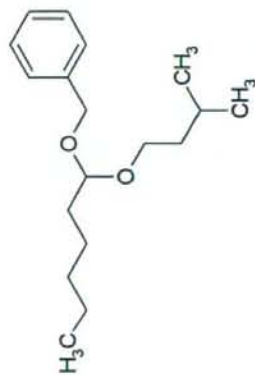
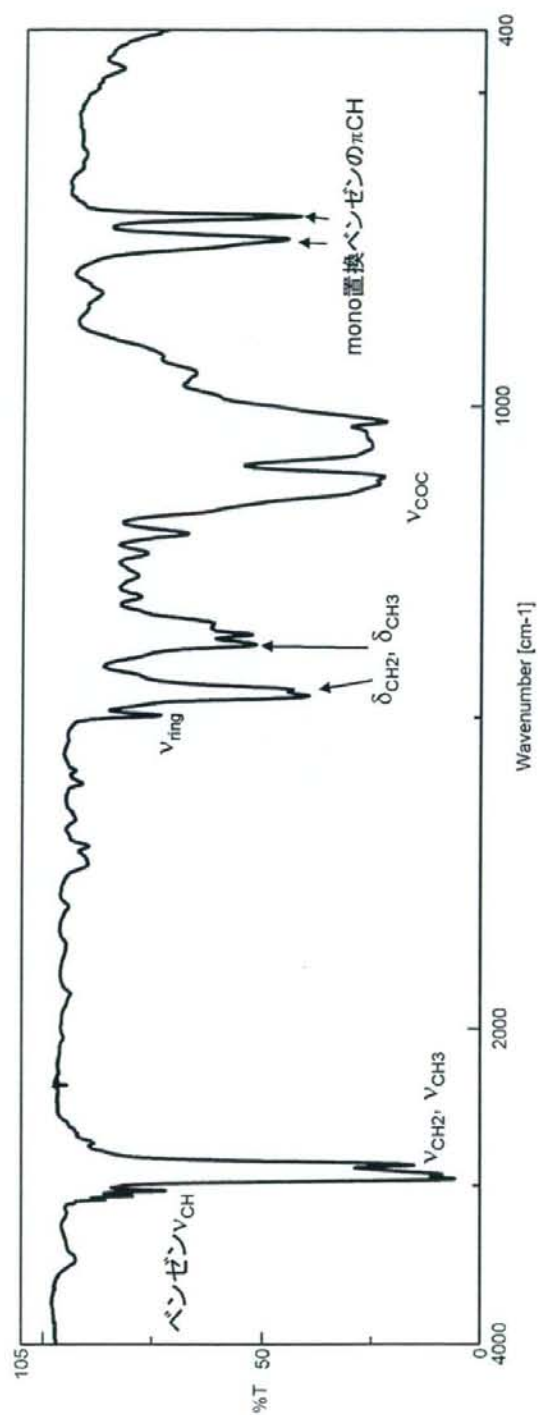


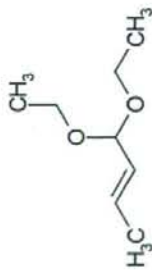
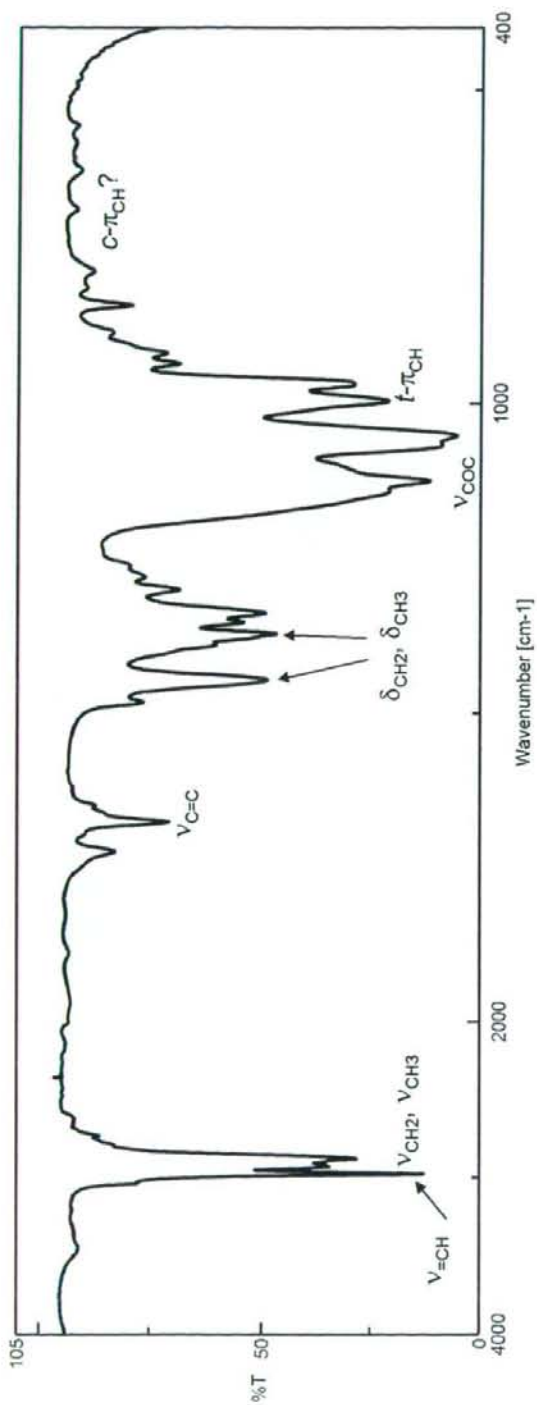
hexanal benzyl hexyl acetal (純度53.8%)
 不純物: hexanal dihexyl acetal (26.3%),
 hexanal dibenzyl acetal (17.4%)

図28. hexanal benzyl hexyl acetal



hexanal benzyl isoamyl acetal (純度60.9%)
 不純物: hexanal diisoamyl acetal (24.6%),
 hexanal dibenzyl acetal (7.9%)

図29. hexanal benzyl isoamyl acetal



2-butenediethyl acetal (純度96.5%(cis-, trans-合算))
 cis-, trans- : 8.3%, 88.2%

図30. 2-butenediethyl acetal

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究
平成20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
-¹H核磁気共鳴法による食用合成赤色素の絶対定量-

研究分担者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長
研究協力者 多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官
研究協力者 建部 千絵 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

