ガスクロマトグラフィーによる食品中のサッカリン ナトリウムの定量法について

(昭和 46 年 3 月 2 日受理)

黒 田 弘 之* 広 瀬 秀 雄*

Determination of Saccharin Sodium in Food by Gas Chromatography

Hiroyuki KURODA and Hideo HIROSE

(Kagawa Prefectural Public Health Laboratory: 4-15, Ban-cho 5-chome, Takamatsu,
Kagawa Prefecture)

Several kinds of determination methods of saccharin sodium in foods have been published, but most of them do not base on the specific reaction for saccharin, for example the method of the neutral titration.

In this report, gas chromatographic method for the new determination of saccharin sodium was studied.

The principle of this method bases on the fact that saccharin sodium is converted to thiophenol derivative by the reaction with 1 ml of hydrochloric acid and 2 g of zinc at 90°C, and it was extracted with 3 ml of methyl isobutyl ketone (containing 0.01 w/v % pyrene as internal standard) and then injected to Shimadzu (GC-1 C type) gas chromatograph. Chromosorb G containing silicone DC-11 (2%) is suitable as the column for thiophenol derivative or pyrene. The relation between peak heights of thiophenol derivative and amount of saccharin sodium was linear in the range of 1~100 mg.

This method was applied to fruit juice and canned fruit, into which 500 ppm of saccharin was added.

The gas chromatography was not interfered by the components contained in food and the recovery rates were over 97%. The minimum limit of detection was approximately 1 µg as saccharin.

(Received March 2, 1971)

I. ま え が き

ズルチン、サイクラミン酸ナトリウムといった人工甘味料が禁止された現在、サッカリンナトリウム(以下 SS と略す)の重要性が増大してきた。しかし食品中の SS の定量法としては、滴定法^{1)~3)}、硫酸根として定量する方法⁴⁾²⁾、分解後アンモニアを定量する方法¹⁾、メチル化して検出する方法⁴⁾が知られているが、これらの方法は SS の特異反応でなく、検出感度も低いので食品中の SS を正確に定量することは非常にむずかしい。

今回、われわれはサッカリンの検出に、金属ナトリウムを用いて脱離してくるイオンを検出する Mahler 法²⁾にヒントを得て、サッカリンを亜鉛と塩酸で還元することにより定量的にチオフェノールの誘導体が生成するこ

とを見出し、食品中の SS をガスクロマトグラフィーにより迅速に定量する方法として十分利用できることを確認したので報告する。

II. 実験方法

1. 装置およびカラム

ガスクロマトグラフ; 島津 GC-1C 型

カラム; 2%DC-11/Chromosorb G (60~80 mesh)

2%SE-52/Chromosorb W (60~80 ")

2%OV-17/Chromosorb W (60~80 ")

2. 標準液および試薬

精製サッカリン: SS (食品添加物規格合格品)を塩酸で遊離酸とした後、エタノールで再結晶し、融点 229°のものを使用。

サッカリン標準液; 上記の精製サッカリン 100 mg を

* 香川県衛生研究所: 高松市番町 5-4-15

Fig. 1. Degradation of saccharin

Fig. 2. Effect of hydrochloric acid on the peak height of a decomposed product from saccharin

Fig. 3. Effect of reaction times on the peak height of a decomposed product from saccharin

精秤し、10%水酸化ナトリウム溶液 0.5 ml に溶かし蒸留水で 100 ml とする。

チオフェノール、チオサリチル酸、メチルイソブチルケトン、塩酸、亜鉛末（粒状）；いずれも特級品（和光純薬）使用。

3. 検液の調製

SS の含量が 1~100 mg になるように食品を常法*に

* リン酸 1 ml で酸性とした後、食塩を飽和し酢酸エチルで 3 回抽出する。

Fig. 4. Gas chromatogram of the compounds obtained from decomposed product of saccharin and pyrene

