

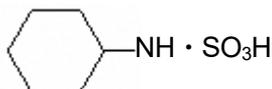
未指定添加物

## サイクラミン酸及びその塩類

Cyclamic Acid and Its Salts

サイクラミン酸

Cyclamic Acid

C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S : 179.24

## 1. 分析法の概要

食品中のサイクラミン酸及びその塩類は、透析法又は水抽出法で抽出した後、強酸性溶液中で次亜塩素酸ナトリウムと反応させ、N, N-ジクロロシクロヘキシルアミンに変換し、液体クロマトグラフィーにより定量する。(2003年改正、2023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

## a 透析法

試料約 20g<sup>1)</sup>を精密に量る<sup>2)</sup>。次に約 20mL<sup>3)</sup>の透析内液と混和して流動状とし、少量の透析内液を用いて透析膜チューブ内に移した後、空気を追い出してからチューブの上端を密封し、200mL容の目盛り付き容器<sup>4)</sup>に入れる。次いでこの目盛り付き容器に透析外液を加えて全量<sup>5)</sup>を正確に 200mL とする。時々、密栓又はフィルム等で覆って目盛り付き容器を転倒混和しながら室温で 24~48 時間透析<sup>6)</sup>し、透析終了後の透析外液を抽出液とする。

b 水抽出法<sup>7)</sup>

試料約 10g を精密に量り、水 40mL を加えて沸騰水浴中で 15 分間加熱する。冷却後、水を加えて正確に 100mL とした後、遠心し、上清を分取する。上清 10mL を正確に量り、逆相固相抽出カラムの下に強陰イオン交換固相抽出カラムを接続したものに負荷する<sup>8)</sup>。流下後、水 10mL を通して洗浄後、逆相固相抽出カラムを除去する。強陰イオン交換固相抽出カラムに塩酸 (1→100) 10mL を通し<sup>9)</sup>、流出した液を溶出液とする。

## ② 反応操作

①の a で得られた抽出液 10mL 又は①の b で得られた溶出液全容量を正確にとり、これに硫酸試液 2mL 及びヘキサン 5mL を加えた後、次亜塩素酸ナトリウム試液 1mL を加えて 1 分間激しく振とうする。水層を除去した後、ヘキサン層に 5 w/v %炭酸水素ナトリウム溶液 25mL を加えて 1 分間振とうする。ヘキサン層を分取し、試験溶液とする<sup>10)</sup>。

### (3) 検量線用標準溶液の調製<sup>11)</sup>

サイクラミン酸ナトリウム 112.0mg を量り、水を加えて正確に 100mL とする。その 10mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL としたものを標準溶液とする (濃度 100µg/mL)。標準溶液 0.5、1、2、10、20 及び 50mL を正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に 100mL とし (濃度 0.5~50µg/mL)、それぞれ 10mL を (2) 試験溶液の調製②反応操作の項に従って操作し、検量線用標準溶液とする。

### (4) 測定法

#### ① 測定条件<sup>12)</sup>

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5µm)

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150~250mm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル/水混液 (7 : 3)

流速：1.0mL/分

測定波長：314nm

注入量：20µL

#### ② 検量線<sup>13)</sup>

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

#### ③ 定量<sup>14~17)</sup>

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

$$\text{サイクラミン酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200}{W \times 1000} \quad (\text{透析法})$$

$$\text{サイクラミン酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100}{W \times 1000} \quad (\text{水抽出法})$$

C : 試験溶液中のサイクラミン酸濃度 (µg/mL)

W：試料の採取量（g）

④ 定量限界 0.005 g/kg

#### 試薬・試液等

1. サイクラミン酸ナトリウム：[特級]（シクロヘキシルアミドスルホン酸ナトリウム）
2. 塩酸：[特級]
3. 塩化ナトリウム：[特級]
4. 透析内液：塩化ナトリウム 100g を 0.01mol/L 塩酸に溶解して 1000mL とする。
5. 透析外液：0.01mol/L 塩酸
6. 透析膜チューブ：透析用セルロース製チューブ（平面幅 44mm、直径 28mm、膜厚 0.0203mm）を適当な長さに切ったものを水で洗浄して片端を結んで閉じる。
7. 逆相固相抽出カラム（900mg）：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、水 10mL を順次通してコンディショニングしたものを用いる。
8. 強陰イオン交換型固相抽出カラム：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）、アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲル固相抽出カラム（360mg）等。カラムの交換容量が 0.1mEq 相当のもの。あらかじめメタノール 10mL、水 10mL を順次通してコンディショニングしたものを用いる。
9. 硫酸：[特級]
10. 硫酸試液：硫酸 50mL を水 50mL に、冷却、かくはんしながら少しずつ加える<sup>18)</sup>。
11. ヘキサン：[高速液体クロマトグラフィー用] 又は [特級]
12. 次亜塩素酸ナトリウム溶液：[化学用、有効塩素 5.0%以上]
13. 次亜塩素酸ナトリウム試液：次亜塩素酸ナトリウム溶液を水で 2 倍に希釈する。
14. 炭酸水素ナトリウム：[特級]
15. 5%炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム 5g を水に溶かして 100mL とする。
16. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

