

図 6 2,3,5,6テトラメチルピラジン (製品) のKBr法による赤外スペクトル

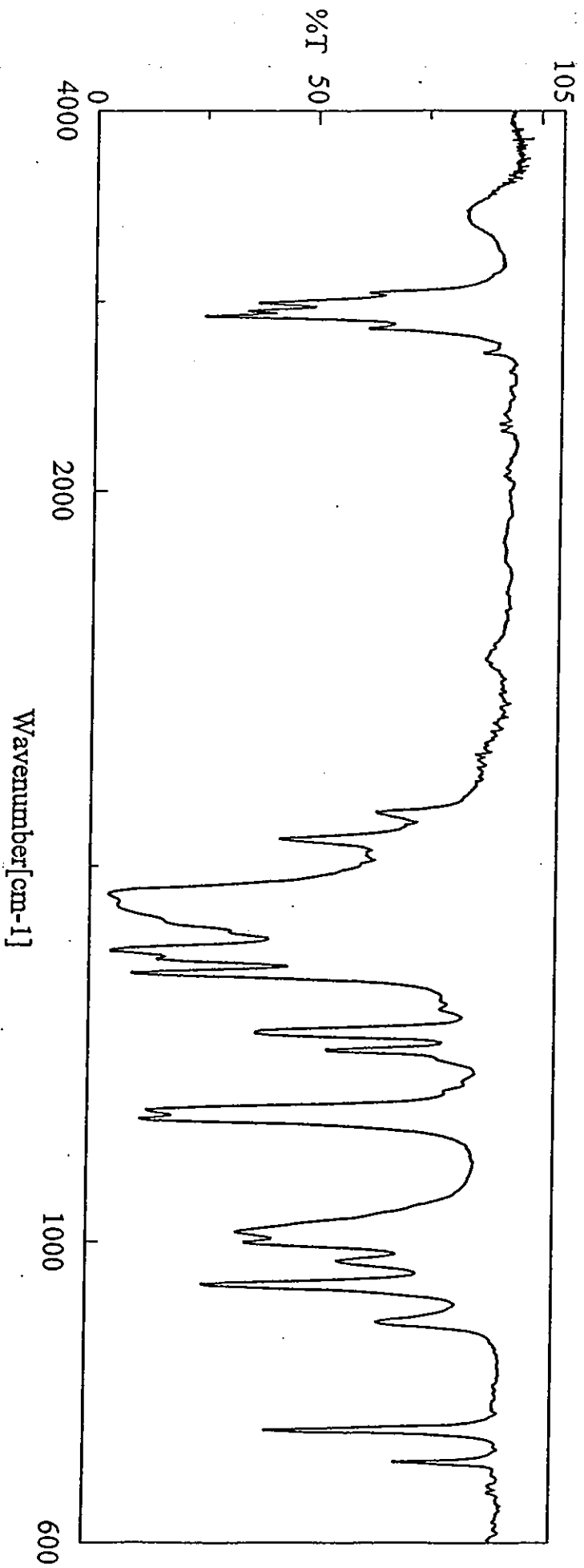


図7 2,3,5トリメチルピラジン (アルドリッチ社製) の液膜法による赤外スペクトル

|                     |            |              |                            |
|---------------------|------------|--------------|----------------------------|
| HIT-NO=3158         | SCORE= ( ) | SDBS-NO=6213 | IR-NIDA-29394 : NUJOL MULL |
| TETRAMETHYLPYRAZINE |            |              |                            |
| $C_6H_{12}N_2$      |            |              |                            |

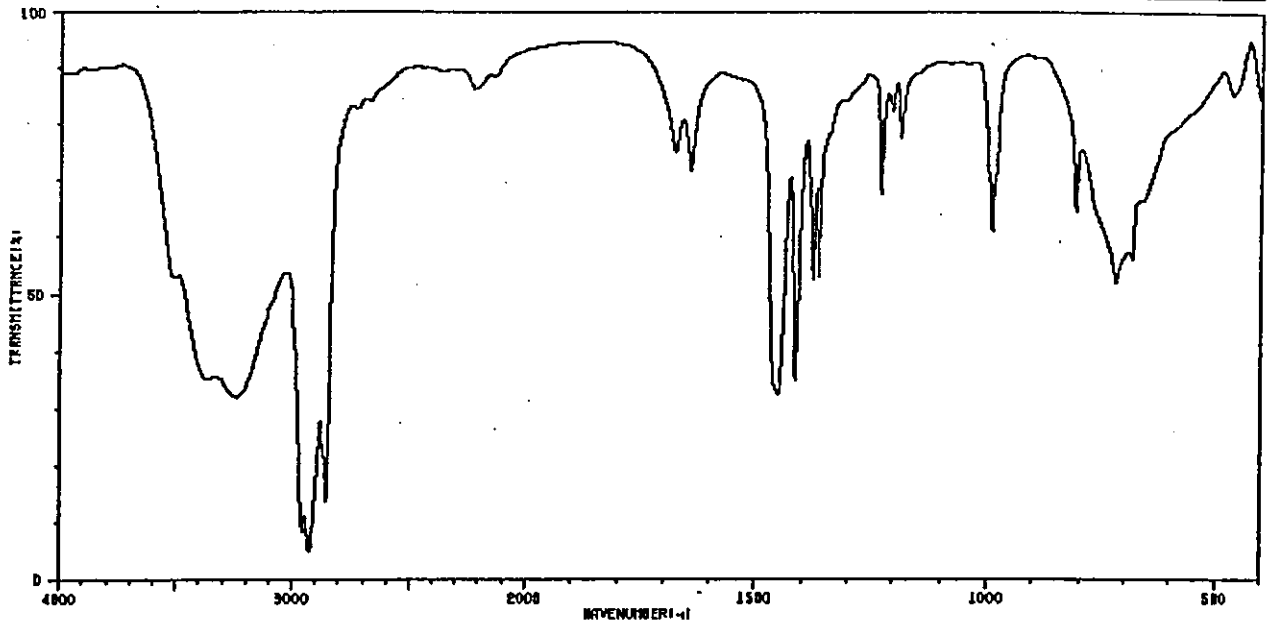


図 8 産総研による赤外スペクトル (ペースト法)

|                     |            |              |                          |
|---------------------|------------|--------------|--------------------------|
| HIT-NO=3969         | SCORE= ( ) | SDBS-NO=6213 | IR-NIDA-18883 : KBR DISC |
| TETRAMETHYLPYRAZINE |            |              |                          |
| $C_6H_{12}N_2$      |            |              |                          |

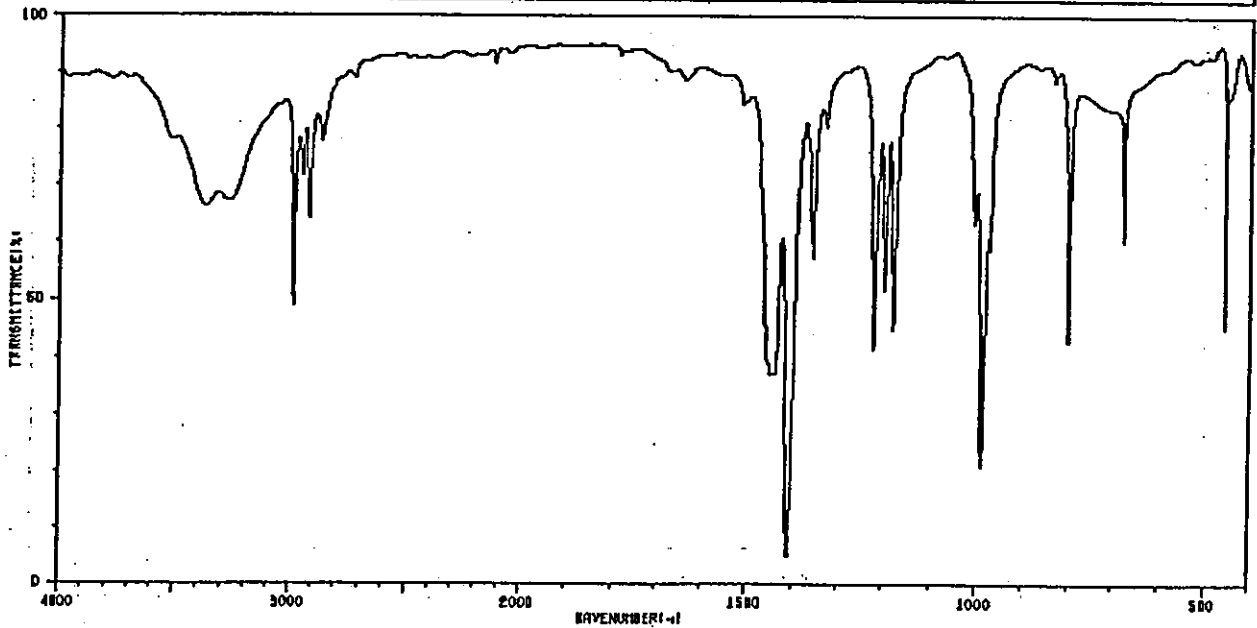


図 9 産総研による赤外スペクトル (KBr 法)

