

平成 22 年度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）

既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発

分担研究報告書

保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究

研究分担者 堀江正一（大妻女子大学）

研究協力者 渡邊美佳（大妻女子大学）

研究要旨

昨年度に引き続き保存料・日持ち向上剤として用いられている既存添加物について、その抗菌活性を調べると共に、抗菌活性成分を明らかにするための基礎的検討を行った。

ホコッシ抽出物をOasis HLBカートリッジに負荷し、カートリッジに保持された成分と流出された成分に分画した。この分画液を微生物学的試験法に供したところ、カートリッジに保持された疎水性分画液側に抗菌性があることがわかった。そこで、この疎水性分画液をHPLC及びLC-MS/MSに供し、本分画液に含まれる主な成分を同定したところ、主成分はバクチオールであった。次に、ホコッシ抽出物に含まれるバクチオール含量についてHPLC法と抗菌活性を指標とした微生物学的試験法により求めた結果、近似した値が得られた。以上のことから、バクチオールがホコッシ抽出物中の主な抗菌活性成分であると推定した。

A. 研究目的

既存添加物の多くは天然物からの抽出物であり、原材料の種類や産地の違い、製法の違いなどから製品の成分組成や含量は必ずしも一定ではない。加えて、有効成分も明確でない品目もある。既存添加物の保存料・日持ち向上剤は、抗菌もしくは静菌作用があるとされているが、市販製品の抗菌力と抗菌活性成分が不明確である上、有効性を担保する成分規格も設定されていない。そこで、有効性を担保するための成分試験法を開発することを目的に、活性成分を解析し、抗菌活性評価の指標成分を明らかにすることを目的とする。

本年度は、昨年度までの検討で抗菌活性が認められたホコッシ抽出物について、その抗菌活性成分を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 試薬・器材

ホコッシ抽出物：既存添加物ホコッシ抽出物の市場流通製品を日本食品添加物協会から提供していただき、研究試料として用いた。

バクチオール：ChromaDex Inc.製

バクチオール標準溶液：バクチオール 5mg をメタノール 1mL に溶解して、バクチオール標準原液とした。バクチオール標準原液を適宜メタノールで希釈して標準溶液とした。

供試試験菌：*Bacillus subtilis* ATCC 6633

ペトリ皿（シャーレ）：合成樹脂製で、内径 90 mm の滅菌したものをを用いた。

パルプディスク：アドバンテック東洋（株）製の直径 10mm，厚さ 1.2mm（吸水量 0.08mL±0.01mL）の厚手のパルプディスクを 121℃，15 分間高圧滅菌後、十分乾燥させてか

ら用いた。

Oasis HLB : Waters 社製 Oasis HLB (500mg) カートリッジは、予めメタノール 10mL、水 10mL でコンディショニングした後使用した。

その他の試薬は、いずれも高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用あるいは特級品を用いた。

2. 試験菌液及び検査用培地の作製

2.1 試験菌液の調製

試験菌液及び培地の調製は、「繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果：JIS L 1902」に準拠し、概ね次のとおり調製した。

斜面培地 A : 精製水 1L に対してポリペプトン 10g、酵母エキス 2g、硫酸マグネシウム 1g 及び寒天 15g を採り、内容物を十分溶解した後、pH7.0±0.2 に調整する。これを 25mL 試験管に約 10mL 分注してから 121°C、15 分間高圧滅菌処理する。滅菌後試験管を水平面に対して 15 度傾けて置き、内容物を凝固させて斜面培地 A を調製する。

ブイヨン培地 : 精製水 1L に対してペプトン 10g、肉エキス 5g 及び塩化ナトリウム 5g を採り、内容物を十分溶解した後、pH 7.0±0.2 に調整する。これを 50mL 三角フラスコに約 25mL 分注してから 121°C、15 分間高圧滅菌処理する。

Bacillus subtilis ATCC 6633 の試験菌液 : 斜面培地 A に試験菌を移植後 18~24 時間培養する。斜面培地上の菌をブイヨン培地 25mL に 1 白金耳移植し、30°C で 18~24 時間培養する。ブイヨン培地中の菌濃度は $10^6 \sim 10^7$ 個/mL 程度とする。

2.2 検査用平板の作成

検査用平板は、Difco 社製のソイビーン・カゼインダイジェスト (SCD) 寒天培地を使用した。培地を 121°C、15 分間高圧滅菌後、55°C±1°C に保持する。調製した試験菌液を SCD 寒天培地の 1/50 量加え、十分に混合した後、その 9 mL をペトリ皿に注入し、水平に静置して凝固

させて検査用平板培地を作製した。

3. 微生物発育阻止試験

パルプディスクを試験溶液に浸漬し、検査用平板培地上に置いた。それらの平板培地は、約 5°C で 30 分間放置した後、30°C で 18~24 時間培養した。

パルプディスク周辺に出現した阻止円の直径をノギスで測定した。

4. 抗菌活性成分調査

4.1 HPLC 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフは、Agilent 社製 HPLC 1100 (フォトダイオードアレイ検出器付き) を用いた。分離カラムは L-column ODS (2 mm × 100 mm) を用い、測定は UV (270nm) を選択した。移動相には A=0.02M リン酸緩衝液 (pH4.5)、B=アセトニトリルを使用し、グラジエント溶出法 (0 分 : A/B=95:5 → 25 分 : A/B=10/90) を採用した。流速は毎分 0.2mL とした。カラム温度は 40°C、注入量は 5µL とした。

4.2 LC-MS/MS 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフは、Waters 社製 Alliance 2695、質量分析装置は、Waters 社製 Quattro micro を用いた。分析カラムには L-column ODS を用い、測定はネガティブモードを採用した。移動相には A=0.05% 酢酸、B=アセトニトリルを使用し、グラジエント溶出法 (0 分 : A/B=95:5 → 25 分 : A/B=10/90) を採用した。流速は毎分 0.2mL とした。

4.3 試験溶液の調製

試料 0.5g を 50mL ポリプロピレン製遠心チューブに採り、メタノール 25mL を加えて溶解した。このホコッシ抽出物溶液 2ml に蒸留水 5mL を加えた後に Oasis HLB に負荷し、流出液をカートリッジ流出分画試験溶液とした。次いで、カートリッジを精製水 2mL で洗浄後、メタノール 5mL で溶出し、これをカートリッジ保持分画成分試験液とした。上記の流出分画試験溶液及び保持分画成分試験液を微生物学的試験法

に供した。さらに、両試験溶液を適宜希釈して HPLC 及び LC-MS/MS に供した。

5. 定量法

5.1 HPLC 法

バクチオール標準溶液(1~500 μ g/mL)を HPLC に供し、それぞれ得られたピーク面積を用いた絶対検量線法により検量線を作成し、定量した。

5.2 Bioassay 法

バクチオール標準溶液(50~500 μ g/mL)を微生物学的試験法に供し、それぞれ得られた阻止円の直径を用いて検量線を作成し、定量した。

C. 結果及び考察

1. ホコッシ抽出物の抗菌活性

ホコッシ抽出物の抗菌活性を調べた結果(グラム陽性菌：*Staphylococcus aureus subsp. aureus* NBRC 13276, グラム陰性菌：*Escherichia coli* NBRC 3972, 芽胞形成菌：*Bacillus subtilis* ATCC 6633, 酵母：*Candida albicans* NBRC 1594 及びかび：*Aspergillus niger* NBRC 9455), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 に対して抗菌活性を示すことを先に報告した¹⁾。そこで、試験菌には、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用いることにした。

ホコッシ抽出物について、固相抽出法(Oasis HLB)により粗分画(カートリッジ流出分画及び保持分画)を行い、両分画の抗菌活性を調べた。その結果、カートリッジ保持成分(疎水性分画)に抗菌活性が認められた。一方、流出分画(親水性分画)には抗菌活性は認められなかった。

2. カートリッジ保持成分(疎水性分画)中の抗菌活性成分の検討

カートリッジに保持された疎水性分画液に抗菌活性が認められたことから、本分画液を HPLC 及び LC-MS/MS に供し、分画液中に含まれる成分について検討した。図 1 に示すとおり、

