ズルチンのガスクロマトグラフィー (第1報)

注入口における熱分解およびカラム内反応について

(昭和43年8月16日受理)

加藤三郎^{*1} 下田通敏^{*2} 井上哲男^{*1}

Gas Chromatography of Dulcin (I)

Thermal Decomposition in Injection Port and On-Column Reaction

Saburo KATO^{*1}, Michitoshi SHIMODA^{*2} and Tetsuo INOUE^{*1}(*¹ National Institute of Hygienic Sciences: Kamiyoga Setagaya-ku, Tokyo;*² Showa Yakuhin Kako Co., Ltd.: Shimonoge, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken)

The gas chromatographic behaviours of dulcin were investigated. From the results it became clear that dulcin was decomposed in injection port at higher temperature than about 170°C where it could be vaporised, showing the appearance of the subsidiary peak which was identified to be *p*-phenetidine. The higher temperature of injection port, the more sharply appeared both peaks, and the subsidiary peak was increased.

By on-column reaction with trifluoroacetic anhydride, the subsidiary peak shifted and the new peak of trifluoroacetophenetidine was observed. In case of the reaction with bis-(trimethylsilyl)-acetamide, the new peak of trimethylsilyl-*p*-phenetidine and two peaks of trimethylsilylated-dulcin appeared.

(Received August 16, 1968)

I ま え が き

人工甘味料のガスクロマトグラフィー (GC) に関しては、サッカリンについて Groebel が *N*-メチル化体として定性定量を行なっており¹⁾、サイクラミン酸塩については、これをシクロヘキシルアミンまたはシクロヘキセンとして行なう方法についての報告もみられるが^{2)~4)}、著者らはさきにこれをシクロヘキサノール亜硝酸エステルとして GC を行なって報告した⁵⁾。

ズルチンの分析法はすでに薄層クロマトグラフィー (TLC)⁶⁾、比色法、その他、種々の方法についてのべられている⁷⁾⁸⁾。しかし、GC に関しては、Groebel が 20% SE-30, 170° における相対保持値について述べているのみで詳細にわたる報告は見当たらない。

そこで著者らは GC によるズルチンの定性定量を行なうにあたり、まずズルチンをそのまま注入したところ、注入口温度によってそのピーク形が大きく変わり、さらにカラム液相の種類によってあらわれるピークの数も異

なることを見い出したので、この現象をさらに追究して若干の知見を得たので報告する。

II 実 験

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検出器 FID-1B 型

カラム;

a) 10% SE-30: Chromosorb W (AW-DMCS, 60/80 mesh) にコーティングし、内径 4 mm×150 cm ステンレス鋼管に充てんした。

b) 5% DC-550: Anakrom (60/80 mesh) にコーティングし、内径 4 mm×150 cm ステンレス鋼管に充てんした。

c) 3% SE-30: Gas-Chrom P (60/80 mesh, 塩酸および DMCS 処理) にコーティングし、内径 4 mm×200 cm パイレックスガラス管に充てんした。

d) 5% EGSS-Y: Chromosorb W (AW-DMCS 処理, 60/80 mesh) にコーティングし、内径 4 mm×200 cm パイレックスガラス管に充てんした。

e) 5% DGS: Gas-Chrom P (60/80 mesh, 塩酸およ

*¹ 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

*² 昭和薬品化工 (株) 開発研究部: 神奈川県川崎市下野毛字久保東

び DMCS 処理) にコーティングし, 内径 4 mm×200 cm バイレックスガラス管に充てんした.

f) 25% DGS: Chromosorb W (AW-DMCS 処理, 60/80 mesh) にコーティングし, 内径 10 mm×75 cm ステンレス鋼管に充てんした.

2) 試薬および試料

i) 充てん剤液相

SE-30: Methyl silicone (General Electric Co.)

DC-550: Phenyl (25%)-methyl silicone (Dow Corning Chem. Co.)

EGSS-Y: Methyl silicone(50%)-ethylene succinate polyester (Applied Sci. Lab.)

