炎光光度型検出器 (FPD) 付きガスクロマトグラフによる サッカリンナトリウムの定量について

(昭和 50 年 8 月 6 日受理)

伊藤 誉志男* 外海 泰秀* 慶田 雅洋*

Application of Gas Chromatograph Equipped with Flame Photometric Detecting System (FPD) for the Determination of Saccharin

Yoshio ITO, Yasuhide TONOGAI and Masahiro IWAIDA

(National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch:
No. 6, Hoenzaka-cho, Higashi-ku, Osaka)

The saccharin was either methylated with dimethylformamide—dimethylacetal (DMF·DMA), methyl iodide or diazomethane, or silylated with trimethylsilyl ether to provide a volatile derivative for gas chromatography, then analyzed by use of a gas chromatograph equipped with flame photometric detecting system (FPD), and the results were compared with gas chromatograms obtained by use of a gas chromatograph equipped with flame ionization detector (FID). Among the four esterification methods compared, methylation with methyl iodide was found to be most sensitive, while methylation with diazomethane was proved to be excellent in reproducibility. By FPD gas chromatography, saccharin could be detected at the level of 0.2 μ g/ml of saccharin sodium, the detection level being about 200 times sensitive compared with the results obtained by FID gas chromatography. Recovery determinations were conducted on soy sauce at the added levels of 500 and 5 ppm, the results being 97.4 and 93.2%, respectively. Levels of saccharin sodium contents of commercial soy sauce products were found to be within the range of 0~14.5 ppm.

(Received August 6, 1975)

食品中のサッカリンの微量定量法としてはこれまでに比色定量法^{1)~3)}, ポーログラフ^{4),5)}, ロ紙および薄層クロマトグラフィー^{6),7)}, けい光 X 線分析法⁸⁾, 高速液体クロマトグラフィー^{9),10)}など多くの方法が検討された。しかしながら, これらの方法については再現性, 感度, 各種食品成分による妨害などの点で問題になるものや, 機器の普及度の点で普遍的な方法として採用するのが困難なものも含まれており, 現状ではガスクロマトグラフィーが日常試験法としては最適であると考え, その条件について検討した。サッカリンは遊離の状態ではピークがテーリングするために感度が悪くなるので, こ

れまでに報告されている数種のメチル化法およびシリル化法による再現性, 感度, 簡便性, および直線性について FPD 付きガスクロマトグラフ (GC) と FID 付き GC との比較を行い, さらに, 妨害物質が多くて定量が困難とされている, しょう油を用いて添加回収実験を行い, また, 数種市販しょう油中のサッカリンナトリウム含量を測定した結果について考察したのでここに報告する。

実験方法

1. 試薬・試液

サッカリンナトリウムは大和化成製のものを120°で4時間乾燥して無水物としたものを使用した。内部標準物

* 国立衛生試験所大阪支所: 大阪市東区法円坂町 6

質としての β -BHC は Polyscience 社製農薬分析用標準品を、また、スミチオンは住友化学(株)製農薬分析用標準品をそれぞれ FID および FPD-GC に注入した場合、ガスクロマトグラム上で単一ピークであることを確かめた後、使用した。N,N-ジメチルホルムアミド・ジメチルアセタール (DMF・DMA), N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミドおよび N-ニトロソ-N-メチルウレタンは(株)東京化成工業製特級を使用した。その他の試薬はすべて試薬特級を使用した。

サッカリン酢酸エチル試液: サッカリンナトリウム 300 mg を蒸留水 45 ml に溶かし、10% 硫酸 5 ml を加え、塩化ナトリウムで飽和させた後、酢酸エチル 50 ml ずつで 2 回抽出した。有機溶剤層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ろ過し、ろ液に酢酸エチルを加えて全量を 100 ml とした。本液 (以下サッカリン溶液と略記) 中のサッカリン含量を mp 226.5° のサッカリンの酢酸エチル溶液とガスクロマトグラムで比較した結果、サッカリン溶液中のサッカリン含量は理論値 (サッカリンとして 2.68 mg/ml) の 99.2% であった。

ジアゾメタン・エーテル試液: N-ニトロソ-N-メチルウレタンに 25% メタノールカリを加え、蒸留して調製した。

2. 装置

FPD 付き GC は柳本製作所製 Yanaco G 80-(dual) FPD を、FID 付き GC は同社製 G-80-FP をそれぞれ使用した。

3. 試料

しょう油: 市販品 (大阪市内) 7 検体うす口 (A, B), 濃口 (C~E), たまり (F, G) を購入して使用した。

4. サッカリンの各種エステル化法

DMF・DMA 法^{11),12)}: サッカリン液の一定量をバイアルにとり、DMF・DMA 3 ml を加えて 110° で 30 分間加熱し、冷却した後、酢酸エチルで全量を 9 ml とした。

