ノート

HPLC による食品中のアセスルファム K, サッカリン及び
アスパルテムの分析法

(平成 7 年 6 月 24 日受理)

守安貴子* 中里光男* 小林千種*
菊地洋子* 早野公美* 田村行弘*Determination of Acesulfame K, Saccharin and Aspartame
in Various Foods by HPLCTakako MORIYASU, Mitsuo NAKAZATO, Chigusa KOBAYASHI, Yoko KIKUCHI,
Kumi HAYANO and Yukihiro TAMURA(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan)

Method for the determination of acesulfame K (AK), saccharin (SA) and aspartame (APM) in various foods was investigated. Chopped or homogenized samples were packed with 0.01 N hydrochloric acid containing 10% sodium chloride into cellulose tubing and dialyzed against 0.01 N hydrochloric acid for 24~48 hours. For the detection of AK and SA, the dialyzate was analysed directly by HPLC on a Cosmosil 5NH₂ column using a mobile phase of methanol-1% phosphoric acid (6:4) with detection at 230 nm. For APM, the dialyzate was passed through a Sep-pak Vac C18 cartridge. The cartridge was washed with water and a mixture of methanol-water (2:8). APM was eluted with a mixture of methanol-1% phosphoric acid (3:7). It was separated on a Cosmosil 5C18-AR column using a mobile phase of methanol-0.02 M phosphate buffer pH 4.0 (1:3) with detection at 210 nm.

The recoveries of AK, SA and APM added to various foods were 94.3~100.4%, 80.4~99.6% and 90.8~101.7%, respectively. The detection limits of AK and APM were 10 µg/g and that of SA was 5 µg/g.

(Received June 24, 1995)

Key words: アセスルファム K acesulfame K; サッカリン saccharin; アスパルテム aspartame; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; アミノプロピルカラム aminopropyl column; ODS (C₁₈) カラム ODS (C₁₈) column; 透析法 dialysis; 固相抽出 solid-phase extraction

緒言

著者は先に、我が国では不許可添加物であるアセスルファム K (AK)^{1), 2)} と許可添加物であるサッカリン (SA) 及びアスパルテム (APM) の 3 種の合成甘味料の分析法を報告した³⁾。しかし、この方法はクリーンアップの際に、固相抽出用のカートリッジを 1 検体につき 3 本使用することから、簡便性及び経済性の点から改良の余地があった。また、その後、種々の市販食品にこの方

法を適用したところ、ビスケット、さきいかなどで AK 及び SA の回収率が低いものがあった。そこでこれらの点を改善するとともに、簡便で精度が良く、広範囲な食品に適用できる分析法について検討したので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試薬

1) AK 及び SA 混合標準原液: AK (純度 99.1%, 和光純薬工業(株)製, 生化学用) 約 100 mg 及びサッカリンナトリウム (二水和物, 特級, 和光純薬工業(株)

* 東京都立衛生研究所: 〒169 東京都新宿区百人町 3-24-1

製) 約 118 mg を精ひょうし, 水に溶解して全量を 100 ml とした.

2) APM 標準原液: APM (純度 98.0% 以上, 和光純薬工業(株)製, 食品添加物試験用) 約 100 mg を精ひょうし, 水に溶解して全量を 100 ml とした.

3) 透析内液用溶液: 塩化ナトリウム 100 g を 0.01 *N* 塩酸に溶解して 1,000 ml とした.

4) 透析外液用溶液: 0.01 *N* 塩酸

5) 透析膜: 透析用セルロースチューブ 30/32 (平面幅 40 mm, 直径 25 mm, 膜厚 0.0305 mm, Viskase sales 社製)

6) 前処理用カートリッジカラム: Sep-pak Vac C18 (逆相系, 充てん量 1,000 mg, Millipore 社製) を用いた. カートリッジは使用前に MeOH 5 ml 及び水 5 ml で順次洗浄した.

7) 1% リン酸: 85% リン酸 11.8 g に水を加え, 1,000 ml とした.

8) MeOH: 高速液体クロマトグラフ用を用いた.

9) 0.02 *M* リン酸緩衝液: 0.2 *M* リン酸水素二ナトリウム 500 ml と 0.2 *M* リン酸 470 ml を混和, これを用時, 10 倍希釈して約 pH 4.0 の緩衝液を作製した.

10) その他の試薬は市販特級品を用いた.

