

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和6年度研究分担報告書
分析法及び試験法の開発に関する研究
窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較

研究分担者 阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

研究要旨

食品添加物公定書の収載された窒素定量法の違いによる定量値，操作性，設備点での課題等を比較した．試料には，試験実施ができない可能性がある「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を用いた．窒素定量法は，① 公定法(ケルダール法)，② 公定法改法(ケルダール法)，③ セミマイクロケルダール法，④ 元素分析法(改良デュマ法)及び⑤ 元素分析法(CHN コーダー法)とした．いずれの定量法でもほぼ同等の定量法が得られることが示された．またいずれの精度も良好であった．ケルダール法及びセミマイクロケルダール法は操作が煩雑で時間を要し，有害・有毒試薬を用いる点，大量の硫酸廃液が出る点，亜硫酸ガスが発生する点等から試験者や環境への負担が非常に大きいことが改めて示された．一方元素分析法では，装置が高額でありキャリアガスや助燃ガスが必要ではあるが，操作は簡便で試験時間も 10 分以内で完結する点で優れていた．なお「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」の公定法は試料量を減らした② 公定法改法へ改正することが最も簡単であったが，将来的には元素分析法へ移行していくべきだと考えられた．

研究協力者

川末慎葉 国立医薬品食品衛生研究所
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
御所窪誠 (一財)日本食品分析センター
渡辺実薫 (一財)日本食品分析センター
座間俊輔 (一財)日本食品分析センター
伊藤朱美 (一財)日本食品分析センター
藤松芽生 (一財)日本食品分析センター

A. 研究目的

我が国では，原則として内閣総理大臣が使用を認めた食品添加物しか使用できないこととされ，また，その安全性及び品質を確保するため成分規格や保存基準等の規格基準が設定され¹⁾，表示基準と合わせて食品添加物公定書(公定書)²⁾に収載されている．

現在，公定書は第 10 版まで発出されており，この中の D 成分規格・保存基準各条には約 720 品目の食品添加物が収載されている．

成分規格には、各食品添加物に応じて、定義、含量、性状、確認試験、純度試験等の項目が定められている。このうち、主成分がたん白質である食品添加物には含量として窒素の含量を規定しているものがある。また、一部の食品添加物には、純度試験として総窒素の含量が規定されているものがある。

窒素の定量法は、B 項の一般試験法の『29.窒素定量法』に記載されているケルダール法、セミマイクロケルダール法又は元素分析法のいずれかで実施することとされている。例えば、「L-シスチン」(FA028600, E00163)(以降、Cys)や「コンドロイチン硫酸ナトリウム」(FA024300, T01400)(CSNa)等ではケルダール法を、「サイリウムシードガム」(FA024400, E00147)や「パントテン酸カルシウム」(FA046100, T02950)等ではセミマイクロケルダール法を用いることとされている。なお、第 10 版公定書において、元素分析法を用いて窒素を定量することとされている品目はない。

窒素定量法としてケルダール法が規定されている品目のうち、Cys では、各条において規定された試料量 0.3 g の上限の試料を採取した場合 0.33 g となるが、これは窒素 38.5 mg に相当し、0.05 mol/L 硫酸で滴定すると 27.4 mL を要する計算となる。試験で規定されている 0.05 mol/L 硫酸は 25 mL であるため、試料によっては過量の硫酸が存在しない。つまり、滴定する前から滴定終点を超えていることとなる。また、CSNa についても、窒素の規格上限(3.8%)である試料を既定の採

取量 1 g 採って試験を実施した場合、これは窒素として 38 mg に相当し、0.05 mol/L 硫酸で滴定すると 27.1 mL を要する計算となる。つまり、Cys と同様に滴定前から滴定終点を超えていることとなる。このように Cys 及び CSNa においては、窒素定量が確実に実施できない場合がある。

そこで本研究では、Cys 及び CSNa の窒素定量法の改正に向けた基礎的検討として、複数の窒素定量法による測定値の比較を行うとともに、各定量法の操作性、設備面での課題、初期コスト等について比較した。

B. 研究方法

B-1) 試料

Cys は一般社団法人日本食品添加物協会(日添協)を通じて入手した市場流通品を用いた。また、CSNa については日添協を通じても入手できなかったため、市販の試薬(特級、関東化学(株)製)を用いた。

