

Table I. Instruments and acquisition parameters.

Spectrometer	MERCURY400 (VARIAN) and ECA500 (JEOL)
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 HMBBC 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

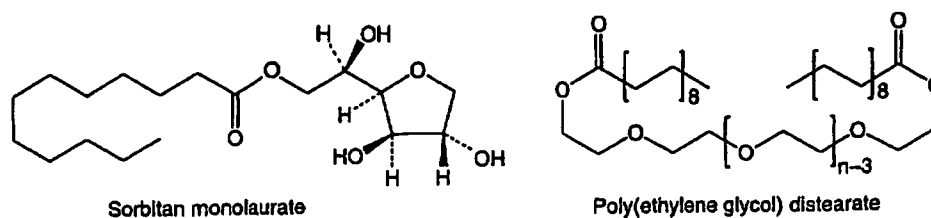


Figure 2. Structures of sorbitan monolaurate and poly(ethylene glycol) distearate.

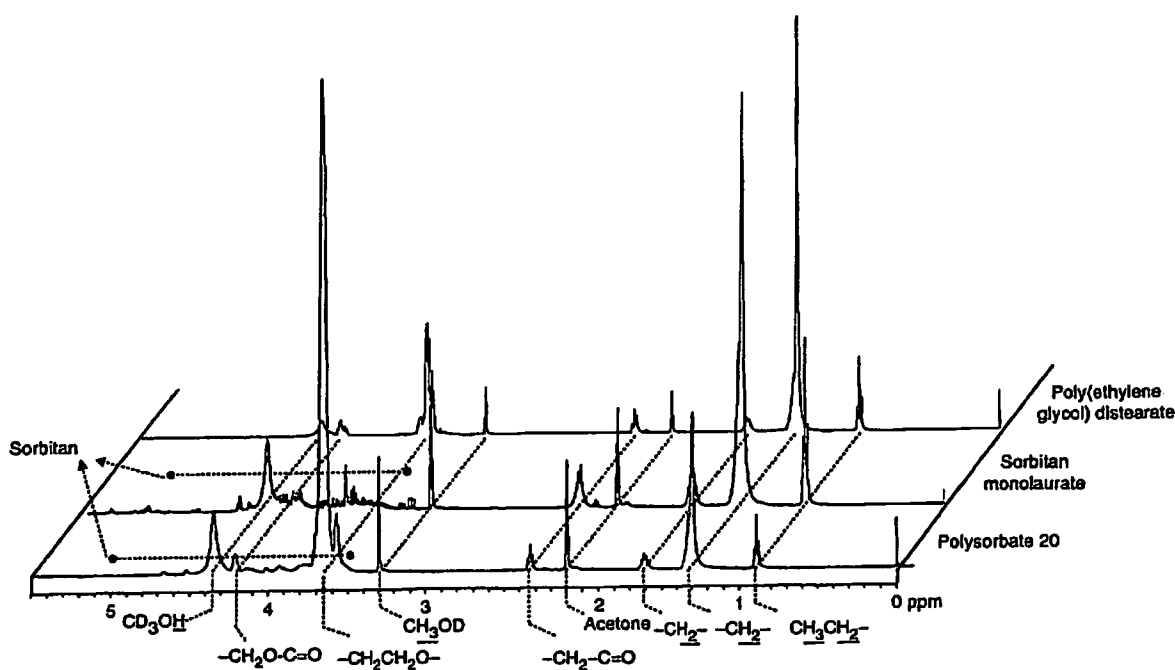


Figure 3. Comparison of NMR spectra of polysorbate 20, sorbitan monolaurate and poly(ethylene glycol) distearate. ¹H-NMR spectra were obtained using the ECA500 system (500 MHz; JEOL) under the conditions shown in Table I.

