

高速液体クロマトグラフィーによる食品中のグリチルリチン酸の定量

宮本 文夫, 佐伯 政信

Determination of Glycyrrhizic Acid in Foods by High Performance Liquid Chromatography

Fumio MIYAMOTO and Masanobu SAEKI

Summary

A simple and rapid method for the determination of glycyrrhizic acid (GA) in foods by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed.

GA was extracted from the sample with 1% ammonium hydroxide solution. The extract was added ethyl acetate, and GA in the extract was re-extracted with ethyl acetate by the addition of 10% sulfuric acid. After the ethyl acetate layer was evaporated to dryness in *vacuo* at a temperature below 50°C, the residue was dissolved in a constant volume of methanol-1.5% acetic acid (69 : 31) mixture as test solution.

Saccharin and 9 preservatives were also recovered quantitatively by the pretreatment method for GA. Accordingly, it seemed that these food additives were able to determine by use of the same test solution.

GA in the test solution was determined by HPLC by use of the following conditions: column : Inertsil ODS-2 (4.6mm i. d. × 150mm), column temperature : 40°C, mobile phase: methanol-1.5% acetic acid (69 : 31), flow rate : 1.0ml/min, detection : 254nm. GA was clearly separated from saccharin, 9 preservatives and interfering peaks from food components by the above HPLC conditions. The recoveries of GA added to 10 kinds of foods at level of 100 μg/g were in the range of 82.4~104.5%. The detection limit of GA in food was 5 μg/g.

By this method, 4 commercial samples adding licorice were analyzed. GA was detected in the range of 57.5~189 μg/g in all samples.

I はじめに

グリチルリチン酸 (GA) の二ナトリウム塩は合成の甘味料としてしょうゆ及び味噌に限定して使用が許可されている。一方、GAは甘草の成分であることから、甘草抽出物や甘草末のような天然添加物として使用制限なしに種々の食品に使用されている。

食品中のGAの分析法としては一般にガスクロマトグラフィー (GC) が用いられている¹⁻³⁾が、加水分解や誘導体化等の煩雑な操作が必要であるため、近年GAを直接測定できる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いる分析法が開発、報告されている。⁴⁻¹¹⁾

GAのGCやHPLC分析における前処理には一般にポリアミドカラム法^{1-3,5-7,10,11)}が用いられているが、チョコレートやピーナッツバターなど食品種によっては目詰まりが起るため透析操作^{5,6)}やセライトによる吸引ろ過^{3,10)}等の処理を追加する必要がある。また、食品種によって60%程度の回収率しか得られない^{3,10)}ことがあり、回収率のバラツキが大きい欠点がある。藤沼ら⁹⁾によって報告された液-液分配抽出法は、操作がやや煩雑な点があるが、種々の食品における回収率は85%以上と良好である。

そこで、著者らはGAを液-液分配抽出法で前処理し、HPLCで定量する方法について、簡便迅速化を目的に検討改良を行った。また、同一の試験溶液におけるサッカリン (SA)、ならびにソルビン酸 (SOA)、安息香酸 (BA)、デヒドロ酢酸 (DHA)、パラオキシン安息香

酸エステル類 (PHBA-Es) 等の保存料類の定量の可能性についても併せて検討したので、それらの結果を報告する。

II 実験方法

1. 試料

グリチルリチン酸二ナトリウム及び甘草の添加表示のない市販のしょうゆ、味噌、ソース等の食品10種類、ならびに甘草の添加表示のある市販のたくあん及び昆布の佃煮を用いた。

2. 試薬及び試液

GA: 東京化成工業(株)製をメタノールで数回再結晶し精製して用いた。

SA, SOA, BA, DHA, パラオキシ安息香酸メチル (PHBA-Me), パラオキシ安息香酸エチル (PHBA-Et), パラオキシ安息香酸イソプロピル (PHBA-iso-Pr), パラオキシ安息香酸プロピル (PHBA-Pr), パラオキシ安息香酸イソブチル (PHBA-iso-Bu), パラオキシ安息香酸ブチル (PHBA-Bu): 東京化成工業(株)製, 特級品

