

短報

食品中のサイクラミン酸分析法の比較と改良

山田利治, 土屋久世

Comparison and Improvement of Cyclamic Acid Analysis in Foods

Toshiharu YAMADA and Hisayo TSUCHIYA

はじめに

サイクラミン酸は我が国で1969年に禁止されて以来、食品への使用が認められていない。しかし、中国をはじめ台湾、ヨーロッパ諸国では使用を許可されており、サイクラミン酸使用食品が輸入される可能性が高い。当県では毎年輸入加工食品の指定外添加物の行政検査を実施しているが、平成12年には中国産の穀物加工食品からサイクラミン酸0.53g/kgを検出している。

食品中のサイクラミン酸の主な分析法としては衛生試験法・注解¹⁾(以下、衛試法と略)と第2版食品中の食品添加物分析法²⁾(以下、食添法と略)の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた方法がある。当所は1997年4月の食品衛生検査施設の業務管理(GLP)制度導入以後、サイクラミン酸の標準操作手順書(SOP)として衛試法を使用してきた。しかし、検査の信頼性確保のために行う精度管理を実施する際に、回収率の低い食品が見受けられるようになり、その原因を明らかにするために検討を行った。さらに、食添法についても若干検討を加えたので報告する。

実験方法

1. 試料 輸入食品および国内産食品

2. 試薬および標準溶液 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)は和光純薬製特級品を、アセトニトリル、メタノールは和光純薬製HPLC用を、次亜塩素酸ナトリウム溶液は和光純薬製化学用(有効塩素5.0%以上)を、その他はすべて和光純薬製特級品を使用した。

標準原液: サイクラミン酸ナトリウム112.3mgを正確

に量り、水を加えて溶解し正確に100mL(サイクラミン酸として1000 μ g/mL)とした。

標準溶液: 標準原液10mLをとり、水を加えて正確に100mL(サイクラミン酸として100 μ g/mL)とした。

検量線: 標準溶液0, 1, 2, 10, 20及び50mLを各々正確にとり、水を加えて各々正確に100mL(0, 1, 2, 10, 20及び50 μ g/mL)とし、それぞれ10mLをとり反応操作した後、それらの20 μ LをHPLCに注入し、検量線を作成した。

3. 固相抽出カートリッジ

メガボンドエルートC18(2g/12cc), バリアン社製

4. HPLC装置及び測定条件

装置: HITACHI L-6000型ポンプ, L-4200UV-VIS検出器, L-5030カラムオープン, D-2520クロマトデータ処理装置及びレオダイン社製7175インジェクター

カラム: Inertsil ODS-3V(粒径5 μ m, 4.6mm i.d.×250mm)ジールサイエンス社製, カラム温度: 40℃, 移動相: メタノール・水(85:15), 流速: 1.0mL/min, 検出波長: 314nm, 注入量: 20 μ L

5. 試験法

二つの試験法の概略はフローチャートとして以下に示した。

① 衛試法

試料20g

透析チューブに入れ, 透析補助液25mL
透析外液(透析補助液)

全量200mL

24~48h室温, 透析
透析外液25mL

0.1mol/L TBA溶液5mL
リン酸塩緩衝液20mL

C18カートリッジに負荷

水30mLで洗浄

アセトニトリル・水(3:7)混液10mLで溶出
溶出液(分液ロート)

50%硫酸2mL

n-ヘキサン5mL

次亜塩素酸ナトリウム溶液(2倍希釈)1mL
1分間振とう

n-ヘキサン層

5%炭酸水素ナトリウム25mL

1分間振とう

n-ヘキサン層

HPLCに注入

② 食添法

試料 10g
 | 水 30～40mL
 | 水浴上で15分間加温
 水で全量 100mL
 | 遠心分離あるいはろ過
 抽出液 10mL (分液ロート)
 | 50%硫酸 2mL
 | n-ヘキサン 5mL
 | 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (2倍希釈) 1mL
 | 1分間振とう
 n-ヘキサン層
 | 5%炭酸水素ナトリウム 25mL
 | 1分間振とう
 n-ヘキサン層
 |
 HPLCに注入

