

Table 1. Molecular weight of commercial gardenia blue estimated by HPGFC performed on OHpak SB-803HQ column

	BI MW×10 ⁻⁴	BII MW×10 ⁻⁴	BIII MW×10 ⁻⁴
Tris-HCl	7.55	3.64	2.33
Tris-HCl+LiCl	1.03	0.46	nd
Na ₂ SO ₄	0.24	0.15	nd
Na ₂ SO ₄ +CH ₃ CN	0.65	0.27	nd

nd: not detected.

Table 2. Molecular weight of commercial gardenia blue estimated by HPGFC performed on TSK-GEL G3000SW column

	BI	BII	BIII
	MW $\times 10^4$	MW $\times 10^4$	MW $\times 10^4$
Tris-HCl	9.88	5.73	4.58
Tris-HCl+LiCl	0.93	0.50	0.39
Na ₂ SO ₄	0.51	0.36	0.18
Na ₂ SO ₄ +CH ₃ CN	0.48	0.37	0.24

Table 3. Contents of residual solvent in gardenia blue

Sample	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	
	Methanol	Ethanol
BI	46	36
BII	69	572
BIII	93	7841

Table 4. Contents of residual amino acid in gardenia blue

Sample	Concentration ($\mu\text{g/g}$)										
	Asp	Glu	Ser	Gly	Ala	Pro	Arg	Tyr	Val	Leu	Total
BI			5	5	5	10	12	10	38	26	112
BII		22			32	123	12		22	24	237
BIII	11		14	7	21	10	15	29	39	24	170

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

食品中のショ糖脂肪酸エステルの分析法に関する研究

分担研究者 伊藤誉志男（武庫川女子大学薬学部）

研究要旨 我が国の「食品中の食品添加物の定量法」は、ほとんど全ての食品に適用できる事を目標にし、1970～1980年にかけて作成した。

本定量法の目的は次の2つである。

- ①食品添加物が各種食品での使用基準以下になっている事を判定する必要性
- ②各食品添加物の日本人の1人1日摂取量実態調査研究のために必要である。

①については、ほぼ確立できた。しかし、②の乳化剤、糊料等の混合成分及び高分子化合物については、未だ不備な点が多い。また、乳化剤及び糊料では、②と③（食品添加物の使用量から求めた日本人の1人1日摂取量実態調査）の調査結果の間には大きな相違点が認められた。これらは、定量法に問題があると考え、今年度はショ糖脂肪酸エステルの各種食品からの簡便、迅速な定量法を作成することにした。

A. 研究目的

ショ糖脂肪酸エステルは乳化剤としてコーヒー、アイスクリーム等に広く使用されている。ショ糖脂肪酸エステルの食品中からの定量法には本化合物が混合物であるので2つの問題点がある。その①は標準品を何にするか、その②は混合物であるため従来のGC法及びHPLC法では多くのピークが出現し、定量が困難となる。そこで、①については市場を調査し、現在、世界中で最も多く使用されている2社の製品（2社の製品の組成はほぼ類似しており、現在、世界中の市場の90%以上を占めている）を標準品として用いる事にし、この標準品の組成を詳細に調べる事にした。②については、SFAEを各種食品から抽出し、抽出溶液中に残存するショ糖を完全に除去した

後、ショ糖脂肪酸エステルを加水分解し、生成したショ糖を糖に高感度で特異性のあるPAD・IC（パルスドアンペロメトリック検出器付きイオンクロマトグラフィ）にて、単一ピークとして定量する簡便かつ迅速な定量法を作成することにした。

B. 研究方法

1. 試験法の概要

食品中のショ糖脂肪酸エステルは、メタノールで抽出後、クリーンアップ用カートリッジカラムにより精製する。次に、得られたショ糖脂肪酸エステルを加水分解し、生成するショ糖をイオンクロマトグラフィにより定量し、その定量値からショ糖脂肪酸エステル量を換算して求める。

また、食品中のショ糖脂肪酸エステルは、THF で抽出後、薄層クロマトグラフィーにより定性を行う。

2. 試験法 (イオンクロマトグラフィー)

(1) 検体採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

試料約 2.5g を精密に量り、メタノール 10mL を加え、5 分間振とうする。遠心分離 (3500 回転/分, 10 分間) したのち、上澄液を分取し、0.5mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 2mL を加え、減圧下でメタノールを除去する。残留物に 1%メタノール含有 0.5mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 5mL を加え、10 分間超音波処理後、加温 (70℃, 10 分間) する。この全液を、あらかじめメタノール 3mL および水 3mL でコンディショニングしたクリーンアップ用カートリッジカラムに静かに注入し、2~5mL/分の速度で流出させる。流出液は捨て、カラムは 0.5mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20mL で洗浄したのち、メタノール:エーテル (4:1) 混液 20mL で溶出する。これを 5mL 以下に減圧濃縮し、5mol/L 水酸化カリウム溶液 5mL を加えて十分に攪拌したのち、25℃で 15 分間放置する。水にて全量 25.0mL とし、メンブランフィルター (0.45 μm) を用いてろ過し、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

ショ糖 1g を水に溶かし正確に 100mL とし、標準原液とする (この液 1mL にはショ糖 10mg を含む)。標準原液を水で適宜希釈し、1mL 中にショ糖が 0.5, 1, 10, 100, 500 および 1000 μg を含むように

