

酸化防止剤

ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール

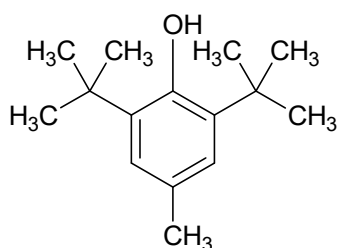
及び没食子酸プロピル

Butylated Hydroxytoluene, Butylated Hydroxyanisole and Propyl Gallate

ジブチルヒドロキシトルエン

Butylated Hydroxytoluene

略名：BHT

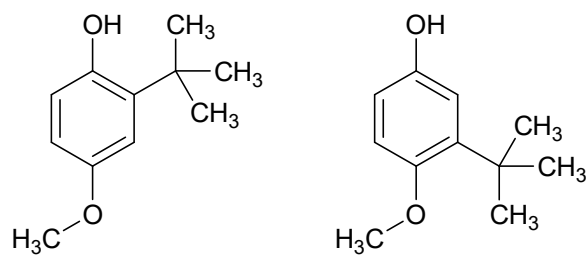


$C_{15}H_{24}O$: 220.35

ブチルヒドロキシアニソール

Butylated Hydroxyanisole

略名：BHA

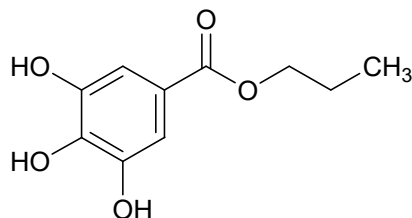


$C_{11}H_{16}O_2$: 180.24

没食子酸プロピル

Propyl Gallate

略名：PG



$C_{10}H_{12}O_5$: 212.20

1. 分析法の概要

食品中のジブチルヒドロキシルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルを分析する方法である。分析法Aでは、アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混合溶媒（2：1：1）で抽出し、 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。分析法Bでは、0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリルで抽出し、 $-30\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。（2008年改正、2023年統合設定）

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）¹⁾

分析法A^{文献1、文献2)}

（1）検体の採取と試料の調製

一般試験採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

① 植物油等

試料約5gを精密に量り、混合溶媒50mLを加えてよく振り混ぜた後、 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、上層を分取して抽出液とする。抽出液を減圧濃縮し1～2mLとした後、混合溶媒を加えて正確に5mLとする。これをメンブランフィルター（0.45 μm 、親水性ポリテトラフルオロエチレン）でろ過し、試験溶液とする。

② その他の食品²⁾

試料約5gを精密に量り、ホモジナイザーのカップにとる。これに無水硫酸ナトリウム10g及び混合溶媒50mLを加え、ホモジナイズ³⁾する。 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で1時間以上冷却した後、すばやくろ紙でろ過する。残さはあらかじめ冷蔵庫で冷却した混合溶媒15mLで洗い、洗液をろ過する。ろ液を合わせ、抽出液とする。抽出液を減圧濃縮し1～2mLとした後、混合溶媒を加えて正確に5mLとする。これをメンブランフィルター（0.45 μm 、親水性ポリテ

トラフルオロエチレン) でろ過し、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピル各 0.100 g を量り、メタノールを加えて溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする (各濃度 1000 μ g/mL)。標準原液 10mL を正確にとり、メタノールを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする (各濃度 100 μ g/mL)。標準溶液 0.5、1、2、5 及び 10mL を正確にとり、混合溶媒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 (各濃度 5~100 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件⁵⁾

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

カラム管：内径 4.6~6.0mm、長さ 150~250mm

カラム温度：室温

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液 (1 : 1)

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件⁶⁾

分	A (%)	B (%)
0	40	60
15	90	10
45	90	10

流速：1.0mL/分

測定波長：280nm

注入量：5 μ 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、得られたピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量⁷⁾

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ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの濃度を求め、次式によって試料中の含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ジブチルヒドロキシトルエン含量 (g/kg)} = \frac{C_1 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{ブチルヒドロキシアニソール含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{没食子酸プロピル含量 (g/kg)} = \frac{C_3 \times 5}{W \times 1000}$$

C_1 : 試験溶液中のジブチルヒドロキシルエンの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_2 : 試験溶液中のブチルヒドロキシアニソールの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_3 : 試験溶液中の没食子酸プロピルの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.005 g/kg

分析法B (分析法Aで対象添加物が回収されにくい食品等)⁸⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試験採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

① 固形食品

試料⁹⁾約5gを精密に量り、ホモジナイザーのカップにとる。これに無水硫酸ナトリウム10～15g及び0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル¹⁰⁾30mLを加え、1～2分間ホモジナイズする。ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過し¹¹⁾、残さに0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル30mLを加え、同様の操作を2回繰り返す。ろ液を合わせ、減圧下40℃で溶媒を留去する。残留物に0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾を正確に5mL加えてよく振り混ぜた後、-30～-5℃の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、すばやくメンブランフィルター(0.45 μm 、親水性ポリテトラフルオロエチレン)¹³⁾でろ過し、得られたろ液を試験溶液とする。

② 液状食品

試料約5gを精密に量り、50mLの耐溶媒遠沈管にとる。これに0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル¹⁰⁾30mLを加え、振とうした¹⁴⁾後、3500回転/分で10分間遠心分離する。上清を分取し、残さに0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル30mLを加え、同様の操作を2回繰り返す。上清を合わせ、減圧下40℃で溶媒を留去する。残留物に0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾を正確に5mL加えてよく振り混ぜた後、-30～-5℃の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、すばやくメンブランフィルター(0.45 μm 、親水性ポリテトラフルオロエチレン)¹³⁾でろ過し、得られたろ液を試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピル各0.100gを量り、それぞれ0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール^{12、15)}に溶かして正確に100mLとし、各標準原液とする(各濃度1000µg/mL)。各標準原液をそれぞれ10mLずつ正確にとり、0.1w/v%アスコルビン酸含有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(各濃度100µg/mL)。標準溶液0.5、1、2、5及び10mLを正確にとり、0.1w/v%アスコルビン酸含有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(各濃度5~100µg/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件⁵⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフ¹⁶⁾を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹⁷⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径5µm)

カラム管：内径2.1mm、長さ150mm

カラム温度：40°C

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液(1:1)

B液 5 vol%酢酸溶液¹⁸⁾

グラジエントの条件¹⁹⁾

分	A (%)	B (%)
0	20	80
5	20	80
20	90	10
35	90	10

流速：0.2mL/分

測定波長：280nm

注入量：5µL

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、得られたピーク面積から検量線を作成する²⁰⁾。

③ 定量^{21~23)}

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ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの濃度を求め、次式によって試料中の含量(g/kg)を計算する。

$$\text{ジブチルヒドロキシトルエン含量 (g/kg)} = \frac{C_1 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{ブチルヒドロキシアニソール含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{没食子酸プロピル含量 (g/kg)} = \frac{C_3 \times 5}{W \times 1000}$$

C_1 : 試験溶液中のジブチルヒドロキシルエンの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_2 : 試験溶液中のブチルヒドロキシアニソールの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_3 : 試験溶液中の没食子酸プロピルの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.005 g/kg

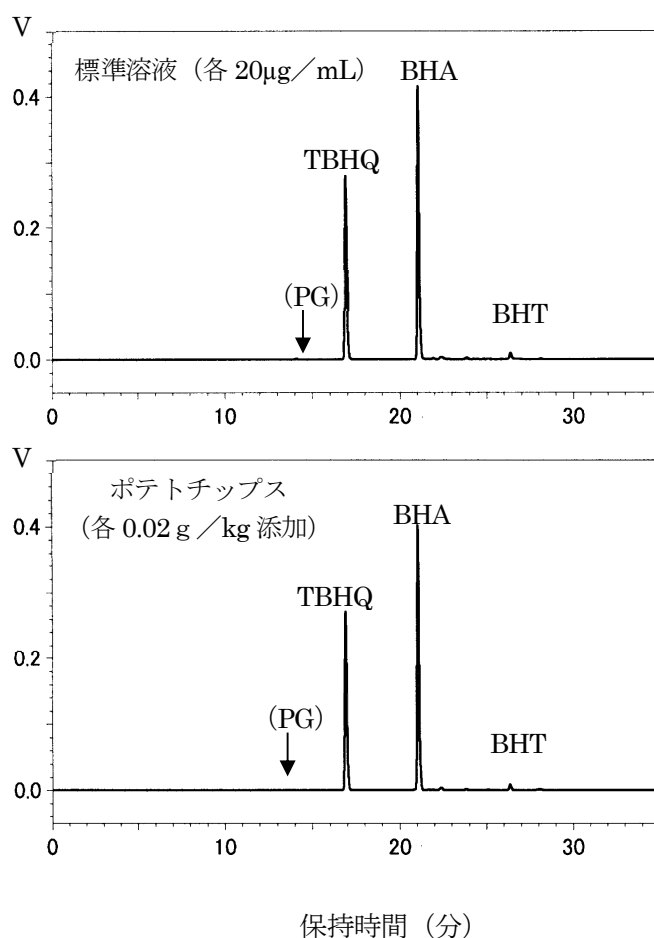
試薬・試液等

1. ジブチルヒドロキシルエン：市販品を用いる。
2. ブチルヒドロキシアニソール：市販品を用いる。
3. 没食子酸プロピル：市販品を用いる。
4. アセトニトリル：[特級] 又は [高速液体クロマトグラフィー用]
5. 2-プロパノール：[特級]
6. エタノール：[特級]
7. 混合溶媒：アセトニトリル、2-プロパノール及びエタノールを容量比2：1：1で混合する。
8. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
9. メタノール：[特級] 又は [高速液体クロマトグラフィー用]
10. 酢酸：[特級]
11. 5 vol% 酢酸溶液：酢酸 50mL を量り、水を加えて 1000mL とする。
12. L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル：市販品を用いる。
13. ヘキサン：[特級]
14. L (+) -アスコルビン酸：[特級]
15. 0.01 w/v % アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル：ヘキサンとアセトニトリルを分液漏斗で振とうし、静置する。2層に分離した後、下層を採取する。この液 1000mL に L (+) -アスコルビン酸パルミチン酸エステル 0.1 g を溶解する。
16. 0.1 w/v % アスコルビン酸含有メタノール：L (+) -アスコルビン酸 0.1 g を量り、メタノールで 100mL に定容する。

