

薬生食基発 0624 第 2 号
薬生食監発 0624 第 2 号
令和 3 年 6 月 24 日

各 検疫所長 殿

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

「食品中の食品添加物分析法」の改正について

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

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

記

- 1 添加物分析法各条に別添 1 の「三二酸化鉄」の分析法を加える。また、参照分析法の「三二酸化鉄」を削除する。

- 2 添加物分析法各条の「ミョウバン類」の名称を「硫酸アルミニウムアンモニウム及び硫酸アルミニウムカリウム」に改めるとともに、「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」、「グルコン酸第一鉄」、「二酸化チタン」、「硫酸アルミニウムアンモニウム及び硫酸アルミニウムカリウム」、「過酸化ベンゾイル」及び「鉄化合物」の分析法について、別添2のとおり改める。
- 3 添加物分析法各条の「二酸化硫黄及び亜硫酸塩類」の対象とする添加物に「亜硫酸水素アンモニウム水」を加える。その他、別添3のとおり所要の改正を行う。また、主要な改正箇所を新旧対照表として別紙に示した。
- 4 本通知は、令和3年6月24日から適用すること。ただし、令和4年6月23日までの間は、なお従前の例によることができる。

着色料

三二酸化鉄

Iron Sesquioxide

別名：三酸化二鉄，ベンガラ

Fe_2O_3 : 159.69

1. 分析法の概要

食品中の三二酸化鉄は、原子吸光光度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¹⁾。(2021 年設定)

2. 分析法（原子吸光光度法）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

次のいずれかの方法²⁾により試験溶液を調製する。

① 湿式灰化法³⁾

試料約 10 g を精密に量り⁴⁾、250～500mL の分解フラスコ⁵⁾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、1-オクタノール 2～3 滴を加える。液が暗色になりはじめたら硝酸 2～3 mL 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、これを熱板上で蒸発乾固する。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、水を加えて正確に 100mL とし、試験溶液とする⁶⁾。

② 乾式灰化法⁷⁾

試料約 10 g を精密に量り⁴⁾、石英又は磁製るつぼに入れ、熱板等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℃⁸⁾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（1→2）2～5 mL を加えて潤し、乾燥⁹⁾した後、灰化を続ける。灰化不十分¹⁰⁾のときは硝酸（1→2）2～5 mL 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、水を加えて正確に 100mL とし、試験溶液とする⁶⁾。

また、①及び②のいずれの方法も、試料を用いずに同様に操作して、空試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製

鉄標準原液 1 mL 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、標準溶液とする（濃度 10µg/mL）。標準溶液 1、2、5、8 mL 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、検量線用標準溶液とする（濃度 1～10µg/mL）。

(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。

光源ランプ：鉄中空陰極ランプ

分析線波長：248.3nm¹¹⁾

バーナー：スリットバーナー

可燃性ガス：アセチレン

支燃性ガス：空気

② 検量線

検量線用標準溶液それぞれにつき、吸光度を測定し、検量線を作成する。

③ 定量¹²⁾

試験溶液及び空試験溶液につきその吸光度を測定し、両者の値の差を求め、その値と検量線から試験溶液中の鉄濃度（µg/mL）を求め、次式によって試料中の鉄含量（g/kg）を計算する。

$$\text{鉄含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の鉄濃度（µg/mL）

W：試料の採取量（g）

$$\text{三二酸化鉄含量 (g/kg)} = \text{鉄含量 (g/kg)} \times 1.430$$

④ 定量限界 鉄として 0.01 g/kg

試薬・試液等

1. 鉄標準原液¹³⁾：市販の原子吸光度分析に適した標準液（Fe：1000µg/mL）を用いる。
2. 硝酸：〔有害金属測定用〕
3. 硫酸：〔有害金属測定用〕
4. 1－オクタノール：〔特級〕
5. 塩酸：〔有害金属測定用〕

[注]

- 1) 本法は、着色料の三二酸化鉄を測定対象としているが、鉄強化剤（水溶性鉄：塩化第二鉄、クエン酸第一鉄ナトリウム、クエン酸鉄、クエン酸鉄アンモニウム、乳酸鉄、硫酸第一鉄、グルコン酸第一鉄。不溶性鉄：ピロリン酸第二鉄。有機鉄：ヘム鉄、フェリチン、ラクトフェリン）及び着色料の鉄クロロフィリンナトリウムも本法により鉄として測定される。
- 2) 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。
- 3) 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難い。
- 4) 試料の採取量を適宜減らしてもよい。ただし、十分な回収率等が得られることを確認できる場合に限る。
- 5) 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、又は硝酸（1→3）に一夜つけておく。
- 6) 試験溶液中の鉄濃度が検量線の範囲を超える場合は、塩酸（1→40）で適宜希釈する。
- 7) 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ので、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）を用いなくても行えるので、これら試薬からの汚染の危険が少ない。
- 8) 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。
- 9) 乾固直前に内容物が飛び散り易いので、水浴を用いる場合はよいが、熱板上で行うときは、高温になり過ぎないように注意する。
- 10) 不完全灰化によって残存する炭素は、鉄に対しての吸着力が大きいため、試料を完全に灰化することが必要である。
- 11) 他の元素の影響を受ける場合は、鉄の他の波長を用いても良い。
- 12) バナナ（果柄及び皮）及コンニャクに、三二酸化鉄を0.01 g/kg又は0.1 g/kg添加した時の回収率は、湿式灰化法では91～105%（相対標準偏差1.8～9.7%）、乾式灰化法では96～99%（相対標準偏差1.1～4.4%）（n=5の平均）であった。
- 13) 鉄1.00 gを量り、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、1000mLのメスフラスコに移し、水を加えて正確に1000mLとしたもの（濃度1000µg/mL）を用いてもよい。

酸化防止剤

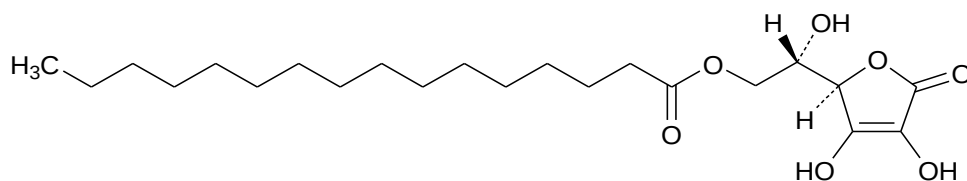
L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及び

L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル

L-Ascorbyl Palmitate and L-Ascorbic Stearate

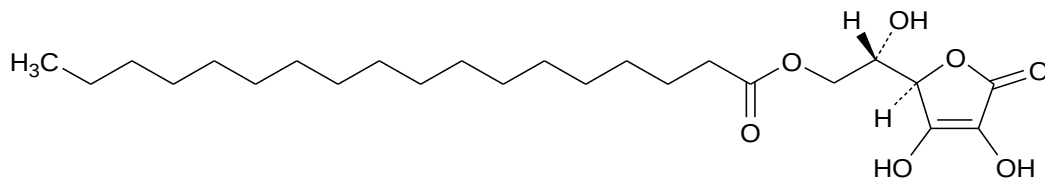
L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル

別名：ビタミンCパルミテート

 $C_{22}H_{38}O_7$: 414.53

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

 $C_{24}H_{42}O_7$: 442.59

1. 分析法の概要

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。(2021年改正)

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

試料¹⁾を細切又はすりつぶした後、その約5 gを50mLの遠心管に精密に量り、アスコルビン酸²⁾ 0.5 g及びエタノール20mLを加え、5分間振とう後、遠心（5分間、3000回転／分）し、上清を50mLのメスフラスコに入れる。沈殿物にエタノール15mLを加え、同様の操作を繰り返す。上清を先の上清と合わせ、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で洗浄した逆相固相抽出カラム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／0.05mol／L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・メタノール試液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（0.45μm）を用いてろ過し⁹⁾、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製¹⁰⁾

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0.0100 gを量り、1％アスコルビン酸・メタノール試液⁸⁾ 10mLを加え、メタノールを加えて溶かして正確に100mLとし、標準原液とする（各濃度100μg／mL）。

標準原液1、2.5mL及び5mLをそれぞれ正確に量り、1％アスコルビン酸・メタノール試液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、検量線用標準溶液とする（各濃度2～10μg／mL）。さらに、2μg／mLの検量線用標準溶液をそれぞれ1mL、2.5mL及び5mL正確に量り、1％アスコルビン酸・メタノール試液⁸⁾ 1mLをそれぞれに加え、メタノールを加えてそれぞれ正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする（各濃度0.2～1μg／mL）。

(4) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

紫外吸光光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹²⁾：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：35℃

移動相：メタノール／0.05mol／Lリン酸二水素ナトリウム緩衝液（pH2.0）混液（85：15）

流速：1.0mL／分

測定波長：254nm

注入量：20μL

② 検量線¹³⁾

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

③ 定量¹⁴⁾

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さと検量線によって試験溶液中のL-アスコルビン酸パルミチン酸エステル濃度 (μg/mL) 及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステル濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中の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。

総L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル含量 (g/kg)

$$= \frac{C_p \times 10 \times 50}{W \times 2} \times \frac{1}{1000}$$

総L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル含量 (g/kg)

$$= \frac{C_s \times 10 \times 50}{W \times 2} \times \frac{1}{1000}$$

C_p : 試験溶液中のL-アスコルビン酸パルミチン酸エステル濃度 (μg/mL)

C_s : 試験溶液中のL-アスコルビン酸ステアリン酸エステル濃度 (μg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.01 g/kg

試薬・試液等

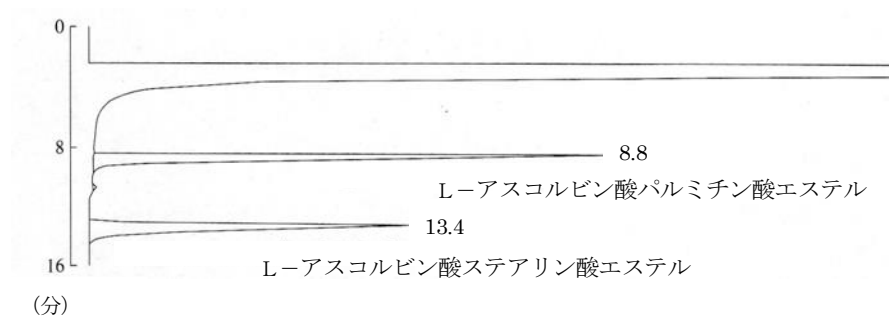
1. L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル : 市販品を用いる。
2. L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル : 市販品を用いる。
3. アスコルビン酸 : [特級]
4. エタノール : [特級]
5. 酢酸 : [特級]
6. 酢酸ナトリウム : [特級]
7. 0.05mol/L酢酸緩衝液 (pH4.0) : 0.05mol/L酢酸ナトリウム溶液に 0.05mol/L酢酸溶液を加え、pH4.0に調整する。
8. メタノール : [特級]
9. 逆相固相抽出カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム
10. DL-ホモシステイン : [特級]
11. 1%DL-ホモシステイン溶液 : DL-ホモシステイン 100mg を水 10mL に溶かす。
12. 1%アスコルビン酸・メタノール試液 : アスコルビン酸 1 g をとり、水 10mL に溶解し、メタノールを加えて 100mL とする。

13. リン酸二水素ナトリウム：[特級]
14. リン酸：[特級]
15. 0.05mol/L リン酸二水素ナトリウム緩衝液（pH2.0）：リン酸二水素ナトリウム 7.80 g
を水 900mL に溶かし、リン酸で pH を 2.0 に調整し、水を加えて 1000mL とする。

[注]

- 1) 液体試料の場合、そのまま約 5 g を遠心管にとる。
- 2) 抽出効率を上げるために加える。通常 0.5～1 g 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逆相固相抽出カラムへの保持力は、酸性側で強くなる傾向にあるため、溶液を逆相固相抽出カラムに通す前に、0.05mol/L 酢酸緩衝液（pH4.0）で酸性とする。
- 4) ガラス繊維ろ紙（粒子保持能：1.6μm）などが使用できる。
- 5) 夾雑物の少ないときは、この操作は省略できる。
- 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は、メタノール量 3mL でほぼ 100% 溶出する。
- 7) 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、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) 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分解を防ぐために加える。
- 9) 遠心して試験溶液を調製する方法もある。
- 10) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜調整してもよい。
- 11) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。
- 12) 分析の際は、被験物質のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 13) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 14) 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 1 に示す。検量線は 0.2～10μg/mL の範囲で直線関係がある。

なお、食用植物油、牛脂及びポテトチップスに、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル又はL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルを、0.02 g/kg 又は 1.5 g/kg 添加した時の回収率は 90～105%（n = 3）であった。また、食用植物油、ポテトチップス及び錠剤型食品に、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル又はL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルを、0.01 g/kg 又は 0.1 g/kg 添加した時の回収率は 76～100%（相対標準偏差 0.2～8.1%）（n = 5 の平均）であった。



<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル	流速：1.0mL／分
カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm	測定波長：254nm
カラム温度：35℃	注入量：20μL
移動相：メタノール／0.05mol／L リン酸二水素ナトリウム緩衝液 (pH2.0) 混液 (85 : 15)	

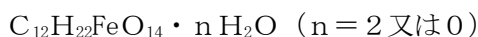
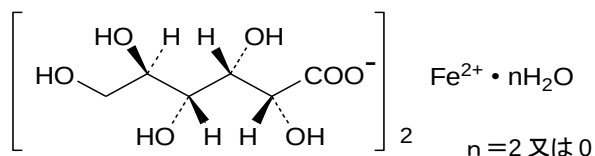
注図 1 L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸
ステアリン酸エステル混合液の液体クロマトグラム

色調安定剤

グルコン酸第一鉄

Ferrous Gluconate

別名：グルコン酸鉄



1. 分析法の概要

食品中のグルコン酸第一鉄は、原子吸光光度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、グルコン酸第一鉄の量として求める。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¹⁾。(2021 年改正)

2. 分析法（原子吸光光度法）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

次のいずれかの方法²⁾により試験溶液を調製する。

① 湿式灰化法³⁾

試料約 10 g を精密に量り⁴⁾、250～500mL の分解フラスコ⁵⁾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、1-オクタノール 2～3 滴を加える。液が暗色になりはじめたら硝酸 2～3 mL 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、これを熱板上で蒸発乾固する。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、水を加えて正確に 100mL とし、試験溶液とする⁶⁾。

② 乾式灰化法⁷⁾

試料約 10 g を精密に量り⁴⁾、石英又は磁製るつぼに入れ、熱板等のヒーター上で加熱乾燥⁸⁾、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℃⁹⁾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（1→2）2～5 mL を加えて潤し、乾燥¹⁰⁾した後、灰化を続ける。灰化不十分¹¹⁾のときは硝酸（1→2）2～5 mL 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）10 mL を加え、加温してかき混ぜ、水を用いて 100 mL のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 100 mL とし、試験溶液とする⁶⁾。

また、①及び②のいずれの方法も、試料を用いずに同様に操作して、空試験溶液とする。

（3）検量線用標準溶液の調製

鉄標準原液 1 mL を正確に量り、100 mL のメスフラスコに入れ、塩酸（1→40）を加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする（濃度 10 µg/mL）。標準溶液 1、2、5、8 mL 及び 10 mL 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 10 mL とし、検量線用標準溶液とする（濃度 1～10 µg/mL）。

（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。

光源ランプ：鉄中空陰極ランプ

分析線波長：248.3 nm¹²⁾

バーナー：スリットバーナー

可燃性ガス：アセチレン

支燃性ガス：空気

② 検量線

検量線用標準溶液それぞれにつき、吸光度を測定し、検量線を作成する。

③ 定量¹³⁾

試験溶液及び空試験溶液につきその吸光度を測定し、両者の値の差を求め、その値と検量線から試験溶液中の鉄濃度（µg/mL）を求め、次式によって試料中の鉄含量（g/kg）を計算する。

$$\text{鉄含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の鉄濃度（µg/mL）

W：試料の採取量（g）

$$\text{グルコン酸第一鉄含量 (g/kg)} = \text{鉄含量 (g/kg)} \times 7.989$$

④ 定量限界 鉄として 0.01 g/kg

試薬・試液等

1. 鉄標準原液¹⁴⁾：市販の原子吸光度分析に適した標準液（Fe：1000μg/mL）を用いる。
2. 硝酸：〔有害金属測定用〕
3. 硫酸：〔有害金属測定用〕
4. 1-オクタノール：〔特級〕
5. 塩酸：〔有害金属測定用〕

[注]

- 1) 本法は、グルコン酸第一鉄を測定対象としているが、鉄強化剤（水溶性鉄：塩化第二鉄、クエン酸第一鉄ナトリウム、クエン酸鉄、クエン酸鉄アンモニウム、乳酸鉄、硫酸第一鉄。不溶性鉄：ピロリン酸第二鉄。有機鉄：ヘム鉄、フェリチン、ラクトフェリン。）、着色料の三二酸化鉄及び鉄クロロフィリンナトリウムも本法により鉄として測定される。
- 2) 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。
- 3) 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難い。
- 4) 試料の量が多く灰化が困難な場合等は、試料の採取量を適宜減らしてもよい。ただし、十分な回収率等が得られることを確認できる場合に限る。
- 5) 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、又は硝酸（1→3）に一夜つけておく。
- 6) 試験溶液中の鉄濃度が検量線の範囲を超える場合は、塩酸（1→40）で適宜希釈する。
- 7) 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ので、比較的多数の試料を同時に操作でき、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）を用いなくても行えるので、これら試薬からの汚染の危険が少ない。
- 8) オリーブのように水分及び油を含むものは、不用意に加熱すると油が飛び散ることがあるため、まず水が蒸発する程度の温度で加熱し、その後温度を上げる。
- 9) 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。
- 10) 乾固直前に内容物が飛び散り易いので、水浴を用いる場合はよいが、熱板上で行うときは、高温になり過ぎないように注意する。

- 11) 不完全灰化によって残存する炭素は、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。
- 12) 他の元素の影響を受ける場合は、鉄の他の波長を用いても良い。
- 13) オリーブに、グルコン酸第一鉄を 0.01 g/kg 及び 0.16 g/kg 添加した時の回収率は、湿式灰化法ではそれぞれ 91%及び 105%（相対標準偏差 1.8%及び 9.7%）、乾式灰化法ではそれぞれ 91%及び 93%（相対標準偏差 1.3%及び 1.5%）（n = 5 の平均）であった。
- 14) 鉄 1.00 g を量り、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、1000mL のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 1000mL としたもの（濃度 1000µg/mL）を用いてもよい。

着色料

二酸化チタン

Titanium Dioxide

TiO₂ : 79.87

1. 分析法の概要

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ペルオキシチタン酸が呈する黄色を測定する比色法により定量する。(2021 年改正)

2. 分析法（比色法）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する¹⁾。

（2）試験溶液の調製

試料約 5 g を精密に量り、灰化容器²⁾に入れ、徐々に加熱して炭化させる³⁾。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⁴⁾。黒色の炭素粒が残っている場合は同じ条件で再灰化を行う⁵⁾。冷後、無水硫酸ナトリウム 0.75 g 及び硫酸 5 mL を加え、注意しながら徐々に加熱して残留物を完全に溶かす⁶⁾。冷後、灰化容器内の残留物を、あらかじめ水を約 10mL 入れた 50mL メスフラスコに徐々に加え⁷⁾、さらに灰化容器内を水約 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 50mL とし、試験溶液とする。また、試料を用いずに同様に操作して、空試験溶液とする。

（3）検量線用標準溶液の調製⁸⁾

チタン標準原液（濃度 1000µg/mL）10mL を正確に量り、100mL メスフラスコに入れ、硫酸（1→10）を加えて正確に 100mL とし、チタン標準溶液とする（濃度 100µg/mL）。チタン標準溶液 1.5、5、10 及び 15mL をそれぞれ正確に量り、硫酸（1→10）を加えてそれぞれ正確に 25mL とし、検量線用標準溶液とする（濃度 6～60µg/mL）。

（4）測定溶液の調製

検量線用標準溶液及び試験溶液⁹⁾を正確に 10mL ずつ量り、それぞれに、過酸化水素 0.2mL を加え、よく振り混ぜたのち、測定溶液とする¹⁰⁾。硫酸（1→10）10mL に過酸化水素 0.2mL を加え、よく振り混ぜた液を対照として、吸光度を測定する。

（5）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 検量線

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

③ 定量¹¹⁾

試験溶液及び空試験溶液につきその吸光度を測定し、両者の値の差を求め、その値と検量線から試験溶液中のチタン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式¹²⁾によって試料中の二酸化チタン濃度 (g/kg) を計算する。

$$\text{二酸化チタン含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 20} \times 1.669$$

C : 試験溶液中のチタン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.1 g/kg

試薬・試液等

1. チタン標準原液：市販の吸光度分析に適した標準液 (Ti : $1000\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いる。
2. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
3. 硫酸：[特級]
4. 過酸化水素：[特級]

[注]

- 1) 可能な限り細切して試料とする。
- 2) ふた付きの磁製のつぼ (50~100mL) が適当である^{文献 1)}。
- 3) 熱板や電熱器など 500℃程度まで加熱できるものを用いる。
- 4) 試料に応じ、灰化を十分に作る。一般に 550℃を超えると、無機成分のるつぼの上薬への吸着が大きくなるといわれている^{文献 2)}。
- 5) 灰化は完全に行う必要がある。炭化した試料が残ったまま続けないこと。炭化した試料が観察される場合は硫酸で潤し熱板上で加熱し硫酸を揮散させた後、あるいは炭化している部分をガラス棒でつぶした後に再度電気炉中で灰化するとよい。それでも灰化しきれないときは試料の採取量を必要に応じて減ずる^{文献 1、文献 2)}。試料によっては、白色の灰化物が得られないものがある。
- 6) 約 300℃で 30 分程度加熱すると、残留物を完全に溶かすことができる。フタをし、温度が下がらないように砂浴等を用いて加熱するとよい。
- 7) 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。
- 8) 市販の吸光度分析に適した二酸化チタンを用い、検量線用二酸化チタン標準溶液を作成

