

酸化防止剤

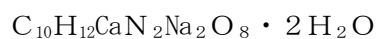
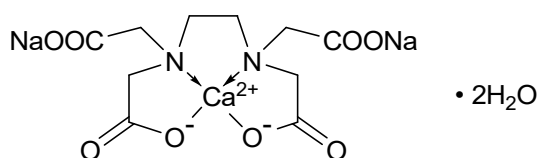
エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム

及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム

Calcium Disodium Ethylenediaminetetraacetate and  
Disodium Ethylenediaminetetraacetate

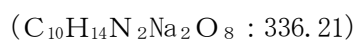
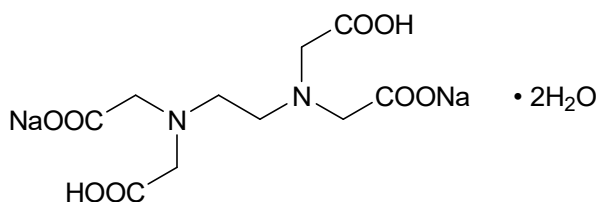
エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム

別名：EDTAカルシウム二ナトリウム



エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム

別名：EDTA二ナトリウム

1. 分析法の概要<sup>1)</sup>

食品中のエチレンジアミン四酢酸（EDTA）カルシウム二ナトリウム及びEDTA二ナトリウムは、トリス・塩酸緩衝液により抽出し、テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物を加えて逆相固相抽出カラムで精製した後、塩化鉄（Ⅲ）と反応させEDTA鉄ナトリウムとし、液体クロマトグラフィーにより定量する。分子量比を乗じてEDTAカルシウム二ナトリウムの量として求める。（2023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) 抽出液の調製

### ① 高脂質食品<sup>2)</sup>

試料約 5 g を精密に量り、50 mL の遠心管に入れ、トリス・塩酸緩衝液 (0.2 mol/L、pH 8.5) 10 mL、水 20 mL 及びヘキサン 15 mL を加え、10 分間超音波処理し、遠心 (5 分間、3000 回転/分) を行い、水層を 100 mL のメスフラスコに入れる。残ったヘキサン層に水 25 mL を加え、10 分間超音波処理した後、遠心 (5 分間、3000 回転/分) を行い、水層を先のメスフラスコに合わせる。この操作を 2 回繰り返す、分取した水層に水を加えて正確に 100 mL とする。この液をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を抽出液とする。

### ② その他の食品<sup>3)</sup>

試料約 5 g を精密に量り、トリス・塩酸緩衝液 (0.2 mol/L、pH 8.5) 10 mL 及び水約 80 mL を加え、10 分間超音波処理を行い、水層を 100 mL のメスフラスコに入れ、水を加えて正確に 100 mL とする。この溶液をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を抽出液とする。

## (3) 試験溶液の調製

抽出液 2 mL を正確にとって 10 mL の試験管に入れ、0.05 mol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 1 mL を加えて混和し、水を加えて 10 mL とする。この液全量を、逆相固相抽出カラムに負荷し、毎分 2 mL の速度で流す。水 20 mL、7.5 vol% メタノール 10 mL、水 10 mL を順次通してカラムを洗浄し、塩酸含有 30 vol% メタノール 7.5 mL で EDTA を溶出する。溶出液を 10 mL の試験管で受け、80°C に加温しながら窒素を吹きつけて 2 mL 以下になるまで濃縮する。残った溶液に塩化鉄 (III)・メタノール試液を 10 µL 加え、よく振り混ぜた後に 5 分間放置し、水を加えて正確に 2 mL とする<sup>4)</sup>。この液をメンブランフィルター (0.45 µm) でろ過したものを試験溶液とする。

## (4) 検量線用標準溶液の調製<sup>5)</sup>

EDTA 鉄ナトリウム三水和物 114.7 mg を量り、水を加えて溶かして正確に 100 mL とし、標準原液とする (濃度 EDTA 鉄ナトリウムとして 1000 µg/mL)。標準原液 10 mL を正確にとり、水を加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする (濃度 100 µg/mL)。標準溶液 0.5、1、2、5、及び 10 mL を正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に 100 mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度 EDTA 鉄ナトリウムとして 0.5~10 µg/mL)。

## (5) 測定法

### ① 測定条件<sup>6)</sup>

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：オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5 µm)

カラム管：内径 4.6 mm、長さ：150~250 mm

カラム温度：40°C

移動相：5 mmol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物含有 水/メタノール/リン酸  
緩衝液 (0.2 mol/L、pH4.0) 混液 (78 : 12 : 10)

流速：0.8 mL/分

測定波長：254 nm

注入量：20 µL

## ② 検量線

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積又はピーク高さから検量線を作成する。

## ③ 定量<sup>7~9)</sup>

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、標準品で得られるピークの保持時間が一致するピーク面積又はピーク高さから検量線により EDTA 鉄ナトリウムの濃度を求め、次式によって試料中の EDTA カルシウム二ナトリウム含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{EDTAカルシウム二ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100 \times a}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中の EDTA 鉄ナトリウムの濃度 (µg/mL)

a : 1.020 (換算係数)<sup>10)</sup>

W : 試料の採取量 (g)

## ④ 定量限界 EDTA カルシウム二ナトリウムとして 0.01 g/kg

### 試薬・試液等

- EDTA 鉄ナトリウム三水和物 : エチレンジアミン-*N, N, N', N'*-四酢酸鉄 (III) ナトリウム塩三水和物 (分子量 : 421.09)
- トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン : 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3プロパンジオール [特級]
- 塩酸 : [特級]
- トリス・塩酸緩衝液 (0.2 mol/L、pH8.5) : 塩酸 180 mL を量り、水を加えて 1000 mL とし、2 mol/L 塩酸とする。トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 24.2 g を量り、水 500 mL を加えて溶かし、2 mol/L 塩酸で pH8.5 に調整した後、水を加えて 1000 mL とする。
- ヘキサミン : [特級]
- テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 : [特級]
- 0.05 mol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 : テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 1.61 g を量り、水を加えて 100 mL とする。
- 逆相固相抽出カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム (約 820 mg)。あ

らかじめメタノール 10mL、水 10mL、0.05mol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物を 10 倍希釈して調製した 5mmol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 10mL を、順次通してコンディショニングしたものを用いる。

9. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
10. 7.5vol%メタノール：メタノール 7.5mL に水を加えて 100mL とする。
11. 20%塩酸：[精密分析用] 又は市販のものを用いることができる。
12. 塩酸含有 30vol%メタノール：20%塩酸 1 mL を水で 1000mL とし、この液 1 mL に水を加えて 410mL として塩酸溶液を調製する（pH は 約 5 である）。メタノール 30mL に塩酸溶液を加えて 100mL とする。
13. 塩化鉄（Ⅲ）六水和物：[特級]
14. 塩化鉄（Ⅲ）・メタノール試液：塩化鉄（Ⅲ）六水和物 0.27 g にメタノール 2 mL を加えて溶かす（濃度 0.5mol/L）。
15. リン酸二水素カリウム：[特級]
16. リン酸：[特級]
17. リン酸緩衝液（0.2mol/L、pH4.0）：リン酸二水素カリウム 27.2 g を量り、水を加えて 1000mL とし、0.2mol/L リン酸二水素カリウム溶液とする。リン酸 23.1 g を量り、水を加えて 1000mL とし、0.2mol/L リン酸溶液とする。0.2mol/L リン酸二水素カリウム溶液に 0.2mol/L リン酸溶液を加えて pH4.0 に調整する。
18. 5mmol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物含有 水/メタノール/リン酸緩衝液：水、メタノール及びリン酸緩衝液（0.2mol/L、pH4.0）を 78：12：10 の容量比で混合し、水/メタノール/リン酸緩衝液（0.2mol/L、pH4.0）混液（78：12：10）とする。テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 1.61 g を量り、水/メタノール/リン酸緩衝液（0.2mol/L、pH4.0）混液（78：12：10）を加えて溶かし 1000mL とする。

[注]

- 1) 本法は食品中の EDTA カルシウム二ナトリウムと EDTA 二ナトリウムを EDTA 鉄キレートに変換して定量する方法である<sup>文献 1)</sup>。EDTA 鉄キレートを特定する必要がある場合には、参考に示す分析法を用いることができる。
- 2) マヨネーズ、油性ドレッシング等に用いる。
- 3) 清涼飲料水、野菜、果実等の缶詰、瓶詰に用いる。
- 4) 逆相固相抽出カラムからの溶出液を受ける試験管に定容可能な目盛精度を有する試験管を用いて定容するか、あるいは、塩化鉄（Ⅲ）・メタノール試液を加えてよく振り混ぜ 5 分間放置した液を、少量の水で容器を洗いながらマイクロメスフラスコ（台付メスフラスコ）に移し、水を加えて定容する。
- 5) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。

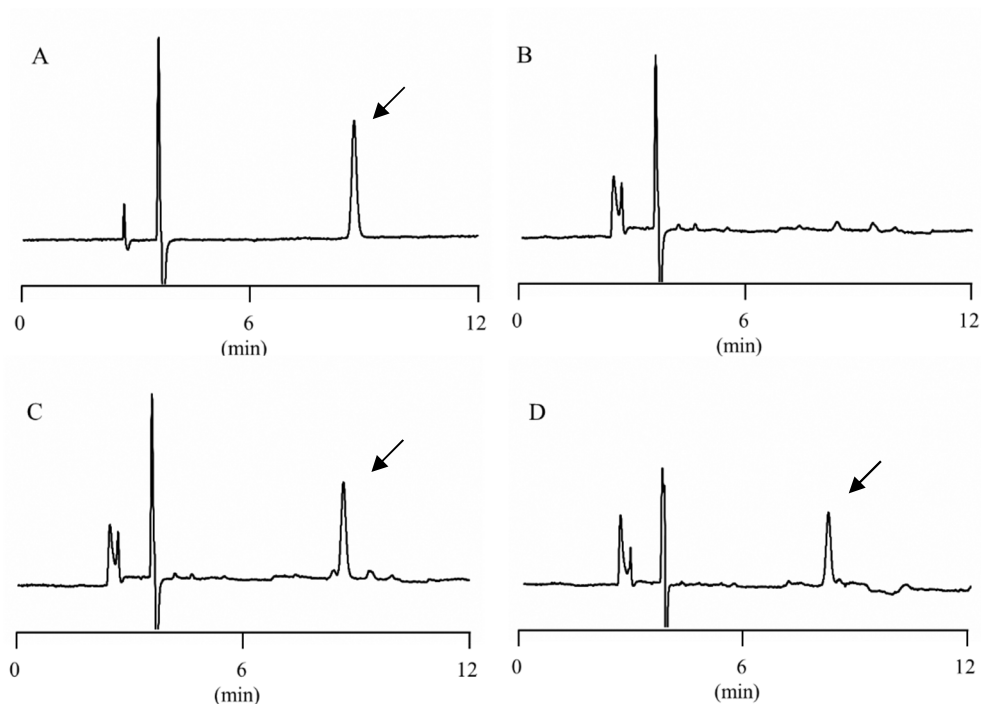
6) 測定条件は例示である。分析の際はEDTAのピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。

