高速液体クロマトグラフィーによる食品中の サイクラミン酸の分析

(平成4年12月15日受理)

中里 光男* 斉藤 和夫* 石川ふさ子*
藤沼 賢司* 守安 貴子* 二島太一郎*

Determination of Cyclamate in Foods by High Performance Liquid Chromatography

Mitsuo NAKAZATO, Kazuo SAITO, Fusako ISHIKAWA, Kenji FUJINUMA,
Takako MORIYASU and Taichiro NISHIMA

(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan)

A simple and widely applicable method for the determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography was developed.

The sample was dialyzed with 0.02 *N* hydrochloric acid for 48 hours. Tetra-*n*-butylammonium bromide was added to the dialyzate, then the sample solution was adjusted to pH 4.0~5.0 and passed through a Mega Bond Elut C₁₈ cartridge. Cyclamate was eluted with a mixture of acetonitrile-water (3:7). Cyclamate in the eluate was converted into *N,N*-dichlorocyclohexylamine by reaction with sodium hypochlorite; the eluate was acidified with 50% sulfuric acid, then *n*-hexane and sodium hypochlorite solution were added, and the mixture was shaken to form *N,N*-dichlorocyclohexylamine. The *n*-hexane layer was shaken with sodium hydrogen carbonate solution to remove free chlorine. The *N,N*-dichlorocyclohexylamine in the *n*-hexane layer was separated on a Finepak SIL C18T-5 column with a mobile phase of methanol-water (8:2) and detected at 314 nm.

The recoveries of cyclamate added at the levels of 50 and 500 µg/g to various kinds of foods were 96.5~100% and 94.8~98.8%, respectively. The detection limit of cyclamate was 10 µg/g. This method seems to be very well suited for routine analysis.

(Received December 15, 1992)

Key words: サイクラミン酸 cyclamate; 合成甘味料 artificial sweetener; *N,N*-ジクロロシクロヘキシルアミン *N,N*-dichlorocyclohexylamine; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 臭化テトラブチルアンモニウム tetra-*n*-butylammonium bromide

はじめに

サイクラミン酸のナトリウム及びカルシウム塩は、我が国では1956年から食品添加物として用いられてきたが、アメリカでラットに膀胱ガンを発生させる疑いがあるとのデータが公表されたことから、1969年に我が国での使用が禁止され、以来現在も使用が認められていない¹⁾。

しかし、中国、台湾及びドイツをはじめとするヨーロッパ諸国では、食品添加物としての使用を許可しており¹⁾、従って、これらの国からサイクラミン酸塩を使用した食品が輸入される可能性は極めて高く、その使用のため輸入不適格となる事例が数件発生している^{2), 3)}。特に、1984年には、東京都内の中華料理店及び中華材料販売業者間に流通していた台湾産の話梅(ホアメイ)からサッカリン、ズルチンと共にサイクラミン酸が検出され、指定外合成甘味料の不正使用事件として問題となっ

* 東京都立衛生研究所: 〒169 東京都新宿区百人町 3-24-1

た⁴⁾。

食品中のサイクラミン酸の分析法としては、従来、ガスクロマトグラフィーによる方法が一般的であったが^{5)~7)}、ガスクロマトグラフィーによる方法は前処理としての誘導体化操作が極めて煩雑であり、かつ長時間を要するという欠点があった。近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析法がいくつか報告された。そのうちサイクラミン酸を分解して cyclohexylamine とした後、これに 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F)⁸⁾ あるいは *o*-phthalaldehyde^{9), 10)} を作用させて誘導体とした後、紫外吸収検出器あるいは蛍光検出器付きの HPLC で測定する方法は、検出感度は優れているが、誘導体化操作が煩雑である。一方、Lehr 及び Schmid¹¹⁾ はサイクラミン酸を強酸性溶液中で塩素処理を行うと 210 nm 及び 314 nm 付近に比較的強い吸収をもつ *N*, *N*-dichlorocyclohexylamine に変換することができることに着目し^{12), 13)}、清涼飲料水中のサイクラミン酸の分析に応用した。この方法は操作が極めて簡便であり、日常的な検体の処理には非常に有利であると考えられた。

そこで、著者らは、この方法を一般食品中のサイクラミン酸の分析に適用するために、試料の前処理、*N*, *N*-dichlorocyclohexylamine の生成及び HPLC での分離条件などについて検討したので報告する。

