

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
平成15年度分担研究報告書

食品香料を含む食品添加物の確認試験としての赤外吸収スペクトルに
関する研究

分担研究者 斎藤 寛 岡山大学薬学部 教授

研究要旨 本研究では、第7版食品添加物公定書記載のアミノ酸、とくにL体とDL体（ラセミ体）ともに収載されているアミノ酸について、その確認試験に赤外吸収スペクトル法（IR法）が活用できるか否かを明らかにするため、アミノ酸のIRについて検討を加えた。その結果、IR法は、アミノ酸の確認に有用であること、さらに、一部のアミノ酸を除き、IR法で、L体とDL体を区別して確認できることが分かった。この結果から、アミノ酸の確認にIR法をさらに活用すべきであるとの結論を得た。

A 研究目的

赤外線吸収スペクトル（以下IRと略する）その簡便性と確実性から、有機・無機化合物を問わず、その結晶形を含めた確認試験に有用で、世界的にも各種化合物の確認に広く活用されている。しかも、IR測定用の機器も最近一段と進歩し、波数再現性のよいフーリエ変換型（FT）分光器なども安価に市販され、 $4000-400\text{ cm}^{-1}$ の領域のIRスペクトルを簡単に得られるようになっている。このような状況のもとで、第8版食品添加物公定書の確認試験用の基礎的資料を得るため、第7版添加物公定書に記載されているアミノ酸のうち、L体とDL体ともに収載されている4種のアミノ酸について、これらのアミノ酸の確認試験用にIRを測定し、L体とDL体のIRの間の差の有無を明らかにすることを試みることにした。また、L体のみ記載されているアミノ酸についても若干の検討を加えることにした。

B 研究 方 法

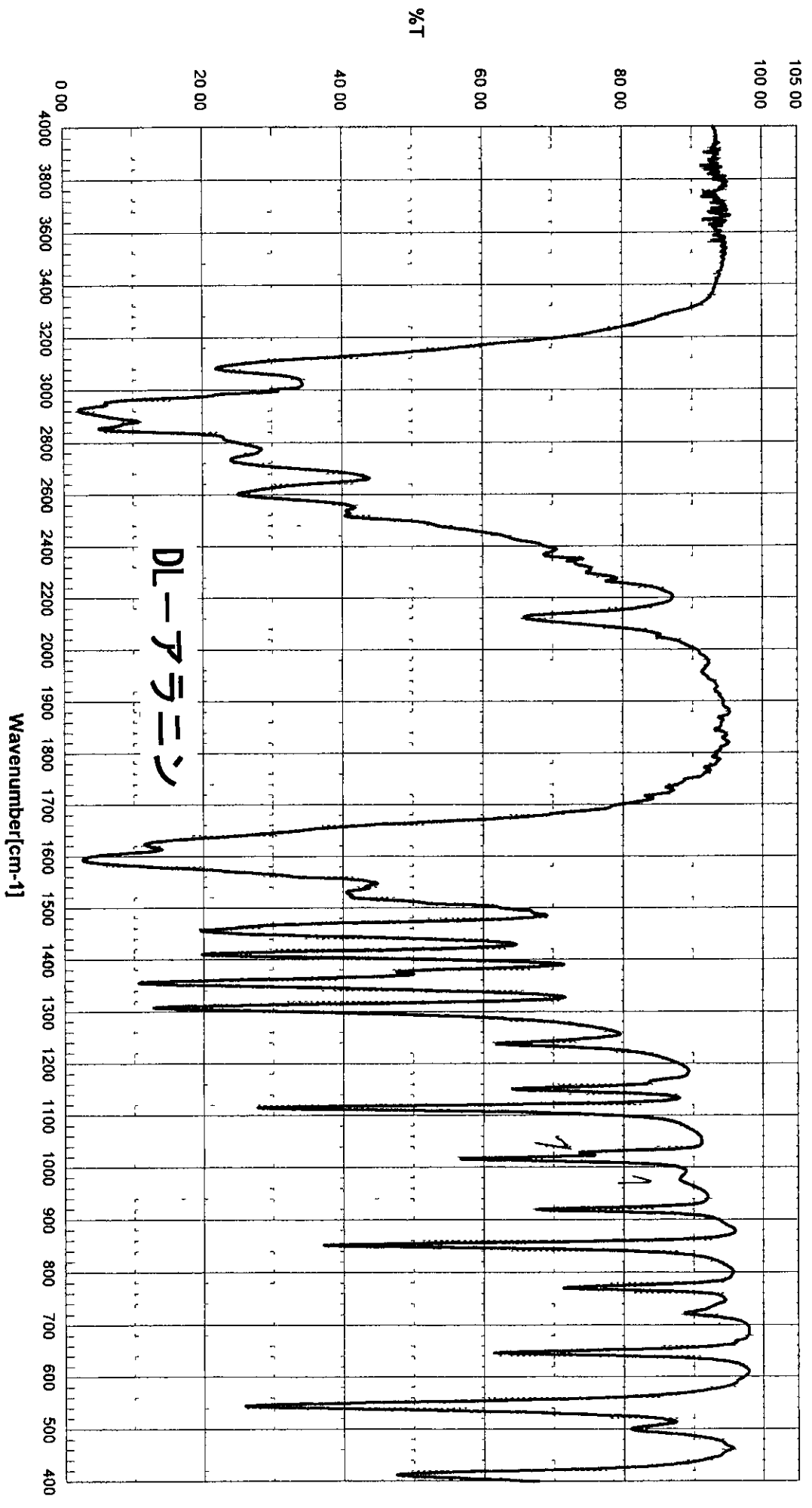
第7版食品添加物公定書にL体とDL体が収載されているアミノ酸は、DL-とL-アラニン、DL-とL-トリプトファン、DL-とL-トレオニンおよびDL-とL-メチオニンの4種類である。これらのアミノ酸は、主に市販試薬特級品を使用した。また、DL-アラニンとDL-トレオニンについては、食品添加物協会を通して入手した食品添加物も使用した。いずれのアミノ酸も固体であるので、結晶形が変化しないとされる流動パラフィンを用いるペースト法(ヌショール, Nujol 法)を用いて測定した。また、本研究では、ヌショール法では、対照にKBrセル板1枚(必要に応じて減光器を使用)、分解能としては 4 cm^{-1} (36回繰り返し)を用いた。なお、使用した分光器(FT-IR装置)は、簡易型の日本分光(株)製フーリエ変換形赤外分光光度計で、公称 400 cm^{-1} まで測定可能であるか、実用的な波数限界は約 450 cm^{-1} である。

