



食安基発0528第3号
平成22年5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

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長



「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が、「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通知いたします。

なお、貴職におかれても、御活用の上、貴管下関係者に対する周知方よろしくお願いいたします。

記

1. ステアロイル乳酸ナトリウムが、本日、添加物として指定されたことに伴い、食品添加物分析法各条に別添1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の分析法を加え、参照分析法からステアロイル乳酸カルシウムの分析法を削除したこと。
2. 安息香酸及び安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及びソルビン酸カリウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸エステル類並びにプロピオン酸及びその塩類について、別添2のとおり分析法を改正したこと。

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. 試験法の概要

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、得られた乳酸含有量を基にステアロイル乳酸カルシウムとして定量する。

2. 試験法 (高速液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

a 抽出

試料²⁾を細切又は粉碎した後、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 2 g を加えて激しく振とう後³⁾、3000rpm で 5 分間遠心分離して酢酸エチル層を採る⁴⁾。この操作を 3 回繰り返す、得られる酢酸エチル層を 50mL に定容する。その液 5mL をねじ口付き試験管に採り、60℃水浴中で加温しながら窒素気流下で濃縮する⁵⁾。

b 誘導体化

エタノール製 1 %水酸化カリウム試液 1mL を加え、密栓して 95℃の水浴中で 60 分間加熱する⁶⁾。水 0.5 mL 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、直ちに塩酸(1→100) 2mL を加え、逆相分配ミニカラム⁷⁾に全量を注入する。さらに塩酸(1→100)を注入し、溶出液を 5 mL に定容する。その液 1mL を正確に採り、0.02 mol/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⁸⁾。5%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⁹⁾。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(孔径 0.45μm, 水系)を通して試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

乳酸リチウムを 105℃で 4 時間乾燥し、その 0.106g を精密に量る。水を加えて正確に 100mL とし、標準原液とする（この液 1mL は L-及び D-乳酸の混合物 1mg を含む）。標準原液 25mL を正確に量り、水を加えて正確に 100mL とする。この液 5, 10, 20, 50mL を正確に量り、水を加えて正確に 100mL とし、希釈に用いた液と共に検量線用標準原液とする（この液 1mL は乳酸 12.5, 25, 50, 125, 及び 250µg を含む）。それぞれ 1mL をねじ口付き試験管に正確に量り、（2）試料液の調製 b 誘導体化の操作を行い、検量線用標準液とする（これらの液 1mL は乳酸として 0.5, 1, 2, 5, 10µg を含む）。

（4）測定法

①測定条件

紫外外部吸収検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤¹⁰⁾：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：メタノール・0.1(v/v)%ギ酸混液（25:75）

カラム温度：40℃

流速：1.0mL/分

測定波長：400nm

注入量：20µL

②検量線

検量線用標準液の調製に用いた水及び検量線用標準液それぞれ 20µL ずつを正確に量り液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③定量

試料液 20µL を正確に量り、高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線から試料液中の乳酸濃度(µg/mL)を求め、次式¹¹⁾によって試料中のステアロイル乳酸カルシウムとしての含量 (g/kg) を計算する^{12)~14)}。

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

C : 試料液中の乳酸濃度 (µg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

1. エタノール製 1%水酸化カリウム試液：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。
2. 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。
3. 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、一か月以内に使用する。
4. 酢酸エチル：[特級]
5. 5%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。
6. 2-ニトロフェニルヒドラジン：市販品を用いる。
7. 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 0.206 g 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。
8. 乳酸リチウム：純度 98%以上のものを用いる。
9. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]

[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。
- 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、乾麺等の乾燥固体試料は粉碎し、生めん、団子等の粘性がある試料は細切する。ミックスパウダー等の粉体試料はそのまま用いる。
- 3) 団子及び生うどん等の細切した試料は一度ホモジナイズした後に振とうする。
- 4) 酸性条件下でステアロイル乳酸カルシウム又は同ナトリウムをステアロイル乳酸として酢酸エチル層に採る操作である。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、HPLC 上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。
- 7) ジーエルサイエンス社製 InertSep-C18 (500mg/6mL) が使用できる。ミニラムは、使用前にメタノール 10mL 及び塩酸(1→100) 10mL でコンディショニングをする。

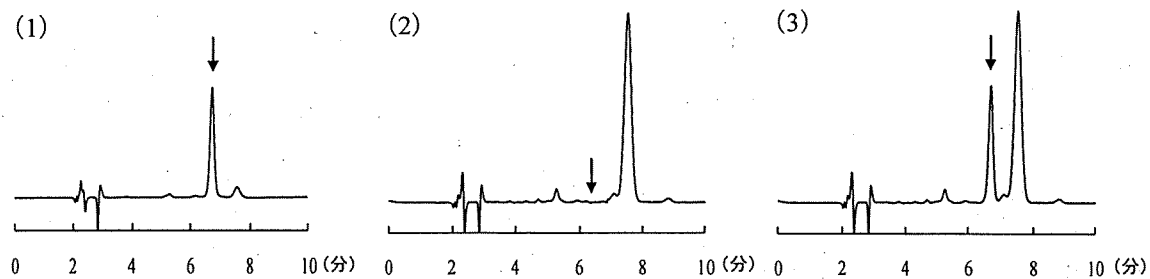
- $$\text{R}-\text{COOH} + \text{2-nitrophenylhydrazin (2-NPH)} \xrightarrow{\text{1-EDC}} \text{2-nitrophenylhydrazide}$$

- 9) 反応を停止するための操作である。
- 10) 市販の充てんカラムとしてジールサイエンス社製 Inertsil C8-4、ワイエムシー社製 YMC-Pack ProC8 等が使用できる。乳酸誘導体と酢酸誘導体の保持時間は非常に近いので、他の市販充てん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。
- 11) 式の説明：

* $\mu\text{g/g}$ から g/kg に変更するために, 1,000 で除す.

