

ジャム及びマーマレード中のサッカリン及びズルチンのHPLC分析

都 田 路 子*, 青 柳 陽 子*, 佐 藤 寛*, 高 田 千 恵 子**
山 田 洋 子*, 荻 原 勉*, 天 川 映 子*, 安 田 和 男*

Determination of Saccharin and Dulcin in Jam and Marmalade by HPLC

Michiko MIYAKODA*, Yoko AOYAGI*, Hiroshi SATOH*, Chieko TAKADA**
Yoko YAMADA*, Tsutomu OGIWARA*, Eiko AMAKAWA* and Kazuo YASUDA*

Keywords: サッカリン saccharin, ズルチン dulcin, 透析法 dialysis, 液体クロマトグラフィー HPLC, ジャム jam, マーマレード marmalade

はじめに

サッカリンナトリウム(以下Sacと略す)の食品からの回収率は、透析/HPLC法を用いた場合、他の食品添加物に比較して、一般的に良好である。守安ら¹⁾の報告によれば、ジャムに添加した場合、この方法における回収率は95%以上である。しかし、著者らが実施した精度管理調査において、試料にジャムを用い、透析/HPLC法によりSacの添加回収実験を行ったところ、若干回収率が低いものがあった。そこで、回収率の低下の原因を解明し、改善をはかる必要性が生じた。

透析操作において、回収率に影響するものとして透析内液の量や組成、試料の成分組成やpH、透析の時間や温度、透析外液の攪拌回数などが考えられる。そこで、最も大きく影響すると考えられる透析内液の量、ジャムやマーマレードに含まれる糖分の量(糖度)及び透析外液の攪拌回数についてSacの回収率及び再現性に及ぼす影響を調べることにした。

また、Sacと同一条件下での透析が可能なズルチン(以下Dulと略す)についても同時に検討した。その結果、食品中のSac及びDulを高い精度で測定する際の最適な透析条件について若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料 イチゴジャム及びアプリコットジャム各2種、リンゴジャム及びオレンジマーマレード各1種の計6種はいずれも市販品を用いた。また、糖度の回収率への影響をみるために、市販のイチゴと砂糖を用い、常法に従い糖度45%、60%及び70%の自家製イチゴジャム3種を調製した。

2. 試薬 1) 混合標準原液: サッカリンナトリウム(二水和物, 特級, 和光純薬工業(株)製を120 で4時間乾燥した

もの) 100 mg及びズルチン(ズルチン標準品, 関東化学(株)製) 100 mgを精秤し、メタノール・水(1:1)混液に溶解して全量100 mLとしたものを混合標準原液とした。本液1 mLはSac及びDulを各々、1000 µgを含有する。2) 混合標準溶液: 混合標準原液をメタノール・水(1:1)混液で適宜、希釈して用いた。3) 透析内液: 塩化ナトリウム25 gを0.01 mol/L塩酸に溶解して1000 mLとした。4) 透析外液: 水 5) 透析膜: 透析膜36/32(平面幅43 mm, 直径27 mm, 膜厚0.0203 mm, Viskase sales社製) 6) メンブランフィルタ: 日本ミリポア社製JHWPO, 0.45 µm 7) その他の試薬は市販特級品を用いた。

3. 装置

1) 高速液体クロマトグラフ: ①Sac分析用; 日本分光工業(株)980-PU型ポンプ, 同950-AS型オートインジェクター, 同UV-970型紫外可視分光検出器, 同CO-965型カラムオーブン, 同DG-980-50型脱気装置, 及び(株)島津製作所製C-R4A型データ処理装置を用いた。②Dul分析用; HEWLETT PACKARD製1100型HPLCシステムを用いた。

2) 糖度計: アタゴ(株)製自動補正式屈折計ATC-1

4. HPLC測定条件

1) Sac分析用

カラム: Wakosil-NH2 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 和光純薬工業(株)製) 移動相: メタノール・1%りん酸(1:1), 検出波長: 230 nm, 流速: 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C, 注入量: 10 µL

2) Dul分析用

DulのHPLC測定条件は、天川ら²⁾の報告に準じた。カラム: Lichrosorb RP-18-5 (4.6 mm i.d. × 250 mm, シーエルサイエンス(株)製), 移動相: 0.02 mol/Lリン酸二水素カリウム溶液(pH 4.6)アセトニトリル(8:2), 検出波長: 243 nm, 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 45 °C, 注

