

粉末状の栄養機能食品からの非表示グリチルリチン酸の検出事例

羽石 奈穂子^a, 林 真輝^a, 牛山 慶子^a, 磯野 真彩^b, 山嶋 裕季子^a, 大塚 健治^a

令和5年に搬入された粉末状栄養機能食品(収去品)から, グリチルリチン酸(GA) 0.14 g/kgを検出した。GAは甘味料として利用され, カンゾウ抽出物やナトリウム塩が食品添加物として利用された場合表示義務がある。しかし収去品にはそれらの表示がなく食品衛生法違反となった。収去品は粉末状で, 検査の信頼性確保にあたり, 次の三点を工夫した。第一に, 含有成分の違いが結果に与える影響を最小限にするため, 添加回収を収去品で行うこととした。また, 収去品に含まれるGAの量を踏まえ, 添加濃度を検討した。第二に, GAの量を正確に算出するため, 最適な採取量を検討した。妥当性確認では, 各パラメーターはガイドラインの基準に適合した。第三にGAとステビア類の同時分析を実施した。収去品にはステビアの表示があるため, GAがステビア類の誤認でないことを示す必要があった。同時分析のデータを示すことで誤認の有無を関係者が一目で確認することができた。このように, 既往研究を再度見直し, 違反時の結果に対する信頼性確保への工夫点を示すことで, 今後の類似事例における検査の実効性の向上に資するべく報告する。

キーワード: グリチルリチン酸, ステビア抽出物, 粉末状栄養機能食品, 同時分析, 添加回収試験

はじめに

グリチルリチン酸(GA)は, マメ科植物甘草の根茎抽出(カンゾウ抽出物)の主成分で, 甘味料として漬け物, 調味料, 菓子等の食品に広範に利用されている。GAから合成されたグリチルリチン酸二ナトリウムには, しょう油及びみそに使用基準が設けられている。食品添加物として使用する場合, GAはカンゾウ抽出物やグリチルリチン酸二ナトリウムも含め, 食品への表示が義務付けられている。

東京都が令和5年12月11日に収去した粉末状の栄養機能食品の甘味料検査^{1,2)}を行ったところ, GAを0.14 g/kg及びステビアの主成分の一つ, レバウジオシドA(RA)を8.3 g/kg検出した。表示には, ステビアは記載されていたが, GAあるいは甘草の記載はなく食品衛生法違反となった。

収去品のように水分含量の低い粉末状の製品は, 夾雑成分の割合や量が多く, 通常, 試験溶液調製の過程で回収率が低下するため, 定量値の信頼性確保が難しい。また, 収去品に表示された添加物名と検出された添加物名が一致していなかった。そこで今回, この検査を実施するにあたり, 次の課題を検討した。第一に, 夾雑成分の影響を可能な限り排除するため, 添加回収試験に用いる試料及び添加量を精査した。第二に, 定量性を確保するために試料採取量の検討を行った。令和6年3月に食品中の食品添加物分析法においても「妥当性確認ガイドライン」³⁾が発出されたことから, 用いた方法の性能評価を行った。第三にGAをステビアの主成分, ステビオシド(SS)及びRAと誤認していないことを明確に説明可能なデータの提示を検討した。そこで, GA, SS及びRAの同時分析が可能な条件を検討し, 誰もが誤認の可能性を排除できる資料の作成を試みた。

実験方法

1. 試料

収去品: 東京都内で市販されていた粉末状の栄養機能食品。

GA陰性試料: 市販の粉ミルク, 粉末状たんぱく質含有食品(プロテインパウダー), 食物繊維パウダー。

2. 標準品

GA: 高速液体クロマトグラフ用, 富士フイルム和光純薬(株)製

SS及びRA: 食品添加物分析用, 富士フイルム和光純薬(株)製

3. 試薬

メタノール及びアセトニトリル: HPLC用, 富士フイルム和光純薬(株)製

アンモニア水(25%), 酢酸, ギ酸, リン酸, 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): 特級, 富士フイルム和光純薬(株)製

