サイクラミン酸ナトリウムのガスクロマトグラフィー

(昭和 42 年 5 月 20 日 受理)

井上 哲男^{*1} 加藤 三郎^{*1} 大河原 晃^{*2}

Gas Chromatography of Sodium Cyclamate

Tetsuo INOUE^{*1}, Saburo KATO^{*1} and Akira OKAWARA^{*2}

(^{*1} National Institute of Hygienic Sciences: Tamagawayoga-machi, Setagaya-ku, Tokyo; ^{*2} Sampo Pharmaceutical Co., Ltd.: 40, 1-chome, Shimoochiai, Shinjuku-ku, Tokyo)

Gas chromatographic procedure for the determination of sodium cyclamate was studied. According to recent studies, it has been reported that sodium cyclamate reacts with nitrite and produces cyclohexanol, cyclohexanone and cyclohexene. The author's experiment showed that the major product of the reaction was cyclohexyl nitrite, together with some cyclohexanol and slight cyclohexene in the presence of excess nitrite at temp. below 5°C.

Using the blended liquid phase column consisting of DC-550 and DEGS (10% of each) on Gaschrom P (60/80 mesh) at 60°C, carrier gas nitrogen (60 ml/min) and a flame ionization detector, cyclohexyl nitrite and cyclohexanol were investigated. The results are given in Fig. 1-(C) and 2.

Sodium cyclamate was determined on the basis of the cyclohexyl nitrite. The cyclohexyl nitrite was prepared by treating varying amounts of sodium cyclamate with 5 ml of 10% sodium nitrite and 4 ml of 10% sulfuric acid in ice water and it was extracted with 10 ml of *n*-hexane containing 0.25 v/v % *n*-decane as internal standard and then injected to the Shimadzu gas chromatograph.

The relation between peak heights of cyclohexyl nitrite and amounts of sodium cyclamate was linear in the range of 20~600 mg of the latter, and in this case, cyclohexanol did not appeared. But, when excessive amounts (>800 mg) of sodium cyclamate were present, the yield of cyclohexyl nitrite diminished and that of cyclohexanol increased. The minimum limit of detection was approximately 0.1 µg as sodium cyclamate.

(Received May 20, 1967)

まえがき

サイクラミン酸ナトリウムの定量法については、すでに数多くの報告がなされている。すなわち、クロラニルによる呈色反応、過酸化水素の存在下に塩酸によって加水分解して生ずるシクロヘキシルアミンとキンヒドロンの呈色反応、ポーラログラフによる方法、サッカリン、ズルチンなどとの分離定量法、および赤外吸収スペクトル測定法による定量法などがある¹⁾。また公定法²⁾としては、亜硝酸を反応させて生成する硫酸イオンを EDTA で滴定する方法が採用されている。

われわれは、ガスクロマトグラフィーによるサイクラ

ミン酸ナトリウムの定量法の可能性について検討を試みた。サイクラミン酸のガスクロマトグラフィーとしては、遊離酸をジアゾメタンでメチルエステルとして行なうことができると述べた報告もあるが³⁾、塩類については困難と思われる。樋口ら⁴⁾によるとそのナトリウム塩は亜硝酸イオンの存在下において、高温、高圧状態ではシクロヘキセンが生成し、同時に生成が予想されたシクロヘキサノール、シクロヘキシルアミンは全く検出されなかったと報告している。また Rees⁵⁾ ならびに Richardson および Luton⁶⁾ は亜硝酸の作用によって生ずるシクロヘキセンによってサイクラミン酸を定量している。後者は、塩酸を用いるとモノクロシクロヘキサンを副生するから硫酸を用いた方がよいと述べている。さらに Derse および Daun⁷⁾ は過酸化水素を作用させ

^{*1} 国立衛生試験所食品添加物部：東京都世田谷区玉川用賀町 2-203

^{*2} 三宝製薬（株）研究室：東京都新宿区下落合 1-40

て生ずるシクロヘキシルアミンのアルカリカラムによるガスクロマトグラフィーを報告しているが、これらの報告はいずれも Cyclohexyl nitrite (以下 C. N. と略す) のピークについてはふれていない。

井上ら¹⁾ はさきにサイクラミン酸塩と亜硝酸を氷冷時反応させ、生成する C. N. の赤外吸収スペクトルを用いて定量する方法を報告した。われわれはこれをさらに、ガスクロマトグラフィーを用いてその性状を検討し、定量にも応用しうることを見いだしたので報告する。

