写

薬生食基発 0628 第１号
薬生食監発 0628 第１号
令和元年６月 28 日

各 ( 都道府県 / 保健所設置市 / 特別区 ) 衛生主管部（局）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お願いします。

記

１　通則について、別添１のとおりとする。

２　添加物分析法各条に別添２の「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」、「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」及び「トコフェロール酢酸エステル及び d－α－トコフェロール酢酸エステル」の分析法を加える。

３　添加物分析法各条の「ナイシン」、「ナタマイシン」、「パラオキシ安息香酸エステル類」、「プロピオン酸及びその塩類」、「亜塩素酸ナトリウム」、「二酸

化硫黄及び亜硫酸塩類」、「イマザリル」、「グリチルリチン酸二ナトリウム」、「ケイ酸マグネシウム」、「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」、「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」及び「ナイシンＺ」について、別添３のとおり改める。

4　添加物分析法各条の「安息香酸及び安息香酸ナトリウム」、「ソルビン酸及びその塩類」、「デヒドロ酢酸ナトリウム」、「オルトフェニルフェノール及びオルトフェニルフェノールナトリウム」、「ジフェニル」及び「チアベンダゾール」を削除する。

5　本通知は、令和元年６月 28 日から適用すること。ただし、令和２年６月 27 日までの間は、なお従前の例によることができる。

# 通　　則

１.「食品中の食品添加物分析法」は、食品中に含まれる食品添加物の定性及び定量を目的とした試験を行う際の分析方法を収載したものである。

２.「食品中の食品添加物分析法」は、通則、一般試料採取法、及び食品添加物分析法各条から構成されており、各章の連関によって分析操作が行われるよう構成されている。

３．食品添加物は、その使用目的により、最終製品中に残留するもの、食品の製造工程中で除去されるもの、食品中で変化するもの等があり、また、食品中での食品添加物の存在形態は、食品添加物ごとに大きく異なっている。「食品中の食品添加物分析法」に収載した分析法は、必ずしも添加された物質を測定対象としていない場合がある。

## 単位及び記号

４．主な計量の単位は、次の記号を用いる。

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

５．質量百分率を示すには、％の記号を用いる。液体又は気体 100mL 中の物質の量（g）を示すには、w／v％の記号を用いる。液体又は気体 100mL 中の物質の量（mL）を示すには、vol％の記号を用いる。ただし、百分率における固体の物質の量（g）は、別に規定するもののほか、無水物として算定した量を表わす。

６．温度の表示は、セルシウス法を用い、アラビア数字の右に℃を付けて示す。

７．標準温度は 20℃、常温は 15～25℃、室温は１～30℃、微温は 30～40℃とする。冷所は、別に規定するもののほか、１～15℃の場所とする。冷水は 10℃以下、微温湯は 30～40℃、温湯は 60～70℃、熱湯は約 100℃の水とする。加温するとは、別に規定するもののほか、60～70℃に熱することである。

## 試　　験

８．食品添加物分析法各条に掲げる食品添加物分析法（以下「規定分析法」という。）に代わる方法で、それが規定分析法以上の精度のある場合には、その分析法を用いることができる。ただし、その結果について疑いのある場合には、規定分析法で最終の判定を行う。

９．試験に用いる水は、別に規定するもののほか、食品製造用水を超ろ過（逆浸透、限外ろ過）、イオン交換、蒸留又はそれらの組み合わせにより精製した水であり、精製した後、速やかに用いる。ただし、適当な容器に入れ、微生物や化学物質による汚染の抑制が図られる場合、一定期間保存したものを用いてもよい。

10．減圧は、別に規定するもののほか、2.0kPa 以下とする。

11．液性を酸性、アルカリ性、中性等として示した場合は、別に規定するもののほか、pH 試験紙又は pH 計を用いて試験する。

12．溶質名の次に溶液と記載し、特にその溶媒名を示さないものは水溶液を示す。

13．１mol／Ｌ塩酸、硫酸（１→10）、50vol％エタノール等液状の試薬名に単に濃度を表示したものは、別に規定するもののほか、水を用いて希釈したものを示す。

14．溶液の濃度を（１→５）、（１→100）等と記載したものは、固形の物質１ｇ又は液状の物質１mL を溶媒に溶かして全量をそれぞれ５mL、100mL 等とする割合を示す。また、混液を（10：１）、（５：３：１）等と記載したものは、液状の物質の 10 容量と１容量の混液、５容量と３容量と１容量の混液等を示す。

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

16．標準溶液の調製に用いる標準品は、別に規定するもののほか、記載された名称の食品添加物規格に適合する食品添加物又は日本工業規格の最高級の規格に適合する化学物質を、適切な条件で保存しておいたものを用いる。

17．デシケーターの乾燥剤は、別に規定するもののほか、シリカゲルとする。

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

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

19．「食品中の食品添加物分析法」に記載された数値は、別に既定するもののほか、原則として四捨五入してその数値になる量を意味する。ただし、１桁の数字のとき、または約を付けて示したときは、記載数値の±10％の範囲の量を意味する。

例えば、２ｇとは 1.8～2.2ｇ、約 10ｇとは９～11ｇを量ることを意味する。

20. 質量を単に「量る」と記載した場合の採取量は，記載された数値の次の桁で四捨五入した値が，その数値になる量をいう。例えば、5.0ｇとは4.95～5.04ｇ、10ｇとは9.5～10.4ｇを量ることを意味する。

21. 質量を「精密に量る」とは、求める値の桁数を考慮して必要な桁数まで読みとることをいう。通例、0.1mgまで読みとる場合には化学はかり、10μgまで読みとる場合にはセミミクロ化学はかり、１μgまで読みとる場合にはミクロ化学はかりを用いる。

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

23.「空試験を行い補正する」とは、別に規定するもののほか、試料を用いず、必要があれば試料と同量の水等を用いて試料の試験操作と同じ方法で空試験溶液を調製して測定を行い、試料の測定値を補正することを意味する。なお、必要に応じて空試験を行い、試験操作由来の夾雑物のないことを確認する。

24.「食品中の食品添加物分析法」の方法による実測値（試験によって得られた値）は、通例、有効数字２桁で示す。

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

26. 試験は、別に規定するもののほか、15～30℃とする。試験操作において「直ちに」とあるのは、通例、前の操作の終了から30秒以内に次の操作を開始することをいう。

27. ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、イオンクロマトグラフィー等における分析条件は、一例を示したもので、適切なピーク分離が得られるように、用いるカラムにより、流速、注入量、グラジェント条件、昇温条件等を調整する。

28. 液体クロマトグラフィーにおいて用いるカラム管の内径により、次の計算式を参考に流速及び注入量を変更することができる。

流速（mL／min）＝記載されている流速（mL／min）×{使用するカラム管の内径（mm）}$^2$／{記載されているカラム管の内径（mm）}$^2$

注入量（μL）＝記載されている注入量（μL）×{使用するカラム管の内径（mm）}$^2$／{記載されているカラム管の内径（mm）}$^2$

例えば、分析カラムが内径4.6mm、流速1.0mL／min、注入量が20μLと記載されている場合、内径3.0mmのカラムを使用すると、計算式では流速0.43mL／min、注入量8.5μLとなる。この場合、流速0.4mL、注入量10μLとしてもよい。

粒子径が３μm以下のカラム充填剤を使用する場合は、長さ50～150mmのカラム管を使用し、流速を上記計算式から得られる値の1.5～２倍にしてもよい。

29. 液体クロマトグラフィーにおいて、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムを使用する場合、試験溶液の溶媒濃度が移動相の溶媒濃度より高いと保持時間及びピーク形状に影響を与え、標準溶液との誤差を生じる場合がある。この現象は、保持時間の短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、標準溶液も試験溶液と同じ組成にし、良好なピーク形状が得られるように、注入量を調整する。

30. 定量限界とは、適切な精確さをもって定量できる分析対象物の最低量又は濃度である。なお、データを表示する際には、有効数字を考慮すること。

保存料

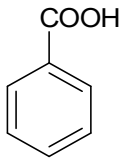
# 安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類

# 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

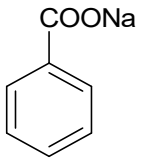
Benzoic Acid




$C_7H_6O_2$：122.12

安息香酸ナトリウム

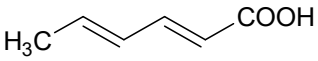
Sodium Benzoate




$C_7H_5NaO_2$：144.10

ソルビン酸

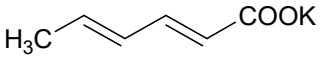
Sorbic Acid




$C_6H_8O_2$：112.13

ソルビン酸カリウム

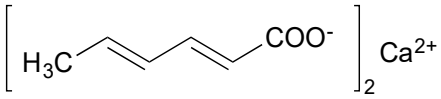
Potassium Sorbate




$C_6H_7KO_2$：150.22

ソルビン酸カルシウム

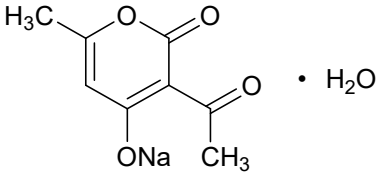
Calcium Sorbate




$C_{12}H_{14}CaO_4$：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との合計値である[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５ｇ[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）10mL[6)]、塩化ナトリウム 60ｇ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 0.100ｇ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１mL 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１mL 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、５mL 及び 10mL 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。

カラム充塡剤[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)]：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）

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。

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

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 7.0 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］

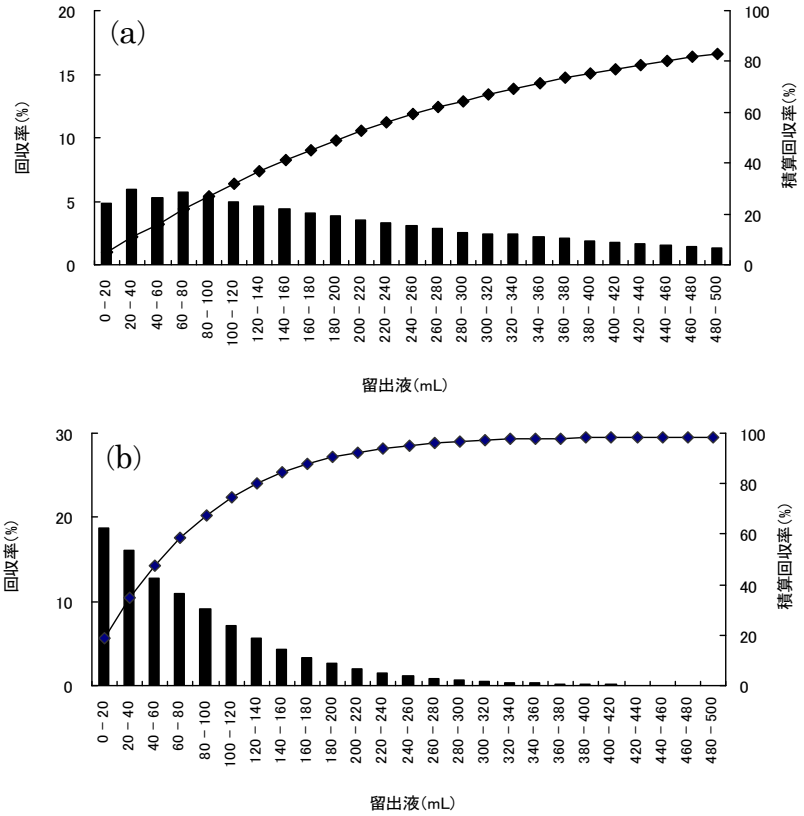
［注］

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 50ｇ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 60～80ｇ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 50ｇと５ｇ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 0.5ｇ／kg 添加）

試料採取量：（ａ）50ｇ、（ｂ）５ｇ

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５ｇ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（0.45μm）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５mL 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。

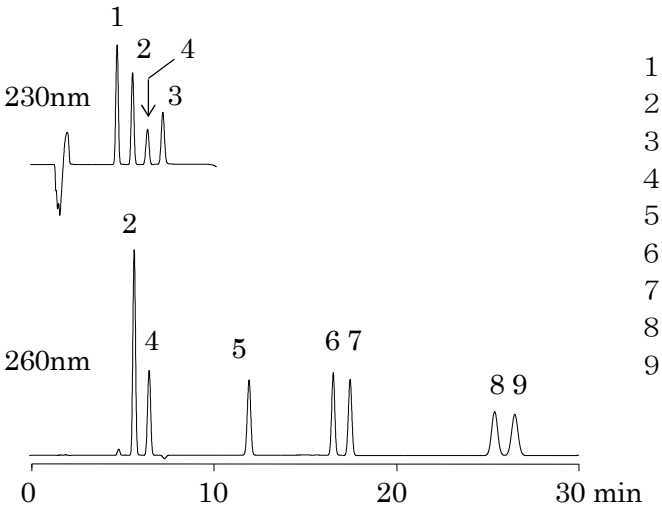
・５mmol／Ｌクエン酸緩衝液（pH4.0）／アセトニトリル／メタノール混液（７：２：１）と５mmol／Ｌクエン酸緩衝液（pH4.0）／アセトニトリル／メタノール混液（11：４：５）によるグラジエント溶離（注図２）。

・6.1mmol／Ｌ臭化セチルトリメチルアンモニウム含有 26mmol／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１ｇ、リン酸二水素ナトリウム二水和物 1.84ｇに水 450mL を加えて溶かした後、メタノール 420mL 及びアセトニトリル 180mL を加えて混合する）。

・水／アセトニトリル／0.2mol／Ｌリン酸緩衝液（pH4.0）混液（67：28：５）、水／メタノール／0.2mol／Ｌリン酸緩衝液(pH4.0)混液(59:36:5)又は水／メタノール／0.2mol／Ｌリン酸緩衝液（pH4.0）混液（17：２：１）と水／メタノール／0.2mol／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(0.2mol／Ｌリン酸緩衝液(pH4.0)の調製方法:リン酸一カリウム 27.0ｇとリン酸 0.2ｇに水を加えて溶かして 1000mL 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 10μg／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 4.6㎜、長さ 150㎜、粒径５μm）

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

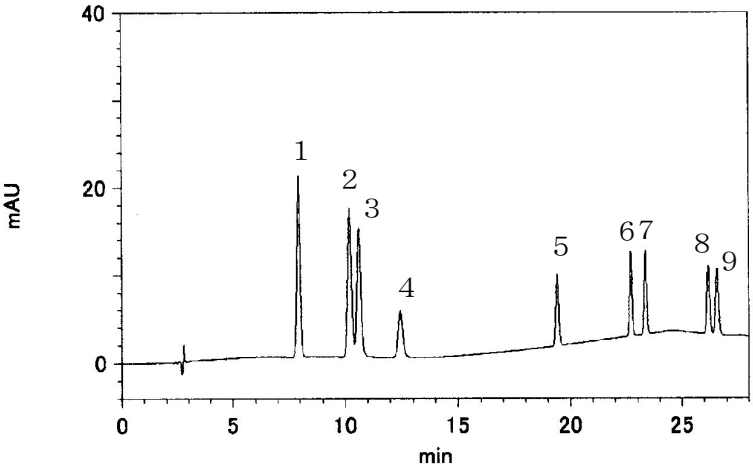
注入量：20μL

※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の例

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 5.0μg/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５μm）

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：20μL

※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 設定)

## 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、デヒドロ酢酸及びそれらの塩類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。

カラム充塡剤[4)]：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 2.1㎜、長さ 100㎜

カラム温度：40℃

移動相[5)]：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

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、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸及びそれらの塩類分析法の（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、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸及びそれらの塩類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 0.25㎜、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 0.25μm 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℃

キャリヤーガス：ヘリウム

注入方式：スプリットレス

イオン化モード（電圧）：ＥＩ（70eV）

検出法：スキャン（*m*／*z* 50～200）

注入量：２μL

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、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸及びそれらの塩類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５vol％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 ＳＩＭ検出イオン | ＬＣ-ＭＳ/ＭＳ プリカーサーイオン | ＬＣ-ＭＳ/ＭＳ 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2.1㎜、長さ100 ㎜、粒子径1.7μm）