本分画液の HPLC クロマトグラムには約 20 分に大きなピーク成分が観測された。このピーク成分の UV スペクトルは図 1 に示すとおり 263nm に UV 吸収極大が認められた。千野ら²⁾は、ホコッシ抽出物の含有成分の主成分はバクチオールであり、その UV スペクトルの極大吸収波長は 263nm であると報告している。

次に、HPLC 条件と同様の移動相条件を用いて、疎水性分画液を LC-MS/MS 測定に供した。図 2 にネガティブモードにより得られたトータルイオンクロマトグラム及び 21.8 分に観測された成分の MS スペクトルを示す。21.8 分に観測された成分の MS スペクトル(脱プロトン化分子は m/z 255.6) から、本成分の分子量は 256 と推定された。バクチオールはフェノール性の水酸基を有する分子量 256.4 の化合物である。

以上の UV スペクトル及び LC-MS/MS により得られた MS スペクトルから、疎水性分画液の HPLC クロマトグラムに観測された約 20 分のピーク成分をバクチオールであると同定した。

3. ホコッシ抽出物中のバクチオールの定量 (1) HPLC 法

ホコッシ抽出物に含まれる成分の HPLC 条件を検討した。抽出物に含まれる成分は、疎水性の低いものから極めて高いものまでが考えられる。そこで、移動相の溶出条件としてグラジエント溶出法(0分:アセトニトリル 5%→25分:アセトニトリル 90%)を採用した。測定には多くの成分を検出できる多波長検出器(ダイオードアレイ検出器)を用いた。本条件によって得られたホコッシ抽出物希釈液(1000倍)の HPLC クロマトグラムは、先に示した Oasis HLB カートリッジに保持された分画液の HPLC クロマトグラム(図 1)とほぼ同じであった。

次に、バクチオール標準品を用いて、ホコッシ抽出物希釈液(1000倍)中に含まれるバ

クチオール含量を求めた。その結果、ホコッシ抽出物希釈液中には約 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のバクチオールが含まれていた。なお、バクチオールは 1~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性を示した。

(2) Bioassay

微生物学的試験法を用いてホコッシ抽出物に含まれるバクチオール濃度を求めた。ペーパードイスク法を用いて、ホコッシ抽出物希釈液 (1000 倍) を分析した結果、1000 倍希釈液の抗菌活性はバクチオール約 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に相当した。

ホコッシ抽出物希釈液中に含まれるバクチオールの濃度は、HPLC 法による値 (330 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と、抗菌力を指標とした微生物学的試験法により得られた定量値 (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) には幾分かの相違が見られたが、近似した値であった。このことから、ホコッシ抽出物の主な抗菌活性成分はバクチオールであると推定した。

4. 考察

ホコッシ抽出物を Oasis HLB カートリッジに負荷し、カートリッジに保持された成分と流出された成分に分画した。この分画液を微生物学的試験法に供したところ、カートリッジに保持された疎水性分画液側に抗菌性があることがわかった。

そこで、この疎水性分画液を HPLC を用いて成分特定を試みた結果、HPLC クロマトグラム上、約 20 分に大きなピークが観測された。このピーク成分の UV スペクトルは、263nm 吸収極大が認められた。次に、疎水性分画液を LC-MS/MS に供した結果、HPLC 分析において約 20 分に観測されたピーク成分の分子量は 256 と推定された。

以上の UV スペクトル及び LC-MS/MS により得られた MS スペクトルの結果から、HPLC クロマトグラムに観測されたピーク成分をバクチオールであると同定し、本成分がホコッシ抽出物の主な抗菌活性成分であると推定し

た。

D 結論

昨年度に引き続き保存料・日持向上剤として用いられている既存添加物について、その抗菌活性を調べると共に、抗菌活性成分を明らかにするための基礎的検討を行った。

ホコッシ抽出物を Oasis HLB カートリッジに負荷し、カートリッジに保持された成分と流出された成分に分画した。この分画液を微生物学的試験法に供したところ、カートリッジに保持された疎水性分画液側に抗菌性があることがわかった。

そこで、この疎水性分画液を HPLC 及び LC-MS/MS に供し、本分画液に含まれる主な成分を同定したところ、主成分はバクチオールであった。次に、ホコッシ抽出物希釈液 (1000 倍希釈) 中に含まれるバクチオール含量について HPLC 法と抗菌活性を指標とした微生物学的試験法により求めた結果、近似した値 (HPLC 法=約 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、微生物学的試験法=約 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が得られた。以上のことから、バクチオールがホコッシ抽出物の主な抗菌活性成分であると推定した。

E. 研究発表

該当なし。

F. 参考文献

- 1) 「既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発」平成21年度分担研究報告書
- 2) 千野 誠, 佐藤恭子, 山崎 壮, 米谷民雄 : 食品衛生学雑誌, 43, 352-355 (2002)