[注]

- 1) 本法は未指定添加物 *tert*-ブチルヒドロキノンの同時分析が可能である。
- 2) バター、ドレッシング、魚介乾製品、魚介冷凍品、チップス、クッキー、チョコレート等における分析に用いることができる。バター等は 40℃で加温融解した後、秤量する。
- 3) 5～10 分間ほどホモジナイズする。試料を十分混合できる場合は、ホモジナイズ時間を短くすることでホモジナイズ時の熱の負荷等を減らすことができ、添加回収率の向上につながる場合もある。
- 4) 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、調整してもよい。
- 5) 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。
- 6) 各試料を分析終了後ごとに移動相Aのみを約 30 分間流すことにより、ほとんどの油脂成分を溶出することができる。また、移動相を初期状態に戻したのち、そのまま 20 分間移動相を流しカラムの安定化を図るとよい。なお、ODS系のカラムでも種々の性質のものがあるため、移動相Aの初期の割合を 40～50%、最終の割合を 90～95%の間で調整する。
- 7) 分析法Aによる 0.1 g/kg の濃度でのジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの添加回収率 (n = 3 の平均) は、植物油で 88～95%、バターで 91～95%、煮干しで 72～85%、冷凍えびで 81～88%である^{文献1)}。
- 8) 煮干し等は、分析法Bの方が分析法Aより良好な場合がある。
- 9) バターは、①固形食品の調製法では、ろ液に試料の混入が見られたため、40℃で加温融解し、②液状食品の調製法を適用する。
- 10) 分析操作中のジブチルヒドロキシトルエン等の酸化による減少を防止するために、アスコルビン酸パルミチン酸エステルを抽出溶媒に添加する。
- 11) ろ紙を用いたろ過でも、問題の無い場合もある。
- 12) 試験溶液中のジブチルヒドロキシトルエン等の酸化による減少を防止するため、アスコルビン酸を試験溶液の溶媒に添加している。ただし、0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールの代わりにメタノールを用いても十分な回収率や精度が得られる場合もある²⁵⁾、^{文献3)}。
- 13) ガラス器具類を試験溶液と同様に冷凍庫で冷却したものをを用いるとよい。
- 14) 1～10 分間ほど振とうする。
- 15) 冷蔵保管の場合、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソールをアスコルビン酸含有液では数か月保管時に減少が見られ、アスコルビン酸無添加の方がより長期間安定であったが、冷凍保管の場合は、アスコルビン酸含有、非含有によらず長期間安定であったとの報告がある^{文献3)}。
- 16) ブチルヒドロキシアニソールは、蛍光検出器付液体クロマトグラフを用い、励起波長 280nm、蛍光波長 325nm で測定することができる²⁴⁾。蛍光検出器は、紫外可視吸光度検

出器に比較してブチルヒドロキシアニソールの検出感度が高いので、検量線用標準溶液の濃度範囲（5～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で直線性が得られない場合は、検量線用標準溶液及び試験溶液を0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾で、適宜、希釈してもよい。蛍光検出器付液体クロマトグラフによるクロマトグラムの一例を注図1に示す。また、ブチルヒドロキシアニソールに比べて感度は低い、ジブチルヒドロキシルエンは励起波長285nm、蛍光波長317nmで、没食子酸プロピルは励起波長274nm、蛍光波長365nmで測定することもできる²⁴⁾。



PG：没食子酸プロピル、TBHQ：*tert*-ブチルヒドロキノン、
BHA：ブチルヒドロキシアニソール、BHT：ジブチルヒドロキシルエン

注図1 蛍光検出器付液体クロマトグラフによるクロマトグラム

<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 μm ）

カラム管：内径2.1mm、長さ150mm、

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$ 、流速：0.2mL/分、注入量：5 μL

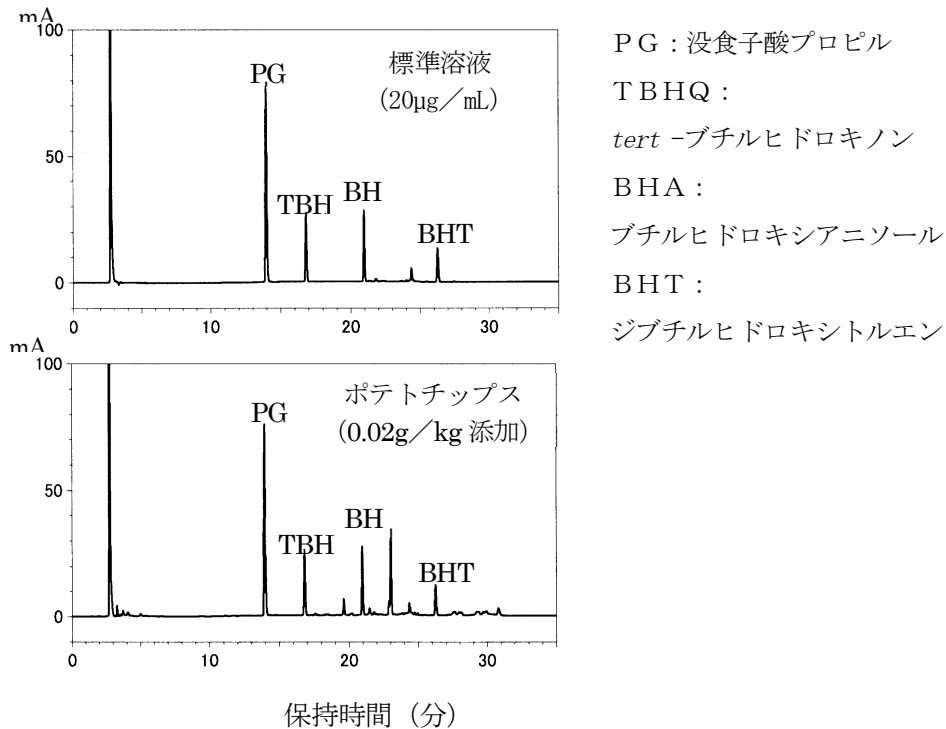
移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 5vol%酢酸溶液

グラジエントの条件		
時間(分)	A (%)	B (%)
0	20	80
5	20	80
20	90	10
35	90	10

検出器：蛍光検出器（励起波長：280nm、蛍光波長：325nm）

- 17) 分析の際は、ジブチルヒドロキシルエン等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。
- 18) 移動相B液として、0.2vol%酢酸溶液を用いることもできる。ただし、各ピークの保持時間が数分程度長くなる傾向がある。
- 19) 各試料を分析終了後ごとに移動相Aのみをしばらく流すことにより、油脂成分を溶出することができる。また、移動相を初期状態に戻した後、初期移動相を流してカラムの安定化を行った後、次の分析を行う。
- 20) 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。
- 21) 試験溶液中のジブチルヒドロキシルエン等の濃度が高く、検量線の濃度範囲を逸脱する場合は、試験溶液を0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾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。
- 22) 本法による液体クロマトグラムの一例を注図2に示す。



注図2 紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラムによるクロマトグラム

<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 μm）、カラム温度：40℃

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm、流速：0.2mL/分、注入量：5 μL

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件		
時間(分)	A (%)	B (%)
0	20	80
5	20	80
20	90	10
35	90	10

検出器：紫外可視吸光光度検出器（280nm）

23) 本法の添加回収試験結果を注表 1～注表 3 に示す。

注表 1 ジブチルヒドロキシトルエンの各種食品での添加回収率（n = 5）

食品	添加量 ²⁵⁾ (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
バター	0.02	81	4.2
オリーブ油	0.02	84	5.0
ポテトチップス	0.02	96	9.2
煮干し	0.02	96	6.6

注表 2 ブチルヒドロキシアニソールの各種食品での添加回収率（n = 5）

食品	添加量 ²⁵⁾ (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
バター	0.02	91	4.7
オリーブ油	0.02	88	5.7
ポテトチップス	0.02	99	6.0
煮干し	0.02	94	7.3

注表 3 没食子酸プロピルの各種食品での添加回収率（n = 5）

食品	添加量 ²⁵⁾ (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
バター	0.02	96	3.6
オリーブ油	0.02	95	4.9
ポテトチップス	0.02	98	7.0
煮干し	0.02	78	13.0

24) 0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールの代わりにメタノールを用いた分析法Bで、0.02 g/kg の濃度²⁵⁾でのジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び

没食子酸プロピルの添加回収試験（2名、n = 3 × 3日）をしたところ、紫外可吸光光度検出器での検出による真度は、なたね油で 86~96%、クラッカーで 89~93%、蛍光検出器での検出による真度は、なたね油で 85~99%、クラッカーで 89~96%、煮干しで 71~92%であった。なお、この時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 μm）、流速：1.0mL/分

カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm、カラム温度：40℃、注入量：5 μL

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	40	60
20	95	5
35	95	5

検出器：(A) 紫外可視吸光光度検出器（測定波長 280nm）

(B) 蛍光検出器

ジブチルヒドロキシルエン（励起波長：285nm、蛍光波長：317nm）

ブチルヒドロキシアニソール（励起波長：280nm、蛍光波長：325nm）

没食子酸プロピル（励起波長：274nm、蛍光波長：365nm）

25) ジブチルヒドロキシルエン等は、酸化還元性の分解しやすい化合物で、低濃度では容易に分解するため、低濃度の添加では良好な回収率が得られない。また、酸化した食品に添加すると良好な回収率が得られない。精度管理では、0.02 g/kg の標準添加濃度で添加回収試験を実施する。