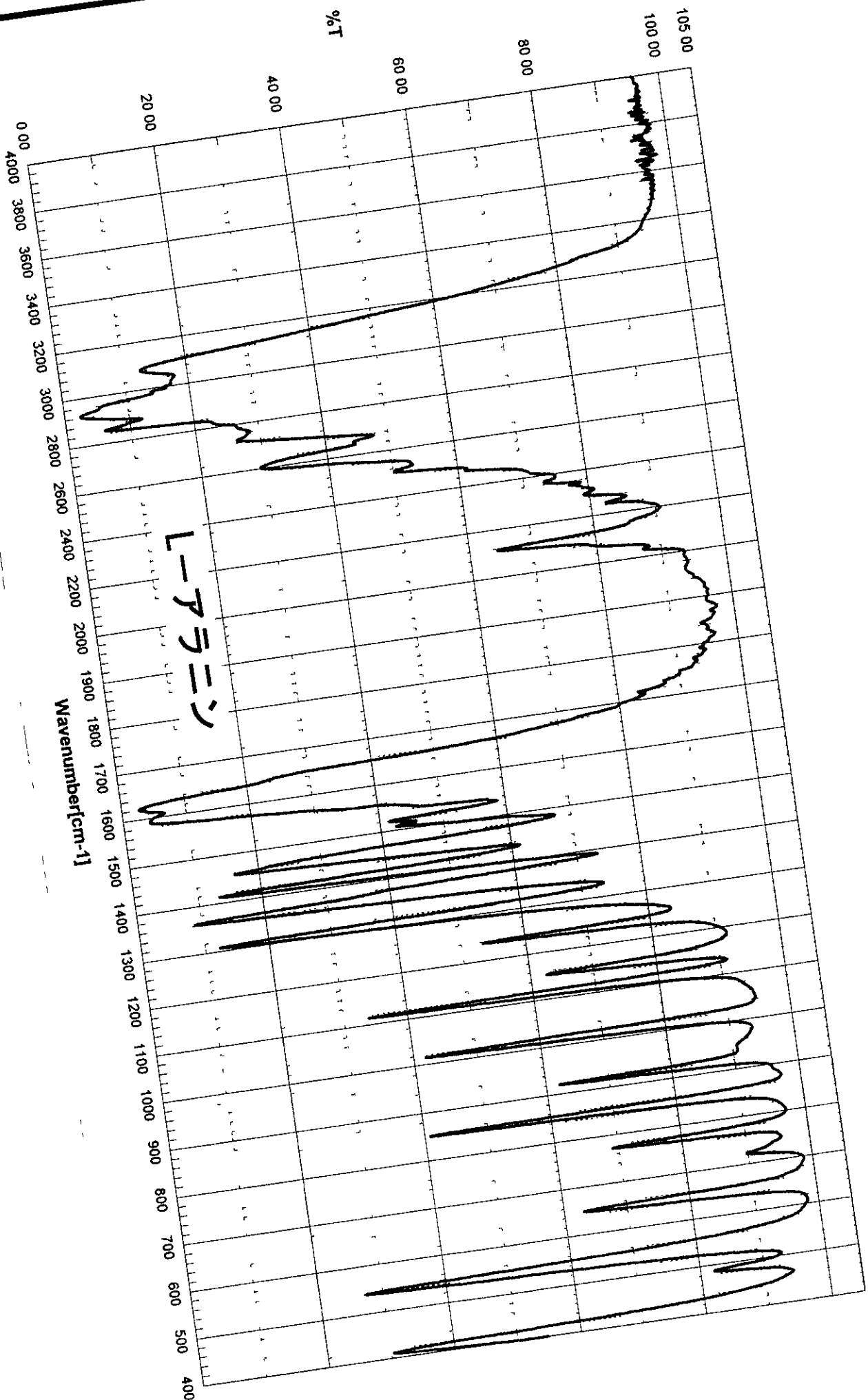
C 研究結果

一般に、アミノ酸の光学異性体間、すなわち L 体と D 体とでは、結晶状態でも完全な鏡映構造となる。そのため、分子内および分子間力とも両者は同じになるのて、結晶形をも区別できる IR ても、固体状態では L 体と D 体は IR は一致し、粉末 X 線法のみならず IR 法からも区別かてきない。一方 DL 体は、D 体と L 体か対となつて結晶を形成する場合と形成しない場合かある。前者の場合、DL 体の結晶は L 体又は D 体とは異なる結晶構造をとる。そのため、固体状態では、両者の IR は、分子内あるいは分子間力か異なるため、互いに異なる。しかし、後者の場合、D 体と L 体のみの結晶の混合物となるため、L 体 (D 体) と DL 体とを IR では識別てきない。この場合、X 線構造解析も単結晶か得られないため、適用てきない。一方、DL 体か固有の結晶となるか否かは、構造からは予測てきないので、IR から判断するか、もしくは X 線構造解析のデータを検索するしか方法かない。しかし、X 線を使う方法は煩雑であるため、確認試験には IR 法の方かより簡便かつ確実であると考えられる。たはし、純度試験なとて、旋光度なとからチェックする必要は当然ある。

