食品添加物の分析に関する研究 (第20報)*¹

食品中のサイクラミン酸ナトリウムの比色定量法

(昭和 45 年 10 月 31 日受理)

川 名 清 子*² 和 田 裕*²
高 橋 武 夫*² 菅 野 三 郎*³

Studies on Analysis of Food Additives (XX) Colorimetric Determination of Sodium Cyclamate in Foods

Kiyoko KAWANA*¹, Yutaka WADA*¹, Takeo TAKAHASHI*¹
and Saburo KANNO*²

(*¹Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory: 52-2, Nakao-cho,
Asahi-ku, Yokohama; *¹Kanagawa Prefectural Public Nuisance
Center: 3-185, Nakamura-cho, Minami-ku, Yokohama)

Sodium cyclamate, which had been forbidden to use as food additive to any kinds of foods, was separated from other food components by ultrafiltration and determined by colorimetric method.

It has been reported that sodium cyclamate reacts with nitrite and turns into cyclohexyl nitrite.

In this report, the experimental condition for the colorimetric determination of the cyclohexyl nitrite was examined. Sulfanilamide and N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride were used as the reagents. The colored solution was determined at about 555 m μ . of wave length Ultrafiltration method was found to be very effective for preparing the test solution, and the prepared test solution could be used for esterification directly without dilution, the solution not being emulsified with organic solvent on extraction procedure.

In the recovery test of cyclamate on food, the recovery ratio was about 90%.

The minimum limit concentrations of detectable sodium cyclamate were 50 ppm in juice and was 500 ppm in the other foods.

(Received October 31, 1970)

I. ま え が き

サイクラミン酸ナトリウムの定量法としては種々の報告があるが、従来呈色反応としては過酸化水素、塩酸存在下に生ずるシクロヘキサノール亜硝酸エステルを赤外吸収スペクトル¹⁾ およびガスクロマトグラフィーで定量する方法^{2)~4)}が報告されている。

また、サイクラミン酸ナトリウムと亜硝酸を冷時作用させることにより生ずるシクロヘキサノール亜硝酸エステルを赤外吸収スペクトル¹⁾ およびガスクロマトグラフィーで定量する方法^{2)~4)}が報告されている。

今回、著者らは食品中のサイクラミン酸ナトリウムについて抽出操作として限外ろ過法を、定量法としてはシ

クロヘキサノール亜硝酸エステルによる比色法を用いて所期の結果を得たので報告する。

II. 食品中のサイクラミン酸ナトリウムの比色定量法

〔試薬〕 サイクラミン酸ナトリウム 標準溶液: サイクラミン酸ナトリウム 100 mg を正確にはかりとり、水に溶かし100 ml とする。その10 ml をとり、水を加えて100 ml とし、これを標準溶液とする。

標準溶液 1 ml = 100 μ g C₆H₁₂O₃NSNa

5% デンプン分解酵素溶液: ジアスターゼ 5 g をとり、水を加えて100 ml とする。

1% スルファミン溶液: スルファミン (日局) 1 g を10% 塩酸に溶かして100 ml とする。

10% 尿素溶液: 尿素 (試薬特級) 10 g を水に溶かして100 ml とする (用時調製)。

*¹ 第19報: 食衛誌. 11 (1), 23 (1970)

*² 神奈川県衛生研究所: 横浜市旭区中尾町 52-2

*³ 神奈川県公害センター: 横浜市南区中村町 3-185

タンパク分解酵素: 科研化学製 プロナーゼを使用した。

透析膜: 市販透析膜をあらかじめ水でうるおしておく。

脱亜硝酸所要時間の測定: 水 10 ml を 50 ml 共せん比色管にとり, 1 % 亜硝酸ナトリウム溶液, 10 % 硫酸のおの 1 ml を加え, よく振りまぜたのち, クロロホルム (試薬特級) 15 ml を加え 5 分間振とう機で振とうし, 上層をすて, ついで水 15 ml を加え 5 分間振とうし洗液はすてる。つぎにクロロホルム層にあらたに調製した 10 % 尿素溶液 10 ml, 10 % 塩酸 2 ml を加え, クロロホルム層が 1 % スルファミン溶液 1 ml および 0.1 % 塩酸ナフチルエチレンジアミン溶液 1 ml で紅色を呈しなくなるまでひきつづき振とうし, ここに要した時間 T を求める。

