

## ジルコニアカーボンカラムを用いたHPLCによる食品中 サッカリンナトリウム定量法の検討

井上 智 宮本紫織 小笠原光憲 大瀬戸光明 井上博雄

### A Study on Determination of Sodium Saccharin in Foods by HPLC with Zirconia Carbon Column

Satoshi INOUE, Shiori MIYAMOTO, Mitsunori OGASAWARA  
Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUE

An analytical method for the determination of Sodium Saccharin (SA) in foods has been developed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with zirconia carbon column.

As the temperature of column rose, the capacity factor decreased. Reciprocal of absolute temperature increased in proportion to logarithm of capacity factor. SA was able to be clearly separated with 1% phosphate acid-tetrahydrofuran (9:1) as the mobile phase. Within the range from 0.1 to 100mg/L, all peaks areas were proportional and correlation coefficient showed 1.000 in linear regression analysis.

Dialysis with 0.1mol/L hydrochloric acid containing 1% Sodium Lauryl Sulfate was possible to prevent SA from declining recovery resulting from protein binding in samples.

The recoveries of SA spiked to a kind of commercially available foods, such as syrup, soy sauce, yogurt and biscuit, showed  $100 \pm 5\%$ , and each coefficient of variation was less than 3%, respectively.

**Keywords** : Sodium Saccharin, Foods, HPLC, Zirconia Carbon Column, Dialysis

#### はじめに

サッカリンナトリウム (SA) は我が国で使用が認められている代表的な人工甘味料であり、漬け物、シロップ等の食品に用いられ、0.1から2.0g/kgの範囲で食品の種類により使用量が定められている。その分析法は、前処理として透析法を用いた高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法が汎用されている。

HPLC法においては、SAが容易に解離しODSカラムに保持され難いため、イオンペア試薬を用いた方法<sup>1, 2)</sup> やシリカゲル・NH<sub>2</sub>カラムを用いた方法<sup>3~5)</sup> が採用されているが、イオンペア試薬を用いた方法では、機器が汚染されやすく維持管理に時間を必要とし、シリカゲル・NH<sub>2</sub>カラムを用いた方法では、使用に伴い官能基が脱落し保持時間の減少がみられる等の問題がある。

分離分析において、温度は化合物の拡散等に影響を与える重要な要因であるため、従来から、ガスクロマトグラフ法では、分析条件を最適化する上で慎重に検討されている。一方、HPLC法においても温度の保持時間に対

する影響等が報告されているが<sup>6)</sup>、一般的に使用されるシリカゲル担体のカラムは、高温になると分解し、50℃以上での使用が困難であり、温度による大きな効果が期待できないため、重要な検討要因とは取り扱われなかった。Antiaらは、HPLC法における温度の保持時間に対する影響を検討し、温度が、移動相の粘度と分析対象物の拡散率に影響を与えることを明らかにし、温度と移動相組成を適切に選択することにより、選択性と分離性の改善の可能性を示唆した<sup>7)</sup>。また、カラム温度を上昇させることにより、使用溶媒量の低減化が可能であり、環境調和性に優れた効果が期待できる。

ジルコニア担体は、ジルコニウムジオキサイドから構成されており、耐熱性、耐酸性及び耐塩基性に優れているため、高温での使用が可能である。今回は、ジルコニアカラムのうち、高極性化合物の分離に有用なジルコニアカーボンカラムを用い、シリカゲル担体カラムの代用としての可能性を検討した。