して定量に用いてもよい。その場合、検量線用二酸化チタン標準溶液は以下の方法により調製する。

二酸化チタン 10mg を正確に量り、灰化容器に入れ、無水硫酸ナトリウム 3 g 及び硫酸 10mL を加え、ふたをした後、注意しながら徐々に加熱して残留物を完全に溶かす⁶⁾。放冷後、ふたを開け、灰化容器内の内容物を、あらかじめ水を約 50mL 入れた 100mL メスフラスコに徐々に加え⁷⁾、さらに灰化容器内を水約 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、二酸化チタン標準原液とする（濃度 100 μ g/mL）。二酸化チタン標準原液 2.5、5、10 及び 20mL をそれぞれ正確に量り、硫酸（1→10）を加えてそれぞれ正確に 25mL とし、検量線用二酸化チタン標準溶液とする（濃度 10～80 μ g/mL）。

この場合、（5）③定量法の項では、試験溶液の測定溶液の吸光度を測定し、二酸化チタン検量線から試験溶液中の二酸化チタン濃度（ μ g/mL）を求め、次式によって試料中の二酸化チタン濃度（g/kg）を計算する。

$$\text{二酸化チタン含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 20}$$

C：試験溶液中の二酸化チタン濃度（ μ g/mL）

W：試料の採取量（g）

なお、チタン標準原液から調製した検量線用標準溶液を用い、検量線用二酸化チタン標準溶液を評価したところ、理論値の $\pm 0.2 \mu$ g/mL の範囲内であった。

- 9) 試験溶液が着色している場合は、ろ紙（5種Bのろ紙もしくは同等品）でろ過してから用いる。
- 10) 測定溶液が検量線の範囲を超えた場合は、試験溶液を硫酸（1→10）で希釈した液を試験溶液とし、測定溶液を調製する。
- 11) ホワイトチョコレート、グミ、クリームサンドビスケット、マシュマロ及びチーズに、二酸化チタンを、0.1 g/kg 又は 1 g/kg 添加した時の回収率は 98～115%（n = 5 の平均）であった。また、マシュマロ、ホワイトチョコレート及びチーズに、二酸化チタンを、0.1 g/kg 又は 0.5 g/kg 添加した時の回収率は 91～106%（相対標準偏差 0.1～0.8%）（n = 5 の平均）であった。
- 12) 式中の係数 1.669 は、二酸化チタンの分子量 79.867 / チタンの原子量 47.867 を示す。

[文献]

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編、211-214（2003）、(社)日本食品衛生協会
- 2) 谷村顕雄ら監修：食品中の食品添加物分析法解説書、327-332（1989）、(株)講談社

参考

二酸化チタン確認分析法

1. 分析法の概要

食品中の二酸化チタンは、誘導結合プラズマ発光分光分析法又は蛍光X線分析法により確認を行う。(2021年設定)

2. 分析法

分析法A (誘導結合プラズマ (ICP) 発光分光分析法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

二酸化チタン分析法の(2)試験溶液の調製を準用する。

(3) 定性用標準溶液及び検量線用標準溶液の調製¹⁾

二酸化チタン分析法の(3)検量線用標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度(6 µg/mL等)の定性用標準溶液及び検量線用標準溶液(濃度6～60 µg/mL)を調製する。

(4) 測定法

① 測定条件²⁾

ICP発光分光分析装置を用い、原子発光スペクトルを分析し、次の条件によってチタンの発光強度を測定する。

測定波長：334.94nm、336.12nm又は337.28nm³⁾

② 定性

試験溶液及び定性用標準溶液を測定し、定性用標準溶液で検出される原子発光スペクトル線(334.94nm、336.12nm及び337.28nm)が、試験溶液で検出されることを確認する。

③ 定量

二酸化チタン分析法により試料から検出された場合、その定量値の確認のため、必要に応じて定量を行う。試験溶液及び空試験溶液につきチタンの発光強度を測定し、両者の値の差を求め、その値と検量線から試験溶液中のチタン濃度(µg/mL)を求め、二酸化チタン分析法の2.(5)③定量の項の式によって試料中の二酸化チタン濃度(g/kg)を計算する⁴⁾。

分析法B (蛍光X線分析法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

二酸化チタン分析法の(2) 試験溶液の調製を準用する。

(3) 標準溶液の調製¹⁾

二酸化チタン分析法の(3) 検量線用標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度(6 µg/mL等)の標準溶液を調製する。

(4) 測定法

① 測定条件²⁾

試験溶液及び標準溶液を、それぞれポリプロピレンを張った試料容器に入れ⁵⁾、蛍光X線分析装置を用い、大気雰囲気下で測定する。

② 定性

試験溶液及び標準溶液を測定し、標準溶液で検出されるTi K α (4.51keV) 及びTi K β (4.90keV) の両方あるいはTi K α が、試験溶液において検出されること及びその強度を確認する。

[注]

1) 市販の二酸化チタンを用い、検量線用二酸化チタン標準溶液を作成して用いてもよい。
その場合、二酸化チタン分析法の注8)を参照すること。

また、必要な場合は、検量線用標準溶液を適宜希釈し、定量に適した濃度の検量線用標準液を調製し、直線性が確認できる範囲で、適宜、検量線用標準溶液の濃度及び数を調製してもよい。

2) 測定条件は、各測定機器に従い、チタンの測定に最適な条件に設定する。

＜分析法Aの測定条件例＞

高周波出力：1.2～1.5kW

プラズマガス流量：16 L／分

補助ガス流量：0.5 L／分

キャリアーガス流量：1.0 L／分

3) 発光強度、バックグラウンド強度のほか、選択性、ピーク形状及び相対標準偏差を考慮して測定波長を設定する。

4) 試験溶液中の他の元素の影響を受ける場合は、内標準元素を用いて補正を行っても良い。

5) 他に、ろ紙に試験溶液を浸み込ませて測定する方法もある。

膨張剤

硫酸アルミニウムアンモニウム及び硫酸アルミニウムカリウム

Aluminium Ammonium Sulfate and Aluminium Potassium Sulfate

硫酸アルミニウムアンモニウム

Aluminium Ammonium Sulfate

別名：結晶物 アンモニウムミョウバン

乾燥物：焼アンモニウムミョウバン

$\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$

($n=12、10、4、3、2$ 又は 0)

$[\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 : 237.15]$

硫酸アルミニウムカリウム

Aluminium Potassium Sulfate

別名：結晶物 カリミョウバン, ミョウバン

乾燥物 焼ミョウバン

$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$

($n=12、10、6、3、2$ 又は 0)

$[\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 : 258.21]$

1. 分析法の概要¹⁾

食品中の硫酸アルミニウムアンモニウム及び硫酸アルミニウムカリウムはマイクロ波分解装置により酸分解した後、誘導結合プラズマ（ICP）発光分光分析法によりアルミニウムとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて、硫酸アルミニウムアンモニウム又は硫酸アルミニウムカリウムの量として求める。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の合計値である。（2021 年改正）

2. 分析法（ICP発光分光分析法）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製²⁾

試料約 0.5 g を精密に量り、マイクロ波分解装置用分解容器に入れ、硝酸 4 mL を加える。硝酸を添加した直後に激しい反応（発泡、発煙等）が確認された場合は、反応が落ち着くまでしばらく放置する。次に水 4 mL を加え、マイクロ波分解装置³⁾により酸分解処理を行う。得られた分解液は水を用いて定量的に 50 mL のメスフラスコ⁴⁾に移し、水を加えて正確に 50 mL としたものをメンブランフィルター（0.45 μm）でろ過し、試験溶液とする⁵⁾。

（3）検量線用標準溶液の調製⁶⁾

アルミニウム標準原液 0.5 mL を正確に量り、硝酸（2→25）を加えて正確に 50 mL とする（濃度 10 μg/mL）。さらに、この液 0.5、5、25 及び 50 mL をそれぞれ正確に量り、硝酸（2→25）を加えてそれぞれ正確に 50 mL とし、検量線用標準溶液とする（濃度 0.1～10 μg/mL）。

(4) 空試験溶液の調製²⁾

水 0.5 g を用い、(2) 試験溶液の調製と同様に操作し、空試験溶液とする。

(5) 測定法

① 測定条件⁷⁾

I C P 発光分光分析装置を用い、次の条件によってアルミニウムの発光強度を測定する。

測定波長：396.15nm⁸⁾

② 検量線

検量線用標準溶液につき、その発光強度を測定し、その値から検量線を作成する。

③ 定量⁹⁾

試験溶液及び空試験溶液につきその発光強度を測定し、両者の値の差を求め、その値と検量線から試験溶液中のアルミニウム濃度 (µg/mL) を求め、次式によって試料中のアルミニウム含量 (g/kg) を計算する¹⁰⁾。

$$\text{アルミニウム含量 (g/kg)} = \frac{A \times 50}{W \times 1000}$$

A：試験溶液中のアルミニウム濃度 (µg/mL)

W：試料採取量 (g)

硫酸アルミニウムアンモニウム含量¹¹⁾ (g/kg)

= アルミニウム含量 (g/kg) × 16.80

硫酸アルミニウムカリウム含量¹¹⁾ (g/kg) = アルミニウム含量 (g/kg) × 17.58

④ 定量限界 アルミニウムとして 0.01 g/kg

試薬・試液等

1. アルミニウム標準原液：市販の I C P 発光分光分析に適した標準液（濃度 1000µg/mL）を用いる。
2. 硝酸：[J I S K8541、特級]（含有量 69～70%、比重：1.42）を用いる。

[注]

- 1) 本法は食品中の硫酸アルミニウムアンモニウム及び硫酸アルミニウムカリウム（ミョウバン類、それぞれ、アンモニウムミョウバン及びカリミョウバンとも呼ばれる）を、I C P 発光分光分析法を用いてアルミニウムとして定量する方法である^{文献1、文献2)}。
- 2) 適切な乾式灰化法又は湿式灰化法で調製してもよい。ただし、予め十分な添加回収率や精度が得られることを確認する。また、試験溶液量に対する試料採取量が、本分析法と異

なる場合は、定量限界も異なる点に留意する。

- 3) 分解条件は各機器メーカーのアプリケーションに従う。
- 4) 試験に用いる器具は、すべて使用前に硝酸（1→20）に浸漬して加温するか、または硝酸（1→20）に一夜つけておく。
- 5) 試験溶液中のアルミニウム濃度が高く、検量線の範囲を超える場合は、試験溶液を硝酸（2→25）で適宜希釈して定量をやり直し、計算式に希釈倍率を乗じて含量を求める。
- 6) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜調整してもよい。
- 7) 測定条件は、各測定機器に従い、アルミニウムの測定に最適な条件に設定する。
- 8) 測定波長は、JECFAでアルミニウムの分析に用いられており文献³⁾、309.3nmより感度が良いとされる396.15nmを用いる。ただし、他の元素の影響を受ける場合は、アルミニウムの他の波長を用いても良い。
- 9) 本法の添加回収試験結果を注表1に示す。

注表1 アルミニウムの各種食品での添加回収率（%）文献²⁾（n = 2 × 5日間）

食品	採取量 (g)	添加量 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
ホットケーキミックス	0.5	0.02	98	7.3	9.7
漬物	0.5	0.05	93	4.1	5.8
うに	0.5	0.2	104	3.9	4.8

また、漬物、クッキー及び味噌に、硫酸アルミニウムアンモニウム又は硫酸アルミニウムカリウムを、0.01 g/kg 又は 0.1 g/kg 添加した時の回収率は 93～101%（相対標準偏差（RSD）0.4～3.6%）（n = 5 の平均）であった。

- 10) 試験溶液中の他の元素の影響を受ける場合は、内標準元素を用いて補正を行っても良い。
- 11) 硫酸アルミニウムアンモニウム及び硫酸アルミニウムカリウムの無水物相当の含量

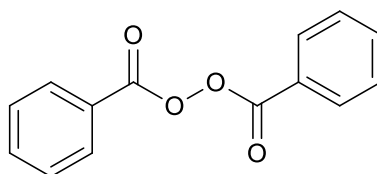
[文献]

- 1) 荻本真美ら：食衛誌, **53**, 57 (2012)
- 2) Ogimoto, M., *et al.* : Food Additives and Contaminants : Part B, **9**, 185 (2016), Taylor & Francis
- 3) JECFA : JECFA Monographs, **14**, Potassium Aluminium silicate-based pearlescent Pigments, Type III (2013)

小麦粉改良剤

過酸化ベンゾイル

Benzoyl Peroxide



$C_{14}H_{10}O_4$: 242.23

1. 分析法の概要

小麦粉、小麦粉製品及びはるさめ中の過酸化ベンゾイルは、アセトニトリルで抽出後、液体クロマトグラフィーで定量する¹⁾。(2004年改正、2021年改正)

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製²⁾

粉末試料はそのまま、固形試料は粉碎後、約 10 g を精密に量り、アセトニトリル 50 mL を正確に加え、マグネチックスターラーで 15 分間かくはんする。この液をメンブランフィルター（0.45 μm）に通し、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製³⁾

過酸化ベンゾイルとして 約 0.25 g に相当する水添加過酸化ベンゾイル^{4, 5)}を精密に量り、アセトニトリルを加えて溶かして正確に 50 mL とする。その 1 mL を正確に量り、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL としたものを標準溶液とする（濃度 25 μg/mL）。標準溶液 1、4、40 及び 100 mL を正確に量り、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に 100 mL とし、0.25、1、10 及び 25 μg/mL の検量線用標準溶液とする。1 μg/mL の検量線用標準溶液 1 mL を正確に量り、アセトニトリルで正確に 25 mL とし、0.04 μg/mL の検量線用標準溶液とする。（濃度 0.04～25 μg/mL）。

(4) 測定法

① 測定条件⁶⁾

紫外可視吸光光度検出器付高速液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル／水混液（55：45）

流速：1.0mL／分

測定波長：235nm

注入量：20μL

② 検量線⁷⁾

検量線用標準溶液それぞれ 20μL ずつを高速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⁸⁾

試験溶液を高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線から試験溶液中の過酸化ベンゾイル濃度（μg／mL）を求め、次式によって試料中の過酸化ベンゾイル含量（g／kg）を計算する。

$$\text{過酸化ベンゾイル含量 (g/kg)} = \frac{C \times 50}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の過酸化ベンゾイル濃度（μg／mL）

W：試料の採取量（g）

④ 定量限界 0.0002 g／kg

試薬・試液等

1. 水添加過酸化ベンゾイル：市販品を用いる。以下の方法に従って、あらかじめ滴定により過酸化ベンゾイル含量を求めておく⁵⁾。

水添加過酸化ベンゾイル約0.25 gを精密に量り、共栓フラスコに入れ、アセトン 15mLを加えて振り混ぜる。この液にヨウ化カリウム溶液（1→2）3 mLを加え、直ちに密栓し、1分間振り混ぜる。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。

$$\text{過酸化ベンゾイル含量 (\%)} = (V \times 12.11 \times F \times 100) / (W \times 1000)$$

V：0.1mol／Lチオ硫酸ナトリウム溶液の消費量（mL）

F：0.1mol／Lチオ硫酸ナトリウム溶液のファクター

W：水添加過酸化ベンゾイルの採取量（g）

2. アセトン：[特級]
3. ヨウ化カリウム：[特級]
4. 0.1mol／Lチオ硫酸ナトリウム溶液：市販品を用いる。
5. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 過酸化ベンゾイルは、小麦粉以外の食品には使用が認められていないが、2004 年（平成 16 年）にはるさめに使用違反があったことから、はるさめも対象食品とした。
- 2) 試料によっては、アセトニトリルを加えた後、かくはんする代わりにホモジナイズし、ろ過又は遠心した後、そのろ液又は上清をメンブランフィルター（0.45μm）に通したものを試験溶液とする。
- 3) 試料中の濃度に合わせ、用いる検量線用標準溶液の濃度範囲を、直線性が確認できるよう、適宜調整する。
- 4) 過酸化ベンゾイルは爆発の危険性があるため、食品添加物としては、過酸化ベンゾイルをミョウバン、リン酸カルシウム塩類、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム及びデンプンのうちの一種以上で約 20%に希釈した希釈過酸化ベンゾイルを用いることとされている。そこで、標準品は市販の試薬として入手可能な水添加過酸化ベンゾイルを使用する。過酸化ベンゾイルは 60℃以上、あるいは還元性物質の共存で爆発する危険性があるので、もとの容器内に保存し、状態が変化しないように取り扱うように注意する。
- 5) 水添加過酸化ベンゾイルは、25%程度の水を含んでいるため、過酸化ベンゾイル含量をあらかじめ滴定により定める必要がある。
0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液 1 mL = 12.11mg 過酸化ベンゾイル ($C_{14}H_{10}O_4$)
- 6) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。
- 7) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 8) 本法による小麦粉及び乾製品における添加回収率は 97.1～99.4%^{文献 1)}であった。また、小麦粉、パン粉、はるさめ、うどん（乾麺）及びたこ焼き粉に、水添加過酸化ベンゾイルのアセトニトリル溶液を、過酸化ベンゾイルとして 0.0002 g/kg、0.002 g/kg 又は 0.066 g/kg 添加した時の回収率は 89～107%（相対標準偏差 0.3～6.0%）（n = 5 の平均）であった。

[文献]

- 1) Abe-Ohnishi, Y., *et al.* : J. Chromatogr. A, **1040**, 209 (2004)

参考

過酸化ベンゾイル確認分析法

1. 分析法の概要

食品中の過酸化ベンゾイルは、液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う。(2021年設定)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー質量分析)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

過酸化ベンゾイル(2)試験溶液の調製を準用する。

(3) 定性用標準溶液及び検量線用標準溶液の調製

過酸化ベンゾイル分析法(3)検量線用標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度の定性用標準溶液(1 µg/mL等)及び検量線用標準溶液(濃度0.04～1 µg/mL)を調製する¹⁾。

(4) 測定法

① 測定条件^{2、3)}

液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 2.0mm、長さ 150mm

カラム温度：40℃

移動相：5 mmol/L ギ酸アンモニウム含有 75vol%メタノール

流速：0.3mL/分

イオン化モード：ESI (+)

検出法：スキャン (m/z 50～300)、

選択イオン検出(SIM)(モニターイオン： m/z 260⁴⁾)

注入量：3 µL

② 定性^{5、6)}

試験溶液及び定性用標準溶液をLC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、定性用標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されること、このピークのスキャン検出で得られるマスペクトルの主なイオンの m/z が定性用標準溶液の主ピークのそれと一致することを確認する。

③ 定量^{7, 8)}

過酸化ベンゾイル分析法により試料から検出された場合、その定量値の確認のため、必要に応じて定量を行う。試験溶液をLC-MSに注入し、SIMで得られたピーク面積と検量線から試験溶液中の過酸化ベンゾイル濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、過酸化ベンゾイル分析法の2. (4)

③定量の項の式によって試料中の過酸化ベンゾイル含量 (g/kg) を計算する。

試薬・試液等

1. 過酸化ベンゾイル分析法の試薬・試液等を準用する。
2. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
3. ギ酸アンモニウム：[特級]
4. $5\text{ mmol}/\text{L}$ ギ酸アンモニウム含有 75 vol%メタノール: ギ酸アンモニウム 0.16 g を量り、水 125mL 及びメタノール 375mL を加えて溶解する。

[注]

- 1) 必要な場合は、検量線用標準溶液を適宜希釈し、定量に適した濃度の検量線用標準液を調製し、直線性が確認できる範囲で、適宜、検量線用標準溶液の濃度及び数を調製してもよい。
- 2) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。分析の際は、過酸化ベンゾイルのピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 3) その他の測定条件は各測定機器に従い、定性用標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 4) 測定により適した過酸化ベンゾイル由来のイオンが検出された場合は、そのイオン (m/z) をモニターイオンとしてもよい。移動相に 75vol%メタノールを用いた場合には、過酸化ベンゾイルのナトリウム付加イオン m/z 265 が確認されている。
- 5) LC-MSを用いて確認を行う場合、食品中の夾雑物の影響により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークの検出感度やマスペクトルの変化について確認する。
- 6) スキャン測定により、過酸化ベンゾイルのアンモニウム付加イオン m/z 260 を確認することができる。バックグラウンドが高い場合は補正する。
- 7) 小麦粉、はるさめ、うどん（乾麺）及びたこ焼き粉に、水添加過酸化ベンゾイルのアセトニトリル溶液を、過酸化ベンゾイルとして $0.0002\text{ g}/\text{kg}$ 又は $0.002\text{ g}/\text{kg}$ 添加した時の回収率は 89～102%（相対標準偏差 0.8～3.3%）（ $n=5$ の平均）であった。
- 8) 液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いる確認分析法が報告されている^{文献1)}。

[文献]

- 1) 米田正樹ら：平成16年度奈良県保健環境センター年報、**39**、81（2005）

強化剤等

鉄化合物

Iron Compounds

塩化第二鉄

Ferric Chloride

$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

(FeCl_3 : 162.20)

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

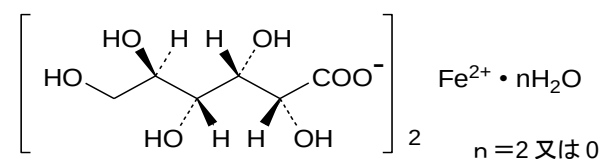
クエン酸鉄アンモニウム

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)

($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{FeO}_{14}$: 446.14)

乳酸鉄

Iron Lactate

($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{FeO}_6$: 233.99)

ピロリン酸第二鉄

Ferric Pyrophosphate

$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$: 745.21

硫酸第一鉄

Ferrous Sulfate

$\text{FeSO}_4 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ ($n = 7$ 又は $1 \sim 1.5$)

(FeSO_4 : 151.91)

三酸化鉄¹⁾

Iron Sesquioxide

別名：三酸化二鉄、ベンガラ

鉄クロロフィリンナトリウム¹⁾

Sodium Iron Chlorophyllin

1. 分析法の概要

食品中の鉄化合物は、原子吸光光度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¹⁾。(2021年改正)

2. 分析法(原子吸光光度法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

次のいずれかの方法²⁾により試験溶液を調製する。

① 湿式灰化法³⁾

試料約10gを精密に量り⁴⁾、250～500mLの分解フラスコ⁵⁾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、1-オクタノール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、これを熱板上で蒸発乾固する。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、水を加えて正確に100mLとし、試験溶液とする⁶⁾。

