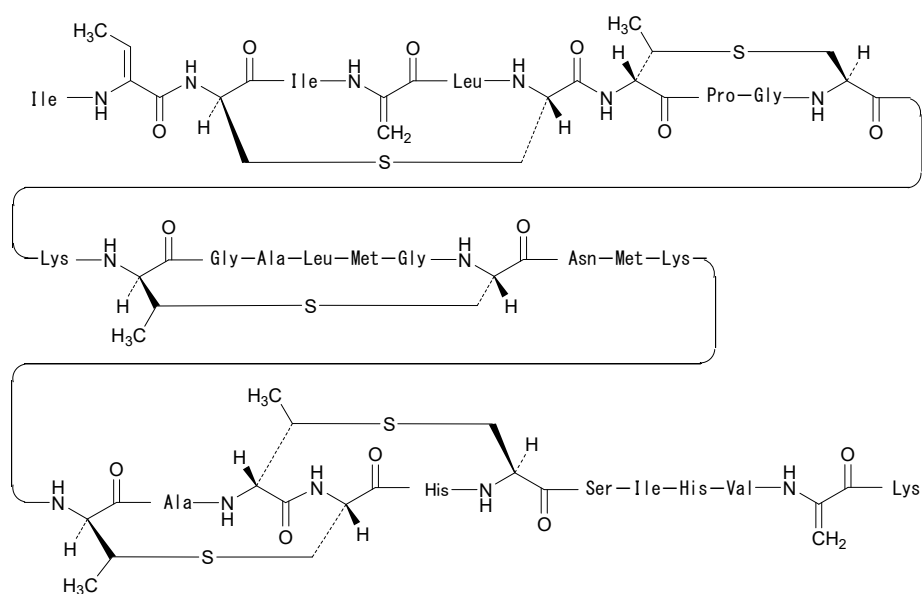


保存料

ナイシン

Nisin



$$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7 : 3354.07$$

1. 分析法の概要

食品中のナイシン¹⁾は、メタノール/水/ギ酸混液（5：4：1）で抽出し、ポリマー固相抽出カラム、弱陽イオン交換固相抽出カラムで精製した後、液体クロマトグラフィー質量分析により定性し、定量する。

同時に多数の検体の試験を行う等スクリーニング法を併用した方が効率的と判断される場合には、ナイシンスクリーニング法（微生物学的定量法）を用いて陽性と判断されたものについてのみ本分析法による試験を実施しても差し支えない。（2009年設定、2019年改正）

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 抽出

試料約 20 g を精密に量り、ヘキサン 20 mL 及びメタノール/水/ギ酸混液（5：4：1）20 mL を加え²⁾、室温で 3 分間ホモジナイズする。遠心（20 分間、10000 回転/分、5℃）

3)後、上清を分液漏斗に移し、下層を 50mL のメスフラスコに移す。沈殿物にヘキサン 20mL 及びメタノール／水／ギ酸混液（5：4：1）20mL を加え、同様にホモジナイズ及び遠心を行い、上清を分液漏斗に合わせ、下層を先のメスフラスコに移す。さらに、沈殿物にヘキサン 20mL 及びメタノール／水／ギ酸混液（5：4：1）20mL を加え、同様の操作を繰り返す。分液漏斗の下層を先のメスフラスコに移し、メタノール／水／ギ酸混液（5：4：1）を加えて正確に 50mL とし、メンブランフィルター（0.45 μ m、ポリフッ化ビニリデン製）⁴⁾でろ過したものを抽出液とする。

② 精製

（a）ポリマー固相抽出カラム

ポリマー固相抽出カラムに、①で得られた抽出液 5 mL に水 15mL を加えて混和した液を負荷した後、容器を 0.1vol%ギ酸含有 12.5vol%メタノール溶液 15mL で洗い、カラムに注入し、洗液は捨てる。0.1vol%ギ酸含有メタノール溶液 10mL をカラムに注入し、溶出液に 50mmol/L リン酸緩衝液（pH5.6）10mL を加える。

（b）弱陽イオン交換固相抽出カラム⁵⁾

弱陽イオン交換固相抽出カラムに、a で得られた溶液を負荷した後、容器をメタノール／リン酸緩衝液混液（1：1）10mL で洗い、カラムに注入し、洗液は捨てる。次いでメタノール 5 mL を注入し、流出液は捨てる⁶⁾。次いで、アンモニア含有メタノール試液 4.5mL をカラムに注入する。溶出液は、あらかじめギ酸 200 μ L を入れた容器に受け⁷⁾、メタノールを加えて正確に 5 mL としたものを試験溶液とする。

（3）定性用標準溶液の調製

100000 単位に対応する⁸⁾ナイシン標準品⁹⁾を量り、0.1vol%ギ酸を加えて溶かして正確に 10mL とし、標準原液とする（濃度 10000 単位/mL）。標準原液 1 mL をとり、0.1vol%ギ酸に溶かして 10mL とし、定性用標準溶液とする（濃度 1000 単位/mL）。

（4）定量用標準試験溶液の調製

（3）の標準原液 20 μ L をとり、試験溶液を加えて 1.0mL とする（濃度 200 単位/mL）。この液 0.5mL をとり、試験溶液を加えて 1.0mL とする（濃度 100 単位/mL）。この操作を繰り返し、25、50、100、200 単位/mL の定量用標準試験溶液とする。

（5）測定法

① 測定条件^{10, 11)}

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¹²⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 2.0～4.6mm、長さ 150～250mm

カラム温度：40°C

移動相：A液 0.1vol%ギ酸¹³⁾

B液 0.1vol%ギ酸¹³⁾含有アセトニトリル¹⁴⁾

リニアグラジエントの条件¹⁵⁾

分	A (%)	B (%)
0	90	10
20	50	50

流速：0.5mL/分

イオン化モード：ESI (+)

検出法：スキャン (m/z 100 ~ 2000) 又は選択イオン検出 (SIM)

主なイオン： m/z 1119、839、672

注入量：30 μ L¹⁶⁾

② 定性¹⁷⁾

試験溶液及び定性用標準溶液をそれぞれLC-MSに注入し、クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が定性用標準溶液と一致すること及びマススペクトルの主要ピーク (m/z 1119、839、672) の強度比が定性用標準溶液と一致することを確認する。

③ 定量 (標準添加法)^{18,19)}

試験溶液及び定量用標準試験溶液をそれぞれLC-MSに注入し、モニターイオン (m/z 1119) より得られたクロマトグラムより試験溶液及び定量用標準試験溶液のナイシンAのピーク面積を求め、試験溶液及び各定量用標準試験溶液中のナイシン添加濃度 (単位/mL) を横軸に、ナイシンAのピーク面積を縦軸にとり、関係線を作成する。関係線の横軸との交点と原点との距離から、試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL) を求め、次式²⁰⁾によって試料中のナイシンAを含む抗菌性ポリペプチドの含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ナイシンAを主とする抗菌性ポリペプチドの含量 (g/kg)} = \frac{C \times 50 \times 2.5 \times 10^{-5}}{W}$$

C：試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL)

W：試料の採取量 (g)

④ 定量限界 ナイシンAを含む抗菌性ポリペプチドとして0.002 g/kg

試薬・試液等

1. ナイシン標準品：[食品添加物公定書標準品]²¹⁾

2. ヘキサン：[特級]
3. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
4. ギ酸：[98%、特級]
5. ポリマー固相抽出カラム：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（1 g、20cc）。あらかじめメタノール 10mL 及び 0.1vol% ギ酸含有 12.5vol% メタノール溶液 10mL でコンディショニングしておく。
6. 12.5vol% メタノール：メタノール 125mL に水を加えて 1 L とする。
7. 0.1vol% ギ酸含有 12.5vol% メタノール溶液：ギ酸 1 mL に 12.5vol% メタノールを加えて 1 L とする。
8. 0.1vol% ギ酸含有メタノール溶液：ギ酸 1 mL にメタノールを加えて 1 L とする。
9. リン酸二水素カリウム：[特級]
10. リン酸水素二カリウム：[特級]
11. 50mmol/L リン酸緩衝液（pH5.6）：50mmol/L リン酸二水素カリウム溶液に 50mmol/L リン酸水素二カリウム溶液を加えて pH5.6 に調整する。
12. 弱陽イオン交換固相抽出カラム：モノカルボキシシリル化ポリマー被覆シリカゲル固相抽出カラム（360mg）。あらかじめメタノール 3mL 及びメタノール/リン酸緩衝液（pH5.6）混液（1：1）3mL でコンディショニングしておく。
13. メタノール/リン酸緩衝液混液（1：1）：メタノールと 50mmol/L リン酸緩衝液（pH5.6）を 1：1 で混ぜ合わせる。
14. アンモニア水：[25.0~27.9%、特級]
15. アンモニア含有メタノール試液：アンモニア水 2.4mL にメタノールを加え 30mL とする。
16. 0.1vol% ギ酸：ギ酸 1mL に水を加えて 1 L とする。
17. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
18. 0.1vol% ギ酸含有アセトニトリル：ギ酸 1 mL にアセトニトリルを加えて 1L とする。

[注]

- 1) ナイシンは、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドと塩化ナトリウムの混合物である。主たる抗菌性ポリペプチドはナイシン A（ $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ）である。ナイシン A は、34 アミノ酸残基からなり、分子量 3354Da である。活性型分子にランチオン、 β -メチルランチオン、デヒドロアラニン、デヒドロブチリンが含まれることが特徴である。ナイシン A の N 末端から 27 番目のヒスチジンがアスパラギンで置換されたものがナイシン Z である。なお、食品添加物として指定されているのはナイシン A である。
- 2) 液卵の場合は、メタノール/水/ギ酸混液（5：4：1）による膨潤を防ぐために、溶媒を加える前に試料を 100°C で 10 分間加熱し液卵を凝固させる。ナイシンの安定性を検討するために、0.1vol% ギ酸に溶解させたナイシン標準品を 100°C で 10 分間加熱しフォトダ

イオードアレイ検出器付液体クロマトグラフを用いて測定したところ、ナイシンAは安定であった。

- 3) 遠心管としてメタノール、ギ酸、ヘキサンに対して耐性のあるものを使用する。ポリプロマー製のもの等が使用できる。
- 4) ナイシンの吸着を防ぐため、low protein binding と表記されているものを使用する。
- 5) 弱陽イオン交換固相抽出カラムにより、ナイシンAのピーク近傍に出現する（用いるC₁₈系カラムによってはナイシンAと重なる場合がある）プロセスチーズ由来の大きな夾雑ピークが除去される。
- 6) カラムを乾燥させるため、空気を5 mL 注入する。
- 7) ナイシンは弱酸性（pH 3～4）で最も安定であることから、溶出液はギ酸を入れた容器に受ける。
- 8) 標準品の表示力価に従い、採取量を計算する。1 mg 当たり 1000 単位の場合、採取量は0.1 g である。
- 9) ナイシンの力価1単位はナイシンA（C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇）を含む抗菌性ポリペプチド0.025μg に対応する。
- 10) 吸着を防ぐため、配管はピーク製を用いる。
- 11) 測定条件は例示である。用いるカラムによって流速及びグラジエント条件を調整する。また、コーン電圧は m/z 1119 が最大になる点を設定する。
- 12) 他の測定条件の例を以下に示す。

カラム：マクロポーラス型スチレンジビニルベンゼン充填カラム（2 mm×150mm、粒径3 μm）

カラム温度：40℃

移動相：A液 5 vol%ギ酸 0.1 vol% TFA 水溶液

B液 アセトニトリル

C液 水

リニアグラジエントの条件

分	A (%)	B (%)	C (%)
0	5	20	75
13	5	35	60
14	5	95	0
18	5	95	0
19	5	20	75
30	5	20	75

流速：0.2 mL/分

注入量：10 μL

イオン化モード：ESI (+)

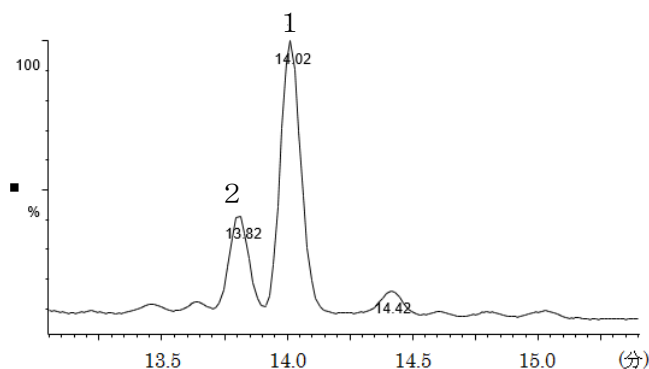
検出法：選択イオン検出法（S I M）
 モニターイオン： m/z 839 及び 1119
 ソース温度：150℃
 コーン電圧：40V
 コーン窒素流量：60 L/時
 デソルベーション窒素流量：600 L/時
 デソルベーション温度：400℃
 キャピラリー電圧：4.00kV

- 13) ギ酸濃度を上げると3価イオンが出やすくなる。
- 14) 代替溶媒としてメタノールを用いることができるが、ピークが広がり、高濃度のナイシンAの定量性が低下する場合がありますので注意して用いる。
- 15) 定量（検出法：S I M）には次のリニアグラジエントの条件を用いてもよい。

リニアグラジエントの条件

分	A (%)	B (%)
0	77.5	22.5
7.5	70	30
12.5	0	100

- 16) 装置の感度により注入量は変更してもよい。
- 17) ナイシンの主な抗菌性ペプチドはナイシンAであるが、ナイシン標準品中にはナイシンAから派生したと思われる類縁体が複数含まれている。ナイシン標準原液（10000 単位/mL）のクロマトグラムを注図1に示す。ナイシンAより分子量が18 大きい類縁体がナイシンAより保持時間で20 秒ほど前に観測される。

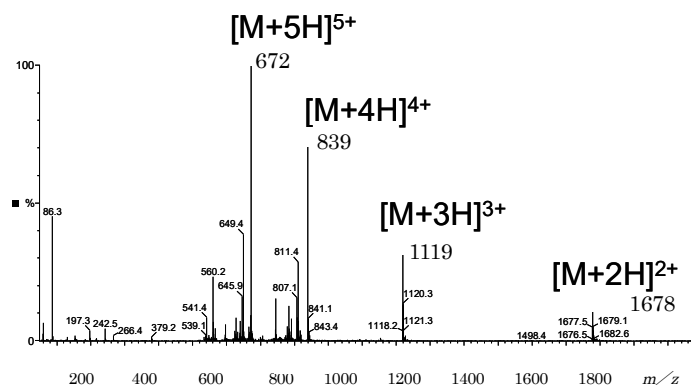


1. ナイシンA、2. ナイシンAに水が1分子付加したもの（分子量3372）

カラム：タンパク質分離用逆相カラム（4.6 mm×250 mm、粒径5 μm）、カラム温度：40℃、移動相：A液 0.1vol%ギ酸、B液 0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル、リニアグラジエントの条件：B=22.5%からB=30%までのリニアグラジエント7.5分間、次いで、B=30%から100%までのリニアグラジエント5分間、流速：0.5mL/分、検出器：フォトダイオードアレイ検出器

注図1 ナイシン標準原液（10000 単位/mL）のクロマトグラム（測定波長210 nm）

ナイシンAについて、ESI (+)でのスキャン測定の結果を注図2に示す。ナイシンA (分子量: 3354) は3価イオン (m/z 1119) の他に、4価 (m/z 839) 及び5価イオン (m/z 672) が観察される。



ESI (+) スキャン測定 (40V)

注図2 ナイシンAの多価イオンピークプロファイル

- 18) 0.1vol%ギ酸で検量線用標準溶液を調製した場合、低濃度 (25~200 単位/mL) の範囲では累乗曲線に近似し直線性を示さない。これはタンパク質であるナイシンが、液体クロマトグラフの流路等に非特異的に吸着するためと推察される。また、食品由来成分によりナイシンAのイオン強度が影響を受けるため、標準添加法により定量を行う。
- 19) 種々の食品についてのナイシンの添加回収率を注表1に示す。本分析法における回収率は、標準品のみを使った際に50%、食品からの添加回収では30~50%である。これは抗菌性ポリペプチドの器具等への非選択的な吸着によるためと考えられる。

注表1 ナイシンの各食品での回収率

食品	添加量 (g/kg)	回収率 (%) *
ナチュラルチーズ	0.01250	34.0±5.6
ソーセージ	0.01250	44.9±4.1
ハム	0.01250	47.7±3.7
ホイップクリーム	0.01250	39.2±1.6
ケチャップ	0.01000	30.6±3.6
マヨネーズ	0.01000	59.4±9.4
プロセスチーズ	0.00625	28.9±6.7
クリームパン	0.00625	49.4±7.2
液卵	0.00500	43.9±3.4

味噌	0.00500	40.7±4.2
タピオカプティング	0.00300	60.5±0.9

*3 試行の平均値±S.D

20)

$$\text{ナイシンAを主とする抗菌性ポリペプチドの含量 (g/kg)} = \frac{C \times 50 \times 0.025}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL)

W : 試料の採取量 (g)

21) 一般財団法人医薬品医療機器レギュレーターリーサイエンス財団より製造・頒布されている。ナイシン標準品は *Lactococcus lactis subsp. lactis* の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドの塩化ナトリウムとの混合物である。糖培地由来の成分を含む。

ナイシンスクリーニング法（微生物学的定量法）

1. 材料

（1）試験菌

Micrococcus luteus（ATCC 10240、NCIB 8166、NBRC 13867）¹⁾を使用する。

（2）培地

培地の液性は水酸化ナトリウム試液又は塩酸（1→10）を用いて調整する。なお、規定の培地と類似の成分を有し、同等又はより優れた菌の発育を示すほかの培地を用いることができる。滅菌は高圧蒸気法で行う。

① 種層用寒天培地

トリプトン 10 g
肉エキス 3 g
塩化ナトリウム 3 g
酵母エキス 1.5 g
スクロース 1 g
寒天 15 g
水 1000mL

全成分を混和し、121℃、15分間滅菌する。滅菌後のpHは7.4～7.6とする。滅菌後、培地と同温度の50%ポリソルベート20溶液を2mL添加する。

② 試験菌移植用斜面寒天培地

ブレインハートインフュージョン寒天 52 g²⁾
水 1000mL

全成分を混和し、121℃、15分間滅菌する。滅菌後のpHは7.2～7.6とする。この寒天培地9mLを内径約16mmの試験管に分注して斜面培地とする。

2. 試験菌の継代保存

試験菌移植用斜面寒天培地により試験菌を30℃³⁾で培養する。継代移植は1ヵ月から1ヵ月半の間隔で行う。

3. 試験菌液の調製

試験菌を試験菌移植用斜面寒天培地を用いて30℃で48時間培養する。この菌⁴⁾を滅菌した生理食塩水7mLに懸濁させ、試験菌液とする。

4. 種層寒天培地の調製

試験菌液を滅菌した生理食塩水で希釈した液（1→10）2mLを48～51℃に保った種層用寒天

培地 100mL に加え⁵⁾、十分に混合し、種層寒天培地とする。

5. 穿孔寒天平板の調製

滅菌した内径 90±1 mm、高さ 15~20mm のペトリ皿に約 20mL の種層寒天培地を入れ⁶⁾、寒天が水平になるように広げて固化させたものを種層寒天平板とする。種層寒天平板上の半径約 25~28mm の円周上に、円筒⁷⁾をその中心間の距離が 30mm 以上となるように一定間隔で 4 個並べる。円筒を置いた状態で種層寒天培地 20mL を分注し、固化させた後、4℃にて 30~60 分保持し、滅菌したピンセット等を用いて培地より円筒を静かに抜き、穿孔寒天平板とする。

6. ナイシン標準溶液の調製

100000 単位に対応する⁸⁾ナイシン標準品⁹⁾を量り、塩酸 (1→600) 80mL に懸濁する。2 時間室温におき、塩酸 (1→600) を加えて正確に 100mL とし、これを標準原液とする。さらに 0.625、1.25、2.5、5、10 (単位/mL) となるよう、標準原液を塩酸 (1→600) を用いて希釈し、標準溶液とする。

7. ナイシン標準曲線の作成

穿孔寒天平板 5 枚を 1 組として用いる。ナイシン標準溶液を濃度ごとに異なる穿孔寒天平板の 4 ヲ所の穴に 0.2mL ずつ入れる。標準溶液分注後、ふたをし、30℃³⁾で 18 時間¹⁰⁾培養する。培養後、形成された阻止円の直径をノギスを用いて 0.1mm 単位で測定する。ナイシン濃度 x (単位/mL) の常用対数値 $\log x$ を横軸に、阻止円の直径 y (mm) を縦軸にとり、ナイシン標準曲線 ($y = \alpha \log x + \beta$) を作成し、定数 α 及び β を求める。

8. 食品中のナイシンの定量

試料¹¹⁾ 5 g を 0.02mol/L 塩酸 25mL でホモジナイズ抽出する。遠心 (10 分間、3500 回転/分) 後、約 5℃に冷却して上層 (脂肪層) を固化して除き、得られた液を抽出液とする。抽出液 2mL を 0.02mol/L 塩酸 38mL で希釈後、2 つに分割し、一方は、1 mol/L 水酸化ナトリウムで pH11.0±0.1 に調整し、ナイシン確認用試験溶液とする。もう一方は、1 mol/L 塩酸で pH2.0±0.1 に調整し、ナイシン定量用試験溶液とする。pH 調整後、ナイシン確認用試験溶液及びナイシン定量用試験溶液を、それぞれ 10mL の試験管に 5mL 分注し、沸騰水中で 10 分間加熱する。室温に冷却した後、ナイシン標準曲線の手法に従い、培養を行う。ナイシン確認用試験溶液について、発育阻止円が認められないことを確認する¹²⁾。また、ナイシン定量用試験溶液について、穿孔寒天平板を用いて得られる試験菌の発育阻止円の直径を測定し¹³⁾、次式により、試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL) を求め、試料中の抗菌性ペプチド含量 (g/kg) を計算する¹⁴⁾。試料中のナイシン A を含む抗菌性ポリペプチドの含量が、0.00156 g/kg 以上となったものを陽性と判定する。

$$I = \frac{\text{阻止円の直径 (mm)} - \beta}{\alpha}$$

試料液のナイシン濃度 = 10^i (単位/mL)

$$\text{ナイシンAを含む抗菌性ポリペプチドの含量 (g/kg)} = \frac{C \times 1.25 \times 10^{-2}}{W}$$

C : 試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液等

1. ナイシン標準品 : [食品添加物公定書標準品]¹⁵⁾
2. 水酸化ナトリウム : [特級]
3. 水酸化ナトリウム試液 : 水酸化ナトリウム 4.3 g を水に溶かし、100mL とする。ポリエチレン瓶に保存する。
4. 塩酸 : [特級]
5. トリプトン : 市販品を用いる。
6. 肉エキス : 市販品を用いる。
7. 塩化ナトリウム : [特級] 又は [日局]
8. 酵母エキス : 市販品を用いる。
9. スクロース : 日本薬局方精製白糖を用いる。
10. 寒天 : [特級]
11. 50%ポリソルベート 20 溶液 : ポリソルベート 20 と水を 1 : 1 の質量比で混合し、121°C、15 分間高圧蒸気滅菌する。
12. ポリソルベート 20 : 市販品を用いる。
13. ブレインハートインフュージョン寒天 : 市販品を用いる。
14. 生理食塩水 : 日本薬局方生理食塩液を用いる。

