

## アンモニア水を使用しない食品中のグリチルリチン酸およびステビア甘味料一斉分析法

高橋 夏生<sup>a</sup>, 石井 悦子<sup>a</sup>, 坂牧 成恵<sup>b</sup>, 小林 千種<sup>a</sup>, 大塚 健治<sup>a</sup>

クリーンアナリシスに配慮した効率的かつ回収率の向上を図ることを目的とし、アンモニア水を使用しないグリチルリチン酸 (GA, カンゾウ抽出物を含む) およびステビア甘味料 (ステビオシド (SS), レバウジオシドA (RS)) 一斉前処理法ならびにLC-PDAによる同時測定条件について検討した。その結果、トリス緩衝液・メタノール混液を用いた直接抽出および固相抽出による効率的な前処理法とLC-PDAによる良好な同時測定条件を確立した。トリス緩衝液は、トリス塩基とトリス塩酸塩を使用することで、塩酸によるpH調整を不要とした。また、ODSカラムで移動相にギ酸およびアセトニトリルを用いたLC-PDAによるグラジエント測定条件を構築した。これにより、1分あたり30分以内で両甘味料の良好な同時測定が可能となった。12種類の食品について添加回収試験を行った結果、SS, RSは90%以上、GAは70%以上と良好な回収率であった。また、SS, RSは既存法と同等性が確認された。一方、GAでは食品により厚生労働省通知「食品中の食品添加物分析法」(通知法)の検査法による定量値と比較し差があった。これは、本法と通知法における抽出溶液の組成の違いおよび試料量と抽出溶液量の比率の違いに起因していた。米菓、スナック菓子およびポテトチップスにおいては、抽出溶液に水を多く含む本法の方が、通知法より2.1-16.0倍高い添加回収率が得られ、日常検査に有用だと考えられる。

**キーワード:** 食品添加物, 甘味料, グリチルリチン酸, カンゾウ抽出物, ステビア甘味料, ステビオシド, レバウジオシドA, アンモニア水, トリス緩衝液, LC-PDA

### はじめに

グリチルリチン酸 (GA, カンゾウ抽出物を含む) およびステビア甘味料 (ステビオシド (SS), レバウジオシドA (RS)) は食品添加物の甘味料であり、その構造はともに植物由来の配糖体である。両甘味料の特徴として、シヨ糖と比較すると甘味の発現が少し遅く後に引くため、塩味を和らげる作用がある。この効果は両甘味料の併用により相乗的に増強され、優れた甘味質が得られる。特にしょう油との相性が良く、漬物やたれなど、両甘味料を併用添加しているものが数多く流通している<sup>1-6)</sup>。

両甘味料が食品に併用されるケースが多いことから、食品検査において一斉分析可能となれば効率的である。一方、これまでに報告された一斉分析法は前処理に数日の時間を要するもの<sup>1,2)</sup>やLC-MS法<sup>7)</sup>のみである。さらに、厚生労働省通知「食品中の食品添加物分析法」(通知法)<sup>8)</sup>などのGAの検査法<sup>3,4,6,9)</sup>はアンモニア水を前処理に使用する。アンモニア水は毒物および劇物取締法上の医薬用外劇物(劇物)および労働安全衛生法上の特定化学物質(特化物)であり、粘膜障害や皮膚障害等の毒性に加え、揮発性が高く強い刺激臭を有する試薬である。検査者の労働安全衛生を考慮した検査法への改善が必要と考えた。

今回、アンモニア水を使用しない効率的かつ回収率向上を図った一斉前処理法および汎用性の高い分析機器であるLC-PDAによる同時測定条件について検討し、良好な結果を得たので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

国内で流通する魚介加工品, 食肉加工品, しょう油, たれ類, 菓子類, 漬物等で、甘草およびステビアの表示無しのもの18検体, 両甘味料の表示有りのもの18検体, 計36検体を用いた