実験方法

1. 試 薬

1) 標準溶液: サイクラミン酸ナトリウム (シクロヘキシルアミドスルホン酸ナトリウム, 特級, 和光純薬工業(株)製) 565 mg を精ひょうし、水に溶解して全量 100 ml としたものを標準原液 (サイクラミン酸として 5.0 mg/ml) とし、これを段階的に希釈して標準溶液とした。

2) 透析用溶液: 塩化ナトリウム 25 g を 0.02 *N* 塩酸に溶解して 1,000 ml とした。

3) 透析膜: 透析用セルロースチューブ 36/32 (平面幅 43 mm, 直径 27 mm, 膜厚 0.0203 mm, Viskase sales 社製) を用いた。

4) リン酸塩緩衝液: 0.2 *M* リン酸水素二ナトリウム溶液 62 ml と 0.2 *M* リン酸二水素ナトリウム 438 ml を混合し、更に 1,000 ml に希釈し、pH 6.0 の緩衝液を調製した。

5) イオン対試薬: 臭化テトラブチルアンモニウム (TBA, ナカライテスク(株)製) を用いた。

6) 前処理用カートリッジ: Mega Bond Elut C₁₈ (充てん量 2 g, Varian 社製) を用いた。また、このカートリッジは使用前にアセトニトリル 10 ml, 水 10 ml 及び 0.01 *M* TBA 溶液 5 ml で洗浄した。

7) 次亜塩素酸ナトリウム溶液: 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (化学用, 有効塩素 5.0% 以上, 和光純薬工業(株)製) を 2 倍に希釈したものをを用いた。なお、有効塩

素の濃度については滴定法¹⁴⁾によって標定し、5.0% 以上であることを確認した。

8) その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. 装 置

高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業(株)製 880-PU 型ポンプ, 同 875-UV 型紫外可視分光検出器, (株)島津製作所製 C-R6A 型データ処理装置及びレオダイン社製 7125 インジェクターにより構成した。

3. HPLC 条件

カラム: Finepak SIL C18T-5 (日本分光工業(株)製, 5 μ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm), 移動相: メタノール-水 (8:2) 混液, 流速: 1.0 ml/min, 検出波長: 314 nm, カラム温度: 室温, 注入量: 10 μ l。

4. 試験溶液の調製

1) クリーンアップ用試料溶液の調製: 液状試料については、その 5.0 g に 0.1 *M* TBA 溶液 5 ml 及びリン酸塩緩衝液 10 ml を加えてよくかく拌したものをクリーンアップ用試料溶液とした。固形試料は細切あるいはすりつぶした後、その 20 g を取り、20 ml の透析用溶液を加えて流動状とした後、少量の透析用溶液で透析膜に充てんし、上端を密封した。これをメスシリンダー中に入れ、透析用溶液で全量を 200 ml とし、ときどき揺り動かしながら常温で 48 時間透析を行った。透析終了後、その 25 ml を分取し、0.1 *M* TBA 溶液 5 ml 及びリン酸塩緩衝液 20 ml を加えてよくかく拌したものをクリーンアップ用試料溶液とした。

2) クリーンアップ: クリーンアップ用試料溶液の全量を Mega Bond Elut C₁₈ カートリッジに毎分 3~4 ml の速度で負荷し、次いで水 30 ml で洗浄した後、アセトニトリル-水 (3:7) 混液 10 ml を用いて溶出した。得られた溶出液を誘導体作製用の試料とした。

3) 反応操作: 誘導体作製用の試料全量を分液漏斗に取り、これに 50% 硫酸 2 ml 及び *n*-ヘキサン 5.0 ml を加えた後、次亜塩素酸ナトリウム溶液 1 ml を加えて 1 分間激しく振とうした。更に、水層を除去した後、*n*-ヘキサン層に 5% 炭酸水素ナトリウム溶液 25 ml を加えて 1 分間振とうした。続いて水層を除去した後、*n*-ヘキサン層を試験管に分取し HPLC 用の試験溶液とした。

5. 検 量 線

5.0, 10, 50, 100, 300 及び 500 μ g/ml の標準溶液を調製し、その各々 10 ml を反応操作の項に従って操作した後、その 10 μ l を HPLC に付し、ピーク面積法により検量線を作成した。

結果及び考察

1. クリーンアップ

サイクラミン酸の試料からの抽出法としては、従来から透析法が繁用されており、固形試料については、以後の処理が容易であることから透析法で行うことにした⁵⁾。なお、透析時間については 24 時間ではビスケッ