〔装置〕

限外ろ過装置: 容量 50 ml および 20 ml のポリエチレン製造沈管二種を用意し, 20 ml 容量のものについて管全体に内径 1 mm の穴をくまなくあけ, これを内管とする。内管はあらかじめ穴をあけた外管のふたに挿入して外管に固定するようにしておく。

振とう機: 水平式振とう機または水平振とう併用の万能振とう機

〔試験溶液の調製〕

A. ジュースなどの場合: 試料 (パルプのような固形物のある場合はあらかじめ遠心分離し上澄液を用いる) 10 g をとり水を加えて 50 ml とし試験溶液とする。

B. しょう油の場合: 試料 10 g をとり, 水を加えて 50 ml とし, その 5 ml を透析膜にとり, 十分空気をぬいたのち, 膜の上方をしばらく, 限外ろ過装置の内管にこれを二つ折りにして装着し, ついで外管に固定したのち卓上型高速遠心器を用いて 4000 回転, 3 時間限外ろ過する。ここに得られたろ液を試験溶液とする。

C. ジャムなどの場合: 試料 10 g をとり, 水 20 ml を加えて沸とう水浴上で 30 分間加熱し, 冷後水を加えて 50 ml とする。これを遠心分離後上澄液をろ過し, ろ液 5 ml をとり, B. しょう油の場合と同様に操作する。

D. カマボコ, ソーセージなどの場合: 細切した試料 10 g をとり, 水 20 ml を加え, ホモジナイザーで粉碎後 0.1 g のタンパク分解酵素を加えてよくかく拌し, ふ卵器を用いて 37°, 16 時間放置する。放置後沸とう水浴上で 30 分間加熱し, 冷後水を加えて 50 ml とする。これを遠心分離後, 以下 C. ジャムなどの場合と同様に操作する。

E. ビスケットなどの場合: あらかじめ乳鉢で粉碎した試料 10 g をとり, 水 20 ml, 5 % デンプン分解酵素溶液 5 ml を加え, ふ卵器を用いて 37°, 16 時間放置する。放置後, 沸とう水浴上で 30 分間加熱し, 以下, D. カマボコ, ソーセージなどの場合と同様に操作する。

F. 脂肪性食品の場合: 試料 10 g をとり, 水 20 ml

を加え, エーテル 50 ml で 3 回, ひきつづき脂肪を抽出分離し, ついでエーテルを加温により除去した水層に水を加えて 50 ml とし, その 5 ml をとり, 以下 E. ビスケットなどの場合と同様に操作する。

〔試験操作〕

試験溶液 1~2 ml (限外ろ過しない場合は 5~10 ml) およびサイクラミン酸ナトリウム標準溶液 10 ml を 50 ml 共せん比色管にとり, 水を加えて 10 ml とする。ついで 0~3° の水浴中で 1 % 亜硝酸ナトリウム溶液および 10 % 硫酸 1 ml を加え, ときどき振りまぜながら 1 時間放置する。つぎにクロロホルム 15 ml を加え, せんをして振とうし, 静置後上層をすて, 水 15 ml を加えて振とう, 水洗し, 水層をすてる。つぎにあらたに調製した 10 % 尿素 10 ml および 10 % 塩酸 2 ml を加え, T 時間ひきつづき振とうする。振とう後上層をすて, 水 15 ml を加えて振とう水洗し, 静置する。つぎにクロロホルム層 5 ml を正確に 25 ml のメスフラスコにとり, メタノール (試薬特級) 15 ml を加えたのち, 1 % スルファミン溶液 1 ml を加え 15 分間氷冷放置する。つぎに 0.1 % 塩酸ナフチルエチレンジアミン溶液 1 ml を加えてついでメタノールで 25 ml とし, 室温 30 分放置後 555 mμ 付近における吸光度 A および標準溶液から得られる吸光度 As を求める。

