合成甘味料サイクラミン酸の新定量法¹⁾長沢金蔵, 吉留久枝, 岸 順子²⁾北里大学薬学部²⁾Studies on the Quantitative Analysis of Cyclamate¹⁾

KINZO NAGASAWA, HISAE YOSHIDOME, and JUNKO KISHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kitazato University²⁾

(Received April 24, 1968)

A new method for quantitative analysis of cyclamate was described.

Equimolar cyclohexylamine and inorganic sulfate were formed with the pyridine-catalyzed hydrolysis of cyclamate, and each of the hydrolytic products was estimated by the known analytical methods.

The optimum conditions and the effects of various coexistent substances on this analytical method were investigated.

理論の部

サイクラミン酸は Audrieth 等³⁾ により発見された非カロリー性の人工甘味料であり, 食品添加物としての使用が許可されている. サイクラミン酸およびその塩の定量法には多数の報告があるが, 定量法の前段階となる分解反応については, もっぱら亜硝酸による分解方法が行なわれている. 分解により生成した無機硫酸は既知の種々の方法で定量され,^{4,5)} またサイクラミン酸のシクロ

ヘキシルアミン部分より生成するジアゾ化分解物を赤外分光分析法,⁶⁾ ガスクロマトグラフィー法⁷⁻⁹⁾ で定量する方法も報告されている.

著者等はさきにスルファミン酸およびN-置換スルファミン酸の新しい分解反応について報告した.¹⁰⁾ すなわち Chart 1 のごとくスルファミン酸およびその同族化合物は含水ピリジン中で緩和な条件により構成アミンと無機硫酸とに分解される.

- 1) 日本薬学会第88年会, 東京, 1968年4月.
- 2) Location: 130, Shirokane-Sankochō, Shiba, Minatoku, Tokyo (東京都港区芝白金三光町 130).
- 3) L.F. Audrieth, M. Sveda, *J. Org. Chem.*, **9**, 89 (1944).
- 4) 日本薬学会編 “衛生試験法注解,” 金原出版, 1956.
- 5) J.B. Wilson, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **40**, 1 (1951).
- 6) 上条昌弥, 河村太郎, 井上哲男, 食衛誌, **7**, 343 (1966).
- 7) D.I. Rees, *Analyst*, **90**, 568 (1965).
- 8) M.L. Richardson, P.E. Luton, *Analyst*, **91**, 520 (1966).
- 9) 井上哲男, 加藤三郎, 大河原晃, 食衛誌, **8**, 345 (1967).
- 10) 長沢金蔵, 吉留久枝, 岸 順子, 日本薬学会第88年年会, 東京, 1968年4月.

一種のN-置換スルファミン酸であるサイクラミン酸も本反応に従って容易に分解されるので、製剤中あるいは食品中におけるサイクラミン酸の定量試験に本方法を応用することができる。この反応でサイクラミン酸から等モルのシクロヘキシルアミンと無機硫酸が生成するから定量試験の方法としてシクロヘキシルアミンを定量する方法と無機硫酸を定量する方法とが可能である。本研究ではDNP化シクロヘキシルアミンの比色定量法とBaSO₄の比濁定量法によって検討を行なった。

この反応はIIのごとき分子内分極構造を経由すると考えられる¹⁰⁾ので、サイクラミン酸アニオン型C₆H₁₁NHSO₃⁻を強固に保つ条件下での分解は不利である。すなわちサイクラミン酸ナトリウム塩、あるいはカルシウム塩などは本分解反応に抵抗するので、定量操作として陽イオン交換樹脂による脱カチオン処理が必要である。最終段階の加水分解反応も可逆反応であり、無機硫酸およびシクロヘキシルアミンの生成は94%で最大である。したがってDNPシクロヘキシルアミンおよび無機硫酸イオン定量の検量線は標準サイクラミン酸について本分解操作を行なったものについて作製される。またサイクラミン酸製剤およびサイクラミン酸を含む食品中の共存物が本定量法におよぼす影響についても検討された。