ト、コーンフレークなどの穀類加工品の試料でやや回収率の低い傾向が認められたが、36 時間以上ではほぼ一定の良好な回収率が得られたことから、透析時間は 48 時間とした。また、透析液をそのまま本法に従って処理し、HPLC に付した場合、目的物のピーク付近に夾雑ピークが出現し、これによって定量が困難となる場合があった。そこで、透析液のクリーンアップに関してカートリッジを用いた固相抽出法について検討した。

Lehr 及び Schmid¹¹⁾ は清涼飲料水中からのサイクラミン酸の分析に当たり、クリーンアップ操作として BAKERBOND spe NH₂/NH カートリッジを用いたイオン交換モードでの方法を提案している。しかし、著者らがこのカートリッジを用いて検討したところ、試料中の塩濃度が増加すると回収率が低下するため、本法のクリーンアップに用いるには不適當であった。そこで、逆相モードのカートリッジを用いて検討することとし、カートリッジとして Mega Bond Elut C₁₈ を用い、サイクラミン酸の保持及び溶出条件について検討した。なお、カートリッジの充てん量は 2 g のものを用いた。

サイクラミン酸の Mega Bond Elut C₁₈ カートリッジへの保持について検討した結果、サイクラミン酸は強酸性物質であるため透析液をそのままカートリッジに付加

してもほとんど保持されなかった。そこで、サイクラミン酸の保持にイオン対試薬を用い、イオン対として保持させることにした。イオン対試薬としては、一般的に良く使用される TBA を用いることとし、イオン対の形成に及ぼす試料溶液の pH の影響について検討した。

その結果、負荷試料の pH を 1.8~7.0 に調整した際には添加したサイクラミン酸 (5,000 μ g) のほぼ全量がカートリッジから回収されたが、pH 1.8 以下になるとサイクラミン酸の回収率が徐々に低下し、pH 1.0 での回収率は約 50% であることが分かった。これは pH の低下に伴ってイオン対を形成しない非解離状態のサイクラミン酸が増加し、これがいったんはカートリッジに保持されても次の水洗行程で解離し、カートリッジから溶出するため、結果的に回収率が低下したものであると考えられる。従って、試料溶液の pH を弱酸性~中性付近に調整する必要がある、本法ではリン酸塩緩衝液を用いてクリーンアップ用試料の pH を 4.0~5.0 前後に調整することにした。

溶出溶媒についてはこれをそのまま反応溶媒とすると操作が大幅に簡略化できること、また、直ちに反応物質を *n*-ヘキサンに抽出することなどを考慮すると、アセトニトリル-水系が適當であると考えられた。そこで、溶出

Fig. 1. Effect of concentration of available chlorine on production of *N,N*-dichlorocyclohexylamine

Each 1 ml of sodium hypochlorite solutions of various concentrations as available chlorine was added to distilled water and apple juice contained 500 μ g/g of cyclamate, and *N,N*-dichlorocyclohexylamine was determined by HPLC.

—○—: distilled water; —●—: apple juice

溶媒として用いるアセトニトリル-水混液の最適組成比について検討した。その結果、溶出液量を各 10 ml とした場合、アセトニトリル-水 (1:9) 混液ではサイクラミン酸は全く溶出しなかったが、(2:8) 混液では 58% 溶出し、更に、3:7 以上ではサイクラミン酸のほぼ全量がカラムから溶出することが分かった。従って、後の操作を考慮して溶出溶媒の混合比はアセトニトリルの比率が最も小さい 3:7 とした。

次に溶出溶媒の組成を 3:7 とした際のサイクラミン酸を溶出するのに必要な溶出液量について検討したところ、サイクラミン酸は 8 ml でほぼ全量溶出したので溶出液量は 10 ml とした。

2. *N,N*-dichlorocyclohexylamine の生成条件

N,N-dichlorocyclohexylamine の生成に必要な次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加量について検討した。すなわち、試料として 100% りんごジュース及び対照として蒸留水を用い、その各々 5.0 g にサイクラミン酸を 2,500 μ g 添加し、これに *n*-ヘキサン 5.0 ml, 50% 硫酸 2 ml 及び有効塩素量を数種の濃度に調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液の各々 1.0 ml を加えて振とうしたものについて *N,N*-dichlorocyclohexylamine の生成量を調べた。その結果を Fig. 1 に示した。

