

GC 及び GC/MS による食品中のサイクラミン酸の分析

小林 千種^{*}, 中里 光男^{**}, 山嶋 裕季子^{*},
田口 信夫^{*}, 安田 和男^{**}, 荻野 周三^{*}

Determination of Cyclamate in Foods by GC and GC/MS

Chigusa KOBAYASHI^{*}, Mitsuo NAKAZATO^{**}, Yukiko YAMAJIMA^{*},
Nobuo TAGUCHI^{*}, Kazuo YASUDA^{**} and Shuzo OGINO^{*}

Keywords : サイクラミン酸 cyclamate, ガスクロマトグラフィーGC, ガスクロマトグラフ/質量分析法 GC/MS, 輸入食品 imported food

はじめに

サイクラミン酸(以下 CY と略す)は,過去にわが国で許可されていた合成甘味料であるが,1969年11月以降使用が禁止されている。しかし,EU 諸国,中国及び台湾等では現在もその使用が認められている¹⁾。

輸入食品からの CY の検出事例としては,東京都内だけでも1984年²⁾と1992年³⁾に台湾産の話梅^{ワウメ},1995年に台湾産の乾燥果実⁴⁾,2000年以降も中国産の醤油⁵⁾,干し甘梅⁶⁾での例がある。また,検疫所における食品添加物関連の違反事例の中でも CY は違反件数の多い検査項目であり,輸入食品の監視において現在でも重要な検査項目の一つとされている。

食品中の CY の分析法は,従来 CY をシクロヘキサノール亜硝酸エステルに変換して測定する GC による方法が衛生試験法で用いられてきたが,操作が極めて煩雑であった⁷⁾。そこで著者らは, CY を *N,N*-dichlorocyclohexylamine に変換し UV-HPLC 法で測定する簡便で高感度な分析法を作成した⁸⁾。後に,この分析法は2000年版衛生試験法に採用された⁹⁾。一方,1997年に行政検査の GLP 対応が義務づけられ,特に輸入食品中の指定外添加物の行政検査においてより高いレベルの信頼性が求められ,他の分析手段でも確認する必要性が生じた。

そこで,我々は HPLC による試験法で作製した試験溶液をそのまま用いて GC 及び GC/MS で CY を確認する方法を検討した。さらに1995年から2003年まで9年間の輸入食品中の CY 使用状況調査結果も併せて報告する。

実験方法

1. 試薬

1) 標準溶液:サイクラミン酸ナトリウム(シクロヘキシルアミドスルホン酸ナトリウム,特級,和光純薬工業製)113

mg を水に溶解して全量 100 mL としたものを標準原液(サイクラミン酸として 1,000 µg/mL)とし,これを段階的に希釈して標準溶液とした。

2) 透析内液用溶液:塩化ナトリウム 100 g を 0.01 mol/L 塩酸に溶解して 1,000 mL とした。

3) 透析外液用溶液:0.01 mol/L 塩酸

4) 透析膜:透析用セルロースチューブ(36/32,平面幅 43 mm,直径 27 mm,膜厚 0.0203 mm,Viskase sales 社製)

5) 次亜塩素酸ナトリウム溶液:次亜塩素酸ナトリウム溶液(化学用,有効塩素 5.0 %以上)を用時水で2倍希釈したものをを用いた。

6) その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. 装置

1) ガスクロマトグラフ:島津製作所製 GC-17A(FID 検出器付)

2) ガスクロマトグラフ質量分析計:島津製作所製 GC-17A に島津製作所製 QP-5000 を接続したもの

3) 高速液体クロマトグラフ:島津製作所製 LC-10A システム,UV 検出器:島津製作所製 SPD-10AV

3. GC 条件

カラム:DB-5MS(0.53 mm i.d. × 15 m,膜厚 1.5 µm, J&W Scientific 社製),キャリアーガス:He,カラム温度:80 (5 min) 10 /min 200 (5 min),注入口温度:150,検出器温度:230,流量:30 mL/min,検出器:FID,注入量:1 µL

4. GC/MS 条件

カラム:DB-5MS(0.25 mm i.d. × 30 m,膜厚 0.25 µm, J&W Scientific 社製),キャリアーガス:He(100 kPa)