② 乾式灰化法⁷⁾

試料約10gを精密に量り⁴⁾、石英又は磁製るつぼに入れ、熱板等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℃⁸⁾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(1→2)2～5mLを加えて潤し、乾燥⁹⁾した後、灰化を続ける。灰化不十分¹⁰⁾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、水を加えて正確に100mLとし、試験溶液とする⁶⁾。

また、①及び②のいずれの方法も、試料を用いずに同様に操作して、空試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製

鉄標準原液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、標準溶液とする(濃度10μg/mL)。標準溶液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、検量線用標準溶液とする(濃度1～10μg/mL)。

(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。

光源ランプ：鉄中空陰極ランプ

分析線波長：248.3nm¹¹⁾

バーナー：スリットバーナー

可燃性ガス：アセチレン

支燃性ガス：空気

② 検量線

検量線用標準溶液それぞれにつき、吸光度を測定し、検量線を作成する。

③ 定量¹²⁾

試験溶液及び空試験溶液につきその吸光度を測定し、両者の値の差を求め、その値と検量線から試験溶液中の鉄濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中の鉄含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{鉄含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の鉄濃度 (μg/mL)

W：試料の採取量 (g)

塩化第二鉄含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) × 2.904

グルコン酸第一鉄含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) × 7.989

乳酸鉄含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) × 4.190

ピロリン酸第二鉄含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) × 3.336

硫酸第一鉄含量 (g/kg) = 鉄含量 (g/kg) × 2.720

④ 定量限界 鉄として 0.01 g/kg

試薬・試液等

1. 鉄標準原液¹³⁾：市販の原子吸光度分析に適した標準液 (Fe：1000μg/mL) を用いる。
2. 硝酸：[有害金属測定用]
3. 硫酸：[有害金属測定用]
4. 1-オクタノール：[特級]
5. 塩酸：[有害金属測定用]

[注]

- 1) 本法は、鉄強化剤（水溶性鉄：塩化第二鉄、クエン酸第一鉄ナトリウム、クエン酸鉄、クエン酸鉄アンモニウム、乳酸鉄、硫酸第一鉄、グルコン酸第一鉄。不溶性鉄：ピロリン酸第二鉄。有機鉄：ヘム鉄、フェリチン、ラクトフェリン。）を測定対象としているが、着色料の三二酸化鉄及び鉄クロロフィリンナトリウムも本法により鉄として測定される。
- 2) 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。
- 3) 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難い。
- 4) 試料の量が多く灰化が困難な場合等は、試料の採取量を適宜減らしてもよい。ただし、十分な回収率等が得られることを確認できる場合に限る。
- 5) 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、又は硝酸（1→3）に一夜つけておく。
- 6) 試験溶液中の鉄濃度が検量線の範囲を超える場合は、塩酸（1→40）で適宜希釈する。
- 7) 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ので、比較的多数の試料を同時に操作でき、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）を用いなくても行えるので、これら試薬からの汚染の危険が少ない。
- 8) 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。
- 9) 乾固直前に内容物が飛び散り易いので、水浴を用いる場合はよいが、熱板上で行うときは、高温になり過ぎないように注意する。
- 10) 不完全灰化によって残存する炭素は、鉄に対しての吸着力が大きいため、試料を完全に灰化することが必要である。
- 11) 他の元素の影響を受ける場合は、鉄の他の波長を用いても良い。
- 12) サプリメント、母乳代替食品又は離乳食に、塩化第二鉄、グルコン酸第一鉄又はピロリン酸第二鉄を 0.01 g/kg 又は 0.1 g/kg 添加した時の回収率は、湿式灰化法では 77～106%（相対標準偏差 0.7～7.5%）、乾式灰化法では 83～110%（相対標準偏差 0.5～3.2%）（n = 5 の平均）であった。
- 13) 鉄 1.00 g を量り、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、1000mL のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 1000mL としたもの（濃度 1000µg/mL）を用いてもよい。

保存料

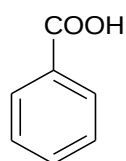
安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類

並びにデヒドロ酢酸ナトリウム

Benzoic Acid, Sorbic Acid, Dehydroacetic Acid and Those Salts

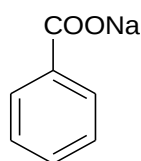
安息香酸

Benzoic Acid

 $C_7H_6O_2 : 122.12$

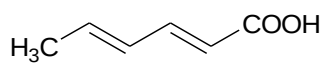
安息香酸ナトリウム

Sodium Benzoate

 $C_7H_5NaO_2 : 144.10$

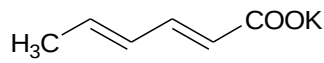
ソルビン酸

Sorbic Acid

 $C_6H_8O_2 : 112.13$

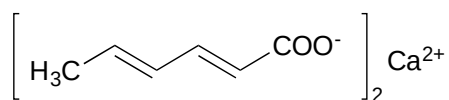
ソルビン酸カリウム

Potassium Sorbate

 $C_6H_7KO_2 : 150.22$

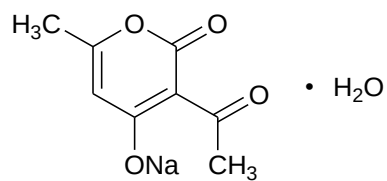
ソルビン酸カルシウム

Calcium Sorbate

 $C_{12}H_{14}CaO_4 : 262.32$

デヒドロ酢酸ナトリウム

Sodium Dehydroacetate

 $C_8H_7NaO_4 \cdot H_2O$ $(C_8H_7NaO_4 : 190.13)$

1. 分析法の概要

食品中の安息香酸、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム及びデヒドロ酢酸ナトリウム¹⁾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、ソルビン酸又はデヒドロ酢酸として定量する²⁾。必要があれば、分子量比を乗じて安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム又はデヒドロ酢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安息香酸と添加されたものの合計値である³⁾。

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸を特定する必要がある場合には、参考に示す分析法を用いることができる。(2010年改正、2019年統合法設定)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

試料を細切又はすりつぶした後、その約5 g^{4,5)}を精密に量り、500～1000mLの丸底フラスコに入れる。これに水 100mL、酒石酸溶液(15→100) 10mL⁶⁾、塩化ナトリウム 60 gを加え、毎分約10mLの留出速度で水蒸気蒸留を行う。留液が480～490mLになったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に500mLとし、この留液を試験溶液とする⁷⁾。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁸⁾

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸各 0.100 gを量り、それぞれメタノールを加えて溶かして正確に100mLとする。これらの液1 mLずつを正確にとり、水を加えて正確に100mLとし、標準溶液とする(濃度 各10µg/mL)。標準溶液1 mLを正確にとり、水を加えて正確に100mLとし、また、標準溶液1、2、5 mL及び10 mLを正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする(濃度 各0.1～10µg/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件⁹⁾

紫外可視吸光光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹⁰⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管¹¹⁾：内径4.6mm、長さ50～250mm

カラム温度：40℃

移動相¹²⁾：5 mmol/Lクエン酸緩衝液(pH4.0) / アセトニトリル / メタノール混液
(7 : 2 : 1)

流速：1.0mL／分

測定波長：230nm^{13,14)}

注入量：20μL

② 検量線¹⁵⁾

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

③ 定量¹⁶⁾

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線によって試験溶液中の安息香酸、ソルビン酸又はデヒドロ酢酸濃度（μg／mL）を求め、次式によって試料中の安息香酸、ソルビン酸又はデヒドロ酢酸含量（g／kg）を計算する。

$$\text{安息香酸、ソルビン酸又はデヒドロ酢酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times V}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の安息香酸等の濃度（μg／mL）

V：試験溶液の量（mL）

W：試料の採取量（g）

安息香酸ナトリウム含量（g／kg）＝ 安息香酸含量（g／kg）×1.180

ソルビン酸カリウム含量（g／kg）＝ ソルビン酸含量（g／kg）×1.340

ソルビン酸カルシウム含量（g／kg）＝ ソルビン酸含量（g／kg）×1.170

デヒドロ酢酸ナトリウム含量（g／kg）＝ デヒドロ酢酸含量（g／kg）×1.131

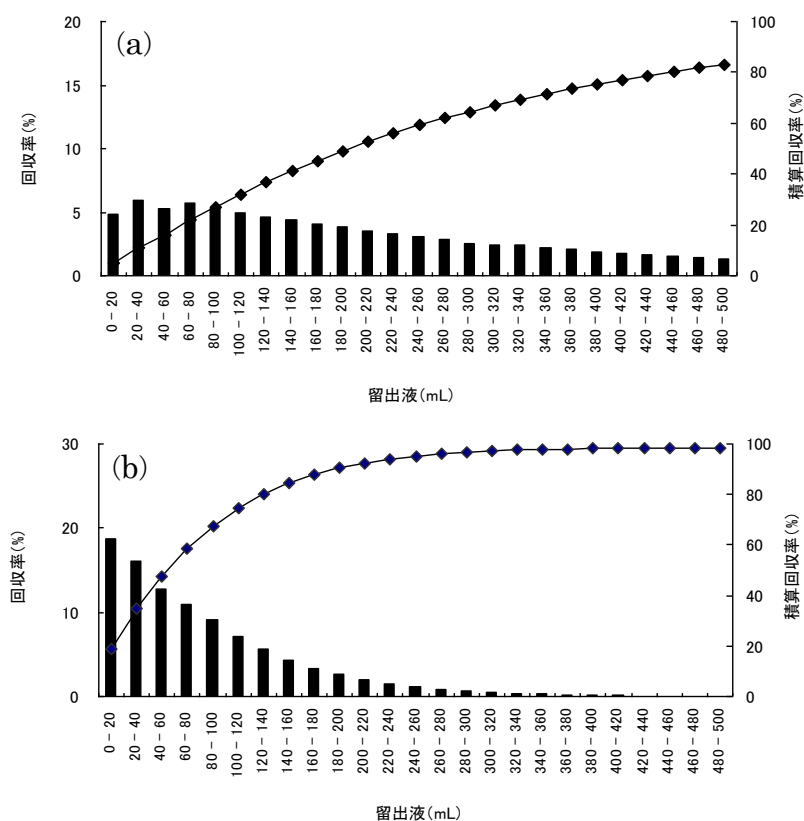
④ 定量限界 安息香酸、ソルビン酸又はデヒドロ酢酸として 0.01 g／kg

試薬・試液

1. 安息香酸：〔特級〕
2. ソルビン酸：市販品を用いる。
3. デヒドロ酢酸：市販品を用いる。
4. 酒石酸：〔特級〕
5. 塩化ナトリウム：〔特級〕又は〔日局〕
6. メタノール：〔高速液体クロマトグラフィー用〕
7. クエン酸一水和物：〔特級〕
8. クエン酸三ナトリウム二水和物：〔特級〕
9. 5mmol／Lクエン酸緩衝液（pH4.0）：クエン酸一水和物 7.0g及び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 1000mL とする。これを用時水で 10 倍に希釈して調製する。
10. アセトニトリル：〔高速液体クロマトグラフィー用〕

[注]

- 1) デヒドロ酢酸は、平成3年に食品添加物から削除された。
- 2) パラオキシ安息香酸エステル類も同一の留液で分析可能である（パラオキシ安息香酸エステル類分析法参照）。ただし、パラオキシ安息香酸エステル類は、水にやや溶解しにくい
ため、注意が必要である。
- 3) 天然由来の安息香酸が検出される食品は、クランベリー、バラ科の果実、香辛料及び発
酵乳製品等 (<http://www.nihs.go.jp/dfa/food-db/food-index.html>) である^{文献1)}。発酵乳
製品では微生物による馬尿酸の分解により安息香酸が生成される。一方、過酸化ベンゾイ
ルが使用された小麦粉から作られた食品では、過酸化ベンゾイルが分解して安息香酸とし
て検出される場合がある。
- 4) 装置の感度が不十分な場合は、試料採取量を増やしてもよい。固形試料 50 g の場合は、
水が足りないので、水を 100~200mL とし、飽和となるよう塩化ナトリウムを 60~80 g に
変更する。さらに、混和後、酸性であることを確認する。ただし、高タンパク、高脂肪の
食品では、試料採取量が多いと十分な回収率が得られないことがある。マーガリンにおい
て試料採取量が 50 g と 5 g の場合の留出パターンを注図 1 に示す。



試料：マーガリン（安息香酸 0.5 g / kg 添加）

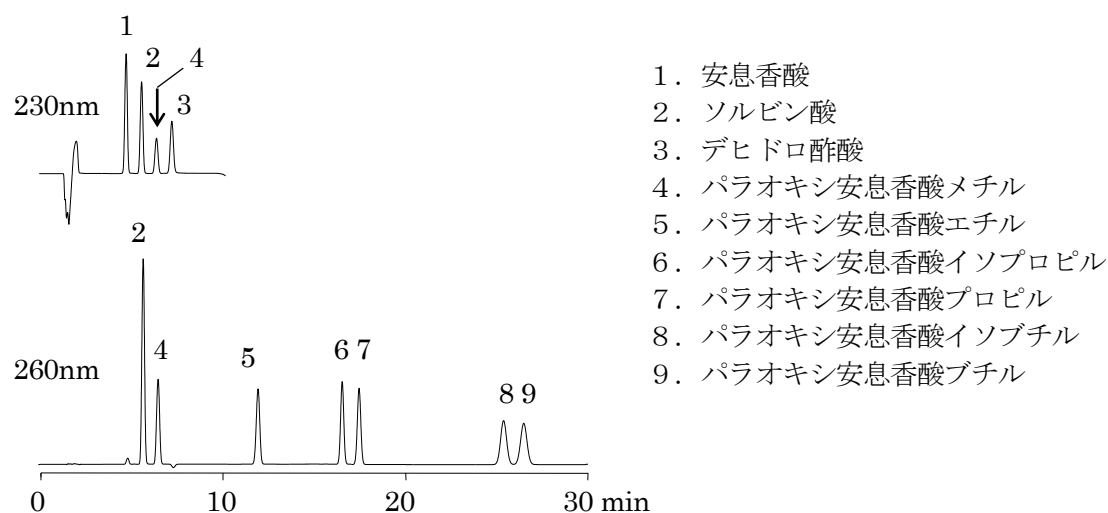
試料採取量：(a) 50 g、(b) 5 g

注図 1 安息香酸の水蒸気蒸留時の留出パターン

- 5) 試料採取量を 5 g とする場合、泡立ちやすい豆類等の一部食品を除き、シリコーン樹脂の添加は必要ない。シリコーン樹脂を添加する場合には、食品添加物グレードのものを使用し、保存料を含む製剤等は使用しない。
- 6) 塩基性の食品では酸性とならない場合がある。そのような場合には、さらに酒石酸溶液 (15→100) を加えて酸性にする。
- 7) 留液の濁りは分析カラムの目詰まりの原因となる。分析カラムの保護のため、留液に濁りが観察されない場合でも、留液を水系ポリテトラフルオロエチレン製メンブランフィルター (0.45 μ m) 等を用いてろ過を行うことが望ましい。この場合、試験溶液は最初のろ液 5 mL を捨てた後に採取したろ液とする。
- 8) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜調整してもよい。
- 9) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。また、夾雑物のピークとの分離等のためにグラジエント分析を行ってもよいが、保存料の一斉分析の場合は、各保存料が分離することを確認する。
- 10) 分析の際は、被験物質のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 11) 高速液体クロマトグラフィー用カラムは、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。
- 12) その他、下記の移動相及びグラジエント溶離等が使用できる。
 - ・ 5 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH4.0) / アセトニトリル / メタノール混液 (7 : 2 : 1) と 5 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH4.0) / アセトニトリル / メタノール混液 (11 : 4 : 5) によるグラジエント溶離 (注図 2)。
 - ・ 6.1 mmol/L 臭化セチルトリメチルアンモニウム含有 26 mmol/L リン酸二水素ナトリウム溶液 / メタノール / アセトニトリル混液 (45 : 42 : 18) (移動相の調製方法: 臭化セチルトリメチルアンモニウム 1 g、リン酸二水素ナトリウム二水和物 1.84 g に水 450 mL を加えて溶かした後、メタノール 420 mL 及びアセトニトリル 180 mL を加えて混合する)。
 - ・ 水 / アセトニトリル / 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (67 : 28 : 5)、水 / メタノール / 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (59 : 36 : 5) 又は水 / メタノール / 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (17 : 2 : 1) と水 / メタノール / 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (5 : 14 : 1) によるグラジエント溶離 (0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) の調製方法: リン酸一カリウム 27.0 g とリン酸 0.2 g に水を加えて溶かして 1000 mL とする)。ただし、リン酸緩衝液系では、ソルビン酸とデヒドロ酢酸の分離が不十分な場合がある (注図 3)。

安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類標準溶液

(各 10 μ g/mL)



<測定条件>

カラム：ODSカラム（内径 4.6mm、長さ 150mm、粒径 5 μ m）

カラム温度：40℃

移動相：A液 5mmol/Lクエン酸緩衝液（pH4.0）／アセトニトリル／メタノール混液
（7：2：1）

B液 5mmol/Lクエン酸緩衝液（pH4.0）／アセトニトリル／メタノール混液
（11：4：5）

リニアグラジエントの条件		
時間(分)	A (%)	B (%)
0	100	0
10	100	0
15	0	100
27	0	100
30	100	0

流速：1.0mL/分

検出器：フォトダイオードアレイ検出器

測定波長：230nm、260nm

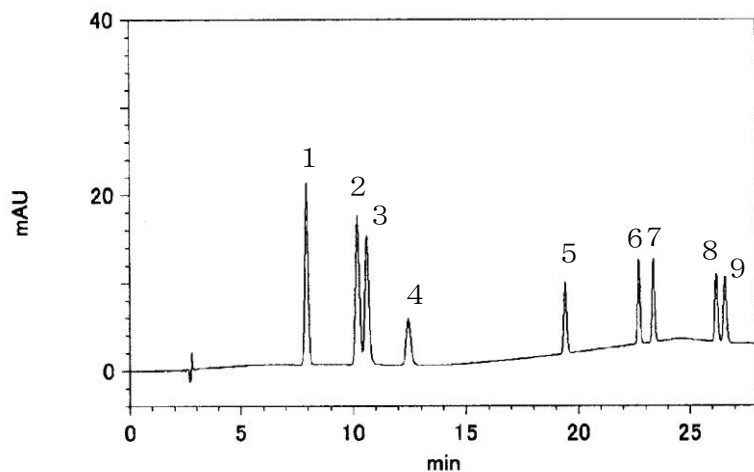
注入量：20 μ L

※パラオキシ安息香酸エステル類を含む検量線用混合標準溶液を調製する際には 60vol%メタノールを使用すること。

注図2 グラジエント溶離法による安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類のクロマトグラム例

安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類標準溶液

(各 5.0 μ g/mL)



1. 安息香酸
2. ソルビン酸
3. デヒドロ酢酸
4. パラオキシ安息香酸メチル
5. パラオキシ安息香酸エチル
6. パラオキシ安息香酸イソプロピル
7. パラオキシ安息香酸プロピル
8. パラオキシ安息香酸イソブチル
9. パラオキシ安息香酸ブチル

<測定条件>

カラム：ODSカラム (内径 4.6mm、長さ 250mm、粒径 5 μ m)

カラム温度：40℃

移動相：A液 水／メタノール／0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (17：2：1)

B液 水／メタノール／0.2mol/Lリン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (5：14：1)

リニアグラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	50	50
10	50	50
20	0	100
25	0	100
25.1	50	50
30	50	50

流速：1.0mL/分

検出器：紫外可視吸光光度検出器

測定波長：230nm

注入量：20 μ L

※パラオキシ安息香酸エステル類を含む検量線用混合標準溶液を調製する際には 60vol% メタノールを使用すること。

注図3 グラジエント溶離法による安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類のクロマトグラム

- 13) ソルビン酸の吸収極大波長は 260nm 付近である。230nm で妨害ピークが重なる場合には、260nm 付近で測定するとよい。
- 14) デヒドロ酢酸の吸収極大波長は、230nm 及び 310nm 付近である。230nm で妨害ピークが重なる場合には、310nm 付近で測定するとよい。
- 15) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 16) 本法によるソルビン酸カルシウムの添加回収試験の結果を注表 1 に示す。

注表 1 ソルビン酸カルシウムの各種食品での添加回収率*

試料	試料量 (g)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
マーガリン	5.0	0.5	91.8	3.0
さきいか	5.0	0.5	92.6	1.1
チーズ	5.0	0.5	85.7	4.3
かまぼこ	5.0	0.5	90.0	0.6
あん	5.0	0.5	92.8	0.6
らっきょう	5.0	0.5	89.1	0.8
みそ	5.0	0.5	94.4	0.9
しょう油	5.0	0.5	95.8	0.9
オレンジジュース	5.0	0.5	95.5	2.2
ワイン	5.0	0.2	97.0	0.7

* 5 試行の平均値

[文献]

- 1) 久保田浩樹ら：日食化誌、17、54 (2010)

参考

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸確認分析法

1. 分析法の概要

食品中の安息香酸、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム及びデヒドロ酢酸ナトリウムは、液体クロマトグラフィー質量分析、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（分析法A）又はガスクロマトグラフィー質量分析（分析法B）により確認を行う¹⁾。（2010年設定、2021年改正）

2. 分析法

分析法 A（液体クロマトグラフィー質量分析又は液体クロマトグラフィータンデム質量分析）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試験溶液の調製²⁾

（3）標準溶液の調製

上記（1）～（3）については、安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム分析法又はパラオキシ安息香酸エステル類分析法を準用する。

（4）測定法

① 測定条件³⁾

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）又は液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤⁴⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 2.1mm、長さ 100mm

カラム温度：40℃

移動相⁵⁾：A液 0.05vol%ギ酸含有 5 vol%アセトニトリル

B液 0.05vol%ギ酸含有 95vol%アセトニトリル

A液 70%から 50%までの直線濃度勾配⁶⁾。

流速：0.2ml/分

イオン化モード：安息香酸 ESI（-）、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸 ESI（+）

