

厚生食基発 1023 第 1 号
厚生食監発 1023 第 1 号
令和 5 年 10 月 23 日

各

都 道 府 県
保 健 所 設 置 市
特 別 区

 衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長
（ 公 印 省 略 ）
厚生労働省健康・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ひします。

また、令和 5 年 5 月 29 日付け薬生食基発 0529 第 1 号・薬生食監発 0529 第 1 号「食品中の食品添加物分析法」の改正について」の別添 1 「ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピル」の正誤についても別紙のとおりお知らせします。

記

- 1 食品添加物分析法各条に別添 1 の「フェロシアン化カリウム」の分析法を加える。

- 2 食品添加物分析法各条の「銅塩類」の分析法について、別添2のとおり改める。
- 3 食品添加物分析法各条の「スクラロース」の分析法について、別紙のとおり所要の改正を行う。また、改正後の分析法は別添3のとおり。
- 4 本通知は、令和5年10月23日から適用すること。ただし、銅塩類については令和6年10月22日までの間は、なお従前の例によることができる。

令和5年10月23日付け厚生食基発1023第1号・厚生食監発1023第1号「食品中の食品添加物分析法」の改正について」別添3の主要な改正箇所

分類	品名等	項目	新	旧
甘味料	スクラロース	2. 分析法、(4)測定法、 ①測定条件	移動相：メタノール／水混液 (3：7)	移動相：メタノール／水混液 (7：3)
甘味料	スクラロース	参考1、2. 分析法、(4) 測定法、①測定条件	移動相 ⁶⁾ ：A液 <u>アセトニトリル／ 2mmol/L 酢酸アンモニウム混液 (1：99)</u> B液 <u>アセトニトリル／2mmol/L 酢酸アンモニウム混液 (95：5)</u>	移動相 ⁶⁾ ：A液 <u>2mmol/L 酢 酸アンモニウム含有1vol%アセト ニトリル</u> B液 <u>2mmol/L 酢酸アンモニウ ム含有95vol%アセトニトリル</u>
甘味料	スクラロース	参考1、試薬・試液等	4. <u>アセトニトリル／2mmol/L 酢 酸アンモニウム混液 (1：99)：</u>	4. <u>2mmol/L 酢酸アンモニウム 含有1vol%アセトニトリル：</u>
甘味料	スクラロース	参考1、試薬・試液等	5. <u>アセトニトリル／2mmol/L 酢 酸アンモニウム混液 (95：5)：</u>	5. <u>2mmol/L 酢酸アンモニウム 含有95vol%アセトニトリル：</u>

正誤（修正後の「ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピル」の分析法は別添4のとおり）

分類	品名等	項目	正	誤
酸化防止 剤	ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒド ロキシアニソール及び没食子酸プロピル	[注] 22) 注図2	<u>TBHQ</u> (2か所)	<u>TBH</u> (2か所)
酸化防止 剤	ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒド ロキシアニソール及び没食子酸プロピル	[注] 22) 注図2	<u>BHA</u> (2か所)	<u>BH</u> (2か所)

清澄剤

フェロシアン化カリウム

Potassium Ferrocyanide

別名：ヘキサシアノ鉄（Ⅱ）酸カリウム

$K_4 [Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$: 422.39

1. 分析法の概要¹⁾

ぶどう酒中のフェロシアン化カリウムは、水で希釈又は更にポリマー固相抽出カラム処理をした後、硫酸鉄（Ⅱ）試液を加え、吸光度を測定し、定量する。（2023年設定）

2. 分析法（吸光光度法）²⁾

（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³⁾

① ぶどう酒（白又はロゼ等）⁴⁾

試料 4 mL を正確に量り、20 mL のメスフラスコに入れ、硫酸鉄（Ⅱ）試液 1 mL を加え、水を加えて 20 mL に定容する。よく振り混ぜた後、30 分間放置し、試験溶液とする。別に、試料 4 mL を正確に量り、20 mL のメスフラスコに入れ、水 4 mL を加えてよく混合した後、硫酸（1→100）1 mL を加え、水を加えて 20 mL に定容する。よく振り混ぜた後、30 分間放置し、対照液とする。

② ぶどう酒（赤等）

試料 8 mL を正確に量り、水 8 mL を加えてよく混合した後、ポリマー固相抽出カラム⁵⁾に負荷し、流出液を 40 mL⁶⁾ のメスフラスコに受ける。ポリマー固相抽出カラムに水 3～5 mL を数回通して洗い、洗液を先のメスフラスコに合わせ、更に水を加えて 40 mL に定容し、試料液とする。試料液 19 mL⁶⁾ を正確に試験管にとり、硫酸鉄（Ⅱ）試液 1 mL を加え、よく振り混ぜた後、30 分間放置し、試験溶液とする。別の試験管に、試料液 19 mL を正確にとり、硫酸（1→100）1 mL を加え、よく振り混ぜた後、30 分間放置し、対照液とする。

（3）検量線用標準溶液の調製

フェロシアン化カリウム三水和物 0.1147 g⁷⁾ を量り、水を加えて溶かして正確に 100 mL とし、標準原液とする（無水フェロシアン化カリウムとして濃度 1000 µg/mL）。標準原液 2 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とする。この液 2 mL を正確に量

り、水を加えて正確に20mLとし、標準溶液とする（無水フェロシアン化カリウムとして濃度 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準溶液 1、2、5 及び 10 mL 正確に量り、硫酸鉄（II）試液 1 mL をそれぞれに加え、水を加えてそれぞれ正確に 20mL とする。これらをよく振り混ぜた後、30分間放置し、検量線用標準溶液とする（濃度 無水フェロシアン化カリウムとして $0.1 \sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

（4）測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、水を対照とし、波長 740nm における、層長 5 cm での吸光度を測定する。

② 検量線

検量線用標準溶液それぞれにつき吸光度を測定し、検量線を作成する。

③ 定量^{8,9)}

試験溶液及び対照液につき吸光度を測定し、両者の値の差を求め、その値と検量線から試験溶液中の無水フェロシアン化カリウム濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式によって試料中の無水フェロシアン化カリウム (g/L) を計算する。

ぶどう酒（白又はロゼ等）

$$\text{無水フェロシアン化カリウム含量 (g/L)} = \frac{C \times V}{S \times 1000}$$

C : 試験溶液中の無水フェロシアン化カリウムの濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V : 試験溶液の定容量 (mL) (20mL)

S : 試料の採取量 (mL) (4 mL)

ぶどう酒（赤等）

$$\text{無水フェロシアン化カリウム含量 (g/L)} = \frac{C \times V}{S \times 1000} \times \frac{20}{19}$$

C : 試験溶液中の無水フェロシアン化カリウムの濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V : 試験溶液の定容量 (mL) (40mL)

S : 試料の採取量 (mL) (8 mL)

④ 検出限界 ぶどう酒（白又はロゼ等）

無水フェロシアン化カリウムとして 0.0005 g/L

ぶどう酒（赤等） 無水フェロシアン化カリウムとして 0.0006 g/L

試薬・試液等

1. フェロシアン化カリウム三水和物：ヘキサシアノ鉄（II）酸カリウム三水和物

[特級]

2. 硫酸鉄（Ⅱ）七水和物：[特級]
3. 硫酸：[特級]
4. メタノール：[特級]
5. 硫酸鉄（Ⅱ）試液：硫酸鉄（Ⅱ）七水和物3.0 gを量り、硫酸（1→100）を加えて100mLとする（用時調製）。

[注]

