東京都で開発した食品中のグリチルリチン酸分析法の試験検査導入に向けた性能評価

中村　理奈[a]，高木　優子[a]，石井　悦子[a]，羽石　奈穂子[a]，大塚　健治[a]，神田　真軌[a]
（外部機関査読者：熊坂　謙一[b]）

甘味料であるグリチルリチン酸について，当センターで開発した分析法の妥当性確認を行った．5食品を対象とし，定量限界（0.01 g/kg）において，分析者2名，2併行，3日間の添加回収試験を実施した．試験溶液は機器及び測定条件を組み合わせた3パターンで測定し，性能を比較した．その結果，選択性，真度（71–104%），併行精度（3–9%）及び室内精度（4–13%）はすべてガイドラインの目標値を満たした．本研究は限定された条件下での検討ではあるが，測定機器や高速液体クロマトグラフィー条件を変更した場合でも，定量限界，選択性，真度及び必要に応じて併行精度を評価することにより，他の性能項目の信頼性も確保できる可能性が示唆された．さらに，液体クロマトグラフ質量分析による確認分析法を構築した．本検討から，本法はグリチルリチン酸の日常検査法として有用であることを示した．

キーワード：甘味料，食品添加物，グリチルリチン酸，妥当性確認，HPLC-PDA，LC-MS

は　じ　め　に

既存添加物であるカンゾウ抽出物は甘味料としてしょう油，漬け物，調味料，菓子等の食品に広範に使用されており[1]，その主成分はグリチルリチン酸（GA）である．食品中のGA検査法として厚生労働省通知「食品中の食品添加物分析法」（通知法）[2] 等が示されており，指定添加物であるグリチルリチン酸二ナトリウムとカンゾウ抽出物中のGAを合わせ，高速液体クロマトグラフィー-フォトダイオードアレイ検出法（HPLC-PDA）を用いて定量する．

当センターではGA検査に通知法を用いているが，揮発性が高く刺激臭を有するアンモニア水を使用することによる作業安全性の問題や，一部の食品において低回収率となる等の課題がある[3–5]．これは測定値の過小評価や再現性の低下につながり，行政検査における違反判定に影響を及ぼす可能性がある．そのため，当センターではこれらの課題を解決する検査法（トリス法）を開発した[5]．本法を用いることにより，米菓，スナック菓子，粉末食品等においても良好な回収率が得られる．

一方，令和6年3月には，食品分析法の国際整合性の確保を目的として，「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」[6]（ガイドライン）が発出され，食品衛生法に規定される使用基準への適合を判定するための分析法について妥当性確認が求められるようになった．また，行政検査において違反が疑われる検体では，結果の信頼性を高めるための確認手段が必要である．そのため，定量分析に加え，液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）を用いた確認分析法の整備も重要である．

以上を踏まえ，本研究では，当センターで開発したトリス法の行政検査への導入を目的として，通知法とトリス法で定量値に差が認められた5食品を対象にガイドラインに基づく妥当性確認試験を実施した．また，同一試験溶液を複数の測定機器及び測定条件で分析し，測定条件の違いが妥当性評価に及ぼす影響を検証した．

さらに，違反判定時の確認検査を想定し，LC-MSを用いた確認分析法を構築した．

実　験　方　法

1. 試料

市販のせんべい，ポテトチップス，食物繊維粉末，ボイルいか及び燻製鴨肉を用いた．いずれもGAが含まれていないことを確認して用いた．

2. 標準品・試薬等

1) 標準品

富士フイルム和光純薬（株）製の局方生薬試験用を用いた．

2) 標準溶液

(1) 標準原液　GA標準品20.0 mgを量り，80%メタノールに溶解して正確に20 mLとした（1,000 µg/mL）．

(2) 検量線用標準溶液　GA標準原液を80%メタノールで段階的に希釈した（濃度0.5–10 µg/mL）．

(3) 添加用標準溶液　GA標準原液を80%メタノールで希釈し正確に200 µg/mLとした．

3) その他の試薬及び試液

メタノール及びアセトニトリル：富士フイルム和光純薬（株）製，HPLC用

[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
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
[b] 神奈川県衛生研究所

ギ酸：富士フイルム和光純薬（株）製，LC–MS用

その他の試薬：試薬特級品を用いた．

トリス緩衝液（0.5 mol/Lトリス緩衝液（pH 9））：2–アミノ–2–ヒドロキシメチル–1,3–プロパンジオール（トリス塩基，関東化学（株）製，特級）109.4 g及びTrizma塩酸塩（トリス塩酸塩，Sigma-Aldrich社製，BioPerformance Certified）15.2 gを水に溶解し2 Lとした．