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。

- 12) 本法で処理した検量線用標準液及びクッキー（ステアロイル乳酸ナトリウム無添加及び添加）から得られた試料液のクロマトグラムを注図 1 に示す。
- 13) 本法の乳酸の定量限界（信頼性をもって定量することのできる被分析物質の最小濃度）は、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ とする（ステアロイル乳酸カルシウム 0.2g/kg に相当する）。なお、データを表示する際には、有効数字を考慮すること。
- 14) 本法による食品へのステアロイル乳酸ナトリウムの回収率を注表 1 に示す。



注図1 検量線用標準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料液のクロマトグラム

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

カラム：Inertsil C8-4（内径 $4.6\text{mm}\times 150\text{mm}$ ），移動相：メタノール・ $0.1\text{vol}\%$ 酢酸混液（25:75），カラム温度： 40°C ，流速： 1.0mL/分 ，測定波長： 400nm

注表1 各食品へのステアロイル乳酸ナトリウム

添加回収試験

試料	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

ステアロイル乳酸ナトリウム添加量： 2mg/g

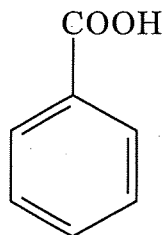
*試料は乳化剤フリーの手製品を用いた。

$n=10$

1 安息香酸及び安息香酸ナトリウム

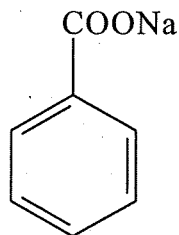
Benzoic Acid and Sodium Benzoate

安息香酸



$C_7H_6O_2$: 122.12

安息香酸ナトリウム



$C_7H_5NaO_2$: 144.10

1. 試験法の概要

食品中の安息香酸及び安息香酸ナトリウムは、水蒸気蒸留法により抽出精製した後、液体クロマトグラフィーにより安息香酸として定量する¹⁾。必要があれば、分子量比を乗じて安息香酸ナトリウムの量として求める。食品中には、天然の安息香酸が分布している場合もある。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²⁾。

安息香酸を特定する必要がある場合には、別紙に参考として示す試験法を用いることができる。

2. 試験法 (液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

試料を細切又はすりつぶした後、その約 5g^{3),4)}を精密に量り、500～1,000mL の丸底フラスコに入れる。これに水 100mL、酒石酸溶液 (15→100) 10mL、塩化ナトリウム 60 g を加え、毎分約 10mL の留出速度で水蒸気蒸留を行う。留液が 480～490mL になったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に 500mL とし、この留液を試料液とする⁵⁾。

(3) 検量線用標準液の調製

安息香酸 0.100g を正確に量り、メタノールを加えて溶かして正確に 100mL とする。この液 1mL を正確に量り、水を加えて正確に 100mL とし、標準液とする（この液 1mL は安息香酸 10 μ g を含む）。標準液 1mL を正確に量り、水を加えて正確に 100mL とし、また、標準液 1, 2, 5mL 及び 10mL をそれぞれ正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 10mL とし、検量線用標準液とする。（これらの液 1mL は、安息香酸 0.1, 1, 2, 5 及び 10 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外吸収検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する⁶⁾。

カラム充填剤⁷⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管⁸⁾：内径 4.6mm，長さ 50～250mm

カラム温度：40℃

移動相⁹⁾：メタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH4.0) (36 : 59 : 5)

流速：1.0mL/分

測定波長：230nm

② 検量線

検量線用標準液の調製に用いた水及び検量線用標準液それぞれ 20 μ L ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量¹⁰⁾

試料液 20 μ L を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線によって試料液中の安息香酸濃度 (μ g/mL) を求め、次式によって試料中の安息香酸含量 (g/kg) を計算する。

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

C：試料液中の安息香酸濃度 (μ g/mL)

W：試料の採取量 (g)

V：試料液の量 (mL)

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

試薬・試液

1. 酒石酸：[特級]

2. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]

3. リン酸：[特級]
4. リン酸一カリウム：[特級]
5. 0.2 mol/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 1,000mL とする。

[注]

- 1) ソルビン酸, デヒドロ酢酸及び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。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いため, 注意が必要である。
- 2) 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 (久保田浩樹ら：日食化誌, 17, 54(2010), <http://www.nihs.go.jp/dfa/food-db/food-index.html>) である。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。
- 3) 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 1-1 に示す。
- 4) 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。
- 5) 留液の濁りは分析カラムの目詰まりの原因となる。分析カラムの保護のため, 留液に濁りが観察されない場合でも, 留液を水系ポリテトラフルオロエチレン製メンブランフィルター (0.45 μ m) などを用いてろ過を行うことが望ましい。この場合, 試料液は最初のろ液 5mL を捨てた後に採取したろ液とする。
- 6) 分析条件は, 一例を示したもので, 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) 市販の充填カラムとして, ジーエルサイエンス株式会社製 Inertsil ODS-3V, 化学物質評価研究機構製 L-column ODS, Waters 社製 Atlantis dC 18, ナカライテスク社製 Cosmosil 5C-18-AR-II, 東ソー株式会社製 TSK GEL-ODS 80TS 等が使用できる。
- 8) 内径 4.6mm 以外のカラム管を使用することができる。その場合は, 次の計算式を参考に流速及び注入量を変更する。内径 3.0mm の分析カラムを使用する場合は, 計算式では流速 0.43mL/min, 注入量 8.5 μ L となるが, 流速 0.4mL/min, 注入量 10 μ L としてもよい。