7) 添加回収試験の結果を注表1に、標準品とマヨネーズの液体クロマトグラムを注図1に示す。

注表1 EDTA塩類の各種食品での添加回収率

試料	試料量 (g)	添加量* <sup>1</sup> (g/kg)	EDTAカルシウム 二ナトリウム		EDTA 二ナトリウム	
			回収率 (%) * <sup>2</sup>	相対標準偏差 (%)	回収率 (%) * <sup>2</sup>	相対標準偏差 (%)
マヨネーズ	5	0.02	82	1.8	73	5.9
		0.25	91	1.9	84	4.7
まぐろ油漬け 缶詰	5	0.02	73	0.5	71	7.4
		0.25	83	4.5	86	2.2

\*<sup>1</sup>EDTAカルシウム二ナトリウムとして、\*<sup>2</sup>5試行の平均値  
(ただし、逆相固相抽出カラムへの負荷液量及び溶出後の最終定容量を2.5mLで実施した。)



A : 標準溶液 EDTA鉄ナトリウム 1 $\mu$ g/mL B : マヨネーズ ブランク  
C : マヨネーズにEDTAカルシウム二ナトリウム 0.02 g/kg 添加  
D : マヨネーズにEDTA二ナトリウム 0.018 g/kg 添加 (EDTAカルシウム二ナトリウムとして 0.02 g/kg 相当)

注図1 標準品とマヨネーズの液体クロマトグラム (EDTA鉄キレートとして測定)

注図1の測定条件を以下に示す。

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 $\mu$ m）

カラム管：内径4.6mm、長さ250mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

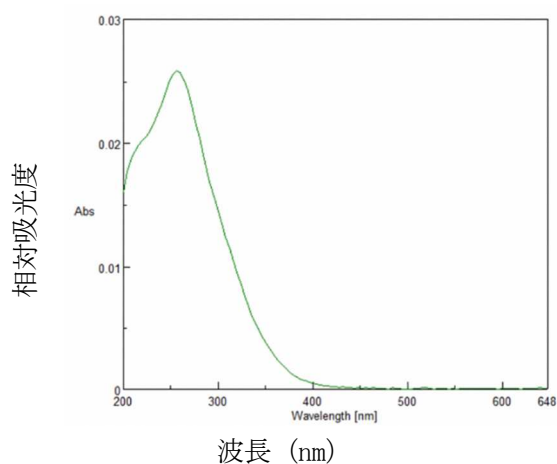
流速：0.8mL/分

測定波長：254nm

注入量：20 $\mu$ L

移動相：水/メタノール/0.2mol/Lリン酸緩衝液（pH4.0）混液（78：12：10）に、テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物を5mmol/Lとなるように溶解する。

8) EDTA鉄ナトリウムのUVスペクトルを注図2に示す。



注図2 EDTA鉄ナトリウム（10 $\mu$ g/mL）のUVスペクトル

9) フォトダイオードアレイ検出器を用いて検出されたピークについてUVスペクトルにより確認し、疑義がある場合には、確認分析法を行う。

10) 換算係数=374.27（EDTAカルシウム二ナトリウム（無水物）の分子量） $\div$ 367.05（EDTA鉄ナトリウム（無水物）の分子量）=1.020

[文献]

1) 関戸晴子ら：神奈川県衛生研究所研究報告、**46**、27、(2016)

## 参考

### エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及び エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム確認分析法

#### 1. 分析法の概要

食品中のエチレンジアミン四酢酸（EDTA）カルシウム二ナトリウム及びEDTA二ナトリウムを、EDTA鉄ナトリウムとし、液体クロマトグラフィー質量分析又は液体クロマトグラフィータンデム型質量分析により確認を行う。（2023年設定）

#### 2. 分析法<sup>1)</sup>（液体クロマトグラフィー質量分析又は液体クロマトグラフィータンデム型質量分析）

##### （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

エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム分析法（2）抽出液の調製及び（3）試験溶液の調製を準用する。ただし、試験溶液は、必要に応じて適宜希釈して用いる。

##### （3）標準溶液の調製

エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム分析法（4）検量線用標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度の標準溶液を調製する。

##### （4）測定法

###### ① 測定条件

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）又は液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用い、次の条件によって測定する<sup>1)</sup>。

カラム充填剤<sup>文献1)</sup>：親水性相互作用クロマトグラフィー用シリカゲル

カラム管：内径2.0～2.1mm、長さ100～150mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル/20mmol/Lギ酸アンモニウム溶液（pH3.0）混液（75：25）

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI（-）

検出法：①LC-MS 選択イオンモニタリング（SIM）

②LC-MS/MS 選択反応モニタリング（SRM）

主なイオン<sup>2)</sup>：①LC-MS  $m/z$  344

- ② LC-MS/MS プリカーサーイオン： $m/z$  344、  
プロダクトイオン： $m/z$  300

注入量：5  $\mu$ L

② 定性<sup>3~5)</sup>

試験溶液及び標準溶液を LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されることを確認する。

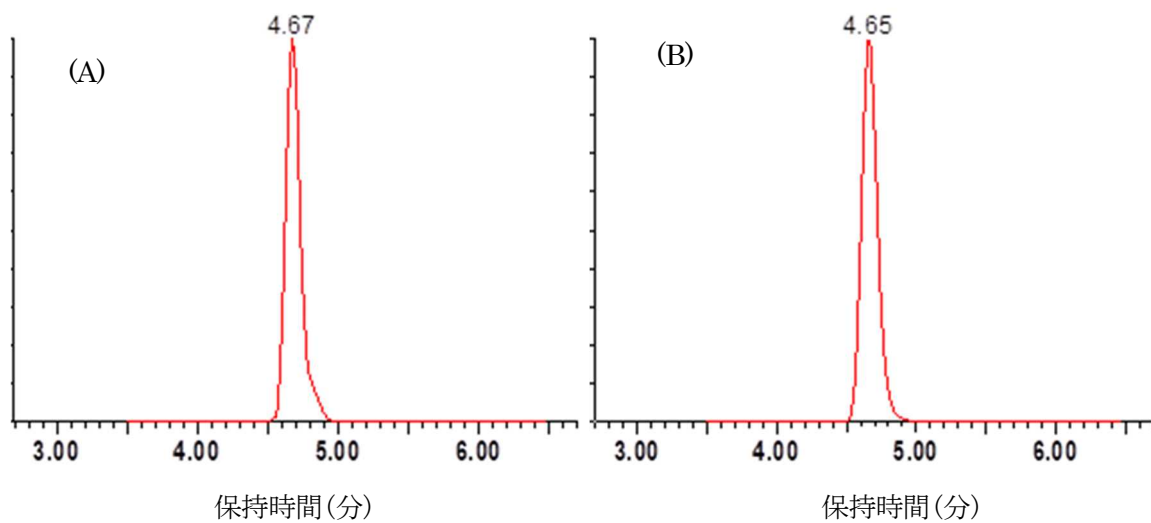
試薬・試液等

1. ギ酸アンモニウム：[特級]
2. ギ酸：[98%、特級]
3. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフ用]
4. アセトニトリル/20mmol/L ギ酸アンモニウム (pH 3.0) 混液 (75:25)：ギ酸アンモニウム 0.63 g を量り、水で 500mL とし、ギ酸で pH3.0 に調整して 20mmol/L ギ酸アンモニウム (pH 3.0) とする。アセトニトリルと 20mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH3.0) を 25:75 の比率で混合し、0.2 $\mu$ m のフィルターでろ過する。

[注]

- 1) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量などを調整する。また、その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 2) [Fe(III)EDTA-4H]<sup>-</sup>： $m/z$  344
- 3) LC-MS 又は LC-MS/MS を用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑成分等により妨害ピークの影響を受ける場合があるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークの検出感度やマススペクトルの変化について確認する。
- 4) スキャン測定により、[Fe(III)EDTA-4H]<sup>-</sup>： $m/z$  344 を確認することができる。バックグラウンドが高い場合は補正する。
- 5) EDTA のマスクロマトグラムを注図 1 に示す。





(A) EDTA鉄ナトリウム 0.5 $\mu$ g/mL

(B) ミックスジュース試験溶液にEDTAカルシウム二ナトリウムとして  
0.01 g/kg となるようにEDTA鉄ナトリウムを添加した液

<測定条件>

カラム充填剤：親水性相互作用クロマトグラフィー用シリカゲル（粒径 5 $\mu$ m）

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm      カラム温度：40 $^{\circ}$ C      流速：0.2mL/分

移動相：アセトニトリル/20mmol/L ギ酸アンモニウム溶液（pH3.0）混液（75：25）

イオン化モード：ESI（-）      検出法：選択反応モニタリング（SRM）

主なイオン：プリカーサーイオン  $m/z$  344、プロダクトイオン  $m/z$  300

注入量：5 $\mu$ L

注図1 EDTAのマスクロマトグラム（SRM）

[文献]

- 1) 貞升友紀ら：東京健安研セ年報、62、133（2011）

発色剤

## 亜硝酸ナトリウム

Sodium Nitrite

NaNO<sub>2</sub> : 69.00

### 1. 分析法の概要

食品中の亜硝酸ナトリウムは、ジアゾ化反応を利用した比色法により亜硝酸根（NO<sub>2</sub><sup>-</sup>）として定量する。必要があれば分子量比を乗じて亜硝酸ナトリウムの量として求める。食品中には、微生物により硝酸塩が亜硝酸塩に還元されて分布している場合があり、検体にこれらの食品が素材として含有されている場合がある。また、食肉製品や鯨肉ベーコンでは、発色剤として添加された硝酸カリウム又は硝酸ナトリウムが還元されて亜硝酸塩が生じ得る。したがって、本法で得られる定量値は、これら由来の亜硝酸塩と亜硝酸塩として添加されたものとの合計値である。（2008年改正、2023年改正）

