報 文

凝集沈殿剤を用いたサッカリンナトリウムおよび
アセスルファムカリウムの新規分析法の開発

(平成27年4月30日受理)

杉浦 潤* 中島正博

Development of a New Method for Determination of Sodium Saccharin and
Acesulfame Potassium with the Aid of Coagulant

Jun SUGIURA* and Masahiro NAKAJIMA

Nagoya City Public Health Research Institute:
1-11 Hagiya-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8615, Japan; * Corresponding author

An HPLC method for determination of sodium saccharin and acesulfame potassium was newly developed, employing coagulant pretreatment to remove particles dispersed in the sample extract. The method showed recovery of 96–101% for both analytes with a repeatability of less than 1% and a reproducibility of less than 2%. The limit of quantification for sodium saccharin was 0.025 g/kg and that for acesulfame potassium was 0.025 g/kg. Only about 20 min was required for preparation of the test solution, whereas the dialysis method takes much longer.

(Received April 30, 2015)

Key words: サッカリンナトリウム sodium saccharin; アセスルファムカリウム acesulfame potassium; 人工甘味料 artificial sweetener; 凝集剤 coagulant

緒 言

サッカリンナトリウムおよびアセスルファムカリウムは人工甘味料として幅広い食品への使用が許可されている。近年における健康志向の高まりから、体内に吸収されにくいと考えられるこれら甘味料を利用したさまざまなダイエット食品や低カロリー飲料が流通している。しかし人工甘味料が肥満や糖尿病の発症などさまざまな健康被害を及ぼす可能性があるとの報告^{1), 2)}もなされており、今後、関心がさらに高まることが予想され、将来、食品中の甘味料検査の需要が増すと考えられる。食品から甘味料を抽出する方法として一般的に透析法が用いられているが、目的物質の透析膜外への拡散が律速となっており試験液の調製にサッカリンナトリウムでは16～24時間³⁾、アセスルファムカリウムでは15～48時間⁴⁾と長時間を要する。またビスケットなどの食品では添加回収試験での回収率が低いなどの欠点が挙げられる⁵⁾。そのため透析時間を短縮する方法⁶⁾や、そのほか透析法以外の抽出法として溶媒抽出法^{7), 8)}が報告されているが固相抽出など煩雑な操作を要する。われわれは調理食品中のリコリンおよびガラタミ

ン分析において凝集沈殿剤ポリ塩化アルミニウム (PAC) を前処理に用いることで夾雑成分を効果的に除去できることを報告している⁹⁾。そこで今回、甘味料分析における上記のような課題を改善するため前処理法としてPAC法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試 料

名古屋市内で販売されている甘味料の表示のないとんかつソース、清涼飲料水、乳酸菌飲料、発泡酒、ビスケット、クッキーを試料とした。

2. 標準品および試薬

サッカリンナトリウム二水和物: 和光純薬工業(株)製。

アセスルファムカリウム: 和光純薬工業(株)製。

サッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム混合標準原液: サッカリンナトリウム二水和物を105℃で4時間加熱脱水し、デシケーター中で放冷し、この250 mgとアセスルファムカリウム250 mgを水に溶解し正確に100 mLとした。(サッカリンナトリウム、アセスルファムカリウムとして各2,500 µg/mL)

ポリ塩化アルミニウム $[Al_2(OH)_nCl_{6-n}]_m$ ($1 \leq n \leq 5$, $m \leq 10$): キシダ化学(株)製のものをを用いた。また Al_2O_3 としての含有率は30%であった。

* fdeiken@sa.starcat.ne.jp

名古屋市衛生研究所: 〒467-8615 名古屋市瑞穂区萩山町1-11

ホルマジン標準液: 和光純薬工業(株).

その他の試薬: メタノール, リン酸はHPLC用, その他の試薬は特級品を使用した.

水: オルガノ(株)製PURELAB Ultra Analyticにより精製した超純水.

メンブランフィルター: Merck社製Millex-LH (孔径 $0.45\ \mu\text{m}$, 直径 $25\ \text{mm}$).

3. 装置

HPLC: (株)島津製作所製LC-20シリーズ

超音波洗浄装置: BRANSON ULTRASONICS社製ULTRASONIC CLEANER.

分光光度計: (株)島津製作所製UV-2550.