$$\text{流速 (mL/min)} = 1.0 \times (\text{カラム管の内径(mm)})^2 / 4.6^2$$

$$\text{注入量 (μL)} = 20 \times (\text{カラム管の内径(mm)})^2 / 4.6^2$$

粒子径が 3 μm 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 倍にする。

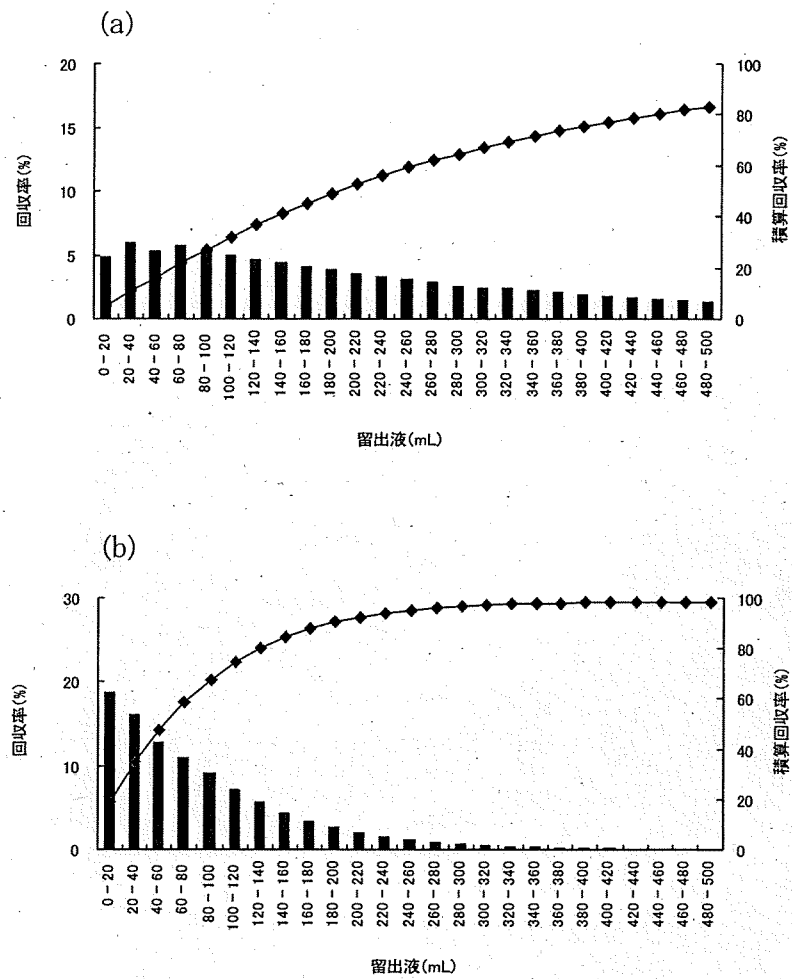
9) その他、下記の移動相及びグラジエント溶離等が使用できる。

- ・アセトニトリル・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH4.0) (28 : 67 : 5)
- ・メタノール・アセトニトリル・5mmol/L クエン酸緩衝液(pH4.0) (1 : 2 : 7)
- ・6.1 mmol/L 臭化セチルメチルアンモニウム含有 26 mmol/L リン酸二水素ナトリウム溶液・メタノール・アセトニトリル (45 : 18 : 42)
- ・メタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH4.0) (2 : 17 : 1) とメタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH4.0) (14 : 5 : 1) によるグラジエント溶離
- ・メタノール・アセトニトリル・5mmol/L クエン酸緩衝液(pH4.0) (1 : 2 : 7) とメタノール・アセトニトリル・5mmol/L クエン酸緩衝液(pH4.0) (5 : 4 : 11) によるグラジエント溶離

(アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用を使用すること。また、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 1,000mL とし、用時水で 10 倍に希釈して調製すること。)

ソルビン酸及びデヒドロ酢酸との分離例を注図 1-2 に、グラジエント溶離によるソルビン酸、デヒドロ酢酸及びパラオキシ安息香酸エステル類との分離例を注図 1-3 及び注図 1-4 に示す。

10) 本法の定量限界 (信頼性をもって定量することのできる被分析物質の最小濃度) は 0.01g/kg とする。なお、データを表示する際には、有効数字を考慮すること。

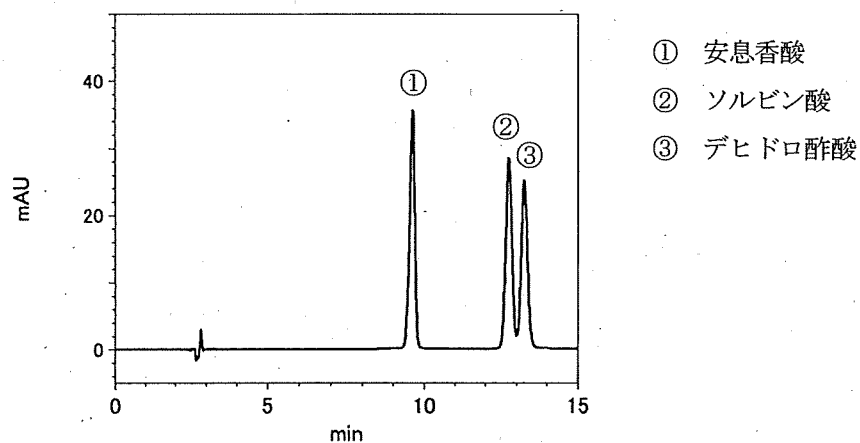


試料：マーガリン（安息香酸 0.5g/kg 添加）

試料採取量：(a) 50 g, (b) 5g

注図 1-1 安息香酸の水蒸気蒸留時の留出パターン

安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸標準液 (各 $5.0 \mu\text{g/ml}$)



〈測定条件〉*

カラム: L-Column ODS (内径 4.6mm, 長さ 250mm, 粒径 $5\mu\text{m}$)

移動相: メタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH4.0) (36 : 59 : 5)

カラム温度: 40°C

流速: 1.0 mL/分

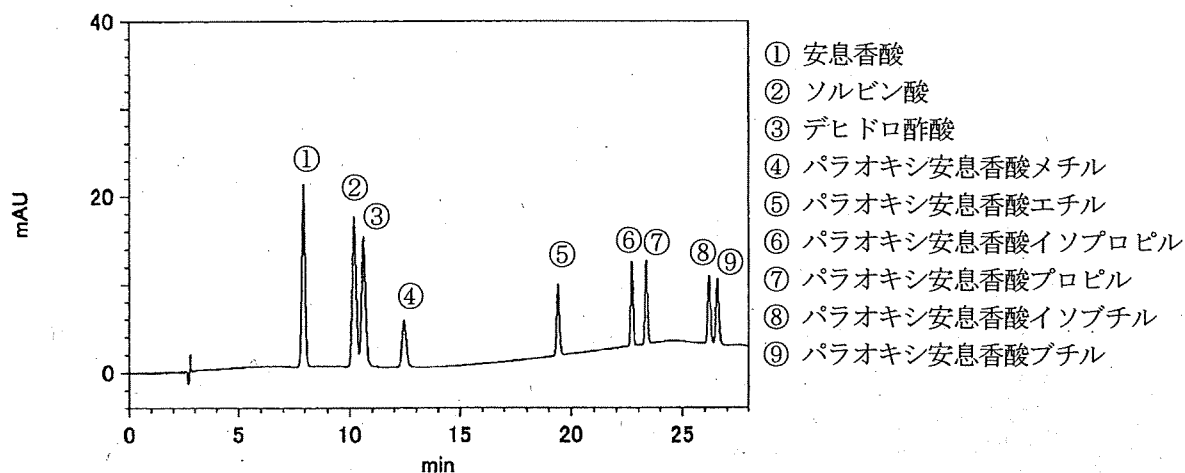
検出器: UV 検出器 (230nm)

注入量: 20 μL

*ソルビン酸が高濃度の場合, デヒドロ酢酸の定性は困難.