標準液を調製する。

(4) 測定法

測定条件

パルスドアンペロメトリック検出器付き高性能陰イオンクロマトグラフィー (HPAEC-PAD) を用い、次の条件によって測定する。

充填剤: 不活性スチレンジビニルベンゼンポリマー

カラム: CarboPacTMPA1 (内径 4.0mm, 長さ 250mm) (DIONEX 社製)

移動相: 0.05mol/L 水酸化ナトリウム溶液

流速: 0.8mL/分

作用電極: 金

参照電極: 銀/塩化銀

パルス電位: +0.05V (480 秒) → +0.60V (120 秒) → -0.60V (60 秒)

カラム温度: 室温

検量線

検量線用標準液を調製し、25 μL ずつをそれぞれ量り、イオンクロマトグラフィーに注入し、ピーク高さまたはピーク面積から検量線を作成する。

定量

試料液 25 μL をイオンクロマトグラフィーに注入し、得られたピーク高さまたはピーク面積と検量線から、試料液中のショ糖濃度 (μg/mL) を求め、次式にてショ糖脂肪酸エステル含量 (μg/g) を計算する。

$$\text{ショ糖脂肪酸エステル含量 } (\mu\text{g/g}) = 2.2 \times \frac{\text{CA}}{\text{W}}$$

2.2: ショ糖の分子量をショ糖脂肪酸エステル
の平均分子量で割ったもの

C: 試料液中のショ糖濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

A: 試料液の量 (mL)

W: 試料の採取量 (g)

3. 定性 (薄層クロマトグラフィー)

(1) 検体採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

試料約 20.0g を精密に量り、分液漏斗に移す。THF 200mL を加え、10 分間振とうする。静置後、上澄液を分取し、減圧濃縮する。THF にて正確に 25.0mL とし、試験溶液とする。

(3) 測定法

測定条件

次の条件によって測定する。

薄層板: シリカゲル 60 (Merck 社製)

展開相: クロロホルム: メタノール:

酢酸: 水 (40: 5: 4: 1)

検出: アンスロン・硫酸溶液を噴霧後、加熱

定性

試料液 20 μL を薄層板にスポットする。得られた試料液のスポットとショ糖脂肪酸エステル
のスポット (青緑色) の Rf 値と色調が一致するかどうか確認する。

試薬

1. ショ糖標準品 [特級]
2. ショ糖脂肪酸エステル: S-1170 (三菱化学フーズ) または F-110 (第一工業製薬)
3. メタノール [特級]
4. エーテル [特級]

5. THF [特級]

6. クロロホルム [特級]

7. アンスロン [特級]

8. 水酸化カリウム [特級]

9. 水酸化ナトリウム [特級]

10. 硫酸 [特級]

11. 酢酸 [特級]

12. リン酸水素二ナトリウム [特級]

13. リン酸二水素カリウム [特級]

14. 固相抽出カートリッジ: Bond Elut Jr C18 (Varian 社製)

C. 研究結果

①操作のフローチャートを下記に示す。

試料 2.5g

メタノール 10mL

振とう 5分

遠心分離 3500 回転/分, 10 分

上澄液

0.5mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 2mL

減圧濃縮

1%メタノール含有 0.5mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 5mL

超音波処理 10分

加温 70°C, 10分

固相抽出 (C18)

洗浄; 0.5mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20mL

溶出; メタノール: エーテル (4: 1) 混液 20mL

減圧濃縮

加水分解

5 mol/L 水酸化カリウム溶液 5 mL

放置 25°C, 15 分

水にて全量 25.0mL とする (試料液)

メンブランフィルター (0.45 μm)

イオンクロマトグラフィーによる定量

②本法による添加回収試験の結果を以下に示す。

ショ糖脂肪酸エステルの添加回収率

試料	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)
コーヒー	200	88.8 \pm 0.1
	1000	97.5 \pm 0.0
乳飲料	500	82.0 \pm 0.0
	1000	84.8 \pm 0.0
アイスクリーム	2000	94.9 \pm 0.0
	4000	97.1 \pm 0.1
クラッカー	100	93.1 \pm 0.0
	1000	98.8 \pm 0.0
パン	200	86.1 \pm 0.1
	2000	89.2 \pm 0.1
豆腐	200	83.6 \pm 0.1
	2000	92.4 \pm 0.1
ファットスプレッド	100	80.8 \pm 0.1
	1000	84.2 \pm 0.0

回収率=平均値 \pm 変動係数 (%), n=6

D. 考察

ショ糖への脂肪酸のエステル化は主にショ糖の第一級アルコール(グルコースの6位, フルクトースの1'位または6'位)でおこり, モノ〜トリエステル体が生成される。そのほかの第二級アルコールにもエステル化はおこるとされており, その構造は複雑である。現在, これらの異性体の精製法は確立されておらず, 食品添加物として用いられる場合, ショ糖脂肪酸エステルは異性体の混合物として使用されている。よって本分析法では, 現在最も使用頻度の高いショ糖脂肪酸エステルを標準品とする。すなわち, 世界

