

スフラスコ 10 ml に採り、メタノールを加えて正確に 10 ml とし内部標準原液とした。この液 1 ml を正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 ml とし内部標準液とした。

内部標準原液 1 ml を正確に少量のメタノールを入れたメスフラスコ 10 ml に採り、次いで、揮発性有機化合物混合標準液 0, 50, 100, 200, 500, 1000 μ l をそれぞれ正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 ml とし、検量線用標準源液とした。塩化ナトリウム 3g 及び測定量精製水 10 ml をヘッドスペースバイアルに採り、次いでマイクロシリンジを使用して検量線用標準源液を 2 μ l 注入し、直ちにテフロンシート付きセプタムをのせ、アルミキャップで密封し、検量線用標準液とした。

C. 研究結果

測定対象とした揮発性有機化合物 (VOC) 混合標準液 23 種の GC/MS クロマトグラムを Fig. 1 に示した。35 分までに全てのピークを検出することができた。このうち m-キシレン及び p-キシレンはピークが分離せず検出された。これら化合物は異性体のためマススペクトルも類似しており分別が困難であった。このため m-キシレン及び p-キシレンは m,p-キシレンの合計量として算出した。その他の化合物については良好な分離結果が得られた。

2) 添加回収試験

カットキャベツに VOC 混合標準液を 10 ng/g 又は 100 ng/g 添加し添加回収試

験を行った (Table 1)。10 ng/g 添加においてジクロロメタンの添加回収率が 130% を越えて検出された。また、m,p-キシレンにおいて若干低い回収結果を示したが、これら以外の化合物については、10 ng/g 添加において 7.1~10.9 ng/g, 100 ng/g 添加では 69.7~114.0 ng/g と概ね良い回収率が得られており、変動係数は 10% 以内であり、分析精度も良好であった。

3) 塩素殺菌処理により生成する揮発性化合物の分析

本法を用いて次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行ったときに生成する消毒副生成物について、ヘッドスペース GC/MS により分析したときのガスクロマトグラムを Fig. 2 に示した。試料としてカットキャベツを用い、有効塩素濃度として 100 μ g/ml の次亜塩素酸ナトリウム溶液及び亜塩素酸ナトリウムについては使用基準の最大限度である 500 μ g/ml 溶液を用いて殺菌処理を行った。

次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理において、13.6 分の保持時間にクロロホルムのピークが検出されたが、亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理では、いずれの揮発性化合物も検出されず、殺菌処理前の試験液と同様のクロマトグラムが得られた。

4) 塩素殺菌処理により生成する消毒副生成物の経時変化

次亜塩素酸ナトリウム溶液及び亜塩素酸ナトリウム溶液にカットキャベツを浸漬させ、生成する消毒副生成物生成量の経

時的な測定を試みた(Fig. 3).

消毒副生成物の経時変化を測定するには、検体に残存する殺菌料を除去する必要がある。水道水の水質検査法では、試料の採取及び保存において酸性条件下、アスコルビン酸ナトリウムを添加し、残留塩素を分解除去する方法がとられている。亜塩素酸ナトリウムに対する検討にあたり、アスコルビン酸による亜塩素酸除去能力を確認するため、アスコルビン酸添加後の亜塩素酸イオンの残存の有無をイオンクロマトグラフにより分析したところ、亜塩素酸の一部が分解せずに残存することが明らかとなった。このため、アスコルビン酸の代替試薬としてチオ硫酸ナトリウムを用いて分解除去を試みたところ、硫酸酸性条件下にチオ硫酸ナトリウムを添加することにより、亜塩素酸ナトリウムの分解除去が可能となった。このため、殺菌料の分解試薬としてチオ硫酸ナトリウムを用いた。

次亜塩素酸ナトリウム溶液により殺菌処理した場合、殺菌処理直後よりクロロホルムが生成し始め、20分後には18.7 ng/gとなり、以降ほぼ一定の値を示した。一方、亜塩素酸ナトリウム溶液により殺菌処理した場合にはクロロホルムを始めとしたTHMの生成は認められなかった。また、殺菌処理後の浸漬液についても測定したところ、カット野菜中のクロロホルム生成量と同様の挙動を示した。

5) 塩素殺菌料の濃度による消毒副生成物生成量の変化

次亜塩素酸ナトリウム溶液及び亜塩素

酸ナトリウム溶液にカットキャベツを10分間浸漬させ、生成する消毒副生成物量の測定を行った(Fig. 4)。次亜塩素酸ナトリウム溶液により殺菌処理を行った場合、クロロホルム生成量は濃度依存的に増加し、500 µg/ml 次亜塩素酸添加において59 ng/gのクロロホルムが生成した。これに対し、亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行った場合には、殺菌濃度によらずクロロホルムは定量下限値以下であった。殺菌処理後の浸漬液についても、同様の挙動を示した。

6) 塩素殺菌料へのクエン酸添加による消毒副生成物量の変化

次亜塩素酸ナトリウムは塩基性の液体であるが、酸性側において殺菌力が増すため、殺菌液にクエン酸等を添加して殺菌効果を高め使用される場合がある¹⁷⁾。また、亜塩素酸ナトリウムも、さくらんぼなどの漂白剤として使用する場合には、クエン酸等の食品添加物用の有機酸を添加して漂白を行うことがある¹⁸⁾。そこで次亜塩素酸ナトリウム溶液及び亜塩素酸ナトリウム溶液にクエン酸を混和して殺菌液を調製し、生成する消毒副生成物量を経時的に調べた(Fig. 5)。殺菌液のpHは、弱酸性から微酸性となるように調整した。次亜塩素酸ナトリウム・クエン酸混液では、調製直後よりクロロホルムの生成が確認されたが、亜塩素酸ナトリウム・クエン酸混液では、対象とした23種の揮発性化合物の生成は認められなかった。

D. 考察

1) ヘッドスペース GC/MS 法によるカット野菜中の消毒副生成物の分析法の検討

カット野菜に含まれる揮発性化合物の分析を行った。平成 16 年度の厚生労働科学研究では、カラムとして AQUATIC (60m×0.25mmI.D. 膜厚 1.0μm)を用いて揮発性化合物の分析の検討を行ったが、このとき 1,2-ジクロロエタンとベンゼンのピークが分離しなかった。今回、カラムを AQUATIC-2 に変更したところ、1,2-ジクロロエタンとベンゼンの分離分析が可能となった。また、添加回収試験においてジクロロメタンの 10ng/g 添加における回収率が 130%を超えて検出されたが、これは実験室内空気の汚染が原因と推定された。このためジクロロメタンに関しては定量下限値を 30 ng/g とした。なお、クロロホルムを含む、その他の揮発性化合物の検出感度は良好であり、1 ng/g 以上の濃度において定量分析が可能であった。m,p-キシレンに関しては、10ng/g 及び 100ng/g 添加のいずれの濃度においても若干低い回収結果を示したが、定量下限値以上の濃度において m,p-キシレンの生成は確認されておらず、本研究への影響はなかった。