蒸留水中で反応させたものではサイクラミン酸は有効塩素濃度約 0.25% の溶液の添加でほぼ 100% 反応したのに対し、りんごジュースに添加したものでは、サイクラミン酸がほぼ 100% 反応するのに有効塩素濃度 0.75% の溶液の添加が必要であった。これは試料中の共存成分によって塩素が消費されることを示しているが、本法では反応操作を行う前に Mega Bond Elut C₁₈ カートリッジによるクリーンアップが行われることから、試料成分によって極端に塩素が消費されることはないものと考えられる。しかし、Mega Bond Elut C₁₈ カートリッジにサイクラミン酸を負荷する際に添加される TBA はそれ自身が塩素を消費することから、大量に存在すると本反応を妨害することが分かった。従って、過剰の TBA はあらかじめ除いておく必要があり、Mega Bond Elut C₁₈ カートリッジの洗浄に際しては水 30 ml を流すことで、過剰の TBA を除去することにした。

以上の結果から、反応系に添加する次亜塩素酸ナトリウム溶液の量は、市販の有効塩素 5.0% 以上のものを 2 倍に希釈したもの 1.0 ml とすることにした。また、本反応は蒸留水中で行った場合にも、アセトニトリル-水 (3:7) 混液中で行った場合にも回収率に全く差異は認められなかった。なお、生成した *N,N*-dichlorocyclohexylamine は揮発性があるため、反応系にあらかじめ抽出溶媒である *n*-ヘキサンを加えておき生成物を直ちに抽出する必要がある。

3. HPLC 条件

1) カラム及び移動相

Lehr 及び Schmid¹¹⁾ は分析カラムに逆相タイプの Nucleosil C₁₈、移動相にメタノール-水 (8:2) 混液、流速 1.0 ml、検出は UV 314 nm で *n*-ヘキサン層を直接注入する方法で良好な結果を得ている。著者らもこれに準じ

Fig. 2. High performance liquid chromatogram of *N,N*-dichlorocyclohexylamine
HPLC conditions, column: Finepak SIL C18T-5 (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.); mobile phase: methanol-water (8:2); flow rate: 1.0 ml/min; detection: UV314 nm; injection volume: 10 μ l

Fig. 3. Absorption spectrum of *N,N*-dichlorocyclohexylamine in methanol-water (8:2)

て HPLC 条件を設定することにした。すなわち、カラムに Finepak SIL C18T-5 を用いて移動相条件を検討したところ、メタノール-水 (8:2) 混液、流速 1.0 ml の条件で保持時間約 8.0 分 (κ' =7.0) の位置に *N,N*-dichlorocyclohexylamine のピークを検出できた。メタノール-水 (8:2) 混液を用いた場合の標準品のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

また、アセトニトリル-水系を用いて検討したところ、

Table 1. Recoveries of Cyclamate from Foods

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (Mean $\pm$ SD)
Apple juice	500	98.0 $\pm$ 2.0
	50.0	100 $\pm$ 1.6
Strawberry jam	500	98.8 $\pm$ 3.4
	50.0	99.8 $\pm$ 2.7
Cornflakes	500	95.1 $\pm$ 1.8
	50.0	96.5 $\pm$ 1.6
Cracker	500	95.9 $\pm$ 1.7
	50.0	98.4 $\pm$ 2.2
Biscuit	500	94.8 $\pm$ 1.8
	50.0	98.4 $\pm$ 3.7
Chocolate	500	96.4 $\pm$ 1.6
	50.0	96.7 $\pm$ 1.6
Dried fruit (Ume)	500	98.4 $\pm$ 2.2
	50.0	99.4 $\pm$ 2.0
Worcester sauce	500	97.1 $\pm$ 2.4
	50.0	98.9 $\pm$ 3.0

$n=3$

アセトニトリル-水 (7:3) 混液の流速 1.0 ml の条件で、メタノール-水 (8:2) 混液の場合とほぼ同様のクロマトグラムが得られた。

2) 検出波長

N,N-dichlorocyclohexylamine の紫外吸収スペクトルを Fig. 3 に示した。

N,N-dichlorocyclohexylamine は 210 nm 付近に極めて強い吸収を有しているため、検出波長を 210 nm に設定して検討したところ、HPLC のベースラインの変動がやや大きく、また、この波長に吸収を持つ物質が多いため、夾雑ピークの数が多いことが分かった。一方、314 nm に設定した場合には、検出器の感度を上げてベースラインは比較的安定しており、また、夾雑ピークは極めて少ないことが分かった。従って、210 nm で測定した場合と 314 nm でさらに検出器の感度を上げて測定した場合とを比較しても、両者の検出限界はほとんど同じであったことから、検出は夾雑ピークのより少ない 314 nm で行うことにした。