3. 器具及び装置

遠心チューブ：ポリプロピレン製，100 mLレーザーマーカー目盛付（AGCテクノグラス（株）製）

複層メンブレンフィルター：GD/Xシリンジフィルター PVDF 0.45 µm，直径25 mm（Whatman社製）

HPLC測定用メンブレンフィルター：Millex-LCR，PTFE 直径13 mm，孔径0.45 µm（Merck Millipore社製）

LC-MS測定用メンブレンフィルター：Millex-LG，PTFE 直径13 mm，孔径0.20 µm（Merck Millipore社製）

固相抽出カラム（C18カラム）：Bond Elut C18 Straight cartridge 500 mg 6 mL（Agilent Technologies社製）

マニホールド：Waters社製

HPLC：Prominence-i LC2030C 3D（（株）島津製作所製）及び1260 Infinity II（アジレントテクノロジー（株）製）

LC-MS：LCシステムはACQUITY UPLC H-Class（Waters社製），質量分析装置はACQUITY QDa（Waters社製）

4. 試験溶液の調製

既報[5]に準じて調製した．試料5.00 gを遠心チューブに量り，メタノール35 mL及びトリス緩衝液を加えて混和した後，トリス緩衝液を用いて100 mLとした．せんべい及びポテトチップスについては，メタノールによる試料の塊化を防止するため，先にトリス緩衝液を30 mL加えて混合し，試料を流動状にしてからメタノールを加えた．振とう（300 rpm，10分間）後，遠心分離（3,000 ×*g*，10分間）を行った．遠心分離後の上清を複層メンブレンフィルターでろ過し，これを抽出液とした．メタノール及び1%ギ酸各5 mLでC18カラムをコンディショニングし，コックを閉じて滴下を止めてから，カラムに1%ギ酸2 mLを注入した．その液層上に抽出液20 mLを加えてコックを開放し，カラムに負荷した．洗浄は，1%ギ酸10 mL，10%ギ酸含有30%メタノール10 mL，水10 mLの順で行った．80%メタノールで溶出し，10 mLに定容して溶出液を得た．溶出液を0.45 µmメンブレンフィルターでろ過してHPLC試験溶液とし，0.2 µmメンブレンフィルターでろ過してLC-MS試験溶液とした．試験溶液は測定まで，遮光し10°C以下で冷蔵して保管した．

5. 測定条件

1) HPLC-PDA条件

HPLC-PDA条件をTable 1に示す．

2) LC-MS条件

分析カラム：ACQUITY UPLC CSH Phenyl–Hexyl（2.1 mm i.d.×100 mm，粒子径1.7 µm，Waters社製），移動相：0.1%ギ酸含有60%メタノール，流速：0.3 mL/min，カラム温度：40°C，注入量：1 µL，イオン化モード：ESI(-)，キャピラリー電圧：0.8 kV，コーン電圧：20 V，プローブ温度：600°C，モニターイオン（SIM）：*m/z* =821.0

6. 性能評価

せんべい，ポテトチップス，食物繊維粉末，ボイルいか及び燻製鴨肉を対象に添加回収試験を実施し，HPLC-PDAを用いて測定した．本試験はグリチルリチン酸二ナトリウムの使用対象食品以外の食品に対して実施したため，添加濃度はガイドラインに従い，トリス法の定量限界相当である0.01 g/kgとした．試料5.00 gに添加用標準溶液250 µLを添加し，30分静置した後，操作を開始した．分析者2名，2併行，3日間の枝分かれ実験を行った．各定量値から真度を，一元配置分散分析により併行精度及び室内精度を算出した．選択性はブランク試料から得られたクロマトグラムにより評価した．目標値はガイドラインに従い，真度70–120%，併行精度10%未満，室内精度15%未満とした．

Table 1. Analytical patterns used for validation of the Tris method for GA

Analytical pattern	**A**	**B**	**C**
HPLC system	Prominence-i LC-2030 3D	1260 Infinity II	Prominence-i LC-2030 3D
Analytical conditions	①		②
Column	CAPCELL PAC C18 MGIII (5 µm, 2.0 mm i.d. x 150 mm, OSAKA SODA CO., LTD.)		Cosmosil 5C18-AR-II (5 µm, 4.6 mm i.d. x 250 mm, Nacalai Tesque, Inc.)
Column temperature	40°C		40°C
Mobile phase	Acetonitrile/Methanol/2%Acetic Acid solution (35:15:50)		(7:3:11)
Flow rate	0.25 mL/min		1.0 mL/min
Injection volume	5 µL		10 µL
Detection wavelength	254 nm (PDA)		254 nm (PDA)

