

食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
食品添加物の試験法の向上及び摂取量に基づく安全性確保に関する研究
令和 7 年度分担研究報告書

代替検出法を適用した新規試験法の開発に関する研究

研究分担者 建部千絵 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

研究要旨

本研究では、第 10 版食品添加物公定書（公定書）において一部の成分規格試験に使用されている特殊検出器（電子捕獲検出器、炎光光度検出器、窒素リン検出器）に着目し、これらの検出器を保有しない機関でも分析可能な代替試験法の検討に資する情報収集を目的として、海外規格（Food Chemicals Codex 14（FCC）及び FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives（JECFA））及び関連文献等の調査を行った。まず、公定書におけるクロマトグラフィー試験法を整理した結果、LC 法では紫外可視吸光光度計、示差屈折計、PDA 検出器、GC 法では水素炎イオン化検出器、熱伝導度検出器が汎用的に使用されていた。一方、食用赤色 104 号（R104）及び食用赤色 105 号（R105）のヘキサクロロベンゼン（HCB）の定量には電子捕獲検出器、ショ糖脂肪酸エステルジメチルスルホキシド及びジメチルホルムアミドの定量には炎光光度検出器及び窒素リン検出器、ビニルイミダゾール・ビニルピロリドン（PVI-PVP）共重合体の有機性不純物の定量には窒素リン検出器が用いられており、これらが代替試験法検討の対象となった。

海外規格の調査では、R104 及び R105 中の HCB について FCC 及び JECFA ともに規格値は設定されておらず、ショ糖脂肪酸エステル中の DMSO は FCC 及び JECFA で 2 mg/kg 以下、DMF は JECFA で 1 mg/kg 以下の規格が設定され、いずれも GC 法による試験法が採用されていた。PVI-PVP 共重合体については FCC 及び JECFA に直接の規格は存在しなかったが、国際ブドウ・ワイン機構（OIV）ではイミダゾール、1, 3-ジビニルイミダゾリジン-2-オン、1-ビニルイミダゾール、1-ビニル-2-ピロリドン、2-ピロリドンに対する詳細な不純物規格が設定されていた。文献調査では、HCB は ODS またはフェニルカラムを用いた UV またはフォトダイオードアレイ検出器を用いた LC 法により分析可能であり、蛍光特性を利用した検出法も報告されていた。DMSO 及び DMF については ODS カラムまたは極性相互作用型カラムを用いた LC-UV 法が複数報告されていた。PVI-PVP 由来モノマーについては、C30 カラムを用いた LC-MS/MS 法が高い選択性と感度を示すことが確認された。以上より、対象化合物に応じて適切なカラム及び検出器を選択することで、特殊検出器を用いずに代替可能な分析法が一定程度存在することが示された。本研究で得られた知見は、公定書試験法の汎用性向上に向けた代替法検討の基礎資料として有用であることが明らかとなった。

研究協力者

藤原由美子 国立医薬品食品衛生研究所

研究目的

第 10 版食品添加物公定書¹⁾（以下、公定書）には、各種食品添加物の成分規格

が収載されており、液体クロマトグラフィー (LC) 法やガスクロマトグラフィー (GC) 法など、さまざまなクロマトグラフィー法および検出器を用いた同定、不純物の定量、添加物の定量方法が各条において定められている。

公定書においては、LC 法では紫外可視吸光光度計または可視吸光光度計、示差屈折計、フォトダイオードアレイ検出器、が、GC 法では水素炎イオン化検出器、熱伝導度検出器が用いられることが多い。一方で、一部の成分規格では特殊な検出器の使用が規定されており、これらの検出器を保有していない機関では分析が困難となるため、汎用性に欠けるという課題がある。多くの機関で分析可能な汎用的検出器を備えた装置により、より精度よく分析できる試験法の整備が望まれている。本研究では、公定書において特殊な検出器を用いた試験法が設定されている添加物を対象に、海外規格 (Food Chemicals Codex 14 (FCC) ²⁾、FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives Monographs (JECFA)) 及びその他文献を調査し、これら試験法に対する代替法の検討に資する情報収集を行った。

A. 研究方法

1) 対象品目

公定書において、LC 法または GC 法において用いられる検出器のうち、紫外可視吸光光度計または可視吸光光度計、フォトダイオードアレイ検出器、水素炎イオン化検出器、熱伝導度検出器以外の検出器を用いて分析している試験法について調査し、対象添加物品目を選定した。

2) 調査方法

1) で選択した対象添加物の同様の規格試験について、FCC および JECFA における試験方法を調査した。また、その他、分析対象物質についての分析例について文献調査を実施し、規格試験の代替法となりうる分析法及びその条件について調査を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

B. 研究結果及び考察

1) 対象品目の検討

公定書 ¹⁾における成分規格試験において、汎用な検出器として LC 法では紫外可視吸光光度計が 54 品目、可視吸光光度計が 8 品目、示差屈折計が 25 品目、フォトダイオードアレイ検出器が 10 品目、蛍光検出器が 2 品目で用いられており、GC 法では水素炎イオン化検出器が 60 品目、熱伝導度検出器 2 品目で用いられていた。LC 法ではその他タール色素の塩化物や硫酸塩の試験やビードレッドの硝酸塩の試験に電気伝導度計が用いられていたが、無機イオンを定量する方法として電気伝導度計は汎用な検出器であるため対象としなかった。その他の検出器としては、GC 法でアルゴンでの酸素の定量に黄リン発光式酸素計が用いられていた。また、食用赤色 104 号 (R104) 及び食用赤色 105 号 (R105) ではヘキサクロロベンゼン (HCB) の定量に電子捕獲検出器が用いられていた。更に、ショ糖脂肪酸エステルではジメチルスルホキシド

