

200636010B

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

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～18年度 総合研究報告書

主任研究者 佐藤 恭子

平成19(2007)年 3月

目 次

I. 総合研究報告		
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	-----	1
佐藤恭子		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	58
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	59

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

主任研究者 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第一室長

研究要旨 国際整合の観点から、国際的に広く使用され安全性が確認されている食品添加物については、指定に向けた検討が進められている。新規指定品目の規格設定にあたっては、国際規格を反映したものとする方向にあるが、食品添加物公定書既収載品目の規格やその試験法についても、国際整合を目指す必要があり、本研究では、その基盤となる調査研究を実施した。

香料化合物の生産使用量・摂取量調査では、高度化データベースを構築し、構築したデータベースを使用して調査を行い、調査開始から集計まで僅か9ヶ月という短期間で調査結果を得ることができた。平成 17 年に使用した香料化合物（新規指定品目を含む）の品目数は 2,164、年間総使用量は約 1,217t であり、安全性に問題があるような摂取量の化合物はないことが分かった。また、香料化合物の自主規格作成では、判断樹を作成し、それにより化合物に必要な規格項目を抽出し、FCC 未収載の 161 品目を含む合計 342 化合物に流通規格を反映した規格を整備することができた。生産量統計を基にした食品添加物の摂取量推定では、指定添加物について、第 7 回アンケート調査より食品添加物ごとの一日平均摂取量を推定し、第 8 回のアンケート調査及びその追加調査、再調査を行った。既存添加物等については第 2 回生産量統計を取りまとめ、第 3 回のアンケート調査を実施し、基礎データの蓄積に努めた。増粘安定剤の残留溶媒分析法については、ヘッドスペース (HS) -GC 法について、蒸留-GC 法あるいは限外ろ過-GC 法との比較検討を行い、HS-GC 法が代替法となりうる可能性が示された。簡便で確実な確認試験法である赤外線吸収スペクトル (IR) は、諸外国でも食品添加物の確認に汎用されている。そこで、外国の添加物の参照 IR を調査・検討し、得られた結果を基に、測定法などを検討し、主にテトラメチルピラジン、ベタインやネオテームなどの国内規格を向上する提言をすることができた。NMR の食品添加物規格への適用の可能性を探るため、LC-NMR 法、未知化合物の構造確認のために同位体を用いたモデル合成法及び定量 NMR (qNMR)法を食品添加物の新規分析法として開発検討した。その結果、LC-NMR 法により、食品添加物中の各化合物の精密な構造確認、純度評価が迅速に可能であること、同位体を用いたモデル合成法により、未知の化合物の構造が推定可能であること、qNMR 法により、高分子中の置換基の含量を簡便且つ高精度で定量可能であることを明らかとした。食品添加物の食品中での消長に関しては、ソルビン酸 (SOA) とシステイン (Cys) とで生じる反応生成物の同定を目的に分取精製を試み、SOA と Cys の添加形態によって、反応性の異なること、複数の生成物が形成されていることが推測された。食品添加物の食品中共存物質との相

互作用により生ずる分解生成物の解明では、カット野菜の次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理により、クロロホルム等の消毒生成物が確認された。消毒副生成物は次亜塩素酸ナトリウムの初期濃度や温度、アルカリ強度に応じて増加する傾向が認められた。次亜塩素酸ナトリウムにクエン酸を混和した殺菌液ではクロロホルム、ハロアセトン、ハロ酢酸が、リンゴ酸を混和した殺菌液では抱水クロラールの増加が認められたが、殺菌処理後の水洗浄が消毒副生成物の低減化に有効であることが確認された。

以上の研究成果は、直接的に食品添加物規格の国際化に向けた改訂に役立つとともに、我が国の食品添加物行政の安心・安全の確保に資するものである。

分担研究者 齊藤 寛
岡山大学薬学部教授
杉本 直樹
国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官
扇間 昌規
武庫川女子大学薬学部教授
久保田浩樹
国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

A. 研究目的

食の国際化により、我が国では安全性に問題がなくかつ国際的に広く使用されている食品添加物（香料化合物を含む）については、区に主導で指定に向けた検討が進められている。食品添加物の国際調和の要請に適切に対応しつつ、我が国の食品の安全性を確保するためには、さらに、食品添加物の規格基準の国際的視野での再整備が不可欠である。本研究では、食品添加物の規格の向上を目指し、以下の調査研究を行った。

①香料化合物については、新規指定された香料化合物を含め、我が国で使用してい

る香料化合物に対する生産使用量を調査し、摂取量を明らかにするとともに、日米欧3極が同時期調査することにより世界における香料摂取量の現状を明らかにするため、日米欧同時期の使用量調査を実施した。②国際的に利用されている香料化合物はおよそ4,300程度あり、我が国では約3,000の化合物が使用流通している。これら香料化合物の流通実態を踏まえた規格は国際的にみても少なく我が国の第8版公定書収載の90品目とFCC収載の約450品の香料化合物のみである。食品添加物に対する安全性が叫ばれている現在において香料化合物の規格を数多く整備し一般公開することは香料の安全安心に大いに寄与するばかりでなく商取引上にも役立つものと思われることから、香料化合物の自主規格作成を推進した。③生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定では、引き続き我が国の食品添加物動向の把握に努めた。④増粘安定剤の残留溶媒分析法については、残留溶媒の分析法として比較的簡便であり、医薬品や水中の残留溶媒分析に利用されているヘッドスペース-GC法と蒸留-GC法あるいは限外ろ過-GC法との比較検討を行った。⑤赤外スペ

