取量は、0.144mgであった。

貴重な試料を提供して頂いた太田紀之(札幌市衛研)、大澤テイ子(仙台市衛研)、中里光夫(東京都衛研)、宮川あし子(長野県衛公研)、矢田朋子(武庫川女子大)、後藤宗彦(島根県衛公研)、石橋正博(北九州市環研)、玉城宏幸(沖縄県衛環研)諸氏に感謝します。

文 献

- 1) 日本薬学会衛生化学調査委員会編, 日本薬学会第111年会 公衆衛生協議会資料, p6~8 (1991)
- 2) 西山修ら: 食衛誌, 36, 495~500 (1995)
- 3) 厚生省生活衛生局食品化学課編, 「食品中の食品添加物分析法」, p25~32 (1989)
- 4) 山城興博: 沖縄県衛生環境研究所報, 28, 53~55 (1994)
- 5) 厚生省生活衛生局食品化学課編, 「食品中の食品添加物分析法」, p516~523 (1989)
- 6) 中村幹男: 食品衛生研究, 45, No.1, 55 (1995)