

補足資料

テルペノイド系ガムベースの含有成分確認のための試験法としての、GC/MS 分析法、LC/MS 分析法、UPLC/MS 分析法の特徴

1. GC/MS

(1) 概要

メタノール抽出物をそのまま、またはメチル化してもしくは TMS 化して、あるいはメチル化後に TMS 化してから分析する。メチル化はカルボキシル基に対して起こり、TMS 化はカルボキシル基にもそれ以外の水酸基に対しても起こる。確認試験にはメチル化した試料を用いるのが一番適していると考えられた。DB-1 キャピラリーカラムを用いて分離する。分析時間は約 23 分である。

(2) 長所

LC/MS と比較して装置が普及している。

メチル化などを施した誘導体を分析している限りは、LC/MS よりも分離が優れている。後述のロシンなどが良い例である。

LC/MS と比較するとフラグメンテーションが多く、構造情報は多く得られる。

メチル化した試料と TMS 化した試料を同条件で分析できるため、構造推定のために誘導体化条件を変えて分析するのが容易である。メチル化後に TMS 化したものをメチル化のみものと比較し、変化のないものはカルボキシル基のみを持っていると推測できる。マスチックに含まれる moronic acid などである。

(3) 短所

誘導体化する必要があるため、LC/MS よりも時間がかかる。

誘導体化反応が不十分だと誤った結論が導き出されるおそれがある。ダンマル樹脂の

dammarenolic acid はカルボキシル基と水酸基を一つずつ持つが、メチル化後に TMS 化したものに、メチル化と TMS 化を受けた誘導体の他に、カルボキシル基と水酸基の両方が TMS 化されたと思われるピークが見られた。

(4) 評価

LC/MS 装置が十分普及していない状況において早急に分析法を確立しなければならない場合には優れている。また、構成成分の標準品がない状況において特定の構成成分を定量する場合には優れている。

2. LC/MS

(1) 概要

メタノール抽出物をそのまま分析する。逆相系のカラムを用い、水-アセトニトリル混合溶媒を用いて分離し、APCI ネガティブモードおよび APCI ポジティブモードで分析する。カルボン酸はネガティブモードで、中性化合物はポジティブモードで検出される。分析時間は約 25 分である。

(2) 長所

分子量情報が得られるため、成分の構造や含量を正しく評価できる。GC/MS と異なり誘導体化する必要がない。マスチックやロシンなど、主成分がカルボン酸の品目は、GC では誘導体化しないと主成分の検出ができない。

(3) 短所

メタノール抽出物をそのまま LC/MS で分析した場合、GC/MS で誘導体を分析する場合と比較して分離が劣る。例えば、ロシンでは、GC/MS では abietic acid のメチルエステルをその異性体と互いに分離することができたが、LC/MS では abietic acid とその異性体がブロードな 1 本のピークになった。

装置が高価であり、十分普及しているとは

言えない。

誘導体化したものは別の条件で分析する必要があるため、手間と時間がかかり、誘導体化して分析するという方法がとりにくい。そのため、構造の推定が難しい。

(4) 評価

誘導体化の必要がなく、トータルの分析時間が短いため、確認試験としては GC/MS よりも優れている。また、誘導体化反応の効率を考慮する必要がないため、品質を評価する試験としても優れている。ただし、特定の構成成分を定量する必要がある場合には標準品が必要となる。

LC/MS よりも短時間で分析できるため、確認試験としても品質を評価する試験としても、この方法が最も優れている。ただし、特定の構成成分を定量する必要がある場合には標準品が必要となる。

3. UPLC/MS

(1) 概要

メタノール抽出物をそのまま分析する。逆相系のカラムを用い、2種類の条件で分析する。酢酸アンモニウム水溶液－アセトニトリル混合溶媒を用いて ESI ネガティブモードで分析する条件ではカルボン酸が検出され、水－アセトニトリル混合溶媒を用いて APCI ポジティブモードで分析する条件では中世化合物が分析される。分析時間は酢酸アンモニウム－アセトニトリル系では約 14 分、水－アセトニトリル系では約 25 分である。

(2) 長所

多くのクロマトピークが得られる酢酸アンモニウム－アセトニトリル系の分離では LC/MS よりも分析時間が短い。

LC/MS に比べて高い分離が得られた。特にニューコウで顕著であった。

(3) 短所

必要とされる装置が LC/MS よりもさらに高価である。

(4) 評価

7. 既存添加物の品質規格策定に関する研究

既存添加物の成分と品質評価に関する研究
平成 19 年度分担研究報告書

—既存添加物の規格化に関する調査研究—

協力研究者 高橋 仁一

日本食品添加物協会 常務理事

〔はじめに〕

当協会は、これまでも既存添加物の成分規格設定を目標に、行政並びに学識経験者のご指導のもと、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。

平成14年11月には、これまで蓄積してきた189品目の自主規格を収載した「第三版既存添加物自主規格」を刊行した。しかしながら、既存添加物418品目のうち、公定規格及び自主規格の策定済み品目は凡そ半数に留まっていたため、新規規格策定を継続し、平成15年度に19品目の自主規格の策定を行ってきた。

平成16年度には、第8版食品添加物公定書への収載候補品目を中心に、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部との間でその規格・試験法の妥当性を検討し、38品目について見直し改定を行った。平成17年度には、新たに9品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、1品目について見直し改定を行った。平成18年度には、新たに4品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、30品目について見直し改定を行った。

本年度は、新たに22品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、26品目について見直し改定を行った。なお、流通実態は確認できるものの、製造業者の特定が困難である場合や、当該製造業者の協力が得られない場合等が多いことから、「参考規格」の概念を導入することにより策定品目の拡大を図ることとした。

これらの作業は、これまでと同様に当協会技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。具体的には、既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。なお、必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、自主規格(案)を改定するとともに、その妥当性評価を行った。

研究結果の概要と考察

1. 研究方法

本研究は、当協会技術委員会の自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当が中心となって推進した。これまでと同様に既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、適切な安全性確保が図れるよう、自主規格(案)を策定し、その妥当性を評価した。

