

食安監発0621第2号
平成25年6月21日

各 検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課長
(公 印 省 略)

食品中のマレイン酸及び無水マレイン酸の試験法について

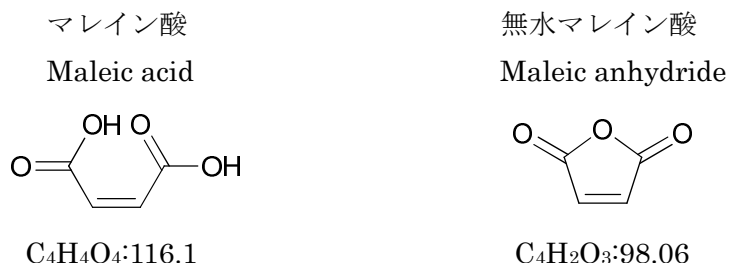
今般、台湾において、デンプン製品からマレイン酸が検出され、その製造工程において無水マレイン酸が使われていることが判明し、回収がなされているとの情報を得たところです。

マレイン酸及び無水マレイン酸については、厚生労働大臣による指定がなされていないため、マレイン酸又は無水マレイン酸を添加物として使用した場合、食品衛生法第10条に抵触すると考えられます。

国立医薬品食品衛生研究所の検討の結果を受け、別添のとおりマレイン酸及び無水マレイン酸試験法を定めたので、御了知の上、適切な運用を図られるようお願いいたします。

マレイン酸及び無水マレイン酸

Maleic acid and Maleic anhydride



1. 試験法の概要¹⁾

デンプン中のマレイン酸及び無水マレイン酸は、50vol%メタノール溶液で抽出し、水酸化カリウム試液による加水分解及び、塩酸試液による酸性化後、紫外可視吸光光度検出器を用いた液体クロマトグラフでマレイン酸として定量する。食品中に天然のマレイン酸が存在している可能性がある。したがって、定量値は食品由来のマレイン酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

均質にした試料約1gを精密に量り、遠心管に入れて、50vol%メタノール溶液25 mLを加えて30分間振とうした後、水酸化カリウム試液20 mLを加え、よく混合して2時間放置する。塩酸試液約3 mLを加えて酸性とした後、水を加えて正確に50 mLとする。数分間放置後、上清0.1 mLを正確にとり、水を加え正確に1 mLとする。この液をメンブランフィルター²⁾でろ過して試験溶液とする。

（3）検量線用標準液の調製³⁾

マレイン酸 0.100 g を量り、水を加えて正確に 100 mL とし標準原液とする（本液 1 mL はマレイン酸 1 mg を含む）。この液 1 mL を正確に採り、水を加えて正確に 100 mL とし標準溶液とする（本液 1 mL はマレイン酸 10 µg を含む）。標準溶液を 0.02, 0.05, 0.2, 0.5 mL 及び 1.0 mL をそれぞれ正確に採り、水を加えて正確に 10 mL とし、検量線用標準溶液とする（これらの液 1 mL は、それぞれマレイン酸 0.02, 0.05, 0.2, 0.5 µg 及び 1 µg を含む）。

(4) 測定法

①測定条件

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。

カラム充てん剤⁴⁾：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4.6 mm, 長さ 250 mm

カラム温度：40°C

移動相：0.1vol%リン酸溶液/メタノール混液 (98 : 2)

流速：1.0 mL/分

測定波長：214 nm

注入量：20 μL

②検量線

検量線用標準液それぞれ20 μLずつを正確に量り、それぞれを液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③定性

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、試験溶液と標準溶液のピーク保持時間が一致することを確認する。

④定量

試験溶液 20 μLを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線から試験溶液中のマレイン酸濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中のマレイン酸及び無水マレイン酸の総量 (mg/kg) をマレイン酸として求める。

$$\text{マレイン酸及び無水マレイン酸の総量(mg/kg)} = C \times 50 \times 10 / W$$

C : 試験溶液中のマレイン酸濃度 (μg/mL)

