

第 2 版

食品中の食品添加物分析法

2 0 0 0

厚生省生活衛生局食品化学課

1944

1944



本書の概要及び改正の要旨

本書は、これまでに通知した方法、改正した方法、新たに開発した方法をまとめて収載したものであり、通則 27 項、一般試料採取法、食品添加物分析法各条 113 条、参照分析法 18 条からなり、概要は下記のとおりである。

1. 収載は、まえがき、目次、通則、一般試料採取法、食品添加物分析法各条、参照分析法の順となっており、分析法に関する参考文献についても記載した。
2. 通則等は、第 7 版食品添加物公定書に準じ改正した。単位に Pa (パスカル) や mol/l (モル毎リットル) 等を採用し、液性に関する定義を新たに加えた。また、有害試薬の使用についてもできる限り使用しない方向で検討した。
3. 食品添加物分析法は、判定を行うための既定の方法である食品添加物分析法各条と現時点で他の方法がなく、参考的なものである参照分析法に分けて収載した。
4. 未指定あるいは指定を削除された食品添加物についても、規制の観点から分析法を収載した。
5. 原則として、食品添加物を主要用途別に収載し、索引により、個別食品添加物を検索できるようにした。
6. 下記の品目については、試験法を改正し、あるいは新たに開発し収載した。

亜塩素酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸ナトリウム、アスパルテーム、アルギン酸及びアルギン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウム、過酸化水素、キシリトール、クエン酸及びその塩類、クエン酸イソプロピル、グリチルリチン酸二ナトリウム、コウジ酸、コハク酸及びその塩類、サイクラミン酸、サッカリン及びサッカリンナトリウム、ジフェニル、ジブチルヒドロキシトルエン、臭素酸カリウム、DL-酒石酸、L-酒石酸及びその塩類、硝酸カリウム及び硝酸ナトリウム、シリコーン樹脂、ステビア、ズルチン、D-ソルビトール、タール色素 12 品目、チアベンダゾール、*dl*- α -トコフェロール及び *d*- α -トコフェロール、TBHQ、乳酸及びその塩類、パラオキシ安息香酸エステル類、ビタミン A 及びビタミン A 脂肪酸エステル、氷酢酸及び酢酸ナトリウム、ブチルヒドロキシアニソール、フマル酸及びフマル酸一ナトリウム、ヘキサン、ホウ酸、没食子酸プロピル、ナリンジン及びヘスペリジン、ノルジヒドログアヤレチック酸、未指定タール色素 (アズルビン、オレンジ RN、キノリンイエロー、パテントブルー V、ファス

トレッド E, プリリアントブラック BN, ポンソー 6R), ミックストコフェロール, ミョウバン類, リン酸及びその塩類, ピロリン酸塩類, ポリリン酸塩類及びメタリン酸塩類, DL-リンゴ酸及び DL-リンゴ酸ナトリウム

食品中の食品添加物分析法の検討に, ご協力いただいた方々は以下のとおりである。(50音順)

石綿 肇	国立医薬品食品衛生研究所
伊藤誉志男	武庫川女子大学
岡 尚男	愛知県衛生研究所
川崎 洋子	国立医薬品食品衛生研究所
川名 清子	神奈川県立衛生研究所
笹尾 忠由	横浜市立衛生研究所
柴田 正	(元)国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
鈴木 忍	財団法人日本食品分析センター
辻 澄子	国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
中岡 正吉	(元)神奈川県衛生研究所
西島 基弘	東京都立衛生研究所
米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所
山田 貞二	(元)愛知県衛生研究所
山田 隆	国立医薬品食品衛生研究所
渡辺健二郎	(元)横浜市衛生研究所

なお, 本書については今後とも最新の科学的知見をもとに改正し, よりよいものにしたいと考えておりますので, 内容等についてご意見等がございましたら, 厚生省生活衛生局食品化学課までお寄せいただきますようお願い申し上げます。

目 次

本書の概要及び改正の要旨	iii
通則，一般試料採取法	1
通 則	3
一般試料採取法	6
食品添加物分析法各条	9
第1章 保 存 料	11
1 安息香酸及び安息香酸ナトリウム	12
2 ソルビン酸及びソルビン酸カリウム	15
3 デヒドロ酢酸ナトリウム	16
4 パラオキシ安息香酸エステル類	17
5 プロピオン酸及びその塩類	21
第2章 酸化防止剤	25
6 L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸 エステル	26
7 エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン 四酢酸二ナトリウム	31
8 エリソルビン酸及びエリソルビン酸ナトリウム	37
9 クエン酸イソプロピル	42
10 L-システイン塩酸塩	47
11 ジブチルヒドロキシトルエン	49
12 <i>dl</i> - α -トコフェロール及び <i>d</i> - α -トコフェロール	52
13 ブチルヒドロキシアニソール	56
14 没食子酸プロピル	58

第3章 殺菌料	61
15 過酸化水素	62
第4章 漂白剤	67
16 亜塩素酸ナトリウム	68
17 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	71
第5章 防かび剤	79
18 イマザリル	80
19 オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウム	83
20 ジフェニル	86
21 チアベンダゾール	87
第6章 増粘剤, 安定剤, ゲル化剤	89
22 アルギン酸及びアルギン酸ナトリウム	90
23 カゼイン及びカゼインナトリウム	93
第7章 発色剤	97
24 亜硝酸ナトリウム	98
25 硝酸カリウム及び硝酸ナトリウム	102
第8章 色調安定剤	105
26 グルコン酸第一鉄	106
第9章 着色料	109
27 β -カロテン	110
28 食用赤色2号及びそのアルミニウムレーキ	113
29 食用赤色3号及びそのアルミニウムレーキ	119
30 食用赤色40号及びそのアルミニウムレーキ	120
31 食用赤色102号	121
32 食用赤色104号	122
33 食用赤色105号	123
34 食用赤色106号	124
35 食用黄色4号及びそのアルミニウムレーキ	125
36 食用黄色5号及びそのアルミニウムレーキ	126
37 食用緑色3号及びそのアルミニウムレーキ	127

38 食用青色 1 号及びそのアルミニウムレーキ	129
39 食用青色 2 号及びそのアルミニウムレーキ	131
40 鉄クロロフィリンナトリウム	132
41 銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム	135
42 二酸化チタン	138
第 10 章 甘 味 料	141
43 アスパルテーム	142
44 キシリトール	146
45 グリチルリチン酸二ナトリウム	150
46 サッカリン及びサッカリンナトリウム	153
47 D-ソルビトール	157
第 11 章 調 味 料	159
48 L-アスパラギン酸ナトリウム	160
49 DL-アラニン	164
50 L-アルギニンL-グルタミン酸塩	165
51 グリシン	168
52 L-グルタミン酸及びその塩類	169
53 L-テアニン	171
54 5'-イノシン酸二ナトリウム	176
55 5'-ウリジル酸二ナトリウム	181
56 5'-グアニル酸二ナトリウム	182
57 5'-シチジル酸二ナトリウム	183
58 5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び 5'-リボヌクレオチドカルシウム	184
59 アジピン酸	190
60 クエン酸及びその塩類	193
61 グルコン酸及びその化合物	197
62 コハク酸及びその塩類	202
63 DL-酒石酸, L-酒石酸及びその塩類	204
64 乳酸及びその塩類	206
65 氷酢酸及び酢酸ナトリウム	208
66 フマル酸及びフマル酸一ナトリウム	210
67 DL-リンゴ酸及び DL-リンゴ酸ナトリウム	212

viii 目 次

第12章 消 泡 剤	215
68 シリコーン樹脂	216
第13章 膨 脹 剤	221
69 アンモニア及びその塩類	222
70 ミョウバン類	226
第14章 小麦粉処理剤	229
71 過酸化ベンゾイル	230
第15章 被 膜 剤	235
72 オレイン酸ナトリウム	236
第16章 防 虫 剤	239
73 ピペロニルブトキシド	240
第17章 強 化 剤	243
74 L-イソロイシン	244
75 DL-トリプトファン及びL-トリプトファン	246
76 DL-トレオニン及びL-トレオニン	248
77 L-バリン	250
78 L-ヒスチジン塩酸塩	251
79 L-フェニルアラニン	253
80 DL-メチオニン及びL-メチオニン	255
81 L-リシンL-アスパラギン酸塩及びL-リシンL-グルタミン酸塩	257
82 L-リシン塩酸塩	260
83 L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸ナトリウム	262
84 エルゴカルシフェロール及びコレカルシフェロール	266
85 チアミン塩類	270
86 チアミン誘導体	276
87 ニコチン酸及びニコチン酸アミド	280
88 パントテン酸カルシウム及びパントテン酸ナトリウム	282
89 ビタミンA 及びビタミンA 脂肪酸エステル	289
90 ピリドキシン塩酸塩	293
91 葉 酸	297
92 リボフラビン及びその誘導体	302

93	亜鉛塩類	306
94	カルシウム塩類	308
95	鉄化合物	312
96	銅塩類	316
第 18 章 製造用剤等		319
97	臭素酸カリウム	320
98	グリセリン	323
99	プロピレングリコール	326
100	ヘキサン	330
101	マグネシウム塩類	333
102	D-マンニトール	336
103	リン酸及びその塩類, ピロリン酸塩類, ポリリン酸塩類及びメタリン酸塩類	339
第 19 章 既存添加物		345
104	コウジ酸	346
105	ステビア抽出物, α -グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア及び フルクトシルトランスフェラーゼ処理ステビア	349
106	ノルジヒドログアヤレチック酸	351
107	ナリンジン及びヘスペリジン	354
108	ミックストコフェロール	357
第 20 章 未指定あるいは指定を削除された添加物		359
109	タール色素 (アゾルビン, オレンジ RN, キノリンイエロー, パテントブルー V, ファストレッド E, プリリアントブラック BN, ポンソー 6R)	360
110	サイクラミン酸	362
111	ズルチン	366
112	ホウ酸	368
113	TBHQ (tert-ブチルヒドロキノン)	371
参照分析法		373
1	アセトン [製造用剤]	375
2	アルギン酸プロピレングリコールエステル [糊料]	377
3	ガムベース [ガムベース]	380

x 目 次

4	グリセリン脂肪酸エステル [乳化剤]	387
5	三二酸化鉄 [着色料]	390
6	次亜塩素酸塩類 [殺菌料]	392
7	シュウ酸 [製造用剤]	395
8	ショ糖脂肪酸エステル [乳化剤]	398
9	水溶性アナトー [着色料]	402
10	ステアロイル乳酸カルシウム [乳化剤]	406
11	セルロース及びデンプンのグリコール酸誘導体 [糊料]	410
12	ソルビタン脂肪酸エステル [乳化剤]	413
13	ナトリウムメトキシド [製造用剤]	417
14	二酸化ケイ素 [製造用剤]	420
15	二酸化炭素 [製造用剤]	423
16	プロピレングリコール脂肪酸エステル [増粘剤]	426
17	ポリアクリル酸ナトリウム [糊料]	429
18	メチルセルロース [糊料]	431
19	流動パラフィン [製造用剤]	435

参考文献

〈食品添加物分析法各条〉

1	安息香酸及び安息香酸ナトリウム	439
2	ソルビン酸及びソルビン酸カリウム	439
3	デヒドロ酢酸ナトリウム	439
5	プロピオン酸及びその塩類	439
7	エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン 四酢酸二ナトリウム	439
9	クエン酸イソプロピル	439
11	ジブチルヒドロキシトルエン	439
13	ブチルヒドロキシアニソール	439
14	没食子酸プロピル	439
15	過酸化水素	439
16	亜塩素酸ナトリウム	439
22	アルギン酸及びアルギン酸ナトリウム	439
24	亜硝酸ナトリウム	439
25	硝酸カリウム及び硝酸ナトリウム	439

28	食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ	439
29	食用赤色 3 号及びそのアルミニウムレーキ	439
31	食用赤色 102 号	439
32	食用赤色 104 号	440
33	食用赤色 105 号	440
34	食用赤色 106 号	440
35	食用黄色 4 号及びそのアルミニウムレーキ	440
36	食用黄色 5 号及びそのアルミニウムレーキ	440
37	食用緑色 3 号及びそのアルミニウムレーキ	440
38	食用青色 1 号及びそのアルミニウムレーキ	440
39	食用青色 2 号及びそのアルミニウムレーキ	440
41	銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム	440
43	アスパルテーム	440
44	キシリトール	440
45	グリチルリチン酸二ナトリウム	440
46	サッカリン及びサッカリンナトリウム	440
47	D-ソルビトール	440
60	クエン酸及びその塩類	440
61	グルコン酸及びその化合物	440
62	コハク酸及びその塩類	440
63	DL-酒石酸, L-酒石酸及びその塩類	440
64	乳酸及びその塩類	440
65	氷酢酸及び酢酸ナトリウム	441
66	フマル酸及びフマル酸一ナトリウム	441
67	DL-リンゴ酸及び DL-リンゴ酸ナトリウム	441
83	L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸ナトリウム	441
97	臭素酸カリウム	441
99	プロピレングリコール	441
102	D-マンニトール	441
103	リン酸及びその塩類, ピロリン酸塩類, ポリリン酸塩類及びメタリン酸塩類	441
104	コウジ酸	441
106	ノルジヒドログアヤレチック酸	441
110	サイクラミン酸	441
113	TBHQ (tert-ブチルヒドロキノン)	441

〈参照分析法〉

4 グリセリン脂肪酸エステル	441
8 ショ糖脂肪酸エステル	441
11 セルロース及びデンプンのグリコール酸誘導体	441
12 ソルビタン脂肪酸エステル	441
16 プロピレングリコール脂肪酸エステル	441

食品添加物名索引	443
----------------	-----

通則，一般試料採取法

通 則

1. 本書は、食品中に含まれる食品添加物の含量、限度等を試験する際の分析方法を収載したものである。
2. 本書は、通則、一般試料採取法及び食品添加物分析法各条等から構成されており、各章の連関によって分析操作が行われるよう構成されている。
3. 本書には、食品添加物分析法各条に掲げる食品添加物分析法（以下、「既定分析法」という）と参照分析法に掲げる食品添加物分析法がある。
4. 既定分析法及び参照分析法の各条の最初に記載されている名称は、食品に添加された物質の名称を示している。

食品添加物は、その使用目的により、最終製品中に残留するものあるいは食品の製造工程中で除去されるもの、食品中で変化するもの等があり、また、食品中での食品添加物の存在形態は、食品添加物ごとに大きく異なっている。本書に収載した分析法は、食品添加物の化学的性質を踏まえて作成しており、必ずしも添加された物質のみを測定対象としていない場合がある。

単位及び記号

5. 次の長さ、面積、容量、重量、濃度及び圧力等を表わす単位は、それぞれ右に掲げる略号を用いて示す。

メートル	m	センチメートル	cm
ミリメートル	mm	マイクロメートル	μm
ナノメートル	nm	平方センチメートル	cm^2
リットル	L	ミリリットル	ml
マイクロリットル	μl	キログラム	kg
グラム	g	ミリグラム	mg
マイクログラム	μg	ナノグラム	ng
モル毎リットル	mol/l	キロヘルツ	kHz
ミリモル毎リットル	mmol/l	パスカル	Pa
キロパスカル	kPa		

6. 重量百分率を示すには%の記号を用いる。液体 100ml 中の物質含量 (g) を示すには w/v %の記号を用いる。液体 100ml 中の物質含量 (ml) 又はガス 100ml 中の物質含量 (ml) を示すには vol %の記号を用いる。ただし、別に規定するもののほか、物質含量 (g) は、無水物として算定した量を表わす。
7. 温度の表示はセルシウス法を用い、アラビア数字の右に℃を付けて示す。
8. 標準温度は 20℃、常温は 15～25℃、室温は 1～30℃、微温は 30～40℃とする。冷所は、別に規定するもののほか、15℃以下の場所とする。冷水は 15℃以下、微温湯は 30～40℃、温湯は 60～70℃、熱湯は約 100℃の水とする。加温するとは、通例、60～70℃に熱することである。

試 験

9. 既定分析法に代わる方法で、それが既定分析法以上の精度がある場合には、その分析法を用いることができる。ただし、その結果について疑いのある場合は、既定分析法を用いて最終判定を行う。
10. 試験に用いる水は、別に規定するもののほか、精製水とする。
11. デシケーターの乾燥剤は、別に規定するもののほか、シリカゲルとする。
12. 減圧は、別に規定するもののほか、2.0kPa 以下とする。
13. 液性を酸性、アルカリ性又は中性として示した場合は、別に規定するもののほか、pH 試験紙を用いて試験する。液性を詳しく示すには pH 値を用いる。また、微酸性、弱酸性、強酸性、微アルカリ性、弱アルカリ性、強アルカリ性等と記載したものは、酸性又はアルカリ性の程度の概略を示すものであって、その pH の範囲は次による。

微 酸 性	約 5～約 6.5
弱 酸 性	約 3～約 5
強 酸 性	約 3 以下
微アルカリ性	約 7.5～約 9
弱アルカリ性	約 9～約 11
強アルカリ性	約 11 以上
14. 溶質名の次に溶液と記載し、特にその溶媒名を示さないものは水溶液を示す。
15. 1 mol/l 塩酸、硫酸 (1 → 10)、50 vol %エタノールなど液状の試薬名に単に濃度を表示したものは、別に規定するもののほか、水を用いて希釈したものを示す。
16. 溶液の濃度を (1 → 5)、(1 → 100) 等と記載したものは、固形の薬品 1g 又は液状の薬品 1ml を溶媒に溶かして全量をそれぞれ 5ml、100ml 等とする。また、混液を (10 : 1)、(5 : 3 : 1) 等と記載したものは、液状の薬品の 10 容量と 1 容量の混液、5 容量と 3 容量と 1 容量の混液等を示す。

17. 標準液の調製に用いる標準品は、別に規定するもののほか、記載された名称の食品添加物規格に適合する食品添加物又は日本工業規格の最高級の規格に適合する化学物質を、試験の前少なくとも5時間以上室温でデシケーターに保存しておいたものを用いる。

18. 試験に用いる次の試薬は、別に規定するもののほか、日本工業規格の最高級の規格に適合するものを用いる。

塩酸、硫酸、硝酸（比重 1.42）、氷酢酸 [日本工業規格の酢酸]、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水（28～30 %）、クロロホルム、*n*-ヘキサン [日本工業規格のヘキサン]、アセトン、ベンゼン、エチルエーテル、塩化ナトリウム

19. 試薬・試液等の記載において、[特級] 又は [1 級] 等のように記載したものは、日本工業規格の特級又は 1 級等の規格に適合するものを、また [日局] 又は [食添] のように記載したものは、それぞれ日本薬局方又は食品添加物規格に適合するものを示す。

20. 重量を「精密に量る」とは、化学はかりを用い、0.1mg まで読みとるか、セミマイクロ化学はかりを用い、0.01mg まで読みとるか又はマイクロ化学はかりを用い、0.001mg まで読みとることを意味する。規格値の桁数を考慮して、化学はかり、セミマイクロ化学はかり又はマイクロ化学はかりを用いる。

21. 重量を「正確に量る」とは、指示された数値の重量をその桁数まで量ることを意味する。

例えば、0.050g とは 0.0495～0.0504g、2.00g とは 1.995～2.004g、0.10g とは 0.095～0.104g、5.0g とは 4.95～5.04g を量ることを意味する。

22. 容量を「正確に量る」とは、別に規定するもののほか、ホールピペット、ビュレット又はこれらと同程度以上の精度のある容量計を用いて計量することを意味する。また、「正確に 100ml とする」等と記載した場合は、別に規定するもののほか、メスフラスコを用いる。

23. 試験の記載において「空試験を行い補正する」とは、別に規定するもののほか、試料を用いず、必要があれば試料と同量の水を用いて試料の試験操作と同じ方法で空試験の試料液を調製し、測定を行い、試料の測定値を補正することを意味する。

24. 試料の試験、空試験及び標準品の試験等一連の同一試験においては、試験に用いる試薬及び試液は、同一ロット又は調製された同一のものを用いて実験を行う。

25. 試験は、別に規定するもののほか、常温で行う。試験操作において「直ちに」とあるのは、通例、前の操作の終了から 30 秒以内に次の操作を開始することを意味する。

26. 記載数値は、別に規定するもののほか、原則として四捨五入してその数値になる量を意味する。ただし、1 桁の数字のとき、又は約を付して示したときは、記載数値の±10 % の範囲の量を意味する。

27. 本書の方法による測定値は、通例有効数字 2 桁で示す。この際、実験値は、3 桁まで計算し、3 桁目を四捨五入する。

一般試料採取法

食品添加物は、食品の製造時又は加工時に添加又は混和等されるものであり、通例、食品全体にわたって均一に分布しているものである。しかしながら、実際問題として液体の食品の場合は、均一に分布させることは容易であるが、固体又は固体を含む食品中の食品添加物の分布は、多少のバラツキが避けられないものである。また、ある場合には、噴霧、塗布、浸漬、接触等の特殊な使用方法が用いられ、食品全体からみれば当然均一性を有していない。一方、食品によっては、それ自体が複数の原料食品の集合体又は混合物から構成されているものがあり、これらの原料食品の個々において異なった食品添加物が使用されている場合もある。

本書は、食品衛生上の見地から食品中の食品添加物の分析方法を扱ったものである。したがって、食品中の食品添加物の分布が不均一であっても、試料採取は、当該食品が1つの単位として喫食される中にどれくらいの率で加わっているかを分析する目的で行われるのが妥当と考えることとする。

この観点から、品目別各論で別に記載する場合及び特定の目的をもって検査するような場合を除き、試験対象の食品検体からの試料の採取にあたっては、原則として次の諸点を前提とする。

- 1 対象食品は、一般人の購入の対象となる流通食品であること
- 2 食品検体からの試料の採取量は、可能な限り多く、かつ偏らない箇所から得られていることが望ましいこと
- 3 同一条件下で食品添加物が使用された同一種類の食品の1群（以下、「ロット」という。）を試験の対象とする場合は、平均的に代表する形で食品添加物の測定値が得られるよう試料が採取される必要があること
- 4 店頭における商品を対象とする場合は、ロットに着目する方法のほか、同一銘柄又は同一事業所の同一製品を対象とし、その全体的平均値として食品添加物の測定値が得られるよう試料を採取する方法も適当であること
- 5 当該食品が可食部、非可食部から構成されているときは、通例、可食部のみを試験対象とすること

以上の諸点を原則として、通例、少なくとも次に示す方法又はより均一な試料が得られる方法で試料を調製する。

1. 容器又は包装単位の食品

(1) 内容量が 500g 又は 500ml 未満の場合

① 液状又は流動性食品

1 容器又は 1 包装以上を任意に採り、よく振り混ぜて開封し、それぞれの容器又は包装から一定量ずつを採取し、ビーカー等に合わせ、よく混和し、試料とする（通例、100～300g、以下同じ.）。試料は、密栓して保管する。分析時に試料を量る際は、再びよく振り混ぜる。

② 固体食品

a 食品添加物がほぼ均一に含まれているとみなされる食品の場合

1 容器又は 1 包装以上を任意に採り、開封し、それぞれの容器・包装から、試験に影響を与えないナイフ、ハサミ等の用具を用い、食品検体は次のいずれかの方法で一定量ずつを採取し、よく混和し、試料とする。

① 食品の表、裏、両側面又は内部中央等 1 食品について 3～5 箇所的一定部分からほぼ一定量ずつを採る。

② 食品を均等に輪切りにするか、又は対称形に 4 等分もしくは 8 等分し、その 1/4～1/2 を採る。

③ 1 容器又は 1 包装の内容量が小さいときは、全量を採る。

試料は、細切してかき混ぜるか、加熱して溶かすか、又は、乳鉢もしくはホモジナイザーを用いて磨砕するなどして均一とし、密栓して保管する。ただし、均一とした試料が保管中に分離していくようなものは、用時調製する。

この操作における磨砕の際、試験の際の試料の採取量に対応的に正確に量れる限り、少量の水又は品目別各論における最初の抽出溶媒を加えてもよい。

b 食品中の食品添加物の分布が均一でないときとみなされる場合及び各種食品の複合体が 1 食品となっている場合

できる限り数多くの容器又は包装を任意に採り、a 食品添加物がほぼ均一に含まれているとみなされる食品の場合に準じて試料を調製する。ただし、それぞれの容器・包装から採取の際には、食品添加物の分布が食品全体として均一に含まれるように磨砕、粉碎をすとか、又は試料を構成する各種食品の組成比が食品全体のそれと同じになるように配慮する必要がある。

(2) 内容量が 500g 又は 500ml 以上、1kg 又は 1,000ml 以下の場合

上記(1)又は下記(3)の方法による。

(3) 内容量が1kg又は1,000mlを超える場合

① 液状又は流動性食品

1 容器又は1包装を任意に採り、よく振り混ぜて開封し、試料の適当量を採取し、試料とする。試料は、密栓して保管する。分析時に試料を量る際は、再びよく振り混ぜる。

② 固体食品

1 容器又は1包装、できれば2容器又は2包装を採り、開封し、必要があれば容器等に取り出し、容器又は包装単位につき、試験に影響を与えないナイフ、ハサミ等の用具を用い、食品検体は偏らずほぼ全表面から1~3cmの深さで4箇所以上、表面から1~3cm以上内部の部分から同様片偏らないように4箇所以上、それぞれほぼ一定量ずつを採り、合わせてよく混和し、試料とする。以下、(1)、②、a食品添加物がほぼ均一に含まれているとみなされる食品の場合を準用する。

食品添加物の分布が均一でないとみなされるような場合は、上記、表面部分、内部部分の採取箇所数を変更し、食品全体として均一に含まれるように配慮し、また、各種食品の複合体の場合は、その組成比が食品全体のそれと同じになるように配慮して試料を調製する。

2. 非容器又は非包装の食品

食品製造業において、その製造直後に適当に小分け又は細断等され、そのまま店頭販売されるような場合があり、製造単位が明確ではなかったり、また食品素材を目分量で混合し製造する場合があり、食品添加物の量が常に一定していなかったりするため、食品を代表的な形で把握するような採取法を一般的に言及することは困難である。したがって、このような食品検体にあつては、1. 容器又は包装単位の食品の場合に準じ、通例、3検体以上から、必要があれば、磨碎、粉碎等をした後、一定量ずつを採取し、よく混和し、試料とする。また、清涼飲料水に氷を加えてあるような場合のように時間とともに食品素材の濃度が変化するような場合もあり、検体の採取には時間的間隔も必要である。いずれにしても採取する食品検体は、可能な限り多くの検体を対象にし、また採取箇所数を多くすることが望ましい。

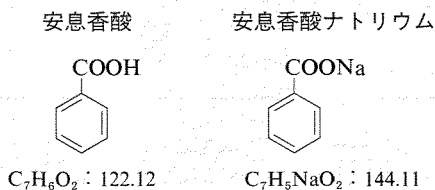
食品添加物分析法各条

第 1 章

保 存 料

1 安息香酸及び安息香酸ナトリウム

Benzoic Acid and Sodium Benzoate



1. 試験法の概要

食品中の安息香酸及び安息香酸ナトリウムは、水蒸気蒸留法により抽出精製した後、液体クロマトグラフィーにより安息香酸として定量する。必要があれば、分子量比を乗じて安息香酸ナトリウムの量として求める。食品中には、天然の安息香酸が分布している。したがって、定量値は天然由来の安息香酸と添加されたものの合計値である。

2. 試 験 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) 試料液の調製

試料を細切又はすりつぶした後、その約 50g を精密に量り、ビーカーに入れて水 100ml を加えてかき混ぜ、リトマス試験紙を用いて水酸化ナトリウム溶液 (1 → 10) 又は硫酸 (1 → 10) で中和し、これを 500～1,000ml の丸底フラスコに移し、これに酒石酸溶液 (15 → 100) 5ml、食塩 80g 及びシリコーン樹脂 1 滴を加えた後、全量を水で約 200ml とする。これを、毎分約 10ml の留出速度で水蒸気蒸留に付し、留液を採り、500.0ml とする。この留液を試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

安息香酸 0.040g を正確に量り、0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液 5ml に溶かした後、水を加えて正確に 100ml とする。この液 5.0ml を採り、水を加えて正確に 100ml とし、標準液とする (この液 1.0ml は安息香酸 20.0 μ g を含む)。

標準液 0, 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1.0ml は、それぞれ安息香酸 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 μ g 及び 10.0 μ g を含む）。

（４）測定法

① 測定条件

紫外線吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：ステンレススチール製、内径 4.6～6.0mm、長さ 150～250mm

カラム温度：40℃

移動相：メタノール・アセトニトリル・5mmol/l クエン酸緩衝液（1：2：7）

流速：1.0ml/分

測定波長：230nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 20 μ l ずつを正確に量り、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

試料液 20 μ l を正確に量り、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料液中の安息香酸濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中の安息香酸含量（g/kg）を計算する。

$$\text{安息香酸含量 (g/kg)} = \frac{CV}{1,000 \times W}$$

C：試料液中の安息香酸濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

V：試料液の量（ml）

$$\text{安息香酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{安息香酸含量 (g/kg)} \times 1.180$$

試薬・試液

1. 酒石酸：〔特級〕
2. シリコーン樹脂：（消泡用）〔食添〕
3. クエン酸・一水塩：〔特級〕
4. クエン酸三ナトリウム・二水塩：〔特級〕
5. 5mmol/l クエン酸緩衝液（pH4.0）：クエン酸・一水塩 7.0g とクエン酸三ナトリウム・二水塩 6.0g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。用時 10 倍に希釈する。

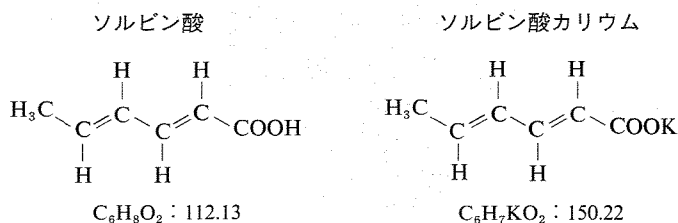
14 第1章 保 存 料

6. メタノール：「高速液体クロマトグラフ用」

7. アセトニトリル：「高速液体クロマトグラフ用」

2 ソルビン酸及びソルビン酸カリウム

Sorbic Acid and Potassium Sorbate



1. 試験法の概要

食品中のソルビン酸及びソルビン酸カリウムは、水蒸気蒸留法により抽出精製した後、液体クロマトグラフィーによりソルビン酸として定量する。必要があれば、分子量比を乗じてソルビン酸カリウムの量として求める。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

(4) 測定法¹⁾

上記(1)～(4)については、1 安息香酸及び安息香酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「安息香酸」は、「ソルビン酸」とする。

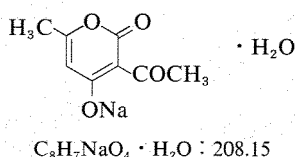
$$\text{ソルビン酸カリウム含量 (g/kg)} = \text{ソルビン酸含量 (g/kg)} \times 1.340$$

[注]

- 1) ソルビン酸の吸収極大は 260nm 付近であるが、安息香酸、デヒドロ酢酸と同じ 230nm で測定を行うこととした。

3 デヒドロ酢酸ナトリウム

Sodium Dehydroacetate



1. 試験法の概要

食品中のデヒドロ酢酸ナトリウムは、水蒸気蒸留法により抽出精製した後、液体クロマトグラフィーによりデヒドロ酢酸として定量し、分子量比を乗じてデヒドロ酢酸ナトリウム量を求める。

2. 試 験 法 (液体クロマトグラフィー)¹⁾

- (1) 検体の採取と試料の調製
- (2) 試料液の調製
- (3) 検量線用標準液の調製
- (4) 測 定 法

上記の(1)~(4)については、1 安息香酸及び安息香酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「安息香酸」は「デヒドロ酢酸」とする。

$$\text{デヒドロ酢酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{デヒドロ酢酸含量 (g/kg)} \times 1.238$$

[注]

- 1) 高速液体クロマトグラフ用カラムは、金属を除く処理をしたカラムを使わないと、デヒドロ酢酸のピークが出ないことがある。

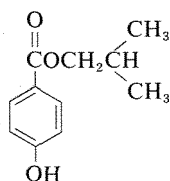
4 パラオキシ安息香酸エステル類

p-Hydroxybenzoic Acid Esters

パラオキシ安息香酸イソブチル

Isobutyl *p*-Hydroxybenzoate

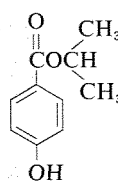
別名：パラヒドロキシ安息香酸イソブチル

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

パラオキシ安息香酸イソプロピル

Isopropyl *p*-Hydroxybenzoate

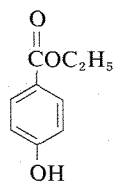
別名：パラヒドロキシ安息香酸イソプロピル

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

パラオキシ安息香酸エチル

Ethyl *p*-Hydroxybenzoate

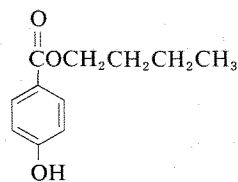
別名：パラヒドロキシ安息香酸エチル

 $C_9H_{10}O_3$: 166.18

パラオキシ安息香酸ブチル

Butyl *p*-Hydroxybenzoate

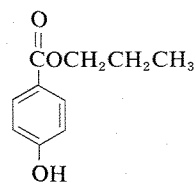
別名：パラヒドロキシ安息香酸ブチル

 $C_{11}H_{14}O_3$: 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. 試験法の概要

食品中のパラオキシ安息香酸エステル類は、水蒸気蒸留法¹⁾により抽出精製した後、パラオキシ安息香酸エステル類の構成成分をそれぞれ測定する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。

2. 試 験 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) 試料液の調製²⁾

① ショウ油及び酢

試料 50ml を正確に採り、500～1,000ml の丸底フラスコに入れ、これに酒石酸溶液 (15→100) 15ml、食塩 80g 及びシリコーン樹脂 1 滴を加えた後、全量を水で約 200ml とする。これを、毎分約 10ml の流出速度で水蒸気蒸留に付し、内容物がこげないように加熱し、留液を採り、500ml とする。この留液を試料液とする³⁾。

② その他の食品

試料を細切又はすりつぶした後、その約 50g を精密に量り、①と同様に操作する。

(3) 検量線用標準液の調製

パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸ブチル及びパラオキシ安息香酸イソブチル各 0.040g を正確に量り、それぞれ 60 %メタノールに溶解して正確に 100ml とする。これらの液 5ml ずつを正確に採り、60 %メタノールを加えて正確に 100ml とし、混合標準液とする (この液 1ml はパラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸ブチル及びパラオキシ安息香酸イソブチル各 20 μ g を含む)。

混合標準液 0, 1, 2, 4, 6, 8ml 及び 10ml を正確に量り、60 %メタノールを加えて正確に 10ml とし、検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸ブチル及びパラオキシ安息香酸イソブチルそれぞれ 0, 2, 4, 8, 12, 16 μ g 及び 20 μ g を含む)。

(4) 測 定 法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：ステンレススチール製、内径 4.6～6.0mm、長さ 150～250mm

カラム温度：40℃

移動相：メタノール・5mmol/l クエン酸緩衝液 (6：4)

流速：1.0ml/分

測定波長：270nm

② 検量線

それぞれの検量線用標準液 20 μ l ずつを正確に量り、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それぞれのパラオキシ安息香酸エステルの検量線を作成する。

③ 定量

試料液 20 μ l を正確に量り、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料液中のそれぞれのパラオキシ安息香酸エステル濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のそれぞれ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。

しょう油及び酢

$$\text{パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/L)} = \frac{CV}{1,000 \times W_1}$$

その他の食品

$$\text{パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{CV}{1,000 \times W_2}$$

C：試料液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 (μ g/ml)

W_1 ：試料の採取量 (ml)

W_2 ：試料の採取量 (g)

V：試料液の量 (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、検体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^{4),5)}。

しょう油及び酢

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/L)} = \text{パラオキシ安息香酸エチル含量 (g/L)} \times 0.8311$$

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

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

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

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

その他の食品

$$\text{パラオキシ安息香酸含量 (g/kg)} = \text{パラオキシ安息香酸エチル含量 (g/kg)} \times 0.8311$$

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

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

$$\times 0.7665$$

パラオキシ安息香酸含量 (g/kg) = パラオキシ安息香酸ブチル含量 (g/kg) × 0.7111

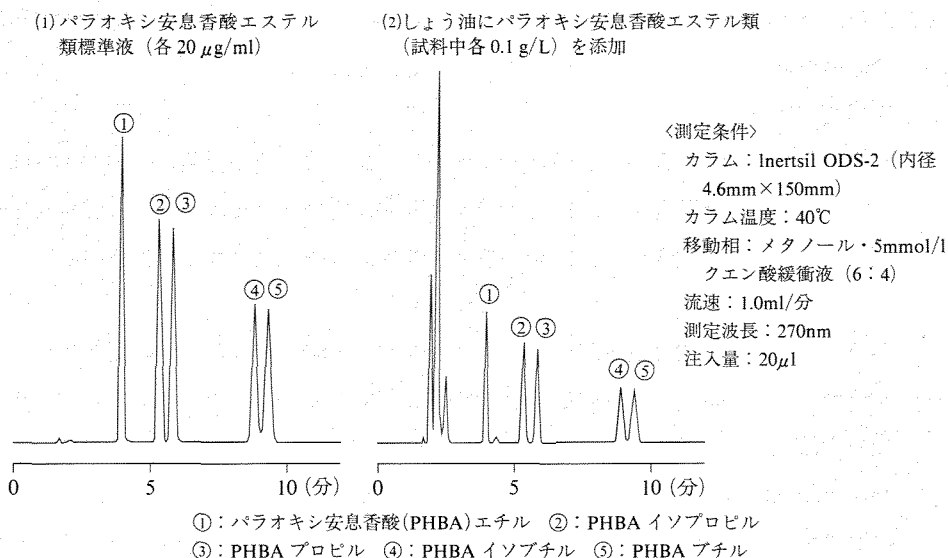
パラオキシ安息香酸含量 (g/kg) = パラオキシ安息香酸イソブチル含量 (g/kg) × 0.7111

試薬・試液

1. 酒石酸：〔特級〕
2. シリコーン樹脂：（消泡用）〔食添〕
3. クエン酸・一水和物：〔特級〕
4. クエン酸三ナトリウム・二水和物：〔特級〕
5. 5mmol/l クエン酸緩衝液（pH4.0）：クエン酸一水和物 7.0g とクエン酸三ナトリウム・二水和物 6.0g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。用時 10 倍に希釈する。
6. メタノール：「高速液体クロマトグラフ用」

〔注〕

- 1) 安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸も同一の留液で、移動相をメタノール・アセトニトリル・5mmol/l クエン酸緩衝液（1：2：7）、測定波長を 230nm にすることで分析可能である。
- 2) 高タンパク食品及び高脂肪食品では回収率が悪い。これらの食品では、試料 20g に水・メタノール（1：1）混合液 150ml を加えてホモジナイズし、同溶液で全量 200ml とする。遠心分離して上澄液 100ml を採り、水蒸気蒸留を行うことにより回収率が向上する。
- 3) 水蒸気蒸留のフラスコ内の液量、流出速度により回収率が異なる。流出速度を約 10ml とし、フラスコ内の液量が増加しないように加熱する。
- 4) 本法の定量限界は、試料中濃度で 0.005g/L 又は 0.005g/kg である。
- 5) 本法による液体クロマトグラムの一例を図に示す。



注図 4-1 パラオキシ安息香酸エステル類の液体クロマトグラム

5 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

C_2H_5COOH

$C_3H_6O_2$: 74.08

プロピオン酸カルシウム

Calcium Propionate

$(C_2H_5COO^-)_2Ca^{2+} \cdot nH_2O$

$C_6H_{10}CaO_4 \cdot nH_2O$ (n=1 又は 0)

($C_6H_{10}CaO_4$: 186.22)

プロピオン酸ナトリウム

Sodium Propionate

C_2H_5COONa

$C_3H_5NaO_2$: 96.06

1. 試験法の概要

食品中のプロピオン酸及びその塩類は、ガス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。

2. 試験法 (ガスクロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

細切した試料約 30g を精密に量り、500ml の蒸留フラスコに入れ、水 150ml、塩化ナトリウム 50g、リン酸溶液 (1 → 10) 10ml¹⁾ 及びシリコーン樹脂 2～3 滴を加えて水蒸気蒸留を行う。あらかじめ水酸化ナトリウム溶液 (1 → 100) 20ml を入れた受器に冷却器の先端を浸し、留液が 280～290ml²⁾ になったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に 300ml とする。この液 5ml を正確に量り、あらかじめ用意した強酸性イオン交換樹脂カラムに静かに注入し、0.5～1ml/分の速度で流出させる³⁾。流出液をギ酸溶液 (1 → 50) 0.5ml⁴⁾ を入れた 10ml のメスフラスコに採り、カラムを少量の水で洗い、水を加えて正確に 10ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

プロピオン酸 1.00g を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、更にこの液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準液とする(この液 1ml は、プロピオン酸 1mg を含む)。標準液 0, 0.5, 1, 2ml 及び 3ml を正確に量り、それぞれ 10ml のメスフラスコに入れ、それぞれ水を加えて正確に 10ml とする。この液 5ml を正確に量り、ギ酸 (1 → 50) 0.5ml を加えた後、水を加えて正確に 10ml とし、検量線用標準液とする(これらの液 1ml は、それぞれプロピオン酸 0, 25, 50, 100 μ g 及び 150 μ g を含む)。

(4) 測 定 法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用いて、次の条件によって測定する。

カラム充填剤⁵⁾：80～100 メッシュのポーラスポリマービーズ

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 3m

カラム温度⁶⁾：180℃

注入口温度⁷⁾：220℃

キャリアーガス：窒素、40ml/分

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 2 μ l を量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたプロピオン酸の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⁸⁾

試料液 2 μ l を量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のプロピオン酸濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のプロピオン酸含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{プロピオン酸含量 (g/kg)} = \frac{3 \times C}{5 \times W}$$

C：試料液中のプロピオン酸濃度 (μ g/ml)

W：検体の採取量 (g)

プロピオン酸カルシウム(無水)含量 (g/kg) = プロピオン酸含量 (g/kg) $\times$ 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) $\times$ 1.297

試薬・試液等

1. 強酸性イオン交換樹脂：100～200 メッシュのもの、H 型とする⁹⁾。

2. 強酸性イオン交換樹脂カラム：強酸性イオン交換樹脂 0.1g を内径約 10mm のプラスチック製クロマトグラフ用ミニカラムに詰め、水洗後少量の海砂を積層し使用する。
3. シリコーン樹脂：(消泡用)[食添]

[注]

- 1) pH は 2~3 となる。
- 2) 最初の 100ml 中に大部分が留出してくる。
- 3) ナトリウム塩を遊離のプロピオン酸にする。なお、強酸性イオン交換樹脂カラムを用いて行う代りにパッチ法で行う方法もある。すなわち、留液 5ml を 10ml の共栓試験管に採り、強酸性イオン交換樹脂 200mg を加え、5 分間振とうした後、ろ過する。ろ液をあらかじめギ酸溶液 (1 → 50) 0.5ml を入れた 10ml のメスフラスコに採り、樹脂を少量の水で洗い、洗液をろ液に合わせ、水を加えて正確に 10ml とし試料液とする。
- 4) ガスクロマトグラム上、遊離のプロピオン酸のピークは、テーリングがみられるので、より強酸で FID-GC に感度の低いギ酸を添加することにより、テーリングの少ない、よりシャープなピークとなる。
- 5) 60~80 メッシュのものをを用いてもよい。
- 6) 160~200℃の範囲で調節してもよい。
- 7) 200~240℃の範囲で調節してもよい。
- 8) 必要があれば内部標準法 (内部標準物質：クロトン酸) を用いてもよい。
- 9) 1mol/l 塩酸を用いて H 型とし、十分水洗する。更に、メタノールで洗った後、減圧乾燥したものを用いる。

第 2 章

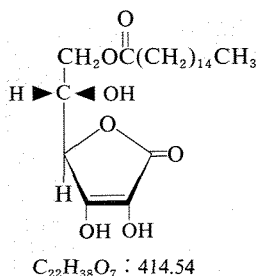
酸化防止剤

6 L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及び L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル

L-Ascorbyl Palmitate and L-Ascorbyl Stearate

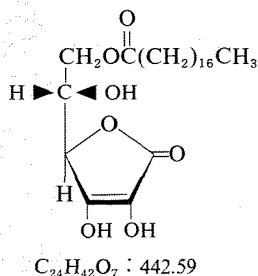
L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル

別名：ビタミン C パルミテート



L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル

別名：ビタミン C ステアレート



1. 試験法の概要

食品中のL-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルは、液体クロマトグラフィーにより酸化型を含めた総L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及び総L-アスコルビン酸ステアリン酸エステルとして定量する。

2. 試験法（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) 試料液の調製

試料¹⁾を細切またはすりつぶした後、その約5gを50mlの遠沈管に精密に量り、アスコルビン酸²⁾ 0.5g及びエタノール20mlを加え、5分間振とう後、遠心分離（5分間、3,000回転/分）し、上澄液を50mlのメスフラスコに入れる。残留物にエタノール15mlを加え、同様の操作を繰り返す。上澄液を先の上澄液と合わせ、0.05mol/l酢酸緩衝液（pH4.0）³⁾を加えて正確に50mlとする。この液をガラス繊維ろ紙⁴⁾でろ過する。ろ液2mlを正確に量り、あらかじめメタノール10ml及び0.05mol/l酢酸緩衝液（pH4.0）5mlで洗浄したクリーンアップ用カートリッジカラム⁵⁾に静かに注入し、1～2ml/分の速度で流出させる。流出液は捨て、カラムは水

10ml 及びエタノール・酢酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (1:1) 5ml を流して洗浄した後、共栓付試験管にメタノール 4ml で溶出する⁶⁾。溶出液に 1% DL-ホモシステイン溶液⁷⁾ 1ml を加え、40℃で 15 分間加温した後、1% アスコルビン酸・メタノール溶液⁸⁾ 1ml を加え、メタノールを加えて正確に 10ml とし、メンブランフィルター (0.45 μ m) を用いてろ過し⁹⁾、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及び L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル各 0.010g を正確に量り、1% アスコルビン酸・メタノール溶液⁸⁾ 10ml を加え、メタノールを加えて溶かして正確に 100ml とし、標準液とする (この液 1ml は、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及び L-アスコルビン酸ステアリン酸エステルそれぞれ 100 μ g を含む)。

標準液 0, 1, 2.5ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、1% アスコルビン酸・メタノール溶液⁸⁾ 5ml をそれぞれに加え、メタノールを加えてそれぞれ正確に 50ml とし、検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及び L-アスコルビン酸ステアリン酸エステルそれぞれ 0, 2, 5 μ g 及び 10 μ g を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル¹⁰⁾

カラム管：ステンレススチール製、内径 4.6~6.0mm、長さ 150~250mm

カラム温度：35℃

移動相：メタノール・0.05mol/l リン酸二水素ナトリウム溶液 (pH2.0) (85:15)

流速：1.0ml/分

測定波長：254nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 20 μ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さから検量線を作成する。

③ 定量

試料液 20 μ l を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さと検量線によって、試料液中の L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル濃度 (μ g/ml) 及び L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中の L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル含量 (g/kg) 及び L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル含量 (g/kg) を計算する¹¹⁾。

$$\text{総 L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{C_p \times V}{40 \times W}$$

$$\text{総 L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{C_s \times V}{40 \times W}$$

C_p : 試料液中の L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

C_s : 試料液中の L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

V : 試料液の量 (ml)

試薬・試液

1. メタノール : [残留農薬試験用]
2. リン酸二水素ナトリウム : [特級]
3. 0.05mol/l リン酸二水素ナトリウム溶液 (pH2.0) : リン酸二水素ナトリウム 7.80g を水 900ml に溶かし, リン酸で pH を 2.0 に調整し, 水を加えて 1,000ml とする。
4. アスコルビン酸 : [特級]
5. 1%アスコルビン酸・メタノール溶液 : アスコルビン酸 1g を採り, 水 10ml で溶解し, メタノールを加えて 100ml とする。
6. エタノール : [残留農薬試験用]
7. 酢酸 : [特級]
8. 酢酸ナトリウム : [特級]
9. 0.05mol/l 酢酸緩衝液 (pH4.0) : 0.05mol/l 酢酸ナトリウム溶液に 0.05mol/l 酢酸溶液を注加し, pH 4.0 に調整する。
10. DL-ホモシステイン : [特級]
11. 1%DL-ホモシステイン溶液 : DL-ホモシステイン 100mg を水 10ml に溶かす。

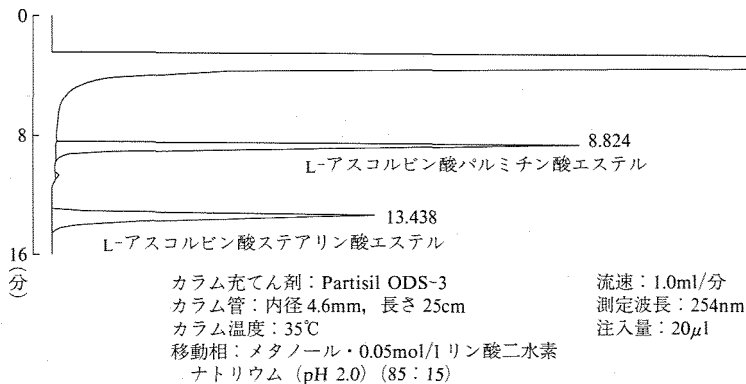
[注]

- 1) 液体試料の場合, そのまま約 5g を遠沈管に採る。
- 2) 抽出効率を上げるために加える。通常 0.5~1g の添加量で効果を示す。
- 3) アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びアスコルビン酸ステアリン酸エステルのクリーンアップ用カートリッジカラムへの保持力は, 酸性側で強くなる傾向にあるため, 溶液をクリーンアップ用カートリッジカラムに通す前に, pH4.0 の酢酸緩衝液で酸性とする。
- 4) ワットマン社製, GF/A などが使用できる。
- 5) 市販のカートリッジカラム, 例えば SEP-PAK C_{18} (ウォータース社製) などが使用できる。妨害物の少ないときは, この操作は省略できる。
- 6) アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びアスコルビン酸ステアリン酸エステルは, メタノール量 3ml でほぼ 100% 溶出する。
- 7) アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びアスコルビン酸ステアリン酸エステルは, 酸化型

では紫外部に吸収を持たないため、還元剤としてホモシステインを加えて酸化型のものを還元型にする。

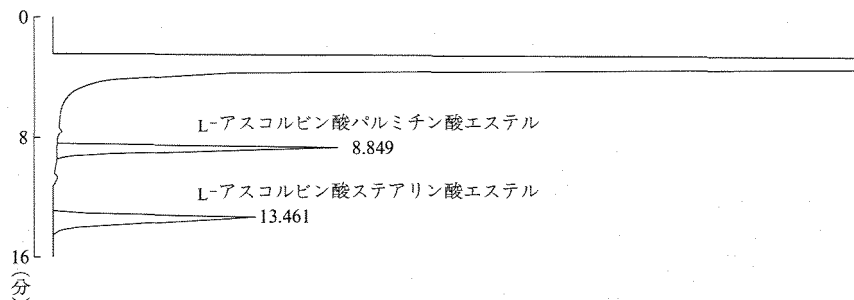
- 8) アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びアスコルビン酸ステアリン酸エステルの分解を防ぐために加える。
- 9) 遠心分離して試料液を調製する方法もある。
- 10) ワットマン社製 Partisil ODS-3, ナーゲル社製 Nucleosil ODS などがこの条件で使用できる。
- 11) L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルの混合液を分離した液体クロマトグラムを注図 6-1 に示す。検量線は $0.2 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で直線関係があり、食品 5g を採取し、本法に従ったときの定量限界は、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルそれぞれ $0.01\text{g}/\text{kg}$ である。

また、種々の食品についての L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルの添加回収率を注表 6-1 に、液体クロマトグラムを注図 6-2 に示す。

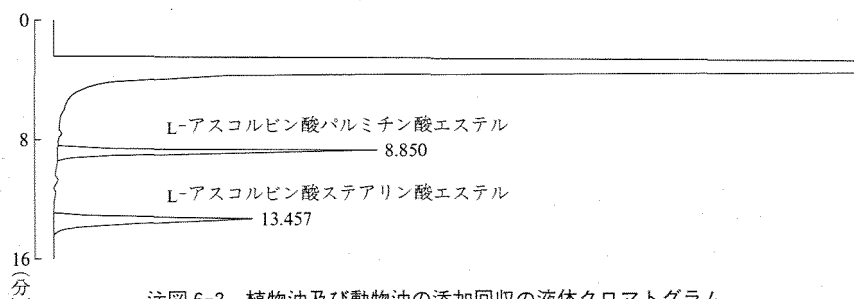


注図 6-1 L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル、L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル混合液の液体クロマトグラム

(a) 植物油+L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル+L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル



(b) 動物油+L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル+L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル



注図 6-2 植物油及び動物油の添加回収の液体クロマトグラム

注表 6-I L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸
ステアリン酸エステルの各種食品での添加回収率 (%)

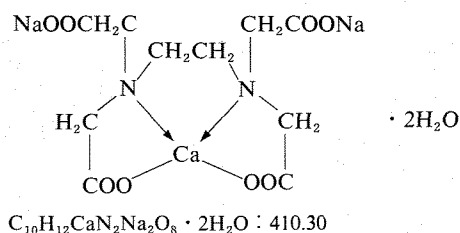
食 品	添加量 (g/kg)	回 収 率 (%)	
		L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル	L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル
食用植物油	0.02	95, 100, 100	90, 100, 100
	1.50	102, 101, 103	100, 99, 101
牛 脂	0.02	100, 100, 100	90, 95, 95
	1.50	91, 101, 104	99, 105, 104
ポテトチップス	0.02	105, 100, 100	95, 100, 95
	0.50	105, 99, 104	105, 103, 105

7 エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム 及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム

Calcium Disodium Ethylenediaminetetraacetate and
Disodium Ethylenediaminetetraacetate

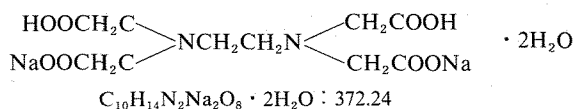
エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム

別名：EDTA カルシウム二ナトリウム



エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム

別名：EDTA 二ナトリウム



1. 試験法の概要

食品中の EDTA カルシウム二ナトリウム及び EDTA 二ナトリウムは、透析により抽出し、カラムクロマトグラフィーによりキレート型 EDTA と遊離型 EDTA を分離後、Cu-EDTA とし、それぞれを液体クロマトグラフィーによりキレート型 EDTA は EDTA カルシウム二ナトリウムとして、遊離型 EDTA は EDTA 二ナトリウムとして定量する。ただし、Fe-EDTA が存在する場合は遊離型 EDTA の画分に混入し、かつ Fe-EDTA のまま定量されるので、その量をキレート型 EDTA の量に加える。

2. 試験法（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) 試料原液の調製

試料約 10g を精密に量り、0.2mol/l トリス・塩酸緩衝液 15ml を加え、テフロンホモジナイザー¹⁾で磨砕する。更に 0.2mol/l トリス・塩酸緩衝液 10ml を用いて洗い込み²⁾、セロファンチューブ³⁾に詰めて透析内液とし、外液に 0.02mol/l トリス・塩酸緩衝液 175ml を用い、室温 (20℃) で 24 時間透析する⁴⁾。この透析外液を試料原液とする。

(3) 試料溶液の調製

試料原液 40ml を正確に量り、あらかじめコンディショニングした分画用イオン交換カラム⁵⁾に流し、次に 0.05mol/l トリス・塩酸緩衝液 60ml を流してカラムを洗浄し⁶⁾、両液を合わせ、キレート型 EDTA⁷⁾ 用試料溶液とする。更に先のカラムに吸着している EDTA 二ナトリウムを 0.2mol/l 塩酸 20ml で溶出し、遊離型 EDTA 用試料溶液⁸⁾とする。

(4) 試料液の調製

キレート型及び遊離型 EDTA 用試料溶液を、それぞれ 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液又は 1mol/l 塩酸で pH2.5 に調整し、それぞれに硫酸銅溶液 2ml ずつを加えた後、室温で 5 分間放置し、キレート型 EDTA 用試料溶液は 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で中和し、遊離型 EDTA 用試料溶液は 0.2mol/l トリス・塩酸緩衝液で中和し⁹⁾、それぞれ陰イオン交換樹脂カラムに流し¹⁰⁾、水 10ml ずつを流してそれぞれのカラムを洗浄した後、0.2mol/l 塩酸 20ml ずつをそれぞれのカラムに流し、溶出液をそれぞれエバポレータにより濃縮乾固し、水 5ml に溶かして 1mol/l 及び 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH4.0 とし¹¹⁾、水を加えて 10ml としてキレート型及び遊離型 EDTA 用試料液とする。

(5) 検量線用標準液の調製

① EDTA 銅ナトリウム検量線用標準液の調製

エチレンジアミン四酢酸銅二ナトリウム・4 水塩 0.5905g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この液 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、EDTA 銅二ナトリウム標準液とする (この液 1ml は、EDTA 銅二ナトリウムとして 50 μ g を含む)。EDTA 銅二ナトリウム標準液 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、水を加えて 10ml とし EDTA 銅二ナトリウム検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれ EDTA 銅二ナトリウムとして 5, 10, 15, 20 μ g 及び 25 μ g を含む)。

② EDTA 鉄ナトリウム検量線用標準液の調製

エチレンジアミン四酢酸鉄ナトリウム・3 水塩 0.5735g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この液 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、EDTA 鉄ナ

トリウム標準液とする（この液 1ml は、EDTA 鉄ナトリウムとして $50\mu\text{g}$ を含む）。EDTA 鉄ナトリウム標準液 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、水を加えて 10ml とし EDTA 鉄ナトリウム検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ EDTA 鉄ナトリウムとして 5, 10, 15, $20\mu\text{g}$ 及び $25\mu\text{g}$ を含む）。

(6) 測定法

① 測定条件

紫外線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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：ステンレススチール製、内径 4.6mm、長さ 150mm

カラム温度： 40°C

移動相：0.01mol/l TBA-Br を含む 0.03mol/l 酢酸緩衝液 (pH4.0)/アセトニトリル (8:2)

流速：1.0ml/分

測定波長：254nm

② 検量線

EDTA 銅二ナトリウム検量線用標準液、EDTA 鉄ナトリウム検量線用標準液 $20\mu\text{l}$ ずつをそれぞれ正確に量り、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 EDTA 銅用又は EDTA 鉄用検量線を作成する。

③ 定量^{12)~14)}

a キレート型 EDTA

キレート型 EDTA 用試料液 $20\mu\text{l}$ を正確に量り、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 EDTA 銅用検量線から試料液中の EDTA 銅濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中の EDTA カルシウム二ナトリウム含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{EDTA カルシウム二ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times a}{W \times 20}$$

C：キレート型 EDTA 用試料液中の EDTA 銅の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

a：0.941 (換算係数)

W：試料の採取量 (g)

b 遊離型 EDTA

遊離型 EDTA 用試料液 $20\mu\text{l}$ を正確に量り、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 EDTA 銅用検量線から試料液中の EDTA 銅濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中の EDTA 二ナトリウム含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{EDTA 二ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times a}{W \times 20}$$

C：遊離型 EDTA 用試料液中の EDTA 銅の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

a：0.845 (換算係数)

W：試料の採取量 (g)

なお、EDTA 鉄ナトリウムのピークが認められた場合には、次式によって検体中の EDTA 鉄ナトリウム含量 (g/kg) を計算し、それを EDTA カルシウム二ナトリウム量に換算するため 1.020 を乗じて、キレート型 EDTA の含量に加える。

$$\text{EDTA 鉄ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times a}{W \times 20}$$

C：遊離型 EDTA 用試料液中のキレート型 EDTA 鉄ナトリウム濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

a：0.845 (換算係数)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液等

1. エチレンジアミン四酢酸銅二ナトリウム・4 水塩：市販品を用いる。
2. エチレンジアミン四酢酸鉄ナトリウム・3 水塩：市販品を用いる。
3. 硫酸銅：[特級]
4. トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン：[特級]
5. 臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (TBA-Br)：[特級]
6. 硫酸銅溶液：硫酸銅 0.25g を量り、水を加えて 100ml とする。
7. トリス・塩酸緩衝液：トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 24.2g を量り、水 500ml を加えて溶かし、2mol/l 塩酸で pH8.5 に調整した後、水を加えて 1,000ml とする (0.2mol/l)。この液 100ml 又は 250ml を量り、水を加えて 1,000ml とする (0.02mol/l 又は 0.05mol/l)。
8. HPLC 用移動相：0.03mol/l の酢酸ナトリウム溶液と 0.03mol/l の酢酸溶液を混合し pH4.0 とし、臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (TBA-Br) を 0.01mol/l になるように溶解する。更に本液とアセトニトリルを 8：2 に混合する。
9. 透析チューブ：市販の透析用セロファンチューブを用いる。
10. 分画用イオン交換型カラム：カートリッジタイプの第四級アミン型を用いる (1,000mg/6ml)。あらかじめメタノール、水、0.05mol/l トリス・塩酸緩衝液各 5ml でコンディショニングして使用する。
11. 陰イオン交換樹脂カラム：市販の陰イオン交換樹脂を 1mol/l 塩酸に懸濁し、中性になるまで水洗した後、内径 1cm のコック付ガラスカラムに 5cm の高さに詰める。

[注]

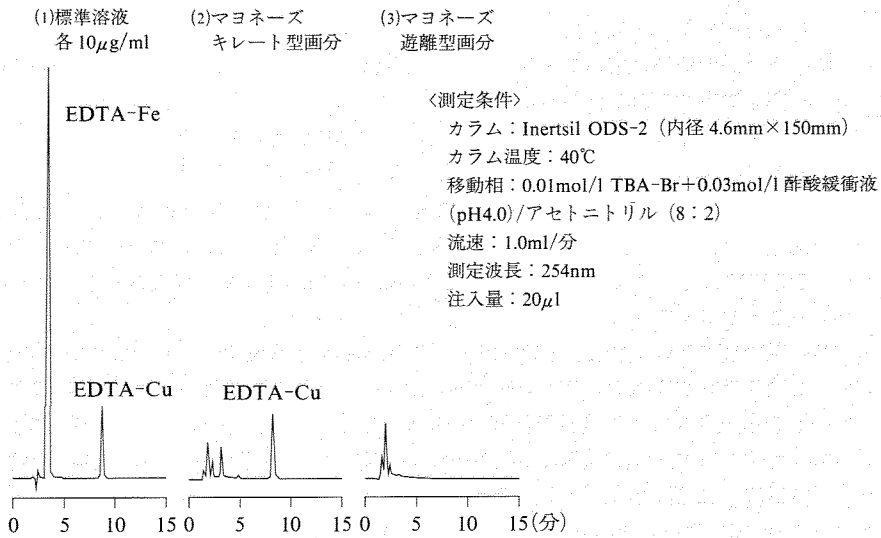
- 1) 金属との接触を防止する目的でテフロンホモジナイザーを用いる。ステンレス製の万能ホモジナイザーでは、操作中に金属と接触することにより遊離型 EDTA がキレート型 EDTA に変化するおそれがある。
- 2) 透析法による抽出操作を pH10 以上の強アルカリ性で行うと、Fe-EDTA が解離し遊離型 EDTA として回収されるおそれがあるので、抽出操作は pH8.5 付近で行う必要がある。
- 3) 透析用セロファンチューブには数種の規格品がある。透析膜の厚みにより透析効率が悪くなる可能性が考えられるので、次のセロファンチューブ (36/32 インチ, 30m: Viskase Sales Corp.) がよい。
- 4) 38℃, 15 時間でも透析効率は同じ結果が得られる。
- 5) カラムは、カートリッジタイプの第四級アミン型陰イオン交換カラム (Mega Bond Elut SAX 1,000mg/6ml, Varian 社製) 又は、同等のカラムを用いる。
- 6) カラムの洗浄に用いるトリス・塩酸緩衝液の濃度を高めたり、容量を増すと遊離型 EDTA の一部が溶出するおそれがある。
- 7) 試料中には種々の金属とキレート化した EDTA の存在が考えられ、これらは Fe-EDTA 以外は EDTA カルシウム二ナトリウムと同一挙動を示す。
- 8) キレート型 EDTA のうち Fe-EDTA のみは分画用イオン交換カラムに吸着され、塩酸で溶出されるので、遊離型 EDTA の画分に混入する。しかし、硫酸銅を用いて遊離型 EDTA を Cu-EDTA として定量するとき、Fe-EDTA は Cu-EDTA に変換されないで、両者は分別することができる。
- 9) 遊離型 EDTA 試料溶液を中和するとき、1mol/l 水酸化ナトリウムで行うと沈殿が生じ、次の陰イオン交換樹脂カラム処理の際目詰まりを生じる。遊離型 EDTA 試料溶液を中和する際には 0.2mol/l トリス・塩酸緩衝液 (pH8.5) を用いることにより沈殿は生成しない。
- 10) すべての EDTA を樹脂に吸着させ、過剰の硫酸銅を洗浄除去する (過剰の硫酸銅が混在する試験液を高速液体クロマトグラフに注入するとカラム劣化の原因となる)。
- 11) pH 調整を行わないと Cu-EDTA の HPLC の保持時間にズレを生じる。
- 12) 市販食品についての EDTA-Ca-Na₂ と EDTA-Na₂ の添加回収試験の結果を、注表 7-1, 7-2 に示した。添加した EDTA-Na₂ は遊離型 EDTA としてではなく、全てキレート型 EDTA として回収された。
- 13) 定量限界は、試料中濃度で EDTA-Ca-Na₂ は $(2.5\mu\text{g} \times 0.941) / (10\text{g} \times 20) = 0.012\text{g/kg}$, EDTA-Na₂ は $(2.5\mu\text{g} \times 0.845) / (10\text{g} \times 20) = 0.011\text{g/kg}$, EDTA-Fe-Na は $2.5\mu\text{g} / (10\text{g} \times 20) = 0.013\text{g/kg}$ である。なお、EDTA 銅ナトリウム及び EDTA 鉄ナトリウム検量線用標準液の最小濃度 (5 $\mu\text{g/ml}$) の 1/2 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) をクロマト上の最小ピークとし計算した。
- 14) 本法による液体クロマトグラムの一例を注図 7-1 に示す。

注表 7-1 エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウムの
各種食品での添加回収率

食品	試料量 (g)	添加量 (mg)	検出量 (mg)	回収率 (%)
マヨネーズ	10	2.5	2.04	81.5
サラダドレッシング	10	2.5	2.14	85.4
かに缶詰	10	2.5	2.24	89.8
たけのこ缶詰	10	2.5	1.56	62.5
オレンジジュース	10	2.5	2.27	90.7

注表 7-2 エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムの各種食品での添加回収率

食品	試料量 (g)	添加量 (mg)	検出量 (mg)		回収率 (%)	
			遊離型	キレート型	遊離型	キレート型
マヨネーズ	10	2.5	0	2.12	0	87.9
サラダドレッシング	10	2.5	0	2.42	0	96.7
かに缶詰	10	2.5	0	2.37	0	94.9
たけのこ缶詰	10	2.5	0	1.65	0	65.9
オレンジジュース	10	2.5	0	2.49	0	99.7

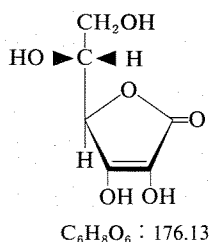


注図 7-1 EDTA の液体クロマトグラム

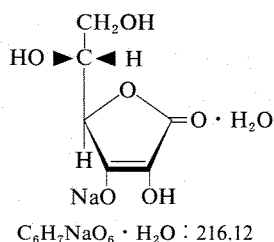
8 エリソルビン酸及びエリソルビン酸ナトリウム

Erythorbic Acid and Sodium Erythorbate

エリソルビン酸
別名：イソアスコルビン酸



エリソルビン酸ナトリウム
別名：イソアスコルビン酸ナトリウム



1. 試験法の概要

食品中のエリソルビン酸及びエリソルビン酸ナトリウムは、液体クロマトグラフィーにより還元型エリソルビン酸として、また、その酸化型であるデヒドロエリソルビン酸を還元して、液体クロマトグラフィーにより総エリソルビン酸¹⁾として定量する。必要があれば分子量比を乗じてエリソルビン酸ナトリウムの量として求める。

2. 試験法（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⁾。

（2）試料液の調製

① 液状及び半流動状食品

試料約 10g を精密に量り、50ml の褐色メスフラスコ³⁾に入れ、試料と同量の 4% メタリン酸溶液⁴⁾を加えた後、2% メタリン酸溶液を加えて 50ml に定容する。次に、メンブランフィルター（0.45 μ m）でろ過し、ろ液を還元型エリソルビン酸測定用試料液とする。

また、ろ液 2ml を採り、0.1% ホモシステイン溶液 1ml 及び 10% リン酸水素二ナトリウム溶液 1ml を加えて混合後⁵⁾、40℃ で 20 分間加温し⁶⁾、総エリソルビン酸測定用試料液とする。

② 粉体及び固体食品⁷⁾

試料約 10g を精密に量り、100ml の褐色抽出管³⁾に入れ、試料と同量の 4% メタリン酸溶

液⁴⁾を加えた後、2%メタリン酸溶液 30ml を加え、5 分間振とうする。更に超音波を用いて 10 分間抽出を行った後、2%メタリン酸溶液を加えて 50ml に定容する。次にメンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し、ろ液を還元型エリソルビン酸測定用試料液とする。

また、ろ液 2ml を採り、0.1%ホモシステイン溶液 1ml 及び 10%リン酸水素二ナトリウム溶液 1ml を加えて混合後⁵⁾、40℃で 20 分間加温し⁶⁾、総エリソルビン酸測定用試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

エリソルビン酸 0.050g を正確に量り⁸⁾、100ml の褐色メスフラスコに入れ、2%メタリン酸溶液を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準原液とする (この液 1ml は、エリソルビン酸 500 μ g を含む)。標準原液 5ml を正確に量り、50ml の褐色メスフラスコに入れ、2%メタリン酸溶液を加えて正確に 50ml とし、標準液とする (この液 1ml は、エリソルビン酸 50 μ g を含む)。標準液 1, 5, 10ml 及び 20ml をそれぞれ正確に量り、50ml の褐色メスフラスコに入れ、2%メタリン酸溶液を加えて正確に 50ml とし、検量線用標準液とする⁹⁾ (これらの液 1ml は、エリソルビン酸 1, 5, 10 μ g 及び 20 μ g を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外線吸収検出器付液体クロマトグラフ¹⁰⁾を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：アミノプロピル基を化学結合したシリカゲル¹¹⁾

カラム管：ステンレススチール製、内径 4.6~6.0mm、長さ 150~250mm

カラム温度：室温

移動相：アセトニトリル・0.01mol/l リン酸二水素ナトリウム溶液・0.03%DL-ホモシステイン・メタノール (600:100:30:30)

流速：1.0ml/分

測定波長：270nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 5 μ l ずつを正確に量り、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¹²⁾

試料液 5 μ l を正確に量り、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料液中のエリソルビン酸濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中の還元型又は総エリソルビン酸含量 (g/kg) を計算する。また、両者の差から酸化型エリソルビン酸含量 (g/kg) を求める。

$$\text{還元型エリソルビン酸含量 (g/kg)} = \frac{C_1}{20 \times W}$$

$$\text{総エリソルビン酸含量 (g/kg)} = \frac{C_2}{10 \times W}$$

$$\text{酸化型エリソルビン酸含量 (g/kg)} = \text{総エリソルビン酸含量 (g/kg)} - \text{還元型エリソルビン酸含量 (g/kg)}$$

C_1 : 試料液中の還元型エリソルビン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

C_2 : 試料液中の総エリソルビン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

$$\text{エリソルビン酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{エリソルビン酸含量 (g/kg)} \times 1.227$$

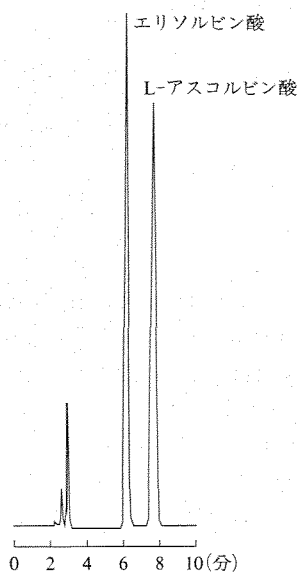
試薬・試液

1. アセトニトリル : [残留農薬試験用]
2. メタノール : [残留農薬試験用]
3. DL-ホモシステイン : [特級]
4. リン酸二水素ナトリウム二水和物 : [特級]
5. リン酸水素二ナトリウム (12 水塩) : [特級]
6. メタリン酸 : [特級]
7. 4%メタリン酸溶液 : メタリン酸 40g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。冷所に保存する。
8. 2%メタリン酸溶液 : メタリン酸 20g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。冷所に保存する。
9. 0.1%ホモシステイン溶液 : DL-ホモシステイン 10mg を水 10ml に溶かす。
10. 10%リン酸水素二ナトリウム溶液 : リン酸水素二ナトリウム (12 水塩) 1g に水を加えて溶かして 10ml とする。

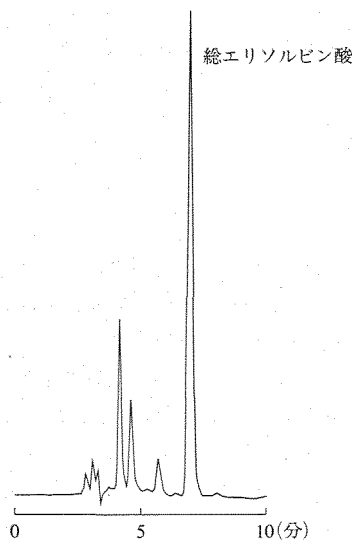
[注]

- 1) エリソルビン酸の残留量を調べるには、還元型のみの測定でよいが、使用の状況を調べるには、酸化型のデヒドロエリソルビン酸を含めた総エリソルビン酸を測定する必要がある。
- 2) エリソルビン酸は酸化されやすいので、試料の調製には包丁、ハサミ等を用いて細切するか、乳鉢で粗粉碎し、長時間空気と接触させないようにする。
- 3) 50ml 及び 100ml の標線付きの褐色遠心管などが使用できる。
- 4) エリソルビン酸の酸化防止のため、メタリン酸溶液を用いる。抽出液中のメタリン酸の終濃度を 2% としたのは、タンパク質の除去ができ、かつ、カラムの劣化防止のためである。
- 5) 0.1%ホモシステイン溶液は、酸化型のデヒドロエリソルビン酸の還元のために用いる。この反応は中性で進むため、中和の目的で 10%リン酸水素二ナトリウム溶液を加える。
- 6) 40℃に加温することにより、還元反応を促進する。20℃前後の温度では 60~90 分を要する。

- 7) パン粉、小麦粉などの乾燥した吸水性の高い試料で、本法による抽出が困難な場合、次のように抽出するとよい。試料約10gを精密に量り、100mlの褐色抽出管に入れ、2%メタリン酸溶液70mlを加え、5分間振とうする。更に超音波を用いて10分間抽出を行った後、100mlの褐色メスフラスコを受器として綿栓ろ過（漏斗に脱脂綿を軽く詰めて、ろ過する）し、抽出管及び残留物は、2%メタリン酸溶液10mlずつで2回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、2%メタリン酸溶液を加えて100mlに定容する。次に、メンブランフィルター（0.45 μ m）でろ過し、ろ液を還元型エリソルビン酸測定用試料液とする。また、ろ液2mlを採り、0.1%ホモシステイン溶液1ml及び10%リン酸水素二ナトリウム溶液1mlを加えて混合後、40℃で20分加温し、総エリソルビン酸測定用試料液とする。
- 8) 標準溶液にアスコルビン酸を加えておくことにより、エリソルビン酸とアスコルビン酸の同時分析が可能である。
- 9) カラムへの吸着があるため、原点を通る直線とはならないが、1~20 μ g/mlの濃度範囲では直線関係が得られる。試料液の濃度が検量線の濃度範囲を超える場合は、試料液を2%メタリン酸溶液を用いて適宜希釈するか、試料採取量を減らして試験する。
- 10) 還元型エリソルビン酸は、本移動相条件下で270nm付近に吸収極大を示すことから、紫外線吸収検出器により測定可能であるが、電気化学検出器を用いることにより、より高感度で選択的に測定できる（加電圧：700mV）。また、電気化学検出器を用いた場合、高感度となる分、検量線の直線領域が低濃度側へ移動することがあるので注意を要する。
- 11) 液体クロマトグラフのカラムとしては、Lichrosorb NH₂、Unisil Q NH₂、TSkgel NH₂-60、Finepak SIL NH₂、Zorbax NH₂などの市販品がある。また、移動相としてはアセトニトリル・酢酸・水（87：2：11）なども使用可能である。
- 12) エリソルビン酸、アスコルビン酸混合液を分離した液体クロマトグラムを注図8-1に示す。検量線は、1~20 μ g/mlの範囲で直線関係がある。また、食品10gを採取し、本法に従ったときの定量限界は、還元型エリソルビン酸で0.005g/kg、総エリソルビン酸で0.01g/kgである。種々の食品についての総エリソルビン酸の添加回収率を注表8-1に、液体クロマトグラムを注図8-2に示す。



注図8-1 エリソルビン酸、アスコルビン酸混合液の液体クロマトグラム



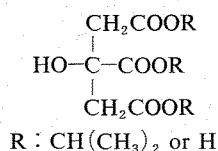
注図8-2 ハムの添加回収の液体クロマトグラム

注表 8-1 総エリソルビン酸の各種食品での添加回収率 (%)

食 品	添加量 (g/kg)	回収率 (%)
サラミソーセージ	1.0	98.1
ウインナーソーセージ	1.0	99.8
ハ ム	1.0	100.6
ゆでだこ	1.0	104.1
ジュース	0.2	106.5
パン粉	0.2	97.2

9 クエン酸イソプロピル

Isopropyl Citrate



クエン酸モノイソプロピル

$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_7$: 234.21

クエン酸ジイソプロピル

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_7$: 276.29

クエン酸トリイソプロピル

$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_7$: 318.37

1. 試験法の概要

食品中のクエン酸イソプロピル¹⁾は、クエン酸モノ及びジイソプロピルをメチル化体にした後、またクエン酸トリイソプロピルは直接、ガスクロマトグラフィーにより測定し、クエン酸モノイソプロピルとして求める。

2. 試験法 (ガスクロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

① 食用油

試料約 20g を精密に量り、*n*-ヘキサン 100ml を加えて溶かす²⁾。この液を定量的に分液漏斗に入れ、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を加えて振り混ぜ、アセトニトリル層を分取する。更に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を用い、同様の操作を繰り返す。全アセトニトリル層を合わせ、減圧乾固した後、ジアゾメタン試液 2ml を加えてメチル化し³⁾、減圧下で乾固した後、残留物をアセトン 4ml に溶かし試料液とする。

② バター及びその他の食品

試料約 20g を精密に量り、飽和食塩水 10ml 又は 20ml 以下⁴⁾、5mol/l 硫酸 2ml 及び酢酸エチル 75ml を加えてホモジナイズした後、ろ過する。残留物は酢酸エチル 50ml ずつを用いて 2 回ホモジナイズした後、ろ過する。全ろ液を合わせ⁵⁾無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、ろ過した後、減圧乾固する⁶⁾。残留物に *n*-ヘキサン 100ml を加えて溶かし、この液を定量的に

分液漏斗に入れる。更に残留物に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を加えて溶かし⁷⁾、この液を定量的に先の分液漏斗に合わせて振り混ぜ、アセトニトリル層を分取する。更に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50ml を用い、同様の操作を繰り返す。全アセトニトリル層を合わせ、減圧乾固した後、ジアゾメタン試薬 2ml を加えてメチル化し、溶媒を留去する。残留物を *n*-ヘキサン 2ml に溶解した後、フロリジルカラムに負荷し *n*-ヘキサン・エチルエーテル混液 (4:1) 80ml (流速 2ml/分) で洗浄する。次いで *n*-ヘキサン・エチルエーテル混液 (1:1) 100ml (流速 2ml/分) で溶出し、減圧乾固後アセトン 4ml に溶かし試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製⁸⁾

クエン酸 2-モノイソプロピル (クエン酸モノイソプロピル a) 及び 1-モノイソプロピル (クエン酸モノイソプロピル b)⁹⁾、クエン酸 1,2-ジイソプロピル (クエン酸ジイソプロピル a) 及び 1,3-ジイソプロピル (クエン酸ジイソプロピル b)、及びクエン酸トリイソプロピル 0.100g ずつを正確に量り、合わせてアセトンを加えて溶かし、正確に 100ml とし、標準液とする (この液 1ml は、クエン酸モノイソプロピル a 及び b、クエン酸ジイソプロピル a 及び b、及びクエン酸トリイソプロピルそれぞれ 1mg ずつを含む)。標準液 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5ml 及び 2ml を正確に量り、それぞれにジアゾメタン試液 2ml ずつを加えてメチル化し、減圧乾固した後アセトンを加えてそれぞれ正確に 4ml ずつとし、検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれクエン酸モノイソプロピル a 及び b、クエン酸ジイソプロピル a 及び b、及びクエン酸トリイソプロピルをそれぞれ 0, 62.5, 125, 250, 375 μ g 及び 500 μ g ずつを含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤: 60~80 メッシュのガスクロマトグラフィー用ケイソウ土をシラン処理した担体にシリコーン OV-330 を 1% の割合でコーティングしたもの。

カラム管: ガラス製, 内径 3mm, 長さ 3m

カラム温度: 160℃

注入口温度: 210℃

検出器温度: 210℃

キャリアーガス: 窒素ガス, 30ml/分

② 検量線

検量線用標準液 5 μ l ずつをそれぞれ正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたそれぞれの成分のピーク面積からクエン酸モノイソプロピル a 及び b 用、クエン酸ジイソプロ

ピル a 及び b 用及びクエン酸トリイソプロピル用検量線を作成する。

③ 定量¹⁰⁾

試料液 5 μ l を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたそれぞれの成分のピーク面積と対応する検量線から試料液中のクエン酸モノイソプロピル a 及び b, クエン酸ジイソプロピル a 及び b, 及びクエン酸トリイソプロピル濃度それぞれ A_{a1} , A_{b1} , A_{a2} , A_{b2} 及び A_3 (μ g/ml) を求め、次式によって試料中のクエン酸イソプロピル含量 C (g/kg) をクエン酸モノイソプロピルとして計算する。

$$\text{クエン酸イソプロピル C (g/kg)} = \frac{A_{a1} + A_{b1} + 0.8477(A_{a2} + A_{b2}) + 0.7357A_3}{250 \times W}$$

A_{a1} : 試料液中のクエン酸モノイソプロピル a 濃度 (μ g/ml)

A_{b1} : 試料液中のクエン酸モノイソプロピル b 濃度 (μ g/ml)

A_{a2} : 試料液中のクエン酸ジイソプロピル a 濃度 (μ g/ml)

A_{b2} : 試料液中のクエン酸ジイソプロピル b 濃度 (μ g/ml)

A_3 : 試料液中のクエン酸トリイソプロピル濃度 (μ g/ml)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液

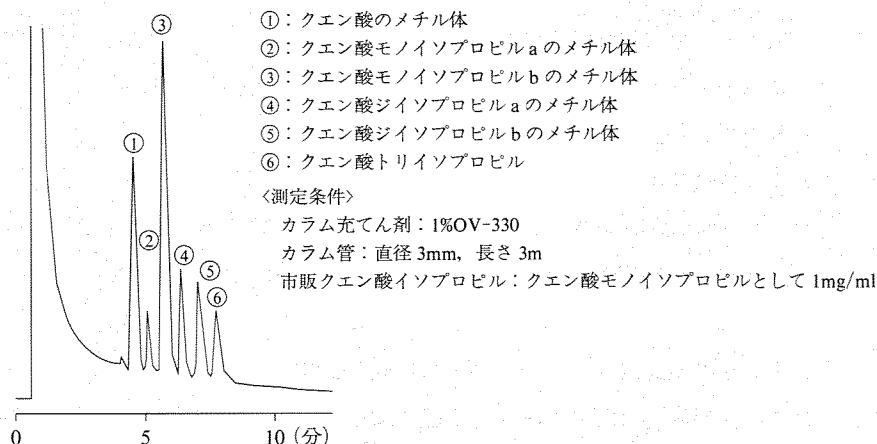
1. *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル: アセトニトリル 1,000ml に, *n*-ヘキサン 200ml を加え, よく振り混ぜた後静置し, アセトニトリル層を分取する。
2. ジアゾメタン試液¹¹⁾: *N*-メチル-*N*-ニトロソ-*p*-トルエンスルホンアミド 4.3g をエチルエーテル 26ml に溶かし, あらかじめ水酸化カリウム 1g を水 1.6ml 及びエタノール 5ml に溶かした溶液を入れたフラスコ中に注意して加え, 水浴上 65℃において蒸留して留液約 20ml を採る。ただし, 受器にはエチルエーテル 5ml を入れた共栓フラスコを用い, 冷却器の先端は受器のエチルエーテルの液面下に浸し, 受器は氷水中に浸して冷却する。ドラフト内で操作する。用時調製する。
3. *N*-メチル-*N*-ニトロソ-*p*-トルエンスルホンアミド: [特級]
4. 飽和食塩水: 水 100ml を量り, 食塩 40g を加え, よく振り混ぜた後静置し, 上澄液を用いる。
5. フロリジルカラム: 130℃で 15 時間活性化したフロリジルをデシケーター中で放冷後, 共栓フラスコに移し, 含水率 15% になるよう水を加えて密栓し激しく振り混ぜた後, 1 時間放置する。この 5g を内径 10mm, 長さ 30mm のクロマト管に *n*-ヘキサンを用いて湿式充てんし, 更に無水硫酸ナトリウム 2g を積層する。
6. クエン酸モノイソプロピル a 及び b, クエン酸ジイソプロピル a 及び b, クエン酸トリイソプロピルは次の合成法によってそれぞれ単品を得る¹²⁾。

- (i) クエン酸トリイソプロピル：無水クエン酸 10g を量り、イソプロピルアルコール 100ml を加えて溶かし、無水硫酸ナトリウム 15g 及び硫酸 2ml を加え、水浴上で 3 時間還流した後、温時ろ紙でろ過する。ろ紙を水酸化ナトリウム溶液 (3 → 10) 約 8ml で中和した後、減圧下でイソプロピルアルコールを留去する。残留物に炭酸水素ナトリウム溶液 (1 → 20) 50ml 及び *n*-ヘキサン 100ml を加えて溶かして分液漏斗に入れ、10 分間振とうした後、*n*-ヘキサン層を分取する。水層に再度 *n*-ヘキサン 100ml を加えて振とうし、*n*-ヘキサン層を分取する。水層は(ii)の操作に用いる。分取し両有機層を合わせ、水 50ml で洗い、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧下で留去し、クエン酸トリイソプロピルの液体を得る。
- (ii) クエン酸ジイソプロピル b：(i)の *n*-ヘキサン分配後の水層を塩酸で中和する。更に 1mol/l 塩酸で pH を約 4 に調整した後、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 200ml を加え、10 分間振とうし、有機層を分取する。水層は(iii)の操作に用いる。分取した有機層を水 50ml で洗い、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧下で留去し、残留物をエーテル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 2) から結晶化させ、クエン酸ジイソプロピル b を得る。
- (iii) クエン酸モノイソプロピル b：(ii)の酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 分配後の水層を、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 50ml を加えて洗う。更に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 50ml でクエン酸ジイソプロピルがなくなるまで洗う¹³⁾。水層に塩酸を加え、pH を約 1 に調整し、酢酸エチル 200ml を加え、10 分間振とうし、有機層を分取する。分取した有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧下で留去し、残留物をエーテル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 2) から結晶化させ、クエン酸モノイソプロピル b を得る。
- (iv) クエン酸ジイソプロピル a：(i)で得られたクエン酸トリイソプロピル 100mg をイソプロピルアルコール 100ml に溶解し、0℃で 60 % 水酸化カリウム溶液 1ml を加え、ときどき振とうし、30 分後、濃硫酸約 0.3ml を加えて pH 1 に調整する。これを 30 % 水酸化ナトリウム溶液で中和後、減圧下でイソプロピルアルコールを留去する。残留物に炭酸水素ナトリウム溶液 (5 → 100) 50ml を加えて溶かし、この液を順次 *n*-ヘキサン 100ml 及び 50ml で洗う。水層は 1mol/l 塩酸で pH を 4 に調整後、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 3) 200ml を加え、10 分間振とうし、有機層を分取する。水層は(v)の操作に用いる。分取した有機層を水 25ml で洗い、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧下で留去し、残留物をエチルエーテル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 2) から結晶化させ、クエン酸ジイソプロピル a を得る。
- (v) クエン酸モノイソプロピル a：(iv)の酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 3) 分配後の水層を酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 3) 50ml を加えて洗う。更に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 3) 50ml でクエン酸ジイソプロピルがなくなるまで数回洗う。水層を濃

塩酸でpH 約2に調整し、酢酸エチル 200mlを加え、10分間振とうし、有機層を分取する。分取した有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧下で留去し、残留物をエチルエーテル・*n*-ヘキサン混液(1:2)から結晶化させ、クエン酸モノイソプロピル a を得る。

[注]

- 食品添加物のクエン酸イソプロピルには、クエン酸も混入している。
- 水洗するとクエン酸モノ及びジイソプロピルがすべて損失するので、水洗をしてはならない。
- 室温でジアゾメタンを加えるだけで、短時間でメチル化される。この条件下ではクエン酸トリイソプロピルはメチル化されない。
- 食塩水は、クリーム状になるまで飽和食塩水を加える。ソフトマーガリンのようなクリーム状のものには加えない。液状食品の場合は、食塩水を加えないで酢酸エチルを用いて抽出を行う。
- 水洗するとクエン酸モノ及びジイソプロピルがそれぞれ 79.5 %, 11.4 % を損失するので、水洗してはならない。
- 酢酸エチルが微量でも残ると *n*-ヘキサン、アセトニトリル分配率が異なる。
- クエン酸モノ及びジイソプロピルは、*n*-ヘキサンに溶けにくいのでこの操作を行う。
- 標準品として、組成のわかっている市販クエン酸イソプロピルを用いてもよい。
- クエン酸モノイソプロピルには、1-モノイソプロピルエステル及び2-モノイソプロピルエステルの2種の異性体がある。このガスクロマトグラフィー条件では保持時間の短い a が2-モノイソプロピルエステルであり、長い b が1-モノイソプロピルエステルである。
- 本法によるガスクロマトグラフの一例を図に示す。

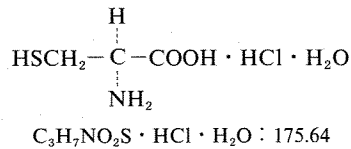


注図 9-1 クエン酸イソプロピルのガスクロマトグラム

- ジアゾメタン (CH_2N_2) は黄色のガス体 (沸点 -23°C) でエーテルに溶け、溶液は低温でも徐々に分解する。鮮黄色を呈する溶液は密栓して冷蔵庫に保存すれば 1~2 週間は使用できる。激しい反応性を有する有毒なガスであるので取り扱いには注意を要する。廃棄するときには、酢酸中に少量ずつ加えて、消費させた後廃棄する。
- この合成法でクエン酸モノイソプロピル a 及び b, クエン酸ジイソプロピル a 及び b, クエン酸トリイソプロピルがそれぞれ単品として得られる。
- ジアゾメタン試液でメチル化して、ガスクロマトグラフィーを用いて確認する。

10 L-システイン塩酸塩

L-Cystein Monohydrochloride



1. 試験法の概要

食品中のL-システイン塩酸塩は、システイン酸にした後、液体クロマトグラフィーによりL-システインとして定量する。必要があれば分子量比を乗じてL-システイン塩酸塩の量として求める。

2. 試験法（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¹⁾。

（2）試料液の調製

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの(2)試料液の調製を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-システイン塩酸塩」とする。

（3）標準液の調製

L-システイン塩酸塩 144.9mg を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、L-システイン 1mg を含む）。