* 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

* 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多摩支所理化学研究科

カラム温度：80 (5 min) 10 /min 200 (5 min),
 注入口温度：150 , 注入量：1 μ L (スプリットレス), イ
 ンターフェース温度：230 , 検出器電圧：1.5 V, イオン
 化法：EI

5. HPLC 条件

カラム: Cosmosil 5C18-AR (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 250 mm, ナカライテスク社製), 移動相: メタノール - 水 (8 : 2) 混液, 流速: 1.0 mL/min, 検出波長: 314 nm, カラム温度: 40 , 注入量: 10 μ L

6. 試験溶液の調製

細切した試料 20 g をとり, 約 20 mL の透析内液用溶液を加えて混和後, 少量の透析内液用溶液で透析膜に充填し, 上端を密封した. これをメスシリンダー中に入れ, 透析外液用溶液で全量を 200 mL とし, 時々揺り動かしながら常温で 24~48 時間透析した. 透析外液 10 mL を分液ロートにとり, 50% 硫酸 2 mL 及び *n*-ヘキサン 5.0 mL を加えた後, 次亜塩素酸ナトリウム溶液 1 mL を加え直ちに栓をして 1 分間振とうした. 水層を除去後, *n*-ヘキサン層に 5% 炭酸水素ナトリウム溶液 25 mL を加え, 1 分間振とうした. 水層を除去した後の *n*-ヘキサン層を HPLC, GC 及び GC/MS 用の試験溶液とした (図 1). 標準溶液は 10.0 mL とり, 透析外液と同様に反応操作を行ったものを標準用の試験溶液とした. なお, 透析外液中の CY 濃度が 500 μ g/mL を超えた場合は, それ以下になるように透析外液を水で希釈して反応操作を行った後に定量した.

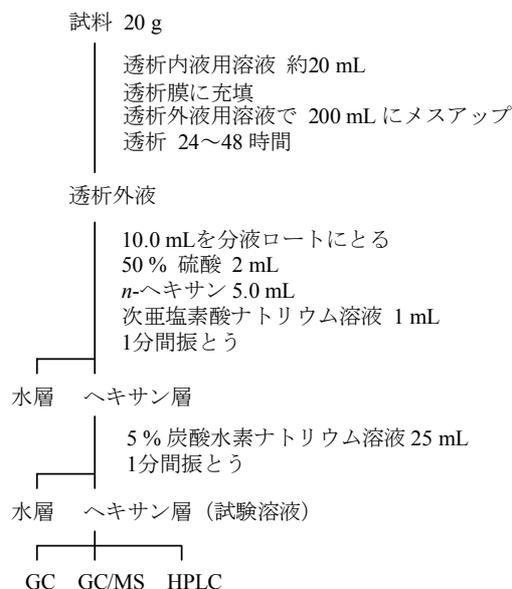


図 1. サイクラミン酸の分析法

7. 輸入食品中の含有量調査

1995~2003 年に東京都食品機動監視班及び特別区保健所が収去した輸入食品 596 件に加え, さらに自主的に購入

したものの 19 件を含め, 総計 615 件について CY の使用実態調査を実施した.

結果及び考察

1. GC

著者らはすでに強酸性条件下で CY に次亜塩素酸を反応させると強い UV 吸収を持つ *N,N*-dichlorocyclohexylamine に変換されることを利用し, UV 検出器付の HPLC で分析する方法を報告した⁸⁾. その際, 生成した *N,N*-dichlorocyclohexylamine は揮散しやすい性質を持っていることから, GC による分析に適し, さらに GC/MS による CY の確認が容易にできるのではないかと考えた. そこで, HPLC の試験溶液として作製したヘキサン溶液をそのまま GC に注入して定量する方法及び GC/MS による確認方法について検討した.