透析法においては、透析補助液に精製水等を用い長時間透析した場合、微生物の繁殖が認められ、分析値に影響を及ぼすため、一般的に0.1mol/L塩酸溶液が用いられ

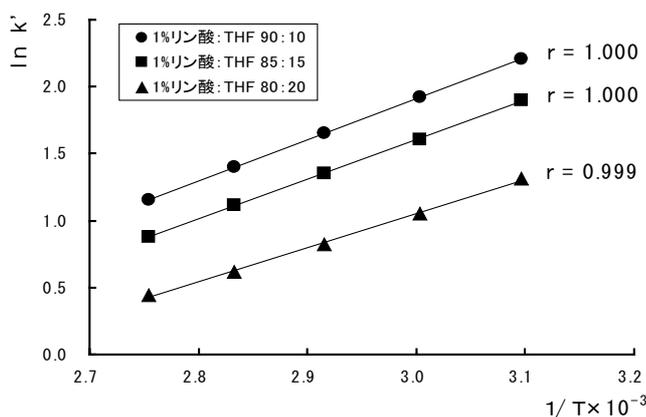


図1 移動相中溶媒組成の変化に伴うカラム温度と容量比(k')の関係 (SA濃度 2.5mg/L)

ている<sup>1,4,5)</sup>。一方、食品中にタンパク質が含まれている場合、解離したサッカリンと結合し、回収率が低下するため、水酸化ナトリウム溶液を用いるよう定められており<sup>1,4)</sup>、食品の種類により透析補助液を使い分ける必要がある。このため、全ての食品に適用可能な汎用性の高い透析補助液の開発を検討した。

## 材料と方法

### 1 装置

高速液体クロマトグラフはLCモジュール1(Waters社)を、データ処理装置はD-2500(株日立製作所)を、カラム温度制御装置はTCM II (Waters社)を、カラム恒温槽はカラムヒーターモジュール(Waters社)を用いた。

### 2 HPLC条件

カラム:Discovery ZR-CARBON(5 μm,150mm×4.6mm i.d.) (SUPELCO社), 移動相:1%リン酸:テトラヒドロフラン(THF)(9:1), 流速:0.8mL/min, 検出波長:230nm, カラム温度:90℃, 注入量:20 μL

### 3 試薬

SAは和光純薬工業株式会社製試薬特級を、THFはナカライテスク株式会社製高速液体クロマトグラフ用試薬を、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)は和光純薬工業株式会社製生化学用を、透析膜はViskase Companies,Inc.製透析用セルロースチューブUC36-32-100を、その他の試薬はナカライテスク株式会社製試薬特級を使用した。

標準液は、SAを120℃で4時間乾燥したのち精秤し、精製水で100mg/100mLの標準原液を調製した。さらに、精製水で希釈し、標準液を調製した。

透析補助液は、SDS10gを0.1mol/L塩酸溶液で1Lとした。

### 4 実験操作

試料5gを透析用チューブに分取し、これに透析補助液15mLを加えよく混和したのち、チューブの端を密閉し、両端をナイロン糸で縛った。このチューブをあらか

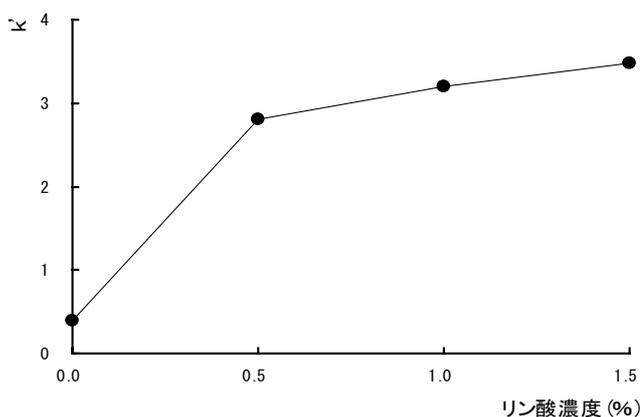


図2 リン酸濃度と容量比(k')の関係

(SA濃度 2.5mg/L)

じめ透析外液として精製水を入れたメスシリンダーに投入し、精製水を加えて200mLとしたのち、300mLのビーカーに移し、糸の両端を持ち、ときどきゆり動かしながら、室温で16~24時間放置して透析した。透析終了後、外液をよく振り混ぜ、メンブランフィルター(0.45 μm)でろ過し、試験溶液とした。