注図 1-2 安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸のクロマトグラム

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液 (各 5.0 μ g/ml)



〈測定条件〉

カラム : L-Column ODS (内径 4.6mm, 長さ 250mm, 粒径 5 μ m)

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相 : A 液及び B 液について下表の濃度勾配で送液

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

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

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

流速 : 1.0 mL/分

検出器 : UV 紫外外部吸収検出器検出器

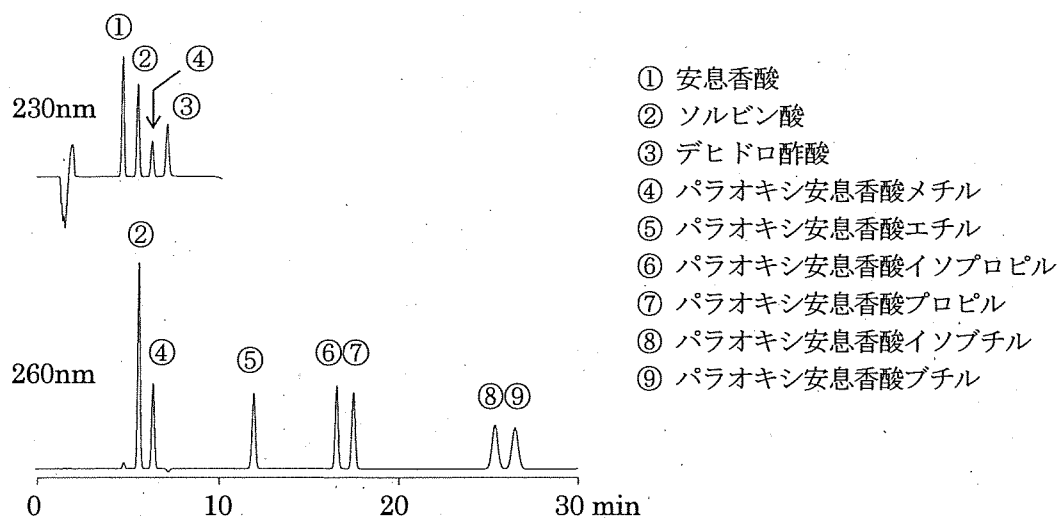
測定波長 : 230nm

注入量 : 20 μ L

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

注図 1-3 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

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液 (各 10 μ g/ml)



〈測定条件〉

カラム: Cosmosil 5C-18-AR-II (内径 4.6mm, 長さ 150mm, 粒径 5 μ m)

カラム温度: 40°C

移動相: A 液及び B 液について下表の濃度勾配で送液

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

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

時間(分)	A 液(%)	B 液(%)
0	100	0
10	100	0
15	0	100
27	0	100
30	100	0

流速: 1.0 mL/分

検出器: フォトダイオードアレイ検出器

測定波長: 230nm, 260nm

注入量: 20 μ L

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

注図 1-4 グラジエント溶離法による安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸, パラオキシ安息香酸エステル類のクロマトグラム例

参考

安息香酸確認試験法

1. 試験法の概要

食品中の安息香酸は、液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC/MS)、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) 又はガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC/MS) により確認を行う¹⁾。

2. 試験法

試験法 A (LC/MS 又は LC/MS/MS による分析)

(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) 試料液の調製

1 安息香酸及び安息香酸ナトリウム又は 4 パラオキシ安息香酸エステル類の試験法の (2) 試料液の調製を準用する²⁾。

(3) 標準液の調製

1 安息香酸及び安息香酸ナトリウム又は 4 パラオキシ安息香酸エステル類の試験法の (3) 検量線用標準液の調製を準用する。

(4) 測定法

① 測定条件

LC/MS あるいは LC/MS/MS を用い、次の条件によって測定する³⁾。

カラム⁴⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.1mm, 長さ 100mm

カラム温度：40℃

移動相：A 液及び B 液について、A:B (7:3) から A:B (1:1) までの直線濃度勾配で送液する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

流速：0.2 ml/分

イオン化モード⁶⁾：ESI (－)

主なイオン(m/z)⁶⁾ :

1) LC/MS の場合 121

2) LC/MS/MS⁷⁾ の場合 プリカーサーイオン 121, プロダクトイオン 77

② 定性⁸⁾

試料液及び標準液 2 μ L ずつを量り, LC/MS 又は 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液と一致することを確認する.

試験法 B (GC/MS による分析)

(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) 試料液の調製

1 安息香酸及び安息香酸ナトリウムの試験法の(2)試料液の調製又は4パラオキシ安息香酸エステル類の試験法の(2)試料液の調製 ② その他の食品(水蒸気蒸留法)を準用し, 得られた留液 50 mL にリン酸を加えて酸性とし, これにジエチルエーテル 50 mL 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. 残渣をアセトンで溶解し試料液とする. あるいは, 「4パラオキシ安息香酸エステル類」の試験法の(2)試料液の調製 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, 残渣をアセトンで溶解し, 試料液とする.

(3) 標準液の調製

1 安息香酸及び安息香酸ナトリウムの試験法の(3)検量線用標準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⁹⁾

カラム¹⁰⁾: 内径 0.25mm, 長さ 15m のフューズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフィー用 5%フェニル 95%メチルポリシロキサンを厚さ 0.25 μ m で被覆したもの.

カラム温度¹¹⁾: 40°C(2分) - (15°C/分) - 230°C(5分)

注入口温度: 250°C

注入方式：スプリットレス

キャリアーガス：ヘリウム

トランスファーライン(インターフェース)温度：230℃

イオン化モード(電圧)：EI (70eV)

注入量：2 μ L

② 定性

試料液を 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液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液と一致することを確認する。

試薬・試液

1. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフ用]
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 1L 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 1L とする。
5. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）「特級」
6. リン酸：「特級」

[注]

- 1) 本法により、ソルビン酸、デヒドロ酢酸及びパラオキシ安息香酸エステル類が同時に確認できる。
- 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」の試験法の(2) 試料液の調製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、陰イオン交換ミニカラムに吸着するため、試料液ではなく、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) 市販の充てんカラムとして、化学物質評価研究機構製 L-column ODS, Waters 社製 ACQUITY UPLC BEH C18 等が使用できる。
- 5) 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。
- 6) 安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸及び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に示す。
- 7) LC/MS/MS の条件例を以下に示す。

LC/MS/MS 条件例

装置：Waters Acquity UPLC , Waters Quattro Premier XE

カラム：Waters 社製 ACQUITY UPLC BEH C18 (内径 2.1mm, 長さ 100 mm,
粒子径 1.7 μ m)

カラム温度：40℃

移動相：A 液及び B 液について下表の濃度勾配で送液する.