(DMSO) またはジメチルホルムアミド (DMF) の定量に炎光光度検出器 (硫黄フィルター装着) が用いられていた。ビニルイミダゾール・ビニルピロリドン共重合体では有機性不純物 (イミダゾール (IMZ)、1, 3-ジビニルイミダゾリジン-2-オン (DVI)、1-ビニルイミダゾール (1VIM)、1-ビニル-2-ピロリドン (NVP)、2-ピロリドン (2-PYR)) の定量に窒素リン検出器が用いられていた。(Table 1) 電子捕獲検出器はハロゲン化合物 (Cl、Br、F) に強く応答し、炎光光度検出器 (硫黄フィルター装着) は硫黄やリンに対して、窒素リン検出器は窒素およびリンに対して選択的に応答する検出器であるため、特定の化合物を選択的に検出できる一方、炭化水素などの一般的な有機化合物にはほとんど応答せず、分析対象物質が限定されるため、汎用的な検出器とは言えない。以上の結果から、本研究では、R104 及び R105 の HCB の定量で用いられている電子捕獲検出器、ショ糖脂肪酸エステルでは DMSO 及び DMF の定量に用いられている炎光光度検出器 (硫黄フィルター装着) 及び窒素リン検出器、ビニルイミダゾール・ビニルピロリドン (PVI-PVP) 共重合体で有機性不純物の定量に用いられている窒素リン検出器について、代替法の調査を実施した。

2) 海外規格との比較

2) -1 食用赤色 104 号及び食用赤色 105 号のヘキサクロロベンゼン規格

R104 及び R105 の成分規格及びその試験法について海外規格 (FCC、JECFA) でのヘキサクロロベンゼン (HCB) の試験

法について調査した。その結果、FCC では成分規格はなく米国電子連邦規則集 (eCFR : Electronic Code of Federal Regulations) ³⁾において、R104 と同じ化合物が D&C Red No.28 として規格が設けられている。しかし、不純物として HCB の規格は設けられていなかった。また、R104 及び R105 は日本で化粧品や医薬部外品に使用できる、法定色素と同じ化合物であるため、「医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令」⁴⁾も調査したが、いずれも HCB の規格は設定されていなかった。

2) -2 ショ糖脂肪酸エステルではジメチルスルホキシドまたはジメチルホルムアミド規格

ショ糖脂肪酸エステル成分規格及びその試験法について海外規格 ^{2,5)} (FCC、JECFA) での DMSO 及び DMF の規格及び試験法について調査した。その結果、Table 3 に示すように、DMSO については、FCC 及び JECFA いずれも 2 mg/kg 以下の規格が設定されており、試験法は公定書と同様の炎光光度検出器 (394 nm 硫黄フィルター) を用いた、パックドカラムによる GC 法が設定されていた。また、DMF については、Table 4 に示すように FCC では規格がなく、JECFA では公定書と同様、1 mg/kg 以下の規格が設定されており、その試験法は、公定書と同様の窒素リン検出器を用いた GC 法が設定されていた。

2) -3 ビニルイミダゾール・ビニルピロリドン共重合体で有機性不純物規格

PVI-PVP 共重合体について FCC 及び JECFA における有機性不純物規格を調査した ^{2,6)}。Table 5-1 に示すように、FCC、

JECFA いずれにおいても、PVI-PVP 共重合体と全く同じ化合物の規格は存在していなかった。そのため FCC では Copovidone (NVP と酢酸ビニルの共重合体) の規格を、JECFA では Polyvinyl pyrrolidone について調査した。FCC での Copovidone では NVP (10 mg/kg 以下)、2-PYR (0.5%以下) 及び酢酸ビニル (1%以下) の規格が設定されており、その試験法は UV 検出器を用いた LC 法であった。JECFA における Polyvinyl pyrrolidone では Monomer content として、1%以下が設定されており、その試験法は滴定法であった。更に、その他の海外の規格として、国際ブドウ・ワイン機構 (OIV : International Organization of Vine and Wine) での PVI-PVP 共重合体 (Polyvinylimidaole/Polyvinylpyrrolidone) 規格について調査した⁷⁾。その結果、Table 5-2 に示すように、IMZ (50 mg/kg 以下)、DVI (2 mg/kg 以下)、1-VIM (10 mg/kg 以下)、NVP (5 mg/kg 以下)、2-PYR (50 mg/kg 以下) が設定されており、公定書と同様に窒素リン検出器を用いた方法が設定されていた。また、OIV 規格では、Appendix 2 として、ワイン中の PVI-PVP 共重合体由来残留モノマーの分析法が設定されており、その方法も同様の化合物が分析対象であったため、試験法を調査した。その結果、ワイン中の残留モノマーの分析法では ODS カラム (C30) を用いた液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS 法) が設定されていた。

3) 文献等調査結果

各分析対象物質について分析方法を報告した文献等を調査し、Table 6 にまと

めた。

3) -1 ヘキサクロロベンゼン分析法

HCB 分析法としては、土壌からの HCB 分析法について報告があり、ODS カラムによる、PDA 検出器を用いた LC 法を使用していた⁸⁾。また、クロロベンゼン分析法として、HCB を含むクロルベンゼンの分析アプリケーションデータで、フェニルカラムを用いた、UV 検出器による LC 法が報告されていた⁹⁾。また、LC 法ではないが、HCB をエタノールで溶解することで、蛍光を発する性質を利用した検出法の報告もあった¹⁰⁾。

3) -2 ジメチルスルホキシドまたはジメチルホルムアミド分析法

DMSO の分析法としては、医薬品原薬中の DMSO の分析法として、ODS (C8) カラムを用いて、UV 検出器による LC 法が報告されており¹¹⁾、DMSO 及び DMF の分析法としては、極性相互作用型カラムのアプリケーションデータとして、UV 検出器を用いた LC 法の報告¹²⁾や、医薬品中の DMSO 及び DMF の分析法として、ODS カラムを用いた、UV 検出器による LC 法の報告があった¹³⁾。