I 実験方法

1. 装置およびカラム

ガスクロマトグラフ：島津 GC-1C 型および付属水素炎イオン化検出器 FID-1B 型。

カラム：主としてつぎのカラムを使用した。

(1) DC-550 (10%) : Silicone oil DC-550 を Ana-krom (acid washed 60~80 mesh) にコーティングしたものを、内径 4 mm×150 cm のステンレス U 字管に充填した。

(2) DEGS (25%) : Diethylene glycol succinate を Gaschrom P (60~80 mesh) にコーティングしたものを、内径 4 mm×150 cm のステンレス U 字管に充填した。

(3) PEGS (25%) : Polyethylene glycol succinate を用いて (2) と同様に作製し充填した。

(4) DC-550+DEGS {(10+10)%} : DC-550 と DEGS の混合アセトン溶液から蒸発法により Gaschrom P (60~80 mesh) にコーティングしたものを、内径 4 mm×150 cm のステンレス U 字管に充填した。

(5) TCP (15%) : Tricresyl phosphate を Daichrom C (80~100 mesh) にコーティングしたものを内径 3 mm×112.5 cm のステンレス U 字管に充填した。

(6) QF-1 (10%) : Silicone DC-QF-1 を Gaschrom P (60~80 mesh) にコーティングしたものを、内径 3 mm×150 cm のステンレス U 字管に充填した。

2. 標準試料および試薬

サイクラミン酸ナトリウムおよびサッカリンナトリウム：食品添加物公定書²⁾ 合格品。

炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウムおよびトウモロコシデンプン：日本薬局方品 (第 7 改正)。

n-デカン (bp 174°), シクロヘキセン (bp 83°), シクロヘキサノール (bp 161°) シクロヘキサノン (bp 155.6°) および脂肪酸メチルエステル：東京化成 KK 製。

n-ヘキサン (bp 69°), アルコール類：市販試薬特級を再留して使用した。

n-アルコール亜硝酸エステル：対応する *n*-アルコールから合成した。

10% NaNO₂, 10% H₂SO₄：試薬特級を用いて調製した。

3. 検液の調製法

井上らがすでに報告した方法¹⁾ に準じて行なった。すなわちサイクラミン酸ナトリウム 100 mg 相当量を 50 ml の共栓遠心沈殿管に正確にひょう取し、蒸留水 5 ml を加えてよく混和し、メチルレッド試液を指示薬として 10% H₂SO₄ で中和したのち、5°を越えない氷水中で 10% NaNO₂ 溶液 5 ml および 10% H₂SO₄ 4 ml を加え、ときどき振り混ぜながら 1 時間放置する。つぎに塩化ナトリウム 4.5 g を添加し、内部標準として *n*-デカン (0.25 v/v%) を含んだ *n*-ヘキサンを正確に 10 ml 加え、センをして 3 分間振とうし、遠心分離 (3000 r. p. m, 3 min) したのち、*n*-ヘキサン層を分取し無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し検液とする。

II 実験結果および考察

定 性

1. カラムの比較

無極性カラムとして DC-550 カラム、極性カラムとして DEGS カラムおよび PEGS カラム、中間極性カラムとして TCP カラム、QF-1 カラム および DC-550+DEGS の配合液相カラムを作成し、サイクラミン酸ナトリウムおよび関連化合物のクロマトグラムを作製し比較検討した。クロマトグラムを Fig. 1-(A) (B) (C) に示す。

Fig. 1-(A) は無極性カラムの例として DC-550 を液相とする場合である。Fig. 1-(A) の上段の C. N. はサイクラミン酸ナトリウムから亜硝酸の作用によって生成されたもので、これはシクロヘキサノールに亜硝酸を作用させた場合のピークと一致する。*n*-デカンは内部標準として添加したものであり、シクロヘキサノールは市販試薬によって得たものである。以下 Fig. 1-(B) および (C) の場合も同様である。

Rees⁵⁾ および Richardson, Luton⁶⁾ らはサイクラミン酸塩を、主としてシクロヘキセンとしてガスクロマトグラフィーを行なう方法を報告している。われわれの実験においてはシクロヘキセンの生成はごくわずかで、ほとんど C. N. となり、後述の特殊な場合にのみシクロヘキサノールが現われている。Fig. 1-(A), (C) の下段は点線が *n*-脂肪族アルコールで、実線はその亜硝酸エステルのクロマトグラムである。

Fig. 1-(B) は PEGS を液相とする場合である。一般にポリエステルカラムでは極性物質がおくれるが、この場合も *n*-デカンが速い時間に現われるのに比べ、アルコール類ははなはだおそく、その C₆ の亜硝酸エステルは C₅ アルコール以前に現われており (Table 1 参照)、シクロヘキサノールおよび C. N. はこのカラムでは *n*-C₇ のヘプタノールに類似した挙動を示す。遊離水酸基を有するアルコール類は一般にテーリングが大きい。エステルは良好なピークを示し、DC-550 カラムより理論段数も高い結果が得られている。