### 2. 分析法（比色法）

#### （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

試料<sup>1)</sup>約5gを精密に量り、ホモジナイズ容器に入れ<sup>2, 3)</sup>、1.0mol/L水酸化ナトリウム溶液12mL及び水（80～90℃）40mLを加え<sup>4, 5)</sup>、直ちにホモジナイズ（2分間、10000回転/分）する<sup>6, 7)</sup>。内容物をトールビーカーに移し、ホモジナイズ容器を水（80～90℃）約35mLで洗い、トールビーカーに移す。酢酸亜鉛溶液（18→100）7.5mL<sup>8)~10)</sup>を加えて混和し、80～90℃の水浴中に入れ、約5分毎に泡を液中に押し込むようにしてつぶしながら混和し、80～90℃で20分間加温する。氷水中で10分間以上冷却した後、吸引ろ過し、ろ液を100mLの短形メスフラスコに受ける<sup>11, 12)</sup>。トールビーカー及び残渣を水で洗ってろ過し、ろ液を合わせ、水を加えて正確に100mLとし、この液を水で正確に2倍に希釈し<sup>13)</sup>、試験溶液とする。

#### （3）空試験溶液の調製<sup>14)</sup>

試料約5gの代わりに水5mLを用い、（2）試験溶液の調製と同様に操作した後、遠心し<sup>15)</sup>、上清を空試験溶液とする。

#### （4）検量線用標準溶液の調製<sup>16)</sup>

亜硝酸ナトリウム0.150gを量り、水を加えて溶かして正確に1000mLとし、標準原液とする（濃度 亜硝酸根として100μg/mL）。標準原液1mLを正確に量り、水を加えて正確に

100mLとし、標準溶液とする（濃度 亜硝酸根として1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準溶液0.5、1、2、4、6 mL及び8 mLをそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に20mLとし、検量線用標準溶液とする（濃度 亜硝酸根として0.025~0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

#### (5) 測定法

##### ① 測定条件

分光光度計を用い、波長540nmにおける吸光度を測定する。

##### ② 測定<sup>17)</sup>

試験溶液及び空試験溶液5 mLずつを正確に量り、それぞれ10mLのメスフラスコa及びbに入れる。各メスフラスコにスルファニルアミド溶液1 mLずつを加えて振り混ぜ、更にナフチルエチレンジアミン溶液1 mLずつを加えて振り混ぜた後、水を加えてそれぞれ正確に10mLとし、よく振り混ぜる。20分間放置して発色させた後に<sup>18,19)</sup>水を対照として波長540nmにおけるメスフラスコa及びbの液の吸光度を測定し、それぞれ $A_{T_a}$ 、 $A_b$ とする。

また、試験溶液5 mLを正確に量り、10mLのメスフラスコcに入れ、これに塩酸(1→2)1.0mL及び水を加えて正確に10mLとし、水を対照として波長540nmにおける吸光度を測定し、 $A_{T_c}$ とする<sup>20)</sup>。

吸光度の差 $\Delta A$  [ $A_{T_a} - (A_b + A_{T_c})$ ] を求める。なお、 $A_{T_c}$ がマイナスである場合は、0として計算する。

##### ③ 検量線

検量線用標準溶液及び水5 mLずつを正確に量り、それぞれ10mLのメスフラスコ $a_1 \sim a_6$ 及びメスフラスコ $b_1$ に入れ、スルファニルアミド溶液1 mLずつ及びナフチルエチレンジアミン溶液1 mLずつを加えて振り混ぜた後、水を加えてそれぞれ正確に10mLとする。20分間放置した後、水を対照として波長540nmにおけるそれぞれの吸光度を測定して $A_{S_{a_1}} \sim A_{S_{a_6}}$ 及び $A_{S_{b_1}}$ とし、 $A_{S_{a_1}} \sim A_{S_{a_6}}$ と $A_{S_{b_1}}$ との各吸光度の差を用いて検量線を作成する。

##### ④ 定量<sup>21)</sup>

吸光度差 $\Delta A$ と検量線から試験溶液中の亜硝酸根含量C ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を求め、次式によって試料中の亜硝酸根含量 ( $\text{g}/\text{kg}$ ) を計算する。

$$\text{亜硝酸根含量 (g/kg)} = \frac{C \times V \times K}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中の亜硝酸根含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

W : 試料の採取量 (g)

V : 試験溶液調製時の定容量 (mL) (100mL)

K : 試験溶液調製時の水での希釈倍率 (2)

$$\text{亜硝酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{亜硝酸根含量 (g/kg)} \times 1.500$$

##### ⑤ 定量限界 亜硝酸根として0.001 g/kg

#### 試薬・試液等

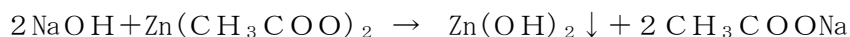
1. 亜硝酸ナトリウム：〔特級〕
2. 水酸化ナトリウム：〔特級〕
3. 1.0mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 4.0 g を量り、水を加えて溶かし、100mL とする。ポリエチレン瓶に保存する。
4. 酢酸亜鉛二水和物：〔特級〕
5. 酢酸亜鉛溶液（18→100）：酢酸亜鉛二水和物 18 g を量り、水を加えて溶かし、100mL とする。
6. スルファニルアミド：〔特級〕
7. 塩酸：〔特級〕
8. スルファニルアミド溶液：スルファニルアミド 0.50g を塩酸（1→2）100mL に加え、超音波処理をして溶かす。
9. *N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩：市販品を用いる。
10. ナフチルエチレンジアミン溶液：*N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.12 g を水 100mL に溶かす。

#### [注]

- 1) 食肉及び魚肉製品、魚卵（すじこ、いくら）等。
- 2) カップ付カッター型ホモジナイザーを用いる場合の操作方法である。シャフト型ホモジナイザーを用いる場合は、試料をトルビーカーに量り、1.0mol/L水酸化ナトリウム溶液 12mL 及び水（80～90℃）40mL を加えて、直ちに、試料の塊が残らないように注意しながら、ホモジナイズ（2分間、10000回転/分）を行う。シャフトを、水（80～90℃）約 35mL を用いて洗い、洗液をトルビーカーに加える。また、シャフト型ホモジナイザーを用いる場合は、シャフトでビーカーを破損しないように注意する。
- 3) たらこのような高脂肪かつ高タンパク質の試料で、水酸化ナトリウム溶液添加により、強力な泡沫が形成される場合には、大きいサイズの容器を使用する。
- 4) 抽出溶媒に温湯を用いると、食品中に含まれる有機酸が抽出される。その有機酸により食品抽出液の pH が低くなり、亜硝酸イオンが損失する<sup>文献1)</sup>。これを防ぐため、水酸化ナトリウム溶液を添加する。また、塩基性条件にすることでタンパク質が溶解し、抽出効率が高まる。
- 5) パスツールピペットなど未洗浄の器具に亜硝酸が含まれることがある。そのため、あらかじめ亜硝酸を含まないことを確認した器具を使用する。
- 6) カップ付カッター型ホモジナイザーを用いる場合、ホモジナイズが終了した際に容器の中を確認し、壁に試料が付着して十分混和できていない場合は樹脂製スパーテルでこそぎ落とした後、樹脂製スパーテルを少量の水（80～90℃）で共洗いしてから再度ホモジナイズ（2分間、10000回転/分）を行う。

7) 水酸化ナトリウム溶液及び水 (80~90℃) を加えた後、ホモジナイズまでの時間を空けると温度が下がり抽出効率が低下する。

8) 次式に示す  $Zn(OH)_2$  のコロイド性沈殿形成により除タンパクを行う<sup>文献2)</sup>。



除タンパクの際、アルカリ性が強すぎると白濁、ろ過速度の低下の原因となるが、中性付近でも白濁が認められる場合があり、酢酸亜鉛の添加量の増加により防止できるとされている<sup>文献3)</sup>。また、清澄な試験溶液の場合、ろ液の液性は pH 試験紙で 7.5~8.5 付近で、混濁した液では pH9.5 付近であったとされている<sup>文献4)</sup>。そこで、加温中 (5分程度経過後) に沈殿しない場合は、酢酸亜鉛溶液を数滴~0.5mL 程度添加して様子を見る。それでも沈殿が生じない場合はさらに酢酸亜鉛溶液を添加する。

9) 魚肉ソーセージのように、デンプンを多く含み、試験溶液が懸濁する食品の場合は、酢酸亜鉛溶液 7.5mL を加えた後、80~90℃の水浴に入れる操作の前に、パンクレアチン 0.1g を加えて混和し<sup>文献5)</sup>、10分放置した後、80~90℃の水浴に入れ、以降の操作を同様に行い、試験溶液及び空試験溶液を調製する。カップ付カッター型ホモジナイザーを用いる場合、酢酸亜鉛溶液添加前の温度は 50~60℃程度であり、添加後はおおむね 40~45℃程度となり、パンクレアチン添加に適した温度となる。

10) シャフト型ホモジナイザーを用いる場合、カップ付カッター型ホモジナイザーを使用する場合より温度が下がりにくい。パンクレアチンを添加する場合は、酢酸亜鉛溶液添加の際に 50~60℃程度となるよう放置時間を調整するとよい。

11) 吸引ろ過には定量用ろ紙 (5種A又は5種B) を用いる。ろ紙から微量の亜硝酸根が検出される場合があるため、あらかじめ水 50mL で洗浄しておく。

12) 吸引ろ過時に泡沫が生じて操作が困難になるのを防ぐため、100mL の矩形メスフラスコの標線付近及び漏斗の足管の内側に、それぞれ消泡剤 (食品添加物シリコーン樹脂を水で 10 倍に希釈したもの) 25 $\mu$ L を塗布しておく。なお、試料に消泡剤を直接添加した場合、消泡効果は低下する。

13) アスコルビン酸などの還元物質や色素による影響を少なくするため 2 倍希釈する。試験溶液中の  $NO_2^-$  濃度が高いときは、濃度に応じて試験溶液調製時の水での希釈倍率を変更する。空試験溶液についても試験溶液と同じ希釈倍率で調製した後、同様に操作する。計算では、適用した希釈倍率を乗じる。

14) 水酸化ナトリウム試薬には微量の亜硝酸ナトリウムが含まれる場合があり、試薬量を一定にすることにより誤差を少なくした。したがって、空試験は必ず行う必要がある。

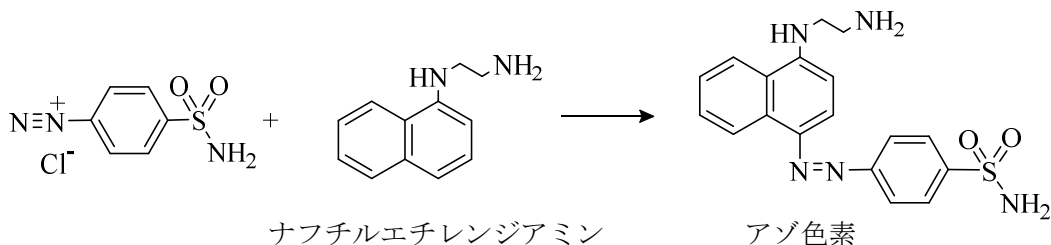
15)  $Zn(OH)_2$  の沈殿を形成しないため混濁している。そのため、遠心 (例: 5℃、12000 $\times$ g、10分) する。

16) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。

17) 本法の原理を次に示す。



スルファニルアミド



- 18) ジアゾ化法では、アスコルビン酸などの還元性物質が存在すると、 $\text{NO}_2^-$ が分解して失われるためにその定量は妨害される<sup>文献6)</sup>。また酸性溶液中では、 $\text{NO}_2^-$ は混在するアミノ酸と反応して分解する。したがってジアゾ化反応時間は短いほどよい。本法ではジアゾ化とカップリング反応を続けて行う方法とした。
- 19) 呈色は10分から2時間程度まで安定であるが、試験溶液の場合は少し反応が遅くなるので20分程度放置するとよい。
- 20) 試料自体の色に由来する吸光度への影響を差し引くため。
- 21) たらこ、魚肉ソーセージ及びハムに、亜硝酸ナトリウムを亜硝酸根として0.002 g/kg及び各食品の使用基準上限値(0.005、0.05及び0.07 g/kg)で添加した時の真度はいずれも80~95% (8機関, 各n=3)であった<sup>文献7)</sup>。

[文献]

- 1) 辻澄子ら：食衛誌、**34**、161 (1993)
- 2) 辻澄子ら：衛生化学、**43**、305 (1997)
- 3) 千葉美子ら：宮城県保健環境センター年報、**26**、20 (2008)
- 4) 亀井正治ら：生活衛生、**54**、153 (2010)
- 5) 佐々木隆宏ら：食衛誌、**64**、21 (2023)
- 6) 平間祐志ら：道衛研所報、**44**、69 (1994)
- 7) 佐藤恭子ら：日本薬学会第141年会要旨集、No. 28P02-223 (2021)

着色料

## 銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム

Copper Chlorophyll and Sodium Copper Chlorophyllin

銅クロロフィル  
Copper Chlorophyll

銅クロロフィリンナトリウム  
Sodium Copper Chlorophyllin

### 1. 分析法の概要

食品中の銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウムは、1-ブタノール及び酢酸エチルを用いて抽出した後、水酸化ナトリウム溶液、1-ブタノール及び酢酸エチルによる液液分配により精製濃縮し、灰化した後、原子吸光光度法により銅として定量する。必要があれば分子量子比を乗じて銅クロロフィルもしくは銅クロロフィリンナトリウムの量として求める。  
(2023年改正)

### 2. 分析法（原子吸光光度法）

#### （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

試料を、みつ豆寒天の場合は20g、それ以外の食品の場合は10g精密に量り<sup>1)</sup>、水5mL<sup>2)</sup>、1mol/L塩酸5mL及び1-ブタノール20mLを加えて5分間ホモジナイズし、さらに酢酸エチル30mLを加えて5分間ホモジナイズした後、遠心（5分間、3000回転/分）し、上層を分液漏斗Aにとる。沈殿物に対して同様の操作を2回繰り返す<sup>3)</sup>、上層を分液漏斗Aに合わせる。分液漏斗Aに石油エーテル100mLを加えて穏やかに混和し、さらに水30mLを加えて振とうし、下層を廃棄する。続いて水50mLを加えて振とうし、さらに、分液漏斗Aに5w/v%水酸化ナトリウム溶液5mLを加え、5分間激しく振とう抽出して静置分離した後、下層を別の分液漏斗Bに回収する。また、同様の操作を2回繰り返す、下層のアルカリ層を分液漏斗Bに合わせる。分液漏斗Bに1mol/L塩酸15mL及び1-ブタノール100mLを加えて軽く振とうし、静置分離した後、下層を廃棄する<sup>4)</sup>。1-ブタノール層をナス型フラスコに移し、10mL程度になるまで減圧濃縮する。残留物をメタノール<sup>5)、6)</sup>で洗い込みながら灰化容器<sup>7)</sup>に移し、蒸発乾固する。硫酸5mLを加えて残留物を潤し、徐々に温度を上げ、炭化し、硫酸の白煙が発生しなくなるまで加熱する。次に、電気炉へ入れて徐々に温度を上げて480°Cで強熱して灰化する<sup>8)</sup>。灰化後、塩酸5mLを加え、蒸発乾固するまで熱板上で加熱した後、硝酸（1→150）を用いて、試料がみつ豆寒天の場合は正確に20mL、それ以外の食品試料の場合は正確に25mLとし、銅クロロフィリンナトリウム試験溶液とする。また、分液漏斗Aに残った抽出溶媒を、乾固する直前まで減圧濃縮し、以下、分液漏斗Bに合わせた液の場合と同様の操作を行い、銅クロロフィル試験溶液

とする。

(3) 空試験溶液の調製

試料を用いずに(2)と同様に操作し、空試験溶液とする。

(4) 検量線用標準溶液の調製

銅標準原液 10mL を正確に量り、硝酸(1→150)を加えて溶かして正確に 1000mL とし、標準溶液とする(濃度 10 $\mu$ g/mL)。標準溶液を、適宜硝酸(1→150)を用いて正確に希釈し、0.2～10 $\mu$ g/mL の検量線用標準溶液とする<sup>9)</sup>。

(5) 測定法

① 測定条件<sup>10)</sup>

原子吸光光度計を用い、次の条件によって測定する。

光源ランプ：銅中空陰極ランプ

分析線波長：324.7nm

可燃性ガス：アセチレン

支燃性ガス：空気

② 検量線

検量線用標準溶液それぞれにつき吸光度を測定し、検量線を作成する。

③ 定量<sup>11,12)</sup>

試験溶液及び空試験溶液につき吸光度を測定し、両者の値の差を求め、その値と検量線から試験溶液中の銅濃度( $\mu$ g/mL)を求め、次式によって試料中の銅含量(g/kg)を計算する。

みつ豆用寒天以外の試料

$$\text{銅含量 (g/kg)} = \frac{C \times 25}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の銅濃度( $\mu$ g/mL)

W：試料の採取量(g)

みつ豆用寒天

$$\text{銅含量 (g/kg)} = \frac{C \times 20}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の銅濃度( $\mu$ g/mL)

W：みつ豆用寒天の採取量(g)

銅クロロフィル含量(g/kg) = 銅含量(g/kg)  $\times$  14.79

銅クロロフィリンナトリウム含量(g/kg) = 銅含量(g/kg)  $\times$  10.91



- ④ 定量限界 みつ豆寒天以外の試料 銅として 0.0005 g/kg (試料採取量 10 g の場合)  
みつ豆寒天 銅として 0.0002 g/kg (試料採取量 20 g の場合)

#### 試薬・試液等

1. 銅標準原液<sup>13)</sup>：市販の原子吸光度分析に適した標準液 (Cu:1000mg/L) を用いる。
2. 塩酸：有害金属測定用を用いる。
3. 1-ブタノール：市販品を用いる。
4. 酢酸エチル：[特級]
5. 石油エーテル：[特級]
6. 水酸化ナトリウム：[特級]
7. メタノール：[特級]
8. 硫酸：[特級]
9. 硝酸：有害金属測定用を用いる。

#### [注]

- 1) 100mL の容器を用いるとよい。
- 2) 試料の状態に応じて水の添加量を適宜変更する。
- 3) ホモジナイザーについての試料を水で洗い込む際は、後の抽出操作における pH を考慮してできるだけ少量にする。
- 4) エマルジョンを生じた場合は遠心 (10 分間、3000 回転/分) し、1-ブタノール層を分取する。
- 5) 銅クロロフィルが添加された試料など、メタノールで洗い込みにくい場合は、酢酸エチルを使用する。
- 6) 銅クロロフィリンナトリウムが添加された試料など、ナス型フラスコに残留物が残る場合は、超音波処理又は加温処理で溶解させ洗い込む。
- 7) 灰化容器として磁製のつぼ、石英製のつぼ、ガラスビーカーなどが利用できる。試験に用いる器具類は、使用前に硝酸 (1→3) で十分洗うか、又は硝酸 (1→3) に一晚浸しておき、水で洗浄した後、乾燥させたものを用いる。特にガラス器具は、高度のコンタミネーションがあるため注意する。
- 8) 電気炉内部の温度が 500°C を超えないよう注意する。500°C 以上になると銅が他の元素と融合反応を起こすことがある。
- 9) 3 濃度以上の検量線標準液を調製する。検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。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。
- 10) 試験溶液の銅濃度が検量線の測定範囲を超える場合は、試験溶液を硝酸 (1→150) で正確に希釈した液を調製して定量をやり直し、計算式に希釈倍率を乗じて含量を求める。

- 11) 銅含量から銅クロロフィル又は銅クロロフィリンナトリウム含有量を算出する場合は、銅クロロフィルは銅含量に 14.79 (銅クロロフィル a と b の平均分子量 939.72 を銅の原子量 63.55 で割った値) を乗じ、銅クロロフィリンナトリウムは銅含量に 10.91 (銅クロロフィリン a ナトリウムと銅クロロフィリン b ナトリウムの平均分子量 693.16 を銅の原子量 63.55 で割った値) を乗じ、それぞれ算出する。
- 12) 本法の添加回収試験<sup>14)</sup>結果を注表 1 に示す。

注表 1 銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウムの各食品での添加回収率

(n = 5)

食 品	銅クロロフィル			銅クロロフィリンナトリウム		
	添加量* (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)	添加量* (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
れんこん水煮**	0.0005	79	2.8	0.0005	83	8.8
	0.1	77	5.0	0.1	86	7.6
魚肉ソーセージ	0.0005	96	9.6	0.0005	88	5.1
	0.03	78	1.5	0.005	71	2.9
チョコレート	0.0005	63	2.7	0.0005	88	2.3
	0.001	66	2.2	0.0064	68	5.7

\*銅としての添加量、\*\*製品中の液体は除いて試験した。

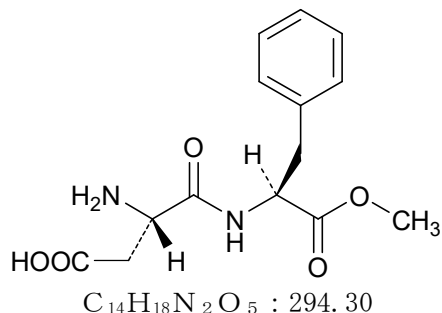
- 13) 硫酸銅五水和物 3.925 g を精密に量り、10vol%硫酸 10mL 及び水 200mL を加えて溶かし、水を加えて正確に 1000mL としたもの(この液 1 mL は銅 1000µg を含む)を標準溶液として用いてもよい。
- 14) 市販の銅クロロフィルや銅クロロフィリンナトリウムの試薬や添加物製剤は、製品により色素成分の組成比率が異なっており、銅含量にバラつきがあることが知られている。このため精度管理の添加回収試験において市販の試薬等を使用する場合は、あらかじめ添加する試薬の銅含量を求めてから添加回収試験を実施する必要がある。銅クロロフィルと銅クロロフィリンナトリウムの添加回収試験はそれぞれ別の試料で実施すること。

