

アセスルファミンKの迅速分析法の検討

松井久仁子¹・中嶋昌徳²

Rapid Analysis of Acesulfame-K

Kuniko MATSUI, Masanori NAKASHIMA

要 旨

平成 12 年 1 月現在, 食品衛生調査会に諮問中である甘味料アセスルファミン K (AK) の迅速分析法の検討を高速液体クロマトグラフ (HPLC) およびキャピラリー電気泳動 (CE) を用いて行った。試料をホモジナイズし, 水を加え, カルツ液で精製し, ろ過後, HPLC で測定した。本法はサッカリンナトリウム (SA) と同時分析が可能であった。12 種類 35 検体の食品に添加したときの回収率は 93 ~ 106 %, 変動係数 (CV%) は 0.51 ~ 2.60% であり, とともに良好であった。また, カルツ抽出液は CE でも測定可能で AK の定性確認に有効であった。

Key Words : アセスルファミン K Acesulfame-K, サッカリンナトリウム Sodium Saccharin, 甘味料 Sweetenings, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, キャピラリー電気泳動 Capillary electrophoresis

I はじめに

AK は, 1983 年にイギリスで認可されたのを皮切りに世界 90 カ国以上で食品添加物として認可を受けているが, 日本ではまだ認められていない。AK は急性毒性試験, 発ガン性試験, 変異原性試験, 繁殖試験, 体内動態等の各試験で問題がないことは確認されており, 平成 12 年 1 月現在, 食品衛生調査会に諮問中である。厚生省の方針では, 加工食品全般に使用を認め, より安全性を確保するという観点から各食品ごとに使用量の基準が設定される。このため, 今後, 行政収去の際に検査を行うことが必要となる。そこで今回, AK と SA の同時分析法を検討した。AK について小林ら¹⁾は透析-HPLC による SA, アスパルテーム等の甘味料の一斉分析法を報告しているが, 著者らは現在, SA の分析に用いているカルツ抽出^{2, 3)}-HPLC⁴⁾で検討を行なった。本法はカルツ液で除タンパクを行い, ろ過して HPLC で分析する簡便な方法で, 透析法に比べ抽出時間が短くできるので

迅速な分析が可能である。また AK の確認法として, HPLC と異なる原理で分離するキャピラリー電気泳動 (CE) を用いて検討したので併せて報告する。

II 材料及び方法

1. 試料

市販の食品 12 種類 35 検体 (表 1 参照)

2. 試薬および試液

- (1) 標準溶液: AK (和光 生化学用) 100mg, SA (o-スルホベンズイミドナトリウム二水和物 東京化成特級) 117.5mg をそれぞれ正確に量り, 蒸留水で 100ml に定容し, 1000ppm 標準原液をそれぞれ調製した。標準原液を適宜水で希釈して標準溶液を調製した。
- (2) 溶離液: HPLC 用アセトニトリル 150ml に水を 800ml 加え, pH3.0 に調整後, 水で 1l に定容した。
- (3) 泳動液: 20mM 四ホウ酸 Na 溶液をリン酸で pH9.0 に調製した。
- (4) カルツ試薬: 市販の特級試薬を用いてカルツ A 液 (15% K₄Fe(CN)₆), カルツ B 液 (30% ZnSO₄ · 7H₂O) を調製した。

1. 福岡市保健環境研究所 理化学課
(現所属: 福岡市中央区役所 保健管理課)

2. 福岡市保健環境研究所 理化学課

その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

3. 装置

HPLC: HITACHI Lachrom (ポンプ L-7100, UV 検出器 L-7400, オートサンプラー L-7200, データ処理装置 D-2500)

CE: ヒューレットパッカード (HP3DCE システム G1600) フォトダイオードアレイ検出器付き

4. 測定条件

HPLC測定条件 (定量試験)

カラム : Inertsil PH 5 μ m 4.6 \times 150mm
溶離液 : アセトニトリル-水 15:85 (pH3.0)
流量 : 1.0 ml/min カラム温度: 室温
検出波長: 230nm 注入量 14 μ l

CE測定条件 (確認試験)

