

3-2) 回答表の作成

高度化したデータベースを基にSEQ番号、品目名、CAS番号、FEMA GRAS番号の表を作成してIOFIの使用量調査用リストと比較し修正を行ったものを使用量調査用の基本回答表とした。また、基本回答表にない香料化合物を調査するための追加品目回答表も併せて作成した。なお、前回調査以降平成22年12月13日までに新たに指定された香料化合物を調査対象に加えた。

4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

本年度は、各国・地域の香料の定義・分類、主剤として使用できる原料の調査を行った。関連法令の調査は、当該国政府・省庁のWeb site、米国農務省など貿易相手国政府・省庁及び各種団体・調査機関の調査報告書等を参考にした。

法令資料は当該国・地域の政府・省庁、FAOの法規データベース及び独立行政法人日本貿易振興機構（ジェトロ）のWeb siteから入手した。当該国・地域の政府機関のWeb siteに法令の英訳、解説、またはQ&A等が掲載されている場合は、それらも法令に準じるものとして利用した。また当局へ問い合わせを行った結果が得られた場合はこれも資料に加えた。

C. 研究結果

1) アルギン酸の定量法に関する研究

1-1) アルギン酸ナトリウムからのウロン酸の分離

硫酸により加水分解された、アルギン酸ナトリウム加水分解物について、陰イオン交換樹脂により分離を行ったところ、約1000mLの溶出液を溶出させ、約200本のフラクションが得られた。各フラクション中のウロン酸の有無をカルバゾール硫酸法により発色させ確

認したところ、Fig.2に示すようにフラクションNo.100~140及びフラクションNo.140~180にピークが確認された。それぞれをピーク1及び2として回収し、減圧濃縮により濃縮後、2mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH6~8に調整後、凍結乾燥を行い、ピーク1及び2でそれぞれ0.3g及び0.5gのウロン酸が得られた。

1-2) アルギン酸ナトリウム加水分解物のHPLCによる分析

得られたウロン酸について、さまざまなカラムを用いて、アルギン酸ナトリウム加水分解物及び陰イオン交換樹脂による分離後のピーク1及びピーク2のHPLCによる分析を行った。その結果、Fig.3に示すように、アルギン酸ナトリウム加水分解物からは12.5分及び15分に二つのピークが確認され、ピーク1は12.5分、ピーク2は15分にそれぞれ溶出し、アルギン酸ナトリウム加水分解物に含まれるピークの溶出時間と一致した。また、ピーク1及びピーク2のクロマトグラムからはその他の不純物は見られなかった。また、マンヌロン酸及びグルロン酸を同様にHPLCで分析した報告例²⁾と比較したところ、それぞれの溶出時間から、ピーク1はグルロン酸、ピーク2はマンヌロン酸と推測された。

2) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物に関しては、平成19年度において、一日摂取量の多かった品目は、L-グルタミン酸ナトリウム (2540mg/人/日)、D-ソルビトール (1450mg/人/日)、クエン酸 (無水物換算、376 mg/人/日)、二酸化炭素 (218 mg/人/日)、グリセリン脂肪酸エステル (212 mg/人/日) 等であった。

既存添加物に関しては、平成20年度の実生産量統計を調査した。出荷量の多かったものは、

製造用剤ケイソウ土(45,390トン)、製造用剤活性白土(36,746トン)、製造用剤窒素(31,333)、製造用剤パーライト(15,720トン)、着色料カラメルI(13,107トン)等であった。

3) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究

高度化した香料化合物データベースから品目名、SEQ番号、CAS番号及びFEMA GRAS番号の項目を抽出し、使用量及び含量の項目を加えた「基本回答表」を作成した。さらに、基本回答表に無い品目を調査するための「追加品目回答表」を作成した。

4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

調査(平成23年2月末)の結果、以下の国と地域について、各国の香料の定義、主剤として使用できる原料の情報を収集することができた。

アジア・オセアニア:インド、インドネシア、韓国、シンガポール、タイ王国、台湾、中国、バングラデシュ、フィリピン、ベトナム、香港、マレーシア、モンゴル、オーストラリア・ニュージーランド

北米:アメリカ合衆国、カナダ

中南米:メキシコ、メルコスール

ヨーロッパ:EU、ロシア

中東・アフリカ:湾岸協力会議加盟国(GCC)、南アフリカ

D. 考察

1) アルギン酸の定量法に関する研究

アルギン酸ナトリウムを硫酸で加水分解し、陰イオン交換樹脂で分離精製し、二つのウロン酸を得ることができた。それぞれのウロン酸はこれまでの報告例より、グルロン酸及びマンヌロン酸と推測されるが、今後NMRによ

るより詳細な同定が必要である。また、これらのウロン酸を用いて、Zorbax SAXカラムによるHPLC分析が可能であったが、RI検出器を用いたため感度が非常に悪かった。今後LC/MSやその他の検出器を用いる方法等の検討が必要であろう。

一方比色法については、今回ウロン酸の検出法として最も一般的なカルバゾール硫酸法を用いたが、カルバゾール硫酸法はマンヌロン酸及びグルロン酸に対しては感度が低いという報告もあり、その他にもオルシノール反応、フェノール硫酸法等さまざまなウロン酸比色法があるため、今後それぞれの比色法を用いて比較を行う必要がある。また、マンヌロン酸及びグルロン酸が市販されていないことから、定量の際、標準品として用いることができないため、今回得られたマンヌロン酸及びグルロン酸の他に、ガラクチュロン酸やグルロン酸といったその他のウロン酸を標準品として比色やHPLCによる定量を行い、マンヌロン酸及びグルロン酸の代わりとなる標準品への適用を検討する必要があるであろう。

2) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物については、過去の調査結果と大きく外れるものではなかった。一日摂取量の多かった品目は、L-グルタミン酸ナトリウム(2540mg/人/日)、D-ソルビトール(1450mg/人/日)、クエン酸(無水物換算、376mg/人/日)、二酸化炭素(218mg/人/日)、グリセリン脂肪酸エステル(212mg/人/日)等であった。また、ADIとの比較からも問題がなかった。一方、直近のマーケットバスケット方式の摂取量と比較すると高甘味料と保存料(安息香酸・ソルビン酸)に関しては値の乖離が大きく、次回以降の課題とする。

既存添加物に関しては平成20年度において、出荷量の多かったもののうち、ケイソウ土、活性白土及びパーライトは、ろ過助剤や精製剤として使用されるものであり、直接食品とともに摂取されるものではない。また、窒素は、気体であるため、他の食品添加物とは異なる。この調査からは食品とともに摂取される既存添加物としては、カラメル類がもっとも多いものと推察された。

3) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関する調査研究

3-1) 香料化合物データベース

データベースの高度化にあたり以下の項目が問題となった。

① 参照するリストにより異なるCAS番号

この原因として、単一の香料化合物に対する複数のCAS番号の存在や異性体の取り扱いの違いなどが挙げられる。異性体の取り扱いの違いについては、参照するリストにより各異性体に対し個別なCAS番号を割り当てる場合と統一したCAS番号を割り当てる場合があった。その場合は、FEMA GRASもEU Registerも海外との商取引上で現実に使用されていることから、両者のCAS番号を併記し、同一物質に対する本データベースと参照するリスト間のCAS番号の不整合性に対処した。

② 参照するリスト間の異性体表記の不一致

参照するリストにより異性体記号を示すものと示さないものが混在していた。

③ IOFIの使用量調査用リストと香料化合物データベース

IOFIの使用量調査用リストには、日本で使用できない品目が収載されており、一方、日本独自香料化合物が収載されていないことから、香料化合物データベースを基に独自の基本回答表を作成した。