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 0.25㎜、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 0.25μm 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：水素炎イオン検出器
注入口温度：240℃
検出器温度：250℃
注入方式：スプリット
スプリット比：１：10
キャリヤーガス及び流量：ヘリウム、2.5mL／分
メイクアップガス：窒素、45mL／分
イオン化モード（電圧）：ＥＩ
検出法：スキャン（*m*／*z* 50～200）
注入量：１μL

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］

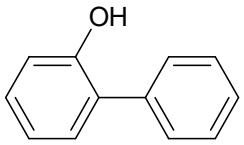
１）氏家愛子ら：食衛誌、48、163（2007）

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

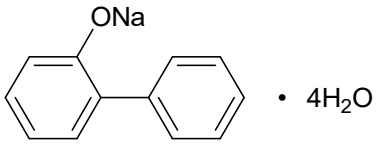
*o*-Phenylphenol, Sodium *o*-Phenylphenate, Diphenyl and Thiabendazole

オルトフェニルフェノール
略名：OPP



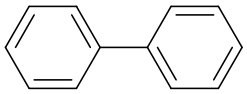

$C_{12}H_{10}O$：170.21

オルトフェニルフェノールナトリウム
略名：OPP-Na



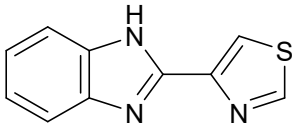

$C_{12}H_9NaO \cdot 4H_2O$
（$C_{12}H_9NaO$：192.19）

ジフェニル
Diphenyl
別名：ビフェニル



$C_{12}H_{10}$：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）

## 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１kg 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１kg 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 10ｇ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１～２ｇ[5]、無水硫酸ナトリウム 20ｇ[6]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２mL 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５mL 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５mL 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５mL 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、８mL 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。

カラム充塡剤：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：１mL／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 10μL 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 10μL 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（μg／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（μg／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）×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／kg[16)]

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］

［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、0.5～５μg／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）

$W_1$：検体の採取量（g）

$W_2$：検体に添加した水の量（g）

16）0.5～5μg／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、0.0003g／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。

強化剤

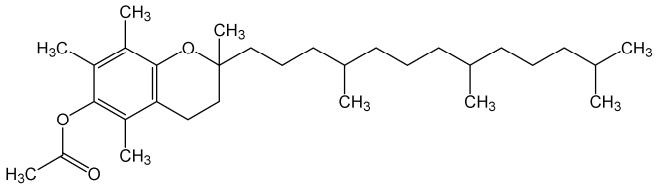
# トコフェロール酢酸エステル及び

# *d*－α－トコフェロール酢酸エステル

Tocopheryl Acetate and *d*-α-Tocopheryl Acetate

トコフェロール酢酸エステル

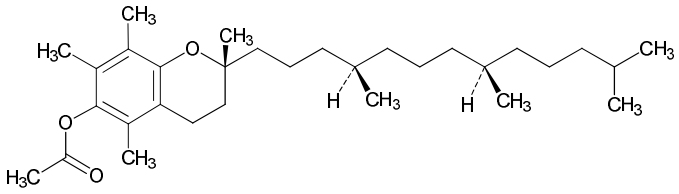
*All-rac*-α-Tocopheryl Acetate



$C_{31}H_{52}O_3$：472.74

*d*－α－トコフェロール酢酸エステル

*R,R,R*-α-Tocopheryl Acetate



$C_{31}H_{52}O_3$：472.74

１．分析法の概要

食品中のトコフェロール酢酸エステル及び*d*－α－トコフェロール酢酸エステル[1)]は、液体クロマトグラフィーにより定量する。(2019 年設定)

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[2)]

試料約 0.1～３ｇを精密に量り、60mL の共栓付き遠心管に入れる。これにピロガロール 0.3

ｇ、10ｇ／Ｌ塩化ナトリウム溶液[3] ２mL 及びエタノール 10mL を加える。さらに、10ｇ／Ｌ塩化ナトリウム溶液 20mL 及びヘキサン／２－プロパノール／0.3ｇ／ＬBHT 含有酢酸エチル混液（18：３：２）14mL を加え、５分間振とうし、遠心（５分間、1500 回転／分）後、有機層を 100mL の褐色ナス形フラスコに移す[4]。水層にヘキサン／２－プロパノール／0.3ｇ／ＬBHT 含有酢酸エチル混液（18：３：２）14mL を加えて同様の操作を２回繰り返し、先のナス形フラスコに有機層を合わせる。全有機層を減圧下、溶媒を留去する。残留物をエタノール５mL に溶解し[5]、メンブランフィルター（0.45μm）を用いてろ過し、ろ液を試験溶液とする。

（３）検量線用標準溶液の調製[6]

定量用トコフェロール酢酸エステル 0.100ｇを量り、エタノールを加えて溶かし正確に 100mL とし、標準原液とする（濃度 1000μg／mL）。この液 25mL を正確に量り、エタノールを加えて正確に 100mL とする（濃度 250μg／mL）。この液４mL を正確に量り、エタノールを加えて正確に 100mL とする（濃度 10μg／mL）。この液 5mL を正確に量り、エタノールを加えて正確に 100mL とし（濃度 0.5μg／mL）、これらを検量線用標準溶液とする。

（４）測定法

① 測定条件[7]

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。

カラム充塡剤：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 250mm

カラム温度：40℃

移動相：メタノール

流速：1.0mL／分

測定波長：284nm

注入量：20μL

② 検量線

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

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、トコフェロール酢酸エステルのピーク面積を測定し、得られたピーク面積及び検量線によって試験溶液中のトコフェロール酢酸エステル濃度（μg／mL）を求め、次式によって試料中のトコフェロール酢酸エステル含量（ｇ／kg）を計算する。

$$\text{トコフェロール酢酸エステル含量（g／kg）} = \frac{C \times V}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中のトコフェロール酢酸エステル濃度（μg／mL）

W：試料の採取量（g）

V：試験溶液の量（mL）

α－トコフェロール含量（g／kg）＝トコフェロール酢酸エステル含量（g／kg）×0.911[8)]

④　定量限界　トコフェロール酢酸エステルとして0.005g／kg（試料0.5g採取の場合）

試薬・試液

1．定量用トコフェロール酢酸エステル：トコフェロール酢酸エステル標準品［日局標準品］

2．ピロガロール：［特級］

3．塩化ナトリウム：［特級］

4．10g／L塩化ナトリウム溶液：塩化ナトリウム1gを水に溶解し、100mLとする。

5．エタノール：［特級］

6．ヘキサン：［残留農薬試験用］

7．2－プロパノール：［特級］

8．BHT：2，6－ジー*tert*－ブチル－4－メチルフェノール［特級］

9．酢酸エチル：［残留農薬試験用］

10．0.3g／L　BHT含有酢酸エチル：BHT　0.3gを秤量し、酢酸エチル1000mLに溶解する。

11．ヘキサン／2－プロパノール／0.3g／L　BHT含有酢酸エチル混液（18：3：2）：ヘキサン2340mL、2－プロパノール390mL及び0.3g／L　BHT含有酢酸エチル260mLを混合する。

12．メタノール：［高速液体クロマトグラフィー用］

［注］

1）本分析法では*d l*－体と*d*－体の分別は不能である。

2）試料がカプセル剤の場合は10g／L塩化ナトリウム溶液を加えた後、70℃で5分間加温してカプセルの被膜を溶解する。なお、カプセル剤の内容物について試験する場合には、次の方法で試験溶液を調製するとよい。

　カプセルをビーカーに3～5粒採取し、質量を精密に量る。カプセルをはさみで半分に切断し、エタノールを加え超音波処理し、内容物を分散させる。漏斗を用いて溶液を褐色メスフラスコに洗い込む。洗い込み操作は3回以上行い、完全にカプセルの内容物を溶か

し出す。トコフェロール酢酸エステルが 0.5～250μg／mL となるように定容し、メンブランフィルター（0.45μm）を用いてろ過し、ろ液を試験溶液とする。

３）10ｇ／Ｌ塩化ナトリウム溶液を加えると固まる試料の場合は、10ｇ／Ｌ塩化ナトリウム溶液を加えずに、ピロガロール 0.3ｇ及びエタノール 10mL を加える。

４）遠心分離後、エマルジョンができている場合はエタノールを少量加えると分離する。

５)必要に応じてトコフェロール酢酸エステルの濃度が 0.5～250μg／mL となるように希釈する。

６）標準溶液の調製例を示す。実際は試験溶液中のトコフェロール酢酸エステルの濃度が検量線の範囲内に入るような濃度の標準溶液を数点調製し、検量線を引く。

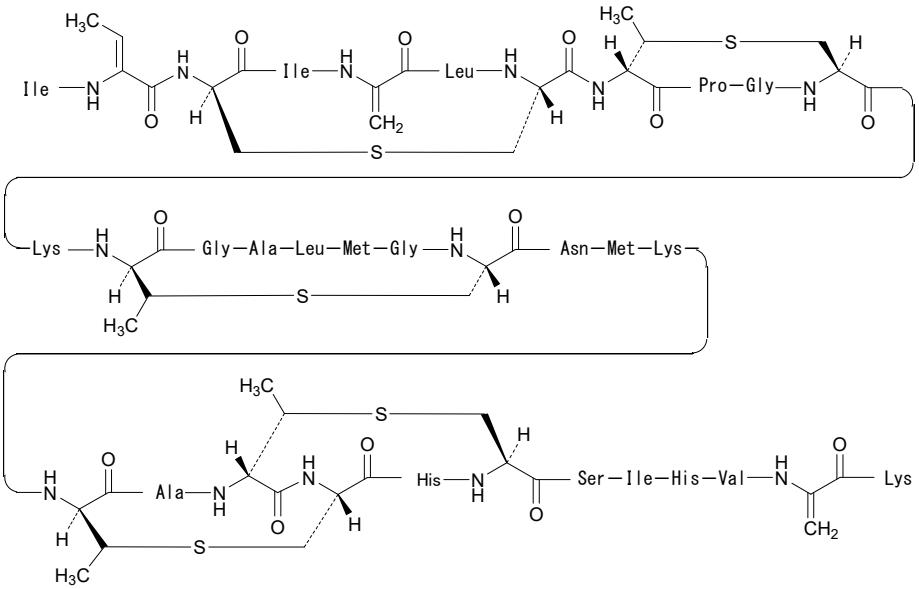
７）測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。

８）トコフェロール酢酸エステルを α－トコフェロールに換算する係数である。使用基準は対象食品として特定保健用食品及び栄養機能食品のみが 150mg 以下／当該食品１日摂取目安量（α－トコフェロールとして）と定められている。

保存料

# ナイシン

Nisin




$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_{7}$：3354.07

１．分析法の概要

食品中のナイシン[1)]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し、定量する。

同時に多数の検体の試験を行う等スクリーニング法を併用した方が効率的と判断される場合には、ナイシンスクリーニング法（微生物学的定量法）を用いて陽性と判断されたものについてのみ本分析法による試験を実施しても差し支えない。(2009 年設定、2019 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

①　抽出

試料約 20 g を精密に量り、ヘキサン 20mL 及びメタノール／水／ギ酸混液（５：４：１）20mL を加え[2)]、室温で３分間ホモジナイズする。遠心（20 分間、10000 回転／分、５℃）

[3]後、上清を分液漏斗に移し、下層を 50mL のメスフラスコに移す。沈殿物にヘキサン 20mL 及びメタノール／水／ギ酸混液（５：４：１）20mL を加え、同様にホモジナイズ及び遠心を行い、上清を分液漏斗に合わせ、下層を先のメスフラスコに移す。さらに、沈殿物にヘキサン 20mL 及びメタノール／水／ギ酸混液（５：４：１）20mL を加え、同様の操作を繰り返す。分液漏斗の下層を先のメスフラスコに移し、メタノール／水／ギ酸混液（５：４：１）を加えて正確に 50mL とし、メンブランフィルター（0.45μm、ポリフッ化ビニリデン製）[4]でろ過したものを抽出液とする。

②　精製

（ａ）　ポリマー固相抽出カラム

ポリマー固相抽出カラムに、①で得られた抽出液５mL に水 15mL を加えて混和した液を負荷した後、容器を 0.1vol％ギ酸含有 12.5vol％メタノール溶液 15mL で洗い、カラムに注入し、洗液は捨てる。0.1vol％ギ酸含有メタノール溶液 10mL をカラムに注入し、溶出液に 50mmol／Ｌリン酸緩衝液（pH5.6）10mL を加える。

（ｂ）　弱陽イオン交換固相抽出カラム[5]

弱陽イオン交換固相抽出カラムに、ａで得られた溶液を負荷した後、容器をメタノール／リン酸緩衝液混液（１：１）10mL で洗い、カラムに注入し、洗液は捨てる。次いでメタノール５mL を注入し、流出液は捨てる[6]。次いで、アンモニア含有メタノール試液 4.5mL をカラムに注入する。溶出液は、あらかじめギ酸 200μL を入れた容器に受け[7]、メタノールを加えて正確に５mL としたものを試験溶液とする。

（３）定性用標準溶液の調製

100000 単位に対応する[8]ナイシン標準品[9]を量り、0.1vol％ギ酸を加えて溶かして正確に 10mL とし、標準原液とする（濃度 10000 単位／mL）。標準原液１mL をとり、0.1vol％ギ酸に溶かして 10mL とし、定性用標準溶液とする（濃度 1000 単位／mL）。

（４）定量用標準試験溶液の調製

（３）の標準原液 20μL をとり、試験溶液を加えて 1.0mL とする（濃度 200 単位／mL）。この液 0.5mL をとり、試験溶液を加えて 1.0mL とする（濃度 100 単位／mL）。この操作を繰り返し、25、50、100、200 単位／mL の定量用標準試験溶液とする。

（５）測定法

①　測定条件[10、11]

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[12]：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 2.0～4.6㎜、長さ 150～250㎜

カラム温度：40℃

移動相：Ａ液　0.1vol％ギ酸[13)]

Ｂ液　0.1vol％ギ酸[13)]含有アセトニトリル[14)]

リニアグラジエントの条件[15)]

| 分 | Ａ（％） | Ｂ（％） |
|---|---|---|
| 0 | 90 | 10 |
| 20 | 50 | 50 |

流速：0.5mL／分

イオン化モード：ＥＳＩ（＋）

検出法：スキャン（*m*／*z* 100 ～ 2000）又は選択イオン検出（ＳＩＭ）

主なイオン：*m*／*z* 1119、839、672

注入量：30μL[16)]

② 定性[17)]

試験溶液及び定性用標準溶液をそれぞれ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定性用標準溶液と一致すること及びマススペクトルの主要ピーク（*m*／*z* 1119、839、672）の強度比が定性用標準溶液と一致することを確認する。

③ 定量（標準添加法）[18､19)]

試験溶液及び定量用標準試験溶液をそれぞれＬＣ－ＭＳに注入し、モニターイオン（*m*／*z* 1119）より得られたクロマトグラムより試験溶液及び定量用標準試験溶液のナイシンＡのピーク面積を求め、試験溶液及び各定量用標準試験溶液中のナイシン添加濃度（単位／mL）を横軸に、ナイシンＡのピーク面積を縦軸にとり、関係線を作成する。関係線の横軸との交点と原点との距離から、試験溶液中のナイシン濃度（単位／mL）を求め、次式[20)]によって試料中のナイシンＡを含む抗菌性ポリペプチドの含量（ｇ／kg）を計算する。

$$\text{ナイシンAを主とする抗菌性ポリペプチドの含量（g／kg）} = \frac{C \times 50 \times 2.5 \times 10^{-5}}{W}$$

Ｃ：試験溶液中のナイシン濃度（単位／mL）

Ｗ：試料の採取量（ｇ）

④ 定量限界　ナイシンＡを含む抗菌性ポリペプチドとして0.002ｇ／kg

試薬・試液等

１．ナイシン標準品：［食品添加物公定書標準品］[21)]

