

## サッカリンナトリウム検査手順の改良

須田千咲 赤城理恵 鈴木司<sup>1)</sup>  
 試験検査課<sup>1)</sup> 県南保健福祉事務所

### 要旨

サッカリンナトリウムの添加回収率とばらつきの改善を目的に、検査手順の見直しを行った。その結果、透析時のかくはんの有無が測定値に大きな影響を及ぼすこと、透析膜を吊すために使用していた留め具に問題があり、十分なかくはんが行われていなかったことが明らかになった。留め具を結束バンドからテフロンたこ糸に変更し、2時間おきに4回かくはんすることで回収率、変動係数が改善した。

キーワード：サッカリンナトリウム、透析法、かくはん

### はじめに

サッカリンナトリウムは、我が国で使用が認められている代表的な合成甘味料であり、漬物、ジャム、清涼飲料水、魚介加工品など多くの食品で使用されている。当所では透析法を前処理法に用いた高速液体クロマトグラフ(HPLC)法<sup>1)</sup>による分析を実施している。

平成22年度財団法人食品薬品安全センター秦野研究所で実施されたサッカリンナトリウムの食品衛生外部精度管理調査に参加した結果、R管理図の管理限界線をわずかに上回り、他施設に比べてばらつきが大きかったため、検査手順の見直しを行った。

問題点として、第一に、透析の際に「ときどき揺り動かしながら」という記述があるが、具体的な間隔や回数が明記されていなかったため、目安を決めることなく透析を実施していたこと、第二に、透析膜を吊すために当課で使用していた留め具が原因でメスシリンダーを密封できず、かくはんが不十分であったことが考えられた。

以上の点を踏まえ、かくはんの回数や間隔、透析膜を吊す留め具の違いが測定値に及ぼす影響について検討したので報告する。

### 方法

#### 1 試薬・試液等

1) 標準原液(400 $\mu$ g/mL)：サッカリンナトリウム二水和物を120℃で4時間乾燥した

後、40mgを量り、水に溶解し全量100mLとした。

2) 標準溶液(20 $\mu$ g/mL)：標準原液5mLを量り水を加えて全量100mLとした。

3) 検量線用標準液(0, 2, 4, 6, 8 $\mu$ g/mL)：標準溶液を0, 1, 2, 3mLおよび4mLをそれぞれ量り、水を加えて10mLとした。

4) 透析補助液：0.1mol/L塩酸

5) 5mmol/LCTA含有10mmol/Lリン酸緩衝液(pH2.5)：塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTA)1.60g及びリン酸二水素カリウム1.36gを水に溶解して1000mLとし、リン酸でpHを2.5に調整し、メンブランフィルターでろ過した。

6) 透析膜：透析用セルロースチューブ36/32〔平面幅44mm、直径28mm、膜厚0.0203mm〕(Viskase Companies)

#### 2 装置

高速液体クロマトグラフ：日本分光(株)製HPLC GULLIVER1500Series, PU-1580型ポンプ, 同AS-1555型オートサンプラー, 同UV-1570型UV検出器, 同CO-1560型カラムオーブン, 同DG-980-50脱気装置, 及び同BORWIN HSS-1500

#### 3 測定条件

カラム：Inertsil C8-3〔4.6 $\times$ 150mm 5 $\mu$ m〕  
 移動相：5mmol/LCTA含有10mmol/Lリン酸緩衝液(pH2.5)：アセトニトリル(4:3)混液

検出波長：230nm  
 流速：1.0mL/min  
 カラム温度：40℃  
 注入量：20μL

#### 4 試験溶液の調製

- 1) 試料 10g を 50mL のビーカーに量り取った。
- 2) 透析補助液 20mL を用いて、試料を透析膜に移し入れた。
- 3) 透析膜の上端を密封し、250mL のメスシリンダーに入れ、水を入れて全量 200mL にメスアップした。
- 4) 室温で 16～24 時間透析後、透析外液をメンブランフィルター (0.45μm) でろ過し、ろ液を試料液とした。

