報 文

p-ジメチルアミノベンズアルデヒドによる ズルチンの比色定量

(昭和 43 年 4 月 24 日 受 理)

田 中 喜 作* 田 中 平*
松 木 幸 夫* 浜 口 彰*

Colorimetric Determination of Dulcin with *p*-dimethylaminobenzaldehyde

Kisaku TANAKA, Taira TANAKA, Yukio MATSUKI
and Akira HAMAGUCHI

(Public Health Research Institute of Kobe City:
5-1-chome, Kano-cho, Ikuta-ku, Kobe-shi)

A colorimetric method for the determination of dulcin was established. According to this procedure, 2 ml of 3% *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) in 1 N HCl-alcohol solution was added to 2 ml of dulcin solution. The colored solution had an absorption maximum at 440 m μ and the absorption spectra were found to follow the Lambert-Beer's Law within the range of 2~40 μ g/ml in dulcin concentration.

Thereafter, the determination of dulcin in foodstuff was attempted by the application of this method.

Interferences from foodstuff ingredients has been minimized by means of dialysis and extraction with ethyl acetate.

(Received April 24, 1968)

ま え が き

最近食品衛生法でズルチンに対する規制措置が行なわれ、食品別の基準が設けられたため、食品中のズルチンの定量試験を行なうことが必要となってきた。

ズルチンの定量法としては、衛生試験法¹⁾に収載されているケルダール法、キサントヒドロール法、紫外部吸収法のほか、赤木ら²⁾の Jorissen 反応の改良法、三橋ら³⁾⁴⁾および山本ら⁵⁾の *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (以下、DMAB と略す) による比色定量法があり、また最近一番ヶ瀬ら^{6)~8)}は亜硝酸ナトリウムを用いて分解し、生成したジアゾニウム化合物に β -ナフトールを作用させて比色定量する方法を報告している。

DMAB はズルチンのほか、尿素⁹⁾¹⁰⁾の定量にも応用

しうるが、これらはいずれも水溶液中での比色法である。

著者らは DMAB による呈色反応条件に検討を加え、アルコール溶液中では感度が鋭敏となり、食品中のズルチン定量に応用しうる結果を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 機 器

日立分光光度計 (EPU 2 型)

2. 試 薬

a) 3% DMAB 1 N 塩酸アルコール溶液 (以下、3% DMAB 試液と略す): 塩酸 9.5 ml に無水エタノールを加えて 100 ml とし、これに DMAB を 3 g 溶かす。

b) セロファンチューブ: Visking 社製 (径 23.8 mm)。

* 神戸市衛生研究所: 神戸市生田区加納町1-5

- c) 0.02 N 水酸化ナトリウム溶液
- d) 酢酸エチル：試薬特級
- e) 飽和食塩溶液
- f) 無水硫酸ナトリウム：あらかじめ焼いたもの
- g) 無水エタノール：試薬特級
- h) ズルチン：熱湯より再結晶して，m. p 173~174° のもの

3. 測定法

ズルチン 2~40 $\mu\text{g/ml}$ を含むエタノール溶液 2 ml に 3% DMAB 試液 2 ml を加え，10分間放置後，層長 10 mm のセルを用い，波長 440 $\text{m}\mu$ における吸光度を測定し，同時に作成した検量線 (Fig. 4 の実線) よりズルチンの含有量を求める。

なお対照には無水エタノール 2 ml に 3% DMAB 試液 2 ml を加えたものを用いた。

4. 食品中のズルチン抽出

Fig. 1 に示すように試料 5~10 g (固形試料の場合はホモジナイズ後) をセロファンチューブに入れ，0.02 N NaOH 溶液を加えて 20 ml とし，外液にも 0.02 N NaOH 溶液 180 ml を入れて室温で 24 時間透析し，透析液 20 ml を 100 ml の分液漏斗にとり，酢酸エチル 30 ml 宛で 2 回抽出する。酢酸エチル層は飽和食塩溶液で 1 回洗浄したのち，少量の無水硫酸ナトリウムで乾燥後，減圧下で酢酸エチルを留去し，その残渣を無水エタノール 10 ml に溶解して試験溶液とする。

Fig. 1. Extraction of dulcin in foodstuff

実験結果および考察

1. 塩酸の濃度

Fig. 2 は 3% DMAB 試液の塩酸濃度をいろいろに変

えた場合の吸光度を示したものである。発色は 0.5 N 塩酸の場合が最大で，これより塩酸濃度が上下することにより吸光度は低下する。

1 N および 2 N 塩酸では検量線が直線となるが，0.5 N 塩酸ではやや曲線を示し，0.2 N 塩酸では明らかにわん曲するので 1 N 塩酸溶液を採用した。

なお Fig. 3 はズルチン 15 $\mu\text{g/ml}$ のエタノール溶液 2 ml に 3% DMAB 試液 2 ml を加え発色させたズルチン溶液の吸収曲線を示したもので，440 $\text{m}\mu$ に吸収極大値を示す。