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

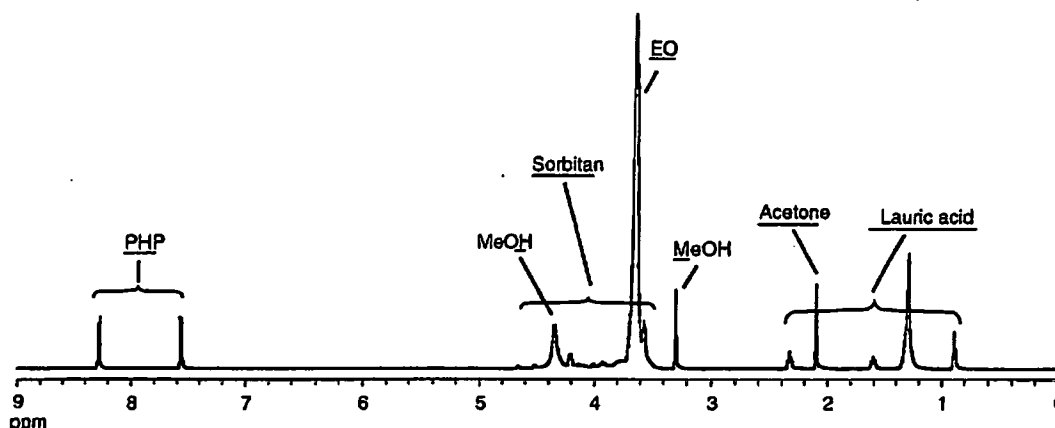


Figure 4. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of polysorbate 20. The spectrum was obtained using the ECA500 system (500 MHz; JEOL). PHP was added as an internal standard. Signals of the four protons on the benzene ring of PHP were observed at δ_{H} values of 7.46–7.66 ppm and 8.18–8.38 ppm. Most of the EO signals 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 $^1\text{H-NMR}$ 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	
		AV	72.3	0.7	AV	72.4
Polysorbate 60 (polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate)	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	
		AV	67.3	1.3	AV	67.8
Polysorbate 65 (polyoxyethylene(20) sorbitan tristearate)	1	49.1		1	49.8	
	2	49.8				
	3	49.5				
	4	49.8				
	5	48.7				
		AV	49.4	0.5		
Polysorbate 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	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	
		AV	67.1	1.1
		A	48.3	
		B	46.0	
		C	–	
Polysorbate 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	65.0–69.5%	D	47.2	
		E	48.1	
		AV	47.4	1.1
		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

- Frisón-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, Stücher 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.

- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Available: http://www.fao.org/ag/agn/jecfa/archive_en.stm. Accessed 20 November 2006.
- Koike R, Jo S, Azuma M, Wakisaka T. 2004a. Precise and rapid determination of anionic and cationic surfactants by ^1H nuclear magnetic resonance using an internal standard. *Bunseki Kagaku* (The Japan Society for Analytical Chemistry) 53:1125–1131.
- Koike R, Jo S, Azuma M, Wakisaka T. 2004b. Precise and rapid determination of amphoteric and nonionic surfactants by ^1H nuclear magnetic resonance using an internal standard. *Bunseki Kagaku* (The Japan Society for Analytical Chemistry) 53:1133–1138.
- Koike R, Jo S, Azuma M, Wakisaka T. 2005. Precise and simultaneous determination of surfactants by ^1H nuclear magnetic resonance using an internal standard. *Bunseki Kagaku* (The Japan Society for Analytical Chemistry) 54:715–722.
- Paula GF. 2001. qNMR—a versatile concept for the validation of natural product reference compounds. *Phytochemical Analysis* 12:28–42.
- Paula GF, Jake BU, Lankin DC. 2005. Quantitative ^1H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis. *Journal of Natural Products* 68:133–149.
- Saito T, Ihara T, Sato H, Jancke H, Kinugasa S. 2003. International comparison on the determination of an ethanol aqueous solution by ^1H nuclear magnetic resonance. *Bunseki Kagaku* (The Japan Society for Analytical Chemistry) 52:1029–1036.
- Saito T, Nakaie S, Kinoshita M, Ihara T, Kinugasa S, Nomura A, Maeda T. 2004. Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia* 41:213–218.
- Stefanova R, Rankoff D, Panayotova S, Spasov SL. 1988. Quantitative proton NMR determination of linoleic acid mono- and diester of polyethyleneglycols via reaction with trichloroacetyl isocyanate. *Journal of American Oil Chemists' Society* 65:1516–1518.
- Vu Dang HV, Gray AI, Watson D, Bates CD, Scholes P, Gillian GM. 2006. Composition analysis of two batches of polysorbate 60 using MS and NMR techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40:1155–1165.
- Wells RJ, Hook JM, Al-Deen TS, Hibbert DB. 2002. Quantitative nuclear magnetic resonance (QNMR) spectroscopy for assessing the purity of technical grade agrochemicals: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and sodium 2,2-dichloropropionate (dalapon sodium). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3366–3374.

The interaction of sorbic acid with amino acid may alter the quality of processed foods somewhere in the food chain from production to table

(Received October 11, 2006)

(Accepted February 19, 2007)

Takanori Mine, Yasuyo Okada, Masanori Semma

School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University

Abstract

Foodstuffs are exposed to transient or repeating high temperature in manufacturing and distributing processes. It will be important to establish a simulation method for estimation of the effect of high temperature on the interaction between food additives and food constituents.

The interaction in a solution of sorbic acid widely used as a preservative with amino acids was examined by the momentary heating using an electric oven (microwave heater) or the standing at room temperature. Residual sorbic acid in the reaction mixture was determined by HPLC with UV detection at 254 nm.

Cysteine was most reactive with sorbic acid among 9 amino acids tested in the present study. The sorbic acid in the mixed solution with cysteine decreased in time- and dose-dependent manner of coexisting cysteine under the standing at room temperature.

However, the decrease of sorbic acid in the mixture with cysteine was strongly inhibited by previous momentary heating by microwave irradiation to the solution. The effect of the momentary heating was suspected to be preferentially on cysteine side in the mixed solution.

