ガスクロマトグラフィーによる食品中サッカリンの N-メチル誘導体としての定量法¹⁾

永井 勇, 岡 日出生, 田坂美和子,^{2a)} 岡 新^{2b)}

山口県衛生研究所,^{2a)} 広島市衛生試験所^{2b)}

Gas-Liquid Chromatographic Determination of Saccharin in Foods as a N-Methyl Derivative¹⁾

ISAMU NAGAI, HIDEO OKA

MIWAKO TASAKA,^{2a)} ARATA OKA^{2b)}

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health^{2a)}

Hiroshima City Institute of Hygiene Science^{2b)}

(Received December 6, 1974)

A new methylation method for gas chromatographic determination of saccharin in foods was established. Saccharin was extracted from samples with ethyl acetate and converted to N-methylsaccharin by reaction with dimethyl sulfate in acetone at room temperature for 10 min. After decomposition of dimethyl sulfate with sodium hydroxide, N-methylsaccharin in the solution was determined by FID-gas chromatography using a column of SE-30 on Chromosorb W. Methyl palmitate was used as an internal standard. Rate of methylsaccharin formation from saccharin was 90.6—96.6%.

This gas chromatographic method gave good results when applied to the determination of saccharin in several kinds of food and the recovery of saccharin added to food at the levels of 150 and 240 ppm was 77.3—94.3%.

緒 言

食品に添加するサッカリンおよびそのナトリウム塩の使用基準が定められたのに伴い、精度の高い定性および定量法が必要となっている。食品中のサッカリンの定性についてはろ紙および薄層クロマトグラフィーにより、その目的を達し得るが、定量法としては種々の方法が報告されていて、食品中のサッカリンの定量にあたり選定がむづかしい。サッカリンの定量においてガスクロマトグラフィー (GLC) の利用は定性と同時に定量が可能である利点を持ち、日常業務に役立つ分析方法である。

GLC によるサッカリンの定量法には、①サッカリンそのものを直接 GLC により分析する方法³⁾ ②サッカ

リンをジアゾメタンあるいはヨウ化メチルによりメチル化するか⁴⁻⁶⁾ またはビストリメチルシリルアセトアミド (BSA) によりトリメチルシリル誘導体 (TMS 体) として測定する方法⁷⁾ 亜鉛と塩酸により還元し、その生成物を測定する方法⁸⁾ などがある。しかし、①の方法では GLC において充填剤の選定、カラム温度、キャリアー流量などの条件の設定が難しく、②のうちメチル誘導体により測定する場合には反応試薬の取扱い上の危険性や封管中での加熱を必要とする点で簡便性に欠け、また TMS 体の測定においては BSA 試薬の品質により反応に差を生じ、さらに還元生成物の測定では精度の低いことなど、それぞれの測定法に難点が認められる。そこ

1) 日本食品衛生学会第27回学術講演会で発表, 東京, 1974年5月。

2) Location: a) 5-67, Aoi, 2-chome, Yamaguchi-shi (山口市葵2丁目 5-67); b) 11-27, Fujimi-cho, Hiroshima-shi (広島市富士見町 11-27)。

3) 黒田弘之, 毛利孝明, 広瀬秀雄, 日本食品衛生学会第26回学術講演会, 名古屋, 1973年11月。

4) H.B.S. Conacher, R.C. O'Brien, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **53**, 1117 (1970)。

5) W. Groebel, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **129**, 154 (1966)。

6) R.J. Daun, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **54**, 1140 (1971)。

7) R. Gerstl, K. Ranfft, *Z. Anal. Chem.*, **258**, 110 (1972)。

8) 黒田弘之, 広瀬秀雄, 食衛誌, **12**, 322 (1973)。

で、著者らは Semenchenko^{9,10)} らがフェノールを GLC により分析する際にメチル化剤として硫酸ジメチルを用いて室温で容易にメチル化を行なっている点に着目し、このメチル化条件をサッカリンのメチル化に適用し、前述の分析法の難点を解決して定性および定量を行なう方法を設定するために検討を試み知見を得たので報告する。