結果および考察

① 衛試法の検討

厚生省通知 (平成9年4月1日 衛食第117号) の「精度管理の一般ガイドライン」に従って、輸入食品のぶどうジュース 20g にサイクラミン酸 800 μ g を添加し (40 μ g/g), 操作法に従って回収率を求めたところ、平均値 55.7%, 標準偏差 6.1 (n=5) と低い回収率であった。

透析操作をしないで同様に回収率を求めたところ、平均値 55.9%, 標準偏差 4.3 (n=5) とほぼ同様の回収率を示した。精製用溶液を C18 カートリッジに負荷した時の溶出液、水 30ml 洗浄溶液の何れにも反応生成物は溶出されなかった。また、C18 カートリッジを使用しないで反応操作のみを行ったときは、ほぼ 100% の回収率であった。これらの結果から、原因は C18 カートリッジにあることが示唆された。

そこで、ロットの異なるカートリッジを用い、水 5g にサイクラミン酸 100 μ g を添加した溶液 (20 μ g/g) を C18 カートリッジに負荷し、操作を行い反応させて回収率を比較した。表 1 に示したように明らかにロット間に差のあることがわかった。

なお、Lot 070733 を用いてあらためてぶどうジュースへ添加した試験では、平均値 86.4%, 標準偏差 4.2 (n=5) と水に添加したときとほぼ同じ回収率であった。

従って、C18 カートリッジを使用するときは必ずロットごとにバリデーションをとってから使用することが望ましい。

② 食添法の検討

抽出操作が簡便なため、共存物質の多いことが予想さ

表 1 C18 カートリッジのロット差によるサイクラミン酸の回収率

	(%)	
No	Lot 072012	Lot 070733
1	62.0	86.5
2	64.5	82.5
3	64.0	89.5
平均	63.5	86.2
標準偏差	1.3	3.5

れ、反応操作のところでいろいろな妨害が考えられるので各種の食品について添加回収試験を行った。

ソフトさきいかとしば漬けを除いた食品が、反応操作の 1 分間振とう後にエマルジョンを形成した。n-ヘキサン層と水層を分離させるため、フタ付き遠沈管を用い冷却遠心分離 (5℃, 3000rpm, 5min) を行い分離したところ、回収率はぶどうジュース 106.0%, いちごジャム 104.0%, ビスケット 114.5%, プルーン 119.0% など 100% を越える値となり、n-ヘキサンの揮散によることが推定された。そこで、遠心分離操作に替わる方法として、エタノールを使用してエマルジョンを消失させる方法を検討した。エマルジョンの程度に応じてエタノールを 0.5～1.5mL 加えることにより、n-ヘキサン層との分離が容易になった。エタノール自体は水層に移行し、n-ヘキサン層の反応生成物の回収率に影響を与えなかった。

この方法を使用して、回収率を求めた結果を表 2 に示した。また、これらの食品において HPLC のクロマト上に妨害となるピークはみられず良好な結果が得られた。

表 2 各種食品からのサイクラミン酸の回収率

食品名	添加量 (μ g/g)	回収率 (%) *
ぶどうジュース	100	98.9 \pm 1.7
いちごジャム	100	95.8 \pm 2.2
ビスケット	100	99.5 \pm 0.9
プルーン	100	87.8 \pm 3.3
チョコレート	100	98.5 \pm 2.1
ソフトさきいか	100	97.5 \pm 1.8
しば漬け	100	92.5 \pm 1.6
乾燥梅	100	99.3 \pm 1.5
しょう油	100	92.2 \pm 2.4

* 平均値 \pm S.D. (n=3)

まとめ

1. 衛試法は C18 カートリッジの保持力がロット間によって異なるため、使用するときは必ずバリデーションをとったものを使用することが望まれる。

2. 食添法は操作が簡便であるが、反応操作のところでエマルジョンを形成する食品が多いため、エタノールを使ってエマルジョンを消失させ、分離させる方法が有効であることがわかり、良好な回収率が得られた。

3. 回収率，操作時間，経済性等の点から食添法は衛試法に比べ，サイクラミン酸のSOPとして有利と考えられる。

(平成15年8月14日受理)

文 献

- 1) 日本薬学会編,衛生試験法・注解, 金原出版, 323-326 (2000)
- 2) 日本食品衛生協会編, 第2版食品中の食品添加物分析法, 362-365 (2000)