サッカリンのガスクロマトグラフィーによる定量

(昭和 49 年 9 月 17 日受理)

星野 庸二* 鈴木 敏正* 菊池 好則*
能勢 憲英* 渡辺 昭宣*

Determination of Saccharin by Gas Chromatographic Method

Youji HOSHINO, Toshimasa SUZUKI, Yoshinori KIKUCHI,
Norihide NOSE and Akinobu WATANABE

(Saitama Institute of Public Health: 639-1 Kamiookubo-higashi, Urawa, Saitama)

A method of the quantitative determination of saccharin in foods by gas liquid chromatography (GLC) was described.

Saccharin was methylated with dimethylformamide dimethylacetal (DMF-Me) heating for 30 min in glycerin bath at $110 \pm 5^\circ\text{C}$. After reaction with DMF-Me, methyl derivative of saccharin obtained was determined by GLC equipped with a flame ionization detector (FID) and an electron capture detector (ECD). GLC was performed using DC-200 (10%) on gas chrom Q as the column and β -BHC as an internal standard.

The recoveries of sodium saccharin added in various foods by the present method were 88.1~94.7%, and the limit of detection as saccharin was about $0.02 \mu\text{g}$ with FID-GLC and 0.02 ng with ECD-GLC.

Furthermore, the determination with ECD-GLC was an effective method for the ultramicro-analysis.

(Received September 17, 1974)

1. 緒 言

サッカリンを定量する方法としてガスクロマトグラフィー (以下 GLC と略記) による方法は特異性, 検出感度などの点で優れた方法であると考えられる。

現在, GLC による定量方法には, ジアゾメタン, ヨウ化メチルによるメチル化法^{1), 2)}, *N,O*-ビストリメチルシリルアセトアミドによる TMS 化法³⁾, 亜鉛と塩酸による還元法⁴⁾および *N*-トリクロルメチルチオ誘導体法⁵⁾などがある。

現在最も一般的で良好な結果を示すのはメチル化法であるが, ジアゾメタン法はジアゾメタンの取り扱いにかなりの危険性があり, 市販品の入手は困難で試薬を合成し, 用時調製するという点などから簡便さに欠け, さ

らにラクチム型に由来する副ピークを与える⁶⁾。ヨウ化メチル法は試薬の保存にアンブルを要し, さらにメチル化後に抽出操作が必要である。

今回, 著者らはジメチルホルムアミドジメチルアセトール (以下 DMF-Me と略記) を用いてサッカリンをメチル誘導体とし, GLC によって直接定量する方法を検討し, さらに種々の食品中のサッカリンナトリウムの定量を試み, 良好な結果を得た。

また, メチルサッカリンは高い EC 能を有することから, ECD-GLC による超微量分析の基礎的条件についても検討を試みたので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬および標準溶液

i) サッカリン標準溶液: サッカリン (東京化成 (株))

* 埼玉県衛生研究所: 埼玉県浦和市上大久保東 639-1

製品をエタノールで再結晶したもの。融点 229°) 200 mg を精秤し、酢酸エチルに溶解して 2 mg/ml の溶液を調製し、FID-GLC 用標準溶液とした。また、ECD-GLC 用標準溶液には FID-GLC 用標準溶液を酢酸エチルで 2 μ g/ml に希釈して用いた。

ii) サッカリンナトリウム標準溶液: サッカリンナトリウム (食品添加物用を 120° で 4 時間乾燥したもの) 500 mg を精秤し、蒸留水を加えて 100 ml とした。

iii) 内部標準溶液: β -BHC (残留農薬用標準品, 和光純薬(株)製) 200 mg を精秤し、酢酸エチルに溶解して 2 mg/ml の溶液を調製し、FID-GLC 用内部標準溶液とした。また、ECD-GLC 用内部標準溶液には FID-GLC 用内部標準溶液を酢酸エチルで希釈し、2 μ g/ml の溶液として用いた。

iv) *N*-メチルサッカリン: 東京化成(株)製特級品。

v) DMF-Me: 東京化成(株)製

vi) 酢酸エチル, 無水硫酸ナトリウム, 塩化ナトリウム, および硫酸はいずれも特級品(和光純薬(株)製)を使用した。

2.2 装 置

i) ホモジナイザー: (株)日本精機製作所製。

ii) バイアル: 日電理硝子(株)製, スクリューバイアル (テフロンキャップ付)。

iii) ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製, GC-5A1FF 型および GC-4BMPEE 型 (^{68}Ni , 10 m Ci)。

