

試験溶液調製にケルダール分解装置を使用した食品中の二酸化チタン分析

伊藤 彩子^a, 門間 公夫^b, 坂牧 成恵^a, 大塚 健治^a

現在、二酸化チタンの分析は厚生労働省通知「食品中の食品添加物分析法」に基づいており、試験溶液を調製するための灰化操作や硫酸による溶解操作に磁製のつぼを使用している。しかし、操作中に硫酸蒸気を吸引する危険性を伴うことから、分析者の安全に配慮し、試験溶液調製時に硫酸蒸気を拡散しないケルダール分解装置を使用することとした。添加回収試験の結果、回収率は70~110%であった。また、加熱時間は30分が妥当であった。試験溶液中に沈殿物が見られたため、走査型電子顕微鏡を用いて観察を行い、分析法を改善して回収率を向上させた。

キーワード：二酸化チタン、食品添加物、着色料、食品分析、磁製のつぼ、ケルダール分解装置、ICP発光分光分析装置

はじめに

二酸化チタンは、着色料として諸外国で古くから様々な食品に使用され、我が国においても1983年より許可された食品添加物である¹⁾。また、化粧品²⁾や薬局方³⁾などにも規定があり、それぞれの用途で使用が認められている。

近年、欧州食品安全委員会は、食品添加物の二酸化チタン(E171)に関して、従来の見解を一変し、健康に対する懸念が完全には払拭できないとした⁴⁾。これを受け、欧州委員会は2022年8月よりE171の使用を禁止している⁵⁾。

一方、我が国では二酸化チタンについて、ラットを用いた経口投与試験を実施しており、その結果、強い毒性を示唆する所見はないとしている。厚生労働省は、今後に向けた検討を実施しているところである⁶⁾。

食品中の二酸化チタン分析法は、いくつか報告^{7,8)}があるが、硫酸のほか、フッ化水素酸や過塩素酸など有害な試薬を使用する。厚生労働省通知「食品中の食品添加物分析法⁹⁾」(通知法)においては、試験溶液調製の際に硫酸での加熱操作でミスが発生し、健康危害の危険性がある。

今回、実験者の安全に配慮し、硫酸蒸気を回収できるケルダール分解装置の適応性を検討し、定量には誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)を使用したもので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試料

チタンを含有していないことを確認した市販のキャンデー、糖衣ガム及びホワイトチョコレートを試料とした。

2. 試薬等

標準品：チタン標準液 原子吸光分析用 1.00 mg/mL (富士フイルム和光純薬(株)製)

内部標準：イットリウム標準液 原子吸光分析用 1.00

mg/mL (富士フイルム和光純薬(株)製)

添加用には二酸化チタン(食品添加物 紅不二化学工業(株)製)を用いた。その他の試薬は、試薬特級を用いた。

フィルター：GD/X25 シリンジフィルター PVDF 孔径 0.45 μm (Whatman), メンブレンフィルター PTFE 孔径 5.0 μm (メルク(株)社製)

3. 装置

電気炉：KM-420 (アドバンテック東洋(株)社製)

ケルダール分解装置：分解装置 DK6 型, 電動アスピレーター付属 (VELP 社製)

ICP-AES：Optima 7300 ((株)パーキンエルマー・ジャパン社製)

走査型電子顕微鏡(SEM)：QUANTA FEG250 (日本FEI(株)社製), エネルギー分散型 X 線分析装置(EDS) (アメテック(株)社製)

4. 試験溶液の調製

通知法⁹⁾に準拠して行い、硫酸で溶解する加熱操作にケルダール分解装置を用いた。

試料 5.0 g を磁製のつぼに精密に量り、ホットプレート上で炭化させた。その後、つぼを電気炉内で徐々に昇温し 550°C で灰化した。黒色の炭素粒が残っている場合は、少量の水を加えて粒子を砕き、電気炉で再灰化した。得られた灰化物に少量のエタノールを加え、超音波発生装置による振動で懸濁液とし、ケルダール管へ移し、70°C 水浴中窒素ガス吹き付けによりエタノールを蒸発させた。ここに無水硫酸ナトリウム 0.75 g 及び硫酸 5 mL を加え、超音波で分散させ、ケルダール分解装置で 300°C 30 分加熱した。放冷後、水 10 mL を入れた 50 mL 容メスフラスコに溶解液を流し込み、ケルダール管を水約 10 mL で 3 回洗い、洗液を合わせ定容したものを試験溶液とした。

