食品の保存料, 人工甘味料等の衛生化学的研究 (第5報)

製剤ならびに食品中の人工甘味料のペーパークロマトグラフィーによる検出

(昭和37年11月28日受理)

菰田 太郎* 竹下 隆三*

Studies on Food Additives (Food Preservatives, Artificial Sweeteners, etc.) (V)

Detection of Artificial Sweeteners (Saccharin, Cyclohexane Sulfamic Acid and Dulcin) in their Preparations and Food

Taro KOMODA and Ryuzo TAKESHITA

(National Institute of Public Health : Shirogane-dai-machi, Shiba, Minato-ku, Tokyo)

A solution containing saccharin, cyclohexane sulfamic acid and dulcin which have been obtained from a preparation or food is allowed to stand in a centrifugal tube for 10 minutes with Amberlite CG 400 Type I (Cl-form) with shaking sometimes and centrifuged. The elution of saccharin and cyclohexane sulfamic acid from the resins is carried out by means of a mixture of 10 % oxalic acid and alcohol. The eluate is neutralized with aqueous ammonia and applied to the paper chromatography. Dulcin is obtained by extracting the supernatant with ethylacetate.

Saccharin, cyclohexane sulfamic acid and dulcin are detected by the ascending paper chromatography with *iso*-amyl alcohol-pyridine-water, or *n*-butanol-aqueous ammonia. In order to identify these artificial sweeteners when they are accompanied with some food preservatives, such as salicylic acid, benzoic acid, sorbic acid, etc., the former solvent is an excellent one as a developer.

(Received November 28, 1962)

人工甘味料として使用されているサッカリン, サイクラミン酸およびズルチンの抽出には, 一般にエーテルまたは酢酸エチルなどの有機溶媒抽出が行なわれているが, 界面活性剤を使用している製剤または食品については, 有機溶媒で抽出することがかなり困難な場合が多い。

そこで著者らは, 強塩基イオン交換樹脂 (Amberlite CG 400 I 型 (Cl 型)) を用いてサッカリンおよびサイクラミン酸を吸着させ, その樹脂から両者をシュウ酸で溶出させ, ペーパークロマトグラフィーによって同定した。ズルチンは水溶液中に残存するので, これを酢酸エチルで抽出する。抽出の際乳化するときは, 水溶液に無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥し, 酢酸エチルで抽出

する。酢酸エチルを留去したのち, ペーパークロマトグラフィーによって同定を行ない (Fig. 1), 良好な結果を得たのでここに報告する。

実験の部

装置 ① Fig. 2 のようなガラス管の一端を引き延ばし, その下端部に極く少量の脱脂綿をつめたもの

② ペーパークロマトグラフィー装置 (上昇法)

③ 紫外線発生装置 (Manaslu-Light UV-S1 (2536 Å))

試薬 ① イオン交換樹脂: Amberlite IR 120 (H

* 国立公衆衛生院: 東京都港区芝白台町1-39

Fig. 1. Analysis of artificial sweeteners in their preparations and food

型)および Amberlite CG 400 I 型 (Cl 型)

② シュウ酸アルコール溶液:
10% シュウ酸・アルコール (1
: 1) の混液

③ 標準溶液

(i) サッカリンおよびサイ
クラミン酸標準溶液: サッカ
リンナトリウム 50 mg およ
びサイクラミン酸ナトリウム
50 mg を、それぞれ水 2 ml に溶
かし、Amberlite IR 120 (H
型) 0.5~1 ml を加え、ときど
きふりまぜて 5 分間放置したの

Fig. 2.