甘味料

## アスパルテーム

Aspartame

別名：L-α-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル



### 1. 分析法の概要

食品中のアスパルテームは、透析法により抽出した後、強陽イオン交換-逆相ミックスモード固相抽出カラムで精製し、液体クロマトグラフィーにより定量する<sup>1)</sup>。(2023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 透析

試料約 20 g<sup>2)</sup>を精密に量る<sup>3)</sup>。次に約 20 mL<sup>4)</sup>の透析内液と混和して流動状とし、少量の透析内液を用いて透析膜チューブ内に移した後、空気を追い出してからチューブの上端を密封し、200 mL 容の目盛り付き容器<sup>5)</sup>に入れる。次いでこの目盛り付き容器に透析外液を加えて全量<sup>6)</sup>を正確に 200 mL とする。時々、密栓又はフィルム等で覆って目盛り付き容器内を転倒混和しながら室温で 24~48 時間透析し<sup>7)</sup>、透析終了後の透析外液を抽出液とする<sup>8)</sup>。

##### ② カラムによる精製

抽出液 10 mL を正確にとり、強陽イオン交換-逆相ミックスモード固相抽出カラム<sup>9)</sup>に負荷し、水 5 mL 及びメタノール 5 mL を順次通して洗浄した後、0.5 mol/L 塩化アンモニウム溶液/アセトニトリル混液 (3 : 2) 9 mL で溶出する。溶出液を水で正確に 10 mL とし<sup>10)</sup>、メンブランフィルター (0.45 μm) でろ過したものを試験溶液とする。

#### (3) 検量線用標準溶液の調製<sup>11)</sup>

アスパルテーム 0.100 g を量り、メタノール/水混液 (1 : 1) を加えて正確に 100 mL とする。その 10 mL を正確にとり、水を加えて正確に 100 mL としたものを標準溶液とする (濃度 100 μg/mL)。標準溶液 1、2、4、6、10 及び 20 mL を正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に 100 mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度 1~20 μg/mL)。用時調製する。

#### (4) 測定法

##### ① 測定条件<sup>12)</sup>

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフにより、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5 μm)

カラム管：内径 4.6 mm、長さ 150~250 mm

カラム温度：40℃

移動相<sup>13)</sup>：リン酸緩衝液 (0.02 mol/L、pH 4.0) / メタノール混液 (3 : 1)

流速：1.0mL/分

測定波長：210nm

注入量：20μL

② 検量線

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量<sup>14、15)</sup>

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中のアスパルテーム濃度(μg/mL)を求め、次式によって試料中のアスパルテーム含量(g/kg)を計算する。

$$\text{アスパルテーム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200 \times 10}{W \times 10 \times 1000}$$

C：試験溶液中のアスパルテーム濃度(μg/mL)

W：試料の採取量(g)

④ 定量限界 0.01 g/kg

試薬・試液等

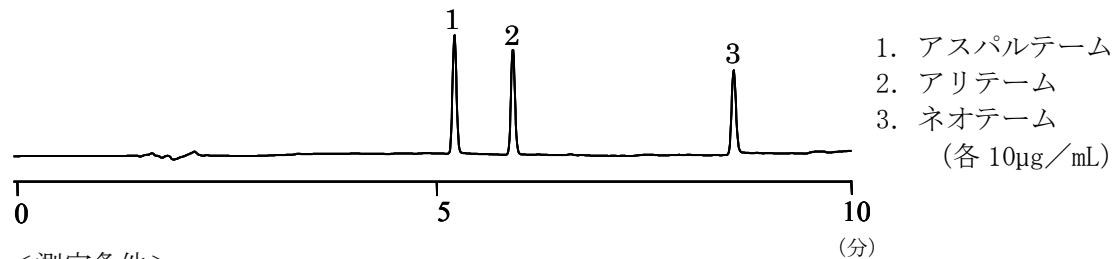
1. アスパルテーム：市販品を用いる<sup>16)</sup>。
2. 塩化ナトリウム：[特級]
3. 塩酸：[特級]
4. 透析内液<sup>17)</sup>：塩化ナトリウム 100 g を 0.01mol/L 塩酸に溶解して 1000mL とする。
5. 透析外液<sup>17)</sup>：0.01mol/L 塩酸
6. 透析膜チューブ：透析用セルロース製チューブ（平面幅 44mm、直径 28mm、膜厚 0.0203mm）を適当な長さに切ったものを水で洗浄して片端を結んで閉じる。
7. 強陽イオン交換-逆相ミックスモード固相抽出カラム：スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体固相抽出カラム(150mg)<sup>9)</sup>。あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL を順次通してコンディショニングしたものを用いる。
8. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
9. 塩化アンモニウム：[特級]
10. 0.5mol/L 塩化アンモニウム溶液：塩化アンモニウム 26.7 g に水を加えて 1 L とする。
11. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
12. リン酸：[85%、特級]
13. リン酸水素二ナトリウム：[特級]
14. リン酸緩衝液(0.02mol/L、pH4.0)：リン酸 23.1 g を量り、水を加えて溶かし、1000mL とし、0.2mol/L リン酸溶液とする。リン酸水素二ナトリウム 28.4 g を量り、水を加えて溶かし、1000mL とし、0.2mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液とする。0.2mol/L リン酸溶液及び 0.2mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液を混和して pH 4.0 に調整したものを水で正確に 10 倍希釈する。
15. 0.1mol/L 塩酸：塩酸 9 mL に水を加えて 1000mL とする。
16. 0.01mol/L 塩酸：0.1mol/L 塩酸 100mL に水を加えて 1000mL とする。

[注]

- 1) 本法を用いた試験溶液をネオテーム及びアリテームの分析に利用することができる<sup>文献 1)</sup>。また、これらを特定する必要がある場合には、参考に示す分析法を用いることができる。
- 2) 試料のかさが大きい場合や水分を含むと膨張する場合は、試料採取量を 5~10 g に



- pH5.0の緩衝液を用いることにより妨害ピークとの分離が可能となる場合もある<sup>文献3)</sup>。
- 13) ヨーグルトドリンク等の乳飲料の場合は、アスパルテームの保持時間付近に夾雑ピークが重なる場合もあるため、移動相をリン酸緩衝液(0.02mol/L、pH4.0)/メタノール混液=90:20とするなど、夾雑ピークが分離する条件で確認を行う。
- また、ネオテーム及びアリテームと同時分析する場合はグラジエント条件で行う。
- グラジエント条件を用いた場合のアスパルテーム、アリテーム及びネオテームの分離例を注図2<sup>文献1)</sup>に示す。



<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5µm）  
 カラム管：内径4.6mm、長さ150mm      カラム温度：40℃  
 流速：1.0mL/分      検出器：紫外可視吸光度検出器（210nm）      注入量：20µL  
 移動相：A液 リン酸緩衝液（0.01mol/L、pH4.0）  
           B液 アセトニトリル  
           グラジエントの条件

分	A(%)	B(%)
0	90	10
10	35	65
10.1	90	10
15	90	10

注図2 グラジエント溶離法によるアスパルテーム、アリテーム及びネオテームの液体クロマトグラム

- 14) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、試料体積を含めて定容し、その定容量を含量計算で乗じている。そのため、固体試料等では透析外液量を乗じた値より数%~10%程度高い定量値となる場合があり、添加回収率が100%を越えて高い場合には、この点が要因の一つとして考えられる。
- 15) アスパルテームをゼリー、ジャム、ヨーグルトドリンク、コーヒー飲料、パイナップル缶詰、漬物、ソース及びクッキーに0.01g/kg及び0.1g/kgとなるように添加したときの添加回収率はそれぞれ86~100%、89~104%であった(n=3)<sup>文献1)</sup>。別の試験で、アスパルテームを炭酸飲料及び乳飲料、ゼリー、ヨーグルト、漬物、梅干しに0.01g/kg添加した時の24時間透析での添加回収率は、それぞれ94、95、102、88、92及び84%（相対標準偏差はそれぞれ2.9、2.9、2.5、4.3、7.2及び10%）であり、ヨーグルトに0.01g/kg添加した時の48時間透析での添加回収率は89%（相対標準偏差は2.6%）であった(n=5)。
- 16) 市販品に食品添加物試験用（純度98~102%）などがある。
- 17) アスパルテームはpH6以上では不安定であること、pH3以上では微生物が繁殖する可能性があるため、透析液のpHは2~3がよい。本条件下ではアスパルテームは安定であるが、48時間を過ぎるとわずかに減少する傾向が見られる。

[文献]

- 1) 松本ひろ子ら：食衛誌、**49**、31 (2008)
- 2) 田原正一ら：食衛誌、**55**、13 (2014)
- 3) 貞升友紀ら：日食化誌、**15**、32 (2008)

## 参考

### アスパルテーム確認分析法

#### 1. 分析法の概要

食品中のアスパルテームは、液体クロマトグラフィータンデム質量分析により確認を行う<sup>1)</sup>。(2023年設定)

#### 2. 分析法(液体クロマトグラフィータンデム質量分析)

##### (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

アスパルテーム分析法(2)試験溶液の調製を準用する。ただし、試験溶液は、必要に応じて適宜希釈して用いる。

##### (3) 標準溶液の調製

アスパルテーム分析法(3)検量線用標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度の標準溶液を調製する。

##### (4) 測定法

###### ① 測定条件<sup>2)</sup>

液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径1.7 $\mu$ m)

カラム管：内径2.1mm、長さ50mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相<sup>3)</sup>：A液 0.1%ギ酸

B液 メタノール/アセトニトリル混液(4:1)

グラジエントの条件

分	A(%)	B(%)
0	90	10
5	30	70
7	30	70
7.1	90	10
12	90	10

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI(+)

検出法：プロダクトイオンスキャン(プリカーサーイオン  $m/z$  295、 $m/z$  50~400)

主なイオン<sup>4)</sup>：プリカーサーイオン  $m/z$  295、プロダクトイオン  $m/z$  119

注入量：1 $\mu$ L

###### ② 定性<sup>5, 6)</sup>

試験溶液及び標準溶液をLC-MS/MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されることを確認する。

