

食品中の甘味料の実態について(第2報)

Study on Use of Sweeteners in Daily foods (2)

氏家 あけみ 森 香織 安永 恵 石川 順子 西岡 千鶴
Akemi UJIKE Kaori MORI Megumi YASUNAGA Junko ISHIKAWA Chizuru NISHIOKA

要 旨

平成 21 年～22 年にかけて収去した検体について、甘味料であるステビア、甘草等について含有量を調査した。ステビアは主成分であるステビオシド (Stv)、レバウジオシド A (RebA) について、甘草はグリチルリチン酸 (GA) について測定した。ステビア、甘草は併用使用が多いため、同時に分析出来る方法を検討したが、発酵食品を使用した佃煮などにおいては妨害があり、正確な分析が困難であった。そこで精製方法等を検討したところ、良好な結果が得られた。Stv は 0.003～0.41g/kg、RebA は 0.003～0.31g/kg、GA は 0.003～0.21g/kg の範囲で検出され、実態が明らかになった。

また、あらゆる加工食品に対応できるように「食品添加物摂取量調査」用の試料を使って分析方法を検討したところ、粘性の高い試料は GA の回収率が悪く、Stv、RebA のピーク妨害を除ききれない試料も出てきたが、抽出や精製の方法、測定機器の検討を実施した結果、おおむね良好な回収率を得た。

キーワード： ステビア 甘草 ステビオシド レバウジオシド A グリチルリチン酸

I はじめに

近年食生活の変化に伴い甘味料の使用実態は大きく変化してきている。前報¹⁾で報告したが、サッカリンナトリウムなどの人工甘味料はほとんど使用実態がなく、かわって天然甘味料であるステビアや甘草が多く使用されるようになってきている。しかしこれらの天然甘味料は、既存添加物に記載されており表示義務はあるが、使用基準がないため使用実態は把握できていない。またステビアについては 2008 年に ADI が設定され、今後さらに摂取量等を把握し、安全性を検討すべきである。そこで今回ステビア、甘草の使用実態を把握するため平成 21 年～22 年に収去した食品 223 検体について含有量を調査した。ステビアと甘草は併用使用が多いため両者が同時に分析できる方法により実施したが、妨害が多いため抽出方法、精製方法や測定機器について検討を行った。その結果若干の知見を得たので報告する。

表 1 試料群及び食品の分類

群名	食品の種類
1群	調味嗜好飲料
2群	穀類
3群	いも類、豆類、種実類
4群	魚介類、肉類、卵類
5群	油脂類、乳類
6群	砂糖類、菓子類
7群	果実類、野菜類、海藻類
8群	特定保健用食品

II 方法

1 試料

- (1) 東讃保健所及び小豆保健所において収去した、食品添加物検査用試料計 223 検体 (平成 21 年度 121 件、平成 22 年度 102 件)
- (2) 平成 22 年度「食品添加物摂取量調査」用試料
表 1 に示したように 1 群～8 群、8 検体

2 試薬

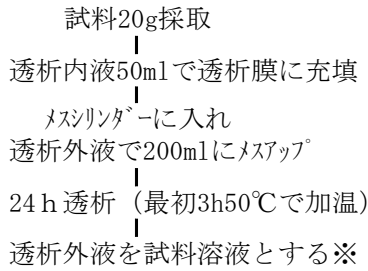
- (1) Stv, RebA, GA 各標準液 : Stv (純度 99%, 和光純薬工業(株)製, ステビオシド定量用), RebA (純度 98.3%, 和光純薬工業(株)製, ステビオシド定量用) GA (純度 90%, 和光純薬工業(株)製, 食品添加物試験用) おおの 100mg を精密にはかり、適宜希釈して使用した。
- (2) 透析内液 : 塩化ナトリウムを 10% 溶解した 0.2mol/L トリス-塩酸緩衝液 (pH9.0)
- (3) 透析外液 : 0.02mol/L トリス-塩酸緩衝液 (pH9.0)
- (4) 抽出溶媒 : 0.02mol/L トリス-塩酸緩衝液 (pH9.0) - メタノール (2:8)