GC については, カラムに定量性の良いワイドポアの DB-5MS を用いて検討した. GC の昇温条件については, 80 で 5 分間保持した後毎分 10 で 200 まで昇温した場合, *N,N*-dichlorocyclohexylamine は約 6.5 分の位置にピークが出現し, 再現性も良好であった. 図 2 に標準品及び試料の試験溶液を本条件で分析したときのクロマトグラムを示した. 試料抽出物のクロマトグラム上において, *N,N*-dichlorocyclohexylamine のピーク付近に特に妨害となるようなピークは認められなかった. また, 1~500 μ g/mL に調製した CY 標準溶液各 10.0 mL を本法に従って反応させて作成した検量線は原点を通る直線を示した (図 3). ソース, 醤油, しば漬, ゼリー, ジュース, たくあん

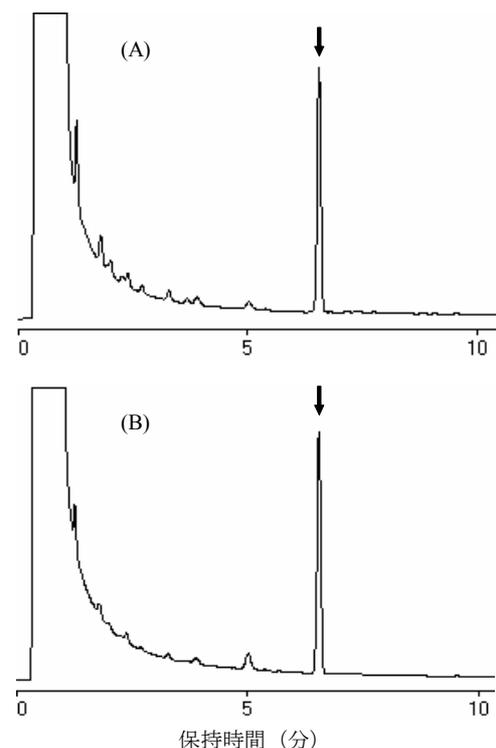


図 2. 標準品(A)及びサイクラミン酸を含有する話梅(B)のガスクロマトグラム

漬, ジャム, ビスケットの 8 種類の各食品に CY を 200 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し, 本法に従って分析したときの回収率は 93.6 ~ 98.7 % であり, 回収率及び再現性とも良好な結果が得られた (表 1). また, CY を含有する乾燥果実 9 検体について GC 及び HPLC の両法で分析したところ, ほぼ同様の測定結果が得られ, 相関係数は 0.999 であった (図 4). 定量限界は試料中濃度として 10 $\mu\text{g/g}$ で, HPLC とほぼ同様であった. 以上のことから, CY は GC でも簡便に精度良く分析できることが認められた.

表 1. GC法における添加回収試験結果

食品	回収率 (%)
ソース	98.7 \pm 0.5
醤油	96.4 \pm 0.7
しば漬	95.3 \pm 2.4
ゼリー	97.8 \pm 1.6
ジュース	98.4 \pm 0.5
たくあん漬	97.6 \pm 1.6
ジャム	93.6 \pm 4.4
ビスケット	96.6 \pm 2.7

添加量: 200 $\mu\text{g/g}$
N=3, 平均値 \pm SD

2. GC/MS

GC/MS についてはカラムをキャピラリータイプ (0.25 mm i.d. \times 30 m) の DB-5MS とし, 昇温条件等は GC のものをそのまま用いて検討した. 図 5 に標準品及び CY を含有する試料の試験溶液を分析して得られたトータルイオンクロマトグラムとマススペクトルを示した. 標準溶液のマススペクトルから 強度は小さいが *N,N*-dichlorocyclohexylamine の分子量に相当する *M/Z* 167 の分子イオンピークが検出された. また, cyclohexylamine を壊裂させたときに生ずるフラグメントイオン (*m/z* 41, 55, 69, 83, 97) が検出された. 一方, CY を含有する試料の試験溶液のマススペクトルのパターンは標準品とよく一致し, CY の確認手段として有用なことが認められた. 検出限界は 2 ng であった.