#### 試薬・試液等

1. アスパルテーム分析法の試薬・試液等を準用する。

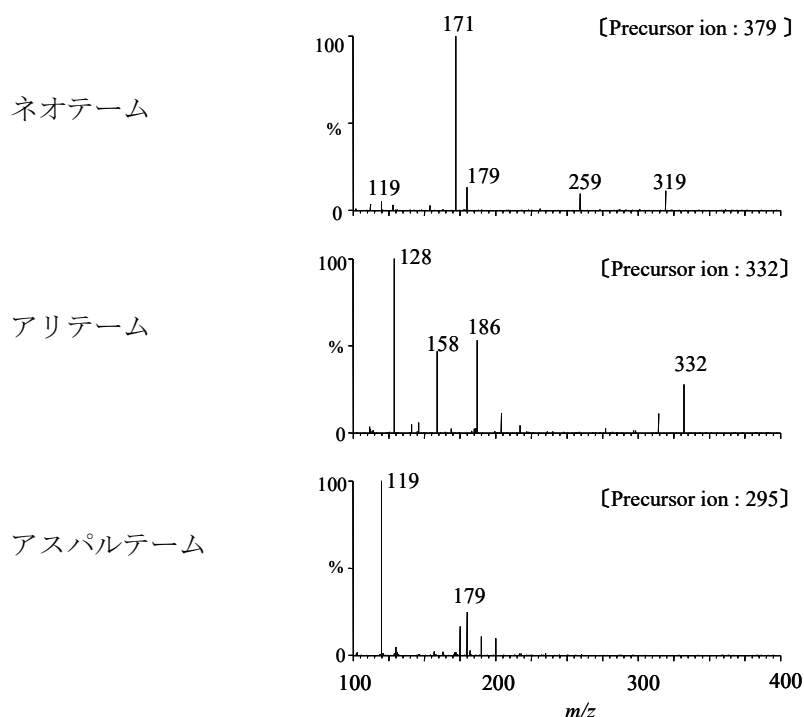
2. ギ酸：[98%、特級]

3. 0.1%ギ酸：市販品を用いるか、あるいは、ギ酸1.0gに水を加えて1000mLとする。



[注]

- 1) 本法により、アリテーム、ネオテームも同時に測定できる<sup>文献1)</sup>。
- 2) 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。分析の際は、アスパルテーム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。その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 3) 濃度勾配の条件は、使用する分析カラムにより適宜変更する。
- 4) 注図1<sup>文献1)</sup>にアスパルテーム、アリテーム、ネオテームより生成されたプロダクトイオンのマスペクトルを示す。



注図1 LC-MS/MSによるアスパルテーム、アリテーム、ネオテームのマスペクトル

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 1.7 $\mu$ m）

カラム管：内径 2.1mm、長さ 50mm カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A液 0.1%ギ酸

B液 メタノール/アセトニトリル混液（4：1）

グラジエントの条件

分	A(%)	B(%)
0	90	10
5	30	70
7	30	70
7.1	90	10
12	90	10

流速：0.2mL/分

注入量：1 $\mu$ L

イオン化モード：ESI(+)

検出法：プロダクトイオンキャン

キャピラリー電圧：3.3kV

脱溶媒温度：350 $^{\circ}$ C

主なイオン ( $m/z$ )

アスパルテーム：プリカーサーイオン 295、プロダクトイオン 119

アリテーム：プリカーサーイオン 332、プロダクトイオン 128

ネオテーム：プリカーサーイオン 379、プロダクトイオン 171

- 5) LC-MS/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ックス効果により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークが検出されることを確認する。
- 6) アスパルテームをいちごジャムに  $0.01 \text{ g/kg}$  の濃度で添加した場合において、アスパルテームより生成されたプロダクトイオンのマススペクトルが得られた。

[文献]

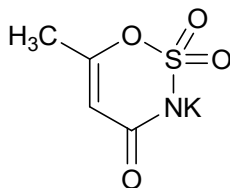
- 1) 松本ひろ子ら：食衛誌、**49**、31 (2008)

甘味料

## アセスルファムカリウム

Acesulfame Potassium

別名：アセスルファムK



$C_4H_4KNO_4S$  : 201.24

### 1. 分析法の概要

食品中のアセスルファムカリウムは、透析法により抽出した後、逆相固相抽出カラム及び強陰イオン交換固相抽出カラムで精製し、液体クロマトグラフィーにより定量する<sup>1)</sup>。(2001年設定、2023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 透析<sup>2)</sup>

試料約 20 g<sup>3)</sup>を精密に量る<sup>4)</sup>。次に約 20mL<sup>5)</sup>の透析内液と混和して流動状とし、少量の透析内液を用いて透析膜チューブ内に移した後、空気を追い出してからチューブの上端を密封し、200mL容の目盛り付き容器<sup>6)</sup>に入れる。次いで、この目盛り付き容器に透析外液を加えて全量<sup>7)</sup>を正確に 200mL とする。時々、密栓又はフィルム等で覆って目盛り付き容器内を転倒混和しながら室温で 24~48 時間透析し<sup>8)</sup>、透析終了後の透析外液を抽出液とする<sup>9)</sup>。

##### ② カラムによる精製

抽出液 20mL を正確にとり、25mL のメスフラスコに入れ、0.1mol/L テトラ-*n*-プロピルアンモニウム臭化物溶液 2mL を加え、水を加えて 25mL とする。この液 5mL を正確にとり、逆相固相抽出カラム<sup>10)</sup>に負荷し<sup>11)</sup>、水 10mL を通して洗浄する。次いで、逆相固相抽出カラムの溶出口に強陰イオン交換固相抽出カラム<sup>12)</sup>を接続し、水/メタノール混液 (6 : 4) 10mL を負荷<sup>11)</sup>後、逆相固相抽出カラムを取り外す。強陰イオン交換固相抽出カラムに 0.3w/v% リン酸 5mL、次いで水 5mL を通して洗浄した後、0.3mol/L 塩酸 5mL で溶出し、溶出液を 0.3mol/L

塩酸で正確に5 mL とする。この液をメンブランフィルター (0.45 $\mu$ m) でろ過したものを試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製<sup>13)</sup>

アセスルファミウム 0.160 g を量り、水を加えて溶かして正確に 100mL とする。その 1 mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする (濃度 16 $\mu$ g/mL)。標準溶液 0.5、1、2、5 mL 及び 10mL を正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に 10mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度 0.8~16 $\mu$ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件<sup>14)</sup>

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフにより、次の条件によって測定する。

カラム充填剤<sup>15)</sup> : アミノプロピル基化学結合型シリカゲル (粒径 5 $\mu$ m)

カラム管 : 内径 4.6mm、長さ 250mm

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相<sup>16)</sup> : アセトニトリル / 1 w / v % リン酸混液 (6 : 4)

流速 : 1.0mL / 分

測定波長 : 230nm

注入量 : 10 $\mu$ L

② 検量線

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量<sup>17~20)</sup>

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中のアセスルファミウム濃度 ( $\mu$ g/mL) を求め、次式によって試料中のアセスルファミウム含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{アセスルファミウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200 \times 25}{W \times 20 \times 1000}$$

C : 試験溶液中のアセスルファミウム濃度 ( $\mu$ g/mL)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.01 g/kg

試薬・試液等

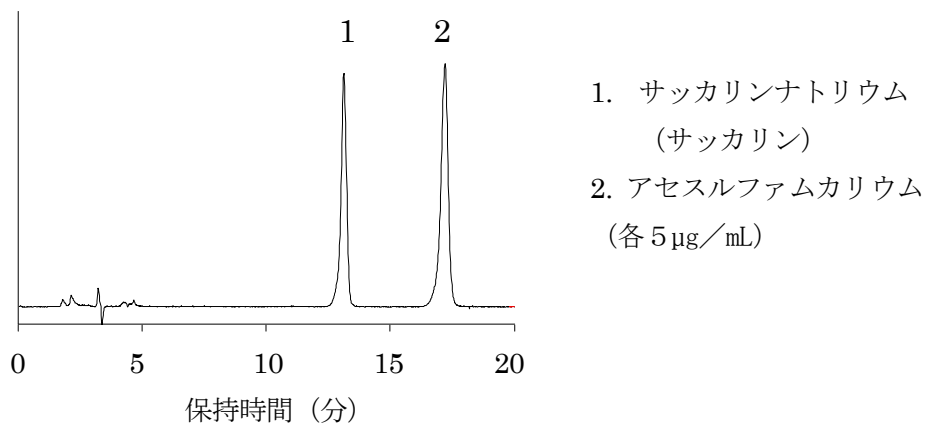
1. アセスルファミウム : 市販品を用いる。
2. 塩化ナトリウム : [特級]

3. 塩酸：[特級]
4. 透析内液<sup>21)</sup>：塩化ナトリウム 100 g を 0.01mol/L 塩酸に溶解して 1000mL とする。
5. 透析外液<sup>21)</sup>：0.01mol/L 塩酸
6. 透析膜チューブ：透析用セルロース製チューブ（平面幅 44mm、直径 28mm、膜厚 0.0203mm）を適当な長さに切ったものを水で洗浄し、片端を結んで閉じる。
7. テトラ-*n*-プロピルアンモニウム臭化物：[特級]
8. 0.1mol/L テトラ-*n*-プロピルアンモニウム臭化物溶液：テトラ-*n*-プロピルアンモニウム臭化物 26.6 g に水を加えて 1000mL とする。
9. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
10. 逆相抽出カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム（1 g）。あらかじめメタノール 10mL、水 10mL を順次通してコンディショニングしたものを用いる。
11. 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化シリカゲル固相抽出カラム（500mg）。あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL を順次通してコンディショニングしたものを用いる。
12. リン酸：[85%、特級]
13. 1 w/v % リン酸：リン酸 11.8 g に水を加えて 1000mL とする。
14. 0.3 w/v % リン酸：1 w/v % リン酸 30mL に水を加えて 100mL とする。
15. 0.3mol/L 塩酸：塩酸 2.7mL を量り、水を加えて 100mL とする。
16. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
17. 0.1mol/L 塩酸：塩酸 9 mL に水を加えて 1000mL とする。
18. 0.01mol/L 塩酸：0.1mol/L 塩酸 100mL に水を加えて 1000mL とする。

[注]

- 1) アセスルファムカリウムを特定する必要がある場合には、参考を示す分析法を用いることができる。
- 2) アスパルテーム分析法の（2）試験溶液の調製①透析と共通である<sup>文献1、文献2</sup>。
- 3) 試料のかさが大きい場合や水分を含むと膨張する場合は、試料採取量を 5～10 g に減らす。
- 4) 炭酸を多く含む試料の場合は、試料の秤量後に、超音波処理によりその大部分を除去する。また、脂肪分を多く含む試料の場合は、試料の秤量後に、ヘキサン約 20mL ずつで 2～3 回洗浄した後、ヘキサン臭がなくなるまで放置又は加温する。ただし、乳化した食品（ピーナッツバター、マヨネーズ等）は脱脂操作を省略できる。
- 5) 試料と混和して流動状にならない場合は、透析内液を適宜追加する。
- 6) 正確に 200mL を量ることができる目盛精度を有する容器。透析チューブの実効長が 15cm の場合は直径（内径）4 cm 以下がよい。
- 7) 試料、透析内液、透析外液の合計量。