3) -3 ビニルイミダゾール・ビニルピロリドン共重合体中の有機性不純物分析法

有機性不純物 (IMZ、NVP、1-VIM、2-PYR) の分析法としては、ワイン清澄剤 PVPP 及び PVI-PVP ポリマー由来のモノマー定量のための方法として、OSD (C30) カラムを用いた、LC-MS/MS 法が設定されていた¹⁴⁾。

C. 結論

海外規格の調査では、R104 及び R105

中の HCB、シヨ糖脂肪酸エステル中の DMSO 及び DMF、PVI-PVP 共重合体中の有機性不純物に関する規格は、対象化合物により規格の有無や試験法が異なっていた。HCB は主要規格で基準値が設定されていない一方、シヨ糖脂肪酸エステル中の DMSO 及び DMF は FCC 及び JECFA で GC 法による規格が存在した。PVI-PVP 共重合体中の有機性不純物については FCC 及び JECFA に直接の規格はないが、OIV では詳細な不純物規格が設定されていた。HCB、DMSO 及び DMF、PVI-PVP 中の有機性不純物について既存文献等を整理した結果、いずれも LC 法が中心であり、対象化合物の極性及び構造に応じて ODS、極性相互作用型、C30 など適切なカラムが選択されていた。検出器は UV が主流であるが、HCB では蛍光特性を利用した方法、PVI-PVP 由来モノマーでは LC-MS/MS による高選択性分析が有効であることが示された。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takada S., Hioki F., Maruta C., Fujiwara Y., Kurohara T., Tatebe C., Tada A., Sugimoto N., Quantitative analysis of stereoisomers of sorbic acid using a single reference on high-performance liquid chromatography and relative molar sensitivity, Jpn. J. Food Chem. Safety, **32**(2), 69–79 (2025).
- 2) Kurohara T.,* Tatebe C.,* Fujiwara Y., Takada S., Ishizuki K., Fujihara K.,

Kawasue S., Tada A., Sugimoto N., Synthesis and quantitation of *m,p*-ESBSA: An impurity in Brilliant Blue FCF and Fast Green FCF, J. Agric. Food Chem., **39**, 24997–25006 (2025).

* Corresponding authors

- 3) Kurohara T., Tatebe C.*, Fujiwara Y., Hioki F., Yanagimoto T., Takada S., Tada A. *, Sugimoto N., Optimization of Ninhydrin Test for Amino Acids by Multiple Reaction Monitoring Analysis, Food Hyg. Saf. Sci., **67**(1), 22–30 (2025).

* Corresponding authors

- 4) Kurohara T., Tatebe C., Fujiwara Y., Takada S., Fujihara K., Kawasue S., Tada A., Sugimoto N., Isomer synthesis focusing on sulfanilic acid moiety of ESBSAs: possible impurities in Brilliant Blue FCF and Fast Green FCF, Food. Addit. Comtam. PartA, **43**, 497–507 (2026).
<https://doi.org/10.1080/19440049.2025.2611433>

2. 学会発表

- 1) 建部千絵、藤原由美子、高田翔平、久保田浩樹、多田敦子、杉本直樹、SR-HPLC 法を用いた食用赤色 2 号中の未反応原料及び反応中間体の定量法に関する検討、日本食品化学学会 第 31 回総会・学術大会 (2025.6.5-6、彦根市)
- 2) 相対モル感度(RMS)を用いた食用緑色 3 号中の未反応原料及び反応中間体の定量法に関する検討、藤原由美子、建部千絵、高田翔平、久保田浩

樹、多田敦子、杉本直樹、第7回日本定量NMR研究会年会

(2025.11.5、朝霞市)

- 3) 建部千絵、藤原由美子、高田翔平、久保田浩樹、多田敦子、登田美桜、杉本直樹、原材料表示から見える飲料における食品添加物の種類と使用状況、第62回全国衛生化学技術協議会年会(2025.11.6-7、高崎市)

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 参考文献

- 1) 第10版食品添加物公定書 Available at: https://www.caa.go.jp/policies/policy/standards_evaluation/food_additives/official_002/
- 2) Food Chemicals Codex, 14th Edition, USP, (2025).
- 3) Code of Federal Regulations (eCFR) 21 CFR § 74.1328 「D&C Red No. 28」 Available at: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-A/part-74/subpart-B/section-74.1328>
- 4) 医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令、昭和四十一年八月三十一日、厚生省令第三十号
- 5) FAO/WHO. Sucrose esters of fatty acids. FAO JECFA Monographs 10. Rome: FAO/WHO; 2010. Available at: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/mono

<graph10/additive-447-m10.pdf>

- 6) FAO/WHO. Polyvinylpyrrolidone. In: FAO JECFA Monographs, Additive No. 328, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2010. Available at: https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/mono_graph10/additive-328-m10.pdf
- 7) International Oenological CODEX, COEI-1-PVIPVP Adsorbent copolymers of polyvinylimidazole/ Polyvinylpyrrolidone (PVI/PVP) Available at: <https://www.oiv.int/standards/international-oenological-codex/part-i-monographs/monographs/polyvinylimidazole/polyvinylpyrrolidone>
- 8) Khan, et al. *BMC Chemical Biology*, 11, 2 (2011). Available at: <http://www.biomedcentral.com/1472-6769/11/2>
- 9) GL Sciences. *HPLC Application Data*, No. LA307-0000. Available at: <https://www.glsciences.com/viewfile/?p=LA307>
- 10) Zhang, X. *Analyst*, 136, 4912–4915 (2011). Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1an15260b>
- 11) Walker, J. T., Paolini, D. L., & Segretario, J. *Journal of Chromatographic Science*, 34, 513–516, (1996).
- 12) SIELC Technologies. HPLC

Separation of Mixture of DMF and DMSO. Available at:

<https://sielc.com/hplc-separation-of-mixture-of-dmf-and-dms>

- 13) Nikalje, A. P. G., Gadikar, R., & Turwale, S. Drug Invention Today, **10**(8),1578–1582 (2018).
- 14) Borghini, F., Ferrari, S., Cavaglioni, A., Consumi, M., Tamasi, G., & Guidugli, F. *Food Chemistry*, **491**, 145266 (2025).