#### [注]

- 1) 試料のかさが大きいもの、水分を含むと膨張する場合は、試料採取量を 5～10 g に減らす。
- 2) 試料を秤量後に、試料が炭酸又はエタノールを多く含む場合は少量の水を加え加温してその大部分を除去する。また、脂肪分を多く含む試料の場合はヘキサン約 20mL ずつで 2～3 回洗浄した後、ヘキサン臭がなくなるまで放置又は加温する。乳化した食品（ピーナッツバター、マヨネーズ等）は脱脂操作を省略できる。
- 3) 試料と混和して流動状にならない場合は、透析内液を適宜追加する。
- 4) 正確に 200mL を量ることができる目盛精度を有する容器。透析チューブの実効長が

15cm の場合は直径（内径） 4 cm 以下がよい。

- 5) 試料、透析内液、透析外液の合計量。
- 6) 透析膜チューブの実効長約 15cm の場合、サイクラミン酸は水分含量の高い食品では 24 時間で十分透析されるが、穀類の調製品や魚介乾製品等の水分含量の低い食品及びはっ酵乳等の乳製品では透析率が低下する傾向があるため、48 時間透析を行う。また、透析膜チューブとして実効長 55cm のものを用いて、密栓できる目盛り付き容器に入れ、チューブを吊るさずに、30 分毎に容器を転倒する方法では、4 時間の透析で、上記の方法と同等以上の回収率が得られる（注表 1）。

注表 1 サイクラミン酸の各種食品での添加回収率\*1

試料	透析法 1 *2				透析法 2 *3			
	0.005 g/kg 添加		0.020 g/kg 添加		0.005 g/kg 添加		0.020 g/kg 添加	
	回収率 (%)	RSD*4 (%)	回収率 (%)	RSD*4 (%)	回収率 (%)	RSD*4 (%)	回収率 (%)	RSD*4 (%)
たくあん漬け	101.0	3.8	97.7	1.6	101.6	3.2	97.8	0.7
オレンジジュース	103.1	2.5	98.3	1.7	100.6	4.0	104.1	3.2
クッキー	104.9	2.8	101.5	3.0	112.7	2.1	106.3	3.8
ヨーグルト	98.0	3.6	97.4	1.7	95.9	5.3	100.3	5.4
米酢	94.9	4.1	92.8	1.2	94.4	4.5	95.3	1.8

\*1 5 試行の平均値、\*2 透析時間 4 時間、チューブ実効長 約 55 cm、

\*3 透析時間 48 時間、チューブ実効長 約 15cm、\*4 相対標準偏差

- 7) 澄明な抽出液が得られる試料については、水抽出法を用いることができる。スクリーニング試験として、反応操作に抽出液を用い、液体クロマトグラフィーを実施し、検出しない場合はこれを分析結果とすることもできる。サイクラミン酸の保持時間にピークが認められた場合は、カラムによる精製操作を実施する。なお、食酢等の pH の低い食品は、水抽出法で、固相抽出で回収率が低下する事例が報告されている<sup>文献1、文献2</sup>。固相抽出カラム負荷前の液の pH を 5～7 に調整することで回収率が向上する可能性がある<sup>文献3</sup>。
- 8) タール色素等、比較的極性の高い化合物が多く含まれている場合、強陰イオン交換固相抽出カラムの交換能力を超えてしまうことがある。このようなときは、抽出液を適時希釈してからカラムに負荷させるようにする。なお、定量計算の際は希釈倍率を乗じて含量を求める。
- 9) カラム内に空気が入らないように注意する。
- 10) エマルジョン生成により試験溶液を採取できない場合は、エマルジョン部分を遠心管に採取し、必要な場合は適量の硫酸ナトリウムを添加し、遠心後、上清液を採取する。また、エマルジョンを含む全液を、シリンジを用いて加圧してフィルターでろ過することにより、エマルジョンを取り除くことができる。ヘキサン溶液なので、減圧ろ過するとへ

