

サイクラミン酸の違反使用が疑われた

輸入乾燥果実（黒梅）の調査結果

三橋隆夫^{1*} 池野まり子²

はじめに

サイクラミン酸は通称「チクロ」と呼ばれ、砂糖の30～40倍の甘味を有する合成甘味料である。わが国では1956年に食品添加物に指定されたが、ラットに膀胱ガンを発生させる疑いが生じたため、1969年に指定を削除された。一方、中国、台湾及びヨーロッパ諸国では使用が認められており、これらの国からサイクラミン酸を含んだ食品が輸入されるおそれがある。

輸入食品におけるサイクラミン酸の不正使用事例は多数報告¹⁻³⁾されており、2001年には中国産の乾燥果実（黒梅）から検出され問題となった。今回、全国的調査の結果、多数の違反品が判明し、その一部は兵庫県内の業者が輸入したことが確認された。このため当所で、その業者が取り扱った輸入黒梅のサイクラミン酸含有量を調査したので、結果を報告する。

方 法

1. 試料

兵庫県内の輸入業者 A が神戸市内の倉庫に保管していた中国産の黒梅（梅を糖蜜に浸けて乾燥させた果実加工食品）。保管品35箱（1箱は1パック3Kgが10袋入り）の内、7箱から計10袋を採取し、試料とした（採取：2001年12月）。

2. 試薬

- 1) 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）特級品112.3mgを精秤し、水に溶かして全量を100mLとした。さらに、この液10mLに水を加えて全量100mLとした（1mL中にサイクラミン酸100μgを含む）。

- 2) 透析補助液：水酸化ナトリウム（特級品）0.8gを水に溶かして全量を100mLとした。
- 3) リン酸塩緩衝液（pH6.0）：0.2mol/L Na₂HPO₄溶液62mLと0.2mol/L NaH₂PO₄溶液438mLを混合し、水を加えて全量を1000mLとした。
- 4) イオン対試薬：臭化テトラブチルアンモニウム（TBA）は和光純薬特級品を用いた。
- 5) 次亜塩素酸ナトリウム溶液：次亜塩素酸ナトリウム溶液（化学用、有効塩素5.0%以上、和光純薬製）を水で2倍に希釈した。
- 6) 透析膜：透析用セルロースチューブ 36/32（平面幅45mm、膜厚0.02mm、日本メデカルサイエンス社製）を用いた。
- 7) クリーンアップ用カートリッジ：Mega Bond Elut C18（充填量2g、Varian社製）を用いた。なお、カートリッジは使用前にアセトニトリル10mL、水10mL及び0.1mol/L TBA溶液5mLで順次洗浄した。
- 8) その他の試薬：全て市販特級品を用いた。

3. HPLC 装置

高速液体クロマトグラフ：島津製作所製 LC-10A シリーズ（SPD-M10A 型フォトダイオードアレイ検出器付）

4. HPLC 測定条件

カラム：Mightysil RP-18GP（関東化学社製、5μm、4.6mm i.d.×150mm）、移動相：アセトニトリル・水混液（7:3）、カラム温度：40℃、流速：1.0mL/min、検出波長：314nm、注入量：10μL。

5. 試験溶液の調製

衛生試験法・注解⁴⁾及び食品添加物分析法⁵⁾の方法に準じた。

1) 精製用溶液の調製

種子を除きホモジナイズした試料20.0gを透析用チューブに入れ、透析補助液25mLを加えてよく混和し

¹健康科学部、²現 感染症部

* 別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
健康環境科学研究センター
健康科学部 三橋隆夫

た後、チューブの端を密閉した。チューブを予め透析外液として透析補助液約 20mL を入れたメスシリンダーに投入した後、さらに透析補助液を加えて全量を 200mL とした。時々ゆり動かしながら、室温で 48 時間放置し透析した。透析終了後、透析外液 25mL (試料 2.5g 相当) を分取し、0.1mol/L TBA 溶液 5mL 及びリン酸塩緩衝液 20mL を加えてよく混和したものを精製用溶液とした。

2) 精製

精製用溶液の全量をクリーンアップ用カートリッジに注入した後、カートリッジを水 30mL で洗浄した。次いで、アセトニトリル・水 (3:7) 混液 10mL を用いてサイクラミン酸を溶出した。

3) 反応操作

溶出液の全量を容量 100mL の分液ロートに移し、50%硫酸 2mL 及び n-ヘキサン 5.0mL を加えた後、次亜塩素酸ナトリウム溶液 1mL を加えて 1 分間激しく振とうした。水相を除去した後、n-ヘキサン相に 5%炭酸水素ナトリウム溶液 25mL を加えて 1 分間振とうした。放置後、n-ヘキサン相を分取し、HPLC 用の試験溶液 (1mL は試料 0.5g 相当) とした。