[注]

- 1) 試験菌 *Micrococcus luteus* (ATCC 10240、NCIB 8166、NBRC 13867) は、独立行政法人製品評価技術基盤機構で分与 (有料) している。また、Micro BioLogics 社でも取り扱っている。
- 2) ブレインハートインフュージョン 37.0 g 及び寒天 15 g を用いてもよい。
- 3) 菌の生育状態により、30~35°C の一定温度としてもよい。

- 4) 18～24 時間の培養を 3 代継代し、斜面培地上に生えた 3 代目の菌を用いてもよい。
- 5) 標準溶液により明瞭でかつ適当な大きさの阻止円を形成する量の試験菌液を加える。希釈液の濃度は適宜調節してもよい。
- 6) 厚さが 2～3 mm となるようにする。
- 7) 外径 8.0±1 mm、内径 6.0±0.1mm、高さ 10.0±0.1mm のステンレス製のもの（ペニシリンカップ）を用いる。
- 8) 標準品の表示力価に従い、採取量を計算する。1 mg 当たり 1000 単位の場合、採取量は 0.1g である。
- 9) 主たる抗菌性ポリペプチドはナイシン A ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) であり、ナイシンの力価 1 単位は、ナイシン A ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) を含む抗菌性ポリペプチド 0.025 μ g に対応する。
- 10) 菌の生育状態により、18～24 時間の一定時間としてもよい。
- 11) 液卵は、鶏卵由来成分により阻止円が観測される場合がある。
- 12) ナイシンは、酸性では熱に強いが、アルカリ性では加熱により失活する。
- 13) 試料成分の影響により阻止円が大きく観測され、添加回収率が 200%以上となる場合がある。この様な場合は、試験抽出液を用いて検量線を作成する必要がある。
- 14)

$$\text{ナイシン A を含む抗菌性ポリペプチドの含量 (g/kg)} = \frac{C \times 40 \times 12.5 \times 0.025}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中のナイシン濃度 (単位/mL)

W : 試料の採取量 (g)

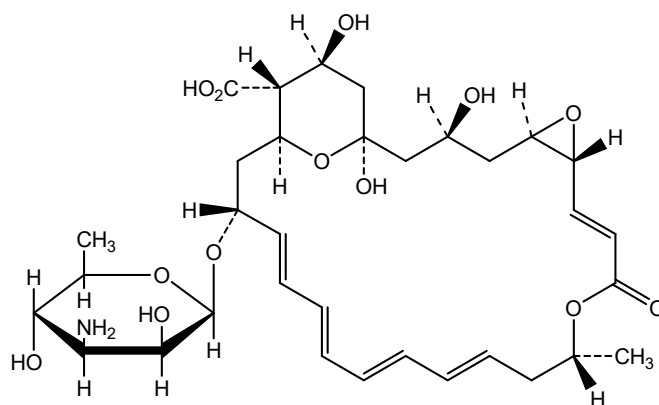
- 15) 一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団より製造・頒布されている。ナイシン標準品は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドの塩化ナトリウムとの混合物である。糖培地由来の成分を含む。

保存料

ナタマイシン

Natamycin

別名 ピマリシン



$C_{33}H_{47}NO_{13}$: 665.73

1. 分析法の概要

チーズ中のナタマイシンは、メタノールで抽出し、液体クロマトグラフィーにより定量する（分析法A）。ワイン中のナタマイシンは、逆相固相抽出カラムを用いて抽出精製し、液体クロマトグラフィーにより定量する（分析法B）。

ナタマイシンを特定する必要がある場合には、参考として示す分析法を用いることができる。（2005年設定、2010年改正、2019年改正）

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

分析法A（チーズ中の分析法）¹⁾

(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⁾。なお、次の諸点にも留意すること³⁾。

① ロットの中から1容器又は1包装のチーズを採取する際には、そのチーズの質量に対する表皮（リンド）の面積の割合が、ロット中のチーズの中で平均的なものを選定すること。

② ロットの中から選定したチーズから、その一部を採取する際には、チーズ全体の質量に対する採取した質量の割合と、チーズ全体に含まれる表皮の面積に対する採取した部分に含まれる表皮の面積の割合が、大きく異ならないようにすること。

③ 粉碎又は細切し均一とする前に、パラフィン等、明らかな非可食部を除くこと。

(2) 試験溶液の調製

試料約 10 g を精密に量り、100mL のホモジナイザーカップ又は 200mL の共栓付三角フラスコに入れ、メタノール 50mL を加え、ホモジナイズ（5 分間、10000 回転／分）又は振とう器で 90 分間振とうした後、水 25mL を加えて混和し、 -20°C の冷凍庫で 1 時間冷却する。冷却後、抽出液をろ紙でろ過し、ろ液の最初の 5mL を捨てる。残ったろ液をメンブランフィルター（0.45 μm 、溶媒系）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⁴⁾

ナタマイシン標準品 10.0mg を量り、メタノールを加えて溶かして正確に 20mL とし、保存用標準原液とする⁵⁾（濃度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。保存用標準原液 1 mL を正確にとり、メタノール／水混液（2：1）を加えて正確に 50mL とし、検量線用標準原液とする（濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。検量線用標準原液 1 mL を正確にとり、メタノール／水混液（2：1）を加えて正確に 100mL とし、また、検量線用標準原液 1、2、5 mL 及び 10mL をそれぞれ正確にとり、メタノール／水混液（2：1）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 0.1～5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

(4) 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⁷⁾：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 150mm

カラム温度： 40°C

移動相：メタノール／水／酢酸混液（50：50：5）

流速：1.0mL／分

測定波長：304nm

注入量：20 μL

② 検量線^{8、9)}

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、得られたピーク面積からナタマイシンの検量線を作成する。

③ 定量

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ナタマイシン濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を求め、次式によって試料中のナタマイシン含量（g／kg）を計算する。

$$\text{ナタマイシン含量 (g/kg)} = \frac{C \times 75}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中のナタマイシン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

W：試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.001 g/kg

分析法B（ワイン中の分析法）¹⁰⁾

(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⁾。

(2) 試験溶液の調製

逆相固相抽出カラムに、試料 10mL を正確にとり、負荷し、流出液は捨てる。次いで水/メタノール混液 (1 : 1) 10mL を注入し、洗液は捨てる¹¹⁾。次いでメタノール 2.5mL を注入し、溶出液を採取し¹²⁾、水を加えて正確に 5 mL とし、試験溶液とする¹³⁾。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

ナタマイシン標準品 10.0mg を量り、メタノールを加えて溶かして正確に 20mL とし、保存用標準原液とする⁵⁾ (濃度 $500\mu\text{g}/\text{mL}$)。保存用標準原液 1 mL を正確にとり、メタノール/水混液 (1 : 1) を加えて正確に 50mL とし、検量線用標準原液とする (濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$)。検量線用標準原液 1 mL 及び 2.5mL をそれぞれ正確にとり、メタノール/水混液 (1 : 1) を加えてそれぞれ正確に 100mL とし、また、検量線用標準原液 1、2 mL 及び 4mL をそれぞれ正確に量り、メタノール/水混液 (1 : 1) 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 (濃度約 $0.1\sim 2.0\mu\text{g}/\text{mL}$)。

(4) 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¹⁴⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 $5\mu\text{m}$)

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150mm

カラム温度： 40°C

移動相¹⁵⁾：水/メタノール/アセトニトリル/酢酸混液 (60 : 20 : 15 : 5)

流速：1.0mL/分

測定波長¹⁶⁾：304nm

注入量：20 μL

② 検量線^{8, 17)}

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、得られたピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{18, 19)}

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ナタマイシン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式によって試料中のナタマイシン含量 (mg/L) を計算する。

$$\text{ナタマイシン含量 (mg/L)} = \frac{C \times V}{W}$$

C : 試験溶液中のナタマイシン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V : 試験溶液量 (mL)

W : 試料の採取量 (mL)

④ 定量限界 0.00005g/L

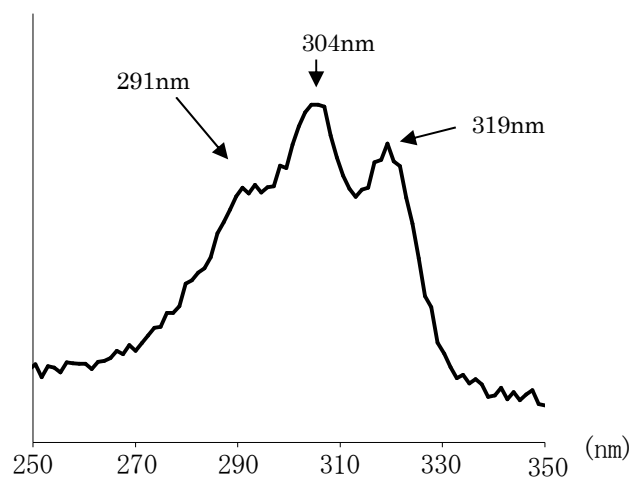
試薬・試液等

1. ナタマイシン標準品 : [食品添加物公定書標準品]
2. メタノール : [高速液体クロマトグラフィー用]
3. ろ紙 : 5種 A (直径 185mm)
4. 酢酸 : [特級]
5. 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 (900mg)。あらかじめメタノール 10mL 及び水 10mL でコンディショニングしておく。また、固相抽出カラムは乾固させない。
6. アセトニトリル : [高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

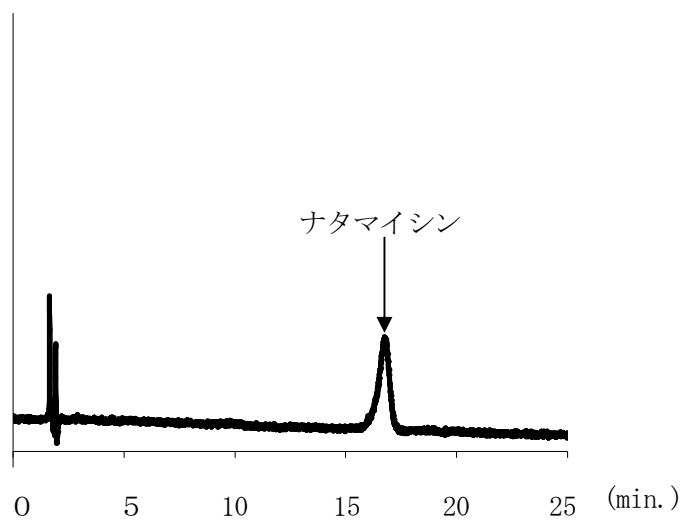
- 1) 本法は、チーズ中のナタマイシンの分析に適用できる。
- 2) ナタマイシンは光により分解するので、操作中に直射日光あるいは紫外線が当たらないよう注意すること。
- 3) ナタマイシンはチーズの熟成過程における表面処理剤として用いられた場合、通常、チーズの内部に浸透せず、表面に残存する。
- 4) 直線性が確認できれば、適宜、検量線用標準溶液の数を調製してもよい。
- 5) 保存用標準原液は、遮光して冷蔵保存すれば少なくとも 1 週間は安定である。
- 6) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。また、夾雑物との分離等のためにグラジエント分析を行ってもよい。
- 7) カラムによりソルビン酸、デヒドロ酢酸等の保存料がナタマイシンのピークと重なる場合があるので、あらかじめ重ならないことを確認すること。
- 8) 共存成分によりピーク高さが影響されるので、定量はピーク面積で行う。
- 9) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いたメタノール/水混液 (2 : 1) を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。

- 10) ワインへのナタマイシンの使用は禁止されている。
- 11) 流下速度は 0.5～2 mL/分程度とし、固相抽出カラムは乾固させない。
- 12) 流下速度は 0.5～2 mL/分程度とする。この際、減圧吸引等により固相抽出カラム内のメタノールをできるだけ回収する。
- 13) 試験溶液の濁りは分析カラムの目詰まりの原因となる。分析カラムの保護のため、試験溶液に濁りが観察されない場合でも、試験溶液をメンブランフィルター（孔径 0.45 μ m、溶媒系）を用いてろ過を行うことが望ましい。
- 14) カラムにより、ソルビン酸、デヒドロ酢酸等の保存料あるいはその他のピークがナタマイシンのピークと重なる場合があるので、あらかじめ重ならないことを確認すること。
- 15) 妨害ピークが出現した場合は、水/酢酸/メタノール/アセトニトリル混液（300 : 65 : 65 : 50）を使用することにより分離できる場合がある。この場合、ナタマイシンのピークは 27 分程度に出現する。
- 16) ナタマイシンは、特徴的な吸収スペクトルを持つため、フォトダイオードアレイ検出器により、定性が可能である（注図 1）。試験溶液では十分な感度が得られない場合には、試料 50mL を（2）試験溶液の調製により処理し、得られた試験溶液を分析する。

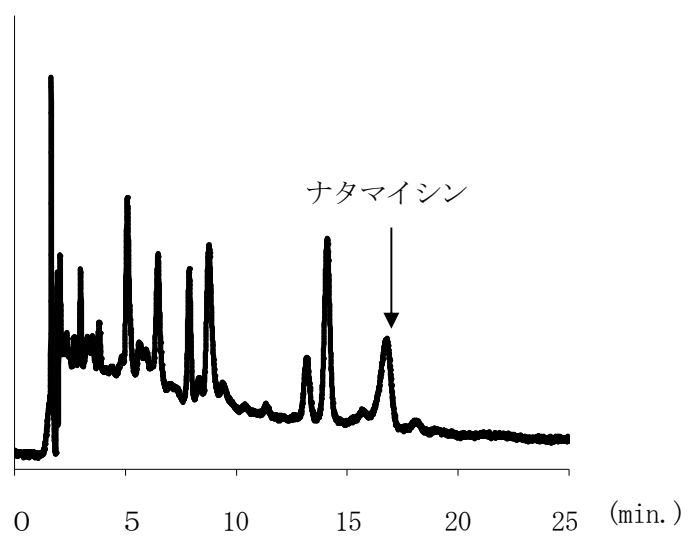


注図 1 検量線用標準溶液（ナタマイシン 0.5 μ g/mL）の吸収スペクトル

- 17) 検量線用標準溶液の調製に用いたメタノール/水混液（1 : 1）を注入し、ナタマイシンの保持時間にピークが現れないことを確認する。
- 18) 定量限界相当量（0.05mg/L）のナタマイシンを添加した赤ワインからのナタマイシンの回収率は 90.7%、相対標準偏差は 2.3%（試行数 5 回）であった。
- 19) 検量線用標準溶液（ナタマイシン 0.1 μ g/mL）及び赤ワイン（ナタマイシン 0.05mg/L 添加）から得られた試験溶液のクロマトグラムを注図 2 及び注図 3 に示す。



注図2 検量線用標準溶液 (0.1 μ g/mL) のクロマトグラム



注図3 ナタマイシンを添加 (0.05mg/L)した赤ワインから得られた試験溶液の
クロマトグラム

参考

ナタマイシン確認分析法

1. 分析法の概要

チーズ又はワイン中のナタマイシンは、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。(2010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

(2) 試験溶液の調製

(3) 標準溶液の調製

上記(1)～(3)については、ナタマイシン分析法を準用する。

(4) 測定法

① 測定条件¹⁾

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

カラム管：内径2mm、長さ150mm

カラム温度：40℃

移動相²⁾：メタノール/水/酢酸混液(50:50:0.1)

流速：0.2ml/分

イオン化モード：ESI(+)

主なイオン⁴⁾：プリカーサーイオン m/z 666、プロダクトイオン m/z 503、95、91又は79

注入量³⁾：2 μ L⁴⁾

② 定性

試験溶液及び標準溶液をLC-MS/MSに注入し、クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が標準溶液と一致することを確認する。

試薬・試液等

1. ナタマイシン分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

- 1) 測定条件は例示である。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) 酢酸濃度が高いとイオン化が阻害され、感度が低下する可能性があるため、酢酸の割合を0.1とした。移動相の組成は、使用する分析カラム等により適宜変更する。
- 3) 各測定機器において最適な測定条件を選択する。
- 4) 注入量は適宜調整する。

保存料

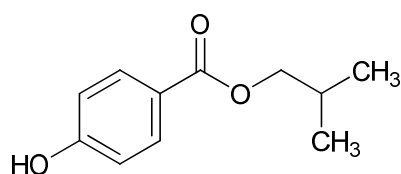
パラオキシ安息香酸エステル類

p-Hydroxybenzoic Acid Esters

パラオキシ安息香酸イソブチル

Isobutyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸イソブチル

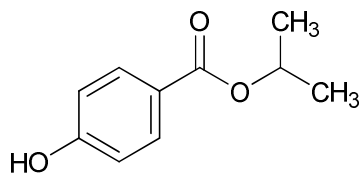


$C_{11}H_{14}O_3$: 194.23

パラオキシ安息香酸イソプロピル

Isopropyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸イソプロピル

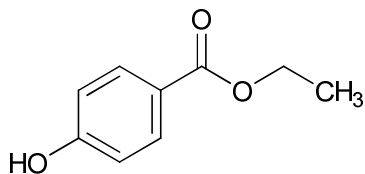


$C_{10}H_{12}O_3$: 180.20

パラオキシ安息香酸エチル

Ethyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸エチル

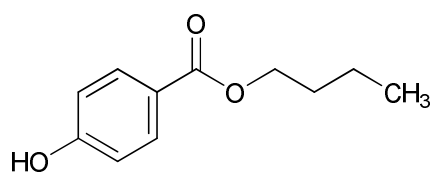


$C_9H_{10}O_3$: 166.17

パラオキシ安息香酸ブチル

Butyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸ブチル

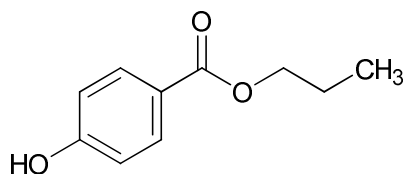


$C_{11}H_{14}O_3$: 194.23

パラオキシ安息香酸プロピル

Propyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸プロピル



$C_{10}H_{12}O_3$: 180.20

1. 分析法の概要

パラオキシ安息香酸エステル類は、高タンパク食品及び高脂肪食品からは溶媒抽出法により、その他の食品からは水蒸気蒸留法により抽出精製した後¹⁾、パラオキシ安息香酸エステル類の構成成分をそれぞれ液体クロマトグラフィーにより測定後、分子量比を乗じて、パラオキシ安息香酸として定量する。

パラオキシ安息香酸エステル類を特定する必要がある場合には、安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸及びそれらの塩類分析法の参考として示す確認分析法を準用することができる。

(2010年改正、2019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 高タンパク食品及び高脂肪食品（溶媒抽出法）

(a) 抽出

試料を細切又はすりつぶした後、その約5gを精密に量り、95vol%メタノール20mLを加え、ホモジナイザー²⁾を用いて1～2分間ホモジナイズした後³⁾、遠心（10分間、3000回転/分）し、上清をろ過する。さらに沈殿物に95vol%メタノール15～20mLを加えて同様の操作を繰り返し⁴⁾、先のろ液と合わせ、95vol%メタノールでろ紙を洗浄するとともに50mLに定容し、抽出液とする。

(b) 精製

ポリマー固相抽出カラムに、aで得られた抽出液5mLに0.1mol/Lリン酸20mLを加えて混和した液を負荷し、流出液は捨てる。次いで容器を水20mLで洗い、洗液をカラムに負荷し、流出液は捨てる。次いで50vol%メタノール10mLを通して洗浄する⁵⁾。次いで、メタノール10mLを正確にとってカラムに通し、得られた溶出液を強陰イオン交換固相抽出カラム及び弱陰イオン交換固相抽出カラムをこの順番に直結したものに負荷し、最初の溶出液5mLを捨てた後、溶出液を採取する。この液2mLを正確に量り、50vol%メタノールを加えて正確に10mLとし、試験溶液とする^{6~8)}

② その他の食品（水蒸気蒸留法）

しょう油及び酢については、試料5mLを正確にとり、その他の食品については、試料を細切又はすりつぶした後、その約5g^{9、10)}を精密に量り、500～1000mLの丸底フラスコに入れる。これに水100mL、酒石酸溶液（15→100）10mL¹¹⁾、塩化ナトリウム60gを加え、毎分約10mLの留出速度で水蒸気蒸留を行う。留液が480～490mLになったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に500mLとし、この留液を試験溶液とする^{6、12)}。

(3) 検量線用標準溶液の調製¹³⁾

パラオキシ安息香酸イソブチル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル及びパラオキシ安息香酸プロピル各 20.0mg を量り、それぞれ60vol%メタノールに溶かして正確に100mLとする。これらの液5mLずつを正確にとり、60vol%メタノールを加えて正確に100mLとし、混合標準溶液とする（各濃度10 μ g/mL）。

混合標準溶液1mLを正確にとり、60vol%メタノールを加えて正確に200mLとし、また、混合標準溶液1、2、5mL及び10mLを正確にとり、60vol%メタノールを加えて正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする（各濃度0.05~10 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を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹⁵⁾：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50~250mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相¹⁶⁾：メタノール/水/0.2mol/Lリン酸緩衝液（pH4.0）混液（12：7：1）

流速：0.5~1.0mL/分

測定波長：260nm¹⁷⁾

注入量：20 μ L¹⁸⁾

② 検量線¹⁹⁾

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

③ 定量

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から試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度（ μ g/mL）を求め、次式によって試料中のパラオキシ安息香酸エステル含量（g/L又はg/kg）を計算する。

(a) 溶媒抽出法²⁰⁾

$$\text{パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{C V}{W \times 20}$$

C：試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度（ μ g/mL）

W：試料の採取量（g）

V：試験溶液の量（mL）

(b) 水蒸気蒸留法

しょう油及び酢

$$\text{パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/L)} = \frac{CV}{W_1 \times 1000}$$

その他の食品

$$\text{パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{CV}{W_2 \times 1000}$$

C : 試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 (μg/mL)

W₁ : 試料の採取量 (mL)

W₂ : 試料の採取量 (g)

V : 試験溶液の量 (mL)

また、それぞれのパラオキシ安息香酸エステル含量からパラオキシ安息香酸含量を求めて合計し、試料中の全パラオキシ安息香酸含量 (g/L 又は g/kg) を計算する。

しょう油及び酢の場合

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸イソブチル含量 (g/L)} \times 0.7111$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸イソプロピル含量 (g/L)} \times 0.7665$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸エチル含量 (g/L)} \times 0.8312$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸ブチル含量 (g/L)} \times 0.7111$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸プロピル含量 (g/L)} \times 0.7665$$

