

Fig 1 GC-FID chromatogram of residual solvent in guar gum. (A) guar gum + water, HS oven temperature: 40 °C, equilibration time: 40 min, (B) guar gum + water + enzyme, HS oven temperature: 40 °C, equilibration time: 40 min (C) guar gum + water + enzyme, HS oven temperature: 60 °C, equilibration time: 40 min, (D) guar gum + water, after keeping overnight at room temperature. HS oven temperature: 60 °C, equilibration time: 40 min.

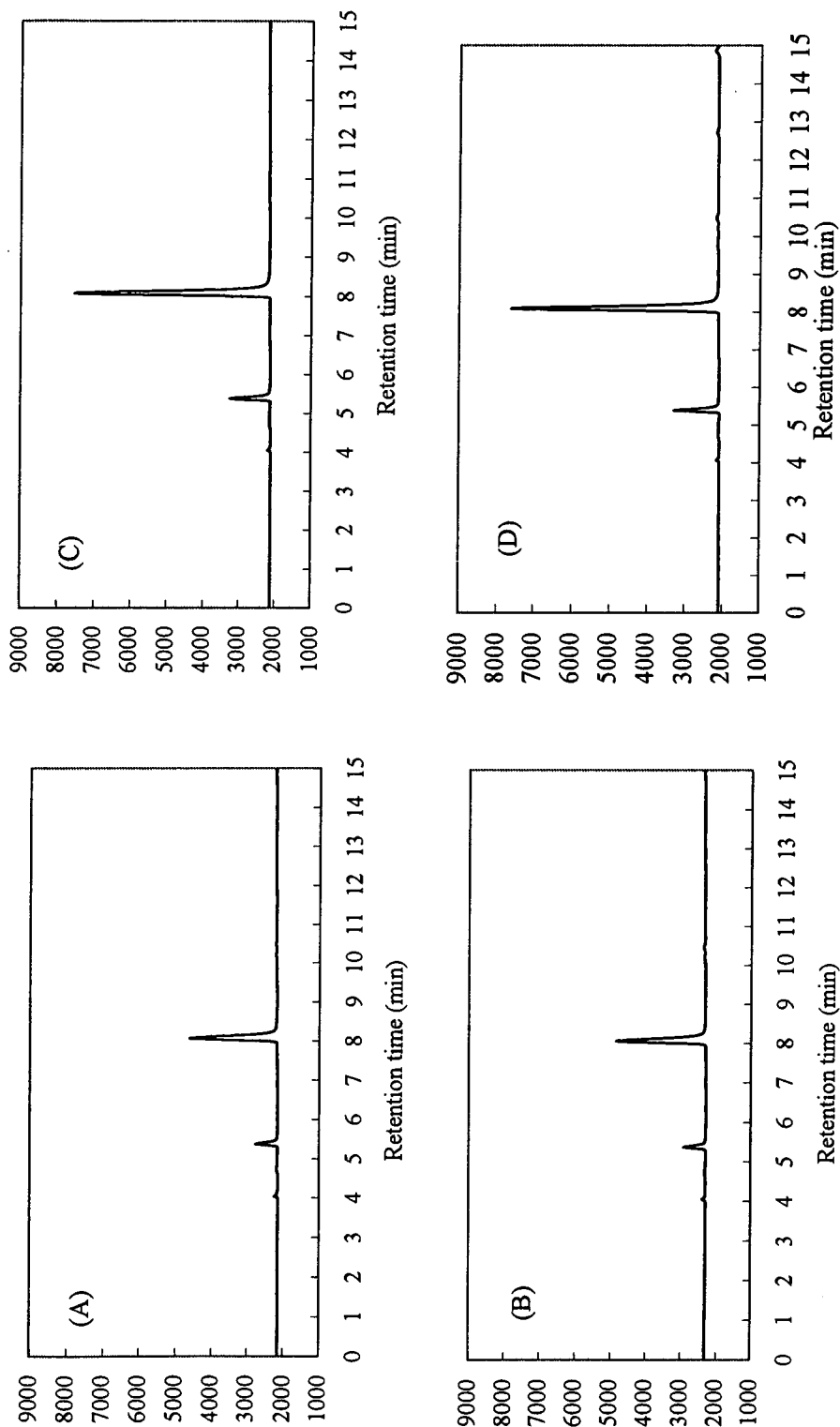


Fig 2 GC-FID chromatogram of residual solvent in carob bean gum. (A) carob bean gum + water, HS oven temperature: 40°C, equilibration time: 40 min, (B) carob bean gum + water + enzyme, HS oven temperature: 40°C, equilibration time: 40 min (C) carob bean gum + water + enzyme, HS oven temperature: 60°C, equilibration time: 40 min, (D) carob bean gum + water, after keeping overnight at room temperature. HS oven temperature: 60°C, equilibration time: 40 min.

