

固相抽出を用いたHPLCによる食品中のグリチルリチン酸，ステビオシド及びレバウディオシドAの同時分析法

小 沢 秀 樹*，広 門 雅 子**，田 口 信 夫***，小 林 千 種***，
山 嶋 裕 季子***，斉 藤 和 夫*

Simultaneous Determination of Glycyrrhizic acid, Stevioside and Rebaudioside A in Food by Solid Phase Extraction and HPLC

Hideki OZAWA*，Masako HIROKADO**，Nobuo TAGUCHI***，Chigusa KOBAYASHI***，
Yukiko YAMAJIMA*** and Kazuo SAITO*

In this study, a simple and efficient method for detecting and determining the natural sweeteners glycyrrhizic acid (GA), stevioside (Stev) and rebaudioside A (Reb. A) in foods is described. These sweeteners were extracted with a methanol-0.1% ammonium hydroxide (40:60) mixture using a homogenizer. After centrifugation of the homogenate, a part of the supernatant was diluted with water, added to tetrabutylammonium bromide (TBA), and then the mixture was loaded in to a C₁₈ cartridge (Mega Bond Elut C₁₈). The cartridge was washed with 25 % acetone-water (containing 5 mM TBA) and water, and the sweeteners were eluted by acetonitrile-0.1% (v/v) phosphoric acid (80:20). The eluate was analyzed by HPLC equipped with an NH₂ column and UV detectors (monitored at 254 nm for GA and at 210 nm for Stev and Reb. A). Recoveries of these sweeteners spiked at 10 or 50 µg/g were 82 - 104 % (GA), 80 - 104 % (Stev) and 84 - 101 % (Reb. A) (Relative standard deviations (CV values) : below 5 %). The detection limits of GA, Stev and Reb. A were 0.0001 g/kg. We applied this method to 16 commercially available foods with indications of both "licorice extracts (GA is dominant component)" and "stevia extracts (Stev and Reb. A are dominant components)"; the sweeteners were detected at levels from 5.1 to 406.7 µg/g (16 out of the 16) for GA, from 5.4 to 160.7 µg/g (14 out of the 16) for Stev and from 4.2 to 170.2 µg/g (14 out of the 16) for Reb. A.

Keywords : 天然甘味料 natural sweetener, 甘草 licorice, グリチルリチン酸 glycyrrhizic acid, ステビオシド stevioside, レバウディオシドA rebaudioside A, 固相抽出 solid-phase extraction, 高速液体クロマトグラフィーHPLC

緒 言

甘草抽出物主成分であるグリチルリチン酸 (GA) や *Stevia rebaudiana* Bertoniの葉抽出物主成分であるステビオシド (Stev) 及びレバウディオシドA (Reb. A) は天然甘味料として塩慣れ、べたつき防止、呈味改善等の観点から漬物、佃煮、珍味等の日本独自の伝統食品に広範に利用されている。現在、GA、Stev及びReb. Aの食品への使用基準はなく、天然抽出物とはいえ制限無く食品に添加することには問題があり、今後、その使用実態を把握していくことは食品衛生的に必要なことである。

食品中のGA、Stev及びReb. Aの分析法については、簡易さ、精度等の観点から汎用性の高いHPLC法が数多く報告されている。GAではC₁₈カラムによる逆相分配モード¹⁻³⁾によるHPLC分析法が、Stev及びReb. AではNH₂カラム

によるイオン交換モードによるHPLC分析法^{4,7)}が各々報告されているが、これら3種の天然甘味料を同時に同条件で分析する方法はこれまで見あたらない。

今回、著者らは、GA、Stev及びReb. Aの3種天然甘味料の使用実態をルーチンとしてモニタリングするにあたり、これらの3成分を同一の前処理法で試験溶液を調製し、更に、特殊な分析装置、試薬及び技術を必要としない汎用性の高いHPLCによる分析法を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