上記以外の食品の場合

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸イソブチル含量 (g/kg)} \times 0.7111$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸イソプロピル含量 (g/kg)} \times 0.7665$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸エチル含量 (g/kg)} \times 0.8312$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸ブチル含量 (g/kg)} \times 0.7111$$

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸プロピル含量 (g/kg)} \times 0.7665$$

④ 定量限界 0.005 g/L又は0.005 g/kg

試薬・試液等

1. パラオキシ安息香酸イソブチル：市販品を用いる。
2. パラオキシ安息香酸イソプロピル：市販品を用いる。
3. パラオキシ安息香酸エチル：市販品を用いる。
4. パラオキシ安息香酸ブチル：市販品を用いる。
5. パラオキシ安息香酸プロピル：市販品を用いる。
6. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
7. ポリマー固相抽出カラム：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 (500mg)。あらかじめメタノール 10mL 及び水 10mL でコンディショニングしておく。
8. リン酸：[特級又は日局]
9. 0.1mol/Lリン酸：リン酸 11.5 g を量り、水を加えて 1000mL とする。
10. 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 10mL でコンディショニングしておく。
11. 弱陰イオン交換固相抽出カラム：エチレンジアミン-*N*-プロピ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 10mL でコンディショニングしておく。
12. 酒石酸：[特級]
13. 塩化ナトリウム：[特級]
14. リン酸一カリウム：リン酸二水素カリウム [特級]
15. 0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0)：リン酸一カリウム 27.0 g とリン酸 0.2 g に水を加えて溶かして 1000mL とする。

[注]

- 1) 高タンパク食品及び高脂肪食品については水蒸気蒸留法では低回収率であるため、これらの食品には溶媒抽出法を用いる。安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸も同一の留液あるいは抽出液で分析可能である。なお、水蒸気蒸留法では分子量の小さいパラオキシ安息香酸エステルは、回収率が低い場合がある。
- 2) バイオミキサー、ウルトラタラックス、ポリトロン等が使用できる。
- 3) 固形分を含まず、振とうにより混和する試料については、1～2分間のホモジナイズを、10分間の振とうに代えることができる。
- 4) 振とうにより混和する場合は、2回目のホモジナイズを、10分間の振とうに代えることができる。
- 5) 50vol%メタノールを全量溶出し、固相抽出カラム内部を空気で置換する。

- 6) 試験溶液の濁りは分析カラムの目詰まりの原因となる。分析カラムの保護のため、試験溶液に濁りが観察されない場合でも、試験溶液を水系ポリテトラフルオロエチレン製メンブランフィルター (0.45 μ m) 等を用いてろ過を行うことが望ましい。最初のろ液 5 mL を捨てた後、ろ液を採取し、試験溶液とする。
- 7) ポリマー固相抽出カラムからの溶出液について液体クロマトグラフィーによる分析を実施し、妨害ピークが見られない場合には、強陰イオン交換固相抽出カラム及び弱陰イオン交換固相抽出カラムによる精製を省略できる。
- 8) 装置の感度が不十分な場合は、ポリマー固相抽出カラムからの溶出液を試験溶液としてもよい。
- 9) 装置の感度が不十分な場合は、試料採取量を増やしてもよい。固形試料 50 g の場合は、水が足りないので、水を 100~200mL とし、飽和となるよう塩化ナトリウムを 60~80 g に変更する。さらに、混和後、酸性であることを確認する。ただし、試料採取量が多いと十分な回収率が得られないことがある。
- 10) 試料採取量を 5 g とする場合、泡立ちやすい豆類等の一部食品を除き、シリコーン樹脂の添加は必要ない。シリコーン樹脂を添加する場合には、食品添加物グレードのものを使用し、保存料を含む製剤等は使用しない。
- 11) 塩基性の食品では酸性とならない場合がある。そのような場合には、さらに酒石酸溶液 (15 \rightarrow 100) を加えて酸性にする。
- 12) テフロンチューブを使用したオートサンプラーでは、吸着する場合がある。その場合は、パラオキシ安息香酸エステル類が吸着しない素材のチューブに交換するか、留液にメタノールを加え、50vol%メタノール溶液とするとよい。
- 13) 直線性が確認できれば、適宜、検量線用標準溶液の数を調整してもよい。
- 14) 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。また、夾雑物との分離等のためにグラジエント分析を行ってもよい。
- 15) 分析の際は、被験物質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。
- 16) その他、下記の移動相及びグラジエント溶離等が使用できる。
 - ・メタノール / 5 mmol / L クエン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (6 : 4)
 - ・水 / メタノール / 0.2 mol / L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (17 : 2 : 1) 及び水 / メタノール / 0.2 mol / L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (5 : 14 : 1) によるグラジエント溶離
 - ・5 mmol / L クエン酸緩衝液 (pH4.0) / アセトニトリル / メタノール混液 (7 : 2 : 1) 及び 5 mmol / L クエン酸緩衝液 (pH4.0) / アセトニトリル / メタノール混液 (11 : 4 : 5) によるグラジエント溶離 (移動相の調製方法: アセトニトリルは高速液体クロマトグラフィー用を使用すること。5 mmol / L クエン酸緩衝液 (pH4.0) は、クエン酸一水和物 7.0 g 及びクエン酸三ナトリウム二水和物 6.0 g に水を加えて溶かして 1000mL とし、用時水で 10 倍に希釈して調製すること。)
- 17) 測定条件に示した移動相中でのパラオキシ安息香酸エステル類の吸収極大は 260nm 付近

である。安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸と同じ 230nm でも測定可能であるが、260nmの方が感度が高い。

18) 安息香酸、ソルビン酸あるいはデヒドロ酢酸を同時に測定する場合は、試験溶液のメタノール濃度が高いと、保持時間に影響を与え、標準溶液における保持時間とずれが生じることがある。また、ピーク形状にも影響を与え、測定値に誤差が生じるおそれがある。このような現象は、保持時間の小さいピークに認めやすく、注入量が多くなると著しくなる。その場合には、標準溶液も同じ組成にし、良好なピーク形状が得られるように、注入量を調整する。アイソクラティック溶離を用いた内径 4.6mm の高速液体クロマトグラフィー用カラムによる分析の場合は、注入量が 20 μ L では、いずれの試験溶液においても差異はみられないが、グラジエント溶離を用いて安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸を同時に測定する場合は、10 μ L 以上で差異がみられる。

19) 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。

20) 式の説明：

抽出液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 (μ g/mL)

$$C (\mu\text{g/mL}) \times V (\text{mL}) \times \text{固相抽出カラム溶出液量} (10\text{mL})$$

$$= \frac{\quad}{\text{希釈に用いた固相抽出カラム溶出液量} (2\text{mL}) \times \text{精製に用いた抽出液量} (5\text{mL})}$$

$$= CV$$

パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/kg)

$$\text{抽出液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度} (\mu\text{g/mL}) \times \text{抽出液量} (50\text{mL}) \quad 1$$

$$= \frac{\quad}{W (\text{試料の採取量} (\text{g}))} \times \frac{\quad}{1000*}$$

$$CV$$

$$= \frac{\quad}{W \times 20}$$

* μ g/g から g/kg に変更するために、1000 で除す。

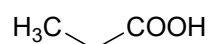
保存料

プロピオン酸及びその塩類

Propionic Acid and Its Salts

プロピオン酸

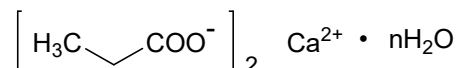
Propionic Acid



$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$: 74.08

プロピオン酸カルシウム

Calcium Propionate

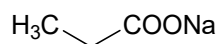


n = 1 または 0

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_4$: 186.22

プロピオン酸ナトリウム

Sodium Propionate



$\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_2$: 96.06

1. 分析法の概要

食品中のプロピオン酸及びその塩類は、水蒸気蒸留法により抽出した後、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プロピオン酸として定量する。必要があれば、分子量比を乗じてそれぞれのプロピオン酸塩の量として求める。食品中には、天然のプロピオン酸が分布している場合もある。したがって、検体中にこれらの食品を素材として含有する場合には、定量値は素材由来のプロピオン酸と添加されたものとの合計値である。

プロピオン酸を特定する必要がある場合には、参考として示す分析法を用いることができる。
(2010年改正、2019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 水蒸気蒸留

試料を細切又はすりつぶした後、その約 30 g を精密に量り、500～1000mL の丸底フラスコに入れる。これに水 200mL、塩化ナトリウム 80 g、10w/v%リン酸 10mL¹⁾及びシリコーン樹脂 1 滴を加える。あらかじめ 0.2mol/L トリス・塩酸緩衝液 (pH8.5)²⁾20mL を入

れた受器に冷却器の先端を浸し、毎分約 10mL の留出速度で水蒸気蒸留を行う。留液が 280～290mL になったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に 300mL とする。

② 精製

強陰イオン交換固相抽出カラム³⁾に、①で得られた留液 20mL を負荷し、流出液は捨てる。次いで水 10mL を注入し、洗液は捨てる。次いで 5w/v%塩化ナトリウム含有 0.01mol/L 塩酸 5mL を注入し、溶出液に水を加えて全量を 10mL とする。これをメンブランフィルター (0.45 μ m、水系) でろ過し、試験溶液とする⁴⁾。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁵⁾

プロピオン酸ナトリウム⁶⁾ 0.130 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 プロピオン酸として 1.00mg/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 プロピオン酸として 100 μ g/mL)。標準溶液 2、5、10mL 及び標準原液 2、5mL をそれぞれ正確にとり、それぞれに水を加えて正確に 10mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度 プロピオン酸として 20～500 μ g/mL)⁷⁾。

(4) 測定法

① 測定条件⁸⁾

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⁹⁾ : 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 : 水/アセトニトリル混液 (94 : 6) をリン酸で pH2.5 に調整したもの。

流速 : 0.8～1.2mL/分

測定波長 : 210nm

注入量 : 10 μ L

② 検量線¹⁰⁾

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から試験溶液中のプロピオン酸濃度 (μ g/mL) を求め、次式¹²⁾によって試料中のプロピオン酸含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{プロピオン酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times 3}{W \times 20}$$

C : 試験溶液中のプロピオン酸濃度 (μ g/mL)

W：試料の採取量（g）

プロピオン酸カルシウム含量（g/kg）＝プロピオン酸含量（g/kg）×1.257

プロピオン酸ナトリウム含量（g/kg）＝プロピオン酸含量（g/kg）×1.297

④ 定量限界 プロピオン酸として0.1 g/kg

試薬・試液等

1. プロピオン酸ナトリウム：市販品を用いる⁶⁾。
2. 塩化ナトリウム：[特級] 又は [日局]
3. リン酸：[特級]
4. 10w/v%リン酸：リン酸 11.8 g を量り、水を加えて 100mL とする。
5. シリコーン樹脂：(消泡用) [食添]
6. 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]
7. 塩酸：[特級]
8. 0.2mol/L トリス・塩酸緩衝液（pH8.5）：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 24.2 g を量り、水 500mL に溶解し、2mol/L 塩酸で pH8.5 に調整後、水を加えて 1000mL とする。
9. 強陰イオン交換固相抽出カラム：四級アンモニウム塩結合ポリスチレン固相抽出カラム（600mg）³⁾。使用前にメタノール 10mL 及び水 10mL でコンディショニングする。
10. 5w/v%塩化ナトリウム含有 0.01mol/L 塩酸：塩化ナトリウム 5 g を量り、0.01mol/L 塩酸を加えて 100mL 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]

[注]

- 1) pH は 2～3 となる。
- 2) 固相抽出カラムに負荷するとき溶液の塩基性を保ちプロピオン酸の吸着を良くする。
- 3) 固相抽出カラムを使用する場合はあらかじめ回収試験を実施する。
- 4) 安息香酸、ソルビン酸あるいはデヒドロ酢酸等が共存する場合、液体クロマトグラフィーにおいて、これらの溶出に長時間を要する。これらを除くするには、以下の操作を行う文献¹⁾。

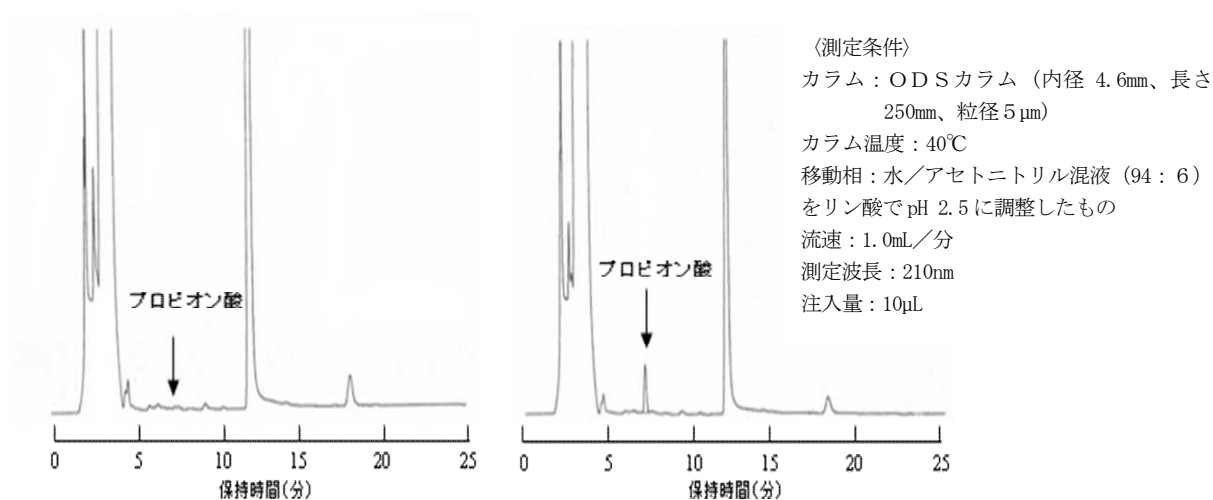
強陰イオン交換固相抽出カラムに留液 20mL を負荷し、流出液は捨てる。次いで水 10mL を注入し、洗液は捨てる。強陰イオン交換固相抽出カラムの下に逆相固相抽出カラム（オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム）を接続する。これに 5w/v%塩化ナトリウム含有 0.01mol/L 塩酸 5mL、次いで水/アセトニトリル混液（9：1）を注入し、溶出液の全量を 10mL としたものを試験溶液とする。

- 5) 直線性が確認できれば、適宜、検量線用標準溶液の数を調整してもよい。

- 6) 純度の低いものがあるため注意を要する。
- 7) 試料中のプロピオン酸濃度に応じて、高濃度の検量線用標準溶液は用いなくてもよい。
- 8) 測定条件は例示である。用いるカラムの内径及び長さによって、流速及び注入量等を調整する。
- 9) 分析の際は、被験物質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。
- 10) 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。
- 11) 本法による液体クロマトグラムの一例を注図に示す。

(1) カステラ

(2) カステラにプロピオン酸(試料中 100 $\mu\text{g}/\text{g}$)を添加



注図1 プロピオン酸のクロマトグラム

12) 式の説明：

$$\text{留液中のプロピオン酸濃度}(\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{C \times \text{試験溶液量}(10\text{mL})}{\text{精製に用いた留液量}(20\text{mL})}$$

$$\text{プロピオン酸含量}(\text{g}/\text{kg}) = \frac{\text{留液中のプロピオン酸濃度}(\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{留液量}(300\text{mL})}{W(\text{試料の採取量}(\text{g}))} \times \frac{1}{1000^*}$$

* $\mu\text{g}/\text{g}$ から g/kg に変更するために、1000 で除す。

[文献]

- 1) 立石恭也ら：東京衛研年報、49、77（1998）

参考

プロピオン酸確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のプロピオン酸は、ガスクロマトグラフィー質量分析により確認を行う¹⁾。(2010 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

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

プロピオン酸及びその塩類分析法の(2)試験溶液の調製 ①水蒸気蒸留を準用する。留液 5 mL にリン酸を 1 滴加え酸性にした後、酢酸エチル 5 mL を加え 1 分間振とうする。静置し 2 層が十分に分離した後、酢酸エチル層を分取し試験溶液とする²⁾。

(3) 標準溶液の調製

プロピオン酸及びその塩類分析法の(3)検量線用標準溶液の調製を準用することにより調製した検量線用標準溶液の 5 mL を(2)試験溶液の調製の項の留液と同様に操作し、標準溶液とする。

(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) 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：100 $^{\circ}$ C (2分)、100 \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (10 $^{\circ}$ C/分、昇温)、230 $^{\circ}$ C (3分)

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

イオン源温度：250 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：ヘリウム

注入方式：スプリットレス

イオン化モード (電圧)：E I (70eV)

検出法：スキャン (m/z 40~250)

主なイオン： m/z 74、45、57

注入量：1 μ L

② 定性⁴⁾

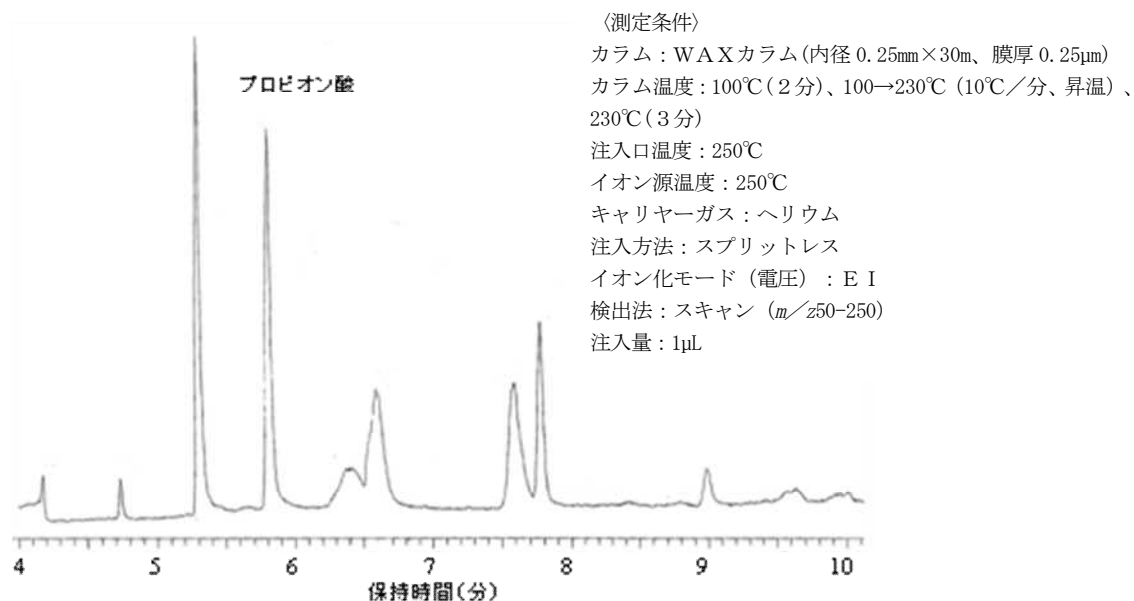
試験溶液をGC-MSに注入し、クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が標準溶液と一致するか、あるいは、マススペクトル上の主要ピークの強度比が標準溶液と一致することを確認する。

試薬・試液等

1. プロピオン酸分析法の試薬・試液等を準用する。
2. 酢酸エチル：[特級]

[注]

- 1) 本法はプロピオン酸の確認分析法であり、定量分析は目的としない。
- 2) 妨害ピークが認められる場合は、弱陽イオン交換固相抽出カラムに留液 10mL を注入し、最初の溶出液 5 mL を捨てた後、溶出液を採取する。これを留液の代わりに用い、以後の操作を行う。固相抽出カラムはあらかじめ水 5mL でコンディショニングしておく。
- 3) その他の測定条件は各測定機器に従い、プロピオン酸標準溶液の強度が最大となるようにあらかじめ最適化を行う。
- 4) 本法によるトータルイオンクロマトグラムの一例を注図 1 に示す。マススペクトルによる確認が困難な場合、SIMモードにより測定を行い、マスクロマトグラム上に検出されたピークが標準溶液と一致することを確認する。



注図 1 カステラ (プロピオン酸 100μg/g 添加) のクロマトグラム (TIC)

漂白剤

亜塩素酸ナトリウム

Sodium Chlorite

NaClO₂ : 90.44

1. 分析法の概要

食品に付着している亜塩素酸ナトリウムは、水により浸出し、亜塩素酸ナトリウムとして紫外可視吸光光度検出器を用いたイオンクロマトグラフィー（分析法 A）により測定する。食品中の亜塩素酸ナトリウムは、9 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液で抽出し、除タンパク、脱塩後に、亜塩素酸ナトリウムとして電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフィー（分析法 B）により測定する。（2005 年改正、2019 年改正）

2. 分析法

分析法 A（紫外可視吸光光度検出器付イオンクロマトグラフィー）¹⁾

（1）検体の採取と試料の調製²⁾

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

試料約 25 g を精密に量り、水 75 mL を加え、軽く振り混ぜながら 10 分間放置する。次に浸出液をろ紙でろ過する。ろ液を 5 mL 分取して逆相固相抽出カラムに通し、その液を試験溶液とする。

（3）検量線用標準溶液の調製³⁾

亜塩素酸ナトリウム（試薬）0.625 g⁴⁾を量り、水を加えて溶かして正確に 100 mL とする。この液 2 mL を正確に量り、水を加えて正確に 200 mL としたものを標準溶液とする（濃度 50 µg/mL）。標準溶液 0.5、2、10、20、50 及び 100 mL をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 100 mL とし、検量線用標準溶液とする（濃度 0.25～50 µg/mL）。

（4）測定法

① 測定条件⁵⁾

紫外可視吸光光度検出器付イオン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：ポリアクリレート系強酸性陰イオン交換樹脂

カラム管：耐アクリル性ポリアクリレート製、内径 4.6～6.0 mm、長さ 150～250 mm

カラム温度：40°C

溶離液：1 mmol/L ホウ酸塩緩衝液

流速：1.0 mL/分

測定波長：260nm

注入量：10 μ L

② 検量線⁶⁾

検量線用標準溶液をイオンクロマトグラフに注入し、得られたピーク面積から亜塩素酸ナトリウムの検量線を作成する。

③ 定量⁷⁾

試験溶液をイオンクロマトグラムに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中の亜塩素酸ナトリウム濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式によって試料中の亜塩素酸ナトリウム含量 (g/kg) を算出する。

$$\text{亜塩素酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{A \times 75}{W \times 1000}$$

A：試験溶液中の亜塩素酸ナトリウム濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
W：試料の採取量 (g)

分析法B（電気伝導度検出器付イオンクロマトグラフィー）⁸⁾

(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

試料を細切し、約5 gを精密に量り、9 mmol/L炭酸ナトリウム溶液45 mLを加え、5分間マグネチックスターラーでかくはん後、遠心（5℃、15分間、15000回転/分）する。上清をメンブランフィルター（0.2 μm 、水系）に通す。ろ液を分画分子量10000の遠心式ろ過ユニットを用いて限外ろ過し、ろ液5 mLに9 mmol/L炭酸ナトリウム溶液を加え、正確に50 mL⁹⁾とする。この液10 mLを陽イオン交換銀型固相抽出カラムに負荷し、初めの3 mLを捨て、全量を採取する。流出液を遠心（5℃、15分間、15000回転/分）し、上清を強陽イオン交換固相抽出カラムに負荷し、流出液を試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製³⁾

