

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)

試薬・試液等

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]

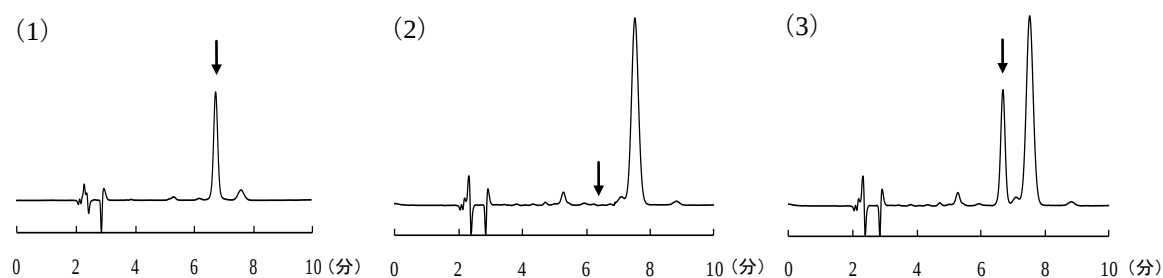
[注]

- 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。ミニカラムは、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。

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

$$\frac{\text{食品中のステアロイル乳酸カルシウム由来の乳酸量(g/kg)} \times \text{C}(\mu\text{g/mL}) \times \text{希釈倍率 (250mL)}}{W(\text{g}) \times 1,000^*} = \frac{\text{C}}{4 \times W}$$

- 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 μ 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 4.6mm.×150mm），移動相：メタノール・0.1vol%ギ酸混液（25:75），カラム温度：40℃，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