実 験 方 法

1. 試料

添加回収試験には甘草及びステビアの添加表示のないものを、実態調査には両添加表示のある食品を都内の販売店

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

** Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

*** 東京都健康安全研究センター微生物部

**** 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

で購入し使用した。

2. 試薬

(1) GA, Stev及びReb. A各標準原液: GA (和光純薬工業(株)製, 生薬試験用), Stev (和光純薬工業(株)製, ステビオシド 定量用) 及びReb. A標準品 (和光純薬工業(株)製, ステビオシド定量用) の各100 mgを50% メタノール水溶液に各々溶解して全量を100 mLとした。

(2) 固相抽出カートリッジ: Mega Bond Elut C₁₈ (5 g/20 mL, バリアン社製) を使用した。試料溶液は, カートリッジを予めメタノール20 mL次いで水20 mLでコンディショニングを行った後, リザーバー (60 mL, 日本ウォーターズ社製) を用いて負荷した。

(3) アセトニトリル (HPLC用), メタノール (HPLC用), リン酸及び臭化テトラブチルアンモニウム (TBA) はすべて和光純薬工業(株) 製試薬特級を用いた。

3. 装置

(1) ホモジナイザー: ヒスコトロン (日音医理工器製作所(株) 製)。

(2) バキュームマニホールド: ジーエルサイエンス(株) 製GL-SPE (# 5010-50000)。

(3) 遠心器: 卓上小型遠心器2100 (久保田製作所(株) 製), 高速冷却遠心器 CX-250 (トミー精工(株) 製)。

(4) 高速液体クロマトグラフ (HPLC): (i) ポンプ; LC-10AT, (ii) カラムオープン; CTO-6A, (iii) 紫外/可視部吸収検出器; (a) SPD-6AV, (b) SPD-6A (紫外/可視部吸収検出器(a)と(b)は流路を直列に接続して用いた), (iv) データ処理; C-R6A, 以上全て島津製作所(株) 製, (v) オートインジェクター; AS-950, 日本分光工業(株) 製。

4. HPLC分析条件

カラム: Mightysil NH₂ (粒径5 μm, 4.6 mm i.d.×250 mm; 関東化学(株) 製, 移動相: アセトニトリル - 0.1% リン酸(80:20)混液, 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40, 検出波長: (a) 210 nm (Stev 及びRev. A検出用), (b) 254

nm (GA検出用), 注入量: 10 μL。

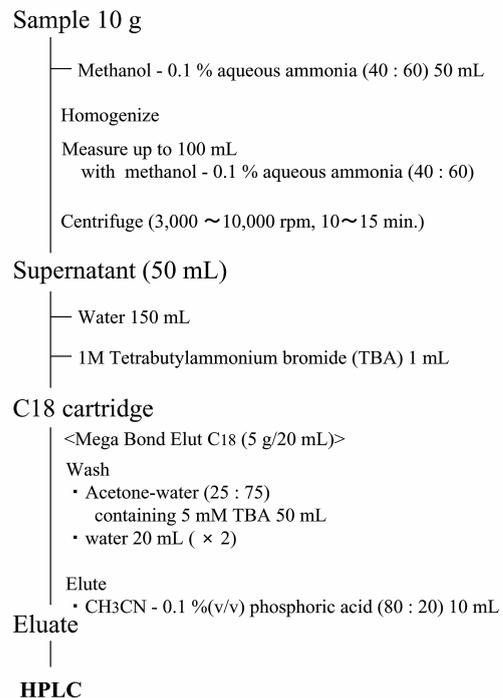


Fig.1. Schematic Diagram for Analytical Procedure of Glycirrhizic Acid (GA), Stevioside (Stev) and Rebaudioside A (Reb. A)