2. 装 置

高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業(株)製, 880-PU 型ポンプ, 同 875-UV 型検出器, 同 860-CO 型カラム恒温槽, (株)島津製作所製 C-R6A 型データ処理装置及びレオダイン社製 7125 インジェクターにより構成した.

3. HPLC 条件

1) AK 及び SA

カラム: Cosmosil 5NH₂ (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.); 移動相: MeOH-1% リン酸 (6: 4); 流速: 1.5 ml/min; 検出波長: 230 nm; カラム温度: 40°; 注入量: 10 μ l

2) APM

カラム: Cosmosil 5C18-AR (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.); 移動相: MeOH-0.02 *M* リン酸緩衝液 pH 4.0 (1: 3); 流速: 1.0 ml/min; 検出波長: 210 nm; カラム温度: 40°; 注入量: 20 μ l

4. 試験溶液の調製

1) 透析: 固体試料は細切又はホモジナイズした後, 液体試料はそのまま各々 20 g を正確に量り, これを透析内液用溶液で透析膜に充てんし, 内容物をよく混和して上端を密封した. これをメスシリンダー中に入れた後, 透析外液用溶液で全量を 200 ml とし, 時々揺り動かしながら室温で 24 時間, 乳製品, 穀物調製品及び魚介乾燥品などの一部の食品については 48 時間透析を行った.

2) HPLC 用試験溶液の調製

AK 及び SA: 透析外液を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し, ろ液を AK 及び SA 用の HPLC 用試験溶液とした.

APM: 透析外液 5 ml を Sep-pak Vac C18 カートリッジに毎分 3~4 ml の速度で負荷した. これを水 5 ml, 次いで MeOH-水 (2: 8) 混液 10 ml で洗浄した後, MeOH-1% リン酸 (3: 7) 混液で溶出し, 全量を 10 ml としたものを APM 用の HPLC 用試験溶液とした.

5. 検量線の作成

1) AK 及び SA: 混合標準原液を水で希釈し, 2, 5, 10, 50 及び 100 μ g/ml の混合標準溶液を調製し, その 10 μ l を高速液体クロマトグラフに付し, ピーク面積法により検量線を作成した.

2) APM: 標準原液を水で希釈し, AK 及び SA と同様に検量線を作成した. ただし, 高速液体クロマトグラフへの注入量は 20 μ l とした.

結果及び考察

1. 透 析

前報³⁾に従い, 種々の試料について検査を行ったところ, 原材料に鶏卵や脱脂粉乳などが用いられたビスケットなどの穀類調製品及びさきいかなどの魚介乾燥品の回収率が, AK で 60% 程度, SA で 50% 程度と良くなかった. 一般に, タンパク質の塩基性基が酸性溶液中でイオン化し, 低分子陰イオンと結合することは良く知られており⁴⁾, こうした食品の回収率が低かったのも, 食品中のタンパク質と, 解離した AK 及び SA が結合し, 透析されにくくなるためと考えられる. 一方, 溶液中に共存する陰イオンは, AK 及び SA と競合し, この結合を阻害する作用がある. リン酸溶液で透析した場合, 陰イオンとしてリン酸イオンが存在するが, 陰イオン交換の SAX カートリッジに保持された AK 及び SA がリン酸溶液では溶出しないことから³⁾, リン酸イオンは AK 及び SA と塩基性基との結合を阻害する作用が極めて弱いものと思われる⁵⁾. 従って, この結合を防ぐためには, 透析液の pH を中性付近とし, 塩基性基のイオン化を抑えるか, あるいはこれと AK 及び SA との結合を妨げるような, 塩基性基に対してより選択性の高いイオンを添加する方法が考えられる. しかし, 透析液を中性付近にした場合, APM は pH 6 以上では不安定であり^{6), 7)}, また, 微生物の繁殖によって分解する可能性もあることから, 回収率が低下することが予想される. そこで, 透析液には APM の分解を防止するために希薄な酸性溶液を用い, 更に結合を阻害するイオンを添加することとした. 一般に塩基性基との選択性が比較的大きい塩化物イオン⁵⁾は, 塩基性基と酸性物質との結合を阻害するのによく用いられる. また, 合成甘味料の透析に塩酸溶液と塩化ナトリウムとの組み合わせが用いられることから^{8), 9)}, 本法においても透析液に 0.01 *N* の塩酸を用

Fig. 1. Effect of concentration of sodium chloride in dialyzing solution on recoveries of the sweeteners

(A) acesulfame K, (B) saccharin, (C) aspartame

■—■: 0%, ●—●: 2.5%, ▲—▲: 5.0%, ◆—◆: 7.5%, □—□: 10% NaCl

The sample was biscuit added sweeteners.