キャピラリー: フューズドシリカ ϕ 75 μ m 有効長 56cm 全長 64.5cm バブルセル
キャピラリー温度: 25 $^{\circ}$ C
泳動液 : 0.02mol/l 四ホウ酸ナトリウム pH 9.0
電圧 : 30KV 注入量 : 150mbar \cdot s
検出波長: 230nm

5. 試験溶液の調製

細切・ホモジナイズした試料を 20g 採り, 蒸留水を 100ml 加え, 10%NaCO₃ で微アルカリに調製後, 一晚放置した。更に水を 180ml になるまで加え, カルツA液, カルツB液をそれぞれ 5ml ずつ加え, 振とう後, 200ml に定容した。15 分間放置後, 茶こし及びろ紙でろ過し, ろ液を試験溶液とした。試験溶液は更に水で 4 倍に希釈後, 孔径 0.2 μ m のメンブランフィルターでろ過し, HPLC 用試験溶液とした。また, 試験用液を水で 5 倍希釈して CE 用試験溶液とした。

III 結果及び考察

1. HPLC測定結果

AK, SA の標準溶液 (10ppm) およびジャムに AK を添加したときのクロマトグラムを図 1 に示す。

AK, SA の保持時間は, それぞれ 10.0 分, 12.3 分と良好に分離し, 同時分析が可能であることがわかった。

また, ジャムに AK を添加したときも妨害ピークは見られなかった。しかしながら図 2 に示すとおり, みその場合, カルツ抽出液をそのまま試験溶液として HPLC で測定すると保持時間が早くなることが判明した。これはみそ中の食塩やタンパク質等の影響を受けているため

と思われたので, その影響を弱めるためカルツ液試験溶液を水で 4 倍希釈し測定したところ, 保持時間の差はなくなった。みそ他にしょうゆ, ソースでも同様に保持時間の差が生じたが, カルツ抽出液を 4 倍に希釈すれば差がなくなることがわかった。そこで食品の種類に関わらずカルツ抽出液は 4 倍希釈して測定することにした。

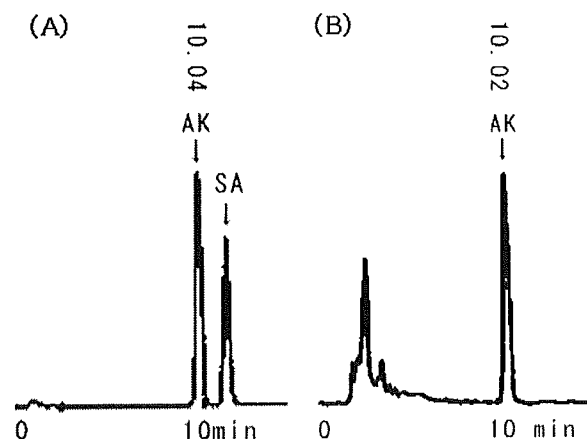


図 1. (A) AK, SA 標準溶液 (各 10ppm) および (B) AK をジャムに添加したときのクロマトグラム

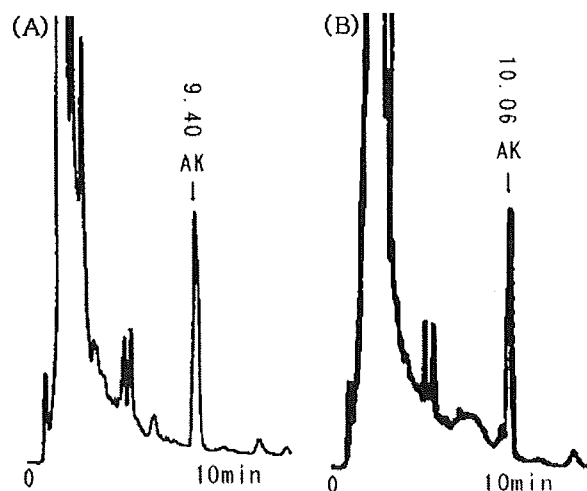


図 2. (A) みそに AK を 10mg/kg になるように添加したときのカルツ抽出液および (B) カルツ抽出液を更に 4 倍希釈したときのクロマトグラム

2. ソルビン酸等の影響

カルツ抽出法ではソルビン酸 (SOA), 安息香酸 (BA), デヒドロ酢酸 (DHA) もいっしょに抽出されることが判明したため, この HPLC 条件でこれらの標準溶液を測定したところ図 3 に示すとおり, 13.2 分に SOA, 15.5 分に BA, 19.3 分に DHA のピークが出現することがわかったので, 分析時間を 22 分とした。