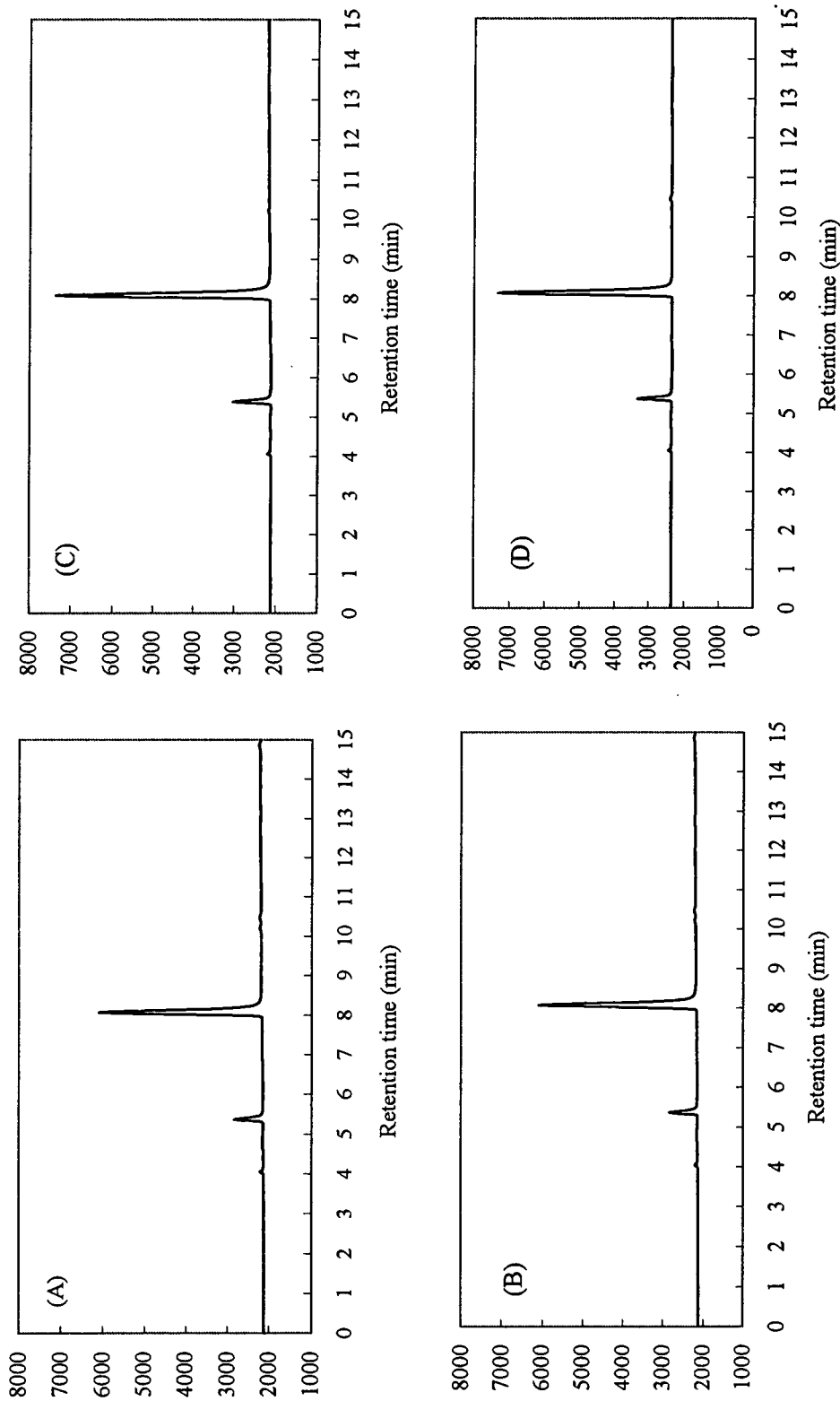


Fig.3 GC-FID chromatogram of residual solvent in gellan gum. (A)gellan gum + water, HS oven temperature: 40°C, equilibration time: 40 min, (B) gellan gum + water + enzyme, HS oven temperature: 40°C, equilibration time: 40 min (C) gellan gum + water + enzyme, HS oven temperature: 60°C, equilibration time: 40 min, (D) gellan gum + water, after keeping overnight at room temperature. HS oven temperature: 60°C, equilibration time: 40 min.

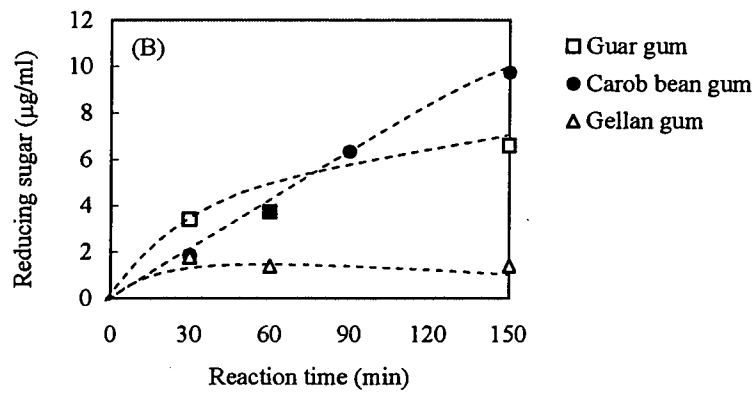
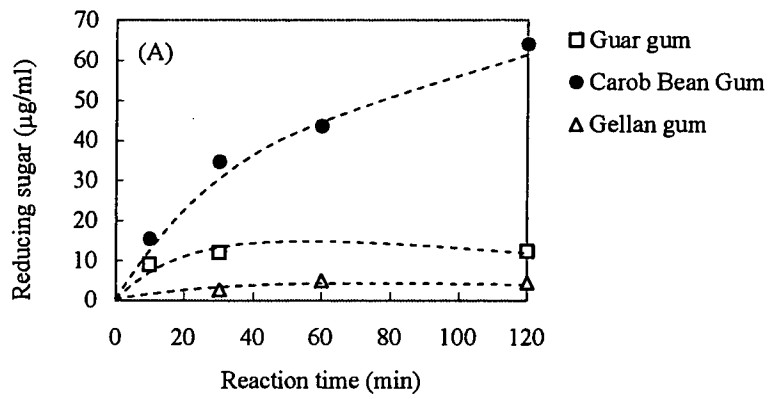


Fig.4 Time-course of guar gum, carob bean gum and gellan gum degradation by hemicellulase (A) or cellulase (B).

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 19 年度分担研究報告書

食品添加物の規格、分析法の国際整合性に関する研究

-<sup>1</sup>H 核磁気共鳴法による香料ピラジン類中の絶対定量-

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 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

今後、我が国において香料ピラジン類が新規指定される際には、その定量法として「食品、添加物等の規格基準 第 2 添加物」に記載される「B. 一般試験法, 15. 香料試験法, 9. 香料のガスクロマトグラフィー」が適用されることとなると思われる。しかし、本法は各標準品を用いた絶対検量線法ではないため、求められた定量値が真値を表しているとは言い難い。そこで、香料ピラジン類の新規定量法として、<sup>1</sup>H 核磁気共鳴法(<sup>1</sup>H-NMR)を利用した qNMR 法を検討した。その結果、qNMR 法では、標準品が入手できない場合においても、NMR シグナルが十分分離したものであれば、どのような化合物でも絶対定量が可能であることが確認された。

A. 研究目的

ピラジン類は、ロースト様の香気を持つ化合物である。諸外国において香料としての使用が認められており、JECFA には、異性体の混合物である品目を含めて 65 種の品目が記載されている。我が国では、その使用は認められていなかったが、最近、国際調和の観点から国際的に汎用される食品添加物の指定に向けた審議が開始されており、ピラジン類もこれに該当し、食品安全委員会で食品健康影響評価が順次進められているところである。

ピラジン類各品目の定量法として、JECFA ではガスクロマトグラフィー(GC)法を採用している。我が国におけるピラジン類の定量法は、JECFA に準じ、「食品、添加物等の規格基準 第 2 添加物(平成 19 年 3 月改正, 昭和 34 年厚生省告示第 370 号)」に記載される「B. 一般試験法, 15. 香料試験法, 9. 香料のガスクロマトグラフィー」が適用されることとなると思われる。これに記載される GC 法では、被検物に不揮発性成分等の不純物が

