UDC 614.31 : 615.756.7/.8 : 543.544.42

279. 一番ヶ瀬 尚, 児島昭次: 人工甘味料に関する研究 (第1報) サイクラ

ミン酸ナトリウム, ズルチンおよびサッカリンナトリウム
のペーパークロマトグラフィー

Hisashi Ichibagase and Shoji Kojima: Studies on Synthetic Sweetening
Agents. I. Paper Chromatography of Cyclamate Sodium,
Dulcin, and Saccharin Sodium.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Kumamoto^{*1})

Paper chromatography of artificial sweet flavours have been studied. Saccharin sodium was identified as a violet spot when colored with α -naphthylamine-cupric acetate solution over the developed paper. As this spot was observed to be a black spot on a pale blue fluorescent paper under ultraviolet light, the limit of identification of saccharin sodium has been increased more sensitively than the usual method. On the other hand, when the hydrolyzed solution of cyclamate sodium and dulcin with hydrogen peroxide in hydrochloric acid acidic media (the hydrolyzed compound were identified to be cyclohexylamine and *p*-phenetidine respectively) were developed and colored with quinihydrone solution, both showed violet-red spot, thus it was able to identify both cyclamate sodium and dulcin simultaneously.

The developing solvent mixtures employed were AcOEt-HAc-H₂O (4:1:2), AcOEt-HCOOH-H₂O (4:1:2) and AcOEt-EtOH-AcOH-H₂O (4:2:1:2) and the limit of identification was 15 γ of cyclamate sodium, 20 γ of dulcin and 3 γ of saccharin sodium. The result of applying this method to the food-stuff was found to be favourable.

(Received April 26, 1962)

ズルチンおよびサッカリンナトリウムは食品添加物としてあるいは医薬品の矯味剤として現在でも広く使用されているが, さらに Audrieth 等¹⁾ によって見出されたサイクラミン酸ナトリウムも食品添加物として許可され, これら人工甘味料が食品や医薬品に添加使用される機会はますます多くなってきた. ズルチン, サッカリンナトリウムおよびサイクラミン酸ナトリウムをペーパークロマトグラフィー (PPC) によって分離検出する方法は現在までに種々報告されているがまだ満足すべき結果は得られていない. すなわち Mitchell²⁾ はこれら人工甘味料の PPC において, サッカリンナトリウムとサイクラミン酸ナトリウムの検出試薬として硝酸銀液とピロガロール液を使用し, ズルチンは濃硝酸によって検出している.

Castiglioni³⁾ はズルチンとサッカリンの混合物の PPC で展開溶媒としてブタノール・アンモニアを用い発色剤としてズルチンに硝酸, サッカリンに α -ナフチルアミン試液を用いている.

また三橋等⁴⁾ は Mitchell²⁾ の方法を追試した結果溶媒をブタノール・アンモニアに変え, 発色剤としてズルチンを *p*-dimethylaminobenzaldehyde 液, サッカリンナトリウムを α -ナフチルアミン液, サイクラミン酸ナトリウム液は Mitchell²⁾ と同じく硝酸銀液とピロガロール液を使用している.

これらの方法はズルチンについては確認限度は高いがサッカリンナトリウムおよびサイクラミン酸ナトリウムでは確認限度も低くかつ呈色も余りはっきりしない. 特にサイクラミン酸ナトリウムでは淡褐色の濾紙上に白色斑点としてスポットを検出するためにサイクラミン酸ナトリウム含量が小さいときにはその確認が困難になる. そこで著者等はこれら人工甘味料の PPC をつぎのようにして行なったが, 本法によると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の確認限度が高まるばかりでなく, 特にサイクラミン酸ナトリウムおよびズルチンが同じ条件における反応, 同一試薬による発色なので同一濾紙上で同時に両物質を確認することができる利

^{*1} Ōe-machi, Kuhonji, Kumamoto.

1) L. F. Audrieth, M. Sveda: J. Org. Chem. **9**, 89(1944).

2) L. C. Mitchell: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists. **39**, 943(1955).