さらに極性カラムとして DEGS を液相とする場合も

- (A) Column: 10% DC 550 on Anakrom (60/80 mesh), in 4 mm×150 cm at 60°C, N₂ flow 68 ml/min
 Detector: HFID at 150°C, H₂ flow 20 ml/min
 Inject. port: at 100°C
- (B) Column: 25% PEGS on Gaschrom P (60/80 mesh), in 4 mm×150 cm at 60°C, N₂ flow 60 ml/min
 Detector: HFID at 150°C, H₂ flow 20 ml/min
 Inject. port: at 100°C
- (C) Column: (10+10)% (DC 550+DEGS) on Gaschrom P (60/80 mesh), in 4 mm×150 cm at 60°C, N₂ flow 60 ml/min
 Detector: HFID at 150°C, H₂ flow 20 ml/min
 Inject. port: at 100°C

Fig. 1-(A)~(C). Gas chromatograms of compounds produced from sodium cyclamate and nitrite, and related compounds

Table 1. Retention Times (min) of Compounds Produced from Sodium Cyclamate and Nitrite, and Related Compounds

Column Compound	Liq. ph.	10% DC-550* ¹	25% DEGS* ²	25% PEGS* ²	(10+10)%* ² (DC-550+DEGS)	15% TCP* ³	
	Temp. (°C) N ₂ flow (ml/min)	60 68	60 91	60 60	60 60	60 96	110 100
Cyclohexene		2.0 min	0.6	0.6	0.9	0.9	0.3
Cyclohexyl nitrite		7.8	3.2	2.7	3.8	6.2	1.3
Cyclohexanol		11.5	24.8	21.6	10.7	26.4	3.3
Cyclohexanone		14.5	17.3	15.7	10.7	19.0	3.1
<i>n</i> -Decane		15.2	2.2	1.3	6.6	5.9	1.1
<i>n</i> -Alcohol (C ₅) nitrite		2.7	1.0	0.9	1.2	1.8	—
(C ₆)		5.3	1.9	1.6	2.5	3.8	—
(C ₇)		11.0	3.6	2.8	5.4	8.3	—
(C ₈)		23.3	7.0	4.8	11.8	18.5	—
<i>n</i> -Alcohol (C ₅)		4.1	8.3	7.2	3.7	9.6	1.5
(C ₆)		8.4	15.7	13.4	7.3	22.4	2.7
(C ₇)		18.3	29.6	24.6	15.0	51.8	5.0
(C ₈)		39.8	57.5	44.7	31.0	118.0	9.3
<i>n</i> -Fatty acid (C ₄) methyl ester		3.2	2.3	2.0	1.7	2.3	0.5
(C ₆)		13.1	7.7	6.2	7.8	10.8	1.8
(C ₈)		56.2	27.7	20.7	35.5	—	6.3

*¹ 150 cm×4 mm, on Anakrom (60/80)

*² 150 cm×4 mm, on Gaschrom P (60/80)

*³ 112.5 cm×3 mm, on Daichrom C (80/100)

ほぼ同様な結果が得られる。

サイクラミン酸ナトリウムを亜硝酸分解したときに生成すると思われる関連物質、*n*-アルコールおよびその亜硝酸エステルの保持時間 (t_R) を Table 1 に表示した。なお脂肪酸メチルエステルは保持時間の参考として同時に行なった。

Fig. 1-(C) は中間極性カラムとして DEGS と DC-550 との両液相を混合して用いた場合である。混合比 1:1 のときのクロマトグラムをここに示した。反応操作において、サイクラミン酸ナトリウム量に対して亜硝酸が十分に存在する範囲では C. N. のピークのみが現われるのでポリエステル、TCP などの分離のよいカラムで定量することも考えられる。

亜硝酸量が不足するにしたがいシクロヘキサノールのピークが現われてくるようになる。そこで、この両者の挙動をも追求したいと考えたが、ポリエステルカラムでは C. N. とシクロヘキサノールのピークが離れすぎ、DC-550 カラムでは接近しすぎて分離が不十分であったので、この両者の中間極性のカラムが適当と考えた。両者の混合比 1:1 でこの目的に適するカラムを得た。

中間極性の液相としては、たとえば QF-1 などが考えられるが、一般に QF-1 系統は低濃度液相として高温で使用する場合が多く、今回は高濃度 (10%) カラムとし