Key words: sorbic acid; amino acid; cysteine; microwave irradiation; food additive

I. Introduction

Foodstuffs temporarily suffer from transient and/or repeating high temperature exposures in sterilizing process, distributing stage or cooking. It will be significant to establish the simulation method for a short period of time on the quality change of a food additive itself or the interaction between food additives and food constituents by high temperature exposures. The residual sorbic acid (SOA) under the momentary heating using an electric oven (microwave heater) and the standing at room temperature was examined on transient or repeating high temperature exposures between SOA and amino acids. SOA is widely used as a preservative in many processed foods such as cheese, fish meat pastes, smoked products, bean jams, pickles, fruit wines, lactic acid drinks and so on, and amino acids are most common food constituents.

SOA is stable in dry powder or crystal state for a long period at room temperature¹⁾. However, SOA has been shown to develop auto-oxidation in solution or in foods during storage and liber-

ated several carbonyl compounds etc¹⁾. Wedzicha et al.²⁾ and Khandelwal et al.³⁾ also reported that SOA reacted gently with thiols or cysteine (Cys) in aqueous solution at 80°C, pH 3.7-5.7 forming labile adducts or 3-hexenoic acid derivative susceptible to hydrolysis. The reactivities of SOA with sulfhydryl groups in proteins and with amines as well as interaction of SOA with anti-oxidizing agents, transition metals, salts, sugars, glycerol, ascorbic acid, nitrous acid etc were reviewed by Scotter et al.⁴⁾. In the present study, we investigated the interaction of widely used reactive substance SOA with amino acids, with respect to the quality change of a food additive on the function of high temperature in the presence of common food constituents.

II. Materials and Methods

1. Electric oven (Microwave heater)

The fixed irradiation type "Imaflex MO-0341" (Imanishi-

kinzoku industry Co. Ltd.) was used.

voltage: 100 V, high frequency output: 400 W, oscillating frequency: 2450 MHz, rating power consumption: 800 W, and Size of the heating chamber : width 245 mm, depth 247 mm and height 168 mm.

Microwave irradiation starts readily by closing the oven door after setting the irradiation time and putting a sample bottle on a plate. The irradiation finishes immediately by pushing a stop button. If a stop watch is used, the irradiation control of a second unit will be possible.

2. Reagents

SOA (Wako Pure Chemicals Industry: guaranteed grade), L-Amino acids: glycine (Gly), alanine (Ala), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), serine (Ser), tryptophane (Try), cysteine hydrochloride/monohydrate (Cys) and methionine (Met) (MP Biomedicals, LLC), Methanol (Wako Pure Chemicals Industry: liquid chromatography grade), Phosphoric acid (Wako Pure Chemicals Industry: guaranteed grade), the ultra pure water prepared in the laboratory was used as purified water.

3. Preparation of standard solutions and combined solutions

SOA standard solution [1,000 μ g/mL]

100 mg of SOA was dissolved in 10 mL of methanol, filling up to 100 mL with purified water.

Amino acid standard solution [1,000 μ g/mL]

Each amino acid standard solution was prepared with purified water to the same concentration of 1,000 μ g/mL

Combined solutions of SOA [100 μ g/mL] and Cys [100 μ g/mL] or each amino acid [1,000 μ g/mL]

Combined solutions of SOA and Cys were adjusted to contain 100 μ g/mL of SOA and Cys. Similarly, adjusted to contain 100 μ g/mL of SOA and 1,000 μ g/mL of each amino acid.

4. High performance liquid chromatograph with a UV detector

- Pump: Shimadzu Corporation, LC-9A
- UV Detector: Shimadzu Corporation, SPD-6A
- Data processor: Shimadzu Corporation, C-R6A Chromatopak integrator
- Column oven: Chromato Science Co. Ltd., CS-300B
- Column: JASCO Corporation, Crest Pack C18S (5 μ m) 4.6 mm I.D. \times 15 cm
- Mobile phase: 50 % (v/v) Aqueous methanol contained 0.05 % (v/v) phosphoric acid
- Flow rate: 0.5 mL/min.
- Detection wave length: 254 nm
- Column oven temperature: 30°C
- Injection volume: 10 μ L

5. Momentary heating

Heating by the electric oven was performed for 3 mL of purified water or test solutions poured in a brown hard-glass bottle (inner volume: 15 mL, outer diameter: 22 mm, height: 50 mm). Test solutions were allowed to stand in the dark at room temperature either just after the microwave irradiation for 30 seconds or without the microwave irradiation. The residual SOA of both test solutions were determined by HPLC by means of the calibration curve obtained by linearly diluted SOA standard solution.

III. Results and Discussion

1. Momentary heating of the solution by microwave

Fig. 1. shows the temperature of the purified water in the bottle immediately after microwave irradiation for 10 to 35 seconds in the electric oven.

