

保存料

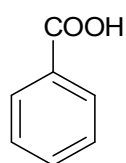
安息香酸、ソルビン酸及びそれらの塩類

並びにデヒドロ酢酸ナトリウム

Benzoic Acid, Sorbic Acid, Dehydroacetic Acid and Those Salts

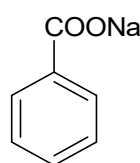
安息香酸

Benzoic Acid

 $C_7H_6O_2 : 122.12$

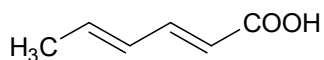
安息香酸ナトリウム

Sodium Benzoate

 $C_7H_5NaO_2 : 144.10$

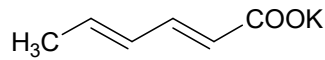
ソルビン酸

Sorbic Acid

 $C_6H_8O_2 : 112.13$

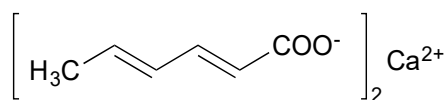
ソルビン酸カリウム

Potassium Sorbate

 $C_6H_7KO_2 : 150.22$

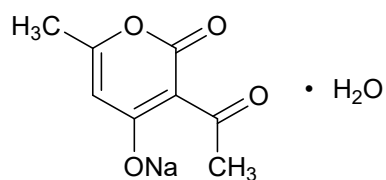
ソルビン酸カルシウム

Calcium Sorbate

 $C_{12}H_{14}CaO_4 : 262.32$

デヒドロ酢酸ナトリウム

Sodium Dehydroacetate

 $C_8H_7NaO_4 \cdot H_2O$ $(C_8H_7NaO_4 : 190.13)$

1. 分析法の概要

食品中の安息香酸、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム及びデヒドロ酢酸ナトリウム¹⁾は、水蒸気蒸留法により抽出精製した後、液体クロマトグラフィーにより安息香酸、ソルビン酸又はデヒドロ酢酸として定量する²⁾。必要があれば、分子量比を乗じて安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム又はデヒドロ酢酸ナトリウムの量として求める。食品中には、天然の安息香酸が分布している場合もある。したがって、検体中にこれらの食品を素材として含有する場合には、定量値は素材由来の安息香酸と添加されたものとの合計値である³⁾。

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸を特定する必要がある場合には、参考に示す分析法を用いることができる。(2010年改正、2019年統合法令設定)

2. 分析法 (液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

試料を細切又はすりつぶした後、その約5 g^{4,5)}を精密に量り、500~1000mLの丸底フラスコに入れる。これに水 100mL、酒石酸溶液 (15→100) 10mL⁶⁾、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、この留液を試験溶液とする⁷⁾。

(3) 検量線用標準溶液の調製⁸⁾

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸各 0.100 gを量り、それぞれメタノールを加えて溶かして正確に100mLとする。これらの液1 mLずつを正確にとり、水を加えて正確に100mLとし、標準溶液とする(濃度 各10 μ g/mL)。標準溶液1 mLを正確にとり、水を加えて正確に100mLとし、また、標準溶液1、2、5 mL及び10 mLを正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする(濃度 各0.1~10 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件⁹⁾

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¹⁰⁾ : オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管¹¹⁾ : 内径 4.6mm、長さ 50~250mm

カラム温度 : 40°C

移動相¹²⁾ : 5 mmol/Lクエン酸緩衝液 (pH4.0) /アセトニトリル/メタノール混液
(7 : 2 : 1)

流速：1.0mL/分

測定波長：230nm^{13,14)}

注入量：20μL

② 検量線¹⁵⁾

検量線用標準溶液をそれぞれ液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量¹⁶⁾

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線によって試験溶液中の安息香酸、ソルビン酸又はデヒドロ酢酸濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中の安息香酸、ソルビン酸又はデヒドロ酢酸含量 (g/kg) を計算する。

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

C：試験溶液中の安息香酸等の濃度 (μg/mL)

V：試験溶液の量 (mL)

W：試料の採取量 (g)