亜塩素酸ナトリウム（試薬）0.125 g⁴⁾を量り、9 mmol/L炭酸ナトリウム溶液を加え、100 mLとする。この液1 mLを正確に量り、9 mmol/L炭酸ナトリウム溶液を加え100 mLとし、標準溶液とする（濃度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準溶液0.5、1、2、5及び10 mLをそれぞれ正確に量り、9 mmol/L炭酸ナトリウム溶液を加え100 mLとし、検量線用標準溶液とする（濃度0.05～1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

(4) 測定法

① 測定条件⁵⁾

電気伝導度検出器付イオン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：エチレンビニルベンゼン-ジビニルベンゼンポリマー系イオン交換樹脂

カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm

カラム温度：30°C

溶離液：9 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液

流速：1.0mL/分

② 検量線⁶⁾

検量線用標準溶液それぞれ 50 μ L ずつを正確に量り、イオン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。

③ 定量^{10,11)}

試験溶液 50 μ L を正確に量り、イオン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亜塩素酸ナトリウム濃度 (μ g/mL) を求め、次式によって試料中の亜塩素酸ナトリウム含量 (g/kg) を算出する。

$$\text{亜塩素酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 450}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の亜塩素酸ナトリウム濃度 (μ g/mL)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液等

1. 亜塩素酸ナトリウム (試薬)⁴⁾：含量 80%以上。市販品を用いる。
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。あらかじめメタノール 5 mL、続いて水 10 mL でコンディショニングしておく。
3. 水：超純水 (逆浸透膜処理装置による精製、イオン交換樹脂による脱塩及びメンブランフィルターによるろ過等により、比抵抗値 17M Ω ・cm 以上まで精製した水)。
4. 0.01mol/L ホウ酸塩緩衝液：市販のホウ酸塩 pH 標準液 (pH9.18) を用いる。
5. 1 mmol/L ホウ酸塩緩衝液：0.01mol/L ホウ酸塩緩衝液 (pH 標準液、pH9.18) を水で 10 倍に希釈する。
6. 1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液：[イオンクロマトグラフィー用]
7. 9 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液：1 mol/L イオンクロマトグラフィー用炭酸ナトリウム溶液 9 mL に水を加え 1 L とする。
8. 陽イオン交換銀型固相抽出カラム：交換容量 2.0~2.2 meq/カラム (1 cc)
9. 強陽イオン交換固相抽出カラム：スルフォニルプロピル化シリカゲル固相抽出カラム

(100mg)

[注]

- 1) 電気伝導度検出器でも測定可能であるが、紫外可視吸光光度検出器を用いると Cl⁻ピークが出現しないため良好なクロマトグラムが得られる。
- 2) 生食用野菜類、卵殻等を対象とする。
- 3) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜調整してもよい。
- 4) 亜塩素酸ナトリウム (試薬) の含量は、通常、80%以上であるため、それを考慮した採取量である。亜塩素酸ナトリウム (試薬) の純度を次により求めて亜塩素酸ナトリウム (試薬) の採取量に乘じ、採取した試薬中の亜塩素酸ナトリウムの量とする。

亜塩素酸ナトリウム (試薬) 約 1 g を精密に量り、水に溶かし、正確に 250mL とする。この液 20mL を正確に量り、ヨウ素フラスコに入れ、3%硫酸 12mL、水 20mL 及びヨウ化カリウム 4 g を加え、直ちに密栓して暗所に 15 分間放置し、遊離したヨウ素を 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する (指示薬: デンプン溶液)。別に空試験を行い補正する。

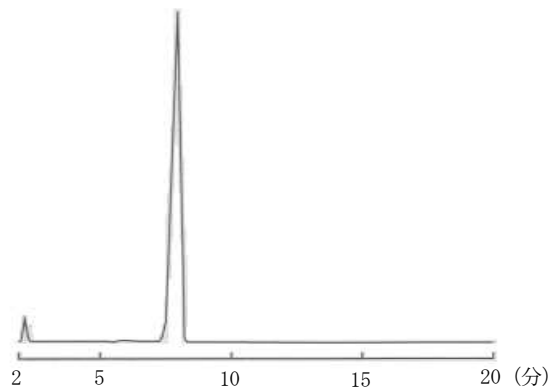
0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液 1 mL = 2.261mg 亜塩素酸ナトリウム

亜塩素酸ナトリウムの純度 = $(V \times 2.261 \times 250) / (W \times 20 \times 1000)$

V : 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定量 (mL)

W : 亜塩素酸ナトリウム (試薬) の採取量 (g)

- 5) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。また、夾雑物との分離等のためにグラジエント分析を行ってもよい。
- 6) 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。
- 7) 本法の添加回収率は 90~100%、相対標準偏差 5% である^{文献1)}。また、検出限界は 0.001 g/kg である。
- 8) しょう油漬け、味付けカズノコ等を対象とする。
- 9) ろ液 2.5mL を正確に 25mL にしてもよい。
- 10) 本法における検出限界は 0.005 g/kg である。
- 11) 亜塩素酸ナトリウムのイオンクロマトグラムを注図 1 に示す。



注図1 酢塩素酸ナトリウムのイオンクロマトグラム

カラム充填剤：エチレンビニルベンゼン-ジビニルベンゼンポリマー系イオン交換樹脂

カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm

カラム温度：30°C

溶離液：9 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液

流速：1.0mL/分

注入量：10 μ L

[文献]

- 1) 鈴木仁ら：食衛誌、38、22 (1997)

参考

亜塩素酸ナトリウム（分析法B）確認分析法

1. 分析法の概要

カズノコ調味加工品中の亜塩素酸ナトリウムは、9mmol/L炭酸ナトリウム溶液で抽出後、限外ろ過による除タンパクして得られたろ液を用い、*N,N*-ジエチル-*p*-フェニレンジアミン(DPD)との発色反応により行う¹⁾。(2005年設定)

2. 分析法

(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

亜塩素酸ナトリウムの分析法Bを準用し、限外ろ過のろ液を試験溶液とする。

(3) 測定法

試験溶液1mLに10w/v%グリシン溶液0.1mLを加え、よく混和する。DPD錠²⁾1錠及び硫酸試液0.1mLを加え、5秒間激しくかくはんし、この液を10分間放置後、色調表により比色する。5mg/kg以上の亜塩素酸ナトリウムがあれば、塩素(Cl)として0.2mg/L以上の呈色が見られる³⁾。

試薬・試液等

1. DPD錠：[残留塩素測定用] 1錠中にDPD0.002g及び硫酸ナトリウム0.048gを含む。
2. グリシン：[特級]
3. 硫酸：[特級]
4. 硫酸試液：水99mLに硫酸1mLを加えて混和する。

[注]

- 1) 本法は亜塩素酸ナトリウムの確認分析法であり、定量分析は目的としない。
- 2) 残留塩素測定用のキットが市販されている。
- 3) 添付の色調表により判別ができる。

漂白剤

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

Sulfur Dioxide and Sulfites

亜硫酸ナトリウム Sodium Sulfite 別名：亜硫酸ソーダ $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (n=7又は0) (Na_2SO_3 : 126.04)	次亜硫酸ナトリウム Sodium Hydrosulfite 別名：ハイドロサルファイド $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: 174.11
二酸化硫黄 Sulfur Dioxide 別名：無水亜硫酸 SO_2 : 64.06	ピロ亜硫酸カリウム Potassium Pyrosulfite 別名：メタ重亜硫酸カリウム $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$: 222.33

ピロ亜硫酸ナトリウム
Sodium Pyrosulfite
別名：メタ重亜硫酸ナトリウム
酸性亜硫酸ソーダ
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$: 190.11

1. 分析法の概要

食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は、アルカリ滴定法（分析法A）又は比色法（分析法B）により二酸化硫黄として定量する¹⁾。必要があれば分子量比を乗じて、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム又はピロ亜硫酸カリウムの量として求める。通常、分析法Aは二酸化硫黄として約0.1 g/kg以上の食品（有機酸を多く含む食品は除く）に、分析法Bは約0.1 g/kg以下の食品及び酢酸等の有機酸を多く含む食品の分析に用いる。本試験において試験溶液並びに標準溶液の調製に用いる水は、用時、精製水を煮沸し、冷却したものをを用いる²⁾。（2000年設定、2019年改正）

2. 分析法

分析法A（アルカリ滴定法）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する³⁾。

（2）試験溶液の調製

あらかじめ図1の通気蒸留装置を組み立て、フラスコ(A)に0.3%過酸化水素溶液10mLを入れ、メチルレッド・メチレンブルー試液3滴を加える。次に0.01mol/L水酸化ナトリウム溶液1～2滴⁴⁾を加え、装置に取り付ける。フラスコ(B)には試料の一定量⁵⁾を精密に量って加え、エタノール2mL⁶⁾、液体食品以外の場合は水20mL⁷⁾、更にシリコーン樹脂⁸⁾2滴、及びリン酸試液10mL⁹⁾を加え、速やかに装置に取り付ける。窒素ガスを流量計(G)を通じて、0.5～0.6L/分¹⁰⁾の速度で通気しながら、マイクロバーナー(D)¹¹⁾の炎の高さを4～5cmとし、フラスコ(B)を約10分間加熱¹²⁾する。次にフラスコ(A)をはずし、試験溶液とする。

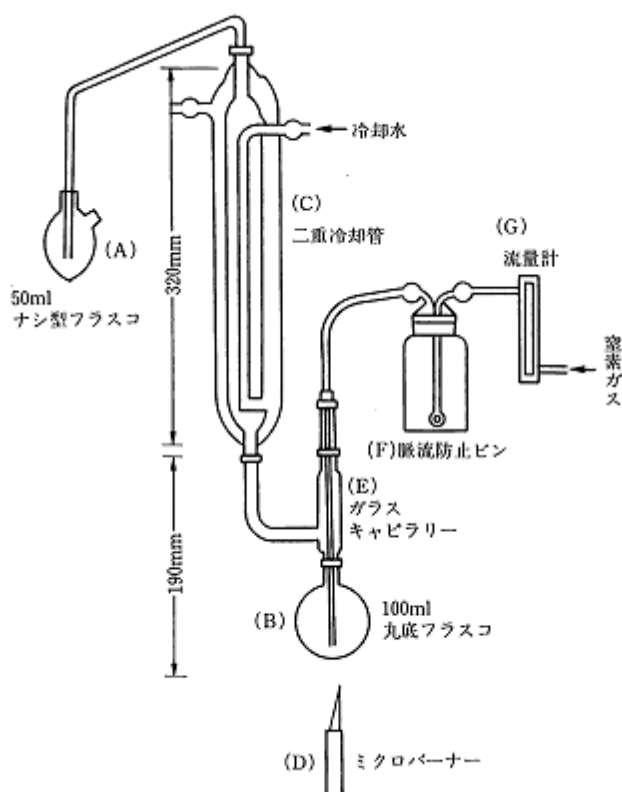


図1 通気蒸留装置

(3) 空試験溶液の調製

(2) 試験溶液の調製における試料の代わりに水20mLを用い、同様に操作して空試験溶液とする。

(4) 測定法

試験溶液及び空試験溶液を0.01mol/L水酸化ナトリウム溶液で液の色が青みの緑になるまで滴定し、次式によって試料中の二酸化硫黄含量(g/kg)を計算する¹³⁾。

$$\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = (a - b) \times F \times 0.32 \times \frac{1}{W}$$

a : 試験溶液の滴定量 (mL)

b : 空試験溶液の滴定量 (mL)

W : 試料の採取量 (g)

F : 0.01mol/L水酸化ナトリウム溶液のファクター

0.32 : 0.01mol/L水酸化ナトリウム溶液 1 mL は二酸化硫黄 0.32mg に相当する。

分析法B (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

あらかじめ図1のフラスコ(A)を25mLの試験管(内径20mm前後)に変更し、通気蒸留装置を組み立て、試験管の中に0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液¹⁴⁾約10mLを入れ、装置に取り付ける。次にフラスコ(B)に蒸留水20mL、5%ジメドン・エタノール溶液1mL¹⁵⁾、アジ化ナトリウム溶液(1→100)1mL¹⁶⁾、エタノール2mL⁶⁾、シリコーン樹脂⁸⁾2滴及びリン酸試液10mL⁹⁾を入れ、直ちに装置に取り付ける。窒素ガスを流量計(G)を通じて、0.5~0.6L/分の速度で5分間通気する¹⁷⁾。次にフラスコ(B)をはずし、試料約2gを精密に量り、速やかに入れ、再び装置に取り付け、窒素ガスを0.5~0.6L/分の速度で流しながら、マイクロバーナー¹¹⁾(D)の炎の高さを4~5cmとし、フラスコ(B)を約10分間加熱する¹²⁾。試験管をはずし、捕集した液を0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液で20mLとし、試験溶液とする。

(3) 空試験溶液の調製

(2)試験溶液の調製における試料添加を行わず、同様に操作して空試験溶液とする¹⁸⁾。

(4) 検量線用標準溶液の調製

亜硫酸水素ナトリウム約0.5gを精密に量り、水に溶かして100mLとする。その10mLをとり、100mLの共栓フラスコに入れ、0.05mol/Lヨウ素溶液15mLを正確に加え、5分間暗所に放置した後、塩酸2mLを加えて、0.1mol/Lチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する(指示薬 デンプン試液1mL)。水10mLを用いて同様に操作し、空試験溶液とする。次式により亜硫酸水素ナトリウムの純度(二酸化硫黄として、%)を求める。

$$\text{亜硫酸水素ナトリウムの純度} = 0.0032 \times F \times (b - a) \times \frac{1000}{W}$$

a : 滴定量(mL)

b : 空試験溶液の滴定量(mL)

W : 亜硫酸水素ナトリウム採取量 (g)

F : 0.1mol/Lチオ硫酸ナトリウム溶液のファクター

0.0032 : 0.05mol/Lヨウ素溶液 1 mL の二酸化硫黄 (SO₂) 相当量 (g)

二酸化硫黄 100mg に相当する量の亜硫酸水素ナトリウムを量り、0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液に溶解して 100mL とし、標準原液とする。標準原液 1 mL を正確にとり 0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液に溶かして 100mL とし、この液 10mL を正確にとり 0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液に溶かして 50mL とし二酸化硫黄標準溶液とする(濃度 二酸化硫黄として 2μg/mL)。

二酸化硫黄標準溶液 0¹⁹⁾、1、2、3、4 mL 及び 5 mL をそれぞれ正確に量り、0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてそれぞれ正確に 5 mL とし、検量線用標準溶液とする(濃度 二酸化硫黄として 0、0.4~2μg/mL)。

(5) 測定法

① 測定

試験溶液 5 mL を正確に量り、水 0.1 mL を加えたものを(A)とし、新しく試験溶液 5 mL を正確に量り、0.3%過酸化水素溶液 0.1 mL を加えたものを(B)とする²⁰⁾。(A)および(B)のそれぞれにパラローズアニリン・ホルムアルデヒド試液 1 mL ずつを正確に加え、よく振り混ぜ、室温で 15 分間放置した後、それぞれの液につき試薬ブランク(検量線の「0」にあたる)を対照とし、波長 580nm における吸光度を測定する²¹⁾。空試験溶液も同様の操作を行い、通気蒸留装置の汚染の有無を確認する。

② 検量線

検量線用標準溶液 5 mL ずつに水 0.1 mL を加え、①測定 of (A) と同様に操作し、吸光度を測定した後、検量線を作成する。

③ 定量

試験溶液の呈色反応後の吸光度 [(A) の吸光度 - (B) の吸光度] を算出し、検量線より、試験溶液中の二酸化硫黄濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中の二酸化硫黄含量 (g/kg) を計算する²²⁾。

$$\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = \frac{C}{1000 \times W} \times 5 \times \frac{20}{5}$$

C : 試験溶液中の二酸化硫黄濃度 (μg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

亜硫酸ナトリウム(無水)含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.968

次亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.359

ピロ亜硫酸カリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.735

ピロ亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.484

1. 亜硫酸水素ナトリウム：[特級]
2. 過酸化水素：[30%、特級]
3. 0.3%過酸化水素溶液：過酸化水素 1mL に水を加えて 100mL とする。用時調製する。
4. メチルレッド：[特級]
5. メチレンブルー：[特級]
6. エタノール：エタノール (99.5) [高速液体クロマトグラフィー用]、遮光して保存する。
7. メチルレッド・メチレンブルー試液²³⁾：メチルレッド 0.2 g 及びメチレンブルー 0.1 g にエタノールを加えて溶かして 100mL とする。
8. 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液：[容量分析用]
9. シリコーン樹脂：[食添]
10. リン酸：[特級]
11. リン酸試液：リン酸 100mL に水 240mL を加える。
12. 水酸化ナトリウム：[特級]
13. ジメドン：5, 5-ジメチル-1, 3-シクロヘキサジオン [特級]
14. 5%ジメドン・エタノール溶液：ジメドン 5 g を量り、エタノールを加えて溶かし 100mL とする。用時調製する。
15. アジ化ナトリウム：[特級]
16. 塩酸：[特級]
17. パラローズアニリン塩酸塩：[特級]
18. パラローズアニリン試液：パラローズアニリン塩酸塩 40mg に塩酸 20mL を加えて溶かし、水を加えて 100mL とする。
19. ホルムアルデヒド液：[特級]
20. 0.2%ホルムアルデヒド溶液：ホルムアルデヒド液 3 g を量り、水を加えて 500mL とする²⁴⁾。用時調製する。
21. パラローズアニリン・ホルムアルデヒド試液：パラローズアニリン試液と 0.2%ホルムアルデヒド溶液の等量を混和する。
22. 0.05mol/L ヨウ素溶液：[容量分析用]
23. 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液：[容量分析用]
24. デンプン：でんぷん (溶性) [1級]
25. デンプン試液：水約 20mL にデンプン 1 g を懸濁させたものを、熱湯約 180mL にかくはんしながら少量ずつ加え、全体をかくはんして液が半透明になるまで煮沸後、放冷し上澄液を用いる。用時調製する。

[注]

- 1) 亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、ピロ亜硫酸カリウム及びピロ亜硫酸ナトリウムは指定添加物であり、亜硫酸水素カリウム液はピロ亜硫酸カリウムの、亜

硫酸水素ナトリウム液はピロ亜硫酸ナトリウムの製剤である。二酸化硫黄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。また、スクリーニング法として参考2に示す分析法がある。

- 2) 精製水中の溶存酸素によって微量の亜硫酸が硫酸に酸化されるので、本操作に用いる水は脱気したものを用いる。煮沸する代わりに、窒素ガス又はヘリウムガスを5分間通気して脱気してもよい。
- 3) 固体食品は、ばらつきが多く、とくに乾燥果実は個体差が大きいので均一化に注意する。
- 4) 溶液の色調は紫色から青みの緑に変わる。捕集液をあらかじめ中性とするための操作である。
- 5) 各試料の採取量は、ぶどう酒、天然果汁等の液体食品では20g、ねりわさび、糖蜜、水あめ、キャンデッドチェリー及び乾燥果実では5g、こんにゃく粉、切り干し大根、甘納豆、煮豆、みそ、チョコレート、にんにく、冷凍むきえび及びゼラチン等では1g、かんぴょうでは0.1~0.2gを参考に、二酸化硫黄含有量に応じて滴定量がビュレットの容量の範囲に収まるように調整する。試料の採取量が多すぎると膨潤や気泡を生じ、亜硫酸の測定値が低くなったり、測定不能になることがある。また、かんぴょう等では試料の採取量が少なく、二酸化硫黄の含有量が不均一である場合があるので、試行数を増し、同一検体について3試行の平均値を求めると比較的正確な値が得られる。
- 6) 膨潤し、流動性が失われるのを防ぐ目的で用いる。比色法（分析法B）では、エタノール中の不純物が定量の妨害となるので、高純度（高速液体クロマトグラフィー用）のものを使用する。
- 7) 液量調整の目的で加える。液体食品では加える必要はない。
- 8) 気泡止めの目的で用いる。多量のホルムアルデヒドが混在する市販品があり、これらを用いると定量妨害となる。
- 9) 二酸化硫黄として1mgに対応する亜硫酸水素ナトリウムを水20mLに添加し、これに5、10、15、20、25、30、40%及び50%のリン酸それぞれ10mLずつを加え、本操作による二酸化硫黄の回収率実験を行った結果では、5%リン酸の場合は65.2%と低いが、10%以上ではいずれも99%以上であった。なお、リン酸の含量は85.0%以上であり、リン酸試液はこの実験での25%リン酸に相当する^{文献1)}。
- 10) 二酸化硫黄として1mgに対応する亜硫酸水素ナトリウムを水20mLに添加し、窒素ガス流量を0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、1、1.2、1.5L及び2L/分として二酸化硫黄の回収率実験を行った結果では、窒素ガス流量が0.1、0.2、0.3L/分での回収率は、それぞれ15.2%、65.9%、92.5%と低いが、0.4~2L/分ではいずれも99%以上の回収率であった。しかし、有機酸含量の多いぶどう酒等の場合、窒素ガス流量が1.2L/分以上では有機酸の影響が大きくなり、二酸化硫黄の見かけ上の数値が高くなる。これらの実験より、窒素ガス流量を0.5~0.6L/分とした^{文献1)}。
- 11) 熱源として電気バーナー、マントルヒーター又は水浴を用いて加熱してもよい。マイクロ

バーナーに比べてフラスコ（B）内の温度上昇速度が異なるため、10分間の加熱では二酸化硫黄が完全に回収されない場合がある。予め回収に必要な加熱時間を確認する必要がある。

- 12) 炎が弱いと回収率が低下する場合があるが、試料が乾固したり、焦がしたりしないように注意する。

二酸化硫黄として1mgに対応する亜硫酸水素ナトリウムを添加した試料を用いた場合、5分間加熱で97.3~98.7%の二酸化硫黄が回収され、10分間加熱では99.4~100%の二酸化硫黄が回収された。しかし、実験条件（炎の強さ、流速等）によっては、10~20分間加熱部分に1.5~3.5%程度の微量の二酸化硫黄が残存することがある。また、キクラゲ等では、0~10分間加熱ではまったく二酸化硫黄は検出されず、10~20分間加熱部分に検出されるものがある。これは二酸化硫黄ではなく、キクラゲ中の含硫成分によるものと考えられる。

- 13) 本法における定量限界は、0.1g/kg（試料2g採取の場合）である。分析法Aにおいて、砂糖2gに二酸化硫黄として1mgに対応する亜硫酸水素ナトリウムを添加した場合（0.5g/kg相当）の5試行の平均回収率は93.3%（相対標準偏差（RSD）2.09%）であった。試料採取量の増加、マイクロビュレットの使用、滴定に用いる0.01mol/L水酸化ナトリウム溶液の希釈により、定量限界を下げるができる。

