

あることを示唆している。また、この結果は、KBr法では、必ずしも再現性のあるIRスペクトルが得られるとは限らないことも示唆している。

さらに、KBr法でネオテーム無水物のIRスペクトルを得るため、7版公定書記載の方法から逸脱した特殊な方法(ほとんどすり混ぜない)を用い、しかも極度に低湿度の部屋でKBr錠剤を作成し、そのIRスペクトルを測定した。その結果、図6に示すように、図3のペースト法とほぼ一致するIRスペクトルが得られた。このように、特殊な測定をすれば無水物のIRスペクトルが得られるが、公定書など一般的な確認試験に用いるのは不適切である。また、このことは、ネオテーム自体の吸湿性は低いことも示唆している。

1-4. 水和物としてのIRスペクトル

水和物の確実なIRスペクトルを得る目的で、提供品とstandardネオテームのIRを測定することにした。ここでは、測定時期が異なるため、再度、ネオテーム(提供品)についても測定を行った。その結果うちネオテーム(提供品)を図7と8に、standardネオテームを図9と10に示す。なお、standardネオテームは少量しか得られなかったため、IRスペクトルは、標準より薄い状態で測定してある。

ペースト法で測定した図7と9を比較すると、両者は一致し、しかも図2のIRスペクトルとも一致する。このことは、ペースト法では、測定時期が異なっても同じIRスペクトルが得られることを示している。しかも、含水率から推定すると、ネオテーム一モルあたり一モルの水が含まれていることが分かる。したがって、これらはネオテーム一水和物のIRスペクトルと考えられる。すなわち、図2のIRスペクトルを標準(参照)IRスペクトルとすべきであると考えられる。

一方、KBr法で測定した図8と10のIRスペクトルを比較すると、指紋領域は、互いに一致するが、NHやOHの伸縮振動領域である 3200 cm^{-1} 付近は互いに異なり、しかもこの領域はペースト法のIRスペクトルとも異なる異常スペクトルである。これらの結果は、先の検討とは異なり、KBr錠剤作成時に吸湿したために、KBr法のスペクトルに差があると考えるのが妥当である。事実、水のOH変角振動によるショルダー(図8と10に↑印)が、 1650 cm^{-1} 付近に観測され、このことを裏付けている。また、図9のIRスペクトルは、JECFAの参照IRスペクトルと一致する。したがって、JECFAのIRスペクトルは、水を含んだネオテーム一水和物のIRスペクトルと結論できる。そのため、標準あるいは参照IR

スペクトルとしては、不適切である。

したがって、確認試験に KBr 法による IR スペクトルを活用する際には、ペースト法と KBr の IR スペクトルを比較し、相違がないことを確認しなければならない。とくに、今後、試薬を多量に使う化学的な確認試験に代えて、省エネルギーの観点からも、IR スペクトルを用いる確認試験が汎用される可能性があることから、このような異常スペクトルが得られることには、注意をしておく必要があると考えられる。このことは、JECFA のような国際的な基準であっても、上記のような場合があるので、国際的あるいは他国の基準の IR スペクトルからという理由で、我が国の基準としてはならないことを示している。すなわち、自ら検討し、確認試験に最適の条件を選択し、その条件で IR スペクトル測定すべきであるといえる。

2. d と dl-酢酸トコフェロール

一般に、光学異性体は、鏡面構造などとなるため、多くの場合分子内および分子間力は同じになるので、IR スペクトルは一致する場合が多い。しかし、両者が対をなして、結晶などを形成する場合、光学異性体とラセミ体の IR スペクトルは、異なる場合が多い。

そこで、本節では、酢酸トコフェロールの d 体と dl 体の IR スペクトルに相違が認められるか否かを、明らかに

するため、両者の IR スペクトルを測定することにした。

酢酸トコフェロールの d 体と dl 体はいずれも液体であるので、7 版公定書記載の方法に従った液膜法で測定した。その結果を、図 11 と 12 に示す。これからも、分かるように両者の IR スペクトルは、互いに一致し、IR スペクトルでは、両者を区別できないことが分かった。しかし、IR スペクトルは、構造を反映しているので、確認試験には使用すべきであり、光学異性体あるいはラセミ体の区別は、旋光度などの測定で行う必要があると考えられる。

なお、得られた IR スペクトルは、The Sigma Library of FT-IR Spectra など記載の IR スペクトルと一致するので、参照スペクトルとして使用可能である。

D. 考察

ネオテームには、表示された構造式とは異なり、水和物が存在する。そのため、確認試験では、どのような構造のネオテームを確認するかを決めておかなければならない。言い換えれば、ネオテームの確認試験に IR スペクトルを用いるのならば、無水物として確認するのか、あるいは水和物として確認するのかを、決めておかなければならない。

著者は、得られた結果から、無水物

をペースト法で測定した IR スペクトルを参照 IR スペクトルとして、勧める。この場合、乾燥条件は乾燥減量を測定する条件がいいであろう。

一方、水和物を使用する場合、構造式・分子量も水和物として表記する必要がある。また、上記で述べたように、水和物を KBr 法で測定した場合、しばしば高波数域が異なる異常スペクトルが得られる。そのため、水和物を用いる場合でもペースト法による IR スペクトルを勧める。

どうしても、KBr 法を用いる場合、下記のように、一致しない場合の対応を表記すべきであろう。

「KBr 法で一致しない場合は、A：無水物が混在している場合、①KBr 錠剤を粉碎して再度 KBr 錠剤を作成し直す、あるいは②水から再結晶したのち、再度測定するなどの規定が必要である。B：水と水以上に水が混在している場合、試料を乾燥し、水を吸わないように注意して KBr 錠剤を作成しなおす。」などの表記が必要と考える。

一般に、確認試験に KBr 法による IR スペクトルを活用する際には、ペースト法と KBr の IR スペクトルを比較し、相違がないことを確認しなければならない。とくに、今後、試薬を多量に使う化学的な確認試験に代えて、省エネルギーの観点からも、IR スペクトルを用いる確認試験が汎用される可能性

があることから、このような異常スペクトルが得られることには、注意をしておく必要があると考えられる。

また、上記 C. と重複するが、JECFA のような国際的な基準であっても、しばしば誤りがある。このことは、国際的あるいは他国の基準の IR スペクトルからという理由で、我が国の基準としてはならないことを示している。すなわち、自ら検討し、確認試験に最適の条件を選択し、その条件で IR スペクトル測定すべきであるといえる。言い換えれば、外国の参照 IR に、濃度や測定条件が曖昧で、規格として適切か否か疑いたくなる IR が数多く見つかった。したがって、国内規格を設定するにあたっては、諸外国の参照 IR も参照することも必要であるが、それを盲信するのではなく、独自に検討を加えて、より確実に優れた参照 IR を規格として設定すれば、食の安全性に寄与できるものと考えられる。

E. 結語

標準となり得る IR スペクトルを得るために、ネオテームなどの測定法や測定条件に検討を加えた。ここで得られた IR スペクトルは、標準的な参照 IR スペクトルとして利用できると考えられる。また、国内規格を設定するにあたっては、諸外国の参照 IR も参照することも必要であるが、独自に検

討を加えて、より確実に優れた参照 IR を規格として設定し、食の安全性に寄与すべきであると結論した。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

Kitamura, Y., Iwasaki, T., Saito, M.,

Mifune, M., Saito, Y., Sato, K., Yomota C. and Tanamoto K, Standard Infrared Absorption Spectrum of Betaine and Optimal Conditions for its Measurement. J. Food Hygienic Society of Japan, 47(5), 232-236 (2006).