3-2) 基本回答表

基本回答表は、高度化したデータベースを基に以下の手順で作成した。

① 個別指定品目及び厚生労働省「類又は誘導体として指定されている18項目の香料に関するリスト」（厚生労働省香料リスト）に収載されている品目は全て基本回答表に入れた。

② 諸外国で使用されている品目のうち、日本の18類に合致すると見なされる品目は、厚生労働省香料リストに収載されていないものも基本回答表に加えた。これらの結果、基本回答表にあげた品目は計4104品目となった。

③ これらの品目を「使用品目」とし、データベースから参考CAS番号、SEQ番号、FEMA GRAS番号を抽出し、使用量、含量、備考の欄を加え、各使用品目に調査No.を付与して基本回答表を完成した。

3-3) 追加品目回答表

追加品目回答表は、各香料会社が基本回答表に無い品目を使用している場合に使用品目名、CAS番号、使用量、含量その他を自由に記載できる表とした。

4) 諸外国の香料規制に関する調査研究

4-1) 香料の定義の比較

香料について、明確な定義のない国もあったが、日本のように香料の機能を明確に「香氣を付与または増強する」と定義しているのは韓国のみで、多くの国では「香料」とは「香りおよび味」を付与する添加物として定義されていると考えられた。一方、諸外国においてもアミノ酸類など日本では調味料に区分される成分をflavourに含める場合とflavour enhancerに含める場合があり、flavour enhancer、調味料、苦味料など関連するカテゴリーについては改めて調査・整理が必要と考えられた。

4-2) 香料の分類

Codex では、天然香料と化学的に定義される香料化合物に区別され、化学的に定義される香料化合物はさらに製法により単離香料化合物と合成香料化合物に分類されている。しかし合成香料化合物について天然物中での存在報告の有無は区別されていない。いくつかの国では、天然香料、天然物中に存在が確認されている化合物及び天然物中に存在が確認されていない化合物の区分がなされていたが、合成香料化合物を天然物中での存在確認によりさらに分類する様式は欧州の古い規制様式に似ており、やがてそういった国々でも新しい分類が採用されるものと考えられた。

4-3) 食品香料に使用可能な原料と使用制限のある原料

天然香料に関しては多くの国でネガティブリスト制を採用していたが、香料化合物に関しては 5 カ国がネガティブリスト、5 カ国・地域が FEMA-GRAS 等他国のポジティブリストを参照する形式、8 カ国・地域が独自のポジティブリストによる規制を持っていた。ポジティブリストを採用している国ではリストに新規化合物を追加するための評価基準の違い、FEMA-GRAS 等参考にしているリストの更新に法規の改正が追いついていない等で不整合がおきていることが判明した。今回の調査では Codex ガイドラインを自国法規に取り入れている国及び香料化合物のポジティブリストとして JECFA リストを参照先にしている国は少なかったが、これは Codex ガイドラインができたのが最近(2008 年)であること及び当該国の法律の制定時まだ JECFA 評価品目が少なく、実用性が乏しかったためと思われる。しかしながら現在では Codex ガイドラインも完成し JECFA リストも 2000 を超える香料化合物を収載する実用

的なものとなっている。今後は政治的に中立であるという点からも Codex 及び JECFA リストも重要性を増すと思われる。

E. 結論

1) アルギン酸の定量法に関する研究

アルギン酸ナトリウムを硫酸で加水分解後、陰イオン交換樹脂で分離精製を行った。その結果、二つのウロン酸画分を得ることができた。それぞれの画分について、Zorbax SAX カラムを用いた HPLC 分析を行ったところ、それぞれの画分は単一のピークとして得られ、それぞれマンヌロン酸及びグルロン酸と推測され、それぞれ 0.3g 及び 0.5g を得ることができた。

2) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

第 9 回の生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定では、国民 1 人が 1 日に摂取する指定添加物量は、過去の調査結果と大きく外れるものではなく、また ADI との比較からも問題がなかった。既存添加物に関しては第 4 回の調査として、平成 20 年度の実産量統計調査をまとめた。

3) 香料化合物の使用量調査及び摂取量に関する調査研究

本年度の研究では、平成 16 年度から平成 21 年度にかけて構築した香料化合物データベースの高度化を行い、IOFI の使用量調査用リストと比較し修正を行ったものを基に、使用品目名、CAS 番号、SEQ 番号、FEMA GRAS 番号の表を作成し、使用量、含量、備考の欄を加え、使用量調査用の基本回答表とした。また、基本回答表にない香料化合物を調査するための追加品目回答表も併せて作成した。

4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

今回、香料に係る法規制を調査し、22の国及び地域について情報を得ることができた。香料の定義に味の付与を含めない日本型の規制を持つ国は韓国のみであり、ほとんどの国では香料の定義に味を含めていることが判明した。また、香料の分類に関してはいくつかのパターンに分かれ、規制を設定した時期が影響していると考えられた。天然香料に関しては多くの国でネガティブリスト制を採用していたが、香料化合物に関してはまちまちであった。ポジティブリストを採用している国ではリストに新規化合物を追加するための評価基準の違い、FEMA-GRAS等参考になっているリストの更新に法規の改正が追いつ

ていない等で不整合が起きていることが判明した。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

H. 参考文献

- 1) Haug et al, *Acta Chemica Scand.* 16, (1962), 1908-1918.
- 2) Voragen, A.G.J. et al, *J. Chromatogr.* 244, (1982), 327-336

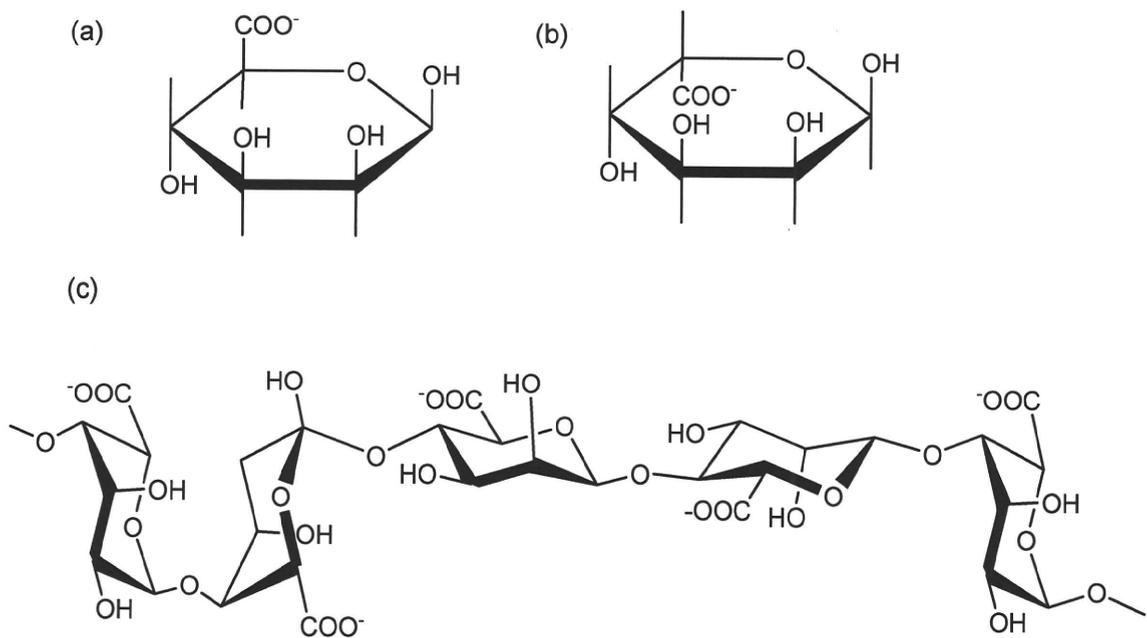


Fig.1 The structure of alginate, (a) β -D-mannuronate; (b) α -L-guluronate, (c) the alginate chain, chair conformation