（4）測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂、平均粒径 17 μ m、架橋度 8 %

カラム管：内径 9mm、長さ 500mm

カラム温度：55℃

移動相：クエン酸緩衝液 (pH3.25)，0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

注入量：500 μ l

② 測定

試料液 4ml を正確に量り，ナス型フラスコに入れ，氷水中で冷却しながらあらかじめ氷水中で冷却した過ギ酸溶液 4ml を加える。室温で 1 時間放置した後，臭化水素酸 1.2ml を加え，臭素が発生しなくなるまで約 40℃ の水浴上で減圧濃縮を行う。この液をクエン酸緩衝液 (pH2.2)⁷⁾ を用いて 100ml のメスフラスコに移し，クエン酸緩衝液 (pH2.2) を加えて正確に 100ml とする。この液につき 570nm の吸光度としてのクロマトグラムを得る。

③ 定量

標準液 4ml を正確に量り，②測定と同様に操作し，得られたクロマトグラムと試料液で得られたクロマトグラムとの面積比例計算で定量する⁹⁾。

$$\text{L-システイン含量 (g/kg)} = \frac{200 \times S \times A^{10)}}{W \times A_s}$$

S：標準液中の L-システイン濃度 (mg/ml)

W：試料の採取量 (g)

A_s：標準液で得られたクロマトグラムの L-システインピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムの L-システインのピーク面積

$$\text{L-システイン塩酸塩含量 (g/kg)} = \text{L-システイン含量 (g/kg)} \times 1.449$$

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし，次の試薬・試液を加える。

19. 過ギ酸溶液：ギ酸 9ml に過酸化水素 1ml を加えて室温に 1 時間放置したものを使用する。

20. 過酸化水素：[30%，特級]

21. ギ酸：[99%以上，特級]

22. 臭化水素酸：[特級]

[注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。ただし，10) は次のとおりとする。

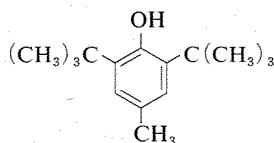
10) L-システイン含量 (g/kg) =

$$S \text{ (mg/ml)} \times \frac{4}{100} \times \frac{A}{A_s} \times \frac{100}{4} \times 200 \times W \text{ (g)}$$

11 ジブチルヒドロキシトルエン

Butylated Hydroxytoluene

略名：BHT



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

1. 試験法の概要

食品中のジブチルヒドロキシトルエンをアセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液(2:1:1)で抽出する。抽出溶液は $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法(液体クロマトグラフィー)^{1), 2)}

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試験採取法に準ずる。

(2) 検液の調製

① 植物油

試料約5gを精密に量り、混合溶媒50mlを加えてよく振り混ぜた後、 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、上層を分取し検液とする。

② バター、魚介類製品及び魚介冷凍品

バターは 40°C で加温融解し、魚介乾製品及び魚介冷凍品は粉碎し、その約5gを精密に量りホモジナイザーのカップに採る。これに無水硫酸ナトリウム10g及び混合溶媒³⁾50mlを加え、10分間ホモジナイズする。 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で1時間以上冷却した後、すばやくろ紙でろ過する。残渣はあらかじめ冷蔵庫で冷却した混合溶媒15mlで洗い洗液をろ過する。ろ液は合わせ、検液とする。

(3) 試料液の調製

検液を減圧濃縮し1~2mlとした後、混合溶媒を加え正確に5mlとする。これを0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し、試料液とする。

(4) 検量線用標準液の調製

ジブチルヒドロキシトルエン0.100gを正確に量り、メタノールを加えて溶かし正確に100mlとし標準液とする（この液1mlはジブチルヒドロキシトルエン1,000 μ gを含む）。標準液10mlを正確に採り、メタノールを加えて正確に100mlとし、標準溶液とする（この液1mlは、ジブチルヒドロキシトルエン100 μ gを含む）。

標準溶液0, 1, 2, 3, 4ml及び5mlをそれぞれ正確に量り混合液を加えてそれぞれ正確に5mlとし、検量線用標準液とする（これらの液1mlは、それぞれジブチルヒドロキシトルエン0, 20, 40, 60, 80 μ g及び100 μ gを含む）。

(5) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管⁴⁾：内径4.6~6.0mm，長さ150~250mm

移動相⁵⁾：A液 アセトニトリル・メタノール混液（1：1）

B液 5%酢酸溶液

A液・B液 混液（7：3）

流速：1.0ml/分

測定波長：280nm

② 検量線

検量線用標準液10 μ lを正確に採り、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⁶⁾

試料液10 μ lを正確に採り、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料液中のジブチルヒドロキシトルエン含量（g/kg）を算出する⁷⁾。

$$\text{ジブチルヒドロキシトルエン含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 1,000 (\text{g}) / 5 (\text{g})}$$

C：試料液中のジブチルヒドロキシトルエン濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液

1. 無水硫酸ナトリウム：[特級]
2. メタノール：[特級] 及び [高速液体クロマトグラフ用]
3. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフ用]
4. 酢酸：[特級]
5. 2-プロパノール：[特級]
6. エタノール：[特級]
7. 混合溶媒：アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液 (2:1:1)

[注]

- 1) 本法は液体クロマトグラフにグラジエント装置を装備することにより、ジブチルヒドロキシトルエンのほかにブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの同時分析が可能である。
- 2) 本法は植物油、バター、魚介乾製品、魚介冷凍品等に使用できる。
- 3) 抽出溶媒としてメタノールも使用できるが、煮干しの場合には抽出物が多く試験溶液に濁りを生ずる。
- 4) 市販の充填カラムとして Wakosil II-5C18HG, Inertsil ODS-2, TSKgel ODS-120T 及び NOVA-PAK C₁₈ いずれも内径 4~6mm, 長さ 150~250mm 等が使用できる。
- 5) グラジエント装置付液体クロマトグラフの場合は、次の条件によりジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルを同時に測定できる。

カラム管：内径 4.6mm, 長さ 150mm

移動相：A 液 アセトニトリル・メタノール混液 (1:1)

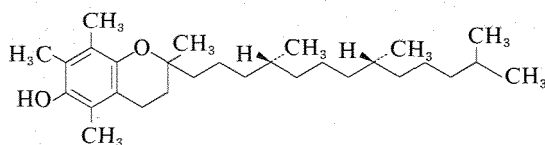
B 液 5%酢酸溶液

A 液の割合を 15 分間で 40~90%まで変化させ、以後 90%の割合で 30 分間保持する。

- 6) 各試料を分析終了後ごとに移動相 A のみを約 30 分間流すことにより、ほとんどの油脂成分を溶出することができる。
- 7) 本法の添加回収率はジブチルヒドロキシトルエンを 0.1g/kg 添加した場合、煮干しで約 75% であるが、食用油、バター、冷凍エビなどでは 80%以上である。なお、定量限界は約 0.005g/kg である。

12 *dl*- α -トコフェロール及び *d*- α -トコフェロール

dl- α -Tocopherol and *d*- α -Tocopherol



$C_{29}H_{50}O_2$: 430.71

1. 試験法の概要

食品中の *dl*- α -トコフェロール及び *d*- α -トコフェロールは、液体クロマトグラフィーにより定量する。天然には *d*- α -トコフェロールが分布している。したがって、定量値は、食品由来の *d*- α -トコフェロールと添加された *dl*- α -トコフェロール及び *d*- α -トコフェロールの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）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) 試料液の調製

① 動・植物性油脂²⁾

試料約 0.5g を精密に量り、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチル-6-クロマノール (PMC)・*n*-ヘキサン溶液 1ml を正確に量って加え、更に *n*-ヘキサンを加えて溶かし正確に 10ml とし、有機溶媒用メンブランフィルター (0.45 μ m) を用いてろ過し、ろ液を試料液とする。

② その他の食品

試料をあらかじめ粉碎し、約 0.5g を精密に量り、60ml 容の栓付き遠沈管に入れる。これに、塩化ナトリウム溶液 (1 → 100) 1.0ml を加えて軽く振り混ぜる。更にピロガロール・エタノール溶液 (6 → 100) 7ml, 水酸化カリウム溶液 (60 → 100) 1ml を加えて栓をし、70℃の水浴中でときどき振り混ぜながら 30 分間加温する。氷水中で冷却した後、塩化ナトリウム溶液 (1 → 100) 15ml 及び酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 9) 15ml を加えて 5 分間激しく振とうし、再度氷水中で冷却した後、遠心分離 (5 分間, 3,000 回転/分) する。有機層をナス型

フラスコに移し、更に水層に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液（1：9）15mlを加えて同様の操作を2回繰り返す、先のフラスコに有機層を合わせる。全有機層を減圧下、40℃で溶媒を留去する。残留物にPMC・ヘキサン溶液1mlを正確に量って加え、更に*n*-ヘキサンを加えて溶かして正確に10mlとする。この液を有機溶媒用メンブランフィルター（0.45 μ m）を用いてろ過し、ろ液を試料液とする。

（3） 検量線用標準液の調製

定量用 *dl*- α -トコフェロール³⁾又は *d*- α -トコフェロール0.100gを正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて溶かし正確に50mlとし、保存用標準原液⁴⁾とする。その5mlを正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に50mlとし、更にこの液5mlを正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に50mlとし、標準液とする（この液1mlは、*dl*- α -トコフェロール又は *d*- α -トコフェロール20.0 μ gを含む）。標準液0、2、4、6ml及び8mlをそれぞれ正確に量り、それぞれにPMC・ヘキサン溶液1mlを正確に量って加え、*n*-ヘキサンを加えてそれぞれ正確に10mlとし、検量線用標準液とする（これらの液1mlは、それぞれ *dl*- α -トコフェロール又は *d*- α -トコフェロール0、4.0、8.0、12.0 μ g及び16.0 μ gを含む）。

（4） 測定法

① 測定条件⁵⁾

けい光光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム管：シリカゲルカラム⁶⁾、内径約4.6mm、長さ約250mm

カラム温度：30℃

移動相：*n*-ヘキサン・イソプロパノール・酢酸混液（1,000：6：5）

流速：1.0ml/分

測定波長：励起波長298nm、蛍光波長325nm

試料注入量：4 μ l⁷⁾

② 検量線

検量線用標準液それぞれ4 μ lずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、それぞれの *dl*- α -トコフェロール及びPMCのピーク面積を測定し、*dl*- α -トコフェロール又は *d*- α -トコフェロールとPMCのピーク面積比を算出し、*dl*- α -トコフェロール又は *d*- α -トコフェロールの検量線を作成する。

③ 定量^{8),9)}

試料液4 μ lを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、*dl*- α -トコフェロール又は *d*- α -トコフェロール及びPMCのピーク面積を測定し、*dl*- α -トコフェロール又は *d*- α -トコフェロールとPMCのピーク面積比を算出する。得られたピーク面積比及び検量線によって試料液

中の dl - α -トコフェロール又は d - α -トコフェロール濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中の dl - α -トコフェロール又は d - α -トコフェロール含量 C (g/kg) を計算する。

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

A：試料液中の dl - α -トコフェロール又は d - α -トコフェロール濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

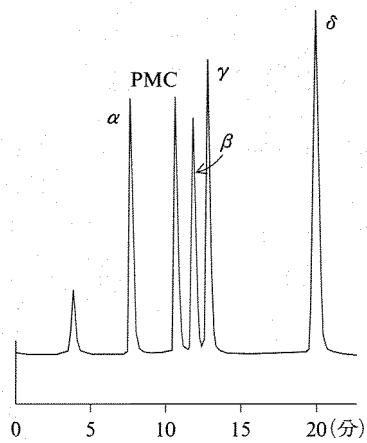
W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. イソプロパノール：「高速液体クロマトグラフ用」
2. エタノール：[特級]
3. 酢酸：[特級] 有機溶媒用メンブランフィルター ($0.45\mu\text{m}$) を用いてろ過する。
4. 酢酸エチル：[特級]
5. 水酸化カリウム：[特級]
6. ピロガロール：[特級]
7. n -ヘキサン：「高速液体クロマトグラフ用」
8. 2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノール (PMC)：「ビタミン E 定量用」
9. PMC・ヘキサン溶液：PMC 50.0mg を正確に量り、 n -ヘキサンを加えて溶かして正確に 50ml とし、保存用内部標準原液とする。その 5ml を正確に量り、 n -ヘキサンを加えて正確に 100ml とする (この液 1ml は、PMC50.0 μg を含む)。

[注]

- 1) 本法は、セザモール等妨害物質を含む試料では分析が困難な場合があり、フロリジルカラム等の固相抽出法による精製処理が必要である。なお、使用する容器は褐色容器を用いる。
- 2) 固形油脂の場合は一度低温で遠心分離した後、メンブランフィルターを用いてろ過した方がよい。
- 3) 定量用 dl - α -トコフェロールには、 d - α -トコフェロール標準品、又は日本薬局方標準品トコフェロールあるいはビタミン E 定量用 d - α -トコフェロールを用いることができる。
- 4) 保存用標準 dl - α -トコフェロール又は d - α -トコフェロール及び保存用内部標準原液は、遮光してヘッドスペースを窒素ガスで置換して冷蔵保存すれば約 1 か月は安定である。
- 5) 移動相の組成及び流速は、カラムの状態等により適宜変更する。
- 6) ジオール系シリカゲルあるいはアミノ系シリカゲルも用いられる。
- 7) 試験液に油脂が混入するので、注入量は少ない方がカラムの劣化を防ぐ。
- 8) 本法による定量限界は、0.00025g/kg である。
- 9) 本法による液体クロマトグラムの一例を図に示す。



〈測定条件〉

カラム充填剤：WAKOUSIL 5SIL (5 μ m)

カラム管：内径 4.6mm，長さ 250mm

各トコフェロール標準品：10 μ g/ml

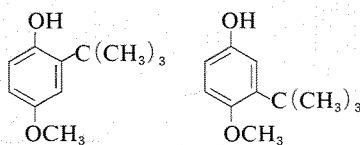
PMC 内部標準品：5 μ g/ml

注図 12-1 トコフェロール同族体標準品の液体クロマトグラム

13 ブチルヒドロキシアニソール

Butylated Hydroxyanisole

略名：BHA



$C_{11}H_{16}O_2$: 180.25

1. 試験法の概要

食品中のブチルヒドロキシアニソールをアセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液(2:1:1)で抽出する。抽出溶液は $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフにより定量する。

2. 試験法(液体クロマトグラフィー)^{1)~3)}

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 検量線用標準液の調製

上記の(1)および(2)については、11 ジブチルヒドロキシトルエンを準用する。ただし、「ジブチルヒドロキシトルエン」は「ブチルヒドロキシアニソール」とする。

(3) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤⁴⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6~6.0mm，長さ 150~250mm

移動相⁵⁾：A 液 アセトニトリル・メタノール混液 (1:1)

B 液 5%酢酸溶液

A 液・B 液 混液 (9:1)

流速：1.0ml/分

測定波長：280nm

② 検量線

検量線用標準液 10 μ l を正確に採り、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⁶⁾

試料液 10 μ l を正確に採り、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料液中のブチルヒドロキシアニソール含量 (g/kg) を算出する。

$$\text{ブチルヒドロキシアニソール含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 200 (g)}$$

C : 試料液中のブチルヒドロキシアニソール濃度 (μ g/ml)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. 無水硫酸ナトリウム: [特級]
2. メタノール: [特級] 及び [高速液体クロマトグラフ用]
3. アセトニトリル: [高速液体クロマトグラフ用]
4. 酢酸: [特級]
5. 2-プロパノール: [特級]
6. エタノール: [特級]
7. 混合溶媒: アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液 (2:1:1)

[注]

- 1) 本法は液体クロマトグラフにグラジエント装置を装備することにより、ジブチルヒドロキシトルエンのほかにブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの同時分析が可能である。
- 2) 本法は植物油、バター、魚介乾製品、魚介冷凍品等に使用できる。
- 3) 抽出溶媒としてメタノールも使用できるが、煮干しの場合には抽出物が多く試験溶液に濁りを生ずる。
- 4) 市販の充填カラムとして Wakosil II-5C18HG, Inertsil ODS-2, TSKgel ODS-120T 及び NOVA-PAK C₁₈ いずれも内径 4~6mm, 長さ 150~250mm 等が使用できる。次の条件によりジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルを同時に測定できる。

カラム管: 内径 4.6mm, 長さ 150mm

移動相: A 液 アセトニトリル・メタノール混液 (1:1)

B 液 5% 酢酸溶液

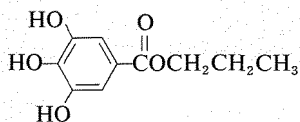
A の割合を 15 分間で 40~90% まで変化させ、以後 90% の割合で 30 分間保持する。

- 5) 各試料を分析終了後ごとに移動相 A のみを約 30 分間流すことにより、ほとんどの油脂成分を溶出することができる。
- 6) 本法の添加回収率はジブチルヒドロキシトルエンを 0.1g/kg 添加した場合、煮干しで約 75% であるが、食用油、バター、冷凍エビ等では 80% 以上。なお、定量限界は約 0.005g/kg である。

14 没食子酸プロピル

Propyl Gallate

略名：PG



$C_{10}H_{12}O_5$: 212.20

1. 試験法の概要

食品中の没食子酸プロピルはアセトニトリル・2-プロパノール・エタノール (2:1:1) 混液で抽出する。抽出溶液は $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法 (液体クロマトグラフィー)^{1), 2)}

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 検液の調製

(3) 試料液の調製

(4) 検量線用標準液の調製

上記の(1)~(4)については、11 ジブチルヒドロキシトルエンを準用する。ただし「ジブチルヒドロキシトルエン」を「没食子酸プロピル」とする。

(5) 測定法

① 測定条件

紫外部吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管³⁾：内径 4.6~6.0mm，長さ 150~250mm

移動相^{4),5)}: A液 アセトニトリル・メタノール混液 (1:1)

B液 5%酢酸溶液

A液・B液 混液 (1:1)

流速: 1.0ml/分

測定波長: 280nm

② 検量線

検量線用標準液 10 μ l を正確に採り、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⁶⁾

試料液 10 μ l を正確に採り、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料液中の没食子酸プロピル含量 (g/kg) を算出する。

$$\text{没食子酸プロピル含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 1,000 (g) / 5 (g)}$$

C: 試料液中の没食子酸プロピル濃度 (μ g/ml)

W: 試料の採取量 (g)

試薬・試液等

11 ジブチルヒドロキシトルエンの試薬・試液等を準用する。

[注]

- 1) 本法は液体クロマトグラフにグラジエント装置を装備することにより、没食子酸プロピルのほかにジブチルヒドロキシトルエン及びブチルヒドロキシアニソールの同時分析が可能である。
- 2) 本法は植物油、バター、魚介乾製品、魚介冷凍品等に使用できる。
- 3) 市販の充てんカラムとして Wakosil II-5C18HG, Inertsil ODS-2, TSKgel ODS-120T 及び NOVA-PAK C₁₈ いずれも内径 4~6mm, 長さ 150~250mm 等が使用できる。
- 4) グラジエント装置付き液体クロマトグラフの場合は、次の条件により没食子酸プロピル、ジブチルヒドロキシトルエン及びブチルヒドロキシアニソールを同時に測定できる。

移動相: A液 アセトニトリル・メタノール混液 (1:1)

B液 5%酢酸溶液

A液の割合を15分間で40~90%まで変化させ、以後90%の割合で30分間保持する。

- 5) 各試料を分析終了後ごとに移動相Aのみを約30分間流すことにより、ほとんどの油脂成分を溶出することができる。
- 6) 本法の添加回収率は没食子酸プロピルを0.1g/kg添加した場合、煮干しで70%程度であるが、そのほかはいずれも85%以上である。なお、定量限界は約0.005g/kgである。

第3章

殺菌料

15 過酸化水素

Hydrogen Peroxide

H_2O_2 : 34.01

1. 試験法の概要

食品中の過酸化水素は、水抽出あるいは希釈した後、カタラーゼ分解で生成する酸素を、酸素電極装置により測定する¹⁾。

2. 試験法（酸素電極法）

（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⁾。

（2）試料液の調製

① 固体食品

試料約 5g を精密に量り、ホモジナイザー用カップに入れ、リン酸緩衝浸出液 40ml を加え、外槽を氷水で冷却しながら約 2～3 分間ホモジナイズする³⁾。シリコーン樹脂 1 滴を加え、50ml のネスラー管に移し、リン酸緩衝浸出液を用いて正確に 50ml とし、軽く振り混ぜ、速やかにひだ折りろ紙⁴⁾で受器を氷冷しながらろ過する。ろ液の最初の数滴は捨て、その後のろ液を試料液とする。試料液は直ちに測定に供する。

② 液体食品⁵⁾

開封前に、1 時間以上氷冷する。

（3）検量線用標準液の調製

過酸化水素水 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml として過酸化水素溶液とし、次のとおり標定する。本液はたびたび標定し直す。

過酸化水素溶液 1ml を正確に量り、100ml の共栓フラスコに入れ、水 20ml、硫酸（1→10）及びヨウ化カリウム溶液（1→10）10ml を加え、10 分間暗所に放置した後、遊離したヨウ素を 20mmol/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）。このときの値を V (ml) とし、別に空試験を行ったときの滴定値を V_0 (ml) として、次式より過酸

化水素溶液中の過酸化水素濃度 H (mg/ml) を求める。

$$H(\text{mg/ml}) = (V - V_0) \times 0.3401$$

標定後、1 時間以上氷冷した過酸化水素溶液 10ml を正確に量り、更にリン酸緩衝浸出液 $10 \times (H - 1.0)$ ml を正確に量って加え、過酸化水素標準原液とし（この液 1ml は、過酸化水素 1.0mg を含む）、冷蔵する。

用時、過酸化水素標準原液 10ml を正確に量り、リン酸緩衝浸出液を加えて正確に 100ml とし、更にこの液 1ml を正確に量り、リン酸緩衝浸出液を加えて正確に 100ml とし、過酸化水素標準液とする（この液 1ml は過酸化水素 $1.0\mu\text{g}$ を含む）⁶⁾。

過酸化水素標準液 0, 2, 4, 6, 8ml 及び 10ml をそれぞれ正確に量り、それぞれにリン酸緩衝浸出液を加えてそれぞれ正確に 10ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ過酸化水素 0, 0.2, 0.4, 0.6, $0.8\mu\text{g}$ 及び $1.0\mu\text{g}$ を含む）⁷⁾。

(4) 測定法

① 測定

a 固体食品

図 15-1 に示すような酸素電極装置を用い、次の操作手順によって測定する。

試料液 2ml を正確に量り、図 15-1 の試料セル⁸⁾ 内に入れ、ごく少量のシリコン樹脂を加えた後、密栓する。スターラーでセル内をかき混ぜながら A より窒素ガスを流し、試料液中の溶存酸素を追い出す。コックを切り換え、窒素ガスを B よりセルのヘッドスペースに流しながら、酸素電極による電位の変化を記録計上で読み取り、安定した時点で 0 調整を行う。あらかじめ窒素置換したカタラーゼ溶液 $20\mu\text{l}$ ⁹⁾ をセル内に注入して、試料液中の過酸化水素の分解により生じた酸素による電位をピーク高さ¹⁰⁾ として測定する。なお、ジャケット内には 30°C の恒温水を循環させる¹¹⁾。

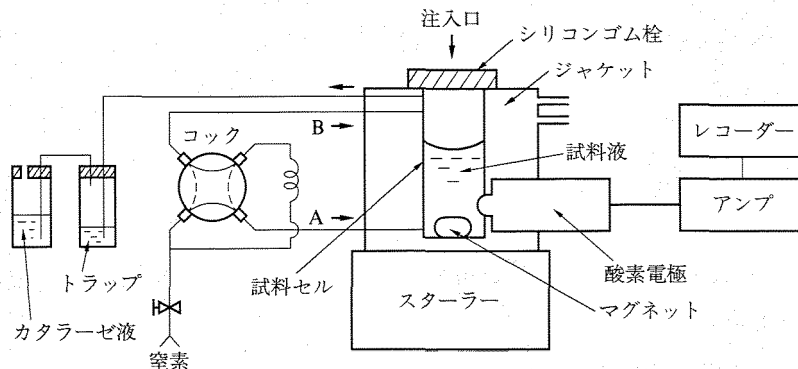


図 15-1 酸素電極装置の概略

b 液体食品

リン酸緩衝浸出液 1ml を正確に量り、図 15-1 の試料セル内に入れた後、密栓する。スターラーでセル内をかき混ぜながら A より窒素ガスを流し、リン酸緩衝浸出液中の溶存酸素を追い出す。コックを切り換え、窒素ガスを B よりセルのヘッドスペースに流しながら、酸素電極の電位の変化を記録計上で読み取り、安定した時点で 0 調整を行う。コックを再度 A に切り換え、栓を開け、開封直後の試料 1ml を正確に量り、試料セル内に入れた後、再度密栓する。スターラーでセル内をかき混ぜながら A より窒素ガスを流し、試料中の溶存酸素を追い出す。コックを切り換え、窒素ガスを B よりセルのヘッドスペースに流しながら、酸素電極の電位の変化が 0 点近くを示したとき¹²⁾、あらかじめ窒素置換したカタラーゼ溶液 20 μ l をセル内に注入して、試料液中の過酸化水素の分解により生じた酸素による電位をピーク高さとして測定する。

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 2ml を正確に量り、酸素電極装置に入れ、①測定の項に従って得られたピーク高さから検量線を作成する。

③ 定量

a 固体食品

試料液について得られたピーク高さと検量線によって試料液中の過酸化水素濃度 A (μ g/ml) を求め、次式によって検体中の過酸化水素含量 C (g/kg) を計算する¹³⁾。

$$C \text{ (g/kg)} = \frac{A}{20 \times W}$$

A：試料液中の過酸化水素濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

b 液体食品

試料液について得られたピーク高さと検量線によって試料液中の過酸化水素濃度 A (μ g/ml) を求め、検体中の過酸化水素含量 2A (g/L) とする¹⁴⁾。

試薬・試液

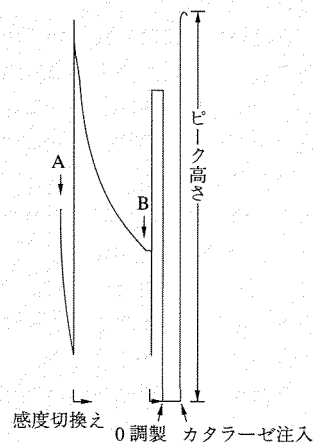
1. 過酸化水素水：[30%，特級]
2. カタラーゼ (EC1.11.1.6)：市販品を用いる。
3. カタラーゼ溶液：カタラーゼを水に溶かして 5,000U/ml となるように調製する。
4. 臭素酸カリウム：[特級]
5. シリコーン樹脂：(消泡用) [食添]
6. リン酸一カリウム：リン酸二水素一カリウム [特級]
7. リン酸二ナトリウム：リン酸水素二ナトリウム・12 水 [特級]

8. リン酸緩衝浸出液：リン酸一カリウム 27.2g を量り、水を加えて溶かして 1,000ml としたものを第 1 液とし、リン酸二ナトリウム 71.6g を量り、水を加えて溶かし 1,000ml としたものを第 2 液とする。第 1 液 3 容量と第 2 液 5 容量とを混和し、両液を用いて pH を 7.0 に調整¹⁵⁾した混液 1,000ml に、臭素酸カリウム 5g を溶かす¹⁶⁾。氷冷下で 1 時間以上窒素を通気しながら¹⁷⁾使用する。保存は冷蔵する。

[注]

- 1) 酸素電極装置が無い場合は、次の方法でも測定することができる。しかし、これらの定量法は酸素電極法に比し、感度及び再現性の点で劣る。
 ヨウ素滴定法：山本ら、食品衛生学雑誌, **22**, 60 (1981)
 4-アミノアンチピリン比色法：宮本ら、衛生化学, **22**, 76 (1976)
 改良 4-アミノアンチピリン比色法：伊藤ら、J. Assoc. Off. Anal. Chem., **64**, 1,448 (1981)
- 2) 過酸化水素は酸化分解されやすいので、検体は長時間空気と接触させないようにして冷蔵保存し、必要量を包丁、ハサミなどで細切する。
- 3) ホモジナイズは激しすぎると過酸化水素が分解するので、過度な回転及び時間は避ける。
- 4) 迅速に行うため、たとえば No.5A 相当品を用いる。
- 5) 牛乳のような中性液体食品の場合はそのまま試料液とすることができるが、通常 1 時間以上氷冷したリン酸緩衝浸出液を用いて試料セル内で 2 倍希釈する。
- 6) 過酸化水素の希釈溶液はきわめて不安定であるから、測定直前に調製する。また調製に用いるガラス器具は傷のない新しい器具を使用する。長時間を経過したものは調製しなおす方がよい。
- 7) 定量限界付近の測定では、過酸化水素標準液 0, 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、それぞれにリン酸緩衝浸出液を加えて正確に 50ml とし、それぞれを検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ過酸化水素 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 μ g 及び 0.1 μ g を含む）。ただし、検量線の直線性は 10 倍濃度のものに比し、若干悪くなる。
- 8) セル内は、水で 4~5 回洗浄した方がよい。気泡が壁に付着しやすくなった場合には、通常の器具洗浄剤で数回洗い、更にろ紙で内部をぬぐった後、水でよく洗浄する。そのときは電極の膜も交換した方がよい。
- 9) 過酸化水素 1 μ g/ml に対し、カタラーゼは 30U 以上あれば十分であるが、食品成分による妨害等を考慮し、100U 用いている。また注入量は少ないほど測定に対する影響が少ないので、できるだけ濃厚なカタラーゼ溶液を用いることが望ましい。
- 10) 過酸化水素 0.1 μ g/ml 溶液の典型的なチャートを図 15-1 に示す。
- 11) 本法は酵素反応を用いているため、一定の温度条件下で測定する必要があるが、常温より若干高い 30℃ としたが、20~30℃ の間の任意の温度を用いてもよい。しかし、氷冷した液体試料を試料内希釈するため、30℃ の方が望ましい。
- 12) 溶存酸素を含まない液体試料の場合、測定中の溶存酸素の影響で過酸化水素を生成する場合がある。そこで、あらかじめ試料セル内のリン酸緩衝浸出液中の溶存酸素を除き、電位の安定した時点で 0 点調整を行った後、試料を入れる。そのとき、微量の電位変化を生じるが、なるべく早くカタラーゼ溶液を加える方がよいので、0 点近くなったらカタラーゼ溶液を加える。試料を加えてカタラーゼ溶液を加えるまでの時間は 1 分以内に収まるように、迅速に行う。この操作により、中性溶液中溶存酸素の影響で過酸化水素を生成する液体試料について、分析操作中の人為的過酸化水素の生成を抑えることができる。

- 13) 本法による固体試料での定量限界は、 $0.1\mu\text{g/g}$ である。
- 14) 本法による液体試料での定量限界は、 $0.01\mu\text{g/g}$ である。
- 15) カタラーゼの至適 pH は 6.0~8.0 の間ではほぼ一定であるから、ここでは中間の pH7.0 を用いた。
- 16) 臭素酸カリウムは、食品中の還元物質の作用を抑制することにより過酸化水素の分解を防止する。臭素酸カリウムの濃度は 0.5 % 以上で良好な回収率を示す。
- 17) 約 1 時間窒素ガスを通気することにより、リン酸緩衝浸出液中の溶存酸素量は 0.3ppm 位になる。しかし、密栓保存することにより、約 10 倍に上昇するため、分析中、窒素ガスの通気は常時行う。この操作により、リン酸緩衝浸出液中の溶存酸素量を低く抑え、分析操作を迅速に行えるようになる。



注図 15-1 過酸化水素の測定パターン

第4章

漂 白 剂

16 亜塩素酸ナトリウム

Sodium Chlorite

NaClO_2 : 90.44

1. 試験法の概要

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イオンクロマトグラフィーにより測定する。

2. 試 験 法 (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

一般試料採取法を用いる。

(2) 試料液の調製

試料 25.0g を正確に量り、水 75ml 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 5ml 分取してクリーンアップ用カートリッジカラム²⁾に通し、その液を試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

80%亜塩素酸ナトリウム水溶液約 1.25g を精密に量り³⁾、水を加えて溶かし正確に 100ml とする。この液 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml としたものを標準液とする（この液 1ml は亜塩素酸ナトリウム約 100 μg を含む）。標準液 0, 1, 5, 10, 25ml 及び 50ml を正確に採り、それぞれ水を加えて正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml はそれぞれ亜塩素酸ナトリウム約 0, 1, 5, 10, 25 μg 及び 50 μg を含む）。

(4) 測 定 法

① 測定条件

紫外線吸収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。

充てん剤⁴⁾：ポリアクリレート系強酸性陰イオン交換樹脂

カラム管：耐アルカリ性ポリアクリレート製、内径 4.6～6.0mm、長さ 150～250mm

カラム温度：40℃

溶離液：1mmol/l ホウ酸塩緩衝液

流速：1.0ml/分

測定波長：260nm¹⁾

② 検量線

検量線用標準液それぞれ正確に 10 μ l ずつを採り、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

試料液 10 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料液中の亜塩素酸ナトリウム濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中の亜塩素酸ナトリウム含量 C (μ g/g) を計算する⁵⁾。

$$\text{試料中の亜塩素酸ナトリウム含量 (mg/kg)} = \frac{A \times 75}{W} \times F$$

A：試料液中の亜塩素酸ナトリウムの濃度 (μ g/ml)

F：注 3) によって標定したファクター

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

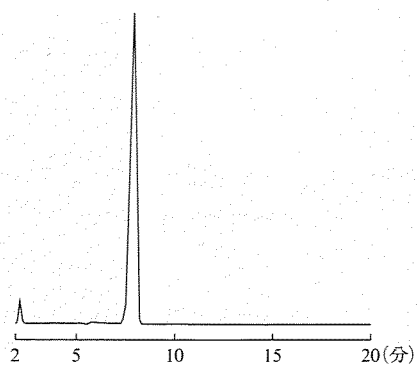
1. 3%硫酸：濃硫酸 3ml を水 95ml に加えたもの。
2. 1mmol/l ホウ酸塩緩衝液：0.01mol/l ホウ酸塩緩衝液 (pH 標準液, pH 9.18 を水で 10 倍に希釈したもの。
3. 超純水：比抵抗値 17M Ω ・cm 以上のもの。
4. クリーンアップ用カートリッジカラム²⁾：メタノール 5ml, 続いて水 10ml でコンディショニングしたもの。

[注]

- 1) 電気伝導度検出器でも測定可能であるが、UV 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) クリーンアップ用カートリッジカラムとしては Sep-Pak Plus C₁₈ などがある。
- 3) 亜塩素酸ナトリウムの標定は標定用標準溶液 1ml を正確に量り、ヨウ素瓶に入れ、3%硫酸 12ml, 水 40ml 及びヨウ化カリウム 4g 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 1ml = 2.261mg 亜塩素酸ナトリウム
- 4) カラムとしては、TSKgel IC-Anion-PWXLPEEK (東ソー(株)製)、又は同等のものをを用いる。
- 5) 本法の添加回収率は 90~100%, CV 値 5% である。また、確認限度は試料濃度として 1mg/

kgである。

6) 亜塩素酸のイオンクロマトグラムの一例を示す。



注図 4-1 亜塩素酸のイオンクロマトグラム

17 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

Sulfur Dioxide and Sulfites

亜硫酸水素カリウム

Potassium Hydrogen Sulfite

KHSO_3 : 120.17

亜硫酸ナトリウム(結晶)

Sodium Sulfite (crystal)

別名：亜硫酸ソーダ(結晶)

$\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 252.15

次亜硫酸ナトリウム

Sodium Hydrosulfite

別名：ハイドロサルファイト

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: 174.11

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

亜硫酸水素ナトリウム

Sodium Hydrogen Sulfite

NaHSO_3 : 104.06

亜硫酸ナトリウム(無水)

Sodium Sulfite (anhydride)

別名：亜硫酸ソーダ(無水)

Na_2SO_3 : 126.04

二酸化硫黄

Sulfur Dioxide

別名：無水亜硫酸

SO_2 : 64.06

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. 試験法の概要

食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は、アルカリ滴定法（試験法 A）又は比色法（試験法 B）により二酸化硫黄として定量する。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、試験法 A は二酸化硫黄として約 0.1g/kg 以上の食品に、試験法 B は約 0.1g/kg 以下の食品の分析に用いる。二酸化硫黄の含有量が全く未知の検体では、まず試験法 A で測定し、アルカリ滴定量が 0.1ml 以下のものについては、試験法 B を用いるとよい。

本試験において試料液並びに標準液の調製に用いる水は、用時、精製水を煮沸し、冷却したものを使用する¹⁾。

2. 試験法

試験法 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²⁾。

(2) 試料液の調製

あらかじめ図 17-1 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 滴を加え³⁾、装置に取り付ける。フラスコ(B)には試料の一定量⁴⁾を精密に量って加え、エタノール 2ml⁵⁾、液体食品以外の場合は水 20ml⁶⁾、更に消泡用シリコーン油 2 滴⁷⁾及びリン酸溶液(1→4) 10ml⁸⁾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⁹⁾の速度で通気しながら、マイクロバーナー(D)¹⁰⁾の炎の高さを 4~5cm とし、フラスコ(B)を約 10 分間加熱¹¹⁾する。次にフラスコ(A)をはずし、試料液とする。

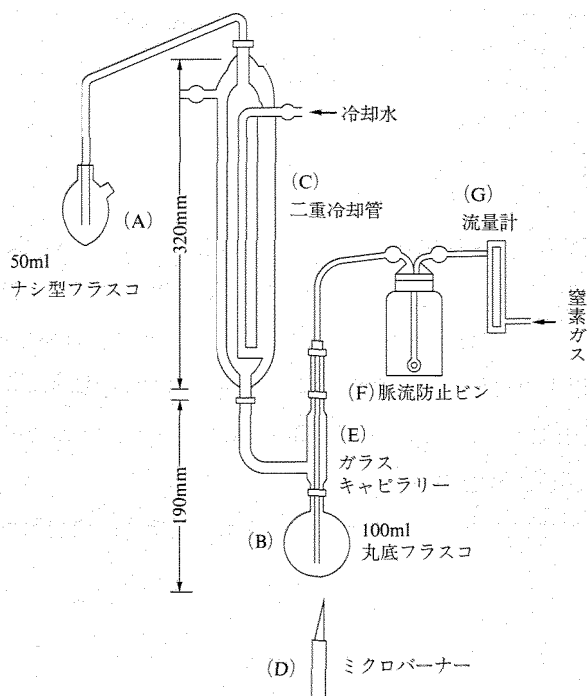


図 17-1 通気蒸留装置

(3) 空試料液の調製

(2)試料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料液とする。

(4) 測定法

試料液及び空試料液を 0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液で液の色がオリーブグリーンになるまで滴定し、次式によって検体中の二酸化硫黄含量 (g/kg) を計算する。

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

a : 試料液の滴定量 (ml)

b : 空試料液の滴定量 (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 1ml は SO₂ 0.32mg に相当する。

試験法 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) 試料液の調製

あらかじめ図 17-1 の通気蒸留装置を組み立て、フラスコ(A)に 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液¹²⁾ 20ml 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 1ml¹³⁾, アジ化ナトリウム溶液 (1→100) 1ml¹⁴⁾, エタノール 2ml⁵⁾, 消泡用シリコーン油 2 滴⁷⁾ 及びリン酸溶液 (1→4) 10ml⁸⁾ を入れ、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¹⁵⁾。次にフラスコ(B)をはずし、試料 2g⁴⁾ を正確に量り、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¹⁰⁾ の高さを 4~5cm とし、フラスコ(B)を約 10 分間加熱する¹¹⁾。フラスコ(A)をはずし、試料液とする。

(3) 空試料液の調製

(2)試料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料液とする。

(4) 検量線用標準液の調製

亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO_3) 162.5mg (SO_2 100mg に相当する) を正確に量り、0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液に溶かして 100ml とし、標準原液とする。標準原液 1ml を正確に採り、0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液に溶かして 500ml とし、標準液とする (この液 1ml は、二酸化硫黄 (SO_2) $2\mu\text{g}$ を含む)。標準液は氷室に保存し、2~3 日使用できる。

標準液 0¹⁶⁾, 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、それぞれに 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えてそれぞれ正確に 5ml とし、検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれ SO_2 0, 0.4, 0.8, 1.2, $1.6\mu\text{g}$ 及び $2\mu\text{g}$ を含む)。

(5) 測定法

① 測定

試料液 5ml を正確に量り、蒸留水 0.1ml を加えたものを (A) とし、新しく、試料液 5ml を正確に量り、0.3% 過酸化水素溶液 0.1ml を加えたものを (B) とする¹⁷⁾。(A) 及び (B) のそれぞれにパラロザニリン・ホルムアルデヒド混液 1ml 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、試薬ブランクを対照とし、波長 580nm における吸光度を測定する¹⁸⁾。

② 検量線

検量線用標準液 5ml ずつをそれぞれ正確に量り、それぞれについて①測定と同様に操作し、吸光度を測定した後、検量線を作成する。

③ 定量

試料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、試料液中の二酸化硫黄濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を求め、次式によって検体中の二酸化硫黄含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = \frac{C}{1,000 \times W} \times 5 \times \frac{20}{5}$$

C : 試料液中の二酸化硫黄濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

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) $\times 1.968$

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

次亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) $\times 2.718$

ピロ亜硫酸カリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) $\times 3.471$

試薬・試液

1. アジ化ナトリウム：市販品を用いる。
2. 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。
3. 塩酸パラロザニン：[特級]
4. 過酸化水素水：[30 %，特級]
5. 0.3 %過酸化水素溶液：過酸化水素水 1ml に水を加えて 100ml とする。用時調製する。
6. ジメドン：[特級]
7. 5 %ジメドンエタノール溶液：ジメドン 5g を量り，エタノールを加えて溶かして 100ml とする。用時調製する¹³⁾。
8. 消泡用シリコーン油：[食添]
9. パラロザニン溶液：塩酸パラロザニン 40mg に塩酸 20ml を加えて溶かし，水を加えて 100ml とする。
10. パラロザニン・ホルムアルデヒド混液：パラロザニン溶液と 0.2 %ホルムアルデヒド溶液の等量を混和する。
11. ホルマリン：[日本薬局方医薬品各条]
12. 0.2 %ホルムアルデヒド溶液：ホルマリン 3g を量り，水を加えて 500ml とする¹⁹⁾。用時調製する。
13. メチルレッド・メチレンブルー試液²⁰⁾：メチルレッド 0.2g 及びメチレンブルー 0.1g にエタノールを加えて溶かして 100ml とする。
14. リン酸溶液 (1 → 4)：リン酸 100ml に水 240ml を加える。
15. 亜硫酸水素ナトリウム：[特級]

[注]

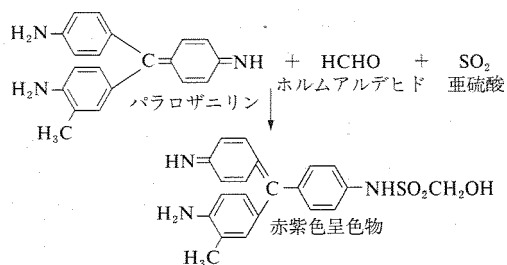
- 1) 蒸留水中の溶存酸素によって微量の亜硫酸が硫酸に酸化されるので，本操作に用いる水は脱気したものを用いる。
- 2) 固体食品は，ばらつきが多く，とくに乾燥果実は個体差が大きいため均一化に注意する。
- 3) 溶液の色調は紫色からオリーブグリーンに変わる。捕集液をあらかじめ中性とするための操作である。
- 4) 各試料の採取量は，ぶどう酒，天然果汁及びしょう油等の液体食品では 20g，ねりわさび，糖蜜，水あめ，キャンデッドチェリー及び乾燥果実では 5g，こんにゃく粉，切り干し大根，甘納豆，煮豆，みそ，チョコレート，にんにく，冷凍むきえび及びゼラチン等では 1g，かんぴょうでは 0.1～0.2g が適当である。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，SO₂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。
- 5) 膨潤し，流動性が失われるのを防ぐ目的で用いる。比色法（試験法 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用）のものを使用する。

- 6) 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。
- 7) 気泡止めの目的で用いる。多量ホルマリン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。
- 8) SO_2 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, 40vol %及び50vol %のリン酸溶液それぞれ10mlずつを加え、本操作による SO_2 の回収率実験を行った結果では、リン酸溶液(1→20)の場合は65.2 %と低いが、(1→10)以上ではいずれも99 %以上であった。
- 9) SO_2 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 SO_2 の回収率を測定したところ、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、 SO_2 の見かけ上の数値が高くなる。これらの実験結果より、窒素ガス流量を0.5~0.6L/分とした。本法では窒素ガスの代わりに空気を用いてもよい。
- 10) 普通のカスバーナーの外側をはずしたものを用いてもよい。
- 11) 炎の強度による SO_2 の回収率を求めたところ、炎の強度はほとんど関係ないが、試料が乾固しないように注意する。

SO_2 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 SO_2 が回収され、10分間加熱では99.4~100 %の SO_2 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 SO_2 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 SO_2 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が、これは SO_2 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。

- 12) 放置中に空気中の SO_2 ガスを吸収するので、調製後密栓して保存する。
- 13) 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、パラロザニリン・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用エタノールに溶かすこと。この溶液は放置すると、 SO_2 の回収率が低下するので、用時調製したものを用いる。
- 14) 亜硝酸による影響を除く目的で用いる。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。
- 15) 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た。 SO_2 として10 μg 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。
また、窒素ガスの代わりに空気を用いると空気中の酸素によって30~40 %減少するので必ず窒素ガスを用いる。
- 16) 試薬ブランクである。比色定量の際の対照として用いる。
- 17) 0.3 % H_2O_2 を加えることにより、亜硫酸は硫酸に酸化され呈色しなくなる。この操作を行うことにより、亜硫酸以外の呈色物の影響を削除できる。

18) 本法の原理は次のとおりである。



19) ホルマリン（日局）は、新しいものはホルムアルデヒド 35.0～38.0%を含むので、この調製法により 0.21～0.23%溶液が得られる。ホルマリンは劣化が激しいので注意を要する。

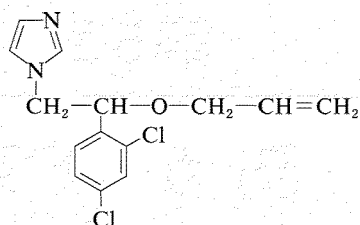
20) 長期間保存して沈殿が生じたり、色調が変化する場合は、メチルレッド 0.2g にエタノール 50ml を加えて溶かしたもの及びメチレンブルー 0.1g にエタノール 50ml を加えて溶かしたものをそれぞれ別々に保存し、用時等量混和するとよい。

第5章

防かび剤

18 イマザリル

Imazalil

C₁₄H₁₄Cl₂N₂O : 297.181. 試験法の概要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。

2. 試験法（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

検体 5～10 個を選び、8 分割法²⁾により平均的に検体 250～300g を採り、ホモジナイズして試料とする。

② バナナ

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 1cm 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 200g 採取し、ホモジナイズして試料とする。

(2) 試料液の調製

試料約 10g を精密に量り、5mol/l 水酸化ナトリウム溶液 2ml 及び無水硫酸ナトリウム³⁾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。遠心分離（3 分間、3,000 回転/分）した後、上澄液を分取する。残留物に酢酸エチル 50ml を加え、同様に操作する。全上澄液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 0.0025mol/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、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⁴⁾、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、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

イマザリル50mgをメタノールに溶かし正確に100mlとし、標準原液とする(この液1mlはイマザリル500 μ gを含む)。標準原液をメタノール・水(75:25)で適宜希釈し、1ml中にイマザリルが1, 2, 3, 4 μ g及び5 μ gを含むように標準液を調製する⁵⁾。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外線吸収検出器付液体クロマトグラフ(HPLC)を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル⁶⁾

カラム管：内径4.6mm、長さ150~250mm

カラム温度：40℃

移動相：メタノール・水混液(75:25)

流速：1ml/分

測定波長：230nm

② 検量線

検量線用標準液20 μ l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^{7),8)}

試料液20 μ lを液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から、試料液中のイマザリル含量(g/kg)を計算する。

$$\text{イマザリル含量 (g/kg)} = \frac{CA}{1,000 \times W}$$

C：試料液中のイマザリル (μ g/ml)

A：試料液の量 (ml)

W：試料の採取量 (g)

試薬

1. 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. 硫酸：[特級]

4. 炭酸ナトリウム：炭酸ナトリウム（無水）[特級]

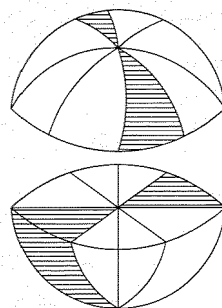
5. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）[残留農薬試験用]

6. 酢酸エチル：[残留農薬試験用]

7. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]

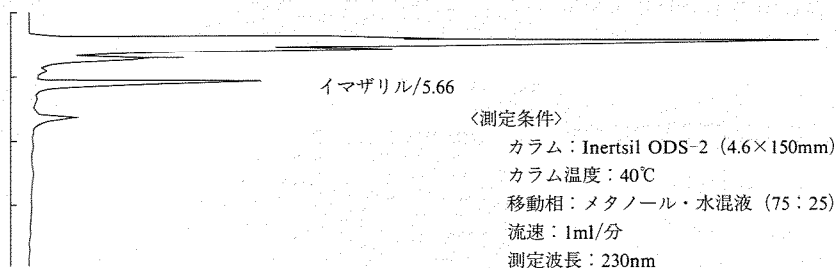
[注]

- 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、米などに 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十分対応できる。
- 2) 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 18-1 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採り、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質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、同重量の水を正確に量って加え、ホモジナイズし、その約 100g を正確に量って試料としてもよい。この場合フラスコへの水の添加量は 150ml である。
- 3) かんきつ類のジュースには使用しなくてよい。
- 4) 塩化ナトリウムを飽和させると回収率が向上する。
- 5) 試料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。
- 6) Inertsil ODS-2, Zorbax BP-ODS, Wakosil-II 5C18HG, Finepack C18-S, Nucleosil 5C18, Shim-pack CLC-ODS などがある。
- 7) 本法による液体クロマトグラムの一例を示す。



注図 18-1 試料採取法

試料：オレンジ



注図 18-2 イマザリルの液体クロマトグラム

- 8) 本法による添加回収試験結果は、次のとおりである。

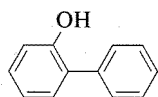
- ① 試料・添加量：レモン $5\mu\text{g}/10\text{g}$, 回収率 (%)：79.2, 77.7, 78.9, 平均値 (%)：78.6
- ② 試料・添加量：レモン $25\mu\text{g}/10\text{g}$, 回収率 (%)：72.8, 74.4, 73.2, 平均値 (%)：73.5

19 オルトフェニルフェノール及び オルトフェニルフェノールナトリウム

o-Phenylphenol and Sodium *o*-Phenylphenate

オルトフェニルフェノール

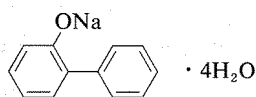
略名：OPP



$C_{12}H_{10}O$: 170.21

オルトフェニルフェノールナトリウム

略名：OPP-Na



$C_{12}H_9NaO \cdot 4H_2O$: 264.25

1. 試験法の概要

食品中のオルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウムは、液体クロマトグラフによりオルトフェニルフェノールとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて、オルトフェニルフェノールナトリウムの量として求める。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）¹⁾

（1） 検体の採取と試料の調製

検体 5～10 個を選び、8 分割法²⁾により平均的に検体 250～300g を採り、3 分間ホモジナイズして試料とする。加工食品はそのまま試料とする。

（2） 試料液の調製

試料約 20g を精密に量り、ブレンダーカップに入れる。次に無水酢酸ナトリウム 1～2g³⁾、無水硫酸ナトリウム 30g⁴⁾を加えてよく混和した後、酢酸エチル 80ml を加えて 5 分間ホモジナイズし、これを遠心分離⁵⁾して酢酸エチル層を分取する。残渣には更に酢酸エチル 80ml を加えて同様に操作し、得られた酢酸エチル層を合わせ、1-ブタノール 5ml を加えて 40℃ 以下で減圧下で濃縮⁶⁾する。これに液体クロマトグラフ用の移動相を加えて全量を正確に 20ml とし、0.45μm のメンブランフィルターでろ過し、試料液⁷⁾とする。

（3） 検量線用標準液の調製

オルトフェニルフェノール 0.100g を正確に量り、メタノール 50ml を加えて溶解した後、移

動相を加えて正確に 100ml とする。この液 10ml を正確に量り、1-ブタノール 25ml を加え、次いで移動相を加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml はオルトフェニルフェノール $10\mu\text{g}$ を含む）。標準液 0, 2, 4, 6ml 及び 8ml を正確に採り、それぞれに移動相を加えて正確に 10ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれオルトフェニルフェノール 0, 2, 4, $6\mu\text{g}$ 及び $8\mu\text{g}$ を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

蛍光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。

カラム充てん剤⁸⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6~6.0mm, 長さ 150~250mm

カラム温度：40℃

移動相⁹⁾：アセトニトリル・メタノール・水混液（5：60：35）に 10mmol/l になるように
ドデシル硫酸ナトリウムを加えた後、リン酸で pH を 2.3~2.5 とする。

流速：1ml/分

測定波長：励起波長 285nm, 蛍光波長 325nm

② 検量線

検量線用標準液 $10\mu\text{l}$ ずつをそれぞれ正確に採り、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¹⁰⁾

試料液 $10\mu\text{l}$ を正確に採り、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¹¹⁾によって試料液中のオルトフェニルフェノール濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中のオルトフェニルフェノール含量 (g/kg) を算出する。

$$\text{オルトフェニルフェノール含量 (g/kg)} = \frac{C}{50 \times W}$$

C：試料液中のオルトフェニルフェノール濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

$$\text{オルトフェニルフェノールナトリウム含量 (g/kg)} = \text{オルトフェニルフェノール含量 (g/kg)} \times 1.129$$

試薬・試液

1. 無水酢酸ナトリウム：酢酸ナトリウム（無水）[特級]
2. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）[特級]
3. 酢酸エチル：[特級]

4. 1-ブタノール：〔特級〕
5. リン酸二水素カリウム：〔特級〕
6. メタノール¹²⁾：〔液体クロマトグラフ用〕

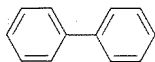
〔注〕

- 1) 本法は、かんきつ類及びその加工品中のオルトフェニルフェノールの分析に適用できる。また、オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウムのほかにジフェニル、チアベンダゾールの同時分析が可能である。
本法による定量限界は、オルトフェニルフェノールが 0.001g/kg、ジフェニルが 0.002g/kg、チアベンダゾールが 0.001g/kg である。
- 2) 8 分割法については、18 イマザリルの〔注〕2) を参照のこと。
- 3) 無水酢酸ナトリウムは pH を調整するために用いる。レモンの場合は 2g、グレープフルーツ、オレンジ等については 1g を加える。
- 4) 無水硫酸ナトリウムの添加量はマーマレード、ジャム等の加工品では 60g、ジュース等では 90g 程度を添加するとよい。
- 5) 試料に酢酸ナトリウムを添加し、ホモジナイズ後、酢酸エチルを分取する場合、分液漏斗に移して静置する方法、あるいはろ過をする方法があるが、いずれも長時間を要するため遠心分離を行うとよい。
- 6) 減圧濃縮する場合 1-ブタノールを添加してあるため乾固することはない。通常、酢酸エチルの臭いがしなくなる程度に濃縮するとよい。
- 7) 試料液の pH が 1~8 のとき、蛍光強度が最も強い。
- 8) ODS の充てん剤としては Finepak SIL C18, Wakosil-II C18 HG, Inertsil ODS-2, LiChrosorb C18, Nucleosil C18 などがある。
- 9) 移動相はアセトニトリル・メタノール・水混液 (40:25:35) に 10mmol/l となるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えた後、リン酸で pH を 2.3~2.5 としたもの、アセトニトリル・0.1%リン酸混液 (65:35) に 10mmol/l となるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えたもの、あるいは 0.01mol/l リン酸二水素カリウム・メタノール混液 (2:3) でも良好なクロマトグラムが得られる。
- 10) かんきつ類 20g に 0.5mg、かんきつ類加工品 20g に 0.2mg 添加した場合の回収率はそれぞれ 90~100% である。
- 11) 検量線用標準溶液を更に移動相で 10 倍希釈し、検量線を作成しても直線性が得られる。なお、この場合の確認限度はオルトフェニルフェノールとして 0.0001g/kg である。
- 12) 使用するメタノール等の試薬類はクロマトグラム上に妨害ピークが出ないことを確認すれば、試薬特級や残留農薬用を用いることができる。

20 ジフェニル

Diphenyl

別名：ビフェニル

 $C_{12}H_{10}$: 154.21

1. 試験法の概要

食品中のジフェニルは、酢酸エチルで抽出した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）¹⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製²⁾(4) 測定法^{3), 4)}

上記の(1)～(4)については、19 オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウムを準用する。ただし、「オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウム」は、「ジフェニル」とする。

試薬・試液

19 オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウムを準用する。

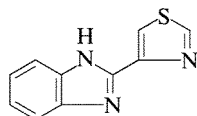
[注]

- 1) 本法はグレープフルーツ、レモン、オレンジ類及びその加工品中のジフェニルの分析に適用できる。
- 2) 検量線用標準液を移動相で 10 倍に希釈し、検量線を作成しても直線性が得られる。なお、この場合の定量限界は 0.0002g/kg である。
- 3) 試料液の pH が 1～10 のとき、蛍光強度が最も強い。
- 4) かんきつ類に 0.5mg、かんきつ類加工品に 0.2mg 添加した場合の回収率は 82～96 % である。

21 チアベンダゾール

Thiabendazole

略名：TBZ



$C_{10}H_7N_3S$: 201.25

1. 試験法の概要

食品中のチアベンダゾールは、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）^{1), 2)}

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

(4) 測定法^{3), 4)}

上記の(1)~(4)については、19 オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウムを準用する。ただし、「オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウム」は、「チアベンダゾール」とする。

試薬・試液

19 オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウムを準用する。

[注]

- 1) 本法はかんきつ類及びその加工品、バナナ中のチアベンダゾールの分析に適用できる。
- 2) 検量線用標準液を更に液体クロマトグラフ用の移動相で10倍に希釈し、検量線を作成しても直線性が得られる。なお、この場合の定量限界は0.0001g/kgである。
- 3) 試料液のpHが1~2.7のとき、蛍光強度は最も強いがpH2.7以上では蛍光は急激に減少する。
- 4) かんきつ類20gに0.5mg、かんきつ類加工品及びバナナ20gにそれぞれ0.2mg添加した場合の回収率は88~92%である。

第 6 章

増粘剤，安定剤，ゲル化剤

22 アルギン酸及びアルギン酸ナトリウム

Alginic Acid and Sodium Alginate

1. 試験法の概要

食品中のアルギン酸及びアルギン酸ナトリウムは希硫酸, 1%炭酸水素ナトリウム溶液, 硫酸マグネシウム-硫酸ナトリウム溶液で抽出, 精製し, ウロン酸をナフトレゾルシンで呈色させ, 比色法により定量する。

2. 試験法 (比色法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製¹⁾

試料約 2g を精密に量り, 試料が固形物であれば乳鉢等で粉碎し, 水 2ml を加えよく混和後, 液体の場合はそのままアセトン 40ml を加えて脂肪分を溶かす。必要があれば更に 1 回繰り返す²⁾。遠心し, アセトン層を除く。沈殿に 1%炭酸水素ナトリウム溶液 20ml を加え, 60℃水浴中で加温し, かくはん, 振とうする。遠心後, 上清を別の容器に移し, 同様の操作を繰り返す。上清を集め 1mol/l 塩酸で pH2~3 に調整し, 水 20ml を加えて 1 時間静置する。遠心し, 上清を除く³⁾。沈殿に 1.5mol/l 硫酸 40ml を加えて 3 分間振とうし, 遠心し, 硫酸層を除去する⁴⁾。この操作を更に 1 回繰り返す。沈殿に 3mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加え溶解又は懸濁させ, pH9~10 に調整する。これに 1mol/l 硫酸マグネシウム-2.2mol/l 硫酸ナトリウム試液 1ml を加え, 80℃水浴中で 10 分間加温し, 冷後, 遠心分離する⁵⁾。必要があれば, ろ紙 No.5A で上清をろ過する。沈殿に 2.5mol/l 硫酸ナトリウム溶液 2ml を加えてよく振り混ぜた後, 遠心分離し上清を先の上清に合わせる。上清を 1mol/l 塩酸で pH3~4 に調整し, 10%硫酸銅溶液 3ml 及び水を加えて全量を 20ml とする。1 時間静置後, 遠心し, 上清を除去する。沈殿をあらかじめ pH4 に調整した水 10ml で洗浄後, 1mol/l アンモニア水 1ml に溶解し, 水で 5~50ml⁶⁾の定容とし試験溶液とする。なお, 遠心はすべて, 3,500 回転/分で 10 分間行う。

(3) 検量線用標準液の調製

アルギン酸ナトリウム⁷⁾を減圧下, デシケーター中で 5 時間乾燥し, その 200mg を正確に量

り、水を加えて溶かし、正確に 100ml とする。この液 5ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml はアルギン酸ナトリウム $100\mu\text{g}$ を含む）。標準液 0, 1, 2, 4ml 及び 6ml をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 10ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml はアルギン酸ナトリウムそれぞれ 0, 10, 20, $40\mu\text{g}$ 及び $60\mu\text{g}$ を含む）。

（４）測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 566nm における吸光度を測定する。

② 測定液の調製

試験溶液をスクリーキャップ付き試験管に 1ml 採り、銅-塩酸試液 2ml 及びナフトレゾルシノール試液 1ml を加え、沸騰水浴中で 65 分間加熱⁸⁾する。氷水中で冷却後、酢酸ブチル 4ml を加え、よく振とうし、遠心する。酢酸ブチル層をろ紙 No.5C でろ過し、測定液とする。

③ 検量線

検量線用標準液をスクリーキャップ付きの試験管に 1ml 採り、試験溶液と同様に②測定液の調製を行い、波長 566nm における吸光度を測定し、アルギン酸ナトリウムの検量線を作成する⁹⁾。

④ 定量¹¹⁾

測定液の波長 566nm における吸光度を測定し、検量線より、測定液中のアルギン酸ナトリウム量を求め (μg)、次式によって検体中のアルギン酸ナトリウムの含量 (g/kg) を計算する¹⁰⁾。

$$\text{アルギン酸ナトリウムの含量 (g/kg)} = \frac{A \times V}{W \times 1,000}$$

A：測定液中のアルギン酸ナトリウム量 (μg)

V：試験溶液の容量

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. アルギン酸ナトリウム [試薬又は食品添加物用]
2. 1mol/l 硫酸マグネシウム-2.2mol/l 硫酸ナトリウム試液：硫酸マグネシウム 7 水和物 24.6g を 2.5mol/l 硫酸ナトリウム溶液に溶解し 100ml にする。
3. ナフトレゾルシノール試液：1,3-ジヒドロキシナフタレン（特級）¹²⁾ 100mg を使用直前に水 25ml に溶解する。
4. 銅-塩酸試液：濃塩酸 40ml に 2.5 % 硫酸銅溶液 1ml 及び水 9ml を加える。

[注]

- 1) 食品中の成分に応じ適宜, 簡略化できる。
- 2) 脱脂のために行う。脂肪分を含まない食品でも脂溶性の色素成分を含むものは, アセトンで除去する。
- 3) 水に不溶性のプロトペクチンを含まない食品では, 1%炭酸水素ナトリウム溶液による抽出は省略できる。
- 4) 水溶性のペクチンの除去のため。
- 5) 除タンパクする目的。
- 6) アルギン酸ナトリウムの量により調整する。アルギン酸ナトリウムの量が極めて少ない場合は, 全量を試験溶液とする。
- 7) 市販試薬及び食品添加物純度のアルギン酸ナトリウムの呈色度に差は無い。
- 8) ナフトレゾルシノール反応における発色は 60 分間の加熱時間で最高値に達し, 以後 120 分間まで一定であるため, 若干の余裕を含め 65 分間とする。
- 9) アルギン酸ナトリウムは 60 μ g/ml まで原点を通る良好な直線性を示す。
- 10) 本法での定量限界は 0.020g/kg である。
- 11) 本法による添加回収試験の結果を注表 22-1, 22-2 に示す。
- 12) 和光純薬工業(株) (和光一級), 関東化学(株) (鹿特級), 片山工業(株), Sigma, Aldrich から市販されている。

注表 22-1 アルギン酸ナトリウムの各種食品での
添加回収率

食 品	回 収 率 (平均 $\pm$ 標準偏差%, n=3)
しょう油	101.1 $\pm$ 3.4
トマトケチャップ	74.9 $\pm$ 4.0
カレールー	89.3 $\pm$ 5.0
フレンチドレッシング	74.9 $\pm$ 6.3
うどん	79.2 $\pm$ 1.8
ラーメン	81.5 $\pm$ 0.8
みそ	75.4 $\pm$ 7.5
ココア	81.8 $\pm$ 3.4
きな粉	54.6 $\pm$ 1.2
ハンバーグ	86.1 $\pm$ 3.8
ハム	84.6 $\pm$ 3.7
はんぺん	82.9 $\pm$ 3.2
アイスクリーム	95.6 $\pm$ 3.7
ヨーグルト	88.2 $\pm$ 2.7
牛乳	88.5 $\pm$ 2.2
イチゴジャム	75.6 $\pm$ 1.0
フルーツゼリー	88.6 $\pm$ 2.8
ようかん	83.0 $\pm$ 2.8

アルギン酸ナトリウム 0.1%添加

注表 22-2 食品中のアルギン酸
ナトリウム含量

食 品	含 量 (g/kg)
しょう油	N.D.
トマトケチャップ	N.D.
カレールー	N.D.
フレンチドレッシング	N.D.
うどん	N.D.
ラーメン	N.D.
そば	2.90
みそ	N.D.
ココア	N.D.
きな粉	N.D.
ハンバーグ	N.D.
ハム	N.D.
はんぺん	N.D.
アイスクリーム	N.D.
ヨーグルト	N.D.
牛乳	N.D.
イチゴジャム	N.D.
フルーツゼリー	N.D.
ようかん	N.D.
プリン	1.12
ホイップクリーム	2.80

定量限界 (N.D.<0.020g/kg)

23 カゼイン及びカゼインナトリウム

Casein and Sodium Caseinate

1. 試験法の概要

食品中のカゼイン及びカゼインナトリウムは比色法によりリンの量として定量する。カゼイン中には、ほぼ一定の割合でリンが含まれているので係数を乗じてカゼインの量とする。動物乳中には天然のカゼインが分布している。またタンパク性食品には天然のカゼイン様物質も分布している。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カゼイン及びカゼイン様物質と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（比色法）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。ただし検体は十分にホモジナイズして検体を微細均一化して試料とする。二酸化炭素を含む試料はあらかじめガスを追い出す。

（2）試料液の調製

試料約 1g を精密に量り、遠心管に入れ、エタノール 20ml を加え、よくかき混ぜて 15 分間放置した後、遠心分離し、エタノール層を除去し、次にエタノール・クロロホルム混液（3：1）20ml を加え、よくかき混ぜて 15 分間放置し、遠心分離して液層を除去する。この混液による洗浄を 3～5 回繰り返した後、最後にエタノール 20ml で最初と同じ条件で 1 回残留物を洗浄する²⁾。次に、あらかじめ 4℃ 以下に冷却した過塩素酸溶液（1→6）20ml を加え、遠心管を氷水中に 30 分間保った後、20 分間遠心分離を行い、液層を除去する。残留物に過塩素酸溶液（1→12）20ml を加え、水浴中で加温し、よくかき混ぜ、遠心分離し、液層を再び除去する。

遠心管内の残留物をできるだけ少量の水及び過塩素酸 2ml でケルダールフラスコへ定量的に移し、沸石を入れ、必要あれば過酸化水素 5 滴を加え、セラミック板上で注意して加熱する。内容物の泡だちが消えた後は炎を小さくし、5～7 時間加熱する³⁾。冷後、水で全量 25ml とし、これを試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

リン酸一カリウムを 105℃ で 3 時間乾燥した後, その 439.3mg を正確に量り, 水を加えて溶かし, 正確に 1,000ml とする. この液 5ml を正確に量り, 水を加えて正確に 50ml とし, 標準液とする (この液 1ml は, リン 10 μ g を含む).

(4) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い, 波長 720nm で吸光度を測定する.

② 検量線

25ml のメスフラスコ 6 本に標準液 0.5, 1, 2, 4, 8ml 及び 15ml ずつをそれぞれ正確に量り, それぞれに過塩素酸 2ml と水を加えて約 20ml とする. 次にアミドール液 2ml 及びモリブデン酸アンモニウム溶液 1ml を加え, 更に水を加えて正確に 25ml とし (これらの液 1ml は, それぞれリン 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μ g 及び 6 μ g を含む), よく混和した後, 5~30 分間の間に波長 720nm で吸光度を測定する. ただし, 対照液は水 20ml, 過塩素酸 2ml, アミドール液 2ml 及びモリブデン酸アンモニウム溶液 1ml の混液を使用する. 横軸にリンの含量, 縦軸に吸光度をとり, 検量線を作成する.

⑤ 定量

25ml のメスフラスコに試料液 20ml を正確に採り, アミドール液 2ml 及びモリブデン酸アンモニウム溶液 1ml を加えた後, 水を加えて正確に 25ml とする. よく混和した後, 5~30 分間の間にこの液につき, 波長 720nm で検量線の作成で用いた対照液を対照として吸光度を測定し, 得られた吸光度と検量線から試料液中のリン濃度 (μ g/ml) を求め, 次式⁴⁾によって検体中のカゼイン含量 (g/kg) を求める.

$$\text{カゼイン含量 (g/kg)} = \frac{C}{W} \times 25 \times \frac{25}{20} \times \frac{1}{1,000} \times \frac{10,000}{65}$$

C : 試料液中のリン濃度 (μ g/ml)

W : 試料の採取量 (g)

$\frac{10,000}{65}$: カゼイン中のリン含有量は 0.65 % であるので, リン含有量からカゼイン含有量への換算値

試薬・試液

1. アミドール : 市販品を用いる.
2. アミドール液 : アミドール 1.0g 及びメタ重亜硫酸ナトリウム 18.3g に水を加えて溶かし,

1,000ml とする。褐色瓶に保存し、4 日間は使用可能である。

3. エタノール：[95v/v %, 特級]
4. 過塩素酸：[60 %, 特級]
5. 過酸化水素水：[30 %, 特級]
6. クロロホルム：[特級]
7. メタ重亜硫酸ナトリウム：市販品を用いる
8. モリブデン酸アンモニウム：[特級]
9. モリブデン酸アンモニウム溶液：モリブデン酸アンモニウム 8.3g を量り、水を加えて溶かし、100ml とする。
10. リン酸一カリウム：[特級]

[注]

- 1) エタノール及びエタノール・クロロホルム混液でリン脂質を反復抽出した後、酸可溶性のリン酸結合物を過塩素酸溶液（1→6）で冷却抽出する。次に 90℃の過塩素酸溶液（1→12）で核酸類を抽出する。ここで残った不溶性物質は動物繊維及びリントタンパク質（カゼイン）のみを含む。両者を過塩素酸で灰化し、灰化物中のリン含量を Allen 法で測定する。リントタンパク質の定量には、水酸化ナトリウム溶液処理によるリン酸結合の開裂を避け、過塩素酸分解を採用した。
- 2) 非常に脂肪の多い試料、たとえばレバーや脳みそを使った食肉加工品では、リン脂質の量が多いので 5～6 回アルコールで抽出する。
- 3) 分解灰化は通常 5～6 時間で終了する。分解がどうしてもうまく進まない場合には、更に促進剤として 4～6 滴の過酸化水素水を追加してもよい。この際にはいったん、フラスコをセラミック板より持ち上げ、約 2 分後に器壁に沿って過酸化水素水を添加し、更に加熱する。
- 4) 試料液のリン濃度が 6 μ g/ml（カゼインとして 2.3 %）以上になるときは、試料液の残り（5ml）の 2ml を正確に量り、定量に用い、得られた結果を 12.5 倍にしてリン含量とする。なお、この方法は食肉製品等では類似物質のために 0.1～0.23 % のブランク値を示す。

第7章

発色剤

24 亜硝酸ナトリウム

Sodium Nitrate

 NaNO_2 : 69.00

1. 試験法の概要

食品中の亜硝酸ナトリウムは、ジアゾ化法による発色を測定する比色法により亜硝酸根として定量する。必要があれば分子量比を乗じて亜硝酸ナトリウムの量として求める。食品中には、微生物により硝酸塩が亜硝酸塩に還元されて分布している場合もある。したがって、検体にこれらの食品が素材として含有されている場合には、定量値は素材由来の亜硝酸塩と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（比色法）

（1） 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2） 試料液の調製

試料¹⁾約 10g を精密に量り、約 80℃ の水 80ml²⁾ 及び 0.5mol/l 水酸化ナトリウム溶液 12ml³⁾ を加え、ホモジナイズした後、容量 200ml のフラスコに移す。容器は温水 10ml ずつで 5 回洗浄し、洗液はフラスコに加える。これに更に 0.5mol/l 水酸化ナトリウム溶液 20ml³⁾ 及び酢酸亜鉛溶液（9 → 100）20ml³⁾ を加えてよく振り混ぜた後、ときどき振り混ぜながら 80℃ の水浴中で 20 分間加温する。次に、冷水中で室温まで冷却した後、水を加えて正確に 200ml とする。内容をよく混和し、乾燥ろ紙を用いて共栓フラスコへろ過する。最初のろ液約 20ml を捨て、澄明なろ液を試料液とする。

（3） 空試験液の調製

水 10ml を容量 200ml のフラスコに採り、(2)試料液の調製と同様に操作し、空試料液とする。

（4） 検量線用標準液の調製

亜硝酸ナトリウム 0.150g を正確に量り、1,000ml のメスフラスコに入れ、水を加えて溶かし

て正確に 1,000ml とし、標準原液とする。標準原液 10ml を正確に量り、100ml のメスフラスコに入れ、水を加えて正確に 100ml とし、その 4ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、亜硝酸根 $0.4\mu\text{g}$ を含む）。標準液 2.5, 5, 10, 15ml 及び 20ml をそれぞれ正確に量り、それぞれ水を加えて正確に 20ml とし、それぞれを検量線用標準液とする（これらの液 1ml 中には、それぞれ亜硝酸根 0.05, 0.1, 0.2, $0.3\mu\text{g}$ 及び $0.4\mu\text{g}$ を含む）。

(5) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 540nm の吸光度を測定する。

② 測定⁴⁾

試料液及び空試料液それぞれ 5ml⁵⁾ を正確に量り、それぞれ 10ml のメスフラスコに入れ、それぞれに、スルファニルアミド溶液 1ml を加え振り混ぜ、更にナフチルエチレンジアミン溶液 1ml を加え振り混ぜた後⁶⁾、水を加えてそれぞれを正確に 10ml とし、よく振り混ぜ、20 分間放置し⁷⁾、測定液及び空測定液とする。水 5ml を用いて同様に操作したものを対照として 540nm における測定液及び空測定液の吸光度を測定し、それぞれ E_A , E_B とする。試料液が着色しているときは試料液 5ml を正確に量り、塩酸 (1 → 2) 1ml 及び水を加えて正確に 10ml としたものを、水を対照として吸光度を測定し、 E_C とする。

吸光度差 $E_A - E_B$ 、又は試料液が着色した場合は吸光度差 $E_A - (E_B + E_C)$ を求め、測定液の吸光度差 ΔE とする⁸⁾。

③ 検量線

検量線用標準液 5ml ずつを正確に量り、それぞれ 10ml のメスフラスコに入れ、②測定における試料液と同様に操作し、それぞれの吸光度を測定し E_{S1} , E_{S2} ……, E_{S5} とする。吸光度差 $E_{S1} - E_B$, $E_{S2} - E_B$ ……, $E_{S5} - E_B$ を求め、標準液の吸光度差 ΔE_{S1} , ΔE_{S2} ……, ΔE_{S5} として、検量線を作成する。

④ 定量

測定液の吸光度差 ΔE と検量線から試料液中の亜硝酸根含量 A ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中の亜硝酸根含量 C (g/kg) を計算する。

$$\text{亜硝酸根含量 } C \text{ (g/kg)} = A \times \frac{200}{W} \times \frac{1}{1,000} = \frac{A}{5 \times W}$$

A : 試料液中の亜硝酸根含量 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

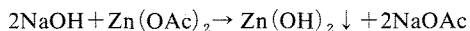
$$\text{亜硝酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{亜硝酸根含量 (g/kg)} \times 1.500$$

試薬・試液

1. スルファニルアミド：[特級]
2. スルファニルアミド溶液：スルファニルアミド 0.50g を塩酸（1→2）100ml に加温しながら溶かす。
3. *N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩：[特級]
4. ナフチルエチレンジアミン溶液：*N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.12g を水 100ml に溶かす。
5. 酢酸亜鉛二水和物：[特級]

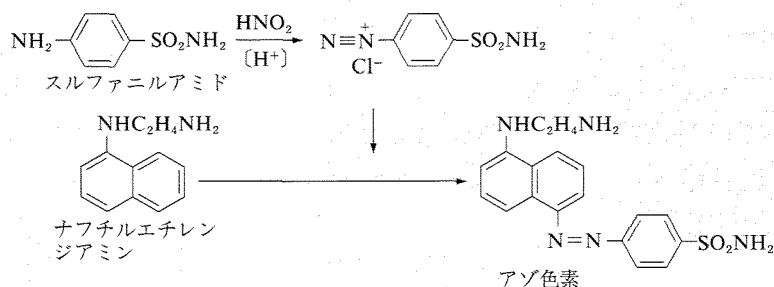
[注]

- 1) 食肉及び魚肉製品、魚卵（すじこ、いくら）など。
- 2) 試料中の酵素作用を停止又は破壊するため。
- 3) 次式に示す $\text{Zn}(\text{OH})_2$ のコロイド性沈殿形成により除タンパクを行う。



この条件下で液性が pH9.5 付近となり、添加した Zn^{2+} のほとんどすべてが $\text{Zn}(\text{OH})_2$ の形で沈殿する。 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ は液中の微粒子をよく吸着するので、清澄なる液が得られる。以前は ZnSO_4 を用いて、水酸化ナトリウム溶液で pH9.5 に調整していたが、pH 調整が難しかった。そこで、水酸化ナトリウム溶液及び $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ の一定量を加えることにした。いくらなど生の魚卵では可溶性タンパク質及びリポ蛋白質が多く、アルカリ抽出時にかなりの量の脂質、タンパク質などが溶解し、以前の 0.5mol/l 水酸化ナトリウム溶液 10ml ではろ過速度が遅くなる場合があり、水酸化ナトリウム溶液及び酢酸亜鉛溶液を以前の倍量を加えることにより、ろ過速度を速くする。他の食品種の定量値には影響を及ぼさない。

- 4) 本法の原理を次に示す。



- 5) 使用基準 0.0050g/kg 以下の魚卵では操作法どおりでよいが、肉、魚肉製品など亜硝酸根濃度の高い場合は、検量範囲（0.05～0.4 $\mu\text{g/ml}$ ）に入るよう試料液を希釈する。
- 6) 発色時に塩酸酸性下でスルファニルアミドを加えると亜硝酸根はスルファニルアミドと食品成分由来の $-\text{NH}_2$ 及び $-\text{OH}$ 等との競合反応が行われる。したがって、塩酸濃度が低いと亜硝酸根は食品成分との反応に消費され、スルファニルアミドとのジアゾ化反応の比率が低くなり、食品種によっては呈色度が低くなる場合がある。そこで、各操作毎に振り混ぜる。また、抽出時のアルカリ性が強く、発色時には酸性を強くしなければならないので、試料液と呈色試薬の量比を小さくする。
- 7) 呈色は反応時間 10 分間から 2 時間程度まで安定であるが、試料液の場合は少し反応が遅くなるので 20 分間ぐらい放置した方がよい。

- 8) 試料中にアスコルビン酸などの還元物質が含まれている場合は定量妨害となり、亜硝酸の測定値は低くなる。そのときは試料量の 10g を 5g 又は 2g に減らすか、試料液の 5ml を 2.5ml 又は 1ml 減らすことにより、その測定値の低下をいくぶん防止することができる。

25 硝酸カリウム及び硝酸ナトリウム

Potassium Nitrate and Sodium Nitrate

硝酸カリウム

KNO_3 : 101.10

硝酸ナトリウム

NaNO_3 : 84.99

1. 試験法の概要

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

2. 試験法 (イオンクロマトグラフィー)^{1),2)}

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 空試験液の調製

上記の(1)~(3)については、24 亜硝酸ナトリウムの試験法を準用する。

(4) 検量線用標準液の調製

硝酸カリウム 1.631g を正確に量り、1,000ml のメスフラスコに入れ、滅菌水を加えて溶かして正確に 1,000ml とし標準原液とする (この液 1ml は、硝酸根 1.000mg を含む)。この液は褐色瓶に保存する。用時、標準原液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 1,000ml とする。次にこの液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし標準液とする (この液 1ml は、硝酸根 100 μg を含む)。標準液 1, 5, 10, 20ml 及び 50ml をそれぞれ正確に量り、それぞれ水を加えて正確に 100ml とし、それぞれを検量線用標準液とする (これらの液 1ml 中には、それぞれ硝酸根 1, 5, 10, 20 μg 及び 50 μg を含む)。

(5) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸光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。

分離カラム：陰イオン交換カラム

溶離液：炭酸ナトリウム溶液及び炭酸水素ナトリウム溶液の混液（前者が2～4mmol/lの濃度，後者が0.75～4mmol/lになるように混合したもの）。これを0.22 μ m以下のフィルターでろ過して使用する。

カラム温度：40℃

紫外外部検出器：波長 210nm³⁾

流速：1.5ml/分

② 検量線の作成

検量線用標準液それぞれ 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、それぞれのピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

試料液 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料液中の硝酸根濃度 A (μ g/ml) を求め、次式によって試料中の硝酸根含量を計算する。

$$\text{硝酸根含量 (g/kg)} = A \times \frac{200}{W} \times \frac{1}{1,000} = \frac{A}{5 \times W}$$

A：試料液中の硝酸根濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

硝酸カリウム含量 (g/kg) = 硝酸根含量 (g/kg) $\times$ 1.631

硝酸ナトリウム含量 (g/kg) = 硝酸根含量 (g/kg) $\times$ 1.371

試薬・試液等

1. 陰イオン交換カラム：ポリスチレン表層皮覆を行った陰イオン交換樹脂（10～15 μ m）をカラム（直径4～4.6mm $\times$ 長さ25～50cm）に充てんしたもの。他に陰イオン交換用官能基を表面処理した多孔性のポリアクリレート（10～12.5 μ m）又は多孔性シリカゲル（6～10 μ m）をカラム（直径4～4.6mm $\times$ 長さ25～50cm）に充てんしたものも利用できるが、それぞれに適した溶離液を調製する必要がある。
2. 炭酸ナトリウム，炭酸水素ナトリウム，酢酸亜鉛：[特級]
3. 水：イオン交換水を蒸留したもの。

[注]

- 1) 還元カラム（銅処理カドミウムカラム）を用いないように、イオンクロマトグラフィーを採用し、亜硝酸ナトリウムと同じ試料液調製法を用いる。液体クロマトグラフィーを用いることもできる。
- 2) カラムは陰イオン交換カラムのみとし、イオンペア-又は間接吸光度型液体クロマトグラフィーは特殊使用方法であるため用いない。
- 3) 検出器には電気伝導度検出器より感度のよい紫外外部吸収検出器（210nm）を用いる。

食品中には各種有機酸（酢酸、シュウ酸、安息香酸他）が存在し、上述の分析条件で硝酸より早く溶出する。通常用いられる電気伝導度検出器では、脂肪酸の大きいピークは硝酸のピークを妨害するが、これら飽和脂肪酸は紫外外部吸収を示さず、多量に含まれていても硝酸の定量に影響を及ぼさない。

また、紫外外部吸収検出器（210nm）を用いる本法の検量線は $0.1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性が得られる。使用基準は $100 \mu\text{g/g}$ 以下であるため、検量線範囲を $1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ とする。

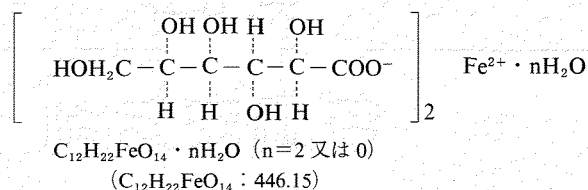
第 8 章

色調安定剤

26 グルコン酸第一鉄

Ferrous Gluconate

別名：グルコン酸鉄



1. 試験法の概要

グルコン酸第一鉄¹⁾の構成成分である鉄を原子吸光法により定量し、分子量比を乗じてグルコン酸第一鉄の量として求める²⁾。食品中には天然の鉄が分布している。したがって、定量値は食品由来の鉄と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法 (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) 試料液の調製

試料約 5g を精密に量り、100ml の灰化容器³⁾に入れ、熱板上又は赤外線ランプで加熱⁴⁾して炭化させた後、電気炉へ入れて 450～500℃ で灰白色の灰分が得られるまで灰化を続ける。もし灰が黒いとき⁵⁾は、硝酸 (1 → 2) で湿らし、150℃ 以下⁶⁾で蒸発乾固した後、電気炉へ入れる。

灰化後、これに塩酸 (1 → 3) 約 10ml を加え、150℃ 以下で蒸発乾固させる。蒸発残留物に塩酸 (1 → 4) 約 10ml 及び水約 10ml を加え加温して溶かした後⁷⁾、ろ紙を用いてろ過する。灰化容器及びろ紙を水を用いてよく洗い、ろ液及び洗液をメスフラスコに合わせ、水を加えて正確に 50ml とし、試料液⁸⁾とする。

また、試料を用いず同様に操作して、空試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

原子吸光分析用鉄標準液 5ml を正確に採り、100ml のメスフラスコに入れ、1mol/l 塩酸で正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、鉄 50 μ g を含む）。標準液 2, 4, 6, 8ml 及び 10ml を正確に量り、それぞれに 1mol/l 塩酸を加えて正確に 100ml ずつとし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ鉄 1, 2, 3, 4 μ g 及び 5 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件で測定する。

光源：鉄中空陰極ランプ

測定波長：248.3nm

燃料ガス：アセチレン-空気フレーム

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき、原子吸光度を測定し、検量線を作成する。

③ 定量

試料液及び空試料液につき、原子吸光度を測定する。両者の吸光度の差を求め、その値と検量線から、試料液中の鉄濃度 (μ g/ml) を求め、次式により検体中の鉄含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{鉄含量 (g/kg)} = \frac{CD}{1,000 \times W}$$

C：試料液中の鉄濃度 (μ g/ml)

D：試料液の量 (ml)

W：試料の採取量 (g)

$$\text{グルコン酸第一鉄含量 (g/kg)} = \text{鉄含量 (g/kg)} \times 8.633$$

試薬・試液

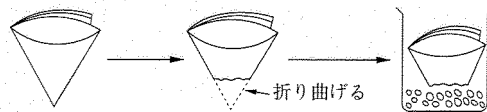
原子吸光分析用鉄標準液：市販の鉄濃度 1,000ppm の溶液を用いる。

[注]

- 1) グルコン酸第一鉄の構成成分であるグルコン酸は、水溶液の状態に光により分解する。したがって、食品中のグルコン酸は一部分解していると考えられる。したがって、一般に鉄からのグルコン酸第一鉄の定量値は、グルコン酸からのそれよりも高いと考えられる。
- 2) 現在、色調安定剤として、その使用が許可されているのはオリーブのみであり、鉄として使用量が決められているので、鉄による定量法とした。

食品由来の鉄含有量の少ないオリーブ等では本法により定量できるが、食品由来の鉄含有量の多い、母乳代替食品、離乳食品、妊産婦授乳用粉乳等では、グルコン酸の定量も同時に行い総合的に判断する必要がある。

- 3) ふた付き超硬質ガラスピーカー又は磁製ルツボが適当である。
- 4) オリーブの場合は水分及び油を含み、不用意に加熱すると油が飛散するので、口付き灰化容器に試料を入れ、図のように無灰ろ紙を灰化容器の内側に入るように4つ折りにし、試料の上にかぶせるとよい。

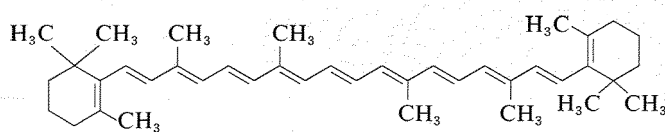


注図 26-1 灰化法

- 5) 不完全灰化によって残存する炭素は、活性炭よりも鉄に対しての吸着力が大きいので、試料を完全に灰化することが必要である。
- 6) 150℃を超えると乾固直前に塩類が飛散するので、水浴を用いる場合はよいが、熱板上で行うときは注意する。
- 7) 器壁に不溶物があるときは、溶液を 5ml 以下に濃縮した後、濃縮液で器壁をぬらしながらガラス棒でこするとよい。
- 8) 試料液の鉄の濃度は 0.5~5 μ g/ml が適している。5 μ g/ml 以上の場合は水を加えてこの範囲まで希釈する。

第9章

着色料

27 β -カロテン β -Carotene $C_{40}H_{56}$: 536.88

1. 試験法の概要

食品中の β -カロテンは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には天然の β -カロテンが広く分布している。また、この分析法では食品中の α -、 β -、 γ -及び δ -カロテンは分離できない。したがって、定量値は食品由来の α -、 β -、 γ -及び δ -カロテンと添加された β -カロテンの合計値である。

2. 試 験 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) 試料液の調製

① 油脂食品

β -カロテンとして 40~200 μ g に対応する、通常、10g 以下の試料の量を精密に量り、50ml の褐色共栓遠心管に入れ、 n -ヘキサン液 25ml を加えて激しく振り混ぜた後、遠心分離 (10 分間、3,000 回転/分) し、 n -ヘキサン液層を分取する。残留物に n -ヘキサン液 10ml を加えて同様に操作し、 n -ヘキサン液層を分取する。全 n -ヘキサン液層を合わせ、 n -ヘキサン液を加えて正確に 40ml とする。この液をメンブランフィルター (孔径 0.45 μ m) でろ過し、ろ液を試料液とする。

② 水分の多い食品

β -カロテンとして 10~50 μ g に対応する、通常、10g 以下の試料の量を精密に量り、50ml の褐色共栓遠心管に入れ、水 10~15ml、エタノール液 10ml 及び n -ヘキサン液 10ml を加え、激しく振り混ぜた後、遠心分離 (10 分間、3,000 回転/分) し、 n -ヘキサン液層を分取し、濃縮

器に入れる。遠心管の残留物に n -ヘキサン液 10ml を加え、同様に操作し、 n -ヘキサン液層を分取し、濃縮器に合わせる。この液を減圧濃縮し、 n -ヘキサン液を加えて液量を正確に 10ml とする。この液をメンブランフィルター（孔径 $0.45\mu\text{m}$ ）でろ過し、ろ液を試料液とする。

③ 水分の少ない食品

β -カロテンとして $5\sim 25\mu\text{g}$ に対応する、通常、5g 以下の試料の量を精密に量り、50ml の褐色共栓遠心管に入れ、水 20ml¹⁾、エタノール液 10ml、 n -ヘキサン液 10ml 及び少量の塩化ナトリウム²⁾を加え、激しく振り混ぜた後、遠心分離（10 分間、3,000 回転/分）し、 n -ヘキサン液層を分取し、濃縮器に入れる。遠心管の残留物に n -ヘキサン液 10ml を加え、同様に操作し、 n -ヘキサン液層を分取し、濃縮器に合わせる。この液を減圧濃縮し、 n -ヘキサン液を加えて液量を正確に 5ml とする。この液をメンブランフィルター（孔径 $0.45\mu\text{m}$ ）でろ過し、ろ液を試料液とする。

（3）検量線用標準液の調製

β -カロテン³⁾ 0.010g を正確に量り、100ml の褐色メスフラスコに入れ、少量のクロロホルムを加えて溶かした後、 n -ヘキサン液を加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、 β -カロテン $100\mu\text{g}$ を含む）。標準液 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、100 ml の褐色メスフラスコにそれぞれ入れ、 n -ヘキサン液を加えてそれぞれ正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ β -カロテン 1, 2, 3, $4\mu\text{g}$ 及び $5\mu\text{g}$ を含む）。

