操作により p-MAP などの還元剤を用いて発色させ、吸光度を測定し、各測定値をプロットした検量線を求めると、Fig. 5 の通りとなり、また繰返し3回の実験値を Table 3 に示す。

測定値 (ε) から、濃度 (μg) を推定する回帰方程式を最小自乗法で求めると、

$$\gamma = 536.6\varepsilon - 0.05 \quad \text{または}$$

$$\varepsilon = 0.001864\gamma + 0.00001 \quad \text{となる。}$$

本式の相関係数は 1.0007 であって、濃度による誤差限界¹⁵⁾を 2σ 法によって求めると $\pm 3.13\gamma$ となる。

結 語

(1) 本法におけるリン酸単独存在の際のリンモリブデン酸の生成ならびに抽出時の濃度条件は $25\sim 30^\circ$ で (試液添加 5 分間後)、Ammonium molybdate 0.2 w/v % 以上 (検水 50 ml につき 10 % MA 1 ml) 以上、 H_2SO_4 0.08~0.7 N (同じく 50 ml につき 4N H_2SO_4 1~9 ml) の範囲で完全である。

(2) 還元試薬としては p-MAP, p-AP が最良であるが、p-PD, HQ, ANS などでも応用できる。

(3) p-MAP を用いた場合、精度は良好で、波長 700 $\text{m}\mu$ における比色で、定量誤差 $\pm 3.13\gamma$ (2σ 法) である。

以上、抽出モリブデン青法によるリン酸微量定量の基

礎的な実験結果につき述べたが、共存イオンの影響およびケイ酸の分離比色定量法については、次報に報告する。

文献 1) 岩本, 中谷, 柳瀬: 北海道衛生研究所報 6, 67 (1954); 2) K. Stoil: Z. Anal. Chem., 112, 81 (1938); 3) 加藤, 沖中: 東北大工, 15, 70 (1950); 4) R. V. Mervel: Zavodskaya. Lab. 11, 135 (1945); 木羽, 浦: 日化, 76, 520 (1955); 5) C. Sideris: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 14, 762 (1942); J. H. Martin, D. M. Doty: Anal. Chem. 21, 965 (1945); C. H. Lueck, D. F. Boltz: Ibid. 28, 1168 (1956); 6) N. S. Ging: Anal. Chem. 28, 1330 (1956); 7) 高橋: 生化学 26, 690 (1955); 8) Dienert, Wandenbloke: Compt. rend. 176, 1478 (1923); 9) 加藤, 大泉: 分析と試薬, 3, No. 2, 5 (1949); 10) G. Gomori: J. Lab. Clin. Med. 27, 955 (1942); 11) R. J. L. Allen: Biochem. J. 34, 858 (1940); 12) Iginio Napoli: Ann. Chim. appl. 27, 258 (1937); 13) R. D. Bell, E. A. Doisy: J. Biol. Chem. 44, 55 (1920); 14) C. H. Fiske, Y. Subbarow: Ibid. 66, 375 (1925); 15) 山口, 太幡, 長沢, 吉川: 薬誌 72, 584 (1952).

ペーパークロマトグラフィーによる食品中のサッカリン、ズルチンおよびサイクラミン酸の分離検出法

Separation and Identification of Saccharin, Dulcin and Cyclohexylsulfamic acid in Foodstuffs by Paper Chromatography

Yasushi Mihashi and Fumiko Kobayashi
(Women's Dept., Tokyo College of Pharmacy)

東京薬科大学女子部 三橋 靖・小林 文子

溶性サッカリン、ズルチンおよびサイクラミン酸塩の混合物をペーパークロマトグラフィー (以下 PC と略す) により、分離検出する方法としては、すでに L. C. Mitchell¹⁾ の報告があるが、著者等は Mitchell の方法を改良すると共に、食品中の溶性サッカリン、ズルチンおよびサイクラミン酸塩の分離検出法を研究し、充分に実用に供しうる結果を得たので報告する。

Mitchell は溶性サッカリン、ズルチンおよびサイクラミン酸塩の混合物を、アンモニア水・酢酸エチル・アセトン (1:1:8) の展開剤を用いて Whatman No. 1 の濾紙上に展開し、発色剤として最初に 0.005 M 硝酸銀試液を噴霧し、つぎに 0.0005 M ピロガロール・アルコール試液を噴霧して、淡かっ色の background に生ずる白色斑点のクロマトグラムから、溶性サッカリンお