新規規格策定に当たっては、主成分の確認、定量法の開発検討等を中心に行い、規格・試験法の設定並びにその妥当性等に関して評価・検討を行った。

なお、これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

2. 研究結果の概要

2-1. 検討対象品目

本年度は以下の品目について、「新規規格設定のための調査研究と規格案の策定」及び「当協会第三版既存添加物自主規格として定められている規格・試験法及びこれまでに策定した自主規格案の内容についての見直し」を行った。なお、必要に応じ新たな試験方法の導入を検討し、それらの妥当性に関しても評価・検討した。

(1)平成19年度 新規規格作成検討(22品目)

本年度新規作成検討品目は次のとおりである。

用途名(検討品目数)	自主規格作成検討品目
着色料(2品目)	銀、シコン色素
増粘安定剤(1品目)	モモ樹脂
酵素(1品目)	フィシン
調味料(1品目)	塩水湖水低塩化ナトリウム液
製造用剤・ミネラル (17品目)	オゾン、クリスタル石、コバルト、タマリンドタンニン、銅、窒素、 ばい煎コメヌカ抽出物、ばい煎ダイズ抽出物、白金、パラジウム、 ひる石、ブタン、プロパン、ヘプタン、ヘリウム、ミモザタンニン、 ルテニウム

(2)既設定規格の見直し(26品目)

本年度は、「第三版 既存添加物 自主規格」(平成14年11月刊行)掲載品目及び自主規格案策定済品目全般について見直しを行った。見直しの結果、改定が必要とされた26品目について、その妥当性を評価・検討した。

本年度見直しを行った品目及び見直しの概要は次表のとおりである。

用途名(品目数)	検討項目	見直しの概要
着色料 (9品目)	タマリンド色素、カカオ色素、褐色フラボノイド系着色料(カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素、チコリ色素、ペカンナッツ色素)	・タマリンド色素の確認試験及び色価試験法の改良検討を行った。 ・カカオ色素の確認試験の改良及び重金属規格の変更について検討を行った。 ・前年度に引き続き褐色(フラボノイド)系着色料の識別のための試験法の調査を実施し、確認試験方法への利用について検討を行った。
保存料・日持向上剤(4品目)	カワラヨモギ抽出物、ペクチン分解物、ブドウ種子抽出物、モウソウチク抽出物	・カワラヨモギ抽出物は強熱残分、定量法及び英文名について検討を行った。 ・ペクチン分解物はペクチンとの規格対比検討を行った。 ・ブドウ種子抽出物は定量法について検討を行った。 ・モウソウチク抽出物は確認試験と定量法について検討を行った。
増粘安定剤 (1品目)	ファーセララン	・確認試験及び純度試験について見直しを行った。
酸化防止剤 (2品目)	ヘスペレチン、ユーカリ葉抽出物	・ヘスペレチンの確認試験、純度試験、乾燥減量、含量について妥当性検証を行った。 ・ユーカリ葉抽出物の性状、確認試験、純度試験、灰分、含量について妥当性検証を行った。
酵素(7品目)	セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	・セルラーゼ活性測定法に、第6法 CMC 振動粘度法を追加した。 ・ヘミセルラーゼ活性測定法に、第4法ガラクトマンナン糖化力測定法ーニトロ試薬法を追加・挿入した。

	α-アミラーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホリパーゼ	・成分規格と酵素活性測定法の妥当性検証(実測値データ補充)を行った。
酸味料(1品目)	フィチン酸	・液体品に規格見直し及びフィチン酸(粉末)の規格追加を行った。
調味料(2品目)	粗製海水塩化カリウム、塩水湖水低塩化ナトリウム液	・粗製海水塩化カリウムに臭化物の規格を追加した。 ・塩水湖水低塩化ナトリウム液の純度試験及び強熱残分について見直しを行った。

3. 研究結果の概要

3-1.新規規格作成検討

(1) 着色料(2品目)

本年度は、銀及びシコン色素について検討した。それぞれの品目の定義、含量、性状、確認試験、純度試験及び定量法について調査研究を行い、その結果に基づいて規格案を策定し、その妥当性について検討した。銀の規格案の策定に当たっては、医薬品添加物規格を参照した。

(2) 増粘安定剤(1品目)

本年度は、モモ樹脂について検討した。定義、含量、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分及び生物限度について調査研究を行い、その結果に基づいて規格案を策定し、その妥当性について検討した。

(3) 酵素(1品目)

酵素については、平成18年度までにほぼ終了していたが、フィシンについて流通実態が確認されなかったため、フィシンについて流通が確認されたため、酵素特性、性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法及び測定結果について調査研究を行い、この結果に基づき規格(案)を策定し、その妥当性について検証を行った。

(4) 調味料(1品目)

塩水湖水低塩化ナトリウム液については、自主規格作成のため、純度試験(5)ナトリウム、純度試験(6)カリウム、純度試験(8)比重、強熱残分等について調査研究を行ってきたが、この結果に基づき自主規格(案)を作成した。なお、作成した規格案については、再見直しを実施し改定を行った。

(5) 製造用剤・ミネラル(17品目)

製造用剤等に17品目につき、規格及び試験方法を策定した。なお、鉱石類、ガス類及び金属類等については、流通実態は確認できるものの、製造業者の特定が困難である場合や、当該製造業者の協力が得られない場合等が多いことから、「参考規格」の概念を導入することにより策定品目の拡大を図った。なお、「参考規格」の既存添加物自主規格における扱いは、次の通りであり、今後他の部会担当品目にも拡大適用していくこととした。

参考規格の扱い：参考規格とは、製造会社等が自社規格を設定し品質管理を行う際の参考に資するための規格であり、関連する公定規格等を基に作成した規格である。参考規格については、適否判定及び試験実施対象とするものではない。

また、「参考規格」の作成が不可能な品目については、定義及び性状のみの規格案を作成した。

ばい煎コメヌカ抽出物及びばい煎ダイズ抽出物については、今回は、含量の規格設定を断念した。

オゾン、クリストバル石、タマリンドタンニン、銅、窒素、ひる石及びミモザタンニンについては、参考規格を付した規格案を作成した。コバルト、白金、パラジウム、プタン、プロパン、ヘプタン、ヘリウム及びルテニウムについては、定義及び性状のみの規格案作成にとどまった。