DGS: Diethylene glycol succinate polyester (Applied Sci. Lab.)

ii) 試薬

ジメチルジクロシラン (DMCS): 特級試薬を蓄留して用いた.

無水トリフルオール酢酸 (TFAA): 特級試薬

ビス-(トリメチルシリル)-アセトアミド (BSA): 特級試薬

iii) 標準試料

ズルチン: 食品添加物公定書合格品 (mp 175°).

p-フェネチジン: 市販試薬を蒸留して用いた (bp 254~255°).

p-アミノフェノール: 一級試薬をエタノールにとかし, 活性炭処理したのち再結晶して用いた (mp 190°).

ジズルチン: ズルチンを水と煮沸して生じた沈殿をろ取し, 熱湯で洗い, エタノールより再結晶した (mp 288°, 分解)⁹⁾

チアヌル酸: 特級試薬

3) 操作法

各試料は一般に 1~0.1% のアセトンまたはジクロルメタン溶液とし, その 1 μ l をハミルトンマイクロシリンジによって, 機器の注入口 (Injection port) に注入した. とくに記載しない限り, 注入口温度 250°, 検出器恒温槽温度 250°, 水素流量 45 ml/min, 空気圧 1.0 kg/cm², 記録紙速度 1 cm/min, 記録計感度 Sens. 10⁸×Range 3.2 とし, カラム条件はおおのこの図に付記した.

なお, カラム内反応⁹⁾は, 試料を注入したのち, ただちに別のマイクロシリンジ内に用意した試薬約 1 μ l を手早く注入して行なった.

III 実験結果および考察

1) 注入口温度の影響

ズルチンの約 1% 溶液 1 μ l (ズルチン約 10 μ g 含有) を注入口温度 270° 付近において, SE-30 などの無極性カラムを用いて GC を行なった場合, Groebel の報告¹⁾のごとく, パラオキシ安息香酸エチルの約半分の時間にピークがあらわれた.

しかし, このピーク形は注入口温度に大きく影響され

Fig. 1. Gas chromatograms of dulcin at variable temperature of injection port

Column: 10% SE-30 on Chromosorb W (AW-DMCS) (60/80 mesh) in i.d. 4 mm×150 cm stainless-steel tube, at 130°C, N₂ flow 70 ml/min Detector: FID, H₂ flow 45 ml/min, air 1 kg/cm² Sens: 10⁸, Range: 3.2

Sample: each 1 μ l of 1% dulcin in acetone

る. Fig. 1 に 10% SE-30 のカラムを用いた場合の注入口温度を変えて行なったクロマトグラムの変化を示した. 注入口温度が高温の場合にはかなりシャープな単一とみなし得るピークを示し, 温度を低くするにしたがって 2 ピークに分離するとともに著しくテーリングして, 感度はより低下し, およそ 170° ではより多量に注入してもわずかに 2 つのブロードの山を示すにすぎなかった.

極性カラムを用いた場合にはこの両ピークはよく分離し, つねに 2 つのピークを示した. Fig. 2 に 5% DGS カラムにおけるズルチン (10 μ g) のクロマトグラムを示した. 注入口温度が高くなるにしたがって第 1 ピークもシャープとなるが, 第 2 ピークがより以上に増大した.

Fig. 2. Gas chromatograms of dulcin at variable temperature of injection port

Column: 5% DGS on Gas-Chrom P (60/80 mesh, acid and DMCS treated) in i.d. 4 mm×200 cm Pyrex-glass tube, at 150°C, N₂ flow 85 ml/min

Other conditions the same as Fig. 1, except Range: 12.8

なお DC-550 カラムにおいては両ピークは若干分離した。Fig. 3 にそのクロマトグラムを示した。

Fig. 3. Gas chromatograms of dulcin at variable injection port temperature and on-column reaction with trifluoroacetic anhydride

Column: 5% DC 550 on Anakrom (60/80 mesh) in i. d. 4 mm × 150 cm stainless-steel tube, at 160°C, N₂ flow 72 ml/min