* 東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町3-16-25

* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

** 東京都立衛生研究所 環境保健部水質研究科

入量：10 μ L

5. 試験溶液の調製 均等になるよう、よく攪拌し混ぜ合せた試料のうちから、その20 gを50 mLのビーカーに秤取りし、透析内液40 mLを加えた後、ガラス棒で混合して流動状とし、透析膜に充填した。さらに、5 mLずつで2回、ビーカーを洗い、洗液も合わせて充填した。これを200 mLのメスシリンダーの中に入れ、透析外液で全量を200 mLとした。透析膜を上下に揺り動かし攪拌した後静置し、1時間後に攪拌、さらに2時間おきに2～3回攪拌し常温で24時間透析を行った。

透析終了後、透析外液をよく攪拌した後0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。

6. HPLCによる測定 試験溶液について、HPLC測定条件に従ってSac及びDulをそれぞれ測定し、ピーク面積法により定量した。

なお、検量線は、Sac及びDulともそれぞれ直線性が認められた0.1～2.5 μ g/mLの範囲を使用した。

7. 統計処理 回収率の差については t -検定、その相対

標準偏差については分散分析/多重比較(LSD検定)を行った。

結果及び考察

糖濃度の高い食品であるジャム及びマーマレード中のSacとDulを効率よく同時に透析できる条件を見いだすために、以下の検討を行った。

1. 透析内液量の検討 透析内液量を20 mL, 50 mL, 80 mLの3種類とし、あらかじめSac及びDulを含有していないことを確認したイチゴジャム及びアプリコットジャム各2種、リンゴジャム及びオレンジマーマレード各1種の計6種を用い添加回収実験を行い、透析内液量の回収率に及ぼす影響を調べた。

試料にSac, Dulが各100 μ g/gになるよう添加し、混和して1時間放置後、本法に従い測定した($n=5$)3種類の内液量を用いて得られた試験溶液について、平均回収率を求め、結果を図1に示した。

