

食品中のスクラロース分析法におけるカラム溶出液濃縮方法の比較検討

新藤 哲也^a, 貞升 友紀^a, 田中 康一^a, 外川 明子^a, 植松 洋子^a

スクラロース分析における固相抽出からの溶出液の濃縮操作として4つの方法を用いて、スクラロースの回収率、濃縮操作に要する時間を比較した。本研究では以下の方法 1) アルミブロック恒温槽を用いた窒素気流下での加熱濃縮 (60~90°C), 2) 減圧濃縮 (40~80°C), 3) 水浴による加熱濃縮 (60~90°C), 4) ホットプレートによる加熱濃縮 (180°C) で行った。スクラロースの回収率は、方法1) および方法2) ではいずれの温度においてもほぼ90%以上と良好な回収率が得られた。これらの温度範囲において短時間で濃縮するには方法1)では90°Cで43分、方法2)では80°Cで6分であった。方法3)の回収率は70°Cで70%を下回り、濃縮に210分を要した。濃縮温度を下げると回収率はやや増加したが、濃縮時間も増加した。濃縮温度を上げると濃縮時間は短縮されるが、回収率も減少した。方法4)の回収率は30%を下回った。以上の結果から、方法1)は10~20検体を同時に処理できることから全濃縮時間が短縮されるため、多検体処理に適していると考えられた。また、方法2)は1検体あたりの濃縮時間が最も短いことから、数検体の処理に適していることがわかった。

キーワード: 食品, スクラロース, 濃縮, ヒートブロック恒温槽, エバポレーター, 添加回収, HPLC

はじめに

近年、低カロリー嗜好を受けて、様々な種類の低カロリー甘味料が使用されているが、その中でもスクラロースは清涼飲料水や菓子等に多用されており、需要が増加している。

スクラロースは食品衛生法¹⁾で使用基準が定められており、衛生試験法・注解2010²⁾に示されているようにHPLCまたはイオンクロマトグラフィーにより分析するのが一般的である。この方法では、固相抽出後に濃縮乾固を行うが、詳しい濃縮方法は示されていない。一般にスクラロースの濃縮には岸らの報告等^{3~6)}にあるようにエバポレーターによる減圧濃縮が用いられているが、伊藤の報告⁵⁾では70°C以下、山辺らの報告⁶⁾では50°Cと統一されていない。一方、多検体の行政検査を行う場合、濃縮操作は多大な時間と労力を要するため、迅速かつ精度の高い濃縮方法が求められている。そこで、窒素気流下でのヒートブロック恒温槽により、多検体を同時に効率良く濃縮操作を行う目的で濃縮条件の検討を行った。また、併せて従来用いられている減圧濃縮の温度条件、水浴やホットプレートによる濃縮についても比較検討し、若干の知見を得たので以下に報告する。

実験方法

1. 標準品および試薬

1) 標準品および標準原液

標準品であるスクラロースは和光純薬工業(株)製を用いた。標準品100 mgを正確に量り、水を加えて正確に100 mLとし、標準原液とした。(本液1 mLはスクラロース1,000 µgを含む)。

2) 添加回収試験用標準溶液

標準原液5 mLを正確に量り、水を加えて正確に1,000 mLとし、添加回収試験用標準溶液とした(本液1 mLはスクラロース5 µgを含む)。

3) 検量線用標準溶液

標準原液1, 2, 5, 10 mLをそれぞれ正確に採り、水で正確に20 mLとし、検量線用標準溶液とした(これらの液1 mLはスクラロース各50, 100, 250, 500 µgを含む)。

4) 固相抽出カートリッジ

アジレント社製のBond Elut-ENV (1 g)を用いた。その他試薬は市販特級品を用いた。

2. 装置

HPLC: ポンプ (PU-1580), カラムオープン (CO-1560), オートサンプラー (AS-1555-10) 以上日本分光工業(株)製, RI (Refractive Index) 検出器 (RID-10A), データ処理装置 (C-R7A plus) 以上島津製作所製を用いた。

ヒートブロック恒温槽: 窒息気流による濃縮ユニット付アルミブロック恒温槽 (DTU-2C) タイテック社製

エバポレーター: SC-MD ジーエルサイエンス社製

水浴は前田製作所製, ホットプレートは家庭用を用いた。

空気ポンプ: CSA-1 アズワン

3. 試験溶液の調製

衛生試験法・注解2010²⁾のHPLC法に準じて行った。

添加回収試験用標準溶液50 mLを、あらかじめメタノー5 mLおよび水10 mLでコンディショニングした固相抽出カートリッジに負荷し、水10 mL, 0.2 mol/L水酸化ナトリウム溶液5 mL, 水10 mLで順次洗浄した。次いでメタノー