5. 試験溶液の調製

液体試料及び細切した固体試料10 gを秤り, メタノール - 0.1%アンモニア (40:60) 混液50 mLを加えてホモジナイズした後, 同混液にて全量を100 mLとした。これを遠心分離器にかけ, 得られた上清50 mLに水150 mL, 1 M テトラブチルアンモニウムブロミド (TBA) 1 mLを添加した後, Bond Elut C₁₈カートリッジに負荷した。このカートリッジを5 mM TBAを添加した25% アセトン/水溶液

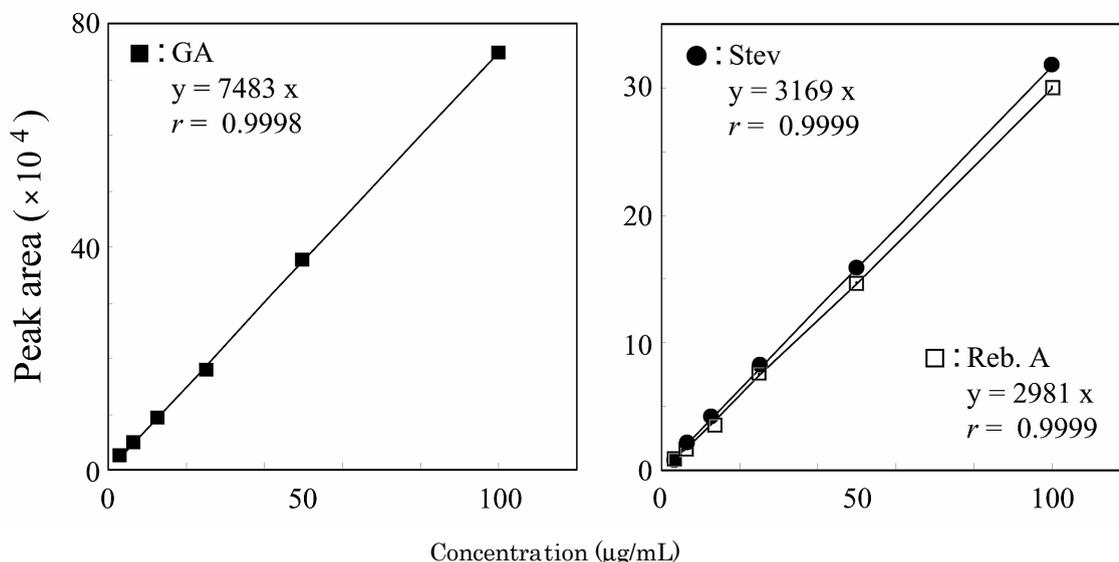


Fig.2. Calibration Curves of GA, Stev and Reb. A

50 mL, 次いで水20 mL で2回洗浄した後, アセトニトリル - 0.1% (v/v) リン酸 (80:20) 混液でGA, Stev及びReb. Aを溶出させ, 同混液で全量を10 mLとしたものをHPLC用試験溶液とした(Fig. 1)

6. 検量線

GA, Stev及びReb. Aの各標準原液をアセトニトリル - 0.1% (v/v) リン酸 (80:20) 混液にて希釈し, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50及び100 µg/mLの混合標準溶液を調製した. その各10 µLをHPLCに付し, ピーク面積法により検量線を作成した.

結果及び考察

1. 3種甘味料の抽出及びクリーンアップ条件の検討

食品からの3種甘味料の抽出及び固相抽出カートリッジによるクリーンアップ条件を検討した.

Fig. 1に従いふりかけ10 gを秤り, 50 mLのメタノール - 0.1%アンモニア (40:60) 混液を用いてホモジナイズし, 同混液にて全量を100 mLとした後, 遠心分離を行い遠心上清を得た. 抽出には, GAの抽出効率を上げるためにアンモニア水及び遠心分離による不溶物の分離を容易にし, クリーンアップ用カートリッジへの目詰まりを防ぐためにメタノールを加えたメタノール - 0.1%アンモニア (40:60) 混液を使用した. 得られた遠心上清50 mLにGA, Stev及びReb. Aの各標準原液を各々100 µL添加し, 固相抽出によるクリーンアップ条件を検討した.