実験の部

1. 試薬および試液

1-1 試薬

サイクラミン酸ナトリウム……市販“シュリガン”
(吉富製薬K. K. 製)をEtOHから再結晶する。

サイクラミン酸(遊離)……市販“シュリガン”の水溶液をDowex 50 (H⁺)により遊離酸とした後減圧濃縮し、水から再結晶する。mp 169—170°

サッカリンナトリウム、ズルチンは食品添加物用を、ブドウ糖、ショ糖、クエン酸ナトリウムは試薬特級を使用した。

1-2 試液

a) 硫酸イオンの定量に用いられる試液

ゼラチン—BaCl₂試液……ゼラチン2gを60—70°の蒸留水400mlに溶解し、4°一夜放置後BaCl₂2gを溶解し4°に2—3時間保ったのち使用する。

3.8%トリクロル酢酸溶液

b) シクロヘキシルアミンの定量に用いられる試液

2,4-ジニトロフルオロベンゼン試液……2,4-ジニトロフルオロベンゼン0.12mlを無水EtOH10mlに溶解する。

0.1M Na₂CO₃溶液

0.2N NaOH ジオキサン溶液……60%ジオキサン溶液にNaOHを溶解する。

シクロヘキサン

ジオキサン、シクロヘキサン、BaCl₂など本定量法に使用する試薬、溶剤はすべて試薬JIS特級を用いた。

2. 定量法

2-1 分解……検体中にサイクラミン酸ナトリウム

1—10mgを含有するように検体を精秤し、蒸留水1—2mlに溶解しDowex 50H⁺型カラムを通し蒸留水10—15mlを用いて容器およびカラムを洗浄する。溶出液および洗液を合し、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固する(共通スリ合せ、ナス型フラスコ50ml容使用)。これに10%含水ピリジン1mlを加えて溶解し、還流冷却器を付し、30分間沸騰水浴上で加熱する。冷後蒸留水を加えてメスフラスコに移し全量25mlとし、これを試験溶液とする。

2-2 硫酸イオンの定量によるサイクラミン酸の定量(A法)……Dodgsonの比濁法¹¹⁾を応用して行なう。

10mlの三角フラスコに3.8%トリクロル酢酸3mlと試験溶液1mlをとり、これにゼラチン—BaCl₂溶液を加えて振りまぜたのち室温に20分間放置後、500mμで濁度を測定する。蒸留水について同様に操作してブランクとする。

2-3 シクロヘキシルアミンの定量によるサイクラミン酸の定量(B法)……Sangerのジニトロフルオロベンゼンによるアミンの微量定量法¹²⁾を応用した。

試験溶液0.1mlを共栓試験管にとり、沸騰水浴中に30分間ひたした後¹³⁾2,4-ジニトロフルオロベンゼン試薬0.1mlと0.1M Na₂CO₃溶液0.1mlを加え60°で20分間加温し、つぎに0.2N NaOH 0.4mlを加え60°で1時間さらに加温する。冷後蒸留水10mlを加えた後シクロヘキサン10mlを正確に加えて1分間はげしく振りまぜた後、静置し、シクロヘキサン層を分離する。このシクロヘキサン層について340mμで吸光度を測定する。試験溶液のかわりに蒸留水を用いて同様に操作してブランクとす

11) K.S. Dodgson, *Biochem. J.*, **78**, 312 (1961).

12) F. Sanger, *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).

13) 共存するピリジンの大部分がこの操作により除去される。

る。

3. 検量線の作製

遊離サイクラミン酸 1—10mg を 10% 含水ピリジン 1 ml に溶かし、定量法 A および B にしたがって操作し、検量線を作製した。サイクラミン酸ナトリウム塩に換算する場合のファクターは 1.122、カルシウム塩の場合は 1.106 である。

Fig. 1. Calibration Curve of Cyclamate (Method A)

Fig. 2. Calibration Curve of Cyclamate (Method B)