2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

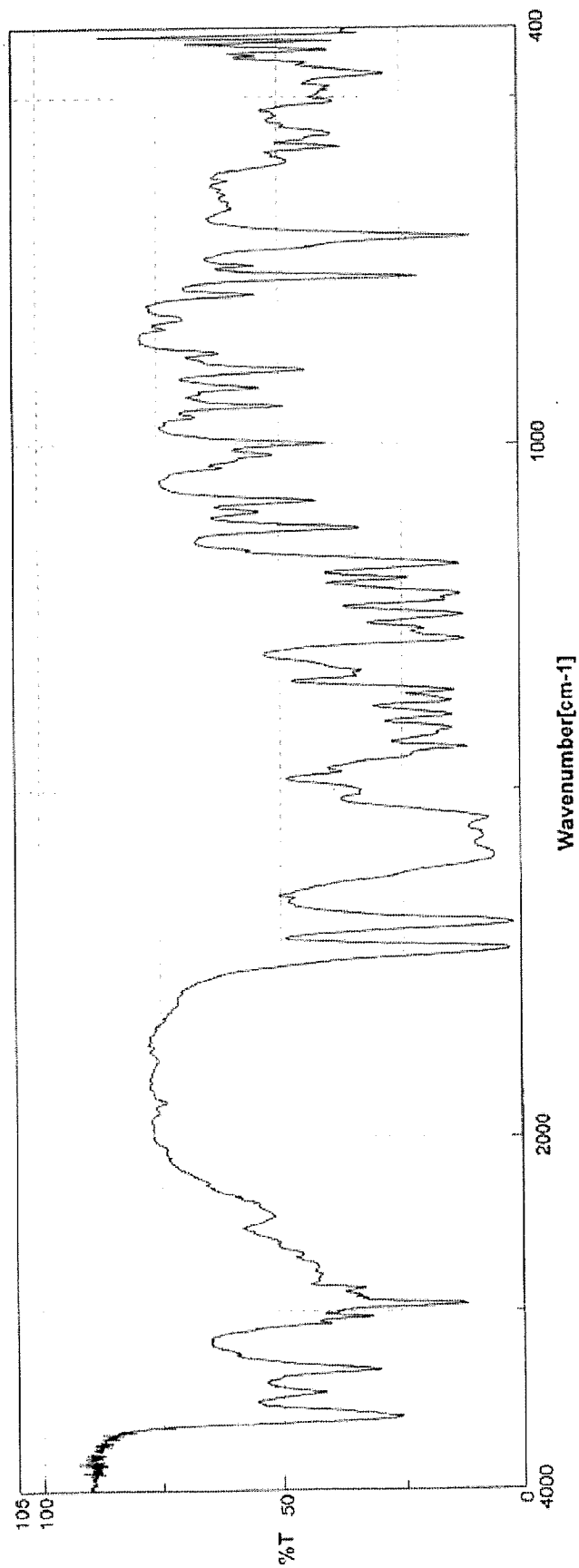


図1 ネオテームの IR スペクトル (KBr 法)

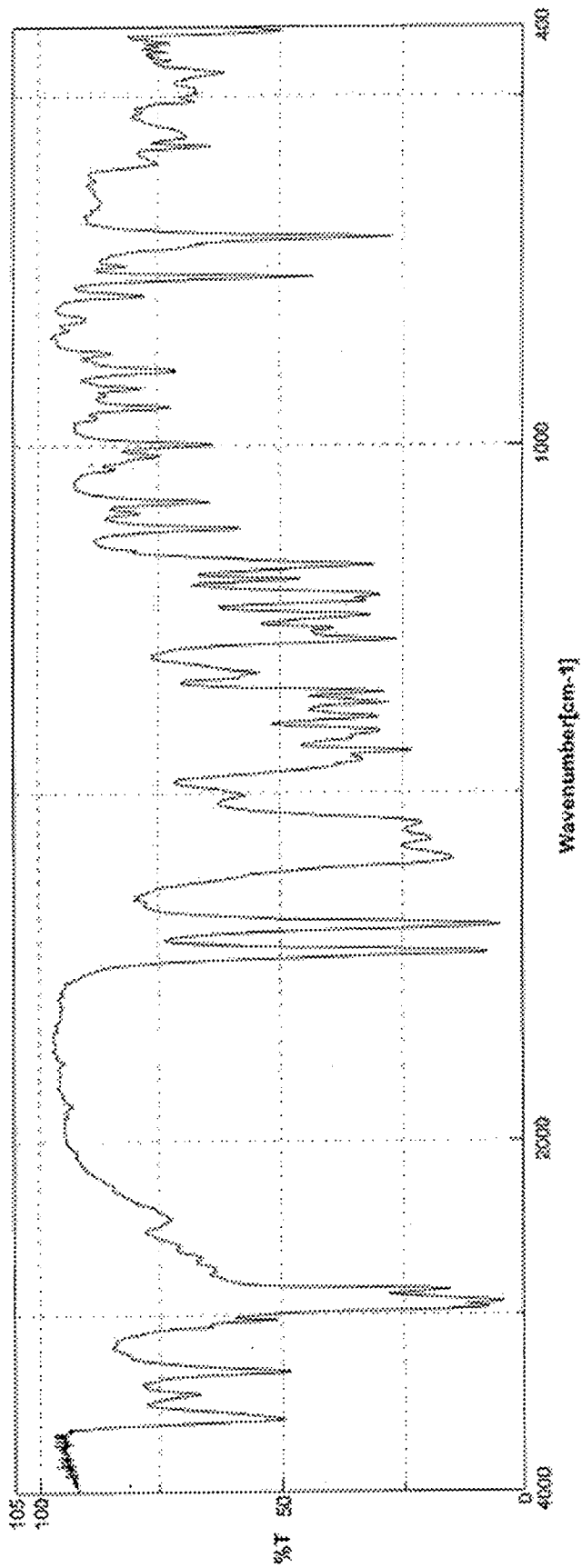


図2 ネオテームのIRスペクトル (ベースト法)