^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

ル5 mLで溶出し、以下に示した濃縮方法によりそれぞれ濃縮乾固した。残渣を水1 mLに溶解し、孔径0.45 μmのメンブランフィルターでろ過後、試験溶液とした (Fig. 1)。

Sucralose standard solution (5 μg/mL) 50 mL

Bond Elut ENV (1 g)

(Conditioned with 5 mL of methanol and 10 mL of water)

Wash the column with 10 mL of water, followed by 5 mL of 0.2 mol/L NaOH and 10 mL of water

Elute with 5 mL of methanol

Eluate

Concentrate of eluate by four different methods

Residue

Redissolve in 1 mL of water

Filtrate through membrane filter with a 0.45 μm pore size

HPLC

Fig. 1. Analytical Procedure of Sucralose

4. 固相抽出液の濃縮

1) ヒートブロック恒温槽を用いる窒素気流下の濃縮

溶出液を10 mL試験管に取り、60、70、80、90°Cにおいて、それぞれ窒素気流下 (1本あたり1~2 L/min) で濃縮乾固した。

2) 減圧濃縮

溶出液を20 mLナス型フラスコに取り、40、60、70、80°Cにおいてそれぞれ減圧乾固 (5~10 kPa) した。

3) 水浴による加熱濃縮

溶出液を30 mLねじ口びん (口径15 mm) に取り、60、70、80、90°Cの水浴中でそれぞれ濃縮乾固した。

4) ホットプレートによる加熱濃縮

溶出液を30 mLねじ口びんに取り、ホットプレート上 (180°C) で濃縮乾固した。

4. HPLC条件

カラム: Inertsil ODS-3V 4.6 mm i.d. × 250 mm (粒径 5 μm, ジーエルサイエンス社製), 移動相: アセトニトリル・水 (15:85), 流速: 1.0 mL/min, 検出: RI, カラム温度: 40°C, 注入量: 50 μL

結 果

添加回収試験結果をTable 1に示した。

1. ヒートブロック恒温槽を用いる窒素気流下の濃縮

回収率は60、70、80°Cではいずれも94.1%以上、CV値3.5%以下と良好であったが、90°Cでは88.6%とやや低かった。また、濃縮時間は80°Cでは54分であったが、70°C以下では1時間以上を要した。これらのことから、窒素気流下でのヒートブロック恒温槽を用いた濃縮は80°Cで行うのが良いと考えられた。

2. 減圧濃縮

回収率は40、60、70、80°Cのいずれも95%以上、CV値2.7%以下といずれも良好であった。また、濃縮時間は60°C以上では15分以下と短時間であり、40°Cでも40分であった。

Table 1. Recoveries of Sucralose by Concentration of Column-eluate with Various Methods

Concentration method	Temperature (°C)	Concentration time (min)	Sucralose	
			Recovery	C.V.
Heating in the aluminum block heater under N ₂ gas stream	60	101	95.3	2.8
	70	66	94.1	3.5
	80	54	94.9	1.3
	90	43	88.6	4.6
Evaporating under reduced pressure (5~10 kPa)	40	40	95.2	2.7
	60	15	98.2	0.9
	70	10	97.1	1.5
	80	6	96.1	0.3
Heating in the water bath	60	300	85.8	3.2
	70	210	68.4	4.0
	80	100	57.0	10.9
90	60	47.0	16.0	
Heating on the electric griddle	180	35	27.1	16.0

(%, n=5)

3. 水浴による加熱濃縮

水浴での回収率は60°Cで85.8%, CV値3.2%であり, 70°C以上では回収率70%以下, CV値4%以上であった. また濃縮時間は60°Cでは5時間, 70°Cでも3.5時間を要した.

4. ホットプレートによる加熱濃縮

ホットプレートでの回収率は27%, CV値16%であり, 他の濃縮操作に比べて, 著しく回収率が低かった.

考 察

ヒートブロック恒温槽を用いる窒素気流下の濃縮では80°C以下で良好な回収率が得られた. この方法では10~20検体の濃縮操作が一度に行えることから, 多検体の濃縮も迅速に行うことができる. しかし, 窒素ガスを使用するため, ガスボンベ等を準備する必要がある. そこで窒素ガスの代わりに空気ポンプを用いた濃縮を試みたところ, ほぼ同様の回収率が得られた.