遠心分離機: (株)久保田製作所製テーブルトップ冷却遠心機.

4. HPLC条件

カラム: Unison UK-Amino ($3\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm i.d.} \times 100\ \text{mm}$, Imtakt社製), カラム温度: 40°C , 移動相: メタノール-1%リン酸 (6:4), 流量: $1\ \text{mL/min}$, 検出器: PDA (測定範囲 $210\sim 350\ \text{nm}$, 定量 $210\ \text{nm}$ (サッカリナトリウム), $230\ \text{nm}$ (アセスルファムカリウム), 注入量: $10\ \mu\text{L}$.

5. 試験液の調製

試験液調製法をScheme 1に示した.

ミキサーにより均一に粉碎した試料 $2\ \text{g}$ を精密に量り取り, 水 $30\ \text{mL}$ を加えた後, 軽く振とうした. 次に 30% PAC水溶液, 10% NaOH水溶液をそれぞれ $1\ \text{mL}$ 加え水で正確に $50\ \text{mL}$ としたものを超音波洗浄装置で10分間抽出を行った. これをメンブランフィルターに通したものをHPLC用試験溶液とした.

6. 検量線の作成および定量

サッカリナトリウム, アセスルファムカリウム混合標

準原液を水で希釈し $1, 2, 5, 10, 20\ \mu\text{g/mL}$ の検量線用標準溶液を調製した. この溶液 $10\ \mu\text{L}$ をHPLCに注入し, ピーク面積による絶対検量線法により検量線を作成した.

結果・考察

1. 使用するPAC濃度およびNaOH濃度について

前報⁹⁾において 30% PAC水溶液と, 10% NaOH水溶液を等量混合することで溶液のpHが中性付近になると報告しているので, 本研究においても同濃度のPAC水溶液およびNaOH水溶液を用いることとした.

2. PAC量が保持時間に与える影響

凝集剤としてPACを用いることで水酸化アルミニウムの白色沈殿が大量に形成されるが, それ以外にもアルミニ

Scheme 1. Analytical procedure for sodium saccharin and acesulfame potassium

Fig. 1. Effect of various amounts of 30% PAC on retention time

(a): Acesulfame potassium. (b): Sodium saccharin. Amount of 10% NaOH is the same as that of 30% PAC.

ウムイオンや塩化物イオンが水溶液中に多く溶け込んでいると考えられた。本研究において用いているカラムはアミノカラムであり、その保持機構にはイオン交換も含まれているため、イオン強度が保持時間に影響を与えることが懸念された。したがって、添加するPACの量がサッカリンナトリウム、アセスルファムカリウムの保持時間に与える影響を調べた。

水2 gに対しサッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム混合標準原液を0.1 mL加えた後、水30 mLを加えた。次に30%PACを0, 0.5, 1, 2, 5 mL加え等量の10% NaOH水溶液を添加した後、水で正確に50 mLとしたものをメンブランフィルターを通し、これをHPLCに注入した。なお、HPLCへの注入量も5, 10, 20 μ Lと変化させた。Fig. 1の結果より添加する30%PACの量が増えるに従い、またHPLCへの注入量が増えるに従いアセスルファムカリウムおよびサッカリンナトリウムの保持時間が短くなることが判明した。また連続注入による保持時間の変化が懸念されたので添加する30%PACを1 mL、注入量を10 μ Lとして10回の繰り返し注入を行ったところ、アセスルファムカリウムおよびサッカリンナトリウムの保持時間は変わらず、また、200回の分析後においてもそれぞれの保持時間の変化は見られなかった。そこで30%PACの量を1 mL以下、またHPLCへの注入量を10 μ Lとし以後の検討を進めることとした。

3. 30%PAC添加による濁度への影響

PACの凝集作用は溶け込んでいる物質の種類や量に大きく左右されることが予想されたので添加する30%PACの量を検討することとした。試料をとんかつソース、清涼飲料水、乳酸菌飲料、発泡酒、ビスケット、クッキーとし、各2 gに水30 mLを加え、次に30%PACを0, 0.1,