### 結果及び考察

#### 1 透析時のかくはんの有無による回収率及びばらつきの検討

試料は食品衛生外部精度管理調査と同様の 0.08g/kg となるように水にサッカリンナトリウムを添加したもので実施した。

8 検体を用い、No.1～3 を無かくはん、No.4～6 をかくはん、No.7 をスターラーで連続かくはん、No.8 をブランクとした。透析開始 1 時間後に 1 回目のかくはんをし、それ以降は 2 時間間隔で少なくとも 2 回以上透析外液をかくはんすると良好な結果が得られるという都田らの報告<sup>2)</sup>に準じて、最初のかくは

んは透析開始 1 時間後に行い、それ以降は 2 時間間隔で 3 回 (計 4 回) かくはんを行った。

かくはんの有無による回収率の差は平均で 11.4 % であり、かくはんの有無が回収率に大きく影響することが明らかになった。

またスターラーを用いて連続でかくはんを行った No.7 が、最も高い回収率であった。

変動係数は、かくはん有りの方がかくはん無しと比べて 0.36 小さく、かくはんにより回収率のばらつきが改善されることも示唆された (表 1)。

#### 2 透析膜留め具の違いによる回収率及びばらつきの検討

##### 1) 水添加試料による回収率及びばらつきの検討

試料は 1 と同一のもので実施した。

当課では利便性の点から幅 3cm の密封クリップに幅 2.5mm の結束バンドを通した器具を作製し、透析膜の留め具 (図 1 上の写真以後 “留め具 B” とする) として使用していた。試料と透析補助液を入れた透析膜の上部をクリップで密封し、結束バンドをメスシリンダー内にテープで固定していた。この留め具 B では、結束バンドの先端がメスシリンダー上端から飛び出してしまい、メスシリンダーの上面をパラフィルムで密封することは困難な状態であった (図 2)。そこで結束バンドを太さ 0.3mm のテフロンたこ糸に替えた

表 1 かくはんの有無による回収率及びばらつき

	試料採取量 (g)	透析液量 (mL)	HPLC注入希釈倍率	試料液サッカリンNa濃度 (μg/mL)	検体中サッカリンNa濃度 (g/kg)	平均 (g/kg)	標準偏差	変動係数 (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	回収率平均 (%)
1 かくはん無し	10.01	200	1	3.372	0.0674				0.08	84.2	
2 かくはん無し	10.02	200	1	3.295	0.0658	0.0661	0.0011348	1.72	0.08	82.2	82.6
3 かくはん無し	10.00	200	1	3.259	0.0652				0.08	81.5	
4 かくはん有り	10.02	200	1	3.783	0.0755				0.08	94.4	
5 かくはん有り	10.00	200	1	3.803	0.0761	0.0752	0.0010219	1.36	0.08	95.1	94.0
6 かくはん有り	10.00	200	1	3.704	0.0741				0.08	92.6	
7 スターラー	10.00	200	1	3.831	0.0766	-	-	-	0.08	95.8	-
8 ブランク	10.01	200	1	0.000	0.0000	-	-	-	-	-	-

留め具(図 1 下の写真以後“留め具 A”とする)を作製し、密封できるように改良した(図 3)。

留め具 A と留め具 B の違いが、かくはん操作に与える影響について検討を行った。

No.1～3を留め具 A, No.4～6を留め具 B で透析を実施した。最初のかくはんは透析開始 2 時間後に行い、以降は 1 時間間隔で計 4 回かくはんを行った。No.7～No.9 については、スターラーで連続かくはんを行った。結果を表 2 に示す。

回収率はスターラーで連続かくはんが最も

高かった。変動係数は留め具 A を用いた場合が最も小さかった。留め具 A により上面が密封され、さらに透析膜が糸とともに上下運動することになったことで(図 4)、かくはん操作が十分行えるようになり、留め具 B を用いた場合より、回収率が上がり、ばらつきも小さくなったと考える。

## 2) 実試料での測定

試料はサッカリンナトリウムの表示のある漬物で実施した。No.1～5を留め具 A, No.6～10を留め具 B を用いて試験を行った。最初のかくはんは透析開始 1 時間後に行い、以



←結束バンド(留め具 B)

←テフロンたこ糸(留め具 A)

