トリメチルシリルジアゾメタンを用いた食品中のサッカリンの ガスクロマトグラフィー

桃園裕子, 衛藤修一, 一色賢司
北九州市環境衛生研究所

Gas Chromatographic Determination of Saccharin in Foods by Using Trimethylsilyldiazomethane

YUKO MOMOZONO, SHUICHI ETO and KENJI ISSHIKI

*Kitakyushu Municipal Institute of Environmental Health Sciences, Shinike, Tobata-ku,
Kitakyushu Fukuoka 804, Japan*

(Received May 30, 1989)

A rapid and convenient methylation method of saccharin was developed to determine its content in foods by gas chromatography.

Saccharin was methylated with trimethylsilyldiazomethane (TMSD) at room temperature for 10 min. *N*-Methylsaccharin formation rate from saccharin with TMSD was about 84%. *N*-Methylsaccharin was analyzed with FID-gaschromatograph by using a column of 3% SE-30 on Uniport B or 10% OV-351 on Uniport HPS. Anthracene was used as an internal standard for gas chromatography.

The recoveries of sodium saccharin from soy-sauce spiked at 250 $\mu\text{g/g}$ were $93.7 \pm 2.5\%$ ($n=5$). Those from scallion pickles (rakkyo) spiked at 500 $\mu\text{g/g}$ were $96.9 \pm 1.9\%$ ($n=5$). The detection limit of saccharin in foods was about 20 $\mu\text{g/g}$ as sodium saccharin. The analytical results obtained with this method agreed with those obtained by using diazomethane on methylation of saccharin ($r=0.998$, $n=10$).

Keywords — saccharin ; gas chromatography ; trimethylsilyldiazomethane ; methylation ; food ; food additive ; sodium saccharin

緒 言

サッカリン (SA) は甘味料として、漬物、みそ、しょうゆ等各種の食品に使用基準が設定されている。食品中の SA の定量法としては、蛍光光度法,¹⁾ 紫外外部吸収スペクトル法,²⁾ ガスクロマトグラフ法 (GC 法),³⁻⁸⁾ 高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法)⁹⁻¹²⁾ 等がある。GC 法は、機器も普及し、操作も簡便で、感度、精度も十分であり、また定性と同時に定量分析もできることから、日常業務において広く用いられている。SA は難揮発性であるため、GC 分析にあたっては、メチル化等の誘導体化が必要である。誘導体化法として最も一般的な方法は、ジアゾメタンによるメチル化であるが、ジアゾメタンは

用時調製の必要があり、毒性が強く、爆発性を有し、取り扱いには注意が必要である。³⁾ そのほかの方法として、ヨウ化メチル,³⁾ ジメチル硫酸,⁴⁾ *N*, *N*-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール⁵⁾ 等によるメチル化や、*N*, *O*-ビストリメチルシリルアセタミドによる TMS 化,⁶⁾ 五塩化リン並びにエチルアルコールによる *O*-エチル化,⁷⁾ 亜鉛と塩酸による還元⁸⁾ 等が報告されているが、これらの方法も、操作性、安全性、分析精度の点で問題がある。そこで、近年では、誘導体化が不要な HPLC による分析法も次々と報告されている。⁹⁻¹²⁾ しかし、簡易迅速な誘導体化法が開発されれば、GC 法も、HPLC 法とともに、有効な分析手段となると考えられる。

トリメチルシリルジアゾメタン (TMSD) は、爆

発性や発ガン性もなく安全なメチル化剤であり、カルボン酸のメチル化等に用いられる。¹³⁾そこで著者らが、これをSAのGC分析に応用したところメチル化が容易になり、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料 しょうゆ、みそ、漬物をはじめとする各種市販食品を用いた。

2. 試薬 サッカリンナトリウム(SA-Na)標準液:「衛生試験法・注解」³⁾に準じ、SA-Naの5000 $\mu\text{g/ml}$ 溶液を調製した。

サッカリン(SA)標準液:SA-Na標準液50 mlを300 ml容の分液ロートにとり、10%硫酸で酸性とし、塩化ナトリウム15 gを加えて溶解させた後、酢酸エチル50 mlずつで2回抽出した。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後ろ過し、酢酸エチルを加えて100 mlとし、SA標準原液とした。本液1 mlは、2500 μg のSA-Naに相当するSAを含む。SA標準原液を酢酸エチルで希釈して、各濃度のSA標準液とした。