いることとし、添加する塩化ナトリウムの濃度について検討を行った。試料には、前報⁹⁾で AK 及び SA の回収率が約 60% と良くなかったビスケットを用い、これに 3 種の甘味料を添加し、透析内液として 0, 2.5, 5, 7.5 及び 10% の塩化ナトリウムを含有する 0.01 N 塩酸約 20 ml を用いて透析し、3 種の甘味料の回収率を経時的に測定した。結果は Fig. 1 に示したように、APM は塩化ナトリウムの添加の有無に関わらず、24 時間でほぼ全量が透析された。AK は塩化ナトリウム無添加の場合、48 時間の透析でも 80% 程度の回収率しか得られなかったが、塩化ナトリウム 2.5% 以上添加ではいずれも 48 時間で 94% 以上の回収率が得られた。また、SA は 48 時間の透析で、塩化ナトリウム無添加では約 60% であったが、塩化ナトリウムの添加量が増加するに従い、回収率は徐々に上昇し、10% 添加では 85% の回収率が得られた。しかし、それ以上は塩化ナトリウムの添加量を増やしても回収率の上昇は認められなかった。これらの結果から、透析内液には 10% 塩化ナトリウムを含有する 0.01 N 塩酸を用いることとした。また、透析時間については、漬物、ジュース、液状調味料類、ジャムなど、大半の食品については 24 時間の透析で十分であったが、ヨーグルトなどの乳製品、ビスケットなどの穀物調製品及びさきいかなどの魚乾乾燥品では、良好な回収率を得るためには 48 時間透析する必要があった。

2. AK 及び SA の HPLC 条件

衛生試験法・注解¹⁰⁾に収載されている SA の HPLC は、カラムにアミノプロピル基を結合させたもの (NH₂ カラム) を、移動相に 1% リン酸-MeOH を用いたイオン交換モードの HPLC 条件を採用している。この場合、透析液をフィルター過したものを HPLC 分析用の試験溶液としており、簡便である。AK も SA と同様な強酸性物質であり、強陰イオン交換カートリッジ内での挙

Fig. 2. Effect of phosphoric acid concentration in the mobile phase on the retention time of acesulfame K and saccharin

●—●: acesulfame K, ■—■: saccharin
HPLC conditions; column: Cosmosil 5NH₂ (4.6 mm i.d. × 250 mm), mobile phase: MeOH-phosphoric acid (6:4), flow rate: 1.5 ml/min, column temperature: 40°C, detection: UV 230 nm

動がほぼ同じであることから⁹⁾, NH₂ カラムを用いたイオン交換モードの HPLC で SA との同時分析ができるものと考えられる。そこで NH₂ カラムを用い、両者を分離するための移動相条件について検討を行うこととした。

移動相条件は衛生試験法・注解¹⁰⁾に準拠し、リン酸溶液と MeOH との混液を用いて検討を行った。まず、リン酸溶液と MeOH の混合比を 4:6 とし、このリン酸溶液の濃度を 0.5~2.5% に変化させた際の AK 及び SA の分離について調べた。結果は Fig. 2 に示すようにいずれの濃度においても AK と SA の分離は良好であった。また、リン酸濃度が高くなるに従い、両者の保持時間は早くなる傾向がみられたが、夾雑物との分離、

Fig. 3. Effect of the ratio of methanol and 1% phosphoric acid of the mobile phase on the retention time of acesulfame K and saccharin

●—●: acesulfame K, ■—■: saccharin

HPLC conditions; column: Cosmosil 5NH₂ (4.6 mm i.d.×250 mm), mobile phase: MeOH-1% phosphoric acid, flow rate: 1.5 ml/min, column temperature: 40°C, detection: UV 230 nm