クトル (IR) は、その簡便性と確実性から、有機・無機化合物を問わず、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、4,000-600 あるいは 4,000-400 cm^{-1} の領域の IR を簡単に得られるようになってきている。一方、IR 法は、ほとんど試薬を必要としないため、有機溶媒などを多用する化学的な確認試験法に比べ、有機廃液の焼却処理に伴う二酸化炭素の排出が少なく、二酸化炭素の削減に寄与すると考えられる。このような状況のもとで、IR 法が各種品目の確認試験に多用されるのは当然のことである。そこで、本研究では、食品添加物の国内規格の向上などを目的にして、諸外国の確認試験に IR が用いられるか否かを調査し、さらに参照 IR が使用されている場合について、その参照 IR を調査・検討を加えた。⑥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) 及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 及び 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、構造的にはほぼ等しい化合物を同定することは困難である。また、分析対象の化合物がイオン化しにくい場合、高分子化合物の混合物である場合、未知化合物を含み且つ成分組成

が明らかとされていない場合、上記の方法は適用不可能である。したがって、厳密に化合物を同定及び定量するには、標準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、液体クロマトグラフ/核磁気共鳴 (LC-NMR) 法は、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。また、一般的に化合物の UV や RI 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 (^1H) 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 (qNMR 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、本研究では食品添加物の分析に NMR を積極的に応用し、以下について検討した。1. LC-NMR 法を用いて、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 及び 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。2. 既存添加物クチナシ青色素の化学構造について、安定同位体を用いたモデル合成を行い、主色素の構造について検討した。3. ポリソルベート類中のオキシエチレン基の含量測定に内標準を用いた定量 NMR (qNMR) 法を適用し、簡便且つ高精度の新規分析法を開発した。⑦食品添加物の使用基準に向けた基礎研究として、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ソルビン酸に関する研究を行った。⑧次亜塩素酸ナトリウムは、野菜や魚介類加工品及び食品製造工程に用いられる装置や器具などの殺菌料として広く利用されている食品添加物であり、食品衛生における微生物学的危害防止のために重要な役割を果たしている。次亜塩素酸は古くから水道の消毒薬としても利用されてきたが、1972 年に Rook らが河川水からクロロホルムを検出し¹⁾、また、河川水

の塩素処理によってクロロホルムを始めとした様々なトリハロメタン (THM) が生成されることが明らかとしている²⁾。これまでに河川水の塩素処理により生成する消毒副生成物については広く研究が行われており、これまでにハロアセトニトリルや、抱水クロラール、ハロ酢酸などの様々な塩素系有機化合物の生成が確認されている。このため、各国では消毒副生成物による健康影響について評価を行い、飲料水の水質基準値が設けられている。WHO の飲料水ガイドライン第3版³⁾では、クロロホルム (CF) が 0.2 mg/l、ブロモジクロロメタン (BDCM) が 0.06 mg/l、ジブromoクロロメタン (DBCM) が 0.1 mg/l、プロモホルム (BF) が 0.1 mg/l であり、ジブromoアセトニトリル (DBAN) が 0.07 mg/l、暫定基準値としてジクロロアセトニトリル (DCAN) が 0.02 mg/l、抱水クロラール (CH) が 0.01 mg/l、ハロ酢酸類に関しては、モノクロロ酢酸 (MCAA) が 0.02 mg/l、ジクロロ酢酸 (DCAA) が暫定基準値として 0.05 mg/l、トリクロロ酢酸 (TCAA) が 0.2 mg/l に設定されている。米国 EPA では総 THM の最大許容濃度 (MCL) が年間平均として 0.08 mg/l であり、ハロ酢酸類として 0.06 mg/l としている⁴⁾。また、EU では、総 THM として 0.1 mg/l に設定しているが、ハロ酢酸類については設定されていない⁵⁾。現在、わが国では水道水の水質基準⁶⁾において、THM 類は総 THM として 0.1mg/l、CF が 0.06 mg/l、BDCM が 0.03 mg/l、DBCM が 0.1 mg/l、BF が 0.09mg/l、DCAN と CH は水質管理目標

値として、それぞれ 0.04 mg/l (暫定) と 0.03 mg/l (暫定) に設定されており、DBAN は、要検討項目として 0.06 mg/l に設定されている。平成 15 年には、水道法水質基準の大幅な改正が行われ、ハロ酢酸類が新たに設定された。MCAA は 0.02 mg/l、DCAA は 0.04 mg/l、TCAA は 0.2 mg/l に設定されており、その他のハロ酢酸類については要検討項目となっている。さらに、現在、清涼飲料水中の消毒生成物に関しても、規格基準策定に向けた検討が行われている。これまでに食品の次亜塩素酸ナトリウム処理に伴う THM 生成挙動の解明に関しては、日高らによるキャベツやモヤシ中の CF の生成⁷⁻⁹⁾や、今枝らによる豆腐製造過程における THM 生成¹⁰⁾、また、Resch らによる牛乳製造プラントにおける次亜塩素酸洗浄による CF 生成挙動の解明などの報告があるが¹¹⁻¹³⁾、これまでのところ THM の生成挙動の全容を解明するまでには至っておらず、また、その他の消毒副生成物に関しては、Chang らによるフルーツジュースの塩素処理による生ずる消毒副生成物の研究において、ハロアセトンやハロ酢酸、ハロアセトニトリル生成の報告があるが¹⁴⁾、食品における消毒副生成物の定量的な生成挙動の解析は行われていない。近年、食品添加物の殺菌料の使用状況にも変化がみられ、2002 年に新規指定食品添加物として食塩水又は塩酸を電解することにより得られる次亜塩素酸水（いわゆる電解水）が新たに指定され¹⁵⁾、2004 年には次亜塩素酸ナトリウムに酸を混和して使用することが認められている¹⁶⁾。