Trizma塩酸塩(トリス塩酸塩): BioPerformance Certified, Sigma-Aldrich社製

アルミナカラム: Sep-Pak Alumina N Plus Long Cartridge (1710 mg), Waters社製

C18カラム: Bond Elut C18 Straight cartridge (500 mg/6 mL) Agilent Technologies社製

複層メンブレンフィルター: ガラス繊維/PVDF製 0.45 µm, 25 mm(GD/X), Whatman社製

^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 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

4. 試液

1%アンモニア水・メタノール試液：アンモニア水10 mLにメタノールを加え250 mLとした。

1%アンモニア水：アンモニア水 40 mLに水を加え1 Lとした。

トリス緩衝液：トリス塩基109.4 g及びトリス塩酸塩15.2 gを水に溶解し2 Lとした。

10%ギ酸含有30%メタノール：ギ酸10 mL及びメタノール30 mLに水を加え100 mLとした。

5. 装置及び測定条件

1) 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

装置：Prominence-i (島津製作所製)

測定条件：GA通知法準拠 (表1)

表1. HPLC測定条件

カラム	COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II Packed Column (4.6×250 mm, 粒子径5 µm, (株)ナカライテスク製)
カラム温度	40°C
移動相	アセトニトリル：メタノール：2%酢酸 (12:5:15)
流速	1.0 mL/min
注入量	10 µL
測定波長	254 nm

2) 液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC-MS/MS)

装置：LC ACQUITY UPLC® H-Class (Waters社製)

MS/MS Xevo® TQD (Waters社製)

測定条件：表2参照

表2. LC-MS/MS測定条件

LC	カラム	ACQUITY UPLC® CHS™ Phenyl-Hexyl (2.1×100 mm, 粒子径1.7 µm, Waters社製)
	カラム温度	40°C
	移動相	A：0.1%ギ酸, B：0.1%ギ酸含有メタノール
	移動相条件	0分 (40% B) → 30分 (80% B) → 30.1分 (40% B) → 40分 (40% B)
	流速	0.2 mL/min
	注入量	2 µL
MS/MS	測定モード	ESI(-)
	モニター	GA：821>351
	イオン	SS：803>641
		RA：965>803

6. 試験溶液の調製

1) 通知法

試料約10 gをホモジナイズカップに精密に量り、1%ア

ンモニア水を10 mL加えて1分間ホモジナイズし、これに1%アンモニア水・メタノール試液40 mLを加えて3分間ホモジナイズした。さらに1%アンモニア水・メタノール試液を加えて正確に100 mLとした。よく振とうした後遠心 (1,200 ×g, 10分間) し、上層を抽出液とした。抽出液20 mLを正確に分取した後、予めメタノール10 mLでコンディショニングしたアルミナカラムに負荷し、1%アンモニア水・メタノール試液10 mLで洗浄した。アルミナカラムに残留するメタノールを、通気して除去した。水で溶出し、溶出液を10 mLに定容した。0.45 µmのメンブレンフィルターでろ過して試験溶液とした。

2) 同時分析法

試料約5 gを遠心チューブに精密に量り、メタノール35 mL及びトリス緩衝液35 mLを加えて混和し、放冷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 (1,200 ×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、最初の10 mLを廃棄し、ろ液50 mLを得た (抽出液)。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、全量10 mLの溶出液を得た。溶出液をメンブレンフィルターでろ過し、試験溶液とした。

7. 添加回収試験のためのGA陰性食品の検討

粉末状食品としてGA陰性の粉ミルク、プロテインパウダー、食物繊維パウダーをそれぞれ10 g採取し (各食品3試行)、1,000 µg/mLのGA溶液を1 mL添加してスパーテルで混和し、暗所で30分間放置した。1%アンモニア水を10 mL加え、以下6.1) 通知法に従い操作した。

8. 試料採取量の検討

収去品を1, 2, 5及び10 g採取し (各採取量3試行)、1%アンモニア水を10 mL加え、以下6.1) 通知法に従い操作した。

9. 添加回収試験におけるGA添加量の検討

収去品1 gに500, 1,000及び5,000 µg/mLのGA溶液を0.1 mL添加 (添加濃度0.05, 0.1及び0.5g/kg相当, 各添加濃度3試行) し、1%アンモニア水を10 mL加え、以下6.1) 通知法に従い操作した。