第8版食品添加物公定書において、食用合成色素(タール色素)の定量法として、TiCl₃法、質量法、または吸光度法が用いられているが、多くのタール色素に用いられているTiCl₃法は装置が複雑で且つ操作も煩雑な滴定法であり、終点の見極めが難しい等の問題も多い。公定法の代替法としては、HPLC法が候補として考えられるが、純度既知の定量用標準品が存在しないため、現状では利用できない。そこで我々はこの問題を抜本的に解消するために、あらゆる有機化合物の絶対定量法として、NMRを用いた新規定量法(quantitative NMR: 以下qNMR)の開発を行った。本研究では、qNMRを用いて合成赤色素を絶対定量し、公定法と比較し、その有効性および妥当性について検証した。

A. 研究目的

食用合成色素：タール色素およびタール色素アルミニウムレーキ（以下、タール色素等と略す）の製品検査は、平成16年2月より登録検査機関に移行された。製品検査は複数の登録検査機関において行われるため、判定結果に機関差が生じないよう試験法の見直し、適切な分析法の設定を今後検討する必要がある。定量法としては、16種類のタール色素等で三塩化チタン(TiCl₃)法、3種類で重量法、1種類で吸光度測定法が用いられているが、多くのタール色素等に用いられているTiCl₃法は煩雑で、終点の見極めが難しいなど問題点が多い。

TiCl₃法の代替法として、吸光度測定法またはクロマトグラフ法が候補として考えられる。しかし、吸光度測定法ではTiCl₃法の結果とほぼ等しい結果を与えるものの、不純物が混入していたとしてもそれを判別できない。また、クロマトグラフ法

では、分析値の信頼性の確保のために測定対象物の検量線作成用標準品が不可欠である。しかし、食用合成色素、すべての標準品の供給体制を整え続けることは現実的に不可能である。さらに、たとえ標準品が供給できたとしても、供給者が独自に純度を値付けしたものであり、国際単位系(SI)に基づく計量トレーサビリティを確保できない。また、標準品の安定性は物質毎に異なり、保存期間や保存状態によっては分解し純度が低下していく可能性もあり、たとえ同一の標準品を用いたとしても室間誤差を与えるなど、結果として、分析値の信頼性の低下を引き起こすと考えられる。したがって、分析精度の更なる向上のために、有機化合物の純度を計量学的に正確に測定する方法が必要とされている。

SIに基づく計量学的な分析法を一次標準測定法といい、本法は一次標準直接法と一次標準比率法に分類される。一次標準直接法は、「物質量の

基準となる他の化学物質を用いずに、自分自身で目的の化学物質の物質量を測れる方法(絶対測定法)であり、電量分析法、重量分析法及び凝固点降下法がある。一方、一次標準比率法は、「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」であり、すでに実用化されているものに滴定法及び同位体希釈質量分析法がある。これらの方法は、一般に分析の迅速性に欠け、また分析できる物質の種類に制限がある。そこで我々は、簡便且つ応用範囲の広い分析法または校正法として、一次標準比率法の資格を原理的に有する核磁気共鳴に基づく定量分析法(quantitative NMR (qNMR))の開発を行っている。qNMRでは、純度値が明らかな他の化合物を基準物質(内標準)として測定対象の有機化合物の純度を求めることが可能な方法である。すなわち、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上に観察される異なる化合物のシグナル強度の比は化合物のモル比に対応することから、一方の化合物の純度が明らかであれば、得られたモル比と溶液の調製値の関係から測定対象の化合物の純度(あるいは濃度)を決定できる。測定対象化合物の標準品を参照せずに純度値を決定できる点で従来法より優れている。

昨年度は、香料ピラジン類の絶対定量法としてqNMRが有効であることを報告した。今年度は、qNMRによる定量値のSIトレーサビリティの確保およびその利便性の拡張について検討すると共に、市販合成赤色素の純度決定に応用した。さらに、公定法とqNMRによる結果を比較し、分析値の妥当性を検証するとともに、qNMRが従来法に代わる迅速且つ簡便な定量法として有効であり、計量学的にも従来法に比べ信頼性の高い結果が得られ、今後の公定法の設定においても有効な手段の一つと成り得ると考えられたので報告する。

B. 研究方法

1) 試料

試料として食品添加物用合成赤色素市販品、食用赤色2号(R2)、食用赤色3号(R3)、食用赤色102号(R102)、食用赤色104号(R104)、食用赤色105号(R105)、食用赤色106号(R106)を用いた(Fig. 1)。

高純度フタル酸水素カリウム(認証標準物(CRM 3001a):純度 $100.00 \pm 0.027\%$)(PHP)は(独)産業技術総合研究所製を用いた。なお、PHPは、添付の使用法に従い、軽く砕いた後、用時 120°C で約1時間加熱乾燥し、デシケーター中で放冷後、使用した。

水溶性qNMR基準物質として高純度DSS- d_6 (和光純薬特注品)を用いた。

qNMR測定用重溶媒として重水(D_2O)(Isotec製)を用いた。

2) 装置

核磁気共鳴装置(NMR): オートサンプラー付きJNM-ECA600 (600 MHz)(日本電子(株)製)。qNMRのケミカルシフト値は、DSS- d_6 を基準シグナル(0 ppm)とし、 δ 値をppm単位で表した。

3) 実験方法

3-1) TiCl_3 法 (for R2, R102, R106)

第8版食品添加物公定書の一般試験法のタール色試験法およびタール色素等の各条に従い測定した。各試料につき3試行し、得られた含量値(%)は平均値 \pm 標準偏差で示した。

3-2) 質量法(重量法) (For R3, R104, R105)

第8版食品添加物公定書の一般試験法のタール色素試験法およびR3, R104, R105の各条に従い測定した。各試料につき3試行し、得られた含量値(%)は平均値 \pm 標準偏差で示した。

3-3) 吸光度測定法(法定色素ハンドブック法)(for R2, R3, R102, R104, R105, R106)

法定色素ハンドブックの定量法に従い測定した。各試料につき3試行し、得られた含量値(%)は平均値±標準偏差で示した。なお、計算に用いた吸光係数は、法定色素ハンドブック記載の値を用いた。

なお、TiCl₃法、質量法および吸光度測定法により求めた含量値は、平成17年度食品・添加物等規格基準に関する試験検査報告書：-タール色素およびタール色素アルミニウムレーキの確認試験および定量法に関する研究-により報告した値を用いた。