ヨウ化メチル法¹³⁾: サッカリン溶液の一定量を乾固させ、N,N-ジメチルホルムアミド 2 ml, 無水酢酸ナトリウム 0.4 g およびヨウ化メチル 1 ml を加え、110° で 30 分間加熱し、酢酸エチルで 2 回抽出し、脱水した後、酢酸エチルで全量を 9 ml とした。

ジアゾメタン法: サッカリン溶液の一定量を乾固させ、ジアゾメタン・エーテル試液 2 ml を加え、室温に 30 分間放置した後、酢酸エチルで全量を 9 ml とした。

トリメチルシリル化 (TMS) 法¹⁴⁾: サッカリン溶液の一定量を乾固させ、アセトアニリド 2 ml および N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド 1 ml を加え、30 分間放置した後、酢酸エチルで全量を 9 ml とした。

最後に内部標準溶液として、FPD-GC の場合はスミチオンの酢酸エチル溶液 (25 μ g/ml), FID-GC の場合は β -BHC の酢酸エチル溶液 (2.4 mg/ml) 各 1 ml を

加えて全量を 10 ml とした。

5. ガスクロマトグラフィー条件

FPD-GC: ガラス管 (内径 4 mm, 長さ 0.75 m) 使用。充てん剤 1.2% SE-30/クロモソルブ G, カラム温度 153°, 注入口温度 230°。

FID-GC: ガラス管 (内径 4 mm, 長さ 1.5 m) 使用。充てん剤 5% DC 200°/クロモソルブ W, カラム温度 153°, 注入口温度 210°。

6. しょう油よりサッカリンの抽出

試料 20 g に水 25 ml および 2 N 水酸化ナトリウム溶液 2 ml を加え、塩化ナトリウムで飽和した後、n-ヘキサン 50 ml ずつで 2 回洗浄した。次に 2 N 硫酸 5 ml を加え、酢酸エチル 50 ml ずつで 3 回抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水後ろ過し、ろ液を乾固した後、メチル化して試験溶液とした。

実験結果

1. エステル化サッカリンのガスクロマトグラフィー

FID-GC を用いた場合は、DMF・DMA によるメチル化法では、妨害ピークが多く、その一部が N-メチルサッカリンおよび β -BHC のピークと重なるために定量は困難であった。TMS 法ではシリル化効率がきわめて悪く、また、試薬による妨害ピークも認められたが、これに対してヨウ化メチル法およびジアゾメタン法では良好なガスクロマトグラムが得られた。

FPD-GC を用いた場合は、DMF・DMA 法では、試薬に由来する三つのピークが認められたが (Fig. 1(a)), N-メチルサッカリンおよびスミチオンのピークと重ならないので定量は可能であった。TMS 法では多くの試薬に由来するピークが認められ、その一部は TMS サッカリンと重なるためによい方法とはいえない (Fig. 1(d))。これに対してヨウ化メチル法およびジアゾメタン法ではいずれも良好なガスクロマトグラムが得られた (Fig. 1(b), (c)) 参照)。

次に FID-GC を用いてヨウ化メチル法およびジアゾメタン法で検量線を描いたところ、いずれもサッカリンナトリウム 0~1.5 mg の間でピーク高さとの間に直線関係が得られ、検出限界はいずれも約 50 μ g/ml であった。また、両者の再現性について比較したところ、Table 1 に示すとおり、ジアゾメタン法の方がやや優れていることが知られた。しかし、ジアゾメタン法による N-メチルサッカリンのピーク高さはヨウ化メチル法の約 64% であった。

一方、FPD-GC を用いて、4 種のエステル化法によるサッカリンの検量線を描くと、Fig. 2 に示すとおりであって、メチル化効率はヨウ化メチル法、ジアゾメタン法、DMF・DMA 法の順になり、前 2 者は 0~20 μ g/ml, 後者は 0~40 μ g/ml の間で直線性が得られ、ヨウ化メチル法における定量限界は 0.2 μ g/ml であって、FID-GC による測定に比較して約 200 倍の感度を示した。TMS

(a) methylated with DMF·DMA (b) methylated with methyl iodide (c) methylated with diazomethane (d) trimethylsilylated derivative of saccharin

Fig. 1. Gas chromatograms (flame photometric detector) of *N*-methyl and trimethylsilyl derivatives of saccharin.