的にみてその製造の大部分を占める2社, F-1170(三菱化学フーズ)およびF-110(第一工業製薬)を標準品とする。なお, これらのショ糖脂肪酸エステルは, 脂肪酸の種類およびその割合が, ステアリン酸: パルミチン酸(7:3)であり, エステル組成比が, モノエステル体約57%, ジエステル体約31%およびトリエステル体約12%を含有し, 両者の組成はほぼ同一であった。各種食品中のSFAEの抽出溶剤はメタノールが最適であった。精製にはC18の固相抽出が最適であり, ショ糖はリン酸緩衝液(pH7.0), SFAEはメタノール: エーテル(4:1)で各々完全に溶出分離した。SFAEの加水分解は5mol/L KOH, 25°C, 15分であった。ショ糖はアンペロメトリー検出器付イオンクロマトグラフィーにより高感度に定量できた。また, 10種市販食品の添加回収率も良好であった。

E. 結論

食品中のショ糖脂肪酸エステルの簡便かつ迅速な定量法を作成する事が出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

高智美, 矢田朋子, 扇間昌規, 伊藤誉志男等, 日食化誌, 4(2), 93-98 (1997)

2. 学会発表

平澤適子, 岡田安代, 扇間昌規, 伊藤誉志男, 第48回日本薬学会近畿支部大会

厚生科学研究費補助金（食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究）
総括研究報告書

食品中の未許可添加物の分析法の開発

主任研究者 山田 隆 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部長
分担研究者 川崎洋子 国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者 石橋 亨 東京顕微鏡院
中里光男 東京都立衛生研究所

研究要旨 未許可食品添加物を含む I. 甘味料（アセスルファムK(AK)、サッカリンナトリウム(SA)、アスパルテーム(APM)、アリテーム(AL)、ズルチン(DU)) II. 保存料（パラオキシ安息香酸メチル、エチル、イソプロピル、プロピル、イソブチル、ブチルエステル）について、HPLCによる食品中からの一斉分析法を検討した。

I. 甘味料：食品中から透析により 5 種類の甘味料を抽出し、臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウムでAK, SAをイオンペアとし、更に、試験溶液を pH 5 付近に調整後、Sep-Pak Vac C18でのクリーンアップで食品中の夾雑物を大幅に除去することができた。また、HPLCにおいて10% テトラプロピルアンモニウムヒドロキシドをイオンペア試薬とし、移動相をpH 3.5に調整することにより5種類の甘味料を 30 分以内に一斉分析することが可能となった。本法における回収率はAK, APM及びALで 90%以上、AS, DUでは75%以上であり、定量限界は10 μ g/gであった。

II. 保存料：脂肪を含有する食品中から 6種類のパラオキシ安息香酸エステル類をエーテル抽出後、Sep-PakアルミナNカートリッジで精製することにより、良好な回収率を得ることができた。

以上、食品成分に影響されない精度の高い分析法を確立できた。

I. HPLCによる食品中の合成甘味料の一斉分析法

A. 研究目的

最近、砂糖の使用を控えることで低う蝕性あるいは低カロリーを強調する清涼飲料や菓子等の食品が多く市販されているが、その甘味を補うために甘味料を使用する場合が増えている。このような食品に、海外では日本で許可されていない合成甘味料を使用する場合が少なくない。たとえば、欧州では甘味の質を向上させる目的で糖アルコ

ール、サッカリン(SA)、アスパルテーム(APM)、アセスルファムK(AK)等の複数の甘味料を食品に添加する例がある^{1),2)}。これらの中でAKは日本では許可されていないが、現在 80か国以上で許可されている合成甘味料であり、近年、輸入食品中の AK に対する監視の必要性が高まっている。

また、アミノ酸系の合成甘味料で、ショ糖の約 2000 倍の甘味度を有する

アリテーム(AL, Fig.1)は1979年にアメリカのファイザー社により開発され, 1994年にオーストラリア及びニュージーランドで, 次いで1995年にメキシコ及び中国でその使用が許可されている^{11,12}. このため, 新たにこれらの国々から輸入される食品中のALの検査の必要性が生じている. このように, 輸入食品の増加とともに我が国では許可されていない添加物の検査需要が増大しているため, 簡便で多数の検体の処理に適し, かつ, さまざまな食品に適応可能な分析法の開発が求められている. すなわち, これらの食品の検査を効率的に行うために多種類の甘味料を一斉に分析する方法が必要となっている.

Lawrenceら¹³はAK, SA, APM, AL, ゼルチン(DU)及びスクラロースの6種の合成甘味料についてHPLCによる一斉分析法を, Thompsonら¹⁴はAK, SA, APM, AL及びDUの5種類の合成甘味料についてキャピラリー電気泳動による分析法を報告している. しかし, いずれも試料の前処理が抽出液をフィルターでろ過するのみであるため, 分析可能な食品の範囲が限られてしまう欠点がある. そこで, 食品中の合成甘味料をスクリーニングする目的とし, 未許可添加物のAK, AL, DU及び許可添加物で使用頻度が高いSA, APMの計5種について, 簡便で広範囲な食品に適応可能なHPLCによる一斉分析法を検討した.

B. 研究方法

1. 試薬

1)混合標準原液: AK(純度99%以上, 和光純薬工業(株)製, 生化学用)約100 mg, サッカリンナトリウム(二水和物, 特級, 和光純薬工業(株)製)約118 mg,

APM(純度98%以上, 和光純薬工(株)製, 食品添加物試験用)約100 mg, AL(純度98%以上, ファイザー(株)製)約100 mg及びDU(食品添加物用, ICN Biochemicals社製)約100 mgを精ひようし, メタノール-水(1:1)混液に溶解して全量を100 mLとしたものを混合標準原液とした. 本液1 mLはAK, サッカリンナトリウム, APM, AL及びDUを各々約1000 µgを含有する.