3-4) qNMR法による含量測定

3-4-1) qNMR標準溶液の調製

DSS-d₆ 約100 mgを精密に量り取り、D₂O 100 mLに定容した。この溶液をD₂Oで5倍希釈したものをqNMR用標準液とした。qNMR用標準液中のDSS-d₆の濃度183.6±1.0 μg/mL (n=3, AV±SD)を下記に従い、PHPにより校正して求めた。すなわち、CRMの一つであるPHP約10 mgを精密に量り取り、qNMR用標準液2.0 mLに溶解した。この溶液0.6 mLをNMR試験管(5 mm φ x 200 mm, S-type (和光純薬工業(株)製))に封入したものをDSS-d₆濃度校正用試料溶液とした。この溶液をqNMRに付し、PHPのPhH x 2およびDSS-d₆のCH₃ x 3に由来するシグナル強度面積、分子量、濃度等を式(1)に代入し、qNMR用標準液中のDSS-d₆の濃度を校正した。

$$W_{DSS} = \left(\frac{M_{DSS} \times I_{DSS}}{H_{DSS}} / \frac{M_{PHP} \times I_{PHP}}{H_{PHP} \times W_{PHP}} \right) \times \frac{P_{PHP}}{100} \quad (1)$$

ただし、W_{DSS}, W_{PHP} = DSS-d₆およびPHPの濃度(mg/mL), M_{DSS}, M_{PHP} = DSS-d₆およびPHPの分子量(MW 224.36および204.22), I_{DSS}, I_{PHP} = DSS-d₆の

CH₃ x 3およびPHPのPhH x 2のシグナル強度面積, P_{PHP} = PHPの純度(100.00%)。

3-4-2) qNMRによる合成赤色素の純度測定

各合成赤色素(RX)を約20 mg精密に量り取り、予め調製したqNMR用標準液2.0 mLに溶解した。この溶液0.6 mLをNMR試験管に封入したものを試料溶液とした。この溶液をqNMRに付し、DSS-d₆のシグナル強度面積、各合成赤色素に由来するそれぞれの特定シグナルの相対強度面積、分子量、濃度等を式(2)に代入し、RXの純度(%)を算出した。

$$P_{RX} = \frac{I_{RX}/H_{RX}}{I_{DSS}/H_{DSS}} \times \frac{M_{RX}/W_{RX}}{M_{DSS}/W_{DSS}} \times 100 \quad (2)$$

ただし、W_{DSS}, W_{RX} = DSS-d₆およびRXの濃度(mg/mL), M_{DSS}, M_{RX} = DSS-d₆およびRXの分子量, I_{DSS}, I_{RX} = DSS-d₆およびRXの特定基のシグナル強度面積, H_{DSS}, H_{RX} = DSS-d₆およびRXの特定基のプロトン数, P_{RX} = RXの純度(%)。

3-4-3) qNMR測定条件および解析処理

qNMR測定条件の基本情報はTable 1に示した。qNMRデータ解析には、得られたFIDデータを定量解析ソフトウェア(日本電子(株)開発中)に導入して自動処理した。すなわち、このソフトウェア上で、qNMRデータをフーリエ変換(Window関数: function = exponential, BF = 0.12 Hz, zero filling = 1, T1 = T2 = 0%, T3 = 90%, T4 = 100%)および自動位相調整を行い、DSS-d₆および特定シグナルの積分範囲等を設定後、予め入力したDSS-d₆および合成赤色素(RX)の濃度、分子量、特定基のプロトン数等の化合物情報から自動解析処理を行い、定量値(純度%)を式(2)に従い算出した。

C. 結果および考察

1) qNMRの原理と測定条件

核磁気共鳴 (NMR) 法は有機化合物の分子構造を決定するための代表的な定性分析法の一つであり、様々な分野で利用されている。qNMRによる定量分析は、 $^1\text{H-NMR}$ で得られる化学シフトの異なる各プロトンシグナル面積比が各置換基に由来する水素原子の数の比を表す特性を利用した方法である。 $^1\text{H-NMR}$ において、シグナル面積比は分子中の個々の置換基上の水素原子数の比に対応する。さらに2つのシグナルが異なる化合物(A, B)に由来する場合には個々のシグナル面積と化合物の濃度は関係式(3)で表すことができる。

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A m_A}{H_B m_B} = \frac{H_A W_A / M_A}{H_B W_B / M_B} \quad (3)$$

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / W_{\text{std}}} \times P_{\text{std}} \quad (4)$$

ただし、I = シグナル面積、H = 特定基のプロトン数、m = モル濃度、W = 重量、M = 分子量、P = 純度%、sample = 試料、std = 基準物質。

よって、2つの化合物の内、一方の化合物として純度が明らかな基準物質(std)を用いれば、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(純度)を決定できる関係式(4)が成り立つ。qNMRによる定量分析は、関係式(4)を利用し、純度あるいは濃度が既知の基準物質を予め加えた溶液中で測定対象の化合物の $^1\text{H-NMR}$ 測定を行い、得られたスペクトル上に観察される基準物質と測定対象の化合物に由来するシグナル面積、水素数および濃度比から定量値を算出する方法である。関係式(4)からわかるように、測定対象化合物の標準品を必要としないことがqNMRの特

徴である。

現在、一般的に利用されている $^1\text{H-NMR}$ 測定初期条件では、プロトンシグナル面積は整数値として得られれば化合物中の置換基の水素数が推測できるため、得られるシグナル面積の定量性を犠牲にして感度やS/Nを優先した条件に設定されている。一方、qNMRによる定量分析では、各シグナル面積の定量性を厳密に確保することが不可欠であるため、Pauli および Saito らの報告を参考に Table 2 に示すように測定条件を設定した。すなわち、シグナル面積の定量性の確保には、パルスにより励起された磁化が次にパルスを照射されるまでに十分緩和していなければならないため、パルス遅延時間をシグナルのスピン-格子緩和時間(T_1)の5倍以上に設定した。更に、ラジオ波(RF)パルスが観測中心から離れるほど強度が低下し、観測幅の両端では定量誤差を与えるため、測定対象のスペクトル範囲が観測幅の80%以内になるように-5 ppm~15 ppmを測定範囲とした。また、本研究では、シム調整を厳密に行い、良好なシグナル形状およびS/Nを得た上で測定し、得られたFID信号データを定量解析ソフトウェア(日本電子(株)開発中)に導入して、同一処理条件下で自動処理し、一元的に定量値を算出した。qNMRによる1測定当たりの所要時間は約20分であり、且つ得られた測定値は高い再現性を示し、不確かさは概ね2%以内であった。

2) qNMR 基準物質の設定と SI トレーサビリティの確保

qNMR 基準物質としては、*p*-トルエンスルホン酸、フタル酸水素カリウム、ジメチルスルホン、安息香酸などが既に報告されているが、これらのシグナルが測定対象の化合物のシグナルと重なってしまった場合には基準物質として使えない。よって、qNMR 基準物質を選択する場合には、測