TMSD溶液:10%ヘキサン溶液(ガスクロ工業製)を用いた。

内部標準液:アントラセン(東京化成工業製)を、酢酸エチルに溶かし、200 $\mu\text{g/ml}$ 、あるいは20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度とし用いた。

N-メチルSA:(東京化成工業製、特級)を用いた。

塩化ナトリウム、メタノール、酢酸エチルその他の試薬は、すべて特級品を用いた。

3. GC装置及び分析条件 ガスクロマトグラフ——日立製作所製663-30型(FID検出器付)。

GC分析条件——a) 分析用カラム:3%SE-30(Uniport B, 60—80 mesh, 3 mm i.d.×2 m)。カラム温度:170°C。注入口及び検出器温度:240°C。キャリアーガス及び流量: N_2 , 40 ml/min。

b) 分析用カラム:10%OV-351(Uniport HPS, 80—100 mesh, 3 mm i.d.×1 m)。カラム温度:220°C。注入口及び検出器温度:240°C。キャリアーガス及び流量: N_2 , 40 ml/min。

4. 操作 4.1 試験溶液の調製——試験溶液の調製は、「衛生試験法・注解」³⁾に準じたが、透析操作は省略し、試料(約10 g)を直接酢酸エチルで抽出した。脂肪を多く含む食品は、あらかじめエーテル50 mlずつで2—3回脱脂した。尚、エマルジョンを生成し、水層と有機溶媒層が分離しない場合は、

遠心分離(3000 rpm, 10 min)を行った。

抽出液は、塩化ナトリウムを飽和させた1%の硫酸15 mlずつで1—3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を留去した。残渣を酢酸エチルに溶かして10 mlとし、試験溶液とした。

4.2 メチル化——4.2.1 TMSD法:試験溶液0.2 mlを、10 ml容の共栓付小試験管にとり、内部標準液0.2 ml、メタノール50 μl 、TMSD溶液10 μl を加え、混和し、室温で放置した。

4.2.2 ジアゾメタン法:「衛生試験法・注解」³⁾に従った。

4.3 GCによる分析——メチル化した試験溶液及びSA標準液3 μl を、GC分析した。それぞれのガスクロマトグラムのN-メチルSAのピークの保持時間により定性を行い、N-メチルSAと内部標準のピークの高さの比を求め、あらかじめ作成した検量線により定量を行った。

結果及び考察

1. メチル化について

Hashimotoら¹³⁾は、脂肪酸をGC分析する際に、TMSDを用いてメチル化を行っている。その方法に準じSAの酢酸エチル溶液(1000 $\mu\text{g/ml}$, 0.2 ml)に、メタノール50 μl とTMSD溶液10 μl を加え室温で放置し、メチル化を行った。反応液をそのままGC分析条件a, bに従って分析すると、N-メチルSAに一致するピークとO-メチルSAと一致するピークが約13:1の割合で現れた。これらのピークは、マススペクトルにより、それぞれ、N-メチルSA、O-メチルSAと確かめられた。TMSDによるSAのN-メチル化を収率よく行うために、以下の検討を行った。

まず反応溶媒について検討した。SAの酢酸エチル溶液(1000 $\mu\text{g/ml}$, 0.2 ml)に、内部標準液0.2 mlを加え、一度酢酸エチルを留去したのち、様々な溶媒0.4 mlを加えて残渣を溶かし、メタノール50 μl と、TMSD溶液10 μl を加え、室温で30分放置した後GC分析した。各々より得られたガスクロマトグラムのN-メチルSAとアントラセンのピーク高さの比を求め、その値を酢酸エチルを溶媒に用いた時の値と比較した。その結果を、Table Iに示した。酢酸エチル、エーテル、クロロホルム、ジクロロメタンを用いたときに、SAは収率よくN-メチル化された。上記溶媒中の生成率に、有意差は認められなかった。SAの抽出溶媒としても用いられ、取り扱いやすい酢酸エチルを反応溶媒として用いることと

TABLE I. Effect of Reaction Solvents on Methylation of Saccharin

Solvent	Ratio of <i>N</i> -methylsaccharin formation ^{a)}
Ethyl acetate	1.00
Chloroform	1.02
Dichloromethane	0.99
Diethyl ether	0.85
Acetone	0.45
Acetonitrile	0.44
Pyridine	0.10
Ethyl alcohol	0.44
Methyl alcohol	0.10

a): Amount of *N*-methylsaccharin formed in each solvent / amount of that in ethyl acetate.