#### 2. 試薬, 装置等

GA: 富士フィルム和光純薬(株)製, HPLC用

SSおよびRS: 富士フィルム和光純薬(株)製, 食品分析用

メタノールおよびアセトニトリル: 富士フィルム和光純薬(株)製, HPLC用

ギ酸: 富士フィルム和光純薬(株)製, 試薬特級

その他の試薬: 試薬特級品を用いた。

混合標準溶液: GA, SSおよびRS各50 mgを精密に量り、50%メタノールに溶解し全量50 mLとした(この混合標準液1 mLは、GA, SSおよびRSを各1 mg含む)。

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および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。

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, 25 mm (Whatman社製)

<sup>a</sup> 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

<sup>b</sup> 当時: 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

固相抽出カートリッジ：Bond Elut C18 Straight cartridge  
500 mg 6 mL (Agilent Technologies社製)

メンブレンフィルター：Millex-LCR, PTFE 直径13 mm  
孔径0.45  $\mu\text{m}$  (Merck社製)

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

振とう機：分液漏斗振とう機, ストロングシェーカー  
SR-2DW (TAITEC (株) 製)

遠心分離機：高速冷却遠心機 Model 6000, スイングロ  
ータS-2504 (久保田商事 (株) 製)

PDA付き一体型高速液体クロマトグラフ：Prominence-i  
LC-2030C 3D (株) 島津製作所製)

### 3. 試験溶液の調製

液体試料はそのまま、固形試料は細切後にフードプロセ  
ッサーで均質化した。試料5 gを遠心チューブに秤量し、  
メタノール35 mLおよびトリス緩衝液を加えて混和後、ト  
リス緩衝液を用いて100 mLとした。振とう (300 rpm, 10  
分間) 後、遠心分離 (4,000  $\times g$ , 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。メタノールおよび1%ギ酸各5 mLで固  
相抽出カートリッジをコンディショニングし、コックを閉  
じてから固相上に1%ギ酸2 mLをのせた。そこに、抽出液  
20 mLを加えてコックを開放し、固相に負荷した。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、全量10  
mLの溶出液を得た。溶出液を0.45  $\mu\text{m}$ メンブレンフィルタ  
ーでろ過し、試験溶液とした。

### 4. LC-PDA測定条件

カラム：Imtakt (株) 製 Unison UK-C18 (4.6 mm  $\times$  250  
mm, 3  $\mu\text{m}$ )、移動相：(A液) 0.01%ギ酸・(B液) アセ  
トニトリル、流速：1.0 mL/min, グラジエント条件 (B  
液)：30% (0–14 min)  $\rightarrow$  30% (14 min)  $\rightarrow$  75% (24 min)  
 $\rightarrow$  30% (24.1–30 min)、検出波長：210 nm (SS, RS)  $\cdot$   
254 nm (GA)、注入量：20  $\mu\text{L}$ 、カラム温度：40°C

### 5. 検量線

混合標準溶液を50%メタノールで希釈し、1, 5, 10, 20  
 $\mu\text{g/mL}$ の検量線用標準溶液を調製した。この溶液をHPLC  
に注入し、ピーク面積による絶対検量線法を用いて検量線  
を作成した。

### 6. 添加回収試験

甘草およびステビアの表示が無い食品12種類について、  
GA, SSおよびRSの各濃度が0.02 または0.10 g/kgとなるよ  
うに混合標準溶液を添加し混和後、室温下で30分間放置し  
たものを試料とした。試行回数5回で添加回収試験を行っ  
た。

## 結果及び考察

### 1. アンモニア水を使用しない前処理の検討

通知法によると、GA分析法<sup>8)</sup>は1%アンモニア水・メタ  
ノール混液によるホモジナイズ抽出、「食品衛生検査指  
針」のSS・RS分析法<sup>10)</sup>では、水を用いたホモジナイズ抽  
出を行う。また、両甘味料のアンモニア水を使用しない抽  
出法として、トリス緩衝液 (0.02 mol/L, pH 9.0) 等を使  
用した透析法<sup>1)</sup>の報告があるが、透析に24時間を要する。  
また、時間の経過とともにGAが再吸着されることで回収  
率が低下したと考察する報告もある<sup>2)</sup>。さらに、GAはカル  
ボキシル基を有するトリテルペン配糖体の酸性物質、  
SS, RSはジテルペン配糖体の中性物質であることから、  
これらの甘味料の同時抽出を塩基性条件下とすることで両  
立可能と示唆された。そこで今回、時間短縮かつ簡便性向  
上のため、トリス緩衝液を用いた直接抽出を採用した。