また、次亜塩素酸水についても、製法の多様化にともない、成分規格の改正が検討されるなど使用実態が日々変化しつつあり、食品における消毒副生成物の挙動解明には現況に合わせた調査が必要となる。そこで、本研究では食品添加物の食品中の共存物質との相互作用により生ずる分解生成物の解明として、次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する消毒副生成物として、THM、ハロアセトニトリル、ハロ酢酸などの生成挙動解明に向けて検討を行った。

B. 研究方法

1. 我が国で使用している香料化合物の生産使用量・摂取量に関わる調査研究

香料のように品目数が多く、更に一つの品目が数多くのシノニム名で使用されているものについては集計用データベースがはっきりしていないと調査から摂取量算出まで膨大な時間がかかり、即応性に欠ける。事実、過去の調査では、米国では生産使用量調査から摂取量算出までに 8 年、欧州では調査自体に数年、集計から摂取量算出にも数年を要した。我が国でも前回調査では調査から算出までに 2 年を要した。

今回は平成 16 年度及び 17 年度の 2 ヶ年度をかけて現在日米欧で使用している約 4,300 の香料化合物を調査整理することにより調査集計用のデータベースを完成させて調査を行った。アンケート調査は、食品香料を製造している会員会社に調査用化合物リストを E-mail 配布し、平成 17 年 1 月初めから 12 月末までに食品香料製剤に使

用した香料化合物の品名と量を平成 18 年 4 月末から 7 月末までに回答することで実施した。

回答の精査集計には日本で使用している香料化合物に米国 FEMA-GRAS 品、EU-Register 品、JECFA リスト品を加えた集計用データベースを使用し、摂取量は PCTT 法にて算出した。

2. 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

平成 16 年度の調査研究で作成した判断樹を用いて個別化合物に必要な規格項目を抽出し、更にこの個別化合物に必須とする項目を化合物の特性を加味して決定した。次ぎに決定した項目毎に、平成 14 年に調査した各種の流通規格実態データを基に最大公約数を求めて規格中心値を決め日本香料工業会の作成した自主規格作成指針（基準）により規格値の巾を決定した。同時に第三者が作成した確認試験のための参照標準チャート文献を付けることによって個別化合物に対する自主規格とした。香料化合物は医薬品としての機能から使用されているものがあり、各国の局方等を調査することにより香料の規格のあり方について検討した後、平成 14 年調査の「我が国で使用流通している食品香料化合物の規格実態に関わる調査研究」で得た流通規格データを基に年間使用量が 10kg 以上の 553 化合物に対しての自主規格化を検討した。

3. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

国民一人が一日に摂取する食品添加物量をそれぞれの物質の製造・輸入量の統計データから推定する。

食品添加物を国内で製造している、あるいは、輸入している事業者に対し、アンケート形式で、食品添加物 1 品目毎に

- 1)製造・輸入量
- 2)差し引くべき輸出货量、食品以外の用途向けの使用量・出荷量
- 3)食品向けの使用量・出荷量

の回答を求め、これを集計した上で、添加後の食品加工工程での消長、食品の廃棄率、等の考察を加え、人工・年間日数で除して、一日の推定摂取量とし、この調査を 3 年 1 サイクルで行う。

4. 増粘安定剤の残留溶媒分析法の検討

あらかじめ溶媒を添加したカロブビーンガム、グアーガム及びジェランガム中の 2-プロパノール及びメタノールについてヘッドスペース (HS) -GC法(標準添加法)及び蒸留-GC法により分析を行った。ペクチン(リンゴ由来及びかんきつ類由来)中の 2-プロパノール及びメタノールについては HS-GC 法及び限外ろ過-GC法により分析を行った。

4.1 標準添加ヘッドスペース(HS)-GC 法

2-プロパノール及びメタノールを水で希釈し、標準溶液 A とし、標準溶液 A10ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、水を加えて正確に 20ml とし、標準溶液 B 及び標準溶液 C とした。

4.1.1 一晩放置法

ヘッドスペース用バイアルに、試料 0.04g を量り、攪拌子と水又は標準溶液 A、標準

溶液 B、標準溶液 C のいずれか 5 ml ずつを正確に加え、直ちに密封し、一晩放置した。翌日、マグネチックスターラーで 1 分間攪拌後、HS-GC/FID により 2-プロパノール及びメタノールのピーク面積を測定した。測定用試料中への 2-プロパノールまたはメタノールの添加濃度を横軸に、クロマトグラム上の各ピーク面積値を縦軸に取り、関係線を作成し、関係線の横軸との交点と原点との距離から、試料中の 2-プロパノール及びメタノール濃度を求めた。

4.1.2 酵素添加法

セルラーゼ (MP biochemicals 社製) を水に溶かし、1%酵素溶液とした。ヘッドスペース用バイアルに、試料 0.04 g を量り、攪拌子と水又は標準溶液 A、標準溶液 B、標準溶液 C のいずれか 5 ml ずつを正確に加え、更に 1%酵素溶液 0.1 ml を加え、直ちに密封し、マグネチックスターラーで 1 分間攪拌後、HS-GC/FID により 2-プロパノール及びメタノールのピーク面積を測定し、試料中の 2-プロパノール及びメタノール濃度を求めた。

4.1.3 GC 測定条件

ヘッドスペースサンプラー (HP7694、HP 社製) : オープン温度、40°C または 60°C ; ループ温度、110°C ; トランスファーライン温度、130°C ; バイアル平衡時間、40 分間 ; Shake、High ; バイアル容量、10 mL。

