

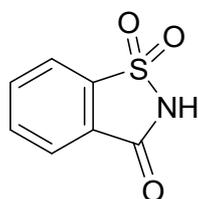
甘味料

サッカリン及びその塩類

Saccharin and Its Salts

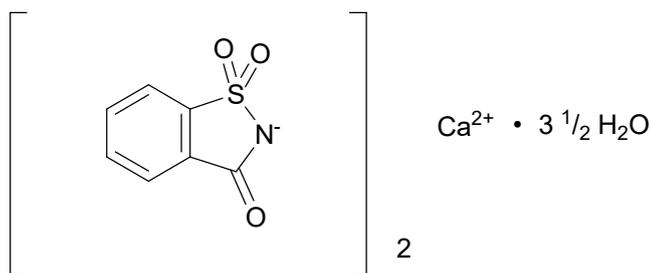
サッカリン

Saccharin

 $C_7H_5NO_3S$: 183.18

サッカリンカルシウム

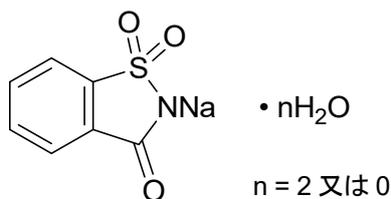
Calcium Saccharin


 $C_{14}H_8CaN_2O_6S_2 \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$
 ($C_{14}H_8CaN_2O_6S_2$: 404.43)

サッカリンナトリウム

別名：溶性サッカリン

Sodium Saccharin


 $C_7H_4NNaO_3S \cdot nH_2O$ (n = 2 又は 0)
 ($C_7H_4NNaO_3S$: 205.17)

1. 分析法の概要

食品中のサッカリン及びその塩類は、透析法または溶媒抽出法により抽出精製し、液体クロマトグラフィーによりサッカリンナトリウムとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて、サッカリンあるいはサッカリンカルシウムの量として求める^{1,2)}。(2008年改正、2023年改正)

2. 分析法（液体クロマトグラフィー）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

① 透析法³⁾

試料約 20 g⁴⁾を精密に量る⁵⁾。次に約 20mL⁶⁾の透析内液と混和して流動状とし、少量の透析内液を用いて透析膜チューブ内に移した後、空気を追い出してからチューブの上端を密封し、200mL 容の目盛り付き容器⁷⁾に入れる。次いでこの目盛り付き容器に透析外液を加えて全量⁸⁾を正確に 200mL とする。時々、密栓又はフィルム等で覆って目盛り付き容器内を転倒混和しながら室温で 24～48 時間透析し⁹⁾、透析終了後の透析外液を抽出液とする。抽出液をメンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを試験溶液とする。

② 溶媒抽出法

試料約 2 g を精密に量り、飽和硫酸ナトリウム溶液 15mL、硫酸 (1→10) 5 mL、ジエチルエーテル 80mL を加えてホモジナイズして抽出する。ジエチルエーテル層を分取し、水層にジエチルエーテル 50mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返す。全ジエチルエーテル層を分液漏斗に合わせ、1%炭酸水素ナトリウム溶液 20mL を加えて 5 分間振とうし、水層を別の分液漏斗に入れる。1%炭酸水素ナトリウム溶液 20mL を用いて同様の操作を繰り返し、先の分液漏斗に水層を合わせる。次に水層に硫酸 (1→10) 7 mL を加えて酸性とし、塩化ナトリウム 5 g、ジエチルエーテル 50mL を加えて激しく振り混ぜた後、水層を別の分液漏斗に移す。水層にジエチルエーテル 50mL を加えて同様の操作を行う。全ジエチルエーテル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水後、濃縮乾固する。残留物に 10vol%メタノールを加えて全量を正確に 20mL とし、メンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製¹⁰⁾

サッカリンナトリウムを 120°C で 4 時間乾燥したもの 0.100 g を量り、水を加えて溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする (濃度 1000 μ g/mL)。標準原液 1 mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする (濃度 10 μ g/mL)。標準溶液 1、2、5 mL 及び 10mL を正確にとり、水を加えてそれぞれ正確に 10mL とし、検量線用標準溶液とする (濃度 1～10 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフにより、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹²⁾ : アミノプロピル基化学結合型シリカゲル (粒径 5 μ m)

カラム管 : 内径 4.6mm、長さ 250mm

カラム温度 : 40°C

移動相¹³⁾ : 1 w/v %リン酸/メタノール混液 (6 : 4)