Table 1 公定書成分規格において特殊な検出器を使用している例

公定書項目	食品添加物名	試験名	規格	分析法	検出器
成分規格	食用赤色104号	純度試験	ヘキサクロロベンゼン 5.0 $\mu\text{g/g}$ 以下	ガスクロマトグラフィー	電子捕獲検出器
成分規格	食用赤色105号	純度試験	ヘキサクロロベンゼン 6.5 $\mu\text{g/g}$ 以下	ガスクロマトグラフィー	電子捕獲検出器
成分規格	シ $\equiv$ 脂肪酸エステル	純度試験	ジメチルスルホキシド シ $\equiv$ 糖酢酸イソ酪酸エステルの場合を除き、ジメチルスルホキシド として2.0 $\mu\text{g/g}$ 以下	ガスクロマトグラフィー	蛍光光度検出器（硫酸フィルター装着）
成分規格	シ $\equiv$ 脂肪酸エステル	純度試験	ジメチルホルムアミド N, N-ジメチルホルムアミドとして1.0 $\mu\text{g/g}$ 以下	ガスクロマトグラフィー	窒素リン検出器
成分規格	ビニルミダゾール・ビニルピロリドン共重合体	純度試験	有機性不純物 イミダゾール 50 $\mu\text{g/g}$ 以下 1, 3-ジビニルイミダゾリジン-2-オン 2 $\mu\text{g/g}$ 以下 1-ビニルイミダゾール 10 $\mu\text{g/g}$ 以下 1-ビニル-2-ピロリドン 5 $\mu\text{g/g}$ 以下 2-ピロリドン 50 $\mu\text{g/g}$ 以下	ガスクロマトグラフィー	窒素リン検出器

Table 2 食用赤色 104 号及び食用赤色 105 号に関連する海外規格

公定書	FCC	JECFA
食用赤色104号	D&C No. 28	—
電子捕獲検出器 ヘキサクロロベンゼン 5.0 $\mu\text{g/g}$ 以下	ヘキサクロロベンゼン規格なし	成分規格なし

公定書	FCC	JECFA
食用赤色105号	—	—
電子捕獲検出器 ヘキサクロロベンゼン 6.5 $\mu\text{g/g}$ 以下	成分規格なし	成分規格なし

Table 3 ショ糖脂肪酸エステルジメチルスルホキシド関連する海外規格

公定書	FCC	JECFA
ショ糖脂肪酸エステル	Sucrose Fatty Acid Esters	
ジメチルスルホキシド ショ糖酢酸イソ酪酸エステルの場合を除き、ジメチルスルホキシドとして 2.0 µg/以下	DIMETHYL SULFOXIDE Acceptance criteria: NMT 2 mg/kg	Dimethyl sulfoxide Not more than 2mg/kg
本品約 5 g を精密に量り、テトラヒドロフランに溶かして正確に 25mL とし、検液とする。別にジメチルスルホキシド約 0.1 g を精密に量り、テトラヒドロフランを加えて正確に 100mL とする。 この液 1 mL を正確に量り、テトラヒドロフランを加えて正確に 100mL とし、標準原液とする。標準原液 0.5mL、1 mL、2 mL 及び 5 mL を正確に量り、それぞれにテトラヒドロフランを加えて正確に 50mL とし、標準液とする。検液及び 4 濃度の標準液をそれぞれ 3 µL ずつ量り、次の操作条件でガスクロマトグラフィーを行う。標準液のジメチルスルホキシドのピーク高さ又はピーク面積を測定し、検量線を両対数方眼紙上で作成する。検液のジメチルスルホキシドのピーク高さ又はピーク面積を測定し、検量線からその量を求める。 操作条件 検出器 蛍光光度検出器（硫黄フィルター装着） カラム充填剤 液相 担体に対して 10% のポリエチレングリコール 20M 及び 3 % の水酸化カリウム担体 180～250µm のガスクロマトグラフィー用ケイソウ土 カラム管 内径 3mm、長さ 2 m のガラス管 カラム温度 150～170℃の一定温度 注入口温度 210℃ キャリヤーガス 窒素 流量 ジメチルスルホキシドのピークが約 3 分後に現れるように調節する。	Standard stock solution: 0.25 mg/ml of dimethyl sulfoxide in tetrahydrofuran Standard solutions: 0.005 mg/ml, 0.001 mg/ml, and 0.0005 mg/ml of dimethyl sulfoxide in tetrahydrofuran, from the Standard stock solution Sample: 5 g Sample solution: Transfer the Sample into a 25-ml volumetric flask, dilute with tetrahydrofuran to volume, and mix. Chromatographic system Mode: Gas chromatography <u>Detector: Flame photometric detector with a 394-nm sulfur filter</u> Column: 2-m × 3-mm (i.d.) glass column packed with 10% PEG 20M and 3% potassium hydroxide on Gas Chrom Z, or equivalent Column temperature: 160° Injection port temperature: 210° Carrier gas: Nitrogen Flow rate: 50 ml/min Injection volume: 3 µl Analysis: Note—Condition the column before use by raising the column temperature to 180° at a rate of 1°/min and letting it stand for 24 to 48 h with nitrogen flowing at 30 to 40 ml/min. Separately inject each of the Standard solutions into the gas chromatograph and record the resulting chromatograms. Prepare a calibration curve by plotting the concentration, in mg/ml, of each Standard solution versus its peak response, and draw the best straight line. Similarly inject the Sample solution into the chromatograph. Record the peak response for dimethyl sulfoxide and determine its concentration from the standard curve. Calculate the concentration of dimethyl sulfoxide, in mg/kg, in the Sample taken by the formula: Result = 2500C / W C = concentration (mg/ml) of dimethyl sulfoxide in the Sample solution determined from the standard curve W = weight (g) of the Sample taken	Standard solutions Prepare a 0.25 mg/mL stock solution of dimethyl sulfoxide in tetrahydrofuran. Prepare a range of solutions containing 0.1, 0.2, 0.4 and 1.0 µg/mL of dimethyl sulfoxide by dilutions of the stock solution with tetrahydrofuran. Chromatography conditions - Column: 10% PEG 20M and 3% KOH on Chromosorb W AW DMCS 60/80 mesh (2 m x 3 mm i.d.) or equivalent. - Raise the oven temperature to 180o at a rate of 10°/min and let stabilize for 24 to 48 h with 30 to 40 mL/min of nitrogen for conditioning - Carrier gas: Nitrogen - Flow rate: 30 mL/min <u>- Detector: Flame photometric detector (using 394 nm sulfur filter)</u> - Temperatures o injection port: 210o o column: 160o The retention time of dimethyl sulfoxide measured under the above conditions is approx. 3.4 min. Procedure Weigh accurately 5 g of the sample into a 25-mL volumetric flask, add 10 mL of tetrahydrofuran to dissolve the sample, add tetrahydrofuran to the mark, and mix the solution well. Inject 3 µl of the sample solution into the chromatograph.. Standard curve Prepare daily by injecting 3 µl of each of the standard solutions into the chromatograph. Calculate the concentration of dimethyl sulfoxide in mg/kg (CDMSO) from $CDMSO (mg/kg) = C \times 25 / W$ where - C is dimethyl sulfoxide concentration determined (µg/mL); - W is weight of sample (g).