2) 消毒副生成物の生成に関与する因子の検討

カット野菜の殺菌処理にともなう消毒副生成物の生成について解明するため、殺菌料との接触時間や濃度を変更し、消毒副

生成物生成量の変化を調べた。

次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理した場合には、殺菌料との接触時間や濃度に応じてクロロホルムの生成量が増加したが、亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理では、クロロホルムなどの塩素系揮発性化合物は検出されなかった。今枝らは豆腐を次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム溶液で浸漬処理を行い、亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理ではクロロホルムが生成しないことを報告しているが、豆腐などのタンパク食品だけでなく、使用基準適応範囲に含まれる生食用野菜類についても THM を生成しないことが明らかとなった。亜塩素酸ナトリウムは、次亜塩素酸ナトリウムのように残留塩素を生じないことが、THM などの消毒副生成物を生成しない要因と考えられる。

今回、モデル実験のため超純水により亜塩素酸ナトリウム溶液を調製しているが、実際には水道水を用いて調製するため、水道水由来の残留塩素が存在している。このため、亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理後においても極微量の THM が検出される可能性はあるが、亜塩素酸ナトリウムは THM 生成能を有していないため、水道水中の THM 濃度を超えて検出される可能性はないものと予想される。

3) 酸共存下におけるクロロホルムの生成

殺菌料にクエン酸を混和したときの消毒副生成物量の推移を調べた。次亜塩素酸ナトリウムにクエン酸を添加した場合、経時的なクロロホルムの濃度が増加したが、

亜塩素酸ナトリウムについては、クエン酸混和によるクロロホルムの生成は確認できなかった。

このように次亜塩素酸ナトリウムと亜塩素酸ナトリウムにより、クロロホルムの生成に差が生じるのは、酸性条件下における化学種の存在形態の違いが理由と考えられる。次亜塩素酸ナトリウムは酸性条件下において塩素を遊離するが、亜塩素酸ナトリウムは二酸化塩素として存在している。いずれも酸化力を有しているため、クエン酸の3位の水酸基を酸化してアセトンジカルボン酸が生成していると予想される。

しかし、引き続いて、次亜塩素酸ナトリウムは、酸性条件下において塩素体として働き、アセトンジカルボン酸に対して塩素付加反応を起こしてハロアセトンとなり、最終的にクロロホルムに生成するが、亜塩素酸ナトリウムは、二酸化塩素として存在しているため、塩素付加反応は進行せず、アセトンジカルボン酸で反応が停止するため、クロロホルムを生じなかったと考えられる。

このように亜塩素酸ナトリウムより生じる二酸化塩素は塩素付加反応には関与しないため、今回対象とした塩素系揮発性化合物のみならず、ハロアセトニトリルやハロ酢酸など、他の塩素系消毒副生成物についても生成する可能性は低いと考えられる。ただし、一方において二酸化塩素は酸化力に優れており、水道水の二酸化塩素消毒により、アルデヒド類や有機酸などの

非塩素系の消毒副生成物を生成するとの報告もある¹⁹⁾。今後、これら化合物についても調査を進めていく予定である。

E. 結論

カット野菜を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理した場合には THM が生成するが、亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理では THM を生成しないことが明らかとなった。THM の生成についてのみ考えた場合、亜塩素酸ナトリウムが次亜塩素酸ナトリウムに比べ優れていると考えられる。殺菌料としての効果全体を考えた場合、次亜塩素酸ナトリウムが優れた面もあり、目的に応じた選択が望まれる。なお、これら殺菌料は、野菜や魚介類加工品など生鮮食品の微生物学的危害を防止する上で欠かすことのできない重要な役割を果たしている。今後とも微生物学的リスクを十分に考慮した上での化学的リスク評価が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 参考論文

- 1) 厚生省:第8版食品添加物公定書,p 195 (2007)
- 2) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 21(3), p259 (1972)
- 3) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 23(2), p234-243 (1974)
- 4) WHO: Guidelines for Drinking-water

- Quality 3rd Ed. (2004)
- 5) Richardson S. D.: Trends in Analytical Chemistry, 22(10), p666-684 (2003)
- 6) Official Journal of the European Communities Council Directive 98/83/EC (1998)
- 7) 厚生労働省令第百一号:水質基準に関する省令 (2003)
- 8) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 32(4), p308-314 (1991)
- 9) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 33(3), p267-273 (1992)
- 10) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 35(4), p357-364 (1994)
- 11) Tiefel, P., Guthy, K.: Milchwissenschaft, 52(12), p686-691 (1997)
- 12) Resch, P., Guthy, K.: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 95, p418-523 (1999)
- 13) Resch, P., Guthy, K.: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 96, p9-16 (2000)
- 14) Imaeda, K.. et al.: 衛生化学, 40(6), p527-533 (1994)
- 15) 官報 第 3378 号, 厚生労働省令第七十五号, p1 (2002)
- 16) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知:食安基発第 0825001 号 (2004)
- 17) 長谷川美典: カット野菜ハンドブック, p170-173 (2002)
- 18) 廣川書店:食品添加物公定書解説書第 8 版,pD1 (2007)
- 19) Richardson S. D. etl al. : Environ. Sci. Technol, 28, p592-599
- H. 研究発表
1. 論文発表 なし
2. 学会発表
- H. Kubota, K. Sato, K. Tanamoto: 121st AOAC annual meeting and exposition. (2007.9)
- 久保田浩樹, 佐藤恭子, 棚元憲一: 日本食品衛生学会第 94 回学術講演会(2007.10)
- I. 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
3. その他 なし