[文献]

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2020、367（2020）、金原出版
- 2) 山田真記子ら：食衛誌、**34**、535（1993）
- 3) 見上葉子ら：食衛誌、**63**、12（2022）

着色料

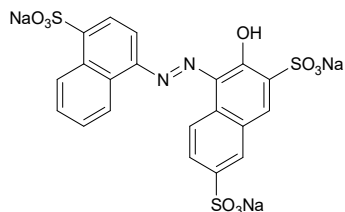
食用タール色素

Food Tar Colors

食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Red No. 2 and Its Aluminium Lake

別名：アマランス

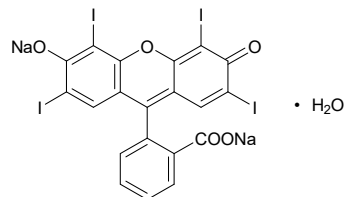


$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$: 604. 47

食用赤色 3 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Red No. 3 and Its Aluminium Lake

別名：エリスロシン

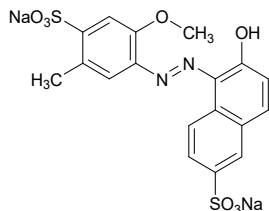


$C_{20}H_6I_4Na_2O_5 \cdot H_2O$
($C_{20}H_6I_4Na_2O_5$: 879. 86)

食用赤色 40 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Red No. 40 and Its Aluminium Lake

別名：アルラレッド AC

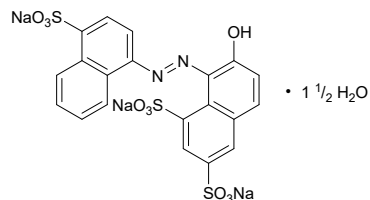


$C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$: 496. 42

食用赤色 102 号

Food Red No. 102

別名：ニューコクシン

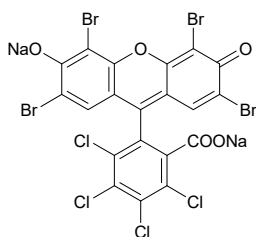


$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$
($C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$: 604. 47)

食用赤色 104 号

Food Red No. 104

別名：フロキシ

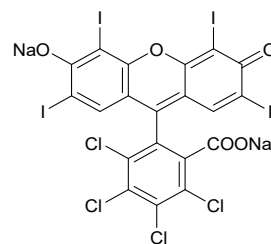


$C_{20}H_2Br_4Cl_4Na_2O_5$: 829. 63

食用赤色 105 号

Food Red No. 105

別名：ローズベンガル

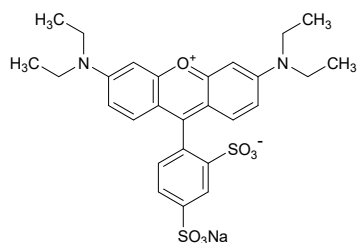


$C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$: 1017. 64

食用赤色 106 号

Food Red No. 106

別名：アシッドレッド

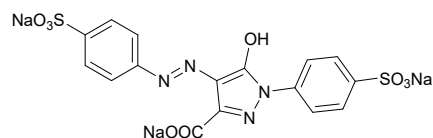


$C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$: 580. 65

食用黄色 4 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Yellow No. 4 and Its Aluminium Lake

別名：タートラジン

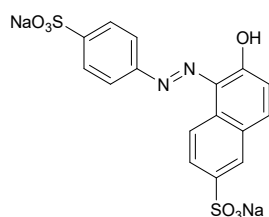


$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$: 534. 36

食用黄色 5 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Yellow No. 5 and Its Aluminium Lake

別名：サンセットイエローFCF

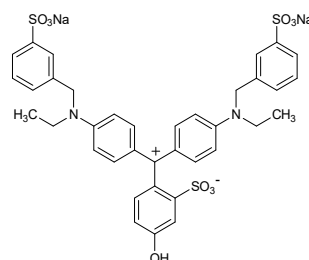


$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$: 452. 37

食用緑色 3 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Green No. 3 and Its Aluminium Lake

別名：ファストグリーン FCF

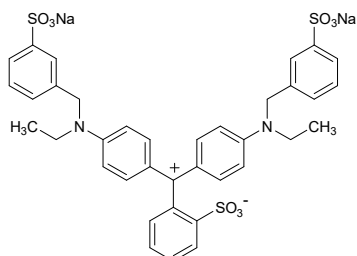


$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$: 808. 85

食用青色 1 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Blue No. 1 and Its Aluminium Lake

別名：ブリリアントブルーFCF

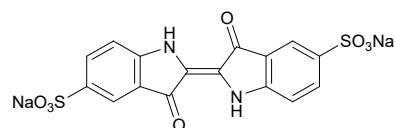


$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$: 792. 85

食用青色 2 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Blue No. 2 and Its Aluminium Lake

別名：インジゴカルミン



$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$: 466. 35

1. 分析法の概要

食品中の食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ、食用赤色 3 号及びそのアルミニウムレーキ、食用赤色 40 号及びそのアルミニウムレーキ、食用赤色 102 号、食用赤色 104 号、食用赤色 105 号、食用赤色 106 号、食用黄色 4 号及びそのアルミニウムレーキ、食用黄色 5 号及びそのアルミニウムレーキ、食用緑色 3 号及びそのアルミニウムレーキ、食用青色 1 号及びそのアルミニウムレーキ並びに食用青色 2 号及びそのアルミニウムレーキは、各色素として薄層クロマトグラフィー¹⁾により定性する。(2008 年改正、2023 年統合設定)

2. 分析法 (薄層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。ただし、部分的に着色された試料は着色部位を採取する。

(2) 試験溶液の調製^{2, 3)}

① 抽出

a 液状食品

試料 10 g を量り、水 5 mL を加えて混和し、試料液とする。アルコールを含有する試料の場合は、試料 10 g を量り、中和した後、水浴上でアルコールを蒸発させ⁴⁾、残留物に水を加えて減量を補い、さらに水 5 mL を加えて混和し、試料液とする。試料液を遠心 (5 分間、3000 回転/分 (以下、遠心は同条件)) して、上清を分取し、抽出液とする。

b 半流動状又は固形食品⁵⁾

試料 10 g を量り、水 50 mL を加え、加温しながらかくはんし、色素を溶出させ、遠心して上清を分取する。沈殿物が着色している場合は、沈殿物に 0.5% アンモニア水⁶⁾ 20~50 mL を入れてかくはん後、必要に応じてさらにエタノール^{7, 8)} 20~50 mL を加えてかくはんした後、遠心する。上清は、先の上清に合わせる。

沈殿物が、なお着色している場合は、アンモニアを揮散させた後、沈殿物に 1 mol/L 塩酸⁹⁾ 10 mL を加え、色素を溶出させ、遠心して上清を集め、先に合わせた上清に合わせる。

合わせた上清を酢酸 (3→50) 又は水酸化ナトリウム溶液 (4→100) で中和した後、エタノールを蒸発させ、抽出液とする。

c 油脂を多く含む液状又は半流動状食品¹⁰⁾

試料 10 g を量り、水 50 mL を加え、加温しながらかくはんし、色素を溶出させ、遠心後、油脂が浮いている場合は、これを除去した後、上清を分取する。沈殿物が着色している場合は、沈殿物に 0.5% アンモニア水⁶⁾ 20~50 mL 及びエタノール^{7, 8)} 20~50 mL を加えてかくはんした後、遠心する。油脂が浮いている場合は、これを除去した後、上清を分取し、先の上清に合わせる。

沈殿物が、なお着色している場合は、アンモニアを揮散させた後、沈殿物に 1 mol/L 塩酸⁹⁾ 10 mL を加え、色素を溶出させ、遠心して上清を集め、先に合わせた上清に合わせる。

合わせた上清を酢酸 (3→50) 又は水酸化ナトリウム溶液 (4→100) で中和した後、エタノール

ールを蒸発させ、抽出液とする。

d 油脂を多く含む固形食品¹⁰⁾

試料 10 g を量り、必要があれば加温して溶かし、ジエチルエーテル¹¹⁾ 30 mL を加え振り混ぜた後、静置¹²⁾ 後、ジエチルエーテル層を取り除く。沈殿物にジエチルエーテル¹¹⁾ 30 mL を加え、同様の操作を繰り返す。沈殿物に 0.5% アンモニア水⁶⁾ 50 mL を加えて振り混ぜ、静置¹²⁾ 後、上清を分取する。沈殿物が着色している場合は 0.5% アンモニア水 50 mL をさらに加え、同様に操作して、上清を合わせる。

ジエチルエーテル層が着色している場合は、ジエチルエーテル層を合わせ、0.5% アンモニア水 50 mL で色素を抽出し、先に合わせた上清と合わせる。

沈殿物が、なお着色している場合は、アンモニアを揮散させた後、沈殿物に 1 mol/L 塩酸⁹⁾ 10 mL を加え、色素を溶出させ、遠心して上清を集め、先に合わせた上清と合わせる。

合わせた上清を酢酸 (3→50) 又は水酸化ナトリウム溶液 (4→100) で中和した後、ジエチルエーテルを蒸発させ、抽出液とする。

② 精製^{13, 14)}

抽出液に水を加えて約 50~200 mL とし、酢酸を加えて酸性¹⁵⁾ とする。これにポリアミド 0.5~1 g を加え、ポリアミドが着色するまでゆっくりかくはんする。しばらく静置した後¹⁶⁾、上清を捨て、これに水 200 mL を加えかくはんした後、再び静置し、上清を捨てる。この洗浄操作を上清が透明になるまで繰り返す。着色したポリアミドを、水を用いてクロマト管に流し込み、これを流出液が中性付近になるまで水で洗浄し¹⁷⁾、次いでエタノール 10~20 mL で洗浄した後、エタノール・アンモニア試液で溶出する。溶出液をできる限り乾固し¹⁸⁾、残留物に水又は 50 vol% エタノール 0.25 mL を加えて溶かし、試験溶液とする^{19, 20)}。