安息香酸ナトリウム含量 (g/kg) = 安息香酸含量 (g/kg) × 1.180

ソルビン酸カリウム含量 (g/kg) = ソルビン酸含量 (g/kg) × 1.340

ソルビン酸カルシウム含量 (g/kg) = ソルビン酸含量 (g/kg) × 1.170

デヒドロ酢酸ナトリウム含量 (g/kg) = デヒドロ酢酸含量 (g/kg) × 1.131

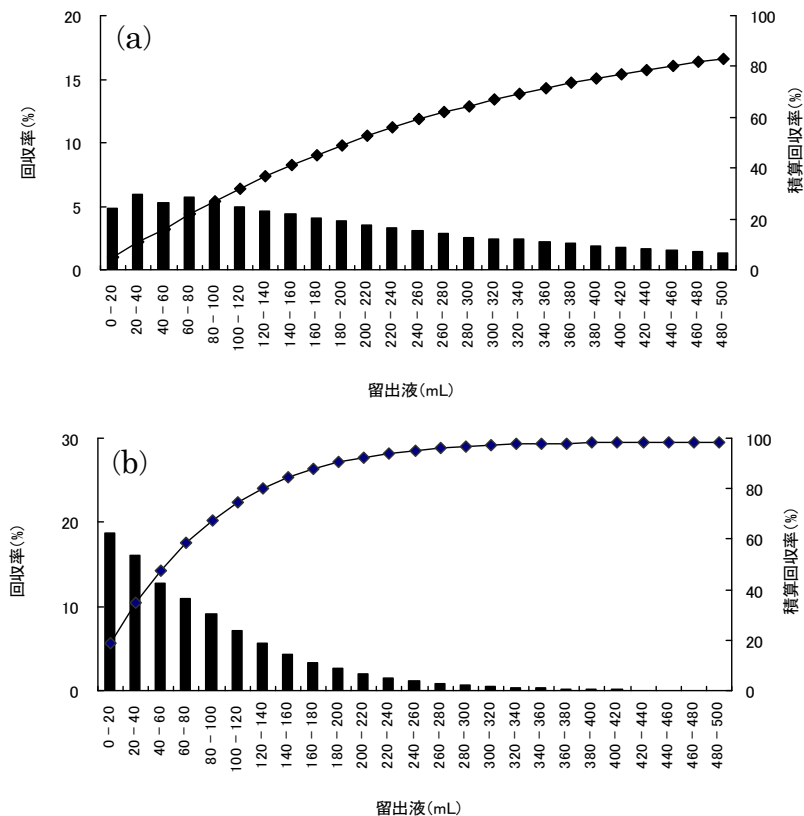
④ 定量限界 安息香酸、ソルビン酸又はデヒドロ酢酸として 0.01 g/kg

試薬・試液

1. 安息香酸：[特級]
2. ソルビン酸：市販品を用いる。
3. デヒドロ酢酸：市販品を用いる。
4. 酒石酸：[特級]
5. 塩化ナトリウム：[特級] 又は [日局]
6. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
7. クエン酸一水和物：[特級]
8. クエン酸三ナトリウム二水和物：[特級]
9. 5mmol/Lクエン酸緩衝液 (pH4.0)：クエン酸一水和物 7.0g及びクエン酸三ナトリウム二水和物 6.0gに水を加えて溶かして 1000mL とする。これを用時水で 10 倍に希釈して調製する。
10. アセトニトリル：[高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) デヒドロ酢酸は、平成3年に食品添加物から削除された。
- 2) パラオキシ安息香酸エステル類も同一の留液で分析可能である（パラオキシ安息香酸エステル類分析法参照）。ただし、パラオキシ安息香酸エステル類は、水にやや溶解しにくいため、注意が必要である。
- 3) 天然由来の安息香酸が検出される食品は、クランベリー、バラ科の果実、香辛料及び発酵乳製品等 (<http://www.nihs.go.jp/dfa/food-db/food-index.html>) である^{文献1)}。発酵乳製品では微生物による馬尿酸の分解により安息香酸が生成される。一方、過酸化ベンゾイルが使用された小麦粉から作られた食品では、過酸化ベンゾイルが分解して安息香酸として検出される場合がある。
- 4) 装置の感度が不十分な場合は、試料採取量を増やしてもよい。固形試料 50 g 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 60~80 g 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 50 g と 5 g の場合の留出パターンを注図 1 に示す。