3 分析方法

- (1) ステビア、甘草の分析方法には、東京都健康安全研究センターの坂牧らの「HPLC を用いた食品中 Stv,

RebA, GA の分析—斉分析の方法²⁾ で実施した。これらの概略を図1に示した。

透析法



抽出法

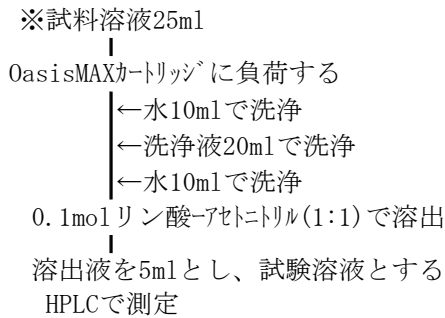
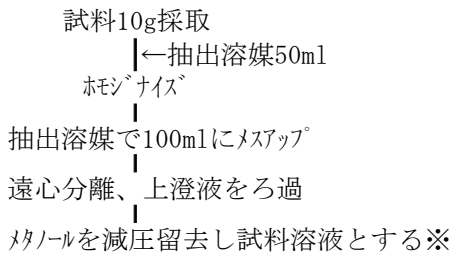


図1 ステビア, 甘草の—斉分析方法

(2) 妨害物の除去方法は東京都健康安全研究センターの都築らの「HPLCによる発酵食品中のステビア抽出物の分析」³⁾により実施した。その概略を図2に示した。

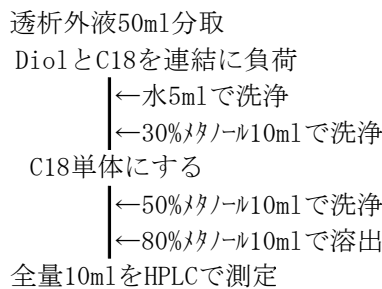


図2 発酵食品中の Stv, RebA, GA の分析方法

4 装置及び測定条件

(1) 高速液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製

LC-10Advp フォトダイオードアレイ検出器

カラム：Develosil RPAQUEOUS-AR-5

(4.6mmi. d. x250mm 野村化学(株)製)

移動相：20mmol/L リン酸-アセトニトリル-メタノール(90:55:5)

流速：1.0ml/min

カラム温度：40°C

注入量：20 µl

検出波長：210nm(Stv, RebA), 254nm(GA)

(2) LC/MS/MS：Waters 社製 UPLC ACQUITY TQD

カラム：ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm2.1×100mm

移動相：A液0.2%ギ酸(in 水) B液アセトニトリル

流量：0.3ml/min

グラジエント条件：

分	A液 (%)	B液 (%)
0:00	100	0
2:00	100	0
5:00	20	80
10:00	20	80
10:10	100	0

MS 条件：

ESI(-)	プリカーサー イオン	プロダクト イオン	チューン(V)	コリジョン (V)
Stv	803.03	641.22	98	46
Reb	821.03	351.08	72	32
GA	965.03	803.16	40	30

III 結果及び考察

1 県内で流通している食品について

合成甘味料の検査結果は前報¹⁾で報告した。今回、表示で多く見られた天然甘味料であるステビア、甘草の含有量について、実態を調査した。検体の内訳としては、図3に示したように佃煮が最も多く、漬物、魚介乾製品、魚肉練製品、ジャム等であった。表2に示したように Stv, RebA については63検体から、GAについては59検体から検出した。食品別では漬物は Stv0.005~0.41g/kg, RebA0.004~0.19g/kg, GA0.033~0.12g/kg, 佃煮は Stv0.007~0.14g/kg, RebA0.009~0.21g/kg, GA0.003~0.20g/kg, 魚介乾製品は Stv0.010~0.23g/kg RebA0.003~0.24g/kg, GA0.004~0.21g/kg, 魚肉練り製品は Stv0.011~0.015g/kg, RebA0.004~0.005g/kg の範囲で

検出した。魚肉練製品中のGAは検出しなかった。以上、漬物、佃煮、魚介乾製品については、概ね類似した含有量であったが、魚肉練り製品については甘味料が検体に練りこまれているせいか抽出率が悪く、結果として含有量が低くなったのではないかと思われた。今後の検討課題であると考えられる。

次に、Stv, GAの併用についてみてみると表2に示したように漬物は4件、佃煮は20件、魚介乾製品14件、魚肉練り製品は4件あり、かなり併用率が高いことが分かる。これは両者に塩なれ効果があり、併用することにより相乗的に効果が増強され、優れた甘味質が得られるためであると思われる。