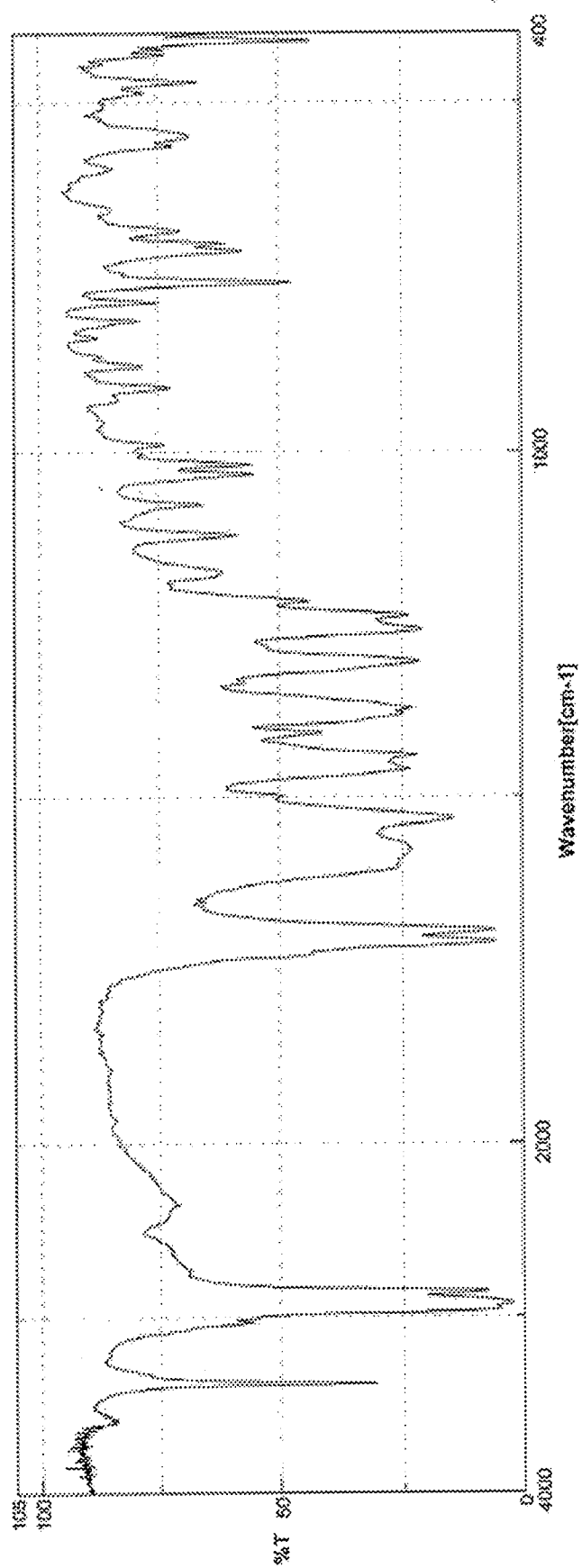


図3 ネオテーム (乾燥品) の IR スペクトル (ペーテスト法)

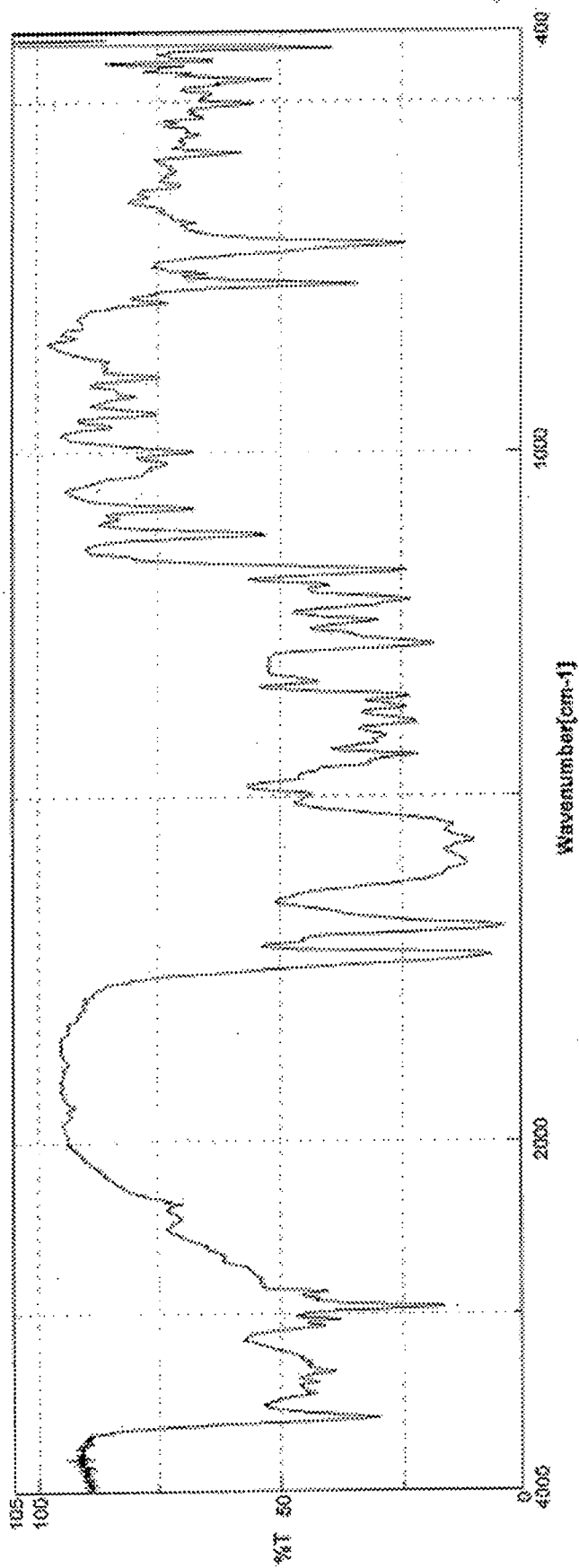


図 4 ネオペンタム (乾燥品) の IR スペクトル (KBr 法)

