

着色料

銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム

Copper Chlorophyll and Sodium Copper Chlorophyllin

銅クロロフィル
Copper Chlorophyll

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

1. 分析法の概要

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

2. 分析法（原子吸光光度法）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

試料を、みつ豆寒天の場合は20g、それ以外の食品の場合は10g精密に量り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。