Sac及びDulともに6試料の平均回収率は、内液量50mL

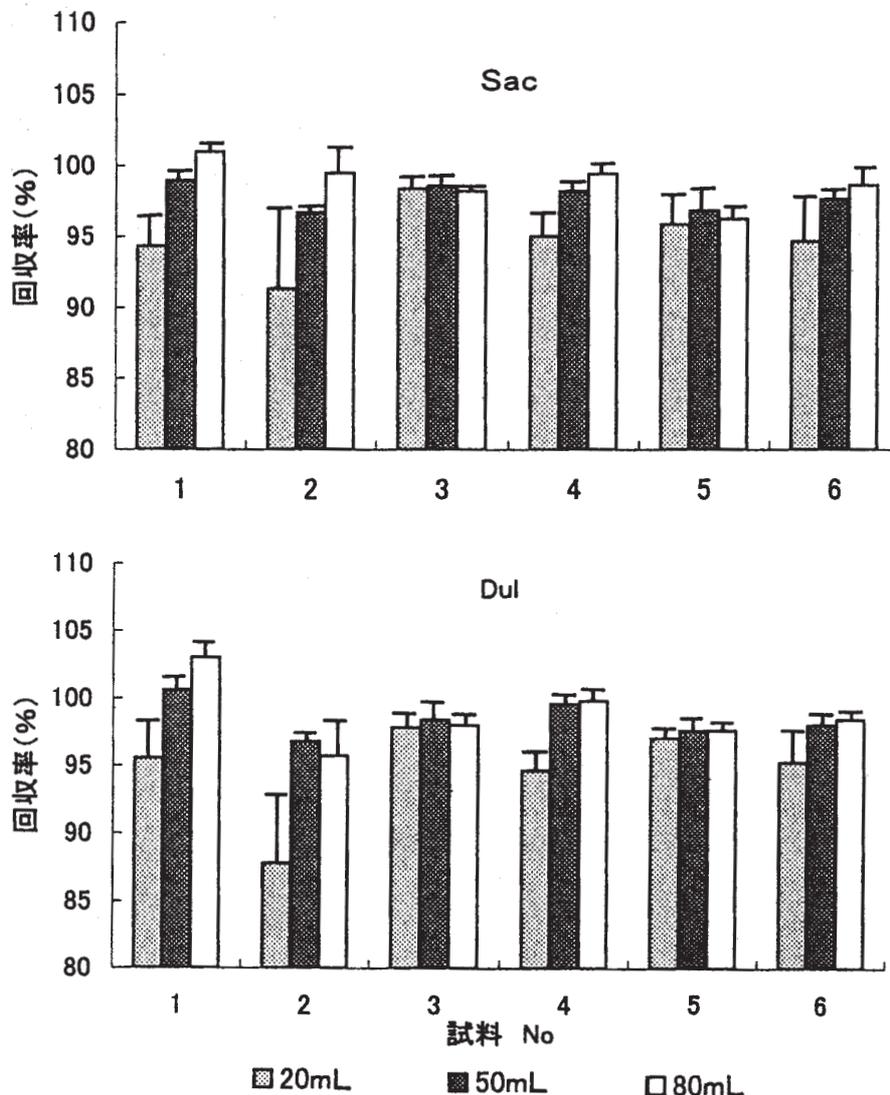


図1：透析内液量の回収率に及ぼす影響

1：リンゴジャム 2：アプリコットジャムA 3：アプリコットジャムB 4：イチゴジャムA
5：イチゴジャムB 6：オレンジマーマレード

及び80 mLの場合、内液量20 mLに対し、有意に高かった。内液量50 mLと80 mLの間では有意差はなかった ($P < 0.05$)。

透析内液の量によって分析の精度(再現性)が変わるかを確かめるため、前記で得られた6試料の回収率の相対標準偏差(RSD)について分散分析/多重比較を行い、結果を表1及び図2に示した。

内液量20 mLに対し、Sacは50 mL及び80 mLで、また、Dulは50 mLでそれぞれ有意差を認めた ($P < 0.05$)。すなわち分析精度(再現性)はSacでは、透析内液の量が20 mLに比べ50 mL、80 mLの場合がよく、Dulでは50 mLの時が最も良かった。

2. 透析内液量に対する糖度の影響 アプリコットジャムAは透析内液20 mLを使用した場合には、Sac, Dulいずれにおいても内液50 mL及び80 mLを用いた時より、回収率は低く、CVの値は5%以上となり再現性が低下した。

透析効率に影響するものとして、糖度やペクチン含有量が考えられる。通常、市販のジャムの糖質含有量(糖度)は、低糖の表示のあるもので約50%、普通の製品では約65%である³⁾。アプリコットジャムAは67%、Bは65%であった。また、Aはペクチン添加の旨の表示がされていたが、Bには添加の表示は見られなかった。これらのことから、

アプリコットジャムAでは、糖質及びペクチンが相乗的に作用し透析膜内の浸透圧を著しく高め、透析外液の水分を膜内に吸収して、透析効率を低下させたものと考えられる。

そこで実際にジャムを作成し、回収率、CV値に対する糖度の影響を調べた。

市販されているジャムの糖度を参考に、45%、60%、70%と3種の糖度の自家製イチゴジャムを作り、Sac及びDulが各100 µg/gになるよう添加し、透析内液20 mL、50 mL及び80 mLを用いて透析し、回収率、CV値を求めた。

回収率は、Sac 94.2~97.8%、Dul 95.0~99.2%であり、ともに糖度を変えたモデル実験では、内液量による有意差は見られなかった ($P < 0.05$)。

CV値は、内液量が50 mL及び80 mLでは、Sac 0.4~3.1%、Dul 0.8~3.8%であり、糖度に関わりなく、共に良好な結果を示した。しかし、表2に示したように内液量20 mLの場合、糖度が45%、60%、70%と増加するにつれて、CV値はSacでは2.1%、3.1%、7.3%、Dulでも1.4%、2.3%、7.6%と大きくなり再現性が低下した。

これらの結果から、ジャムやマーマレードの様な糖度が高く、ペクチン含量の多い食品では、透析内液の量を増やして糖度を低下させSac, Dulの透析効率を上げることに

表1. 多重比較(LSD検定)の結果

Sac	LSD検定	変数 RSD		Dul	LSD検定	変数 RSD	
	有意確率	透析内液量			有意確率	透析内液量	
	(1)	(2)	(3)		(1)	(2)	(3)
透析内液量	2.616667	0.7833334	0.9333333	透析内液量	2.51667	0.8666667	0.9000000
20 mL(1)		0.017552*	0.027062*	20 mL(1)		0.047231*	0.051300
50 mL(2)	0.017552*		0.830151	50 mL(2)	0.047231*		0.965746
80 mL(3)	0.027062*	0.830151		80 mL(3)	0.051300*	0.965746	