２．ヘキサン：[特級]
３．メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
４．ギ酸：[98%、特級]
５．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（１ｇ、20cc)。あらかじめメタノール 10mL 及び 0.1vol%ギ酸含有 12.5vol%メタノール溶液 10mL でコンディショニングしておく。
６．12.5vol%メタノール：メタノール 125mL に水を加えて１Ｌとする。
７．0.1vol%ギ酸含有 12.5vol%メタノール溶液：ギ酸１mL に 12.5vol%メタノールを加えて１Ｌとする。
８．0.1vol%ギ酸含有メタノール溶液：ギ酸１mL にメタノールを加えて１Ｌとする。
９．リン酸二水素カリウム：[特級]
10．リン酸水素二カリウム：[特級]
11．50mmol／Ｌリン酸緩衝液（pH5.6)：50mmol／Ｌリン酸二水素カリウム溶液に 50mmol／Ｌリン酸水素二カリウム溶液を加えて pH5.6 に調整する。
12．弱陽イオン交換固相抽出カラム：モノカルボキシシリル化ポリマー被覆シリカゲル固相抽出カラム（360mg)。あらかじめメタノール 3mL 及びメタノール／リン酸緩衝液（pH5.6)混液（１：１）３mL でコンディショニングしておく。
13．メタノール／リン酸緩衝液混液（１：１)：メタノールと 50mmol／Ｌリン酸緩衝液(pH5.6)を１：１で混ぜ合わせる。
14．アンモニア水：[25.0～27.9%、特級]
15．アンモニア含有メタノール試液：アンモニア水 2.4mL にメタノールを加え 30mL とする。
16．0.1vol%ギ酸：ギ酸 1mL に水を加えて１Ｌとする。
17．アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
18．0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル：ギ酸１mL にアセトニトリルを加えて 1L とする。

[注]
１）ナイシンは、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドと塩化ナトリウムの混合物である。主たる抗菌性ポリペプチドはナイシンＡ（$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$）である。ナイシンＡは、34 アミノ酸残基からなり、分子量 3354Da である。活性型分子にランチオニン、β－メチルランチオニン、デヒドロアラニン、デヒドロブチリンが含まれることが特徴である。ナイシンＡのＮ末端から 27 番目のヒスチジンがアスパラギンで置換されたものがナイシンＺである。なお、食品添加物として指定されているのはナイシンＡである。
２）液卵の場合は、メタノール／水／ギ酸混液（５：４：１）による膨潤を防ぐために、溶媒を加える前に試料を 100℃で 10 分間加熱し液卵を凝固させる。ナイシンの安定性を検討するために、0.1vol%ギ酸に溶解させたナイシン標準品を 100℃で 10 分間加熱しフォトダ

イオードアレイ検出器付液体クロマトグラフを用いて測定したところ、ナイシンＡは安定であった。

３）遠心管としてメタノール、ギ酸、ヘキサンに対して耐性のあるものを使用する。ポリアロマー製のもの等が使用できる。

４）ナイシンの吸着を防ぐため、low protein binding と表記されているものを使用する。

５）弱陽イオン交換固相抽出カラムにより、ナイシンＡのピーク近傍に出現する（用いる$C_{18}$系カラムによってはナイシンＡと重なる場合がある）プロセスチーズ由来の大きな夾雑ピークが除去される。

６）カラムを乾燥させるため、空気を５mL 注入する。

７）ナイシンは弱酸性（pH３～４）で最も安定であることから、溶出液はギ酸を入れた容器に受ける。

８）標準品の表示力価に従い、採取量を計算する。１mg 当たり 1000 単位の場合、採取量は 0.1ｇである。

９）ナイシンの力価１単位はナイシンＡ（$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_{7}$）を含む抗菌性ポリペプチド 0.025μg に対応する。

10）吸着を防ぐため、配管はピーク製を用いる。

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グラジエント条件を調整する。また、コーン電圧は *m*／*z* 1119 が最大になる点を設定する。

12）他の測定条件の例を以下に示す。

カラム：マクロポーラス型スチレンジビニルベンゼン充塡カラム（２mm×150mm、粒径３μm）

カラム温度：40℃

移動相：Ａ液　５vol％ギ酸 0.1vol％ＴＦＡ水溶液

Ｂ液　アセトニトリル

Ｃ液　水

リニアグラジエントの条件

| 分 | Ａ（%） | Ｂ（%） | Ｃ（%） |
|---|---|---|---|
| 0 | 5 | 20 | 75 |
| 13 | 5 | 35 | 60 |
| 14 | 5 | 95 | 0 |
| 18 | 5 | 95 | 0 |
| 19 | 5 | 20 | 75 |
| 30 | 5 | 20 | 75 |

流速：0.2mL／分

注入量：10μL

イオン化モード：ＥＳＩ（＋）

検出法：選択イオン検出法（ＳＩＭ）

モニターイオン：$m/z$ 839 及び 1119

ソース温度：150℃

コーン電圧：40Ｖ

コーン窒素流量：60Ｌ／時

デソルベーション窒素流量：600Ｌ／時

デソルベーション温度：400℃

キャピラリー電圧：4.00kV

13）ギ酸濃度を上げると３価イオンが出やすくなる。

14）代替溶媒としてメタノールを用いることができるが、ピークが拡がり、高濃度のナイシンＡの定量性が低下する場合があるので注意して用いる。

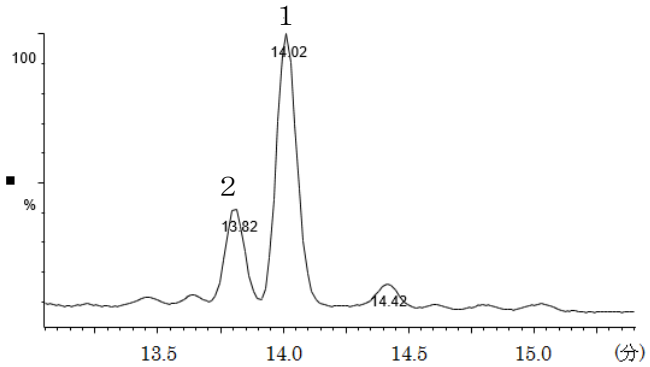
15）定量（検出法：ＳＩＭ）には次のリニアグラジエントの条件を用いてもよい。

リニアグラジエントの条件

| 分 | Ａ(%) | Ｂ（%） |
|---|---|---|
| 0 | 77.5 | 22.5 |
| 7.5 | 70 | 30 |
| 12.5 | 0 | 100 |

16）装置の感度により注入量は変更してもよい。

17）ナイシンの主な抗菌性ペプチドはナイシンＡであるが、ナイシン標準品中にはナイシンＡから派生したと思われる類縁体が複数含まれている。ナイシン標準原液（10000 単位／mL）のクロマトグラムを注図１に示す。ナイシンＡより分子量が 18 大きい類縁体がナイシンＡより保持時間で 20 秒ほど前に観測される。

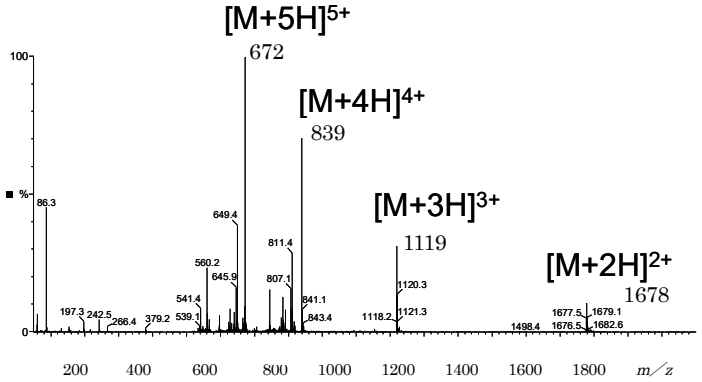



１．ナイシンＡ、２．　ナイシンＡに水が１分子付加したもの（分子量 3372）

カラム：タンパク質分離用逆相カラム（4.6 mm×250 mm、粒径５μm）、カラム温度：40℃、移動相：Ａ液　0.1vol％ギ酸、Ｂ液　0.1vol％ギ酸含有アセトニトリル、リニアグラジェントの条件：Ｂ=22.5％からＢ=30％までのリニアグラジエント 7.5 分間、次いで、Ｂ=30％から 100％までのリニアグラジエント５分間、流速：0.5mL／分、検出器：フォトダイオードアレイ検出器

注図１　ナイシン標準原液（10000 単位／mL）のクロマトグラム（測定波長 210 nm）

ナイシンＡについて、ＥＳＩ（＋）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。




ＥＳＩ（＋）スキャン測定（40Ｖ）

注図２　ナイシンＡの多価イオンピークプロファイル

18）0.1vol％ギ酸で検量線用標準溶液を調製した場合、低濃度（25～200 単位／mL）の範囲では累乗曲線に近似し直線性を示さない。これはタンパク質であるナイシンが、液体クロマトグラフの流路等に非特異的に吸着するためと推察される。また、食品由来成分によりナイシンＡのイオン強度が影響を受けるため、標準添加法により定量を行う。

19）種々の食品についてのナイシンの添加回収率を注表１に示す。本分析法における回収率は、標準品のみを使った際に 50％、食品からの添加回収では 30~50％である。これは抗菌性ポリペプチドの器具等への非選択的な吸着によるためと考えられる。

注表１　ナイシンの各食品での回収率

| 食品 | 添加量（ｇ／kg） | 回収率（％）＊ |
|---|---|---|
| ナチュラルチーズ | 0.01250 | 34.0±5.6 |
| ソーセージ | 0.01250 | 44.9±4.1 |
| ハム | 0.01250 | 47.7±3.7 |
| ホイップクリーム | 0.01250 | 39.2±1.6 |
| ケチャップ | 0.01000 | 30.6±3.6 |
| マヨネーズ | 0.01000 | 59.4±9.4 |
| プロセスチーズ | 0.00625 | 28.9±6.7 |
| クリームパン | 0.00625 | 49.4±7.2 |
| 液卵 | 0.00500 | 43.9±3.4 |

| | | |
|---|---|---|
| 味噌 | 0.00500 | 40.7±4.2 |
| タピオカプティング | 0.00300 | 60.5±0.9 |

＊３試行の平均値±S.D

20）

$$\text{ナイシンAを主とする抗菌性ポリペプチドの含量（g／kg）} = \frac{C \times 50 \times 0.025}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中のナイシン濃度（単位／mL）

W：試料の採取量（g）

21）一般財団法人医薬品医療機器レギュラトーリーサイエンス財団より製造・頒布されている。ナイシン標準品は*Lactococcus lactis subsp. lactis*の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドの塩化ナトリウムとの混合物である。糖培地由来の成分を含む。

# ナイシンスクリーニング法（微生物学的定量法）

## １．材料

### （１）試験菌

*Micrococcus luteus*　(ATCC 10240、NCIB 8166、NBRC 13867)[1]を使用する。

### （２）培地

培地の液性は水酸化ナトリウム試液又は塩酸（1→10）を用いて調整する。なお、規定の培地と類似の成分を有し、同等又はより優れた菌の発育を示すほかの培地を用いることができる。滅菌は高圧蒸気法で行う。

①　種層用寒天培地

トリプトン　10ｇ
肉エキス　３ｇ
塩化ナトリウム　３ｇ
酵母エキス　1.5ｇ
スクロース　１ｇ
寒天　15ｇ
水　1000mL

全成分を混和し、121℃、15 分間滅菌する。滅菌後の pH は 7.4～7.6 とする。滅菌後、培地と同温度の 50%ポリソルベート 20 溶液を２mL 添加する。

②　試験菌移植用斜面寒天培地

ブレインハートインフュージョン寒天　52ｇ[2]
水　1000mL

全成分を混和し、121℃、15 分間滅菌する。滅菌後の pH は 7.2～7.6 とする。この寒天培地９mL を内径約 16mm の試験管に分注して斜面培地とする。

## ２．試験菌の継代保存

試験菌移植用斜面寒天培地により試験菌を 30℃[3]で培養する。継代移植は１ヵ月から１ヵ月半の間隔で行う。

## ３．試験菌液の調製

試験菌を試験菌移植用斜面寒天培地を用いて 30℃で 48 時間培養する。この菌[4]を滅菌した生理食塩水 7mL に懸濁させ、試験菌液とする。

## ４．種層寒天培地の調製

試験菌液を滅菌した生理食塩水で希釈した液（１→10）２mL を 48～51℃に保った種層用寒天

培地 100mL に加え[5]、十分に混合し、種層寒天培地とする。

５．穿孔寒天平板の調製

滅菌した内径 90±１㎜、高さ 15～20㎜のペトリ皿に約 20mL の種層寒天培地を入れ[6]、寒天が水平になるように広げて固化させたものを種層寒天平板とする。種層寒天平板上の半径約 25～28㎜の円周上に、円筒[7]をその中心間の距離が 30㎜以上となるように一定間隔で４個並べる。円筒を置いた状態で種層寒天培地 20mL を分注し、固化させた後、４℃にて 30～60 分保持し、滅菌したピンセット等を用いて培地より円筒を静かに抜き、穿孔寒天平板とする。

６．ナイシン標準溶液の調製

100000 単位に対応する[8]ナイシン標準品[9]を量り、塩酸（１→600）80mL に懸濁する。２時間室温におき、塩酸（１→600）を加えて正確に 100mL とし、これを標準原液とする。さらに 0.625、1.25、2.5、５、10（単位／mL）となるよう、標準原液を塩酸（１→600）を用いて希釈し、標準溶液とする。

７．ナイシン標準曲線の作成

穿孔寒天平板５枚を１組として用いる。ナイシン標準溶液を濃度ごとに異なる穿孔寒天平板の４ヵ所の穴に 0.2mL ずつ入れる。標準溶液分注後、ふたをし、30℃[3]で 18 時間[10]培養する。培養後、形成された阻止円の直径をノギスを用いて 0.1㎜単位で測定する。ナイシン濃度 x（単位／mL）の常用対数値 log x を横軸に、阻止円の直径 y（㎜）を縦軸にとり、ナイシン標準曲線（$y = \alpha \log x + \beta$）を作成し、定数 $\alpha$ 及び $\beta$ を求める。

８．食品中のナイシンの定量

試料[11]５ｇを 0.02mol／Ｌ塩酸 25mL でホモジナイズ抽出する。遠心（10 分間、3500 回転／分）後、約５℃に冷却して上層（脂肪層）を固化して除き、得られた液を抽出液とする。抽出液２mL を 0.02mol／Ｌ塩酸 38mL で希釈後、2 つに分割し、一方は、１mol／Ｌ水酸化ナトリウムで pH11.0±0.1 に調整し、ナイシン確認用試験溶液とする。もう一方は、１mol／Ｌ塩酸で pH2.0±0.1 に調整し、ナイシン定量用試験溶液とする。pH 調整後、ナイシン確認用試験溶液及びナイシン定量用試験溶液を、それぞれ 10mL の試験管に５mL 分注し、沸騰水中で 10 分間加熱する。室温に冷却した後、ナイシン標準曲線の手法に従い、培養を行う。ナイシン確認用試験溶液について、発育阻止円が認められないことを確認する[12]。また、ナイシン定量用試験溶液について、穿孔寒天平板を用いて得られる試験菌の発育阻止円の直径を測定し[13]、次式により、試験溶液中のナイシン濃度（単位／mL）を求め、試料中の抗菌性ペプチド含量（ｇ／kg）を計算する[14]。試料中のナイシンＡを含む抗菌性ポリペプチドの含量が、0.00156ｇ／kg 以上となったものを陽性と判定する。

$$I = \frac{\text{阻止円の直径(mm)} - \beta}{\alpha}$$

試料液のナイシン濃度＝$10^{I}$（単位／mL）

$$\text{ナイシンAを含む抗菌性ポリペプチドの含量（g／kg）} = \frac{C \times 1.25 \times 10^{-2}}{W}$$

C：試験溶液中のナイシン濃度（単位／mL）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液等

1．ナイシン標準品：［食品添加物公定書標準品］[15)]

2．水酸化ナトリウム：[特級]

3．水酸化ナトリウム試液：水酸化ナトリウム 4.3 g を水に溶かし、100mL とする。ポリエチレン瓶に保存する。

4．塩酸：[特級]

5．トリプトン：市販品を用いる。

6．肉エキス：市販品を用いる。

7．塩化ナトリウム：[特級] 又は［日局]

8．酵母エキス：市販品を用いる。

9．スクロース：日本薬局方精製白糖を用いる。

10．寒天：[特級]

11. 50%ポリソルベート 20 溶液：ポリソルベート 20 と水を 1：1 の質量比で混合し、121℃、15 分間高圧蒸気滅菌する。

12．ポリソルベート 20：市販品を用いる。

13．ブレインハートインフュージョン寒天：市販品を用いる。

14．生理食塩水：日本薬局方生理食塩液を用いる。

[注]

