

薬生食基発 0529 第 1 号
薬生食監発 0529 第 1 号
令和 5 年 5 月 29 日

各 $\left(\begin{array}{l} \text{都 道 府 県} \\ \text{保 健 所 設 置 市} \\ \text{特 別 区} \end{array} \right)$ 衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長
(公 印 省 略)
厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長
(公 印 省 略)

「食品中の食品添加物分析法」の改正について

標記分析法については、「食品中の食品添加物分析法について」（平成 12 年 3 月 30 日付け衛化第 15 号厚生省生活衛生局食品化学課長通知）の別添「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」により定めているところです。

今般、科学的知見に基づき見直しを行い、「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」を下記のとおり改正したので、関係者への周知方よろしくお願ひします。

記

- 1 食品添加物分析法各条の「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」、「没食子酸プロピル」、「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」及び

「食用青色2号及びそのアルミニウムレーキ」を削除し、別添1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」、「食用タール色素」及び「スクラロース」の分析法を加える。

- 2 食品添加物分析法各条の「サッカリン及びサッカリンナトリウム」の名称を「サッカリン及びその塩類」に改めるとともに、対象とする添加物に「サッカリンカルシウム」を加え、その分析法について、別添2のとおり改める。
- 3 食品添加物分析法各条の「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」、「亜硝酸ナトリウム」、「銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム」、「アスパルテーム」、「アセスルファミウム」及び「プロピレングリコール」の分析法について、別添3のとおり改める。
- 4 食品添加物分析法各条の「硝酸カリウム及び硝酸ナトリウム」の分析法を、第7章 発色剤の項から第18章 製造用剤等の項へ移し、その分析法について、別添4のとおり改める。
- 5 食品添加物分析法各条の「タール色素」の名称を「未指定酸性タール色素」に改めるとともに、対象とする添加物の例示として、オレンジG、オレンジII、ポンソーR、レッド2Gを加え、オレンジRN、ファストレッドE、ポンソー6Rを削除し、その分析法について別添5のとおり改める。
- 6 食品添加物分析法各条の「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」の名称を「サイクラミン酸及びその塩類」に、「TBHQ (tert -ブチルヒドロキノン)」の名称を「tert -ブチルヒドロキノン」に改めるとともに、その分析法を別添6のとおり改める。
- 7 本通知は、令和5年5月29日から適用すること。ただし、令和6年5月28日までの間は、なお従前の例によることができる。

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

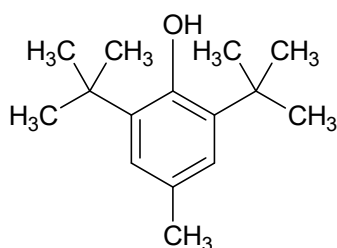
及び没食子酸プロピル

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

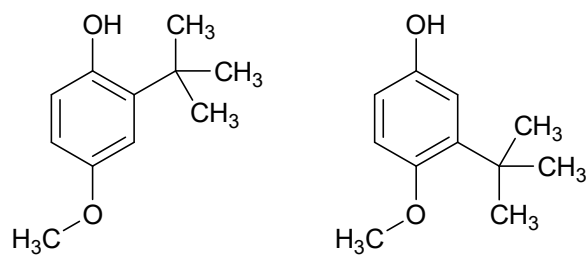


$C_{15}H_{24}O$: 220.35

ブチルヒドロキシアニソール

Butylated Hydroxyanisole

略名：BHA

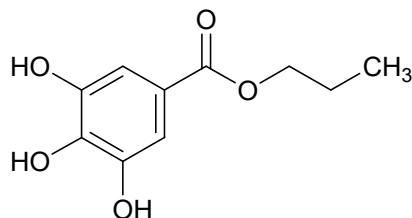


$C_{11}H_{16}O_2$: 180.24

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0.100 g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

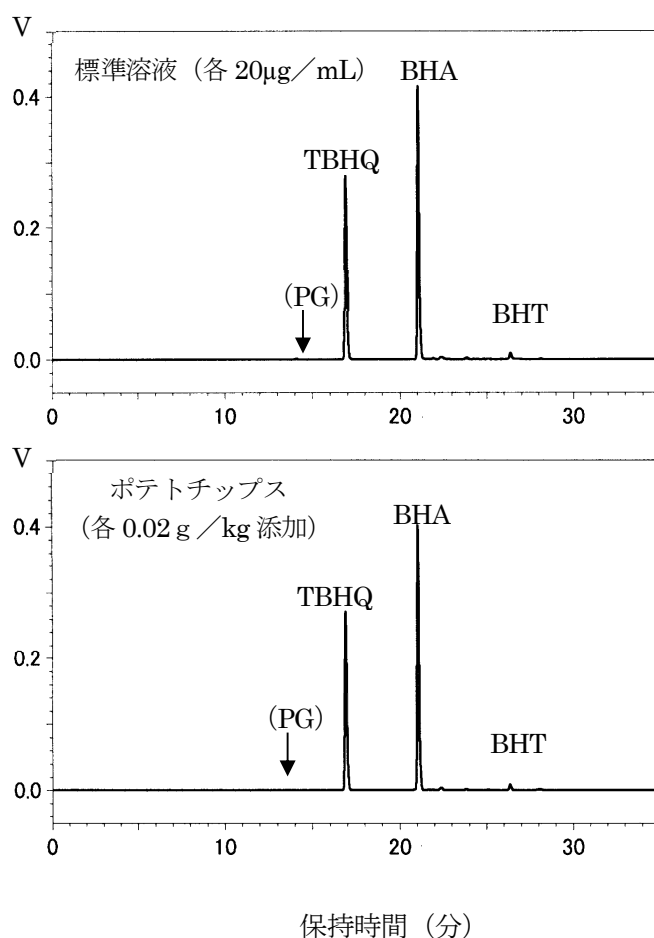
試薬・試液等

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

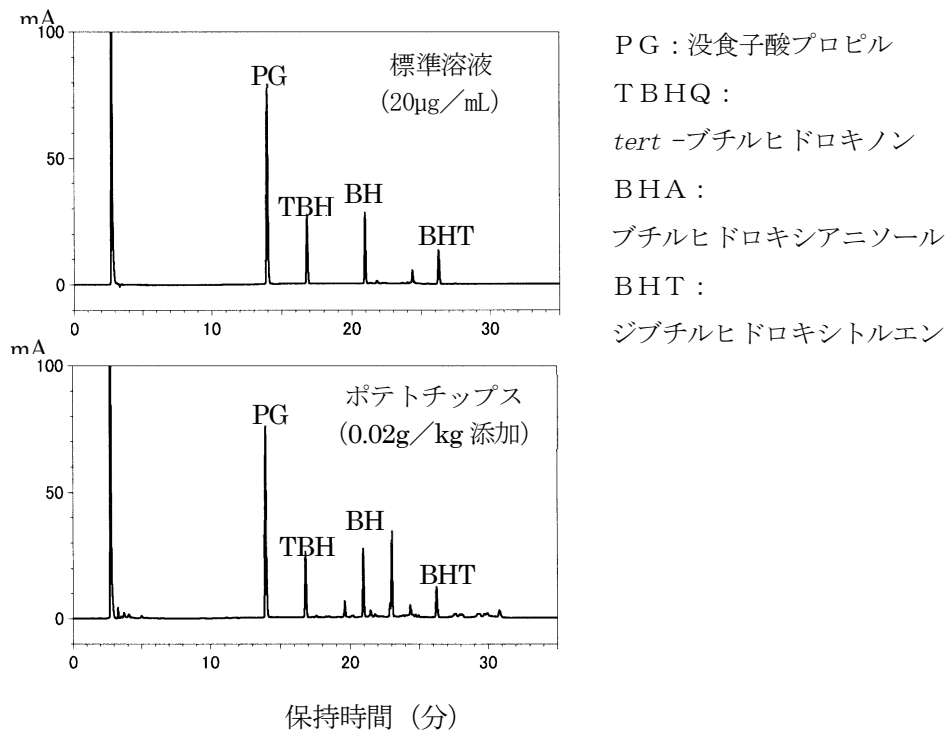
移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 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：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]

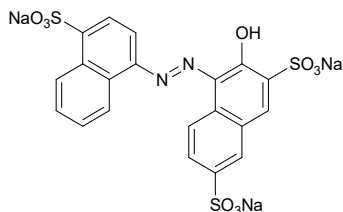
- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2020、367（2020）、金原出版
- 2) 山田真記子ら：食衛誌、**34**、535（1993）
- 3) 見上葉子ら：食衛誌、**63**、12（2022）

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

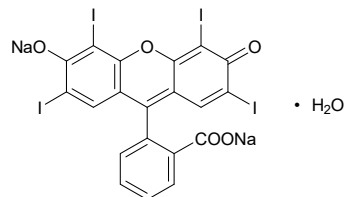
別名：アマランス



$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$: 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

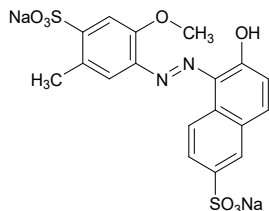
別名：エリスロシン



$C_{20}H_6I_4Na_2O_5 \cdot H_2O$
($C_{20}H_6I_4Na_2O_5$: 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

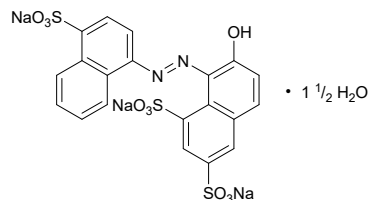


$C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$: 496. 42

食用赤色 102 号

Food Red No. 102

別名：ニューコクシン

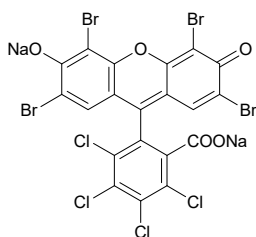


$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$
($C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$: 604. 47)

食用赤色 104 号

Food Red No. 104

別名：フロキシ

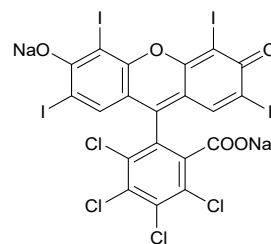


$C_{20}H_2Br_4Cl_4Na_2O_5$: 829. 63

食用赤色 105 号

Food Red No. 105

別名：ローズベンガル

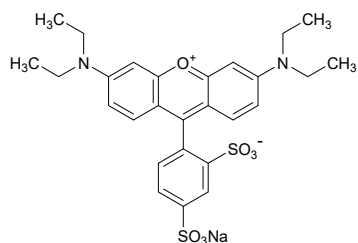


$C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$: 1017. 64

食用赤色 106 号

Food Red No. 106

別名：アシッドレッド

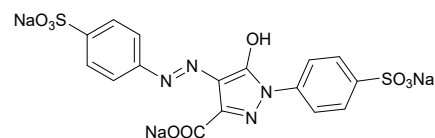


$C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$: 580. 65

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

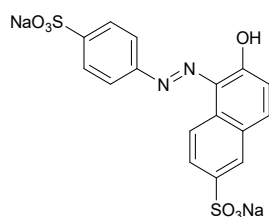


$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$: 534. 36

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

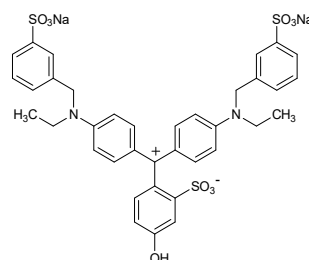


$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$: 452. 37

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

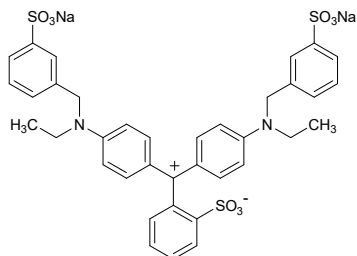


$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$: 808. 85

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

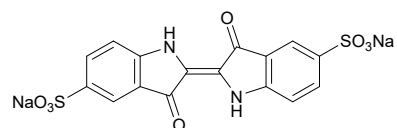


$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$: 792. 85

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⁾30mL 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⁾30mL 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⁾50mL 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 50mL 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 50mL 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⁾ 10mL 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 50~200mL 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 200mL 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 10~20mL 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 50vol%エタノール 0.25mL 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 20.0mg を量り、それぞれ水を加えて溶かして 10mL 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 20mL とし、標準溶液²¹⁾とする (濃度 100µg/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 1.5cm 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 3mm 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 μ L

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 5 g 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 5 mL 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 5 mL 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3R (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6R (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2G (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6B (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)}。

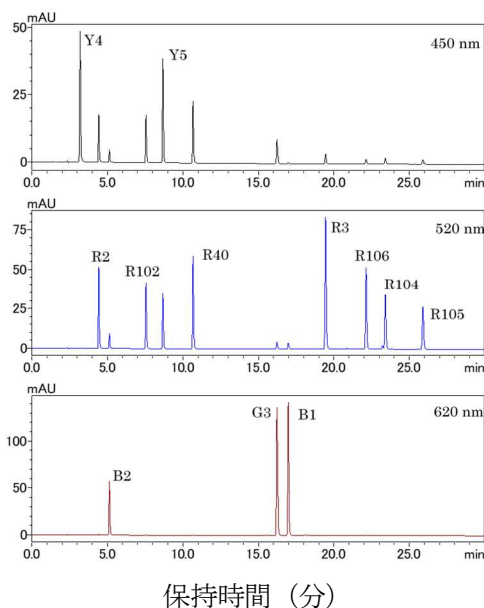
試薬・試液等

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]