1) L-と DL-アラニン

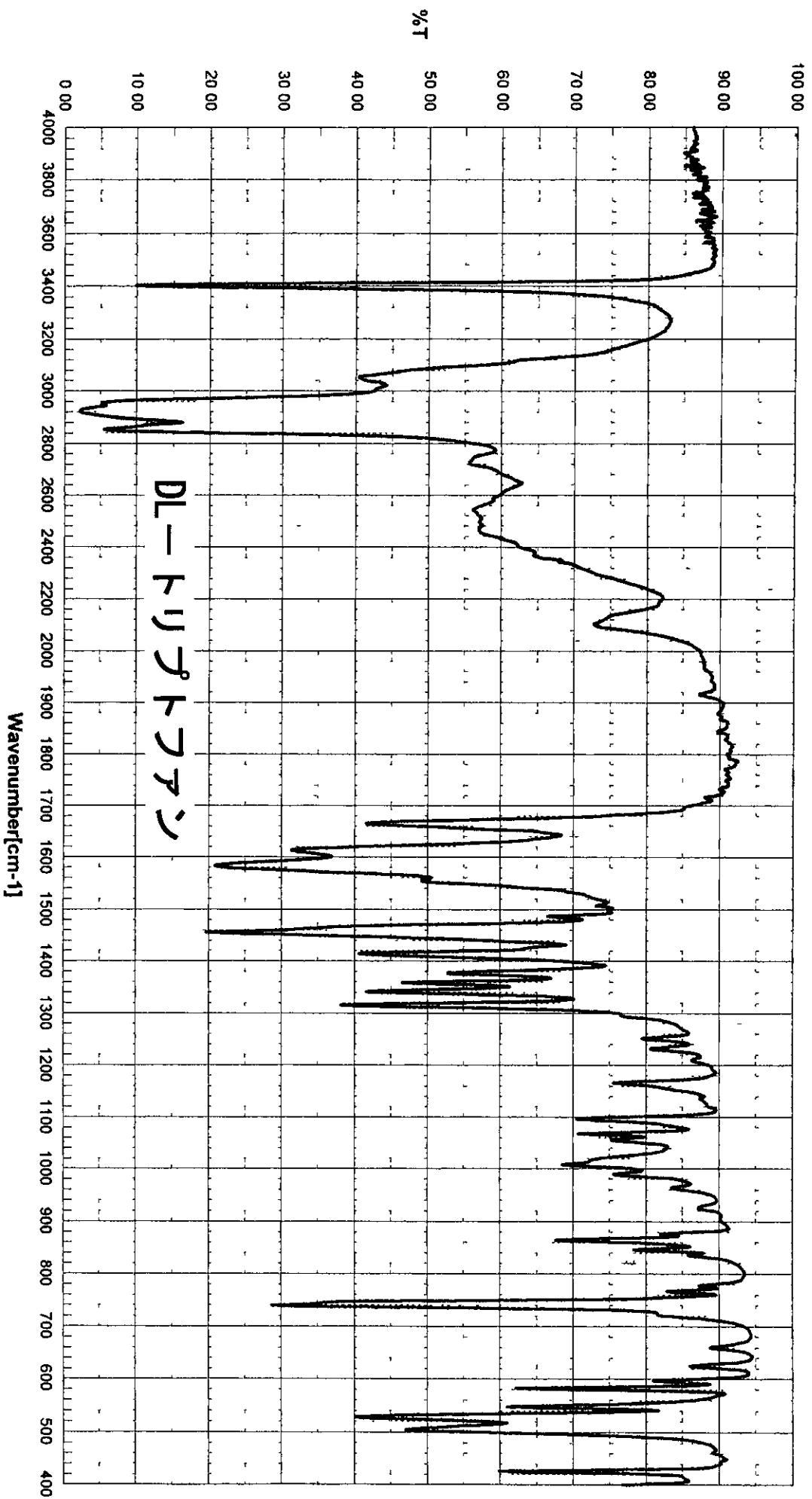
次の5と6ページに示すように、L体とDL体のIRを比較してみると、指紋領域を含め比較的類似し、しかも各吸収帯の波数にも差がほとんどない。しかし、C=O伸縮振動とNH₂変角振動が観測される1650-1500 cm⁻¹の領域に観測される吸収帯には、相対強度の差が認められる。とくに、L体ではC=O伸縮振動による最も強い吸収帯が、factor group splitting (結晶場による分裂)あるいはフェルミ共鳴によって2本に分裂し、ほぼ同じ強度で1620と1590 cm⁻¹付近に観測されるか、DL体では1620 cm⁻¹付近の吸収帯の強度が弱く、相対強度に差が認められる。また1500~1530の中程度の吸収帯には、波数にも差が認められる。その他の領域の吸収帯にも若干の差が認められるか、顕著ではない。強いて指摘すれば、DL体で↑印を付けた吸収帯が、DL体のみで観測され、さらに、相対強度にも若干の差が認められる。これらの結果から、L体とDL体との結晶構造は、異なる状態にあると考えられる。なお、アラニンの場合、波数より相対強度に差が強く観測されるので、両者を確認するには1650-1500 cm⁻¹の領域を中心としたIRのパターンで行なう必要がある。