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

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

流速：0.3mL/分

イオン化モード：安息香酸 ESI (－), その他 ESI (+)

測定法：MRM

デソルベーション温度：400℃

その他の条件：注表

- 8) 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恐れがあるため、別途、対象試料の試料液に検量線用標準液を添加し、ピークが検出されることを確認する。
- 9) 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各保存料検量線用標準液と一致することを確認する。

SIM 選択イオン：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)

- 10) 市販のカラムとして、J&W キャピラリーカラム DB-5ms 等が使用できる。
- 11) 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。

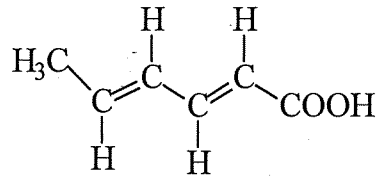
注表 安息香酸，ソルビン酸，デヒドロ酢酸及びパラオキシ安息香酸エステル類のイオン化モード及び主なイオン

	分子量	ESI (+/-)	LC/MS	LC/MS/MS	
			SIM 検出 イオン	プリカーサー イオン	プロダクト イオン
安息香酸	122.12	—	121	121	77
ソルビン酸	112.13	+	113	113	98, 67
デヒドロ酢酸	168.15	+	169	169	85, 127
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

2 ソルビン酸及びその塩類

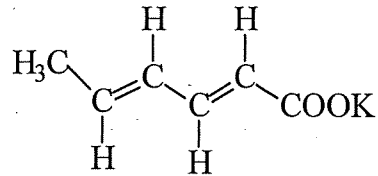
Sorbic Acid and Its Salts

ソルビン酸
Sorbic Acid



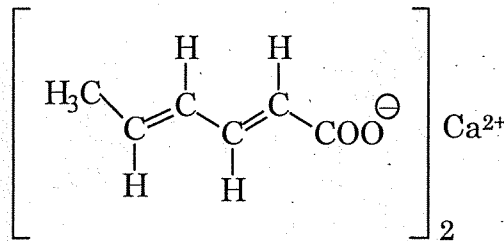
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$: 112.13

ソルビン酸カリウム
Potassium Sorbate



$\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$: 150.22

ソルビン酸カルシウム
Calcium Sorbate



$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{CaO}_4$: 262.32

1. 試験法の概要

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

ソルビン酸及びその塩類を特定する必要がある場合には、1 安息香酸及び安息香酸ナトリウムの試験法の別紙に参考として示す試験法を準用することができる。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試料液の調製

（3）検量線用標準液の調製

(4) 測定法^{1)~3)}

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

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

$$\text{ソルビン酸カルシウム含量 (g/kg)} = \text{ソルビン酸含量 (g/kg)} \times 1.170$$

[注]

- 1) ソルビン酸の吸収極大は 260nm 付近である。安息香酸、デヒドロ酢酸と同じ 230nm で測定可能であるが、妨害ピークが重なる場合には、ソルビン酸の吸収極大の 260nm 付近で測定するとよい。
- 2) 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 2-1 に示す。
- 3) 本法の定量限界（信頼性をもって定量することのできる被分析物質の最小濃度）は 0.01g/kg とする。なお、データを表示する際には、有効数字を考慮すること。

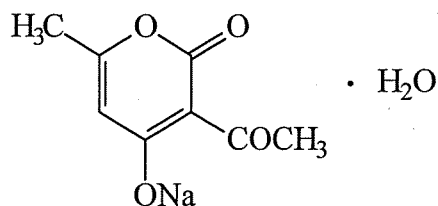
注表 2-1 ソルビン酸カルシウムの各種食品での添加回収率*

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
ラッキョウ	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

3 デヒドロ酢酸ナトリウム

Sodium Dehydroacetate



$\text{C}_8\text{H}_7\text{NaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} : 208.14$

1. 試験法の概要

食品中デヒドロ酢酸ナトリウムは、水蒸気蒸留法により抽出精製した後、液体クロマトグラフィーによりデヒドロ酢酸として定量する。必要があれば、分子量比を乗じてデヒドロ酢酸ナトリウムの量として求める。

デヒドロ酢酸を特定する必要がある場合には、1 安息香酸及び安息香酸ナトリウムの試験法の別紙に参考として示す試験法を準用することができる。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試料液の調製

（3）検量線用標準液の調製

（4）測定法 1)~3)

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

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

[注]

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

- 2) デヒドロ酢酸は、230nm 及び 310nm 付近に吸収極大がある。
- 3) 本法における定量限界（信頼性をもって定量することのできる被分析物質の最小濃度）は 0.01g/kg とする。なお、データを表示する際には、有効数字を考慮すること。

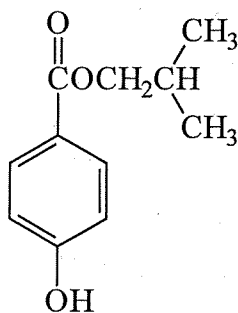
4 パラオキシ安息香酸エステル類

p-Hydroxybenzoic Acid Esters

パラオキシ安息香酸イソブチル

Isobutyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸イソブチル

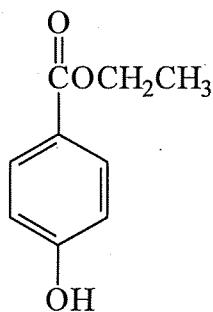


$C_{11}H_{14}O_3$: 194.23

パラオキシ安息香酸エチル

Ethyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸エチル

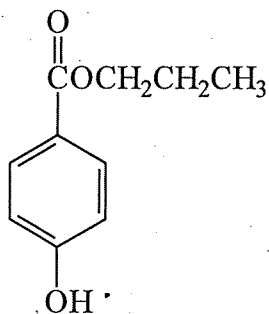


$C_9H_{10}O_3$: 166.17

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

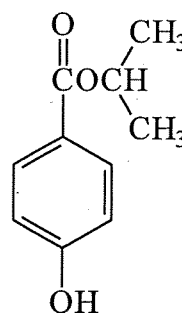


$C_{10}H_{12}O_3$: 180.20

パラオキシ安息香酸イソプロピル

Isopropyl *p*-Hydroxybenzoate

別名：パラヒドロキシ安息香酸イソプロピル

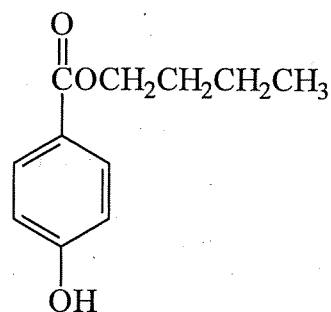


$C_{10}H_{12}O_3$: 180.20

パラオキシ安息香酸ブチル

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

1. 試験法の概要

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、1 安息香酸及び安息香酸ナトリウムの試験法の別紙に参考として示す試験法を準用することができる。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

① 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、95 vol%メタノール 20 mL 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⁾、3,000rpm、10 分間遠心分離し、上清をろ過する。更に残渣に 95 vol%メタノール 15～20 mL を加えて同様の操作を繰り返し⁴⁾、先のろ液と合わせ、95 vol%メタノールでろ紙を洗浄するとともに 50 mL に定容し、抽出液とする。

b 精製

逆相分配ミニカラム⁵⁾に、a で得られた抽出液 5 mL に 0.1 mol/L リン酸 20 mL を加えて混合した液を注入し、流出液は捨てる。次いで容器を水 20 mL で洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで 50 vol%メタノール 10 mL を注入し、流出液は捨てる⁶⁾。次いで、メタノール 10 mL を正確に量って注入する。得られた溶出液を強塩基性陰イオン交換ミニカラム及び弱塩基性陰イオン交換ミニカラムをこの順番に直結したもの⁷⁾に注入し、最初の溶出液 5 mL を捨てた後、溶出液を採取する。この液 2mL を正確に量り、50 vol%メタノールを加えて正確に 10mL とし、試料液とする^{8)～10)}

