

電気伝導度検出器付き HPLC による食品中サイクラミン酸の直接分析と 7 種甘味料の系統的分析

松本 ひろ子*, 萩野 賀世*, 坂牧 成恵*,
粕谷 陽子*, 永山 敏廣*

Determination of Cyclamate in Foods by HPLC with Electric Conductivity Detector without Derivatization and Systematically Analysis of 7 Sweeteners

Hiroko MATSUMOTO*, Kayo HAGINO*, Narue SAKAMAKI*,
Yoko KASUYA* and Toshihiro NAGAYAMA*

Keywords : サイクラミン酸 cyclamate, 電気伝導度検出器 electro conductivity detector, 高速液体クロマトグラフィ
ー HPLC, 非誘導体化 non-derivatization, 甘味料 sweetener, 系統的分析 systematically analysis

はじめに

サイクラミン酸 (以下CYと略す) は, 我が国では1969年11月以降, 安全性の観点から使用が禁止されている¹⁾. しかし, 中国, 台湾, EU諸国等において甘味料として使用が認められている²⁾. このため輸入食品からCYが検出され, 食品衛生法不適格となる事例が例年起きている.

我々は, 各種甘味料について, 前処理を透析法に統合して系統化し, 省力化した分析法を報告している³⁾. この際にCYは, 中里ら⁴⁾が報告したN,N-dichlorocyclohexylamine に変換し, 紫外外部吸収検出器 (以下UVと略す) 付きHPLCで測定する方法を用いている. 平成15年にはこの方法の原理が, 厚生労働省のCYの分析法として採用され通知された (以下通知法と略す)⁵⁾. CYは紫外外部吸収や蛍光を持たないためにHPLCで測定するためにはこのような誘導体化が必要となる. しかし, この分析法は高感度ではあるが, 強酸性下で塩素と反応させるため操作には十分な注意が必要である. その他にCYをシクロヘキサノール亜硝酸エステルに変換してGCで測定するGC法⁶⁾や, 蛍光試薬などを用いて誘導体化するHPLC法^{7, 8)}などがあるが, 通知法と同様にCYを直接分析するものではなく, 操作も煩雑である.

一方, 立花ら⁹⁾は, 電気伝導度検出器 (以下CDと略す) を使ってCYを直接分析する方法を報告している. この分析法は, CYを透析法により抽出し, CD付きHPLC (以下CD-HPLCと略す) で分析するものである. 前処理が透析法であり, 誘導体化などの煩雑な操作がないことから, 系統化, 省力化した甘味料の分析法の一つとして適当であると考へ, この方法を多様な加工食品に適用するための検討を行った. また, 指定甘味料であるサッカリン (SA), アセスルファムカリウム (AK), スクラロース (SUC), アスパルテーム (APM) と, 指定外甘味料であるCY, ズルチン

(DU), アリテーム (AL) 計7種の甘味料について, 既報³⁾の前処理を透析法に統合した系統的分析法の一部を改良したので報告する.

実験方法

1. 試薬及び試液

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) 112 mg を水に溶解して全量100 mL としたものを標準原液 (CY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 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 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 社製)

5) その他の試薬は市販特級品を用いた.

2. HPLC 装置

1) ポンプ, オープン, オートサンプラー, UV 検出器 日本分光(株)製ガリバー900型シリーズ

2) CD 東亜電波工業 (株) 製 ICA-5220

3. HPLC 条件

カラム: Cosmosil 5NH₂ (4.6 mm i.d. × 150 mm, ナカライテスク (株) 製), 移動相: メタノール-1%リン酸 (4 : 6) 混液, カラム温度: 40°C, 流速: 1.0 mL/min, 注入量: 50 µL, CD: セル温度 45°C, GAIN ×1

4. 試験溶液の調製

液状試料はそのまま20 gを, 固形試料は細切した試料20 g

* 東京都健康安全研究センター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 Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

をとり、約20 mLの透析内液を加えて混和後、少量の透析内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内に入れ、透析外液で全量を200 mLとし、時々揺り動かしながら常温で24 時間透析した。透析外液20 mLを分液ロートにとり、塩酸1 mL及び塩化ナトリウム10 gを加え、酢酸エチル50 mLずつで各5 分間振とうし、3 回抽出を行った。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過した後、減圧下で乾固した。残留物に50%メタノール2 mLを加えて溶解し、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、HPLC用試験溶液とした。