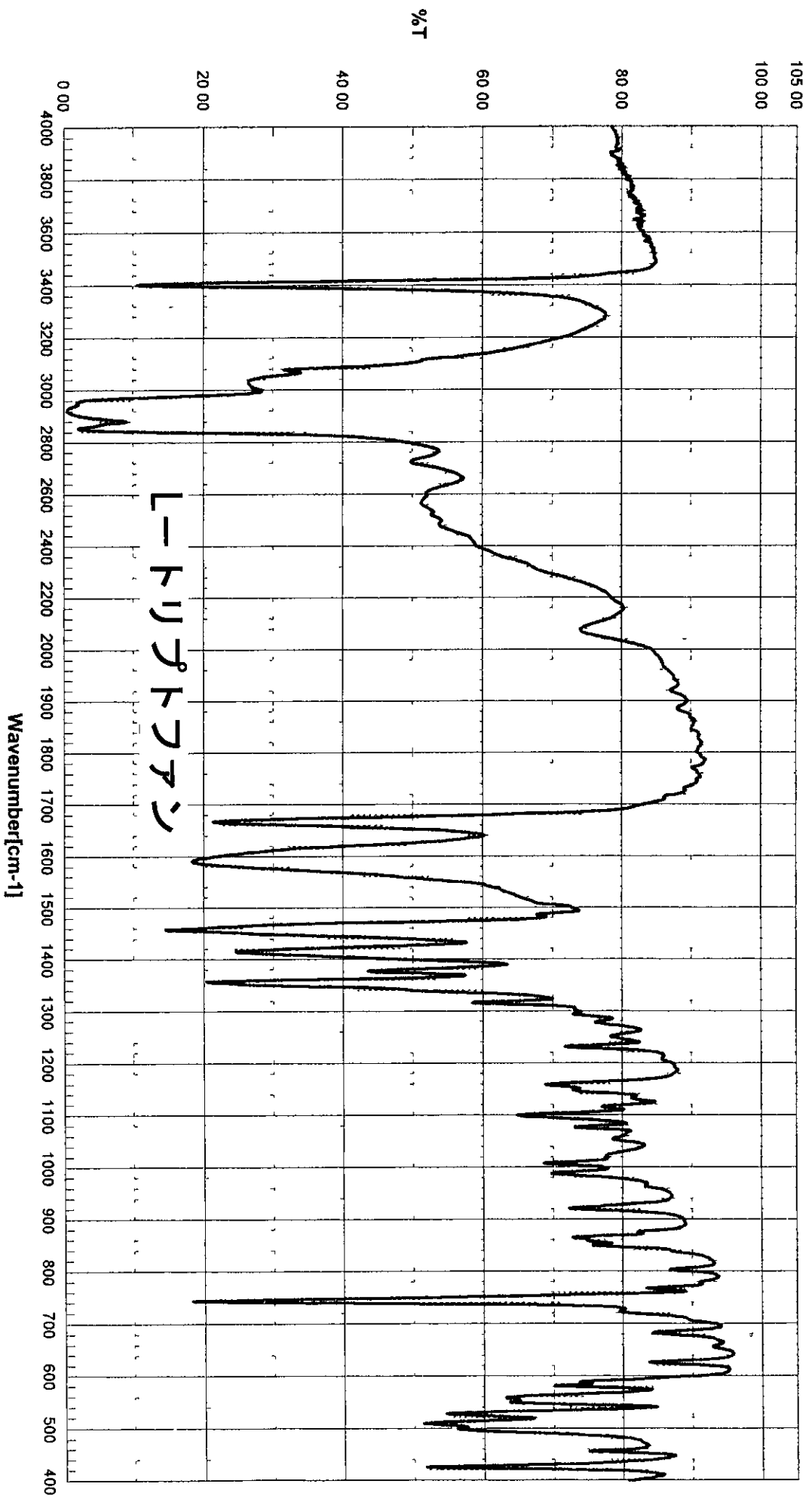




2) L-と DL-トリプトファン

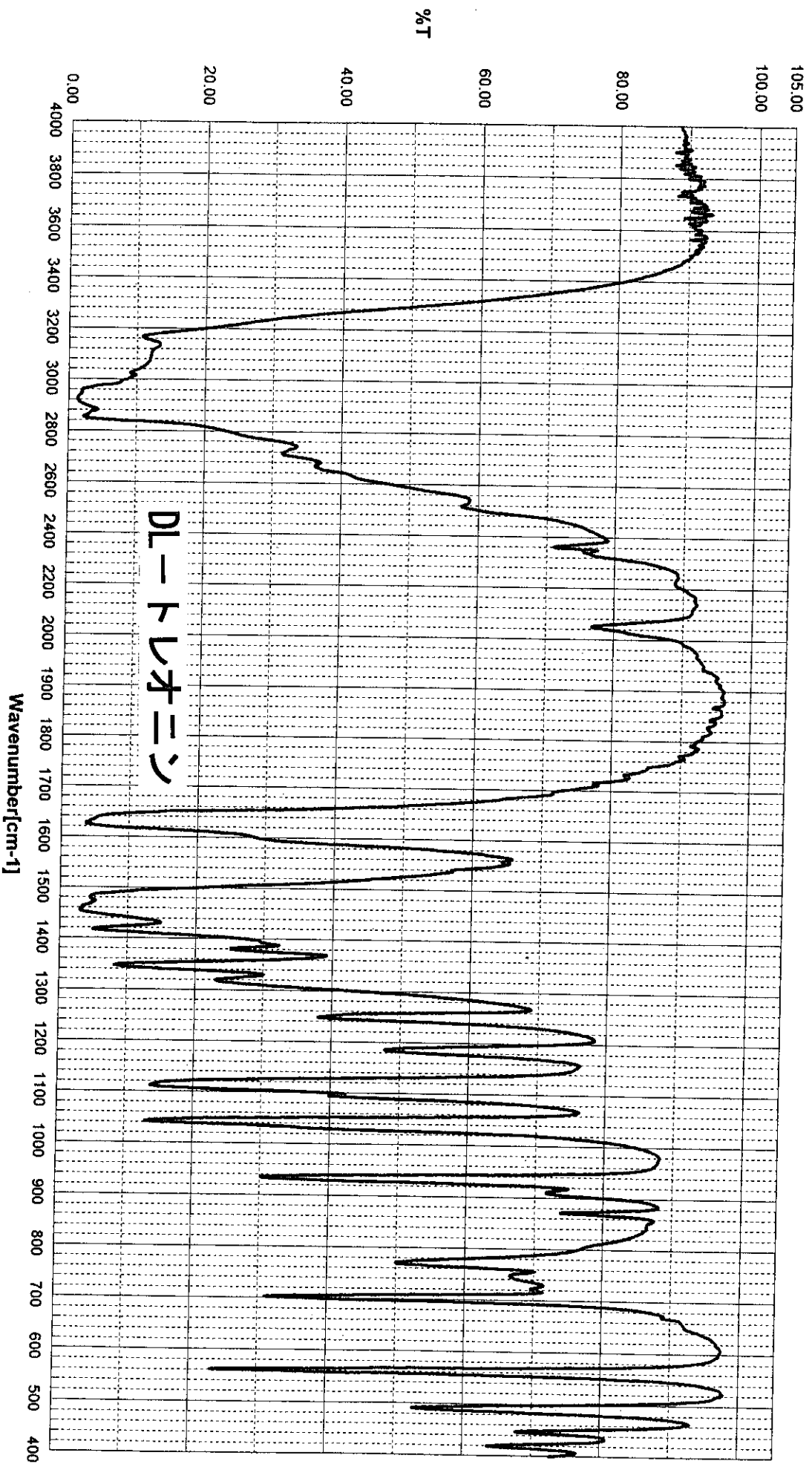
次の 8 と 9 ページに示す L 体と DL 体の IR を比較してみると、C=O 伸縮振動と NH₂ 変角振動が観測される 1650-1500 cm⁻¹ の領域に観測される吸収帯は、明らかに波数のみならず、観測される吸収帯の数まで異なる。さらに、指紋領域、とくに 1300~800 cm⁻¹ の領域では、各吸収帯の波数と相対強度に差が認められ、同じ分子構造とは思えないほど、互いに異なっている。しかし、強い吸収帯の波数は、両者で類似しているものもある。これは、L 体の結晶中での分子構造が、DL 体では D 体と L 体とで対を作ることで、分子内の捻れ角の変化のため、大きく変化し、さらに水素結合などの分子間力も大きく変化したためと考えられる。このように、強い吸収帯が比較的類似し、他の吸収帯が大きく異なっている場合、L-と DL-トリプトファンを確認するには、波数規定でも可能であるか、しばしは誤認される。従って、類似の吸収帯があるため、IR パターンでの確認を行なうべきであると考えられる。

