

しょうゆ及びしょうゆ漬中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析

吉田 あゆむ^a, 佐藤 千鶴子^a, 安井 明子^a, 山嶋 裕季子^a, 坂牧 成恵^a, 貞升 友紀^b, 小林 千種^a

平成30年から令和元年に市販されたしょうゆ4検体及びしょうゆ漬22検体について、食品添加物の保存料含有量調査を実施した。定量下限値を下げた分析法を用いたところ、パラオキシ安息香酸 (PHBA) エステル類の原材料表示がないしょうゆ漬3検体から、複数成分のPHBAエステル類0.002~0.005 g/kgを検出した。また、しょうゆ3検体から使用基準未満の複数成分のPHBAエステル類を検出した。しょうゆ及びしょうゆ漬から検出された成分の比率が類似していることから、しょうゆ漬より検出されたPHBAエステル類は原材料に用いたしょうゆに由来すると推定された。定量下限値を下げた分析法を用いて測定し、PHBAエステルの種類を確認することにより、食品からPHBAエステル類を検出した場合の原因調査の一助にできると考える。

キーワード: 保存料, パラオキシ安息香酸エステル類, 安息香酸, ソルビン酸, 水蒸気蒸留法, 透析法, LC, しょうゆ, 漬物, 食品添加物

はじめに

我が国で保存料として許可されているPHBAエステル類は、パラオキシ安息香酸エチル (PHBA-E), パラオキシ安息香酸イソプロピル (PHBA-iP), パラオキシ安息香酸プロピル (PHBA-nP), パラオキシ安息香酸イソブチル (PHBA-iB), パラオキシ安息香酸ブチル (PHBA-nB) の5種類である。食品衛生法における対象食品ごとの使用基準値はPHBAとして定められており、しょうゆでは0.25 g/L以下、果実ソースでは0.20 g/kg以下、酢では0.10 g/L以下、清涼飲料水及びシロップでは0.10 g/kg以下、果実又は果菜 (いずれも表皮の部分に限る) では0.012 g/kg以下と定められている¹⁾。厚生労働省通知²⁾では、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を計算するとある。なお、日本では食品への使用が認められないパラオキシ安息香酸メチル (PHBA-M) は、「パラオキシ安息香酸エステル類」とは区別して扱う。

平成30年12月に収去された、なすのしょうゆ漬を検査したところ、表示にないPHBA-iP, PHBA-iB及びPHBA-nBのピークがそれぞれ定量下限値 (0.005 g/kg) 未満で見られた。当該製品の表示にはソルビン酸カリウムとあり、ソルビン酸は検出されている。痕跡として見られたPHBAエステル類については、漬物製造時の添加ではなく、原材料のしょうゆ由来と推察された。

そこで今回、市販されているしょうゆ及びしょうゆ漬中のPHBAエステルについて、検出感度を上げ、定量下限値を0.001 g/kgに設定した方法を用いた調査を行い、若干の知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

平成30年から令和元年に東京都内のスーパー、小売店等で入手したしょうゆ4検体及びしょうゆ漬22検体を用いた。

2. 試薬等

1) 標準品

安息香酸 (BA), ソルビン酸 (SOA) は富士フィルム和光純薬工業 (株) 製, デヒドロ酢酸 (DHA), PHBA-M, PHBA-E, PHBA-iP, PHBA-nP, PHBA-iB, PHBA-nB は東京化成工業 (株) 製を用いた。いずれも特級品である。

2) メタノール及びアセトニトリル

高速液体クロマトグラフ用を用いた。

3) その他の試薬

塩化ナトリウムは日本薬局方を、その他の試薬は特級を用いた。

4) 標準原液及び混合標準溶液

(1) 標準原液

各標準品をそれぞれ100 mg量り、メタノールで100 mLに定容したものを標準原液 (各1,000 µg/mL) とした。

(2) 保存料9種一斉分析用混合標準溶液

各標準原液を適宜希釈してBA, SOA, DHA50 µg/mL, 6種のPHBAエステル25 µg/mLの9種混合標準溶液を調製した。これを、30%メタノールで適宜希釈してBA, SOA, DHAは0.1~20 µg/mL, PHBAエステルは0.05~10 µg/mLの範囲で保存料9種一斉分析用の混合標準溶液を調製した (透析法用)。ただし、水蒸気蒸留法の場合は、混合標準溶液を水で調製した。