試料：マーガリン（安息香酸 0.5 g / kg 添加）

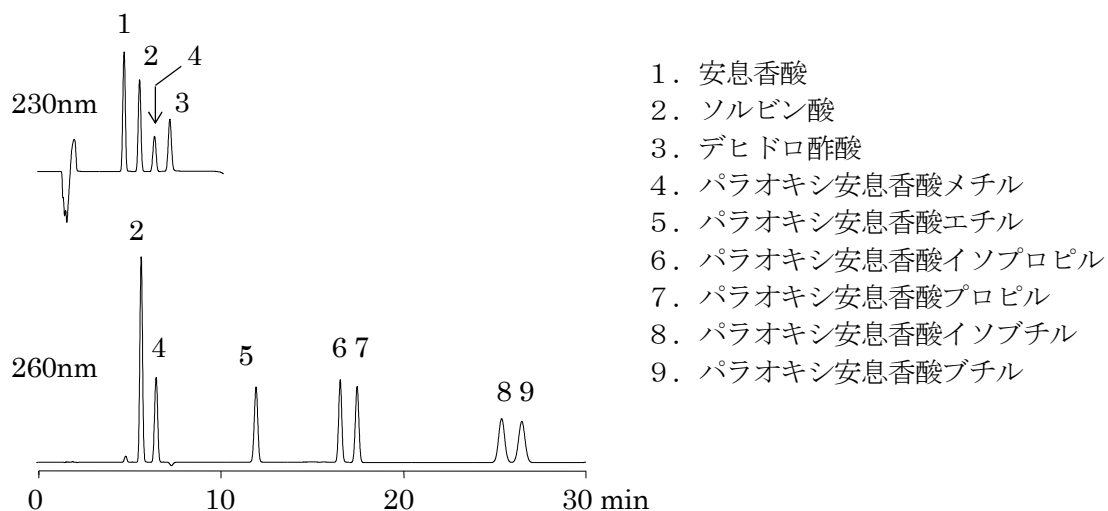
試料採取量：(a) 50 g、(b) 5 g

注図 1 安息香酸の水蒸気蒸留時の留出パターン

- 5) 試料採取量を 5 g とする場合、泡立ちやすい豆類等の一部食品を除き、シリコーン樹脂の添加は必要ない。シリコーン樹脂を添加する場合には、食品添加物グレードのものを使用し、保存料を含む製剤等は使用しない。
- 6) 塩基性の食品では酸性とならない場合がある。そのような場合には、さらに酒石酸溶液 (15→100) を加えて酸性にする。
- 7) 留液の濁りは分析カラムの目詰まりの原因となる。分析カラムの保護のため、留液に濁りが観察されない場合でも、留液を水系ポリテトラフルオロエチレン製メンブランフィルター (0.45 μ m) 等を用いてろ過を行うことが望ましい。この場合、試験溶液は最初のろ液 5 mL を捨てた後に採取したろ液とする。
- 8) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜調整してもよい。
- 9) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。また、夾雑物のピークとの分離等のためにグラジエント分析を行ってもよいが、保存料の一斉分析の場合は、各保存料が分離することを確認する。
- 10) 分析の際は、被験物質のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 11) 高速液体クロマトグラフィー用カラムは、金属を除く処理をしたカラムを使わないと、デヒドロ酢酸のピークが出ないことがある。
- 12) その他、下記の移動相及びグラジエント溶離等が使用できる。
 - ・ 5 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH4.0) / アセトニトリル / メタノール混液 (7 : 2 : 1) と 5 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH4.0) / アセトニトリル / メタノール混液 (11 : 4 : 5) によるグラジエント溶離 (注図 2)。
 - ・ 6.1 mmol/L 臭化セチルトリ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 / アセトニトリル混液 (45 : 42 : 18) (移動相の調製方法 : 臭化セチルトリメチルアンモニウム 1 g、リン酸二水素ナトリウム二水和物 1.84 g に水 450 mL を加えて溶かした後、メタノール 420 mL 及びアセトニトリル 180 mL を加えて混合する)。
 - ・ 水 / アセトニトリル / 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (67 : 28 : 5)、水 / メタノール / 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (59 : 36 : 5) 又は水 / メタノール / 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (17 : 2 : 1) と水 / メタノール / 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) 混液 (5 : 14 : 1) によるグラジエント溶離 (0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) の調製方法 : リン酸一カリウム 27.0 g とリン酸 0.2 g に水を加えて溶かして 1000 mL とする)。ただし、リン酸緩衝液系では、ソルビン酸とデヒドロ酢酸の分離が不十分な場合がある (注図 3)。

安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類標準溶液

(各 10 μ g/mL)



<測定条件>

カラム：ODSカラム（内径 4.6mm、長さ 150mm、粒径 5 μ m）

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

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

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

リニアグラジエントの条件		
時間(分)	A (%)	B (%)
0	100	0
10	100	0
15	0	100
27	0	100
30	100	0

流速：1.0mL/分

検出器：フォトダイオードアレイ検出器

測定波長：230nm、260nm

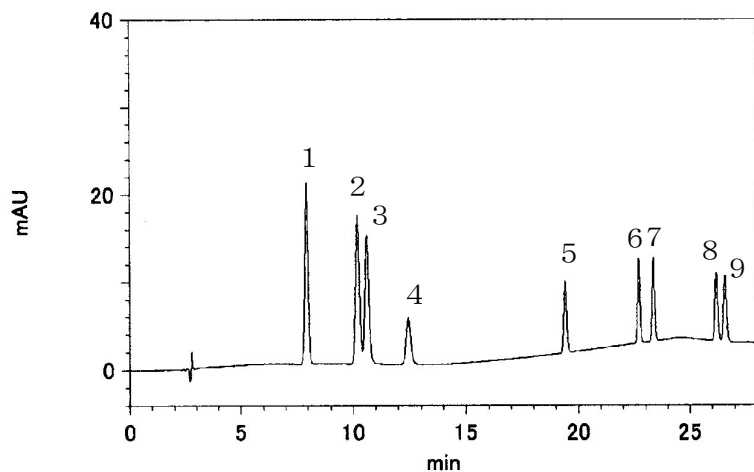
注入量：20 μ L

※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溶液を調製する際には 60vol%メタノールを使用すること。