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1000 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30/32(平面幅40 mm, 直径25 mm, 膜厚0.0305 mm, Viskase sales製)

5)前処理用カートリッジカラム: Sep-Pak Vac C18(逆相系, 充てん量1 g, Waters社製)を用いた. カートリッジは使用前にメタノール5 mL及び水5 mLで順次洗浄した.

6)メタノール: 高速液体クロマトグラフィー用

7)イオンペア試薬: 10% テトラプロピルアンモニウムヒドロキシド(TPA-OH)溶液(特級, 和光純薬工業(株)製), 臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム(TBA-Br)(イオンペアクロマト用, ナカライテスク(株)製)

8)0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 5.0): 0.2 mol/Lリン酸水素二ナトリウム及び0.2 mol/Lリン酸二水素ナトリウムを混和し, pH 5.0に調整したものを水で2倍希釈した.

9)その他の試薬は市販特級品を用いた.

2. 装置

高速液体クロマトグラフ: 日本分光

工業(株)製 880-PU 型ポンプ, 同 85 1-AS 型オートインジェクター, (株) 島津製作所製 SPD-10AV 型 UV 検出器, 同 CTO-10AC 型カラム恒温槽, 同 CR-5A 型データ処理装置により構成した。

3. HPLC条件

カラム: Inertsil ODS-2(4.6 mm i.d.×250 mm, ジーエルサイエンス(株)製); 移動相: 0.01 mol/L TPA-OH含有メタノール-水(1:3)混液をリン酸で pH 3.5 に調整したもの; 流速: 1.0 mL/min; 検出波長: 210 nm; カラム温度: 40°C; 注入量: 10 μL

4. 試験溶液の調製

1) 透析

液体試料は 20 g をとり, 約 20 mL の透析内液用溶液と共に透析膜に充てんした。固体試料は細切又はホモジナイズした後, その 20 g をとり, 約 20 mL の透析内液用溶液を加えて流動状とし, 少量の透析内液用溶液を用いて透析膜に充てんした。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時間透析を行った。

2) クリーンアップ

透析終了後, 透析外液 10 mL を分取し, 0.1 mol/L TBA-Br溶液 1 mL 及び 0.1 mol/L リン酸緩衝液(pH 5.0)を加え全量を 20 mL とし, 十分に混和した。これを 10 mL 分取し, Sep-Pak Vac C18カートリッジに負荷し, 水 30 mL 及びメタノール-水(1:9)混液 5 mL で洗浄後, メタノール-水(45:55)混液で溶出し全量を 10 mL としたものを試験溶液とした。

C. 結果及び考察

1. 透析条件

著者らはすでに食品中の AK, SA 及び APM の3種の甘味料の分析法について報告した¹⁾。その中で, 試料からの抽出方法については, ある程度クリーンアップ効果があり, かつ簡便に多数の検体の処理が行えることから透析法を採用している。その際, 穀類加工品や魚介乾製品において AK 及び SAの回収率が低い傾向がみられたが, 透析内液に10%塩化ナトリウム含有0.01 mol/L 塩酸を用いることで回収率を高めている。

このように AK 及び SA については, 透析内液中の塩化ナトリウム濃度が回収率に影響を及ぼすことが明らかであったので, ALb 及び DU についてもその影響を調べた。

透析外液に0.01 mol/L 塩酸を, 透析内液として 0, 2.5, 5, 7.5 及び 10% の塩化ナトリウムを含有する 0.01 mol/L 塩酸のそれぞれ約 20 mL を用いて, 5 種の甘味料各 200 μg/gを添加した各種食品について, 透析による回収率を経時的に調べた。このうち, 前報で AK 及び SA の回収率が最も低かったビスケットを試料として用いた場合の結果を Fig.2.に示した。ALの場合, いずれの塩化ナトリウム濃度の透析内液を用いても, 24 時間の透析で 95% 以上の回収率が得られ, 透析内液中の塩化ナトリウムの影響を受けないことがわかった。これは同じアミノ酸系の甘味料である APMと同様の結果であった。DUの回収率については, 時間の経過とともに回収率は上昇したが, 塩化ナトリウム濃度の違いによる差は少なく, むしろ塩化ナトリウム無添加のときの方が回収率がやや高い傾向を示した。AK 及び SA の場合は, 前報と全く同様であり, 塩化ナト

リウム濃度が上昇するに従い回収率も上昇し、10%のときに最大となった。しかし、それ以上濃度を上げてこれら回収率の上昇はほとんど認められなかった。塩化ナトリウム濃度が10%の場合、AK、SA及びDUにおける24時間の透析による回収率はそれぞれ91%、82%及び75%、48時間の透析による回収率は、それぞれ97%、87%及び82%であった。

ソース、漬物、ゼリー、清涼飲料及びジャムについては、透析内液中の塩化ナトリウムがいずれの濃度でも、24時間の透析による5種の甘味料の回収率はすべて95%以上であった。