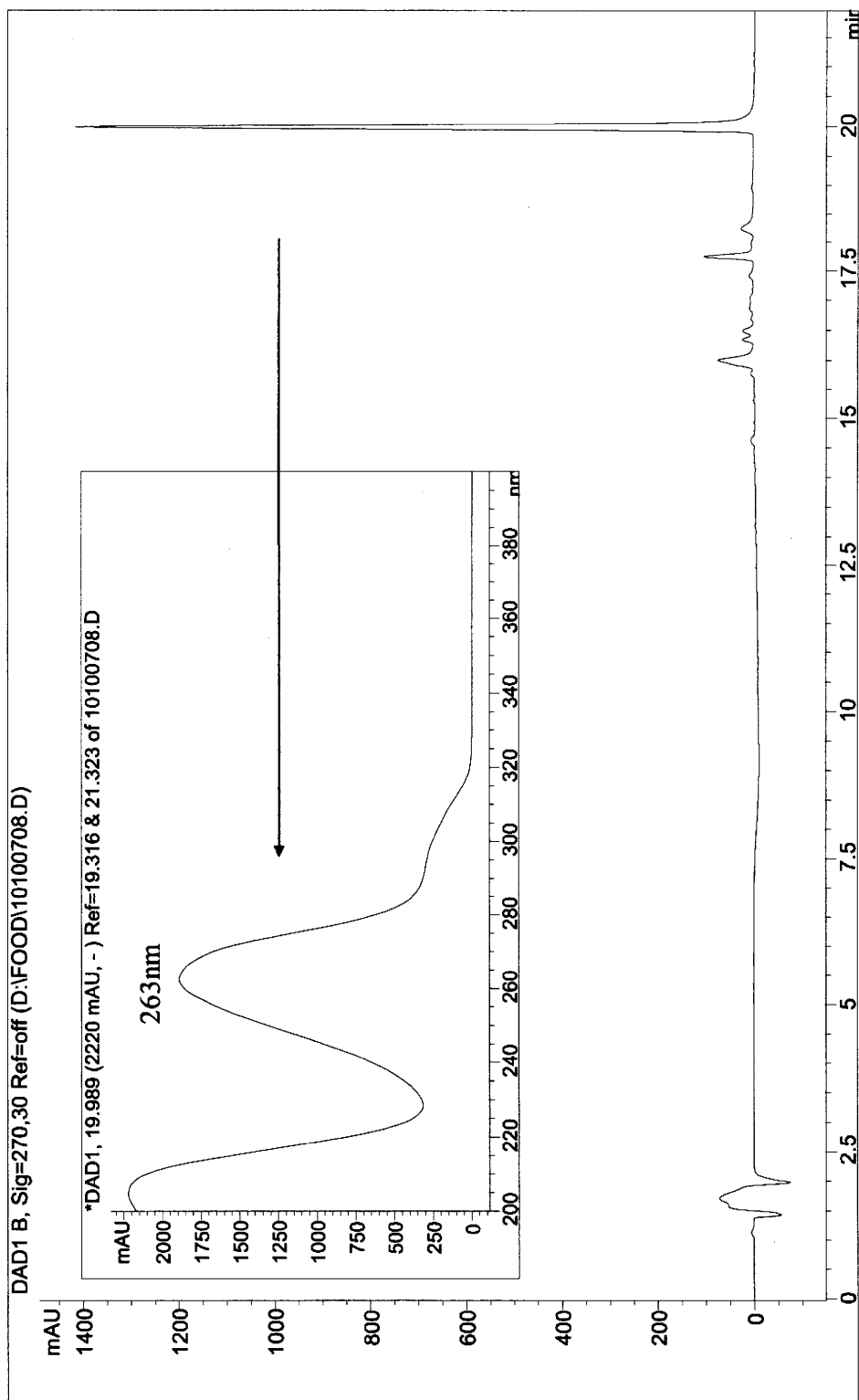


図 1 代表的なホクシ抽出物希釈液の HPLC クロマトグラム

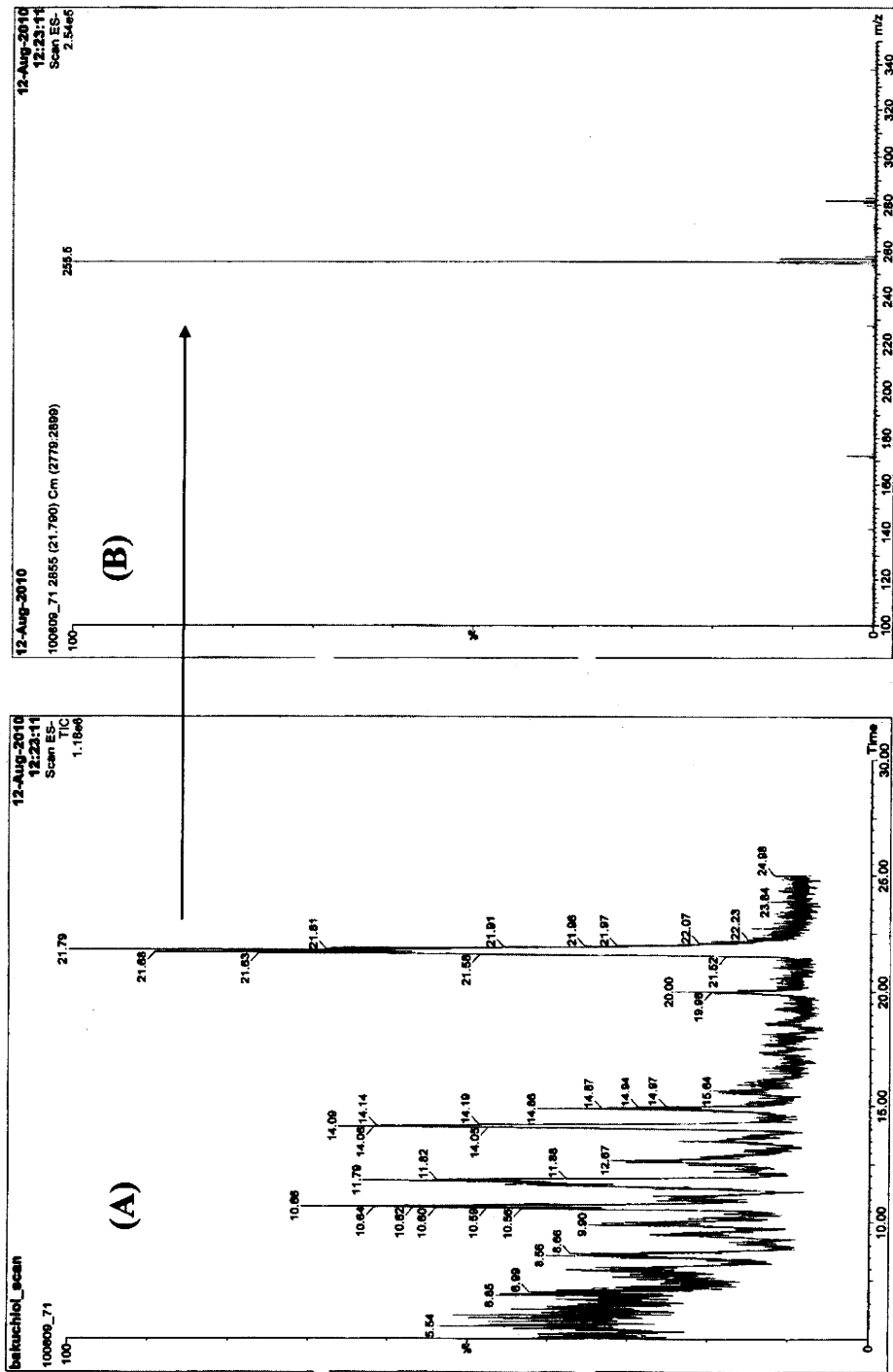


図2 代表的なホロシ抽出物希釈液のLC-MS/MSクロマトグラム
 (A) トータルイオンクロマトグラム, (B) 21.8 分に検出されたピークのMSスペクトル

B. 定量NMR法を利用した既存添加物分析法の開発

4. NMRを用いた既存添加物の新規分析法の開発と応用に関する研究

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）

既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発

平成 22 年度分担研究報告書

NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発に関する研究

-qNMR 多変量解析によるカラメル色素に関する研究-

研究分担者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

研究協力者 田原麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 研究員

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

研究要旨

カラメル色素は、製法の違いから I-IV に分類されるが、市場に流通している製品を I-IV に区別、さらに各製品の原材料を特定することは容易ではない。また、カラメル色素に不純物として含まれる 2-アセチル-4-(1,2,3,4-テトラヒドロキシブチル)イミダゾール (2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole: THI), 4-メチルイミダゾール (4-methylimidazole: 4-MeI) の定量分析に必要な標準品の純度値についても科学的な根拠が求められる。そこで、SI にトレーサブルな定量値を導くことが可能である定量 NMR (qNMR) および多変量解析を組み合わせた qNMR 多変量解析法により、カラメル色素製品の区別分類、原材料の特定、不純物 THI の絶対定量が可能であるか検討した。その結果、qNMR 多変量解析が有効な手法の一つと成り得ることが示唆された。また、今回入手したカラメル I (9 製品 26 ロット), III (4 製品 12 ロット) および IV (7 製品 18 ロット) について THI の存否を qNMR 多変量解析により確認したところ、すべての製品より検出されなかった。qNMR により、4-MeI 市販試薬および THI 標準品 3 製品について純度決定したところ、91~97%であった。

A. 研究目的

NMR (核磁気共鳴法) は、低分子~高分子の定性的な分子情報が得られる構造解析には欠かせない分光法である。測定対象とした核種さらに、個々のシグナルの完全帰属は行わず、得られたスペクトルの変動(化学シフト変化や強度変化)を統計的に処理し、変動成分の情報を取り出そうという解析手法(多変量解析)が、複雑な系の混合物の解析にも応用され始めている。この多変量解析は、近赤外分光法やクロマトグラフ法などには既に応用されており、NMR に多変量解析を応用した場合には、変動成分の構造と絶対量の情報が同時に収集可能

であり、既存の定性・定量分析技術で得られる情報を遙かに超える。すなわち、本手法は、混合物中の成分の包括的把握が可能であることから、変動あるいは異常成分の検出と追跡・評価だけでなく、混合物の品質評価に応用可能であると考えられる。また、従来の分離分析手法とは異なり、分離精製をいっさい行わない NMR 計測であり、分離分析が不可能、あるいは分離分析の過程で個々の成分の化学構造が変化してしまうような系において、複合成分をそのまま把握できる点が優れている。複雑な系である植物抽出物、合成混合物、バイオテクノロジー製品、発酵産品等を扱う産業界で応用可

能な技術として期待されている。

一方、我々はこれまでの研究過程において、国際単位系(SI)に基づく計量トレーサビリティが確保された新たな定量分析法として、NMRを用いた定量法(quantitative NMR (qNMR))の開発した。qNMRは、他の定量分析法のほとんどが個々の化合物に特有の物性値を利用して、化合物中に等価に存在する水素原子の数を指標として定量値を求める方法である。すなわち、一つの¹H-NMRスペクトル上に2つの化合物が同時に観察される場合、プロトンシグナル面積比は2つの化合物のモル濃度に比例することから、一方の化合物の純度と濃度が明らかであれば、もう一方の化合物の純度あるいは含量を、観察されるシグナル面積比と調製値の関係から算出可能であることを利用している。したがって、qNMRは、測定対象と同一の化合物の定量用標準品を必要とせず、別の物質を基準として定量分析が可能な定量法であり、SIにトレーサブルな一次標準測定法のうち、一次標準比率法、すなわち「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」の資格を原理的に有する方法である。