検出法：スキャン、選択イオン検出（SIM）又は選択反応検出（SRM）

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸の主なイオン^{7,8)}

	分子量	LC-MS	LC-MS/MS	
		SIM検出 イオン	プリカーサー イオン	プロダクト イオン
安息香酸	122.12	121	121	77
ソルビン酸	112.13	113	113	95、67
デヒドロ酢酸	168.15	169	169	85、127

注入量：2μL

② 定性⁹⁾

試験溶液及び標準溶液を LC-MS又はLC-MS/MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上に検出されたピークの保持時間¹⁰⁾が標準溶液のピークと一致することを確認する。また、LC-MSを用いる場合は、試験溶液と標準溶液のマスペクトルを比較して定性を行う。

分析法B（ガスクロマトグラフィー質量分析）

（１）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（２）試験溶液の調製

安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム分析法の（２）試験溶液の調製又はパラオキシ安息香酸エステル類分析法の（２）試験溶液の調製 ② その他の食品（水蒸気蒸留法）を準用し、得られた留液 50mL にリン酸を加えて酸性とし、これにジエチルエーテル 50mL を加えて振とうする。ジエチルエーテル層を 1/10 量の水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ろ紙でろ過し、ろ液を減圧濃縮する。残留物をアセトンで溶解し、試験溶液とする。あるいは、パラオキシ安息香酸エステル類分析法の（２）試験溶液の調製 ① 高タンパク食品及び高脂肪食品（溶媒抽出法）の a の抽出液又は b の溶出液を濃縮後、残留物をアセトンで溶解し、試験溶液とする。

（３）標準溶液の調製

安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム分析法又はパラオキシ安息香酸エステル類分析法の（３）検量線用標準溶液の調製を準用する。ただし、溶媒にはアセトンを用いる。

（４）測定法

① 測定条件¹¹⁾

ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）を用い、次の条件によって測定する。

カラム¹²⁾：内径 0.25mm、長さ 15m のフューズドシリカ管の内面に 5 % フェニル 95 %
メチルポリシロキサンを 0.25 μ m の厚さで被覆したもの。

カラム温度¹³⁾：40℃（2 分）、40→230℃（15℃／分、昇温）、230℃（5 分）

注入口温度：250℃

イオン源温度：230℃

キャリアーガス：ヘリウム

注入方式：スプリットレス

イオン化モード（電圧）：E I（70eV）

検出法：スキャン（ m/z 50～200）

注入量：2 μ L

② 定性

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

試薬・試液等

1. 安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム分析法又はパラオキシ安息香酸エステル類分析法の試薬・試液等を準用する。
2. ギ酸：[98%、特級]
3. 0.05vol% ギ酸含有 5 vol% アセトニトリル：ギ酸 0.5mL にアセトニトリル 50mL 及び水を加えて 1000mL とする。
4. 0.05vol% ギ酸含有 95vol% アセトニトリル：ギ酸 0.5mL にアセトニトリル 950mL 及び水を加えて 1000mL とする。
5. リン酸：[特級]
6. ジエチルエーテル：[特級]
7. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）[特級]
8. アセトン：[特級]

[注]

- 1) 本法により、パラオキシ安息香酸エステル類も同時に確認できる。
- 2) 安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸については、パラオキシ安息香酸エステル類分析法の（2）試験溶液の調製 ① 高タンパク食品及び高脂肪食品（溶媒抽出法）を用いる場合には、陰イオン交換カラムに吸着するため、試験溶液ではなく、抽出液を用いる。
- 3) その他の測定条件は各測定機器に従い、検量線用標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 4) 分析の際は、被験物質のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。

- 5) イオンペア試薬を用いた移動相による分析例の報告もある^{文献1)}。
- 6) 濃度勾配の条件は、使用する分析カラムにより適宜変更する。
- 7) パラオキシ安息香酸エステル類のイオン化モード及び主なイオンを注表1に示す。

注表1 パラオキシ安息香酸エステル類のイオン化モード及び主なイオン

	分子量	イオン化 モード ESI	LC-MS	LC-MS/MS	
			SIM検出 イオン	プリカーサー イオン	プロダクト イオン
パラオキシ安息香酸イソブチル	194.23	+	195	195	139、95
パラオキシ安息香酸イソプロピル	180.20	+	181	181	139、95
パラオキシ安息香酸エチル	166.18	+	167	167	139、95
パラオキシ安息香酸ブチル	194.23	+	195	195	139、95
パラオキシ安息香酸プロピル	180.20	+	181	181	139、95

- 8) LC-MS/MS条件の一例を以下に示す。

カラム：ODSカラム（内径2.1mm、長さ100mm、粒子径1.7 μ m）

カラム温度：40℃

移動相：A液 0.05vol%ギ酸含有5vol%アセトニトリル

B液 0.05vol%ギ酸含有95vol%アセトニトリル

グラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	70	30
5	50	50
5.5	50	50
5.51	70	30
7	70	30

流速：0.3mL/分

測定法：多重反応モニタリング（MRM）

デソルベーション温度：400℃

その他の条件：注表1

- 9) LC-MSを用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑物によるマトリックス効果により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に検量線用標準溶液を添加し、ピークが検出されることを確認する。
- 10) 各ピークの保持時間が非常に近い場合もあるため、確認時は注意する。
- 11) マススペクトルによる確認が困難な場合、選択イオンモニタリング（SIM）により測定を行い、マスクロマトグラム上に検出されたピークが各保存料検量線用標準溶液と一致することを確認する。

モニターイオン：ソルビン酸（ m/z 112、97）

安息香酸（ m/z 122、105）

デヒドロ酢酸（ m/z 168、153）

パラオキシ安息香酸エチル (m/z 166、138)

パラオキシ安息香酸プロピル及びイソプロピル (m/z 180、138)

パラオキシ安息香酸ブチル及びイソブチル (m/z 194、138)

12) 内径 0.25mm、長さ 30m のフューズドシリカ管の内面にポリエチレングリコールを 0.25 μ m の厚さで被覆したカラムを下記の測定条件で使用することもできる。

測定条件

カラム温度：160→240℃ (15℃/分、昇温)、240℃ (10 分)

検出器：水素炎イオン化検出器

13) 昇温の条件は、使用する分析カラム等により適宜変更する。

[文献]

1) 氏家愛子ら：食衛誌、48、163 (2007)

防かび剤

オルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、

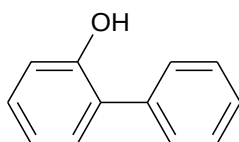
ジフェニル及びチアベンダゾール

o-Phenylphenol, Sodium *o*-Phenylphenate, Diphenyl and Thiabendazole

オルトフェニルフェノール

o-Phenylphenol

略名：OPP

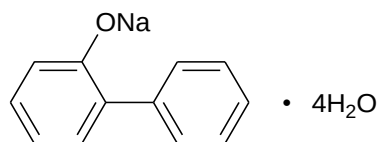


$C_{12}H_{10}O$: 170. 21

オルトフェニルフェノールナトリウム

Sodium *o*-Phenylphenate

略名：OPP-Na



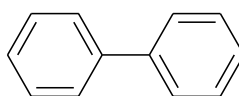
$C_{12}H_9NaO \cdot 4 H_2O$
($C_{12}H_9NaO$: 192. 19)

ジフェニル

Diphenyl

別名：ビフェニル

略名：DP

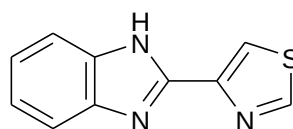


$C_{12}H_{10}$: 154. 21

チアベンダゾール

Thiabendazole

略名：TBZ



$C_{10}H_7N_3S$: 201. 25

1. 分析法の概要

食品中のオルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、ジフェニル及びチアベンダゾールは、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オルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾールとして定量する。必要があれば、オルトフェニルフェノールに分子量比を乗じて、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。（2000 年設定、2019 年統合法設定、2021 年改正）

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）¹⁾

（1）検体の採取と試料の調製

① かんきつ類

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

② バナナ

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

③ 加工食品

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

試料約 10 g 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 1～2 g⁵⁾、無水硫酸ナトリウム 20 g⁶⁾を加えてよく混和した後、酢酸エチル 40mL を加え 2 分間ホモジナイズし、これを遠心 (10 分間、3000 回転/分)⁷⁾して酢酸エチル層を分取する。沈殿物には更に酢酸エチル 40mL 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 2 mL を加えて 40℃以下で減圧下で濃縮⁸⁾する。これに液体クロマトグラフィー用の移動相を加えて全量を正確に 5 mL とし、メンブランフィルター (0.45μm) でろ過し、試験溶液⁹⁾とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製¹⁰⁾

オルトフェニルフェノール、ジフェニル及びチアベンダゾール各 10.0mg を量り、それぞれメタノール 5 mL を加えて溶解した後、移動相を加えて正確に 100mL とする (濃度 各 100μg/mL)。これらの液 10mL ずつを正確にとり、1-ブタノール 5 mL を加え、次いで移動相を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする (濃度各 10μg/mL)。標準溶液 2、4、6、8 mL 及び 10mL を正確にとり、それぞれに移動相を加えて正確に 10mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度各 2～10μg/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

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。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6～6.0mm、長さ 150～250mm

カラム温度：40℃

移動相¹²⁾：メタノール／水／アセトニトリル混液 (60 : 35 : 5) 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：1 mL/分

測定波長：励起波長 285nm、蛍光波長 325nm

注入量：10μL

② 検量線¹³⁾

検量線用標準溶液 10 μ L ずつをそれぞれ液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量¹⁴⁾

試験溶液 10 μ L を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中のオルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール濃度 (μ g/mL) を求め、次式によって試料中¹⁵⁾のオルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、ジフェニル又はチアベンダゾール含量 (g/kg) を算出する。

オルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール含量 (g/kg)

$$= \frac{C \times 5}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中のオルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール濃度 (μ g/mL)

W : 試料の採取量 (g)

オルトフェニルフェノールナトリウム含量 (g/kg)

= オルトフェニルフェノール含量 (g/kg) $\times$ 1.129

④ 定量限界 オルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾールとして 0.001 g/kg¹⁶⁾

試薬・試液

1. オルトフェニルフェノール：オルトフェニルフェノール標準品 [残留農薬試験用]
2. ジフェニル：ジフェニル標準品 [残留農薬試験用]
3. チアベンダゾール：チアベンダゾール標準品 [残留農薬試験用]
4. 無水酢酸ナトリウム：酢酸ナトリウム [特級]
5. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
6. 酢酸エチル：[特級]
7. 1-ブタノール：[特級]
8. リン酸二水素カリウム：[特級]
9. メタノール¹⁷⁾：[高速液体クロマトグラフィー用]
10. アセトニトリル：[液体クロマトグラフィー用]
11. ドデシル硫酸ナトリウム：市販品を用いる。
12. リン酸：[特級]

[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、オルトフェニルフェノールナトリウム、ジフェニル及びチアベンダゾールの分析並びにバナナ中のチアベンダゾールの分析に適用できる。
- 2) 「食品、添加物等の規格基準 第1食品 A食品一般の成分規格6 (2) 検体」及び「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知) 別添「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」参照。
- 3) 8分割法については、イマザリル分析法[注] 3) を参照のこと。
- 4) 1～2房のバナナから3～4本を任意に採取し、先端及び果柄部を可食部の近くで切断する。果実又は果肉のみを約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してもよい。
- 5) 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。
- 6) 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30g、ジュース等では45g程度を添加するとよい。
- 7) 試料に無水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を行うとよい。
- 8) 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。
- 9) 試験溶液のpHが1～8のとき、蛍光強度が最も強い。
- 10) 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。バナナの果肉中のチアベンダゾールを分析する場合は、0.5～5 $\mu\text{g/mL}$ の検量線用標準溶液を用いる。また、いずれの場合も、検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜、調整してもよい。
- 11) 測定条件は例示である。用いるカラムの内径及び長さによって、流速及び注入量等を調整する。
- 12) 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。
- 13) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 14) かんきつ類10gに0.25mg、かんきつ類加工品10gに0.1mg添加した場合の回収率は、

オルトフェニルフェノールで 90～100%、ジフェニルで 82～96%、チアベンダゾールでは 88～92%である。

- 15) 試料の調製の際に水を添加した場合には、次式により、検体中のオルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール含量を求める。

オルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール含量 (g/kg)

$$= \frac{C \times 5}{W \times 1000} \times \frac{W_1 + W_2}{W_1}$$

C : 試験溶液中のオルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール濃度 (μg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

W₁ : 検体の採取量 (g)

W₂ : 検体に添加した水の量 (g)

- 16) 0.5～5 μg/mL の検量線用標準溶液を用いてバナナ果肉中のチアベンダゾールを分析した場合、チアベンダゾールの定量限界は、0.0003 g/kg である。

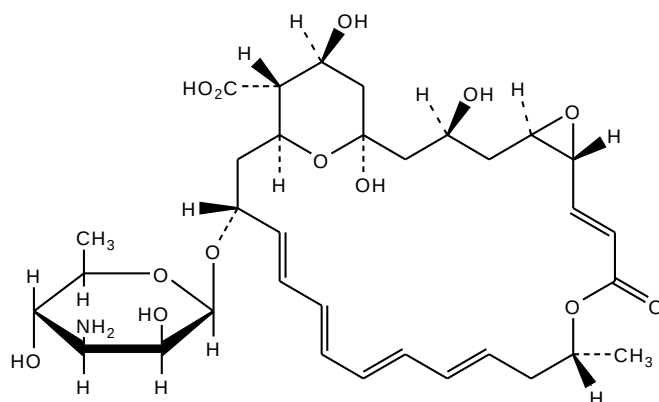
- 17) 使用するアセトニトリル、メタノール等の試薬類はクロマトグラム上に妨害ピークが出ないことを確認すれば、試薬特級や残留農薬用を用いることができる。

保存料

ナタマイシン

Natamycin

別名 ピマリシン



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

1. 分析法の概要

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

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

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

分析法A（チーズ中の分析法）¹⁾

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する²⁾。なお、次の諸点にも留意すること³⁾。

- ① ロットの中から1容器又は1包装のチーズを採取する際には、そのチーズの質量に対する表皮（リンド）の面積の割合が、ロット中のチーズの中で平均的なものを選定すること。
- ② ロットの中から選定したチーズから、その一部を採取する際には、チーズ全体の質量に対する採取した質量の割合と、チーズ全体に含まれる表皮の面積に対する採取した部分に含まれる表皮の面積の割合が、大きく異ならないようにすること。
- ③ 粉砕又は細切し均一とする前に、パラフィン等、明らかな非可食部を除くこと。

(2) 試験溶液の調製

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

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

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

(4) 測定法

① 測定条件⁶⁾

紫外可視吸光光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤⁷⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150mm

カラム温度：40℃

移動相：メタノール／水／酢酸混液（50：50：5）

流速：1.0mL／分

測定波長：304nm

注入量：20μL

② 検量線^{8、9)}

検量線用標準溶液をそれぞれ液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積からナタマイシンの検量線を作成する。

③ 定量

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線から試験溶液中のナタマイシン濃度（μg/mL）を求め、次式によって試料中のナタマイシン含量（g/kg）を計算する。

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

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

W：試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.001 g/kg

分析法B（ワイン中の分析法）¹⁰⁾

（１）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する²⁾。

（２）試験溶液の調製

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

（３）検量線用標準溶液の調製⁴⁾

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

（４）測定法

① 測定条件⁶⁾

紫外可視吸光光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹⁴⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm ）

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150mm

カラム温度：40℃

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

流速：1.0mL/分

測定波長¹⁶⁾：304nm

注入量：20 μL

② 検量線^{8、17)}

検量線用標準溶液をそれぞれ液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{18、19)}

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線から試験溶液中のナタマイシン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式によって試料中のナタマイシン含量 (mg/L) を計算する。

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

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

V : 試験溶液量 (mL)

W : 試料の採取量 (mL)

④ 定量限界 0.00005g/L

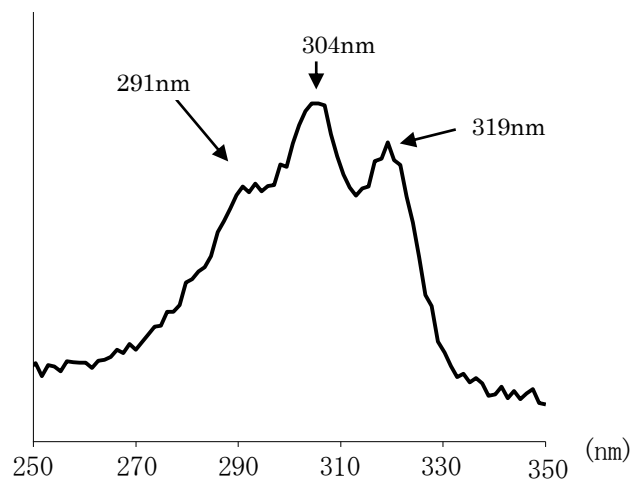
試薬・試液等

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

[注]

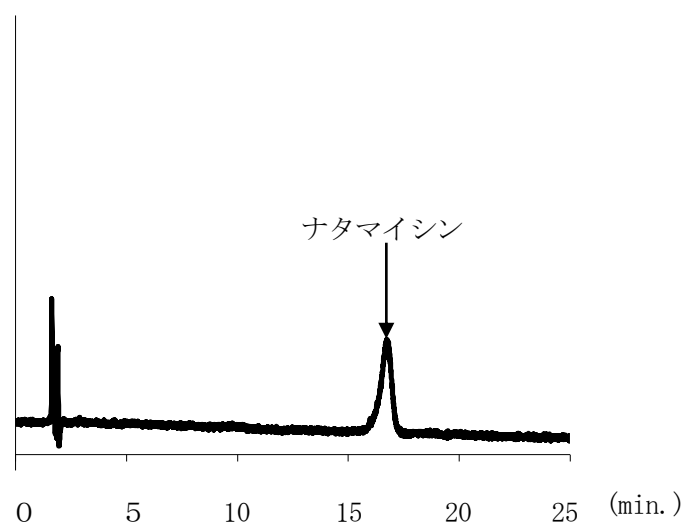
- 1) 本法は、チーズ中のナタマイシンの分析に適用できる。
- 2) ナタマイシンは光により分解するので、操作中に直射日光あるいは紫外線が当たらないよう注意すること。
- 3) ナタマイシンはチーズの熟成過程における表面処理剤として用いられた場合、通常、チーズの内部に浸透せず、表面に残存する。
- 4) 直線性が確認できれば、適宜、検量線用標準溶液の数を調製してもよい。
- 5) 保存用標準原液は、遮光して冷蔵保存すれば少なくとも 1 週間は安定である。
- 6) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。また、夾雑物との分離等のためにグラジエント分析を行っても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

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

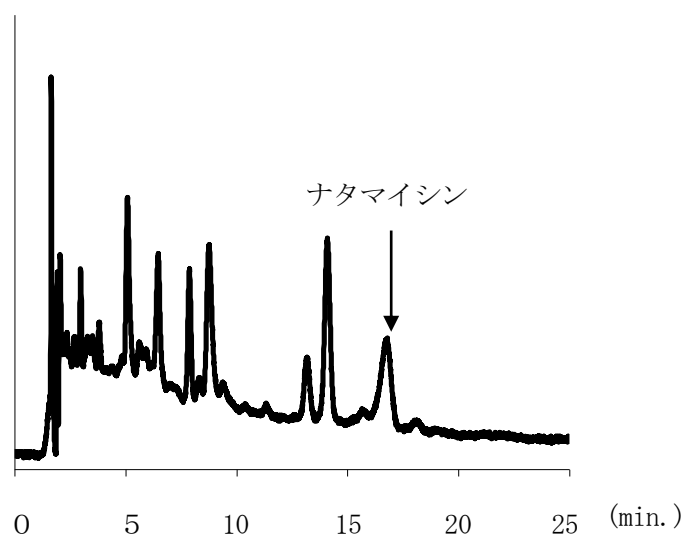


注図 1 検量線用標準溶液（ナタマイシン 0.5μg/mL）の吸収スペクトル

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



注図2 検量線用標準溶液 (0.1 μ g/mL) のクロマトグラム



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

参考

ナタマイシン確認分析法

1. 分析法の概要

チーズ又はワイン中のナタマイシンは、液体クロマトグラフィータンデム質量分析により確認を行う。（2010年設定、2021年改正）

2. 分析法（液体クロマトグラフィータンデム質量分析）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試験溶液の調製

（3）標準溶液の調製

上記（1）～（3）については、ナタマイシン分析法を準用する。

（4）測定法

① 測定条件¹⁾

液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径2mm、長さ150mm

カラム温度：40℃

移動相²⁾：メタノール／水／酢酸混液（50：50：0.1）

流速：0.2ml／分

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン³⁾：プリカーサーイオン m/z 666、プロダクトイオン m/z 503、95、91又は79

注入量⁴⁾：2μL

② 定性

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

試薬・試液等

1. ナタマイシン分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

- 1) 測定条件は例示である。測定条件は各測定機器に従い、標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 2) 酢酸濃度が高いとイオン化が阻害され、感度が低下する可能性があるため、酢酸の割合を 0.1 とした。移動相の組成は、使用する分析カラム等により適宜変更する。
- 3) 各測定機器において最適な測定条件を選択する。
- 4) 注入量は適宜調整する。