Saccharin (200 μ g) was dissolved in 0.4 ml of each solvent, and mixed with 50 μ l of methanol and 10 μ l of TMSD solution. *N*-methylsaccharin formed was analyzed with FID-GC.

し、更に反応時間、TMSD 溶液、メタノールの添加量等について検討を行った。

以下の実験では、SA 標準液 (1000 μ g/ml, 0.2 ml) に、内部標準液 0.2 ml を加え、10 分間室温に放置した後、GC 分析し、得られたクロマトグラムの *N*-メチル SA と内部標準物質アントラセンのピークの高さの比を求め、*N*-メチル SA の生成率を検討した。

まず、メタノールの添加量を 50 μ l に固定し、TMSD 溶液の添加量の検討を行った。TMSD 溶液の添加量の増加に伴い、*N*-メチル SA の生成率は増加していったが、TMSD 溶液 4.0 μ l 以上ではほとんど変化は見られなかった (Fig. 1)。TMSD 溶液の添加量は、反応液に TMSD の黄色が確認できれば十分であることが確かめられたが、ここでは、試薬を加える操作の再現性も考慮して、10 μ l を添加することとした。

次に、TMSD 溶液の添加量を 10 μ l に固定して、メタノールの添加量の検討を行った。メタノール 50 μ l 以下では、副生成物のピークが観察された。メタノールの添加量を 50 μ l にすると、この副生成物のピークは、ほとんど観察されず、*N*-メチル SA の生成率は、ほぼ最高に達し、100 μ l 以上では、むしろ減少する傾向がみられた (Fig. 2)。したがって、メタノールの添加量は、50 μ l とした。

試料によっては、TMSD 溶液を 10 μ l 加えても共存する物質のために TMSD が消費され、黄色が消失したが、そのような場合は黄色が残るまで TMSD 溶液を追加した。また、前述の副生成物のピークが現れた時は、メタノールの添加量を増してメチル化

Fig. 1. Effect of Amount of TMSD Solution on Methylation of Saccharin

200 μ g of saccharin in 0.4 ml of ethyl acetate was mixed with 50 μ l of methanol and 0.5–20 μ l of TMSD solution (10%, in hexane), left at room temperature for 10 min, then analyzed with gas chromatography.

Fig. 2. Effect of Amount of Methanol on Methylation of Saccharin

200 μ g of saccharin in 0.4 ml of ethyl acetate was mixed with 0–100 μ l of methanol and 10 μ l of TMSD solution (10%, in hexane), left at room temperature for 10 min, then analyzed with gas chromatography.

を行った。

また試薬を加えた直後、10 分後、20 分後、60 分後、120 分後と繰り返し GC 分析したところ *N*-メチル SA の内部標準に対するピーク高さ比は、ほとんど変化なかった。試薬が十分に存在する時、TMSD による SA のメチル化は、きわめて速やかに終結し、生じたメチル化体は安定であることがわかったので、ここでは、試薬を加えてから GC 分析に供するまでの放置時間は 10 分間とした。

以上の検討の結果に基づいて、TMSD により SA の標準液 (1000 μ g/ml) をメチル化したところ、*N*-メチル SA の生成率は $84.0 \pm 1.3\%$ ($n=5$) であった。またジアゾメタン法による *N*-メチル SA の生

Fig. 3. Gas Chromatogram of Methylsaccharin

Peak 1: *N*-methylsaccharin.

Peak 2: Anthracene (Internal standard),

Peak 3: *O*-methylsaccharin.

Standard solution (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of saccharin in ethyl acetate) and soy-sauce extract (added 500 $\mu\text{g}/\text{g}$ of sodium saccharin, extracted with ethyl acetate) were methylated with the TMSD method and analyzed.

GC conditions — a) column: 3% SE-30 on Uniport B (60–80 mesh), 3 mm i.d. $\times$ 2 m; column temperature: 170°C; injection and detector temperature: 240°C; carrier gas: N_2 , 40 ml/min; detector: FID.

b) column: 10% OV-351 on Uniport HPS (80–100 mesh), 3 mm i.d. $\times$ 2 m; column temperature: 220°C; injection and detector temperature: 240°C; carrier gas: N_2 , 40 ml/min; detector: FID.