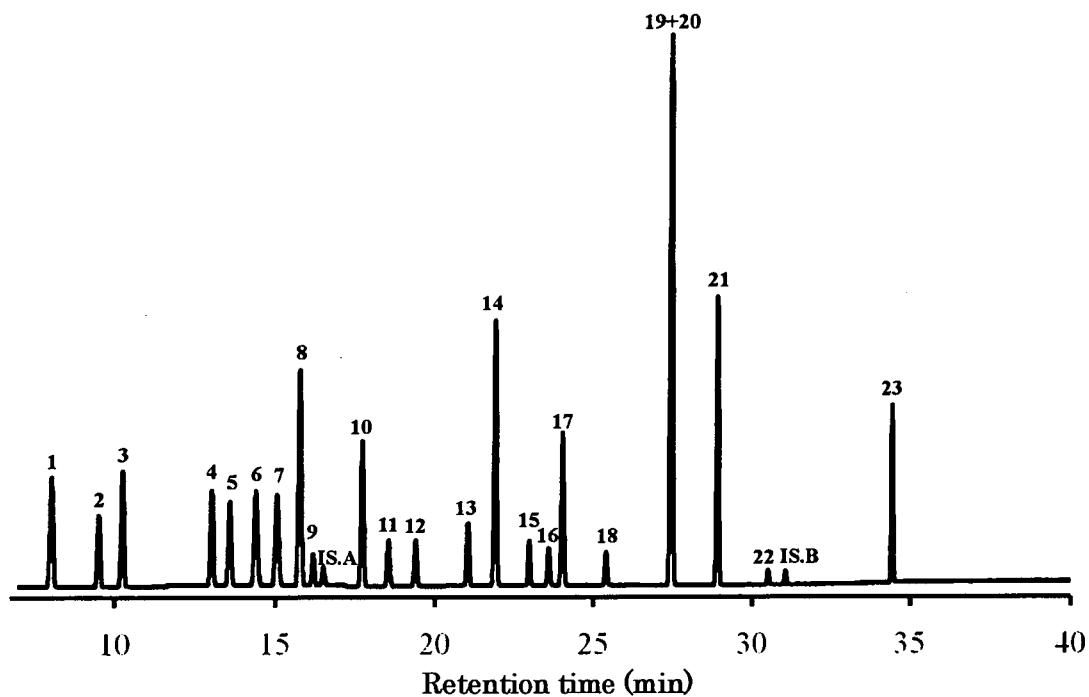


Fig. 1. 揮発性有機化合物混合標準液の GC/MS クロマトグラム

1: 1,1-Dichloroethen, 2: Dichloromethane, 3: trans-1,2-Dichloroethylene,
 4: c-1,2-Dichloroethylene, 5: Chloroform, 6: 1,1,1-Trichloroethane, 7: Carbon
 Tetrachloride, 8: Benzene, 9: 1,2-Dichloroethane, 10: Trichloroethene, 11:
 1,2-Dichloropropane, 12: Bromodichloromethane, 13: c-1,3-Dichloropropene, 14: Toluene,
 15: t-1,3-Dichloropropene, 16: 1,1,2-Trichloroethane, 17: Tetrachloroethylene, 18:
 Dibromochloromethane, 19: m-Xylene, 20: p-Xylene, 21: o-Xylene, 22: Bromoform, 23:
 p-dichlorobenzene, IS.A: Fluorobenzene, IS.B: 4-Bromofluorobenzene

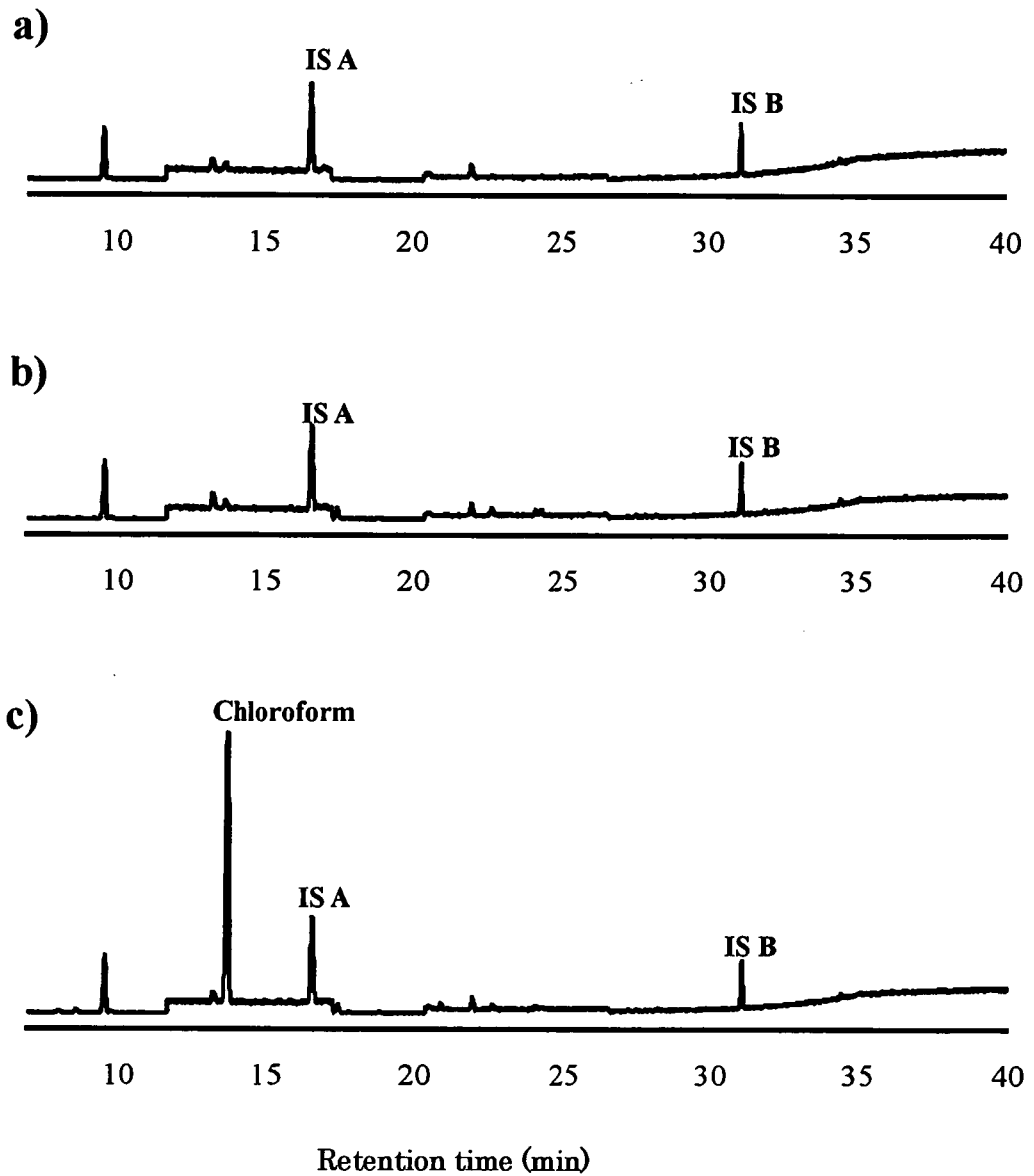
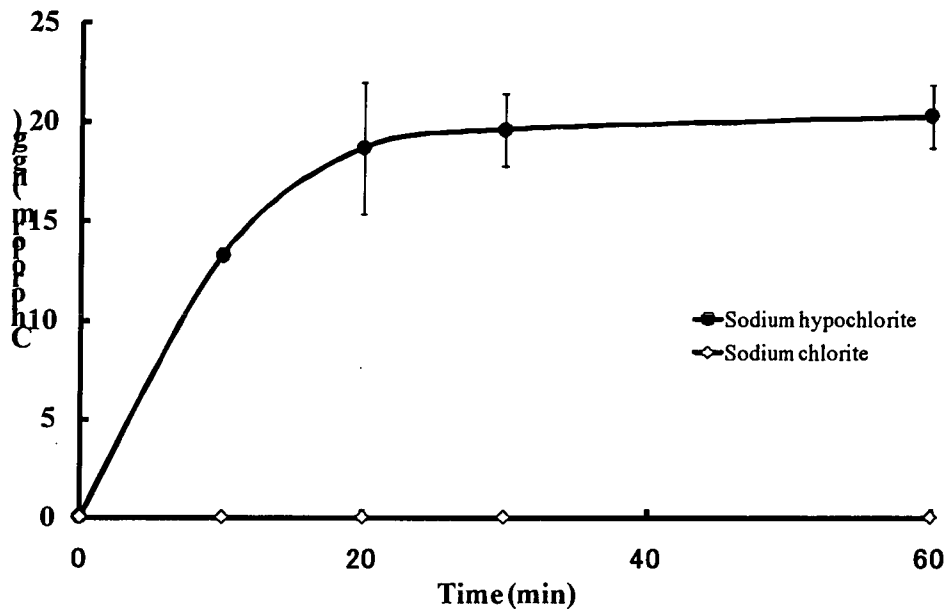