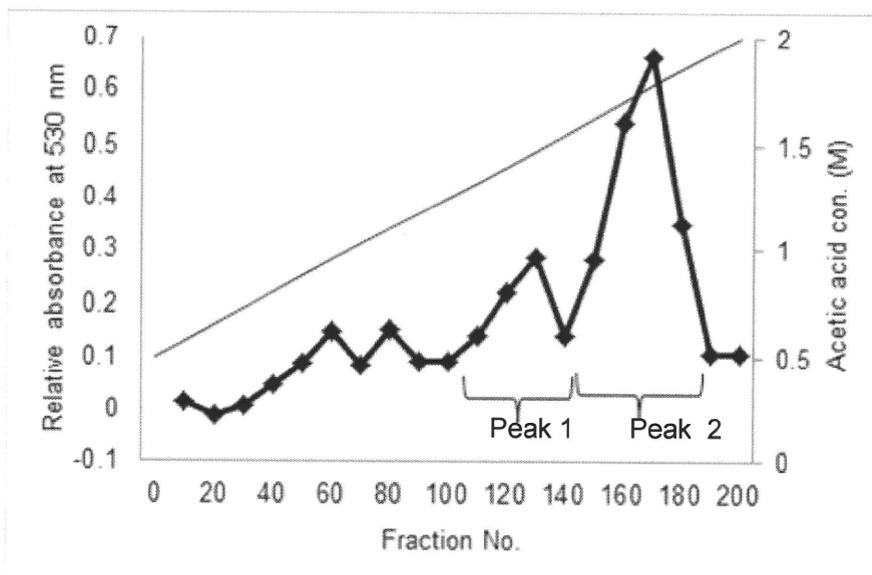


Fig.2 The elution curve of hydrolysate of commercial sodium alginate by H_2SO_4

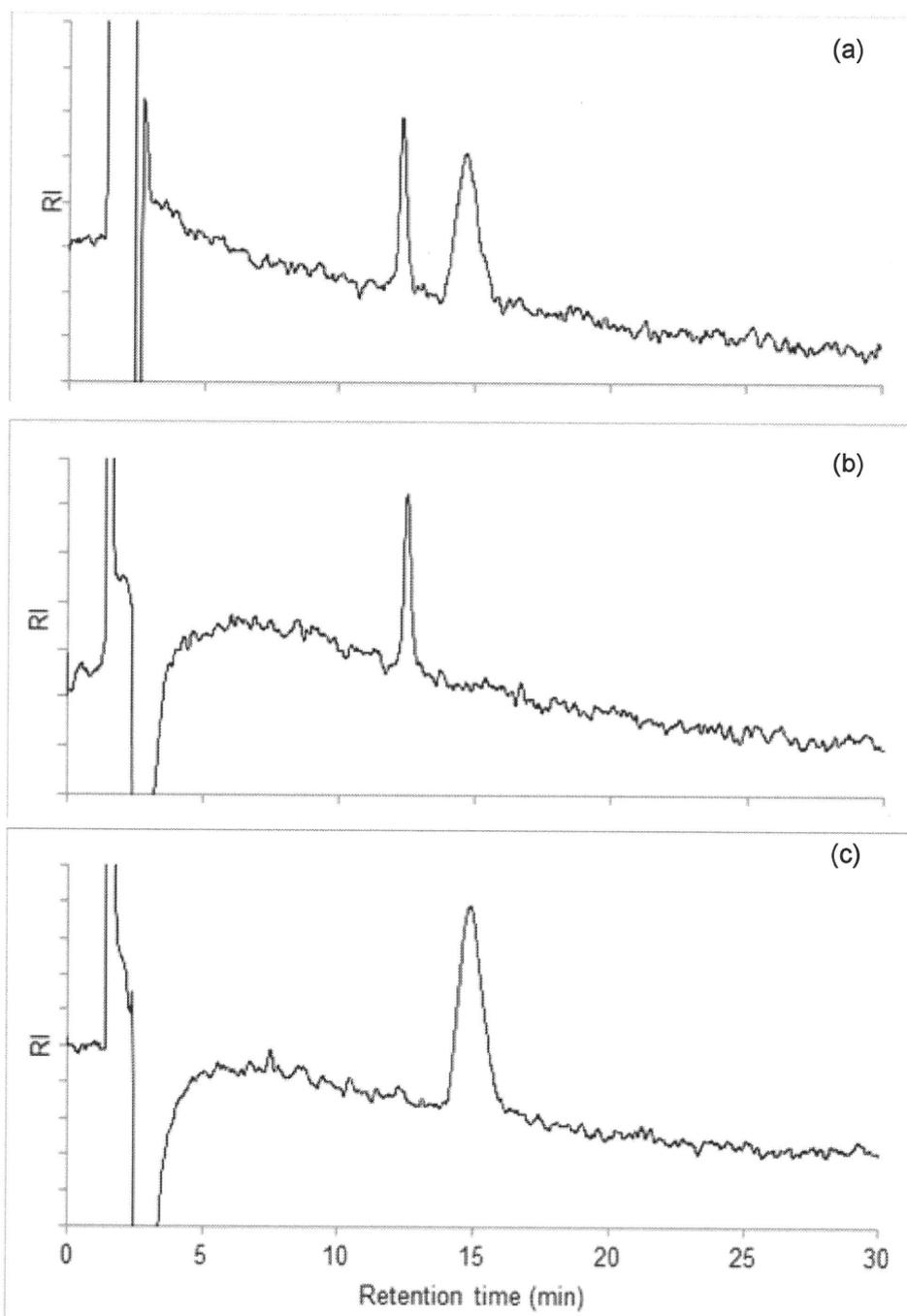


Fig.3 HPLC chromatogram of hydrolysate of sodium alginate(a), peak 1 eluate (b), peak 2 eluate (c)

NMR を用いた食品添加物定量法の開発

研究分担者 大槻 崇 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

食品添加物の規格試験法の精度向上を目指した研究の一環として、国際単位系へのトレーサビリティが確保された絶対定量法である定量 NMR 法についてアスコルビン酸及びフルジオキソニル分析への適用性、有効性について検討し、これらの化合物の定量に本法は適用可能であることが明らかとなった。また、粗製試料に対する本法の適用性を明らかにするため、アスコルビン酸含有製品についても併せて検討し、従来法である HPLC 法と同程度に正確な定量結果を与えることが確認された。また、HPLC 法と比べ、迅速性、簡便性が大幅に向上し、粗製試料に対する定量においても本法は適用可能であることが示された。

A. 研究目的

食品添加物は、食品衛生法第 11 条第 1 項に基づき、その成分規格や使用基準等が定められている。このうち、食品添加物の定量法としては、滴定法や吸光度法等が採用されているが、分析操作の煩雑性等の問題が指摘されている。また、分析法によっては標準物質を必要とするが、その純度については、多くが試薬メーカーにより独自に値付けされたものである。しかし、値付けに用いられたクロマトグラフィー等の分析法は、国際単位系（SI）へのトレーサビリティが確保された定量法ではない。故に、その純度は計量学的に値づけられたものとはいえ、分析値の信頼性の低下も懸念される。このように、食品、食品添加物製品の安全性を確保する上で、精度や信頼性の高い分析法の確立は非常に重要である。近年、SI へのトレーサビリティが確保された絶対定量法として定量 NMR

