

サイクラミン酸, ズルチンのHPLCによる定量及び  
LC/MS/MSによる確認と8種甘味料の系統的分析

松本ひろ子, 平田恵子, 坂牧成恵, 萩野賀世, 牛山博文

## サイクラミン酸, ズルチンのHPLCによる定量及び

### LC/MS/MSによる確認と8種甘味料の系統的分析

松本 ひろ子\*, 平田 恵子\*, 坂牧 成恵\*, 萩野 賀世\*, 牛山 博文\*\*

8種人工甘味料, サッカリン, アスパルテーム, スクラロース, アセスルファムカリウム, ネオテーム, サイクラミン酸 (CY), ズルチン (DU), アリテームの透析-HPLCによる系統的分析法の一部改良を行った. この中でCY, DUの各HPLC分析の前処理として, 透析外液の精製にいずれも逆相系固相抽出カートリッジを用いるよう改良した. 9種の食品にCY, DUを各0.2 g/kg添加した場合の平均回収率は96%以上で, 定量限界はいずれも試料当たり0.005 g/kgであった. また, CY, DUのLC/MS/MSによる確認法を作成した.

**キーワード:** サイクラミン酸, ズルチン, 人工甘味料, 高速液体クロマトグラフィー, 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法, 透析法, 固相抽出

#### はじめに

生活習慣病の予備軍であるメタボリックシンドローム (内臓脂肪症候群) の予防・改善を目的とする「特定健診・特定保健指導」(通称メタボ健診) が2008年4月からスタートした. 消費者の健康志向はさらに強まり, 食生活を改善しようという機運が高まっている. これまでのダイエット志向とも相俟って, 糖摂取を抑制してカロリー低減を図ろうと, 低カロリーの人工甘味料を使用した食品のニーズが増加している.

我が国では, 1948年にサッカリンナトリウム (以下SAと略す), 1983年にアスパルテーム (以下APM), 1999年にスクラロース (以下SUC), 2000年にアセスルファムカリウム (以下AK), 2007年にネオテーム (以下NE) がそれぞれ食品添加物に指定され, 人工甘味料として使用することができる. この他に甘味料としては, 糖アルコールのD-ソルビトール, キシリトール, 天然系甘味料としてステビア, グリチルリチン酸等がある. このように甘味料の選択肢の多様化とともに, 甘味料を複数組み合わせる使用ケースが見られるようになった.

一方, 世界的にはサイクラミン酸 (以下CYと略す), アリテーム (以下AL) といった人工甘味料も使用されている. また, ズルチン (以下DU) のように過去に使用されていたものが検出される事例も見られる. これらは我が国では使用することができない指定外添加物であるが, 輸入食品の増加から, これらの検査需要も高まっている. このように国内で使用できる甘味料の多様化と, 指定外甘味料も視野に入れた多種甘味料の検査が求められている.

そこで, 著者らはこれまでに, 各種甘味料について前処理を透析法に統合し, 系統化, 省力化した分析法を報告している<sup>1)</sup>. また, CYについては, CYを誘導体化することなく, 電気伝導度検出器 (以下CDと略す) を用いて直接分析

する方法を報告した<sup>2)</sup>. 今回は既報<sup>1), 2)</sup>の改良として, CY及びDUの固相抽出カートリッジによる新たな精製方法について検討した. さらに, これら2種甘味料が指定外添加物であることから, LC/MS/MSによる確認法についても検討を行った.

また, 最近報告したNE, AL及びAPMの同時分析法<sup>3)</sup>を, 今回のCY, DUの一部改良法と合わせて, これまでの前処理を透析法に統合した甘味料の系統的分析法<sup>1), 2)</sup>に加えることとした. すなわち, 指定添加物であるSA, APM, SUC, AK, NEの5種と指定外添加物であるCY, DU, ALの3種を合わせた8種甘味料を透析法により一括抽出し, 透析外液を5系統に分けてHPLCにより分析することとした. この透析-HPLC法による系統的分析法の再構築により, 甘味料分析の大幅な省力化を図ることができたので報告する.

#### 実験方法

8種甘味料中, 今回の実験方法は, CYとDUの2種甘味料に関する記述に止め, 他の6種甘味料の分析条件等については, 後述の結果及び考察の「5. 8種甘味料の系統的分析」の中に記述した. なお, 透析方法については8種甘味料とも共通である.