減圧濃縮ではいずれの温度においても良好な回収率が得られたが, 多検体を濃縮する際には労力と時間を要することから, 少数検体の濃縮に適していると考えられた.

水浴による加熱濃縮では他の濃縮方法に比べて回収率が低い傾向がみられ, 濃縮時間も70°C以下では3時間以上を要した. そこで, 濃縮の際に用いる容器をねじ口びんではなく, 試験管およびビーカーを用いたところ, 試験管ではさらに回収率が低下したが, ビーカーでは80°Cの回収率が88.9%と改善された. さらに, ビーカーを用いて水浴で濃縮する際, 上部から扇風機で風を送ることにより, 90.9% (濃縮時間40分) と良好な結果が得られることがわかった. なお, ビーカーを用いる場合には, 濃縮後, 水に溶解して試験溶液を調製する際に密栓して溶解できないため, 操作を行うには注意を要する.

ホットプレートによる加熱濃縮では回収率が低く, スクラロースの濃縮には適さないことがわかった. なお, 回収率が低下したのは加熱温度が180°Cと高温であったことが

一因と考えられた.

以上のように, ホットプレートを除く各濃縮操作ともそれぞれの特徴があり, これらの特徴を把握した上で濃縮操作を選択することが検査の効率化につながると考える.

ま と め

低カロリー甘味料であるスクラロース分析における固相抽出液の濃縮操作として, 以下の4つの異なる方法を用い, それぞれによる添加回収率, 濃縮時間等を比較した. 本研究では濃縮方法として 1) ヒートブロック恒温槽を用いた窒素気流下での加熱濃縮, 2) 従来から用いられている減圧濃縮, 3) 水浴および 4) ホットプレートによる加熱濃縮を用いた. 添加回収試験の結果, ヒートブロック恒温槽および減圧濃縮ではいずれもほぼ90%以上と良好な回収率が得られた. しかし, 水浴による加熱濃縮ではこれらの濃縮操作に比べて回収率が低く, 溶出液をビーカーに採取し, 上部から送風するなどの工夫をする必要があった. さらにホットプレートによる加熱濃縮では回収率が30%以下で, スクラロースの濃縮には適さないことがわかった. 以上の結果から, 少数検体では減圧濃縮, 多検体では80°Cのヒートブロック恒温槽による窒素気流下の濃縮操作が適していると考えられた.

文 献

- 1) 食品衛生研究会編集: 食品衛生小六法II・平成23年版, 1886-1887, 2010, 新日本法規出版, 東京.
- 2) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解2010, 362-365, 2010, 東京.
- 3) 岸弘子, 川名清子: 食衛誌, **42**, 133-138, 2001.
- 4) 畑野和弘, 中尾朱美: 食衛誌, **43**, 267-272, 2002.
- 5) 伊藤誉志男: *Foods Food Ingredients J.Jpn.*, **182**, 35-41, 1999.
- 6) 山辺智子, 竹村学, 河口裕香, 他: 日食化誌, **19**, 54-58, 2012.

Comparison of Various Methods for Column Eluate Concentration in the Analysis of Sucralose in Food

Tetsuya SHINDO^a, Yuki SADAMASU^a, Yasukazu TANAKA^a,
Akiko TOGAWA^a, and Yoko UEMATSU^a

Four methods for the concentration step of solid-phase extraction column eluate in sucralose analysis were compared in terms of recovery and required time for concentration. The methods compared were as follows: 1) heating in aluminum block heater under nitrogen stream at 60–90°C, 2) evaporation under reduced pressure at 40–80°C, 3) heating in water bath at 60–90°C, and 4) heating on electric griddle at 180°C. Recoveries generally exceeded 90% using Methods (1) and (2) at any temperature. Within the temperature used, the shortest time required for concentration was 43 minutes for Method (1) (at 90°C), whereas it was 6 minutes by Method (2) (at 80°C). Recovery by Method (3) was less than 70% at 70°C, with 210 minutes of concentration time. Lowering the temperature slightly increased recovery, but also increased the time required. Increasing the temperature decreased the time required, but decreased recovery as well. Recovery by Method (4) was less than 30%. Method (1) would be preferable for a large number of samples because 10–20 samples can be processed simultaneously, and the total required time would be reduced. Method (2) would be preferable for a small number of samples because it required the shortest time for one sample among the 4 methods tested.

Keywords: food, sucralose, concentration, aluminum block heater, vacuo, recovery rate, HPLC

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