## 結果及び考察

### 1 HPLC条件の検討

シリカゲルを担体としたカラムによる分離においては、一般的に、溶媒組成、液性等により最適化が検討される。一方、今回使用したジルコニアカラムは、物理的及び化学的強度に優れているため、温度による最適化が可能である。そこで、カラム温度、移動相の溶媒組成及びリン酸濃度の最適条件を検討した。

#### (1) カラム温度及び溶媒組成の保持に対する影響

カラム温度及び移動相の溶媒組成の分離に対する影響を検討するため、移動相である1%リン酸:THFの比を90:10, 85:15, 80:20の3段階とし、それぞれの組成でカラム温度を50, 60, 70, 80, 90℃と変化させたときの容量比を測定した。その結果を図1に示した。なお、横軸はカラムの絶対温度の逆数とし、縦軸は容量比の自然対数とした。また、カラム通過時間( $t_0$ )は1mg/L硝酸イオンを注入し測定した。

カラム温度の上昇に伴い容量比は減少し、カラムの絶対温度の逆数と容量比の自然対数は、3溶媒組成全てで、相関係数0.999以上の良好な直線関係を示した。また、移動相中のTHFの増加に伴い、容量比が減少した。以上のことから、SAの保持には、溶媒組成同様、温度も重要な要因であることが明らかとなった。今回は、使用溶媒量を低減し、1試料当たりの測定時間を極力短時間とするため、カラム温度90℃、1%リン酸:THFの比を90:10とすることにした。