（4）測定法

① 測定条件

可視分光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。

充てん剤：ポーラスポリマー

カラム管：内径約 2.1mm、長さ約 500mm⁴⁾

カラム温度：40℃⁵⁾

移動相：メタノール・クロロホルム・ n -ヘキサン混液（10：7：3）、0.5ml/分

測定波長：453nm

② 検量線

検量線用標準液 $20\mu\text{l}$ ずつをそれぞれ正確に量り、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

試料液 $20\mu\text{l}$ を正確に量り、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料液中の β -カロテン濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中の β -カロテン含量 (g/kg) を計算する。

$$\beta\text{-カロテン含量 (g/kg)} = \frac{CV}{1,000 \times W}$$

C : 試料液中の β -カロテン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

V : 試料液の量 (ml)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液等

1. エタノール : [95v/v %, 特級]
2. エタノール液⁶⁾ : エタノール 1,000ml に BHT 1g を加えて溶かす。
3. クロロホルム : [高速液体クロマトグラフ用]
4. ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) : [特級]
5. *n*-ヘキサン : [高速液体クロマトグラフ用]
6. *n*-ヘキサン液⁶⁾ : *n*-ヘキサン 1,000ml に BHT 1g を加えて溶かす。
7. メタノール : [高速液体クロマトグラフ用]

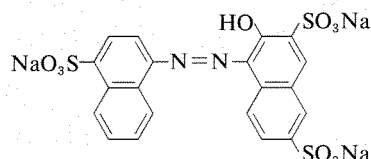
[注]

- 1) 加水量が少ないと、エタノールが *n*-ヘキサン層へ移行するので注意する。
- 2) 塩化ナトリウムを添加すると、懸濁による *n*-ヘキサン層への β -カロテンの抽出率の低下を防ぐことができる。なお、この際エタノールが *n*-ヘキサン層へ移行するのを最小限にするため、塩化ナトリウムの添加量は試料量及び溶解に用いる水の量により加減する。
- 3) β -カロテンは、未開封のまま冷凍庫に保存しても劣化しやすいので、長期間置かないこと。
- 4) カラムは内径を細く、長さはやや長くした方が分離がよくなる。
- 5) カラム温度を上げた方が分離がよくなる。
- 6) 酸化防止剤 BHT を 0.1 % 濃度添加することにより、窒素ガス置換を行わなくても、 β -カロテンは 25℃ で 3 日間、5℃ で 1 週間は変化しない。

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Red No. 2 and Its Aluminium Lake

別名：アマランス



$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$: 604.48

1. 試験法の概要

食品中の食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキは食用赤色 2 号として、薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー、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。ただし、部分的に着色された検体は着色部位を採取する。

（2） 検液の調製

① 液状食品

試料 10ml を量り¹⁾、水 5ml を加えて混和した後、遠心分離（5 分間、3,500 回転/分、以下同じ）して不溶物を除き、水を加えて 20ml とし、検液とする。アルコールを含有する試料の場合は中和した後、水浴上でアルコールを蒸発させ²⁾、残留物に水を加えて減量を補った液を試料として、上記の場合と同様に操作し、検液を調製する。

② 固形食品

試料 10g を量り³⁾、2～10 倍量の水、50～80 vol % エタノール又はアンモニア・エタノール溶液を加え⁴⁾、ときどき振り混ぜながら 2～3 時間室温に放置するか、又は水浴上で 10～30 分間加温する。冷後、この液を遠心分離して固形物を除き、水層をとる。残留物がなお着色している場合は、同様の操作を繰り返し、全水層を合わせる。アンモニアを含む場合は酢酸（3→50）で中和した後、水浴上でエタノールを蒸発させ、濃縮して 20ml とし、検液とする。

以上の操作を行った後の残留物が、なお着色している場合は、アンモニアを揮散させた後、

残留物に 1mol/l 塩酸⁵⁾ 10ml を加え、色素を溶出させ、遠心分離して上層を集め、水酸化ナトリウム溶液 (4 → 100) で中和した後、先の検液に加えて、濃縮して 20ml とする。

③ 油脂食品

試料 10g を量り、3～5 倍量の石油エーテル又はエチルエーテル・石油エーテル混液 (1 : 1) を加え⁶⁾、ときどきかき混ぜながら 30 分間放置した後、石油エーテル又はエチルエーテル・石油エーテル混液 (1 : 1) をろ過して除く⁷⁾。この操作を更に 2 回繰り返す。次いで、2～10 倍量のアセトンを加え、ときどきかき混ぜながら 2～3 時間放置した後、アセトン抽出液を分取する。この操作を更に 2 回繰り返す。全アセトン抽出液を合わせる。残留物は 2～10 倍量のアンモニア・エタノール溶液を用いて、アセトンの場合と同様の操作を繰り返し、アンモニア・エタノール抽出液をアセトン抽出液に合わせ、酢酸 (3 → 50) を加えて中和した後、ロータリーエバポレーターでアセトン及びエタノールを除き、濃縮して 20ml とし、検液とする。

以上の操作でもなお、残留物が着色する場合は、アンモニアを揮散させた後、残留物に 1mol/l 塩酸 10ml を加え、色素を溶出させ⁵⁾、遠心分離して上層を集め、水酸化ナトリウム溶液 (4 → 100) で中和した後、先の検液に加えて、濃縮して 20ml とする。

(3) 試料液の調製

検液⁸⁾に酢酸を加えて酸性とした後、分離用カラムに静かに流し込み⁹⁾、液を流出させた後、カラムを酢酸 (1 → 100) で洗液がほとんど無色となるまで洗い、酢酸液は捨てる。カラムは更に水 20ml を流して洗った後、次いでエタノール・アンモニア混液を加え、溶出してくる着色液を集め、酢酸 (3 → 50) で中和した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固する。残留物に水 1ml を加えて溶かし、試料液とする^{10), 11)}。

(4) 標準液の調製

① 薄層クロマトグラフィー用

食用赤色 2 号標準品 100mg を正確に量り、水を加えて溶かし、100ml とし、薄層クロマトグラフィー用標準液とする。

② 液体クロマトグラフィー用

薄層クロマトグラフィー用標準液 10ml を正確に量り、水を加えて 100ml とし、液体クロマトグラフィー用標準液とする。

(5) 測定法

① 薄層クロマトグラフィー

試料液¹²⁾と薄層クロマトグラフィー用標準液 2 μ l ずつを量り、次に示す条件で薄層クロマトグラフィーを行う。標準品の R_f 値と比較するとともに、色調も観察し、試料中の食用赤色 2

号を定性する¹³⁾。

薄層板¹⁴⁾：シリカゲル薄層板及びオクタデシルシリル化シリカゲル薄層板¹⁵⁾

展開距離：15cm

シリカゲル薄層板用展開溶媒：酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア混液 (3:1:1)¹⁶⁾

オクタデシルシリル化シリカゲル薄層板展開溶媒：メタノール・アセトニトリル・5%硫酸ナトリウム混液 (3:3:10)¹⁷⁾ 及びメチルエチルケトン・メタノール・5%硫酸ナトリウム混液 (1:1:1)¹⁸⁾

② 液体クロマトグラフィー

試料液¹²⁾と液体クロマトグラフィー用標準液 1 μ l ずつを量り、次に示す条件で液体クロマトグラフィーを行う。標準品の保持時間と比較し、試料中の食用赤色 2 号を定性する¹⁹⁾。

紫外可視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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：ステンレススチール製、内径 4.6mm、長さ 150mm

カラム温度：室温

移動相：0.01mol/l 酢酸アンモニウム溶液・アセトニトリル混液 (95:5) から (1:1) までの直線濃度勾配を 30 分間行い、溶出させる。

流速：1ml/分

測定波長：520nm

試薬・試液

1. アセトニトリル：[特級] 及び高速液体クロマトグラフ用
2. アセトン：[特級]
3. 28%アンモニア：[特級]
4. アンモニア・エタノール溶液：アンモニア水 3.5ml、エタノール 50ml 及び水を加えて 100ml とする。
5. エタノール：[特級]
6. エタノール・アンモニア混液：アンモニア水 1ml に水を加えて 28ml とした液にエタノール 28ml を混和する。
7. エチルエーテル：[特級]
8. 塩酸：[特級]
9. 1mol/l 塩酸：塩酸 95ml を量り、水を加えて 1,000ml とする。
10. 酢酸：[特級]
11. 酢酸アンモニウム：[特級]
12. 酢酸エチル：[特級]

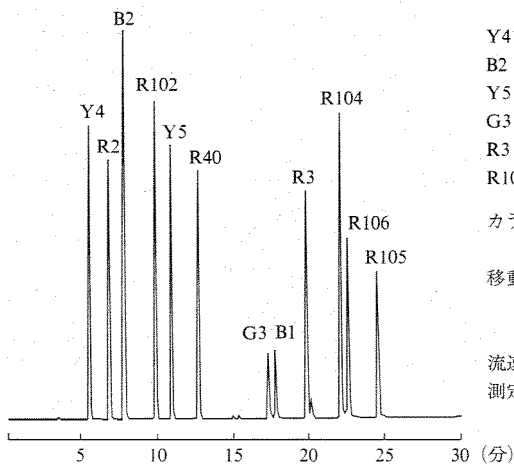
13. 石油エーテル：〔特級〕
14. ポリアミド：カラムクロマトグラフ用，60～80 メッシュを用いる。
15. 分離用カラム：ポリアミドを水に懸濁し，よくかき混ぜて空気を除き，垂直に保持したガラス管（内径 10mm，長さ 200mm）に約 5cm の高さとなるように充てんする。吸着柱の上部まで水を流出させた後，酢酸（1→100）約 20ml を流出させる。
16. 無水硫酸ナトリウム：〔特級〕
17. メチルエチルケトン：〔特級〕
18. 5%硫酸ナトリウム溶液：無水硫酸ナトリウム 5g に水 95ml を加える。

〔注〕

- 1) 試料がタール色素で着色されているか否かを試験する場合は，①液状食品，②固型食品，③油脂食品の試料採取量は 100g とし，使用基準のある食品に準じ，適宜抽出用溶媒を選び操作する。しょう油は 10ml，ソースは 10g を採取する。
- 2) アルコールの存在はポリアミドに対する色素の吸着を低下させるため，あらかじめ除去する。
- 3) マーマレードは 100g，カステラ，スポンジケーキは 30g を採取する。こんぶ類は乾燥検体について 10g，わかめ類は乾燥検体について 5g 採取する。野菜は 50g を採取し，表皮のみが有色の場合は，皮を削ぎ，その部分を細切し試料とする。食肉，鯨肉，鮮魚介類，めん類は 20g を採取する。なお，めん類については即席めんのように，めんを油で処理してある場合は脱脂する必要がある。
- 4) キャンデーなどの飴菓子，ジャムなどは水を加えて温めると色素が溶出してくるが，あんなどはエタノール溶液又はアンモニアを含むエタノール溶液を用いた方が色素の溶出がよい。一般にデンプン，タンパク質の溶出を避けるためにエタノールを用いるが，食品表面が凝固するようなときは，アルコール濃度を 60～70% に下げる。マーマレードは水 100～200 ml，こんぶ類，わかめ類は水 300ml，野菜は水 50ml を用い，カステラ，スポンジケーキは石油エーテル 200ml を加えて脱脂した後，約 1% アンモニアを含むエタノール溶液（80 vol %）200ml を用いる。めん類は石油エーテル 100ml を用いて脱脂した後，エタノール溶液（70 vol %）150ml を加える。食肉，鯨肉，鮮魚介類は約 1% アンモニアを含むエタノール溶液（70 vol %）50ml を加える。
- 5) アルミニウムレーキを溶出させる。
- 6) エチルエーテル・石油エーテル混液を用いるとエマルジョンを防止できる。
- 7) エチルエーテル・石油エーテル混液で 3 回処理しても，なお脱脂が十分でない場合は，更に操作を繰り返す。
- 8) しょう油，ソース等のように不溶物が生じる食品は試料液をそのままポリアミドカラムに加えると，カラムの上部に不溶物が沈着し，カラムの流速を低下させるので，ポリアミドカラム法を行うまえに，以下のポリアミドパッチ法を用いて食品成分と色素との分離を行う。
 〈ポリアミドパッチ法〉 検液を遠心管に採り，酢酸（3→50）を加えて酸性とし，よく混和する。次にポリアミド 0.5g を加え，約 1 分間よく振り混ぜた後 3,000～3,500 回転/分で約 5 分間遠心分離する。上澄液は捨て，残留物を酢酸（3→50）5ml ずつで洗液がほとんど無色となるまで洗い，洗液は捨てる。更に残留物を水 5ml ずつで 2 回洗った後，洗液は捨てる。次に残留物にエタノール・アンモニア混液を 5ml 加え，よく振り混ぜ遠心分離する。この操作をエタノール・アンモニア水溶液混液が着色しなくなるまで繰り返す。全エタノール・アンモニア混液を合わせ，酢酸（3→50）で中和した後，水浴上でエタノールをほとんど除く。この液に酢酸

(3→50)を加えて十分酸性とし、試料液とする。食品本来の色素、カラメルなどが試料液中に移行するような場合は更にポリアミドバッチ法による分離を繰り返す。

- 9) 本操作における試料液及び溶媒の流出速度は約 2ml/分となるように調整する。
- 10) 通常色素濃度が約 0.1 % となるように調整して、次の測定を行う。ただし、使用基準のあるカステラ等の食品の場合には溶出液につき、再度ポリアミドカラムによるクリーンアップ操作を繰り返す。また、残留物の溶解には水又は 50 vol % エタノール 0.5ml を加える。
- 11) 試料液の調製法は、本法のほか毛糸染色法がある。毛糸染色法は多種類の食品に適用でき、操作も簡便で、かつ安価に分析できる優れた方法であるが、酸性タール色素の吸着、溶出に加熱操作が必要であるため加熱操作で分解しやすい色素（食用青色 2 号等）の分析には不適當である。また色素濃度が薄く、塩類や糖類を多く含む食品では分析が困難な場合もある。
 〈毛糸染色法〉検液に酢酸を加えて酸性とした後、脱脂羊毛 0.1g を入れ、よく振り混ぜ、水浴中で 30 分間加温し、羊毛を取り出し、よく水洗する。この染色羊毛を 1 % アンモニア水 5ml 中に入れ、水浴中で 30 分間加温した後、羊毛を取り除き、酢酸を用いて中和した後、約 0.1 % の濃度に調整して試料液とする。
- 12) 使用基準のあるカステラ等の食品の場合は試料液 50 μ l を用いる。
- 13) 参考として R_f 値を注表 28-1 に示す。
- 14) 市販の薄層板は同一の展開溶媒を用いても薄層板のメーカーあるいはロットにより、 R_f 値や相互分離が異なることがあるため、あらかじめ使用する薄層板を用いて確認しておくとい。
- 15) 120 $^{\circ}$ C、15 分間加熱した後に用いる。
- 16) 酢酸エチルの混合比を増加させるにつれて、各色素の R_f 値は相対的に低下するので標準品を用いてあらかじめ分離条件を選定するとよい。酢酸エチルの混合比 4.5 のときはキサンテン系色素の分離がよく、混合比が 2 のときは原点近くの色素の分離がよい。
- 17) 主として、キサンテン系以外の色素の分離に用いる。5 % 硫酸ナトリウムの混合比を増加させるにつれて、各色素の R_f 値は相対的に低下するので標準品を用いてあらかじめ分離条件を選定するとよい。
- 18) 主として、キサンテン系色素の分離に用いる。3 種の溶媒を混合すると白濁するが、ろ紙を用いてろ過するか、静置後上澄を使用する。
- 19) 参考としてクロマトグラムを図に示す。



Y4: 食用黄色 4 号	R2: 食用赤色 2 号
B2: 食用青色 2 号	R102: 食用赤色 102 号
Y5: 食用黄色 5 号	R40: 食用赤色 40 号
G3: 食用緑色 3 号	B1: 食用青色 1 号
R3: 食用赤色 3 号	R104: 食用赤色 104 号
R106: 食用赤色 106 号	R105: 食用赤色 105 号

カラム管: TSKgel ODS-80Ts (5 μ m, 150 $\times$ 内径 4.6mm, トーソー)

移動相: 0.01mol/l 酢酸アンモニウム溶液・アセトニトリル混液 (95:5) から (1:1) までの直線濃度勾配を 30 分間行い、溶出させる。

流速: 1ml/分

測定波長: 254nm

注図 28-1 食用色素（タール色素）の液体クロマトグラム

注表 28-1 タール色素の R_f 値

タール色素 (Color Index)	R_f 値			タール色素 (Color Index)	R_f 値		
	分離条件 A ¹⁾	分離条件 B ²⁾	分離条件 C ³⁾		分離条件 A ¹⁾	分離条件 B ²⁾	分離条件 C ³⁾
食用赤色 2 号 (16185)	0.07	0.84	1.0	ボンソー 3R (16155)	0.38	0.16	0.77
食用赤色 3 号 (45430)	0.77	0	0.35	ボンソー SX (14700)	0.26	0.19	0.81
食用赤色 40 号 (16035)	0.39	0.37	1.0	ボンソー 6R (16290)	0.02	1.0	1.0
食用赤色 102 号 (16255)	0.14	0.64	1.0	ファーストレッド E (16045)	0.29	0.20	0.93
食用赤色 104 号 (45410)	0.80	0	0.11	オレンジ I (14600)	0.42	0.14	0.64
食用赤色 105 号 (45440)	0.86	0	0.20	オレンジ II (15510)	0.65	0.05	0.51
食用赤色 106 号 (45100)	0.54	0.04	0.73	オレンジ RN (15970)	0.64	0.04	0.50
食用黄色 4 号 (19140)	0.06	0.93	1.0	オレンジ G (16230)	0.30	0.47	1.0
食用黄色 5 号 (15985)	0.30	0.52	1.0	キノリンエロー ⁴⁾ (47005)	0.62	0.12	0.68
食用緑色 3 号 (42053)	0.13	0.16	1.0	ナフトールエロー S (10316)	0.45	0.47	0.86
食用青色 1 号 (42090)	0.23	0.11	1.0	グリーン S (44090)	0.17	0.14	0.88
食用青色 2 号 (73015)	0.23	0.79	1.0	ライトグリーン SF 黄口 (42095)	0.20	0.07	1.0
アゾフロキシシ (18050)	0.26	0.44	1.0	ギネアグリーン B (42085)	0.51	0	0.72
アゾルビン (14720)	0.18	0.08	0.80	パテントブルー V (42051)	0.10	0.05	0.73
エオシン (45380)	0.53	0	0.37	アシッドバイオレット 6B (42640)	0.51	0	0.63
ボンソー R (16150)	0.36	0.22	0.84	ブリリアントブラック BN (28440)	0.07	0.49	1.0

1) 分離条件 A

薄層プレート: Kieselgel 60 F254 (E. Merck 5747)

展開溶媒: 酢酸エチル・メタノール・28%アンモニア混液 (3:1:1)

2) 分離条件 B

薄層プレート: RP-18 F254s (E. Merck 1,15389)

展開溶媒: メタノール・アセトニトリル・5%硫酸ナトリウム混液 (3:3:10)

3) 分離条件 C

薄層プレート: RP-18 F254s (E. Merck 1,15389)

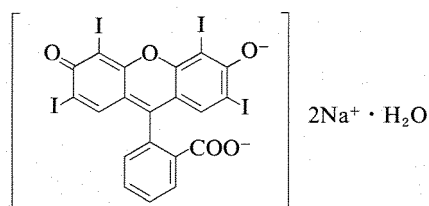
展開溶媒: メチルエチルケトン・メタノール・5%硫酸ナトリウム混液 (1:1:1)

4) 標準品の種類によっては、あるいは食品から抽出した場合には、複数のスポットを示すことがある。

29 食用赤色 3 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Red No. 3 and Its Aluminium Lake

別名：エリスロシン



$C_{20}H_6I_4Na_2O_5 \cdot H_2O$: 897.88

1. 試験法の概要

食品中の食用赤色 3 号及びそのアルミニウムレーキは食用赤色 3 号として、薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）検液の調製

（3）試料液の調製

（4）標準液の調製

上記の(1)～(4)については、28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし、「食用赤色 2 号」を「食用赤色 3 号」とする。

（5）測定法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ、①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

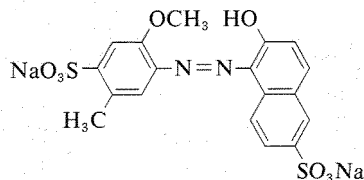
② 液体クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ、②液体クロマトグラフィーの項を準用する。ただし、測定波長は 526nm とする。

30 食用赤色 40 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Red No. 40 and Aluminium Lake

別名：アルラレッド AC



$C_{18}H_{14}N_2Na_2O_6S_2$: 496.43

1. 試験法の概要

食品中の食用赤色 40 号及びそのアルミニウムレーキは食用赤色 40 号として，薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試 験 法（薄層クロマトグラフィー，液体クロマトグラフィー）

（1） 検体の採取と試料の調製

（2） 検液の調製

（3） 試料液の調製

（4） 標準液の調製

上記の(1)～(4)については，28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし，「食用赤色 2 号」を「食用赤色 40 号」とする。

（5） 測 定 法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

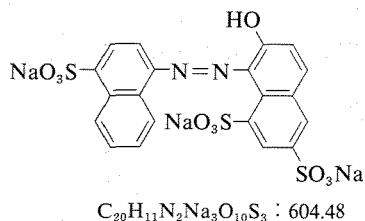
② 液体クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，②液体クロマトグラフィーの項を準用する。ただし，測定波長は 498nm とする。

31 食用赤色 102 号

Food Red No. 102

別名：ニューコクシン



1. 試験法の概要

食品中の食用赤色 102 号は、薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー，液体クロマトグラフィー）

（1） 検体の採取と試料の調製

（2） 検液の調製

（3） 試料液の調製

（4） 標準液の調製

上記の(1)～(4)については、28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし、「食用赤色 2 号」を「食用赤色 102 号」とする。

（5） 測定法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

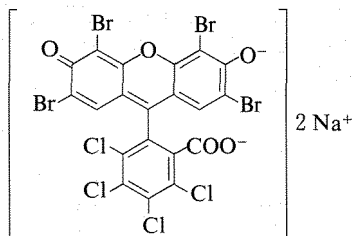
② 液体クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，②液体クロマトグラフィーの項を準用する。ただし、測定波長は 508nm とする。

32 食用赤色 104 号

Food Red No. 104

別名：フロキシシ

 $C_{20}H_2Br_4Cl_4Na_2O_5 : 829.64$

1. 試験法の概要

食品中の食用赤色 104 号は、薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試 験 法 (薄層クロマトグラフィー, 液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 検液の調製

(3) 試料液の調製

(4) 標準液の調製

上記の(1)~(4)については、28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし、「食用赤色 2 号」を「食用赤色 104 号」とする。

(5) 測 定 法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ、①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

② 液体クロマトグラフィー

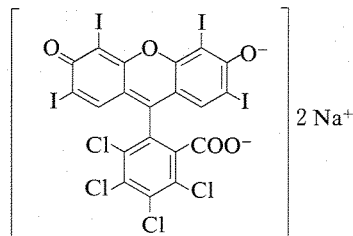
28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ、②液体クロマトグラフィーの項を準用する。

ただし、測定波長は 538nm とする。

33 食用赤色 105 号

Food Red No. 105

別名：ローズベンガル



$C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$: 1017.64

1. 試験法の概要

食品中の食用赤色 105 号は、薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー，液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）検液の調製

（3）試料液の調製

（4）標準液の調製

上記の(1)~(4)については、28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし、「食用赤色 2 号」を「食用赤色 105 号」とする。

（5）測定法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

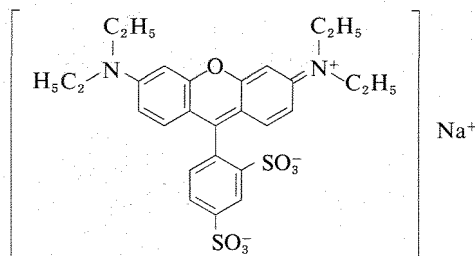
② 液体クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，②液体クロマトグラフィーの項を準用する。ただし、測定波長は 548nm とする。

34 食用赤色 106 号

Food Red No. 106

別名：アシッドレッド

 $C_{27}H_{29}N_2NaO_7S_2$: 580.66

1. 試験法の概要

食品中の食用赤色 106 号は、薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試 験 法 (薄層クロマトグラフィー, 液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 検液の調製

(3) 試料液の調製

(4) 標準液の調製

上記の(1)~(4)については、28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし、「食用赤色 2 号」を「食用赤色 106 号」とする。

(5) 測 定 法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ, ①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

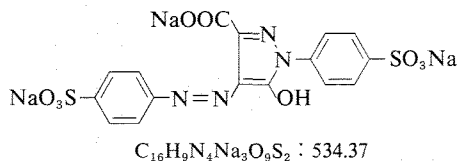
② 液体クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ, ②液体クロマトグラフィーの項を準用する。ただし、測定波長は 566nm とする。

35 食用黄色 4 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Yellow No. 4 and Its Aluminium Lake

別名：タートラジン



1. 試験法の概要

食品中の食用黄色 4 号及びそのアルミニウムレーキは食用黄色 4 号として、薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー，液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 検液の調製

(3) 試料液の調製

(4) 標準液の調製

上記の(1)~(4)については、28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし、「食用赤色 2 号」を「食用黄色 4 号」とする。

(5) 測定法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

② 液体クロマトグラフィー

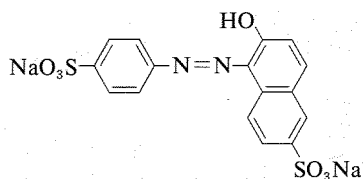
28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，②液体クロマトグラフィーの項を準用する。

ただし，測定波長は 428nm とする。

36 食用黄色5号及びそのアルミニウムレーキ

Food Yellow No. 5 and Its Aluminium Lake

別名：サンセットイエロー FCF



$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$: 452.88

1. 試験法の概要

食品中の食用黄色5号及びそのアルミニウムレーキは食用黄色5号として，薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試 験 法（薄層クロマトグラフィー，液体クロマトグラフィー）

（1） 検体の採取と試料の調製

（2） 検液の調製

（3） 試料液の調製

（4） 標準液の調製

上記の(1)～(4)については，28 食用赤色2号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし，「食用赤色2号」を「食用黄色5号」とする。

（5） 測 定 法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色2号及びそのアルミニウムレーキ，①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

② 液体クロマトグラフィー

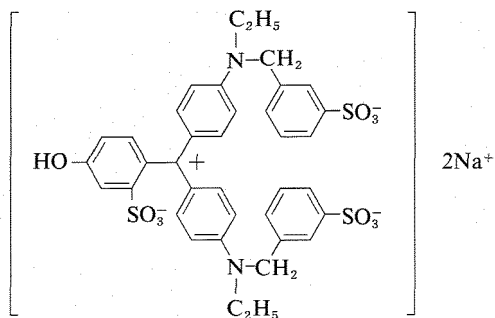
28 食用赤色2号及びそのアルミニウムレーキ，②液体クロマトグラフィーの項を準用する。

ただし，測定波長は482nmとする。

37 食用緑色 3 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Green No. 3 and Its Aluminium Lake

別名：ファストグリーン FCF



$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3 \cdot 808.86$

1. 試験法の概要

食品中の食用緑色 3 号及びそのアルミニウムレーキは食用緑色 3 号として、薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー，液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 検液の調製

(3) 試料液の調製

(4) 標準液の調製

上記の(1)~(4)については、28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし、「食用赤色 2 号」を「食用緑色 3 号」とする。

(5) 測定法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

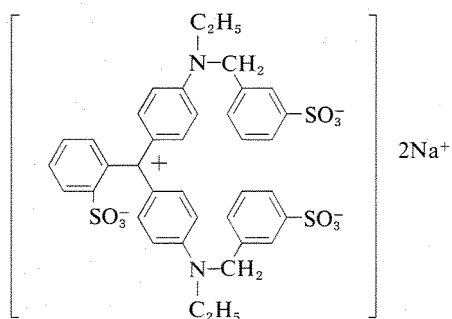
② 液体クロマトグラフィー

28 食用赤色2号及びそのアルミニウムレーキ，②液体クロマトグラフィーの項を準用する。
ただし，測定波長は 624nm とする。

38 食用青色 1 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Blue No. 1 and Its Aluminium Lake

別名：プリリアントブルー FCF



C₃₇H₃₄N₂Na₂O₉S₃ : 792.86

1. 試験法の概要

食品中の食用青色 1 号及びそのアルミニウムレーキは食用青色 1 号として，薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー，液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 検液の調製

(3) 試料液の調製

(4) 標準液の調製

上記の(1)～(4)については，28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし，「食用赤色 2 号」を「食用青色 1 号」とする。

(5) 測定法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

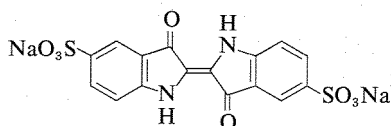
② 液体クロマトグラフィー

28 食用赤色2号及びそのアルミニウムレーキ，②液体クロマトグラフィーの項を準用する。
ただし，測定波長は630nmとする。

39 食用青色 2 号及びそのアルミニウムレーキ

Food Blue No. 2 and Its Aluminium Lake

別名：インジゴカルミン



$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$: 466.36

1. 試験法の概要

食品中の食用青色 2 号及びそのアルミニウムレーキは食用青色 2 号として、薄層クロマトグラフィーあるいは液体クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー，液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）検液の調製

（3）試料液の調製

（4）標準液の調製

上記の(1)～(4)については、28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし、「食用赤色 2 号」を「食用青色 2 号」とする。

（5）測定法

① 薄層クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，①薄層クロマトグラフィーの項を準用する。

② 液体クロマトグラフィー

28 食用赤色 2 号及びそのアルミニウムレーキ，②液体クロマトグラフィーの項を準用する。ただし，測定波長は 612nm とする。

40 鉄クロロフィリンナトリウム

Sodium Iron Chlorophyllin

1. 試験法の概要

食品中の鉄クロロフィリンナトリウムは、原子吸光法により求めた鉄の濃度に分子量比を乗じて鉄クロロフィリンナトリウムとして定量する。

2. 試 験 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) 試料液の調製

鉄として $40\mu\text{g}$ に対応する、通常、 20g 以下の試料の量を精密に量り、ブレンダー容器に入れ、水 80ml 、 1mol/l 塩酸 10ml ¹⁾ 及び酢酸エチル 40ml を加え、ホモジナイズする。この液を水を用いて遠心管に移し、遠心分離 (10 分間、 $3,000$ 回転/分、以下同じ) する。酢酸エチル層はナス型フラスコに分取し、水層には酢酸エチル 40ml を加えてよくかき混ぜ遠心分離し、酢酸エチル層を分取し、先の酢酸エチル層と合わせる。水層に酢酸エチル 40ml を加えて同様の操作を繰り返す。全酢酸エチル層を水浴上で減圧濃縮し、残留物を酢酸エチルを用いて磁製るつぼに移す。水浴上で磁製るつぼの中の酢酸エチルを揮散させ、電気炉に移し、 $450\sim 500^\circ\text{C}$ ²⁾ で加熱して灰化する。24 時間を過ぎても灰化が十分でないときは、硝酸 (1 → 2) 2ml を加えて水浴上で蒸発乾固し、次いで電気炉で再び灰化する。灰分は少量の水で潤し、塩酸 (1 → 2) 10ml を加えて水浴上で蒸発乾固した後、残留物に 3mol/l 塩酸 10ml を加えて加温して溶かす。冷後、クエン酸二アンモニウム溶液 (1 → 4) 10ml 及びブロムチモールブルー試液 2 滴を加えて、溶液の色が緑色になるまでアンモニア水を加え、中和する。この液を 300ml の分液漏斗に移し、水を加えて約 100ml とし、硫酸アンモニウム溶液 (2 → 5) 10ml 及びジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液 (1 → 10) 10ml を加えて振り混ぜる。数分間放置した後、メチルイソブチルケトン 20ml を正確に量って加え、激しく振り混ぜ、メチルイソブチルケトン層を分取し、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

硫酸第一鉄アンモニウム 7.022g を正確に量り、10%塩酸 10ml 及び水 500ml を加えて溶かし、水を加えて正確に 1,000ml とする。この液 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、鉄 $10\mu\text{g}$ を含む）。標準液 0, 2, 4ml 及び 6ml をそれぞれ正確に量り、クエン酸二アンモニウム溶液（1→4）10ml 及びブロムチモールブルー試液 2 滴をそれぞれ加えて溶液の色が緑色になるまでアンモニア水を加え、中和する。この液を 300ml の分液漏斗に移し、水を加えて約 100ml とし、硫酸アンモニウム溶液（2→5）10ml 及びジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液（1→10）10ml を加えて振り混ぜる。数分間放置した後、メチルイソブチルケトン 20ml を正確に量って加え、激しく振り混ぜ、メチルイソブチルケトン層を分取し、検量線用標準液とする（これらの液 1ml はそれぞれ鉄 0, 1, $2\mu\text{g}$ 及び $3\mu\text{g}$ を含む）。

(4) 空試料液の調製

試料採取量と同量の水を用い、(2)試料液の調製と同様に操作し、空試料液とする。

(5) 測定法

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件で測定する。

バーナー：10cm スリット型

燃料ガス：アセチレン-空気、アセチレン 3L/分、空気 13L/分

測定波長：248.3nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき原子吸光度を測定し、得られた値から検量線を作成する。

③ 定量

試料液及び空試料液につき原子吸光度を測定する。得られた両者の吸光度の差と検量線から試料液中の鉄濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）を求め、次式によって検体中の鉄クロロフィリンナトリウム含量（g/kg）を求める。

$$\text{鉄クロロフィリンナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 50} \times 12.19^{(3)}$$

C：試料液中の鉄濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液

1. クエン酸二アンモニウム：〔特級〕
2. ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム：〔特級〕
3. 硝酸：有害金属用，市販品を用いる。
4. ブロムチモールブルー：〔特級〕
5. ブロムチモールブルー試液：ブロムチモールブルー 0.1g にエタノール・水混液（1：1）100ml を加えて溶かし，必要があればろ過する。
6. メチルイソブチルケトン：〔特級〕
7. 硫酸アンモニウム：〔特級〕
8. 硫酸第一鉄アンモニウム：〔特級〕

〔注〕

- 1) 水層の酸性度が強すぎると，鉄クロロフィリンナトリウム分子中の鉄が離脱するおそれがあるので，弱酸性になるようにこの量を調整する方がよい。
- 2) 550℃以上になると他の元素と融合反応を起こすことがある。
- 3) 鉄クロロフィリン a ナトリウムと鉄クロロフィリン b ナトリウムの平均分子量 679.96 を鉄の原子量 55.8 で割った値である。

41 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

1. 試験法の概要

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、原子吸光法により銅として定量する。必要があれば分子量比を乗じて銅クロロフィルもしくは銅クロロフィリンナトリウムの量として求める。

2. 試験法（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）試料液の調製

銅として $40\mu\text{g}$ に対応する、通常 20g 以下の試料の量を精密に量り、ブレンダー容器に入れ、水 80ml を加え、ホモジナイズした後、 0.5% 水酸化ナトリウム溶液を加えて弱アルカリ性とし、酢酸エチル 50ml を加えて振り混ぜる。静置後¹⁾、上層の酢酸エチル層を分取し、下層は更に酢酸エチル 50ml を加え、同様の操作を2回繰り返す。水層は別に保存する。酢酸エチル層を合わせ、水 30ml ずつで3回洗浄した後、酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウム 10g ²⁾ を加え、ときどき振り混ぜながら約1時間放置する。次いで、酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで濃縮乾固する。残留物にクロロホルム 5ml を加え混和した後、更に n -ヘキサン 45ml を加えて混和する。この液をシリカゲルカラムに加え、液を流下させた後、 n -ヘキサン-クロロホルム (9:1) 200ml を加え、洗浄する。次いで、メチルエチルケトン・メタノール混液 (3:2) 120ml を加え、溶出液を集める。溶出液はロータリーエバポレーターで濃縮乾固する。残留物にメチルイソブチルケトンを加え、溶解した後、正確に 20ml とし、銅クロロフィル用試料液とする。

先に保存した水層は、 5% 塩酸を加えて弱酸性とし、 n -ブタノール 50ml を加えて振り混ぜる¹⁾。静置後、 n -ブタノール層を分取する。水層に更に、 n -ブタノール 50ml を加え、同様の操作を2回繰り返す。 n -ブタノール層を合わせ、水 30ml ずつで3回洗浄した後、 n -ブタノール

ル層をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、残留物をメタノールを用いて磁製るつばに移す。水浴上で磁製るつばの中のメタノールを揮散させ、電気炉に移し、 $450\sim 500\text{ }^{\circ}\text{C}$ ³⁾で加熱して灰化する。灰分は少量の水で潤し、塩酸(1→2) 10mlを加えて水浴上で蒸発させた後、3mol/l 塩酸 10mlを加えて加温して溶かす。冷後、クエン酸二アンモニウム溶液(1→4) 10ml及びブロムチモールブルー試液 2滴を加えて、溶液の色が緑色になるまでアンモニア水を加え、中和する。この液に水を加えて約 100mlとし、硫酸アンモニウム溶液(2→5) 10ml及びジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液(1→10) 10mlを加えて振り混ぜる。数分間放置した後、メチルイソブチルケトン 20mlを正確に量って加え、激しく振り混ぜ、メチルイソブチルケトン層を分取し、銅クロロフィリンナトリウム用試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

硫酸銅 3.925gを正確に量り、10%硫酸 10ml及び水 200mlを加えて溶かし、水を加えて正確に 1,000mlとする。この液 1mlを正確に量り、水を加えて正確に 100mlとし、標準液とする(この液 1mlは、銅 $10\mu\text{g}$ を含む)。標準液 0, 2, 4ml及び 6mlをそれぞれ正確に量り、クエン酸二アンモニウム溶液(1→4) 10ml及びブロムチモールブルー試液 2滴をそれぞれ加えて溶液の色が緑色になるまでアンモニア水を加え、中和する。この液を 300mlの分液漏斗に移し、水を加えて約 100mlとし、硫酸アンモニウム溶液(2→5) 10ml及びジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液(1→10) 10mlを加えて振り混ぜる。数分間放置した後、メチルイソブチルケトン 20mlを正確に量って加え、激しく振り混ぜ、メチルイソブチルケトン層を分取し、検量線用標準液とする(これらの液 1mlはそれぞれ銅 0, 1, $2\mu\text{g}$ 及び $3\mu\text{g}$ を含む)。

(4) 空試料液の調製

試料採取量と同量の水を用い、(2)試料液の調製と同様に操作し、空試料液とする。

(5) 測定法

① 測定条件

原子吸光度計を用い、次の条件で測定する。

バーナー：10cm スリット型

燃料ガス：アセチレン-空気、アセチレン 4L/分、空気 23L/分

測定波長：324.7nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき原子吸光度を測定し、得られた値から検量線を作成する。

③ 定量

試料液及び空試料液につき原子吸光度を測定する。得られた両者の吸光度の差と検量線から

試料液中の銅濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中の銅クロロフィル又は銅クロロフィリンナトリウム含量 (g/kg) を求める。

$$\text{銅含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 50}$$

C : 試料液中の銅濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

$$\text{銅クロロフィル含量 (g/kg)} = \text{銅含量 (g/kg)} \times 14.75^{4)}$$

$$\text{銅クロロフィリンナトリウム含量 (g/kg)} = \text{銅含量 (g/kg)} \times 10.83^{4)}$$

試薬・試液等

1. クエン酸二アンモニウム : [特級]
2. ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム : [特級]
3. 硝酸 : 有害金属用, 市販品を用いる。
4. シリカゲルカラム : 内径 1.5cm のガラスカラムに, シリカゲル 6g を *n*-ヘキサン・クロロホルム混液 (9:1) で湿式充てんする。
5. プロムチモールブルー : [特級]
6. プロムチモールブルー試液 : プロムチモールブルー 0.1g にエタノール・水混液 (1:1) 100ml を加えて溶かし, 必要があればろ過する。
7. メチルイソブチルケトン : [特級]
8. 硫酸アンモニウム : [特級]
9. 硫酸銅 : (結晶) [特級]

[注]

- 1) エマルジョンを生じた場合は遠心分離 (10 分間, 3,000 回転/分) し, 酢酸エチル層を分取する。
- 2) 脱水の目的で加える。適宜追加する。
- 3) 550℃ 以上になると他の元素と融合反応を起こすことがある。
- 4) 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, 前者は本式に 14.75 (銅クロロフィル a と b の平均分子量 936.25 を銅の原子量 63.5 で割った値) を乗じ, 後者は本式に 10.83 (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 687.67 を銅の原子量 63.5 で割った値) を乗じ, それぞれ算出する。

42 二酸化チタン

Titanium Dioxide

 TiO_2 : 79.88

1. 試験法の概要

食品中の二酸化チタンは、灰化後、硫酸に溶かし、過酸化水素を作用させて生ずる黄色を測定する比色法により定量する。

2. 試 験 法 (比色法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する¹⁾。

(2) 試料液の調製

試料約 10g を精密に量り、100ml の磁製るつぼに入れ、徐々に加熱して炭化させる。次いで残留物がほとんど白色となるまで 550～650℃ に強熱して灰化させる²⁾。冷後、無水硫酸ナトリウム 1.5g 及び硫酸 10ml を加え、注意しながら徐々に加熱して残留物を溶かす。冷後、残留物を水約 30ml を入れた 100ml のメスフラスコに徐々に加え³⁾、更に、るつぼを水約 10ml ずつで 3 回洗い、洗液はメスフラスコに加え、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

(3) 標準液の調製

二酸化チタン 25mg を正確に量り、100ml の磁製るつぼに入れ、無水硫酸ナトリウム 7.5g 及び硫酸 25ml を加え、注意しながら徐々に加熱して溶かす。冷後、内容物をあらかじめ水約 100ml を入れた 250ml のメスフラスコに徐々に加え³⁾、更にるつぼを水約 20ml ずつで 3 回洗い、洗液はメスフラスコに加え、水を加えて正確に 250ml とし、標準液とする（この液 1ml は、二酸化チタン 100 μg を含む）。

(4) 測 定 法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 408nm における吸光度を測定する。

② 測定

試料液 1～8ml の適当量を正確に量り、10ml のメスフラスコに入れ、過酸化水素水 0.2ml を加え、よく振り混ぜた後、硫酸（1→10）を加えて正確に 10ml とし、測定液とする。測定液につき、過酸化水素水 0.2ml に硫酸（1→10）を加えて 10ml とした液を対照として、吸光度を測定する。

③ 検量線

標準液 2, 4, 6ml 及び 8ml をそれぞれ正確に量り、それぞれ 10ml のメスフラスコに入れ、②測定における試料液と同様に操作し、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ二酸化チタン 20, 40, 60 μ g 及び 80 μ g を含む）。検量線用標準液それぞれにつき、測定液と同様に吸光度を測定し、検量線を作成する。

④ 定量

測定液の吸光度と検量線から測定液中の二酸化チタン濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中の二酸化チタン含量（g/kg）を計算する。

$$\text{二酸化チタン含量 (g/kg)} = \frac{C}{AW}$$

C：測定液中の二酸化チタン濃度（ μ g/ml）

A：測定液調製に用いた試料液の採取量（ml）

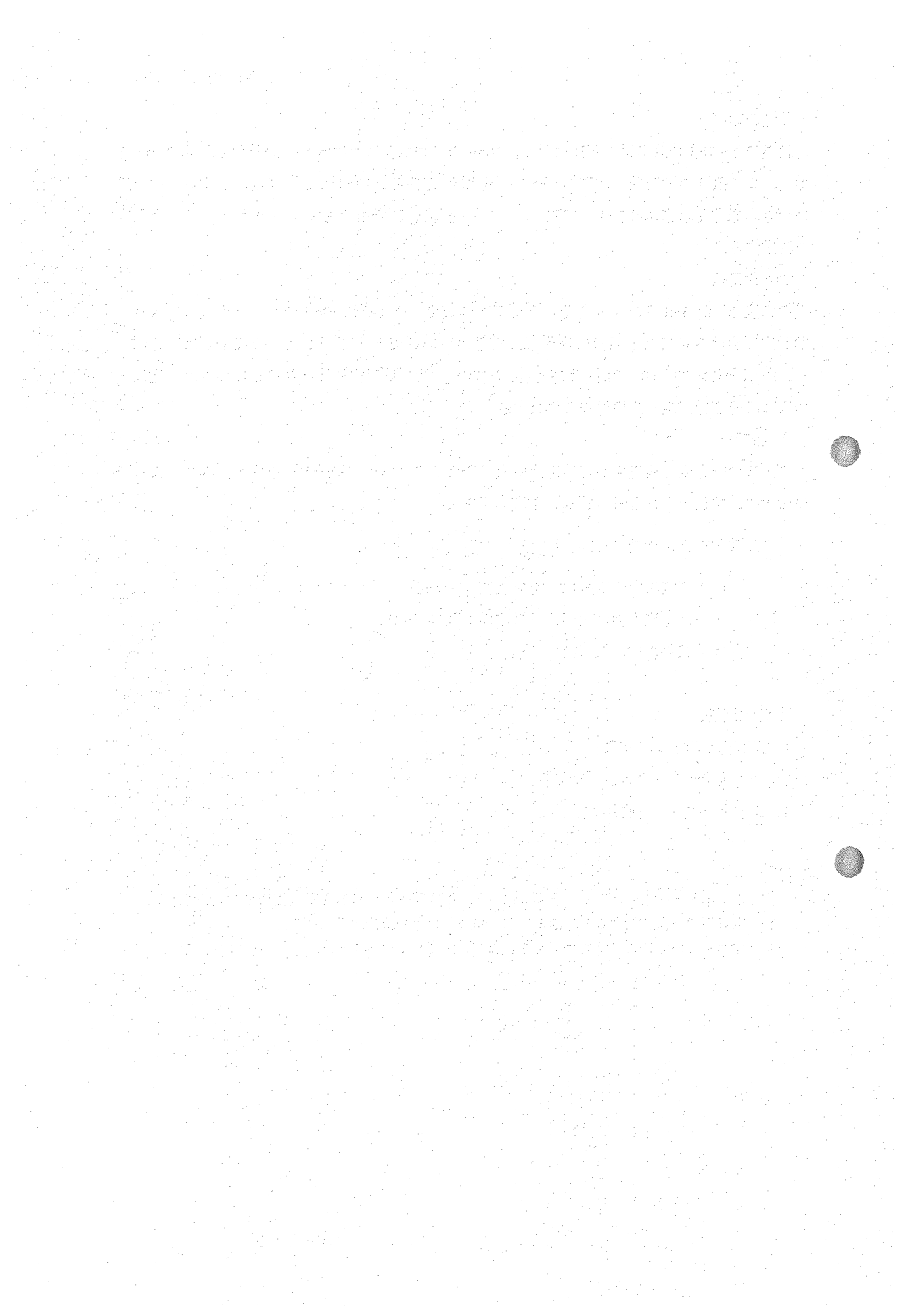
W：試料の採取量（g）

試薬・試液

1. 過酸化水素水：[特級]
2. 無水硫酸ナトリウム：[特級]
3. 二酸化チタン：[食添]

[注]

- 1) ホワイトチーズ、ホワイトチョコレート、糖衣菓子は、可能な限り細切して試料とする。
- 2) 電気炉で一夜加熱すると、ほとんどの場合、白色の灰分が得られる。
- 3) 発熱するのでメスフラスコを冷やしながら注意して操作する。

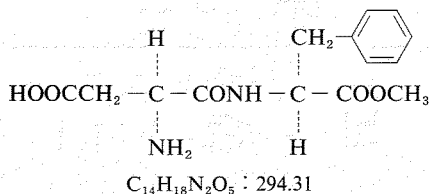


第 10 章

甘 味 料

43 アスパルテーム

Aspartame

別名：L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル

1. 試験法の概要

食品中のアスパルテームは、透析法により抽出した後、オクタデシルシリル化シリカゲルカートリッジ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測定する。

2. 試 験 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） 試料液の調製

① 液状試料

試料約 20g を精密に量り、透析内液用溶液¹⁾ 20ml を用いてセロハンチューブ²⁾に移した後、セロハンチューブの上端を密封し、200ml のメスシリンダーに入れる。次いで透析外液用溶液¹⁾で全量を 200ml とする。ときどき揺り動かしながら室温で 24 時間透析³⁾を行う。透析液 10ml を正確に採り、オクタデシルシリル化シリカゲルカートリッジカラム⁴⁾に負荷し、水 5ml、次いでメタノール・水混液（2：8）10ml を通し⁵⁾て洗浄する。メタノール・1%リン酸混液（3：7）で溶出し、全量を正確に 10ml とし、メンブランフィルター（0.45 μ m）を用いてろ過し、ろ液を試料液とする。

② 固形試料

試料を細切した後、約 20g を精密に量り、1%リン酸 20ml を用いてセロハンチューブに移した後、液状試料と同様に操作する。

(3) 検量線用標準液の調製

アスパルテーム 0.100g を正確に量り、水に溶解して正確に 100ml とする。その 10ml を正確に採り、水を加えて正確に 100ml としたものを標準液とする（本液 1ml はアスパルテーム 100 μ g を含む）。標準液 0, 1, 2, 4, 6ml 及び 10ml を正確に採り、水を加えてそれぞれ正確に 10ml とし、検量線用標準液とする。（これらの液 1ml は、それぞれアスパルテーム 0, 10, 20, 40, 60 μ g 及び 100 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収検出器付液体クロマトグラフにより、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル⁶⁾

カラム管：内径 4.6～6.0mm，長さ 150～250mm

カラム温度：40℃

移動相⁷⁾：メタノール・0.02mol/l リン酸塩緩衝液（pH4.0）混液（1：3）

流速：1.0ml/分

測定波長：210nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 10 μ l ずつを正確に採り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積からアスパルテームの検量線を作成する。

③ 定量

試料液 10 μ l を正確に採り、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料液中のアスパルテーム濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中のアスパルテーム含量 C（g/kg）を計算する^{8)～10)}。

$$C \text{ (g/kg)} = \frac{20AB}{W} \times \frac{1}{1,000}$$

A：試料中のアスパルテーム濃度（ μ g/ml）

B：試料液の容量（ml）

W：試料の採取量（g）

1/1,000：kg 当たりの g 数への換算係数

20：透析液量（ml）/透析外液分取量（ml）

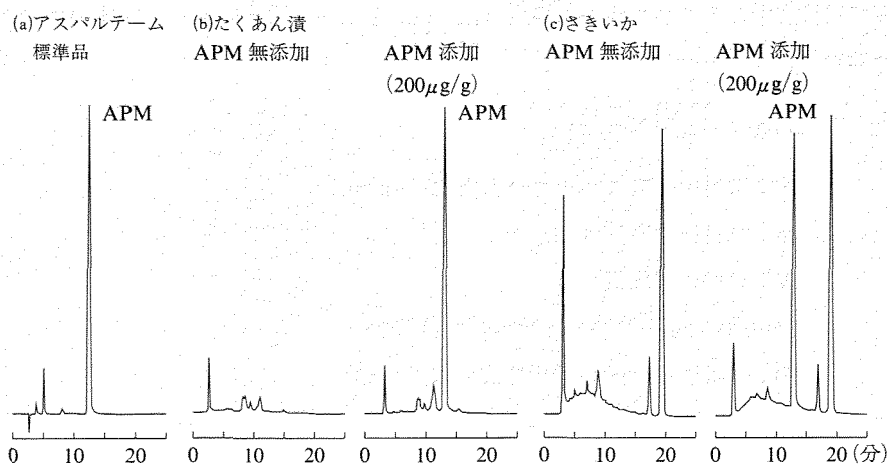
試薬・試液

1. 透析内液用溶液：塩化ナトリウム 100g を 0.01mol/l 塩酸に溶解して 1,000ml とする。

2. 透析外液用溶液：0.01mol/l 塩酸
3. メタノール：[特級]
4. 1%リン酸：85%リン酸 11.8g に水を加えて 1,000ml とする。
5. オクタデシルシリル化シリカゲルカートリッジカラム：使用前にメタノール 5ml, 次いで水 5ml で順次洗浄する。
6. セロハンチューブ：透析用セルロースチューブ
7. 0.02mol/l リン酸緩衝液：0.2mol/l リン酸水素二ナトリウム 500ml と 0.2mol/l リン酸 470ml を混和する。これを用時 10 倍量に希釈して pH4.0 の緩衝液を作成する。

[注]

- 1) アスパルテームは pH6 以上では不安定であること、pH3 以上では微生物が繁殖する可能性があるため、透析液の pH は 2~3 がよい。本条件下ではアスパルテームは安定であるが、48 時間を過ぎるとわずかに減少する傾向が見られるため、試料液の長期間保存は好ましくない。
- 2) 透析用セロハンチューブとしては 36/32 (平面幅 43mm, 直径 27mm, 膜厚 0.0203mm) Viskase sales 社製などがある。
- 3) 本透析液はサッカリン及びアセスルファム K の分析にも使用できる。これらを同時に測定する場合は、それらの透析時間を考慮して 24~48 時間程度透析するとよい。
- 4) オクタデシルシリル化シリカゲルカートリッジカラムとしては Sep-Pac Vac C18 (逆相系, 充てん量 1,000mg Millipore 社製) などがある。
- 5) オクタデシルシリル化シリカゲルカートリッジカラムは毎分 3~4ml の流速で流す。
- 6) オクタデシルシリル化シリカゲルカラムとしては Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス(株)製), Cosmosil 5C18-AR (ナカライテスク(株)製), L-column ODS (化学品検査協会製) 等が使用できる。
- 7) 移動相の pH によりアスパルテームの保持時間が大きく変動する。pH5 に調整したとき夾雑ピークとの分離が最もよい。
- 8) アスパルテームの液体クロマトグラムを図に示す。



〈測定条件〉 カラム管：内径 4.6mm, 長さ 250mm 注入量：20 μ l

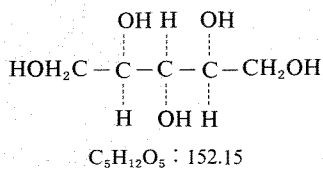
注図 43-1 アスパルテーム (APM) の液体クロマトグラム

- 9) 本法による添加回収率は、94～100.5 %である。
- 10) 本法による定量限界は、試料中 0.01g/kg である。

44 キシリトール

Xylitol

別名：キシリット



1. 試験法の概要

食品中のキシリトールは、アセチル体とし、ガスクロマトグラフィーにより定量する。

2. 試 験 法（ガスクロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

① 糖質食品，タンパク食品，油脂食品

一般試料採取法を準用する。

② チューインガム

数枚を細片し，混ぜ合わせて均一試料とする。

(2) 試料溶液の調製

① 糖質食品

キシリトールとして0.2～0.8gに対応する，通常，20g以下の細切した試料の量を精密に量り，水50mlを加え，一夜放置した後，ろ過する。残留物に温水50mlを加え，加熱しながらかき混ぜた後，ろ過する。全ろ液を合わせ，水を加えて正確に200mlとし¹⁾，試料溶液とする。

② タンパク食品

キシリトールとして0.2～0.8gに対応する，通常，20g以下の細切した試料の量を精密に量り，80%エタノール50mlを加え，冷却器を付け，還流加熱を行った後，ろ過する。残留物に80%エタノール50mlを加え，同様に操作した後，ろ過する。全ろ液を合わせ，80%エタノールを加えて正確に200mlとし¹⁾，試料溶液とする。

③ 油脂食品

キシリトールとして0.2~0.8gに対応する、通常、20g以下の細切した試料の量を精密に量り、*n*-ヘキサン 100mlを加えて激しく振り混ぜ、ヘキサン層を傾斜法（デカンテーション）で除く。残留物に *n*-ヘキサン 100mlを加えて同様の操作を繰り返す。残留物を水浴上で加熱して *n*-ヘキサンを除いた後、②タンパク食品と同様に操作し、試料溶液とする。

④ チューインガム

試料約2gを精密に量り、100mlの三角フラスコに入れ、水²⁾ 50mlを加え、一夜放置する。この液をろ過し、残留物に水 25mlを加え、60℃の水浴上で1時間加温した後、ガラス棒で不溶物を圧縮し、ろ過する。容器及びろ過器を水で洗浄し、ろ液及び洗液を合わせ、水を加えて正確に 100mlとし、試料溶液³⁾とする。

(3) 試料液の調製

① 糖質食品、タンパク食品、油脂食品

試料溶液 10mlを正確に量り、50mlの濃縮器に入れ、内部標準液 5mlを正確に量って加えた後、60℃の水浴上で減圧濃縮を行い、水分を除く。次に 60℃の水浴上で30~60分間減圧乾燥を行った後、無水ピリジン 14ml及び無水酢酸 7ml⁴⁾を加え、60~70℃の水浴上で激しく振り混ぜて残留物を溶かし、一夜放置する。水 20mlを加えた後、水 10mlを用いて分液漏斗に移し、エチルエーテル 50, 30ml及び30mlで3回抽出する。全エチルエーテル層を合わせ、0.1mol/l 硫酸 20mlずつで2回及び水 20mlで1回洗った後、エチルエーテル層に無水硫酸ナトリウムを加えて1時間放置する。この液をろ過し、残留物はエチルエーテル 50mlで数回洗い、ろ液及び洗液を合わせてナス型フラスコに入れ、減圧濃縮してエチルエーテルを留去する。残留物にアセトンを加えて溶かして正確に 10mlとし、試料液とする。

② チューインガム

試料溶液 40mlを正確に量り⁵⁾、濃縮器に入れ、内部標準液 5mlを正確に量って加えた後、60℃の水浴上で減圧濃縮を行い、水分を除く。次に 60℃の水浴上で30~60分間減圧乾燥を行った後、無水ピリジン 14ml及び無水酢酸 7ml⁴⁾を加え、60~70℃の水浴上で激しく振り混ぜて残留物を溶かし、一夜放置する。水 20mlを加えた後、水 10mlを用いて分液漏斗に移し、エチルエーテル 50, 30ml及び30mlで3回抽出する。全エチルエーテル層を合わせ、0.05mol/l 硫酸 20mlで2回及び水 20mlで1回洗った後、エチルエーテル層に無水硫酸ナトリウムを加えて1時間放置する。この液をろ過し、残留物はエチルエーテル 50mlで数回洗い、ろ液及び洗液を合わせてナス型フラスコに入れ、減圧濃縮してエチルエーテルを留去する。残留物にアセトンを加えて溶かして正確に 10mlとし、試料液とする。

(4) 検量線用標準液の調製

キシリトールを 60℃で減圧乾燥した後、0.400g を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、キシリトール 4mg を含む）。標準液 0、2.5、5、7.5ml 及び 10ml をそれぞれ正確に量り、50ml の濃縮器に入れ、それぞれに内部標準液 5ml を正確に量って加え、以下(2)試料液の調製と同様に操作して検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、キシリトールとしてそれぞれ 0、1、2、3mg 及び 4mg を含む）。

(5) 測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）を用い、次の条件により測定する。

カラム充てん剤：60～80 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフ用ケイソウ土担体に XE-60 を含むアセトンを加え、アセトンを蒸発し、乾燥し、3% となるようにしたもの。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 2m

カラム温度：150℃から 220℃まで 6℃/分の昇温を行う。

検出器温度：250℃

キャリアーガス：窒素、40ml/分

② 検量線

検量線用標準液 2μl ずつを、それぞれガスクロマトグラフに注入し、ピーク面積比から検量線を作成する⁶⁾。

③ 定量

試料液 2μl を量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク面積比から検量線によって試料液中のキシリトール濃度 (mg/ml) を求め、次式によって検体中のキシリトール含量 (g/kg) を計算する⁷⁾。

$$\text{キシリトール含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200}{W}$$

C：試料液中のキシリトール濃度 (mg/ml)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. アセトン：[残留農薬試験用]

2. エチルエーテル：[残留農薬試験用]

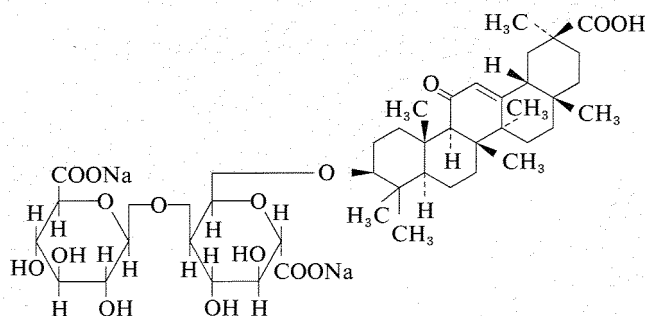
3. エリスリトール：市販品を用いる。
4. 内部標準液：エリスリトール約 400mg を精密に量り、水を加えて溶かし 100ml とする⁸⁾。
5. ピリジン：〔特級〕
6. 無水ピリジン：ピリジンに水酸化ナトリウム（ペレット状）を入れる。
7. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）〔特級〕

[注]

- 1) 必ずしも 200ml にこだわらない。キシリトールとして 0.1~0.4g/100ml の一定量の溶液とすることが目的。
- 2) 熱アルコールで抽出する方法があるが、ガムベース及び香料等の溶出によるガスクロマトグラフィーの妨害ピークを少なくするため、水で抽出する方法を採用した。この方法で良好な回収率が得られる。
- 3) CV 値 (%) 0.57 で完全な溶出糖液が得られる。
- 4) トリメチルシリル化されたキシリトールと D-マンニトールの誘導体はガスクロマトグラフィーでは分離がうまくいかない。
- 5) キシリトールとして 40mg 以下になるようにする。必ずしも 40ml にする必要はない。
- 6) 直線性を示す。
- 7) 本法によるキシリトールの定量限界は、1g/kg である。
- 8) あらかじめ、試料にエリスリトールが含まれていないことを確認してから内部標準液を加える。エリスリトールが含まれていた場合は、D-マンニトール、D-ソルビトールのうち、含まれていないものを内部標準とする。

45 グリチルリチン酸二ナトリウム

Disodium Glycyrrhizinate

 $C_{42}H_{60}Na_2O_{16}$: 866.91

1. 試験法の概要

食品中のグリチルリチン酸二ナトリウムはアンモニア水・メタノール溶液で抽出後アルミナカートリッジカラムでクリーンアップし、液体クロマトグラフでグリチルリチン酸として測定する。

2. 試 験 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) 試料液の調製

① 液状食品

試料約 10g を精密に量り、1%アンモニア水・メタノール溶液を加えて正確に 100ml とする。よく振とうした後、3,000 回転/分で 10 分間遠心分離する。上清液 20ml を正確に分取し、あらかじめメタノール 10ml で洗浄した後アルミナカートリッジ¹⁾に約 2ml/分で負荷し、1%アンモニア水・メタノール溶液²⁾で洗浄後カートリッジに空気を通し残留するメタノールを除去する。次いで水 10ml を正確に量り、これを用いて溶出し、溶出液を試料液とする³⁾。

② 固形食品

細切した試料約 10g 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・メタノール溶液 40ml を加えて 3 分間ホモジナイズする。

さらに1%アンモニア水・メタノール溶液を加えて正確に100mlとする。よく振とうした後、3,000回転/分で10分間遠心分離する。上清液を正確に20ml分取し、以下①液状食品と同様にアルミナカートリッジ処理し、得られた溶出液を試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

グリチルリチン酸0.100gを正確に量り、50%メタノールに溶解して正確に100mlとする。この液10mlを正確に採り、水を加えて正確に100mlとする。(この液1mlはグリチルリチン酸100 μ gを含む)。標準液0, 0.5, 1, 5ml及び10mlをそれぞれ正確に採り、水を加えてそれぞれ正確に100mlとし、検量線用の標準液とする(これらの液1mlは、それぞれグリチルリチン酸0, 0.5, 1, 5 μ g及び10 μ gを含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル⁴⁾

カラム管：内径4.6~6.0mm、長さ150~250mm

カラム温度：40℃

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

② 検量線

検量線用標準液それぞれ10 μ lずつを正確に採り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積からグリチルリチン酸の検量線を作成する。

③ 定量

試料液10 μ lを正確に採り、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料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C(g/kg)を計算する^{5),6)}。

$$C(\text{g/kg}) = \frac{5A}{W} \times \frac{B}{1,000}$$

A：試料液中のグリチルリチン酸濃度(μ g/ml)

B：試料液の容量(ml)

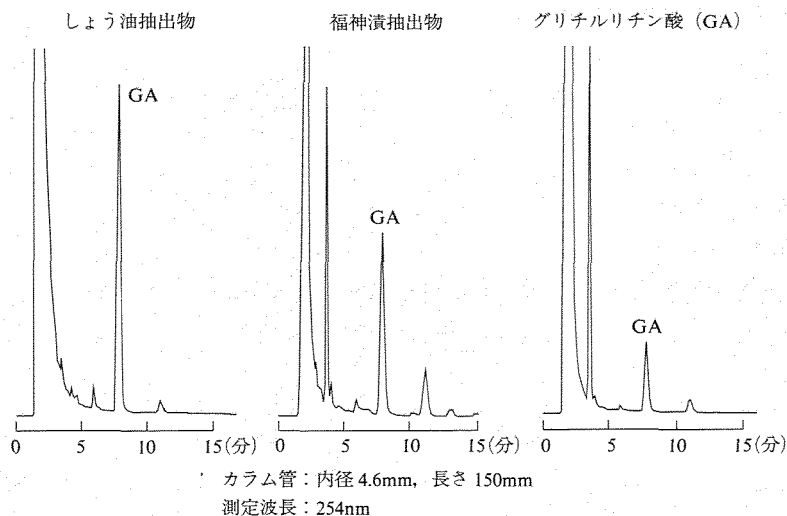
W：試料の採取量(g)

試薬・試液

1. アルミナカートリッジカラム：市販品を用いる。
2. アンモニア水：〔特級〕
3. メタノール：〔特級〕
4. アセトニトリル：〔特級〕
5. 氷酢酸：〔特級〕
6. 1%アンモニア水・メタノール溶液：28%アンモニア水〔特級〕10mlにメタノール270mlを加える。

〔注〕

- 1) Sep-Pak Almina N が回収率や夾雑物の除去効果の点でよい結果が得られる。
- 2) ソースやみそなどの固形及び半固形試料は、1%アンモニア水でホモジナイズした後1%アンモニア水・メタノール溶液で抽出することにより回収率が向上する。
- 3) 本法は塩化ナトリウムや保存料、サッカリンナトリウムなどの妨害はない。
- 4) 市販のカラム充てん剤としては Cresuto Pak C₁₈S, Wakosil-II C₁₈HG, Inertsil ODS-2 及び Cosumosil 5C₁₈ AR などがある。
- 5) グリチルリチン酸の液体クロマトグラムを図に示す。



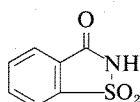
注図 45-1 グリチルリチン酸の液体クロマトグラム

- 6) 本法の添加回収率は 90%以上（魚肉ねり製品は 87%）である。なお、定量限界は 0.0025g/kg である。

46 サッカリン及びサッカリンナトリウム

Saccharin and Sodium Saccharin

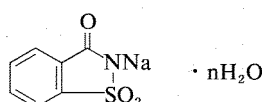
サッカリン



$C_7H_5NO_3S$: 183.19

サッカリンナトリウム

別名：溶性サッカリン



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

1. 試験法の概要

食品中のサッカリン及びサッカリンナトリウムは、透析抽出法又は溶媒抽出法により抽出精製し、液体クロマトグラフィーによりサッカリンナトリウムとして定量する。必要があれば、分子量比を乗じて、サッカリンの量として求める。

2. 試験法 (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) 試料液の調製

① 透析抽出法^{1),2)}

試料約 10g を精密に量り、試料が炭酸又はエタノールを多く含む場合は、試料を直接又は必要があれば少量の水を加えて加温し、その大部分を除去する。また、脂肪分を多く含む試料の場合は *n*-ヘキサン約 20ml ずつで 2~3 回洗浄した後、ヘキサン臭がなくなるまで放置又は加温する。次に透析補助液³⁾ 20ml を用いて試料を透析膜に移した後、透析膜の上端を密封し、250ml のメスシリンダーに入れ、メスシリンダーに水を入れて 200ml とする。ときどき揺り動かしながら室温で 16~24 時間透析を行う。この透析外液をメンブランフィルター (0.45 μ m) を用いてろ過し、ろ液を試料液とする。

② 溶媒抽出法⁴⁾

試料約 2g を精密に量り、飽和硫酸ナトリウム溶液 15ml⁵⁾、硫酸 (1→10) 5ml、エチルエーテル 80ml を加えてホモジナイズして抽出する。エチルエーテル層を分取し、水層にエチル

エーテル 50ml を加え、同様の操作を 2 回繰り返す。全エチルエーテルを分液漏斗に合わせ、1 %炭酸水素ナトリウム溶液 20ml を加えて 5 分間振とうし、水層を別の分液漏斗に入れる。更に 1 %炭酸水素ナトリウム溶液 20ml を用いて同様の操作を繰り返し、先の分液漏斗に水層を合わせる。次に水層に硫酸 (1 → 10) 7ml を加えて酸性とし、塩化ナトリウム 5g, エチルエーテル 50ml を加えて激しく振り混ぜた後、水層を別の分液漏斗に移す。水層にエチルエーテル 50ml を加えて同様の操作を行う。全エチルエーテル層を合わせ、脱水後濃縮乾固する。残留物に 10 %メタノールを加えて全量を正確に 20ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の作成

サッカリンナトリウムを 120℃で 4 時間乾燥し、その 0.040g を正確に量り、水を加えて溶かし正確に 100ml とする。この液 5ml を正確に量り、水を加えて溶かし正確に 100ml とし、標準液とする (この液 1ml はサッカリンナトリウム 20 μ g を含む)。標準溶液 0, 1, 2, 3ml 及び 4ml をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 10ml とし、検量線用標準液とする (これらの液 1.0ml は、それぞれサッカリンナトリウム 0, 2.0, 4.0, 6.0 μ g 及び 8.0 μ g を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤：オクチルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6~6.0mm, 長さ 150mm

カラム温度：40℃

移動相：5mmol/l CTA 含有 10mmol/l リン酸緩衝液 (pH2.5) ・アセトニトリル混液 (4 : 3)

流速：1.0ml/分

測定波長：230nm

② 検量線

それぞれの検量線用標準液 20 μ l ずつを正確に量り、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サッカリンナトリウムの検量線を作成する⁶⁾。

③ 定量

試料液 20 μ l を正確に量り、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り試料液のサッカリンナトリウム濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のサッカリンナトリウム含量 (g/kg) を計算する⁷⁾。

$$\text{検体中のサッカリンナトリウム濃度 (g/kg)} = \frac{C \times V}{W \times 1,000}$$

C：試料液のサッカリンナトリウム濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

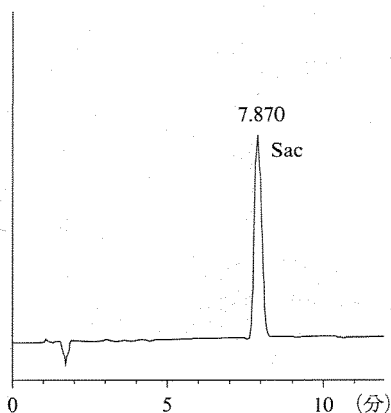
V：試料液の全量 (ml)

試薬・試液

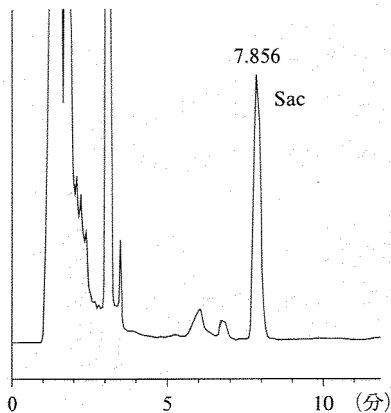
1. 透析膜：直径2～3 cmのセロファン膜を長さ約15 cmに切断して水に浸した後、一端を細いひもで縛り、袋状として使用する。
2. 透析補助液：0.1mmol/l 塩酸を用いる。
3. CTA：塩化セチルトリメチルアンモニウム
4. 5mmol/l CTA 含有 10mmol/l リン酸緩衝液 (pH2.5)：CTA 1.60g 及びリン酸二水素カリウム 1.36g を水に溶かして 1,000ml とし、リン酸で pH を 2.5 に調整し、メンブランフィルター ($0.45\mu\text{m}$) でろ過する (用時調製)。
5. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]

[注]

- 1) 本法により、保存料も同時に抽出、測定が可能である。
- 2) 透析抽出法は、透析に時間がかかるが、一度に多数の試料を処理できる点が特徴である。有機溶媒で乳化しやすい食品（しょう油、みそ、マヨネーズ、ピーナッツバター、清涼飲料水など）にも適用できる。
- 3) 透析補助液には 0.1mol/l 塩酸を使用する。ただし、魚介乾製品などのようにタンパク質の多い試料の場合には、0.01～0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を用いた方が、よい回収率が得られる。
- 4) 溶媒抽出法は、操作が煩雑であるが、透析法と比較して短時間で試料液が調製でき、クロマトグラム上の妨害ピークが少ない。
- 5) 試料の含水量によって、加える飽和硫酸ナトリウム溶液の量を調整する。飽和硫酸ナトリウム溶液を少量ずつ加え、エチルエーテルを加えてホモジナイズしたとき、試料がかゆ状になるまで加える。飽和硫酸ナトリウム溶液の添加量が少ないと、乳化することがある。
- 6) 本法によるサッカリンナトリウムのクロマトグラムと、サッカリンナトリウムと保存料が共存するときのクロマトグラムを注図 46-1, 46-2 に示した。
- 7) 本法による定量限界は、0.010g/kg である。

(1) サッカリンナトリウム標準溶液 ($8\mu\text{g/ml}$)

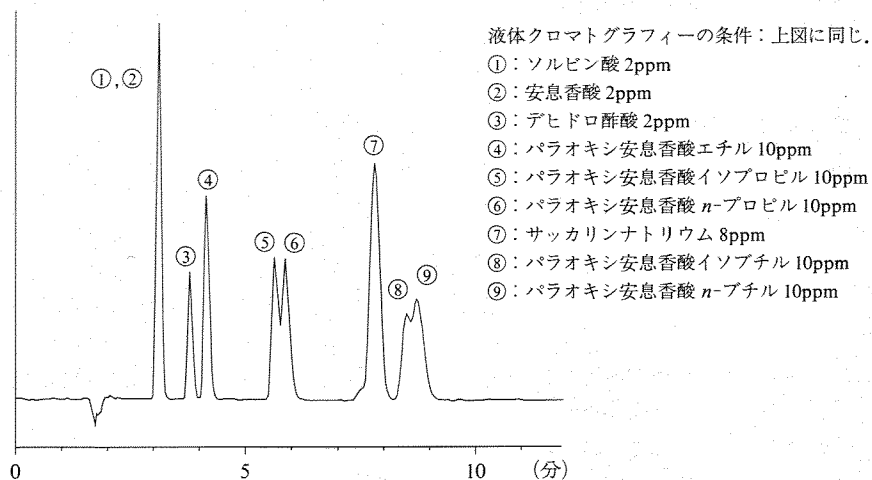
(2) 福神漬にサッカリンナトリウムを添加



〈測定条件〉

検出器：UV 検出器 (230nm)，カラム管：Inertsil C₈ (内径 4.6mm×150mm)，カラム温度：40℃，移動相：5mmol/l CTA 含有 10mmol/l リン酸緩衝液 (pH2.5)・アセトニトリル混液 (4:3)，流速：1.0ml/分

注図 46-1 サッカリンナトリウムの液体クロマトグラム

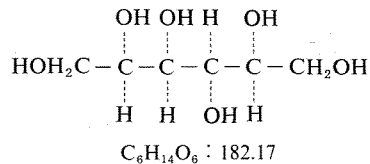


注図 46-2 サッカリンナトリウムと保存料の液体クロマトグラム

47 D-ソルビトール

D-Sorbitol

別名：D-ソルビット



1. 試験法の概要

食品中のD-ソルビトールは、ガスクロマトグラフィーにより定量する。

植物中には、天然のD-ソルビトールが広く分布している。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D-ソルビトールと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料溶液の調製

(3) 試料液の調製

(4) 検量線用標準液の調製

(5) 測定法

上記の(1)～(5)については、44 キシリトールのガスクロマトグラフィーによる試験法を準用する。ただし、「キシリトール」を「D-ソルビトール」とする。また、内部標準液を、試薬・試液記載のものに変更する。

試薬・試液

1. アセトン：〔残留農薬試験用〕
2. エチルエーテル：〔残留農薬試験用〕
3. キシリトール：市販品を用いる。
4. 内部標準液：キシリトールを 60℃で減圧乾燥した後，400mg を量り，蒸留水を加えて溶かして 100ml とする¹⁾。
5. ピリジン：〔特級〕
6. 無水ピリジン：ピリジンに水酸化ナトリウム結晶（ペレット状）を入れる。
7. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）〔特級〕

〔注〕

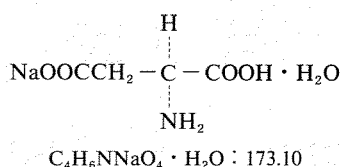
- 1) あらかじめ，試料にキシリトールが含まれていないことを確認してから内部標準液を加える。
キシリトールが含まれていた場合は，エリスリトールを内部標準とする。

第 11 章

調 味 料

48 L-アスパラギン酸ナトリウム

Monosodium L-Aspartate



1. 試験法の概要

食品中のL-アスパラギン酸ナトリウムは、液体クロマトグラフィーによりアスパラギン酸として定量する。必要があれば分量比を乗じてL-アスパラギン酸ナトリウムの量として求める。食品中には天然の遊離のL-アスパラギン酸が分布している。したがって、定量値は食品由来の遊離アスパラギン酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（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¹⁾。

(2) 試料液の調製

① 水溶性食品

L-アスパラギン酸として50～100mgに対応する試料の量を精密に量り、水を用いて分散又は溶かして正確に200mlとし、試料溶液とする。

この液約2mlを採り、ピクリン酸溶液（1→100）10mlを加えるとき²⁾、液が懸濁した場合は、次の除タンパク操作を行い、懸濁しない場合はそのまま試料液とする。

除タンパク操作

試料溶液50mlを正確に量り、エタノール150mlを加え、振り混ぜた後、ろ過する³⁾。残留物は、エタノール（3→4）20mlずつで3回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、50～60℃で減圧濃縮して約40～45mlとした後、水を加えて正確に50mlとし、試料液とする。

② タンパク食品

L-アスパラギン酸として50～100mgに対応する試料の量を精密に量り、遠心管に入れ、試料約1gについて約100℃の水を約5mlの割合で加え、水浴中で15分間加熱⁴⁾した後、冷後、

冷凍遠心分離（約 10 分間，約 5,000 回転/分）し，分離液を別に分ける．遠心管の残留物に最初に加えた水の量の約 2/3 量ずつの約 100℃の水を加え，同様な操作を 3 回繰り返す．全分離液を合わせ，水を加えて正確に 200ml とし，必要があればろ過し，試料溶液とする．この際全分離液量が 200ml を超えるときは，約 180～190ml になるまで減圧濃縮した後，正確に 200ml とし，必要があればろ過し，試料溶液とする．

試料溶液約 2ml にピクリン酸溶液（1 → 100）10ml を加えるとき⁵⁾，液が懸濁した場合は①水溶性食品の除タンパク操作を行い，試料液とし，懸濁しない場合はそのまま試料液とする．

③ 油脂食品

通常，②タンパク食品の場合と同様に操作し，試料液を調製する．ただし，遠心分離した際，分離液が油層と水層の 2 層に分かれたり，分離液の乳濁が著しい場合は，次の脱脂操作を行った後，試料液とする．

脱脂操作⁶⁾

全分離液を分液漏斗に入れ，エチルエーテル又はエチルエーテル・*n*-ヘキサン混液（2：1）50ml ずつを用い，振り混ぜて脱脂を 2 回繰り返す，水層を分取した後，水浴上でエチルエーテル及び *n*-ヘキサンのにおいがなくなるまで加熱し，水を加えて正確に 200ml とし，必要があればろ過する．

（３）標準液の調製

L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg を正確に量り，水を加えて溶かして正確に 100ml とした後，その 2ml を正確に量り，クエン酸緩衝液（pH2.2）⁷⁾を加えて正確に 100ml とし，標準液とする（この液 1ml は，L-アスパラギン酸 20μg を含む）．

（４）測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い，次の条件によって測定する⁸⁾．

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 17μm，架橋度 8 %

カラム管：内径 9mm，長さ 500mm

カラム温度：55℃

移動相：クエン酸緩衝液（pH3.25），0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り，塩酸（1 → 6）を加えて pH2.2 に調整した後，クエン酸緩衝液

(pH2.2)⁷⁾を加えて正確に 100ml とし、測定液とする。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 μ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと、標準液のクロマトグラムとの面積比例計算で定量する⁹⁾。

$$\text{L-アスパラギン酸含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A^{10)}}{W \times A_s}$$

S : 標準液中の L-アスパラギン酸濃度 (μ g/ml)

W : 試料の採取量 (g)

A_s : 標準液で得られたクロマトグラムの L-アスパラギン酸ピーク面積

A : 測定液で得られたクロマトグラムの L-アスパラギン酸ピーク面積

$$\text{L-アスパラギン酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{L-アスパラギン酸含量 (g/kg)} \times 1.301$$

試薬・試液

1. エタノール : [99.5v/v %, 特級]
2. エチレングリコールモノメチルエーテル : 市販のアミノ酸自動分析用を用いる。
3. 塩酸 : 市販の 35 % 精密分析用を用いる。
4. *n*-カプリル酸 : 市販のアミノ酸自動分析用を用いる。
5. クエン酸・一水塩 : 市販のアミノ酸自動分析用を用いる。
6. クエン酸緩衝液 (pH2.2) : クエン酸ナトリウム・二水塩 19.6g, 塩酸 16.5ml, *n*-カプリル酸 0.1ml, チオジグリコール 20ml¹¹⁾ 及び BRIJ-35 溶液 (1 → 4) 4ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。
7. クエン酸緩衝液 (pH3.25) : クエン酸ナトリウム・二水塩 7.7g, クエン酸・一水塩 17.9g, 塩化ナトリウム 7.1g, *n*-カプリル酸 0.1ml, チオジグリコール 5ml¹¹⁾, BRIJ-35 溶液 (1 → 4) 4ml 及びエタノール 80ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。
8. クエン酸ナトリウム・二水塩 : 市販のアミノ酸自動分析用を用いる。
9. 酢酸 : 市販のアミノ酸自動分析用を用いる。
10. 酢酸ナトリウム・三水塩 : 市販のアミノ酸自動分析用を用いる。
11. 三塩化チタン溶液 : 市販品のニンヒドリン試液用を用いる。
12. チオジグリコール : 市販のアミノ酸自動分析用を用いる。
13. 窒素 : 高純度の市販品を用いる。
14. ニンヒドリン : 市販のアミノ酸自動分析用を用いる。
15. ニンヒドリン液¹²⁾ : 使用する分析計に付属の耐圧容器を用い、酢酸ナトリウム・三水塩 136g 及び氷酢酸 25ml に水を加えて溶かして 250ml とする。これにエチレングリコールモ

ノメチルエーテル 750ml を加え、かき混ぜながら 20 分間窒素を通気した後、ニンヒドリン 20g を加え、更に 15 分間窒素を通気し、かき混ぜてニンヒドリンを完全に溶解させる。その後、三塩化チタン溶液 1.7ml を加え、更に 10 分間窒素を通気し、かき混ぜて完全に溶解混合させ、調圧器で 0.28kg/cm² に加圧し、保存する。

16. ピクリン酸：[特級]

17. BRIJ-35：市販品を用いる。

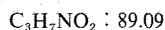
18. ベンジルアルコール：[特級]

[注]

- 1) 試料が調製機器に付着し、その後の操作が困難となる検体については包丁又はハサミ等で、できる限り細切して試料とする。
- 2) 検体の組成によっては試料液中に可溶性タンパクが混入することがあり、これが分析計のカラムの汚染又は反応コイルの詰まり等の原因となる。したがって、除タンパク操作の必要の有無を調べる。
- 3) ろ過にはガラスろ過器 11G 4 又はろ紙 No.5B 相当品を用いる。ろ過が著しく困難な場合は遠心分離によって分離してもよい。
- 4) 食品に含まれる遊離 L-アスパラギン酸は水溶性であり、水又は熱水により容易に抽出される。したがって、熱水抽出によって試料液を調製することが一般的である。
- 5) 試料溶液調製時の冷凍遠心分離操作により、食品素材のタンパク質はほとんど除かれるが、2) と同じ理由により可溶性タンパクの混入を調べる。
- 6) L-アスパラギン酸は油には溶解しない。試料を熱水抽出及び冷凍遠心分離するとき、通常、油脂分は固化し、抽出液と分離して取り除きやすいが、油脂含量がきわめて多い試料で固化しない油等が存在するときには、ここで脱脂操作が必要である。
- 7) 使用する分析計の機種によっては希釈液は塩酸 (1 → 600) 等を用いるものがある。また適正濃度の異なるものもあり、それぞれの機種の定めに従って調製する。
- 8) 使用する分析計により測定条件が異なるときはその分析計に指定された条件により行う。
- 9) 面積計算は半値幅法、積分計又はコンピューター等いずれを用いてもよい。
- 10) L-アスパラギン酸含量 (g/kg) =
$$\frac{1}{1,000} \times \frac{S}{W} \times \frac{A}{A_s} \times \frac{200}{10} \times 100$$
- 11) チオジグリコールはメチオニンの酸化を防止するために作用するので、メチオニン以外のアミノ酸を測定するときは省略して差し支えない。
- 12) ニンヒドリン液の調製にあたっては、空気との接触を極力防ぐよう注意する。

49 DL-アラニン

DL-Alanine



1. 試験法の概要

食品中の DL-アラニンは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には天然の遊離の L-アラニンが分布している。したがって、定量値は食品由来の遊離の L-アラニンと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)～(4)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「DL-アラニン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「DL-アラニン 100.0mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は、次のとおりとする。

$$\text{DL-アラニン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}$$

S : 標準液中の DL-アラニン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

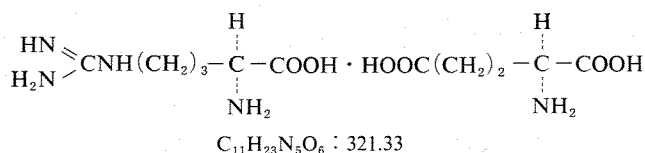
W : 試料の採取量 (g)

A_s : 標準液で得られたクロマトグラムの DL-アラニンピーク面積

A : 測定液で得られたクロマトグラムの DL-アラニンピーク面積

50 L-アルギニン L-グルタミン酸塩

L-Arginine L-Glutamate



1. 試験法の概要

食品中のL-アルギニンL-グルタミン酸塩は、液体クロマトグラフィーにより、それぞれ構成するL-アルギニン及びL-グルタミン酸として定量する。食品中には、天然の遊離のアミノ酸が分布している。特にL-グルタミン酸は種々の食品に広く分布している。したがって、定量値は食品由来の遊離のL-アルギニン及びL-グルタミン酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

上記の(1)~(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-アルギニンあるいはL-グルタミン酸」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-アルギニン塩酸塩 119.6mg 及びL-グルタミン酸ナトリウム 127.2mg」とする。

(4) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤

L-アルギニン用：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂、平均粒径 15.5 μ m、架橋度 10%

L-グルタミン酸用：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 $17\mu\text{m}$ ，架橋度 8 %
カラム管

L-アルギニン用：内径 9mm，長さ 100mm

L-グルタミン酸用：内径 9mm，長さ 500mm

カラム温度

L-アルギニン用：55℃

L-グルタミン酸用：55℃

移動相

L-アルギニン用：クエン酸緩衝液 (pH5.28)，0.6ml/分

L-グルタミン酸用：クエン酸緩衝液 (pH3.25)，0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り，塩酸 (1 → 6) を加えて pH2.2 に調整した後，クエン酸緩衝液 (pH2.2)⁷⁾ を加えて正確に 100ml とし，測定液とする。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ $500\mu\text{l}$ ずつを正確に量り，液体クロマトグラフに注入し 570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比例計算で，それぞれ定量する⁹⁾。

$$\text{各アミノ酸含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}^{10)}$$

S：標準液中の L-アルギニン塩酸塩又は L-グルタミン酸ナトリウムそれぞれの濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

A_s ：標準液で得られたクロマトグラムの L-アルギニン又は L-グルタミン酸それぞれのピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムの L-アルギニン又は L-グルタミン酸それぞれのピーク面積

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬を準用する。ただし，7. クエン酸緩衝液 (pH3.25) は，次のとおりとする。

7. クエン酸緩衝液 (pH3.25)：クエン酸ナトリウム・二水塩 7.7g，クエン酸・一水塩

17.9g, 塩化ナトリウム 7.1g, *n*-カプリル酸 0.1ml, チオジグリコール 5ml¹¹⁾, BRIJ-35 溶液 (1→4) 4ml 及びエタノール 80ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

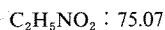
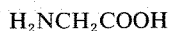
クエン酸緩衝液 (pH5.28) : クエン酸ナトリウム・二水塩 26.8g, クエン酸・一水塩 6.1g, 塩化ナトリウム 4.5g, *n*-カプリル酸 0.1ml, BRIJ-35 溶液 (1→4) 4ml 及びベンジルアルコール 5ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

[注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。

51 グリシン

Glycine



1. 試験法の概要

食品中のグリシンは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には、天然の遊離のグリシンが分布している。したがって、定量値は食品由来の遊離のグリシンと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)~(4)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「グリシン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「グリシン 100.0mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は、次のとおりとする。

$$\text{グリシン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}$$

S : 標準液中のグリシン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

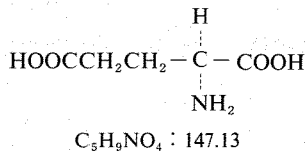
A_s : 標準液で得られたクロマトグラムของグリシンピーク面積

A : 測定液で得られたクロマトグラムของグリシンピーク面積

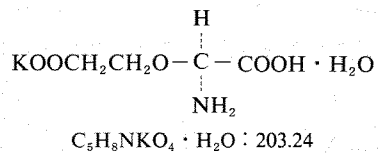
52 L-グルタミン酸及びその塩類

L-Glutamic Acid and Its Salts

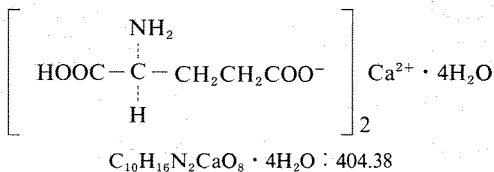
L-グルタミン酸 L-Glutamic Acid



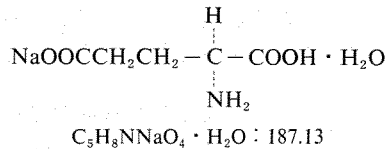
L-グルタミン酸カリウム Monopotassium L-Glutamate



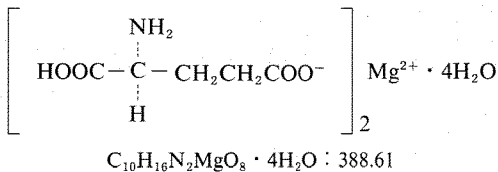
L-グルタミン酸カルシウム Monocalcium Di-L-Glutamate



L-グルタミン酸ナトリウム Monosodium L-Glutamate 別名：グルタミン酸ソーダ



L-グルタミン酸マグネシウム Monomagnesium Di-L-Glutamate



1. 試験法の概要

食品中のL-グルタミン酸及びその塩類は、液体クロマトグラフィーによりL-グルタミン酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じてL-グルタミン酸塩の量として求める。食品中には、天然の遊離のL-グルタミン酸が広く分布している。したがって、定量値は食品由来の遊離のL-グルタミン酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

（1） 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)~(4)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-グルタミン酸」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-グルタミン酸ナトリウム 127.2mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は次のとおりとする。

$$\text{L-グルタミン酸含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}$$

S：標準液中の L-グルタミン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

A_s ：標準液で得られたクロマトグラムの L-グルタミン酸ピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムの L-グルタミン酸ピーク面積

L-グルタミン酸カリウム含量 (g/kg) = L-グルタミン酸 (g/kg) $\times$ 1.381

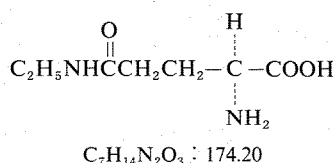
L-グルタミン酸カルシウム含量 (g/kg) = L-グルタミン酸 (g/kg) $\times$ 1.374

L-グルタミン酸ナトリウム含量 (g/kg) = L-グルタミン酸 (g/kg) $\times$ 1.272

L-グルタミン酸マグネシウム含量 (g/kg) = L-グルタミン酸 (g/kg) $\times$ 1.319

53 L-テアニン

L-Theanine



1. 試験法の概要

食品中のL-テアニンは、液体クロマトグラフィー（試験法A）又はトリメチルシリル体としてガスクロマトグラフィー（試験法B）により定量する。緑茶には、天然の遊離のL-テアニンが分布している。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遊離のL-テアニンと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー，ガスクロマトグラフィー）

試験法A（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試料液の調製

（3）検量線用標準液の調製

上記の(1)～(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-テアニン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-テアニン 100mg」とする。

（4）測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 5～6μm，架橋度 10～12 %

カラム管：内径 2.6mm，長さ 250mm

カラム温度：初期 34℃，32 分間後 43℃に設定

移動相：クエン酸緩衝液 (Li 0.155mol/l, pH3.00)，0.275ml/分

反応コイル：内径 0.25mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り，塩酸 (1 → 6) を加えて pH2.2 に調整した後，塩酸 (1 → 600) を加えて正確に 100ml とし，測定液とする¹³⁾。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 μ l ずつを正確に量り，液体クロマトグラフに注入し，570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比例計算で定量する⁹⁾。

$$\text{L-テアニン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A^{10)}}{W A_s}$$

S：標準液中の L-テアニン濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

A_s ：標準液で得られたクロマトグラムの L-テアニンピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムの L-テアニンピーク面積

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし，「7. クエン酸緩衝液 (pH3.25)」の代わりに次の試薬・試液を用いる。

塩化リチウム：市販のアミノ酸自動分析用を用いる。

クエン酸リチウム・四水塩：市販のアミノ酸自動分析用を用いる。

クエン酸緩衝液 (Li 0.155mol/l, pH3.00)：クエン酸リチウム・四水塩 9.80g，塩化リチウム 2.12g，クエン酸・一水塩 34.00g，エタノール 40ml，チオジグリコール 5ml¹¹⁾，BRIJ-35 溶液 (1 → 4) 4ml 及び *n*-カプリル酸 0.1ml を水に溶かして 1,000ml とする。

[注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。ただし，13) は次のとおりとする。

13) ここで濁りを生じた場合は，ろ紙 No. 5B でろ過し，ろ液を測定液とする。

試 験 法 B (ガスクロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

試料約 5g を精密に量り、温湯 50ml を加えて 5 分間振り混ぜ、ろ紙 (No. 5C) でろ過する¹⁾。残留物に温湯 20ml ずつを加え、先のろ紙を用いて同様の操作を 2 回繰り返す。全ろ液を合わせて水を加え、正確に 100ml とし、試料溶液とする。この液 8ml を正確に量り、イオン交換カラムを通過させ、次に水 10ml を通過させ、流出した液は捨てる。更に、1mol/l アンモニア水の溶液 2ml 及び水 1ml を順に通過させて両流出液を 25ml の共栓ナス型フラスコに合わせ、減圧下濃縮乾固する²⁾。残留物に TSIM 液 200 μ l を正確に量って加え、残留物が溶けるまで激しく振り混ぜた後、15 分間静置する³⁾。次に *n*-ヘキサン 1.8ml を正確に量って加え、よく振り混ぜ、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

L-テアニン 20mg を正確に量り、0.5mol/l アンモニア水の溶液⁴⁾を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準液とする (この液 1ml は、L-テアニン 200 μ g を含む)。標準液 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、25ml の共栓ナス型フラスコにそれぞれ入れ、減圧下濃縮乾固する²⁾。以下(2)試料液の調製と同様に操作してトリメチルシリル化し、それぞれを検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれ L-テアニンとして 200, 300, 400 μ g 及び 500 μ g を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件⁵⁾

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：60~80 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフィー用ケイソウ土担体に、シリコーン OV-101 を 4% の割合にコーティングしたもの。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 2m

カラム温度：160℃

キャリアーガス：窒素

② 検量線

検量線用標準液 2 μ l ずつを正確に量り、ガス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

試料液 2 μ l を正確に量り、ガス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料液中の L-テアニン濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中の L-テアニン含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{L-テアニン含量 (g/kg)} = \frac{C}{40 \times W}$$

C : 試料液中の L-テアニン濃度 (μ g/ml)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液等

1. イオン交換カラム：パスツールピペットにガラスウールを詰め、カラムとして使用する。
強酸性陽イオン交換樹脂 1ml を水を用いて湿式法でカラム管に詰め、2mol/l アンモニア水の溶液 5ml、水 10ml、2mol/l 塩酸 5ml を流し、更に、水 10ml でよく洗浄する。
2. 強酸性陽イオン交換樹脂：市販品を用いる。
3. トリメチルクロロシラン：市販のガスクロマトシリル化用。
4. *N*-（トリメチルシリル）イミダゾール：市販のガスクロマトシリル化用。
5. トリメチルシリルイミダゾール (TSIM) 液⁶⁾：*N*, *O*-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド、*N*-（トリメチルシリル）イミダゾール及びトリメチルクロロシランを 2：1：1 の割合で混合する。
6. *N*, *O*-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド：市販のガスクロマトシリル化用。
7. *n*-ヘキサン：[残留農薬分析用]

[注]

- 1) 抹茶等の粉末状のものは、遠心分離操作（10 分間、3,000 回転/分）を行った後、又は No.5A のろ紙でろ過した後、No.5C のろ紙でろ過する。
- 2) 水分があると反応が妨害されるので、完全に水分を除去する。濃縮乾固後、微量の水分がナス型フラスコの壁面に付着しているときは、過塩素酸マグネシウムをトラップにして真空ポンプで 2 分間吸引する。
- 3) TSIM 液により L-テアニンがトリメチルシリル (TMS) 化されるが、この反応は室温 5～15 分で十分に進行する。
- 4) L-テアニンは水でもよく溶けるが、0.5mol/l アンモニア水の溶液を用いた方が濃縮乾固のときに水分が完全に除去できる。
- 5) ガスクロマトグラフィーの測定条件は次のように行ってもよい。

カラム充てん剤：5% SE-30（ケイソウ土）

カラム温度：240℃

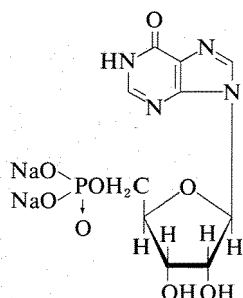
キャリアーガス：窒素

- 6) *N,O*-ビス (トリメチルシリル) アセトアミドの代わりに, *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアミドを用いてもよい.