10. 妥当性確認試験

食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン³⁾に従い、妥当性確認試験を行った。

収去品を1 gを6.1) 通知法に従い操作し、3試行の平均値からGA含有量を算出した。別に、収去品1 gに1,000 µg/mLのGA溶液を0.1 mL添加して6.1) 通知法に従い操作し (2試

行) , 得られた個々のGA定量値からGA含有量を減じて回収率を算出した。これを5日間繰り返し、真度、併行精度及び室内精度を算出した。

結果及び考察

1. 添加回収試験のためのGA陰性食品の検討

甘味料として食品に添加する場合、GAに基準値は設定されていないが、添加した場合には表示が義務付けられている。しかし今回のGA検査では、表示のない食品から検出した。食品衛生法への適否を判定するためには、用いる分析法に対し妥当性を確認する必要がある。妥当性確認ガイドラインに示された確認手順では、陰性試料に分析対象物質を添加して性能を評価する。そこで、収去品と類似する陰性確認済み食品を用いて添加回収試験を行った。表3に示す3種類の粉末状の食品に対して通知法の条件を適用したところ、いずれも回収率は60%未満と低く、通知法に従い試験溶液を調製した場合は添加回収試験が難しいことを示した。

表3. 粉末状食品のGA添加回収率 (n=3)

GA陰性試料	回収率*(%)
粉ミルク	56 ± 4.7
プロテインパウダー	32 ± 0.6
食物繊維パウダー	57 ± 5.6

*0.1 g/kg相当添加

低回収率の原因を、試料抽出時と固相精製時の2つの工程に分けて考察した。

1) 試料抽出時の抽出効率の低下

1%アンモニア水・メタノールによる抽出が不十分である可能性がある。乾燥した粉末状の食品では、一般的な加工食品に比べて水分含量が非常に低いため、通知法に記載の採取量 (10 g) では、はじめに加えた1%アンモニア水が試料の膨潤に消費され、添加した溶液中に目的物質の抽出には不足すると推察した。

2) 固相精製時のカラム保持容量不足

アルミナカラムによる固相精製時に、目的物質が十分に保持されない可能性がある。粉末状食品のように水分含量の低い場合は、他の共存成分の絶対量が多くなり、それらが目的物質の保持を妨げると推察した。

さらに、同じ粉末状食品であっても原材料の組成は異なるため、今回は、収去品そのものを添加回収用試料とすること、試料採取量を減じることが望ましいと判断した。

2. 試料採取量の検討

1. の検討結果から、添加回収用試料を収去品に変更し検討を進めた。GA含有量の真値は不明のため、はじめに採取量によりGA定量値が異なるか確認した。採取量を1, 2, 5, 10 gとしてそれぞれの定量値を比較したところ、採取量が多いほど定量値は低くなった (表4)。

ら、採取量が少ないほうがGA含有量の真値に近いと考えた。試料の均質性を鑑み、採取量は1 gとした。

表4. 採取量の違いによるGA定量値 (n=3)

収去品採取量(g)	GA定量値 (µg/g)
1	146 ± 4
2	137 ± 14
5	49 ± 4
10	33 ± 7

採取量が多いと定量値が低下する原因として、前述のGA陰性試料と同様の2点、1) 抽出効率及び2) 固相抽出カラムの保持容量不足を検討した。

1) 試料抽出時の抽出効率の低下

収去品10 gを通知法に従い抽出した溶液2 mLを固相抽出カラムに負荷した場合と、1 gを抽出した溶液20 mLを負荷した場合のGA定量値を比較した (表5)。

抽出効率が同等であれば、試料から抽出された様々な成分は固相抽出カラムに同量負荷され、GA定量値も同じになると予測した。しかし、1 g採取時の定量値が1割以上高かった。このことから収去品のような粉末状の食品では、通知法に従い10 g採取すると、十分に抽出できないことが示唆された。