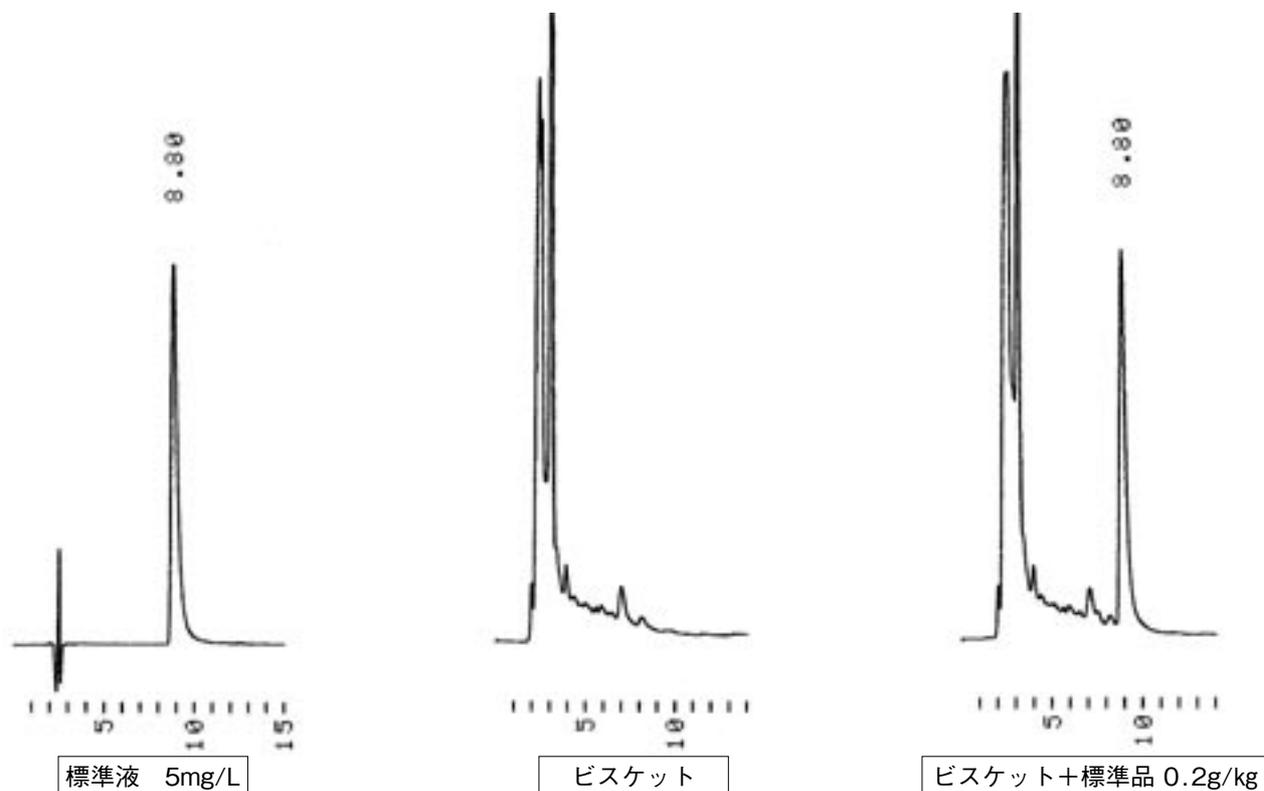


図3 標準液, 実試料(ビスケット)及び標準品添加実試料(ビスケット)のクロマトグラム

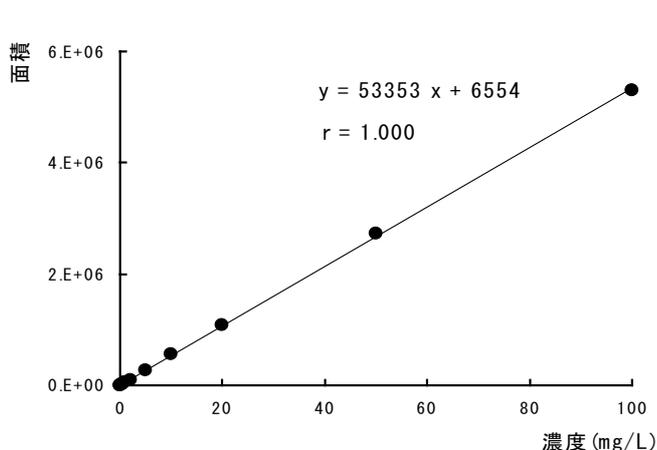


図4 検量線

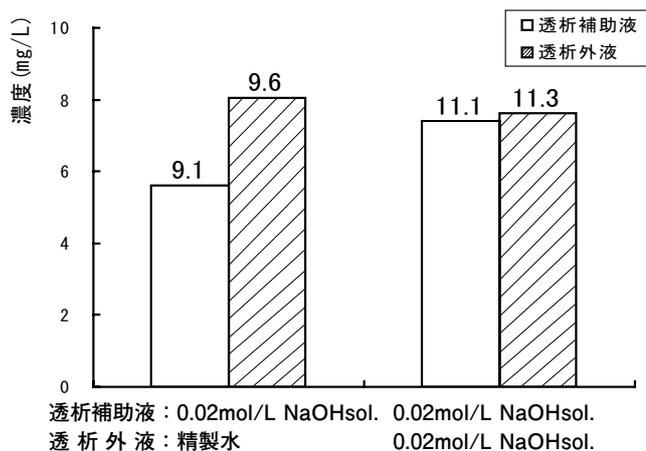


図5 透析液の透析平衡に及ぼす影響  
(試料: シロップ 10g, SA濃度: 0.15g/kg, グラフ上の数値はpH値)

(2) リン酸濃度の保持に対する影響

ODSカラムによる酸性化合物の分析では, 化合物のイオン化を抑制するため, 移動相のpHを低下する方法が, 一般的に用いられている. ジルコニアカーボンカラムにおいても分析対象物のイオン化状態が影響を及ぼすか検討するため, 移動相中のリン酸濃度を変化させ, 容量比を測定した. その結果を図2に示した.

リン酸を添加しない精製水では, 容量比が0.4であり, ほとんどカラムに保持されなかったが, 0.5%では2.8と急激に上昇し, それ以上では比較的緩やかに上昇した. 以上のことから, ジルコニアカーボンカラムにおいてもODSカラム同様, 化合物のイオン化状態が保持に影響

を与えることが明らかとなった. 今回は, 保持比の上昇率が比較的緩やかとなったリン酸濃度1%とすることにした. この条件で得られた標準液のクロマトグラムを図3に示した.

(3) 検量線

SAとして0.1mg/Lから100mg/Lの範囲で検量線を作成した. その結果を図4に示した. 相関係数は1.000であり, 良好な直線関係を示した. また, 0.1から1.0mg/L, 1.0から10.0mg/L, 10.0から100.0mg/Lの範囲で回帰分析を行ったところ全ての範囲で相関係数は1.000であり, 全濃度範囲で良好な直線性を示した.

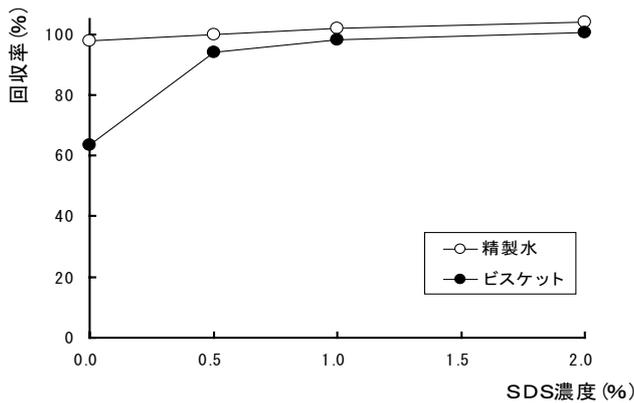


図6 SDS濃度と回収率の関係  
(添加濃度：0.1g/kg)

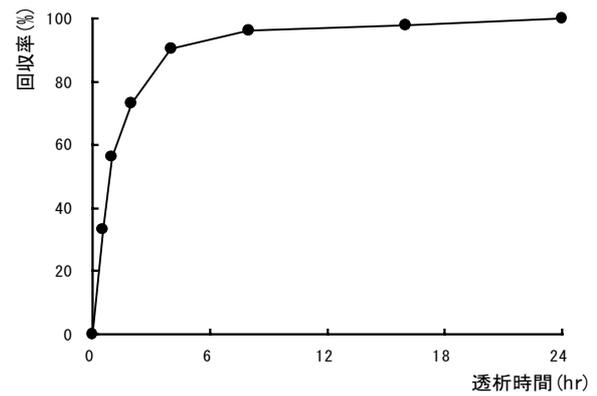


図8 透析時間と回収率の関係  
(添加濃度：0.1g/kg)

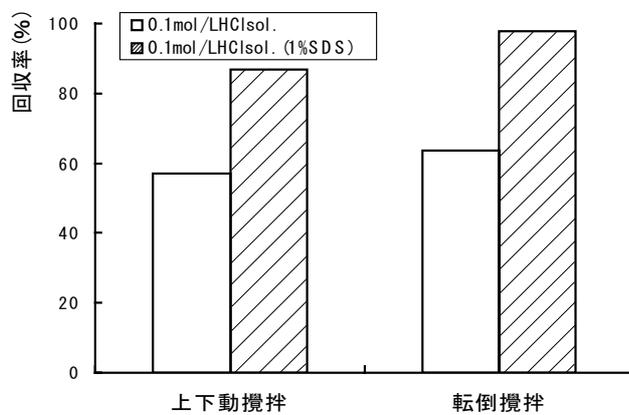


図7 攪拌方法の透析平衡に及ぼす影響  
(試料：ビスケット，添加濃度：0.1g/kg)