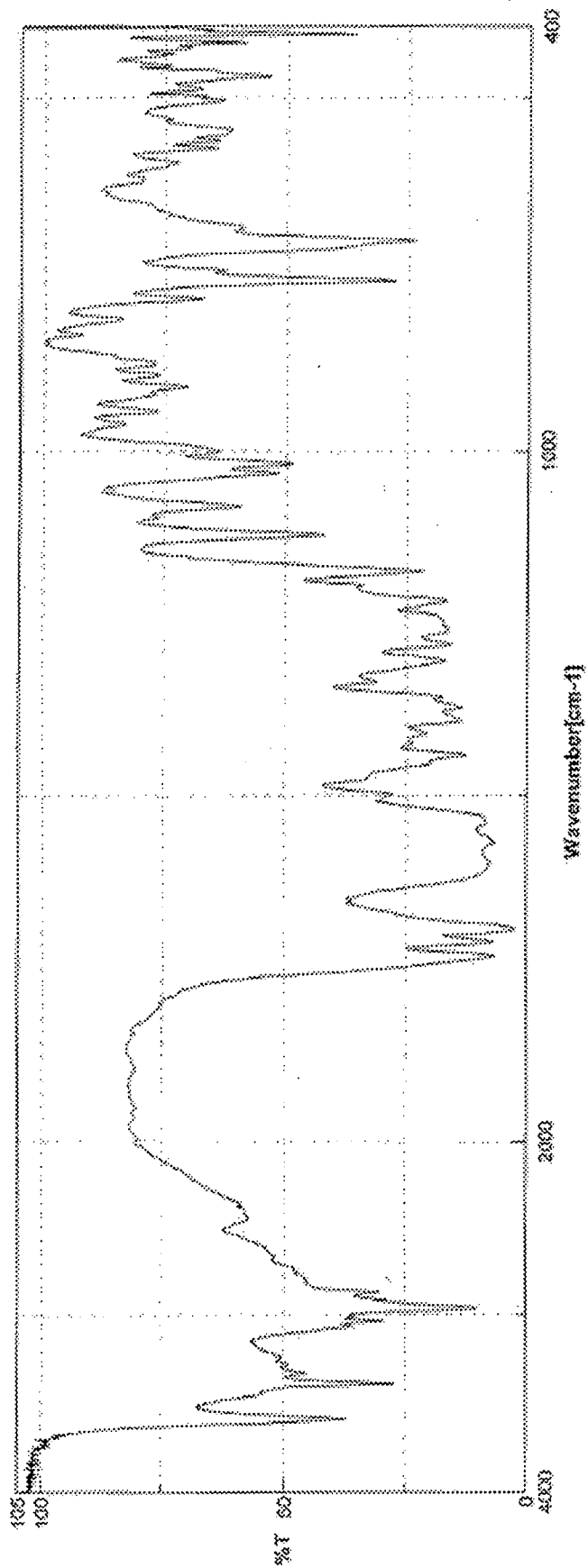


図5 ネオテーム (乾燥品) の IR スペクトル (KBr 法)

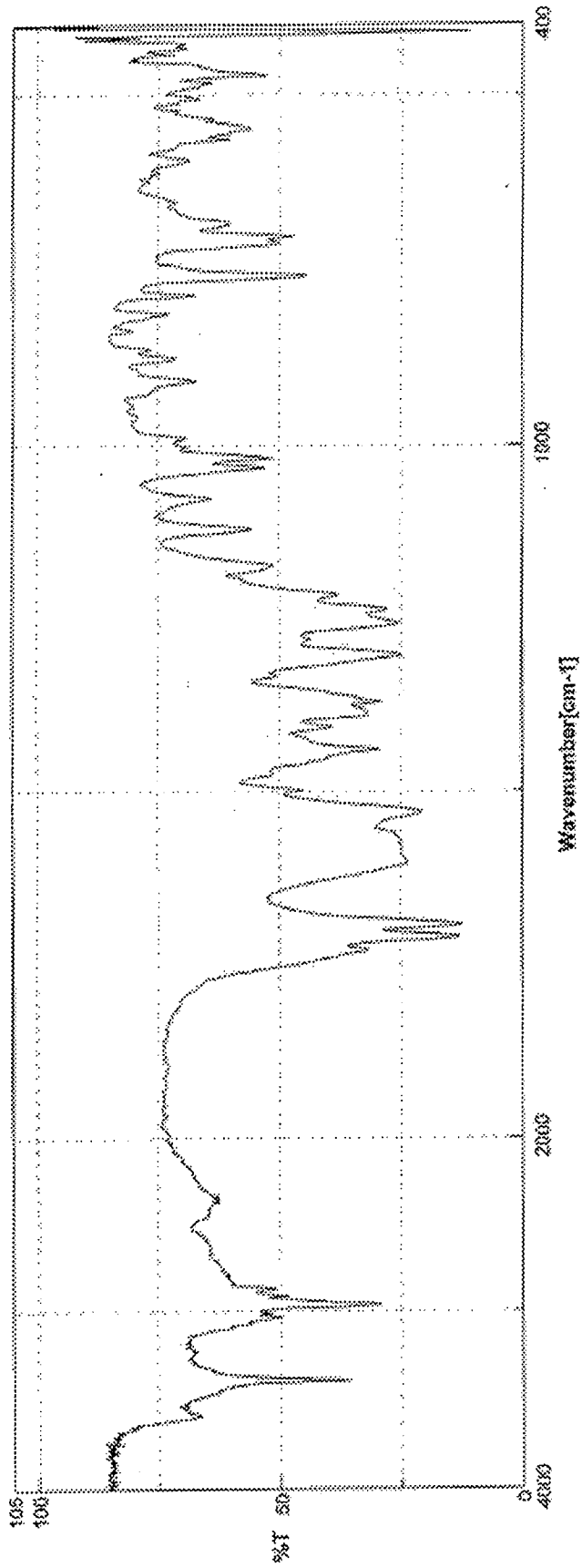


図6 ネオテーム (乾燥品) のIRスペクトル (KBr法)

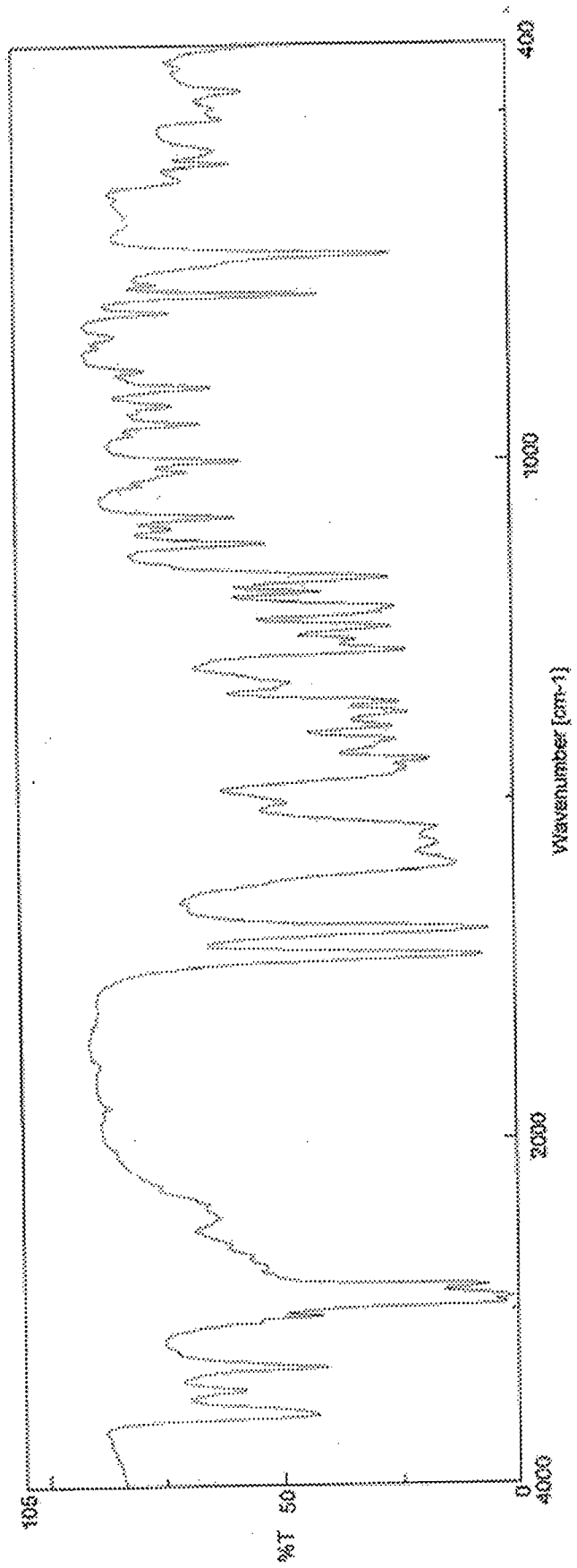


図7 ネオテームのIRスペクトル (ベースト法)