B-2) 試薬及び標準品

① 試薬

硫酸：特級

二酸化セレン：和光特級

水酸化ナトリウム：特級

0.05mol/L 硫酸：容量分析用

以上、富士フイルム和光純薬(株)製

② 標準品

エチレンジアミン四酢酸(EDTA)：認証標準物質、LECO ジャパン合同会社製

アセトアニリド：有機元素分析用、キシ

ダ化学(株)製

B-3) 定量

① 公定法(ケルダール法)

操作は公定書にしたがった。すなわち、Cysは乾燥せず、CSNaは105℃で4時間乾燥したもの試料とし、既定の量(Cys : 0.3 g, CSNa : 1 g)を精密にケルダールフラスコに量り採り、硫酸カリウム 5 g, 硫酸銅(II)五水和物 0.5gを加えた。ただし、Cysの場合はさらに二酸化セレン 0.2 gを加えた。これに硫酸 20 mLを加え、泡立ちがほとんど止むまで穏やかに加熱し、更に温度を上げて沸騰させ、内容物が青色の透明な液となった後、更に 1～2時間加熱した(Cysの場合は4時間)。冷後、水 150mLを徐々に加え、冷却した。冷後、沸騰石又は粒状の亜鉛 1～3粒を加え、ケルダール分解装置を組み立てた(図1)。Hに0.05 mol/L 硫酸 25 mLを正確に量って入れ、更に水約 50 mLを加え、Gの下端をこの液中に浸し、次に、Cから水酸化ナトリウム溶液(1→5)85 mLを徐々に加え、更に少量の水で洗い込み、Dの部分のピンチコックを閉じ、Aを軽く揺り動かして内容物を混和した後、穏やかに加熱し、沸騰し始めたならば加熱を強めて、内容物の約 2/3 容量が留出するまで蒸留した。次に、Gの下端をHの液面から離し、更にしばらく蒸留を続けた後、Gの下端を少量の水で洗い込み、Hの液中の過量の硫酸を 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。終点の確認には、電位差計又は指示薬(ブロモクレゾールグリーン・メチルレッド混合試液 3 滴)を用いた。別に空試験を

行い、補正した。なお、全ての操作を3回繰り返した(n=3)。

② 公定法改法(ケルダール法)

公定法から試料量を減らした方法を公定法改法とした。試料量は、Cys は 0.2 g, CSNa は 0.8 g とした。その他は全て① ケルダール法と同様に操作した。

③ セミマイクロケルダール法

1)装置

加熱分解装置 : DigiPREP HT250-20(株式会社 SCP SCIENCE 製)(図2)

自動蒸留滴定装置 : VAPODEST 500(ゲルハルトジャパン株式会社製)(図3)

2)測定条件

水添加量 : 50 mL

30%水酸化ナトリウム溶液量 : 30 mL

2%ほう酸溶液量 : 80 mL

蒸留時間 : 5 min

3)定量

第18改正日本薬局方³⁾又は医薬部外品原料規格 2021⁴⁾にしたがった。すなわち、Cys は 105℃3 時間、CSNa は 105℃で 4 時間乾燥したもの試料とし、既定の量(Cys : 30 mg, CSNa : 0.1 g)を精密に分解容器に量り採り、分解促進剤 1 gを加えた。これに硫酸 7 mLを加えた後、過酸化水素(30) 1 mLを分解容器を揺り動かしながら徐々に加えたのち、加熱分解装置で分解した。なお分解温度は 380℃、分解時間は4時間とした。冷後、水 20mLを注意しながら加えて冷却し、自動蒸留滴定装置で蒸留滴定を行った(滴定液 :

0.005 mol/L 硫酸). 別に空試験を行い, 補正した. なお, 全ての操作を 3 回繰り返した (n=3).

④ 元素分析法(改良デュマ法)

1)装置

元素分析装置 : SUMIGRAPH NC-TRINITY(株式会社住友分析センター製)(図 4)

2)測定条件

燃焼管温度 : 900 °C

還元管温度 : 600 °C

熱伝導度検出器温度 : 100 °C

カラム温度 : 70 °C

キャリアガス : 高純度ヘリウムガス(純度 99.995 %以上)

キャリアガス流量 : 80 mL±5 mL/min

助燃ガス : 高純度酸素ガス(純度 99.99 %以上)

3)定量

試料(Cys : 0.5 及び 0.25 g, CSNa : 0.5 g)及び EDTA 標準品をそれぞれ石英ボードに精密に量りとり装置に導入し測定した. 検量線範囲は想定される範囲として窒素量が 10~64 mg に相当する濃度とした. 得られた EDTA 標準品のピーク面積から検量線を作成し, 各試料のピーク面積値から窒素量を求めた. なお, 全ての操作を 3 回繰り返した (n=3).