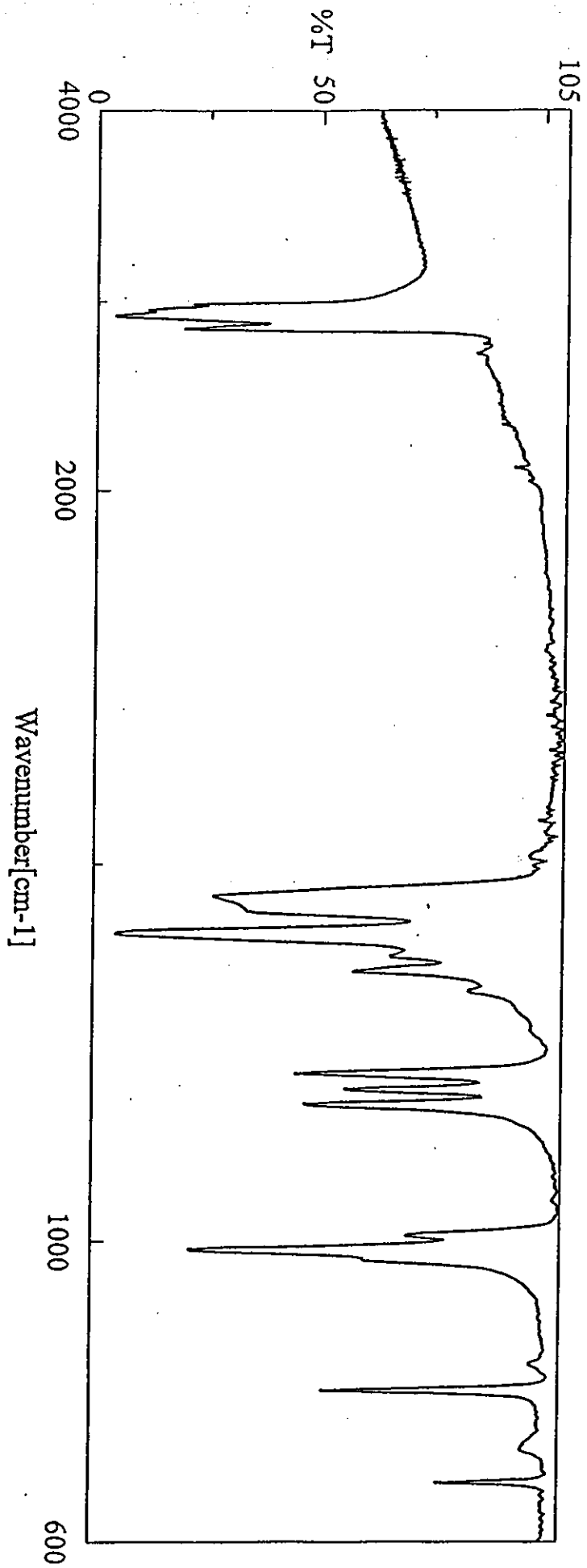


図 10 2,3,5,6テトラメチルピラジンの赤外スペクトル (ペースト法)

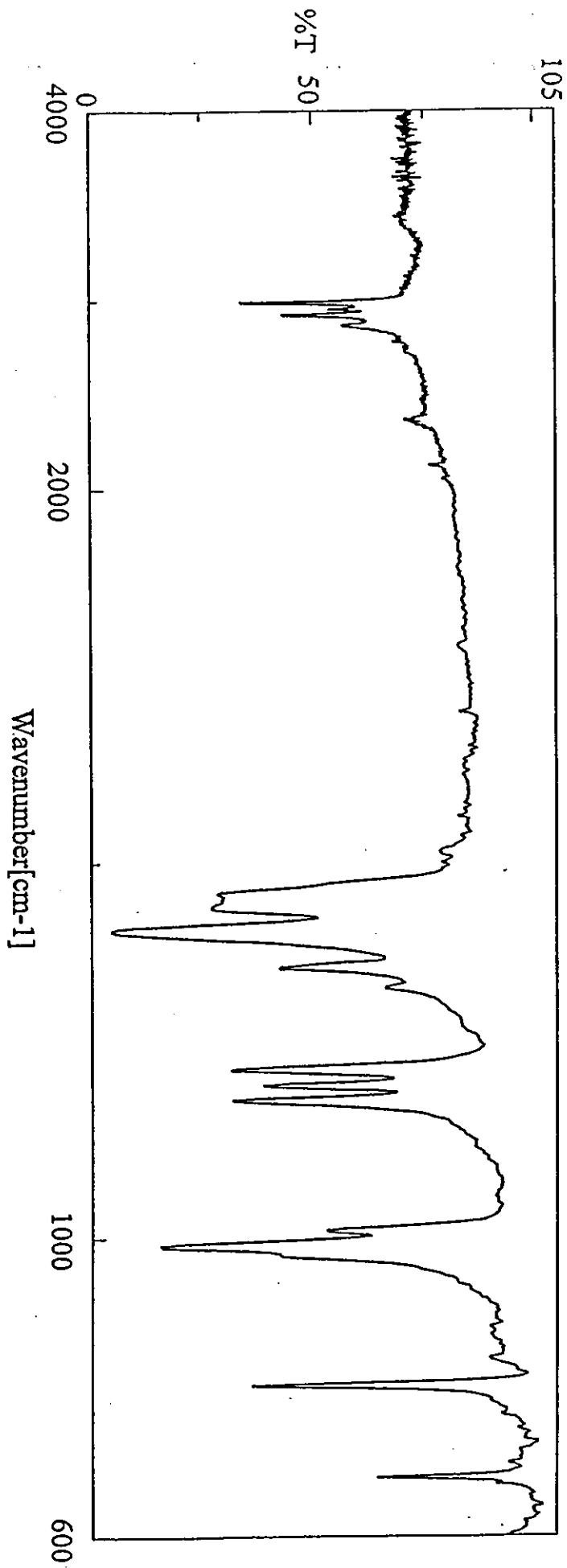


図 11 2,3,5,6テトラメチルピラジンの赤外スペクトル (KBr法)