ち、アルコール 2 ml を加え、ろ過してイオン交換樹脂
を除き、ろ液をアンモニア水で中和またはアルカリ性
とし、水を加えて 5 ml とする。

(ii) ズルチン標準溶液: ズルチン 20 mg をアル
コール 5 ml に溶かす。

④ 展開液

(i) iso-アミルアルコール: ピリジン: 水 (3: 2:
1.5) の割合によく混和し、その有機溶媒層を用いる。

(ii) n-ブチルアルコール: 強アンモニア水¹⁾ (4:
1)²⁾

⑤ 発色液

(i) α-ナフチルアミン試液¹⁾²⁾: α-ナフチルアミン
の 0.1% アルコール溶液 100 ml に、飽和酢酸銅溶液 4
~5 滴および氷酢酸 2~3 滴を加える。用時調製する。

(ii) *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液²⁾²³⁾:
p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1 g を 1 N 塩酸 100 ml に溶かす。

(iii) メチルレッド試液: メチルレッドの 0.1% アルコール溶液 10 ml に, Sørensen のリン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml を加える。

試験溶液の調製 サッカリンナトリウム 2~5 mg, サイクラミン酸ナトリウム 5~10 mg およびズルチン 2 mg に対応する試料をとる。

i) 液体試料: 試料中に炭酸またはアルコールを含むものは、液性を pH 6 程度にし、水浴中で加熱して炭酸またはアルコールを除く。また繊維質を含むものは遠心分離してこれを除く。この溶液を遠心分離管に入れ、これに Amberlite CG 400 I 型 (Cl 型) 0.2 ml を加え、センをして、ときどきふりまぜて 10 分間放置する。これを遠心分離し、上層を分液漏斗に移し、イオン交換樹脂の部分の水 5~10 ml を用いて遠心分離管内で 2 回水洗し、そのつど遠心分離し、全水溶液を分液漏斗に合わせる。さらに 50% アルコール 10 ml で樹脂を洗って同様に遠心分離し、ズルチンの含有量が非常に少ないときは、このアルコール洗液中のアルコールを除いたのち、分液漏斗中に合わせる。

これに塩化ナトリウムを加えて飽和させたのち、酢酸エチル 20~30 ml で抽出する。酢酸エチルで抽出する際、乳化する試料の場合は、その水溶液部分の約 3 倍量の無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥したのち、酢酸エチル 50 ml で抽出する。酢酸エチル溶液を減圧濃縮してほとんど乾固し、残留物をアルコール 0.1~0.5 ml に溶かし、ズルチンについてペーパークロマトグラフィーを行なう。

別に Fig. 2 のようなガラス管に、50% アルコールで洗浄したイオン交換樹脂を、50% アルコールとともにため、液が切れるときに、これにシュウ酸アルコール溶液 0.5~1 ml を加えて溶出する。溶出液の液性を pH 試験紙 (東洋ロ紙製 IPB または BPB) で検し、酸性になってから溶出液 0.1~0.2 ml を分取する。溶出液をそのまま、または強アンモニア水で中和またはアルカリ性とし、サッカリンおよびサイクラミン酸についてペーパークロマトグラフィーを行なう。

ii) 固体試料: 試料を細かく砕き、水 30~50 ml を加えてさらによくすりつぶす。これをろ過するかまたは遠心分離し、液体の部分について液体試料と同様に操作する。

ペーパークロマトグラフィーによる検出 ペーパークロマトグラフィー用東洋ロ紙 No. 51 (2×4 cm) の下端から 3 cm の原線中央に、試験溶液 0.001~0.002 ml をつける。同様に別のロ紙に各標準溶液 0.001~0.002 ml ずつをつけて対照とする。なおズルチンの検出の場合、試料中に多量の界面活性剤などが共存すると、ズルチン

の R_f が標準ズルチンの R_f と一致しないことがあるので、別のロ紙の原点に試験溶液とズルチン標準溶液とを同時につけて、試料中のズルチンが同一の斑点になるか否かを観察する。

展開は展開液 (i) および (ii) を用いて常法に従って上昇法で行なう。展開が終つたならば風乾し、紫外線発生装置を用いて各人工甘味料の紫外外部吸収を観察し、また発色液による呈色によって R_f を求める。

紫外線照射によってサイクラミン酸およびズルチンは紫外外部吸収を示し、サッカリンは白色蛍光を発する。また発色液による呈色で、サッカリンの発色は α -ナフチルアミン試液を噴霧し、室温で乾かすと赤紫色の斑点を生ずる。サッカリンまたはサイクラミン酸はメチルレッド試液を噴霧すると、黄色のロ紙に赤色の斑点を生ずる。ズルチンの発色は、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧して乾かすと、黄色の斑点を生ずる。

結果および考察

(1) 保存料が共存する人工甘味料のペーパークロマトグラフィーによる検出 製剤または食品中に、保存料として安息香酸、ソルビン酸、サリチル酸などが共存している場合、人工甘味料のペーパークロマトグラフィーによる検出に使用している展開用溶媒の *n*-ブターノール: アンモニア水¹⁾ (4:1)²⁾ では、サッカリンおよびサイクラミン酸の R_f が安息香酸、ソルビン酸およびサリチル酸の R_f と近似し、またサイクラミン酸に特異的な発色液がないため、これの検出がむづかしい (Table 1)。しかしながら展開用溶媒に *iso*-アミルアルコール: ピリジン: 水 (3:2:1.5) の混液を使用したときは、サッカリンおよびサイクラミン酸の R_f が、上記の保存料の R_f とかなり相違し、しかも人工甘味料間の分離能も比較的良好な結果を得た。

(2) 人工甘味料のペーパークロマトグラフィーによる発色 ズルチンの発色試薬として、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド²⁾ が呈色の感度もよく、すぐれているがサッカリンおよびサイクラミン酸には、すぐれた発色試薬が見いだせない。例えば硝酸銀溶液を噴霧したのち、ピロガロール溶液を噴霧して淡かっ色の背景に白色の斑点を得る方法²⁾ があるが、硝酸銀の噴霧する度合がかなり発色に影響し、必ずしも良好な斑点が得られないし、またサッカリンおよびサイクラミン酸以外の物質で銀塩を形成するものなども発色する欠点がある。メチルレッド試液を使用しても、人工甘味料のほかは酸性物質も呈色する欠点はあるが、発色条件の複雑さはなくなる。また発色後放置して、赤色斑点が消失した場合でも再びアンモニアにロ紙をかざすことによって赤色の斑点を再現できる利点がある。

発色試薬による検出のほか、紫外線吸収による方法では、ズルチンでは非常に感度がよく、明確に吸収斑点

Table 1. Paper Chromatography of Artificial Sweeteners and the Other Related Compounds

	Solvent	Artificial sweeteners							Dulcin	Food preservatives					Other compounds		
		Saccharin			Cyclohexane sulfamic acid					Salicylic acid	Benzoic acid	Sorbic acid	<i>p</i> -Hydroxy benzoic acid	Dehydro acetic acid	Tartaric acid	Citric acid	Ammonium chloride
			NH ₄ salt	Na salt		NH ₄ salt	Na salt	Ca salt									
Rf	(i)	0.46	0.46	0.44	0.39	0.39	0.39	0.38	0.86	0.57	0.69	0.76	0.79	0.85	0.02	0.05	0.13
	(ii)	0.47	0.47	0.34	0.47	0.48	0.40	0.40	0.80	0.50	0.45	0.50	0.07	0.62	0.02	0	0.15

The compounds were chromatographed at 15 ~ 20°C.

が観察され (ズルチンの紫外吸収波長 235 mμ), サッカリンは白色螢光斑点を示し, サイクラミン酸も感度はズルチンおよびサッカリンほどではないが, 吸収斑点が観察される。特にサッカリンおよびサイクラミン酸の判定に際し, R_f が類似している場合でも, 紫外線照射時における両者の相違とメチルレッド試液による発色との組合わせによって両者の判定が容易になる。

(3) イオン交換樹脂 Amberlite CG 400 I 型 (CI 型) による人工甘味料の吸着 サッカリンナトリウム 5~10 mg およびサイクラミン酸ナトリウム 10~50 mg を含む水溶液 20~50 ml を遠心分離管にとり, これに Amberlite CG 400 I 型 (CI 型) 0.2 ml を入れ, ときどきふりまぜて 10 分間放置すると, ほとんど完全にこれら人工甘味料が吸着される。一方ズルチンもイオン交換樹脂に分子吸着する。吸着量はズルチン 2 mg で同様に処理したとき, 約 1/3 が吸着される。しかし吸着されたズルチンは 50% アルコールで樹脂を洗うことにより, かなり溶出されて水溶液に移行する。

試料中にサッカリンおよびサイクラミン酸以外の共存酸性物質例えばアスコルビン酸, 酒石酸, クエン酸などが存在していても, Amberlite CG 400 の交換容量が大きいので, これらの物質が相当多量に含まれていなければ, サッカリンおよびサイクラミン酸の吸着に影響しない。

人工甘味料が吸着されたかどうかは, 樹脂とふりまぜたのち, 水層の液性を検して判断し, 樹脂が不足する場合は, 極く少量ずつ加えてそのつど充分ふりまぜる。

またこの方法によって界面活性剤が共存している試料でも, サッカリンおよびサイクラミン酸を充分捕集できる。

(4) サッカリンおよびサイクラミン酸を吸着した樹脂から両者の溶出 サイクラミン酸を捕集した樹脂を, Fig. 2 のようなガラス管でカラムを作り, 10% シュウ酸: アルコール (1:1) の混液で溶出すると, Fig. 3 に示すように, 両者はほとんど同時に溶出されて溶出液 0.5 ml 中に大部分が含まれる。しかし試料中のサッカリ

Fig. 3. Elution of saccharin and cyclohexane sulfamic acid from Amberlite CG 400 (CI-) by means of a mixture of 10% oxalic acid and alcohol

ンおよびサイクラミン酸の含有量が少ないとき, または共存酸性物質の含有量が多いときは樹脂量が多くなり, 溶出液を初めから 0.5 ml 分取することは必ずしも適当でないので, これらの場合には, 溶出液の液性を検して酸性になってから, ただちに溶出液を捕集して 0.2~0.3 ml を分取すればよい。

(5) 食品中の人工甘味料のペーパークロマトグラフィー ズルチンは Amberlite CG 400 (CI 型) に分子吸着し多少吸着されるが, 樹脂を希アルコールで洗浄すれば, 容易に溶離させることができる。ズルチンを含有する水溶液からズルチンを抽出するには, 酢酸エチルで抽出できる。しかしながらこの抽出の際乳化するときは, 溶液に無水硫酸ナトリウムを加え, 乾燥して酢酸エチルで抽出すれば乳化の心配はなくなり, かつ少量の酢酸エチルで充分抽出ができる。

食品としてサイダー, あん, ジャム, 牛乳およびアイスクリームを用い, それぞれにズルチン 5 mg を添加して操作し, ペーパークロマトグラフィーによって検出したところ, 界面活性剤を多量に含有する試料では R_f に多少の影響がみられるが, *o*-ジメチルアミノベンズアルデヒドによる判定およびペーパークロマトグラフィーにおける標準ズルチン溶液の添加試験によって容易に判定

できる。

他方、食品としてジュース、ジャム、あん、牛乳およびアイスクリームを用い、それぞれにサッカリンナトリウム 5 mg およびサイクラミン酸ナトリウム 10 mg を添加し、同様に操作し、ペーパークロマトグラフィーを行ない、それぞれの Rf を求めたところ、それらの Rf は標準サッカリンおよび標準サイクラミン酸の Rf とよく一致する結果を得た。しかしながらメチルレッド試液で発色させるときは、他の共存酸性物質、溶出液中のシュウ酸およびイオン交換樹脂からの塩素イオンの斑点が観察されるため、紫外線照射下での観察を発色前に行なう必要がある。展開溶媒 (i) および (ii) を用いたときのシュウ酸、塩素イオン、酒石酸およびクエン酸の Rf を Table 1 に附記する。

結 論

1. 製剤ならびに食品中の人工甘味料を分別する方法として、イオン交換樹脂 Amberlite CG 400 (C1 型) を用いることによって、サッカリンおよびサイクラミン酸を容易に、かつかなり高濃度に捕集することができる。

2. 人工甘味料が保存料と共存している場合でも、ペーパークロマトグラフィーによって検出することが可能である。

文 献

- 1) Angelo Castiglioni : Pubbl. univ. cattolica S. Cuore, Ann. fac. agar. Ser. 5, Atti convegno appl. tec. cromatogr. prod. agar. 53, 80 (1957).
- 2) 三橋 靖, 小林文子 : 衛生化学 7, 12 (1959).
- 3) J. Deshusses, P. Desbaumes : Mitt. Gebiete Lebensm. u. Hyg. 47, 264 (1956).