- 8) 透析膜チューブの実効長約 15cm の場合、アセスルファミウムは、水分含量の高い食品において 24 時間で十分透析されるが、穀類の調製品や魚介乾製品等の水分含量の低い食品や、はっ酵乳等の乳製品では、透析効率が低下する傾向があるため、48 時間透析を行う。また、より実効長の長い透析膜チューブを用いる既報<sup>文献<sup>3)</sup></sup>に記された透析条件を用いることにより、穀類の調製品や乳製品においても 4 時間の透析で、上記方法と同等以上（クッキーにアセスルファミウム 0.1 g/kg 添加した時の添加回収率 98%及び相対標準偏差 0.6% (n = 5)) の透析率が得られる。
- 9) 食品中の夾雑成分による妨害ピーク及びマトリックス効果による保持時間変動等の影響がない場合は、透析による抽出液をメンブランフィルター (0.45µm) でろ過したものを試験溶液として用いることができる。
- 10) メーカーにより溶出条件が異なるため、あらかじめ、標準溶液を用いて溶出挙動を確認する。
- 11) 毎分 3～4 mL の流速で流す。
- 12) メーカーにより溶出条件が異なるため、あらかじめ、標準溶液を用いて溶出挙動を確認する。
- 13) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。
- 14) 測定条件は例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、サッカリンとアセスルファミウムが分離することが必要である。また、分析の際は、アセスルファミウム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。
- 15) 分析に用いるアミノプロピル基化学結合型シリカゲルカラムは、シリカゲルにアミノプロピル基が化学結合した順相系カラムである。なお、アミノプロピル基化学結合型シリカゲルカラムは、移動相を水に変えて洗浄すると再現性が悪くなるので、移動相で洗浄するとよい。
- 16) 移動相は 1 w/v%リン酸/メタノール混液 (6 : 4) 又はメタノール/1 w/v%リン酸混液 (6 : 4)、1 w/v%リン酸/メタノール混液 (6 : 4)、メタノール/1 w/v%リン酸混液 (6 : 4) の順に保持時間が長く (溶出が遅く) なる。妨害成分が多いと予想されるもの (高タンパク食品等) は保持時間が長い (溶出が遅い) 条件で分析すると良好な結果が得られることが多い。食品の種類によっては、保持時間が短い条件で妨害成分との分離が良い場合もあり、3種類の移動相を使い分けることにより、ほとんどの食品で固相抽出カラムによる精製を省略することが可能である。
- 17) アセスルファミウム及びサッカリンナトリウムの液体クロマトグラム例を注図 1 に示す。



<測定条件>

カラム充填剤：アミノプロピル基化学結合型シリカゲル（粒径 5 μm）

カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm                      カラム温度：40°C

流速：1.0mL/分    検出器：紫外可視吸光度検出器（230nm）    注入量：10μL

移動相：1 w/v %リン酸/メタノール混液（6：4）

注図1 アセスルファムカリウム及びサッカリンナトリウムの液体クロマトグラム

- 18) フォトダイオードアレイ検出器を用いて検出されたピークについては、UVスペクトルによる確認をし、疑義がある場合には、確認分析法を行う。
- 19) アセスルファムカリウムを紅茶及びヨーグルトドリンクに 0.01 g/kg 添加した時の 24 時間透析での添加回収率は 95% 及び 86%（相対標準偏差は 3.5 及び 1.6%）であり、ヨーグルトドリンク及びビスケットに 0.01 g/kg 添加した時の 48 時間透析での添加回収率は 90% 及び 88%（相対標準偏差はいずれも 1.5%）であった（n = 5）。
- 20) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、試料体積を含めて定容し、その定容量を含量計算で乗じている。そのため、固体試料等では透析外液量を乗じた値より数%～10%程度高い定量値となる場合があり、添加回収率が 100%を越えて高い場合には、この点が要因の一つとして考えられる。
- 21) 魚介乾製品のようにタンパク質の多い試料の場合には、0.02mol/L 水酸化ナトリウム溶液を透析内液及び透析外液として用いた方がよい回収率が得られる。サッカリンと同時に抽出できるが、アスパルテームは、アルカリ性下で分解するため抽出できない。

[文献]

- 1) 守安貴子ら：衛生化学、**37**、97（1991）
- 2) 守安貴子ら：食衛誌、**37**、91（1996）
- 3) 田原正一ら：食衛誌、**55**、13（2014）

## 参考

### アセスルファムカリウム確認分析法

#### 1. 分析法の概要

食品中のアセスルファムカリウムは、液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う<sup>1)</sup>。  
(2023年設定)

#### 2. 分析法（液体クロマトグラフィー質量分析）

##### （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

アセスルファムカリウム分析法（2）試験溶液の調製①透析抽出法により得られた抽出液を適宜希釈して、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とする。

##### （3）標準溶液の調製

アセスルファムカリウム分析法（3）標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度の標準溶液を調製する。

##### （4）測定法

###### ① 測定条件<sup>2)</sup>

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm）

カラム管：内径 2.0mm、長さ 150mm

カラム温度：40℃

移動相：0.1%ギ酸/メタノール混液（85：15）

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI（-）

検出法：スキャン（ $m/z$  50~250）又は

選択イオンモニタリング（SIM）（モニターイオン： $m/z$  162）

注入量：5 μL

###### ② 定性<sup>3)</sup>

試験溶液及び標準溶液をLC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されること、このピークのスキャン検出で得られるマススペクトルの主なイオンの  $m/z$  が標準溶液の主ピークのそれと一致することを確認する。



#### 試薬・試液等

1. アセスルファムカリウム分析法の試薬・試液等を準用する。
2. ギ酸：[98%、特級]
3. 0.1%ギ酸：市販品を用いるか、あるいは、ギ酸 1.0 g に水を加えて 1000mL とする。

#### [注]

- 1) ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)により確認を行う方法<sup>文献1)</sup>も使用できる。
- 2) 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。分析の際は、アセスルファムカリウム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。その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 3) LC-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ックス効果により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークの検出感度やマススペクトルの変化について確認する。

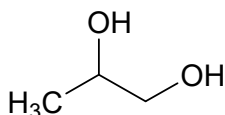
#### [文献]

- 1) 守安貴子ら：食衛誌、**34**、277 (1993)

製造用剤等

## プロピレングリコール

Propylene Glycol



$C_3H_8O_2$  : 76.09

### 1. 分析法の概要

食品中のプロピレングリコールは、メタノールで抽出し、ガスクロマトグラフィーにより定量する。(2023年改正)

### 2. 分析法 (ガス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

試料を粉砕又は細切した後、その約5gを精密に量り、メタノールを加えて正確に50mLとし、よく振り混ぜる。時々振り混ぜながら2時間放置した後、上清を5Aのろ紙でろ過し、得られたろ液を、抽出液とする<sup>1)</sup>。抽出液2mLを正確にとり、メタノールを加えて正確に10mLとし、試験溶液とする。

#### (3) 検量線用標準溶液の調製<sup>2)</sup>

プロピレングリコール約0.5gを精密に量り、メタノールに溶かして正確に100mLとする。その4mLを正確にとり、メタノールを加えて正確に100mLとしたものを標準溶液とする(濃度200 $\mu$ g/mL)。標準溶液0.5、1、2、3、4mL及び5mLを正確にとり、メタノールを加えてそれぞれ正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする(濃度10~100 $\mu$ g/mL)。

#### (4) 測定法<sup>文献1)</sup>

##### ① 測定条件<sup>3)</sup>

水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ(GC-FID)を用い、次の条件によって測定する。

カラム: 内径0.25mm、長さ30mのフューズドシリカ管の内面にポリエチレングリコールを0.25 $\mu$ mの厚さで被覆したもの

カラム温度：60℃（2分）、60→200℃（15℃/分、昇温）、200℃（4分）

注入口温度：220℃

検出器温度：250℃

キャリアーガス及び流量：ヘリウム、1 mL/分

注入方式：スプリットレス<sup>4)</sup>

注入量：1 µL

## ② 検量線<sup>5)</sup>

検量線用標準溶液をガス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<sup>6~10)</sup>

試験溶液をガス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によって試験溶液のプロピレングリコール濃度（µg/mL）を求め、次式<sup>11)</sup>によって試料中のプロピレングリコール含量（%）を計算する。

$$\text{プロピレングリコール含量 (\%)} = \frac{C}{W \times 40}$$

C：試験溶液中のプロピレングリコール濃度（µg/mL）

W：試料の採取量（g）

## ④ 定量限界 0.05%

## (5) 水分含量<sup>12)</sup>

試料約5 gを精密に量り、ハサミで約60個程度に分割する。これをあらかじめ質量（W<sub>1</sub>）を精密に量った秤量皿に入れ、試料を均一に広げ、この総質量（W<sub>2</sub>）を精密に量る。次に温度を130℃に上昇させておいた乾燥機の中に、すばやく秤量皿を入れる。その際ふたははずし、皿の下に置く。乾燥機の温度を130℃に保ち、3時間乾燥する。秤量皿を取り出し、ただちにふたをし、デシケーター（シリカゲル）中で室温まで放冷した後、質量（W<sub>3</sub>）を精密に量る。試料の水分含量は次式によって算出する。

$$\text{試料の水分含量 (\%)} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

めん類においてはプロピレングリコール含量を次式によって水分含量30%の場合に換算し、使用基準値と比較する。

$$\text{プロピレングリコール換算含量 (\%)} = \frac{70 \times a}{100 - b}$$

a : 試料中のプロピレングリコール実測値 (%)

b : 試料の水分含量 (%)

#### 試薬・試液等

1. プロピレングリコール：純度 98%以上の市販品を用いる。
2. メタノール：[特級]
3. 秤量皿：アルミニウム製、上径 55mm、下径 50mm、深さ 25mm 等