実験の部

1. 試薬 1) サッカリン標準溶液——サッカリン (和光純薬・特級) 200 mg をアセトンに溶かして 100 ml とした。さらにアセトンで稀釈して、その溶液 1 ml 中にサッカリンとして 0.2—2.0 mg を含むように各濃度溶液を調製した。

2) 内部標準溶液——パルミチン酸メチル (東京化成・1 級) 200 mg をアセトンに溶かして 100 ml とした。

3) メチルサッカリン標準溶液——メチルサッカリン (東京化成・特級) 200 mg をアセトンに溶かして 100 ml とした。さらにアセトンで稀釈して、その溶液 1 ml 中にメチルサッカリンとして 0.05—0.5 mg を含むように各濃度溶液を調製した。

4) アセトンおよび酢酸エチル—和光純薬・特級

5) 硫酸ジメチル——和光純薬・1 級

6) セロハンチューブ——Visking Company 製

2. ガスクロマトグラフィー装置および条件 装置として島津製 GC-5 AIF 型 (水素イオン化検出器) を用い、ガスクロマトグラフ充填剤として定性用には SE-30 および DEGS-H₃PO₄ の 2 種類の固定相液体を、定量には SE-30 を固定相液体として選定した。それぞれの固定相液体を用いたときの分析条件を示すと、

a) カラム—ガラスカラム (3 mm × 2 m) に 1.5% SE-30—Chromosorb W, (酸およびシラン処理) 80—100 メッシュを充填した。

温度—注入口および検出器 200°, カラム 160°

キャリアーその他ガス流量—N₂: 60 ml/min

H₂: 40 ml/min, 空気: 0.6 liter/min

感度—Sensitivity: 10³, Range: 0.08

b) カラム—ガラスカラム (3 mm × 2 m) に 3% DEGS-1% H₃PO₄—Chromosorb W, (酸およびシラン処理) 80—100 メッシュを充填した。

温度—注入口および検出器 200°, カラム 120°

キャリアーその他ガス流量—N₂: 50 ml/min

H₂: 40 ml/min, 空気: 0.6 liter/min

感度—Sensitivity: 10³, Range: 0.08

3. 操作法 抽出——試料一定量 (サッカリンとして 1—10 mg を含む) を採取する。液体試料はそのまま分液漏斗に移し入れ、1N 水酸化ナトリウム溶液を加えてアルカリ性としたのち、エーテル 50 ml を加えて振り混ぜ静置する。この際、乳化を起す試料にあつては遠心分離を行なう。

ついで水層を別の分液漏斗に移し、10% 塩酸で酸性とし、塩化ナトリウムを飽和したのち酢酸エチル 50 ml で 3 回抽出する。全抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、ナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターを用い、40° 以下で酢酸エチルを留去する。残留物を 14 ml のアセトンに溶かしメチル化用試験溶液とする。固体試料および半流動試料は少量の水を加えてすりつぶしたのち、2% 炭酸ナトリウム溶液 10 ml を加えてアルカリ性とする。これをセロハンチューブに移し、20% 塩化ナトリウム溶液を加えてよく混和する。セロハンチューブ内液と外液の和が正確に 250 ml となるようにビーカー中に外液として水適量を入れ、マグネチックスタラーを用い、室温で 25 時間透析を行なう。ついで外液 100 ml を分液漏斗に移し、以下、液体試料と同様にサッカリンを抽出する。

メチル化反応——メチル化用試験溶液に硫酸ジメチル 1 ml を加え、室温で 10 分間振り混ぜる。ついで 50% 水酸化ナトリウム溶液 1.5 ml を加えて振り混ぜ、5 分間放置したのち、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水する。これに内部標準溶液 5 ml を加えてろ過し、ろ液を試験溶液とする。別にサッカリン標準溶液 5 ml にアセトン 9 ml を加え、試験溶液と同様に操作する。

定性および定量——ガスクロマトグラフィー条件にしたがって試験溶液およびサッカリン標準溶液から得られた溶液それぞれ 5 μ l をガスクロマトグラフに注入する。試験溶液から得られたガスクロマトグラムの中のピークの内標準物質ピークに対する相対保持時間を求め、メチルサッカリン標準溶液から得られたそれと比較して定性する。また定量は得られたピークと内部標準物質とのピーク高比を求め、あらかじめ作成した検量線より測定する。

結果および考察

1. サッカリンのメチル化について a) サッカリンのメチル化物のガスクロマトグラフィー——サッカリンをメチル化し、1.5% SE-30 を用いてガスクロマトグ

9) L.V. Semenchenko, V.T. Kaplin, Zh. Analit. Khim., 27, 1257 (1968).