べつに水 10 ml をとり, 同様に操作したものおよび試験溶液 1~2 ml をとり, 水を加えて 10 ml とし, 1 % 亜硝酸ナトリウム溶液を加えないで同様に操作したものから得られる吸光度を As' および A' とする。

対照液はクロロホルム 5 ml, 1 % スルファミン溶液 1 ml, 0.1 % 塩酸ナフチルエチレンジアミン溶液 1 ml にメタノールを加えて 25 ml としたものを用いる。

試料中のサイクラミン酸ナトリウム C (ppm) は次式により算出される。

$$C(\text{ppm}) = \frac{A - A'}{As - As'} \times \frac{\text{試験溶液全量 } V(\text{ml})}{\text{試験溶液採取量 } v(\text{ml})} \times \frac{1000}{\text{試料採取量 } W(\text{g})}$$

備考: ただし, A', As' および A は下記の条件を満足しなければならない。もし, この条件を満足しないときは試薬の精製, 振とう時間の延長などを考慮して操作をやりなおす必要がある。

条件: A', As' < 0.01 A > 0.03

III. 実験結果および考察

1. 試験溶液調製方法の検討

1) 限外ろ過法の導入

食品中からのサイクラミン酸ナトリウムの抽出法としては, 酸性下に食塩または硫酸マグネシウムを飽和し, 酢酸エチルを用いて抽出する方法および試料を透析したのち, 溶媒抽出する方法が広く行なわれているが, 本試験法においては, 食品中からのサイクラミン酸ナトリウムの抽出法として限外ろ過法を導入した。この方法によ

Fig. 1. Apparatus of ultrafiltration

Table 1. Recovery of Sodium Cyclamate by Ultrafiltration Method

Sodium Cyclamate		Recovery (%)
added (μ g)	found (μ g)	
1,000	986.0	98.6
1,000	1,020.0	102.0
1,000	986.0	98.6
1,000	1,000.0	100.0
1,000	975.0	97.5

Table 2. Recovery of Sodium Cyclamate Added to Various Foods

Food	Sodium Cyclamate		Recovery (%)
	added(mg)	found (mg)	
Bean jam	25	24.1	96.3
Orange juice	25	22.9	91.4
Orange juice	25	25.0	100.0
Mayonnaise	25	23.6	94.2
Kamaboko	25	23.1	92.3
Canned mackerel	25	25.2	100.6
Miso	25	22.7	90.9
Tomato juice	25	23.6	94.2
Cracker	25	23.6	94.4
Fish sausage	25	24.7	98.9
Peach juice	25	25.9	103.7
Strawberrey jam	25	24.1	96.3
Sauce	25	23.9	95.5
Vineger	25	25.0	100.0
Canned meat	25	24.1	96.4
Peanut butter	25	24.3	97.1
Wine	25	24.0	96.0
Fermented milk	25	24.3	97.0
Shōyu	25	24.5	97.8

るときは①溶媒抽出による誤差を無視することができ、②試験溶液の希釈がなく高濃度の試験溶液を得ることができる、という利点を期待したためである。

すなわち、Fig. 1 のごとき限外ろ過装置を用い、サイクラミン酸ナトリウム標準溶液について前記Ⅱ〔試験操作〕の項に準じて得られたサイクラミン酸ナトリウムの回収率を Table 1 に示す。

つぎに、各種食品中へサイクラミン酸ナトリウム標準溶液の一定量を添加し、回収率を検討した結果を Table 2 に示す。

2) 脱脂操作について

脂肪の多い食品について限外ろ過法を適用するとき、あらかじめエーテルを用い脂肪除去操作を加えたところ、良好な回収結果を得た。

すなわち、サイクラミン酸標準溶液 25 ml を試料 10 g に添加し、エーテル 50 ml で 3 回ひきつづき脂肪を抽出分離し、水層のエーテルを除去したのち、水を加えて一定量とし、前記Ⅱ試験操作の項に準じて操作した結果を Table 2 にあわせて示す。