Table 4 ショ糖脂肪酸エステル ジメチルホルムアミド 関連する海外規格

公定書	FCC	JECFA
ショ糖脂肪酸エステル	Sucrose Fatty Acid Esters	
ジメチルホルムアミド <i>N</i>, <i>N</i>-ジメチルホルムアミドとして 1.0 µg/g 以下	規格無し	Dimethylformamide Not more than 1 mg/kg
本品約 2 g を精密に量り、テトラヒドロフランに溶かして正確に 20 mL とし、検液とする。別に、<i>N</i>, <i>N</i>-ジメチルホルムアミド約 0.1 g を精密に量り、テトラヒドロフランを加えて正確に 100 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、テトラヒドロフランを加えて正確に 100 mL とし、標準原液とする。標準原液 0.5 mL、1 mL 及び 2 mL を正確に量り、それぞれにテトラヒドロフランを加えて正確に 100 mL とし、標準液とする。検液及び 3 濃度の標準液をそれぞれ 1 µL ずつ量り、次の操作条件でガスクロマトグラフィーを行う。標準液の <i>N</i>, <i>N</i>-ジメチルホルムアミドのピーク面積を測定し、検量線を作成する。検液の <i>N</i>, <i>N</i>-ジメチルホルムアミドのピーク面積を測定し、検量線から <i>N</i>, <i>N</i>-ジメチルホルムアミドの量を求める。 操作条件 検出器 窒素リン検出器 カラム 内径 0.32 mm、長さ 30 m のフューズドシリカ管の内面に、ガスクロマトグラフィー用ポリエチレングリコールを 0.5 µm の厚さで被覆したものカラム温度 40℃で 2 分間保持した後、毎分 20℃で 160℃まで昇温し、160℃を 2 分間保持する。 注入口温度 180℃ キャリアーガス ヘリウム 流量 <i>N</i>, <i>N</i>-ジメチルホルムアミドのピークが約 6 分後に現れるように調整する。 注入方式 スプリットレス		Determine by gas chromatography (Vol. 4) under the following conditions: Standard solutions Prepare a stock solution containing 1.00 mg/mL of dimethylformamide in tetrahydrofuran. Prepare a range of standard solutions containing 0.05, 0.1 and 0.2 µg/mL of dimethylformamide by diluting the stock solution with tetrahydrofuran Chromatography conditions - Column: Polyethylene glycol (30 m x 0.32 mm i.d. with a 0.5 µm film) - Carrier gas: Helium - Pressure: 150 kPa (constant pressure) - Detector: Nitrogen/phosphorus detector or thermionic specific detector) - Temperatures: o injection port: 180° column: Hold for 2 min at 40°, then 40-160° at 20°/min, hold for 2 min at 160° o detector: 325° - Injection method: Splitless injection of 1.0 µl with auto-injector, followed by start of purge after 1.0 min. The retention time of dimethylformamide measured under the above conditions is approx. 6.4 min. Procedure Weigh accurately 2 g of sample into a 20-mL volumetric flask, add 10 mL of tetrahydrofuran to dissolve the sample, add tetrahydrofuran to the mark, and mix the solution well. Inject 1.0 µl of the sample solution into the chromatograph. Standard curve Prepare daily by injecting 1.0 µl of each of the standard solutions into the chromatograph. Calculate the concentration of dimethylformamide in mg/kg (CDFA) from: CDFA (mg/kg) = $C \times 20 / W$ where - C is dimethylformamide concentration determined (µg/mL); - W is weight of sample (g) Note: The column must be reconditioned frequently. Overnight reconditioning (flow carrier gas in the reverse direction at 180° without the connection of the detector) is required after about every 15 samples.