表5. 抽出効率の検討 (n=3)

採取量及び固相抽出カラムへの負荷量	GA定量値 (µg/g)
10 g 採取 2 mL 負荷	128 ± 1
1 g 採取 20 mL 負荷	147 ± 4

2) 固相精製時のカラム保持容量不足

収去品10 gを通知法に従い操作し、得られた抽出液を固相抽出カラムに2, 5, 10, 20 mL負荷した。GA定量値の比較を表6に示した。

表6. 保持容量の検討 (n=3)

固相抽出カラムへの負荷量 (mL)	GA定量値 (µg/g)
2	128 ± 1
5	131 ± 3
10	101 ± 3
20	33 ± 7

同濃度の溶液を負荷するため、カラム保持容量が十分であれば負荷量を変えてもGA定量値は変わらないと予測した。しかし、負荷量10 mL以上では定量値の低下が認められた。すなわち、収去品10 gからの抽出溶液を固相抽出カラムに10 mL以上負荷した場合は、カラムの保持容量を超える可能性が示された。以上より、収去品を通知法に従い操作した場合のGAの定量値の低下は、抽出効率の低下及びカラム保持容量不足が要因であることを示唆した。この課題を解決するため、採取量を1 gへ変更することとした。

3. 添加回収試験におけるGA添加量の検討

添加回収試験におけるGA添加量を検討した．本来添加回収試験では，陰性の類似食品を用いて基準値や定量限界相当濃度を添加している．それに対して，今回はGA陽性の試料（含有量暫定値0.14 g/kg）を用い，また，GAに基準値は設定されていないため，添加量は含有量付近の0.05, 0.1, 0.5 g/kg相当を検証することとした．採取量は1 gとし，無添加試料3試行の定量値より回収率を求めた(表7)．

今回はGA陽性試料を用いたため，無添加試料定量値に比べて添加量が低いと回収率が大きく変動することが懸念された．また，添加量が多いと抽出効率及び保持容量の要因で定量値が低下する可能性があった．添加量0.5 g/kgにおける回収率が他の回収率より低かったことは，このことが要因と考えた．0.05及び0.1 g/kgにおける回収率はいずれも良好だが，今回は無添加試料の定量値に近い0.1 g/kgを選択した．

表7. 収去品1 g採取時の添加回収試験結果 (n=3)

添加量 (g/kg)	回収率 (%)
0.05	97 ± 1
0.1	101 ± 3
0.5	91 ± 2

4. 妥当性確認試験

試験者1名，2併行，5日間の添加回収試験を行い，真度，併行精度，室内精度を算出し表8に示した．今回はGA陽性試料を用いたため，選択性の確認は除外した．回収率は，毎回無添加試料を3回測定し，その平均値から個々の回収率を算出した．

表8. 妥当性確認試験（添加量0.1 g/kg, n=2, 5日間）

真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
104	2.8	6.1

妥当性確認試験における目標値は，添加量0.1 g/kgの場合，真度70-120%，併行精度10%未満，室内精度15%未満である．表8に示すように，各パラメーターはいずれも目標値を満たしていた．

5. GA・SS・RAの同時定量

ステビアはキク科植物 *Stevia rebaudiana* の葉等を由来とする甘味料でSSやRA等のステビオール配糖体が主成分である．これらは構造が類似しているため，機器分析の際，保持時間やMSスペクトルの分離に工夫が必要である．しかし，GAの通知法はステビアとの同時分析ではないため，これら3成分が十分に抽出され同時分析可能な試験法を既往研究^{4,5)}から2種類（表9）選択した．また，LC-MS/MSによる確認分析法は，日常検査での知見をもとに開発した．

1) 前処理法

収去品を試験法A⁴⁾，B⁵⁾の前処理法で調製し，GA定量値を比較した．試験法Bは通知法と同様アンモニア系メタノール

の抽出溶媒だが，定量値は80 µg/gと3分の2程度であった．トリス緩衝液・メタノール混液を用いた試験法AではGA定量値は150 µg/gと通知法と同等以上であり，RA定量値は収去品製造者が提示した数値とほぼ同等であったため，前処理法は試験法A（実験方法6.2）に相当）を選択した．

