

高速液体クロマトグラフィーによる食品中のサッカリン 及びグリチルリチン酸の定量

Determination of Saccharin and Glycyrrhizic Acid
in Foods by High Performance Liquid Chromatography

堀 義宏

Yoshihiro Hori

サッカリン(SA)のナトリウム塩は人工甘味料としてしよう油、みそ、その他種々の食品への使用が認められている。一方、グリチルリチン酸(GA)のナトリウム塩は人工甘味料としてよう油とみそに限り使用が認められているが、GAの抽出原料である甘草は天然添加物として多くの食品に使用されている¹⁾。

これらの甘味料の分析法としては、一般にガスクロマトグラフィーが用いられているが^{2,3)}、誘導体化など操作が煩雑であることから、近年高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による簡易な分析法が報告されている^{4~12)}。SAは保存料との同時分析が多く報告されており、前処理には透析法²⁾やセップパックカラム法^{7,9)}などが用いられている。一方、GAは単独で分析されていることが多い、前処理には液一液分配抽出法¹²⁾、ポリアミドカラム法^{2,5,6)}などが用いられているが、ポリアミドカラム法は食品の種類によってはカラムの目づまりを起こす。また、SAとGAの同時分析法として、セップパックで前処理し、イオンペアモードを用いたHPLC分析法が報告されている¹¹⁾。

食品には多種の食品添加物が同時に使用されることが多いので、その分析の省力化を計るためにには使用実態に即した多成分の一斉分析が可能なことが望ましい。前報^{13,14)}でポリアミドカラムを用いた食品中の食用タール色素の分析法について報告した。今回、このポリアミドカラム法によりしよう油、みそ、漬物(たくあん漬)を前処理し、HPLCを用いてSAおよびGAの定量を試みた。また、ポリアミドカラムにおける目づまり防止等についても検討したので併せて報告する。

まず、最終的に確立した試験溶液の調製法を示す。

1) 漬物：細切、均一にした試料10gを秤取し、0.1%アンモニア含有80%エタノール40mlを加えて、5分間ホモジ

ナイズし、吸引ろ過した。残留物に0.1%アンモニア含有80%エタノール30mlを加え同様の操作を行った。次いで前後のろ液を合し、減圧下で約10mlに濃縮して試料溶液とした。この試料溶液を水20mlを用いて100mlのビーカーに移し、塩酸溶液(1→4)0.2mlおよびポリアミド1gを加え、マグネットスターで10分間攪拌後、ポリアミドカラム(ポリアミドC-200、和光純薬工業(株)3gを内径2cm、長さ30cmのカラム管に水で湿式充てんしたもの)に負荷し、展開した。その後、水50ml、80%メタノール30mlで順次カラムを洗浄した後、1%アンモニア含有メタノール40mlで溶出した。溶出液にエタノール約20mlを加えて減圧下約40°Cで濃縮乾固し、残留物を60%メタノール5mlに溶解した後、ろ紙でろ過し、ろ液を試験溶液とした。

2) みそ：試料10gを50mlの共栓付遠沈管に秤取し、0.2%アンモニア水30mlを加えて10分間振とうした後、遠心分離(3,000rpm、10分間)し、上清を100mlの共栓付マスシリンダーに移した。更に残留物に0.2%アンモニア水30mlを加えて同様の操作を行った後、上清を合わせ試験溶液とした。この試験溶液の半分量を100mlのビーカーに移し、塩酸溶液(1→4)1mlおよびポリアミド1gを加えて、マグネットスターで10分間攪拌後、遠心分離した。上清をビーカーに移し、残ったポリアミドを水を用いてポリアミドカラムに移し、展開した。更に先の上清をカラムに負荷し、展開した。以下、漬物の場合と同様に精製し、試験溶液を調製した。

3) よう油：試料5gをビーカーに秤取し、水25mlおよび塩酸溶液(1→4)0.2mlを加えて攪拌した後、ポリアミドカラムに負荷し、展開した。以下、漬物の場合と同様に精製し、試験溶液を調製した。