- 1) 食塩中のフェロシアン化物の分析を行なう場合は、本分析法ではなく、別に平成14年8月の通知（食発第0801001号）^{文献1)}により通知された分析法を適用する。
- 2) 本法では、フェロシアン化カリウムに硫酸鉄を加えることによりフェロシアン化鉄（Ⅲ）が生成し、その吸収極大である740nmでの測定値から、フェロシアン化カリウムを定量する。一方、ぶどう酒中の総シアンは、産業排水の水質試験法として示されているピリジン・ピラゾロン法による定量が可能である^{文献2)}。ただし、遊離型シアン、錯塩型シアンのほとんどをシアン化水素として留出させ、総シアンとして定量するため、定量値は食品素材由来のシアンと食品添加物フェロシアン化カリウム由来のものとの合計値となり、本法とは対象範囲が異なる。また、フェロシアン化カリウム量への換算が必要であり、酸性条件下でのシアン揮散の可能性にも留意が必要である。他に、ぶどう酒中のフェロシアン化物を硫酸酸性下で熱分解させ、生じたシアンイオンを検出する方法が報告^{文献3)}されているが、銀電極を使用した電気化学検出イオンクロマトグラフィーによるものである。また、食品中の分析法では無いものの、高速液体クロマトグラフィーを用いたフェロシアン化物の分析法は報告されている^{文献4)}。ぶどう酒中のフェロシアン化カリウムの定量には検出感度が十分でない可能性はあるが、フェロシアン化物イオンの確認には適用できる可能性がある。
- 3) フィルター処理を行うと、十分な回収が得られない場合があるため、フィルター処理操作は加えていない。
- 4) 試料の色が濃く、色の影響が生じる場合は、②に準じて調製する。
- 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（500 mg）等。あらかじめメタノール10mL、水10mLを順次通してコンディショニングしたものを用いる。
- 6) 40mLメスフラスコ及び19mL全量ピペットは、市販製品がある。ただし、入手が困難な場合は、40mLメスフラスコの代わりに目盛誤差±0.25mL以下の50mL容器を、また、19mL全量ピペットの代わりに20mLメスピペット（日本産業規格（JIS）R 0350のクラスA適合品）を用いてもよい。
- 7) フェロシアン化カリウム三水和物（ $K_4 [Fe (CN)_6] \cdot 3H_2O$ ）の分子量は422.39、無水フェロシアン化カリウム（ $K_4 [Fe (CN)_6]$ ）の分子量は368.34であ

り、分子量比からフェロシアン化カリウム三水和物0.1147 gはフェロシアン化カリウム0.1000 gに相当する。

- 8) 精度管理では、無水フェロシアン化カリウムとして0.001 g/Lの標準添加濃度で添加試験を実施する。
- 9) 本法により、ぶどう酒の（白）、（ロゼ）及び（ロゼ・発泡）にフェロシアン化カリウム標準原液を0.0005 g/L（無水フェロシアン化カリウムとして）の濃度で添加して、試験溶液の調製①により試験した時の添加回収率（n = 3の平均）はそれぞれ93%、104%及び101%（相対標準偏差3%、0.8%及び0%）であった。また、本法により、ぶどう酒の（赤）及び（赤・発泡）にフェロシアン化カリウム標準原液を0.001 g/L（無水フェロシアン化カリウムとして）の濃度で添加して、試験溶液の調製②により試験した時の添加回収率（n = 6の平均）はそれぞれ51%及び81%（相対標準偏差7%及び6%）であった。

[文献]

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品保健部通知：平成14年08月01日付食発第0801001
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2020、966（2020）、金原出版
- 3) 義平邦利ら：食衛誌、**32**、559（1991）
- 4) 建部千絵ら：国立医薬品食品衛生研究所報告、**134**、63（2016）

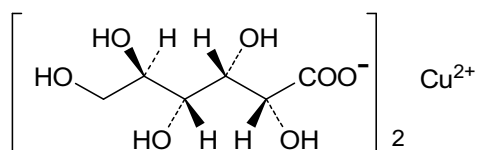
強化剂等

銅塩類

Copper Salts

グルコン酸銅

Copper Gluconate



$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{CuO}_{14}$: 453.84

硫酸銅

Cupric Sulfate

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

(CuSO_4 : 159.61)

銅クロロフィリンナトリウム¹⁾

Sodium Copper Chlorophyllin

銅クロロフィル¹⁾

Copper Chlorophyll

1. 分析法の概要

食品中の銅塩類は、原子吸光光度法により、銅として定量する。必要があれば分子量比を乗じて銅塩類それぞれの量として求める。食品中には天然の銅が分布している。したがって、定量値は食品由来の銅と添加されたものとの合計値である¹⁾。(2023年改正)

2. 分析法 (原子吸光光度法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

試料が標準調乳濃度調乳液²⁾又はぶどう酒の場合は10mLを正確に量り、これら以外の試料の場合は約2gを精密に量り、灰化容器³⁾に入れ、ホットプレート上で加熱乾燥し⁴⁾、更に加熱を続けて炭化する。次に電気炉に入れ、温度を上げて500℃とし、淡色の灰が得られ灰化するまで加熱を続ける⁵⁾。冷後、残留物に塩酸(5→9)5mLを加え、蒸発乾固するまでホットプレート上で加熱する。残留物に塩酸(5→9)5mLを加えて加温して溶かし⁶⁾、この液を分液漏斗⁷⁾に移し、灰化容器の内壁を少量の水で洗って合わせ、50w/v%クエン酸二アンモニウム溶液10mLを加えた後、BTB試液2滴を加え、液の色が黄色から青色に変化するまでアンモニア水を滴加する。次に、水を加えて100mLとし、APDC・硫酸アンモニウム試液5mLを加えて5分間放置し、酢酸ブチルを正確に10mL加えて5分間振とう抽

出する。静置後、酢酸ブチル層を分取し、試験溶液とする⁸⁾。

別に、試料を用いずに同様に操作して、空試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁹⁾

銅標準原液 1 mL を正確に量り、10 mL のメスフラスコに入れ、硝酸試液 (0.1 mol/L) を加えて正確に 10 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、100 mL のメスフラスコに入れ、硝酸試液 (0.1 mol/L) を加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする (濃度 1 µg/mL)。標準溶液 2、4、6、8 及び 10 mL をそれぞれ正確に量り、分液漏斗⁷⁾に入れ、それぞれ塩酸 (5 → 9) 5 mL を加えた後、以下、50 w/v % クエン酸二アンモニウム溶液 10 mL を加えるところから (2) 試験溶液の調製と同様に操作し、検量線用標準溶液とする (濃度 0.2 ~ 1.0 µg/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件

原子吸光光度計を用い、次の条件で測定する。

光源ランプ：銅中空陰極ランプ

分析線波長：324.8 nm

可燃性ガス：アセチレン

支燃性ガス：空気

② 検量線

検量線用標準溶液それぞれにつき、吸光度を測定し、検量線を作成する。

③ 定量¹⁰⁾

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

標準調乳濃度調乳液²⁾又はぶどう酒の場合

$$\text{銅含量 (g/L)} = \frac{C \times D \times 10}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の銅濃度 (µg/mL)

D：希釈率⁸⁾

W：試料の採取量 (mL)

グルコン酸銅含量 (g/L) = 銅含量 (g/L) × 7.142

硫酸銅 (無水物) 含量 (g/L) = 銅含量 (g/L) × 2.512

上記以外の食品の場合

$$\text{銅含量 (g/kg)} = \frac{C \times D \times 10}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中の銅濃度 (μg/mL)

