食品中のアセスルファム K, サッカリン及び アスパルテームの含有量

(平成4年10月21日受理)

守安貴子* 斉藤和夫* 中里光男*
石川ふさ子* 藤沼賢司* 二島太一郎*

Amounts of Acesulfame K, Saccharin and Aspartame Used in Foods

Takako MORIYASU, Kazuo SAITO, Mitsuo NAKAZATO, Fusako ISHIKAWA,
Kenji FUJINUMA and Taichiro NISHIMA

(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1,
Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan)

The contents of three sweeteners [acesulfame K (AK), saccharin (SA) and aspartame (APM)] in 203 samples of foods, either imported, purchased on a trip abroad, or made in Japan, were examined. In soft drinks, we detected both SA and APM in three samples manufactured in the U.S.A., AK and APM in three samples manufactured in the U. K. and only APM in three samples manufactured in Japan. In powdered soft drinks, we detected AK and APM, and SA and APM in British and Japanese products, respectively. In solid foods, we detected SA in three pickles and a confectionery (all Japanese-made).

Confirmation of AK was carried out as follows: samples were dialyzed against 0.1 N hydrochloric acid, and AK was extracted with ethyl acetate from the dialyzate. It was methylated with ethereal diazomethane, and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry.

(Received October 21, 1992)

Key words: アセスルファム K acesulfame K; サッカリン saccharin; アスパルテーム aspartame; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; ガスクロマトグラフィー-質量分析 gas chromatography-mass spectrometry

緒 言

前報¹⁾において著者らは合成甘味料であるアセスルファム K (AK), サッカリン (SA) 及びアスパルテーム (APM) の同時分析法を作成した。今回はこの分析法を用いて、輸入、国産及び海外渡航時に購入した食品についてこれら3種の甘味料の使用状況を調査した。また、SA²⁾ 及び APM³⁾ については確認法が既に確立されているが、AK についてはこれまで報告されている AK の分

析方法が逆相系による高速液体クロマトグラフィーを用いたものがほとんど^{4)~10)}であり、確認方法としては不十分であった。そこでガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC/MS) による確認法について検討したところ、良好な結果が得られたので併せて報告する。

実験方法

1. 試 薬

1) 0.1 N 塩酸: 20% 塩酸 (特級, 和光純薬工業(株) 製) 8.4 ml に水を加えて 500 ml とした。

2) ジアゾメタン-エーテル溶液^{2), 11)}: N-メチル N-ニ

* 東京都立衛生研究所: 〒169 東京都新宿区百人町 3-24-1

トロソウレア（試験研究用，岩井化学薬品（株）製）約 20 mg を共栓試験管にとりエーテルで 50 ml とした後，氷浴中で冷却しながら 30% 水酸化ナトリウム溶液 0.5～1 ml を静かに滴下させ，約 1 時間放置した。得られた黄色のジアゾメタン-エーテル溶液は別の容器に移し，水酸化ナトリウム約 5 g で脱水した。なお，以上の操作はドラフト内で行った。

AK, SA 及び APM 混合標準液，透析用溶液，透析膜，前処理用カートリッジカラム，イオンペアー試薬及びメタノールは前報¹⁾に準じた。

その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. 装 置

1) 高速液体クロマトグラフ：前報¹⁾に準じた。

2) ガスクロマトグラフ-マススペクトロメーター：ガスクロマトグラフとしてバリアン社製 GC-3400 型に質量分析計としてフィニガンマット社製 INCOS-50 型を装着したもの。

3. HPLC 条件

前報¹⁾に従った。

4. 試 料

昭和 63 年 4 月から平成 4 年 3 月までに都内で市販されていた輸入，国産の食品及び海外渡航時に購入した食品，合計 203 検体を分析に供した。なお，その内訳は，清涼飲料水 131 検体（国産品 21 検体，輸入品 107 検体及び海外渡航時購入品 3 検体），粉末清涼飲料 6 検体（国産品 1 検体，輸入品 4 検体及び海外渡航時購入品 1 検体），菓子類 13 検体（国産品），果物・野菜加工品 42 検体（国産品 22 検体，輸入品 20 検体），その他の食品 11 検体（国産品 9 検体，輸入品 2 検体）である。

5. 試験溶液の調製及び定量

前報¹⁾に準じた。

6. SA の確認

衛生試験法²⁾に準じ，ガスクロマトグラフィー (GC) により確認した。

7. APM の確認

井部らの方法³⁾に準じ，薄層クロマトグラフィー (TLC) により確認した。

8. AK の確認

1) 透析及び抽出操作

透析用溶液に 0.1 N 塩酸を用い，前報¹⁾と同様に操作し透析を行った。透析終了後透析外液 100 ml を分取し，塩化ナトリウム 40 g を加え，酢酸エチル 50 ml で 3 回抽出を行った。抽出液は合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水した後，溶媒を減圧留去し残留物を得た。