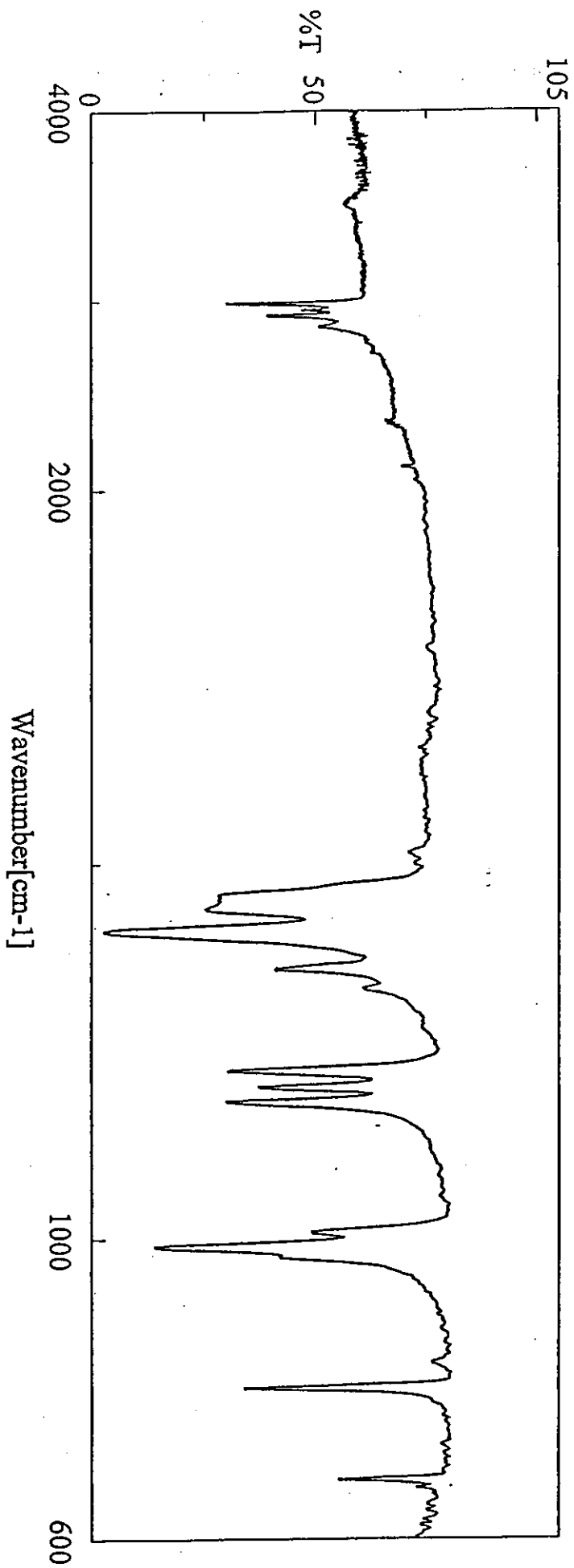


図 12 2,3,5,6テトラメチルピラジンの赤外スペクトル (NaCl法)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究

平成 16 年度分担研究報告書

LC-NMR 等による食品添加物の複合分析法に関する研究

－ 香料「2-エチル-3,5-ジメチルピラジン及び2-エチル-3,6-ジメチルピラジンの混合物」 －

分担研究者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

協力研究者 古庄 紀子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員

研究要旨

香料「2-エチル-3,5-ジメチルピラジン及び2-エチル-3,6-ジメチルピラジンの混合物(2-ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine)」の両異性体の同定を LC/NMR を用いて検討した。その結果、PDA-LC/MS および GC/MS に比べ、LC/NMR により有用な構造情報が得られ、両異性体の同定を迅速に行うことが出来た。また、NMR による両異性体の含量比の測定結果は、PDA-LC/MS および GC/MS による測定結果とほぼ同様な値を示したことから、NMR が化合物の定量に有効であることが確認された。

A. 研究目的

近年、食品添加物の厳密な分析には、液体クロマトグラフ(LC)およびガスクロマトグラフ(GC)の検出器として質量分析装置(MS)を接続した LC/MS および GC/MS が一般的に利用されている。MS を検出器とすることによって分子量情報や部分構造情報が得られることから、化合物の同定が可能である。しかしながら、位置異性体や立体異性体など共通の組成式を持ち、構造的にほぼ等しい化合物を同定することは困難である。また、イオン化しにくい化合物も同定できない。したがって、厳密に化合物を同定するには、標品との比較を行うか、標品が入手できない場合は単離・精製を行い、NMR, IR 等のスペクトルデータを測定し、構造を確認する必要がある。一方、最近開発された液体クロマトグラフ/核磁気共鳴(LC/NMR)は、LC の検出器として NMR を接続することによって、従来必要とされていた一連の前処理（分離精製、真空乾燥（凍結乾燥）、試料調製）を省き、目的とする化合物の構造情報を得ることが可能である。また、微量で不安定な化合物に対しても直接解析することができる。したがって、LC/NMR は

食品中に微量に含まれる食品添加物に適した分析法と考えられる。また、一般的に化合物の UV や IR などにより検出されたクロマトグラフィーで化合物を定量する場合、測定対象物質と同物質の濃度標準が必要であるが、NMR は例外である。すなわち、同一の部分構造を持つ異なる化合物において、同一の部分構造上のプロトン( $^1\text{H}$ )シグナル強度の比は両者のモル比に対応することから、一方の化合物の純度が明らかであれば、得られたモル比と溶液の調製値の関係から測定対象の化合物の純度（あるいは濃度）が測定される量の標準を参照せずに決定できる。実際に、NMR による定量法は、国際度量衡委員会（CIPM）の物質諮問委員会（CCQM）で定義された一次標準測定法になり得ることが期待され、国際的な予備的研究も実施されている。よって、本技術を用いれば、少なくとも類似構造の食品添加物群はきわめて効率的に純度（あるいは濃度）値を付与することが可能になるものと考えられる。

そこで、LC/NMR を用いて、香料「2-エチル-3,5-ジメチルピラジン及び2-エチル-3,6-ジメチルピラジンの混合物(2-ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine)」の分析を行い、PDA-LC/MS および GC/MS による

方法に対する利点について検証した。また同時に、NMRによる本香料の組成比についても検討した。

## B. 研究方法

### 1) 試料

香料「2-エチル-3,5-ジメチルピラジン及び2-エチル-3,6-ジメチルピラジンの混合物(2-ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine)」(液体)は日本食品添加物協会を通じて入手したものをを用いた。重水(D<sub>2</sub>O)およびアセトニトリル-d<sub>3</sub>(CD<sub>3</sub>CN)は日本酸素(株)より購入したものをを用いた。その他、試薬および溶媒は市販のものをを用いた。

### 2) 装置

液体クロマトグラフ/質量分析装置(LC/MS):

Waters 社製 LC/MS system (LC, Alliance 2695; PDA, 2996; MS, ZQ-4000).

ガスクロマトグラフ/質量分析装置(GC/MS):

島津製作所(株)製 GC/MS system (GCMS-QP-5050A).

液体クロマトグラフ/核磁気共鳴(LC/NMR):

JEOL 社製 LC/NMR system (LC, NANOSPACE SI-2 series (Shiseido); NMR, ECA-500).

### 3) LC/MS 分析条件

LC 条件: カラム, TSK gel ODS-80TsQA (2.0 mm i.d. × 250 mm); カラム温度, 40°C; 移動相, CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O = 80:20; 流速, 0.1 mL/min; PDA, 192-400 nm; 検出波長, 278 nm.

MS 条件: ソース温度, 120°C; 脱溶媒温度, 350°C; 脱溶媒ガス, 350 L/h; コーンガス, 60 L/h; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 30 V (ESI pos.); スキャン範囲, *m/z* 50-300.

### 4) GC/MS 分析条件

GC 条件: カラム, Inert Cap WAX (0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚 0.25 μm); 気化室温度, 250°C; インターフェース温度, 250°C; 注入量, 1.0 μL; 注入法, スプリット(1:200); カラム入口圧, 87.5 kPa; カラム流量, 1.5 mL/min; 昇温条件, 50°C (0 min)→(5°C/min)→230°C (36 min)→40°C (40 min).

MS 条件: スキャン範囲, *m/z* 50-300; NIST library, NIST147

### 4) LC/NMR 分析条件

LC 条件: カラム, TSK gel ODS-80TsQA (2.0 mm i.d. × 250 mm); カラム温度, 40°C; 移動相, CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O = 80:20; 流速, 0.1 mL/min; 注入量, 2 μL; 検出波長, 278 nm.

NMR 条件: 測定温度, 30°C; ON-FLOW 法, FRACTION-LOOP 法により測定した。なお, WET-COSY, WET-HMQC および WET-HMBC により各シグナルの帰属を行った。

### 4) 分析試料の調製

香料「2-エチル-3,5-ジメチルピラジン及び2-エチル-3,6-ジメチルピラジンの混合物」を精密に測り, 10 mL/mL (CH<sub>3</sub>CN)に調製したものを分析試料とした。

### 5) 異性体比の測定

LC/MS において検出波長 278 nm におけるピーク面積比を測定した。GC/MS における TIC クロマトグラムピーク面積比を測定した。また, 試料 20 μL を D<sub>2</sub>O:CD<sub>3</sub>CN = 4:1 混液 500 μL に溶かし, <sup>1</sup>H-NMR における pyrazine 環上の 5 位および 6 位のプロトンシグナルの積分値より異性体比を求めた。

### 6) 定量 NMR 条件

NMR 条件: NMR, ECA-500 (JEOL); temp., 30°C; scans, 8 times; relaxation delay, 5-100 s; detect signal, δ 8.38 ppm.