54 5'-イノシン酸二ナトリウム

Disodium 5'-Inosinate

別名：5'-イノシン酸ナトリウム

 $C_{10}H_{11}N_4Na_2O_8P$: 392.17

1. 試験法の概要

食品中の5'-イノシン酸二ナトリウムは、液体クロマトグラフィーにより定量する。獣鳥肉や魚肉中には、天然の5'-イノシン酸が分布している。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5'-イノシン酸と添加されたものの合計値である。

2. 試験法（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¹⁾。

(2) 試料溶液の調製

① 水溶性食品

5'-イノシン酸二ナトリウムとして1~5mgに対応する、通常、20g以下の試料の量を精密に量り、水を加えて約90mlとし、塩酸（19→200）を加えてpHを約2²⁾に調整した後、水を加えて正確に100mlとし、試料溶液とする。

② 水不溶性食品

5'-イノシン酸二ナトリウムとして1~5mgに対応する、通常、20g以下の試料の量を精密に量り、過塩素酸溶液（2→25）³⁾30mlを加えてホモナイズした後、遠心管に入れ、遠心分離

(冷却下, 10 分間, 10,000 回転/分) して上澄液を分取する⁴⁾。残留物に過塩素酸溶液 (2 → 25) 30ml ずつを加えて同様の操作を 2 回繰り返す, 全上澄液を合わせ, 過塩素酸溶液 (2 → 25) を加えて正確に 100ml とし, 試料溶液とする⁵⁾。

(3) 試料液の調製

試料溶液 Vml⁶⁾ を正確に量り, あらかじめ用意した活性炭カラムを通過させ, 更に水約 20ml を通過させて洗浄する⁷⁾。次にアンモニア水の溶液 (1 → 10)⁸⁾ 20ml を流速約 0.5ml/分 で通過させ, 流出液を集め, 水浴上で蒸発乾固する⁹⁾。これに水 10ml を正確に量って加え, 振り混ぜた後, 活性炭処理液とする。

活性炭処理液 1ml ずつを正確に量り, それぞれ 2 本の試験管に入れ, 一方に酵素液 0.2ml, 他方に硫酸マグネシウム・トリス緩衝液 0.2ml をそれぞれ正確に量って加え, 37℃ の恒温水槽中で 60 分間保つ¹⁰⁾。この液を常温まで冷却し, それぞれ試料液 A, B とする。

(4) 標準液の調製

5'-イノシン酸二ナトリウム 0.250g を正確に量り, 水を加えて溶かして正確に 100ml とする。この液 2ml を正確に量り, 水を加えて正確に 100ml とし, 標準液とする¹¹⁾ (この液 1ml は, 5'-イノシン酸二ナトリウム 50 μ g を含む)。標準液 1ml ずつを正確に量り, それぞれ 2 本の試験管に入れ, (3) 試料液の調製における活性炭処理液と同様に以下の操作を行い, それぞれ標準測定液 A_s, B_s とする。

(5) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフを用い, 次の条件によって測定する。

カラム充てん剤: 多孔性強塩基性陰イオン交換樹脂

カラム管: 内径 4.6mm, 長さ 250mm

カラム温度: 60℃

移動相: 1.5mol/l 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH3.4)

流速及び圧力: 1.5ml/分, 約 70kg/cm²

測定波長: 254nm

② 定量

標準測定液 A_s, B_s 及び試料液 A, B 5 μ l ずつをそれぞれ正確に量り, それぞれを液体クロマトグラフに注入し^{12), 13)}, 得られたそれぞれのクロマトグラムからそれぞれのピーク高さ¹⁴⁾ を求め, 次式によって検体中の 5'-イノシン酸二ナトリウム含量 (g/kg) を求める¹⁵⁾。

$$5\text{'-イノシン酸二ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{S \times (B - A)}{W \times V \times (B_s - A_s)} \quad 16)$$

S : 標準液中の 5'-イノシン酸二ナトリウム濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

V : 試料溶液の採取量 (ml)

A_s : 標準測定液 A_s で得られたクロマトグラムの 5'-イノシン酸のピーク高さ

B_s : 標準測定液 B_s で得られたクロマトグラムの 5'-イノシン酸のピーク高さ

A : 試料液 A で得られたクロマトグラムの 5'-イノシン酸のピーク高さ

B : 試料液 B で得られたクロマトグラムの 5'-イノシン酸のピーク高さ

試薬・試液等

1. アデノシン-5'-リン酸二ナトリウム：市販品を用いる。
2. エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム：[特級]
3. 過塩素酸：[60%，特級]
4. 活性炭¹⁷⁾：市販のクロマトグラフ用を次の方法で精製して用いる。標準網フルイ 105～250 μm の粒度のもの 200g を採り、塩酸 (19→200) 1,500ml を加えて 30 分間かき混ぜた後、ろ過する。次に水 1,000ml を加えて 30 分間かき混ぜた後、ろ過する。これにアンモニア・エタノール混液 (アンモニア水・水・エタノール (1:9:10)) 1,500ml を加え、30 分間かき混ぜた後、ろ過する。更に水 1,000ml ずつとアンモニア・エタノール混液 1,500ml ずつを用い、上記の操作を 2 回繰り返す。これにエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液 (0.372→1,000) 1,000ml を加え、30 分間かき混ぜた後、ろ過し、更に水を加えて洗液が中性になるまで洗浄を繰り返す。風乾して保存する。
5. 活性炭カラム：ガラス製カラム (図 54-1) の下端に少量の脱脂綿を詰め、カラムの半分ぐらいまで水を溜めておき、10 倍量の水に懸濁した活性炭約 300mg をカラムに注入し、活性炭が沈降してから少量の脱脂綿で上部を軽く押さえ、水を流出させ、更に塩酸 (1→1,000) 約 30ml を通過させた後、用いる。
6. 酵素 (5'-ヌクレオチダーゼ)：市販品として、蛇毒由来のものが入手できる。また、*Brevibacterium*, *Streptomyces* 等の微生物の 5'-ヌクレオチダーゼが簡単な精製操作によって得られ、本法に使用できる。
7. 酵素液：酵素 (5'-ヌクレオチダーゼ) 1.0～1.25 単位 (I. U. B. 酵素委員会による単位, 1 単位：基質アデノシン-5'-リン酸二ナトリウム, pH7.5 で 37℃, 1 分間に 1 μmol の無機リン酸を

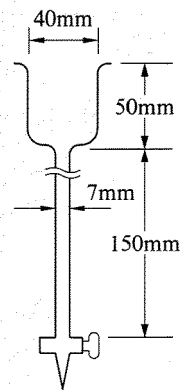


図 54-1 ガラス製カラム

生ずる酵素量) 及び硫酸マグネシウム 123.2mg に 0.5mol/l トリス緩衝液 (pH7.5) 5ml を加えて溶かす。

8. 酢酸アンモニウム [特級]

9. 1.5mol/l 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH3.4) : 氷酢酸 90.0g を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 1,000ml とし、A 液とする。酢酸アンモニウム 115.5g を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 1,000ml とし、B 液とする。A 液 1,000ml に B 液を加え、pH を 3.4 に調整し、メンブランフィルター (孔径 0.45 μ m) でろ過する¹⁸⁾。

10. 0.5mol/l トリス緩衝液 (pH7.5) : トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 60.6g に水約 500ml を加えて溶かし、塩酸を用いて pH を 7.5 に調整した後、水を加えて 1,000ml とする。

11. 硫酸マグネシウム・トリス緩衝液 : 硫酸マグネシウム 123.2mg に 0.5mol/l トリス緩衝液 (pH7.5) 5ml を加えて溶かす。

12. トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン : 市販の特級品。

13. 硫酸マグネシウム : [特級]

[注]

- 1) 試料が調製機器に付着し、その後の操作が困難となる検体については包丁又はハサミ等でできる限り細切して試料とする。
- 2) 5'-イノシン酸は pH2~4 で活性炭に吸着されやすい性質がある。
- 3) 試料中のタンパク質等の分離をよくする目的で過塩素酸溶液を用いる。ホモジナイザー等はステンレス製を用いる。
- 4) 油脂含量の多い食品では遠心分離したとき油脂が遠心管の上層部に分離してくるので、上澄液に油脂が混入しないように駒込ピペット等で上澄液を取り出す。必要に応じてセライト層でろ過する。
- 5) 水不溶性食品から 5'-イノシン酸二ナトリウムを抽出するために熱水を用いてもよい。
- 6) 通常は 10ml を用いるが、5'-イノシン酸二ナトリウムとして 0.25~0.5mg を含むように試料溶液量を増減させることが望ましい。
- 7) 洗浄液の pH が中性付近になるように、必要により更に水で洗浄してもよい。
- 8) 活性炭からの 5'-イノシン酸の流出液としてはアンモニア水の溶液 (1 → 20), アンモニア・エタノール混液, アンモニア・*n*-ブタノール・エタノール混液 (アンモニア水 : 水 : *n*-ブタノール : エタノール (7 : 43 : 5 : 45)) 等も用いられる。アンモニア水の溶液に比較してアンモニア・アルコール系混液では活性炭に吸着された食品の褐変物が 5'-イノシン酸と共に溶出されやすい。
- 9) 水浴上で蒸発乾固する方法又はロータリーエバポレーターを使用する方法いずれを用いてもよい。この操作では硬質ガラス製の器具を用いる。
- 10) この条件での酵素反応は 30 分間でほぼ終了する。酵素量は一般にはここで用いた量の 1/5~1/10 でも十分であるが、酵素量が少ないと、アデノシン-5'-二リン酸 (ADP) 等が共存する試料では、酵素反応が阻害されて反応が完全に行われないことがある。ここで用いている酵素量では、ADP が 5'-イノシン酸と同程度又は若干多くても問題はない。

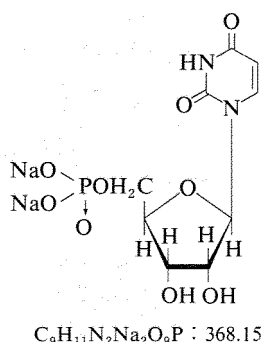
- 11) 冷蔵庫で1週間程度保存できる。
- 12) 標準測定液 B_s のクロマトグラムでは、5'-イノシン酸がピークとして得られる。しかし、標準測定液 A_s では、5'-イノシン酸のピークは消失する。試料液 B のクロマトグラムでは、5'-イノシン酸のピークのほかに多数の妨害ピークが出現する。試料液 A のクロマトグラムでは、5'-イノシン酸及び他のヌクレオチドに相当するピークが消失する。標準測定液 B_s とピークの保持時間が一致し、かつ試料液 A で消失したピークを5'-イノシン酸のピークとする。なお、目的とするピークが小さすぎる場合には、試料液注入量を $100\mu\text{l}$ まで増量する。
- 13) 妨害物質が少ない試料の場合には、酵素反応を省略して活性炭処理液をそのまま試料液とすることができる。この場合は標準測定液には標準液を用いる。
妨害物質がとくに存在しない場合には、熱水で抽出した抽出液をそのまま試料液とすることもできる。この場合も標準測定液には標準液を用いる。
- 14) クロマトグラムは鋭いピークとして得られるので、通常ピーク高さを求めるが、面積法でもよい。
- 15) 12) に述べたように、標準測定液 A_s のクロマトグラムでは5'-イノシン酸のピークは完全に消失するので、通常、 A_s の値はゼロである。また、試料液 A でも妨害ピークが少ないと A の値はゼロになる。
- 16) 検体中の5'-イノシン酸二ナトリウム含量 (g/kg) =

$$\frac{1}{1,000} \times \frac{100}{V} \times 10 \times \frac{S}{W} \times \frac{B-A}{B_s-A_s}$$
- 17) 活性炭の精製法として、活性化して吸着能を上げるよりも吸着能を低下させ、いったん吸着した5'-イノシン酸が定量的に脱離、溶出されるようにしてある。
- 18) 液体クロマトグラフィーで使用される充てん剤は微粒子であるため、液中の微細な浮遊物で目詰まりを起こす。それを防止する目的でフィルターを通してろ過する。

55 5'-ウリジル酸二ナトリウム

Disodium 5'-Uridylate

別名：5'-ウリジル酸ナトリウム



1. 試験法の概要

食品中の5'-ウリジル酸二ナトリウムは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には天然の5'-ウリジル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5'-ウリジル酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

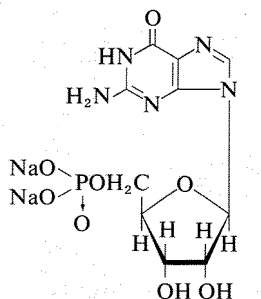
- (1) 検体の採取と試料の調製
- (2) 試料溶液の調製
- (3) 試料液の調製
- (4) 標準液の調製
- (5) 測定法

上記の(1)～(5)については、54 5'-イノシン酸二ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「5'-イノシン酸二ナトリウム」は「5'-ウリジル酸二ナトリウム」とし、「5'-イノシン酸」は「5'-ウリジル酸」とする。

56 5'-グアニル酸二ナトリウム

Disodium 5'-Guanylate

別名：5'-グアニル酸ナトリウム

 $C_{10}H_{12}N_5Na_2O_8P$: 407.19

1. 試験法の概要

食品中の5'-グアニル酸二ナトリウムは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には天然の5'-グアニル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5'-グアニル酸と添加されたものの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

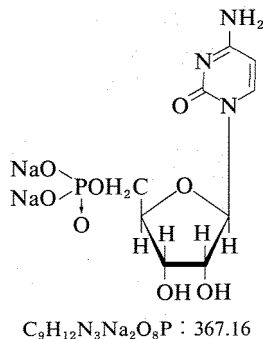
- (1) 検体の採取と試料の調製
- (2) 試料溶液の調製
- (3) 試料液の調製
- (4) 標準液の調製
- (5) 測定法

上記の(1)～(5)については、54 5'-イノシン酸二ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「5'-イノシン酸二ナトリウム」は「5'-グアニル酸二ナトリウム」とし、「5'-イノシン酸」は「5'-グアニル酸」とする。

57 5'-シチジル酸二ナトリウム

Disodium 5'-Cytidylate

別名：5'-シチジル酸ナトリウム



1. 試験法の概要

食品中の 5'-シチジル酸二ナトリウムは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には天然の 5'-シチジル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 5'-シチジル酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

- (1) 検体の採取と試料の調製
- (2) 試料溶液の調製
- (3) 試料液の調製
- (4) 標準液の調製
- (5) 測定法

上記の(1)～(5)については、54 5'-イノシン酸二ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「5'-イノシン酸二ナトリウム」は「5'-シチジル酸二ナトリウム」とし、「5'-イノシン酸」は「5'-シチジル酸」とする。

58 5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び 5'-リボヌクレオチドカルシウム

Disodium 5'-Ribonucleotide and Calcium 5'-Ribonucleotide

別名：5'-リボヌクレオチドナトリウム又は5'-リボヌクレオチド
ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウム

1. 試験法の概要

食品中の5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムは、5'-リボヌクレオチドの構成成分である5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、5'-シチジル酸及び5'-ウリジル酸をそれぞれ測定する液体クロマトグラフィーにより、5'-リボヌクレオチドナトリウムとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて5'-リボヌクレオチドカルシウムの量として求める。食品中には天然の5'-リボヌクレオチド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5'-リボヌクレオチドと添加されたものとの合計値である。

2. 試 験 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） 試料溶液の調製

① 水溶性食品

5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムとして2～10mgに対応する、通常、20g以下の試料の量を精密に量り、水を加えて約90mlとし、塩酸（19→200）を加えてpHを約2¹⁾に調整した後、水を加えて正確に100mlとし、試料溶液とする。

② 水不溶性食品

5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムとして2～10mgに対応する、通常、20g以下の試料の量を精密に量り、過塩素酸溶液（2→25）²⁾30mlを加えてホモジナイズした後、遠心管に入れ、遠心分離（冷却下、10分間、10,000回転/分）して上澄液を分取する³⁾。残留物に過塩素酸溶液（2→25）30mlずつを加えて同様の操作を2回繰り返

し、全上澄液を合わせ、過塩素酸溶液 (2 → 25) を加えて正確に 100ml とし、試料溶液とする⁴⁾。

(3) 試料液の調製

試料溶液 Vml⁵⁾ を正確に量り、あらかじめ用意した活性炭カラムを通過させ、更に水約 20ml を通過させて洗浄する⁶⁾。次にアンモニア水の溶液 (1 → 10)⁷⁾ 20ml を流速約 0.5ml/分 で通過させ、流出液を集め、水浴上で蒸発乾固する⁸⁾。これに水 30ml⁹⁾ を正確に量って加え、振り混ぜた後、活性炭処理液とする。

活性炭処理液 1ml ずつを正確に量り、それぞれ 2 本の試験管に入れ、一方に酵素液 0.2ml、他方に硫酸マグネシウム・トリス緩衝液 0.2ml をそれぞれ正確に量って加え、37℃ の恒温水槽中で 60 分間保つ¹⁰⁾。この液を常温まで冷却し、それぞれ試料液 A、B とする。

(4) 標準液の調製

5'-イノシン酸二ナトリウム (I) 及び 5'-グアニル酸二ナトリウム (G) それぞれ 0.250g ずつを正確に量り、合わせ、水を加えて溶かして正確に 100ml とし、IG 液とする。

別に、5'-シチジル酸二ナトリウム (C) 及び 5'-ウリジル酸二ナトリウム (U) それぞれ 0.250g ずつを正確に量り、合わせ、水を加えて溶かして正確に 100ml とし、この液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、CU 液とする。

IG 液及び CU 液それぞれ 2ml ずつを正確に量って合わせ、水を加えて正確に 100ml とし、標準液¹¹⁾ とする (この液 1ml は、I 及び G を 50 μ g ずつ、C 及び U を 5 μ g ずつ含む)。

標準液 1ml ずつを正確に量り、それぞれ 2 本の試験管に入れ、(3) 試料液の調製における活性炭処理液と同様に以下の操作を行い、それぞれ標準測定液 A_S、B_S とする。

(5) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：多孔性強塩基性陰イオン交換樹脂

カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm

カラム温度：60℃

移動相：1.5mol/l 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH3.4)

流速及び圧力：1.5ml/分、約 70kg/cm²

測定波長：254nm¹²⁾

② 定量^{13),14)}

標準測定液 A_S、B_S 及び試料液 A、B それぞれ 5 μ l ずつを正確に量り、それぞれを液体クロ

マトグラフに注入し、得られたそれぞれのクロマトグラムからI, G, C及びUのピーク高さ¹⁵⁾を求め、次式によって検体中のI, G, C及びU含量(g/kg)を求める¹⁶⁾。

$$5\text{'-イノシン酸二ナトリウム含量 (g/kg)} : I = \frac{3S_I(B_I - A_I)}{WV(B_{SI} - A_{SI})}$$

$$5\text{'-グアニル酸二ナトリウム含量 (g/kg)} : G = \frac{3S_G(B_G - A_G)}{WV(B_{SG} - A_{SG})}$$

$$5\text{'-シチジル酸二ナトリウム含量 (g/kg)} : C = \frac{3S_C(B_C - A_C)}{WV(B_{SC} - A_{SC})}$$

$$5\text{'-ウリジル酸二ナトリウム含量 (g/kg)} : U = \frac{3S_U(B_U - A_U)}{WV(B_{SU} - A_{SU})}$$

S_I, S_G, S_C, S_U : 標準液中のI, G, C, Uそれぞれの濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

V : 試料溶液の採取量 (ml)

$A_{SI}, A_{SG}, A_{SC}, A_{SU}$: 標準測定液 A_S で得られたクロマトグラムのI, G, C, Uそれぞれのピーク高さ

$B_{SI}, B_{SG}, B_{SC}, B_{SU}$: 標準測定液 B_S で得られたクロマトグラムのI, G, C, Uそれぞれのピーク高さ

A_I, A_G, A_C, A_U : 試料液Aで得られたクロマトグラムのI, G, C, Uそれぞれのピーク高さ

B_I, B_G, B_C, B_U : 試料液Bで得られたクロマトグラムのI, G, C, Uそれぞれのピーク高さ

$$5\text{'-リボヌクレオチド二ナトリウム含量 (g/kg)} = I + G + C + U$$

$$5\text{'-リボヌクレオチドカルシウム含量 (g/kg)} = 5\text{'-リボヌクレオチド二ナトリウム含量 (g/kg)} \times 0.985^{17)}$$

試薬・試液等

1. アデノシン-5'-リン酸二ナトリウム : 市販品を用いる。
2. アンモニア水 : [比重約 0.90, 特級]
3. エタノール : [99.5v/v %, 特級]
4. エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム : [特級]
5. 過塩素酸 : [60 %, 特級]
6. 活性炭 : 市販のクロマトグラフ用を次の方法で精製して用いる¹⁸⁾。標準網フルイ 105~250 μm の粒度のものを 200g を採り、塩酸溶液 (19→200) 1,500ml を加えて 30 分間かき混ぜた後、ろ過する。次に水 1,000ml を加えて 30 分間かき混ぜた後、ろ過する。これにアンモニア・エタノール混液 (アンモニア水・水・エタノール (1 : 9 : 10)) 1,500ml を加え、

30 分間かき混ぜた後、ろ過する。更に水 1,000ml ずつとアンモニア・エタノール混液 1,500ml ずつを用い、上記の操作を 2 回繰り返す。これにエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液 (0.372 → 1,000) 1,000ml を加え、30 分間かき混ぜた後、ろ過し、更に水を加えて洗液が中性になるまで洗浄を繰り返す。風乾して保存する。

7. 活性炭カラム：ガラス製カラム（図 54-1）の下端に少量の脱脂綿を詰め、カラムの半分くらいまで水を溜めておき、10 倍量の水に懸濁した活性炭約 300mg¹⁹⁾ をカラムに注入し、活性炭が沈降してから少量の脱脂綿で上部を軽く押さえ、水を流出させ、更に塩酸 (1 → 1,000) 約 30ml を通過させた後、用いる。
8. 酵素 (5'-ヌクレオチダーゼ)：市販品として、蛇毒由来のものが入手できる。また、*Brevibacterium*, *Streptomyces* 等の微生物の 5'-ヌクレオチダーゼが簡単な精製操作によって得られ、本法に使用できる。
9. 酵素液：酵素 (5'-ヌクレオチダーゼ) 1.0~1.25 単位 (I.U.B.酵素委員会による単位, 1 単位：基質アデノシン-5'-リン酸二ナトリウム, pH7.5 で 37°C, 1 分間に 1 μ mol の無機リン酸を生ずる酵素量) 及び硫酸マグネシウム 123.2mg に 0.5mol/l トリス緩衝液 (pH7.5) 5ml を加えて溶かす。
10. 0.5mol/l トリス緩衝液 (pH7.5)：トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 60.6g に水 約 500ml を加えて溶かし、塩酸を用いて pH を 7.5 に調整した後、水を加えて全量を 1,000ml とする。
11. 硫酸マグネシウム・トリス緩衝液：硫酸マグネシウム 123.2mg に 0.5mol/l トリス緩衝液 (pH7.5) 5ml を加えて溶かす。
12. トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン：市販の特級品を用いる。
13. 硫酸マグネシウム：[特級]
14. 酢酸アンモニウム：[特級]
15. 1.5mol/l 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH3.4)：氷酢酸 90.0g を正確に量り、水を加えて正確に 1,000ml とし、A 液とする。酢酸アンモニウム 115.5g を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 1,000ml とし、B 液とする。A 液 1,000ml に B 液を加えて pH を 3.4 に調整し、メンブランフィルター (孔径 0.45 μ m) でろ過する²⁰⁾。

[注]

- 1) 5'-リボヌクレオチドは pH2 付近で活性炭に最も吸着されやすい。
- 2) 試料中のタンパク質等の分解をよくする目的で過塩素酸溶液を用いる。ホモジナイザー等はステンレス製を用いる。
- 3) 油脂含量の多い食品では、遠心分離したとき、油脂が遠心管の上層部に分離してくるので、上澄液に油脂が混入しないように駒込ピペットなどで上澄液を取り出す。必要に応じてセライト層でろ過する。

- 4) 水不溶性食品から5'-リボヌクレオチド二ナトリウムを抽出するために、熱水を用いてもよい。
- 5) 通常は10mlを用いるが、5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムとして0.5~1mgを含むように試料溶液量を増減させることが望ましい。
- 6) 洗浄液のpHが中性付近になるように必要により更に水で洗浄してもよい。
- 7) 活性炭からの5'-リボヌクレオチドの流出液としては、アンモニア水の溶液(1→20)、アンモニア・エタノール混液、アンモニア・*n*-ブタノール・エタノール混液(アンモニア水・水・*n*-ブタノール・エタノール(7:43:5:45))等も用いられる。アンモニア水の溶液に比較してアンモニア・アルコール系混液では活性炭に吸着された食品の褐変物が5'-リボヌクレオチドと共に溶出されやすい。
- 8) 水浴上で蒸発乾固する方法又はロータリーエバポレーターを使用する方法いずれを用いてもよい。この操作では硬質ガラス製の器具を用いる。
- 9) 5'-リボヌクレオチド二ナトリウム含量が少なければ、水10mlを用いてもよい。その場合には、定量の計算式で3を掛けない。
- 10) この条件での酵素反応は30分間でほぼ終了する。酵素量は一般にはここで用いた量の1/5~1/10でも十分であるが、酵素量が少ないと、アデノシン-5'-二リン酸(ADP)等が共存する試料では、酵素反応が阻害されることがある。ここで用いられる酵素量では、ADPが5'-リボヌクレオチドと同程度又は若干多く含まれても問題はない。
- 11) 5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムはI, G, C, Uの4成分の混合物であるが、I, G含量に比較してC, U含量は非常に少ないので、本液の組成を標準液とした。本液は冷蔵庫で1週間程度保存できる。
- 12) 5'-シチジル酸二ナトリウムの場合には、280nmの測定波長を用いると約2倍の感度が得られる。
- 13) 5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムの各成分は、C, U, I及びGの順で溶出する。標準液B_sのクロマトグラムでは上記4成分がピークとして得られる。しかし標準液A_sでは4成分のピークが消失する。
試料液Bでは、C, U, I及びGのピークのほかに多数の妨害ピークが、とくにCの溶出位置付近に出現する。標準液B_sとピークの保持時間が一致し、かつ試料液Aで消失したピークをそれぞれC, U, I及びGのピークとする。なお、目的とするピークが小さすぎる場合には、サンプル注入量を100 μ lまで増量する。
- 14) 妨害物質が少ない試料の場合には、酵素反応を省略して活性炭処理液をそのまま試料液とすることができる。この場合も標準測定液には標準液を用いる。
妨害物質がとくに存在しない場合には、熱水で抽出した抽出液をそのまま試料液とすることもできる。この場合も標準測定液には標準液を用いる。
- 15) クロマトグラムは鋭いピークとして得られるので、通常、ピーク高さを求めるが、面積法でもよい。
- 16) 13)でも述べたように、標準測定液A_sのクロマトグラムではI, G, C及びUのピークは完全に消失するので、通常A_{Si}, A_{SG}, A_{SC}及びA_{SU}の値はゼロとなる。また、試料液Aでも妨害ピークが少ないとA_I, A_G, A_C及びA_Uの値はゼロとなる。
- 17) 無水の5'-リボヌクレオチドカルシウムと無水の5'-リボヌクレオチド二ナトリウムの分子量比である。5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムにはイノシン酸、グアニル酸、シチジル酸、ウリジル酸のナトリウム又はカルシウム塩が含まれているが、このうち、イノシン酸及びグアニル酸で95%以上を占めることになっている。無水の5'-イノシン酸二ナトリウムと5'-イノシン酸カルシウムの分子量比、無水の5'-グアニル酸二ナトリウ

ムと 5'-グアニル酸カルシウムの分子量比は共に 0.985 となる。

- 18) 活性炭の精製法として、活性化して吸着能を上げるよりも吸着能を低下させ、いったん吸着した 5'-リボヌクレオチドが定量的に脱離、溶出されるようにしてある。
- 19) しょう油のように褐変物質の多い検体の場合には、活性炭を 400~600mg に増量する。
- 20) 液体クロマトグラフィーで使用される充てん剤は微粒子であるため、液中の微細な浮遊物で目詰まりを起こす。それを防止する目的でフィルターを通してろ過する。

59 アジピン酸

Adipic Acid



$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$: 146.14

1. 試験法の概要

食品中のアジピン酸は、アジピン酸をメチル化体とし、ガスクロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

① 液状食品

試料約 5g を精密に量り、メタノールを加えて正確に 50ml とする。この液 10ml をナス型フラスコに採り、エバポレーターで溶媒を蒸発させる¹⁾。次いで、残留物にメタノール 1~2ml を加えて溶かし²⁾、次にアセトン約 20ml を加え、析出物及び水分を除去する目的で乾燥ろ紙でろ過する。ろ液をナス型フラスコに入れ、エバポレーターで約 3ml に濃縮する。濃縮液にジアゾメタン試液³⁾ 2ml を加え、室温で約 10 分間放置した後、溶媒を留去し⁴⁾、アセトンを加えて正確に 10ml とし、試料液とする。

② 固体食品⁵⁾

試料約 5g を精密に量り、150ml のホモジナイザー用カップに入れ、0.5mol/l 硫酸を加え pH2 以下とし⁶⁾、混和する。次にメタノール約 20ml を加え約 3 分間ホモジナイズし、ろ過する。この操作を更に 1 回繰り返す。先のろ液と合わせた後、1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH5 とする⁷⁾。この液にメタノールを加えて正確に 50ml とし、この液 10ml をナス型フラスコに採り、以下、①液状食品の場合と同様に操作し、試料液とする。

（3）検量線用標準液の調製

アジピン酸 0.100g を正確に量り、アセトンを加えて正確に 100ml とし、標準液とする（こ

の液 1ml は、アジピン酸 1mg を含む)。標準液 0, 0.5, 1, 2ml 及び 3ml を正確に量り、それぞれアセトンを加えて約 3ml とし、ジアゾメタン試液 2ml を加え、室温で約 10 分間放置した後、溶媒を留去し⁴⁾、アセトンを加えて正確に 10ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれアジピン酸 0, 50, 100, 200 μ g 及び 300 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：80~100 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフィー用ケイソウ土担体に、アルキレングリコールフタル酸エステルを 5% の割合で含ませたもの⁸⁾。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 1m

カラム温度：140℃

注入口温度：200℃

キャリアーガス：窒素、30ml/分

② 検量線

検量線用標準液 2 μ l ずつをそれぞれ正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

試料液 2 μ l を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のアジピン酸濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のアジピン酸含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{アジピン酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times 10 \times 5}{W \times 1,000 \times 1,000} \times 1,000$$

C：試料液中のアジピン酸濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. ジアゾメタン試液⁹⁾：N-メチル-N-ニトロソ-p-トルエンスルホンアミド 4.3g をエチルエーテル 26ml に溶かし、あらかじめ KOH 1g を水 1.6ml 及びエタノール 5ml に溶かした溶液を入れたフラスコ中に注意して加え、水浴上 65℃において蒸留して留液約 20ml を採る。ただし、受器にはエチルエーテル 5ml を入れた共栓フラスコを用い、冷却器の先端は受器のエチルエーテルの液面下に浸し、受器は氷水中に浸して冷却する。ドラフト内で操

作する。用時調製する。

2. *N*-メチル-*N*-ニトロソ-*p*-トルエンスルホンアミド：市販の特級品を用いる。

[注]

- 1) 乾固しないように注意する。
- 2) チーズでは不溶物の残る場合がある。
- 3) 反応後の試料液に微黄色が残らないときは、ジアゾメタン試液を追加する。
- 4) ジアゾメタン試液中のエチルエーテルを除去する。
- 5) チーズ、ゼリー、プリン等の軟試料は、細切又はホモジナイズカップ中でガラス棒等により細碎してもよい。

キャンディーは少量の水に溶解し、以後①液状食品の方法に従って処理するとよい。

- 6) チーズで約 5ml、ゼリー、プリン等では 1~2ml で pH2 以下となる。
- 7) にごりを生ずる場合があるが差し支えない。

脂肪を多く含む試料の場合は、pH を調整したる液を分液漏斗に入れ、同量の *n*-ヘキサンで洗浄し、ヘキサン層を捨てる。

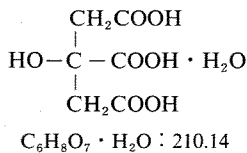
- 8) 5% Thermon-3,000 として市販されている。
- 9) ジアゾメタン (CH_2N_2) は黄色のガス体 (bp. -23°C) でエチルエーテルに溶け、溶液は低温でも徐々に分解する。ここには市販試薬を用いた一般的調製法を採用したが、より簡便な方法としてニトロソメチル尿素を合成しておいて用時その少量にエチルエーテルと NaOH 溶液を加えて生ずる黄色のエチルエーテル層を使用する方法もある (日本化学会編：実験化学講座 20, p.373 (1963))。鮮黄色を呈する溶液は密栓して冷蔵庫に保存すれば 1~2 週間は使用できる。激しい反応性を有する有毒なガスであるから取り扱いには注意を要する。過剰な溶液を処理するには、このエチルエーテル溶液は使用後酢酸中に少量ずつ加えて廃棄する。

60 クエン酸及びその塩類

Citric Acid and Its Salts

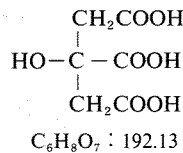
クエン酸（結晶）

Citric Acid (crystal)



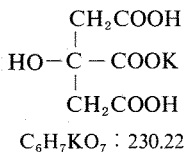
クエン酸（無水）

Citric Acid (anhydride)



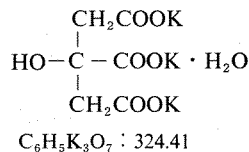
クエン酸一カリウム

Monopotassium Citrate



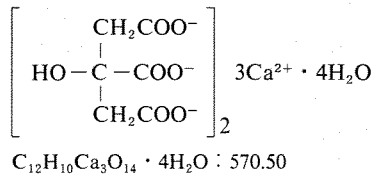
クエン酸三カリウム

Tripotassium Citrate



クエン酸カルシウム

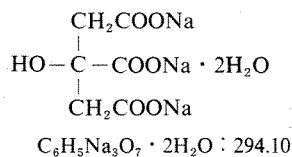
Calcium Citrate



クエン酸三ナトリウム（結晶）

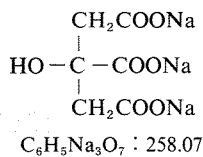
Trisodium Citrate (crystal)

別名：クエン酸ナトリウム



クエン酸三ナトリウム（無水）

Trisodium Citrate (anhydride)



クエン酸第一鉄ナトリウム*

Sodium Ferrous Citrate

別名：クエン酸鉄ナトリウム

クエン酸鉄*

Ferric Citrate

クエン酸鉄アンモニウム*

Ferric Ammonium Citrate

*：化学構造が類似している他の用途の食品添加物も、本法の測定対象に含まれる。

1. 試験法の概要

食品中のクエン酸及びその塩類¹⁾は、過塩素酸で抽出し、液体クロマトグラフィーによりクエ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塩類の量として求める。食品中には、天然のクエン酸が分布している。したがって、定量値は、食品由来のクエン酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（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）試料液の調製

試料約 5g を精密に量り、5%過塩素酸溶液 5ml 及び水 30ml を加え、10 分間振とう抽出又はホモジナイズ抽出²⁾した後、水を加えて正確に 50ml とする。これをろ過³⁾し、ろ液を試料液とする。

（3）検量線用標準液の調製

クエン酸三ナトリウム・二水和物 153.1mg を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 200ml とし、標準液とする（この液 1ml は、クエン酸 500 μ g を含む）。標準液 0, 1, 5, 10ml 及び 20ml をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 50ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれクエン酸 0, 10, 50, 100 μ g 及び 200 μ g を含む）。

（4）測定法⁴⁾

① 測定条件⁵⁾

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤：スルホン化スチレン-ジビニルベンゼン（有機酸分析専用カラム⁶⁾）

カラム管：内径 6.0~8.0mm、長さ 300~500mm

カラム温度：40℃

移動相：3mmol/l 過塩素酸

流速：1.0ml/分

測定波長：220nm

注入量：10 μ l

② 検量線⁷⁾

検量線用標準液それぞれ 10 μ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積からクエン酸の検量線を作成する。

③ 定量

試料液 10 μ l を正確に量り、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料液中のクエン酸濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって試料中のクエン酸含量 C (%) を計算する^{8), 9)}。

$$C (\%) = \frac{A}{W \times 200}$$

A：試料液中のクエン酸濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

クエン酸（結晶）含量 (%) = クエン酸含量 (%) $\times$ 1.094

クエン酸一カリウム含量 (%) = クエン酸含量 (%) $\times$ 1.198

クエン酸三カリウム含量 (%) = クエン酸含量 (%) $\times$ 1.688

クエン酸カルシウム含量 (%) = クエン酸含量 (%) $\times$ 1.485

クエン酸三ナトリウム（無水）含量 (%) = クエン酸含量 (%) $\times$ 1.343

クエン酸三ナトリウム（結晶）含量 (%) = クエン酸含量 (%) $\times$ 1.531

試薬・試液

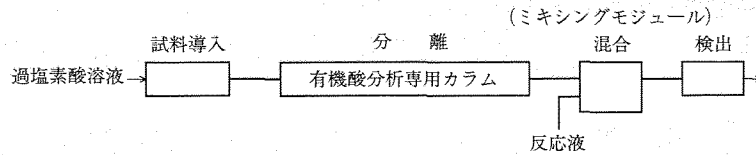
1. 過塩素酸：[特級, 60 %]
2. クエン酸三ナトリウム・二水和物：[特級]
3. ブロムチモールブルー：[特級]
4. リン酸水素二ナトリウム：[特級]
5. 5 % 過塩素酸溶液：過塩素酸 8.3ml を量り、水を加えて 100ml とする。

[注]

- 1) クエン酸は、かんきつ類などをはじめとして多くの食品に存在する代表的な食用の有機酸で、さわやかな強い酸味がある。普通の酸味を付ける目的で使用される「酸味料」としては一番多く使われる酸である。工業的には、デンプン類を原料として発酵法によって作られたクエン酸を精製して作られる。食品添加物としては、菓子類や乳製品などにも酸味を付けたり、酸度を調整する目的で使用されるが、その使用の主体は、清涼飲料水をはじめとする飲料での酸味・酸度の調整目的になっている。また、酸化防止剤や保存料と併用すると、酸化防止の効果や保存性を強くする作用があるため、これらの食品添加物の補助剤（シネルギスト）としても使われている。
- 2) 試料が肉、魚及び野菜などの場合は、ホモジナイザーを用いて粉碎抽出する。
- 3) 例えば、ろ紙 ADVANTEC No.5B などが使用できる。
- 4) 他の測定法としてカラム溶出液と反応液とをミキシングモジュールで混合し、有機酸（酸性物質）が溶出するときに示す発色を可視部吸収検出器で検出するポストカラム誘導体化検出法がある。試料中の有機酸成分は、過塩素酸溶液を移動相とした有機酸専用分析カラムにより分

離され溶出する。

一方、反応液中の pH 指示薬は塩基性の状態、すなわち解離状態 ($I^- + H^+$) に調整しておく。この反応液とカラム溶出液とをミキシングモジュールで混合させると酸性成分は、解離状態 ($AH \rightarrow A^- + H^+$) となる。このとき、溶液の pH は、酸性側にかたより、pH 指示薬は $I^- + H^+ \rightarrow IH$ の反応により発色する。



ポストカラム誘導体化検出法の測定条件を下記に示す。

カラム管：Shodex Rspak C-811, 内径 8mm, 長さ 500mm 移動相：3mmol/l 過塩素酸

反応液：0.2mmol/l ブロムチモールブルー含有 15mmol/l リン酸水素二ナトリウム

流速：移動相 1.0ml/分, 反応液 1.4ml/分 カラム温度：40℃

ミキシングモジュール温度：室温 測定波長：445nm 注入量：10 μ l

5) 他の測定条件として下記の条件も使用できる。

①カラム管：TSKgel Oapak, 内径 7.8mm, 長さ 300mm カラム温度：40℃

移動相：0.75mmol/l 硫酸 流速：0.8ml/分 測定波長：220nm 注入量：10 μ l

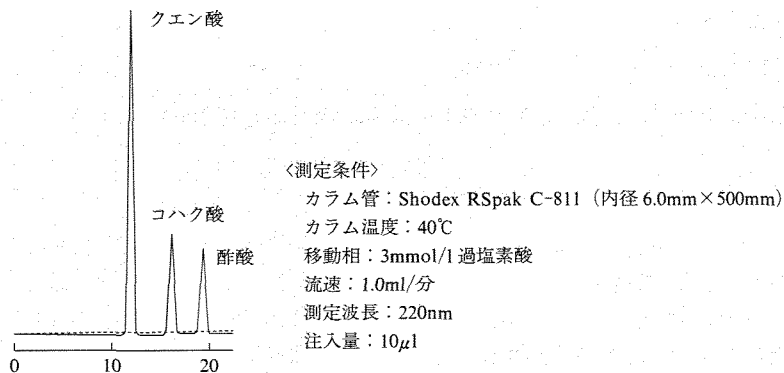
②カラム管：Inertsil ODS-2, 内径 4.6mm, 長さ 250mm カラム温度：40℃

移動相：0.1%リン酸 流速：0.7ml/分 測定波長：220nm 注入量：10 μ l

6) H 型の強陽イオン交換カラムであり、イオン排除、サイズ分離、分配・吸着の混合分離モードにより分離する。移動相には、過塩素酸のような酸性溶液を用いると、有機酸は解離が抑制され、相対的に親水性が低くなるため、逆相的にカラムに保持される。

7) クエン酸のほか、各種酸味料の標準液を用いれば、同時分析も可能である。

8) クエン酸のほか、各種酸味料の標準液の液体クロマトグラムを図に示す。



注図 60-1 混合標準液 (クエン酸, コハク酸, 酢酸) の液体クロマトグラム

9) 本法によるクエン酸の定量限界は、0.01%である。

61 グルコン酸及びその化合物

Gluconic Acid and Its Compounds

グルコノデルタラクトン

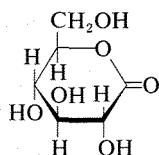
Glucono- δ -Lactone

別名：グルコノラクトン

グルコン酸

Gluconic Acid

$C_6H_{12}O_7$: 196.16



$C_6H_{10}O_6$: 178.14

グルコン酸亜鉛*

Zinc Gluconate

グルコン酸カルシウム*

Calcium Gluconate

グルコン酸第一鉄*

Ferrous Gluconate

グルコン酸銅*

Copper Gluconate

別名：グルコン酸鉄

*：化学構造が類似している他の用途の食品添加物も、本法の測定対象に含まれる。

1. 試験法の概要

食品中のグルコン酸及びその化合物は、グルコン酸キナーゼ及び6-ホスホグルコン酸脱水素酵素を用いる酵素法によりグルコン酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じて、それぞれの化合物の量として求める。食品中には天然のグルコン酸は通常存在しない。したがって、定量値は食品に添加された値である。

2. 試験法（酵素法）

（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）試料液の調製

① 液状食品

グルコン酸として3～100mgに対応する、通常、10g以下の試料の量を精密に量る。試料が澄明で着色していないか、着色していても薄い場合は、水70～80mlを加えて試料溶液とする。試料が懸濁している場合は、水を加えて約50～70mlとし、ろ過する。容器及び残留物は

水 20~30ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、試料溶液とする。試料の着色の著しい場合は、試料の量の約 1/10 量のポリアミド末又はポリビニルピロリドンを加え、必要があれば水 20~30ml を加え、激しく振り混ぜ、ろ過する。容器及び残留物は、水 40~50ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、試料溶液とする。

それぞれの方法で得た試料溶液に 2mol/l 水酸化カリウム溶液を加えて pH10 に調整し、5 分間放置した後¹⁾、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

② 固体食品

グルコン酸として 3~100mg に対応する、通常、10g 以下の試料²⁾の量を精密に量る。試料が脂肪又はタンパクを含まないかほとんど含まない場合は、ブレンダー容器に入れ、水 10~30ml を加えて 5 分間ホモジナイズした後、ろ過する。容器及び残留物は、水 50~60ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、2mol/l 水酸化カリウム溶液で pH10 に調整した後、5 分間放置し、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。試料が脂肪又はタンパク³⁾を含む場合は、ブレンダー容器に入れ、氷冷した 0.4mol/l 過塩素酸溶液 10ml を加えて 5 分間ホモジナイズした後、ろ過する。容器及び残留物は、水 50~70ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、2mol/l 水酸化カリウム溶液で pH10 に調整した後、冷蔵庫中に 20 分間放置する⁴⁾。この液をろ過し、更に水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

グルコン酸液約 4g を精密に量り、水 60ml と混和した後、水を加えて正確に 200ml とし、グルコン酸原液とする。この原液 50ml を正確に量り、2mol/l 水酸化カリウム溶液で pH10 に調整する。5 分間放置した後、水を加えて正確に 250ml とし、標準液とする（この液 1ml はグルコン酸 $4 \times F$ mg を含む）。

別に、グルコン酸原液 15ml を正確に量り、200ml の三角フラスコに入れ、0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液 40ml を正確に量って加え、振り混ぜ、20 分間放置した後、0.05mol/l 硫酸で過剰のアルカリを滴定する（指示薬フェノールフタレイン試液 3 滴）。別に同様の方法で空試験を行う。

本試験の滴定値と空試験のそれとの差から標準液のファクター（F）を算出する⁵⁾。

0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液 1ml = 19.62mg $C_6H_{12}O_7$

用時、標準液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、この液 1ml ずつを正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 5, 10, 20, 50ml 及び 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれグルコン酸 $80 \times F$, $40 \times F$, $20 \times F$, $8 \times F \mu g$ 及び $4 \times F \mu g$ を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件⁶⁾

分光光度計を用い、波長 340nm における吸光度を測定する。

② 測定⁷⁾

2本のセルを用い、それぞれ A 及び B とする。A, B それぞれにグリシルグリシン緩衝液 1ml, NADP 溶液 0.1ml 及び ATP 溶液 0.1ml ずつをそれぞれ正確に量って加える。次いで A には試料液 1.5ml⁸⁾ を、B には水 1.5ml を正確に量って加える。A, B それぞれに 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素懸濁液 0.05ml ずつを正確に量って加え、混和して 5 分間放置し、A を試料測定液、B を空試料測定液とする。

試料測定液及び空試料測定液は、それぞれ水を対照として、波長 340nm における吸光度、 E_A 及び E_B を測定する。次に、A, B のセルそれぞれにグルコン酸キナーゼ懸濁液 0.01ml ずつを正確に量って加え、混和して 10~15 分間放置した後⁹⁾に再び同条件で吸光度を測定し、 E'_A 及び E'_B とする。

E_A と E'_A の差 ΔE_A , E_B と E'_B の差 ΔE_B を求め、更に ΔE_A と ΔE_B の差 ΔE_T を計算する。

③ 検量線

検量線用標準液 1.5ml ずつをそれぞれ正確に量り、②測定における試料液の代わりに、この液を用い、それぞれセル $S_1, S_2, \dots, S_5$ に入れ、②測定と同様に操作し、それぞれ $\Delta E_{S1}, \Delta E_{S2}, \dots, \Delta E_{S5}$ を求め、検量線を作成する。

④ 定量

試料液の ΔE_T と検量線から試料液中のグルコン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中のグルコン酸含量 (g/kg) を計算する¹⁰⁾。

$$\text{グルコン酸含量 (g/kg)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C: 試料液中のグルコン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W: 試料の採取量 (g)

$$\text{グルコノデルタラクトン含量 (g/kg)} = \text{グルコン酸含量 (g/kg)} \times 0.9081$$

$$\text{グルコン酸カルシウム含量 (g/kg)} = \text{グルコン酸含量 (g/kg)} \times 2.285$$

試薬・試液

1. アデノシン-5'-三リン酸 (ATP): 市販品を用いる¹¹⁾。
2. 塩化マグネシウム: (六水塩) [特級]
3. グリシルグリシン: [特級]
4. グリシルグリシン緩衝液: グリシルグリシン 0.25mol/l, Mg^{2+} 0.017mol/l, pH8.0 の溶液

- である。すなわちグリシルグリシン 1.98g 及び塩化マグネシウム 0.21g に再蒸留水 50ml を加えて溶かし、2mol/l 水酸化カリウム溶液約 3.5ml を加えて pH8.0 に調整し、水を加えて正確に 60ml とする。この液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 4 週間は安定である。
5. グルコン酸キナーゼ懸濁液：市販品¹²⁾を希釈せずにそのまま用いる。本懸濁液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 1 年間は安定である。
6. ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸塩 (NADP-Na₂H)：市販品を用いる¹³⁾。
7. 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素懸濁液：市販品¹⁴⁾を希釈せずにそのまま用いる。本懸濁液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 1 年間は安定である。
8. ATP 溶液：アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) の約 0.081mol/l の溶液である。すなわち ATP-Na₂H₂ · 3H₂O 250mg 及び炭酸水素ナトリウム 250mg に再蒸留水 5ml を加えて溶かす。この液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 4 週間は安定である。
9. NADP 溶液：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸塩 (NADP-Na₂H) の 0.0115mol/l の溶液である。すなわち NADP-Na₂H · 3H₂O 50mg に再蒸留水 5ml を加えて溶かす。この液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 4 週間は安定である。

[注]

- 1) この操作で、5 分以内にグルコノデルタラクトンはグルコン酸に変換される。
- 2) シャーベット、ゼリー、ビスケット、パン等。酸味料、膨脹剤原料として添加される。
- 3) 大豆タンパク、牛乳タンパクの凝固剤としてグルコノデルタラクトンが用いられることがある。畜肉製品については除タンパク操作を行わずに、次の操作法を用いる。

試料約 2g を精密に量り、250ml のビーカーに入れ、水 70ml と混和した後、2mol/l 水酸化カリウム溶液を用いて pH10 に調整し 10 分間放置する。水を加えて正確に 100ml とし、ろ過する。ろ液の最初の 10ml は捨て、あとのろ液を試料液とする。必要があればグルコン酸として 0.03~1.0g/L に希釈する。

- 4) 過塩素酸の結晶等が分離する。
- 5) 標準液のファクターは次式より求める。

$$\text{標準液のファクター (F)} = f \times \frac{a_B - a_S}{b} \times \frac{19.62}{5 \times 4}$$

f : 0.05mol/l 硫酸溶液のファクター

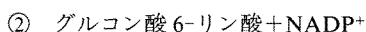
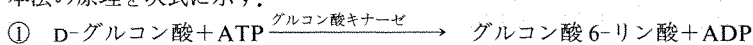
a_B : 空試験での 0.05mol/l 硫酸消費量 (ml)

a_S : グルコン酸原液の場合の 0.05mol/l 硫酸消費量 (ml)

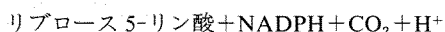
b : グルコン酸原液の採取量 (ml)

上記計算式で 5 で割ってあるのは、最初のグルコン酸原液 (約 2%) を 5 倍希釈して標準液としたためである。

- 6) グルコン酸測定用キットが市販されている。
- 7) 本法の原理を次式に示す。



↓ 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素



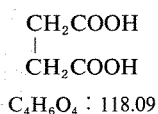
生成した NADPH の量はグルコン酸塩の量と等量関係にあるので、NADPH の波長 340nm における吸光度を利用してグルコン酸量を定量する。本法の反応系はグルコン酸のみに対してきわめて特異的であり、他の物質はほとんど基質として利用されない。

- 8) 試料液中のグルコン酸量を推定し、セル中のグルコン酸量が約 $20\sim 40\mu\text{g}$ となるような量として $0.1\sim 1.5\text{ml}$ の範囲で正確に量って加える。なお、 1.5ml 以下の採取量の場合は、水を加えて正確に 1.5ml がセルに加えられるようにする。
- 9) もし吸光度の漸増がグルコン酸キナーゼ添加 15 分間後でもみられるようであれば、2 分間ごとに吸光度を測定し、それらの吸光度を外挿して E_2 を求める。
- 10) ②測定において試料液 1.5ml 以下を採取 (t ml) した場合は、C を求める際 $1.5/t$ を乗じる。
- 11) 結晶、二ナトリウム三水塩。
- 12) 大腸菌由来のもの。約 40U/mg 。 3.2mol/l 硫酸アンモニウム溶液に懸濁したもの。
- 13) 結晶、二ナトリウム三水塩。
- 14) 酵母由来のもの。約 12U/mg 。

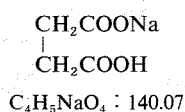
62 コハク酸及びその塩類

Succinic Acid and Its Salts

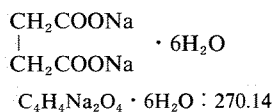
コハク酸
Succinic Acid



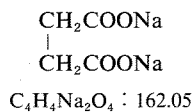
コハク酸一ナトリウム
Monosodium Succinate



コハク酸二ナトリウム（結晶）
Disodium Succinate (crystal)



コハク酸二ナトリウム（無水）
Disodium Succinate (anhydride)



1. 試験法の概要

食品中のコハク酸及びその塩類¹⁾は、過塩素酸で抽出し、液体クロマトグラフィーによりコハク酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じてそれぞれの塩類の量として求める。食品中には、天然のコハク酸が分布している。したがって、定量値は、食品由来のコハク酸と添加されたものの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）²⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)～(4)については、60 クエン酸及びその塩類の試験法を準用する。ただし、「クエン酸」は「コハク酸」とし、(3)検量線用標準液の調製中の「クエン酸三ナトリウム・二水和物 153.1mg」は「コハク酸 100.0mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は、次のとおりとする。

$$\text{試料中のコハク酸含量 (\%)} = \frac{A}{W \times 200}$$

A：試料液中のコハク酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

$$\text{コハク酸一ナトリウム含量 (\%)} = \text{コハク酸含量 (\%)} \times 1.186$$

$$\text{コハク酸二ナトリウム (無水) 含量 (\%)} = \text{コハク酸含量 (\%)} \times 1.372$$

$$\text{コハク酸二ナトリウム (結晶) 含量 (\%)} = \text{コハク酸含量 (\%)} \times 2.288$$

試薬・試液

60 クエン酸及びその塩類の試薬・試液を準用する。

[注]

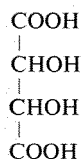
- 1) コハク酸は、貝類の旨味成分の酸としてよく知られている有機酸で、貝類をはじめとする動物に広く存在しているものである。食品添加物のコハク酸は、通常、マレイン酸などを原料とする化学的な合成によって得られており、独特な酸味と旨味がある。清酒や合成酒、みそ、しょう油などの味（酸味・旨味）の調整に使われているが、独特な味のために、酸味料としての使用より、酸味をもつ調味料として使われることが多いことが特徴である。
- 2) 本法によるコハク酸の定量限界は、0.01 %である。

63 DL-酒石酸, L-酒石酸及びその塩類

DL-Tartaric Acid, L-Tartaric Acid and Its Salts

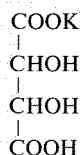
DL-酒石酸

DL-Tartaric Acid

別名: *dl*-酒石酸 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$: 150.09

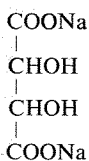
DL-酒石酸水素カリウム

Potassium DL-Bitartrate

別名: *dl*-酒石酸水素カリウム,
DL-重酒石酸カリウム $\text{C}_4\text{H}_5\text{KO}_6$: 188.18

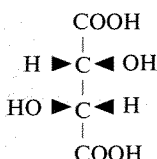
DL-酒石酸ナトリウム

Disodium DL-Tartrate

別名: *dl*-酒石酸ナトリウム $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$: 194.05

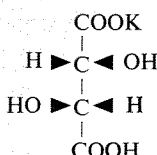
L-酒石酸

L-Tartaric Acid

別名: *d*-酒石酸 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$: 150.09

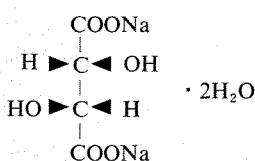
L-酒石酸水素カリウム

Potassium L-Bitartrate

別名: *d*-酒石酸水素カリウム,
L-重酒石酸カリウム $\text{C}_4\text{H}_5\text{KO}_6$: 188.18

L-酒石酸ナトリウム

Disodium L-Tartrate

別名: *d*-酒石酸ナトリウム $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 230.08

1. 試験法の概要

食品中の酒石酸及びその塩類¹⁾は、過塩素酸で抽出し、液体クロマトグラフィーにより酒石酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じてそれぞれの塩類の量として求める。食品中には、天然の酒石酸が分布している。したがって、定量値は、食品由来の酒石酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法 (液体クロマトグラフィー)²⁾

(1) 検体採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)~(4)については、60 クエン酸及びその塩類の試験法を準用する。ただし、「クエン酸」は「酒石酸」とし、(3)検量線用標準液の調製中の「クエン酸三ナトリウム・二水和物 153.1mg」は、「酒石酸ナトリウム・二水和物 153.3mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は、次のとおりとする。

$$\text{試料中の酒石酸含量 (\%)} = \frac{A}{W \times 200}$$

A：試料液中の酒石酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

$$\text{酒石酸水素カリウム含量 (\%)} = \text{酒石酸含量 (\%)} \times 1.254$$

$$\text{酒石酸ナトリウム含量 (\%)} = \text{酒石酸含量 (\%)} \times 1.293$$

$$\text{酒石酸ナトリウム・二水和物含量 (\%)} = \text{酒石酸含量 (\%)} \times 1.533$$

試薬・試液

60 クエン酸及びその塩類の試薬・試液を準用する。

[注]

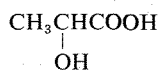
- 1) 酒石酸は、代表的な食品用の有機酸の一つで、やや渋味を伴った酸味がある。自然界では、ブドウなどの植物を中心に広く常在している。食品では、ワインの中に多く含まれており、ときにはそのカリウム塩が酒石として沈殿を生じることがよく知られている。食品には、単独又はその塩類と併用されて酸味の付与や酸度・pHの調整の目的で使用され、また食品の風味の調整にも使用される。
- 2) 本法による酒石酸の定量限界は、0.01 %である。

64 乳酸及びその塩類

Lactic Acid and Its Salts

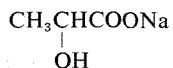
乳酸

Lactic Acid

 $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 : 90.08$

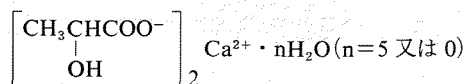
乳酸ナトリウム

Sodium Lactate

 $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3 : 112.06$

乳酸カルシウム

Calcium Lactate

 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6 \cdot 0 \sim 5\text{H}_2\text{O}$ $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6 : 218.22)$

乳酸鉄*

Iron Lactate

*：化学構造が類似している他の用途の食品添加物も、本法の測定対象に含まれる。

1. 試験法の概要

食品中の乳酸及びその塩類¹⁾は、過塩素酸で抽出し、液体クロマトグラフィーにより乳酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じてそれぞれの塩類の量として求める。食品中には、天然の乳酸が分布している。したがって、定量値は、食品由来の乳酸と添加されたものの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）²⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)～(4)については、60 クエン酸及びその塩類の試験法を準用する。ただし、「クエン酸」は「乳酸」とし、(3)検量線用標準液の調製中の「クエン酸三ナトリウム・二水和物 153.1mg」は、「乳酸リチウム（105℃で4時間乾燥したもの）106.6mg」とし、(4)測定法、③

定量中の計算式は、次のとおりとする。

$$\text{試料中の乳酸含量 (\%)} = \frac{A}{W \times 200}$$

A：試料液中の乳酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

$$\text{乳酸ナトリウム含量 (\%)} = \text{乳酸含量 (\%)} \times 1.244$$

$$\text{乳酸カルシウム (無水) 含量 (\%)} = \text{乳酸含量 (\%)} \times 1.211$$

試薬・試液

60 クエン酸及びその塩類の試薬・試液を準用する。

[注]

- 1) 乳酸は、多くの動物、イネなどの植物の組織に存在する酸で、ヨーグルトや乳酸飲料などの乳の発酵物に多量に含まれるなど自然界に広く常在する有機酸である。食品添加物としては、主に酸味をつけたり、酸度・pHを調整する目的で清涼飲料水や漬物をはじめ、さまざまな食品に使用されている。とくに清酒の製造では、主要な原材料の一つとして、明治時代から使われてきている。
- 2) 本法による乳酸の定量限界は、0.01 %である。

65 氷酢酸及び酢酸ナトリウム

Acetic Acid Glacial and Sodium Acetate

氷酢酸	酢酸ナトリウム（結晶）	酢酸ナトリウム（無水）
CH_3COOH	Sodium Acetate (crystal)	Sodium Acetate (anhydride)
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$: 60.05	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	CH_3COONa
	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 136.08	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$: 82.03

1. 試験法の概要

食品中の氷酢酸及び酢酸ナトリウム¹⁾は、過塩素酸で抽出し、液体クロマトグラフィーにより酢酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じて酢酸ナトリウムの量として求める。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）²⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)～(4)については、60 クエン酸及びその塩類の試験法を準用する。ただし、「クエン酸」は「酢酸」とし、(3)検量線用標準液の調製中の「クエン酸三ナトリウム・二水和物 153.1mg」は、「酢酸ナトリウム（無水物） 136.6mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は、次のとおりとする。

$$\text{試料中の酢酸含量 (\%)} = \frac{A}{W \times 200}$$

A：試料液中の酢酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

酢酸ナトリウム（無水）含量 (%) = 酢酸含量 (%) $\times$ 1.366酢酸ナトリウム（結晶）含量 (%) = 酢酸含量 (%) $\times$ 2.266

試薬・試液

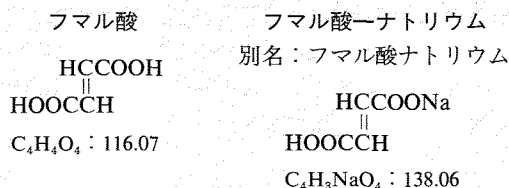
60 クエン酸及びその塩類の試薬・試液を準用する。

〔注〕

- 1) 氷酢酸及び酢酸ナトリウムは、食品に対しては、酸味・酸度の調整の目的でソース類、マヨネーズなどの酸性調味料食品、酢漬け、水産ねり製品、パンなどに使用される。また、氷酢酸と酢酸ナトリウムは、併用して酢酸の味をまろやかにしたり、日持ちを向上させる目的などにも使用されている。日持ち向上の目的では、ねり製品やパンなどに使用されている。
- 2) 本法による酢酸の定量限界は、0.01 %である。

66 フマル酸及びフマル酸一ナトリウム

Fumaric Acid and Monosodium Fumarate



1. 試験法の概要

食品中のフマル酸及びフマル酸一ナトリウム¹⁾は、過塩素酸で抽出し、液体クロマトグラフィーによりフマル酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じてフマル酸一ナトリウムの量として求める。食品中には、少量ではあるが天然のフマル酸が分布している。したがって、定量値は、食品由来のフマル酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）²⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)～(4)については、60 クエン酸及びその塩類の試験法を準用する。ただし、「クエン酸」は「フマル酸」とし、(3)検量線用標準液の「クエン酸三ナトリウム・二水和物 153.1mg」は「フマル酸 100.0mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は、次のとおりとする。

$$\text{試料中のフマル酸含量 (\%)} = \frac{A}{W \times 200}$$

A：試料液中のフマル酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

$$\text{フマル酸一ナトリウム含量 (\%)} = \text{フマル酸含量 (\%)} \times 1.190$$

試薬・試液

60 クエン酸及びその塩類の試薬・試液を準用する。

[注]

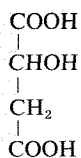
- 1) フマル酸は、クエン酸などの他の有機酸類と併用して酸味の調整に使われることがほとんどであり、また、水溶性のナトリウム塩が使われることが一般的である。ジュース類や清涼飲料水などの飲料、冷菓やゼリー菓子、漬物などに酸味料として他の有機酸類との併用などで使用され、洋酒類での酸味・酸度の調整にも使用されている。
- 2) 本法によるフマル酸の定量限界は、0.01 %である。

67 DL-リンゴ酸及びDL-リンゴ酸ナトリウム

DL-Malic Acid and Sodium DL-Malate

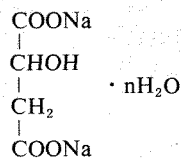
DL-リンゴ酸

別名：dl-リンゴ酸

 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$: 134.09

DL-リンゴ酸ナトリウム

別名：dl-リンゴ酸ナトリウム

 $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 232.10 $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_5 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: 187.06

1. 試験法の概要

食品中のDL-リンゴ酸及びDL-リンゴ酸ナトリウム¹⁾は、過塩素酸で抽出し、液体クロマトグラフィーによりリンゴ酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じてリンゴ酸ナトリウムの量として求める。食品中には、天然のリンゴ酸が分布している。したがって、定量値は、食品由来のリンゴ酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）²⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)～(4)については、60 クエン酸及びその塩類の試験法を準用する。ただし、「クエン酸」は「リンゴ酸」とし、(3)検量線用標準液の調製中の「クエン酸三ナトリウム・二水和物 153.1mg」は、「リンゴ酸 100.0mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は、次のとおりとする。

$$\text{試料中のリンゴ酸含量 (\%)} = \frac{A}{W \times 200}$$

A：試料液中のリンゴ酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

リンゴ酸ナトリウム・1/2 水和物含量 (%) = リンゴ酸含量 (%) $\times 1.395$

リンゴ酸ナトリウム・三水和物含量 (%) = リンゴ酸含量 (%) $\times 1.731$

試薬・試液

60 クエン酸及びその塩類の試薬・試液を準用する。

[注]

- 1) リンゴ酸は、リンゴをはじめとするいろいろな果実類を中心に、動植物に広く存在する有機酸の一つである。食品添加物のリンゴ酸は、マレイン酸を原料とする化学的な合成方法で作られている。通常は、特有の酸味がある白色の粉末又は結晶となっている。天然系と称するL-リンゴ酸は、発酵法や酵素法で作りが得るが、既存添加物名簿に記載されておらず、食品添加物としては使用できない。リンゴ酸及びリンゴ酸ナトリウムは、いずれも水に溶けるため、求める効果を発揮しやすい方が選ばれて使われている。リンゴ酸は、いろいろなリンゴ加工食品をはじめとして清涼飲料水や飴菓子、マーガリン、マヨネーズなどの酸味や酸度の調整の目的で使用されている。
- 2) 本法によるリンゴ酸の定量限界は、0.01 %である。

第 12 章

消 泡 劑

68 シリコーン樹脂

Silicone Resin

別名：ポリジメチルシロキサン

1. 試験法の概要

食品中のシリコーン樹脂¹⁾は、主成分であるポリジメチルシロキサンを有機溶媒抽出し、活性炭カラムで精製後、原子吸光法により、ポリジメチルシロキサン中のケイ素を測定し、ポリジメチルシロキサンとして求める。

2. 試 験 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) 試料液の調製

① 脂肪を含まない食品²⁾

試料約5gを精密に量り、ホモジナイザー用カップに入れ³⁾、飽和塩化ナトリウム溶液10ml⁴⁾及びジエチルエーテル70mlを加え、外槽を氷冷しながら約5分間ホモジナイズする。次にジエチルエーテルを傾斜法で分取し⁵⁾、水層にジエチルエーテル50mlずつを加え、同様の操作を2回繰り返す。全ジエチルエーテル層を分液漏斗に合わせ、飽和塩化ナトリウム溶液20mlを加え、軽く振り混ぜた後、水層を捨てる。

ジエチルエーテル層⁶⁾に無水硫酸ナトリウム約10gを加え、約30分間室温に放置し、濃縮器中にろ過する。少量のジエチルエーテルで残留物を洗い、洗液をろ液に合わせ、液量が約10mlになるまで約40℃の水浴上で減圧濃縮する⁷⁾。

この液をあらかじめ活性炭10gを充てんしたカラム⁸⁾に流し、続いてジエチルエーテル100mlを3ml/分の流速で流す。全溶出液を合わせ、40℃の水浴上で減圧乾固⁷⁾する。残留物にメチルイソブチルケトン⁹⁾を加えて溶かし、正確に25mlとし、試料液とする。

② 脂肪を含む食品¹⁰⁾

試料約5gを精密に量り、200mlのビーカーに入れ、*n*-ヘキサン40ml及びDEAEセルロース25gを加え、よく混和したものを、あらかじめDEAEセルロース5gを充てんしたカラムに流し込む¹¹⁾。

カラムを図 68-1 に示したように、ドライアイス・アセトンの寒剤中に -70°C ¹²⁾ で約 30 分間放置した後、あらかじめ -70°C に冷却した *n*-ヘキサン 400ml をカラムに流し、溶出液は吸引しながら捕集する。

溶出液は 40°C の水浴上で減圧乾固⁷⁾し、残留物をジエチルエーテル 10ml に溶かす。

この液をあらかじめ活性炭 10g を充てんしたカラム^{8), 13)}に流し、続いてジエチルエーテル 100ml を 3ml/分の流速で流す。全溶出液を合わせ、 40°C の水浴上で減圧乾固⁷⁾する。残留物にメチルイソブチルケトン⁹⁾を加えて溶かし、正確に 25ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

ポリジメチルシロキサン 0.200g を正確に量り、メチルイソブチルケトンを加えて溶かし、正確に 100ml とする。その 1ml を正確に量り、メチルイソブチルケトンを加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、ポリジメチルシロキサン $20\mu\text{g}$ を含む）。標準液 0, 1, 2, 5, 10, 15ml 及び 20ml をそれぞれ正確に量り、メチルイソブチルケトンを加えてそれぞれ正確に 20ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれポリジメチルシロキサン 0, 1, 2, 5, 10, 15 μg 及び $20\mu\text{g}$ を含む）。

(4) 測定法¹⁴⁾

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件によって測定する。

光源：ケイ素中空陰極ランプ

高温バーナー：亜酸化窒素バーナー

燃料ガス：亜酸化窒素-アセチレン¹⁵⁾

測定波長：251.6nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれについて 251.6nm における原子吸光度を測定し、波高から検量線を作成する。

③ 定量¹⁶⁾

試料液につき原子吸光度を測定する。得られた波高と検量線から試料液中のポリジメチルシロキサン濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中のポリジメチルシロキサン含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ポリジメチルシロキサン含量 (g/kg)} = \frac{C}{40 \times W}$$

C：試料液中のポリジメチルシロキサン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. ポリジメチルシロキサン：市販品を用いる（オイル型，食品工業用）。
2. 活性炭：粒状のものをジエチルエーテルでよく洗浄して用いる。
3. カラム管：ガラス製（15mm，長さ 300mm）
4. 低温カラムクロマトグラフィー用装置：図 68-1 のような装置を用いる。
5. DEAE セルロース：ジエチルエーテルでよく洗浄したもの。
6. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）〔特級〕
7. メチルイソブチルケトン：〔特級〕

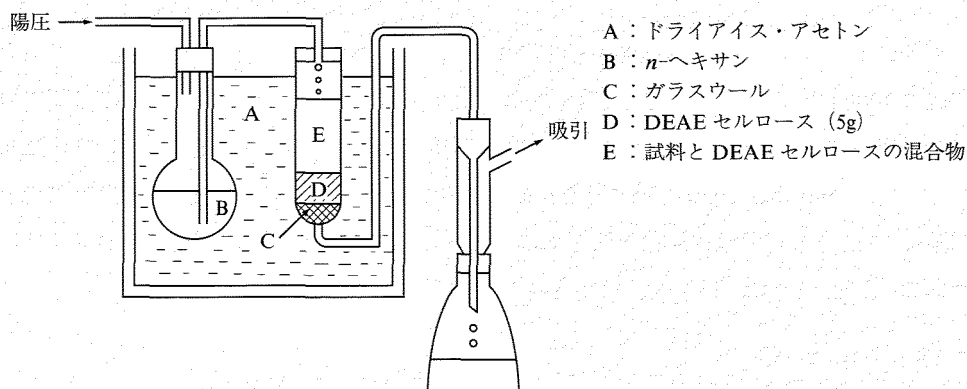


図 68-1 低温カラムクロマトグラフィー用装置

〔注〕

- 1) 食品添加物として使用を認められているシリコーン樹脂は，ポリジメチルシロキサンを主成分とし，二酸化ケイ素を 0～15 % 含むものである。
- 2) しょう油，ソース，ビール，脱脂乳，乳酸菌飲料，ケチャップ，ジャム，砂糖などにこの方法を用いる。
- 3) ビールなどの水性食品はホモジナイズせず，直接分液漏斗を用いて抽出してもよい。
- 4) 含水量の多い試料は，飽和塩化ナトリウム溶液量を適当に減らすことにより，ホモジナイズ後の乳化現象を防止することができる。
- 5) ほとんどすべての食品で乳化現象は起こさず，簡単に傾斜法でジエチルエーテル層を取ることができる。分離が悪い場合は，飽和塩化ナトリウム溶液量が多いためであり，そのときには飽和塩化ナトリウム溶液量を減らし，もう一度はじめてやりなおした方がよい。
- 6) シリコーン樹脂中の二酸化ケイ素や各種食品が含有する無機のケイ素類は，ジエチルエーテル層に抽出されないで水層に残る。
- 7) Kuderna-Danish 濃縮器，ロータリーエバポレーター，その他減圧吸引による濃縮器のいずれを用いてもよい。
- 8) 天然色素などが混入していると，原子吸光光度計による測定妨害となるので，活性炭カラムにより天然色素などを吸着させ，ジエチルエーテルで目的物を溶出させる操作である。
- 9) たとえ，残留物に無機ケイ素が混入していても，それらはメチルイソブチルケトンに溶けないので，原子吸光光度計での定量の際，影響しない。

- 10) 動物性の各種の食用油やケーキミックスなどにこの方法を用いる。
- 11) 無機ケイ素化合物が試料中に混在していても、カラムに吸着されてしまい、*n*-ヘキサンでは溶出しない。
- 12) ポリジメチルシロキサンと食用油の凝固点の差を利用して両者を分離する方法である。−70℃では食用油は凝固して、固体として DEAE セルロースカラム内にとどまるのに対して、ポリジメチルシロキサンは液状で、*n*-ヘキサンによりカラムから溶出される。
- 13) 食用油の DEAE セルロースの低温カラムクロマトグラフィーによる溶出液中には、原子吸光度計によるポリジメチルシロキサン定量の際に、0~20 %程度の増感現象を生じる物質が含まれている。そこで活性炭カラムにより、それらの物質を除去する。
- 14) ICP（誘導結合プラズマ）発光分光分析法を用いて測定することもできる。試料液の調製操作で得られた残留物をメチルイソブチルケトンに代えてケロシンに溶かし、試料液とする。ポリジメチルシロキサンにケロシンを加えて溶かし、検量線用標準液とし、試料液と共に ICP 発光分光分析装置により、測定波長 251.611nm で測定する。
- 15) 測定条件の一例を示すと次のとおりである。
ランプ電流 40mA, N₂O 13.0L/分, アセチレン 8.5L/分
- 16) 本法による定量限界は、ポリジメチルシロキサンとして 0.005g/kg である。

1917. The following is a list of the names of the persons who have been elected to the office of the President of the United States since 1789.

George Washington, John Adams, Thomas Jefferson, James Madison, James Monroe, John Quincy Adams, Andrew Jackson, Martin Van Buren, William Henry Harrison, John Tyler, Zachary Taylor, Franklin Pierce, James Buchanan, Abraham Lincoln, Andrew Johnson, Ulysses S. Grant, Rutherford B. Hayes, James A. Garfield, Chester A. Arthur, Grover Cleveland, Benjamin Harrison, William McKinley, Theodore Roosevelt, William Howard Taft, Woodrow Wilson, Warren G. Harding, Calvin Coolidge, Herbert Hoover, Franklin D. Roosevelt, Harry S. Truman, Dwight D. Eisenhower, John F. Kennedy, Lyndon B. Johnson, Richard M. Nixon, Gerald R. Ford, Jimmy Carter, Ronald Reagan, George H. W. Bush, Bill Clinton, George W. Bush, Barack Obama, Donald Trump.

The following is a list of the names of the persons who have been elected to the office of the Vice President of the United States since 1789.

John Adams, Thomas Jefferson, James Madison, James Monroe, John Quincy Adams, Andrew Jackson, Martin Van Buren, William Henry Harrison, John Tyler, Zachary Taylor, Franklin Pierce, James Buchanan, Abraham Lincoln, Andrew Johnson, Ulysses S. Grant, Rutherford B. Hayes, James A. Garfield, Chester A. Arthur, Grover Cleveland, Benjamin Harrison, William McKinley, Theodore Roosevelt, William Howard Taft, Woodrow Wilson, Warren G. Harding, Calvin Coolidge, Herbert Hoover, Franklin D. Roosevelt, Harry S. Truman, Dwight D. Eisenhower, John F. Kennedy, Lyndon B. Johnson, Richard M. Nixon, Gerald R. Ford, Jimmy Carter, Ronald Reagan, George H. W. Bush, Bill Clinton, George W. Bush, Barack Obama, Donald Trump.

The following is a list of the names of the persons who have been elected to the office of the Chief Justice of the United States since 1789.

John Jay, John Rutledge, William O. Douglas, Earl Warren, Warren E. Burger, Lewis F. Powell, Jr., John P. Stevens, Sandra Day O'Connor, Anthony M. Kennedy, William B. Justice, Hugo Black, Tom C. Clark, Byron R. White, Potter Stewart, Thurgood Marshall, Stephen G. Breyer, John G. Roberts, Jr., Samuel J. Alito, Sonia Sotomayor, Elena Kagan, Neil M. Gorsuch, Brett M. Kavanaugh, Amy Coney Barrett.

The following is a list of the names of the persons who have been elected to the office of the Secretary of the United States since 1789.

Thomas Jefferson, James Madison, James Monroe, John Quincy Adams, Andrew Jackson, Martin Van Buren, William Henry Harrison, John Tyler, Zachary Taylor, Franklin Pierce, James Buchanan, Abraham Lincoln, Andrew Johnson, Ulysses S. Grant, Rutherford B. Hayes, James A. Garfield, Chester A. Arthur, Grover Cleveland, Benjamin Harrison, William McKinley, Theodore Roosevelt, William Howard Taft, Woodrow Wilson, Warren G. Harding, Calvin Coolidge, Herbert Hoover, Franklin D. Roosevelt, Harry S. Truman, Dwight D. Eisenhower, John F. Kennedy, Lyndon B. Johnson, Richard M. Nixon, Gerald R. Ford, Jimmy Carter, Ronald Reagan, George H. W. Bush, Bill Clinton, George W. Bush, Barack Obama, Donald Trump.