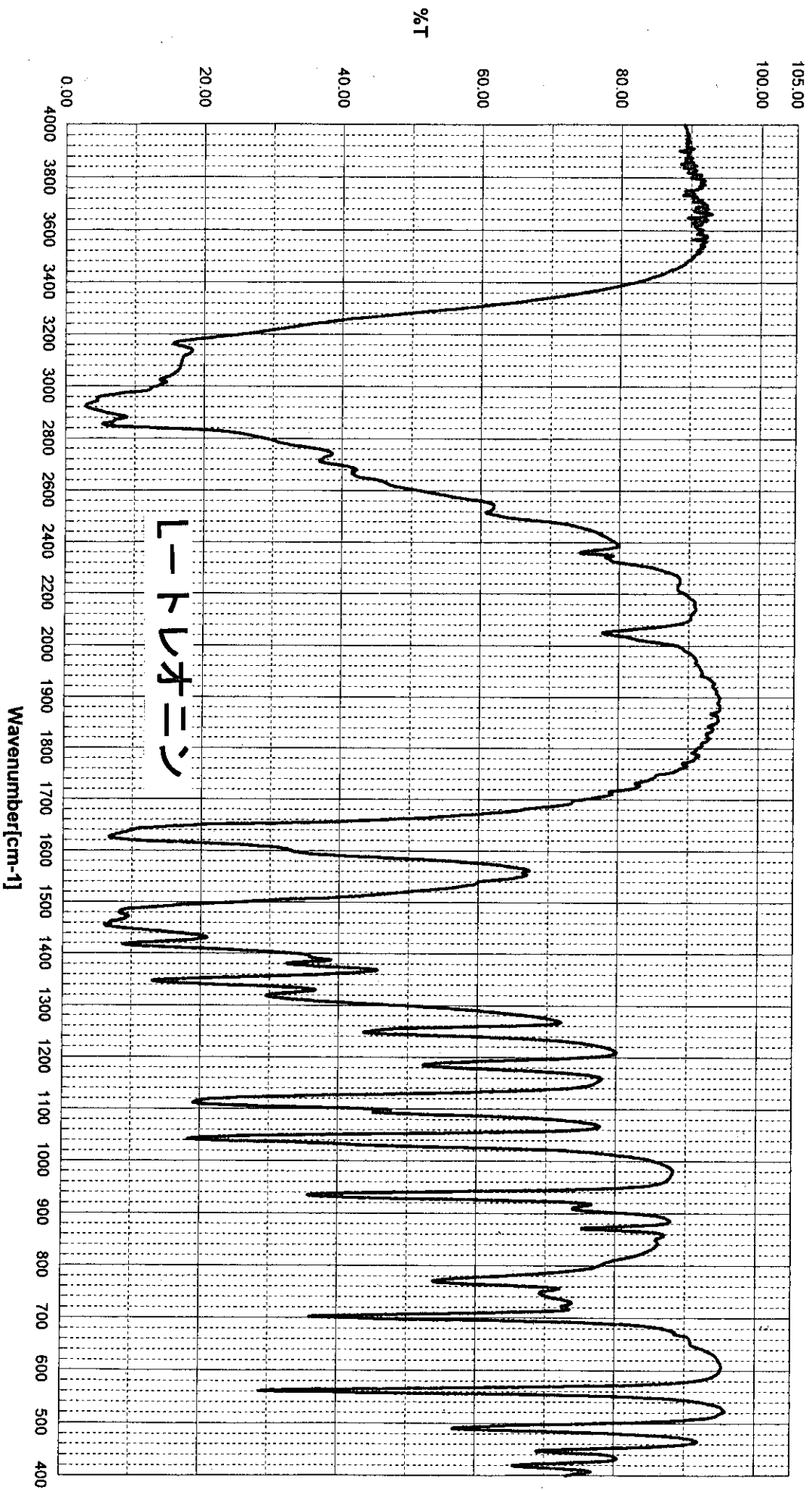




3) L-と DL-トレオニン

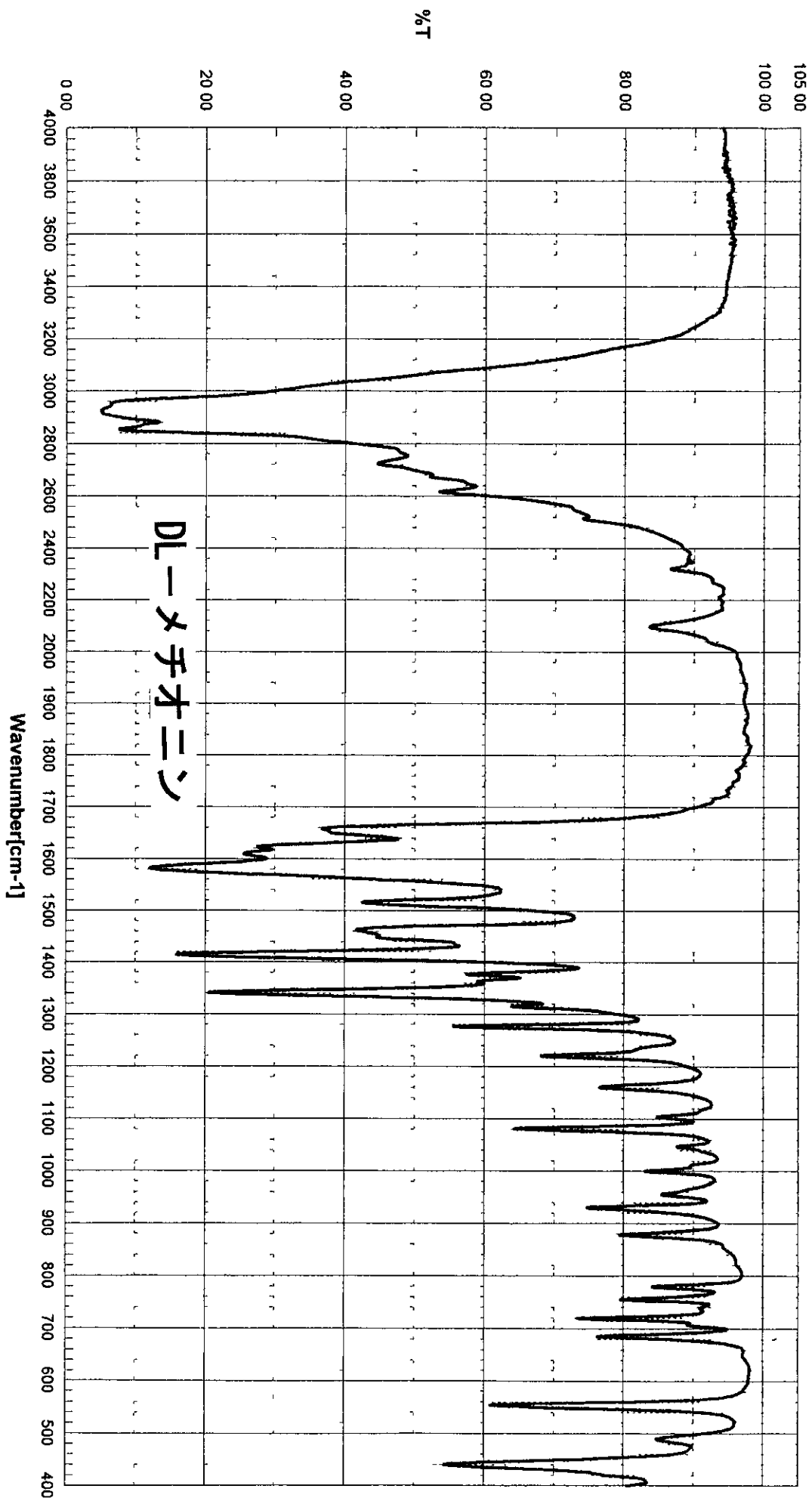
トレオニンの場合 11 と 12 ページに示すように、L 体と DL 体の IR は全領域に渡って完全に一致し、両者の区別はできない。このように DL-と L-トレオニンの IR が一致するのは、L 体のみと D 体のみとからなる微結晶の等量集合物を生成するためと考えられる。従って、L-と DL-トレオニンでは、IR からトレオニンとしては確認できるか、DL 体と L 体との区別はできない。従って、両者を区別できる確認試験は、旋光度を用いる方法しかないと考えられる。