7. 分析パターン間の性能評価結果の比較

HPLC2機種3台と2種の測定条件を組み合わせ，Table 1に示す3パターンで，6.に記載した性能評価を実施し，得られた結果を比較した．

結果及び考察

1. HPLC-PDA条件の検討

既報[5]はGA，ステビオシド及びレバウジオシドAの同時分析を目的としており，1サイクルに30分を要した．本研究ではGAのみを対象としたため，HPLC-PDA条件を検討し，分析時間の短縮を図った．HPLC-PDA条件①，②のカラムを用いて通知法に示された移動相で測定したところ，トリス法の試験溶液ではGAピークの近傍に試料由来の夾雑ピークが認められ，選択性は確保できないと判断した．

そのため，移動相の溶媒の混合比率を検討した．条件①ではGAの保持時間は7.5 min，②では13.5 minであり，いずれもピーク形状は良好であった．GAピークの近傍に夾雑ピークは認められず，選択性は十分であることを確認した．一例として，ポテトチップスのクロマトグラムをFig. 1に示す．条件①を用いるパターンA及びBでは15 min，条件②を用いるパターンCは20 minで1サイクルの分析が可能となった．

2. LC-MS条件の検討

LC-MS条件は甘味料の一斉分析法等[2,7]をもとに検討した．MS条件については，ESI(-)における*m/z* 821.0（$[M-H]^-$に相当）をモニターイオンとした．コーン電圧は最も高い信号強度が得られた20 Vとした．LC条件については，移動相のメタノール濃度を検討し，1サイクル15 minで分析可能な0.1%ギ酸含有60%メタノールを選択した．注入量は同システムに接続されたPDA検出器による定量を視野に入れ，最初に2 μLを試みた．5食品にGAをHPLC-PDA測定の定量限界相当濃度で添加し試験溶液を調製した．その結果，GAピークの*S/N*は10未満であり，この測定では定量は困難と判断した．そこで，MS測定は定性確認法として位置づけ，ピークのテーリング及び機器の汚染を抑制するため，注入量を1 μLとした．

この条件では，5食品のブランク試験溶液においてGAピーク近傍に夾雑ピークは認められなかった．

また，ブランク試験溶液にGAを定量限界相当（1 μg/mL）となるよう添加し，標準溶液のピークと比較した．その結果，保持時間及びSIMによる*m/z*が一致し，ピーク面積値も同等であったことから，マトリックスによる保持時間のずれやイオン化抑制に起因する見逃しへの影響がないことを確認した．