1）試験菌 *Micrococcus luteus*（ATCC 10240、NCIB 8166、NBRC 13867）は、独立行政法人製品評価技術基盤機構で分与（有料）している。また、Micro BioLogics 社でも取り扱っている。

2）ブレインハートインフュージョン 37.0 g 及び寒天 15 g を用いてもよい。

3）菌の生育状態により、30～35℃の一定温度としてもよい。

４）18～24 時間の培養を３代継代し、斜面培地上に生えた３代目の菌を用いてもよい。

５）標準溶液により明瞭でかつ適当な大きさの阻止円を形成する量の試験菌液を加える。希釈液の濃度は適宜調節してもよい。

６）厚さが２～３㎜となるようにする。

７）外径 8.0±１㎜、内径 6.0±0.1㎜、高さ 10.0±0.1㎜のステンレス製のもの（ペニシリンカップ）を用いる。

８）標準品の表示力価に従い、採取量を計算する。１㎎当たり 1000 単位の場合、採取量は 0.1g である。

９）主たる抗菌性ポリペプチドはナイシンＡ（$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_{7}$）であり、ナイシンの力価１単位は、ナイシンＡ（$C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_{7}$）を含む抗菌性ポリペプチド 0.025μg に対応する。

10）菌の生育状態により、18～24 時間の一定時間としてもよい。

11）液卵は、鶏卵由来成分により阻止円が観測される場合がある。

12）ナイシンは、酸性では熱に強いが、アルカリ性では加熱により失活する。

13）試料成分の影響により阻止円が大きく観測され、添加回収率が 200%以上となる場合がある。この様な場合は、試験抽出液を用いて検量線を作成する必要がある。

14）

$$\text{ナイシンAを含む抗菌性ポリペプチドの含量（g／kg）} = \frac{C \times 40 \times 12.5 \times 0.025}{W \times 1000}$$

Ｃ：試験溶液中のナイシン濃度（単位／㎖）

Ｗ：試料の採取量（ｇ）

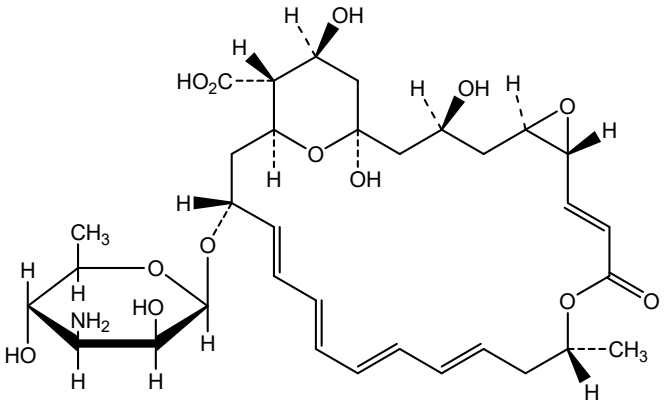
15）一般財団法人医薬品医療機器レギュラトーリーサイエンス財団より製造･頒布されている。ナイシン標準品は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の培養液から得られた抗菌性ポリペプチドの塩化ナトリウムとの混合物である。糖培地由来の成分を含む。

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 10ｇ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１mL 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１mL 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、５mL 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。

カラム充塡剤[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（μg／mL）

Ｗ：試料の採取量（ｇ）

④　定量限界　0.001ｇ／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５mL 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 500μg／mL）。保存用標準原液１mL 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 10μg／mL）。検量線用標準原液１mL 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、２mL 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 0.1～2.0μg／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[14]：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 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：20μL

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（μg／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(μg／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 0.5～２mL／分程度とし、固相抽出カラムは乾固させない。

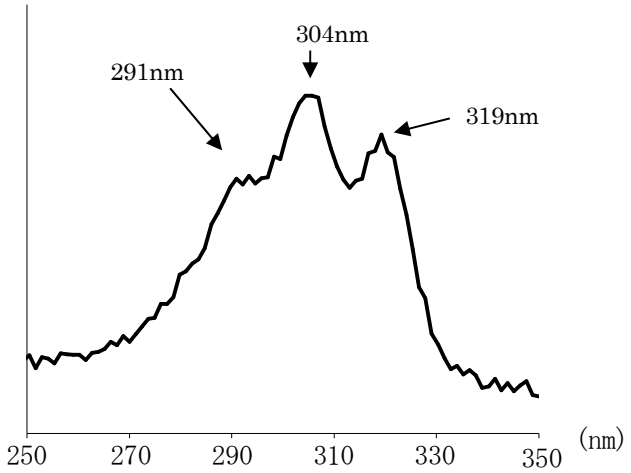
12）流下速度は 0.5～２mL／分程度とする。この際、減圧吸引等により固相抽出カラム内のメタノールをできるだけ回収する。

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。

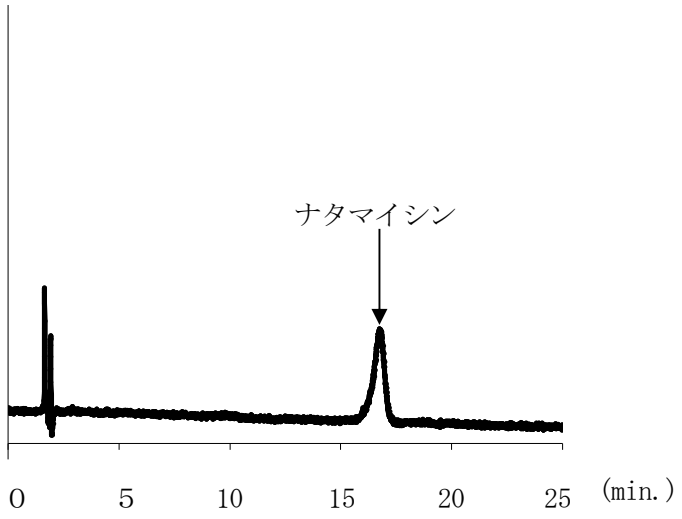



注図１　検量線用標準溶液（ナタマイシン 0.5μg／mL）の吸収スペクトル

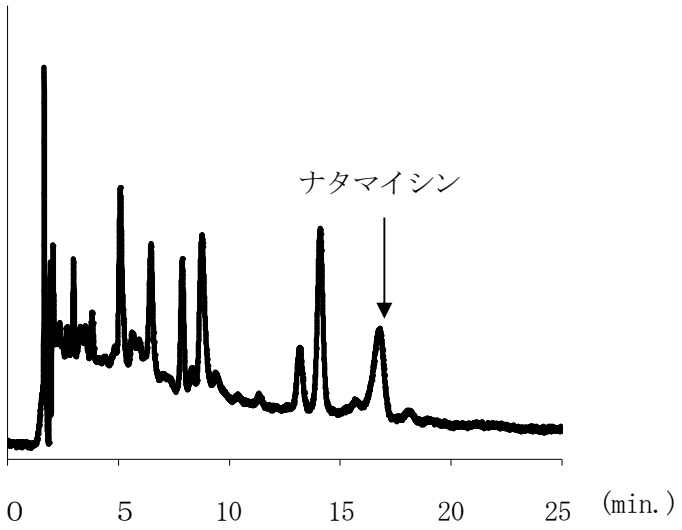
17）検量線用標準溶液の調製に用いたメタノール／水混液（１：１）を注入し、ナタマイシンの保持時間にピークが現れないことを確認する。

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%、相対標準編差は 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（0.1μg／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設定）

## 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。

カラム充塡剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径2㎜、長さ150㎜

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[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)]：２μL[4)]

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。

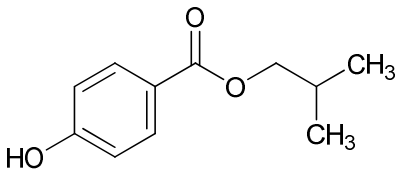
４）注入量は適宜調整する。

保存料

# パラオキシ安息香酸エステル類

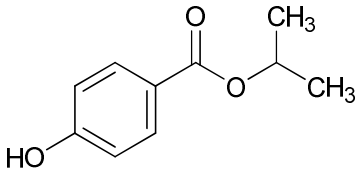
*p* -Hydroxybenzoic Acid Esters

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



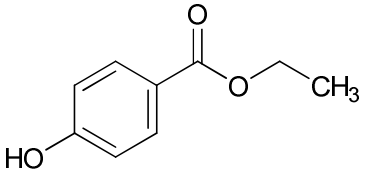
$C_{11}H_{14}O_3$：194.23

パラオキシ安息香酸イソプロピル
Isopropyl *p* -Hydroxybenzoate
別名：パラヒドロキシ安息香酸イソプロピ



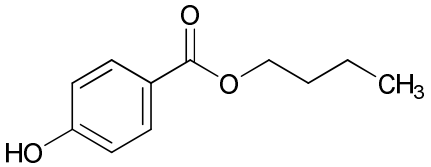
$C_{10}H_{12}O_3$：180.20

パラオキシ安息香酸エチル
Ethyl *p* -Hydroxybenzoate
別名：パラヒドロキシ安息香酸エチル



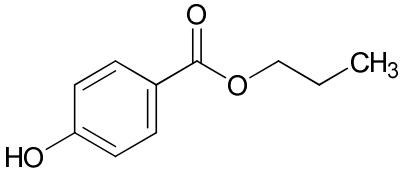
$C_9H_{10}O_3$：166.17

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



$C_{11}H_{14}O_3$：194.23

パラオキシ安息香酸プロピル
Propyl *p* -Hydroxybenzoate
別名：パラヒドロキシ安息香酸プロピル



$C_{10}H_{12}O_3$：180.20

１．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、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸及びそれらの塩類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 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５ｇ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５ｇ[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）10mL[11)]、塩化ナトリウム 60ｇ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 10μg／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 0.05～10μg／mL）。

（４）測定法

①　測定条件[14)]

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。

カラム充塡剤[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：260nm[17)]

注入量：20μL[18)]

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（μg／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)]

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

Ｃ：試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度（μg／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

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

その他の食品

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

C：試験溶液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度（μg／mL）
$W_1$：試料の採取量（mL）
$W_2$：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

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

パラオキシ安息香酸含量（g／L）＝パラオキシ安息香酸イソプロピル含量（g／L）×0.7665

パラオキシ安息香酸含量（g／L）＝パラオキシ安息香酸エチル含量（g／L）×0.8312

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

パラオキシ安息香酸含量（g／L）＝パラオキシ安息香酸プロピル含量（g／L）×0.7665

上記以外の食品の場合

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

パラオキシ安息香酸含量（g／kg）＝パラオキシ安息香酸イソプロピル含量（g／kg）×0.7665

パラオキシ安息香酸含量（g／kg）＝パラオキシ安息香酸エチル含量（g／kg）×0.8312

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

パラオキシ安息香酸含量（ｇ／kg）＝パラオキシ安息香酸プロピル含量（ｇ／kg）×0.7665

④　定量限界　0.005ｇ／Ｌ又は0.005ｇ／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11.5ｇ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27.0ｇとリン酸0.2ｇ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（0.45μm）等を用いてろ過を行うことが望ましい。最初のろ液５mL 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 50ｇ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 60～80ｇ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５ｇ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／５mmol／Ｌクエン酸緩衝液（pH4.0）混液（６：４）

・水／メタノール／0.2mol／Ｌリン酸緩衝液（pH4.0）混液（17：２：１）及び水／メタノール／0.2mol／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

・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）及び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）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。５mmol／Ｌクエン酸緩衝液（pH4.0）は、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 20μL 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、10μL 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(μg／mL)

$$= \frac{C(\mu g/mL) \times V(mL) \times \text{固相抽出カラム溶出液量}(10mL)}{\text{希釈に用いた固相抽出カラム溶出液量}(2mL) \times \text{精製に用いた抽出液量}(5mL)}$$

$$= CV$$

パラオキシ安息香酸エステル含量（g／kg）

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

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

*μg／g から g／kg に変更するために、1000 で除す。

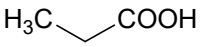
保存料

# プロピオン酸及びその塩類

Propionic Acid and Its Salts

プロピオン酸

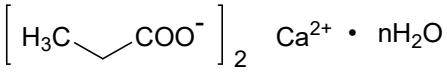
Propionic Acid



$C_3H_6O_2$：74.08

プロピオン酸カルシウム

Calcium Propionate

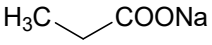


n = 1 または 0

$C_6H_{10}CaO_4$：186.22

プロピオン酸ナトリウム

Sodium Propionate



$C_3H_5NaO_2$：96.06

## １．分析法の概要

食品中のプロピオン酸及びその塩類は、水蒸気蒸留法により抽出した後、強陰イオン交換固相抽出カラムで精製し、液体クロマトグラフィーによりプロピオン酸として定量する。必要があれば、分子量比を乗じてそれぞれのプロピオン酸塩の量として求める。食品中には、天然のプロピオン酸が分布している場合もある。したがって、検体中にこれらの食品を素材として含有する場合には、定量値は素材由来のプロピオン酸と添加されたものとの合計値である。

プロピオン酸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。（2010 年改正、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 水蒸気蒸留

試料を細切又はすりつぶした後、その約 30ｇを精密に量り、500～1000mL の丸底フラスコに入れる。これに水 200mL、塩化ナトリウム 80ｇ、10ｗ／ｖ％リン酸 10mL[1)]及びシリコーン樹脂１滴を加える。あらかじめ 0.2mol／Ｌトリス・塩酸緩衝液（pH8.5）[2)]20mL を入

れた受器に冷却器の先端を浸し、毎分約 10mL の留出速度で水蒸気蒸留を行う。留液が 280～290mL になったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に 300mL とする。

② 精製

強陰イオン交換固相抽出カラム[3]に、①で得られた留液20mLを負荷し、流出液は捨てる。次いで水 10mL を注入し、洗液は捨てる。次いで５w／ｖ％塩化ナトリウム含有 0.01mol／Ｌ塩酸５mL を注入し、溶出液に水を加えて全量を 10mL とする。これをメンブランフィルター（0.45μm、水系）でろ過し、試験溶液とする[4]。

（３）検量線用標準溶液の調製[5]

プロピオン酸ナトリウム[6]0.130ｇを量り、水を加えて溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする（濃度 プロピオン酸として 1.00mg／mL）。標準原液 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 プロピオン酸として 100μg／mL）。標準溶液２、５、10mL 及び標準原液２、５mL をそれぞれ正確にとり、それぞれに水を加えて正確に 10mL とし、検量線用標準溶液とする（濃度 プロピオン酸として 20～500μg／mL）[7]。

（４）測定法

① 測定条件[8]

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。

カラム充塡剤[9]：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℃

移動相：水／アセトニトリル混液（94：６）をリン酸で pH2.5 に調整したもの。

流速：0.8～1.2mL／分

測定波長：210nm

注入量：10μL

② 検量線[10]

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[11]

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プロピオン酸濃度（μg／mL）を求め、次式[12]によって試料中のプロピオン酸含量（ｇ／kg）を計算する。

$$\text{プロピオン酸含量（g／kg）} = \frac{C \times 3}{W \times 20}$$

Ｃ：試験溶液中のプロピオン酸濃度（μg／mL）

W：試料の採取量（g）

プロピオン酸カルシウム含量（g／kg）=プロピオン酸含量（g／kg）×1.257

プロピオン酸ナトリウム含量（g／kg）=プロピオン酸含量（g／kg）×1.297

④　定量限界　プロピオン酸として0.1g／kg

試薬･試液等

1．プロピオン酸ナトリウム：市販品を用いる[6)]。

2．塩化ナトリウム：［特級］又は［日局］

3．リン酸：［特級］

4．10w／v％リン酸：リン酸11.8gを量り、水を加えて100mLとする。

5．シリコーン樹脂：（消泡用）［食添］

6．トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン：２－アミノ－２－ヒドロキシメチル－１，３－プロパンジオール［特級］

7．塩酸：［特級］

8．0.2mol／Lトリス・塩酸緩衝液（pH8.5）：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン24.2gを量り、水500mLに溶解し、2mol／L塩酸でpH8.5に調整後、水を加えて1000mLとする。

9．強陰イオン交換固相抽出カラム：四級アンモニウム塩結合ポリスチレン固相抽出カラム（600mg）[3)]。使用前にメタノール10mL及び水10mLでコンディショニングする。