⑤ 元素分析法(CHN コーダー法)

1)装置

有機微量元素分析装置 : vario EL cube(エレ

メンター・ジャパン株式会社製)(図 5)

2)測定条件

燃焼管温度 : 950°C

還元管温度 : 550°C

キャリアガス : ヘリウム

キャリアガス流量 : 230 mL/min

助燃ガス : 酸素

3)定量

試料(Cys 及び CSNa : 2 mg)及びアセトアニリド標準品をそれぞれアルミボードに精密に量りとり装置に導入し測定した. 検量線範囲は想定される範囲として窒素量が約 0.1~0.3 mg に相当する濃度とした. 得られたアセトアニリド標準品のピーク面積から検量線を作成し, 各試料のピーク面積値から窒素量を求めた. なお, 全ての操作を 3 回繰り返した(n=3).

C. 結果及び考察

C-1) 各定量法の定量値の比較

C-1-1) Cys

各定量法における結果を表 1 及び図 6 に示した. また, ④ 改良デュマ法及び ⑤ CHN コーダー法の検量線を図 7 に示した. いずれの検量線も測定した範囲において良好な直線性($r>0.9999$)であった. ただし, Cysにおいては, ④ 改良デュマ法において試料中の窒素量が今回設計した検量線範囲の上限値付近となったことから試料量を半分の 0.25 g とした結果も④'として示した.

定量値の平均値(n=3)は 98.7~99.4%であった. 公定法とその他の定量法の定量値の比(その他の定量法/公定法)は 0.99~1.00 であ

った。また、相対標準偏差は 0.07~0.55%であった。以上の結果から、いずれの定量法においてもほぼ同程度の定量値が得られること、かついずれの定量法においても精度よく測定可能であることが確認された。

C-1-2) CSNa

CSNaは吸湿性があり、⑤ CHN コーダー法における採取量 2 mg は極めて微量なため正確な秤量が困難であった。そのため、CSNaでは⑤ CHN コーダー法は検討から除外した。⑤ CHN コーダー法以外の定量法における結果を表 2 及び図 8 に示した。

定量値の平均値(n=3)は 3.08~3.19%、公定法とその他の定量法の定量値の比(その他の定量法/公定法)は0.98~1.02、相対標準偏差は 0.21~2.27%であった。以上の結果から、CSNaにおいても、いずれの定量法でも得られる定量値はほぼ同じであること、かついずれの定量法においても精度よく測定可能であることが確認された。

C-2) 各定量法の特徴

C-2-1) ケルダール法及びセミマイクロケルダール法

ケルダール法の操作は以下の通りである。また、公定書に示されているケルダール法及びセミマイクロケルダール法で用いる装置をそれぞれ図 1~図 3 に示した。

- ① 試料に硫酸を加え分解促進剤存在下で加熱分解して窒素を硫酸アンモニウムに変換する。
- ② 水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性と

したのち、水蒸気蒸留によってアンモニアを遊離させ硫酸に捕集し、再び硫酸アンモニウムとする。

- ③ 過量の硫酸を水酸化ナトリウムで滴定し、②において消費された硫酸の量を求める。(逆滴定)
- ④ 消費された硫酸の量から計算式により窒素の量を求める。

なお、セミマイクロケルダール法の操作もケルダール法とほぼ同様であるが、公定書においては、試料量はケルダール法の 1/10 とされ、遊離したアンモニアの捕集はホウ酸溶液を用い、ホウ酸溶液中に遊離したアンモニアを硫酸で滴定する点で異なる。なお、一部の操作は自動化された装置を用いることもできる。