食品添加物カラメル色素は、調味料、飲料、製菓等に広く用いられる着色料である。カラメル色素は製法によってカラメルI、II、III、IVに分類され、第8版食品添加物公定書にはその定義、性状、確認試験および純度試験が規定されている。第8版食品添加物公定書に記載の定義によると、カラメル色素は、でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物を製造原料とすることは共通であるが、「亜硫酸化合物」および「アンモニウム化合物」の使用の有無によってI-IVの4つに分類されていることがわかる。純度試験の項目としては共通項が多いが、「亜硫酸化合物」を加えて調製するカラメルIIとIVは二酸化硫黄の限度規定が設定されており、

「アンモニウム化合物」を加えて調製するカラメルIIIとIVにはアンモニア性窒素の限度試験が設定されている。また、「アンモニウム化合物」を加えて調製するカラメルIIIとIVには、微量の副生成物として4-メチルイミダゾール(4-methylimidazole: 4-MeI)が、カラメルIIIには、2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール

(2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole: THI)が限度規定されている。このように、カラメルI-IVには純度試験中に異なる項目が設定されているが、これらの性状は等しいため、市場に流通する市販のカラメルI-IVを純度試験の結果あるいは他の物性値のみの情報による正確な区別は困難である場合もある。

昨年度までにqNMRを応用し、食品添加物コチニール色素中の主色素成分カルミン酸、ダットンソバ中の有効成分クエルセチンの絶対量が計量学的に正確に算出可能であることを報告した。また、我々は、qNMRと多変量解析の手法を融合し、両手法の利点、すなわち、計量学的に正確な定量性能と変動成分の追跡・検出能を併せ持った包括的分析法の開発に着手している。

そこで、本研究では我が国に流通するカラメルI、III、およびIV製品について、qNMR多変量解析の応用により、製造法、原料、性状による分類が可能であるかどうか、同時に、4-MeIおよびTHIの絶対定量が可能であるかどうかについて検討した。また、qNMRにより、本研究に用いた4-MeIおよびTHIの定量用標準品の絶対純度を算出した。

B. 研究方法

1) 試薬および試料

カラメルI (9製品 26ロット)、III (4製品 12ロット)およびIV (7製品 18ロット)および2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール

ール

(2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole: THI)標準品 3 種 (THI-0 (食品添加物公定書分析用標準品), THI-1 (合成品), THI-2 (米国製標準品)) は, 日本キャラメル工業会から分与していただいたものを用いた. Table 2 に実験に供したキャラメル I-IV 製品の分類, 原材料等を示す. また, 2-メチルイミダゾール (2-methylimidazole: 2-MeI ($C_4H_6N_2$ MW=82.1038, cat. M0345, lot. EUXKB, 純度>96%(GC)(T)), 4-メチルイミダゾール (4-methylimidazole: 4-MeI ($C_4H_6N_2$ MW=82.1038, cat. M0636, lot. GA01, 純度>96%(T))およびトリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid: TFA, cat. T0431, 純度>99%(T))には, 東京化成工業(株)製の市販試薬を用いた.

qNMR 基準物質として sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3- d_6 -sulfonate: DSS- d_6 ($92.2\% \pm 0.6\%$ ($k=2$), 和光純薬工業(株)製 NMR 標準物質 No. 048-31071), qNMR 用重溶媒として重水(D_2O)(99.9 atom % D, cat. 151882, lot. CX0066, Isotec 製)を用いた. 高純度フタル酸水素カリウム (potassium hydrogen phthalate: PHP)認証標準物質 (certified reference material: CRM)(品番 NMIJ CRM 3001-a: 純度 $100.00 \pm 0.027\%$)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, $120^\circ C$ で約 1 時間加熱し, デシケーター中で放冷後, 用時使用とした.

2) 装置

核磁気共鳴装置(NMR): オートサンプラー付き JNM-ECA (600 MHz) (日本電子(株)製). qNMR および qNMR 多変量解析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.

ウルトラマイクロ天秤: XP2U (メトラートレ

ド製). 試料の秤量値は, 特に断りのない限り, 最小目盛 0.0001 mg まで読み取った値を用いた.

なお, 標準液および試料溶液の調製には, 化学用体積計(20~100 mL メスフラスコ)または電動オートピペッター(マルチピペット Xstream (エッペンドルフ製), 10 mL (不確かさ $\pm 0.4\%$), 1~5 mL (不確かさ $\pm 0.5\%$))を用いた.

3) qNMRによる2-MeI, 4-MeIおよびTHIの純度測定

3-1) qNMR 標準液の調製および濃度校正

qNMR 標準液の調製および標準液中の DSS- d_6 の濃度校正は既報に準じた. すなわち, DSS- d_6 約 10 mg を精密に量り取り, 0.5%TFA in D_2O を加えて溶解し, 正確に 100 mL に定容して qNMR 標準液とした. qNMR 標準液中の DSS- d_6 の濃度は, 認証標準物質(CRM)である PHP により校正して求めた. すなわち, PHP 約 3 mg を精密に量り取り, qNMR 標準液 1.0 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 のフェニルプロトン PhH $\times 2$ ($\delta 7.69$ ppm), PhH $\times 2$ ($\delta 7.82$ ppm)および DSS- d_6 のメチルプロトン CH $_3 \times 3$ ($\delta 0$ ppm)に由来するシグナル面積, 分子量, 濃度等を式(1)に代入し, qNMR 標準液中の DSS- d_6 の濃度(W_{DSS})を校正し, $852.2 \mu g/mL$ (AV, $n=3$, from $\delta 7.69$ ppm, $\delta 7.82$ ppm)を得た.

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

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 および PHP の特定基のシグナル面積, H_{DSS} , H_{PHP} = DSS- d_6 および PHP の特定基のプロ

トン数(DSS- d_6 = CH₃×3, PHP = PhH×2 (δ7.69 ppm, δ7.82 ppm)), P_{PHP} = PHPの純度(100.00%).

3-2) 2-MeI, 4-MeI および THI の純度測定

2-MeI, 4-MeIおよびTHI (THI-0, THI-1, THI-2) 約1.5~5 mg精密に量り取り, 予め調製した qNMR標準液1.0 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, 2-MeI, 4-MeIおよびTHI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)に代入して純度(%)を算出した.

$$P_s = \frac{I_s / H_s}{I_{\text{DSS}} / H_{\text{DSS}}} \times \frac{M_s / W_s}{M_{\text{DSS}} / W_{\text{DSS}}} \times 100 \quad (2)$$

ただし, W_{DSS} , W_s = DSS- d_6 および試料(2-MeI, 4-MeIおよびTHI)の濃度(mg/mL), M_{DSS} , M_s = DSS- d_6 および試料(2-MeI, 4-MeIおよびTHI)の分子量, I_{DSS} , I_s = DSS- d_6 および試料(2-MeI, 4-MeIおよびTHI)の特定基のシグナル強度面積, H_{DSS} , H_s = DSS- d_6 および試料(2-MeI, 4-MeIおよびTHI)の特定基のプロトン数, P_s = 試料(2-MeI, 4-MeIおよびTHI)の純度(%).

3-3) qNMR 測定条件および解析処理

qNMR 測定条件の基本情報は Table 3 に示した. qNMR データ解析には, 定量解析ソフトウェア Alice for qNMR (日本電子(株)製)を用いた. qNMR データをフーリエ変換および自動位相補正した後に, qNMR 基準物質および測定対象化合物の情報から自動解析処理を行い, 式(1)または式(2)に従い, qNMR 標準液中の DSS- d_6 の濃度(W_{DSS})(mg/mL)および 2-MeI, 4-MeI および THI の純度(P_s)(w/w%)を算出した.

4. qNMR多変量解析による評価

各カラメル色素製品約15~25 mgを精密に量り取り, 予め調製したqNMR標準液(DSS- d_6 84.57 μg/mL in D₂O (AV, n = 3, PHPにより校正)) 1.0 mLに溶解した(Table 2). 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. Table 3に示すqNMR条件下でスペクトル測定を行い, NMR多変量解析ソフトウェア Alice2 for Metabolome (日本電子(株)製)上で一元的に解析処理した.