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 を正確に採り、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^{11),12)}を精密に量り、500～1,000mL の丸底フラスコに入れる。これに水 100mL、酒石酸溶液（15→100）10mL、塩化ナトリウム 60 g を加え、

毎分約 10mL の留出速度で水蒸気蒸留を行う。留液が 480～490mL になったとき蒸留をやめ、水を加えて正確に 500mL とし、この留液を試料液とする^{8),13)}。

(3) 検量線用標準液の調製

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 0.020g を正確に量り、それぞれ 60%メタノールに溶解して正確に 100mL とする。これらの液 5mL ずつを正確に量り、60%メタノールを加えて正確に 100mL とし、混合標準液とする（この液 1mL はパラオキシ安息香酸イソブチル、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 10 μ g を含む）。

混合標準液 1 mL を正確に量り、60%メタノールを加えて正確に 200mL とし、また、混合標準液 1, 2, 5mL 及び 10mL を正確に量り、60%メタノールを加えて正確に 10mL とし、検量線用標準液とする（これらの液 1mL は、それぞれパラオキシ安息香酸エステル類（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）0.05, 1, 2, 5 μ g 及び 10 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する¹⁴⁾。

カラム充填剤¹⁵⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管¹⁶⁾：内径 4.6mm、長さ 50～250mm

カラム温度：40℃

移動相¹⁷⁾：メタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) (12 : 7 : 1)

流速：0.5 ～ 1.0mL/分

測定波長：260nm¹⁸⁾

② 検量線

検量線用標準液の調製に用いた 60%メタノール及びそれぞれの検量線用標準液 20 μ L¹⁹⁾ ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量²⁰⁾

試料液 20 μ L¹⁹⁾ を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 (μ g/mL) を求め、次式によって試料中のパラオキシ安息香酸エステル含量 (g/L 又は g/kg) を計算する。

溶媒抽出法 ²⁾

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

C : 試料液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 (μ g/mL)

W : 試料の採取量 (g)

V : 試料液の量 (mL)

水蒸気蒸留法

しょう油及び酢

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

その他の食品

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

C : 試料液中のパラオキシ安息香酸エステル濃度 (μ g/mL)

W₁ : 試料の採取量 (mL)

W₂ : 試料の採取量 (g)

V : 試料液の量 (mL)

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

しょう油及び酢の場合

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

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

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

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

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

上記以外の食品の場合

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

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

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

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

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

試薬・試液

1. 酒石酸：[特級]
2. シリコーン樹脂：(消泡用) [食添]
3. リン酸：[特級]
4. リン酸二水素カリウム：[特級]
5. 0.2 mol/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 1,000mL とする。
6. メタノール：[高速液体クロマトグラフ用]

[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) 日本ウォーターズ株式会社製 Oasis HLB (500mg) などが使用できる。ミニカラムは、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。
- 6) 50%メタノールを全量溶出し、ミニカラム内部を空気で置換する。
- 7) 強塩基性陰イオン交換ミニカラムとしてバリアン製 Bond Elut SAX (500mg)、弱塩基性陰イオン交換ミニカラムとしてバリアン製 Bond Elut PSA (500mg) などが使用できる。ミニカラムは、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。
- 8) 試料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、試料液に濁りが観察されない場合でも、試料液を水系ポリテトラフルオロエチレン製メンブランフィルター (0.45 μ m) など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、試料液とする。
- 9) 逆相分配ミニカラムからの溶出液について高速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、強塩基性及び弱塩基性陰イオン交換ミニカラムによるクリーンアップを省略できる。
- 10) 装置の感度が不十分な場合は、ミニカラムからの溶出液を試料液としてもよい。
- 11) 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。

- 12) 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。
- 13) 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、50%メタノール溶液とするとよい。
- 14) 分析条件は、一例を示したもので、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) 市販の充填カラムとして、Inertsil ODS-3V, L-column ODS, Atlantis dC 18, TSK GEL-ODS 80TS などが使用できる。
- 16) 内径 4.6mm 以外のカラム管を使用することができる。その場合は、次の計算式を参考に流速及び注入量を変更する。内径 3.0mm の分析カラムを使用する場合は、計算式では流速 0.43mL/min, 注入量 8.5 μ L となるが、流速 0.4mL/min, 注入量 10 μ L としてもよい。

$$\text{流速 (mL/min)} = 1.0 \times (\text{カラム管の内径(mm)})^2 / 4.6^2$$

$$\text{注入量 (}\mu\text{L)} = 20 \times (\text{カラム管の内径(mm)})^2 / 4.6^2$$

粒子径が 3 μ m 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 倍にする。

- 17) 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。
 - ・アセトニトリル・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH4.0) (28 : 67 : 5)
 - ・メタノール・アセトニトリル・5mmol/L クエン酸緩衝液(pH4.0) (1 : 2 : 7)
 - ・6.1 mmol/L 臭化セチルメチルアンモニウム含有 26 mmol/L リン酸二水素ナトリウム溶液・メタノール・アセトニトリル (45 : 18 : 42)
 - ・メタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH4.0) (2 : 17 : 1) とメタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH4.0) (14 : 5 : 1) によるグラジエント溶離
 - ・メタノール・アセトニトリル・5mmol/L クエン酸緩衝液(pH4.0) (1 : 2 : 7) とメタノール・アセトニトリル・5mmol/L クエン酸緩衝液(pH4.0) (5 : 4 : 11) によるグラジエント溶離

(アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用を使用すること。また、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 1,000mL とし、用時水で 10 倍に希釈して調製すること)。
- 18) 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。

19) 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、試料液のメタノール濃度が高いと、保持時間及びピーク形状に影響を与え、標準液との誤差を生じる場合がある。この現象は、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、標準液も同じ組成にし、良好なピーク形状が得られるように、注入量を調整する。アイソクラティック溶離を用いた内径 4.6mm の高速液体クロマトグラフィー用カラムによる分析の場合は、注入量が 20 μ L では、いずれの試料液においても差異はみられないが、グラジエント溶離を用いて安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸を同時に測定する場合は、10 μ L 以上で差異がみられる。

20) 本法の定量限界（信頼性をもって定量することのできる被分析物質の最小濃度）は、0.005g/L 又は 0.005g/kg とする。なお、データを表示する際には、有効数字を考慮すること。