Table 5-1 ビニルイミダゾール・ビニルピロリドン共重合体の有機性不純物に関する国際規格①

公定書	FCC	JECFA
ビニルイミダゾール・ビニルピロリドン共重合体	Copovidone*	POLYVINYLPIRROLIDONE*
イミダゾール 50 µg/g 以下 1, 3-ジビニルイミダゾリジン-2-オン 2 µg/g 以下 1-ビニルイミダゾール 10 µg/g 以下 1-ビニル-2-ピロリドン 5 µg/g 以下 2-ピロリドン 50 µg/g 以下	MONOMERS (1-VINYL-2-PYRROLIDONE, VINYL ACETATE, AND 2-PYRROLIDONE) 1-Vinyl-2-pyrrolidone: NMT 10 mg/kg Vinyl acetate: NMT 10 mg/kg 2-Pyrrolidone: NMT 0.5%	Monomer content Not more than 1% (as vinylpyrrolidone)
本品 2.0 g を量り、内標準液 1 mL を正確に加え、更にアセトン 24 mL を加えてかくはん機で 4 時間かくはんする。静置した後、ろ過し、ろ液を検液とする。ただし、内標準液は、ベンゾニトリル・アセトン溶液（1 → 4000）とする。別に 200mL のメスフラスコに、イミダゾール 80 mg、1, 3-ジビニルイミダゾリジン-2-オン 3.2 mg、1-ビニルイミダゾール 16 mg、1-ビニル-2-ピロリドン 8.0 mg 及び 2-ピロリドン 80 mg をそれぞれ量り入れ、アセトンを加えて正確に 200 mL とし、標準液とする。標準液 1 mL 及び内標準液 4 mL を正確に量り、アセトンを加えて 100mL とし、比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 1 µL ずつ量り、次の操作条件でガスクロマトグラフィーを行う。 検液及び比較液におけるベンゾニトリルのピーク面積に対する各有機性不純物のピーク面積比を求めるとき、検液で得られた各有機性不純物のピーク面積比は、比較液で得られた対応する各有機性不純物の面積比を超えない。	Solution A: Acetonitrile, methanol, and water (1:1:18) Solution B: Acetonitrile, methanol, and water (9:1:10) Standard stock solution: 0.5 mg/ml 1-vinyl-2-pyrrolidone, 0.5 mg/ml vinyl acetate, 3 mg/ml 2-pyrrolidone in methanol Standard solution: 0.25 µg/ml 1-vinyl-2-pyrrolidone, 0.25 µg/ml vinyl acetate, 1.5 µg/ml 2-pyrrolidone prepared by diluting the Standard stock solution with Solution A. Sample solution: Transfer 250 mg of sample into a 10-ml volumetric flask, add 1 ml of methanol, mix ultrasonically to dissolve, dilute with water to volume, and mix. If necessary, filter this solution to remove undissolved particles. Chromatographic system, HPLC Mode: High-performance liquid chromatography Detectors: UV 205 nm and 235 nm Column: 4-mm × 250-mm stainless-steel column packed with octadecylsilane silica gel (5 µm particle diameter), with a 4-mm × 30-mm guard column of the same packing Column temperature: 30° Flow rate: About 1.0 ml/min Injection volume: About 10 µl Resolution: NLT 2.0 between 2-pyrrolidone, vinyl acetate, and 1-vinyl-2-pyrrolidone peaks Relative standard deviation: NMT 2.0% for each analyte for replicate injections Analysis Separately inject the Standard solution and the Sample solution into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the peak area responses for 2-pyrrolidone, vinyl acetate, and 1-vinyl-2-pyrrolidone. Note—The order of elution is 2-pyrrolidone, vinyl acetate, and 1-vinyl-2-pyrrolidone. Note—After each injection of the Sample solution, wash polymeric material from the guard column by passing the mobile phase (100% Solution A) through the column backwards for about 30 min at the same flow rate. Calculate the content of the three monomers in the sample taken using the following equations: 1-Vinyl-2-pyrrolidone (mg/kg) = (ru / rs) × (Cs/Cu) × F₁ Vinyl acetate (mg/kg) = (ru / rs) × (Cs/Cu) × F₁ 2-Pyrrolidone (%) = (ru / rs) × (Cs/Cu) × F₂ × 100% Where: ru = peak area response from the Sample solution rs = peak area response from the Standard solution (for each analyte: 1-vinyl-2-pyrrolidone, vinyl acetate, 2-pyrrolidone) Cs = concentration of each analyte in the Standard solution (µg/ml) Cu = Sample solution concentration (mg/ml) F₁ = correction factor to convert mg/g to mg/kg = 100 F₂ = correction factor to convert 1/1000 µg/mg to µg/µg	Dissolve about 4 g of the sample, accurately weighed, in 30 ml of water in a 125 ml round-bottom flask, add 0.5 g of sodium acetate, mix and begin titrating with 0.1 N iodine. When the iodine colour no longer fades, add additional 3.0 ml of the titrant, and allow the solution to stand for 5 to 10 min. Add starch TS, and titrate the excess iodine with 0.1 N sodium thiosulfate. Perform a blank determination, using the same volume of 0.1 N iodine, accurately measured, as was used for the sample. Each ml of 0.1 N iodine is equivalent to 5.56 mg of vinylpyrrolidone.