3-2. 既策定規格の見直し

(1) 着色料(9品目)

タマリンド色素については、既存添加物自主規格第4版の協会パブリックコメントの意見に基づき、確認試験(1)及び(2)、(4)の判定を行う試料溶解性及びその溶解液並びに生成する沈殿の表現色調についての確認検討を行い、改定案を作成した。また、色価測定方法における測定溶媒についての確認検討を行い、改定案を作成した。

カカオ色素については、カカオ豆中に含まれる銅、鉄、亜鉛等の重金属が色素成分とともに除去されることなく、製品に移行することから、実態を調査し、改定案を作成した。また、既存添加物自主規格第4版の協会パブリックコメントの意見に基づき、確認試験(3)についての確認検討を行い、改定案を作成した。

褐色(フラボノイド)系着色料9品目については、昨年度に引き続き、識別のための試験法の調査を実施し、確認試験方法への応用の可否について検討を行った。コウリヤン色素において他の色素との差別化試験が確認できたことから、改定案を作成した。

(2) 保存料・日持ち向上剤(4品目)

本年度は、カワラヨモギ抽出物は強熱残分、定量法の HPLC 注入量、英文名について、ペクチン分解物はペクチンの規格に準じる方向で、ブドウ種子抽出物は定量法について、モウソウチク抽出物は確認試験と定量法について見直しを行った。

(3) 増粘安定剤(1品目)

ファーセラランは、フルセラリアの全藻から得られた多糖類を主成分とするものであるが、JECFA 規格及び EU 規格においては精製カラギナンの由来原藻の一つとしてフルセラリアが記載されており、ファーセラランは精製カラギナンとして流通している。このため、精製カラギナンの確認試験の適用が可能かを確認し、改定案を作成した。また、第8版食品添加物公定書における精製カラギナンの規格改定に伴う純度試験等についての確認検討を行い、改定案を作成した。

(4) 酵素(7品目)

セルラーゼ及びヘミセルラーゼについて、酵素活性測定法の追加を行った。セルラーゼ活性測定法については、第6法 CMC 振動粘度法を追加した。また、ヘミセルラーゼ活性測定法については、第4法ガラクトマンナン糖化力測定法—ニトロ試薬法を追加・挿入した。

成分規格と酵素活性測定法の妥当性検証を行った。 α -アミラーゼ(1製品)、グルカナーゼ(2製品)、セルラーゼ(1製品)、プロテアーゼ(1製品)、ペクチナーゼ(1製品)、ヘミセルラーゼ(3製品)及びホスホリパーゼ(1製品)について実測値データに基づく妥当性検証を行った。

(5) 酸化防止剤

ヘスペレチンについては、確認試験、純度試験、乾燥減量、含量・定量法について妥当性検証を行い、確認試験及び含量・定量法について改定案を作成した。

ユーカリ葉抽出物については、性状、確認試験、純度試験、灰分、含量について妥当性検証を行い、確認試験及び純度試験(3)ヒ素について改定案を作成した。

(6) 酸味料(1品目)

フィチン酸については、従来48.0～52.0%の液体品として流通していたが、デキストリン等を賦形剤として粉末化したものも流通している実態に鑑み、この品目の第9版食品添加物公定書への収載を目指すためにも第3版自主規格に収載されている液体品と規格未設定である粉末品の両規格を第4版自主規格に収載することが必要であると考え検討を行った。また、液体品についても純度試験項目の改良検討を行った。

(7) 調味料(2品目)

粗製海水塩化カリウムにおいて、臭化物の規格化を行うため、粗製海水塩化マグネシウムの試験方法を基に既存流通製品の成分について検討を行い、改定案を作成した。

塩水湖水低塩化ナトリウム液については、純度試験及び強熱残分について見直しを行い、改定案を作成した。

4. 自主規格・規格専門委員会メンバー

別紙のとおり。

5. 考察

本年度は22品目の新規自主規格策定検討及び26品目の既設定規格・規格案の見直しを行った。

規格検討内容の概要は既に述べてきた通りであるが、本年度も、規格案を作成した段階で当協会顧問の山田隆先生に規格案の全面的レビューと問題点の抽出をしていただき、必要に応じて修正するという一連の作業を繰り返し行った。これにより、本年度新規策定及び改定した規格内容は、よりの確なものになったと考えている。また、第4版既存添加物自主規格作成に伴う成分規格案について意見募集を行ったが、この中に本年度新規策定及び改定規格のかなりの品目が含まれている。

今後は、新規規格策定を継続するとともに、規格策定の可否についても早急に結論を出していく。

また、第4版既存添加物自主規格の作成作業を進めており、来年度前半までには完成の所存である。なお、第4版既存添加物自主規格には、既存添加物201品目(第3版既収載122品目、新規収載79品目)及び一般飲食物添加物19品目(第3版既収載19品目)の収載を予定している。

本年度自主規格策定あるいは見直し作業に関しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の山崎壮先生をはじめとする諸先生方並びに当協会顧問である山田隆先生には多大なるご指導をいただいた。この場をお借りし心より感謝申しあげる次第である。

以上

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	高橋 仁一	日本食品添加物協会
自主規格・規格専門委員長	大倉 裕二	キリンフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	相田 忠	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	浅井 以和夫	三栄源I7・I7・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	浅田 敏	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	伊藤 秀行	理研ビタミン株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	岩間 保憲	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田 実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	長田 裕次	三菱商事フードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野 茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	皆藤 光雅	三菱化学フーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	柏木 哲	上野製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	唐澤 昌彦	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	香田 隆敏	三栄源I7・I7・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	坂井 昭浩	オルガノ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	滝口 俊男	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	田中正剛	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	所 一彦	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾 正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	宮野 信雄	株式会社タイショーテクノス
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上 和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村椿 康隆	第一工業製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	大和谷 和彦	大日本住友製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本 隆志	小川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	吉武 繁廣	エーザイフード・ケミカル株式会社
技術顧問	山田 隆	日本食品添加物協会