て低温 (60°) で使用してみたところ、*n*-デカンおよび *n*-アルコールの亜硝酸エステル、C. N. はテーリングも少なく比較的よく分離した。しかしアルコール類はもちろん脂肪酸メチルエステル類もはなはだしくテーリングが大きく、シクロヘキサノールの挙動を追求するためにはこのカラムでは不適当であった。

フェノール類に適するといわれる弱極性の TCP を液相とするカラムの場合には、サイクラミン酸ナトリウムの亜硝酸分解物および関連化合物ともにテーリングがなく、しかも分離のよいクロマトグラムが得られたが、ポリエステルカラム同様 C. N. とシクロヘキサノールが離れすぎ両者の挙動を追求するには適当でない。なお *n*-デカンと C. N. のピークは本実験の条件ではほとんど重なってしまう。

以上述べたカラム以外に 3.5% SE-30, 5% SE-52, 20% Carbowax-1500 カラムについても検討したが、SE-30, SE-52 においてはテーリングが大きく使用に適さなかった。

Carbowax カラムにおいては C. N. のピークは現われずシクロヘキサノールに相当するピークのみ現われた。検液は他のカラムにおける場合と同様に調製したものであり、このシクロヘキサノールに相当するピークは副生する量をはるかに越える量であり、したがってカラ

ム内反応によって C. N. が分解してシクロヘキサノールを生成すると考えられる。

前述の検液の調製法により、サイクラミン酸ナトリウム 5 mg, 注入量 1 μ l, Fig. 1-(C) の条件 (Sensitivity 10^3 , Range V 3.2) で十分安定したクロマトグラムが得られる。すなわちサイクラミン酸ナトリウムとして 1 μ g まで再現性よく検出しうる。また 0.01% サイクラミン酸ナトリウム水溶液に亜硝酸ナトリウム結晶を加え、30% 硫酸を加えて反応させエーテルで抽出したものを検液と

Fig. 2. Relation between amount of sodium cyclamate and the peak height

Fig. 3. Calibration curve of sodium cyclamate

Table 2. Reproducibility of Relative Peak Height on Injections of Same Sample

Test numbers	Relative peak height	
	C/D*	
1	1.6595	
2	1.6696	
3	1.7639	
4	1.6893	
5	1.6750	
$\bar{X}$	1.6915	
σ ($\sigma\%$)	0.0419 (2.48%)	

* C/D: Cyclohexyl nitrite/n-Decane

Sample: Prepared with 99.98 mg of sodium cyclamate

Conditions: Same as Fig. 1-(C)

Sample size: Approx. 1 μ l

Table 3. Reproducibility of Relative Peak Height on Individual Sample

(A)

No.	Weight of sodium cyclamate (mg)	Relative peak height	
		C/D*	100/W** $\times$ C/D
1	99.14	1.5338	1.5472
2	99.91	1.5046	1.5060
3	101.49	1.6017	1.5782
4	101.25	1.5115	1.4929
5	100.50	1.4742	1.4669
	$\bar{X}$	—	1.5182
	σ ($\sigma\%$)	—	0.0443 (2.92%)

(B)

No.	Weight of sodium cyclamate (mg)	Relative peak height	
		C/D*	300/W** $\times$ C/D
1	302.18	2.7921	2.7719
2	300.41	2.7982	2.7944
3	300.64	2.9545	2.9483
4	300.98	2.8108	2.8017
5	301.86	2.7757	2.7586
	$\bar{X}$	—	2.8150
	σ ($\sigma\%$)	—	0.0765 (2.72%)

* C/D: Cyclohexyl nitrite/n-Decane

** W: Weight of sodium cyclamate (mg)

Conditions: same as Table 2

Sample size: (A) Approx. 1 μ g

(B) Approx. 0.5 μ l

すれば 0.1 μ g まで十分に検出しえた。

定 量

1. 亜硝酸量によるクロマトグラムの変化

前述の各カラムおよび使用条件におけるクロマトグラムを比較検討した結果、DC-550+DEGS (1:1) の混合液相カラムが適当であると考えられたので以下このカラムについて実験を行なった。その結果を Fig. 2 に示した。

前述のように一定量の亜硝酸に対してサイクラミン酸ナトリウムが比較的少量の場合はほとんど C. N. のピークのみが現われ、シクロヘキサノールのピークはほとんど認められない。ただし少量のシクロヘキセンを副生し、これについて今回は定量を行なわなかったが反応温度が高いと増加する傾向にある。アルコール類の亜硝酸エステルは比較的安定で、抽出液を乾燥して保存する場合には十数時間はクロマトグラム上に変化を示さないが、その後徐々に加水分解されて、もとのアルコールに