定対象化合物のシグナルを予測し、シグナルが重ならない物質を事前に選択して使用する必要があるばかりか、得られたスペクトルは基準物質のシグナルと混ざった状態で得られるため、測定対象の化合物の構造解析と定量分析を同時に行おうとした場合、利便性が悪いという欠点がある。そこで、qNMR 基準物質として DSS-*d*₆を用いることとした。DSS-*d*₆は、無色粉末、水溶性の NMR 基準物質として用いられるものである。また、0 ppm にシグナルを示すため、得られた qNMR スペクトルは、通常の ¹H-NMR と同等であり、一般的な測定対象化合物のシグナルと重ならないため、qNMR の基準物質として適している。

しかしながら、現在、SI にトレーサブルな DSS-*d*₆ が流通していないため、厳密な純度値あるいは濃度値が要求される qNMR 基準物質としてそのまま用いることができない。そこで、qNMR による分析値の SI トレーサビリティの確保のため、Fig. 1 に示すように計量学的に妥当な手順によって値付けされ、計量学的トレーサビリティが証明された CRM の一つであるフタル酸水素カリウム(PHP)を一次標準として用い、qNMR 標準液中の DSS-*d*₆ の濃度を校正した後に、DSS-*d*₆ を二次標準として測定対象化合物の qNMR 測定を行う 2 段階の方式を用いることとした。すなわち、qNMR 標準液に PHP を溶解し、PHP の PhH × 2 に由来するシグナル(7.46 ppm)に対する qNMR 標準液中の DSS-*d*₆ の(CH₃) × 3 に由来するシグナル面積比を測定し、関係式(1)より DSS-*d*₆ の濃度(183.6±1.0 μg/mL (n = 3, AV±SD))を校正した。このようにして、DSS-*d*₆ を qNMR 基準物質として用いた際の測定対象化合物の定量値の SI トレーサビリティは、CRM の PHP を介して実現した。

3) TiCl₃ 法、質量法、吸光度測定法および qNMR

法による定量値の比較

分析対象試料として食用合成赤色素市販品(R2, R3, R102, R102, R104, R105, R106)を用いた。Table 2 に TiCl₃ 法、質量法、吸光度測定法および qNMR 法により求めた定量値を示した。TiCl₃ 法、質量法および吸光度測定法により求めた定量値は総じて 91%以上を示し、定量法の違いによる差は小さかった。

次に、食用合成赤色素それぞれを qNMR 標準液にそれぞれ溶解し、qNMR 測定を行い、得られたスペクトルを Fig. 3, 4 に示した。重溶媒には食用合成赤色素の溶解性を考慮して D₂O を用い、各プロトンシグナルの帰属を行い、qNMR スペクトル上に観察された基準物質 DSS-*d*₆ および各食用合成赤色素に由来する各シグナル面積、水素数、濃度等を関係式(2)に代入し、それぞれの純度値(AV±SD, n = 3)を算出した。さらに、各シグナルから導かれた純度値の平均値±標準偏差(AV±SD)を求め、これを最終的に qNMR による食用合成赤色素の定量値とした。その結果、特に R3 では、すべてのシグナルから求めた定量値の平均は 86.1±3.6%となったが、δ 7.00 ppm では 82.0±0.9%、δ 7.65 ppm では 90.8±1.2%を示し、定量に用いたシグナルにより、定量値は大きく異なった。一方、R3 以外の食用合成赤色素では、定量に用いたシグナルにより、定量値が大きく異なることもなかった。定量に用いたシグナルにより定量値が異なったのは、同等な化学構造を有する不純物(分解物あるいは異性体)に由来するシグナルが定量用シグナルに重なっているためと考えられた。

また、qNMR 法により求めた各食用合成赤色素の定量値は、TiCl₃ 法、質量法および吸光度測定法により求めた定量値より総じて 10%程度低い結果となった。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、計量学的に信頼性の高く、真値に非常に近い値が求められていると考えられる。一方、 $TiCl_3$ 法、質量法および吸光度測定法は、その測定原理より総じて真値より大きな値を示す可能性が高いことから、今回の結果は予想の範囲内であった。また、公定法($TiCl_3$ 法および質量法)の結果を基準として考えると、公定法値% = qNMR 値% $\times 1.12$ の関係式が成り立った。

D. まとめ

今回、合成赤色素の定量法として、 $TiCl_3$ 法、質量法および吸光度測定法以外に 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 法は原理的に一次標準比率法の一つとしての資格を有し、求められた値は計量学的にも従来法に比べ信頼性も高いことから、今回 qNMR 法によって求めた合成赤色素類の定量値は、公定法により求めた値よりもより真値に近い値を示していると考えられた。qNMR 法により求めた純度値は、公定法により求めた純度値より総じて 10%程度低く、公定法値% = qNMR 値% $\times 1.12$ の関係式が成り立った。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計量学的に信頼性の高い絶対量の測定が可能であること、qNMR スペクトルデータが定量性を伴った参照スペクトルとして有用であること、化学構造の確認が可能であること等、従来法および公定法より優れていると考えられ、将来、次世代の公定法における確認試験法、純度試験法あるいは定量法としての資格を有すると思われる。また、今回検討した qNMR 法は合成赤色素のみならず、他の合成色素、食品添加物の定量にも応用可能であり、今後更に検証する予定である。

E. 参考文献

- 1) Pauli G. F., Jaki, B. U., Lankin, D. C.: A routine experimental protocol for qHNMR illustrated with taxol. *J. Natural Prod.*, 70, 589-595 (2007).
- 2) Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A., Maeda, T.: Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia*, 41, 213-218 (2004).
- 3) Shao, G., Kautz, R., Peng, S., Cui, G., Giese, R. W.: Calibration by NMR for quantitative analysis: p-Toluenesulfonic acid as a reference substance. *J. Chromatogr. A*, 1138, 305-308 (2007).
- 4) 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, 799-806 (2007).
- 5) Wells, R. J., Cheung, J., Hook, J. M.: Dimethylsulfone as a universal standard for analysis of organics by QNMR. *Accred. Qual. Assur.*, 9, 450-456 (2004).
- 6) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hirai, T.: A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, 14, 79-86 (2009).
- 7) 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 藪島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 宮田一義, 岡村隆志, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田光, 掛樋一晃, 合田幸広, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英: ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究(第1報): 1H -NMR によるヘパリンナト

リウム不純物の分析. 医薬品研究, 39(10), 651-659 (2008).