トリス緩衝液は、トリス塩基を水に溶解後、塩酸を用い  
てpH調整を行う必要がある。しかし、塩酸は劇物および  
特化物であり、検査者への危害軽減ならびに試薬調製作業  
の簡素化を図るために使用を避けたいと考えた。そこで、  
pH調整が不要なトリス塩基とトリス塩酸塩を用いること  
とし、各試薬を秤量後、水に溶解するのみで塩酸を使用せ  
ずに作製した。このトリス緩衝液を抽出溶液とし、両甘味  
料の併用が想定される食品について抽出条件の検討を行っ  
た。

#### 1) 抽出条件の検討

両甘味料の併用頻度の高いしょう油および漬物につい  
て、トリス緩衝液を抽出溶液に用いて添加回収試験を行っ  
た。あらかじめGA, SS, RSを各0.10 g/kgとなるように添  
加した試料5 gをトリス緩衝液で100 mLに定容し、手振り  
20回、振とう機 (300 rpm) で10分間、30分間、1時間と振  
とう条件を変更し回収率を比較した。その結果、しょう油  
は手振り20回の振とうで95%以上の回収率が得られ、漬物  
は手振り20回では回収率約60%であったが、振とう機を用  
いて10分以上振とうすると90%以上の回収率が得られた  
(Fig. 1)。ホモジナイズや透析を行わなくても、振とう  
操作のみで十分に抽出可能であった。

本抽出条件が種々の食品に適用可能か検討したところ、  
高タンパク質・高脂質食品 (食肉加工品や魚介加工品等)  
ならびに水を含むと膨張する食品 (米菓やスナック菓子  
等) ではいずれの甘味料も抽出率が低下した。特にGAは  
米菓やスナック菓子における回収率が40%程度で顕著に低  
かった。これらは抽出溶液がトリス緩衝液のみの水系であ  
るため、試料への浸透、分散が不十分であったこと、GA  
はタンパク質などへの吸着を起し、抽出溶液中に十分に  
移行しなかったと考えられた<sup>1,2,9,11)</sup>。そこで、抽出に有機  
溶媒を加えて改善を試みることにし、メタノール、エタノ  
ールを用いて検討を行った。その結果、抽出溶液中エタノ  
ール20%およびメタノール30%以上で概ね良好な抽出であ  
ったが、エタノール20%およびメタノール40%以上では  
C18 (500 mg) の固相への保持が不十分であったため、

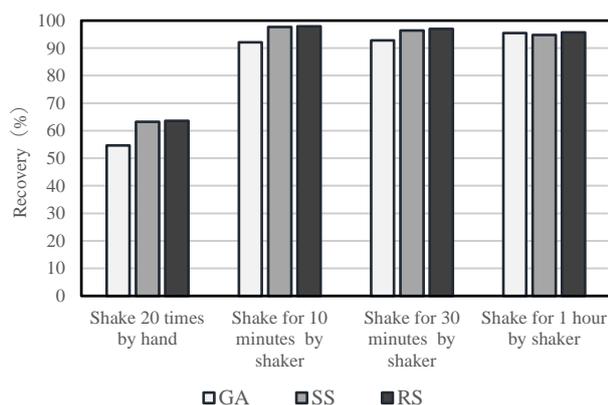


Fig. 1. Change of the addition recovery by the difference in shaking condition in the pickles

抽出溶液中のメタノール濃度を35%とした。また、水を含むと膨張する食品などは先にトリス緩衝液を30 mL程度加え混合し、固まりが無く流動性のある状態にしてからメタノールを加えることで、メタノールによる試料の塊化を防止でき回収率が向上した。

多くの食品で抽出液の懸濁や試料の浮遊がみられたため、 $4,000\times g$ 、10分間の遠心分離を行ったところ、上清と残渣がよく分離されたが、濁りが残る場合があったため、一律に複層構造のメンブレンフィルターを使用して上清のろ過を行うこととした。

