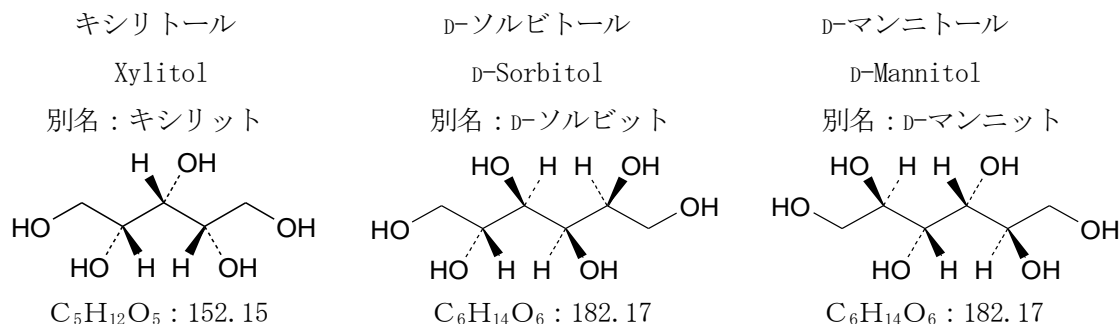


甘味料等

## キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトール

Xylitol, D-Sorbitol and D-Mannitol



## 1. 分析法の概要

食品中のキシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールは、水または80%エタノールにより抽出し、液体クロマトグラフィーにより定量する<sup>1)</sup>。(2024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

## ① 液状試料

試料約5gをビーカーに精密に量り、水40mLでビーカーを洗いながらメスフラスコに移す。エタノール50mLを加えてよく混合した後、水を加えて正確に100mLとし、メンブランフィルター(0.45 $\mu$ m)でろ過したものを試験溶液とする。

## ② 固形試料

試料約5gを遠心管に精密に量り、温湯15mLを加えた後、5分間超音波処理を行う。エタノール50mLを加えて混合した後、遠心(5分間、3000回転/分)を行う。上清をメスフラスコに移し、沈殿物に水20mLを加えた後、同様に操作し、上清をメスフラスコに合わせる。水を加えて正確に100mLとし、メンブランフィルター(0.45 $\mu$ m)でろ過<sup>2)</sup>したものを試験溶液とする。

## ③ タンパク食品、油脂食品

試料約5gを遠心管に精密に量り、80%エタノール40mLを加えた後、5分間超音波処理を行う。氷水中で10分間冷却した後、遠心(5分間、3000回転/分)を行う。上清をメスフラスコに移し、沈殿物に80%エタノール40mLを加えた後、同様に操作し、上清をメスフラスコに合わせる。水を加えて正確に100mLとし、メンブランフィルター(0.45 $\mu$ m)でろ過<sup>2)</sup>したものを

を試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製<sup>3)</sup>

キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトール各 0.100 g を量り、水を加えて正確に 100mL としたものを標準溶液とする（各濃度 1 mg/mL）。標準溶液 1、2.5、5、10mL を正確にとり、エタノール 10mL を加え、水を加えて正確に 20mL とし、検量線用標準溶液とする。（各濃度 0.05~0.5mg/mL）。

(4) 測定法

① 測定条件<sup>4)</sup>

示差屈折検出器付液体クロマトグラフにより、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：スルホン酸型ポリスチレン系カチオン交換樹脂（粒径 5~10 $\mu$ m）

カラム管：内径 7.8~8.0mm、長さ 300mm

カラム温度：50~80 $^{\circ}$ C

移動相：水

流速：0.4~1.0mL/分

注入量：10 $\mu$ L

② 検量線<sup>5)</sup>

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、キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールの各ピーク面積から各検量線を作成する。

③ 定量<sup>6)</sup>

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたキシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールの各ピーク面積と各検量線から試験溶液中のキシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールの各濃度（mg/mL）を求め、次式によって試料中のキシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールの各含量（g/kg 又は%）を計算する。

$$\text{キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールの各含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100}{W}$$

$$\text{D-マンニトールの含量 (\%)} = \frac{C \times 100}{W \times 10}$$

C：試験溶液中のキシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールの各濃度（mg/mL）

W：試料の採取量（g）

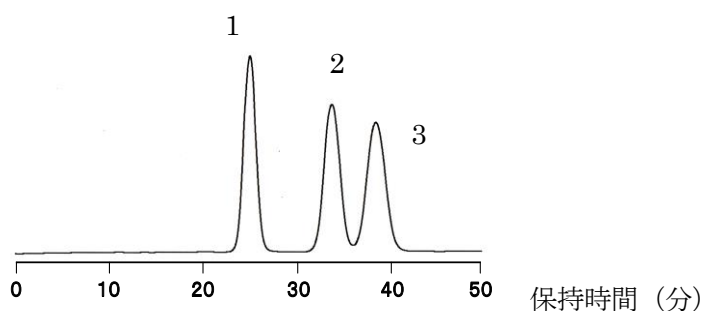
④ 定量限界 1 g/kg

試薬・試液等

1. キシリトール：市販の純度 98%以上のものを用いる。
2. D-ソルビトール：市販の純度 98%以上のものを用いる。
3. D-マンニトール：市販の純度 99%以上のものを用いる。
4. エタノール：エタノール (99.5) [特級]

[注]

- 1) これら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<sup>文献1)</sup>。
- 2) フィルターろ過の際に目詰まりを起こすような場合は、ろ過前に遠心分離して上澄を用いることで、ろ過が容易となる場合もある。ただし、遠心分離操作を追加しても、十分な回収が得られることを確認しておく。
- 3) 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。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。
- 4) 測定条件は例示である。キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールの分離例を注図1に示す。



<測定条件>

カラム充填剤：スルホン酸型ポリスチレン系カチオン交換樹脂（粒径 10 $\mu$ m）  
カラム管：内径 8.0mm、長さ 300mm  
カラム温度：50  $^{\circ}$ C  
移動相：水  
流速：0.85mL/分  
検出器：示差屈折検出器

注図1 キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールのクロマトグラム

1：D-マンニトール、2：キシリトール、3：D-ソルビトールいずれも 5mg/mL

- 5) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた水を分析し、水由来の夾雑物がないことを確認する。
- 6) キシリトール、D-ソルビトール、D-マンニトールをオレンジジュース、ヨーグルト、チュ

ーインガム及び牛乳に 10 g/kg 及び 50 g/kg となるように添加したときの回収率はそれぞれ 93~102%、91~101%、97~103%であった。ビスケットについては回収率がいずれも約 75%であったが、抽出操作を 3 回 (40、30、20mL) にすることで、82%以上の回収率が得られた<sup>文献1)</sup>。

また、オレンジジュースに 4 g/kg となるように添加した時の回収率は、キシリトールで 110% (相対標準偏差 5.2%)、D-ソルビトールで 111% (相対標準偏差 2.9%)、D-マンニトールで 99% (相対標準偏差 1.4%) (いずれも n=5 の平均) であった。

また、キシリトール、D-ソルビトール、D-マンニトールを 4 g/kg となるように添加した時の回収率は、スポーツドリンクではそれぞれ 100% (相対標準偏差 2.5%)、96% (相対標準偏差 3.4%)、100% (相対標準偏差 2.2%)、固形栄養調整食品ではそれぞれ 92% (相対標準偏差 4.7%)、92% (相対標準偏差 6.7%)、91% (相対標準偏差 5.3%)、チョコレートではそれぞれ 94% (相対標準偏差 3.3%)、91% (相対標準偏差 4.5%)、90% (相対標準偏差 1.8%) であった。(いずれも n=6 の平均)

#### [文献]

- 1) 新藤哲也ら：食衛誌、54、358 (2013)

## 参考

### キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトール確認分析法

#### 1. 分析法の概要

食品中のキシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールは、液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う。(2024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

##### (2) 試験溶液の調製

##### (3) 検量線用標準溶液の調製

上記(1)～(3)については、キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトール分析法を準用する。

##### (4) 測定法

###### ① 測定条件<sup>1)</sup>

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：アミノプロピルシリル化シリカゲル(粒径2.0～5.0 $\mu$ m)

カラム管：内径2.0～2.1mm、長さ100～150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル/水混液(9：1)

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI(-)、ESI(+)

検出法：スキャン( $m/z$  100～250)及び選択イオン検出(SIM)