Gas chromatograph, Yanaco G-80 FPD; column, ϕ 4 mm $\times$ 75 cm, 1.2% SE-30 on Chromosorb G; column temperature, 150°C; injection port temperature, 230°C; detection temperature, 250°C; internal standard (sumithion), 25 μ g/ml.

Concentration of saccharin (expressed as saccharin sodium): (a), 40 μ g/ml; (b), 10 μ g/ml; (c), 10 μ g/ml; (d), 2000 μ g/ml.

Table 1. Reproducibility of Esterification Methods of Saccharin Evaluated by Gas Chromatography

Type of GC		FID		FPD			
Esterification procedure		Methylated with		Methylated with			Esterified
		CH ₃ I Diazomethane		DMF. DMA	CH ₃ I	Diazo-methane	TMS
Saccharin sodium concentration (μ g/ml)		1000	1000	20	10	10	1000
Peak height ratio to internal standard	Range	1.09~1.16	0.70~0.75	0.34~0.40	1.37~1.49	0.56~0.61	0.24~0.35
	Average	1.12	0.72	0.38	1.46	0.59	0.28
	Standard error	$\pm 3.2\%$	$\pm 2.5\%$	$\pm 5.5\%$	$\pm 4.5\%$	$\pm 2.9\%$	$\pm 19.3\%$

Note: β -BHC (2.4 mg/ml) was used for FID-GC and sumithion (25 μ g/ml) was used for FPD-GC as the internal standard.

Table 2. Recovery of Saccharin from Soy Sauce

Gas chromatograph with	Flame ionization detector		Flame photometric detector	
	Found (mg/kg)	Recovery (%)	Found (mg/kg)	Recovery (%)
Saccharin sodium added (mg/kg)				
0	ND*	—	0.27 $\pm$ 0.02	—
5	ND	—	4.91 $\pm$ 0.31	93.2 $\pm$ 6.1
500	492 $\pm$ 15	98.4 $\pm$ 3.0	487 $\pm$ 18	97.4 $\pm$ 3.6

Note: * ND, not detected. Each figure is an average of five trials.

Fig. 2. Comparison of calibration curves of four kinds of saccharin esters by gas chromatography with flame photometric detector

●—●, methylated with methyl iodide;
○—○, methylated with diazomethane;
△—△, methylated with DMF·DMA;
▲—▲, trimethylsilylated derivative.

As for the conditions of gas chromatography confer Fig. 3.

法では感度は前2者の1/100であり、直線性もよくなかった。再現性についての比較結果は Table 1 に示したとおりであって、ジアゾメタン法が変動係数2.9%で最も優れており、以下ヨウ化メチル法、DMF·DMA法の順となり、TMS法では約20%のばらつきが認められ、定量法として不適当であると判定された。

2. しょう油中サッカリンナトリウムの回収率

濃口しょう油Cにサッカリンナトリウム5または500 ppm 添加した際の結果は Fig. 3 に示すとおりである。ただし、FPD-GCによる場合のサッカリンナトリウム無添加対照の測定値は試験溶液を10倍に濃縮して測定したものである。500 ppm 添加の回収率はFID-GC、FPD-GCによった場合、共に満足すべきものであった。FPD-GCでは5 ppm 添加でも93%の回収率が得られた。(Table 2 参照)

3. 市販しょう油のサッカリンナトリウム含量

1975年4月に大阪府下で購入した市販しょう油のサッカリンナトリウム含量の測定結果を Table 3 に示した。

Table 3. Saccharin Contents of Commercial Soy Sauces

Sample	Saccharin sodium content (mg/kg)
A	0.56
B	1.24
C	0.27
D	4.65
E	5.63
F	12.92
G	14.50

Note: Determined by use of gas chromatograph equipped with flame photometric detector.

サッカリンナトリウムとして0.6~14.5 ppmであって、たまりが最も高く、以下濃口、うす口の順であった。

考 察

エステル化サッカリンのガスクロマトグラフィーについて詳しく述べた総説¹⁵⁾はあるが、実際に比較実験した報告は見当たらない。DMF·DMA法は簡便ではあるが、FID-GCでは試薬由来のピークが多くみられ、DMF·DMAのロットによってそれらの位置および高さが異なり、純度が一定しないことを知った。FPD-GCを用いると妨害ピークは消えるが、メチル化率はヨウ化メチル法よりも低かった。