D : 希釈率⁸⁾

W : 試料の採取量 (g)

グルコン酸銅含量 (g/kg) = 銅含量 (g/kg) × 7.142

硫酸銅 (無水物) 含量 (g/kg) = 銅含量 (g/kg) × 2.512

- ④ 定量限界 標準調乳濃度調乳液²⁾及びぶどう酒 銅として 0.0002 g/L
上記以外の食品 銅として 0.001 g/kg

試薬・試液等

1. 銅標準原液¹¹⁾ : 市販の原子吸光度分析に適した標準液 (Cu : 1000μg/mL) を用いる。
2. 塩酸 : [金属分析用]
3. APDC : ピロリジンジチオカルバミド酸アンモニウム [特級]
4. 硫酸アンモニウム : [特級]
5. 酢酸ブチル : [特級]
6. APDC・硫酸アンモニウム試液 : APDC 3 g、硫酸アンモニウム 10 g を分液漏斗⁷⁾ に量り、水 100mL と酢酸ブチル 20mL を加え、5分間振とうし、静置後、水層を使用する。
7. クエン酸二アンモニウム : [特級]
8. アンモニア水 : 濃度 25% 又は 28% [特級又は金属分析用]
9. 50w/v%クエン酸二アンモニウム溶液 : クエン酸二アンモニウム 1000 g を 3000mL 容の樹脂製ビーカーにとり、アンモニア水 250mL と適量の水で溶解したのち、水で 2000mL とする。1000mL 容分液漏斗 2つに半量ずつ移し、それぞれに APDC・硫酸アンモニウム試液 30mL と酢酸ブチル 20mL を加え 5分間振とうする。静置後、水層をろ過して使用する。
10. BTB : ブロムチモールブルー [特級]
11. エタノール (99.5) : [特級]
12. 50vol%エタノール¹²⁾ : エタノール (99.5) 50mL に水を加えて 100mL とする。
13. BTB試液 : BTB 0.1 g に 50vol%エタノール 100mL を加えて溶かす。
14. 硝酸 : [微量金属測定用]
15. 硝酸試液 (0.1mol/L) : 濃度 69~70%の硝酸の場合には 6.4mL、濃度 65~66%の硝酸の場合には 6.9 mL、濃度 60~61%の硝酸の場合には 7.6mL を量り、水を加えて 1000mL とする。

[注]

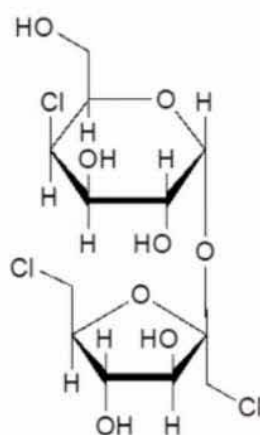
- 1) 本法は、強化剤等として使用された銅（グルコン酸銅及び硫酸銅）を測定対象としているが、着色料の銅クロロフィリンナトリウム及び銅クロフィルも本法により銅として測定される。
- 2) 母乳代替食品を標準調乳濃度に調乳して得た液を用いる。
- 3) 100mLのホウケイ酸ガラスビーカー又は磁製のるつぼが適当である。低濃度での測定を行う場合は、試験に用いるガラス器具はすべて使用前に硝酸（1→3）で十分洗うか、又は硝酸（1→3）に一晩つけておくとよい。ただし、ガラス器具の硝酸洗浄は、空試験の結果に影響がないことが確認できれば省略してもよい。
- 4) 乾固直前に内容物が飛び散り易いので、乾固までは高温になり過ぎないように徐々に温度を上げていくとよい（加熱乾燥例：145℃ホットプレート上で水分を蒸発させてから、徐々に500℃まで上げて炭化）。
- 5) 灰化時間は大抵の場合一晩で十分である。ぶどう酒は淡色の灰、標準調乳濃度調乳液²⁾は検体由来の残渣が残る場合がある。
- 6) 塩酸（5→9）を加え、樹脂製薬さじや超音波洗浄機を用いてよくなじませてから、時計皿で蓋をして加温をするとよい（加温例：145℃ホットプレート上で30分間）。
- 7) 200mLのスキープ形分液漏斗などが適当である。
- 8) 試験溶液の希釈が必要な場合は、酢酸ブチルを用いて希釈した液を測定に用い、希釈率を乗じて銅含量の算出を行う。
- 9) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。3濃度以上の検量線標準溶液を調製する。また、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。
- 10) ぶどう酒に、硫酸銅を銅として0.0002 g/L及び0.002 g/L相当添加した時の回収率は、それぞれ95.0%～98.4%及び98.5%～100.2%（相対標準偏差3.3%～5.5%及び0.6%～0.8%）（n=5の平均）であった。また、標準調乳濃度調乳液²⁾に、硫酸銅又はグルコン酸銅を銅として0.0002 g/L及び0.0006 g/L相当添加した時の回収率は、それぞれ95.0%～102.5%及び95.1%～101.6%（相対標準偏差1.1%～3.5%及び0.4%～1.3%）（n=5の平均）であった。
- 11) 硫酸銅（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）3.929 gを量り、硝酸試液（1 mol/L）を加えて溶かして正確に1000mLとしたもの（濃度1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を用いてもよい。
- 12) エタノール（99.5）の代わりにエタノール（95）50mLをとり、水45mLを加えて混合したものをを用いてもよい。

甘味料

スクラロース

Sucralose

別名：トリクロロガラクトスクロース



$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$: 397.63

1. 分析法の概要

食品中のスクラロースは、透析法により抽出した後、ポリマー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定量する。(2023年設定)

2. 分析法¹⁾ (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 透析

試料約 20 g²⁾ を精密に量る³⁾。次に約 20 mL⁴⁾ の透析内液と混和して流動状とし、少量の透析内液を用いて透析膜チューブ内に移した後、空気を追い出してからチューブの上端を密封し、200 mL 容の目盛り付き容器⁵⁾ に入れる。次いでこの目盛り付き容器に透析外液を加えて全量⁶⁾ を正確に 200 mL とする。時々、密栓又はフィルム等で覆って目盛り付き容器内を混和しながら室温で 24~48 時間透析し⁷⁾、透析終了後の透析外液を抽出液とする。

② カラムによる精製

抽出液 50 mL を正確にとり、ポリマー固相抽出カラムに負荷する⁸⁾。水 10 mL、0.2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 5 mL、水 10 mL を順次通して洗浄後、メタノール 5 mL で溶出する。溶出液を減圧乾固後、水を加えて正確に 1 mL とし、メンブランフィルター (0.45 μm) 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⁹⁾

スクラロース 50.0mg を量り、水を加えて正確に 50mL とし、標準溶液とする（濃度 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準溶液 1、2、4、10 及び 20mL を正確にとり、水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 50～1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

(4) 測定法

① 測定条件¹⁰⁾

示差屈折計付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6mm、長さ 150～250mm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：メタノール／水混液（3：7）

流速：1.0mL／分

注入量：20 μL

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、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によって試験溶液中のスクラロース濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を求め、次式によって試料中のスクラロース含量（ g/kg ）を計算する¹²⁾。

$$\text{スクラロース含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200 \times 1}{W \times 50 \times 1000}$$

C：試験溶液のスクラロース濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

W：試料の採取量（g）

④ 定量限界 0.01 g/kg

試薬・試液等

1. スクラロース：市販品を用いる。
2. 塩化ナトリウム：[特級]
3. 塩酸：[特級]
4. 透析内液：塩化ナトリウム 100 g を 0.01mol/L 塩酸に溶解して 1000mL とする。