Fig. 2. 殺菌処理したカット野菜の GC/MS クロマトグラム
 a) 殺菌処理前のカット野菜, b) 亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理後のカット野菜,
 c) 次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理後のカット野菜

a)



b)

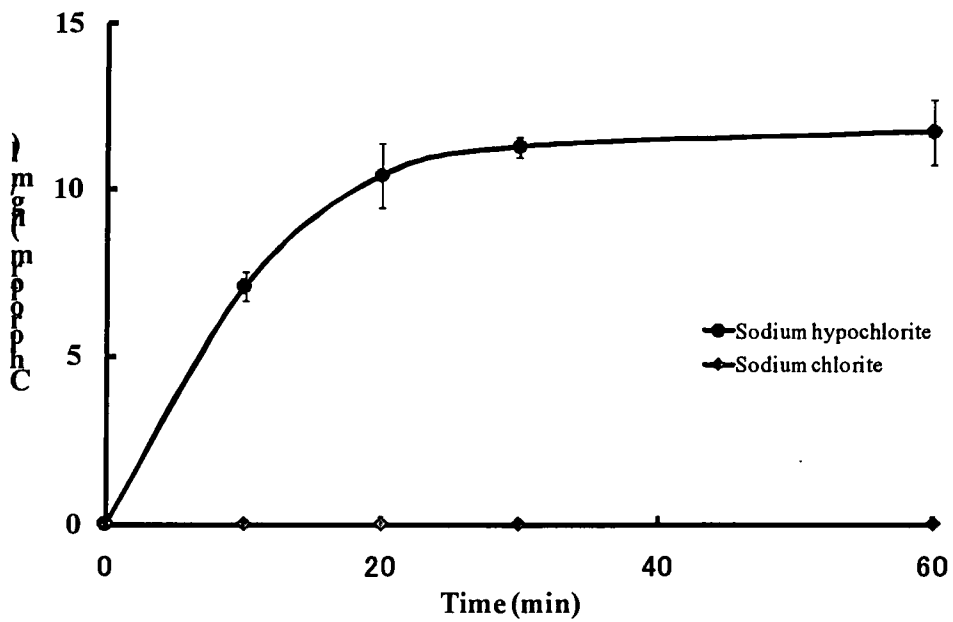


Fig. 3. 殺菌処理によるカット野菜中のクロロホルム生成量の経時変化
a) カット野菜中のクロロホルム量の経時変化, b) 殺菌処理後の浸漬液中のクロロホルム量の経時変化