5. 定量

CY標準溶液及び試験溶液の各50 μL をHPLCに注入し、あらかじめ作成した2.5~100 $\mu\text{g/mL}$ のCY標準溶液の検量線から試験溶液中のCY濃度を求めた。

結果及び考察

1. HPLC 条件

1) **カラム及び移動相** 立花ら⁹⁾にならい、カラムにはSA, AKの分析に用いるシリカゲルにアミノプロピル基が化学結合したシリカゲルNH₂カラムを用いた。移動相については、従来³⁾よりSA, AKの分析に用いており、立花ら⁹⁾も用いた1%リン酸-メタノール混液(6:4)と、AKの通知検査法¹⁰⁾で用いる1%リン酸-アセトニトリル混液(4:6)の2液について検討した。SA, AK検出用のUV検出器では、2液とも使用可能であったが、CY検出用のCD検出器ではメタノール混液の方がCYを感度良く測定できた。そこで、移動相には1%リン酸-メタノール混液(6:4)を用いることとした。

2) **検出器** CYはCD検出器を用いることで、誘導体化することなく、標準溶液で2.5 $\mu\text{g/mL}$ まで測定することができた。また、UV検出器を直列に接続し、カラム、移動相を変えることなくSA, AKを測定することができた。CD及びUV検出器の直列接続によるCY, SA, AK標準溶液のクロマトグラムを図1に示した。

2. 精製

甘味料分析の省力化のために前処理を統一したことから、CYの試料からの抽出には透析法を用いることとした。CD検出器によるCYの検出限界は2.5 $\mu\text{g/mL}$ であり、透析外液を直接HPLCに注入した場合の定量限界は試料中濃度として0.025 g/kgとなる。通知法の定量限界である0.005 g/kgまで検出するためには少なくとも透析外液を5倍濃縮する必要があった。そこで、透析外液の濃縮を兼ねた精製方法について検討を行った。

1) **固相抽出カートリッジによる濃縮及び精製** CYはスルホン基を持つ強酸性物質である。そこで、陰イオン交換カートリッジに大量に保持させ、溶出液を少量とする濃縮と精製を試みた。酸性物質を陰イオン交換カートリッジに保持させるためには、透析外液のpHを中性付近に調整し、

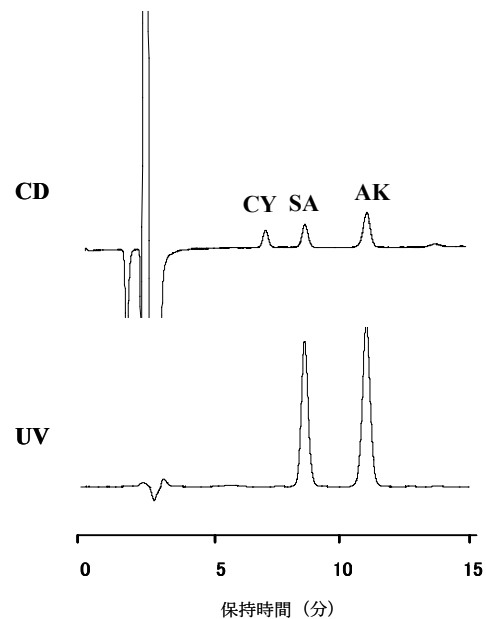


図1. CD及びUV検出器によるCY, SA, AKの混合標準溶液のHPLCクロマトグラム
各20 $\mu\text{g/mL}$ (注入量50 μL)