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター食品化学部

(3) PHBAエステル6種分析用混合標準溶液

各標準原液をメスフラスコに採り30%メタノールで希釈してPHBAエステル25 µg/mL混合標準溶液を調製した。これを、30%メタノールで適宜希釈して0.05~5 µg/mLの範囲でPHBAエステル6種分析用の混合標準溶液を調製した(透析法用)。ただし、水蒸気蒸留法の場合は、混合標準溶液を水で調製した。

5) 透析膜

透析用セルロースチューブ36/32(平面幅44 mm, 直径28 mm, 壁厚0.0203 mm, 透過分子量14,000, Viskase社製)

3. 試験溶液の調製

粕谷らの透析法³⁾に準じて行った。試料 10 g を採り、30%メタノール約 50 mL を用いて透析膜に充てんし、よく混和して上端を密封した(有効長約 20 cm)。これをメスシリンダーに入れ、30%メタノールで全量を 200 mL とし、実験用パラフィルムでメスシリンダーの口を密封した。透析開始直後から1時間ごと(日中)に約5回上下に転倒混和して、室温にて24時間透析を行った。得られた透析外液を0.45 µmのメンブランフィルターでろ過し、LC用試験溶液とした。

透析法でLCクロマトグラム上に夾雑成分が多く判定困難な試料については、厚生労働省通知²⁾の水蒸気蒸留法(蒸留法)に準じて試験溶液の調製を行った。なお、試料採取量は透析法と同一希釈倍率となるように25 gとし、留液を500 mLとした。

4. 装置

LC: Agilent Technologies 社製 1260 series

5. LC条件

原則1)で分析し、妨害ピークが出現する等により判定や定量が困難な場合には、2)を併用した。

1) 保存料9種一斉分析条件

カラム: Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 µm), 移動相: A;メタノール・アセトニトリル・5 mmol/Lクエン酸緩衝液(pH4.0) (1:2:7), B;メタノール・アセトニトリル (1:2), A液100% (0-7.5分) →68% (10.5-22分) →100% (22.1-30分) のグラジエント溶出, 流速: 0.8 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 10 µL, 検出波長: 230 nm (BA, SOA及びDHA), 260 nm (PHBAエステル類)

2) PHBAエステル6種分析条件

カラム: Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 µm), 移動相: メタノール・5 mmol/Lクエン酸緩衝液(pH4.0) (6:4), 流速: 0.6 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 10 µL, 検出波長: 254 nm

6. 本調査の定量下限値

JISの高速液体クロマトグラフィー通則⁴⁾に従い, S/N比10以上かつ変動係数が10%未満となる最小の濃度0.05 µg/mLをLCの定量下限値とした。これに基づき, しょうゆ漬は0.001 g/kg, しょうゆについては0.001 g/Lを各PHBAエステル類の定量下限値に設定した。

なお, BA, SOA及びDHAについては参考として分析したことから, 通知法に設定されている0.01 g/kg(試験溶液として0.5 µg/mL)を定量下限値とした。

7. 精度管理

あらかじめ保存料を検出しないことを確認した清涼飲料水あるいは漬物を陰性検体として分析の度に併行試験を行った。また, BA 250 µg/g, PHBA-nP 50 µg/gとなるように標準溶液を添加した清涼飲料水, 又は, PHBAエステル6種が10 µg/gとなるように標準溶液を添加した漬物を, 陽性検体として分析の度に併行試験を行った。透析法では98.1%~101.4%, 蒸留法ではPHBA-Mを除く前述の7種保存料について82.3%~97.3%の回収が得られた。PHBA-Mは蒸留法で回収率が低下することが知られており⁵⁾, 57.3%~61.0%であった。

結果及び考察

1. 調査結果

しょうゆ漬22試料, しょうゆ4試料について分析した結果を表1に示した。PHBAエステル類は各物質としての含有量を示しており, これに分子量比を乗じてPHBAとして合算した値を「合計」欄に示した。

検体 No.1~3 のしょうゆ漬から, PHBA-iP を 0.002~0.005 g/kg, PHBA-iB を 0.002~0.003 g/kg, PHBA-nB を 0.002~0.003 g/kg 検出し, PHBA としての合計値は 0.005~0.008 g/kg であった。これらのしょうゆ漬には PHBA エステル類の食品表示はなかった。