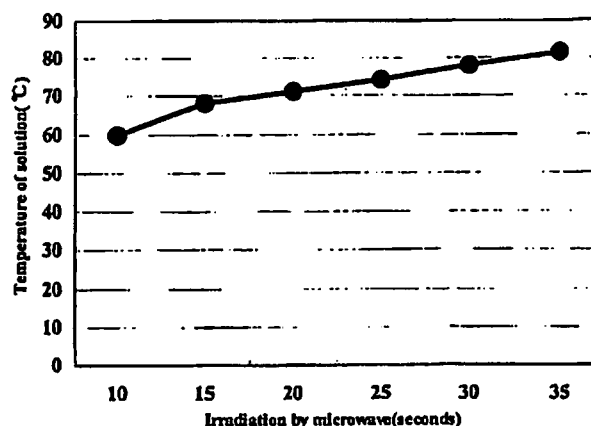


Fig. 1. Momentary heating of the solution by microwave
Each circle represents the mean value of three trials.

The temperature of the water raised from 24°C to 82°C in 35 seconds. Since the concentration by evaporation of the solution in a bottle was suspected over 80°C, the irradiation time was fixed to 30 seconds.

2. Residual SOA in the amino acid combined solutions

Table 1. summarizes the residual percent of SOA in the combined solution of SOA and each amino acid kept in the dark at room temperature for 3 weeks without the microwave irradiation.

As shown in Table 1. the residual SOA was the lowest in the combination with Cys among the nine amino acids tested in the present experiment. Therefore, subsequent experiments were carried out for the combination of SOA and Cys.

Table 1. Residual sorbic acid (%) in the mixed solution of sorbic acid and each amino acid

mixed solution	after 3weeks	CV% (n=3)
SOA	99.9	0.26
SOA+Gly	95.5	1.00
SOA+Ala	95.3	0.92
SOA+Val	98.7	0.06
SOA+Leu	97.0	0.88
SOA+Ile	97.9	0.36
SOA+Ser	93.7	1.60
SOA+Try	101.3	0.10
SOA+Cys	43.0	2.33
SOA+Met	98.0	0.26

Residual sorbic acid (%) is the sorbic acid concentration that remains in the mixed solution after three weeks as 100% at the preparation. The mixed solution contains 100 μ g/mL of SOA and 1,000 μ g/mL of each amino acid and the pH of these solutions is as follows: SOA(pH3.85), SOA+Gly(pH4.11), SOA+Ala(pH4.09), SOA+Val(pH4.06), SOA+Leu(pH4.08), SOA+Ile(pH4.08), SOA+Ser(pH4.08), SOA+Try(pH4.05), SOA+Cys(pH2.42), SOA+Met(pH4.03). After three weeks, SOA in the solution was analyzed by HPLC.

3. Residual SOA in the Cys combined solution standing at room temperature

Fig. 2. indicates that SOA decreased in time dependent manner about the all of samples.

Furthermore, the decreasing of SOA was suggested to be depending on the dose of coexisting Cys. With respect to the concentration ratio of SOA to Cys was 1:1 for the sample (A) or (C), and 1:10 for the sample (B) or (D) respectively.

Interestingly, this time- and Cys dose-dependent decrease of the SOA was delayed by the previous microwave irradiation for 30 seconds (C and D).

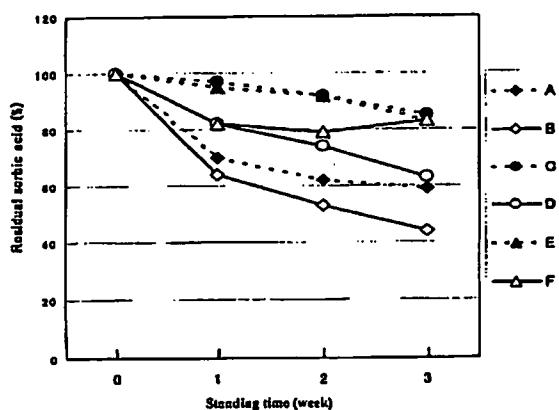


Fig. 2. Residual sorbic acid (%) under cysteine coexistence. Each symbol represents the single analysis value. The mixed solutions of SOA 100 μ g/mL and Cys 100 μ g/mL are A, C and E. The mixed solution of SOA 100 μ g/mL and Cys 1,000 μ g/mL are B, D and F. A and B were kept at room temperature after preparation. C and D were on standing at room temperature after the momentary heating. E and F were adjusted to contain the above concentration of SOA and Cys, where Cys solutions were momentary heated immediately before preparation of the mixed solutions.

4. Effect of the momentary heating on the residual SOA

The effect of momentary microwave heating on the delay of decrease of SOA in combined solution with Cys was examined by reconstruction of the solution for combination of SOA and Cys. Cys solution was irradiated by microwave for 30 seconds immediately before mixing with SOA solution. The mixed solution was adjusted to attain the same concentrations of the reagents to the sample (A) and (B). Thus, sample (E) and (F) were kept in the dark at room temperature. As shown in Fig. 2, both (E) and (F) samples maintained SOA more than 80% after 3 weeks.

In the present study, it was indicated that SOA in aqueous solution could interact with Cys in the form of changing the chemical structure which occurred at room temperature in time- and Cys dose-dependent manner detectable by HPLC. Previous momentary heating of the mixed solution by microwave irradiation could hinder the interaction. The microwave irradiation might affect preferentially on Cys rather than on SOA.