流速：1.0mL/分

測定波長：230nm

注入量：10 μ L

② 検量線

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量^{14~16)}

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線から試験溶液中のサッカリンナトリウム濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式によって試料中のサッカリンナトリウムまたはサッカリン¹⁾含量 (g/kg) を計算する。

透析法の場合

$$\text{サッカリンナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 200}{W \times 1000}$$

溶媒抽出法の場合

$$\text{サッカリンナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C \times 20}{W \times 1000}$$

$$\text{サッカリン含量 (g/kg)} = \frac{C \times 20}{W \times 1000} \times 0.8928$$

C：試験溶液中のサッカリンナトリウム濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

W：試料の採取量 (g)

サッカリンカルシウム含量 (g/kg) = サッカリンナトリウム含量 (g/kg) \times 0.9856

④ 定量限界 サッカリンナトリウムとして 0.01 g/kg

試薬・試液等

1. サッカリンナトリウム：二水和物、市販品を用いる¹⁷⁾。
2. 塩化ナトリウム：[特級]
3. 塩酸：[特級]
4. 透析内液¹⁸⁾：塩化ナトリウム 100 g を 0.01mol/L 塩酸に溶解して 1000mL とする。
5. 透析外液¹⁸⁾：0.01mol/L 塩酸
6. 透析膜チューブ：透析用セルロース製チューブ (平面幅 44mm、直径 28mm、膜厚 0.0203mm) を適当な長さに切ったものを水で洗浄し、片端を結んで閉じる。クラッカーでは実効長約

30cm、それ以外では実効長約 15cm になるように切ったものを水で洗浄する。

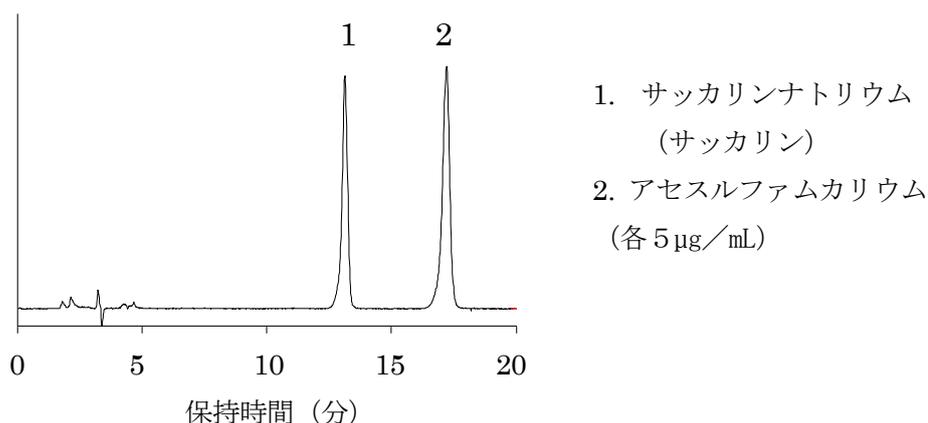
7. 無水硫酸ナトリウム：硫酸ナトリウム [特級]
8. 硫酸：[特級]
9. ジエチルエーテル：[特級]
10. 炭酸水素ナトリウム：[特級]
11. メタノール：[高速液体クロマトグラフィー用]
12. リン酸：[85%、特級]
13. 1 w/v %リン酸：リン酸 11.8 g に水を加えて 1000mL とする。
14. 0.1mol/L 塩酸：塩酸 9 mL に水を加えて 1000mL とする。
15. 0.01mol/L 塩酸：0.1mol/L 塩酸 100mL に水を加えて 1000mL とする。

[注]