表1 実試料での添加回収実験結果

| 試料名   | 添加量 (g/kg) | 回収率 (%) | 変動係数 (%) |
|-------|------------|---------|----------|
| シロップ  | 0.02       | 97.1    | 2.1      |
|       | 0.20       | 99.2    | 0.5      |
|       | 2.00       | 101.1   | 0.9      |
| しょう油  | 0.02       | 95.6    | 2.4      |
|       | 0.20       | 97.8    | 0.2      |
|       | 2.00       | 100.9   | 0.4      |
| ヨーグルト | 0.02       | 97.2    | 1.9      |
|       | 0.20       | 97.1    | 0.5      |
|       | 2.00       | 98.7    | 0.4      |
| ビスケット | 0.02       | 96.3    | 1.5      |
|       | 0.20       | 95.3    | 0.7      |
|       | 2.00       | 97.2    | 1.6      |

(n=5)

## 2 透析法の検討

### (1) 水酸化ナトリウム溶液を透析補助液とした場合の透析平衡への影響

タンパク質を含有する試料は、0.1mol/L塩酸溶液を透析補助液に使用した場合、回収率が低下するため、透析補助液として水酸化ナトリウム溶液を用いることにより、良好な結果が得られる旨報告されているが<sup>1, 4)</sup>、その他の試料での影響は十分検討されていない。このため、タンパク質を含有しない試料での影響を確認するため、シロップを検討試料とし、透析補助液及び外液のSA濃度及びpHを測定した。その結果を図5に示した。

外液を0.02mol/L水酸化ナトリウム溶液とした場合は、pH及び濃度とも差が見られなかったが、精製水の場合は、pH及び濃度とも外液が高く、良好な平衡状態に達していなかった。以上のことから、0.02mol/L水酸化ナトリウム溶液を透析補助液とし、外液に精製水を使用した場合、試料により透析平衡が保たれず定量値に影響を及ぼす可能性があり、注意が必要であることが明らかとなった。

### (2) 汎用性の高い透析補助液の検討

守安らによると、タンパク質を含有する試料での回収率の低下の原因は、透析時、酸性条件下では、タンパク質の塩基性基がイオン化し、低分子陰イオンであるSAと結合し、透析膜を通過できなくなり、透析率が低下するためである旨報告されている<sup>5)</sup>。このため、HPLCのイオンペア試薬として汎用されるSDSを用いたタンパク質の塩基性基のマスキング効果を検討した。なお、検討試料は、タンパク質含量の多いビスケット及び対照として精製水を用いた。その結果を図6に示した。回収率は、精製水では、SDS濃度に関わらず、ほぼ100%と一定の値を示した。一方、ビスケットでは、SDS無添加では約64%と回収率の低下がみられたが、0.5%では94%、1%以上ではほぼ100%と良好なマスキング効果を示した。以上のことからSDSのタンパク質に対するマスキング剤としての有用性が明らかとなり、濃度は、回収率がほぼ一定となった1%とすることにした。

### (3) 攪拌方法の透析平衡に及ぼす影響

透析において分子やイオンを速やかに移動させるため

には、攪拌をよくすることが必要である<sup>8)</sup>。このため、メスシリンダー内での上下動攪拌による攪拌方法とビーカー内での転倒攪拌による差を検討した。なお、透析補助液は、0.1mol/L塩酸溶液にSDSを1%となるように添加したもの及び無添加のものとした。その結果を図7に示した。0.1mol/L塩酸溶液での回収率は、SAがタンパク質と結合しているため、上下動攪拌では約57%、転倒攪拌では約64%と両方法の間に大きな差は見られなかった。一方、1% SDSを含有する透析補助液では、上下動攪拌では約87%、転倒攪拌では約100%であった。これは、試料が固体のため、上下動攪拌では、透析用チューブ内の溶液と試料が十分に混合されずSAの移動が速やかに行われませんが、攪拌を十分にすることによりSAの移動が促進されたためと考えられる。以上のことから、透析中の攪拌は、ビーカー内で転倒攪拌することにした。この条件で得られた、SAを含有していないビスケットを測定したクロマトグラム及びこれに標準品を0.2g/kgとなるよう添加し測定したクロマトグラムを図3に示した。