The interaction of food additives with food constituents leading to structural changes in both components should be considered carefully as to the sufficient function of the additives and safety of the foods. The structural change of SOA as a result of the interaction with Cys was suspected to be reflecting either decomposition of SOA or formation of other substances in the solution. Both of the structural changes would spoil the function of SOA in foods containing Cys. On the other hand, it was found that momentary heating by microwave could control the interaction of SOA and Cys in the solution. Details of the interaction and mechanisms of the control are being investigated.

IV. References

- 1) Thakur, B.R., Singh, R.K. and Arya, S.S.: Chemistry of sorbate a basic perspective. *Food Reviews Intern.*, 10(1), 71-91(1994)
- 2) Wedzicha, B.L., Brook, M.A.: Reaction of acid with nucleophiles: preliminary studies. *Food Chem.*, 31, 29-40(1989)
- 3) Khandelwal, G.D., Wedzicha, B.L.: Derivatives of sorbic acid-thiol adducts. *Food Chem.*, 37, 159-169(1990)
- 4) Scotter, M.J., Castle, L.: Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. *Food Add. - Contam.*, 21(2), 93-124(2004)

Acknowledgments

This work was supported by a Grant for Scientific Research Expense for Health, Labor and Welfare Programs from the Japanese Government.

ノ ー ト

食品の製造から流通までの品質変化を想定したソルビン酸とアミノ酸の反応
—電子レンジでの瞬間加熱と室温放置との消長比較—

(2006年10月11日受付)

(2007年2月19日受理)

峯孝則、岡田安代、扇間昌規

武庫川女子大学薬学部

キーワード: ソルビン酸、アミノ酸、システイン、電子レンジ加熱、食品添加物

概 要

食品はその製造から流通過程あるいは調理において、一過性あるいは繰り返しの高温曝露を受ける場合があり、高温曝露により食品添加物自体の化学変化や食品添加物と他の食品成分との相互作用が起こり得る。今回、電子レンジ(マイクロ波加熱器)を用いた瞬間加熱と室温放置での成分間の相互作用について、食品添加物として広く使われるソルビン酸と食品成分として最も普遍的な成分の一つであるアミノ酸について検討した。

供試した9種類のアミノ酸の中で、ソルビン酸との相互作用が最も顕著であったのはシステインであった。そこでソルビン酸とシステインの瞬間加熱と室温放置とを比較したところ、ソルビン酸の残存率は瞬間加熱のほうが高かった。このことから、加熱によりシステイン自体が優先的に化学変化を引き起こしているものと推察され、ソルビン酸による食品中での保存効果を十分発揮させるためには、添加方法も考慮する必要があることが示唆された。

平成 19 年度

食品香料化合物の自主規格の作成に関わる
調査研究

平成 20 年 3 月

機 関 名 日本香料工業会

研究者名 長谷川 徳二郎

目 次

研究要旨	1
はじめに	3
A. 研究目的	5
B. 研究方法	5
C. 研究結果および考察	6
1. 研究計画の見直し	6
2. 規格再調査	8
3. 日本香料工業会自主規格作成指針の見直し	9
4. 産総研とのスペクトルデータに関する共同研究	12
5. 自主規格検討	12
6. 今後の課題	12
7. 昨年度設定した自主規格の訂正	14
D. 結論	14
おわりに	15
E. 健康危機管理情報	17
参考文献リスト	18
添付資料	

平成 19 年度厚生労働科学委託研究

「食品香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究」

研究要旨

食品香料化合物は、現在、世界的に約 4,500 化合物が使用され、我が国ではこのうちの約 3,000 化合物を使用している。一方これらの化合物についての規格は我が国での食品衛生法施行規則別表第一に個別指定されている 93 品目を除けば、商取引用として米国 FCC に収載されている約 450 化合物、安全性評価化合物同定用として約 1,600 化合物の JECFA 規格がある。しかしながら JECFA 規格は市場流通品を必ずしも反映したものとは言えず、また測定値のみで規格化されてしまっているものもあることも分かっている。

日本香料工業会では平成 16 年度より国内において流通している食品香料化合物の実態を取りまとめ、国内外に積極的に情報公開することを目的に、厚生労働科学研究において香料化合物の自主規格作成に関する調査研究を進めてきた。

平成 16 年度の研究では、食品香料化合物に相応しい規格のあり方について調査研究した結果、個別食品香料化合物に必要とされる規格項目選定を判断樹により行う方式が最も望ましいと結論した。平成 17 年度、18 年度は、平成 14 年に実施した使用量実態調査において得られた規格情報を基に、年間使用量 10kg 以上の化合物の規格設定について調査研究した。ここでは各規格項目に対する設定基準を示した「自主規格作成指針」を取り決め、平成 16 年度の研究で作成した判断樹で選定される項目に対して、その指針に基づいた設定を行う方法が適当であると結論した。結果、342 品目の化合物について流通実態に基づいた自主規格を取りまとめた。