注図2 グラジエント溶離法による安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類のクロマトグラムの場合

安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類標準溶液

(各 5.0 μ g/mL)



1. 安息香酸
2. ソルビン酸
3. デヒドロ酢酸
4. パラオキシ安息香酸メチル
5. パラオキシ安息香酸エチル
6. パラオキシ安息香酸イソプロピル
7. パラオキシ安息香酸プロピル
8. パラオキシ安息香酸イソブチル
9. パラオキシ安息香酸ブチル

<測定条件>

カラム：ODSカラム (内径 4.6mm、長さ 250mm、粒径 5 μ m)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

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

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

リニアグラジエントの条件

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

流速：1.0mL/分

検出器：紫外可視吸光度検出器

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溶液を調製する際には 60vol%
メタノールを使用すること。

注図3 グラジエント溶離法による安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸エステル類のクロマトグラム

- 13) ソルビン酸の吸収極大波長は 260nm 付近である。230nm で妨害ピークが重なる場合には、260nm 付近で測定するとよい。
- 14) デヒドロ酢酸の吸収極大波長は、230nm 及び 310nm 付近である。230nm で妨害ピークが重なる場合には、310nm 付近で測定するとよい。
- 15) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 16) 本法によるソルビン酸カルシウムの添加回収試験の結果を注表 1 に示す。

注表 1 ソルビン酸カルシウムの各種食品での添加回収率*

試料	試料量 (g)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
マーガリン	5.0	0.5	91.8	3.0
さきいか	5.0	0.5	92.6	1.1
チーズ	5.0	0.5	85.7	4.3
かまぼこ	5.0	0.5	90.0	0.6
あん	5.0	0.5	92.8	0.6
らっきょう	5.0	0.5	89.1	0.8
みそ	5.0	0.5	94.4	0.9
しょう油	5.0	0.5	95.8	0.9
オレンジジュース	5.0	0.5	95.5	2.2
ワイン	5.0	0.2	97.0	0.7

* 5 試行の平均値

[文献]

- 1) 久保田浩樹ら：日食化誌、17、54 (2010)

参考

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸確認分析法

1. 分析法の概要

食品中の安息香酸、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸カルシウム及びデヒドロ酢酸ナトリウムは、液体クロマトグラフィー質量分析、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（分析法A）又はガスクロマトグラフィー質量分析（分析法B）により確認を行う¹⁾。（2010 設定）

2. 分析法

分析法 A（液体クロマトグラフィー質量分析又は液体クロマトグラフィータンデム質量分析）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試験溶液の調製²⁾

（3）標準溶液の調製

上記（1）～（3）については、安息香酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸及びそれらの塩類分析法又はパラオキシ安息香酸エステル類分析法を準用する。

（4）測定法

① 測定条件³⁾

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

カラム充填剤⁴⁾：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 100mm

カラム温度：40℃

移動相⁵⁾：A液 0.05vol%ギ酸含有 5 vol%アセトニトリル

B液 0.05vol%ギ酸含有 95vol%アセトニトリル

A液 70%から 50%までの直線濃度勾配⁶⁾。

流速：0.2ml/分

イオン化モード：安息香酸 ESI（-）、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸 ESI（+）

検出法：スキャン、選択イオン検出（SIM）又は選択反応検出（SRM）

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸の主なイオン^{7,8)}

	分子量	LC-MS	LC-MS/MS	
		SIM検出イオン	プリカーサーイオン	プロダクトイオン
安息香酸	122.12	121	121	77
ソルビン酸	112.13	113	113	95、67
デヒドロ酢酸	168.15	169	169	85、127

注入量：2μL

② 定性⁹⁾

試験溶液及び標準溶液を LC-MS又はLC-MS/MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上に検出されたピークの保持時間¹⁰⁾が標準溶液のピークと一致することを確認する。また、LC-MSを用いる場合は、試験溶液と標準溶液のマスペクトルを比較して定性を行う。