6. HPLC 用標準溶液の調製

サイクラミン酸標準溶液 (100µg/mL) を 0.10, 0.20, 1.0, 5.0 及び 10.0mL とり、それぞれ水で全量 10.0mL とした後、前項の反応操作を行い、得られた n-ヘキサン抽出液を HPLC 用標準溶液とした。これらの溶液 1mL 中には、それぞれ 2, 4, 20, 100 及び 200µg 相当量のサイクラミン酸を含有する。

7. 定量

本法ではサイクラミン酸を酸性溶液中で次亜塩素酸ナトリウムと反応させて N,N-ジクロロシクロヘキシルアミンに変換した (図 1)。HPLC 用の標準溶液及び試験溶液を HPLC に注入し、N,N-ジクロロシクロヘキシルアミンのピーク面積を測定した。

HPLC 用標準溶液のピーク面積から検量線を作成し、これを用いて試料中のサイクラミン酸含有量を算出した。

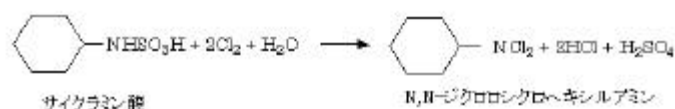


図 1 サイクラミン酸の変換反応

結果及び考察

1. 検量線

N,N-ジクロロシクロヘキシルアミンのピーク面積から作成した検量線は、良好な直線性を示した (相関係数: $r^2=0.998$)。

2. 添加回収実験

試料にサイクラミン酸を 50µg/g 及び 500µg/g の濃度になるように添加し、本法に従って操作したときの回収率を表 1 に示した。回収率はいずれも 85%以上と良好であった。

表 1 黒梅試料からのサイクラミン酸の回収率

添加量 ^{a)}	サイクラミン酸 (µg/g)			回収率 ^{b)} (%)
	測定値	平均値		
0	6, 8, 7	7		
50	51, 53, 50	51		88.7 ± 3.1
500	498, 472, 478	483		95.1 ± 2.7

3. ピークの同定

HPLC 用標準溶液及び試験溶液の HPLC クロマトグラム例を図 2 に示した。保持時間約 8 分に現れるピークが N,N-ジクロロシクロヘキシルアミンに由来すると推定された。このピークの UV スペクトルを測定した結果を図 3 に示した。HPLC 用標準溶液(A)と試験溶液(B)ではスペクトル強度に違いがあるものの、ほぼ同様のパターンであった。これらは文献⁹⁾に記載された N,N-ジクロロシクロヘキシルアミンの UV スペクトルと一致することから、保持時間約 8 分のピークの物質が N,N-ジクロロシクロヘキシルアミンであることが確認された。

なお、本調査 (黒梅の測定) では 8 分付近に妨害ピークが存在しないことから、低濃度のサイクラミン酸の定量が可能であり、定量下限値を 5µg/g とした。

4. 黒梅中のサイクラミン酸含有量

黒梅 10 試料 (3Kg 入り 1 パックを 1 試料とした) についてサイクラミン酸を測定した結果を表 2 に示した。いずれの試料からも 5~9µg/g と低レベルのサイクラミン酸が検出された。

なお本調査では、食品衛生法の指定する試験法がないため (不許可の食品添加物に対しては試験法が指定されない)、衛生試験法・注解及び食品添加物分析法の試験法を準用した。これらは、妨害物の多い他の

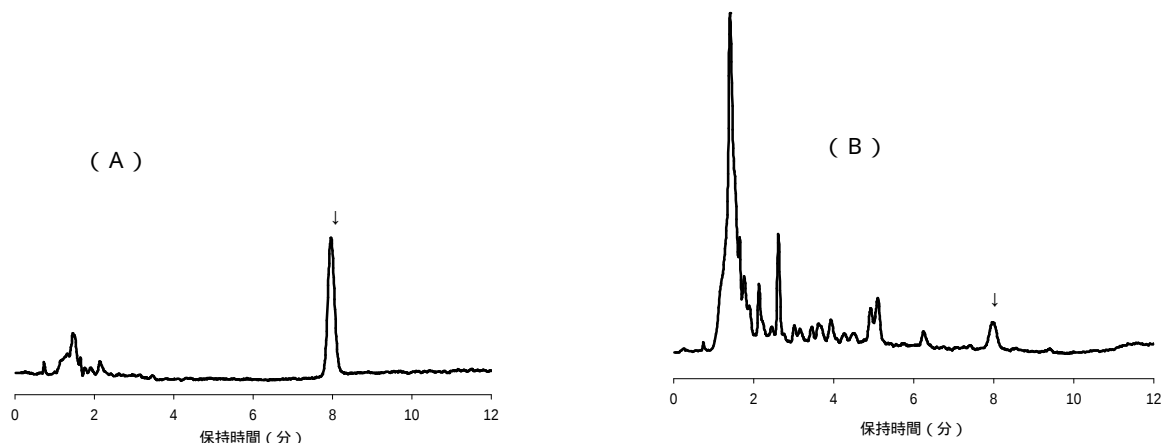


図2 HPLC 用標準溶液及び試験溶液の HPLC クロマトグラム
 (A)：HPLC 用標準溶液（サイクラミン酸相当量：20 $\mu\text{g/mL}$ ）
 (B)：試験溶液（黒梅 No.1）
 HPLC 条件は方法の項に示した通り