以上の結果から、透析内液の塩化ナトリウム濃度は10%が最適であると判断した。また、透析時間は、ビスケット等の穀物加工品及びさきいか等の魚介乾燥品については48時間、その他の食品では24時間とした。

2. クリーンアップ条件

透析外液を直接HPLCに注入して分析する方法において、清涼飲料水の場合は測定が可能であったが、調味料、固形食品等の場合は夾雑ピークが出現して測定が困難なものがあつた。そこで、透析外液のクリーンアップにC18カートリッジを用いる方法について検討した。

DUはC18カートリッジの固定層への分配率が大きいことで、また、酸性物質であるAK及びSAについてはTBAとのイオンペアとすることで、固定層に保持させることができた。一方、APMとALは両性物質であるため、C18カートリッジに対する保持に試料溶液のpHの影響が大きいものと考えられた。そこでカートリッジに充てん量1gのSep-Pak Vac C18を用い、5

種の甘味料のカートリッジへの保持に及ぼすpHの影響を調べた。試験には200 $\mu\text{g/g}$ の混合標準溶液5 mLに、0.1 mol/L TBA-Br溶液1 mL及びpH2~7の6段階に調整した0.1 mol/Lリン酸緩衝液を加えてそれぞれ全量を20 mLとしたものを用いた。これらの10 mLをとりSep-Pak Vac C18カートリッジに負荷したときの各甘味料の保持率をFig.3.に示した。その結果、AK、SA、AL及びDUについてはpH2~6において98%以上の保持率が得られた。一方、APMについてはpH2~5で95%以上の保持率であったが、pH6以上では保持率が低下した。従って、すべての甘味料を十分に保持させるために、試料溶液のpHを5以下に調整する必要があることがわかった。また、pH2より低い場合はAK及びSAのイオンペア形成に影響が出るものと考えられることから、カートリッジに負荷する際に試料溶液のpHを2~5に調整することが望ましいと考えられた。そこで、実際には食品により透析外液のpHが異なることを考慮して、透析外液にpH5.0の0.1 mol/Lリン酸緩衝液を加えたものをカートリッジに負荷することにした。

次に、Sep-Pak Vac C18カートリッジに保持させた甘味料の溶出条件について検討した。クリーンアップ効果を高めるため、洗浄には水30 mLの次にメタノール-水(1:9)混液5 mLを用いることにした。5種の甘味料を保持させたカートリッジをこの方法により洗浄したところ、カートリッジから5種の甘味料の溶出は認められなかった。また、水のみでの洗浄に比べて夾雑物の除去に大きな効果が認められた。

カートリッジからの溶出溶媒については、メタノール-水(45:55)混液を用いたとき 8 mL で 5種の甘味料の全量を溶出することができた。従って溶出溶媒量は 10 mLとした。

3. HPLC条件

先に守安らは AK, SA 及び APM の同時分析法^{11,12)}において、AK と SAは TPA とのイオンペアとして、APM は移動相の pH 調整によって C18カラムに保持させ、良好な結果を得ている。著者らも、この条件を参考に化学的性質の異なる 5 種の甘味料を逆相系カラムを用いて一斉分析する条件を検討した。

カラムには Inertsil ODS-2 を用い、移動相には 0.01 mol/L TPA-OH含有メタノール-水混液を用いて検討した。はじめに移動相のメタノールの比率が 5種の甘味料の相互分離と保持時間に及ぼす影響について検討した。pH4.0 に調整した移動相のメタノール-水の比率を 1:9から 4:6に変化させた場合、いずれの比率でもピークは AK, SA, APM, DU, ALの順に出現し、相互分離も比較的良好であった。しかし、これらの比率のうち、実際の食品に適用した場合、夾雑ピークの影響が少なく、かつ短時間で分析できるのは、メタノール-水の比率が 1:3のときであった。

また、この条件下において移動相の pHが 5種の甘味料の保持時間に及ぼす影響を Fig.4.に示した。AK, SA及び DUの保持時間は pH の影響をほとんど受けなかったが、APM及び ALは pHが低下すると保持時間が短くなり、pH3.0以下では DU と AL, SA と APM との分離が極めて悪くなった。また、pHが高くなると、特に AL の保持時間が極端に長くなる傾向がみられた。しかし、

pH を 3.5 に調整した場合には、5種の甘味料は 30 分以内に出現し、相互分離も良好であり、かつ試料由来の夾雑ピークの影響もほとんど受けなかった。そこで、移動相の pH を 3.5 に調整することとした。Fig. 5.に標準品及びビスケットを用いた場合の試験溶液のクロマトグラムを示した。5 種の甘味料を定量する上で、夾雑ピークの影響はなく、良好なクロマトグラムが得られた。検量線は 0.5~500 $\mu\text{g/mL}$ の間で直線性を示した。

4. 添加回収試験

あらかじめ 5 種の甘味料を含有していないことを確認したウスターソース、キュウリの酢漬け、たくあん漬け、ゼリー、りんごジュース、ブルーベリージャム及びビスケットを用いて添加回収試験を行った。液状食品はそのまま、固体食品は細切後、5 種の甘味料をそれぞれ 200 $\mu\text{g/g}$ になるよう添加し、混和して 6 時間放置後に本法に従って分析した。その結果を Table 1 に示した。ビスケット以外の 6 試料においては、5 種の甘味料の回収率は 93% 以上であり、良好な結果が得られた。一方、ビスケットの場合、AK, APM 及び AL の回収率は良好であったが、SA 及び DUの回収率はそれぞれ 80.0%, 77.3%とやや低い結果であった。分析精度についてはいずれの食品でも標準偏差(n=3)は 5% 以内であり、良好な結果が得られた。