成率は、 $81.7 \pm 2.5\%$ ($n=5$) であった。

2. GC 分析について

10%OV-351, 3%SE-30 の両方のカラムで、*N*-メチル SA 及び内部標準アントラセンは分離され、対称性のある良好なピークが得られた。Fig. 3 に、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の SA 標準液及びしょうゆに SA-Na 標準液を 500 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるように標準添加し分析して得られたクロマトグラムを示した。SA の分析を妨害するようなピークはなかった。

3. 共存物質の影響

食品から SA とともに抽出される食品添加物や脂肪酸等が、TMSD による SA のメチル化を抑制あるいは促進する可能性がある。また、GC 分析に際してこれらの物質が、そのままの形であるいはメチル化されて、クロマトグラム上に現れ、SA の分析の妨害となることも考えられる。

そこで、保存料のソルビン酸、デヒドロ酢酸、安息香酸、パラオキシ安息香酸エステル類及びプロピオン酸、酸化防止剤の BHT, BHA, 脂肪酸のラウリン酸、クロトン酸、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、有機酸の酒石酸、シュウ酸、クエン酸それぞれ 1 mg を、SA 標準液 (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.2 ml) に加え操作法に従ってメチル化し、GC 分析した。

その結果、脂肪酸の存在下で、*N*-メチル SA の生

成率は、2–5% 増加したが、有機酸や、各種食品添加物の存在下では、影響は見られなかった。一方ジアゾメタン法では、脂肪酸や有機酸が存在する時、*N*-メチル SA の生成率は 2–7% 増加した。

また、GC 分析において、3%SE-30 では、クエン酸、クロトン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸プロピルが、SA の分析を妨害するピークを与えたが、10%OV-351 では妨害とならず、2 種のカラムを併用すれば、ほとんどの食品について、SA の分析は可能であると思われた。

4. 定量分析について

SA の標準原液を酢酸エチルで希釈して、各濃度の標準液を調製し、TMSD 法でメチル化し GC 分析した。内部標準に対する *N*-メチル SA のピークの高さの比を求めたところ、10–2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で直線性のある良好な検量線が得られた。尚、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度の SA を分析する場合は、内部標準として 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアントラセンを用い、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の濃度の SA を分析する場合は、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアントラセンを用いた。また、各濃度のものを 5 回ずつ繰り返してメチル化し、GC 分析したところピーク高さ比の変動係数は、3% 以内であった。

食品中の SA の定量限界は、SA-Na として 20 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。今回は、GC 検出器として、水素炎

イオン化検出器 (FID) を用いたが、イオウ原子に対して選択的に高い感度を持つ炎光光度検出器 (FPD) を用いれば、妨害も除かれ、より低濃度の SA の定量も可能になる。

5. 添加回収実験

SA が検出されなかった市販の漬物、しょうゆにそれぞれ 500 $\mu\text{g/g}$ 、250 $\mu\text{g/g}$ となるように SA-Na 標準液を添加し、操作法に従って抽出し、TMSD 法でメチル化し、GC 分析した。それぞれ 5 回繰り返して分析した結果、Table II に示したように良好な回収率が得られた。

6. 各種市販食品中の SA の分析

TMSD 法を用いて市販の 16 種 72 品の食品中の SA の分析を行ったところ、Table III に示したような結果が得られた。しょうゆ 1 検体から SA-Na として 62 $\mu\text{g/g}$ 、漬物 10 検体から SA-Na として

67—875 $\mu\text{g/g}$ の SA が検出された。定量に際しては、あらかじめ内部標準液を加えずに分析し、アントラセンに一致するピークが無いことを確認した。定性的に複数のカラムで GC 分析し確認を行った。

また、SA が検出された漬物 10 検体について、その試薬溶液をジアゾメタン法でメチル化し GC 分析した結果、TMSD 法とほぼ同等な定量結果が得られた (Table IV)。

ジアゾメタン法の方が、若干高い値が得られた試料があるが、漬物より SA とともに抽出された有機酸等が、ジアゾメタンによる SA の *N*-メチル化を促進したためと考えられる。