なお，糖分の少ない清涼飲料水などにおいては，そのまま酢酸エチルを加え，上記と同様に抽出した際に液層が良く分離するものについては，透析操作は省略した。

2) メチル化操作

1) で得られた残留物にジアゾメタン-エーテル溶液の

Table 1. Classification of Samples by Kinds of Foods

Sample	No. of domestic products	No. of imported products
Carbonated drink	7	56
Fruits juice drink	5	53 (3)
Powdered soft drink	1	5 (1)
Other soft drinks	9	1
Confectionery	13	0
Fruit preserves	10	17
Vegetable preserves	12	3
Other foods	9	2
Total	66	137

() : Numbers of foods bought on a trip abroad

Table 2. Classification of Samples by Producing Countries

Country	No. of samples
U.S.A.	70
France	11
U.K.	6
Canada	5
South Africa	5
Hong Kong	5
Australia	4
Philippines	4
Korea	4
Singapore	3
Thailand	3
China	2
Germany	2
Switzerland	2
Japan	66
Others (eleven countries)	11
Total	203

黄色が十分持続するまで加え，30 分間放置した。この後エーテルを減圧留去し，残留物にアセトン 2 ml を加えて溶解したものを GC/MS 用試験溶液とした。

3) GC/MS の測定条件

GC 条件

カラム：DB-5，長さ 30 m，内径 0.25 mm，膜厚 0.25 μ m の fused シリカキャピラリーカラム（J & W Scientific 社製）；カラム温度：100°（1 分）→200°（2 分）5°/min の昇温分析；注入口温度 250°

MS 条件

測定モード：EI；トランスファーライン温度：250°；イオンソース温度：180°；イオン化エネルギー：70 eV；

エミッションカレント: 200 μ A**結果及び考察****1. 調査品目**

今回の調査に当たっては, AK, SA 及び APM の使用される可能性が高く, 我が国における輸入加工食品の中で輸入量の多い¹¹⁾清涼飲料水 (137 検体), 果物加工品 (27 検体) を中心に総計 203 検体 (国産品 66 検体, 輸入品 133 検体及び海外渡航時購入品 4 検体) について検査を行った (Table 1). また, これらの食品の原産国を Table 2 に示したが, 輸入品については我が国において輸入量の多いアメリカ及びヨーロッパの製品¹²⁾を中心に調査を行った.

2. 使用実態調査

AK, SA 及び APM の検査結果を Table 3 に示した.

1) 炭酸飲料

炭酸飲料のコーラ類では国産品から APM のみが 220 及び 490 μ g/g 検出された. 輸入品からは SA が 200, 220 μ g/g 及び APM が 75, 72 μ g/g 検出され, これらはいずれも併用して使用されていたものであった. また, サイダー類は国産品から APM のみが 120, 200 μ g/g 検出されたが, 輸入品からは SA が 120 μ g/g, APM が 63 μ g/g 検出され, これも併用して使用されていたものであった.

炭酸飲料で, コーラ類及びサイダー類は国産品では APM が単独で使用されていたのに対して, 輸入品はいずれも APM と SA が併用して使用されていた. なお, 今回 SA 及び APM が同時に検出された輸入品の原産国はいずれもアメリカであった.

Table 3. Contents of Sweeteners Used in Foods

Sample	No. of Samples	No. of positive samples	Content of sweeteners (μ g/g)			Country
			AK	SA	APM	
Carbonated drink						
Cola drinks	18	4	—	—	490	Japan
			—	—	220	Japan
			—	200	75	U.S.A.
			—	220	72	U.S.A.
Transparent carbonated drinks	9	3	—	—	200	Japan
			—	—	120	Japan
			—	120	63	U.S.A.
Carbonated drinks with fruit juice	27	—	—			
Others	9	—				
Fruit juice						
Fruit juice drink (more than 50%)	13	—				
Fruit juice drink (less than 50%)	45	3	180	—	170	U.K.*
			200	—	180	U.K.*
			190	—	170	U.K.*
Fruit flavored and colored drink (0%)	4	—				
Powdered soft drink						
Instant coffee	3	—				
Instant tea	1	—				
Instant cocoa	1	1	2,000	—	1,400	U.K.*
Fruit flavor	1	1	—	740	820	Japan
Other drinks	6	—				
Solid food						
Canned fruit or vegetable	19	—				
Fruit jam	10	—				
Pickles	13	3	—	370	—	Japan
			—	760	—	Japan
			—	810	—	Japan
Confectionery	13	1	—	370	—	Japan
Others	11	—				
Total	203	16				