2. DMAB の濃度

Fig. 4 は 1 N 塩酸アルコール溶液中に各種濃度の

Fig. 2. Effect of HCl concentration at 3% DMAB

..... 0.2N HCl - · - · - 0.5N HCl
— 1.0N HCl - - - - 2.0N HCl

Fig. 3. Absorption spectrum of dulcin (15 $\mu\text{g/ml}$)

Fig. 4. Effect of DMAB concentration in 1N HCl alcohol

..... 2% — 3% - · - · 4%

DMAB を添加した場合の吸光度を示したもので、DMAB の濃度が濃くなる程発色は強くなるが、溶解度を考慮して 3% 溶液とした。

3. 希釈による影響

ズルチン含有量が 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上になると呈色が強過ぎ希釈して測定する必要がある。Fig. 5 は 20, 40, 60... 180 $\mu\text{g/ml}$ のズルチンエタノール溶液 2 ml にそれぞれ 3% DMAB 試液を 2 ml 加えて発色させ、これに希釈液として蒸留水、0.5 N 塩酸、0.5 N 塩酸エタノール、無水エタノール、および 3% DMAB 試液と無水エタノールの等量混液で希釈し、ズルチンの最終濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ になるよう調整したときの吸光度を示したものである。対照はそれぞれの希釈液で希釈したものをを用いた。

蒸留水および 0.5 N 塩酸で希釈したものは急激に呈色は減少し、4 倍希釈ではほとんど無色となる。0.5 N 塩酸エタノールおよび無水エタノールで希釈したものでも吸光度はかなり低下する。

Fig. 6 は DMAB の濃度を一定にするため、上記の高濃度発色液を 1.5% DMAB エタノール溶液および 1.5% DMAB 0.5 N 塩酸溶液で希釈し、ズルチンの最終濃度を 10 $\mu\text{g/ml}$ に調整したときの吸光度を示したものである。対照はそれぞれの希釈液で希釈したものをを用いた。

1.5% DMAB エタノール溶液で希釈したとき、5 倍希釈のものが最も吸光度が大きくなる。これは塩酸の濃度が変動するためと考えられ、また 1.5% DMAB, 0.5 N 塩酸溶液で希釈すると急激に吸光度が減少する。これは呈色液中のエタノール濃度が希薄になるためと考えられる。

Fig. 5 および Fig. 6 において 3% DMAB 試液と無

水エタノールの等量混液で希釈すると、吸光度にほとんど変化がみられない。これは呈色時における DMAB, 塩

Fig. 5. Effect of diluent
each concentration of dulcin solution is 10 $\mu\text{g/ml}$

..... H_2O and 0.5N HCl
- · - · 0.5N HCl-Alcohol
--- Alcohol
— 1.5% DMAB-0.5N HCl-Alcohol

Fig. 6. Effect of diluent
each concentration of dulcin solution is 10 $\mu\text{g/ml}$

--- 1.5% DMAB-Alcohol
..... 1.5% DMAB-0.5N HCl
— 1.5% DMAB-0.5N HCl-Alcohol

Fig. 7. Stability of colored solution (Dulcin 15 µg/ml)

酸、およびエタノールの最終濃度が一定のためと考えられ、3% DMAB 試液と無水エタノールの等量混液による希釈により、高濃度のズルチンを定量することができる。また反応液中の水分含有は呈色にかなりの影響をおよぼすため、測定時におけるキューベットの乾燥が必要である。

4. 呈色液の安定性

Fig. 7 に示すようにズルチンは発色後、常温で3時間放置しても変化がみられず非常に安定である。

5. 試薬の安定性

3% DMAB 試液は冷蔵庫内に30日間放置したものと、新製のものについて同一濃度の試料で比較したところ、ほとんど差異を認めず、冷蔵庫内に保存すれば、1か月後も十分使用できる。

6. 共存物質の影響

比較的エタノールに溶け易いアミノ酸（アルギニン、グリシン、ロイシン、およびトリプトファン）、尿素、保存料（安息香酸、パラオキシ安息香酸ブチルエステル、デヒドロ酢酸、サリチル酸、およびソルビン酸）、および殺菌料 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリル酸アミド（以下、AF-2 と略す）のエタノール溶液、およびそれぞれの水溶液を酢酸エチルで抽出後、酢酸エチルを留去し、その残渣をエタノールに溶かし、3% DMAB 試液を加えて、440 mμ における吸光度を求めたところ Table 1 のような成績を得た。