図 1 留め具の種類

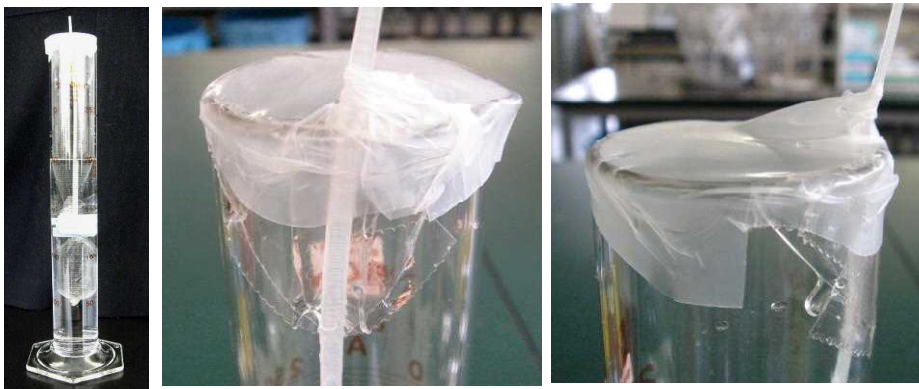


図 2 留め具Bで吊した状態

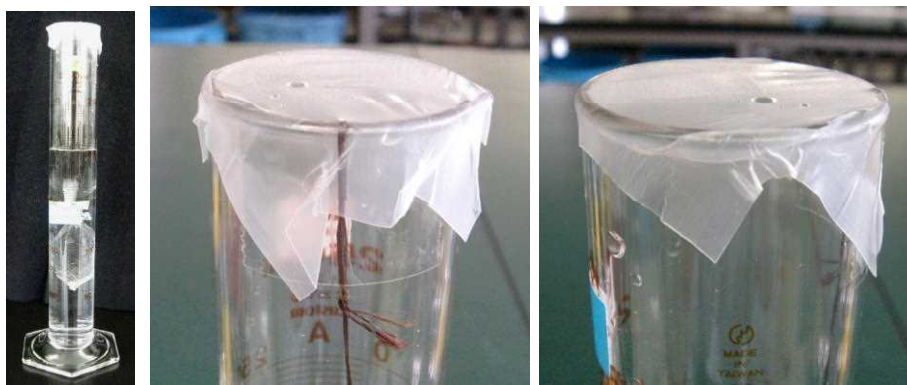


図 3 留め具Aで吊した状態



図4 かくはん時の透析膜の様子(左：留め具 B, 右：留め具 A)

表2 留め具とかくはん方法の違いによる回収率及びばらつき

	試料採取量 (g)	透析液量 (mL)	HPLC注入希釈倍率	試料液 サッカリンNa濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	検体中 サッカリンNa濃度 (g/kg)	平均 (g/kg)	標準偏差	変動係数 (%)	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	回収率平均 (%)
1 留め具A	10.00	200	1	3.886	0.0777				0.08	97.2	
2 留め具A	10.00	200	1	3.930	0.0786	0.0782	0.00044	0.56	0.08	98.3	97.7
3 留め具A	10.01	200	1	3.912	0.0782				0.08	97.7	
4 留め具B	10.00	200	1	3.862	0.0772				0.08	96.6	
5 留め具B	10.01	200	1	3.793	0.0758	0.0764	0.0007773	1.02	0.08	94.7	95.4
6 留め具B	10.00	200	1	3.802	0.0760				0.08	95.1	
7 スターラー	10.01	200	1	3.995	0.0798				0.08	99.8	
8 スターラー	10.00	200	1	3.931	0.0786	0.0790	0.0006813	0.86	0.08	98.3	98.8
9 スターラー	10.01	200	1	3.937	0.0787				0.08	98.3	

降 1 時間間隔で計 4 回かくはんを行った。結果を表 3 に示す。検体中のサッカリンナトリウム濃度測定では留め具 A を使った場合と留め具 B を使った場合で、平均値に大きな