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Sugimoto N, Koike R, Furusho N, Tanno M, Yomota C, Sato K, Yamazaki T, Tanamoto K.	Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates	Food Additives and Contaminants	24	799-806	2007
Maruyama T, Sugimoto N, Kuroyanagi M, Kim IK, Kamakura H, Kawasaki T, Fujita M, Shimada H, Yamamoto Y, Tada A, Goda Y.	Authentication and chemical study of Isodonis Herba and Isodonis extracts	Chemical and Pharmaceutical Bulletin	55	1626-1630	2007
Uekusa Y, Sugimoto N, Yun YS, Sato K, Kunugi A, Yamazaki T, Tanamoto K.	Neocrocine A: a novel crocetin glycoside with a unique system for binding sugars isolated from gardenia yellow	Chemical and Pharmaceutical Bulletin	55	1643-1646	2007
杉本直樹、多田敦子、山崎壮、棚元憲一	天然保存料カラヨモギ抽出物の有効成分の確認	食品衛生学雑誌	48	106-111	2007
杉本直樹、多田敦子、山崎壮、棚元憲一	グレープフルーツ種子抽出物および配合製品中の合成殺菌剤の調査	食品衛生学雑誌	49	56-62	2008
多田敦子、増田愛乃、杉本直樹、山形一雄、山崎壮、棚元憲一	既存添加物エステル系ガムベースの成分分析	食品衛生学雑誌	48	179-185	2007
島村智子、松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、松藤寛、松井利郎、松本清、受田浩之	酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験	日本食品科学工学会誌	54	482-487	2007
El-Dine R. S., El-Halawany A. M., Nakamura N., Ma C., Hattori M.	New lanostane triterpene lactones from the Vietnamese mushroom <i>Ganoderma colossum</i> (Fr.) C. F. Baker	Chemical and Pharmaceutical Bulletin	56	642-646	2008

El-Dine R. S., El-Halawany A. M., Ma C., Hattori M.	Anti-HIV protease active triterpenes from the Vietnamese mushroom <i>Ganoderma colossum</i>	Journal of Natural products		in press	2008
---	--	-----------------------------------	--	----------	------

研究成果の刊行物・別刷

Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group content of polysorbates

NAOKI SUGIMOTO¹, RYO KOIKE², NORIKO FURUSHO¹, MAKOTO TANNO²,
CHIKAKO YOMOTA¹, KYOKO SATO¹, TAKESHI YAMAZAKI¹, &
KENICHI TANAMOTO¹

¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan and ²Kao Corporation, Analytical Research Center, 1334, Minato, Wakayama-shi, Wakayama 640-8580, Japan

(Received 30 November 2006; revised 5 February 2007; accepted 13 February 2007)

Abstract

Guidelines for the oxyethylene group (EO) content of polysorbates are set by the Food and Agriculture Organization/World Health Organization Joint Expert Committee on Food Additives. However, the classical titration method for EO determination is difficult and time-consuming. Here, we show that quantitative ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy can determine the EO contents of polysorbates rapidly and simply. The EO signals were identified through comparisons with sorbitan monolaurate and poly(ethylene glycol) distearate. Potassium hydrogen phthalate was used as an internal standard. The EO contents were estimated from the ratio of the signal intensities of EO to the internal standard. Two nuclear magnetic resonance systems were used to validate the proposed method. The EO content of commercial polysorbates 20, 60, 65, and 80 was determined to be within the recommended limits using this technique. Our approach thus represents an additional or alternative method of determining the EO contents of polysorbates.

Keywords: Analytical method, food additive, oxyethylene, polysorbate, quantitative nuclear magnetic resonance

Introduction

Polysorbates are non-ionic surfactants that are widely used as emulsifiers, dispersants, and stabilizers in food processing. Polysorbates consist of a mixture of fatty-acid partial esters of sorbitol and condensed sorbitol anhydrides, and contain approximately 20 moles of ethylene oxide (comprising the oxyethylene unit [EO] –OC₂H₄–) for each mole of sorbitol, along with its monohydrides and dianhydrides. The main fatty acids of polysorbates 20, 60, 65, and 80 are monolauric acid, monostearic acid, tristearic acid, and monooleic acid, respectively. The typical structures of these polysorbates are shown in Figure 1.

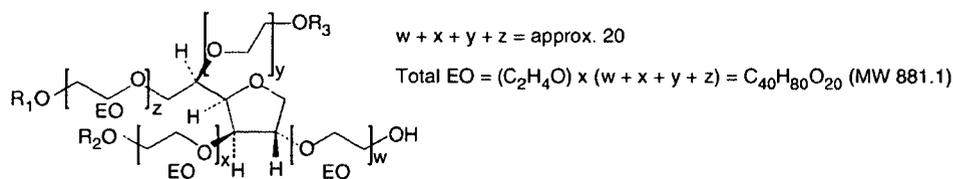
Guidelines for the EO contents of polysorbates are set by the Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO) Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA). To comply with the JECFA standards, the quality

and composition of commercially synthesized polysorbates must be monitored and regulated. The standard method of measuring EO as described in “section VI. Methods for fats and related substances in the guide to specification” is as follows: “The oxyethylene groups are converted to ethylene and ethyl iodide which can be determined by titration. By utilizing a conversion factor determined on a reference sample, it is possible to compute the polyoxyethylene ester content” (JECFA [internet]). However, this classical titration method requires a complicated apparatus and involves several time-consuming steps. Alternative methods for determining the EO contents of polysorbates have not previously been reported, because these complex compounds are mixtures of isomers that are non-selectively substituted with EOs and fatty acids.

The quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) approach is based upon the International

Correspondence: Naoki Sugimoto. E-mail: nsugimot@nihs.go.jp

ISSN 0265–203X print/ISSN 1464–5122 online © 2007 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/02652030701278347



Compound		Formula (MW)	EO(%) in molecule
Polysorbate 20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)	$R_1 = \text{H}_3\text{C} \left[\text{CH}_2 \right]_5 \text{C}(=\text{O})$ $R_2 = R_3 = \text{H}$	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ (MW1227.5)	EO(%) = 71.8
Polysorbate 60 (polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate)	$R_1 = \text{H}_3\text{C} \left[\text{CH}_2 \right]_{18} \text{C}(=\text{O})$ $R_2 = R_3 = \text{H}$	$\text{C}_{64}\text{H}_{126}\text{O}_{26}$ (MW1311.7)	EO(%) = 67.2
Polysorbate 65 (polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate)	$R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}_3\text{C} \left[\text{CH}_2 \right]_{18} \text{C}(=\text{O})$	$\text{C}_{100}\text{H}_{194}\text{O}_{28}$ (MW1844.6)	EO(%) = 47.8
Polysorbate 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	$R_1 = \text{H}_3\text{C} \left[\text{CH}_2 \right]_6 \text{CH}=\text{CH} \left[\text{CH}_2 \right]_{16} \text{C}(=\text{O})$ $R_2 = R_3 = \text{H}$	$\text{C}_{63}\text{H}_{122}\text{O}_{26}$ (MW1295.6)	EO(%) = 68.0

Figure 1. Typical structures of polysorbates 20, 60, 65, and 80. The formulae and EO (%) were estimated based on the assumption that there were 20 moles of EO per molecule.

system of units (SI units). This valuable technique meets the requirements of a primary ratio analytical method (Jancke 1998). The use of qNMR to determine the ethanol content of deuterium oxide solution was previously reported as a part of an intercomparison study organized by the Comité Consultatif pour la Quantité de Matière (CCQM). The results showed that the accuracy of qNMR was equivalent to that of gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID) (Saito et al. 2003). qNMR exploits the fact that the signal intensities of a given NMR resonance are directly proportional to the molar amount of the nucleus within the sample. qNMR can determine the quantity of a compound, its substituent contents, or its absolute quality if the whole sample weight is known. This technique has several advantages for the analysis of organic compounds: it is non-destructive, it provides both quantitative data and structural information about a compound, and high-throughput spectral-acquisition instruments are commercially available. The main drawback of the qNMR approach is that manual spectral assignment is required; however, this can easily be rectified by applying current NMR technical experiments such as total correlated spectroscopy (TOCSY), heteronuclear multiple quantum correlation (HMQC), heteronuclear multiple bond coherence (HMBC), etc.

Based on these features of qNMR, we predicted that the method could be used to determine the EO

contents of polysorbates. In the current paper, we detail the application of qNMR along with an internal standard for the direct determination of the EO contents of polysorbates.

Materials and methods

Materials

Samples of reagent-grade polysorbates 20, 60, 65, 80, and sorbitan monolaurate (Span 20) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd (Osaka, Japan). Poly(ethylene glycol) distearate was purchased from Sigma-Aldrich Japan KK (Tokyo). Commercial samples of polysorbates were obtained from companies A–E via the Japan Food Additives Association. The NMR solvents, methanol- d_4 and acetone- d_6 with 0.03% tetramethylsilane (TMS), were purchased from Isotec Inc. (Miami, OH). Potassium hydrogen phthalate (PHP), which was standard grade for volumetric analysis according to Japanese Industrial Standard (JIS) K8005, was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Instrumentation

NMR spectra were recorded on JNM-ECA (500 MHz; JEOL, Tokyo) and MERCURY (400 MHz; VARIAN, Palo Alto, CA) pulsed Fourier-transform (FT) spectrometers, equipped with 5 mm $^1\text{H}\{\text{X}\}$ inverse detection gradient

Table I. Instruments and acquisition parameters.

	MERCURY400 (VARIAN) and ECA500 (JEOL)
Spectrometer	
Probe	5 mm indirect detection probe
Spectral width	2.5–12.5 ppm
Data points	64 000
Flip angle	45°
Pulse delay	30 s ($>5 * T_1$)
Scan times	8
Sample spin	15 Hz
Probe temperature	25°C
Solvent	Mixture of methanol-d ₄ and acetone-d ₆ (1:1)
Internal standard	Potassium hydrogen phthalate (PHP)
Range of integral signal	Oxyethylene group (EO) = 3.40–3.85 ppm 4 protons of PHP = 7.46–7.66 ppm + 8.18–8.38 ppm

probes, with methanol-d₄:acetone-d₆ (1:1) and 0.3% (w/v) PHP as an NMR solvent. The spectra were referenced internally to TMS by ¹H-NMR. The samples and internal standard were weighed on a LIBROR AEG-80SM (Shimadzu, Kyoto, Japan) electronic balance to an accuracy of ±0.01 mg.

Preparation of samples and NMR measurement conditions

The polysorbate samples were prepared as follows. PHP was crushed into a powder in a mortar and dried for 1 h at 120°C. After cooling in a desiccator, the powder (300 mg) was dissolved in 100 ml of methanol-d₄:acetone-d₆ (1:1) with ultrasonic agitation for 30 min. This stock solution was used as the NMR solvent and included an internal standard. A 50-mg polysorbate sample was then dissolved in 3 ml of the NMR solvent described above, and 0.6 ml of the sample solution was placed into a 5-mm NMR tube (Kusano Science Co. Ltd, Tokyo). The ¹H-NMR spectra were recorded on MERCURY400 and ECA500 spectrometers operating at 400 and 500 MHz, respectively. Typical ¹H-NMR parameters for the quantitative analyses are listed in Table I. The free induction decay (FID) signals of the samples from the MERCURY400 and ECA500 spectrometers were loaded onto a Windows XP-based personal computer (PC) equipped with the Alice 2 Version 5 (JEOL) NMR data-processing and analytical software. Fourier transformations of the FID signals were carried out with this software using the default parameters; window function = exponential, BF = 0.12 Hz, zero filling = 1, T1 = T2 = 0%, T3 = 90%, T4 = 100%. After phase adjustments and baseline corrections of the NMR spectra were performed using the same algorithms in the automatic mode of Alice 2, the signal intensities

of the EOs and internal standard protons were measured, respectively.