## C. 結果及び考察

### 1) PDA-LC/MS および GC/MS による分析

香料「2-エチル-3,5-ジメチルピラジン及び2-エチル-3,6-ジメチルピラジンの混合物(2-ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine)」は, メチル基の置換位置の異なる 2 つの異性体の混合物である(Fig. 1)。LC/MS および GC/MS により分析した結果を Fig. 2, 3, 4 に示した。LC/MS では, 検出波長 278 nm におけるクロマトグラム上にピーク 1 および 2 が観察された(Fig. 2A)。ピーク 1 および 2 は, ESI-MS(pos.)において, 共に *m/z* 137 [M+H]<sup>+</sup>を与え, また, 共に 278.6 nm に極大吸収を持つ PDA スペクトルを与えた(Fig. 3)。更に, ESI-MS 測定条件を変えて測定を行ったがどの条件において



もほぼ等しい MS スペクトルを与えた。したがって、LC/MS 分析によって各異性体を同定することは不可能であった。

次に、GC/MS においても 2 つの異性体のピークが観察され、LC/MS におけるピーク面積比と TIC ピーク面積比の比較により、保持時間 10.6 分のピークが LC/MS におけるピーク 2 に、保持時間 11.0 分のピークがピーク 1 に対応するものと考えられた (Fig. 2B)。ピーク 1 および 2 は、EI-MS において、共に分子量関連イオン  $m/z$  135  $[M-H]^+$  (100%) および  $136 M^+$  (75%) を与え、 $m/z$  121, 108, 94, 80, 56 にほぼ同様なフラグメントイオンを与えた (Fig. 4)。次に、両 EI-MS スペクトルについて、NIST (National Institute of Standards and Technology) ライブラリー検索を行った結果、共に 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine を第 1 候補化合物 (類似度 94) に、2,6-diethylpyrazine, 2-ethyl-5,6-dimethylpyrazine を第 2,3 候補化合物として示され、2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine は共に第 4 候補化合物 (類似度 90) として示された。よって、GC/MS においても各異性体を同定することは不可能であった。

以上の結果、LC/MS および GC/MS 分析においては、香料 2-ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine を両異性体の標準品無しに同定することは不可能であり、また、同一の組成式を持つ他の pyrazine 類と完全に区別することも現実的には不可能であると思われた。したがって、今後、香料 2-ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine を添加した食品を分析する必要が生じた場合においても、LC/MS および GC/MS 分析によって両異性体を確実に同定することは不可能であると思われた。

#### 4) LC/NMR による各異性体の同定

LC/NMR は、LC の検出器として NMR を接続した装置であり、単離等の前処理無しに混合物のまま NMR 測定が可能である。今回実験に用いた LC/NMR 装置の模式図を Fig. 5 に示した。LC 部と NMR 部より構成され、UV 検出器によってピークを検出し、検出されたピークは、NMR の LC

probe に導入される。LC probe 内の flow cell に各ピークが導入されたとき NMR 測定が行われる。Serial link box は LC と NMR を同期させる役割を持つ。

LC/NMR では、測定試料より遙かに巨大な移動相 (水とアセトニトリルの混液であり、水には NMR ロック用に重水 ( $D_2O$ ) を用いた) の信号が妨害となるので、WET (water suppression enhanced through T1 effect) 法を用いて溶媒信号消去を行った。また、溶媒信号のケミカルシフトは、水/有機溶媒の組成比によりシフトするので、自動的に溶媒信号の位置を検出させる SCOUT SCAN を用いた。また、巨大な溶媒信号存在下で微少な試料信号を検出するので、磁場補正を正しく行わなければ溶媒信号の消え残りにより良いスペクトルを得られない。そこで、移動相由来の大きな単一のプロトンシグナルがあるので PFG (pulsed field gradient)-シミングを利用した。FG-シミングは、Z1~Z6 の補正用のシム軸基本マップを作成した後、実際に試料の磁場マップを測定し、そのマップが平坦になるようなシム軸基本マップの係数の組み合わせを計算する方法であり、短時間で十分な磁場補正を行うことができた。

LC/NMR の測定法には ON-FLOW 法、STOP&FLOW 法および FRACTION-LOOP 法などがある。本研究においては、ON-FLOW 法および FRACTION-LOOP 法を用いた。

ON-FLOW 法は移動相を流しながら連続して NMR スペクトルを測定していく方法であり、LC による分離と平行して連続的に NMR 測定が行われるので得られるデータは、縦軸に保持時間 (min)、横軸に化学シフト (ppm) を示す 2 次元データである。ON-FLOW 法による分析結果を Fig. 6 に示した。ピーク 1 および 2 の NMR スペクトルは等高線表示 (縦軸: 保持時間 (min)、横軸: 化学シフト (ppm)) で示されており、各ピークの保持時間でスライスすると対応する 1 次元データを得ることが出来る。ピーク 1 および 2 の 1 次元  $^1H$ -NMR データを比較すると、2 つの methyl 基と 1 つの ethyl 基に相当するシグナルはほぼ同じ化学シフトを

示したが、pyrazine 環上のプロトンに相当するシグナルがピーク 1 では  $\delta$  8.38 ppm に、ピーク 2 では  $\delta$  8.36 ppm に観察された。よって、両シグナルが 5 位または 6 位のプロトンのどちらによるものか帰属することができれば、ピーク 1 および 2 が 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine であるか 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine であるかを確認できると考えられた。しかし、ON-FLOW 法は移動相を流しながら連続して NMR スペクトルを測定していく方法であることから、Fig. 6 に示した 2 次元データと各ピークの 1 次元  $^1\text{H-NMR}$  データ以外のスペクトル情報を得ることが出来ない。

そこで次に、FRACTION-LOOP 法により分析を行った。FRACTION-LOOP 法は、予め各成分をオンライン接続したループに貯めておき、LC 分析終了後に NMR に各成分を導き順次スペクトルを測定する方法である。よって、各ピークの成分が LC プローブに導入された時点で通常の NMR 測定と同じ状況になることから、 $^1\text{H}$  測定だけでなく、構造解析に必要な情報を得る 2 次元測定が可能である。FRACTION-LOOP 法により、ピーク 1 および 2 についてそれぞれ WET-COSY, WET-HMQC および WET-HMBC を測定した。その結果、ピーク 1 に観察された pyrazine 環上のプロトン  $\delta$  8.38 ppm のシグナルは 2 位のカーボン  $\delta$  161.7 ppm のシグナルと HMBC 相関が観察されたことから、ピーク 1 が 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1) であることが確認された。各シグナルの相関情報を Fig. 7 に示す。したがって、LC/NMR により、ピーク 1 が 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1)、ピーク 2 が 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2) と同定された。

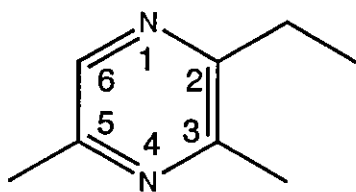
## 2) 異性体比の測定

NMR で正確な定量分析をするためには測定の際、吸収されたエネルギーが周囲に放出されて、もとの平衡状態に戻る時間(縦緩和時間  $T_1$  はその目安)を知っておく必要がある。なぜなら、緩和時間が定量目的の化合物によって大きく異なる場

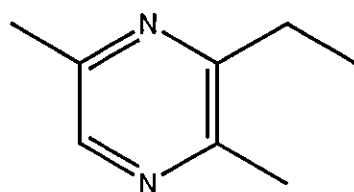
合、各化合物のシグナル強度も異なるためである。このため定量には各化合物の縦緩和時間  $T_1$  を正確に求めることが必要であるが、今回は各異性体の標品が入手できないことから困難であった。そこで、2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1) および 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2) の緩和時間が仮に大きく異なるとしても、定量するのに十分な緩和待ち時間(relaxation delay (s))を求めた。緩和待ち時間を 5~100 秒まで段階的に変えて 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1) の含量%を測定したところ、緩和待ち時間を延長するに伴い、含量%は減少し、60 秒以降で減少しなくなった(Fig. 8)。よって、2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1) と 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2) の含量比%を正確に測定するには、60 秒以上の緩和待ち時間が必要であるとわかった。次に、緩和待ち時間を 60 秒として測定した結果を GC/MS および PDA-LC/MS の測定結果と比較をしたところ、NMR による含量比(%)は GC/MS による TIC ピーク面積より求めた含量比(%)とほぼ一致した。また、PDA-LC/MS の結果とは 1%の誤差がみられたが、これは 278 nm における両ピークが十分にベースライン分離していないことが原因と考えられた(Fig. 2B)。以上の結果、NMR による定量あるいは含量比の測定は GC や LC による方法とほぼ同じ精度で可能であると考えられた。