試薬として劇物である硫酸や水酸化ナトリウムを使用するうえ、「L-シスチン」では分解促進剤に毒物である二酸化セレンを使用する。

分析時間は、ケルダール法及びセミマイクロケルダール法ともに試料の分解に約 4 時間、蒸留から測定までの操作にケルダール法は約 45 分間、セミマイクロケルダール法は約 7 分間程度かかる。また、自動化されていない装置を用いる場合は、大部分の操作において試験者が現場に立ち会う必要があるため、試験者への負担が大きい。

基本的に特別な機器は不要であり、試験に用いる装置はいずれもガラス器具で構成されそれぞれはそれほど高価なものではない。しかし、複数試料を同時に加熱できるような装置もあり(図 9)、十数万円程度かか

る。また、セミマイクロケルダール法では加熱分解装置(図2)や自動蒸留滴定装置(図3)を使用することができるが、それぞれ数十万～百数十万円程度かかる。

また試料の分解時に亜硫酸ガスが発生するためドラフト設備が必須となり、大量の硫酸廃液に加え、硫酸銅を使用するため重金属廃液の処理が必要となる。したがって、環境負荷が大きい試験法であるとも言える。

C-2-2) 元素分析法

元素分析法は、いわゆる燃焼法と呼ばれ、元素分析計を用いる。窒素の場合、採取した試料を高温で完全燃焼し窒素酸化物(NO_x)を発生させ、還元管を通過して窒素に還元したのち、水分と二酸化炭素を除去し熱伝導度検出器(Thermal Conductivity Detector, TCD)や非分散赤外線吸収法(Non-Dispersive Infrared Absorption, NDIA)等によって検出する。適切な標準品を用いて検量線を作成し定量することができる。大部分の操作は自動化されているため、煩雑な操作はない。装置としては、窒素以外にも炭素、水素、硫黄、酸素等の定量も可能なものなど、様々なメーカーから多種の装置が市販されているが、いずれも数百万～一千数百万円程度と非常に高価である(図4及び図5)。

分析時間は操作全体では10分以内で完了するため非常に迅速である。特別な試薬は使用しないが、キャリアガスとしてヘリウム又はアルゴン、助燃ガスとして酸素を必要とする。そのためこれらのガスを供給可能な設備又はガスボンベの設置が必要とな

る。

得られた結果は滴定のように目視での判定を行わないため試験者による差が生じない。

C-2-3) 各定量法の特徴の比較

各定量法の特徴を表3にまとめた。ケルダール法は分析に長時間を要し、また試験者や環境への負荷が大きいことが改めて示された。一方元素分析法においては、装置が高価であり初期投資が大きいというデメリットがあったが、測定時間や操作性は明らかに迅速で簡便であり、試験者や環境負担の小さい分析法であると考えられた。

D. 結論

窒素定量に課題がある「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を試料に用いて、公定法を含む複数の窒素定量法の定量値及び操作性等を比較した。

定量値はいずれの定量法でもほぼ同程度の値が得られた。またいずれの精度も同等であった。ケルダール法は試験者や環境への負荷が大きい分析法であること、一方元素分析法は迅速かつ簡便ではあるが初期投資の負担が大きいことが改めて示された。

以上の結果を踏まえると、「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」に対しては、公定法の試料量を少なくした公定法改法を導入することが最も簡単であると考えられた。一方、元素分析法は複数の元素を測定可能な装置も有ることから、複数部署で共有して使用できると考えられる。

したがって、将来的には試験者や環境への負荷低減のため元素分析法へシフトしていくべきであると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 食品，添加物等の規格基準 第2 添加物，厚生省告示第370号(昭和34年)。
- 2) 第10版食品添加物公定書，厚生労働省，消費者庁(2024)。
- 3) 第18改正日本薬局方，厚生労働省告示第220号(2021)。
- 4) 医薬部外品原料規格，厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課(2021)。

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 渡辺実薫，御所窪誠，伊藤朱美，藤松芽生，座間俊輔，阿部 裕，建部千絵，多田敦子，杉本直樹：食品添加物公定書における窒素定量法の検証，日本食品衛生学会第120回学術講演会(2024.11)。
- 2) 中島 馨，増本直子，阿部 裕，杉本直樹：相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討 ～クロロゲ

ン酸類縁体の構造と RMS の関係～，日本食品衛生学会第120回学術講演会(2024.11)。

- 3) 石附京子，阿部裕，杉本直樹：エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定呈法の検討，第61回全国衛生化学技術協議会年会(2024.11)。
- 4) 渡辺実薫：食品添加物公定書における窒素定量法の代替試験法の検証．第7回(公社)日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会(2025.2)。