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 当時：東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科

5. ICP-AESによる測定

1) 測定溶液の調製

試験溶液を0.45 μm フィルターろ過後、1 mL を正確に量り50 mL 容メスフラスコに入れ、内標としてイットリウム標準液 100 μL を加え、1% 硫酸で定容し測定溶液とした。

2) 検量線用標準液

チタン標準液2 mL を正確に量り、メスフラスコに入れ、1% 硫酸を加えて20 mL とし、100 μg/mL チタン標準溶液とした。100 μg/mL チタン標準溶液50, 500, 5000 μL を正確に量り、イットリウム標準液 100 μL を加え、1% 硫酸でそれぞれ50 mL とし、検量線用標準液とした。検量線ブランクは、イットリウム標準液100 μL を1% 硫酸で正確に50 mL としたものをを用いた。

3) 測定条件

チタン測定波長：334.94 nm, 336.12 nm, 337.28 nm

イットリウム波長：371.03 nm

4) 定量

チタンとイットリウムの発光強度比とチタン濃度から検量線を作成しチタン濃度を求め、次式により試料中の二酸化チタン含量を計算した。

$$\text{二酸化チタン含量 (g/kg)} = \frac{C \times A}{W \times 20} \times 1.669$$

C：測定溶液中のチタン濃度 (μg/mL)

A：測定溶液の希釈倍率

W：試料の採取量 (g)

結果及び考察

1. ケルダール分解装置による加熱時間の検討

試料を灰化後、硫酸に溶解する加熱操作にケルダール分解装置を用い、加熱時間のみを変更し検討を行った。キャンデー5.0 g に二酸化チタン 25 mg を添加し、ケルダール分解装置による加熱時間を 10~40 分まで 10 分間隔で変更し、回収率を調べた結果を図 1 に示した。回収率はそれぞれ 10 分で 82.0%、20 分で 96.3%、30 分で 98.5%、40 分では 97.9% であった。20 分ではほぼ回収されていたが、30 分以降でより安定した結果が得られたことから、加熱時間は 30 分とした。

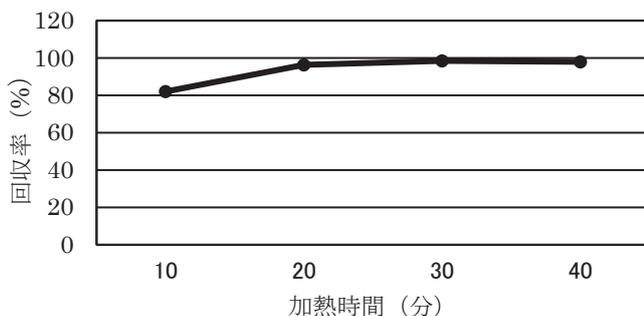


図1. ケルダール分解装置での加熱時間と回収率

2. 無水硫酸ナトリウム添加の必要性

通知法⁹⁾では、試料を灰化後、硫酸を加え 30 分加熱する際、無水硫酸ナトリウムを添加する。無水硫酸ナトリウムを添加せず、硫酸のみで試験溶液調製が可能であれば、時間短縮と検査コストの削減が期待される。そこで添加の有無による比較を行ったところ、無水硫酸ナトリウム無添加の場合、回収率が 56.9% となり、添加時の 98.5% に比し、著しく回収が低下した。この結果より、試験溶液調製に無水硫酸ナトリウム添加は必要と判断した。

3. 沈殿物の観察及び試験法の改善について

調製した試験溶液に沈殿物が確認されたことから、その沈殿物について SEM 観察及び EDS による分析を行った。沈殿物は 5.0 μm PTFE フィルターを用いて減圧ろ過し水で洗浄した。