- 8) 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 泰艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英: ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究(第4報): 合成過硫酸化コンドロイチン硫酸の日周標準品としての適用性の評価. 医薬品研究, 39(11), 721-729 (2008).
- 9) Ihara, T., Saito, T., Sugimoto, N.: Expansion of organic reference materials for the analysis of hazardous substances in foods and environments. -Realization of an efficient metrological traceability using the quantitative NMR method-. *Synthesiology*, 2(1), 12-22 (2009).
- 10) 田原麻衣子, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 多田敦子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 棚元憲一,

中澤裕之, 西村哲治: qNMRに基づく有機リン系農薬イソキサチオンオキシソンの品質管理. 食化誌, in press (2009).

F. 研究発表

1) 学会発表

1. 杉本直樹, 古庄紀子, 建部千絵, 末松孝子, 内海博明, 多田敦子, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一: 核磁気共鳴に基づく食品添加物の新規定量法の開発. 日本食品化学学会第14回学術大会 (2008.5).
2. 建部千絵, 杉本直樹, 齋藤 剛, 井原俊英, 末松孝子, 有福和紀, 内海博明, 吉田雄一, 多田敦子, 佐藤恭子, 山崎壮, 棚元憲一, 西村哲治: qNMRに基づく食用合成色素の新規定量法. 日本薬学会第129年会 (2009.3).

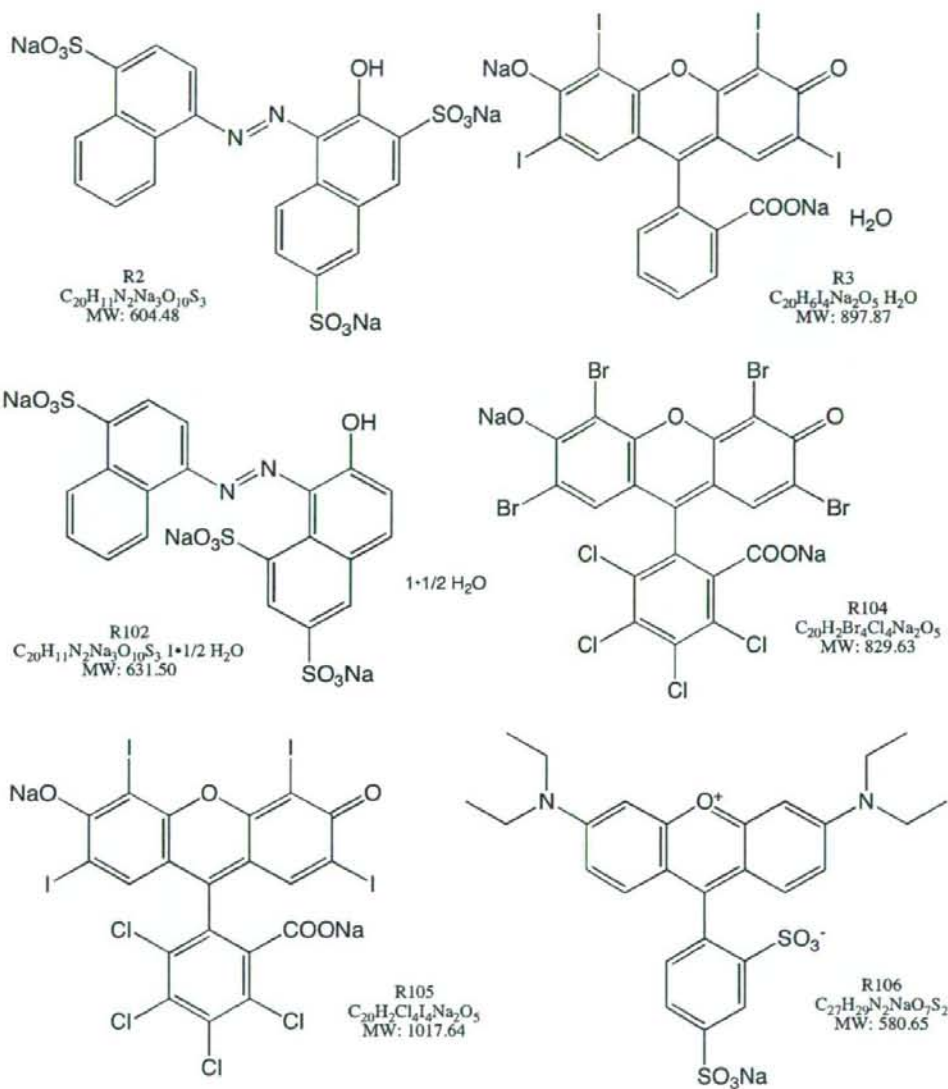


Fig. 1 Structures of food reds.

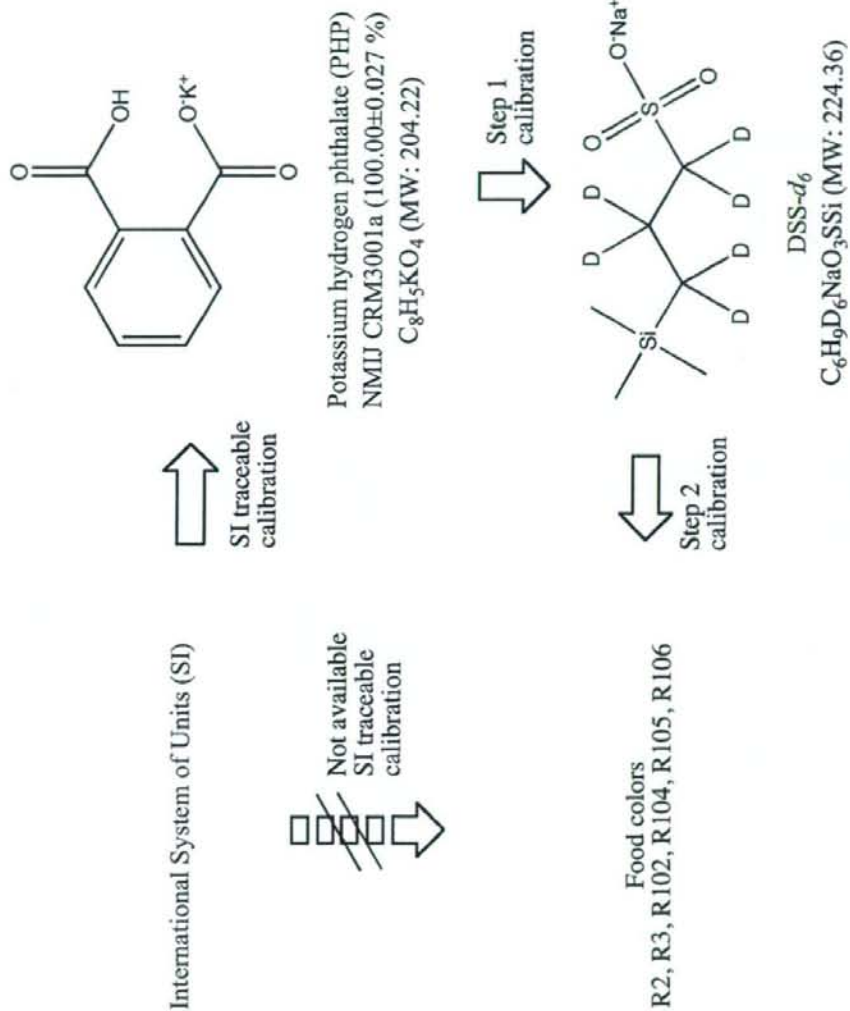


Fig. 2 Strategy of SI-traceable quantification based on qNMR.