(3) 標準溶液の調製

食用赤色 2 号、食用赤色 3 号、食用赤色 40 号、食用赤色 102 号、食用赤色 104 号、食用赤色 105 号、食用赤色 106 号、食用黄色 4 号、食用黄色 5 号、食用緑色 3 号、食用青色 1 号及び食用青色 2 号標準品 20.0 mg を量り、それぞれ水を加えて溶かして 10 mL とし、各色素標準原液とする (濃度 2 mg/mL)。各色素標準原液 1 mL を正確に量り、水を加えて 20 mL とし、標準溶液²¹⁾ とする (濃度 100 µg/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件

試験溶液²²⁾ 及び標準溶液につき、次に示す条件で薄層クロマトグラフィー²³⁾ を行う。ただし、試験溶液及び標準溶液は以下の方法で薄層板にスポットする。薄層板の下端から約 1.5 cm の位置を原線とし、両側から少なくとも 1 cm 離し、原線上に直径が 3 mm 以下となるように、1 cm 以上の間隔でスポットして風乾する。展開用容器にあらかじめ展開溶媒を深さ約 0.5~1 cm になるように入れ、展開溶媒の蒸気で展開用容器内を飽和させておく。次に薄層板の下端を展開溶

媒に浸し、展開する。展開終了後、薄層板を取り出し、風乾する。

薄層板²⁴⁾：シリカゲル薄層板及びオクタデシルシリル化シリカゲル薄層板²⁵⁾

スポット容量：1 μL

シリカゲル薄層板用展開溶媒²⁶⁾：

酢酸エチル／メタノール／28%アンモニア水混液（3：1：1）²⁷⁾

オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板用展開溶媒^{26)、28)}：

5%硫酸ナトリウム溶液／メタノール／アセトニトリル混液（10：3：3）²⁹⁾、

5%硫酸ナトリウム溶液／メタノール／アセトニトリル／28%アンモニア水混液（10：3：3：1）

メチルエチルケトン／メタノール／5%硫酸ナトリウム溶液混液（1：1：1）³⁰⁾

展開距離：6～15cm

② 定性

試験溶液及び標準溶液から得られたスポットのRf値を比較するとともに、色調も観察し、試料中の食用タール色素を定性する^{31～33)}。

試薬・試液等

1. 食用赤色2号、食用赤色3号、食用赤色40号、食用赤色102号、食用赤色104号、食用赤色105号、食用赤色106号、食用黄色4号、食用黄色5号、食用緑色3号、食用青色1号及び食用青色2号標準品：[食品添加物公定書標準品]
2. 28%アンモニア水：アンモニア水 [特級、質量分率28%]
3. 0.5%アンモニア水：28%アンモニア水1 mLに水を加えて56 mLとする。
4. エタノール：エタノール (95) [特級]
5. 塩酸：[特級]
6. 1 mol/L塩酸：塩酸90 mLを量り、水を加えて1000 mLとする。
7. 酢酸：[特級]
8. 水酸化ナトリウム：[特級]
9. ジエチルエーテル：[特級]
10. ポリアミド³⁴⁾：カラムクロマトグラフ用、60～80メッシュを用いる。
11. クロマト管：ガラス管(内径10 mm、長さ200 mm)等やフィルター付きカラム(内径0.8 cm、長さ4 cm)等が使用できる。
12. エタノール・アンモニア試液：アンモニア水1 mLに水を加えて28 mLとした液にエタノール28 mLを混和する。
13. 50 vol%エタノール：エタノール50 mLに水を加えて100 mLとする。
14. 酢酸エチル：[特級]
15. メタノール：[特級]
16. アセトニトリル：[特級]

17. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
18. 5%硫酸ナトリウム溶液：無水硫酸ナトリウム 5 g に水 95mL を加える。
19. メチルエチルケトン：[特級]

[注]

- 1) 食用タール色素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) 食用青色 2 号は紫外線や加熱によって分解しやすいため、食用青色 2 号が使用されているときは、全ての操作を遮光し、できるだけ短時間で行う。また、遠心分離により沈殿物がうまく分離が出来ない場合は、脱脂綿、ガーゼ又はガラス繊維を用いてろ過してもよい。ろ紙を用いてろ過を行うと、ろ紙に色素が吸着し回収できないことがあるため、注意が必要である。
- 3) 色素の表示があるにもかかわらず、色素を検出できない場合などは、適宜試料の採取量、試験溶液の濃度、薄層板へのスポット容量を調整する。明らかに食品の一部が着色しているものについては、着色部分のみを採取し、その部分を細切し試料とする。着色部分が 10 g に満たない場合は、試験溶液の濃度や薄層板へのスポット容量を調整し、薄層板上の試料相当量が、試料 10 g を採取して (2) ~ (4) の操作をした場合と同じになるようにし、採取部分について試験を行う。また、白色を引き立たせるために少量の青色が使用されている食品（マシュマロ等）もあるため、必要に応じて着色されていないように見える部分についても採取し、試験を行う。かさ高い食品（わかめなどの乾燥品等）については採取量を減らしてもよい。その場合、試験溶液の濃度、薄層板へのスポット容量を調整する。食品に使用される色素は複数混合されて使用される場合が多く、各色素の配合割合が掛け離れている場合には、目的に応じて試料の採取量を適宜増減する必要がある。
- 4) アルコールの存在はポリアミドに対する色素の吸着を低下させるため、あらかじめ除去する。
- 5) 飴菓子、ゼリー菓子などの固形試料は、約 5 倍量の水で加温して溶かし、遠心（5 分間、3000 回転/分）後、上清を分取して抽出液とし、精製操作を行い、試験溶液を調製する。
- 6) すあま、かまぼこなどの色素が抽出されにくい食品は、アンモニア水を加えて加温した後、さらに同量のエタノールを加え、必要に応じて加温抽出を行う。また、ホモジナイザーなどを用いて抽出を行ってもよい。多糖類を含む食品では、アンモニア水とエタノールを合わせると多糖類が沈殿して内部の色素が抽出されにくくなるため、まず、アンモニア水で抽出後、さらにエタノールを加える方がよい。また、試料中のタンパク質をタンパク質分解酵素で分解し、色素抽出後、イオンペア試薬を用いて固相カートリッジで色素を精製する方法^{文献 1)}や、同様にタンパク質分解酵素で分解し、色素抽出後、ポリアミドで色素を精製する改良法^{文献 2)}、試料中のタンパク質を、尿素を用いて可溶化し、色素抽出後、イオンペア試薬を用いて固相カートリッジで色素を精製する方法^{文献 3)}も報告されている。た

だし、精製にイオンペア試薬を用いると、試験溶液にイオンペア試薬が含まれ、表1とは異なる Rf 値を示す可能性があるため、イオンペア試薬を用いる液体クロマトグラフィーにより同定する必要がある^{文献1~文献3)}。

- 7) 一般にデンプン、タンパク質の溶出を避けるためにエタノールを用いる。
- 8) キサンテン系色素の場合はエタノールに溶けやすいので、エタノールの量を多くするとよい。
- 9) アルミニウムレーキを溶出するために行う。アルミニウムレーキは、食用色素を水に溶けにくくするためにアルミニウム塩と反応させたものであるが、酸やアルカリ中では次第に分解して水溶性の食用色素に戻る。
- 10) 水溶性の夾雑物が多く析出したり、チョコレートのように油脂を含んだりすることなどから、蒸発操作が困難な食品には以下のような抽出法を使用し、抽出液につき、精製操作を行う。

試料5gを量り、必要があれば加温して溶かす。そこへ、ジエチルエーテル/石油エーテル混液(1:1)50mLを加え、1分間振とう後約2分放置する。静置¹²⁾後、ジエチルエーテル/石油エーテル層を取り除き、沈殿物にジエチルエーテル/石油エーテル混液(1:1)50mLを加え同様の操作を繰り返す。沈殿物に1%アンモニア水10mLを加えて室温で約5分間放置し、1分間振とう又はかくはんする。そこへエタノール20mLを加え、1分間振とう又はかくはんした後、静置又は遠心(5分間、3000回転/分)し、上清を別の容器へ移す。同様の操作を3回繰り返す。上清を合わせる。この液に酢酸エチル60mLを加え、必要に応じて遠心(5分間、3000回転/分)し、上清を分液漏斗へ移す。上清に石油エーテル50mL及び1%アンモニア水5mLを加え、5秒間振とうし、分離するまで静置する。下層を別の容器に取る。残った上層にさらに1%アンモニア水5mLを加え、同様の操作を下層に着色が見られなくなるまで繰り返す。合わせた下層に酢酸を加えて酸性~中性とし、水浴上加熱又は減圧濃縮操作によりジエチルエーテル及び石油エーテルを蒸発させ、抽出液とする。

- 11) ジエチルエーテルを用いてエマルジョンが形成される場合は、ジエチルエーテルと石油エーテルの混液(例えばジエチルエーテル/石油エーテル混液(1:1))を用いるとエマルジョンを防止できる。
- 12) ジエチルエーテル溶液やジエチルエーテルを含む溶液について遠心分離が必要な場合は、防爆型の遠心機を用いて遠心(5分間、3000回転/分)してもよい。
- 13) 高タンパク質食品(たらこ、かまぼこ等)中に含まれるキサンテン系色素は、抽出液を濃縮する際に析出したタンパク質に吸着したり、キサンテン系色素が酸性で不溶化したりするため、酸性にした抽出液をポリアミドで精製する際に析出し、回収率が悪くなることがある。高タンパク質食品中のキサンテン系色素の検出が困難である場合、弱陰イオン交換固相抽出カラムを使用する方法^{文献4)}や、限界ろ過ユニットを使用する方法^{文献5)}、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^{文献6)}が報告されている。