表9. GA通知法及び同時分析法の比較

試験法	通知法	試験法A	試験法B
抽出 溶媒	アンモニア水・ メタノール混液	トリス緩衝液・ メタノール混液	アンモニア水・ メタノール混液
精製 カラム	アルミナN	C18	C18
HPLC カラム	C18	C18	NH2
移動相	アセトニトリル/ メタノール/2% 酢酸 (12:5:15)	0.01%ギ酸/ アセトニトリル (グラジエント)	0.1%リン酸/ アセトニトリル (2:8)
測定 波長	GA : 254 nm SS及びRA : 210 nm		

2) HPLC測定法

試験法Aの測定条件における標準溶液のクロマトグラムを図1に示した．HPLCカラムとしてC18カラムを用いており，SS及びRAの保持時間が近接し，分離能が弱い．一方，NH2カラムを用いた試験法Bでは3成分の保持時間に差があり分離能が大きく，ピークを誤認する可能性は低いことから，HPLC測定法は試験法Bを選択した．

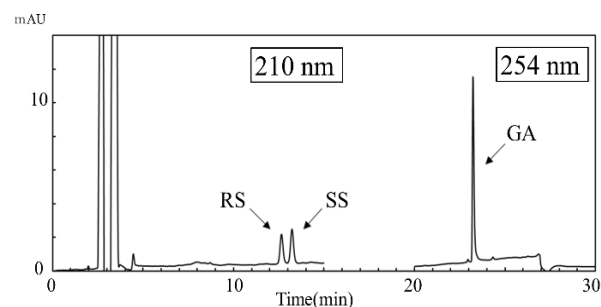


図1. 試験法Aの測定条件におけるHPLCクロマトグラム

図2に標準溶液，通知法と試験法Aで調製した試験溶液を通知法Bの測定条件で測定したクロマトグラムを示した．本クロマトグラムは，210 nmから254 nmで得られた最大吸光度をプロットした．(3)が混合標準溶液で，3成分が明瞭に分離できることを示した．(2)の通知法，(1)の試験法Aともに，SSのピークは不明瞭だが，GAとRAのピークは認められ，収去品にはGAとRAが含まれることが確認できた．

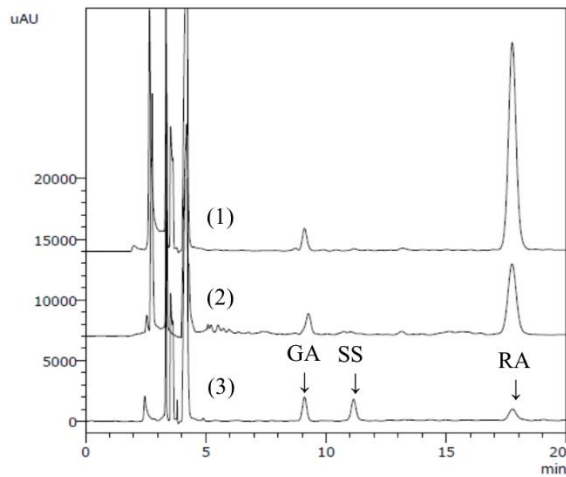


図2. 試験法Bの測定条件におけるHPLCクロマトグラム

- (1) 試験法Aによる試験溶液
- (2) 通知法による試験溶液
- (3) 標準溶液 (GA 4 µg/mL, SS及びRA 10 µg/mL)

3) LC-MS/MSを用いた確認分析法

GA通知法に準拠した場合、SS及びRAの測定は可能だったが、保持時間が非常に近かった。そこで、我々が日常検査で用いているSS及びRAの確認分析法をもとに、3成分の同時分析法の検討を行った。