3) タンパク分解酵素およびデンプン分解酵素の使用について

タンパク性食品およびデンプン質を多量に含む食品について限外ろ過法によりサイクラミン酸ナトリウムの回収率を検討したが満足な結果が得られなかった。そこで、タンパク分解酵素あるいはデンプン分解酵素を用いて分解の後、Ⅱ〔試験操作〕の項に準じて操作したところ良好な回収結果を得た。

すなわち、試料 10 g をとり、サイクラミン酸ナトリウム標準溶液 25 ml およびタンパク分解酵素 0.1 g (デンプン質の食品を対象とする場合には 5 % デンプン分解酵素溶液 5 ml) をよくかき混ぜ、37°, 16 時間放置したのち、沸とう水浴上で 30 分加熱し、冷後、水を加えて一定量としたのち、Ⅱ. 試験操作の項に準じて操作し得られた回収率は Table 2 に示すとおりである。

なお、この場合のタンパク分解酵素およびデンプン分解酵素に由来する空試験値 (吸光度) はまったく認められなかった。

2. 試験操作の検討

1) 脱亜硝酸剤の検討

サイクラミン酸ナトリウムからシクロヘキサノール亜硝酸エステル生成時に添加される過量の亜硝酸を除去する目的で脱亜硝酸作用のあると思われる試薬について検討した結果を Table 3 に示す。

なお、用いた振とう機の条件は水平式、振幅 8 cm、振とう回数 150/分 で行ない、振とう時間と脱亜硝酸効果との関係について併せて Table 3 に示す。

Table 3 の結果から酸性でスルファミン酸アンモニウム、アジ化ナトリウムおよび尿素が脱亜硝酸の目的を果すものと思われる。

Table 3. Effect of Various Reagents on the Denitrition

Reagents	Absorbance	Absorbance		
	Time	5 min	10 min	15 min
10% Ammonium sulfamate + 10% Hydrochloric acid		0.09	0.038	0.031
5% Ammonium sulfamate + 10% Hydrochloric acid		0.65		0.020
10% Sodium carbonate		>2	>2	>2
5% Sodium carbonate		>2	>2	>2
5% Sodium bicarbonate		>2	>2	>2
1% Sodium bicarbonate		>2	>2	>2
10% Sodium azide + 10% Hydrochloric acid		0.19	0.17	0.08
5% Sodium azide + 10% Hydrochloric acid		0.14	0.11	0.04
10% Urea + 10% Hydrochloric acid		0.18	0.04	0.01
5% Urea + 10% Hydrochloric acid		0.34	0.07	0.03

Fig. 2. Influence of denitritation reagents on calibration curve

つぎに、酸性でスルファミン酸アンモニウム、アジ化ナトリウムおよび尿素のそれぞれを脱亜硝酸剤とした場合のサイクラミン酸ナトリウム標準溶液 0~10 ml をとり、検量線を作成した結果を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 の結果からスルファミン酸アンモニウムを脱亜硝酸剤とした場合は検量線の直線性がなく、またアジ化ナトリウムを用いた場合はサイクラミン酸ナトリウムの有無にかかわらず呈色せず、スルファミン酸アンモニウム同様脱亜硝酸剤としては不適当と思われる。そこで、本試験法においては脱亜硝酸剤として10%尿素10 ml を酸性で作用させることとした。また、クロロホルム抽出かわりに *n*-ヘキサン抽出を行なったのち、スルファミンおよび塩酸ナフチルエチレンジアミン混液を用いてI色を呈しなくなるまで洗浄する方法⁵⁾についても検討したが、空試験値が高く検量線は得られなかった。

2) 脱亜硝酸時の尿素振とう時間について

前記振とう機を用いた場合〔脱亜硝酸所要時間の測定〕に準じて操作した場合の尿素振とう時間と吸光度の変化は Table 3 に示すとおり、脱亜硝酸時の尿素振とう時間と振とう機の機種、条件などにより異なるものと思われるので本試験法においてはそれらの条件を考慮し、あらかじめ脱亜硝酸のための振とう時間Tを求めることとした。

また、脱亜硝酸時の振とう条件として、振とう機を用いず、サイクラミン酸ナトリウム標準溶液についてII〔操作〕の項に準じて分液ロート抽出を行なったところ、検量線は得られなかった。