C. 結果及び考察

1) qNMR による 2-MeI, 4-MeI および THI の純度測定

Table 1 にカラメル I-IV について「第 8 版食品添加物公定書」の「D. 成分規格・保存基準各条」に記載されている定義および性状, 純度試験の項目を示した. カラメル I-IV の製造原料は共通であり, 「亜硫酸化合物」および「アンモニウム化合物」の使用の有無によってカラメル色素は I-IV の 4 つに分類されていることがわかる. 「アンモニウム化合物」を加えて調製するカラメル III と IV には, 微量の副生成物として 4-MeI および THI が限度規定されている. 4-MeI にはマウスやウサギにおいてけいれんを引き起こす作用が, THI にはラットにおいてリンパ球数減少作用等が報告されており, 安全性を考慮して限度値が設定されている. また, 4-MeI および THI の定量用標準品, 内標準物質として用いられる 2-MeI については, 「第 8 版食品添加物公定書」の「C. 試薬・試液等」の項に記載されている(Table 4). 2-MeI および 4-MeI は含量 98%以上および 97%以上, その定量法として滴定法が設定されている. 一方, THI は含量が設定されておらず, 純度試験として HPLC/UV により THI 以外のピークが検出されないことが規定されている.

ところで, 化学物質の絶対値(絶対量)は国際単位系(International System of Units: SI)にトレ

ーサブルな測定によって得られると定義されている。このような測定法は「一次標準測定法」と呼ばれている。「一次標準測定法」の資格を有する分析法は「一次直接法」と「一次比率法」に分類される。「一次直接法」は、「物質量の基準となる他の化学物質を用いず、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、重量分析法および凝固点降下法がある。「一次比率法」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、滴定法及び同位体希釈質量分析法がある。したがって、2-MeI および 4-MeI の定量用標準品の含量については、原理的には「一次比率法」による絶対量が求められ、その値が規定されていることとなる。一方、THI の定量用標準品の含量については、HPLC/UV によるクロマトグラフ上の THI 以外のピークの有無のみを規定しているだけであって、THI の定量用標準品中の内容物、すなわち、THI (および不純物)の絶対量が規定されていない。また、特に THI については定量用標準品として使用できる試薬の入手が困難であるという問題もある。

そこで、4-MeI および THI、また合わせてカラメル I, III, IV 中の 4-MeI の定量分析の際に内標準物質として用いられる 2-MeI について qNMR による絶対純度の測定を行った。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。qNMR により得られる定量値の SI トレーサビリティを、Fig. 1 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 DSS- d_6 の濃度を PHP により校正した後に、DSS- d_6 を基準として測定対象化合物の qNMR 測定を行う 2 段階の方式を用いた。qNMR 基準物質に用いた DSS- d_6 には、和光純薬工業(株)製の NMR 用 DSS- d_6 標準物質を用いた。この DSS- d_6 標準物質の純度値として $92.2\% \pm 0.6\%$ ($k=2$)が計量標準総合センター(NMIJ)により証明されている。qNMR 標準液中の DSS- d_6 の濃度を PHP により校正した際に DSS- d_6 の純度を求めたところ $92.5\% \pm 0.5\%$ (AV \pm SD, $n=3$)を与え、NMIJ が証明した純度値と等しい結果となった。このことから、qNMR 標準液中の DSS- d_6 の純度の SI トレーサビリティが確保されていることが証明された。

Fig. 2 には、qNMR 基準物質として DSS- d_6 を $85.22 \mu\text{g/mL}$ 含む qNMR 標準液 1.0 mL に THI 標準品(3 試料: THI-0 (食品添加物公定書分析用標準品), THI-1 (合成品), THI-2 (米国製標準品)) 約 1.5 mg を溶解したものの実際のスペクトルを示した。なお、THI は pH が中性の水に溶けにくいため、qNMR 標準液の調製には強酸性の 0.5% TFA in D_2O を用いた。 δ 0 ppm に qNMR 基準物質の DSS- d_6 のメチル基のシグナル、 δ 6.42 ppm にイミダゾール環上の 5 位、 δ 5.27 ppm および δ 3.7~3.9 ppm に 4-テトラヒドロキシブチル基、 δ 2.62 ppm に 2-アセチル基のプロトンシグナルが観察された。また、 δ 7.4 ppm および δ 5.2 ppm に若干の不純物のシグナルが観察された。qNMR により正確な定量分析を行うためには、十分に分離したシグナルを定量用として選択することが重要である。よって、 δ 3.7~3.9 ppm に観察される 4-テトラヒドロキシブチル基の 2', 3', 4'位のシグナルはこの条件に合致しないため、定量用シグナルには δ 6.42 ppm, δ 5.27 ppm および δ 2.62 ppm を選定した。これらの THI のシグナルと qNMR 基準物質の DSS- d_6 とのシグナル面積比を測定し、式 2 に化合物情報を入力し、純度値を求めた。その結

果, THI 標準品(THI-0 (食品添加物公定書分析用標準品), THI-1 (合成品), THI-2 (米国製標準品))の純度は93.4%~95.6%であり, THI-0の食品添加物公定書分析用標準品が最も純度が高いことがわかった(Table 5).

同様にして, qNMRにより 2-MeI および 4-MeIの絶対純度を測定した. Fig. 3にはqNMR基準物質として DSS- d_6 を 85.22 $\mu\text{g/mL}$ 含む qNMR 標準液 1.0 mLに 2-MeI および 4-MeIの市販試薬製品約 5 mgを溶解したものの実際のスペクトルを示した. $\delta 0$ ppmの qNMR 基準物質の DSS- d_6 のメチル基のシグナルと共に, 2-MeIでは $\delta 7.28$ ppmにイミダゾール環上の 4, 5位, $\delta 2.62$ ppmに 2-メチル基, 4-MeIでは $\delta 8.52$ ppm および $\delta 7.16$ ppmにイミダゾール環上の 4, 5位, $\delta 2.32$ ppmに 4-メチル基のプロトンシグナルが観察された. なお, 2-MeI および 4-MeIの qNMR スペクトル上には不純物に由来すると考えられるシグナルはほとんど観察されなかった. 2-MeI および 4-MeIの定量用シグナルには前述のシグナルを利用し, それぞれの純度値を求めたところ, 2-MeIの純度が $97.9 \pm 0.4\%$ (AV \pm SD%), 4-MeIの純度が $93.2 \pm 1.9\%$ (AV \pm SD%)であった. 試薬メーカーが保証する両者の純度(含量)値は滴定法または GC 法より 96%以上とされていたことから, 2-MeIについてはその保証内であったが, 4-MeIについてはそれを下回る結果となった. また, 4-MeIの絶対純度(含量)は「第8版食品添加物公定書」の「C. 試薬・試液等」の項に規定されている 4-MeIの含量「97%以上」を数%下回ることがわかった.

今回, 2-MeI および 4-MeI市販試薬, THI 標準品(3試料: THI-0 (食品添加物公定書分析用標準品), THI-1 (合成品), THI-2 (米国製標準品))について, qNMRにより絶対純度を求めた. 「第8版食品添加物公定書」の「C. 試薬・試液等」の項に記載の 2-MeI および 4-MeIの含量規定,

THIの純度試験と qNMRにより得られた絶対純度を照らし合わせたところ, 若干異なることが確認された. また, THIの純度試験では, THIの純度が正確に規定されていない可能性が示唆された. 本研究において対象とした THIのような入手および純度決定が困難な標準品については, qNMRを用いた SI トレーサビリティが確保された絶対純度の規定が今後必要であると考えられた.

2) qNMR 多変量解析によるカラメル色素の検討

カラメル工業会から分与していただいたカラメル色素製品(カラメル I 9 製品, カラメル III 4 製品, カラメル IV 7 製品)を qNMR 多変量解析に付し, 製造方法, 原料, 性状による差異の有無を検討した. Fig. 4には, 代表的な qNMR スペクトルとして, カラメル I (試料番号 1), カラメル III(試料番号 27)およびカラメル IV(試料番号 39)を示したが, すべてのサンプルにおいて $\delta 3.0 \sim 5.5$ ppmの領域に糖類に由来するシグナルが観察されると共に, 高磁場 $\delta 1.0 \sim 3.0$ ppm および低磁場 $\delta 6.0 \sim 10$ ppmの領域にサンプル毎に特徴的なシグナルが観察された. また, 各試料毎に qNMR スペクトル上に観察されるシグナルが若干異なり, 製造方法, 原料, 性状に起因しているものと考えられた.