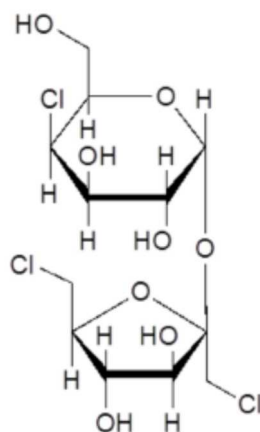
- 1) 石川ふさ子ら：食衛誌、**46**、228 (2005)
- 2) 石川ふさ子ら：食衛誌、**37**、281 (1996)
- 3) 宮武ノリエら：東京健安研セ年報、**56**、145 (2005)
- 4) 廣川書店：第9版食品添加物公定書解説書、D-1148 (2019)
- 5) 合田麻美ら：食衛誌、**54**、188 (2013)
- 6) 新藤哲也ら：食衛誌、**53**、1 (2012)
- 7) 田村行弘ら：東京都衛研年報、**47**、52 (1969)
- 8) 石川ふさ子ら：食衛誌、**46**、93 (2005)

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 $^{\circ}$ C

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）

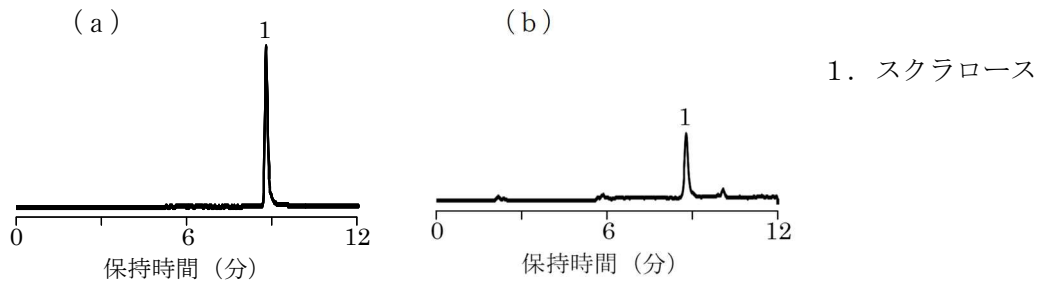
試薬・試液等

- 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 0.5 μ g/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 3 μ 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

注入量：10 μ L

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キングマトグラム

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 1 mL 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 4 g 及び塩化ナトリウム 20 g 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)

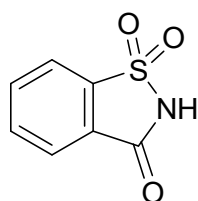
甘味料

サッカリン及びその塩類

Saccharin and Its Salts

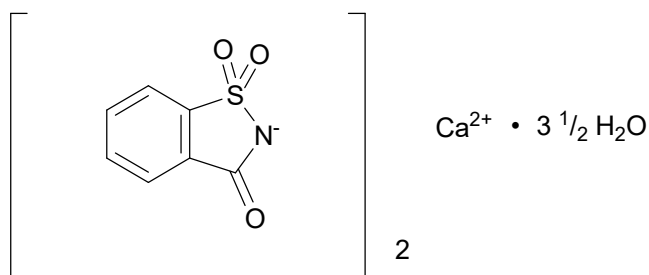
サッカリン

Saccharin

 $C_7H_5NO_3S$: 183.18

サッカリンカルシウム

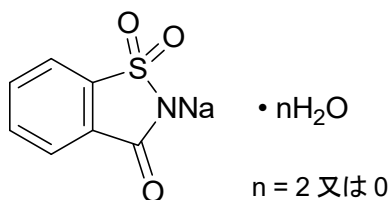
Calcium Saccharin

 $Ca^{2+} \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$ $C_{14}H_8CaN_2O_6S_2 \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$ $(C_{14}H_8CaN_2O_6S_2 : 404.43)$

サッカリンナトリウム

別名：溶性サッカリン

Sodium Saccharin

 $n = 2 \text{ 又は } 0$ $C_7H_4NNaO_3S \cdot nH_2O$ ($n = 2 \text{ 又は } 0$) $(C_7H_4NNaO_3S : 205.17)$

1. 分析法の概要

食品中のサッカリン及びその塩類は、透析法または溶媒抽出法により抽出精製し、液体クロマトグラフィーによりサッカリンナトリウムとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて、サッカリンあるいはサッカリンカルシウムの量として求める^{1,2)}。(2008年改正、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 透析法³⁾

試料約 20 g⁴⁾を精密に量る⁵⁾。次に約 20mL⁶⁾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⁷⁾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⁸⁾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⁹⁾、透析終了後の透析外液を抽出液とする。抽出液をメンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを試験溶液とする。

② 溶媒抽出法

試料約 2 g を精密に量り、飽和硫酸ナトリウム溶液 15mL、硫酸 (1→10) 5 mL、ジエチルエーテル 80mL を加えてホモジナイズして抽出する。ジエチルエーテル層を分取し、水層にジエチルエーテル 50mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返す。全ジエチルエーテル層を分液漏斗に合わせ、1%炭酸水素ナトリウム溶液 20mL を加えて 5 分間振とうし、水層を別の分液漏斗に入れる。1%炭酸水素ナトリウム溶液 20mL を用いて同様の操作を繰り返し、先の分液漏斗に水層を合わせる。次に水層に硫酸 (1→10) 7 mL を加えて酸性とし、塩化ナトリウム 5 g、ジエチルエーテル 50mL を加えて激しく振り混ぜた後、水層を別の分液漏斗に移す。水層にジエチルエーテル 50mL を加えて同様の操作を行う。全ジエチルエーテル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水後、濃縮乾固する。残留物に 10vol%メタノールを加えて全量を正確に 20mL とし、メンブレンフィルター (0.45 μ 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¹⁰⁾

サッカリンナトリウムを 120°C で 4 時間乾燥したもの 0.100 g を量り、水を加えて溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする (濃度 1000 μ g/mL)。標準原液 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 10 μ g/mL)。標準溶液 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 1～10 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

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¹²⁾ : アミノプロピル基化学結合型シリカゲル (粒径 5 μ m)

カラム管 : 内径 4.6mm、長さ 250mm

カラム温度 : 40°C

移動相¹³⁾ : 1 w/v %リン酸/メタノール混液 (6 : 4)

流速：1.0mL/分

測定波長：230nm

注入量：10 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、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{14~16)}

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から試験溶液中のサッカリンナトリウム濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式によって試料中のサッカリンナトリウムまたはサッカリン¹⁾含量 (g/kg) を計算する。

透析法の場合

$$\text{サッカリンナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200}{W \times 1000}$$

溶媒抽出法の場合

$$\text{サッカリンナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 20}{W \times 1000}$$

$$\text{サッカリン含量 (g/kg)} = \frac{C \times 20}{W \times 1000} \times 0.8928$$

C：試験溶液中のサッカリンナトリウム濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

W：試料の採取量 (g)

サッカリンカルシウム含量 (g/kg) = サッカリンナトリウム含量 (g/kg) \times 0.9856

④ 定量限界 サッカリンナトリウムとして 0.01 g/kg

試薬・試液等

1. サッカリンナトリウム：二水和物、市販品を用いる¹⁷⁾。
2. 塩化ナトリウム：[特級]
3. 塩酸：[特級]
4. 透析内液¹⁸⁾：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¹⁸⁾：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。クラッカーでは実効長約

30cm、それ以外では実効長約 15cm になるように切ったものを水で洗浄する。

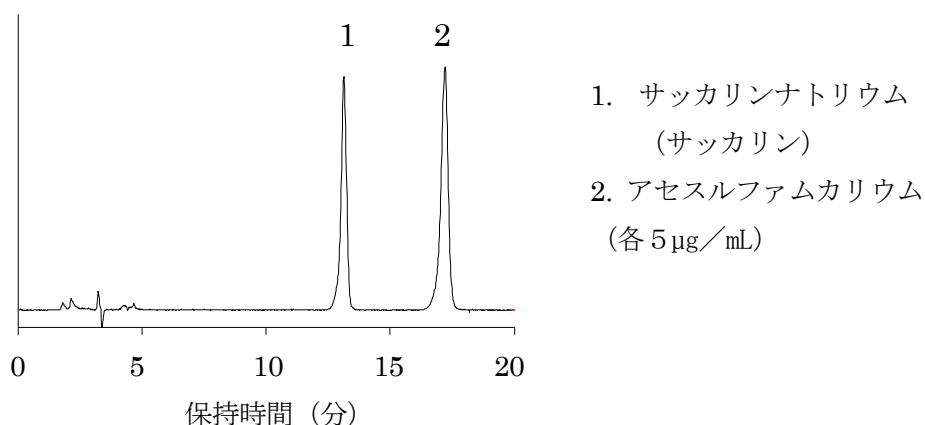
7. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
8. 硫酸：[特級]
9. ジエチルエーテル：[特級]
10. 炭酸水素ナトリウム：[特級]
11. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
12. リン酸：[85%、特級]
13. 1 w/v %リン酸：リン酸 11.8 g に水を加えて 1000mL とする。
14. 0.1mol/L 塩酸：塩酸 9 mL に水を加えて 1000mL とする。
15. 0.01mol/L 塩酸：0.1mol/L 塩酸 100mL に水を加えて 1000mL とする。

[注]

- 1) 透析法は、サッカリンのナトリウム塩またはカルシウム塩に適用できるが、サッカリンには適用できない。溶媒抽出法は、サッカリン及びサッカリン塩類に適用できる。また、ガムの場合は溶媒抽出法を用いる。
- 2) サッカリン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。
- 3) アスパルテーム分析法（2023年改正）の（2）試験溶液の調製①透析及びアセスルファムカリウム分析法（2023年改正）の（2）試験溶液の調製①透析と共通である^{文献1、2}。なお、分析時に妨害ピークがある場合は、同アセスルファムカリウム分析法の（2）試験溶液の調製②カラムによる精製と同様の操作により精製し、試験溶液を調製する。
- 4) 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。
- 5) 炭酸を多く含む試料の場合は、試料を秤量後に、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、試料を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または加温する。ただし、乳化した食品（ピーナッツバター、マヨネーズなど）は、脱脂操作を省略できる。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 試料、透析内液、透析外液の合計量。
- 9) 透析膜チューブの実効長約 15cm の場合、サッカリンナトリウム及びサッカリンカルシウムは、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などの水分含量の低い食品や、発酵乳などの乳製品では、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^{文献3}に記された透析条件を用いることにより、穀類の調製品及び乳製品においても 4 時間の透析で、上記方法と同等以上（クッキーにサッカリンナトリウムとして 0.1 g/kg 添加した

時の添加回収率 93%、相対標準偏差 1.3% (n = 5)) の透析率が得られる。

- 10) 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。
- 11) 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ムカリウムが分離することが必要である。また、分析の際は、サッカリン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。
- 12) 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。
- 13) 移動相は、メタノール / 1 w / v % リン酸混液 (6 : 4) またはアセトニトリル / 1 w / v % リン酸混液 (6 : 4) など也可以使用できる。なお、移動相に用いるメタノール、アセトニトリルは、高速液体クロマトグラフィー用を用いる。
- 14) サッカリンナトリウム及びアセスルファムカリウムの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 サッカリンナトリウム及びアセスルファムカリウムの液体クロマトグラム

- 15) 透析法により試料調製した場合は、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。

16) 本法の添加回収試験結果を注表1、注表2及び注表3に示す。

注表1 透析法におけるサッカリンナトリウム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 (%) |
|--------|---------------|------------|---------------|
| たくあん漬 | 0.01 | 94 | 0.5 |
| | 2.0 | 96 | 3.4 |
| いかくん製品 | 0.01 | 77 | 2.6 |
| | 1.2 | 79 | 0.1 |
| クッキー | 0.01 | 93 | 1.9 |
| | 0.1 | 93 | 3.1 |

*¹ 3試行の平均値

ただし、たくあん漬及びクッキーは24時間透析、
いかくん製品は24時間では不十分であり48時間透析で試験した。

注表2 溶媒抽出法におけるサッカリンナトリウム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 (%) |
|--------|---------------|------------|---------------|
| たくあん漬 | 0.01 | 82 | 1.5 |
| | 2.0 | 89 | 3.8 |
| いかくん製品 | 0.01 | 93 | 1.0 |
| | 1.2 | 89 | 1.3 |
| クッキー | 0.01 | 97 | 1.4 |
| | 0.10 | 97 | 0.2 |
| ガム | 0.01 | 93 | 5.2 |
| | 0.05 | 89 | 2.0 |

*¹ 3試行の平均値

注表3 溶媒抽出法におけるサッカリンの各種食品での添加回収率*¹

| 試料 | 添加量* ² (g/kg) | 回収率 (%) | 相対標準偏差 (%) |
|-------|-----------------------------|------------|---------------|
| たくあん漬 | 0.01 | 87 | 2.2 |
| | 0.05 | 89 | 3.2 |

| | | | |
|--------|------|----|-----|
| いかくん製品 | 0.01 | 92 | 2.0 |
| | 0.05 | 89 | 1.9 |
| クッキー | 0.01 | 95 | 0.2 |
| | 0.05 | 93 | 1.3 |
| ガム | 0.01 | 99 | 4.5 |
| | 0.05 | 90 | 2.5 |