10．５w／v％塩化ナトリウム含有0.01mol／L塩酸：塩化ナトリウム５gを量り、0.01mol／L塩酸を加えて100mLとする。

11．アセトニトリル：［高速液体クロマトグラフィー用］

［注］

1）pHは２～３となる。

2）固相抽出カラムに負荷するとき溶液の塩基性を保ちプロピオン酸の吸着を良くする。

3）固相抽出カラムを使用する場合はあらかじめ回収試験を実施する。

4）安息香酸、ソルビン酸あるいはデヒドロ酢酸等が共存する場合、液体クロマトグラフィーにおいて、これらの溶出に長時間を要する。これらを除去するには、以下の操作を行う[文献1)]。

強陰イオン交換固相抽出カラムに留液20mLを負荷し、流出液は捨てる。次いで水10mLを注入し、洗液は捨てる。強陰イオン交換固相抽出カラムの下に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）を接続する。これに５w／v％塩化ナトリウム含有0.01mol／L塩酸５mL、次いで水／アセトニトリル混液（９：１）を注入し、溶出液の全量を10mLとしたものを試験溶液とする。

5）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。

６）純度の低いものがあるため注意を要する。

７）試料中のプロピオン酸濃度に応じて、高濃度の検量線用標準溶液は用いなくてもよい。

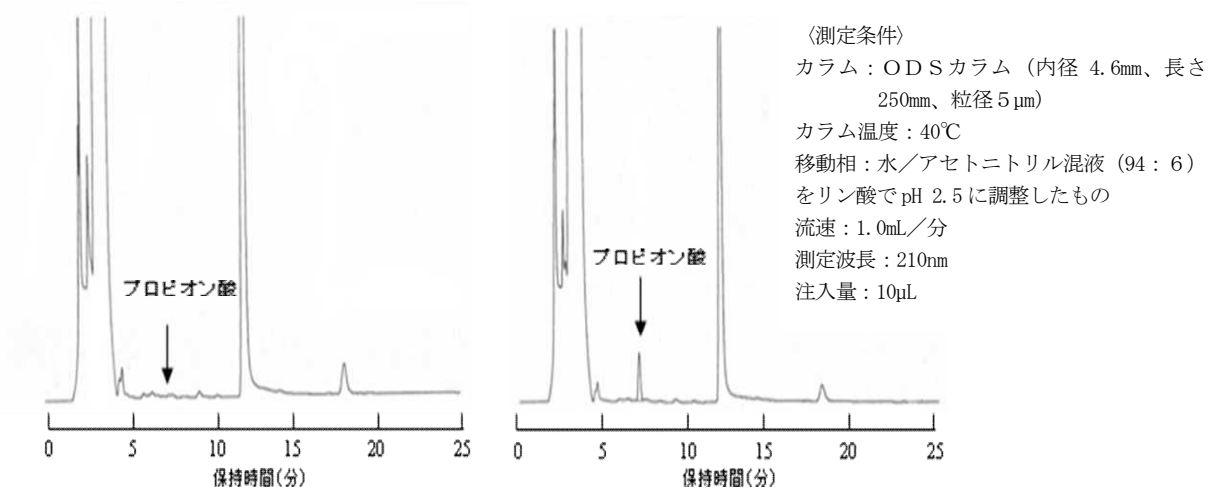
８）測定条件は例示である。用いるカラムの内径及び長さによって、流速及び注入量等を調整する。

９）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。

10）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。

11）本法による液体クロマトグラムの一例を注図に示す。

（１）カステラ　　（２）カステラにプロピオン酸(試料中 100μg／ｇ)を添加




注図１　プロピオン酸のクロマトグラム

12）式の説明：

$$\text{留液中のプロピオン酸濃度(μg／mL)} = \frac{\text{C}\times\text{試験溶液量(10mL)}}{\text{精製に用いた留液量(20mL)}}$$

プロピオン酸含量（ｇ／kg)

$$= \frac{\text{留液中のプロピオン酸濃度(μg／mL)}\times\text{留液量(300mL)}}{\text{W（試料の採取量(ｇ))}} \times \frac{1}{1000^{*}}$$

*μg／ｇからｇ／kg に変更するために、1000 で除す。

［文献］

１）立石恭也ら：東京衛研年報、49、77（1998）

参考

# プロピオン酸確認分析法

## １．分析法の概要

食品中のプロピオン酸は、ガスクロマトグラフィー質量分析により確認を行う[1)]。(2010 設定)

## ２．分析法（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

プロピオン酸及びその塩類分析法の（２）試験溶液の調製　①水蒸気蒸留を準用する。留液５mL にリン酸を１滴加え酸性にした後、酢酸エチル５mL を加え１分間振とうする。静置し２層が十分に分離した後、酢酸エチル層を分取し試験溶液とする[2)]。

### （３）標準溶液の調製

プロピオン酸及びその塩類分析法の（３）検量線用標準溶液の調製を準用することにより調製した検量線用標準溶液の５mL を（２）試験溶液の調製の項の留液と同様に操作し、標準溶液とする。

### （４）測定法

① 測定条件[3)]

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：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 0.25μm の厚さで被覆したもの。

カラム温度：100℃（２分）、100→230℃（10℃／分、昇温）、230℃（3 分）

注入口温度：250℃

イオン源温度：250℃

キャリヤーガス：ヘリウム

注入方式：スプリットレス

イオン化モード（電圧）：ＥＩ（70eV）

検出法：スキャン（*m*／*z* 40～250）

主なイオン：*m*／*z* 74、45、57

注入量：１μL

② 定性[4)]

試験溶液をＧＣ－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か、あるいは、マススペクトル上の主要ピークの強度比が標準溶液と一致することを確認する。

試薬･試液等

１．プロピオン酸分析法の試薬・試液等を準用する。

２．酢酸エチル：［特級］

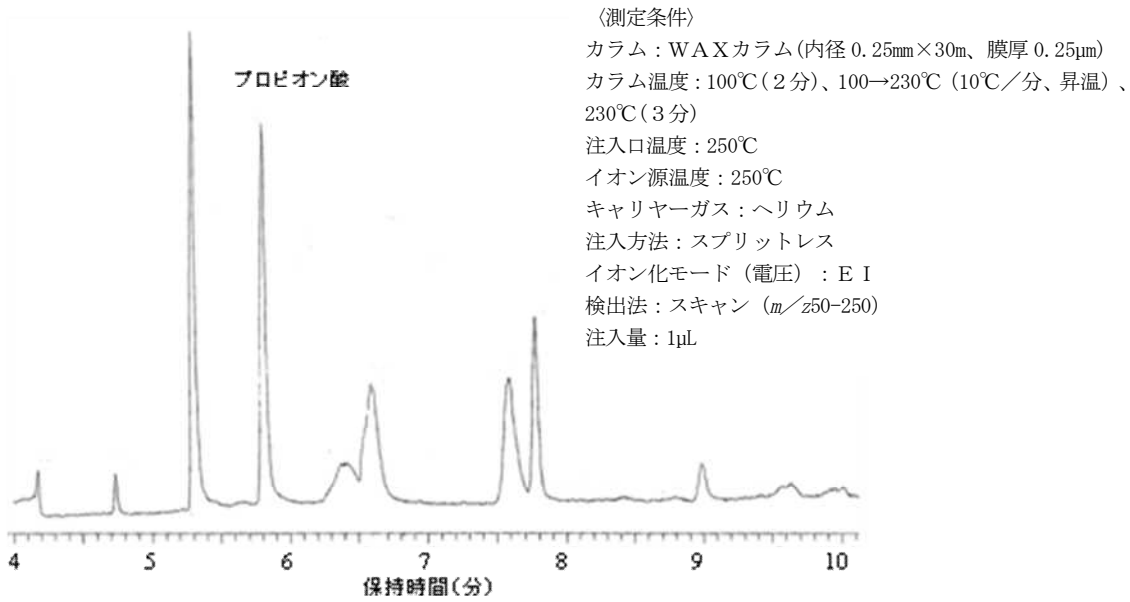
［注］

１）本法はプロピオン酸の確認分析法であり、定量分析は目的としない。

２）妨害ピークが認められる場合は、弱陽イオン交換固相抽出カラムに留液 10mL を注入し、最初の溶出液５mL を捨てた後、溶出液を採取する。これを留液の代わりに用い、以後の操作を行う。固相抽出カラムはあらかじめ水 5mL でコンディショニングしておく。

３）その他の測定条件は各測定機器に従い、プロピオン酸標準溶液の強度が最大となるようにあらかじめ最適化を行う。

４）本法によるトータルイオンクロマトグラムの一例を注図１に示す。マススペクトルによる確認が困難な場合、ＳＩＭモードにより測定を行い、マスクロマトグラム上に検出されたピークが標準溶液と一致することを確認する。




注図１　カステラ（プロピオン酸 100μg／ｇ添加）のクロマトグラム（ＴＩＣ）

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)

## 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２mL 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 50μg／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 0.25～50μg／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。

カラム充塡剤：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 150～250mm

カラム温度：40℃

溶離液：1mmol／Ｌホウ酸塩緩衝液

流速：1.0mL／分

測定波長：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ムに注入し、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５ｇを精密に量り、９mmol／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５mL に９mmol／Ｌ炭酸ナトリウム溶液を加え、正確に 50mL[9)]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３mL 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）0.125ｇ[4)]を量り、９mmol／Ｌ炭酸ナトリウム溶液を加え、100mL とする。この液 1mL を正確に量り、９mmol／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、９mmol／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 0.05～１μg／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。

カラム充塡剤：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 4.6㎜、長さ 250㎜

カラム温度：30℃

溶離液：９mmol／Ｌ炭酸ナトリウム溶液

流速：1.0mL／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､11)]

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５mL、続いて水 10mL 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ラ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。

５．１mmol／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。

６．１mol／Ｌ炭酸ナトリウム溶液：[イオンクロマトグラフィー用]

７．９mmol／Ｌ炭酸ナトリウム溶液：１mol／Ｌイオンクロマトグラフィー用炭酸ナトリウム溶液９mL に水を加え１L 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（１cc）

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）の採取量に乗じ、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１ｇ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４ｇを加え、直ちに密栓して暗所に15分間放置し、遊離したヨウ素を0.1mol／Ｌチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する(指示薬:デンプン溶液)。別に空試験を行い補正する。

0.1moL／Ｌ チオ硫酸ナトリウム溶液１mL=2.261mg亜塩素酸ナトリウム

亜塩素酸ナトリウムの純度＝（Ｖ×2.261×250）／（Ｗ×20×1000）

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。

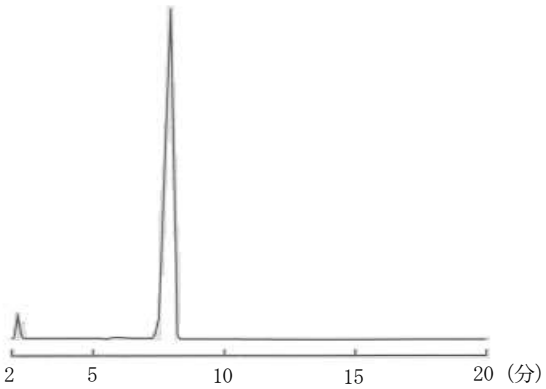
７）本法の添加回収率は90～100％、相対標準偏差５％である[文献1)]。また、検出限界は0.001ｇ／kgである。

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0.005ｇ／kgである。

11）亜塩素酸ナトリウムのイオンクロマトグラムを注図１に示す。




注図１　亜塩素酸ナトリウムのイオンクロマトグラム

カラム充塡剤：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 4.6㎜、長さ 250㎜
カラム温度：30℃
溶離液：９mmol／Ｌ炭酸ナトリウム溶液
流速：1.0mL／分
注入量：10μL

［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、９mmol／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－*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）

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１mLに10ｗ／ｖ％グリシン溶液0.1mLを加え、よく混和する。ＤＰＤ錠[2)]１錠及び硫酸試液0.1mL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。５mg／kg以上の亜塩素酸ナトリウムがあれば、塩素（Cl）として0.2mg／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ＤＰＤ0.002ｇ及び硫酸ナトリウム0.048ｇを含む。

２．グリシン：［特級］

３．硫酸：［特級］

４．硫酸試液：水99mLに硫酸１mL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

亜硫酸ナトリウム
Sodium Sulfite
別名：亜硫酸ソーダ
$Na_2SO_3 \cdot nH_2O$（n=７又は０）
（$Na_2SO_3$：126.04）

次亜硫酸ナトリウム
Sodium Hydrosulfite
別名：ハイドロサルファイド
$Na_2S_2O_4$：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
$K_2S_2O_5$：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
$Na_2S_2O_5$：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、亜硫酸ナトリウム、次亜硫酸ナトリウム又はピロ亜硫酸カリウムの量として求める。通常、分析法Ａは二酸化硫黄として約0.1ｇ／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0.1ｇ／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)

## 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２mL[6]、液体食品以外の場合は水 20mL[7]、更にシリコーン樹脂[8]２滴、及びリン酸試液 10mL[9]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、ミクロバーナー（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。

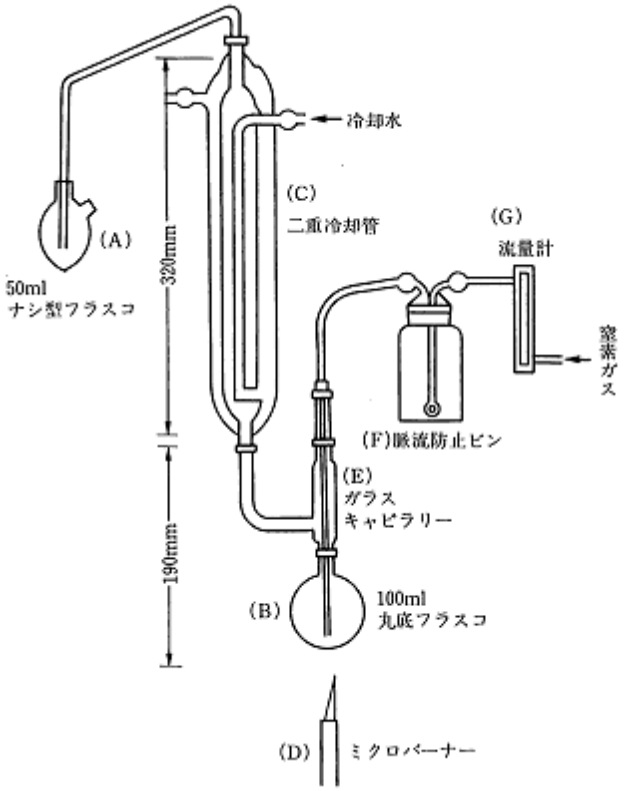



図１　通気蒸留装置

（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）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）

Ｗ：試料の採取量（ｇ）

Ｆ：0.01mol／Ｌ水酸化ナトリウム溶液のファクター

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

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１mL[15]、アジ化ナトリウム溶液（１→100）１mL[16]、エタノール２mL[6]、シリコーン樹脂[8] ２滴及びリン酸試液 10mL[9]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２ｇ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、ミクロバーナー[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[18]。

（４）検量線用標準溶液の調製

亜硫酸水素ナトリウム約 0.5ｇ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（$SO_2$）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０[19]、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[20]。(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[21]。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（μg／mL）を求め、次式によって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

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．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[23)]：メチルレッド 0.2ｇ及びメチレンブルー0.1g にエタノールを加えて溶かして 100mL とする。
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［特級］
14．５％ジメドン・エタノール溶液：ジメドン５ｇを量り、エタノールを加えて溶かし 100mL とする。用時調製する。
15．アジ化ナトリウム：［特級］
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３ｇを量り、水を加えて 500mL とする[24)]。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１ｇ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。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、天然果汁等の液体食品では20ｇ、ねりわさび、糖蜜、水あめ、キャンデッドチェリー及び乾燥果実では５ｇ、こんにゃく粉、切り干し大根、甘納豆、煮豆、みそ、チョコレート、にんにく、冷凍むきえび及びゼラチン等では１ｇ、かんぴょうでは0.1～0.2ｇ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ったり、測定不能になることがある。また、かんぴょう等では試料の採取量が少なく、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１mg に対応する亜硫酸水素ナトリウムを水 20mL に添加し、これに５、10、15、20、25、30、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１mg に対応する亜硫酸水素ナトリウムを水 20mL に添加し、窒素ガス流量を 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、１、1.2、1.5Ｌ及び２Ｌ／分として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、0.3Ｌ／分での回収率は、それぞれ 15.2%、65.9%、92.5%と低いが、0.4～２Ｌ／分ではいずれも 99%以上の回収率であった。しかし、有機酸含量の多いぶどう酒等の場合、窒素ガス流量が 1.2Ｌ／分以上では有機酸の影響が大きくなり、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 0.5～0.6Ｌ／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。ミクロ