検体 No.23 及び No.24 のしょうゆから PHBA-E を 0.002 g/L, 0.001 g/L, PHBA-iP を 0.040 g/L, 0.034 g/L, PHBA-iB を 0.011 g/L, 0.017 g/L, PHBA-nB を 0.013 g/L, 0.019 g/L 検出し, 検体 No.25 から PHBA-E のみを検出した。これら3検体のしょうゆは PHBA エステル類の食品表示があり, PHBA 換算の合計値は使用基準未満であった。

その他の20試料から, PHBA エステル類を検出したものはなかった。

2. しょうゆのPHBAエステル類について

しょうゆでは, 産膜酵母のような耐塩性の酵母菌が繁殖し風味を損なうため, PHBA エステル類が食品添加物として許可されている^{6,7)}。化粧品・医薬品などの防腐にも使用されている PHBA エステル類は, 水に難溶であり, しょうゆのような高濃度の塩分のもとでも溶解度が小さい^{7,8)}。そこで, エタノール溶液や酢酸溶液あるいは複数の PHBA エステル類を混合して用いる⁸⁾。例えば, PHBA-nB, PHB

表 1. しょうゆ及びしょうゆ漬中の保存料含有量

検体 No.	品名	原産国	添加物表示	分析法	PHBA-M (g/kg)	パラオキシ安息香酸エステル類(g/kg)					安息香酸 (g/kg)	ソルビン酸 (g/kg)	デヒドロ酢酸 (g/kg)	
						PHBA-E	-IP	-nP	-iB	-nB				合計 ^{a)}
1	なすのしょうゆ漬	日本	ソルビン酸K	透析	ND	ND	0.003	ND	0.002	0.002	0.006	ND	0.72	ND
2	きゅうりのしょうゆ漬	日本	ソルビン酸K	透析	ND	ND	0.005	ND	0.003	0.003	0.008	ND	0.99	ND
3	しゃくし菜のしょうゆ漬	日本		透析	ND	ND	0.002	ND	0.002	0.002	0.005	ND	ND	ND
4	大根のしょうゆ漬	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	高菜の塩漬け(刻み)	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	福神漬	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	干し大根のしょうゆ漬	日本		透析 蒸留	ND —	— ND	ND —	ND —	ND —	ND —	ND	ND —	ND —	ND —
8	すぐき蕪のしょうゆ漬(刻み)	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	大根のしょうゆ漬	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	高菜のしょうゆ漬	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	高菜のしょうゆ漬(刻み)	日本		透析 蒸留	ND —	— ND	ND —	ND —	ND —	ND —	ND	ND —	ND —	ND —
12	生姜のしょうゆ漬(刻み)	日本		透析 蒸留	ND —	— ND	ND —	ND —	ND —	ND —	ND	ND —	ND —	ND —
13	干し大根のしょうゆ漬(刻み)	日本	ソルビン酸K	透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.54	ND
14	ごぼうのしょうゆ漬	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	干し大根のしょうゆ漬	日本		透析 蒸留	ND —	— ND	ND —	ND —	ND —	ND —	ND	ND —	ND —	ND —
16	高菜のしょうゆ漬	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	すぐき蕪のしょうゆ漬(刻み)	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	刻みしば漬(しょうゆ漬)	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	にんにくのしょうゆ漬	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	きゅうりのしょうゆ漬(薄切り)	中国	ソルビン酸K	透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.28	ND
21	高菜のしょうゆ漬(刻み)	日本		透析	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	大根・きゅうり・しその実・生姜のしょうゆ漬(刻み)	日本	ソルビン酸K	透析 蒸留	ND —	ND —	— ND	ND —	ND —	ND —	ND	ND —	0.82 0.80	ND —
23	こいくちしょうゆ(混合)	日本	パラオキシ安息香酸	透析 蒸留	ND —	— 0.002 ^{b)}	— 0.040 ^{b)}	— ND	— 0.011 ^{b)}	— 0.013 ^{b)}	— 0.050 ^{b)}	ND —	ND —	ND —
24	こいくちしょうゆ(混合)	日本	パラオキシ安息香酸	透析 蒸留	ND —	— 0.001 ^{b)}	— 0.034 ^{b)}	— ND	— 0.017 ^{b)}	— 0.019 ^{b)}	— 0.053 ^{b)}	ND —	ND —	ND —
25	こいくちしょうゆ(混合)	韓国	パラオキシ安息香酸 エチル	透析 蒸留	ND —	0.160 ^{b)} 0.137 ^{b)}	ND —	ND —	ND —	ND —	0.133 ^{b)} 0.113 ^{b)}	ND —	ND —	ND —
26	こいくちしょうゆ(醸造)	韓国		透析 蒸留	— ND	— ND	ND —	ND —	ND —	ND —	ND	ND —	ND —	ND —