保存料

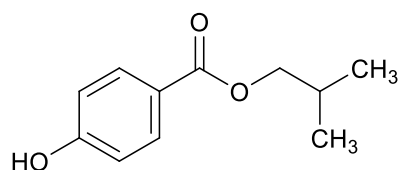
パラオキシ安息香酸エステル類

p-Hydroxybenzoic Acid Esters

パラオキシ安息香酸イソブチル

Isobutyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸イソブチル

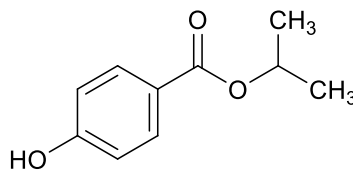


C₁₁H₁₄O₃ : 194. 23

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

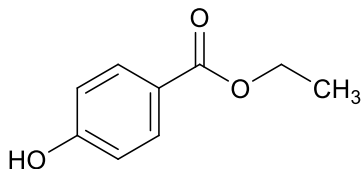


C₁₀H₁₂O₃ : 180. 20

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

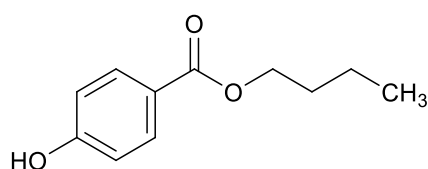


C₉H₁₀O₃ : 166. 17

パラオキシ安息香酸ブチル

Butyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸ブチル

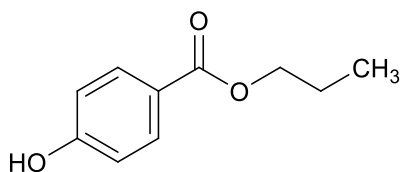


C₁₁H₁₄O₃ : 194. 23

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



C₁₀H₁₂O₃ : 180. 20

1. 分析法の概要

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

パラオキシ安息香酸エステル類を特定する必要がある場合には、安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム分析法の参考として示す確認分析法を準用することができる。(2010 年改正、2019 年改正、2021 年改正)

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

① 高タンパク食品及び高脂肪食品（溶媒抽出法）

(a) 抽出

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

(b) 精製

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

② その他の食品（水蒸気蒸留法）

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

(3) 検量線用標準溶液の調製¹³⁾

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

混合標準溶液1mLを正確にとり、60vol%メタノールを加えて正確に200mLとし、また、混合標準溶液1、2、5mL及び10mLを正確にとり、60vol%メタノールを加えて正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする（各濃度0.05～10 μ g/mL）。

(4) 測定法

① 測定条件¹⁴⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹⁵⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径4.6mm、長さ50～250mm

カラム温度：40℃

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

流速：0.5～1.0mL/分

測定波長：260nm¹⁷⁾

注入量：20 μ L¹⁸⁾

② 検量線¹⁹⁾

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

③ 定量

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度（ μ g/mL）を求め、次式によって試料中のパラオキシ安息香酸エステル含量（g/L又はg/kg）を計算する。

(a) 溶媒抽出法²⁰⁾

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

C：試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度（ μ g/mL）

W：試料の採取量（g）

V：試験溶液の量（mL）

(b) 水蒸気蒸留法

しょう油及び酢

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

その他の食品

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

C：試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 (μg/mL)

W₁：試料の採取量 (mL)

W₂：試料の採取量 (g)

V：試験溶液の量 (mL)

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

しょう油及び酢の場合

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

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

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

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

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

上記以外の食品の場合

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

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

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

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

0.7111

パラオキシ安息香酸含量 (g/kg) = パラオキシ安息香酸プロピル含量 (g/kg) ×

0.7665

④ 定量限界 0.005 g/L 又は 0.005 g/kg

試薬・試液等

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

[注]

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

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

- 17) 測定条件に示した移動相中でのパラオキシ安息香酸エステル類の吸収極大は 260nm 付近である。安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸と同じ 230nm でも測定可能であるが、260nmの方が感度が高い。
- 18) 安息香酸、ソルビン酸あるいはデヒドロ酢酸を同時に測定する場合は、試験溶液のメタノール濃度が高いと、保持時間に影響を与え、標準溶液における保持時間とずれが生じることがある。また、ピーク形状にも影響を与え、測定値に誤差が生じるおそれがある。このような現象は、保持時間の小さいピークに認めやすく、注入量が多くなると著しくなる。その場合には、標準溶液も同じ組成にし、良好なピーク形状が得られるように、注入量を調整する。アイソクラティック溶離を用いた内径 4.6mm の高速液体クロマトグラフィー用カラムによる分析の場合は、注入量が 20 μ L では、いずれの試験溶液においても差異はみられないが、グラジエント溶離を用いて安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸を同時に測定する場合は、10 μ L 以上で差異がみられる。
- 19) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 20) 式の説明：

抽出液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 (μ g/mL)

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

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

$$= CV$$

パラオキシ安息香酸エステル含量 (g/kg)

$$\text{抽出液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度} (\mu\text{g/mL}) \times \text{抽出液量} (50\text{mL}) \times \frac{1}{1000}$$

$$= \frac{\quad}{W (\text{試料の採取量} (\text{g}))} \times \frac{1}{1000}$$

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

* μ g/g から g/kg に変更するために、1000 で除す。

漂白剤

亜塩素酸ナトリウム

Sodium Chlorite

NaClO_2 : 90.44

1. 分析法の概要

食品に付着している亜塩素酸ナトリウムは、水により浸出し、亜塩素酸ナトリウムとして紫外可視吸光光度検出器を用いたイオンクロマトグラフィー（分析法 A）により測定する。食品中の亜塩素酸ナトリウムは、 9 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液で抽出し、除タンパク、脱塩後に、亜塩素酸ナトリウムとして電気伝導度検出器を用いたイオンクロマトグラフィー（分析法 B）により測定する。（2005 年改正、2019 年改正、2021 年改正）

2. 分析法

分析法 A（紫外可視吸光光度検出器付イオンクロマトグラフィー）¹⁾

（1）検体の採取と試料の調製²⁾

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

試料約 25 g を精密に量り、水 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 分取して逆相固相抽出カラムに通し、その液を試験溶液とする。

（3）検量線用標準溶液の調製³⁾

亜塩素酸ナトリウム（試薬） 0.625 g ⁴⁾を量り、水を加えて溶かして正確に 100mL とする。この液 2 mL を正確に量り、水を加えて正確に 200mL としたものを標準溶液とする（濃度 $50\mu\text{g/mL}$ ）。標準溶液 0.5、2、10、20、50 及び 100mL 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、検量線用標準溶液とする（濃度 $0.25\sim 50\mu\text{g/mL}$ ）。

（4）測定法

① 測定条件⁵⁾

紫外可視吸光光度検出器付イオンクロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：ポリアクリレート系強酸性陰イオン交換樹脂

カラム管：耐アクリル性ポリアクリレート製、内径 4.6～6.0mm、長さ 75～250mm

カラム温度：40℃

溶離液： 1 mmol/L ホウ酸塩緩衝液

流速：1.0mL／分

測定波長：260nm

注入量：10μL

② 検量線⁶⁾

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

③ 定量⁷⁾

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

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

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

分析法B（電気伝導度検出器付イオンクロマトグラフィー）⁸⁾

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

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

（3）検量線用標準溶液の調製³⁾

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

(4) 測定法

① 測定条件⁵⁾

電気伝導度検出器付イオンクロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

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

カラム管：内径 4 mm、長さ 250mm

カラム温度：30℃

溶離液：9 mmol/L 炭酸ナトリウム溶液

流速：1.0 mL/分

② 検量線⁶⁾

検量線用標準溶液それぞれ 50μL ずつを正確に量り、イオンクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量¹⁰⁾

試験溶液 50μL を正確に量り、イオンクロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中の亜塩素酸ナトリウム濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中の亜塩素酸ナトリウム含量 (g/kg) を算出する。

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

C：試験溶液中の亜塩素酸ナトリウム濃度 (μg/mL)

W：試料の採取量 (g)

試薬・試液等

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

9. 強陽イオン交換固相抽出カラム：スルフォニルプロピル化シリカゲル固相抽出カラム
(100mg)

[注]

- 1) 電気伝導度検出器でも測定可能であるが、紫外可視吸光光度検出器を用いると Cl^- ピークが出現しないため良好なクロマトグラムが得られる。
- 2) 生食用野菜類、卵殻等を対象とする。
- 3) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜調整してもよい。
- 4) 亜塩素酸ナトリウム（試薬）の含量は、通常、80%以上であるため、それを考慮した採取量である。亜塩素酸ナトリウム（試薬）の純度を次により求めて亜塩素酸ナトリウム（試薬）の採取量に乘じ、採取した試薬中の亜塩素酸ナトリウムの量とする。
亜塩素酸ナトリウム（試薬）約 1 g を精密に量り、水に溶かし、正確に 250mL とする。
この液 20mL を正確に量り、ヨウ素フラスコに入れ、3%硫酸 12mL、水 20mL 及びヨウ化カリウム 4 g を加え、直ちに密栓して暗所に 15 分間放置し、遊離したヨウ素を 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する（指示薬：デンプン溶液）。別に空試験を行い補正する。
 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液 1 mL = 2.261mg 亜塩素酸ナトリウム
亜塩素酸ナトリウムの純度 = $(V \times 2.261 \times 250) / (W \times 20 \times 1000)$
 V : 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定量 (mL)
 W : 亜塩素酸ナトリウム（試薬）の採取量 (g)
- 5) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。また、夾雑物との分離等のためにグラジエント分析を行ってもよい。
- 6) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 7) 本法の添加回収率は 90~100%、相対標準偏差 5% である^{文献 1)}。また、検出限界は 0.001 g/kg である。
- 8) しょう油漬け、味付けカズノコ等を対象とする。
- 9) ろ液 2.5mL を正確に 25mL にしてもよい。
- 10) 本法における検出限界は 0.005 g/kg である。

[文献]

- 1) 鈴木仁ら：食衛誌、38、22 (1997)

参考

亜塩素酸ナトリウム（分析法B）確認分析法

1. 分析法の概要

カズノコ調味加工品中の亜塩素酸ナトリウムは、9 mmol/L炭酸ナトリウム溶液で抽出後、限外ろ過による除タンパクして得られたろ液を用い、*N, N*-ジエチルー *p*-フェニレンジアミン(DPD)との発色反応により行う¹⁾。(2005年設定、2019年改正、2021年改正)

2. 分析法

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

亜塩素酸ナトリウムの分析法Bを準用し、限外ろ過のろ液を試験溶液とする。

(3) 測定法

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

試薬・試液等

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

[注]

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

漂白剤

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類

Sulfur Dioxide and Sulfites

亜硫酸水素アンモニウム水 Ammonium Hydrogen Sulfite water (NH_4HSO_3 : 99.11)	亜硫酸ナトリウム Sodium Sulfite 別名：亜硫酸ソーダ (無水) Na_2SO_3 : 126.04 (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ド $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$: 174.11	二酸化硫黄 Sulfur Dioxide 別名：無水亜硫酸 SO_2 : 64.06
ピロ亜硫酸カリウム Potassium Pyrosulfite 別名：メタ重亜硫酸カリウム $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$: 222.33	ピロ亜硫酸ナトリウム Sodium Pyrosulfite 別名：メタ重亜硫酸ナトリウム 酸性亜硫酸ソーダ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$: 190.11

1. 分析法の概要

食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は、アルカリ滴定法（分析法A）又は比色法（分析法B）により二酸化硫黄として定量する¹⁾。必要があれば分子量比を乗じて、亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸ナトリウム（無水）、次亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム又はピロ亜硫酸ナトリウムの量として求める。通常、分析法Aは二酸化硫黄として約0.1 g/kg以上の食品（有機酸を多く含む食品は除く）に、分析法Bは約0.1 g/kg以下の食品及び酢酸等の有機酸を多く含む食品の分析に用いる。本試験において試験溶液並びに標準溶液の調製に用いる水は、用時、精製水を煮沸し、冷却したものを用いる²⁾。（2000年設定、2019年改正、2021年改正）

2. 分析法

分析法A（アルカリ滴定法）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する³⁾。

（2）試験溶液の調製

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

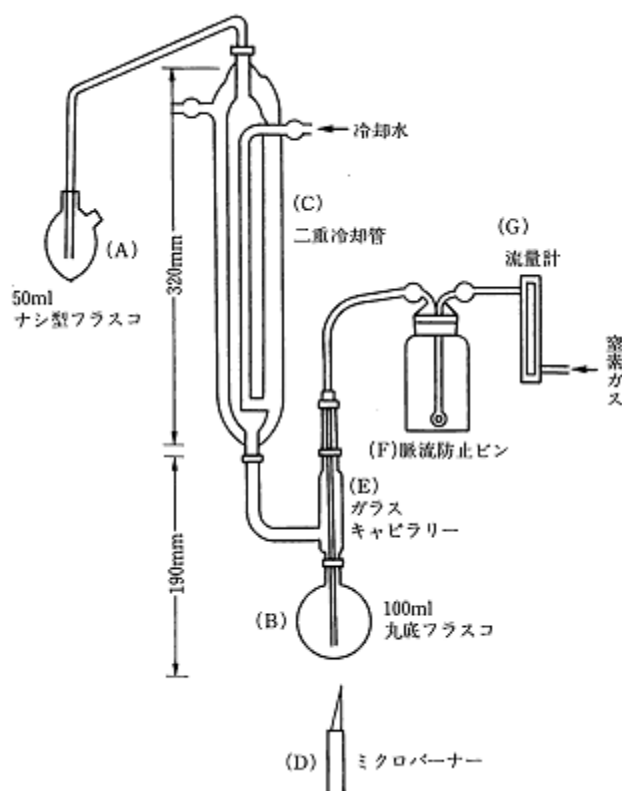


図1 通気蒸留装置

(3) 空試験溶液の調製

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

(4) 測定法

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

$$\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = (a - b) \times F \times 0.32 \times \frac{1}{W_1}$$

亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合

$$\text{亜硫酸水素アンモニウム (g/L)} = (a - b) \times F \times 0.32 \times \frac{1}{W_2} \times 1.547$$

a : 試験溶液の滴定量 (mL)

b : 空試験溶液の滴定量 (mL)

W_1 : 試料の採取量 (g)

W_2 : 試料の採取量 (mL)

F : 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター

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

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

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

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

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

分析法B (比色法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

あらかじめ図1のフラスコ(A)を25mLの試験管(内径20mm前後)に変更し、通気蒸留装置を組み立て、試験管の中に0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液¹⁴⁾約10mLを入れ、装置に取り付ける。次にフラスコ(B)に蒸留水20mL、5%ジメドン・エタノール溶液1mL¹⁵⁾、アジ化ナトリウム溶液(1→100)1mL¹⁶⁾、エタノール2mL⁶⁾、シリコーン樹脂⁸⁾2滴及びリン酸試液10mL⁹⁾を入れ、直ちに装置に取り付ける。窒素ガスを流量計(G)を通じて、0.5~0.6L/分の速度で5分間通気する¹⁷⁾。次にフラスコ(B)をはずし、試料約2g¹⁸⁾を精密に量り、速やかに入れ、再び装置に取り付け、窒素ガスを0.5~0.6L/分の速度で流しながら、マイクロバーナー¹¹⁾(D)の炎の高さを4~5cmとし、フラスコ(B)を約10分間加熱する¹²⁾。試験管をはずし、捕集した液を0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液で20mLとし、試験溶液とする。

(3) 空試験溶液の調製

(2)試験溶液の調製における試料添加を行わず、同様に操作して空試験溶液とする¹⁹⁾。

(4) 検量線用標準溶液の調製

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

$$\text{亜硫酸水素ナトリウム (SO}_2\text{として) の純度 (\%)} = 0.0032 \times F \times (b - a) \times \frac{1000}{W}$$

a : 滴定量 (mL)

b : 空試験溶液の滴定量 (mL)

W : 亜硫酸水素ナトリウム採取量 (g)

F : 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター

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

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

二酸化硫黄標準溶液 0²⁰⁾、1、2、3、4mL 及び 5mL をそれぞれ正確に量り、0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えてそれぞれ正確に 5mL とし、検量線用標準溶液とする（濃度 二酸化硫黄として 0、0.4～2μg/mL）。

(5) 測定法

① 測定

試験溶液 5mL を正確に量り、水 0.1mL を加えたものを (A) とし、新しく試験溶液 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²¹⁾。(A) および (B) のそれぞれにパラローズアニリン・ホルムアルデヒド試液 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（検量線の「0」にあたる）を対照とし、波長 580nm における吸光度を測定する²²⁾。空試験溶液も同様の操作を行い、通気蒸留装置の汚染の有無を確認する。

② 検量線

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

③ 定量

試験溶液の呈色反応後の吸光度〔(A) の吸光度－(B) の吸光度〕を算出し、検量線

より、試験溶液中の二酸化硫黄濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を求め、次式によって試料中の二酸化硫黄含量 (g/kg) 又は亜硫酸水素アンモニウム含量 (g/L) を計算する²³⁾。

$$\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = \frac{C}{1000 \times W_1} \times 5 \times \frac{20}{5}$$

亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合

$$\text{亜硫酸水素アンモニウム (g/L)} = \frac{C}{1000 \times W_2} \times 5 \times \frac{20}{5} \times 1.547$$

C : 試験溶液中の二酸化硫黄濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

W_1 : 試料の採取量 (g)

W_2 : 試料の採取量 (mL)

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

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

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

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

試薬・試液

1. 亜硫酸水素ナトリウム : [特級]
2. 過酸化水素 : [30%、特級]
3. 0.3%過酸化水素溶液 : 過酸化水素 1mL に水を加えて 100mL とする。用時調製する。
4. メチルレッド : [特級]
5. メチレンブルー : [特級]
6. エタノール : エタノール (99.5) [高速液体クロマトグラフィー用]、遮光して保存する。
7. メチルレッド・メチレンブルー試液²⁴⁾ : メチルレッド 0.2 g 及びメチレンブルー 0.1 g にエタノールを加えて溶かして 100mL とする。
8. 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液 : [容量分析用]
9. シリコーン樹脂 : [食添]
10. リン酸 : [特級]
11. リン酸試液 : リン酸 100mL に水 240mL を加える。
12. 水酸化ナトリウム : [特級]
13. ジメドン : 5, 5-ジメチル-1, 3-シクロヘキサジオン。市販品を用いる。
14. 5%ジメドン・エタノール溶液 : ジメドン 5 g を量り、エタノールを加えて溶かし 100mL とする。用時調製する。
15. アジ化ナトリウム : 市販品を用いる。
16. 塩酸 : [特級]

17. パラローズアニリン塩酸塩：[特級]
18. パラローズアニリン試液：パラローズアニリン塩酸塩 40mg に塩酸 20mL を加えて溶かし、水を加えて 100mL とする。
19. ホルムアルデヒド液：[特級]
20. 0.2%ホルムアルデヒド溶液：ホルムアルデヒド液 3 g を量り、水を加えて 500mL とする²⁵⁾。用時調製する。
21. パラローズアニリン・ホルムアルデヒド試液：パラローズアニリン試液と 0.2%ホルムアルデヒド溶液の等量を混和する。
22. 0.05mol/L ヨウ素溶液：[容量分析用]
23. 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液：[容量分析用]
24. デンプン：でんぷん（溶性）[1 級]
25. デンプン試液：水約 20mL にデンプン 1 g を懸濁させたものを、熱湯約 180mL にかくはんしながら少量ずつ加え、全体をにかくはんして液が半透明になるまで煮沸後、放冷し上澄液を用いる。用時調製する。

[注]

- 1) 亜硫酸水素アンモニウム水、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、ピロ亜硫酸カリウム及びピロ亜硫酸ナトリウムは指定添加物であり、亜硫酸水素カリウム液はピロ亜硫酸カリウムの、亜硫酸水素ナトリウム液はピロ亜硫酸ナトリウムの製剤である。なお、亜硫酸水素アンモニウム水は「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年厚生省告示 370 号）の第 2 添加物の F 使用基準の添加物一般の 2. に掲げる表にいう「亜硫酸塩等」には該当しないが、食品中の亜硫酸水素アンモニウム水を分析する際には、本分析法を用いることができる。二酸化硫黄を特定する必要がある場合には、参考 1 に示す分析法を用いることができる。また、スクリーニング法として参考 2 に示す分析法がある。
- 2) 精製水中の溶存酸素によって微量の亜硫酸が硫酸に酸化されるので、本操作に用いる水は脱気したものを用いる。煮沸する代わりに、窒素ガス又はヘリウムガスを 5 分間通気して脱気してもよい。
- 3) 固体食品は、ばらつきが多く、とくに乾燥果実は個体差が大きいので均一化に注意する。
- 4) 溶液の色調は紫色から青みの緑に変わる。捕集液をあらかじめ中性とするための操作である。
- 5) 各試料の採取量は、ぶどう酒の製造に用いるぶどう果汁及びぶどう酒の亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合は 20mL、それ以外の場合は、ぶどう酒、天然果汁等の液体食品では 20 g、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 5 g、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 1 g、かんぴょうでは 0.1~0.2 g を参考に、二酸化硫黄含有量に応じて滴定量がビュレットの容量の範囲に収まるように調整する。試料の採取量が多すぎる

と膨潤や気泡を生じ、亜硫酸の測定値が低くなることや、測定不能になることがある。また、かんぴょう等では試料の採取量が少なく、二酸化硫黄の含有量が不均一である場合があるので、試行数を増し、同一検体について3試行の平均値を求めると比較的正確な値が得られる。

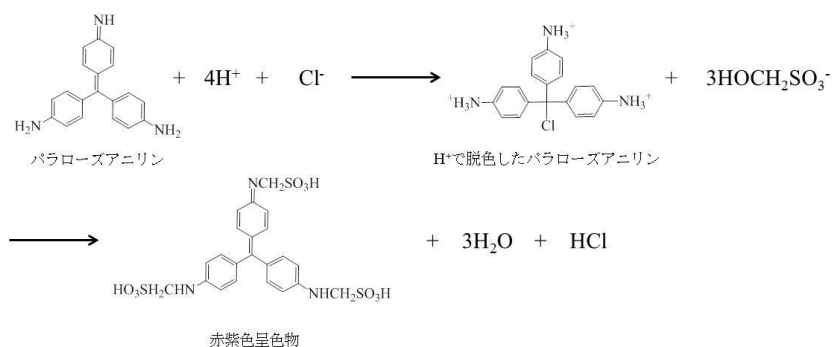
- 6) 膨潤し、流動性が失われるのを防ぐ目的で用いる。比色法（分析法B）では、エタノール中の不純物が定量の妨害となるので、高純度（高速液体クロマトグラフィー用）のものを使用する。
- 7) 液量調整の目的で加える。液体食品では加える必要はない。
- 8) 気泡止めの目的で用いる。多量のホルムアルデヒドが混在する市販品があり、これらを用いると定量妨害となる。
- 9) 二酸化硫黄として1 mg に対応する亜硫酸水素ナトリウムを水 20mL に添加し、これに5、10、15、20、25、30、40%及び50%のリン酸それぞれ 10mL ずつを加え、本操作による二酸化硫黄の回収率実験を行った結果では、5 %リン酸の場合は 65.2%と低いが、10%以上ではいずれも 99%以上であった。なお、リン酸の含量は 85.0%以上であり、リン酸試液はこの実験での 25%リン酸に相当する^{文献1)}。
- 10) 二酸化硫黄として1 mg 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、1.5 L 及び 2 L / 分として二酸化硫黄の回収率実験を行った結果では、窒素ガス流量が 0.1、0.2、0.3 L / 分での回収率は、それぞれ 15.2%、65.9%、92.5%と低いが、0.4～2 L / 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 1.2 L / 分以上では有機酸の影響が大きくなり、二酸化硫黄の見かけ上の数値が高くなる。これらの実験より、窒素ガス流量を 0.5～0.6 L / 分とした^{文献1)}。
- 11) 熱源として電気バーナー、マントルヒーター又は水浴を用いて加熱してもよい。マイクロバーナーに比べてフラスコ（B）内の温度上昇速度が異なるため、10 分間の加熱では二酸化硫黄が完全に回収されない場合がある。予め回収に必要な加熱時間を確認する必要がある。
- 12) 炎が弱いと回収率が低下する場合があるが、試料が乾固したり、焦がしたりしないように注意する。