ま と め

TMSD を用いて SA をメチル化し、GC 分析する方法を検討した。SA の酢酸エチル溶液に、メタノールと TMSD 溶液を加え、室温、10 分間の反応で SA はメチル化され、そのまま GC 分析することができた。*N*-メチル SA の生成率は 84% で、*O*-メチル SA も少量生じたが、*N*-メチル SA のピークを用いて定量を行った場合、10—2500 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性のある検量線を与えた。食品中の定量限界は、SA-Na として約 20 $\mu\text{g/g}$ であった。SA-Na を漬物へ 500 $\mu\text{g/g}$ 、しょうゆへ 250 $\mu\text{g/g}$ 標準添加した際の回収

TABLE II. Recovery Test of Saccharin in Foods

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)
Scallion pickles (rakkyo)	500	96.9 $\pm$ 1.9 ^{a)}
Soy-sauce	250	93.7 $\pm$ 2.5 ^{a)}

a) mean $\pm$ S.D. ($n = 5$).

TABLE III. Saccharin Contents of Commercial Foods

Sample	Number of samples		Content ($\mu\text{g/g}$)
	Analyzed	Detected	
Vineger	2	0	62
Soy-sauce	5	1	
Worcester sauce	6	0	
Tomato catsup	2	0	
Salad dressing	2	0	
Lactic acid bacteria beverage	1	0	121—373
Yogurt	1	0	
Tsukudani ^{a)}	5	0	
Cooked bean	1	0	
Shoyu-zuke ^{b)}	4	2	
Su-zuke ^{c)}	2	1	263
Kasu-zuke ^{d)}	2	1	145
Takuan-zuke ^{e)}	6	5	77—875
Karashi-zuke ^{f)}	2	1	67
Dried fruit	3	0	0
Ice ^{g)}	9	0	
Confectionery	4	0	
Jam	3	0	
Fish paste product	9	0	

a) boiled kelp in soy sauce, b) soaked Takana-leaf in soy sauce c) scallion pickles, d) soaked cucumber or oriental pickling melon in sake lees, e) soaked Japanese radish in salted rice-bran, f) soaked eggplant in masterd. g) jelly and ice pudding.

TABLE IV. Comparison between Analytical Results Saccharin in Foods with the TMSD Method and the Diazomethane Method

Sample No.	Saccharin contents($\mu\text{g/g}$)	
	TMSD method (X) ^{a)}	Diazomethane method (Y) ^{a)}
1	67	72
2	77	89
3	121	125
4	145	150
5	263	279
6	283	309
7	373	384
8	389	396
9	806	798
10	875	953

a) $Y = 1.04X + 2.09$. Coefficient of correlation : $r = 0.998$.

率は、それぞれ 96.9%, 93.7%と良好であった。また、TMSD 法による市販食品中の SA の分析値は、ジアゾメタン法で分析した値とよく一致していた。

本法による SA のメチル化は操作も簡単で危険性も少なく、日常の SA の GC 分析に有用と思われる。

なお、本論文の一部は、第 25 回全国衛生化学技術協議会 (1988 年 9 月, 札幌) において、発表した。

引用文献

- 1) 中村幸男, 食衛誌, **16**, 368 (1975).
- 2) 中村正明, 渡部久美子, 桐ヶ谷忠司他, 食衛誌, **16**, 264 (1975).
- 3) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 金原出版, 東京, **1980**, pp.330—342.
- 4) 永井勇, 岡日出夫, 田坂美和子, 岡新, 衛生化学, **21**, 261 (1975).
- 5) 星野庸二, 鈴木敏正, 菊池好則, 能勢憲英, 渡辺昭宣, 食衛誌, **16**, 182 (1975).
- 6) R. Gerstl, K. Ranfft, *Z. Anal. Chem.*, **258**, 110 (1972).
- 7) 馬場強三, 力岡有二, 長崎県衛生公害研究所報, **16**, 105 (1976).
- 8) 黒田弘之, 広瀬秀雄, 食衛誌, **12**, 322 (1971).
- 9) L.P. Marc, B. Chris, D. Louis, L.M. Desire, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 80 (1985).
- 10) H. Terada, Y. Sakabe, *J. Chromatogr.*, **346**, 333 (1985).
- 11) 松永明信, 大戸幹也, 山本敦他, 食衛誌, **27**, 408 (1986).
- 12) K.S. Anna-Maija, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1210 (1988).
- 13) N. Hasimoto, T. Aoyama, T. Shioiri, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1475 (1981).