試験溶液は、HPLCを用いて下記の条件で分析に供した。機器は、紫外波長可変検出器付日立655型高速液体クロ

マトグラフ、島津クロマトパック C-R3A、カラムは Nucleosil 5 C₁₈ (4 mmI.D.×250mm) を用いた。

1) SA

移動相: 0.2%リン酸一カリウム+0.2%リン酸二カリウム水溶液: アセトニトリル=95:5
流速: 0.6ml/min
測定波長: 230nm
カラム温度: 40°C
注入量: 10μl

2) GA

移動相: メタノール:水:酢酸=70:30:1
流速: 0.6ml/min
測定波長: 254nm
カラム温度: 40°C
注入量: 10μl

前報¹³⁾の前処理法を今回の試料に適用し、検討した点について以下に述べる。

漬物については適用が可能であったが、みそについては抽出液の濃縮の際突沸が起こり試料溶液の調製は不可能であった。みそ中のGAの抽出には一般にアンモニア水が用いられている²⁾ことから、この方法を検討した。アンモニア水の濃度を0.2~1%とし、SAおよびGAの回収率を求めたところ、SA、GA共濃度の違いによる差は認められなかったことから、0.2%アンモニア水を用いて試料溶液を調製した。

ポリアミドカラムの目づまり防止策として、事前に透析を行う方法が既に報告されている^{5,6)}が、この方法は時間を要する。そこで今回、あらかじめポリアミドにSA等を吸着させてからカラムに導入する方法を検討した。すなわち、みその試料溶液を塩酸で酸性にした後、ポリアミド1gを加えてマグネットスターで10分間攪拌した。ただし、このままポリアミドカラムに負荷、展開するとやはりカラムの目づまりが起った。そこで先の攪拌操作の後、遠心分離して上清とポリアミドに分別した。この際、GAはポリア

ミドに完全に吸着されたが、SAの一部は上清に残った。そこで、まず水を用いてポリアミドをカラムに負荷、展開した後、上清を同様に処理したところ、試料溶液による目づまりは起こらなかった。また、漬物の試料溶液もカラムの目づまりを起こす場合があるので、みそと同様の操作を行う必要がある。ただし、遠心分離以降の操作を省略してもカラムの目づまりは起こらなかった。しょう油の場合は、前処理操作をせず直接ポリアミドカラムに負荷、展開してもカラムの目づまりを起こすことはなかった。

カラム充てん用ポリアミド量は、GA (0.1mg) の場合、1gのポリアミドに完全に吸着され、水および80%メタノールでは溶出されなかった。一方、SA (0.5mg) の場合、ポリアミド量が1gでは80%メタノールを流すとSAの溶出が見られた。ポリアミド1~3gを用いSAの回収率を求めたところ、1gで19%, 2gで84%, 3gで100%の回収率を得た。従ってカラムに充てんするポリアミド量は3gとした。この際、SAおよびGAは1%アンモニア含有メタノール30mlで完全に溶出回収された。

以上の検討結果をもとに前述の前処理法を確立した。この方法を用いて漬物、みそ、しょう油にSA、GAを添加し、回収実験を行った。結果をTable 1に示したが、SA、GA共良好な回収結果が得られた。

また、Fig. 1にみそ抽出物のクロマトグラムを示した。SA、GA共妨害成分の影響を受けることなく定量できた。漬物、しょう油の場合も同様なクロマトグラムが得られ、定量を妨害するピークは認められなかった。定量限界はSAが0.005g/kg、GAが0.002g/kgであった。

以上の結果から、SAおよびGAは前処理法としてポリアミドカラム法を用いる同一分析法で定量することができた。また、ポリアミドカラム法の改良により透析操作を行うことなくカラムの目づまりを防止することができた。更に、漬物については食用タール色素の試験溶液の調製法¹³⁾とほぼ同様であることから、食用タール色素と甘味料との同時使用の多い漬物や菓子類などは、本法を用いることにより、食用タール色素と甘味料との同時分析が可能と思われる。