CYを解離状態にする必要がある。また、透析外液には透析内液由来の塩化ナトリウムが少なくとも2.5%存在する。そこで、中里ら⁴⁾のpH調整法を参考に2.5%塩化ナトリウム含有0.05 mol/Lリン酸緩衝液(pH 6.0)をpH調整済み透析外液と想定して、50 $\mu\text{g/mL}$ 濃度のCY溶液を調製し、その10 mLずつをカートリッジに負荷することとした。試みた陰イオン交換カートリッジは、強陰イオン交換のBond Elut SAX、弱陰イオン交換のSep-Pak NH₂、ポリマーベースのOasis MAX及びOasis WAXである。これらカートリッジの容量から、溶出には通常5~10 mLの溶出液が必要であり、透析外液を少なくとも5倍濃縮するためには、透析外液を25~50 mL負荷する必要があった。しかし、いずれのカートリッジも10~20 mLの負荷でCYが漏出した。これは、透析外液中の塩化ナトリウムがイオン交換固相へのCYの保持を妨げているためであり、この塩化ナトリウムを除去しない限り、イオン交換モードによる精製は不可能であった。通知法で用いるC18とSAXの連結カートリッジでも20 mLで漏出した。透析法の場合、良好な回収率を得るためには、透析内液には10%塩化ナトリウムが必要である¹¹⁾。また、食品由来の塩化ナトリウムが加算されることを考慮すると、透析外液の塩化ナトリウム濃度は2.5%以上となることは確実であり、塩素イオン除去用のカートリッジでも除去は難しい。そこで、透析外液の濃縮と精製に固相抽出カートリッジを利用することは困難であると判断した。

2) **溶媒抽出法による濃縮及び精製** 透析外液からの溶媒抽出法については、立花ら⁹⁾も検討し、塩化ナトリウム飽和、塩酸性下で酢酸エチルによる溶媒抽出を行っている。しかし、透析外液100 mLに対し酢酸エチル70 mLによる1回目の抽出ではCYは47%しか回収されないことを報告して

いる。そこで、CY2,000 µgを含むジュースの透析外液20 mLに対して、抽出溶媒である酢酸エチル量を20~80 mLまで変化させた場合の第1回目のCYの抽出率を求めた。図 2に示したように、第1回目の抽出率が良好なのは、酢酸エチル量50~60 mLの場合で、約70%を1回で抽出することができた。酢酸エチル50 mLによる3回の抽出率の各合計は、2回目で84%、3回目で92%と良好な結果が得られた。そこで、透析外液の濃縮と精製には溶媒抽出法を用い、透析外液20 mLに対し酢酸エチル50 mLで3回抽出することとした。なお、スクリーニング試験の場合は、2回の抽出でも十分と思われる。

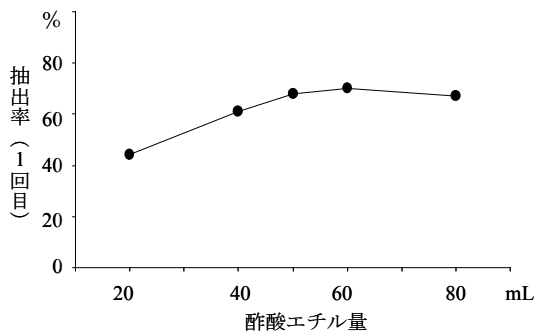


図 2. 抽出溶媒 (酢酸エチル) 量と抽出率との関係

3. 検量線

検量線は、CYの2.5~100 µg/mLの範囲で直線性 (r=0.9999) が得られた (図 3)。定量限界は試料中濃度として 0.0025 g/kgであった。

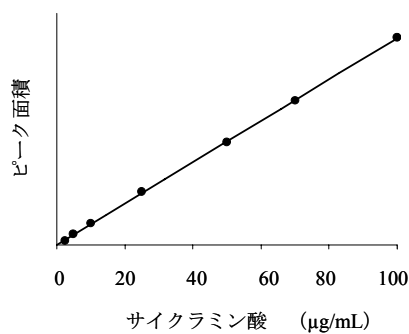


図 3. CD-HPLCによるサイクラミン酸の検量線

4. 添加回収試験

干黒梅、ジュース、ゼリー、ジャム、酢こんぶ、ウスターソース、しば漬け、しょうが酢漬けの8種類の食品にサイクラミン酸を0.2 g/kgとなるように添加し、本法に従い回収試験を行った。表 1に示したように、平均回収率は90.1%と良好な結果が得られた。図 4にCYを添加した酢こんぶの透析外液、溶媒抽出後のHPLC用試験溶液及び標準溶液のHPLCクロマトグラムを示した。酢酸エチルを用いた溶媒抽出による濃縮と精製により、良好な感度と妨害物質による影響の少ないクロマトグラムを得るとともに、HPLCの