- 14) 放置中に空気中の二酸化硫黄ガスを吸収するので、調製後密栓して保存する。0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液のかわりに、参考1 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類確認分析法で使用する1%トリエタノールアミンを使用してもよい。

- 15) 検体中にホルムアルデヒド、アセトアルデヒド等が存在すると、パラローズアニリン・ホルムアルデヒド混液による亜硫酸の呈色が妨害されるので、これを防止する目的で用いる。アセトアルデヒド2.5gが存在してもその妨害は認められない。ジメドンは、必ず高速液体クロマトグラフィー用エタノールに溶かすこと。この溶液は放置すると、二酸化硫黄の回収率が低下するので、用時調製したものを用いる。

- 16) 亜硝酸による影響を防ぐ目的で用いる。亜硫酸1mgに対して亜硝酸0.05mgでは、ほとんど影響しないが、それ以上では妨害のおそれがある。アジ化ナトリウム溶液（1→100）1mLの添加により、亜硝酸1mgまでの影響を除くことができる。アルカリ滴定法は亜硫酸含量の高い検体に適用されるので、亜硝酸の影響はほとんど認められないが、アジ化ナトリウム溶液（1→100）を加えてもよい。一方、ネギ、玉ねぎ、ニンニク等の硫黄化合物を含む食品ではアジ化ナトリウム溶液を添加することで二酸化硫黄が生成される。これを防ぐにはアジ化ナトリウム溶液を添加せずに通気蒸留操作を行うことが有効である^{文献2)}。

- 17) アルカリ滴定法に比べて微量の亜硫酸を定量するため、試液及び装置中に酸素があると亜硫酸は硫酸に酸化されるので、置換の目的でこの操作を加える。二酸化硫黄として0.01mg添加の際、この操作を省略すると回収率は10~20%程度減少する。

- 18) 装置内の汚染の有無を確認するために実施する。そのため、定量の補正には使用しない。

参考1

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類確認分析法

1、分析法の概要

食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は、液体クロマトグラフィー又はイオンクロマトグラフィーにより確認を行う。(2018年設定)

2. 分析法

(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

図1の通気蒸留装置を用いる。

フラスコ(A)を25mL試験管(内径20mm)に変更し、その中に1%トリエタノールアミン(TEA)溶液を約9mL¹⁾入れ、装置に取り付ける。フラスコ(B)には、水20mL(液体食品の場合は入れない)、エタノール1mL、リン酸試液10mLを加え、装置に取り付ける。窒素ガスを流量計(G)を通して、0.8L/分の速度で5分間通気する。次にフラスコ(B)を外し、試料2g²⁾を速やかに入れ、再び装置に取り付け、窒素ガスを0.8L/分の速度で通気しながらマイクロバーナーの炎の高さを4~5cmとし、フラスコ(B)を約15分間加熱する。25mL試験管をはずし、捕集した液を1%TEA溶液で10mLとし、メンブランフィルター(0.45µm)でろ過して試験溶液とする。

(3) 標準溶液の調製

亜硫酸水素ナトリウムの純度(二酸化硫黄として、%)を、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類分析法の(4)検量線用標準溶液の調製を準用して求める。二酸化硫黄100mgに相当する量の亜硫酸水素ナトリウムを量り、1%TEA溶液に溶かして100mLとし、さらに同溶液で速やかに10倍希釈したものを二酸化硫黄標準原液とする(濃度 二酸化硫黄として100µg/mL)。標準原液を1%TEA溶液で希釈し、0.5~100µg/mLの溶液を調製し、これを検量線用標準溶液とする(濃度 二酸化硫黄として0.5~100µg/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件³⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフ又はイオン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⁴⁾: 強アニオン交換(第4級アミン)

カラム管：内径4mm、長さ200mm

カラム温度：40℃

移動相：1.8mmol/L炭酸ナトリウム・1.2mmol/L炭酸水素ナトリウム溶液

流速：1.0～1.5mL/分

測定波長：210nm⁵⁾

注入量：50μL

② 定量

試験溶液50μLを正確に量り、液体クロマトグラフ又はイオン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二酸化硫黄(SO₂)濃度を求め、次式によって試料中の二酸化硫黄含量を求める^{6,7)}。

$$\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = C \times V \times \frac{1}{1000 \times W}$$

C：試験溶液中の二酸化硫黄濃度 (μg/mL)

V：捕集液量 (mL)

W：試料の採取量 (g)

亜硫酸ナトリウム(無水)含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.968

亜硫酸ナトリウム(結晶)含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 3.936

次亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.359

ピロ亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.484

試薬・試液

1. 亜硫酸水素ナトリウム：[特級]
2. トリエタノールアミン：2, 2', 2''-ニトリロトリエタノール [特級]
3. 1%トリエタノールアミン(TEA)溶液：トリエタノールアミン10gを水に溶かして1000mLとしたのち、N₂ガスを5分間通気して脱気する。
4. エタノール：[99.5v/v%高速液体クロマトグラフ用] 遮光して保存する。
5. リン酸：[特級]
6. リン酸試液：リン酸100mLに水240mLを加える。
7. 炭酸ナトリウム：[特級]
8. 炭酸水素ナトリウム：[特級]
9. 0.1mol/L炭酸ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム10.6gを水に溶かして1000mLとする。
10. 0.1mol/L炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム8.4gを水に溶かして1000mLとする。
11. 1.8mmol/L炭酸ナトリウム・1.2mmol/L炭酸水素ナトリウム溶液：0.1mol/L炭酸ナ

トリウム 18mL と 0.1mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 12mL に水を加えて 1000mL とする。

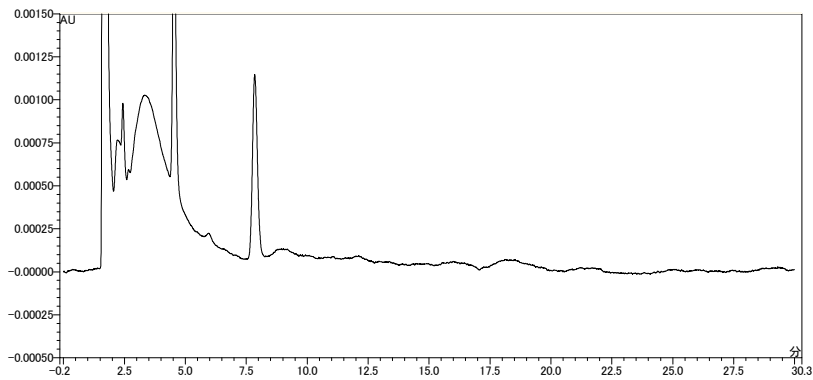
[注]

- 1) 蒸留操作中に液量が増えることがあるため、約 9mL とした。
- 2) 装置の感度が不十分な場合は試料採取量を 10g まで増やしてもよい。
- 3) 測定条件は例示である。イオンクロマトグラフに紫外可視吸光度検出器を接続していない場合、電気伝導度検出器でも高感度に測定できる。ただし、硫酸、リン酸等保持時間の近いピークとの分離の確認が必要である。
- 4) 分析の際は亜硫酸イオ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。
- 5) 亜硫酸イオンの測定可能な波長領域は 200~240nm であり^{文献1)}、食品由来の有機酸等の影響を避けるため松本らは 240nm での測定を推奨している^{文献2)}。しかし検出感度が十分でなかったため、240nm よりも感度のよい 210nm を測定波長とした^{文献3)}。
- 6) 本法における定量限界は、0.003 g/kg (2g 採取) である。
- 7) 本法による結果を注表 1 に、標準品と赤ワインのクロマトグラムを注図 1 に示す。

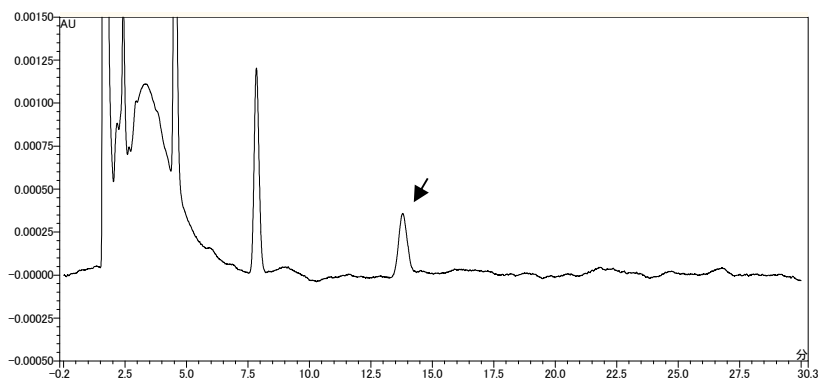
注表 1 各種食品中の二酸化硫黄測定値の比較結果

食品	亜硫酸塩類使用の表示	二酸化硫黄測定値(g/kg)		
		アルカリ滴定法	比色法	HPLC法
赤ワイン1	有	0.044	0.034	0.034
赤ワイン2	有	0.062	0.056	0.058
白ワイン1	有	0.096	0.084	0.077
白ワイン2	有	0.12	0.075	0.12
バルサミコ酢	有	0.0082	0.0012	不検出
赤ワインビネガー	有	0.012	不検出	不検出
白ワインビネガー	有	0.0080	不検出	不検出
タピオカ	有	不検出	不検出	不検出
かんぴょう1	有	1.5	1.4	1.3
かんぴょう2	無	不検出	不検出	不検出
乾燥果実マンゴー	有	0.31	0.28	0.38
乾燥果実あんず	有	0.83	0.84	0.88
真だこ	有	不検出	0.0039	0.0040
冷凍エビ	有	不検出	不検出	不検出
山菜水煮1	有	不検出	不検出	不検出
山菜水煮2	有	不検出	不検出	不検出
たけのこ水煮	無	不検出	不検出	不検出
白きくらげ1	無	不検出	不検出	不検出
白きくらげ2	無	不検出	不検出	不検出
塩漬くらげ	無	不検出	不検出	不検出
煮豆1	有	不検出	不検出	不検出
煮豆2	無	不検出	不検出	不検出

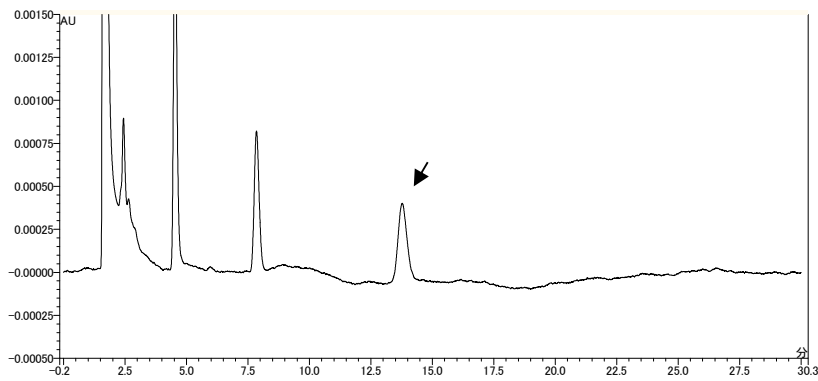
亜硫酸塩類使用の表示(有) の食品は 3 試行の平均、(無) の食品は 1 試行



(1) 亜硫酸塩未使用赤ワイン



(2) 亜硫酸塩未使用赤ワインに二酸化硫黄として5µg/g添加



(3) 標準溶液 (二酸化硫黄として1µg/mL)

注図1 亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) のクロマトグラム

カラム：強アニオン交換カラム（内径4mm、長さ200mm）、ガードカラム（内径4mm、長さ50mm）

カラム温度：40℃

移動相：1.8mmol/L炭酸ナトリウム・1.2mmol/L炭酸水素ナトリウム溶液

流速：1.5mL/分

検出波長：210nm

注入量：50µL

[文献]

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2015、357 (2015)、金原出版
- 2) 松本ひろ子ら：食衛誌、42、329 (2001)
- 3) 関戸晴子ら：神奈川衛研研究報告、41、24 (2011)

参考2

ヨウ素酸カリウム・デンプン紙による定性分析法

1. 分析法の概要

ヨウ素酸カリウム・デンプン紙の変色による定性試験により、食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の存在の有無を判定する。(2018年設定)

2. 分析法

(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) 標準溶液の調製

亜硫酸水素ナトリウムの純度(二酸化硫黄として、%)を、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類分析法の(4)検量線用標準溶液の調製を準用して求める。二酸化硫黄100mgに相当する量の亜硫酸水素ナトリウムを量り、0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液に溶解して100mLとし、標準原液とする。標準原液1mLを正確にとり0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液に溶かして10mLとし、二酸化硫黄標準溶液とする(濃度 二酸化硫黄として100 μ g/mL)。

(3) 測定法

液体試料はそのまま、固体の試料は細切し10gを100mLの三角フラスコ¹⁾にとり、水10~20mLを加えて振り混ぜ3~5分間放置した後²⁾、リン酸2mLを加え、ただちに下端約1cmを蒸留水でうるおしたヨウ素酸カリウム・デンプン試験紙³⁾を吊るしたコルク栓で溶液の面から約1cm上方になるように軽く栓をする。室温で60分間放置して試験紙の変色を観察する⁴⁾。別に、試料の代わりに水10mLに二酸化硫黄標準溶液0.2mL(二酸化硫黄20 μ g)を添加して試験溶液の調製を行い、試験紙の変色を確認する⁵⁾。

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類が存在するときは、試験紙の水でうるおした部分と乾いた部分の境界面の両脇から徐々に藍色を呈する^{6~8)}。

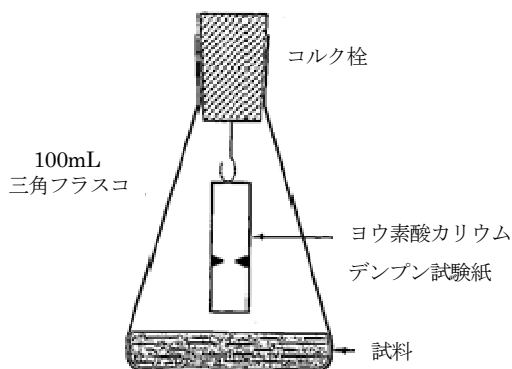


図1 ヨウ素酸カリウム・デンプン紙による定性法

試薬・試液

1. ヨウ素酸カリウム：[特級]
2. 0.2%ヨウ素酸カリウム溶液：ヨウ素酸カリウム 0.2 g を水に溶かして 100mL とする。
3. デンプン：でんぷん（溶性）[1級]
4. デンプン試液：水約 20mL にデンプン 1g を懸濁させたものを、熱湯約 180mL に攪拌しながら少量ずつ加え、全体をかくはんして液が半透明になるまで煮沸後、放冷し上澄液を用いる。用時調製する。
5. ヨウ素酸カリウム・デンプン試験紙：0.2%ヨウ素酸カリウム溶液およびデンプン試液の等量混合液にろ紙を十分に浸し、暗所で風乾する。遮光、密栓して保存する。使用期限 5 年
6. リン酸：[特級]

[注]

- 1) 大きさが大きい試料には、200mL の三角フラスコも使用できる。
- 2) 固体試料の場合、水となじませるために放置する。かんぴょう等は水 20mL では十分に試料と水がなじまないため、水の量を 50mL に増やすとよい。
- 3) 市販品も使用できる。
- 4) 室温で 10～20 分で試験紙が藍色に変色しないときは、少し栓をゆるめ、50℃の水浴又はホットプレート上等で数分間加温して観察する方法もある。加温しても、なお藍色を呈しないときは、再び密栓して放冷する。その際 30 分以内に試験紙が藍色に変わらないときは、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は存在しない。
- 5) 感度の確認をする。本分析法は二酸化硫黄として 10μg まで確認可能である。二酸化硫黄は酸化しやすいため、感度の確認は 20μg で実施すると明瞭な試験紙の変色を確認できる。
- 6) しょう油、酢等を含む試料は、明瞭な呈色を示さない。
- 7) $2 \text{KIO}_3 + 5 \text{SO}_2 + 5 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{I}_2 + \text{K}_2\text{SO}_4 + 4 \text{H}_2\text{SO}_4$
発生したヨウ素がデンプンで藍色になる。過量の二酸化硫黄が存在するときは、一度発現した藍色は消失する。
 $\text{I}_2 + \text{SO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{HI} + \text{H}_2\text{SO}_4$
従って、試験紙を吊るしてから数分間は、観察を継続する必要がある。
- 8) 本法における結果を注表 1 に示す。

注表1. ヨウ素酸カリウム・デンプン紙法とアルカリ滴定法の比較

食品	亜硫酸塩類 使用の表示	よう素酸カリウム・でんぷん紙法			アルカリ滴定法*	
		試料採取量 (g)	加えた水の 量(mL)	結果	試料採取量 (g)	SO ₂ 定量値 (g/kg)
赤ワイン	有	10.0	10	+	20.0	0.067
かんぴょう	有	10.0	50	+	0.1	1.8
乾燥マンゴー	有	10.0	10	+	5.0	0.32
中華くらげ	有	10.0	10	-	2.0	0.008

3 試行の平均値

*アルカリ滴定法

(マイクロビュレット使用、0.01mol/L水酸化ナトリウム溶液を10倍希釈して使用)

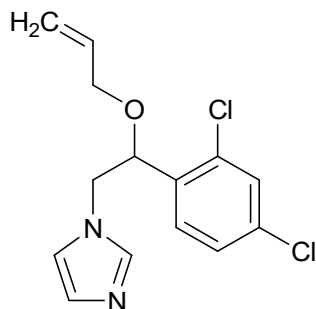
[文献]

日本薬学会編：衛生試験法・注解 2015、352 (2015)、金原出版

防かび剤

イマザリル

Imazalil



$C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$: 297.18

1. 分析法の概要¹⁾

食品中のイマザリルは、アルカリ性下に酢酸エチルで抽出後、硫酸溶液及び酢酸エチルによる液液分配により精製し、液体クロマトグラフィーにより定量する。(2000年設定、2019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

① かんきつ類

果実約1kgを精密に量り、必要に応じて適量の水を量って加え、細切均一化する^{2,3)}。

② バナナ

果柄部を除去した果実約1kgを精密に量り、必要に応じて適量の水を量って加え、細切均一化する^{2,4)}。

③ 加工食品

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製⁵⁾

試料約10gを精密に量り、5mol/L水酸化ナトリウム溶液2mL⁶⁾及び無水硫酸ナトリウム⁷⁾を20~40g加えて十分にかくはんし、酢酸エチル50mLを加え、3分間ホモジナイズする。遠心(10分間、3000回転/分)した後、上清を分取する。沈殿物に酢酸エチル50mLを加え、同様に操作する。全上清を分液漏斗に合わせ、5%炭酸ナトリウム溶液50mL、水50mLで順次洗浄した後水層を捨てる。次いで酢酸エチルに0.025mol/L硫酸溶液50mLを加え、振り混ぜた後、水層を分取し、この操作を更に1回繰り返す。全水層を分液漏斗に合わせる。水層に5mol/L水酸化ナトリウム溶液5mLを加えた後⁸⁾、酢酸エチル25mLを加えよ

く振り混ぜる。この操作を更に1回繰り返す、酢酸エチル層を分取し、無水硫酸ナトリウム10gで脱水後、減圧乾固する。残留物はメタノール/水混液(75:25)5mLを加えて溶解し、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁹⁾

イマザリル50.0mgを量り、メタノールに溶かし正確に100mLとして標準溶液とする(濃度500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。標準溶液をメタノール/水混液(75:25)で適宜希釈し、1mL中にイマザリルが1~10 μg を含むように検量線用標準溶液を調製する¹⁰⁾(濃度1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

(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：メタノール/水混液(75:25)

流速：1mL/分

測定波長：230nm

注入量：20 μL

② 検量線¹²⁾

検量線用標準溶液20 μL ずつをそれぞれ量り、液体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^{13,14)}

試験溶液20 μL 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イマザリル濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)を求め、次式によって試料中¹⁵⁾のイマザリル含量(g/kg)を計算する。

$$\text{イマザリル含量 (g/kg)} = \frac{C \cdot V}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中のイマザリル($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V：試験溶液の量(mL)

W：試料の採取量(g)

④ 定量限界 0.0005g/kg

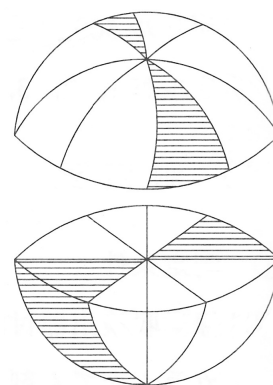
試薬

1. イマザリル：イマザリル標準品 [残留農薬試験用]

2. 水酸化ナトリウム：[特級]
3. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [残留農薬試験用]
4. 酢酸エチル：[残留農薬試験用]
5. 無水炭酸ナトリウム：炭酸ナトリウム [特級]
6. 硫酸：[特級]
7. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 農薬としてイマザリルが使用される場合の残留基準は、食品添加物として使用される場合（みかんを除くかんきつ類に 5.0ppm、バナナに 2.0ppm）よりも著しく低いもの（小麦に 0.01ppm、米等に 0.05ppm）もある。したがって農薬としてのイマザリルの分析法は高感度が要求され、食品添加物としてのイマザリルの分析法よりも煩雑になっている。食品添加物としてのイマザリルを分析するには、ここに記載した方法で対応できる。
- 2) 「食品、添加物等の規格基準 第1食品 A食品一般の成分規格6 (2) 検体」及び「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）別添「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」参照。
- 3) 果実 5～10 個を選び、8 分割法により平均的に検体 250～300 g をとり、ホモジナイズして試料としてもよい。8 分割法：箱又はロットの各段から、平均的な大きさのもの 5～10 個を選び、それぞれについて注図 1 のように分割し、これらのうち図中の斜線部分にあたる部位 20～40 片を検体のそれぞれから均等にとり、ホモジナイズして試料とする。水分の少ないかんきつ類の場合、果皮と果肉を分離し、果肉をホモジナイズした後、細断した果皮を少量ずつ加えながらホモジナイズすると均等な試料になりやすい。レモン、ネーブル等の果皮の硬いかんきつ類では、同量の水を精密に量って加え、ホモジナイズし、その約 100 g を精密に量って試料としてもよい。
- 4) 1～2 房のバナナから 3～4 本を任意に採取し、先端及び果柄部を可食部の近くで切断する。果肉を果皮ごと約 1 cm ずつの輪切りにしたものを交互に、各検体についてほぼ均等に約 200 g 採取し、ホモジナイズして試料としてもよい。
- 5) オルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、ジフェニル及びチアベンダゾールの分析法の試験溶液調製法を適用する場合は、酢酸エチル層を合わせた後、本法の試験溶液の調製に記載の 0.025mol/L 硫酸溶液 50mL を加える操作以降を実施する。ただし、分析対象により夾雑成分の影響を除去できない場合もあるので、その場合は本法