W : 試料の採取量(g)

⑤検出限界

本法の検出限界はマレイン酸として10 mg/kgとする。

試薬・試液等

1. マレイン酸：[特級]
2. リン酸：[特級] (含量85%以上)
3. 塩酸：[特級]
4. 水酸化カリウム：[特級]
5. メタノール：液体クロマトグラフィー用
6. 50vol%メタノール溶液：メタノール 250 mL に水を加えて 500 mL とする。
7. 塩酸試液：塩酸 42 mL に水 50 mL を加え、室温まで冷却した後、水を加えて 100 mL とする (5 mol/L)。
8. 水酸化カリウム試液：水酸化カリウム 14 g を量り、水を加えて溶かして 500 mL とする (0.5 mol/L)。
9. 0.1vol%リン酸：リン酸 1.2 mL をとり、水を加えて溶かして 1000 mL とする。

[注]

- 1) 本法は、デンプン中のマレイン酸の試験法である。
- 2) メンブランフィルターとして、孔径 0.2 μm 、PVDF 製のフィルターを用いる。
- 3) 検量線用標準溶液の数及び調製方法は、直線性が確認できれば、適宜、調整してよい。
- 4) 測定条件は例示である。カラムとして InertSustain C18 (ジーエルサイエンス)が使用できる。他のカラム、条件を用いる場合は、マレイン酸が、フマル酸、酢酸、リンゴ酸、コハク酸などの有機酸と良好に分離することを確認する。

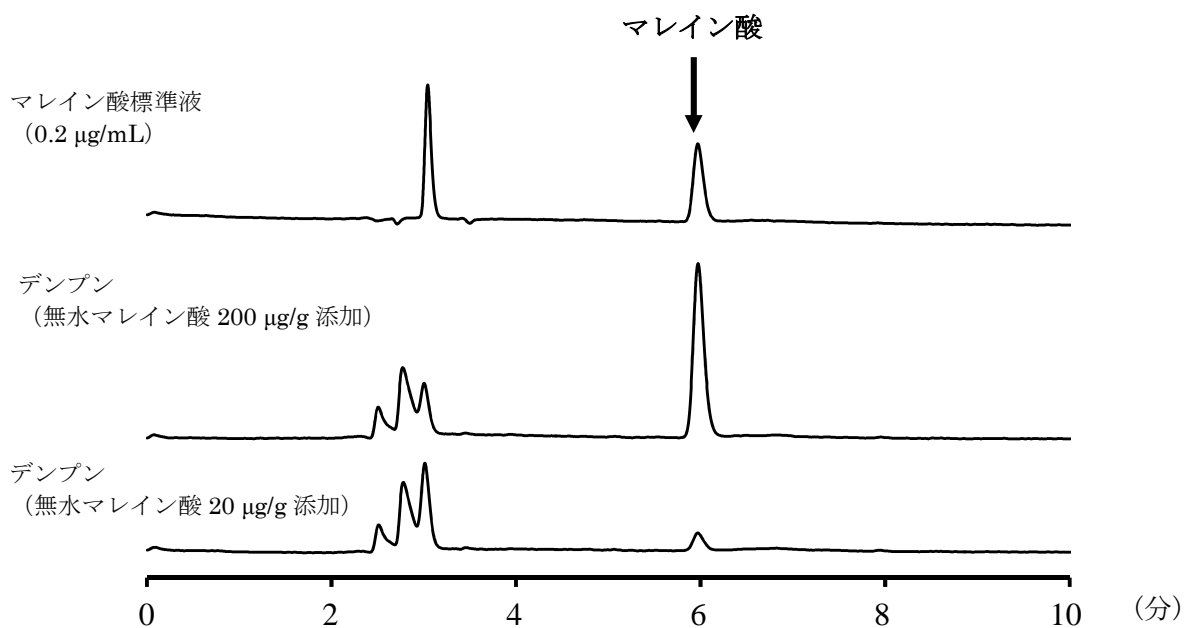


図1. マレイン酸標準液及び無水マレイン酸を添加したデンプンの試験溶液のクロマトグラム

表1 デンプンからの無水マレイン酸添加回収試験

	添加量 (μg/g)	回収率 (%)	RSD (%)
デンプンA*	20	99.5	0.71
	200	99.3	0.86
デンプンB**	20	98.8	0.17
	200	97.8	0.83