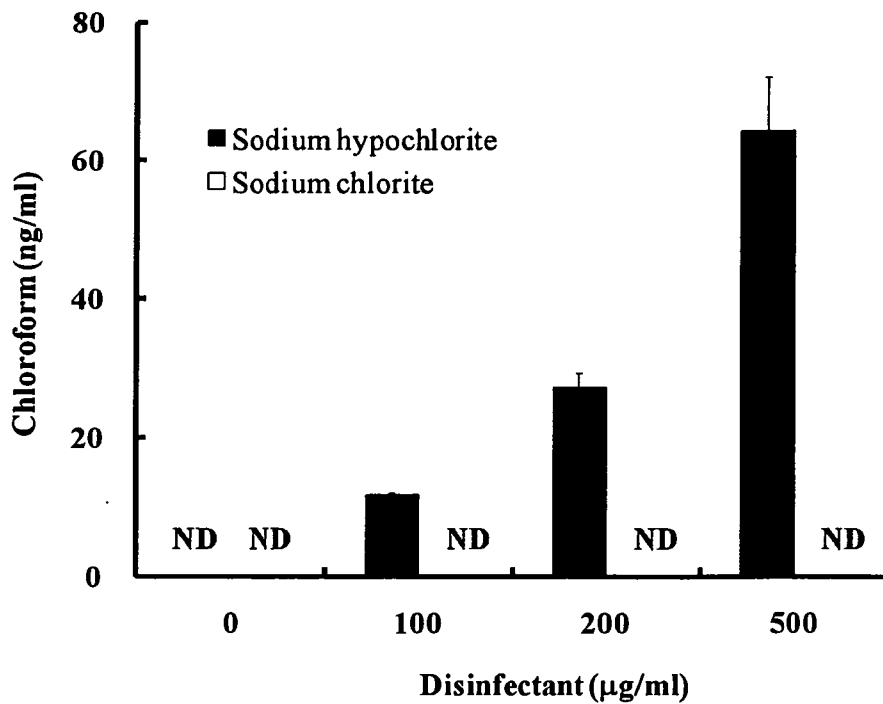
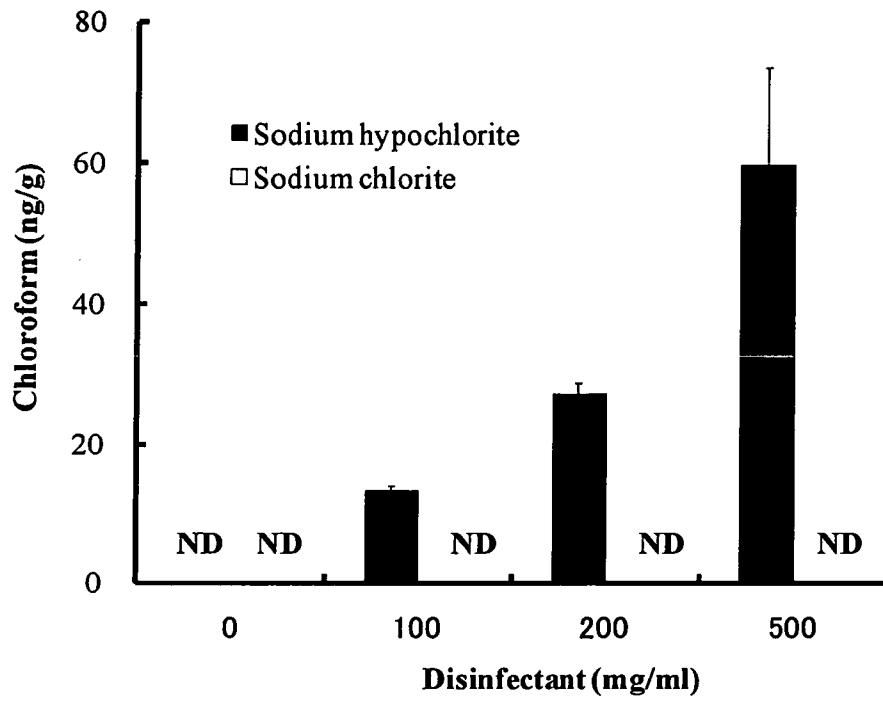


Fig. 4. 殺菌液濃度によるカット野菜中のクロロホルム生成量の変化
 a) カット野菜中のクロロホルム量, b) 殺菌処理後の浸漬液中のクロロホルム量

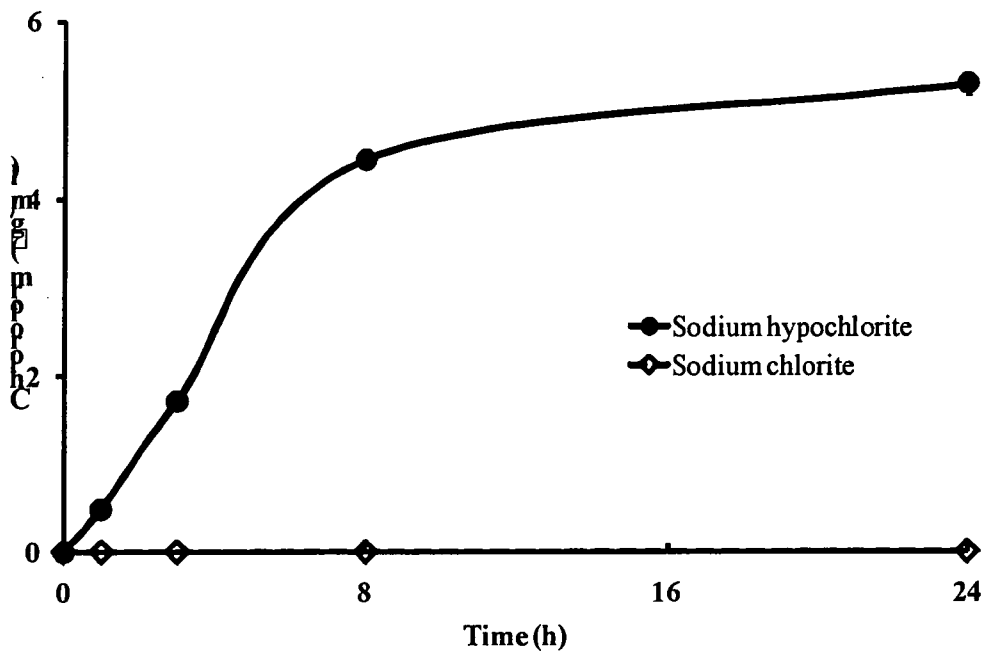


Fig. 5. 殺菌液へのクエン酸混和によるクロロホルム生成量の推移

Table 1. 添加回收試験

| No. | Compounds | Amount of added VOCs | | | |
|--------|------------------------|---------------------------|-----|---------------------------|-----|
| | | 10ng/g 平均(ng/g)* CV(%) | | 100ng/g 平均(ng/g) CV(%) | |
| 1. | 1,1-Dichloroethylene | 10.9 | 2.3 | 114.0 | 0.9 |
| 2. | Dichloromethane | 13.3 | 7.0 | 103.7 | 5.2 |
| 3. | t-1,2-Dichloroethylene | 10.5 | 1.3 | 106.2 | 0.4 |
| 4. | c-1,2-Dichloroethylene | 10.6 | 3.7 | 99.6 | 2.7 |
| 5. | Chloroform | 10.9 | 2.7 | 98.6 | 2.4 |
| 6. | 1,1,1-Trichloroethane | 9.7 | 3.2 | 103.7 | 2.6 |
| 7. | Carbon Tetrachloride | 9.3 | 7.2 | 99.8 | 4.2 |
| 8. | 1,2-Dichloroethane | 9.9 | 7.3 | 95.4 | 7.3 |
| 9. | Benzene | 10.2 | 0.9 | 101.4 | 0.9 |
| 10. | Trichloroethylene | 9.4 | 2.5 | 95.9 | 2.2 |
| 11. | 1,2-Dichloropropane | 9.6 | 3.1 | 92.9 | 3.4 |
| 12. | Bromodichloromethane | 9.3 | 4.7 | 89.5 | 4.6 |
| 13. | c-1,3-Dichloropropene | 7.1 | 8.3 | 69.7 | 7.1 |
| 14. | Toluene | 8.9 | 1.6 | 89.1 | 2.1 |
| 15. | t-1,3-Dichloropropene | 9.0 | 7.3 | 82.0 | 6.4 |
| 16. | 1,1,2-Trichloroethane | 9.3 | 6.9 | 86.0 | 7.2 |
| 17. | Tetrachloroethylene | 7.7 | 9.9 | 78.8 | 7.5 |
| 18. | Dibromochloromethane | 9.0 | 6.7 | 82.4 | 6.2 |
| 19+20. | m,p-Xylene | 7.0 | 7.3 | 70.5 | 5.3 |
| 21. | o-Xylene | 6.8 | 4.8 | 65.3 | 4.0 |
| 22. | Bromoform | 8.9 | 6.0 | 76.5 | 7.1 |
| 23. | p-Dichlorobenzene | 7.4 | 3.3 | 70.4 | 2.0 |