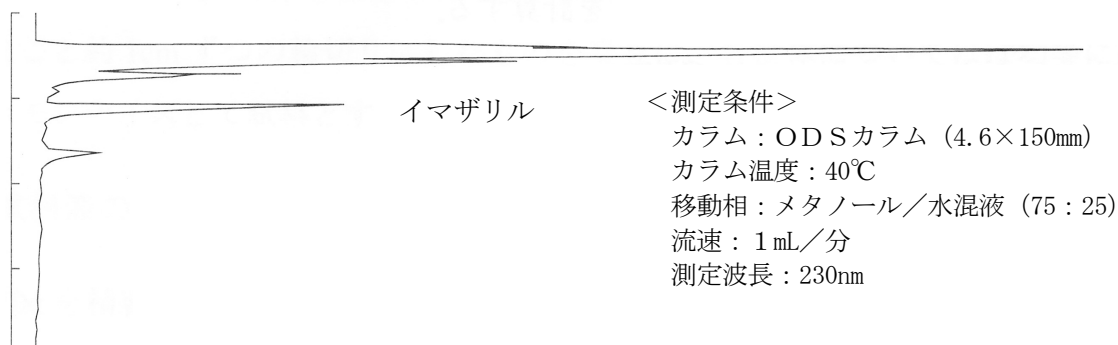


注図 1 試料採取法

(イマザリルの分析法) を用いること。

- 6) 試料抽出液の液性に注意する。特に、試料がレモン等の酸性の強い柑橘類の場合、水層がアルカリ性であることを確認する。
 - ・ 試料からの抽出時は、水層はアルカリ性
 - ・ 酢酸エチル-硫酸水溶液分配時は、水層は酸性
 - ・ 酢酸エチル-水酸化ナトリウム溶液分配時は、水層はアルカリ性なお、酸性は pH 1 付近、アルカリ性は pH11 付近を目安にする。
- 7) かんきつ類のジュースには使用しなくてよい。
- 8) 塩化ナトリウムを飽和させると回収率が向上する。
- 9) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜、調整してもよい。
- 10) 試験溶液中の濃度が低濃度の場合は、検量線を 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように標準原液を適宜希釈して検量線を作成する。
- 11) 測定条件は例示である。用いるカラムの内径及び長さによって、流速及び注入量等を調整する。
- 12) 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。
- 13) 本法による液体クロマトグラムの一例を注図 2 に示す。

試料：オレンジ



注図 2 イマザリルの液体クロマトグラム

- 14) 本法による添加回収試験結果は、次のとおりである。
 - ① 試料・添加量：レモン 5 $\mu\text{g}/10\text{g}$ 、回収率 (%)：79.2、77.7、78.9、平均値 (%)：78.6
 - ② 試料・添加量：レモン 25 $\mu\text{g}/10\text{g}$ 、回収率 (%)：72.8、74.4、73.2、平均値 (%)：73.5
- 15) 試料の調製の際に水を添加した場合には、次式により、検体中のイマザリル含量を求める。

$$\text{イマザリル含量 (g/kg)} = \frac{C \times 5}{W \times 1000} \times \frac{W_1 + W_2}{W_1}$$

C : 試験溶液中のイマザリル ($\mu\text{g/mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

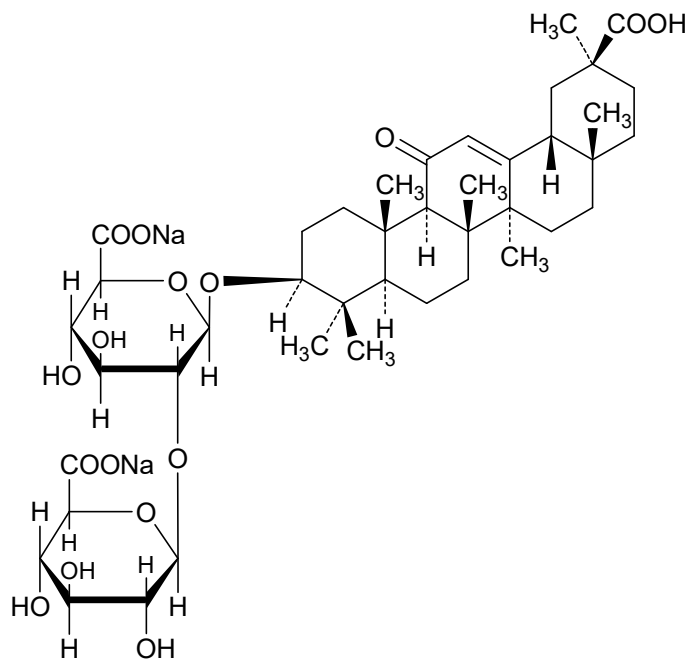
W_1 : 検体の採取量 (g)

W_2 : 検体に添加した水の量 (g)

甘味料

グリチルリチン酸二ナトリウム

Disodium Glycyrrhizinate



$C_{42}H_{60}Na_2O_{16}$: 866.90

1. 分析法の概要

食品中のグリチルリチン酸二ナトリウムは、1%アンモニア水・メタノール試液で抽出後、順相固相抽出カラムでクリーンアップし、液体クロマトグラフィーによりグリチルリチン酸として定量する。本法の対象には、カンゾウ抽出物のグリチルリチン酸も含まれる¹⁾。(2000年設定、2019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 液状食品

試料約10gを精密に量り、1%アンモニア水・メタノール試液を加えて正確に100mLとする。よく振とうした後、遠心(10分間、3000回転/分)する。上層20mLを正確に分取した後、順相固相抽出カラムに約2mL/分で負荷し、1%アンモニア水・メタノール試液で洗浄後、固相抽出カラムに空気を通して残留するメタノールを除去する。溶出溶媒に水

を使用し、溶出液を 10mL に定容したものを試験溶液とする²⁾。

② 固形食品

試料約 10 g を精密に量り、1 %アンモニア水を 10mL 加えて 1 分間ホモジナイズし、これに 1 %アンモニア水・メタノール試液 40mL を加えて 3 分間ホモジナイズする³⁾。さらに、1 %アンモニア水・メタノール試液を加えて正確に 100mL とする。よく振とうした後、遠心 (10 分間、3000 回転/分) する。上層 20mL を正確に分取した後、以下①液状食品と同様に固相抽出カラムで処理し、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

グリチルリチン酸 0.100 g を量り、50%メタノールに溶解して正確に 100mL とする。その 10mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする (濃度 100 μ g/mL)。標準溶液 0.5、1、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 0.5~10 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 4.6mm、長さ 150~250mm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル/メタノール/2%酢酸混液 (12 : 5 : 15)

流速：1.0mL/分

測定波長：254nm

注入量：10 μ L

② 検量線⁶⁾

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^{7,8)}

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グリチルリチン酸濃度 (μ g/mL) を求め、次式によって試料中のグリチルリチン酸含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{グリチルリチン酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times V \times 5}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中のグリチルリチン酸濃度 (μ g/mL)

V : 試験溶液の容量 (mL)

W：試料の採取量（g）

④ 定量限界 0.0025g/kg

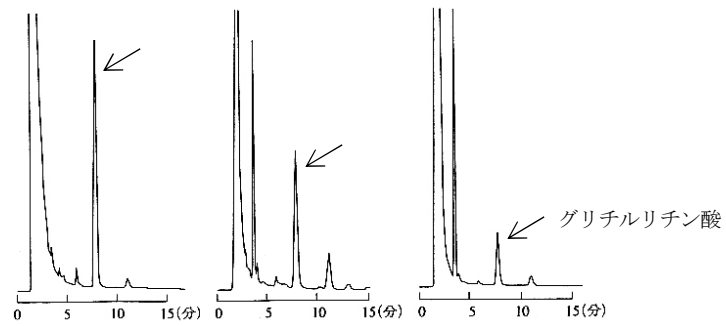
試薬・試液

1. グリチルリチン酸：市販品を用いる。
2. アンモニア水：含量28% [特級]
3. メタノール：[特級] 及び [高速液体クロマトグラフィー用]
4. 1%アンモニア水・メタノール試液：アンモニア水10mLにメタノール270mLを加える。
5. 1%アンモニア水：アンモニア水10mLに水270mLを加える。
6. 順相固相抽出カラム：アルミナ固相抽出カラム。使用前にメタノール10mLでコンディショニングする。
7. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
8. 酢酸：[特級]

[注]

- 1) グリチルリチン酸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) 本法は塩化ナトリウムや保存料、サッカリンナトリウム等の妨害はない。
- 3) ソースやみそ等の半固形及び固形食品は、1%アンモニア水でホモジナイズした後、1%アンモニア水・メタノール試液で抽出することにより回収率が向上する。
- 4) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、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、流速及び注入量等を調整する。分析の際は、グリチルリチ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。
- 6) 必要に応じて、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。
- 7) グリチルリチン酸の液体クロマトグラムを注図1に示す。

(a) しょう油抽出物 (b) 福神漬抽出物 (c) グリチルリチン酸



〈測定条件〉

カラム：ODSカラム（内径4.6mm、長さ150mm）

測定波長：254nm

注図1 グリチルリチン酸の液体クロマトグラム

8) 本法の添加回収率は90%以上（魚肉ねり製品は87%）である。

参考

グリチルリチン酸二ナトリウム確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のグリチルリチン酸二ナトリウムは、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質量分析によりグリチルリチン酸として確認を行う。(2018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

(2) 試験溶液の調製

(3) 標準溶液の調製¹⁾

上記(1)～(3)については、グリチルリチン酸二ナトリウム分析法を準用する。

(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

カラム管：内径2.0mm、長さ150mm

カラム温度：40℃

移動相：A液 0.2vol%ギ酸

B液 0.2vol%ギ酸含有アセトニトリル

リニアグラジエントの条件⁴⁾

分	A (%)	B (%)
0	95	5
15	20	80
16	20	80
16.1	95	5
26	95	5

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI (-)

検出法：①LC-MS-選択イオン検出(SIM)、②LC-MS/MS-選択反応検出(SRM)

主なイオン：①LC-MS- m/z 21、②LC-MS/MS-プリカーサーイオン m/z

821、プロダクトイオン m/z 351, 113

注入量：10 μ L

② 定性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に検出されたピークの保持時間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

1. ギ酸：[98% 特級]
2. 0.2vol%ギ酸：ギ酸2mLに水を加えて1000mLとする。
3. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
4. 0.2vol%ギ酸含有アセトニトリル：ギ酸2mLにアセトニトリルを加えて1000mLとする。

[注]

- 1) 質量分析計の感度に応じて適宜希釈すること。
- 2) 測定条件^{文献¹⁾}は例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、グリチルリチ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、検量線用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) 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。
- 5) LC-MSを用いて定性確認を行う場合、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。

[文献]

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：平成17年1月24日食安発第0124001号

製造用剤

ケイ酸マグネシウム

Magnesium Silicate

1. 分析法の概要

油脂中のケイ酸マグネシウムは、原子吸光法によりマグネシウムとして定量し、分子量比を乗じてケイ酸マグネシウムの量として求める。油脂中には天然のマグネシウムが分布している。したがって、定量値は油脂由来のマグネシウムと添加されたものとの合計値である。(2010 設定、2019 年改正)

2. 分析法 (原子吸光法)

(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¹⁾

試料約 5 g を精密に量り、灰化容器²⁾に入れる。これを熱板上で加熱し³⁾、着火して⁴⁾炭化させる。灰化容器にふた⁵⁾をし、電気炉に入れて室温から 30 分間に約 500°C の速度で昇温させ、500°C に達したら 5 時間保持して灰化させる⁶⁾。電気炉の電源を切り、扉を少し開けて温度を下げる。電気炉の炉内温度が約 200°C 以下に下がったら、灰化容器を取り出す。黒色の炭素粒が残っている場合は同じ条件で再灰化を行う⁶⁾。放冷後、20%塩酸 5 mL を加えて残留物を溶解させ、熱板上で加熱して、蒸発乾固させる。20%塩酸 3 mL を加えて 60°C の水浴中で加温しながら残留物を溶かし、100 mL のメスフラスコに移す⁷⁾。灰化容器内を 20%塩酸 1 mL で洗浄し、洗液はメスフラスコに合わせる⁷⁾。容器に 20%塩酸 1 mL を加えて同様の操作を繰り返す⁸⁾。水を用いて正確に 100 mL とし、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製^{1,9)}

マグネシウム標準原液 1 mL を正確に量り、1%塩酸を加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする (濃度 10 µg/mL)。標準溶液を適宜 1%塩酸で希釈し、0.05~0.5 µg/mL の検量線用標準溶液とする。

(4) 空試験溶液の調製

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。

(5) 測定溶液の調製

検量線用標準溶液、試験溶液及び空試験溶液それぞれに、ストロンチウム濃度が 0.5 w/v % となるようにストロンチウム溶液を一定量混合したものを測定溶液とする¹⁰⁾。

(6) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

原子吸光度計を用い、次の条件によって測定する。

光源ランプ：マグネシウム中空陰極ランプ

分析線波長：285.2nm

可燃性ガス（流量）：アセチレン（2.0～2.5L/分）

支燃性ガス（流量）：空気（14L/分）

② 検量線¹²⁾

検量線用標準溶液の測定溶液それぞれにつき吸光度を測定し、得られた吸光度から検量線を作成する。

③ 定量^{13,14)}

試験溶液及び空試験溶液の測定溶液につき吸光度を測定する。得られた両者の吸光度の差を求め、その値と検量線から試験溶液中のマグネシウム濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を求め、次式によって検体中のマグネシウム含量（ g/kg ）を計算する。

$$\text{マグネシウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中のマグネシウム濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

W：試料の採取量（g）

ケイ酸マグネシウム含量（ g/kg ）＝マグネシウム含量（ g/kg ） $\times 8$ ¹⁵⁾

④ 定量限界 マグネシウムとして 0.001 g/kg

試薬・試液

1. マグネシウム標準原液¹⁶⁾：市販の原子吸光分析に適した標準液（Mg:1000mg/L）を用いる。
2. 20%塩酸：市販の精密分析用を用いる。
3. 1%塩酸：20%塩酸を水で20倍に希釈する。
4. ストロンチウム溶液¹⁷⁾：干渉抑制剤の塩化ストロンチウム溶液（市販の原子吸光分析用、ストロンチウムとして10 \pm 0.1w/v%のもの）を用いる。

[注]

- 1) 試験に用いる器具類は、使用前に1%塩酸で十分洗うか、又は1%塩酸に一夜つけておき、水で洗浄後、乾燥させたものを用いる。特にガラス器具は、高濃度のコンタミネーションがあるため注意する。
- 2) ふた付きの磁製のつぼが適当である。

- 3) 熱板や電熱器等 500°C程度まで加熱できるものを用いる。ただし、試料温度が 500°Cを超えないよう注意する。
- 4) 油脂が引火点付近まで十分加熱され、蒸発が激しくなった時点で着火する。着火操作は、マグネシウムの蒸発を抑えるため、電子ライター等、極力低温の炎を用いて、短時間で行う。
- 5) 灰化時の試料の飛散を防ぐ。ろつぼ用のふたの代わりに時計皿等を用いてもよい。
- 6) 試料に応じ、灰化を十分にするために昇温速度、灰化時間は変更してもよい。ただし、マグネシウムの蒸発を防ぐため、500°C以下で灰化を行う。
- 7) 不溶物が残っている場合は、原子吸光分析装置のネブライザーが詰まるため、あらかじめ、1%塩酸を用いて数回洗浄し、マグネシウムの溶出が無いことを確認した J I S 5 又は 6 種のろ紙を用い、メスフラスコにろ過する。あるいは、試験溶液の上清を測定溶液の調製に用いてもよい。
- 8) 試験溶液の塩酸濃度は 1%となる。
- 9) 3 濃度以上の検量線用標準溶液を調製する。また、検量線の範囲は、直線性が得られることを確認したうえで、必要に応じて変更してもよい。
- 10) マグネシウムは、試験溶液中にリン酸、硫酸あるいはケイ酸の化学干渉を受けるといわれているため、干渉抑制剤としてストロンチウムを加える。
- 11) マグネシウム濃度が高すぎる場合は、原子吸光分析装置のバーナーヘッドを回転させ、感度を落とし、測定する。又は、試験溶液を 1%塩酸で希釈した液を試験溶液とし、測定液を調製する。
- 12) 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。
- 13) 空試験溶液からは 0~0.02µg/mL 程度 (試料 0~0.4µg/g 程度相当) が検出される。
- 14) サラダ油にマグネシウム標準溶液を 0.001 g/kg 相当量添加した場合の回収率は 91.0% (試行数 5 回)、また、0.010 g/kg 相当量添加した場合の回収率は 99.5% (試行数 11 回) であった。なお試験を実施する際にあっては当該製品のろ過前のマグネシウム濃度を確認のうえ、実施することが望ましい。
- 15) ケイ酸マグネシウムは、酸化マグネシウム (MgO : 40.30) と二酸化ケイ素 (SiO₂ : 60.08) のモル比が約 2 : 5 の合成化合物であると定義されている。マグネシウムの原子量は 24.30 であるため、分子量比 = $(40.30 \times 2 + 60.08 \times 5) / (24.30 \times 2) \div 8$ を乗じる。
- 16) 塩化マグネシウム六水和物 8.363 g を量り、1%塩酸 100mL を加えて溶かし、水を加えて正確に 1000mL としたもの (Mg : 1000µg/mL) を用いてもよい。
- 17) 塩化ストロンチウム六水和物 (原子吸光分析用) 15.215g に 1%塩酸を加えて 100mL としたものを用いてもよい (ストロンチウムとして 5 w/v%)。

製造用剤等

ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム

Calcium Stearoyl Lactylate and Sodium Stearoyl Lactylate

1. 分析法の概要

食品中のステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム¹⁾は、けん化して得られる乳酸を2-ニトロフェニルヒドラジンで誘導体化して液体クロマトグラフィーにより測定し、得られた乳酸含量をもとにステアロイル乳酸カルシウムとして定量する。(2010年設定、2019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

試料²⁾を細切又は粉碎した後、約2.5gを精密に量り、塩酸(1→100)20mL、酢酸エチル15mL及び塩化ナトリウム2gを加えて激しく振とう後³⁾、遠心(5分間、3000回転/分)して酢酸エチル層をとる⁴⁾。この操作を3回繰り返す、得られる酢酸エチル層を50mLに定容する。その液5mLを正確にとり、ねじ口付き試験管に入れ、60℃水浴中で加温しながら窒素気流下で濃縮し、残留物を得る⁵⁾。

② 誘導体化

得られた残留物に1w/v%水酸化カリウム・エタノール試液1mLを加え、密栓して95℃の水浴中で60分間加熱する⁶⁾。水0.5mLを加えた後、95℃の水浴中で加熱してエタノールを留去した後、ただちに塩酸(1→100)2mLを加え、逆相固相抽出カラムに全量を負荷し、溶出液は5mLのメスフラスコに受ける。さらに塩酸(1→100)で溶出し、溶出液を5mLに定容する。その液1mLを正確にとり、0.02mol/L 2-ニトロフェニルヒドラジン試液200μL、0.25mol/L 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド試液200μLを加え、60℃水浴中で20分間加温する⁷⁾。5w/v%水酸化カリウム試液200μLを加え、60℃水浴中で15分間加温する⁸⁾。室温まで放冷後、塩酸(1→100)で5mLに定容し、メンブレンフィルター(0.45μm、水系)を通して試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁹⁾

乳酸リチウムを105℃で4時間乾燥し、0.106gを量り、水を加えて溶かし正確に100mLとする。この液25mLを正確にとり、水を加えて正確に100mLとし、標準原液とする(濃度 乳酸として250μg/mL)。標準原液5、10、20、50mL及び100mL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 乳酸として 12.5～250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準溶液 1 mL をそれぞれねじ口付き試験管に正確にとり、(2) 試験溶液の調製②誘導体化の操作を行い、検量線用標準溶液とする（濃度 乳酸として 0.5～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

(4) 測定法

① 測定条件¹⁰⁾

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¹¹⁾：オクチ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

移動相：0.1vol%ギ酸/メタノール混液（75：25）

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

流速：1.0mL/分

測定波長：400nm

注入量：20 μL

② 検量線¹²⁾

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^{13～15)}

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から試験溶液中の乳酸濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を求め、次式によって試料中のステアロイル乳酸カルシウムの含量（g/kg）を計算する。

$$\text{ステアロイル乳酸カルシウム含量 (g/kg)} = \frac{C}{W}$$

C：試験溶液中の乳酸濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

W：試料の採取量（g）

④ 定量限界 ステアロイル乳酸カルシウムとして 0.2 g/kg

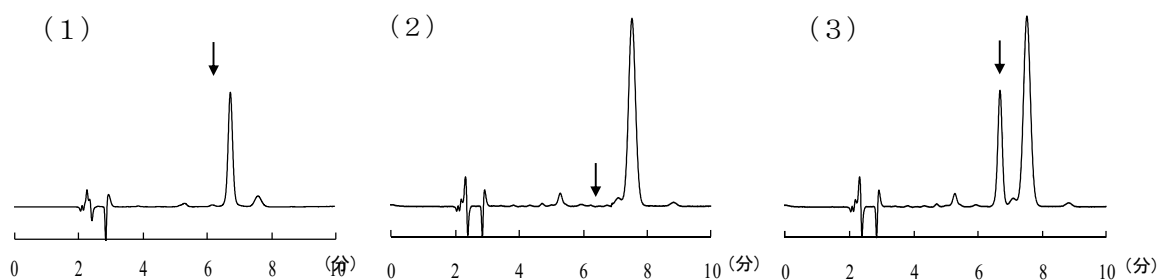
試薬・試液等

1. 乳酸リチウム：純度 98%以上のものを用いる。
2. 塩酸：[特級]
3. 酢酸エチル：[特級]
4. 塩化ナトリウム：[特級]
5. 水酸化カリウム：[特級]
6. エタノール：エタノール（95）[特級]
7. 1 w/v%水酸化カリウム・エタノール試液：水酸化カリウム 1.0g を 5 mL の水に溶かし、エタノールを加えて 100mL とする。密栓保存する。

8. 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/6 mL)。使用前にメタノール 10mL 及び塩酸 (1→100) 10mL で順次コンディショニングをする。
9. 2-ニトロフェニルヒドラジン：市販品を用いる。
10. 0.02mol/L 2-ニトロフェニルヒドラジン試液：2-ニトロフェニルヒドラジン 0.206 g を 15mL の水に溶かし、エタノールを加えて 50mL とする。この液と塩酸 (1→100) を 3 : 1 で混合する。冷暗所で保存し、一か月以内に使用する。
11. 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩：市販品を用いる。
12. ピリジン：[特級]
13. 0.25mol/L 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド試液：1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 2.39 g を 3 w/v %ピリジン含有エタノールに溶かして 50mL とする。冷暗所に保存し、一か月以内に使用する。
14. 5 w/v %水酸化カリウム試液：水酸化カリウム 5.0 g を 50mL の水に溶かし、エタノールを加えて 100mL とする。
15. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
16. 0.1vol%ギ酸：ギ酸 11mL をとり、水で 1000mL とする。これを 10 倍希釈して使用する。

[注]