5. 透析外液：0.01mol/L塩酸
6. 透析膜チューブ：透析用セルロース製チューブ（平面幅 44mm、直径 28mm、膜厚 0.0203mm）を適当な長さに切ったものを水で洗浄し、片端を結んで閉じる。
7. ポリマー固相抽出カラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体固相抽出カラム（1000mg）。あらかじめメタノール 5 mL、水 10 mL を順次通してコンディショニングしたものを用いる。
8. 水酸化ナトリウム：[特級]
9. 0.2mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 0.8 g に水を加えて 100 mL とする。
10. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
11. 0.1mol/L塩酸：塩酸 9 mL に水を加えて 1000 mL とする。
12. 0.01mol/L塩酸：0.1mol/L塩酸 100 mL に水を加えて 1000 mL とする。

[注]

- 1) 本法は、既報^{文献1,2)}を参照した検討結果に基づく。また、参考 1 及び参考 2 には、本法の透析後抽出液を逆相固相抽出カラム処理し、液体クロマトグラフィー質量分析を用いる分析法^{文献3)}や、さらに逆相固相抽出カラム溶出液を減圧乾固し、塩化ベンゾイルで誘導体化した後、紫外可視吸光光度検出器付液体クロマトグラフを用いる分析法^{文献4)}を示す。スクラロース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。
- 2) 試料のかさが大きいもの、水分を含むと膨張する場合は、試料採取量を 5～10 g に減らす。
- 3) 炭酸を多く含む試料の場合は、試料の秤量後に、超音波処理によりその大部分を除去する。また、脂肪分を多く含む試料の場合は、試料の秤量後に、ヘキサン約 20 mL ずつで 2～3 回洗浄した後、ヘキサン臭がなくなるまで放置又は加温する。ただし、乳化した食品（ピーナッツバター、マヨネーズ等）は脱脂操作を省略できる。
- 4) 試料と混和して流動状にならない場合は、透析内液を適宜追加する。
- 5) 正確に 200 mL を量ることができる目盛精度を有する容器。透析チューブの実効長が 15 cm の場合は直径（内径）4 cm 以下がよい。
- 6) 試料、透析内液、透析外液の合計量。
- 7) 透析膜チューブの実効長約 15 cm の場合、スクラロースは水分含量の高い食品では 24 時間で十分透析されるが、穀類の調製品や魚介乾製品等の水分含量の低い食品及びはっ酵乳等の乳製品では透析率が低下する傾向があるため、48 時間透析を行う。また、より実効長の長い透析膜チューブを用いる既報^{文献5)}に記された透析条件を用いることにより、穀類の調製品や魚介乾製品等の水分含量の低い食品及びはっ酵乳等の乳製品等においても 4 時間の透析で、上記方法とほぼ同等の透析率が得られる^{文献6)}。
- 8) 毎分 3～4 mL の流速で流す。
- 9) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。

- 10) 測定条件は例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、スクラロース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。移動相に水／アセトニトリル混液（85：15）を用いることもできる^{文献1)}。
- 11) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、分析操作後の透析外液量を乗じず、操作時の試料体積を含めた定容量を乗じている。そのため、固体試料等では実態より数%～10%ほど高い定量値となる場合もあり、本法での添加回収率が非常に高い場合には、要因の一つにこの点もあることを考慮する。
- 12) 本法によるスクラロースの添加回収試験の結果を注表1及び注表2に示す。

注表1 スクラロースの各種食品での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
ジュース	0.02	95	4.0
ゼリー	0.02	98	3.0
ジャム	0.02	91	5.8
しょうが酢漬	0.02	97	4.2
たくあん漬	0.02	92	3.2

*1 5試行の平均値

注表2 スクラロースのたくあん漬での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
たくあん漬	0.01	84	9.4
	0.58	97	3.2

*1 5試行の平均値

ただし、移動相は水／アセトニトリル混液（85：15）^{文献1)}で試験した。

[文献]

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2020、397（2020）、金原出版
- 2) 小林千種ら：食衛誌、**42**、139（2001）
- 3) 畑野和広ら：食衛誌、**43**、267（2002）
- 4) 石井達三ら：埼玉県衛研所報、**39**、137（2005）
- 5) 田原正一ら：食衛誌、**55**、13（2014）
- 6) 大槻崇ら：第106回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集（2013.11、沖縄）

参考1

スクラロース確認分析法1

1. 分析法の概要

食品中のスクラロースを、透析法により抽出した後、逆相固相抽出カラムで精製し、液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う。(2023年設定)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー質量分析)

(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 透析

スクラロース分析法(2)試験溶液の調製 ① 透析を準用する。

② カラムによる精製

抽出液5mLを正確にとり、逆相固相抽出カラムに負荷し¹⁾、水10mLを通して洗浄する。次いで40vol%メタノール5mLで溶出し、溶出液を40vol%メタノールで正確に5mLとする。この液をメンブランフィルター(0.22 μ m)でろ過したものを試験溶液²⁾とする。

(3) 定性用標準溶液及び検量線用標準溶液の調製³⁾

スクラロース50.0mgを量り、40vol%メタノールを加えて溶かし、正確に50mLとする。この1mLを正確にとり、40vol%メタノールを加えて正確に100mLとしたものを標準原液とする(濃度10 μ g/mL)。標準原液10mLを正確にとり、40vol%メタノールを加えて正確に50mLとしたものを標準溶液とする(濃度2 μ g/mL)。標準溶液1、2、4、6及び10mLをそれぞれ正確にとり、40vol%メタノールを加えてそれぞれ正確に10mLとし、定性に適した濃度の定性用標準溶液(2 μ g/mL等)及び検量線用標準溶液(濃度0.2~2 μ g/mL)を調製する。

(4) 測定法

① 測定条件^{4, 5)}

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

カラム充填剤: オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管: 内径2.1mm、長さ: 100~150mm

カラム温度: 40°C

移動相⁶⁾: A液 アセトニトリル/2mmol/L 酢酸アンモニウム混液(1:99)

B液 アセトニトリル/2mmol/L 酢酸アンモニウム混液(95:5)

グラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	99	1
12	40	60
12.01	0	100
17	0	100
17.01	99	1
22	99	1

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI（－）

検出法：スキャン（ m/z 50～450）、

選択イオンモニタリング（SIM）（モニターイオン： m/z 395⁷⁾）

注入量：1 μ L

② 検量線³⁾

検量線用標準溶液をそれぞれLC-MSに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定性^{8, 9)}

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

④ 定量^{8, 10～13)}

試験溶液をLC-MSに注入し、SIMで得られたピーク面積と検量線から試験溶液中のスクラロース濃度（ μ g/mL）を求め、次式によって試料中のスクラロース含量（g/kg）を計算する。

$$\text{スクラロース含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200 \times 5}{W \times 5 \times 1000}$$