第 13 章

膨 脹 剤

69 アンモニア及びその塩類

Ammonia and Its Salts

塩化アンモニウム
Ammonium Chloride
 NH_4Cl : 53.49

炭酸水素アンモニウム
Ammonium Bicarbonate
別名：重炭酸アンモニウム
 NH_4HCO_3 : 79.06

硫酸アルミニウムアンモニウム
(乾燥)
Aluminium Ammonium Sulfate (dry)
別名：焼アンモニウムミョウバン
 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$: 237.15

アンモニア*
Ammonia
 NH_3 : 17.03

クエン酸鉄アンモニウム*
Ferric Ammonium Citrate

リン酸二水素アンモニウム*
Ammonium Dihydrogen Phosphate
別名：リン酸一アンモニウム,
酸性リン酸アンモニウム
 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: 115.03

炭酸アンモニウム
Ammonium Carbonate

硫酸アルミニウムアンモニウム
Aluminium Ammonium Sulfate
別名：アンモニウムミョウバン
 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 453.33

硫酸アンモニウム
Ammonium Sulfate
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 132.14

過硫酸アンモニウム*
Ammonium Persulfate
 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$: 228.20

リン酸水素二アンモニウム*
Diammonium Hydrogen Phosphate
別名：リン酸二アンモニウム,
第二リン酸アンモニウム
 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 132.06

*：化学構造が類似している他の用途の食品添加物も、本法の測定対象に含まれる。

1. 試験法の概要

食品中のアンモニア及びその塩類は、グルタミン酸脱水素酵素を用いる酵素法によりアンモニアとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて各アンモニウム塩の量として求める。食品中には、食品成分の分解により生ずる天然のアンモニア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が素材として含有されている場合には、定量値は素材由来のアンモニアと添加されたものの合計値である。

2. 試 験 法 (酵素法)

(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) 試料液の調製

① 液状食品

アンモニアとして1~10mgに対応する、通常、10g以下の試料の量を精密に量る。試料が澄明で着色していないか、着色していても薄い場合は、水を加えて正確に100mlとし、試料液とする。試料が懸濁している場合は、水を加えて約50~70mlとし、ろ過する。容器及び残留物は水20~30mlを用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、水を加えて正確に100mlとし、試料液とする。試料の着色の著しい場合は、試料の量の約1/10量のポリアミド末又はポリビニルピロリドンを加え、必要があれば水20~30mlを加え、激しく振り混ぜ、ろ過する。容器及び残留物を水40~50mlを用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、水を加えて正確に100mlとし、試料液とする。

② 固体食品

アンモニアとして1~10mgに対応する、通常、10g以下の試料の量を精密に量る。試料が脂肪及びタンパクを含まないか、ほとんど含まない場合は、ブレンダー容器に入れ、水10~30mlを加えて5分間ホモジナイズした後、ろ過する。容器及び残留物は水50~60mlを用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、必要があれば2mol/l水酸化カリウム溶液で中和した後、水を加えて正確に100mlとし、試料液とする。試料が脂肪又はタンパクに富む場合¹⁾は、ブレンダー容器に入れ、氷冷した0.4mol/l過塩素酸溶液10mlを加えて5分間ホモジナイズした後、ろ過する。容器及び残留物は水50~70mlを用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、2mol/l水酸化カリウム溶液で中和²⁾した後、冷蔵庫中に10分間放置する³⁾。この液をろ過し、水を加えて正確に100mlとし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

130℃で3時間乾燥した硫酸アンモニウム388mgを正確に量り、水を加えて溶かして正確に1,000mlとし、標準液とする(この液1mlは、アンモニア100 μ gを含む)。標準液1, 3, 5, 8ml及び10mlをそれぞれ正確に量り、それぞれに水を加えて正確に100mlとし、検量線用標準液とする(これらの液1mlは、それぞれアンモニア1, 3, 5, 8 μ g及び10 μ gを含む)。

(4) 測 定 法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 340nm で吸光度を測定する。

② 測定⁴⁾

光路幅 1cm のキューベット 2 本を用意し、A、B とする。A、B それぞれにトリエタノールアミン緩衝液 1ml ずつ、NADH 液 0.1ml ずつを正確に量って加え混和する。A には試料液を、試料液中のアンモニア量を推定し、キューベット中のアンモニア量が約 2~8 μ g と目されるような量として 0.1~1ml の範囲で正確に量って入れ、更に水を加えて正確に 2.6ml とし、3 分間放置し、試料測定液とする。B には水 1.5ml を正確に量って加え、3 分間放置し、空測定液とする。

試料測定液及び空測定液につき、それぞれ水を対照として波長 340nm における吸光度 E_A 及び E_B を測定する。次に A、B のキューベットそれぞれにグルタミン酸脱水素酵素液 0.02ml ずつを正確に量って加え、混和し、15 分間放置した後、再び同条件で吸光度を測定し⁵⁾、 $E_{A'}$ 及び $E_{B'}$ とする。

E_A と $E_{A'}$ の差 ΔE_A 、 E_B と $E_{B'}$ の差 ΔE_B を求め、更に ΔE_A と ΔE_B の差 ΔE_T を計算する。

③ 検量線

各検量線用標準液 1ml ずつをそれぞれ正確に量り、②測定における試料液の代わりにそれぞれキューベット S_1 、 S_2 、…… S_5 に入れ、②測定と同様に操作し、それぞれ ΔE_{S1} 、 ΔE_{S2} 、…… ΔE_{S5} を求め、検量線を作成する。

④ 定量

試料液の ΔE_T と検量線から、②測定において用いた試料液の量 t (ml) に応じ $1/t$ を乗じて試料中のアンモニア濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のアンモニア含量 (g/kg) を計算する。必要があれば分子量比から特定アンモニウム塩の含量に換算する。

$$\text{アンモニア含量 (g/kg)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C：試料液中のアンモニア濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

硫酸アルミニウムアンモニウム (結晶) 含量 (g/kg) = アンモニア含量 (g/kg) $\times$ 26.62

硫酸アルミニウムアンモニウム (乾燥) 含量 (g/kg) = アンモニア含量 (g/kg) $\times$ 13.93

塩化アンモニウム含量 (g/kg) = アンモニア含量 (g/kg) $\times$ 3.141

過硫酸アンモニウム含量 (g/kg) = アンモニア含量 (g/kg) $\times$ 6.700

硫酸アンモニウム含量 (g/kg) = アンモニア含量 (g/kg) $\times$ 3.880

リン酸水素二アンモニウム含量 (g/kg) = アンモニア含量 (g/kg) $\times$ 3.877

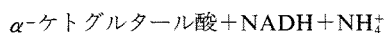
リン酸二水素アンモニウム含量 (g/kg) = アンモニア含量 (g/kg) $\times$ 6.755

試薬・試液

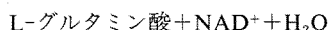
1. 過塩素酸：[特級]
2. 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH- Na_2)：市販品を用いる。
3. グルタミン酸脱水素酵素液：市販のグルタミン酸脱水素酵素のグリセリン液⁶⁾を希釈せずそのまま用いる。この液は 4℃ で保存するとき、1 年間は安定である。
4. α -ケトグルタル酸二ナトリウム：[特級]
5. トリエタノールアミン塩酸塩：[特級]
6. トリエタノールアミン緩衝液：トリエタノールアミン塩酸塩 9.3g 及び α -ケトグルタル酸二ナトリウム 670mg に約 70ml の水を加えて溶かし、5mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH8.6 に調整した後、水を加えて 100ml とする。この液は 4℃ で保存するとき、4 週間は安定である。
7. NADH 液：還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド 30mg 及び炭酸水素ナトリウム 60mg に水 6ml を加えて溶かす。この液は 4℃ で保存するとき、4 週間は安定である。

[注]

- 1) ソーセージ等。
- 2) 中和に用いた 2mol/l 水酸化カリウム溶液の液量を記録しておく。この液量は測定の際に必要な試料液中のアンモニア含量の推定に必要なデータである。
- 3) 沈殿は主として過塩素酸カリウム及びタンパク質よりなる。
- 4) 本法の原理は次のようである。



↓ グルタミン酸脱水素酵素



上式の反応で酸化されて減量する NADH の量はアンモニアの量と定量的に対応するので、NADH の波長 340nm における吸光度の変化を利用してアンモニア量を測定する。

- 5) グルタミン酸脱水素酵素液添加後 15 分間経過しても反応が完了しない場合、2 分間ごとに吸光度を測定してほぼ一定値をとるまで続ける。
- 6) ウシ肝臓由来、10mmol/l リン酸カリウム緩衝液に透析し、50% の割合にグリセリンを加えたもの。

70 ミョウバン類

Alum group

硫酸アルミニウムアンモニウム
Aluminium Ammonium Sulfate
別名：アンモニウムミョウバン
 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 453.33

硫酸アルミニウムアンモニウム（乾燥）
Aluminium Ammonium Sulfate (dry)
別名：焼アンモニウムミョウバン
 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$: 237.15

硫酸アルミニウムカリウム
Aluminium Potassium Sulfate
別名：カリミョウバン，ミョウバン
 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 474.39

硫酸アルミニウムカリウム（乾燥）
Aluminium Potassium Sulfate (dry)
別名：焼ミョウバン
 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$: 258.21

1. 試験法の概要

食品中のミョウバン類は，原子吸光法によりアルミニウムとして定量する．食品中には天然のアルミニウムが分布している．したがって，定量値は食品由来のアルミニウムと添加されたものとの合計値である．

2. 試 験 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） 試料液の調製

試料約 5g を精密に量り，250～300ml の分解フラスコ¹⁾に入れ，必要があれば少量の水を加え，硝酸 20ml を加えて穏やかに加熱する．最初の激しい反応が弱まるにつれ，加熱を強めて均一な黄色液状となるまで加熱する．次に過塩素酸 5ml を加えて穏やかに加熱し，二酸化窒素の発生が終わり，発泡が激しく，液が濃褐色になったとき，加熱を止め²⁾，硝酸約 2ml を静かに加えて再び加熱する．液が濃褐色を呈したならば，同様に硝酸の追加と加熱を繰り返す，過塩素酸の白煙が生じ，液が微黄色～無色になったとき，加熱を止める．冷後，分解液を水を用いて定量的に 100ml のメスフラスコに移し，水を加えて正確に 100ml とする．この液 10～20ml を正確に量り，1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 12³⁾ に調整した後，分液漏斗に入れ，水 20～30ml を加える．次にアセチルアセトン・酢酸ブチル混液 10ml を正確に量って加え，振とう機で 10 分間激しく振り混ぜた後，水層を除き，アセチルアセトン・酢酸ブ

チル層を分取し、ろ紙でろ過した後、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

硫酸アルミニウムカリウム（無水）0.957gを正確に量り、1mol/l硝酸を加えて溶かし、1mol/l硝酸を加えて正確に100mlとする。この液1mlを正確に量り、0.5mol/l硝酸を加えて、正確に100mlとし、標準液とする（この液1mlは、アルミニウム10 μ gを含む）。標準液0, 1, 2, 5, 10ml及び15mlをそれぞれ正確に量り、それぞれを1mol/l水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを12に調整した後、分液漏斗に入れ、水20~30mlを加える。以下、アセチルアセトン・酢酸ブチル混液10mlを正確に量って加えるところから試料液と同様に操作して、検量線用標準液とする（これらの液1mlは、それぞれアルミニウム0, 1, 2, 5, 10 μ g及び15 μ gを含む）。

(4) 空試料液の調製

水5mlを用い、(2)試料液の調製と同様に操作し、空試料液とする。

(5) 測定法⁴⁾

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件によって測定する。

光源：アルミニウム中空陰極ランプ

バーナー：亜酸化窒素高温バーナー

燃料ガス：亜酸化窒素－アセチレン⁵⁾

測定波長：309.3nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき、原子吸光度を測定し、波高から検量線を作成する。

③ 定量

試料液及び空試料液につき、原子吸光度を測定する。両者の吸光度の差を求め、その値と検量線から試料液中のアルミニウム濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中のアルミニウム含量（g/kg）を計算する。

$$\text{アルミニウム含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times V}$$

C：試料液中のアルミニウム濃度（ μ g/ml）

V：試料を酸分解した後、水で100ml定容とした分解液からの採取量（ml）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液

1. アセチルアセトン・酢酸ブチル混液：アセチルアセトン 10ml に酢酸ブチルを加えて 100ml とする。
2. 過塩素酸：市販の有害金属用。
3. 硝酸：市販の有害金属用。

[注]

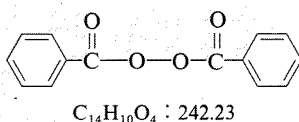
- 1) 試験に用いるガラス器具は、すべて使用前に硝酸（1→3）に浸漬して加温するか、又は硝酸（1→3）に一夜つけておく。
- 2) 乾固すると爆発の危険があるので、目を離さないように十分注意して操作する必要がある。
- 3) アルミニウムイオンのアセチルアセトン・酢酸ブチル混液による抽出率は、pH11～13の範囲でほぼ一定し、抽出率もよい。
- 4) ICP（誘導結合プラズマ）発光分光法を用いて測定することができる。この場合、分解液に水を加えて正確に 100ml とし、必要があればろ過した後、ICP 発光分光分析装置により、測定波長 309.271nm で測定する。
- 5) 測定条件の一例を示すと次のとおりである。
ランプ電流 9mA, N_2O 7.0L/分, アセチレン 6.3L/分

第 14 章

小麦粉处理剂

71 過酸化ベンゾイル

Benzoyl Peroxide



1. 試験法の概要

食品中の過酸化ベンゾイルは、安息香酸にしてガスクロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法 (ガスクロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料溶液の調製

試料約 10g を精密に量り、ホモジナイザー用カップに入れ、飽和塩化ナトリウム溶液 1～10ml¹⁾ 及びエチルエーテル 100ml を加え、氷水で冷却しながら 2～3 分間ホモジナイズした後、エチルエーテル層を分取し、残留物にはエチルエーテル 100ml ずつを加えて同様に 2 回操作する。全エチルエーテル層を合わせ、無水硫酸ナトリウム 10g を加えてよく振り混ぜ、ろ過して濃縮器²⁾に移し、残留物はエチルエーテル 10ml ずつで 2 回洗い、洗液は先のろ液に合わせる。40℃でエチルエーテル液を 5ml になるまで減圧濃縮し、あらかじめ用意したシリカゲルカラムにエチルエーテルを用いて注入し、液面がカラム層の上面にくるまで流出させる。受器として 300ml のナス型フラスコを置き、エチルエーテル・*n*-ヘキサン混液 (1:9) 100ml を注ぎ、流速 5ml/分で通過させ³⁾、流出液を捕集し、試料溶液とする。

(3) 試料液の調製

試料溶液にメタノール 20ml⁴⁾、クエン酸 1ml⁵⁾ 及びヨウ化カリウム溶液 2ml を順に加え、ときどき振り混ぜながら室温で 10 分間放置⁶⁾する。次にナス型フラスコをロータリーエバポレーターに取り付け、60℃で減圧下濃縮し、約 10ml⁷⁾とした後、水 40ml を用いて 200ml の分液漏斗に移す。次にチオ硫酸ナトリウム溶液 (1→10) 2ml⁸⁾を加えて振り混ぜ、硫酸 (1→10) を用いて強酸性⁹⁾とし、塩化ナトリウムを加えて飽和した後、エチルエーテル 50ml を加

えて激しく振り混ぜ¹⁰⁾、水層を別の分液漏斗に移し、エチルエーテル層を分取し分液漏斗は少量のエチルエーテルを用いて洗う。水層にエチルエーテル 50ml ずつを加え、同様の操作を 2 回繰り返す、エチルエーテル層は先のエチルエーテル液に合わせる。エチルエーテル液に無水硫酸ナトリウム 5g を加えて脱水し、濃縮器中にろ過する。残留物を少量のエチルエーテルで洗い、洗液をろ液に合わせ、40℃で乾固しない程度に減圧濃縮し、アセトンを加えて正確に 5ml とし、試料液とする。

(4) 検量線用標準液の調製

過酸化ベンゾイル 0.100g を正確に量り、アセトンを加えて溶かして正確に 100ml とする。この液 10ml を正確に量り、アセトンを加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、過酸化ベンゾイル 100 μ g を含む）。標準液 1, 2.5, 5, 7.5ml 及び 10ml をそれぞれ正確に量り、それぞれ 300ml のナス型フラスコに入れ、それぞれにエチルエーテル・*n*-ヘキサン混液（1:9）100ml を加えて振り混ぜ、以下(3)試料液の調製と同様に操作し、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ過酸化ベンゾイル 20, 50, 100, 150 μ g 及び 200 μ g を含む）。

(5) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：60～80 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフ用ケイソウ土担体に、ジエチレングリコールサクシネート及びリン酸をそれぞれ 5% 及び 1% の割合で含ませたもの。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 2m

カラム温度：160℃

注入口及び検出器温度：240℃

キャリアガス：窒素、安息香酸のピークが約 5～10 分間後に現われるよう流速を調整する。

② 検量線¹²⁾

検量線用標準液 5 μ l を正確に量り、それぞれガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

試料液 5 μ l を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中の過酸化ベンゾイル濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中の過

酸化ベンゾイル含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{過酸化ベンゾイル含量 (g/kg)} = \frac{C}{200 \times W}$$

C：試料液中の過酸化ベンゾイル濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

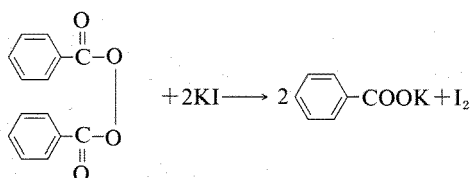
試薬・試液等

1. クエン酸：[特級]
2. クエン酸液：クエン酸 10g にメタノールを加えて溶かして 100ml とする。
3. シリカゲル：市販のカラムクロマトグラフ用のもの、70~230 メッシュ、活性化せずそのまま用いる。
4. シリカゲルカラム：止め栓付ガラス製カラム（内径 1.5cm、長さ 40cm）の下端に少量の脱脂綿を詰め、カラムの半分くらいまでエチルエーテル・*n*-ヘキサン混液（1：9）を入れ、エチルエーテル・*n*-ヘキサン混液（1：9）に懸濁したシリカゲルをカラムに注入し、カラム床高さが約 10cm になるよう湿式充てんする。溶媒を通過させ、カラム床の上端に達するまで流出させた後用いる。
5. チオ硫酸ナトリウム：（五水塩）[特級]
6. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）[特級]
7. メタノール：[特級]
8. ヨウ化カリウム：[特級]
9. ヨウ化カリウム溶液：ヨウ化カリウム 50g に水を加えて溶かして 100ml とする。用時調製する。

[注]

- 1) 過酸化ベンゾイルは中性下でエチルエーテル層に抽出される。酸性下での抽出は過酸化ベンゾイルが一部分解して安息香酸を生成するので好ましくない。
飽和食塩水量は試料中の含水量に応じて 1~10ml を加える。
- 2) Kuderna-Danish 濃縮器、ロータリーエバポレーター、そのほか減圧吸引による濃縮装置のいずれを用いてもよい。いずれの場合にも乾固すると回収率が低くなるので、必ず乾固する少し前に濃縮をやめる。
- 3) この条件で過酸化ベンゾイルのみカラムから溶出する。安息香酸はカラムにとどまり、過酸化ベンゾイルと分離される。
- 4) 有機溶媒層と水層の混合を補助し、反応が進みやすくする目的で加える。
- 5) ヨウ化カリウムと過酸化ベンゾイルの反応を補助する目的で加える。

- 6) 過酸化ベンゾイルはヨウ化カリウムと次式のように反応し、安息香酸を定量的に生成する。



- 7) 乾固すると回収率が低くなる。また濃縮が不足でメタノールが多量に残存すると次のエチルエーテル抽出の際、抽出率が低くなるので、必ず約 10ml になったら濃縮をやめる。
- 8) 過酸化ベンゾイルとヨウ化カリウムとの反応により生成した I_2 は、残存すると FID-GC の検出器等をいためる原因となるので還元して分解する目的で加える。
- 9) pH1~2 とする。
- 10) 抽出の際、振り混ぜると水層が白濁することがあるが、これはチオ硫酸ナトリウムに由来する硫黄の析出によるものであり操作上差し支えはない。
- 11) 過酸化ベンゾイルは、本法では最終的に安息香酸に転換して定量するため、安息香酸の分離定量に適した測定条件を設定する。
- 12) 本検量線は、過酸化ベンゾイルを(3)試料液の調製の操作に従って、定量的に安息香酸に転換させて作成するものである。なお、安息香酸の標準品を用いた簡便法について以下に示す。

安息香酸 0.100g を正確に量り、アセトンを加えて溶かして正確に 100ml とし、標準液とする(この液 1ml は、安息香酸 1,000 μg を含む)。標準液 1, 2.5, 5, 7.5ml 及び 10ml を正確に採り、アセトンを加えて正確に 10ml とし、検量線用標準液とする(これらの液 1ml は、それぞれ安息香酸 100, 250, 500, 750 μg 及び 1,000 μg を含む)、検量線用標準液の 5 μl ずつをそれぞれ正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。過酸化ベンゾイル濃度は、安息香酸濃度に換算係数 (0.992) を乗じて算出する。

Dear Mr. [Name],

I have your letter of the 10th inst. regarding the [subject] and am sorry to hear that you are having trouble with the [subject].

I have been thinking about this matter and have decided to [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

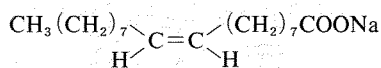
I am sure that you will be satisfied with the results of my [action]. I will be sure to [action] and will be sure to [action].

第 15 章

被 膜 剂

72 オレイン酸ナトリウム

Sodium Oleate

 $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NaO}_2 : 304.45$

1. 試験法の概要

食品中のオレイン酸ナトリウムは、メチル化後ガスクロマトグラフィーによりオレイン酸メチルとして定量し、分子量比を乗じてオレイン酸ナトリウムの量として求める。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する¹⁾。

(2) 試料液の調製

試料約 10g²⁾ を精密に量り、300ml の分液漏斗に入れる。これに飽和硫酸ナトリウム溶液 25ml を加え、硫酸（1 → 10）を用いて酸性³⁾とし、エチルエーテル 100ml を加え、約 5 分間激しく振り混ぜる。エチルエーテル層を分取し⁴⁾、水層にエチルエーテル 70ml ずつを加え、同様の操作を更に 2 回繰り返す。全エチルエーテル層を 500ml の分液漏斗に合わせ、飽和硫酸ナトリウム溶液 30ml を加え、軽く振り混ぜた後、水層を捨てる。エチルエーテル層を 300ml の三角フラスコに移し、無水硫酸ナトリウム約 15g を加え、約 30 分間室温に放置し、濃縮器中にろ過する。少量のエチルエーテルで残留物を洗い、洗液をろ液に合わせ、約 40℃ の水浴中で、液量が 2～3ml になるまで減圧濃縮する⁵⁾。濃縮液にジアゾメタン試液 2ml を加え⁶⁾、室温で約 10 分間放置した後、溶媒を留去し⁷⁾、アセトンを加えて正確に 5ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

オレイン酸 0.100g を正確に量り、アセトンを加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、オレイン酸 1,000μg を含む）。標準液 0, 2, 4, 6, 8ml 及び 10ml をそれぞれ正確に量り、液量の多いものは、約 40℃ の水浴中で、液量が 2～3ml になるまで濃縮し、濃縮液

にジアゾメタン試液 2ml を加え⁶⁾、室温で約 10 分間放置した後、溶媒を留去し⁷⁾、アセトンを加えて正確に 10ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれオレイン酸 0, 200, 400, 600, 800 μ g 及び 1,000 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用い、次の条件により測定する。

カラム充てん剤：80～100 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフ用ケイソウ土担体に、ジエチレングリコールサクシネート及びリン酸をそれぞれ 5 % 及び 1 % コーティングしたもの。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 1m

カラム温度：150℃

注入口及び検出器温度：215℃

キャリアーガス：窒素、50ml/分

② 検量線

検量線用標準液 5 μ l ずつをそれぞれ正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し⁸⁾、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

試料液 5 μ l を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し⁸⁾、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のオレイン酸濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のオレイン酸ナトリウム含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{オレイン酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C}{W} \times 5 \times \frac{1}{1,000} \times 1.078^{9)}$$

C：試料液中のオレイン酸濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. オレイン酸：市販のガスクロマトグラフ用標準試料¹⁰⁾を用いる。
2. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）[特級]
3. 硫酸ナトリウム：[特級]

[注]

- 1) かんきつ類の場合は、検体 5～10 個を選び、8 分割法により平均的に 250～300g を採り、種

子があれば除去してホモジナイズしたものを試料とする。8分割法については、18 イマザリルの [注] 2) を参照のこと。

- 2) オレイン酸ナトリウムとして1~4mg 含まれていることが望ましい。
- 3) pH1~2 とする。
- 4) 分離しにくいときは遠心分離する。
- 5) オレイン酸の分解を防止するため、操作は窒素気流中で行う。
- 6) 反応後の試料液に微黄色が残らないときは、ジアゾメタン試液を追加する。
- 7) ジアゾメタン試液中のエーテルを除去する。
- 8) 検量線用標準液及び試料液は、調製後速やかに測定に供することが望ましい。
- 9) オレイン酸ナトリウムとオレイン酸の分子量比は $304.45/282.46$ である。
- 10) 純度 99 %。

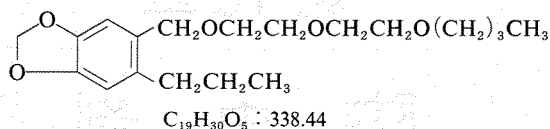
第 16 章

防 虫 剤

73 ピペロニルブトキシド

Piperonyl Butoxide

別名：ピペロニルブトキサイド



1. 試験法の概要

食品中のピペロニルブトキシドは、ガスクロマトグラフィーにより定量する。

2. 試 験 法 (ガスクロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

試料約 10g を精密に量り、水 20ml を加え、ホモジナイズした後、水 20ml を用いて 100ml の分液漏斗に入れ、*n*-ヘキサン 40ml を加えて 10 分間激しく振り混ぜた後、*n*-ヘキサン層を分取し、水層に *n*-ヘキサン 40ml を加え、同様の操作を更に 2 回繰り返す。すべての *n*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウム 2g を加えて脱水し、減圧濃縮¹⁾、約 2ml とする。この液を *n*-ヘキサン少量を用いてあらかじめ用意した合成ケイ酸マグネシウムカラムに注入し、次に *n*-ヘキサン・エチルエーテル混液 (1:1) 100ml を流速 1~1.5ml/分で流し洗浄する。次に受器として濃縮器を置き *n*-ヘキサン・アセトン・エチルエーテル混液 (3:3:1) 150ml を通過させ、流出液を集める。この液を減圧乾固後、*n*-ヘキサン液を加えて溶かして正確に 2ml とし、試料液²⁾とする。

(3) 検量線用標準液の調製

ピペロニルブトキシド 0.100g を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて溶かして正確に 100ml とする。この液 20ml を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 100ml とし、標準液とする (この液 1ml は、ピペロニルブトキシド 200 μ g を含む)。

標準液 0.25, 0.5, 1, 1.5ml 及び 2ml をそれぞれ正確に量り、*n*-ヘキサン液を加えてそれぞ

れ正確に 2ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれピペロニルブトキシド 25, 50, 100, 150 μ g 及び 200 μ g を含む）。

（４）測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：60～80 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフ用ケイソウ土
担体にシリコーン OV-1 を 2% コーティングしたもの。

カラム管：ガラス製、内径 3～4mm、長さ 2m

カラム温度：210～230℃

キャリアーガス：窒素、上記の条件でピペロニルブトキシドが約 10 分間後に現われるよう流速を調整する。

② 検量線

検量線用標準液 5 μ l ずつをそれぞれ正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

試料液 5 μ l を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピペロニルブトキシドのピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のピペロニルブトキシド濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中のピペロニルブトキシド含量（g/kg）を計算する。

$$\text{ピペロニルブトキシド含量 (g/kg)} = \frac{C \times 2}{W} \times \frac{1}{1,000}$$

C：試料液中のピペロニルブトキシド濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液等

1. カラムクロマトグラフ用合成ケイ酸マグネシウム：66～100 メッシュのクロマトグラフ用合成ケイ酸マグネシウムを 130℃で 15 時間活性化する。
2. 合成ケイ酸マグネシウムカラム：内径 20mm、長さ 30cm のカラム管に、あらかじめ *n*-ヘキサンに懸濁したカラムクロマトグラフ用合成ケイ酸マグネシウム 20g を入れ、その上に、同様に *n*-ヘキサンに懸濁した無水硫酸ナトリウム約 5g を重層させる。カラムの上端に少量の *n*-ヘキサンが残る程度まで *n*-ヘキサンを毎分 1～1.5ml の流速で流出させた後を用いる。
3. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）[特級]

[注]

- 1) ロータリーエポレーターを用いる。
- 2) 試料液のガスクロマトグラム上に妨害ピークがみられた場合は、次の精製を行う。

試料液をあらかじめ用意したシリカゲルカラムに入れ、1~1.5ml/分の流速（以下同）で通過させる。更に、*n*-ヘキサン・アセトン混液（10：1）30mlを通過させ、最初の流出液 10ml は捨て、次の 20ml を分取し、濃縮装置に入れ蒸発乾固した後、*n*-ヘキサン液を加えて溶かして正確に 2ml とし、試料液とする。

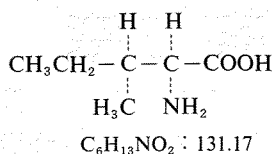
ここで用いるシリカゲルカラムは内径 12mm、長さ 30cm のカラム管にあらかじめ *n*-ヘキサンに懸濁した 30~70 メッシュのカラムクロマトグラフ用シリカゲル（130℃で3時間活性化したもの）5g を入れ、カラムの上端に少量の *n*-ヘキサンが残る程度まで *n*-ヘキサンを流出させたものを用いる。

第 17 章

強 化 剤

74 L-イソロイシン

L-Isoleucine



1. 試験法の概要

食品中のL-イソロイシンは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には、天然の遊離のL-イソロイシンがわずかであるが分布している。したがって、定量値は食品由来の遊離のL-イソロイシンと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

上記の(1)～(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-イソロイシン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-イソロイシン 100mg」とする。

(4) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 17 μ m，架橋度 8 %

カラム管：内径 9mm，長さ 500 mm

カラム温度：55℃

移動相：クエン酸緩衝液（pH4.25），0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm，長さ 20 m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り、塩酸 (1 → 6) を加えて pH2.2 に調整した後、クエン酸緩衝液 (pH2.2)⁷⁾ を加えて正確に 100ml とし、測定液とする。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 μ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し 570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比例計算で定量する⁹⁾。

$$\text{L-イソロイシン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A^{10)}}{W \times A_s}$$

S：標準液中の L-イソロイシン濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

A_s：標準液で得られたクロマトグラムの L-イソロイシンピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムの L-イソロイシンピーク面積

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし、「7. クエン酸緩衝液 (pH3.25)」は次のとおりとする。

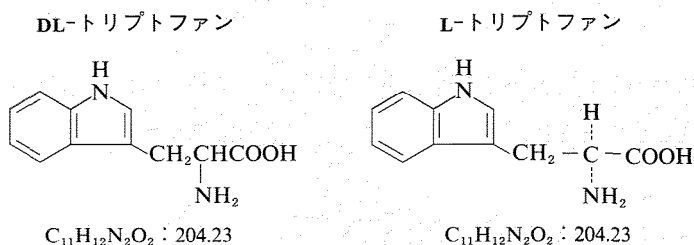
7. クエン酸緩衝液 (pH4.25)：クエン酸ナトリウム・二水塩 14.7g、クエン酸・一水塩 10.5g、塩化ナトリウム 1.92g、*n*-カプリル酸 0.1ml、チオジグリコール 5ml¹¹⁾ 及び BRIJ-35 溶液 (1 → 4) 4ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

[注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。

75 DL-トリプトファン及びL-トリプトファン

DL-Tryptophan and L-Tryptophan



1. 試験法の概要

食品中のDL-トリプトファン及びL-トリプトファンは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には、天然の遊離のL-トリプトファンはほとんど存在しない。したがって、定量値は食品に添加されたトリプトファンのみの値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

上記の(1)~(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「トリプトファン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-トリプトファン 100mg」とする。

(4) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 $15.5\mu\text{m}$ ，架橋度 10 %

カラム管：内径 9mm，長さ 500mm

カラム温度：55℃

移動相：クエン酸緩衝液 (pH5.28), 0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm, 長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り、塩酸 (1 → 6) を加えて pH2.2 に調整した後、クエン酸緩衝液 (pH2.2)⁷⁾ を加えて正確に 100ml とし、測定液とする。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 μ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比例計算で定量する⁹⁾。

$$\text{DL-トリプトファン及びL-トリプトファン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}^{10)}$$

S : 標準液中の L-トリプトファン濃度 (μ g/ml)

W : 試料の採取量 (g)

A_s : 標準液で得られたクロマトグラムのトリプトファンピーク面積

A : 測定液で得られたクロマトグラムのトリプトファンピーク面積

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし、「7.クエン酸緩衝液 (pH3.25)」は次のとおりとする。

7. クエン酸緩衝液 (pH5.28) : クエン酸ナトリウム・二水塩 26.76g, クエン酸・一水塩 6.1g, 塩化ナトリウム 4.5g, *n*-カプリル酸 0.1ml, BRIJ-35 溶液 (1 → 4) 4ml 及びベンジルアルコール 5ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

[注]

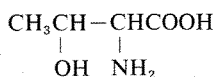
48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。

76 DL-トレオニン及びL-トレオニン

DL-Threonine and L-Threonine

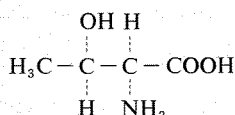
DL-トレオニン

別名：DL-スレオニン

 $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$: 119.12

L-トレオニン

別名：L-スレオニン

 $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$: 119.12

1. 試験法の概要

食品中のDL-トレオニン及びL-トレオニンは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には、天然の遊離のL-トレオニンがわずかであるが分布している。したがって、定量値は食品由来の遊離のL-トレオニンと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)~(4)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「トレオニン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-トレオニン 100mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は次のとおりとする。

$$\text{DL-トレオニン及びL-トレオニン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}^{10)}$$

S : 標準液中のL-トレオニン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

A_s : 標準液で得られたクロマトグラムのトレオニンピーク面積

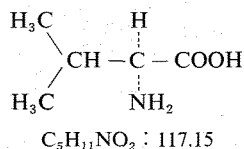
A : 測定液で得られたクロマトグラムのトレオニンピーク面積

[注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。

77 L-バ リ ン

L-Valine



1. 試験法の概要

食品中の L-バリンは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には、天然の遊離の L-バリンが分布している。したがって、定量値は食品由来の遊離の L-バリンと添加されたものとの合計値である。

2. 試 験 法 (液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

(4) 測 定 法

上記の(1)~(4)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-バリン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-バリン 100mg」とし、(4)測定法、③定量中の計算式は次のとおりとする。

$$\text{L-バリン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}^{10)}$$

S : 標準液中の L-バリン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

 A_s : 標準液で得られたクロマトグラムの L-バリンピーク面積

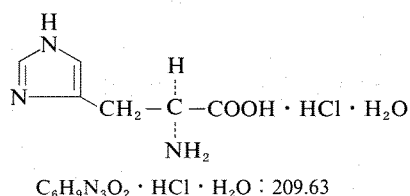
A : 測定液で得られたクロマトグラムの L-バリンピーク面積

[注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。

78 L-ヒスチジン塩酸塩

L-Histidine Monohydrochloride



1. 試験法の概要

食品中のL-ヒスチジン塩酸塩は、液体クロマトグラフィーによりL-ヒスチジンとして定量する。必要があれば分子量比を乗じてL-ヒスチジン塩酸塩の量として求める。赤身の魚等には、天然の遊離のL-ヒスチジンが分布している。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遊離のL-ヒスチジンと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

上記の(1)～(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-ヒスチジン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-ヒスチジン塩酸塩 135.1mg」とする。

(4) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂、平均粒径 15.5 μ m、架橋度 10 %

カラム管：内径 9mm、長さ 100mm

カラム温度：55℃

移動相：クエン酸緩衝液（pH5.28），0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り，塩酸（1→6）を加えて pH2.2 に調整した後，クエン酸緩衝液（pH2.2）⁷⁾ を加えて正確に 100ml とし，測定液とする。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 μ l ずつを正確に量り，液体クロマトグラフに注入し，570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比例計算で定量する⁹⁾。

$$\text{L-ヒスチジン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}^{10)}$$

S：標準液中の L-ヒスチジン濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

A_s：標準液で得られたクロマトグラムの L-ヒスチジンピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムの L-ヒスチジンピーク面積

$$\text{L-ヒスチジン塩酸塩含量 (g/kg)} = \text{L-ヒスチジン含量 (g/kg)} \times 1.351$$

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし，「7. クエン酸緩衝液（pH3.25）」は次のとおりとする。

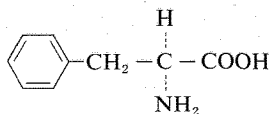
7. クエン酸緩衝液（pH5.28）：クエン酸ナトリウム・二水塩 26.76g，クエン酸・一水塩 6.1g，塩化ナトリウム 4.5g，*n*-カプリル酸 0.1ml，BRIJ-35 溶液（1→4）4ml 及びベンジルアルコール 5ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

〔注〕

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの〔注〕を準用する。

79 L-フェニルアラニン

L-Phenylalanine



$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$: 165.19

1. 試験法の概要

食品中のL-フェニルアラニンは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には、天然の遊離のL-フェニルアラニンはほとんど存在しない。したがって、定量値は食品に添加されたL-フェニルアラニンのみの値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試料液の調製

（3）標準液の調製

上記の(1)~(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-フェニルアラニン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-フェニルアラニン 100mg」とする。

（4）測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 $17\mu\text{m}$ ，架橋度 8 %

カラム管：内径 9mm，長さ 500mm

カラム温度：55℃

移動相：クエン酸緩衝液（pH4.25），0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り，塩酸（1 → 6）を加えて pH2.2 に調整した後，クエン酸緩衝液（pH2.2）⁷⁾ を加えて正確に 100ml とし，測定液とする。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 μ l ずつを正確に量り，液体クロマトグラフに注入し，570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比例計算で定量する⁹⁾。

$$\text{L-フェニルアラニン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}^{10)}$$

S：標準液中のL-フェニルアラニン濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

A_s：標準液で得られたクロマトグラムのL-フェニルアラニンピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムのL-フェニルアラニンピーク面積

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし，「7. クエン酸緩衝液（pH3.25）」は次のとおりとする。

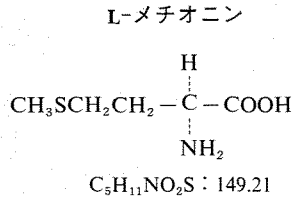
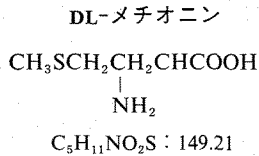
7. クエン酸緩衝液（pH4.25）：クエン酸ナトリウム・二水塩14.7g，クエン酸・一水塩10.5g，塩化ナトリウム 1.92g，*n*-カプリル酸 0.1ml，チオジグリコール 5ml¹¹⁾ 及び BRIJ-35 溶液（1 → 4）4ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

[注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。

80 DL-メチオニン及びL-メチオニン

DL-Methionine and L-Methionine



1. 試験法の概要

食品中のDL-メチオニン及びL-メチオニンは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には、天然の遊離のメチオニンはほとんど存在しない。したがって、定量値は食品に添加されたメチオニンのみの値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試料液の調製

（3）標準液の調製

上記の(1)～(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「メチオニン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-メチオニン 100mg」とする。

（4）測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 17 μ m，架橋度 8 %

カラム管：内径 9mm，長さ 500mm

カラム温度：55℃

移動相：クエン酸緩衝液（pH4.25），0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り，塩酸（1→6）を加えて pH2.2 に調整した後，クエン酸緩衝液（pH2.2）⁷⁾ を加えて正確に 100ml とし，測定液とする。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 μ l ずつを正確に量り，液体クロマトグラフに注入し，570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比例計算で定量する⁹⁾。

$$\text{DL-メチオニン及び L-メチオニン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}^{10)}$$

S：標準液中の L-メチオニンの濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

A_s：標準液で得られたクロマトグラムのメチオニンピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムのメチオニンピーク面積

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし，「7. クエン酸緩衝液（pH3.25）」は次のとおりとする。

7. クエン酸緩衝液（pH4.25）：クエン酸ナトリウム・二水塩 14.7g，クエン酸・一水塩 10.5g，塩化ナトリウム 1.92g，*n*-カプリル酸 0.1ml，チオジグリコール 5ml¹¹⁾ 及び BRIJ-35 溶液（1→4）4ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

〔注〕

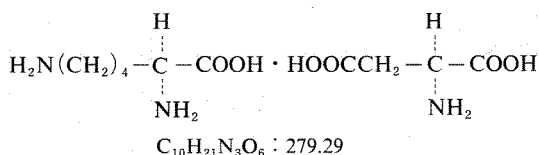
48 L-アスパラギン酸ナトリウムの〔注〕を準用する。

81 L-リシンL-アスパラギン酸塩及び L-リシンL-グルタミン酸塩

L-Lysine L-Aspartate and L-Lysine L-Glutamate

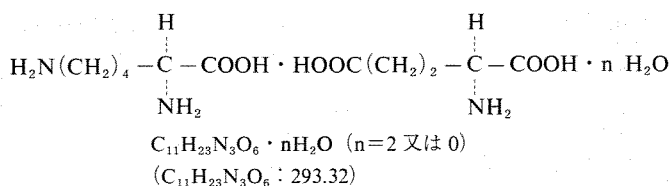
L-リシンL-アスパラギン酸塩

別名：L-リジンL-アスパラギン酸塩



L-リシンL-グルタミン酸塩

別名：L-リジンL-グルタミン酸塩



1. 試験法の概要

食品中のL-リシンL-アスパラギン酸塩及びL-リシンL-グルタミン酸塩は、液体クロマトグラフィーによりそれぞれ構成するL-リシン、L-アスパラギン酸又はL-グルタミン酸として定量する。食品中には、天然の遊離のアミノ酸が広く分布しており、とくにL-グルタミン酸に次いでL-アスパラギン酸も多い。したがって、定量値は食品由来の遊離のアミノ酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

- (1) 検体の採取と試料の調製
- (2) 試料液の調製
- (3) 標準液の調製

上記の(1)～(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、

「L-アスパラギン酸」は「L-リシン、L-アスパラギン酸又はL-グルタミン酸」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-リシン塩酸塩 124.9mg, L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg 及びL-グルタミン酸ナトリウム 127.2mg」とする。

(4) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤

L-リシン用：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 15.5 μ m，架橋度 10 %

L-アスパラギン酸及びL-グルタミン酸用：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 17 μ m，架橋度 8 %

カラム管

L-リシン用：内径 9mm，長さ 100mm

L-アスパラギン酸及びL-グルタミン酸用：内径 9mm，長さ 500mm

カラム温度：55℃

移動相

L-リシン用：クエン酸緩衝液 (pH5.28)，0.6ml/分

L-アスパラギン酸及びL-グルタミン酸用：クエン酸緩衝液 (pH3.25)，0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り，塩酸 (1 → 6) を加えて pH2.2 に調整した後，クエン酸緩衝液 (pH2.2)⁷⁾ を加えて正確に 100ml とし，測定液とする。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 μ l ずつを正確に量り，液体クロマトグラフに注入し，570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比例計算でそれぞれ定量する⁹⁾。

$$\text{各アミノ酸含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s} \quad {}^{10)}$$

S：標準液中の L-リシン，L-アスパラギン酸及び L-グルタミン酸それぞれの濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

A_s：標準液で得られたクロマトグラムの L-リシン，L-アスパラギン酸及び L-グル

タミン酸それぞれのピーク面積

A : 測定液で得られたクロマトグラムの L-リシン, L-アスパラギン酸及び L-グル
タミン酸それぞれのピーク面積

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし、「7. クエン酸緩衝液 (pH3.25)」は次のとおりとする。

7. クエン酸緩衝液 (pH3.25) : クエン酸ナトリウム・二水塩 7.7g, クエン酸・一水塩 17.9g, 塩化ナトリウム 7.1g, *n*-カプリル酸 0.1ml, チオジグリコール 5ml¹¹⁾, BRIJ-35 溶液 (1 → 4) 4ml 及びエタノール 80ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

クエン酸緩衝液 (pH5.28) : クエン酸ナトリウム・二水塩 26.76g, クエン酸・一水塩 6.1g, 塩化ナトリウム 4.5g, *n*-カプリル酸 0.1ml, BRIJ-35 溶液 (1 → 4) 4ml 及びベンジルアルコール 5ml に水を加えて溶かし, 1,000ml とする。

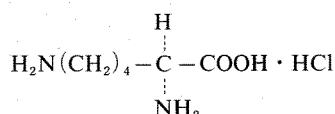
[注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。

82 L-リシン塩酸塩

L-Lysine Monohydrochloride

別名：L-リジン塩酸塩

 $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl} : 182.65$

1. 試験法の概要

食品中のL-リシン塩酸塩は、液体クロマトグラフィーによりL-リシンとして定量する。必要があれば分子量比を乗じてL-リシン塩酸塩の量として求める。食品中には、天然の遊離のL-リシンはほとんど存在しない。したがって、定量値は食品に添加されたL-リシンのみの値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 標準液の調製

上記の(1)~(3)については、48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試験法を準用する。ただし、「L-アスパラギン酸」は「L-リシン」とし、(3)標準液の調製中の「L-アスパラギン酸ナトリウム 130.1mg」は「L-リシン塩酸塩 124.9mg」とする。

(4) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフとしてアミノ酸分析計を用い、次の条件によって測定する⁸⁾。

カラム充てん剤：ゲル型強酸性陽イオン交換樹脂，平均粒径 $15.5\mu\text{m}$ ，架橋度 10 %

カラム管：内径 9mm，長さ 100mm

カラム温度：55℃

溶離液：クエン酸緩衝液（pH5.28），0.6ml/分

反応コイル：内径 0.5mm，長さ 20m

反応槽温度：98℃

ニンヒドリン液の流速：0.3ml/分

② 測定液の調製

試料液 10ml を正確に量り，塩酸（1→6）を加えて pH2.2 に調整した後，クエン酸緩衝液（pH2.2）⁷⁾ を加えて正確に 100ml とし，測定液とする。

③ 定量

測定液及び標準液それぞれ 500 μ l ずつを正確に量り，液体クロマトグラフに注入し，570nm における吸光度として得られた測定液のクロマトグラムと標準液のクロマトグラムとの面積比例計算で定量する⁹⁾。

$$\text{L-リシン含量 (g/kg)} = \frac{2 \times S \times A}{W \times A_s}^{10)}$$

S：標準液中のL-リシン濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

A_s ：標準液で得られたクロマトグラムのL-リシンピーク面積

A：測定液で得られたクロマトグラムのL-リシンピーク面積

$$\text{L-リシン塩酸塩含量 (g/kg)} = \text{L-リシン含量 (g/kg)} \times 1.249$$

試薬・試液

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの試薬・試液を準用する。ただし，「7. クエン酸緩衝液（pH3.25）」は次のとおりとする。

7. クエン酸緩衝液（pH5.28）：クエン酸ナトリウム・二水塩26.76g，クエン酸・一水塩6.1g，塩化ナトリウム 4.5g，*n*-カプリル酸 0.1ml，BRIJ-35 溶液（1→4）4ml 及びベンジルアルコール 5ml に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

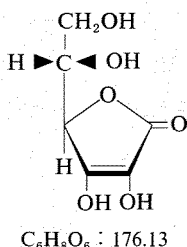
[注]

48 L-アスパラギン酸ナトリウムの [注] を準用する。

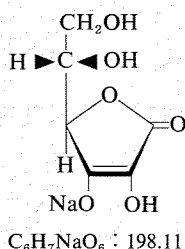
83 L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸ナトリウム

L-Ascorbic Acid and Its Compounds

L-アスコルビン酸
L-Ascorbic Acid
別名：ビタミン C



L-アスコルビン酸ナトリウム
Sodium L-Ascorbate
別名：ビタミン C ナトリウム



1. 試験法の概要

食品中のアスコルビン酸及びアスコルビン酸ナトリウムは、液体クロマトグラフィーにより還元型アスコルビン酸として、また、その酸化型であるデヒドロアスコルビン酸を還元して、液体クロマトグラフィーにより総アスコルビン酸¹⁾として定量する。必要があれば分子量比を乗じてアスコルビン酸ナトリウムの量として求める。

2. 試験法 (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⁾。

(2) 試料液の調製

① 液状及び半流動状食品

試料約 10g を精密に量り、50ml の褐色メスフラスコ³⁾に入れ、試料と同量の 4% メタリン酸溶液⁴⁾を加えた後、2% メタリン酸溶液を加えて 50ml に定容する。次に、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し、ろ液を還元型アスコルビン酸測定用試料液とする。また、ろ液 2ml を採り、0.1% ホモシステイン溶液 1ml 及び 10% リン酸水素二ナトリウム溶液 1ml を加えて混合後⁵⁾、40℃ で 20 分間加温し⁶⁾、総アスコルビン酸測定用試料液とする。

② 粉体及び固体食品⁷⁾

試料約 10g を精密に量り、100ml の褐色抽出管³⁾に入れ、試料と同量の 4% メタリン酸溶液⁴⁾を加えた後、2% メタリン酸溶液 30ml を加え、5 分間振とうする。更に、超音波を用いて 10 分間抽出を行った後、2% メタリン酸溶液を加えて 50ml に定容する。次に、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し、ろ液を還元型アスコルビン酸測定用試料液とする。また、ろ液 2ml を採り、0.1% ホモシステイン溶液 1ml 及び 10% リン酸水素二ナトリウム溶液 1ml を加えて混合後⁵⁾、40℃ で 20 分間加温し⁶⁾、総アスコルビン酸測定用試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

アスコルビン酸 0.050g を正確に量り⁸⁾、100ml の褐色メスフラスコに入れ、2% メタリン酸溶液を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準原液とする (この液 1ml は、アスコルビン酸 500 μ g を含む)。標準原液 5ml を正確に量り、50ml の褐色メスフラスコに入れ、2% メタリン酸溶液を加えて正確に 50ml とし、標準液とする (この液 1ml は、アスコルビン酸 50 μ g を含む)。標準液 1, 5, 10ml 及び 20ml をそれぞれ正確に量り、50ml の褐色メスフラスコに入れ、2% メタリン酸溶液を加えて正確に 50ml とし、検量線用標準液とする⁹⁾ (これらの液 1ml は、アスコルビン酸 1, 5, 10 μ g 及び 20 μ g を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外線吸収検出器付液体クロマトグラフ¹⁰⁾を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：アミノプロピル基を化学結合したシリカゲル¹¹⁾

カラム管：ステンレススチール製、内径 4.6~6.0mm、長さ 150~250mm

カラム温度：室温

移動相：アセトニトリル・0.01mol/l リン酸二水素ナトリウム・0.03% ホモシステイン溶液・メタノール混液 (600:100:30:30)

流速：1.0ml/分

測定波長：270nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 5 μ l ずつを正確に量り、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¹²⁾

試料液 5 μ l を正確に量り、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料液中のアスコルビン酸濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中の還元型又は総アスコルビン酸含量 (g/kg) を計算する。また、両者の差から酸化型アスコルビン

酸含量 (g/kg) を求める.

$$\text{還元型アスコルビン酸含量 (g/kg)} = \frac{C_1}{20 \times W}$$

$$\text{総アスコルビン酸含量 (g/kg)} = \frac{C_2}{10 \times W}$$

$$\text{酸化型アスコルビン酸含量 (g/kg)} = \text{総アスコルビン酸含量 (g/kg)} - \text{還元型アスコルビン酸含量 (g/kg)}$$

C_1 : 試料液中の還元型アスコルビン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

C_2 : 試料液中の総アスコルビン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

$$\text{アスコルビン酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{アスコルビン酸含量 (g/kg)} \times 1.125$$

試薬・試液

1. アセトニトリル : [残留農薬試験用]
2. メタノール : [残留農薬試験用]
3. DL-ホモシステイン : [特級]
4. リン酸二水素ナトリウム二水和物 : [特級]
5. リン酸水素二ナトリウム (12 水塩) : [特級]
6. メタリン酸 : [特級]
7. 4%メタリン酸溶液 : メタリン酸 40.0g に水を加えて溶かして 1,000ml とする. 冷所に保存する.
8. 2%メタリン酸溶液 : メタリン酸 20.0g に水を加えて溶かして 1,000ml とする. 冷所に保存する.
9. 0.1%ホモシステイン溶液 : DL-ホモシステイン 10.0mg を水に溶かして 10ml とする.
10. 0.03%ホモシステイン溶液 : DL-ホモシステイン 30.0mg を水に溶かして 100ml とする.
11. 10%リン酸水素二ナトリウム溶液 : リン酸水素二ナトリウム (12 水塩) 1.0g に水を加えて溶かして 10ml とする.

[注]

- 1) アスコルビン酸の残留を調べるには, 還元型のみの測定でよいが, 使用の状況を調べるには, 酸化型のデヒドロアスコルビン酸を含めた総アスコルビン酸を測定する必要がある.
- 2) アスコルビン酸は酸化されやすいので, 試料の調製には包丁, ハサミなどを用いて細切するか, 乳鉢で粗粉碎し, 長時間空気と接触させないようにする.
- 3) 50ml 及び 100ml の標線付きの褐色遠心管などが使用できる.
- 4) アスコルビン酸の酸化防止のため, メタリン酸溶液を用いる. 抽出液の終濃度を 2% としたのは, タンパク質の除去ができ, かつ, カラムの劣化防止のためである.

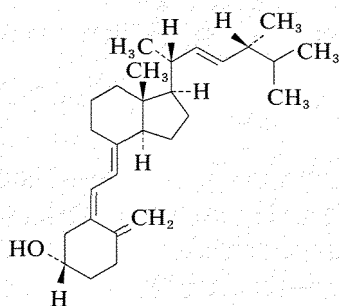
- 5) 0.1%ホモシステイン溶液は、酸化型のデヒドロアスコルビン酸の還元のために用いる。この反応は、中性に進むため、中和の目的で10%リン酸水素二ナトリウム溶液を加える。
- 6) 40℃に加温することにより、還元反応を促進する。20℃前後の温度では60~90分を要する。
- 7) バン粉、小麦粉などの乾燥した吸水性の高い試料で、本法による抽出が困難な場合、次のように抽出するとよい。試料約10gを精密に量り、100mlの褐色抽出管に入れ、2%メタリン酸溶液80mlを加え、5分間振とうする。更に超音波を用いて10分間抽出を行った後、100mlの褐色メスフラスコを受器として綿栓ろ過（漏斗に脱脂綿を軽く詰めて、ろ過する）し、抽出管及び残留物は、2%メタリン酸溶液10mlずつで2回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、2%メタリン酸溶液を加えて100mlに定容する。次に、メンブランフィルター（0.45 μ m）でろ過し、ろ液を還元型アスコルビン酸測定用試料液とする。また、ろ液2mlを採り、0.1%ホモシステイン溶液1ml及び10%リン酸水素二ナトリウム溶液1mlを加えて混合後、40℃で20分加温し、総アスコルビン酸測定用試料液とする。
- 8) 標準溶液にエリソルビン酸を加えておくことにより、アスコルビン酸とエリソルビン酸の同時分析が可能である。
- 9) カラムへの吸着があるため、原点を通る直線とはならないが、1~20 μ g/mlの濃度範囲では、直線関係が得られる。試料液の濃度が、検量線の濃度範囲を超える場合、試料液を2%メタリン酸溶液を用いて適宜希釈するか、試料採取量を減らして試験する。
- 10) 還元型のアスコルビン酸は、本移動相条件下で270nm付近に吸収極大を示すことから、紫外線検出器により測定可能であるが、電気化学検出器を用いることにより、より高感度で選択的に測定できる（加電圧：70mV）。また、電気化学検出器を用いた場合、高感度となるぶん、検量線の直線領域が低濃度側へ移動することがあるので注意を要する。
- 11) 液体クロマトグラフィーのカラムとしては、Lichrosorb NH₂、Unisil Q NH₂、TSKgel-NH₂-60、Finepak SIL NH₂、Zorbax NH₂などの市販品がある。また、移動相としては、アセトニトリル・酢酸・水混液（87：2：11）なども使用可能である。
- 12) 本法による定量限界は、還元型アスコルビン酸で0.005g/kg、総アスコルビン酸で0.01g/kgである。

84 エルゴカルシフェロール及び コレカルシフェロール

Ergocalciferol and Cholecalciferol

エルゴカルシフェロール

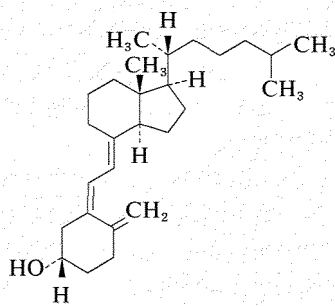
別名：カルシフェロール，ビタミン D₂



C₂₈H₄₄O : 396.66

コレカルシフェロール

別名：ビタミン D₃



C₂₇H₄₄O : 384.65

1. 試験法の概要

食品中のエルゴカルシフェロール及びコレカルシフェロールは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中にはとくにコレカルシフェロールが存在していることがある。また、この定量法ではエルゴカルシフェロールとコレカルシフェロールの分離定量¹⁾ができない。したがって、定量値は食品由来のエルゴカルシフェロール及びコレカルシフェロールと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（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）試料液の調製

ビタミン D として 2～10 IU に対応する、通常、2g 以下の試料の量を精密に量り、100ml の褐色ナス型フラスコに入れ、ピロガロール 0.5g 及び温湯 5ml を加える。エタノール製 5% 水酸化カリウム溶液 30ml を加え、還流冷却管を付け、沸騰水浴上でときどき振り混ぜながら 20 分間還流を行う。次に冷水中で速やかに室温まで冷却し、必要があればろ過し、分液漏斗に移

す。ナス型フラスコは、水 50ml 及びエチルエーテル 50ml で洗い、洗液は分液漏斗に合わせ、激しく振り混ぜる。水層は第 2 の分液漏斗に移し、エチルエーテル 50ml を加えて激しく振り混ぜ、水層は第 3 の分液漏斗に移し、エチルエーテル 50ml を加え同様の操作を行う。全エチルエーテル層を合わせ、洗液がアルカリ性²⁾を示さなくなるまで水を用いて洗った後、無水硫酸ナトリウム³⁾ 5g を加える。脱水した後、200ml の褐色ナス型フラスコを受器としてろ過し、残留物は少量のエチルエーテルで洗い、洗液はろ液に合わせ、減圧下でエチルエーテルを留去⁴⁾する。エチルエーテルを留去した後、エタノール 5ml を加えて減圧下で共沸留去を行い、更に窒素をフラスコに直接吹き込み、エタノールを完全に蒸発させる。少量のエチルエーテルを用いて濃縮器⁵⁾に移し、減圧乾固し、残留物にイソプロピルアルコールを加えて溶かして正確に 0.2ml とし、試料液とする。

(3) 標準液の調製

エルゴカルシフェロール⁶⁾ 0.010g (400,000 IU) を正確に量り、エタノールを加えて溶かして正確に 1,000ml とする。この液 1ml を正確に量り、エタノールを加えて正確に 100ml とし、標準原液とする（この液 1ml は、エルゴカルシフェロール $0.1\mu\text{g}$ (4 IU) を含む）。標準原液 1ml を正確に量り、100ml の褐色ナス型フラスコに入れ、ピロガロール 0.5g 及び温湯 5ml を加え、以下(2)試料液の調製と同様に操作し、標準液とする（この液 1ml は、エルゴカルシフェロール $0.5\mu\text{g}$ (20 IU) を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外分光検出器付液体クロマトグラフを用い、次の 2 つの条件で処理し測定する。

a 分取用

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 10mm⁷⁾，長さ 250mm

カラム温度：室温

移動相：アセトニトリル・メタノール混液 (1:1)，3ml/分

測定波長：254nm

b 測定用

カラム充てん剤：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 250mm

カラム温度：室温

移動相：イソプロピルアルコール・*n*-ヘキサン混液 (0.4:99.6)，1ml/分

測定波長：254nm

② 測定

試料液 100 μ l を正確に量り、分取用の条件の液体クロマトグラフに注入し、ビタミン D 画分を濃縮器⁵⁾を受器として分取⁸⁾する。次に、減圧乾固⁹⁾し、イソプロピルアルコール・*n*-ヘキサン混液 (0.4 : 99.6) を加えて溶かして正確に 0.2ml とし、この液 50 μ l を正確に量り、測定用の条件の液体クロマトグラフに注入する。

③ 定量

標準液 100 μ l を正確に量り、②測定と同様に操作し、得られたピーク高さ又はピーク面積と試料液のピーク高さ又はピーク面積より、次式から検体中のエルゴカルシフェロール及びコレカルシフェロール含量 (IU/kg) を求める。

$$\text{エルゴカルシフェロール及びコレカルシフェロール含量 (IU/kg)} = \frac{200 \times A \times C}{A_s \times W}$$

A : 試料液から得られたクロマトグラム上のピーク高さ又はピーク面積

A_s : 標準液から得られたクロマトグラム上のピーク高さ又はピーク面積

C : 標準液中のエルゴカルシフェロール濃度 (IU/ml)

W : 検体の採取量 (g)

試薬・試液

1. アセトニトリル : [液体クロマトグラフ用]
2. イソプロピルアルコール : [液体クロマトグラフ用]
3. エチルエーテル : 過酸化物を含まないもの。エチルエーテルを蒸留して用いる (初留、後留の 10 % を除く)。
4. エタノール : [99.5v/v %, 特級]
5. エタノール製 5 % 水酸化カリウム溶液 : 水酸化カリウム 25g を 500ml メスフラスコに入れ、少量の水で溶かし、エタノールを加えて 500ml とする。
6. ピロガロール : [特級]
7. *n*-ヘキサン : [液体クロマトグラフ用]
8. 無水硫酸ナトリウム : 硫酸ナトリウム (無水) [特級]
9. メタノール : [液体クロマトグラフ用]

[注]

- 1) カラム及び移動相の条件によっては分離の可能性もある。
- 2) 洗液にフェノールフタレイン試液を加えて紫色にならないことを確かめる。
- 3) 無水硫酸ナトリウムの代わりに、液相分離ろ紙を用いてもよい。
- 4) 減圧下で留去のときは 40℃ 以下で行う (以下同じ)。
- 5) Kuderna-Danish 濃縮器等を用いる。

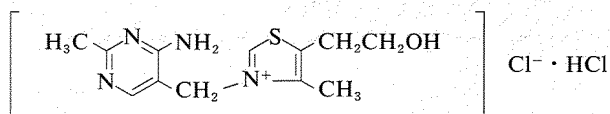
- 6) 現在、わが国で市販されている調製粉乳のようなビタミン D 強化食品には主としてエルゴカルシフェロールが添加されているので、この場合の標準液にはエルゴカルシフェロールを用いる。一方、天然中のビタミン D はコレカルシフェロールとして存在している場合が多いので、その場合はコレカルシフェロール 10mg を標準液に用いる。
- 7) カラム内径を大きくすると、カラムへのサンプル負荷が少なくてすみ、分取カラムに適當である。
- 8) 常にビタミン D₂又は D₃の標準品を用いて溶出位置を確認しておくことが必要である。この条件で、ビタミン D₂、D₃は保持時間 17~18 分に溶出するので、16~19 分を D 画分とする。ミニフラクションコレクターを用いるときは、2,500~2,850 滴の画分を分取するとよい。大半の妨害ピークは、ビタミン D₂画分よりも前の方に溶出する。
- 9) 分取したビタミン D 画分のアセトニトリル・メタノール混液は、突沸させないようにできるだけ低温で減圧乾固する。

85 チアミン塩類

Thiamine Salts

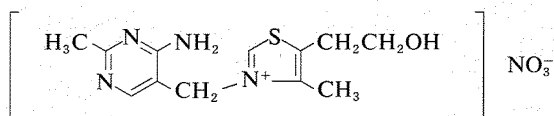
チアミン塩酸塩

Thiamine Hydrochloride

別名：ビタミン B₁塩酸塩 $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl} : 337.27$

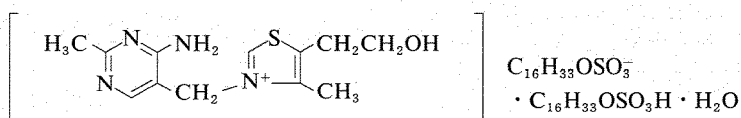
チアミン硝酸塩

Thiamine Mononitrate

別名：ビタミン B₁硝酸塩 $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4\text{S} : 327.36$

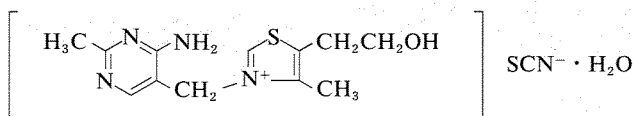
チアミンセチル硫酸塩

Thiamine Dicetylsulfate

別名：ビタミン B₁セチル硫酸塩 $\text{C}_{44}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} : 927.39$

チアミンチオシアン酸塩

Thiamine Thiocyanate

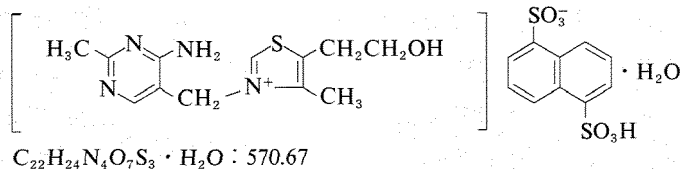
別名：ビタミン B₁ロゲン酸塩 $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{OS}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} : 341.46$

チアミンナフタレン-1,5-ジスルホン酸塩

Thiamine Naphthalene-1,5-Disulfonate

別名：チアミンナフタリン-1,5-ジスルホン酸塩,

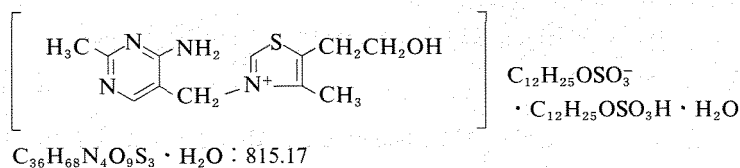
ビタミン B₁ナフタレン-1,5-ジスルホン酸塩



チアミンラウリル硫酸塩

Thiamine Dilaurylsulfate

別名：ビタミン B₁ラウリル硫酸塩



1. 試験法の概要

食品中のチアミン塩類は、チオクローム蛍光法によりチアミン塩酸塩として定量する。必要があれば定数を乗じて各チアミン塩の量として求める。食品中には天然のチアミンが分布している。したがって、定量値は食品由来のチアミンと添加されたものの合計値である。

2. 試験法（チオクローム蛍光法）

（1）検体の採取¹⁾と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

チアミン塩酸塩として約 20 μg に対応する、通常、10g 以下の試料の量を精密に量り、0.1mol/l 塩酸 60ml²⁾ を加えてよく混和³⁾した後⁴⁾、4mol/l 酢酸ナトリウム溶液を加えて pH4.0～5.0 に調整する⁵⁾。これにジアスターゼ溶液（1→20）5ml を加えてよく混和し、トルエン⁶⁾ 5 滴を加えた後、38～40℃ で一夜⁷⁾ 放置する。冷後、水を加えて正確に 100ml とする。これを乾燥ひだ折りろ紙⁸⁾ を用いてろ過⁹⁾、試料溶液¹⁰⁾ とする。

試料溶液 25ml を正確に量り、パームチットカラムに静かに注ぐ¹¹⁾。試料溶液がカラム中のパームチット層の上面にくるまで、3 秒に 1 滴の速度¹²⁾ で流出させた後、塩酸（1→100,000）

約5mlでカラムのR部の内面を洗い流す。次に熱湯50~100mlを注ぎ、熱湯がカラム中のパームチット層の上面にくるまで、1秒に1滴の速度¹³⁾で流出させた後¹⁴⁾、カラムのコックを閉める。

カラムが温かいうちに¹⁵⁾、受器として25mlのメスフラスコを用い、沸騰した塩化カリウム・塩酸溶液10mlをカラムに注ぎ、1秒に1滴の速度で流出させ、更に沸騰した塩化カリウム・塩酸溶液8ml及び7mlをそれぞれカラムに注ぎ、同様に流出させ、冷後、水を加えて正確に25mlとし、試料液とする。

(3) 標準液の調製

チアミン塩酸塩を105℃で2時間乾燥した後、その0.100gを正確に量り、0.1mol/l塩酸2mlを加えて溶かし、水を加えて正確に100mlとし、標準原液¹⁶⁾とする（この液1mlは、チアミン塩酸塩1mgを含む）。用時標準原液10mlを正確に量り、水を加えて正確に100mlとし、この液10mlを正確に量り、水を加えて正確に1,000mlとし、標準液とする（この液1mlは、チアミン塩酸塩1 μ gを含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

蛍光光度計を用い、励起波長370nm、測定波長440nm、液層10mmの条件によって測定する。

② 測定液の調製

次のいずれかの方法により調製する。

a フェリシアン化カリウム溶液を用いる方法

試料液5mlずつを正確に量り、それぞれ3本の共栓試験管A, B, C¹⁷⁾に入れる。Aには標準液1mlを正確に量って加え、B, Cには水1mlずつを正確に量って加える。更にA, Bにフェリシアン化カリウム溶液¹⁸⁾（1→100）0.5mlずつを、Cには水0.5mlを正確に量って加え、よく振り混ぜる。次にA, B, Cに水酸化ナトリウム溶液（3→10）3mlずつを正確に量って加え、30秒間振り混ぜた後、イソブチルアルコール10mlずつを正確に量って加え、密栓して2分間激しく振り混ぜる。イソブチルアルコール層が分離するまで静置¹⁹⁾した後、イソブチルアルコール層7~8mlを駒込ピペットで別の試験管にそれぞれ分取し、無水硫酸ナトリウム2gずつを少量ずつ加えて²⁰⁾振り混ぜ、イソブチルアルコール層が澄明になるまで静置し、測定液とする。

b 臭化シアン溶液を用いる方法

試料液5mlずつを正確に量り、それぞれ3本の共栓試験管A, B, C¹⁷⁾に入れる。Aには標準液1mlを正確に量って加え、B, Cには水1mlずつを正確に量って加える。更にA, Bに

臭化シアン溶液 3ml ずつを、C には水酸化ナトリウム溶液 (3 → 10) 3ml を正確に量って加え、よく振り混ぜ、次に A、B に水酸化ナトリウム溶液 (3 → 10) 3ml ずつ、C に臭化シアン溶液 3ml を正確に量って加え、よく振り混ぜた後、イソブチルアルコール 10ml ずつを正確に量って加え、密栓して 1 分間激しく振り混ぜる。イソブチルアルコール層が分離するまで静置¹⁹⁾した後、イソブチルアルコール層 7~8ml を駒込ピペットで別の試験管にそれぞれ分取し、無水硫酸ナトリウム 2g ずつを少量ずつ加えて²⁰⁾振り混ぜ、イソブチルアルコール層が澄明になるまで静置し、測定液とする。

③ 定量

測定液を蛍光光度計用セルに入れ、蛍光強度を測定する。A の蛍光強度を 100 % に合わせ、B、C の蛍光強度を測定する。

検体中のチアミン塩酸塩の含量 (g/kg) は、次式によって求める²¹⁾。

$$\text{チアミン塩酸塩含量 (g/kg)} = \frac{A \times (B - C) \times T}{50 \times (100 - B) \times W}$$

A : 標準液中のチアミン塩酸塩濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

B : B の蛍光強度 (%)

C : C の蛍光強度 (%)

W : 試料の採取量 (g)

T : 試料液の希釈倍数¹⁰⁾

チアミン硝酸塩含量 (g/kg) = チアミン塩酸塩含量 (g/kg) $\times$ 0.9706

チアミンセチル硫酸塩含量 (g/kg) = チアミン塩酸塩含量 (g/kg) $\times$ 2.750

チアミンチオシアン酸塩含量 (g/kg) = チアミン塩酸塩含量 (g/kg) $\times$ 1.012

チアミンナフタレン-1, 5-ジスルホン酸塩含量 (g/kg)

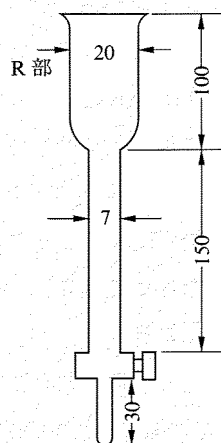
= チアミン塩酸塩含量 (g/kg) $\times$ 1.692

チアミンラウリル硫酸塩含量 (g/kg) = チアミン塩酸塩含量 (g/kg) $\times$ 2.417

試薬・試液等

1. イソブチルアルコール : [特級] 蛍光がないことを確かめる。
2. 塩化カリウム : [特級]
3. 0.1mol/l 塩酸 : 塩酸 9.5ml に水を加えて 1,000ml とする。
4. 塩化カリウム・塩酸溶液 : 塩化カリウム 250g に 0.1mol/l 塩酸を加えて溶かして 1,000ml とする²²⁾。
5. 酢酸ナトリウム : [特級]
6. 4mol/l 酢酸ナトリウム溶液 : 酢酸ナトリウム 544g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。

7. ジアスターゼ：市販品を用いる。
8. 臭素：〔特級〕
9. チオシアン酸カリウム：〔特級〕
10. 臭化シアン溶液：氷冷した水 100ml に臭素 2ml を加え、激しく振り混ぜた後、氷冷したチオシアン酸カリウム溶液（1→10）を臭素の色がまさに脱色するまで滴加する。この溶液はドラフト中で調製し、冷所に保存する。調製後 1 カ月以内に用いる。
11. トルエン：〔特級〕
12. パームチット：市販のビタミン B₁ 定量用を用いる²³⁾。
13. パームチットカラム：図 85-1 に示すカラムを用い、次の方法によりパームチットを充てんする。コックの部分に薄くシリコーン樹脂を塗り、コックを閉じて水を注ぎ、カラムの下端に少量のガラスワールを詰める。ピーカーにパームチット 1.3~1.5g を採り、水 20~30ml を加え、カラム中に空気が残らないように流し込む²⁴⁾。水がカラム中のパームチット層の上面にくるまで流出させた後、酢酸（3→100）約 10ml を加え、酢酸がカラム中のパームチット層の上面にくるまで 3 秒に 1 滴の速度で流出させる。更に水 20ml を加えて同様に流出させる²⁵⁾。
14. フェリシアン化カリウム：〔特級〕
15. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）〔特級〕 蛍光のないことを確かめる。



単位：mm（直径はすべて内径を示す）

図 85-1 パームチットカラム

〔注〕

- 1) 栄養改善法（昭和 27 年 7 月 31 日 法第 248 号）第 12 条に基づく特殊栄養食品の標準成分基準（昭和 46 年 4 月 8 日 衛発第 222 号）では、検体は 5 包装以上から無作為に採ることになっている。また、1 包装では任意の 5 箇所の部分から試料の採取量以上の量を採ることになっている。栄養改善法では試料の採取量は次のようになっている。米 3g、押し麦、小麦粉、ゆでめん、乾めん、即席めん及びみそいずれも 5g、食パン 10g。また試料液としては適宜希釈してチアミン塩酸塩含量 20 μ g/100ml としている。
- 2) 0.1mol/l 硫酸 60ml を使用してもよい。
- 3) 均質になりにくい場合は、十分にかくはんする。
- 4) 続いて沸騰水浴中で 30 分間加熱抽出してもよい。
- 5) 後に加えるジアスターゼの至適 pH が 4.0~5.0 である。
- 6) 防腐の目的で添加する。
- 7) 45~50℃ で 2 時間から 3 時間放置してもよい。そのときはトルエンを加えなくてよい。
- 8) ろ紙は蛍光のないものを使用する。
- 9) 遠心分離（15 分間、3,000 回転/分）して上澄液を使用してもよい。
- 10) この試料溶液には、チアミン塩酸塩として 1ml 中に約 0.2 μ g 含まれるようにする。チアミン塩酸塩の含量が多い場合は適宜希釈する。この際の希釈倍数を T とする。
- 11) チアミン以外の物質に起因する蛍光（盲蛍光）が非常に少ない試料の場合には、パームチット

ト処理をせずに、次の②測定液の調製に進んでよい。

- 12) 1 分間に 1ml となる。
- 13) 1 分間に 3~4ml となる。
- 14) 洗液に盲蛍光がなくなるまで繰り返す。
- 15) 温度が下がると流出中に塩化カリウムの結晶がカラムの中で析出する。
- 16) 標準原液は遮光して冷暗所に保存する。数カ月は保存できる。
- 17) 試験管 A は添加試験用、B は主試験用、C は空試験用である。
- 18) 遮光して冷暗所に保存する。
- 19) 遠心分離（2 分間、1,000~1,500 回転/分）する方法もある。又は 40℃に加熱してもよい。
- 20) イソブチルアルコール層に水がわずかに含まれていると濁るので加える。
- 21) 各チアミン塩類よりチアミン塩酸塩への換算係数は以下のとおりである。
チアミン硝酸塩：1.030
チアミンセチル硫酸塩：0.3637
チアミンチオシアン酸塩：0.9878
チアミンナフタレン-1, 5-ジスルホン酸塩：0.5910
チアミンラウリル硫酸塩：0.4137
- 22) もし結晶が析出したら、加熱して完全に溶かして使用する。
- 23) 試薬は前処理する必要がなく、そのまま使用できる。
- 24) 空気が入ると吸着が十分に行われない。また、流出速度が遅くなる。
- 25) パームチットの上端に水を少量残しておき、乾燥させないようにする。

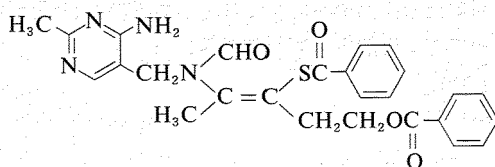
86 チアミン誘導体

Thiamine Derivatives

ジベンゾイルチアミン

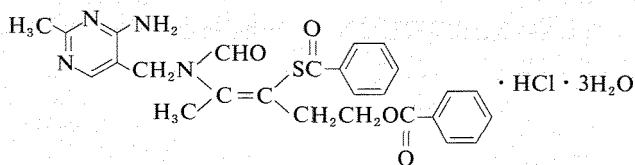
Dibenzoyl Thiamine

略名：DBT

 $C_{26}H_{26}N_4O_4S$: 490.58

ジベンゾイルチアミン塩酸塩

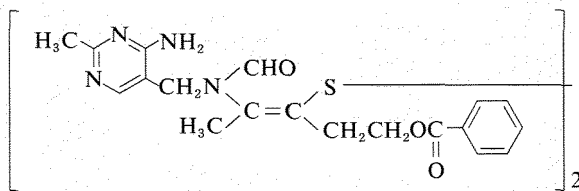
Dibenzoyl Thiamine Hydrochloride

 $C_{26}H_{26}N_4O_4S \cdot HCl \cdot 3H_2O$: 581.09

ビスベンチアミン

Bisbentiamine

別名：ベンゾイルチアミンジスルフィド

 $C_{38}H_{42}N_8O_6S_2$: 770.93

1. 試験法の概要

食品中のジベンゾイルチアミン、ジベンゾイルチアミン塩酸塩及びビスベンチアミンは、チオクローム蛍光法により定量する。食品中には天然のチアミンが分布している。したがって、定量値は食品由来のチアミンと添加されたものの合計値である。

2. 試 験 法 (チオクローム蛍光法)

(1) 検体の採取¹⁾と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

チアミン誘導体として約 20 μ g に対応する、通常、10g 以下の試料の量を精密に量り、0.1mol/l 塩酸・エタノール混液 70ml を加えて軽く振り混ぜた後、還流冷却管を付けて 80～90℃の水浴中でときどき軽く振り混ぜながら 30 分間加温する。冷後、0.1mol/l 塩酸・エタノール混液を加えて正確に 100ml とする、これを乾燥ひだ折りろ紙²⁾を用いてろ過³⁾し、試料液⁴⁾とする。

(3) 標準液の調製

ジベンゾイルチアミン (又はビスベンチアミン) 100mg を正確に量り、0.1mol/l 塩酸・エタノール混液を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準原液とする。用時標準原液 10ml を正確に量り、0.1mol/l 塩酸・エタノール混液を加えて正確に 100ml とし、この液 10ml を正確に量り、0.1mol/l 塩酸・エタノール混液を加えて正確に 1,000ml とし、標準液とする (この液 1ml は、チアミン誘導体 1 μ g を含む)。

(4) 測 定 法

① 測定条件

蛍光光度計を用い、励起波長 370nm、測定波長 440nm、液層 10mm の条件によって測定する。

② 測定液の調製

次のいずれかの方法により調製する。

a フェリシアン化カリウム溶液を用いる方法

試料液 5ml ずつを正確に量り、それぞれ 3 本の共栓試験管 A, B, C に入れる。A には標準液 1ml を正確に量って加え、B, C には 0.1mol/l 塩酸・エタノール混液 1ml ずつを正確に量って加える。よく振り混ぜた後、A, B, C にシステイン塩酸塩溶液 (1→50) 0.1ml ずつをそれぞれ正確に量って加え、次に 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液 1ml ずつを正確に量って加える。よく振り混ぜ、正確に 20 分間放置した後、1mol/l 塩酸 1ml ずつを正確に量って加えて微酸性とする。更に A, B にフェリシアン化カリウム溶液⁵⁾ (1→100) 0.5ml ずつを、C には水 0.5ml を正確に量って加えてよく振り混ぜる。次に A, B, C に水酸化ナトリウム溶液 (3→

10) 3ml ずつを正確に量って加え、30 秒間振り混ぜた後、イソブチルアルコール 10ml ずつを正確に量って加え、密栓して 2 分間激しく振り混ぜる。イソブチルアルコール層が分離するまで静置⁶⁾した後、イソブチルアルコール層 7~8ml を駒込ピペットで別の試験管にそれぞれ分取し、無水硫酸ナトリウム 2g ずつを少量ずつ加えて⁷⁾振り混ぜ、イソブチルアルコール層が澄明になるまで静置し、測定液とする。

b 臭化シアン溶液を用いる方法

試料液 5ml ずつを正確に量り、3 本の共栓試験管 A, B, C に入れる。A には標準液 1ml を正確に量って加え、B, C には 0.1mol/l 塩酸・エタノール混液 1ml ずつを正確に量って加える。よく振り混ぜた後、A, B, C にシステイン塩酸塩溶液 (1→50) 0.1ml ずつを正確に量って加え、次に 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液 1ml ずつを正確に量って加える。よく振り混ぜ、正確に 20 分間放置した後、1mol/l 塩酸 1ml ずつを正確に量って加えて微酸性とする。更に A, B に臭化シアン溶液 3ml ずつを、C には水酸化ナトリウム溶液 (3→10) 3ml を正確に量って加え、よく振り混ぜる。次に、A, B に水酸化ナトリウム溶液 (3→10) 3ml ずつを、C に臭化シアン溶液 3ml を正確に量って加え、よく振り混ぜた後、イソブチルアルコール 10ml ずつを正確に量って加え、密栓して 1 分間激しく振り混ぜる。イソブチルアルコール層が分離するまで静置⁶⁾した後、イソブチルアルコール層 7~8ml を駒込ピペットで別の試験管にそれぞれ分取し、無水硫酸ナトリウム 2g ずつを少量ずつ加えて⁷⁾振り混ぜ、イソブチルアルコール層が澄明になるまで静置し、測定液とする。

③ 定量

測定液を蛍光光度計用セルに移し、蛍光強度を測定する。A の蛍光強度を 100 % に合わせ、B, C の蛍光強度を測定する。検体中のジベンゾイルチアミン、ジベンゾイルチアミン塩酸塩及びビスベンチアミンの含量 (g/kg) は次式によって求める⁸⁾。

$$\text{ジベンゾイルチアミン含量 (g/kg)} = \frac{A \times (B - C) \times T}{50 \times (100 - B) \times W}$$

$$\text{ジベンゾイルチアミン塩酸塩含量 (g/kg)} = \frac{A \times (B - C) \times T}{50 \times (100 - B) \times W} \times 1.184$$

$$\text{ビスベンチアミン含量 (g/kg)} = \frac{A \times (B - C) \times T}{50 \times (100 - B) \times W}$$

A : 標準液中のチアミン誘導体濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

B : B の蛍光強度 (%)

C : C の蛍光強度 (%)

W : 試料の採取量 (g)

T : 試料液の希釈倍数⁴⁾

試薬・試液

1. イソブチルアルコール：〔特級〕 蛍光がないことを確かめる。
2. エタノール：〔95v/v%，特級〕
3. 0.1mol/l 塩酸・エタノール混液：1mol/l 塩酸 10ml を採り，エタノール 74ml 及び水を加えて 100ml とする。
4. L-システイン塩酸塩：〔特級〕
5. 臭素：〔特級〕
6. チオシアン酸カリウム：〔特級〕
7. 臭化シアン溶液：氷冷した水 100ml に臭素 2ml を加え，激しく振り混ぜた後，氷冷したチオシアン酸カリウム溶液（1→10）を臭素の色がまさに脱色するまで滴加する。この溶液はドラフト中で調製し，冷所に保存する。調製後 1 カ月以内に用いる。
8. フェリシアン化カリウム：〔特級〕
9. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）〔特級〕 蛍光がないことを確かめる。

〔注〕

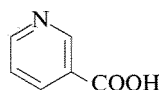
- 1) 栄養改善法（昭和 27 年 7 月 31 日 法第 248 号）第 12 条に基づく特殊栄養食品の標準成分基準（昭和 46 年 4 月 8 日 衛発第 222 号）では，検体は 5 包装以上から無作為に採ることになっている。また，1 包装では任意の 5 箇所の部分から試料の採取量以上の量を採ることになっている。栄養改善法では試料の採取量は次のようになっている。米 3g，押し麦，小麦粉，ゆでめん，乾めん，即席めん及びみそいずれも 5g，食パン 10g。また試料液としては適宜希釈してチアミン誘導体含量 $20\mu\text{g}/100\text{ml}$ としている。
- 2) ろ紙は蛍光のないものを使用する。
- 3) 遠心分離して上澄液を使用してもよい。
- 4) この試料液にはチアミン誘導体が 1ml 中に約 $0.2\mu\text{g}$ 含まれるようにする。チアミン誘導体の含量が多い場合は適宜希釈する。この際の希釈倍数を T とする。
- 5) 遮光して冷暗所に保存する。
- 6) 遠心分離（2 分間，1,000～1,500 回転/分）する方法もある。
- 7) イソブチルアルコール層に水がわずかに含まれると濁るので加える。
- 8) ジベンゾイルチアミン，ジベンゾイルチアミン塩酸塩及びビスベンチアミンよりチアミン塩酸塩への換算係数は，それぞれ 0.6875，0.5804，0.8748 である。

87 ニコチン酸及びニコチン酸アミド

Nicotinic Acid and Nicotinamide

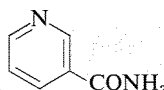
ニコチン酸

別名：ナイアシン

 $C_6H_5NO_2$: 123.11

ニコチン酸アミド

別名：ナイアシンアミド

 $C_6H_6N_2O$: 122.13

1. 試験法の概要

食品中のニコチン酸及びニコチン酸アミドは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中には天然のニコチン酸及びニコチン酸アミドが分布している。したがって、定量値は食品由来の遊離のニコチン酸及びニコチン酸アミドと添加されたものの合計値である。

2. 試験法（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) 試料液の調製

試料約 10g を精密に量り、水 30ml を加えてホモジナイズし、遠心分離（10 分間、3,000 回転／分）し、上澄液を分取する。沈澱物は水 20ml ずつを用いて更に 2 回同様に操作し、上澄液を分取する。全上澄液を 100ml のメスフラスコに合わせ、水を加えて正確に 100ml とし、綿栓ろ過する。このろ液 10ml を正確に量り、硫酸亜鉛飽和溶液 1ml、1mol/l 水酸化ナトリウム溶液 0.5ml 及び水を加えて正確に 25ml とし、30 分間放置した後、ろ紙でろ過し、更にメンブランフィルター（孔径 $0.45\mu m$ ）でろ過して、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

ニコチン酸（又はニコチン酸アミド）0.010g を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、ニコチン酸（又はニコチン酸アミド） $100\mu g$ を含む）。標準液 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、それぞれ水を加えて正確に 50ml

ずつとし、検量線用標準液とする（これらの液は、それぞれニコチン酸（又はニコチン酸アミド）2, 4, 6, 8 μ g 及び 10 μ g を含む）。

（４） 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：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 250mm

カラム温度：室温

移動相：水・メタノール・リン酸一カリウム混液（224：25：1）、1.0ml/分

測定波長：254nm

② 検量線

検量線用標準液 10 μ l ずつをそれぞれ正確に量り、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

試料液 10 μ l を正確に量り、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料液中のニコチン酸（又はニコチン酸アミド）濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中のニコチン酸（又はニコチン酸アミド）含量（g/kg）を求める。

$$\text{ニコチン酸（又はニコチン酸アミド）含量（g/kg）} = \frac{C}{4 \times W}$$

C：試料液中のニコチン酸（又はニコチン酸アミド）濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

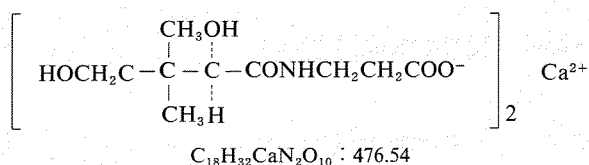
試薬・試液

1. メタノール：〔高速液体クロマトグラフ用〕
2. リン酸一カリウム：リン酸二水素カリウム〔特級〕
3. 硫酸亜鉛：硫酸亜鉛七水和物〔特級〕
4. 水酸化ナトリウム：〔特級〕

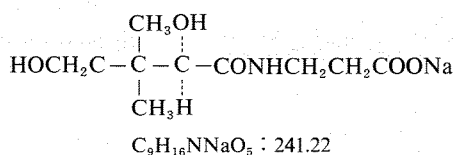
88 パントテン酸カルシウム及び パントテン酸ナトリウム

Calcium Pantothenate and Sodium Pantothenate

パントテン酸カルシウム



パントテン酸ナトリウム



1. 試験法の概要

食品中のパントテン酸カルシウム及びパントテン酸ナトリウムは、液体クロマトグラフィー（試験法 A）又は *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いる微生物定量法（試験法 B）によりパントテン酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じてパントテン酸カルシウム又はパントテン酸ナトリウムの量として求める。

2. 試験法

試験法 A（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

試料を細切り、その約 10g を精密に量り、水 60ml 及びシリコーン樹脂 1 滴を加えて、5 分間ホモジナイズする¹⁾。これを遠心管に少量の水を用いて移し、0.1mol/l 塩酸で pH4~5 に調整する。次に硫酸亜鉛溶液（3→20）10ml を加えてよく混和し、遠心分離を行う。上澄液は

ろ紙でろ過し、ろ液は 100ml のメスフラスコに受ける。遠心管の残留物は少量の水で先のろ紙に流し込み、少量の水で洗い、洗液は先のメスフラスコに合わせる。水を加えて正確に 100ml とし、この液をメンブランフィルター（孔径 $1.0\mu\text{m}$ ）²⁾ でろ過し、試料液とする。

（３） 検量線用標準液の調製

デシケーター（五酸化リン）中で乾燥したパントテン酸カルシウム³⁾ 1.0918g を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 1,000ml とし、標準液とする（この液 1ml は、パントテン酸 1mg を含む）。標準液 1, 2, 4, 8ml 及び 12ml をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれパントテン酸 10, 20, 40, $80\mu\text{g}$ 及び $120\mu\text{g}$ を含む）。

（４） 測定法

① 測定条件

紫外分光光度計検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件で測定する。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 6.2mm, 長さ 250mm ⁴⁾

移動相：アセトニトリル・リン酸一カリウム溶液の混液（1：9）⁵⁾, 1ml/分⁵⁾

測定波長：200nm ⁶⁾

② 検量線の作成

検量線用標準液 $10\mu\text{l}$ ⁷⁾ をそれぞれ正確に量り、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

試料液 $10\mu\text{l}$ を正確に量り、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料液中のパントテン酸濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）を求め、次式によって試料中のパントテン酸含量（g/kg）を計算する。

$$\text{パントテン酸含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 10}$$

C：試料液中のパントテン酸濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）

W：試料の採取量（g）

パントテン酸カルシウム含量（g/kg）＝パントテン酸含量（g/kg） $\times 1.087$

パントテン酸ナトリウム含量（g/kg）＝パントテン酸含量（g/kg） $\times 1.100$

試薬・試液

1. アセトニトリル：[残留農薬試験用]

2. アセトニトリル・リン酸一カリウム溶液の混液 (1:9): アセトニトリル1容量にリン酸一カリウム溶液9容量を加え、塩酸で pH3 に調整する。
3. シリコーン樹脂: [食添]
4. 硫酸亜鉛: [特級]
5. リン酸一カリウム: [特級]
6. リン酸一カリウム溶液: リン酸一カリウム 2.72g に水を加えて溶かして 1,000ml とする (0.02mol/l)。

[注]

- 1) 粉碎と抽出を同時に行う。
- 2) 液体クロマトグラフのカラムに目詰まりがなければ必要としない。
- 3) USP の Reference Standard 又はこれに準ずるもの。
- 4) カラムの長さ、内径は自由に選ぶ。
- 5) 移動相組成比及び流速はカラムの状態等により一律に規制ができないため適宜変更し、パントテン酸の保持時間が 8~12 分になるように設定する。
- 6) 移動相でのパントテン酸の吸収極大が 194nm 近くにあるが、移動相の吸収もあるため、測定波長を 200nm とした。
- 7) 注入量は、検出感度、液体クロマトグラフの注入方式にも関係するので、3~20 μ l の一定量に変更できる。

試験法 B (微生物定量法)

(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) 試料液の調製

粉碎した試料約 1g を精密に量り、30ml の水を加え、よく混和しながら 0.2mol/l 酢酸及び酢酸ナトリウム溶液 (1 → 50) を加えて pH を 5.6~5.7 に調整する¹⁾。次に、オートクレーブに入れ、1kg/cm²で約 5 分間²⁾加熱した後、冷却する。必要があれば、1mol/l 塩酸を加えて pH を 4.0~4.5 に調整した後、ろ過し、容器及び残留物を少量の水で洗い、ろ液及び洗液を合わせ、水を加えて正確に 50ml とする。この液 25ml を正確に量り、0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 6.8 に調整し、水を加えて正確に 50ml にする。この液 10ml を正確に量り、溶液の 1ml がパントテン酸約 50ng 程度含むように水で希釈し、試料液とする。

(3) 標準液の調製

デシケーター（五酸化リン）中で乾燥させたパントテン酸カルシウム 54.4mg を正確に量り、1,000ml のメスフラスコに入れ、水約 500ml を加えて溶かす。この液に 0.2mol/l 酢酸 10ml、酢酸ナトリウム溶液（1 → 50）100ml を加え、水を加えて正確に 1,000ml とし、標準原液とする（この液 1ml は、パントテン酸 50 μ g を含む）。この液はトルエン少量を加えて冷所に保存する。

標準原液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、更にこの液 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、パントテン酸 50ng を含む）。

(4) 定量用培地の調製

カゼイン酸分解液³⁾ 10ml、シスチン・トリプトファン溶液 10ml、アデニン・グアニン・ウラシル溶液 2ml、ビタミン液 2ml、*p*-アミノ安息香酸・ニコチン酸・ビタミン B₆液 2ml、塩類溶液 A 2ml 及び塩類溶液 B 2ml を混和し、これにブドウ糖 4g 及び酢酸ナトリウム 2g を加えて溶かし、水酸化ナトリウム溶液（1 → 10）で pH を 6.8 に調整し、更に水を加えて全量を 100ml とし、定量用培地とする。必要があればろ過する。

(5) 接種菌液の調製

使用菌株として *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014⁴⁾ を用いる。保存されていた菌株保存用培地から増菌用培地 10ml に接種し、37℃ で 16～24 時間培養する。培養後、菌浮遊液をよく振り混ぜた後、そのまま接種菌液⁵⁾ とする。

(6) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、540～660nm の一定波長における吸光度を測定する。

② 測定

試料液 0.5、1.0ml 及び 1.5ml を 2 回ずつ正確に量り、2 系列の試験管 T（0.5～1.5）、T'（0.5～1.5）に入れ、それぞれに定量用培地 2ml 及び水を加えて正確に 4ml とし、よく混和する。

各試験管は綿栓をした後、1kg/cm² で 5 分間高圧蒸気滅菌し²⁾、冷却した後、各試験管に接種菌液 1 滴ずつを無菌的に接種し、37℃、20～24 時間ふ卵器⁶⁾に入れて培養後、内容物をよく振り混ぜて試料測定液とする。水 2ml と定量用培地 2ml を合わせて正確に 4ml とし、接種せずに試料測定液と同様に操作した液を対照として波長 540～660nm の一定波長における試料測定液の吸光度 AT（0.5～1.5）、AT'（0.5～1.5）を測定する。

③ 検量線

標準液 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75ml 及び 2.0ml を 2 回ずつ正確に量り, 2 系列の試験管 S (0~2.0), S' (0~2.0) に入れ, ②測定と同様に操作し, 標準液による吸光度 AS_0 と AS'_0 , $AS_{0.25}$ と $AS'_{0.25}$, …… $AS_{2.0}$ と $AS'_{2.0}$ のそれぞれ平均値を求め, 濃度を横軸に, 吸光度を縦軸にとって検量線を作成する. ただし標準液による各吸光度が, 全体的比例曲線の値からみて $\pm 10\%$ 以上かけはなれている場合, この吸光度の数値は除外する.

④ 定量

検量線を用いて試料測定液による吸光度 $AT_{0.5}$, $AT'_{0.5}$, $AT_{1.0}$, $AT'_{1.0}$, $AT_{1.5}$, $AT'_{1.5}$ から, 6 本の試験管中のパントテン酸含量 (ng) を求め, 試料液 1ml 当たりの含量 (ng/ml) に換算してこの平均値を a とする.

