

サイクラミン酸検査法の問題点の検討及び今年度納入予定の分析装置の選定について

東部厚生環境事務所・保健所福山支所

○中廣 賢太, 万徳 淳

1 はじめに

サイクラミン酸は、1937年にアメリカの Michael Sveda により発見された砂糖の 30 倍から 50 倍の甘さをもつ人工甘味料である。日本においても“チクロ”の名称で使用されていたが、FDA により発癌性や催奇形性の疑いが指摘され、日本やアメリカは 1969 年に食品添加物の指定を取り消し、使用が禁止された。しかし、EU 諸国、中国及び台湾等では現在使用が認められているため、輸入食品回収事件の原因等となっている。平成 15 年に厚生労働省より試験法が通知され（以下、施行通知法という）¹⁾、広島県においても、指定外添加物として標準作業書（抽出操作の異なる 2 方法：通知法及び衛生試験法）を作成し、検査が開始された。

サイクラミン酸の分析法は、強酸性溶液中で塩素と反応させ、N,N-ジクロロシクロヘキシルアミン（以下、DCHA という）に変換し、高速液体クロマトグラフィーにより波長 314nm で測定する方法である。そして、標準作業書の最下限検量線用標準液濃度（n-ヘキサン中の濃度）は通知法 1 µg/ml、衛生試験法 2 µg/ml である。しかし、当所のフォトダイオードアレイ検出器（以下、PDA という）付き高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLC という）では、定量下限値に相当する DCHA 濃度 2 µg/ml の測定において管理基準である S/N 比 10 を取れない状況である。そこで、DCHA の吸収極大は波長 210 nm 及び 314 nm 付近に在ることから、数種のカラムを使用し、波長 210 nm 及び 314 nm での検出限界値（S/N 比 10/3）と定量下限値（S/N 比 10）を求め、標準作業書の最下限検量線用標準液の適合性について検証した。

DCHA の最大吸収極大は波長 210 nm 付近に在り、高感度な測定を行うことができる。しかしながら、この測定波長において DCHA ピーク中に夾雑物が混入していることが判明した。この夾雑物の定量における影響についても検討したので報告する。

また、平成 24 年度機器購入予定の参考資料とするため、機器メーカー 4 社の新機種超高压対応 HPLC（以下、UPLC という）により求めた DCHA 1 µg/ml の S/N 比及び平成 22 年に通知された「食品添加物分析法」²⁾ の改正で定められた数項目の最下限検量線用標準液の S/N 比を現有の HPLC で検討したので併せて報告する。

2 実験方法

(1) 試薬

サイクラミン酸ナトリウム：特級（和光純薬）

硫酸溶液：硫酸（特級：和光純薬）10 ml を水 10 ml に注意しながら加える。

硫酸（1+1）：（和光純薬）

アセトニトリル：HPLC用（キシダ化学）

メタノール：HPLC用（Honeywell）

炭酸水素ナトリウム：和光純薬（特級：Lot.STR3712, Lot.LAH0050），関東化学（特級：Lot.310U1444），MERCK（特級：Lot.K42495129 126），ナカライテスク（特級：Lot.MIN2892，分子生物学研究用：Lot.VIK6516），東京化成（一般有機合成用：Lot.VNXWE）

次亜塩素酸ナトリウム試液：次亜塩素酸ナトリウム溶液（化学用（和光純薬））を水で2倍に希釈する。

パラオキシ安息香酸エステル（5項目）：特級（東京理化）

その他はすべて特級（和光純薬）を使用した。

サイクラミン酸標準液：サイクラミン酸ナトリウム 112.3 mg を正確に量り，水を加えて溶かし正確に 100 ml とする（サイクラミン酸として 1000 µg/ml）。