2. 論文発表等

なし

3. 総説，解説等

- 1) 阿部 裕，多田敦子：第10版食品添加物公定書における改正のポイント．月刊フードケミカル，2024；5：20-24。

G. 知的財産権の出願，登録状況

なし

装置

概略は、図1による。ただし、接続部は、すり合わせにしてもよい。

A：ケルダールフラスコ（硬質ガラス製 容量約300mL）

B：ガラス管

C：アルカリ溶液注入用漏斗

D：ゴム管（BとCを連結する。途中にピンチコックが付けてある。）

E：しぶき止め

F：蒸留管

G：冷却器

H：吸収用フラスコ（容量約300mL）

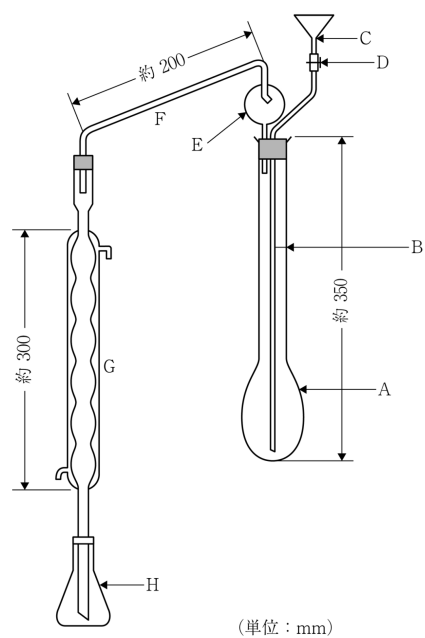


図1 ケルダール法の装置²⁾



図 2 加熱分解装置((DigiPREP HT250-20, 株式会社 SCP SCIENCE 製)



図 3 自動蒸留滴定装置 (VAPODEST 500, ゲルハルトジャパン株式会社製)



図4 改良デュマ法で用いた装置
((SUMIGRAPH NC-TRINITY, 株式会社住友分析センター製)

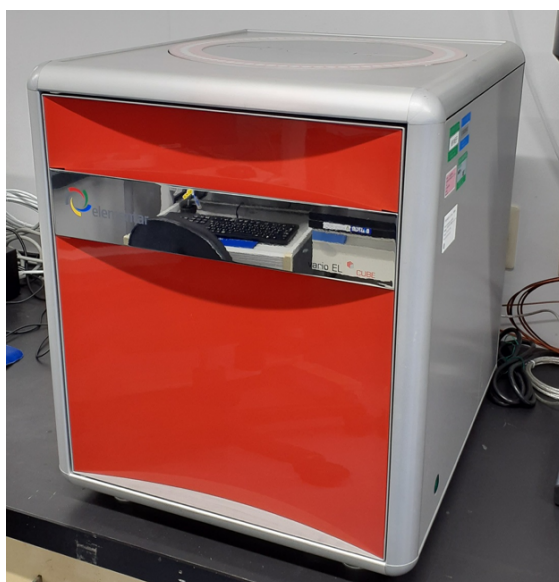


図5 CHN コーダー法で用いた装置
((vario EL cube, エレメンター・ジャパン株式会社製)