ただし各含量値 (ng/ml) が, 平均値 a から $\pm 10\%$ 以上かけはなれているとき, その数値は計算から除外する. この除外した数値が 3 個以上ある場合は試験をやり直す. 次式によって検体中のパントテン酸含量 (g/kg) を計算する.

$$\text{パントテン酸含量 (g/kg)} = \frac{a \times b}{W \times 100,000}$$

a : 試料液 1ml 中のパントテン酸量 (ng/ml)

b : 試料液の量 (ml)

W : 試料の採取量 (g)

$$\text{パントテン酸カルシウム含量 (g/kg)} = \text{パントテン酸含量 (g/kg)} \times 1.087$$

$$\text{パントテン酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{パントテン酸含量 (g/kg)} \times 1.100$$

試薬・試液

1. アデニン・グアニン・ウラシル溶液: 硫酸アデニン, 塩酸グアニン及びウラシル各 0.1g を塩酸 (1 → 2) 5ml に加熱しながら溶かし, 冷後, 水を加えて 100ml とし, トルエン少量を加えて約 10℃ で保存する.
2. p-アミノ安息香酸: [特級]
3. p-アミノ安息香酸・ニコチン酸・ビタミン B₆ 液: p-アミノ安息香酸 10.0mg, ニコチン酸 20.0mg 及びピリドキシン塩酸塩 40.0mg をエタノール溶液 (1 → 4) に溶かして全量を 1,000ml とし, 冷所に保存する.
4. ウラシル: 市販の特級品を用いる.
5. エタノール: [95v/v%, 特級]
6. 塩酸グアニン: 市販の特級品を用いる.
7. 塩酸チアミン: 市販の特級品を用いる.
8. 塩類溶液 A: リン酸一カリウム及びリン酸二カリウム各 5g を水に溶かして全量を 100ml

とし、塩酸 1 滴及びトルエン少量を加えて保存する。

9. 塩類溶液 B：硫酸マグネシウム 2g、塩化ナトリウム 0.1g、硫酸第一鉄 0.1g 及び硫酸マンガ 0.1g を水に溶かして全量を 100ml とし、塩酸 1 滴及びトルエン少量を加えて保存する。
10. カゼイン：〔食添〕あらかじめパントテン酸を含有していないことを確かめる。
11. カゼイン酸分解液³⁾：カゼイン 100g をエタノールで 2 回洗浄し、5 倍量の塩酸 (1 → 2) を加え、還流冷却器を付けて 8~12 時間加熱する。この操作はオートクレーブ中、121~123℃で 8~12 時間加熱する操作でもよい。次に減圧下濃い糊状となるまで濃縮し、更に水 200ml を加えて同様濃縮する。残留物を水に溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (1 → 10) で pH を 3.5 (±0.1) に調整し、水を加えて 1,000ml とする。次に活性炭 20g を加えてかき混ぜた後、ろ過する。ろ液が淡黄~無色となるまでこの操作を繰り返し、トルエン少量を加えて冷蔵庫に保存する。保存中、沈殿が生ずればろ過して用いる。
12. 寒天：市販品を用いる。
13. 菌株保存用培地及び保存方法：水 100ml に酵母エキス 2g を溶かし、ブドウ糖 0.5g、酢酸ナトリウム 0.5g を加え、0.1mol/l 酢酸で pH を 6.8 に調整し、水浴上で 10~20 分間加熱し、ろ過後、寒天 1.5g を加え、加熱しながら溶かす。この液約 10ml ずつをあらかじめ綿栓をして乾熱滅菌⁷⁾を行った試験管に分注し、綿栓をして 1kg/cm²で 10 分間高压蒸気滅菌し、試験管を垂直にして冷却し、菌株保存用培地とする。*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 の保存菌株から菌株保存用培地に移植する。37℃で 16~24 時間培養し、冷所に保存する。保存菌株は毎週新たに調製し、1 週間を超したものは使用してはならない。
14. 酢酸ナトリウム：(無水)〔特級〕
15. L-シスチン：〔特級〕
16. シスチン・トリプトファン溶液：L-シスチン 2g 及び L-トリプトファン 0.5g を水 350~400ml に懸濁し、70~80℃に加熱し、固形物が溶けてしまうまで塩酸 (1 → 2) を加える。冷後、水を加えて全量を 500ml とし、トルエン少量を加えて約 10℃で保存する。
17. 増菌用培地：定量用培地 5ml 及びパントテン酸カルシウム溶液 5ml を、あらかじめ綿栓をして乾熱滅菌⁷⁾を行った試験管に分注し、綿栓をし、1kg/cm²で 10 分間高压滅菌し、直ちに冷却し、冷所に保存する。
18. L-トリプトファン：〔特級〕
19. ニコチン酸：市販の特級品を用いる。
20. パントテン酸カルシウム溶液：パントテン酸カルシウム 4mg に水を加えて溶かして 1,000ml とする。この液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 1,000ml とする。
21. ビオチン：市販品を用いる。
22. ビタミン液：塩酸チアミン 1g、リボフラビン 2g 及びビオチン 4mg を 0.02mol/l 酢酸に

溶かして100mlとし、保存溶液とする。保存溶液1mlを採り、0.02mol/l酢酸を加えて1,000mlとする。この溶液はトルエン少量を加え、光を遮って冷所に保存する。

23. ピリドキシン塩酸塩：[食添]
24. ブドウ糖：[特級]
25. リボフラビン：市販品を用いる。
26. 硫酸アデニン：市販の特級品を用いる。
27. 硫酸マグネシウム：[特級]
28. 硫酸マンガン：[特級]
29. リン酸一カリウム：[特級]
30. リン酸二カリウム：[特級]

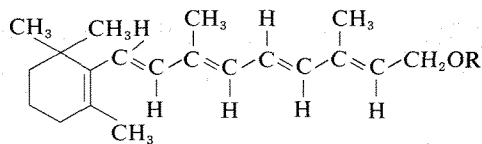
[注]

- 1) 分解を防ぐために、操作中の液のpHを常に7以下に保つ必要がある。
- 2) ビタミン定量用の基礎培地は、通常、半合成培地であり、天然培地と異なり不用意に長時間高圧蒸気滅菌処理を行うと、成分の一部が分解するおそれがあるので、定められた時間を守る必要がある。
- 3) 市販のビタミン不含カザミノ酸粉末1gを使用した方が簡便である。
- 4) その他のバントテン酸定量用菌株として、*L. casei* E ATCC 769, *L. fermenti* 36 ATCC 9338, *Str. faecalis* ATCC 8043, *Leuc. mesenteroides* P-60 ATCC 8042, *Pediococcus acidilactici* NCIB 6990 等がある。
- 5) 通常接種菌液を調製するには、前培養した菌を滅菌生理食塩水で数回洗浄後、5~100倍に希釈して用いるが、少なくとも本法に限り結果に大差なく、上記の操作は不必要である。
- 6) 37℃で72時間培養した後、酸度滴定による定量を行ってもよい。
- 7) ガラス器具類の滅菌に使用し、160~170℃で30~60分間加熱する。ピペットや注射筒は硫酸紙で包み、金属製の缶に入れて滅菌するが、硫酸紙や綿栓がキツネ色に変色すれば滅菌は完全である。

89 ビタミン A 及びビタミン A 脂肪酸エステル

Vitamin A and Vitamin A Fatty Acid Ester

別名：レチノール及びレチノール脂肪酸エステル



R : H ビタミン A

R : 脂肪酸 ビタミン A 脂肪酸エステル

1. 試験法の概要

食品中のビタミン A はけん化後抽出する。必要に応じカラムクロマトグラフィーによってクリーンアップした後、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を用いる。

(2) 試料液の調製

① けん化

試料 0.5～1.5g の一定量を容量 60ml の褐色共栓試験管に精密に量り、1%塩化ナトリウム溶液 0.5ml、3%ピロガロール・エタノール溶液 10ml 及び 60%水酸化カリウム溶液 1ml を加え、70℃の水浴中でガラス棒でかき混ぜながら 30 分間加熱する。

② 抽出

けん化後、冷水中で速やかに室温まで冷却し、1%塩化ナトリウム溶液 22.5ml を加えた後、酢酸エチル・ヘキサン混液 (1:9) 15ml を加える。振とう器で 5 分間振とうし、遠心分離後、上清液を分取する。水層は酢酸エチル・ヘキサン混液 (1:9) 15ml で更に 2 回、同様に処理して抽出する。抽出液を合わせ、40℃で溶媒を減圧留去する。残留物に石油エーテルを加えて溶かし正確に 2ml としたものを試験液とする。

なお、試料が加工品等でクロマトグラム上に妨害ピークが出現した場合は、試験液を減圧蒸

留して溶媒を留去した後、石油エーテル 5ml を加えて溶かしカラム用試験液とする。

③ カラムクロマトグラフィー¹⁾

内径 1cm のクロマト管に、あらかじめ弱活性化したアルミナを石油エーテルにけん濁させて、約 7cm の高さまで充てんする。これにカラム用試験液を静かに流し入れ、約 1ml/分の速度で流出する。カラム上部の液がなくなる直前に石油エーテル 5ml を加え、更に 3 回繰り返す。次いでエーテル・石油エーテル混液 (5:95) で洗浄後、エーテル・石油エーテル混液 (1:9) を加えて溶出する。その溶出液を 40℃ で減圧留去した後、残留物にエタノールを加えて溶解し、一定量としたものを試験液とする。

(3) 検量線用標準液²⁾の調製

パルミチン酸レチノール³⁾ 400g を正確に量り試料と同様にけん化し、不けん化物を抽出する。溶媒留去後、残留物に 2-プロパノールを加えて正確に 100ml とし標準原液とする。標準原液を 2-プロパノールで適宜希釈し、レチノール濃度で 2~3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、この液について 325nm の吸光度を測定する。次式によって希釈液のレチノール濃度を求める。

$$\text{レチノール濃度 } (\mu\text{g}/\text{ml}) = \frac{E \times 549}{100}$$

E : 希釈標準溶液の 325nm における吸光度 (対照: 2-プロパノール・1cm セル)

標準原液をエタノールで希釈し、レチノール濃度で約 0.07, 0.175, 0.35 及び 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、検量線用標準溶液とする。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外部検出器付液体クロマトグラフを用いて、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤: オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム温度: 35℃

カラム管: 内径 4.6~6.0mm, 長さ 150~250mm

移動相: 水・メタノール混液 (8:92)

流速: 1.0ml/分

測定波長: 325nm

② 検量線

検量線用標準溶液をそれぞれ 10 μl ずつを正確に採り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積からレチノールの検量線を作成する。

③ 定量

試料液 10 μl を正確に採り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積⁴⁾を検量線

によって試料液中のレチノール濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を求め、次式によって食品中のレチノール含量を計算する⁵⁾。

$$\text{レチノール含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{A \times V \times N}{W} \times 100$$

A : 検量線より求めた試験液中のレチノール濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

V : 試験液量 (ml)

N : 希釈倍率

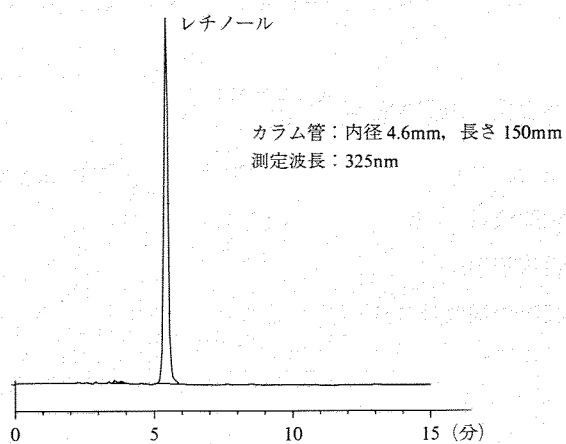
W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. ピロガロール : [特級]
2. 水酸化カリウム : [特級]
3. 塩化ナトリウム : [特級]
4. 活性アルミナ : (Merck, Art. 1097) アルミナの弱活性化は水約 10 % を加え、よく振とうして混合し、乾燥剤を入れないデシケーター中で一晩放置し、平衡状態にしてから用いる。
5. 酢酸エチル : [特級]
6. *n*-ヘキサン : [特級]
7. 石油エーテル : [特級]
8. ジエチルエーテル : [特級]
9. エタノール : [特級]
10. メタノール : [特級]
11. 2-プロパノール : [特級]

[注]

- 1) アルミナカラムクロマトグラフィーは、予試験で妨害ピークを認めない場合は省略することができる。
- 2) 標準液は冷蔵庫中で保存すれば、4 カ月は使用可能である。
- 3) パルミチン酸レチノールは $0.550\mu\text{g}$ が 1 国際単位 (IU) に相当する。
- 4) レチノールの液体クロマトグラムを注図 89-1 に示す。
- 5) 0.5g を採取し、試験液を 2ml にした場合の定量限界は $2 \sim 5\mu\text{g}/100\text{g}$ である。牛乳などのように含量の少ない試料は採取量を 1.5g 程度まで増やすことで、検出感度、再現性を向上させることができる。

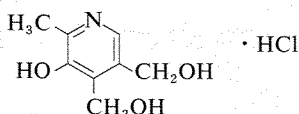


注図 89-I レチノールのクロマトグラム

90 ピリドキシン塩酸塩

Pyridoxine Hydrochloride

別名：ビタミン B₆



$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$: 205.64

1. 試験法の概要

食品中のピリドキシンは *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 を用いる微生物定量法により、ピリドキシン塩酸塩として定量する。食品中にはピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミンが分布している。したがって、定量値は食品由来のものと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（微生物定量法）

（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）試料液の調製

ピリドキシン塩酸塩として約 5 μ g に対応する、通常、5g 以下の試料の量を精密に量り、0.055mol/l 塩酸 180ml を加え、オートクレーブ中 121℃ で 4 時間加熱溶解する。冷却した後、1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH4.5～5.0¹⁾ に調整し、生じた沈殿をろ過し、残留物を水で洗浄し、洗液は先のろ液に合わせる。この液を 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH5.0～5.2 に再調整し、水を加えて正確に 250ml とする。この液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 50ml とし、試料液とする。

（3）標準液の調製

ピリドキシン塩酸塩 0.100g を正確に量り、1mol/l 塩酸を加えて溶かして正確に 100ml とする。用時、この液 5ml を正確に量り、水を加えて正確に 1,000ml とする。更に、この液 2ml を正確に量り、水を加えて正確に 1,000ml とし、標準液とする（この液 1ml は、ピリドキシン

塩酸塩 10ng を含む)。

(4) 定量用培地の調製

カゼイン酸分解液 10ml, ビタミン B₁ 溶液 5ml, イノシトール溶液 5ml, ビオチン溶液 2ml, パントテン酸カルシウム溶液 2.5ml, ニコチン酸溶液 0.5ml, 塩類溶液 50ml 及びクエン酸緩衝液 10ml を採り, 混和し, これにブドウ糖 10g を加えて溶かす。1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH を 5.0~5.2 に調整し, 更に水を加えて 100ml とし, 必要があればろ過し, 定量用培地とする。

(5) 接種菌液の調製

使用菌株として *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 (ATCC 9080) を用いる。その純粋培養菌を用いて酵母用寒天斜面培地に接種し, 30℃ で 16~24 時間培養し, 冷所に保存して保存菌株をつくる。保存菌株は 2 週間ごとに新たに調製する。

保存菌株より菌体を採り, 滅菌生理食塩水を加え, 分光光度計を用い, 波長 600nm での透過率が 80~85 % になるように滅菌生理食塩水で希釈し, 接種菌液とする。

(6) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い, 波長 600nm における吸光度を測定する。

② 測定

試料液 0.5, 1.0ml 及び 2.0ml をそれぞれ 2 回ずつ正確に量り, 2 系列の試験管 T (0.5~2.0), T' (0.5~2.0) に入れ, それぞれの試験管に定量用培地 2.5ml 及び水を加えて正確に 5ml とし, よく混和する。

各試験管に綿栓をした後, 121℃ で 5 分間高圧蒸気滅菌し, 冷却した後, 各試験管に接種菌液 1 滴ずつを無菌的に接種し, 30℃ で 20~24 時間振とう培養する。培養後, 直ちに全試験管を同時に 121℃ で 5 分間高圧蒸気滅菌し, 試料測定液とする。

試料測定液につき, 水を対照として波長 600nm における吸光度 AT (0.5~2.0), AT' (0.5~2.0) を測定する。

③ 検量線

標準液 0²⁾, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1.0ml 及び 1.5ml をそれぞれ 2 回ずつ正確に量り, 2 系列の試験管 S (0~1.5), S' (0~1.5) に入れ, ②測定と同様に操作し, 標準液による吸光度 AS₀ と AS'₀, AS_{0.1} と AS'_{0.1}, …… AS_{1.5} と AS'_{1.5} のそれぞれ平均値を求め, 濃度を横軸に, 吸光度を縦軸にとって検量線を作成する。ただし標準液による各吸光度が, 全体的比例曲線の値からみて ±10 % 以上かけはなれている場合, この吸光度の数値は除外する。

④ 定量

検量線を用いて、試料測定液³⁾による吸光度 $AT_{0.5}$, $AT'_{0.5}$, $AT_{1.0}$, $AT'_{1.0}$, $AT_{2.0}$, $AT'_{2.0}$ から 6 本の試験管中のピリドキシン塩酸塩含量 (ng) を求め、試料液 1ml 当たりの含量 (ng/ml) に換算してこの平均値を c とする。

ただし各含量値 (ng/ml) が、平均値 c から $\pm 10\%$ 以上かけはなれているとき、その数値は計算から除外する。この除外した数値が 3 個以上ある場合、試験はやり直す。次式によって検体中のピリドキシン塩酸塩含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ピリドキシン塩酸塩含量 (g/kg)} = \frac{c}{W \times 800}$$

c : 試料液中のピリドキシン塩酸塩含量 (ng/ml)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. イノシトール：[特級]
2. イノシトール溶液：イノシトール 100mg に水を加えて溶かして 100ml とする。
3. エタノール：[95v/v %, 特級]
4. 塩化カリウム：[特級]
5. 塩化カルシウム：[特級]
6. 塩化第二鉄：[特級]
7. 塩類溶液：リン酸一カリウム 2.2g, 塩化カリウム 1.7g, 塩化カルシウム 0.5g, 硫酸マグネシウム 0.5g, 硫酸マンガン 0.01g 及び塩化第二鉄 0.01g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。トルエン 3 滴を加えて保存する。
8. カゼイン：[食添] あらかじめピリドキシンを含有していないことを確かめる。
9. カゼイン酸分解液：カゼイン 100g をエタノールで 2 回洗浄し、5 倍量の塩酸 (1 → 2) を加え、還流冷却器を付け、8～12 時間加熱する。この操作はオートクレーブ中、121～123℃ で 8～12 時間加熱としてもよい。次に減圧下濃い糊状となるまで濃縮し、更に水 200ml を加えて同様濃縮する。残留物を水に溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (1 → 10) で pH を 3.5 (± 0.1) に調整し、水を加えて 1,000ml とする。次に活性炭 20g を加えてかき混ぜた後、ろ過する。ろ液が淡黄～無色となるまでこの操作を繰り返し、トルエン少量を加えて冷蔵庫に保存する。保存中沈殿が生ずればろ過して用いる。
10. 寒天：[日局]
11. クエン酸：[特級]
12. クエン酸カリウム：[特級]
13. クエン酸緩衝液：クエン酸カリウム 10g 及びクエン酸 2g に水を加えて溶かして 100ml

とする。

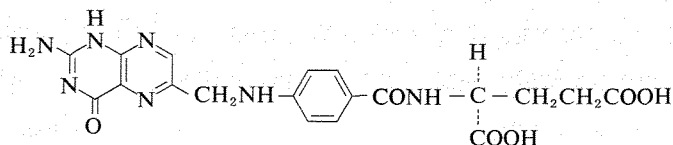
14. 酵母エキス：市販品を用いる。
15. 酵母用寒天斜面培地：寒天 20g, 酵母エキス 3g, 麦芽エキス 3g, ペプトン 5g 及びブドウ糖 10g に水を加えて溶かし、必要があれば pH を 5.0～5.2 に調整し、更に水を加えて 1,000ml とする。あらかじめ綿栓をして乾熱滅菌を行った試験管に 10ml ずつ分注し、121℃で 5 分間高圧蒸気滅菌を行う。滅菌後直ちに冷却し（斜面とする）、冷所に保存する。
16. 生理食塩水：[日局]
17. チアミン塩酸塩：[食添]
18. ニコチン酸：[食添]
19. ニコチン酸溶液：ニコチン酸 100mg に水を加えて溶かして 100ml とする。
20. 麦芽エキス：市販品を用いる。
21. パントテン酸カルシウム：[食添]
22. パントテン酸カルシウム溶液：パントテン酸カルシウム 20mg に水を加えて溶かして 100ml とする。
23. D-ビオチン：市販品を用いる。
24. ビオチン溶液：D-ビオチン 25mg に水を加えて溶かして 1,000ml とした後、その 40ml を採り、更に水を加えて 1,000ml とする。
25. ビタミン B₁ 溶液：チアミン塩酸塩 10mg に水を加えて溶かして 1,000ml とする。
26. ブドウ糖：[日局]
27. ペプトン：市販品を用いる。
28. 硫酸マグネシウム：[特級]
29. 硫酸マンガン：[特級]
30. リン酸一カリウム：[特級]

[注]

- 1) 粉乳等では沈殿を生じる場合が多いため、pH4.5～5.0 であらかじめ除タンパク操作をする。
- 2) 0 の場合でも菌が多少増殖する。この量が多いときは失敗であり、再度検量線を作る。
- 3) 試料液 0.5, 1.0ml 及び 2.0ml と濃度に比例して菌が増殖するが、検量線と比べ、傾きが異なる場合（±10%以上）は再度試料測定液を調製する。

91 葉 酸

Folic Acid

 $C_{19}H_{19}N_7O_6 : 441.40$

1. 試験法の概要

食品中の葉酸は、*Lactobacillus casei* ATCC 7469 を用いる微生物定量法により定量する。食品中には、葉酸及びその関連化合物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葉酸及びその関連化合物と添加されたものとの合計値である。

2. 試 験 法 (微生物定量法)

(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) 試料液の調製

葉酸として約 $1\mu\text{g}$ に対応する、通常、 10g 以下の試料の量¹⁾を精密に量り、水約 10ml 、アンモニア水の溶液 (2 → 5) 2ml を加え、よくかき混ぜ、綿栓をほどこし、オートクレーブに入れ、 121°C で 15 分間加熱した後、冷却する。冷後、澄明な抽出液が得られるような方法²⁾でろ過又は遠心分離し、更に水 $70\sim 80\text{ml}$ を用いてろ液又は分離液を集め、塩酸 ($0.1\sim 1\text{mol/l}$) 又は水酸化ナトリウム溶液 ($0.1\sim 1\text{mol/l}$) で pH を 6.8 に調整³⁾した後、水を加えて正確に 200ml とする。この液 20ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

(3) 標準液の調製

葉酸 0.010g を正確に量り、 500ml のメスフラスコに入れ、 0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液約 30ml を加えて溶かし、水約 300ml を加え、更に塩酸 (1 → 120) を加えて pH を $7\sim 8$ に調整した後、水を加えて正確に 500ml とし、標準原液とする (この液 1ml は、葉酸 $20\mu\text{g}$ を含

む)。この液はトルエン1滴を加え、遮光した冷所に保存する。標準原液5mlを正確に量り、水を加えて正確に1,000mlとし、更にこの液10mlを正確に量り、水を加えて正確に1,000mlとし、標準液とする（この液1mlは、葉酸1ngを含む）。

（４） 定量用培地の調製

ビタミン不含カザミノ酸2.5g、アスパラギン溶液15ml、トリプトファン溶液12.5ml、アデニン・グアニン・ウラシル溶液2.5ml、ビタミン液50ml、塩類溶液A 5ml、塩類溶液B 5ml、L-システイン塩酸塩一水和物0.125g、ブドウ糖10g、無水酢酸ナトリウム10g、キサンチン溶液5mlをそれぞれ300mlの三角フラスコに入れ、よく振り混ぜて溶かし、塩酸（0.1～1mol/l）又は水酸化ナトリウム溶液（0.1～1mol/l）を加えてpHを6.8に調整する。次に、ポリソルベート80・エタノール液0.25mlを加え、沸騰水浴中で5分間加熱した後、流水中で冷却し、グルタチオン溶液1mlを加え、よく振り混ぜた後、ろ過し、ろ液に水を加えて250mlとし、定量用培地とする。

（５） 接種菌液の調製

使用菌株として *Lactobacillus casei* ATCC 7469 を用いる。その保存された菌株保存用培地から増菌用培地に移植し、37℃で16～24時間培養する。この培養液5mlを採り、増殖した菌体を無菌的に遠心分離し、滅菌生理食塩水で3回洗う。接種菌液の濃度は、分光光度計を用い、滅菌生理食塩水を対照とし、波長550nmにおける透過率が75～85%になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

（６） 測定法

① 菌の接種と培養

標準液0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4ml及び5mlを2回ずつ正確に量り、それぞれ2系列の試験管（20×150mm） S_A （0～5）、 S_B （0～5）に入れる。別に試料液の1.5, 2, 2.5, 3ml及び4mlを2回ずつ正確に量り、それぞれ別の2系列の試験管 T_A （1.5～4）、 T_B （1.5～4）に入れる。次にすべての試験管に水を加えて正確に5mlとする。更に別に対照液用として、2本の試験管に水5mlずつをそれぞれ正確に量って入れる。

これら全試験管に定量用培地5mlずつを正確に量って加え、全試験管をアルミ製キャップでふたをし、121℃で5分間高压蒸気滅菌を行う。冷後、対照液用試験管を除き、他のすべての試験管に接種菌液を1滴ずつ無菌的に接種した後、対照液用試験管を含め、全試験管を37±0.5℃の温度で16～24時間培養する。培養後、直ちに全試験管同時に115℃で5分間高压蒸気滅菌し、培養液とする。

② 測定

各試験管の培養液につき、分光光度計を用い、それぞれ液層 10mm、波長 550nm における透過率を、それぞれ対照液を対照として測定する。標準液によるものを S_a (0~5) 及び S_b (0~5) とし、試料液によるものを T_a (1.5~4) 及び T_b (1.5~4) とする。

③ 定量⁴⁾

それぞれ対応する標準液の透過率 S_{a0} と S_{b0} , $S_{a0.5}$ と $S_{b0.5}$, …… S_{a5} と S_{b5} のそれぞれの平均値を求め、検量線を作成する。試料液の透過率 T_a (1.5~4) 及び T_b (1.5~4) についてもそれぞれ同様に对应する平均値を求め、このそれぞれの平均値について検量線からそれぞれの試験管の中の葉酸濃度 (ng/ml) を求め、更に試料液 1ml 当たりの含量を求めて、これらの平均値を c (ng/ml) とし、次式によって検体中の葉酸含量 (g/kg) を計算する。ただし、標準液及び試料液の各吸光度がそれぞれの濃度系列の値の傾向からみて $\pm 10\%$ 以上かけはなれている場合はこの透過率はないものとみなす。また試料液の培養液 10 本中 6 本以上の透過率がないうものとみなされたときは試験をやり直す。

$$\text{葉酸の含量 (g/kg)} = \frac{c}{W \times 1,000}$$

c : 試料液中の平均葉酸濃度 (ng/ml)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. L-アスパラギン水和物：[特級]
2. アスパラギン溶液：L-アスパラギン水和物 8.0g に水 800ml を加えて溶かす。トルエン 1 滴を加えて保存する。
3. アデニン・グアニン・ウラシル溶液：硫酸アデニン、塩酸グアニン及びウラシルそれぞれ 0.500g に、塩酸 (1 → 2) 25ml を加え、水浴中で加熱して溶かす。冷後、水を加えて全量を 500ml とする。トルエン 1 滴を加えて冷所に保存する。
4. アンモニア水：[25~28%，特級]
5. ウラシル：市販の特級品を用いる。
6. エタノール：[95v/v%特級]
7. 塩酸グアニン：市販の特級品を用いる。
8. 塩酸チアミン：市販の特級品を用いる。
9. 塩酸ピリドキシン：市販の特級品を用いる。
10. 塩類溶液 A：リン酸一カリウム 25g 及びリン酸二カリウム 25g に水を加えて溶かして 500ml とする。塩酸 5 滴及びトルエン 1 滴を加えて保存する。
11. 塩類溶液 B：硫酸マグネシウム 20g、塩化ナトリウム 1.0g、硫酸第一鉄 1.0g 及び硫酸マ

ンガン 1.0g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。塩酸 10 滴及びトルエン 2 滴を加えて保存する。

12. 寒天末：市販品を用いる。

13. キサンチン：[1 級]

14. キサンチン溶液：キサンチン 0.400g に水約 80ml 加え、振り混ぜながら水浴中で 70～80℃に加温し、アンモニア水の溶液（2→5）12ml を加え、振り混ぜて溶かす。冷後、水を加えて 400ml とし、トルエン 1 滴を加えて冷所に保存する。

15. 菌株保存用培地及び保存方法：ペプトナイズドミルク 15g, 酵母エキスパウダー 10g, ブドウ糖 10g, リン酸一カリウム 2g に約 600ml の水を加えて溶かし、これにトマトジュースのろ液 100ml を加え、1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH を 6.5～6.8 に調整した後、ポリソルベート 80・エタノール液 10ml を加え、水を加えて 1,000ml とする。この液に寒天末 10～15g を加え、加温して溶かし、温時 10ml ずつ、あらかじめ綿栓をして乾熱滅菌を行った試験管に分注し、121℃で 20 分間高圧蒸気滅菌を行う。滅菌後、直ちに冷却し、固化させる⁵⁾。

Lactobacillus casei ATCC 7469 の純粋培養から菌株保存用培地に移植する。移植された菌株保存用培地は、37℃で 16～24 時間培養し、冷所に保存する⁶⁾。

16. グルタチオン溶液：グルタチオン（還元型）0.125g に水 100ml を加えて溶かす。凍結して保存する。

17. グルタチオン（還元型）：[特級]

18. 酵母エキスパウダー：市販品を用いる。

19. L-システイン塩酸塩一水和物：[特級]

20. 増菌用培地：菌株保存用培地と同一組成で、寒天末を加えない培地を調製し、あらかじめ綿栓をし、乾熱滅菌（170℃, 2 時間）を行った試験管に 10ml ずつ分注し、121℃で 10 分間高圧蒸気滅菌を行う。滅菌後、直ちに冷却し、冷所に保存する。

21. L-トリプトファン：[特級]

22. トリプトファン溶液：L-トリプトファン 2g に水 700～800ml を加えて懸濁する。70～80℃に加熱し、振り混ぜながら塩酸を L-トリプトファンの結晶が溶けるまで滴加する。冷後、水を加えて 1,000ml とする。トルエン 1 滴を加えて常温で保存する。

23. トルエン：[特級]

24. ニコチン酸：市販の特級品を用いる。

25. パラアミノ安息香酸：[特級]

26. パントテン酸カルシウム：市販の 1 級品を用いる。

27. D-ビオチン：市販品を用いる。

28. ビタミン液：パラアミノ安息香酸 20.0mg, 塩酸ピリドキシン 40.0mg, 塩酸チアミン

4.0mg, パントテン酸カルシウム 8.0mg, ニコチン酸 8.0mg 及び D-ビオチン溶液 (1 → 100,000) 20ml を約 300ml の水に溶かし, これにリボフラビン 10.0mg に酢酸 (3 → 2,500) 200ml を加えて溶かした液を加える. 次に無水酢酸ナトリウム 1.9g 及び酢酸 1.6ml に水を加えて 40ml とした液を加え, 更に水を加えて 2,000ml とする. トルエン 1 滴を加え, 遮光して冷所に保存する.

29. ビタミン不含カザミノ酸：市販品を用いる.
30. ブドウ糖：[特級]
31. ペプトナイズドミルク：市販品を用いる.
32. ポリソルベート 80：市販品を用いる.
33. ポリソルベート 80・エタノール液：ポリソルベート 80 25g にエタノールを加えて溶かして 250ml とする.
34. 無水酢酸ナトリウム：酢酸ナトリウム（無水）[特級]
35. 滅菌生理食塩水：塩化ナトリウム 9g に水 1,000ml を加えて溶かし, あらかじめ綿栓をして乾熱滅菌を行った試験管に約 10ml ずつ分注し, 121℃で 20 分間高圧蒸気滅菌を行う.
36. リボフラビン：市販の 1 級品を用いる.
37. 硫酸アデニン：市販の特級品を用いる.
38. 硫酸第一鉄：[特級]
39. 硫酸マグネシウム：[特級]
40. 硫酸マンガン：[特級]
41. リン酸一カリウム：[特級]
42. リン酸二カリウム：[特級]

[注]

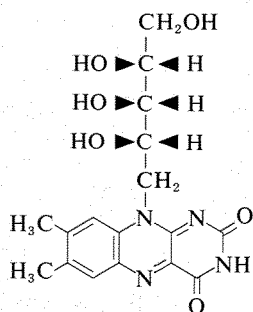
- 1) 調製粉乳のように試料の量が少なく水に溶ける場合は 10 倍量（葉酸として 10 μ g に対応する量）を採取して水に溶かし, 2) の操作後, 正確に 100ml とし, その 10ml を正確に量って試料液の調製に用いてもよい.
- 2) 本法は, 菌の増殖度を濁度により測定するので, 試料液は完全に澄明でなければならない. 調製粉乳のように, カゼインを含むものにあつては, 薄めた塩酸で pH を約 4.5 に調整してカゼインを沈殿させた後, ろ過又は遠心分離して沈殿を除くと澄明な液が得られる.
- 3) 塩酸, 水酸化ナトリウム溶液等のように, 測定液の調製に際して微生物の生育に妨げとならない種類の酸, アルカリを用いて調製する.
- 4) 標準液の場合の透過率の平均値は, 75%を超えることが望ましい.
- 5) 培地の上面に凝固水がたまることがあるが, この場合は, ふ卵器 (37℃) に入れて一夜放置し, 凝固水を蒸発された後用いる. 遮光して冷所に保存し, 調製後 1 カ月以内に用いる.
- 6) 保存菌株は毎週新たに調製し, 1 週間を超えたものは, 接種菌液の調製に使用してはならない.

92 リボフラビン及びその誘導体

Riboflavin and Its Derivatives

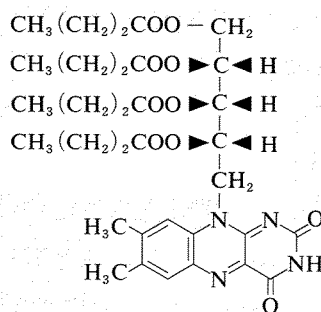
リボフラビン

Riboflavin

別名：ビタミン B₂ $C_{17}H_{20}N_4O_6$: 376.37

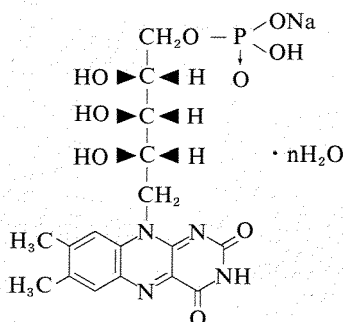
リボフラビン酪酸エステル

Riboflavin Tetrabutyrate

別名：ビタミン B₂酪酸エステル $C_{33}H_{44}N_4O_{10}$: 656.73

リボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウム

Riboflavin 5'-Phosphate Sodium

別名：リボフラビンリン酸エステルナトリウム，
ビタミン B₂リン酸エステルナトリウム $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P \cdot nH_2O$ ($n=2$ 又は 0) $(C_{17}H_{20}N_4NaO_9P : 478.33)$

1. 試験法の概要

食品中のリボフラビン、リボフラビン酪酸エステル及びリボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウムは、ルミフラビン蛍光法により、リボフラビンとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて、リボフラビン酪酸エステル又はリボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウムの量として求める。食品中には、天然のリボフラビン、フラビンアデニンジヌクレオチドなどリボ

フラビンのエステル型が広く分布している。したがって、定量値は食品由来のリボフラビンと添加されたものとの合計値である。

2. 試 験 法 (ルミフラビン蛍光法)

(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) 試料溶液の調製¹⁾

① 一般的方法

通常、試料 1~10g を精密に量り、少量の水とともに乳鉢又はホモジナイザーを用いて磨碎する。次に水 5~50ml を用いて三角フラスコに移し、約 20~30 分間水浴中でしばしば振り混ぜながら加熱抽出する。冷後、ろ過又は遠心分離し、ろ液又は上澄液を分取する。残留物は少量の水を用いて数回洗浄又は遠心分離を行い、洗液又は上澄液は先のろ液又は上澄液に合わせる。水を加えて正確に 50ml 又は 100ml とし、試料溶液とする²⁾。

② 高タンパク性食品

通常、試料 1~10g を精密に量り、少量の水とともに乳鉢又はホモジナイザーを用いて磨碎する。次に水 5~50ml を用いて三角フラスコに移し、約 20~30 分間水浴中でしばしば振り混ぜながら加熱抽出する。冷後、抽出液に対し 10% トリクロル酢酸溶液 1/4 容量を少量ずつ加え、ろ過又は遠心分離し、ろ液又は上澄液を分取する。残留物は少量の水を用いて数回洗浄又は遠心分離を行い、洗液又は上澄液は先のろ液又は上澄液に合わせる。水を加えて正確に 50ml 又は 100ml とし、試料溶液とする²⁾。

③ 高デンプン性食品

通常、試料 1~10g を精密に量り、少量の水とともに乳鉢又はホモジナイザーを用いて磨碎する。次に水 5~50ml を用いて三角フラスコに移し、三角フラスコの液に、必要があれば 1mol/l 塩酸又は 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH を 4.5~5.0 に調整した後、その 1/10 容量のジアスターゼ溶液 (1 → 20) を加え、37~40℃ で約 24 時間保つ。冷後、ろ過又は遠心分離し、ろ液又は上澄液を分取する。残留物は少量の水を用いて数回洗浄又は遠心分離を行い、洗液又は上澄液は先のろ液又は上澄液に合わせる。水を加えて正確に 50ml 又は 100ml とし、試料溶液とする²⁾。

④ 油脂性食品³⁾

通常、試料 1~10g を精密に量り、塩酸・エタノール混液約 10ml を加え、ブレンダー用カップに入れ、ホモジナイズする。塩酸・エタノール混液約 25~30ml を用いて共栓遠心管に移し、37℃ で一昼夜保つ。次に 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH を 4.5 に調整し、遠心分離

する。分離液を分取し、残留物は少量の水で洗い、洗液はろ過し、分離液に洗液を合わせ、水を加えて正確に 50ml 又は 100ml とし、試料溶液とする。

(3) 試料液の調製

試料溶液に盲蛍光物質が多い場合には、試料溶液 25ml を 50ml 共栓遠心管に採り、クロロホルム 25ml を加え、激しく振とうする。これを遠心分離し、下層のクロロホルム層を取り除き、再びクロロホルム 25ml を加え、同様に操作する。この操作をクロロホルム層に蛍光が認められなくなるまで繰り返し⁴⁾、試料液とする。

(4) 標準液の調製

リボフラビンを 105℃ で 2 時間乾燥した後、その 0.020g を正確に量り、酢酸 (1 → 400) 800ml を加え、加温して溶かし、冷後、水を加えて正確に 1,000ml とする。この液は褐色びんに入れ、冷蔵庫に保管する。用時、この液 5ml を正確に量り、酢酸 (1 → 400) を加えて正確に 200ml とし、標準液とする (この液 1ml は、リボフラビン 0.5μg を含む)。

(5) 測定法

① 測定条件

蛍光光度計を用い、励起波長 436nm、蛍光波長 530nm、液層 10mm の条件によって測定する。

② 測定液の調製

試料液 2~4ml の一定量ずつを正確に量り、それぞれ 3 本の共栓試験管 A, B, C に入れ、A には標準液 1ml を正確に量って加え、B, C には水 1ml ずつを加える。この液と同容量の 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液をそれぞれ A, B, C に加え、混和した後、A, B を光分解装置⁵⁾に 1 時間入れ、C は 1 時間暗所に放置する。次に A, B, C それぞれに、その内容量と同容量の酢酸を加え、A, B, C に 4% 過マンガン酸カリウム溶液 0.5ml を加え、混和して 1 時間放置した後、過酸化水素水の溶液 (1 → 10) 0.5ml を加える。次にクロロホルム 10ml ずつを正確に量り、A, B, C それぞれに加えて、2 分間激しく振り混ぜた後、静置⁶⁾、下層のクロロホルム層を分取し、測定液 A, B, C とする⁷⁾。

③ 定量

測定液 A, B, C を蛍光光度計用セルに入れ、蛍光強度を測定する。A の蛍光強度を 100% に合わせ、B, C の蛍光強度を測定する。

次式によって検体中のリボフラビン含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{リボフラビン含量 (g/kg)} = \frac{D \times (b - c) \times V}{(100 - b) \times V' \times W \times 1,000}$$

D：測定液 A に添加した標準リボフラビン量 (μg)

b：測定液 B の蛍光強度

c：測定液 C の蛍光強度

V：試料液の調製に用いた試料液の採取量 (ml)

V：試料の溶液量 (ml)

W：試料の採取量 (g)

リボフラビン酪酸エステル含量 (g/kg) = リボフラビン含量 (g/kg)

$\times 1.745$

リボフラビン 5'-リン酸エステル含量 (g/kg) = リボフラビン含量 (g/kg)

$\times 1.271$

試薬・試液

1. エタノール：[95v/v%，特級]
2. 塩酸・エタノール混液：塩酸 190ml にエタノール 700ml を加え，更に水を加えて 1,000ml とする。
3. 過酸化水素水：[30%，特級]
4. 過マンガン酸カリウム：[特級]
5. クロロホルム：[特級]，蛍光のないことを確かめ，水を飽和させて用いる。この液は冷暗所に保存する。
6. ジアスターゼ：市販品を用いる。
7. トリクロル酢酸：[特級]

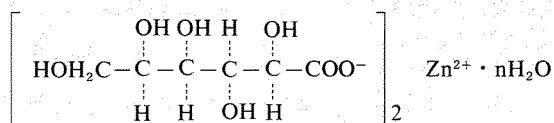
[注]

- 1) リボフラビンは光により分解されやすいため，試料溶液の調製には褐色のガラス容器を用いる。
- 2) 試料溶液 1ml 中にリボフラビン 0.1～1.0 μg 含有するようにする。必要があれば水で正確に希釈する。
- 3) 油脂性食品には主にリボフラビン酪酸エステルが添加されており，エステルの加水分解処理を酸性下で行う。
- 4) 通常 3～4 回繰り返す。
- 5) 蛍光灯に反射鏡を付けて試験管の両側面から蛍光灯を照射し，試験管のほぼ全面から光分解できるような装置。
- 6) 1,500 回転/分で遠心分離してもよい。
- 7) 少量の無水硫酸ナトリウムを加えてもよい。

93 亜鉛塩類

Zinc Salts

グルコン酸亜鉛
Zinc Gluconate



$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{14}\text{Zn} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=3$ 又は 0)

($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{14}\text{Zn}$: 455.69)

硫酸亜鉛

Zinc Sulfate

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 287.56

1. 試験法の概要

食品中の亜鉛塩類は、原子吸光法により亜鉛として定量する。必要があれば、分子量比を乗じて亜鉛塩類それぞれの量として求める。食品中には、天然の亜鉛が分布している。したがって、定量値は食品由来の亜鉛と添加されたものの合計値である。

2. 試験法 (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) 試料液の調製

試料約 4g を精密に量り、灰化容器に入れ、赤外線ランプで加熱して炭化させた後、電気炉へ入れて 450~550℃ で淡色の灰が得られるまで灰化を続ける。灰化後、これに塩酸 5ml を加え、蒸発乾固するまで赤外線ランプで加熱する。残留物に硝酸 (1 → 5) 5ml を加えて溶かし、100ml のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。別に、試料を用いず同様に操作し、空試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

金属亜鉛 1.00g を正確に量り、1mol/l 硝酸を加えて溶かして正確に 1,000ml とし、標準原液とする。用時、標準原液 2ml を正確に量り、0.1mol/l 硝酸を加えて正確に 1,000ml とし、標準液とする (この液 1ml は、亜鉛 2μg を含む)。標準液 0, 1, 2, 3.5, 5ml 及び 7ml をそれぞれ

正確に量り、それぞれに硝酸（1→5）3mlを加えた後、更に水を加えて正確に10mlとし、検量線用標準液とする（これらの液1mlは、それぞれ亜鉛0, 0.2, 0.4, 0.7, 1.0 μ g及び1.4 μ gを含む）。

（4）測定法

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件によって測定する。

燃料ガス：アセチレン-空気フレーム

測定波長：213.8nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき、原子吸光度を測定し、波高から検量線を作成する。

③ 定量

試料液及び空試料液につき、原子吸光度を測定する。得られた波高の差を求め、その値と検量線から試料液中の亜鉛濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中の亜鉛含量（g/kg）を計算する。

$$\text{亜鉛含量 (g/kg)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C：試料液中の亜鉛濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

グルコン酸亜鉛（無水物）含量（g/kg）＝亜鉛含量（g/kg） $\times$ 6.969

硫酸亜鉛（七水塩）含量（g/kg）＝亜鉛含量（g/kg） $\times$ 4.398

94 カルシウム塩類

Calcium Salts

塩化カルシウム

Calcium Chloride

 $\text{CaCl}_2 \cdot 0 \sim 2\text{H}_2\text{O}$ (CaCl₂ : 110.98)

グリセロリン酸カルシウム

Calcium Glycerophosphate

 $\text{C}_3\text{H}_7\text{CaO}_6\text{P}$: 210.14

水酸化カルシウム

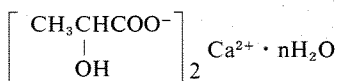
Calcium Hydroxide

別名：消石灰

 $\text{Ca}(\text{OH})_2$: 74.09

乳酸カルシウム

Calcium Lactate

 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (n=5, 3, 1 又は 0)(C₆H₁₀CaO₆ : 218.22)

ピロリン酸二水素カルシウム

Calcium Dihydrogen Pyrophosphate

別名：酸性ピロリン酸カルシウム

 $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$: 216.04

リン酸三カルシウム

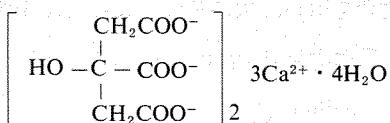
Tricalcium Phosphate

別名：第三リン酸カルシウム

 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 310.18

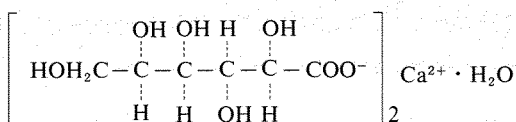
クエン酸カルシウム

Calcium Citrate

 $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Ca}_3\text{O}_{14} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 570.50

グルコン酸カルシウム

Calcium Gluconate

 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14} \cdot \text{H}_2\text{O}$: 448.39

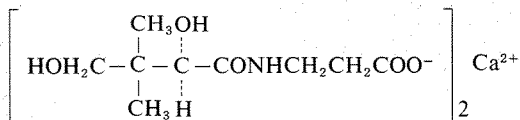
炭酸カルシウム

Calcium Carbonate

 CaCO_3 : 100.09

パントテン酸カルシウム

Calcium Pantothenate

 $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{CaN}_2\text{O}_{10}$: 476.54

硫酸カルシウム

Calcium Sulfate

 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 172.17

リン酸一水素カルシウム

Calcium Monohydrogen Phosphate

別名：第二リン酸カルシウム、

リン酸水素カルシウム

 $\text{CaHPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (n=2, 1 1/2, 1, 1/2 又は 0)(CaHPO₄ : 136.06)

リン酸二水素カルシウム

Calcium Dihydrogen Phosphate

別名：第一リン酸カルシウム、

酸性リン酸カルシウム

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 0 \sim 1\text{H}_2\text{O}$

$[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 : 234.05]$

エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム*

Calcium Disodium Ethylenediaminetetraacetate

別名：EDTA カルシウム二ナトリウム

カルボキシメチルセルロースカルシウム*

Calcium Carboxymethylcellulose

別名：繊維素グリコール酸カルシウム

高度サラシ粉*

High-Test Hypochlorite

プロピオン酸カルシウム*

Calcium Propionate

ステアロイル乳酸カルシウム*

Calcium Stearoyl Lactylate

別名：ステアリル乳酸カルシウム

5'-リボヌクレオチドカルシウム*

Calcium 5'-Ribonucleotide

別名：5'-リボヌクレオチドカルシウム

*：化学構造が類似している他の用途の食品添加物も、本法の測定対象に含まれる。

1. 試験法の概要

食品中のカルシウム塩類は、原子吸光法により、カルシウムとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて、カルシウム塩類それぞれの量として求める。食品中には、天然のカルシウムが広く分布している。したがって、定量値は食品由来のカルシウムと添加されたものの合計値である。

2. 試験法（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）試料液の調製

試料約 2g を精密に量り、250～300ml の分解フラスコ¹⁾に入れ、硝酸 20ml を加えて穏やかに加熱する²⁾。最初の激しい反応が弱まるにつれ、加熱を強めて均一な黄色液体となるまで加熱する。次に過塩素酸 5ml を加えて穏やかに加熱して、二酸化窒素の発生が終わり、発泡が激しく、液が濃褐色になったときに加熱を止め、硝酸約 2ml をきわめて静かに加えて再び加熱する³⁾。液が濃褐色を呈したならば、以下同様に硝酸の添加と加熱とを繰り返し⁴⁾、過塩素

酸の白煙が生じ、液がほとんど無色になったとき、加熱を止める。冷後、少量の水を用いて磁製蒸発皿⁵⁾に移し、これをホットプレート上で蒸発乾固する⁶⁾。残留物に塩酸(1→4) 10mlを加え、加温してかき混ぜ、100mlのメスフラスコに移し、水を加えて正確に100mlとする。この液1mlを正確に量り、塩化ランタン溶液⁷⁾ 1ml及び塩酸(1→40)を加えて正確に10mlとし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

炭酸カルシウム 2.497g を正確に量り、塩酸(1→4) 100mlを加えて溶かし、水を加えて正確に1,000mlとする。この液2mlを正確に量り、塩酸(1→40)を加えて正確に100mlとし、標準液とする(この液1mlは、カルシウム 20 μ gを含む)。標準液 0, 1, 2, 3, 5ml及び7mlをそれぞれ正確に量り、10mlのメスフラスコに入れ、それぞれに塩化ランタン溶液 1mlずつを加え、更にそれぞれに塩酸(1→40)を加えて正確に10mlとし、検量線用標準液とする(これらの液1mlは、それぞれカルシウム 0, 2, 4, 6, 10 μ g及び14 μ gを含む)。

(4) 空試料液の調製

水 2mlを用い、(2)試料液の調製と同様に操作し、空試料液とする。

(5) 測定法

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件によって測定する。

燃料ガス：アセチレン-空気フレイム⁸⁾ (アセチレン 2~3L/分, 空気 14L/分)

測定波長：422.7nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき、原子吸光度を測定し、波高から検量線を作成する。

③ 定量

試料液及び空試料液につき、原子吸光度を測定する。得られた波高の差を求め、その値と検量線から試料液中のカルシウム濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のカルシウム含量 (%) を計算する。

$$\text{カルシウム含量 (\%)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C：試料液中のカルシウム濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

塩化カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 2.769

クエン酸カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 4.745

グリセロリン酸カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 5.243

グルコン酸カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 11.188

水酸化カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 1.849

炭酸カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 2.497

乳酸カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 5.445

パントテン酸カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 11.890

ピロリン酸二水素カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 5.390

硫酸カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 4.296

リン酸二水素カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 5.840

リン酸一水素カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 3.395

リン酸三カルシウム含量 (%) = カルシウム含量 (%) $\times$ 2.580

試薬・試液

1. 塩酸：市販の有害金属用を用いる。
2. 塩化ランタン：（七水塩）[1級]
3. 塩化ランタン溶液：塩化ランタン 26.7g に水 100ml を加えて溶かす。
4. 過塩素酸：市販の有害金属用を用いる。
5. 硝酸：市販の有害金属用を用いる。

[注]

- 1) 試験に用いるガラス器具はすべて、使用前に硝酸（1→3）で十分洗うか、又はこの硝酸に一夜つけておく。
- 2) 必要があれば、少量の水を加える。
- 3) 硝酸を加えずに加熱を続けると爆発することがあるので、十分注意する。
- 4) クッキーのような脂肪含有食品では、この操作を 2~3 回要する。その他の食品では硝酸の追加はほとんど必要ない。
- 5) 使用する前に塩酸（1→2）で煮沸洗浄しておく。
- 6) 過塩素酸除去の操作は省略しても差し支えない。その場合、反応液中の硝酸を完全に除くため、次の操作を行う。無色になった液を放冷した後、水約 30ml を加えて熱し、過塩素酸の白煙が生じてから更に 20~30 分間加熱を続ける。
- 7) 原子吸光分析用として市販されている。
- 8) アセチレン流量を増減することにより、検量線濃度範囲を変えることができる。たとえばアセチレン 2L/分のときカルシウム 1~15 μ g/ml、アセチレン 3L/分のときカルシウム 1~7 μ g/ml である。

95 鉄化合物

Iron Compounds

塩化第二鉄

Ferric Chloride

 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 270.30

クエン酸第一鉄ナトリウム

Sodium Ferrous Citrate

別名：クエン酸鉄ナトリウム

クエン酸鉄

Ferric Citrate

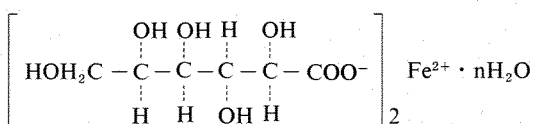
クエン酸鉄アンモニウム

Ferric Ammonium Citrate

グルコン酸第一鉄

Ferrous Gluconate

別名：グルコン酸鉄

 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{FeO}_{14} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=2$ 又は 0) $(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{FeO}_{14} : 446.15)$

乳酸鉄

Iron Lactate

 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{FeO}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 288.04

ピロリン酸第一鉄

Ferrous Pyrophosphate

 $\text{Fe}_2\text{P}_2\text{O}_7$: 285.64

ピロリン酸第二鉄

Ferric Pyrophosphate

 $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$: 745.22

硫酸第一鉄 (乾燥)

Ferrous Sulfate (dry)

 $\text{FeSO}_4 \cdot 1 \sim 1.5\text{H}_2\text{O}$ $(\text{FeSO}_4 : 151.91)$

硫酸第一鉄 (結晶)

Ferrous Sulfate (crystal)

 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 278.02

三二酸化鉄*

Iron Sesquioxide

別名：ベンガラ

鉄クロロフィリンナトリウム*

Sodium Iron Chlorophyllin

*：化学構造が類似している他の用途の食品添加物も、本法の測定対象に含まれる。

1. 試験法の概要

食品中の鉄化合物は、原子吸光法により鉄として定量する。必要があれば分子量比を乗じて、鉄化合物それぞれの量として求める。食品中には天然の鉄化合物が広く分布している。したがって、定量値は食品由来の鉄と添加されたものとの合計値である。

2. 試 験 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) 試料液の調製

次のいずれかの方法¹⁾により試料液を調製する。

① 湿式灰化法²⁾

試料約 10g を精密に量り、250～500ml の分解フラスコ³⁾に入れ、液体食品以外には水約 30ml を加える。次に硝酸 30ml を加えて振り混ぜ、放置した後、穏やかに加熱し、激しい反応がおさまれば、冷後、硫酸 10ml を加え、再び穏やかに加熱する。加熱のはじめに発泡が激しい場合には、カプリルアルコール 2～3 滴を加える。液が暗色になりはじめたら硝酸 2～3ml ずつを追加し、加熱を続ける。無水硫酸の白煙が生じ、液が微黄～無色になったとき、加熱を止める。冷後、少量の水を用いて磁製蒸発皿に移し、これをホットプレート上で蒸発乾固する。残留物に塩酸 (1→4) 10ml を加え、加温してかき混ぜ、水を用いて 100ml のメスフラスコに移し、塩酸 (1→40) を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

② 乾式灰化法⁴⁾

試料約 10g を精密に量り、石英又は磁製るつぼに入れ、ホットプレート又は弱熱用のヒーター上で加熱乾燥し、更に加熱を続けて炭化する。次に電気炉に入れ、温度を上げて 500～550℃⁵⁾とし、灰化するまで加熱する。24 時間加熱しても灰化しない場合は、硝酸マグネシウム溶液 (50%) 又は、硝酸 (1→2) 2～5ml を加えて潤し、乾燥した後、灰化を続ける。灰化不十分のときは硝酸 (1→2) 2～5ml ずつを加え、同様の操作を完全に灰化するまで繰り返す。冷後、残留物に塩酸 (1→4) 10ml を加え、加温してかき混ぜ、水を用いて 100ml のメスフラスコに移し、塩酸 (1→40) を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

鉄 1.00g を正確に量り、硝酸 (1→4) 100ml を加えて溶かし、煮沸して二酸化窒素を追い出し、冷後、1,000ml のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 1,000ml とする。この液 1ml を正確に量り、100ml のメスフラスコに入れ、塩酸 (1→40) を加えて正確に 100ml とし、標準液とする (この液 1ml は、鉄 10 μ g を含む)。標準液 1, 2, 5, 8ml 及び 10ml をそれぞれ正確に量り、塩酸 (1→40) を加えてそれぞれ正確に 10ml とし、検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれ鉄 1, 2, 5, 8 μ g 及び 10 μ g を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件で測定する。

光源：鉄中空陰極ランプ

バーナー：スリットバーナー

燃料ガス：アセチレン-空気フレイム

測定波長：248.3nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき、原子吸光度を測定し、波高から検量線を作成する。

③ 定量

試料液につき、原子吸光度を測定する。得られた波高から検量線により試料液中の鉄濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中の鉄含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{鉄含量 (g/kg)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C：試料液中の鉄濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

塩化第二鉄（六水塩）含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) $\times$ 4.840

グルコン酸第一鉄（無水物）含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) $\times$ 7.989

乳酸鉄（三水塩）含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) $\times$ 5.158

ピロリン酸第一鉄含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) $\times$ 2.557

ピロリン酸第二鉄含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) $\times$ 3.336

硫酸第一鉄（結晶）含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) $\times$ 4.978

試薬・試液

1. カプリルアルコール：*n*-カプリルアルコール [特級]
2. 硝酸：市販の有害金属測定用を用いる。
3. 硝酸マグネシウム：（六水塩）[特級]
4. 硫酸：市販の有害金属測定用を用いる。

[注]

- 1) これら2法の他に、低温灰化装置を用い減圧下高周波エネルギーによって低温で試料を酸化する方法もある。
- 2) 湿式灰化法は硝酸、硫酸、過塩素酸、過酸化水素等の酸化剤を適宜配合して用い、比較的低温で酸化分解する方法である。本法は試薬による汚染が第一の欠点である。また、脂肪性の検

体は分解しがたい。

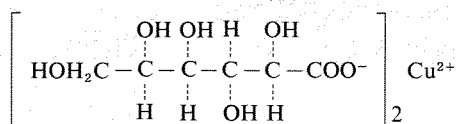
- 3) 試験に用いるガラス器具はすべて使用前に硝酸 (1 → 3) で十分洗うか、又はこの硝酸に一夜つけておく。
- 4) 乾式灰化法は試料を強熱して有機物を空気酸化し、揮発させる方法である。本法は、操作の管理が湿式灰化法のように煩雑でないで、比較的多数の試料を同時に操作できるし、大量の試料を逐次追加して灰化することもできる。更に酸化物 (分解剤) を用いないでも行えるので、これら試薬からの汚染の危険が少ない。
- 5) 湿式法に比べて灰化温度が高いため、ほとんどすべての元素について揮散のおそれがある。Hg は完全に揮散し、Cd, Pb, Zn, Sn, As, Ca 等は 500℃ 以上で揮散する。とくにハロゲンが存在すると Zn, Sn, Sb, As 等が揮散しやすい。しかし、550℃ 以下の灰化では Fe に関しては心配ない。

96 銅 塩 類

Copper Salts

グルコン酸銅

Copper Gluconate

 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CuO}_{14}$: 453.84

硫酸銅

Cupric Sulfate

 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 249.69

銅クロロフィリンナトリウム*

Sodium Copper Chlorophyllin

銅クロロフィル*

Copper Chlorophyll

* : 化学構造が類似している他の用途の食品添加物も、本法の測定対象に含まれる。

1. 試験法の概要

食品中の銅塩類は、原子吸光法により、銅として定量する。必要があれば分子量比を乗じて銅塩類それぞれの量として求める。食品中には天然の銅が分布している。したがって、定量値は食品由来の銅と添加されたものとの合計値である。

2. 試 験 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) 試料液の調製

試料約 4g を精密に量り、100ml の灰化容器¹⁾に入れ、赤外線ランプで加熱して炭化させた後、電気炉へ入れて 500℃ で淡色の灰が得られるまで灰化を続ける²⁾。灰化後、これに硝酸 (1 → 2) 5ml を加え、蒸発乾固するまで赤外線ランプで加熱する。残留物に硝酸 (1 → 5) 5ml を加えて溶かし、100ml のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 100ml とする。この液 50ml を正確に量り、100ml のスキープ形分液漏斗に入れ、クエン酸二アンモニウム溶液 (1 → 20) 5ml を加えた後、BTB 試液 2 滴を加え、液の色が黄色から青色に変化するまでアンモニア水 (1 → 3) を滴加する。次に、DDTC 溶液 (1 → 50) 5ml を加えて 5 分間放置し、MIBK を正確に 10ml 加えて 3 分間振とう抽出する。静置後、MIBK 層を分取し、試料液とする。別に、

試料を用いず同様に操作し、空試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 3.929g を正確に量り、1mol/l 硝酸に溶かして正確に 1,000ml とし、保存溶液とする³⁾。用時、この液を 0.1mol/l 硝酸で正確に 1,000 倍に希釈し、標準液とする (この液 1ml は、銅 $1\mu\text{g}$ を含む)。標準液 0, 2, 4, 6, 8ml 及び 10ml をそれぞれ正確に量り、100ml のスキップ形分液漏斗に入れ、それぞれ硝酸 (1 → 5) 3ml を加えた後、更に水を加えて 50ml とし、以下、クエン酸二アンモニウム溶液 (1 → 20) 5ml を加えるところから(2)試料液の調製と同様に操作し、検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれ銅 0, 0.2, 0.4, 0.6, $0.8\mu\text{g}$ 及び $1.0\mu\text{g}$ を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件で測定する。

光源：銅中空陰極ランプ

測定波長：324.8nm

バーナー：10cm スリットバーナー

燃料ガス：アセチレン-空気フレーム

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき原子吸光度を測定し、波高から検量線を作成する。

③ 定量

試料液及び空試料液につき、原子吸光度を測定する。得られた波高の差を求め、その値と検量線から試料液中の銅濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を求め、次式によって検体中の銅含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$) を計算する。

$$\text{銅含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{C \times 2,000}{W}$$

C：試料液中の銅濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

W：試料の採取量 (g)

$$\text{グルコン酸銅含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \text{銅含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) \times 7.142$$

$$\text{硫酸銅含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \text{銅含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) \times 3.929$$

試薬・試液

1. 硝酸：[特級]

2. クエン酸二アンモニウム：[特級]

3. BTB：ブロムチモールブルー [特級]

4. エタノール：[特級]

5. BTB 試液：BTB 0.1g にエタノール 100ml を加えて溶かし，必要があればろ過する。

6. アンモニア水：[特級]

7. DDTC：ジエチルジチオカルバミン酸 [原子吸光分析用]

8. MIBK：メチルイソブチルケトン [原子吸光分析用]

[注]

- 1) ふた付き超硬質ガラスビーカーが適当である。
- 2) 灰化時間は，たいていの場合一夜（約 15 時間）で十分である。
- 3) この液 1ml は銅 1mg を含む。この液の代わりに，市販されている同濃度の原子吸光分析用標準液を用いても差し支えない。

第 18 章

製造用剤等

97 臭素酸カリウム

Potassium Bromate

KBrO_3 : 167.00

1. 試験法の概要

パン中の臭素酸カリウムは、臭素酸イオンを液体クロマトグラフィーにより分離後、ポストカラム法により *o*-ジアニシジンと反応発色させ定量する¹⁾。必要があれば分子量比を乗じて臭素酸カリウムとしての量を求める。

2. 試験法（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）試料液の調製

試料を粉碎してその 10.0g を正確に量り、水 50ml を加えて 30 分間かくはんする。約 5 分間静置後、その上清を 5℃ で約 10,000×g で 30 分間遠沈する。上清をろ紙（No.5A）でろ過後、その 5ml をディスポーザブルフィルター、固相抽出カートリッジカラム、銀カートリッジカラム²⁾をこの順番で直列に接続したものに負荷する。初流液約 1ml を捨て、その後の流出液約 3ml を限外ろ過カートリッジカラムに負荷し、流出液を陽イオン交換カートリッジカラムに負荷する。流出液約 1ml を捨て、その後の流出液を液体クロマトグラフィー用試料液とする。

（3）検量線用標準液の調製

臭素酸カリウム 129.5mg を正確に量り、水を加えて溶かし正確に 100ml とする。この液 1ml を採り、水を加えて 100ml とする。更に、この希釈した液 10ml を採り、水を加えて 100ml とする。この液 0.1~10ml を採り、水を加えて 100ml とし検量線用標準液とする（この液 1ml は臭素酸 1~100ng を含む）。

（4）測定法

① 測定条件

ポストカラム反応装置を備えた可視部吸収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。

検出器：紫外吸収検出器

カラム充填剤³⁾：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 250mm

カラム温度：40℃

移動相⁴⁾：水 700ml にメタノール 100ml, 酢酸 2.0g, テトラブチルアンモニウムヒドロキシド (TBAH) 19g を加えて混和し, TBAH で pH6.3~6.5 に調整し, 水で正確に 1,000ml としたもの。

流速：1ml/分

反応液の流速：0.3ml/分

反応温度：60℃

反応カラムの長さ：3m

測定波長：450nm

注入量：200 μ l

脱気用ガス：高純度窒素

② 検量線

それぞれの検量線用標準液それぞれ 200 μ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さから臭素酸の検量線を作成する。

③ 定量^{5), 6)}

試料液 200 μ l を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さと検量線によって試料液中の臭素酸濃度 A (ng/ml) を求め、次式によって検体中の臭素酸濃度 (ng/ml) を求め、次式によって検体中の臭素酸含量 C (μ g/kg) を計算する。

$$C (\mu\text{g/kg}) = \frac{A \times 50}{W}$$

A：試料液中の臭素酸濃度 (ng/ml)

W：試料の採取量 (g)

〈使い捨てカラム〉

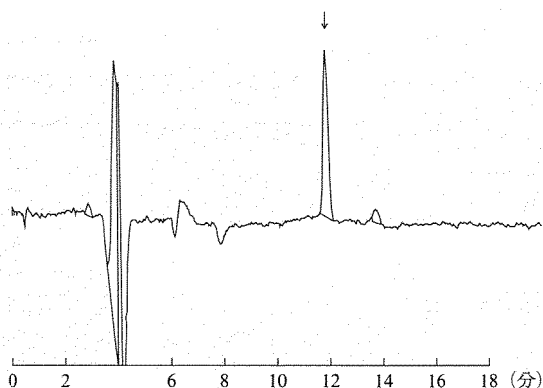
1. ディスポーザブルフィルター：孔径 0.45 μ m, 直径 25mm, 水系
2. 陽イオン交換カートリッジカラム：BondElutPRS, 3cc/500mg 相当品
3. 固相抽出カートリッジカラム：Sep-Pak Plus tC₁₈ Environmental 相当品。使用前にメタノール 10ml, 続いて水 10ml でコンディショニングする。
4. 銀カートリッジカラム：OnGuard TM-Ag 相当品
5. 限外ろ過カートリッジカラム：Molcut L 相当品

試薬・試液

1. 臭素酸カリウム：[特級]
2. メタノール：[液体クロマトグラフ用]
3. *o*-ジアニシジン・二塩酸塩
4. 硝酸：精密分析用，70 %
5. テトラブチルアンモニウムヒドロキシド (TBAH)：40 % 溶液
6. 臭化カリウム：光学分析用
7. 水：水道水を超純粋製造装置で処理した水
8. ポストカラム用反応試薬⁷⁾：水 700ml に硝酸 60ml 及び臭化カリウム 10.0g を加える。更に，*o*-ジアニシジン・二塩酸塩 500mg をメタノール 200ml で溶解した液を加え，水で 1,000ml とする。

[注]

- 1) 臭素酸カリウムは，パン以外の食品には使用できないので，パンからの定量法を記載してある。パン以外の食品の場合は，クリーンアップの方法が異なることが考えられる。
- 2) 負荷する溶液の量が多すぎて Cl⁻ イオンが混入すると発色を妨害するので注意する。TOYOPAK IC-SP-M を 0.1mol/l 硝酸銀溶液 10ml，次いで水 10ml で洗浄し，Ag 型としても使用できる。
- 3) カラムは，ガードカラムを装着して使用する。測定終了後，TBAH を除去するため 20 % メタノールで洗浄する。
- 4) 移動相の脱気を十分に行わないと，ベースラインが安定しない。
- 5) 本法による定量限界は，10 μ g/kg である。
- 6) 臭素酸カリウムを 15mg/kg 加えて試作したパンから抽出したもののクロマトグラムを示す。



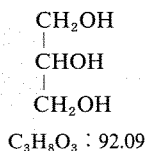
注図 97-1 臭素酸カリウムを 15 mg/kg 加えて試作したパンから抽出したものの液体クロマトグラム

- 7) *o*-ジアニシジンが完全に溶けていないと液が着色することがあるので，以下のようにするとよい。*o*-ジアニシジン・二塩酸塩 500mg を 20ml のスクリュウキャップ付きバイアル瓶に入れ，メタノール約 15ml を加えて溶かし，上澄液を臭化カリウム・硝酸溶液に合わせる。バイアル瓶中に残った *o*-ジアニシジンは，更にメタノールを加え，ガラス棒で碎いて溶かす。*o*-ジアニシジンが完全に溶けるまで，この操作を繰り返す。

98 グリセリン

Glycerol

別名：グリセロール



1. 試験法の概要

食品中のグリセリンは、グリセリンをトリメチルシリル体としてガスクロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料溶液の調製

① 液体食品

グリセリンとして $500\mu\text{g}$ に対応する、通常、5g 以下の試料の量を精密に量り、水を加えて正確に 100ml とし、試料溶液¹⁾とする。

② 固体食品

グリセリンとして $500\mu\text{g}$ に対応する、通常、5g 以下の試料の量を精密に量り、ブレンダー容器に入れ、エタノール 30ml を加えてホモジナイズ²⁾した後、少量のエタノールを用いて定量的に遠心管に移す。遠心分離（10 分間、3,500 回転/分、以下同じ）を行い、上澄液は 100ml のメスフラスコに分取する。残留物にエタノール 30ml を加えてよくかき混ぜ、遠心分離を行い、上澄液は先のメスフラスコに合わせる。残留物にエタノール 30ml を加えて同様の操作を繰り返す。全エタノール液にエタノールを加えて正確に 100ml とし、試料溶液とする。

③ 油脂性食品

グリセリンとして $500\mu\text{g}$ に対応する、通常、5g 以下の試料の量を精密に量り、ブレンダー容器に入れ、*n*-ヘキサン 30ml を加えてホモジナイズした後、少量の *n*-ヘキサンを用いて定

量的に遠心管に移す。遠心分離を行い、ヘキサン層は捨てる。残留物をブレンダー容器に移し、遠心管はエタノール 30ml で洗い、洗液は残留物に合わせる。以下、②固体食品と同様に操作する。

(3) 試料液の調製

試料溶液 10ml を正確に量り、25ml のナス型フラスコに入れ、55℃以下の水浴上で減圧乾固する。残留物に TMS 化試液 1ml を正確に量って加え、栓をしてときどき振り混ぜながら 60℃で 10 分間加温する。冷後、反応液の一部を遠心管に移し、遠心分離を行い、上澄液を試料液とする。

(4) 検量線用標準液の調製

グリセリン 1.00g を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とする。この液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 1,000ml とし、標準液とする（この液 1ml は、グリセリン 100 μ g を含む）。標準液 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、25ml のナス型フラスコに入れ、55℃以下の水浴上で減圧乾固する。残留物に TMS 化試液 1ml を正確に量って加え、栓をしてときどき振り混ぜながら 60℃で 10 分間加温する。冷後、4ml のピリジンをそれぞれ正確に量って加え、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれグリセリン 20, 40, 60, 80 μ g 及び 100 μ g を含む）。

(5) 測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：80～100 メッシュのガスクロマトグラフ用ケイソウ土担体にシリコーン GE-SE-52 を 10 % の割合で含ませたもの、又は 60～80 メッシュのガスクロマトグラフ用ケイソウ土担体にジキシル 300 を 5 % の割合で含ませたもの³⁾。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 1.5m

カラム温度：100～110℃の間の一定温度又は 80～150℃の間を 1 分間に 4℃の割合で昇温させる⁴⁾。

注入口温度：200℃

キャリアガス：窒素、グリセリンのトリメチルシリル誘導体のピークが約 7 分後に現われるようにカラム温度及びキャリアガスの流速を調整する。

② 検量線の作成

検量線用標準液 3 μ l をそれぞれ正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さ又は

ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

試料液 3 μ l を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のグリセリン濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のグリセリン含量 (mg/g) を計算する。

$$\text{グリセリン含量 (mg/g)} = \frac{C}{100 \times W}$$

C：試料液中のグリセリン濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

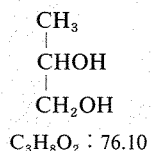
1. エタノール：[95v/v%，特級]
2. トリメチルクロロシラン：市販のガスクロマトグラフ用を用いる。
3. ピリジン：市販のシリル化用を用いる。あるいは、市販特級品 1L に対し乾燥用合成ゼオライト (0.4Å) 約 10g 加え、一夜放置し脱水したものをを用いる。
4. ヘキサメチルジシラザン：市販のガスクロマトグラフ用を用いる。
5. TMS 化試液：トリメチルクロロシラン、ヘキサメチルジシラザン及びピリジンを 1：3：9 の割合で混合し、バイアル瓶に保存する。

[注]

- 1) 混濁しているものは遠心分離して上澄液を試料溶液とする。
- 2) 遠心管内でホモジナイズできるホモジナイザーを用いると便利である。
- 3) その他の充てん剤としてシリコーン SE-30 (5%) も使用できる。
- 4) 昇温した方が溶媒とグリセリン-TMS 誘導体の分離が良好となる。

99 プロピレングリコール

Propylene Glycol



1. 試験法の概要

食品中のプロピレングリコールはガスクロマトグラフィーによって定量する。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

① 一般食品

試料5～10gを精密に量り、ブレンダー容器に入れ、ほぼ2倍量のメタノールを加え、ホモジナイズした後、メタノール約20mlを用いて定量的に100mlのフラスコに移す。フラスコに還流冷却器を付け、70℃の水浴上で約30分間還流加熱し¹⁾、メタノール液を傾斜して遠心管に入れる。フラスコの残留物にメタノール20mlずつを加え、同様の還流加熱操作を2回行い、それぞれメタノール液を先の遠心管に合わせ、更にメタノール10mlを用い、フラスコの残留物を先の遠心管に洗い込み、遠心分離（10分間、3,500回転/分）する。油脂分の多い試料の場合は、冷凍遠心分離（-5℃）する。メタノール層を分取し、濃縮器に入れる。遠心管及び残留物はメタノール10mlずつで2回洗い、ろ過して濃縮器に合わせる。次に、メタノール液を50mlになるまで濃縮し、水を用いて定量的に100mlのメスフラスコに移し、水を加えて正確に100mlとし、試料液とする。

② めん類

試料約5gを精密に量り、ブレンダー容器に入れ、メタノール20mlを加え、ホモジナイズした後、メタノール20～25mlを用いて定量的に共栓遠心管に移し、3時間放置する。この液を遠心分離（10分間、3,500回転/分）し、メタノール液を200mlのメスフラスコに分取し、

遠心管の残留物にはメタノール 20ml を加え、かき混ぜた後、よく振り混ぜ、再び遠心分離する。メタノール液を先のメスフラスコに合わせ、遠心管にはメタノール 10ml ずつを 2 回加え、よくかき混ぜ、それぞれろ過して先のメスフラスコに合わせ、メタノールを加えて 100ml とした後、水を加えて正確に 200ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

プロピレングリコール 0.100g を正確に量り、メタノール溶液 (1 → 2) を加えて正確に 100ml とし、標準液 A とする。標準液 A 10ml を正確に量り、メタノール溶液 (1 → 2) を加えて正確に 100ml とし、標準液 B とする。

標準液 A 又は B につき、0.5, 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、メタノール溶液 (1 → 2) を加えてそれぞれ正確に 5ml とし、検量線用標準液 A (これらの液 1ml は、それぞれプロピレングリコール 100, 200, 400, 600, 800 μ g 及び 1,000 μ g を含む) 又は検量線用標準液 B (これらの液 1ml は、それぞれプロピレングリコール、10, 20, 40, 60, 80 μ g 及び 100 μ g を含む) とする。

(4) 内部標準液の調製

トリメチレングリコール 0.500g を正確に量り、メタノール溶液 (1 → 2) を加えて正確に 100ml とし、内部標準液 A とする。内部標準液 A 10ml を正確に量り、メタノール溶液 (1 → 2) を加えて正確に 100ml とし、内部標準液 B とする。

(5) 測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：60～80 メッシュのポーラスポリマービーズ

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 2m

カラム温度：170～200℃の一定温度

注入口温度：250℃

注入量：1～3 μ l

キャリアガス：窒素、トリメチレングリコールのピークが約 7 分間後に現われるようカラム温度と流速を調整する。

② 検量線

試料液 1ml 中のプロピレングリコールが 100 μ g 以上と目される場合は、検量線用標準液 A を用い、100 μ g 未満と目される場合には検量線用標準液 B を用いる。

検量線用標準液 A を用いる場合は、それぞれに内部標準液 A 0.5ml ずつをそれぞれ正確に量って加え、よく混和し、それぞれにつき、ガスクロマトグラフで測定し、プロピレングリコールとトリメチレングリコールのピーク高さ比又はピーク面積比から検量線 A を作成する。検量線用標準液 B を用いる場合には、それぞれ内部標準液 B 0.5ml ずつを、それぞれ正確に量って加え、よく混和し、ガスクロマトグラフで測定し、プロピレングリコールとトリメチレングリコールのピーク高さ比又はピーク面積比から検量線 B を作成する。ただし、縦軸にはピーク高さ比又はピーク面積比、横軸には標準液の濃度をとる。

③ 定量

検量線の濃度領域を勘案し、試料液²⁾ 1~5ml を正確に量り、メタノール溶液 (1→2) を加え正確に 5ml とし、測定液とする。この液に検量線 A を用いる場合は内部標準液 A 0.5ml を、検量線 B を用いる場合には内部標準液 B 0.5ml を正確に量って加え、混和した後、ガスクロマトグラフで測定し、得られたピーク高さ比又はピーク面積比と検量線 A 又は検量線 B から測定液中のプロピレングリコール濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中のプロピレングリコール含量 (%) を計算する。

$$\text{プロピレングリコール含量 (\%)} = \frac{CV_1}{2,000 \times V_2 W}$$

C : 測定液中のプロピレングリコール濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

V_1 : 試料液全量 (ml)

V_2 : 定量の際用いた試料液量 (ml)

W : 試料の採取量 (g)

(6) 水分含量

試料約 5g を精密に量り、ハサミで約 60 個程度に分割する。これをあらかじめ重量 (W_1) を精密に量った秤量皿に入れ、試料を均一に広げ、この総重量 (W_2) を精密に量る。次に温度を 130℃ に上昇させておいた乾燥器の中に、すばやく秤量皿を入れる。その際ふたははずし、皿の下に置く。乾燥器の温度を 130℃ に保ち、3 時間乾燥する。秤量皿を取り出し、直ちにふたをし、デシケーター中で室温まで放冷した後、重量 (W_3) を精密に量る。試料の水分含量は次式によって算出する。

$$\text{試料の水分含量 (\%)} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

めん類においてはプロピレングリコール含量を次式によって水分含量 30% の場合に換算し、使用基準値と比較する。

$$\text{プロピレングリコール換算含量 (\%)} = \frac{70 \times a}{100 - b}$$

a : 検体中のプロピレングリコール実測値 (%)

b : 試料の水分含量 (%)

試薬・試液等

1. アルミニウム製秤量皿：上径 55mm, 下径 50mm, 深さ 25mm
2. トリメチレングリコール：[特級]

[注]

- 1) 抽出温度 70℃以上, 抽出時間 60 分以上の抽出操作で, プロピレングリコールは定量的に抽出される。記述は抽出困難な場合を想定しており, 適宜簡略化できる。分離がしやすいときは遠心分離せず, 還流加熱液をろ過してメタノール抽出液を得てもよい。
- 2) 試料液中のプロピレングリコール濃度が $1,000\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上になる場合には 1ml を用いる。

100 ヘキサン

Hexane

1. 試験法の概要

植物油脂中のヘキサンは、ヘッドスペース法（標準添加法）を用い、ガスクロマトグラフィーにより測定する。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を用いる。

（2）標準溶液の調製

n-ヘキサン約0.5gを精密に量り、エタノールを加えて正確に50mlとする。その1mlを正確に採り、エタノールを加えて正確に25mlとし、標準原液とする（本液1mlは*n*-ヘキサン400 μ gを含む）。標準原液1mlずつを正確に採り、エタノールで正確に10ml及び20mlとし、標準溶液①及び②とする（それぞれの標準溶液1mlは*n*-ヘキサン40 μ g及び20 μ gを含む）。標準溶液②を2mlずつを正確に採り、エタノールを加えて正確に5、10ml及び20mlとし、それぞれ標準溶液③、④及び⑤とする（それぞれの標準溶液1mlは*n*-ヘキサン8、4 μ g及び2 μ gを含む）。

（3）試料気相の調製¹⁾

ヘッドスペース用バイアル瓶（内容量6ml）7本に試料1.00gずつを正確に量る。試料を採取したバイアル瓶のうち2本にはエタノール0.25mlを、残りの5本のバイアル瓶には(2)で調製した標準溶液①～⑤を、それぞれ0.25ml²⁾正確に添加する。バイアル瓶に小攪拌子を入れ、密栓した後、5分間かくはんする。50℃の恒温水槽中で10分間静置した後、気相を採取しガスクロマトグラフに注入する。

（4）測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）を用い、次の条件によって測定

する。

カラム充てん剤：スチレンジビニルベンゼン重合体の PLOT（型）キャピラリーカラム³⁾

カラム管：内径 0.25mm，長さ 10m，膜厚 10 μ m

注入口温度：180 $^{\circ}$ C

検出器温度：250 $^{\circ}$ C

昇温条件：120 $^{\circ}$ C（3 分） $\rightarrow$ （20 $^{\circ}$ C/分） $\rightarrow$ 240 $^{\circ}$ C（2 分）⁴⁾

注入方法：スプリット注入，スプリット比：1：15

カラムヘッド圧：50kpa

② 定量

試料及びそれぞれの標準溶液を添加したバイアル瓶の気相 500 μ l をガスタイトシリンジ⁵⁾を用いて正確に採り，ガスクロマトグラフに注入しピーク高さ，又はピーク面積によって試料中のヘキサン含量を計算する。

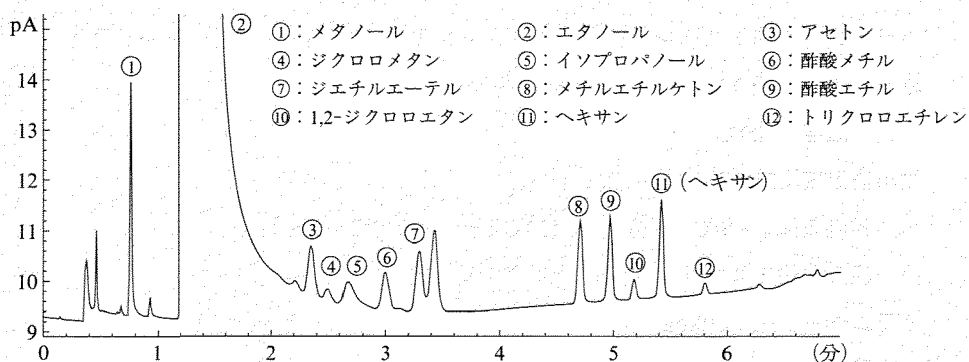
試料中のヘキサン含量は，横軸に試料 1g 当たり添加した *n*-ヘキサン量を，縦軸にそれぞれのクロマトグラムから得られたヘキサンのピーク面積を縦軸にプロットする。最小二乗法により検量線 $Y=a+bX$ を作成するとき，この検量線の横軸との接点の絶対値⁶⁾を試料中のヘキサン含量とする^{7),8)}。

試薬・試液

1. エタノール [特級]
2. *n*-ヘキサン [特級]

[注]

- 1) 試料とほぼ同等のマトリックスを持ち，ヘキサンが含有されていないことを確認できた油が得られれば，検量線は標準添加法を用いずに作成することができる。
- 2) 試料 1g 当たりの *n*-ヘキサンの添加量は標準溶液 1ml 中に含まれる量の 4 分の 1 に相当する。
- 3) Poraplot Q (Chrompack(社)製) などがある。
- 4) 初期カラムヘッド圧：50kpa，カラム流量：2.4ml/分，（コンスタントフローモード）で，ヘキサンは約 5.3 分で溶出する。
- 5) ガスタイトシリンジをあらかじめ 50 $^{\circ}$ C 程度に加熱しておくといよい。
- 6) 検量線 $Y=a+bX$ で $Y=0$ となるとき X の値がヘキサン含量となる。
- 7) 食用油（なたね・大豆混合油）に *n*-ヘキサンを初めとする溶剤を添加したヘッドスペースガスクロマトグラムを注図 100-1 に示す。ここに示したほかに，シクロヘキサンはトリクロロエチレンと同じ保持時間に溶出する。また，純度の低い *n*-ヘキサン中の不純物が 1,2-ジクロロエタンと同じ保持時間に溶出する。
- 8) 検量線は試料当たり 1~10mg/kg の間で直線性を示す。定量限界は約 1mg/kg である。



〈測定条件〉

カラム充てん剤: Poraplot Q キャピラリーカラム (Chrompack 製)

カラム管: 内径 0.25mm, 長さ 10m, 膜厚 10 μ m

注入口温度: 180 $^{\circ}$ C

検出器温度: 250 $^{\circ}$ C

昇温条件: 120 $^{\circ}$ C (3分) $\rightarrow$ (20 $^{\circ}$ C/分) $\rightarrow$ 240 $^{\circ}$ C (2分)⁵⁾

注入方法: スプリット注入, スプリット比: 1:15

注図 100-I ヘキサンのガスクロマトグラム

101 マグネシウム塩類

Magnesium Salts

塩化マグネシウム Magnesium Chloride $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 203.30	酸化マグネシウム Magnesium Oxide MgO : 40.30
炭酸マグネシウム Magnesium Carbonate	硫酸マグネシウム(結晶) Magnesium Sulfate (crystal) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 246.48
	硫酸マグネシウム(乾燥) Magnesium Sulfate (dry) $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 174.41

1. 試験法の概要

食品中のマグネシウム塩類は、原子吸光法によりマグネシウムとして定量する。必要があれば分子量比を乗じてそれぞれのマグネシウム塩類の量として求める。食品中には天然のマグネシウムが広く分布している。したがって、定量値は食品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。

2. 試験法 (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) 試料液の調製

試料約 2g を精密に量り、250～300ml の分解フラスコ¹⁾に入れ、硝酸 20ml を加えて穏やかに加熱する²⁾。最初の激しい反応が弱まるにつれ、加熱を強めて均一な黄色液体となるまで加熱する。次に過塩素酸 5ml を加えて穏やかに加熱して³⁾、二酸化窒素の発生が終わり、発泡が激しく、液が濃褐色になったとき、加熱を止め、硝酸約 2ml をきわめて静かに加えて再び加熱する⁴⁾。液が濃褐色を呈したならば、以下同様に硝酸の添加と加熱とを繰り返す⁵⁾、過塩素酸の白煙が生じて液がほとんど無色になったとき、加熱を止める。冷後、少量の水を用いて定量的に磁製蒸発皿⁶⁾に移し、これをホットプレート上で蒸発乾固する⁷⁾。残留物に塩酸 (1 → 4) 10ml を加え、加温してかき混ぜ、100ml のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 100ml

とする。この液 1ml を正確に量り、塩酸 (1 → 40) を加えて正確に 50ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

塩化マグネシウム 8.363g を正確に量り、塩酸 (1 → 4) 100ml を加えて溶かし、水を加えて正確に 1,000ml とする⁸⁾。この液 1ml を正確に量り、塩酸 (1 → 40) を加えて正確に 200ml とし、標準液とする (この液 1ml は、マグネシウム 5 μ g を含む)。

標準液 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0ml 及び 3.0ml をそれぞれ正確に量り、50ml のメスフラスコに入れ、それぞれに塩酸 (1 → 40) を加えて正確に 50ml とし、検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれマグネシウム 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 μ g 及び 0.30 μ g を含む)。

(4) 空試料液の調製

水 2ml を用い(2)と同様に操作し、空試料液とする。

(5) 測定法

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件によって測定する。

光源：マグネシウム中空陰極ランプ

燃料ガス：アセチレン-空気フレイム (アセチレン 2.0~2.5L/分, 空気 14L/分)

測定波長：285.2nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき原子吸光度を測定し、波高から検量線を作成する。

③ 定量

試料液及び空試料液につき、原子吸光度を測定する。両者の吸光度の差を求め、その値と検量線から試料液中のマグネシウム濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中の含量 (%) を計算する。

$$\text{マグネシウム含量 (\%)} = \frac{C}{2 \times W}$$

C：試料液中のマグネシウム濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

塩化マグネシウム含量 (%) = マグネシウム含量 (%) $\times$ 8.365

酸化マグネシウム含量 (%) = マグネシウム含量 (%) $\times$ 1.658

硫酸マグネシウム (結晶) 含量 (%) = マグネシウム含量 (%) $\times$ 10.14

硫酸マグネシウム (乾燥) 含量 (%) = マグネシウム含量 (%) $\times$ 7.176

試 薬

1. 塩酸：市販の有害金属用を用いる。
2. 過塩素酸：市販の有害金属用を用いる。
3. 硝酸：市販の有害金属用を用いる。

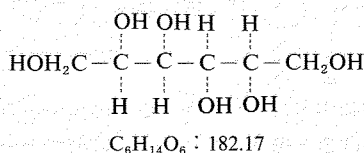
[注]

- 1) 試験に用いるガラス器具は、すべて使用前に硝酸（1→3）で十分洗うか、又はこの硝酸に一夜つけておく。
- 2) 必要があれば、少量の水を加える。
- 3) 過塩素酸添加後の加熱が強すぎるとマグネシウムの損失があるので、静かに沸騰させる。
- 4) 硝酸を加えずに加熱を続けると爆発することがあるので十分注意する。
- 5) クッキーのような脂肪含有食品では、この操作を2～3回必要とする。その他の食品では硝酸の追加はほとんど必要としない。
- 6) 使用する前に塩酸（1→2）で煮沸洗浄しておく。
- 7) 過塩素酸除去の操作は省略しても差し支えない。その場合、反応液中の硝酸を完全に除くため、次の操作を行う。無色になった液を放冷した後、水約30mlを加えて熱し、過塩素酸の白煙が生じてから更に20～30分間加熱を続ける。
- 8) この液1mlは、マグネシウム1mgを含む。この濃度の標準液は市販されている。

102 D-マンニトール

D-Mannitol

別名：D-マンニット



1. 試験法の概要

食品中のD-マンニトールは、アセチル体とし、ガスクロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）¹⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

① チューインガム

数枚を細片にし、混ぜ合わせて均一試料とする。

② あめ

任意に数個を採り、粉碎して均一試料とする。

(2) 試料溶液の調製

① チューインガム

試料約 2g を精密に量り、100ml の三角フラスコに入れ、水²⁾ 50ml を加え、一夜放置する。この液をろ過し、残留物に水 25ml を加え、60℃の水浴上で1時間加温した後、ガラス棒で不溶物を圧縮し、ろ過する。容器及びろ過器を水で洗浄し、ろ液及び洗液を合わせ、水を加えて正確に 100ml とし、試料溶液³⁾とする。

② あめ

試料約 2g を精密に量り、水 50～70ml を加えて溶かし、必要があればろ過し、残留物を水で洗い、ろ液及び洗液を合わせ、水を加えて正確に 100ml とし、試料溶液とする。

(3) 試料液の調製⁴⁾

試料溶液 40ml を正確に量り⁵⁾、濃縮器に入れ、内部標準液 5ml を正確に量って加えた後、

60℃の水浴上で減圧濃縮を行い、水分を除く。次に 60℃の水浴上で 30～60 分間減圧乾燥を行った後、無水ピリジン 14ml 及び無水酢酸 7ml を加え、60～70℃の水浴上で激しく振り混ぜて残留物を溶かし、一夜放置する。水 20ml を加えた後、水 10ml を用いて分液漏斗に移し、エチルエーテル 50, 30ml 及び 30ml で 3 回抽出する。全エチルエーテル層を合わせ、0.05mol/l 硫酸 20ml で 2 回及び水 20ml で 1 回洗った後、エチルエーテル層に無水硫酸ナトリウムを加えて 1 時間放置する。この液をろ過し、残留物はエチルエーテル 50ml で数回洗い、ろ液及び洗液を合わせてナス型フラスコに入れ、減圧濃縮してエチルエーテルを留去する。残留物にアセトンを加えて溶かして正確に 10ml とし、試料液とする。

(4) 検量線用標準液の調製

D-マンニトールを 60℃で減圧乾燥した後、0.400g を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、D-マンニトール 4mg を含む）。標準液 0, 2.5, 5, 7.5ml 及び 10ml をそれぞれ正確に量り、濃縮器に入れ、それぞれに内部標準液⁶⁾ 5ml を正確に量って加え、以下、(3)試料液の調製と同様に操作して検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれD-マンニトールとして 0, 1, 2, 3mg 及び 4mg を含む）。