次に, すべての試料について qNMR 多変量解析を行った(Fig. 5). なお, 多変量解析用に用いた qNMR スペクトル領域は, $0.1 \sim 10$ ppm (ただし, 水のシグナル領域 $4.75 \sim 4.95$ ppmを除く)とし, スペクトルを 0.04 ppm 毎に分解した. カラメル I を Blue, III を Green, IV を Red で示し, 原材料が砂糖を●, グルコースを○, 糖蜜を■, グルコース+糖蜜を□で表した. この結果, 糖蜜および砂糖を原材料とするものは明らかに異なるグループを形成した. また, カラメル I, III および IV のうち, グルコースまたは砂

糖を原材料としたものに関しては若干異なるグループを形成した。これらのグループ形成に関わる寄与成分について今後精査することによって、カラメル I, III および IV, また、原材料を特定するための指標成分を設定可能であると考えられた。

D. まとめ

カラメル色素は製法によってカラメル I, II, III, IV に分類され、第 8 版食品添加物公定書にはその定義、性状、確認試験および純度試験が規定されている。カラメル色素は、食用炭水化物を製造原料とすることは共通であるが、「亜硫酸化合物」および「アンモニウム化合物」の使用の有無によって I-IV の 4 つに分類され、「アンモニウム化合物」を加えて調製するカラメル III と IV には、微量の副生成物として 4-メチルイミダゾール(4-methylimidazole: 4-MeI)が、カラメル III には 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole: THI)が限度規定されている。また、これらの性状は等しいため、市場に流通するカラメル I-IV を純度試験の結果あるいは他の物性値より完全に区別することは困難であると考えられる。そこで、本研究では我が国に流通するカラメル I, III, および IV 市販製品について、qNMR 多変量解析による区別、4-MeI および THI の定量用標準品の絶対純度を算出した。その結果、qNMR 多変量解析が有効な手法の一つと成り得ることが示唆された。また、今回入手したカラメル I(9 製品 26 ロット)、III(4 製品 12 ロット)および IV(7 製品 18 ロット)について THI の存否を qNMR 多変量解析により確認したところ、すべての製品より検出されなかった。qNMR により、4-MeI 市販試薬および THI 標準品 3 製品について純度決定したところ 91~97%であった。

E. 謝辞

カラメル色素製品試料および THI 標準品を分与していただいた日本カラメル工業会、カラメル I, III および IV の qNMR 多変量解析に御協力いただいた有福和紀氏(日本電子株式会社)に深謝いたします。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎 壮, 河村葉子: 定量 NMR に基づく既存添加物中のクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量. 食衛誌, **51(5)**, 205-212 (2010).
2. 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 田原麻衣子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 河村葉子, 西村哲治: 定量 NMR を用いたダツタンソバ乾麺中のクエルセチンの迅速定量. 食化誌, **17(3)**, 179-184 (2010).
3. Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: Application of ¹H-NMR spectroscopy to validation of berberine alkaloid reagents and to chemical evaluation of *Coptidis Rhizoma*, *Journal of Natural Medicines* **65**, 262-267 (2011).
4. 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀: 定量 NMR を用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保. *FFI ジャーナル*, **215 (2)**, 129-136 (2010).

2) 学会発表

1. 大槻崇, 杉本直樹, 多田敦子, 建部千絵, 末松孝子, 有福和紀, 山崎壮, 佐藤恭子, 西村哲治, 河村葉子: 食品添加物の定量における qNMR 法の適用について. 日本薬学

- 会第 130 年会 (2010.3).
2. 三浦亨, 齋藤剛, 井原俊英, 前田恒昭, 杉本直樹, 多田敦子, 山崎壮, 西村哲治, 有福和紀, 末松孝子, 山田裕子, 吉田雄一, 小池亮, 堀之内嵩暁: NMR を用いた定量分析における試料調製の重要性. 第 77 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会 (2010.5).
 3. 井原俊英, 齋藤剛, 清水由隆, 前田恒昭, 千葉光一, 杉本直樹, 多田敦子, 山崎壮, 西村哲治, 末松孝子, 有福和紀, 山田裕子, 吉田雄一, 小池亮, 堀之内嵩暁: 一対多型校正技術の開発. 第 71 回分析化学討論会 (2010.5).
 4. 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 石附京子, 末松孝子, 有福和紀, 西村哲治, 山崎壮, 河村葉子: ステビオシドおよびレバウジオシド A 標準品の NMR による純度測定法の検討. 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会(2010.9).
 5. 杉本直樹, 田原麻衣子, 多田敦子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 河村葉子, 合田幸広, 西村哲治: qNMR に基づく有機化合物の微量分析の検討. 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11).
 6. Sugimoto, N., Tahara, M., Kubota, R., Shimizu, K., Hayakawa, K., Nishimura, T.: Development of a novel quantitative GC/MS using multidimensional property database. Pacifichem2010 (2010.12).
- 3) 招待講演
1. Sugimoto, N. : Innovation of Analytical Technique for food Chemistry and Safety (食品化学のための分析技術イノベーション). 第 10 回国際計量シンポジウム (2010.5).
 2. 杉本直樹: qNMR を用いた有機化合物の絶対定量法の開発と実用化に関する研究. 日本食品化学学会第 16 回総会学術大会 (2010.6).
 3. 杉本直樹: 定量 NMR の食品分析への応用. 東京コンファレンス 2010 (2010.9).
- 4) 学会賞等
1. 杉本直樹: qNMR を用いた有機化合物の絶対定量法の開発と実用化に関する研究. 日本食品化学学会奨励賞受賞 (2010.6).

International System of Units (SI)

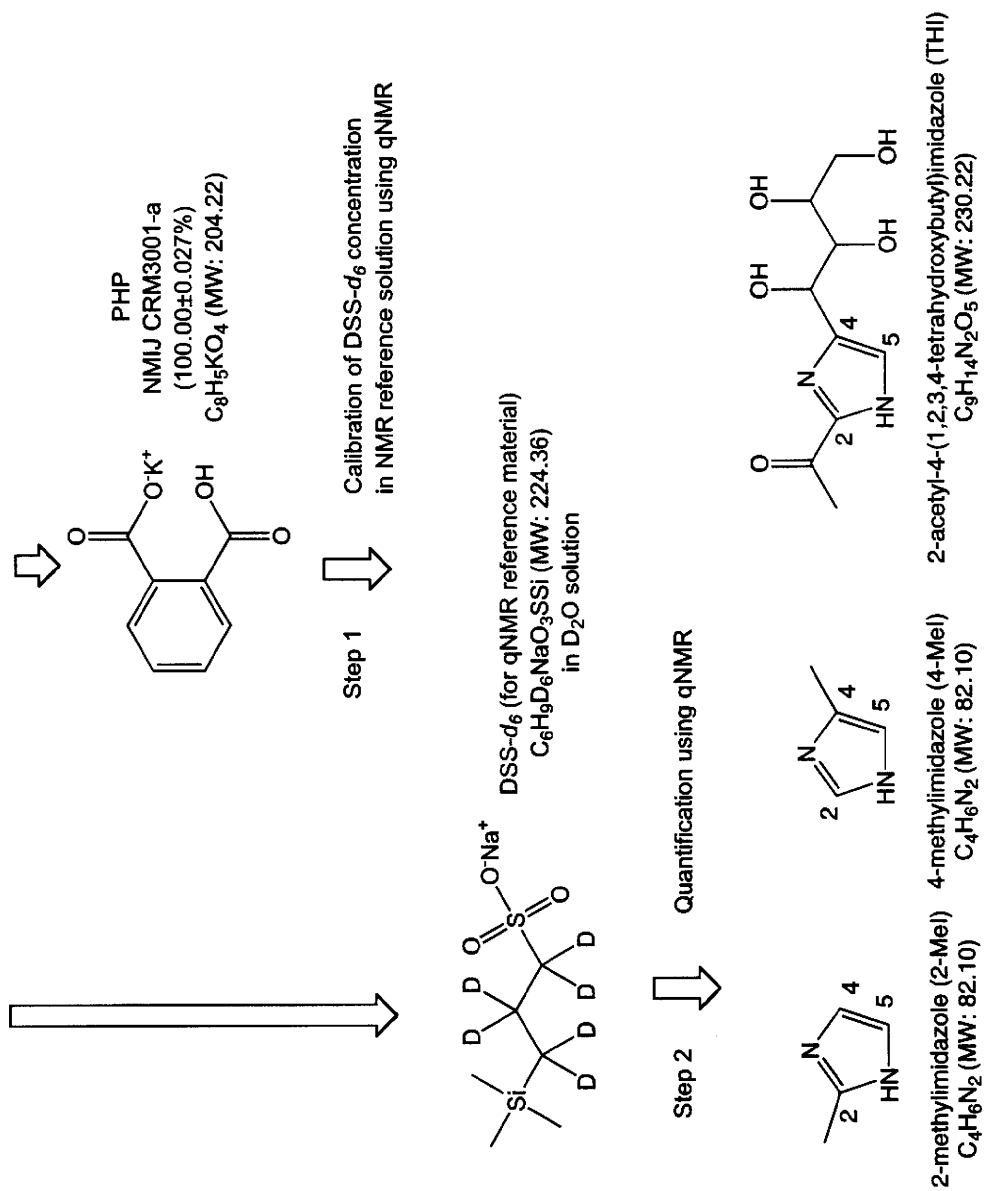


Fig.1 Strategy of SI-traceable absolute quantification based on qNMR.