GA標準溶液: GA 50mgを精秤し, 60%メタノールに溶かして100mlとした (GA標準原液)。GA標準原液をメタノール-1.5%酢酸 (69:31) 混液で希釈して標準溶液を調製した。

SA, SOA, BA, DHA, PHBA-Es類標準溶液: SA, SOA, BA, DHA, PHBA-Es類各50mgを精秤し, 50mlのメタノールに溶解した後, 水を加えて100mlとした (SA及び保存料類標準原液)。SA及び保存料類の標準原液をメタノール-1.5%酢酸 (69:31) 混液で希釈して標準溶液を調製した。

5mMクエン酸緩衝液pH4.0: クエン酸 (1水和物) 7gとクエン酸ナトリウム (2水和物) 6gを水に溶解し1Lとし, これを水で10倍希釈して用いた。

その他の試薬はいずれも試薬特級品を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ: 島津製作所製LC-3A

検出器: 島津製作所製紫外検出器SPD-2A

4. 試験溶液の調製

1) 液状食品: 試料10gをとり, 水を加えて100mlとした後, 綿栓でろ過し試験溶液とした。試験溶液20mlをとり, 酢酸エチル50mlを加えた後, 10%硫酸10mlを加えて直ちに振とう抽出し, 酢酸エチル層を分取した。酢酸エチル層にエマルジョンが生成して分離が不十分な場合は, 遠心分離し, 酢酸エチル層を分取した。残った水層

に酢酸エチル50mlを加え, 再度振とう抽出し, 酢酸エチル層を分取して酢酸エチル層を合わせた。次に酢酸エチルを無水硫酸ナトリウムで脱水した後, 綿栓でろ過し, ろ液に2%炭酸水素ナトリウム0.1mlを加え, 50℃以下で減圧濃縮した。残留物をメタノール-1.5%酢酸 (69:31) 混液に溶解して全量を5mlとし, これを試験溶液とした。

2) 半固形及び固形食品: 試料10gをとり, 1%アンモニア水60mlを加えてホモジナイズした後, 1%アンモニア水を加えて100mlとした。発泡が生じてメスアップしにくい場合は, ホモジナイズ後に遠心分離し, 内容物をメスアップ用の容器に1%アンモニア水25mlを用いて静かに移し, 1%アンモニア水で100mlとした。必要に応じて遠心分離した後, 綿栓でろ過し試験溶液とした。試験溶液20mlをとり, 酢酸エチル50mlを加え, 以下液状食品の項と同様に操作し試験溶液を調製した。

5. HPLC条件

1) GA測定条件

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6mm i.d.×150mm)

移動相: メタノール-1.5%酢酸 (69:31)

流量: 1.0ml/min

カラム温度: 40℃

検出波長: 254nm

感度: 0.04 AUFS

注入量: 20μl

2) SA及び保存料類測定条件

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6mm i.d.×150mm)

SA, SOA, BA, DHA用移動相, 検出波長及び感度: メタノール-アセトニトリル-5mMクエン酸緩衝液pH4.0 (6:12:82), 230nm, 0.04 AUFS

PHBA-Es類用移動相, 検出波長及び感度: メタノール-5mMクエン酸緩衝液pH4.0 (55:45), 230nm, 0.04 AUFS

流量: 0.8ml/min

カラム温度: 40℃

注入量: 20μl

III 結果及び考察

1. 前処理方法の検討

藤沼ら⁹⁾は食品中のGAを1%アンモニア水で抽出して得た試験溶液をpH2.0に調整して1-ブタノール-酢酸エチル (3:7) 混液で2回抽出し, 更に1%アンモニア水で2回再抽出し, 抽出液を濃縮して試験溶液を調製している。そのため, エマルジョンが生成しやすい食