（quantitative NMR ; qNMR）法が注目を集めており、農薬、添加物、生薬、天然化合物等の定量分析へ応用されている¹⁾⁶⁾。qNMR 法は、計量学的に正確に純度が値付けされた SI にトレーサブルな認証標準物質（Certified Reference Material : CRM）またはそれに準じた化合物を内部標準として用い、測定対象物質と混合して ¹H NMR 測定を行う。¹H NMR 上で観察される内部標準及び測定対象物質のシグナル面積強度比は、「モル濃度×水素数」に比例することから、測定対象物質及び内部標準のシグナル面積強度比、水素数、秤量濃度の関係から、測定対象物質の含量（純度）の算出が可能である。また、本法は個々の測定対象物質と同一の定量用標準物質を必要とせず、簡便性、迅速性、環境負荷の低減の面で格段と優れている。さらに、粗製試料に含まれる測定対象成分を測定する際、¹H NMR 上で測定対象成分と夾雑成分の

シグナルが十分に分離されていれば、クリーンアップ、誘導体化等の前処理が不要な迅速、簡便かつ選択性の高い絶対定量が可能と考えられる。このように、本法は極めて汎用性の高い分析法であり、得られる定量値の信頼性も確保されていると言える。

当部では、食品添加物の規格試験法の精度向上を目指した研究の一環として、食品添加物分析への qNMR 法の適用に関する検討を行い、これまでに、食品香料ピラジン類⁷⁾や食用合成色素(タール色素)^{8,9)}及びコチニール色素¹⁰⁾に含まれる主成分の正確な絶対定量が可能であることを明らかにした。そこで本研究では、食品添加物分析への本法の有効性、汎用性を更に明らかにするため、今年度はアスコルビン酸及びフルジオキソニルを対象に検討を行った。また、粗製試料に対する本法の有用性を明らかにするため、アスコルビン酸を含有する市販製品を対象に、これらに含まれるアスコルビン酸含量を測定し、従来法との比較を行った。

B. 研究方法

1) 試料

アスコルビン酸標準品は、(財)日本公定書協会製、アスコルビン酸(特級品)は和光純薬製を用いた。アスコルビン酸含有製品7種(試料1:食品添加物用アスコルビン酸、試料2:ビタミンE、C主薬製剤(第3類医薬品)、試料3:ビタミンC主薬製剤(第3類医薬品)、試料4:日本薬局方アスコルビン酸原末(第3類医薬品)、試料5:ビタミンC含有食品、試料6:ビタミンC含有食品(栄養機能食品)、試料7:ビタミン類含有食品(栄養機能食品))は都内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。フルジオキソニルは、和光純薬製の残留農薬試験用標準品を使用した。

2) 試薬

Sodium3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3-*d*₆-sulfonate (DSS-*d*₆)標準物質は、和光純薬製の Traceable Reference Material (Code No.048-31071, Lot.No.EPL1095:純度 92.2±1.0%)を用いた。DSS-*d*₆は Isotec 製を用いた。フタル酸カリウム (Potassium phthalate : PHP) 認証標準物質は(独)産業技術総合研究所製(品番 NMIJ-CRM 3001a : 純度 100.00±0.027%)を用いた。なお、PHP は添付の使用法に従い、軽く砕いた後、120℃で約1時間加熱乾燥しデシケーターで放冷後、使用した。重水及び重ジメチルスルホキシドは Acros 製を用いた。その他の試薬はすべて市販の試薬特級品を用いた。

3) 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)。

HPLC : LC-10AD_{VP} システム (ポンプ : LC-10AD_{VP} x 2、恒温槽 : CTO-10A_{VP}、多波長検出器 : SPD-M10A_{VP}、デガッサー : DGU-14A、オートサンプラー : SIL-10AD_{VP}、データ処理装置 : LC solution) (島津製作所製)。

4) アスコルビン酸

4-1) qNMR 法

4-1-1) qNMR 標準溶液の調製

DSS-*d*₆ 57.1 mg を精密に量り、重水 50 g を加え qNMR 標準溶液とした。qNMR 標準溶液の DSS-*d*₆ 濃度 (1.05 mg/g) は、下記に従い PHP により校正し算出した。すなわち、PHP 約 10 mg を精密に量り、qNMR 標準溶液 1.0 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qNMR に付した。δ_H 7.57 及び 7.71 ppm に観測される

PHP に由来するプロトンシグナル (4H) 及び $\delta_{\text{H}} 0$ ppm に観測される DSS- d_6 に由来するメチルプロトンシグナル (9H) のシグナル面積強度 (積分値)、分子量、濃度等を式 (1) に代入し、qNMR 標準溶液中の DSS- d_6 濃度 (mg/g) を算出した。

$$C_{\text{DSS}} = \left[\frac{M_{\text{DSS}} \times I_{\text{DSS}}}{H_{\text{DSS}}} \div \frac{M_{\text{PHP}} \times I_{\text{PHP}}}{H_{\text{PHP}} \times W_{\text{PHP}}} \right] \times \frac{P_{\text{PHP}}}{100} \quad (1)$$

ただし、 C_{DSS} =DSS- d_6 濃度 (mg/g)、 M_{DSS} 、 M_{PHP} =DSS- d_6 及び PHP の分子量 (MW: 224.36 及び 242.31)、 I_{DSS} 、 I_{PHP} =DSS- d_6 及び PHP の特定基のシグナル面積強度、 H_{DSS} 、 H_{PHP} =DSS- d_6 及び PHP の特定基のプロトン数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3 = 9$, PHP: $\text{CH} \times 2 \times 2 = 4$) W_{PHP} =PHP の秤量濃度 (mg/g)、 P_{PHP} =PHP の純度 (100.00%)。

4-1-2) アスコルビン酸含量の測定

アスコルビン酸 (標準品及び特級品)、アスコルビン酸含有製品は、それぞれ約 10 mg を精密に量りとり、qNMR 標準溶液約 1.0 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試験管に入れ、密閉し、qNMR に付した。DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.000 としたときのアスコルビン酸に由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を式 (2) に代入し、アスコルビン酸含量 (%) を算出した。

$$C_{\text{ASA}} = \left[\frac{I_{\text{ASA}}/H_{\text{ASA}}}{I_{\text{DSS}}/H_{\text{DSS}}} \times \frac{M_{\text{ASA}}/W_{\text{ASA}}}{M_{\text{DSS}}/C_{\text{DSS}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

ただし、 I_{ASA} 及び I_{DSS} =アスコルビン酸及び DSS- d_6 のシグナル面積強度 (DSS- d_6 :

9.000)、 H_{ASA} 及び H_{DSS} =アスコルビン酸及び DSS- d_6 の特定基のプロトン数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3 = 9$)、 M_{ASA} 及び M_{DSS} =アスコルビン酸及び DSS- d_6 の分子量 (MW: 176.12 及び 224.36)、 W_{ASA} =アスコルビン酸の秤量濃度 (mg/g)、 C_{DSS} =DSS- d_6 濃度 (1.05 mg/g)。