分析法B（ガスクロマトグラフィー質量分析）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸及びそれらの塩類分析法の(2)試験溶液の調製又はパラオキシ安息香酸エステル類分析法の(2)試験溶液の調製 ② その他の食品（水蒸気蒸留法）を準用し、得られた留液 50mL にリン酸を加えて酸性とし、これにジエチルエーテル 50mL を加えて振とうする。ジエチルエーテル層を 1/10 量の水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ろ紙でろ過し、ろ液を減圧濃縮する。残留物をアセトンで溶解し、試験溶液とする。あるいは、パラオキシ安息香酸エステル類分析法の(2)試験溶液の調製 ① 高タンパク食品及び高脂肪食品（溶媒抽出法）の a の抽出液又は b の溶出液を濃縮後、残留物をアセトンで溶解し、試験溶液とする。

(3) 標準溶液の調製

安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸及びそれらの塩類分析法又はパラオキシ安息香酸エステル類分析法の(3)検量線用標準溶液の調製を準用する。ただし、溶媒にはアセトンを用いる。

(4) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

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

カラム¹²⁾：内径 0.25mm、長さ 15m のフューズドシリカ管の内面に 5% フェニル 95%
メチルポリシロキサンを 0.25 μ m の厚さで被覆したもの。

カラム温度¹³⁾：40 $^{\circ}$ C（2分）、40 \rightarrow 230 $^{\circ}$ C（15 $^{\circ}$ C/分、昇温）、230 $^{\circ}$ C（5分）

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

イオン源温度：230 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：ヘリウム

注入方式：スプリットレス

イオン化モード（電圧）：E I（70eV）

検出法：スキャン（ m/z 50 \sim 200）

注入量：2 μ L

② 定性

試験溶液及び標準溶液を GC-MS に注入し、試験溶液のクロマトグラム上に検出されたピークの保持時間が標準溶液のピークと一致すること及びマススペクトル上の主要ピークの強度比が標準溶液のピークと一致することを確認する。

試薬・試液等

1. 安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸及びそれらの塩類分析法又はパラオキシ安息香酸エステル類分析法の試薬・試液等を準用する。
2. ギ酸：[98%、特級]
3. 0.05vol%ギ酸含有 5vol%アセトニトリル：ギ酸 0.5mL にアセトニトリル 50mL 及び水を加えて 1000mL とする。
4. 0.05vol%ギ酸含有 95vol%アセトニトリル：ギ酸 0.5mL にアセトニトリル 950mL 及び水を加えて 1000mL とする。
5. リン酸：[特級]
6. ジエチルエーテル：[特級]
7. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム（無水）[特級]
8. アセトン：[特級]

[注]

- 1) 本法により、パラオキシ安息香酸エステル類も同時に確認できる。
- 2) 安息香酸、ソルビン酸及びデヒドロ酢酸については、パラオキシ安息香酸エステル類分析法の（2）試験溶液の調製 ① 高タンパク食品及び高脂肪食品（溶媒抽出法）を用いる場合には、陰イオン交換カラムに吸着するため、試験溶液ではなく、抽出液を用いる。
- 3) その他の測定条件は各測定機器に従い、検量線用標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 4) 分析の際は、被験物質のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。

- 5) イオンペア試薬を用いた移動相による分析例の報告もある^{文献1)}。
- 6) 濃度勾配の条件は、使用する分析カラムにより適宜変更する。
- 7) パラオキシ安息香酸エステル類のイオン化モード及び主なイオンを注表1に示す。

注表1 パラオキシ安息香酸エステル類のイオン化モード及び主なイオン

	分子量	イオン化 モード ESI	LC-MS	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
パラオキシ安息香酸イソブチル	194.23	+	195	195	139、95
パラオキシ安息香酸イソプロピル	180.20	+	181	181	139、95
パラオキシ安息香酸エチル	166.18	+	167	167	139、95
パラオキシ安息香酸ブチル	194.23	+	195	195	139、95
パラオキシ安息香酸プロピル	180.20	+	181	181	139、95

- 8) LC-MS/MS条件の一例を以下に示す。

カラム：ODSカラム（内径2.1mm、長さ100mm、粒子径1.7 μ m）

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A液 0.05vol%ギ酸含有5vol%アセトニトリル

B液 0.05vol%ギ酸含有95vol%アセトニトリル

グラジエントの条件

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

流速：0.3mL/分

測定法：多重反応モニタリング (MRM)

デソルベーション温度：400 $^{\circ}$ C

その他の条件：注表1

- 9) LC-MSを用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑物によるマトリックス効果により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に検量線用標準溶液を添加し、ピークが検出されることを確認する。
- 10) 各ピークの保持時間が非常に近い場合もあるため、確認時は注意する。
- 11) マススペクトルによる確認が困難な場合、選択イオンモニタリング (SIM) により測定を行い、マスクロマトグラム上に検出されたピークが各保存料検量線用標準溶液と一致することを確認する。

モニターイオン：ソルビン酸 (m/z 112、97)

安息香酸 (m/z 122、105)

デヒドロ酢酸 (m/z 168、153)