よびサイクラミン酸塩を検出する。さらにそのクロマトグラムに濃硝酸を噴霧して、容器中に1夜放置して生ずる黄色斑点のクロマトグラムから、ズルチンを検出している。なお、検出限度はズルチンの0.01 M 液 0.001 ml, 溶性サッカリンおよびサイクラミン酸ナトリウム（またはカルシウム）液の0.01 M 液 0.003~0.004 mlであると報告している。

著者等は Whatman No. 1 の代りに、東洋汙紙 No. 51 を用いて Mitchell の報告を追試したが、溶性サッカリンおよびサイクラミン酸ナトリウムの白色斑点による両者の鑑別が明確でない。またズルチンの発色剤として、濃硝酸を噴霧することは操作上好ましくなく、かつその発色の完了のため、1夜放置することは迅速を要する場合には不便である。なお検出限度はズルチンの0.1 M 液 0.001 ml, 溶性サッカリンの0.1 M 液 0.005 ml, サイクラミン酸ナトリウムは0.1 M 液 0.015 ml で、Mitchell の報告より低い結果を示した。

著者等は、まず発色剤の検討を行った。ズルチンについては、濃硝酸の代りに濃硝酸・アセトン（1:3）試液²⁾を用いた。この場合は、濃硝酸を用いる場合のように、操作上の危険はないが、鋭敏度は良くない。また、Jorissen 法を応用して0.1%第二硝酸水銀試液を噴霧したのち加熱し、紫外線を照射して観察すると黄色環の螢光を発する斑点が見られるが、この反応も鋭敏度があまり良くない。ズルチンのp-ジメチルアミノベンツアルデヒド試液³⁾（以下D試液と略する）による反応は非常に鋭敏であって、明瞭な黄色の斑点を生ずる。かつ溶性サッカリンおよびサイクラミン酸ナトリウムは全く呈色しない。従って、人工甘味料の混合物よりズルチンを検出するのに適当な発色剤であることを知った。サッカリンの α -ナフチルアミン試液²⁾（以下N試と略す）による反応（A. Gandini の反応）は赤紫色の斑点を生じ、鋭敏度も良い。ズルチンおよびサイクラミン酸ナトリウムは呈色しない。サイクラミン酸ナトリウムの硝酸銀・ピロガロール試液（以下N試液と略す）による反応は、サッカリンも白色斑点を生ずる。ズルチンは白色斑点を生じない。

展開剤としては、はじめ Mitchell¹⁾ の報告のアンモニア水・酢酸エチル・アセトン（1:1:8）を用い、ズルチンはD試液により、溶性サッカリンはN試液によりまたサイクラミン酸ナトリウムはS試液により発色させた。その結果は第1表のようである。

しかし前記の展開剤では、ズルチンと溶性サッカリンのRf値が近接しているため、両者の混合物の分離の場合には展開剤として不適当なので、展開剤をn-ブタノ

ール・アンモニア水（4:1）に改めて実験したが、分離能が良好であった（第2表）。

つぎに上記の実験を基礎にして、人工甘味料の混合物を調製し、その分離検出をした。混合物を展開した汙紙につき、それぞれ別々に、発色剤を噴霧するときはズルチンはD試液により黄色斑点（Rf 0.78~0.80）を、溶性サッカリンはN試液により赤紫色の斑点（Rf 0.35~0.36）を、またサイクラミン酸ナトリウムはS試液により、白色の斑点（Rf 0.48~0.49）を認めることができた。もし展開後の汙紙1枚に、発色剤を順次に噴霧する場合はS試液、N試液、D試液の順に噴霧するのがよい（第3表）。S試液によりサイクラミン酸ナトリウムおよび溶性サッカリンの二つの白色斑点を生じ、つぎにN試液により二つの白色斑点は消失し、この際溶性サッカリンの赤紫色の斑点は現われないが、紫外線（3022~4075Å）下で溶性サッカリンによる黒色斑点を明瞭に認めることができる。つぎにD試液を噴霧すると、ズルチンによる黄色の斑点を生ずる。

上記のような方法を用いて、二三の食品についてPCによる人工甘味料の分離検出を試みた。検体の前処理は個々の検体について多少は異なるが、大体つぎのように行った。検体（液体ならば100 ml, 固体ならばその30~40 gに水100 mlを加えてよくかきまぜ、遠心分離して上液を取る）を分液漏斗に取り、濃硫酸1 ml および酢酸エチル100 mlを加えてよくふりまぜ、酢酸エチル層を分取し、酢酸エチルは蒸留し去り、その残留物をアンモニアアルカリ性50%アルコール1 mlに溶かし、この液を用いてPCにより人工甘味料の分離検出をした。