差は認められなかった。しかし、留め具 A を使った方が留め具 B を使った場合より変動係数が低い値を示した。

表3 留め具の違いによる実試料の測定値及びばらつき

	試料採取量 (g)	透析液量 (mL)	HPLC注入希釈倍率	試料液 サッカリンNa濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	検体中 サッカリンNa濃度 (g/kg)	平均 (g/kg)	標準偏差	変動係数 (%)
1 留め具A	10.05	200	1	2.958	0.0589			
2 留め具A	10.01	200	1	2.924	0.0584			
3 留め具A	10.01	200	1	2.890	0.0577	0.0588	0.0007005	1.19
4 留め具A	10.04	200	1	2.987	0.0595			
5 留め具A	10.01	200	1	2.966	0.0593			
6 留め具B	10.00	200	1	2.958	0.0592			
7 留め具B	10.01	200	1	2.942	0.0588			
8 留め具B	10.00	200	1	2.918	0.0584	0.0580	0.001129	1.95
9 留め具B	10.03	200	1	2.827	0.0564			
10 留め具B	10.00	200	1	2.870	0.0574			

### 3 透析セット後、かくはん開始までの静置時間とかくはん間隔の違いによる回収率及びばらつきの検討

1, 2の結果から、以後留め具 A, かくはん回数は4回で実施することとした。

収去検査の場合、14時～15時頃に検体が搬入されるケースが多いため、翌朝透析をセットし、1時間後からかくはんを開始したものと、搬入当日の夕方に透析をセットし、翌朝からかくはんを開始したものと違い、及びかくはん間隔が1時間と2時間での測定値の違いについて検討した。かくはん無しで静置したものについても検討した。

パターン A(No.1～3)；セット後1時間からかくはん開始、以後かくはん間隔2時間、透析時間23時間

パターン B(No.4～6)；セット後1時間からかくはん開始、以後かくはん間隔1時間、透析時間23時間

静置23時間(No.7)

パターン C(No.8～10)；夕方セット翌日からかくはん開始、以後かくはん間隔2時間、透析時間22時間(4回目かくはん後30分で終了)

静置22時間(No.11)

パターン D(No.12～14)；夕方セット翌日からかくはん開始、以後かくはん間隔1時間、透析時間19時間(4回目かくはん後30分で終了)

静置19時間(No.15)

試料は無添加確認済みの漬物に0.1g/kgになるようにサッカリンナトリウムを添加したもので実施した。

結果を表4に示す。透析セット1時間後にかくはんを開始したものと前日透析セットし翌朝からかくはんを開始したものでは、2時間間隔でかくはんしたパターン A, C については回収率に違いは見られなかった。かくはん間隔については2時間間隔のパターン A, Cの方が、1時間間隔のパターン B, Dよりも回収率が高いことが明らかになった。

かくはん無しの No.7, No.11, No.15 はかくはんしたもの比べると回収率は低かった。透析時間が長くなるにつれて回収率が高い結果となったが、かくはん無しでは透析時間19時間でもまだ透析が不十分であると思われた。

表4 かくはん開始までの静置時間とかくはん間隔の違いによる測定値及びばらつき

	試料採取量 (g)	透析液量 (ml)	HPLC注入 希釈倍率	試料液 サッカリンNa濃度 ( $\mu$ g/ml)	検体中 サッカリンNa濃度 (g/kg)	平均	標準偏差	変動係数	添加量 (g/kg)	回収率 (%)	回収率 平均 (%)	
1	パターンA	10.00	200	1	4.866	0.0973			0.1000	97.3		
2	パターンA	10.03	200	1	4.842	0.0966	0.0969	0.00039053	0.40	0.0997	96.8	97.0
3	パターンA	10.00	200	1	4.841	0.0968			0.1000	96.8		
4	パターンB	10.02	200	1	4.831	0.0964			0.0998	96.6		
5	パターンB	10.00	200	1	4.791	0.0958	0.0961	0.00032003	0.33	0.1000	95.8	96.2
6	パターンB	10.02	200	1	4.807	0.0959			0.0998	96.1		
7	静置	10.01	200	1	4.602	0.0919	-	-	-	0.0999	92.0	-
8	パターンC	10.01	200	1	4.823	0.0964			0.0999	96.5		
9	パターンC	10.00	200	1	4.864	0.0973	0.0969	0.00046323	0.48	0.1000	97.3	96.9
10	パターンC	10.00	200	1	4.847	0.0969			0.1000	96.9		
11	静置	10.03	200	1	4.585	0.0914	-	-	-	0.0997	91.7	-
12	パターンD	10.00	200	1	4.729	0.0946			0.1000	94.6		
13	パターンD	10.02	200	1	4.701	0.0938	0.0941	0.00039485	0.42	0.0998	94.0	94.2
14	パターンD	10.01	200	1	4.704	0.0940			0.0999	94.1		
15	静置	10.05	200	1	4.385	0.0873	-	-	-	0.0995	87.7	-
	ブランク	10.00	200	1	0.000	0.0000	-	-	-	-	-	-