キャンデー試験溶液の沈殿物の分析結果を図 2 及び図 3 に示した。図 2 の (a) SEM 像白枠部の X 線スペクトル (b) では、分析対象であるチタンが確認された。図 3 の (a) の白枠部については、X 線スペクトル (b) から、多い順にケイ素、酸素及びアルミニウムのシグナルが検出された。これら元素は磁製るつぼの主な構成成分であり EDS のスペクトルも同等であった。このことから、沈殿物はるつぼ表面を物理的に削ったことに起因するものと推測された。そこで、るつぼから灰化物をケルダール管に移す際には、るつぼをガラス棒等で擦ることなく超音波処理

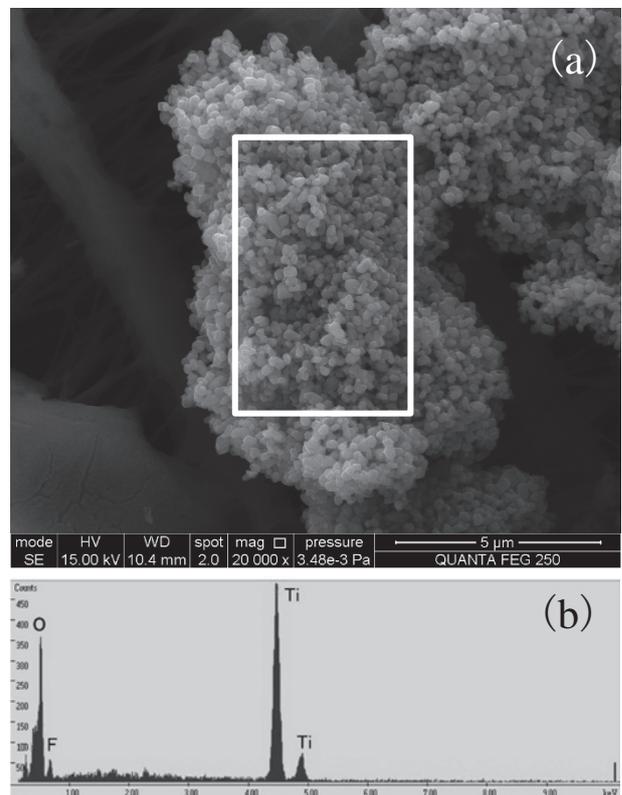


図 2. キャンデー試験溶液中の粒子状沈殿物の SEM 像

(a) : 沈殿物の 2 次電子像

(b) : (a) 白枠部の X 線スペクトル

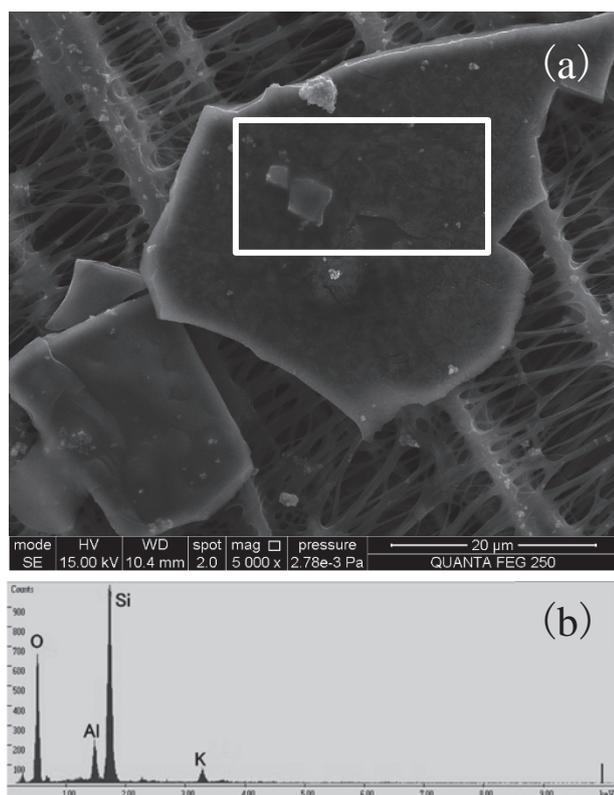


図3. キャンデー試験溶液中の板状沈殿物のSEM像
(a) : 沈殿物の2次電子像
(b) : (a) 白枠部のX線スペクトル

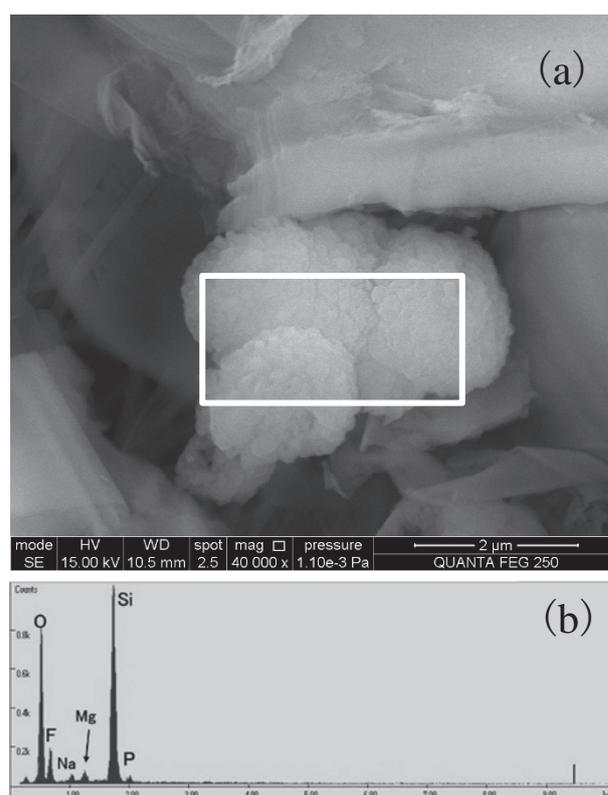


図4. 糖衣ガム試験溶液中の沈殿物のSEM像
(a) : 沈殿物の2次電子像
(b) : (a) 白枠部のX線スペクトル

によるエタノール懸濁液とした。この操作によりつば由来の沈殿物が少なくなり、チタン回収率が75%から95%に改善された。