C：試験溶液のスクラロース濃度（ μ g/mL）

W：試料の採取量（g）

試薬・試液等

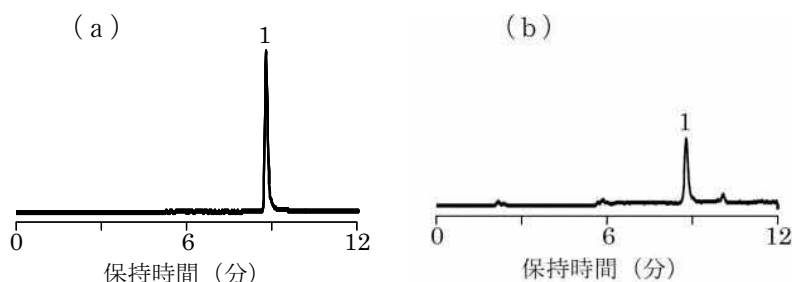
- スクラロース分析法の試薬・試液等を準用する。
- 逆相固相抽出カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム（500mg）。あらかじめメタノール5mL、水5mLを順次通してコンディショニングしたものを用いる。
- 酢酸アンモニウム：[特級]
- アセトニトリル/2mmol/L 酢酸アンモニウム混液（1：99）：酢酸アンモニウム154.2mgを水に溶解して1000mLとする。この溶液990mLにアセトニトリル10mLを加えて

混合する。

5. アセトニトリル／2mmol／L 酢酸アンモニウム混液 (95：5)：酢酸アンモニウム 15.4mg
を水に溶解して 100mL とする。この溶液 50mL にアセトニトリル 950mL を加えて混合する。
6. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 毎分 3～4 mL の流速で流す。
- 2) 試験溶液中の濃度が高く、検量線の濃度範囲を逸脱する場合は、試験溶液を、試験溶液の調製の最終段階で用いた溶液で適宜希釈して定量をやり直し、計算式に希釈倍率を乗じて含量を求める。
- 3) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。
- 4) 測定条件は例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、スクラロース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) 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モニターイオン強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 6) その他、0.1vol%ギ酸含有 5 vol%アセトニトリルと 0.1vol%ギ酸含有 95vol%アセトニトリルによるグラジエント溶離等が使用できる。
- 7) 食品中の夾雑物の影響により定量が困難な場合は、 m/z 397 をモニターイオンとして用いることもできる。
- 8) LC-MSを用いて確認や定量を行う場合、食品中の夾雑物の影響によりイオン化抑制や促進を生じて確認や定量を正しく行えないおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークの検出感度やマススペクトルの変化について確認する。
- 9) スキャン測定により、スクラロースの脱プロトンイオン m/z 395 を確認することができる。バックグラウンドが高い場合は補正する。
- 10) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、分析操作後の透析外液量を乗じず、操作時の試料体積を含めた定容量を乗じている。そのため、固体試料等では実態より数%～10%ほど高い定量値となる場合もあり、本法での添加回収率が非常に高い場合には、要因の一つにこの点もあることを考慮する。
- 11) スクラロースのマスキングマトグラムを注図 1 に示す。



1. スクラロース

(a) 標準溶液 0.5µg/mL、(b) いちごジャム抽出物 (スクラロース 0.002 g/kg 添加)

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 3 µm)

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm カラム温度：40°C

流速：0.2mL/分

注入量：10µL

移動相： A液 アセトニトリル/2mmol/L酢酸アンモニウム混液 (1:99)

B液 アセトニトリル/2mmol/L酢酸アンモニウム混液 (95:5)

グラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	99	1
12	40	60
12.01	0	100
17	0	100
17.01	99	1
22	99	1

イオン化モード：ESI (-)

検出法：選択イオンモニタリング (SIM) (モニターイオン：m/z 395)

注図1 スクラロースのマスキングクロマトグラム

12) 本法によるスクラロースの添加回収試験の結果を注表1及び注表2に示す。

注表1 スクラロースの各種食品での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD*2 (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD*2 (%)
チューインガム	2.6	92	2.5	0.002	105	5.6
ビスケット	1.8	97	2.9	0.002	110.8	7.0
いちごジャム	1.0	90	6.9	0.002	93	5.8
ソース	0.58	98	5.7	0.002	84	9.7
白菜漬	0.58	94	6.6	0.002	104	6.9
さきいか	0.58	81	4.1	0.002	90	8.5
紅茶	0.4	101	5.2	0.002	96	4.7
ヨーグルト	0.4	91	5.7	0.002	93	6.6

*1 5試行の平均値、*2 相対標準偏差

注表2 スクラロースのたくあん漬での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
たくあん漬	0.002	109	1.9
	0.01	98	1.1

*1 5試行の平均値

13) 液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いる確認分析法が報告されている^{文献1)}。

[文献]

1) 畑野和広ら：食衛誌、**43**、267 (2002)

参考2

スクラロース確認分析法2

1. 分析法の概要

食品中のスクラロースを、透析法により抽出して逆相固相抽出カラムにより精製し、塩化ベンゾイルで誘導体化して精製した後、液体クロマトグラフィーにより確認を行う¹⁾。(2023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

① 透析

スクラロース分析法（2）試験溶液の調製 ① 透析を準用する。

② 誘導体化及び精製

抽出液5 mLを正確にとり、逆相固相抽出カラム²⁾に負荷し³⁾、水10 mLを通して洗浄する。次いで40 vol%メタノール5 mLで溶出し、溶出液を40 vol%メタノールで正確に5 mLとする。この液3 mLを正確にとり、60°Cで減圧乾固し、残留物を4%炭酸ナトリウム含有20%塩化ナトリウム溶液0.1 mLで溶解する⁴⁾。これに、アセトニトリル9 mLを加え、よく混和した後、メンブランフィルター（0.45 μm）でろ過し、塩化ベンゾイル0.4 mLを加え振り混ぜる。次いで、60 w/v%水酸化ナトリウム溶液0.3 mLを加え振り混ぜた後、超音波洗浄器に入れ30秒間超音波処理する。その後、8分間振とう⁵⁾した後、遠心分離（10分間、3000回転/分）し、上層を分取する。沈殿物にアセトニトリル8 mLを加え、ミクロスパーテルでかくはんして沈殿物を懸濁させた後、振り混ぜ、30秒間超音波処理する。次いで、8分間振とう後、遠心分離（10分間、3000回転/分）する。上層を先に分取した液に合わせ、水10 mLを加えて振り混ぜた後、逆相固相抽出カラム⁶⁾に負荷し、アセトニトリル/水混液（6：4）10 mLで洗浄する。次いで、アスピレーターで吸引し水分を除いた後、アセトニトリル5 mLで溶出し、溶出液の全量を正確に5 mLとする。この液をメンブランフィルター（0.45 μm）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

スクラロース60.0 mgを量り、アセトニトリルを加えて正確に50 mLとしたものを標準原液Aとする（濃度1200 μg/mL）。標準原液A 5 mLを正確にとり、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとしたものを標準原液Bとする（濃度60 μg/mL）。標準原液B 1、2、4及び10 mLをそれぞれ正確にとり、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に100 mLとし、また、標準原液A 1及び2.5 mLをそれぞれ正確にとり、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に100 mLとし、標準溶液とする

(濃度 0.6~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

あらかじめ4%炭酸ナトリウム含有20%塩化ナトリウム溶液0.1mLにアセトニトリル8mLを入れた容器に、各標準溶液1mLをそれぞれ正確に加え、塩化ベンゾイル0.4mLを加え振り混ぜ、以下、(2)試験溶液の調製②誘導体化及び精製の場合と同様に操作して得られたものを検量線用標準溶液(濃度0.12~6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とする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。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径4.6mm、長さ150~250mm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：アセトニトリル/水混液(8:2)

流速：1.0mL/分

測定波長：230nm

注入量：20 μL

② 検量線⁷⁾

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^{9~11)}

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によって試験溶液中のスクラロース濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)を求め、次式によって試料中のスクラロース含量(g/kg)を計算する。

$$\text{スクラロース含量}(\text{g}/\text{kg}) = \frac{C \times 200 \times 5}{W \times 3 \times 1000}$$