## 2) 固相抽出法による精製の検討

直接抽出法では、食品由来の夾雑成分が同時に抽出されるため、固相抽出カートリッジによる精製を検討した。固相は汎用性と操作性を考慮し、逆相系のC18を用いることとした。GAは抽出液中において陰イオンの状態であり、SS, RSより保持が弱く有機溶媒を含有する洗浄液を用いた時に夾雑成分とともに漏出した。そこで、GAの漏出防止のためにギ酸を加えて検討を行った。

コンディショニングではメタノールに続いて、GAの固相への保持力向上のために1%ギ酸を用いた。また、抽出液負荷前の固相上にあらかじめ1%ギ酸を2 mLおくことで負荷時の固相内pH変化を穏やかにして保持力を高めた。この時、ギ酸添加量が不足すると漏出がみられた。一方、過剰の場合は溶液中のpHが酸性に傾き沈殿物を生じると報告されている<sup>11)</sup>。1%ギ酸と抽出液を混和した溶液は、pH試験紙でpH8程度を示し、沈殿物は認められなかった。負荷後に、1%ギ酸10 mLを用いて洗浄を行いGAの保持に加えて水溶性物質を除去した。

次いで、夾雑物質の除去を目的とした洗浄液としてギ酸・メタノール混液の各濃度を検討した結果、10%ギ酸含有30%メタノールを用いることとした。ギ酸の添加はメタノールによるGA漏出の防止に加え、夾雑成分を除去しクロマトグラフ上のSS, RSピーク付近の妨害ピークが消失した。

溶出溶液を通液する前に、ギ酸が試験溶液に残存しないように水で洗浄を行った。溶出溶液には80%メタノールを

採用し、液量は10 mLで両甘味料ともに全量回収できた。なお、抽出溶液の負荷量は検出下限値0.01 g/kgが担保できる容量として20 mL負荷することとした。

## 2. LC-PDAによる同時測定条件の検討

SS, RSは210 nm, GAは254 nmにそれぞれUV吸収を持つため、LC-PDAを用いて同時測定することとした。ODSカラムのうち、SSとRSの分離が良好である粒径3  $\mu\text{m}$ のUnison UK-C18カラムを選択した<sup>12)</sup>。また、SS, RSは逆相系カラムでアセトニトリル・水系移動相で同時測定可能であるため<sup>13)</sup>、酸性物質であるGAを保持するために移動相に酢酸ならびにギ酸を添加して検討した。

GA通知法<sup>8)</sup>のLC条件では、移動相全量あたり酢酸を約1%用いてGAを保持させている。酢酸濃度1%の移動相を使用してGA, SS, RSを一斉分析したとき、測定波長210 nmにおいてベースラインの上昇およびノイズの増大によりSS, RSの測定が困難であった。ギ酸濃度が0.05%以上では、210 nmの測定においてギ酸の吸収が強くベースラインのノイズが増大し、0.005%未満ではGAピーク形状が崩れた。そこで、混合標準溶液(1  $\mu\text{g/mL}$ )ピークのS/N比が10以上かつGAピーク形状を維持できる濃度である0.01%を採用した。0.01%ギ酸、アセトニトリルを用いるグラジエント溶出により、1分析あたり30分以内で両甘味料の良好な同時測定が可能となった(Fig. 2)。実験方法の項に示した本法の定量下限値は0.01 g/kgであった。