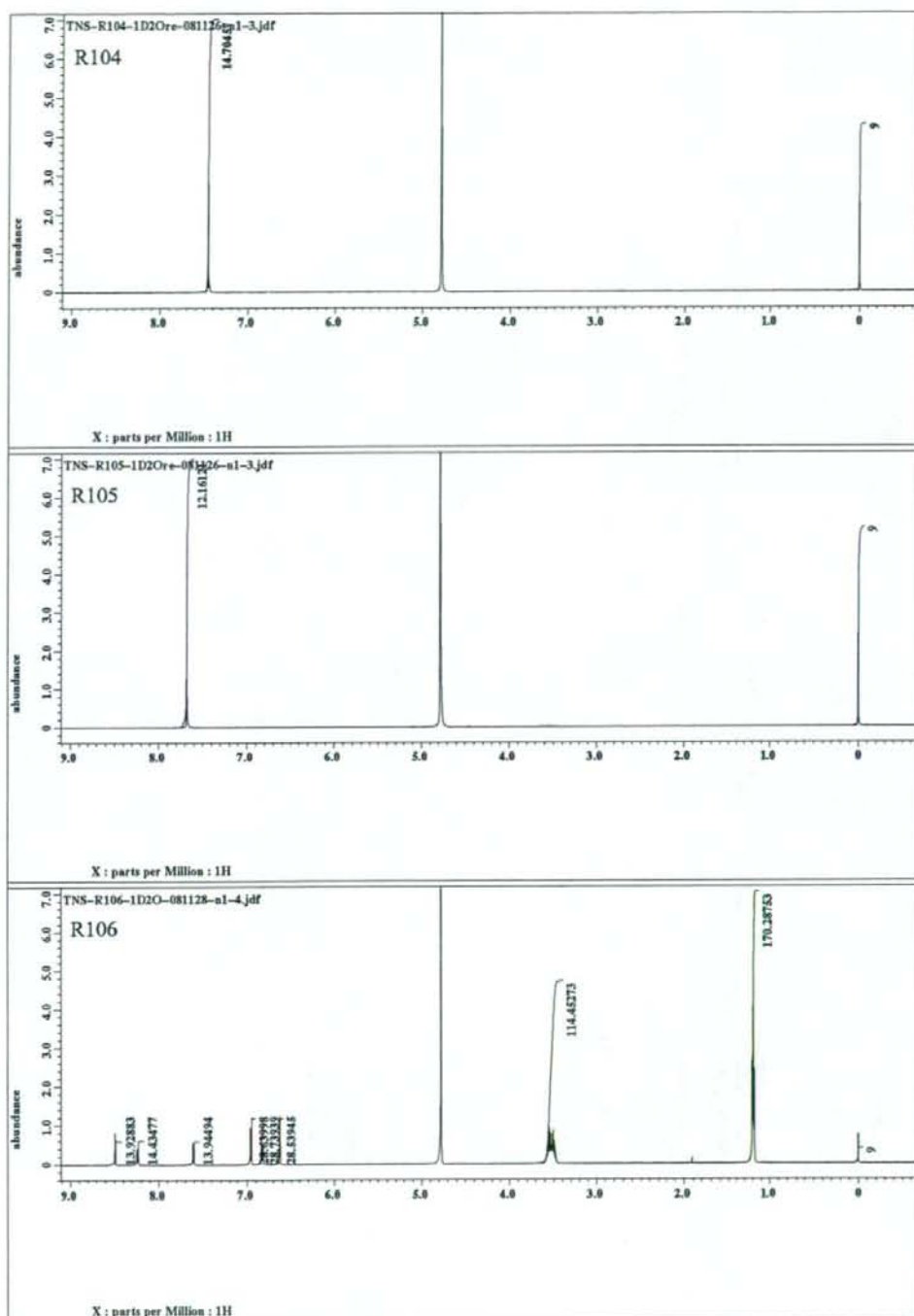


Fig. 4 qNMR spectra of R104, R105 and R106

Table 1 Instruments and acquisition parameters

Spectrometer	ECA600 (JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	- 5 - 15 ppm
Data points	32000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s (>5* <i>T</i> ₁)
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	25°C
Solvent	D ₂ O
qNMR reference material	DSS- <i>d</i> ₆
Primary standard material	Potassium hydrogen phthalate (PHP) (NMIJ CRM3001a)

Table 2 Summary of food reds contents calcd. By using $TiCl_3$, gravimetry, spectrophotometry and qNMR.

Method	R2		R3		R102	
$TiCl_3$ (n > 3)	91.8±1.6%*				92.3±1.2%*	
spectrophotometry (n > 3)	93.2±3.2%		94.6±2.8%		93.4±3.9%	
gravimetry (n > 3)			94.5±1.0%*			
qNMR (n = 3)						
	Target signal	δ (ppm)	Target signal	δ (ppm)	Target signal	δ (ppm)
	PhH x 2	7.42 80.9±1.9%	PhH x 1	7.00 82.0±0.9%	PhH x 1	6.50 81.5±0.8%
	PhH x 1	7.62 84.1±1.7%	PhH x 1	7.58 87.0±1.4%	PhH x 1	7.43 82.0±1.4%
	PhH x 1	7.77 81.5±1.6%	PhH x 1	7.65 90.8±1.2%	PhH x 1	7.51 82.4±1.2%
	PhH x 1	7.88 83.1±1.7%	PhH x 2	7.71 83.0±1.3%	PhH x 1	7.58 84.3±1.1%
	PhH x 1	8.05 81.2±1.8%	PhH x 1	7.79 87.6±1.7%	PhH x 1	7.85 82.0±1.0%
	PhH x 2	8.16 83.2±1.7%			PhH x 1	7.99 82.3±0.8%
	PhH x 2	8.30 82.6±1.8%			PhH x 1	8.29 81.7±0.3%
					PhH x 1	8.60 82.1±0.9%
					PhH x 1	8.75 83.0±1.3%
					PhH x 1	8.92 82.4±1.0%
	Av. of calcd. Content	82.4±1.2	Av. of calcd. Content	86.1±3.6	Av. of calcd. Content	82.4±0.8%
		R104		R105		R106
$TiCl_3$ (n > 3)						
spectrophotometry (n > 3)		91.2±1.6%		91.8±1.3%		96.5±1.9%*
gravimetry (n > 3)		93.1±0.4%*		92.3±0.6%*		95.4±1.1%
qNMR (n = 3)						
	Target signal	δ (ppm)	Target signal	δ (ppm)	Target signal	δ (ppm)
	PhH x 2	7.45 85.5±0.3%	PhH x 2	7.68 82.9±0.6%	(CH ₃) x 4	1.19 87.6±2.0%
					(CH ₂) x 4	3.52 87.9±2.1%
					PhH x 2	6.62 87.9±2.1%
					PhH x 2	6.82 87.7±1.0%
					PhH x 2	6.95 88.2±2.1%
					PhH x 1	7.61 86.6±2.2%
					PhH x 1	8.24 88.2±1.9%
					PhH x 1	8.49 88.4±2.0%
	Av. of calcd. Content	85.5±0.3%	Av. of calcd. Content	82.9±0.6%	Av. of calcd. Content	87.8±0.6%