4 かくはん間隔2時間での添加回収試験 (N=5)

試料は無添加確認済み漬物及びみそに 0.1g/kg になるようにサッカリンナトリウムを添加したもので実施した。結果を表 5 に示す。なお透析を行った時間は 22 時間であった。漬物は回収率の平均が 95.8% (2009, 2010 年度平均回収率 91.4%), みそは 84.8% (2009, 2010 年度平均回収率 75.6%) となり、漬物、みそともに回収率の改善がみられた。

まとめ

サッカリンナトリウムの分析における透析中のかくはん方法の検討を行い、以下の結果を得た。

- 1 水添加試料で、かくはんの有無とスターラーによる連続かくはんによる添加回収試験を実施した。かくはん無しの添加回収率は 82.6%, かくはん有りの平均回収率は 94.0%, スターラーによる連続かくはんの回収率は 95.8% であり、透析中のかくはんが回収率に大きな影響を及ぼしていることが明らかとなった。
- 2 透析膜を吊す留め具を結束バンドからテフロンたこ糸に変更することで、メスシリンダー上面を密封できるようになり、さらに透

析膜が糸とともに上下運動するようになったことで、十分なかくはん操作が可能となり、回収率及びばらつきが改善した。

3 透析セット後、かくはんの間隔は 1 時間間隔よりも 2 時間間隔で 4 回行った方が、ばらつきが少なく良好な結果が得られた。また、かくはん開始までの静置時間は測定値に影響しない結果が得られた点を考慮すると、透析開始は夕方、朝どちらでも可能であることが明らかになった。

4 透析膜を吊す留め具をテフロンたこ糸に変更し、2 時間間隔で 4 回かくはんを実施した結果、過去 2 年間の添加回収試験の平均値よりも漬物で 4.4%, みそで 9.2% 高い回収率が得られた。この方法で透析を実施することで、今後はより精度の高い試験を行うことができると思う。

参考文献

- 1) 食品衛生検査指針 食品添加物編 2003;233-239. 社団法人 日本食品衛生協会. 都田路子, 青柳陽子, 佐藤寛, 他.
- 2) ジャム及びマーマレード中のサッカリン及びズルチンの HPLC 分析 東京衛研年報 2001;52:57-61

表 5 添加回収試験 (N=5)

	試料	透析	HPLC 注入	試料液	検体中	平均	標準偏差	変動係数	添加量	回収率	回収率	
	採取量	液量	希釈倍率	サッカリンNa濃度	サッカリンNa濃度	(g/kg)		(%)	(g/kg)	(%)	平均	
	(g)	(mL)		( $\mu$ g/mL)	(g/kg)							
1	漬物	10.00	200	1	0.000	0.0000						
2	漬物	10.02	200	1	4.858	0.0970			0.1	97.0		
3	漬物	10.01	200	1	4.776	0.0954			0.1	95.4		
4	漬物	10.00	200	1	4.824	0.0965	0.0958	0.0009258	0.97	0.1	96.5	95.8
5	漬物	10.01	200	1	4.771	0.0953			0.1	95.3		
6	漬物	10.01	200	1	4.739	0.0947			0.1	94.7		
7	みそ	10.01	200	1	0.000	0.0000						
8	みそ	10.00	200	1	4.215	0.0843			0.1	84.3		
9	みそ	10.02	200	1	4.170	0.0832			0.1	83.2		
10	みそ	10.01	200	1	4.299	0.0859	0.0848	0.0016667	1.97	0.1	85.9	84.8
11	みそ	10.01	200	1	4.357	0.0871			0.1	87.1		
12	みそ	10.01	200	1	4.171	0.0833			0.1	83.3		