主なイオン<sup>2)</sup>：

キシリトール：ESI(-)  $m/z$  151、ESI(+) $m/z$  175

D-ソルビトール：ESI(-)  $m/z$  181、ESI(+) $m/z$  205

D-マンニトール：ESI(-)  $m/z$  181、ESI(+) $m/z$  205

注入量：1 $\mu$ L

###### ② 定性<sup>3)</sup>

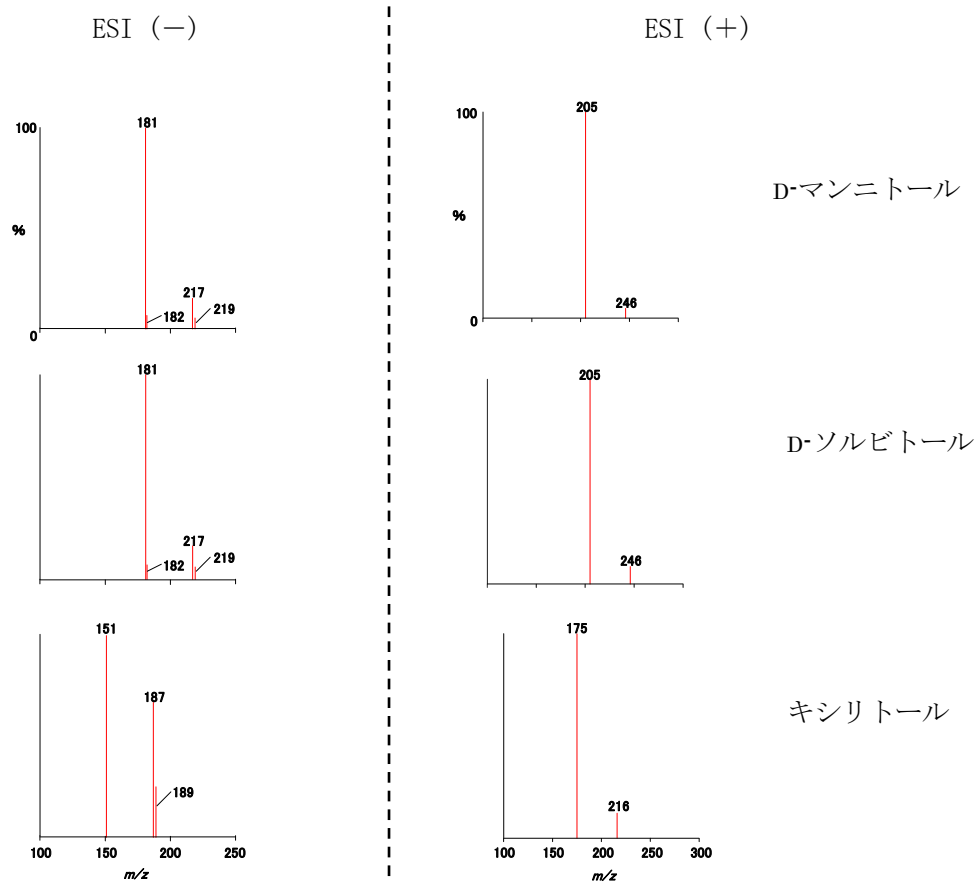
試験溶液及び標準溶液をLC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上に検出された各ピークの保持時間が標準溶液の各ピークと一致すること、及び試験溶液の各ピークのマスペクトルの主要ピークの強度比が標準溶液の各ピークの場合と一致することを確認する。

試薬・試液等

1. キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトール分析法の試薬・試液等を準用する。
2. アセトニトリル：[液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 測定条件は例示である。キシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトールの検量線用標準溶液（各濃度 1 mg/mL）のマススペクトルを注図 1 に示す。
- 2) ESI（-）の  $m/z$  151 及び 181 は各物質の  $[M-H]^-$ 、ESI（+）の  $m/z$  175 及び 205 は各物質の  $[M+Na]^+$  に相当する。測定機器により検出に適した主なイオンが異なる場合もある。予め標準溶液を用いて確認する。
- 3) 本法による確認限度はキシリトール、D-ソルビトール、D-マンニトールのいずれも 1 g/kg である。



注図 1 液体クロマトグラフィー質量分析によるキシリトール、D-ソルビトール及びD-マンニトール（各濃度 1 mg/mL）のマススペクトル

<測定条件>

カラム充填剤：アミノプロピルシリル化シリカゲル（粒径 3.0 $\mu$ m）

カラム管：内径 2.0mm、長さ 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル／水混液（9：1）

流速：0.2mL／分

イオン化モード：ESI（-）、ESI（+）

キャピラリー電圧：3.0kV

コーン電圧：30V（キシリトールのESI（-）20V）

主なイオン：

キシリトール：ESI（-） $m/z$  151、187、ESI（+） $m/z$  175、216

D-ソルビトール：ESI（-） $m/z$  181、217、ESI（+） $m/z$  205、246

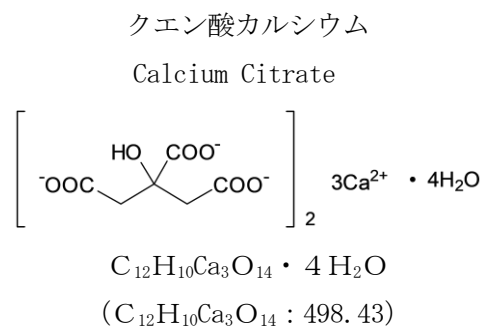
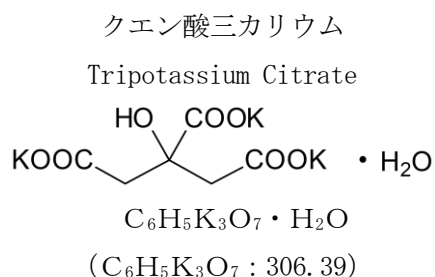
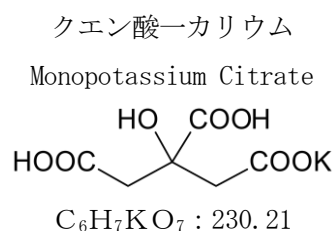
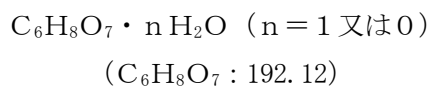
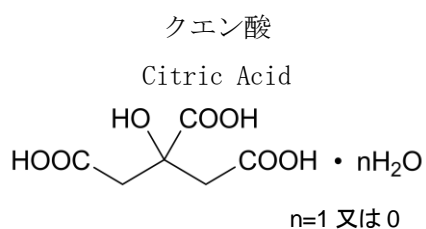
D-マンニトール：ESI（-） $m/z$  181、217、ESI（+） $m/z$  205、246

注入量：5 $\mu$ L

調味料等

クエン酸、コハク酸、酢酸、酒石酸、乳酸、フマル酸、リンゴ酸及び

## それらの塩類

Citric Acid, Succinic Acid, Acetic Acid, Tartaric Acid, Lactic Acid,  
Fumaric Acid, Malic Acid and Those Salts

クエン酸第一鉄ナトリウム  
Sodium Ferrous Citrate  
別名：クエン酸鉄ナトリウム

クエン酸鉄  
Ferric Citrate

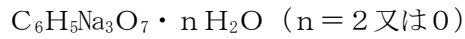
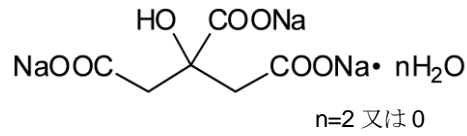
クエン酸鉄アンモニウム  
Ferric Ammonium Citrate



クエン酸三ナトリウム

Trisodium Citrate

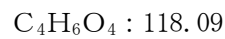
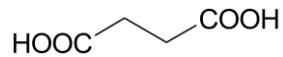
別名：クエン酸ナトリウム



( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  : 258.07)

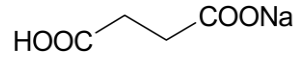
コハク酸

Succinic Acid



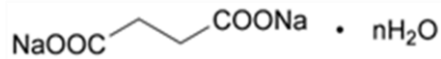
コハク酸一ナトリウム

Monosodium Succinate

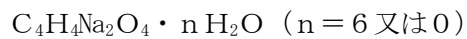


コハク酸二ナトリウム

Disodium Succinate



n=6 又は 0

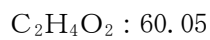
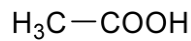


( $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$  : 162.05)

酢酸 (氷酢酸)

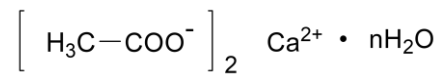
Acetic Acid

(Glacial Acetic Acid)

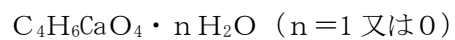


酢酸カルシウム

Calcium Acetate



n=1 又は 0



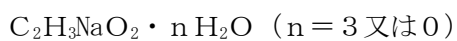
( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$  : 158.17)

酢酸ナトリウム

Sodium Acetate



n=3 又は 0

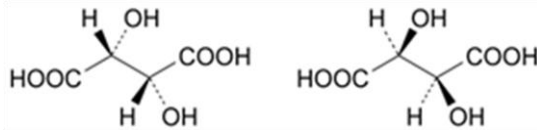


( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$  : 82.03)