分析時間を短縮することができた。以上から、本法は種々の食品に適用できるものと思われる。

表 1. CD-HPLCによる添加回収試験結果

食品	回収率 % (mean ± SD)
干黒梅	90.1 ± 0.6
ジュース	89.7 ± 3.2
ゼリー	89.0 ± 1.4
ジャム	92.9 ± 3.4
酢こんぶ	90.8 ± 2.9
ウスターソース	85.0 ± 3.2
しば漬け	92.3 ± 3.8
しょうが酢漬け	91.1 ± 1.9

添加量 0.2 g/kg (n=3)

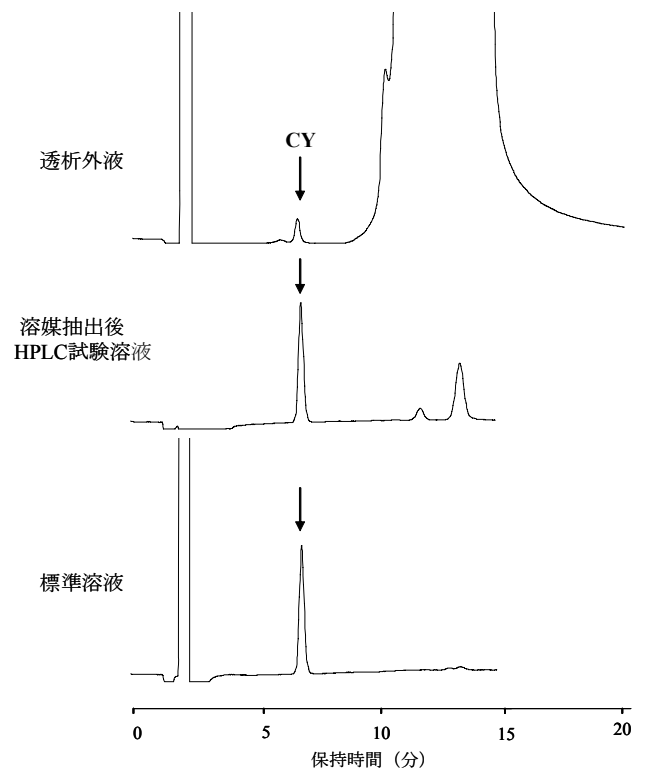


図 4. CYを添加した試料の透析外液、溶媒抽出後のHPLC試験溶液及び標準溶液のHPLCクロマトグラム

試料: 酢こんぶ (0.2 g/kg 添加), 標準溶液: 100 µg/mL

5. 7種甘味料のHPLCによる系統的分析

図 5に作成したCD-HPLCによるCYの分析法と既報³⁾で報告した前処理を透析法に統合した7種甘味料のHPLCによる系統的分析法の概要を示した。7種の甘味料は、透析外液をCY, DU, APM+AL, SA+AK, SUCの5系統に分けて各試験溶液を調製し、HPLCにより分析することとした。CYの分析法は今回作成したCD-HPLC法とした。試料20 gを本法により透析した時に得られる透析外液はおよそ100~150 mLであり、5系統に分けても十分な量が確保できた。