- 1) ステアロイル乳酸類のカルシウム又はナトリウム塩を主成分とし、これとその関連酸類及びそれらのカルシウム又は同ナトリウム塩との混合物である^{文献1,2)}。
- 2) 試料にはジャムやあん、クリーム等を除いた部分のみを用いる。パン、クッキー、ドーナツ、スポンジケーキ、マカロニ、乾めん等の乾燥固体試料は粉碎し、生めん、団子等の粘性がある試料は細切する。ミックスパウダー等の粉体試料はそのまま用いる。
- 3) 団子及び生うどん等の細切した試料は一度ホモジナイズした後に振とうする。
- 4) 酸性条件下でステアロイル乳酸カルシウム又は同ナトリウムをステアロイル乳酸として酢酸エチル層にとる操作である。この操作によってステアロイル乳酸カルシウム又は同ナトリウム及び食品由来の遊離の乳酸を除くことができる。
- 5) けん化及び誘導体化操作によって抽出操作に用いる酢酸エチルから酢酸誘導体が生じる。ステアロイル乳酸をけん化して得られる乳酸誘導体と酢酸誘導体とは、液体クロマトグラフィーで分離が可能であるが、窒素ガス気流下で酢酸エチルを十分に留去することが望ましい。
- 6) ステアロイル乳酸類をけん化し、ステアリン酸、乳酸の構成分子に分解する操作である。ただし、試料中にグリセリン脂肪酸エステルのような乳酸エステルが入っている場合はそれ由来の乳酸を量りこむため、参考2で述べる液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)によるステアロイル乳酸の確認試験を行うのが望ましい。



- (1) 検量線用標準溶液 (乳酸として $4\mu\text{g}/\text{mL}$)
 (2) クッキー (ステアロイル乳酸ナトリウム無添加)
 (3) クッキー (ステアロイル乳酸ナトリウム添加)

カラム：C8カラム (内径 4.6mm、長さ 150mm、粒径 $5\mu\text{m}$)
 移動相：0.1vol%ギ酸/メタノール混液 (75:25)
 カラム温度： 40°C
 流速：1.0mL/分
 測定波長：400nm
 注入量：20 μL

注図1 検量線用標準溶液及びステアロイル乳酸ナトリウムを添加した試料から得られた試験溶液の液体クロマトグラム

15) ステアロイル乳酸ナトリウムを $2\text{g}/\text{kg}$ 添加での各種食品の添加回収率を注表1に示す。

注表1 ステアロイル乳酸ナトリウムの各食品での回収率

食品	回収率(%)	相対標準偏差(%)
クッキー*	87.4	4.3
パン*	83.5	4.2
ドーナツ*	96.6	5.9
スポンジケーキ*	102.1	5.5
蒸しまんじゅう*	97.8	3.8
団子*	94.1	2.6
生うどん	92.5	2.5
乾麺	97.3	3.3
マカロニ	88.3	4.8
ミックス粉	79.5	6.8

*乳化剤フリーの製品を作り、試験に用いた。

各試料にステアロイル乳酸ナトリウムを $2\text{g}/\text{kg}$ 添加

試行回数 10回

[文献]

- 1) 箕川剛ら：日食化誌、19、178 (2012)
- 2) 久保田浩樹ら：食衛誌、53、14 (2012)
- 3) Miwa, H. *et al.* : J.Chromatogr.、321、165 (1985)

参考

ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウムは、けん化して得られる乳酸の2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体(分析法A)又はステアロイル乳酸(分析法B)として液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う。(2018年設定)

2. 分析法

分析法A(乳酸の2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体の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

(3) 標準溶液の調製

上記(1)～(3)については、ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム分析法を準用する。

(4) 測定法

① 測定条件^{1,2)}

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^{3,4)}: オクチ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/vol%ギ酸/メタノール混液(75:25)

流速: 0.2mL/分

イオン化モード: ESI(-)

検出法: 選択イオン検出(SIM)

主なイオン: m/z 224⁵⁾

注入量: 0.5 μ L

② 定性⁶⁾

試験溶液及び標準溶液をLC-MSに注入し、クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が標準溶液と一致することを確認する⁷⁾。

分析法B(ステアロイル乳酸の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

ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム分析法の(2)試験溶液の調製①抽出で得られた酢酸エチル溶液5mLを分取し、濃縮後、エタノールを50mL加え、試験溶液とする。

(3) 標準溶液の調製

ステアロイル乳酸ナトリウム0.100gを量り、エタノールを加えて正確に100mLとする。この液10mLを正確にとり、エタノールを加えて正確に100mLとし、標準原液とする。標準原液1、5及び10mLを正確にとり、エタノールを加えて正確に100mLとし、標準溶液とする。

(4) 測定法

① 測定条件

LC-MSを用い、次の条件によって測定する^{1,2)}。

カラム充填剤³⁾：オクチ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：アセトニトリル/0.1/vol%ギ酸混液（9：1）

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI（-）

検出法：選択イオン検出（SIM）

主なイオン： m/z 355（ステアロイル-乳酸）⁸⁾

注入量：1 μ L

② 定性⁶⁾

試験溶液及び標準溶液をLC-MSに注入し、クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が標準溶液と一致することを確認する⁹⁾。

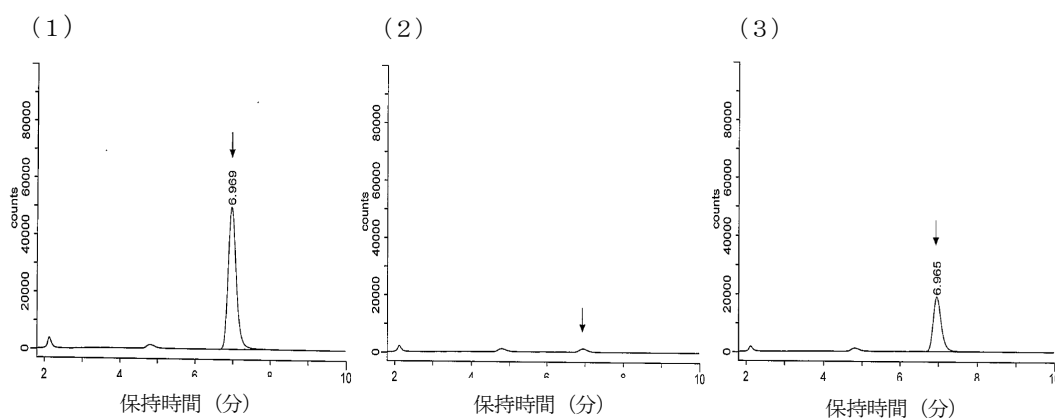
試薬・試液等

1. ステアロイル乳酸ナトリウム：食品添加物用を用いる。
2. ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム分析法の試薬・試液を準用する。
3. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。
- 2) 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強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。

- 3) 分析の際は、被験物質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) オクタデシルシリル化シリカゲルを充填剤としたカラムによる分析も報告されている^{文献1)}。
- 5) 乳酸の2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体の[M-H]⁻イオンである。
- 6) 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。
- 7) 本法で処理した検量線用標準溶液及びクッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム無添加及び添加）の試験溶液のLC-MSクロマトグラムを注図1に示す。

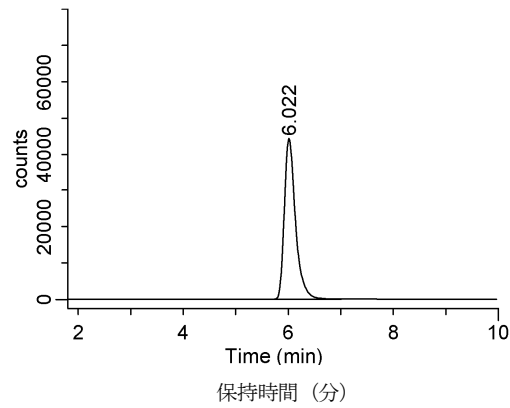


- (1) 検量線用標準溶液（乳酸として10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）
- (2) クッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム無添加）
- (3) クッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム添加）

カラム：C8カラム（内径2.0mm、長さ150mm、粒径5 μm ）
 移動相：0.1vol%ギ酸/メタノール混液（75：25）
 カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$
 流速：0.2mL/分
 イオン化モード：ESI（-）
 検出法：選択イオン検出（SIM）
 モニターイオン： m/z 224（乳酸誘導体）
 注入量：0.5 μL

注図1 検量線用標準溶液及びステアロイル乳酸ナトリウムを添加した試料から得られた試験溶液のLC-MSクロマトグラム

- 8) ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウムを構成する乳酸の重合度は主に1～2である。その中でも比較的含有量が高いと思われるステアロイル-乳酸[M-H]⁻イオンをモニターする。
- 9) ステアロイル-乳酸標準溶液のLC-MSクロマトグラムを注図2に示す。



カラム：C8カラム（内径2.0mm、長さ150mm、粒径5 μ m）
移動相：アセトニトリル/0.1vol%ギ酸混液（9：1）
カラム温度：40 $^{\circ}$ C
流速：0.2mL/分
イオン化モード：ESI（-）
検出法：選択イオン検出（SIM）
主なイオン： m/z 355（ステアロイル-乳酸）
注入量：1 μ L

注図2 ステアロイル-乳酸標準溶液のLC-MSクロマトグラム

[文献]

- 1) 齋藤尋輝ら：分析化学、52、923（2003）

製造用剤

ポリソルベート 20、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65 及び ポリソルベート 80

Polysorbate 20, Polysorbate 60, Polysorbate 65 and Polysorbate 80

1. 分析法の概要

食品中のポリソルベート類（ポリソルベート 20、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65 及びポリソルベート 80）はアセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）で抽出し、アルミナカラム及びシリカゲル固相抽出カラムでクリーンアップした後、薄層クロマトグラフィーにより定性する。ポリソルベート類が検出された場合には、比色法により、ポリソルベート 80 として定量する。（2010 年設定、2019 年改正）

2. 分析法（薄層クロマトグラフィー及び比色法）

（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

①抽出

試料約 10 g を 100mL の遠心管¹⁾に精密に量り、水 10mL²⁾及びヘキサン 5 mL を加え、ホモジナイズ又はかくはんし、全体を混和させる³⁾。これにアセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）30mL を加え、1 分間ホモジナイズする。遠心（5 分間、1000 回転／分又は 1 分間、3000 回転／分）⁴⁾後、上層と沈殿物の間の中間層を分液漏斗に移す^{5,6)}。遠心管に水 5 mL を加え、ホモジナイズ又はかくはんした後、アセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）40mL を加え、1 分間ホモジナイズする。遠心後、中間層を分取し⁶⁾、全中間層を分液漏斗に合わせ、ヘキサン 20mL を加え、軽く振り⁷⁾、静置する⁸⁾。下層を別の分液漏斗に移し、酢酸エチル 35mL を加えて軽く混ぜ合わせる。これに飽和食塩水約 10mL 及び塩化ナトリウム 2～5 g を加え⁹⁾、5 分間振とうした後、静置する⁸⁾。下層の飽和食塩水層を除去し、更に塩化ナトリウム少量を加えて¹⁰⁾軽く振とうし、静置後⁸⁾、下層の飽和食塩水層を除去する。残った上層を脱水ろ過し¹¹⁾、ろ液を減圧濃縮容器にとり、減圧乾固する。

②精製

減圧濃縮容器に酢酸エチル約 30mL を加え、残留物を溶解し¹²⁾、次に無水硫酸ナトリウム 2～5 g¹³⁾を加えて振り混ぜ、酢酸エチル溶液をアルミナカラムへ静かに注入し、流出液は捨てる。酢酸エチル 100mL を用いて減圧濃縮容器を洗浄し、同様にアルミナカラムに注入し、流出液は捨てる¹⁴⁾。次にメタノール 10mL を減圧濃縮容器に加えて振り混ぜ、これに酢酸エチル 40mL を加え軽く混合する¹⁵⁾。この液をアルミナカラムへ注入し、流出液

を別の減圧濃縮容器にとる。さらに、先の減圧濃縮容器を酢酸エチル／メタノール混液（4：1）100mL を用いて洗浄し、洗液をアルミナカラムに注入し、流出液を先の流出液と合わせて、40℃以下で減圧乾固する。残留物に酢酸エチル 10mL を加えて溶解し、順相固相抽出カラム¹⁶⁾に注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル 20～30mL を注入し流出液は捨てる¹⁷⁾。順相固相抽出カラムを逆さにし¹⁸⁾、ジクロロメタン／メタノール混液（2：1）10mL を注入し、溶出液を減圧濃縮容器にとり、減圧乾固する。得られた残留物にジクロロメタンを加えて溶かし、正確に 10mL として¹⁹⁾試験溶液とする。このうち 0.5mL を正確に量り、薄層クロマトグラフィー用試験溶液とする。

(3) 標準溶液の調製

① 薄層クロマトグラフィー用標準溶液

ポリソルベート 80 及びポリソルベート 65 をそれぞれ 0.10 g ずつ正確に量り²⁰⁾、ジクロロメタンを加え、超音波処理で完全に溶解した後、ジクロロメタンでそれぞれ正確に 50mL とし、ポリソルベート 80 及びポリソルベート 65 薄層クロマトグラフィー用標準溶液とする（濃度 2mg/mL）。

② 比色法用検量線用標準溶液

ポリソルベート 80 標準品 0.100 g を量り、少量のジクロロメタンを加え、超音波処理で完全に溶解した後、ジクロロメタンで正確に 50mL とし、検量線用標準原液とする（濃度 2mg/mL）。定量用標準原液 1mL、1mL 及び 2mL をそれぞれ正確に量り、ジクロロメタンでそれぞれ正確に 20、10mL 及び 10mL とし、100、200µg/mL 及び 400µg/mL の検量線用標準溶液とする。100µg/mL の検量線用標準溶液 2mL 及び 5mL をそれぞれ正確に量り、それぞれジクロロメタンで正確に 10mL とし、20µg/mL 及び 50µg/mL の検量線用標準溶液とする。

(4) 測定法

① 薄層クロマトグラフィー（定性）

薄層クロマトグラフィー用試験溶液及び標準溶液につき、次の条件で薄層クロマトグラフィーを行う。

薄層板の下端から約 2 cm の位置を原線とし、両側から少なくとも 1 cm 離し、原線上に、スポットの直径が 3 mm 以下になるように、薄層クロマトグラフィー用試験溶液及び標準溶液を 1 cm 以上の間隔で塗布して風乾する。展開溶媒を展開槽に約 1 cm の深さになるように入れ、飽和させる。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。この薄層板にドラーゲンドルフ試液を噴霧し、標準溶液及び試験溶液の、スポットの位置及び色の濃さを自然光下で比較観察する²¹⁾。

薄層板：シリカゲル薄層板²²⁾

塗布量：薄層クロマトグラフィー用試験溶液 全量²³⁾

定性用ポリソルベート 80 標準溶液 5 μL 及び 100 μL (それぞれポリソルベート 80 として 10 及び 200 μg 相当)

定性用ポリソルベート 65 標準溶液 100 μL (ポリソルベート 65 として 200 μg 相当)

展開溶媒：ジクロロメタン／メタノール／アセトン／水混液 (100 : 20 : 15 : 3)

展開距離：約 10cm

② 比色法 (定量)

(a) 測定条件

分光光度計を用い、波長 620nm における吸光度を液層 1 cm で測定する。

(b) 測定液の調製

試験溶液²⁴⁾ 5 mL を正確に量り、チオシアン酸コバルト試液 5 mL を加え、5 分間振とう²⁵⁾し、遠心 (5 分間、3000 回転/分) する²⁶⁾。上層のチオシアン酸コバルト溶液を捨て、下層のジクロロメタン層を採取し²⁷⁾、測定液とする。

(c) 検量線

ジクロロメタン²⁸⁾及び検量線用標準溶液 5 mL をそれぞれ正確に量り、それぞれにチオシアン酸コバルト試液 5 mL を加え、(b) 測定液の調製における試験溶液と同様に操作し、吸光度を測定し、検量線を作成する²⁹⁾。

(d) 定量³⁰⁾

測定液の波長 620nm における吸光度を測定し、検量線より、試験溶液中のポリソルベート濃度 (ポリソルベート 80 として、μg/mL) を求め、次式によって検体中のポリソルベート含量 (ポリソルベート 80 として、g/kg) を計算する。

$$\text{ポリソルベート含量 (g/kg)} = \frac{C \times 10 \times \text{試験溶液の希釈倍率}}{W} \times \frac{1}{1000}$$

C : 試料溶液中のポリソルベートの濃度 (μg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

③ 定量限界 ポリソルベート 80 として 0.02 g/kg

試薬・試液等

1. ポリソルベート 80 : ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート、Tween 80
2. ポリソルベート 65 : ポリオキシエチレン(20)ソルビタントリステアレート、Tween 65
3. ポリソルベート 80 標準品 : オレイン酸純度 99%以上
4. ヘキサン : [特級]
5. アセトニトリル : [特級]
6. メタノール : [特級]
7. 酢酸エチル

8. 塩化ナトリウム：[特級]
9. 飽和食塩水：塩化ナトリウム 400g に水 1 L を加え、加温しながらよくかくはんし、冷後上清を用いる。
10. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
11. アルミナ：酸化アルミニウム（塩基性）。市販品を用いる³¹⁾。
12. アルミナカラム：活栓付クロマトグラフ管（内径 1.5cm、長さ 30cm）に酢酸エチル約 20mL を入れ、脱脂綿を緩く詰め、アルミナ 10 g を少しずつ入れて³²⁾充填し、無水硫酸ナトリウム 5g を積層し³³⁾、酢酸エチル 30～50mL を流して、コンディショニングしておく。クロマトグラフ管の上部に、脱脂綿を詰めた漏斗を置き、漏斗を通して沈殿物を含む液を流し込むと、カラムが詰まるのを防ぐことができる。
13. 順相固相抽出カラム：シリカゲル固相抽出カラム（690mg）¹⁶⁾、内径 8～9 mm のポリエチレン製のカラム管に、カラムクロマトグラフィー用に製造したシリカゲル 690mg を充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。
14. ジクロロメタン：[特級]
15. シリカゲル薄層板：市販品を用いる。
16. アセトン：[特級]
17. 塩基性硝酸ビスマス：[特級]
18. 酢酸：[特級]
19. ヨウ化カリウム：[特級]
20. ドラーゲンドルフ試液：塩基性硝酸ビスマス 1.7 g を 20vol%酢酸 100mL に溶かし、その 10mL と 40w/v%ヨウ化カリウム溶液 10mL 及び酢酸 40mL を混合し、水で 250mL とする。
21. チオシアン酸アンモニウム：[特級]
22. 硝酸コバルト六水和物：[特級]
23. チオシアン酸コバルト試液：チオシアン酸アンモニウム 50 g、硝酸コバルト六水和物 15 g 及び塩化ナトリウム 25 g を水に溶かして 250mL とする。

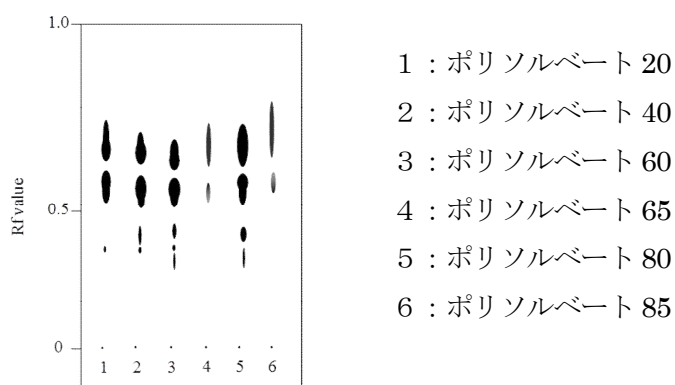
[注]

- 1) 容量 100mL 以上の遠心管を用いても良い。
- 2) フリーズドライ製品等の場合は、先に水 10mL を加え試料を膨潤させる。試料の膨潤が足りない場合には、水の量を増やしても良いが、その場合は、加えた水と次に加えるヘキサンとアセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）の割合が、2：1：6となるようにし、それ以降の抽出に用いる水、ヘキサン、アセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）及び酢酸エチルの量も、増やした水の量に応じて同じ割合で増やす。例えば、はじめに加える水を 10mL 追加して、20mL とした場合には、ヘキサンは 10mL、アセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）は 60mL とし、次に加える水は 10mL、アセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）は 80mL、ヘキサンは 40mL、

酢酸エチルは 70mL とする。

- 3) 試料がチョコレート等の場合はあらかじめ加温して融解させる。わかめには、TLC ではポリソルベート 80 と異なる Rf 値を示し、定性には影響を与えないが、比色定量には影響を与える物質が含まれており、比色の際のブランク値が大きくなることがあるため、必要に応じてホモジナイズの前に除いておく。他の海藻類の場合にも注意が必要。
- 4) 遠心の回転数は用いる遠心管に応じて選択する。
- 5) ヘキサン層は捨てず、直接、中間層を採取する。次の操作でヘキサンによる洗浄を行うので、ヘキサンが少量混ざってしまってもよい。
- 6) 遠心で試料が沈まず、中間層の浮遊物が多い場合には、固形物を除くために、綿栓でろ過をして、分液漏斗へ移す。ろ過後の残留物は、遠心した沈殿物と合わせ、再度抽出に用いる。
- 7) 食品の種類によっては、エマルジョンを生じて溶媒が充分に分離しない場合があり、回収率が悪くなる原因となるので、軽く振る。
- 8) 分液漏斗中の溶媒が分離するのに時間がかかる食品の場合は、十分に分離してから次の操作を行う。
- 9) 食塩水を飽和に保つために葉さじ 1 杯程度を加える。加えた塩化ナトリウムは完全には溶けない。
- 10) 1 回の除去では飽和食塩水層を除けない場合があるため、酢酸エチルから水を分離させるため更に少量の塩化ナトリウムを加える。この時、塩化ナトリウムの量が多いと酢酸エチル層と飽和食塩水層の境界線が見えにくくなるので注意する。
- 11) あらかじめ漏斗に脱脂綿を緩く詰め、無水硫酸ナトリウムを積層し、酢酸エチルで湿らせておく。
- 12) ポリソルベートは、次の操作で加えるメタノールには溶解するので、無理に残留物を酢酸エチルに溶解させない。
- 13) 葉さじ 1 杯程度でよい。試料がガムの場合は無水硫酸ナトリウムを加えない。
- 14) 試料がガムの場合は、TLC の際に妨害がみられるため、アンモニア水を含む溶液で以下のように洗浄操作を行う。アルミナカラムには無水硫酸ナトリウムを積層せず、減圧濃縮容器は、酢酸エチル 100mL で洗浄する代わりに、酢酸エチル / 1-プロパノール / アンモニア水混液 (100 : 1 : 1) 50mL で洗浄してアルミナカラムに注入し、流出液を捨てる。更に、アルミナカラム内のアンモニア水を取り除くために、減圧濃縮容器を酢酸エチル 50mL で洗浄し、洗液をアルミナカラムに注入し、流出液を捨てる。
- 15) 酢酸エチルを加えると白く濁る場合があるが、濁った液をそのままアルミナカラムへ注入し、流出液を別の減圧濃縮容器に回収する。
- 16) 使用前に酢酸エチル 10mL を通過させてコンディショニングしておく。
- 17) 洗浄液が透明になるまで酢酸エチルを流す。少量の色素は酢酸エチルでは洗浄されないため、少量の色素が残っていてもよい。