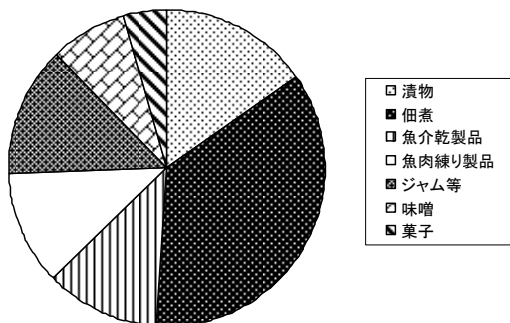


図3 収去食品 223 検体の内訳

表2 収去食品別ステビア、甘草の検出件数内訳及び併用数

	ステビア	甘草	併用
漬物	9	6	4
佃煮	26	32	20
魚介乾製品	18	15	14
魚肉練り製品	9	4	4
ジャム	0	0	0
味噌	0	1	0
菓子	1	1	1
計	63	59	43

(件)

2 妨害物の除去方法について

一斉分析法²⁾で実施した場合、佃煮などの発酵食品である醤油を使った検体の場合、図4の上段に示したようにStvとRebAのRT(6分~7分)付近に妨害がみられ、正確な測定が出来ない。特に表示のない検体ではピークの有無確認をするのが困難であった。そこでまずカラム、

流量、移動相等の測定条件について検討を行った。カラムについては東ソー(株)のTSK-GEL NH2-100(3)、SUPELCOのSUPELCO SIL™LC-NH2などのNH2カラムを検討した。また移動相についてはアセトニトリル:0.1%リン酸の割合を8:2から5:5に変化させてみた。

流速については0.2ml/min~0.7ml/minの変化を測定した。以上、カラム、移動相、流速を各々検討した結果、NH2カラムを用いることにより、GAはRT8分付近に、Stv, RebAは12分、20分付近に検出した。又Stv, RebAについては妨害は消失したが、GA付近に妨害がでるため、やはり正確な測定が困難であった。そこで測定条件は変えずに、発酵食品の妨害を除くため東京都健康安全研究センターの方法³⁾により精製を試みた。その結果、図4の下段に示したように妨害物質を除くことができ、表3に示したように良好な結果を得ることができた。

しかし、この精製方法ではStv, RebAのみの検出となり、GAは検出できないため、洗浄段階で洗い流されると推測された。そこで、各洗浄段階で5mlずつ計15mlを分取し、GAの動向を調べてみた。結果、図5に示したように30%メタノールと50%メタノールの洗浄部分で100%溶出されることが判明した。

以上、精製方法をまとめると、GA測定用に30%メタノール及び50%メタノール洗浄液を検体とし、Stv, RebA用に80%メタノール溶出液を検体として、HPLCで測定することにより妨害がなく同時分析が可能であることがわかった。

表3 佃煮の妨害除去処理前後の検出値

佃煮検体	Stv (g/kg)		RebA (g/kg)	
	処理前	処理後	処理前	処理後
A	0.0073	0.0044	0.034	0.0027
B	0.012	0.0097	0.030	0.0058
C	0.0093	0.014	0.011	0.014
D	0.014	0.0078	0.023	0.0071
E	0.020	0.015	0.31	0.017
F	0.063	0.069	0.079	0.041
G	妨害	0.021	妨害	0.022
H	妨害	0.028	妨害	0.029
I	妨害	0.068	妨害	0.10