Table 1. Recoveries of Sweeteners from Foods

Sample	Dialyzing time (hr)	Recovery (%)*		
		Acesulfame K	Saccharin	Aspartame
Apple juice	24	97.6±1.0	95.6±0.8	99.0±2.8
Soy sauce	24	100.4±1.3	99.6±1.9	101.7±2.7
Wercester sauce	24	98.8±1.8	98.8±2.4	90.8±1.3
Strawberry jam	24	98.1±1.3	95.7±1.2	91.8±1.7
Canned peach	24	98.1±1.5	95.5±1.2	96.8±2.2
Pickles with vinegar	24	96.7±1.3	95.7±0.9	99.5±2.5
Takuan-zuke	24	98.0±1.9	96.3±1.9	97.8±0.6
Yogurt	48	94.9±1.4	89.7±1.1	94.0±3.8
Biscuit	48	94.3±0.8	85.1±1.5	98.2±5.0
Dried cuttlefish	48	95.3±2.2	80.4±1.6	90.8±2.5

* Data are mean±SD. (n=4)

分析時間及び高速液体クロマトグラフポンプへの影響を考え、移動相に用いるリン酸濃度は1%とした。次に1%リン酸とMeOHの混合比について検討を行った。結果はFig. 3に示すように、1%リン酸の比率が高くなるに従ってAKとSAの分離は悪くなった。また、両者の保持時間は1%リン酸-MeOHの混合比が2:8から6:4までは1%リン酸の比率が増加するに従って早くなるが、更に1%リン酸の比率が高くなると逆に遅くなる傾向がみられた。これらの結果から、分析条件として適当な混合比は1%リン酸-MeOH 4:6又は5:5であることが分かった。しかし、夾雑物との分離の点で4:6の方が5:5よりも良好であったため、移動相の1%リン酸-MeOHの混合比は4:6とした。

3. APMのクリーンアップ条件及びHPLC条件

1) クリーンアップ条件: 強陽イオン交換カートリッジを用いたAPMのクリーンアップでは、負荷する試料溶液のpHが3以上では、塩化ナトリウムの影響を強く受けることから、その影響を除くために試料溶液のpHを2以下とする必要がある³⁾。従って、本法の透析液の組成では、pH調整が不可欠となる。一方、寺田ら¹¹⁾はAPMがpH 2~6の間でSep-pak C18カートリッジに保持されると報告している。従って、このカートリッジを用いればpH調整を行うことなく、簡便にクリーンアップできるものと考えられた。そこで、Sep-pak Vac C18 (充てん量1,000 mg)を用いて、種々の試料の透析液について、pH調整せずに、そのまま負荷したところ、いずれの試料においてもAPMの保持が可能であっ

Fig. 4. HPLC chromatograms of standard solution of acesulfame K and saccharin (A), extract of Takuan-zuke (B), and extract of dried cuttlefish (C)

(1) control, (2) sweeteners added (200 µg/g)

HPLC conditions; column: Cosmosil 5NH₂ (4.6 mm i.d.×250 mm), mobile phase: MeOH-1% phosphoric acid (6:4), flow rate: 1.5 ml/min, column temperature: 40°C, detection: UV 230 nm, injection volume: 10 µl

Fig. 5. HPLC chromatograms of standard solution of aspartame (A), extract of Takuan-zuke (B), and extract of dried cuttlefish (C)

(1) control, (2) sweeteners added (200 µg/g)

HPLC conditions; column: Cosmosil 5C18-AR (4.6 mm i.d.×250 mm), mobile phase: MeOH-0.02 M phosphate buffer pH 4.0 (1:3), flow rate: 1.0 ml/min, column temperature: 40°C, detection: UV 210 nm, injection volume: 20 µl

た。しかし、寺田ら¹¹⁾の方法では試料負荷後の洗浄を水のみで行っており、夾雑物の多い試料ではクリーンアップ不足となる傾向があった。そこで、洗浄液として、洗浄効果の高い MeOH-水を加え、その比率及び液量について検討した。その結果、水 5 ml で洗浄した後、更に MeOH-水 (2:8) 混液 10 ml で洗浄したとき、APM が溶出することなく、夾雑物の大幅な除去が可能であった。しかし、この MeOH-水混液で過剰に洗浄すると、洗浄液量 15~35 ml 中に APM が溶出されることから、洗浄は正確に 10 ml で行う必要があった。

次に、溶出液について MeOH-水系を用いて検討した。カラム内に残っている夾雑物の溶出を防ぐために

は、MeOH の比率が低い方が、また、溶出液量は少ない方が好ましい。そこで、溶出液の pH を下げて APM のイオン化を促進し、より MeOH の比率が少ない条件で溶出させるために、水の代わりに 1% リン酸を用いることとした。その結果、MeOH-1% リン酸の比率は 3:7 が適当であり、また、溶出液量は 8 ml で APM のほぼ全量が溶出したため、10 ml とした。