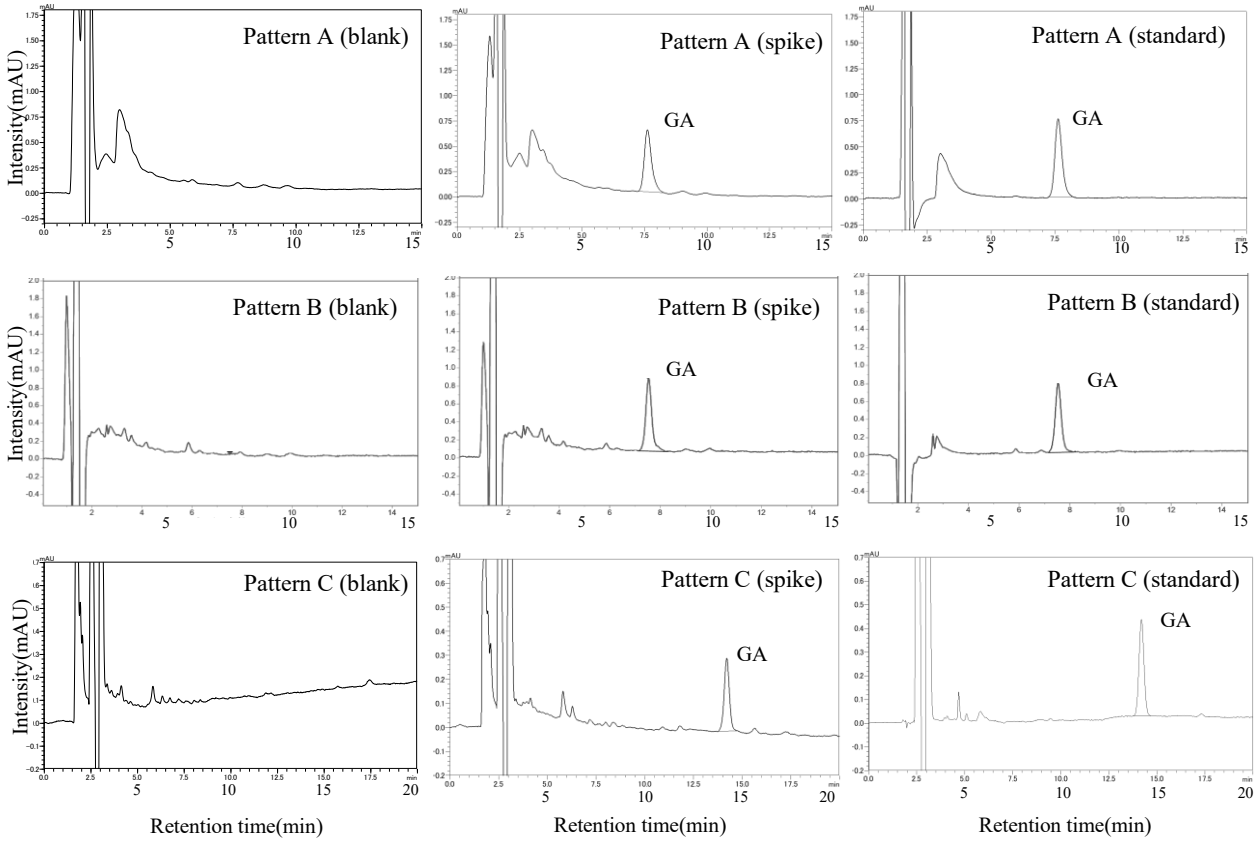


Fig. 1. HPLC-PDA chromatograms of blank potato chips, GA-spiked potato chips, and a GA standard solution obtained using three analytical patterns.
blank：blank potato chips
spiked：potato chips spiked with GA at 0.01 g/kg
standard：GA standard solution (1 μg/mL)

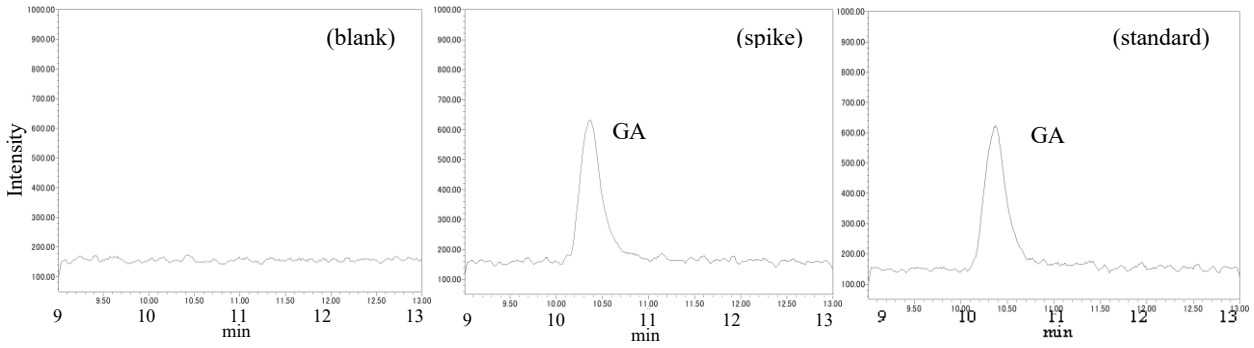


Fig. 2. LC-MS SIM chromatograms of blank potato chips, GA-spiked potato chips, and a GA standard solution obtained using three analytical patterns.
blank：blank potato chips
spiked：potato chips spiked with GA at 0.01 g/kg
standard：GA standard solution (1 μg/mL)

Table 2. Validation results for GA in foods at 0.01 g/kg using three analytical patterns

Analytical pattern	**A**			**B**			**C**		
	Trueness (%)	RSDr[a] (%)	RSD_{WR}[b] (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSD_{WR} (%)	Trueness (%)	RSDr (%)	RSD_{WR} (%)
Rice cracker	72	9	9	76	8	13	71	6	6
Potato chips	85	3	4	82	7	12	83	3	4
Powdered dietary fiber	91	6	9	93	5	7	91	7	10
Boiled squid	89	4	4	89	4	5	88	4	4
Smoked duck	99	9	11	104	6	6	96	6	6

a RSDr of repeatability
b RSD_{WR} of within laboratory reproducibility

さらに，HPLC-PDA測定における定量限界相当となるよう5食品にGAを添加して調製した試験溶液では，GAピークの*S/N*は10以上であった．一例として，ポテトチップスのクロマトグラムをFig. 2に示す．