I: decomposed product of saccharin

II: pyrene

column: 2% DC-11 on Chromosorb G in 4 mm × 150 cm at 200°C

N₂ flow: 80 ml/min

H₂ flow: 60 ml/min

detector: FID at 230°C

injection port: at 250°C

sample size: 2 μl

より処理し、その水溶液 10 ml を 50 ml の共セン遠沈管にとり、塩酸 1 ml および亜鉛末（粒状）2 g を加えて 90° の水浴中で 1 時間還流冷却器をつけて還流する。

冷後、内部標準物質としてピレン（サッカリン 1 mg～10 mg の場合 0.01 w/v%）を含んだメチルイソブチルケトン 3 ml を正確に加え 4 分間振とうし、3 分間遠心分離（3000 r. p. m.）した後溶媒層を検液とした。

III. 実験結果および考察

1. サッカリンの分解反応

1-1 反応生成物

サッカリンのガスクロ活性（試料が適当なカラム、温度等の条件で、ガスクロマトグラフィーにより分離および

び検出されること）を有する分解反応を種々検討したところ、亜鉛と塩酸によって環の開裂が行なわれ、しかもこの生成物はガスクロ活性を有することを見出した。この構造式については現在 IR、マスペクトル等により検討中であるが、Fig. 1 のⅢ式、すなわちチオサリチル酸を推定している。

1-2 反応条件の検討

1-2-1 試薬による影響

水溶液中での還元法として、亜鉛と塩酸を用いる還元方法を選んだ。また分解生成率は、サッカリン標準液

Fig. 5. Gas chromatograms of the compounds obtained from decomposed product of saccharin at various temperatures of injection port
Conditions: the same as Fig. 4

Fig. 6. Calibration curve for saccharin

Table 1. Reproducibility of Relative Peak Height on Injections of the Same Sample

Test numbers	Relative peak height
	s/p*
1	1.59
2	1.63
3	1.64
4	1.64
5	1.58
$\bar{X}$	1.616
$\sigma(\sigma\%)$	0.0258 (1.60%)

* s/p: saccharin/pyrene

sample: prepared with 5 mg of saccharin

conditions: the same as Fig. 4

sample size: approx. 2 μ l

Table 2. Reproducibility of Relative Peak Height on Individual Sample

No.	Weight of Saccharin	s/p*
1	5 mg	1.64
2	5 mg	1.65
3	5 mg	1.63
4	5 mg	1.70
5	5 mg	1.54
$\bar{X}$		1.635
$\sigma(\sigma\%)$		0.0524 (3.20%)

* s/p: saccharin/pyrene

conditions: the same as Fig. 4

sample size: approx. 2 μ l

Table 3. Recovery Test of Saccharin Sodium in Food

Sample	Added mg/kg	Found mg/kg	Recovery %
Orange juice	0.500	0.505	101.2%
Canned orange	0.500	0.486	97.2%

10 ml を遠心管にとり亜鉛および塩酸の量を変え、以下検液の調製の項に準じて操作し、メチルイソブチルケトン層の 5 μ l をガスクロマトグラフに注入し、そのピークの高さ（サッカリン分解生成物）から求めた。亜鉛の量は 1~5 g の範囲でサッカリンの分解には影響を与えないが、塩酸の添加量は Fig. 2 に示すとおり著しく影響がみられた。塩酸 0.5~2 ml の範囲ではサッカリンの分解はほぼ一定であるが、2 ml 以上ではサッカリンの分解が低下してくる。

1-2-2 反応時間

反応時間と分解物の生成量との関係は、1-2-1 と同じ方法により求め、その結果を Fig. 3 に示す。水浴中 (90°) で 1 時間サッカリンを分解すると、SS の分解物の生成は最高に達し、180 分後ともほぼ一定であった。また室温においても、90° における分解物の生成量の 30% 相当量が生成するが、それ以後は分解物生成の増加が認められなかった。生成した分解物については 5 日後もガスクロマトグラム上に何らの変化は見られなかった。