0.2, 0.5, 1 mL添加し等量の10%NaOHを加え、水で正確に50 mLとした。これらを超音波洗浄装置に10分かけた後、遠沈管へと移し、遠心（1分, 1,460 $\times$ g）し得られた上澄みの濁度を測定した。濁度の測定については上水試験方法¹⁰⁾を参考にし、透過光測定法により行った。すなわち分光光度計で波長660 nmの吸光度を10 mmセルを用いて測定し、得られた吸光度をホルマジン標準液の吸光度と比較し濁度を算出した。Fig. 2より添加する30%PACの増加に伴い、得られる上澄みの濁度が低くなることが分かった。また濁度の減少率は0~0.1 mLで最も大きくそれ以降は緩やかに減少していくことが分かった。0.5 mLの

Fig. 2. Effect of various amounts of 30% PAC on turbidity of sample extract

Amount of 10% NaOH is the same as that of 30% PAC.

Fig. 3. Chromatograms of extract from 6 kinds of foods with deflection at the wavelengths of 210 nm (a) and 230 nm (b)

Amounts of 30% PAC and 10% NaOH were both fixed at 1 mL.

時点でPACが飽和していると考えられるが、今後、本法を多様な食品に適用していくことを踏まえるとPACが過剰に存在している状態が好ましいと考えられたので添加する30%PACの量を1 mLとした。

4. 妨害ピークの確認

PACの添加により、澄明な試験液が得られることは確認できたが、沈殿に取り込まれず、溶け込んでいる夾雑物質がサッカリンおよびアセスルファムの定量に影響を与えることが懸念された。そこでクロマトグラム上での夾雑ピークの有無を確認することとした。試料をとんかつソース、清涼飲料水、乳酸菌飲料、発泡酒、ビスケット、クッキーとし試験液を調製し、試験液をHPLCに注入し得られたクロマトグラムと検量線の最低濃度である1 µg/mLのサッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム混合標準液のクロマトグラムを同じ感度で比較したところ、全食品においてサッカリンナトリウム、アセスルファムカリウムの定量を阻害するピークは確認されなかった (Fig. 3)。また Fig. 4に示したように、PACを用いることによりクロマトグラム上の妨害ピークは明らかに減少した。

5. 検量線

検量線はサッカリンナトリウム、アセスルファムカリウムともに1~20 µg/mLの範囲で、相関係数0.999以上の良好な直線性を示した。また本法による定量限界は試料あたりサッカリンナトリウムで0.025 g/kg、アセスルファムカリウムで0.025 g/kgであった。

Fig. 4. Chromatograms of extract of after processing with PAC (a) and without PAC (b)

Detection at 210 nm.

6. 添加回収試験

試料をとんかつソース、清涼飲料水、乳酸菌飲料、発泡酒、ビスケット、クッキーとし添加回収試験を行った。試験は試料2 gに対しサッカリンナトリウム、アセスルファムカリウム混合標準原液 (1 mL中にサッカリンナトリウム、アセスルファムカリウムを2,500 µg含む) を0.1 mL加えて30分放置した後行った。2 併行5日間で試験を行ったところ、すべての食品においてサッカリンナトリウムの回収率は96~98%であり、併行精度は1%以下、室内精度は2%以下であった。またアセスルファムカリウムの回収率は98~101%であり併行精度は1%以下、室内精度は2%以下であった (Table 1)。また試料による保持時間の変化もほとんど見られなかった (Fig. 5)。

7. 甘味料表示のある試料における透析法との比較

甘味料表示のある7食品 (スポーツ飲料、乳酸菌飲料、モナカアイスクリーム、おからケーキ、チョコレート菓子、たくあん漬け、福神漬け) を試料として本法と透析法との比較を行った。なお透析法は守安らの方法⁵⁾を参考にし、実験を行った。また試験液の対象物質濃度が検量線の範囲外である場合には適宜水で希釈しHPLCに導入した。Table 2の結果に示したように本法と透析法とで一部食品を除き同等の値を示した。チョコレート菓子では本法がや

Fig. 5. Chromatograms of extract from 6 kinds of foods spiked with 0.125 g/kg of sodium saccharin and acesulfame potassium

Detection at 230 nm.