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

- 13) 本法における定量限界は、0.1 g / kg（試料 2g 採取の場合）である。分析法Aにおいて、

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

- 14) 放置中に空気中の二酸化硫黄ガスを吸収するので、調製後密栓して保存する。0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液のかわりに、参考 1 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類確認分析法で使用する 1% トリエタノールアミンを使用してもよい。
- 15) 検体中にホルムアルデヒド、アセトアルデヒド等が存在すると、パラローズアニリン・ホルムアルデヒド混液による亜硫酸の呈色が妨害されるので、これを防止する目的で用いる。アセトアルデヒド 2.5 g が存在してもその妨害は認められない。ジメドンは、必ず高速液体クロマトグラフィー用エタノールに溶かすこと。この溶液は放置すると、二酸化硫黄の回収率が低下するので、用時調製したものを用いる。
- 16) 亜硝酸による影響を防ぐ目的で用いる。亜硫酸 1 mg 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) 1 mL の添加により、亜硝酸 1 mg までの影響を除くことができる。アルカリ滴定法は亜硫酸含量の高い検体に適用されるので、亜硝酸の影響はほとんど認められないが、アジ化ナトリウム溶液 (1→100) を加えてもよい。一方、ネギ、玉ねぎ、ニンニク等の硫黄化合物を含む食品ではアジ化ナトリウム溶液を添加することで二酸化硫黄が生成される。これを防ぐにはアジ化ナトリウム溶液を添加せずに通気蒸留操作を行うことが有効である^{文献 2)}。
- 17) アルカリ滴定法に比べて微量の亜硫酸を定量するため、試液及び装置中に酸素があると亜硫酸は硫酸に酸化されるので、置換の目的でこの操作を加える。二酸化硫黄として 0.01mg 添加の際、この操作を省略すると回収率は 10~20% 程度減少する。
- 18) ぶどう酒の製造に用いるぶどう果汁及びぶどう酒の亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合は試料採取量を 2 mL とする。
- 19) 装置内の汚染の有無を確認するために実施する。そのため、定量の補正には使用しない。
- 20) 試薬ブランクである。比色定量の際の対照として用いる。
- 21) 0.3% 過酸化水素溶液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。
- 22) 本法の原理は次のとおりである。



- 23) 分析法B（比色法）における定量限界は0.004 g/kg（試料2 g採取の場合）である。
 分析法Bにおいて、砂糖2 gに二酸化硫黄0.01mgを添加した場合（0.005 g/kg相当）の5試行の平均回収率は85.6%（RSD8.60%）であった。試料によっては妨害成分の影響により、定量限界が高くなる場合がある。
- 24) 長期間保存して沈殿が生じる、あるいは色調が変化する場合は、メチルレッド0.2 g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0.1 g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。市販品を使用することもできる。
- 25) ホルムアルデヒド液は、新しいものはホルムアルデヒド36.0～38.0%を含むので、この調製法により、0.22～0.23%溶液が得られる。ホルムアルデヒド液は劣化が激しいので注意を要する。

[文献]

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2015、354（2015）、金原出版
- 2) 下井俊子ら：食衛誌 45、332（2004）

参考 1

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類確認分析法

1、分析法の概要

食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は、液体クロマトグラフィー又はイオンクロマトグラフィーにより確認を行う。(2019 年設定、2021 年改正)

2. 分析法

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

図 1 の通気蒸留装置を用いる。

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

(3) 標準溶液の調製

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

(4) 測定法

① 測定条件³⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフ又はイオンクロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤⁴⁾ : 強アニオン交換 (第 4 級アミン)

カラム管：内径 4mm、長さ 200mm

カラム温度：40℃

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

流速：1.0～1.5mL/分

測定波長：210nm⁵⁾

注入量：50μL

② 定量

試験溶液 50μL を正確に量り、液体クロマトグラフ又はイオンクロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線によって試験溶液中の二酸化硫黄（SO₂）濃度を求め、次式によって試料中の二酸化硫黄含量（g/kg）又は亜硫酸水素アンモニウム含量（g/L）を求める^{6,7)}。

$$\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = C \times V \times \frac{1}{1000 \times W_1}$$

亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合

$$\text{亜硫酸水素アンモニウム (g/L)} = C \times V \times \frac{1}{1000 \times W_2} \times 1.547$$

C：試験溶液中の二酸化硫黄濃度（μg/mL）

V：捕集液量（mL）

W₁：試料の採取量（g）

W₂：試料の採取量（mL）

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

次亜硫酸ナトリウム含量（g/kg）＝二酸化硫黄含量（g/kg）×1.359

ピロ亜硫酸カリウム含量（g/kg）＝二酸化硫黄含量（g/kg）×1.735

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

試薬・試液

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

8. 炭酸水素ナトリウム：[特級]
9. 0.1mol/L 炭酸ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム 10.6 g を水に溶かして 1000mL とする。
10. 0.1mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム 8.4 g を水に溶かして 1000mL とする。
11. 1.8mmol/L 炭酸ナトリウム・1.2mmol/L 炭酸水素ナトリウム溶液：0.1mol/L 炭酸ナトリウム 18mL と 0.1mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 12mL に水を加えて 1000mL とする。

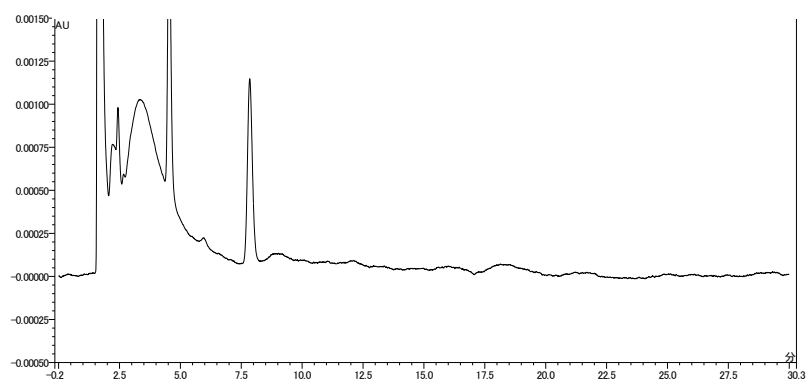
[注]

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

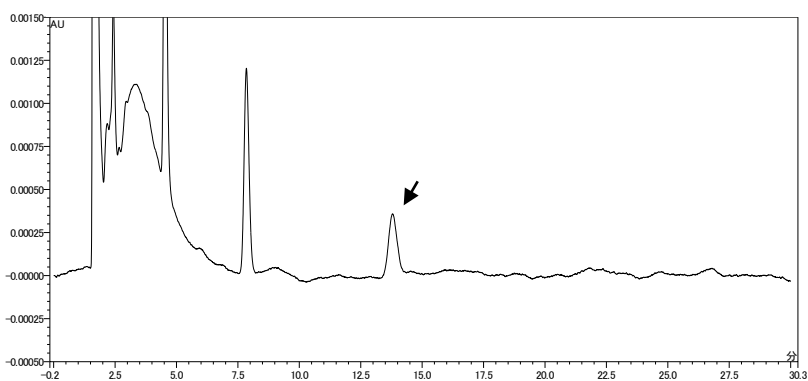
注表 1 各種食品中の二酸化硫黄測定値の比較結果

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

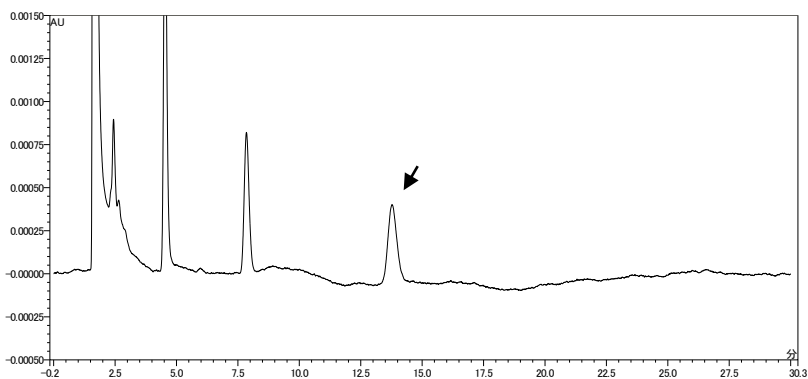
亜硫酸塩類使用の表示(有) の食品は3 試行の平均、(無) の食品は1 試行



(1) 亜硫酸塩未使用赤ワイン



(2) 亜硫酸塩未使用赤ワインに二酸化硫黄として $5\mu\text{g/g}$ 添加



(3) 標準溶液 (二酸化硫黄として $1\mu\text{g/mL}$)

注図1 亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) のクロマトグラム

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

カラム温度：40℃

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

流速：1.5mL/分

検出波長：210nm

注入量：50μL

[文献]

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

参考 2

ヨウ素酸カリウム・デンプン紙による定性分析法

1. 分析法の概要

ヨウ素酸カリウム・デンプン紙の変色による定性試験により、食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の存在の有無を判定する。(2019 年設定、2021 年改正)

2. 分析法

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 標準溶液の調製

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

(3) 測定法

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

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

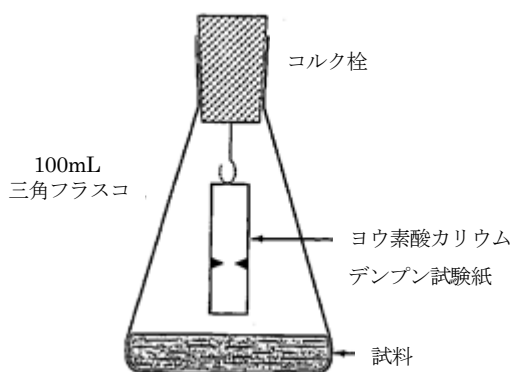


図1 ヨウ素酸カリウム・デンプン紙による定性法

試薬・試液

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

[注]

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

注表 1. ヨウ素酸カリウム・デンプン紙法とアルカリ滴定法の比較

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

3 試行の平均値

*アルカリ滴定法

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

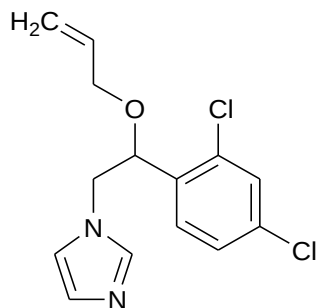
[文献]

日本薬学会編：衛生試験法・注解 2015、352（2015）、金原出版

防かび剤

イマザリル

Imazalil



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

1. 分析法の概要¹⁾

食品中のイマザリルは、アルカリ性下に酢酸エチルで抽出後、硫酸溶液及び酢酸エチルによる液液分配により精製し、液体クロマトグラフィーにより定量する。（2000 年設定、2019 年改正、2021 年改正）

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

① かんきつ類

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

② バナナ

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

③ 加工食品

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製⁵⁾

試料約 10 g を精密に量り、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 2 mL⁶⁾ 及び無水硫酸ナトリウム⁷⁾ を 20～40 g 加えて十分にかくはんし、酢酸エチル 50 mL を加え、3 分間ホモジナイズする。遠心（10 分間、3000 回転/分）した後、上清を分取する。沈殿物に酢酸エチル 50 mL を加え、同様に操作する。全上清を分液漏斗に合わせ、5 %炭酸ナトリウム溶液 50 mL、水 50 mL で順次洗浄した後水層を捨てる。次いで酢酸エチルに 0.025 mol/L 硫酸溶液 50 mL 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5 mol/L水酸化ナトリウム溶液5 mLを加えた後⁸⁾、酢酸エチル25 mLを加えよく振り混ぜた後、酢酸エチル層を分取する。この操作を更に1回繰り返す、酢酸エチル層を分取し、無水硫酸ナトリウム10 gで脱水後、減圧乾固する。残留物はメタノール/水混液(75:25)5 mLを加えて溶解し、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁹⁾

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

(4) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

紫外可視吸光光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径4.6 mm、長さ150~250 mm

カラム温度：40℃

移動相：メタノール/水混液(75:25)

流速：1 mL/分

測定波長：230 nm

注入量：20 µL

② 検量線¹²⁾

検量線用標準溶液20 µLずつをそれぞれ量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{13,14)}

試験溶液20 µLを液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線によって試験溶液中のイマザリル濃度(µg/mL)を求め、次式によって試料中¹⁵⁾のイマザリル含量(g/kg)を計算する。

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

C：試験溶液中のイマザリル(µg/mL)

V：試験溶液の量(mL)

W：試料の採取量(g)

④ 定量限界 0.0005 g/kg

試薬

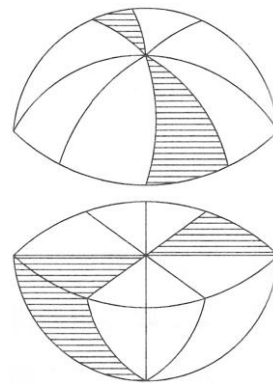
1. イマザリル：イマザリル標準品〔残留農薬試験用〕
2. 水酸化ナトリウム：〔特級〕
3. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム〔残留農薬試験用〕
4. 酢酸エチル：〔残留農薬試験用〕
5. 無水炭酸ナトリウム：炭酸ナトリウム〔特級〕
6. 硫酸：〔特級〕
7. メタノール：〔高速液体クロマトグラフィー用〕

〔注〕

1) 農薬としてイマザリルが使用される場合の残留基準は、食品添加物として使用される場合（みかんを除くかんきつ類に 5.0ppm、バナナに 2.0ppm）よりも著しく低いもの（小麦に 0.01ppm、米等に 0.05ppm）もある。したがって農薬としてのイマザリルの分析法は高感度が要求され、食品添加物としてのイマザリルの分析法よりも煩雑になっている。食品添加物としてのイマザリルを分析するには、ここに記載した方法で対応できる。

2) 「食品、添加物等の規格基準 第1食品 A食品一般の成分規格6 （2）検体」及び「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）別添「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」参照。

3) 果実 5～10 個を選び、8 分割法により平均的に検体 250～300 g をとり、ホモジナイズして試料としてもよい。8 分割法：箱又はロットの各段から、平均的な大きさのもの 5～10 個を選び、それぞれについて注図 1 のように分割し、これらのうち図中の斜線部分にあたる部位 20～40 片を検体のそれぞれから均等にとり、ホモジナイズして試料とする。水分の少ないかんきつ類の場合、果皮と果肉を分離し、果肉をホモジナイズした後、細断した果皮を少量ずつ加えながらホモジナイズすると均等な試料になりやすい。レモン、ネーブル等の果皮の硬いかんきつ類では、同量の水を精密に量って加え、ホモジナイズし、その約 100 g を精密に量って試料としてもよい。



注図 1 試料採取法

4) 1～2 房のバナナから 3～4 本を任意に採取し、先端及び果柄部を可食部の近くで切断する。果肉を果皮ごと約 1 cm ずつの輪切りにしたものを交互に、各検体についてほぼ均等に約 200 g 採取し、ホモジナイズして試料としてもよい。

5) オルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、ジフェニル及びチアベンダゾールの分析法の試験溶液調製法を適用する場合は、酢酸エチル層を合わせた後、

本法の試験溶液の調製に記載の 0.025mol/L 硫酸溶液 50mL を加える操作以降を実施する。
ただし、分析対象により夾雑成分の影響を除去できない場合もあるので、その場合は本法
(イマザリルの分析法) を用いること。

6) 試料抽出液の液性に注意する。特に、試料がレモン等の酸性の強い柑橘類の場合、水層
がアルカリ性であることを確認する。

- ・試料からの抽出時は、水層はアルカリ性
- ・酢酸エチル-硫酸水溶液分配時は、水層は酸性
- ・酢酸エチル-水酸化ナトリウム溶液分配時は、水層はアルカリ性

なお、酸性は pH1 付近、アルカリ性は pH11 付近を目安にする。

7) かんきつ類のジュースには使用しなくてよい。

8) 液性が pH11 付近であることを確認する。必要に応じて、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶
液を追加する。

9) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜、調整してもよい。

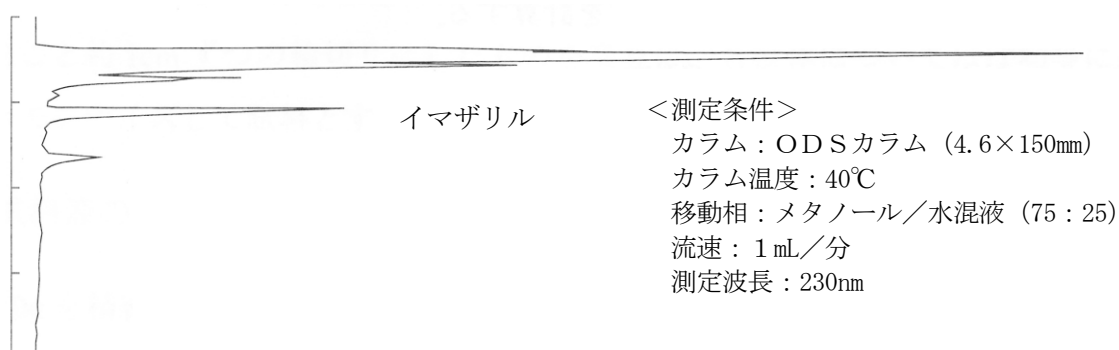
10) 試験溶液中の濃度が低濃度の場合は、検量線を 0.5 μ g/mL $\sim$ 5 μ g/mL になるように標準
原液を適宜希釈して検量線を作成する。

11) 測定条件は例示である。用いるカラムの内径及び長さによって、流速及び注入量等を調
整する。

12) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のな
いことを確認する。

13) 本法による液体クロマトグラムの一例を注図 2 に示す。

試料：オレンジ



注図 2 イマザリルの液体クロマトグラム

14) 本法による添加回収試験結果は、次のとおりである。

①試料・添加量：レモン 5 μ g/10 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 μ g/10 g、回収率 (%)：72.8、74.4、73.2、平均値 (%)：73.5

15) 試料の調製の際に水を添加した場合には、次式により、検体中のイマザリル含量を求め

る。

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

C : 試験溶液中のイマザリル (μg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

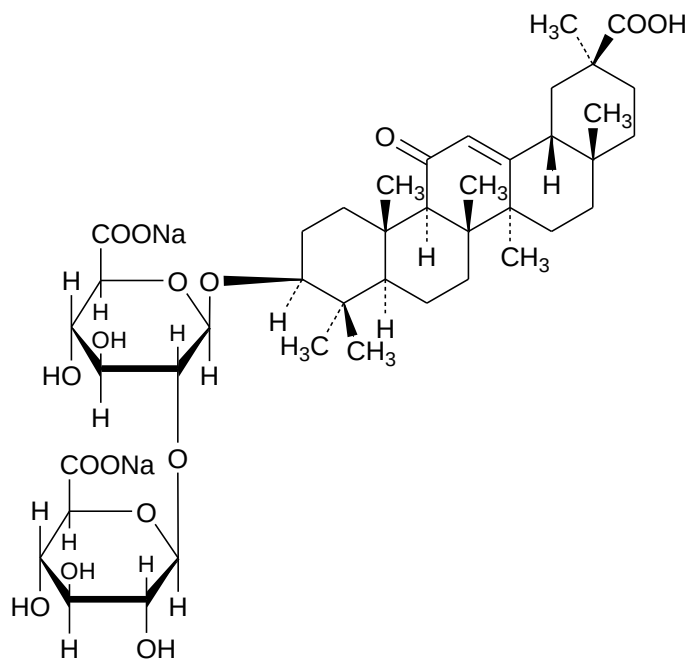
W₁ : 検体の採取量 (g)

W₂ : 検体に添加した水の量 (g)

甘味料

グリチルリチン酸二ナトリウム

Disodium Glycyrrhizinate



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

1. 分析法の概要

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

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

① 液状食品

試料約10gを精密に量り、1%アンモニア水・メタノール試液を加えて正確に100mLとする。よく振とうした後、遠心（10分間、3000回転/分）する。上層20mLを正確に分取した後、順相固相抽出カラムに約2mL/分で負荷し、1%アンモニア水・メタノール試液

で洗浄後、固相抽出カラムに空気を通して残留するメタノールを除去する。溶出溶媒に水を使用し、溶出液を 10mL に定容したものを試験溶液とする²⁾。

② 固形食品

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

（3）検量線用標準溶液の調製⁴⁾

グリチルリチン酸 0.100 g を量り、50%メタノールに溶解して正確に 100mL とする。その 10mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする（濃度 100 μ g/mL）。標準溶液 0.5、1、5 及び 10mL を正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に 100mL とし、検量線用標準溶液とする（濃度 0.5～10 μ g/mL）。

（4）測定法

① 測定条件⁵⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150～250mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル／メタノール／2%酢酸混液（12：5：15）

流速：1.0mL／分

測定波長：254nm

注入量：10 μ L

② 検量線⁶⁾

検量線用標準溶液をそれぞれ液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{7,8)}

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中のグリチルリチン酸濃度（ μ g/mL）を求め、次式によって試料中のグリチルリチン酸含量（g/kg）を計算する。