iv) カラム管: 内径 3 mm, 長さ 1.5 または 2 m, ガラス製。

2.3 実験操作

2.3.1 試験溶液の調製

試料 25 g をホモジナイザーカップにとり、水 50 ml, 10%硫酸 5 ml, 塩化ナトリウム 20 g, および酢酸エチル 100 ml を加えて 5 分間ホモジナイズした後、内容物を共セン遠沈管に移して遠心分離した。酢酸エチル層 50 ml を分液漏斗にとり、1%硫酸 10 ml で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後溶媒を留去して、残留物を酢酸エチル 5 ml に溶解して試験溶液とした。

また、直接酢酸エチルで抽出して液層がよく分離する液状食品などでは酢酸エチルで抽出し、上記と同様の操作を行った。なお、ECD-GLC の場合は上記試験溶液を 10~100 倍に希釈して用いた。

2.3.2 メチル化

試験溶液 1 ml を正確にバイアルにとり、DMF-Me 0.5 ml を加え、 $110 \pm 5^{\circ}$ のグリセリン浴中に 30 分間放置する。反応後水冷して、冷却した後、内部標準溶液 0.5 ml を加える。

ECD-GLC 用試料は DMF-Me 50 μ l および酢酸エチル 0.45 ml を加え、上記と同様の操作を行った。

2.3.3 検量線の作成

サッカリン標準溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, およ

Fig. 1. Gas chromatograms of methyl saccharin A, methyl saccharin; B, internal standard (β -BHC); column, 10% DC-200 (1.5 m $\times$ 3 mm); column temp., 200°C (FID), 190°C (ECD); injection port and detector temp., 210°C ; carrier gas, N_2 60 ml/min (FID), 65 ml/min (ECD).

Fig. 2. Effect of reaction temperature on formation of methyl saccharin

Fig. 3. Effect of reaction time on formation of methyl saccharin

Fig. 4. Effect of amount of DMF-Me on formation of methyl saccharin

び 1.0 ml ずつを、それぞれのバイアルにとり、酢酸エチルを加えて 1 ml とし、前記 2.3.2 のメチル化操作を行い、内部標準法によるピーク高比より検量線を作成した。

また、ECD-GLC の場合は、ECD-GLC 用サッカリン標準溶液を上記と同様の操作を行った。

2.3.4 ガスクロマトグラフィーの条件

(1) FID-GLC

カラム充てん剤および担体: 10% DC-200, ガスクロム Q (80~100 mesh).

カラム管: ガラスカラム, 1.5 m × 3 mm.

カラム温度: 200°.

検出器および注入口温度: 210°.

キャリアーガスおよび流量: N₂, 60 ml/min.

感度: 10⁸ MΩ × 0.32 V.

(2) ECD-GLC

カラム充てん剤および担体: 10% DC-200, ガスクロム Q (80~100 mesh).

カラム管: ガラスカラム, 1.5 m × 3 mm.

カラム温度: 190°.

検出器および注入口温度: 210°.

キャリアーガスおよび流量: N₂, 65 ml/min.

感度: 10⁸ MΩ × 0.16 V.

3. 実験結果および考察

3.1 カラム充てん剤の検討

充てん剤には 5% OV-17, 10% DC-200, 10% SE-30, および 5% DEGS の 4 種類を用い、分離能および検出感度について検討した。

OV-17, DC-200, SE-30, および DEGS のカラムともメチルサッカリンの分離は可能であったが、DEGS のカラムは保持時間が長く、OV-17, DC-200, および SE-30 のシリコン系のカラムでは単一の良好な対称ピークが得られ、検出感度もほぼ同程度であった。この結果、本実験では DC-200 のカラムを用い、Fig. 1 に示すようなメチルサッカリンのクロマトグラムが得られ

Table 1. Effect of Solvent on Formation of Methyl Saccharin

Solvent	Rate of reaction (%)
Pyridine	64.9
Ethyl acetate	98.7
Methyl isobutyl ketone	88.9
Chloroform	70.6
Benzene	99.1