Other conditions the same as Fig. 1, except Range: 6.4

2) 試験管内加熱物の GC

試験管にズルチン (1 g) を入れ約 210° の油浴中で 2 時間加熱したところ、熱時はかっ色の油状を呈し、冷後固化して種々の溶剤に難溶となったので、これを粉碎して約 100 倍量のアセトンと温め、溶けた部分について同様に GC を行なった。このものは注入口温度が低くても、ズルチンを高温で注入した時と近似したクロマトグラムを示し、明らかに第 2 ピークがあらわれた。

これらの結果から、ズルチンは気化し難く、また気化し得る注入口温度においてはすでに熱分解が始まっており、これらは高温になるほど促進されるものと考えられる。

3) 熱分解物の同定

ズルチンは 190° 以上において熱分解してジズルチン、*p*-フェネチジンおよび尿素となり、尿素はさらに昇華性のチアヌル酸とアンモニアになるといわれ、ズルチンの定性試験に応用されている^{10) 11)}。

ズルチンの分解物としては、このほか酸、アルカリまたは生体代謝によって *p*-アミノフェノールを生ずると

もいわれる⁷⁾。

これら分解物に相当する標準試料を、種々のカラムにおいて、ズルチンを注入するときにあらわれるピークと比較したところ、第 2 ピークが *p*-フェネチジンと一致した。

SE-30 カラムにおいては、ズルチンを高温で注入すれば、みかけ上単一ピークを示すことはさきに述べた (Fig. 1)。*p*-フェネチジンはこのピークとほとんど同じ保持時間を示したが、テーリングが大きく、微量の場合にはピークせん端が遅れる結果を示した。Fig. 1 において注入口温度が低いほど第 2 ピークが分離してあらわれるのは、分解生成率が低下して *p*-フェネチジンが微量となること、およびその分解速度が遅れることと相重なってピークせん端が遅れるためと考えられる。

ジズルチンは一般に難溶であるが、ジメチルスルフォキシドに溶ける。この溶液を注入すると、ズルチンの場合と同じ保持時間の 2 つのピークを示した。これはジズルチンが分解してあらわれるものと推定される。チアヌル酸はほとんどあらゆる溶剤に不溶で、GC においてはピークを示さなかった。

4) TFAA によるカラム内反応

ズルチンを注入したのち、ただちに少量の TFAA を注入するとき、第 1 ピークはやや減少して TFAA を注入しない場合と同じ時間にはあらわれたが、第 2 ピークはシフトしてもの時間にはほとんどピークを示さず、はるかに遅れてあらわれた。Fig. 4 に 5% EGSS-Y カラムにおいて行なったクロマトグラムを示し、また Fig. 3 に 5% DC 550 カラムにおける注入口温度によるピーク変化と、TFAA によるそのピークシフトをあわせて示した。

この実験によって、第 1 ピークはあまり反応しないが、第 2 ピークは容易に反応し、*p*-フェネチジンについ

Fig. 4. Peak-shift by on-column reaction of dulcin with trifluoroacetic anhydride

Column: 5% EGSS-Y on Chromosorb W (AW-DMCS) (60/80 mesh) in i. d. 4 mm × 200 cm Pyrex-glass tube, at 130°C, N₂ flow 70 ml/min

Other conditions the same as Fig. 1
Injection port temperature: 300°C

て同様なカラム内反応を行なうときと全く一致した挙動を示すことから、第2ピークは *p*-フェネチジンであると考えられる。

5) BSA によるカラム内反応

同様に、BSA を注入してカラム内 TMS 化反応を試みたところ、BSA を注入しない場合と同じ時間に第1ピークはあらわれるがかなり減少し、第2ピークはシフトしてもとの時間にはほとんどあらわれなかった。Fig. 5 には SE-30 カラムにおいて行なった場合の例を示したが、この条件においては、ズルチンは前に述べたようにみかけ上単一ピークを示し、あとから BSA を注入してカラム内反応させた場合にはあらたに *p*-フェネチジンの TMS 化体のピーク (A) とズルチンの TMS 化体のピーク (B および C) があらわれた。この場合注入温度が高いほど A ピークは大きくあらわれた。

