亜硝酸ナトリウムを用いるズルチンの新けい光分析法 (第1報¹⁾)
定量法の開発とその食品分析への応用

内山貞夫, 近藤龍雄, 川城 巖
国立衛生試験所食品部²⁾

A New Fluorometric Analysis of Dulcin using Sodium Nitrite. I.¹⁾
Establishment of Quantitative Method and Its
Application to Food Analysis

SADAO UCHIYAMA, TATSUO KONDO, and IWA O KAWASHIRO
Department of Foods, National Institute of Hygienic Sciences²⁾

(Received November 9, 1968)

A new fluorometric determination of dulcin (4-ethoxyphenylurea) was established as follows: To 1 ml of dulcin solution in a test tube with a stopper is added 0.4 ml of 1N HCl, and the test tube is heated in a boiling water bath for 10 minutes. After cooling to room temperature, 0.5 ml of 10% NaNO₂ solution is added and the solution is allowed to stand for 30 minutes at room temperature. Then, 0.5 ml of 6% NaOH solution is added and the solution is allowed to stand for 40 minutes at room temperature. Subsequently, the solution is extracted with 10 ml of CHCl₃ by an automatic shaker for 5 minutes.

The CHCl₃ phase gives a fluorescence spectrum with an excitation maximum at 354 mμ and an emission maximum at 446 mμ. A straight line relationship between dulcin concentration and fluorescence intensity was obtained within the range of 1—8 μg/ml in CHCl₃.

This method was successfully applied to the determination of dulcin in some foods.

ズルチンは人工甘味料として食品一般に使用基準も設けられることなく使用されてきたが, 近年その毒性が認められて以来, ズルチンの使用に対して批判的となり, 昭和42年12月に使用基準が設けられ, ついで 昭和44年1月をもって全面禁止が実施されることになった. それに伴い食品中のズルチンのより精度の高い定性, 定量試験を行なうことが必要になってきた.

ズルチンの定量法としては, 衛生試験法³⁾ に記載されているケルダール法, キサントヒドロール法があり, 他に Eeckhaut⁴⁾ の硝酸添加による比色法, 赤木等⁵⁾ による Jorissen 反応の定量法への応用, 三橋等⁶⁾ の *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドによる比色定量法, 最近になって一番ヶ瀬等⁷⁾ がジアゾカップリングによる比色定量法を報告している.

今回著者はズルチンに塩酸性, 室温で亜硝酸ナトリウムを作用させたのちアルカリ性とし反応液をクロロホルムで抽出し, クロロホルム液に紫外線を照射するとけい光を発することを認めたので, この知見に基づいてズルチンの新けい光定量法を開発した.

実 験 の 部

装置および試薬

装 置 日立製けい光光度計 MPF-2A 型.

1) 日本薬学会第88年会で発表, 東京, 1968年4月.

2) Location: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo.

3) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 金原出版, 1965, p. 222.

4) R.G. Eeckhaut, *Fermentatio*, 2, 86 (1955) [*Anal. Abstr.*, 3, 1882 (1956)].

5) 赤木満州雄, 手島節子, 薬誌, 77, 1043 (1957).

6) 三橋 靖, 小林文子, 衛生化学, 7, 12 (1959); 三橋 靖, 小林文子, 衛生化学, 9, 25 (1963).

7) 一番ヶ瀬 尚, 児島昭次, 市川正孝, 薬誌, 84, 707 (1964); 一番ヶ瀬 尚, 児島昭次, 栗崎ムツ子, 薬誌, 87, 1020 (1967).

試 薬 a) ズルチン——熱湯 (80°) より 2 回再結晶したもの (mp 173—174°).

b) 1N HCl, 10 w/v% NaNO₂, 6 w/v% NaOH の調製およびクロロホルムは試薬特級を用いた.

定量法 試料溶液 (ズルチン 10 μg—80 μg/ml 水溶液) 1 ml を栓つき試験管 (20 ml 用) にとり, 1N HCl 0.4 ml を加え, 10 min 間沸騰水浴中で加温する. 冷水で冷し室温にもどしてから 10% NaNO₂ 0.5 ml を加え, おだやかに振り混ぜたのち 30 min 放置する. つぎに 6% NaOH 0.5 ml を加え, おだやかに振り混ぜ 40 min 間室温で放置したのち, クロロホルム 10 ml を加え試験管を振り混ぜ器に装置し 5 min 1 回抽出する. クロロホルム層をピペットで分取しけい光光度計で測定する. 温度などの反応条件により多少けい光強度に変化があるので, そのつど検量線を作成しズルチンの含量を求める. なおけい光光度計の測定条件は励起波長 354 mμ で slit は 10, けい光波長 446 mμ で slit は 10—14 とし感度は 1—2 とした. 栓つき試験管のかわりに Fig. 1 のガラス器具を用いると, 反応から抽出分離まで同一器具で簡単に操作できる.

