

(別 添)

サイクラミン酸及びサイクラミン酸ナトリウム, サイクラミン酸カルシウム

1. 試験法の概要: 食品中のサイクラミン酸及びその塩類は, 水で抽出した後, 強酸性溶液中で次亜塩素酸ナトリウムと反応させ, N,N-ジクロロシクロヘキシルアミンに変換し, 高速液体クロマトグラフィーにより定量する.

2. 試験法 (高速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) 試験液の調製¹⁾

試料をそのまま、あるいは細切もしくは粉砕器で粉砕後、約 10 gを精密に量り、水 40 mlを加えて沸騰水浴中で 15 分間加熱する。冷却後、水を加えて正確に 100 mlとした後、遠心分離して上澄液 10 mlを正確に量り採り、固相抽出カートリッジ³⁾及び陰イオン交換カートリッジ⁴⁾をこの順番に接続したものに負荷する。流下後、水 10 mlを通過させる。固相抽出カートリッジを除去した後、陰イオン交換カートリッジに塩酸(1→100) 10 mlを負荷し⁵⁾、その流出液を採取し抽出液とする。

反応操作

抽出液 10 mlを正確に採り⁶⁾、これに硫酸溶液 2 ml及びn-ヘキサン 5 mlを加えた後、次亜塩素酸ナトリウム試液 1 mlを加えて1分間激しく振とうする。水層を除去した後、ヘキサン層に 5%炭酸水素ナトリウム溶液 25 mlを加えて1分間振とうする。ヘキサン層を分取し、試験液とする。⁷⁾

(3) 検量線用標準液の調製

サイクラミン酸標準液⁸⁾: サイクラミン酸ナトリウム (シクロヘキシルアミドスルホン酸ナトリウム) 112 mgを正確に量り、水を加えて正確に 100 mlとする。この液 10 mlを量り、水を加えて正確に 100 mlとしサイクラミン酸標準液とする(この液 1 mlはサイクラミン酸として 100 µgを含む)。

サイクラミン酸標準液 0, 1, 2, 10, 20 ml及び 50 mlをそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 100 mlとし、検量線用標準液とする(これらの液 1 mlは、サイクラミン酸 0, 1, 2, 10, 20 µg 及び 50 µgを含む)。

(4)測定法

①測定条件

紫外外部吸収検出器付高速液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤⁹⁾: 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

移動相: アセトニトリル・水混液(70:30)

カラム温度: 40°C

流速: 1.0 ml/分

測定波長: 314 nm

②検量線

検量線用標準液それぞれ 10 ml を反応操作の項に従って操作した後、それぞれ 10 µl ずつを正確に量り、高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積からサイクラミン酸の検量線を作成する。

③定量

試料液 10 μl を正確に量り、高速液体クロマトグラムに注入し、得られたピーク面積と検量線から試料液中のサイクラミン酸濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)を求め、次式によって試料中のサイクラミン酸含量 C ($\mu\text{g}/\text{g}$)を計算する.

$$C(\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{A \times 100}{W}$$

A: 試験液中のサイクラミン酸濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

W: 試料の採取量 (g)

試薬・試液等

1. サイクラミン酸ナトリウム : [特級]
2. アセトニトリル : [高速液体クロマトグラフ用]
3. 炭酸水素ナトリウム : [特級]
4. 5%炭酸水素ナトリウム溶液:炭酸水素ナトリウム 5 g を水に溶かして 100 ml とする.
5. 硫酸 : [特級]
6. 硫酸溶液 : 硫酸 50 ml を水 50 ml に注意しながら加える.
7. 次亜塩素酸ナトリウム溶液 : [化学用, 有効塩素 5.0%以上]
8. 次亜塩素酸ナトリウム試液 : 次亜塩素酸ナトリウム溶液を水で 2 倍に希釈する
9. 固相抽出カートリッジ : C18 充填剤量カートリッジ当たり 900 mg 以上
10. 陰イオン交換カートリッジ : カートリッジの交換容量が 0.1 mEq 相当のもの.

[注]

- 1) スクリーニング試験として、カートリッジを通さないで誘導体化、HPLC 分析を実施し、検出しない場合はこれを分析結果とすることもできる。サイクラミン酸の保持時間にピークが認められた場合は、カートリッジによる精製操作を実施する。なお、スクリーニング試験の試験液の調製時にエマルジョンが発生し操作が困難な場合には、始めからカートリッジによる精製操作を実施するのが望ましい。
- 2) タール色素等、比較的極性の高い化合物が多く含まれている場合、陰イオン交換カートリッジの交換能力を超えてしまうことがある。このようなときは、遠心分離して得られた上澄み液を適時希釈してからカートリッジに負荷させるようにする。
- 3) 固相抽出カートリッジとして、Sep-Pak tC18 Environment 900 mg が使用できる。使用前にメタノール 10 ml 及び水 10 ml を通過させ、コンディショニングする。
- 4) 陰イオン交換カートリッジとして、TOYOPAK DEAE M (東ソー)、Bond Elut SAX 500mg/3ml (バリアン)、Sep-Pak Plus QMA (ウォーターズ)等が使用できる。Bond Elut 及び Sep-Pak は使用前にメタノール 10 ml 及び水 10 ml を通過させコンディショニングを行う。TOYOPAK は水 10 ml でコンディショニングを行う。溶出速度は毎分 1 ml 程度とする。
- 5) カートリッジ内に空気が入らないように注意する。
- 6) 試験液の調製においてカートリッジを通した場合、採取した抽出液の全量を反応操作に用いる。
- 7) エマルジョン生成により試験液を採取できない場合は、エマルジョン部分を遠沈管に採取し、必要な場合は適量の硫酸ナトリウムを添加し、遠心分離後、上澄液を採取する。
- 8) サイクラミン酸標準液は冷暗所にて数週間保存可能である。
- 9) 市販の充てんカラムとして Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス)等が使用できる。
- 10) 本分析法の検出限界を 5 $\mu\text{g/g}$ とする。
- 11) なお、精度管理では 20 $\mu\text{g/g}$ での添加回収率を求めることとする。