## D. 結論

香料「2-エチル-3,5-ジメチルピラジン及び 2-エチル-3,6-ジメチルピラジンの混合物(2-ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine)」の異性体の同定を LC/NMR を用いて行った結果、PDA-LC/MS および GC/MS に比べ、有用な構造情報が得られた。また、NMR による含量比の測定結果は、PDA-LC/MS および GC/MS による測定結果とほぼ同様な値を示したことから、NMR が化合物の定量に有効であることが確認された。



2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1)



2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2)

Fig. 1 Structures of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1) and 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2)

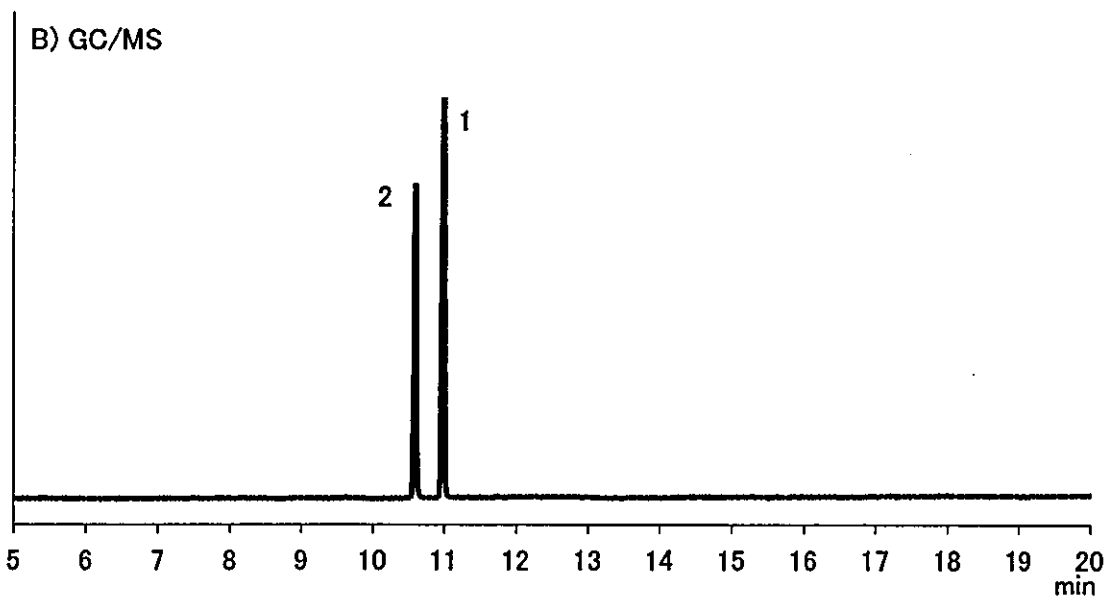
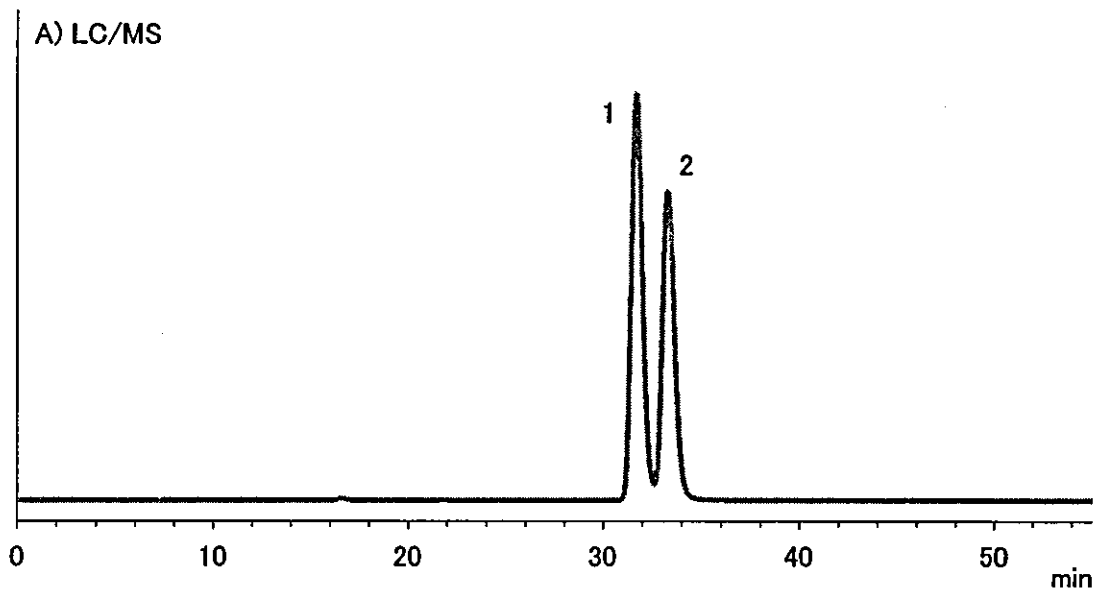


Fig. 2 GC/MS and LC/MS profiles of ethyldimethylpyrazine  
A) UV 278 nm. B) TIC.