また、本法における 5 種の甘味料の定量限界は、試料あたりいずれも 10 $\mu\text{g/g}$ であった。本分析法は、これらの甘味料の一斉分析法として使用できるものとする。

D. 結論

食品中の AK, SA, APM, AL及びDUの5種の合成甘味料をHPLCにより一斉に分析する方法を検討した。その結果 1.試験溶液は、透析により5種の甘味料を抽出したのち、TBA-Brを用いてAK及びSAをイオンペアとし、かつ試料溶液のpHを5前後に調整し、5種の甘味料の全てをSep-Pak Vac C18カートリッジに保持させてクリーンアップを行う。これによって食品中の夾雑物を大幅に除去することができる。

2. HPLC条件として、C18カラムを用い、またイオンペア試薬としてTPA-OHを用い、pH 3.5に調整した移動相を用いることにより5種の甘味料を30分以内に一斉に分析することができる。

3. 7種類の食品に5種の甘味料を添加したときの回収率はAK, APM及びALで90%以上、SA及びDUでは77%以上である。

4. 本法における定量限界は $10\mu\text{g/g}$ である。

以上のことが明らかになった。

文 献

- 1)健康産業新聞社：食品と開発,32(7),63~69(1997).
- 2)健康産業新聞社：食品と開発,32(8),59~65(1997).
- 3)香川輝彦：世界の食品添加物(改訂版),別冊フードケミカル-6,60~64(1994).
- 4)健康産業新聞社：食品と開発,30(5),62~64(1995).
- 5)Lawrence,J.F.,Charbonneau,C.F.: J.Assoc.Off.Anal. Chem. 71,934~937(1988).
- 6)Thompson,C.O.,Trenerry,V.C.,Kemery,B.:J.Chromatogr.A,694,507~514(1995).
- 7)守安貴子,中里光男,小林千種,菊地洋子,早野公美,田村行弘:食衛誌.37,91~96(1996).
- 8)守安貴子,斉藤和夫,中里光男,菊地洋子,藤沼賢司,二島太一郎:食衛誌.30,164~169(1989).
- 9)守安貴子,斉藤和夫,中里光男,石川ふさ子,藤沼賢司,二島太一郎:衛生化学 37,97~102(1991).