* Foods bought on a trip abroad

2) 果汁飲料

果汁含有量が 50% 以上のものからは、これら 3 種の甘味料は検出されなかった。50% 未満のものは 45 検体中 3 検体から AK が 180~200 $\mu\text{g/g}$ 、APM が 170~180 $\mu\text{g/g}$ 検出され、これらはいずれも併用して使用されていたものであった。またこの AK と APM が併用して使用された果汁飲料の原産国はいずれもイギリスであった。

3) 粉末清涼飲料

粉末清涼飲料 12 検体中、インスタントココア及び粉末オレンジジュースの 2 検体から甘味料が検出された。すなわちインスタントココアからは AK が 2,000 $\mu\text{g/g}$ 、APM が 1,400 $\mu\text{g/g}$ 検出され、粉末オレンジジュースからは、SA が 740 $\mu\text{g/g}$ 、APM が 820 $\mu\text{g/g}$ 検出された。なお、インスタントココアの原産国はイギリスであり、粉末オレンジジュースは国産品であった。

4) 固形食品

固形食品については果物及び野菜缶詰、ジャム、漬物、菓子類など、66 検体について検査したところ、たくあん、福神漬などの漬物類 3 検体から SA が 370~810 $\mu\text{g/g}$ 、せんべいから SA が 370 $\mu\text{g/g}$ 検出された。これらはいずれも国産品であった。

以上の結果より、清涼飲料水については、輸入品では SA と APM、外国で購入したものでは AK と APM のように APM と他の甘味料が併用して使用される傾向が

認められた。これに対して国産品では APM が単独で使用されている傾向が認められた。一般に、合成甘味料はその甘味度の相乗効果を期待したり、甘味の発現の早さの違いを利用して甘味の幅を広げる、あるいは苦みや後味を隠す目的で併用して使用することが多い¹³⁾。しかし、我が国では近年、化学合成品以外の食品添加物が好まれる傾向にあり、また、甘味の質で SA に比べて APM がすぐれているなどの点で、清涼飲料水には APM を単独で使用する傾向にあるのではないかと考えられる。

国産品の清涼飲料水は APM が単独で使用されていたのに対して、固形食品の漬物及び菓子類はいずれも SA が単独で使用されていた。この理由としては APM が加熱や pH 6 以上で不安定であり、微生物によっても分解されやすいのに対して、SA はこれらの条件下でも安定なため使用されたものと考えられる。なお、今回は天然甘味料については検査を行わなかったが、国産品の漬物類の多くは、添加物表示によると近年ではほとんど天然甘味料であるステビアや甘草抽出物などが使用される傾向にあるため¹⁴⁾、今回の調査では、SA の検出頻度が少なかったものと考えられる。

今回 3 種の甘味料が検出された食品の 16 検体中 12 検体は清涼飲料水であった。また、これらは「ダイエット」と称するものや「低カロリー」「美容」の文字を表した医薬品のドリンク剤と類似の製品がほとんどであった。近年の痩身指向により、消費者が手軽に利用できる清涼飲料水にこれらの甘味料が多く使われているものと

Fig. 1. Mass chromatogram of methylated derivatives of Acesulfame K (AK)
1: *N*-methyl-AK; 2: *O*-methyl-AK

Fig. 2. Structures of methylated derivatives of AK

Fig. 3. Mass spectra of methylated derivatives of AK
A: *N*-methyl-AK; B: *O*-methyl-AK

Fig. 4. Mass chromatograms of methylated derivatives of AK extracted from samples
A: apple juice; B: orange juice; C: tropical juice; D: instant cocoa; 1: *N*-methyl-AK; 2:
O-methyl-AK

思われる。また、今回検出されたこれらの3種の甘味料はいずれも当該生産国では使用の認められているものであった。特にAKは我が国では使用が認められていないが、イギリスをはじめ約42か国で使用が認められており、今回検出された製品はいずれもイギリス産のものであった。なお、AKが検出された製品は、海外に渡航した際に購入したものである。イギリスでは清涼飲料水をはじめ固形食品、卓上甘味料などにその使用が認められている。

3. AKのGC/MSによる確認

今回イギリスで購入した清涼飲料水及び粉末清涼飲料からAKが検出されたが、我が国ではまだAKを検出した報告例はない。これまで報告されているAKの分析法のほとんどはHPLCによるものであり^{4)~10)}、数種のカラムや移動相の変更のみで、AKの確認をする事は確実な確認方法ではないと考えた。そこで、全く分析モードを変えてGCを用いることとし、また確認をより確かにするため、質量分析を装着したGC/MSによる確認を試みた。検討に当たっては、AKは気化しにくいメチル化等により誘導体化化の必要があるが、AKの構造がSAと類似していることから、SAのGCによる分析法²⁾を適用することとした。すなわち、試料を透析後酢酸エチルにより抽出し、無水硫酸ナトリウムにより脱水、溶