10) L.V. Semenchenko, V.T. Kaplin, Zavodsk Lab., 33, 801 (1967).

Fig. 1. Gas Chromatogram of Methylsaccharin

peak 1: methylsaccharin

peak 2: methylpalmitate as internal standard

GLC conditions: 1.5% SE-30 on chromosorb W (80-100 mesh, AW DMCS), glass tube 3 mm×2 m

column temperature: 160°

injection and detector temperature: 200°

carrier gas: N₂ 60 ml/min, H₂ flow rate: 40 ml/min

air flow rate: 0.6 liter/min

detector: FID

ラフィーを行なった結果を Fig. 1 に示す。この生成物質を同定するため、同種のカラム充填剤を用いてガスクロマトグラフィー質量分析を行ない、さらに、この生成物質を精製し、赤外吸収スペクトル測定をあわせて行なった。Fig. 1 におけるピーク 1 のマスペクトルグラムを Fig. 2 に、赤外吸収スペクトルを Fig. 3 に示す。この結果から、生成物質は N-メチルサッカリンであることが確認された。

N-メチルサッカリンのガスクロマトグラフィーにおいて最も適する固定相液体を選定するため、1.5% SE-30, 2% OV-1, 3% OV-17, 3% OV-25, 3% DEGS-1% H₃PO₄, 5% DC-11 および 2% QF-1 について検討したところ、内部標準物質としてパルミチン酸メチルを用いる場合には、両者の分離はいずれの固定相液体を用いても可能であるが、1.5% SE-30 は分離に最も優れており、定性にはこのものと極性の異なる 3% DEGS-H₃PO₄ を併せて用いることが適当であると考えた。

b) 反応条件について サッカリンのメチル化において、サッカリンの量と反応試薬の量的関係、反応時間と N-メチルサッカリンの生成率の関係、用いる溶媒の種類と量と生成率との関係を知る必要がある。この反応

Fig. 2. Mass Spectra of N-Methyl Derivative

Fig. 3. Infrared Spectra of the Products (I) Obtained from Saccharin Using the Same Reaction and N-Methylsaccharin (II)

において硫酸ジメチル 1 ml をサッカリン 5 mg に反応させ、反応時間を 5, 10, 20 および 30 分間とし、これら反応液中の N-メチルサッカリンを N-メチルサッカリンを標準としてガスクロマトグラフィーを行ない、N-メチルサッカリンの生成率を調べた。Fig. 4 に示すように、この間における生成率は変化なく、すみやかに、しかも、ほぼ定量的に反応していることが知られた。硫酸ジメチルの量を 1 ml とし、メチル化されるサッカリンの量を調べたところ、サッカリンとして 10-50 mg が 96.4% メチル化され、通常、食品 20 g から分離されるサッカリンの量は硫酸ジメチル 1 ml で十分メチル化されることが知られた。なお、メチル化後の過剰の硫酸ジメチルを中和するために要するアルカリ量は計算により、50% 水酸化ナトリウム溶液 1.5 ml で十分であり、この量で実験上特に支障は認められなかった。

サッカリンのメチル化に用いる溶媒を選定するため、サッカリン 5 mg を Table I に示す 9 種の溶媒 14 ml に溶かし、メチル化条件に従って操作し、N-メチルサッカリンの生成率を調べた。各条件において、アセトニ

Fig. 4. Relationship between Reaction Time and Formation of N-Methylsaccharin

TABLE I. Effect of Solvents on Formation of N-Methylsaccharin

Solvent	Peak height ratio ^{a)}
Acetone	0.99
Acetonitrile	1.00
Benzene	0.03
Chloroform	0.99
Dimethyl formamide	0.76
Ethyl acetate	0.59
Ethyl alcohol	0.25
Ethyl ether	0.24
Methyl alcohol	0.09

a) peak height ratio: peak height of N-methylsaccharin formed using other solvents at the reaction using acetonitrile as solvent