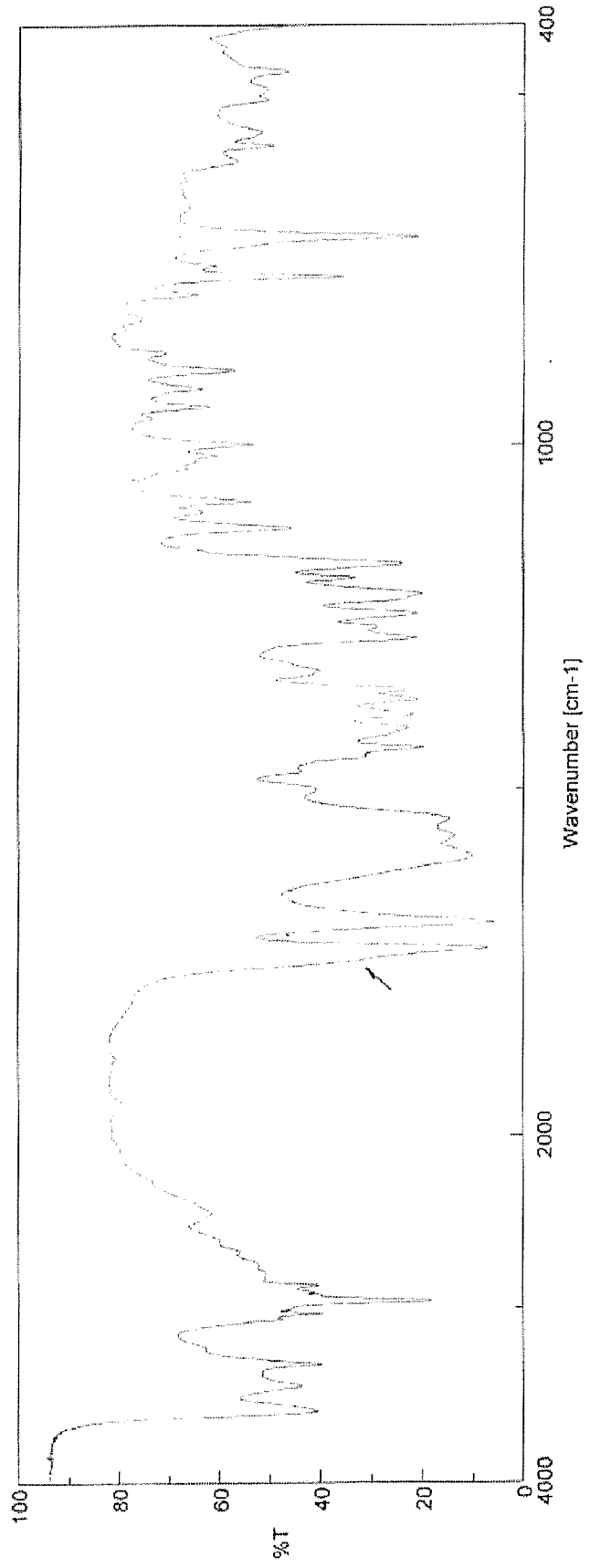


図 8 ネオテームの IR スペクトル (KBr 法)

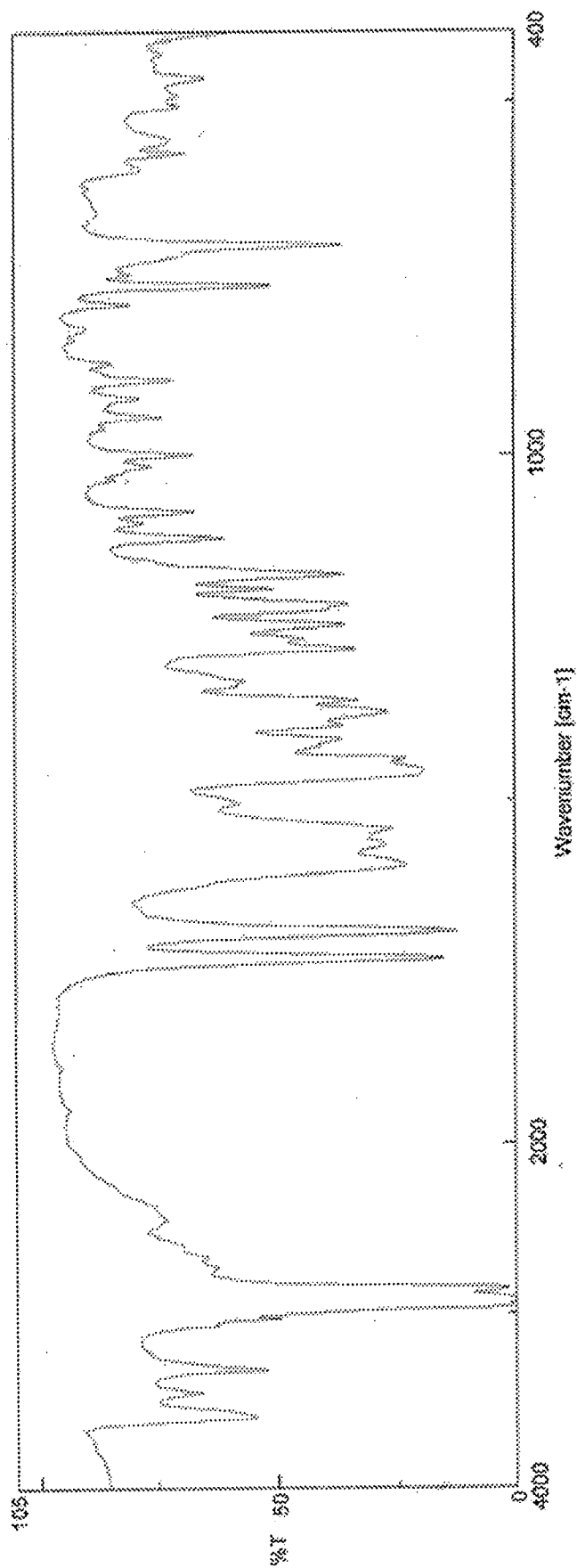


図9 ネオテーム (Standard) の IR スペクトル (ペーセント法)