3) 亜硝酸濃度と振とう時間の検討

0.1%、0.5%亜硝酸ナトリウム溶液および1.0%亜硝酸ナトリウム溶液各1 ml について脱亜硝酸所要時間の項に準じて操作し、振とう時間と脱亜硝酸所要時間を検討したところ、Fig. 3 に示す結果を得た。

Fig. 3 の結果より、0.5%亜硝酸ナトリウム溶液および1%亜硝酸ナトリウム溶液はほぼ同じ振とう時間で脱

Fig. 3. Influence of concentration of sodium nitrite on the denitritation

Fig. 4. Difference between 1% NaNO_2 and 0.5% NaNO_2 on the calibration curve

Fig. 5. Calibration curve of sodium cyclamate obtained by colorimetric method

Fig. 6. Absorption spectrum of sodium cyclamate

亜硝酸されうる。

つぎにサイクラミン酸ナトリウム標準溶液 0, 2, 4, 6, 8, 10 ml をとり, 0.5% 亜硝酸ナトリウム溶液 1 ml および 1.0% 亜硝酸ナトリウム溶液 1 ml を用いた場合についてⅡ〔試験操作〕の項に準じて操作した場合の検量線を Fig. 4 に示す。

Fig. 4 の結果より, 0.5% 亜硝酸ナトリウム溶液を用いた場合はバラツキが大きく検量線の直線性を示さない。そこで, 本法では 1% 亜硝酸ナトリウム溶液 1 ml を用いることとした。

4) 検量線

サイクラミン酸ナトリウム標準溶液 0, 2, 4, 6, 8 および 10 ml をとり, Ⅱ〔試験操作〕に準じて操作して得られる検量線を Fig. 5 に, 吸収曲線を Fig. 6 に示す。

検量線は直線性を示し, 最大吸収波長は 555 $m\mu$ 付近にあった。

5) 呈色の安定性

呈色の安定性を実験室内暗所および室内散乱光下で調べた結果を Fig. 7 に示す。

発色後 100 分まで観察したが, その間の吸光度はいずれも安定であった。

3. 妨害物質の検討

1) 各種食品の盲検値

サイクラミン酸ナトリウム無添加の食品についてⅡ〔試験溶液の調製〕および〔試験操作〕の項に準じて操作した結果は Table 4 に示したとおり市販品 16 種の食品については盲検値は低く日常試験に支障のないことがわかった。

しかし, Table 4 中に示すある種のしょう油については類似反応のあることが判明した。

2) しょう油の類似反応について

盲検値の高いしょう油製造所の製造過程における添加物, 製品の類似反応を検討した結果を Table 5 に示す。

Table 5 のとおり, 原料の甘草から類似反応が認められた。また発酵 7 日後に同様の呈色が認められるものが

Fig. 7. Stability of the color developed

Table 4. Blank Value of Various Foods by the Presented Method

Food	Absorbance	Food	Absorbance
Bean jam	0	Peach juice	0
Orange juice	0	Strawberry jam	0
Orange juice	0	Sauce	0
Mayonnaise	0.005	Vineger	0
Kamaboko	0	Canned meat	0
Canned mackerel	0	Peanut butter	0
Miso	0.01	Wine	0
Tomato juice	0	Fermented milk	0
Cracker	0	Shōyu	0
Fish sausage	0.02	Shōyu	0.06

Table 5. Influence of Some Materials in Shōyu on the Determination of Sodium Cyclamate

Sample	Absorbance
Ext. Glycyrrhizin	0.09, 0.08
Saccharose	0
Monosodium l-glutamate	0
Sodium 5-ribonucleotide	0
Sodium citrate	0
Glucose	0
Lactose	0
Sodium tartarate	0

Fig. 8. Calibration curve of cyclohexyl-nitrite obtained by colorimetric method

あった。これらについては目下検討中である。

4. サイクラミン酸ナトリウムからのシクロヘキサノール亜硝酸エステルの生成率

シクロヘキサノールから亜硝酸エステルを合成し、これを標準物質として生成率を検討した。

1) シクロヘキサノール亜硝酸エステル検量線

シクロヘキサノール亜硝酸エステル 10 ppm 溶液 0, 1, 2, 3, 4 および 5 ml をとり、クロロホルムを加えて 5 ml とし、以下 II [操作] の項に準じて得られた検量線は Fig. 8 に示すように原点を通り直線性を示した。