クリーンアップ用カラムはBond Elut C₁₈カートリッジを用いることとし, C₁₈カートリッジからの3種甘味料GA, Stev及びReb. Aの溶出条件を検討した. 遠心上清 (抽出液) は40%メタノールを含有することから, 3種の甘味料はC₁₈カートリッジに保持されにくいことが考えられるため,

水を加えてメタノール含有量を10%以下にすることで3種甘味料をカートリッジに保持させた. 更に, GAのC₁₈カートリッジへの保持力を強化するため, イオンペア剤のTBAを添加した後カートリッジへ負荷した. このカートリッジをメタノール - 水混液, アセトニトリル - 水混液, アセトン - 水混液等の種々の溶媒で洗浄し, クリーンアップ効果を検討した結果, アセトン - 水混液による洗浄がHPLC上の妨害物質の除去に最も有効であることが分かった. しかし, アセトン - 水混液による洗浄でGAの回収率が若干減少することが判明したため, 同混液にTBAを添加することとし, 同混液の混合比及びTBA濃度について更に詳細に検討した. その結果, カートリッジの洗浄に5 mM TBA含有25%アセトン/水溶液50 mLを用いることで最良のクリーンアップ効果及び回収率が得られることが分かった. なおアセトン濃度が30%以上ではGAの回収率は減少した. またカートリッジからの3種甘味料の溶出溶媒には, HPLCクロマトグラムのベースラインの乱れの少ないHPLC移動相と同じ組成のアセトニトリル - 0.1%リン酸 (80:20) 混液10 mLを用いたところ, 定量的に回収することができた.

2. HPLC分析条件及び検量線

3種甘味料をHPLCで同時分析するため, 使用するHPLCカラムについて検討した.

GAのHPLC分析ではC₁₈逆相カラムでの報告¹⁻³⁾が多いため, 種々のメーカーのC₁₈カラム並びにGAの分析に用いられている移動相を中心に検討したが, 3成分の十分な分離条件を見いだすことはできなかった.

次にStev及びReb. AのHPLC分析に使用されているNH₂カラムについて同様の検討を行ったところ, 移動相に80%アセトニトリル - 0.1%リン酸混液を用いることで3種甘

Table 1. Recoveries of GA, Stev and Reb. A from Various Foods Spiked at 10 or 50 µg/g

Samples	Spiked (µg/g)	Recovery (%) ¹⁾		
		GA	Stev	Reb. A
Noodles rainy season (Mentsuyu)	10	93.6 (1.5)	90.2 (4.6)	92.4 (4.1)
	50	95.3 (3.0)	97.2 (3.4)	100.2 (2.9)
Orange juice	10	104.6 (1.2)	93.9 (2.9)	93.1 (3.5)
	50	101.1 (2.3)	97.4 (1.4)	99.3 (3.0)
Strawberry jam	10	91.1 (2.0)	92.4 (3.5)	91.1 (2.6)
	50	94.0 (2.1)	101.5 (3.1)	93.5 (1.7)
Pork cutlet sauce (thick)	10	85.5 (1.7)	98.6 (2.5)	95.9 (3.9)
	50	95.9 (1.9)	104.6 (1.5)	101.1 (4.9)
Fish flour (Furikake)	10	82.7 (4.0)	80.5 (4.8)	84.2 (2.9)
	50	83.2 (1.5)	83.8 (4.9)	88.2 (2.7)
Food boiled down in soy sauce (Tsukudani)	10	97.8 (2.7)	96.7 (3.3)	91.0 (3.5)
	50	100.9 (1.5)	99.8 (4.3)	99.3 (4.0)

1) Average of 3 experiments: mean (CV %).