媒留去後、ジアゾメタン-エーテル溶液によるメチル化を検討した。その結果AKの酢酸エチルへの抽出率は99%と良く、また、簡便にメチル化体が得られたので、本法によって得られたメチル化体をアセトンに溶解したものをGC/MS用の試験溶液とした。

AK標準品を上記に従って処理し、GC/MS分析した際のマスプロトグラムをFig. 1に示した。Fig. 2に示したようなSAと類似の*N*-メチル化体と*O*-メチル化体と思われる2つのピークが保持時間8.7分、14.0分に認められた。なお、GCのカラムの特性から、より極性の高い*N*-メチル化体の方が先に検出されるものと考えられるため、保持時間8.7分のピークが*N*-メチル-AK、保持時間14.0分のピークが*O*-メチル-AKと考えられる。この各々のピークについて質量スペクトルを測定したものをFig. 3に示した。*N*-メチル-AKでは、 m/z 177の分子イオンピーク及びフラグメントイオンとして、 m/z 28, 43, 56, 69及び85が、*O*-メチル-AKでは m/z 177の分子イオンピーク及びフラグメントイオンとして、 m/z 28, 43, 55, 70, 83及び162が検出された。

次にHPLCでAKを検出したトロピカル、オレンジ、アップルの3種の清涼飲料水とインスタントココアのマスプロトグラムをFig. 4に示したが、いずれの試料からもAK標準品同様、保持時間8.7分及び14.0分付

Fig. 5. Mass spectra of methylated derivatives of AK extracted from samples
A-I: tropical juice (*N*-methyl-AK); A-II: tropical juice (*O*-methyl-AK); B-I: instant cocoa (*N*-methyl-AK); B-II: instant cocoa (*O*-methyl-AK)

近にピークが認められた。また、この各々のピークについて質量スペクトルを測定し、その一例を Fig. 5 に示したが、いずれの試料のピークについても AK 標準品と同様の分子イオンピーク及びフラグメントイオンが得られ、AK の確認ができた。以上の結果から、本法により AK についての確認が可能であるものと考えられる。

まとめ

前報¹⁾に従って、輸入、国産及び海外渡航時に購入した食品 203 検体について AK, SA 及び APM の甘味料の検査を行い、その使用状況について調査を行った。

清涼飲料水及び粉末清涼飲料でアメリカ産の 3 検体から SA と APM を、イギリス産の 4 検体から AK と APM を、国産品の 4 検体から SA を、1 検体から SA と APM を検出した。なお、これらの製品はいわゆる「ダイエット食品」である表示があった。なお、輸入品は甘味料が併用して使用され、国産品は単独で使用される傾向が認められた。また、固形食品のうち、国産品の漬物類 3 検体、菓子類 1 検体から SA が検出された。

AK の確認について GC/MS による方法を検討したところ、試料を透析し、酢酸エチル抽出した後ジアゾメタン-エーテル溶液によりメチル化を行い、その誘導体を GC/MS 分析する方法により AK の確認ができた。

文 献

- 1) 守安貴子, 斎藤和夫, 中里光男, 石川ふさ子, 藤沼賢司, 二島太一郎: 衛生化学 **37**, 97~102 (1991).
- 2) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解 1990” p. 493~495 (1990), 金原出版.
- 3) 井部明広, 斎藤和夫, 中里光男, 菊地洋子, 藤沼賢司, 直井家壽太, 二島太一郎: 食衛誌. **26**, 1~6 (1985).
- 4) Rymon, L. G.-W. von, Brixius, H.-Ch.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **168**, 212~213 (1979).
- 5) Zache, U, Grunding, H.: *ibid.* **184**, 503~509 (1987).
- 6) Veerabhadrarao, M., Narayan, M. S., Kapur, O.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70**, 578~582 (1987).
- 7) Lawrence, J. F.: Analyst **112**, 879~881 (1987).
- 8) Großpietsch, H., Hachenberg, H.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **171**, 41~43 (1980).
- 9) 守安貴子, 斎藤和夫, 中里光男, 菊地洋子, 藤沼賢司, 二島太一郎: 食衛誌. **30**, 164~169 (1989).
- 10) Atle Hannisdal: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **194**, 517~519 (1992).
- 11) 日本化学会編: 実験化学講座, **20**, 373 (1963).
- 12) 厚生省生活衛生局食品保健課検疫所業務管理室輸出入検査係: 食品衛生研究 **42**, 81~108 (1992).
- 13) 食品化学新聞社編: “別冊フードケミカル-4 甘味料総覧” p. 244~250 (1990).
- 14) 食品化学新聞社編: 食品添加物総覧, p. 41~43 (1992).