3. 性能評価における標準溶液の添加量の検討

ガイドラインには「試験物質を溶解した溶液の添加量は可能な限り少量にとどめる」と記載されており，当初はGA標準溶液（1,000 μg/mL）50 μLを添加する方法を試みた．しかし，使用したポテトチップスや食物繊維粉末では，添加液が試料の一部に局在して吸水され塊化したため，試料中に均一に分散させることは困難であった．また，このような状態の試料では，ポテトチップスにおいて回収率が68–108%，CVが22%となるなど，低回収率やばらつきが認められた．これは，塊化した試料では，前処理工程でGAが十分に抽出されなかったためと考えられた．そこで，ガイドラインの規定に従い，添加液量が試料量の10分の1以下となる範囲内で液量を増やし，GA標準溶液（200 μg/mL）250 μLを添加することとした．その結果，塊化は抑制され，5食品すべてで回収率のばらつきは9%以内であったことから，妥当性確認にはこの添加法を用いた．

4. 本法の性能評価

1) HPLC-PDA測定における検量線及び定量限界

0.5，1，2，5及び10 μg/mLで絶対検量線を作成した．HPLC-PDA条件①，②を機器と組み合わせた3分析パターンいずれにおいても，決定係数0.999以上の良好な直線性が得られた．

定量限界は，5食品にGAを0.01 g/kgとなるように添加して調製した試験溶液において，3分析パターンいずれも*S/N*が10以上であったことから，既報[5]のトリス法及び当センターで運用しているGA通知法と同じく0.01 g/kgとした．

2) 選択性

使用した5食品のブランク試料では，GA保持時間付近における信号強度は添加試料で得られたGAピークの信号強度の1/10未満であり，選択性に問題は認められなかった．

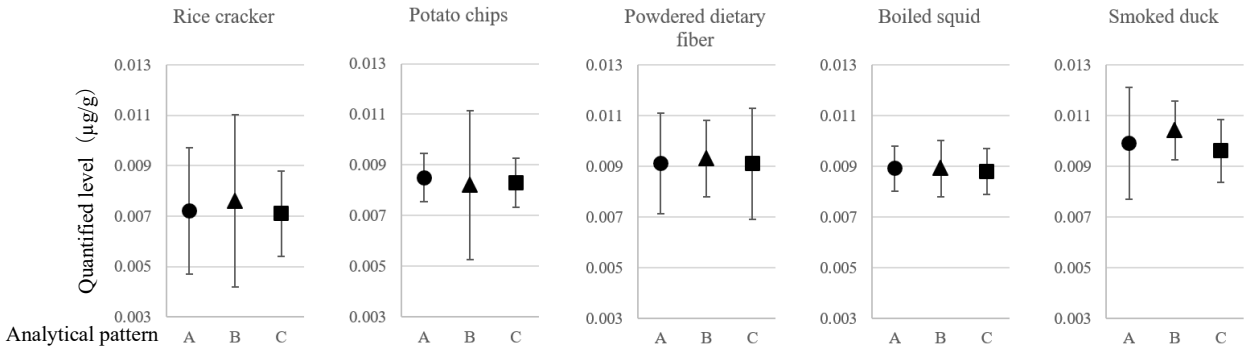


Fig. 3. Quantitative values and expanded uncertainty under different analytical conditions
Error bars：the expanded uncertainty (k = 2),
calculated from within-laboratory reproducibility based on the mean values obtained in the validation study

3) 真度及び精度

添加回収試験の結果をTable 2に示す．真度71–104%，併行精度3–9%，室内精度4–13%であり，3分析パターンのいずれにおいても，すべての項目でガイドラインの目標値に適合した．

5. 分析パターン間の性能評価結果の比較

分析パターンAとBではHPLC条件を同一とし，異なる機種2台を用いて機種変更時の影響を比較した．一方，パターンAとCでは同型の機種を用い，HPLC条件を変更した場合の影響を比較した．比較結果をTable 2に示す．