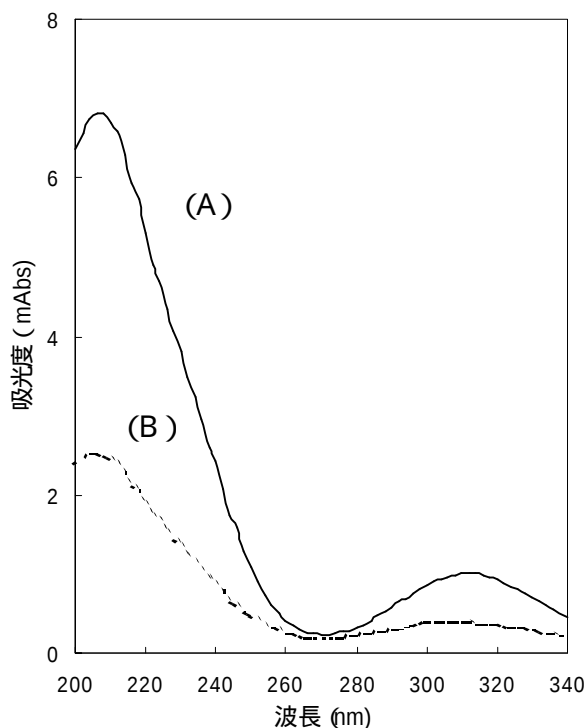


図3 ピーク（保持時間約 8 分）の UV スペクトル
 (A)：HPLC 用標準溶液
 （サイクラミン酸相当量：10 $\mu\text{g/mL}$ ）
 (B)：試験溶液（黒梅 No.1）

多い他の食品も対象としており、定量下限値は両者とも 10 $\mu\text{g/g}$ が設定されている。本調査は行政試験であるため、この定量下限値を適用した。すなわち、試験成績は 10 試料全てを定量下限値以下（10 $\mu\text{g/g}$ 以下）とし、上記の定量値は参考値とした。

まとめ

中国産の乾燥果実（黒梅）からサイクラミン酸が検出された違反事例が大きな問題となり、違反が疑

表2 黒梅中のサイクラミン酸含有量

試料 No ^{a)}	測定値 ^{b)} ($\mu\text{g/g}$)
1	8
2	7
3A	9
3B	9
4	6
5	5
6A	6
6B	5
7A	6
7B	6

a) 3,6,7 は、1 箱から 2 パックをサンプリングした。

b) 定量下限値：5 $\mu\text{g/g}$

われた試料のサイラミン酸含有量を調査した。結果は、検査した 10 試料から 5～9 $\mu\text{g/g}$ と低レベルのサイクラミン酸が検出された。

過去の輸入食品におけるサイクラミン酸の違反事例¹⁾は、乾燥果実が約 40 mg/g と高濃度で含有していたこともあり、通常は 1 mg/g (1,000 $\mu\text{g/g}$) を超える違反品が多い。一方、今回の黒梅の含有量はその 1/100 以下の低レベルであり、サイクラミン酸の不正使用というよりは汚染や混入が原因と推定される。中国産黒梅の場合、国内（中国）や台湾向けにはサイクラミン酸を使用することから、製造管理に十分な注意を払わないと、日本向けの製品に汚染が起こるおそれがある。汚染や混入を防止するためには、製造ラインを分けるなどの徹底した品質管理が必要であり、適切な対応をとらないと今後も同様の事例が起こると考えられる。

謝 辞

本調査は県庁生活衛生課が計画し、当所が試験検査を担当した。試料採取に協力していただいた生活衛生課ならびに社健康福祉事務所食品衛生課の関係者に深謝いたします。

文 献

- 1) 田村行弘，二島太一郎：食品の化学検査における食品衛生法違反事例（第1報）。東京衛研年報，**40**,141-148(1989)
- 2) 井上典子，山村朋子，各田光淳，大竹 昇，立花光雄，金児克忠，飯島増弘：簡易迅速検査により見つけた違反事例について。食品衛生研究，**47**(5)，61-67 (1997)
- 3) 小林千種，中里光男，山嶋裕季子，川合由華，立石恭也，友松俊夫：第37回全国衛生化学技術協議会年会要旨集，p.84-85,1995年11月（秋田）
- 4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2000，p.323-326, 金原出版，東京（2000）
- 5) 第2版 食品中の食品添加物分析法 2000，p.362-365，日本食品衛生協会，東京（2000）
- 6) 中里光男，斉藤和夫，石川ふさ子，藤沼賢司，守安貴子，二島太一郎：高速液体クロマトグラフィーによる食品中のサイクラミン酸の分析。食衛誌,**34**,248-253（1993）

（受理 2002 年 12 月 5 日）