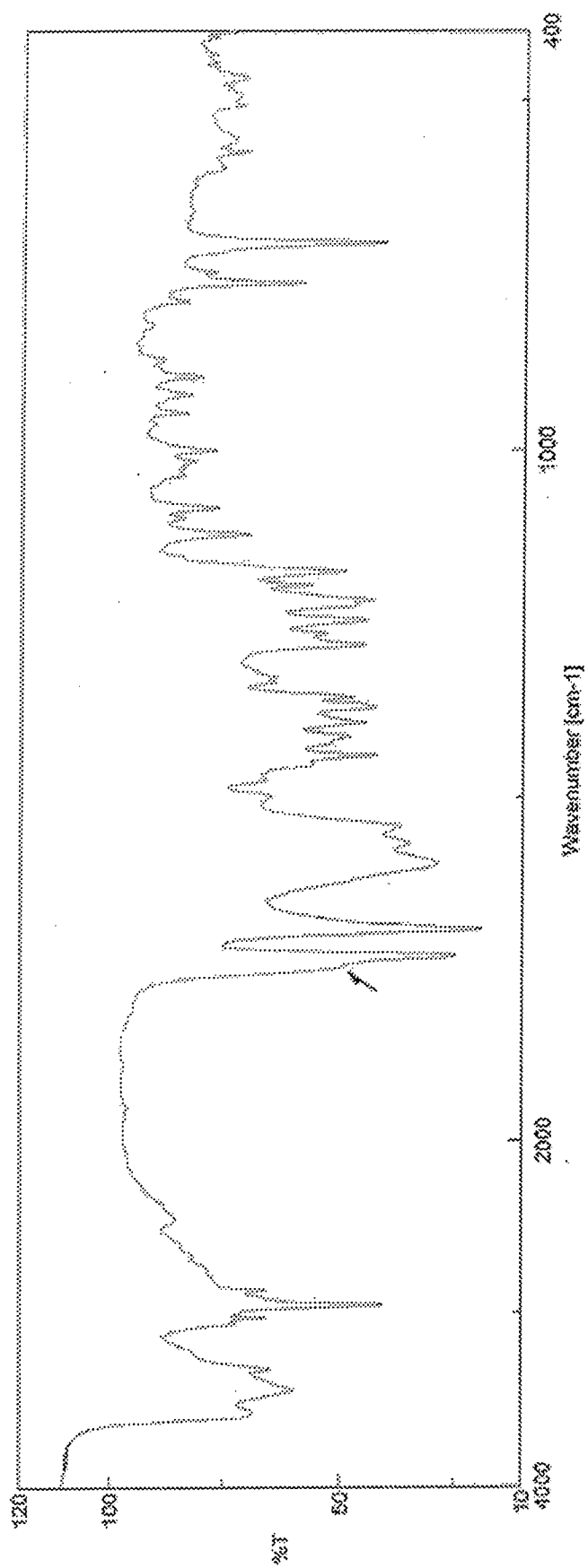


図 10 ネオフェノール (Standard) の IR スペクトル (KBr 法)

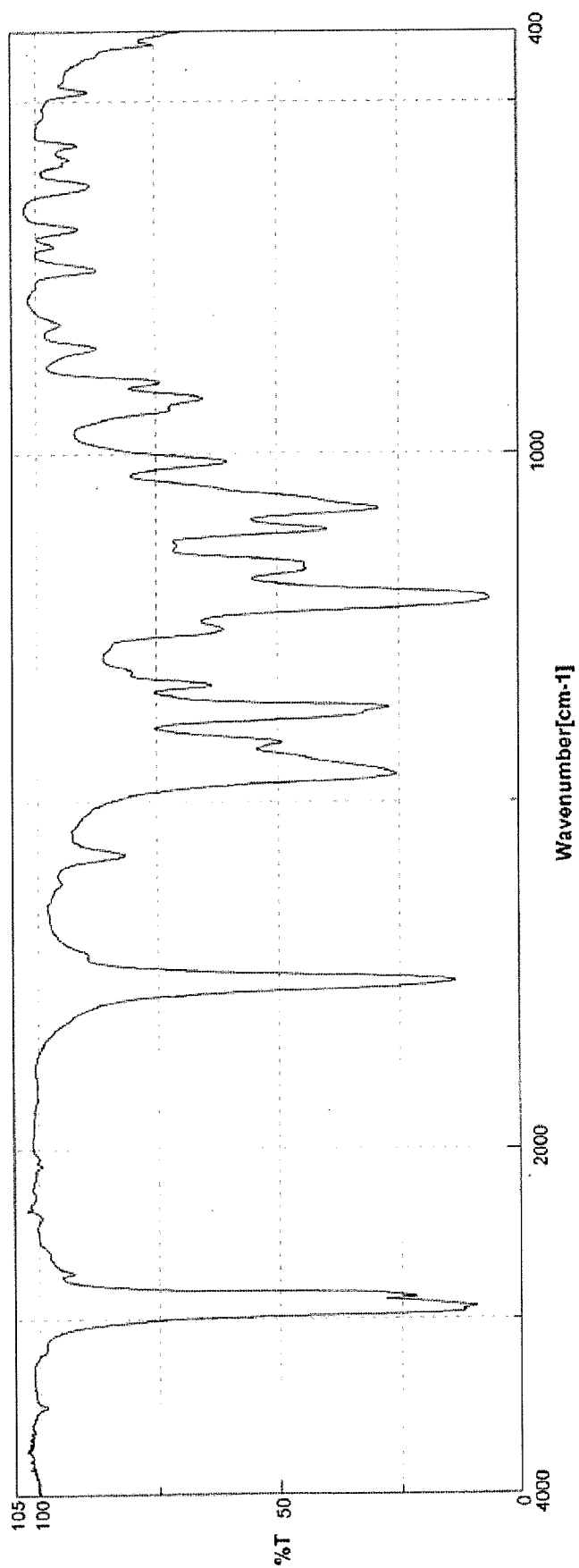


図 11 d-酢酸トコフェロールの IR スペクトル (液膜法)