含有されていないことを前提としている。また、あらゆる不純物のレスポンスファクターが一定であると仮定し、クロマトグラム上に観察されるすべての成分のピーク面積の総和に対する被検成分のピーク面積百分率を求め、含量とするとしている。すなわち、本 GC 法により香料を定量する場合、以下の大きな欠点があると言える。1. 被検物にクロマトグラム上にピークとして観察されない不揮発性成分や水が含まれていた場合、被検成分の含量を真値より高く見積もる。2. 未知の不純物のピークが顕著に観察された場合、被検成分の正確な含量を求められない。3. 被検物が構造異性体の混合物である品目の場合、各異性体に由来するピークの同定には各異性体の標準品との比較が不可欠である。これらの欠点は、クロマトグラフィーによる定量分析が純度既知の標準品を用いた相対定量法であることに起因する方法論としての限界である。したがって、「食品、添加物等の規格基準 第 2 添加物」に記載される「B. 一般試験法, 15. 香料試験法, 9. 香料のガスクロマトグラフィー」法に従い定量値を

求めたとしても、その得られた測定値が真値とかけ離れてしまうことも起こり得ることを念頭に置かなくてはならない。

一方、核磁気共鳴法による定量分析法 (quantitative NMR (qNMR))には、次の利点がある。

1. 被検成分と同物質の濃度標準を必要としない。シグナル強度の比は異なる物質のモル比に対応することから、一方の物質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被検成分の含量(あるいは濃度)が求められる。2. シグナルが重ならない限り、複数の被検成分を同時に定量できる。3. 不安定な被検成分を迅速に測定できる。等である。したがって、qNMR法では分析対象とする化合物の構造式さえ明らかであればどのような化合物でもそれと同物質の濃度標準を必要せずに定量可能であり、GC法とは全く原理の異なる定量法である。

昨年度は、定量分析が非常に困難であるポリソルベート類中のオキシエチレン基が qNMR法により簡便且つ迅速に定量可能であることを示した。今年度は、qNMR法を更に応用して、香料ピラジン類の定量法とされる GC法に代わる方法と成り得るかどうか検討したので報告する。

## B. 研究方法

### 1) 試料

試料として用いたピラジン類(14品目 14製品: P1~P14)は、日本香料工業会を通じて入手したものを用いた。食品添加物用途品として入手できなかったものは市販試薬を代用品とした(Table 1)。高純度フタル酸水素カリウム (容量分析用標準物質 (JIS K8005): 純度 99.95~100.05%)(PHP)、エーテル(Et<sub>2</sub>O)および 99.5%エタノール(EtOH)は和光純薬工業(株)製を用いた。NMR測定用重溶媒として重水(D<sub>2</sub>O)(Isotec 製)を用いた。

### 2) 装置

ガスクロマトグラフ/水素炎イオン化型検出装置(GC/FID): Agilent 製 6890N。

ガスクロマトグラフ/質量分析装置 (GC/MS):

Agilent 製 5973MSD。

核磁気共鳴装置 (NMR): 日本電子 (株) 製 JNM-ECA (500 MHz)。

### 3) 実験方法

#### 3-1) GC法による含量測定

「香料のガスクロマトグラフィー」に記載の方法に準じた。すなわち、各試料を GC用バイアル瓶に取り、下記の条件の GC/FIDに付し、測定時間内に観察された成分のピーク面積の総和を 100とし、それに対する被検成分のピーク面積百分率を求め、含量とした。ただし、試料が固体の場合には、Et<sub>2</sub>Oに溶解して 1000 ppmに調製したものを GC/FIDに付し、溶媒由来のピークを除いたピーク面積の総和を 100とした。

GC/FID条件: カラム, InertWax (0.25 mm φ × 30 m, thickness 0.25 μm); カラム温度, 50°C (5 min) → 5°C /min. → 230°C; 注入口および検出器温度, 150°C および 250°C; ガス流量, 1.0 mL/min; キャリアーガス, 窒素; スプリット比, 100 : 1; 注入量, 1.0 μL。なお、試料が構造異性体の混合物であり、各異性体由来するピークの分離が不十分でピーク面積比を求められない場合には、スプリット比を 240:1、ガス流量を 0.8 mL/min に調整し再度測定した。また別に、マスフラグメントスペクトルによる構造異性体の同定には、同 GC条件の GC/MS に試料を付し、キャリアーガスとしてヘリウムを用い、イオン化電圧 70 eV として MS 検出範囲 *m/z* 25 - 300 を走査した。

#### 3-2) qNMR法による含量測定

qNMR用内標準液の調製: PHP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後、約 300 mg を精密に量り、D<sub>2</sub>Oに溶解し正確に 100 mLとした。

試料溶液の調製: 各試料約 50-100 mg を精密に量り、内標準液を 3.0 mL ホールピペットにて添加し、これを試料溶液とした。試料溶液 0.6 mL を NMR試験管に移し、Table 2の条件で <sup>1</sup>H-NMR測定した。得られた各試料の FID は、NMRデータ

処理ソフトウェア (Delta Ver. 4.3.6 (日本電子(株)製)) 上でフーリエ変換 (Window function = exponential, BF = 0.2 Hz, Zero filling = 1, T1 = T2 = 0%, T3 = 80%, T4 = 100%) 後, 自動位相補正した。

ピラジン類の純度(%): <sup>1</sup>H-NMR スペクトル上に観察された内標準 PHP および試料のプロトンシグナル積分値と試料量から式 A により含量(%)を算出した。

式 A

$$\text{content}(\%) = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}} \times M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}} \times M_{\text{std}} / W_{\text{std}}}$$

I = シグナル積分値, H = プロトン数, M = 分子量, W = 重量, sample = 試料, std = 内標準 (PHP).