(5) 測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：60～80 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフ用ケイソウ土

担体に XE-60（3%）を含むアセトンを加え、アセトンを蒸発し、乾燥したもの。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 2m

カラム温度：150℃から 220℃まで 6℃/分の昇温を行う。

検出器温度：250℃

キャリアーガス：窒素、40ml/分

② 検量線

検量線用標準液 2 μ l ずつをそれぞれ量り、それぞれガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さ比又はピーク面積比から検量線⁷⁾を作成する。

③ 定量

測定液 2 μ l を量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ比又はピーク面積比から検量線によって試料液中のD-マンニトール濃度（mg/ml）を求め、次式によって検体中のD-マンニトール含量（g/kg）を計算する。

$$\text{D-マンニトール含量 (g/kg)} = \frac{25 \times C}{W}$$

C：試料液中のD-マンニトール濃度 (mg/ml)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. アセトン：[残留農薬試験用]
2. キシリトール：市販品を用いる。
3. エチルエーテル：[残留農薬試験用]
4. 内部標準液：キシリトールを 60℃ で減圧乾燥した後，0.400g を量り，蒸留水を加えて溶かして 100ml とする。
5. ピリジン：[特級]
6. 無水ピリジン：ピリジンに水酸化ナトリウム結晶（ペレット状）を入れる。
7. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）[特級]

[注]

- 1) チューインガム，あめ以外の食品からD-マンニトールを分析，定量する場合には，44 キシリトールの試験法を準用することができる。ただし，「キシリトール」を「D-マンニトール」とする。
- 2) 熱アルコールで抽出する方法があるが，ガムベース及び香料等の溶出による GC の妨害ピークを少なくするため，水で抽出する方法を採用した。この方法で良好な回収率が得られる。
- 3) CV 値 (%) 0.57 で完全な溶出糖液が得られる。
- 4) トリメチルシリル化されたD-マンニトールとD-ソルビトールの誘導体は GC では分離がうまくいかない。
- 5) D-マンニトールとして 40mg 以下になるようにする。必ずしも 40ml にする必要はない。
- 6) あらかじめ検体にキシリトールが含まれていないことを確認する。キシリトールが含まれている場合は，エリスリトールが使用できる。
- 7) 直線性を示す。

103 リン酸及びその塩類, ピロリン酸塩類, ポリリン酸塩類及びメタリン酸塩類

Phosphoric Acid and Its Salts, Pyrophosphates,
Polyphosphates and Metaphosphates

リン酸及びその塩類

リン酸

Phosphoric Acid

H_3PO_4 : 98.00

リン酸三カリウム

Tripotassium Phosphate

別名：第三リン酸カリウム

$\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=3, 1\frac{1}{2}, 1$ 又は 0)

(K_3PO_4 : 212.27)

リン酸水素二アンモニウム

Diammonium Hydrogen Phosphate

別名：リン酸二アンモニウム,

第二リン酸アンモニウム

(NH_4)₂ HPO_4 : 132.06

リン酸水素二カリウム

Dipotassium Hydrogen Phosphate

別名：リン酸二カリウム,

第二リン酸カリウム

K_2HPO_4 : 174.18

リン酸一水素カルシウム

Calcium Monohydrogen Phosphate

別名：第二リン酸カルシウム,

リン酸水素カルシウム

$\text{CaHPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=2, 1\frac{1}{2}, 1, 1/2$ 又は 0)

(CaHPO_4 : 130.06)

リン酸水素二ナトリウム (結晶)

Disodium Hydrogen Phosphate (crystal)

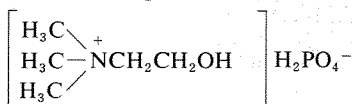
別名：リン酸二ナトリウム (結晶),

第二リン酸ナトリウム (結晶)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=12, 10, 8, 7, 5, 2$ 又は 0)

コリンリン酸塩

Choline Phosphate



$\text{C}_5\text{H}_{16}\text{NO}_5\text{P}$: 201.16

リン酸三カルシウム

Tricalcium Phosphate

別名：第三リン酸カルシウム

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 310.18

リン酸二水素アンモニウム

Ammonium Dihydrogen Phosphate

別名：リン酸一アンモニウム,

酸性リン酸アンモニウム

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: 115.03

リン酸二水素カリウム

Potassium Dihydrogen Phosphate

別名：リン酸一カリウム,

酸性リン酸カリウム

KH_2PO_4 : 136.09

リン酸二水素カルシウム

Calcium Dihydrogen Phosphate

別名：第一リン酸カルシウム,

酸性リン酸カルシウム

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=1$ 又は 0)

($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$: 234.05)

リン酸水素二ナトリウム (無水)

Disodium Hydrogen Phosphate (anhydride)

別名：リン酸二ナトリウム (無水),

第二リン酸ナトリウム (無水)

Na_2HPO_4 : 141.96

リン酸二水素ナトリウム (結晶)

Sodium Dihydrogen Phosphate (crystal)

別名: リン酸一ナトリウム (結晶),

第一リン酸ナトリウム (結晶)

 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 156.10

リン酸三ナトリウム (結晶)

Trisodium Phosphate (crystal)

別名: 第三リン酸ナトリウム (結晶)

 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 380.14

リン酸二水素ナトリウム (無水)

Sodium Dihydrogen Phosphate (anhydride)

別名: リン酸一ナトリウム (無水),

第一リン酸ナトリウム (無水)

 NaH_2PO_4 : 119.98

リン酸三ナトリウム (無水)

Trisodium Phosphate (anhydride)

別名: 第三リン酸ナトリウム (無水)

 Na_3PO_4 : 163.94ピロリン酸塩類

ピロリン酸四カリウム

Potassium Pyrophosphate

別名: ピロリン酸カリウム

 $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$: 330.34

ピロリン酸二水素二ナトリウム

Disodium Dihydrogen Pyrophosphate

別名: 酸性ピロリン酸ナトリウム

 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$: 221.94

ピロリン酸第二鉄

Ferric Pyrophosphate

 $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$: 745.22

ピロリン酸二水素カルシウム

Calcium Dihydrogen Pyrophosphate

別名: 酸性ピロリン酸カルシウム

 $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$: 216.04

ピロリン酸第一鉄

Ferrous Pyrophosphate

 $\text{Fe}_2\text{P}_2\text{O}_7$: 285.64

ピロリン酸四ナトリウム (結晶)

Sodium Pyrophosphate (crystal)

別名: ピロリン酸ナトリウム (結晶)

 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$: 446.05

ピロリン酸四ナトリウム (無水)

Sodium Pyrophosphate (anhydride)

別名: ピロリン酸ナトリウム (無水)

 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: 265.90ポリリン酸塩類

ポリリン酸カリウム

Potassium Polyphosphate

ポリリン酸ナトリウム

Sodium Polyphosphate

メタリン酸塩類

メタリン酸カリウム

Potassium Metaphosphate

メタリン酸ナトリウム

Sodium Metaphosphate

1. 試験法の概要

食品中のリン酸及びその塩類、ピロリン酸塩類、ポリリン酸塩類及びメタリン酸塩類は、加水分解後、モリブデン酸アンモニウムによる呈色物を比色により定量する。必要があれば分子量比を乗じてそれぞれのリン酸塩の量として求める。食品中には天然のリン酸、リン酸塩及びリン酸化合物が分布している。したがって、定量値は食品由来のリン酸塩と添加されたものの合計値である。

2. 試験法（比色法）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料溶液の調製

① 液状食品

試料約 10g を精密に量り、トリクロロ酢酸溶液（1 → 10）50ml を加えてよくかき混ぜ、液が澄明で着色していないか、又は着色していても薄い場合は、そのまま試料溶液とする。液が懸濁している場合は、ろ過し、容器及び残留物はトリクロロ酢酸溶液（1 → 10）40ml で洗う。ろ液及び洗液を合わせ、試料溶液とする。液の着色が著しい場合は、活性炭¹⁾ 0.1～0.5g を加えてよくかき混ぜ、ろ過し、容器及び残留物はトリクロロ酢酸溶液（1 → 10）40ml で洗う。ろ液及び洗液を合わせ、試料溶液とする。

② 固体食品²⁾

試料約 10g を精密に量り、トリクロロ酢酸溶液（1 → 10）50ml を加えてホモジナイズする。液が澄明で着色していないか、又は着色していても薄い場合はろ過し、容器及び残留物はトリクロロ酢酸溶液（1 → 10）40ml で洗う。ろ液及び洗液を合わせ、試料溶液とする。液の着色が著しい場合は、活性炭¹⁾ 0.1～0.5g を加えてよくかき混ぜ、ろ過し、容器及び残留物はトリクロロ酢酸溶液（1 → 10）40ml で洗う。ろ液及び洗液を合わせ、試料溶液とする。

（3）試料液の調製

試料溶液にアンモニア水を加えて pH9.3 に調整し、あらかじめ用意したイオン交換カラムに注入し、流速 1ml/分（以下同じ）で通過させた後、アンモニア緩衝液 100ml、次いで 6mol/l 塩酸 100ml を通過させる³⁾。6mol/l 塩酸流出液を集め、この 5ml を 50ml 比色管に採り、水 5ml、2mol/l 硫酸 5ml 及びモリブデン酸アンモニウム溶液 5ml を加えて混和し、水浴中 20 分間加熱後、直ちに混合試薬 4ml を加え、20 分間室温に放置後水で 30ml とし、試料液とする。

(4) 検量線用標準液の調製

110℃で乾燥したリン酸二水素カリウム 2.195g を正確に量り、水に溶かして正確に 1,000ml とする。この液 10ml を採り、水を加えて正確に 1,000ml とし、標準液とする（この液 1ml は、リンとして 5 μ g を含む）。標準液 1, 2, 4, 6ml 及び 10ml をそれぞれ正確に比色管に採り、それぞれに水を加えて正確に 10ml とし、2mol/l 硫酸 5ml 及びモリブデン酸アンモニウム溶液 5ml を加えて混和し、水浴中 20 分間加熱後、直ちに混合試薬 4ml を加え、20 分間室温に放置後水を加えて 30ml とし、検量線用標準液とする（これらの液中には、それぞれリンとして 5, 10, 20, 30 μ g 及び 50 μ g を含む）。

(5) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 880nm、液層 1cm で測定する。

② 検量線

検量線用標準液につき吸光度を測定し、検量線を作成する。

③ 定量

試料液につき吸光度を測定し、得られた吸光度と検量線によりリン濃度を求め、次式によって試料中のリン含量 (g/kg) を計算する⁴⁾。

$$\text{リン含量 (g/kg)} = C \times \frac{100 \text{ (ml)}}{5 \text{ (ml)}} \times \frac{1}{W} \times \frac{1}{1,000} = \frac{C}{50 \times W}$$

C：試料液中のリン含量 (μ g)

W：試料の採取量 (g)

$$\text{リン酸含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 3.164$$

$$\text{コリンリン酸塩含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 6.495$$

$$\text{リン酸三カルシウム含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 6.854$$

$$\text{リン酸水素二アンモニウム含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 4.264$$

$$\text{リン酸二水素アンモニウム含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 3.714$$

$$\text{リン酸水素二カリウム含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 4.458$$

$$\text{リン酸二水素カリウム含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 4.394$$

$$\text{リン酸水素二ナトリウム（無水）含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 4.584$$

$$\text{リン酸二水素ナトリウム（結晶）含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 5.037$$

$$\text{リン酸二水素ナトリウム（無水）含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 3.874$$

$$\text{リン酸三ナトリウム（結晶）含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 12.274$$

$$\text{リン酸三ナトリウム（無水）含量 (g/kg)} = \text{リン含量 (g/kg)} \times 5.294$$

ピロリン酸四カリウム含量 (g/kg) = リン含量 (g/kg) × 10.665

ピロリン酸二水素カルシウム含量 (g/kg) = リン含量 (g/kg) × 6.975

ピロリン酸二水素二ナトリウム含量 (g/kg) = リン含量 (g/kg) × 7.165

ピロリン酸第一鉄含量 (g/kg) = リン含量 (g/kg) × 9.222

ピロリン酸第二鉄含量 (g/kg) = リン含量 (g/kg) × 24.06

ピロリン酸四ナトリウム (結晶) 含量 (g/kg) = リン含量 (g/kg) × 14.401

ピロリン酸四ナトリウム (無水) 含量 (g/kg) = リン含量 (g/kg) × 8.585

試薬・試液

1. 塩化アンモニウム：[特級]
2. 0.01mol/l 塩化アンモニウム溶液：塩化アンモニウム 535mg に水を加えて溶かし、1,000ml とする。
3. アンモニア緩衝液：0.01mol/l アンモニア溶液と 0.01mol/l 塩化アンモニウム溶液とを混合して pH9.3 に調整する。
4. イオン交換カラム：陰イオン交換樹脂 40g を湿式法でカラム (内径 1.2cm, 長さ 60cm) に詰める。
5. 陰イオン交換樹脂：市販のリン酸測定用を用いる。
6. 塩化カリウム：[特級]
7. 塩化カリウム・アンモニア緩衝液：塩化カリウム 15g にアンモニア緩衝液を加えて 1,000ml とする。
8. L-アスコルビン酸：[特級]
9. アスコルビン酸溶液：L-アスコルビン酸 10g を水に溶かして 100ml とする。
10. 酒石酸アンチモニルカリウム：[特級]
11. 酒石酸アンチモニルカリウム溶液：酒石酸アンチモニルカリウム 267mg を水に溶かして 100ml とする。
12. 混合試薬：アスコルビン酸溶液と酒石酸アンチモニルカリウム溶液の等量混合液
13. トリクロロ酢酸：[特級]
14. モリブデン酸アンモニウム：[特級]
15. モリブデン酸アンモニウム溶液：モリブデン酸アンモニウム 5g を水に溶かして 100ml とする。

[注]

- 1) 着色物が多量に存在する試料については、リン酸イオンの樹脂からの流出を妨害することがあるのであらかじめ活性炭で脱色する。

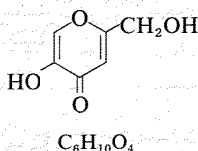
- 2) 生鮮野菜の化粧にリン酸塩を使ったか否かの判定のためには、ホモジナイズせずに抽出する。
- 3) リン酸塩、ピロリン酸塩、ポリリン酸塩、メタリン酸塩を分離して定量する必要がある場合は以下のように操作する。リン酸塩は、アンモニア緩衝液 100ml でカラムを洗浄後、更に塩化カリウム・アンモニア緩衝液 200ml を通過させ、この流出液を集め、その 10ml を 50ml の比色管に採り、2mol/l 硫酸 5ml を加えて以下同様に操作する。ピロリン酸塩は、アンモニア緩衝液 100ml で洗浄後、塩化カリウム・アンモニア緩衝液 200ml を通過させて洗浄し、更に塩化カリウム・アンモニア緩衝液 200ml を連続して通過させる。最後の流出液 200ml を集め、その 10ml を 50ml の比色管に採り、2mol/l 硫酸 5ml を加えて以下同様に操作する。ポリリン酸塩、メタリン酸塩は、カラムにアンモニア緩衝液 100ml、塩化カリウム・アンモニア緩衝液 400ml の順で通過させて洗浄し、更に 6mol/l 塩酸 100ml を通過させる。6mol/l 塩酸流出液を集め、その 5ml を 50ml 比色管に採り、水 5ml、2mol/l 硫酸 5ml を加えて同様に操作する。
- 4) 本法による定量限界は、リンとして $10\mu\text{g/g}$ 試料である。

第 19 章

既存添加物

104 コウジ酸

Kojic Acid



1. 試験法の概要

食品中のコウジ酸¹⁾は、酸性下ジエチルエーテルで抽出し、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（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) 試料液の調製

① 液状食品

試料約 2g を精密に量り、9mol/l 硫酸 0.7ml、セライト 5g²⁾ 及び無水硫酸ナトリウム 5g²⁾ を加えた後、ジエチルエーテル 100ml³⁾ を加え、20 分間振とうする。

遠心分離（5 分間、3,000 回転/分）した後、ジエチルエーテル層を分取し、水層にジエチルエーテル 100ml ずつを加え、同様の操作を更に 3 回⁴⁾ 繰り返す。全ジエチルエーテル層を合わせ、減圧下濃縮乾固する。残留物に水 10ml を加えて溶かし、試料液とする。

② 固体食品

試料約 10g を精密に量り、水 30ml を加えてホモジナイズした後、内容物を水を用いて 50ml のメスフラスコに移し入れる。

水を用いて定容した後、遠心分離（5 分間、3,000 回転/分）を行う。上清液 5ml を正確に採り、9mol/l 硫酸 0.7ml、セライト 5g²⁾ 及び無水硫酸ナトリウム 5g²⁾ を加えた後、ジエチルエーテル 100ml³⁾ を加え、20 分間振とうする。

遠心分離（5 分間、3,000 回転/分）した後、ジエチルエーテル層を分取し、水層にジエチルエーテル 100ml ずつを加え、同様の操作を更に 3 回⁴⁾ 繰り返す。全ジエチルエーテル層を合わせ、減圧下濃縮乾固する。残留物に水 5ml を加えて溶かし、試料液⁵⁾ とする。

(3) 検量線用標準液の調製

コウジ酸 0.100g を正確に量り、水を加えて溶かして 100ml とする。この液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準溶液とする（この液 1ml は、コウジ酸 100 μ g を含む）。標準溶液 1, 5, 10, 20ml 及び 50ml をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれコウジ酸 1, 5, 10, 20 μ g 及び 50 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管⁶⁾：ステンレススチール製、内径 4.6～6.0mm、長さ 150～250mm

移動相⁶⁾：0.05mol/l 過塩素酸

流速：1.0/分

測定波長：270nm

② 検量線

検量線用標準液それぞれ 20 μ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量⁷⁾

試料液 20 μ l を正確に量り、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料液中のコウジ酸濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって試料中のコウジ酸含量 (g/kg) を計算する。

[液状食品]

$$\text{コウジ酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times V}{1,000 \times W}$$

[固体食品]

$$\text{コウジ酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times V \times T}{1,000 \times W}$$

C：試料液中のコウジ酸濃度 (μ g/ml)

V：試料液の量 (ml)

W：試料の採取量 (g)

T：希釈倍率

試薬・試液

1. コウジ酸：〔特級〕
2. 無水硫酸ナトリウム：〔特級〕
3. 9mol/l 硫酸：硫酸（96.0%，特級）5.0ml を水 10ml に注意しながら加え、冷後、水を加えて 20ml とする。
4. セライト⁸⁾
5. 0.05mol/l 過塩素酸：過塩素酸（60%，特級）5.5ml に水を加えて 1,000ml とする。

〔注〕

- 1) コウジは、古くからみそ、しょう油、日本酒などの醸造に用いられている。このコウジの中から分離同定されたピロン系化合物の一種がコウジ酸であり、現在、食品には油脂類の酸化防止、めん類の変質防止、甲殻類の黒変防止、畜肉の退色防止、野菜類の鮮度保持、米飯の日持ち向上や魚卵の退色防止などに用いられている。
- 2) 抽出助剤として加えている。
- 3) 酢酸エチルを用いた方がコウジ酸は効率的に抽出されるが、分析妨害物質も同時に多量に抽出され、分析が困難となる。そこでコウジ酸の抽出効率はやや低いが、同時に抽出される分析妨害物質の少ないジエチルエーテルを用いている。
- 4) 第1回目の抽出で添加したコウジ酸の 50～60%，第2回目に 20%前後、第3回目に 10%前後、第4回目に数%抽出回収され、第5回目の抽出液にはコウジ酸は認められない。
- 5) たらこや蒲鉾などタンパク質が多く含まれる食品や、米飯やうどんなどデンプンが多く含まれる食品で、本法による抽出が困難な場合、次のように抽出するとよい。

試料を乳鉢でよくすりつぶした後、その約 1g を精密に量り、水 5ml、9mol/l 硫酸 0.7ml、セライト 5g、無水硫酸ナトリウム 5g、ジエチルエーテル 100ml を加え、ホモジナイズ抽出を行う。遠心分離（5 分間、3,000 回転/分）した後、ジエチルエーテル層を分取し、水層にジエチルエーテル 100ml ずつを加え、同様の操作を更に 3 回繰り返す。全ジエチルエーテル層を合わせ、減圧下濃縮乾固する。残留物に水 5ml を加えて溶かし、試料液とする。

- 6) カラムには、YMC-Pack ODS AM-312、TSK-gel ODS 80Ts、Mightysil RP-18 などが使用できる。移動相としては、0.05mol/l 過塩素酸のほかに 1%プロピオン酸、0.1mol/l クエン酸、0.1mol/l リン酸二水素ナトリウム（pH3.0）・メタノール混液（99：1）などが使用できる。
- 7) 本法による定量限界は、0.005g/kg である。
- 8) セライト 545（和光純薬）などが使用できる。

105 ステビア抽出物, α -グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア及びフルクトシルトランスフェラーゼ処理ステビア

Stevia Extract, α -Glucosyl Transferase-treated Stevia and
Fructosyl Transferase-treated Stevia

1. 試験法の概要

食品中のステビア抽出物, α -グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア及びフルクトシルトランスフェラーゼ処理ステビアは, 抽出後, クリーンアップ用カートリッジカラムを用いて精製し, 薄層クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法 (薄層クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

試料を細切又はすりつぶした後, その約 2.5g を量り, 水 10ml を加え, 10 分間振とう後, 遠心分離 (10 分間, 3,000 回転/分) し, 上澄液を 25ml のメスフラスコに入れる。残留物に水 10ml を加え, 同様の操作を繰り返す。上澄液を先の上澄液と合わせ, 水を加えて正確に 25ml とする。この液 5ml を正確に量り, あらかじめアセトニトリル 3ml 及び水 3ml で洗浄したクリーンアップ用カートリッジカラム¹⁾に静かに注入し, 1~2ml/分の速度で流出させる。流出液は捨て, カラムは 20%アセトニトリル水溶液 3ml を流して洗浄した後, 40%アセトニトリル水溶液 2.5ml 及び 70%アセトニトリル水溶液 2.5ml で溶出する。メンブランフィルター (0.45 μ m) を用いてろ過し, 試料液とする。

(3) 測定法

① 測定条件

次の条件によって測定する。

薄層板: シリカゲルプレート²⁾

展開溶媒: クロロホルム・メタノール・水混液 (65:35:10) (下層)

検出: 5%硫酸を噴霧後, 加熱

② 定性

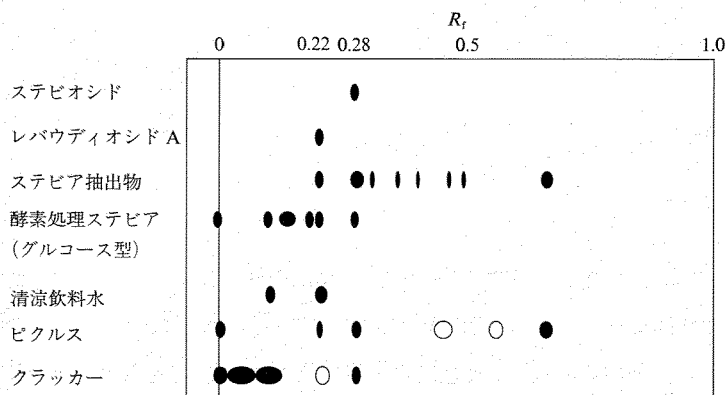
試料液を薄層板にスポットする。得られた試料液のスポットとステビア抽出物あるいは酵素処理ステビアのスポットが一致するかどうか確認する。

試薬・試液

1. クロロホルム：[特級]
2. メタノール：[特級]

[注]

- 1) クリーンアップ用カートリッジカラムは Bond Elut Jr[®] C18 (Varian 社製) 等が使用できる。ステビア抽出物及び酵素処理ステビアは 20 %アセトニトリル水溶液 3ml ではまったく溶出されないが、40 %アセトニトリル水溶液で酵素処理ステビアが、70 %アセトニトリル水溶液でステビア抽出物がほぼ 100 %溶出する。
- 2) 薄層板：ANALTECH 社製 UNIPLATETM SILICA GEL GF 等が用いられる。薄層クロマトグラフの一例を図に示す。

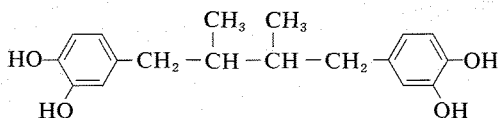


薄層板：ANALTECH 社製，UNIPLATETM SILICA GEL GF
 展開相：クロロホルム・メタノール・水（65：35：10）（下層）
 検出：5 %硫酸を噴霧後，加熱

注図 105-I ステビアの薄層クロマトグラフ

106 ノルジヒドログアヤレチック酸

Nordihydroguaiaretic Acid



1. 試験法の概要

食品中のノルジヒドログアヤレチック酸は、アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液（2：1：1）で抽出する。抽出溶液は $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）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）試料液の調製

① 植物性油脂食品

試料約 5g を精密に量り、混合溶媒 50ml を加えてよく振り混ぜた後、 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で 1 時間以上冷却する。冷却後、上層を分取する。下層は混合溶媒 50ml を加え、同様に操作する。上清液を合わせ、減圧濃縮して 1~2ml とした後、混合溶媒を加えて正確に 5ml とする。これを $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過し、ろ液を試料液とする。

② 動物性油脂食品

試料を 40°C で加温融解した後、約 5g を精密に量り、混合溶媒 50ml を加えて $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で 1 時間以上冷却して、すばやくろ紙でろ過する。残渣はあらかじめ冷蔵庫で冷却した混合溶媒 15ml で洗い、ろ過する。ろ液は合わせた後、減圧濃縮して 1~2ml とし、混合溶媒を加えて正確に 5ml とする。これを $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過し、ろ液を試料液とする。

③ 固体食品

粉碎あるいは細切した試料約 5g を精密に量り、ホモジナイザー用カップに採る。これに無水硫酸ナトリウム 10g 及び混合溶媒 50ml を加え、10 分間ホモジナイズする。 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷

凍庫で1時間以上冷却した後、すばやくろ紙でろ過する。残渣はあらかじめ冷蔵庫で冷却した混合溶媒 15ml で洗い洗液をろ過する。ろ液は合わせ、減圧濃縮して1~2mlとした後、混合溶媒を加えて正確に 5ml とする。これを $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過し、ろ液を試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

ノルジヒドログアヤレチック酸 0.100g を正確に量り、メタノールを加えて溶かし正確に 100ml とする。この液 10ml を正確に採り、メタノールを加えて正確に 100ml としたものを標準溶液とする（この液 1ml はノルジヒドログアヤレチック酸 $100\mu\text{g}$ を含む）。

標準溶液 0, 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り混合液を加えてそれぞれ正確に 5ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれノルジヒドログアヤレチック酸 0, 20, 40, 60, $80\mu\text{g}$ 及び $100\mu\text{g}$ を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外部吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル²⁾

カラム管：内径 4.6~6.0mm, 長さ 150~250mm

移動相³⁾：A液 アセトニトリル・メタノール混液 (1:1)

B液 5%酢酸溶液

A液・B液混液 (7:3)

流速：1.0ml/分

測定波長：280nm

② 検量線

検量線用標準液 $10\mu\text{l}$ を正確に採り、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⁴⁾

試料液 $10\mu\text{l}$ を正確に採り、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料液中のノルジヒドログアヤレチック酸含量 (g/kg) を算出する。

$$\text{ノルジヒドログアヤレチック酸含量 (g/kg)} = \frac{CV}{W \times 1,000}$$

C：試料液中のノルジヒドログアヤレチック酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

V：試料液の量 (ml)

試薬・試液

1. 無水硫酸ナトリウム：〔特級〕
2. メタノール：〔特級〕及び〔液体クロマトグラフ用〕
3. アセトニトリル：〔液体クロマトグラフ用〕
4. 酢酸：〔特級〕
5. 2-プロパノール：〔特級〕
6. エタノール：〔特級〕
7. 混合溶媒：アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液（2：1：1）

〔注〕

- 1) 本法は植物油，バター，魚介乾製品，魚介冷凍品等に使用できる。
- 2) 市販の充てんカラムとして Wakosil II-5C18HG, Inertsil ODS-2, TSKgel, ODS-120T 及び NOVA-PAK C₁₈ いずれも内径 4～6mm，長さ 150～250mm 等が使用できる。
- 3) グラジエント装置付液体クロマトグラフの場合は，次の条件によりノルジヒドログアヤレチック酸，ジブチルヒドロキシトルエン，ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルを同時に測定できる。

移動相：A 液 アセトニトリル・メタノール混液（1：1）

B 液 5%酢酸溶液

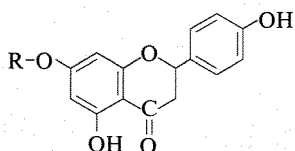
移動相 A 液の割合を 15 分間で 40～90%まで変化させ，以後 90%の割合で 30 分間保持する。

- 4) ノルジヒドログアヤレチック酸は油脂，バターにそれぞれ 0.1g/kg 以下の基準値で許可されているが，食用油脂及びバターにそれぞれノルジヒドログアヤレチック酸を 0.1g/kg 添加し，本法に従ったときの回収率は 93%以上である。煮干し，冷凍エビに 0.1g/kg 添加したときの回収率は 70%以上である。

107 ナリンジン及びヘスペリジン

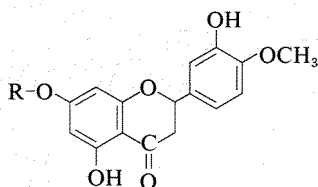
Naringin and Hesperidin

ナリンジン



ナリンゲニン R : H
 ナリンジン R : neohesperidose

ヘスペリジン



ペスペレチン R : H
 ヘスペリジン R : rutinose
 ネオヘスペリジン R : neohesperidose

1. 試験法の概要

食品中のナリンジン及びヘスペリジンは、希釈又は固相抽出法により精製し、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法 (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) 試料液の調製¹⁾

① かんきつ類

試料 2~4g を精密に量り、50 % エタノール約 50ml を加え、超音波で 2 分間抽出する。50 % エタノールで約 80ml にして、ときどき振とうしながら 20 分間超音波抽出した後、50 % エタノールで正確に 100ml とする。上清を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、試料液とする。

② 液状食品

試料約 1g を精密に量り、メタノールを加えて 2ml とし、遠心して上清を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、試料液とする。

③ 固形食品 (固相抽出法)²⁾

試料 1~5g を精密に量り、10 倍量の水を加えて³⁾加温溶解する。チューインガムなど溶けな

いものは、加温下で超音波抽出する。油状物質がある場合は添加した水と同量のヘキサンで洗浄する。固相カートリッジをメタノール 10ml, 続いて水 10ml でコンディショニングし、試料抽出液を負荷する。カートリッジを水 5ml で水洗した後、メタノール 10ml で溶出する。溶出液を濃縮し、濃縮物に移動相 A 液を加え溶解し正確に 2ml とし、これを $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過し、試料液とする⁴⁾。

(3) 検量線用標準液の作成

ナリンジン及びヘスペリジン 0.010g を正確に量り、メタノールを加えて溶かし正確に 20ml とし、標準原液とする。それぞれの標準原液 10ml を正確に採り、メタノールを加えて正確に 50ml とし、標準溶液とする（この液 1ml はナリンジン及びヘスペリジン $100\mu\text{g}$ を含む）。

標準溶液 0, 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、移動相 A 液を加えてそれぞれ正確に 10.0ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれナリンジン及びヘスペリジン 0, 10, 20, 30, $40\mu\text{g}$ 及び $50\mu\text{g}$ を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル⁵⁾

カラム管：内径 4.6mm, 長さ 150mm

カラム温度： 40°C

移動相：A 液 10mmol/l TFA 含有アセトニトリル・水混液 (20:80)

B 液 10mmol/l TFA 含有アセトニトリル・水混液 (40:60)

リニアグラジエントの条件（測定後 A 液で 10 分洗浄）

A (%) : 0 分 100, 10 分 100, 20 分 0, 30 分 0

B (%) : 0 分 0, 10 分 0, 20 分 100, 30 分 100

流速：1.0ml/分

測定波長：285nm

② 検量線

検量線用標準液 $20\mu\text{l}$ を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積からナリンジン及びヘスペリジンの検量線を作成する。

③ 定量

試料液 $20\mu\text{l}$ を正確に量り、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り試料液中のナリンジン及びヘスペリジンの濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中のナリンジン及びヘスペリジン含量 C (g/kg) を計算する⁶⁾。

$$C(\text{g/kg}) = \frac{A \times V}{W \times 1,000}$$

A：試料液中のナリンジン及びヘスベリジン濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W：試料の採取量 (g)

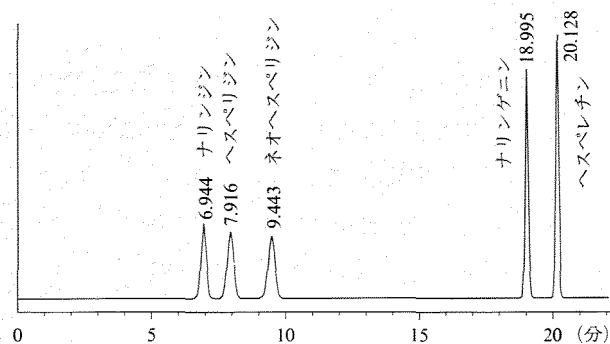
V：試料液の全量 (ml)

試薬・試液等

1. エタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
2. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
3. *n*-ヘキサン：[高速液体クロマトグラフ用]
4. 1-ブタノール：[高速液体クロマトグラフ用]
5. 固相カートリッジ：C₁₈
6. TFA：トリフルオロ酢酸 [特級]
7. 10mmol/l TFA 含有アセトニトリル：アセトニトリル 1L に TFA 770 μl を添加し，メンブランフィルター (0.45 μm) でろ過する (用時調製)。

[注]

- 1) 本法は果実類，清涼飲料水，キャンデー，ゼリーに適用できる。また，本法によりナリンジン及びヘスベリジンのほか，ネオヘスベリジン，ナリンゲニン，ヘスペレチンも測定できる。クロマトグラムを図に示した。



注図 107-I ナリンジン，ヘスベリジン類の液体クロマトグラム

- 2) 固相抽出法による精製はメーカーやロットにより，溶出条件が異なるため，あらかじめ溶出量をチェックしておく必要がある。
- 3) ゼリーは目詰まりを起こしやすいため，100 倍量の水に溶解するとよい。
- 4) 固相抽出法のほか，1-ブタノールによる抽出法でも精製できる。試料抽出液を同量の 1-ブタノールで 2 回抽出する。抽出液を合わせ，減圧下に溶媒を留去し，濃縮物にメタノール 2ml を加え，溶解して試料液とする。
- 5) 市販の充填カラムとして Inertsil ODS-2, Wakosil II-5C18HG, TSKgel ODS-120T 及び NOVA-PAK C₁₈ いずれも内径 4~6mm，長さ 150~250mm 等が使用できる。
- 6) 本法による定量限界は，0.010g/kg である。

108 ミックストコフェロール

Mixed Tocopherols

別名：ミックスビタミン E

1. 試験法の概要

食品中のミックストコフェロールは、主成分である d - α -トコフェロール、 d - β -トコフェロール、 d - γ -トコフェロール及び d - δ -トコフェロールを液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）¹⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

(4) 測定法

上記の(1)~(4)については、12 dl - α -トコフェロール及び d - α -トコフェロールの試験法を準用する。ただし、「 dl - α -トコフェロール及び d - α -トコフェロール」は、「 d - α -トコフェロール、 d - β -トコフェロール、 d - γ -トコフェロール及び d - δ -トコフェロール」とする。

[注]

- 1) 本法は、 d - α -トコフェロール及び dl - α -トコフェロールとの分離定量はできない。

第 20 章

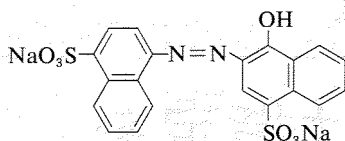
未指定あるいは指定を 削除された添加物

109 タール色素

アゾルビン

Azorubine

別名：カルモイシン (Carmoisine)



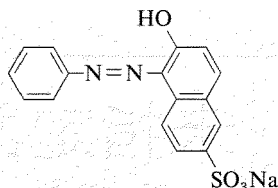
$C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$: 502.44

(C.I.14720)

オレンジ RN

Orange RN

別名：クロセインオレンジ (Crocein Orange)

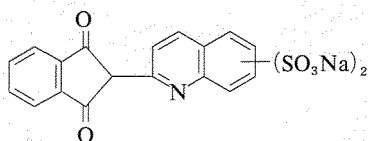


$C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$: 350.33

(C.I.15970)

キノリンイエロー

Quinoline Yellow



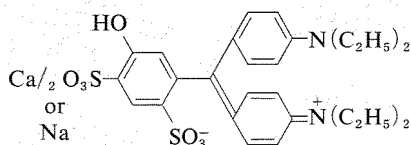
$C_{18}H_9NNa_2O_8S_2$: 477.38

(主色素成分として)

(C.I.47005)

パテントブルー V

Patent Blue V



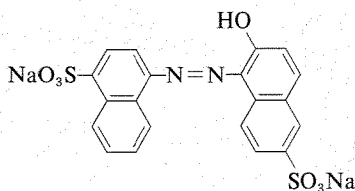
$C_{27}H_{31}N_2NaO_7S_2$: 582.67

又は $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2 \cdot \frac{1}{2}Ca$: 579.72

(C.I.42051)

ファストレッド E

Fast Red E



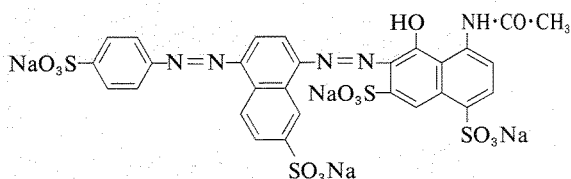
$C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$: 502.44

(C.I.16045)

ブリリアントブラック BN

Brilliant Black BN

別名：ブラック PN (Black PN)

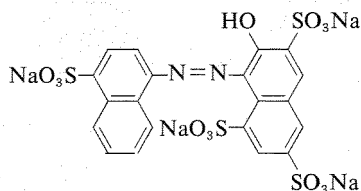


$C_{28}H_{17}N_5Na_4O_{14}S_4$: 867.69

(C.I.28440)

ボンソー 6 R

Ponceau 6R



$C_{20}H_{10}N_2Na_4O_{13}S_4$: 706.53

(C.I.16290)

1. 試験法の概要

食品中のタール色素は、薄層クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）検液の調製

（3）試料液の調製

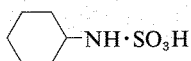
（4）標準液の調製

（5）測定法

上記の(1)～(5)については、食品添加物分析法各条、第9章、28 食用赤色2号及びそのアルミニウムレーキを準用する。ただし、「食用赤色2号」を、それぞれ「アゾルビン」、「オレンジRN」、「キノリンイエロー」、「パテントブルーV」、「ファストレッドE」、「ブリリアントブラックBN」、「ボンソー6R」とする。

110 サイクラミン酸

Cyclamic Acid



$C_6H_{13}NO_3S$: 179.24

1. 試験法の概要

食品中のサイクラミン酸¹⁾は、水で抽出した後、強酸性溶液中で塩素と反応させ、*N,N*-ジクロロシクロヘキシルアミンに変換し、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法（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）試料液の調製

① 液体試料

試料約 10g を精密に量り、水を加えて正確に 100ml とし、抽出液とする。

② 半固形及び固形試料

試料約 10g を精密に量り、水 30~40ml を加えて沸騰水浴上で 15 分間加温する。冷却し、水を加えて正確に 100ml とした後、遠心分離して上澄液を分取し、抽出液とする。なお、上澄液に浮遊物がある場合は、ろ紙でろ過する。

③ 反応操作²⁾

抽出液 10ml を正確に採り、これに硫酸溶液 2ml 及び *n*-ヘキサン 5ml を加えた後³⁾、次亜塩素酸ナトリウム試液 1ml を加えて 1 分間激しく振とうする。水層を除去した後、ヘキサン層に 5% 炭酸水素ナトリウム溶液 25ml を加えて 1 分間振とうする⁴⁾。水層を除去した後、ヘキサン層を分取し、試料液とする^{5), 6)}。

（3）検量線用標準液の調製

サイクラミン酸ナトリウム（シクロヘキシルアミドスルホン酸ナトリウム）112.3mg を正確に量り、水を加えて溶かし正確に 100ml とする。この液 10ml を量り、水を加えて溶かし、正

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

（４）測定法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.0～6.0mm、長さ 150～250mm

カラム温度： 40°C

移動相⁷⁾：アセトニトリル・水混液（70：30）

流速： $1.0\text{ml}/\text{分}$

測定波長⁸⁾： 314nm

注入量： $10\mu\text{l}$

② 検量線

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

③ 定量

試料液 $10\mu\text{l}$ を正確に量り、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料液中のサイクラミン酸濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を求め、次式によって試料中のサイクラミン酸含量 C （ $\mu\text{g}/\text{g}$ ）を計算する^{9)～11)}。

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

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

W：試料の採取量（g）

試薬・試液

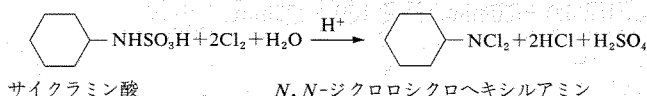
1. アセトニトリル：[残留農薬試験用]
2. 炭酸水素ナトリウム：[特級]
3. 5%炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム 5.0g を水に溶かして 100ml とする。
4. 硫酸：[特級]
5. 硫酸溶液：硫酸 10ml を水 10ml に注意しながら加える。

6. 次亜塩素酸ナトリウム溶液：〔化学用，有効塩素 5.0 %以上〕

7. 次亜塩素酸ナトリウム試液：次亜塩素酸ナトリウム溶液を水で2倍に希釈したものをいう。

〔注〕

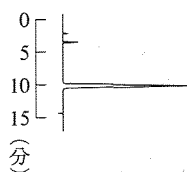
- 1) サイクラミン酸のナトリウム塩及びカルシウム塩は，わが国では 1956 年から甘味料として用いられてきたが，米国でラットに膀胱ガンを発生させる疑いがあるとのデータが公表されたことから，1969 年にわが国での使用が禁止され，以来現在も使用は認められていないが，中国，台湾及びヨーロッパ諸国などで認められている。
- 2) サイクラミン酸を *N,N*-ジクロロシクロヘキシルアミンに変換する反応操作である。反応機構は，以下のとおりである。



- 3) 生成する *N,N*-ジクロロシクロヘキシルアミンは，揮発性があるため，反応前にあらかじめ，*n*-ヘキサンを加えておき，反応と同時に反応生成物をヘキサンに吸収させる。
- 4) 過剰の塩素を除去するための操作である。
- 5) *N,N*-ジクロロシクロヘキシルアミンは，揮発性があるのでヘキサン抽出後は，直ちに定量を行う方がよい。したがって保存する場合は，密封して冷蔵する。
- 6) ヘキサン層を直接，液体クロマトグラフに注入する。20 検体の試料を連続して注入しても保持時間の変動は，ほとんど認められない。
- 7) 移動相としてメタノール・水（80：20）混液も使用できる。
- 8) *N,N*-ジクロロシクロヘキシルアミンは，210nm 付近に極めて強い吸収を有しているため，検出波長を 210nm に設定して検討したところ，ベースラインの変動が大きく，また夾雑ピークの数が多い。一方，314nm に設定した場合には，検出器の感度を上げててもベースラインは安定しており，また夾雑ピークも極めて少ない。したがって，210nm で測定した場合と 314nm で更に検出器の感度を上げて測定した場合とを比較しても，両者の定量限界はほとんど同じであることから，検出波長は夾雑ピークのより少ない 314nm とする。
- 9) サイクラミン酸を本法で処理した際のクロマトグラムを例を注図 110-1 に示す。
- 10) 本法によるサイクラミン酸の回収率を注表 110-1 に示す。
- 11) 本法の定量限界は，試料中濃度として 10 μ g/g である。

注表 110-1 各種食品からのサイクラミン酸の回収率

試料	添加量 (μ g/g)	回収率 (平均 $\pm$ SD)
りんごジュース	500	94.0 $\pm$ 3.1
ケチャップ	500	92.9 $\pm$ 3.2
しば漬	500	95.8 $\pm$ 2.4
たくあん漬	500	90.8 $\pm$ 4.6
しょう油	500	88.5 $\pm$ 3.1
ソフトさきいか	500	90.8 $\pm$ 3.9

(1): *N,N*-ジクロロヘキシルアミン (標準品)

<測定条件>

カラム: YMC-Pack ODS AM-312

(5 μ m, 内径 6.0mm, 長さ 150mm)

移動相: アセトニトリル・水混液 (7:3)

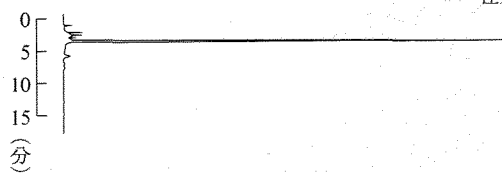
流速: 1.0ml/分

検出波長: 314nm

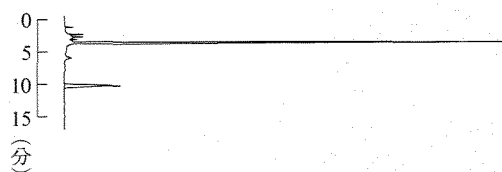
カラム温度: 40℃

注入量: 10 μ l

(2): ケチャップ (サイクラミン酸無添加)



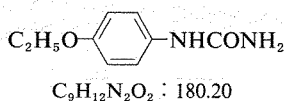
(3): ケチャップ (サイクラミン酸添加)



注図 110-I サイクラミン酸を添加した試料からの
抽出物のクロマトグラム

111 ズルチン

Dulcin



1. 試験法の概要

食品中のズルチンは、薄層クロマトグラフィーにより定性する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

① 液状試料

試料約 20ml を分液漏斗に採り、水 30ml を加える。ただし、炭酸又はアルコールを含む試料は水浴で加熱し炭酸又はアルコールを除き、冷後分液漏斗に移し、水を加えて約 50ml とする。これを 10%塩酸を用いて酸性とし、酢酸エチル 50ml で 2 回抽出する。抽出液を合わせ、飽和塩化ナトリウム溶液 5ml ずつで 4 回洗った後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し溶媒を留去する。得られた残留物に 0.5g 無水硫酸ナトリウム及び酢酸エチル 20ml を加えて振り混ぜる。ここに得られた酢酸エチル溶液をあらかじめ酢酸エチルを用いて湿式法により調製したカラム（1×5cm 上部に無水硫酸ナトリウム 1cm 積層する）にのせて流出させ試験溶液とする。

② 半流動状又は固体試料

試料約 20g を採り、よくすりつぶした後、水 30ml を加えて分液漏斗に移し、10%塩酸を用いて酸性とし、以下、液状試料と同様に操作する。

③ 油脂を含む試料

試料約 20g を分液漏斗に入れ、*n*-ヘキサン 50ml 及び 1%水酸化ナトリウムを用いて微アルカリ性にした水 100ml を加えて振り混ぜ、静置して下層を別の分液漏斗に移し、10%塩酸を用いて酸性とし、以下、液状試料と同様に操作する。

(3) 定性法

シリカゲル薄層板に各標準溶液及び試験溶液をスポットする。展開後、溶媒を完全に揮散させ、薄層板を紫外線ランプ下で観察した後、発色液を噴霧する。両検出法により試料から得られるスポットをズルチン標準溶液のそれと比較し判定する¹⁾。

試薬・試液

1. シリカゲル薄層板
2. ズルチン標準溶液：ズルチン 10mg をエタノール 5ml に溶かす。
3. 展開溶媒²⁾：酢酸エチル
5. *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド：市販の特級品を用いる。
6. 発色液：*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1g を 10% 塩酸 10ml に溶かしこれにエタノール 10ml を加える。

[注]

- 1) 本法による検出限界は、0.05 μ g である。
- 2) ポリアミド薄層板を用い、ベンゼン・酢酸エチル・99.5% 硝酸混液 (5:10:2) を展開溶媒としても良好なクロマトグラムが得られるが、ベンゼンを使用するのは好ましくないため採用していない。

112 ホウ酸

Boric Acid

H_3BO_3 : 77.83

1. 試験法の概要¹⁾

食品中のホウ酸は、試料を直接 2-エチル-1,3-ヘキサジオール（以下 EHD という）でキレート抽出した後、非水条件下でプロトン化クルクミン発色を行い比色法で定量する。

2. 試験法（比色法）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

試料約 10g を精密に量り、水 3ml を加えた後、濃塩酸 1ml、5 % EHD 溶液 30ml を加えホモジナイザーで 2 分間磨砕する。次いで無水硫酸ナトリウム²⁾ 20g を加え再び軽くホモジナイズした後、上澄液を分取する。残留物は 5 % EHD 溶液 30ml ずつで 2 回同様にホモジナイズし、上澄液を分取し、はじめの液に合わせ、5 % EHD 溶液を加えて全量を正確に 100ml とし、試料液とする。

（3）検量線用標準液の調製

ホウ酸 EHD 標準溶液を 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5ml 及び 3ml をそれぞれ 25ml の目盛り付きポリプロピレン製試験管³⁾に正確に量り、5 % EHD 溶液を加えてそれぞれ正確に 3ml とし、検量線用標準液とする（これらの試験管はそれぞれホウ酸として 0, 1, 2, 3, 4, 5 μg 及び 6 μg を含む）。

（4）測定法

① 発色条件

試料液 3ml を 25ml の目盛り付きポリプロピレン製試験管に正確に採り、クルクミン試液 1ml 及び濃硫酸 0.5ml をそれぞれ正確に加え、栓をしてよく混合する。ときどき混合しながら

室温で30分間放置した後、水3ml⁴⁾を加えて振り混ぜ、次いでアセトンで全量25mlとして発色させる。

② 検量線

検量線用標準液を上記の条件で発色させ、波長550nmにおける吸光度を測定し、検量線を作成する。

③ 定量条件

対照として、5% EHD 溶液3mlを用いて上記と同様に操作し空試験液を用い、①の操作で発色した液の波長550nmにおける吸光度を測定し、別に作成した検量線によって試料液中のホウ酸濃度A (μg/ml)を求める。

(5) 試料中の含有率の計算式

検量線から、試料液3mlの試験管中のホウ酸含有量(A)を求め、次式から試料中のホウ酸濃度(g/kg)を求める^{5)~7)}。

$$\text{試料中のホウ酸濃度 (mg/g)} = \frac{A}{3 \times 10 \times W}$$

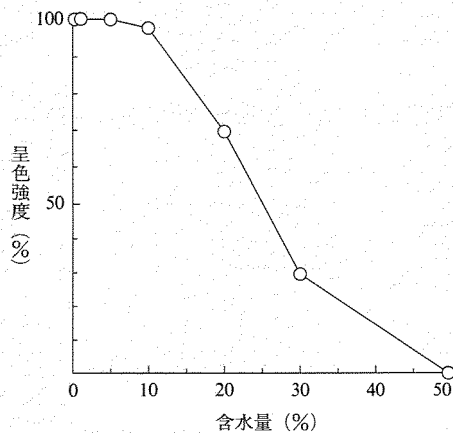
W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. 2-エチル-1,3-ヘキサジオール (EHD)：[1級]
2. クルクミン：[特級]
3. ホウ酸：特級品をデシケーター（硫酸）中で5時間乾燥したものを用いる。
4. 5% EHD 溶液：EHD50mlを*n*-ヘキサン・酢酸ブチル混液(4:1)に溶かし、全量1,000mlとする⁸⁾。
5. クルクミン試薬：クルクミン375mgを酢酸に溶かし、全量100mlとする。
6. ホウ酸標準原液（ホウ酸1mg/ml）：ホウ酸100mgを水に溶かし全量を100mlとする。
7. ホウ酸標準溶液（ホウ酸100μg/ml）：ホウ酸標準原液10mlに水を加え全量を100mlとする。
8. ホウ酸 EHD 標準原液（ホウ酸10μg/ml）：ホウ酸標準溶液10mlを分液漏斗に採り、濃塩酸1mlを加え、5% EHD 溶液30mlずつで3回抽出し、二層分離後有機層を分取し合わせる。有機層に無水硫酸ナトリウム少量を加え脱水した後ろ過し、ろ液に5% EHD 溶液を加えて全量100mlとする。
9. ホウ酸 EHD 標準溶液（ホウ酸2μg/ml）：ホウ酸 EHD 標準原液20mlに5% EHD 溶液を加えて全量100mlとする。

[注]

- 1) 灰化操作がないため、一度に多数の試料を処理でき、簡易で迅速な方法である。
- 2) プロトン化クルクミン発色法における、水分による影響を検討した結果を注図 112-1 に示した。試験溶液中に水分を 5 % 以上含むと、呈色度が減少することが明らかになった。したがって、試験溶液は無水硫酸ナトリウムで脱水し、非水条件下での発色を行う。
- 3) ガラス器具からはホウ素を溶出するためポリプロピレン製試験管を用いる。
- 4) プロトン化クルクミンの分解剤として水 3ml を用いる。
- 5) 添加回収実験の結果を注表 112-1 に示す。
- 6) 本法の定量限界は、 $0.3\mu\text{g/g}$ である。
- 7) 20 検体の定量に要する時間は約 3 時間であった。
- 8) n -ヘキサン・酢酸ブチル混液 (4 : 1) の方がクロロホルムより層分離が良好である。



水分 0~50 % 及びホウ酸 $3\mu\text{g}$ を含む 5 % EHD 溶液 1ml を用いた。
水分 0 % の反応液での呈色強度を 100 % とした。

注図 112-1 発色に及ぼす水分の影響

注表 112-1 ホウ酸の食品からの添加回収率

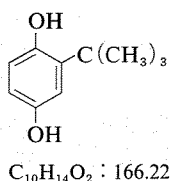
検体	ホウ酸		回収率 (%)
	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	検出量 ($\mu\text{g/g}$)	
殻付き冷凍エビ	0	2.9	—
	10	12.7	98.0
	100	102.2	99.3
塩蔵くらげ	0	40.5	—
	10	50.3	98.0
	100	139.5	99.0
寒天	0	864.9	—
	500	1,360.9	99.2
牛乳	0	1.0	—
	10	10.7	97.0
	100	99.3	98.3
豆乳	0	9.6	—
	10	19.3	97.0
	100	108.2	98.6
赤ワイン	0	23.8	—
	10	33.5	97.0
	100	122.6	98.8

いずれも 3 試行の平均値

113 TBHQ (tert-ブチルヒドロキノン)

Tertiary Butylhydroquinone

別名：ターシャリーブチルヒドロキノン



1. 試験法の概要

食品中の TBHQ は、アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液 (2:1:1) を加えて抽出し、冷凍庫で冷却した後、溶媒を分取し、液体クロマトグラフィーにより定量する。

2. 試験法 (液体クロマトグラフィー)¹⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試料液の調製

(3) 検量線用標準液の調製

上記の(1)~(3)については、食品添加物分析法各条、第2章、11 ジブチルヒドロキシトルエンを準用する。ただし、「ジブチルヒドロキシトルエン」を「TBHQ」とする。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収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。

カラム充てん剤²⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6~6.0mm、長さ 150~250mm

移動相：アセトニトリル・メタノール・5%酢酸混液 (1:1:2)

流速：1.0ml/分

測定波長：280nm

② 検量線

検量線用標準液 10 μ l を正確に採り、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

試料液 10 μ l を正確に採り、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によって試料液中の TBHQ 濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって食品中の TBHQ の含量を計算する^{3), 4)}。

$$\text{TBHQ 含量 (g/kg)} = \frac{AB}{W} \times \frac{1}{1,000}$$

A：試料液中の TBHQ 濃度 (μ g/ml)

B：試料液の容量 (ml)

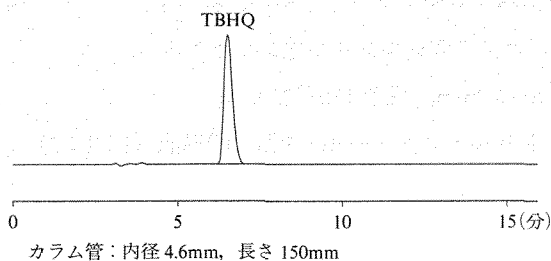
W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. 無水硫酸ナトリウム：[特級]
2. メタノール：[特級] 及び [液体クロマトグラフ用]
3. アセトニトリル：[液体クロマトグラフ用]
4. 酢酸：[特級]
5. 2-プロパノール：[特級]
6. エタノール：[特級]
7. 混合溶媒：アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混液 (2：1：1)

[注]

- 1) 本法は TBHQ のほかに没食子酸プロピル (PG), 2,4,5-トリヒドロキシブチロフェノン (THBP), ノルジヒドロゲアレチック酸 (NDGA), ブチルヒドロキシアニソール (BHA) 等についても同時分析が可能である。
- 2) 市販のカラム充てん剤として Inertsil ODS-II, TSKgel ODS-120T, Wakosil II-5C18HG 及び NOVA-PAK C₁₈ (いずれも内径 4.0~6.0mm, 長さ 150~250mm) 等が使用できる。
- 3) TBHQ の液体クロマトグラムを注図 113-1 に示す。
- 4) 各食品からの定量限界は 10mg/kg である。なお、添加回収率はバター及び植物油は 90 % 以上、煮干し及びえびは 65~70 % である。



注図 113-1 TBHQ の液体クロマトグラム

参 照 分 析 法

THE UNIVERSITY OF CHICAGO



1 アセトン

[製造用剤]

Acetone

CH_3COCH_3

$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$: 58.08

1. 試験法の概要

食品中のアセトンは、蒸留によりアセトンを分離した後、ガスクロマトグラフィーで定量する。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1） 検体の採取と試料の調製

検体は気密容器にほぼいっぱいになるように入れ、保存する。容器の検体は、容器の気密性を確認し、試験直前まで開封しない¹⁾。

（2） 試料液の調製

試料液の調製には、図 1-1 のような蒸留装置を用いる。

試料約 10g を精密に量り、蒸留フラスコに入れ、2,2,4-トリメチルペンタン 11ml を加え、マントルヒーターで加熱して直ちに蒸留する。留液約 9ml を、あらかじめ氷水浴中で冷却した 10ml のメスフラスコに捕集し、室温にもどしてから 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて正確に 10ml とし、試料液とする。

（3） 検量線用標準液の調製

アセトン 1.00g を正確に量り、2,2,4-トリメチルペンタンを加えて正確に 50ml とし、標準原液とする。用時、標準原液 5ml を正確に量り、2,2,4-ト

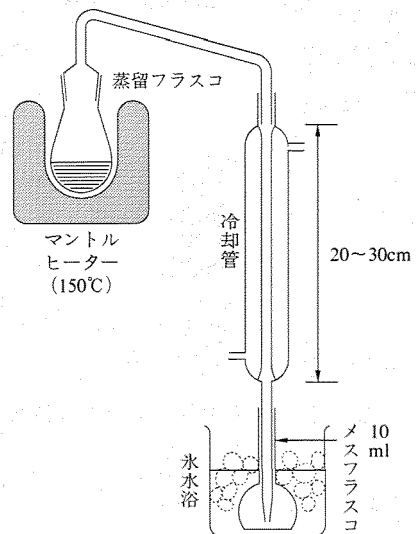


図 1-1 蒸留装置

リメチルペンタンを加えて正確に 100ml とし、更にその 10ml を正確に量り、2, 2, 4-トリメチルペンタンを加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml はアセトン 100 μ g を含む）。

標準液 2, 4, 6, 8ml 及び 10ml をそれぞれ正確に量り、2, 2, 4-トリメチルペンタンを加えてそれぞれ正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml はそれぞれアセトン 2, 4, 6, 8 μ g 及び 10 μ g を含む）。

（４）測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-DG）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：60～80 メッシュのポーラスポリマービーズ

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 1.5～2m

カラム温度：170～190℃

注入口温度：230℃

キャリアーガス：窒素 30～60ml/分。カラム温度及びキャリアーガス流量によりアセトンのピークが約 3 分前後に現れるように調整する。

② 検量線

検量線用標準液 5 μ l ずつをそれぞれ正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

試料液 5 μ l を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のアセトン濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中のアセトン含量（mg/kg）を求める。

$$\text{アセトン含量 (mg/kg)} = \frac{C \times 10}{W}$$

C：試料液中のアセトン濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液

2, 2, 4-トリメチルペンタン：〔特級〕²⁾

〔注〕

- 1) 空気酸化によるアセトンの生成と疑似ピークの出現を防止する。
- 2) 上記ガスクロマトグラフの条件でアセトンの位置にピークが出現しないものを用いる。

2 アルギン酸プロピレングリコールエステル

[糊 料]

Propylene Glycol Alginate

1. 試験法の概要

食品中のアルギン酸プロピレングリコールエステルは、酵素でタンパク質及びペクチンを分解して除いた後、硫酸銅を加え、アルギン酸及びアルギン酸ナトリウムをアルギン酸銅として沈殿させて除去する。上澄液に残存するアルギン酸プロピレングリコールエステルをナフトレゾルシンで発色させ、液体クロマトグラフィーで定量する。

2. 試 験 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） 試料液の調製

試料¹⁾約 2g を精密に量り、ホモジナイザー用カップに入れ、水 10ml を加え、約 2～3 分間ホモジナイズする²⁾。0.1mol/l 塩酸及び 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 7.0 に調整し、プロテアーゼ溶液³⁾ 3ml を加え、40℃で 1 時間、ときどき振とうしながら加温する。次に、0.1mol/l 塩酸を用いて pH を 4.0 に調整し、ペクチナーゼ溶液⁴⁾ 20 μ l を加え、40℃で 1 時間、ときどき振とうしながら加温する。次に、1mol/l アンモニア水で pH を 8.0 に調整し、70℃に加温し十分に溶解した後、2,000 回転/分で 10 分間遠心分離し不溶物を除去する。

上澄液に 10 %硫酸銅溶液⁵⁾ 3ml を加え、1mol/l 塩酸で pH を 4.0 に調整し、1 時間室温に放置する。析出した沈殿を 3,000 回転/分で 10 分間遠心分離し、上澄液と沈殿に分離し、上澄液は減圧濃縮⁶⁾し、水で正確に全量 10ml とし、試料液とする。

（3） 標準液の調製

アルギン酸プロピレングリコールエステル 0.060g を正確に量り、水で全量 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、アルギン酸プロピレングリコールエステル 600 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：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 250mm

移動相：アセトニトリル・水・酢酸ブチル混液（75：20：5）

流速：1.2ml/分

測定波長：565nm

② 測定液の調製

試料液 1ml に、銅・塩酸溶液⁷⁾ 2ml 及びナフトレゾルシノール試薬 1ml を加え、沸騰水浴中で 40 分間加熱後、氷水中で冷却し、酢酸ブチル 4ml を加え、10 分間振とう後、酢酸ブチル層を採り、20 % 食塩水 3ml を加え、軽く振とうした後水層を捨てる。この酢酸ブチル層を測定液⁸⁾とする。

③ 検量線

アルギン酸プロピレングリコールエステルの各標準液を別々の試験管に正確に 0.25, 0.5, 0.75ml 及び 1ml を採り、水でそれぞれ正確に 1ml とした後、試料液と同様にして②測定液の調製の操作を行い、検量線用標準液とする。それぞれ 20 μ l ずつを量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積から、アルギン酸プロピレングリコールエステルの検量線を作成する⁹⁾。

④ 定量

測定液 20 μ l を量り、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を求め、検量線より測定液中のアルギン酸プロピレングリコールエステルの濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のアルギン酸プロピレングリコールエステル含量 (g/kg) を計算する¹⁰⁾。

$$\text{アルギン酸プロピレングリコールエステル含量 (g/kg)} = \frac{C \times 4 \times 10}{W \times 1,000}$$

C：測定液中のアルギン酸プロピレングリコールエステル濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. プロテアーゼ溶液：プロテアーゼ（市販品）500mg を採り、水に溶かして全量 50ml とする。用時調製する。
2. ペクチナーゼ溶液：ペクチナーゼ（市販品）500mg を採り、水に溶かして全量 50ml とする。20 μ l 中には 2 単位以上とする。用時調製する。

3. アルギン酸プロピレングリコールエステル：食品添加物純度のもの。
4. 銅・塩酸溶液：濃塩酸 40ml に 2.5 % 硫酸銅溶液 1ml 及び水 9ml を加える。
5. ナフトレゾルシノール試薬：1,3-ジヒドロキシナフタレン 100mg を水 25ml に溶かす。
用時調製する。
6. 酢酸ブチル：〔特級〕
7. 硫酸銅：（五水塩）〔特級〕

〔注〕

- 1) 脂肪を多く含む食品では、試料約 2g にアセトン 80ml を加えてホモジナイズし、遠心分離（10 分間、3,000 回転/分）し、アセトン層を除去し、脱脂を行う。
- 2) アルギン酸プロピレングリコールエステルのアルギン酸総量を測定したいときには、この操作後、1mol/l 水酸化ナトリウム溶液 1ml を加え、よくかくはん後、沸騰水浴中で 10 分間加熱し、アルギン酸プロピレングリコールエステルを加水分解して、アルギン酸にする。
- 3) 除タンパクする目的。至適 pH は 7.0。
- 4) ペクチンの除去のため。至適 pH は 4.0。
- 5) アルギン酸は銅塩となり沈殿し、アルギン酸プロピレングリコールエステルは、上澄液中に存在するので、両者の分離ができる。
- 6) 減圧濃縮する際、気泡等が生じ濃縮が困難なものは、正確に 20ml 又は 30ml に調製する。そのときは計算式の 10 の代わりに 20 又は 30 を使用する。
- 7) 呈色強度を高め、呈色物を安定化するために用いる。
- 8) 酢酸ブチル中の呈色物は、室温で 4 時間までは 100 % 安定である。
- 9) アルギン酸プロピレングリコールエステルは、25～150 μ g/ml の範囲内で良好な直線性を示す。保持時間は、7～8 分である。
- 10) 本法での定量限界は、試料当たり約 0.01g/kg である。

3 ガムベース

[ガムベース]

Gum Bases

エステルガム Ester Gum	酢酸ビニル樹脂 Polyvinyl Acetate
ポリイソブチレン 別名：ブチルゴム Polyisobutylene	ポリブテン 別名：ポリブチレン Polybutene

1. 試験法の概要

ガム中のガムベースは、糖分を除去した乾燥ガムベースを *n*-ヘキサン、アセトン及び二塩化エチレンを用いて分画し、各分画について定性試験によって各ガムベースの存在を確認した後、エステルガムはガスクロマトグラフィー（試験法 A）、酢酸ビニル樹脂は重量分析法（試験法 B）、ポリイソブチレン及びポリブテンはゲルパーミエーションクロマトグラフィー（試験法 C）によりそれぞれのガムベースとして定量する。

2. 試験法

試験法 A（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

① 板ガム

検体 5 包装（1 包装が 6～7 枚）から 2 枚ずつ計 10 枚（約 30g）を採取し、細切して試料とする。

② 加工ガム

検体 5 包装から無作為に複数個以上を抽出し、それぞれのキャンディー、クリーム、ジャム等の付加物を除き、ガム部のみの約 20g を採取し、細切して試料とする。

（2）試料液の調製

試料を板ガムについては 30g、加工ガムについては 20g 正確に量り、200ml のビーカーに入れ、水 200ml を加えて 12～16 時間浸漬する。水層を傾斜して捨て、残留物に水 200ml を加え

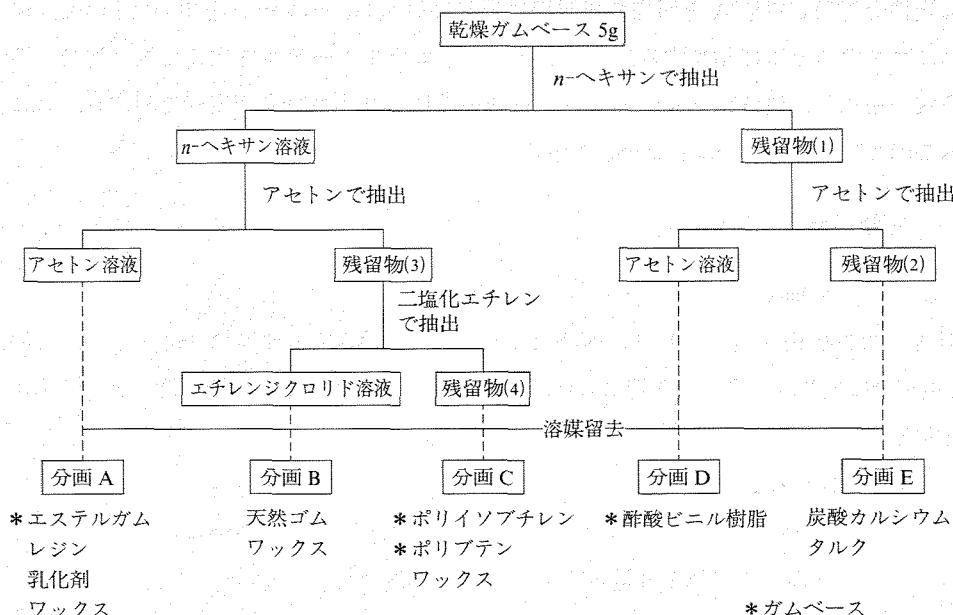


図 3-1 ガムベースの分画操作

てかき混ぜ、この水層も傾斜して捨てる。次に残留物に微温湯 200ml を加え、微温水浴中で加温しつつ、ガラス棒を用いて残留物を圧縮した後水層を傾斜して捨てる。残留物をシャーレに採り、薄く展延し、60℃で8時間真空乾燥し、乾燥ガムベースとする。

乾燥ガムベース約 5g を精密に量り、ソックスレー抽出器に入れ、*n*-ヘキサンを用いて 40 時間抽出操作を行った後、*n*-ヘキサン液と残留物(1)について、*n*-ヘキサン液は *n*-ヘキサンを用いて別のソックスレー抽出器に入れ蒸発乾固後、アセトンを用いて 40 時間抽出操作を行う。ここで得られたアセトン液は残留物(3)と分別し、分画 A とする。残留物(3)は更に二塩化エチレンを用いて 40 時間抽出操作を行い、二塩化エチレン液は残留物(4)と分別し、分画 B とする。残留物(4)は分画 C とする。一方、残留物(1)はアセトンで 40 時間抽出操作を行い、アセトン液は残留物(2)と分別して分画 D とする。残留物(2)は分画 E とする。これら分画のうち、分画 A はエステルガム、分画 D は酢酸ビニル樹脂、分画 C はポリイソブチレンとポリブテンの試験にそれぞれ溶媒を留去した後に用いる。操作の概要及び得られる分画中の主成分を図 3-1 に示す。

(3) 定性試験

分画 A ¹⁾ 100mg を量り、ベンゼンを加えて溶かし 1ml とし、定性分析用試料液 A とする。この液及びエステルガム 100mg を同様に操作して調製した標準液を、シリカゲルを塗布した薄層板 (20cm×20cm) にそれぞれスポットし、ベンゼンを用いて約 10 cm 展開した後 50 % 硫酸により発色を行い、得られた R_f 値を比較して確認する。

別に定性分析用試料液 A を同様の薄層板に帯状に塗布し、ベンゼンを用いて約 10cm 展開した後、エステルガムに相当する部分をかきとり、エチルエーテルを加えて振り混ぜ、ろ過し、ろ液を濃縮し、残留物を KBr 錠剤法又は薄膜法により赤外分光光度計で測定し、エステルガムの赤外吸収スペクトルと比較して確認する。

(4) 定量試験

① 試料液 A の調製

分画 A¹⁾ 約 200mg を精密に量り、内部標準液を加えて溶かし、正確に 2ml とする。この液 200 μ l を正確に量り、マイクロ試験管に入れ、窒素気流中で溶媒を揮散させた後、トリメチルシリル化試液 200 μ l を正確に量って加え、90℃で 10 分間加温し、試料液 A とする。

② 検量線用標準液 A の調製

エステルガム 10.0g を正確に量り、テトラヒドロフランを加えて溶かし、正確に 100ml とし、標準液 A とする（この液 1ml はエステルガム 100mg を含有する）。

標準液 0, 0.5, 1, 1.5ml 及び 2ml をそれぞれ正確に量り、試験管に入れ、窒素気流中で溶媒を揮散させる。各試験管中の残留物にそれぞれ内部標準液 2ml を正確に量って加えて溶かし、以下は①試料液 A の調製と同様に操作し、検量線用標準液 A とする（これらの液 1ml は、それぞれエステルガム 0, 25, 50, 70mg 及び 100mg を含む）。

(5) 測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：80~100 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフ用ケイソウ土担体にシリコーン OV-1 を 1% 含ませたもの。

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 400mm

カラム温度：100℃から 360℃まで 5℃/分の昇温を行う。

注入口及び検出器温度：360℃

キャリアーガス：窒素ガス、40ml/分

② 検量線

検量線用標準液 A 2 μ l ずつを量り、それぞれガスクロマトグラフに注入し、エステルガムに相当するピーク面積の和²⁾とノナデカンのピーク面積との比率から検量線を作成する。

③ 定量

試料液 A 2 μ l を量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたエステルガムに相当するピーク面積の和とノナデカンのピーク面積との比率と検量線から試料液 A 中のエステルガム濃

度 (mg/ml) を求め、次式によって検体中のエステルガム含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{エステルガム含量 (g/kg)} = \frac{C_A W' \omega_A \times 10}{5 \times W}$$

C_A : 試料液 A 中のエステルガム濃度 (mg/ml)

W : 試料の採取量 (g)

W' : 乾燥ガムベースの重量 (g)

ω_A : 分画 A の重量 (g)

試薬・試液

1. 二塩化エチレン : [特級]
2. シリカゲル : [薄層クロマトグラフ用] 結着剤 5 %, 325 メッシュ以下を 75 % 以上含有のものをを用いる。
3. テトラヒドロフラン : [クロマトグラフ用]
4. トリメチルクロロシラン : [ガスクロマトグラフ用]
5. トリメチルシリル化試液 : トリメチルクロロシラン、ヘキサメチルジシラザン及びピリジンを 1 : 3 : 9 の割合で混合し、密封して保存する。
6. ノナデカン : 市販のガスクロマトグラフ用標準試料を用いる。
7. ピリジン : 市販のシリル化用を用いる。あるいは、市販特級品 1L に対し乾燥用合成ゼオライト (0.4 Å) 約 10g を加え、一夜放置し脱水したものをを用いる。
8. ヘキサメチルジシラザン : [ガスクロマトグラフ用]

[注]

- 1) 分画 A にはエステルガムのほかに、樹脂類 (チクル、ジェルトン等に由来するトリテルペンアルコールのカルボン酸エステル類)、乳化剤 (グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル等)、ワックス等が含まれている。
- 2) 内部標準物質ノナデカンのピークに続いて標準物質由来の遊離樹脂酸、樹脂酸モノグリセリド、同ジグリセリド、エステルガム (樹脂酸トリグリセリド) の順に溶出がみられる。これらすべてのピーク面積の和を求める。

試験法 B (重量分析法)

(1) 検体の採取と試料の調製

試験法 A を準用する。

(2) 試料液の調製

試験法 A を準用する。

(3) 定性試験

分画 D¹⁾ を薄膜法により赤外分光光度計で測定し、酢酸ビニル樹脂の赤外スペクトルと比較して確認する。

(4) 定量試験

分画 D¹⁾ の重量を測定し、次式によって検体中の酢酸ビニル樹脂含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{酢酸ビニル樹脂含量 (g/kg)} = \frac{20 \times W' \omega_D \times 10}{W}$$

W : 試料の採取量 (g)

W' : 乾燥ガムベースの重量 (g)

ω_D : 分画 D の重量 (g)

[注]

1) 分画 D には酢酸ビニル樹脂のみが含まれ、夾雑物はさわめて少ない。

試験法 C (ゲルパーミエーションクロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

試験法 A を準用する。

(2) 試料液の調製

試験法 A を準用する。

(3) 定性試験

分画 C を薄膜法により赤外分光光度計で測定し、ポリイソブチレン又はポリブテンの赤外スペクトルと比較して確認する¹⁾。

(4) 定量試験²⁾

① 試料液 C の調製

分画 C 5.0mg を正確に量り、テトラヒドロフラン約 5ml を加えて溶かした後、テトラヒド

ロフランを更に加えて正確に 10ml とする。この液をメンブランフィルター（孔径 10μ ）でろ過し、ろ液を試験液 C とする。

② 検量線用標準液 C の調製

ポリイソブチレン又はポリブテン 0.100g を正確に量り、テトラヒドロフランを加えて溶かし、正確に 100ml とし、標準液 C とする（この液 1ml は、ポリイソブチレン又はポリブテン 1mg を含む）。

標準液 C 0, 1, 3, 5ml 及び 10ml をそれぞれ正確に量り、10ml のメスフラスコに入れ、テトラヒドロフランを加えて正確に 10ml とし、それぞれをメンブランフィルター（孔径 10μ ）でろ過し、ろ液を検量線用標準液 C とする（これらの液 1ml は、それぞれポリイソブチレン又はポリブテン 0, 0.1, 0.3, 0.5mg 及び 1mg を含む）。

(5) 測定法

① 測定条件

ゲルパーミエーションクロマトグラフィーとして屈折率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。

カラム充てん剤：排除限界分子量が 5×10^7 である³⁾ポリスチレン系ゲル

カラム管：内径 0.8mm, 長さ 300mm のカラムを 2 本直結する。

移動相：テトラヒドロフラン

流速：1ml/分

検出器：屈折率検出器

② 検量線

検量線用標準液 C 500 μ l ずつをそれぞれ正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積からポリイソブチレン又はポリブテンそれぞれの検量線を作成する。

③ 定量

試料液 C 500 μ l を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたポリイソブチレン及びポリブテンそれぞれのピーク面積とそれぞれの検量線から試料液 C 中のポリイソブチレン又はポリブテン濃度 (mg/ml) を求め、次式によって検体中のポリイソブチレン又はポリブテン含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ポリイソブチレン又はポリブテン含量 (g/kg)} = \frac{400 \times C_c W' \omega_c}{W}$$

C_c ：試料液 C 中のポリイソブチレン又はポリブテン濃度 (mg/ml)

W ：試料の採取量 (g)

W' ：乾燥ガムベースの重量 (g)

ω_c ：分画 C の重量 (g)

[注]

- 1) ポリイソブチレンとポリブテンの赤外吸収スペクトルはきわめて類似しているので、試料中にポリイソブチレンとポリブテンとが混在するときは、赤外分光分析法によるそれぞれの同定はできない。その場合には、液体クロマトグラフィー（定量法）による分離分析に頼ることになる。
- 2) ポリイソブチレンとポリブテンの定量操作は同じなのでどちらでも利用可能な文章形態となっている。標準物質は定量対象とした方を用いること。
- 3) ポリイソブチレンはきわめて広い分子量分布を有するので、分子量 1,000 から 1,000 万までの分離が可能なゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）用充てん剤の利用が望ましい。このようなカラムに適用可能な溶離液溶媒としてクロロホルムとテトラヒドロフランがあげられている。ポリイソブチレンはテトラヒドロフランでないと溶けにくいので、テトラヒドロフランを溶離液に用いた。

4 グリセリン脂肪酸エステル

[乳化剤]

Glycerin Esters of Fatty Acids

1. 試験法の概要

食品中のグリセリン脂肪酸エステルは、その主成分のモノグリセリドをトリメチルシリル体として、測定するガスクロマトグラフィーによりモノグリセリドとして定量する¹⁾。食品中にはモノグリセリドは油脂（脂質）成分として広く分布している。したがって、定量値は食品由来のモノグリセリドと添加されたものの合計値である。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

試料²⁾約 10g³⁾を精密に量り、ホモジナイザー用カップに入れ、飽和食塩水 10ml 及び酢酸エチル⁴⁾ 50ml を加え、約 2～3 分間ホモジナイズする。次に酢酸エチル層を分取し⁵⁾、下層に酢酸エチル 50ml を加え、同様の操作を繰り返す。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、40℃以下の水浴中で減圧乾固する。残渣をクロロホルムに溶かして正確に 10ml とする⁶⁾。この液 0.5ml を小型シリカゲルカラムに入れ、クロロホルム 3ml で洗浄後、メタノール 3ml で溶出し、これを試料液とする。

（3）標準液の調製

パルミチン酸モノグリセリド及びステアリン酸モノグリセリドそれぞれ 0.100g を正確に量り、合わせ、クロロホルムを加えて溶かして正確に 100ml とする。この液 5ml を正確に量り、クロロホルムを加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、パルミチン酸モノグリセリド及びステアリン酸モノグリセリドそれぞれ 50 μ g を含む）。

（4）測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：80～100 メッシュのガスクロマトグラフ用ケイソウ土担体に、シリコーン OV-17 を 0.5 % の割合で含ませたもの。

カラム管：ステンレス製，内径 3mm，長さ 500mm

カラム温度：185℃

注入口及び検出器温度：230℃

キャリアーガス：窒素，20～40ml/分

② 測定液の調製

試料液⁷⁾を濃縮器に入れ，約 40℃ の水浴中で減圧下蒸発乾固する。これにピリジン 0.5ml を加えて溶かし，TMS 試薬⁸⁾ 0.5ml を加え，よく振り混ぜ，10 分間放置したものを測定液とする。

③ 検量線

標準液 0.5，1，1.5ml 及び 2ml をそれぞれ正確に量り，それぞれ濃縮器に入れ，以下，②測定液の調製と同様に操作し，検量線用標準測定液とする（これらの液 1ml は，パルミチン酸モノグリセリド及びステアリン酸モノグリセリドそれぞれ 25，50，75μg 及び 100μg を含む）。

検量線用標準測定液 5μl ずつをそれぞれ量り，ガスクロマトグラフに注入し，得られたパルミチン酸モノグリセリド及びステアリン酸モノグリセリドそれぞれのピーク高さ又はピーク面積の和から検量線を作成する。

④ 定量

測定液 5μl を量り，ガスクロマトグラフに注入し，得られたパルミチン酸モノグリセリド及びステアリン酸モノグリセリドそれぞれのピーク高さ又はピーク面積の和を計算し検量線から測定液中のモノグリセリド濃度（μg/ml）を求め，次式によって検体中のモノグリセリド含量（g/kg）を計算する。

$$\text{モノグリセリド含量 (g/kg)} = \frac{C}{W} \times \frac{10}{0.5} \times \frac{1}{1,000}$$

C：測定液中のモノグリセリド濃度（μg/ml）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液

1. 小型シリカゲルカラム：使い捨てのディスポーザブルミニカラム（内径 10mm，高さ 20mm）。
2. ピリジン：市販のシリル化用を用いる，あるいは，市販特級品 1L に対し乾燥用合成ゼオライト（0.4Å）約 10g 加え，一夜放置し脱水したものを用いる。

3. パルミチン酸モノグリセリド及びステアリン酸モノグリセリド：市販のパルミチン酸モノグリセリド及びステアリン酸モノグリセリドを用いるか、あるいは市販の高純度飽和モノグリセリドをエタノールで2回再結晶し純度を測定した後⁹⁾用いる。

[注]

- 1) グリセリン脂肪酸エステルはモノ-, ジ-, トリグリセリドを含む混合物であるが、ここではその主成分である飽和モノグリセリドとしてパルミチン酸モノグリセリド及びステアリン酸モノグリセリドの合計量のみを定量対象としており、これ以外のモノグリセリドは定量できない。
- 2) マーガリン、ショートニング等の油性食品やアイスクリーム等ほとんどすべての食品に適用できる。
- 3) 試料採取量は食品のモノグリセリド含量により調整することが必要である。多ければ試料の採取量を少なくした方がよい。
- 4) 抽出効果を高めるために酢酸エチルを用いた。
- 5) 酢酸エチル層の分離が悪いときには、遠心分離（10分間、5,000回転/分）を行う。
- 6) 油性及びタンパク食品以外の食品の場合は、シリカゲル精製工程を省略して、この液0.5mlをそのまま試料液としてもよい。
- 7) 試料液中のモノグリセリド含量に応じて、試料液の採取量は変えてもよい。
- 8) トリメチルシリル化のほかに、無水酢酸-ピリジンによるアセチル化による方法でも可能である。
- 9) 飽和モノグリセリドの純度測定は次のように行う。

試料約0.15gを精密に量り、100mlの三角フラスコに入れ、クロロホルム20mlを加えて溶かした後、クロロホルムを用いて分液漏斗に移す。先の三角フラスコを60~70mlの水で3回洗い、洗液を分液漏斗に合わせ、分液漏斗を激しく振り混ぜて放置する。クロロホルム層を別の分液漏斗に移し、水層を少量のクロロホルムで洗い、洗液をクロロホルム層に合わせ、水又は10%食塩水を加えて激しく振り混ぜて放置する。クロロホルム層を500mlの共栓付三角フラスコに移し、水層は少量のクロロホルムで洗い、洗液をクロロホルム層に合わせ、0.1mol/l 過ヨウ素酸液50mlを正確に量って加え、更に60%過塩素酸溶液0.1mlを正確に量って加え、振り混ぜた後30分間放置する。次に20%ヨウ化カリウム溶液15mlを加え、激しく振り混ぜた後1分間放置し、水100mlを加えて振り混ぜ、0.1mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する（指示薬1%デンプン溶液）。別にクロロホルム50mlを用い、0.1mol/l 過ヨウ素酸液50mlを正確に量って加え、以下同様に操作して空試験を行う。モノグリセリドの純度（ステアリン酸モノグリセリドとして求めた値）は次式により求められる。

$$\text{モノグリセリドの純度 (\%)} = \frac{(A-B) \times 0.1 \times f \times 17.927}{S}$$

A：空試験の0.1mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液の使用量 (ml)

B：本試験の0.1mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液の使用量 (ml)

f：0.1mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター

S：試料の採取量 (g)

ただし試薬は特級品を用い、0.1mol/l 過ヨウ素酸液は次のように調製する。

0.1mol/l 過ヨウ素酸液：過ヨウ素酸5.4gを量り、氷酢酸500mlを加え、1~2日間ときどき振り混ぜながら溶かし、更に氷酢酸を加えて2,000mlとする。

5 三二酸化鉄

[着色料]

Iron Sesquioxide

別名：三酸化二鉄，
ベンガラ

Fe_2O_3 : 159.69

1. 試験法の概要

食品中の三二酸化鉄は、原子吸光法により鉄として定量する。必要があれば分子量比を乗じて三二酸化鉄の量として求める。食品中には天然の鉄が広く分布している。したがって、定量値は食品由来の鉄と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（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） 試料液の調製

試料約 2g を精密に量り、250～300ml の分解フラスコ¹⁾に入れ、硝酸 20ml を加えて振り混ぜ、放置した後、穏やかに加熱する。最初の激しい反応がおさまれば、加熱を強めて均一な黄色液体とする。次に、過塩素酸 5ml を加えて振り混ぜ、穏やかに加熱して二酸化窒素の発生が終わり、発泡が激しくなり、液が黄～黄褐色になったとき加熱を止め、硝酸約 2ml をきわめて静かに加えて、再び加熱する²⁾。過塩素酸の白煙が生じ、液が微黄色～黄色になったとき、加熱を止める。冷後、水 30ml を加え、再び加熱し、過塩素酸の白煙が生じてから更に 20～30 分間加熱を続ける³⁾。

冷後、分解液を 100ml のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

（3） 検量線用標準液の調製

塩化第二鉄 4.838g を正確に量り、塩酸（19→200）100ml を加えて溶かし、水を加えて正確に 1,000ml とする。この液 20ml を正確に量り、塩酸（19→2,000）を加えて正確に 200ml とし、標準液⁴⁾とする（この液 1ml は、鉄 100 μg を含む）。

標準液 0, 1, 5, 10, 30ml 及び 50ml をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ鉄 0, 1, 5, 10, 30 μ g 及び 50 μ g を含む）。

（４） 空試料液の調製

水 2ml を用い、(2)試料液の調製と同様に操作し、空試料液とする。

（５） 測定法

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件で測定する。

燃料ガス：アセチレン-空気フレイム、アセチレン 3L/分、空気 13L/分

測定波長：371.99nm⁵⁾

② 検量線

検量線用標準液それぞれにつき、原子吸光度を測定し、得られた値から検量線を作成する。

③ 定量

試料液及び空試料液につき、原子吸光度を測定する。得られた両者の吸光度の差と検量線により試料液中の鉄濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中の鉄含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{鉄含量 (g/kg)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C：試料液中の鉄濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

$$\text{三酸化鉄含量 (g/kg)} = \text{鉄含量 (g/kg)} \times 1.430$$

試薬・試液

1. 塩化第二鉄：（六水化物）[特級]
2. 過塩素酸：市販の有害金属測定用を用いる。
3. 硫酸：市販の有害金属測定用を用いる。

[注]

- 1) 試験に用いるガラス器具は、すべて使用前に温硝酸（1→3）で十分洗うか、又はこの硝酸溶液（1→3）に一夜つけておく。
- 2) 乾固すると爆発の危険がある。
- 3) 反応液中の硝酸を完全に除くための操作である。
- 4) 遮光して保存する。
- 5) 248.33nm でも測定可能である。

6 次亜塩素酸塩類

[殺菌料]

Hypochloric Acid and Its Salts

高度サラシ粉

High-Test Hypochlorite

次亜塩素酸ナトリウム

Sodium Hypochlorite

別名：次亜塩素酸ソーダ

NaClO：74.44

亜塩素酸ナトリウム*

Sodium Chlorite

*：化学構造が類似している他の用途の食品添加物も、
本法の測定対象に含まれる。

1. 試験法の概要

食品中の次亜塩素酸塩類は、有効塩素をシアンと反応させ、クロルシアンとし、ガスクロマトグラフィーにより塩素の量として定量する。水道水は有効塩素を含有する。したがって、検体中に水道水が含まれる場合、定量値は食品由来の塩素と水道水に添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。ただし、次亜塩素酸塩類は分解しやすいので手早く処理して試料を調製し、速やかに分析用の試料¹⁾とする。

（2）試料ガス^{2),3)}の調製

あらかじめヘッドスペース用三角フラスコ⁴⁾にリン酸塩緩衝液 20ml 及びシアン化カリウム溶液 1ml を入れ、これに試料約 2g を精密に量って加え、密栓して 30 分間放置し、発生したガスを試料ガスとする。

（3）標準液の調製

次亜塩素酸ナトリウム約 3g を精密に量り、水 50ml を加え、ヨウ化カリウム 2g 及び酢酸 10ml を加え、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

ブン試液)。別に同様の方法で空試験を行い補正する。0.1mol/lチオ硫酸ナトリウム溶液 1ml=3.545mg Clとして、用いた次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素量T(%)を求める。次に、この次亜塩素酸ナトリウム1~2gを正確に量り、A(mg)とする。次の式により、加える水の量V(ml)を求め、A(mg)に正確にV(ml)の水を加えて溶かして標準原液とする(この液1mlは、有効塩素0.5mgを含む)。この液は冷暗所に保存する。

$$V(\text{ml}) = A(\text{mg}) \times \frac{T(\%)}{100} \times \frac{1}{0.5}$$

用時、標準原液5mlを正確に量り、水を加えて正確に500mlとし、標準液とする(この液1mlは、有効塩素5 μ gを含む⁵⁾)。

(4) 測定法

① 測定条件

電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ(ECD-GC)を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：60~80メッシュのポーラスポリマービーズ

カラム管：ガラス製、内径3mm、長さ1m

カラム温度：80℃

注入口及び検出器温度：150℃

キャリアーガス：窒素、20ml/分

② 検量線

あらかじめ5個のヘッドスペース用三角フラスコにリン酸塩緩衝液20ml及びシアン化カリウム溶液1mlを入れ、それぞれに標準液0, 0.5, 1, 1.5ml及び2ml⁶⁾をそれぞれ正確に量って加え、30分間放置した後、ガスタイトシリンジを用いてヘッドスペース用三角フラスコ中のガス10 μ lを正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

ガスタイトシリンジを用いて試料ガス10 μ lを正確に量り、ガスクロマトグラフに注入する。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料ガス中の塩素量(μ g)を求め、次式によって検体中の残留塩素量(mg/kg)を計算する^{7),8)}。

$$\text{残留塩素量 (mg/kg)} = \frac{C}{W}$$

C：試料ガス中の塩素量(μ g)

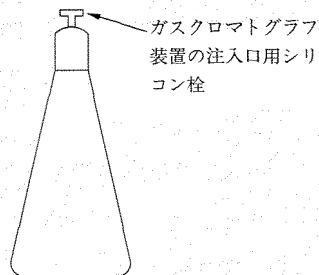
W：試料の採取量(g)

試薬・試液

1. シアン化カリウム：[特級]
2. シアン化カリウム溶液：シアン化カリウム 100mg に水を加えて 100ml とし、原液を調製する。原液 10ml を採り、水を加えて 100ml とする（この液 1ml は、KCN として 100 μ g を含む）。
3. 0.1mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液：[容量分析用標準液]
4. リン酸一ナトリウム：[特級]
5. リン酸緩衝液：0.2mol/l リン酸二ナトリウム溶液 305ml と 0.2mol/l リン酸一ナトリウム溶液 195ml を混和し、水を加えて 1,000ml とする。この液の pH は 7 である。
6. リン酸二ナトリウム：（結晶）[特級]

[注]

- 1) 分解しやすいので、測定用試料ガスを調整する直前に手早く検体を処理する。
- 2) 四塩化炭素は電子捕獲型検出器の感度を低下させるので、これらの操作中に同一室内で四塩化炭素を使用しないように注意する。
- 3) 器具は必ずイオン交換水で洗浄して用いる。水道水で洗浄後、直ちに用いると水道水中の残留塩素によって影響を受ける。
- 4) 200ml の共通すり合わせ三角フラスコを用い（注図 6-1 参照）、これに共通すり合わせ連結管（ゴム止付）の上部を切断してシリコン栓（ガスクロマトグラフ装置の注入口用のもの）を付したもので内部のガスが漏れないようにふたをする。ふたの部分は乾燥して使用する。
- 5) 本品は分解しやすいので、有効塩素量約 500mg/L の標準原液を調製しておき、用時、標定してその係数 F を乗じてよい。



注図 6-1 ヘッドスペース用三角フラスコ

標定法：標準原液 20ml を正確に量って三角フラスコに入れ、ヨウ化カリウム 1g 及び酢酸 5ml を加え、遊離したヨウ素を 0.025mol/l チオ硫酸ナトリウム液で滴定する（指示薬：デンプン試液）。

0.025mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液 1ml = 0.886mg Cl

$$F = a \times f \times 0.886 \times \frac{1}{10}$$

a：0.025mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定量（ml）

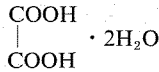
f：0.025mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター

- 6) 有効塩素として 0, 2.5($\times F$), 5($\times F$), 7.5($\times F$), 10($\times F$) μ g を含む。
- 7) たとえば次亜塩素酸ナトリウムとしての値を出すときは、分子量比から試料中の残留塩素量に 2.1 を乗ずればよい。
- 8) 本法による定量限界は、0.5mg/kg である。

7 シュウ酸

[製造用剤]

Oxalic Acid



$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} : 126.07$

1. 試験法の概要

食品中のシュウ酸は、シュウ酸脱炭酸酵素及びギ酸脱水素酵素を用いる酵素法により定量する。食品中には天然のシュウ酸が分布している。したがって、定量値は食品由来のシュウ酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法 (酵素法)

(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) 試料液の調製

① 液状食品

シュウ酸として 2.5~25mg に対応する、通常、10g 以下の試料の量を精密に量る。1mol/l 塩酸又は 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH5.0 に調整し¹⁾、アスコルビン酸オキシダーゼ 1U を加えて²⁾振り混ぜ、10 分間放置する。試料が澄明で着色していないか、着色していても薄い場合は、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。試料が懸濁している場合は、水を加えて約 50~60ml とし、ろ過する。容器及び残留物は水 20~30ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。試料の着色の著しい場合は、試料の量の約 1/10 量のポリアミド末又はポリビニルピロリドンを加え、必要があれば水 20~30ml を加え、激しく振り混ぜ、ろ過する。容器及び残留物を水 40~50ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

② 固体食品

シュウ酸として 2.5~25mg に対応する、通常、10g 以下の試料の量を精密に量る。試料が脂肪又はタンパクを含まないかほとんど含まない場合は、ブレンダー容器に入れ、水 50~60ml

を加えて 60℃ に加温し、5 分間ホモジナイズした後、ろ過する。容器及び残留物は水 20～30ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、1mol/l 塩酸又は 1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH5.0 に調整し、アスコルビン酸オキシダーゼ 1U を加えて振り混ぜ、10 分間放置した後、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。試料が脂肪性又はタンパク性の場合は、ブレンダー容器に入れ、水 30～40ml を加えて 60℃ に加温し、5 分間ホモジナイズした後、60℃ で 15 分間加温し、冷後、冷蔵庫中に 20 分間放置し、ろ過する。容器及び残留物は、水 20～30ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、0.4mol/l 過塩素酸溶液 10ml を加えてよくかき混ぜ、2mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH5.0 に調整し、アスコルビン酸オキシダーゼ 1U を加えて振り混ぜ、10 分間放置した後、水を加えて正確に 100ml とし、冷蔵庫中に 15 分間放置する。この液を必要があればろ過し、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

シュウ酸ナトリウムを 110℃ で恒量になるまで乾燥し、その 37.2mg を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、シュウ酸 0.25mg を含む）。標準液 2, 4, 8, 16ml 及び 20ml をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 20ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれシュウ酸 25, 50, 100, 200 μ g 及び 250 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 340nm における吸光度を測定する。

② 測定

光路幅 1cm のキュベット 2 本を用意し、A, B とする。A, B それぞれにリン酸・クエン酸緩衝液 0.2ml 及び試料液 0.1ml をそれぞれ正確に量って加え、A にはシュウ酸脱炭酸酵素液 0.02ml を、B には水 0.02ml をそれぞれ正確に量って加えた後、混和し、常温に 10 分間放置する。次に A, B それぞれにリン酸緩衝液 1ml³⁾、NAD 溶液 1ml 及び水 0.5ml をそれぞれ正確に量って加え、混和し、3 分間放置し、A を試料測定液、B を空測定液とする。

試料測定液及び空測定液につき、それぞれ水を対照として波長 340nm における吸光度 E_A 及び E_B を測定する。次に A, B のそれぞれにギ酸脱水素酵素液 0.05ml ずつをそれぞれ正確に量って加え、混和し、常温に 20 分間放置した後、再び同条件で吸光度を測定し、 E'_A 及び E'_B とする。

E_A と E'_A の差 ΔE_A 、 E_B と E'_B の差 ΔE_B を求め、更に ΔE_A と ΔE_B の差 ΔE_T を計算する。

③ 検量線

検量線用標準液 0.1ml ずつをそれぞれ正確に量り、②測定における試料液の代わりにそれぞ

れキュベット $S_1, S_2, \dots, S_5$ に入れ, ②測定と同様に操作し, それぞれ $\Delta E_{S_1}, \Delta E_{S_2}, \dots, \Delta E_{S_5}$ を求め, 検量線を作成する.