- 14) 試験溶液の調製法は、本法のほか毛糸染色法がある。毛糸染色法は多種類の食品に適用でき、操作も簡便で、かつ安価に分析できる優れた方法であるが、酸性タール色素の吸着、溶出に加熱操作が必要であるため加熱操作で分解しやすい色素（食用青色2号等）の分析には不適當である。また色素濃度が薄く、塩類や糖類を多く含む食品では分析が困難な場合もある。また、羊毛に漂白剤が使用されている場合は食用赤色102号や食用黄色5号が還元されるか、重亜硫酸塩が付加することにより黄色色素が生成することや^{文献7、文献8}、羊毛に蛍光剤が使用されている場合は、黄色呈色物質が毛糸から溶出することが報告されていることから^{文献9}、使用する毛糸は十分にアルカリ洗浄をおこなったものを使用する。
- 〈毛糸染色法〉濃縮した抽出液に酢酸を加えて酸性とした後、脱脂羊毛 0.1gを入れ、よく振り混ぜ、水浴中で30分間加温し、羊毛を取り出し、よく水洗する。この染色羊毛を1%アンモニア水5mL中に入れ、水浴中で30分間加温した後、羊毛を取り除き、酢酸を用いて中和した後、試験溶液とする。また、試験溶液中の色素濃度が濃い場合や、試験溶液をさらに濃縮した場合は、適宜スポット量を減らしてもよい。目安として20 μ g/mL色素溶液を1 μ L以上スポットすると目視による確認が可能である。
- 15) かまぼこについてポリアミドカラムを用いた検討で、pH6.0での精製が、それより低いpHに比べ夾雑物が少なく、キサントゲン系色素の回収率が良いという報告^{文献6}がある。
- 16) ポリアミドに色素が吸着しにくい時は、適宜かくはんしたり、静置時間を長くしたりしてもよい。また、食品によっては食品由来の夾雑物の影響により、ポリアミドに色素が吸着しにくい場合がある、その場合は抽出液をさらに希釈し、夾雑物の影響をなるべく小さくして、ポリアミドを加えるとよい。
- 17) 抽出液に加えた酢酸と、溶出液に含まれるアンモニアの影響で塩が析出し、スポットのRf値が変動したり、テーリングをおこしたりするため、水で十分洗浄しておく。
- 18) 濃縮の方法として、エバポレーターを用いる方法、水浴を用いる方法、ヒートブロックで加温しながら、窒素を吹き付ける方法等がある。
- 19) アルカリ性で不安定な色素（食用青色2号）が含まれる場合は、少量の酢酸（3→50）を加えて中和した後、水又は50vol%エタノールを加えるとよい。
- 20) 使用基準のあるカステラ等の食品の場合には溶出液につき、食品由来の夾雑物を少なくするため、再度ポリアミドによる精製操作を繰り返す。また、水又は50vol%エタノールに溶解できない場合は、水又は50vol%エタノールの代わりに50vol%メタノールやアルカリ性で不安定な色素（食用青色2号）が含まれない場合はエタノール・アンモニア試液を用いたり、適宜溶解する液量を増やしたりしてもよい。その場合、薄層板へのスポット容量を調整する。また、試料採取量を増減させた場合もその量及び試験溶液調製濃度に応じて、薄層板上の試料相当量が（2）～（4）の操作の場合と同じになるようにスポット容量を調整する。目安として、色素として20 μ g/mL色素溶液を1 μ Lスポットすれば目視による確認が可能であるが、黄色系色素（食用黄色4号、食用黄色5号）は見えづらいため、適宜スポット容量を増やすとよい。

- 21) 食用青色 2 号は分解しやすいため、4℃以下で遮光保存し、2 週間以内に使用する。
また、本法で規定する標準溶液と同等の溶液を調製可能である場合に限り、市販の食用タール色素水溶液から調製して標準溶液として用いてもよい。
- 22) 試料採取量や試験溶液の調製濃度を変更した場合は、薄層板上の試料相当量が (2) ~ (4) の操作の場合と同じになるようにスポット容量を調整する。また、固形物が浮遊している場合はメンブランフィルター (0.45µm) でろ過する。
- 23) 本法のほか、セルロース薄層板を用いた薄層クロマトグラフィーがある^{文献10)}。24) 市販の薄層板は同一の展開溶媒を用いても薄層板のメーカーあるいはロットにより、Rf 値や相互分離が異なることがあるため、あらかじめ使用する薄層板を用いて確認しておくことよい。また、ロットによってはスポット形状に歪みが生じることがある。あらかじめ測定を行う薄層板をメタノールで一度展開し乾燥させた薄層板を用いることで改善することがある^{文献11)}。
- 25) オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板を用いる逆相薄層クロマトグラフィーは、シリカゲル薄層板を用いる順相薄層クロマトグラフィーに比べて、スポットのまとまりがよく、試料中の夾雑物の影響による Rf 値のばらつき及び標準品の Rf 値との相違の度合いが少なく、色素の同定が容易である^{文献12、文献13)}。
- 26) 古くなった展開溶媒は、組成比が変化しているため、良好な結果が得られないことがある。
- 27) 酢酸エチルの混合比を高くするほど、各色素の Rf 値は相対的に低下するので標準品を用いてあらかじめ分離条件を選定するとよい。酢酸エチルの混合比 4.5 のときはキサントレン系色素の分離がよく、混合比が 2 のときは原点近くの色素の分離がよい。
- 28) 未指定酸性タール色素と、同系色の食用タール色素との分離を確認したい場合は、注表 1 のように展開溶媒組成変更することで両者が良好に分離する。

注表1 同系色の食用色素と未指定色素を分離する場合の展開溶媒例

薄層板：オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板

	未指定色素	食用色素	展開溶媒 5%硫酸ナトリウム溶液/メタノール/アセトニトリル/28%アンモニア水混液
1	ポンソーR オレンジG オレンジII	食用黄色4号 食用黄色5号	10 : 3 : 3 : 1
2	アゾルビン	食用赤色2号 食用赤色3号 食用赤色40号 食用赤色102号 食用赤色104号 食用赤色105号 食用赤色106号	8 : 3 : 3 : 0.5
3	ブリリアントブラックB N、 パテントブルーV	食用緑色3号 食用青色1号 食用青色2号	8 : 3 : 3 : 3

29) 主として、キサントゲン系以外の色素の分離に用いる。5%硫酸ナトリウム溶液の混合比を高くするほど、各色素の Rf 値は相対的に低下するので標準品を用いてあらかじめ分離条件を選定するとよい。

30) 主として、キサントゲン系色素の分離に用いる。3種の溶媒を混合すると白濁するが、ろ紙を用いてろ過するか、静置後上清を使用する。

31) 参考として、4種の分離条件における Rf 値を注表2に示す。

注表2 タール色素の Rf 値

タール色素 (Color Index)	Rf 値				タール色素 (Color Index)	Rf 値			
	分離条件					分離条件			
	A* ¹	B* ²	C* ³	D* ⁴		A* ¹	B* ²	C* ³	D* ⁴
食用赤色 2 号 (16185)	0.07	0.84	0.73	1.0	ボンソー 3 R (16155)	0.38	0.16	0.11	0.77
食用赤色 3 号 (45430)	0.77	0	0.03	0.35	ボンソー SX (14700)	0.26	0.19	0.36	0.81
食用赤色 40 号 (16035)	0.39	0.37	0.34	1.0	ボンソー 6 R (16290)	0.02	1.0	0.96	1.0
食用赤色 102 号 (16255)	0.14	0.64	0.58	1.0	ファーストレッド E (16045)	0.29	0.20	0.26	0.93
食用赤色 104 号 (45410)	0.80	0	0	0.11	オレンジ I (14600)	0.42	0.14	0.42	0.64
食用赤色 105 号 (45440)	0.86	0	0	0.20	オレンジ II (15510)	0.65	0.05	0.05	0.51
食用赤色 106 号 (45100)	0.54	0.04	0.02	0.73	オレンジ RN (15970)	0.64	0.04	0.05	0.50
食用黄色 4 号 (19140)	0.06	0.93	0.92	1.0	オレンジ G (16230)	0.30	0.47	0.5	1.0
食用黄色 5 号 (15985)	0.30	0.52	0.52	1.0	キノリンイエロー* ⁵ (47005)	0.62	0.12	0.15	0.68
食用緑色 3 号 (42053)	0.13	0.16	0.25	1.0	ナフトレイエロー S (10316)	0.45	0.47	0.58	0.86
食用青色 1 号 (42090)	0.23	0.11	0.08	1.0	グリーン S (44090)	0.17	0.14	0.23	0.88
食用青色 2 号 (73015)	0.23	0.79	0.79	1.0	ライトグリーン SF 黄 (42095)	0.20	0.07	0.1	1.0
レッド 2 G (18050)	0.26	0.44	0.39	1.0	ギネアグリーン B (42085)	0.51	0	0	0.72
アズルピシン (14720)	0.18	0.08	0.59	0.80	パテントブルー V (42051)	0.10	0.05	0.03	0.73
エオシン (45380)	0.53	0	0.1	0.37	アンソッドイオレット 6 B (42640)	0.51	0	0.49	0.63
ボンソー R (16150)	0.36	0.22	0.17	0.84	ブリリアントブラック BN (28440)	0.07	0.49	0.54	1.0