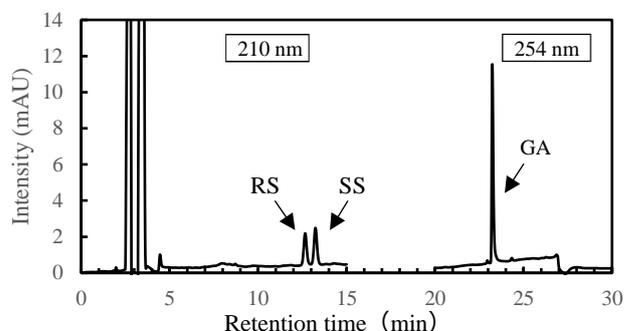


Fig. 2. LC-PDA chromatograms of GA, SS and RS standard at the level of 0.05 g/kg

## 3. 添加回収試験

添加回収試験の結果をTable 1-1, Table 1-2に示した。

SSの回収率は、添加量0.02 g/kgで91.9–105.1%, 0.10 g/kgでは97.7–104.8%であった。RSの場合は、添加量0.02 g/kgで92.3–105.2%, 0.10 g/kgでは98.1–105.0%であった。また、GAでは添加量0.02 g/kgで78.3–103.5%, 0.10 g/kgでは73.9–99.9%という回収率が得られた。SS, RSについては12種類の食品いずれにおいても90%以上の値となり、また、GAでは高タンパク質・高脂質ならびに水を含むと膨張する食品においても70%以上の回収率が得られ、種々の食品への適用が可能であることが示された。

Table 1-1. Recoveries of GA, SS and RS spiked in foods

Sample	Recovery (%)		
	GA	SS	RS
Tsukudani (kombu)	96.4 (2.1)	102.9 (4.9)	103.0 (2.5)
Teriyaki sauce	101.7 (0.8)	105.2 (3.8)	103.7 (3.9)
Furikake (dried bonito)	85.2 (2.3)	93.5 (1.2)	93.0 (1.7)
Seasoned and smoked squid	100.7 (1.3)	96.5 (6.4)	99.6 (4.3)
Salted squid guts	88.8 (3.2)	97.3 (4.6)	99.4 (2.8)
Satsuma-age	80.2 (4.7)	94.1 (5.1)	91.9 (2.7)
Soy-braised pork	91.4 (3.6)	98.8 (0.8)	97.7 (0.9)
Pork sausage	99.9 (2.0)	93.0 (3.8)	92.5 (4.7)
Rice cracker	78.3 (2.2)	104.1 (5.1)	100.8 (2.4)
Potato chips	83.4 (3.4)	102.6 (3.6)	105.1 (2.4)
Soy sauce	103.5 (1.0)	102.2 (2.2)	101.1 (3.5)
Pickles (cucumbers)	100.6 (2.5)	92.3 (8.7)	93.7 (4.0)

GA, SS and RS were spiked at 0.02 g/kg.

Each value represents the mean (RSD) (%) of five experiments.

Table 1-2. Recoveries of GA, SS and RS spiked in foods

Sample	Recovery (%)		
	GA	SS	RS
Tsukudani (kombu)	96.5 (1.2)	100.9 (1.0)	99.8 (1.1)
Teriyaki sauce	99.0 (1.2)	104.2 (1.4)	104.2 (0.5)
Furikake (dried bonito)	90.8 (2.7)	102.2 (0.9)	101.0 (1.4)
Seasoned and smoked squid	95.8 (1.2)	98.1 (1.8)	98.5 (1.7)
Salted squid guts	75.6 (6.6)	98.9 (1.3)	98.9 (0.7)
Satsuma-age	80.2 (4.7)	99.6 (1.5)	98.3 (1.9)
Soy-braised pork	76.6 (3.6)	98.8 (0.8)	97.7 (0.9)
Pork sausage	94.4 (3.7)	100.3 (0.9)	102.4 (0.6)
Rice cracker	78.3 (2.2)	104.1 (5.1)	100.8 (2.4)
Potato chips	80.3 (7.7)	105.0 (1.1)	104.7 (1.4)
Soy sauce	99.9 (1.2)	100.0 (1.8)	101.0 (1.4)
Pickles (cucumbers)	95.2 (1.3)	102.2 (1.8)	101.6 (1.3)

GA, SS and RS were spiked at 0.10 g/kg.

Each value represents the mean (RSD) (%) of five experiments.