*n=5、**n=3

参考

マレイン酸及び無水マレイン酸確認試験法

1. 試験法の概要¹⁾

デンプン中のマレイン酸及び無水マレイン酸は、50vol%メタノール溶液で抽出し、水酸化カリウム試液による加水分解及び、塩酸試液による酸性化後、液体クロマトグラフ／タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)により確認を行う。食品中に天然のマレイン酸が存在している可能性がある。したがって、定量値は食品由来のマレイン酸と添加されたものとの合計値である。

2. 試験法 (LC/MS/MS)

(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

マレイン酸及び無水マレイン酸試験法の(2)試験溶液の調製を準用する。

(3) 検量線用標準液の調製

マレイン酸及び無水マレイン酸試験法の(3)検量線用標準液の調製を準用する。

(4) 測定法

①測定条件

LC/MS/MSを用い、次の条件によって測定する²⁾。

カラム充てん剤³⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径3 μ m)

カラム管：内径2.1 mm, 長さ 150 mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相⁴⁾：0.1vol%ギ酸溶液／メタノール混液(90：10)

流速：0.2 mL/分

注入量：10 μ L

イオン化モード：ESI (-)

主なイオン(m/z)：

LC/MS/MSの場合 プリカーサーイオン 115, プロダクトイオン 71

②定性⁵⁾

試験溶液及び検量線標準液をLC/MS/MSに注入し、クロマト上に検出されたピークの保持時間が一致することを確認する。

試薬・試液等

1. マレイン酸：[特級]
2. ギ酸：[特級]
3. 塩酸：[特級]
4. 水酸化カリウム：[特級]
5. メタノール：液体クロマトグラフィー用
6. 50vol%メタノール溶液：メタノール 250 mL に水を加えて 500 mL とする。
7. 塩酸試液：塩酸 42 mL に水 50 mL を加え、室温まで冷却した後、水を加えて 100 mL とする (5 mol/L)。
8. 水酸化カリウム試液：水酸化カリウム 14 g を量り、水を加えて溶かして 500 mL とする (0.5 mol/L)。
9. 0.1vol%ギ酸：ギ酸 1.0 mL をとり、水を加えて溶かして 1000 mL とする。

[注]

- 1) 本法は、マレイン酸の確認試験法であり、定量分析は目的としない。
- 2) その他の測定条件は各測定機器に従い、検量線用標準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) 測定条件は例示である。カラムとして InertSustain C18 (ジューエルサイエンス)が使用できる。他のカラム、条件を用いる場合は、マレイン酸が、フマル酸、酢酸、リンゴ酸、コハク酸などの有機酸と良好に分離することを確認する。
- 4) 移動相条件は、使用する分析カラムにより適宜変更する。
- 5) LC/MS/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恐れがあるため、別途、対象試料の試験溶液に検量線用標準液を添加し、ピークが検出されることを確認する。
- 6) LC/MS/MS の条件例を以下に示す。

LC/MS/MS 条件例

装置：Waters Acquity UPLC, Waters Quattro Premier XE

カラム：ジューエルサイエンス製 InertSustain C18 (内径 2.1mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μ m)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：0.1vol%ギ酸溶液/メタノール混液 (90 : 10)

流速：0.2mL/分

デソルベーション温度：150 $^{\circ}$ C

コーン電圧：15V

コリジョンエネルギー：10eV