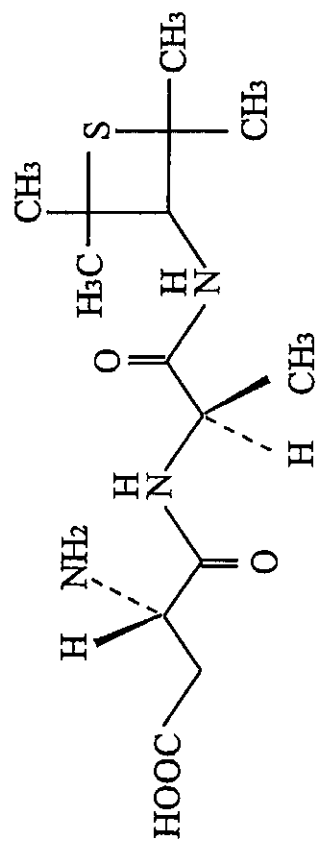


Fig. 1. Structure of Alitame

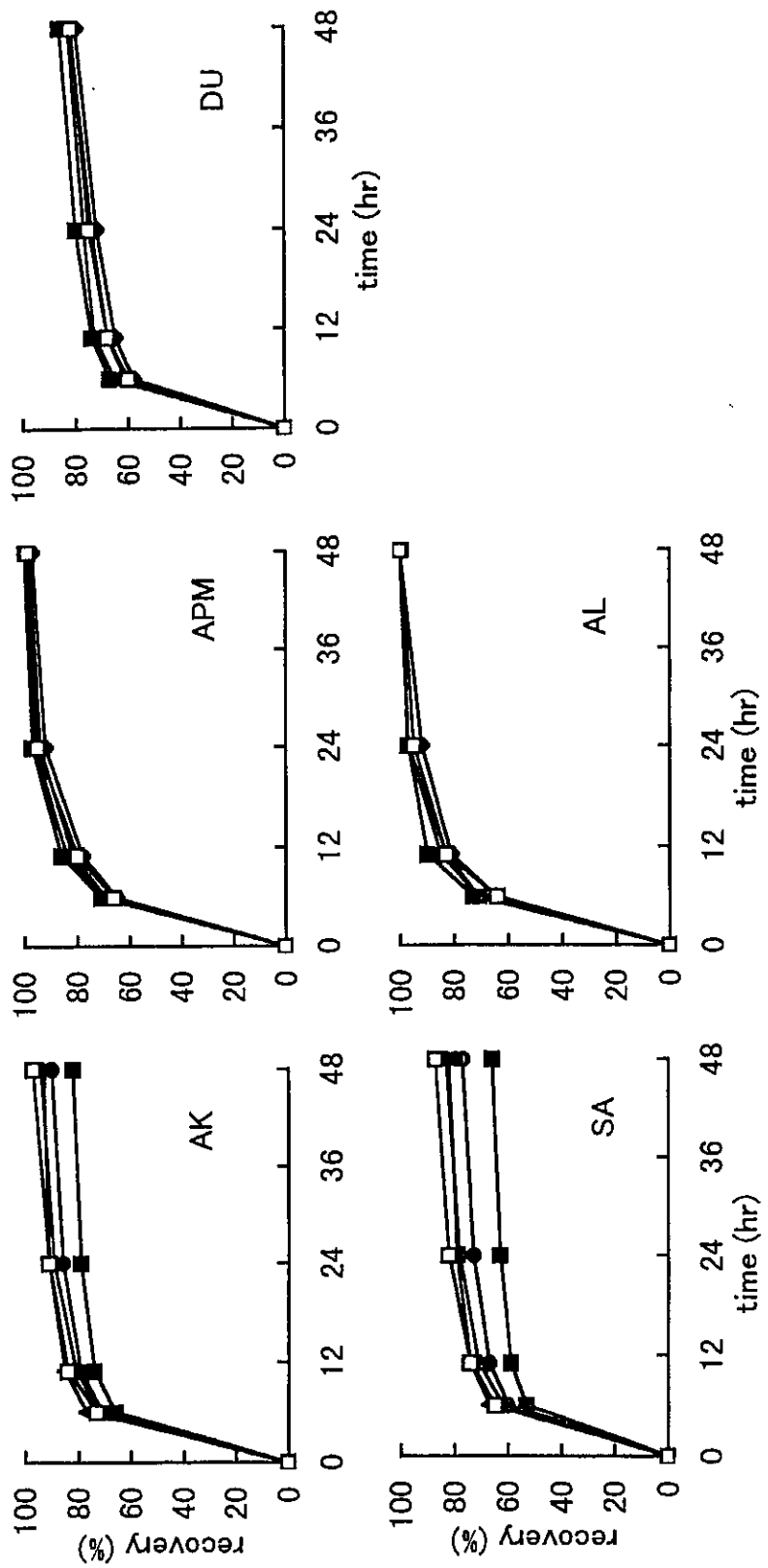


Fig. 2. Effect of concentration of NaCl in dialyzing solution on recoveries of the sweeteners

—■— 0% —●— 2.5% —▲— 5% —◆— 7.5% —□— 10%NaCl

The sample was biscuit added sweeteners.

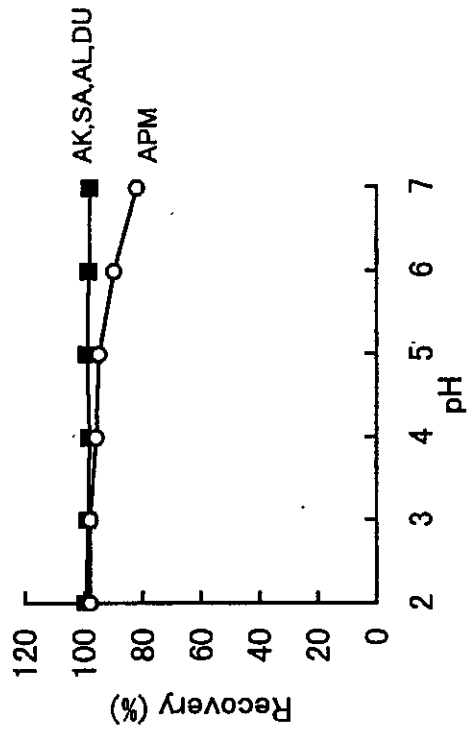


Fig.3. Effect of the pH of Sample Solution on Recovery from Sep-Pak Vac C18 Cartridge

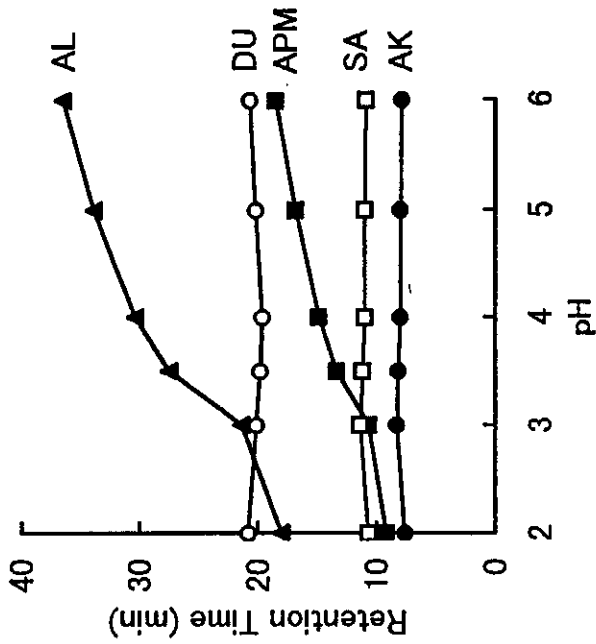


Fig.4. Effect of the pH of Mobile Phase on the Retention Time of the Sweeteners

HPLC conditions : column:Inertsil ODS-2(4.6mm i.d.x250mm)
 mobile phase:methanol-water(1:3) containing 0.01mol/LTPA-OH,
 flow rate:1.0mL/min ,detect:UV 210nm,column temp.:40°C