Fig. 1. Apparatus for Determination of Dulcin by Fluorescence Reaction

A: stopper, B: separator, C: reaction tube

Fig. 2. Absorption Spectra and Fluorescence Spectra of the Reaction Product from Dulcin (in Chloroform, Uncorrected)

concn. of dulcin, 6 μg/ml for fluorescence measurement

定量法の検討 1) けい光スペクトル ズルチンを蒸留水に溶解したものを試料溶液として定量法にしたがって操作し, そのけい光スペクトルをとると Fig. 2 のようになる. 励起波長は 354 mμ, けい光波長は 446 mμ でけい光強度が最高になった. なお高濃度の反応液について, そのクロロホルム抽出液を薄層クロマトグラフィー的に分離し, けい光物質の紫外線吸収を測定すると 354 mμ に極大があり, 励起波長と一致した. 脱エタノールした精製クロロホルムと特級クロロホルムとで比較したところ励起波長, けい光波長, けい光強度にまったく変化がないので特級試薬を用いた.

2) 検量線の作成 ズルチンの 10—100 μg/ml の濃度範囲の水溶液について定量法にしたがって操作し検量線求め, Fig. 3 を得た. クロロホルム中ズルチンとして 1—8 μg/ml の範囲では直線になるが, 10 μg/ml 以上では測定誤差が大きくなる. 6 μg/ml での σ は ±0.24 μg/ml であった.

Fig. 3. Calibration Curve of Dulcin

Fig. 4. Relationship between HCl Concentration and Fluorescence Intensity (Concn. of Dulcin: 6 μg/ml in CHCl₃)

3) **HCl の濃度** HCl の濃度のみを変化させ他は定量法にしたがって操作するとき Fig. 4 に示すようにけい光強度は 1N HCl のところでもっとも高いので 1N とした。なお沸騰水浴中で 10 min 間加温することにより誤差は減少した。

4) **NaNO₂ の濃度** NaNO₂ の濃度のみを変化させ他は定量法にしたがって操作したところ Fig. 5 に示すように 10% のときもっともけい光強度が高く、また食品からの回収実験でもけい光反応に対する影響がもっとも少なかったので 10% NaNO₂ を用いることにした。

5) **10% NaNO₂ 添加後の放置時間と反応温度** 10% NaNO₂ 添加後 6% NaOH 液を加えるまでの時間を変えて他は定量法にしたがって操作すると Fig. 6a) のように 20 min 以後はけい光強度は一定となるので、30 min 放置後 6% NaOH を加えることにした。また 10% NaNO₂ 添加後、温度だけを変化させ、他は定量法にしたがって操作すると Fig. 7a) に示すようにけい光強度に大きな変化はないので室温で操作することにした。なお 20° で最高を示した。

Fig. 5. Relationship between Fluorescence Intensity and NaNO₂ Concentration (Concn. of Dulcin: 6 μ g/ml in CHCl₃)

Fig. 6. Relationship between Fluorescence Intensity and Time Interval

curve a: after adding of 10% NaNO₂
curve b: after adding of 6% NaOH
concn. of dulcin: 6 μ g/ml in CHCl₃

6) **NaOH の濃度** NaOH の濃度のみを変化させて他は定量法にしたがって操作したところ Fig. 8 に見られるように 6% NaOH でもっとも高いけい光強度を示した。

7) **6% NaOH 添加後の反応温度と放置時間** 6% NaOH を加えたのちの反応温度条件は Fig. 7b) に示したようにけい光強度に大きな変化はないので室温で操作することにした。なお 20° で最高を示した。また 6% NaOH を添加してからクロロホルムで抽出するまでの時間を変えて操作すると Fig. 6b) のように 40—70 min までけい光強度は高く一定になるので、40 min 間放置してから抽出することにした。

8) **けい光物質の安定性** ズルチン水溶液を定量法にしたがって反応させ抽出したクロロホルム液は室温で暗所に密せんして保存し、時間ごとに分取してけい光光度計で定量した。その結果クロロホルム中のけい光物質は 30 min 後から 48 hr にわたってけい光強度に変化はなかった。