糖衣ガム試験溶液には、前述のキャンデーより多くの沈殿物が見られた。つばに起因する沈殿物の他にも、図4に示した通り、異なる形状のSEM像が観察された。X線スペクトル(b)ではリンやナトリウムが検出され、アラビアガムやメタリン酸Naなど糖衣ガムの原料由来成分であると推測された^{10,11)}。試験溶液が白濁し多くの沈殿が認められる場合は、二酸化チタンの硫酸への溶解が十分でなく分析結果に影響を及ぼすことが考えられた。そこで、ケルダール分解装置での加熱・溶解の前には、超音波振動で十分に硫酸に懸濁させる操作を追加することとした。

4. 添加回収試験

キャンデー、糖衣ガム及びホワイトチョコレートを試料とし、試料5.0gに二酸化チタン2.5mg及び25mgをそれぞれ添加し、回収試験を行った。試料あたりの添加量は、0.5g/kg及び5g/kgであり、各々3併行で試験した結果を表1に示した。キャンデーに二酸化チタンを0.5g/kg添加のとき、標準偏差が15%とばらつきが生じたが、回収率はすべて70%以上の良好な結果が得られた。

食品衛生検査指針食品添加物編¹²⁾に記載されている天川ら⁷⁾の報告では、ホワイトチョコレート、チューイングガムの回収率は、二酸化チタン添加量0.01g/kg及び0.1

表1. 二酸化チタン添加回収試験の結果

試料	二酸化チタン	
	添加量 (g/kg)	回収率 (%)
キャンデー	5	95.8 ± 2.2
	0.5	88.7 ± 15
糖衣ガム	5	77.3 ± 2.9
	0.5	84.8 ± 8.6
ホワイトチョコレート	5	70.1 ± 2.3
	0.5	110 ± 3.6