3) A. Castiglioni: Z. anal. Chem. **145**, 188(1955).

4) 三橋, 小林: 第 79 回日本薬学会で発表 (1959).

点を有している。

サイクラミン酸ナトリウム水溶液は熱に対して非常に安定^{5,6)}であるが、遊離のサイクラミン酸はその水溶液を沸騰水浴中で加温すれば徐々に加水分解することが Audrieth¹⁾ によって報告されているが、著者等はこれに着目しサイクラミン酸ナトリウムの分解によって生成する硫酸イオンをクロム酸バリウム法⁷⁾によって定量することによりその加水分解について検討を行なった。すなわちサイクラミン酸ナトリウムの加水分解液を水酸化ナトリウムで中和後過酸化水素水を用いた場合は二酸化マンガンを分解し酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液とクロム酸バリウム溶液を加え、数分後アンモニア水を加え析出した沈殿を除去した母液について 405 m μ で吸光度を測定しあらかじめ作製した検量線 (Fig. 1) によって定量を行なった結果、Fig. 2 に示すようにサイクラミン酸ナトリウムを塩酸性で沸騰水浴中で加水分解した場合の分解度は 1 時間で 15%, 2 時間で 25% にすぎなかった。しかるに過酸化水素水を添加して塩酸性で加水分解を行なえば反応は順調に進行し、サイクラミン酸ナトリウム濃度が 800 γ /cc 以下の時には沸騰水浴中約 1 時間で 100% に達することがわかった。

上記の方法により過酸化水素水を添加して塩酸性で加水分解した分解液を水酸化ナトリウムアルカリ性にしてクロロホルムで抽出しクロロホルム抽出液を試料として PPC を行ない、Kröller⁸⁾ が脂肪族アミン類の呈色試薬として用いたキンヒドラン試薬で発色させるとスポットは帯紫紅色を呈しその Rf 値がシクロヘキシルアミンの Rf 値と一致することからサイクラミン酸ナトリウムの加水分解産物はシクロヘキシルアミンであることを確認した。本法によるサイクラミン酸ナトリウムの確認限度は 15 γ である。

Fig. 1. Calibration Curve of SO_4^{2-}

Fig. 2. Degree of Hydrolysis of Cyclamate Sodium

Concn. of test soln.: 750 γ /cc.

----- HCl alone, at 100°

———— HCl with H_2O_2 , at 100°

またズルチンはサイクラミン酸ナトリウムと同じ条件で過酸化水素水を用いて加水分解し分解液を水酸化ナトリウムアルカリ性でクロロホルム抽出し、クロロホルム抽出液について PPC を行ないキンヒドラン試薬で発色すると帯紫紅色を呈するが、その Rf 値は *p*-フェネチジンの Rf 値と一致することから分解産物は *p*-フェネチジンであることを確認した。この場合分解によって生成した *p*-フェネチジンの一部は過酸化水素によってさらに酸化されるためにズルチンの確認限度は三橋等⁴⁾ の *p*-dimethylaminobenzaldehyde を用いた場合より幾分わるくなり 20 γ であるが、同一母液上でサイクラミン酸ナトリウムと同時に検出できる利点を有する。

つぎにサッカリンナトリウムは試料液をそのまま PPC を行ない発色剤として α -ナフチルアミン酢酸銅液を噴霧して加温すれば堇色スポットとして検出できる。スポットが不明確な場合は紫外線下で観察すれば黒色のスポットとして確認できる (母液全面は紫外線照射により淡青色の螢光を示す) ので三橋等⁴⁾ の場合 (64 γ) よりずっと感度よく確認できる。本法によるサッカリンナトリウムの確認限度は 3 γ である。

試 薬

N HCl, 0.25% H_2O_2 , CHCl_3 , キンヒドラン液 (キンヒドラン 500 mg を 50% EtOH 100 cc に溶解), α -ナフチルアミン $\cdot(\text{AcO})_2\text{Cu}$ 液 (α -ナフチルアミン 100 mg, $(\text{AcO})_2\text{Cu}$ 45 mg, AcOH 0.5 cc を EtOH 100 cc に溶解)。

5) 泉, 田中: 特許公告 779(1952).