* Official method

厚生科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究

平成 20 年度分担研究報告書
食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明

研究分担者 久保田浩樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨

カット野菜を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したときに生成する消毒副生成物の生成挙動を明らかとするため、誘導体化・溶媒抽出・GC/MSを用いてアルデヒド類の分析を行った。

カット野菜を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したとき、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒド量が増加した。しかし、殺菌処理により生成したアルデヒド量は、一般食品に天然由来として含まれるアルデヒド量に比べ少ない量であった。

また、殺菌効果を高めることを目的として殺菌料に有機酸を添加して使用する事例もあるため、食品添加物として使用が認められている各種有機酸を殺菌料と混和し、アルデヒドの生成能を調べたところ、次亜塩素酸ナトリウムに酒石酸を混和したとき、グリオキサールが生成した。一方、亜塩素酸ナトリウムに酒石酸を混和した場合、強酸性条件下において速やかにグリオキサールが生成するが、微酸性条件下では検出されなかった。食品の殺菌処理において殺菌料と併用される事が多いクエン酸との混和では、アルデヒド類の生成は認められなかった。

A. 研究目的

亜塩素酸ナトリウム及び次亜塩素酸ナトリウムは、殺菌料として広く利用されている食品添加物であり、食品衛生における微生物学的危害防止ため重要な役割を果たしている。

これら殺菌料には使用基準が設定されており、次亜塩素酸ナトリウムはゴマに使用してはならぬことが定められており、亜塩素酸ナトリウム及び次亜塩素酸ナトリウム液については、数の子の調味加工品（干しかずのこ及び冷凍かずのこを除く。）、か

んきつ類果皮（菓子製造に用いるものに限る。）、さくらんぼ、生食用野菜類、卵類（卵殻の部分に限る。）、ふき、ぶどう及びもも以外の食品に使用してならず、使用量は、亜塩素酸ナトリウムとして、かすのこの調味加工品、生食用野菜類及び卵類にあつては浸漬液 1kg につき 0.50g 以下となっている。また、最終食品の完成前に分解し、又は除去することが義務づけられている¹⁾。

次亜塩素酸ナトリウムは古くから水道の消毒薬としても利用されてきたが、

1972年にRookらが河川水からクロロホルム(CF)を検出し²⁾、また、河川水の塩素処理によってCFを始めとした様々なトリハロメタン(THM)が生成されることが明らかとされている³⁾。その後も、塩素処理により生成する消毒副生成物について広く研究が行われ、これまでにハロアセトニトリルや、抱水クロラール、ハロ酢酸、ホルムアルデヒド(FA)などの様々な化合物の生成が確認されている。

このため、各国では消毒副生成物による健康影響について評価を行い、飲料水の水質基準値が設けられている。WHOの飲料水ガイドライン第3版⁴⁾では、CFが0.2 mg/l、ブロモジクロロメタン(BDCM)が0.06 mg/l、ジブロモクロロメタン(DBCM)が0.1 mg/l、プロモホルム(BF)が0.1 mg/l、FAが0.9 mg/lに設定されている。米国EPAでは総THMの最大許容濃度(MCL)が年間平均として0.08 mg/lであり⁵⁾、また、EUでは、総THMとして0.1 mg/lに設定している⁶⁾。

平成21年3月現在、わが国では水道水の水質基準において、THM類は総THMとして0.1mg/l、CFが0.06 mg/l、BDCMが0.03 mg/l、DBCMが0.1 mg/l、BFが0.09mg/l、FAが0.08 mg/L以下など51項目の水質基準項目が設けられている⁷⁾。

これまでに食品の殺菌処理に伴う消毒副生成物の生成挙動の解明としては、日高らによるキャベツやモヤシの次亜塩素酸ナトリウム処理によるクロロホルムの生成⁸⁻¹⁰⁾や、Reschらによる牛乳製造プラントにおける次亜塩素酸洗浄によるクロロホルム生成挙動の解明などの報告がある¹¹⁻¹³⁾。一方、亜塩素酸ナトリウム処理

における副生成物の生成挙動については、今枝ら¹⁴⁾が豆腐製造工程におけるTHM生成能に関する報告例があるのみで、食品との相互作用に関する研究は少ない。また、河川水の塩素又は二酸化塩素処理により、Ald類の生成が知られているが¹⁵⁻¹⁶⁾、食品の殺菌処理に伴うAld類の生成挙動については未解明である。

近年、食品添加物の殺菌料の使用状況にも変化がみられ、2002年に新規指定食品添加物として食塩水又は塩酸を電解することにより得られる次亜塩素酸水(いわゆる電解水)が新たに指定され¹⁷⁾、2004年には次亜塩素酸ナトリウムに酸を混和して使用することが認められている¹⁸⁾。米国では新規殺菌料として亜塩素酸ナトリウムにGRASの酸を添加してpH2.3~3.9に調整した酸性亜塩素酸ナトリウム溶液が認可されるなど¹⁹⁾、使用実態が日々変化しつつあり、殺菌料による消毒副生成物の挙動解明にも現況に合わせた調査が必要となる。

これまでの研究において、「食品添加物の食品中の共存物質との相互作用により生ずる分解生成物の解明」として、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム殺菌処理により生成する消毒副生成物について調査を行い、THMなどの塩素系有機化合物の生成挙動について調査を行ってきた。本年は、カット野菜を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したときのAld類の生成能について検討を行った。