GC-FID (HP5890、HP 社製) : カラム、Aquatic-2 (内径 0.25mm、長さ 60m、膜厚 1.4 μ m、ジーエルサイエンス (株) 製) ; カラム温度、40°C (6min) \rightarrow 4°C/min \rightarrow 110°C \rightarrow

25°C/min \rightarrow 240°C (10min) ; 注入口温度、200°C ; ガス流量、ヘリウム (キャリアーガス) 175kPa、水素 100 kPa、空気 250 kPa ; 注入方法、スプリット注入 (スプリット比 = 10 : 1) ; 検出器温度、260°C。

4.2 蒸留-GC法

tert-ブタノール 0.1g に水を加え 100ml とし、内標準溶液とした。2-プロパノール及びメタノールをそれぞれ約 0.5g ずつ精密に量り、水を加えて正確に 50ml とした。この液 5ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準液とした。試料 2g を 300ml 容のナス型フラスコに精密に量り、水 200ml、沸騰石数個及びシリコーン樹脂約 3ml を入れよく混和した。内標準溶液 (*tert*-ブタノール) 4ml を正確に量り、100ml 容のメスフラスコに入れ、蒸留装置を組み立て、すり合わせ連結部を水でぬらした。泡がしぶき止め付き蒸留管に入らないように調整しながら、1 分間に 2~3ml の留出速度で留分が約 90ml になるまで蒸留した。この留分に水を加えて正確に 100ml とし、検液とした。検液及び標準液につき、GC-FID で分析を行った。検液及び標準液の *tert*-ブタノールのピーク面積に対する溶媒 (2-プロパノール及びメタノール) のピーク面積比 Q_T 及び Q_S を求め、以下の式により 2-プロパノール及びメタノールの量を求めた。

溶媒量 = 溶媒の採取量(g) / 試料の採取量(g) $\times Q_T / Q_S \times 0.4$ (%)

GC 測定条件 1

GC-FID (GC14B、島津製作所製) ; カラム、Gaskuropak54 (内径 3mm、長さ 2m、ジ

ーエルサイエンス (株) 製) ; カラム温度、120°C ; 注入口温度、200°C ; ガス流量、ヘリウム (キャリアーガス) 250kPa、水素 50kPa、空気 50kPa ; 検出器温度、200°C。

GC測定条件2

GC-FID (GC14B、島津製作所製) : カラム、Aquatic-2 (内径0.25mm、長さ60m、膜厚1.4 μ m、ジーエルサイエンス (株) 製) ; カラム温度、40°C (6min) \rightarrow 4°C/min \rightarrow 110°C \rightarrow 25°C/min \rightarrow 240°C (10min) ; 注入口温度、200°C ; ガス流量、ヘリウム (キャリアーガス) 250 kPa、水素 50 kPa、空気 50 kPa ; 注入方法、スプリット注入 (スプリット比 = 100 : 1) ; 検出器温度、260°C

4.3 限外ろ過-GC 法

tert-ブタノール 1ml に水を加え 1,000ml とし、内標準溶液とした。内標準溶液 4ml に水を加えて 100ml とし、この液 10ml 及び攪拌子をサンプル瓶に入れ、攪拌しながら、精密に量った試料約 0.1g を少しずつ加え、密栓し、均一に分散するまで攪拌した、この液を遠心式限外ろ過ユニットに移し、3,000 \times g で約 1 時間遠心ろ過し、ろ液を検液とした。別に 2-プロパノール及びメタノールをそれぞれ約 0.1g ずつ精密に量り、水を加えて正確に 100ml とし、この液 0、5、10、20 及び 40ml を正確に量り、それぞれ内標準溶液 4ml を正確に加え、水を加えて正確に 100ml とし、5 濃度の標準液 (0~0.4mg/ml) とした、検液及び標準液をそれぞれ 2.0 μ l ずつ量り、GC-FID (蒸留-GC 法 GC 測定条件 2) で分析を行った。検量線を作成し、検液中の 2-プロパノール及びメタ

ノールの濃度を算出し、それぞれの試料中濃度を求めた。また、内標準法として、検液及び標準液 (0.1mg/ml) の *tert*-ブタノールのピーク面積に対する溶媒 (2-プロパノール、メタノール) のピーク面積比 Q_T 及び Q_S を求め、以下の式により、2-プロパノール及びメタノールの量を求めた。

溶媒量 = 溶媒の採取量 (g) / 試料の採取量 (g) \times Q_T / Q_S (%)

5. 食品添加物の赤外吸収スペクトルに関する国際的な規格と国内規格向上に関する調査研究

ペースト法 (ヌジョール、Nujol 法)、KBr 錠剤法及び NaCl 錠剤法で IR を測定し、FCC や JECFA 記載の参照 IR スペクトル等と比較検討した。

6. MR 等による食品添加物の規格分析法に関する研究

6.1 LC-NMR 法による香料「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」の分析

6.1.1 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 μ L/mL (CH_3CN) に調製したものを分析試料とした。以下の条件の LC-MS、GC-MS 及び LC-NMR に付した。

LC-MS 分析条件 : Waters 社製 LC-MS system (LC, Alliance 2695; PDA, 2996; MS, ZQ-4000)。LC 条件 : カラム、TSK gel ODS-80TsQA (2.0 mm i.d. \times 250 mm); カラム温度、40°C ; 移動相、 CH_3CN : H_2O = 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。

GC-MS 分析条件：島津製作所(株)製 GC/MS system (GCMS-QP-5050A)。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