21) 式の説明：

抽出液中のパラオキシ安息香酸エステル類濃度(μ g/mL)

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

=CV

パラオキシ安息香酸エステル類含有量 (g/kg)

$$= \frac{\text{抽出液中のパラオキシ安息香酸エステル類濃度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{抽出液量}(50\text{mL})}{W(\text{試料の採取量}(\text{g}))} \times \frac{1}{1,000^*}$$

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

* μ g/g から g/kg に変更するために、1,000 で除す。

5 プロピオン酸及びその塩類

Propionic Acid and Its Salts

プロピオン酸

Propionic Acid

$\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$

$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2:74.08$

プロピオン酸カルシウム

Calcium Propionate

$(\text{C}_2\text{H}_5\text{COO})_2\text{Ca}^{2+} \cdot n\text{H}_2\text{O}$

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}(n=1 \text{ 又は } 0)$

$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_4:186.22)$

プロピオン酸ナトリウム

Sodium Propionate

$\text{C}_2\text{H}_5\text{COONa}$

$\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_2:96.06$

1. 試験法の概要

食品中のプロピオン酸及びその塩類は、水蒸気蒸留法により抽出した後、陰イオン交換ミニ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の合計値である。

プロピオン酸及びその塩類を特定する必要がある場合には、別紙に参考として示す試験法を用いることができる。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

① 水蒸気蒸留

試料を細切又はすりつぶした後、その約 30 g を精密に量り、500～1,000mL の丸底フラス

コに入れる。これに水 200 mL, 塩化ナトリウム 80 g, 10%リン酸溶液 10 mL¹⁾及びシリコーン樹脂 1 滴を加える。あらかじめ 0.2 mol/L トリスー塩酸緩衝液(pH 8.5)²⁾20 mL 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 ~290 mL になったとき蒸留をやめ, 水を加えて正確に 300 mL とする。

② 精製

強塩基性陰イオン交換ミニカラム³⁾に, ①で得られた留液 20 mL を注入し, 流出液は捨てる。次いで水 10 mL を注入し, 流出液は捨てる。次いで 5w/v%塩化ナトリウム含有 0.01 mol/L 塩酸 5mL を注入し, 溶出液に水を加えて全量を 10 mL とする。これを 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し, 試料液とする⁴⁾。

(3) 検量線用標準液の調製

プロピオン酸ナトリウム⁵⁾0.130g を正確に量り, 水を加えて溶かして正確に 100 mL とし, 標準原液とする(この液 1mL はプロピオン酸 1.00 mg を含む)。この液 10 mL を正確に量り, 水を加えて正確に 100 mL とし, 標準液とする(この液 1 mL はプロピオン酸 0.100 mg を含む)。標準液 2, 5, 10 mL 及び標準原液 2, 5 mL をそれぞれ正確に量り, それぞれに水を加えて正確に 10 mL とし, 検量線用標準液とする(これらの液 1mL はプロピオン酸 20, 50, 100, 200, 500 μ g を含む)⁶⁾。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外外部吸収検出器付液体クロマトグラフを用い, 次の条件によって測定する。

カラム充てん剤⁷⁾: オクタデシルシリル化シリカゲル, 粒径 5 μ m

カラム管: 内径 4.6 mm, 長さ 150~250 mm

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

移動相: 水・アセトニトリル混液(94:6)をリン酸で pH 2.5 に調整したもの。

流速: 0.8~1.2 mL/分

測定波長: 210 nm

② 検量線

検量線用標準液の調製に用いた水及び検量線用標準液それぞれ 10 μ L ずつを正確に量り, 液体クロマトグラフに注入し, ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{8),9)}

試料液 10 μ L を正確に量り, 液体クロマトグラフに注入し, 得られたピーク面積と検量線から試料液中のプロピオン酸濃度 (μ g/mL) を求め, 次式¹⁰⁾によって試料中のプロピオン酸含量 (g/kg) を計算する。

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

C : 試験液中のプロピオン酸濃度 (μg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液等

1. アセトニトリル : [高速液体クロマトグラフ用]
3. 5w/v%塩化ナトリウム含有 0.01 mol/L 塩酸 : 塩化ナトリウム 5g を量り, 0.01 mol/L 塩酸を加えて 100mL とする.
3. シリコーン樹脂 : (消泡用) [食添]
4. 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]
5. 0.2mol/L トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5) : トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 24.2 g を量り, 水 500 mL に溶解し, 2 mol/L 塩酸で pH 8.5 に調整後, 水を加えて 1,000 mL とする.
6. プロピオン酸ナトリウム : [特級]
7. メンブランフィルター : 孔径 0.45 μm, 水系
8. リン酸 : [特級]
9. 10%リン酸溶液 : リン酸 11.8mL を量り, 水を加えて 100g とする.

[注]

- 1) pH は 2~3 となる.
- 2) 強塩基性陰イオン交換ミニ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) 強塩基性陰イオン交換ミニカラムとして, Alltech 社製 MAXI-CLEAN SAX 600 mg が使用できる. ミニカラムはあらかじめメタノール 10 mL 及び水 10 mL でコンディショニングしておく. 他社のミニ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.

強塩基性陰イオン交換ミニカラム(MAXI-CLEAN SAX 600mg)に留液 20mL を注入し, 流出液は捨てる. 次いで水 10 mL を注入し, 流出液は捨てる. 強塩基性陰イオン交換ミニカラムの下に逆相分配ミニカラム (日本ウォーターズ株式会社製

Sep-pak VAC C18(1,000 mg)) を接続する。これに 5%塩化ナトリウム含有 0.01 mol/L 塩酸 5mL を注入し、流出液は捨てる。次いで水・アセトニトリル(90:10)混液を注入し、全量を 10 mL としたものを試料液とする。