#### (4) 透析時間の透析平衡に及ぼす影響

透析平衡に達するまでの透析時間を確認するため、0.1mg/mL標準液5gを試料とし、透析時間30分、1、2、4、8、16、24時間後に、実験操作に従いそれぞれの透析外液のSA濃度を測定した。その結果を図8に示した。開始から4時間までは透析が急激に進み、8時間後にほぼ平衡に達し、それ以後はほぼ一定となった。収去試験においては、多数の試料を同時に分析する必要があり、前処理に時間を要するので、透析時間は16~24時間とすることにした。

### 3 添加回収実験

本法の実試料への適用と再現性を検討するため、SAの使用が認められている代表的な食品であるシロップ、しょう油、ヨーグルト、ビスケットの4食品に標準品を添加し回収率を測定した。このうちヨーグルト、ビスケットの2食品は、タンパク質を含有しているため、透析補助液に0.01mol/L塩酸溶液を使用した場合は、回収率の低下が報告されている<sup>5)</sup>。なお、添加量は、0.02、0.20、2.00g/kgの3段階とした。その結果を表1に示した。回収率は、最低がビスケットの添加量0.2g/kg時の95.3%であり、最大はシロップの添加量2g/kg時の101.1%であった。全て95~102%の範囲内であり、タンパク質を含有する試料でも回収率の低下が見られず良好な結果を示した。

また、変動係数は、最大でもしょう油の添加量0.02g/kg時の2.4%であり全試料で良好な結果を示した。以上のことより、今回開発した方法が、実試料においても広範囲な濃度で精度及び再現性よく適用できることが明らかとなった。

### まとめ

- 1 ジルコニアカーボンカラムを用い、カラム温度のSA保持に対する影響を検討したところ、カラム温度の上昇に伴い容量比は減少し、カラム温度の絶対温度の逆数と容量比の自然対数は良好な直線関係を示した。
- 2 ジルコニアカーボンカラムと1%リン酸:THF混液移動相(9:1)を用いることにより、SAを良好に分離することが可能であり、検量線は、0.1~100mg/Lの範囲で直線性を示した(相関係数1.000)。
- 3 透析補助液に0.02mol/L水酸化ナトリウム溶液を用いた場合、外液を精製水とすると、シロップでは良好な透析結果を得られず、定量値が高くなった。
- 4 透析時、透析補助液に1%SDS含有0.1mol/L塩酸溶液を用い、転倒攪拌することによりタンパク質の妨害除去が可能であり、試料による透析補助液の変更は不要であった。
- 5 シロップ、しょう油、ヨーグルト及びビスケットの4種類の市販食品に標準品を添加し、今回開発した方法により定量したところ、回収率は100±5%の範囲内であり、変動係数も3%未満と良好な結果を示した。

### 文 献

- 1) 厚生労働省：食品衛生検査指針 食品添加物編2003, 233-239, 社団法人日本食品衛生協会 (2003)
- 2) 守安貴子ほか：衛生化学, 37, 97-102 (1991)
- 3) 日本薬学会：衛生試験法・注解2000, 314-315, 金原出版株式会社 (2000)
- 4) 矢野元章ほか：衛生化学, 38, 196-201 (1992)
- 5) 守安貴子ほか：食衛誌, 37, 91-96 (1996)
- 6) Snyder, I. R.: J. Chromatogr., 179, 167-172 (1979)
- 7) Antia, F. D. et al.: J. Chromatogr., 435, 1-15 (1988)
- 8) 阿南功一ほか：抽出・分離・精製 基礎生化学実験法2, 98-105, 丸善株式会社 (1974)