④ 定量

試料液の ΔE_T と検量線から試料液中のシュウ酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め, 次式によって検体中のシュウ酸含量 (g/kg) を計算する.

$$\text{シュウ酸含量 (g/kg)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C : 試料液中のシュウ酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. アスコルビン酸オキシダーゼ: 市販品を用いる.
2. ギ酸脱水素酵素: 市販品を用いる.
3. ギ酸脱水素酵素液: ギ酸脱水素酵素 (0.4U/mg) 500mg に水 2.5ml を加えて溶かす.
4. クエン酸: [特級]
5. シュウ酸脱炭酸酵素液: 市販品のシュウ酸脱炭酸酵素の硫酸アンモニウム懸濁液 (40U/ml) を希釈せずに用いる.
6. ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド ($\beta\text{-NAD} \cdot \text{H}_2\text{O}$): 市販品を用いる.
7. リン酸緩衝液: リン酸二カリウム 2.61g に水を加えて溶かして 100ml とする. pH は約 9.5 になる.
8. リン酸・クエン酸緩衝液: クエン酸 0.712g 及びリン酸二カリウム 1.152g に水を加えて溶かして 50ml とする. pH は約 5.0 となる.
9. リン酸二カリウム: [特級]
10. NAD 溶液: $\beta\text{-NAD} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 904mg に水 45ml を加えて溶かす (約 30mol/l).

[注]

- 1) ギ酸脱水素酵素の活性は pH4~6 領域で示されるが, 至適 pH は 5.0 である.
- 2) アスコルビン酸の共存下では, シュウ酸の回収率は 10~70 % にとどまる. アスコルビン酸オキシダーゼで処理してアスコルビン酸を除く.
- 3) この操作でキュベット内の溶液の pH は 7.5 となる. ギ酸脱水素酵素の至適 pH は 7.5 である. なお多数のキュベットを必要とするので, 安価なプラスチック製を用いるとよい.

8 ショ糖脂肪酸エステル

[乳化剤]

Sucrose Esters of Fatty Acids

1. 試験法の概要

食品中のショ糖脂肪酸エステルは、イソブタノールにより抽出し、薄層クロマトグラフィーによりモノ、ジ-及びトリエステルを分離し、比色法により定量する。

2. 試験法（薄層クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

試料約 20g¹⁾ を精密に量り、500ml の共栓三角フラスコに入れ、イソブタノール 200ml と塩化ナトリウム溶液（1 → 10）200ml を加え、60～80℃の水浴中に保持しながら 10 分間振り混ぜる。次に遠心分離（10 分間、3,000 回転/分）を行いイソブタノール層を分取する。水層にイソブタノール 200ml を加え、同様の操作を繰り返した後、水層を捨てる。イソブタノール層を合わせ、塩化ナトリウム溶液（1 → 10）200ml を加え、60～80℃の水浴中で 10 分間振り混ぜ、水層を捨てる。イソブタノール層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、ろ紙を通じて濃縮器に移し、約 70℃で減圧濃縮し、イソブタノールを除去する。残留物はクロロホルム 20ml を加えて溶解し、25ml のメスフラスコに移し、濃縮器はクロロホルム少量ずつで 2 回洗い、それぞれの洗液をメスフラスコに入れ、クロロホルムを加えて正確に 25ml とし、試料溶液とする。試料溶液 20μl をマイクロシリンジを用いて正確に量り、薄層板の下端より 2cm の位置にスポットする。

薄層板をあらかじめ第一次展開溶媒を入れた第一次展開槽に入れ、スポット位置より 12cm の高さまで展開する²⁾。薄層板を引き上げ、60℃で 30 分間乾燥させた後、放冷し、あらかじめ第二次展開溶媒を入れた第二次展開槽に入れ、スポット位置より 10cm の高さまで展開する。薄層板を引き上げ、ドラフト中で溶媒を蒸散させた後、更に 100℃の乾燥器に約 20 分間入れて完全に溶媒を蒸散させる。

各スポットを確認するため、薄層板にモリン液を噴霧し、暗室で UV ランプを用い、ショ

糖モノ-, ジ-及びトリエステルの境界を確認し, 線を引く³⁾.

モノ-, ジ-及びトリエステルの区分をかき取り, それぞれ試験管 T_M , T_D , T_T に入れる. エタノール溶液を T_M に 4ml, T_D 及び T_T にそれぞれ 2ml ずつ正確に量って加え, それぞれを試料液とする. また, 試料溶液をスポットしていない部分の各成分相当位置の薄層をかき取り, それぞれ試験管 T_{BM} , T_{BD} , T_{BT} に入れ, エタノール溶液を T_{BM} には 4ml, T_{BD} 及び T_{BT} にはそれぞれ 2ml ずつ正確に量って加え, それぞれを空試料液とする.

(3) 標準液の調製

硫酸真空デシケーター中で乾燥したショ糖 0.200g を正確に量り, 硫酸 1ml 及びエタノール溶液を加えて正確に 200ml とする. この液 10ml を正確に量り, エタノール溶液を加えて正確に 200ml とし, 標準液とする (この液 1ml は, ショ糖 $50\mu\text{g}$ を含む).

(4) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い, 波長 620nm における吸光度を測定する.

② 測定液の調製

試料液の入った試験管 T_M , T_D , T_T それぞれを流水中で冷却しながら, アンスロン試薬を T_M には 20ml, T_D 及び T_T にはそれぞれ 10ml ずつ正確に量ってそれぞれに加える. T_M , T_D , T_T の 3 本の試験管をそれぞれを 60°C の水浴中に 30 分間浸漬し, 途中 2~3 回振り混ぜた後, 冷水中で冷却し室温に戻す.

試験管中のこれらの液をそれぞれ遠心管に移し, 遠心分離 (約 5 分間, 約 4,000 回転/分) を行い, 上澄液をそれぞれ測定液とする.

また, モノ-, ジ-及びトリエステルそれぞれの試料液に対応する空試料液をそれぞれの試料液と同様に操作してそれぞれに対応する空測定液とする.

③ 検量線

標準液 0, 1ml 及び 2ml をそれぞれ正確に量り, それぞれ試験管 T_B , T_{S1} , T_{S2} に入れる. エタノール溶液を T_B には 2ml, T_{S1} には 1ml 正確に量って加えた後, 3 本の試験管 T_B , T_{S1} , T_{S2} をそれぞれ流水中で冷却しながら, アンスロン試薬 10ml ずつを正確に量ってそれぞれに加え, 以下, ②測定液の調製と同様に操作し, それぞれを検量線用空測定液及び検量線用標準測定液とする.

検量線用標準測定液及び検量線用空測定液につき, それぞれエタノール溶液を対照として波長 620nm における吸光度 E_{S1} , E_{S2} 及び E_B を測定し, E_{S1} , E_{S2} と E_B の差 ΔE_1 , ΔE_2 を計算し, 検量線を作成する.

④ 定量

各測定液につき、エタノール溶液を対照として波長 620nm における吸光度 E_{AM} , E_{AD} , E_{AT} を測定し、これらとそれぞれに対応する空測定液の吸光度 E_{BM} , E_{BD} , E_{BT} との差 ΔE_M , ΔE_D , 及び ΔE_T を計算し、検量線から各測定液中の各エステルの結合糖濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中のショ糖脂肪酸エステル含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ショ糖脂肪酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{MC_M V_M + DC_D V_D + TC_T V_T}{W} \times \frac{25}{0.02} \times \frac{1}{1,000}$$

C_M : 測定液中のモノエステルの結合糖濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

C_D : 測定液中のジエステルの結合糖濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

C_T : 測定液中のトリエステルの結合糖濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

M, D, T : ショ糖脂肪酸エステルの種類により、次表の係数を用いる。

V_M : モノエステルの測定液量 (ml)

V_D : ジエステルの測定液量 (ml)

V_T : トリエステルの測定液量 (ml)

表 8-1 ショ糖脂肪酸エステルの係数

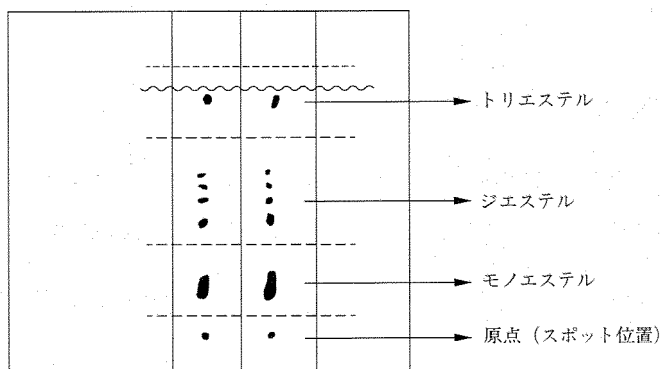
ショ糖脂肪酸 エステル名	ステアレート	パルミテート	オレート	ラウレート
	{ ステアレート 70 % パルミテート 30 %	{ ステアレート 30 % パルミテート 70 %		
係数 M	1.753	1.720	1.749	1.556
係数 D	2.507	2.440	2.497	2.111
係数 T	3.260	3.160	3.246	2.667

試薬・試液等

1. アンスロン: [特級]
2. アンスロン試薬: 硫酸 100ml, 水 60ml 及びメタノール 15ml の混合液にあらかじめ硫酸 25ml に溶かした 0.4g のアンスロンを加え、硫酸 75ml で洗い込む。冷暗所に保存し、2 日以内に使用する。
3. エタノール溶液: エタノール 4 容に水 1 容を加えて混和する。
4. 第一次展開溶剤²⁾: 石油エーテル・エチルエーテル混液 (1:1)。
5. 第二次展開溶剤: クロロホルム・メタノール・酢酸・水混液 (40:5:4:1)。
6. 薄層板: 市販のシリカゲル薄層板を 110℃ で 1.5 時間活性化し用いる。2 日以内に使用する。
7. モリン: 市販の特級品を用いる。
8. モリン液: モリン 50mg にメタノール 100ml を加えて溶かす。

[注]

- 1) ショ糖脂肪酸エステルとして約 100mg に対応する量。通常 20g 以下を試料量とする。
- 2) 油脂をまったく含まないか、もしくはごくわずかしかな含まない試料の場合には、第一次展開を省略してもよい。
- 3) モノ、ジ-及びトリエステルのモデルパターンは図のようになるので、境界線を破線のように引く。



注図 8-1 モノ、ジ、トリ-ショ糖脂肪酸エステルのモデルパターン

9 水溶性アナトー

[着色料]

Annatto, Water-soluble

1. 試験法の概要

食品中の水溶性アナトーは、吸収スペクトル法及び薄層クロマトグラフィーにより定性し、必要があれば液体クロマトグラフィーによりノルビキシシンとして定量する。

2. 試験法（吸収スペクトル法，薄層クロマトグラフィー，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）試料液の調製

試料 3～10g を精密に量り，50ml の遠心管に採り，*n*-ヘキサン 40ml を加え¹⁾，かき混ぜた後，遠心分離（5 分間，3,500 回転/分）する。上層の *n*-ヘキサン層を捨て，残留物に *n*-ヘキサン 20ml を加えて同様の操作を 2 回繰り返し，*n*-ヘキサン層は捨てる。次いで，残留物を加温し²⁾，冷後，0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液・エタノール混液（1：1）40ml を加え，ホモジナイズした後，遠心分離し，0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液・エタノール混液（1：1）を分取する。残留物は 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液・エタノール混液（1：1）20ml ずつを用いて同様に 2 回操作し，0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液・エタノール混液（1：1）を合わせ，更に水を加えて正確に 100ml とし，試料液とする。

（3）標準液の調製

水溶性アナトー約 1g を精密に量り，0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて溶かして正確に 100ml とし，標準原液とする。この液 1ml を正確に量り 0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて 100ml とし，標準液とする³⁾。

（4）測定法

① 定性

a 吸収スペクトル法

試料液 10ml を正確に量り、分液漏斗に入れ、塩化ナトリウム溶液（1 → 10）10ml 及び水を加えて 50ml とした後、硫酸（1 → 20）2ml を加えてよく混和する。次いで、この液にベンゼン 10ml を加え、激しく振り混ぜ、ベンゼン抽出液を分取する⁴⁾。水層はベンゼン 10ml ずつを用いてベンゼン抽出液が着色しなくなるまで抽出を繰り返す。全ベンゼン抽出液を合わせ、水 5ml ずつで 3 回洗い、水層を完全に除いてから、ベンゼン抽出液を別の分液漏斗に移し、先の分液漏斗はベンゼン 2ml ずつを用いて 3 回洗い、洗液をベンゼン抽出液に合わせる。このベンゼン抽出液に等容量の石油ベンジンを加え、振り混ぜた後、0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液 3ml ずつを用いて、水酸化ナトリウム溶液が着色しなくなるまで抽出を繰り返し、抽出液を合わせる。この抽出液は吸光度が 0.2~0.7 を示す濃度に調整した後、波長 340~600nm のスペクトルを測定する。別に、標準原液 1ml を用いて同様に操作して得たスペクトルと試料液のスペクトルを比較し、吸収極大が同じであり⁵⁾、吸収曲線が相似であることを確かめ、試料中の水溶性アナトーを判定する。

b 薄層クロマトグラフィー

試料液 10ml を正確に量り、以下、a 吸収スペクトル法に準じて操作して得たベンゼン抽出液につき、シリカゲル薄層板、クロロホルム・アセトン・酢酸混液（50：50：1）を展開溶媒として、薄層クロマトグラフィーを行う。なお、標準液は標準原液 1ml を用いて、a 吸収スペクトル法で得たベンゼン抽出液を用いる。展開後の薄層板上のそれぞれのはん点の位置と色とを比較観察し、試料中の水溶性アナトーを定性する。

② 定量**a 検量線用標準液の調製**

水溶性アナトー約 1g を精密に量り、0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて溶かして正確に 100ml とし、標準原液とする。この液 1ml を正確に量り、分液漏斗に入れ、塩化ナトリウム溶液（1 → 10）10ml を加え、更に水を加えて 50ml とした後、1mol/l 硫酸 2ml を加えてよく振り混ぜる。次にベンゼン 10ml ずつを用いて、ベンゼン抽出液が着色しなくなるまで抽出を繰り返す。全ベンゼン抽出液を合わせ、水 5ml ずつで 3 回洗い、水層を完全に除いてからベンゼン抽出液を別の分液漏斗に移し、先の分液漏斗はベンゼン 2ml ずつを用いて 3 回洗い、洗液をベンゼン抽出液に合わせる。このベンゼン抽出液に等容量の石油ベンジンを加え、振り混ぜた後、0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液 5ml ずつを用いて、水酸化ナトリウム溶液が着色しなくなるまで抽出を繰り返し、抽出液を合わせ、0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて正確に 100ml とする。この液の波長 454nm における吸光度 E を測定する。次に標準原液 1ml に対して 0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて 3,473/Eml となるように希釈し⁶⁾、標準液とする（この液 1ml は、ノルビキシン 100 μ g を含む）。

標準液 1, 3, 5, 7ml 及び 10ml を正確に量り、0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて正

確に 10ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれノルビキシシン 10, 30, 50, 70 μ g 及び 100 μ g を含む）。

b 測定法

1) 測定条件

紫外線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。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：ステンレススチール製、内径 4mm、長さ 250mm

カラム温度：室温

移動相：メタノール・水・酢酸混液（85：14：1）

流速：1ml/分

測定波長：454nm

2) 検量線

検量線用標準液 5 μ l ずつをそれぞれ正確に量り、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) 測定

①定性、a 吸収スペクトル法の 0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液を正確に 10ml とし、定量用試料液とし、その 5 μ l を正確に量り、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料液中のノルビキシシン濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって検体中のノルビキシシン含量（g/kg）を計算する。

$$\text{ノルビキシシン含量 (g/kg)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C：定量用試料液中のノルビキシシン濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液

1. アセトン：[特級]
2. エタノール：[特級]
3. 塩化ナトリウム：[特級]
4. クロロホルム：[特級]
5. 酢酸：CH₃COOH [特級]
6. 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 4.0g を水に溶かして 1,000ml とする。
7. 0.01mol/l 水酸化ナトリウム溶液：0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液に水を加えて 10 倍容量に薄める。

8. 石油ベンジン：〔特級〕
9. *n*-ヘキサン：〔特級〕
10. ベンゼン：〔特級〕
11. メタノール：〔液体クロマトグラフ用〕

〔注〕

- 1) 脱脂の目的のほか、天然由来又は着色料として使用された β -カロテンなどが *n*-ヘキサン層へ移行し、除去される。
- 2) 残留する *n*-ヘキサンを加温して除く。
- 3) 食品添加物規格の水溶性アナトーは色素含量が1%前後であるが、濃度が一定していないため、吸光度が0.2~0.7となるように調整する。
- 4) 二層に分離しにくい場合は、3,500回転/分で約5分間遠心分離するとよい。
- 5) 吸収極大波長は524、454及び460nmにある。
- 6) ノルビキシンの波長454nmにおける比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3,473$ である。したがって標準原液中の

$$\text{ノルビキシンの濃度 (mg/ml)} = \frac{E}{3,473} \times 100 \times 100$$

10 ステアロイル乳酸カルシウム

[乳化剤]

Calcium Stearoyl Lactylate

別名：ステアリル乳酸カルシウム

1. 試験法の概要

食品中¹⁾のステアロイル乳酸カルシウムは、けん化して得られる乳酸を乳酸脱水素酵素を用いて定量し、分子量比を乗じてステアロイル乳酸カルシウムの量として求める。

2. 試験法（酵素法）

(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⁾。

(2) 試料液の調製

試料約 10g を精密に量り、200ml の三角フラスコに入れ、トリス緩衝液 70ml 及び α -アミラーゼ 100mg を加えてかき混ぜ、70℃ の水浴中で 1 時間加温する。次に分液漏斗に移し、三角フラスコは飽和塩化ナトリウム溶液 30ml で洗い、洗液を分液漏斗に合わせる。放冷後、塩化ナトリウム 30g を加えてかき混ぜ³⁾、クロロホルム 70ml を加えて 5 分間振り混ぜ、クロロホルム層⁴⁾を分取する。水層にはクロロホルム 50ml ずつを加えて同様の操作を 2 回繰り返す。全クロロホルム層を合わせ、飽和塩化ナトリウム溶液 20ml ずつで 2 回洗い、洗液は捨てる。

クロロホルム層をガラスろ過器 (SG-4) を通して濃縮器にろ過し⁵⁾、ろ液を乾固するまで減圧濃縮する。油状の残留物にエタノール製 0.5mol/l 水酸化カリウム試液 10ml 及び水 10ml を加えた後、還流冷却管を付け、45 分間加熱する⁶⁾。次に濃縮器及び還流冷却管を水約 40ml で洗い、洗液を濃縮器に合わせ、濃縮器を水蒸気浴中に放置してエタノールを完全に揮散させる。放冷後、硫酸 (1 → 2) 6ml を加え、遊離した脂肪酸が溶けるまで加熱する。次に約 60℃ まで冷やし、石油エーテル 25ml を加え、穏やかに振り混ぜ、水を用いて分液漏斗に移す。水層は 100ml のメスフラスコに分取し、石油エーテル層は水 20ml ずつで 2 回洗い、洗液を先のメスフラスコに合わせる⁷⁾。水を加えて正確に 100ml とし、この液 10ml を正確に量って 100ml のメスフラスコに入れ、5mol/l 水酸化ナトリウム溶液を用いて中和した後、水を加え

て正確に 100ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

乳酸リチウムを 105℃ で 4 時間乾燥し、その 0.1066g を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 1,000ml とし、標準液とする（この液 1ml は、L-及び D-乳酸の混合物 0.1mg を含む）。標準液 2, 5, 10, 20ml 及び 35ml をそれぞれ正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ乳酸として 2, 5, 10, 20 μ g 及び 35 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 340nm の吸光度を測定する。

② 測定

光路幅 1cm のキューベット 2 本を用意し、A, B とする。A, B それぞれにグリシルグリシン緩衝液 1ml, NAD 液 0.2ml, GPT 液 0.02ml 及び水 0.5ml をそれぞれ正確に量って加え、A には試料液 1.0ml, B には水 1.0ml をそれぞれ正確に量って混和し、5 分間放置し、A を試料測定液、B を空測定液とする。

試料測定液及び空測定液につき、それぞれ水を対照として波長 340nm における吸光度 E_A 及び E_B を測定する。次に A, B それぞれに L-LDH 液及び D-LDH 液をそれぞれ 0.02ml ずつ正確に量って加え、混和し、10 分間放置後、再び同条件で吸光度を測定し、 E'_A 及び E'_B とする。 E_A と E'_A の差 ΔE_A , E_B と E'_B の差 ΔE_B を求め、更に ΔE_A と ΔE_B の差 ΔE_T を計算する。

③ 検量線

検量線用標準液 1ml ずつをそれぞれ正確に量り、②測定における試料液の代わりにそれぞれキューベット $S_1, S_2, \dots, S_5$ に入れ、②測定と同様に操作し、それぞれ $\Delta E_{S1}, \Delta E_{S2}, \dots, \Delta E_{S5}$ を求め、検量線を作成する。

④ 定量

試料液の ΔE_T と検量線から試料液中の結合乳酸濃度 (μ g/ml) を求め、次式⁸⁾によって検体中のステアロイル乳酸カルシウム含量 (%) を計算する。

$$\text{ステアロイル乳酸カルシウム含量 (\%)} = \frac{CV}{250 \times W}$$

C : 試料液中の乳酸濃度 (μ g/ml)

V : 試料液の量 (ml)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. α -アミラーゼ：市販の細菌性 α -アミラーゼを用いる。
2. グリシルグリシン：[特級]
3. グリシルグリシン緩衝液：グリシルグリシン 4.75g 及び L-グルタミン酸 0.88g に約 50ml の水を加えて溶かし、10mol/l 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH10 に調整する。次に水を加えて 60ml とする。
4. L-グルタミン酸：[特級]
5. グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)：市販品を用いる。
6. エタノール製 0.5mol/l 水酸化カリウム試液：水酸化カリウム 35g を量り、水 20ml を加えて溶かした後、エタノールを加えて 1,000ml とする。密栓保存する。
7. 石油エーテル：[特級]
8. トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン：市販の特級品を用いる。
9. トリス緩衝液：トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 24.2g とマレイン酸 23.2g を量り、水を加えて溶かして 1,000ml とする。この液 50ml を量り、0.2mol/l 水酸化ナトリウム溶液 37.0ml を加えて pH を 6.4 に調整し、更に水を加えて 200ml とする。
10. β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (酵母製)：市販の生化学用を用いる。
11. マレイン酸：[特級]
12. GPT 液：GPT の懸濁液 (10mg/ml) の 2ml を遠心分離 (10 分間、4,000 回転/分) し、上清 1ml を吸い取って捨てる。この懸濁液を 4℃ で保存するとき、少なくとも 1 年間は安定である。
13. D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH 液)：市販品 (D-LDH 活性 1,500U/ml) を用いる。4℃ で保存して 1 年以内に使用する。
14. L-乳酸脱水素酵素 (L-LDH 液)：市販品 (L-LDH 活性 2,250U/ml) を用いる。4℃ で保存して 1 年以内に使用する。
15. NAD 液： β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (酵母製) 900mg を水 30ml に溶かす。4℃ で保存して 3 週間以内に使用する。

[注]

- 1) ここでの対象食品はパン、菓子パン等のパン部分のみに限定する。
- 2) ジャム、あん、クリーム、外皮等を取り除いたパン部分のみを採る。
- 3) 塩化ナトリウム飽和により、引き続きアシル乳酸塩の抽出操作において、クロロホルム層の分離を容易にする。クロロホルム層の分離に時間がかかるときは遠心分離してもよい。
- 4) これまでの操作により、パン生地ステアロイル乳酸塩を添加して焙焼したパン試料から、アシル乳酸塩 88~95 % が回収される。
- 5) 洗浄後のクロロホルム層はやや白濁している。この白濁物質は未消化のパン粉末に由来する。

もので、ガラスろ過器でろ過すれば、ろ液はほぼ澄明となる。なお、飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄しているので、クロロホルム層中の水含有量はわずかであり、無水硫酸ナトリウム等による乾燥操作は不要である。

- 6) ステアロイル乳酸カルシウムをけん化し、ステアリン酸、乳酸の構成分子に分解する操作である。
- 7) ステアリン酸等の高級脂肪酸を除去し、乳酸や低級脂肪酸のみを水層に採る操作である。
- 8) けん化により生成した結合型乳酸由来の乳酸濃度を求める。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、 $CV/(0.1)(10,000)W$ より得た検体中の結合乳酸含量(%)に $1/0.25=4$ を乗じて検体中のステアロイル乳酸カルシウム含量(%)とする。

なお、本品及び食品由来の遊離乳酸はクロロホルムに難溶なので抽出されず、本定量法で妨害を示さない。

11 セルロース及びデンプンのグリコール酸誘導体

[糊 料]

Carboxymethyl Derivatives of Cellulose and Starch

カルボキシメチルセルロースカルシウム

Calcium Carboxymethylcellulose

別名：繊維素グリコール酸カルシウム

カルボキシメチルセルロースナトリウム

Sodium Carboxymethylcellulose

別名：繊維素グリコール酸ナトリウム

デンプングリコール酸ナトリウム

Sodium Carboxymethylstarch

1. 試験法の概要

食品中のセルロース及びデンプンのグリコール酸誘導体は、ナフタレンジオールを用いる比色法により、カルボキシメチルセルロースナトリウムあるいはデンプングリコール酸ナトリウムとして定量する。必要があれば、分子量比を乗じてカルボキシメチルセルロースカルシウムの量として求める。

2. 試 験 法 (比色法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

試料約 10g を精密に量り、50ml の共栓付遠心管に入れ、沸騰水浴中で 5 分間加熱しながらガラス棒でかき混ぜる¹⁾。50℃以下に冷却した後、テトラヒドロフラン 40ml を加えて激しく振り混ぜ²⁾、遠心分離 (5 分間、2,000 回転/分) し、上澄液を傾斜して捨てる。残留物中のテトラヒドロフランを加温しながら窒素ガスを吹きつけてできるだけ除去する³⁾。次に水 10ml を加え、遠心管を 60℃の超音波浴槽に浸漬しながらガラス棒を用いて残留物を完全に溶解又は分散させる。酵素溶液⁴⁾ 1ml を加えて振り混ぜ、約 37℃の恒温槽に 2～3 時間放置する。沸騰水浴中で 10 分間加熱した後冷却し、水を用いてセルロースチューブに入れ、1,000ml の水に浸漬して 15～25℃で 12～16 時間透析を行う。次に透析内液を水を用いて 150ml の遠心管に移し、4 倍量のテトラヒドロフランを加えて振り混ぜ、遠心分離 (5 分間、2,000 回転/分) した後、上澄液を傾斜して捨てる。残留物に 2mol/l 水酸化ナトリウム溶液 20ml を加え、沸騰

水浴中で加熱して完全に溶かし、水を加えて正確に 200ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

カルボキシメチルセルロースナトリウム又はデンプングリコール酸ナトリウム⁵⁾ 0.100g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、カルボキシメチルセルロースナトリウム又はデンプングリコール酸ナトリウム 1mg を含む）。

標準液 1, 2, 3, 4ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 20ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれカルボキシメチルセルロースナトリウム又はデンプングリコール酸ナトリウム 50, 100, 150, 200 μ g 及び 250 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、波長 540nm における吸光度を測定する。

② 測定

試料液 1ml を正確に量り、ネスラー管に入れる。ナフタレンジオール液 20ml を加え、水浴中で 3 時間加熱した後冷却する。この液を 50ml のメスフラスコに移し、ネスラー管は 50 % 硫酸で洗い、洗液を先のメスフラスコに合わせ、冷却しながら 50 % 硫酸を加えて正確に 50ml とする。この液について 50 % 硫酸を対照として波長 540nm における吸光度を測定する。

③ 検量線

検量線用標準液 1ml ずつを正確に量り、それぞれネスラー管に入れ、以下、②測定と同様の操作をして吸光度を測定し、検量線を作成する。

④ 定量

試料液について得られた吸光度と検量線から試料液中のカルボキシメチルセルロースナトリウム又はデンプングリコール酸ナトリウム濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のカルボキシメチルセルロースナトリウム又はデンプングリコール酸ナトリウム含量 (g/kg) を計算する。

カルボキシメチルセルロースナトリウム又はデンプングリコール酸ナトリウム含量

$$(\text{g/kg}) = \frac{C}{W} \times \frac{200}{1,000}$$

C：試料液中のカルボキシメチルセルロースナトリウム又はデンプングリコール酸ナトリウム濃度 (μ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

カルボキシメチルセルロースカルシウム含量 (g/kg)

$$= \text{カルボキシメチルセルロースナトリウム含量 (g/kg)} \times 0.99^{6)}$$

試薬・試液

1. 酵素溶液：プロテアーゼ 500mg を量り，水を加えて溶かし，10ml とする。
2. テトラヒドロフラン：市販の特級品を用いる。
3. 2,7-ナフタレンジオール：市販の特級品を用いる。
4. ナフタレンジオール液：2,7-ナフタレンジオール 0.1g を量り，硫酸 100ml を加えて溶かし，液の黄色が微黄色になるまで水浴中で加熱する。冷却し暗所に保存する。このとき黄色は完全に消失している。用時，硫酸で 10 倍に希釈する。
5. プロテアーゼ：市販品を用いる。

[注]

- 1) 沸騰水浴中で加熱混合することにより，不溶化していた物質を均一に溶解，分散する。
- 2) テトラヒドロフランを約 80 % 濃度として，脱脂と高分子物質の凝集沈殿を同時に行う。なお脂肪含量の多い試料の場合は，更に残留物をテトラヒドロフラン 30~40ml で洗った方がよい。
- 3) テトラヒドロフランが酵素反応を妨害することのないよう，できるだけ除去する。
- 4) 定量に影響するタンパク質を酵素で分解する。
- 5) 分析の対象としている化合物と同一のものを用いるのが最適であるが，異なっても分析値に大きな差は出ない。
- 6) カルシウム塩，ナトリウム塩ともにエーテル化度を 1 とし，すべてのカルボン酸が塩になっていると仮定して分子量比を求めた。

12 ソルビタン脂肪酸エステル

[乳化剤]

Sorbitan Esters of Fatty Acids

1. 試験法の概要

ソルビタン脂肪酸エステルは、ソルビトール、ソルビタン及びソルバイドの各種脂肪酸エステルの混合物である。食品中のソルビタン脂肪酸エステルは、けん化分解後、得られたソルビトール、ソルビタン及びソルバイドをトリメチルシリル体とし、ガスクロマトグラフィーによりソルビタンモノ脂肪酸エステルとして定量する。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

試料約 20g¹⁾ を精密に量り²⁾、クロロホルム 20ml を加え、還流冷却器を付け、温浴中で 1 時間加熱還流した後、ろ過し、残留物にクロロホルム 20ml を加えて同様の操作を繰り返し、全ろ液を合わせて試料液とする。

（3）標準液の調製

α -(D)ソルビトール、1,4-ソルビタン、及び 1,4,3,6-ソルバイド 0.100g ずつをそれぞれ正確に量り、合わせ、クロロホルムを加えて正確に 100ml とする。この液 2ml を正確に量り、クロロホルムを加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、 α -(D)ソルビトール、1,4-ソルビタン及び 1,4,3,6-ソルバイドそれぞれ 20 μ g ずつを含む）。

（4）測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：60～80 メッシュのシラン処理されたガスクロマトグラフ用ケイソウ土

担体に、JXR シリコンを 3 % の割合で含ませたもの。

カラム管：内径 3mm，長さ 1m

カラム温度：120～220℃ まで 10℃/分 で昇温を行う。

注入口及び検出器温度：300℃

キャリアーガス：ヘリウム，50ml/分

② 測定液の調製

試料液を濃縮器に入れ，減圧濃縮してクロロホルムを留去し，エタノール製 0.5mol/l 水酸化カリウム試液 100ml を加えて 1 時間加熱還流し，減圧濃縮した後，0.5mol/l 塩酸 120ml を加えて 1 時間加熱還流する。冷後，分液漏斗に移し，*n*-ヘキサン 25ml ずつで，2 回水層を洗い，それぞれ洗液は捨て，水層を濃縮器に入れ，エタノール製 0.5mol/l 水酸化カリウム試液で中和し，減圧濃縮した後，無水硫酸ナトリウム 3g 及び *n*-ブタノール 25ml を加えてよく振り混ぜ，ろ過する。残留物を *n*-ブタノール 25ml で洗い，ろ液及び洗液を合わせ³⁾，減圧濃縮して *n*-ブタノールを留去する。これにピリジン 3ml 及び TMS 試液 3ml をそれぞれ正確に量って加え，30 分間振り混ぜ，測定液とする。

③ 検量線

標準液 0.1，0.5ml 及び 1ml をそれぞれ正確に量り，濃縮器に入れ³⁾，減圧濃縮してクロロホルムを留去する。次にピリジン 3ml ずつ及び TMS 試液 3ml ずつをそれぞれ正確に量ってそれぞれに加え，それぞれを 30 分間振り混ぜ，検量線用標準液とする。

検量線用標準液 5 μ l ずつを量り，それぞれガスクロマトグラフに注入し，得られたピーク高さ比又はピーク面積比から α -(D) ソルビトール，1,4-ソルビタン及び 1,4,3,6-ソルバイドそれぞれの検量線を作成する。

④ 定量

測定液 5 μ l を量り，ガスクロマトグラフに注入し，得られた α -(D) ソルビトール，1,4-ソルビタン及び 1,4,3,6-ソルバイドそれぞれのピーク高さ比又はピーク面積比とそれぞれの検量線によって測定液中のそれぞれの濃度 (μ g/ml) を求め，次式によって検体中のソルビタン脂肪酸エステル含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ソルビタン脂肪酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{(C_1 + C_2 + C_3) V}{1,000 \times Wf}$$

C_1 ：測定液中のソルビトール濃度 (μ g/ml)

C_2 ：測定液中の 1,4-ソルビタン濃度 (μ g/ml)

C_3 ：測定液中の 1,4,3,6-ソルバイド濃度 (μ g/ml)

V ：測定液量 (ml)

W ：試料の採取量 (g)

f ：ソルビタンモノステアレートとして換算する場合 $f=0.27$ ⁴⁾ を用いる。

試薬・試液

1. エタノール：[95v/v%，特級]
2. キシレン：市販の特級品を用いる。
3. シリカゲル：市販の100~200メッシュのカラムクロマトグラフ用を用いる。
4. 1,4,3,6-ソルバイド：ソルビトール20gと

-トルエンスルホン酸5gをキシレン60mlに懸濁し、かくはんしながら135~140℃で4時間還流し、冷後、キシレンを除き、残留物に希エタノールを加えて溶かし、中和後、ろ過し、ろ液を減圧濃縮し、得られたシロップ状物質をメタノールに溶解し、シリカゲル約5gを加え、メタノールを留去する。次に、あらかじめシリカゲル約30gをクロロホルムに分散させて充てんしたカラムに上記残留物を加え、クロロホルム200mlにメタノール40mlを混合した混液をカラムに加えて溶出させ、溶出液を減圧濃縮して1,4,3,6-ソルバイドを得る。
5. 1,4-ソルビタン：ソルビトール20gに濃硫酸、水をそれぞれ3滴ずつ加え、減圧下で140℃、30分間加熱し、水を加えた後活性炭で脱色する。硫酸をバリウム塩として除いた後、減圧濃縮し、得られたシロップ状物質をメタノールに溶解し、シリカゲル約5gを加え、メタノールを留去する。次に、あらかじめシリカゲル約30gをクロロホルムに分散させて充てんしたカラムに上記残留物を加え、クロロホルム200mlにメタノール60mlを混合した混液をカラムに加えて溶出させ、溶出液を減圧濃縮して1,4-ソルビタンを得る。
6. α -(D)ソルビトール：市販の特級品を用いる。
7. トリメチルクロルシラン：市販のTMS化用を用いる。
8. *p*-トルエンスルホン酸：[1級]
9. ピリジン：市販のシリル化用を用いる。あるいは、市販特級品1Lに対し乾燥用合成ゼオライト(0.4Å)約10gを加え、一夜放置し脱水したものを用いる。
10. *n*-ブタノール：[特級]
11. 1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン：市販のTMS化用を用いる。
12. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム(無水)[特級]
13. TMS試液：1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン2ml及びトリメチルクロルシラン1mlをピリジン10mlに加える。
14. エタノール製0.5mol/l水酸化カリウム試液：水酸化カリウム35gを量り、水20mlを加えて溶かした後、エタノールを加えて1,000mlとする。密栓保存する。

[注]

- 1) ソルビタン脂肪酸エステルとして約50mgに対応する量が適当である。
- 2) 水性食品では、試料量を量った後、凍結乾燥することにより、クロロホルムによる抽出効率を高めることができる。
- 3) 内部標準を使用する際には、 α -メチル-D(+)-グルコシド(市販特級)が適当である。1.0mg

416 参照分析法

を量り、クロロホルムに溶かし、全量 100ml とし、その 1ml を用いる。

- 4) ソルビタン脂肪酸エステルをソルビタンモノステアレートとして換算した場合、その中に占めるソルビトール等のポリオール部分の割合は、市販品では 25～29 % の範囲であるので、平均の 27 % を計算に用いた。

13 ナトリウムメトキシド

[製造用剤]

Sodium Methoxide

別名：ナトリウムメチラート

CH_3ONa : 54.02

1. 試験法の概要

食品中のナトリウムメトキシドは、ガスクロマトグラフィーによりメタノールとして定量する。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

あらかじめ図 13-1 の発生管を組み立て、試料約 10g を精密に量り、発生管に入れる。2 本の吸気管には氷冷した再蒸留水 5ml ずつを正確に量って入れ、図のように発生管及び 2 本の吸気管を直列につなぎ、吸気管をジュワー瓶に入れ、氷水で冷却する。発生管をあらかじめ約 $150^\circ\text{C}^{(1)}$ に加熱したオイルバス中に約 3 分間浸した後、そのまま窒素ガスを約 200ml/分の速度⁽²⁾で、通気ガスが吸気管中の水の中で導かれるようにして通気する。約 10 分間通気を行った後、吸気管の吸収液を 20ml のメスフラスコに入れる。吸気管をそれぞれ再蒸留水 2ml ずつで 2 回洗い、洗液をメスフラスコに入れ、再蒸留水を加えて正確に 20ml とし、試料液とする。

（3）検量線用標準液の調製

メタノール 126 μl をマイクロシリンジを用いて正確に量り、あらかじめ再蒸留水 80ml を入れた 100ml のメスフラスコに入れ、再蒸留水を加えて正確に 100ml とする。この液 10ml を正確に量り、再蒸留水を加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、メタノール 100 μg を含む）。

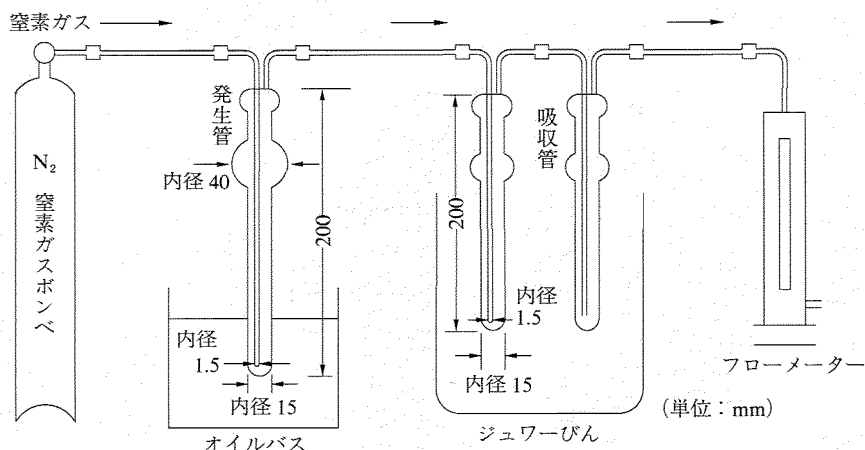


図 13-1 メタノール捕集装置

標準液 0, 0.25, 0.5, 1ml 及び 2ml をそれぞれ正確に量り, それぞれに再蒸留水を加えて正確に 10ml とし, 検量線用標準液とする (これらの液 1ml は, それぞれメタノール 0, 2.5, 5, 10 μ g 及び 20 μ g を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ (FID-GC) を用い, 次の条件によって測定する。

カラム充填剤: 50~80 メッシュのポラスポリマービーズ

カラム管: ガラス又はステンレス製, 内径 3~4mm, 長さ 2m

注入口温度: 約 200℃

カラム温度: 約 180℃

キャリアーガス: 窒素, メタノールのピークが約 1.5 分間後に現れるよう流速を調節する。

② 検量線

検量線用標準液 2 μ l ずつをそれぞれ正確に量り, ガスクロマトグラフに注入し, ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

試料液 2 μ l を正確に量り, ガスクロマトグラフに注入し, 得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のメタノール濃度 (μ g/ml) を求め, 次式によって検体中のメタノール含量 (g/kg) を計算する。

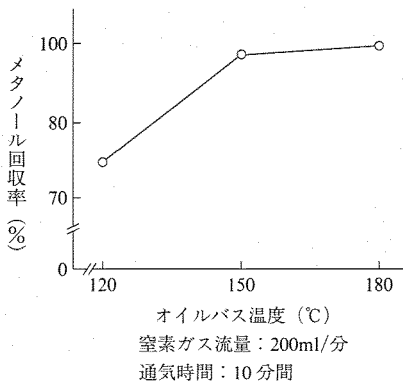
$$\text{メタノール含量 (g/kg)} = \frac{C}{50 \times W}$$

C：試料液中のメタノール濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

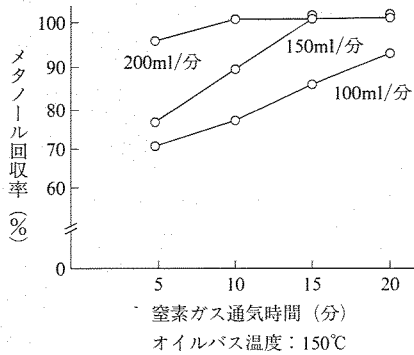
W：試料の採取量 (g)

[注]

- 1) オイルバスによる加熱温度と回収率の関係は注図 13-1 に示すように 150℃で回収率が最高に達したので、150℃とした。それ以上の加熱温度は油脂の分解による揮発性成分がガスクロマトグラムを妨害する可能性がある。
- 2) 通気速度と回収率の関係を注図 13-2 に示す。図の条件では 200ml/分の窒素流量で回収率が 10 分間で最高に達したので、本文においては通気の条件を 200ml/分で通気時間 10 分間とした。



注図 13-1 メタノール 100 μg を含む食用油脂 10 g からのメタノール回収率とオイルバス温度の関係



注図 13-2 メタノール 100 μg を含む食用油脂 10 g からのメタノール回収率と窒素ガス流量の関係

14 二酸化ケイ素

[製造用剤]

Silicon Dioxide

別名：シリカゲル

SiO₂：60.08

1. 試験法の概要

食品中の二酸化ケイ素は、無水炭酸カリウムと融解後、ケイモリブデン酸黄法により定性する。また、必要ならば同法により定量する。

食品中には天然の二酸化ケイ素が広く分布している。また、本法では、ケイソウ土等の不溶性鉱物に由来する二酸化ケイ素も共に定性される。なお、定量値は、原料由来の二酸化ケイ素と食品添加物として使用されたものとの合計値である。

2. 試験法（比色法）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

試料約 100g を精密に量り、あらかじめメンブランフィルター（孔径 0.45μm）を装着したフィルターホルダーを用いて吸収ろ過する。フィルター上の残留物は水 50ml ずつで 3 回、吸引しながら洗浄した後、メンブランフィルターを白金製のつぼに入れ、120℃で乾燥した後、無水炭酸カリウム 0.2g を加え、フィルターが燃えないように徐々に加熱し、ついで 1,000℃で 10 分間加熱融解する。

冷後、内容物に水約 10ml を加え、必要ならば加温して溶かした後、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

（3）標準液の調製

二酸化ケイ素（SiO₂）0.200g を正確に量り、白金製のつぼに入れ、無水炭酸カリウム 3g を加え、十分混合した後、30 分間加熱融解する。冷後、熔融物を水に溶かし、必要ならばろ過し、

ろ液を 200ml のメスフラスコに移し、ろつば及びろ紙を水 10ml ずつで 3 回洗い、洗液をろ液に合わせ、水を加えて正確に 200ml とし、原液とする。原液 10ml を正確に量り、200ml のメスフラスコに採り、水を加えて正確に 200ml とし、標準液とする（この液 1ml は二酸化ケイ素 $50\mu\text{g}$ を含む）。

（４）測定法

① 定性

試料液 10ml を採り、1.5mol/l 硫酸 2ml を混和して放置した後、モリブデン酸アンモニウム溶液（10 → 100）2ml を加え、水を加えて正確に 40ml とし、混和した後、5 分間放置するとき、二酸化ケイ素が存在すれば黄色を呈する。

② 定量

a 測定条件

分光光度計を用い、波長 400nm の吸光度を測定する。

b 検量線

標準液 1, 3, 5, 10ml 及び 15ml をそれぞれ正確に量り、それぞれ 50ml のメスフラスコに入れ、水約 20ml を加えて混和し、次いで 1.5mol/l 硫酸 2ml をそれぞれに加え、混和して放置した後、モリブデン酸アンモニウム溶液（10 → 100）2ml を加え、更に水を加えて正確に 50ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれ二酸化ケイ素 1, 3, 5, $10\mu\text{g}$ 及び $15\mu\text{g}$ を含む）。検量線用標準液それぞれにつき、5 分間放置した後、波長 400nm における吸光度を測定する。ただし、対照液は 1.5mol/l 硫酸 2ml 及びモリブデン酸アンモニウム溶液（10 → 100）2ml を混和し、水で 50ml とした液を用いる。

c 測定

試料液 10ml を正確に量り、50ml のメスフラスコに入れ、1.5mol/l 硫酸 2ml を加え、混和して放置した後、モリブデン酸アンモニウム溶液（10 → 100）2ml を加え、更に水を加えて正確に 50ml とし、測定液とする。この液を 5 分間放置した後、検量線用標準液の測定に準じて、吸光度を測定し、得られた吸光度と検量線から測定液中の二酸化ケイ素濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）を求め、次式によって検体中の二酸化ケイ素含量（g/kg）を計算する。

$$\text{二酸化ケイ素含量 (g/kg)} = \frac{C}{2 \times W}$$

C：測定液中の二酸化ケイ素濃度（ $\mu\text{g/ml}$ ）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液

1. 無水炭酸カリウム：[特級]

2. モリブデン酸アンモニウム：〔特級〕

3. 1.5mol/l 硫酸：水約 500ml を採り，かき混ぜながら硫酸 80ml を徐々に加え，約 20℃ になるまで放冷した後，水を加えて 1,000ml とする。

15 二酸化炭素

[製造用剤]

Carbon Dioxide

別名：炭酸ガス

CO₂ : 44.01

1. 試験法の概要

食品中の二酸化炭素は、酸性下加熱してアルカリ溶液に捕集し、滴定により定量する¹⁾。

2. 試験法（滴定法）

（1）試料の前処理

検体²⁾は、0℃で30～60分間冷却した後、開栓し、直ちに水酸化ナトリウム溶液（1→2）を検体100mlにつき1.5mlの割合で正確に量り加える。再び密栓し、振とうした後、室温になるまで放置し、試料とする。

（2）試料液の調製

試料50ml³⁾を正確に量り、容量500mlの蒸留フラスコに入れ、10%過酸化水素溶液⁴⁾3ml及び沸石を加えて図15-1の吸尿管⁵⁾に連結する。その際、滴下漏斗を蒸留フラスコに接続し、空気漏れのないようにする。あらかじめ第一と第二の吸尿管にはそれぞれ0.25mol/l水酸化ナトリウム溶液20mlずつを正確に量って加え、第三の吸尿管には0.25mol/l水酸化ナトリウム溶液10mlと塩化バリウム溶液10mlをそれぞれ正確に量って加え、これらを直列に連結しておく。第三の吸尿管の端を減圧装置⁶⁾に接続し、徐々に減圧コックを開栓し、発泡しなくなったら全開する。次に酸性リン酸液35mlを滴下漏斗に入れ、その約30mlを蒸留フラスコに滴下した後、かくはんする。次にフラスコを緩やかに加熱し、二酸化炭素が発泡しはじめたら強く加熱する。留液が2～3ml留出し、第一の吸尿管が温まったら滴下漏斗のコックを開き、各減圧系を常圧に戻して加熱を止める。

第一と第二の吸尿管の水酸化ナトリウム溶液を滴定フラスコに移し、それぞれの吸尿管は3mlずつの水でそれぞれ2回洗い、洗液を滴定フラスコに合わせる。第三の吸尿管に炭酸バリウムの沈殿が生じている場合は、この吸尿管の液も合わせ、吸尿管は3mlずつの水で2回洗

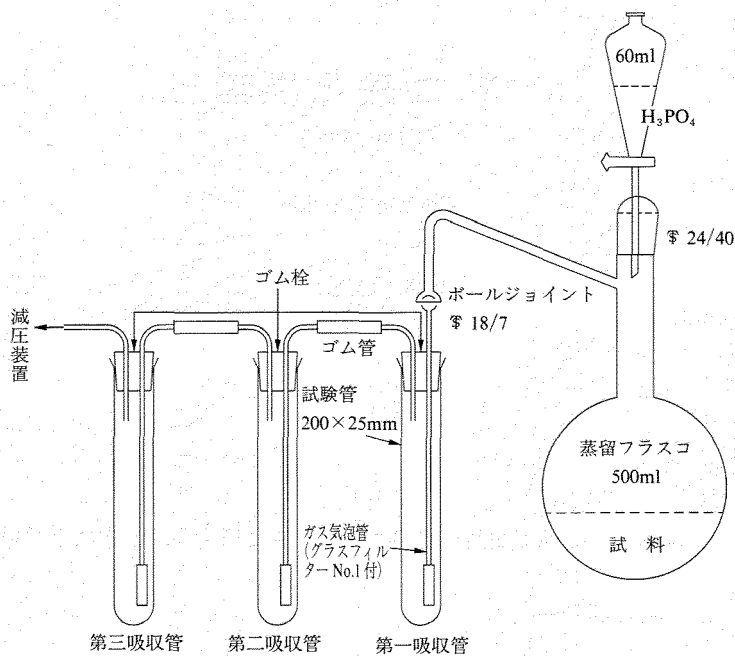


図 15-1 吸収装置

い、洗液を滴定フラスコに合わせる。この液に塩化バリウム溶液⁷⁾ 50ml を加え、試料液とする。

(3) 測定法

試料液にフェノールフタレイン試液 3 滴を加え、0.25mol/l 塩酸で滴定し、次式によって検体中の二酸化炭素含量 (w/v %) を計算する。

$$\text{二酸化炭素含量 (w/v \%)} = (50 \times f \times 0.25 - a \times f' \times 0.25) \times \frac{2.233}{b}$$

f : 0.25mol/l 水酸化ナトリウム溶液のファクター

f' : 0.25mol/l 塩酸のファクター

a : 0.25mol/l 塩酸の滴定量 (ml)

b : 試料の採取量 (ml)

試薬・試液

1. エタノール：[95v/v %, 特級]
2. 塩化バリウム：(二水塩) [特級]
3. 塩化バリウム溶液：塩化バリウム 65g を水 1,000ml に溶かし、フェノールフタレイン試液を指示薬として 0.1mol/l NaOH で中和する。
4. 過酸化水素水：[30 %, 特級]

5. 10%過酸化水素溶液：過酸化水素水 10ml に水 20ml を加える。
6. 酸性リン酸液：リン酸一ナトリウム 20g を水に溶かし，リン酸 3ml を加えて水で 100ml にする。
7. フェノールフタレイン：〔特級〕
8. フェノールフタレイン試液：フェノールフタレイン 1g をエタノール 100ml に溶かす。
9. リン酸：〔特級〕
10. リン酸一ナトリウム：〔特級〕

〔注〕

- 1) 本法は AOAC 法を骨子とした。定量法の原理は，あらかじめアルカリ処理した試料を酸性条件で加熱して，二酸化炭素を追い出し，これを水酸化ナトリウム液に通じて炭酸塩として吸収させ，この炭酸塩を塩化バリウムで沈殿させて，化学的に系外に除き，過剰の水酸化ナトリウムを塩酸で滴定して，二酸化炭素を定量する。
- 2) 食品としては炭酸飲料，発泡ワイン等の瓶詰及び缶詰がある。
- 3) ワインの場合，酒税法上 0.05% (w/w) が含量測定の目安になる。この場合二酸化炭素によるアルカリ消費量は約 5ml となる。
- 4) 亜硫酸が共存すると酸性で亜硫酸ガスとして追い出され，水酸化ナトリウムを消費するため，あらかじめ亜硫酸を酸化して硫酸にしておく。
- 5) 図 15-1 は AOAC 法 14 版 (1984) による。なお，15 版 (1990) 以降は，他の装置となっている。
- 6) 減圧度は 13.3~26.7 kPa がよい。
- 7) 炭酸バリウムの沈殿は滴定終点の観察をほとんど妨害しないが，多少過剰滴定になる。

16 プロピレングリコール脂肪酸エステル

[増粘剤]

Propylene Glycol Esters of Fatty Acids

1. 試験法の概要

プロピレングリコール脂肪酸エステルは、種々の脂肪酸とプロピレングリコールとのモノ-及びジエステル体の混合物である。食品中のプロピレングリコール脂肪酸エステルは、けん化分解後、得られたプロピレングリコールをアセチル体とし、ガスクロマトグラフィーによりプロピレングリコールモノステアレートとして定量する。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

試料約 20g^{1),2)} を精密に量り、無水硫酸ナトリウム約 30g を加えてよく混合し、ソックスレー抽出器を用いてエチルエーテル 100ml で 1 時間加熱還流抽出後、ろ過し、そのろ液を試料液とする。

（3）標準液の調製

プロピレングリコール 0.200g を正確に量り、無水エタノールを加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml はプロピレングリコール 2mg を含む）。

（4）測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：60～80 メッシュのガスクロマトグラフ用ケイソウ土担体に、シリコーン SE-30 を 5 % の割合で含ませたもの。

カラム管：内径 3mm，長さ 750mm

カラム温度：100℃

注入口及び検出器温度：200℃

キャリアーガス：窒素又はヘリウム，30ml/分

② 測定液の調製

試料液を分液漏斗に移し，水 50ml ずつで 2 回洗い³⁾，それぞれの洗液は捨てる．エチルエーテル層を濃縮器に入れ，減圧濃縮し，エタノール製 0.5mol/l 水酸化カリウム試液 100ml⁴⁾を加え，1 時間加熱還流する⁵⁾．減圧濃縮し⁶⁾，0.5mol/l 塩酸 120ml を加えて 1 時間加熱還流する．冷後，分液漏斗に移し，*n*-ヘキサン 25ml ずつで 2 回水層を洗い，それぞれ洗液は捨て，水層を濃縮器に入れ，エタノール製 0.5mol/l 水酸化カリウム試液で中和した後，減圧濃縮し⁶⁾，無水硫酸ナトリウム 10g 及び無水エタノール 25ml を加えてよく振り混ぜ，ろ過する．残留物を無水エタノール 25ml で洗い，ろ液及び洗液を合わせ，減圧濃縮⁶⁾する．これに無水酢酸 20ml を正確に量って加え，1 時間加熱還流を行い，測定液とする．

③ 検量線

標準液 2，5ml 及び 10ml を正確に量り⁵⁾，減圧濃縮し⁶⁾，無水酢酸 20ml を正確に量って加え，1 時間加熱還流を行い，検量線用標準液とする．検量線用標準液 5μl ずつを量り，それぞれガスクロマトグラフに注入し，得られたピーク高さ又はピーク面積からプロピレングリコールの検量線を作成する．

④ 定量

測定液 5μl ずつを量り，ガスクロマトグラフに注入し，得られたクロマトグラムのプロピレングリコールのピークの高さ又はピーク面積を求め，検量線より測定液中のプロピレングリコール濃度 (mg/ml) を求め，次式によって検体中のプロピレングリコール脂肪酸エステル含量 (g/kg) をプロピレングリコールモノステアレートとして計算する．

$$\text{プロピレングリコール脂肪酸エステル含量 (g/kg)} = \frac{CV}{W} \times 4.732$$

W：試料の採取量 (g)

C：測定液中のプロピレングリコール濃度 (mg/ml)

V：測定液量

$$4.732 = \frac{\text{プロピレングリコールモノステアレートの分子量 (360.06)}}{\text{プロピレングリコールの分子量 (76.09)}}$$

試薬・試液

- 1, 3-ブチレングリコール：市販品を用いる．
2. 無水エタノール：[99.5v/v%，特級]
3. 無水酢酸：[特級]

4. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）〔特級〕
5. エタノール製 0.5mol/l 水酸化カリウム試薬：水酸化カリウム 35g を量り，水 20ml を加えて溶かした後，エタノールを加えて 1,000ml とする，密栓保存する。

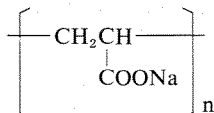
〔注〕

- 1) 試料量は 20g 以下とする。プロピレングリコール脂肪酸エステルとして約 0.1g に対応する量が適当である。
- 2) 試料が完全にエーテルに溶解する油性食品等の場合は，試料をエーテル 50ml に溶かし，そのまま試料液とする。
- 3) 遊離のプロピレングリコールを除く目的である。
- 4) 試料液中の蒸発残留物が多い場合（10g 以上）はエタノール製 0.5mol/l 水酸化カリウム試液を多く用いる。その場合 0.5mol/l 塩酸も多く用いる。
- 5) 内部標準が必要なときは，1,3-ブチレングリコールを内部標準物質とし，その 200mg を量り，無水エタノールに溶かし全量 100ml とし，その 10ml を用いる。
- 6) 過度の減圧を行うとプロピレングリコールも留出する可能性があるので乾固してはならない。

17 ポリアクリル酸ナトリウム

[糊 料]

Sodium Polyacrylate



1. 試験法の概要

食品中のポリアクリル酸ナトリウムを水抽出し、硫酸マグネシウムを加え、ポリアクリル酸マグネシウムの沈殿を生成させた後、硫酸を加え加熱灰化することにより生じた硫酸マグネシウムを重量分析法により定量する。

2. 試 験 法 (重量分析法)

(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) 試料液の調製¹⁾

試料約 25g を精密に量り、水 50ml を加えてホモジナイズ²⁾した後、水 100ml を用いて 200ml のビーカーに入れる。この液に 0.5mol/l 水酸化ナトリウム溶液又は 0.5mol/l 塩酸を加え、pH を 9～12 に調整した後³⁾、少量の水を用いて共栓遠心管に移し、振とう機を用いて 1 時間振とうする。次に遠心分離 (10 分間、10,000 回転/分) し、分離液を分取する。遠心管の残留物に水 50ml を加えてかき混ぜ、0.5mol/l 水酸化ナトリウム溶液又は 0.5mol/l 塩酸を加え、pH を 9～12 に調整し、同様の条件で振とうし、遠心分離する。この操作を更に 2 回繰り返し⁴⁾、全分離液を合わせ、試料液とする。

(3) 測 定 法

試料液の pH を 0.5mol/l 塩酸で 7.6～7.8⁵⁾ に調整し、これに硫酸マグネシウム溶液 (5→8) 100ml を加え、60℃ で 1 時間加温した後、12 時間放置する。この液を少量の水を用いて定量的に遠心管に入れ、遠心分離する。分離液を捨て、残留物に 50～60℃ の水 50ml を加えて再

び遠心分離を行い⁶⁾、分離液を捨てる。更に 50～60℃の水 50ml を加え、遠心分離を行い、分離液を捨てた後、残留物を少量の水を用いて重量既知のるつぼに移す。硫酸 2ml を加え、徐々に加熱して炭化した後、600℃で強熱灰化する⁷⁾。るつぼ中の灰分重量 (mg) を求め、次式によって検体中のポリアクリル酸ナトリウム含量 (g/kg) を計算する⁸⁾。

$$\text{ポリアクリル酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{A}{W} \times \frac{94.1 \times 2}{120.4}$$

A：灰分重量 (mg)

W：試料の採取量 (g)

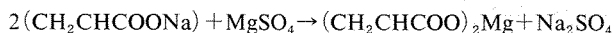
$$\frac{94.1 \times 2}{120.4} : \frac{\text{アクリル酸ナトリウムの分子量} \times 2 \text{ 分子}}{\text{硫酸マグネシウムの分子量}}$$

試薬・試液

硫酸マグネシウム：[特級]

[注]

- 1) オレンジジュース、酒、ビール、食酢等の液体食品の場合は、(2)試料液の調製操作を省略して、試料をそのまま試料液として(3)測定法の操作に移れる。本法は、ほとんどすべての食品に適用できる。
- 2) 分析精度は主として抽出の操作の良し悪しにより左右されるものであり、抽出を完全に行うためできるだけ微細な乳濁状にホモジナイズする必要がある。
- 3) pH の調整はタンパク質とポリアクリル酸ナトリウムとの静電的結合を分離するために必要な操作である。pH 領域は食品の種類、状態、その他の条件により異なり、例えば生めんの場合には 9～10 が最適である。
- 4) 抽出を完全にするため合計 4 回抽出を行う。
- 5) 食品中に共存するリン酸塩の影響を防ぐため pH 領域を 7.6～7.8 に調整しなければならない。たとえば中華めんはピロリン酸ナトリウム、リン酸三ナトリウム等を成分とするかん水が含まれており、本分析法のこの後に続く硫酸マグネシウム添加において pH が 8～11 の場合はリン酸マグネシウムの沈殿を生じ、また pH11 以上では水酸化マグネシウムの沈殿が生ずる。
- 6) 沈殿したポリアクリル酸マグネシウムから低分子量マグネシウム塩を十分洗浄除去する目的であり、スーパーテル等により残留物を微細化しながら水中に洗い出す。
- 7) 洗浄を繰り返したポリアクリル酸マグネシウムの沈殿中にはなお、タンパク質とポリアクリル酸マグネシウムの結合物が含有され、ゲル状を呈しているので、有機物を灰化して硫酸マグネシウムとし、これよりポリアクリル酸含量を求める。ジュース等の沈殿物も灰化することにより除去できる。
- 8) アクリル酸ナトリウムと硫酸マグネシウムの反応式は次式のとおりであり、アクリル酸ナトリウム 2mol と硫酸マグネシウム 1mol が反応する。



上記に従って生成したアクリル酸マグネシウムの沈殿に、硫酸を加え、加熱灰化し、生成した硫酸マグネシウム量を重量分析法で測定し、計算式よりポリアクリル酸ナトリウム含量を測定する。

18 メチルセルロース

[糊 料]

Methyl Cellulose

1. 試験法の概要

食品中のメチルセルロースは、水抽出し精製後、ヨウ化水素酸と反応させ、生成したヨウ化メチルを Zeisel 反応を用い、ガスクロマトグラフィーにより定量する。

食品中にはメトキシ基を有する物質が分布している。したがって、定量値は食品由来のメトキシ基を有する物質の影響を受ける。

2. 試験法（ガスクロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製¹⁾

試料約 1g を精密に量り、ホモジナイザー用カップに入れ、水 5ml 及び *n*-ヘキサン 50ml を加え、氷水で冷却しながら約 2~3 分間ホモジナイズする。次に *n*-ヘキサン層を除去し²⁾、下層に *n*-ヘキサン 50ml を加え、同様の操作を行う。下層に冷却水 30ml を加え、氷水で冷却しながら、約 2~3 分間ホモジナイズし、2,500 回転/分で 10 分間遠心分離を行い、上澄液を分取する。上澄液をガラスフィルターを用いて吸引ろ過し、ろ液を約 2~3ml まで減圧濃縮し、活性炭カラム³⁾に入れ、水 50ml で溶出し、溶出液を減圧濃縮して 2~3ml とする。この液をポリビニル系ゲルろ過クロマトグラフ用充てん剤カラム⁴⁾に入れ、水で溶出し、溶出液の 15~45ml⁵⁾ の部分を集め、減圧濃縮して 1ml⁶⁾ とし、これを試料液とする。

（3）測定法

① 測定条件

水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ（FID-GC）又は熱伝導度型検出器付ガスクロマトグラフ（TCD-GC）を用いて次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：60~80 メッシュのガスクロマトグラフ用ポーラスポリマービーズ

カラム管：ガラス製、内径 3mm、長さ 1.5m

カラム温度：130℃

注入口及び検出器温度：200℃

キャリアーガス：窒素，流量 30～50ml/分

② 測定液の調製

試料液をセミクロ Zeisel 分解装置⁷⁾ (図 18-1 参照) の分解フラスコに入れる。ガス洗浄器に容量の約半分まで赤リン懸濁溶液を入れ、また吸接管には酢酸エチル⁸⁾吸収液 8ml を正確に量って入れる。分解フラスコには数個の沸石とヨウ化水素酸 10ml⁹⁾ を入れる。連結部は 1 滴のヨウ化水素酸でぬらした後、空冷管と連結し、更に吸接管と連結して装置を組み立てる。吸接管をドライアイス-メタノールで -60～-70℃¹⁰⁾ に冷却し、窒素導入管から窒素ガスを通じて、適当な調圧器を用い、流速を約 10ml/分に調整する。速やかに分解フラスコを約 160℃ の油浴に浸し、約 1 分間加熱乾留する¹¹⁾。吸接管を連結部からはずし吸接管を常温になるまで放置し、均一¹²⁾にし、測定液とする。

③ 検量線

メチルセルロース 0.5, 1.0, 2.0mg 及び 3.0mg を正確に量り、それぞれをセミクロ Zeisel 分解装置の分解フラスコに入れ、それぞれ水 1ml を加え、以下、②測定液の調製と同様の操作を行い、その吸収液を検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれメチルセルロース 62.5, 125, 250 μ g 及び 375 μ g に対応するヨウ化メチルを含む)。

検量線用標準液 5 μ l をそれぞれ正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、メチルセルロースとヨウ化メチルのピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

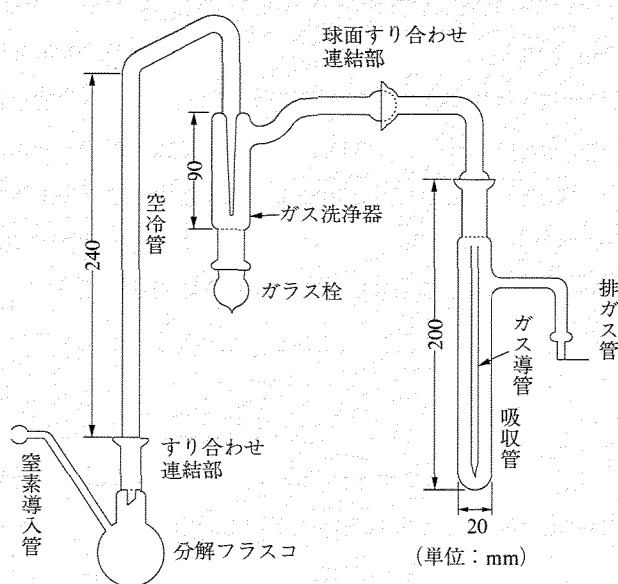


図 18-1 セミクロ Zeisel 分解装置

④ 定量

測定液 5 μ l を正確に量り、ガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から測定液中のメチルセルロース濃度 (μ g/ml) を求め、次式によって検体中のメチルセルロース含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{メチルセルロース含量 (g/kg)} = \frac{C}{W} \times 8 \times \frac{1}{1,000}$$

C：測定液中のメチルセルロース基濃度 (μ g/ml)

W：検体の採取量 (g)

試薬・試液

1. ガラスフィルター：G-2, 40~50 μ のものを用いる。
2. 活性炭：〔クロマトグラフ用〕活性炭 63~297 μ のものを用いる。
3. 活性炭カラム：内径 10mm, 長さ 50mm になるように活性炭を湿式法で充てんする。
4. ポリビニル系ゲルろ過クロマトグラフ用充てん剤：粒径 30~60 μ m の親水性ビニルポリマー
5. ポリビニル系ゲルろ過クロマトグラフ用充てん剤カラム⁴⁾：内径 15mm, 長さ約 100mm になるように湿式法で充てんする。
6. 赤リン：市販の 1 級品を用いる。
7. 赤リン懸濁溶液：赤リン 1g に水 100ml を加えて懸濁させる。
8. ヨウ化水素酸：〔特級〕
9. メチルセルロース：食品添加物純度のもの。メトキシ基 27.5~31.5 % のものを用いる。

〔注〕

- 1) 本法はみかんの缶詰のほか、ほとんどすべての食品に適用できる。また、ジュース等の液体食品の場合は、試料液の調製工程を省略して、試料をそのまま試料液として測定液の調製に進むことができる。
- 2) *n*-ヘキサン層と水層との分離が悪いときは、遠心分離 (10 分間, 3,000 回転/分) を行う。
- 3) 減圧濃縮液が着色していないときは、この工程を省略できる。
- 4) 高速で高分離、耐圧性を有する。排除限界分子量はタンパク質で 1×10^6 , デキストランでは 3×10^6 である。分子量分別用カラムである。
- 5) 1 フラクシオン 3.3ml の受器で、7~9 番目のフラクションを集めるとよい。
- 6) 水量が多いと、次の操作でヨウ化メチルの生成率が悪くなるので 1ml とする。濃縮器から、セミマイクロ Zeisel 分解装置の分解フラスコへ試料液を移し替えるときは、ヨウ化水素酸を用いるとよい。
- 7) この装置は特殊で高価であるので、亜硫酸の定量に用いる通気蒸留装置 (食品添加物分析法各条, 第 4 章の 17 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類参照) を用い、丸底フラスコ (B) を 160℃ の油浴につけ、ナシ型フラスコ (A) をドライアイス・メタノールで冷却することにより代替できる。
- 8) 測定の際、エチルエーテル、アセトン、ヘキサンの溶媒ピークはヨウ化メチルのピークと重

なり，酢酸ブチル及びトルエンでは溶媒ピークがテーリングして定量に 30 分以上を要する。

- 9) 試料液が 1ml 以下に濃縮できない場合，又は試料中に酸と反応する無機物が存在する場合，その量を考慮し，ヨウ化水素酸量を多くする。また試料がヨウ化水素酸に溶けない場合には酢酸，フェノール，プロピオン酸等を加えてもよい。
- 10) メタノール中の水分が増加すると， -60°C 以下に冷却できないことがあるので，確認する。
- 11) メチルセルローズにヨウ化水素酸を反応させて，ヨウ化メチルを生成させる。
- 12) 吸尿管を $-60\sim-70^{\circ}\text{C}$ に冷却するのでガス導管の上部にヨウ化メチルが凝結するため，トルエンを常温に戻し，ガス導管内のトルエンを上下させて溶解させるとともに導管内の液を数回排出させるなどの操作を行い，均一化する。

19 流動パラフィン

[製造用剤]

Liquid Paraffin

別名：ミネラルオイルホワイト

1. 試験法の概要

食品中の流動パラフィンは、重量分析法により定量する。

2. 試験法（重量分析法）

（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）試料液の調製

乾燥重量として約 200g に対応する試料¹⁾の量を精密に量り、乾燥器に入れ、60～70℃で 8 時間乾燥させ²⁾、乾燥試料とし、重量を測定する。乾燥試料を乳鉢に入れ、約 20～50 メッシュ（840～297 μ m）程度に細碎し、粉体試料とする。粉体試料約 150g を精密に量り、円筒ろ紙に入れ、脱脂綿で表面を覆い、ソックスレー抽出器に入れる。あらかじめ沸石と *n*-ヘキサン³⁾ 500ml を入れた 1,000ml のナス型フラスコ及び冷却器をソックスレー抽出器と接続する。マントルヒーターを用い、5 時間⁴⁾加熱還流を行う。還流終了後、*n*-ヘキサン液は減圧濃縮し、重量既知のビーカーに *n*-ヘキサンを用いて定量的に移す。*n*-ヘキサン液を水浴上で濃縮した後、105～110℃の乾燥器中で 30 分間乾燥し、冷却した後、残留物の重量 (g)⁵⁾ を精密に測定する。ビーカーに *n*-ヘキサン 10ml を加えて残留物を溶かし、*n*-ヘキサン少量で定量的にアルミナカラムに注入する。3～4ml/分（以下同じ）で通過させ、ナス型フラスコを受器として石油エーテル・ベンゼン混液（9：1）⁶⁾（残留物の重量 (g) × 60）ml を通過させる。流出液を水浴上で減圧濃縮し、試料液とする。

（3）測定法

試料液を *n*-ヘキサンを用いて定量的に重量既知のビーカーに移し、水浴上で *n*-ヘキサン液を濃縮した後、105～110℃の乾燥器中で 30 分間乾燥し、冷却した後、試料液中の流動パラフ

イン⁷⁾の重量 (g) を精密に測定し、次式によって検体中の流動パラフィン含量 (%) を求める。

$$\text{流動パラフィン含量 (\%)} = \frac{100 \times A}{a \times c / b}$$

A：試料液中の流動パラフィン重量 (g)

a：試料の採取量 (g)

b：乾燥試料重量 (g)

c：粉体試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. アルミナカラム：クロマト管（内径 25mm，長さ 400mm）の底部に脱脂綿を詰め，（残留物の重量×20）g の活性アルミナを少量ずつ，十分にタッピングしながら加える。アルミナの上面には適当な大きさのろ紙を置き，使用したアルミナと同量の石油エーテルで洗う⁸⁾。コックはテフロン製を用いる。
2. 活性アルミナ：80～200 メッシュのクロマトグラフ用，塩基性で水分は 1 % 以内のもの。
3. 石油エーテル：使用前に蒸留したものを用いる。
4. 脱脂綿：あらかじめ *n*-ヘキサンで洗い，乾燥させたものを用いる。
5. *n*-ヘキサン：使用前に蒸留したものを用いる。
6. ベンゼン：使用前に蒸留したものを用いる。

[注]

- 1) パン類を対象とした試験法である。菓子パンの場合は具の部分を除いて試料とする。
- 2) この条件では水分含量は 35 % 程度となる。
- 3) エーテル，石油エーテルは沸点が低いいため抽出時間が長くなる。
- 4) 3 時間の還流で 98～99 % 抽出される。
- 5) 通常，5g 程度である。
- 6) 石油エーテル（AOAC 法）のみでは溶出が不十分である。油脂と流動パラフィンを分離する目的であるから，油脂が溶出しにくい極性のある溶剤を用いる。
- 7) 得られた流動パラフィンは，次の定性試験で同定する。

1. 薄層クロマトグラフィーによる確認

試料：得られた流動パラフィン少量にクロロホルム数滴を加えて溶かす。対照に流動パラフィン 1ml をクロロホルム 500ml に溶かした液を用いる。

薄層板：薄層クロマトグラフ用シリカゲルを用い，厚さ 0.25mm のもの。

展開液：*n*-ヘキサン（残留農薬用又は発煙硫酸処理し分留したもの）

発色：リンモリブデン酸 5g をエタノール 100g に加えて溶かした液を噴霧し，110℃ で 20 分間加熱し，*R_f* 0.6 付近の暗緑青色の単一スポットを確認する。原点が発色したら，それは油脂か不けん化物である。

2. 赤外吸収スペクトル法による確認

得られた流動パラフィンを塩化ナトリウム板につけ、赤外吸収スペクトルを測定し 3.4, 6.82, 7.26 μm 及び 13.89 μm の吸収を確認する。対照として、流動パラフィン [食添] の吸収を測定する。

- 8) カラム管のコックを開いてから石油エーテルを流す。逆にするとカラム中に気泡ができる。石油エーテルがカラムの上面約 1cm まで流下したとき、コックを閉じる。

参考文献

食品添加物分析法各条

- 1 安息香酸及び安息香酸ナトリウム
上村 尚ら：食品衛生学雑誌，**24**，416 (1983)
峯 孝則ら：食品衛生学雑誌，**26**，61 (1985)
村上千秋ら：食品衛生学雑誌，**26**，485 (1985)
畑中久勝ら：食品衛生学雑誌，**27**，81 (1986)
西島基弘ら：食品衛生学雑誌，**27**，316 (1986)
- 2 ソルビン酸及びソルビン酸カリウム
村上りつ子：食品衛生学雑誌，**25**，360 (1984)
峯 孝則ら：食品衛生学雑誌，**26**，61 (1985)
村上千秋ら：食品衛生学雑誌，**26**，485 (1985)
- 3 デヒドロ酢酸ナトリウム
村上千秋ら：食品衛生学雑誌，**26**，485 (1985)
- 5 プロピオン酸及びその塩類
矢部芳枝ら：食品衛生学雑誌，**24**，329 (1983)
高橋まゆみら：食品衛生学雑誌，**27**，87 (1986)
- 7 エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム
矢部芳枝ら：食品衛生学雑誌，**24**，220 (1983)
山口昭弘ら：食品衛生学雑誌，**26**，253 (1985)
浜野 孝ら：食品衛生学雑誌，**26**，630 (1985)
- 9 クエン酸イソプロピル
辻 澄子ら：食品衛生学雑誌，**26**，357 (1985)
加藤クニら：食品衛生学雑誌，**27**，668 (1986)
牛山博文ら：食品衛生学雑誌，**28**，200 (1987)
- 11 ジブチルヒドロキシトルエン
Page *et al.* : J. AOAC Int. **76**，765 (1993)
- 13 ブチルヒドロキシアニソール
Page *et al.* : J. AOAC Int. **76**，765 (1993)
- 14 没食子酸プロピル
Page *et al.* : J. AOAC Int. **76**，765 (1993)
- 15 過酸化水素
M. Toyoda *et al.* : J. Agric. Food Chem. **30**，346 (1982)
宮本文夫ら：食品衛生学雑誌，**27**，362 (1986)
辻 澄子ら：食品衛生学雑誌，**28**，196，445 (1987)
- 16 亜塩素酸ナトリウム
鈴木 仁ら：食品衛生学雑誌，**38**，22 (1997)
- 22 アルギン酸及びアルギン酸ナトリウム
豊田正武ら：食品衛生学雑誌，**26**，189 (1985)
川崎洋子ら：食品衛生学雑誌，**39**，297 (1988)
- 24 亜硝酸ナトリウム
功刀 彰ら：食品衛生学雑誌，**24**，324 (1983)
辻 澄子ら：食品衛生学雑誌，**34**，161 (1993)
- 25 硝酸カリウム及び硝酸ナトリウム
功刀 彰ら：食品衛生学雑誌，**24**，324 (1983)
辻 澄子ら：食品衛生学雑誌，**34**，161 (1993)
- 28 食用赤色2号及びそのアルミニウムレーキ
桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278 (1986)
角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473 (1987)
- 29 食用赤色3号及びそのアルミニウムレーキ
桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278 (1986)
角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473 (1987)
- 31 食用赤色102号
桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278 (1986)
角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473 (1987)

32 食用赤色 104 号

桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278（1986）

角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473（1987）

33 食用赤色 105 号

桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278（1986）

角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473（1987）

34 食用赤色 106 号

桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278（1986）

角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473（1987）

35 食用黄色 4 号及びそのアルミニウムレーキ

桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278（1986）

角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473（1987）

36 食用黄色 5 号及びそのアルミニウムレーキ

桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278（1986）

角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473（1987）

37 食用緑色 3 号及びそのアルミニウムレーキ

桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278（1986）

角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473（1987）

38 食用青色 1 号及びそのアルミニウムレーキ

桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278（1986）

角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473（1987）

39 食用青色 2 号及びそのアルミニウムレーキ

桑野和民ら：食品衛生学雑誌，**27**，278（1986）

角田光淳ら：食品衛生学雑誌，**28**，473（1987）

41 銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム

牛山博文ら：食品衛生学雑誌，**27**，417（1986）

43 アスパルテーム

井部明広ら：食品衛生学雑誌，**26**，1（1985）

玉瀬喜久雄ら：食品衛生学雑誌，**26**，515（1985）

片岡洋行ら：食品衛生学雑誌，**28**，273（1987）

44 キシリトール

D. H. Daniels *et al.* : J. Assoc. Off. Anal Chem.
65, 588 (1982)

45 グリチルリチン酸二ナトリウム

松永明信ら：食品衛生学雑誌，**27**，408（1986）

46 サッカリン及びサッカリンナトリウム

松永明信ら：食品衛生学雑誌，**27**，408（1986）

47 D-ソルビトール

D. H. Daniels *et al.* : J. Assoc. Off. Anal Chem.
65, 588 (1982)

60 クエン酸及びその塩類

Wada A. *et al.* : J. Chromatography, **291**, 111
(1984)

田中 進ら：第 12 回 HPLC 研究談話会要旨集，
11（1985）

太田英明ら：日本食品工業学雑誌，**32**，811（1985）

61 グルコン酸及びその化合物

石田 裕ら：食品衛生学雑誌，**25**，198（1984）

62 コハク酸及びその塩類

Wada A. *et al.* : J. Chromatography, **291**, 111
(1984)

田中 進ら：第 12 回 HPLC 研究談話会要旨集，
11（1985）

太田英明ら：日本食品工業学雑誌，**32**，811（1985）

63 DL-酒石酸，L-酒石酸及びその塩類

Wada A. *et al.* : J. Chromatography, **291**, 111
(1984)

田中 進ら：第 12 回 HPLC 研究談話会要旨集，
11（1985）

太田英明ら：日本食品工業学雑誌，**32**，811（1985）

64 乳酸及びその塩類

Wada A. *et al.* : J. Chromatography, **291**, 111
(1984)

田中 進ら：第 12 回 HPLC 研究談話会要旨集，

- 11 (1985)
太田英明ら：日本食品工業学雑誌, **32**, 811(1985)
- 65 氷酢酸及び酢酸ナトリウム
Wada A. *et al.*: J. Chromatography, **291**, 111 (1984)
田中 進ら：第 12 回 HPLC 研究談話会要旨集, 11 (1985)
太田英明ら：日本食品工業学雑誌, **32**, 811(1985)
- 66 フマル酸及びフマル酸一ナトリウム
Wada A. *et al.*: J. Chromatography, **291**, 111 (1984)
田中 進ら：第 12 回 HPLC 研究談話会要旨集, 11 (1985)
太田英明ら：日本食品工業学雑誌, **32**, 811(1985)
- 67 DL-リンゴ酸及びDL-リンゴ酸ナトリウム
Wada A. *et al.*: J. Chromatography, **291**, 111 (1984)
田中 進ら：第 12 回 HPLC 研究談話会要旨集, 11 (1985)
太田英明ら：日本食品工業学雑誌, **32**, 811(1985)
- 83 L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸ナトリウム
酒巻千波ら：食品衛生学雑誌, **27**, 578 (1986)
- 97 臭素酸カリウム
日高利夫ら：食品衛生学雑誌, **24**, 376, 383(1983)
小山田則孝ら：食品衛生学雑誌, **24**, 563 (1983)
毛利孝明ら：食品衛生学雑誌, **26**, 260 (1985)
K. Himata *et al.*: Food Add. Contam. **14**, 809 (1997)
- 99 プロピレングリコール
山田利治ら：食品衛生学雑誌, **24**, 340 (1983)
三ツ橋幸正ら：食品衛生学雑誌, **26**, 290 (1985)
- 102 D-マンニトール
D. H. Daniels *et al.*: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **65**, 588 (1982)

- 103 リン酸及びその塩類, ピロリン酸塩類, ポリリン酸塩類及びメタリン酸塩類
一色賢司ら：食工誌, **32**, 216 (1985)
- 104 コウジ酸
真鍋 勝ら：日本醤油研究所雑誌, **10**, 146(1984)
真鍋 勝ら：日本醤油研究所雑誌, **14**, 183(1988)
西島 基弘ら：日本食品衛生学会 第 74 回学術講演会講演要旨集 (1997)
- 106 ノルジヒドログアヤレチック酸
Page *et al.*: J. AOAC Int. **76**, 765 (1993)
- 110 サイクラミン酸
中里光男ら：食品衛生学雑誌, **34**, 248 (1993)
- 113 TBHQ (tert-ブチルヒドロキノン)
Page *et al.*: J. AOAC Int. **76**, 765 (1993)

参照分析法

- 4 グリセリン脂肪酸エステル
中西 弘ら：食品衛生学雑誌, **24**, 474 (1983)
四方田千佳子ら：食品衛生学雑誌, **27**, 37(1986)
- 8 ショ糖脂肪酸エステル
四方田千佳子ら：食品衛生学雑誌, **27**, 37(1986)
- 11 セルロース及びデンプンのグリコール酸誘導体
四方田千佳子ら：食品衛生学雑誌, **25**, 505(1984)
- 12 ソルビタン脂肪酸エステル
四方田千佳子ら：食品衛生学雑誌, **27**, 37(1986)
- 16 プロピレングリコール脂肪酸エステル
四方田千佳子ら：食品衛生学雑誌, **27**, 37(1986)

Dear Mr. [Name],

I have your letter of the 15th inst. and am glad to hear that you are well. I am also well and hope this finds you the same. I have been thinking of you very much lately and wondering how you are getting on. I hope you are still as active as ever.

I have been very busy lately with my work, but I have managed to find some time to write to you. I have been thinking of you very much lately and wondering how you are getting on. I hope you are still as active as ever.

I have been thinking of you very much lately and wondering how you are getting on. I hope you are still as active as ever.

I have been thinking of you very much lately and wondering how you are getting on. I hope you are still as active as ever.

I have been thinking of you very much lately and wondering how you are getting on. I hope you are still as active as ever.

I have been thinking of you very much lately and wondering how you are getting on. I hope you are still as active as ever.

I have been thinking of you very much lately and wondering how you are getting on. I hope you are still as active as ever.

I have been thinking of you very much lately and wondering how you are getting on. I hope you are still as active as ever.