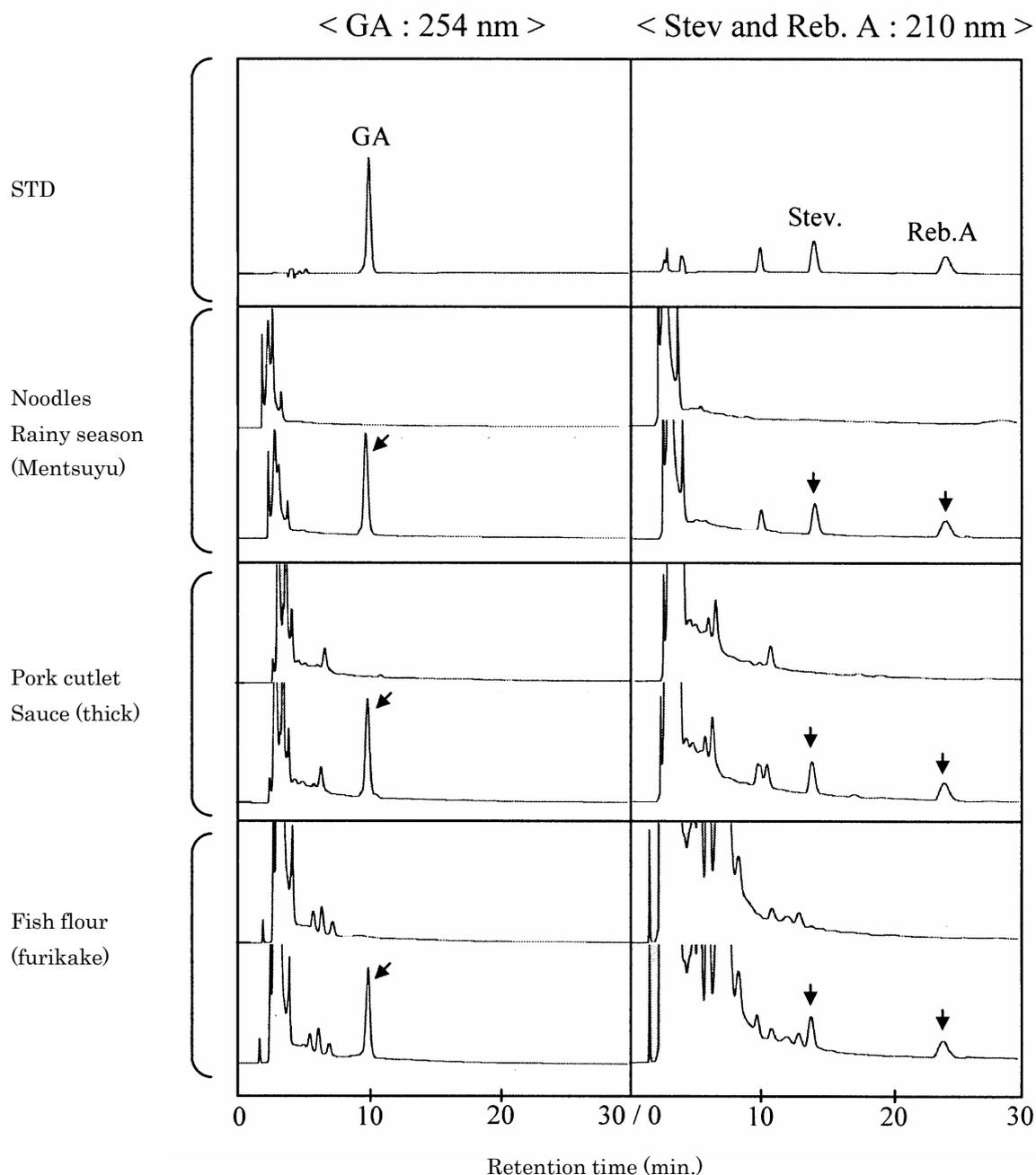


Fig.3. HPL Chromatograms of GA, Stev and Reb. A Spiked to the Food at the Level of 50µg/g
Upper profile : unspiked, lower profile : spiked, in each window.