Table 2. Reproducibility of Reaction

Saccharin mg/ml	Peak height ratio	Statistics
0.10	0.42	$\bar{x} = 0.44$
	0.47	$\sigma = 0.019$
	0.43	$c = 4.38$ (%)
	0.46	
	0.43	
0.25	1.24	$\bar{x} = 1.27$
	1.32	$\sigma = 0.041$
	1.21	$c = 3.19$ (%)
	1.29	
	1.30	
0.50	2.44	$\bar{x} = 2.49$
	2.55	$\sigma = 0.056$
	2.56	$c = 2.28$ (%)
	2.48	
	2.42	
0.75	3.74	$\bar{x} = 3.74$
	3.61	$\sigma = 0.087$
	3.86	$c = 2.32$ (%)
	3.70	
	3.79	
1.00	5.00	$\bar{x} = 5.03$
	5.12	$\sigma = 0.092$
	5.16	$c = 1.83$ (%)
	4.98	
	4.91	

Coefficient variation = $\sigma/\bar{x} \times 100$ (%)

た。

3.2 試験溶液調製方法の検討

サッカリンナトリウムの抽出法としては、酸性で塩化ナトリウムを飽和し、酢酸エチルまたはエーテルを用いて抽出する方法、あるいは試料を透析した後、溶媒抽出する方法が広く行われている。本試験においては、清涼

Table 3. Recovery Test of Sodium Saccharin in Various Foods

Name of sample	Level added (%)	Recovery (%)
Cola	0.02	94.0
Cider	0.02	94.7
Fermented milk drink	0.02	93.4
Orange juice	0.02	92.1
Soybean paste	0.04	88.9
Soy sauce	0.04	91.6
Fish paste product	0.04	90.9
Boiled bean	0.04	90.4
Biscuit	0.04	89.2
Egg-apple pickles (mustard)	0.04	90.3
Ginger pickling in vinegar	0.04	93.1
Canned tuna	0.04	89.8
Wasabi preserved in sake lees	0.04	88.1
Marine manufactured product (codfish)	0.04	90.6

飲料などの液状食品については酢酸エチルを用いて直接抽出する方法を行った。しかし、固型食品およびしょう油、みそなどの発酵食品では酢酸エチルを用いて直接抽出するとエマルジョン化して分液しにくく、クロマトグラムにも妨害ピークが出現して、定量は不可能であった。そのため、試料を酢酸エチルとともにホモジナイズし、さらに遠心分離することによりエマルジョン化することを防止した。

また、Daun²⁾ および蒔田ら⁵⁾ は酢酸エチル抽出液を少量の水で洗浄する操作を行っている。しかし、酢酸エチル層を 10 ml の水で 1 回洗浄すると約 20% 程度、また、5% 塩化ナトリウム溶液 10 ml で 1 回洗浄すると約 10% 程度それぞれサッカリンの損失が認められたが、1% 硫酸 10 ml で 1 回洗浄した場合ではサッカリンの損失は認められず、さらに妨害ピークもほとんど除去され定量することができた。このため本実験においては酢酸エチル層を 1% 硫酸 10 ml で洗浄する操作を行った。

3.3 メチル化反応条件の検討

サッカリンのメチル化反応温度を上げると反応が促進されることが考えられるが、他方、逆にメチル誘導体が分解されることも考えられる。そこで反応温度を変えてメチル化操作を検討したところ、Fig. 2 に示すように 100°ではメチルサッカリンの生成はほぼ平衡に達しているが、若干のばらつきがでるので、本実験では反応温度を $110 \pm 5^\circ$ とした。

次に反応時間について検討したところ、Fig. 3 に示すように 15 分後にはサッカリンのメチル化反応はほぼ 100% 近く進行するが、若干のばらつきがあるので、本実験では反応時間を 30 分間とした。

メチル化剤の添加量によっても誘導体生成率の変動することが考えられるので、DMF-Me 添加量を増加させ

て検討したところ、Fig. 4 に示すように 0.3 ml 以上でメチルサッカリンのピーク高は一定となり、この結果本実験では DMF-Me 添加量を 0.5 ml とした。また、ECD-GLC の場合は、DMF-Me 添加量が 30 μ l 以上で一定のピーク高となったので、添加量を 50 μ l とした。