パラオキシ安息香酸エチル (m/z 166、138)

パラオキシ安息香酸プロピル及びイソプロピル (m/z 180、138)

パラオキシ安息香酸ブチル及びイソブチル (m/z 194、138)

12) 内径 0.25mm、長さ 30m のフューズドシリカ管の内面にポリエチレングリコールを 0.25 μ m の厚さで被覆したカラムを下記の測定条件で使用することもできる。

測定条件

カラム温度：160→240 $^{\circ}$ C (15 $^{\circ}$ C/分、昇温)、240 $^{\circ}$ C (10 分)

検出器：水素炎イオン検出器

注入口温度：240 $^{\circ}$ C

検出器温度：250 $^{\circ}$ C

注入方式：スプリット

スプリット比：1 : 10

キャリアーガス及び流量：ヘリウム、2.5mL/分

メイクアップガス：窒素、45mL/分

イオン化モード (電圧)：E I

検出法：スキャン (m/z 50~200)

注入量：1 μ L

13) 昇温の条件は、使用する分析カラム等により適宜変更する。

[文献]

1) 氏家愛子ら：食衛誌、48、163 (2007)

防かび剤

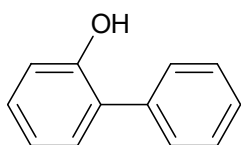
オルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、

ジフェニル及びチアベンダゾール

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

オルトフェニルフェノール

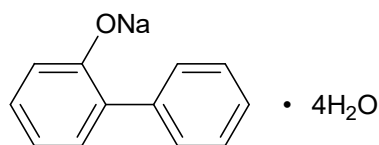
略名：OPP



$C_{12}H_{10}O$: 170.21

オルトフェニルフェノールナトリウム

略名：OPP-Na

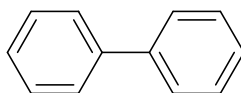


$C_{12}H_9NaO \cdot 4H_2O$
($C_{12}H_9NaO$: 192.19)

ジフェニル

Diphenyl

別名：ビフェニル

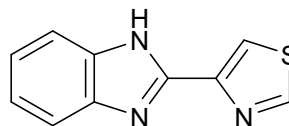


$C_{12}H_{10}$: 154.21

チアベンダゾール

Thiabendazole

略名：TBZ



$C_{10}H_7N_3S$: 201.25

1. 分析法の概要

食品中のオルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、ジフェニル及びチアベンダゾールは、酢酸エチルで抽出した後、液体クロマトグラフィーによりオルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾールとして定量する。必要があれば、オルトフェニルフェノールに分子量比を乗じて、オルトフェニルフェノールナトリウムの量として求める。(2000年設定、2019年統合法設定)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー)¹⁾

(1) 検体の採取と試料の調製

① かんきつ類

果実約1kgを精密に量り、必要に応じて適量の水を量って加え、細切均一化する^{2,3)}。

② バナナ

果柄部を除去した果実又は果肉約 1 kg を精密に量り、必要に応じて適量の水を量って加え、細切均一化する^{2,4)}。

③ 加工食品

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

試料約 10 g を精密に量り、ブレンダーカップに入れる。次に無水酢酸ナトリウム 1～2 g⁵⁾、無水硫酸ナトリウム 20 g⁶⁾を加えてよく混和した後、酢酸エチル 40mL を加え 2 分間ホモジナイズし、これを遠心 (10 分間、3000 回転/分)⁷⁾して酢酸エチル層を分取する。沈殿物には更に酢酸エチル 40mL を加えて同様に操作し、得られた酢酸エチル層を合わせ、1-ブタノール 2 mL を加えて 40°C 以下で減圧下で濃縮⁸⁾する。これに液体クロマトグラフィー用の移動相を加えて全量を正確に 5 mL とし、メンブランフィルター (0.45µm) でろ過し、試験溶液⁹⁾とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製¹⁰⁾

オルトフェニルフェノール、ジフェニル及びチアベンダゾール各 10.0mg を量り、それぞれメタノール 5 mL を加えて溶解した後、移動相を加えて正確に 100mL とする (濃度 各 100µg/mL)。これらの液 10mL ずつを正確にとり、1-ブタノール 5 mL を加え、次いで移動相を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする (濃度各 10µg/mL)。標準溶液 2、4、6、8 mL 及び 10mL を正確にとり、それぞれに移動相を加えて正確に 10mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度各 2～10µg/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

蛍光検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：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：40°C

移動相¹²⁾：メタノール/水/アセトニトリル混液 (60 : 35 : 5) に 10mmol/L になるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えた後、リン酸で pH を 2.3～2.5 とする。