Results and discussion

Identification of EO signals in polysorbates

Polysorbate molecules contain approximately 20 moles of EO according to the JECFA definition. However, recently reported matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) spectra showed that polysorbates include numerous other chemical species, including polyethylenes, unesterified, monoesterified, and diesterified polyoxyethylene sorbitans, and isosorbides (Frison-Norrie and Sporns 2001). Furthermore, analysis by liquid chromatography (LC)-mass spectrometry (MS) confirmed that polysorbates contain not only polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters but also numerous intermediates, such as polyoxyethylene sorbitan and isosorbitan, and the monoesters and diesters of fatty acids (Vu Dang et al. 2006). These studies have confirmed that polysorbates comprise many types of chemical isomers. This molecular diversity makes it difficult to determine the EO contents of polysorbates. However, we hypothesized that the EO contents of polysorbates could be measured rapidly and simply by qNMR if the signals could be identified on ¹H-NMR spectra, regardless of whether they contained numerous chemical isomers.

Thus, in order to identify the EO signals in polysorbates, we compared the ¹H-NMR spectra of polysorbate 20, sorbitan monolaurate, and poly(ethylene glycol) distearate. The partial structures of sorbitan monolaurate and poly(ethylene glycol) distearate, which comprised a sorbitol anhydride core and poly(ethylene glycol), were similar to those of polysorbate 20 (Figures 2 and 3). The sorbitan monolaurate and poly(ethylene glycol) distearate spectra revealed fatty-acid moiety signals with δ_{H} values ranging from 0.9 to 2.4 ppm, similar to those of polysorbate 20. The triplet signal at δ_{H} c. 0.9 ppm, the major broad signal and multiplet signal at δ_{H} c. 1.3 ppm and 1.6 ppm, and the triplet signal at δ_{H} c. 2.4 ppm were identified as the terminal CH₃-, -CH₂-, and -CH₂C=O- groups of the fatty acids, respectively. Most of the EO signals in poly(ethylene glycol) distearate were observed between δ_{H} values of 3.40 and 3.85 ppm. One of the -CH₂O- groups appeared to have been shifted downfield to δ_{H} c. 4.2 ppm, near to the residual proton of methanol-d₄ at δ_{H} c. 4.4 ppm. A HMBc experiment revealed that the proton at δ_{H} c. 4.2 ppm was correlated to the carbonyl carbon of the fatty acid at δ_{C} 173.4 ppm. Thus, the proton signal was assigned

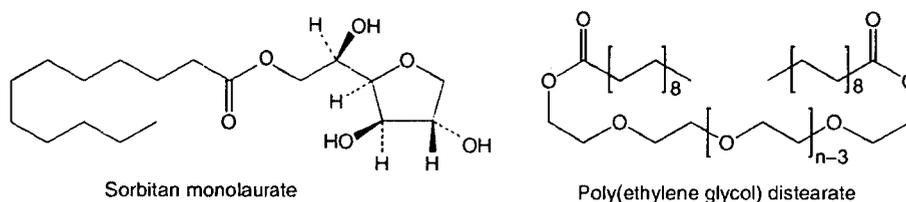


Figure 2. Structures of sorbitan monolaurate and poly(ethylene glycol) distearate.

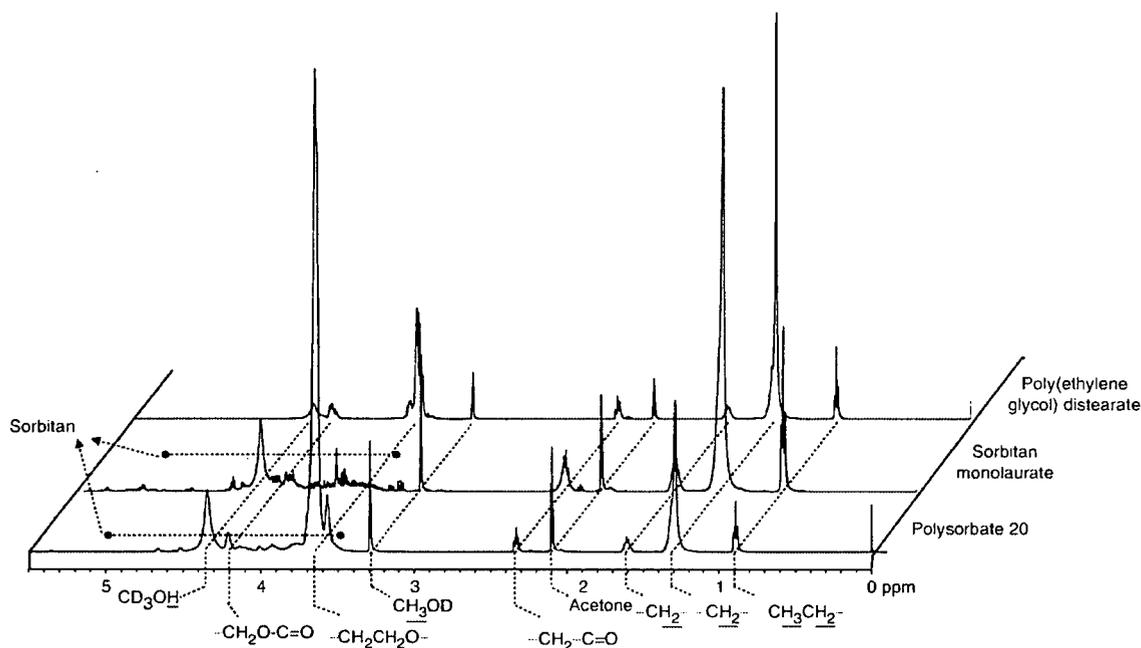


Figure 3. Comparison of NMR spectra of polysorbate 20, sorbitan monolaurate and poly(ethylene glycol) distearate. ¹H-NMR spectra were obtained using the ECA500 system (500 MHz; JEOL) under the conditions shown in Table I.