- 1) 透析法は、サッカリンのナトリウム塩またはカルシウム塩に適用できるが、サッカリンには適用できない。溶媒抽出法は、サッカリン及びサッカリン塩類に適用できる。また、ガムの場合は溶媒抽出法を用いる。
- 2) サッカリンを特定する必要がある場合には、参考を示す分析法を用いることができる。
- 3) アスパルテーム分析法（2023年改正）の（2）試験溶液の調製①透析及びアセスルファムカリウム分析法（2023年改正）の（2）試験溶液の調製①透析と共通である^{文献1、2}。なお、分析時に妨害ピークがある場合は、同アセスルファムカリウム分析法の（2）試験溶液の調製②カラムによる精製と同様の操作により精製し、試験溶液を調製する。
- 4) 試料のかさが大きい場合や、水分を含むと膨張する場合は、試料採取量を 5～10 g に減らす。
- 5) 炭酸を多く含む試料の場合は、試料を秤量後に、超音波処理によりその大部分を除去する。また、脂肪分を多く含む試料の場合は、試料を秤量後にヘキサン約 20mL ずつで 2～3 回洗浄した後、ヘキサン臭がなくなるまで放置または加温する。ただし、乳化した食品（ピーナッツバター、マヨネーズなど）は、脱脂操作を省略できる。
- 6) 試料と混和して流動状にならない場合は、透析内液を適宜追加する。
- 7) 正確に 200mL を量ることができる目盛精度を有する容器。透析チューブの実効長が 15cm の場合は直径（内径）4 cm 以下がよい。
- 8) 試料、透析内液、透析外液の合計量。
- 9) 透析膜チューブの実効長約 15cm の場合、サッカリンナトリウム及びサッカリンカルシウムは、水分含量の高い食品において 24 時間で十分透析されるが、穀類の調製品や魚介乾製品などの水分含量の低い食品や、発酵乳などの乳製品では、透析効率が低下する傾向があるため、48 時間透析を行う。また、より実効長の長い透析膜チューブを用いる既報^{文献3}に記された透析条件を用いることにより、穀類の調製品及び乳製品においても 4 時間の透析で、上記方法と同等以上（クッキーにサッカリンナトリウムとして 0.1 g/kg 添加した

時の添加回収率 93%、相対標準偏差 1.3% (n = 5)) の透析率が得られる。

- 10) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。
- 11) 測定条件は、例示である。他のカラム、条件を用いる場合は、サッカリンとアセスルファムカリウムが分離することが必要である。また、分析の際は、サッカリンのピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 12) 分析に用いるアミノプロピル基化学結合型シリカゲルカラムは、シリカゲルにアミノプロピル基が化学結合した順相系カラムである。なお、アミノプロピル基化学結合型シリカゲルカラムは、移動相を水に変えて洗浄すると再現性が悪くなるので、移動相で洗浄するとよい。
- 13) 移動相は、メタノール / 1 w / v % リン酸混液 (6 : 4) またはアセトニトリル / 1 w / v % リン酸混液 (6 : 4) など也可以使用できる。なお、移動相に用いるメタノール、アセトニトリルは、高速液体クロマトグラフィー用を用いる。
- 14) サッカリンナトリウム及びアセスルファムカリウムのクロマトグラム例を注図 1 に示す。



<測定条件>

カラム充填剤：アミノプロピル基化学結合型シリカゲル (粒径 5 µm)

カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm カラム温度：40°C

流速：1.0mL/分 検出器：紫外可視吸光光度検出器 (230nm) 注入量：10µL

移動相：1 w / v % リン酸 / メタノール混液 (6 : 4)

注図 1 サッカリンナトリウム及びアセスルファムカリウムの液体クロマトグラム

- 15) 透析法により試料調製した場合は、操作の煩雑さ軽減のため、試料体積を含めて定容し、その定容量を含量計算で乗じている。そのため、固体試料等では透析外液量を乗じた値より数%~10%程度高い定量値となる場合があり、添加回収率が 100%を越えて高い場合には、この点が要因の一つとして考えられる。

16) 本法の添加回収試験結果を注表1、注表2及び注表3に示す。

注表1 透析法におけるサッカリンナトリウムの各種食品での添加回収率^{*1}

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
たくあん漬	0.01	94	0.5
	2.0	96	3.4
いかくん製品	0.01	77	2.6
	1.2	79	0.1
クッキー	0.01	93	1.9
	0.1	93	3.1

^{*1} 3試行の平均値

ただし、たくあん漬及びクッキーは24時間透析、

いかくん製品は24時間では不十分であり48時間透析で試験した。

注表2 溶媒抽出法におけるサッカリンナトリウムの各種食品での添加回収率^{*1}

試料	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
たくあん漬	0.01	82	1.5
	2.0	89	3.8
いかくん製品	0.01	93	1.0
	1.2	89	1.3
クッキー	0.01	97	1.4
	0.10	97	0.2
ガム	0.01	93	5.2
	0.05	89	2.0