(2) 装置及び測定条件

測定装置：PDA 検出器（日本分光 MD-2015 型）付き HPLC System（日本分光）

ア サイクラミン酸測定条件

カラム：ZORBAX SB-C18（粒径 5 µm，4.6 mm i.d.×150 mm，Agilent），

Crestpak C18T-5（粒径 5 µm，4.6 mm i.d.×250 mm，日本分光），

STR ODS-2（粒径 5 µm，4.6 mm i.d.×150 mm，信和化工），

Inertsil ODS-3（粒径 5 µm，4.6 mm i.d.×150 mm，GL Sciences）

移動相：アセトニトリル・水（7:3）混液，流速：1.0 ml/min

カラム温度：40℃，注入量：10 µl，20 µl，測定波長：210 nm，314 nm

イ 安息香酸，ソルビン酸及びパラオキシ安息香酸エステル類測定条件

カラム：STR ODS-2（粒径 5 µm，4.6 mm i.d.×150 mm，信和化工）

移動相：①安息香酸及びソルビン酸：メタノール・アセトニトリル・5 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）（1:2:7）

②パラオキシ安息香酸エステル類：メタノール・5 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）（6:4）

流速：1.0 ml/min，カラム温度：40℃，注入量：20 µl，測定波長：230 nm，260 nm

(3) 試験方法

試験溶液 10 ml に硫酸溶液 2 ml 及び n-ヘキサン 5 ml を加えた後，次亜塩素酸ナトリウム試液 1 ml を加えて 1 分間振とうした。水層を除去後，n-ヘキサン層に 5% 炭酸水素ナ

トリウム (和光純薬 : Lot.STR3712) 溶液 25 ml を加え, 1分間振とうした。水層を除去した後のn-ヘキサン層をHPLCにより測定した。

(4) 算出方法 (S/N比)

S/N 比は、分析対象物のピーク (S) 及びベースラインノイズ (N) の高さから算出した。定量下限値は S/N=10, 検出限界値は S/N=10/3 とした。

3 結果および考察

(1) 検出限界値及び定量下限値の確認

サイクラミン酸標準液濃度 1000 µg/ml 及び水を試験方法に従い操作し, DCHA 溶液 (2000 µg/ml) 及び試薬 Blank 溶液を作成した。DCHA 溶液を試薬 Blank 溶液で希釈し, 1, 2, 4, 6, 8, 10 及び 12 µg/ml に調製した標準液と ODS 系カラム 4 種類を用いて, 当所の HPLC における検出限界値 (S/N 比 10/3) 及び定量下限値 (S/N 比 10) を求めた。

ア 測定波長 314 nm による検討

S/N 比 10/3 に相当する検出限界値は 1.7~2.7 µg/ml (注入量 10 µl), 1.0~1.6 µg/ml (注入量 20 µl), S/N 比 10 に相当する定量下限値は 5.3~8.1 µg/ml (注入量 10 µl), 3.7~5.6 µg/ml (注入量 20 µl) と求められた (表 1, 図 1)。4 種類のカラムでは STR ODS-2 カラムが最も性能が良く, 定量下限値は 5.3 µg/ml (注入量 10 µl), 3.7 µg/ml (注入量 20 µl) であった。従って, 当所の HPLC では衛生試験法の最下限検量線用標準液 2 µg/ml に必要な感度が十分取れていないことが明らかとなった。更に, カラム間で定量下限値に約 1.5 倍差が生じることも明らかとなった。標準作業書の定量下限値を設定する場合には, カラムの劣化による性能等を考慮にいれる必要があると思われる。

イ 測定波長 210 nm による検討

DCHA は, 波長 210 nm 付近に最大吸収極大を有し, 高感度の測定が可能である。そこで, 波長 314 nm で十分な感度が得られないため, 波長 210 nm における検出限

表1 4種類のカラムにおける検出限界値及び定量下限値の濃度 (µg/ml)

カラム	注入量 10 µl		注入量 20 µl	
	検出限界値	定量下限値	検出限界値	定量下限値
	S/N = 10/3	S/N = 10	S/N = 10/3	S/N = 10
314 nm				
ZORBAX SB-C18	1.77	6.03	1.56	4.69
Crestpak C18T-5	2.71	8.06	1.53	5.62
STR ODS-2	1.69	5.34	1.00	3.73
Inertsil ODS-3	2.53	7.79	1.00	4.42
210 nm				
ZORBAX SB-C18	<0.100	0.792	<0.100	0.189
Crestpak C18T-5	0.338	1.41	0.102	1.05
STR ODS-2	0.558	1.02	<0.100	0.425
Inertsil ODS-3	0.736	1.19	0.198	0.728