その結果，測定機器又はHPLC条件を変更しても，いずれの食品においても選択性及びピーク形状に差は認められず，定量限界相当濃度でS/N10以上が確保されていた．真度には顕著な差は認められなかった一方で，併行精度及び室内精度については，せんべいやポテトチップスのパターンBなど，ほかのパターンに比べてやや高くなる傾向がみられるものがあった．これは，固相精製後に残存した夾雑成分が，明瞭な夾雑ピークとしては認められないものの，ベースラインに影響を及ぼしたためと考えられた．

また，包含係数 k=2を用いて絶対拡張不確かさを算出した．Fig. 3に示すように，各分析パターンの拡張不確かさの範囲は互いに重なっており，どの分析パターンを用いても，定量値はその重なりの中に存在した．

ガイドラインでは，妥当性確認された分析法の一部を変更する場合について「測定条件を変更しピーク形状の変化が生じる場合は選択性及び真度を評価し，併行精度が変わる可能性が想定される場合は併行精度を評価する」とされている．本研究は，5食品マトリクス及び3分析パターンの範囲で実施した検討であり，他の食品マトリクスや装置系における適用性については今後の検証を要する．しかし，本結果から，測定機器又はHPLC条件を変更した場合でも，定量限界，選択性，真度及び必要に応じて併行精度を評価することにより，分析法の性能を適切に確認できる可能性を示した．

ま　と　め

東京都では，加工食品中のGA検査に国から示された通知法を用いてきた．しかし，一部の食品で低回収率となる等の課題があり，今回，この課題を改善したトリス法による前処理を用いた妥当性確認を実施した．HPLC-PDA測定では，複数のHPLCと測定条件を組み合わせた3パターンで性能評価を行った．いずれもガイドラインの目標値を満たし，複数の測定条件での定量法を整備できた．加えて，LC-MSを用いた確認検査法を構築した．

以上より，本法は通知法で低回収率となる食品の検査に適用可能であることが確認できた．また，HPLC-PDA測定でGAを検出した場合には，別条件による定量及びLC-MS測定による定性確認が可能な体制を整えた．

文　　献

1）谷村顕雄：よくわかる暮らしのなかの食品添加物，191，2008，株式会社光生館，東京．
2) 厚生労働省医薬・生活衛生局基準審査課長，厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長：薬生食基発0624第1号，食安監発0624第1号，「食品中の食品添加物分析法」の改正について，令和3年6月24日．
3）小沢秀樹，広門雅子，田口信夫，他：東京健安セ研年報，**54**, 93–98, 2003.
4）羽石奈穂子，林　真輝，牛山慶子，他：東京健安セ研年報，**76**, 151–156, 2025.
5) 髙橋　夏生，石井　悦子，坂牧　成恵，他：東京健安研セ年報，**75**, 193–199, 2024.
6）厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長，厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長：健生食基発0308第1号，健生食監発0308第1号，「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」の作成及び「第2版 食品中の食品添加物分析法」の改正について，令和6年3月8日．
7）山本純代，田原正一，石井悦子，他：日本食品化学学会誌, **27**, 111–117, 2020.

利益相反（COI）利益相反はない．

Validation of an Analytical Method for Glycyrrhizic Acid in Foods Developed by the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health for Implementation in Routine Testing

Rina NAKAMURA[a], Yuko TAKAGI[a], Etsuko ISHII[a], Nahoko HANEISHI[a], Kenji OTSUKA[a], and Maki KANDA[a]
(Reviewed by Kenichi KUMASAKA[b])

We validate an analytical method developed by the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health for analyzing glycyrrhizic acid, a sweetener, through recovery tests in five food matrices (rice crackers, potato chips, powdered dietary fiber, boiled squid, and smoked duck) at the limit of quantification (0.01 g/kg). For validation, two analysts conducted duplicate analyses over three consecutive days. The trueness (71%–104%), repeatability (3%–9%), and within-laboratory reproducibility (4%–13%) parameters met the criteria specified in the validation guidelines. Although the limited scope (five food matrices and three analytical patterns) must be extended to other food matrices and analytical systems for applicability assessment, the results suggest that the performance of our method may be appropriately verified through the limit of quantification, selectivity, trueness, and (if necessary) repeatability when the analytical instruments or chromatographic conditions are changed. In addition, a confirmatory analytical method based on liquid chromatography–mass spectrometry was established. These findings indicate that the proposed method is useful for routine analysis of glycyrrhizic acid.

Keywords: sweetener, food additive, glycyrrhizic acid, validation, HPLC–PDA, liquid chromatography–mass spectrometry

[a] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan
[b] Kanagawa Prefectural Institute of Public Health