1-2-3 抽出溶媒の選択

エチルエーテル、キシレン、クロロホルム、メチルイソブチルケトン等の溶媒で分解物の抽出実験を行なったところ、メチルイソブチルケトン、エーテル、クロロホルムによる抽出率が良好であった。沸点、比重などの点を考えてメチルイソブチルケトンを抽出溶媒に選んだ。

2. ガスクロマトグラフィー

2-1 カラムの選択

SE-52, OV-17, DEGS, DC-11 などのカラムを用いて検討したところ、DEGS を除いたいずれのカラムを用いても分離が可能であった。テーリングが少なく、また内部標準物質ピレンの分離が良いシラン処理の DC-11/Chromosorb G をカラム充てん剤に選んだ。その分離像を Fig. 4 に示す。

2-2 注入口温度およびカラム温度

注入口温度は Fig. 5 に示すとおり 300° で分解小ピークが出現した。250° ではピークもシャープで良好であった。また 200° ではややテーリングがみられた。なおカラム温度はいずれの場合も 200° であった。カラム温度については 150~300° で検討を行なったが 200° でサッカリン分解物は約 5 分で分離し、ピークもシャープであった。

3. 食品中の SS の定量

3-1 検量線

内部標準物質としてピレンを用いて、検液の調製の項に従って操作を行なうと、1~100 mg までは直線性を示した。Fig. 6 に検量線の 1 例を示す。

3-2 共存物質の影響

ソルビン酸、デヒドロ酢酸、安息香酸などの保存料、

サイクラミン酸ナトリウムおよびズルチンなどそれぞれ 500 ppm を添加し、検液の調製の項に準じて操作して得たクロマトグラム上には、妨害ピークはみられなかった。

3-3 定量精度の検討

サッカリンの 500 ppm の水溶液を作成し、その 10 ml をとり、前述の検液の調製法に従って操作した検液を用い、同一検液についてガスクロマトグラフで 5 回測定した結果を Table 1 に示す。また 500 ppm の濃度のものを、別々に 5 検体前記と同様に作成した検液について実験した結果を Table 2 に示す。

注入操作によるバラツキと別々に検液を調製した場合のバラツキはいずれも $\pm 3\%$ であり、この程度の誤差を認めるならば十分信頼しうる定量法である。また本実験では sensitivity 10^8 , range V 0.8~1.6 を使用したが、機械感度を下げてサッカリンの濃度を上げるならば、誤差の幅をさらに小さくできると考えられる。

3-4 回収率

市販ジュース およびみかんかん詰に SS の 500 ppm を添加しその回収率を求めた結果を Table 3 に示す。

IV. むすび

SS のガスクロマトグラフィーによる定量法を検討し、良好な結果を得た。

1) サッカリンに亜鉛と塩酸を作用し、定量的にガスクロ活性を有するチオフェノールの誘導体に変化することを見出し、食品中の SS をガスクロマトグラフィーにより定性、定量する方法を確立した。

2) 本法を食品のオレンジジュースおよびみかんかん詰に応用したところ、おおむね良好な結果を得た。また $\pm 3\%$ の誤差を認めるならば他の食品にも応用できると思われる。

3) 本法によるサッカリンの検出限度は 1 μ g である。

終りに臨み本研究に援助下さった香川県公衆衛生課多田課長補佐に厚くお礼申し上げる。本研究の要旨は第 19 回日本食品衛生学会（昭和 45 年 5 月 7 日、東京）において発表。

文 献

- 1) 日本薬学会編：“衛生試験法註解” p. 27 (1965) 金原出版。
- 2) 金子太郎、藤川福二郎：“衛生化学” 下巻, p. 436 (1963) 医歯薬出版。
- 3) 厚生省編：食品添加物公定書 p. 156 (1966) 日本食品衛生協会。
- 4) W. Greebel: Z. Lebensmittel-Untersuch. u. -Forsch. 192, H-3, 153 (1966)。