* n=5

厚生労働科学研究費補助金（臨床研究基盤整備推進研究事業）
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
平成 19 年度分担研究報告書

食品添加物が動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する研究
ソルビン酸とシステインとの反応生成物の構造決定

分担研究者 扇間昌規 武庫川女子大学薬学部

協力研究者 小村 啓 財団法人サントリー生物有機科学研究所

峯 孝則 大阪大学大学院工学研究科附属フロンティア研究センター

研究要旨

厳しい規制の下で完成された食品中の添加物が、流過程の様々な条件の中でどのように変動するかを解明することは、食品の安全性や品質を高める上で極めて重要な事柄である。前年度までの「食品中の食品添加物の流通状態における消長調査」という課題研究を続ける中で、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し、消長の機構について分子レベルからの解明を試みてきた。今回、食品添加物のソルビン酸と食品素材の一つとしてシステインとの反応生成物の構造決定が遂行できた。その構造物の性質や生成機構は、「食品添加物が動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する研究」の充実・展開に結びついていくだろう。

A. 研究目的

食品添加物は食品中の各種食品成分と相互作用しその機能を発揮することも、機能を損なうこともある。また食品添加物は食品を食した人の消化管内で様々な反応を進行させる能力を有している。動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する本研究と、前年度までの研究を結びつけるものとして、すでに報告した保存料の一種であるソルビン酸(以下 SOA)とアミノ酸のシステイン(以下 Cys)の反応物の構造を解明し反応機構を推測することが当面の研究の目的である。

B. 研究方法

1. 概略

(1) SOA (SOA と SOA カリウム) と Cys (Cys 遊離塩基と Cys 塩酸塩) との 4 種の組合せで水溶液中での室温放置による消長調査を行なった結果、SOA と Cys 塩酸塩との組合せの場合に生成する物質が経時的に最も顕著に増加することが認められた。今年度はその主要生成物質を分取し NMR、MS 等で構造決定することを試みた。

(2) SOS と Cys の構造式を図 1 に示す。SOA は炭素数 6 の 2 価不飽和脂肪酸であ

り、その2重結合はトランス型の共役構造を持つ平面分子であり比較的化学反応性に富み、保存料としての静菌作用¹⁾との関連においても関心が持たれる。

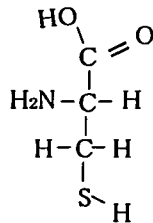
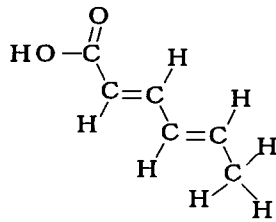


図 1 ソルビン酸と L-システイン

2. 試薬及び試料溶液の調製

(1) 試薬

SOA：和光純薬工業特級、SOAK：和光純薬工業一級、L-Cys 塩酸塩・1水和物：MP BIOMEDICALS、L-Cys 遊離塩基：MP BIOMEDICALS、メタノール：和光純薬工業 LC/MS 用、トリフルオロ酢酸（以下 TFA）：和光純薬工業高速液体クロマトグラフ用

(2) 試料溶液の調製

SOA 500mg を 50%メタノール水溶液に溶解させた後、50mL にメスアップする

(10mg/mL：SOA 原液)。SOAK 500mg を 10%メタノール水溶液に溶解させた後、50mL にする (10mg/mL：SOAK 原液)。Cys 遊離塩基 500mg を同様に 10%メタノール水溶液に溶解させた後、50mL にする (10mg/mL：Cys 遊離塩基原液)。Cys 塩酸塩 1 水和物 500mg を 10%メタノール水溶液に溶解させた後、50mL にする (10mg/mL：Cys 塩酸塩 1 水和物原液)。SOA 原液 20mL と Cys 塩酸塩 1 水和物原液 20mL とを混合した (各 5mg/mL 含有)。液とする (各 5mg/mL 含有)。

3. 分取方法

SOA と Cys 塩酸塩、各 5mg/mL を含む 30%メタノール溶液を約 5 週間室温放置した溶液、約 30mL を減圧下濃縮し、ニンヒドリン反応及び UV 吸収を指標に以下の方法で分画した。まず、濃縮物をダイアイオン HP20 カラム (4.8cm φ × 10cm) に通し、引続き 1000mL の水で非吸着部分を回収、画分 1 とした。次に各々 1000mL の 10%エタノール溶液、20%エタノール溶液、40%エタノール溶液、100%エタノールとエタノール含量を上げて溶出し、それぞれの画分を順次画分 2、3、4、5 とした。

4. 装置

(1) UV 検出器付き高速液体クロマトグラフ

① 分析条件

- ・プレカラム：ダイソー DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (4.6mm I. D. × 5cm)
- ・分析カラム (分取用プレカラム：

- ・ 和光純薬 Wakosil-II 5C18RS Prep (20mm I. D. x5cm)
- ・ 移動相：0.1%TFA 水溶液、メタノールによるグラディエント
- ・ グラディエント条件：メタノール 0% →70% (25分) →90% (5分) →0% (リニアグラディエント)
- ・ UV検出器：日本分光 UV-970
- ・ 検出波長：230nm
- ・ 流速：3mL/min.
- ・ 注入量：20 μL

②分取条件 (I)

- ・ 分取カラム：DAISOPAKSP-120-20-ODSA、(45mm φ × 15cm)
- ・ 移動相：0.1%TFA を含む水および 90%メタノールの直線グラジエント溶出
- ・ 波長：230nm

③分取条件 (II)

- ・ 分取カラム：YMC-ODS S30/50 120 Å、(2cm φ × 22cm)
- ・ 移動相：1%酢酸水溶液および、1%酢酸を含む 10%メタノール溶液

(2) 核磁気共鳴装置

高分解能 NMR: Bruker 社、Avance DMX750 重水測定

(3) 質量分析装置

FT-ICR-MS: Bruker Daltonics 社、apex-Qe エレクトロスプレー方式によるイオン化を用いた高分解能測定

(4) GC/MS 装置

- ・ Agilent Technologies 社: 6890N 型 GC+5975 型 MS
- ・ カラム: HP5ms (30m × 0.25mm φ × 0.25 μm d f)
- ・ 温度条件: 40°C (10分間保持) から 220°C まで 毎分 5°C の昇温後、220°C で 30分保持
- ・ 注入口温度 250°C
- ・ ガス流量: 毎分 1.0mL、注入口スプリット比 10:1.