トリルを溶媒として反応させたときの N-メチルサッカリンのピーク高を1.0とした場合、他の溶媒によるメチルサッカリンとのピーク高比を求めると Table I のようになる。ここにおいて、その生成率はアセトニトリルおよびアセトンが最も高く、両溶媒が反応溶媒として適することが知られた。

また、溶媒の量を増加させると反応率が低下することが考えられるので、サッカリン5mgについて、アセトン容量を、5, 10, 20 および 30 mlとして、N-メチルサッカリンの生成率を調べた。それぞれの条件において N-メチルサッカリンの生成率はそれぞれ 96.5%, 96.6%, 96.5% および 96.4%を示し、この範囲のアセトン使用は生成率に影響を与えないことが知られた (Fig. 5)。

各種サッカリン濃度系列溶液 (溶液 1 ml 中にサッカ

Fig. 5. Effect of Amount of Acetone on Formation of N-Methylsaccharin

Fig. 6. Calibration Curve of Saccharin

リンとして 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0mgを含む) 各 5 ml をとり、アセトンを加えて 14 ml としたものについてメチル化条件に従って反応させ、定量範囲を調べたところ、得られた検量線は 0.05—0.5 mg において直線性を示した (Fig. 6)。

また N-メチルサッカリンの生成率の再現性は Table II に示すようにサッカリン 4.5 mg について、平均 96.4%, 標準偏差 0.266 の結果が得られた。

2. 共存物質の影響

a) 保存料 人工甘味料および酸化防止剤——食品中のサッカリンの分析に際し、食品中の保存料、人工甘味料および酸化防止剤が同時に抽出され、それらがそのままか、あるいはそれぞれのメチル化物がガスクロマト

TABLE II. Formation of N-Methylsaccharin from Saccharin

Exp. No.	Saccharin added (mg)	N-Methylsaccharin		
		Theoretical yield (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
1	4.5	4.8	4.62	96.2
2	4.5	4.8	4.62	96.2
3	4.5	4.8	4.64	96.6
4	4.5	4.8	4.61	96.0
5	4.5	4.8	4.64	96.6
6	4.5	4.8	4.64	96.6
7	4.5	4.8	4.64	96.6
8	4.5	4.8	4.64	96.6
9	4.5	4.8	4.64	96.6
10	4.5	4.8	4.61	96.0
Mean				96.40
Standard deviation				0.266

グラフィーにおいて妨害するかについて検討した。

すなわち、安息香酸、パラオキシ安息香酸（メチル、エチル、プロピル、ブチル）エステル、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、サリチル酸、ズルチン、サイクラミン酸、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）を選び、それぞれ 20 mg をアセトン溶液とし、サッカリンのメチル化条件に従い操作し、実験の部で述べた a) の条件でガスクロマトグラフィーを行ない、各添加物による妨害について調べた。その結果、パラオキシ安息香酸メチル、エチル、プロピル、ブチルと、BHA および BHT がガスクロマトグラム上にピークを示し、メチルサッカリンに対する相対保持時間は、それぞれ 0.58, 0.71, 1.04, 1.54, 0.50 および 0.69 であり、いずれもサッカリンの定量に妨害とならないことが知られた。

b) 脂肪酸 サッカリンの抽出において、同時に抽出される脂肪酸によるサッカリンの定量への影響を知るため、カブロン酸、カプリン酸、ラウリル酸、ミリスチン酸およびステアリン酸をそれぞれ 20mg アセトンに溶かし、サッカリンのメチル化条件に従い操作し、実験の部で述べた a) の条件でガスクロマトグラフィーを行なった。得られた脂肪酸メチルエステルのメチルサッカリンに対する相対保持時間を求めると 0.12, 0.30, 1.56, 3.48 および 8.00 でいずれもサッカリンの定量に妨害とならないことが知られた。

c) 香料および香辛料 食品に添加される香料および香辛料がサッカリンと同時に抽出され、抽出成分そのものがガスクロマトグラム上に認められるか、もしくはサッカリンのメチル化において抽出成分がメチル化さ