DL-酒石酸

DL-Tartaric Acid

別名：dl-酒石酸

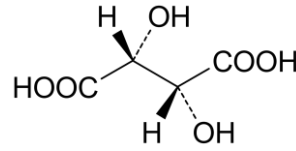


$C_4H_6O_6$  : 150.09

L-酒石酸

L-Tartaric Acid

別名：d-酒石酸



$C_4H_6O_6$  : 150.09

DL-酒石酸カリウム

Dipotassium DL-Tartrate

別名：dl-酒石酸カリウム

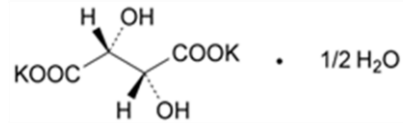


$C_4H_4K_2O_6$  : 226.27

L-酒石酸カリウム

Dipotassium L-Tartrate

別名：d-酒石酸カリウム



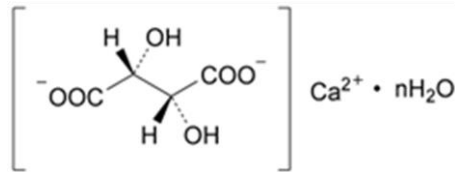
$C_4H_4K_2O_6 \cdot 1/2 H_2O$  : 235.28

( $C_4H_4K_2O_6$  : 226.27)

L-酒石酸カルシウム

Calcium L-Tartrate

別名：d-酒石酸カルシウム



n=2 又は 4

$C_4H_4CaO_6 \cdot n H_2O$  (n = 2 又は 4)

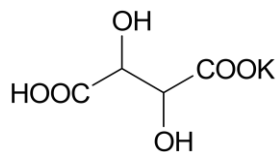
( $C_4H_4CaO_6$  : 188.15)

DL-酒石酸水素カリウム

Potassium DL-Bitartrate

別名：dl-酒石酸水素カリウム

DL-重酒石酸カリウム



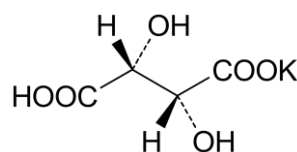
$C_4H_5KO_6$  : 188.18

L-酒石酸水素カリウム

Potassium L-Bitartrate

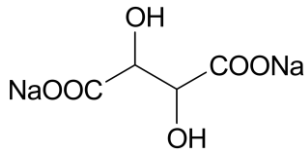
別名：d-酒石酸水素カリウム

L-重酒石酸カリウム



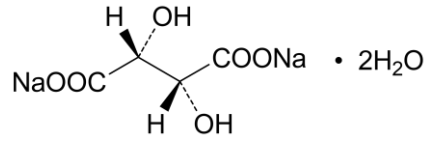
$C_4H_5KO_6$  : 188.18

DL-酒石酸ナトリウム  
 Disodium DL-Tartrate  
 別名：dl-酒石酸ナトリウム



$C_4H_4Na_2O_6$  : 194.05

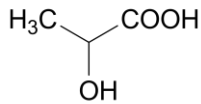
L-酒石酸ナトリウム  
 Disodium L-Tartrate  
 別名：d-酒石酸ナトリウム



$C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$

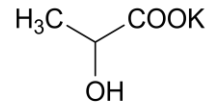
( $C_4H_4Na_2O_6$  : 194.05)

乳酸  
 Lactic Acid



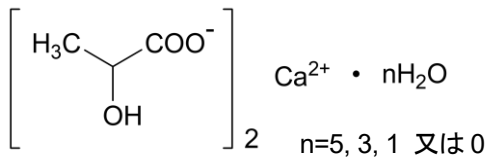
$C_3H_6O_3$  : 90.08

乳酸カリウム  
 Potassium Lactate  
 別名：乳酸カリウム液



$C_3H_5KO_3$  : 128.17

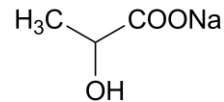
乳酸カルシウム  
 Calcium Lactate



$C_6H_{10}CaO_6 \cdot nH_2O$  (n = 5, 3, 1 又は 0)

( $C_6H_{10}CaO_6$  : 218.22)

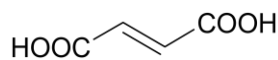
乳酸ナトリウム  
 Sodium Lactate  
 別名：乳酸ナトリウム液



$C_3H_5NaO_3$  : 112.06

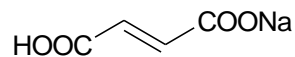
乳酸鉄  
 Iron Lactate

フマル酸  
 Fumaric Acid



$C_4H_4O_4$  : 116.07

フマル酸一ナトリウム  
 Monosodium Fumarate  
 別名：フマル酸ナトリウム



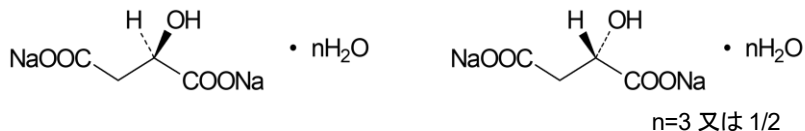
$C_4H_3NaO_4$  : 138.05

DL-リンゴ酸  
DL-Malic Acid  
別名：DL-リンゴ酸



$C_4H_6O_5$  : 134.09

DL-リンゴ酸ナトリウム  
Sodium DL-Malate  
別名：DL-リンゴ酸ナトリウム



$C_4H_4Na_2O_5 \cdot n H_2O$  (n = 3 又は 1 / 2)

( $C_4H_4Na_2O_5$  : 178.05)

## 1. 分析法の概要

食品中の有機酸及びそれらの塩類（クエン酸及びその塩類<sup>1)</sup>、コハク酸及びその塩類<sup>2)</sup>、酢酸（氷酢酸）及びその塩類<sup>3)</sup>、DL-酒石酸、L-酒石酸及びその塩類<sup>4)</sup>、乳酸及びその塩類<sup>5)</sup>、フマル酸及びフマル酸一ナトリウム<sup>6)</sup>並びに DL-リンゴ酸及び DL-リンゴ酸ナトリウム<sup>7)</sup>）は、過塩素酸で抽出し、液体クロマトグラフィーにより各有機酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じてそれぞれの塩類の量として求める。食品中には、天然の有機酸が分布している。したがって、定量値は、食品由来のものと添加されたものとの合計値である。(2024 統合設定)

## 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

試料約 5 g を精密に量り、5%過塩素酸 5 mL 及び水 30 mL を加え、10 分間振とう抽出又はホモジナイズ抽出<sup>8)</sup>した後、水を加えて正確に 50 mL とする。これをろ過<sup>9)</sup>し、ろ液を試験溶液とする。

### (3) 検量線用標準溶液の調製<sup>10)、11)</sup>

クエン酸三ナトリウム・二水和物 0.1531 g、コハク酸 0.1000 g、酢酸ナトリウム（無水物）0.1366 g、酒石酸ナトリウム・二水和物 0.1533 g、乳酸リチウム（105℃で4時間乾燥したもの）0.1066 g、フマル酸 0.1000 g 及びリンゴ酸 0.1000 g を量り、それぞれ水に溶かして正確に 50mL とし、標準溶液とする（濃度 各有機酸として 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。それぞれの標準溶液 1、5、10mL 及び 20mL を正確にとり、水を加えて正確に 200mL とし、検量線用標準溶液とする（濃度 各有機酸として 10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

#### (4) 測定法<sup>12)</sup>

##### ① 測定条件<sup>13)、14)</sup>

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：スルホン化スチレンージビニルベンゼン（有機酸分析専用カラム<sup>15)</sup>）

カラム管：内径 6.0~8.0mm、長さ 300~500mm

カラム温度：40℃

移動相：3mmol/L 過塩素酸

流速：1.0mL/分

測定波長：220nm

注入量：10 $\mu\text{L}$

##### ② 検量線<sup>16)</sup>

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

##### ③ 定量<sup>17~20)</sup>

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積又はピーク高さから検量線によって試験溶液中の各有機酸濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を求め、次式によって試料中の各有機酸含量（g/kg）を計算する。

$$\text{各有機酸含量 (g/kg)} = \frac{C \times 50}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の各有機酸濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