味料の分離のよい良好なピークが得ることができた。しかしNH₂カラムはメーカーの違いにより、3種甘味料の保持時間は若干異なったが、今回著者らはカラムにMighty SIL-NH₂を、移動相にアセトニトリル - 0.1 %りん酸 (80:20)を用いて一昼夜コンディショニングした後に分析使用したところ、GA, Stev, Reb. Aは良好に分離することができた。(保持時間: GA, 9.9 min; Stev, 14.5 min; Reb. A, 23.1 min)。

3種甘味料の検出には紫外外部吸収検出器2台を直列に接続し、GAの検出には254 nm, Stev及びReb. Aの検出には210 nmに設定して分析した(フォトダイオードアレー検出器(PDA)を利用すれば更にデータ処理等の簡便化が可

能)。

以上の分析条件のもとでGA, Stev及びReb. Aの混合標準溶液を用いて検量線の直線性について検討したところ、3~100 µg/mLの範囲で良好な直線性を示した(GA: $r = 0.9998$, Stev: $r = 0.9999$, Reb. A: $r = 0.9999$) (Fig. 2)。

3. 添加回収実験

あらかじめGA, Stev及びReb. Aが検出されないことを確認しためんつゆ、とんかつソース、ふりかけなど市販食品を用いて添加回収試験を行った。試料10 gに対しGA, Stev及びReb. Aを各々10 µg/gあるいは50 µg/gになるように各標準原液を添加し、よく混和した。これを室温で30分以上放置した後、Fig. 1に従って操作して回収率を求めた。

Table 2. Analysis of GA, Stev and Reb. A in Commercial Foods Indicated with all of them

Samples	Content ($\mu\text{g/g}$)		
	GA	Stev	Reb. A
Food boiled down in soy sauce (Tsukudani)	47.7	44.7	16.7
Pickled radish (Tsubozuke)	100.2	62.0	26.4
Yellow pickled radish (Takuanzuke)	93.4	17.8	9.9
Yellow pickled radish (Takuanzuke)	118.1	95.9	42.8
Dressing (Japanese type)	18.6	6.0	5.1
Dressing (Japanese type)	25.2	6.6	6.1
Fish flour (Furikake)	14.9	ND	ND
Fish flour (Furikake)	5.1	ND	ND
Fish flour (Furikake)	19.9	5.4	5.9
Snack sea tangle (Sukonbu)	406.7	160.7	87.5
Smoked squid (Ika kunsei)	71.0	23.3	22.5
Pickled squid (Pickled in vinegar)	47.6	17.0	10.3
Picked squid (Ika shiokara)	44.6	11.8	4.2
Dried squid (Sakiika)	76.8	36.3	21.3
Dried squid (Sakiika)	46.9	94.3	45.2
Dried squid (Sakiika)	9.5	86.0	170.2

ND : not detected

回収率はTable 1に示したように、ふりかけで若干低い値を示したのもあったが、その他の食品ではGA 85.5 ~ 104.6 %, Stev 90.2 ~ 104.6 %, Reb. A 91.0 ~ 101.1 %と良好な結果が得られた。CV値は3回の分析でいずれも5 %以下であった。なお、いずれの試料の場合もHPLCクロマトグラム上にGA, Stev及びReb. Aの保持時間付近に妨害ピークは認められなかった。Fig. 3にめんつゆ、とんかつソース、ふりかけから得られたクロマトグラムを示した。

4. 市販食品の実態調査

甘草及びステビア抽出物の両添加表示がある市販食品16検体について調査を行い、その結果をTable 2に示した。分析した16検体中すべての食品からGAが検出された。ま