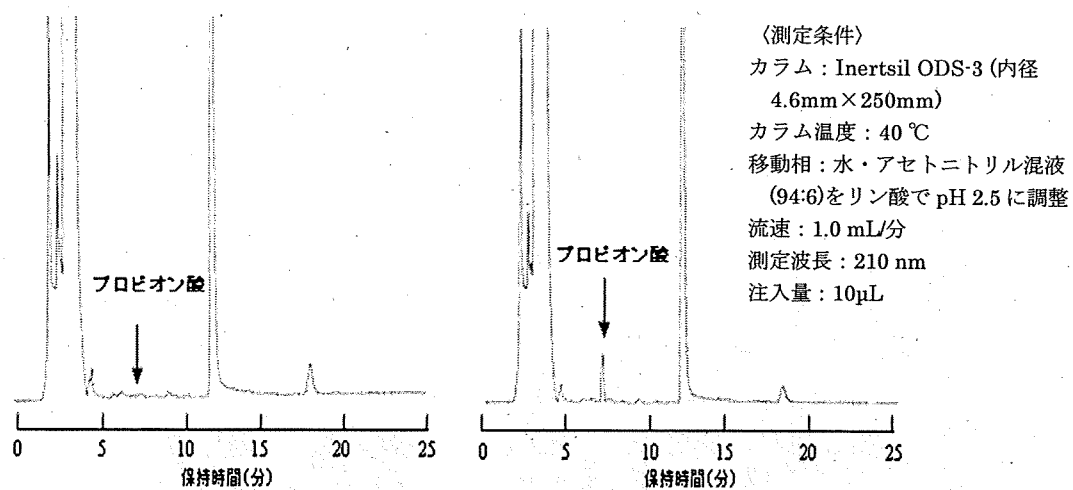
- 5) 純度の低いものがあるため注意を要する。市販品として東京化成株式会社製、シグマ・アルドリッチ製の試薬が使用できる。
- 6) 試料中のプロピオン酸濃度に応じて、高濃度の検量線用標準液は用いなくてもよい。
- 7) 市販のカラムとして、ジーエルサイエンス株式会社製 Inertsil ODS-3, 化学物質評価研究機構製 L-column ODS 等が使用できる。カラムの内径及び長さによって、流速を調整する。
- 8) 本法の定量限界（信頼性をもって定量することのできる被分析物質の最小濃度）は 0.1 g/kg とする。なお、データを表示する際には、有効数字を考慮すること。
- 9) 本法による液体クロマトグラムの一例を注図 5-1 に示す。
- 10) 式の説明：

$$\begin{aligned}
 & \text{留液中のプロピオン酸濃度}(\mu\text{g/mL}) = \frac{C \times \text{試料液量}(10\text{mL})}{\text{精製に用いた留液量}(20\text{mL})} \\
 & \text{プロピオン酸含有量 (g/kg)} \\
 & = \frac{\text{留液中のプロピオン酸濃度}(\mu\text{g/mL}) \times \text{留液量}(300\text{mL})}{W \text{ (試料の採取量(g))}} \times \frac{1}{1,000*}
 \end{aligned}$$

*pg/g から g/kg に変更するために、1,000 で除す。

(1)カステラ

(2)カステラにプロピオン酸(試料中 100 μ g/g)
を添加



注図 5・1 プロピオン酸の液体クロマトグラム

参考

プロピオン酸確認試験法

1. 試験法の概要

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、陽イオン交換ミニカラムでクリーンアップし、ガスクロマトグラフ・質量分析計(GC/MS)により確認を行う¹⁾。

2. 試験法(ガスクロマトグラフ・質量分析法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

プロピオン酸試験法(2) 試料液の調製 ① 水蒸気蒸留を準用する。陽イオン交換ミニカラム²⁾に、留液 10 mL を注入し、最初の溶出液 5 mL を捨てた後、溶出液を試料液とする。

(3) 標準液の調製

プロピオン酸試験法の(3) 検量線用標準液の調製を準用する。

(4) 測定法

① 測定条件³⁾

GC/MS を用い、次の条件によって測定する。

カラム⁴⁾：内径 0.25 mm、長さ 30 m のフューズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフィー用ポリエチレングリコールを厚さ 0.25 μm で被覆したもの。

カラム温度：100℃で2分間保持し、毎分 10℃で昇温し、230℃で3分間保持する。

注入口温度：250℃

注入方式：スプリットレス

キャリアーガス：ヘリウム

トランスファーライン(インターフェース)温度：250℃

注入量：1 μL

イオン化法：EI

主なイオン(m/z): 74, 45, 57

② 定性確認⁵⁾

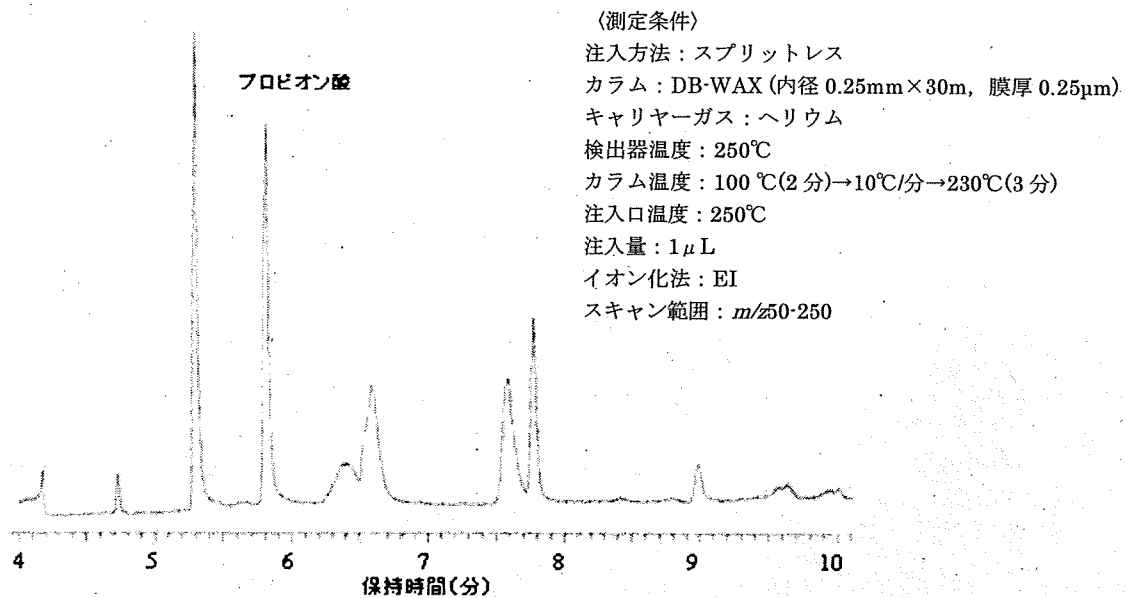
試料液を GC/MS に注入し、クロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が標準液と一致するか、あるいは、マススペクトル上の主要ピークの強度比が検量線用標準液と一致することを確認する。

試薬・試液等

5 プロピオン酸の試薬・試液を準用する。

[注]

- 1) 本法はプロピオン酸の確認試験法であり、定量分析は目的としない。
- 2) 弱酸性陽イオン交換ミニカラムとして、シグマアルドリッチジャパン株式会社 Discovery DSC-WCX, 1,000 mg が使用できる。ミニカラムはあらかじめ水 5 mL 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) 市販のカラムとして、アジレントテクノロジー社製 DB-WAX 等が使用できる。
- 5) 本法によるガスクロマトグラフィー/質量分析によるトータルイオンクロマトグラムの一例を注図に示す。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、マスキロマトグラム上に検出されたピークがプロピオン酸検量線用標準液と一致することを確認する。



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