B. 研究方法

1) 試料 都内スーパーで購入したキャベ

ツを幅約 1mm に細切り実験に用いた。

2) 試薬 FA 標準原液として関東化学社製の水質試験用標準液を用いた。その他の Ald 類 (アセトアルデヒド(AA), プロパナール(Pro), ブタナール(But), ペンタナール(Pen), ヘキサナール(Hex), ヘプタナール(Hep), ベンズアルデヒド(BA)) については、上水試験方法 2001 年版の Ald 試験法に従って試薬特級あるいは 1 級試薬を希釈し Ald 標準原液を調製した。グリオキサル(Gly)は関東化学製の 40%グリオキサル溶液を用いた。内部標準原液(1-クロロデカン)及び誘導体化試薬 o-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン塩酸塩(PFBOA)は関東化学製の水質試験用を用いた。希釈溶媒には和光純薬工業社製のトリハロメタン用メタノールを用い、塩化ナトリウムは和光純薬工業社製の水質試験用を用いた。次亜塩素酸ナトリウム及びクエン酸、DL-リンゴ酸、L-酒石酸は和光純薬工業社製又は関東化学社製の食品添加物用を用い、フマル酸水素ナトリウムは試薬 1 級を用いた。測定用精製水には、妨害成分が殆ど含まれていないことをあらかじめ確認した、EDSPak を通過させた超純水もしくはミネラルウォーター(Volvic)を用いた。その他の試薬は特級を用いた。次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムは食品添加物公定書第 8 版に従いあらかじめヨウ素滴定法²⁰⁾で定量し、この希釈液を用いた。

3) 器具及び装置 GC/MS は島津製作所製の GCMS-QP2010 を用いた。ガラス体積計を除く全てのガラス器具は 100℃で 3 時間加熱後、放冷して用いた。

4) ヘッドスペース GC/MS 測定条件

カラム : DB-5MS+DG 30m×0.25mm I.D. 膜厚 0.25µm, カラム温度 : 50℃ (1min)→(4℃/min)→220℃→(20℃/min)→250℃(10min), 注入口温度 : 220℃, インターフェース温度 : 250℃, イオン化法 : EI, イオン化電圧 : 70ev

5) 殺菌処理方法

試料 2g を 50 ml のスクリーキャップバイアルに採り、有効塩素濃度として 100 µg/ml となるように調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液、あるいは、500 µg/ml 亜塩素酸ナトリウム溶液 20 ml を加え、直ちに密栓し、通常室温で 10 分間殺菌処理を行った。殺菌処理後、チオ硫酸ナトリウム(5→10) 200µl 及び硫酸(1+1) 40µl を加えて反応を止めた後、直ちに試料を採取した。

6) GC/MS 用試験液の調製

試料を測定用精製水 20 ml を含むバイアルに移し、10 分間振とう抽出した後、この抽出液 5ml をフタル酸水素カリウム 50mg 添加した 15 ml のスクリーキャップ付試験管に採取した。この液に 1 mg/ml PFBOA 1ml を加え密栓した後、ヒートブロック上で 35℃, 2 時間反応させ誘導体化を行った。放冷後、硫酸(1+1) 80 µl 及び塩化ナトリウム 2g を加え、ボルテックスマキサーでよく攪拌した後、内部標準液含有ヘキサン 5ml を加え、3 分間振とう抽出を行った。抽出後、3000rpm, 5℃で 5 分間遠心分離した後、ヘキサン層の一定量を分取し、GC/MS 用試験液とした。

7) 検量線用標準液の調製

各 Ald 標準原液をメスフラスコに採り、

測定用精製水で正確にメスアップし、Ald 標準液とした。この Ald 標準液を段階的に採り、測定用精製水で正確にメスアップし Ald 検量線用標準液とし、以下、試験液と同様に操作を行った。

C. 研究結果

1) GC/MS 法による Ald 類の分析

PFBOA 誘導体とした Ald 混合標準液 9 種の GC/MS による分析を行った (Fig. 1-3)。45 分までに全てのピークを検出することができた。FA 及び BA を除く Ald 類については誘導体化合物が異性体 (E,Z) を生じるため複数のピークとして検出された。このため各 Ald 誘導体ピーク面積の総和を算出し、内部標準法による検量線を作成し定量計算を行った。また、測定用精製水から FA 及び AA が微量検出された。このため、検量線作成前に測定用精製水中の Ald のピーク面積を求め、ブランク値を差し引いて検量線を作成した。

なお、上水試験方法の Ald 試験法では、検水の pH を調整せずに誘導体化反応を行っているが、PFBOA 誘導体化において、強酸性では Ald 誘導体が分解し、pH6 以上では Gly の誘導体化収率が急激に低下することが知られているため、本試験では EPA method 556 を参考に試料液にフタル酸水素カリウムを添加し pH4 付近に調整した後、誘導体化操作を行った。

各 Ald 類の GC/MS 分析のマススペクトルの基準ピークは m/z 181 であった。そこでターゲットマスを m/z 181 に設定し、殺菌処理後のカット野菜に含まれる Ald 類を分析したところ、Pen 及び Hex は食

品由来の妨害ピークと重なり測定が困難であった。このため Pen 及び Hex は、ターゲットマスを m/z 239 に変更し、定量下限値を 100 ng/g とした。その他の Ald 類については、良好な分離を示し、定量下限値を FA を 20 ng/g, AA を 200 ng/g, Pro, But, Hep, BA 及び Gly を 50 ng/g に設定した。

2) 添加回収試験

カットキャベツに Ald 混合標準液を 50 ng/g 又は 500 ng/g 添加し添加回収試験を行った。食品には通例、天然由来の FA 及び AA が含まれている。そこで天然由来と区別するため、添加標準液として ^{13}C -FA 及び $1,2\text{-}^{13}\text{C}$ -AA を用いた。また、AA は天然中の存在量を考慮し、添加量を 500ng/g 及び 5,000ng/g とした。試料に Ald を添加した場合、約 50% の低い回収率であったが (Table 1)、試料の抽出液に直接 Ald を添加した場合には、50 ng/g 添加の Pen 及び Hex を除き、69.2~110.6% と比較的良い回収率を示した (Table 2)。また、5 回試行における分析精度は、試料添加及び抽出液添加のいずれの場合においても良好な結果であった。

3) 塩素殺菌処理により生成する Ald 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い、殺菌処理後の Ald 生成能を GC/MS により測定を行った。殺菌処理前後の試料液の GC/MS クロマトグラフを Fig. 4 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の次亜塩素酸ナトリウム溶液及び、使用基準の最大限度である 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の亜塩素酸ナトリ