C：試験溶液のスクラロース濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)

W：試料の採取量(g)

試薬・試液等

1. スクラロース分析法の試薬・試液等を準用する。
2. 逆相抽出カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム(500mg)。
3. 炭酸ナトリウム：[特級]
4. 4%炭酸ナトリウム含有20%塩化ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム4g及び塩化ナトリウム20gを水に溶解して100mLとする。
5. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

10) 本法によるスクラロースの添加回収試験の結果を注表1及び注表2に示す。

注表1 スクラロースの各種食品での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD*2 (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD*2 (%)
チューインガム	2.6	88	2.4	0.002	100	7.6
ビスケット	1.8	80	4.6	0.002	86	8.6
いちごジャム	1.0	88	7.7	0.002	94	3.7
ソース	0.58	90	5.2	0.002	80	5.5
白菜漬	0.58	95	4.3	0.002	96	5.1
さきいか	0.58	83	6.8	0.002	89	3.4
紅茶	0.4	101	3.1	0.002	93	6.2
ヨーグルト	0.4	97	2.4	0.002	86	4.6

*1 5試行の平均値、*2 相対標準偏差

注表2 スクラロースのたくあん漬での添加回収率*1

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
たくあん漬	0.002	75	3.2
	0.58	84	2.5

*1 5試行の平均値

11) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、分析操作後の透析外液量を乗せず、操作時の試料体積を含めた定容量を乗じている。そのため、固体試料等では実態より数%~10%ほど高い定量値となる場合もあることを考慮する。また、本法での添加回収率が非常に高い場合には、要因の一つにこの点もあることを考慮する。

[文献]

- 1) 石井達三ら：埼玉県衛研所報、39、137 (2005)

酸化防止剤

ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール

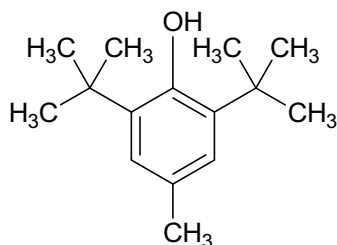
及び没食子酸プロピル

Butylated Hydroxytoluene, Butylated Hydroxyanisole and Propyl Gallate

ジブチルヒドロキシトルエン

Butylated Hydroxytoluene

略名：BHT

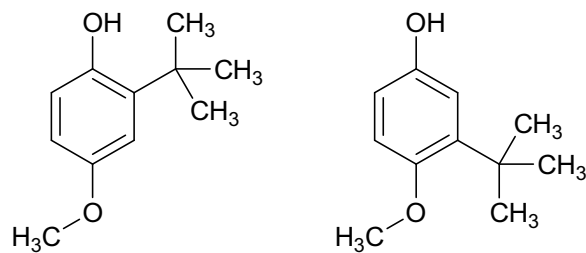


$C_{15}H_{24}O$: 220.35

ブチルヒドロキシアニソール

Butylated Hydroxyanisole

略名：BHA

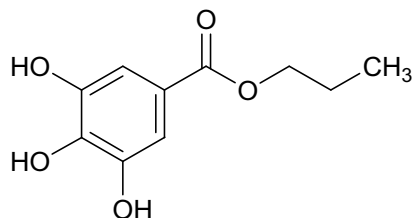


$C_{11}H_{16}O_2$: 180.24

没食子酸プロピル

Propyl Gallate

略名：PG



$C_{10}H_{12}O_5$: 212.20

1. 分析法の概要

食品中のジブチルヒドロキシルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルを分析する方法である。分析法Aでは、アセトニトリル・2-プロパノール・エタノール混合溶媒（2：1：1）で抽出し、 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。分析法Bでは、0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリルで抽出し、 $-30\sim-5^{\circ}\text{C}$ に冷却し、油脂分と分離した後、液体クロマトグラフィーにより定量する。（2008年改正、2023年統合設定）

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）¹⁾

分析法A^{文献1、文献2)}

（1）検体の採取と試料の調製

一般試験採取法を準用する。

（2）試験溶液の調製

① 植物油等

試料約5gを精密に量り、混合溶媒50mLを加えてよく振り混ぜた後、 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、上層を分取して抽出液とする。抽出液を減圧濃縮し1～2mLとした後、混合溶媒を加えて正確に5mLとする。これをメンブランフィルター（0.45 μm 、親水性ポリテトラフルオロエチレン）でろ過し、試験溶液とする。

② その他の食品²⁾

試料約5gを精密に量り、ホモジナイザーのカップにとる。これに無水硫酸ナトリウム10g及び混合溶媒50mLを加え、ホモジナイズ³⁾する。 $-20\sim-5^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で1時間以上冷却した後、すばやくろ紙でろ過する。残さはあらかじめ冷蔵庫で冷却した混合溶媒15mLで洗い、洗液をろ過する。ろ液を合わせ、抽出液とする。抽出液を減圧濃縮し1～2mLとした後、混合溶媒を加えて正確に5mLとする。これをメンブランフィルター（0.45 μm 、親水性ポリテ

トラフルオロエチレン) でろ過し、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピル各 0.100 g を量り、メタノールを加えて溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする (各濃度 1000 μ g/mL)。標準原液 10mL を正確にとり、メタノールを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする (各濃度 100 μ g/mL)。標準溶液 0.5、1、2、5 及び 10mL を正確にとり、混合溶媒を加えてそれぞれ正確に 10mL とし、検量線用標準溶液とする (各濃度 5~100 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件⁵⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 4.6~6.0mm、長さ 150~250mm

カラム温度：室温

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液 (1 : 1)

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件⁶⁾

分	A (%)	B (%)
0	40	60
15	90	10
45	90	10

流速：1.0mL/分

測定波長：280nm

注入量：5 μ L

② 検量線

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⁷⁾

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ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの濃度を求め、次式によって試料中の含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ジブチルヒドロキシトルエン含量 (g/kg)} = \frac{C_1 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{ブチルヒドロキシアニソール含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{没食子酸プロピル含量 (g/kg)} = \frac{C_3 \times 5}{W \times 1000}$$

C_1 : 試験溶液中のジブチルヒドロキシルエンの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_2 : 試験溶液中のブチルヒドロキシアニソールの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_3 : 試験溶液中の没食子酸プロピルの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.005 g/kg

分析法B (分析法Aで対象添加物が回収されにくい食品等)⁸⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試験採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

① 固形食品

試料⁹⁾約5gを精密に量り、ホモジナイザーのカップにとる。これに無水硫酸ナトリウム10～15g及び0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル¹⁰⁾30mLを加え、1～2分間ホモジナイズする。ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過し¹¹⁾、残さに0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル30mLを加え、同様の操作を2回繰り返す。ろ液を合わせ、減圧下40℃で溶媒を留去する。残留物に0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾を正確に5mL加えてよく振り混ぜた後、-30～-5℃の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、すばやくメンブランフィルター(0.45 μm 、親水性ポリテトラフルオロエチレン)¹³⁾でろ過し、得られたろ液を試験溶液とする。

② 液状食品

試料約5gを精密に量り、50mLの耐溶媒遠沈管にとる。これに0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル¹⁰⁾30mLを加え、振とうした¹⁴⁾後、3500回転/分で10分間遠心分離する。上清を分取し、残さに0.01w/v%アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル30mLを加え、同様の操作を2回繰り返す。上清を合わせ、減圧下40℃で溶媒を留去する。残留物に0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾を正確に5mL加えてよく振り混ぜた後、-30～-5℃の冷凍庫で1時間以上冷却する。冷却後、すばやくメンブランフィルター(0.45 μm 、親水性ポリテトラフルオロエチレン)¹³⁾でろ過し、得られたろ液を試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁴⁾

ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピル各0.100gを量り、それぞれ0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール^{12、15)}に溶かして正確に100mLとし、各標準原液とする(各濃度1000 μ g/mL)。各標準原液をそれぞれ10mLずつ正確にとり、0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールを加えて正確に100mLとしたものを標準溶液とする(各濃度100 μ g/mL)。標準溶液0.5、1、2、5及び10mLを正確にとり、0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールを加えてそれぞれ正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする(各濃度5~100 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件⁵⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフ¹⁶⁾を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹⁷⁾：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2.1mm、長さ150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液(1:1)

B液 5 vol%酢酸溶液¹⁸⁾

グラジエントの条件¹⁹⁾

分	A (%)	B (%)
0	20	80
5	20	80
20	90	10
35	90	10

流速：0.2mL/分

測定波長：280nm

注入量：5 μ L

② 検量線

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²⁰⁾。

③ 定量^{21~23)}

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ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの濃度を求め、次式によって試料中の含量(g/kg)を計算する。

$$\text{ジブチルヒドロキシトルエン含量 (g/kg)} = \frac{C_1 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{ブチルヒドロキシアニソール含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 5}{W \times 1000}$$

$$\text{没食子酸プロピル含量 (g/kg)} = \frac{C_3 \times 5}{W \times 1000}$$

C_1 : 試験溶液中のジブチルヒドロキシルエンの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_2 : 試験溶液中のブチルヒドロキシアニソールの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

C_3 : 試験溶液中の没食子酸プロピルの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.005 g/kg

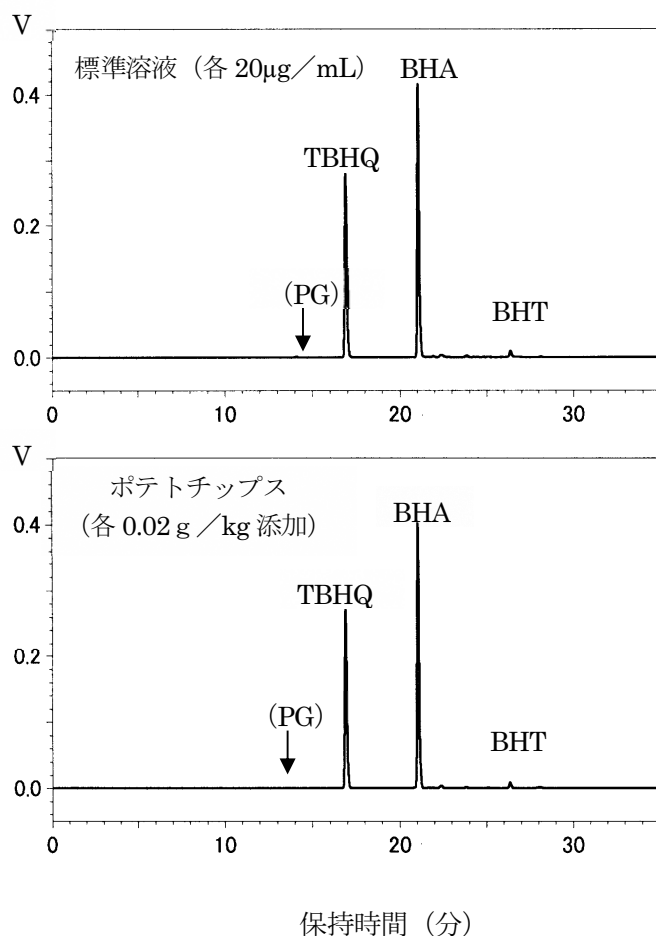
試薬・試液等

1. ジブチルヒドロキシルエノール : 市販品を用いる。
2. ブチルヒドロキシアニソール : 市販品を用いる。
3. 没食子酸プロピル : 市販品を用いる。
4. アセトニトリル : [特級] 又は [高速液体クロマトグラフィー用]
5. 2-プロパノール : [特級]
6. エタノール : [特級]
7. 混合溶媒 : アセトニトリル、2-プロパノール及びエタノールを容量比 2 : 1 : 1 で混合する。
8. 無水硫酸ナトリウム : 硫酸ナトリウム [特級]
9. メタノール : [特級] 又は [高速液体クロマトグラフィー用]
10. 酢酸 : [特級]
11. 5 vol% 酢酸溶液 : 酢酸 50mL を量り、水を加えて 1000mL とする。
12. L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル : 市販品を用いる。
13. ヘキサン : [特級]
14. L (+) -アスコルビン酸 : [特級]
15. 0.01 w/v % アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有ヘキサン飽和アセトニトリル :
ヘキサンとアセトニトリルを分液漏斗で振とうし、静置する。2層に分離した後、下層を採取する。この液 1000mL に L (+) -アスコルビン酸パルミチン酸エステル 0.1 g を溶解する。
16. 0.1 w/v % アスコルビン酸含有メタノール : L (+) -アスコルビン酸 0.1 g を量り、メタノールで 100mL に定容する。

[注]

- 1) 本法は未指定添加物 *tert*-ブチルヒドロキノンの同時分析が可能である。
- 2) バター、ドレッシング、魚介乾製品、魚介冷凍品、チップス、クッキー、チョコレート等における分析に用いることができる。バター等は 40℃で加温融解した後、秤量する。
- 3) 5～10 分間ほどホモジナイズする。試料を十分混合できる場合は、ホモジナイズ時間を短くすることでホモジナイズ時の熱の負荷等を減らすことができ、添加回収率の向上につながる場合もある。
- 4) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、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、流速及び注入量などを調整する。
- 6) 各試料を分析終了後ごとに移動相Aのみを約 30 分間流すことにより、ほとんどの油脂成分を溶出することができる。また、移動相を初期状態に戻したのち、そのまま 20 分間移動相を流しカラムの安定化を図るとよい。なお、ODS系のカラムでも種々の性質のものがあるため、移動相Aの初期の割合を 40～50%、最終の割合を 90～95%の間で調整する。
- 7) 分析法Aによる 0.1 g/kg の濃度でのジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び没食子酸プロピルの添加回収率 (n = 3 の平均) は、植物油で 88～95%、バターで 91～95%、煮干しで 72～85%、冷凍えびで 81～88%である^{文献1)}。
- 8) 煮干し等は、分析法Bの方が分析法Aより良好な場合がある。
- 9) バターは、①固形食品の調製法では、ろ液に試料の混入が見られたため、40℃で加温融解し、②液状食品の調製法を適用する。
- 10) 分析操作中のジブチルヒドロキシトルエン等の酸化による減少を防止するために、アスコルビン酸パルミチン酸エステルを抽出溶媒に添加する。
- 11) ろ紙を用いたろ過でも、問題の無い場合もある。
- 12) 試験溶液中のジブチルヒドロキシトルエン等の酸化による減少を防止するため、アスコルビン酸を試験溶液の溶媒に添加している。ただし、0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールの代わりにメタノールを用いても十分な回収率や精度が得られる場合もある²⁵⁾、^{文献3)}。
- 13) ガラス器具類を試験溶液と同様に冷凍庫で冷却したものをを用いるとよい。
- 14) 1～10 分間ほど振とうする。
- 15) 冷蔵保管の場合、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソールをアスコルビン酸含有液では数か月保管時に減少が見られ、アスコルビン酸無添加の方がより長期間安定であったが、冷凍保管の場合は、アスコルビン酸含有、非含有によらず長期間安定であったとの報告がある^{文献3)}。
- 16) ブチルヒドロキシアニソールは、蛍光検出器付液体クロマトグラフを用い、励起波長 280nm、蛍光波長 325nm で測定することができる²⁴⁾。蛍光検出器は、紫外可視吸光度検