アミノ酸のアルコール溶液は、いずれもわずかに呈色し、尿素は希薄溶液でもかなり強い黄色を示す。しかしこれらはいずれも酢酸エチルによる抽出操作を行なうことにより、この妨害を除去することができる。

保存料は全く妨害しない。AF-2 はアルカリに対し不安定¹¹⁾¹²⁾であることを利用し、0.02 N NaOH 溶液で24時間室温で放置後、酢酸エチルで抽出すると酢酸エチル層には全く移行せず完全にその妨害を除去することができた。

7. 食品中のズルチンの透析

透析時の 0.02 N NaOH 溶液は、透析液の防腐の目的

Table 1. Absorbance of Amino Acids and Preservatives Treated with 3% DMAB Solution before and after Extraction

	Concentration (in EtOH 2ml)	Absorbance (440 mμ)	
		before	after
Arginine	1.0 mg	0.032	0.000
Glycine	1.0 "	0.065	0.000
Leucine	1.0 "	0.051	0.000
Tryptophan	1.0 "	0.061	0.000
Urea	0.1 "	0.215	
	2.0 "		0.000
Benzoic acid	1.0 "	0.000	
Butyl p-Hydroxy benzoic acid	1.0 "	0.000	
Dehydroacetic acid	1.0 "	0.000	
Salicylic acid	1.0 "	0.000	
Sorbic acid	1.0 "	0.000	
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide	0.02 "	0.000	
	2.0 "		*0.000

* pre-treated with 0.02 N NaOH

Fig. 8. Relation between recovery rate of dulcin and dialysis time (at 25°C)

と、AF-2 を含有する食品等の場合、これを分解しその影響をなくするために用いた。

ズルチンの透析率と時間との関係は Fig. 8 に示す通りで、ほぼ24時間で平衡に達する。

なお透析液からの抽出は、三橋ら⁴⁾、一番ヶ瀬ら⁷⁾に

より酢酸エチルとした。

8. 食品からの回収

ソース、しょう油、つくだ煮などにズルチンを添加して上記の方法で測定したところ、Table 2 に示すとおり、いずれも95%以上の好結果を得た。

ズルチンを含まない試料は、しょう油のみしか得られなかったもので、他のものについては、いずれもあらかじめ同様の方法でズルチン量を測定しておき、あらためてズルチンを添加して行なったものである。

Table 2. Recovery of Dulcin in Foods

	Con- tained (ppm)	Added (ppm)	Found (ppm)	Recovery (%)
Sauce	200	500	685	97.0
		250	440	96.3
Fruit-sauce	320	500	795	95.0
		250	560	96.0
Soy-sauce	0	500	490	98.0
		250	240	96.2
"Tsukudani" (Bonito)	300	500	790	98.0
		250	540	86.2
"Tsukudani" (Shrimp)	430	500	925	99.0
		250	680	100.0

ま と め

ズルチンの微量定量を行なうため DMAB 試液に改良を加え、エタノール溶液中で呈色反応を行ない、2~40 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で定量することが可能となった。

また食品中のズルチンを定量するには、前処置として透析操作を行ない、さらに抽出は酢酸エチルを用いることにより、妨害物質による影響を防止し、計算上、食品 1 kg 中 0.02 g まで定量することができる。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法注解 (1965).
- 2) 赤木満州雄，手島節子：薬学雑誌 77, 1043 (1957).
- 3) 三橋 靖，小林文子：衛生化学 7, 12 (1959).
- 4) 三橋 靖，小林文子：衛生化学 9, 25 (1963).
- 5) 山本義彦，矢田光子，植田恭一：大阪府立公衆衛生研究所公衆衛生部報告 6, 24 (1960).
- 6) 一番ヶ瀬 尚，児島昭次，市川正孝：薬学雑誌 84, 707 (1964).
- 7) 一番ヶ瀬 尚，児島昭次，栗崎ムツ子：薬学雑誌 87, 1020 (1967).
- 8) 林 敏夫：食品衛生研究 17, 63 (1967).
- 9) Feigl: 有機ハロゲン分析.
- 10) 見目明継，岩尾裕之：国立栄養研究所研究報告 93 (1965).
- 11) 菅野三郎，詫摩真澄，他 2 名：食衛誌. 7, 140 (1966).
- 12) 岩原滋利，萩野喜文，入江友子：食衛誌. 7, 449 (1966).