Table 2. Contents of GA, SS and RS in Commercial foods

Sample	Number of samples	Analytical result (g/kg)		
		GA	SS	RS
Soy sauce	3	0.05-0.16	0.07-0.43	0.06-0.25
Sauce (Yakiniku)	1	0.02	0.03	0.03
Sauce (Tamagoyaki)	1	0.10	0.14	0.07
Sauce (Kabayaki)	1	0.01	0.01	0.03
Pickles (Takuan-zuke)	2	0.01, 0.09	0.11, 0.15	0.08, 0.14
Salted squid guts	2	0.03, 0.05	0.03, 0.16	0.03, 0.09
Fried squid	2	0.03, 0.07	0.27, 0.41	0.28, 0.29
Rice cracker	2	0.01, 0.05	ND, 0.04	ND, 0.05
Corn snacks	2	ND, 0.01	ND, 0.03	ND, 0.01
Potato chips	1	ND	ND	ND
Ume-kombu	1	0.14	0.22	0.34

ND : &lt; 0.01 g/kg

#### 4. 既存法との比較

##### 1) 市販食品中の使用実態及び既存法<sup>8,12)</sup>との同等性確認

市場で流通している食品について表示調査を行ったところ、両甘味料の併用はしょう油、漬物、たれ類、米菓、スナック菓子およびイカ加工品（塩辛や姿揚げ等）で多くみられた。特に、九州産の甘口しょう油、はちみつしょう油味やBBQ味等のたれ類や菓子類での併用頻度が高かった。両甘味料の塩なれ効果と後を引く甘味質の特徴を狙った製

品に多く使用されていた。

以上の結果を基に、両甘味料の使用表示のある食品18検体を購入し、本法を用いて使用量を調査した (Table 2)。その結果、いずれの食品においても両甘味料の使用量は少ない傾向にあり、両甘味料の特性を活かした甘味質の付与およびショ糖やその他の糖類の補助的な役割として添加されたことが示された。特に、米菓やスナック菓子は使用量が少なく、定量下限値 (0.01 g/kg) 付近もしくは定量下限値未満 (ND) であった。これらは甘味料を添加した味付け用の原料（しょう油、たれ、シーズニングパウダー等）の原料重量中の割合が少量であったことが推測された。

なお、NDであった3検体を除く15検体については既存法 (GA : 通知法<sup>8)</sup>, SS・RS : 山本らの方法<sup>12)</sup>) でも定量を行い、両者の定量値を散布図にプロットし相関係数を求め、その結果をFig. 3に示した。SS, RSでは本法と既存法において相関係数が0.997以上と強い正の相関関係が認められ、同等の検査結果が得られるものと示された。GAでは概ね同等性がみられるが、以下に述べる一部の食品においては定量値に差がみられた。イカ加工品（塩辛や姿揚げ等）のような高タンパク質・高脂質の食品では定量値は同等もしくは通知法の方が高かった。一方、米菓およびスナック菓子では通知法の定量値が本法の半分以下であった。また、水あめ等が多く含まれる甘口のたれ類も本法より定量値が低かった。

本法は抽出溶液中の水の含有量が高い一方、通知法はメタノール含有量が高いため、食品によってはこの組成の違いが起因して定量値に差が生じたと考えられた。特に、米菓・スナック菓子および水あめ等が多く含まれる甘口のたれ類においては、通知法の抽出溶液では混和時に明らかな沈殿や塊化を生じ、試料への浸透、分散が不十分であった。これが抽出不良を引き起こし、定量値の低下の要因となった。また、試料のかさが大きくかつ水分が少ない場合は、試料の量と抽出溶液の比率が高いこと (10 g→100 mL) も定量値低下の一因と考えられた。本法の抽出では、水分含有量の高い抽出溶液を用いることおよび試料と抽出溶液の比率が低いこと (5 g→100 mL) により定量値の改善に寄与したことが示された。

##### 2) GA通知法と添加回収率の比較

今回、GA通知法で抽出不良が予測されるスナック菓子1検体および米菓、ポテトチップス各3検体の計7検体の試料について、本法および通知法を用いて各甘味料0.10g/kg添加し、試行回数5回で添加回収試験を行い、回収率の比較をFig. 4に示した。なお、使用した食品のうちRice cracker 2, Potato chips 2の本法の回収率はTable 1-2に示す結果を使用した。