出器に比較してブチルヒドロキシアニソールの検出感度が高いので、検量線用標準溶液の濃度範囲（5～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で直線性が得られない場合は、検量線用標準溶液及び試験溶液を0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾で、適宜、希釈してもよい。蛍光検出器付液体クロマトグラフによるクロマトグラムの一例を注図1に示す。また、ブチルヒドロキシアニソールに比べて感度は低い、ジブチルヒドロキシルエンは励起波長 285nm、蛍光波長 317nm で、没食子酸プロピルは励起波長 274nm、蛍光波長 365nm で測定することもできる²⁴⁾。



PG：没食子酸プロピル、TBHQ：*tert*-ブチルヒドロキノン、
BHA：ブチルヒドロキシアニソール、BHT：ジブチルヒドロキシルエン

注図1 蛍光検出器付液体クロマトグラフによるクロマトグラム

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm ）

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm、

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$ 、流速：0.2mL/分、注入量：5 μL

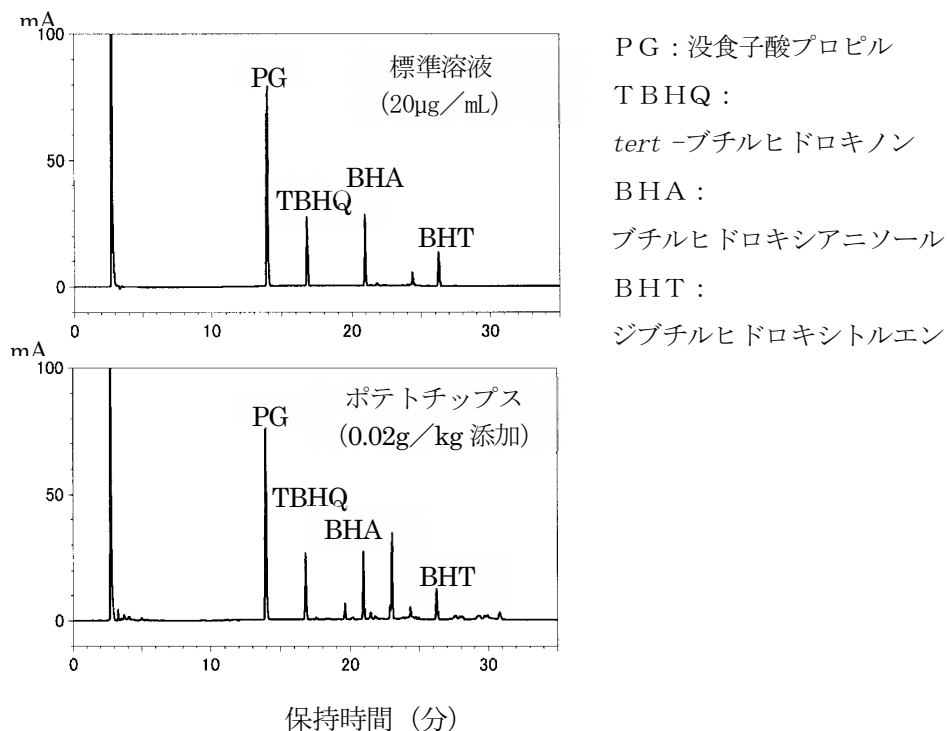
移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件		
時間(分)	A (%)	B (%)
0	20	80
5	20	80
20	90	10
35	90	10

検出器：蛍光検出器（励起波長：280nm、蛍光波長：325nm）

- 17) 分析の際は、ジブチルヒドロキシルエン等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。
- 18) 移動相B液として、0.2vol%酢酸溶液を用いることもできる。ただし、各ピークの保持時間が数分程度長くなる傾向がある。
- 19) 各試料を分析終了後ごとに移動相Aのみをしばらく流すことにより、油脂成分を溶出することができる。また、移動相を初期状態に戻した後、初期移動相を流してカラムの安定化を行った後、次の分析を行う。
- 20) 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。
- 21) 試験溶液中のジブチルヒドロキシルエン等の濃度が高く、検量線の濃度範囲を逸脱する場合は、試験溶液を0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノール¹²⁾で適宜希釈して定量をやり直し、計算式に希釈倍率を乗じて含量を求める。
- 22) 本法による液体クロマトグラムの一例を注図2に示す。



注図2 紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラムによるクロマトグラム

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm）、カラム温度：40℃

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm、流速：0.2mL/分、注入量：5 μL

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	20	80
5	20	80
20	90	10
35	90	10

検出器：紫外可視吸光光度検出器（280nm）

23) 本法の添加回収試験結果を注表 1～注表 3 に示す。

注表 1 ジブチルヒドロキシトルエンの各種食品での添加回収率（n = 5）

食品	添加量 ²⁵⁾ (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
バター	0.02	81	4.2
オリーブ油	0.02	84	5.0
ポテトチップス	0.02	96	9.2
煮干し	0.02	96	6.6

注表 2 ブチルヒドロキシアニソールの各種食品での添加回収率（n = 5）

食品	添加量 ²⁵⁾ (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
バター	0.02	91	4.7
オリーブ油	0.02	88	5.7
ポテトチップス	0.02	99	6.0
煮干し	0.02	94	7.3

注表 3 没食子酸プロピルの各種食品での添加回収率（n = 5）

食品	添加量 ²⁵⁾ (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
バター	0.02	96	3.6
オリーブ油	0.02	95	4.9
ポテトチップス	0.02	98	7.0
煮干し	0.02	78	13.0

24) 0.1w/v%アスコルビン酸含有メタノールの代わりにメタノールを用いた分析法Bで、0.02 g/kg の濃度²⁵⁾でのジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール及び

没食子酸プロピルの添加回収試験（2名、n = 3 × 3日）をしたところ、紫外可吸光光度検出器での検出による真度は、なたね油で 86～96%、クラッカーで 89～93%、蛍光検出器での検出による真度は、なたね油で 85～99%、クラッカーで 89～96%、煮干しで 71～92%であった。なお、この時の測定条件を以下に示す。

<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm）、流速：1.0mL/分

カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm、カラム温度：40℃、注入量：5 μL

移動相：A液 アセトニトリル/メタノール混液（1：1）

B液 5 vol%酢酸溶液

グラジエントの条件

時間(分)	A (%)	B (%)
0	40	60
20	95	5
35	95	5

検出器：(A) 紫外可視吸光光度検出器（測定波長 280nm）

(B) 蛍光検出器

ジブチルヒドロキシルエン（励起波長：285nm、蛍光波長：317nm）

ブチルヒドロキシアニソール（励起波長：280nm、蛍光波長：325nm）

没食子酸プロピル（励起波長：274nm、蛍光波長：365nm）

25) ジブチルヒドロキシルエン等は、酸化還元性の分解しやすい化合物で、低濃度では容易に分解するため、低濃度の添加では良好な回収率が得られない。また、酸化した食品に添加すると良好な回収率が得られない。精度管理では、0.02 g/kg の標準添加濃度で添加回収試験を実施する。

[文献]

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2020、367（2020）、金原出版
- 2) 山田真記子ら：食衛誌、**34**、535（1993）
- 3) 見上葉子ら：食衛誌、**63**、12（2022）