*1 3試行の平均値、*2 サッカリンとしての量

また別に、20%りんご果汁入り飲料及びいちごジャムにサッカリンナトリウム 0.02 g/kg (定量限界の2倍相当濃度) を添加して、24時間の透析法で試験した時の添加回収率はそれぞれ96%及び102% (相対標準偏差1.2%及び0.7%) であり、ヨーグルト及びクラッカーにサッカリンナトリウム 0.02 g/kg (定量限界の2倍相当濃度) を添加して、48時間の透析法で試験した時の添加回収率はそれぞれ89%及び78% (相対標準偏差1.1%及び8.4%) であった (n=5)。

- 17) 市販品に純度99%以上のものなどがある。また、サッカリン (不溶性、純度98%以上などがある。) も用いることができる。この場合、120°Cで乾燥する必要はない。サッカリンは水に溶けにくいことから、サッカリン標準原液 (濃度 1000 µg/mL) の調製は、サッカリン 0.100g を量り、少量のメタノールに溶かしたのち、水で正確に 100mL とする。なお、サッカリンを用いた場合のサッカリンナトリウム含量を計算する際は、次の式を用いる。

透析法の場合

$$\text{サッカリンナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 200 \times 1.120}{W \times 1000}$$

溶媒抽出法の場合

$$\text{サッカリンナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 20 \times 1.120}{W \times 1000}$$

$$\text{サッカリン含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 20}{W \times 1000}$$

C_2 : 試験溶液中のサッカリン濃度 (µg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

- 18) 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。アセスルファムカリウム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

サッカリン確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のサッカリンは、液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う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

サッカリン及びその塩類分析法(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

サッカリン及びその塩類分析法(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²⁾

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 μ m)

カラム管：内径2.0mm、長さ150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

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

選択イオン検出(SIM)(モニターイオン： m/z 182)

注入量：5 μ L

② 定性³⁾

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. サッカリン及びその塩類分析法の試薬・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^{文献1、2)}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、サッカリン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）
- 2) 藤川名伊子ら：香川県環境保健研究センター所報、**6**、118（2007）

酸化防止剤

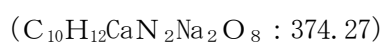
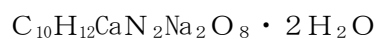
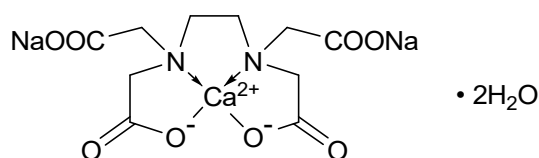
エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム

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

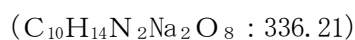
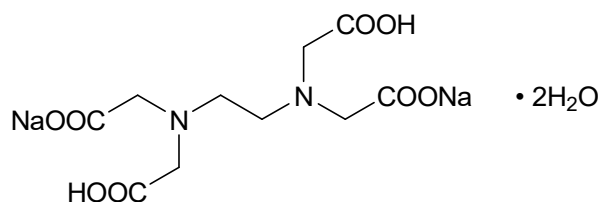
エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム

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¹⁾

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²⁾

試料約 5 g を精密に量り、50mL の遠心管に入れ、トリス・塩酸緩衝液 (0.2mol/L、pH8.5) 10mL、水 20mL 及びヘキサン 15mL 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 100mL のメスフラスコに入れる。残ったヘキサン層に水 25mL 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 100mL 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³⁾

試料約 5 g を精密に量り、トリス・塩酸緩衝液 (0.2mol/L、pH8.5) 10mL 及び水約 80mL を加え、10 分間超音波処理を行い、水層を 100mL のメスフラスコに入れ、水を加えて正確に 100mL 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 2mL を正確にとって 10mL の試験管に入れ、0.05mol/L テトラ-*n*-ブチルアンモニウム臭化物 1mL を加えて混和し、水を加えて 10mL とする。この液全量を、逆相固相抽出カラムに負荷し、毎分 2mL の速度で流す。水 20 mL、7.5vol%メタノール 10mL、水 10mL を順次通してカラムを洗浄し、塩酸含有 30vol%メタノール 7.5mL で EDTA を溶出する。溶出液を 10mL の試験管で受け、80°C に加温しながら窒素を吹きつけて 2mL 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 μ L 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 2mL とする⁴⁾。この液をメンブランフィルター (0.45 μ m) 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⁵⁾

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

(5) 測定法

① 測定条件⁶⁾

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 μ m)

カラム管：内径 4.6mm、長さ：150~250mm

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^{7~9)}

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)¹⁰⁾

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^{文献 1)}。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。

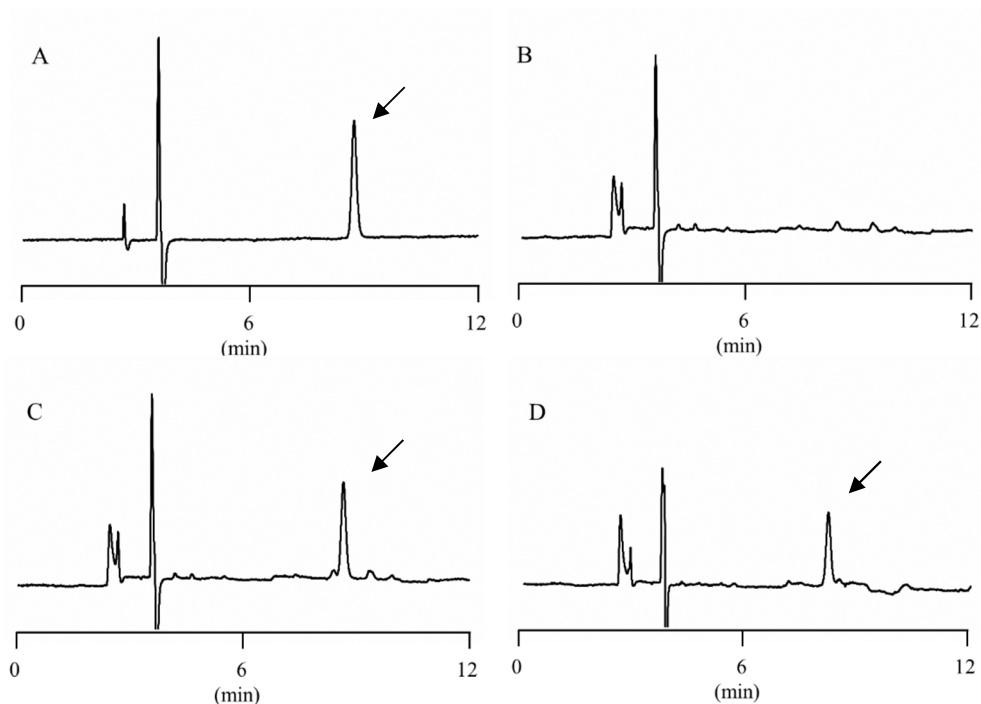
6) 測定条件は例示である。分析の際はEDTAのピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。

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

*¹EDTAカルシウム二ナトリウムとして、*²5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 μ 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 μ m）

カラム管：内径4.6mm、長さ250mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

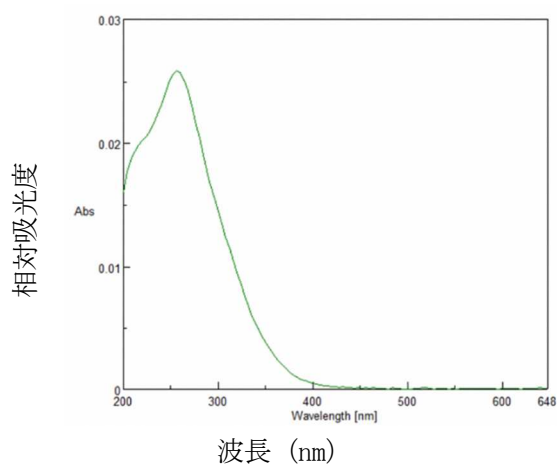
流速：0.8mL/分

測定波長：254nm

注入量：20 μ 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 μ 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¹⁾（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¹⁾。

カラム充填剤^{文献1)}：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²⁾：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 μ L

② 定性^{3~5)}

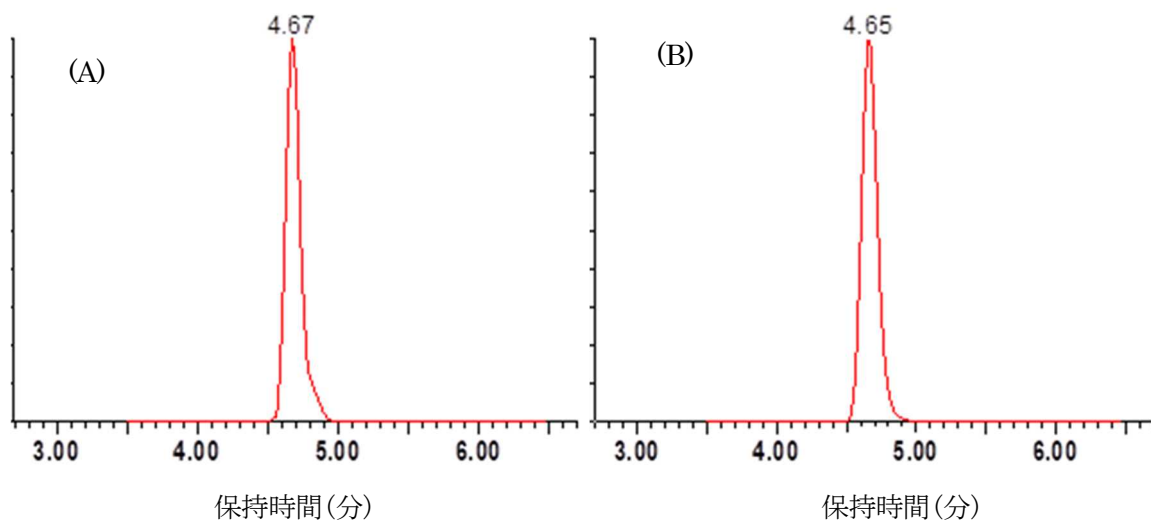
試験溶液及び標準溶液をLC-MS又はLC-MS/MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されることを確認する。

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 μ 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]⁻： 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]⁻： 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 μ 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 μ 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 μ 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

NaNO₂ : 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（NO₂⁻）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¹⁾約5gを精密に量り、ホモジナイズ容器に入れ^{2, 3)}、1.0mol/L水酸化ナトリウム溶液12mL及び水（80～90℃）40mLを加え^{4, 5)}、直ちにホモジナイズ（2分間、10000回転/分）する^{6, 7)}。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^{8)~10)}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^{11, 12)}。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¹³⁾、試験溶液とする。

（3）空試験溶液の調製¹⁴⁾

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¹⁵⁾、上清を空試験溶液とする。

（4）検量線用標準溶液の調製¹⁶⁾

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¹⁷⁾

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^{18,19)}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²⁰⁾。

吸光度の差 ΔA [$A_{T_a} - (A_b + A_{T_c})$] 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²¹⁾

吸光度差 ΔA 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 (g/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

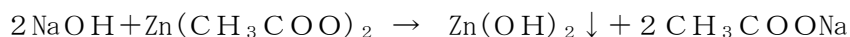
1. 亜硝酸ナトリウム：〔特級〕
2. 水酸化ナトリウム：〔特級〕
3. 1.0mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 4.0 g を量り、水を加えて溶かし、100mL とする。ポリエチレン瓶に保存する。
4. 酢酸亜鉛二水和物：〔特級〕
5. 酢酸亜鉛溶液（18→100）：酢酸亜鉛二水和物 18 g を量り、水を加えて溶かし、100mL とする。
6. スルファニルアミド：〔特級〕
7. 塩酸：〔特級〕
8. スルファニルアミド溶液：スルファニルアミド 0.50g を塩酸（1→2）100mL に加え、超音波処理をして溶かす。
9. *N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩：市販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



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^{文献3)}。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^{文献4)}。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^{文献5)}、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 μ 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。

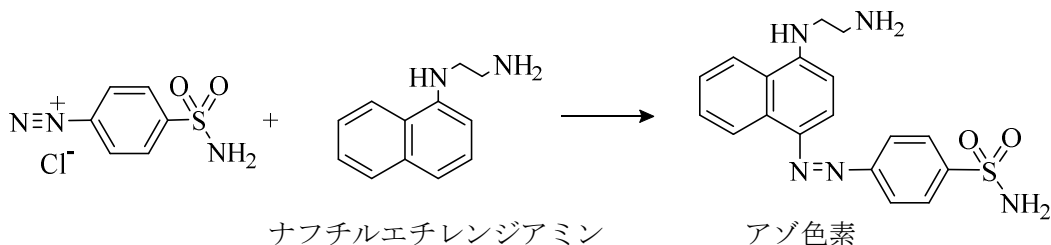
15) $Zn(OH)_2$ の沈殿を形成しないため混濁している。そのため、遠心 (例: 5℃、12000 \times g、10 分) する。

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、 NO_2^- が分解して失われるためにその定量は妨害される^{文献6)}。また酸性溶液中では、 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^{文献7)}。