6) 奥田, 鈴木: 本誌 81, 1550(1961).

7) 加藤, 野溝, 新良: 日化 76, 373(1955).

8) E. Kröller: Apotheker Zeitung (Berlin) 90, 724(1950) (Chem. Zentr. 122, 874(1951)).

実験方法

ペーパークロマトグラフィー (1) 試料液の調製 i. 標準操作法: 人工甘味料を含む水溶液約 1 cc をとりその一部を試料液 A としてサッカリン Na 検出用に, 残りを共栓試験管にとり N HCl 0.5 cc, 0.25% H_2O_2 水 0.4 cc を加え沸騰水浴中で 1 hr 加熱, 冷後 4*N* NaOH 4 滴を加えてアルカリ性にし $CHCl_3$ 1 cc で抽出し濃縮して試料液 B としサイクラミン酸 Na とズルチンの検出に使用する. ii. 食品の場合: 人工甘味料を含む紅茶, ココア, ジュースは沓紙で沓過して不溶物を除去し, 果物缶詰は遠心分離して不溶物を除去した液について標準操作法にしたがって行なう. しょうゆはそのまま標準操作法による.

(2) 展開溶媒: I. $AcOEt \cdot AcOH \cdot H_2O$ (4:1:2) (上層), II. $AcOEt \cdot 80\% HCOOH \cdot H_2O$ (4:1:2) (上層), III. $AcOEt \cdot EtOH \cdot AcOH \cdot H_2O$ (4:2:1:2).

(3) 展開条件: 一次元上昇法. 東洋沓紙 No. 50 (2×40 cm) を用い, 試料液 A と B を別々の沓紙にスポットし, 室温 (11±2°) で展開を行ない, 展開時間は溶媒先端が原点より 25 cm 程度上昇するまでとした. 展開溶媒 I および II では約 4 hr, III では約 7 hr を要する.

(4) 発色法: 試料液 A を展開した沓紙は風乾後 α -ナフチルアミン・ $(AcO)_2Cu$ 液を噴霧し 90~100° に約 30 min 加温するとサッカリン Na は藍色スポットとして検出できる. スポット不明確な場合は紫外線下に観察すれば淡青色螢光の沓紙上に黒色スポットとして検出できる. 一方試料液 B を展開した沓紙は風乾後キノヒドロ液を噴霧し同様に加温すればサイクラミン酸 Na, ズルチンはいずれも帯紫紅色のスポットを示す.

実験結果と考察

Rf 値: サイクラミン酸ナトリウムとズルチンの加水分解産物, サッカリンナトリウム, シクロヘキシルアミンおよび *p*-フェネチジンの Rf 値を Table I に示す.

Table I. Rf Values of Cyclohexylamine, *p*-Phenetidine, Saccharin Sodium, and Hydrolysis Products from Cyclamate Sodium and Dulcin

Compd.	Solvent system		
	(I)	(II)	(III)
Cyclohexylamine	0.33	0.59	0.78
<i>p</i> -Phenetidine	0.62	0.72	0.87
Saccharin sodium	0.80	top	0.71
Hydrolysis product from cyclamate sodium	0.34	0.58	0.77
Hydrolysis product from dulcin	0.62	0.71	0.86

確認限度: サイクラミン酸ナトリウム (15 γ), ズルチン (20 γ), サッカリンナトリウム (3 γ).

混合物の確認: 人工甘味料混合物について本法を行なう場合は先づ試料液の一部を沓紙にスポットし, 残りの試料液は加水分解後クロロホルムで抽出し, 抽出液を別の沓紙にスポットし同時に展開する. 試料液をそのまま展開した沓紙は α -ナフチルアミン・酢酸銅液でサッカリンナトリウムを検出し, クロロホルム抽出液を展開した沓紙はキノヒドロ液でサイクラミン酸ナトリウムとズルチンを同時に検出できる.