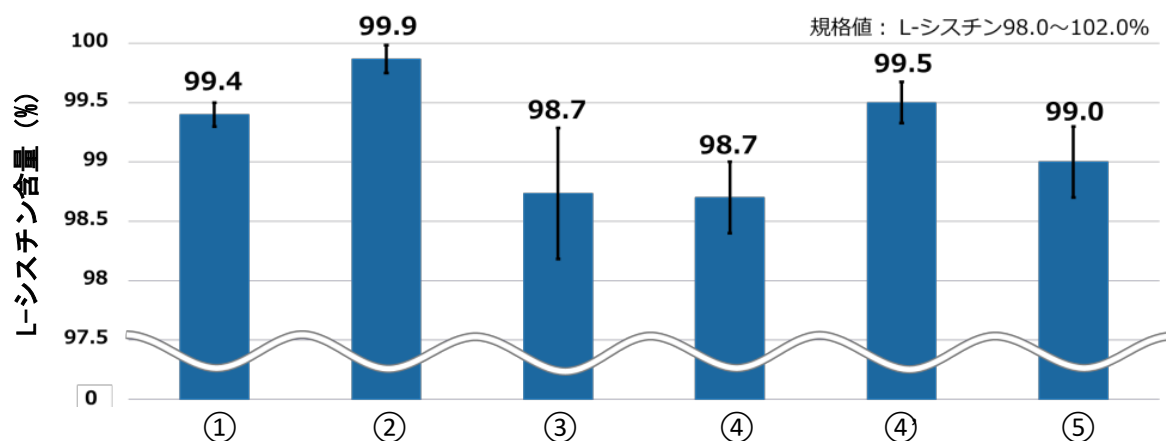


図6 L-シスチン含量(%, n=3)

- ① 公定法((ケルダール法)), ② 公定法改法((ケルダール法),
- ③ セミマイクロケルダール法,
- ④ 元素分析法((改良デュマ法)・試料量 0.5g,
- ④' 元素分析法((改良デュマ法)・試料量 0.25 g,
- ⑤ 元素分析法((CHN コーダー法))

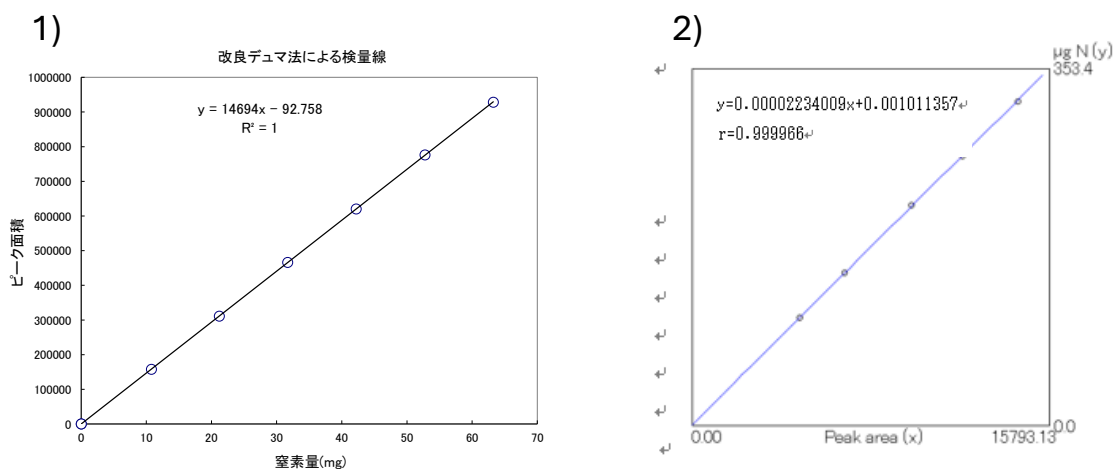


図7 元素分析法による検量線

- 1)改良デュマ法((標準品：EDTA, 検量線範囲：窒素量として 10~64 mg)
- 2)CHN コーダー法((標準品：アセトアニリド, 検量線範囲：窒素量として約 0.1~0.3 mg)

なお、CHN コーダー法の検量線は装置からとりだされたものであるため縦軸の記載がない。

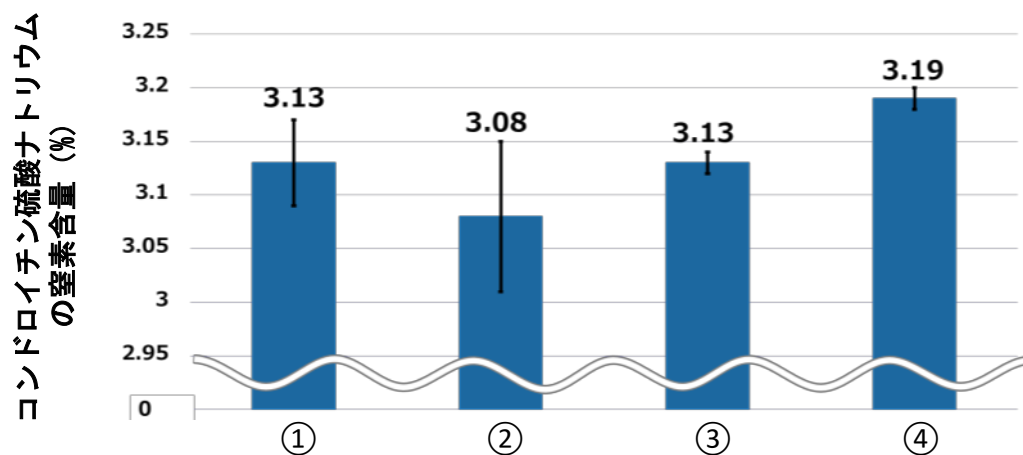


図8 コンドロイチン硫酸ナトリウムの窒素含量(%, n=3)