品では抽出時における遠心分離の回数が増えて操作が煩雑となり、また最終抽出液が水溶液であるため濃縮に時間がかかる。

そこで、試料溶液からGAを有機溶媒で抽出し、抽出液をそのまま脱水濃縮して試験溶液を調製する方法を検討した。有機溶媒によるGAの抽出率はpH2.0において1-ブタノール99%、酢酸エチル93%、エチルエーテル34%と報告されている⁹⁾。この結果は水層に対して有機溶媒を半量用いた時の抽出率であることから、GAの抽出率を上昇させるために水層に対して有機溶媒を約1.5倍量用いることとした。

水10gにGA標準原液(500 μ g/ml)2mlを添加し、1%アンモニア水を加えて100mlとした後、その20mlを分取してpH1.3(10%硫酸10ml添加)またはpH1.7(10%硫酸7ml添加)に調整し、3種の有機溶媒各50mlで1回抽出し脱水濃縮して回収率を求めた。その結果、Table 1に示したように、抽出溶媒として1-ブタノールおよび酢酸エチルを用いた時、いずれのpH条件においてもGAは97%以上の回収率が得られた。この結果から、濃縮操作の容易な酢酸エチルを抽出溶媒として用いることとし、抽出の安全性を見込んでpH調整のための10%硫酸の添加量は10mlとし、抽出回数は2回で行うこととした。

Table 1. Recovery of Glycyrrhizic Acid from Water by Pretreatment Methods using Three Organic Solvents

Solvent	Recovery (%)	
	pH1.3 ^{a)}	pH1.7 ^{b)}
1-Butanol	99.0	98.8
Ethyl acetate	98.9	97.5
Ethyl ether	32.8	25.1

Glycyrrhizic acid was added to water at the level of 100 μ g/g.

- a) Ten ml of 10% H₂SO₄ was added to 20ml of 1% ammonium hydroxide solution.
- b) Seven ml of 10% H₂SO₄ was added to 20ml of 1% ammonium hydroxide solution.

2. GAの前処理方法におけるSA及び保存料類の回収率

水10gにSA, SOA, BA, DHA, PHBA-Es類の標準原液(500 μ g/ml)各2mlを添加し、GAの前処理方法に従って試験溶液を調製し、各添加物の回収率を求めた。但し、酢酸エチルの抽出回数は1回で行った。その結果、Table 2に示したようにいずれの添加物

も93%以上の回収率が得られた。なお、保存料類は減圧下では揮散しやすく、濃縮操作時に回収率の低下を招く恐れがあるため、揮散防止のために酢酸エチルに2%炭酸水素ナトリウム0.1mlを加えて濃縮した。

通常の分析においては安全性を見込んで抽出は2回行われることから、GAの前処理方法でSA及び保存料類は定量的に回収でき、同一の試験溶液での定量は十分可能と考えられた。

Table 2. Recoveries of Saccharin and 9 Kinds of Preservatives from Water by Pretreatment Method^{a)} for Glycyrrhizic Acid

Food additive	Recovery (%)
Saccharin	95.7
Sorbic acid	93.7
Benzoic acid	94.5
Dehydroacetic acid	93.8
Methyl p-hydroxybenzoate	97.3
Ethyl p-hydroxybenzoate	98.0
Isopropyl p-hydroxybenzoate	97.8
Propyl p-hydroxybenzoate	98.2
Isobutyl p-hydroxybenzoate	98.1
Butyl p-hydroxybenzoate	98.0

Each food additive was added to water at the level of 100 μ g/g.

- a) Times of extraction with ethyl acetate was first.

3. HPLC条件の検討

GAの分離カラムとしては一般的に逆相分配カラムが使用されている^{4,5,8-11)}ことから、SA及び保存料類の分析¹²⁾で用いたInertsil ODS-2を使用することとした。

試験溶液にはSA及び保存料類が共存する可能性があるため、GAとSA及び保存料類が分離可能な移動相を選定する必要がある。そこで、メタノール-クエン酸緩衝液系¹²⁾、メタノール-酢酸系^{8,11)}、アセトニトリル-クエン酸緩衝液系、アセトニトリル-酢酸系^{4,10)}の4種の移動相について検討した。その結果、メタノール-クエン酸緩衝液系及びメタノール-酢酸系ではTable 3に示したように、SA及び保存料類はいずれもGAより先に溶出し、GAの測定の妨害とはならなかった。これに対し、アセトニトリル-クエン酸緩衝液系及びアセトニトリル-酢酸系ではGAの保持時間の近くにPHBA-Es類が溶出し、アセトニトリルの比率によってはGAのピークがPHBA-Es類と重なる場合が見られた。