た、StevとReb. Aは16検体中ふりかけ2 検体を除く14検体から検出された。

昆布加工品1検体からはGAが406.7 $\mu\text{g/g}$, Stevが160.7 $\mu\text{g/g}$, Reb. Aが87.5 $\mu\text{g/g}$ と高濃度で検出された。たくあん漬3検体からはGAが93.4 ~ 118.1 $\mu\text{g/g}$, Stevが17.8 ~ 95.9 $\mu\text{g/g}$, Reb. Aが9.9 ~ 42.8 $\mu\text{g/g}$ が検出された。いか加工品(薫製, 酢漬, 塩辛, さきいか等)6 検体中1 検体からGAが9.5 $\mu\text{g/g}$, Stevが86.0 $\mu\text{g/g}$, Reb. Aが170.2 $\mu\text{g/g}$ とGAの使用量は非常に少なく、一方味質の良いとされるReb. Aが多量に検出された。他のいか加工品5検体ではGAが44.6 ~ 76.8 $\mu\text{g/g}$, Stevが11.8 ~ 94.3 $\mu\text{g/g}$, Reb. Aが4.2 ~ 45.2 $\mu\text{g/g}$ が検出された。和風ドレッシング2 検体ではGAが18.6,

25.2 µg/g, Stev及びReb. Aが6.0, 6.6 及び5.1, 6.1 µg/g 各々検出された。ふりかけ3検体の分析では、すべてからGAが5.1~19.9 µg/g検出された。一方, Stev 及びReb. Aは1検体で5.4 µg/g及び5.9 µg/g 各々検出されたが, 表示はあるにもかかわらず他の2検体からは全く検出されなかった。

以上, 今回我々が検査した市販食品16検体中ふりかけ2検体におけるステビア抽出物が検出されなかった他は, 全ての食品より表示通りの甘味料が検出された。

ま と め

固相抽出法およびHPLC法を用いた天然甘味料GA, Stev 及びReb. Aの簡易迅速同時分析法を検討した。食品中より3種甘味成分をメタノール-0.1%アンモニア溶液により抽出し, 水で希釈, イオンペア剤のTBAを添加後, C₁₈カートリッジへ負荷し, TBA含有25%アセトン/水溶液と水にてクリーンアップを行うことにより, より簡便で汎用性の高い分析法を確立することができた。食品への添加回収試験の結果, 回収率はGAが82~104%, Stev が80~104%, Reb. Aが84~101%, 3回の繰り返し実験でのCV値は5%以下と良好な結果が得られた。本法により, 甘草およびステビア両添加表示のある市販食品16検体を分析した結果, GAは, 表示食品16検体中すべてから検出され

た(5.1~406.7 µg/g)。一方, Stev及びReb. Aは, 16検体中ふりかけ2検体を除く14検体からStevが5.4~160.7 µg/g, Reb. Aが4.2~170.2 µg/g検出された。

本法は, その簡易性並びに迅速性を有する食品中のGA, Stev及びReb. Aの同時分析法として十分に適用できると思われる。なお本法による検出限度はGA, Stev, Reb. Aでいずれも0.0001 g/kgであった。

文 献

- 1) 済田清隆, 桐ヶ谷忠司, 菊池聡子, 他: 横浜衛研年報, **34**, 69-72, 1995.
- 2) 大石充男, 竹内正博, 大西和夫, 他: *Chromatography*, **115**, 141-146 (1994).
- 3) 藤沼賢司, 斉藤和夫, 中里光男, 他: 食衛誌, **29**, 210-215, 1988.
- 4) 小沢秀樹, 広門雅子, 嶋村保洋, 他: 東京衛研年報, **51**, 75-79 (2000).
- 5) Bovanova, L., Brandsteterova, E. and Baxa, S.: *Z. Lebensm. Unters Forsch A*, **207**, 352-355, 1998.
- 6) 松本幸一郎, 済田清隆, 桐ヶ谷忠司, 他: 横浜衛研年報, **35**, 71-73, 1996.
- 7) Fujinuma, K., Saito, K., Nakazato, M., *et al.*: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 799-802, 1986.