4-1-3) qNMR 測定条件及びデータの解析

qNMR 測定の基本条件を Table1 に示した。

なお、qNMR の化学シフト値は、DSS- d_6 のプロトンシグナルを基準シグナル ($\delta 0$ ppm) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。得られた FID データは、フーリエ変換 (Windows 関数: exponential function BF=0.12 Hz, zero filling=1, trapezoidal function T1=T2=0, T3=90, T4=100) 及び位相補正を行った。DSS- d_6 及び特定シグナルの積分範囲を設定した後、DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.000 としたときのアスコルビン酸に由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を式 (2) に代入し、アスコルビン酸含量を算出した。なお、データの解析は、フーリエ変換から含量の算出までを自動処理できる定量解析ソフトウェア (日本電子 (株) 開発中) を用いた。

4-2) 滴定法

第 8 版食品添加物公定書に記載された L-アスコルビン酸定量法に従った¹¹⁾。すなわち、アスコルビン酸 200 mg を精密に量り、メタリン酸溶液 (1→50) 50 mL を加えて溶かし、指示薬としてデンプン試薬を添加し 0.05 mol/L ヨウ素溶液で滴定した。滴下したヨウ素溶液量等を式 (3) に代入し、アスコルビン酸含量 (%) を算出した。

$$C = \frac{8.806 \times F \times V}{W} \times 100 \quad (3)$$

ただし、C=アスコルビン酸含量 (%)、

F=0.05 mol/L ヨウ素溶液のファクター (1.004)、V=滴下したヨウ素溶液量 (mL)、W=アスコルビン酸の秤取量 (mg)

4-3) HPLC 法

4-3-1) 試料溶液の調製

アスコルビン酸含有製品約 10 mg を精密に量り、2%メタリン酸溶液を加えて 10 mL に定容した。このうち 3 mL を褐色試験管に入れ、4.5 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 0.4 mL 及び 2%インドフェノール溶液 70 μ L を加えて混合した。速やかに σ フェニレンジアミン溶液 0.5 mL を加えて混合した後、遮光下 37°C の水浴で 30 分間振とうした。この溶液をあらかじめメタノール 10 mL、水 5 mL でコンディショニングされた ODS カートリッジに付し、0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.8) -メタノール混液 (7:3) 3 mL で溶出させた。溶出された溶液のうち 1 mL をとり、2%メタリン酸溶液で 50 倍希釈したものを試料溶液とした。

4-3-2) アスコルビン酸含量の測定

得られた試料溶液を下記に示す条件を用い HPLC にて分析した。

【HPLC 条件】カラム: L-column2 ODS (粒径 5 μ m、4.6 mm i.d. x 250 mm)、移動相: 0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.8) -メタノール (8:2)、流速: 0.8 mL/min、カラム温度 40°C、検出: 蛍光検出 (励起波長: 355 nm、検出波長: 425 nm)、注入量: 10 μ L

なお、定量分析は絶対検量線法により行った。すなわち、アスコルビン酸濃度が 0.05~20 μ g/mL の範囲になるように検量線用アスコルビン酸標準溶液を注入し、得られた 6 点のクロマトグラムのピーク面積より検量線を作成した。検量線から試料溶液のアスコルビン酸濃度 (μ g/mL) を求め、式 (4) により

アスコルビン酸含有製品のアスコルビン酸含量 (%) を算出した。

$$C = \frac{A}{2W} \times 100 \quad (4)$$

ただし、C=アスコルビン酸含量 (%), A=試料溶液のアスコルビン酸濃度 (μ g/mL)、W=製品の秤取量 (mg)

5) フルジオキソニル

5-1) qNMR 法によるフルジオキソニルの含量測定

試料約 20 mg 及び DSS- d_6 標準物質約 4 mg をそれぞれ精密に量り、重水素化ジメチルスルホキシド 2 mL を加えてこれらを溶解した。この液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qNMR に付した。DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.000 としたときのフルジオキソニルに由来する δ_H 7.31~7.40、7.56 及び 7.85 ppm のシグナル面積強度等を式 (5) に代入し、フルジオキソニル含量 (%) を算出した。

$$C_{FL} = \frac{W_{DSS} \times I \times P}{W_{FL} \times N} \times 1.106 \quad (5)$$

ただし、 C_{FL} =フルジオキソニル含量 (%), W_{FL} 及び W_{DSS} =フルジオキソニル及び DSS- d_6 標準物質の秤取量 (mg)、I=3 種のシグナル (δ_H 7.31~7.40、7.56 及び 7.85 ppm) の面積強度の和、N=3 種のシグナルの水素数の和、P= DSS- d_6 標準物質の純度 (92.2%)

5-2) qNMR 測定条件及びデータの解析

測定条件は 4-1-3) に従った。得られた FID データは、4-1-3) に示す条件でフーリエ変換及び位相補正した。DSS- d_6 のシグナルを δ_H 0 ppm とし、 δ_H 7.31~7.40、7.56 及び 7.85 ppm 付近のシグナルの面積強度をそれぞれ

A₁ (水素数 3 に相当)、A₂ (水素数 1 に相当) 及び A₃ (水素数 1 に相当) としたとき、(A₁/3)/A₂ 及び(A₁/3)/A₃ 及び A₂/A₃ がそれぞれ 1.0 であることを確認した。DSS-*d*₆ のシグナル面積強度を 9.000 としたときの A₁、A₂ 及び A₃ の和等を式 (5) に代入しフルジオキノニルの含量を求めた。

C. 結果及び考察

1) アスコルビン酸

1-1) qNMR 法によるアスコルビン酸 (特級品 及び標準品) の含量測定及び定量下限

qNMR 法は、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の関係から、測定対象化合物の濃度を絶対定量することが可能である。また、SI にトレーサブルな基準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が向上することが期待される。そこで、本法の食品添加物分析への適用性を明らかにするため、酸化防止剤であるアスコルビン酸について qNMR 測定を行った。なお、本法により得られた定量値の SI トレーサビリティーを確保するため、既報¹⁰⁾と同様に PHP (認証標準物質) を用いて qNMR 基準物質 DSS-*d*₆ の濃度を定量した後、アスコルビン酸含量を算出した。アスコルビン酸の化学構造及び ¹H NMR ケミカルシフトを Fig.1、標準品の化学構造及び標準品の ¹H NMR チャートを Fig.2、qNMR 法によるアスコルビン酸含量を Table 2 にそれぞれ示した。δ_H 3.75 ppm (水素数 2)、δ_H 4.07 ppm (水素数 1)、及び δ_H 4.96 ppm (水素数 1) にアスコルビン酸に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのシグナルより算出されたアスコルビン酸含量は、標準品で 99.2%、特級品で 98.7%であった。各シグナルから得られる含量値に着目すると、標準品では 3 種のシグナル間の含量値に大きな違い

は認められなかった。一方、特級品では、δ_H 4.96 ppm より得られた含量値 (99.2%) が、他の 2 種の含量値 (δ_H 3.75 ppm : 98.6%, δ_H 4.07 ppm : 98.4%) より 0.6~0.8% 高めに算出された。本測定では、シム調整を厳密に行い、良好なシグナル形状及び S/N を得た上で qNMR 測定を行い、積分範囲も含め同一の解析条件により含量値を算出している。標準品における各シグナルの含量値及び特級品の δ_H 3.75 ppm 及び δ_H 4.07 ppm の含量値がほぼ同等であることを考慮すると、特級品の δ_H 4.96 ppm の定量値が高めに算出されたことは、このシグナルと重なる不純物による影響と推定された。なお、相対標準偏差 (RSD) は標準品で 0.2%、特級品で 0.6% であり定量再現性は良好であった。