to the $-\text{CH}_2\text{O}-$ group adjacent to the fatty acid side chain. In the sorbitan monolaurate spectrum, various minor proton signals were observed from δ_{H} values of *c.* 3.4–5.0 ppm; these were attributed to the sorbitan moiety in sorbitan monolaurate, which consists of a mixture of cyclic sorbitol-derived ethers (such as sorbitan, isosorbite, and other isomers). These signals were also observed on the spectrum of polysorbate 20. However, the signals were broad and negligibly smaller than that of sorbitan monolaurate, as polysorbate 20 has the diversity of molecule more than sorbitan monolaurate. The polysorbate 20 signals ranging from δ_{H} 0.9 to 2.4 ppm that were attributed to the fatty-acid moiety were similar to those of sorbitan monostearate and poly(ethylene glycol) distearate. Polysorbate 60, 65, and 80 also showed the signals of fatty acid as same as sorbitan monolaurate, but

the olefinic protons were only observed at δ_{H} 5.3 ppm on the spectrum of polysorbate 80 consisting of an unsaturated fatty acid (data not shown). The EO signals were assigned to a large envelop between δ_{H} 3.40 and 3.85 ppm, and at δ_{H} 4.20 ppm, which overlapped with the negligible small broad signals seen for the mixture of sorbitan, isosorbite, and other isomers moieties between δ_{H} values of *c.* 3.4 and 5.0 ppm. The EO signals of polysorbates 60, 65, and 80 also appeared within these ranges (data not shown). This was due to the fact that polysorbates basically comprise the same units: sorbitol anhydrides core, EO chains, and fatty acids. Although proton signals of the $-\text{CH}_2\text{O}-$ group adjacent to the fatty acid at δ_{H} *c.* 4.20 ppm were observed, and the signals of the sorbitol anhydrides core were overlapped on EO signals, they were negligible and did not effect the

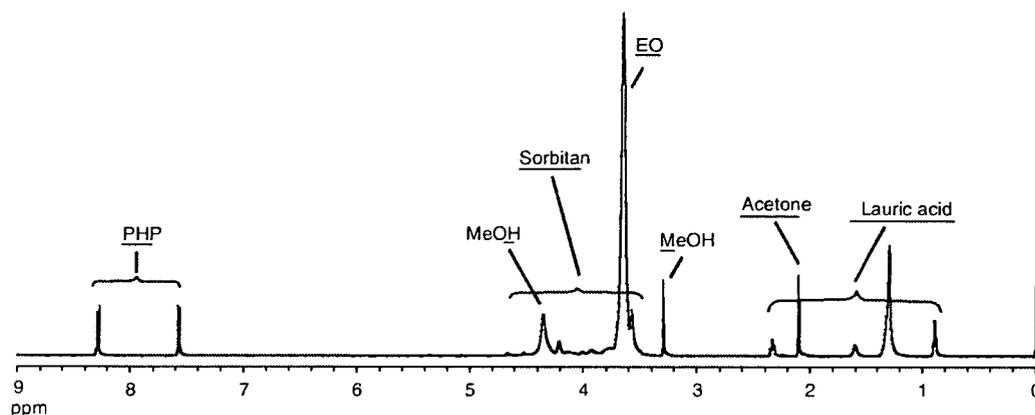


Figure 4. ^1H -NMR spectrum of polysorbate 20. The spectrum was obtained using the ECA500 system (500 MHz; JEOL). PHP was added as an internal standard. Signals of the four protons on the benzene ring of PHP were observed at δ_{H} values of 7.46–7.66 ppm and 8.18–8.38 ppm. Most of the EO signals of polysorbate 20 were observed in a large envelope between δ_{H} 3.40 and 3.85 ppm.

determination of the EO contents. Thus, in the current research, we used the EO signals between δ_{H} 3.40 and 3.85 ppm to determine the EO contents of polysorbates by NMR.

Determination of EO contents in polysorbates 20, 60, 65, and 80

Several reports have described the applications of qNMR to determine specific types of chemical compound, such as natural products, impurities, and polymers (Stefanova et al. 1988; Paula 2001; Jake et al. 2002; Wells et al. 2002; Paula et al. 2005). Recently, a practical set of parameters for qNMR has been discussed (Saito et al. 2004). Furthermore, qNMR using an internal standard has been suggested as a new way of determining the contents of surfactants with a relatively high throughput (Koike et al. 2004a, 2004b, 2005). To minimize quantitative errors, we used the qNMR conditions described by Koike and colleagues, as listed in Table I. In particular, the flip angle was set to 45° , and the spectral width was set at a value sufficient for the peak of interest to fall within 80% of its centre, because the signal intensities decreased towards both edges of the spectral window. The number of data points was set at 64 000 to enhance the resolution. The pulse delay was set at up to 30 s, as high-precision NMR can only be achieved when the pulse delay time is greater than the quintuple spin-lattice relaxation time ($>5 * T_1$). As qNMR is based on the fact that the signal intensities of a given resonance are directly proportional to the molar quantity of the nucleus within the sample, the EO signal intensity of polysorbates and four protons on the benzene ring of PHP were used to determine the EO contents. The total time taken to obtain one FID using these parameters was <10 min.

The weight percentage of the EO groups was calculated according to Equation 1.

$$\text{EO(w/w\%)} = \frac{(I_{\text{EO}}/H_{\text{EO}} \times M_{\text{EO}}/W_{\text{sample}})}{(I_{\text{standard}}/H_{\text{standard}} \times M_{\text{standard}}/W_{\text{standard}})} \times 100. \quad (1)$$

Here, I_{EO} is the signal intensity of the EO group; H_{EO} is the number of protons of the EO group (four); M_{EO} is the partial molecular weight of the EO group (44); W_{sample} is the weight (mg) of the sample in 3 ml of NMR solvent including PHP as an internal standard; I_{standard} is the total signal intensity of PHP; H_{standard} is the number of protons on the benzene ring of PHP (four); M_{standard} is the molecular weight of PHP (204); and W_{standard} is the weight (mg) of PHP in 3 ml of NMR solvent.