サッカリンのTMS誘導体のガスクロマトグラフィーも報告されているが¹⁴⁾、この方法では明確なピークは認められない¹⁶⁾、あるいは再現性がよくない¹⁷⁾との批判もあり、著者らの結果もこれを裏付けている。ジアゾメタン法はO-メチル体が副生するといわれており、著者らもFIDおよびFPD-GCによりO-メチル体を検出した。本法によるN-メチル体のピークがヨウ化メチル法のピーク高さよりも低いのはここに原因があると思われる。ヨウ化メチル法についてはDaun¹⁸⁾および細矢ら*はジメチルスルホキシドを用いているが、FPD-GCにかけた場合に溶媒ピークが大きくなるので、本実験ではジメチルホルムアミドを用いることにした。N-メチルサッカリンの抽出にはジクロロメタン1 ml またはクロロホルムを用いた報告もあるが、予備実験の結果いずれも再現性が低かったので、本実験では酢酸エチル4 ml ずつで2回抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水する方法に改良した。しょう油のサッカリンの測定の場合、FID-GCでは透析などの前処理が必要であるが、FPD-GCを使用すれば、試料をアルカリ性にして、*n*-ヘキサンで香気性物質および脂質などを除去するのみで直接FPD-GC

* 細矢義隆, 高槻圭悟, 石川 潔, 大槻和子, 加藤玲子, 堺 敬一: 日本食品衛生学会第28回学術講演会で講演(昭49. 10. 24, 長崎)。

Fig. 3. Gas chromatograms of *N*-methyl derivatives of saccharin from soy sauce a) and b), drawn by use of flame ionization detector; c) and d), drawn by use of flame photometric detector.

As for condition of FPD gas chromatography, confer Fig. 1.

The condition for FID gas chromatography: GC, Yanaco G-80 FP; tube (glass),

ϕ 4 mm $\times$ 150 cm, 5% DC 200 on Chromosorb W 60/80; column temperature, 153°C;

injection port temperature, 210°C; internal standard (β -BHC), 2.4 mg/ml.

---, soy sauce only; —, soy sauce to which saccharin sodium was added.

で測定することができ、しかも FID-GC の約 100 倍の検出感度を得ることが示された。

結 論

1) ガスクロマトグラフィーによるサッカリンの定量の際の各種エステル化法の影響を比較したところ、感度ではヨウ化メチル法、再現性ではジアゾメタン法が優れていることを認めた。

2) *N*-メチルサッカリンの測定の場合は FPD-GC を用いた場合には FID-GC の場合に比べて約 200 倍の感度を有し、前者の場合にはしょう油のように夾雑物の多い試料でも妨害ピークはきわめて少く、微量のサッカリンでも定量が可能であった。

3) しょう油にサッカリンナトリウム 500 および 5 ppm 添加の回収率はそれぞれ 97.4~98.4% および 93.2% であった。

4) 7 種類の市販しょう油のサッカリン含量は 0~14.5 ppm であった。

文 献

- 1) Shih, I. K., Teare, F. W.: Can. J. Pharm. Sci., 1, 15 (1967).
- 2) 山本敏信: 薬誌. 88, 28 (1968).
- 3) Frandez-Flores, E., Johnson, A. R., Leber B., Larry, D., Lerner, S.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 56, 1411 (1973).
- 4) 館 勇, 塚本 務: 農化. 25, 335 (1951).
- 5) Pratt, D. E., Powers, J. J.: J. Assoc. Offic. Agr. Chem., 37, 486 (1954).
- 6) 竹下隆三: 食品衛生研究, 14, 67 (1964).
- 7) Korbelak, T., Bartlett, T.: J. Chromatog., 41, 124 (1969).
- 8) 山田利治, 中岡正吉, 和田 裕: 食衛誌. 16, 7

-
- (1975).
- 9) Nelson, J.J.: J. Chromatog. Sci., **11**, 28 (1973).
- 10) 谷村顕雄編: “食品添加物の分析 II” p. 10 (1970) 講談社.
- 11) Meerwein, H.: Ber., **89**, 206 (1956).
- 12) 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).
- 13) Walker, H. J., Gee, M., McCreary, R. M.: J. Org. Chem., **27**, 2100 (1962).
- 14) Grestl, R., Ranfft, K.: Z. Anal. Chem., **258**, 110 (1972).
- 15) 加藤三郎: 食品衛生研究, **24**, 469 (1974).
- 16) Conacher, H.B.S., O'Brien, R.C.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **53**, 1117 (1970).
- 17) 加藤三郎: 食品衛生研究, **24**, 543 (1974).
- 18) Daun, R.J.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **54**, 1140 (1971).