Table 1 Recoveries of Saccharin (SA) and Glycyrrhizic Acid (GA) from Foods

Sample	Weight (g)	SA			GA		
		Added (mg)	Recovery ^{*1} (%)	C. V. ^{*2} (%)	Added (mg)	Recovery ^{*1} (%)	C. V. ^{*2} (%)
Pickle	10	0.5	96.6	0.9	0.1	103.0	2.2
Soy paste	10	1.0	83.6	2.0	0.2	99.5	1.8
Soy sauce	5	0.5	102.2	0.8	0.1	102.3	0.2

*¹ Average of three determinations

*² Coefficient of variations

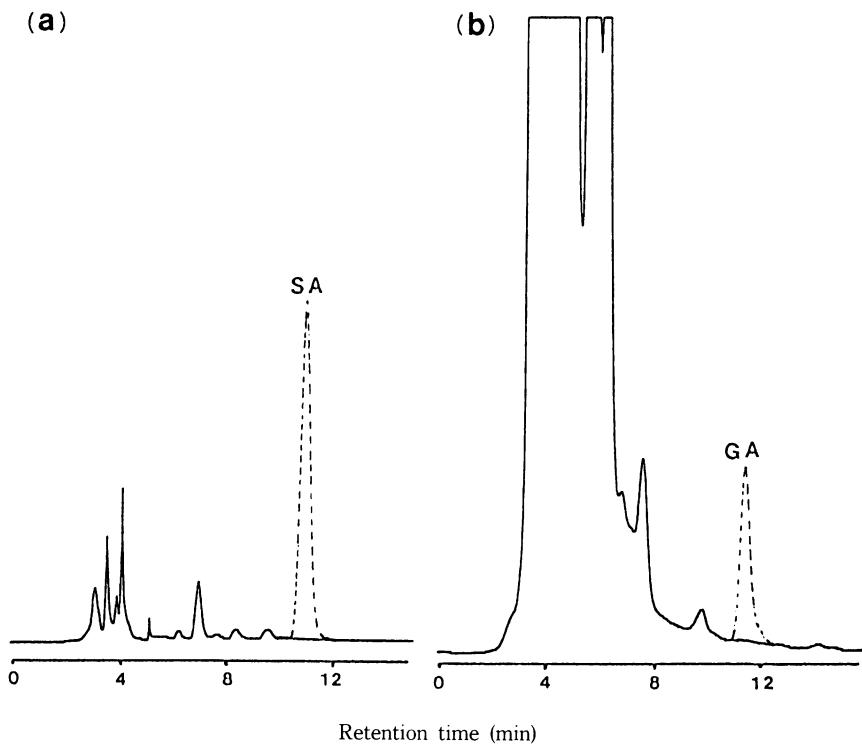


Fig. 1 High Performance Liquid Chromatograms of Extracts of Soy Paste

(a) SA

—: soy paste

···: soy paste spiked 1mg/10g of SA

(b) GA

—: soy paste

···: soy paste spiked 0.2mg/10g of GA

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局食品化学課：食品添加物の1日摂取量調査に関する研究, 15 (1983)
- 2) 厚生省環境衛生局食品化学課：食品中の食品添加物分析法指針 その1, 40 (1981)
- 3) 高槻圭悟他：食衛誌, 21, 476 (1980)
- 4) 上田雅彦他：食衛誌, 18, 278 (1977)
- 5) 北田善三他：食衛誌, 21, 354 (1980)
- 6) 山田利治他：神奈川県衛研研究報告, 10, 5 (1980)
- 7) 寺田久屋他：衛生化学, 29, 297 (1983)
- 8) 厚生省生活衛生局食品化学課：食品中の天然添加物分析法試案, 139 (1985)
- 9) 松永明信他：衛生化学, 31, 269 (1985)
- 10) 今井田雅示他：大阪府立衛研所報、食品衛生編, 16, 57 (1985)
- 11) 松永明信他：食衛誌, 27, 408 (1986)
- 12) 藤沼賢司他：食衛誌, 29, 210 (1988)
- 13) 長南隆夫他：道衛研所報, 36, 1 (1986)
- 14) 堀 義宏他：道衛研所報, 37, 30 (1987)