W：試料の採取量（g）

クエン酸一カリウム含量（g/kg）= クエン酸含量（g/kg） $\times$  1.198

クエン酸三カリウム含量（g/kg）= クエン酸含量（g/kg） $\times$  1.595

クエン酸カルシウム含量（g/kg）= クエン酸含量（g/kg） $\times$  1.297

クエン酸三ナトリウム含量（g/kg）= クエン酸含量（g/kg） $\times$  1.343

コハク酸一ナトリウム含量（g/kg）= コハク酸含量（g/kg） $\times$  1.186

コハク酸二ナトリウム含量（g/kg）= コハク酸含量（g/kg） $\times$  1.372

酢酸ナトリウム含量（g/kg）= 酢酸含量（g/kg） $\times$  1.366

酢酸カルシウム含量 (g/kg) = 酢酸含量 (g/kg) × 1.316

酒石酸カリウム含量 (g/kg) = 酒石酸含量 (g/kg) × 1.508

酒石酸カルシウム含量 (g/kg) = 酒石酸含量 (g/kg) × 1.254

酒石酸水素カリウム含量 (g/kg) = 酒石酸含量 (g/kg) × 1.254

酒石酸ナトリウム含量 (g/kg) = 酒石酸含量 (g/kg) × 1.293

乳酸カリウム含量 (g/kg) = 乳酸含量 (g/kg) × 1.423

乳酸カルシウム含量 (g/kg) = 乳酸含量 (g/kg) × 1.211

乳酸ナトリウム含量 (g/kg) = 乳酸含量 (g/kg) × 1.244

フマル酸一ナトリウム含量 (g/kg) = フマル酸含量 (g/kg) × 1.189

リンゴ酸ナトリウム含量 (g/kg) = リンゴ酸含量 (g/kg) × 1.328

④ 定量限界 各有機酸として 0.1 g/kg<sup>21)</sup>

#### 試薬・試液等

1. クエン酸三ナトリウム二水和物：[特級]
2. コハク酸：市販の純度 99%以上のものを用いる。
3. 酒石酸ナトリウム・二水和物：(+) 一酒石酸ナトリウム二水和物 [特級]
4. 乳酸リチウム：市販の純度 95%以上のものを用いる<sup>22)</sup>。
5. 酢酸ナトリウム（無水物）：[特級]
6. フマル酸：市販の純度 98%以上のものを用いる。
7. リンゴ酸：市販の純度 98%以上のものを用いる。（UV波長 220nm 測定時に、DL-リンゴ酸からフマル酸と近似の溶出時間に不純物が検出されることがあるため、不純物が検出されないことを事前に確認する。）
8. 過塩素酸（60%）：[特級、60%]
9. 5%過塩素酸：過塩素酸（60%）8.3mL をとり、水を加えて 100mL とする。
10. 3mmol/L 過塩素酸：過塩素酸（60%）3.3mL をとり、水を加えて 1000mL とし、この溶液 100mL に水を加えて 1000mL とする。

#### [注]

- 1) クエン酸は、かんきつ類などをはじめとして多くの食品に存在する代表的な食用の有機酸で、さわやかな強い酸味がある。普通の酸味を付ける目的で使用される「酸味料」としては一番多く使われる酸である。工業的には、デンプン類を原料として発酵法によって作られたクエン酸を精製して作られる。食品添加物としては、菓子類や乳製品などにも酸味を付けたり、酸度を調整する目的で使用されるが、その使用の主体は、清涼飲料水をはじめとする飲料での酸味・酸度の調整目的になっている。また、酸化防止剤や保存料と併用すると、酸化防止の効果や保存性を強くする作用があるため、これらの食品添加物の補助剤（シネルギスト）としても使われている。主に酸味料として使用されるクエン酸塩類に

は、クエン酸一カリウム、クエン酸三カリウム、クエン酸カルシウム、クエン酸三ナトリウムがあるが、クエン酸第一鉄ナトリウム、クエン酸鉄、クエン酸鉄アンモニウムも本法の測定対象に含まれる。

- 2) コハク酸は、貝類の旨味成分の酸としてよく知られている有機酸で、貝類をはじめとする動植物に広く存在しているものである。食品添加物のコハク酸は、通常、マレイン酸などを原料とする化学的な合成によって得られており、独特な酸味と旨味がある。清酒や合成酒、みそ、しょう油などの味（酸味・旨味）の調整に使われているが、独特な味のために、酸味料としての使用より、酸味を持つ調味料として使われることが多いことが特徴である。
- 3) 酢酸（氷酢酸）及び酢酸ナトリウムは、食品に対しては、酸味・酸度の調整の目的でソース類、マヨネーズなどの酸性調味料食品、酢漬け、水産ねり製品、パンなどに使用される。また、酢酸（氷酢酸）と酢酸ナトリウムは、併用して酢酸の味をまろやかにしたり、日持ちを向上させたりする目的などにも使用されている。日持ち向上の目的は、ねり製品やパンなどに使用されている。なお、酢酸カルシウムも本法の測定対象に含まれる。
- 4) 酒石酸は、代表的な食品用の有機酸の一つで、やや渋みを伴った酸味がある。自然界では、ぶどうなどの植物を中心に広く常駐している。食品では、ワインの中に多く含まれており、ときにはそのカリウム塩が酒石として沈殿を生じることがよく知られている。食品には、単独又はその塩類と併用されて酸味の付与や酸度・pHの調整の目的で使用され、また商品の風味の調整にも使用される。
- 5) 乳酸は、多くの動物、イネなどの植物の組織に存在する酸で、ヨーグルトや乳酸飲料などの乳の発酵物に多量に含まれるなど自然界に広く常駐する有機酸である。食品添加物としては、主に酸味を付けたり、酸度・pHを調整する目的で清涼飲料水や漬物をはじめ、さまざまな食品に使用されている。とくに清酒の製造では、主要な原材料の一つとして、明治時代から使われてきている。主に酸味料として使用される乳酸塩類には、乳酸カリウム、乳酸カルシウム、乳酸ナトリウムがあるが、乳酸鉄も本法の測定対象に含まれる。
- 6) フマル酸は、クエン酸などの他の有機酸類と併用して酸味の調整に使われることがほとんどであり、また、水溶性のナトリウム塩が使われることが一般的である。ジュース類や清涼飲料水などの飲料、冷菓やゼリー菓子、漬物などに酸味料として他の有機酸類との併用などで使用され、洋酒類での酸味・酸度の調整にも使用されている。
- 7) リンゴ酸は、リンゴをはじめとするいろいろな果実類を中心に、動植物に広く存在する有機酸の一つである。食品添加物のリンゴ酸は、マレイン酸を原料とする化学的な合成方法で作られている。通常は、特有の酸味がある白色の粉末又は結晶となっている。天然系と称するL-リンゴ酸は、発酵法や酵素法で作りが得るが、既存添加物名簿に記載されておらず、食品添加物としては使用できない。リンゴ酸及びリンゴ酸ナトリウムは、いずれも水に溶けるため、求める効果を発揮しやすい方が選ばれて使われている。リンゴ酸は、いろいろなリンゴ加工食品をはじめとして清涼飲料水や飴菓子、マーガリン、マヨネーズな

どの酸味や酸度の調整の目的で使用されている。

- 8) 試料が肉、魚及び野菜などの場合は、ホモジナイザーを用いて粉碎抽出する。

波長 220nm での測定時は、固体試料の場合マトリックスの影響でベースラインが上がり、測定不能になることがある。また、波長 220nm での測定は、有機酸以外の物質も検出しやすく、液体試料や含まれる有機酸が分かっている場合は有用であるが、加工品や発酵食品等では有機酸以外の妨害ピークとの判別が困難である。後述するポストカラム誘導体化検出法<sup>12)</sup>を併用するとよい。

試験溶液の調製は、ほぼ過塩素酸水溶液での希釈のみであることから、試料採取量を少なくするか、定容量を大きくしたほうが良好な結果が得られる可能性が高い。ただし、この場合、定量限界濃度が高くなるため、結果の読取り時は留意する。試料によっては後述する固相抽出カラムによる精製<sup>17)</sup>が有効な場合もある。

- 9) 例えば、ろ紙として日本産業規格の 5 B 又は同等品が使用できる。

- 10) 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。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) 分離状況に応じて、各有機酸を混合してもよいが、クエン酸及び酒石酸並びにコハク酸、乳酸及びフマル酸の溶出時間が近い場合、二種類以上のグループに分けるとよい。

例) A グループ：クエン酸、コハク酸、フマル酸及び酢酸

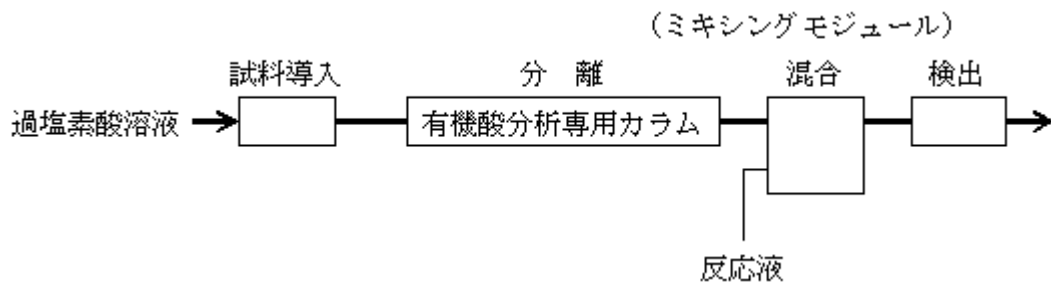
B グループ：酒石酸、リンゴ酸及び乳酸

また、波長 220nm での測定時は、フマル酸は他の有機酸に比べ高感度なため、フマル酸標準溶液はさらに 1 mL を正確にとり、水を加えて正確に 200mL とし、それぞれの標準溶液 1、5、10mL 及び 20mL を正確にとり、水を加えて正確に 200mL とし、検量線用標準溶液とする。濃度はフマル酸 0.05～1 µg/mL (各有機酸 10～200 µg/mL)。