2) HPLC 条件

APM の分析は、寺田ら¹¹⁾の HPLC 条件に準じて行った。すなわち、カラムには Cosmosil 5C18-AR を、移動相には MeOH-0.02 M リン酸緩衝液 (pH 4.0) (1:3) 混液を用いて、種々の試料について分析したとこ

ろ、いずれも夾雑物との分離が良く、良好なクロマトグラムが得られた。

4. 添加回収実験

AK, SA 及び APM が検出されないことを確認したり、りんごジュース、しょう油、ソース、いちごジャム、桃の缶詰、ヨーグルト、酢漬け、たくあん漬け、ビスケット及びさきいかの 10 種の食品について、添加回収実験を行った。液状食品はそのまま、固形食品は細切後、3 種の甘味料をそれぞれ 200 $\mu\text{g/g}$ になるように添加し、6 時間放置した試料を本法に従って操作した。回収率は Table 1 に示したように、AK が 94.3~100.4%, SA が 80.4~99.6%, APM が 90.8~101.7% であった。AK 及び APM についてはいずれの食品においても 90% 以上の回収率が得られた。SA についてはヨーグルト、ビスケット及びさきいかで 80.4~89.7% とやや回収率が低い傾向がみられたが、本法が 3 種の甘味料の分析法であることを考慮すると、実用上、十分な回収率が得られたと考える。

標準品と、たくあん漬け及びさきいかより得た試験溶液の、AK 及び SA についてのクロマトグラムを Fig. 4 に、APM についてのクロマトグラムを Fig. 5 に示した。いずれの甘味料についても夾雑物と分離ができ、良好なクロマトグラムが得られた。

また、本法における検出限界は、試料中濃度として、AK 及び APM で 10 $\mu\text{g/g}$ 、SA で 5 $\mu\text{g/g}$ であった。

ま と め

食品中の AK, SA 及び APM の分析法について、簡便で精度も良く、経済性の高い試験法を作成した。

1. 試料中からの AK, SA 及び APM の抽出には透析法を用い、透析内液として 10% 塩化ナトリウムを含有する 0.01 N 塩酸を用いた。これにより、ビスケット、さきいかなど、前報で回収率の良くなかった試料について回収率を高めることができた。

2. AK 及び SA の HPLC 分析に NH_2 カラムを用いることにより、クリーンアップ操作をすることなく分析することができ、大幅に簡素化できた。

3. APM はクリーンアップに Sep-pak Vac C18 カートリッジを用い、洗浄に MeOH-水を用いることにより、pH 調整なしで夾雑物の大幅な除去が可能となった。

4. 本法における定量限界は試料中濃度として AK 及び APM で 10 $\mu\text{g/g}$ 、SA で 5 $\mu\text{g/g}$ であった。

5. 10 種の食品に 3 種の甘味料を添加した際の回収率は AK 及び APM で 90% 以上、SA で 80% 以上であった。

文 献

- 1) Hough, C. A. M., Parker, K. J., Vlitos, A. J.: "Developments in Sweeteners—1" p. 151~158 (1979) Applied Science Publishers Ltd., London.
- 2) 香川輝彦: "世界の食品添加物" p. 60~64 (1994) 食品化学新聞社.
- 3) 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).
- 4) 水島三一郎, 赤堀四郎編: "蛋白質化学 4" p. 31~45 (1956) 共立出版.
- 5) 久保博昭監修: "固相抽出法ハンドブック" p. 98~104 (1986) ユニフレックス.
- 6) 西島基弘, 冠 政光, 高橋尚子, 上村 尚, 中里光男, 渡利優子, 木村康夫: 食衛誌. **17**, 78~84 (1976).
- 7) 中村圭寛: 醸協. **86**, 200~207 (1991).
- 8) 谷村顕雄, 藤井正美, 義平邦利, 伊藤誉志男, 城 照雄監修: "食品中の食品添加物分析法解説書" p. 354~364 (1992) 講談社.
- 9) 中里光男, 斎藤和夫, 石川ふさ子, 藤沼賢司, 守安貴子, 二島太一郎: 食衛誌. **34**, 248~253 (1993).
- 10) 日本薬学会編: "公衆衛生協議会資料" p. 12~13 (1994).
- 11) 寺田久屋, 坂部美雄: 衛生化学 **29**, 394~399 (1983).