* : 有意確率 (強調表示) $p < 0.05000$

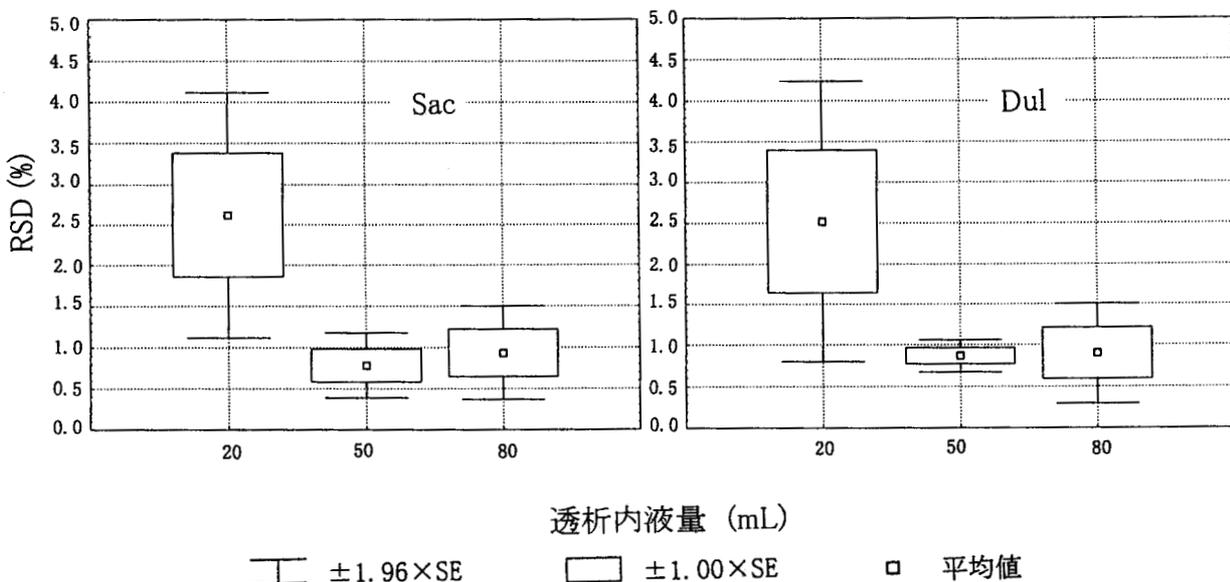


図2. 透析内液量の差による再現性の比較

表2. 糖度のCV値への影響

糖度 (%)	内液量 (mL)	回収率 (%)		CV (%)	
		Sac	Dul	Sac	Dul
45	20	97.4	98.0	2.1	1.4
	50	97.8	99.2	1.3	0.8
	80	97.4	99.2	0.9	0.8
60	20	95.2	95.8	3.1	2.3
	50	95.8	97.0	0.4	0.7
	80	96.0	96.6	1.0	0.5
70	20	94.2	95.0	7.3	7.6
	50	95.4	95.4	3.1	3.8
	80	97.2	97.2	1.3	1.3

n=5

より回収率及びCV値を改善できるものと思われる。

3. 透析外液攪拌回数の影響 透析内液20 mlを使用したアプリコットジャムAは透析時、2～3時間すると透析膜内の高い浸透圧により、透析外液が膜内に移行し透析膜が膨張して透析外液の攪拌が難しくなった。このことが、回収率の低下及びCV値の増加に影響したと考えられる。

そこで回収率、CV値とも良好な試料No.6のオレンジマーマレード (Sac回収率97.6%, CV=1.1%, Dul回収率96.8%, CV=1.5%) を使い、透析外液の攪拌回数が回収率に及ぼす影響を調べた。

SacとDulを添加した試料を、透析内液50 ml を使って充填し24時間の透析中に、0, 2, 3及び5回の攪拌をし、回収率を求めた。なお、最初の攪拌は、透析開始1時間後に行い、以降は2時間ごとに攪拌した。結果を図3に示した。

全く攪拌しないで24時間透析した時の結果は、Sac, Dulいずれも回収率は70%以下と低く、CV値はSacで7.1%、Dulで5.7%と再現性も悪かった。しかし、攪拌回数が、2回、3回と増加するに従って、回収率が向上し再現性も良くなった。2回の攪拌で、Sac, Dulいずれも回収率は92.6%, CV値は1.7%となり、3回以上攪拌すると回収率は97.6～99.1%, CV値は1.1～1.5%と良好な結果が得られた。