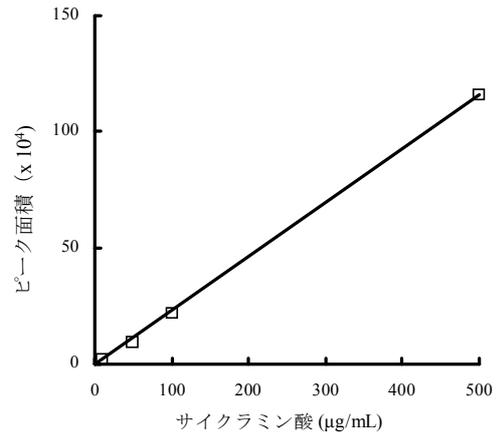


図 3. GC法によるサイクラミン酸の検量線

3. 輸入食品中の含有量調査

1995 ~ 2003 年に東京都内で収去された輸入食品 596 検体について HPLC 法により CY の分析を行った (表 2). その結果, 1995 ~ 1996 年に乾燥果実である話梅 (原産国: 中国, 台湾, 不明) 及び台湾産橄欖 (カンラン) の 6 検体から CY を 1.0 ~ 43 g/kg を検出し, 特にこの 2 年の検出例が多かった.

そこで, 1997 年に中国・台湾人向けの食品専門店で購入乾燥果実を購入してさらに調査を行ったところ, 話梅, 橄欖, アズ, 烏梅, 陳皮の 9 検体から 0.02 ~ 27 g/kg の CY が検出された (表 3). CY を検出したすべての検体について, GC でクロスチェックを行い, さらに GC/MS で CY

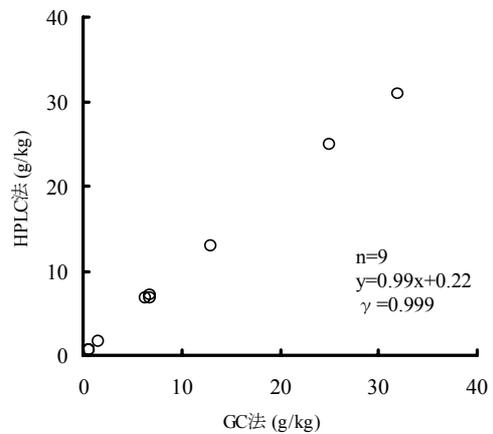


図 4. サイクラミン酸を含有する乾燥果実試料の分析値におけるGC法とHPLC法との相関

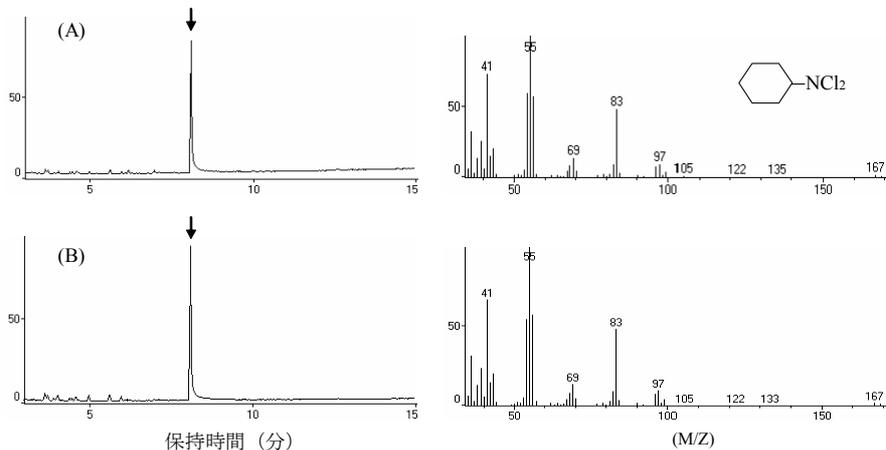


図 5. 標準品(A)およびサイクラミン酸を含有する話梅(B)のトータルイオンクロマトグラムおよびマススペクトル

表2. 輸入食品中のサイクラミン酸の検出量
(収去検査: 1995~2003年)

品名	検体数	原産国数	検出数	検出量*
菓子	119	20	0	
調味料	132	18	2	0.08, 0.85
果実加工品	58	12	0	
酒類	19	9	0	
清涼飲料	67	16	0	
乾燥果実	58	8	6	1.0~43
野菜加工品	57	10	0	
漬物	33	7	0	
ジャム	22	7	0	
その他	31	11	2	1.4, 2.1
(合計)	(596)	(39)	(10)	