しかし、昨年までの検討から、平成 14 年の調査データでは自主規格設定に十分な情報が得られない品目や、作成した指針では画一的に規格を設定することが困難な品目が少なからず存在することも分かってきた。すなわち、含量が低く、表示名以外の成分情報もないため、名称から内容・組成を特定できない品目、判断樹から要求される規格値が欠落している品目、比重・屈折率規格値幅が自主規格作成指針の基準に比べ著しく大きい品目、確認試験の参照スペクトルデータが存在しない品目などである。

そこで、最新の規格データ収集と品目に関する詳細情報を集めるために、会社ごとに調査対象品目を抽出して規格再調査を行った。また、平成 18 年度使用量実態調査において使用実態のある食品香料化合物品目数は平成 14 年度の約 2,800 から 2,164 に減少しており、最新の使用実態に基づいた規格設定という観点から、本年度より検討対象としてこの 2,164

品目を優先し、これらに対して再調査を実施した。

その結果、多くの品目について、より詳細なデータを得ることができた。これを基に実態に即してより多くの品目に対する規格設定をするため自主規格作成指針の見直しを行い、異性体を有する化合物の含量規定、酸価、比重・屈折率規格値幅について、指針の見直しを行った。異性体を有する化合物の含量規定については再調査結果から表示名以外の成分についての情報が得られた化合物については、「異性体合算」でも含量規格とすることとした。酸価については該当化合物類の流通データ酸価設定値の分布状況を詳しく解析し、酸価未設定の化合物に限って、エステル類、アセタール類には「酸価 1 以下」、アルデヒド類、ラクトン類には「酸価 10 以下」の日本香料工業会暫定酸価を与えることとした。比重や屈折率規格値幅についても再調査で確実なデータが得られたため、幅が広い実態が確認されたものについては、実態を反映させた規格設定を行うこととした。

確認試験の参照スペクトルデータが存在しない品目については、平成 18 年より独立行政法人産業技術総合研究所と共同研究を行い、スペクトルの測定とデータの公開を進めている。平成 20 年 2 月現在 51 品目の共同研究結果が公開されるに至った。

上記のように問題点の分析、再調査の実施、自主規格作成指針の見直しを行い、本年度は 552 化合物について規格化を検討し、370 化合物に自主規格を設定した。

はじめに

これまでに日本香料工業会では食品香料化合物の国際的整合化を目指し、厚生科学研究および厚生労働科学委託研究を通じて様々な研究を行ってきた。食品香料化合物の規格については平成5年度より以下の経緯のもとに、一連の調査研究を行った。

平成5年度では、当時の食品添加物公定書収載78品目の香料化合物の規格について、JECFA、FCCおよび日本薬局方収載の規格との比較研究を行った。この調査研究では、規格項目や規格内容についてはFCCとおおむね整合性が取れていることを報告した¹⁾。

平成10年度では、JECFA Compendium Addendum 5までに収載されている日本の食品衛生法において「香料」に属する211品目の使用実態を調査し、中でも汎用性の高い28品目の実測値とJECFA規格との比較を行った。この調査研究では、アルデヒド類やジケトン類の様に経時変化を受けやすいもの等を除けば、大部分の香料化合物の実測値はJECFA規格内にあることが分かり報告した²⁾。

平成13年度では、米国(FDA、FEMA、FCC)、欧州(EU)および国際機関(JECFA)の規格への考え方に関して比較調査を行った。この研究では、欧州および米国での規格は規制目的ではなく、主として商業取引の目的で設定されたものであり、香料の安全性はGMP基準の遵守により十分確保できるという考え方であることを報告した³⁾。

平成14年度および平成15年度の研究では、食品香料化合物のほとんど(食品添加物公定書第7版に収載の78品目以外)に公的規格がない現状の下で、わが国で実際に使用している食品香料化合物の使用量および規格の実態について調査した。この調査研究では、使用量の多い食品香料化合物には規格が設定されていたが、使用量の少ない食品香料化合物の多くには規格が定められていなかったこと、また、規格が設定されている食品香料化合物であっても規格項目について確認試験、含量、純度試験(屈折率・比重・酸価・沸点・溶状)など、食品添加物公定書第7版収載(当時)の食品香料化合物に設定されている試験項目を全て満たしているものがほとんどないことを報告した^{4)、5)}。

平成16年度では、日本において流通使用している食品香料化合物の参考規格設定に当たり、食品香料化合物に適用する規格項目について検討を行い、化合物の物性、構造から必要な項目を選別できる判断樹を提案した⁶⁾。

平成17年度では、平成14年度に実施した食品香料化合物使用量および規格実態調査データの中から、使用量上位245品目の具体的規格内容について調査研究した。平成16年度の研究で作成した判断樹を使用して個別化合物に必要な規格項目を選定すると同時に各規格項目の「自主規格作成指針」を作り129品目の化合物について流通実態に基づいた自主規格を取りまとめた。なお、規格設定に当たり問題があり平成17年度で規格設定できなかった116品目については、次年度での調査研究で検討することとした⁷⁾。