^{*1} 3試行の平均値

注表3 溶媒抽出法におけるサッカリンの各種食品での添加回収率^{*1}

試料	添加量 ^{*2} (g/kg)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
たくあん漬	0.01	87	2.2
	0.05	89	3.2

いかくん製品	0.01	92	2.0
	0.05	89	1.9
クッキー	0.01	95	0.2
	0.05	93	1.3
ガム	0.01	99	4.5
	0.05	90	2.5

*1 3試行の平均値、*2 サッカリンとしての量

また別に、20%りんご果汁入り飲料及びいちごジャムにサッカリンナトリウム 0.02 g/kg (定量限界の2倍相当濃度) を添加して、24時間の透析法で試験した時の添加回収率はそれぞれ96%及び102% (相対標準偏差1.2%及び0.7%) であり、ヨーグルト及びクラッカーにサッカリンナトリウム 0.02 g/kg (定量限界の2倍相当濃度) を添加して、48時間の透析法で試験した時の添加回収率はそれぞれ89%及び78% (相対標準偏差1.1%及び8.4%) であった (n=5)。

- 17) 市販品に純度99%以上のものなどがある。また、サッカリン (不溶性、純度98%以上などがある。) も用いることができる。この場合、120°Cで乾燥する必要はない。サッカリンは水に溶けにくいことから、サッカリン標準原液 (濃度 1000 µg/mL) の調製は、サッカリン 0.100g を量り、少量のメタノールに溶かしたのち、水で正確に 100mL とする。なお、サッカリンを用いた場合のサッカリンナトリウム含量を計算する際は、次の式を用いる。

透析法の場合

$$\text{サッカリンナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 200 \times 1.120}{W \times 1000}$$

溶媒抽出法の場合

$$\text{サッカリンナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 20 \times 1.120}{W \times 1000}$$

$$\text{サッカリン含量 (g/kg)} = \frac{C_2 \times 20}{W \times 1000}$$

C_2 : 試験溶液中のサッカリン濃度 (µg/mL)

W : 試料の採取量 (g)

- 18) 魚介乾製品のようにタンパク質の多い試料の場合には、0.02mol/L水酸化ナトリウム溶液を透析内液及び透析外液として用いた方がよい回収率が得られる。アセスルファムカリウムと同時に抽出できるが、アスパルテームは、アルカリ性下で分解するため抽出でき

ない。

[文献]

- 1) 守安貴子ら：衛生化学、**37**、97 (1991)
- 2) 守安貴子ら：食衛誌、**37**、91 (1996)
- 3) 田原正一ら：食衛誌、**55**、13 (2014)

参考

サッカリン確認分析法

1. 分析法の概要

食品中のサッカリンは、液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う¹⁾。(2023年設定)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー質量分析)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試験溶液の調製

サッカリン及びその塩類分析法(2)試験溶液の調製を準用する。ただし、試験溶液は、必要に応じて適宜希釈して用いる。

(3) 標準溶液の調製

サッカリン及びその塩類分析法(3)検量線用標準溶液の調製を準用し、定性に適した濃度の標準溶液を調製する。

(4) 測定法

① 測定条件²⁾

液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径5 μ m)

カラム管：内径2.0mm、長さ150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：0.1%ギ酸/メタノール混液(85:15)

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI(-)

検出法：スキャン(m/z 50~250)又は

選択イオン検出(SIM)(モニターイオン： m/z 182)

注入量：5 μ L

② 定性³⁾

試験溶液及び標準溶液をLC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されること、このピークのスキャン検出で得られるマススペクトルの主なイオンの m/z が標準溶液の主ピークのそれと一致することを確認する。

試薬・試液等

1. サッカリン及びその塩類分析法の試薬・試液等を準用する。
2. ギ酸：[98%、特級]
3. 0.1%ギ酸：市販品を用いるか、あるいは、ギ酸 1.0 g に水を加えて 1000mL とする。

[注]

- 1) ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）により確認を行う方法^{文献1、2)}も使用できる。
- 2) 測定条件は、例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。分析の際は、サッカリンのピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液の強度が最大になるように、あらかじめ最適化を行う。
- 3) LC-MSを用いて定性確認を行う場合、食品中の夾雑成分によるマトリックス効果により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークの検出感度やマススペクトルの変化について確認する。

[文献]

- 1) 守安貴子ら：食衛誌、**34**、277（1993）
- 2) 藤川名伊子ら：香川県環境保健研究センター所報、**6**、118（2007）