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１mg に対応する亜硫酸水素ナトリウムを添加した試料を用いた場合、５分間加熱で 97.3～98.7％の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、0.1ｇ／kg（試料 2g 採取の場合）である。分析法Ａにおいて、砂糖２ｇに二酸化硫黄として１mg に対応する亜硫酸水素ナトリウムを添加した場合（0.5ｇ／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、ミ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、定量限界を下げることができる。

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 2.5ｇが存在してもその妨害は認められない。ジメドンは、必ず高速液体クロマトグラフ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１mg に対して亜硝酸 0.05mg では、ほとんど影響しないが、それ以上では妨害のおそれがある。アジ化ナトリウム溶液（１→100）１mL の添加により、亜硝酸１mg までの影響を除くことができる。アルカリ滴定法は亜硫酸含量の高い検体に適用されるので、亜硝酸の影響はほとんど認められないが、アジ化ナトリウム溶液（１→100）を加えてもよい。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)]。

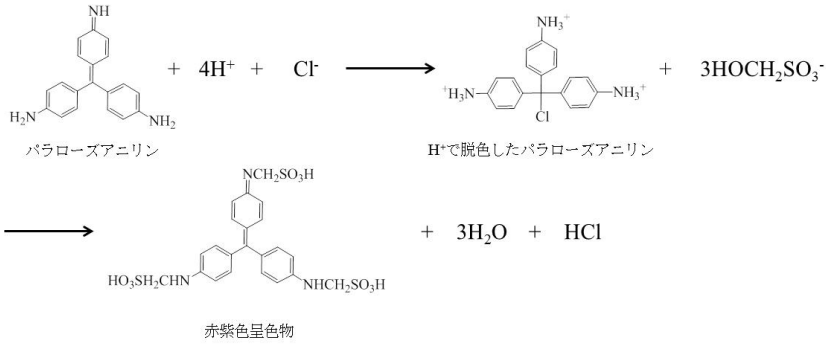
17）アルカリ滴定法に比べて微量の亜硫酸を定量するため、試液及び装置中に酸素があると亜硫酸は硫酸に酸化されるので、置換の目的でこの操作を加える。二酸化硫黄として 0.01mg 添加の際、この操作を省略すると回収率は 10～20％程度減少する。

18）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。

19）試薬ブランクである。比色定量の際の対照として用いる。

20）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。

21）本法の原理は次のとおりである。




22）分析法Ｂ（比色法）における定量限界は0.004ｇ／kg（試料２ｇ採取の場合）である。分析法Ｂにおいて、砂糖２ｇに二酸化硫黄0.01mgを添加した場合（0.005ｇ／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。

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、メチルレッド0.2ｇにエタノール50mLを加えて溶かしたもの及びメチレンブルー0.1ｇにエタノール50mLを加えて溶かしたものをそれぞれ別々に保存し、用時等量混和するとよい。市販品を使用することもできる。

24）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。(2018 年設定)

## 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９mL[1)]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１mL、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、0.8Ｌ／分の速度で５分間通気する。次にフラスコ（B）を外し、試料２ｇ[2)]を速やかに入れ、再び装置に取り付け、窒素ガスを 0.8Ｌ／分の速度で通気しながらミクロバーナーの炎の高さを４～５cm 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４㎜、長さ 200㎜

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：210nm[5)]

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（$SO_2$）濃度を求め、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

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 10ｇを水に溶かして 1000mL としたのち、$N_2$ガスを５分間通気して脱気する。

４．エタノール：[99.5ｖ／ｖ％高速液体クロマトグラフ用］遮光して保存する。

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 10.6ｇ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 8.4ｇ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）装置の感度が不十分な場合は試料採取量を 10g 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)]。

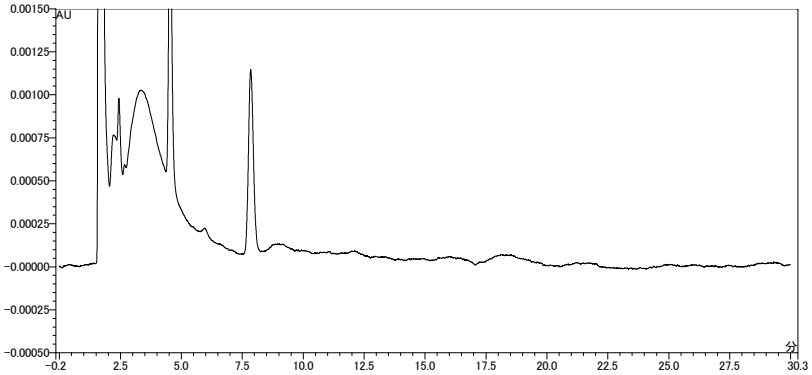
6）本法における定量限界は、0.003ｇ／kg（2g 採取）である。

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。

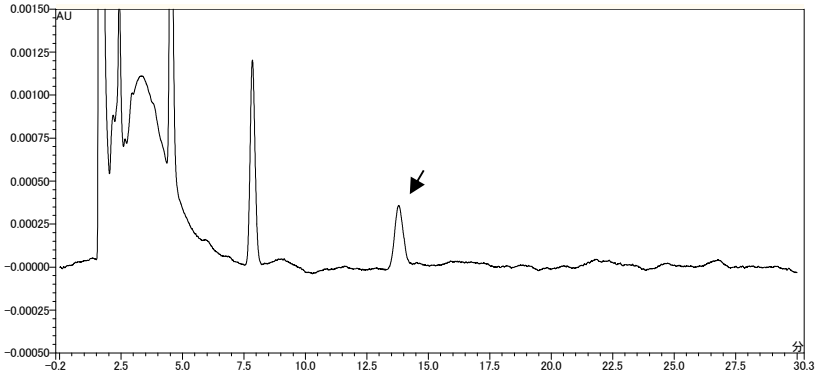
注表１　各種食品中の二酸化硫黄測定値の比較結果

| 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 |

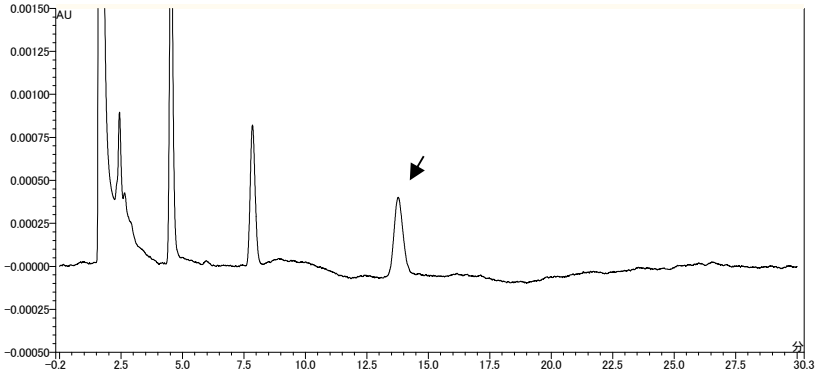
亜硫酸塩類使用の表示（有）の食品は３試行の平均、（無）の食品は１試行




（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５μg／ｇ添加




（3）標準溶液（二酸化硫黄として 1μg／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。(2018 年設定)

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 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 100μg／mL)。

（３）測定法

液体試料はそのまま、固体の試料は細切し 10ｇ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１cm 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１cm 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 20μg）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)]。

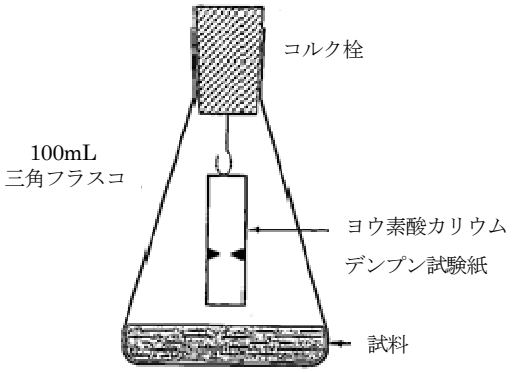



図１　ヨウ素酸カリウム・デンプン紙による定性法

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 0.2ｇ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１ｇを懸濁させたものを、熱湯約 180mL に撹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 30 分以内に試験紙が藍色に変わらないときは、二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は存在しない。

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）$2KIO_3 + 5SO_2 + 5H_2O \rightarrow I_2 + K_2SO_4 + 4H_2SO_4$

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。

$I_2 + SO_2 + 2H_2O \rightarrow 2HI + H_2SO_4$

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

（ミ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）

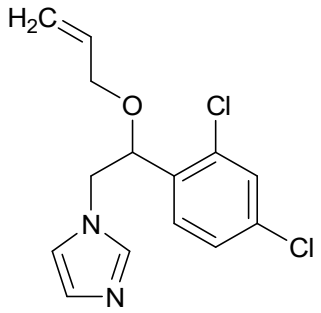
［文献］

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）

## 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１kg 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１kg 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 10ｇを精密に量り、５mol／Ｌ水酸化ナトリウム溶液２mL[6)]及び無水硫酸ナトリウム[7)]を 20～40ｇ加えて十分にかくはんし、酢酸エチル 50mL を加え、３分間ホモジナイズする。遠心（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 50mL 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 50mL、水 50mL で順次洗浄した後水層を捨てる。次いで酢酸エチルに 0.025mol／Ｌ硫酸溶液 50mL を加え、振り混ぜた後、水層を分取し、この操作を更に１回繰り返し、全水層を分液漏斗に合わせる。水層に５mol／Ｌ水酸化ナトリウム溶液５mL を加えた後[8)]、酢酸エチル 25mL を加えよ

く振り混ぜる。この操作を更に１回繰り返し、酢酸エチル層を分取し、無水硫酸ナトリウム10ｇで脱水後、減圧乾固する。残留物はメタノール／水混液（75：25）５mL を加えて溶解し、試験溶液とする。

（３）検量線用標準溶液の調製[9)]

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

カラム充塡剤：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：メタノール／水混液（75：25）

流速：１mL／分

測定波長：230nm

注入量：20μL

② 検量線[12)]

検量線用標準溶液 20μL 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 20μL 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。

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

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　0.0005ｇ／kg

試薬

１．イマザリル：イマザリル標準品［残留農薬試験用］

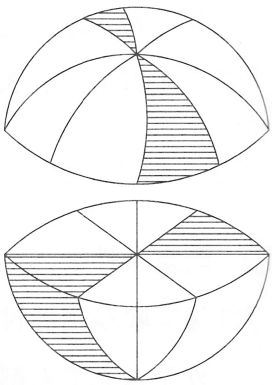
２．水酸化ナトリウム：［特級］
３．無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム［残留農薬試験用］
４．酢酸エチル：［残留農薬試験用］
５．無水炭酸ナトリウム：炭酸ナトリウム［特級］
６．硫酸：［特級］
７．メタノール：［高速液体クロマトグラフィー用］

［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 250～300ｇ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 100ｇ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）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）塩化ナトリウムを飽和させると回収率が向上する。

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。

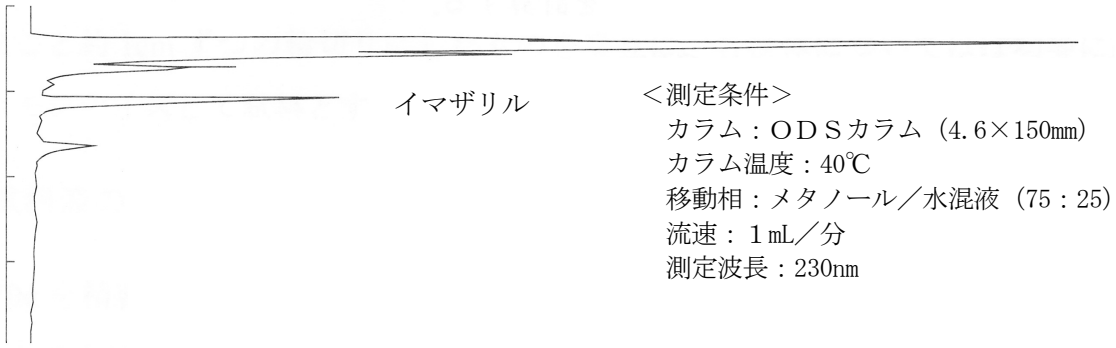
10）試験溶液中の濃度が低濃度の場合は、検量線を 0.5μg／mL～５μg／mL になるように標準原液を適宜希釈して検量線を作成する.

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５μg／10ｇ、回収率（%）：79.2、77.7、78.9、平均値（%）：78.6

②試料・添加量：レモン 25μg／10ｇ、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）

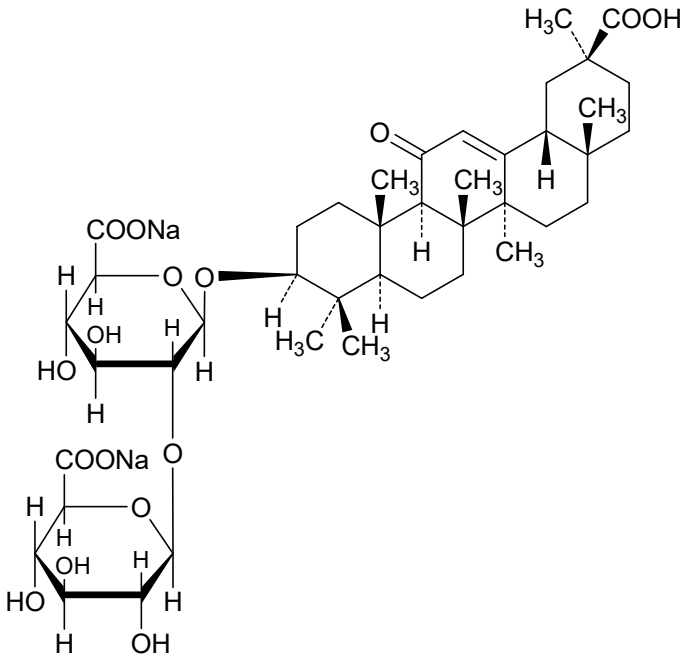
$W_1$：検体の採取量（g）

$W_2$：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ニナトリウムは、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 10ｇを精密に量り、１％アンモニア水を 10mL 加えて１分間ホモジナイズし、これに１％アンモニア水･メタノール試液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 0.100ｇ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 100μg／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 0.5～10μg／mL）。

（４）測定法

① 測定条件[5)]

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。

カラム充塡剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6㎜、長さ 150～250㎜

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：10μL

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（μg／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。

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

Ｃ：試験溶液中のグリチルリチン酸濃度（μg／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。

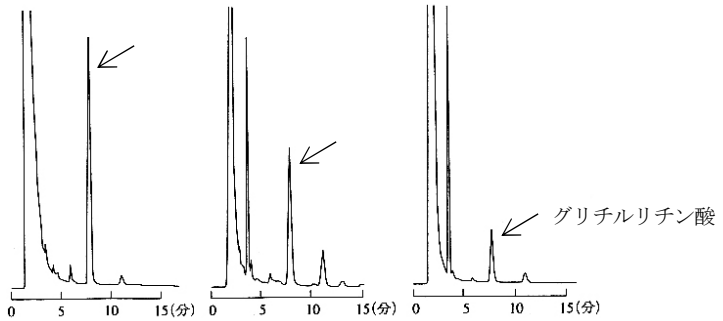
４）検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜、調整してもよい。

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。

（a） しょう油抽出物　（b） 福神漬抽出物　（c） グリチルリチン酸




〈測定条件〉

カラム：ＯＤＳカラム（内径 4.6㎜、長さ 150㎜）

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。(2018 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

（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。

カラム充塡剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 2.0㎜、長さ 150㎜

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：10μL

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、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）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。