- 18) 溶出液の容量を減らすためにバックフラッシュ法を用いるが、カートリッジに負荷する際、沈殿物がある場合は、バックフラッシュ法で溶出すると沈殿物が落ちるため、逆さにならず、ジクロロメタン/メタノール混液（2：1）30mLで溶出してもよい。
- 19) 濃度が高い場合には、適宜希釈する。
- 20) 薄層クロマトグラフィーでは、ポリソルベート 80、ポリソルベート 60、ポリソルベート 20 は同様の Rf 値のスポットパターンを示すが、ポリソルベート 65 は異なるため、定性用標準溶液は、ポリソルベート 80 及びポリソルベート 65 とする。
- 21) ポリソルベート 20、60 及び 80 は同様の Rf 値のスポットパターンを示すが、ポリソルベート 65 は、他のポリソルベートに比べ、観察されるスポットの数は少なく、色は薄い。ポリソルベートの薄層クロマトグラムの一例を注図 1 に示す^{文献 1)}。



<分離条件>

薄層板：シリカゲル薄層板

展開溶媒：ジクロロメタン/メタノール/アセトン/水混液（100：20：15：3）

発色液：ドラーゲンドルフ試液

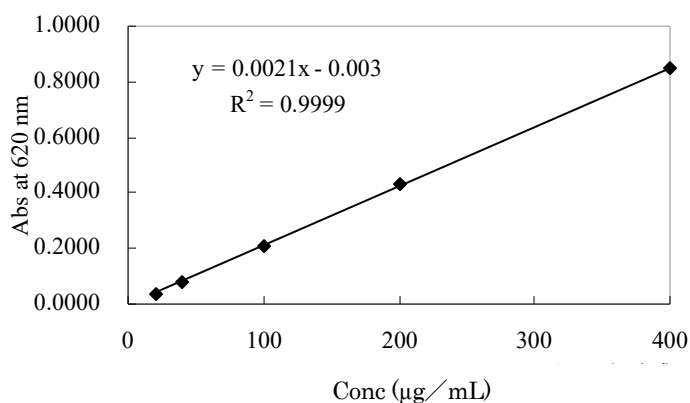
注図 1 ポリソルベートの薄層クロマトグラム

- 22) 薄層板は 120℃で 30 分間加熱し活性化したものを使用する。
- 23) 試験溶液は、ジクロロメタン溶液である。スポット中に溶媒が揮発して濃度が変わる恐れがあるため、0.5mL を正確に採取して別の小さな容器に移し、全量をスポットする。また、別の容器に移した後、濃縮してからスポットしてもよい。
- 24) TLC による分析の結果、試験溶液中のポリソルベート濃度が濃い場合は、ジクロロメタンで適宜希釈する。
- 25) 発色が不十分となる場合があるので、ジクロロメタン層とチオシアン酸コバルト試液層がよく混合するような振とう方法で行う。
- 26) 遠心の代わりに、10 分間以上静置してもよい。
- 27) 上層のチオシアン酸コバルト溶液はピペット等で下層ぎりぎりまで捨てる。下層のジクロロメタン層をピペット等で採取する際は、チオシアン酸コバルト溶液がピペットにつか

ないように注意する。ジクロロメタン層は空気に触れると退色するため、上層を捨てた後、すばやく測定する。

28) 空試験溶液である。比色定量の際の対照として用いる。

29) チオシアン酸コバルト試液による比色法で作成したポリソルベート 80 の検量線の一例を注図 2 に示す。



注図 2 ポリソルベート 80 検量線

30) 種々の食品についてのポリソルベート 80 の添加回収率を注表 1 に示す。添加回収試験を行う場合は、ポリソルベート 80 の添加量を基準値の濃度又は 0.1 g/kg とする。

注表 1 ポリソルベート 80 の各種食品での添加回収率^{文献 1)}

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%) *
ホットケーキミックス	0.1	53.6 ± 2.6
トマトケチャップ	0.1	68.7 ± 1.7
粉末スープ (味噌)	0.1	52.8 ± 1.6
オリーブオイル	0.1	65.2 ± 4.1
ピクルス	0.1	60.7 ± 1.4
クッキー	0.1	61.1 ± 7.2
ドレッシング	0.1	68.0 ± 2.1
コチュジャン	0.1	76.2 ± 2.6

* 3 試行の平均値 ± S.D

31) 必要に応じて、活性化 (135°C、12 時間等) して用いる。

32) 酢酸エチルに懸濁せず、アルミナを粉体のまま入れる。

33) 試料がガムの場合は無水硫酸ナトリウムを積層しない。

[文献]

- 1) 河崎裕美ら：日食化誌、15、122 (2008)

参考

ポリソルベート確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のポリソルベート類（ポリソルベート20、ポリソルベート60、ポリソルベート65及びポリソルベート80）はアセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）で抽出し、アルミナカラム及びシリカゲル固相抽出カラムでクリーンアップした後、減圧濃縮し、メタノールに溶解し、メンブランフィルターでろ過後、液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う¹⁾。（2010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

ポリソルベート 20、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65 及びポリソルベート 80 分析法を準用することにより調製した試験溶液数 mL（2～4 mL）を量り、減圧濃縮後、メタノールに溶解し、メンブランフィルター（0.2 μ m）でろ過し、試験溶液とする。

（3）標準溶液の調製

ポリソルベート 20、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65 及びポリソルベート 80 0.05g を量り、メタノールを加え、超音波処理して完全に溶解した後、メタノールで正確に 50mL とし、標準原液とする（各濃度 1 mg/mL）。標準原液 5 mL をそれぞれ量り、それぞれメタノールで 10mL とし、標準溶液とする（濃度 各 500 μ g/mL）。

（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：オクチルシリル化シリカゲル（粒径 5 μ m、孔径 300 \AA ）

カラム管：内径 2.0mm、長さ 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A液 0.1vol%ギ酸溶液

B液 0.1vol%ギ酸メタノール溶液

リニアグラジエントの条件

分	A (%)	B (%)
0	50	50
5	30	70
30	1	99
40	1	99

流速：0.2mL/分

注入量：5 μ L

イオン化法：ESI(+)

検出法：スキャン (m/z 300~2000)

主なイオン³⁾

ポリソルベート 20：1249.74 [C₅₈H₁₁₄O₂₆+Na]⁺

ポリソルベート 60：1333.84 [C₆₄H₁₂₆O₂₆+Na]⁺

ポリソルベート 80：1331.82 [C₆₄H₁₂₄O₂₆+Na]⁺

ポリソルベート 65：1866.36 [C₁₀₀H₁₉₄O₂₈+Na]⁺

② 定性⁴⁾

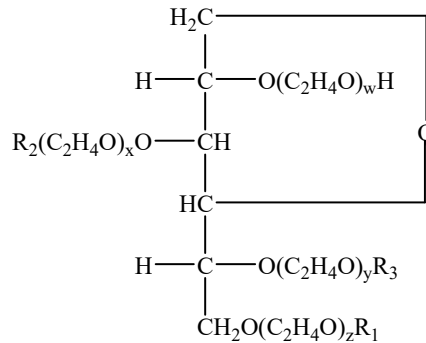
試験溶液及び標準溶液をLC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が標準溶液と一致することを確認する。

試薬・試液等

1. ポリソルベート 20、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65 及びポリソルベート 80 分析法の試薬・試液等を準用する。
2. ポリソルベート 20：ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート、Tween 20
3. ポリソルベート 60：ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノステアレート、Tween 60
4. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
5. ギ酸：[高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 本法は、ポリソルベート類の確認分析法であり、定量分析は目的としない。ポリソルベートの種類を特定する必要がある場合に用いる。本法により、ポリソルベート 40 (Tween 40) 及びポリソルベート 85 (Tween 85) も確認できる。ただし、ポリソルベート 60 には、ポリソルベート 40 の主成分であるポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノパルミテートが含まれているため、確認の際には注意を要する。ポリソルベート類の構造式を注図 1 に示す。



$w+x+y+z$ = 約 20

ポリソルベート 20 $R_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

ポリソルベート 60 $R_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

ポリソルベート 65 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$

ポリソルベート 80 $R_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

ただし、他の脂肪酸を含む。

注図1 ポリソルベート類の構造式

2) 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。

参考としてフラグメント確認の測定条件の一例を示す。装置により、設定条件は異なる。

MS条件

キャピラリー電圧: 1.00kV

コーン電圧: 100V

エクストラクター: 4.00V

ソース温度: 120°C

脱溶媒温度: 400°C

コーンガス流量: 47 L/時

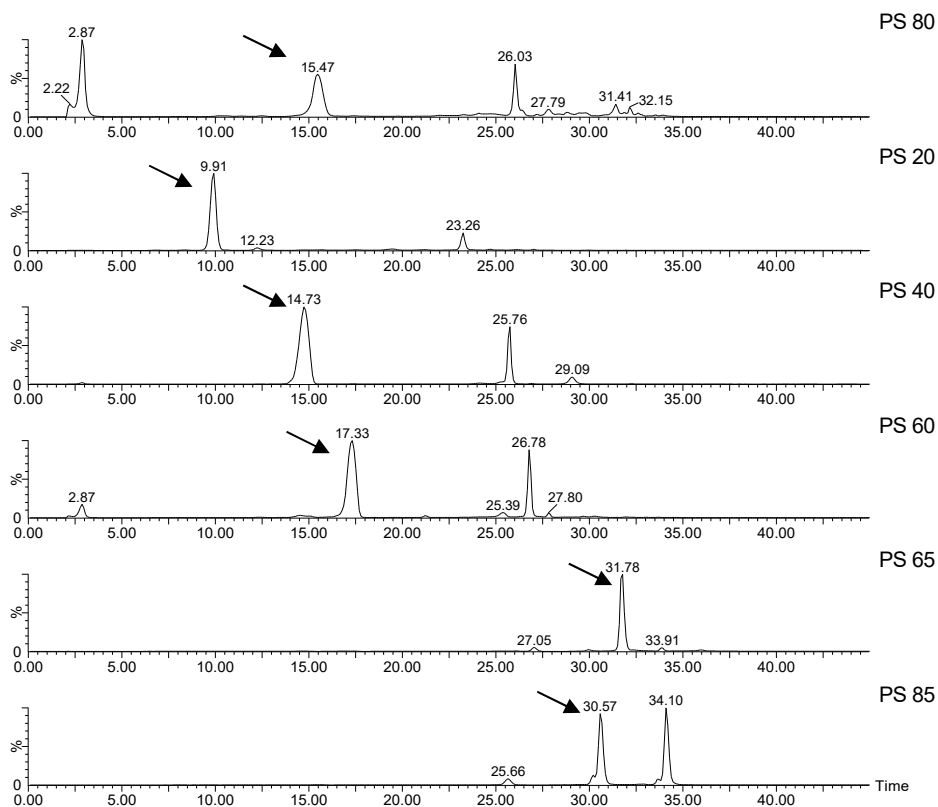
脱溶媒ガス流量: 1000 L/時

3) 選択イオン検出 (SIM) ターゲットイオンは、ポリソルベート類の定義に合わせ、ポリオキシエチレン基が 20 分子縮合したものに、ナトリウム 1 分子が付加した場合のもので、感度の高いものではない。スキャン測定によりそれぞれの測定対象質量を確認後、実測値をターゲットイオンとして設定してもよい^{文献 1)}。ポリソルベート 40 及びポリソルベート 85 の m/z はそれぞれ 1305.81 $[\text{C}_{62}\text{H}_{122}\text{O}_{26} + \text{Na}]^+$ 及び 1860.31 $[\text{C}_{100}\text{H}_{188}\text{O}_{28} + \text{Na}]^+$ である。なお、ポリソルベート 40 の構成脂肪酸はパルミチン酸であるが、ポリソルベート 60 はステアリン酸の他にパルミチン酸を構成脂肪酸としているため、ポリソルベート 60 に由来する m/z 1333.84 $[\text{C}_{64}\text{H}_{126}\text{O}_{26} + \text{Na}]^+$ とポリソルベート 40 の 1305.81 $[\text{C}_{62}\text{H}_{122}\text{O}_{26} + \text{Na}]^+$ が

同程度観察される。

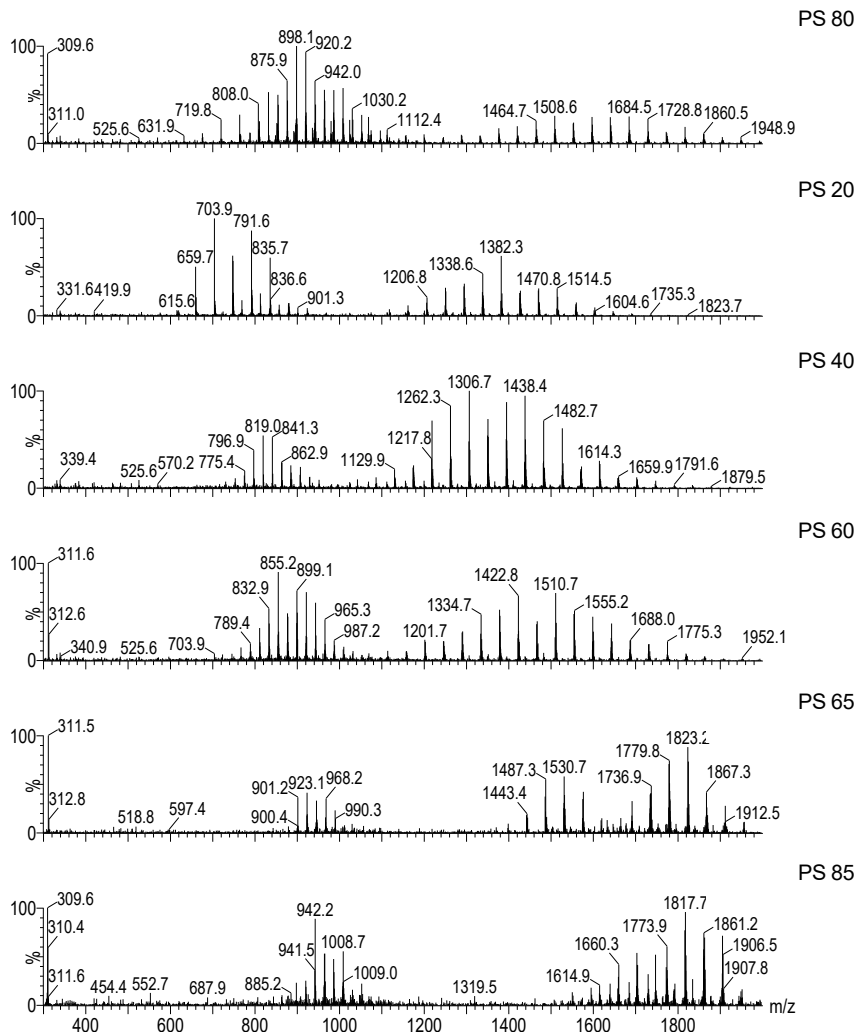
4) 各ポリソルベートのSIMクロマトグラムを注図2に、SIMで確認されたピークのリテンションタイムでのMSスペクトルの一例を注図3に示す。

各ポリソルベート濃度：500 μ g/mL



➤ は、各ポリソルベートのピークを示す。

注図2 各ポリソルベート (PS) のSIMクロマトグラム



注図3 SIMでピークの確認されたリテンションタイムのMSスペクトル

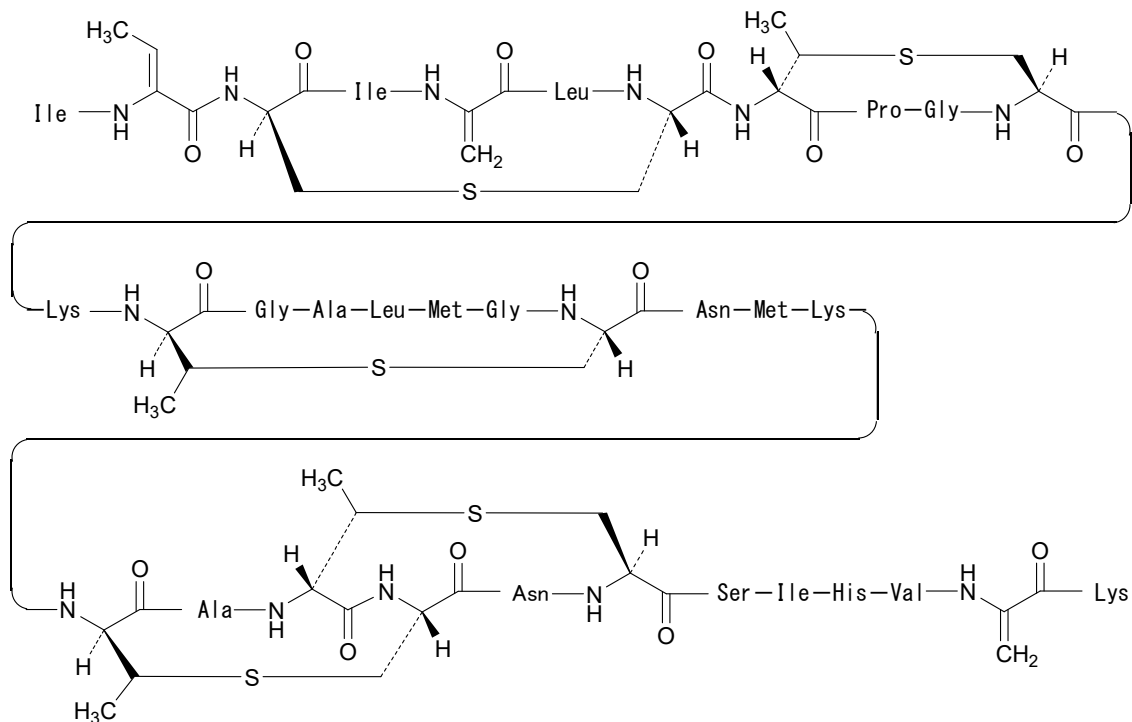
[文献]

- 1) 建部千絵ら：日食化誌、15、129 (2008)

未指定添加物

ナイシンZ

Nisin Z



$C_{141}H_{229}N_{41}O_{38}S_7$: 3331.03

1. 分析法の概要

食品中のナイシンZは、メタノール/水/ギ酸混液（5：4：1）で抽出し、ポリマー固相抽出カラム、弱陽イオン交換固相抽出カラムで精製した後、液体クロマトグラフィー質量分析により定性する。（2009年設定、2019年改正）

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

（2）試験溶液の調製

上記の（1）及び（2）については、ナイシンの分析法を準用する。

（3）標準溶液の調製

100000 単位に対応するナイシン標準品を量り、0.1vol%ギ酸を加えて溶かして正確に 10mL とする。この液 1mL をとり、0.1vol%ギ酸に溶かして正確に 10mL とし、ナイシン標準溶液とする（1000 単位/mL）。

(4) 測定法

① 測定条件

ナイシン分析法の(5)測定法の①測定条件を準用する。ただし、試験溶液の主なイオンは m/z 1111、ナイシン標準溶液の主なイオンは m/z 1119 とする。

② 定性¹⁾

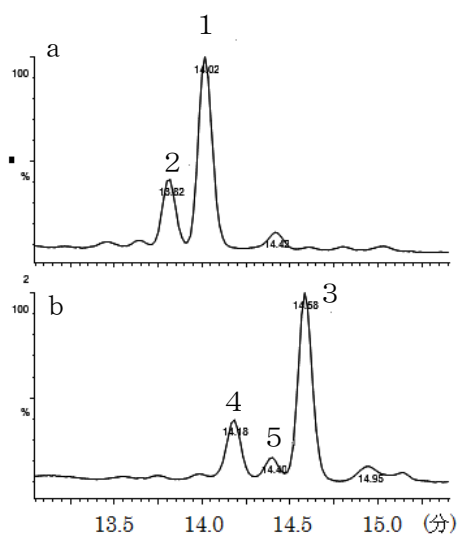
試験溶液及びナイシン標準溶液をそれぞれLC-MSに注入し、ナイシン標準溶液のナイシンAの保持時間より後に観測されるナイシンZの多価イオン (m/z 1111、834、667) により判定する。

試薬・試液等

ナイシンの分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

1) ナイシンZは、ナイシンAのピークよりも保持時間にして約1分後方に現れる(注図1 b)。

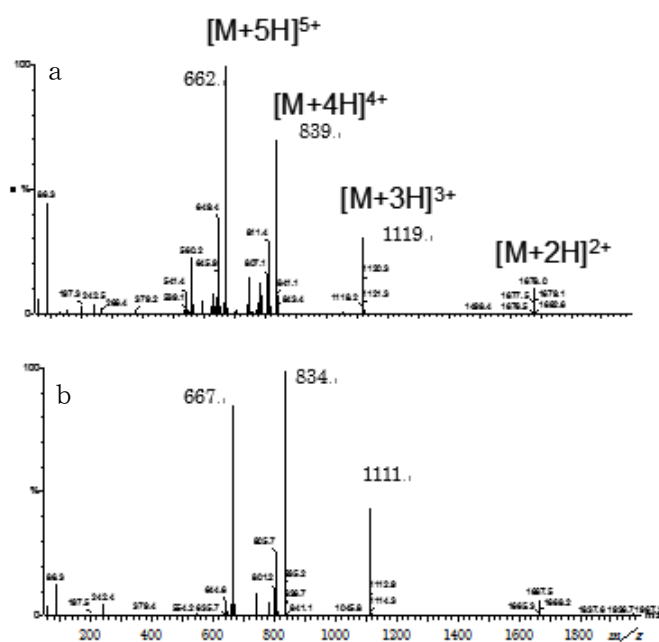


注図1 ナイシン標準品 (a. 10000 単位/mL) 及びナイシンZ (b. 10000 単位/mL) のクロマトグラム (測定波長 210 nm)

1. ナイシンA
2. ナイシンAに水が1分子付加したもの (分子量 3372)
3. ナイシンZ
4. ナイシンZに水が1分子付加したもの (分子量 3349)
5. ナイシンZに水が1分子付加したもの (分子量 3349)

また、S I Mによる測定において m/z 1119 をモニターイオンにすると、ナイシンZは検出されない。ナイシンZを検出する場合は、 m/z 1111 をモニターイオンにした測定を行う。その他の測定条件はナイシンAのS I Mによる測定条件に同じでよい。

ナイシンA及びナイシンZについて、E S I (+) でのスキャン測定の結果を注図2に示す。ナイシンA (分子量 3354) は3価イオン (m/z 1119) の他に、4価 (m/z 839) 及び5価イオン (m/z 672) が観察される。ナイシンZ (分子量 3331) は、2価、3価、4価、5価イオンピークとして m/z 1667、1111、834 及び667 が観測される。



注図2 ナイシンA (a) 及びナイシンZ (b) の多価イオンピークプロファイル
E S I (+) スキャン測定 (40V)