また、qNMR 法におけるアスコルビン酸の定量下限は、以下のように算出した。すなわち、アスコルビン酸標準品の秤量濃度 (0.16、0.32、0.62、1.2、2.5、5.0 及び 50 mg/g) と qNMR により得られた測定濃度の相対誤差及び 3 回の繰り返し測定による測定濃度の RSD がともに 1% 以下である最小濃度を定量下限とした。Table 3 に示すように、δ_H 3.75 ppm のシグナルでは、0.63 mg/g 以上の秤量濃度では、測定濃度との相対誤差及び測定濃度の RSD は 1% を下回る結果であった。一方、0.16 及び 0.32 mg/g では、Fig.3 に示すように各シグナルの S/N は小さいことから、測定濃度との相対誤差及び測定濃度の RSD も 1% を超える結果となった。これらの値は、濃度が低くなるにつれて大きくなる傾向であった。δ_H 4.07 ppm 及び δ_H 4.96 ppm のシグナルにおいても相対誤差及び RSD は、δ_H 3.75 ppm のシグナルより得られた結果と同様であった。以上より、qNMR におけるアスコルビン酸の定量下限は、試料濃度として 0.63 mg/g と決定した。

1-2) qNMR 法及び滴定法によるアスコルビン酸含量の比較

第8版食品添加物公定書では、L-アスコルビン酸の定量法としてヨウ素溶液を用いた酸化還元滴定が示されている。そこで、アスコルビン酸標準品を対象に qNMR 法と滴定法によるアスコルビン酸含量を比較した。その結果、Table 4 に示すように qNMR 法の含量値及び RSD は、滴定の結果とほぼ一致し、qNMR 法により算出された定量値が正確であることが確認された。qNMR 法及び滴定法はともに検量線を必要としない絶対定量法である。特に qNMR 法の場合、求められる定量値は計量学的に信頼性が高いことから、真値をより正確に反映した絶対定量法であると考えられた。

1-3) アスコルビン酸含有製品のアスコルビン酸含量

これまでに、標準品、特級品等比較的純度の高い製品を用いて qNMR 法に関する検討を行った。qNMR 法の特徴の一つとしては、粗製試料に含まれる測定対象成分を、誘導体化等の処理を行わず非分離で短時間に絶対定量ができることが挙げられる。そこで、この特徴を生かし、アスコルビン酸を含有する市販のビタミン製剤や食品添加物規格品について qNMR 法によるアスコルビン酸の含量測定を行い、得られた結果を HPLC 法と比較した。なお、Fig.4 に示すように、特に試料 2、3、5 及び 7 では、アスコルビン酸に由来する δ_{H} 3.75 ppm 及び δ_{H} 4.07 ppm のシグナルは、賦形剤等の夾雑物に由来すると考えられるシグナルとの分離が不十分であるため、これらのシグナルからアスコルビン酸含量を正確に定量することは困難と考えられた。一方、 δ_{H} 4.96 ppm のシグナルは、すべての試料において夾雑物由来のシグナルと十分に分離して

いることが確認された。そこで、 δ_{H} 4.96 ppm を定量用シグナルとして選択し、本シグナルより製品中のアスコルビン酸含量を算出することとした。qNMR 法及び HPLC 法により算出された各製品のアスコルビン酸含量を Table 5 に示す。すべての試料において、qNMR 法により得られたアスコルビン酸含量は HPLC 法により得られた結果とほぼ同等であり、両分析法における含量値の差は最大で 2.7% (試料 1, qNMR: 100.1%, HPLC: 102.8%) であった。なお、qNMR による各試料の RSD は 0.3~2.8% と定量再現性も良好であった。なお、HPLC 法で用いたアスコルビン酸標準品は、qNMR により計量学的に正確に純度 (99.2%) を決定した後に使用した。従って、HPLC 法により得られたアスコルビン酸含量は、SI にトレーサブルな定量値と言える。qNMR 法と HPLC 法の含量値がほぼ同等であったことから、qNMR 法は定量用アスコルビン酸標準品を用いず別の基準物質を用いて SI にトレーサブルなアスコルビン酸含量を算出できることが、本検討からも裏付けられた。また、HPLC 法はアスコルビン酸を選択的に測定できる点で有用ではあるものの、誘導体化等の煩雑な操作が必要となる。また検量線の作成等により分析に時間を要する。一方、qNMR 法は試料を直接 qNMR 標準溶液へ溶解した後、qNMR 測定を行うのみで製品中のアスコルビン酸含量の絶対定量が可能である。今回確立した qNMR によるアスコルビン酸の定量分析法は、従来の HPLC 法に比べ簡便性、迅速性の面で優位性があり、定量値の信頼性も向上した新たな方法である。今後、食品等に含まれるアスコルビン酸の定量分析等への応用が期待される。

2) フルジオキソニル

2-1) qNMR 法によるフルジオキソニルの含

量測定

フルジオキシニルの定量法としての qNMR 法の適用性を明らかにするため検討を行った。なお、アスコルビン酸では、PHP（認証標準物質）を用いて qNMR 基準物質 DSS- d_6 の濃度を定量し、その qNMR 基準物質を使って測定対象物質を定量する 2 段階方式で定量値の SI トレーサビリティーを確保していた。最近、試薬メーカーより計量学的に正確に値づけされた DSS- d_6 標準物質の販売が開始されたことから、本検討ではこれを qNMR 基準物質として用い、1 段階方式で定量値の SI トレーサビリティーを確保した。また、測定試料は同一のフルジオキシニルから別々に秤量し調製した 4 サンプルを用いて非連続で 6 回測定した。フルジオキシニルの化学構造及び ^1H NMR ケミカルシフトを Fig.5、フルジオキシニルの ^1H NMR チャートを Fig.6、フルジオキシニル含量を Table 6 に示した。4 サンプルのフルジオキシニル含量は 98.9~99.3% とほぼ同等であった。また、4 サンプル間の定量値の RSD は 0.1% であり、定量再現性は良好であった。さらに、同一サンプルの 6 回繰り返し測定による RSD も 0.1% と繰り返し測定精度も良好であることが確認された。以上より、qNMR 法はフルジオキシニルの定量に十分適用可能であることが確認された。

D. 結論

本研究では、食品添加物の規格試験法の精度向上を目指して、qNMR 法によるアスコルビン酸及びフルジオキシニルの絶対定量に関する検討を行った。qNMR 法は良好な定量精度を示すとともに試料調製、分析操作等が簡便化するとともに迅速な定量分析が可能となる等、アスコルビン酸及びフルジオキシニルの絶対定量に有効な分析法であることが判

明した。また、粗製試料についても、誘導体化等の前処理が不要な選択性の高い絶対定量が可能であることが明らかとなった。本検討結果は、これらの食品添加物分析の精度並びに信頼性を更に向上させる知見であり、将来的な公定法における純度試験法または定量法への適用へ向けた基礎的データが得られたものとする。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

H. 参考文献

- 1) Ihara, T.; Saito, T.; Sugimoto, N. *Synthesiology* 2009, 2, 12-22.
- 2) Saito, T.; Ihara, T.; Koike, M.; Kinugasa, S.; Fujimine, Y.; Nose, K.; Hira, T. *Accred. Qual. Assur.* 2009, 14, 79-86.
- 3) 田原麻衣子, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 斎藤剛, 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, 日食化誌 2009, 16, 28-33.
- 4) 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 斎藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎壮, 河村葉子, 食衛誌 2010, 51, 205-212.
- 5) 細江潤子, 杉本直樹, 合田幸広, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2010, 41, 960-970.
- 6) Hasada, K; Yoshida, T.; Yamazaki, T.; Sugimoto, N; Nishimura, T.; Nagatsu, A.; Mizukami, H. *J. Nat. Med.* 2010, 65, 262-267.
- 7) 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，基準の向
上に関する調査研究 平成 19 年度総
括・分担研究報告書，p25-34
- 8) 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，基準の向
上に関する調査研究 平成 20 年度総
括・分担研究報告書，p63-76
- 9) 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，基準の向
上に関する調査研究 平成 21 年度総
括・分担研究報告書，p55-69
- 10) 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，
久保田 領志，田原 麻衣子，清水 久美
子，伊藤 澄夫，山崎 壮，河村 葉子，西
村 哲治，食衛誌 2010，51, 19-27.
- 11) 第 8 版食品添加物公定書 2007，
207-208.