平成18年度では、平成17年度の研究で規格を設定することができなかった116品目に

加えて、年間使用量が10kg以上の308品目の合計424化合物について規格化の調査研究を行った。自主規格作成指針の要求する項目に対し平成14年度調査では質問が不足していた部分について再調査を行い、この再調査結果を基に指針の見直しを行いながら自主規格内容について調査研究を行った。その結果、213品目に流通実態に基づいた自主規格を取りまとめることができたが、新たに解決すべきいくつかの課題が考察された⁸⁾。

本年度は、平成18年度において保留とした化合物に加えて、年間使用量10kg未満の化合物を対象とした。検討に当たっては平成18年度の使用量実態調査⁹⁾において使用実態のあった2,164品目を優先して規格情報の再調査を行うとともに、この調査結果を基に自主規格作成指針の見直しを行うこととした。

【本報告書で引用した略語および用語】

EU : European Union 欧州連合

FCC : Food Chemicals Codex 米国食品化学物質規格集
米国において FCC は法的な強制力のある規格集ではなく、自主規格として利用されており、また使用できる香料化合物がすべて掲載されているものではない

FDA : Food and Drug Administration 米国食品医薬品局

FEMA : Flavor and Extract Manufacturers' Association of the United States
米国食品香料工業会

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会

JFFMA : Japan Flavor and Fragrance Materials Association
日本香料工業会

公定書：食品添加物公定書

産総研：独立行政法人産業技術総合研究所

A. 研究目的

国際的に利用されている食品香料化合物は最近の調査によれば約 4,500 品目であり、我が国では平成 18 年度の厚生労働科学研究での調査によると 2,164 品目の使用実績がある。

これら食品香料化合物の流通実態を踏まえた規格が設定されているのは、国際的にみても我が国の食品衛生法施行規則別表第一に個別指定されている 93 品目と FCC 収載の 454 品目のみである。

本研究では、食品香料化合物の規格を数多く整備し一般公開することを目的とする。このことは、食品添加物に対する安全性が叫ばれている今日において香料の安全性を裏付けるものとして大きな役割を果たすばかりでなく商取引上にも役立つものと思われる。

B. 研究方法

本研究では、平成 18 年度の研究で規格を設定できなかった品目および年間使用量 10kg 未満の品目について規格化の検討を行った。

規格化の検討手順は以下の通りである。

1. 研究計画の見直し
 - 1) 規格化における問題点の解析と対策
 - 2) 検討品目の優先順位の見直し
 - 3) 研究スケジュールの見直し
2. 規格再調査
 - 1) 調査方法の検討
 - 2) 調査の実施と結果
3. 日本香料工業会自主規格作成指針の見直し
4. 産総研とのスペクトルデータに関する共同研究
5. 自主規格検討
6. 今後の課題

C. 研究結果および考察

1. 研究計画の見直し

平成 17 年度の厚生労働科学研究から、これまで平成 14 年度調査で得られた規格情報を基に食品香料化合物に対し自主規格の設定を検討してきたが、設定できた品目数は当初の予定を大幅に下回り、342 品目にとどまっている。このままでは本厚生労働科学研究の 6 年間で、すべての食品香料に規格を設定するのは困難であることが予測された。一方、平成 18 年度の使用量実態調査では、使用実態のある香料化合物品目数は 2,164 で、平成 14 年度調査での約 2,800 から減少しており、検討対象品目の見直しも必要と考えられた。そこで残る 3 ヶ年で実用性のある規格集を作成するため以下のように研究計画の見直しを行った。

1) 規格化における問題点の解析と対策

平成 18 年度の研究結果における諸問題の検討から、次の①～⑥のような問題点が未解決であり、それらの検討に時間を要していることが分かっている。

そこで昨年度までの課題に対し、以下のように対応することとした。

①低含量、表示名以外の成分情報もなく、名称から内容・組成を特定できない品目について

昨年度までの検討において、含量が低い品目として天然原料由来の品目（テルペン系化合物・脂肪酸類）、および未反応原料や幾何異性体など合成過程における副生成物の混在が避けられない品目が存在した。これらの品目は、表示名以外の成分情報がないため同一の名称であっても、合成原料、合成方法、精製の程度によりさまざまな組成を持つ可能性があり、現在の自主規格作成指針では含量、確認試験を規定することができなかった。

そこで、これらの化合物に関しては表示名以外の成分情報の記述など組成の定義を検討する必要があると考え、これらの情報を得るために規格を再調査する必要があると結論した。

再調査によっても組成の特定できない品目については、現時点においてそれらに対する対応方針が決定されていないため、検討の優先順位を下げることとした。

②規格流通実態からは判断樹で要求される規格値が得られない品目について

平成 14 年度の規格データにおいては、比重や屈折率の測定温度が不明、旋光度と比旋光度の区別および融点と凝固点の区別が不明瞭、エステル類やアルデヒド類において判断樹で要求される酸価の規格情報がないなどにより、自主規格の設定が困難な品目があった。