Fig. 7. Effects of Temperature after Adding of 10% NaNO₂ and of 6% NaOH

curve a: 10% NaNO₂ curve b: 6% NaOH
concn. of dulcin: 6 μ g/ml in CHCl₃

Fig. 8. Relationship between Fluorescence Intensity and NaOH Concentration

(Concn. of Dulcin: 6 μ g/ml in CHCl₃)

食品からの回収実験 ジャム, アン, ジュース, しょう油, みそ, かまぼこについてズルチンを加えてその回収実験を行なった. 各食品 10 g をとりズルチン水溶液 (1 mg/ml) 3 ml を加えてよく混和し加温したもの (ただしかまぼこは細切し擦りつぶしズルチン水溶液を加えたもの) を, ジャム, アン, ジュースについては林等⁸⁾ の酢酸エチルによる直接抽出法によって回収し, しょう油, みそ, かまぼこについては井上, 林等⁹⁾ の透析法によって回収し定量した結果, Table I のようにいずれも盲けい光はなく 94—96.7% の回収率を得た.

TABLE I. Recovery Test of Dulcin in Some Foods

Foods	Concn. of dulcin in test soln. ($\mu\text{g/ml}$)		Recovery (%)
	Added	Found	
Juice	0	0	—
	60.0	58.0	96.7
Fruit Jam	0	0	—
	60.0	56.4	94.0
An	0	0	—
	60.0	57.0	95.0
Soy	0	0	—
	54.5	53.9	98.8
Miso	0	0	—
	54.5	52.3	95.9
Kamaboko	0	0	—
	54.5	51.9	95.2

他物質の発けい光性 他の人工甘味料, アミノ酸, 保存料, 若干の構造類似物質について定量法と同じけい光反応を行なったところ Table II のような結果を得た. アニリンは励起波長 346 m μ , けい光波長 404 m μ のけい光物質が得られ, ズルチンの等モル濃度の最高けい光強度に比較して未補正ながら 10% のけい光強度を示した. また *p*-フェネチジンは励起波長, けい光波長ともにズルチンと一致し, けい光強度もズルチンの等モル濃度に等しかった. しかし Table I の回収実験の際ズルチンと等量の *p*-フェネチジンとアニリンが混在しても抽出操作でそれらは除去できズルチンの定量にまったく影響がなかった.

TABLE II. Fluorescence of Products Obtained from Other Substances by This Reaction

Substance	Fluorescence	Substance	Fluorescence
Saccharin	none	Phenylalanine	none
Sodium cyclamate	none	Aniline	Ex. 346 m Em. 404 m (10%) ^{a)}
Urea	none	<i>p</i> -Methoxyphenol	none
Alanine	none	<i>p</i> -Phenetidine	Ex. 354 m Em. 446 m (100%) ^{a)}
Arginine	none	Benzoic acid	none
Asparaginic acid	none	Salicylic acid	none
Tryptophan	none	Ethyl <i>p</i> -hydroxy benzoate	none
Tyrosine	none	<i>p</i> -Aminophenol	none

a) comparative value of fluorescence intensity in equimolar concentration (dulcin: 100%)

考 察

この定量法は試薬の調製, 反応条件が他の定量法に比べ簡単であり, 共存物質の影響も少なく選択的である. ただアニリンと *p*-フェネチジンがけい光物質を生成するが, いずれも酢酸エチルによる抽出操作中にこの妨害を

8) 林 敏夫, 食品衛生研究, 17, 63 (1967).

9) 井上哲男, 林 敏夫, 食品衛生学雑誌, 9, 312 (1968).

除去することができる。ズルチンのけい光物質は 48 時間にわたりけい光強度に変化なく非常に安定である。検量線はクロロホルム中 1—8 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線になるが高濃度では誤差が大きくなるので、その場合には試料溶液を測定可能な濃度にうすめる必要がある。食品からの添加回収実験では食品からの盲けい光はなく、回収率も高く良好な成績を得たので十分に食品中のズルチンを定量することができると思う。なおズルチンからのけい光物質の構造や反応機構は現在検討中であり、食品中のズルチンのけい光法による定性試験に関しては次回に報告する。

謝辞 本研究にあたり、御指導ならびに御校閲を賜った東京大学教授 田村善蔵博士に深謝いたします。また終始御鞭撻を賜った当所食品部部長 田辺弘也博士に感謝いたします。