LC-NMR 分析条件：JEOL 社製 LC/NMR system (LC、NANOSPACE SI-2 series (Shiseido)；NMR、ECA-500)。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、CH₃CN：H₂O = 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 及び WET-HMBC により各シグナルの帰属を行った。

6.1.2 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 D₂O:CD₃CN = 4:1 混液 500 μL に溶かし、¹H-NMR における pyrazine 環上の 5 位及び 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。

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

6.2 既存添加物クチナシ青色素の安定同位体を用いた構造解析

6.2.1 同位体を用いたクチナシ青色素のモデル合成

¹⁴N-ベンジルアミン (¹⁴N-benzylamine) (¹⁴B) または ¹⁵N-ベンジルアミン (¹⁴N-benzylamine)(¹⁵B)(0.1 mmol) と ゲニピン (0.1 mmol) を EtOH (5 mL) に溶かし、封管中、90°C で 5 時間反応させた。反応液に水 (50 mL) を加え、0.5 M HCl で弱酸性に調製した後、AcOEt (50 mL) で 3 回抽出したものを合わせ、分析試料とした。

6.2.2 LC/MS 分析条件

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

LC 条件 1：カラム、Atlantis-HILIC (2.1x150 mm、Waters)；カラム温度、40°C；移動相、90% CH₃CN (0 min) - 0% CH₃CN (50 min) (0.1% HCOOH included)；流速、0.2 mL/min；注入量、4 μL；PDA、192-800 nm；検出波長、600、680 nm。

LC 条件 2：カラム、YMC-Pack-C8-AP (2.1x150 mm、YMC)；カラム温度、40°C；移動相、10% CH₃CN (0 min) - 100% CH₃CN (50 min) (0.1% HCOOH included)；流速、0.2 mL/min；注入量、4 μL；PDA、192-800 nm；検出波長、600、680 nm。

LC 条件 3：カラム、YMC-Pack-CN (2.1x150 mm、YMC)；カラム温度、40°C；移動相、

10% CH₃CN (0 min) - 100% CH₃CN (50 min) (0.1% HCOOH included); 流速、0.2 mL/min; 注入量、4 μL; PDA、192-800 nm; 検出波長、600、680 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、50 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* 100-2,000。

6.3 qNMR 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

6.3.1 内部標準液の調製

フタル酸水素カリウム(JIS 規格準拠容量分析用標準物質)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。

6.3.2 試料溶液の調製及び qNMR 測定

NMR 装置: JEOL ECA-500 (500 MHz)、Variann Mercury400 (400MHz)。

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 E1 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。

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

$$\frac{\text{実試料の特定シグナル積分値}/4 \times 44 / \text{実試料の重量 (mg)}}{\text{内標の積分値}/4 \times 204 / \text{内部標準溶液 3 mL 中の内標の重量 (mg)}}$$

44: エチレンオキシド(EO)の分子量

204: 内部標準の分子量

7. 食品中の食品添加物の流通状態における消長調査

ソルビン酸及びソルビン酸カリウムを対象とし、それらの動態を UV 検出器付き HPLC による 254nm のクロマトグラムの解析より推定する。試料調製時の濃度とクロマトグラムのピークを基準として、条件付加後のソルビン酸残存率を求め、ソルビン酸の構造の変化を検討する。

7.1 高温曝露実験

褐色ガラス瓶に精製水で調製した一定濃度のソルビン酸を入れ、家庭用電子レンジでマイクロ波照射することにより、どれほど短時間に所定の温度に達することができるか。

7.2 食品成分との相互作用

食品中のモデル成分として、いくつかのアミノ酸をソルビン酸と混合して一定期間室温放置後、ソルビン酸の残存率はどうに変動したか、HPLC ピークに差はないか。

8. 食品添加物の食品中の共存物質との相互作用により生ずる分解生成物の解明

8.1 試料

都内スーパーで購入したキャベツを幅約 1mm に細切し実験に用いた。

8.2 試薬

各種消毒副生成物混合標準原液は関東化

学社製の水質試験用を用いた。次亜塩素酸ナトリウム及びクエン酸、DL-リンゴ酸、L-酒石酸には和光純薬工業社製又は関東化学社製の食品添加物用を用い、フタル酸水素ナトリウムには和光純薬工業社製の試薬 1 級を用いた。測定用精製水には、EDS 若しくは MilliQ 水を用いた。その他の試薬は特級を用いた。次亜塩素酸ナトリウムは食品添加物公定書第 7 版に従いあらかじめヨウ素滴定法¹⁷⁾で定量し、この希釈液を次亜塩素酸ナトリウム液として用いた。

8.3 器具及び装置

ヘッドスペース GC/MS として、Agilent Technology 製の HP-7694 及び HP6890/5973 を用いた。GC/ECD は Agilent Technology 製の HP6890N を用い、溶媒抽出-GC/MS には島津製作所製の GCMS-QP2010 を用いた。全てのガラス器具は 110°C で 3 時間加熱後、放冷して用いた。

8.4 THM 用ヘッドスペース GC/MS 条件

ヘッドスペース条件 バイアルオープン温度：60°C、サンプルループ温度：130°C、トランスファーライン温度：170°C、バイアル加熱時間：30 min、バイアル加圧時間：0.2 min (15 psi)、注入法：スプリット(1:1)又は(1:20)、スプリット比は GC/MS 用試験液に含まれる THM 濃度に応じて適宜変更を行った。GC/MS 条件 カラム：AQUATIC 60m×0.25mmI.D. 膜厚 1.0µm、カラム温度：40°C(2min)→(4°C/min)→200°C、注入口温度：200°C、トランスファーライン温度：200°C、イオン化法：EI、イオン化電圧：70ev。