実験に供したサイダー、ジュースはあらかじめ人工甘味料を含まないことを確かめたのち、検体に対してズルチン0.01%, 溶性サッカリン0.01%, サイクラミン酸ナトリウム0.1%の割合に混ぜて添加した。またリンゴジャム（自製品）、あん（自製品）にはズルチン0.033%, 溶性サッカリン0.033%, サイクラミン酸ナトリウム0.33%の割合に混合して添加した。これらの食品について前処理したのち、PCにより分離検出をしたが（第4表）、各食品中のいずれの人工甘味料も、明かに検出することができた。

本研究に御援助を得た、本学村山学長および寺阪部長に厚く謝意を表する。

実験の部

I. ズルチン、溶性サッカリンおよびサイクラミン酸ナトリウムのPCによる検出

展開剤としてアンモニア水・酢酸エチル・アセトン

(1:1:8)を用いた。ズルチンの発色剤は、p-ジメチルアミノベンツアルデヒド試液（以下D試液と略す）を用いた。本試液はp-ジメチルアミノベンツアルデヒド（レモン黄色の結晶，mp 74°）1 gを1 N 塩酸 100 mlに溶かして製する。本試液を沱紙に噴霧して，室温で乾かすとズルチンの存在で黄色の斑点を生ずる。

溶性サッカリンの発色剤はα-ナフチルアミン試液²⁾（以下N試液と略す）を用いた。本試液はα-ナフチルアミンの0.1%アルコール液100 mlに，飽和酢酸銅液4～5滴および氷酢酸2～3滴を加えて調製する。調製時は淡青色で，直ちに用いる。放置すると変色し，変色したものは発色の鋭敏度が悪い。本試液を沱紙に噴霧し室温で乾かすと，サッカリンの存在で赤紫色の斑点を生ずる。紫外線（3022～4075 Å）下では，黒かった色の斑点に見える。

サイクラミン酸ナトリウムの発色剤には，硝酸銀試液およびピロガロール試液を用いた。初めに沱紙に硝酸銀試液を噴霧し，乾いてからピロガロール試液を噴霧すると，溶性サッカリンおよびサイクラミン酸塩の存在で

淡かった色の background に白色の斑点を生ずる。硝酸銀試液は硝酸銀 170 mg を水 1 ml に溶かし，アンモニア水 5 ml を加えたのち，アルコールで 200 ml に希釈する。ピロガロール試液はピロガロール 13 mg をアルコール 200 ml に溶かす。ピロガロール試液は用時調製する方がよい。調製後 1～2 週間経過したものは鋭敏度が低い。

人工甘味料の検液はつぎのように調製した。ズルチン（市販品を再結晶して mp 173～174° のもの）はアルコール・酢酸エチル同容量混液を用い，溶性サッカリン（六局方品）およびサイクラミン酸ナトリウム（日本化成製品）はいずれも 50% アルコールを用いてそれぞれ 1 ml 中に 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 および 256 mg を含む溶液を調製した。

各検液はPC用ピペットを用い 0.002 ml を沱紙に点じた。実験の結果は第1表のようである。

つぎに展開剤をn-ブタノール・アンモニア水（比重約 0.9）（4:1）に代えて，前記と同様の実験を行った結果は，第2表のとおりである。

第 1 表

人 工 甘 味 料	人 工 甘 味 料 濃 度 mg/ml										Rf*
	0.05	0.1	0.2		16	32	64	128	256		
ズ ル チ ン	—	+	+							0.95~0.97	
溶性サッカリン					—	+	+			0.83~0.93	
サイクラミン酸ナトリウム							—	+	+	0.31~0.42	

* PC 用東洋沱紙 No. 51, 展開温度 18～19°, 展開時間 3.5～4 時間

第 2 表

人 工 甘 味 料	人 工 甘 味 料 濃 度 mg/ml										Rf**
	0.05	0.1	0.2		2	4	8	16	32	64	
ズルチン	—	+	+								0.78～0.80
溶性サッカリン					⊖	* ⊕	⊕	⊕	+	+	0.35～0.36
サイクラミン酸ナトリウム							—	+	+		0.48～0.49

* 紫外線（3022～4075 Å）下では 4 mg/ml まで検出できる。

** PC 用東洋沱紙 No. 51, 展開温度 14～21°, 展開時間 16 時間

この結果から検出限度は，ズルチンは 0.2 μg，溶性サッカリンは 8 μg，サイクラミン酸ナトリウムは 32 μg である。

II. ズルチン，溶性サッカリン，サイクラミン酸ナトリウム混合物のPCによる分離と検出

ズルチン 80 mg，溶性サッカリン 640 mg およびサイクラミン酸ナトリウム 640 mg を，50% アルコールに

溶かし，全量を 10 ml とし，検液とする。

PC 用東洋沱紙 No. 51 に，PC 用ピペットで検液を 0.002 ml 点じ，展開剤は n-ブタノール・アンモニア水（4:1）で 16 時間展開する。展開温度は 15～20° である。展開後室温で乾燥した 3 枚の沱紙に別々に D 試液，N 試液および S 試液を噴霧した場合，並びに 1 枚の沱紙に各試液を，順次（D→N→S のように示す）噴霧した

