薄層クロマトグラフィー・デンストメトリーによる サッカリンの定量

(昭和 56 年 3 月 10 日受理)

七瀬 葉子* 高田久美代*
島岡 敏* 土肥 静幸*

Determination of Saccharin by Thin Layer Chromatography-Densitometry

Youko NANASE, Kumiyo TAKATA, Satoshi SHIMAOKA and Shizuyuki DOHI

(Hiroshima Prefectural Hatsukaichi Public Health Center: 2-68, Sakurao 2-chome,
Hatsukaichi-cho, Saeki-gun, Hiroshima)

An analytical method was investigated for the determination of saccharin by thin layer chromatography-densitometry. Saccharin was separated well from other food additives on a thin layer plate (Kiesel Gel 60 F₂₅₄) with a hexane—ethyl acetate—formic acid developing solvent system. Fumaric acid, having an *R_f* value similar to that of saccharin, could be separated from it by the use of hexane—ethyl acetate—formic acid=10:20:0.15.

Calibration plots of concentration vs. the integrated value were found to be linear within the concentration range of 0.5~10 µg and the plot could be extrapolated through zero. The limit of detection was 0.2 µg as saccharin.

Recoveries of saccharin added to soft drinks, kamaboko, cooked soybeans, tsukudani and tsukemono were 93.3, 91.3, 90.3, 87.1 and 85.1%, respectively, and the accuracy of determination for commercial foods was as good as that of gas chromatographic determination.

The assay of saccharin by thin layer chromatography-densitometry was faster than that by gas chromatography. This thin layer chromatography-densitometry procedure seems to be suitable for the routine analysis of saccharin.

(Received March 10, 1981)

Key words: 薄層クロマトグラフィー・デンストメトリー thin layer chromatography-densitometry; 食品添加物 food additive; サッカリンの定量 determination of saccharin; 薄層クロマトグラフィー thin layer chromatography; 二波長クロマトスキャナー dual wavelength chromatoscanner

はじめに

食品に添加されたサッカリンの定量分析法としてガスクロマトグラフィー (GC 法) がよく検討されており^{1)~6)} 現在では最も一般的な分析法として行政的試験法⁷⁾ にも採用されている。また高速液体クロマトグラフィー

(HPLC) によるサッカリンの分析法の研究も装置の普及に伴って報告がなされるようになった^{8)~11)}。

一方、薄層クロマトグラフィー (TLC) も衛生化学領域で食品添加物などの定性分析法として早くから利用され、食品中のサッカリンにも応用されているが^{12)~16)}、安定したクロマトグラムが得られ難いこともあって定量分析への応用が GC 法などに比べて、不十分であった。

* 広島県廿日市保健所: 広島県佐伯郡廿日市町 桜尾 2-2-68

最近になって、プレコートされた良質の薄層プレートが簡単に入手でき、なおかつ TLC 用のデンストメーターが開発されたこともあって TLC による定量分析法が注目されるようになった。そこで著者らは比較的簡単な方法で、短時間に多くの検体中のサッカリンを精度よく定量することを目的として薄層クロマトグラフィー・デンストメトリー (TLC-D 法) の応用を検討し、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

サッカリンの使用が予想される食品のうち、清涼飲料水、かまぼこ、漬物、煮豆、つくだ煮およびさきいかを用いた。これらの試料は、昭和55年5月から7月の間に広島県佐伯郡廿日市町、五日市町、大竹市のスーパーマーケット、食料品店などから収集した。

2. 試薬

(1) サッカリン標準溶液: サッカリン (和光純薬工業 (株)) をデシケーター中で1昼夜乾燥したもの 500 mg をアセトンに溶かして 100 ml とした。さらにアセトンで希釈してその溶液 1 ml 中にサッカリンとして 0.1~5.0 mg を含むように各濃度溶液を調製した。

(2) TLC 用プレート: Kiesel Gel 60 F-254 20×20 cm 厚さ 0.25 mm (Merck 社製), Polyamide 11 F-254 20×20 cm 厚さ 0.15 mm (Merck 社製)

(3) 展開溶媒: i) ヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (10:10:0.15), ii) ベンゼン-酢酸エチル-ギ酸 (10:7:3), iii) *n*-ブチルアルコール-28% アンモニア水 (9:1), iv) イソプロピルアルコール-エチルアルコール-28% アンモニア水-水 (5:20:0.5:1), v) ベンゼン-酢酸エチル-ギ酸 (5:10:1), vi) ヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (10:20:0.15)

(4) 試薬はすべて市販特級品を用いた。

3. 装置および器具

(1) デンストメーター: (株)島津製作所製二波長クロマトスキャナー CS-910

(2) ガスクロマトグラフ: (株)柳本製作所製 G-80 (FID 検出器付)