*ビニルイミダゾール・ビニルピロリドン共重合体と同じ化合物規格がなかったため、類似した化合物の規格を参考とした。

Table 5-2 ビニルイミダゾール・ビニルピロリドン共重合体の有機性不純物に関する国際規格②

INTERNATIONAL OENOLOGICAL CODEX	INTERNATIONAL OENOLOGICAL CODEX
Polyvinylimidazole/Polyvinylpyrrolidone Appendix 1 : Determination by gas chromatography of the constitutive monomers and/or impurities liable to be found in copolymers of vinylpyrrolidone/vinylimidazole (vinylimidazole, vinylpyrrolidone, pyrrolidone, divinylethyleneurea and imidazole)	Polyvinylimidazole/Polyvinylpyrrolidone Appendix 2: Analytical method for the detection of Imidazole, Pyrrolidone and residual monomers (Vinylpyrrolidone, Vinylimidazole, Divinylimidazolidinone) in wines and musts
The vinylpyrrolidone content must be less than 5 mg/kg The vinylimidazole content must be less than 10 mg/kg The divinylimidazolidinone content must be less than 2 mg/kg The pyrrolidone content must be less than 50 mg/kg The imidazole content must be less than 50 mg/kg	
<u>Example of chromatographic conditions</u> Injector: 220°C Oven: 160°C then programmed at a rate of 5°C/min up to 210°C Final isothermal period: 210°C, 7 min Detector (NSD): 250°C Carrier gas helium Column head pressure 140 kPa (1.4 bar) Split flow 10 ml/min Septum purge 5 ml/min Volume injected 1.0 µl <u>Preparation of the samples</u> Weigh about 2g of sample, accurate to 0.1 mg, then mix it with 1 ml of internal standard solution (5.1) and 24 ml of acetone (3.8). Extract the sample for 4 h on the rotary mixer (4.6) then analyse the supernatant solution under the conditions described in point 6. For routine determinations, analyse each sample twice. <u>Calibration factor</u> Chromatographic calibration factor f(i): $f(i) = \frac{A(i)_0 \times m(IS)_0}{m(i)_0 \times A(IS)_0}$ where: A(i) ₀ = peak area of analyte i in the chromatogram for the calibration solution (mVs) m(i) ₀ = initial weight of reference product i in the calibration solution [mg] A(I.S.) ₀ = peak area of the internal standard in the chromatogram of the calibration solution (mVs) m(I.S.) ₀ = initial weight of the internal standard in the calibration solution [mg] The weight ratio w(i) of analyte i is calculated in the following way: where: w(i) = weight ratio of the analyte i [µg/g] A(i) = peak area of the analyte i in the chromatogram of the sample solution (mVs) A(I.S.) = peak area of the internal standard in the chromatogram of the sample solution (mVs) m(I.S.) = initial weight of the internal standard added to the sample [µg] m(s) = initial weight of sample [g] f(i) = average chromatographic calibration factor For routine determinations, the result is expressed as a whole number.	<u>Sample preparation</u> • Model wine Solution The model wine solution is prepared according to Martínez-Rodríguez and Polo, 2000 (Characterization of the Nitrogen Compounds Released during Yeast Autolysis in a Model Wine System). Four grams of tartaric acid, 0.1 g of acetic acid, and 120 mL of ethanol are dissolved in 800 mL of water (bidistilled). After adjustment of the pH value to 3.2 with 2N sodium hydroxide, the solution is made up to 1000 mL. The model wine solution is brought to temperature at 20°C. • Sample preparation for migration analysis The amount of 0.5 grams Divergan HM are added to 1 litre of model wine solution and stirred at 20°C for 48 hours (at approximately 150 rpm). Prior to analysis the sample is centrifuged (approximately 3 min, 4500 rpm) and filtered through a 0.45 µm membrane filter. • Other samples (e.g. musts and wines) Clear samples are filled directly into sample vials and ready for chromatography without any sample preparation. Cloudy wine samples are filtered through a 0.45 µm membrane filter before injection, and the first fractions of filtrate are discarded <u>Operating conditions for HPLC:</u> Injection volume: 10 µl Flow rate: 1 ml/min Solvent A: Pipette 0.6 ml of heptafluorobutyric acid (4.1.3) into 1000 ml bidistilled water (4.1.2), shake and degas. Solvent B: Add 300 ml of bidistilled water (4.1.2) to 700 ml of methanol (4.1.1) and shake. Pipette 0.6 ml of heptafluorobutyric acid (4.1.3) into this solution, shake and degas. Gradient: $85:15 (A:B) \xrightarrow{10 \text{ min}} 85:15 \xrightarrow{5 \text{ min}} 0:100 \xrightarrow{10 \text{ min}} 0:100 \xrightarrow{5 \text{ min}} 85:15 \xrightarrow{15 \text{ min}} 85:15$ Column heater: 25 °C Run time: 45 min MS conditions: Scan Type: MRM Polarity: Positive Ion Source: Turbo Spray Duration: 20,005 min; 1364 Cycles Curtain Gas: 40 psi Ion spray Voltage :2500 V Temperature: 550°C Ion Source Gas 1: 60 psi Ion Source Gas 2: 60 psi Collision Gas Medium Entrance Potential 10 V compound mass transfer Imidazole 69.1 → 42.2 Pyrrolidone 86.1 → 44.1 Vinylimidazole 95.1 → 69.2 Vinylpyrrolidone 112.1 → 69.2