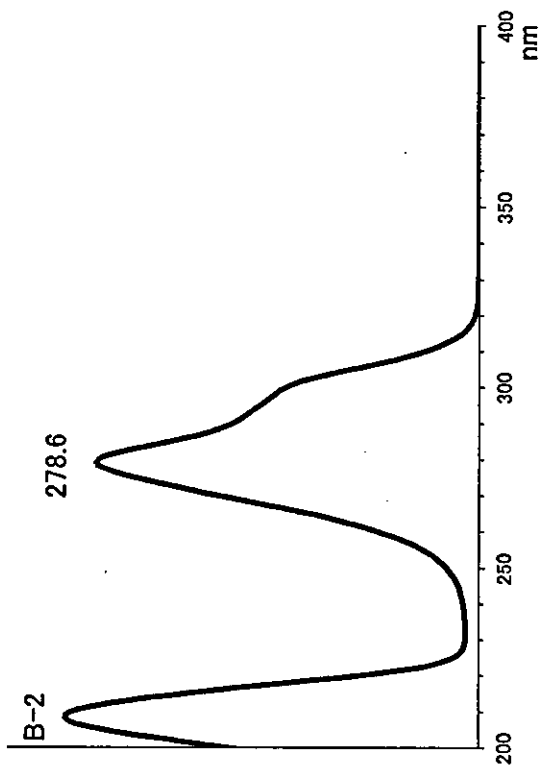
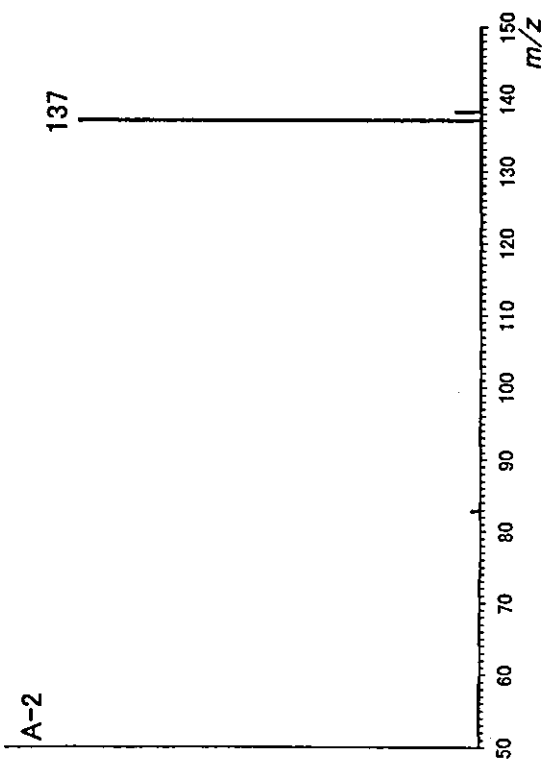
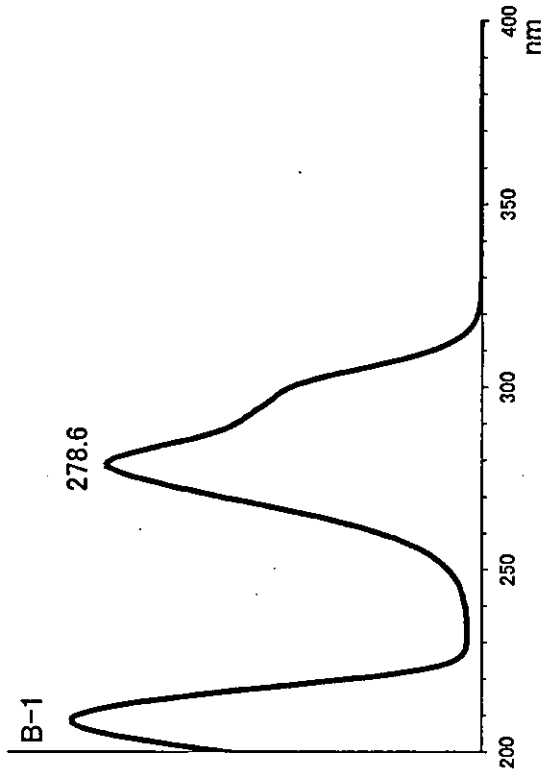
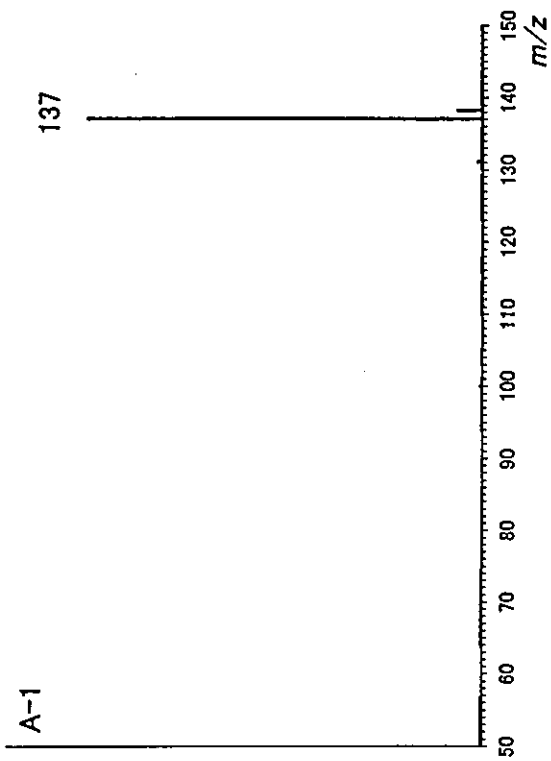


Fig. 3 ESI-MS and PDA spectra of peak 1 and 2

A-1) ESI-MS of peak 1. B-1) PDA of peak 1.

A-2) ESI-MS of peak 2. B-2) PDA of peak 2.

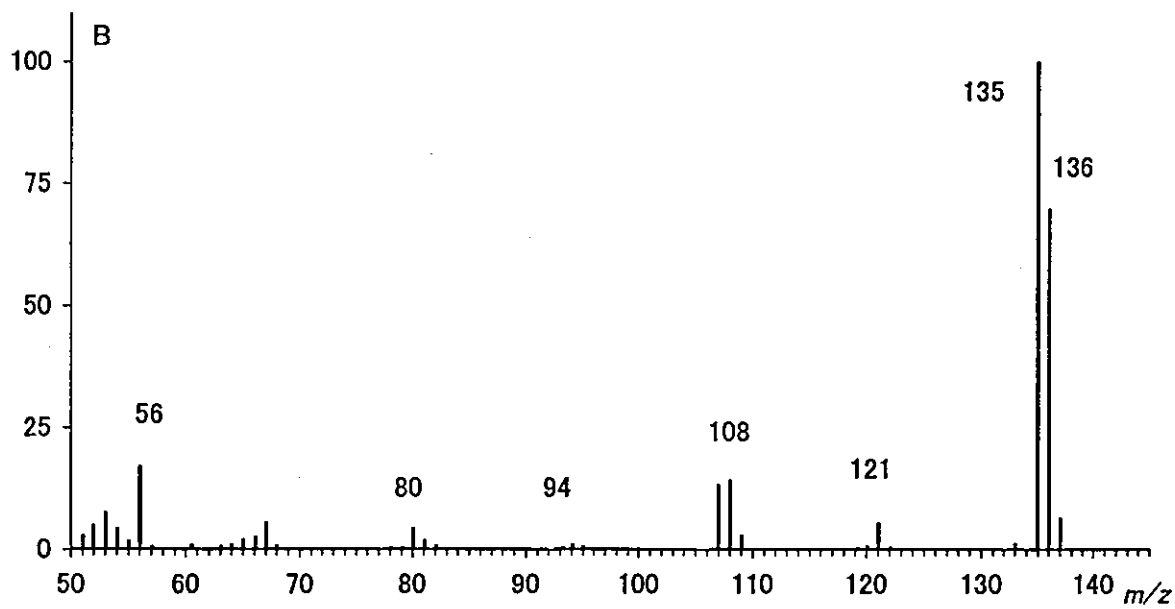
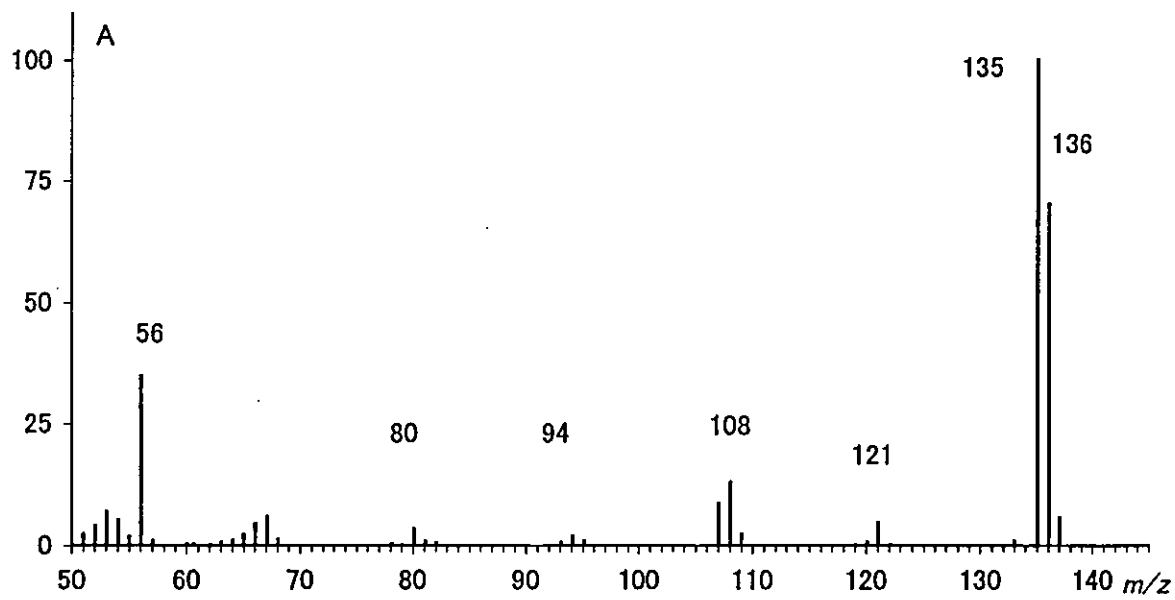