平均値±標準偏差 (n=3)

g/kgのとき98.1~102%であった。また、通知法⁹⁾では、マシュマロ、ホワイトチョコレート及びチーズに二酸化チタンを0.1g/kg及び0.5g/kg添加したときの回収率は91~106%であった。報告により試験溶液の調製方法や添加量も異なり、比色法による定量結果であるが、これらと比較しても、本試験法で得られた回収率は同等であると考えられた。

また、試験溶液調製にケルダール分解装置を使用しない通知法⁹⁾で、キャンデーに二酸化チタンを5g/kg添加したとき102%の回収率であった。同等の結果が得られたことから、本報告は実験者の安全に配慮した方法として有用である。

ま と め

試験溶液の調製にケルダール分解装置を用いることで、作業者が硫酸の蒸気に暴露されることがなくなった。ケルダール分解装置による加熱は300°C 30分で良好な結果が得られ、通知法⁹⁾収載の磁製のつぼで砂浴等を用いる加熱条件と同じであった。試料によっては試験溶液に沈殿物が多く見られたことから、ケルダール分解装置での加熱・溶解の前には超音波発生装置を用いて硫酸と沈殿物をよくなじませた。添加回収試験の結果、70～110%の回収が得られたことから日常の分析法として十分な結果であった。ケルダール分解装置を用いる本法は、作業環境の安全性が高く日常の検査に有用であると考えられた。

文 献

- 1) 川西 徹, 穂山 浩, 河村葉子, 佐藤恭子: 第9版食品添加物公定書解説書, 下, D1663-D1667, 2019, 廣川書店, 東京.
- 2) 厚生労働省: 化粧品・医薬部外品等ホームページ, 基準, 関連通知, https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/iyakuhin/keshouhin/index.html (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) 日本薬局方解説書編集委員会: 第十八改正日本薬局方, 2327-2329, 2021, 廣川書店, 東京.
- 4) 欧州食品安全委員会: Titanium dioxide: E171 no longer considered safe when used as a food additive, <https://www.efsa.europa.eu/en/news/titanium-dioxide-e171-no-longer-considered-safe-when-used-food-additive> (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) 欧州委員会: Food safety: Food additive Titanium Dioxide banned as of this summer, https://cyprus.representation.ec.europa.eu/news/food-safety-food-additive-titanium-dioxide-banned-summer-2022-01-14_en (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) 厚生労働省: 2021年12月15日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会議事録, https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_22819.html (2022年9月30日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 7) 天川映子, 大西和夫, 西島基弘: 東京衛研年報, **38**, 262-266, 1987.
- 8) 浜野 考, 三ッ橋幸正, 青木伸實, 他: 日本食品工業学会誌, **37**, 162-166, 1990.
- 9) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長, 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長: 薬生食基発0624第1号, 薬生食監発0624第1号, 「食品中の食品添加物分析法」の改正について, 別添2 着色料, 令和3年6月24日.
- 10) 2018年版16918の化学商品, 1559, 2018, 化学工業日報社, 東京.
- 11) 2018年版16918の化学商品, 1913, 2018, 化学工業日報社, 東京.
- 12) 厚労省監修: 食品衛生検査指針食品添加物編 2003, 211-214, 2003, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京.

Analysis of Titanium Dioxide in Food using a Kjeldahl Decomposition Apparatus for Sample Solution PreparationAyako ITO^a, Kimio MONMA^b, Narue SAKAMAKI^a, and Kenji OTSUKA^a

Currently, the analysis of titanium dioxide is based on the “Method for Analysis of Food Additives in Foods” released by the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan. The test solution is prepared by using a porcelain crucible for ashing and dissolution is done by using sulfuric acid. However, it involves the risk of inhaling sulfuric acid vapors while doing the analysis. We decided to use Kjeldahl decomposition apparatus out of concern for the analyst’s well-being, as this method does not involve the diffusion of sulfuric acid vapors. The results of the additive recovery test showed that the recovery ranged from 70 to 110%. A heating time of 30 min was appropriate. Since precipitates were observed in the test solution, the analysis method was improved by using a scanning electron microscope that helped in improving the recovery rate.

Keywords: titanium dioxide, food additive, colorant, food analysis, porcelain crucible, Kjeldahl decomposition equipment, ICP–AES

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out