以上の結果から、糖分の多い試料の場合、透析時、攪拌が不十分だと回収率、CV値が大きく影響を受けることが

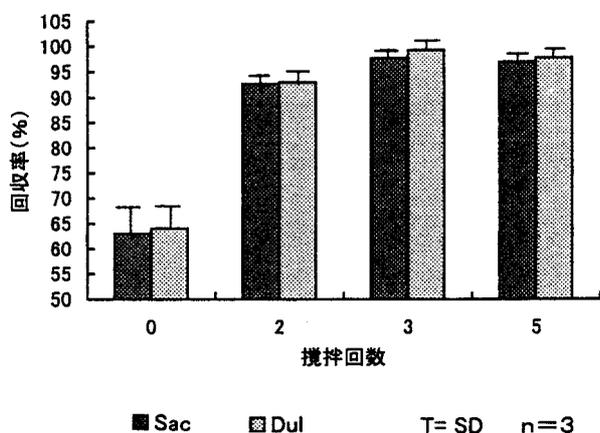


図3. 攪拌回数の回収率に及ぼす影響

分かった。そこで、本法では、透析開始1時間後に1回目の攪拌をし、それ以降は2時間おきに少なくとも2回以上透析外液を攪拌することにした。

4. Sac及びDulの透析効率の比較 これまでに乾燥梅干し(話梅)などで同一検体からSacとDulを検出する例があったためSacとDulを同時に透析する場合の最適な透析条件を求めた。それぞれについて6試料の平均回収率を用い、透析内液20 mL, 50 mL, 80 mLにおけるSac及びDulの回収率の相関関係を調べた。相関係数は20 mLの場合R=0.90, 50 mLでR=0.88, 80 mLではR=0.57であり、内液量20 mL及び50 mLで相関が認められた。

すなわち、内液量20 mL及び50 mLのとき透析効率は、Sac及びDulで同様の傾向を示した。内液量を80 mLに増やすと、浸透圧が低くなりSac及びDulで透析効率が異なってくるものと考えられる。

以上の結果から、本法では、SacとDulを同時に分析する場合を考慮し、透析内液量はSac及びDulいずれの場合も回収率、再現性に優れた結果が得られる、50 mLとした。

小林らは⁴⁾、Sacの回収率の低い傾向がみられる試料について、透析内液の塩分濃度を上げることにより、回収率を高めている。しかしDulにおいては、むしろ塩分濃度が低い時、あるいは塩化ナトリウム無添加の時に高い傾向を示し、SacとDulでは、最適透析条件が異なることを報告している。しかし、本法では、糖質の多い試料の場合、透析内液50 mLを使用し透析中に外液を十分に攪拌することで、Sac及びDulのいずれについても、高感度で精度の高い分析が出来る考える。なお、当所では、SacとDulについて定量試験と同一の透析外液を用いて、ペ-パ-クロマトグラフィ-による定性試験を行っている。定性試験の際に十分な検出感度を得るためには、少なくとも100 mLの透析外液を必要とする。このことを考慮しても、透析外液の量が120 mL前後得られる50 mLが、透析内液の量として適切と考える。

5. 定量限界 定量限界を求めるにあたりDulについて検出波長210 nm, 235 nm, 243 nm, 254 nm, で検出感度を検討したところ、極大吸収波長の243 nmとすることで天川ら、の報告による210 nmに比べ試料1g当たり5 µgと約2倍の感度が得られた。Sacの定量限界は試料1g当たり5 µgである。

まとめ

ジャムやマーマレードなど糖度の高い食品中のSac及びDulを同時に測定するための最適な透析条件を検討し、これらの分析法の改良を試みたところ、以下のことが明らかになった。

1. 透析内液量として50 mLを用いることで、Sac及びDulともに回収率95%以上でCV 5%以内と良好な結果を得た。
2. 糖度の回収率に及ぼす影響について検討した結果、糖

度が高くなるに従い、CV値が増加し再現性が低下した。

3. 透析外液攪拌回数の回収率に及ぼす影響を検討したところ、まず、透析開始1時間後に攪拌し、それ以後は2時間毎に2回以上攪拌することで、良好な結果が得られた。
4. Dulは、検出波長を243 nmとすることで、高感度が得られた。

以上の結果から、本法は、糖度の高い食品中のSac及びDulの分析法として充分使用できると考える。

なお、これらの結果をSacについては、直ちに、当所のSOPに反映させ、また、Dulに関しては、SOP作成の重要

な基礎資料とし日常業務に役立てたいと考える。

文 献

- 1) 守安貴子, 中里光男, 小林千種 他: 食衛誌37, 91-96, 1996.
- 2) 天川映子, 蒲田国広, 斉藤和夫 他: 食衛誌40, 304-308, 1999.
- 3) 香川芳子監修: 市販食品成分表, 第6版, 524-532, 1991, 女子栄養大学出版部, 東京.
- 4) 小林千種, 中里光男, 牛山博文 他: 食衛誌40, 166-171, 1999.