[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¹⁾、水5mL²⁾、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³⁾、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⁴⁾。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^{5,6)}で洗い込みながら灰化容器⁷⁾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⁸⁾。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 μ 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 μ g/mL の検量線用標準溶液とする⁹⁾。

(5) 測定法

① 測定条件¹⁰⁾

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^{11,12)}

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(μ 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(μ 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(μ 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¹³⁾：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、ガラスピ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¹⁴⁾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。

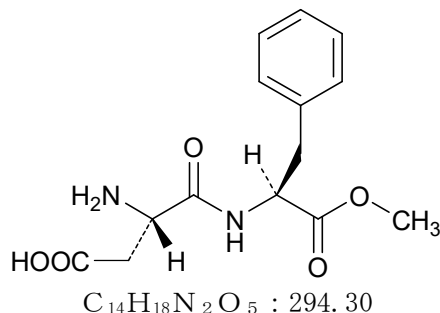
- 13) 硫酸銅五水和物 3.925 g を精密に量り、10vol%硫酸 10mL 及び水 200mL を加えて溶かし、水を加えて正確に 1000mL としたもの(この液 1 mL は銅 1000µg を含む)を標準溶液として用いてもよい。
- 14) 市販の銅クロロフィルや銅クロロフィリンナトリウムの試薬や添加物製剤は、製品により色素成分の組成比率が異なっており、銅含量にバラつきがあることが知られている。このため精度管理の添加回収試験において市販の試薬等を使用する場合は、あらかじめ添加する試薬の銅含量を求めてから添加回収試験を実施する必要がある。銅クロロフィルと銅クロロフィリンナトリウムの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-逆相ミックスマ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¹⁾。(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 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転倒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⁸⁾。

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-逆相ミックスマード固相抽出カラム⁹⁾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¹⁰⁾、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¹¹⁾

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¹²⁾

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¹³⁾：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：20 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、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{14、15)}

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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

W：試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.01 g/kg

試薬・試液等

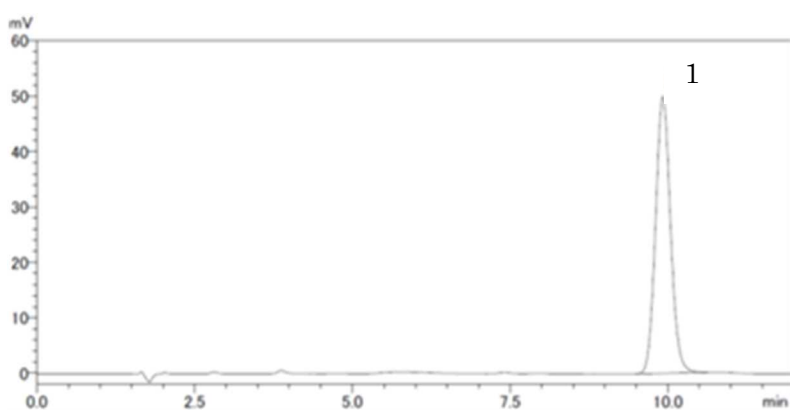
1. アスパルテーム：市販品を用いる¹⁶⁾。
2. 塩化ナトリウム：[特級]
3. 塩酸：[特級]
4. 透析内液¹⁷⁾：塩化ナトリウム 100 g を 0.01mol/L 塩酸に溶解して 1000mL とする。
5. 透析外液¹⁷⁾：0.01mol/L 塩酸
6. 透析膜チューブ：透析用セルロース製チューブ（平面幅 44mm、直径 28mm、膜厚 0.0203mm）を適当な長さに切ったものを水で洗浄して片端を結んで閉じる。
7. 強陽イオン交換-逆相ミックスモード固相抽出カラム：スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体固相抽出カラム (150mg)⁹⁾。あらかじめメタノール 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^{文献 1)}。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

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 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。
- 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 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。
- 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 15cm の場合、アスパルテームは水分含量の高い食品では 24 時間で十分透析されるが、穀類の調整品や魚介乾製品などの水分含量の低い食品及びはっ酵乳など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 2)}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（クッキーにアスパルテームを 0.1 g/kg 添加した時の添加回収率 103% 及び相対標準偏差 1.0% (n = 5)) の透析率が得られる。
- 8) 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（0.45 μ m）でろ過したものを試験溶液として用いることができる。また、抽出液の pH を確認し、中性～弱アルカリ性の場合は固相抽出カラムへの保持が弱くなることから、pH 3 以下となるよう調整する。
- 9) メーカーにより溶出条件が異なるため、あらかじめ回収率等を確認する必要がある。
- 10) 試験溶液中のアセトニトリル量がピーク形状に影響するため、水で定容する。
- 11) 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。
- 12) 測定条件は例示である。また、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。本法でのアスパルテームの液体クロマトグラム例を注図 1 に示す。



1. アスパルテーム
(20 μ g/mL)

保持時間（分）

<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 μ m）

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

流速：1.0mL/分

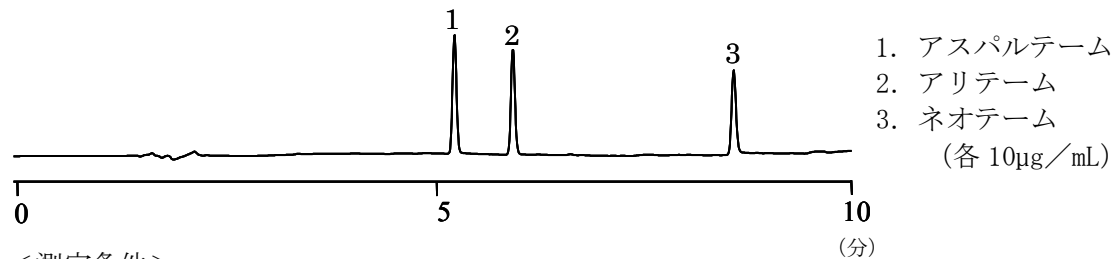
検出器：紫外可視吸光度検出器（210nm）

注入量：20 μ L

移動相¹³⁾：リン酸緩衝液（0.02mol/L、pH4.0）/メタノール混液（3：1）

注図 1 アスパルテームの液体クロマトグラム

- 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^{文献3)}。
- 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^{文献1)}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）
 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。
- 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0.01 g/kg及び0.1 g/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）^{文献1)}。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0.01 g/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0.01 g/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¹⁾。(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²⁾

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 μ m)

カラム管：内径2.1mm、長さ50mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相³⁾：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⁴⁾：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 μ L

② 定性^{5, 6)}

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

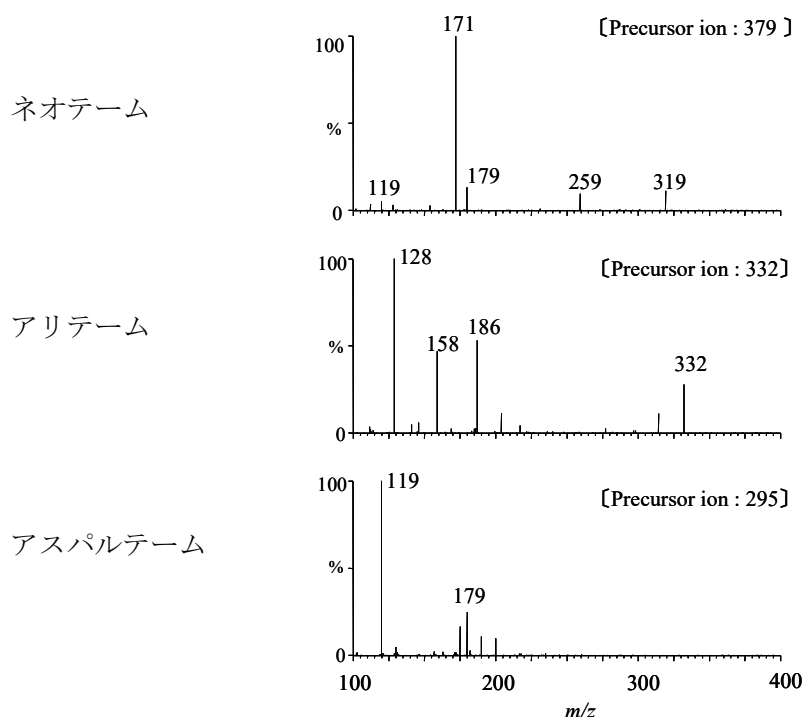
1. アスパルテーム分析法の試薬・試液等を準用する。

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^{文献1)}。
- 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^{文献1)}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 μ 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 μ 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 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]

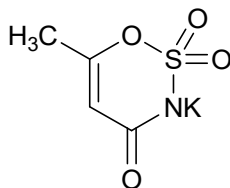
- 1) 松本ひろ子ら：食衛誌、**49**、31 (2008)

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¹⁾。(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²⁾

試料約 20 g³⁾を精密に量る⁴⁾。次に約 20mL⁵⁾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⁶⁾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⁷⁾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⁸⁾、透析終了後の透析外液を抽出液とする⁹⁾。

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¹⁰⁾に負荷し¹¹⁾、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¹²⁾を接続し、水/メタノール混液 (6 : 4) 10mL を負荷¹¹⁾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 μ 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¹³⁾

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 μ 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 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件¹⁴⁾

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¹⁵⁾ : アミノプロピル基化学結合型シリカゲル (粒径 5 μ m)

カラム管 : 内径 4.6mm、長さ 250mm

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相¹⁶⁾ : 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 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、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{17~20)}

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 (μ 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 (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

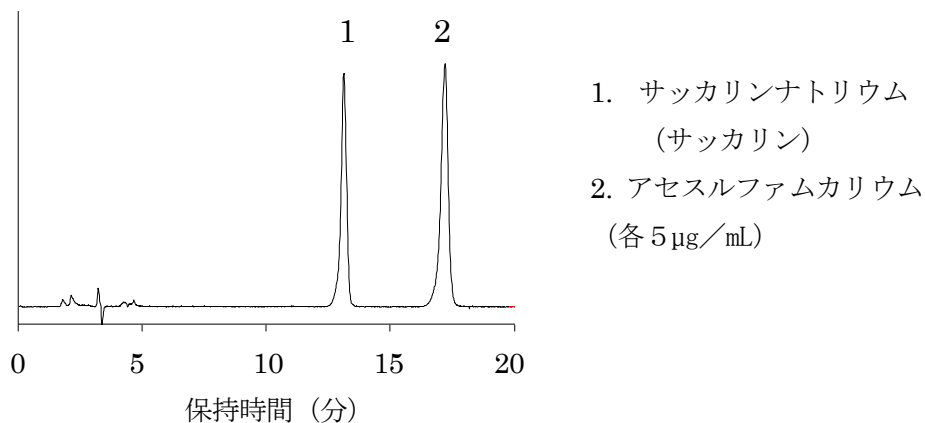
1. アセスルファミウム : 市販品を用いる。
2. 塩化ナトリウム : [特級]

3. 塩酸：[特級]
4. 透析内液²¹⁾：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²¹⁾：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^{文献1、文献2}。
- 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^{文献³⁾}に記載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

アセスルファミウム確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のアセスルファミウムは、液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う¹⁾。
(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

アセスルファミウム分析法（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

アセスルファミウム分析法（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²⁾

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³⁾

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. アセスルファミウム分析法の試薬・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^{文献1)}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。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。

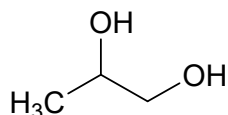
[文献]

- 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¹⁾。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²⁾

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 μ 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 μ g/mL)。

(4) 測定法^{文献1)}

① 測定条件³⁾

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 μ 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⁴⁾

注入量：1 µL

② 検量線⁵⁾

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^{6~10)}

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¹¹⁾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¹²⁾

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（W₁）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（W₂）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（W₃）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^{文献1)}、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^{文献1)}。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^{文献1)}、(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。

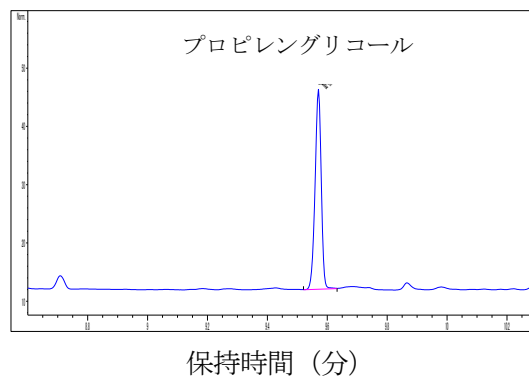
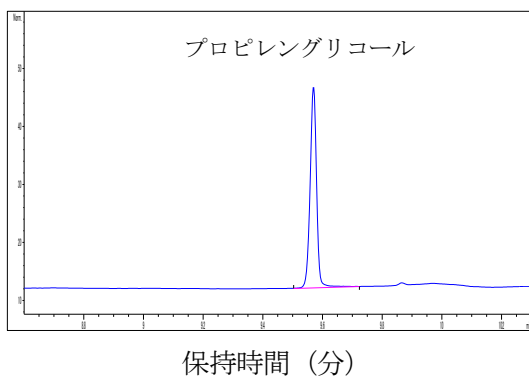
7) 試験溶液中の濃度が高く、検量線の濃度範囲を逸脱する場合は、試験溶液をメタノールで適宜希釈して定量をやり直し、計算式に希釈倍率を乗じて含量を求める。