メタノール-クエン酸緩衝液系とメタノール-酢酸系ではGAのクロマト上の差は見られなかったことから、両移動相における食品由来の妨害物質の影響について検討した。GA無添加の10種の食品について試験溶液を調製し、移動相としてメタノール-5 mMクエン酸緩衝液 pH4.0 (65 : 35) 及びメタノール-1.5%酢酸 (69 : 31) を用いてHPLC測定を行った時のGAに対する妨害ピー

クの有無をTable 4 に示した。メタノール5 mMクエン酸緩衝液pH4.0 (65 : 35) を用いた時、味噌に妨害ピークが存在が認められたが、メタノール-1.5%酢酸 (69 : 31) ではいずれの食品にも妨害ピークは認められなかった。

以上の結果からHPLCの移動相としてメタノール-1.5%酢酸 (69 : 31) を用いることとした。

Table 3. Retention Time of Glycyrrhizic Acid and Other Food Additives

Food additive	Retention time (min)	
	Mobile phase 1 ^{a)}	Mobile phase 2 ^{b)}
Glycyrrhizic acid	9.5	8.0
Saccharin	7.0	1.9
Sorbic acid	2.0	2.3
Benzoic acid	2.7	2.6
Dehydroacetic acid	2.7	2.6
Methyl p-hydroxybenzoase	2.5	2.7
Ethyl p-hydroxybenzoase	2.9	3.3
Isopropyl p-hydroxybenzoate	3.5	4.1
Propyl p-hydroxybenzoate	3.7	4.5
Isobutyl p-hydroxybenzoate	4.7	6.1
Butyl p-hydroxybenzoate	4.9	6.4

a) Mobile phase 1 : methanol- 1.5% acetic acid (69 : 31)

b) Mobile phase 2 : methanol- 5 mM citric acid buffer pH4.0 (65 : 35)

Table 4. Comparison of Mobile Phase for Interfering Peaks from Food Components on the Determination of Glycyrrhizic Acid

Sample	Mobile phase 1 ^{a)}	Mobile phase 2 ^{b)}
Soy sauce	○	○
Soy bean paste	○	×
Worcester sauce	△	△
Kamaboko	○	○
Takuan-zuke	○	○
Ice cream	○	○
Ice candy	△	○
Yogurt	○	○
Chocolate	○	○
Peanut butter	△	○

○ : absence of interfering peak in the retention time of glycyrrhizic acid and in the neighborhood of that,

△ : presence of interfering peak in the neighborhood of the retention time of glycyrrhizic acid,

× : presence of interfering peak in the retention time of glycyrrhizic acid.

a) Mobile phase 1 : methanol- 1.5% acetic acid (69 : 31)

b) Mobile phase 2 : methanol- 5 mM citric acid buffer pH4.0 (65 : 35)

4. 添加回収実験

GA無添加の10種の食品にGAを100 μ g/gとなるように添加し、回収実験を行った結果をTable5に示した。ピーナツバターが82.4%であった他はいずれも90%以上であった。また、本法におけるGAの定量限界値は5 μ g/gであった。

なお、添加回収実験を行った際、当初ピーナツバターにおいて回収率の大きなバラツキが見られた。この原因について追求した結果、試料溶液に10%硫酸を添加した後の放置時間が長くなるほどGAの回収率がより低下することがわかった。これは強酸性下での放置により水層中のピーナツバター成分にGAが吸着したためと推測された。GAを良好に回収するためには酸性状態での放置時間をできるだけ短くすることが必要と考えられたため、試料溶液にあらかじめ酢酸エチルを加え、その後10%硫酸を加えて直ちに振とうする操作法を用いることとした。この操作法によりピーナツバターにおいても安定した回収率が得られるようになった。