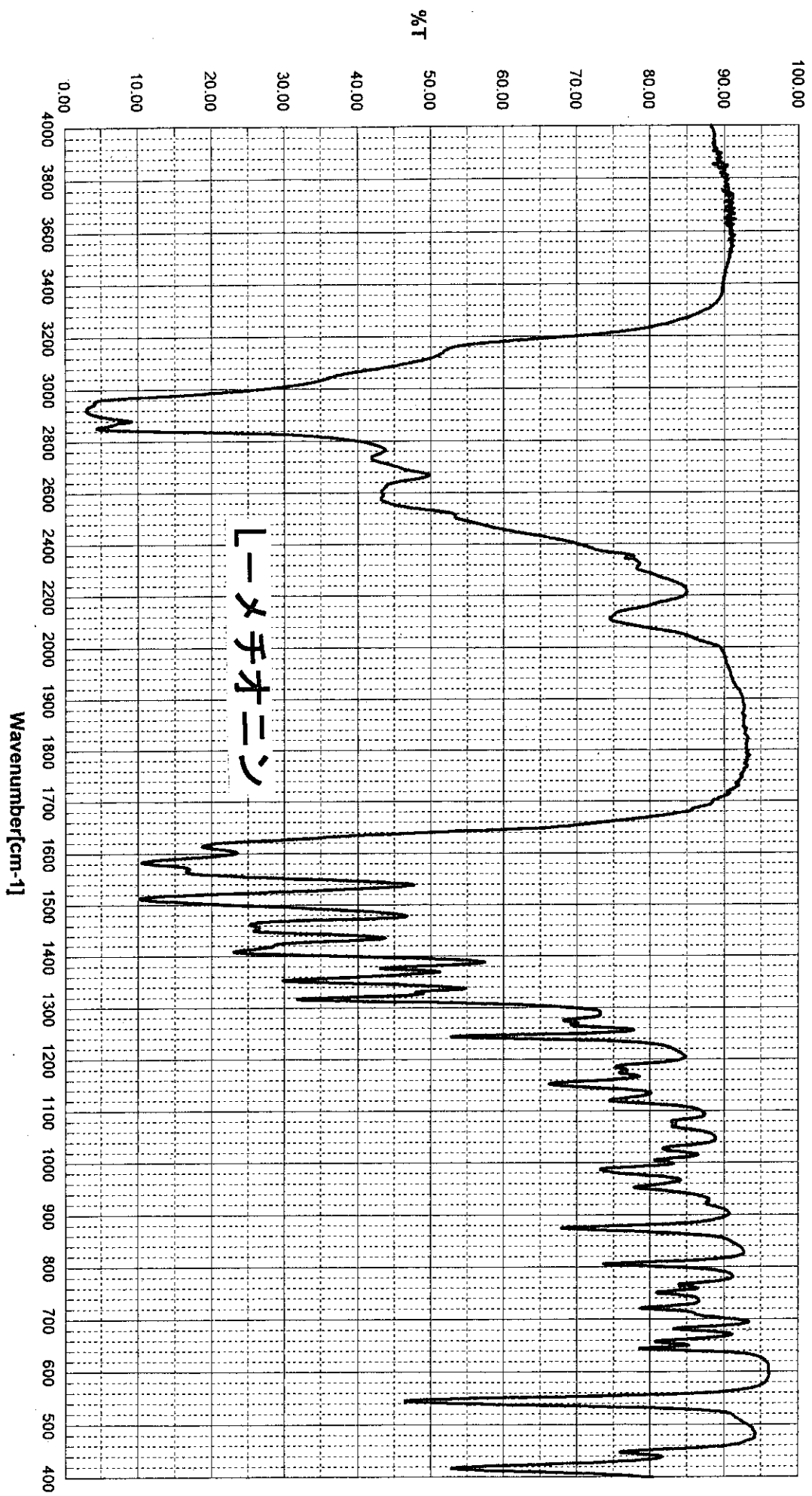




4) L-と DL-メチオニン

L体とDL体のIRを比較してみると14と15ページに示すように、指紋領域を含め各吸収帯の波数と相対強度に差が認められ、同じ分子構造とは思えないほど、互いに大きく異なっている。これは、上記トリプトファンの場合と同様に、L体の結晶中での分子構造が、DL体ではD体とL体とで対を作ること、分子内の捻れ角の変化したため、大きく変化し、さらに分子間力も変化したためと考えられる。従って、両者を区別するには、類似の吸収帯がないわけでもないの、IRパターンでの確認を行なう方がよい。





5) その他

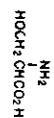
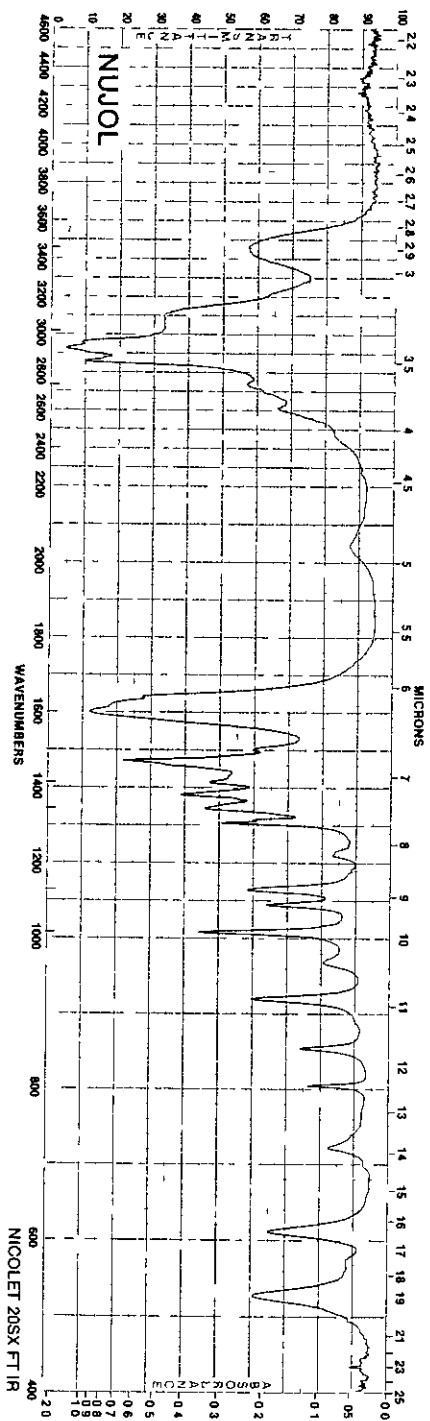
第7版公定書には、L-グルタミン酸、L-グルタミン酸、L-セリン、L-ハリン、L-リシンやL-ロイシンなど多数のL-アミノ酸が収載されている。これらのうちL-グルタミン酸、L-セリン、L-ハリン、L-リシンやL-ロイシンのIRは、上記トリプトファンやメチオニンの場合と同様に、明らかに対応するDL体とは異なっている。一例として17ページにセリンの場合を示した。このように、L体とDL体とのIRは互いに異なることも多い。従って、アミノ酸とその関連物質などのように光学活性のある物質の確認試験には、IRを公定書に導入するのが望ましいと考えられる。また、アミノ酸以外でも、光学異性体とラセミ体がある場合は、同様にIRを活用すべきであろう。

S4250 CAS [312-84-5]
D-SERINE Sigma Grade

FW 105.1
 mp 270°C (dec)
 [α]_D²⁰ -13.6° (c=10.0, 0M HCl)