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 μ 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 μ 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 μ 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^{文献1)}

①測定条件¹⁾

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 μ 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 μ L

②定性

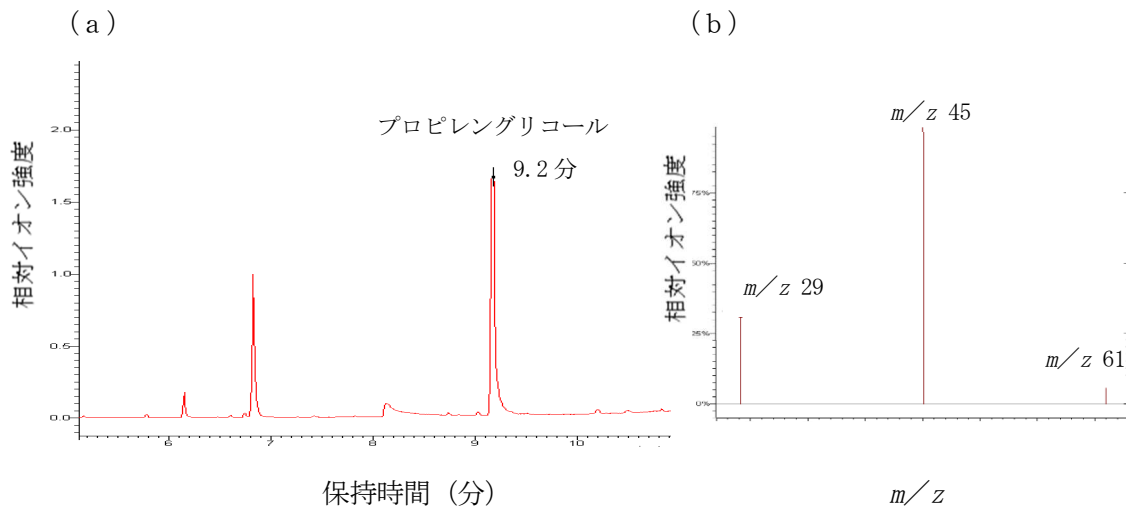
試験溶液及び標準溶液をGC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されること、このピークのスキャン検出で得られるマススペクトル上の主要ピークの強度比が標準溶液のピークと一致することを確認する。

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 μ 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 μ L

検出法：スキャン (m/z 10~200) 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)

製造用剤等

硝酸カリウム及び硝酸ナトリウム

Potassium Nitrate and Sodium Nitrate

| | |
|-------------------------|-------------------------|
| 硝酸カリウム | 硝酸ナトリウム |
| $\text{KNO}_3 : 101.10$ | $\text{NaNO}_3 : 84.99$ |

1. 分析法の概要¹⁾

食品中の硝酸カリウム及び硝酸ナトリウムは液体クロマトグラフィーにより硝酸根として定量する^{文献1)}。必要があれば分子量比を乗じて硝酸カリウム及び硝酸ナトリウムの量として求める。食品中、とくに植物体中には天然の硝酸塩が広く分布している。したがって、定量値は食品由来の硝酸塩と添加された硝酸塩との合計値である（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

一般試験採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製²⁾

① チーズ、乳等

チーズ等試料はミキサー等で均質化した後に乳鉢ですりつぶしたもの約5gを精密に量り、乳等試料は5mLを正確に量り、ビーカーにとる。0.5mol/L水酸化ナトリウム溶液10mL及び水(80~90℃)50mLを加えて、シリコーンスパーテル等で固形物を押しつぶしながら混和又は溶解させる。さらに、酢酸亜鉛溶液(9→100)10mLを加えて混和した後、80~90℃の水浴上で20分間加熱する³⁾。次に、冷水中で30分間以上冷却した後⁴⁾、50mLの水で洗浄したろ紙を用いて吸引ろ過し、超音波処理によりろ液の細かい気泡を除き、室温に戻した後、水を加えて正確に100mLとしたものを抽出液とする⁵⁾。抽出液を12000×g、5℃で10分間遠心し、上清を試験溶液とする⁶⁾。

液体クロマトグラフィーでの測定時に妨害ピークが認められる際は、遠心後の上清を蓋付き試験管に正確に5mLとり、リン酸50μLを加えて混和したものを固相抽出カラム⁷⁾に全量負荷する。次に、水2mLで2回試験管を洗いこみ、固相抽出カラムに負荷する。さらに水5mLを固相抽出カラムに通して洗浄後、0.04mol/L水酸化ナトリウム溶液で溶出し、5mLに定容したものを試験溶液とする。

② 清酒等

試料5mLを正確に量り、水で100mLに定容したものを抽出液とし、これを12000×g、5℃で10分間遠心し、上清を試験溶液とする⁶⁾。

なお、液体クロマトグラフィーでの測定時に妨害ピークが認められる際は、遠心後の上清を蓋付き試験管に正確に5 mL とり、リン酸 50 μ L を加えて混和したものを固相抽出カラム⁷⁾に全量負荷する。次に、水2 mL で2回試験管を洗いこみ、固相抽出カラムに負荷する。さらに水5 mL を固相抽出カラムに通して洗浄後、0.04mol/L 水酸化ナトリウム溶液で溶出し、5 mL に定容したものを試験溶液とする。

(3) 空試験溶液の調製⁸⁾

試料の代わりに水5 mL を用い、(2) 試験溶液の調製と同様に操作し、空試験溶液とする。

(4) 検量線用標準溶液の調製

硝酸カリウム 1.631 g を量り、水を加えて溶かして正確に 1000mL としたものを標準原液とし(濃度 硝酸根として 1000 μ g/mL)⁹⁾、褐色瓶に保存する。用時、標準原液 1 mL を正確に量り、50mL のメスフラスコに入れ、水を加えて正確に 50mL とし、標準溶液とする(濃度 硝酸根として 20 μ g/mL)。この液 0.5、5、10 及び 20mL 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 硝酸根として 0.5~20 μ g/mL)¹⁰⁾。

(5) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

紫外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¹²⁾：強塩基性陰イオン交換樹脂

カラム管：内径 4~4.6mm、長さ 250mm

カラム温度：40°C

移動相：0.05mol/L 塩化ナトリウム溶液

流速：0.6mL/分

測定波長：210nm

注入量：20 μ L

② 検量線

検量線用標準溶液 20 μ L 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^{13~15)}

試験溶液及び空試験溶液をそれぞれ液体クロマトグラフに注入し、両者のピーク面積の差を求め、その値と検量線から試験溶液中の硝酸根濃度 (μ g/mL) を求め、次式によって試料中の硝酸根含量 (g/kg 又は g/L) を計算する。

$$\text{硝酸根含量 (g/kg 又は g/L)} = C \times \frac{100}{S} \times \frac{1}{1000} = \frac{C}{S \times 10}$$

硝酸カリウム含量 (g/kg 又は g/L) = 硝酸根含量 (g/kg 又は g/L) × 1.631

硝酸ナトリウム含量 (g/kg 又は g/L) = 硝酸根含量 (g/kg 又は g/L) × 1.371

C : 試験溶液中の硝酸根濃度 (µg/mL)

S : 試料の採取量 (g 又は mL)

④ 定量限界 0.01 g/kg 又は g/L

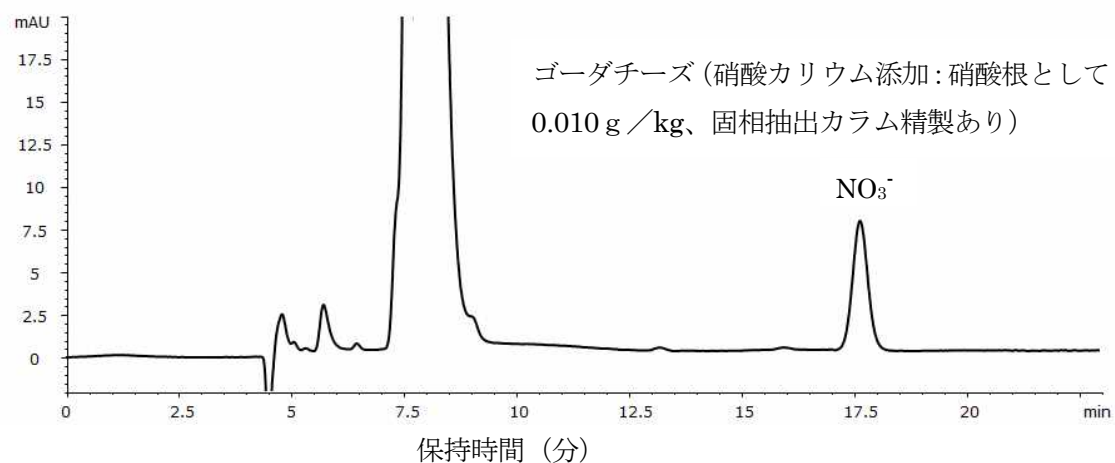
試薬・試液等

1. 塩化ナトリウム : [特級]
2. 0.05mol/L 塩化ナトリウム溶液 : 塩化ナトリウム 1.46 g を量り、水を加えて溶かし、500mL とする。
3. 固相抽出カラム : カーボンモレキュラーシーブタイプのもの (約 400mg) を用いる⁷⁾。
4. 酢酸亜鉛二水和物 : [特級]
5. 酢酸亜鉛溶液 (9→100) : 酢酸亜鉛二水和物 9.0 g を量り、水を加えて溶かし、100mL とする。
6. 硝酸カリウム : [特級]
7. シリコーン樹脂 : [食品添加物用]¹⁶⁾
8. 水酸化ナトリウム : [特級]
9. 0.5mol/L 水酸化ナトリウム溶液 : 水酸化ナトリウム 2.0 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。
10. 0.04mol/L 水酸化ナトリウム溶液 : 水酸化ナトリウム 1.6 g を量り、水を加えて溶かし、1000mL とする。
11. リン酸 : [特級]

[注]

- 1) 硝酸カリウム及び硝酸ナトリウムは、発酵の際の窒素源を供給する発酵調整剤として使用され、使用基準において、チーズにあっては原料に供する乳 1 L につき 0.20 g 以下、清酒にあっては酒母 1 L につき 0.10 g 以下でなければならないと規定されている。また、食肉加工品の発色剤としても使用され、食肉製品及び鯨肉ベーコンにあってはその 1 kg につき亜硝酸根として 0.070 g 以上残存しないように使用しなければならないと規定されてい

- る。これらの亜硝酸根としての残存基準の適否判定を目的とする分析の場合は、亜硝酸ナトリウムの分析法により行う。
- 2) 使用する器具類は、硝酸イオンの汚染を取り除くため、用時よく水洗したものを用いる。特に、ろ紙、バイアルには硝酸イオンの汚染が認められる製品があるため、使用の際には留意する必要がある。
 - 3) 水酸化ナトリウムと酢酸亜鉛により生成する水酸化亜鉛のコロイド性沈殿物の形成により除タンパクを行う。
 - 4) ろ液への脂肪分の流入を抑えるため、脂肪分を固化させ十分に冷却する。
 - 5) 短形メスフラスコなど精度が確認されたガラス製容器を用いる。吸引ろ過の際に気泡が生じるため、水で10倍希釈したシリコーン樹脂25 μ Lを標線付近に塗布する。
 - 6) 遠心後の上清に浮遊物が認められる場合、上清をメンブランフィルター(0.45 μ m)でろ過するとよい。この場合、試験溶液は最初のろ液数mLを捨てた後に採取したろ液とする。なお、メンブランフィルターから微量の硝酸イオンが検出されることがあるため、使用の際には留意し、空試験でも同様に操作する。
 - 7) 固相抽出カラムは、あらかじめアセトン5mLを通し、次いで水5mLを2回通してコンデューショニングしたものを用いる。
 - 8) 試薬や固相抽出カラム等に含まれる微量の硝酸イオンが定量に影響するため、空試験を実施して定量値を補正する。なお、空試験溶液中の硝酸根濃度が定量限界未満の場合は、試験溶液と空試験溶液のピーク面積の差と検量線から定量計算を行なう。
 - 9) 標準原液として、計量法トレーサビリティ制度(JCSS)に適合した市販の硝酸イオン標準液を用いることができる。
 - 10) 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。
 - 11) 測定条件は例示である。
 - 12) 陰イオン測定用のイオンクロマトグラフ用カラムを用いることができる。
 - 13) 試験溶液中の硝酸根濃度が高く、検量線の濃度範囲を逸脱する場合は、試験溶液を水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。
 - 14) 本法による液体クロマトグラムの一例を注図1に示す。この条件において検量線は0.1~20 μ g/mLの範囲で相関係数0.999以上が得られた。



<測定条件>

カラム：陰イオン交換カラム（内径 4mm、長さ 250mm）
 ガードカラム：陰イオン交換カラム（内径 4mm、長さ 50mm）
 カラム温度：40°C
 移動相：0.05mol/L 塩化ナトリウム溶液
 流速：0.6mL/分
 検出器：紫外可視吸光光度検出器（210nm）
 注入量：20μL