Fig. 5. Peak-shift by on-column reaction of dulcine with bis-(trimethyl silyl)-acetamide
Column: 3% SE-30 on Gas-Chrom P (60/80 mesh, acid and DMCS-treated) in i.d. 4 mm × 200 cm Pyrex-glass tube, at 140°C, N₂ flow 90 ml/min

Other conditions the same as Fig. 1 Injection port temperature: 350°C

各 TMS 化体については次報に詳しく報告する予定であるが、ズルチンの TMS 化体は注入温度 350° においても安定であって *p*-フェネチジンの TMS 化体を生成しない。

これらの結果は、ズルチンは注入口において一部熱分解して *p*-フェネチジンを生成し、後者はカラム内反応によってほとんど完全に TMS 化され、また未分解のズルチンもその一部がカラム内で反応すると考えられる。

6) カラム流出物中のズルチンの確認

25% DGS を詰めた内径 10 mm × 75 cm 分取用カラムの末端を流出口 (Vent) に連結し、さらに流出口に細いガラス管を接続して捕集管とし、ズルチンの注入を繰り返して流出物を捕集した。ただし注入口および流出口は 300° とし、すでに第2ピークは *p*-フェネチジンであると同定したので、各ピークに分取は省略して全流出物を捕集した。

捕集物をアセトンに溶かし、TLC によってズルチンの注出してくることを確認した。TLC はシリカゲル G を使い、*iso*-プロパノール・28% アンモニア水 (4:1)⁶⁾、またはクロロホルム・氷酢酸 (9:1)⁷⁾ によって展開し、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液を噴霧して呈する黄色により検出した。

IV 総括

1) ズルチンをそのまま注入して GC を行なうとき、それが気化する注入温度においてはすでに熱分解による副ピークを生ずる。

2) この副ピークは、極性カラムを用いるときは主ピークとよく分離してあらわれるが、SE-30, SE-52 などではほとんど同時にあらわれて見かけ上単一ピークを示す。

3) 主、副ピークとも注入温度の高いほどシャープとなり、かつ副ピークの生成が増大する。

4) 副ピークは *p*-フェネチジンであることを同定した。これをさらにカラム内反応によって確かめた。

5) TFAA によるカラム内反応では副ピークがシフトし、*p*-フェネチジンの TFA 化体としてあらわれる。

6) BSA によるカラム内反応では、*p*-フェネチジンの TMS 化体とともにズルチンの TMS 化体のピークがあらわれる。

7) カラム流出物中のズルチンの存在を TLC によって確かめた。

以上、ズルチンの GC における挙動を解明したが、ズルチンのままで直接 GC による定量を行なうことは不適当であると考えられる。そこで誘導体として行なうことを検討する必要があると考え、実験を行なっている。これについては次報に報告する予定である。

終わりに臨み、本研究にご協力をいただいた国立衛生試験所食品添加物部林 敏夫室長ならびにエスエス製薬中央研究所西村征男氏および佐々木武祥氏に謝意を表します。

本研究の一部は第24回薬学会 (昭和42年4月8日、京都) において発表。

文 献

- 1) W. Groebel: Z. Lebensmitt-Untersuch. **129**, 153 (1966).
- 2) P. H. Derse, R. J. Daun: J. Assoc. Offic. Anal. Chemists **49**, 1090 (1966).
- 3) D. I. Rees: Analyst **90**, 568 (1958).
- 4) M. L. Richardson, P. E. Luton: ibid. **91**, 520 (1966).
- 5) 井上哲男, 加藤三郎, 大河原晃: 食衛誌, **8**, 347 (1967).
- 6) 菰田太郎, 竹下隆三: 衛生化学 **13**, 204 (1967).
- 7) 林 敏夫: 食品衛生研究 **17**, 1005 (1967).
- 8) 井上哲男, 林 敏夫, 中村昌子: 食衛誌, **9** (4),

-
- 309 (1968).
- 9) M. W. Anders, G. J. Mannering: *Anal. Chem.* **34**, 730 (1962).
- 10) 食品添加物公定書注解編集委員会編: “第一版食品添加物公定書注解” p. 342 (1961) 金原出版.
- 11) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 150 (1965) 金原出版.