- 12) 他の測定法としてカラム溶出液と反応液とをミキシングモジュールで混合し、有機酸(酸性物質)が溶出するときに示す発色を紫外可視吸光光度検出器で検出するポストカラム誘導体化検出法がある。試料中の有機酸成分は、過塩素酸溶液を移動相とした有機酸専用分析カラムにより分離され溶出する。

一方、反応液中の pH 指示薬は塩基性の状態、すなわち解離状態 ( $I^- + H^+$ ) に調整しておく。この反応液とカラム溶出液とをミキシングモジュールで混合させると酸性成分は、解離状態 ( $AH \rightarrow A^- + H^+$ ) となる。このとき、溶液の pH は、酸性側にかたより、pH 指示薬は  $I^- + H^+ \rightarrow IH$  の反応により発色する。





ポストカラム誘導体化検出法の測定条件を下記に示す<sup>文献1)</sup>。

カラム：スルホン化スチレンージビニルベンゼンカラム（有機酸分析専用カラム<sup>15)</sup>）、内径 8 mm、長さ 500mm

移動相：3 mmol/L 過塩素酸

反応液：0.2 mmol/L ブロムチモールブルー含有 15 mmol/L リン酸水素ニナトリウム

流速 移動相 1.0 mL/分、反応液 1.4 mL/分；カラム温度 40℃；ミキシングモジュール温度 室温；測定波長 445 nm；注入量 10 μL

13) 他の測定条件として下記の条件も使用できる。

①カラム スチレンポリマー系陽イオン交換カラム（有機酸分析専用カラム）、内径 7.8 mm、長さ 300 mm；カラム温度 40℃；移動相 0.75 mmol/L 硫酸；流速 0.8 mL/分；測定波長 220 nm；注入量 10 μL

②カラム オクタデシルシリル化シリカゲルカラム、内径 4.6 mm、長さ 250 mm；カラム温度 40℃；移動相 0.1% リン酸；流速 0.7 mL/分；測定波長 220 nm；注入量 10 μL

14) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量などを調整する。分析の際は、各有機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。

15) H<sup>+</sup>型の強陽イオン交換カラムであり、イオン排除、サイズ分離、分配・吸着の混合分離モードにより分離する。移動相には、過塩素酸のような酸性溶液を用いると、有機酸は解離が抑制され、相対的に親水性が低くなるため、逆相的にカラムに保持される。また、同じカラムを2本直列に連結して分析することにより、各有機酸のピーク分離を向上させることができる。

16) 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。

17) 有機酸以外の妨害ピークが多く有機酸の定量が困難な試料の場合、固相抽出カラムを用いた精製が有効な場合がある。以下に操作例を示す。ただし、フマル酸及び本法で同時に分析可能なアジピン酸<sup>20)</sup>はこの操作によりピークが消失するため、固相抽出カラム処理の適用対象外である。また、添加回収率が乳酸では50～60%台、酢酸では30%前後となり、他の有機酸も対象食品によっては添加回収率の低下がみられる場合もあったことから、本体法で夾雑ピークの重なり等で定量が困難な有機酸に限り、対象食品での回収率を確認した上で補足的に固相抽出処理を行うとよい。

試料約 5 g を精密に量り、水 20mL を加えて 10 分間振とう抽出又はホモジナイズ抽出した後、水を加えて正確に 50mL とする。これを遠心分離後ろ過し、ろ液 500 $\mu$ L に 2%アンモニア水 1500 $\mu$ L を加え試料溶液とする。

強陰イオン交換ー逆相ミックスマード固相抽出カラムをメタノール 1 mL と水 1 mL でコンディショニングした後、試料溶液 2 mL のうち 1 mL を負荷し、メタノール 1 mL と水 1 mL でカラムを洗浄した後、6%硫酸溶液 1 mL で溶出した溶出液を試験溶液とする。みそ等の発酵食品の場合は、強陰イオン交換ー逆相ミックスマード固相抽出カラムをメタノール 2 mL と水 2 mL でコンディショニングした後、試料溶液 2 mL を負荷し、メタノール 2 mL と水 2 mL でカラムを洗浄した後、6%硫酸溶液 5 mL で溶出した溶出液を試験溶液とする。

18) 本法では、操作の煩雑さ軽減のため、試料体積を含めて定容し、その定容量を含量計算で乗じている。そのため、固体試料等では抽出液量に乗じた値より数%~10%程度高い定量値となる場合があり、添加回収率が 100%を越えて高い場合には、この点が要因の一つとして考えられる。

19) 本法による添加回収率の結果の例を以下に示す。

緑茶	固層カラム処理 <sup>17)</sup> なし (n = 3)			固層カラム処理 <sup>17)</sup> あり (n = 5)		
	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
クエン酸	1	106	0.6	0.8	114	1.7
コハク酸	1	131*1	0.6	1.6	92.8	6.6
酢酸	1	104	0.6	1.6	37.7	2.2
酒石酸	1	108	0.6	0.8	108	1.1
乳酸	1	102	0.6	0.8	66.7	3.7
フマル酸	0.005	104	0.5			
リンゴ酸	1	103	0.6	0.8	104	0.8
アピロン酸	1	104	2.6			

\*1: 夾雑ピークの重なりを含む、斜線: 対象外

ビスケット	固層カラム処理 <sup>17)</sup> なし (n = 3)			固層カラム処理 <sup>17)</sup> あり (n = 5)		
	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
クエン酸	1	101	1.1	0.8	104	2.7
コハク酸	1	84.7	1.8	1.6	102	1.9
酢酸	1	80.3	0.4	1.6	32.9	1.9
酒石酸	1	107	0.8	0.8	116	1.6
乳酸	1	104	0.2	0.8	59.0	3.7

フマル酸*1	0.005	85.1	25			
リンゴ酸*2	1	98.4	0.9	0.8	96.2	4.1
アジピン酸	1	82.8	0.9			

\*1: 10倍希釈して測定、 \*2: 2倍希釈して測定、 斜線: 対象外

みそ	固層カラム処理 <sup>17)</sup> なし (n=3)			固層カラム処理 <sup>17)</sup> あり (n=5)		
	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
クエン酸	1	73.1	7.4	0.1	70.1	12
コハク酸	1	-	-	0.2	47.4	30
酢酸	1	69.7	4.9	0.2	36.1	3.5
酒石酸	1	-	-	0.1	116	3.4
乳酸	1	84.9	1.5	0.1	51.6	4.5
フマル酸	0.005	77.3	4.4			
リンゴ酸	1	-	-	0.1	58.5	9.4
アジピン酸	1	-	-			

-: 夾雑ピークの影響で有機酸の同定・定量困難、 斜線: 対象外

ドレッシング	固層カラム処理 <sup>17)</sup> なし (n=3)			固層カラム処理 <sup>17)</sup> あり (n=5)		
	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
クエン酸	1	101	3.8	0.8	54.5*1	46
コハク酸	1	-	-	1.6	21.0	6.4
酢酸	1	96.7	17	1.6	24.7	57
酒石酸	1	134	0.8	0.8	-*1	-
乳酸	1	94.4	2.2	0.8	56.0	13
フマル酸	0.005	92.9	2.5			
リンゴ酸	1	-	-	0.8	83.0	1.0
アジピン酸	1	-	-			

-: 夾雑ピークの影響で有機酸の同定・定量困難、 \*1: クエン酸と酒石酸のピーク不分離、  
斜線: 対象外

20) アジピン酸も本法により同時分析が可能である。

21) クエン酸を多く含む試料において酒石酸を分析する場合など、保持時間の近い有機酸の濃度が高く、分離が困難な場合は、試料注入量を1/10~1/20等に減じることで、ピー

クトップが判別できるようになることが多いが、その場合、定量限界濃度は反比例して高くなるため、結果の読取り時は留意する。

- 22) 次の精製法により得られたものを用いても良い。乳酸リチウム約10 gに水20mLを加え、注意して加熱、溶解し、熱時ろ別する。冷後ろ液にアルコール及びエーテルの等容量の混液200mLを加え、乳酸リチウムの白色の結晶あるいは粉末を析出させ減圧下でろ取する。これを105°Cで4時間乾燥し、冷後遮光した容器に密封して保存する。

[文献]

- 1) Wada, A., *et al.* : J. Chromatography, **291**, 111 (1984)

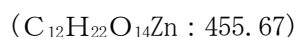
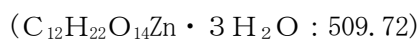
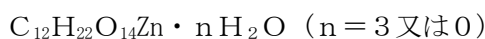
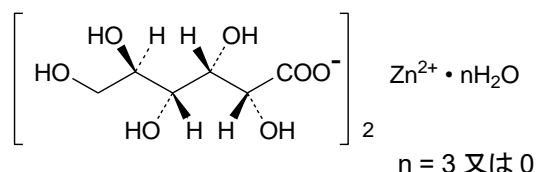
強化剤