8.5 ハロアセトニトリル用 GC/MS 条件

GC/MS 条件 カラム：DB-1 (J&W) 60m×0.25mmI.D. 膜厚 1.0µm、カラム温度：35°C(10min)→(20°C/min)→300°C、スプリットレス、注入口温度：250°C、インターフェース温度：250°C、イオン化法：EI、イオン化電圧：70ev、線速度：43 cm/min

8.6 ハロ酢酸用 GC/ECD 測定条件

カラム：DB-1701 (J&W) 30m×0.25mmI.D. 膜厚 0.25µm、カラム温度：35°C(10min)→5°C/min→75°C(15min)→5°C/min→100°C(5min)→5°C/min→135°C→20°C/min→260°C、スプリットレス、注入口温度：200°C、検出器温度：260°C、線速度：25 cm/min

8.7 次亜塩素酸ナトリウム処理方法

試料 2 g を 50 ml のスクリーキャップバイアルに採り、有効塩素濃度として 100 µg/ml となるように調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液 20 ml を加え、直ちに密栓し、10 分間殺菌処理を行った。殺菌処理後、40% アスコルビン酸ナトリウム 200µl を加えて反応を止め、よく攪拌した後、試料を採取した。

C. 研究結果及び考察

1. 我が国で使用している香料化合物の生産使用量・摂取量に関わる調査研究
香料化合物の安全性評価に必須な摂取量(暴露量)調査を日米欧 3 極が同時期(2006 年)に実施することが IOFI(国際食品香料工業会)の提案で 2003 年に決まった。2003 年は日本における初めての香料の摂取量調査が終了した年であったが、国際的に実施する重要性に鑑みこの調査に参加すること

とした。

アンケート調査及びその集計はできるだけ短期間で行うことが望ましい。前回の調査ではアンケート回答の精査に多大な時間がかかり摂取量算出までに2年を要した。今回は前回の経験から、予め調査を集計するデータベースを高度化し構築しておくことによって、可能な限り迅速かつ正確に結果を出せるように計画した。その結果、アンケート調査の回答を回収後、摂取量算出までの集計作業を約6ヶ月という短期間で完了することができた。

即応性が要求される摂取量調査において今回使用したデータベースは極めて有効であった。今後の調査においてもこのデータベースは欠くことができないものになると思われる。

平成18年度の研究として行った実際の「生産使用量・摂取量調査」結果概要は次の通りである。

① 使用品目数

使用品目数は2,164、前回調査2,854に比べ大幅に減った。その理由については香気の流れということもあるが、近年におけるアジア諸国の香料規制の変化に影響を受け食品香料製造処方の見直しや合理化が進められたことがおおきな一因と考えられる。

② 用量

総使用量は約1,217t、前回調査1182tに比較してやや微増という結果であった。

③ 摂取量

摂取量については、JECFAの香料評価法において安全性に懸念なしとされている

1.5 μg /人/日以下の品目数が1,373品目(全品目中の63.4%)。また、90 μg /人/日(JECFAの香料評価法判断樹における構造クラスⅢの閾値)以下の品目数は1,999品目(全品目中の92.4%)であった。前回調査と同様に国内で使用されている食品香料化合物の大半の推定摂取量は少量であることが分かった。

④ 新規指定品目の摂取量

平成16年12月から平成17年12月までに新規指定となった化合物8品の使用量、摂取量をTable 1に示す。食品安全委員会評価時に使用した欧米の推定摂取量と比較すると、今回の調査で得られた新規指定化合物の我が国における推定摂取量は極めて低い値であった。今回の調査では安全性に懸念が無い量で使用されていることが確認されたが、今後も定期的な調査が必要である。今回の調査結果は、我が国における香料の使用状況が極めて健全であることを実証するものであるが、同時に我が国のみで使用しているものを含め、JECFAが今後香料化合物の安全性評価をする際の摂取量資料として、従来は欧米のみのデータであったところに我が国の情報も提供できることを考えるとその価値は非常に高い。一方、今回の調査は日米欧3極が同時期に調査を行ったものであったが、米欧の調査結果については、集計の遅れから平成18年度報告書に反映できなかった点は極めて残念なことであった。今後米欧の集計が全て終了した時点で、何らかの手段により米欧の摂取量状況についても公表したいと考えている。

2. 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

世界で公開されている食品香料化合物の規格は、日本の公定書収載品目、FCC 収載品目及びJECFA が評価品目特定のために使用する規格以外にはない。このうち JECFA 規格は安全性評価品目を特定するためのもので必ずしも市場流通品を反映した規格ではない。したがって、市場流通品を反映した規格は我が国の公定書収載の 90 品目と FCC 収載の約 450 品目のみといえる。このうち重複した品目を整理するとわずか 450 の化合物にしか規格が明確となっていない。このような状況の中で流通実態を反映した香料化合物の規格を整備し、順次公開していくことは香料の安全安心に寄与するばかりでなく商取引上にも大いに役立つものと考え、調査研究をすることとした。

平成 16 年度は約 3,000 もの香料化合物の規格をどのように整備するのが望ましいのかについての調査研究を行い、香料化合物に対する規格項目の設定は化合物の特性を利用した判断樹を用いて決めるのが最も望ましい方法であると結論した。次いで平成 17 年度は 16 年度の調査研究に沿って、使用量の多い順番に上位 245 化合物について検討し、特に問題を含まない 129 の化合物に自主規格を設定できた。実際に規格化を検討し始めてみると、香料化合物には幾何異性体、光学異性体、単一名称であるが複数成分からなる天然物由来の化合物、固体結晶物等様々なものがあり、それぞれについて規格化の基準を検討する必要があるこ