注図1 チーズにおける添加試験を実施した際の液体クロマトグラム

15) 本法の添加回収試験結果を注表1に示す。

注表1 硝酸根の各種食品での添加回収率 (n=5)

| 食品 | 添加量* (g/kg 又は g/L) | 回収率 (%) | 相対標準偏差 (%) |
|-----------|-----------------------|------------|---------------|
| モッツアレラチーズ | 0.010 | 91.3 | 0.9 |
| | 0.20 | 93.9 | 1.5 |
| エメンタールチーズ | 0.010 | 93.0 | 1.8 |
| | 0.20 | 96.9 | 1.2 |
| ゴータチーズ | 0.010 | 94.6 | 3.5 |
| | 0.20 | 97.0 | 2.6 |
| 牛乳 | 0.010 | 97.0 | 3.4 |
| | 0.20 | 99.3 | 1.8 |
| 清酒A、B | 0.010 | 99.2、97.9 | 4.5、1.7 |
| | 0.10 | 99.1、99.6 | 0.8、0.9 |
| にごり酒 | 0.010 | 96.1 | 2.3 |
| | 0.10 | 99.4 | 0.4 |

ただし、モッツアレラチーズ、牛乳及び清酒は、固相抽出カラムによる精製操作を行わずに試験を実施した。

*:硝酸根として当該濃度となるように硝酸カリウム標準溶液を添加した。

16) 食品工業用消泡剤が使用できる。

[文献]

1) 佐々木隆宏ら：食衛誌、**61**、 229 (2020)

未指定添加物

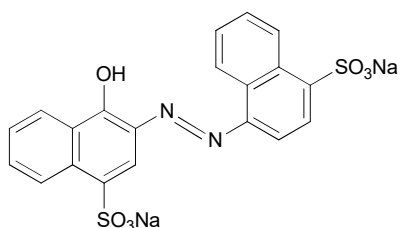
未指定酸性タール色素

Undesignated Acidic Tar Colors

アズルビン

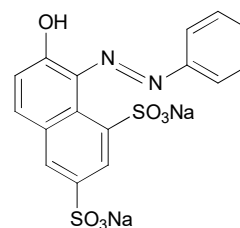
Azorubine

別名：カルモイシン (Carmoisine)


 $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2 : 502.43$
(C. I. 14720)

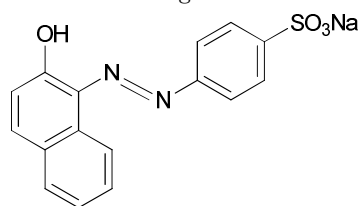
オレンジ G

Orange G

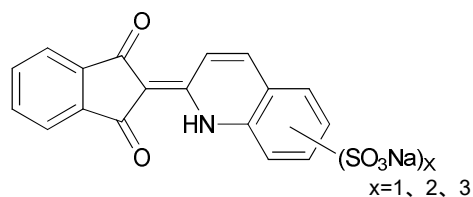

 $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2 : 452.37$
(C. I. 16230)

オレンジ II

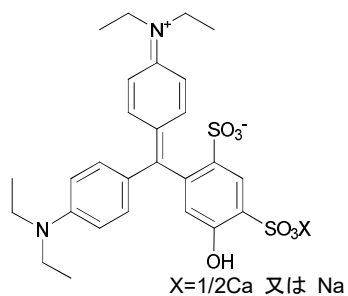
Orange II


 $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S : 350.32$
(C. I. 15510)
キノリンイエロー¹⁾

Quinoline Yellow


 $C_{18}H_9NNa_2O_8S_2 : 477.38$
(ジスルホン化体を主成分色素として)
(C. I. 47005)
パテントブルー V²⁾

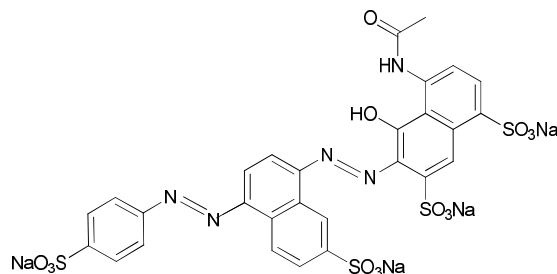
Patent Blue V

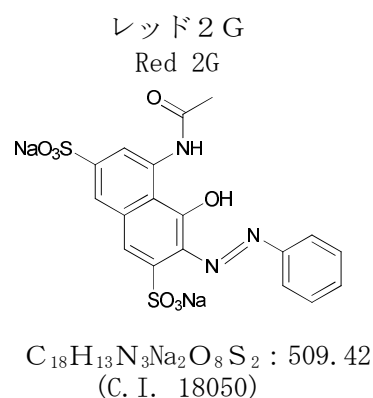
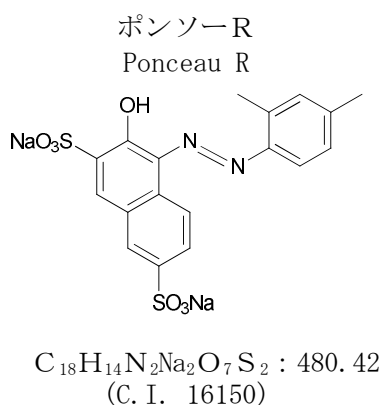

 Ca 塩： $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2 \cdot 1/2Ca : 579.71$
 Na 塩： $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2Na : 582.66$
(C. I. 42051)

ブリリアントブラック BN

Brilliant Black BN

別名：ブラック PN (Black PN)


 $C_{28}H_{17}N_5Na_4O_{14}S_4 : 867.68$
(C. I. 28440)



※上記は、未指定酸性タール色素の例示

1. 分析法の概要

食品中の未指定酸性タール色素（アズルビン、オレンジG、オレンジ II、キノリンイエロー、パテントブルーV、ブリリアントブラック BN及びレッド 2 G等）を薄層クロマトグラフィー³⁾により定性する。（2023 年改正）

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

（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⁴⁾。

（3）標準溶液の調製⁵⁾

アズルビン、オレンジG、オレンジ II、キノリンイエロー、パテントブルーV、ブリリアントブラック BN、ポンソーR及びレッド 2 Gそれぞれ 20.0mg を量り、それぞれ水を加えて溶かし、20mL とし各色素標準原液とする。各色素標準原液 10mL を正確に量り、水を加えて 100mL とし、標準溶液とする（濃度 100 μ g/mL）。

（4）測定法

食用タール色素分析法の（4）測定法を準用する。

試薬・試液等

1. アズルビン：市販品を用いる。
2. オレンジG：市販品を用いる。

3. オレンジ II：市販品を用いる。
4. キノリンイエロー：市販品を用いる。
5. パテントブルー V：市販品を用いる。
6. ブリリアントブラック BN：市販品を用いる。
7. ポンソー R：市販品を用いる。
8. レッド 2 G：市販品を用いる。
9. 食用タール色素分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

- 1) キノリンイエローはスルホン酸基が 1～3 個結合したものの混合物であり、そのスルホン酸基の位置も異なることがあるため、薄層クロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーでは複数のスポットやピークが確認される。食品添加物として使用されるものにはスルホン酸基が 2～3 個結合したものの割合が多いが、試薬として購入できるキノリンイエローにはスルホン酸基が 1～2 個結合したものの含量が多い場合があるため、注意が必要である。
- 2) 海外で許可されているパテントブルー V は C. I. 42051 の色素であり、カルシウム塩のものと、ナトリウム塩のものがある。これらは薄層クロマトグラフィー及び液体クロマトグラフィーで同じ Rf 値及び同じ溶出時間を示す。一方、パテントブルー (C. I. 42045、別名パテントブルー V F、アズールブルー、ブルー V R S) は、パテントブルー V (C. I. 42051) の水酸基が一つ外れた構造をしており、薄層クロマトグラフィーの Rf 値や液体クロマトグラフィーの溶出時間がパテントブルー V (C. I. 42051) と異なる^{文献 1、2)}ので注意する。
- 3) 未指定酸性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。
- 4) ブリリアントブラック BN が含まれている場合は、水浴上で加熱濃縮すると分解する可能性があるため、40℃以下で減圧濃縮して抽出液とするとよい。
- 5) 例示以外の未指定酸性タール色素の定性を行う場合は、定性対象化合物の試薬を標準溶液の調製に用いる。

[文献]

- 1) 荻原勉ら：東京衛研年報、**53**、153 (2002)
- 2) 新矢将尚ら：食衛誌、**61**、58 (2020)

参考

未指定酸性タール色素確認分析法

1. 分析法の概要

食品中の未指定酸性タール色素は、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、未指定酸性タール色素分析法(1)及び(2)を準用する。

(3) 標準溶液の調製

未指定酸性タール色素分析法(3)標準溶液の調製の各色素標準溶液10mLを量り、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¹⁾

フォトダイオードアレイ検出器付又は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²⁾: 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 $^{\circ}$ 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⁴⁾

| 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（オレンジG、オレンジ II、キノリンイエロー）

520nm（ポンソーR、アゾルビン、レッド2G）

580nm（ブリリアントブラックBN）

620nm（パテントブルーV）

注入量：10 μ L⁵⁾

② 定性⁶⁾

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。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、未指定酸性タール色素分析法（1）及び（2）を準用する。

（3）標準溶液の調製

未指定酸性タール色素分析法（3）標準溶液の調製の各色素標準溶液 10mL を量り、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）⁷⁾。

（4）測定法

① 測定条件⁸⁾

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 3～5 μ m）

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C付近の一定温度

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⁴⁾

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

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI (+) 又は 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⁹⁾

| 化合物 | イオン化モード | モニターイオン* ¹ (m/z) |
|----------------|---------|------------------------------------|
| アズルビン | ESI (-) | 457 |
| オレンジG | ESI (+) | 409 |
| オレンジII | ESI (-) | 327 |
| キノリンイエロー (x=1) | ESI (+) | 354 |
| キノリンイエロー (x=2) | ESI (+) | 434 |
| キノリンイエロー (x=3) | ESI (+) | 514 |
| パテントブルーV | ESI (+) | 561 |
| ブリリアントブラックBN | ESI (-) | 777 |
| ポンソーR | ESI (+) | 437 |
| レッド2G | ESI (+) | 467 |

*¹：スキャン測定時の主なイオンも同じ。

注入量：5 μ L

② 定性¹⁰⁾

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。

試薬・試液等

1. 未指定酸性タール色素分析法の試薬・試液等を準用する。
2. 酢酸アンモニウム：[特級]
3. アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー用
4. 0.01mol/L酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 0.77gに水を加えて1Lとする。

[注]

- 1) 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。
- 2) 市販のカラムとして内径4.6mm、長さ150mm、粒径5 μ mのカラムや、内径4.6mm、

長さ 250mm、粒径 5 μ m のカラム^{文献1)}が使用できる。

3) 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)}。

4) ブリリアントブラック BN のピークが割れ、形状が悪くなることもある。試験溶液が 50vol% エタノール溶液であった場合、水で希釈し 25vol% エタノール溶液とするか、以下のグラジエント条件が使用できる。

グラジエントの条件

| 分 | A (%) | B (%) |
|------|-------|-------|
| 0 | 99 | 1 |
| 1 | 99 | 1 |
| 3 | 90 | 10 |
| 30 | 50 | 50 |
| 30.1 | 99 | 1 |
| 40 | 99 | 1 |

5) 試料採取量や試験溶液濃度を変更した場合は、カラムへ負荷する試料相当量が (2) ~ (4) の操作の場合と同じになるように注入量を調整する。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 (0.45 μ m) でろ過する。

6) 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。

7) 液体クロマトグラフ質量分析計は装置によって感度が異なるため、試験溶液と標準溶液の濃度が高い場合は適宜水で希釈して用いる。

8) 測定条件は例示である。市販のカラムとして内径 2.1mm、長さ 150mm、粒径 5 μ m のカラムや、内径 2.1mm、長さ 150mm、粒径 3 μ m のカラム^{文献4)}が使用できる。