C. 研究結果および考察

1. SOA と Cys との反応物生成物の HPLC クロマトグラム

SOA と Cys 塩酸塩の混合液を室温暗所に 3ヶ月間放置した時のクロマトグラムを図 2. に示す。

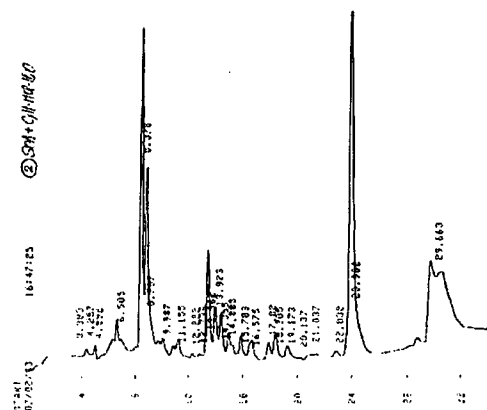


図 2. 室温、暗所に 3ヶ月間放置した時の HPLC クロマトグラム

保持時間約 8.4分：ピーク①

保持時間約 8.8分：ピーク②

保持時間約 13.4分：ピーク③

図2. で経時的に増加が認められたピーク①、②、③について分取を試みた。

2. 分取結果

画分1及び画分2はニンヒドリン反応が陽性で、画分2のほうが呈色は強く、画分2は同時に UV 吸収曲線も 280nm 付近まで観察されたのに対し、画分1は 240nm 付近で吸収が途切れていたことから、画分1のニンヒドリン反応は残存するシステインまたはその分解物によるもので、画分2が求める付加物を含む画分と推定した。更に、これらの画分を HPLC (DAISOPAKSP-120-20-ODSA カラム) でグラジエント溶出し、画分2に求める付加物が含まれていることも、同時に確認した。

先の HP20 カラムにて得られた画分2を更に ODS カラム(YMC-ODS S30/50 120Å)にて 1%酢酸水溶液を溶離液に用いて分画し、Fr1~Fr7を、次に溶離液を1%酢酸を含む10%メタノール溶液に変更し、引続き画分 Fr8~Fr11を得た。それぞれの画分は HPLC にて溶出成分を確認したところ、画分 Fr4~Fr7 に付加物由来と思われるピーク(図3)が存在したため、これらの画分について、そこに含まれる成分は完全には純化できてはいない段階ではあるが、凍結乾燥後 NMR を中心とする構造解析を試みた。

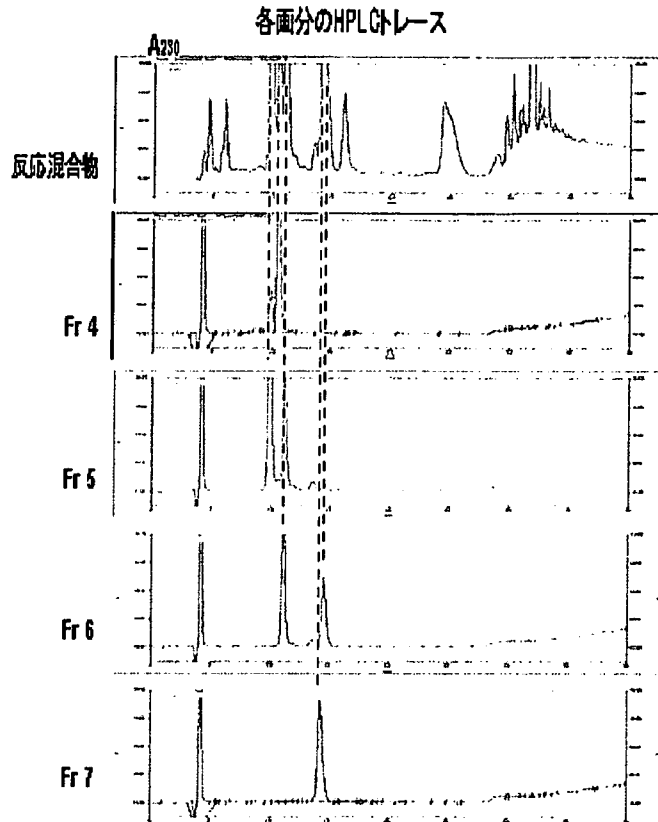


図3. 画分2の細分画 Fr4~Fr7の HPLC クロマトグラム

3. 構造解析

解析の結果、Fr4 の成分及び Fr6 に含まれる主要成分には構造上の類似点が期待された。そこで、比較的純物の少ない Fr4 について、COSY、TOCSY、NOESY、ROESY、HSQC、HMBC の 2 次元測定結果を詳細に検討し、また、FT-ICR-MS を用いた高分解能測定の結果も踏まえて、組成式が $C_{10}H_{14}N_2O_5S_2$ で構造が(1)であると確定した。

この結果も踏まえて Fr6 に含まれる主成分も検討し、こちらはシステインが付加している炭素上での立体異性体(2)であると確定した。なお、Fr6 に含まれるもう一方の成分は

5-hydroxy-4-methoxy-2-hexenoic acid (3)と決定した。

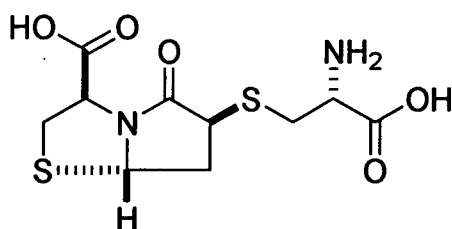
Fr5についてはNMR解析の結果、主成分とそれに類似した別の成分を含んでいることが判明し、主成分は methyl 4,5-dihydroxy-2-hexenoate (4)と同定した。

この成分は十分揮発性を有し、GC分析も可能であるため、GC/MS分析も行い、分子イオン及びその開裂フラグメントの検討により、両者の構造を4位及び5位の関係が cis 及び trans の異性体であることを確認した。