Table 6 各分析対象物質の分析法、条件に関する文献等調査結果（次ページに続く）

分析対象物質	文献の表題（日本語または日本語訳）	文献の表題（英語）	抽出・操作概要	分析条件	検量線範囲	LOD 等算出定義	参考文献
ヘキサクロロベンゼン	土壌からのヘキサクロロベンゼン等の分析	Development of an HPLC method for determination of pentachloronitrobenzene, hexachlorobenzene and their possible metabolites	ヘキサンで抽出	HPLC PDA detector (300 nm) Column: ODS 5 μ m C18 (150 $\times$ 4.6 mm) Mobile phase: methanol: water (96:4, v/v) Column temperature : 25°C Flow rate: 1.0 ml/min Injection volume : 5 μ l	0.5–4.0 μ g/ml	HCB は 0.0003 μ g/ml LOD はバックグラウンドノイズの標準偏差の 3 倍に相当するシグナル	8)
ヘキサクロロベンゼン	クロロベンゼンの分析 (カラムのアプリケーションデータ)			HPLC Uv-Vis detector(254 nm) Column :Inertsil Ph 5 μ m(150 $\times$ 4.6mmI.D.) Mobile phase : Acetonitrile : water (50:50) Column temperature: 40°C. Flow rate :1.0 mL/min			9)
ヘキサクロロベンゼン	エタノールによる分散化を利用した六塩化ベンゼン (HCB) の超微量蛍光検出法	A potential fluorescence detection approach to trace hexachlorobenzene via disaggregating with ethanol	エタノール 2 mL を光路長 10 mm の石英セルに入れる HCB エタノール溶液 20 μ L を濃度別に滴定 励起波長 : 360 nm (25°C) 蛍光測定 : 励起・蛍光スリット幅 5 nm				10)
DMSO	逆相高速液体クロマトグラフィーによる医薬品原薬（ビスナフィド）中の残留ジメチルスルホキシドの定量	Quantitation of Residual Dimethylsulfoxide in a Drug Substance (Bisnafide) by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography	原薬 : 約 40 mg を量り取り、水 20 mL で溶解 超音波 → 低温攪拌で完全溶解 標準溶液 : 3.3 / 2.2 / 1.1 μ g/mL (DMSO) 原薬中濃度換算 : 0.16 / 0.11 / 0.055% (w/w) 回収率試験 : DMSO 無添加原薬に既知量をスパイク 標準・サンプル溶液は 24 時間以内に分析	HPLC UV-Vis detector (215 nm) Column: ODS C8 Mobile phase A: aqueous 0.01M sodium chloride solution that contained 0.10% phosphoric acid by volume Mobile phase B: 90% acetonitrile and 10% mobile phase A by volume. Gradient condition: A:B (100 : 0) 10 min → A:B (0 : 100) 5 min → A:B (100 : 0) 15 min Column temperature : 45°C $\pm$ 2 Flow rate: 0.80 mL/min Injection volume : 200 μ L	0.219~3.288 μ g/mL	検出限界は 約 0.051 μ g/mL、定量限界は 0.219 μ g/mL (RSD 4.8%) 検出限界 (LOD) は、S/N = 3 となる濃度と定義した。定量限界 (LOQ) は、6 回の繰返し注入で RSD が 5% 以下となる最小濃度と定義	11)
DMSO 及び DMF	カラムのアプリケーションデータ			HPLC UV-Vis detector (220 nm) Column : 極性相相互作用型カラム (SHARC 1, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m) Column temperature : 40°C Mobile phase A : Acetonitrile Mobile phase B : MeOH Gradient condition: A:B = 98:2 → 85:15 (0–10 min) Flow rate : 1 mL/min Injection volume : 1 μ L			12)

Table 6 各分析対象物質の分析法、条件に関する文献等調査結果（前ページからの続き）

分析対象物質	文献の表題（日本語）	文献の表題（英語）	抽出・操作概要	分析条件	検量線範囲	LOD 等算出定義	参考文献
DMSO 及び DMF	医薬品中のジメチルスルホキシド（DMSO）および N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）を同時定量するための、ガスクロマトグラフィーに代わる液体クロマトグラフィー法	Alternative liquid chromatographic method to gas chromatography for simultaneous determination of dimethyl sulfoxide and N, N-dimethyl formamide in pharmaceuticals		HPLC Uv-Vis detector(210 nm) Column : L1 (ODS) 250 × 4.6 mm、5 μm Mobile phase A: 10 mM phosphate buffer + 0.1% TEA, pH 2.3; Mobile phase B: Acetonitrile Gradient condition: A:B = 99:1 (0–15 min), 30:70 (15–30 min), and 99:1 (32–40 min) with transitions at 15 min (to 30:70) and at 32 min (back to 99:1). Flow rate : 1.0 mL/min	DMSO : 50~150 μg/mL DMF : 8.8~26.4 μg/mL		13
イミダゾール 1-ビニルイミダゾール 1-ビニル-2-ピロリドン 2-ピロリドン	ワイン清澄剤 PVPP および PVI-PVP ポリマー由来モノマーの定量のための LC-HRMS 法の開発とバリデーション	Development and validation of an LC-HRMS method for the determination of monomers of wine fining PVPP and PVI-PVP polymers	ワイン : 0.45 μm フィルター（Minisart RC4）でろ過後、直接注入 ブドウ : 破碎 → 遠心分離 → 上清を 0.45 μm フィルター（Minisart RC4）でろ過して分析	UHPLC : Vanquish Flex MS : Orbitrap Exploris 120 (HESI+, MS1 120k / MS2 60k) Column : Aqueous C30 Devosil (150 × 2.0 mm, 3 μm) Mobile phaseA : Water / 0.1% Formic acid / 1% IPA Mobile phaseB : MeOH / 0.1% Formic acid / 1% IPA Gradient condition: A:B = 99:1 → 70:30 (0–9 min) 、 70:30 → 0:100 (9–10 min) 、 100% B (10–13 min) 、 99:1 (13–15 min reequilibrium) Column temperature : 40°C Flow rate : 0.2 mL/min Injection volume : 0.1 μL MS condition Ion mode : ESI (+) Gas : Sheath 40 / Aux 20 / Sweep 0 Temperature : Ion tube 325°C、Vaporizer 250°C m/z range : 50–800 HCD : 30% Spray volt : 3.5 kV	10~1000 ng/mL	定量下限（LOQ）は標的化合物すべてで 10 ng/mL	14)