なお、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。装置により、設定条件は異なる。

参考として、注図 1 に、本法によるクロマトグラム例を示す。また、フラグメントイオン確認のための MS 条件の例を以下に示す。

<MS 条件>

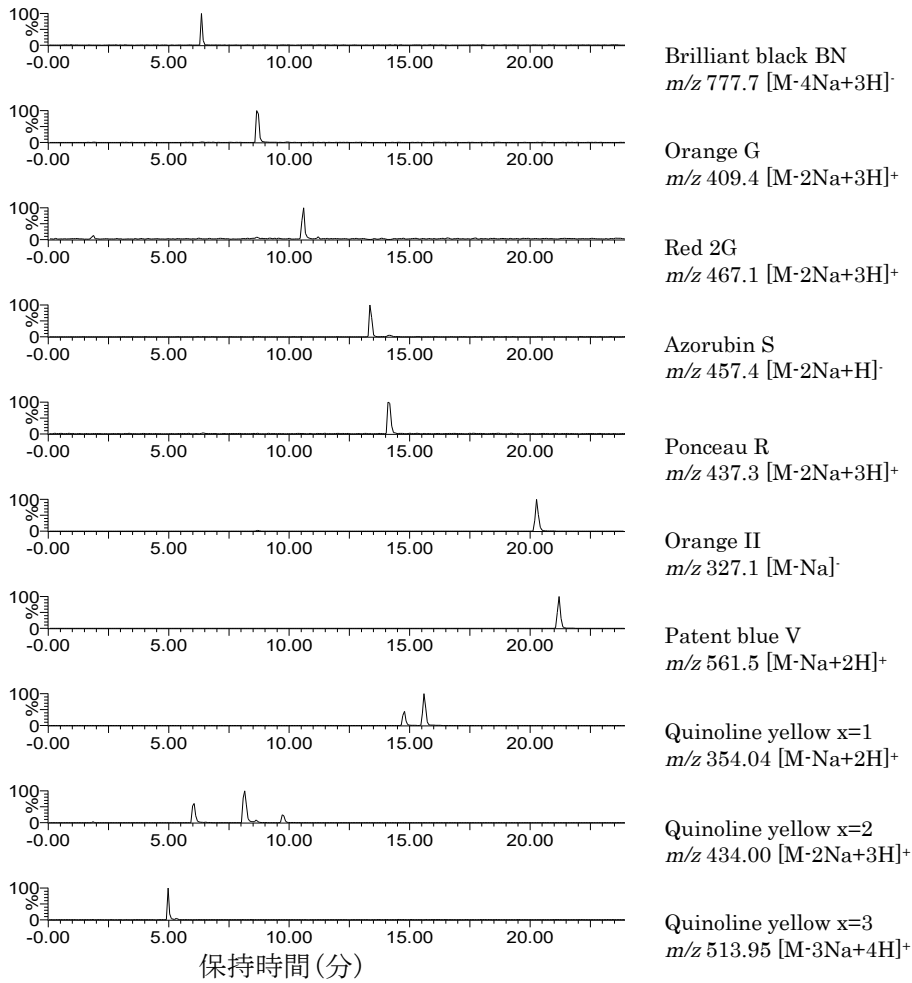
キャピラリー電圧: 3.00kV、 コーン電圧: 50.0V

エクストラクター: 3.00V、 ソース温度: 120°C

脱溶媒温度: 350°C、 コーンガス流量: 47 L/時

脱溶媒ガス流量: 593 L/時、 RF レンズ: 0.4V

モニターイオン



カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1mm、長さ 150mm、粒径 5 μm）

カラム温度：40°C、流速：0.2mL/分、

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 |
| 30 | 50 | 50 |
| 30.1 | 95 | 5 |
| 40 | 95 | 5 |

イオン化モード：ESI (+) 又は ESI (-)、検出法：SIM、注入量：5 μL

注図 1 未指定酸性タール色素の SIM クロマトグラム

9) LC-MSによる同様の分析例の報告もあり^{文献 1、文献 4~文献 6)}、レッド 2 G は m/z 464 [M-2Na+H]⁻、パテントブルー V は m/z 559 [M-Na]⁻、キノリンイエロー

($x = 1$) は m/z 352 $[M-Na]^-$ 、キノリンイエロー ($x = 2$) は m/z 432 $[M-2Na+H]^-$ がイオンとして検出されている。

- 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、**41**、194 (2000)
- 3) 宮武ノリエら：東京健安研セ年報、**56**、145 (2005)
- 4) 関戸晴子ら：神奈川衛研報、**38**、35 (2008)
- 5) 荻原勉ら：東京衛研年報、**53**、153 (2002)
- 6) 山口瑞香ら：食衛誌、**56**、8 (2015)

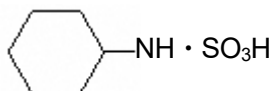
未指定添加物

サイクラミン酸及びその塩類

Cyclamic Acid and Its Salts

サイクラミン酸

Cyclamic Acid

C₆H₁₃NO₃S : 179.24

1. 分析法の概要

食品中のサイクラミン酸及びその塩類は、透析法又は水抽出法で抽出した後、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、液体クロマトグラフィーにより定量する。(2003年改正、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 抽出

a 透析法

試料約 20g¹⁾を精密に量る²⁾。次に約 20mL³⁾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⁴⁾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⁵⁾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を転倒混和しながら室温で 24~48 時間透析⁶⁾し、透析終了後の透析外液を抽出液とする。

b 水抽出法⁷⁾

試料約 10 g を精密に量り、水 40mL 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 100mL とした後、遠心し、上清を分取する。上清 10mL を正確に量り、逆相固相抽出カラムの下に強陰イオン交換固相抽出カラムを接続したものに負荷する⁸⁾。流下後、水 10mL を通して洗浄後、逆相固相抽出カラムを除去する。強陰イオン交換固相抽出カラムに塩酸 (1→100) 10mL を通し⁹⁾、流出した液を溶出液とする。

② 反応操作

①の a で得られた抽出液 10mL 又は①の b で得られた溶出液全容量を正確にとり、これに硫酸試液 2mL 及びヘキサン 5mL を加えた後、次亜塩素酸ナトリウム試液 1mL 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 w/v %炭酸水素ナトリウム溶液 25mL を加えて 1 分間振とうする。ヘキサン層を分取し、試験溶液とする¹⁰⁾。

(3) 検量線用標準溶液の調製¹¹⁾

サイクラミン酸ナトリウム 112.0mg を量り、水を加えて正確に 100mL とする。その 10mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL としたものを標準溶液とする (濃度 100 μ g/mL)。標準溶液 0.5、1、2、10、20 及び 50mL を正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に 100mL とし (濃度 0.5~50 μ g/mL)、それぞれ 10mL を (2) 試験溶液の調製②反応操作の項に従って操作し、検量線用標準溶液とする。

(4) 測定法

① 測定条件¹²⁾

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 (粒径 5 μ m)

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150~250mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル/水混液 (7 : 3)

流速：1.0mL/分

測定波長：314nm

注入量：20 μ L

② 検量線¹³⁾

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^{14~17)}

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サイクラミン酸濃度 (μ g/mL) を求め、次式によって試料中のサイクラミン酸含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{サイクラミン酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200}{W \times 1000} \quad (\text{透析法})$$

$$\text{サイクラミン酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100}{W \times 1000} \quad (\text{水抽出法})$$

C : 試験溶液中のサイクラミン酸濃度 (μ 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. サイクラミン酸ナトリウム：[特級]（シクロヘキシルアミドスルホン酸ナトリウム）
2. 塩酸：[特級]
3. 塩化ナトリウム：[特級]
4. 透析内液：塩化ナトリウム 100g 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て片端を結んで閉じる。
7. 逆相固相抽出カラム（900mg）：オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム（900mg）。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。
8. 強陰イオン交換型固相抽出カラム：トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル固相抽出カラム（500mg）、アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲル固相抽出カラム（360mg）等。カラムの交換容量が 0.1mEq 相当のもの。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。
9. 硫酸：[特級]
10. 硫酸試液：硫酸 50mL を水 50mL に、冷却、かくはんしながら少しずつ加える¹⁸⁾。
11. ヘキサン：[高速液体クロマトグラフィー用] 又は [特級]
12. 次亜塩素酸ナトリウム溶液：[化学用、有効塩素 5.0%以上]
13. 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。
14. 炭酸水素ナトリウム：[特級]
15. 5%炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム 5g を水に溶かして 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]

[注]

- 1) 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。
- 2) 試料を秤量後に、試料が炭酸又はエタノールを多く含む場合は少量の水を加え加温して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。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。
- 3) 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。
- 4) 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。

- 5) 試料、透析内液、透析外液の合計量。
- 6) 透析膜チューブの実効長約 15cm の場合、サイクラミン酸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、透析膜チューブとして実効長 55cm のものを用いて、密栓できる目盛り付き容器に入れ、チューブを吊るさずに、30 分毎に容器を転倒する方法では、4 時間の透析で、上記の方法と同等以上の回収率が得られる（注表 1）。

注表 1 サイクラミン酸の各種食品での添加回収率*1

| 試料 | 透析法 1 *2 | | | | 透析法 2 *3 | | | |
|----------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| | 0.005 g/kg 添加 | | 0.020 g/kg 添加 | | 0.005 g/kg 添加 | | 0.020 g/kg 添加 | |
| | 回収率 (%) | RSD*4 (%) | 回収率 (%) | RSD*4 (%) | 回収率 (%) | RSD*4 (%) | 回収率 (%) | RSD*4 (%) |
| たくあん漬け | 101.0 | 3.8 | 97.7 | 1.6 | 101.6 | 3.2 | 97.8 | 0.7 |
| オレンジジュース | 103.1 | 2.5 | 98.3 | 1.7 | 100.6 | 4.0 | 104.1 | 3.2 |
| クッキー | 104.9 | 2.8 | 101.5 | 3.0 | 112.7 | 2.1 | 106.3 | 3.8 |
| ヨーグルト | 98.0 | 3.6 | 97.4 | 1.7 | 95.9 | 5.3 | 100.3 | 5.4 |
| 米酢 | 94.9 | 4.1 | 92.8 | 1.2 | 94.4 | 4.5 | 95.3 | 1.8 |

*1 5 試行の平均値、*2 透析時間 4 時間、チューブ実効長 約 55 cm、

*3 透析時間 48 時間、チューブ実効長 約 15cm、*4 相対標準偏差

- 7) 澄明な抽出液が得られる試料については、水抽出法を用いることができる。スクリーニング試験として、反応操作に抽出液を用い、液体クロマトグラフィーを実施し、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、カラムによる精製操作を実施する。なお、食酢等の pH の低い食品は、水抽出法で、固相抽出で回収率が低下する事例が報告されている^{文献1、文献2}。固相抽出カラム負荷前の液の pH を 5～7 に調整することで回収率が向上する可能性がある^{文献3}。
- 8) 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、強陰イオン交換固相抽出カラム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、抽出液を適時希釈してからカラムに負荷させるようにする。なお、定量計算の際は希釈倍率を乗じて含量を求める。
- 9) カラム内に空気が入らないように注意する。
- 10) エマルジョン生成により試験溶液を採取できない場合は、エマルジョン部分を遠心管に採取し、必要な場合は適量の硫酸ナトリウムを添加し、遠心後、上清液を採取する。また、エマルジョンを含む全液を、シリンジを用いて加圧してフィルターでろ過することにより、エマルジョンを取り除くことができる。ヘキサン溶液なので、減圧ろ過するとへ

キサンの揮発して、濃度が変化するおそれがあるため、減圧ろ過は望ましくない。

- 11) 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。
- 12) 測定条件は例示である。分析の際は、サイクラミン酸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。妨害ピークが認められる場合は、カラムを変更したり、参考法に示すサイクラミン酸確認分析法や既報^{文献1、文献4、文献5}の分析法等を参照したりすることで、できるだけ影響を除いて測定できる分析法を適用する。ただし、希釈して測定する方法では、導入量を増やさない場合、定量限界濃度が高くなる点に留意が必要である。
- 13) 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。
- 14) 精度管理では0.020 g/kgでの添加回収率を求めることとする。
- 15) 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、固体試料等では試料体積を含めない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。
- 16) 本法による添加回収試験の結果を注表2に示す。

注表2 サイクラミン酸の各種食品での添加回収率*1

| 試料 | 透析法*2 | | 水抽出法 | |
|------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| | 0.010 g/kg 添加 | | 0.010 g/kg 添加 | |
| | 回収率 (%) | RSD*3 (%) | 回収率 (%) | RSD*3 (%) |
| たけのこ水煮 | 85.3 | 1.8 | 97.7 | 2.4 |
| チョコチップクッキー | 95.1 | 1.3 | 95.0 | 1.6 |
| ジャム | 98.3 | 1.8 | 103.8 | 2.3 |
| ヨーグルト | 91.2 | 6.0 | —*4 | — |
| 紹興酒 | 92.6 | 1.2 | — | — |

*1 5 試行の平均値、*2 透析時間 30 時間、チューブ実効長 約 15 cm、

*3 相対標準偏差、*4—：実施していない

- 17) 茶からの抽出物を粉末化した製品等では、(2)②の反応が上手くいかず、本法による検出が困難であることが報告されている^{文献4}。こうした試料では、既報^{文献2、文献4~文献7}の分析法等を参照し、添加試験でできるだけ回収可能な分析法を適用する。ただし、希釈して測定する方法では、導入量を増やさない場合、定量限界濃度が高くなる点に留意が必要である。
- 18) 水に硫酸を入れると激しく反応して発熱して突沸する場合もあるので、氷水等で冷却し、かくはんしながら少しずつ硫酸を加えることにより、発熱を抑え、突沸しないようにする。

[文献]

- 1) 石井里枝：微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の妥当性評価法に関する研究（研究分担報告書）、令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業）食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究（研究代表 渡辺卓穂）研究分担報告書、115（2021）
- 2) 山口之彦ら：大阪市立環科研報告、**72**、13（2010）
- 3) 石井里枝：微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の妥当性評価法に関する研究（研究分担報告書）、令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業）食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究（研究代表 渡辺卓穂）、110（2022）
- 4) 朝倉敬行ら：日食化誌、**24**、82（2017）
- 5) 大門拓実ら：食衛誌、**60**、68（2019）
- 6) 松本ひろ子ら：東京都健康安全研究センター年報、**59**、129（2008）
- 7) 山口瑞香ら：大阪府公衆衛生研究所年報、**49**、7（2011）

参考

サイクラミン酸確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のサイクラミン酸は、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(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⁾

サイクラミン酸及びその塩類分析法(2)試験溶液の調製 ①抽出を準用して調製し、a 透析法で得られる抽出液又はb 水抽出法で得られる溶出液を試験溶液とする。

(3) 標準溶液の調製¹⁾

サイクラミン酸ナトリウム 112.0mg を量り、水を加えて正確に 100mL とする(濃度 1000 μ g/mL)。この液を水で適宜希釈し、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^{2,3)}