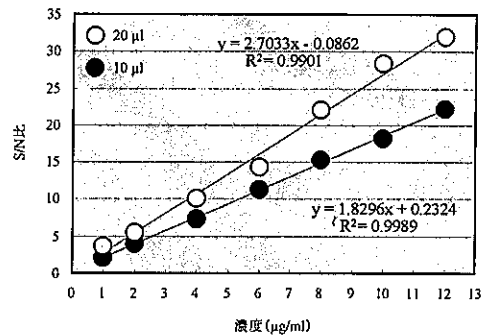


図1 STR ODS-2で測定したS/N比の検量線 (314nm)

界値及び定量下限値を検討した。その結果、定量下限値は 0.79~1.4 $\mu\text{g/ml}$ (注入量 10 μl)、0.19~1.1 $\mu\text{g/ml}$ (注入量 20 μl) と求められた。波長 314 nm に比べ、数倍高感度で測定され、波長 210 nm 及び注入量 20 μl であれば、通知法の最下限検量線用標準液 1 $\mu\text{g/ml}$ も十分測定することが可能であることが確認された。しかしながら、図 2 に示すように試薬 Blank 溶液から DCHA ピークと重なる夾雑物ピークが見受けられ、波長 210 nm による信頼性のある定量が困難であることが判明した。

更に、夾雑物が DCHA ピークに対してどの程度影響するのかを求めた。注入量 10 μl のときに夾雑物ピークの面積は約 1900 であった。同様に DCHA 1 $\mu\text{g/ml}$ を測定した場合、夾雑物ピークを分離できていない状態でピーク面積が 8200 であることから、DCHA 1 $\mu\text{g/ml}$ の測定で得られた結果の約 23 % を夾雑物が占めることになる。

(2) 夾雑物についての検討

夾雑物の原因を特定するため、変換過程で使用する硫酸溶液、次亜塩素酸ナトリウム試液、5%炭酸水素ナトリウム溶液について下記の 5 種類の試料液を作成し、検討した。

①試料 1：水 10 ml に硫酸溶液 2 ml、ヘキサン 5 ml 及び次亜塩素酸ナトリウム試液 1 ml を加えた後、ヘキサン層に 5%炭酸水素ナトリウム溶液 25 ml を加えた。

②試料 2：ヘキサン 5 ml に 5%炭酸水素ナトリウム溶液 25 ml を加えて振とうした。

③試料 3：ヘキサン 5 ml に硫酸(1+1) 2 ml を加えて振とうした。

④試料 4：ヘキサン 5 ml に硫酸溶液 2 ml を加えて振とうした。

⑤試料 5：ヘキサン 5 ml に次亜塩素酸ナトリウム試液 1 ml を加えて振とうした。

検討の結果、試料 1 と同様の夾雑物ピークが 5%炭酸水素ナトリウム溶液を用いた試料 2 で確認された (図 3)。よって、夾雑物の原因は、炭酸水素ナトリウム溶液であることが確認された。

次に、炭酸水素ナトリウムの Lot. 及びメーカーについて夾雑物ピークの比較検討を行った。その結果、和光純薬の炭酸水素ナトリウムに含まれる夾雑物は、Lot. (STR3712, LAH0050) 間での違いは見られないが、他社の試薬に比べると明らかに高濃度に含ま