キサンの揮発して、濃度が変化するおそれがあるため、減圧ろ過は望ましくない。

- 11) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。
- 12) 測定条件は例示である。分析の際は、サイクラミ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。妨害ピークが認められる場合は、カラムを変更したり、参考法に示すサイクラミン酸確認分析法や既報<sup>文献1、文献4、文献5</sup>の分析法等を参照したりすることで、できるだけ影響を除いて測定できる分析法を適用する。ただし、希釈して測定する方法では、導入量を増やさない場合、定量限界濃度が高くなる点に留意が必要である。
- 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) 精度管理では0.020 g/kgでの添加回収率を求めることとする。
- 15) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、試料体積を含めて定容し、その定容量を含量計算で乗じている。そのため、固体試料等では試料体積を含めない液量を乗じた値より数%~10%程度高い定量値となる場合があり、添加回収率が100%を越えて高い場合には、この点が要因の一つとして考えられる。
- 16) 本法による添加回収試験の結果を注表2に示す。

注表2 サイクラミン酸の各種食品での添加回収率\*1

試料	透析法*2		水抽出法	
	0.010 g/kg 添加		0.010 g/kg 添加	
	回収率 (%)	RSD*3 (%)	回収率 (%)	RSD*3 (%)
たけのこ水煮	85.3	1.8	97.7	2.4
チョコチップクッキー	95.1	1.3	95.0	1.6
ジャム	98.3	1.8	103.8	2.3
ヨーグルト	91.2	6.0	—*4	—
紹興酒	92.6	1.2	—	—

\*1 5 試行の平均値、\*2 透析時間 30 時間、チューブ実効長 約 15 cm、

\*3 相対標準偏差、\*4—：実施していない

- 17) 茶からの抽出物を粉末化した製品等では、(2)②の反応が上手くいかず、本法による検出が困難であることが報告されている<sup>文献4</sup>。こうした試料では、既報<sup>文献2、文献4~文献7</sup>の分析法等を参照し、添加試験でできるだけ回収可能な分析法を適用する。ただし、希釈して測定する方法では、導入量を増やさない場合、定量限界濃度が高くなる点に留意が必要である。
- 18) 水に硫酸を入れると激しく反応して発熱して突沸する場合もあるので、氷水等で冷却し、かくはんしながら少しずつ硫酸を加えることにより、発熱を抑え、突沸しないようにする。

[文献]

- 1) 石井里枝：微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の妥当性評価法に関する研究（研究分担報告書）、令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業）食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究（研究代表 渡辺卓穂）研究分担報告書、115（2021）
- 2) 山口之彦ら：大阪市立環科研報告、**72**、13（2010）
- 3) 石井里枝：微生物定性試験法における検出下限値の推定及び食品添加物試験法の妥当性評価法に関する研究（研究分担報告書）、令和3年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業）食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究（研究代表 渡辺卓穂）、110（2022）
- 4) 朝倉敬行ら：日食化誌、**24**、82（2017）
- 5) 大門拓実ら：食衛誌、**60**、68（2019）
- 6) 松本ひろ子ら：東京都健康安全研究センター年報、**59**、129（2008）
- 7) 山口瑞香ら：大阪府公衆衛生研究所年報、**49**、7（2011）

## 参考

### サイクラミン酸確認分析法

#### 1. 分析法の概要

食品中のサイクラミン酸は、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型質量分析により確認を行う。(2023年設定)

#### 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

一般試料採取法を準用する。

##### (2) 試験溶液の調製<sup>1)</sup>

サイクラミン酸及びその塩類分析法(2)試験溶液の調製 ①抽出を準用して調製し、a 透析法で得られる抽出液又はb 水抽出法で得られる溶出液を試験溶液とする。

##### (3) 標準溶液の調製<sup>1)</sup>

サイクラミン酸ナトリウム 112.0mg を量り、水を加えて正確に 100mL とする(濃度 1000 $\mu$ g/mL)。この液を水で適宜希釈し、定性に適した濃度の標準溶液を調製する。

##### (4) 測定法

###### ① 測定条件<sup>2,3)</sup>

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(粒径 5 $\mu$ m)

カラム管: 内径 2.1mm、長さ 150mm

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

移動相: メタノール/0.1 vol%ギ酸混液(3:2)

流速: 0.2mL/分

イオン化モード: ESI (-)

検出法: スキャン( $m/z$  50~200)、

選択イオンモニタリング(SIM)(モニターイオン: $m/z$  178)

選択反応モニタリング(SRM)

(モニターイオン:プリカーサーイオン  $m/z$  178、プロダクトイオン  $m/z$  80)

注入量: 10 $\mu$ L

###### ② 定性<sup>4)</sup>

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で、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を確認する。また、LC-MSを用いる場合は、このピークのスキャン検出で得られるマススペクトルの主なイオンの  $m/z$  が標準溶液の主ピークのそれと一致することを確認する。

#### 試薬・試液等

1. サイクラミン酸及びその塩類分析法の試薬・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：[98%、特級]
4. 0.1 vol%ギ酸：ギ酸 1 mL に水を加えて 1000mL とする。

#### [注]

- 1) 質量分析計の感度に応じて適宜希釈又は注入量を減らすこと。
- 2) 測定条件は例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、サイクラミ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) 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。