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

C：試験溶液中のグリチルリチン酸濃度（ μ g/mL）

V：試験溶液の容量（mL）

W：試料の採取量（g）

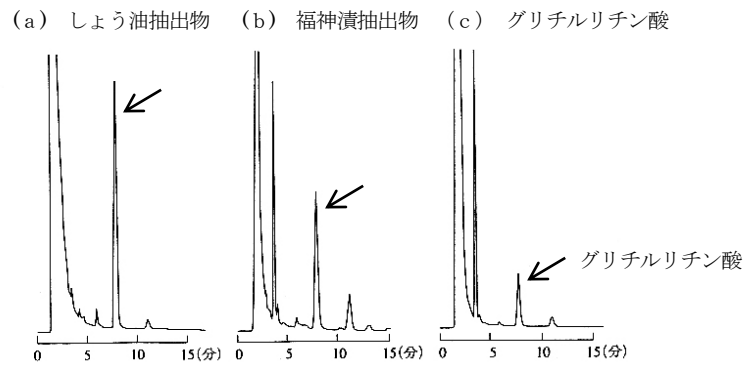
④ 定量限界 0.0025g/kg

試薬・試液

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

[注]

- 1) グリチルリチン酸を特定する必要がある場合には、参考に示す分析法を用いることができる。
- 2) 本法は塩化ナトリウムや保存料、サッカリンナトリウム等の妨害はない。
- 3) ソースやみそ等の半固形及び固形食品は、1%アンモニア水でホモジナイズした後、1%アンモニア水・メタノール試液で抽出することにより回収率が向上する。
- 4) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜、調整してもよい。
- 5) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。分析の際は、グリチルリチン酸のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 6) 必要に応じて、標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 7) グリチルリチン酸の液体クロマトグラムを注図 1 に示す。



〈測定条件〉

カラム：ODSカラム（内径 4.6mm、長さ 150mm）

測定波長：254nm

注図1 グリチルリチン酸の液体クロマトグラム

8) 本法の添加回収率は 90%以上（魚肉ねり製品は 87%）である。

参考

グリチルリチン酸二ナトリウム確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のグリチルリチン酸二ナトリウムは、液体クロマトグラフィー質量分析又は液体クロマトグラフィータンデム質量分析によりグリチルリチン酸として確認を行う。(2019 年設定、2021 年改正)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー質量分析又は液体クロマトグラフィータンデム質量分析)

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試験溶液の調製

(3) 標準溶液の調製¹⁾

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

(4) 測定法

① 測定条件^{2,3)}

液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)又は液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 2.0mm、長さ 150mm

カラム温度：40℃

移動相：A液 0.2vol%ギ酸

B液 0.2vol%ギ酸含有アセトニトリル

リニアグラジエントの条件⁴⁾

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

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI (－)

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

主なイオン：①LC-MS- m/z 821、②LC-MS/MS-プリカーサーイオン m/z 821、プロダクトイオン m/z 351, 113

注入量：10 μ L

② 定性⁵⁾

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

試薬・試液

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

[注]

- 1) 質量分析計の感度に応じて適宜希釈すること。
- 2) 測定条件^{文献1)}は例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、グリチルリチン酸のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 3) その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 4) 濃度勾配の条件は、使用する分析カラムにより適宜変更する。
- 5) LC-MSを用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑物によるマトリックス効果により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークが検出されることを確認する。

[文献]

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

製造用剤等

ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム

Calcium Stearoyl Lactylate and Sodium Stearoyl Lactylate

1. 分析法の概要

食品中のステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム¹⁾は、けん化して得られる乳酸を2-ニトロフェニルヒドラジンで誘導体化して液体クロマトグラフィーにより測定し、得られた乳酸含量をもとにステアロイル乳酸カルシウムとして定量する。(2010年設定、2019年改正、2021年改正)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

① 抽出

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

② 誘導体化

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

(3) 検量線用標準溶液の調製⁹⁾

乳酸リチウムを105℃で4時間乾燥し、0.106 gを量り、水を加えて溶かし正確に100mLと

する。この液 25mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL とし、標準原液とする（濃度 乳酸として 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準原液 5、10、20、50mL 及び 100mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする（濃度 乳酸として 12.5～250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準溶液 1 mL をそれぞれねじ口付き試験管に正確にとり、（2）試験溶液の調製②誘導体化の操作を行い、検量線用標準溶液とする（濃度 乳酸として 0.5～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

（4）測定法

① 測定条件¹⁰⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹¹⁾：オクチルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm ）

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150mm

移動相：0.1vol%ギ酸／メタノール混液（75：25）

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

流速：1.0mL／分

測定波長：400nm

注入量：20 μL

② 検量線¹²⁾

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{13～15)}

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線から試験溶液中の乳酸濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を求め、次式によって試料中のステアロイル乳酸カルシウムの含量（g/kg）を計算する。

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

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

W：試料の採取量（g）

④ 定量限界 ステアロイル乳酸カルシウムとして 0.2 g/kg

試薬・試液等

1. 乳酸リチウム：純度 98%以上のものを用いる。
2. 塩酸：[特級]
3. 酢酸エチル：[特級]
4. 塩化ナトリウム：[特級]
5. 水酸化カリウム：[特級]
6. エタノール：エタノール（95）[特級]

7. 1 w/v %水酸化カリウム・エタノール試液：水酸化カリウム 1.0 g を 5 mL の水に溶かし、エタノールを加えて 100 mL とする。密栓保存する。
8. 逆相固相抽出カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム (500 mg / 6 mL)。使用前にメタノール 10 mL 及び塩酸 (1 → 100) 10 mL で順次コンディショニングをする。
9. 2-ニトロフェニルヒドラジン：市販品を用いる。
10. 0.02 mol / L 2-ニトロフェニルヒドラジン試液：2-ニトロフェニルヒドラジン 0.206 g を 15 mL の水に溶かし、エタノールを加えて 50 mL とする。この液と塩酸 (1 → 100) を 3 : 1 で混合する。冷暗所で保存し、一か月以内に使用する。
11. 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩：市販品を用いる。
12. ピリジン：[特級]
13. 0.25 mol / L 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド試液：1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 2.39 g を 3 w/v %ピリジン含有エタノールに溶かして 50 mL とする。冷暗所に保存し、一か月以内に使用する。
14. 5 w/v %水酸化カリウム試液：水酸化カリウム 5.0 g を 50 mL の水に溶かし、エタノールを加えて 100 mL とする。
15. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
16. 0.1 vol %ギ酸：ギ酸 11 mL をとり、水で 1000 mL とする。これを 10 倍希釈して使用する。

[注]

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

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



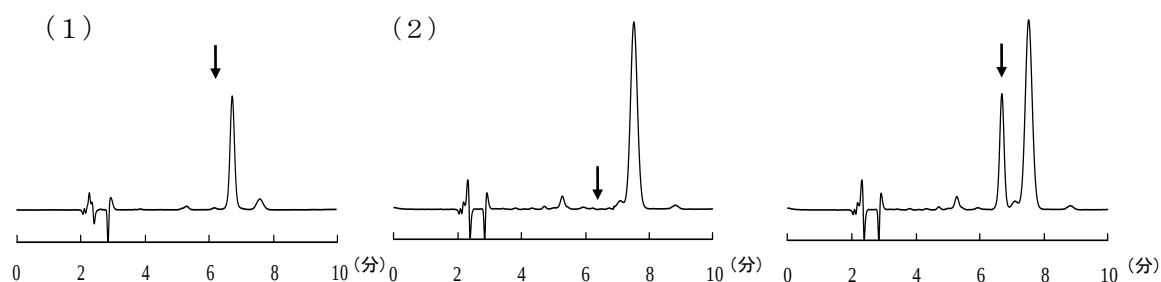
- 式の説明：

$$= \frac{C \text{ (試験溶液中の乳酸濃度}(\mu\text{g/mL)}) \times 250 \text{ (希釈倍率)}}{W \text{ (試料の採取量}(\text{g})) \times 1000*} = \frac{C}{W \times 4}$$

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

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

- 14) 本法で処理した検量線用標準溶液及びクッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム無添加及び添加）の試験溶液の液体クロマトグラムを注図1に示す。



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

カラム：C 8 カラム（内径 4.6mm、長さ 150mm、粒径 $5\mu\text{m}$ ）
 移動相：0.1vol%ギ酸／メタノール混液（75：25）
 カラム温度： 40°C
 流速：1.0mL／分
 測定波長：400nm
 注入量：20 μL

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

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

注表 1 ステアロイル乳酸ナトリウムの各食品での回収率

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

*乳化剤フリーの製品を作り、試験に用いた。

各試料にステアロイル乳酸ナトリウムを 2g/kg 添加

試行回数 10 回

[文献]

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

参考

ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウムは、けん化して得られる乳酸の2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体（分析法A）又はステアロイル乳酸（分析法B）として液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う。（2019年設定、2021年改正）

2. 分析法

分析法A（乳酸の2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体の液体クロマトグラフィー質量分析）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試験溶液の調製

（3）標準溶液の調製

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

（4）測定法

① 測定条件^{1,2)}

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤^{3,4)}：オクチルシリル化シリカゲル（粒径5 μ m）

カラム管：内径2.0mm、長さ150mm

カラム温度：40℃

移動相：0.1vol%ギ酸／メタノール混液（75：25）

流速：0.2mL／分

イオン化モード：ESI（－）

検出法：選択イオン検出（SIM）

主なイオン： m/z 224⁵⁾

注入量：0.5 μ L

② 定性⁶⁾

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

分析法B（ステアロイル乳酸の液体クロマトグラフィー質量分析）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（２）試験溶液の調製

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

（３）標準溶液の調製

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

（４）測定法

① 測定条件

LC-MSを用い、次の条件によって測定する^{1,2)}。

カラム充填剤³⁾：オクチルシリル化シリカゲル（粒径5 μ m）

カラム管：内径2.0mm、長さ150mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル／0.1vol%ギ酸混液（9：1）

流速：0.2mL／分

イオン化モード：ESI（－）

検出法：選択イオン検出（SIM）

主なイオン： m/z 355（ステアロイル－乳酸）⁸⁾

注入量：1 μ L

② 定性⁶⁾

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

試薬・試液等

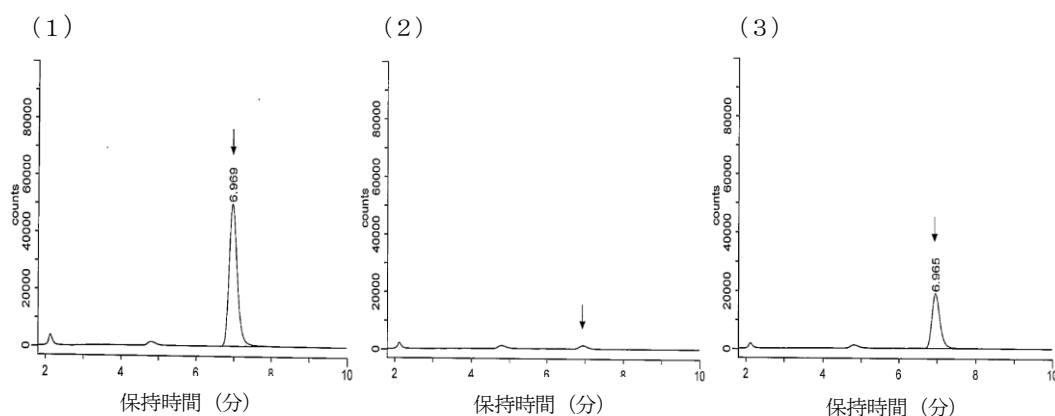
1. ステアロイル乳酸ナトリウム：食品添加物用を用いる。
2. ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム分析法の試薬・試液を準用する。
3. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。
- 2) その他の測定条件は各測定機器に従い、検量線用標準溶液の強度が最大になるように、あ

らかじめ最適化を行う。

- 3) 分析の際は、被験物質のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 4) オクタデシルシリル化シリカゲルを充填剤としたカラムによる分析も報告されている文献¹⁾。
- 5) 乳酸の2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体の $[M-H]^-$ イオンである。
- 6) LC-MSを用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑成分によるマトリックス効果により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に検量線用標準溶液を添加し、ピークが検出されることを確認する。
- 7) 本法で処理した検量線用標準溶液及びクッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム無添加及び添加）の試験溶液のLC-MSクロマトグラムを注図1に示す。

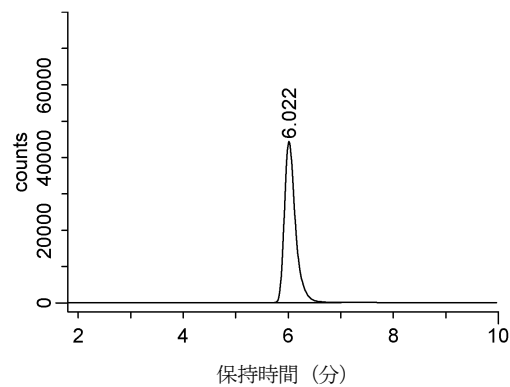


- (1) 検量線用標準溶液（乳酸として 10 μ g/mL）
- (2) クッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム無添加）
- (3) クッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム添加）

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

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

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



カラム：C 8 カラム（内径 2.0mm、長さ 150mm、粒径 5 μ m）

移動相：アセトニトリル／0.1vol%ギ酸混液（9：1）

カラム温度：40℃

流速：0.2mL／分

イオン化モード：ESI（－）

検出法：選択イオン検出（SIM）

主なイオン： m/z 355（ステアロイルー乳酸）

注入量：1 μ L

注図2 ステアロイルー乳酸標準溶液のLC-MSクロマトグラム

[文献]

- 1) 齋藤尋輝ら：分析化学、52、923（2003）

製造用剤

ポリソルベート 20、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65 及び

ポリソルベート 80

Polysorbate 20, Polysorbate 60, Polysorbate 65 and Polysorbate 80

1. 分析法の概要

食品中のポリソルベート類（ポリソルベート 20、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65 及びポリソルベート 80）はアセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）で抽出し、アルミナカラム及びシリカゲル固相抽出カラムでクリーンアップした後、薄層クロマトグラフィーにより定性する。ポリソルベート類が検出された場合には、比色法により、ポリソルベート 80 として定量する。（2008 年設定、2019 年改正、2021 年改正）

2. 分析法（薄層クロマトグラフィー及び比色法）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

①抽出

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

②精製

減圧濃縮容器に酢酸エチル約 30mL を加え、残留物を溶解し¹²⁾、次に無水硫酸ナトリウム 2～5 g¹³⁾を加えて振り混ぜ、酢酸エチル溶液をアルミナカラムへ静かに注入し、流出液は捨てる。酢酸エチル 100mL を用いて減圧濃縮容器を洗浄し、同様にアルミナカラムに

注入し、流出液は捨てる¹⁴⁾。次にメタノール 10mL を減圧濃縮容器に加えて振り混ぜ、これに酢酸エチル 40mL を加え軽く混合する¹⁵⁾。この液をアルミナカラムへ注入し、流出液を別の減圧濃縮容器にとる。さらに、先の減圧濃縮容器を酢酸エチル／メタノール混液（4：1）100mL を用いて洗浄し、洗液をアルミナカラムに注入し、流出液を先の流出液と合わせて、40℃以下で減圧乾固する。残留物に酢酸エチル 10mL を加えて溶解し、順相固相抽出カラム¹⁶⁾に注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル 20～30mL を注入し流出液は捨てる¹⁷⁾。順相固相抽出カラムを逆さにし¹⁸⁾、ジクロロメタン／メタノール混液（2：1）10mL を注入し、溶出液を減圧濃縮容器にとり、減圧乾固する。得られた残留物にジクロロメタンを加えて溶かし、正確に 10mL として¹⁹⁾試験溶液とする。このうち 0.5mL を正確に量り、薄層クロマトグラフィー用試験溶液とする。

（3）標準溶液の調製

① 薄層クロマトグラフィー用標準溶液

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

② 比色法用検量線用標準溶液

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

（4）測定法

① 薄層クロマトグラフィー（定性）

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

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

薄層板：シリカゲル薄層板²²⁾

塗布量：薄層クロマトグラフィー用試験溶液 全量²³⁾

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

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

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

展開距離：約 10 cm

② 比色法 (定量)

(a) 測定条件

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

(b) 測定液の調製

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

(c) 検量線

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

(d) 定量³⁰⁾

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

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

C : 試料溶液中のポリソルベートの濃度 (μg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

③ 定量限界 ポリソルベート 80 として 0.02 g/kg

試薬・試液等

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

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

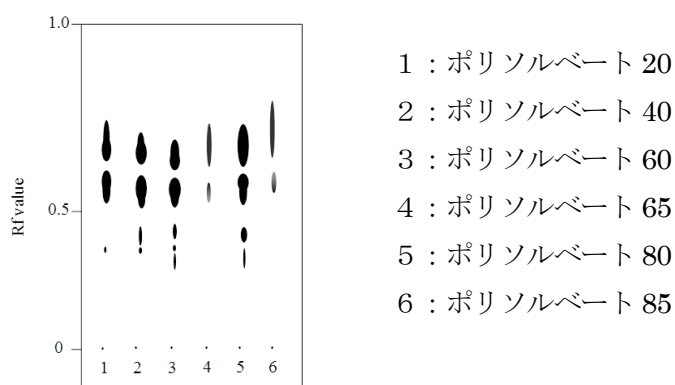
[注]

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

10mL、アセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液(28: 3 : 2)は80mL、ヘキサンは40mL、酢酸エチルは70mL とする。

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

- 17) 洗浄液が透明になるまで酢酸エチルを流す。少量の色素は酢酸エチルでは洗浄されない
ので、少量の色素が残っていてもよい。
- 18) 溶出液の容量を減らすためにバックフラッシュ法を用いるが、カートリッジに負荷する
際、沈殿物がある場合は、バックフラッシュ法で溶出すると沈殿物が落ちるため、逆さに
せず、ジクロロメタン／メタノール混液（2：1）30mL で溶出してもよい。
- 19) 濃度が高い場合には、適宜希釈する。
- 20) T L C では、ポリソルベート 80、ポリソルベート 60、ポリソルベート 20 は同様の Rf 値
のスポットパターンを示すが、ポリソルベート 65 は異なるため、定性用標準溶液は、ポリ
ソルベート 80 及びポリソルベート 65 とする。
- 21) ポリソルベート 20、60 及び 80 は同様の Rf 値のスポットパターンを示すが、ポリソルベ
ート 65 は、他のポリソルベートに比べ、観察されるスポットの数は少なく、色は薄い。
ポリソルベートの薄層クロマトグラムの一例を注図 1 に示す^{文献 1)}。



<分離条件>

薄層板：シリカゲル薄層板

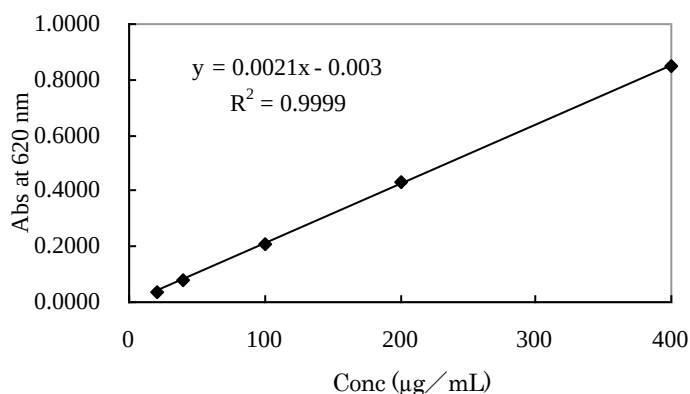
展開溶媒：ジクロロメタン／メタノール／アセトン／水混液（100：20：15：3）

発色液：ドラーゲンドルフ試液

注図 1 ポリソルベートの薄層クロマトグラム

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

- 27) 上層のチオシアン酸コバルト溶液はピペット等で下層ぎりぎりまで捨てる。下層のジクロロメタン層をピペット等で採取する際は、チオシアン酸コバルト溶液がピペットにつかないように注意する。ジクロロメタン層は空気に触れると退色するため、上層を捨てた後、すばやく測定する。
- 28) 空試験溶液である。比色定量の際の対照として用いる。
- 29) チオシアン酸コバルト試液による比色法で作成したポリソルベート 80 の検量線の一例を注図 2 に示す。



注図 2 ポリソルベート 80 検量線

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

注表 1 ポリソルベート 80 の各種食品での添加回収率^{文献 1)}

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

* 3 試行の平均値±S.D

- 31) 必要に応じて、活性化 (135℃、12 時間等) して用いる。
- 32) 酢酸エチルに懸濁せず、アルミナを粉体のまま入れる。

33) 試料がガムの場合は無水硫酸ナトリウムを積層しない。

[文献]

- 1) 河崎裕美ら：日食化誌、15、122 (2008)

参考

ポリソルベート確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のポリソルベート類（ポリソルベート20、ポリソルベート60、ポリソルベート65及びポリソルベート80）はアセトニトリル／ヘキサン／メタノール混液（28：3：2）で抽出し、アルミナカラム及びシリカゲル固相抽出カラムでクリーンアップした後、減圧濃縮し、メタノールに溶解し、メンブランフィルターでろ過後、液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う¹⁾。（2008年設定、2021年改正）

2. 分析法（液体クロマトグラフィー質量分析）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

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

（3）標準溶液の調製

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

（4）測定法

① 測定条件²⁾

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクチルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm、孔径 300 Å）

カラム管：内径 2.0mm、長さ 150mm

カラム温度：40℃

移動相：A液 0.1vol%ギ酸溶液

B液 0.1vol%ギ酸メタノール溶液

リニアグラジエントの条件		
分	A (%)	B (%)
0	50	50
5	30	70
30	1	99
40	1	99

流速：0.2mL／分

注入量：5μL

イオン化法：ESI (+)

検出法：スキャン (m/z 300～2000)