食品中の共存物質の影響: 紅茶, ココア, ジュース, 果物缶詰およびしょうゆなどの食品にこれら人工甘味料を添加した場合ならびに人工甘味料を含有する市販食品について本法を応用する場合, 共存物質およびその他の食品に添加を予想される物質の影響について検討を行なった.

i. 色素, 紅茶, ココアを試料としてサイクラミン酸ナトリウムとズルチンを検出する場合色素はクロロホルムに転溶しないし, サッカリンナトリウムの検出では原点に淡褐色の色素が残るがいずれも甘味料のスポット確認を障害しない. 市販ジュース (人工甘味料, β -カロチン, 合成保存料含有と標示したもの) および市販果物缶詰 (人工甘味料含有と標示) では黄色色素が共存するがサイクラミン酸ナトリウムとズルチンを検出する場合は使用したすべての展開溶媒で沓紙の先端に移動し, サッカリンナトリウムの検出では溶媒 (I) で Rf 0.05, (II) で top, (III) で 0.94 に黄色スポットを認めるがいずれも各甘味料のスポットと区別できるので影響を与えない. しょうゆではサッカリンナトリウムを検出する時原点に褐色色素が残るのみである.*2 これら食品中の各甘味料および共存色素の PPC を Fig. 3 に示す.

つぎに一般食品に添加を予想される食用色素のうち酸性色素 10 種をえらび同一展開溶媒で PPC を行ない Table II に示すような Rf 値を得た. これら食用色素のうち食用黄色 1 号, 食用橙色 1 号は溶媒 (II) におい

*2 発色剤を噴霧することなく原点に色素のスポットが見られる. 発色剤を噴霧して現われるスポットについては後述.

Fig. 3.

Paper Chromatography of Synthetic Sweetening Agents and their Conjugated Coloring Matters in Foods

Solvent system: (I), (II), (III)

- Spot: a Cyclamate sodium added with quinihydrone reagent.....purplish pink
 b Dulcin, with quinihydrone reagent.....purplish pink
 c Saccharin sodium, with α -naphthylamine $\cdot$ $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ reagent.....violet
 d Coloring matter in black tea and cocoa, with α -naphthylamine $\cdot$ $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ reagent.....brown
 e Coloring matter in juice, with α -naphthylamine. $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ reagent.....yellow
 f Coloring matter in juice and canned fruit, with quinihydrone reagent.....yellow
 g Coloring matter in soy, with α -naphthylamine $\cdot$ $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ reagent.....brown

てサイクラミン酸ナトリウムの Rf 値に一致し、食用橙色 1 号、食用緑色 2 号は溶媒 (III) でそれぞれサイクラミン酸ナトリウムおよびズルチンに近似した Rf 値を示すが、これらの色素はアルカリ性で CHCl_3 に転溶しないのでサイクラミン酸ナトリウムとズルチンの検出を妨害しない。故に各人工甘味料を検出する時これらの色素が共存しても影響のないことがわかった。

ii. 合成保存料: 食品衛生法で許可されている合成保存料について検討した結果、サリチル酸、安息香酸、パラオキ安息香酸エチルおよびデヒドロ酢酸ナトリウムは発色剤によって発色しないので影響しない。ニトロフラゾン溶媒 (I), (II) では top, (III) では Rf 0.93 に黄色スポットを与えるが発色剤によって変色せずその Rf 値および色調の相違によって甘味料のスポットを識別できる。

iii. その他の共存物質: しょうゆ中のサッカリンナトリウムの検出を行なう場合発色剤により呈色するアミノ酸と考えられる淡紫色スポットを認めるがその Rf 値は溶媒 (I) で 0.13, 0.30, (II) で 0.06, 0.25, (III) で 0.13, 0.30 でありサッカリンナトリウムの Rf 値と異なる。つぎにその他二、三の物質について検討した結果、L-グルタミン酸ナトリウムは発色剤で淡紫色スポット、ビタミン B₁ は α -ナフチルアミン・酢酸銅液で紫色スポット、*p*-nitro-*o*-toluidine は黄色スポットで発色剤によって変色しない。これらの物質の Rf 値は Table III に示すように各甘味料の検出を障害しない。

Table II. Rf Values of Some Food Coloring Matters.