Fig. 4 EI-MS of peak 1 and 2

A) Peak 1. B) Peak 2

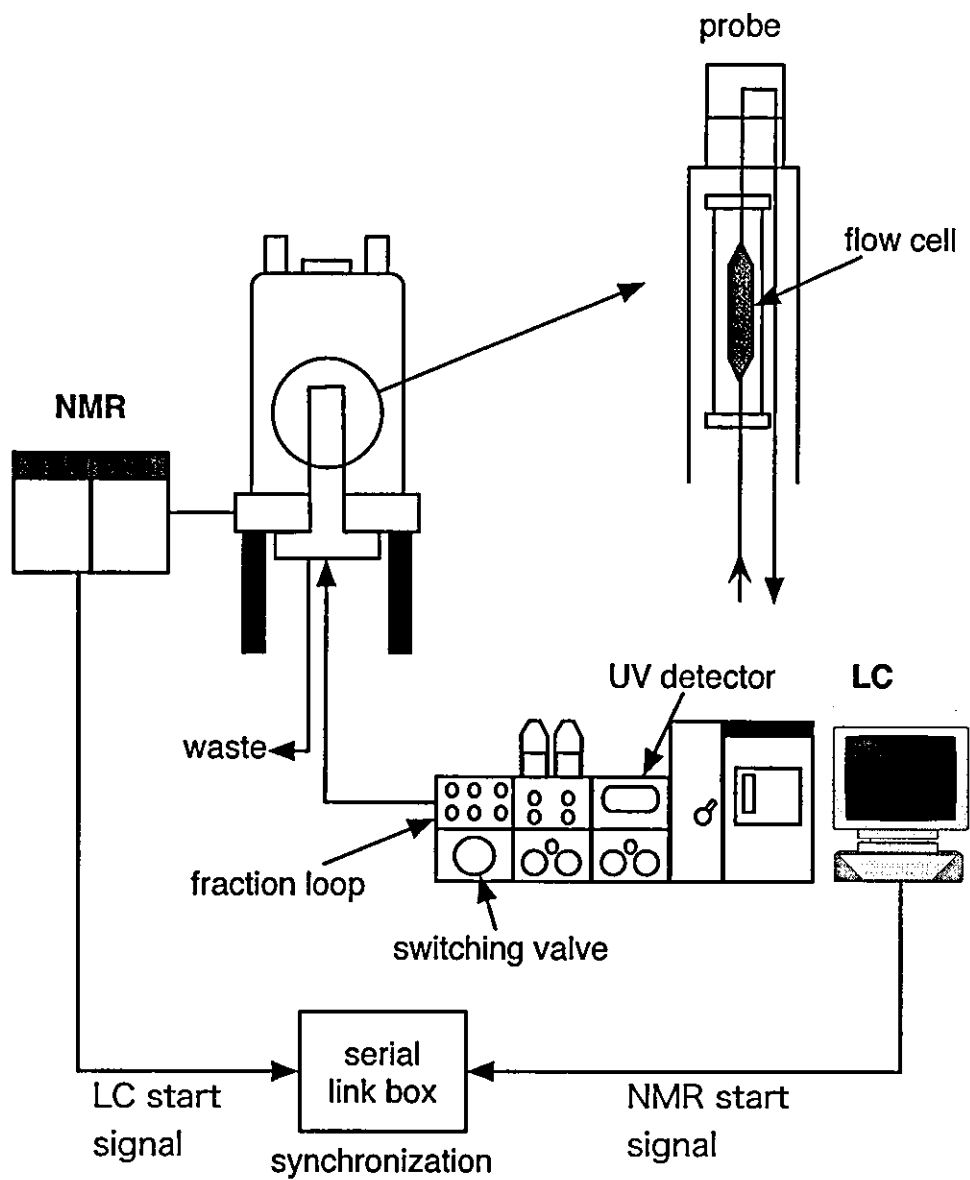


Fig. 5 Schematic of LC/NMR system

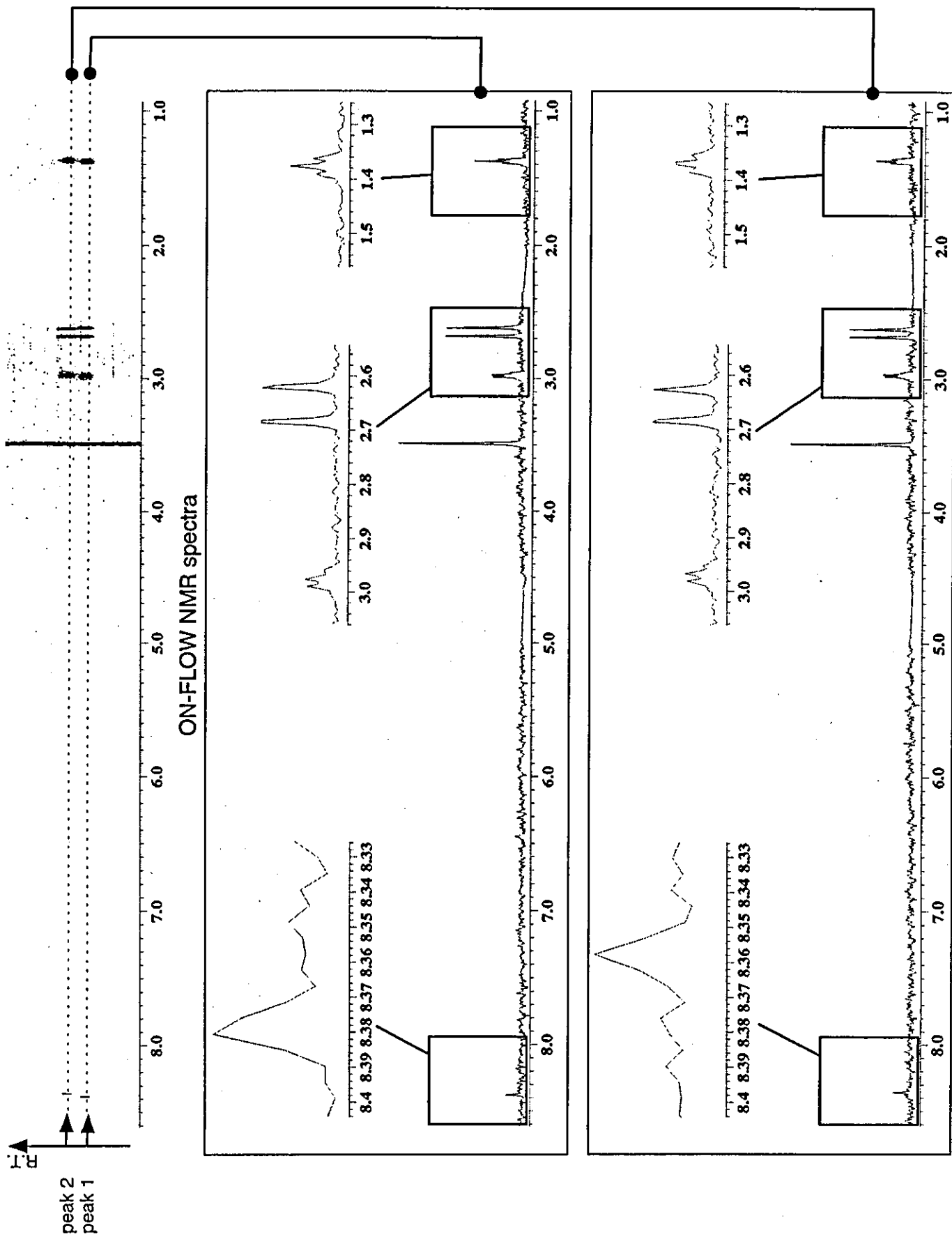


Fig. 6 NMR spectra of 2-ethyl-3, (5 or 6)-dimethylpyrazole by ON-FLOW method



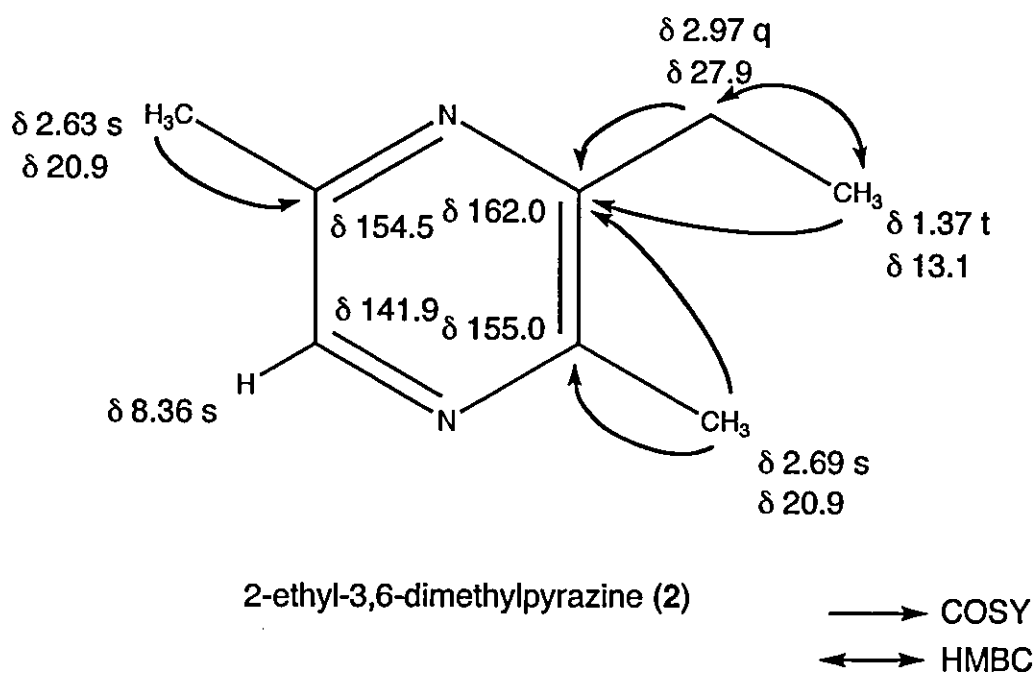
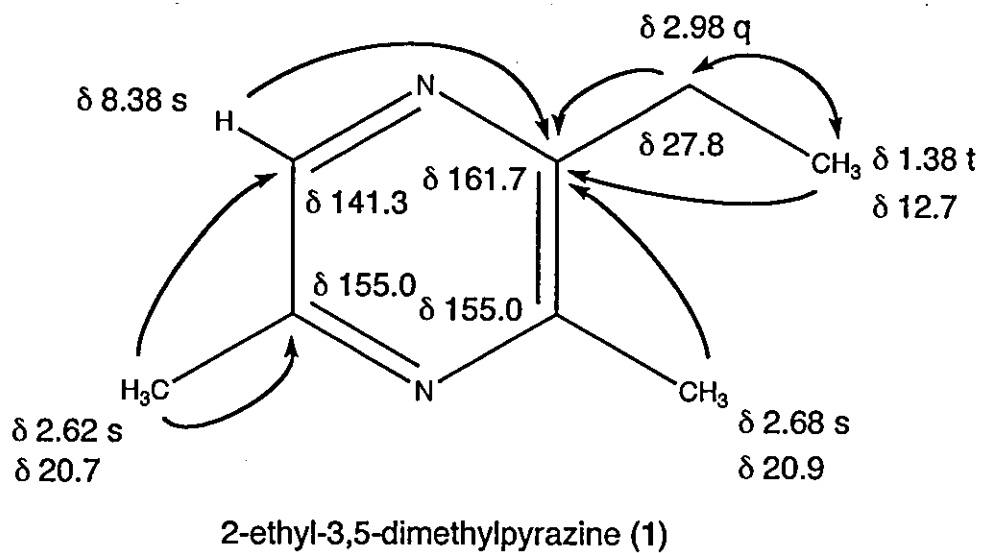


Fig. 7 Observed COSY and HMBC correlations of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1) and 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2)

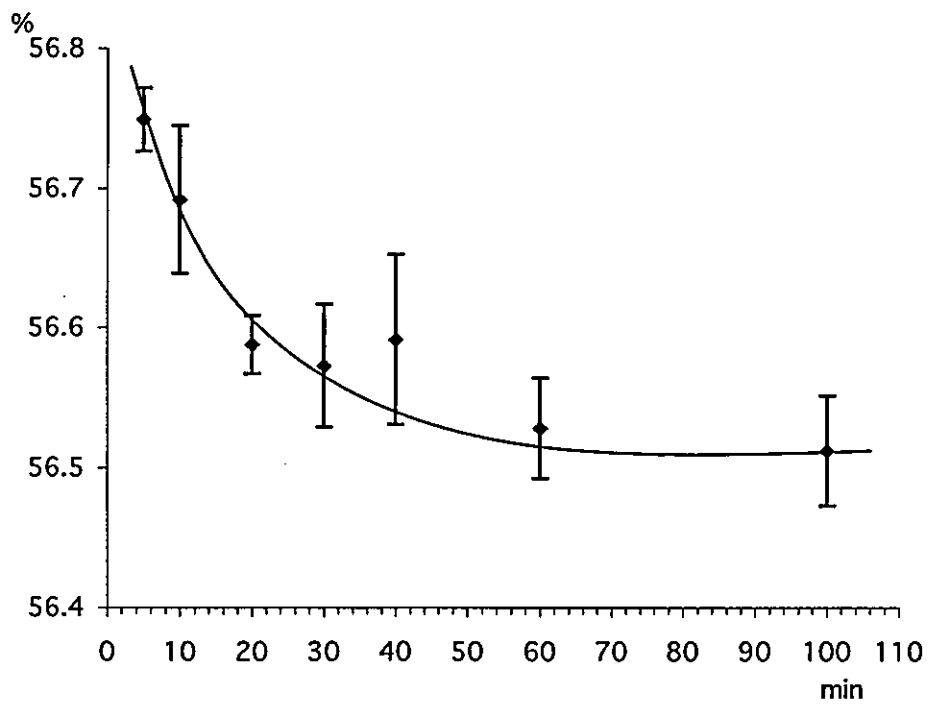


Fig. 8 Relationship between relaxation delay and composition rate of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1)

◆:  $AV \pm SD$  ( $n = 3$ )

Table 1 Composition rate of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1) and 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2) derived from GC/MS, PDA-LC/MS and NMR

|           | detection  | 1 (%) | 2 (%) |
|-----------|------------|-------|-------|
| GC/MS     | TIC        | 56.6  | 43.4  |
| PDA-LC/MS | UV 278 nm  | 55.0  | 45.0  |