3453.9 1599.0 1342.3
 3013.1 1498.6 1125.7
 2728.9 1411.0 1013.5

A

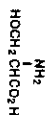
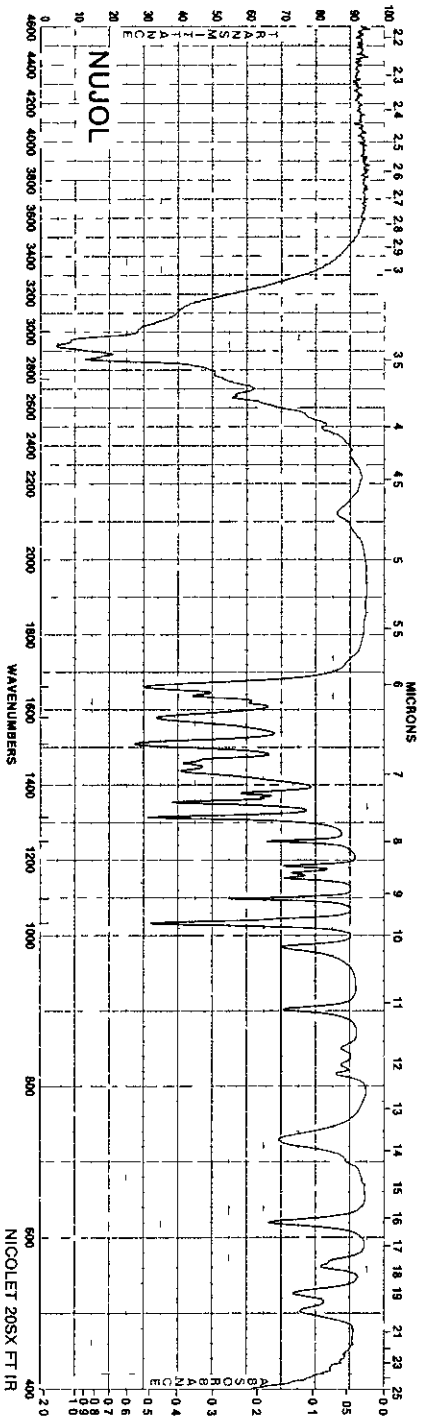


S4375 CAS [302-84-1]
DL-SERINE

FW 105.1
 mp 240°C (dec)

3006.3 1577.2 1247.7
 2748.3 1507.4 1094.7
 1658.8 1312.1 1029.9

B



D 考 察

食添アミノ酸には、多くの場合、その L 体と DL 体との IR には、差が認められる。これは、両者の結晶中での分子構造（とくに捻れ角）による分子内力や分子間力の差によるものと考えられる。この差は、IR では、波数や相対強度の差として観測される。換言すれば、官能基が全く同じであっても固体状態では IR が異なる。従って、旧態依然とした波数規定による官能基による確認試験は廃止し、参照 IR スペクトル法による確認試験に可能な限り置き換えるべきであると考えられる。

E 結 論

食品添加物に使用されているアミノ酸の多くの L 体と DL 体の区別は IR を用いれば可能である。従って、アミノ酸の確認試験に IR 法、とくに参照 IR 法を活用すべきである。

Ⅱ 分担研究報告書

7 食品中の未許可添加物の分析法の開発

分担研究者 川崎 洋子

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

（分担研究報告書）

食品中の未許可添加物の分析法の開発

分担研究者 川崎洋子（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官）

研究要旨 1 2003年にEU諸国で乾燥唐辛子を用いた製品から、EUで使用が認められていない赤色系の油溶性色素スダンIが検出された。我が国においても、パスタソースからスダンIが検出され、自主回収の措置がとられた。このようなことから、我が国で流通している唐辛子を原料にした製品中のスダンIの分析法策定を行う必要があった。その際、スダンI以外の色素が使用されている可能性のあることから、赤色系の油溶性フェニルアゾ系色素（スダンII、スダンIII、スダンレッドG、スダンオレンジG）4種を含めた分析法を検討した。試料からエタノールで抽出し、逆相系HPLCを用い、480nmで検出した。市販の香辛料に適用したところ、回収率70%以上、検出限界5 μ g/gであり、ルーチン分析に適した、簡便で迅速な分析法が確立された。

2 牛乳の製造、加工機械、器具及びビンあるいはパック等の殺菌消毒に用いられた塩素系の殺菌消毒剤が機械、容器などに残留し、牛乳に移行するとクロロホルム等有機塩素化合物生成の原因物質となる。臭気は比較的少ない亜塩素酸塩では残存が見過ごされる懸念がある。そこで、牛乳中の亜塩素酸塩の微量定量法を検討した。除タンパク剤に酢酸亜鉛と水酸化ナトリウムで生成する水酸化亜鉛をpH7で用いさらに、HPLC用試験溶液をpH9に調製することにより、亜塩素酸イオンとし、セミマイクロポストカラム誘導体化HPLCで測定した。0.2 μ g/gでの添加回収率は86%、変動係数(CV%)は2.7%であり良好な微量定量法が確立された。

協力研究者

中里光男（東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科課長補佐）

杉本直樹（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官）

1 香辛料を使用した加工食品中のスダンI及びその同族体の分析

A 研究目的

2003年5月に最初にフランスで輸入チリペッパー（唐辛子）粉末から、EU諸国で

使用の認められていない赤色系の油溶性色素スダンIが検出され、その後、イギリス、イタリア、ドイツ、フィンランド等のEU諸国においても乾燥唐辛子を用いたチリパウダー、チャツネ、カレーパウダー、ソース、調味料等の多くの製品から相次いで検出された。スダンIはインド原産の乾燥唐辛子に使用されていたものであることが明らかにされているが、我が国においても2003年9月にインド産の乾燥唐辛子を使用したパスタソースからスダンIが発見され、自主回収の措置が取られた¹⁾。このような