定量下限値：パラオキシ安息香酸エステル類(各エステルとして)・パラオキシ安息香酸メチル (PHBA-M) 0.001 g/kg
安息香酸・ソルビン酸・デヒドロ酢酸 0.01 g/kg

ND：検出しない —：検査実施せず又は検査不能

a) 5種のエステルをパラオキシ安息香酸として合算した値を合計欄に示した。

b) 単位はg/L。

A-iB, PHBA-iP を 3:3:4 の割合で混合すると共融合を起こし、常温で液体となり、溶解度も非常に大きくなる⁷⁾。この共融混合物を水中油型乳剤として用いると、しょうゆへの混合・溶解が容易になる^{7,8)}。実際に、しょうゆを対象食品としたパラオキシ安息香酸製剤として、PHBA-iP 20%、PHBA-nB 15%、PHBA-iB 15%、エタノール（溶剤）50%の割合で配合された液体製剤がある⁹⁾。今回、しょうゆ漬（No.1~3）から検出された PHBA-iP, PHBA-iB, PHBA-nB の比率から、いずれも PHBA-nB と PHBA-iB が概ね同量で、PHBA-iP がこれら 2 つの 1.5 倍程度となった。これは、上述の共融混合物や製剤と同じ組合せであり、比率も類似していることから、原材料のしょうゆにこうしたパラオキシ安息香酸製剤を使用していると考えられた。

なお、しょうゆの JAS 規格では、製品に使用できる添加物として、保存料では『安息香酸ナトリウム、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及びパラオキシ安息香酸ブチルのうち 3 種以下』と定められている¹⁰⁾。

さらに、過去に当センターで実施した輸入しょうゆの調査¹¹⁾では、台湾産のしょうゆから PHBA-nB、韓国産のしょうゆから PHBA-nB 単独、PHBA-nB 及び PHBA-E、PHBA-nB と PHBA-iP 及び PHBA-iB の組合せで検出された。また、平成 19 年度の一日摂取量調査¹²⁾でも、PHBA エステル類添加表示のあるいくつかのしょうゆから、PHBA-iP, PHBA-iB, PHBA-nB が検出された。これら過去の調査も踏まえると、実際にパラオキシ安息香酸エステル類の表示のあるしょうゆの中には、PHBA-nB, PHBA-iB, PHBA-iP を 3:3:4 で添加したものが存在すると考えられた。

PHBA エステル類の中ではブチルエステルの抗菌作用が優れており、しょうゆへの使用量は通常 0.05~0.10 g/L であること⁸⁾、諸外国では PHBA-E, PHBA-nP の使用が多く、日本では PHBA-nB が最も多く使用されている^{8,11)}ことが知られている。今回、検体 No.25 の韓国産しょうゆには PHBA-E の表示があり、透析法で 0.160 g/L、蒸留法で 0.137 g/L 検出した。なお、しょうゆの使用基準は PHBA として 0.25 g/L 以下であり、基準内であった。輸入しょうゆの調査¹¹⁾で述べているように、今回の調査からも外国で使われる PHBA エステル類の種類は、日本国内と異なっていた。

3. しょうゆ漬について

複数の PHBA エステル類を使用したしょうゆを、漬物等の製造に用いた場合、微量の PHBA エステル類が複数検出されると推測された。今回の調査で通知法の定量下限値（0.005 g/kg）未満の PHBA エステル類を検出した試料に PHBA エステル類の表示はなかった。また、漬物は PHBA エステル類の許可対象食品ではなく、しょうゆ漬の保存性向上を目的として添加されたと考えるには量が少ないことから、原材料のしょうゆ由来であると考えられた。なお、漬物を製造する際に PHBA エステル類を直接使用せず、

PHBA エステル類を含有するしょうゆを用いた場合、漬物に保存の効果を発揮することができる量より少ない量しか含有されないときは、キャリーオーバーとみなし、食品表示法上、表示は省略できる。