[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

# ケイ酸マグネシウム

Magnesium Silicate

## １．分析法の概要

油脂中のケイ酸マグネシウムは、原子吸光法によりマグネシウムとして定量し、分子量比を乗じてケイ酸マグネシウムの量として求める。油脂中には天然のマグネシウムが分布している。したがって、定量値は油脂由来のマグネシウムと添加されたものとの合計値である。(2010 設定、2019 年改正)

## ２．分析法（原子吸光法）

### （１）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

### （２）試験溶液の調製[1)]

試料約５ｇを精密に量り、灰化容器[2)]に入れる。これを熱板上で加熱し[3)]、着火して[4)]炭化させる。灰化容器にふた[5)]をし、電気炉に入れて室温から 30 分間に約 500℃の速度で昇温させ、500℃に達したら５時間保持して灰化させる[6)]。電気炉の電源を切り、扉を少し開けて温度を下げる。電気炉の炉内温度が約 200℃以下に下がったら、灰化容器を取り出す。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[6)]。放冷後、20％塩酸５mL を加えて残留物を溶解させ、熱板上で加熱して、蒸発乾固させる。20％塩酸３mL を加えて 60℃の水浴中で加温しながら残留物を溶かし、100mL のメスフラスコに移す[7)]。灰化容器内を 20％塩酸１mL で洗浄し、洗液はメスフラスコに合わせる[7)]。容器に 20％塩酸１mL を加えて同様の操作を繰り返す[8)]。水を用いて正確に 100mL とし、試験溶液とする。

### （３）検量線用標準溶液の調製[1,9)]

マグネシウム標準原液１mL を正確に量り、1％塩酸を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする（濃度 10μg／mL)。標準溶液を適宜 1％塩酸で希釈し、0.05～0.5μg／mL の検量線用標準溶液とする。

### （４）空試験溶液の調製

水５mL 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）測定溶液の調製

検量線用標準溶液、試験溶液及び空試験溶液それぞれに、ストロンチウム濃度が 0.5ｗ／ｖ％となるようにストロンチウム溶液を一定量混合したものを測定溶液とする[10)]。

（６）測定法

①　測定条件[11)]

原子吸光光度計を用い、次の条件によって測定する。

光源ランプ：マグネシウム中空陰極ランプ

分析線波長：285.2nm

可燃性ガス（流量）：アセチレン（2.0～2.5Ｌ／分）

支燃性ガス（流量）：空気（14L／分）

②　検量線[12)]

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[13､14)]

試験溶液及び空試験溶液の測定溶液につき吸光度を測定する。得られた両者の吸光度の差を求め、その値と検量線から試験溶液中のマグネシウム濃度（μg／mL）を求め、次式によって検体中のマグネシウム含量（ｇ／kg）を計算する。

$$\text{マグネシウム含量（g／kg）} = \frac{C \times 100}{W \times 1000}$$

Ｃ：試験溶液中のマグネシウム濃度（μg／mL）

Ｗ：試料の採取量（ｇ）

ケイ酸マグネシウム含量（ｇ／kg）＝マグネシウム含量（ｇ／kg）×８[15)]

④　定量限界　マグネシウムとして 0.001ｇ／kg

試薬・試液

１．マグネシウム標準原液[16)]：市販の原子吸光分析に適した標準液（Mg:1000mg／Ｌ）を用いる。

２．20%塩酸：　市販の精密分析用を用いる。

３．１%塩酸：20%塩酸を水で 20 倍に希釈する。

４．ストロンチウム溶液[17)]：干渉抑制剤の塩化ストロンチウム溶液（市販の原子吸光分析用、ストロンチウムとして 10±0.1ｗ／ｖ%のもの）を用いる。

［注］

１）試験に用いる器具類は、使用前に１%塩酸で十分洗うか、又は１%塩酸に一夜つけておき、水で洗浄後、乾燥させたものを用いる。特にガラス器具は、高濃度のコンタミネーションがあるため注意する。

２）ふた付きの磁製るつぼが適当である。

３）熱板や電熱器等 500℃程度まで加熱できるものを用いる。ただし、試料温度が 500℃を超えないよう注意する。

４）油脂が引火点付近まで十分加熱され、蒸発が激しくなった時点で着火する。着火操作は、マグネシウムの蒸発を抑えるため、電子ライター等、極力低温の炎を用いて、短時間で行う。

５）灰化時の試料の飛散を防ぐ。るつぼ用のふたの代わりに時計皿等を用いてもよい。

６）試料に応じ、灰化を十分にするために昇温速度、灰化時間は変更してもよい。ただし、マグネシウムの蒸発を防ぐため、500℃以下で灰化を行う。

７）不溶物が残っている場合は、原子吸光分析装置のネブライザーが詰まるため、あらかじめ、１％塩酸を用いて数回洗浄し、マグネシウムの溶出が無いことを確認したＪＩＳ５又は６種のろ紙を用い、メスフラスコにろ過する。あるいは、試験溶液の上清を測定溶液の調製に用いてもよい。

８）試験溶液の塩酸濃度は１％となる。

９）３濃度以上の検量線用標準溶液を調製する。また、検量線の範囲は、直線性が得られることを確認したうえで、必要に応じて変更してもよい。

10）マグネシウムは、試験溶液中にリン酸、硫酸あるいはケイ酸の化学干渉を受けるといわれているため、干渉抑制剤としてストロンチウムを加える。

11）マグネシウム濃度が高すぎる場合は、原子吸光分析装置のバーナーヘッドを回転させ、感度を落とし、測定する。又は、試験溶液を１％塩酸で希釈した液を試験溶液とし、測定液溶を調製する。

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）空試験溶液からは０～0.02μg／mL 程度（試料０～0.4μg／ｇ程度相当）が検出される。

14）サラダ油にマグネシウム標準溶液を 0.001ｇ／kg 相当量添加した場合の回収率は 91.0%（試行数５回）、また、0.010ｇ／kg 相当量添加した場合の回収率は 99.5%（試行数 11 回）であった。なお試験を実施する際にあっては当該製品のろ過前のマグネシウム濃度を確認のうえ、実施することが望ましい。

15）ケイ酸マグネシウムは、酸化マグネシウム（MgO：40.30）と二酸化ケイ素（$SiO_2$：60.08）のモル比が約２：５の合成化合物であると定義されている。マグネシウムの原子量は 24.30 であるため、分子量比＝(40.30×２＋60.08×５)／(24.30×２)≒８を乗じる。

16）塩化マグネシウム六水和物 8.363ｇを量り、１％塩酸 100mL を加えて溶かし、水を加えて正確に 1000mL としたもの（Mg：1000μg／mL）を用いてもよい。

17）塩化ストロンチウム六水和物（原子吸光分析用）15.215g に１％塩酸を加えて 100mL としたものを用いてもよい（ストロンチウムとして５ｗ／ｖ％）。

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)

## 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)]を細切又は粉砕した後、約2.5ｇを精密に量り、塩酸（１→100）20mL、酢酸エチル15mL及び塩化ナトリウム2gを加えて激しく振とう後[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５mLを正確にとり、ねじ口付き試験管に入れ、60℃水浴中で加温しながら窒素気流下で濃縮し、残留物を得る[5)]。

②　誘導体化

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

### （３）検量線用標準溶液の調製[9)]

乳酸リチウムを105℃で４時間乾燥し、0.106ｇを量り、水を加えて溶かし正確に100mLとする。この液25mLを正確にとり、水を加えて正確に100mLとし、標準原液とする（濃度　乳酸として250μg／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 12.5～250μg／mL）。標準溶液１mL 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 0.5～10μg／mL）。

（４）測定法

①　測定条件[10)]

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[11)]：オクチルシリル化シリカゲル（粒径５μm）

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℃

流速：1.0mL／分

測定波長：400nm

注入量：20μL

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（μg／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（μg／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 0.2ｇ／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］

７．１ｗ／ｖ％水酸化カリウム・エタノール試液：水酸化カリウム 1.0g を５mL の水に溶かし、エタノールを加えて 100mL とする。密栓保存する。

８．逆相固相抽出カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム（500mg／６mL）。使用前にメタノール 10mL 及び塩酸（１→100）10mL で順次コンディショニングをする。

９．２－ニトロフェニルヒドラジン：市販品を用いる。

10．0.02mol／Ｌ　２－ニトロフェニルヒドラジン試液：２－ニトロフェニルヒドラジン 0.206ｇを 15mL の水に溶かし、エタノールを加えて 50mL とする。この液と塩酸（１→100）を３：１で混合する。冷暗所で保存し、一か月以内に使用する。

11．１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩：市販品を用いる。

12．ピリジン：［特級］

13．0.25mol／Ｌ　１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド試液：１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩 2.39ｇを３ｗ／ｖ％ピリジン含有エタノールに溶かして 50mL とする。冷暗所に保存し、一ヵ月以内に使用する。

14．５ｗ／ｖ％水酸化カリウム試液：水酸化カリウム 5.0ｇを 50mL の水に溶かし、エタノールを加えて 100mL とする。

15．メタノール：［高速液体クロマトグラフィー用］

16．0.1vol％ギ酸：ギ酸 11mL をとり、水で 1000mL とする。これを 10 倍希釈して使用する。

［注］

１）ステアロイル乳酸類のカルシウム又はナトリウム塩を主成分とし、これとその関連酸類及びそれらのカルシウム又は同ナトリウム塩との混合物である[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砕し、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。

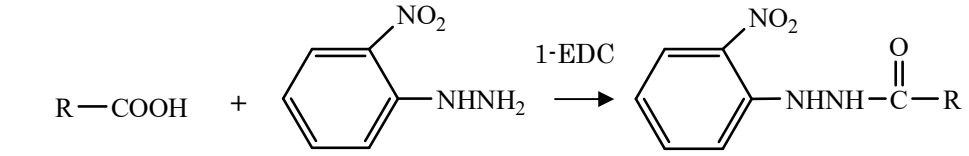
３）団子及び生うどん等の細切した試料は一度ホモジナイズした後に振とうする。

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乳酸脂肪酸エステルのような乳酸エステルが入っている場合はそれ由来の乳酸を量りこむため、参考２で述べる液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）によるステアロイル乳酸の確認試験を行うのが望ましい。

７)けん化反応で生じた乳酸を誘導体化する操作である。誘導体化の反応機構を以下に示す。本反応は乳酸に限らず、さまざまな酸を誘導体化するため[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。




carboxlic acid　　2-nitrophenylhydrazine (2-NPH)　　2-nitrophenylhydrazide

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

８）反応を停止するための操作である。

９）直線性が確認できれば、適宜、検量線用標準溶液の数を調整してもよい。

10）測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。

11）乳酸誘導体と酢酸誘導体の保持時間は非常に近いため、他の市販の充填カラムを使用する際には両者が十分に分離できることを確認する。

12）標準溶液の調製に用いた水 1mL をねじ口試験管に正確にとり、（２）試験溶液の調製②誘導体化の操作を行ったものを液体クロマトグラフに注入し、乳酸誘導体の保持時間にピークが現れないことを確認する。

13）ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウムの使用基準は、いずれも「ステアロイル乳酸カルシウムとして」定められているため、含量は、ステアロイル乳酸カルシウムとして求める。

式の説明：

検体中のステアロイル乳酸カルシウム由来の乳酸量（ｇ／kg）

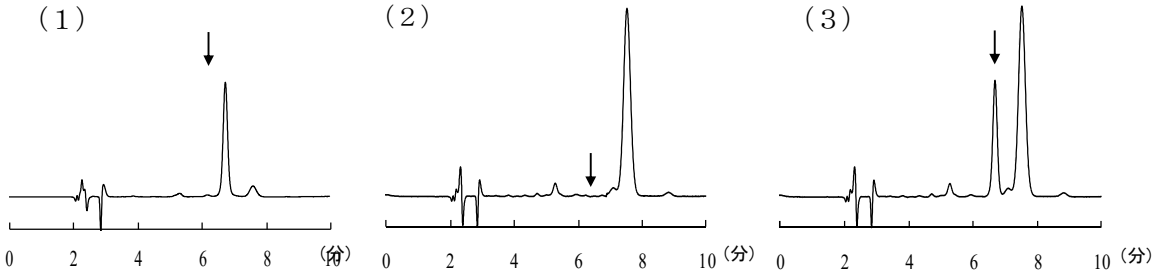
$$= \frac{\text{C（試験溶液中の乳酸濃度(μg／mL)）×250（希釈倍率）}}{\text{W（試料の採取量(ｇ)）×1000*}} = \frac{\text{C}}{\text{W×４}}$$

*μg／ｇから ｇ／kg に変更するために、1000 で除す。

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

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

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４μg／mL）
（２）クッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム無添加）
（３）クッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム添加）

カラム：Ｃ８カラム（内径 4.6mm、長さ 150mm、粒径５μm）
移動相：0.1vol％ギ酸／メタノール混液（75：25）
カラム温度：40℃
流速：1.0mL／分
測定波長：400nm
注入量：20μL

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。（2018年設定）

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５μm）

カラム管：内径2.0mm、長さ150mm

カラム温度：40℃

移動相：0.1／vol％ギ酸／メタノール混液（75：25）

流速：0.2mL／分

イオン化モード：ＥＳＩ（－）

検出法：選択イオン検出（ＳＩＭ）

主なイオン：*m*／*z* 224[5)]

注入量：0.5μL

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]。

カラム充塡剤[3]：オクチルシリル化シリカゲル（粒径５μm）

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／0.1／vol％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：１μL

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。

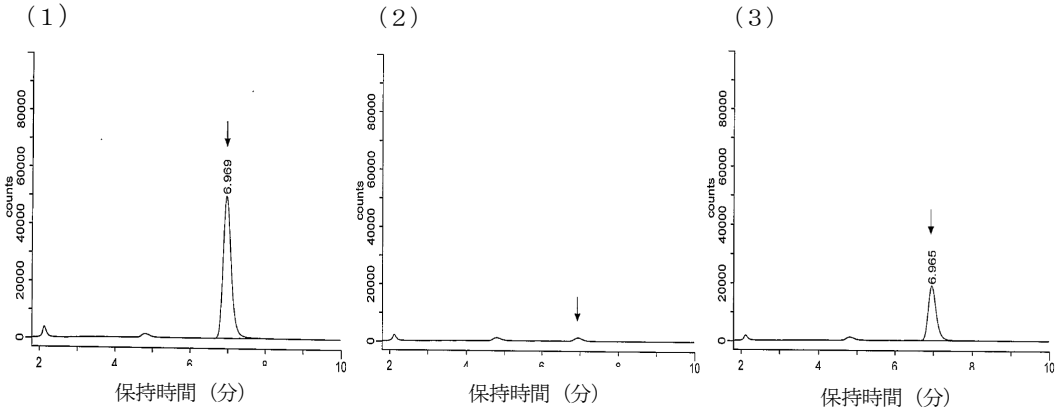
３）分析の際は、被験物質のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。

４）オクタデシルシリル化シリカゲルを充塡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。



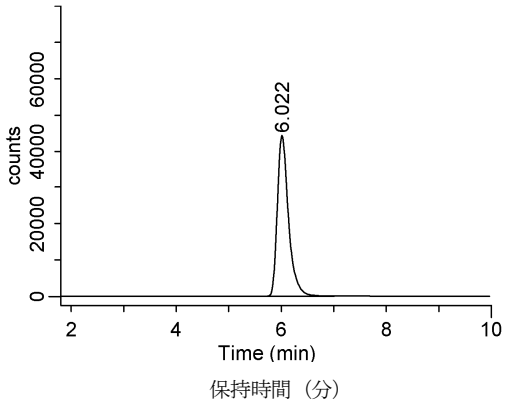

（１）検量線用標準溶液（乳酸として 10μg／mL）
（２）クッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム無添加）
（３）クッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム添加）

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

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

８）ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウムを構成する乳酸の重合度は主に１～２である。その中でも比較的含量が高いと思われるステアロイル一乳酸[M-H]⁻イオンをモニターする。

９）ステアロイル一乳酸標準溶液のＬＣ－ＭＳクロマトグラムを注図２に示す。




カラム：Ｃ８カラム（内径 2.0㎜、長さ 150㎜、粒径５μm）
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（ステアロイル一乳酸）
注入量：１μL