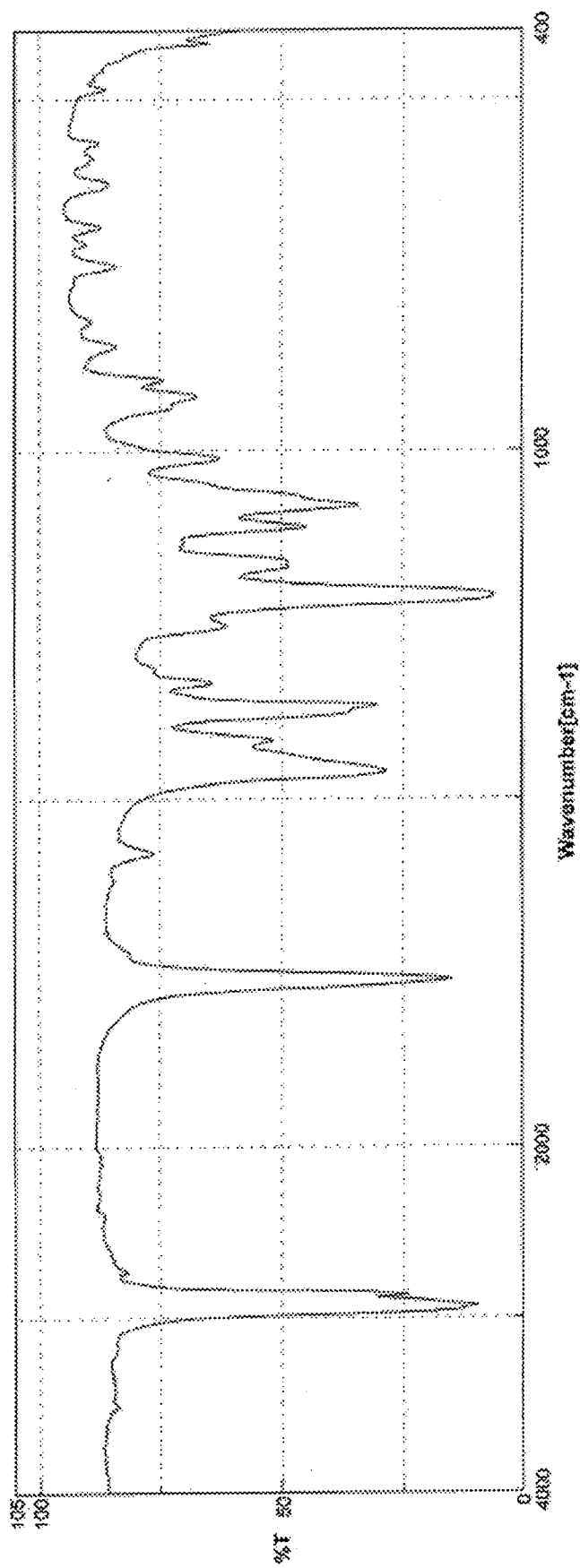


図 12 di-酢酸トフェニールの IR スペクトル (液膜法)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
平成 18 年度分担研究報告書

NMR 等による食品添加物の規格分析法に関する研究
-¹H 核磁気共鳴法によるポリソルベート類中のオキシエチレン基の定量-

分担研究者	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
協力研究者	小池 亮	花王(株)		
協力研究者	四方田 千佳子	国立医薬品食品衛生研究所	薬品部第 1 室長	
協力研究者	古庄 紀子	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部	研究員

研究要旨

昨年度より引き続き、ポリソルベート類中のオキシエチレン基の定量法について、¹H 核磁気共鳴法 (¹H-NMR) を利用した qNMR 法を検討した。qNMR 法は、内部標準物質を含む NMR 用溶媒に試料を溶解し、内部標準と試料の特徴的なシグナルの強度比から定量を簡便且つ迅速に行う方法である。昨年度、3 研究機関において、ポリソルベート類の NMR による定量を行った結果、各機関間に定量値の差が観察され、これが各機関の試料溶液等の調製法に起因していると考えられた。そこで、今年度は 2 機関において再検討したところ、定量値は、機関間および機器間に差が殆どなく、qNMR 法がポリソルベート類中のオキシエチレン基を簡便且つ迅速に定量する方法として十分機能することが確認された。

A. 研究目的

ポリソルベート類の規格については Food Chemicals Codex (FCC) (4th edition, p.306-309) に記載があり、国際調和の観点から、我が国におけるポリソルベート類の規格設定は、まずはこれに準じたものとなると思われる。その内、ポリソルベート類中のオキシエチレン(EO)の含量は、それぞれ規定されているが、その定量を行うには、非常に複雑な反応装置を組む必要がある。また、実験操作も煩雑であることから、多大な分析時間を要し、更に誤差の小さい定量値を得るためには熟練を要し、その RSD 値は実験の煩雑度から 5~10% 程度になると予想される。したがって、FCC に記載の方法は、現実的には実行力がないと思われ、その方法に代わる簡便且つ迅速な方法を早急に検討すべきである。¹H-NMR による定量法がその候補としてあげられた。

¹H-NMR による定量分析には、次の多くの利点がある。1. 一般的に化合物を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 ではこれを必要としない。すなわち、プロトン(¹H)シグナル強度の比は異なる化合物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。2. 分離精製・前処理の必要がない。3. 複数の成分を同時に定量できる。4. 不安定な化合物を迅速に測定できる。等である。

また、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、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。

そこで本研究では、昨年度より引き続きポリソルベート類中のオキシエチレン基について、NMR による定量分析が応用可能であるか検討した。

B. 研究方法

1) 試料

市販食品添加物用ポリソルベート(polysorbate)類製品(20 (5 製品), 60 (5 製品), 65 (4 製品), 80 (5 製品))は, UNIQUEMA, BASF, 花王, 日光ケミカルズ, 日本油脂より提供していただいたものを用いた. 試薬ポリソルベート類およびソルビタンモノラウレート(sorbitan monolaurate)は, 和光純薬製, ポリエチレングリコールジステアレート(poly(ethylene glycol)distearate)は, Sigma-Aldrich 製, フタル酸水素カリウム(JIS 規格準拠容量分析用標準物質)は関東化学製, NMR 用溶媒(重メタノール(CD₃OD)および重アセトン(acetone-*d*₆with 0.03% TMS))は AQUOS ORGANICS 製を用いた.

2) 装置

NMR: JEOL ECA-500 (500 MHz), Variann Mercury400 (400MHz)

3) 内部標準液の調製

フタル酸水素カリウムを軽く砕いた後, 120°C で約 1 時間加熱し, デシケーターに入れて放冷する. その試料 300mg を精密に量り, 重メタノール/重アセトン (1/1)に十分溶解(超音波使用 30 分)した後, 正確に 100 mL とした.

4) 試料の調製および qNMR 測定

実試料 50 mg を精密に量り, 内部標準溶液を 3 mL ホールピペットにて添加し, これを試料溶液とし, この内 0.6 mL を NMR 測定用サンプルチューブに取り, Table I に示す条件で測定した. 得られた各 FID データは, NMR データ処理ソフトウェア Alice 2 ver.5 for Windows (JEOL)に取り込み, 同ソフトウェアの初期条件でフーリエ変換後, ベースライン補正を行った. 得られた NMR スペクトルの内部標準の積分値(プロトン 4 個), 実試料の EO シグナル積分値(プロトン 4 個)と試料量から次のように算出した.

$$EO (\%) = 100 \times$$

実試料の特定シグナル積分値/4x44/実試料の重量 (mg)

内標の積分値/4x204/内部標準溶液 3 mL 中の内標の重量 (mg)

44: エチレンオキサイド(EO)の分子量

204: 内部標準の分子量

C. 結果及び考察

1) ポリソルベート類中の EO の同定.

Fig. 1 に今回検討したポリソルベート類の構造式を示した. ポリソルベート類は, ソルビタンの水酸基にオキシエチレン(-CH₂CH₂O-) (EO)が約 20 個重合し, ポリソルベート 20, 60, 80 はそれにそれぞれラウリン酸, ステアリン酸, オレイン酸が 1 つエステル結合したものであり, ポリソルベート 65 は, ステアリン酸が 3 つエステル結合したものである. さらに最近の研究では, ポリソルベートのコアに相当するソルビタン部にはいくつかの異性体が存在し, また, 脂肪酸とエステル結合していないもの, 脂肪酸が多数結合したものも含む混合物であることがわかっている. すなわち, 各ポリソルベートの主な分子種は Fig. 1 に示す構造式で表すことができるものの, 実際には多種多様な異性体の混合物であると考えられる. したがって, クロマトグラフィーにより, ポリソルベート類の定量は非常に困難であり, さらに EO 基の含量測定は不可能であると考えられる.