*¹ 分離条件 A

薄層板：シリカゲル薄層板

展開溶媒：酢酸エチル／メタノール／28%アンモニア水混液（3：1：1）

*² 分離条件 B

薄層板：オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板

展開溶媒：5%硫酸ナトリウム溶液／メタノール／アセトニトリル混液（10：3：3）

*³ 分離条件 C

薄層板：オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板

展開溶媒：5%硫酸ナトリウム溶液／メタノール／アセトニトリル／28%アンモニア水混液（10：3：3：1）

*⁴ 分離条件 D

薄層板：オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板

展開溶媒：メチルエチルケトン／メタノール／5%硫酸ナトリウム溶液混液（1：1：1）

*⁵ 標準品の種類によっては、あるいは食品から抽出した場合には、複数のスポットを示すことがある。

32) 食品由来の夾雑物の影響で試験溶液の Rf 値が標準溶液の Rf 値と異なる場合は、標準溶液と試験溶液を重ねてスポットし、確認してもよい。色素の同定が困難な場合、展開した

色素を分取し、単離精製した後に、可視部吸収スペクトルを測定し、確認を行うとよい。また、分取が不可能な場合には、薄層板上の色素スポットの可視部吸収スペクトルを、単離することなく直接測定が可能なスキャニングデンストメトリーを用いるとよい^{文献14)}。タール色素には元々数%程度の副成色素が含まれるため^{文献15、文献16)}、食品に色素が多量に使用されている場合、色素中に元々含まれる微量の副成色素が検出されることがある^{文献17、文献18)}。また、食品の加工中や保存中に色素が分解し、色素由来の分解生成物として、注表2に示すような色素のRf値が異なる色素が検出される可能性がある^{文献19、文献20)}。室温での展開でRf値の大きい色素についてスポット形状が悪く分離ができない場合は、氷冷下で展開することでスポット形状や分離が改善することがある^{文献21)}。

33) キサンテン系色素は365nmの紫外線を照射することにより蛍光を発するので、定性には有効な情報となる。食用赤色3号は淡橙赤色の、食用赤色104号は橙赤色の、食用赤色106号は赤色の、エオシンは橙黄色の蛍光を発する。酸あるいはアルカリによる色素の色合いの変化を調べる定性法がある^{文献10)}。

34) あらかじめ水に浸し、浮遊する微粒子を取り除いた後に使用するとよい。

[文献]

- 1) 辻 澄子ら：食衛誌、**36**、68 (1995)
- 2) 河崎裕美ら：食化誌、**19**、136 (2012)
- 3) 石川ふさ子ら：食衛誌、**41**、194 (2000)
- 4) 古賀梓美ら：福岡市保健環境研究所報、**37**、77 (2011)
- 5) 林都香ら：宮城県保健環境センター年報、**27**、97 (2009)
- 6) 大須賀愛幸ら：食衛誌、**57**、207 (2016)
- 7) 加藤クニら：神奈川衛研報告、**7**、63 (1977)
- 8) 石川ふさ子ら：東京衛研報告、**42**、141 (1991)
- 9) 宮本美紀子ら：千葉衛研報告、**6**、52 (1982)
- 10) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015、380 (2015)、金原出版
- 11) 青木ら：東京健安研七周年報、**67**、177 (2016)
- 12) Oka, H. *et al.* : J.Chromatogr.、**411**、437 (1987)
- 13) 尾関尚子ら：食衛誌、**34**、542 (1993)
- 14) 大野 勉ら：衛生化学、**42**、53 (1996)
- 15) 廣川書店：第9版食品添加物公定書解説書、D-1148 (2019)
- 16) 合田麻美ら：食衛誌、**54**、188 (2013)
- 17) 石川ふさ子：食衛誌、**46**、228 (2005)
- 18) 新藤哲也ら：食衛誌、**53**、1 (2012)
- 19) 田村行弘ら：東京都衛研年報、**21**、47 (1969)
- 20) 石川ふさ子ら：食衛誌、**46**、93 (2005)

21) 京小ひと美ら：東京健安研セ年報、**65**、135 (2014)

参考

食用タール色素確認分析法

1. 分析法の概要

食品中の食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ、食用赤色 3 号及びそのアルミニウムレーキ、食用赤色 40 号及びそのアルミニウムレーキ、食用赤色 102 号、食用赤色 104 号、食用赤色 105 号、食用赤色 106 号、食用黄色 4 号及びそのアルミニウムレーキ、食用黄色 5 号及びそのアルミニウムレーキ、食用緑色 3 号及びそのアルミニウムレーキ、食用青色 1 号及びそのアルミニウムレーキ並びに食用青色 2 号及びそのアルミニウムレーキは、各色素として液体クロマトグラフィー又は液体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 (液体クロマトグラフィー又は液体クロマトグラフィー質量分析)

分析法 A (液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試験溶液の調製

上記の (1) 及び (2) については、食用タール色素分析法 (1) 及び (2) を準用する。

(3) 標準溶液の調製

食用タール色素分析法の (3) 標準溶液の調製の各色素標準原液 1 mL を量り、水を加えて 20mL とし、この液 10mL をとり、水を加えて 100mL としたものを標準溶液とする (濃度 10 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件

フォトダイオードアレイ検出器付又は紫外可視吸光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^{1、2)}。

カラム充填剤：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

カラム温度：40°C 付近の一定温度

移動相³⁾：A液 0.01mol/L 酢酸アンモニウム溶液

B液 アセトニトリル

グラジエントの条件

分	A (%)	B (%)
0	95	5
30	50	50
30.1	95	5
40	95	5

流速：1 mL/分

測定波長：450nm（食用黄色 4 号、食用黄色 5 号）

520nm（食用赤色 2 号、食用赤色 3 号、食用赤色 40 号、食用赤色 102 号、
食用赤色 104 号、食用赤色 105 号、食用赤色 106 号）

620nm（食用緑色 3 号、食用青色 1 号、食用青色 2 号）

注入量：10 μ L⁴⁾

② 定性

試験溶液及び標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、試験溶液のクロマトグラム上に検出された各ピークの保持時間が標準溶液の各ピークと一致することを確認する^{5、6)}。また、フォトダイオードアレイ検出器を用いる場合は、試験溶液と標準溶液の各ピークの吸収スペクトルを比較して定性を行う。

分析法B（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

（2）試験溶液の調製

上記の（1）及び（2）については、食用タール色素分析法（1）及び（2）を準用する。

（3）標準溶液の調製

食用タール色素分析法（3）標準溶液の調製の各色素標準原液 1 mL を量り、水を加えて 20mL とし、この液 10mL をとり、水を加えて 100mL としたものを標準溶液とする（濃度 10 μ g/mL）。

（4）測定法

① 測定条件⁷⁾

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）を用い、次に示す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 3～5 μ m）

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A液 0.01mol/L 酢酸アンモニウム溶液

B液 アセトニトリル

グラジエントの条件

分	A (%)	B (%)
0	95	5
40	30	70
45	95	5
55	95	5

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI (-)

検出法：スキャン (m/z 200~1000)、

選択イオンモニタリング (SIM)

モニターイオン

化合物	モニターイオン*1 (m/z)
食用黄色4号	467
食用赤色2号	537
食用青色2号	420
食用赤色102号	537
食用黄色5号	407
食用赤色40号	451
食用緑色3号	763
食用青色1号	747
食用赤色3号	834
食用赤色106号	557
食用赤色104号	782
食用赤色105号	970

*1：スキャン測定時の主なイオンも同じ。

注入量：5 μ L⁸⁾

② 定性

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、各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、これら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 が各標準溶液の主ピークのそれと一致することを確認する^{9, 10)}。

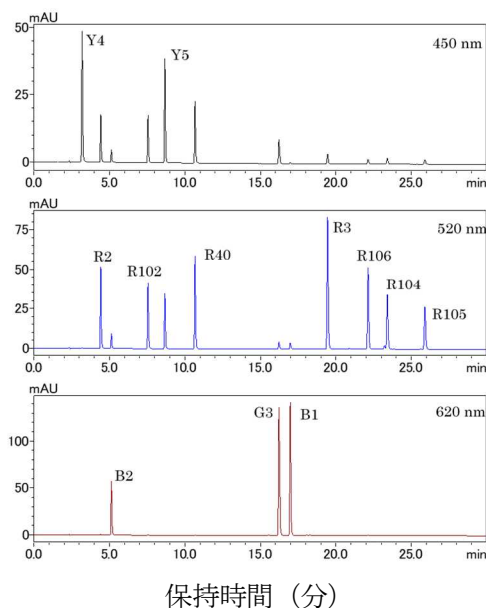
試薬・試液等

1. 酢酸アンモニウム：[特級]
2. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

3. 0.01mol/L 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム0.77 gに水を加えて1 Lとする。

[注]

1) 測定条件は例示である。注図1に参考クロマトグラムを示す。グラジエントの条件は各色素と食品由来の夾雑物が分離するように、使用する分析カラムにより適宜変更する。



カラム: オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (5 μ m, 4.6 mm i. d. \times 150 mm)
移動相: A液; 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液
B液; アセトニトリル
グラジエント条件: 5%B (0 min) -50%B (30 min) -5%B (30.1 min) -5%B (40 min)
流量: 1.0 mL/min
カラム温度: 40°C
注入量: 10 μ L

注図1 食用タール色素の液体クロマトグラム

- 液体クロマトグラフィーを用いた方法ではフォトダイオードアレイ検出器による吸収スペクトルによる同定方法^{文献1)}がある。
- 移動相にイオンペア試薬を含む方法もある^{文献2、文献3)}。
- 紫外可視吸光度検出器又はフォトダイオードアレイ検出器の感度により、標準溶液及び試験溶液の濃度を希釈し、適宜注入量を調整する。また、固形物が浮遊している場合は0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過する。
- アルミニウムレーキは、塩酸で色素として抽出され、精製されるため、各色素として検出される。液体クロマトグラフィーでは各色素標準溶液の保持時間や吸収スペクトルと一致するか確認する。
- タール色素には元々数%程度の副成色素が含まれるため^{文献4、文献5)}、食品に色素が多量に使用されている場合、副成色素が検出されることがある^{文献1、文献6)}。また、食品の保存中に色素が分解し、色素由来の分解生成物として、溶出時間が異なる色素が検出される可能性がある^{文献7、文献8)}。