TABLE III. Recovery Test of Saccharin in Foods

Food	Added (mg/kg)	Found (mg/kg)	Recovery (%)
Soy-Sauce	150	127	84.7
	150	128	85.3
	150	126	84.0
	150	126	84.0
	150	128	85.3
	mean		84.66
Vinegar	standard deviation		0.650
	150	135	90.0
	150	134	89.3
	150	136	90.7
	150	136	90.7
	150	136	90.7
Orange juice	mean		90.28
	standard deviation		0.626
	150	132	88.0
	150	134	89.3
	150	133	88.7
	150	133	88.7
Uzura ^{a)} mame cooked	150	135	90.0
	mean		88.94
	standard deviation		0.750
	240	185	77.1
	240	184	76.7
	240	184	76.7
Tomato ^{a)} catsup	240	187	77.9
	240	187	77.9
	mean		77.26
	standard deviation		0.607
	240	224	93.3
	240	225	93.8
Tomato ^{a)} catsup	240	229	95.4
	240	227	94.6
	240	227	94.6
	mean		94.34
	standard deviation		0.811

a) The samples were dialyzed before extraction of saccharin

れ、N-メチルサッカリンの妨害ピークとしてガスクロマトグラム上に認められるかについて検討を加えた。香料エッセンスとして、コーヒー、パイン、まっ茶、パッション、オレンジ、バニラ、アップルおよびヨーグルトエッセンス、香辛料として、ナッツメグ、ジンジャー、セージ、ペッパー、コリアンダーおよびオイルスパイスの粉末について、それぞれ 20mg をアセトンに溶かしメチル化条件に従い操作した。コーヒー、バニラ、パインおよびヨーグルトの香料およびコリアンダー、ナッツメグの香辛料について1-数本のピークを認めたが、いずれもサッカリンの定量に妨害とはならなかった。

3. 食品中のサッカリンの定量

a) 内部標準物質について この定量法では内部標準物質としてパルミチン酸メチルを使用しているの、

試料抽出物をメチル化し、内部標準物質を加える前に、反応液についてガスクロマトグラフィーを行なつて、パルミチン酸メチルが存在しないことを確認することが必要である。また、内部標準物質を加えたものについてはパルミチン酸メチルのピークが同濃度の内部標準物質溶液から得られたピークより高い場合には、試料中にパルミチン酸が含まれていることを示すので、内部標準法を適用することはできない。

b) サッカリンの添加回収 市販の醤油、酢、オレンジジュース、うずら豆、トマトケチャップのそれぞれにサッカリンナトリウムとして 150—240 ppm を添加し、回収試験を行なった。その結果は Table III に示すように、うずら豆においてやや低い回収率が得られたが、恐らくサッカリンの抽出が不完全であったものと推定される。

結 語

硫酸ジメチルをメチル化剤として用い、サッカリンをメチル誘導体とし、ガスクロマトグラフィーによる定量条件について検討した。

1) サッカリンのアセトン溶液に硫酸ジメチルを加え、室温で10分間振とうすることにより容易にメチル化することが出来た。この反応生成物はガスクロマトグラ

フィー質量分析および赤外吸収スペクトル測定により、N-メチルサッカリンと確認され、メチルサッカリンの生成率は96.4%であった。この反応によりサッカリンを定量する場合には、ジアゾメタンやその他のメチル化剤を用いた場合の操作に較べて簡便で短時間でサッカリンを定量できる利点を有する。

2) ガスクロマトグラフィーにおけるカラム充填剤としては、1.5% SE-30 が適当であったが、定性には3% DEGS-1% H_3PO_4 も併用する必要がある。

3) 食品に添加される保存料、酸化防止剤、香料、香辛料および法定外人工甘味料による定量法に対する妨害は認められなかった。

4) 醤油、酢、オレンジジュース、うずら豆およびトマトケチャップへの添加回収試験の結果は77.3—94.3%であった。本法は上記の検討した食品以外の食品中のサッカリンの定量にも十分利用出来るものと考えられる。

謝辞 本研究に際し、その機会を与えられ、かつ、御校閲をいただいた、山口県衛生研究所 田中一成所長、藤村暢男化学部長、ならびに国立公衆衛生院 竹下隆三博士に深謝いたします。