通知法の回収率は4.6-30.1%であり、本法は60.9-80.3%であった。今回、本法は通知法より2.1-16.0倍高い回収率が得られた。これらの試料は、前述の使用量調査結果より、使用量が定量下限値付近であったことから、回収率が良好

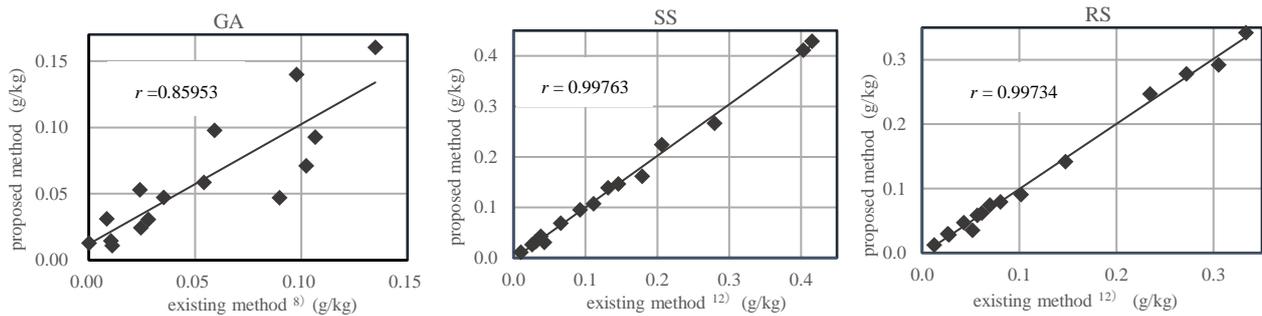


Fig. 3. Correlation between results obtained with existing method and proposed method

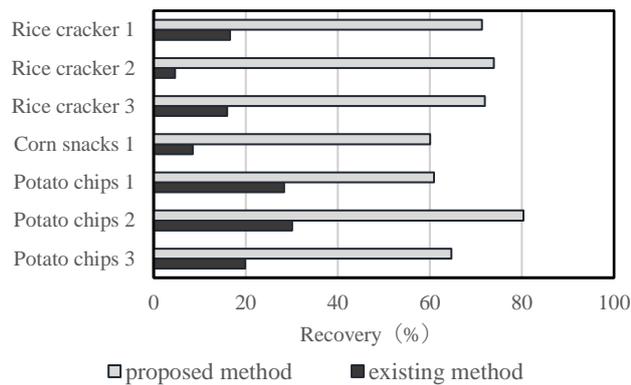


Fig. 4. Recoveries of GA spiked in foods with existing method and proposed method (spiked at 0.10 g/kg, n=5)

な本法の方が日常検査に適していると考えられた。

## ま と め

食品中のGA, SSおよびRSについて、トリス緩衝液・メタノール混液を用いた直接抽出および固相抽出による効率的な前処理法とLC-PDAによる良好な同時測定条件を確立した。

本法の前処理では、劇物および特化物であるアンモニア水ならびに塩酸を使用しないため、検査者への危害軽減を可能とした。また、本法はホモジナイズや透析が不要であり、抽出も10分と短時間で済むため作業負担が少ない簡便な分析法である。

添加回収試験では、12種類のいずれの食品においてもSS, RSは90%以上、GAは70%以上の良好な回収率であった。

市場調査では、しょう油、漬物、たれ類、米菓、スナック菓子およびイカ加工品（塩辛や姿揚げ等）で両甘味料の併用頻度が高かった。また、使用量調査では、多くの食品で両甘味料ともに少量の使用であった。これらの調査結果から、両甘味料の特性を活かした甘味質の付与およびショ糖やその他の糖類の補助的な役割として添加されていると考えられた。

両甘味料を本法と既存法との同等性を確認したところ、

SS, RSは既存法と同等性が確認され、一方、GAでは食品により定量値に差があった。これは、本法と通知法における抽出溶液の組成の違いおよび試料量と抽出溶液量の比率の違いに起因していた。米菓、スナック菓子およびポテトチップスにおいては、抽出溶液に水を多く含む本法の方が、通知法より2.1–16.0倍高い添加回収率が得られ、これらの試料においては本法の方が適していることが示された。