- ① 公定法((ケルダール法)、② 公定法改法((ケルダール法)、
③ セミマイクロケルダール法、④ 元素分析法((改良デュマ法)



図9 ケルダール分解装置((同時加熱式)

表 1 L-シスチンの試験結果

No	試験方法	試行数	空試験滴定量 (mL)	滴定量 (mL)	空試験差引後 滴定量 (mL)	試料採取量 (g)	滴定液 フタガー	Nとして			L-シスチンとして		
								計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)	計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)
①	公定法 (ケルダール法)	1回目	25.01	0.05	24.96	0.3024	1.001	11.58			99.3		
		2回目	25.01	0.07	24.94	0.3020	1.001	11.58	11.58	0.07	99.4	99.4	
		3回目	25.01	0.08	24.93	0.3016	1.001	11.59			99.5		
②	公定法改法 (ケルダール法)	1回目	25.01	8.27	16.74	0.2019	1.001	11.63			99.8		
		2回目	25.01	8.39	16.62	0.2004	1.001	11.63	11.64	0.11	99.8	99.9	
		3回目	25.01	8.37	16.64	0.2003	1.001	11.65			100.0		
③	セミクロ ケルダール法	1回目	1.129	25.924	24.795	0.0304	1.000	11.44			98.2		
		2回目	1.129	26.059	24.930	0.0302	1.000	11.57	11.51	0.55	99.3	98.7	
		3回目	1.129	26.129	25.000	0.0304	1.000	11.51			98.7		
④	元素分析法 (改良デュマ法) 試料量：0.5 g	1回目	-	-	-	0.5063	-	11.47			98.4		
		2回目	-	-	-	0.5051	-	11.54	11.50	0.31	99.0	98.7	
		3回目	-	-	-	0.5007	-	11.50			98.7		
④'	元素分析法 (改良デュマ法) 試料量：0.25 g	1回目	-	-	-	0.2508	-	11.58			99.3		
		2回目	-	-	-	0.2501	-	11.51	11.54	0.35	98.7	99.0	
		3回目	-	-	-	0.2505	-	11.54			99.0		
⑤	元素分析法 (CHN コーダー法)	1回目	-	-	-	0.0020362	-	11.58			99.4		
		2回目	-	-	-	0.0019561	-	11.63	11.60	0.22	99.7	99.5	
		3回目	-	-	-	0.0019009	-	11.58			99.4		

表 2 コンドロイチン硫酸ナトリウムの試験結果

No	試験方法	試行数	空試験滴定量 (mL)	滴定量 (mL)	空試験差引後 滴定量 (mL)	試料採取量 (g)	滴定液 777ター	Nとして		
								計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)
①	公定法 (ケルダール法)	1回目	25.02	2.50	22.52	1.0014	1.001	3.15		
		2回目	25.02	2.91	22.11	1.0027	1.001	3.09	3.13	1.20
		3回目	25.02	2.37	22.65	1.0051	1.001	3.16		
②	公定法改法 (ケルダール法)	1回目	25.02	6.98	18.04	0.8016	1.001	3.16		
		2回目	25.02	7.62	17.40	0.8035	1.001	3.04	3.08	2.27
		3回目	25.02	7.66	17.36	0.8025	1.001	3.03		
③	セミミクロ ケルダール法	1回目	1.129	23.880	22.751	0.10185	1.000	3.13		
		2回目	1.129	23.555	22.426	0.10028	1.000	3.13	3.13	0.29
		3回目	1.129	23.449	22.320	0.10036	1.000	3.12		
④	元素分析法 (改良デュマ法)	1回目	-	-	-	0.5022	-	3.19		
		2回目	-	-	-	0.5061	-	3.19	3.19	0.21
		3回目	-	-	-	0.5041	-	3.18		