相間移動触媒による食品中のサッカリンナトリウムの分析法

(昭和 55 年 4 月 22 日受理)

高 槻 圭 悟* 堺 敬 一*

Determination of Saccharin in Foods by Methylation with the Aid of a Phase Transfer Catalyst

Keigo TAKATSUKI and Keiichi SAKAI

(Miyagi Prefectural Institute of Public Health: 4-7-2, Saiwai-cho, Sendai, Miyagi)

Phase transfer catalysis was utilized for the methylation of saccharin, which was extracted and methylated in one process (extractive methylation). Saccharin in aqueous solution was extracted into an organic solvent as an ion pair with tetrabutylammonium (phase transfer catalyst) and methylated with methyl iodide at room temperature. The resulting *N*-methyl saccharin was quantitated by gas-liquid chromatography on a 5% OV-1 or 5% OV-17 column equipped with a flame ionization detector or flame photometric detector (sulfur mode) without any clean-up procedures. Dibenzothiophene was used as an internal standard for both detectors. The peak of *N*-methyl saccharin was well separated and no interfering peak was observed even though no clean-up procedure was used. The mean recovery of added saccharin in soy sauce was 94.2%, with a 5.7% coefficient of variation. This method offers several advantages, including greater simplicity, rapidity, and a small requirement for organic solvents, over other methods now commonly used, and avoids the use of poisonous substances such as diazomethane. This procedure is applicable to daily routine analysis of saccharin in various liquid foods.

(Received April 22, 1980)

1. 序

サッカリンナトリウムは、各種の食品に使用基準が定められた¹⁾ 合成甘味料として用いられている。この微量分析法としては種々の方法が報告されている²⁾ が、厚生省通達による食品添加物分析法³⁾ では、メチル誘導体のガスクロマトグラフィー (GLC) による定量法が採用されている。これは分析精度も比較的良好であり、機器の普及度も広く、最も一般的に使用されていると思われる。しかしメチル誘導体を得る試薬としてジアゾメタンを用いており、これは低沸点で毒性が強く爆発性を有するため、取扱いや操作に注意を要し、日常分析の方法としては難点を残していると思われる。このメチル化の段階に

相間移動触媒⁴⁾ を利用すれば、抽出とメチル化を同一の操作で行うため (extractive methylation⁵⁾) 極めて簡便な分析法になると共に、有機溶媒の使用量も極く少量ですみ、有毒物質の使用も避けるなどの利点があり、日常分析の方法として適当であると思われる。そこでメチル化の反応条件に検討を加え、妨害物質が多く定量が困難とされているしょう油を主に清涼飲料水などの分析に適用したところ良好な結果を得ることができたのでこれを報告する。

2. 実験方法

(1) 試薬

サッカリンナトリウム：食品添加物規格品

臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (TBA)：東京化成工業(株)製

* 宮城県衛生研究所：仙台市幸町 4-7-2

ヨウ化メチル：和光純薬工業(株)製，試薬特級

ジベンゾチオフェン：和光純薬工業(株)製，試薬特級
その他の試薬：試薬特級を使用した。

サッカリンナトリウム標準溶液：サッカリンナトリウムを 120° で 4 時間乾燥後，その 100 mg を水に溶かして 100 ml とし標準原液 (1000 ppm) とする。これを水で希釈して各濃度の標準溶液をつくる。

内部標準溶液：ジベンゾチオフェン 100 mg を塩化メチレンに溶かして 100 ml とし，その 20 ml をとり塩化メチレンで 100 ml とし 200 ppm 溶液とする。この 10 ml をとり塩化メチレンで 100 ml とし 20 ppm 溶液とする。FID の場合には 200 ppm 溶液，FPD の場合には 20 ppm 溶液を用いる。

相間移動触媒・リン酸塩溶液： $M/30$ 濃度のリン酸一水素ナトリウム水溶液 100 ml に臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム 0.5 g を溶解する。

(2) 装置

振とう機：ヤヨイ 8-1-W

ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC-7AG, GC-4CMF・FPD

(3) 分析操作

① 試験溶液の調製

せん付試験管 (10 ml) に試料 1 ml (サッカリンナトリウム含有量：FID の場合 1.0~0.1 mg, FPD の場合 100~5 μ g) をとり，相間移動触媒・リン酸塩溶液 3 ml を加え混合する。内部標準溶液 1 ml, ヨウ化メチル 100 μ l を加え，せんをして振とう機を用いて 60 分間振とうする。静置して分離した塩化メチレン層を GLC 用試験溶液とする。

② ガスクロマトグラフィーの条件

カラム管：内径 3 mm, 長さ 2 m, ガラス製

カラム充填剤：OV-1 (5% Chromosorb WHP, 80~100 mesh), OV-17 (5% Chromosorb WHP, 80~100 mesh)

カラム温度：OV-1 160° ; OV-17 180°

試料注入口温度： 270°

キャリアーガス：窒素，流量 60 ml/min

感度：FID (GC-7AG) Atten. 16. Range 10^2

FPD (GC-4CM) Sens 10 M Ω

Range 0.16~1.28 V

③ 定量法

サッカリンナトリウム標準溶液について試料と同様の操作を行い，ピーク高を測定して内部標準法により検量線を作製する。試験溶液についても同様に操作して得られたガスクロマトグラムからピーク高比を求め検量線を用いて定量する。

3. 結果および考察

(1) 触媒および有機溶媒の選択

相間移動触媒としては，各種の四級アンモニウム・ホ

スホニウム塩が用いられてきているが，入手が容易であり，文献の反応例で比較的効率の良いことが確かめられている⁹⁾テトラ-*n*-ブチルアンモニウム塩 (TBA) を用いることにした。有機溶媒は一般にはクロル炭化水素系が使われており，塩化メチレン，クロロホルム，ジエチルエーテルを試みた結果，塩化メチレンで最も良好な結果が得られ，これを用いることにした。

(2) メチル化の条件の検討

以下の条件の検討はサッカリンナトリウム 1 mg (標準原液 1 ml)，水又は緩衝液 2~3 ml，有機溶媒塩化メチレン 1 ml の条件で行った。

① ヨウ化メチルの量

ヨウ化メチルの使用量は 10 μ l では不足し，50 μ l でもやや収率が低かったが，100 μ l で十分であることが分った (Fig. 1)。この時の再現性も良好であり，100 μ l を使用することにした。

Fig. 1. Effect of amount of methyl iodide for methylation of saccharin

○—○, CH₃I 100 μ l; ●—●, CH₃I 50 μ l; △—△, CH₃I 10 μ l

Fig. 2. Effect of concentration of catalyst for methylation of saccharin

(*n*-Bu)₄N⁺Br⁻ conc.:
○—○, 0.47%; ●—●, 0.24%;
△—△, 0.06%

Fig. 3. Effect of pH of aqueous phase for methylation of saccharin

○—○, pH 4.8; △—△, pH 7.0;
●—●, pH 7.8; ▲—▲, pH 10.0

Fig. 4. Effect of pH of aqueous phase for methylation of saccharin

② TBA 濃度

水層の TBA 濃度は 0.24% から 0.47% で定量的にメチル化されることが分った (Fig. 2). 試料に加える相間移動触媒・リン酸塩溶液の TBA 濃度を 0.5% とすれば, 試料と混合したときに 0.375% となり上記の TBA 濃度範囲に入るので, この濃度を用いることにした.

③ 水層の pH

水層の pH 5 から 10 までの間ではメチル化は影響を受けず定量的であり, 反応速度にも差は見られなかった (Fig. 3). しかしこの範囲を越える強酸性, 強アルカリ性では, 反応時間 60 分の結果ではメチル誘導体の収率が半減した (Fig. 4). 強酸性ではサッカリンの解離が抑えられるためであり, 強アルカリ下では生成したメチル誘導体が分解してしまうためと考えられる. $M/30$ 濃度のリン酸一水素ナトリウム溶液 3 ml を加えることにより, 水層の pH を約 8 に保ってメチル化を行うことにした.

④ 反応時間

反応時間は 5~10 分間でほぼ 90% メチル化されるが, 更に徐々に反応の進行が見られるので, 60 分間反応

Fig. 5. Effect of sodium chloride for methylation of saccharin

させることにした. 反応液はそのまま室温に 1 晩放置しても変化はみられなかった.

(3) 塩化ナトリウムの影響

大量の塩化ナトリウムの存在はメチル化を妨害し, 塩化ナトリウム量の増加とともに反応収率が減少するのがみられた (Fig. 5). しかし試料溶液 1 ml に塩化ナトリウムを 0.1 g 添加した場合のサッカリンナトリウムの回収率は 90% 以上であり, 0.2 g の添加でも 80~100% の範囲に入っており, これは試料量 1 ml 中塩化ナトリウム濃度 20% に相当し実際の食品の場合には実用上問題は無いと考えられる.

(4) メチル誘導体

相間移動触媒により生成したメチル誘導体を, ジアゾメタンにより得られたメチル誘導体とガスクロマトグラム上で比較したところ, 前者では *N*-メチル誘導体のピークのみ観察された. *N*-メチルおよび *O*-メチル誘導体が見られるジアゾメタン法と比較し, *N*-メチル誘導体の単一ピークが見られることは, 分析上は都合が良いと思われる.

(5) ガスクロマトグラフのカラム充てん剤

メチル化反応後の有機層には若干四級アンモニウム塩が溶解しており, これが GLC のカラム中で徐々に熱分解を起こしていると思われる. FID ではこのため生成するピークが溶媒ピークに続くテーリングとなってみられ, DEGS (5%) を用いたカラムではこれがサッカリンナトリウムの定量的妨害になるほどはなはだしかった. しかし OV-1 および OV-17 のカラムを用いれば十分分離して定量可能であり, FID を使用する場合は OV-1 が最も良好なクロマトグラムを与えた. なお何らクリーンアップ操作を加えていないが, しょう油の複雑な成分に由来する妨害ピークはみられなかった (Fig. 6). また FPD を用いた場合には硫黄に特異的な感度を有するため, 上述のテーリングもまったくみられず, OV-1, OV-17, DEGS のカラムで良好なクロマトグラムを得ることができる.

Fig. 6. Gas chromatograms of methylated saccharin sample: soy sauce
peak 1, *N*-methyl saccharin; peak 2, internal standard (dibenzothiophene)

(6) 検量線

検量線は原点を通るほぼ良好な直線が得られた。定量範囲は FID を用いた場合には試料 1 ml 中サッカリンナトリウム 1.0~0.1 mg, FPD を用いた場合は 100~5 μ g である。

(7) 添加回収実験

サッカリンナトリウム 500 ppm 添加のしょう油を試料溶液として FID を用いた 10 回の回収実験の結果、平均回収率 94.2%, 変動係数 (CV%) 5.7 であった。またサッカリンナトリウム 300 ppm 添加の無果汁飲料および 50% 果汁飲料 (みかん) についての FID を用いた回収実験では 3 回の分析の平均率がそれぞれ 99% および 102% と良好であった。

4. まとめ

サッカリンナトリウムのメチル化に相間移動触媒を用いて、抽出とメチル化を一段階の操作で行い分析法をごく簡易化することができた。生成した *N*-メチルサッカリンは、何らクリーンアップ操作を加えず FID または FPD 付ガスクロマトグラフで定量することができた。操作が簡単で分析所要時間も短く、有機溶媒の使用量も少い等の利点があり、ジアゾメタンのような有毒物質の使用も避けており、日常分析の方法として適していると

思われる。

なお本研究の要旨は日本食品衛生学会第38回学術講演会 (1979年11月, 仙台) において発表した。

文 献

- 1) 厚生省令第30号 (昭和50年7月25日)
- 2) 加藤三郎: 食品衛生研究, **24**, 469~477, 543~552, 887~903 (1974); Page, B. D., Conacher, H. B. S.: Pure Appl. Chem., **50**, 243~254 (1978).
- 3) 厚生省環境衛生局食品化学課: 食品中の添加物分析法, 第1集, 昭和51年2月.
- 4) Weber, W. P., Gokel, G. W.: 田伏岩夫, 西谷孝子訳 “相間移動触媒” (1978) 化学同人.
- 5) Ehrsson, H., Tilly, A.: Anal. Lett., **6**, 197~210 (1973); Ervik, M., Gustavii, K.: Anal. Chem., **46**, 39~42 (1974); Gyllenhaal, O., Brötell, H., Sandgren, B.: J. Chromatogr., **122**, 471~477 (1976); Gyllenhaal, O., Brötell, H., Hartrig, P.: J. Chromatogr., **129**, 295~302 (1976).
- 6) Herriott, A. W., Picker, D.: J. Am. Chem. Soc., **97**, 2345~2349 (1975).