

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<sup>1)</sup>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、2021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<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>、遠心(5分間、3000回転/分)して酢酸エチル層をとる<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。

##### 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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>

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 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。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<sup>10)</sup>

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<sup>11)</sup>：オクチ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

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 $\mu\text{L}$

##### ② 検量線<sup>12)</sup>

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<sup>13～15)</sup>

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]

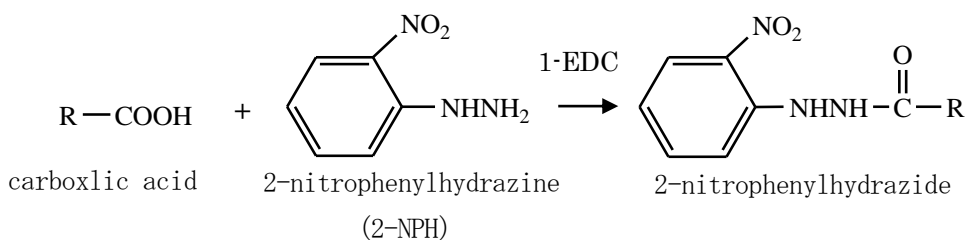
7. 1 w/v%水酸化カリウム・エタノール試液：水酸化カリウム 1.0g を 5 mL の水に溶かし、エタノールを加えて 100mL とする。密栓保存する。
8. 逆相固相抽出カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム (500mg/6 mL)。使用前にメタノール 10mL 及び塩酸 (1→100) 10mL で順次コンディショニングをする。
9. 2-ニトロフェニルヒドラジン：市販品を用いる。
10. 0.02mol/L 2-ニトロフェニルヒドラジン試液：2-ニトロフェニルヒドラジン 0.206 g を 15mL の水に溶かし、エタノールを加えて 50mL とする。この液と塩酸 (1→100) 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<sup>文献1,2)</sup>。
- 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) けん化及び誘導體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體が生じる。ステアロイル乳酸をけん化して得られる乳酸誘導體と酢酸誘導體とは、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 分析法B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。

- 7) けん化反応で生じた乳酸を誘導体化する操作である。誘導体化の反応機構を以下に示す。本反応は乳酸に限らず、さまざまな酸を誘導体化するため<sup>文献3)</sup>、反応に供する液に食品由来の脂肪酸や残存した酢酸エチル由来の酢酸が多いと、それらが乳酸の誘導体化に競合することで回収率の低下の原因となる。



1-EDC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide

- 8) 反応を停止するための操作である。  
9) 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。  
10) 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。  
11) 乳酸誘導体と酢酸誘導体の保持時間は非常に近いので、他の市販の充填カラムを使用する際には両者が十分に分離できることを確認する。  
12) 標準溶液の調製に用いた水 1mL をねじ口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ったものを液体クロマトグラフに注入し、乳酸誘導体の保持時間にピークが現れないことを確認する。  
13) 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の使用基準は、いずれも「ステアロイル乳酸カルシウムとして」定められているため、含量は、ステアロイル乳酸カルシウムとして求める。

式の説明：

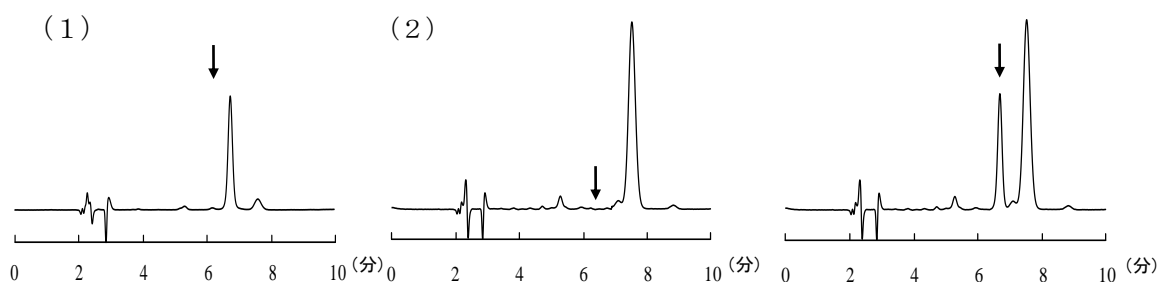
$$\begin{array}{l} \text{検体中のステアロイル乳酸カルシウム由来の乳酸量 (g/kg)} \\ = \frac{C (\text{試験溶液中の乳酸濃度} (\mu\text{g/mL})) \times 250 (\text{希釈倍率})}{W (\text{試料の採取量 (g)}) \times 1000*} = \frac{C}{W \times 4} \end{array}$$