Table 1 qNMR測定条件

Spectrometer	ECA600(JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	-5-15 ppm
Data points	32,000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s ($>5 \times T_1$)
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	25°C

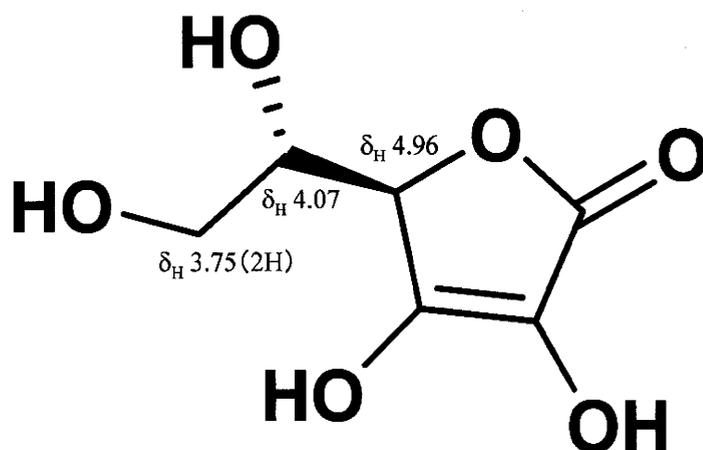


Fig.1 アスコルビン酸の化学構造及び ^1H NMR ケミカルシフト

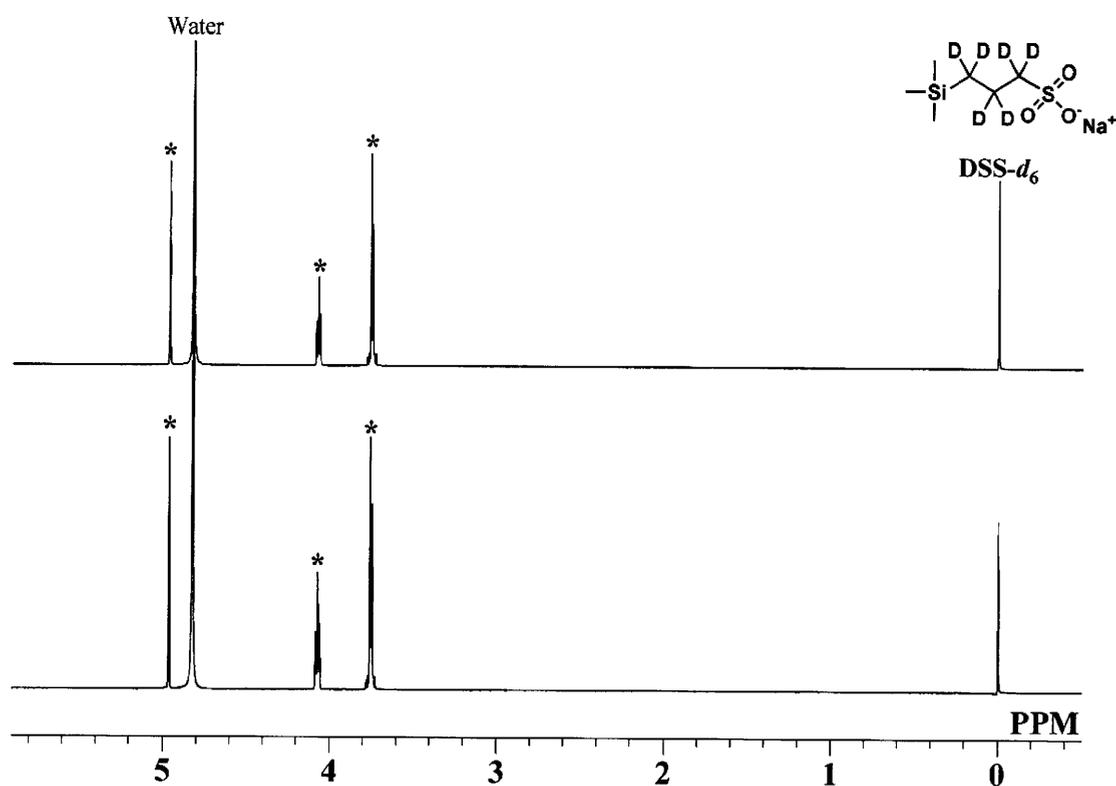


Fig.2 アスコルビン酸(標準品及び特級品)の¹H NMR スペクトル

上段:標準品、下段:特級品

*アスコルビン酸由来のシグナル

Table.2 qNMR 法による標準品及び特級品のアスコルビン酸含量(n=3)

Target signal (ppm)	Standard		Reagent	
	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)
3.75	99.3	0.3	98.6	0.6
4.07	99.1	0.2	98.4	0.6
4.96	99.1	0.2	99.2	0.5
Mean	99.2	0.2	98.7	0.6

Table 3 秤取量と測定値の比較(n=3)

Preparation value (mg/g)	δ_H 4.96			δ_H 4.07			δ_H 3.75		
	Measurement value (mg/g)	RSD (%)	Relative error (%)	Measurement value (mg/g)	RSD (%)	Relative error (%)	Measurement value (mg/g)	RSD (%)	Relative error (%)
0.16	0.21	12.5	31.2	0.15	1.8	-5.1	0.15	1.2	-7.0
0.32	0.34	8.2	6.9	0.31	1.1	-4.6	0.30	0.7	-5.1
0.63	0.63	0.4	0.2	0.63	1.0	-0.5	0.63	0.8	-0.6
1.3	1.3	0.5	0.9	1.3	1.0	0.8	1.3	0.9	0.1
2.5	2.5	0.7	0.8	2.5	0.5	0.1	2.5	0.4	0.1
5.0	5.0	0.2	1.0	5.0	0.1	0.6	5.0	0.0	0.4
50	49.9	0.3	-0.1	49.7	0.1	-0.7	49.7	0.1	-0.7