##### 1. 試料

東京都内で購入した干黒梅, 酢こんぶ, しば漬け, ジャム, ジュース, フルーツ缶詰, ウスターソース, クッキー, キムチを用いた.

##### 2. 標準品及び試薬等

###### 1) 標準品及び標準溶液

CY (シクロヘキシルアミド硫酸ナトリウム, 特級, 和光純薬工業 (株) 製) 112 mg, DU (食品添加物用, ICN Biochemicals社製) 100 mgを精秤し, それぞれを50%メタノ

\* 東京都健康安全研究センター多摩支所食品衛生研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

\*\* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

ール溶液に溶解して全量を100 mLとしたものを標準原液 (CY, DUとして各1,000 µg/mL) とし, これを段階的に希釈して標準溶液とした。

## 2) 透析内液

塩化ナトリウム100 gを0.01 mol/L塩酸に溶解して1,000 mLとした。

## 3) 透析外液

0.01 mol/L塩酸

## 4) 透析膜

透析用セルロースチューブ36/32 (平面幅43 mm, 直径27 mm, 膜厚0.0203 mm, Viskase社製)

## 5) 前処理用カートリッジカラム

(1) **HPLC試験溶液用** CY用としてOasis HLB (充填量500 mg, Waters社製), DU用としてSep-Pak Vac C18 (充填量500 mg, Waters社製) を使用前にメタノール, 水各5 mLでコンディショニングして用いた。

(2) **LC/MS/MS CY試験溶液用** Maxi-Clean IC-Ag (交換容量0.5 mL, Alltech社製) を使用前に水3 mLでコンディショニングして用いた。

## 6) 試薬, 溶媒

試薬は市販特級品を用い, メタノールは高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

## 3. HPLC装置及び測定条件

### 1) HPLC装置

日本分光(株)製LC-900シリーズ (送液ポンプ, デガッサー, 恒温槽, オートサンプラー, UV検出器)。CDには東亜電波工業(株)製ICA-5220を用いた。

### 2) 測定条件

(1) **CY用** カラム:Cosmosil 5NH<sub>2</sub> (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 µm, ナカライテスク(株)製), 移動相:1%リン酸-メタノール(3:2)混液, カラム温度:40°C, 流速:1.0 mL/min, 注入量:100 µL, 検出器:CD (セル温度 45°C, GAIN ×1)

(2) **DU用** カラム:Cosmosil 5C18AR-II (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 µm, ナカライテスク(株)製), 移動相:40%メタノール, カラム温度:40°C, 流速:0.8 mL/min, 注入量:10 µL, 検出器:UV 240 nm

## 4. LC/MS/MS装置および測定条件

### 1) LC/MS/MS装置

LC装置:Waters社製ACQUITY UPLC システム, タンデム質量分析装置:Waters社製Quattro Premier XE

### 2) 測定条件

Table 1に示した。

## 5. 試験溶液の調製

液状試料はそのまま20 gを, 固形試料は細切した試料20 gをとり, 約20 mLの透析内液を加えて混和後, 少量の透析内液で透析膜に充填し, 上端を密封した。これをメスシリンダー内に入れ, 透析外液で全量を200 mLとし, 時々揺り

動かしながら常温で24時間透析した。なお, 穀類, 魚介類加工品などの一部食品では透析時間を48時間とした。

### 1) HPLC用CY試験溶液の調製

透析外液30 mLに20%塩酸0.6 mLを加え, この25.5 mL (透析外液25 mL相当量) をOasis HLBカートリッジに負荷した。これを水5 mLで洗浄した後, 50%メタノール溶液で溶出し, 5 mLに定容したものをHPLC用CY試験溶液とした。

### 2) LC/MS/MS用CY試験溶液の調製

HPLC用CY試験溶液4 mLをMaxi-Clean IC-Ag カートリッジに負荷した。初めに流出した2 mLを捨て, 残りの流出液を捕集してLC/MS/MS用CY試験溶液とした。

### 3) HPLC及びLC/MS/MS用DU試験溶液の調製

透析外液5 mLをSep-Pak Vac C18カートリッジに負荷し, 0.02 mol/L水酸化ナトリウム溶液5 mL, 水5 mLで洗浄し, 50%メタノール溶液で溶出し, 5 mLに定容したものをHPLC及びLC/MS/MS用DU試験溶液とした。

Table 1. Operating Conditions of LC/MS/MS

	CY	DU
Column	ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d.×100 mm, 1.7 µm)	
Column temperature	40 °C	
Mobile phase	0.1% HCOOH - MeOH (7:3)	40% MeOH
Flow rate	0.2 mL/min	
Injection volume	1 µL	
Ionization	ESI negative	ESI positive
Analysis mode	Product ion scanning ( <i>m/z</i> 50 - 200)	
Capillary voltage	3.5 kV	
Desolvation gas flow	N <sub>2</sub> 800 L/hr	
Cone gas flow	N <sub>2</sub> 50 L/hr	
Source temperature	120 °C	
Desolvation temperature	400 °C	
Cone voltage	40 V	25 V
Collision voltage	25 eV	20 eV
Precursor ion	<i>m/z</i> 178	<i>m/z</i> 181

## 6. 定量

CY標準溶液及びHPLC用CY試験溶液の各100 µL, DU標準溶液及びHPLC用DU試験溶液の各10 µLをHPLCに注入し, あらかじめ作成した2.5~100 µg/mLのCY標準溶液の検量線及び0.5~100 µg/mLのDU標準溶液の検量線から試験溶液中のCY, DU濃度を求めた。

## 結果及び考察

### 1. CYのHPLC測定条件

#### 1) カラム及び移動相

カラムにはSA, AKの分析に用いるシリカゲルにアミノプロピル基が化学結合したシリカゲルNH<sub>2</sub>カラムを用いた。移動相については, 既報<sup>2)</sup>で用いた1%リン酸-メタノール混液(3:2)と, AKの通知検査法<sup>4)</sup>で用いる1%リン酸-アセトニトリル混液(2:3)の2液について検討した。SA, AK検出用のUV検出器では, 2液とも使用可能であったが, CY検出用のCD検出器ではメタノール混液の方がCY

を感度良く測定できた。そこで、移動相には1%リン酸-メタノール混液 (3 : 2) を用いることとした。

## 2) 検出器

CYはCD検出器を用いることで、誘導体化することなく、標準溶液で2.5 µg/mLまで測定することができた。また、UV検出器を直列に接続し、カラム、移動相を変えることなくSA、AKを連続して測定することができた (HPLCクロマトグラムは既報<sup>2)</sup> 掲載)。

## 2. CYの精製

### 1) HPLC用試験溶液の精製

CD検出器によるCYの検出限界は2.5 µg/mLであり、通知検査法<sup>5)</sup>の定量限界である0.005 g/kgまで検出するためには透析外液を少なくとも5倍濃縮する必要があった。既報<sup>2)</sup>では溶媒抽出法を用いたが、使用する溶媒量を低減化するために今回は固相抽出カートリッジを用いた透析外液の濃縮、精製方法について検討を行った。

CYはスルホン基を持つ強酸性物質であり、はじめに、陰イオン交換カートリッジに大量に保持させ、溶出液を少量とする濃縮と精製を試みた。陰イオン交換カートリッジとして強陰イオン交換のBond Elut SAX、弱陰イオン交換のSep-Pak NH<sub>2</sub>、ポリマーベースのOasis MAX及びOasis WAXの各々にpHを調整したCY添加透析外液を負荷したところ、いずれのカートリッジも10~20 mLの負荷でCYが漏出した。これは、透析外液中の塩化ナトリウムがイオン交換固相へのCYの保持を妨げているためであり、この塩化ナトリウムを除去しない限り、イオン交換モードによる精製は不可能であった。そこで、堀江<sup>6)</sup>らが用いたポリマーベースの逆相系カラムであるOasis HLBカートリッジによる精製を試みた。非解離状態のCYをカートリッジに保持させるため、透析外液の塩酸濃度を0.1 mol/Lとしたところ、5%塩化ナトリウム含有透析外液 (25%食塩含有試料20 gを50 mL透析内液で透析した時) でもCYを十分に保持することができた。洗浄は水5 mLが限界で、それ以上行くとCYが漏出してしまった。

Fig. 1にCY標準溶液及びCYを添加した酢こんぶのHPLCクロマトグラムを示した。溶媒抽出法に比べて10分以降の夾雑ピークの除去が不完全ではあるが、おおむねCY測定の妨害とはならなかった。CYの検出限界は試料中濃度として0.005 g/kgであり、良好な感度を得ることができた。

### 2) LC/MS/MS用試験溶液の調製

Oasis HLBカートリッジによる精製では、HPLCクロマトグラム10分以降の夾雑ピーク、特に塩素イオンのピークを完全に除去することはできなかった。LC/MS/MSへの注入用試験溶液としてはさらに精製する必要があった。そこで、Ag型の陽イオン交換カートリッジによる精製法の検討を行った。用いたのはMaxi-Clean IC-Ag (交換容量0.5 mL) で、水3 mLでコンディショニングした後、Oasis HLBカートリッジで精製したHPLC用CY試験溶液4 mLを負荷した。ハロゲンイオンはカートリッジに保持され、CYは保持され

ることなく流出することから、流出液を1 mLずつ捕集してCY濃度を測定した。その結果、3 mL以降の流出液のCY回収率は97%以上と良好であったことから、初めに流出した2 mLを捨て、残りの流出液2 mLを捕集してLC/MS/MS用CY試験溶液とした。Fig. 2にCYを添加したキムチ透析外液のOasis HLB及びMaxi-Clean IC-Agカートリッジによる精製後のHPLCクロマトグラムを示したが、10分以降の夾雑ピークを良く除去することができた。

また、この精製はCD検出でも効果的であった。ほとんどの食品では問題とならなかったが、キムチなどの一部の食品でHPLC用CY試験溶液を注入後、CDが大きくマイナスにドリフトしたままとなり、CYの検出時間近辺になっても測定可能なレベルまで戻らないという現象が見られた。これは試料中のイオン性物質が過剰であることに起因すると考えられた。そこで、HPLC用CY試験溶液ではCD測定が困難な試料のみLC/MS/MS用CY試験溶液と同様の精製を行った。

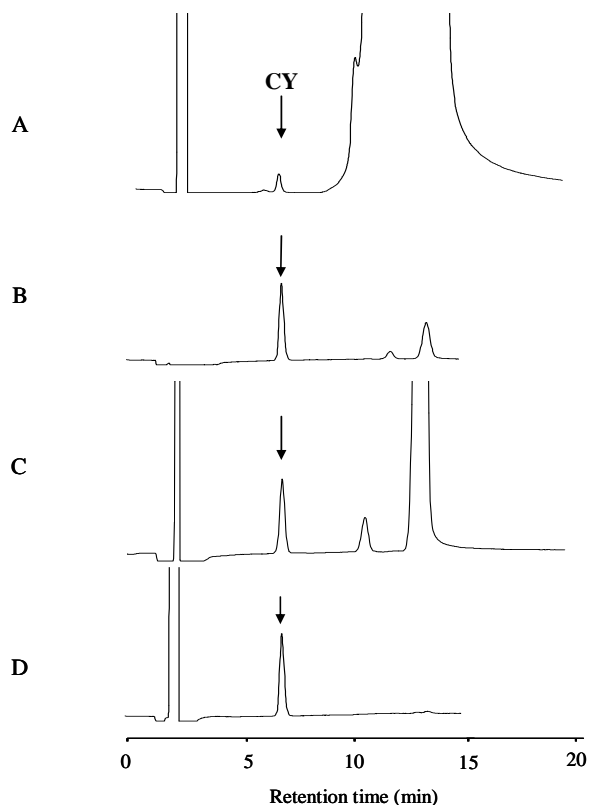


Fig. 1. HPLC Chromatograms of (A, B, C) Sample Solutions of Su-konbu spiked with 0.2 g/kg Cyclamate, and (D) Cyclamate Standard Solution (100 µg/mL)

- A: Not treated with a cartridge or not extracted by solvent
- B: Extracted by solvent with ethyl acetate
- C: Treated with an Oasis HLB cartridge

## 3. DUの精製

透析外液をHPLCに直接注入した場合、食品の種類によってDUの直前に測定の妨害となる夾雑ピークが出現した。小林らは、SA、APM、AK、AL、DUの5種甘味料を同時に

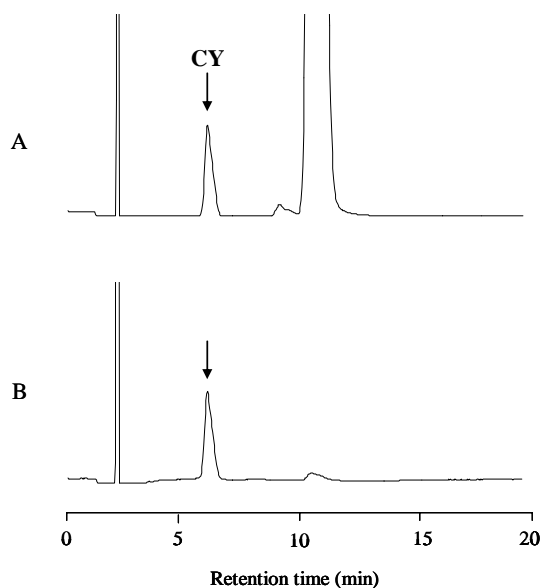


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Sample Solutions of Kim chee spiked with 0.2 g/kg Cyclamate

A: Treated with an Oasis HLB cartridge  
B: Treated with an Oasis HLB cartridge and a Maxi-Clean IC-Ag cartridge

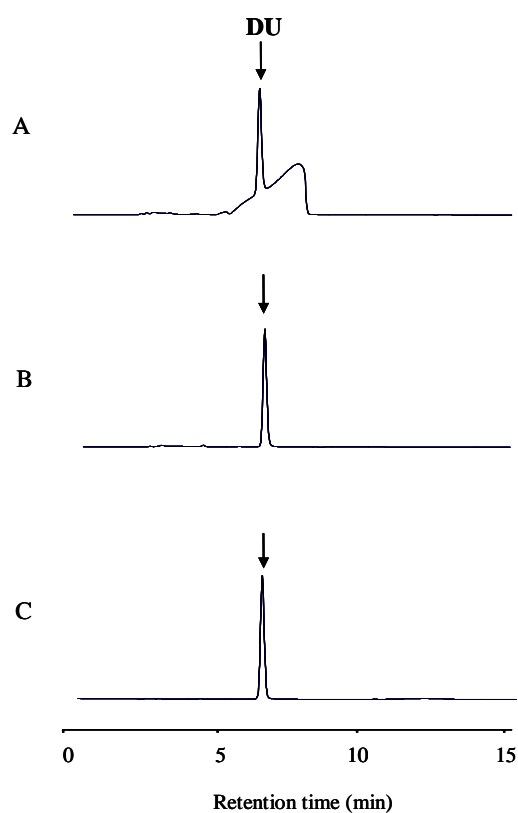


Fig. 3. HPLC Chromatograms of (A, B) Sample Solutions of Su-konbu spiked with 0.2 g/kg Dulcin, and (C) Dulcin Standard Solution (20 µg/mL)

A: Not treated with a cartridge  
B: Treated with a Sep-pak C18 cartridge

精製することを目的としたイオンペア試薬とC18カートリッジを用いる方法を報告している<sup>7)</sup>。しかし、DUのみであれば、イオンペアにしなくてもC18カートリッジに保持されることから、C18充填量の少ないSep-Pak Vac C18カートリッジによる精製方法について検討した。洗浄液は水のみでは不十分で、0.02 mol/L水酸化ナトリウム溶液を用いたところ、夾雑ピークを完全に除去することができた。Fig. 3にDU標準溶液及びDUを添加した酢こんぶのHPLCクロマトグラムを示した。DUの検出限界は試料中濃度として0.005 g/kgであり、良好な感度と妨害物質による影響の少ないクロマトグラムを得ることができた。

#### 4. 添加回収試験

あらかじめ2種甘味料を含有していないことを確認した干黒梅、酢こんぶ、しば漬け、ジャム、ジュース、フルーツ缶詰、ウスターソース、クッキー、キムチの9種類の食品にCY及びDUを0.2 g/kgとなるように添加し、本法に従い回収試験を行った (Table 2)。なお、キムチについては、透析外液をOasis HLBカートリッジで処理後、さらにMaxi-Clean IC-Agカートリッジで精製してHPLCに供した。平均回収率はCYが96.1%、DUが96.7%といずれも良好な結果が得られたことから、本法は種々の食品に適用できるものと思われる。

Table 2. Recoveries of Cyclamate and Dulcin from Various Foods spiked with 0.2 g/kg each

Samples	Recovery (%)	
	CY	DU
Black hoshiume	93.8 ± 2.1	92.4 ± 1.1
Su-konbu	98.1 ± 0.2	95.9 ± 1.1
Shiba-zuke	97.9 ± 1.1	96.6 ± 0.6
Strawberry jam	96.5 ± 2.0	95.1 ± 0.5
Juice	98.2 ± 1.7	99.4 ± 0.7
Canned fruits	95.4 ± 2.4	94.0 ± 2.4
Worcester sauce	93.8 ± 3.1	98.6 ± 0.7
Cookie	95.0 ± 4.4	99.5 ± 2.2
Kim chee	96.1 ± 0.4	98.4 ± 1.7

Values are means ± S.D. of three trials.

#### 5. LC/MS/MSによる確認

添加した試料を用いてLC/MS/MSによる確認法の検討を行った。LC条件はCY、DUともC18カラムを用いた逆相系の分析条件を用いることとした。MS/MSによる測定は、確認が目的であることからProduct ion scanning法を用い、標準品と試料から生成されたプロダクトイオンのマススペクトルを比較することで同定を行うこととした。

CYが酸性物質であることから、HPLC移動相にギ酸メタノール混液を用い、イオン化にエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のネガティブモードを選択したところ、[M

-H]⁻の脱プロトン化分子イオンを観察することができた。一方、DUのHPLC移動相にもギ酸-メタノール混液を用いたところ、C18カラムへの保持が悪かった。そこで定量用HPLCと同じ40%メタノール溶液を移動相とし、イオン化にポジティブモードを選択したところ、[M+H]⁺のプロトン化分子イオンを観察することができた。そこで、CYはm/z 178、DUはm/z 181をプレカーサーイオンとし、プロダクトイオンを観察するためのコーン電圧、コリジョンエネルギー等の検討を行った結果、Table 1に示すイオン化条件が最適であった。

Fig. 4にCY、DU各標準溶液のマススペクトルを示した。CYはm/z 79、DUはm/z 107が最も特徴的なプロダクトイオンであった。市販のキムチにCY、DUを各0.2 g/kgとなるように添加したところ、試料溶液の保持時間、ピーク形状、マススペクトルは、標準溶液のそれらと良く一致した。

5. 8種甘味料の系統的分析

8種甘味料の透析-HPLCによる系統的分析法の概要をFig. 5に分析条件の概要をTable 3に示した。NE、APM、ALは著者らが作成した方法<sup>3)</sup>を用い、SUCは小林らの方法<sup>8)</sup>、SA、AKは守安らの方法<sup>9)</sup>に準拠した。8種の甘味料は、前処理を透析法に統合し、透析外液をCY、DU、NE+APM+AL、SUC、SA+AKの5系統に分けて各試験溶液を調製し、HPLCにより分析することとした。試料20 gを本法により透析した時に得られる透析外液はおおよそ100~150 mLであり、5系統に分けても十分な量が確保できた。1回の透析操作で8種の甘味料を一括抽出すること、CYを誘導體化することなく直接分析することなどの改良の結果、従来法に比べ、8種甘味料の分析に要する試料量を少なくとも1/5以下に、試薬、器具、操作回数なども大幅に削減することができた。

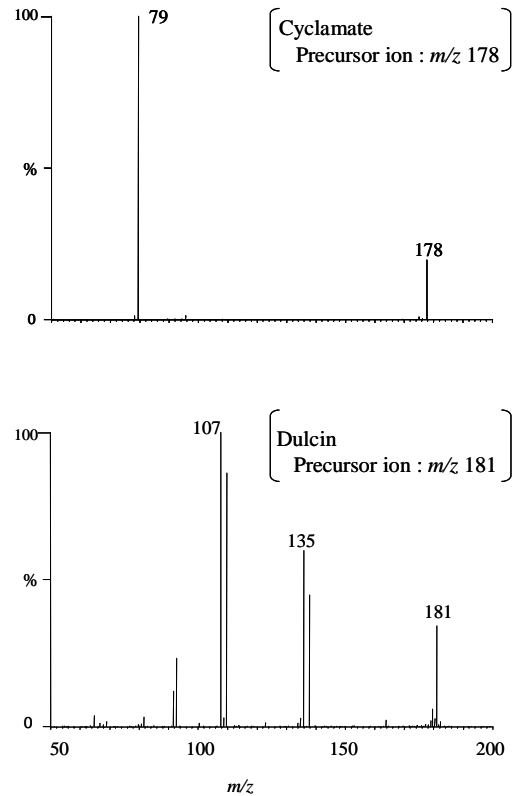


Fig. 4. Mass Spectra of Product Ion Scanning of Cyclamate and Dulcin Standard Solution (1 µg/mL)

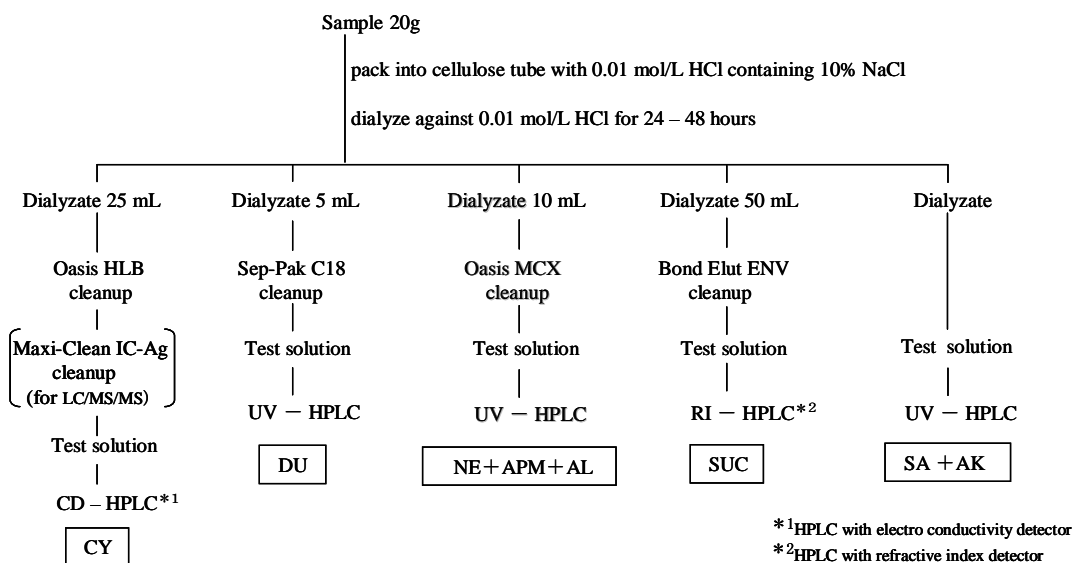


Fig. 5. Outline of Systematically Analysis of Eight Kinds of Sweeteners

CY:cyclamate, DU:dulcin, NE:neotame, APM:aspartame, AL:alitame, SUC:sucralose, SA:saccharin, AK:acesulfame K

Analysis details are shown in references 3), 8), 9).

Table 3. HPLC Conditions and SPE Method for Eight Kinds of Sweeteners

Sweetener	HPLC conditions			Solid phase extraction method			
	Column type	Mobile phase	Detector	Cartridge	Washing solvent1	Washing solvent2	Elution solvent
CY	NH <sub>2</sub>	1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> - MeOH(3:2)	CD	Oasis HLB (Maxi-Clean IC-Ag) * <sup>1</sup>	H <sub>2</sub> O		50% MeOH
DU	C18	40% MeOH	UV240nm	Sep-pak C18	0.02 mol/L NaOH	H <sub>2</sub> O	50% MeOH
NE + APM + AL * <sup>2</sup>	C18	0.01 mol/L PBS - MeCN (gradient)	UV210nm	Oasis MCX	H <sub>2</sub> O	MeOH	0.5 mol/L NH <sub>4</sub> Cl - MeCN (3:2)
SUC * <sup>2</sup>	C18	15% MeCN	RI	Bond Elut ENV	0.2 mol/L NaOH	H <sub>2</sub> O	MeOH
SA + AK * <sup>2</sup>	NH <sub>2</sub>	1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> - MeOH (3:2)	UV230nm				

\*<sup>1</sup> For the additional purification of cyclamate for the LC/MS/MS analysis.

\*<sup>2</sup> Details are shown in references 3), 8), 9).

### ま と め

すでに報告したCYを誘導体化することなく直接分析する方法<sup>2)</sup>の一部改良として、固相抽出カートリッジを用いて透析外液を精製する方法の検討を行った。また、DUについても同様の検討を行った。

食品からの抽出には透析法を用い、透析外液の精製にCYでは、逆相系のOasis HLBカートリッジを、DUではSep-Pak Vac C18を用いた。市販の9種類の食品にこれら2種甘味料を0.2 g/kgとなるように添加して行った添加回収試験の平均回収率は、いずれも96%以上と良好であった。また、これらの方法による検出限界は、試料中濃度として2種甘味料とも0.005 g/kgであった。

CY及びDUのLC/MS/MSによる確認法についても検討を行い、イオン化にはCYはESI (-)、DUはESI (+) モードを選択し、Product ion scanning法を用い、生成されたプロダクトイオンのマススペクトルによる同定を行った。

また、最近報告したNE、AL及びAPMの同時分析法<sup>3)</sup>を、今回のCY、DUの一部改良法と合わせて、これまでの前処理を透析法に統合した甘味料の系統的分析法<sup>1), 2)</sup>に加えることとした。すなわち、対象甘味料を指定添加物であるSA、APM、SUC、AK、NEの5種と指定外添加物であるCY、DU、ALの3種を合わせた8種甘味料とし、これらを5系統に分けてHPLCにより分析することとした。透析-HPLC法による

系統的分析法の再構築により、8種甘味料分析の大幅な省力化を図ることができた。

### 文 献

- 1) 萩野賀世, 松本ひろ子, 坂牧成恵, 他: 東京衛研年報, **53**, 73-77, 2002.
- 2) 松本ひろ子, 萩野賀世, 坂牧成恵, 他: 東京健安研七年報, **56**, 153-156, 2005.
- 3) 松本ひろ子, 平田恵子, 坂牧成恵, 他: 食衛誌, **49**, 31-36, 2008.
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長: 食基発第58号, 食品中のアセスルファムカリウムの分析法について(通知), 2001.
- 5) 厚生労働省医薬局食品安全部監視安全課長: 食安監発第0829009号, サイクラミン酸に係わる試験法について(通知), 2003.
- 6) 堀江正男, 大石充男, 石川ふさ子, 他: 日本食品衛生学会第90回学術講演要旨集, **40**, 2005.
- 7) 小林千種, 中里光男, 牛山博文, 他: 食衛誌, **40**, 166-171, 1999.
- 8) 小林千種, 中里光男, 山嶋裕季子, 他: 食衛誌, **42**, 139-143, 2001.
- 9) 守安貴子, 中里光男, 小林千種, 他: 食衛誌, **37**, 91-96, 1996.

**Determination of Cyclamate and Dulcin by HPLC and LC/MS/MS  
and Systematic Analysis of Eight Types of Sweeteners**

Hiroko MATSUMOTO\*, Keiko HIRATA\*, Narue SAKAMAKI\*, Kayo HAGINO\* and Hirofumi USHIYAMA\*\*

Systematic analysis of 8 artificial sweeteners, namely, saccharin aspartame sucralose acesulfame K neotame cyclamate (CY) dulcin (DU) and alitame, was partially improved. Chopped or homogenized samples were packed into cellulose tubing with 0.01 mol/L hydrochloric acid containing 10% sodium chloride, and dialyzed against 0.01 mol/L hydrochloric acid for 24 – 48 hours. The dialyzate was cleaned up using a solid-phase extraction method with an Oasis HLB cartridge for CY and a Sep-Pak Vac C18 cartridge for DU. The average recovery of CY and DU from 9 types of foods spiked with 200 µg/g was above 96%. Their detection limits were 5 µg/g in samples. Furthermore, CY and DU were both successfully identified by liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

**Keywords:** cyclamate, dulcin, artificial sweetener, HPLC, LC/MS/MS, dialysis, solid-phase extraction

---

\* Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

\*\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan