

図 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム (ペースト法)
試料乾燥

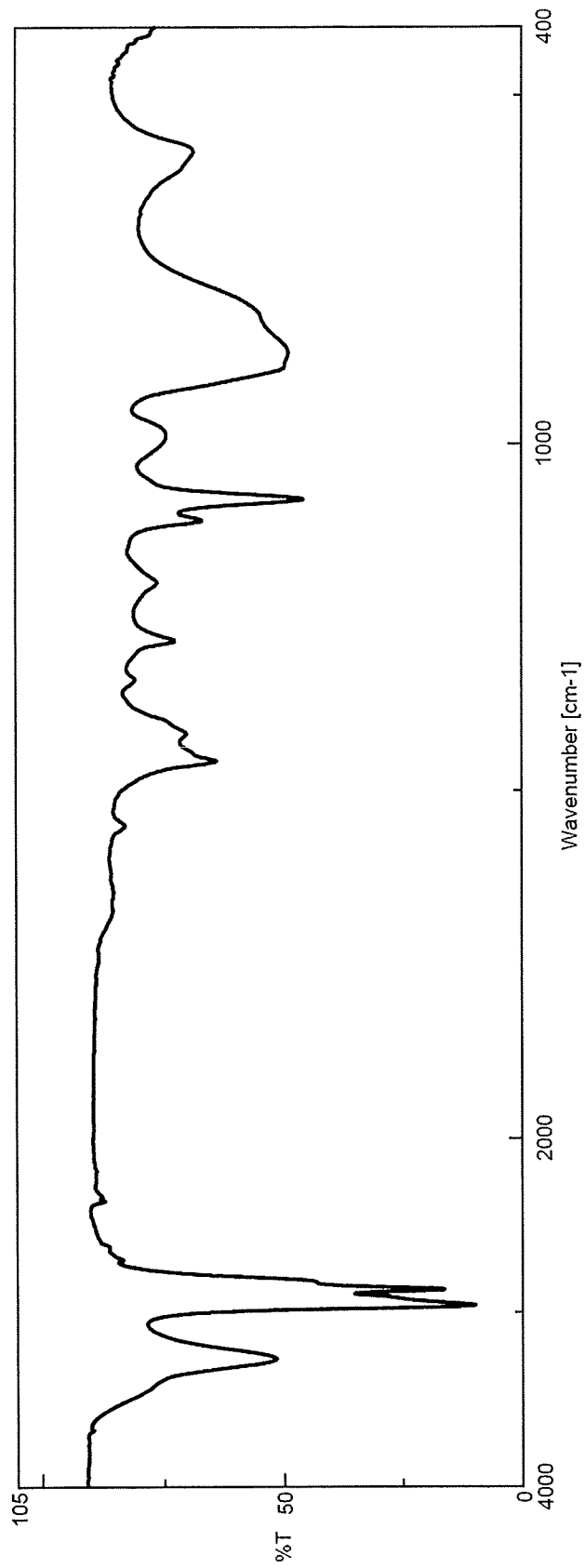


図6 ピロリジン (乾燥なし)

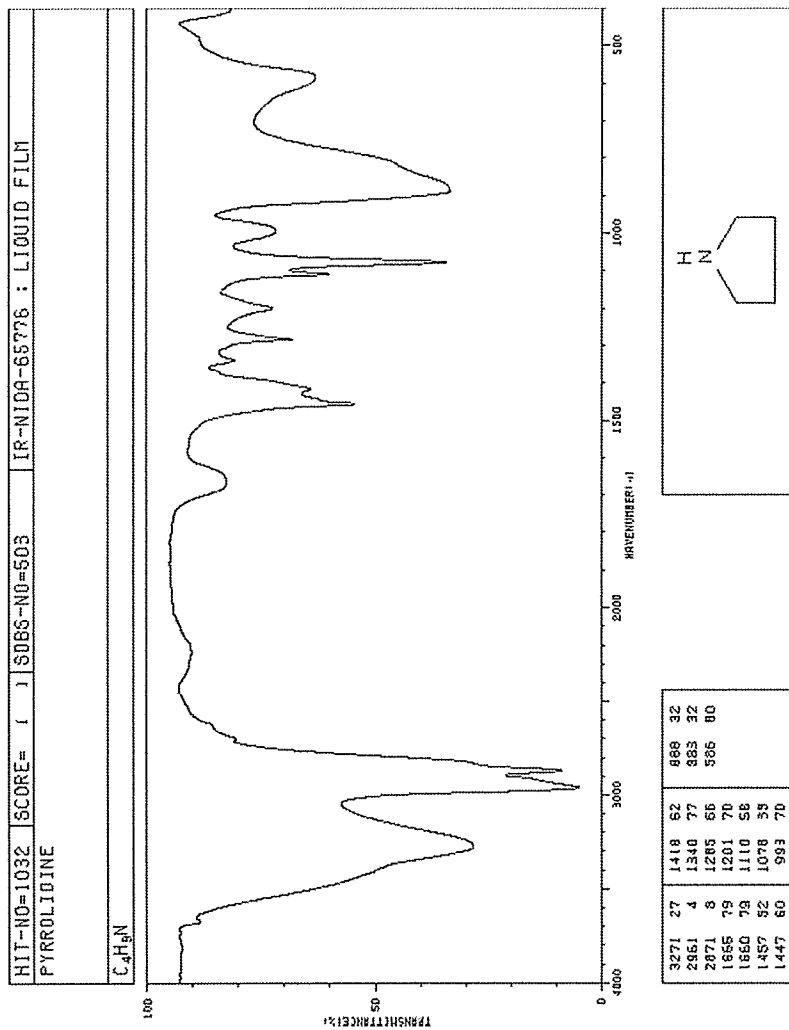


図7 ピロリジン
(独立行政法人産業技術総合研究所 SDBS より引用)

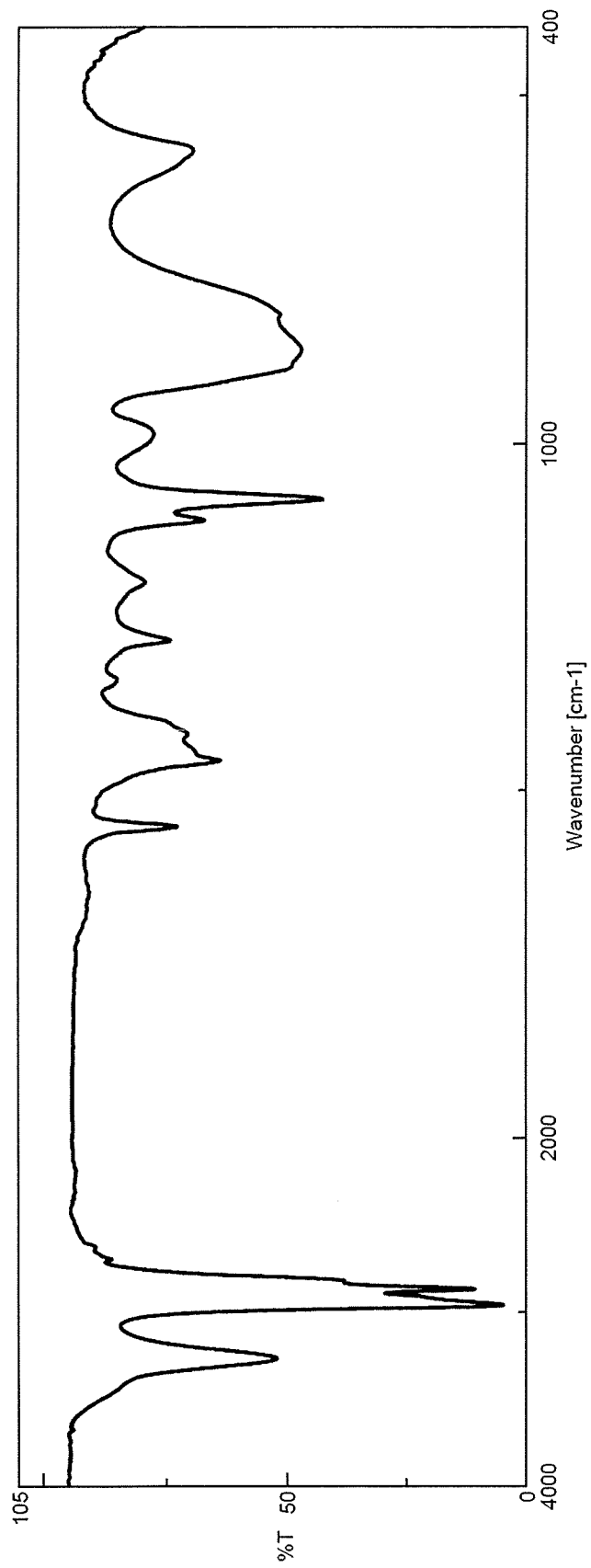


図8 ピロリジン (水2 μ L添加)

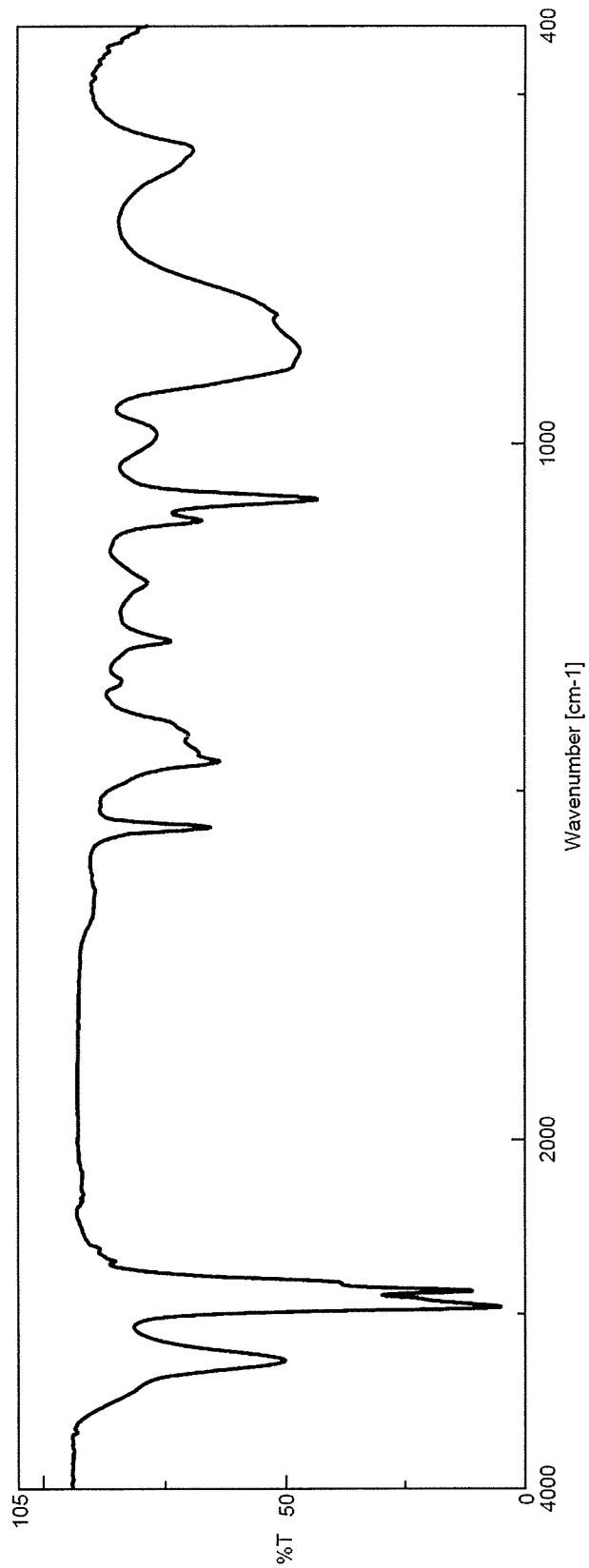


図9 ピロリジン (水10 μ L添加)

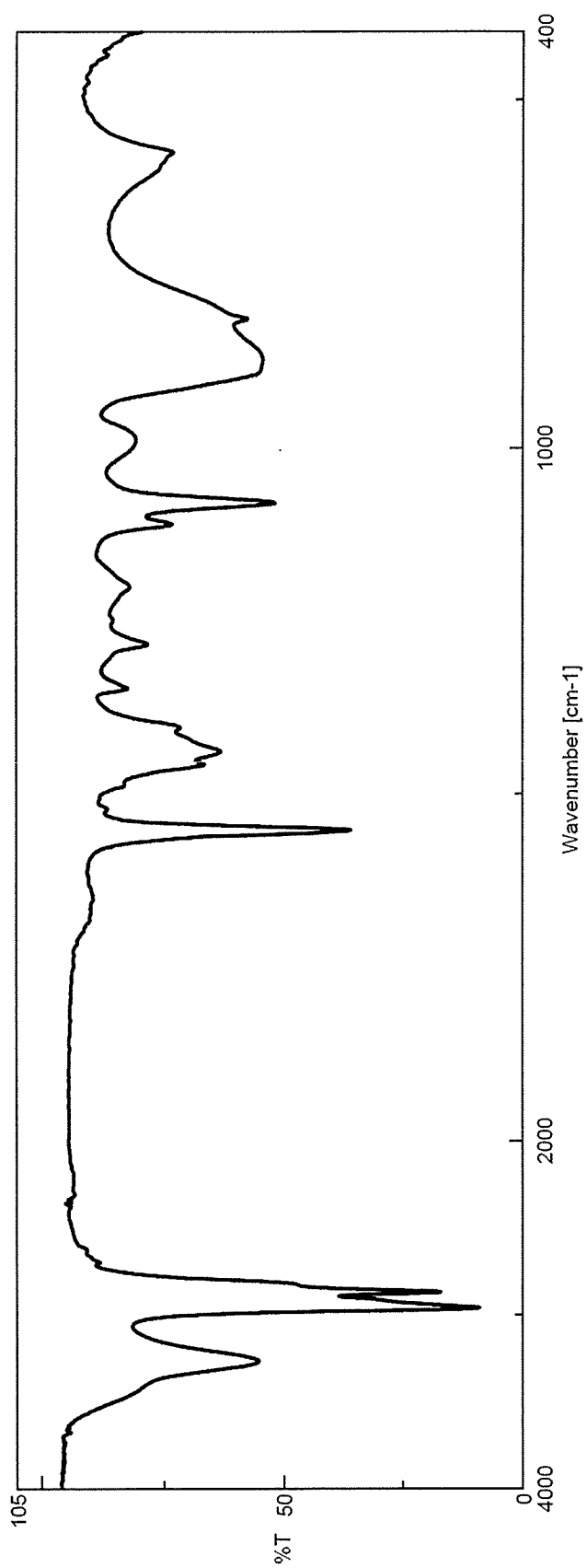


図10 ポロリジン (水20 μ L添加)

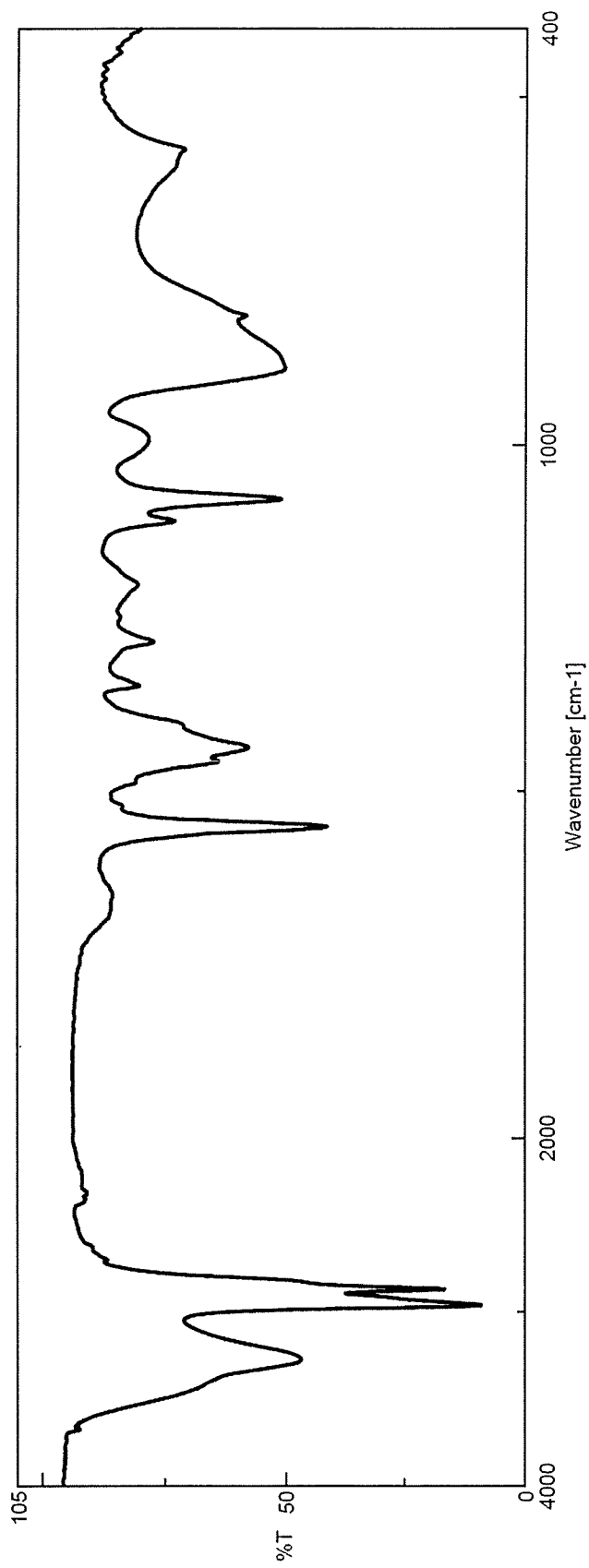


図11 ピロリジン (水40 μL添加)

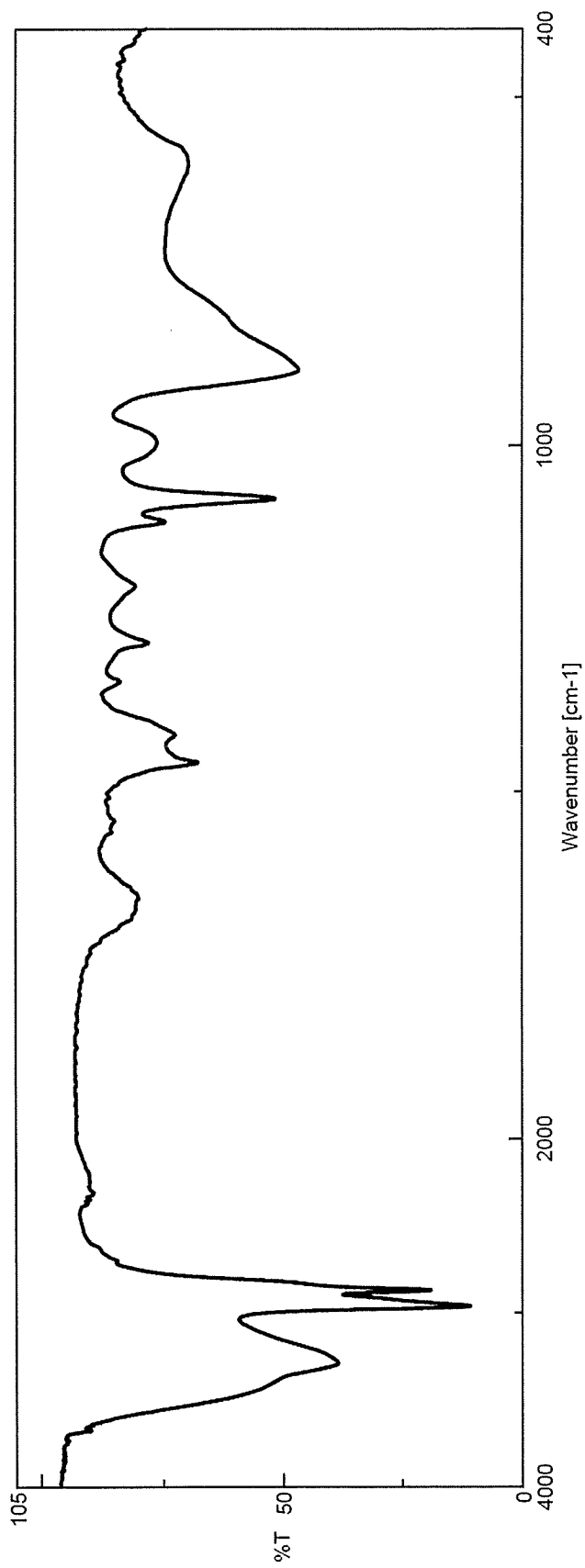


図12 ピロリジン (水80 μ L添加)

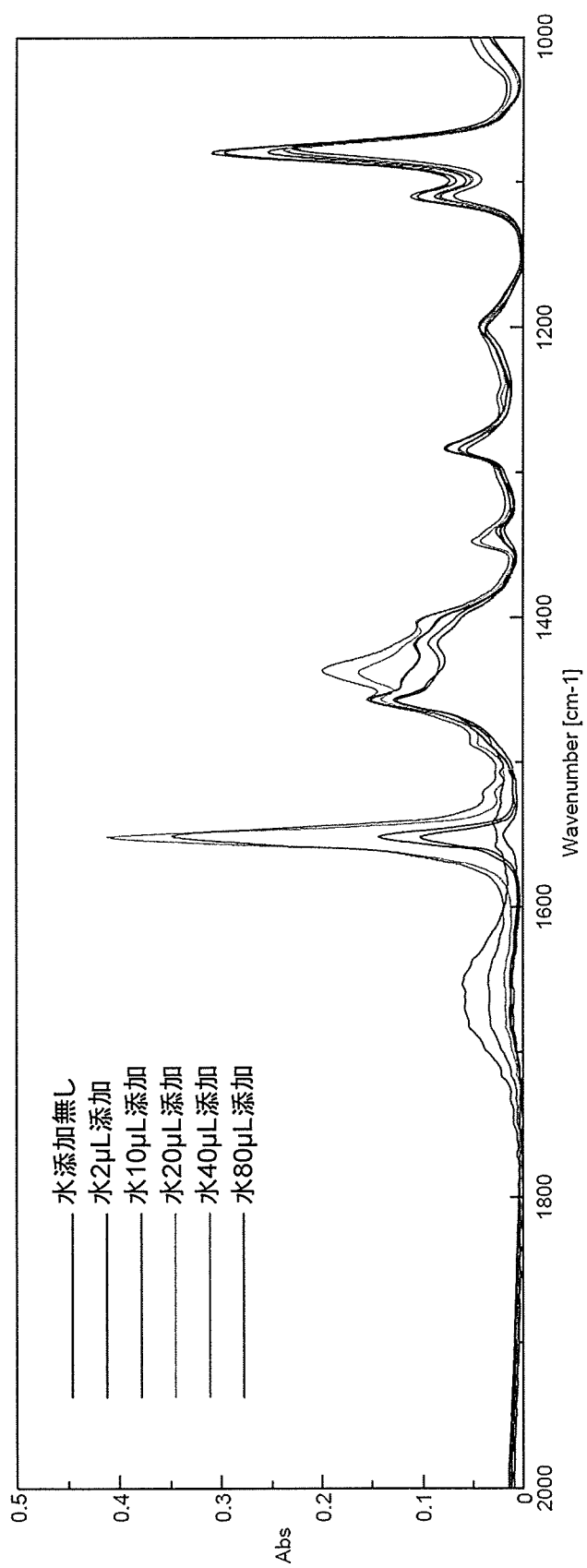


図13 ピロリジン (水0~80 μ L添加 ; 縦軸Abs変換)

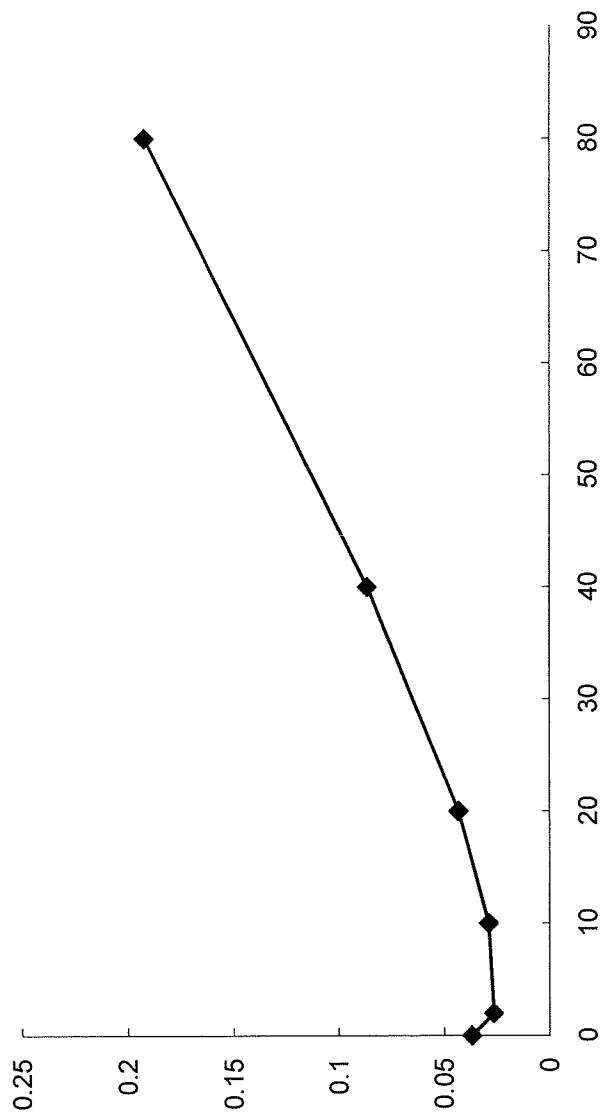


図14 1650/1080 cm⁻¹ピーク高さ比
(ピーク高さはベースライン法にて算出)

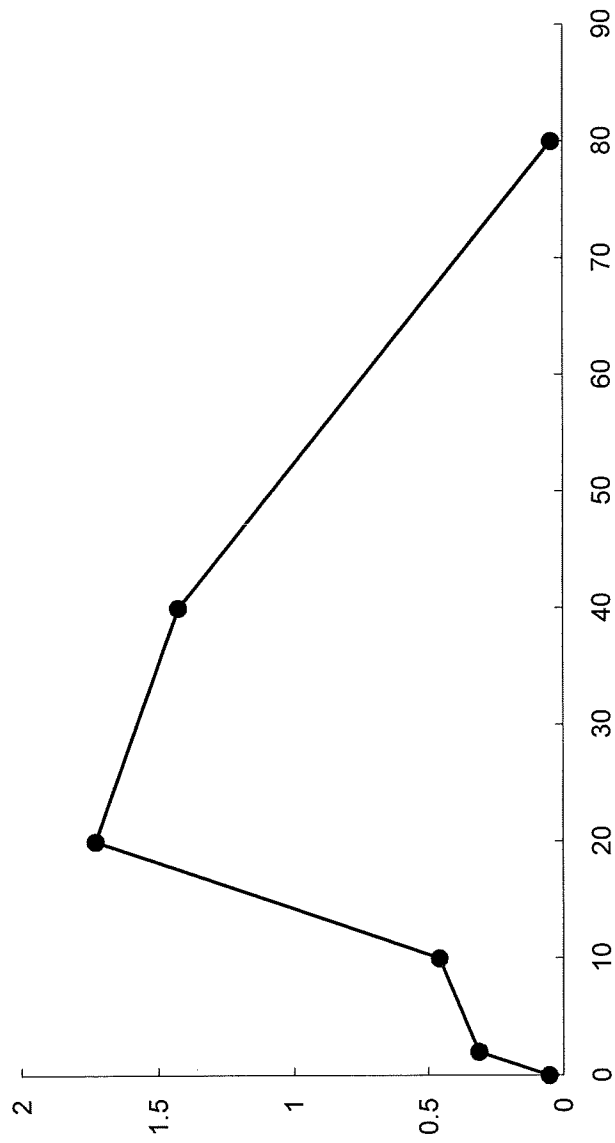


図15 1550/1080 cm^{-1} ピーク高さ比
 (ピーク高さはベースライン法にて算出)

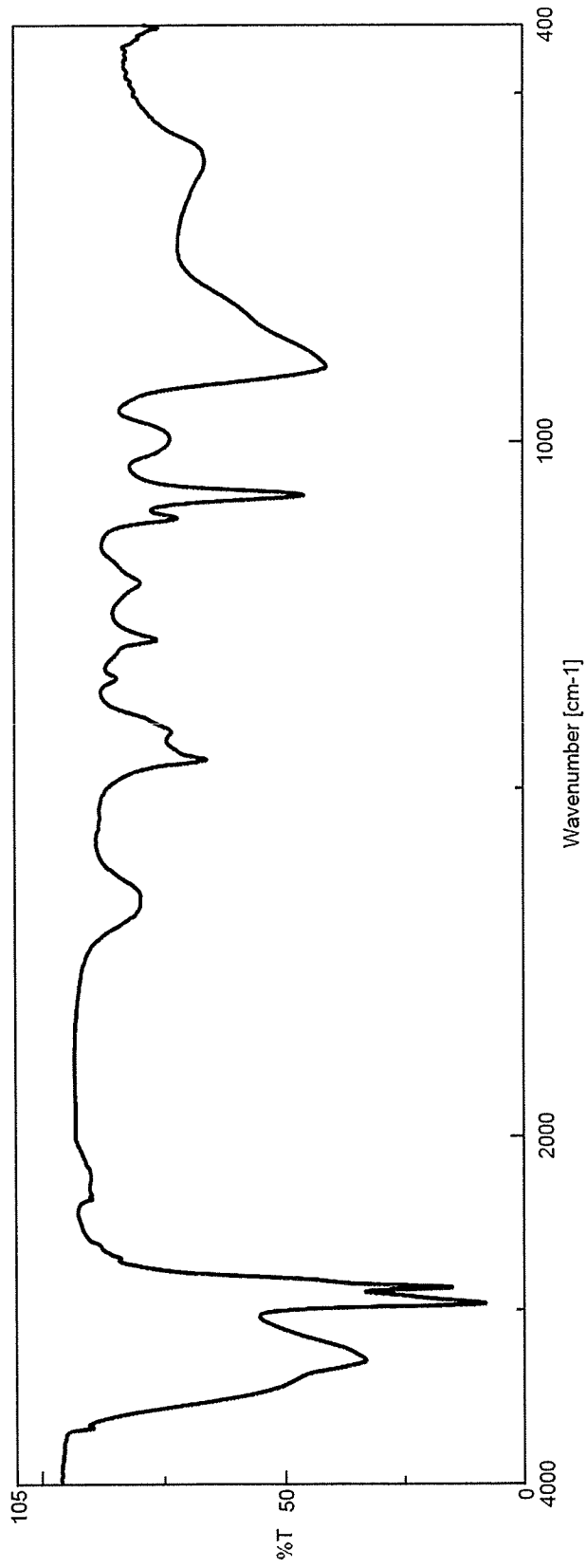


図16 ピロリジン (水100 μ L添加)

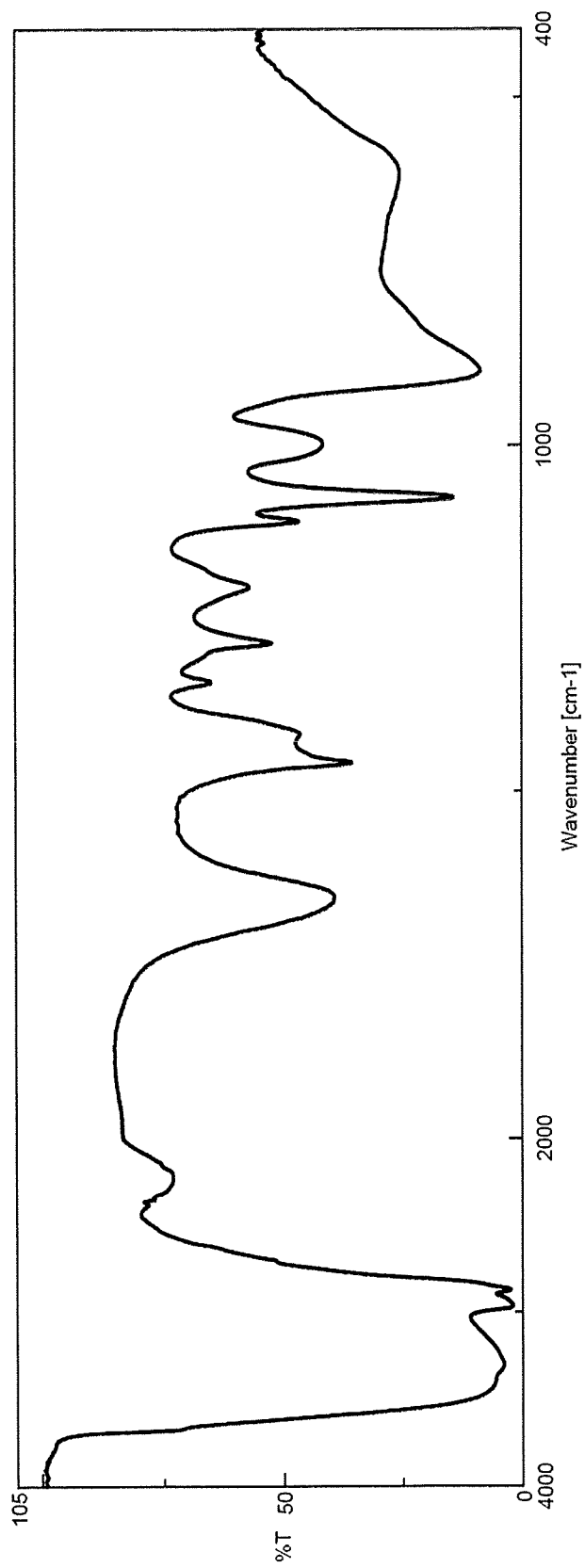


図17 ピロリジン (水200 μ L添加)

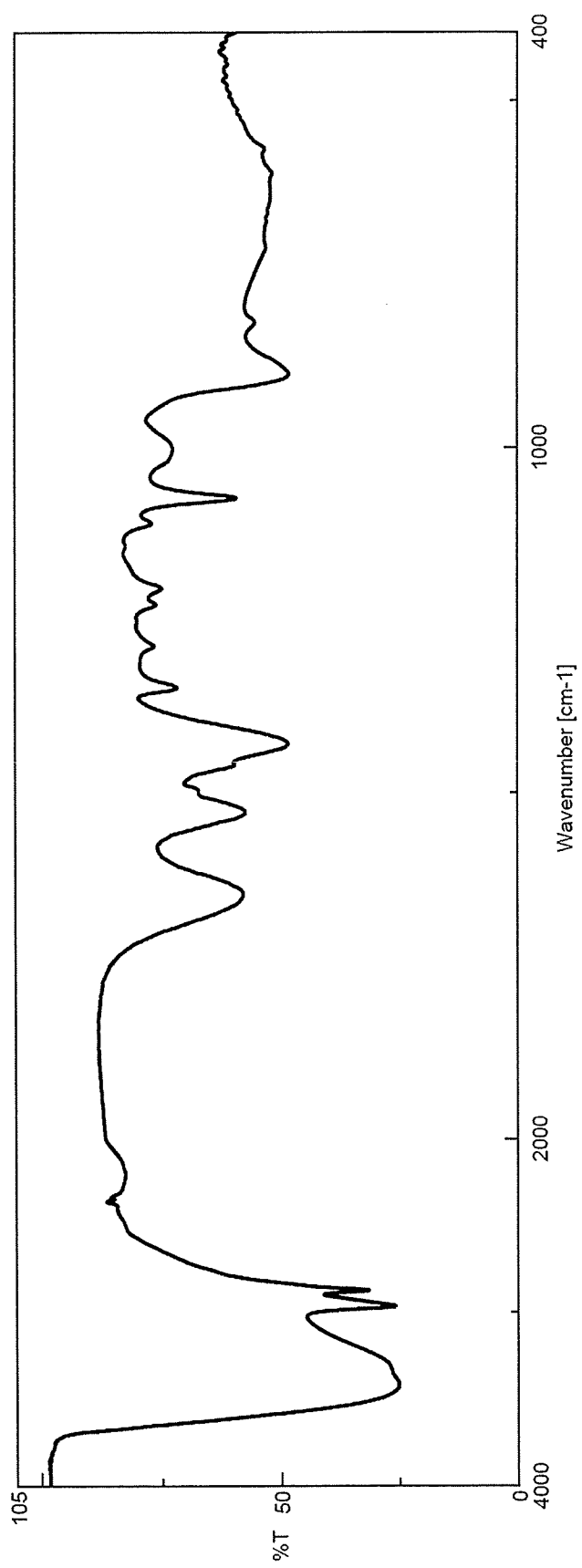


図18 ピロリジン (水200 μ L添加 窓板閉)

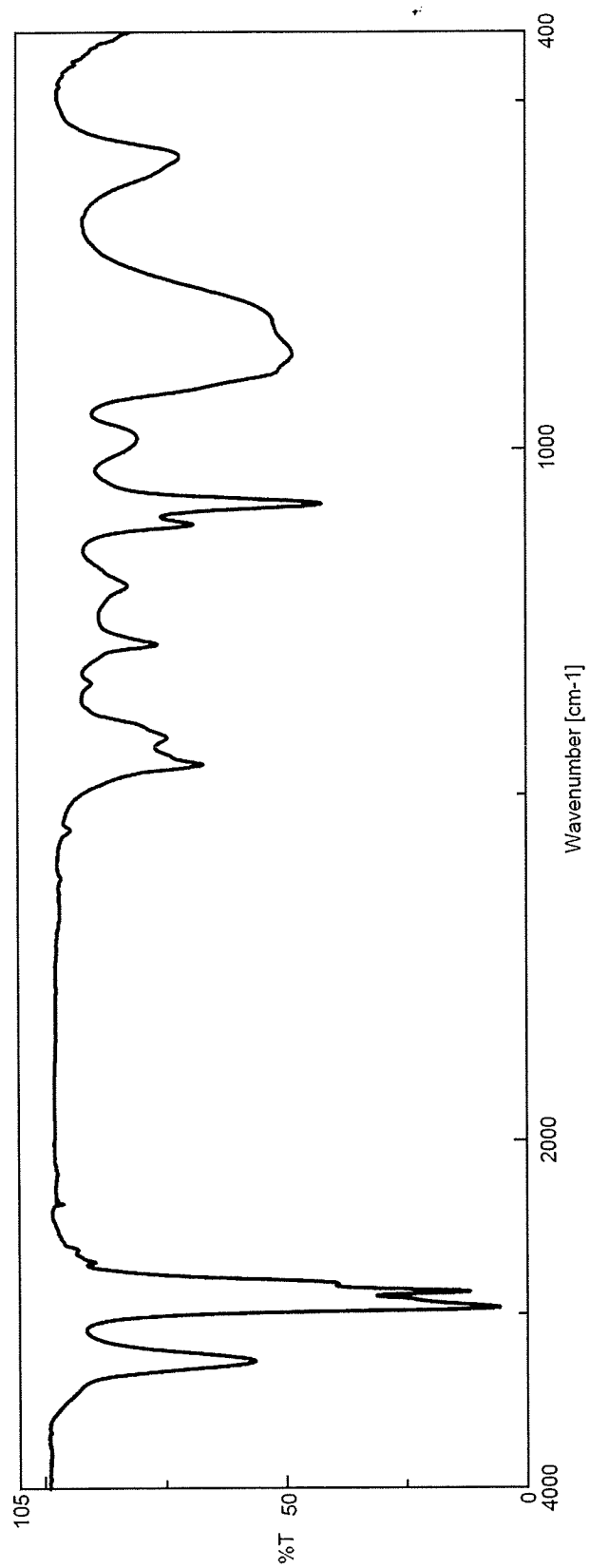


図19 ピロリジン
(モレキュラーシーブ3Aで乾燥後, 素早く測定)

P2271 CAS[123-75-1]
PYRROLIDINE

FW 71.1
MP 87-88°C

d 0.852
n_D 1.4431

3261.6 1283.5 863.5
2959.9 1070.0 822.0
1457.5 961.9 560.0

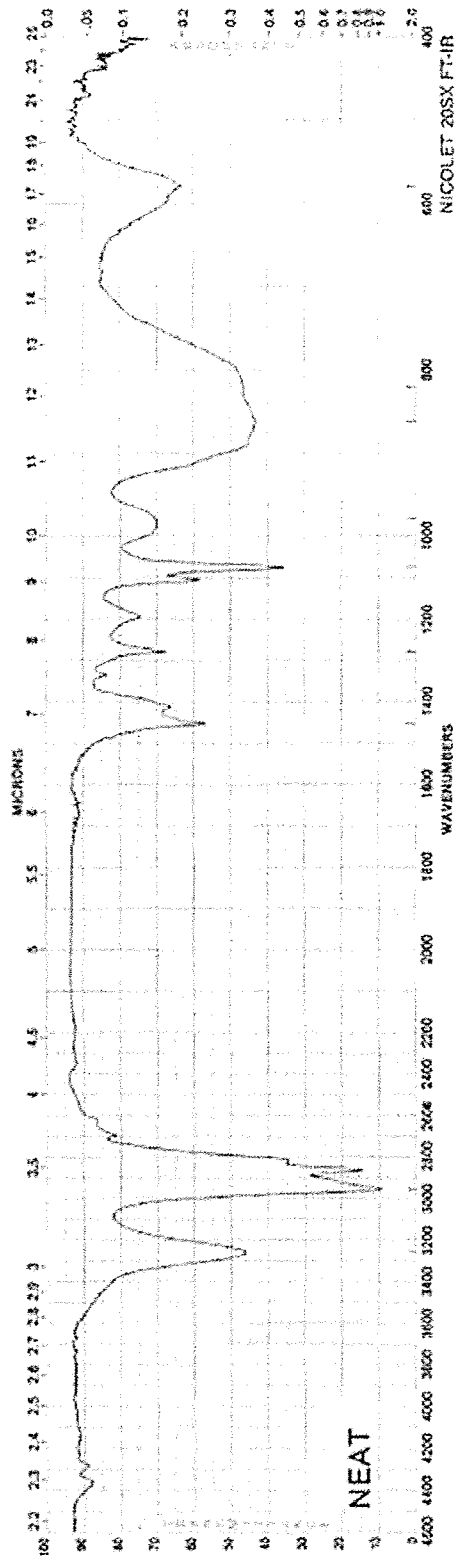


図20 ピロリジン
(The Sigma Library of FT-IR Spectra より引用)

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）
平成 21 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
-qNMR によるタール色素の絶対定量-