### 3-3) GC 法と qNMR 法の測定値の比較

2-ethyl-6 (or 5)-methylpyrazine (2E6MP と 2E5MP の約 7:3 の混合物) 製品に EtOH を加え, 2-ethyl-6 (or 5)-methylpyrazine : EtOH = 80 : 20 (w/w) に調製したものを試料とした。GC 法および qNMR 法により, この試料中の各異性体および EtOH の含量を求め比較した。

## C. 結果および考察

### 1) GC 法と qNMR 法による測定値の精度比較

NMR は, 分子構造に関するスペクトル情報が多く得られることから化合物の分子構造解析および同定に広く用いられている。

<sup>1</sup>H-NMR において, プロトンシグナル強度の比は分子中の置換基のプロトン数に対応する。さらに 2 つのシグナルが異なる分子に由来する場合には個々のシグナル積分値と化合物の濃度の関係は式 B により表される。

式 B

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{n_1 m_1}{n_2 m_2} = \frac{n_1 W_1 / M_1}{n_2 W_2 / M_2}$$

n = プロトン数, m = モル濃度, W = 重量, M = 分子量

次に, 観察されるすべてのシグナル積分値の定

量性が確保された <sup>1</sup>H-NMR スペクトルでは, 2 つの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含量(あるいは純度, 濃度)が測定される量の標準を参照せずに決定できるため, 式 A が成り立つ。

実際の qNMR 法によるピラジン類の定量では, 濃度既知の一次標準物質 PHP を含む D<sub>2</sub>O 溶媒に試料を一定量溶解し, ピラジン環と PHP のベンゼン環上のプロトンシグナル積分値, 秤量値等を式 A に代入することで含量を算出した。また, GC 法による含量測定は, 「食品, 添加物等の規格基準 第 2 添加物(平成 19 年 3 月改正, 昭和 34 年厚生省告示第 370 号)」に記載される「B. 一般試験法, 15. 香料試験法, 9. 香料のガスクロマトグラフィー」に記載に従い, qNMR 法による結果と比較した。

qNMR 法が, 香料ピラジン類の定量法として応用可能かどうか検証するため, 2-ethyl-6 (or 5)-methylpyrazine (P1: 2-ethyl-6-methylpyrazine と 2-ethyl-5-methylpyrazine の約 7:3 の混合物), また, この製品に不純物が混入した場合を想定し, これに EtOH を加え, 2-ethyl-6 (or 5)-methylpyrazine : EtOH = 80 : 20 (w/w) に調整したものを試料とし, qNMR 法および GC 法で含量測定し, 結果を比較した。(Table 3). Fig. 1 に EtOH を添加した 2-ethyl-6 (or 5)-methylpyrazine 製品 (Table 3, entry 2) の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示したが, 内標準の PHP のベンゼン環上の 4 つのプロトンが 7.56 ppm および 7.73 ppm に, 2-ethyl-6-methylpyrazine および 2-ethyl-5-methylpyrazine のピラジン環上の 2 つのプロトンに由来するシグナルがそれぞれ 8.26 ppm 付近および 8.32 ppm 付近に, また, EtOH の -CH<sub>2</sub>O- に由来するシグナルが 3.68 ppm に観察された。なお, EtOH 無添加では EtOH のシグナルは全く観察されない。これらの観察されたシグナル積分値, 分子量等を式 A に代入し, それぞれの含量を求めた。また, Fig. 2 に EtOH を添加した 2-ethyl-6 (or 5)-methylpyrazine 製品 (P1) (Table 3, entry 2) の GC 法による結果を示したが, 保持時間 4.6 分に EtOH

に由来するピークが、16.8分および16.9分に2-ethyl-6(or 5)-methylpyrazineの各異性体由来するピークAおよびBが観察された。ピークAおよびBについては、その含量比からピークAが2-ethyl-6-methylpyrazine、ピークBが2-ethyl-5-methylpyrazineに由来するものと考えられたが、両者のフラグメントマススペクトルは酷似しており、判別できるものではなかった。

EtOH無添加の2-ethyl-6(or 5)-methylpyrazine製品の異性体比および総含量は、GC法およびqNMR法でほぼ一致した(Table 3, entry 1)。次に、EtOHを添加したものは、qNMR法ではEtOH含量を19.29%と求めることができたが、GC法では14.83%と実際の添加量より低い値を示した(Table 1, entry 2)。この結果より、GC法では、分析対象とする各化合物のレスポンスファクターの差が定量値に大きな誤差を与えることが確認された。

## 2) qNMRによるピラジン類の含量測定

同様にGC法およびqNMR法によりピラジン類製品(P1-P14)について定量を行った結果をTable 4に示した。qNMR法による定量値は、GC法に比べ、概ね1%ほど小さい結果となった。

GC法は、分離分析という点では優れているが、求められた定量値は、あらゆる不純物のレスポンスファクターが一定であると仮定し、クロマトグラム上に観察されるすべての成分のピーク面積の総和に対する被検成分のピーク面積百分率であり、常に真値に近い値を示す方法とは言い難い。さらに、GC法では標準品がない場合、異性体混合物の各異性体の同定は不可能であった。

一方、qNMR法で求められた定量値は、観察されたプロトンのシグナル積分値より絶対定量された値であり、方法論的にも真値に非常に近い値が求められていると考えられた。さらに得られた<sup>1</sup>H-NMRスペクトルデータは構造解析にも利用可

能であり、各種2D-NMR測定を行うことにより、異性体の同定にも応用できる点で優れていると考えられた。

## D. まとめ

今回、香料ピラジン類の定量法として、GC法以外にqNMR法が有効な手段の一つに成り得ることが確認された。qNMR法では、分析対象とする化合物の標準品が入手できない場合や不純物の混入がある場合においても、NMRシグナルが十分分離したものであれば、どのような化合物でも絶対量の測定が可能であるということとNMRスペクトルデータより化学構造が同定可能であることがGC法より優れている。qNMR法は他の食品添加物の定量にも応用可能であり、今後更に他の品目について検討する予定である。

## 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 spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add. Contam.* 24(8), 799-806 (2007).

### 2) 学会発表

Sugimoto, N., Furusho, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Application of quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy to determination of the contents of Food Additives. 121st AOAC international (2007.9).

古庄 紀子, 杉本 直樹, 佐藤 恭子, 山崎 壮, 棚元 憲一. <sup>1</sup>H核磁気共鳴法による香料ピラジン類の定量. 全国衛生化学技術協議会年会(2007.11).



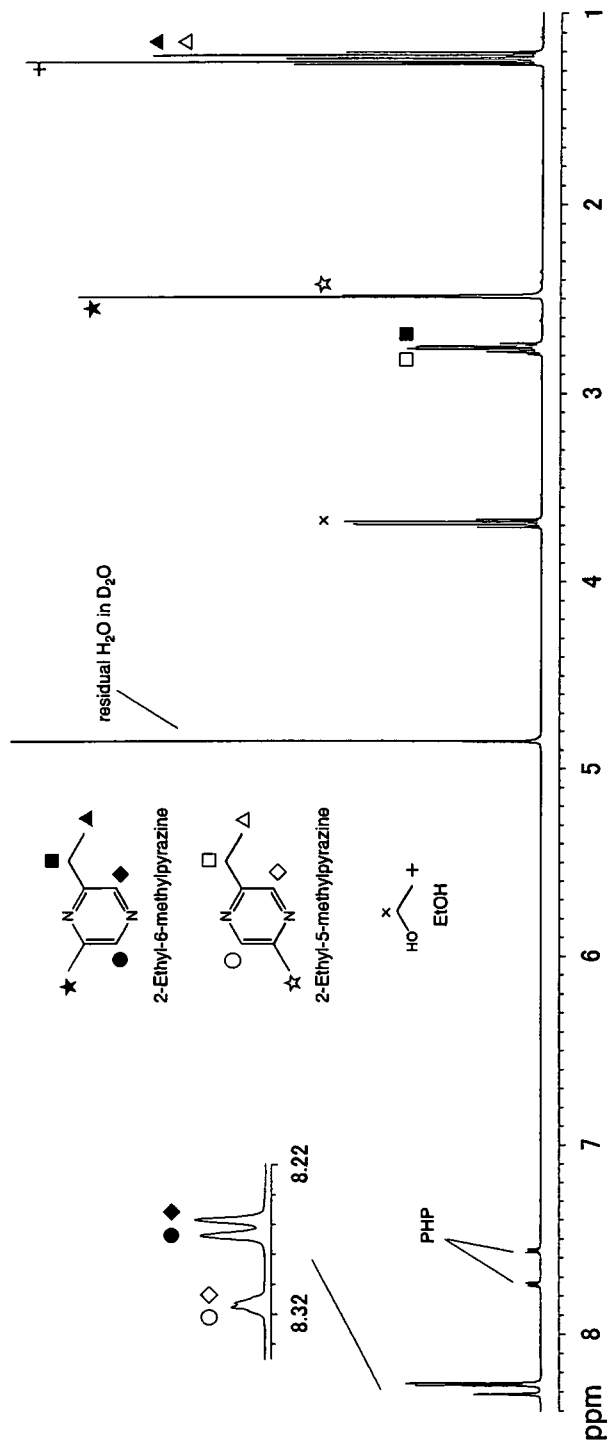


Fig. 1. Typical quantitative <sup>1</sup>H-NMR spectrum (D<sub>2</sub>O) of commercial 2-ethyl-6-methylpyrazine added EtOH. The assignments of signals were carried out using 2D-NMR such as COSY, HMQC and HMBC, and shown as symbols.

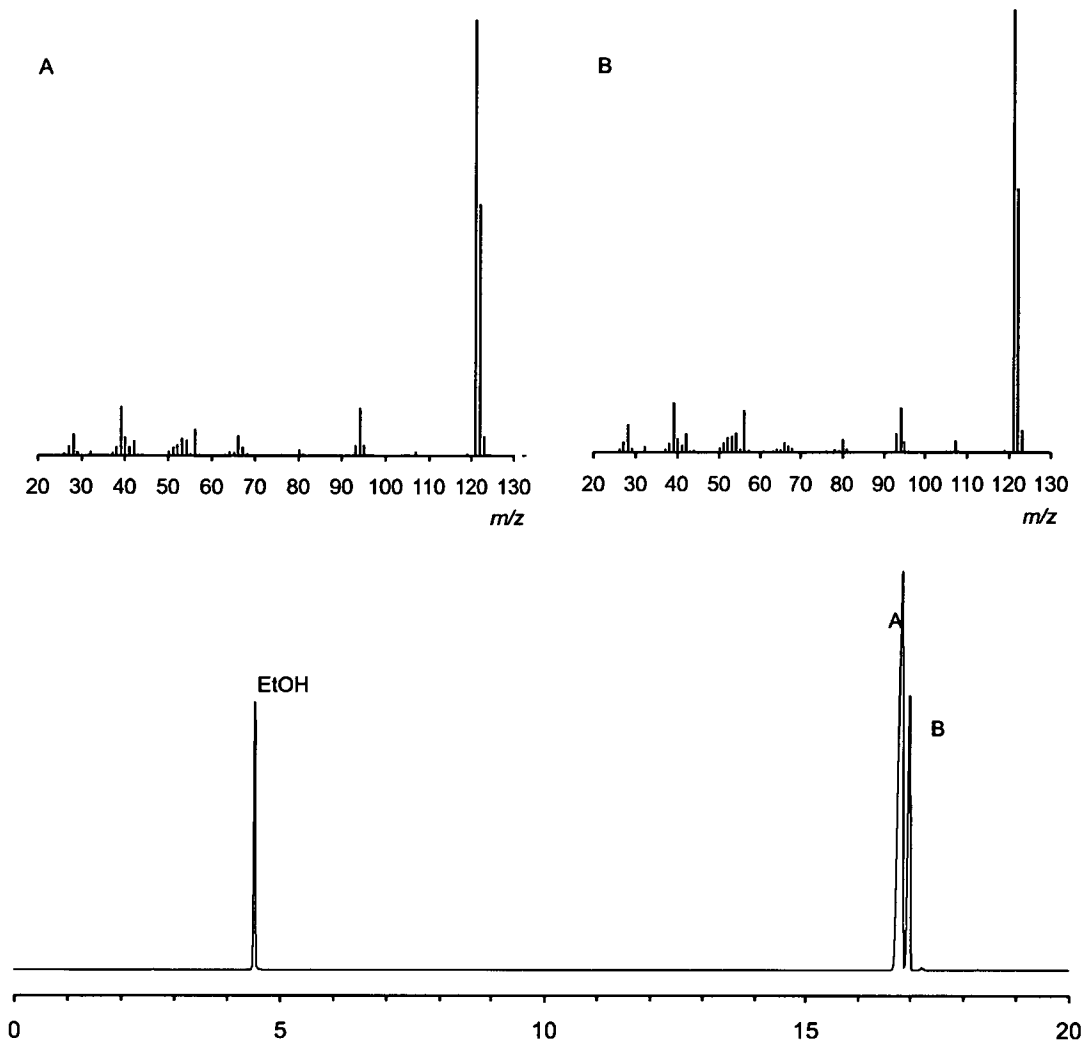


Fig. 2 Typical GC-FID profile of mixture of 2-ethyl-6-methylpyrazine and EtOH, together with the mass spectra of peak A and B. The mass spectra of peak A and B were recorded on GC-MS.

Table 1 Samples of pyrazine derivatives

Sample No.	Compound	Molecular weight	Manufacturer Specialties	Catalog No.	Grade <sup>a)</sup>	Food Additive	Remarks and specifications <sup>b)</sup>
P1	2-Ethyl-6-methylpyrazine	122.2	Pyrazine Specialties	726M	Food Additive		Liquid. Mixture of 2-ethyl-6-methylpyrazine and 2-ethyl-5-methylpyrazine
P2	2-Ethyl-5-methylpyrazine	122.2	Aldrich	W315400	Reagent		Liquid. Mixture of 2-ethyl-5-methylpyrazine and 2-ethyl-6-methylpyrazine, ≥98%, Kosher
P3	2-Ethyl-3-methylpyrazine	122.2	Acros Organics	25252	Reagent		Liquid. >98.5% (GC)
P4	Pyrazine (crystalline)	80.1	Sigma	P2145	Reagent		Crystals. Approx. 99%
P5	2-Methylpyrazine	94.1	Aldrich	W330906	Reagent		Liquid. ≥99%, FCC, Kosher, FG
P6	2-Ethylpyrazine	108.1	Aldrich	W328103	Reagent		Liquid. ≥98%, Kosher, FCC
P7	2,3-Dimethylpyrazine	108.1	Aldrich	W327107	Reagent		Liquid. ≥95%, FCC, Kosher, FG
P8	2,5-Dimethylpyrazine	108.1	Aldrich	W327204	Reagent		Liquid. ≥98%, FCC, Kosher, FG
P9	2,6-Dimethylpyrazine	108.1	Aldrich	W327301	Reagent		Crystals. ≥98%, FCC, Kosher, FG
P10	2,3-Diethylpyrazine	136.2	Aldrich	W313602	Reagent		Liquid. ≥98%, Kosher
P11	2-Ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine	136.2	Givaudan	4945003	Food Additive		Liquid. Mixture of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine and 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine, 99% (combine isomers)
P12	2,3,5-Trimethylpyrazine	122.2	Aldrich	W324418	Reagent		Liquid. 2,3,5-trimethylpyrazine, ≥99%, FCC, Kosher, FG
P13	5,6,7,8-Tetrahydroquinoxaline	134.2	Aldrich	W332100	Reagent		Liquid. ≥97%, Kosher, FG
P14	6,7-Dihydro-5-methyl-5H-cyclopentapyrazine	134.2	Aldrich	W330604	Reagent		Liquid. ≥97%, Kosher, FG

a) Food Additive grade pyrazine derivatives were obtained through Japan Flavor and Fragrance Materials Association (JFFMA).

b) Remarks and specifications are reprinted from the specification sheets or label.

Table 2. Instrument and acquisition parameters

Spectrometer	JNM-ECA (500 MHz)
Probe	5 mm indirect detection probe
Probe temperature	25°C
Spectral width	- 2.5 - 12.5 ppm
Data points	64000
Flip angle	45°
Pulse delay	30 s ( $>5 \cdot T_1$ )
Scan times	8
Sample spin	15 Hz
Internal standard	Potassium hydrogen phthalate (PHP)

Table 3 Quantitative capability of qNMR and GC-FID

entry	Sample	Content (%) (n = 3)		
		qNMR	GC-FID	
1	2-Ethyl-6-methylpyrazine (sample No. P1)	2-Ethyl-5-methylpyrazine	28.7	29.4
		2-Ethyl-6-methylpyrazine	69.8	70.3
		Sum of isomers	98.5 (sd = 0.85)	99.7 (sd = 0.01)
2	2-Ethyl-6-methylpyrazine (sample No. P1) + EtOH (80:20 (weight))	2-Ethyl-5-methylpyrazine	23.1	25.1
		2-Ethyl-6-methylpyrazine	55.7	59.8
		Sum of isomers	78.8	84.9
		EtOH	19.2	14.8
		Total	98.0 (sd = 0.21)	99.8 (sd = 0.01)

Table 4 Results of quantitative analysis by qNMR and GC-FID

No.	Compound	Content (%)		Ratio of isomers	
		qNMR	GC-FID	Main / Minor	qNMR GC-FID
P1	2-Ethyl-6-methylpyrazine	98.5 <sup>a)</sup>	99.7 <sup>a)</sup>	2-Ethyl-6-methylpyrazine / 2-Ethyl-5-methylpyrazine	69.8 / 28.7 70.3 / 29.4
P2	2-Ethyl-5-methylpyrazine	98.8 <sup>a)</sup>	99.3 <sup>a)</sup>	2-Ethyl-6-methylpyrazine / 2-Ethyl-5-methylpyrazine	57.6 / 41.3 57.7 / 41.5
P3	2-Ethyl-3-methylpyrazine	98.9	99.9		
P4	Pyrazine	99.0	b)		
P5	2-Methylpyrazine	98.7	100.0		
P6	2-Ethylpyrazine	98.9	99.7		
P7	2,3-Dimethylpyrazine	99.4	99.6		
P8	2,5-Dimethylpyrazine	97.2	99.9		
P9	2,6-Dimethylpyrazine	99.1	99.8		
P10	2,3-Diethylpyrazine	98.8	98.7		
P11	2-Ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine	98.4 <sup>a)</sup>	98.7 <sup>a)</sup>	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine / 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine	53.0 / 45.4 54.4 / 44.3
P12	2,3,5-Trimethylpyrazine	99.8	99.9		
P13	5,6,7,8-Tetrahydroquinoxaline	98.4	99.1		
P14	6,7-Dihydro-5-methyl-5H-cyclopentapyrazine	98.1	98.7		

a) Sum of isomers. b) Not measured.

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、基準の向上に関する調査研究  
分担研究報告書

食品添加物の規格向上のための赤外スペクトルに関する調査研究

分担研究者 齋藤 寛 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

簡便で確実な確認試験法である赤外スペクトル法（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試験に汎用され，しかも，その簡便さ（省エネ）に注目されている．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，トリメチルアミンやポリソルベート類などの IR の測定法などを検討し，国内規格の向上を試みた．その結果，確認試験に活用でき得るこれらの IR 測定法を確立できた．

A. 研究目的

赤外スペクトル（赤外線吸収スペクトル，以下 IR と略する）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，4000-600あるいは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・検討した．加えて，外国での参照 IR の測定法なども調査・検討し，国内規格を得るための測定法の改良・改善についても検討を行うことにした．とくに，我が国においては，IR の測定法としては，多くの固体試料測定法が知られているにもかかわらず，臭化カリウム錠剤法（KBr 法）が適用されることが多い．一方，15<sup>th</sup> Ed. Food Chemical Codex（以下 FCC と略する）や Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives（以下 JECFA と略する）を調査した結果，しばしばペースト法（ヌジョール法，Nujol 法）が用いられていることが分かった．なお，従前より指摘されて

いるように、KBr 法では、試料と KBr との相互作用や KBr に含まれる水分の影響などによって、有機化合物でも、しばしば異常スペクトルが観測されることが知られている。なお、ここでは、通常固体状態の IR は、その固体について結晶形などを含め固有の情報として扱われているため、「本来の試料のスペクトルとは異なるスペクトル」を「異常スペクトル」という表現で使用している。本研究では、調査の結果、FCC や JECFA の参照 IR スペクトルに疑問のある添加物を取り上げ、国内規格を向上させるために、これらの IR スペクトルを検討することにした。

## B. 研究方法

メーカーなどからトリメチルアミンやポリソルベート類を入手し、試料として用いた。さらに、測定法などの妥当性と問題点の有無などを検討するため、各製品についてペースト法（ヌジョール、Nujol 法）あるいは KBr 錠剤法で IR を測定し、FCC や JECFA 記載の参照 IR スペクトルなどと比較検討した。トリメチルアミンに関しては、常温で気体であり、毒性をもつため、ガスセル（光路長 5 cm）に封入して測定した。

また、本研究では、ペースト法については、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  $4\text{ cm}^{-1}$ （32 回繰り返し）を用い、KBr 法については、原則として現行第 7 版の記載どおりの測定条件で錠剤（直径 10 mm）を作成し、測定

時の対照には KBr のみの錠剤を使用した。なお、使用した分光器（FT-IR 装置）は、JASCO FT/IR-4100（日本分光社製）である。

（倫理面への配慮）

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

## C. 研究結果

### 1. トリメチルアミン

#### 1-1. トリメチルアミンの既存の IR スペクトル調査

トリメチルアミンの IR スペクトルを、15<sup>th</sup> Ed. Food Chemical Codex（以下 FCC と略する）や Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives（以下 JECFA と略する）および National Institute of Standards and Technology, USA (NIST) の WebBook から検索したところ、NIST にのみ参考となる IR スペクトルが掲載されていた（図 1）。しかし、その IR スペクトルを詳しく解析すると、 $3000\text{ cm}^{-1}$ ～ $2700\text{ cm}^{-1}$  付近のピークの透過度が 0 以下になるなど、標準スペクトルとしては不適切と考えられる箇所がある。さらに、The Sigma Library of FT-IR Spectra、独立行政法人産業技術総合研究所・有機化合物のスペクトルデータベース SDDBS を調査したところ、トリメチルアミン塩酸塩の IR スペクトルが掲載されていることが分かった。したがって、現時点では、参考となるトリメチルアミンの IR スペクトルは、公表されていないと判断し、本研究で、世界標



準となり得るトリメチルアミンの IR スペクトルを検討することにした。

以上の状況を鑑み、本研究では、標準となる得る IR スペクトルを選定するため、測定法などがトリメチルアミンの IR スペクトルに及ぼす影響を検討し、測定条件などを定めることにした。なお、試料トリメチルアミンとしては、Trimethylamine, 25 wt.% solution in water (ALDRICH 社) と Trimethylamine, anhydrous, 99% (ALDRICH 社) を用いた。

#### 1-2. トリメチルアミン塩酸塩の IR 測定

まず、トリメチルアミンを、比較的取り扱いが容易な塩酸塩にして測定することを試みた。トリメチルアミン水溶液に塩酸を加え、蒸発乾固してトリメチルアミン塩酸塩を作成し、120℃で3時間乾燥した後に KBr 法による測定を試みた。しかし、トリメチルアミン塩酸塩の場合、吸湿性が激しく、KBr 法では測定するのが極めて困難であった。さらに、同様に乾燥したトリメチルアミン塩酸塩でペースト法による測定を行ったが、試料調製の際に吸湿が生じるため、本来の IR スペクトルは得られなかった(図2)。従って、日本の湿度では、ペースト法でも、安定してトリメチルアミン塩酸塩の IR スペクトルを得ることは不可能と考え、トリメチルアミンを塩酸塩として IR スペクトルを測定するのは不適切であると判断した。

#### 1-3. トリメチルアミン(気体)の IR 測定

前述の通り、トリメチルアミンを塩酸塩とし、ペースト法での測定を試みたが、吸湿が激しく、本来の IR スペクトルは得られなかった。そこで、トリメチルアミンに関しては、気体状態で測定することにした。トリメチルアミンは常温で気体であり、毒性をもつため、ガスセルに封入して測定を試みた。ガスセルは研究方法に記載の通り、光路長 5 cm のものを用いた。その結果、図3に示す通り、水分による妨害のないスペクトルを得ることができた。すなわち、図3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。

#### 2. ピペリジンとピロリジン

ピペリジンとピロリジンは非常に吸湿性の高い化合物である。日本のような高温多湿の環境下で、このような化合物の IR スペクトルを測定した場合、水による妨害を受けることが頻繁に起こる。そこで本研究では、標準となる得る IR スペクトルを選定するため、水の妨害を受けない測定法を確立することにした。なお、試料ピペリジンとピロリジンとしては、Piperidine (ALDRICH 社) と Pyrrolidine (ALDRICH 社) を用いた。

ピペリジン、ピロリジンはいずれも常温で液体であるため、通常どおりの液膜法による測定を行った。その結果、図4と図5に示すように、水によるピークが観測され、

JECFA, NIST および The Sigma Library of FT-IR Spectra などの国外で測定されたスペクトルとは異なるスペクトルが得られた。また、日本国内で測定されたと思われる SDBS のスペクトルとも一致しなかった。そこで、水分混入の経路を調べることにした。まず、試料をモレキュラーシーブ 3A で乾燥させ、通常の測定を行ったが、図 4 と図 5 と同様に、水によるピークが観測された。次に、試料調製から測定までを非常に短時間で行ったところ、図 6 と図 7 に示すように、水のピークのない正常なスペクトルを得ることができ、既存のスペクトルとも一致した。従って、図 6 と図 7 のスペクトルをそれぞれピペリジン、ピロリジンの標準スペクトルとすべきである。また、この結果は、試料調製時に水分が混入することを示唆しており、試料調製から測定までを短時間で行う必要があることを示している。