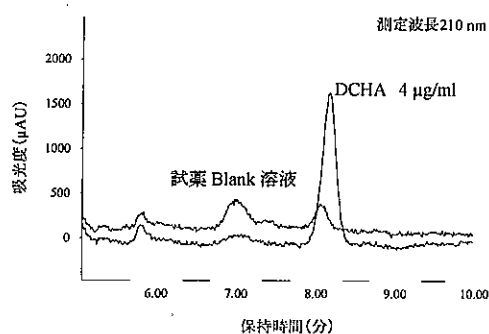


図2 DCHA標準液及び試薬Blank溶液のクロマトグラム

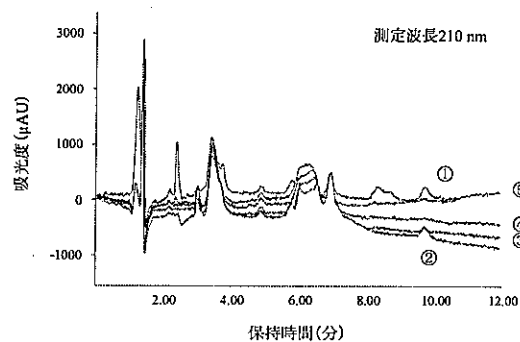


図3 5種類の試料に含まれる夾雑物のクロマトグラム

れていた。更に、他社の試薬にも DCHA 1 µg/ml のピーク面積に 10%前後影響する夾雑物が含まれていることも判明した。このことから、波長 210 nm で測定する場合、炭酸水素ナトリウム溶液に含まれる夾雑物を把握するとともに、各検体に使用する炭酸水素ナトリウム溶液の量を一定（正確）にする必要がある。また、標準作業書の作成においても使用する試薬に夾雑物が含まれているかどうか事前に検討する必要がある。

(3) 次年度新規導入分析装置の選定について

「食品添加物分析法」²⁾の改正により定められた安息香酸、ソルビン酸及びパラオキシ安息香酸エステル（5項目）の最下限検量線用標準液が、当所の HPLC で S/N 比 10 を超える十分な感度が取れるか検討した。測定の結果は、表 2 のとおりであり、サイクラミン酸の検討でのカラム間差を考慮すると十分な感度が取れたのはソルビン酸（0.1 µg/ml, 260 nm）S/N=35.4 のみであった。従って、現有機器での安息香酸やパラオキシ安息香酸エステルの標準作業書の改定は、十分な検討が必要である。

次に、4社の PDA 検出器付き UPLC により、ODS 系カラム、波長 314 nm、カラム温度 40°C、注入量 10 µl、移動相アセトニトリル・水（7:3）、流速 1.0 ml/min の同一条件設定で、DCHA 1 µg/ml の感度確認（S/N 比）を依頼した。その報告結果（S/N 比）を表 3 に示す。カラム間差を考慮した場合、2社の装置が十分にサイクラミン酸検査法に使用できる装置と思われる。

4 まとめ及び機器導入に対する提案

これらの検討から、サイクラミン酸の検査には夾雑物に影響されない波長 314 nm で測定する必要がある。また、現有機器で施行通知法の定量下限値 0.005 g/kg に対応するには、濃縮等の操作やガスクロマトグラフ質量分析装置等など定量下限値 S/N 比が 10 以上取れる方法での標準作業書の改正が早急に必要である。

「食品添加物分析法」²⁾の改正でみられるように微量化がますます求められるようになっていくことから、高感度かつ有害性溶媒の少量化によるエコ（環境への負荷が少ない）で経費削減（試薬費の削減）ができる PDA 検出器付き UPLC が、新規更新機器選定の条件として望ましいと考えられる。

本発表にあたり多大な御協力をして頂きました Agilent、日本分光、島津製作所、Waters 及び和光純薬の皆様方に深く感謝いたします。

5 関連法規

- 1) サイクラミン酸に係わる試験方法について（H15.8.29 食安監発第 0829009 号）
- 2) 「食品中の食品添加物分析法」の改正について（H22.5.28 食安基発 0528 第 3 号）

表2 安息香酸, ソルビン酸及びパラオキシ安息香酸エステル類のS/N比 (n=3)

化学物質	濃度 (µg/ml)*	平均値
<i>230 nm</i>		
安息香酸	0.1	11.0
ソルビン酸	0.1	12.7
パラオキシ安息香酸エチル	0.05	4.93
パラオキシ安息香酸イソプロピル	0.05	3.65
パラオキシ安息香酸プロピル	0.05	2.78
パラオキシ安息香酸イソブチル	0.05	2.42
パラオキシ安息香酸ブチル	0.05	2.43
<i>260 nm</i>		
ソルビン酸	0.1	35.4
パラオキシ安息香酸エチル	0.05	11.8
パラオキシ安息香酸イソプロピル	0.05	8.15
パラオキシ安息香酸プロピル	0.05	8.31
パラオキシ安息香酸イソブチル	0.05	5.50
パラオキシ安息香酸ブチル	0.05	5.49

*「食品中の食品添加物分析法(平成22年通知)」の最下限検量線用標準液

表3 機器メーカー4社のUPLCで測定した DCHA 1 µg/ml の S/N比

メーカー	A社	B社	C社	D社
S/N比	87.3	8.0	13.1	21.3