¹H-NMR において, ポリソルベート類の EO のシグナルを同定するために, ポリソルベート 20, ソルビタンモノラウレートおよびポリエチレングリコールジステアレートの NMR シグナルを比較した(Fig. 2, 3). ソルビタンモノラウレートは, ポリソルベート類と同じく, ソルビタンをコアとし, 脂肪酸としてラウリン酸が 1 つソルビタン部に直接エステル結合したものであり, EO を含まないものである. ポリエチレングリコールジステアレートは, 2 つのステアリン酸が EO 基とエステル結合したものである. すなわち, 両者は, ポリソルベート類の部分構造を含む化合物であり, 部分構造に特徴的な NMR シグナルを与えることから, ポリソルベート類の EO の同定に有効であると考えられた.

ソルビタンモノラウレートおよびポリエチレングリコールジステアレートの脂肪酸に由来するシグナルが 0.9~2.4 ppm に観察された. ソルビタンモノラウレートでは, ソルビタン部に由来する小さな多数のシグナルが 3.4~5.0 ppm に観察さ

れた。ソルビタンモノラウレートのソルビタン部が小さな多数のシグナルとして観察されるのは、ソルビタンモノラウレートが脂肪酸のエステル結合の位置の異なる多数の異性体の混合物であることに由来すると考えられた。また、ソルビタン部を分子中に含まないポリエチレングリコールジステアレートでは、3.6 ppm および 4.2 ppm に EO に由来すると考えられるシグナルが観察された。ポリエチレングリコールジステアレートについて、HMBC 測定を行ったところ、4.2 ppm に観察されたシグナルはステアリン酸のカルボキシル基(-O-C=O-)と相関が観察されたことから、脂肪酸がエステル結合した末端の EO 基の-CH₂O-に由来すると決定した。よって、脂肪酸がエステル結合していない殆どの EO 基のシグナルは、3.6 ppm に観察されることがわかった。この結果とポリソルベート 20 のシグナルを比較することより、ポリソルベート 20 の EO 基に由来するシグナルは 3.6 ppm および 4.2 ppm であると同定された。脂肪酸とエステル結合した EO 基のシグナルが 4.2 ppm に観察されたが、3.6 ppm の大きな EO 基のシグナルに対して非常に小さなものであり、EO 基の含量を測定するに当たり無視できるものと考えられた。なお、他のポリソルベート類についても同様に比較を行った結果、EO 基に由来するシグナルはすべて同じ位置に観察された。

2) ポリソルベート類中の EO の定量

現在一般的に用いられている NMR 装置は、パルスフーリエ変換(FT)型のものである。通常の各社の FT-NMR 装置の¹H-NMR 初期測定条件は、構造解析を行う場合に特別問題にならない程度の定量性が設定されている。すなわち、低分子の化合物のプロトンシグナルの定量性が 90% 程度確保できていれば、構造解析には通常、化合物のプロトン数を整数値として扱うため必要十分である。しかし、FT-NMR 装置による定量性(>99%)を向上するための条件設定として以下が重要である。1. 測定対象のスペクトル範囲が観測幅の 80% 以内になるようにする。2. パルス幅を短くする。3. パルス遅延時間をシグナルの緩和時間(T_1)の 5 倍以

上に設定する。1 の測定対象のスペクトル範囲が観測幅の 80% 以内になるようにする理由として、ラジオ波(RF)パルスが観測中心から離れるほど強度が低下するため、観測幅の両端では定量誤差を与えるためである。2 のパルス幅を短くする理由として、RF パルスをより広範囲に均一に照射し定量誤差を小さくするためである。3 のパルス遅延時間をシグナルの緩和時間(T_1)の 5 倍以上に設定する理由として、NMR シグナルが定量性を持つためには、パルスにより励起された磁化が、次にパルスを照射されるまでに十分緩和していなければならないためである。したがって、1, 2, 3 を満たす条件として、Table I に示すように設定した。

Fig. 4 に Table I の条件でポリソルベート 20 の¹H-NMR スペクトルを測定した結果を示した。ポリソルベート 20 の EO 基の大きなプロトンシグナルが約 3.6 ppm に観察された。また、内部標準物質として用いた容量分析用標準物質フタル酸水素カリウム(PHP)のベンゼン環上の 4 つのプロトンシグナルが 7.5 ppm および 8.2 ppm に観察された。次に、PHP を一定量含む NMR 溶媒 3.0 mL にポリソルベート 20 を精密に 10~100 mg 溶解し、PHP のプロトンシグナルの積分値を 4 としたときの EO シグナルの積分値と試料の濃度の関係を観察した。その結果、ポリソルベート 20 の濃度と EO シグナルの積分値の間に高い相関関係($R^2 = 0.9996$)が認められた。よって、ポリソルベート類中の EO の含量測定に qNMR が利用可能であると確かめられた。

理論上、NMR 装置間の測定誤差は同一の条件で測定した場合、非常に小さいと考えられる。そこで、実際に測定誤差が小さいことを確認するために、試薬のポリソルベート類(20, 60, 65, 80)を一定量の PHP を含む NMR 溶媒に精密に溶解し、PHP および EO に由来するプロトンの積分値の比より EO 含量(%)を次式により算出した。

Table II に試薬のポリソルベート類中の EO の含量を 2 つの NMR 装置(MERCURY (400 MHz, VARIAN)および ECA500 (500 MHz, JEOL))で定

量した結果を示した。MERCURY では、ポリソルベート20, 60, 65 および 80 を各 5 回ずつ測定し、平均値と標準偏差を求めた。ECA500 では、ポリソルベート 20 および 60 について 9 回および 5 回測定し、平均値(AV)と標準偏差(SD)を求めた。その結果、MERCURY では、標準偏差が 0.5~1.3 であり、ばらつきの小さい安定した定量値を与えた。また、MERCURY と ECA500 の測定結果を比較すると、ほぼ等しい値を示していることから、NMR 装置の違いによる測定誤差は非常に小さいことが確認できた。

次に、食品添加物として諸外国で流通している各社の市販ポリソルベート 20, 60, 65 および 80 について、EO 含量を測定した(Table III)。その結果、すべて FCC および JECFA に規定された範囲内であった。したがって、ポリソルベート類中のオキシエチレン基 (EO) 含量(%)の測定法として、qNMR が JECFA および FCC に記載の滴定法に代わる簡便且つ有効な手段であると考えられた。

D. 結論

ポリソルベート類中のオキシエチレン(EO)の含量%の定量として、qNMR 法が FCC に記載の滴定法に代わる簡便且つ有効な手段であることが確認された。今後、qNMR 法が他の食品添加物の定量法として有効であることを証明するとともに、従来法では定量が困難である他の品目についても応用を試みる予定である。

E. 研究発表

1) 論文発表

Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. Food Add. Contam., accepted. (Feb. 2007).