主なイオン³⁾

ポリソルベート 20：1249.74 $[C_{58}H_{114}O_{26}+Na]^+$

ポリソルベート 60：1333.84 $[C_{64}H_{126}O_{26}+Na]^+$

ポリソルベート 80：1331.82 $[C_{64}H_{124}O_{26}+Na]^+$

ポリソルベート 65：1866.36 $[C_{100}H_{194}O_{28}+Na]^+$

② 定性⁴⁾

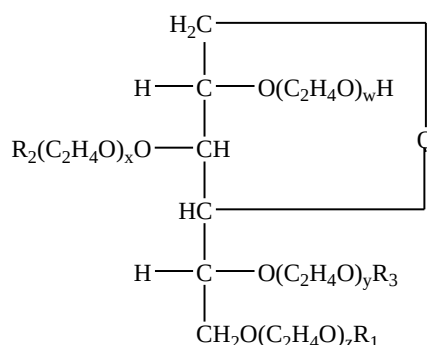
試験溶液及び標準溶液をLC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が標準溶液と一致することを確認する。

試薬・試液等

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

[注]

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



$w+x+y+z \approx 20$

ポリソルベート 20 $\text{R}_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$

ポリソルベート 60 $\text{R}_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$

ポリソルベート 65 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$

ポリソルベート 80 $\text{R}_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$, $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$

ただし、他の脂肪酸を含む。

注図1 ポリソルベート類の構造式

2) その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液のピーク強度が最大となるようにあらかじめ最適化を行う。

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

MS条件

キャピラリー電圧: 1.00kV

コーン電圧: 100V

エクストラクター: 4.00V

ソース温度: 120°C

脱溶媒温度: 400°C

コーンガス流量: 47 L/時

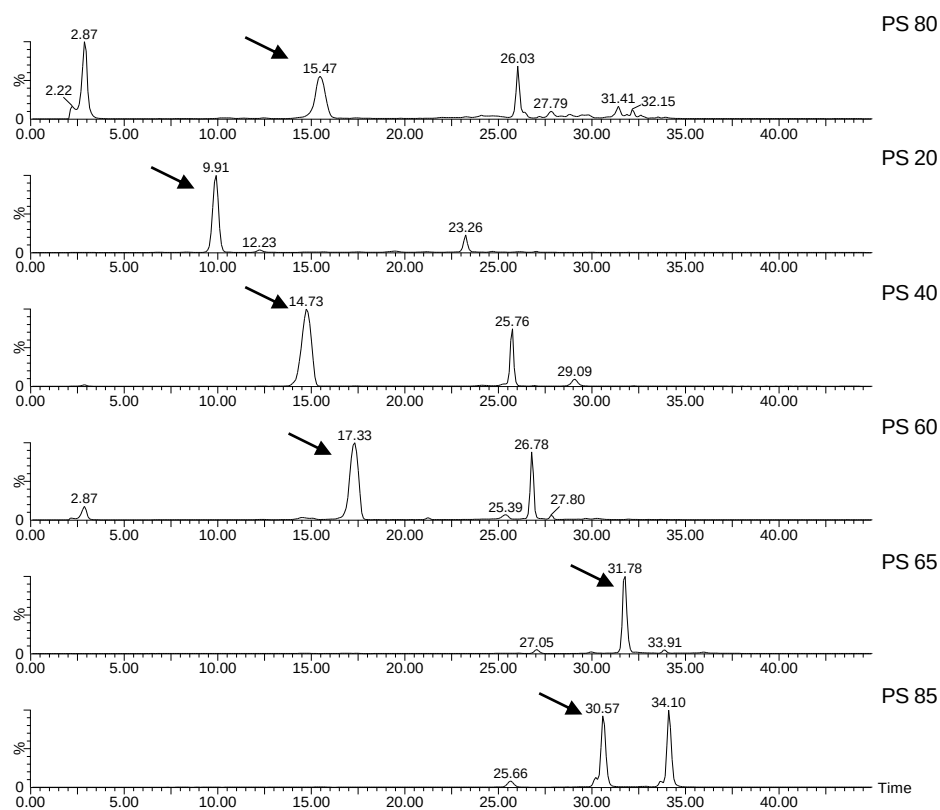
脱溶媒ガス流量: 1000 L/時

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

同程度観察される。

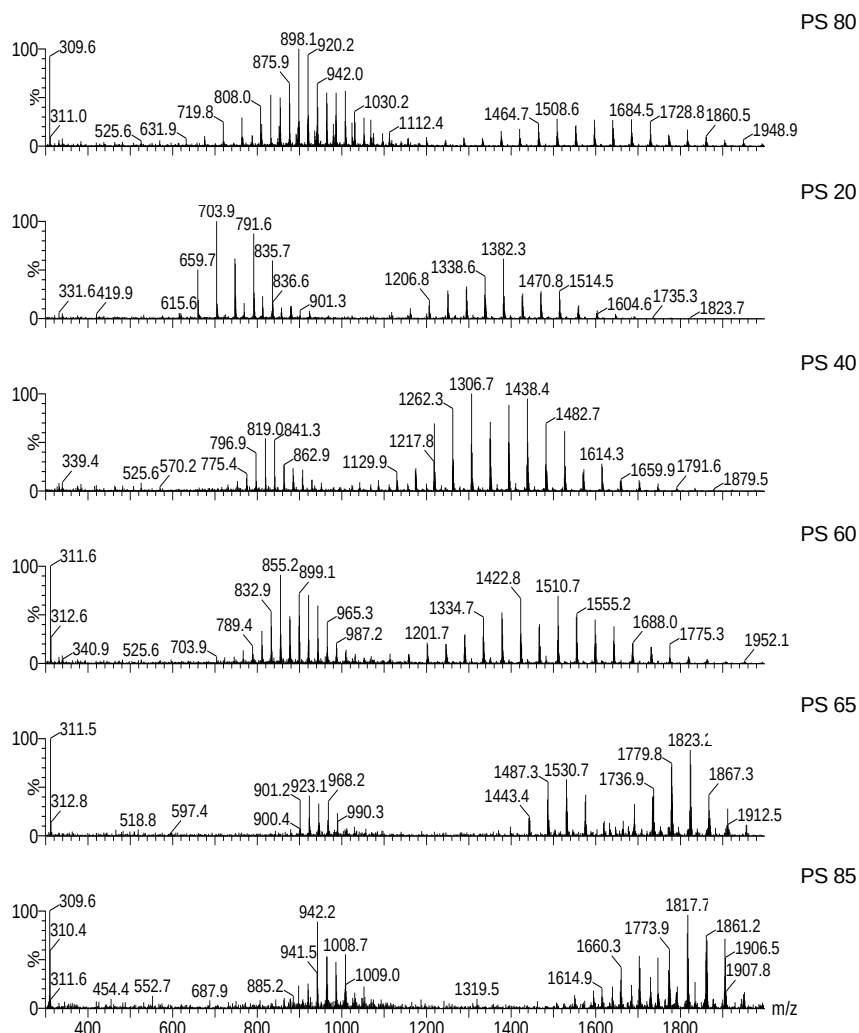
- 4) 各ポリソルベートのSIMクロマトグラムの一例を注図2に、SIMで確認されたピークのリテンションタイムでのMSスペクトルの一例を注図3に示す。

各ポリソルベート濃度：500 μ g/mL



➡ は、各ポリソルベートのピークを示す。

注図2 各ポリソルベート (PS) のSIMクロマトグラム



注図3 S I Mでピークの確認されたリテンションタイムのMSスペクトル

[文献]

- 1) 建部千絵ら：日食化誌、15、129 (2008)

ナイシンZ

Nisin Z

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

食品中のナイシンZは、メタノール／水／ギ酸混液（５：４：１）で抽出し、ポリマー固相抽出カラム、弱陽イオン交換固相抽出カラムで精製した後、液体クロマトグラフィー質量分析により定性する。（2009 年設定、2019 年改正、2021 年改正）

(1) 検体の採取と試料の調製

上記の（１）及び（２）については、ナイシンの分析法を準用する。

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

とする (1000 単位/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件

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

② 定性¹⁾

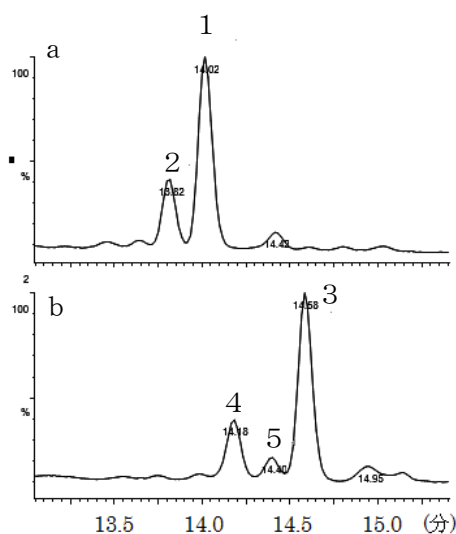
試験溶液及びナイシン標準溶液をそれぞれ LC-MS に注入し、ナイシン標準溶液のナイシン A の保持時間より後に観測されるナイシン Z の多価イオン (m/z 1111、834、667) により判定する。

試薬・試液等

ナイシンの分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

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



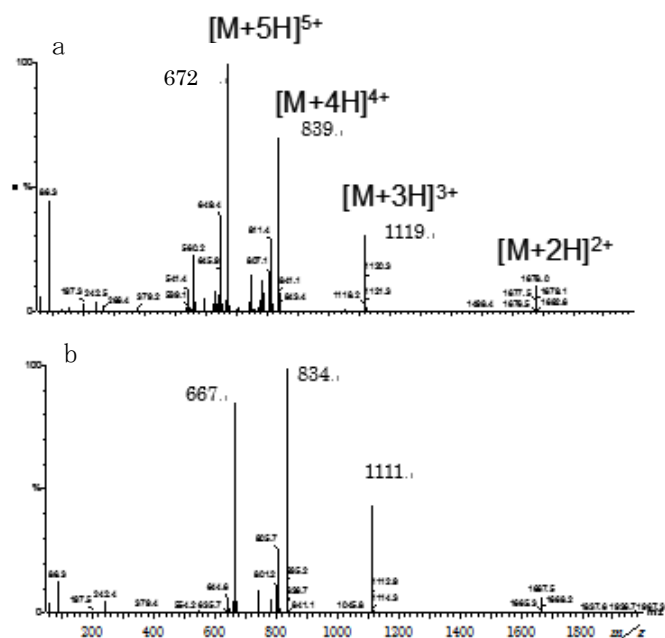
注図 1 ナイシン標準品 (a. 10000 単位/mL) 及びナイシン Z (b. 10000 単位/mL) のクロマトグラム (測定波長 210 nm)

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

5. ナイシンZに水が1分子付加したもの（分子量 3349）

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

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



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

令和3年6月24日付け薬生食基発 0624 第2号・薬生食監発 0624 第2号「食品中の食品添加物分析法」の改正について」別添3の主要な改正箇所

分類	品名等	項目	旧	新
保存料	安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム	参考 2. 分析法A (3)	安息香酸、ソルビン酸、 <u>デヒドロ酢酸及びそれらの塩類</u> 分析法	安息香酸、ソルビン酸及び <u>それらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム</u> 分析法
保存料	安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム	参考 2. 分析法B (2か所)	安息香酸、ソルビン酸及び <u>デヒドロ酢酸及びそれらの塩類</u> 分析法	安息香酸、ソルビン酸及び <u>それらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム</u> 分析法
保存料	安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム	参考 2. 試薬・試液	安息香酸、ソルビン酸及び <u>デヒドロ酢酸及びそれらの塩類</u> 分析法	安息香酸、ソルビン酸及び <u>それらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム</u> 分析法
保存料	安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム	参考 [注] 12)	検出器： <u>水素炎イオン検出器</u> <u>注入口温度：240℃</u> <u>検出器温度：250℃</u> <u>注入方式：スプリット</u> <u>スプリット比：1：10</u> <u>キャリアーガス及び流量：ヘリウム、2.5mL／分</u> <u>メイクアップガス：窒素、45mL／分</u> <u>イオン化モード（電圧）：E I</u> <u>検出法：スキャン（m/z 50～200）</u> <u>注入量：1μL</u>	検出器： <u>水素炎イオン化検出器</u>

防かび 剤	オルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、ジフェニル及びチアベンダゾール	試薬・試液	—	11. ドデシル硫酸ナトリウム：市販品を用いる。 12. リン酸：[特級]
保存料	ナタマイシン	参考 2. (4)	主なイオン ⁴⁾ ：プリカーサーイオン m/z 666、プロダクトイオン m/z 503、95、91 又は 79 注入量 ³⁾ ：2 μ L ⁴⁾	主なイオン ³⁾ ：プリカーサーイオン m/z 666、プロダクトイオン m/z 503、95、91 又は 79 注入量 ⁴⁾ ：2 μ L
保存料	パラオキシ安息香酸エステル類	1.	安息香酸、ソルビン酸及び <u>デヒドロ酢酸及びそれらの塩類</u> 分析法	安息香酸、ソルビン酸及び <u>それらの塩類並びにデヒドロ酢酸ナトリウム</u> 分析法
漂白剤	亜塩素酸ナトリウム	2. 分析法 A (4) ①	長さ <u>150</u> ～250mm	長さ <u>75</u> ～250mm
漂白剤	亜塩素酸ナトリウム	2. 分析法 B (4) ①	内径 <u>4.6</u> mm	内径 <u>4</u> mm
漂白剤	亜塩素酸ナトリウム	2. 分析法 B (4) ③	定量 ^{10), 11)}	定量 ¹⁰⁾ ([注] 11) (注図 1 を含む) を削除)
漂白剤	亜塩素酸ナトリウム	参考 1.	2005 年設定	2005 年設定、 <u>2019 年改正</u>
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類		—	(以下を対象添加物として追加する。) 亜硫酸水素アンモニウム水 Ammonium Hydrogen Sulfite Water (NH ₄ HSO ₃ : 99.11)

漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	1.	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。	<u>亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸ナトリウム（無水）、次亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム又はピロ亜硫酸ナトリウムの量として求める。</u>
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	2. 分析法 A (4)	試料中の二酸化硫黄含量 (g/kg) を計算する¹³⁾。 $\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = (a - b) \times F \times 0.32 \times \frac{1}{W}$ a : 試験溶液の滴定量 (mL) b : 空試験溶液の滴定量 (mL) <u>W : 試料の採取量 (g)</u> F : 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター 0.32 : 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL は二酸化硫黄 0.32mg に相当する。	試料中の二酸化硫黄含量 (g/kg) 又は亜硫酸水素アンモニウム含量 (g/L) を計算する¹³⁾。 $\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = (a - b) \times F \times 0.32 \times \frac{1}{W_1}$ <u>亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合</u> $\text{亜硫酸水素アンモニウム (g/L)} = \frac{(a - b) \times F \times 0.32 \times \frac{1}{W_2} \times 1.547}{1}$ a : 試験溶液の滴定量 (mL) b : 空試験溶液の滴定量 (mL) <u>W₁ : 試料の採取量 (g)</u> <u>W₂ : 試料の採取量 (mL)</u> F : 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター 0.32 : 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL は二酸化硫黄 0.32mg に相当する。 <u>亜硫酸ナトリウム（無水）含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.968</u> <u>次亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.359</u>

				ピロ亜硫酸カリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.735 ピロ亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.484
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	2. 分析法B (2)	次にフラスコ (B) をはずし、試料約 2 g を精密に量り、	次にフラスコ (B) をはずし、試料約 2 g ¹⁸⁾ を精密に量り、 (以降の注の番号をずらす)
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	2. 分析法B (5)、③	試料中の二酸化硫黄含量 (g/kg) を計算する²²⁾。 $\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = \frac{C}{1000 \times W} \times 5 \times \frac{20}{5}$ C : 試験溶液中の二酸化硫黄濃度 (µg/mL) W : 試料の採取量 (g) 亜硫酸ナトリウム (無水) 含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.968	試料中の二酸化硫黄含量 (g/kg) 又は亜硫酸水素アンモニウム含量 (g/L) を計算する²²⁾。 二酸化硫黄含量 (g/kg) $= \frac{C}{1000 \times W_1} \times 5 \times \frac{20}{5}$ 亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合 亜硫酸水素アンモニウム含量 (g/L) $= \frac{C}{1000 \times W_2} \times 5 \times \frac{20}{5} \times 1.547$ C : 試験溶液中の二酸化硫黄濃度 (µg/mL) W₁ : 試料の採取量 (g) W₂ : 試料の採取量 (mL) 亜硫酸ナトリウム (無水) 含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.968

漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	試薬・試液	13. ジメドン：5,5-ジメチル-1,3-シクロヘキサジオン <u>〔特級〕</u>	13. ジメドン：5,5-ジメチル-1,3-シクロヘキサジオン。 <u>市販品を用いる。</u>
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	試薬・試液	15. アジ化ナトリウム： <u>〔特級〕</u>	15. アジ化ナトリウム： <u>市販品を用いる。</u>
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	[注] 1)	亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、ピロ亜硫酸カリウム及びピロ亜硫酸ナトリウムは指定添加物であり、亜硫酸水素カリウム液はピロ亜硫酸カリウムの、亜硫酸水素ナトリウム液はピロ亜硫酸ナトリウムの製剤である。	亜硫酸水素アンモニウム水、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム、二酸化硫黄、ピロ亜硫酸カリウム及びピロ亜硫酸ナトリウムは指定添加物であり、亜硫酸水素カリウム液はピロ亜硫酸カリウムの、亜硫酸水素ナトリウム液はピロ亜硫酸ナトリウムの製剤である。 なお、 <u>亜硫酸水素アンモニウム水は「食品、添加物等の規格基準」（昭和34年厚生省告示370号）の第2添加物のF 使用基準の添加物一般の2. に掲げる表にいう「亜硫酸塩等」には該当しないが、食品中の亜硫酸水素アンモニウム水を分析する際には、本分析法を用いることができる。</u>
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	[注] 5)	各試料の採取量は、ぶどう酒、天然果汁等の	各試料の採取量は、 <u>ぶどう酒の製造に用いるぶどう果汁及びぶどう酒の亜硫酸水素アンモニウム含量を求め</u> <u>る場合は20mL、それ以外の場合は、ぶどう酒、天然果汁等の</u>
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	[注] 5)	亜硫酸の測定値が低く <u>なったり</u>	亜硫酸の測定値が低く <u>なることや</u>
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	[注] 18)	—	(注18) として以下を追加し、以降の注番号をずらす) <u>ぶどう酒の製造に用いるぶどう果汁及びぶどう酒の亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合は試料採取量を2mLとする。</u>

漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	[注] 23)	長期間保存して沈殿が生じたり、色調が変化する場合は、	長期間保存して沈殿が生じる、あるいは色調が変化する場合は、 (注番号は 24 に修正)
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	参考 1 1.	2018 年設定	2019 年設定
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	参考 1 2. (4) ②	次式によって試料中の二酸化硫黄含量を求める^{6,7)}。 $\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = C \times V \times \frac{1}{1000 \times W}$ C : 試験溶液中の二酸化硫黄濃度 (μg/mL) V : 捕集液量 (mL) W : 試料の採取量 (g) 亜硫酸ナトリウム (無水) 含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.968 亜硫酸ナトリウム (結晶) 含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 3.936 次亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.359 ピロ亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.484	次式によって試料中の二酸化硫黄含量又は亜硫酸水素アンモニウム含量 (g/L) を求める^{6,7)}。 $\text{二酸化硫黄含量 (g/kg)} = C \times V \times \frac{1}{1000 \times W_1}$ 亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合 亜硫酸水素アンモニウム含量 (g/L) $= \frac{C \times V \times \frac{1}{1000 \times W_2} \times 1.547}{1}$ C : 試験溶液中の二酸化硫黄濃度 (μg/mL) V : 捕集液量 (mL) W₁ : 試料の採取量 (g) W₂ : 試料の採取量 (mL) 亜硫酸ナトリウム (無水) 含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.968 次亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.359

				ピロ亜硫酸カリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.735 ピロ亜硫酸ナトリウム含量 (g/kg) = 二酸化硫黄含量 (g/kg) × 1.484
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	参考 1 [注] 2)	装置の感度が不十分な場合は試料採取量を 10 g まで増やしてもよい。	ぶどう酒の製造に用いるぶどう果汁及びぶどう酒の亜硫酸水素アンモニウム含量を求める場合は試料採取量を 2 mL とする。 <u>装置の感度が不十分な場合は試料採取量を 10 g 又は 10 mL まで増やしてもよい。</u>
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	参考 2 1.	<u>2018 年設定</u>	<u>2019 年設定</u>
漂白剤	二酸化硫黄及び亜硫酸塩類	参考 2 [注] 4)	その際 30 分以内に試験紙が藍色に変わらないときは、 <u>二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は存在しない。</u>	その際、通例、 <u>二酸化硫黄又は亜硫酸塩類が存在すれば 30 分以内に試験紙が藍色に変わるが、食品によっては、夾雑物等の影響により呈色困難な場合もある。</u>
防かび剤	イマザリル	2. (2)	を加えた後 ⁸⁾ 、酢酸エチル 25mL を加えよく振り混ぜる。	を加えた後 ⁸⁾ 、酢酸エチル 25mL を加えよく振り混ぜた後、酢酸エチル層を分取する。
防かび剤	イマザリル	[注] 8)	<u>塩化ナトリウムを飽和させると回収率が向上する。</u>	<u>液性が pH11 付近であることを確認する。必要に応じて、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を追加する。</u>
甘味料	グリチルリチン酸二ナトリウム	参考 1.	<u>2018 年設定</u>	<u>2019 年設定</u>
製造用剤等	ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム	[注] 6)	参考 2 で述べる	参考 <u>分析法 B</u> で述べる
製造用剤等	ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム	参考 1.	<u>2018 年設定</u>	<u>2019 年設定</u>

製造用 剤等	ポリソルベート 20、ポリソルベ ート 60、ポリソルベート 65 及 びポリソルベート 80	1 .	<u>2010</u> 年設定	<u>2008</u> 年設定
製造用 剤等	ポリソルベート 20、ポリソルベ ート 60、ポリソルベート 65 及 びポリソルベート 80	参考 1 .	<u>2010</u> 年設定	<u>2008</u> 年設定
未指定 添加物	ナイシン Z	[注] 1) 、 注図 2 、 a	<u>662</u>	<u>672</u>