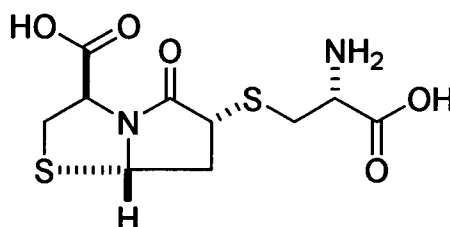
Fr7に含まれる成分についてはNMR測定の結果、量比が約 2:1 のシステイン残基を含む成分の混合物と考えられた。しかし、詳細検討により得た推定構造は、高分解能 FT-ICR-MS の測定結果得られた組成式、 $C_{12}H_{16}N_2O_6S_2$ と水 1 分子分で一致せず、構造は未定である。

なお、先の化合物(1)及び(2)が SOA 由来の炭素骨格の一部が開裂した炭素数4の部分に Cys 2分子が付加した形の化合物であるのに対して、Fr7に含まれる付加物は炭素数が6のまま保持されたところに Cys が2分子付加した化合物と推定されており、大変興味深い。

ここで、Fr5 及び Fr6 には SOA の炭素骨格がすべて保持されたままで二重結合の一部が酸化された形の生成物(3)及び(4)が見出されたことを考えると、SOAのうちかなりの量が反応中に空気酸化を受けていると考えられ、今後嫌気的条件下での生成物の検討も必要となる。図4. に構造決定された(1)、(2)、(3)および(4)の構造式を示す。



(1)

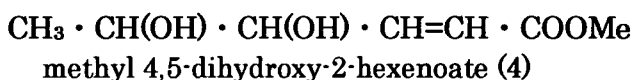


(2)

但し、絶対構造は Cys の立体構造からの類推である。



5-hydroxy-4-methoxy-2-hexenoic acid (3)



methyl 4,5-dihydroxy-2-hexenoate (4)

図4. 構造決定された(1)~(4)の物質

D. 結論

SOA と Cys 塩酸塩との混合水溶液 (SOA が水に難溶性であったため、結果的に 30% メタノール水溶液とした) を暗所に放置したところ、経時的に生成増加する物質が認められた。その主要物質について分取・同定を試み、SOA と Cys の反応付加物 (1) および (2) が構造決定された。

更に(3)および(4)が同定されたが、これらは図1.に示したとおりSOAが共役二重結合とカルボキシル基とで平面構造をとりカルボキシル基の電気陰性度によって共役系を通して5位の炭素はプラスに分極した状態となることで、酸化分解を受け易くなり4,5位の二重結合が開列したものと推測される。一方、この開列反応の中で(3)はSOAの溶解のために加えた30%メタノール水溶液中によるメタノーリシスが起ったものと推測される。更に(3)の対である5の炭素がメトキ化された物質も生成している可能性が考えられるが、これはまだ同定されていない。今回構造が明らかになった(1)および(2)の物質の物性等についてはまだ未調査である。

これらの物質の有効性、有害性はもとより、その生成機構等の解明には多方面から研究がなされなければならない。

E. 健康危機管理情報

本研究で得られた結果においては、現在健康危機管理に関する特筆すべき知見は特に無かった。

F. 研究発表

T.Mine, Y.Okada, M.Senma : The interaction of sorbic acid with amino acid may alter the quality of processed foods somewhere in the food chain from production to table. Jap.J.Food Chem.,14(1),23-26(2007)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

引用文献

1) S.Tetsumoto: J.Agr.Chem.Soc.,9, 338,569(1933)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 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 Add. Contam. | 24(8) | 799-806 | 2007 |
| T.Mine, Y.Okada, M.Senma | The interaction of sorbic acid with amino acid may alter the quality of processed foods somewhere in the food chain from production to table | Jap.J.Food Chem. | 14(1) | 23-26 | 2007 |

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

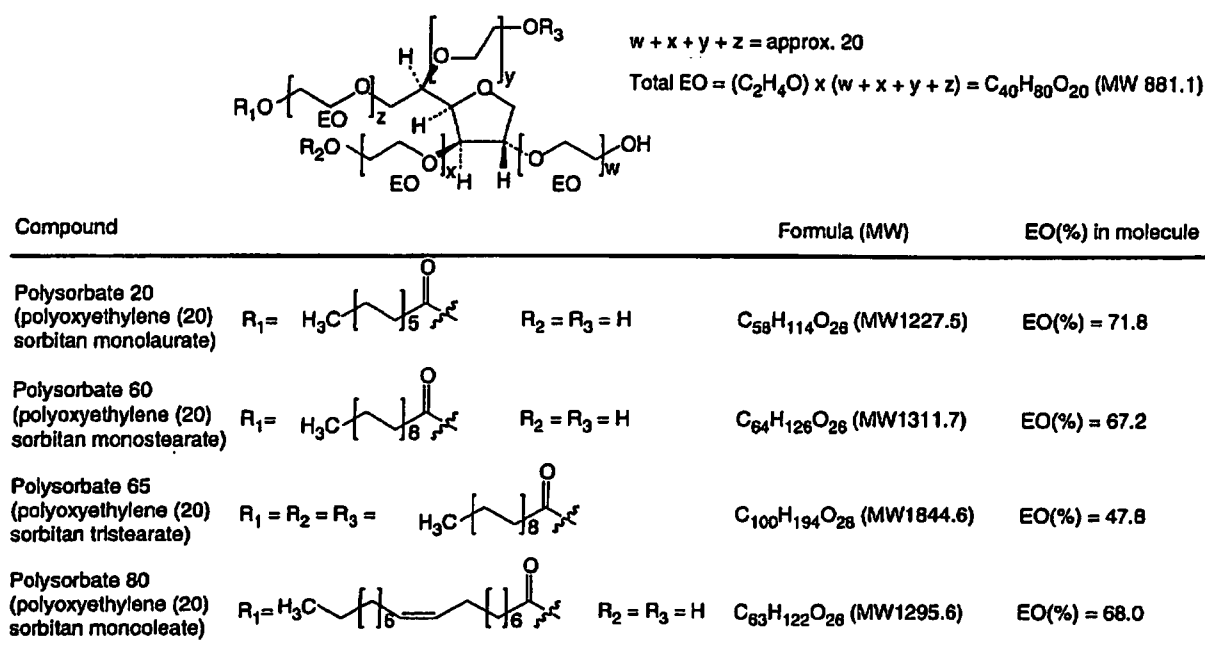


Figure 1. Typical structures of polysorbates 20, 60, 65, and 80. The formulae and EO (%) were estimated based on the assumption that there were 20 moles of EO per molecule.

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. (Miamisburg, 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