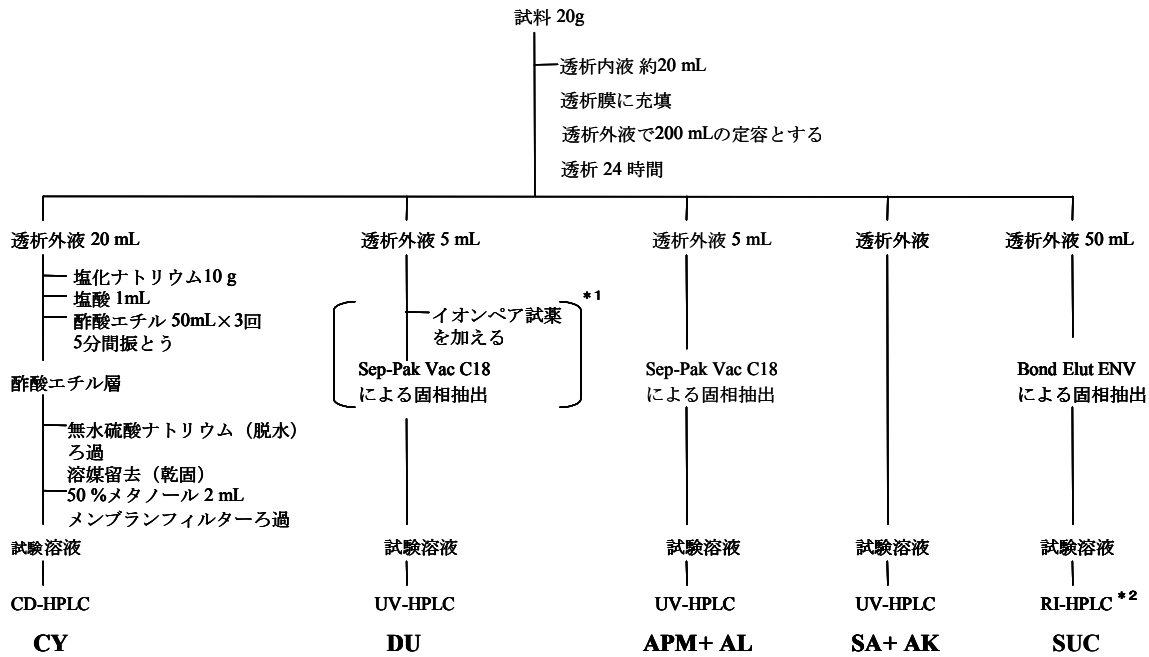


図5. CD-HPLCによるサイクラミン酸の分析法及び7種甘味料のHPLCによる系統的分析の概要

*1: 試料により省略可, *2: 示差屈折計付き HPLC

(DU, APM, AL, SA, AK, SUCの分析法は既報³⁾による)

1回の透析操作で7種の甘味料を一括抽出し、CYを誘導体化することなく直接分析することが可能となったことから、7種甘味料分析の大幅な省力化を図ることができた。

まとめ

電気伝導度検出器付きHPLCを用いてCYを誘導体化することなく、直接分析する方法を実際の加工食品に適用するための検討を行った。また、CYの分析法の変更により既報のCYを含む7種甘味料の系統的分析法³⁾について再考した。

1. 試料からのCYの抽出にはこれまでの透析法を用いた。
2. 透析外液の濃縮を兼ねた精製には、透析外液20 mLに対し酢酸エチル50 mL×3回の溶媒抽出法を用いることとした。溶媒抽出による濃縮と精製により、良好な感度と妨害物質による影響の少ないクロマトグラムを得るとともに、HPLCの分析時間を短縮することができた。
3. 8種の食品にCYを添加した際の平均回収率は、90.1%であった。
4. 本法によるCYの検出限界は試料中濃度として0.0025 g/kgであり、通知法以上の感度を得ることができた。
5. 7種甘味料について、透析法により一括抽出し、透析外液をCY, DU, APM+AL, SA+AK, SUCの5系統に分けて各試験溶液を調製し、HPLCにより分析することとした。
6. CYを誘導体化することなく直接分析することが可能となったことから、7種甘味料分析の大幅な省力化を図ることができた。

文献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針、食品添加物編、580-585, 2003, 日本食品衛生協会, 東京。
- 2) 世界の食品添加物概説, 2004, 日本食品添加物協会, 東京。
- 3) 萩野賀世, 松本ひろ子, 坂牧成恵, 他：東京衛研年報, 53, 73-77, 2002。
- 4) 中里光男, 斉藤和夫, 石川ふさ子, 他：食衛誌, 34, 248-253, 1993。
- 5) 厚生労働省医薬局食品安全部監視安全課長通知“サイクラミン酸に係わる試験法について”平成15年8月29日食安監発第0829009号(2003)。
- 6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解1990, 491-493, 1990, 金原出版, 東京。
- 7) Hauck, M. and Köbler, H.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **191**, 322-324, 1990。
- 8) Rüter, J. and Raczek, D. I. U.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **194**, 520-523, 1992。
- 9) 立花光雄, 青山光雄, 谷口力夫, 他：杉並衛試年報, 13, 70-73, 1995。
- 10) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長通知“食品中のアセスルファミウムカリウム分析法について”平成13年12月28日食基発第58号(2001)。
- 11) 守安貴子, 中里光男, 斉藤和夫, 他：食衛誌, 37, 91-96, 1996。