7) 測定条件は例示である。グラジエントの条件は各色素と食品由来の夾雑物が分離するように、使用する分析カラムにより適宜変更する。また、イオン化の条件等は使用する質量分析計により異なる場合があるため、あらかじめ標準溶液を用いて最適な条件を確認するとよい。

その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液のピーク強度が最大となるようにあらかじめ最適化を行う。

8) 液体クロマトグラフ質量分析計の感度により、標準溶液及び試験溶液の濃度を希釈し、適宜注入量を調整する。

9) アルミニウムレーキは、塩酸で色素として抽出され、精製されるため、各色素として検出される。液体クロマトグラフィー質量分析では、各色素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、これら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 が各標準溶液の主ピークのそれと一致するかを確認する^{文献1)}。

10) LC-MSを用いて確認を行う場合、食品中の夾雑物の影響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とよい。

[文献]

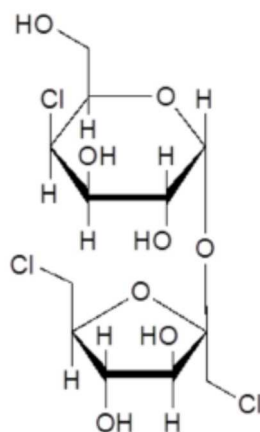
- 1) 石川ふさ子ら：食衛誌、**46**、228 (2005)
- 2) 石川ふさ子ら：食衛誌、**37**、281 (1996)
- 3) 宮武ノリエら：東京健安研セ年報、**56**、145 (2005)
- 4) 廣川書店：第9版食品添加物公定書解説書、D-1148 (2019)
- 5) 合田麻美ら：食衛誌、**54**、188 (2013)
- 6) 新藤哲也ら：食衛誌、**53**、1 (2012)
- 7) 田村行弘ら：東京都衛研年報、**47**、52 (1969)
- 8) 石川ふさ子ら：食衛誌、**46**、93 (2005)

甘味料

スクラロース

Sucralose

別名：トリクロロガラクトスクロース



$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$: 397.63

1. 分析法の概要

食品中のスクラロースは、透析法により抽出した後、ポリマー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。(2023年設定)

2. 分析法¹⁾ (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 g²⁾ を精密に量る³⁾。次に約 20 mL⁴⁾ 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⁵⁾ 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⁶⁾ 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混和しながら室温で 24~48 時間透析し⁷⁾、透析終了後の透析外液を抽出液とする。

② カラムによる精製

抽出液 50 mL を正確にとり、ポリマー固相抽出カラムに負荷する⁸⁾。水 10 mL、0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 5 mL、水 10 mL を順次通して洗浄後、メタノール 5 mL で溶出する。溶出液を減圧乾固後、水を加えて正確に 1 mL とし、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⁹⁾

スクラロース 50.0mg を量り、水を加えて正確に 50mL とし、標準溶液とする（濃度 1000 μ g/mL）。標準溶液 1、2、4、10 及び 20mL を正確にとり、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 50～1000 μ g/mL）。

(4) 測定法

① 測定条件¹⁰⁾

示差屈折計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

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150～250mm

カラム温度：40℃

移動相：メタノール／水混液（7：3）

流速：1.0mL/分

注入量：20 μ L

② 検量線

検量線用標準溶液をそれぞれ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¹¹⁾

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スクラロース濃度（ μ g/mL）を求め、次式によって試料中のスクラロース含量（g/kg）を計算する¹²⁾。

$$\text{スクラロース含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200 \times 1}{W \times 50 \times 1000}$$

C：試験溶液のスクラロース濃度（ μ 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. スクラロース：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：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：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. ポリマー固相抽出カラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体固相抽出カラム（1000mg）。あらかじめメタノール 5 mL、水 10 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. 水酸化ナトリウム：[特級]
9. 0.2mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 0.8 g に水を加えて 100 mL とする。
10. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
11. 0.1mol/L 塩酸：塩酸 9 mL に水を加えて 1000 mL とする。
12. 0.01mol/L 塩酸：0.1mol/L 塩酸 100 mL に水を加えて 1000 mL とする。

[注]

- 1) 本法は、既報^{文献1,2)}を参照した検討結果に基づく。また、参考 1 及び参考 2 には、本法の透析後抽出液を逆相固相抽出カラム処理し、液体クロマトグラフィー質量分析を用いる分析法^{文献3)}や、さらに逆相固相抽出カラム溶出液を減圧乾固し、塩化ベンゾイルで誘導体化した後、紫外可視吸光光度検出器付液体クロマトグラフを用いる分析法^{文献4)}を示す。スクラロースを特定する必要がある場合には、参考 1 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もの、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。
- 3) 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 20 mL 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。
- 4) 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。
- 5) 正確に 200 mL 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 15 cm の場合は直径（内径）4 cm 以下がよい。
- 6) 試料、透析内液、透析外液の合計量。
- 7) 透析膜チューブの実効長約 15 cm の場合、スクラロースは水分含量の高い食品では 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及びはっ酵乳等の乳製品では透析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^{文献5)}に記された透析条件を用いることにより、穀類の調製品や魚介乾製品等の水分含量の低い食品及びはっ酵乳等の乳製品等においても 4 時間の透析で、上記方法とほぼ同等の透析率が得られる^{文献6)}。
- 8) 毎分 3～4 mL の流速で流す。
- 9) 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。

- 10) 測定条件は例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、スクラロース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。移動相に水／アセトニトリル混液（85：15）を用いることもできる^{文献1)}。
- 11) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、分析操作後の透析外液量を乗じず、操作時の試料体積を含めた定容量を乗じている。そのため、固体試料等では実態より数%～10%ほど高い定量値となる場合もあり、本法での添加回収率が非常に高い場合には、要因の一つにこの点もあることを考慮する。
- 12) 本法によるスクラロースの添加回収試験の結果を注表1及び注表2に示す。

注表1 スクラロースの各種食品での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
ジュース	0.02	95	4.0
ゼリー	0.02	98	3.0
ジャム	0.02	91	5.8
しょうが酢漬	0.02	97	4.2
たくあん漬	0.02	92	3.2

*1 5試行の平均値

注表2 スクラロースのたくあん漬での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
たくあん漬	0.01	84	9.4
	0.58	97	3.2

*1 5試行の平均値

ただし、移動相は水／アセトニトリル混液（85：15）^{文献1)}で試験した。

[文献]

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2020、397（2020）、金原出版
- 2) 小林千種ら：食衛誌、**42**、139（2001）
- 3) 畑野和広ら：食衛誌、**43**、267（2002）
- 4) 石井達三ら：埼玉県衛研所報、**39**、137（2005）
- 5) 田原正一ら：食衛誌、**55**、13（2014）
- 6) 大槻崇ら：第106回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集（2013.11、沖縄）

参考1

スクラロース確認分析法1

1. 分析法の概要

食品中のスクラロースを、透析法により抽出した後、逆相固相抽出カラムで精製し、液体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(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

① 透析

スクラロース分析法(2)試験溶液の調製 ① 透析を準用する。

② カラムによる精製

抽出液5mLを正確にとり、逆相固相抽出カラムに負荷し¹⁾、水10mLを通して洗浄する。次いで40vol%メタノール5mLで溶出し、溶出液を40vol%メタノールで正確に5mLとする。この液をメンブランフィルター(0.22 μ m)でろ過したものを試験溶液²⁾とする。

(3) 定性用標準溶液及び検量線用標準溶液の調製³⁾

スクラロース50.0mgを量り、40vol%メタノールを加えて溶かし、正確に50mLとする。この1mLを正確にとり、40vol%メタノールを加えて正確に100mLとしたものを標準原液とする(濃度10 μ g/mL)。標準原液10mLを正確にとり、40vol%メタノールを加えて正確に50mLとしたものを標準溶液とする(濃度2 μ g/mL)。標準溶液1、2、4、6及び10mLをそれぞれ正確にとり、40vol%メタノールを加えてそれぞれ正確に10mLとし、定性に適した濃度の定性用標準溶液(2 μ g/mL等)及び検量線用標準溶液(濃度0.2~2 μ g/mL)を調製する。

(4) 測定法

① 測定条件^{4, 5)}

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

カラム管: 内径2.1mm、長さ: 100~150mm

カラム温度: 40°C

移動相⁶⁾: A液 2mmol/L 酢酸アンモニウム含有1vol%アセトニトリル

B液 2mmol/L 酢酸アンモニウム含有95vol%アセトニトリル

グラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	99	1
12	40	60
12.01	0	100
17	0	100
17.01	99	1
22	99	1

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI（－）

検出法：スキャン（ m/z 50～450）、

選択イオンモニタリング（SIM）（モニターイオン： m/z 395⁷⁾）

注入量：1 μ L

② 検量線³⁾

検量線用標準溶液をそれぞれLC-MSに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定性^{8, 9)}

試験溶液及び定性用標準溶液をLC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、定性用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 が定性用標準溶液の主ピークのそれと一致することを確認する。

④ 定量^{8, 10～13)}

試験溶液をLC-MSに注入し、SIMで得られたピーク面積と検量線から試験溶液中のスクラロース濃度（ μ g/mL）を求め、次式によって試料中のスクラロース含量（g/kg）を計算する。

$$\text{スクラロース含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200 \times 5}{W \times 5 \times 1000}$$