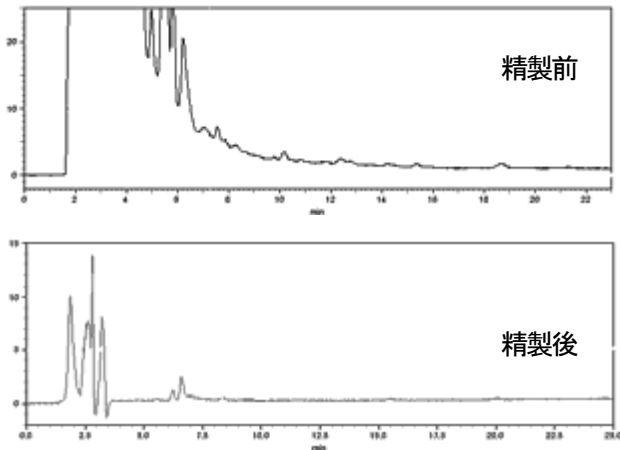


図4 佃煮試料のクロマトグラム

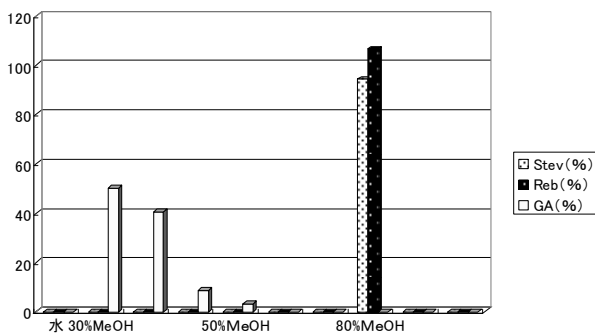


図5 Stv, RebA, GA の溶出状況

3 加工食品中のステビア、甘草の分析方法について

今回の収去検体は佃煮や魚介乾製品等であり偏っているため、あらゆる検体に対応できるように、「食品添加物摂取量調査」用試料を用い検討することとした。この試料は表1に示したように、さまざまな加工食品の混合物である。1群から8群の各試料に100 μ gを添加し、n=3で添加回収率を求め、その結果を表4に示した。

GAについては1, 3, 5, 7群は75%以上の良好な回収率が得られたが、2, 4, 6, 8群については、44.5%~58.2%の回収率にとどまった。回収率の悪かった2, 4, 6, 8群はいずれも粘性が高く、透析されたGAが時間の経過とともに再吸着されることにより回収率が低くなったと考えられた。そこでこれら回収率の低かった2, 4, 6, 8群については抽出法により実施した。その結果回収率は2群については65.0%、4群は83.8%、6群は63.4%、8群は95.3%と良好な結果が得られた。

Stv, RebAについては図6に示したように3群, 5群について、RT6~7のピーク付近に妨害があり、測定が困難であった。そこでLC/MS/MSにより測定を試みた。その結果、図7に示したように妨害を除くことが出来、表5に示したように良好な回収率を得ることが出来た。

表4 群別のStv, RebA, GAの回収率

	Stv	RebA	GA
1群	93.07	94.24	83.56
2群	99.89	79.99	44.53
3群	妨害	妨害	75.09
4群	88.58	75.54	54.37
5群	妨害	妨害	81.81
6群	97.43	78.55	46.94
7群	89.74	80.11	77.42
8群	91.72	81.47	58.22

(%)n=3

表5 LC/MS/MSによる回収率

	LC		LC/MS/MS	
	Stv	Reb	Stv	Reb
3群	妨害	妨害	90.08	92.50
5群	妨害	妨害	87.08	85.42

(%)n=3

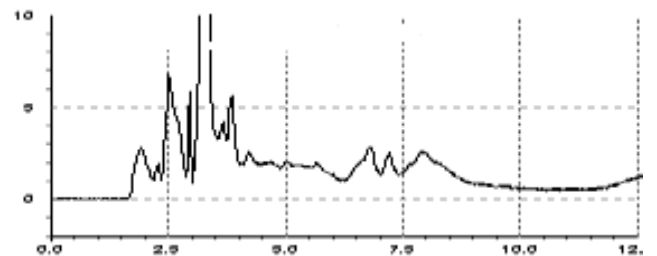
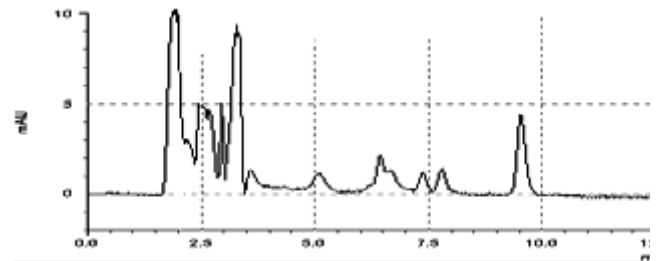