流速：1 mL/分

測定波長：励起波長 285nm、蛍光波長 325nm

注入量：10µL

② 検量線¹³⁾

検量線用標準溶液 10µL ずつをそれぞれ液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積から

検量線を作成する。

③ 定量¹⁴⁾

試験溶液 10 μ L を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中のオルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール濃度 (μ g/mL) を求め、次式によって試料中¹⁵⁾のオルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、ジフェニル又はチアベンダゾール含量 (g/kg) を算出する。

オルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール含量 (g/kg)

$$= \frac{C \times 5}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中のオルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール濃度 (μ g/mL)

W : 試料の採取量 (g)

オルトフェニルフェノールナトリウム含量 (g/kg)

= オルトフェニルフェノール含量 (g/kg) \times 1.129

④ 定量限界 オルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾールとして 0.001 g/kg¹⁶⁾

試薬・試液

1. オルトフェニルフェノール：オルトフェニルフェノール標準品 [残留農薬試験用]
2. ジフェニル：ジフェニル標準品 [残留農薬試験用]
3. チアベンダゾール：チアベンダゾール標準品 [残留農薬試験用]
4. 無水酢酸ナトリウム：酢酸ナトリウム [特級]
5. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
6. 酢酸エチル：[特級]
7. 1-ブタノール：[特級]
8. リン酸二水素カリウム：[特級]
9. メタノール¹⁷⁾：[高速液体クロマトグラフィー用]
10. アセトニトリル：[液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 本法は、かんきつ類及びその加工品中のオルトフェニルフェノール、オルトフェニルフェノールナトリウム、ジフェニル及びチアベンダゾールの分析並びにバナナ中のチアベンダゾールの分析に適用できる。
- 2) 「食品、添加物等の規格基準 第1食品 A食品一般の成分規格6 (2) 検体」及び「食

品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)別添「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」参照。

- 3) 8分割法については、イマザリル分析法〔注〕3)を参照のこと。
- 4) 1～2房のバナナから3～4本を任意に採取し、先端及び果柄部を可食部の近くで切断する。果実又は果肉のみを約1cmずつの輪切りにしたものを交互に、各検体についてほぼ均等に約200g採取し、ホモジナイズして試料としてもよい。
- 5) 無水酢酸ナトリウムはpHを調整するために用いる。レモンの場合には2g、グレープフルーツ、オレンジ等については1gを加える。
- 6) 無水硫酸ナトリウムの添加量はマーマレード、ジャム等の加工品では30g、ジュース等では45g程度を添加するとよい。
- 7) 試料に無水酢酸ナトリウムを添加し、ホモジナイズ後、酢酸エチルを分取する場合、分液漏斗に移して静置する方法、あるいはろ過をする方法があるが、いずれも長時間を要するため遠心を行うとよい。
- 8) 減圧濃縮する場合、1-ブタノールを添加してあるため、乾固することはない。通常、酢酸エチルの臭いがしなくなる程度に濃縮するとよい。
- 9) 試験溶液のpHが1～8のとき、蛍光強度が最も強い。
- 10) 検量線用標準溶液を更に移動相で10倍希釈し、検量線を作成しても直線性が得られる。バナナの果肉中のチアベンダゾールを分析する場合は、0.5～5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の検量線用標準溶液を用いる。また、いずれの場合も、検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜、調整してもよい。
- 11) 測定条件は例示である。用いるカラムの内径及び長さによって、流速及び注入量等を調整する。
- 12) 移動相はアセトニトリル/メタノール/水混液(40:25:35)に10 mmol/L となるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えた後、リン酸でpHを2.3～2.5としたもの、アセトニトリル/0.1%リン酸混液(65:35)に10 mmol/L となるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えたもの、あるいは0.01 mol/L リン酸二水素カリウム/メタノール混液(2:3)でも良好なクロマトグラムが得られる。
- 13) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 14) かんきつ類10gに0.25mg、かんきつ類加工品10gに0.1mg添加した場合の回収率は、オルトフェニルフェノールで90～100%、ジフェニルで82～96%、チアベンダゾールでは88～92%である。
- 15) 試料の調製の際に水を添加した場合には、次式により、検体中のオルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール含量を求める。

オルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール含量 (g/kg)

$$= \frac{C \times 5}{W \times 1000} \times \frac{W_1 + W_2}{W_1}$$

C : 試験溶液中のオルトフェニルフェノール、ジフェニル又はチアベンダゾール濃度 (µg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

W₁ : 検体の採取量 (g)

W₂ : 検体に添加した水の量 (g)

- 16) 0.5～5 µg/mL の検量線用標準溶液を用いてバナナ果肉中のチアベンダゾールを分析した場合、チアベンダゾールの定量限界は、0.0003 g/kg である。
- 17) 使用するアセトニトリル、メタノール等の試薬類はクロマトグラム上に妨害ピークが出ないことを確認すれば、試薬特級や残留農薬用を用いることができる。