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 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: メタノール/0.1 vol%ギ酸混液(3:2)

流速: 0.2mL/分

イオン化モード: ESI (-)

検出法: スキャン(m/z 50~200)、

選択イオンモニタリング(SIM)(モニターイオン: m/z 178)

選択反応モニタリング(SRM)

(モニターイオン:プリカーサーイオン m/z 178、プロダクトイオン m/z 80)

注入量: 10 μ L

② 定性⁴⁾

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。また、LC-MSを用いる場合は、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. サイクラミン酸及びその塩類分析法の試薬・試液等を準用する
2. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
3. ギ酸：[98%、特級]
4. 0.1 vol%ギ酸：ギ酸1 mLに水を加えて1000mLとする。

[注]

- 1) 質量分析計の感度に応じて適宜希釈又は注入量を減らすこと。
- 2) 測定条件は例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、サイクラミン酸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。
- 3) 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。
- 4) 食品中の夾雑物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検量線用標準溶液を添加し、ピークが検出されることを確認する。

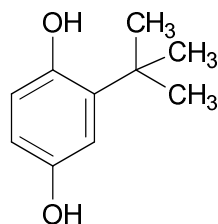
未指定添加物

tert-ブチルヒドロキノン

Tertiary Butylhydroquinone

別名：ターシャリーブチルヒドロキノン

略名：TBHQ



$C_{10}H_{14}O_2$: 166.22

1. 分析法の概要

食品中の *tert*-ブチルヒドロキノンを分析する方法である。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°C 〜 -5°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。(2005年改正、2023年改正)

2. 分析法 (液体クロマトグラフィー) ¹⁾、文献1、文献2)

(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、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分析法の分析法Bの (1) 及び (2) ²⁾を準用する。

(3) 検量線用標準溶液の調製 ³⁾

tert-ブチルヒドロキノン 0.100 g を量り、0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール ⁴⁾に溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする (濃度 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。標準原液 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正確に 100mL としたものを標準溶液とする (濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。標準溶液 0.1、0.5、1、2 及び 5mL 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 (濃度 1〜50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

(4) 測定法

① 測定条件 ⁵⁾

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分析法の分析法B（4）測定法の①測定条件を準用する。ただし、蛍光検出器を用い、励起波長 280nm、蛍光波長 325nm により検出して測定する⁶⁾。

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、得られたピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する⁷⁾。

③ 定量^{8、9)}

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線によって試験溶液中の *tert*-ブチルヒドロキノンの濃度を求め、次式によって試料中の含量（g/kg）を計算する。

$$tert\text{-ブチルヒドロキノン含量 (g/kg)} = \frac{C \times 5}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の *tert*-ブチルヒドロキノンの濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）

W：試料の採取量（g）

④ 定量限界 0.001 g/kg

試薬・試液等

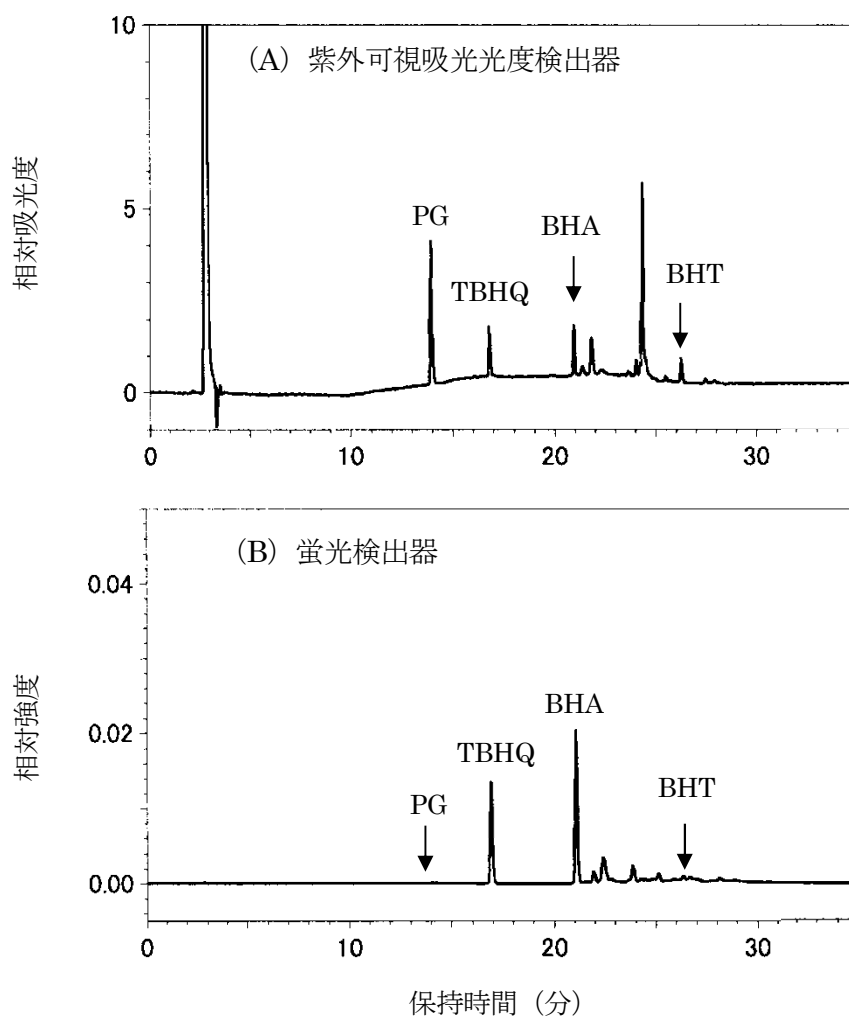
1. *tert*-ブチルヒドロキノン：市販品を用いる。
2. ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピル分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

- 1) 本法はブチルヒドロキシアニソールの同時分析が可能である。また、蛍光検出器と紫外可視吸光光度検出器とを直列に接続することにより、*tert*-ブチルヒドロキノンのほかに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同時分析が可能である。また、*tert*-ブチルヒドロキノン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) 試験溶液中の *tert*-ブチルヒドロキノ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^{10)、文献³⁾}。
- 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、調整してもよい。
- 4) 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、むしろ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もある^{文献3)}。

- 5) 測定条件は例示である。分析の際は、*tert*-ブチルヒドロキノン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。
- 6) 選択性は少し低下するが、紫外可視吸光光度検出器付液体クロマトグラフでも測定可能である。測定波長は、280nmを用いる。
- 7) 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。
- 8) 標準溶液のクロマトグラムの一例を注図1に示す。



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トルエン

注図1 標準溶液 (各 1.0µg/mL) の液体クロマトグラム

<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℃

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 |

流速：0.2mL/分

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（励起波長：280nm、蛍光波長：325nm）

注入量：5µL

9) 本法の添加回収試験結果を注表1に示す。

注表1 tert-ブチルヒドロキノンの各種食品での添加回収率（n=5）

| 食品 | 添加量 ¹¹⁾ (g/kg) | 回収率 (%) | 相対標準偏差 (%) |
|---------|------------------------------|------------|---------------|
| バター | 0.02 | 92 | 4.7 |
| オリーブ油 | 0.02 | 95 | 5.6 |
| ポテトチップス | 0.02 | 100 | 6.8 |
| 煮干し | 0.02 | 95 | 5.6 |

10) 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、0.02g/kg¹¹⁾の濃度での tert-ブチルヒドロキノンの添加回収試験（2名、n=3×3日）をしたところ、蛍光検出器での検出による真度は、なたね油で102%、クラッカーで89%、煮干しで79%、紫外可視吸光光度検出器での検出による真度は、なたね油で102%、クラッカーで88%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5µm）、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：5µL

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（励起波長：280nm、蛍光波長：325nm）

11) *tert*-ブチルヒドロキノンは、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）

参考

tert-ブチルヒドロキノン確認分析法

1. 試験法の概要

食品中の *tert*-ブチルヒドロキノン は、ガスクロマトグラフィー質量分析又はガスクロマトグラフィーにより確認を行う¹⁾。(2005年設定、2023年改正)

2. 分析法 (ガスクロマトグラフィー質量分析又は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

tert-ブチルヒドロキノン分析法の(2)試験溶液の調製で調製した試験溶液2mLを正確にとり、減圧下40℃で溶媒を留去する。残留物にアセトンを正確に2mL加えてよく振り混ぜて溶解したものを試験溶液とする²⁾。

(3) 標準溶液の調製

tert-ブチルヒドロキノン分析法の(3)検量線用標準溶液の調製で調製した検量線用標準溶液各2mLを正確にとり、減圧下40℃で溶媒を留去する。各残留物にアセトンを正確にそれぞれ2mLずつ加えてよく振り混ぜて溶解し、定性に適した濃度の標準溶液を調製する²⁾。

(4) 測定法

① 測定条件³⁾

ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)又は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14%シアノプロピルフェニル86%メチルポリシロキサンを0.25µmの厚さで被覆したもの。

カラム温度：60℃(2分)、60→250℃(10℃/分、昇温)、250℃(3分)

注入口温度：270℃(GC-MS)、250℃(GC-FID)

イオン源温度：280℃(GC-MS)

キャリアーガス：ヘリウム又は窒素

流量：*tert*-ブチルヒドロキノンの保持時間が約18分になるように調整する。

注入方式：スプリットレス

検出器温度：250℃(GC-FID)

イオン化モード(電圧)：EI(70eV)

検出法：GC-MS：スキャン(m/z 50~300)、

選択イオンモニタリング(SIM) (モニターイオン： m/z 166、123、151)

GC-FID：水素炎イオン化検出

注入量：1 μ L

② 定性^{4~6)}

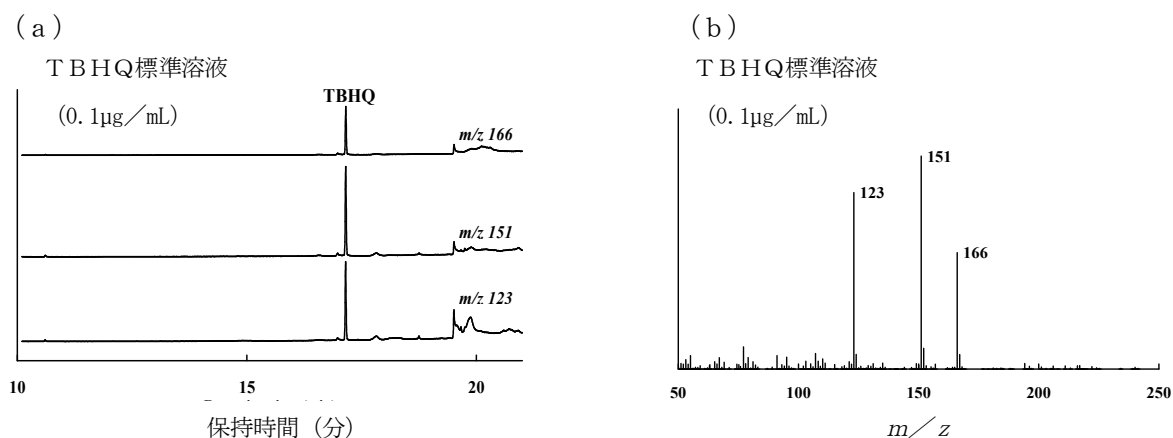
試験溶液をGC-MS又はGC-FIDに注入し、クロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されることを確認する。また、GC-MSの場合は、このピークのスキャン検出で得られるマススペクトル上の主要ピークの強度比が標準溶液と一致することを確認する。

試薬・試液等

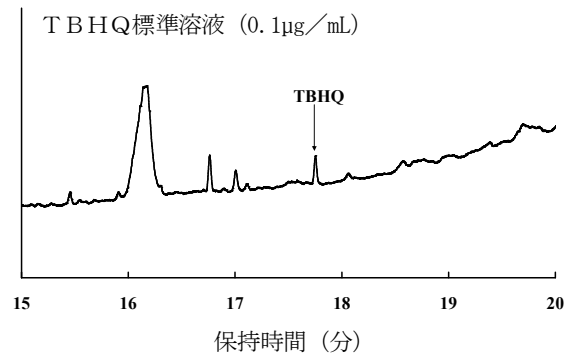
1. アセトン：[残留農薬試験用]
2. *tert*-ブチルヒドロキノン分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

- 1) 本法は、*tert*-ブチルヒドロキノンの確認を目的とした分析法である。
- 2) 必要があれば、メンブランフィルター (0.45 μ m、親水性ポリテトラフルオロエチレン) でろ過する。
- 3) 測定条件は例示である。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となるように予め最適化を行う。
- 4) GC-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クス効果により確認を見誤る恐れがあるため、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。
- 5) GC-FIDでは、食品中の夾雑成分の影響により確認が不明瞭となる場合がある。その場合はGC-MSにより確認を行う。
- 6) GC-MSによる分析例を注図1に、GC-FIDによる分析例を注図2に、示す。



注図1 *tert*-ブチルヒドロキノン (TBHQ) のGC-MSによるクロマトグラム (a) 及びマススペクトル (b)



注図2 *tert*-ブチルヒドロキノン (TBHQ) のGC-FIDによるクロマトグラム