そこで、これらの情報を得るために規格を再調査する必要があると結論した。また、調査においては質問の仕方や回答方法を工夫することで、より正確な情報を求めるこ

ととした。

③流通実態に複数の規格が存在し、どの規格を採用するかの根拠が得られない品目について

平成 14 年度の規格データにおいて表示名が同じであるにも関わらず、規格幅の中心値が大きくずれている規格が存在し、自主規格を設定するのが困難な品目があった。

そこで、これらの規格情報に誤りがないかを確認するため、規格の再調査を行うこととした。

④流通実態が JECFA 等他の規格と異なっている品目について

これまで自主規格設定の妥当性を確認するため、JECFA や FCC の国際規格がある場合は、それらとの整合性も加味してきた。しかし、測定条件の違いを考慮してもこれらの規格と整合性が取れない場合があったことで保留扱いとしてきた品目がある。これらの品目については平成 14 年度調査の規格データに誤りがないかを確認するため、規格の再調査を行うこととした。

⑤流通実態の規格値幅が自主規格作成指針の基準に比べ著しく大きい品目について

昨年度までの検討では規格値の幅についても自主規格作成指針を作り、規格化を行ってきた。しかし流通している規格の中には指針の幅に合わないものがある。昨年度までは比重や屈折率の規格において指針の幅より 0.002 程度広いものについては許容していたが、それより規格幅が広い場合は、自主規格を設定せずに保留扱いとしてきた。

本年度の検討においては、自主規格が流通実態を反映させることに主眼をおき、規格の再調査から流通規格幅の広いことが確認できた場合は、流通規格を採用し規格設定することとした。

⑥確認試験として、参照スペクトルデータが存在しない品目について

これらの化合物については、昨年度に引き続き産総研との共同研究によりスペクトルデータの公開を進めることとした。昨年度の検討で課題となっていた複数成分から構成される品目については、別途検討することとした。

2) 検討品目の優先順位の見直し

平成 18 年度の使用量実態調査から、食品香料化合物の使用量および使用品目に変化が見られた。平成 14 年度に使用が報告されていた約 2,800 品のうち平成 18 年度も使用されていた品目は 1,822 品に減少した。また、平成 14 年度調査では使用されていなかった 256 品目の新たな使用が報告された。

そこで、最新の使用実態に即した自主規格を設定することに主眼をおき、対象品目を平成 14 年度の使用品目から、平成 18 年度の使用品目へ変更することとした。

なお、規格検討の優先順位はこれまでの経緯を考慮し、平成 14 年度の使用量の多い順とした。以下、文章中の使用量順位とは平成 14 年度の順位を示す。

3) 研究スケジュールの見直し

これまでの確定品目は342品であり、今後優先して検討を要する品目は1,700余品である。これらを3年で検討終了するためには、1年間あたり約600品目について検討しなければならないこととなる。

しかし、昨年までの検討から、平成14年の調査データでは自主規格設定に十分な情報が得られていない品目や、作成した指針では画一的に規格を設定することが困難な品目が少なからず存在することも分かっている。すなわち、含量が低く、表示名以外の成分情報もないため、名称から内容・組成を特定できない品目、判断樹から要求される規格値が欠落している品目、比重・屈折率規格値幅が自主規格作成指針の基準に比べ著しく大きい品目、確認試験の参照スペクトルデータが存在しない品目などである。

そこで、詳細で確実なデータを得るために、今後検討する品目すべてに対して、より具体的な再調査を実施することとした。しかし、回答者の負担を軽減するため、2回に分けて実施することとし、以下のような研究スケジュールを設定した。

- ・平成19年度：使用量順位1,159位までの約700品目の規格情報収集と規格検討
- ・平成20年度：使用量順位1,160位以降の約750品目および平成18年度使用量実態調査で新たに使用が確認された品目の規格情報収集と規格検討
- ・平成21年度：保留品目に関する規格設定

なお、各年度につき200品目以上に規格設定することを目標とした。

2. 規格再調査

1) 調査方法の検討

平成14年度の調査では、調査対象となる全品目を記載した質問表を使用していた。この方式では、回答者の負担が多いのみならず、記入のなかった品目に関する「使用実態なし」と「記入漏れ」の区別ができない問題点があった。このため、本年度の調査では、会社ごとに平成18年度使用量実態調査に基づき、調査対象品目を抽出した質問表を使用することとした。

また、昨年度に規格を設定しないことに決定した項目（ヒ素、乾燥減量、強熱残分、溶状）は質問項目から除くこととした。

単位・測定条件（温度等）については、リストから選択し入力するプルダウン形式を採用した。融点・凝固点、旋光度・比旋光度など混同しやすい項目は記入欄を明確に分けることなどの対策を講じた。さらに構成成分の情報を得るため、表示名以外の成分が含まれる場合には、その化合物名と含量に関する情報の記入欄も設けた。

以下、調査に提示した質問表の記入例と記入時の入力注意事項を示した。