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

研究要旨

第8版食品添加物公定書において、タール色素の定量法として、 $TiCl_3$ 法または質量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 $TiCl_3$ 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、昨年度に引き続き、qNMRを用いてタール色素中の主色素を絶対定量し、公定法で得られる結果と比較し、その有効性および妥当性について検証した。

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
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
大槻 崇 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部研究員

A. 研究目的

我が国では、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に試験法の検証、見直しや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($TiCl_3$)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 $TiCl_3$ 法は煩雑で、終点の見極めが難しいなど問題点が多い。

$TiCl_3$ 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 $TiCl_3$ 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。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定量用標準品が不可欠であるが、すべてタール色素の標準品の供給は現実的に不可能である。さらに、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。

国際単位系(International System of Units: SI units)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))の開発を行ってきた。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、タール色素の内、食用赤色素 6 種(赤色 2 号(R2), 赤色 3 号(R3), 赤色 102 号(R102), 赤色 104 号(R104), 赤色 105 号(R105), 赤色 106 号(R106))の絶対定量法として qNMR が有望であることを報告した。今年度は、同法により、引き続きタール色素 6 種(赤色 40 号(R40), 黄色 4 号(Y4), 黄色 5 号(Y5), 青色 1 号(B1), 青色 2 号(B2), 緑色 3 号(G3))の純度測定を行った。また、qNMR スペクトルの解析処理法を見直し、一元的自動処理法の適用を試みた。さらに qNMR および公定法により得られた分析値を比較し、その妥当性を検証した。その結果、qNMR により、プロトンシグナルが十分に分離したタール色素について、その主色素成分の絶対量が計量学的に正確に求められることがわかった。また、公定法の TiCl_3 による滴定法および質量法(重量法)では、タール色素中の不純物を合算した含量が求められていることが示唆された。qNMR は、SI にトレーサブルな分析値を簡便かつ迅速に得られる方法であり、すなわち、分析値の国際整合性の確保が可能である。したがって、我が国の公定法に

qNMR を導入することにより、タール色素の主成分の含量を計量学的に正確に規格基準化することが可能と考えられた。

B. 研究方法

1) 試料

食品添加物用合成色素(タール色素)市販品(12 色素(各 1 製品))を試料として用いた。食用赤色 2 号(R2), 食用赤色 3 号(R3), 食用赤色 40 号(R40), 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), 食用黄色 4 号(Y4), 食用黄色 5 号(Y5), 食用青色 1 号(B1), 食用青色 2 号(B2), 食用緑色 3 号(G3)を用いた(Fig. 1, 2)。

高純度フタル酸水素カリウム(認証標準物質(Certified Reference Material) (NMIJ-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 $\text{DSS-}d_6$ (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、 $\text{DSS-}d_6$ 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, R40, R102, R106, Y4, Y5, B1, B2, G3)

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 AV(%),

RSD(%)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 4 試行し、得られた含量値は AV(%), RSD(%)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, R40, R102, R104, R105, R106, Y4, Y5, B1, B2, G3)

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 5 試行し、得られた含量値(%)は AV(%), RSD(%)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-*d*₆ 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-*d*₆ 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-*d*₆ 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-*d*₆ 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-*d*₆ 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-*d*₆ および PHP の濃度(mg/mL), M_{DSS} , M_{PHP} = DSS-*d*₆ および PHP の分子量(MW 224.36 および 204.22), I_{DSS} , I_{PHP} = DSS-*d*₆ 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 によるタール色素の純度測定

各タール色素(TX)を約 20~30 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-*d*₆ 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、TX の純度(%)を算出した。

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

ただし、 W_{DSS} , W_{TX} = DSS-*d*₆ および TX の濃度(mg/mL), M_{DSS} , M_{TX} = DSS-*d*₆ および TX の分子量, I_{DSS} , I_{TX} = DSS-*d*₆ および TX の特定基のシグナル強度面積, H_{DSS} , H_{TX} = DSS-*d*₆ および TX の特定基のプロトン数, P_{TX} = TX 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-*d*₆ 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-*d*₆ およびタール色素(TX)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 では、スペクトル上に観察される基準物質と測定対象化合物のシグナル強度とモル濃度との関係から、基準物質の濃度を測定対象化合物の濃度に転嫁することが可能である。そこで、昨年度の報告と同様に、qNMR により得られる定量値の SI トレーサビリティを、Fig. 3 に示す方式で実現した。すなわち、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認証標準物質 (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 HMD の濃度を PHP により校正した後に、HMD 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。

次に、各タール色素を 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. 4 に示した。重溶媒にはタール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 および各タール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(%), RSD(%), n=3) を算出した。なお、昨年度の報告と同様に qNMR データ解析には、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が、分析精度の向上のために一部解析アルゴリズムの見直しを行い、一元的な自動処理法の適用を試みた。

Table 2 には、qNMR による分析値を示した。Fig. 4 に各タール色素の qNMR スペクトルを示

したが、定量用のプロトンシグナルとして、基本的にベースライン分離したシグナルを用いた。ベースライン分離が十分でなく、2 つ以上のシグナルが重複するものについては、それらを含む範囲をシグナルとして積算し、定量用シグナルとした。その結果、R2, R40, R102, R104, R105, R106, Y5, B2 は各 3 試料間の RSD(%) が 1.4% 以下、かつ、同一色素中のシグナル間の定量値の RSD(%) が 2.7% 以下と小さく、試料調製の誤差に起因する分析誤差が小さいだけでなく、各タール色素中のどのシグナルを定量用シグナルとしても、ほぼ同等な定量値が得られることが確認された。これらについては、十分に定量用シグナルが分離し、また、定量用シグナルに不純物に由来するがほとんど重なっていないためと考えられた。一方、R3, Y4, G3 では、各タール色素中のシグナルにより、得られる定量値は大きく異なり、その RSD(%) は 4.1~10.3% となった。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。

2) TiCl₃ 法, 質量法, 吸光度測定法および qNMR による定量値の比較

Table 3 に TiCl₃ 法, 質量法, 吸光度測定法および qNMR により求めた定量値を示した。qNMR 法により求めたタール色素の定量値は、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低い値を示した。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、色素本体の純度の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、TiCl₃ 法, 質量法および吸光度測定法では、その測定原理よりタール色素中の主色素成分だけでなく付随色素および不純物を合算した総量が定量値として導かれる。すなわち、総じて大きな値を示す可能性が高いこ