本法は、両甘味料を同時かつ正確性の高い分析値が得られ、さらに回収率が良好かつ労働安全衛生環境に配慮しクリーンアナリシスを指向した分析法であり、日常検査に有用だと考える。

(本研究の概要は第57回全国衛生化学技術協議会年会、2020年11月、において発表した。)

## 文 献

- 1) 坂牧成恵, 松本ひろ子, 萩野賀世, 他: 食衛誌, **45**, 81–86, 2004.
- 2) 氏家あけみ, 森 香織, 安永 恵, 他: 香川県環境保健研究センター年報, **10**, 80–84, 2011.
- 3) 小沢秀樹, 広門雅子, 田口信夫, 他: 東京健安研七年報, **54**, 93–98, 2003.
- 4) 松永明信, 大戸幹也, 山本 敦, 他: 食衛誌, **27**, 408–412, 1986.
- 5) 小沢秀樹, 広門雅子, 嶋村保洋, 他: 東京衛研年報, **51**, 75–79, 2000.
- 6) 冠 政光, 西島基弘, 観 公子, 他: 東京衛研年報, **29**(1), 193–198, 1978.
- 7) 小山政道, 吉田和郎, 内堀伸健, 他: 食衛誌, **46**, 72–78, 2005.
- 8) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長, 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, 薬生食監発0624第1号, 「食品中の食品添加物分析法」の改正について(通知), 令和3年6月24日.
- 9) 宮本文夫, 佐伯政信: 千葉県衛生研究所研究報告,

**16**, 23–28, 1992.

- 10) 厚生労働省監修，食品衛生検査指針 食品添加物編，  
555–563, 2003, 社団法人日本食品衛生協会，東京。
- 11) 成川一郎，西本初博，吉井美矢子，他：富山県薬事総

合開発研究センター，家庭薬研究，**5**, 21–29, 1986.

- 12) 山本純代，田原正一，杉木幹夫，他：食衛誌，**57**,  
155–159, 2016.

## Simultaneous Analysis of Glycyrrhizic Acid and Stevia Sweeteners in Foods Without Using Ammonia Solution

Natsumi TAKAHASHI<sup>a</sup>, Etsuko ISHII<sup>a</sup>, Narue SAKAMAKI<sup>b</sup>, Chigusa KOBAYASHI<sup>a</sup>, and Kenji OTSUKA<sup>a</sup>

To assess the efficiency and improved recovery rates considering clean analysis, the simultaneous pretreatment of glycyrrhizic acid (GA, including licorice extracts) and stevia sweeteners (stevioside(SS) and rebaudioside A(RS)) without using ammonia solution and the simultaneous determination conditions with LC-PDA were investigated. Therefore, this study developed a simultaneous pretreatment method that performs direct extraction with Tris buffer/methanol mixed solution and solid-phase extraction with a C18 cartridge. Using Tris base and Tris hydrochloride, the Tris buffer solution does not require pH adjustment with hydrochloric acid. In addition, gradient measurement conditions were established using LC-PDA on the ODS column with formic acid and acetonitrile as the mobile phase. In this way, good simultaneous measurement of both sweeteners was enabled within 30 min per analysis. The results of spiked recovery tests on 12 kinds of foods revealed good recoveries of >90% for SS and RS and >70% for GA. In addition, the proposed method was confirmed to be equivalent to those of the existing methods. As for GA, quantitative values for some foods differed from those obtained by the Ministry of Health, Labour and Welfare's "Method for Analysis of Food Additives in Foods" (existing method) due to the difference in the composition of the extraction solution and the ratio of the sample amount to the extraction solution amount between this method and the existing method. This method, which contains a large amount of water in the extraction solution, gave spiked recoveries of rice crackers, snack foods, and potato chips that were 2.1–16.0 times higher than the existing method, and was considered useful for routine testing.

**Keywords:** food additive, sweetener, glycyrrhizic acid, licorice extract, stevia sweeteners, stevioside, rebaudioside A, ammonia solution, tris buffer, LC-PDA

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

<sup>b</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out