反応溶媒としてピリジン、酢酸エチル、メチルイソブチルケトン、クロロホルム、およびベンゼンの 5 種類を用いて検討したところ、Table 1 に示すように酢酸エチルおよびベンゼンでは良好な誘導体生成率を示したので、本実験においては反応溶媒として酢酸エチルを用いた。

以上のようにメチル化反応条件を検討した結果から、前記メチル化操作を設定し、生成したメチル誘導体の室温における経時変化を調べたところ、24 時間放置後も何ら変化なく、安定性の高いことが認められた。

3.4 メチル化反応率および再現性

サッカリン 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, および 1.0 mg/ml の濃度についてそれぞれ 5 回ずつ反応率を調べた結果、上記サッカリン濃度に各々対応する N-メチルサッカリン標準品のピーク高と比較して、98.3~101.8% であり、サッカリンは DMF-Me により定量的にメチル化されていることが認められた。

また、この結果を用いて、内部標準物質に対するピーク高比の再現性を求めたところ、Table 2 に示すように $\pm 4\%$ 程度の誤差であり、良好な再現性を示した。

また、ジアゾメタンおよびヨウ化メチルによるメチル化反応率を上記サッカリン濃度について比較検討したところ、ジアゾメタンによるメチル化反応率は 99.1~101.2% であり、再現性は $\pm 3\%$ 程度であった。ヨウ化メチルによる反応率は 96.4~100.7% であり、再現性は $\pm 5\%$ 程度であった。以上のことから DMF-Me、ジアゾ

メタン, およびヨウ化メチルによるサッカリンのメチル化反応率はほぼ同じ結果であった。

3.5 検量線

前記実験方法 2 の項における検量線より, FID-GLC ではサッカリン濃度 0.1~1.0 mg/ml の範囲で直線性を示し, ECD-GLC では 0.1~1.0 µg/ml の範囲で直線性を示した。

3.6 保存料の影響

各保存料の添加量として使用基準の最大値を採用し, ソルビン酸 10 mg, デヒドロ酢酸 2.5 mg, 安息香酸 3.0 mg, サリチル酸 1.5 mg, およびパラオキシ安息香酸エステル (エチル, プロピル, およびブチル) 2.5 mg についてそれぞれサッカリン 1.0 mg との共存下, 2.3.2 のメチル化操作に従い, その影響を調べた。

この結果, ソルビン酸, デヒドロ酢酸, 安息香酸, およびサリチル酸については, 妨害ピークが現れず, 定量性への影響は認められなかった。パラオキシ安息香酸エステルについてはメチルサッカリンのピークの前後に二, 三のピークが出現したが, 定量性への影響は認められなかった。

ECD-GLC の場合では各保存料とも妨害ピークは現れなかった。

3.7 添加回収実験

サッカリンナトリウム標準溶液 1 および 2 ml (サッカ

リンナトリウムとして 5 および 10 mg) を添加して回収実験を行ったところ, Table 3 に示すような結果を得た。液状食品では 92.1~94.7%, 固形食品および発酵食品では 88.1~93.1% の範囲で回収された。

ECD-GLC の場合にもほぼ同様な回収率を示した。

4. 結 論

サッカリンをメチル化する方法において DMF-Me を用いたことにより, 反応後, 直接 GLC 装置に注入できることから, 他の方法によるメチル化法と比べ, メチル化後の抽出操作を必要とせず, また DMF-Me の取り扱いも簡単であるので, サッカリンを GLC によって定量するときのメチル化法として有効であると考えられる。

文 献

- 1) Grobel, W.: Z. Lebensmitt-Unters. u. Forsch., **129**, 153 (1966).
- 2) Daun, R. J.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **54**, 1140 (1971).
- 3) Gerstl, R., Ranfft, K.: Z. Anal. Chem., **258**, 110 (1972).
- 4) 黒田弘之, 広瀬秀雄: 食衛誌. **12**, 322 (1971).
- 5) 蔦田政見, 山本重雄, 吉原恵子: 衛生化学, **19**, 297 (1973).
- 6) 食品添加物公定書Ⅲ版解説書, B-366 (1973) 広川書店。