合の結果は、第3表のようである。

第 3 表

発色剤	ズルチン		溶性 サッカリン		サイクラミン 酸ナトリウム	
	発色	Rf	発色	Rf	発色	Rf
D	+	0.79	—	—	—	—
N	—	—	+	0.36	—	—
S	—	—	+	0.36	+	0.49
D→N→S	+	0.76	—	—	—	—
D→S→N	+	0.76	—	—	—	—
N→S→D	+	0.78	—	—	—	—
S→N→D	+	0.78	+	0.36	+	0.50

発色剤をS→N→Dの順に噴霧するときは、まずS試薬により淡褐色の background に、溶性サッカリンおよびサイクラミン酸ナトリウムの二つの白色斑点を生じ、濾紙を室温で乾燥し、N試液を噴霧すると二つの白色斑点は消失するが、紫外線 (3022~4075Å) 下で、溶性サッカリンによる黒色の斑点が明瞭に認められる (サイクラミン酸ナトリウムによる黒色斑も、わずかに認められるが非常に弱いので区別できる)。つぎに濾紙を室温で乾かしたのち、最後にD試液を噴霧すると、ズルチンによる黄色斑点を生ずる。

Ⅲ. 食品中のズルチン、溶性サッカリンおよびサイクラミン酸ナトリウムの混合物のPCによる分離と検出

検体 1. レモンサイダーにズルチン、溶性サッカリンを、それぞれ 0.01 %, サイクラミン酸ナトリウムを 0.1 % の割合に加えたものを用いた。試料 100 ml を取り、沸騰水浴上でときどきかきまぜながら、10 分間加温し炭酸を除去する。冷後これを分液ろうとに取り、硫酸 1 ml を加て、酢酸エチル 50 ml を用いて 2 回抽出する。

抽出液は合して、酢酸エチルを留去し、残留物をアンモニアアルカリ性 50 % アルコール 1 ml に溶かし、PC の検液とする。PC 用東洋濾紙 No. 51 使用、点滴量 0.002 ml、展開剤は n-ブタノール・アンモニア (4:1)、展開温度 14~18°, 展開時間 16 時間、発色剤は D 試液、

N 試液、S 試液を使用した。

検体 2. 市販ジュースに、検体 1 と同様に人工甘味料を加えた。試料 100 ml を取り、脱色炭 0.5 g を加えてよくふりまぜたのち、30 分間放置し、濾過する。濾液はほとんど無色透明となる。濾液を硫酸酸性とし、酢酸エチルで抽出する。以下の操作は検体 1 の場合と同じである。

検体 3. リンゴジャム (自製品、ゼリー化させるために必要な最少限度のショ糖を加えた) に、ズルチンおよび溶性サッカリンをそれぞれ 0.033 %, サイクラミン酸ナトリウムを 0.33 % の割合に加えたものを用いた。試料 30 g を取り、水 100 ml を加えてよくかきまぜ、室温で 30 分間浸出する。つぎに遠心分離して上液を分け取る。上液はやや濁っているので濾過する。濾液を分液漏斗に取り、硫酸酸性で酢酸エチルで抽出する。以下の操作は、検体 1 の場合と同じように行う。

検体 4. あん (自製品 ショ糖を加えてない) に検体 3 と同様の割合に人工甘味料を添加した。試料 30 mg を取る。以下の操作は検体 3 と同じである。

検体 1, 2, 3 および 4 から得た検液の PC の結果は第 4 表のようである。

第 4 表

検 体	Rf		
	ズルチン	溶性サッ カリ	サイクラミン 酸ナトリウム
1. レモンサイダー	0.79	0.38	0.47
2. ジュース	0.79	0.39	0.44
3. リンゴジャム	0.80	0.41	0.51
4. あ ん	0.79	0.39	0.50

発色剤による発色は、いずれの検体についても明瞭に現われた。なおそれぞれの検体の対照試験をした。

文献 1) L. C. Mitchell: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists **38**, 943 (1955); 2) Angelo Castiglioni: Z. Anal. Chem. **145**, 188 (1955); 3) J. Deshus-ses, P. Desbaumes: Mitt. Lebensmitt. Hyg. **47**, 264 (1956).