4. 検量線

サイクラミン酸の 5.0~500 $\mu\text{g/ml}$ の標準溶液 10 ml を本法に従って操作し、検量線を作成したところ直線性を示した。なお、繰り返し精度は 500 $\mu\text{g/ml}$ の標準溶液 10 μl を 7 回繰り返し測定した際、相対標準偏差 (RSD) として 0.5% 以下であった。また、本法における定量限界は試料中濃度として 10 $\mu\text{g/g}$ であった。

5. 添加回収実験

ジュース、ジャム、乾燥果実 (話梅)、ビスケット、コーンフレーク、クラッカー、チョコレート及びウスター

Fig. 4. High performance liquid chromatograms of sample extracts before and after addition of cyclamate

(A): strawberry jam; (B): cracker

(1): control; (2): cyclamate added (500 $\mu\text{g/g}$)

HPLC conditions, column: Finepak SIL C18T-5 (5 μm , 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.); mobile phase: methanol-water (8:2); flow rate: 1.0 ml/min; detection: UV314 nm; injection volume: 10 μl

ソースの8種類の食品にサイクラミン酸を50 µg/g 及び500 µg/g となるように添加し、本法に従って操作した際の回収率の結果を Table 1 に示した。

回収率は50 µg/g の添加で 96.5~100%, 500 µg/g の添加で 94.8~98.8% であり、多少のばらつきはあるが、ほぼ良好な結果であった。Fig. 4 に試料抽出物のクロマトグラムを示した。サイクラミン酸のピーク付近に特に妨害ピークは認められなかった。

ま と め

食品中のサイクラミン酸の分析法について検討した。

1. 試料からのサイクラミン酸の抽出には透析法を用い、透析用溶液としては0.02 N HCl を用いた。
2. クリーンアップ法については、Mega Bond Elut C₁₈ カートリッジを用いた固相抽出法について検討した。その結果、試料にTBAを加え、サイクラミン酸をTBAとのイオン対とした後、Mega Bond Elut C₁₈ カートリッジ(2 g)に負荷し、前処理することにより、従来の液-液分配法によるクリーンアップ法と比較して大幅な操作時間の短縮が可能となった。
3. サイクラミン酸を酸性溶液中で次亜塩素酸ナトリウムと反応させてN,N-dichlorocyclohexylamine に変換することにより、紫外外部吸収を検出に応用したHPLCでの分析が可能となった。
4. 本法におけるサイクラミン酸の検出限界は試料中濃度として10 µg/g であった。
5. 8種の食品にサイクラミン酸を添加した際の回収

率は94.8% 以上であった。

文 献

- 1) 小西正彦: “世界の食品添加物”, p. 109~114 (1988), 食品化学新聞社。
- 2) 厚生省生活衛生局検疫所業務管理室輸入食品監視情報検討会編: “輸入食品 1988”, p. 139 (1989), 日本食品衛生協会。
- 3) 厚生省生活衛生局検疫所業務管理室, 厚生省輸入食品衛生監視員協議会編: “輸入食品 1990”, p. 169 (1991), 日本食品衛生協会。
- 4) 田村行弘, 二島太一郎: 東京衛研年報, **40**, 141~148 (1989)。
- 5) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解 1990”, p. 491~493 (1990) 金原出版。
- 6) 加藤三郎, 金子次雄, 谷村顕雄: 食衛誌, **11**, 98~102 (1970)。
- 7) 長沢金蔵, 篠塚達雄, 小鴨 晃: 衛生化学, **20**, 337~340 (1974)。
- 8) Hauck, M., Köbler, H.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **191**, 322~324 (1990)。
- 9) Schwedt, G., Hauck, M.: *ibid.* **187**, 127~129 (1988)。
- 10) Rüter, J., Raczek, D. I. U.: *ibid.* **194**, 520~523 (1992)。
- 11) Lehr, M., Schmid, W.: *ibid.* **192**, 335~338 (1991)。
- 12) Hoo, D., Hu, C.: Anal. Chem. **44**, 2,111~2,113 (1972)。
- 13) Sjöberg, A. K., Alanko, T. A.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70**, 588~590 (1987)。
- 14) 石館守三, 鈴木郁生, 谷村顕雄: “第六版 食品添加物公定書解説書”, D-461~464 (1992)。