* 単位 (g/kg)

表3. 輸入乾燥果実中のサイクラミン酸の検出量
(1995年~1997年)

品名	原産国	検体数	検出数	検出量*
(収去検査)				
レーズン	アメリカ	9	0	
ブルーベリー	アメリカ, フランス	7	0	
イチヂク	アメリカ	1	0	
パパイヤ	タイ	1	0	
バナナ	台湾	1	0	
キンカン	台湾	2	0	
アンズ	オーストラリア, 南アフリカ, トルコ	5	0	
橄欖	台湾	2	2	1.0, 5.5
話梅	中国, 台湾	2	2	11, 43
話梅	不明	2	2	5.0, 10
(合計)		(32)	(6)	
(購入)				
話梅	中国, 台湾	3	2	0.02, 27
烏梅	不明	1	1	5.1
乾燥梅	日本	2	0	
橄欖	中国, 台湾	3	3	2.1~14
アンズ	中国, 台湾	2	2	0.74, 6.9
キンカン	中国	2	0	
陳皮	中国	1	1	15
ブルーベリー	不明	1	0	
生薑	不明	1	0	
スターフルーツ	不明	1	0	
マンゴー	不明	1	0	
杞子	中国	1	0	
(合計)		(19)	(9)	

* 単位 (g/kg)

であることを確認した。CY を検出した検体の原産国は中国、台湾でいずれも CY の使用を許可している国であった。また、これらの検体のほとんどは日本語の原材料等の表示が無いものであった。

さらに 2003 年までで行政検査結果をまとめたところ、調味料 (中国産と台湾産醤油) 2 検体、その他 (中国産すいかの種加工品) 2 検体から CY を検出した (表 2)。

また、2001 年から 2002 年にかけて中国・台湾産乾燥梅から CY を検出する例が報告された¹⁰⁾。現在、約 50 ヶ国が

CY の使用を許可しており、これらの国々からわが国に多くの食品が輸入されていることから、今後も CY を使用した食品が発見される可能性は高いと思われる。特に中国・台湾産乾燥果実については継続的な調査が必要と考える。

まとめ

1. HPLC による方法と同一の試験溶液を用いて GC 及び GC/MS による分析方法を確立することにより、HPLC 以外のクロスマスク及び確認手段を確立することができた。
2. GC による定量法は HPLC とほぼ同様の定量精度を示し、相関性もよく、検出限界も試料あたり 10 µg/g であり HPLC と同程度であった。
3. GC/MS によって得られたマススペクトルのパターンにより試料中の CY の確認を行うことができた。
4. 1995 年から 2003 年に実施した CY についての調査の結果、輸入乾燥果実等から CY が検出された。

(本研究の一部は平成 9 年度第 34 回全国衛生化学技術協議会年会で発表した。また、本研究は厚生科学研究補助金、輸入農産物の分析・試験法に関する研究の「指定外添加物の分析法の検討」の一環として行った。)

文献

- 1) 世界の食品添加物 (改訂版) 別冊フードケミカル-6, 1994, 食品化学新聞社, 東京。
- 2) 田村行弘, 二島太一郎: 東京衛研年報, **40**, 141-148, 1989。
- 3) 東京都食品環境指導センター編: 94 食品衛生キャンペーン・くらしの衛生特集号・食品衛生データブック, 12, 1994。
- 4) 穴吹公子, 串田昭文, 鎌田郁, 他: 杉並衛試年報, **14**, 53-56, 1996。
- 5) 東京都食品環境指導センター編: くらしの衛生特集号・食品衛生データブック 2000, 26, 2001。
- 6) 東京都食品指導センター編: くらしの衛生特集号・食品衛生データブック 2002, 26, 2003。
- 7) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 1990, 491-493, 1990, 金原出版, 東京。
- 8) 中里光男, 斉藤和夫, 石川ふさ子, 他: 食衛誌, **34**, 248-253, 1993。
- 9) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 2000, 323-326, 2000, 金原出版, 東京。
- 10) 萩野賀世, 松本ひろ子, 坂巻成恵, 他: 東京衛研年報, **53**, 73-77, 2002。