| NMR       | d 8.38 ppm | 56.5  | 43.5  |

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

分担研究報告書

食品中の食品添加物の流通状態における消長調査

分担研究者 扇間昌規（武庫川女子大学薬学部）  
峯 孝則（サントリー（株））

#### 研究要旨

食品添加物のうち製造基準、使用基準があるものについては、対象食品、使用量、使用制限などが細かく定められている。そのような規制の下で完成された食品中の添加物が、流通過程の様々な条件の中でどのように変動するかを解明することは、食品の安全性や品質を高める上で極めて重要な事柄である。本研究は、食品に使用された食品添加物の流通状態における消長を実験室レベルでシミュレーションする方法を検討するとともに、消長の機構について分子レベルからの解明を試み、それらの結果を実際の食品への応用へと提案することを目的としている。

#### A. 研究目的

食品は製造後、特に冷凍あるいは低温保存の注意がされない場合、予期せぬ高温に一過性にあるいはくり返し暴露される場合が考えられる。そこで起こる食品添加物自体の変動および食品添加物と他の成分との相互作用を短期間でシミュレーションする方法を確立すること。今回は食品添加物のうち、保存料として世界中で広く使用されているソルビン酸を研究の対象とした。

ソルビン酸は乾燥及び結晶状態では安定で室温に長期間置いても変化しないが、溶液ならびに食品中では貯蔵中に自動酸化を起こしてカルボニル化合物などを生

成する<sup>1)</sup>。Wedzicha らはソルビン酸が pH3.7-5.7、80℃の水溶液中でチオール類と緩やかに反応し付加物を生成するが、分解のため単離の難しいことを報告している<sup>2)</sup>。Khandelwal らもソルビン酸がチオール類に付加すること、システインと 80℃、pH5.5 で緩やかに反応し、5 置換 3-hexenoic acid を生成するが、加水分解を受けやすいことを報告している<sup>3)</sup>。また、アミノ酸やたんぱく質との反応ではスルフヒドリル基を有するものとの反応が見出されており、アミンとの反応、pH の効果、抗酸化剤、遷移金属イオン、塩類、糖とグリセロール、アスコルビン酸、亜硝酸などとの相互作用について、