Relative error=(measurement value-preparation value)/preparation value) × 100

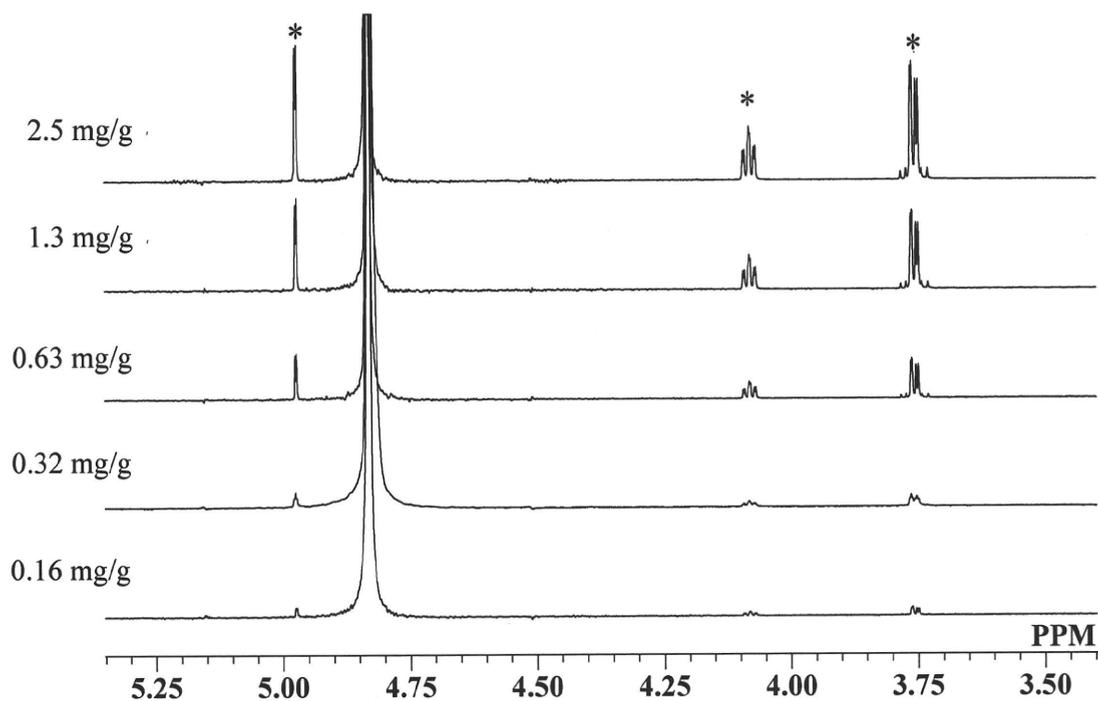


Fig.3 各濃度におけるアスコルビン酸の¹H NMRスペクトル(拡大図)

Table.4 滴定法及び qNMR 法によるアスコルビン酸含量の比較 (n=3)

	Content (%)	RSD (%)
Iodometric titration	99.0	0.2
qNMR	99.2	0.2

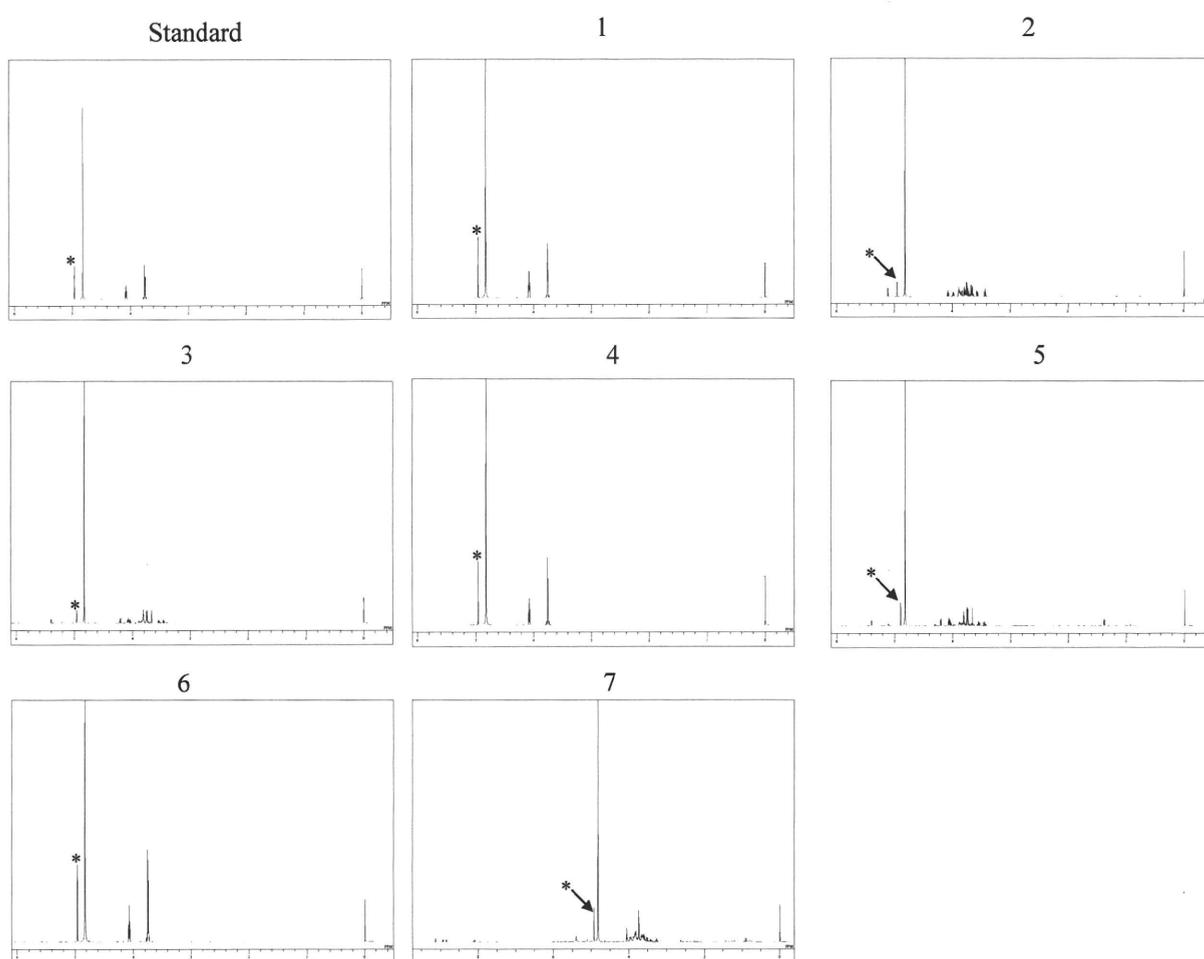


Fig.4 アスコルビン酸標準品及びアスコルビン酸含有製品の¹H NMR スペクトル

*定量に用いたアスコルビン酸のシグナル

Table.5 qNMR 法及び HPLC 法による各製品のアスコルビン酸
 含量の比較 (n=3)

Sample No.	qNMR		HPLC	
	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)
1	100.1	0.3	102.8	1.4
2	34.4	0.3	36.4	0.4
3	37.3	2.3	37.6	1.1
4	100.1	0.6	100.3	0.6
5	33.9	2.8	32.6	0.5
6	98.2	0.9	98.6	1.5
7	32.1	1.1	30.5	0.3

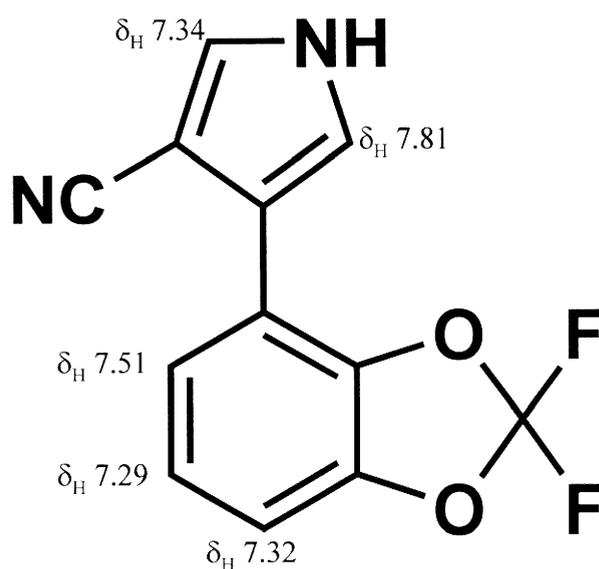


Fig.5 フルジオキシニルの化学構造及び ^1H NMR ケミカルシフト