C：試験溶液のスクラロース濃度（ μ g/mL）

W：試料の採取量（g）

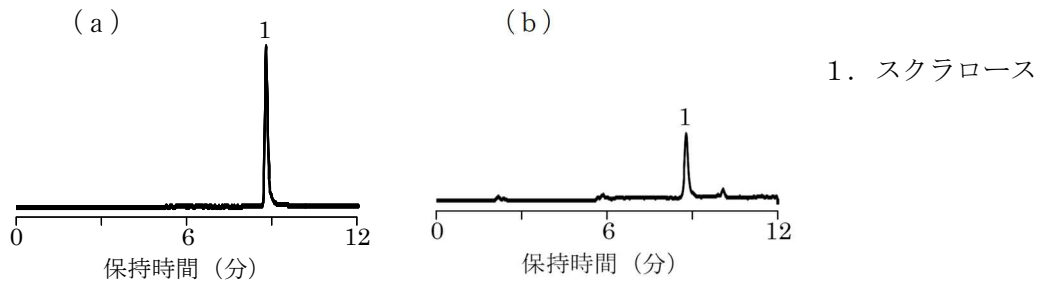
試薬・試液等

- スクラロース分析法の試薬・試液等を準用する。
- 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（500mg）。あらかじめメタノール5mL、水5mLを順次通してコンディショニングしたものを用いる。
- 酢酸アンモニウム：[特級]
- 2mmol/L 酢酸アンモニウム含有1 vol%アセトニトリル：酢酸アンモニウム154.2mgを水に溶解して1000mLとする。この溶液990mLにアセトニトリル10mLを加えて混合する。

5. 2mmol/L 酢酸アンモニウム含有 95vol%アセトニトリル：酢酸アンモニウム 15.4mg
を水に溶解して100mLとする。この溶液 50mL にアセトニトリル 950mL を加えて混合する。
6. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 毎分 3～4 mL の流速で流す。
- 2) 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、試験溶液の調製の最終段階で用いた溶液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。
- 3) 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。
- 4) 測定条件は例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、スクラロース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。
- 5) その他の測定条件は各測定機器に従い、検量線用標準溶液のモニターイオン強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 6) その他、0.1vol%ギ酸含有 5 vol%アセトニトリルと 0.1vol%ギ酸含有 95vol%アセトニトリルによるグラジエント溶離等が使用できる。
- 7) 食品中の夾雑物の影響により定量が困難な場合は、 m/z 397 をモニターイオンとして用いることもできる。
- 8) LC-MSを用いて確認や定量を行う場合、食品中の夾雑物の影響によりイオン化抑制や促進を生じて確認や定量を正しく行えないおそれがあるため、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。
- 9) スキャン測定により、スクラロースの脱プロトンイオン m/z 395 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。
- 10) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、分析操作後の透析外液量を乗じず、操作時の試料体積を含めた定容量を乗じている。そのため、固体試料等では実態より数%～10%ほど高い定量値となる場合もあり、本法での添加回収率が非常に高い場合には、要因の一つにこの点もあることを考慮する。
- 11) スクラロースのマスキングマトグラムの例を注図 1 に示す。



1. スクラロース

(a) 標準溶液 0.5µg/mL、(b) いちごジャム抽出物 (スクラロース 0.002 g/kg 添加)

<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 3µm)

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm カラム温度：40°C

流速：0.2mL/分

注入量：10µL

移動相： A液 アセトニトリル/2mmol/L酢酸アンモニウム混液 (1:99)

B液 アセトニトリル/2mmol/L酢酸アンモニウム混液 (95:5)

グラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	99	1
12	40	60
12.01	0	100
17	0	100
17.01	99	1
22	99	1

イオン化モード：ESI (-)

検出法：選択イオンモニタリング (SIM) (モニターイオン： m/z 395)

注図1 スクラロースのマスクロマトグラム

12) 本法によるスクラロースの添加回収試験の結果を注表1及び注表2に示す。

注表1 スクラロースの各種食品での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD*2 (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD*2 (%)
チューインガム	2.6	92	2.5	0.002	105	5.6
ビスケット	1.8	97	2.9	0.002	110.8	7.0
いちごジャム	1.0	90	6.9	0.002	93	5.8
ソース	0.58	98	5.7	0.002	84	9.7
白菜漬	0.58	94	6.6	0.002	104	6.9
さきいか	0.58	81	4.1	0.002	90	8.5
紅茶	0.4	101	5.2	0.002	96	4.7
ヨーグルト	0.4	91	5.7	0.002	93	6.6

*1 5試行の平均値、*2 相対標準偏差

注表2 スクラロースのたくあん漬での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
たくあん漬	0.002	109	1.9
	0.01	98	1.1

*1 5試行の平均値

13) 液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いる確認分析法が報告されている文献¹⁾。

[文献]

- 1) 畑野和広ら：食衛誌、**43**、267 (2002)

参考2

スクラロース確認分析法2

1. 分析法の概要

食品中のスクラロースを、透析法により抽出して逆相固相抽出カラムにより精製し、塩化ベンゾイルで誘導体化して精製した後、液体クロマトグラフィーにより確認を行う¹⁾。(2023年設定)

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

スクラロース分析法（2）試験溶液の調製 ① 透析を準用する。

② 誘導体化及び精製

抽出液5 mLを正確にとり、逆相固相抽出カラム²⁾に負荷し³⁾、水10 mLを通して洗浄する。次いで40 vol%メタノール5 mLで溶出し、溶出液を40 vol%メタノールで正確に5 mLとする。この液3 mLを正確にとり、60°Cで減圧乾固し、残留物を4%炭酸ナトリウム含有20%塩化ナトリウム溶液0.1 mLで溶解する⁴⁾。これに、アセトニトリル9 mLを加え、よく混和した後、メンブランフィルター（0.45 μm）でろ過し、塩化ベンゾイル0.4 mLを加え振り混ぜる。次いで、60 w/v%水酸化ナトリウム溶液0.3 mLを加え振り混ぜた後、超音波洗浄器に入れ30秒間超音波処理する。その後、8分間振とう⁵⁾した後、遠心分離（10分間、3000回転/分）し、上層を分取する。沈殿物にアセトニトリル8 mLを加え、ミクロスパーテルでかくはんして沈殿物を懸濁させた後、振り混ぜ、30秒間超音波処理する。次いで、8分間振とう後、遠心分離（10分間、3000回転/分）する。上層を先に分取した液に合わせ、水10 mLを加えて振り混ぜた後、逆相固相抽出カラム⁶⁾に負荷し、アセトニトリル/水混液（6：4）10 mLで洗浄する。次いで、アスピレーターで吸引し水分を除いた後、アセトニトリル5 mLで溶出し、溶出液の全量を正確に5 mLとする。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。

(3) 検量線用標準溶液の調製

スクラロース60.0 mgを量り、アセトニトリルを加えて正確に50 mLとしたものを標準原液Aとする（濃度1200 μg/mL）。標準原液A 5 mLを正確にとり、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとしたものを標準原液Bとする（濃度60 μg/mL）。標準原液B 1、2、4及び10 mLをそれぞれ正確にとり、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に100 mLとし、また、標準原液A 1及び2.5 mLをそれぞれ正確にとり、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に100 mLとし、標準溶液とする

(濃度 0.6~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

あらかじめ4%炭酸ナトリウム含有20%塩化ナトリウム溶液0.1mLにアセトニトリル8mLを入れた容器に、各標準溶液1mLをそれぞれ正確に加え、塩化ベンゾイル0.4mLを加え振り混ぜ、以下、(2)試験溶液の調製②誘導体化及び精製の場合と同様に操作して得られたものを検量線用標準溶液(濃度0.12~6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とする⁷⁾。

(4) 測定法

① 測定条件⁸⁾

紫外可視吸光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

カラム管：内径4.6mm、長さ150~250mm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：アセトニトリル/水混液(8:2)

流速：1.0mL/分

測定波長：230nm

注入量：20 μL

② 検量線⁷⁾

検量線用標準溶液をそれぞれ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^{9~11)}

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スクラロース濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)を求め、次式によって試料中のスクラロース含量(g/kg)を計算する。

$$\text{スクラロース含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200 \times 5}{W \times 3 \times 1000}$$

C：試験溶液のスクラロース濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液等

1. スクラロース分析法の試薬・試液等を準用する。
2. 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(500mg)。
3. 炭酸ナトリウム：[特級]
4. 4%炭酸ナトリウム含有20%塩化ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム4g及び塩化ナトリウム20gを水に溶解して100mLとする。
5. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

10) 本法によるスクラロースの添加回収試験の結果を注表1及び注表2に示す。

注表1 スクラロースの各種食品での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD*2 (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD*2 (%)
チューインガム	2.6	88	2.4	0.002	100	7.6
ビスケット	1.8	80	4.6	0.002	86	8.6
いちごジャム	1.0	88	7.7	0.002	94	3.7
ソース	0.58	90	5.2	0.002	80	5.5
白菜漬	0.58	95	4.3	0.002	96	5.1
さきいか	0.58	83	6.8	0.002	89	3.4
紅茶	0.4	101	3.1	0.002	93	6.2
ヨーグルト	0.4	97	2.4	0.002	86	4.6

*1 5試行の平均値、*2 相対標準偏差

注表2 スクラロースのたくあん漬での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
たくあん漬	0.002	75	3.2
	0.58	84	2.5

*1 5試行の平均値

11) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、分析操作後の透析外液量を乗せず、操作時の試料体積を含めた定容量を乗じている。そのため、固体試料等では実態より数%~10%ほど高い定量値となる場合もあることを考慮する。また、本法での添加回収率が非常に高い場合には、要因の一つにこの点もあることを考慮する。

[文献]

1) 石井達三ら：埼玉県衛研所報、39、137 (2005)