本調査から、通知法より定量下限値を下げた分析法を用いて、食品表示にないしょうゆ漬中の PHBA エステル類を測定し、エステルの種類を確認することにより、原材料で使ったしょうゆ由来の可能性を示すことができた。この手法を用いることにより、加工食品から表示のない PHBA エステル類を検出した場合に、食品表示法の適否の判断のための原因調査の一助にできると考える。

ま と め

市販のしょうゆ及びしょうゆ漬の合計 26 検体について保存料含有量調査を実施した。通知法より定量下限値を下げた分析法を用いた結果、しょうゆ 3 検体から使用基準未満の複数種類の PHBA エステル類を検出した。また、PHBA エステル類の原材料表示がないしょうゆ漬 3 検体から 0.002~0.005 g/kg の複数種類の PHBA エステル類を検出した。一方、しょうゆから類似した成分比率の PHBA エステル類を検出した事例があったことから、しょうゆ漬から検出された PHBA エステル類は保存効果を狙って添加されたものではなく、原材料として使用したしょうゆに由来するものと推察された。

今後このような事例のデータを蓄積し、日常検査に活かしていくことが必要と考える。

文 献

- 1) 厚生省告示第370号：食品、添加物等の規格基準，第2 添加物，F 使用基準，昭和34年12月28日制定・令和2 年9月14日改正。
- 2) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長：薬生 食基発0624第1号，厚生労働省医薬・生活衛生局食品 監視安全課長：薬生食監0624第1号，「食品中の食品 添加物分析法」の改正について，別添3（通知），令 和3年6月24日。
- 3) 粕谷陽子，松田敏晴，中里光男，他：東京健安研七年 報，54，104-108，2003。
- 4) 日本規格協会：高速液体クロマトグラフィー通則 JIS K0124，1983年制定・2011年改訂。
- 5) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編 2003，21-25，2003，日本食品衛生協会，東京。
- 6) 野白喜久雄，小崎道雄，好井久雄：醸造学，199， 1982，講談社，東京。
- 7) 松田敏夫，古橋樹雄：別冊フードケミカル-5，保存料 総覧，22-61，1993，食品化学新聞社，東京。
- 8) 川西 徹，穂山 浩，河村葉子，佐藤恭子：第9版食 品添加物公定書解説書，下，D-1710-1726，2019，廣川 書店，東京。
- 9) 食品添加物表示問題連絡会，一般社団法人日本食品添

加物協会：新食品添加物表示の実務2017, 253, 2017,
一般社団法人日本食品添加物協会, 東京.

- 10) 一般財団法人日本醤油技術センター：しょうゆのJAS
製品に使用可能な添加物リスト,
<https://www.soysauce.or.jp/gijutsu/pdf/tenkabutu.pdf>
(2021年6月30日現在. なお本URLは変更または抹消
の可能性がある)
- 11) 山嶋裕季子, 田口信夫, 小林千種, 他：東京衛研年
報, **53**, 78-82, 2002.
- 12) 宮川弘之, 山嶋裕季子, 田口信夫, 他：東京健安研
セ年報, **61**, 239-247, 2010.

Analysis of Paraoxybenzoic Acid Esters in Soy Sauce and Soy Sauce Pickles

Ayumu YOSHIDA^a, Chizuko SATO^a, Akiko YASUI^a,
Yukiko YAMAJIMA^a, Narue SAKAMAKI^a, Yuki SADAMASU^a and Chigusa KOBAYASHI^a

We investigated the preservative content of 4 soy sauces and 22 soy sauce pickles marketed from 2018 to 2019. Using an analytical method with a lowered lower limit of quantification, 0.002–0.005 g/kg of paraoxybenzoic acid (PHBA) esters, which are multiple components, were detected in three samples of soy sauce pickles with no food label for PHBA esters. In addition, PHBA esters with multiple components below the usage standard were detected in three soy sauce samples. Since the ratios of the components detected in the soy sauce and soy sauce pickle samples were similar, we presumed that the PHBA esters detected in the soy sauce pickles were derived from the soy sauce used in the product. Using an analytical method with a lowered lower quantification limit, and confirming the type of PHBA ester, can help investigate the origin of PHBA esters detected in food.

Keywords: preservative, paraoxybenzoic acid esters, benzoic acid, sorbic acid, steam distillation, dialysis, LC, soy sauce, pickles, food additive

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan