

## 食品中のサッカリンおよびアセスルファミカリウムのHPLC分析における 疑似ピークの傾向と条件検討

佐藤 絵里<sup>a</sup>, 森川 麻里<sup>a</sup>, 貞升 友紀<sup>a</sup>, 坂牧 成恵<sup>a</sup>, 牛山 慶子<sup>a</sup>, 門間 公夫<sup>b</sup>, 小林 千種<sup>a</sup>

HPLCを用いてサッカリンおよびアセスルファミカリウムの検査を行った行政検体で再分析が必要であった検体の検査データについて疑似ピークの出現する傾向を解析し、分析条件の検討を行った。その結果、魚肉ハム・魚肉ソーセージ、魚肉ねり製品、食肉製品、そうざい類およびソース由来の疑似ピークは保持時間の長い条件で分析を行うと判定可能であることが分かった。また、大根由来の疑似ピークは移動相のメタノールと1%(w/v)リン酸の割合を変化させることでアセスルファミカリウムのピークとの分離が可能であり、昆布由来の疑似ピークには固相カラムによる精製が適していた。食品の種類によって適した条件を選択することで検査業務の正確性向上と効率化を図ることができた。

**キーワード**：食品添加物，甘味料，サッカリン，アセスルファミカリウム，透析法，固相抽出，HPLC

### はじめに

食品添加物であるサッカリン（以下Sacと略す）、サッカリンナトリウム、サッカリンカルシウムおよびアセスルファミカリウム（以下AKと略す）は、砂糖の代替品として様々な食品に使用されている高甘味度甘味料である。高甘味度甘味料は近年、カロリーゼロ・糖質ゼロ、低カロリーなどを特徴とする製品で市場を拡大しており、検査の需要も高まっている。

高甘味度甘味料の分析における食品の前処理は、一般的に透析法<sup>2,4)</sup>が用いられている。当研究科では、食品中のSacおよびAKの定性試験は厚生労働省通知<sup>4)</sup>に示された透析条件で前処理を行った後、ろ過した透析液を試験溶液としてHPLCで分析を行っているが、使用表示がない食品にもSacまたはAKの保持時間に近接する疑似ピークが出現し、再分析を必要とすることがしばしばある。平成27年度～28年度に検査を行った1,075検体中、約6%にあたる61検体について再分析が必要であった。再分析は検査成績発行の遅延や移動相の使用量増加につながり、時間やコストが余分にかかるため、頻度を減らすことが望ましい。今回、再分析が必要であった61検体の検査データについて疑似ピークの出現する傾向を解析し、分析条件の検討を行った。

### 実験方法

#### 1. 試料

1) 平成27年度～28年度の行政検体1,075検体のうち再分析が必要であった魚肉ハム・魚肉ソーセージ、魚肉ねり製品、食肉製品、そうざい類、ソース、大根を含む食品等61検体

2) 平成27年度～29年度の行政検体（魚肉ソーセージ、魚肉ねり製品、食肉製品、そうざい類、ソース）および購入した大根（生鮮品）、AK使用表示のある大根の漬物、昆布の素干し

#### 2. 試薬等

##### 1) 標準品

Sacは和光純薬工業（株）製（試薬特級）、AKは和光純薬工業（株）製（高速液体クロマトグラフ用）を用いた。

##### 2) 混合標準溶液

Sac100 mgを正確に秤量し、メタノールで溶解して100 mLとしたものをSac標準原液（1,000 µg/mL）とした。また、AK100 mgを正確に秤量し、水で溶解して100 mLとしたものをAK標準原液（1,000 µg/mL）とした。SacおよびAK標準原液各10 mLを採り、水で希釈して100 µg/mL混合標準溶液を調製した。100 µg/mL混合標準溶液を水で希釈して10 µg/mL、5 µg/mLおよび1 µg/mLの検量線用標準溶液を調製した。

##### 3) メタノールおよびアセトニトリル

高速液体クロマトグラフ用を用いた。

##### 4) その他の試薬

塩化ナトリウムは日本薬局方を、その他の試薬は特級を用いた。

##### 5) 透析膜

透析用セルロースチューブ36/32（平面幅44 mm，直径28 mm，壁厚0.0203 mm，透過分子量14,000，孔径50 Å，Viskase社製）

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部

Table 1. HPLC Conditions

	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4
Column	Inertsil NH2 5 $\mu$ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm (GL Sciences Inc.)	Mightysil NH <sub>2</sub> 5 $\mu$ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm (KANTO CHEMICAL CO.,INC.)	Inertsil NH2 5 $\mu$ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm (GL Sciences Inc.)	Cosmosil 5NH <sub>2</sub> -MS 5 $\mu$ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm (NACALAI TESQUE, INC.)
Mobile phase	CH <sub>3</sub> OH $\cdot$ 1%(w/v) phosphoric acid (6:4)	CH <sub>3</sub> OH $\cdot$ 1%(w/v) phosphoric acid (6:4)	CH <sub>3</sub> OH $\cdot$ 1%(w/v) phosphoric acid (4:6)	CH <sub>3</sub> CN $\cdot$ 1%(v/v) phosphoric acid (4:6)
Flow rate	1.0 mL/min	1.0 mL/min	1.0 mL/min	0.7 mL/min

## 6. 固相カラム

Waters社製Sep-Pak Vac 6cc (1 g) C18 およびAgilent Technologies社製Bond Elut Jr-SAX (500 mg) を用いた。

## 3. 試験溶液の調製

試料約20 gを採り、約20 mLの透析内液(10%塩化ナトリウム含有0.01 mol/L塩酸溶液)とともに透析膜に充填した。これをメスシリンダーに入れ、透析外液(0.01 mol/L塩酸溶液)で全量を200 mLとし、ときどき揺り動かしながら室温で24時間以上透析を行った。得られた外液を孔径0.45  $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。分析の結果、疑似ピークが出現した場合は試験溶液1 mLに1.0  $\mu$ g/mLとなるよう10  $\mu$ Lの標準溶液(100  $\mu$ g/mL)を混和した。または、厚生労働省通知<sup>4)</sup>に示された固相カラムによる精製を行った後に孔径0.45  $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過した。

## 4. 装置および分析条件

HPLCは日本分光社製LC1500およびLC2000システム(UV検出器付, PDA検出器付 各1台), Agilent Technologies社製1260 Infinity (PDA検出器付 1台)を用いた。検出波長: 230 nm, カラム温度: 40°C, 注入量: 20  $\mu$ L, その他の分析条件をTable 1に示した。

## 5. 検量線

各検量線用標準溶液をHPLCに注入し、ピーク面積値による絶対検量線法を用いて検量線を作成した。定量下限値は、文献<sup>3,4)</sup>に示された0.01 g/kgとした。

## 結果及び考察

### 1. 平成27年度~28年度の検体についての解析

当研究科の日常の検査業務では、SacおよびAKの使用表示のない検体のHPLCクロマトグラム上で標準溶液の保持時間を基準に、 $\pm$ 1分以内のピークを疑似ピークとしている。疑似ピークが認められた場合は、HPLC条件の変更や標準溶液の添加(定量下限値 1.0  $\mu$ g/mL相当)によるピークの分離の確認、あるいは固相カラムによる精製などを行い再分析している。精製に用いる固相カラムは1検体につき2種類必要となり、他の方法に比べてコ

ストが高いため、HPLC条件の変更や標準溶液の添加を優先して再分析を行った。

平成27年度~28年度の検体で疑似ピークが出現した61検体のうち、食品の種類や食材ごとに一定の傾向が見られた45検体について、その内訳と分析条件をTable 2に示した。

魚肉ハム・魚肉ソーセージは、1検体でSac疑似ピーク、11検体でAK疑似ピークが認められた。HPLC条件の変更もしくは標準溶液の添加で判定可能であったが、1度の分析で正確な定性試験結果を出すためにはあらかじめ標準溶液を添加した試験溶液も同時に分析すると良いことが分かった。

魚肉ねり製品では、9検体でAK疑似ピークが認められた。Condition 4で再分析となることが多いため、それ以外のHPLC条件を用いるか、あらかじめ標準溶液を添加した試験溶液も同時に分析することが望ましいと考えられた。

食肉製品では、2検体でSac疑似ピーク、8検体でAK疑似ピークが認められた。Sac疑似ピークについてはCondition 1以外の、AK疑似ピークについてはCondition 3以外のHPLC条件を選択すると良いと考えられた。

そうざい類およびその半製品では、5検体でSac疑似ピーク、2検体でAK疑似ピークが認められた。その中の1検体ではSacとAK両方の疑似ピークが出現した。Condition 1を選択することで再分析せずに判定できる可能性が高いことが分かった。

ソース2検体では、Sac疑似ピークが認められた。Condition 1で疑似ピークが消失したため、Condition 1が適していると考えられた。

大根を含む食品6検体では、AK疑似ピークが認められた。Condition 3では標準溶液の添加を行うことでピークが分離し、AKとは異なるものであると判明した。固相カラムによる精製を行った試験溶液をCondition 1および2で再分析すると、疑似ピークは減少するものの消失しなかった。この試験溶液への標準溶液添加で判定可能なものもあったが、LC-MS/MSによる確認検査が必要なものもあった。判定が困難なものがあったため、分析条件の検討が必要であると考えた。

また他にも、昆布を含む食品において定量下限値未満

Table 2. Result of Analysis of Inspection Data of Samples in 2015 - 2016

Sample	Appearance peak	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4
Fish ham and Fish sausage (12)	Interfere with Sac (1)	× (1)	—	○(1)	—
	Interfere with AK (11)	—	—	× (5)	○(5)
Fish paste product (9)	Interfere with AK (9)	—	○(4)	—	○(5, std) × (6)
	Interfere with Sac (2)	× (2)	—	○(2)	—
Meat product (10)	Interfere with AK (8)	○(5)	—	× (8)	○(3)
	Interfere with Sac (5)	—	○(2,SPE) × (2)	—	—
Daily dish and Semi-finished product (6)	Interfere with Sac (5)	—	○(2,SPE) × (2)	—	—
	Interfere with AK (2)	○(3)	—	× (3)	—
Worcestershire sauce (2)	Interfere with AK (2)	○(2)	—	× (2)	—
	Interfere with Sac (2)	○(2)	× (1)	—	× (1)
Food containing Japanese radish (6)	Interfere with Sac (2)	—	○(1, SPE) × (2), (1, SPE)	—	○(1, SPE)
	Interfere with AK (6)	○(1, SPE+std) × (2), (2, SPE) <sup>a)</sup>	—	—	—
		—	—	○(2, std) × (2)	—

(n=2)

Sac:saccharin, AK:acesulfame potassium,

○: possible to identify, ×: difficult to identify, —: not applicable, ( ): the number of samples and treatment,

std: dialysate was spiked with standard solution (equivalent to 1.0 µg/mL), SPE: dialysate was extracted by solid phase cartridges

Those not described about treatment were analyzed for dialysate.

<sup>a)</sup>:one sample was determined by LC-MS/MS

Table 3. Result of Investigation of Analysis Conditions of Samples with Interfering Peak

Sample	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4
Fish sausage	○	○	○	× Interfere with Sac std ○, SPE ○
Fish paste product	○	○	○	× Interfere with AK std ○, SPE ○
Meat product	○	○	× Interfere with AK std ×, SPE ○	× Interfere with Sac std ○, SPE ○
Daily dish	○	○	○	× Interfere with Sac std ○, SPE ○
Worcestershire sauce	○	○	○	× Interfere with Sac std ×, SPE ×

(n=2)

○: possible to separate, ×: difficult to separate, no mark: dialysate,  
std: dialysate was spiked with standard solution (equivalent to 1.0 µg/mL),  
SPE: dialysate was extracted by solid phase cartridges

Table 4. Retention Time of Sac and AK in Each Condition

	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 4
Sac	20.7	18.2	16.6	9.6
AK	28.0	24.7	21.1	14.0

(min)

の Sac (Condition 4) もしくは AK (Condition 1) の疑似ピークが認められる事例があった。この疑似ピークは HPLC 条件の変更のみでは判定が困難であり、固相カラムによる精製を行うことで消失した。昆布を含む食品では固相カラムによる精製が有効であると考えられた。

## 2. 疑似ピークが出現した食品を用いた条件検討

平成27年度～28年度に疑似ピークが出現した食品（魚肉ソーセージ、魚肉ねり製品、食肉製品、そうざい類、ソース）について、平成27年度～29年度の行政検体のうち同分類の製品を用いて、Condition 1～4で分析し検討を行った。その結果をTable 3に示した。各条件における Sac, AKの保持時間はTable 4に示したとおりであり、疑似ピークが出現するこれらの食品は保持時間が長い条件で分析すると判定可能であることが明らかとなった。ただし、魚肉ソーセージおよび食肉製品をCondition 1で分析した場合とそうざい類およびソースをCondition 2で分析した場合は、Table 2で示した結果と一致しなかった。製品により原材料が異なることから、疑似ピークの出現の有無に影響があった可能性がある。

## 3. 食材に由来する疑似ピークについての検討

1の解析で分析が困難であった大根を含む食品について検討を行った。市販の生鮮品の大根を試料として試験溶液を調製しCondition 2で分析したところ、AK疑似ピークが出現し (Fig. 1), UV吸収スペクトルもAKと類似していることが分かった (Fig. 2)。このことより、大根を含む食品を分析したときに出現した疑似ピークは大根由来であることが判明した。また、固相カラムによる精製を行っても疑似ピークは消失しなかった。そこで、AK使用表示のある大根の漬物を用いて分析条件を検討した。移動相についてメタノールと1%(w/v)リン酸の割合を変化させて検討を行ったところ、メタノール・1%(w/v)リン酸 (5:5) を用いることで大根由来の疑似ピークとAKピークの分離が可能であった (Fig. 3)。メタノール・1%(w/v)リン酸 (4:6) を用いた際も疑似ピークとAKピークの分離は良好であったがAKピークに他の夾雑ピークが重なっていた。AKの定量値はメタノール・1%(w/v)リン酸 (6:4) を用いた場合は0.18 g/kg, メタノール・1%(w/v)リン酸 (5:5) を用いた場合は0.08 g/kgであり、0.10 g/kgの差が見られた。AKは大根の漬物

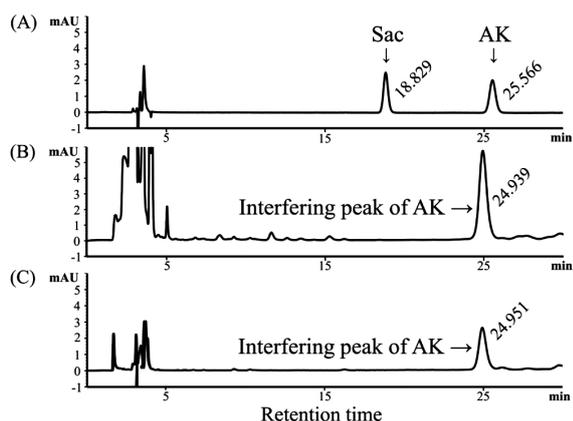


Fig. 1. HPLC Chromatograms of Japanese Radish Dialysate without and with Solid Phase Extraction  
(A) Standard solution (1.0 µg/mL)  
(B) Japanese radish dialysate  
(C) Japanese radish dialysate extracted by solid phase cartridges

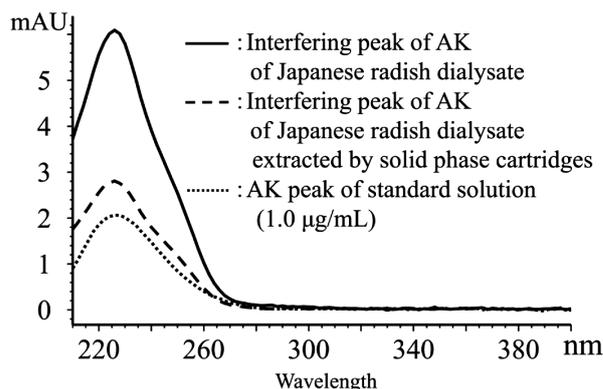


Fig. 2. UV Absorption Spectra of AK Peak and Interfering peak of AK of Japanese Radish Dialysate

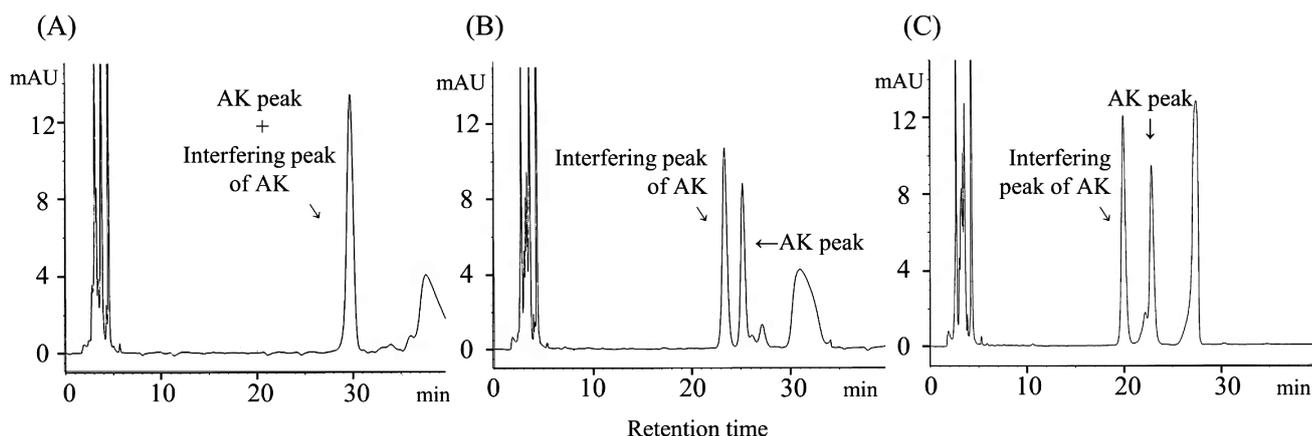


Fig. 3. HPLC Chromatograms of Japanese Radish Pickle Dialysate under Various Mobile Phase Conditions  
Column : Inertsil NH2 (5 µm, 4.6 mm i.d. ×250 mm), Flow rate : 1.0 mL/min,  
Mobile Phase : (A) CH<sub>3</sub>OH · 1%(w/v) phosphoric acid (6:4), (B) CH<sub>3</sub>OH · 1%(w/v) phosphoric acid (5:5),  
(C) CH<sub>3</sub>OH · 1%(w/v) phosphoric acid (4:6)

に使用されていることが多く、定量を行う際に疑似ピークの合算により実際の使用量よりも高い値になる可能性があることから注意が必要である。

甘味料使用表示のない市販の昆布の素干しを試料として試験溶液を調製し Condition 1~4 で分析したところ、すべての条件で疑似ピークが出現した。この疑似ピークは、固相カラムによる精製を行うことでいずれの条件でも定量下限値未満となった。このことから、昆布を含む食品において出現した疑似ピークは昆布由来であることが判明した。昆布を含む食品では固相カラムによる精製が有効であると考えられた。

## ま と め

平成27年度~28年度に行った食品中のSac, AKの検査について、再分析となった61検体の検査データの解析を行った。その結果、食品の種類や食材によってHPLCクロマトグラム上の疑似ピークの出現に傾向があることが明らかとなった。魚肉ハム・魚肉ソーセージ、魚肉ねり製品、食肉製品、そうざい類およびソース由来の疑似ピークは、保持時間の長いHPLC条件で分析を行うと判定可能であることが分かった。大根由来の疑似ピークは、移動相にメタノール・1%(w/v)リン酸(5:5)を用いることでAKピークとの分離が良好であり、昆布由来の疑似ピークには、固相カラムによる精製が適していること

が認められた。

また、Sac, AKは食品ごとに使用基準が定められているため、疑似ピーク出現の可能性のある食品にSac, AKが使用されている場合は定量を行う際に疑似ピークの合算に注意しなければならないことが分かった。

それぞれの食品について最適な分析条件を明確にし、日常の分析に適用することで検査業務の正確性の向上および効率化を図ることができた。

(本研究の概要は、第54回全国衛生化学技術協議会年会において発表した。)

#### 文 献

- 1) 食品と開発編集部：食品と開発, 52(12), 34-45, 2017.
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015, 351-370, 2015, 金原出版, 東京.
- 3) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編 2003, 233-239, 2003, 社団法人 日本食品衛生協会, 東京.
- 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ミカリウム分析法について (通知), 平成13年12月28日.

### Investigation of Tendencies and Conditions for Interfering Peaks in HPLC Analyses of Saccharin and Acesulfame Potassium in Foods

Eri SATO<sup>a</sup>, Mari MORIKAWA<sup>a</sup>, Yuki SADAMASU<sup>a</sup>, Narue SAKAMAKI<sup>a</sup>, Keiko USHIYAMA<sup>a</sup>,  
Kimio MONMA<sup>a</sup> and Chigusa KOBAYASHI<sup>a</sup>

We analyzed inspection data for samples of HPLC analyses of saccharin and acesulfame potassium in foods that needed reanalysis, and investigated tendencies for interfering peaks and the analysis conditions. This showed that interfering peaks derived from fish hams, fish sausages, fish paste products, meat products, daily dishes and Worcestershire sauces were identified by HPLC under long retention time conditions. The interfering peak derived from Japanese radish could be separated from the acesulfame potassium peak by changing the ratio of methanol and 1%(w/v) phosphoric acid in the mobile phase, and the interfering peak derived from kelp could be removed using solid phase extraction. By choosing suitable conditions for each type of food, it was possible to improve the accuracy of inspections and the efficient analysis of saccharin and acesulfame potassium.

**Keywords:** food additive, sweetener, saccharin, acesulfame potassium, dialysis, solid phase extraction, HPLC

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