なる。アルカリ性で加熱すれば加水分解は顕著である。

一方亜硝酸量に対してサイクラミン酸ナトリウムが多量の場合にはシクロヘキサノールのピークが顕著に現われてくる。このときシクロヘキサンの生成量も関係すると思われるが、われわれの使用したカラムおよびその使用条件では t_R がはなはだ早く、したがって溶媒のピークと重なるか接近して正確に生成量を測定することは困難であった。

2. 検量線

Fig. 2 および 3 に示すように内部標準として n -デカンを用い検液の調製法に従い操作し検量線を作成するとき、サイクラミン酸ナトリウムとして 600 mg までは良好な直線性を示した。

3. 定量精度の検討

前述の検液の調製法に従い、検量線範囲内の 2 点、すなわちサイクラミン酸ナトリウム 100 mg および 300 mg 量について調製した n -ヘキサン溶液を用い、同一検液につき 5 回測定した結果を Table 2 に示した。また個々にひょう取り操作した 5 検液につき測定した結果を Table 3-(A) および (B) に示した。

注入操作による機械的なバラツキと、各個別に検液調製した場合のバラツキとは、相互に近似した結果を示した。±3% (σ) 程度の誤差を見込むならば十分に信頼しうる定量法として利用することができる。本実験においては Sensitivity 10^3 , Range V 3.2~6.4 を使用したが、これら機器感度を下げて注入量を増すならば誤差の幅をさらに小さくすることが可能と考えられる。

4. 混合試料中のサイクラミン酸ナトリウムの定量

混合試料につき Table 2 と同一条件で回収率の測定を行なった結果を Table 4 に示した。この場合、同一処方よりサイクラミン酸ナトリウムを除いた混合試料か

ら調製した検液では、C. N. に相当する付近には全くピークを示さなかった。

むすび

サイクラミン酸ナトリウムに、井上らがさきに報告した赤外法の操作に準じ¹⁾、亜硝酸ナトリウムおよび硫酸を加えて氷冷時反応させたのち、有機溶剤で抽出し、そのまま注入してガスクロマトグラフィーを行なった。

DC-550 などの無極性カラムでは、シクロヘキサノール 亜硝酸 エステル (C. N.) とシクロヘキサノール (C.) のピークは接近して現われるが、極性カラム (DEGS, PEGS, TCP) による場合には C. N. と C. は大きく離れて現われる。

反応操作によって生成する C. N. と C. の両者を観察するために、DC-550 と DEGS の配合液相カラムを調製し、配合比 1:1 において適当なクロマトグラムを得ることができた。

これらの条件において、亜硝酸が十分に過剰ならば C. N. のピークが主体であって、C. はほとんど現われない。生成した C. N. は安定であり、再現性もよく ±3% の誤差で定量への応用も可能である。

氷冷時の反応においてはシクロヘキサンの生成もごくわずかであったが、これは反応温度によって増加するように思われる。

なお、TCP または DEGS を液相としたカラムの方が C. N. のピークは尖鋭であり、検出限界および定量精度も良好であろうと考えられる。

終わりに臨み、本研究にご援助いただいた東京薬科大学藤井清次教授、および国立衛生試験所食品添加物部林敏夫室長、ならびに実験にご協力いただいた東邦薬科大学樋口慶子氏に感謝します。

本研究の要旨は第24回薬学大会（昭和42年4月8日、京都）において発表。

文 献

- 1) 上条昌弥, 河村太郎, 井上哲男: 食衛誌, 7, 343 (1966).
- 2) 厚生省編: “食品添加物公定書” (第2版) p. 136 (1966).
- 3) V. W. Groebel: Z. Lebensm. Untersuch. u. -Forsch. 129, 153 (1966).
- 4) 樋口亮一, 小野正之, 他: 食衛誌, 6, 448 (1965).
- 5) D. I. Rees: Analyst 90, 568 (1965).
- 6) M. L. Richardson, P. E. Luton: ibid. 91, 520 (1966).
- 7) P. H. Derse, R. J. Daun: J. Assoc. Offic. Anal. Chemists 49, 1090 (1966).

Table 4. Recovery Test of Sodium Cyclamate in Prepared Model Sample

Mixed proportion of sample

Sodium cyclamate	46%
Saccharin	18
Sodium bicarbonate	34
Corn starch	2

Results of test		
Sodium cyclamate	Added	45.95%
	Found	46.65%
	Recovery	101.51%

Conditions: Same as Table 2

Sample size: Approx. 1 μ l