Table 5. Recovery of Glycyrrhizic Acid from 10 Kinds of Foods

Sample	Recovery(%)	Ave. (%)
Soy sauce	97.1, 98.4	97.7
Soy bean paste	100.0, 103.9	101.9
Worcester sauce	101.6, 97.6	99.6
Kamaboko	99.8, 98.3	99.0
Takuan-zuke	102.9, 96.3	99.6
Ice cream	92.2, 103.1	97.6
Ice candy	93.2, 96.2	94.7
Yogurt	92.7, 104.7	98.7
Chocolate	103.6, 105.4	104.5
Peanut butter	86.7, 78.1	82.4

Glycyrrhizic acid was added to each sample at the level of 100 μ g/g.

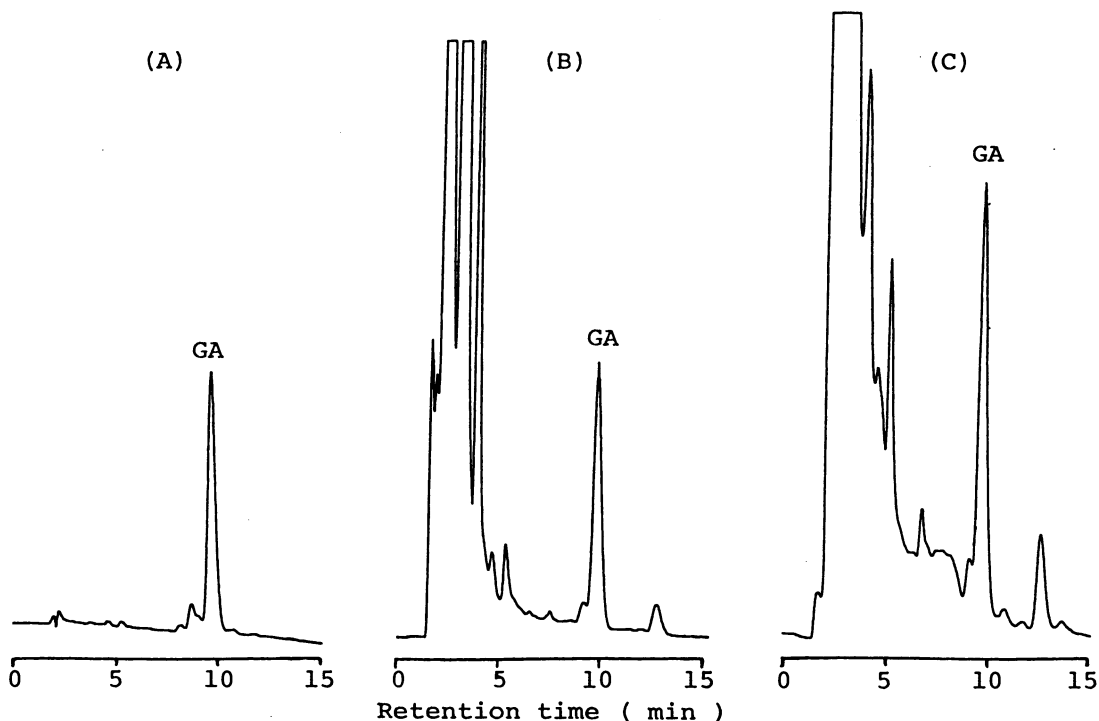


Fig. 1. High performance liquid chromatograms of glycyrrhizic acid standard and sample extracts

(A) : standard, (B) : takuan-zuke, (C) : konbu-tsukudani

Operating conditions—column : Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6mm i.d. \times 150mm), column temperature : 40 $^{\circ}$ C, mobile phase : methano 1-1.5% acetic acid (69 : 31), flow rate : 1.0ml/min, detection : 254nm (0.04AUFS), injection volume : 20 μ l