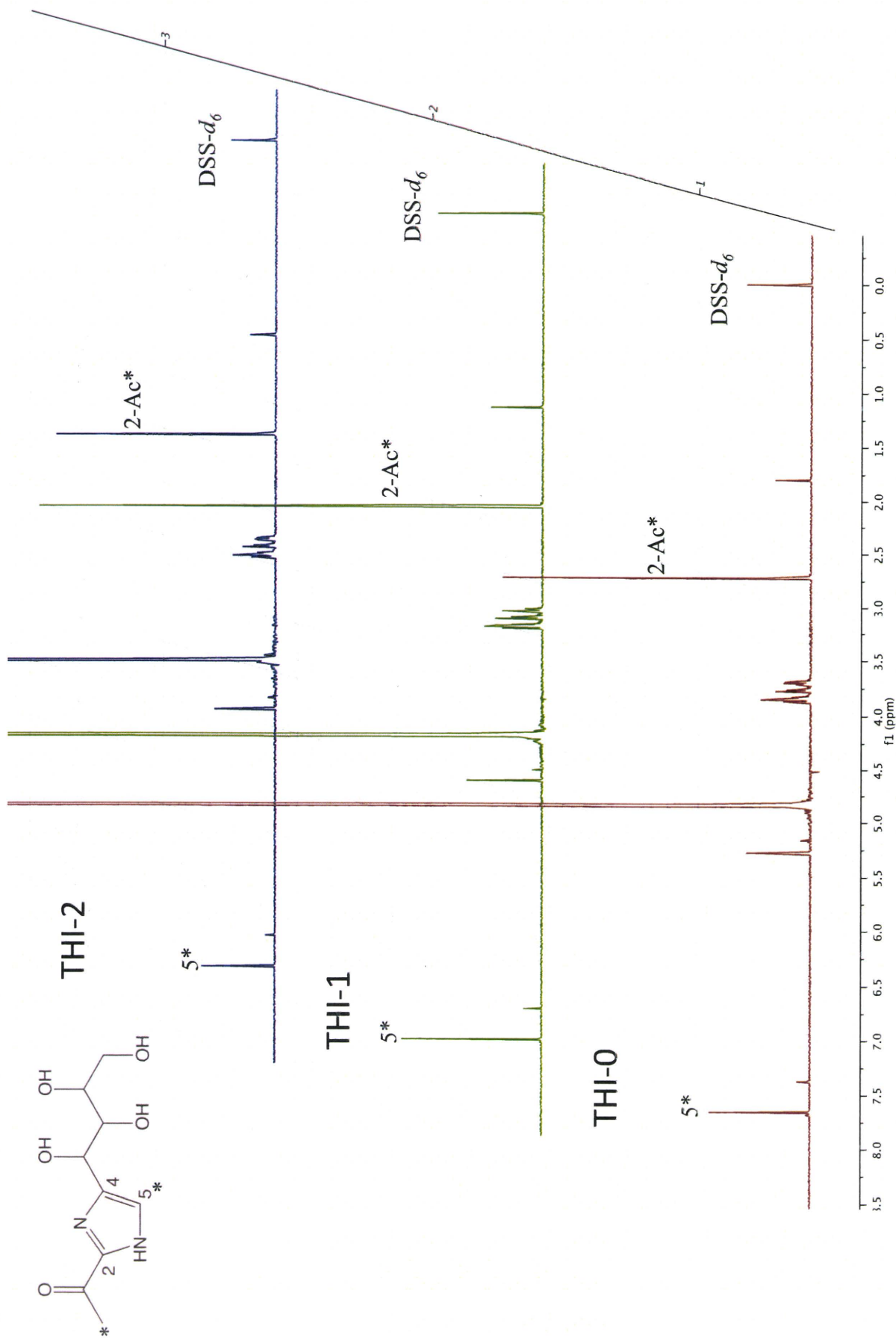


Fig. 2 qNMR spectra of THI standards

THI-0 = standard for quantification, THI-1 = synthesized standard, THI-2 = standard obtained from U.S. market.

NMR solvent = 0.5% TFA in D₂O. DSS-d₆ conc. = 85.22 µg/mL. THI conc. = 1.5798 mg/mL (THI-0), 1.6687 mg/mL (THI-1), 1.5695 mg/mL (THI-2).

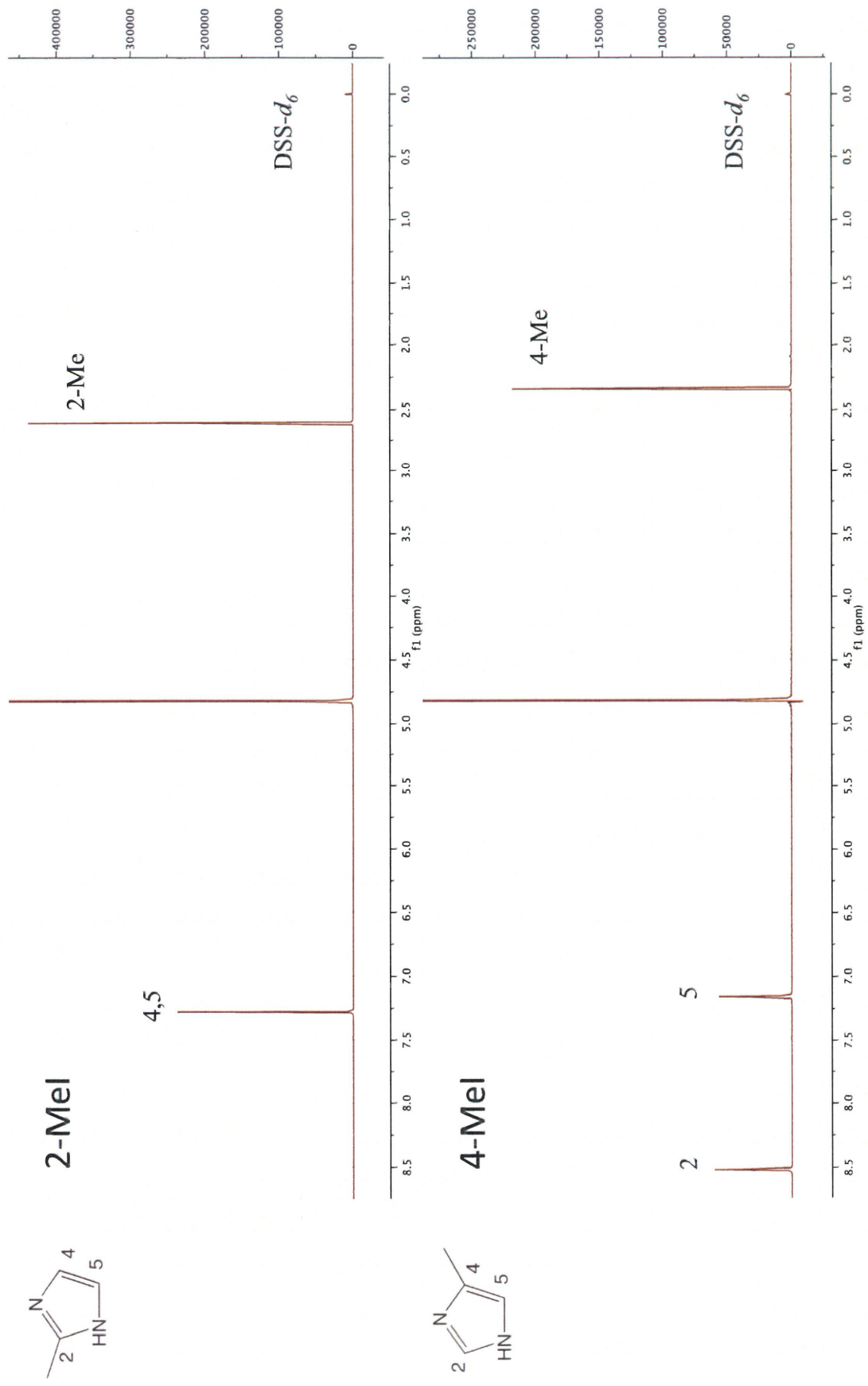


Fig. 3 qNMR spectra of 2-MeI and 4-MeI standards
 NMR solvent = 0.5% TFA in D₂O. DSS-*d*₆ conc. = 85.22 μg/mL. 2-MeI conc. = 4.121 mg/mL 4-MeI conc. = 5.421 mg/mL.