## 亜鉛塩類

Zinc Salts

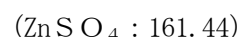
グルコン酸亜鉛

Zinc Gluconate



硫酸亜鉛

Zinc Sulfate



## 1. 分析法の概要

食品中のグルコン酸亜鉛及び硫酸亜鉛は、原子吸光光度法により亜鉛として定量する。必要があれば、分子量比を乗じて亜鉛塩類それぞれの量として求める。食品中には天然の亜鉛が分布している。したがって、定量値は食品由来の亜鉛と添加されたものとの合計値である。(2024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

試料約 4 g (発泡性酒類の場合は、試料約 20 g) を精密に量り、灰化容器<sup>1)</sup>に入れる。これを熱板<sup>2)</sup>上で加熱して炭化させた後、電気炉へ入れて 450～550℃ で灰化する。灰化後、これに塩酸 5 mL を加え、超音波処理を行った後、蒸発乾固するまで熱板上で加熱する。残留物に硝酸 (1→5) 5 mL を加えて溶かし、100 mL のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 100 mL とし、試験溶液とする<sup>3)</sup>。

(3) 検量線用標準溶液の調製<sup>4)</sup>

亜鉛標準原液 1 mL を正確に量り、硝酸 (1→100) を加えて溶かして正確に 100 mL とし、標準溶液とする (濃度 10 µg/mL)。標準溶液を適宜硝酸 (1→100) で正確に希釈し、0.05～1.5 µg/mL の検量線用標準溶液とする。

#### (4) 空試験溶液の調製

水 4 mL (発泡性酒類の空試験溶液の場合は、水 20 mL) 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) 測定法

##### ① 測定条件<sup>5)</sup>

原子吸光度計を用い、次の条件によって測定する。

光源ランプ：亜鉛中空陰極ランプ

分析線波長：213.8 nm

バーナー：スリットバーナー

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<sup>6)</sup>

試験溶液及び空試験溶液につきその吸光度を測定、両者の値の差を求め、その値と検量線から試験溶液中の亜鉛濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を求め、次式によって試料中の亜鉛含量 ( $\text{g}/\text{kg}$ ) を計算する。

$$\text{亜鉛含量 (g/kg)} = \frac{C \times 100}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中の亜鉛濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

W：試料の採取量 (g)

グルコン酸亜鉛 (無水物) 含量 ( $\text{g}/\text{kg}$ ) = 亜鉛含量 ( $\text{g}/\text{kg}$ )  $\times$  6.970

硫酸亜鉛 (七水和物) 含量 ( $\text{g}/\text{kg}$ ) = 亜鉛含量 ( $\text{g}/\text{kg}$ )  $\times$  4.398

##### ④ 定量限界 発泡性酒類以外の場合 亜鉛として 0.005 g/kg

発泡性酒類の場合 亜鉛として 0.00025 g/kg

#### 試薬・試液等

1. 亜鉛標準原液<sup>7)</sup>：市販の原子吸光度分析に適した標準液 (Zn : 1000 mg/L) を用いる。
2. 塩酸：[微量金属測定用]
3. 硝酸：[微量金属測定用]

#### [注]

- 1) 磁製るつぼ、石英製るつぼ、ガラスビーカーなどが利用できる。試験に用いる器具類は、使用前に硝酸 (1→3) で十分洗うか、又は硝酸 (1→3) 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、高度のコンタミネーションがあるため注意する。

- 2) ホットプレートや電熱器等 550°C程度まで加熱できるものを用いる。ただし、試料温度が 550°Cを超えないよう注意する。また、熱板の上から赤外線ランプで加熱してもよい。
- 3) 灰化が不十分な場合は、熱板上での加熱以降の操作を繰り返し、得られた液をメスフラスコに合わせ、水を加えて正確に 100mL とし、試験溶液とする。試験溶液に不溶物が含まれる場合は、必要に応じてろ紙でろ過する。
- 4) 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。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。
- 5) 亜鉛濃度が高すぎる場合は、原子吸光光度計のバーナーヘッドを回転させるか、分析線波長を変更することにより感度を落とし、測定する。または、試験溶液を硝酸 (1→150) で希釈した液を調製し測定する。
- 6) グルコン酸亜鉛を添加した時の回収率は、ゼリーへの亜鉛として 0.0125 g/kg 及び 0.125 g/kg の添加で 93.2%及び 96.1% (相対標準偏差 11.2%及び 1.3%)、粉ミルクへの亜鉛として 0.0125 g/kg 及び 0.0430 g/kg の添加で 102.5%及び 102.0% (相対標準偏差 3.0%及び 1.1%)、タブレット錠剤への亜鉛として 0.0125 g/kg 及び 9.375 g/kg の添加で 79.4~94.7%及び 89.5~103.3% (相対標準偏差 0.7~4.7%及び 0.9~2.1%) (各 n = 5 の平均) であった。

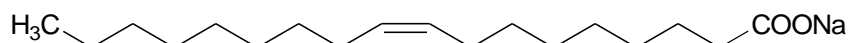
硫酸亜鉛を添加した時の回収率は、粉ミルクへの亜鉛として 0.0125 g/kg 及び 0.0430 g/kg の添加で 95.0%及び 105.6% (相対標準偏差 1.9%及び 2.1%) (n = 5 の平均) であった。タブレット錠剤への 0.0125 g/kg 及び 0.125 g/kg の添加で 95.3~101.4%及び 93.4~98.2% (相対標準偏差 1.7~2.7%及び 0.6~3.6%) (n = 5 の平均) であった。

硫酸亜鉛を発砲性酒類に亜鉛として 0.00025 g/kg 及び 0.0010 g/kg 添加した時の回収率は、74.4%及び 91.2% (相対標準偏差 5.6%及び 11.7%) (n = 5 の平均) であった。
- 7) 金属亜鉛 1.00 g を量り、1 mol/L 硝酸を加えて溶かして正確に 1000mL としたもの (濃度 1000µg/mL) を用いてもよい。

被膜剤

## オレイン酸ナトリウム

Sodium Oleate

 $C_{18}H_{33}NaO_2 : 304.44$ 

## 1. 分析法の概要

食品中のオレイン酸ナトリウムは、メチル化してオレイン酸メチルに変換後、ガスクロマトグラフィーにより定量し、分子量比を乗じてオレイン酸ナトリウムの量として求める。(2024年改正)

## 2. 分析法 (ガスクロマトグラフィー)

## (1) 検体の採取と試料の調製

約 1 kg を精密に量り、細切均一化する<sup>1)</sup>。

## (2) 試験溶液の調製

試料約 10 g<sup>1)</sup>を精密に量り、遠沈管又は共栓付三角フラスコに入れる。これに飽和塩化ナトリウム溶液 2 mL を加え、さらに硫酸 (1→10) 0.5 mL を加えて酸性<sup>2)</sup>とし、エチルエーテル 20 mL を加え、約 5 分間激しく振とうする。

遠心分離 (2 分間, 3000 回転) 後、エチルエーテル層を 100 mL のナス型フラスコ中に無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過する。残った水層にエチルエーテル 20 mL を加え、同様の操作を繰り返す。少量のエチルエーテルで無水硫酸ナトリウムを洗い、洗液をろ液に合わせ、約 40°C の水浴中で減圧乾固する。ナス型フラスコにアセトン約 4 mL を加えて残渣を溶解させ、ナス型フラスコ内をアセトンで洗いながら 10 mL に定容する。ガスクロマトグラフ用サンプル瓶に正確に 1 mL を量りとり、3-(トリフルオロメチル)フェニルトリメチルアンモニウムヒドロキシド 100 µL を加えて速やかにふたを閉め、室温で約 15 分間放置したものを試験溶液とする。

## (3) 検量線用標準溶液の調製

オレイン酸 0.100 g を量り、アセトンを加えて正確に 100 mL としたものを標準原液とする (濃度 1000 µg/mL)。標準原液 1、2、5 mL 及び 10 mL をそれぞれ正確にとり、アセトンを加えて正確に 10 mL とし、標準溶液とする。また標準原液 1 mL 正確にとり、アセトンを加えて正確に 20 mL とし、標準溶液とする。ガスクロマトグラフィー用サンプル瓶に各標準溶液を正確に 1 mL ずつ量りとり、それぞれに 3-(トリフルオロメチル)フェニルトリメチルアンモニウムヒドロキシド



ド 100 $\mu$ L ずつを加えて速やかにふたを閉め、室温で約 15 分間放置したものを検量線用標準溶液とする（濃度 100～1000 $\mu$ g/mL）<sup>3)</sup>。

#### （４）測定法

##### ① 測定条件

ガスクロマトグラフを用い、次の条件によって測定する<sup>4)</sup>。

カラム：内径 0.25 mm、長さ 30m のフューズドシリカ管の内面に 50% シアノプロピル 50% メチルポリシロキサンを 0.25 $\mu$ m の厚さで被覆したもの。

カラム温度：50 $^{\circ}$ C（1 分）、50→180 $^{\circ}$ C（25 $^{\circ}$ C/分、昇温）、180 $^{\circ}$ C（16 分）、180→230 $^{\circ}$ C（15 $^{\circ}$ C/分、昇温）、230 $^{\circ}$ C（5 分）