注図２　ステアロイル一乳酸標準溶液の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。(2010年設定、2019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10ｇを100mLの遠心管[1)]に精密に量り、水10mL[2)]及びヘキサン５mL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５mL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２～５ｇ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２～５ｇ[13)]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 0.10ｇ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 0.100ｇ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２cm の位置を原線とし、両側から少なくとも１cm 離し、原線上に、スポットの直径が３mm 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１cm 以上の間隔で塗布して風乾する。展開溶媒を展開槽に約１cm 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５μL及び100μL(それぞれポリソルベート80として10及び200μg相当)

定性用ポリソルベート65標準溶液100μL（ポリソルベート65として200μg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10cm

② 比色法（定量）

（ａ）測定条件

分光光度計を用い、波長620nmにおける吸光度を液層１cmで測定する。

（ｂ）測定液の調製

試験溶液[24]５mLを正確に量り、チオシアン酸コバルト試液５mL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５mL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５mL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620nm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。

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

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0.02ｇ／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１Ｌ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 10ｇを少しずつ入れて[32]充塡し、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㎜ 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 を充塡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 1.7ｇ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 50ｇ、硝酸コバルト六水和物 15ｇ及び塩化ナトリウム 25ｇ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、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があるため、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しまってもよい。

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薬さじ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）薬さじ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。

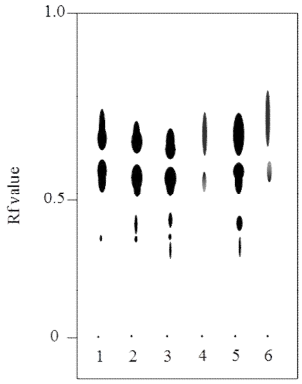
18）溶出液の容量を減らすためにバックフラッシュ法を用いるが、カートリッジに負荷する際、沈殿物がある場合は、バックフラッシュ法で溶出すると沈殿物が落ちるため、逆さにせず、ジクロロメタン／メタノール混液（２：１）30mL で溶出してもよい。

19）濃度が高い場合には、適宜希釈する。

20）薄層クロマトグラフィーでは、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)]。




１：ポリソルベート 20
２：ポリソルベート 40
３：ポリソルベート 60
４：ポリソルベート 65
５：ポリソルベート 80
６：ポリソルベート 85

＜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）TLC 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。

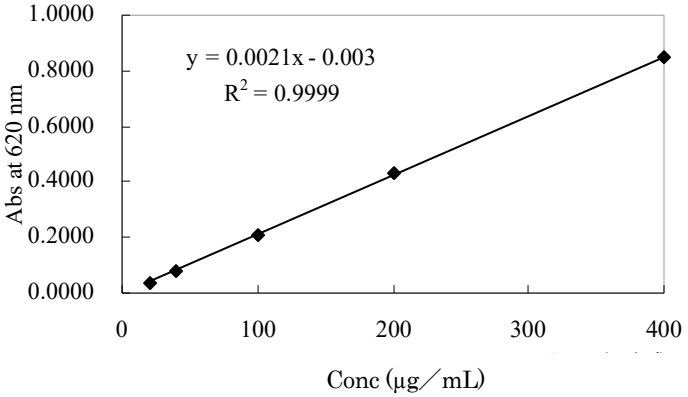
26）遠心の代わりに、10 分間以上静置してもよい。

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 0.1ｇ／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）河﨑裕美ら：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)]。（2010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

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（２～４mL）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１mg／mL）。標準原液５mL 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５μm、孔径 300Å）

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

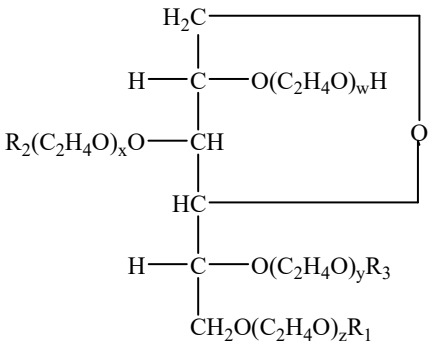
３．ポリソルベート 60：ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート、Tween 60

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＝約 20
ポリソルベート 20　$R_1$＝$CH_3(CH_2)_{10}CO$－、$R_2$＝$R_3$＝H
ポリソルベート 60　$R_1$＝$CH_3(CH_2)_{16}CO$－又は$CH_3(CH_2)_{14}CO$－、$R_2$＝$R_3$＝H
ポリソルベート 65　$R_1$＝$R_2$＝$R_3$＝$CH_3(CH_2)_{16}CO$－又は$CH_3(CH_2)_{14}CO$－
ポリソルベート 80　$R_1$＝$CH_3(CH_2)_7CH$＝$CH(CH_2)_7CO$－、$R_2$＝$R_3$＝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

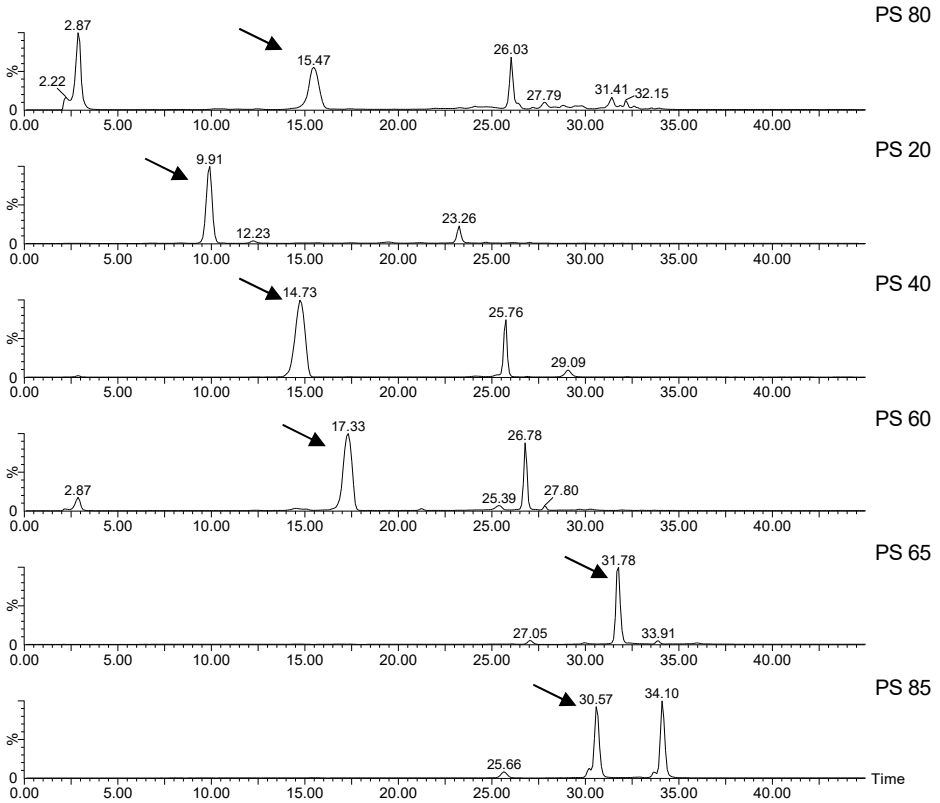
キャピラリー電圧:1.00kV
コーン電圧：100Ｖ
エクストラクター：4.00Ｖ
ソース温度：120°C
脱溶媒温度：400°C
コーンガス流量：47Ｌ／時
脱溶媒ガス流量：1000Ｌ／時

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［$C_{62}H_{122}O_{26}$＋Na］$^+$及び 1860.31［$C_{100}H_{188}O_{28}$＋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［$C_{64}H_{126}O_{26}$＋Na］$^+$とポリソルベート 40 の 1305.81［$C_{62}H_{122}O_{26}$＋Na］$^+$が

同程度観察される。

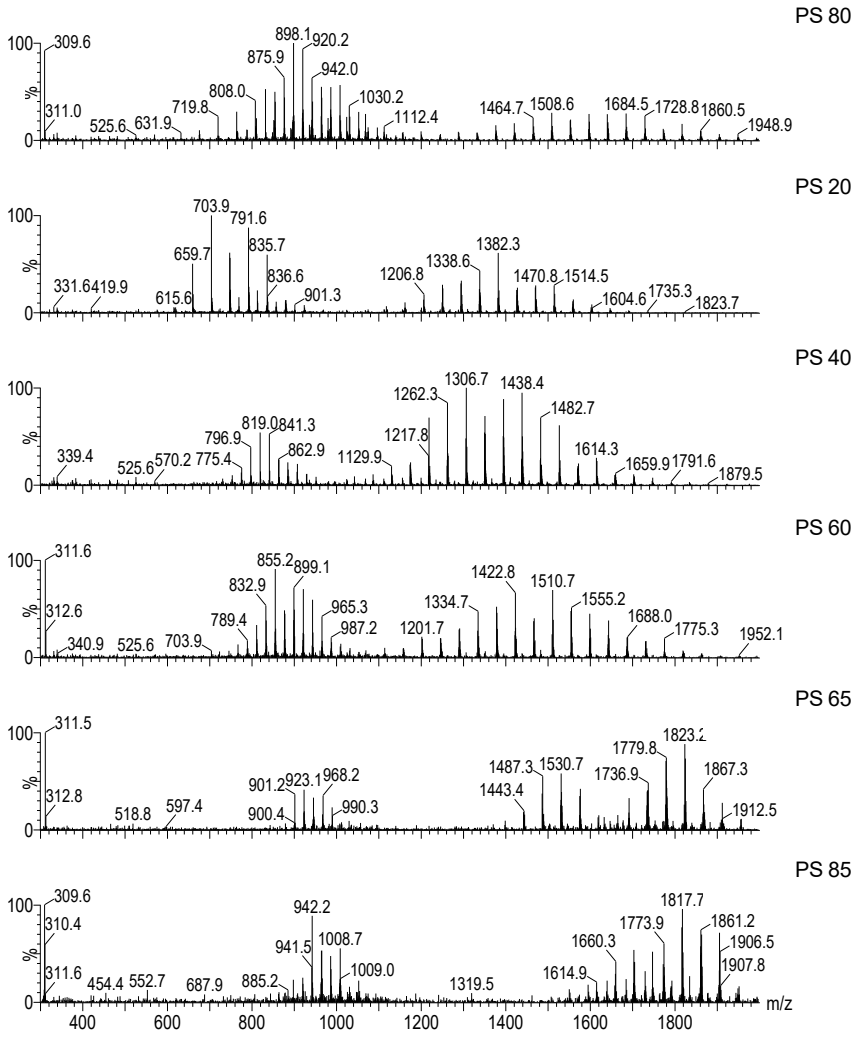
4）各ポリソルベートのＳＩＭクロマトグラムの一例を注図２に、ＳＩＭで確認されたピークのリテンションタイムでのＭＳスペクトルの一例を注図３に示す。

各ポリソルベート濃度：500μg／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　ＳＩＭ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

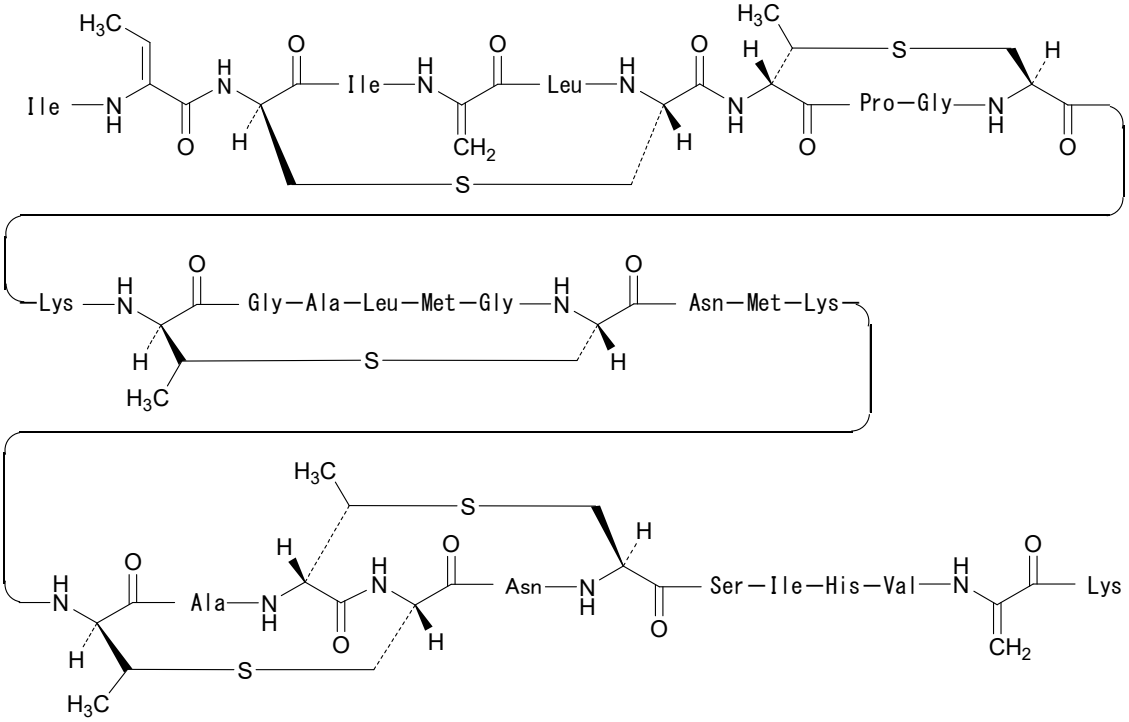
［文献］

１）建部千絵ら：日食化誌 、15、129（2008）

未指定添加物

# ナイシンＺ

Nisin Z




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

１．分析法の概要

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)

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

（２）試験溶液の調製

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。

（３）標準溶液の調製

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１mL 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)]

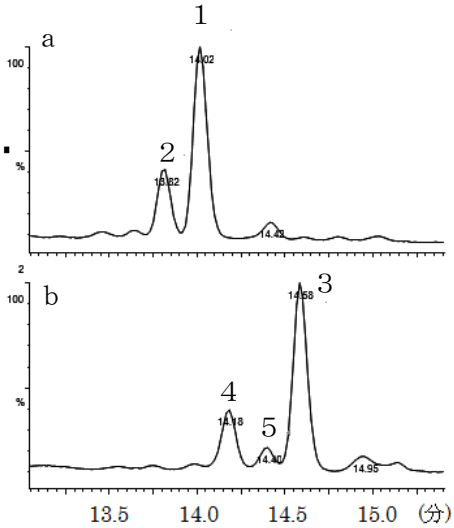
試験溶液及びナイシン標準溶液をそれぞれＬＣ－ＭＳに注入し、ナイシン標準溶液のナイシンＡの保持時間より後に観測されるナイシンＺの多価イオン（*m*／*z* 1111、834、667）により判定する。

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１ｂ）。




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）

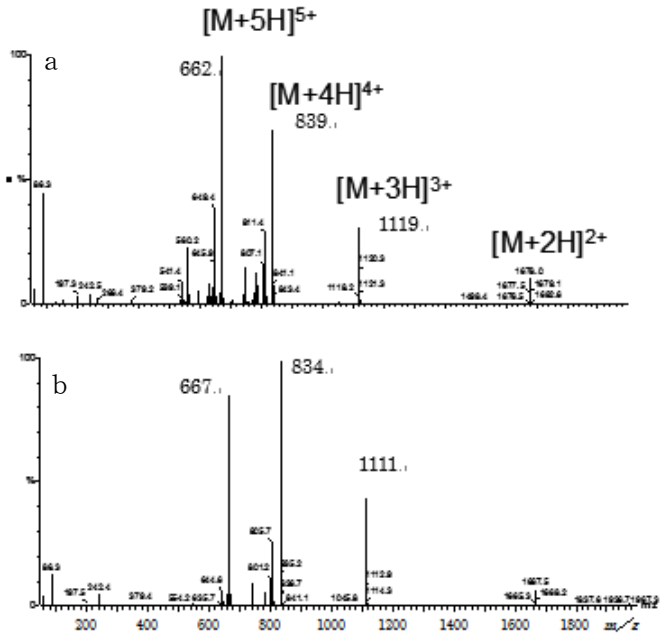
３．ナイシンＺ

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、ＳＩＭ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ＳＩＭ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、ＥＳＩ（＋）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
ＥＳＩ（＋）スキャン測定（40Ｖ）