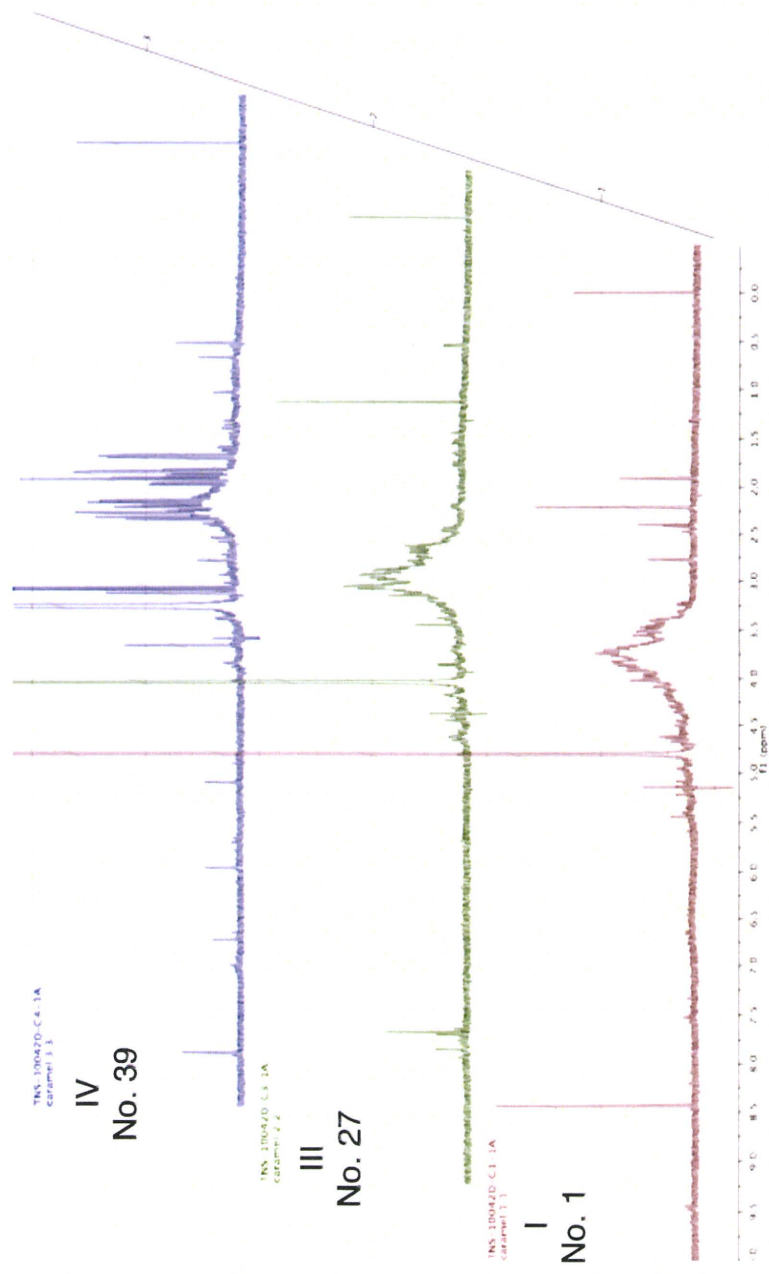


Fig. 4 Typical qNMR spectra of caramel I, III and IV

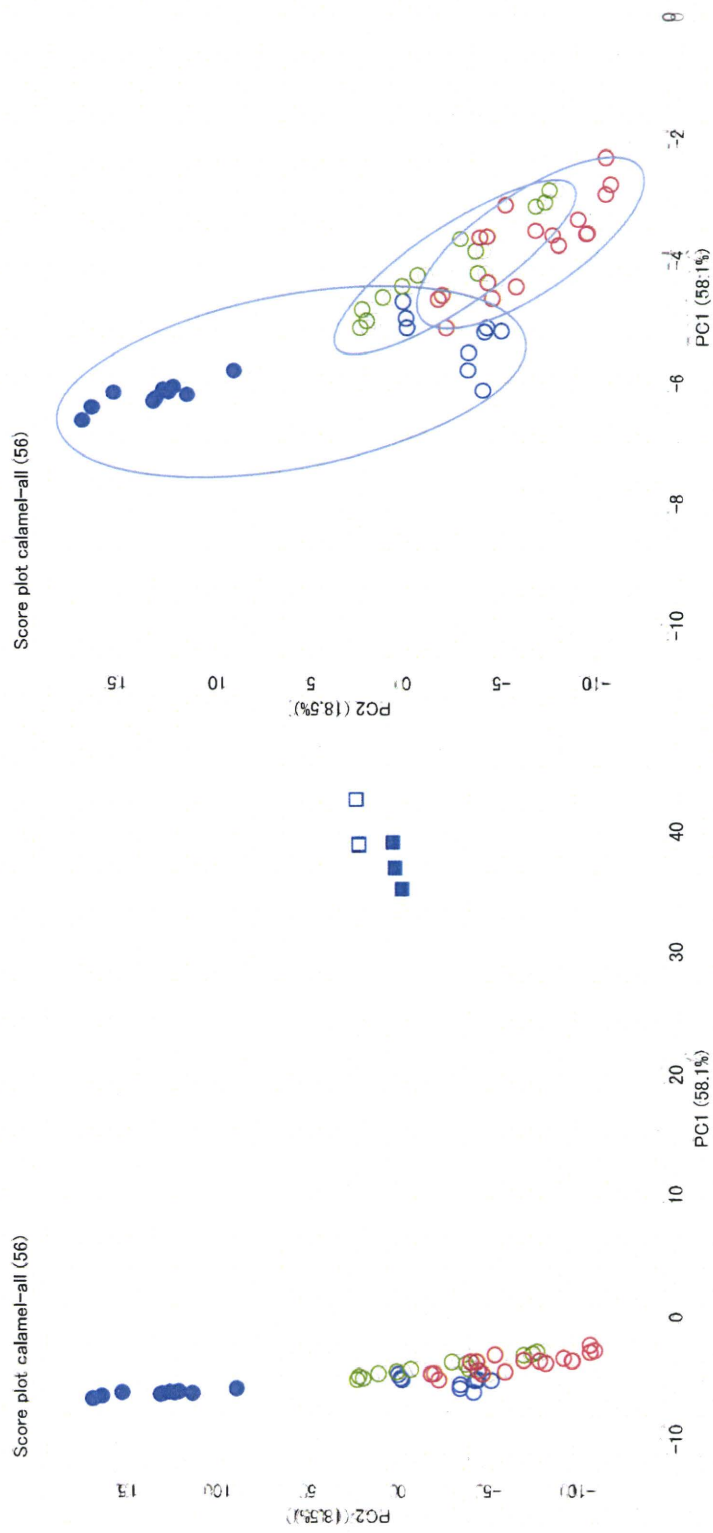


Fig. 5 qNMR-multivariate analysis of caramel I, III and IV
 Raw material: sugar = ●, glucose = ○, molasses = ■, molasses+glucose = □. Caramel variety: blue = I, green = III, red = IV.
 Plot: left = all sample, right: magnified view.