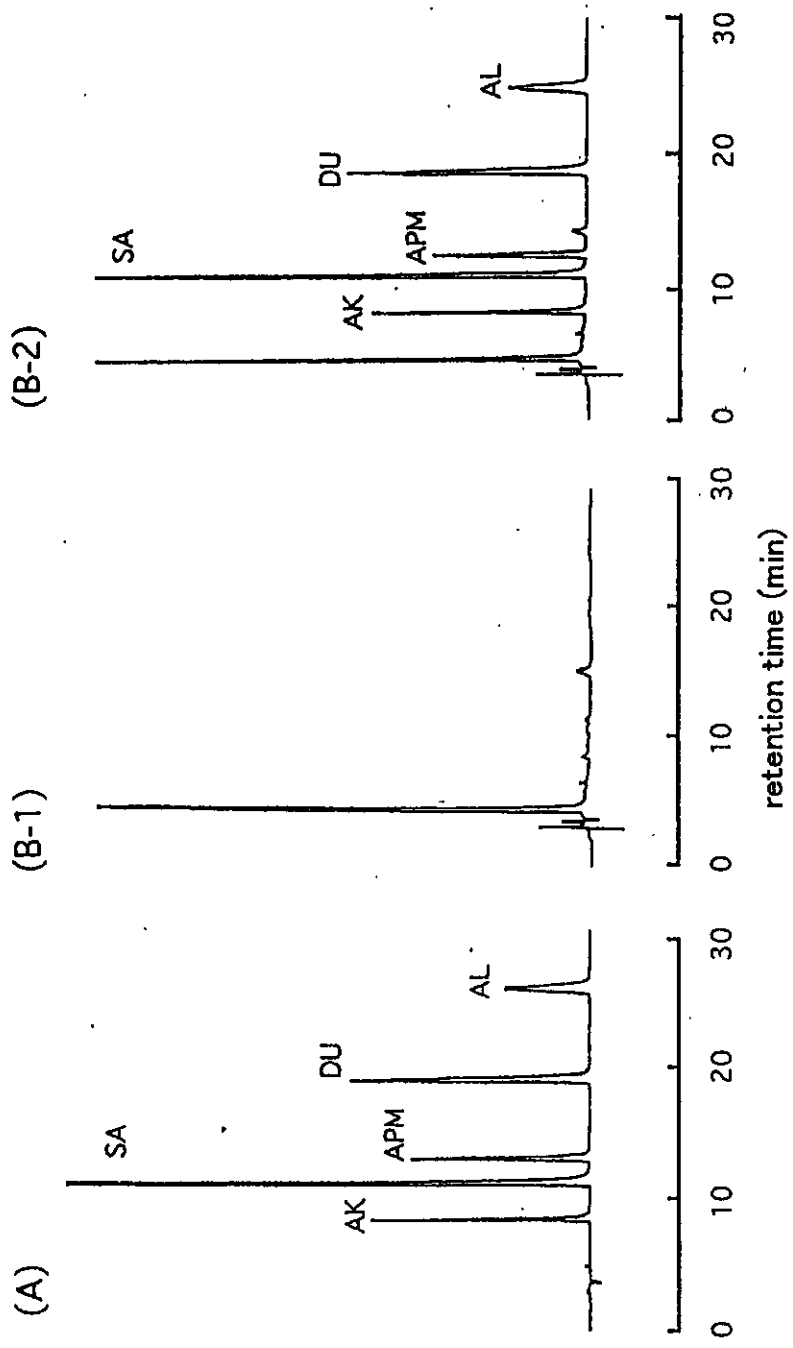


Fig. 5. HPLC Chromatograms of Sweeteners in Sample extracts

(A) Standard (B-1) Biscuit;control (B-2) Biscuit;Sweeteners added(200 µg/g)

HPLC conditions : column,Inertsil ODS-2(4.6mm i.d.x250mm);
 mobile phase,methanol-water(1:3) containing 0.01 mol/LTPA-OH(pH 3.5);
 flow rate,1.0mL/min ;detect:UV 210nm;column temp.,40°C

Table 1. Recoveries of Sweeteners from Foods

Sample	Dialyzing time (hr)	Recovery (%) [*]					
		AK	SA	APM	AL	DU	
Worcester sauce	24	102 ± 2.9	101 ± 0.5	97.4 ± 3.0	99.9 ± 1.4	100 ± 3.4	
Pickles with vinegar	24	99.7 ± 4.6	98 ± 2.0	96.0 ± 2.7	97.7 ± 3.2	96.7 ± 2.7	
Jelly	24	100 ± 0.8	98.4 ± 0.4	96.0 ± 2.0	95.6 ± 2.1	99.6 ± 2.4	
Apple juice	24	107 ± 2.4	101 ± 1.2	98.2 ± 2.0	98.7 ± 0.6	102 ± 2.2	
Takuan-zuke	24	101 ± 0.8	100 ± 0.6	98.9 ± 0.3	93.7 ± 0.5	102 ± 0.5	
Blueberry jam	24	95.6 ± 4.2	102 ± 1.3	96.7 ± 0.5	94.7 ± 1.2	99.9 ± 3.4	
Biscuit	48	91.2 ± 2.1	80.0 ± 1.9	97.0 ± 2.1	99.2 ± 2.1	77.3 ± 0.9	

* mean ± SD (n=3) ; added 200 μg/g