とくに、今後、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、測定に時間かかると、異なる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。すなわち、標準スペクトルを設定するにあたっては、既存のスペクトルが存在する場合でも、自ら検討し、測定条件や注意事項を明らかにし、再現性の良い測定法を確立すべきであるといえる。

### 3. ポリソルベート類

ポリソルベート類は、ソルビタン脂肪酸

エステルにエチレンオキシドが約 20 分子縮合したものである。脂肪酸エステル部位が 1 つで、含まれる脂肪酸が主にラウリン酸であるものがポリソルベート 20, ステアリン酸およびパルミチン酸であるものがポリソルベート 60, オレイン酸であるものがポリソルベート 80 である。また、脂肪酸エステル部位が 3 つで、含まれる脂肪酸が主にステアリン酸およびパルミチン酸であるものがポリソルベート 65 である。現在、米国、EU をはじめとする諸外国で、乳化剤等として広く利用されている。しかし、15<sup>th</sup> Ed. Food Chemical Codex (以下 FCC と略する) や Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (以下 JECFA と略する) および National Institute of Standards and Technology, USA (NIST) の WebBook から参考となる IR スペクトルを検索したが、参照 IR スペクトルは掲載されていなかった。そこで、本研究では、国内規格の確認試験としての参照 IR スペクトルを得ることを目的とした。ここでは、試料として、国立医薬品食品衛生研究所から複数メーカーの製品を提供していただき、それらの IR スペクトルを検討した。さらに得られた IR スペクトルを各メーカー間で比較検討し、参照 IR スペクトル法が確認試験として有用であるか検討した。さらに、常温で固体/ゲル状であるポリソルベート 65 に関しては、測定法の検討も行った。

### 3-1. ポリソルベート 20

ポリソルベート 20 は、常温で油状の液体であるため、液膜法にて測定した。図 8~13 に、それぞれ各メーカーのポリソルベート 20 の IR スペクトルを示す。図 8~13 に示されるように、ポリソルベート 20 の IR スペクトルは、いずれのメーカー間においても、差は認められなかった。従って、液膜法で測定した参照 IR スペクトルがポリソルベート 20 の確認試験として有用であるといえる。

### 3-2. ポリソルベート 60

ポリソルベート 60 は、常温で油状の液体または、半ゲル状であるため、必要に応じて加温して溶解させて液膜法にて測定した。図 14~19 に、それぞれ各メーカーのポリソルベート 60 の IR スペクトルを示す。図 14~19 に示されるように、ポリソルベート 60 の IR スペクトルは、いずれのメーカー間においても、差は認められなかった。なお、図には示していないが、試料を冷却して半ゲル状にして測定した場合でも、IR スペクトルに大きな変化は認められなかった。従って、液膜法で測定した参照 IR スペクトルがポリソルベート 60 の確認試験として有用であるといえる。

### 3-3. ポリソルベート 65

ポリソルベート 65 は、常温で固体であるため、まず、測定法の検討を行った。すなわち、加温して溶解させ、固化する前に

液状で測定する液膜法で測定した場合と、加温して溶解させ、溶液をセル板に挟んだ後空冷して固化させて測定する薄膜法で測定した場合とを比較した。図 20 および 21 には、それぞれ液膜法で測定した場合と薄膜法で測定した場合のポリソルベート 65 の IR スペクトルを示す。その結果、どちらの方法で測定した場合でも、同じスペクトルを示すことが分かった。しかし、液膜法で測定する場合、試料調製から測定までの時間を非常に短くする必要があり、また、気温の低い冬場では短時間で固化するなど、安定した測定が難しいことが考えられることから、液膜法による測定は不適切であると判断した。従って、安定して測定できる薄膜法が適当であると判断した。そこで、ポリソルベート 65 の測定法は薄膜法とし、各メーカー間での IR スペクトルを比較検討した。図 22~26 に、それぞれ各メーカーのポリソルベート 65 の IR スペクトルを示す。図 22~26 に示されるように、ポリソルベート 65 の IR スペクトルは、いずれのメーカー間においても、差は認められなかった。従って、薄膜法で測定した参照 IR スペクトルがポリソルベート 65 の確認試験として有用であるといえる。

### 3-4. ポリソルベート 80

ポリソルベート 80 は、常温で油状の液体であるため、液膜法にて測定した。図 27~32 に、それぞれ各メーカーのポリソルベート 80 の IR スペクトルを示す。図 27~

32 に示されるように、ポリソルベート 80 の IR スペクトルは、いずれのメーカー間においても、差は認められなかった。従って、液膜法で測定した参照 IR スペクトルがポリソルベート 80 の確認試験として有用であるといえる。

#### D. 考察

確認試験は、再現性よく正確に測定できることが必須条件である。扱いやすさの観点から試料の化学型を変えて測定する場合は、再現性よく正確に測定できることを確認しておく必要がある。本研究では、常温で気体であるトリメチルアミンを比較的取り扱いが容易な塩酸塩とし、KBr 法およびペースト法による測定を試みたが、いずれの方法でも、吸湿により本来の IR スペクトルを得ることはできなかった。一方、ガセルを用いて気体状態で測定したところ、水分による妨害のないスペクトルを再現性よく得ることができた。これらの結果から、トリメチルアミンを塩酸塩として IR スペクトルを測定するのは不適切であり、ガセルを用いて測定した 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。

さらに、著者は、ピペリジンやピロリジンの測定においても、試料調製中に吸湿し、水の妨害を受けることを示した。これらの結果は、日本のような高温多湿の国においては、測定に時間かかると、吸湿により含水物のスペクトルが得られることに十分注

意をしておく必要があることを示している。従って、「試料調製中に吸湿する可能性があるため、試料調製から測定までを短時間で行うことが必要」といった、測定における注意事項を表記することも考慮すべきである。

とくに、今後、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、日本の気候・風土を考慮に入れた独自の規格を設定すべきである。すなわち、標準 IR スペクトルを設定するにあたっては、国際的あるいは他国の基準の IR スペクトルが存在する場合でも、自ら検討し、測定条件や注意事項を明らかにし、再現性の良い測定法を確立すべきであるといえる。

#### E. 結論

標準となり得る IR スペクトルを得るために、トリメチルアミンなどの測定法や測定条件を検討した。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、再現性のある IR 測定法を確立するとともに、測定の条件や注意点を併記することで、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。

#### G. 研究発表

なし