5. 市販食品への適用

甘草添加表示のある市販のたくあん2検体及び昆布の佃煮2検体に本法を適用した結果、たくあんから102~134 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、昆布の佃煮から57.5~189 $\mu\text{g}/\text{g}$ のGAが検出された。Fig. 1にGA標準溶液、たくあん及び昆布の佃煮から得られた試験溶液のクロマトグラムを示した。本法は操作が簡便で短時間で行え、多種の食品における回収率も82%以上と良好である。また、同一の試験溶液でSA及び保存料類の定量も可能と考えられることから、日常のスクリーニング分析法として有用と考えられる。なお、SA及び保存料類の食品からの回収率及びHPLC測定における食品由来の妨害物質の影響については今回は検討しなかったが、これについては今後の検討課題としたい。

IV まとめ

食品中のGAを液-液分配抽出法で前処理し、HPLCで定量する方法について、簡便迅速化を目的に検討改良した。

1. 前処理方法として、食品から得た試料溶液20mlに酢酸エチル50mlを加えた後、10%硫酸10mlを加えて振とう抽出し、抽出液を脱水濃縮して試験溶液を調製する方法はGAの回収率が良く、操作も簡便で短時間で行えた。

2. GAの前処理方法でSA及び保存料類も定量的に回収でき、同一の試験溶液での定量が可能と考えられた。

3. 分離カラムとしてInertsil ODS-2を用い、移動相としてメタノール-1.5%酢酸(69:31)を用いることにより、GAはSAや保存料類と良好に分離し、またGAに対する食品由来の妨害ピークはいずれの食品においても認められなかった。

4. 10種の食品にGAを100 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるように添加し、回収実験を行った結果、ピーナツバターが82.4%の値を示した他はいずれも90%以上であった。また、本法の定量限界値は5 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

5. 甘草添加表示のあるたくあん及び昆布の佃煮に本法を適用した結果、57.5~189 $\mu\text{g}/\text{g}$ のGAが検出された。

文献

- 1) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針・食品中の食品添加物分析法，185-189，日本食品衛生協会，東京，1989。
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，488-491，金原

出版，東京，1990。

- 3) 神蔵美枝子，中里圭子，谷村顕雄(1988)：グリチルリチン酸の摂取量に関する研究(第1報)，衛生試験所報告，106，130-136。
- 4) Helrich, K. ed.: Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 15th Ed., 908-909, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1990.
- 5) 北田善三，玉瀬喜久雄，佐々木美智子，西川喜孝(1980)：高速液体クロマトグラフィーによる食品中のグリチルリチン酸の定量，食衛誌，21，354-359。
- 6) 山田利治，中岡正吉，池田陽男(1980)：高速液体クロマトグラフィーによる食品中のグリチルリチン酸の定量，神奈川衛研報告，10，5-8。
- 7) 加藤三郎：高速液体クロマトグラフィーによる食品中のグリチルリチンの定量，衛生化学，26，318-321。
- 8) 松永明信，大戸幹也，山本 敦，齊藤行雄，牧野正雄，(1986)：高速液体クロマトグラフィーによる食品中のサッカリンナトリウム及びグリチルリチンの定量，食衛誌，27，408-412。
- 9) 藤沼賢司，齊藤和夫，中里光夫，菊地洋子，井部明広，二島太郎(1988)：食品中のグリチルリチン酸の分析法，食衛誌，29，210-215。
- 10) 神蔵美枝子，武田由比子，川崎洋子，合田幸広，佐藤恭子，鈴木敦子，小池紀子，義平邦利(1988)：グリチルリチン酸の摂取量に関する研究(第2報)，日本食品衛生学会第56回学術講演会講演要旨集，32。
- 11) 堀 義宏(1989)：高速液体クロマトグラフィーによる食品中のサッカリン及びグリチルリチン酸の定量，北海道衛研所報，39，91-93。
- 12) 宮本文夫，佐伯政信(1991)：高速液体クロマトグラフィーによる食品中のサッカリン，ソルビン酸，安息香酸，デヒドロ酢酸及び5種類のパラオキシ安息香酸エステル類の定量，千葉衛研報告，15，47-53。