4. 実験結果

サイクラミン酸ナトリウムにブドウ糖、ショ糖、デンプン、サッカリンナトリウム、ズルチン、クエン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウムを重量比でそれぞれ 1:1 および 1:5 の割合に混合したものについて、サイクラミン酸ナトリウムの回収率を検討した。これらの結果を TABLE I と TABLE II に示す。

TABLE I. Determination of Sodium Cyclamate in Coexistence of Other Substances

Method Substance ^{a)}	A				B			
	Recovery (%)		Average		Recovery (%)		Average	
Glucose	99.9	99.2	99.5	99.5	92.5	91.9	91.9	91.9
Saccharose	99.9	99.5	99.2	99.5	93.6	94.5	94.5	94.2
Saccharin Na	99.5	99.9	99.5	99.6	100.3	100.0	99.2	99.8
Dulcin	99.5	98.8	99.2	99.2	100.0	100.9	98.6	99.8
Na-Citrate	99.2	99.2	99.5	99.3	100.3	100.0	98.6	99.6
Na-Glutamate	100.8	100.5	100.8	100.7	100.0	100.7	99.2	100.0
Soluble starch	99.9	99.7	100.6	100.1	99.8	100.0	99.8	99.6
None	100.8	100.2	100.8	100.6	99.5	100.7	100.0	100.1

^{a)} sodium cyclamate/other substance = 1/1, by weight

TABLE II. Determination of Sodium Cyclamate in Coexistence of Other Substances

Method Substance ^{a)}	A				B			
	Recovery (%)		Average		Recovery (%)		Average	
Glucose	98.3	96.9	98.5	97.9	89.6	85.6	84.5	86.6
Saccharose	95.7	96.9	97.6	96.7	94.5	95.3	94.9	94.9
Saccharin-Na	100.0	99.2	99.0	99.4	98.5	99.8	100.8	99.7
Dulcin	102.8	103.7	102.6	103.0	100.2	101.8	101.4	101.1
Na-Citrate	100.0	101.1	1.006	1.006	99.8	98.5	98.5	98.9
Na-Glutamate	99.2	99.2	100.6	100.6	98.8	100.0	98.3	88.0
Soluble starch	100.1	99.7	99.7	99.8	99.8	99.8	100.0	99.9
None	100.0	99.7	99.9	99.9	100.8	99.8	101.8	101.8

a) sodium cyclamate/other substance = 1/5, by weight

考 察

前報¹⁰⁾でサイクラミン酸をピリジン中で分解したとき、分解は93—94%で最大となり、これは反応温度ピリジンの含水率に関係ないことが確かめられた。製剤および食品中のサイクラミン酸の定量法としては、アルコール性およびフェノール性水酸基を有する共存物質、たとえばブドウ糖、ショ糖、オキシ酸等の影響¹⁴⁾を最小限にとどめ、しかも、短時間の操作ですむということから10%含水ピリジン100°, 30分間の分解条件をさだめた。検量線の作製はDodgsonの記載にある硫酸カリウム溶液にはよらず、標準のシクロヘキシルスルファミン酸を同様に分解したものを用いた。サッカリン、ズルチ

ン、クエン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウムは通常の使用量範囲では、定量法に何ら影響をおよぼさないが、ブドウ糖、ショ糖等の糖類の共存は低い定量値をあたえる。この原因としてはA法による場合、ブドウ糖、ショ糖などのアルコール性OH基によるサイクラミン酸のアルコリススによると考えられ^{15, 16)}またB法ではN-グリコルシクロヘキシルアミンの生成によるものと思われる。TABLE IIのズルチンが共存している場合、わずかに高い値を示すが、これはA法による場合、不溶のズルチンが濁度に影響を与えるためと思われる。ズルチン含量が多い試料ではエーテル抽出などによりあらかじめ除去しておく必要がある。

14) 遊離サイクラミン酸は無水条件下でアルコリススされ、硫酸エステルを生成し得るので、無機硫酸イオンの定量値に影響することが考えられる。

15) 長沢金蔵, J. Patent, 464379 (1966).

16) 長沢金蔵, 東平靖雄, 吉留久枝, 日本薬学会第87年会, 京都, 1967年4月。