Coloring matter	Solvent system		
	(I)	(II)	(III)
Food yellow No. 1	0.10	0.59	0.61
Food yellow No. 4	0.00	0.00	0.03
Food yellow No. 5	0.00	0.03	0.23
Food orange No. 1	0.18	0.57	0.80
Food red No. 2	0.00	0.00	0.02
Food red No. 103	top	top	top
Food red No. 104	top	top	top
Food blue No. 2	0.00	0.00	0.05
Food violet No. 1	0.10	0.48	top
Food green No. 2	0.05	0.30	0.85

Table III. Rf Values of L-Glutamate Sodium, Vitamin B₁, and *p*-Nitro-*o*-toluidine

Compds.	Solvent system		
	(I)	(II)	(III)
L-Glutamate sodium	0.04	0.20	0.40
Vitamin B ₁	0.02	0.06	0.31
<i>p</i> -Nitro- <i>o</i> -toluidine	top	top	top

以上の結果より本法を食品中の人工甘味料の検出に応用する場合共存物質の影響は殆んどないことがわかった。なお本法の各甘味料の定量への応用および発色機構については目下検討中である。

本研究に当たり試料を提供して頂いた第一製薬株式会社ならびに吉富製薬株式会社に深謝します。

熊本大学薬学部

UDC 547.785.5 : 615.782

280. 赤 輝也, 小松曼蒼, 笹島道忠, 渡辺慶昭, 中山八千代: 2-ベンツイミダゾール

チオール誘導体の研究 (第1報^{*1}) 合成ならびに鎮痛作用

Teruya Seki, Manki Komatsu, Michitada Sasazima, Yoshiaki Watanabe,
and Yachiyo Nakayama: Studies on 2-Benzimidazolethiol

Derivatives. I. Synthesis and Analgesic Effects.

(Research Laboratory, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.^{*2})

The tosylated *o*-nitroaniline (I) was condensed with 2-diethylaminoethyl chloride and N-(2-diethylaminoethyl)-2-nitroaniline (IV) was obtained, after the detosylation with conc. sulfuric acid. The nitro group of (IV) was reduced with stannous chloride and hydrochloric acid to N-(2-diethylaminoethyl)-*o*-phenylenediamine (V), which was condensed with carbon disulfide into 1-(2-diethylaminoethyl)-2-benzimidazolethiol (VI). When the potassium-salt of (VI) was reacted with the corresponding halides in either ethanol, benzene or xylene, 11 kinds of new substances were obtained. The analgetic effect of these derivatives was studied by the D'Amour-Smith method, and the substitution of hydrogen in the thiol group with methylene was found to give a decrease of the action generally, though (VI) showed a slight action.

(Received April 27, 1962)

かつて著者等は 2-benzimidazolethiol 誘導体の合成ならびにその抗白癬菌作用を検討し二、三の化合物にかなり強力な抗白癬菌作用を認め報告した。¹⁾

近年 1-(2-diethylaminoethyl)benzimidazole 誘導体が極めて強力な鎮痛作用を有することが報告され²⁾ 著者等もこれを追試し、その効力を立証したが、2-benzimidazolethiol 誘導体とその鎮痛作用との関係は未開発の状態にあり、これを開発すべく検討を開始した。今回は新規物質 1-(2-diethylaminoethyl)-2-(substituted-thio)-benzimidazole 11 種の合成法ならびに鎮痛作用につき得た知見を報告する。

1-(2-diethylaminoethyl)-2-benzimidazolethiol およびそのイオウ誘導体の合成は Chart 1 に示した通り行なった。

*1 本報の一部は第81回日本薬学会年会で講演 (1961)。

*2 Takata-minami-cho 3-chome, Toshima-ku, Tokyo.

1) 中島, 田中, 赤, 安茂, 小松: 本誌 79, 1113(1959); 中島, 他: 本誌 78, 1378(1958).

2) A. Hunger, *et al.*: *Helv. Chim. Acta* 43, 800(1960); A. Hunger, *et al.*: *Ibid.* 43, 1032(1960).