とが分かった。また、平成 17 年度の調査研究を通じて、固体結晶物に重金属の項目を設定する場合の必要条件の検討、異性体を含む化合物の扱い、互変異性体化合物の取扱、不飽和化合物に対する過酸化物質の取扱、天然物原料を使用した合成香料等様々な検討課題が新たに見出された。これらの課題のうち平成 18 年度では固体結晶化合物を使用している会社へ再調査した結果、固体結晶化合物の最終精製法の特定は不可能であることが明確となり、基本的に全ての固体結晶物に重金属の項目を設定することで解決した。また幾何異性体についても再調査の結果、名称に *cis*、*trans* が明記されているものについては他の異性体（即ち、*cis* 体明記に対する *trans* 体、逆に *trans* 体明記に対する *cis* 体）を含むことは無かった。その結果品名に *cis*、*trans* が明記されていないものについては原則として異性体混合物として取扱うことを自主規格作成指針として決めた。天然物を原料とする合成化合物、光学異性体や反応性混合物等については指針を決めるに至らず今後の検討課題として残ったが、これらの作成指針により平成 18 年度は検討した 424 化合物のうち 213 化合物に規格が設定できた。なお、平成 17 年度、18 年度の 2 ケ年度で整備した 342 品目の規格のうち、161 品目は FCC 未収載であった。

平成 17 年度分に関しては平成 19 年 4 月から日本香料工業会ホームページ上で一般公開することとしている。平成 18 年度分に関しても準備が整い次第公開する予定である。香料化合物の自主規格を整備し公開す

ることは単に香料の安全安心に寄与するばかりでなく商取引上にも大いに意義があるものと考えられる。

3. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

昭和57年より開始した過去7回の指定添加物についての調査の結果、ADIのある添加物1品目毎の摂取量推定値は、そのADI値よりも十分に低い値であった。この結果はマーケットバスケット方式による結果と矛盾するものではなかった。経年変化については、使用禁止などの行政措置があった場合を除くと、猛暑の年の清涼飲料用酸味料が若干増える程度で、大きな変動はなかった。既存添加物については平成12年に調査を開始し、過去2回、品目毎に推定摂取量をまとめた。

4. 増粘安定剤中の残留溶媒分析法

蒸留-GC法の結果を比べると、HS-GC法（一晚放置法）の方が、値が低くなる傾向が見られたが、HS-GC法（酵素添加法）では、グアーガム及びカロブベーンガムのようにセルラーゼにより加水分解されやすいガムについては、蒸留-GC法等とほぼ同様か若干高い値が得られ、代替法となりうると考えられた。しかし、ジェランガムのようにセルラーゼで加水分解されにくいガムでは値が低く、別の酵素を用いる必要があると考えられた。また、蒸留で得られた留液について、HS-GC法と同じキャピラリーカラムで分析を行ったところ、良好な結果が得られ、蒸留-GC法でもキャピラリーカラムの使用は可能であると考えられた。

限外ろ過-GC法では、ペクチンからは2-プロパノール及びメタノールが検出するため、2-プロパノール及びメタノール及びペクチンに含まれていない、エタノールを用いて限外ろ過-GC法における添加回収試験を行った。検量線を用いて求めた回収率は、いずれも92%以上であった。一方、内標準法により添加回収率を求めると、いずれも100%以上となった。そこで、溶媒添加回収実験用に調製した添加溶液（エタノールのみ）及びこの添加溶液を遠心式限外ろ過ユニットに移し、3000×gで、約1時間遠心ろ過して得られたろ液を分析した。限外ろ過前は、(エタノールのピーク面積) / (tert-ブタノールのピーク面積) = 2.5であったのに対し、限外ろ過後は、2.6に上昇した。また、試料溶液のろ過後には、その比は、2.7であった。分析対象物質（各溶媒）と内標準物質（tert-ブタノール）の挙動が異なる場合には、実際の値が反映されないことになる。

次に、限外ろ過-GC法（絶対検量線法）とHS-GC法（標準添加法）を比較したところ、限外ろ過-GC法の方がばらつきは少なかったが、同様の値が得られ、ペクチン中の残留溶媒分析法として、HS-GC法は使用可能と考えられた。

5. 食品添加物の赤外吸収スペクトルに関する国際的な規格と国内規格向上に関する調査研究

平成16年度には、2,3,5,6テトラメチルピラジンのIRの検討を行った。世界的にはFCC及びJECFAの参照IRなど、異なるIR

が使われている。そこで、この原因を解明し、ペースト法でもKBr錠剤法でも標準となる得るIRの測定法を定めた。

平成17年度には、ベタインのIRの検討を行った。ベタインも種々のIRが報告され、しかも同じ試料でも測定地域によってIRが異なる。そこで、この原因を検討した結果、無水物と水和物が存在するため、湿度や測定法によってIRに差がでることを明らかにし、ペースト法を用いれば標準IRを得られることを示した。

平成18年度には、ネオテームとトコフェロール酢酸エステルを検討を行った。ネオテームにも無水物と水和物が存在することを明らかにした。無水物の場合はペースト法のみ、水和物の場合はペースト法とKBr法のいずれでも測定できることを明らかにした。さらに、トコフェロール酢酸エステルなどの標準となるIRを得ることができた。

6. NMR等による食品添加物の規格分析法に関する研究

6.1 LC-NMR法による香料「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」の分析

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. P1)。LC-MS及びGC-MSにより分析した結果をFig. P2、P3、P4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A及びBが観