検出器：水素炎イオン検出器

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

検出器温度：260 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：ヘリウム<sup>5)</sup>

注入方式：スプリット

スプリット比：1：50

注入量：1 $\mu$ L

##### ② 検量線<sup>6, 7)</sup>

検量線用標準溶液をそれぞれガスクロマトグラフに注入し、ピーク面積又はピーク高さから検量線を作成する。

##### ③ 定量<sup>8)</sup>

試験溶液をガスクロマトグラフに注入し、得られたピーク面積またはピーク高さから検量線によって試験溶液中のオレイン酸濃度（ $\mu$ g/mL）を求め、次式によって試料中のオレイン酸ナトリウム含量（g/kg）を計算する。

$$\text{オレイン酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{10 \times C \times 1.078^9}{W} \times \frac{1}{1000}$$

C：試験溶液中のオレイン酸濃度（ $\mu$ g/mL）

W：試料の採取量（g）

##### ④ 定量限界 オレイン酸として 0.1 g/kg

#### 試薬・試液等

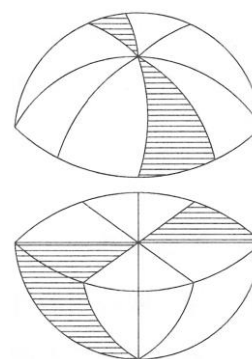
1. オレイン酸：市販のガスクロマトグラフィー用<sup>10)</sup>を用いる。
2. 硫酸：[特級]
3. エチルエーテル：ジエチルエーテル [特級]
4. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]

5. 3- (トリフルオロメチル) フェニルトリメチルアンモニウムヒドロキシド：5%メタノール溶液，市販のガスクロマトグラフィー用誘導体化試薬を用いる。
6. 飽和塩化ナトリウム溶液：塩化ナトリウム 500 g に水 500mL を加え，1 時間かくはんした後，静置し上澄液を分取する。
7. 塩化ナトリウム：[特級]
8. アセトン：[特級]

[注]

- 1) 「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。

かんきつ類の場合は、検体5~10個を選び、8分割法により平均的に250~300gをとり、種子があれば除去してホモジナイズしたものを試料としてもよい。



注図1 試料採取法

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

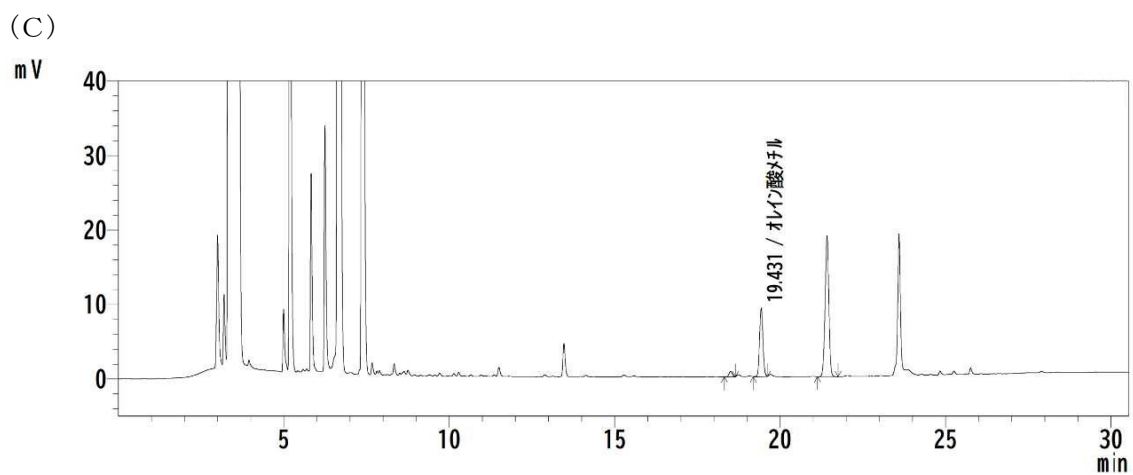
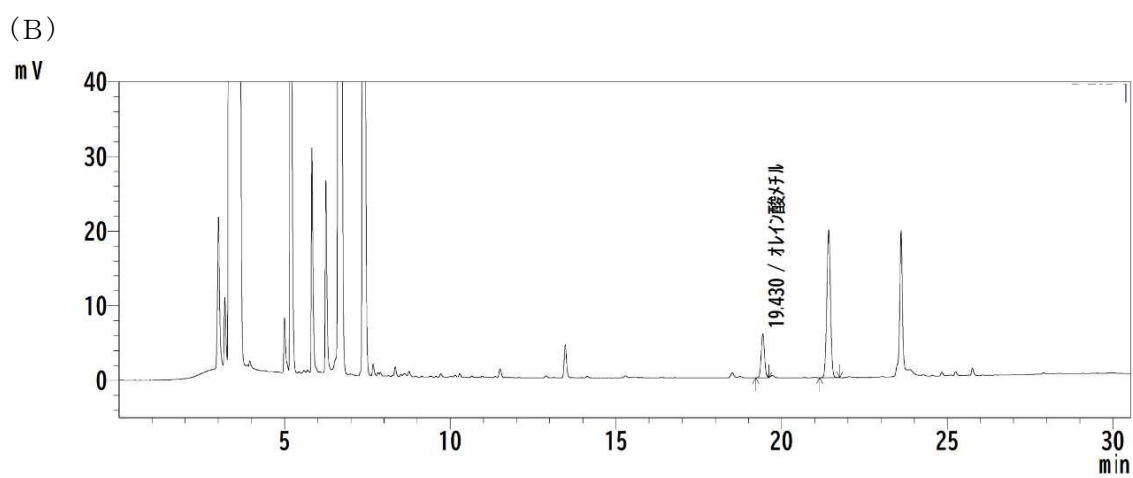
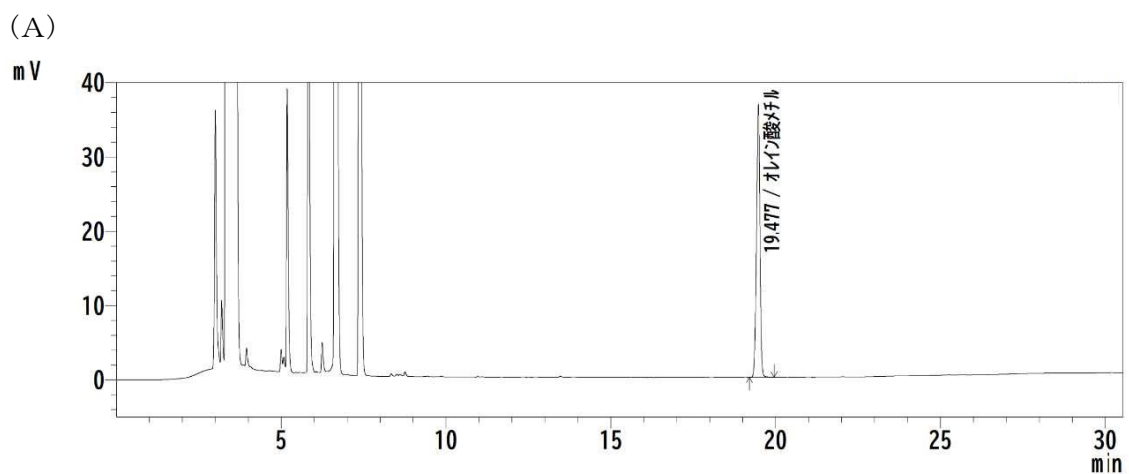
~10個を選び、それぞれについて注図1のように分割し、これらのうち図中の斜線部分にあたる部位20~40片を検体のそれぞれから均等にとり、ホモジナイズして試料とする。水分の少ないかんきつ類の場合、果皮と果肉を分離し、果肉をホモジナイズした後、細断した果皮を少量ずつ加えながらホモジナイズすると均等な試料になりやすい。レモン、ネーブル等の果皮の硬いかんきつ類では、同量の水を精密に量って加え、ホモジナイズし、その約100gを精密に量って試料としてもよい。

- 2) pH1~2とする。
- 3) 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。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。
- 4) 測定条件は例示である。分析の際は、オレイ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。
- 5) 窒素を用いても保持時間はほとんど変わらない。ピーク幅は若干広がるが、感度的には十分である。
- 6) 検量線用標準溶液及び試験溶液は、調製後速やかに測定に供することが望ましい。
- 7) 標準物質を入れずに標準溶液調製の操作を行って得られた溶液(検量線の「0」にあたる溶液)も分析し、妨害ピークのないことを確認する。
- 8) 本法による添加回収試験の結果を注表1に、標準品，いちご及びいちごにオレイン酸ナ

トリウムを0.1 g/kg (オレイン酸として) 添加した時のクロマトグラムを注図2に示す。  
添加回収試験を行う場合は、添加濃度をオレイン酸として0.1 g/kg 及び0.2 g/kg などで行う。