2) スルファミンに対するシクロヘキサノール亜硝酸エステルと亜硝酸ナトリウムとの反応率について

シクロヘキサノール亜硝酸エステルと亜硝酸ナトリウムは理論上当モルの呈色を示すはずである。そこで、亜硝酸ナトリウム 2 ppm 溶液 5 ml およびシクロヘキサノール亜硝酸エステル 10 ppm 溶液 5 ml をとり、II [試験操作] の項に準じて発色したのち吸光度を求め、亜硝酸ナトリウムに対する比を求めた結果を Table 6 に示す。

Table 6 の結果から $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2 : \text{NaNO}_2 = 0.9:1$

と推定される。

3) サイクラミン酸ナトリウムからシクロヘキサノール亜硝酸エステル生成率

サイクラミン酸ナトリウム 500 ppm 溶液 2 ml をとり、II [試験操作] の項に準じて操作し、べつにシクロヘキサノール亜硝酸エステル 10 ppm 溶液を調製し、同様に操作したのち得られる吸光度からサイクラミン酸ナ

Table 6. Reaction Ratio of Cyclohexyl Nitrite and Sodium Nitrite for Sulfanilamide

NaNO ₂ (%)	Cyclohexyl Nitrite (%)
100	90.6, 90.7, 90.7

Table 7. Yield of Cyclohexyl Nitrite Obtained from Sodium Cyclamate and Sodium Nitrite

Sodium cyclamate (μg)	Cyclohexyl nitrite theoretical (μg)	Cyclohexyl nitrite found (μg)	Recovery (%)
500	320.5	72.3	22.6
500	320.5	72.3	22.6
500	320.5	72.6	22.7
500	320.5	76.9	24.0
500	320.5	76.9	24.0
500	320.5	70.1	21.9
500	320.5	81.5	25.4

Table 8. Concentration of Sodium Cyclamate in Commercial Foods

Samples	Sodium cyclamate found (ppm)
Shōyu	602
Cracker	1,111
Narazuke	990
Peach juice	792
Lemon juice	2,742
Fruits syrup	3,835
Orange juice	1,625
Sauce	1,402
Sauce	1,290
Ginger pickles	2,061
Akamamushi drink	4,080

トリウムのシクロヘキサノール亜硝酸エステルへの生成率を Table 7 に示す。

Table 7 の結果から本法によるときはサイクラミン酸ナトリウムからシクロヘキサノール亜硝酸エステル生成率は理論値の20~25%であると推定される。

5. 市販食品中のサイクラミン酸ナトリウムの定量値について

II〔試験溶液の調製〕および〔操作〕の項に準じて市販食品について調査した結果を Table 8 に示す。

なおガスクロマトグラフィーによる定量法との比較については次回に報告する予定である。

IV. む す び

食品中のサイクラミン酸ナトリウムを限外ろ過法を用いて抽出し、比色法により定量する方法を確立し、その基礎的条件を検討し、つぎの諸点を明らかにした。

① 限外ろ過法による食品中からのサイクラミン酸ナトリウムの回収率は90%以上であった。

② 本法による各種食品の盲検値は0.03以下である。

また、定量限界はジュースなどの場合 50 ppm それ以外の食品にあつては 500 ppm である。

文 献

- 1) 上条昌弥, 河村太郎, 井上哲男: 食衛誌. 7, 343 (1966).
- 2) 井上哲男, 加藤三郎, 大河原 晃: 食衛誌. 8, 345 (1967).
- 3) 加藤三郎, 金子次雄, 谷村顕雄: 食衛誌. 11, 98 (1970).
- 4) 吉岡賢明, 福山忠男, 佐藤 円, 福田栄一郎: 食衛誌. 10, 43 (1969).
- 5) 多田 治: “有害物管理のための測定法” (1968) 労働科学研究所。