(3) 質量分析計: 日本電子(株)製 JMS D-300 型, JMA 2000 データー処理装置付

(4) キャピラリー: ドラumont社製マイクロキャップ

4. 試験溶液の調製

(1) 液体試料: 試料 20 g を分液漏斗に量り取り、リン酸 1 ml, 水約 200 ml を加える。更に、塩化ナトリウムを飽和させ、酢酸エチル 50 ml で2回抽出する。抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮乾固する。得られた残留物にアセトン 10 ml を加えて溶かし、4 ml ずつ2本の共栓試験管に分注し、一方を TLC-D 用試験溶液とする。他方は 4 ml を再度濃縮乾固し、残留物にジアゾメタン・エーテル溶液 5 ml を加えてメチル化を行う。反応後エーテルを留去し、内部標準液 (ア

ントラセン 100 mg を酢酸エチルに溶かし 100 ml としたもの) 4 ml を加えて溶かし、GC 用試験溶液とする。

(2) 半流動状および固形試料: 細切した試料 20 g および透析補助液 (塩化ナトリウム 2.5 g を 0.01 *N* 塩酸に溶かして 100 ml としたもの) 20 ml を透析膜に入れて水 500 ml を用いて 20~24 時間透析する。得られた透析外液 200 ml を分液漏斗に取り、以下液体試料と同様に操作する。

5. TLC-D 法による定量

サッカリン標準溶液 1, 2, 4 mg/ml および試験溶液の 2 μ l を正確にキャピラリーで薄層プレート (Kiesel Gel 60 F-254) の下端から 2 cm の位置に塗布し、展開溶媒 (vi) で展開後風乾した。

この薄層プレートをデンストメーターで次の測定条件で測定した。

紫外分光光度法 ($\lambda_s=260$ nm, $\lambda_R=380$ nm), 測定モード: 反射ジグザグスキャニング, 測定光束: 1.25×1.25 mm, 検量線の補正: SX=3

6. GC 法による定量

GC 用試験溶液の 3 μ l を下記の GC 条件で測定し、*N*-メチルサッカリンおよび内部標準物質のピークを保持時間により定性し、ピーク高さから内部標準法により定量を行う。

GC 条件

カラム: 3% SE-30 クロモソルブ W (AW-DMCS) 60~80 mesh, カラム管: 3 mm×1.5 m ガラス製, キャリアーガス: 窒素 30 ml/min, カラム温度: 160°, 注入口および検出器温度: 200°

結果および考察

1. TLC によるサッカリンの分離条件の検討

薄層プレートとして Kiesel Gel 60 F-254, Polyamide 11 F-254 を用い、従来より人工甘味料の TLC による分離に使用されている展開溶媒 (ii), (iii), (v)¹⁷⁾, (iv)¹⁸⁾ を用いてサッカリンと共存が予想される保存料との分離を試みた。結果は Table 1 に示したようにサッカリンと保存料との分離が不十分であった。そこで新たな展開溶媒を種々検討した結果、薄層プレート Kiesel Gel 60 F-254 と展開溶媒 (i) の組合わせで良好なクロマトグラムが得られた。

次に、ここで得られた TLC 条件を、市販食品から得た試験溶液に応用し、サッカリンの定量を妨害する物質の有無を検討した。Fig. 1 で明らかなように供試した漬物類にはサッカリンを妨害するスポットの存在が認められなかったが、清涼飲料水にはサッカリンのスポットに近接する物質が存在することが認められた。

そこで、この物質 [I] を同定するために、分取用 Kiesel Gel 薄層によって同一条件で展開し、相当するスポットをかきとり、得られた [I] を直接導入法によって電子衝撃型イオン化 (EI) 法、化学イオン化 (CI) 法に

Table 1. R_f Values of Saccharin and Food Preservatives

Compound	TLC plate	A				B
		(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)
Saccharin		0.20	0.82	0.23	0.80	0.59
Salicylic acid		0.41	0.88	0.31	0.78	0.74
Sorbic acid		0.54	0.86	0.21	0.75	0.86
Benzoic acid		0.57	0.86	0.19	0.74	0.88
Dehydroacetic acid		0.62	0.81	0.28	0.75	0.61
<i>p</i> -Hydroxy benzoates		0.59~0.66	0.86~0.88	0.65	0.82	0.91~0.95

TLC plate A: Kiesel Gel 60 F-254 (silica gel)

B: polyamide 11 F-254 (polyamide)

Solvent (i): hexane—ethyl acetate—formic acid (10:10:0.15)

(ii): benzene—ethyl acetate—formic acid (10:7:3)

(iii): *n*-butanol—ammonia water (9:1)(iv): *iso*-propanol—ethanol—ammonia water—water (5:20:0.5:1)

(v): benzene—ethyl acetate—formic acid (5:10:1)

Fig. 1. Thin layer chromatogram of soft drink (1), tsubo-zuke (2), takuan-zuke (3), and saccharin and food preservatives (4)

Plate: Kiesel Gel 60 F-254

Solvent: hexane—ethyl acetate—formic acid (10:10:0.15)

Detection: UV light (254 nm)

SA: saccharin B: benzoic acid

SL: salicylic acid D: dehydroacetic acid

SO: sorbic acid PB: butyl *p*-hydroxy benzoate

Fig. 2. Mass spectra of the compound from soft drink (A) and fumaric acid (B)

えられた。そこで、フマル酸の市販品を〔I〕と同一条件で EI マススペクトルを測定したところ Fig. 2 (B) のスペクトルが得られ、〔I〕とよく一致した。また〔I〕とフマル酸は TLC 上でも一致することから、〔I〕をフマル酸と同定した。

このフマル酸は、清涼飲料水に酸味料として添加されることがある。また、かまぼこ、らっきょう漬およびさきいかなどの食品からもフマル酸が検出されたが、酸味料、pH 調整剤あるいは抗微生物補助剤として添加されたものと考えられる。

なお、つぼ漬にも R_f 値 0.1 付近に UV 吸収を示す物質が存在したが、TLC 上でサッカリンに影響が認められないので同定は行わなかった。

これまでの検討から食品中のサッカリンを TLC で分

よる質量分析を行った。EI (Fig. 2 (A)) および CI マススペクトルから〔I〕は、分子量 116 のフマル酸と考

Fig. 3. Relation between R_f values of additives and volume ratio of ethyl acetate in solvent system

Solvent system, hexane—ethyl acetate—formic acid (10:X:0.15); adsorbent, Kiesel Gel 60 F-254

離するために選定した展開溶媒 (i) では食品によく使われているフマル酸とサッカリンとの分離が不十分であることが明らかとなった。そこでさらに、この展開溶媒系の組成比について検討したところ、酢酸エチルの割合を変えることによって良好なクロマトグラムが得られた。すなわちヘキサン-酢酸エチル-ギ酸の組成のうちヘキサンとギ酸を 10:0.15 に固定し、酢酸エチルの割合を 5, 10, 20 とすると Fig. 3 に示したように 5 種類の保存料とフマル酸は酢酸エチルの割合の増加に比例して展開され高い R_f 値を示すようになることが認められたが、サッカリンおよびクエン酸はほとんどその R_f 値が変化しなかった。

このことからヘキサン-酢酸エチル-ギ酸の系で酢酸エチルの組成比を増加すれば食品中のサッカリンの分離が十分に行えることが明らかとなった。しかし、さきにつづいて検出された R_f 値 0.1 を示した未同定の物質も酢酸エチルの組成比の増加に比例して R_f 値が高くなり、サッカリンの検出位置に接近する傾向が認められた。このことから展開溶媒はヘキサン-酢酸エチル-ギ酸 (10:20:0.15) を採用することにした。

Fig. 4. Calibration curve of saccharin

2. TLC-D 法によるサッカリンの定量性の検討

サッカリンの標準溶液について 1, で採用した条件によって TLC を行い、デンストメーターで測定し、測定値 (積分値) とサッカリン量との関係を検討した。

サッカリンのスポット量 0.5~10 µg の範囲において積分値との間に直線性が認められたが、標準溶液のスポット容量によっては再現性に若干の問題があった。そこで 5 枚のプレートにサッカリン量 2 µg を 0.5, 1, 2, 5 µl のキャピラリーを用いてそれぞれ 1 回で薄層プレートに塗布し、TLC-D 法で再現性を検討した。5 回の繰り返し測定の結果、薄層プレートへの塗布容量が 0.5, 1, 5 µl のものは、変動係数が 5% 以上で若干ばらつきがみられたが、2 µl のものは 3.7% と最も安定していた。また、サッカリン量 4, 8 µg/2 µl の変動係数も 3.2, 1.5% と良好であった。スポット容量 2 µl で得られた検量線を Fig. 4 に示した。なお検出限界は 0.2 µg であった。

3. TLC-D 法と GC 法による食品中のサッカリンの定量精度の比較

TLC-D 法の定量精度を、現在実用化されている GC 法と比較するため、まずサッカリンを含まない清涼飲料水、かまぼこ、煮豆、つくだ煮および漬物について添加回収実験を行った。実験結果を Table 2 に示した。TLC-D 法による定量値は GC 法に比較してやや低い傾向にあ

Table 2. Recovery of Added Saccharin by TLC-Densitometry and Gas Chromatography

Added (mg/kg)	TLC-densitometry			Gas chromatography			TLC-D/GC
	Found (mg/kg)	C.V. ^{a)} (%)	Recovery (%)	Found (mg/kg)	C.V. ^{a)} (%)	Recovery (%)	
Soft drink 150	140	2.0	93.3	148	1.8	98.7	0.95
Kamaboko 150	137	3.1	91.3	144	3.5	96.0	0.95
Soybean (cooked) 350	316	3.6	90.3	337	2.2	96.3	0.94
Tsukudani 350	305	2.3	87.1	308	3.3	88.0	0.99
Tsukemono 700	596	3.9	85.1	606	3.1	86.6	0.98

^{a)} $n=5$

Table 3. Analytical Values Obtained by TLC-Densitometry and Gas Chromatography

Sample food		TLC-densitometry	Gas chromatography	TLC-D/GC
Takuan-zuke	1	125 mg/kg	132 mg/kg	0.95
	2	250	257	0.97
	3	577	583	0.99
	4	420	416	1.01
	5	280	304	0.92
Kasu-zuke	1	517	505	1.02
	2	677	682	0.99
Su-zuke	1	119	129	0.92
	2	317	339	0.94
Soft drink	1	120	122	0.98
	2	246	258	0.95
	3	135	132	1.02
Kamaboko		78	78	1.00
Tsukudani		90	90	1.00

ったが、両法の比は 0.94~0.99 とよく一致しており、5 回の繰り返し測定による変動も TLC-D 法では 2.0~3.9%, GC 法では 1.8~3.5% とほぼ同程度であった。また回収率は TLC-D 法では 85.1~93.3%, GC 法では 86.6~98.7% と食品別にばらつきが見られるが、両法ともに同じ傾向であることから食品の種類によってサッカリンの抽出に工夫を要することを示唆するものと考えられる。

次にサッカリンが添加されている市販食品14種に本法および GC 法を応用した。結果は Table 3 に示したとおりで、TLC-D 法による定量値は、GC 法による定量値に非常によく一致しており、両法の定量値の相関係数は 0.999 であった。

ま と め

薄層クロマトグラフィー・デンストメトリーによるサッカリンの分析法を検討したところ、良好な定量性が認められた。本法による回収率は、85.1~93.3% であり、市販食品へ応用した場合の定量値も、現在実用化されている GC 法とよく一致した。また本法は、操作が簡単で分析時間も短く、危険性を伴うメチル化剤を使用しないことなど、日常業務の分析方法として適していると思われる。

謝 辞

本研究に当たり、御助言御指導をいただいた広島県衛生研究所森本一義博士をはじめ研究員各位に深謝いたします。

なお本研究の要旨は日本食品衛生学会第40回学術講演会(1980年10月、長野)において発表した。

文 献

- 1) Groebel, W.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch.

129, 153~155 (1966).

- 2) Daun, R. J.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 54, 1140~1145 (1971).
- 3) Gerstl, R., Ranfft, K.: Z. Anal. Chem. 258, 110~114 (1972).
- 4) 黒田弘之, 広瀬秀雄: 食衛誌. 12, 322~325 (1971).
- 5) 永井 勇, 岡 日出生, 田坂美和子, 岡 新: 衛生化学, 21, 261~266 (1975).
- 6) 高槻圭悟, 堺 敬一: 食衛誌. 21, 476~479 (1980).
- 7) 厚生省環境衛生局食品化学課: 食品中の添加物分析法, 第 I 集, (昭和 51 年 2 月).
- 8) Nelson, J. J.: J. Chromatog. Sci., 11, 28~35 (1973).
- 9) 田中之雄, 池辺克彦, 田中凉一, 国田信治: 食衛誌. 16, 295~300 (1975).
- 10) 上田雅彦, 間崎真典: 同上, 18, 278~282 (1977).
- 11) 北田善三, 玉瀬喜久雄, 佐々木美智子, 西川喜孝, 谷川 薫: 同上, 21, 480~484 (1980).
- 12) Salo, T., Airo, E., Salominen, K.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 125, 20~22 (1964).
- 13) Shildknecht, E., Konig, H.: Z. Anal. Chem. 207, 269~270 (1965).
- 14) 菰田太郎, 竹下隆三: 衛生化学, 13, 204~206 (1967).
- 15) 林 敏夫, 渡辺晴美, 山本美沙子, 谷村顕雄: 食衛誌. 11, 93~97 (1970).
- 16) 児王陽太郎, 新谷恵子, 森本一義: 広島県衛研・公害研・研究報告. 21, 29~30 (1974).
- 17) 日本薬学会編: “衛生 試験法・注解” p. 331~333 (1980) 金原出版.
- 18) 竹下隆三編: “薄層クロマトグラフィー基礎と応用-” (石川正幸他編) XVI 食品添加物, p. 231~249 (1968) 南山堂.