注表1 オレイン酸ナトリウムの添加回収率 (n = 5の平均)

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
いちご	0.1	93.1	2.6
	0.2	93.6	2.3
トマト	0.1	77.4	2.6
	0.2	78.7	3.4
みかん	0.1	92.9	2.3
	0.2	88.5	2.2



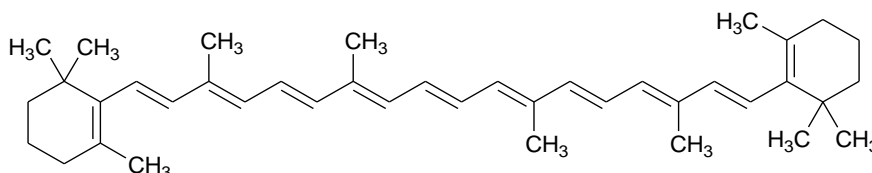
注図2 検量線用標準溶液(A), 無添加いちご(B)及び

オレイン酸ナトリウム0.1g/kg添加いちご(C)のガスクロマトグラム

9) オレイン酸ナトリウムとオレイン酸の分子量比は304.44/282.46である。

10) 純度99%。

着色料

 $\beta$ -カロテン $\beta$ -CaroteneC<sub>40</sub>H<sub>56</sub> : 536.87

## 1. 分析法の概要

食品中の $\beta$ -カロテンは、液体クロマトグラフィーにより定量する<sup>1)</sup>。食品中には天然の $\beta$ -カロテンが広く分布している。したがって、定量値は食品由来と添加された $\beta$ -カロテンの合計値である。(2024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<sup>2)</sup>

## ① 脂質を含む固形食品及び液状食品

液状食品はよく振り混ぜ、固形食品は乳鉢等で細かく粉碎した試料約2gを精密に量り、3w/v%ピロガロール・エタノール溶液<sup>3)</sup>10mL、60w/v%水酸化カリウム溶液1mL、水酸化カリウム1gを加え、56°Cで20分間加温する。水冷後、1w/v%塩化ナトリウム溶液15mL、2-プロパノール4mL、ヘキサン/酢酸エチル混液(9:1)15mLを入れ、激しく振り混ぜる。その後、遠心(10分間、3000回転/分)し、有機層を分液漏斗に移す。水層と沈殿物を合わせたものにヘキサン/酢酸エチル混液(9:1)15mLを加えて、再び激しく振り混ぜて遠心した後、有機層を分液漏斗に合わせる。合わせた有機層を蒸留水20mLで2回洗浄した後、減圧濃縮する。残留物を0.1w/v%BHT<sup>4)</sup>・エタノール溶液10mLに溶解し、試験溶液とする。

## ② 脂質の少ない液状食品

よく振り混ぜた試料約2gを精密に量り、ヘキサン/酢酸エチル混液(9:1)20mL、次いで無水硫酸ナトリウム10g<sup>5)</sup>を加え、激しく振り混ぜる。その後遠心(10分間、3000回

転／分) した後、上清を分取する。沈殿物にヘキサン／酢酸エチル混液 (9 : 1) 15mL を加えて、再び激しく振り混ぜて遠心した後、上清は、先の上清に合わせる。合わせた上清を減圧濃縮した後、残留物を 0.1w／v % BHT・エタノール溶液 10mL に溶解し、試験溶液とする。

### (3) 検量線用標準溶液の調製<sup>6)</sup>

β-カロテン<sup>7,8)</sup> 20.0mg を量り、20mL の褐色メスフラスコに入れ、0.1w／v % BHT・THF 溶液を加えて正確に 20mL とし、標準原液とする (濃度 1000μg/mL)。標準原液 0.04、0.1、0.2、0.3、0.4 及び 0.5mL をそれぞれ正確に量り、100mL の褐色メスフラスコにそれぞれ入れ、0.1w／v % BHT・エタノール溶液<sup>9)</sup>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 0.4～5 μg/mL)。

### (4) 測定法

#### ① 測定条件

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<sup>10)</sup>：内径 2～4.6mm、長さ 100～150mm

移動相：50μg/mL L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル含有 メタノール／アセトニトリル混液 (8 : 2)

カラム温度：40℃

測定波長：455nm

流速：0.4～2.0mL／分

注入量：10μL

#### ② 検量線<sup>11)</sup>

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。横軸にはβ-カロテンの純度を考慮した値を用いる。

#### ③ 定量<sup>12)</sup>

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試験溶液中のβ-カロテン濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中のβ-カロテン含量 (g/kg) を計算する。

$$\beta\text{-カロテン含量 (g/kg)} = \frac{C \times V}{W \times 1000}$$

C：試験溶液中のβ-カロテン濃度 (μg/mL)

V：試験溶液の量 (mL)

W：試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.002 g/kg

#### 試薬・試液等

1.  $\beta$ -カロテン：食品分析用標準品
2. ピロガロール：[特級]
3. エタノール：エタノール (95) [特級]
4. 3 w/v %ピロガロール・エタノール溶液：ピロガロール 3 g をエタノール 100mL に溶かす。
5. 水酸化カリウム：[特級]
6. 塩化ナトリウム：[特級]
7. 2-プロパノール：[特級]
8. 酢酸エチル：[特級]
9. ヘキサン：[特級]
10. BHT：ジブチルヒドロキシトルエン [特級]
11. 0.1 w/v % BHT・エタノール溶液：BHT 1 g をエタノール 1000mL に溶かす。
12. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
13. THF：テトラヒドロフラン [特級]
14. 0.1 w/v % BHT・THF 溶液：BHT 1 g をTHF 1000mL に溶かす。
15. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
16. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]
17. L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル：市販の純度 97%以上のものを用いる。

#### [注]

- 1) 食品中の $\beta$ -カロテン分析法として、試料の性状を考慮し、ヘキサン、アセトン、エタノール及びトルエンの混液を使った溶媒抽出やけん化等により $\beta$ -カロテンを抽出後、逆相系液体クロマトグラフィーにて分析する方法も提示されている<sup>文献1</sup>。
- 2)  $\beta$ -カロテンは、光線によって分解されやすく、また空気酸化されやすいので、試料採取操作を含むすべての操作は可能な限り速やかに行うことが好ましい。
- 3) ピロガロールは、 $\beta$ -カロテンの分解を抑制するために用いる。
- 4) BHTは、 $\beta$ -カロテンの分解を抑制するために用いる。
- 5) 先に無水硫酸ナトリウムを加えると、固化してしまう。
- 6) 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。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)  $\beta$ -カロテンは空気中で分解し易いので、純度を確認する必要がある。 $\beta$ -カロテンの純度試験： $\beta$ -カロテン標準原液（約 20mg を精密に量り、20mL に定容したもの） 1

mL を正確に量り、0.1w/v% BHT・THF 溶液で 50mL に定容後、455nm の吸光度を測定する。β-カロテンの吸光係数 ( $E_{1\text{cm}}^{10\%}=2500$ ) を用いて標準溶液中の β-カロテンの正確な濃度を求める。

$$\beta\text{-カロテン濃度 } (\mu\text{g/mL}) = E \times 10000 / 2500$$

- 8) β-カロテンは、未開封のまま冷凍庫に保存しても劣化しやすいので、長期間置かないこと。
- 9) 酸化防止剤 BHT を 0.1% 濃度添加することにより、窒素ガス置換を行わなくても、β-カロテン検量線用標準溶液 (5 μg/mL) は 5℃ で 1 週間は変化しない。
- 10) カラムは内径を細く、長さはやや長い方が分離はよくなる。
- 11) 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。
- 12) マーガリン、キムチ、菓子、チーズおよび清涼飲料水に、β-カロテンを、0.005 又は 0.025 g/kg 添加したときの回収率は 88~114% (相対標準偏差 0.2~6.1%) (n = 3 の平均) であった。

ドーナツに、β-カロテンを、0.002 g/kg 添加した時の回収率は 94.3% (相対標準偏差 1.7%) (n = 5 の平均) であった。清涼飲料水に、β-カロテンを、0.002 g/kg 添加した時の回収率は 79.5% (相対標準偏差 4.0%) (n = 5 の平均) であった。また、調製粉乳に、β-カロテンを、0.002 g/kg 添加した時の回収率は 88.1% (相対標準偏差 2.9%) (n = 5 の平均) であった。さらにドーナツに、β-カロテンを、0.02 g/kg 添加した時の回収率は 96.8% (相対標準偏差 1.1%) (n = 5 の平均) であった。清涼飲料水に、β-カロテンを、0.02 g/kg 添加した時の回収率は 91.5% (相対標準偏差 1.8%) (n = 5 の平均) であった。また、調製粉乳に、β-カロテンを、0.02 g/kg 添加した時の回収率は 90.4% (相対標準偏差 2.0%) (n = 5 の平均) であった。

#### [文献]

- 1) 安井明美他編：日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂) 分析マニュアル・解説、141-147 (2023)、建帛社