#### [注]

- 1) チューインガムで妨害ピークがある場合<sup>文献1)</sup>、細切した試料約 5 g を精密に量り、メタノール (1 → 2) を加えて正確に 50mL としよく振り混ぜる。時々振り混ぜながら 2 時間放置した後、上清を 5 A のろ紙でろ過し、ろ液 10mL を減圧濃縮し、窒素ガスを吹き付けて水分を除く。残留物に少量のメタノールを加えて超音波処理で溶解し、更にメタノールを加えて約 9mL とし、遠心 (10 分間、3000 回転/分) した後、上清にメタノールを加えて正確に 10mL とし、チューインガム抽出液とする。この抽出液 2 mL を正確にとり、メタノールを加えて正確に 10mL とし、チューインガム試験溶液とする。これをガスクロマトグラフィーで測定することにより妨害ピークが減少する。あるいは、「参考 プロピレングリコール確認分析法」に示す操作法を参照し、試験溶液をガスクロマトグラフィー質量分析の選択イオンモニタリング (SIM) により測定しても定量が可能である。
- 2) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。
- 3) 測定条件は例示である<sup>文献1)</sup>。また、分析の際は、プロピレングリコール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。
- 4) スプリットレス注入法でピークが割れてしまう様な場合は、適切な条件のスプリット注入法とする。
- 5) 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。
- 6) 内部標準法により定量する場合は<sup>文献1)</sup>、(2) で得られる抽出液 2 mL に内部標準溶液 (トリメチレングリコール 0.100 g を量り、メタノールに溶かして 100mL としたもの) 0.5mL を正確に量って加え、メタノールを加えて正確に 10mL としたものを試験溶液とする。この場合、プロピレングリコール標準溶液 0.5、1、2、3、4 及び 5 mL を正確に量り、内部標準溶液 0.5mL ずつを正確に量って加え、メタノールを加えてそれぞれ正確に 10mL とし、検量線用標準溶液とする。(4) と同様の測定法により得られる内標準物質トリメチレングリコールに対するプロピレングリコールのピーク高さ比又はピーク面積比をそれぞれ確認し、試験溶液中のピーク高さ比又はピーク面積比と検量線用標準溶液におけるこれら値から得られる関係線とから、試験溶液中のプロピレングリコール濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

を求める。この場合は、あらかじめ試験溶液のみを測定し、内部標準物質のピーク位置に妨害が無いことを確認する。

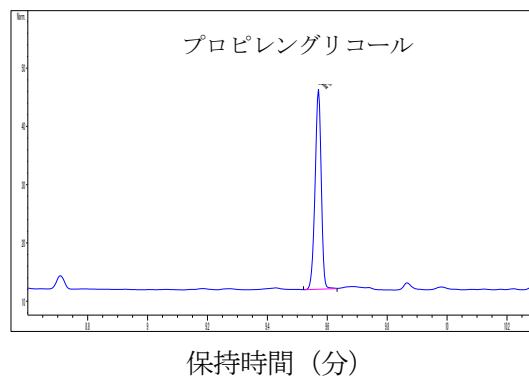
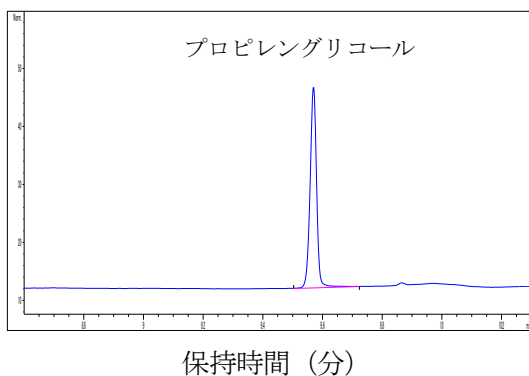
7) 試験溶液中の濃度が高く、検量線の濃度範囲を逸脱する場合は、試験溶液をメタノールで適宜希釈して定量をやり直し、計算式に希釈倍率を乗じて含量を求める。

8) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、試料体積を含めて定容し、その定容量を含量計算で乗じている。そのため、固体試料等では抽出液量に乗じた値より数%~10%程度高い定量値となる場合があり、添加回収率が100%を越えて高い場合には、この点が要因の一つとして考えられる。

9) プロピレングリコール標準溶液 (10 $\mu$ g/mL) 及びプロピレングリコール0.05%添加中華めんから得られた試験溶液のクロマトグラムを注図1に示す。

(a) プロピレングリコール標準溶液

(b) 中華めん (プロピレングリコール0.05%添加)



#### <測定条件>

カラム：内径 0.25mm、長さ 30mのフューズドシリカ管の内面にポリエチレングリコールを0.25 $\mu$ mの厚さで被覆したもの。

カラム温度：60 $^{\circ}$ C (2分)、60 $\rightarrow$ 200 $^{\circ}$ C (15 $^{\circ}$ C/分、昇温)、200 $^{\circ}$ C (4分)

検出器：水素炎イオン化検出器

注入口温度：220 $^{\circ}$ C

検出器温度：250 $^{\circ}$ C

キャリアーガス及び流量：ヘリウム、1 mL/分

注入方式：スプリットレス

注入量：1  $\mu$ L

注図1 食品中のプロピレングリコールのGC-FIDによる分析例

10) 本法によるプロピレングリコールの添加回収試験の結果を注表1に示す。

注表1 プロピレングリコールの各種食品での添加回収率

試料	添加量(%)	回収率(%)	相対標準偏差(%)
中華めん	0.05	95	2.2
	2.0	100	2.2
ギョウザの皮	0.05	93	1.5
	1.2	101	1.3
いかくん製品	0.05	97	2.0
	2.0	98	1.4

11) 式の説明：

$$\text{プロピレングリコール含量 (\%)} = \frac{(C (\mu\text{g}/\text{mL}) \times 50 (\text{mL}))}{W (\text{g})} \times \frac{10 (\text{mL})}{2 (\text{mL})} \times \frac{1}{10000}$$

12) 生めん並びにギョウザ等の皮類に関するプロピレングリコールの使用基準値は、製品中の水分含量が30%以上として設定されたものであり、これらの製品は流通中、水分含量が減少する場合、また、半生めんと称される水分含量20%前後のものも存在するので、水分含量30%未満の製品を対象とする場合には使用基準は水分含量30%として適用する。水分含量の測定は、試料の水分含量30%として適用するためである。

[文献]

- 1) 岸 弘子ら：神奈川県衛生研究所研究報告、**37**、35 (2007)

## 参考

### プロピレングリコール確認分析法

#### 1. 分析法の概要

食品中のプロピレングリコールは、ガスクロマトグラフィー質量分析により確認を行う。  
(2023年設定)

#### 2. 分析法（ガスクロマトグラフィー質量分析）

##### (1) 検体の採取と試料の調製

##### (2) 試験溶液の調製

上記(1)、(2)については、プロピレングリコール分析法の(1)、(2)を準用する。

##### (3) 標準溶液の調製

プロピレングリコール分析法(3)検量線用標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度の標準溶液を調製する。

##### (4) 測定法<sup>文献1)</sup>

###### ①測定条件<sup>1)</sup>

ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)を用い、次の条件によって測定する。

カラム：内径0.25mm、長さ30mのフューズドシリカ管の内面にポリエチレングリコールを  
0.25 $\mu$ mの厚さで被覆したもの

カラム温度：60 $^{\circ}$ C(2分)、60 $\rightarrow$ 200 $^{\circ}$ C(15 $^{\circ}$ C/分、昇温)、200 $^{\circ}$ C(4分)

注入口温度：220 $^{\circ}$ C

イオン源温度：250 $^{\circ}$ C

キャリアーガス及び流量：ヘリウム、1mL/分

注入方式：スプリットレス

イオン化法モード(電圧)：EI(70eV)

検出法：スキャン( $m/z$  10~200)又は選択イオンモニタリング(SIM)

主なイオン： $m/z$  29、45、61

注入量：1 $\mu$ L

###### ②定性

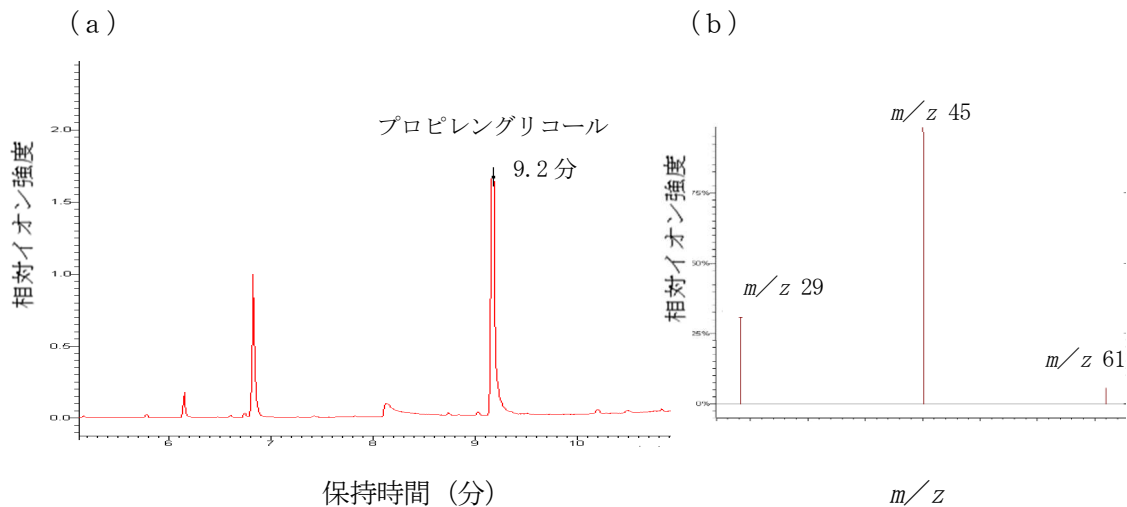
試験溶液及び標準溶液をGC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されること、このピークのスキャン検出で得られるマススペクトル上の主要ピークの強度比が標準溶液のピークと一致することを確認する。

試薬・試液等

1. プロピレングリコール分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

- 1) 標準溶液の強度が最大となるように予め最適化を行う。分析の際は、プロピレングリコール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。



<測定条件>

カラム：内径 0.25mm、長さ 30m のフューズドシリカ管の内面にポリエチレングリコールを 0.25 $\mu$ m の厚さで被覆したもの

カラム温度：60 $^{\circ}$ C（2分）、60 $\rightarrow$ 200 $^{\circ}$ C（15 $^{\circ}$ C/分、昇温）、200 $^{\circ}$ C（4分）

注入口温度：220 $^{\circ}$ C、イオン源温度：250 $^{\circ}$ C、注入方式：スプリットレス

キャリアーガス及び流量：ヘリウム、1 mL/分

イオン化モード（電圧）：E I（70eV）、注入量：1  $\mu$ L

検出法：スキャン（m/z 10 $\sim$ 200）又は選択イオン検出（S I M）

主なイオン：m/z 29、45、61

注図1 中華めん（プロピレングリコール 0.05%添加）のS I Mクロマトグラム（a）及び選択イオン検出（S I M）におけるイオン強度（b）

[文献]

- 1) 岸 弘子ら：神奈川県衛生研究所研究報告、37、35（2007）