表2で示したように、LCカラムはC18カラムからSSとRAの分離が良好なPhenyl-Hexylカラムに変更した。移動相はメタノールを用い、グラジェントの勾配を変え、有機溶媒の比率を上昇させる時間を拡大することで、SSとRAの分離を向上した。LC-MS/MSクロマトグラム図3の(1)は混合標準溶液で、SSとRAは保持時間が近いものの、3成分が明確に確認できた。なお、SSの測定条件ではRAの位置にピークがわずかに検出された。これは、RAの一部のフラグメントイオンがSSのモニターイオンと同じなためである。このことから、SS及びRAを明確に分離するために測定条件を見直す必要があることが裏付けられた。(2)は収去品の試験溶液で、先のHPLCの結果同様、SSのピークは不明瞭だが、収去品にはGAとRAが含まれることが確認できた。

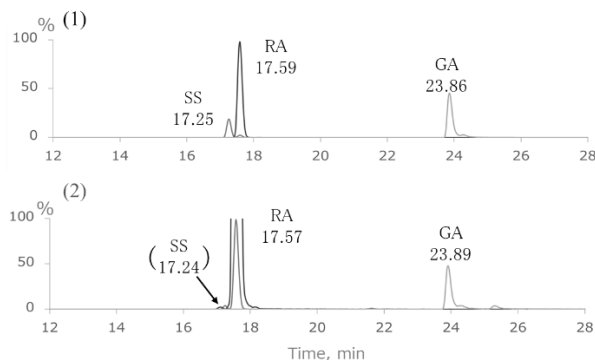


図3. 表2の測定条件によるLC-MS/MSクロマトグラム

- (1) 標準溶液100 µg/mL
- (2) 通知法による試験溶液

ま と め

粉末状の食品から表示にないグリチルリチン酸 (GA) を検出した事例への対応を行った。一般的に、粉末状の食品は採取量に対して夾雑成分の割合や量が膨大になるため、状況に応じて、採取量を変更して採取することが望ましいと考えられた。同様の理由で、粉末状の食品中の成分の正確な回収率を把握するためには、当該製品そのものを用いて添加回収試験を行うことが望ましいと考えられた。今回、収去品にはステビア抽出物の表示があったため、既往研究等を利用して急遽GAとステビア類の同時分析を行った。収去品から検出されたGAがステビア類の誤認ではないことを、収去担当者を含む関係部署にも明瞭に示し、本事例の違反對等円滑に行うことができた。

文 献

- 1) 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: 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.
- 2) 山本純代, 田原正一, 杉木幹雄, 他: 食衛誌, **57**, 155–159, 2016.
- 3) 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 (通知), 令和6年3月8日.
- 4) 高橋夏生, 石井悦子, 坂牧成恵, 他: 東京健安セ研年報, **75**, 193–200, 2024.
- 5) 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.

Detection of Undeclared Glycyrrhizic Acid in Powdered Nutritional Functional Food

Nahoko HANEISHI^a, Masaki HAYASHI^a, Keiko USHIYAMA^a, Maasa ISONO^b and Kenji OTSUKA^a

In 2023, 0.14 g/kg of glycyrrhizic acid (GA) was found to be present in a powdered nutritional functional food (a product collected for testing). GA is known as licorice in American English and is found in *Glycyrrhiza glabra* root, which is used as a sweetener. When licorice extract or sodium salt is used as a food additive, it must be labeled. However, the collected product did not have such labeling, which was a violation of the Food Sanitation Act. When reporting the test results, the following three points were considered for establishing a valid ingredient confirmation test, especially for testing powdered food. To minimize the effect of differences in the constituent food ingredients on the results, the food was used to perform the test. First, since the collected product contains GA, the concentration of the added GA was quantified. Second, to accurately calculate the amount of GA, the sampling quantity was adjusted. The test validity confirmation showed that each parameter met the guideline standards. Third, simultaneous analysis of GA and stevia was performed. Since the collected product was labeled as containing stevia, it was necessary to show that GA was not misidentified as stevia. By presenting the data from the simultaneous analysis, inspectors could quickly confirm that correct identification was made. By reevaluating prior research and implementing measures to ensure analytical reliability in cases of regulatory violations, this report serves as a practical reference for future testing of similar products.

Keywords: glycyrrhizic acid, stevia, powdered nutritional functional food, simultaneous analysis, spiking and recovery test

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out