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

ステアロイル乳酸カルシウム中の結合乳酸残基 (ステアロイル乳酸類及びラクトイル乳酸類を構成する乳酸) は、その全量の約 25% とされているので、試料中の結合乳酸含有量 ( $\text{g/kg}$ ) に  $1/0.25$  を乗じてステアロイル乳酸カルシウム含有量 ( $\text{g/kg}$ ) とする。

$$\text{ステアロイル乳酸カルシウム含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 4} \times \frac{1}{0.25} = \frac{C}{W}$$

- 14) 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) の試験溶液の液体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  $4\mu\text{g}/\text{mL}$ )  
 (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： $40^{\circ}\text{C}$   
 流速：1.0mL/分  
 測定波長：400nm  
 注入量：20 $\mu\text{L}$

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。（2019年設定、2021年改正）

#### 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<sup>1,2)</sup>

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<sup>3,4)</sup>：オクチルシリル化シリカゲル（粒径5 $\mu$ m）

カラム管：内径2.0mm、長さ150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：0.1vol%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： $m/z$  224<sup>5)</sup>

注入量：0.5 $\mu$ L

###### ② 定性<sup>6)</sup>

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<sup>7)</sup>。

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<sup>1,2)</sup>。

カラム充填剤<sup>3)</sup>：オクチルシリル化シリカゲル(粒径5 $\mu$ 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/0.1vol%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)<sup>8)</sup>

注入量：1 $\mu$ L

### ② 定性<sup>6)</sup>

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<sup>9)</sup>。

## 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]

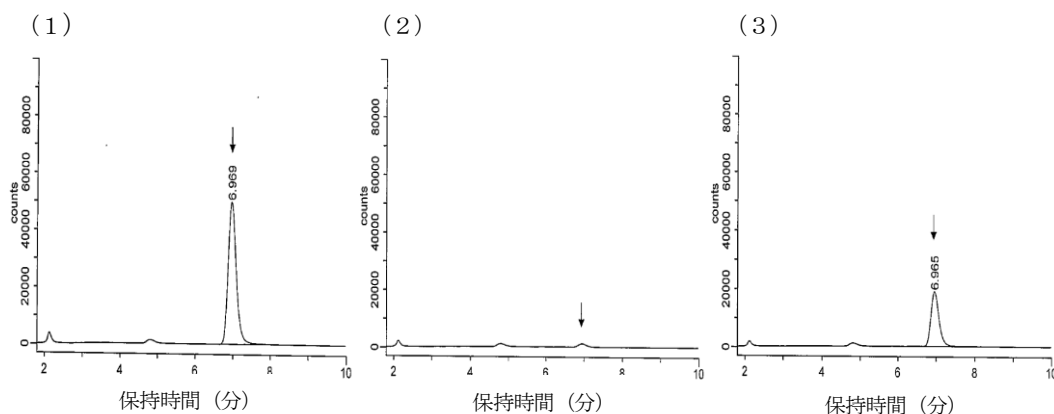
## [注]

- 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<sup>文献1)</sup>。
- 5) 乳酸の2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体の[M-H]<sup>-</sup>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10µg/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5µm）

移動相：0.1vol%ギ酸/メタノール混液（75：25）

カラム温度：40℃

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI（-）

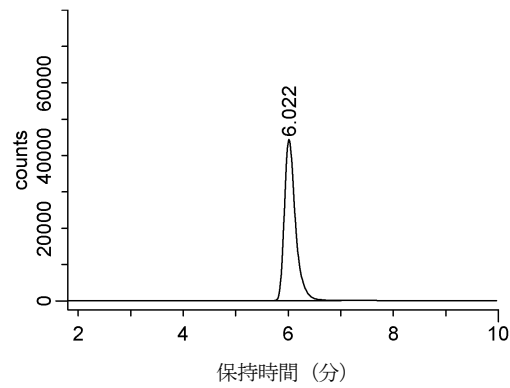
検出法：選択イオン検出（SIM）

モニターイオン： $m/z$  224（乳酸誘導体）

注入量：0.5µL

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]<sup>-</sup>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 $\mu$ 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（ステアロイルー乳酸）  
注入量：1 $\mu$ L

注図2 ステアロイルー乳酸標準溶液のLC-MSクロマトグラム

[文献]

- 1) 齋藤尋輝ら：分析化学、52、923（2003）