察され、ESI-MS(pos.)において、共に m/z 137 $[M+H]^+$ 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. P3)。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XがLC-MSにおけるピークBに、保持時間11.0分のピークYがピークAに対応するものと考えられた。ピークX及びYは、EI-MSにおいて、共に分子量関連イオン m/z 135 $[M-H]^+$ (100%)及び136 M^+ (75%)を与え、 m/z 121、108、94、80、56にはほぼ同様なフラグメントイオンを与えた(Fig. P4)。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。

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. P5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(D₂O)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法及びFRACTION-LOOP法などがある。本研究においては、ON-FLOW法及び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. P6に示した。ピークA及びB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次元データを取得することが出来る。ピークA及びB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Aでは δ 8.38 ppmに、ピークBでは δ 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A及びB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¹H-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、¹H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A及びBについてそれぞれWET-COSY、WET-HMQC及びWET-HMBCを測定した。その結果、ピークAに観察されたpyrazine環上のプロトン δ 8.38ppmのシグナルは2位のカーボン δ 161.7ppmのシグナルとHMBC相関が観察されたことから、ピークAが2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1)であることが確認された(Table P1)。したがって、LC/NMRにより、ピークAが2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1)、ピークBが2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2)と同定された。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T1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T1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)及び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. P7)。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及び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(Table P2)。また、PDA-LC/MSの結果とは1%の誤差がみられたが、これは278nm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あることが確認された。

6.2 既存添加物クチナシ青色素の安定同位体を用いた構造解析

市販のクチナシ青色素はクチナシ果実中に含まれるイリドイド配糖体のゲニポシドとアミノ酸類を反応させて製造したものである(Fig. G1(1))。反応に用いられるアミノ酸は、多くの場合、製造コスト削減のためにタンパク加水分解物が用いている。よって、市販のクチナシ青色素中の色素成分は、様々なアミノ酸との反応物からなる有機溶媒に不溶の複雑な混合物であり、それぞれを単離することは非常に困難である。そこで、モデル合成としてゲニピン(G)とベンジルアミン(benzylamine)を反応させて生成した化合物の構造解析を行うこととした。ベンジルアミンを用いる利点は、1. 反応生成物の有機溶媒への溶解性を高める。2. 重合反応の進行過程でベンゼン環が立体障

害となり、比較的重合度が小さな化合物を与える。3. ^1H -または ^{13}C -NMR で分析する際にベンゼン環のシグナルの積分値から重合度を換算できる。ことがあげられる。また、安定同位体を分子内に持つ ^{15}N -ベンジルアミン(^{15}B)を反応に用いた。LC-MSにより、 ^{14}N -ベンジルアミン(^{14}B)を反応させた生成物と比較することによって生成物の分子中の窒素の数を推定すること可能であるとともに重合度を推定することも可能である。例えば、反応生成物が、ゲニピン(G)にベンジルアミン(B)が等量導入されたものの重合体であるとき、それぞれの分子量が測定できれば、 $(\text{G}+^{15}\text{B})_n - (\text{G}+^{14}\text{B})_n = \text{重合度}(n)$ の式が成り立つ(Fig. G1(2))。

ゲニピン(G)と ^{14}N -または ^{15}N -ベンジルアミン(^{14}B or ^{15}B)をエタノール中で反応させたところ、メタノール、エタノール、酢酸エチル等の有機溶媒に可溶性青色素が生成した。この青色素は、市販のクチナシ青色素と同等の色合いを示したことから、クチナシ青色素の生成過程と同様な反応経路により生成したものと考えられ、青色素の分子構造を推定するためのモデル化合物になり得ると判断した。

ゲニピン(G)とベンジルアミン(B)から生成した青色素のLC/MS分析条件を検討した。まず、通常のODSカラムを用いて、各種移動相による溶出条件の検討を行ったが、生成した青色素は分子量が非常に大きいためか、ODSカラムを通過しなかった。そこで、順相条件として親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction

Chromatography = HILIC)カラムを、また、逆相条件としてシアノプロピル(CN)カラム及びオクチル(C8)カラムを用いて分析条件を検討した。HILICカラムは、逆-逆相クロマトグラフィーまたは水系順相クロマトグラフィーとしての挙動を示し、化合物の極性が強くなる順に溶出する。CNカラムは逆相でも順相でも使用できる固定相であり、シアノプロピル固定相は移動相中の有機溶媒濃度を変化させるだけで、逆相モード領域からヒリックモード領域に変化する稀な固定相である。C8カラムは逆相クロマトグラフィーとして用いられ、ODSカラムと比べて化合物の保持力が弱い。ゲニピン(G)とベンジルアミン(B)から生成した青色素の検出波長680 nmにおけるクロマトグラムをFig. G2に示した。検出波長680 nmにおいて、HILICカラムでは15.4分に、CNカラムでは24.1分に、C8カラムでは32.0分に大きなピークが1本ずつ観察された。このピークXは680-690 nmに極大吸収を持つものであり、ピーク強度も強いことから、ゲニピン(G)とベンジルアミン(B)から生成した青色素の主成分である可能性が高いと考えられた。

ピーク X を示した化合物の構造情報を得るために、ゲニピン(G)と ^{14}N -または ^{15}N -ベンジルアミン(^{14}B or ^{15}B)より生成した青色素をLC-MSに付し、観察されたMSスペクトルを比較した(Fig. G3)。 ^{14}N -または ^{15}N -ベンジルアミン(^{14}B or ^{15}B)を用いた反応物は、同じ条件で反応させると同一構造の化合物を与えるはずであるから、観察されるMSスペクトルの差は、分子中あるいはフラ