We initially confirmed that the qNMR showed linearity between the intensity of the EO signal and the amount of polysorbate 20. Various amounts of the reagent-grade polysorbate 20 sample were analysed by ^1H -NMR under the conditions described in the Materials and methods and Table I. The NMR spectrum of polysorbate 20 with the internal standard is shown in Figure 4. The four protons of the PHP benzene ring were observed as two double-doublet signals at δ_{H} values of 7.46–7.66 ppm and 8.18–8.38 ppm, respectively. The ratio of the EO signal intensity was calculated as follows: intensity of EO/total intensities of four protons on PHP benzene ring. The relationship between EO/PHP and the amount of polysorbate 20 was linear ($R^2 = 0.9996$) in the range of 12.5–100 mg of polysorbate 20 in 3 ml of NMR solvent. Based on these results, we concluded

Table II. Determination of EO contents in polysorbates by qNMR.^a

Sample name	MERCURY (400 MHz, VARIAN)			ECA500 (500 MHz, JEOL)		
	Entry	EO (%)	SD	Entry	EO (%)	SD
Polysorbate 20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)	1	73.0		1	72.2	
	2	71.8		2	71.8	
	3	73.2		3	72.3	
	4	71.7		4	72.5	
	5	71.9		5	71.6	
				6	72.9	
				7	72.0	
				8	72.7	
				9	73.7	
Polysorbate 60 (polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate)	AV	72.3	0.7	AV	72.4	0.6
	1	67.7		1	67.4	
	2	65.3		2	67.7	
	3	68.9		3	67.5	
	4	67.8		4	67.9	
	5	66.9		5	68.6	
Polysorbate 65 (polyoxyethylene(20) sorbitan tristearate)	AV	67.3	1.3	AV	67.8	0.5
	1	49.1		1	49.8	
	2	49.8				
	3	49.5				
	4	49.8				
	5	48.7				
Polysorbate 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	AV	49.4	0.5			
	1	65.0		1	67.0	
	2	65.5				
	3	66.2				
	4	64.8				
	5	65.1				
	AV	65.3	0.6			

^aReagent-grade polysorbates were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. "Entry" means that the same sample was measured repeatedly on different days.

that qNMR could quantitatively determine the EO contents of polysorbates.

In order to verify whether qNMR could accurately determine the EO contents of polysorbates, two different NMR instruments (MERCURY and ECA500, with magnetic field strengths of 400 and 500 MHz, respectively) were used to repeatedly measure the EO contents of reagent grade polysorbates 20, 60, 65, and 80, which are generally used as standards. The results are shown in Table II. Reproducible results were obtained from each sample using the MERCURY system. Furthermore, the results obtained by the two NMR instruments did not differ significantly (standard deviations = 0.5–1.3%). These findings confirmed that it was possible to determine the EO contents of polysorbates using this approach regardless of the NMR instrument employed.

Finally, to confirm the validity of qNMR, we determined the EO contents of the commercially synthesized polysorbates 20, 60, 65, and 80, which

met the specifications of the JECFA. All of the EO contents of the polysorbates were within the limits described in the *Compendium of Food Additive and Flavoring Agent Specifications* (JECFA [internet]) (Table III). The qNMR method for determining the EO contents of polysorbates demonstrated in this paper thus represents a simple and rapid alternative to the classic titration method recommended by the JECFA, which does not require specific chemical reactions or sophisticated apparatus. Moreover, the qNMR method made it possible to distinguish between Polysorbates 60 and 80, which have the same stipulated value, by comparison with the ¹H-NMR spectra, as polysorbate 80 consisting of an unsaturated fatty acid only showed the signals of olefinic protons at δ_{H} 5.3 ppm. It is theoretically possible to determine the ratio of a substituted group in any molecule, or the quality of any compound, using the proposed qNMR method with an internal standard, provided that the target proton signals can be separated from those

Table III. EO contents in commercial polysorbates determined using qNMR.^a

Name	Stipulated value	Brand	EO (%)	SD
Polysorbate 20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)	70.0–74.0%	A	71.2	
		B	73.0	
		C	70.3	
		D	71.0	
		E	71.5	
Polysorbate 60 (polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate)	65.0–69.5%	AV	71.4	1.0
		A	66.9	
		B	65.4	
		C	68.0	
		D	68.1	
Polysorbate 65 (polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate)	46.0–50.0%	E	67.2	1.1
		AV	67.1	
		A	48.3	
		B	46.0	
		C	—	
Polysorbate 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	65.0–69.5%	D	47.2	1.1
		E	48.1	
		AV	47.4	
		A	67.4	
		B	65.1	
		C	69.3	
		D	66.7	
		E	68.0	
		AV	67.1	
			1.6	

^aBrands A–E were purchased from five manufacturers. Brand C does not supply polysorbate 65.

of non-target groups and impurities. We are currently investigating the potential for this technique to determine various other compounds and polymers.

Conclusions

This research demonstrated that the EO contents of commercial polysorbates 20, 60, 65, and 80 could be readily determined using qNMR with an internal standard. Clear NMR data for the polysorbates were obtained from simple sample preparations. Two different NMR instruments validated the proposed method, and no significant differences were observed among the results. Moreover, the data obtained for commercial polysorbates 20, 60, 65, and 80 were in good agreement with the JECFA guidelines.

It is generally difficult to determine the amounts of substituted groups within polymers owing to their great diversity in molecular weights and structures. Classical methods require time-consuming preparation to set up the apparatus, and technically skilled operators. Furthermore, as there are no alternative methods to validate the results, they have to be accepted without verification. Our proposed qNMR

is a rapid and simple analysis that provides the structural information of target compounds together. These advantages will reduce dramatically the time and manpower cost required, even if the NMR spectrometer and the solvents are expensive. qNMR is thus a valuable additional and/or alternative method, with a broad range of applications in quantitative analysis.

Acknowledgements

This work was supported by a Research on Food Safety in Health and Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

References

- Frison-Norrie S, Sporns P. 2001. Investigating the molecular heterogeneity of polysorbate emulsifiers by MALDI-TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:3335–3340.
- Jake B, Sticher O, Veit M, Fröhlich R, Paili GF. 2002. Evaluation of glucoiberin reference material from *Iberis amara* by spectroscopic fingerprinting. *Journal of Natural Products* 65:517–522.
- Jancke H. 1998. NMR spectroscopy as a primary analytical method. *Comité Consultatif pour la Quantité de Matière Report* 98: 1–12.