Table 1. Repeatability and reproducibility of the method for 6 kinds of food

	Sodium saccharin			Acesulfame potassium		
	Recovery (%)	Repeatability (%)	Reproducibility (%)	Recovery (%)	Repeatability (%)	Reproducibility (%)
Sauce	97.3	0.7	1.1	99.5	0.5	1.1
Soft drink	97.9	0.6	1.6	99.1	0.5	1.1
Fermented milk drink	97.7	0.4	1.5	98.8	0.4	1.0
Low-malt beer	97.2	0.7	0.7	98.6	0.8	1.0
Biscuit	98.0	0.3	0.3	100.1	0.5	0.5
Cookie	96.7	0.8	0.8	99.9	0.4	1.0

Samples were spiked with 0.125 g/kg sodium saccharin and acesulfame potassium.

Table 2. Comparison between proposed method and dialysis method using samples labeled with artificial sweeteners

	Dialysis method				Proposed method			
	Sodium saccharin		Acesulfame potassium		Sodium saccharin		Acesulfame potassium	
	Conc. (g/kg)	RSD (%)	Conc. (g/kg)	RSD (%)	Conc. (g/kg)	RSD (%)	Conc. (g/kg)	RSD (%)
Isotonic drink	N.D.	—	0.114	2.3	N.D.	—	0.119	0.7
Fermented milk drink	N.D.	—	0.084	1.6	N.D.	—	0.083	1.0
Monaka ice cream sandwich	N.D.	—	0.070	6.1	N.D.	—	0.074	1.1
Cake	N.D.	—	0.107	1.4	N.D.	—	0.118	1.0
Chocolate snack	N.D.	—	0.115	4.4	N.D.	—	0.157	0.4
Takuan	0.635	1.9	N.D.	—	0.648	1.1	N.D.	—
Fukuzin duke	0.481	2.4	N.D.	—	0.497	0.8	N.D.	—

$n = 3$.

や高い値を示したが、これは透析法においてチョコレート由来の油脂類が透析膜外への移行を妨げており抽出が不十分であることが示唆される。実際に透析時間を5日間にし、測定した際には0.142 g/kgであり本法と近い値を示した。

ま と め

本研究では、人工甘味料サッカリンナトリウムおよびアセスルファムカリウムの新規分析法を開発した。前処理に凝集沈殿剤PACを用いることで効果的に妨害物質を取り除くことができた。本法により得られた回収率はサッカリンナトリウムでは96~98%であり、アセスルファムカリウムでは98~101%であった。また、両物質において併行精度は1%以下、室内精度は2%以下であった。試験溶液の調製に要する時間は透析法と比較して大幅に短く20分程度であり、操作も簡便であるため今後、甘味料検査の迅速化・効率化に大きく寄与すると考えられる。

文 献

- Whitehouse, C. R., Boullata, J., McCauley, L. A. The potential toxicity of artificial sweeteners. *AAOHN Journal*, **56**, 251-259 (2008).
- Saito, M., Hori, Y., Nakajima, K. Artificial sweeteners and glucose metabolism: A review of the literature published since 2000. *Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **66**, 69-75 (2013).
- 厚生労働省監修. “第10章 甘味料”. 食品衛生検査指針 食品添加物編. 東京, 日本食品衛生協会, 2003, p. 233-239.
- 安田和男. “第2章 飲食物試験法”. 衛生試験法・注解 2010. 東京, 日本薬学会, 2010, p. 354-356.
- Moriyasu, T., Nakazato, M., Kobayashi, C., Kikuchi, Y., Hayano, K., Tamura, Y. Determination of acesulfame K, saccharin and aspartame in various foods by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **37**, 91-96 (1996).
- Tahara, S., Fujiwara, T., Yasui, A., Hayafuji, C., Kobayashi, C., Uematsu, Y. A rapid dialysis method for analysis of artificial sweeteners in food. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **55**, 13-18 (2014).
- Koyama, M., Yoshida, K., Uchibori, N., Wada, I., Akiyama, K., Sasaki, T. Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 72-78 (2005).
- Tsuruda, S., Sakamoto, T., Akagi, K. Simultaneous determination of twelve sweeteners and nine preservatives in foods by solid-phase extraction and LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **54**, 204-212 (2013).
- Sugiura, J., Noguchi, S., Nakajima, M. Application of coagulant on analysis of lycorine and galanthamine in processed foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **56**, 108-113 (2015).
- 上水試験方法2011年版・理化学編. 東京, 日本水道協会, 2011, p. 46-47. (ISBN 978-4-904017-30-2)