強化剤

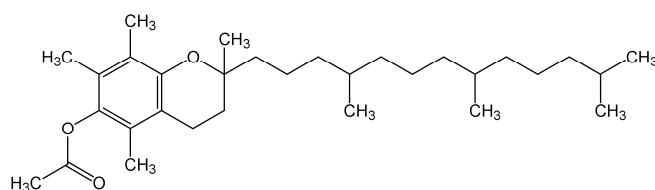
トコフェロール酢酸エステル及び

d- α -トコフェロール酢酸エステル

Tocopheryl Acetate and *d*- α -Tocopheryl Acetate

トコフェロール酢酸エステル

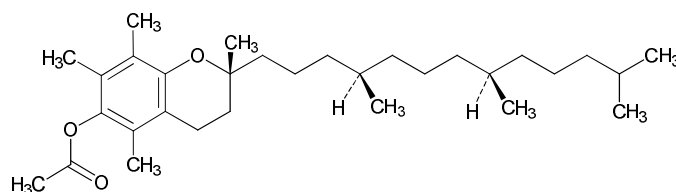
All-rac- α -Tocopheryl Acetate



$C_{31}H_{52}O_3$: 472.74

d- α -トコフェロール酢酸エステル

R, R, R- α -Tocopheryl Acetate



$C_{31}H_{52}O_3$: 472.74

1. 分析法の概要

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

2. 分析法 (液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製²⁾

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

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

(3) 検量線用標準溶液の調製⁶⁾

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

(4) 測定法

① 測定条件⁷⁾

紫外可視吸光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 (粒径 5 µm)

カラム管：内径 4.6 mm、長さ 250 mm

カラム温度：40°C

移動相：メタノール

流速：1.0 mL/分

測定波長：284 nm

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、得られたピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

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

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

C : 試験溶液中のトコフェロール酢酸エステル濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

V : 試験溶液の量 (mL)

$$\alpha\text{-トコフェロール含量 (g/kg)} = \text{トコフェロール酢酸エステル含量 (g/kg)} \times 0.911^{(8)}$$

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

試薬・試液

1. 定量用トコフェロール酢酸エステル：トコフェロール酢酸エステル標準品 [日局標準品]
2. ピロガロール：[特級]
3. 塩化ナトリウム：[特級]
4. 10 g/L 塩化ナトリウム溶液：塩化ナトリウム 1 g を水に溶解し、100mL とする。
5. エタノール：[特級]
6. ヘキサン：[残留農薬試験用]
7. 2-プロパノール：[特級]
8. BHT：2, 6-ジ-*tert*-ブチル-4-メチルフェノール [特級]
9. 酢酸エチル：[残留農薬試験用]
10. 0.3 g/L BHT含有酢酸エチル：BHT 0.3 g を秤量し、酢酸エチル 1000mL に溶解する。
11. ヘキサン/2-プロパノール/0.3 g/L BHT含有酢酸エチル混液 (18 : 3 : 2)：ヘキサン 2340mL、2-プロパノール 390mL 及び 0.3 g/L BHT含有酢酸エチル 260mL を混合する。
12. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]

[注]

- 1) 本分析法では *d* 1-体と *d*-体の分別は不能である。
- 2) 試料がカプセル剤の場合は 10 g/L 塩化ナトリウム溶液を加えた後、70°C で 5 分間加温してカプセルの被膜を溶解する。なお、カプセル剤の内容物について試験する場合には、次の方法で試験溶液を調製するとよい。

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

し出す。トコフェロール酢酸エステルが $0.5\sim 250\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように定容し、メンブレンフィルター ($0.45\mu\text{m}$) を用いてろ過し、ろ液を試験溶液とする。

- 3) $10\text{ g}/\text{L}$ 塩化ナトリウム溶液を加えると固まる試料の場合は、 $10\text{ g}/\text{L}$ 塩化ナトリウム溶液を加えずに、ピロガロール 0.3 g 及びエタノール 10 mL を加える。
- 4) 遠心分離後、エマルジョンができている場合はエタノールを少量加えると分離する。
- 5) 必要に応じてトコフェロール酢酸エステルの濃度が $0.5\sim 250\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈する。
- 6) 標準溶液の調製例を示す。実際は試験溶液中のトコフェロール酢酸エステルの濃度が検量線の範囲内に入るような濃度の標準溶液を数点調製し、検量線を引く。
- 7) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。
- 8) トコフェロール酢酸エステルを α -トコフェロールに換算する係数である。使用基準は対象食品として特定保健用食品及び栄養機能食品のみが 150 mg 以下/当該食品 1 日摂取目安量 (α -トコフェロールとして) と定められている。