図6 3群(いも, 豆, 種実)(上)及び5群(油脂, 乳)(下)のクロマトグラム

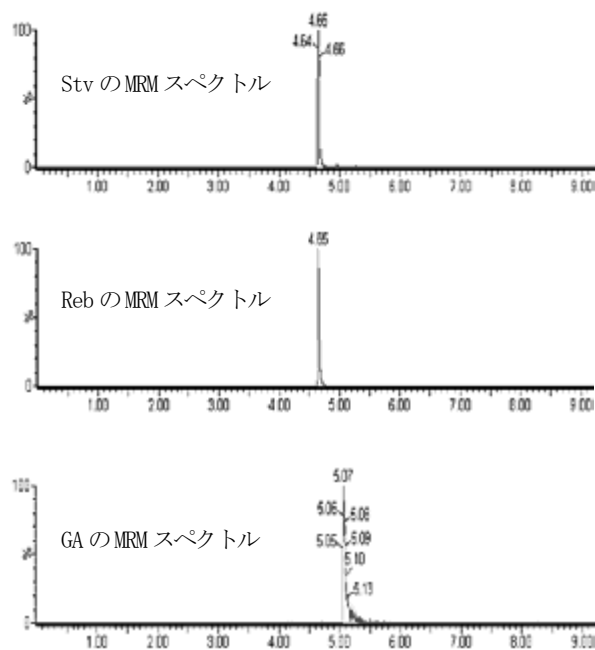


図7 GA, Stv, RebAのLC/MS/MSスペクトル

IV まとめ

平成22年～23年に収去した佃煮、漬物、魚介乾製品、魚肉練り製品等223検体について、Stv, RebA, GAの一斉分析を実施した。その結果、漬物についてはStv0.005～0.41g/kg, RebAA0.004～0.19g/kg, GA0.033～0.12g/kg, 佃煮についてはStv0.007～0.14g/kg, RebA0.009～0.21g/kg, GA0.003～0.20g/kg 魚介乾製品についてはStv0.010～0.23g/kg RebA0.003～0.24g/kg, GA0.004～0.21g/kg, 魚肉練り製品については、Stv0.011～0.015g/kg, RebA0.004～0.005g/kgの値が得られた。しかし、発酵食品を使用した佃煮の場合、Stv, RebA付近の

妨害により正確な測定が出来なかった。そこで精製方法を検討した結果、妨害を除くことが出来、良好な結果を得ることが出来た。また同時に30%、50%メタノール洗浄液を分取し測定することにより、GAについても同時測定が可能であることが分かった。

また、すべての検体の分析に対応するため、「食品添加物摂取量調査」用試料（1群～8群）8検体を使って添加回収を実施した。その結果GAについて回収率の低い2, 4, 6, 8群については、抽出法を採用することで良好な結果を得ることができた。Stv, RebAについて精製が困難であった3, 5群は、LC/MS/MSにより測定することにより、良好な回収率を得ることができた。これらの検討結果を今後のステビア、甘草の実態の把握等の検査に応用していきたい。

文献

- 1) 氏家あけみ, 安永恵, 石川順子, 西岡千鶴: 香川県に流通している食品中の甘味料の実態について, 香川県環境研究センター所報, 91-94(2010)
- 2) 坂牧成恵, 松本ひろ子, 荻野賀世, 中里光男, 安田和男: HPLCを用いた食品中のステビオシド, レバウジオシドAおよびグリチルリチン酸の一斉分析, 食品衛生学雑誌, 45(2), 81-86(2004)
- 3) 都築さやか, 上田豊甫ら: HPLCによる発酵食品中のステビア抽出物の分析, 日本薬学会第129年会, 26P-am128(2009)

Abstract

We examined the properties of stevia (a sweetener), licorice, etc., using samples taken from 2009 to 2010. The amounts of the two main ingredients of stevia - stevioside(Stv) and rebaudiosideA (RebA) – and of glycyrrhizic acid (GA) in licorice were measured. Since there are many combined uses of stevia and licorice, we considered an analysis method which tested both materials at the same time, but there were obstacles to this kind of analysis when looking at fermented foods, such as tsukudani, making an accurate analysis very difficult. Then, after examining purification methods, we obtained reliable results. From this, the situation became clear and we detected Stv in amounts ranging from 0.003 to 0.41g/kg, RebA in amounts of 0.003 to 0.31g/kg, and GA in amounts of 0.003 to 0.21g /kg.

Also, we examined an analysis method in which we would take into account processed foods by using samples from the “food additive intake investigation.” Although samples with high viscosity had poor GA collection results, and there were samples in which the complete removal of Stv and Reb was hindered, we obtained largely good collection results from our extraction, purification, and instrument measurement testing.