3. AKの検量線および定量下限

AK, SA の検量線は 0.5ppm から 50ppm の間で相関係数 0.999 以上の良好な直線性を示した。なお, 定量下限は試料濃度 0.02g/kg とした。

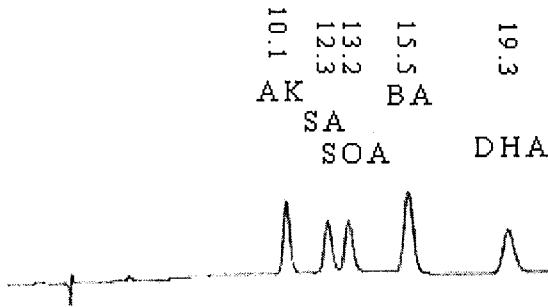


図3 AK,SA,SOA,BA,DHA の標準溶液(各 0.5ppm)のクロマトグラム

4. AKの添加回収実験

ソーセージ, 魚みりん干, みそ等の食品 20g に, AK 標準溶液(1000ppm)をそれぞれ 2ml 添加し, 本法に従い添加回収実験を行った。なお, キャンディについては妨害ピークがみられたのでエーテル抽出を行ったところ, 妨害が除去できた。添加回収実験の結果を表 1 に示す。

回収率は 93 ~ 106%, CV%は 0.51 ~ 2.60%とどちらも良好であった。回収率が 100%を若干超える食品もあるが, これは試験溶液定容の際に固形の残渣が含まれるためである。

5. CEによるAK, SAの確認

HPLCでAK, SA のピークを検出したものについて, CEでの確認試験法を検討した。

Thompson ら⁵⁾は CE による AK, SA 等の一斉分析法を報告しているが, 試料を水で希釈し, ろ過するだけなので検査対象食品は限られている。著者らは多数の種類の商品を対象としているので, カルツ抽出液をそのまま CE で測定できる条件を検討した。pH9.0 の 0.02M 四ホウ酸 Na の泳動液で AK, SA, SOA, BA, DHA の標準溶液を泳動させたところ, 各物質は図 4 に示すとおり良好に分離した。そこで, カルツ抽出液をそのまま CE で測定したところ, みそ, しょうゆ, ソースの場合, HPLC と同様に標準溶液と移動時間(M.T.)に差が生じることが判明した。そこでカルツ抽出液を 5 倍希釈して CE で測定したところ, 差がなくなることが確認できた。図 5 にみそのエレクトロフェログラムを示す。CE の M.T.およびピークの吸収スペクトルから, AK, SA の同定が可能

であることが分かった。図 6 に AK,SA の吸収スペクトルを示す。

表 1 AK 添加回収結果

食品名	種類	回収率 (%)	平均回収率 (%)	CV (%)
ソーセージ	食肉製品	102.7 103.9 101.5	102.7	0.95
魚みりん干し	魚介加工品	100.4 98.0 100.4	99.6	1.14
みそ	みそ	99.9 98.4 99.0	99.1	0.62
しょうゆ	しょうゆ	96.6 98.2 100.5	98.4	1.63
ソース	ソース	94.5 93.3 93.3	93.7	0.60
ヨーグルト	発酵乳	100.4 102.7 99.2	100.8	1.44
乳酸菌飲料	乳酸菌飲料	100.4 100.4 101.5	100.8	0.51
ジャム	ジャム	99.2 100.4 100.4	100.0	0.57
ワイン	酒精飲料	99.2 100.4 99.2	99.6	0.57
キャンディ	菓子	99.1 100.3 94.4	97.9	2.60
タイソース	調味料	98.8 101.4	100.1	1.30
梅干し 白菜漬 朝鮮漬	漬物	100.2 105.6 106.2	104.0	2.59
平均回収率 (%)		99.7		

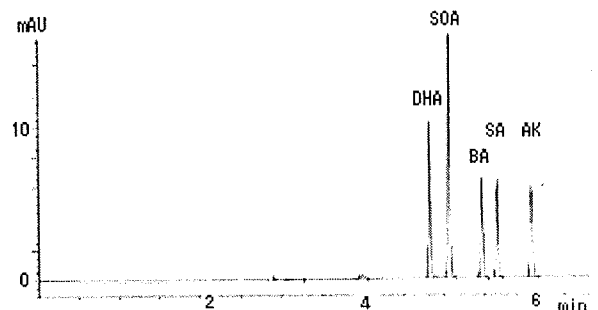


図4 DHA,SOA,BA,SA,AK 標準溶液(各 10ppm)のエレクトロフェログラム

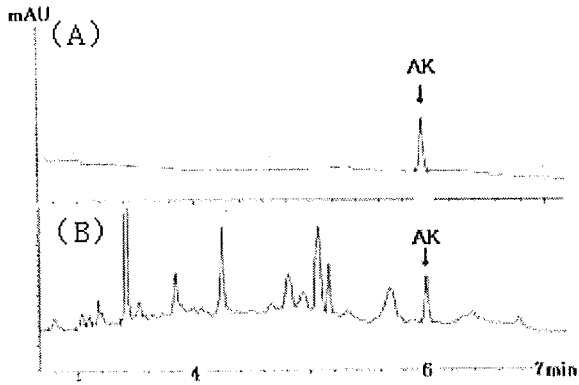


図5 (A) AK 標準溶液(2ppm)および(B)みそに AK を添加し、カルツ抽出液を5倍希釈したときのエレクトロフェログラム

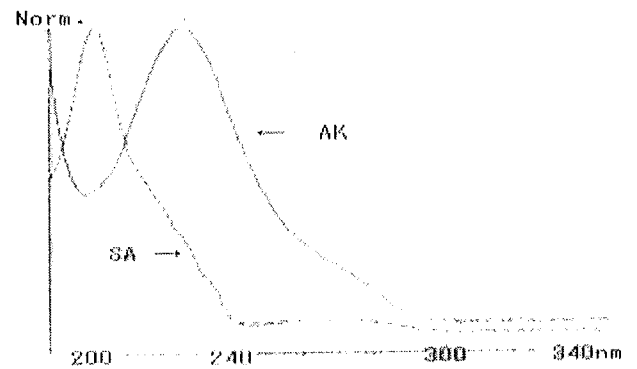


図6 CEで分離した AK ,SA 標準溶液(10ppm)の吸収スペクトル

IV まとめ

今回、食品中の AK の迅速分析法を検討した。本法はカルツ液で除タンパク、抽出を行い、ろ過して希釈するだけの簡便な操作である。AK の添加回収実験結果は、回収率は 93 ~ 106%、CV%は 0.51 ~ 2.60%とともに良好な結果が得られ、また、SA との同時分析も可能であった。カルツ抽出液は CE でも AK, SA の分析は可能で、確認試験法として有用であった。また、本法は保存料の SOA,BA,DHA 等も抽出するので、現在、AK, SA, SOA, BA, DHA 等の一斉分析法を検討中である。

参考文献

- (1)小林千種, 中里光男, 牛山博文ほか: 食品衛生学雑誌 40, 166 ~ 171(1999).
- (2)衛生検査指針Ⅲ食品衛生検査指針(Ⅱ) 保存料検査法,p15(1963).
- (3)日本薬学会 衛生試験法注解 1990 金原出版, p 307 ~ 311(1995).
- (4)日本薬学会 衛生試験法注解 1990 金原出版, p1544 ~ 1549(1995).
- (5)Thompson,C.O.,Trenerry,V.C.,Kemmerly,J.Chromatogr.A, 694,507 ~ 514(1995).