

201033054A

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

NMRを用いた食品中の食品添加物 分析法の開発に関する研究

平成22年度総括研究報告書

研究代表者 大槻 崇 国立医薬品食品衛生研究所

平成23(2011)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

NMRを用いた食品中の食品添加物分析法の開発に関する研究……………1
研究代表者:大槻 崇

II. 研究成果の刊行に関する一覧表……………40

NMRを用いた食品中の食品添加物分析法の開発に関する研究

研究代表者: 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

現在の食品中の食品添加物の分析には、主に GC, HPLC などが用いられているが、試料によっては煩雑な前処理を必要とするものがあり改善を望む声も大きい。また、これらの分析では測定対象物質と同一かつ純度が正確な定量用標準物質が必要であるが、計量学的に妥当な手順によって値付けされたものは限られている。従って、計量学的に不正確な標準物質を用いた場合、得られる分析値の信頼性が損なわれることになる。定量 NMR (qNMR) は ^1H NMR を用いた内標準法による絶対定量法であり、化学構造に応じたレスポンスファクターに依存しない測定法であるため、国際単位系 (SI) にトレーサブルな qNMR 用標準物質を用いることにより、分析値の信頼性を確保した絶対定量が可能である。また、 ^1H NMR スペクトル上で測定対象物質の定量用シグナルと夾雑物質のシグナルが十分に分離されていれば、測定対象物質の定量が可能であるため、多段階のクリーンアップや誘導体化等の操作が不要となる。故に、qNMR は迅速性、簡便性、選択性の面でも格段と優れた分析法であると言える。そこで本研究では、食品中の食品添加物分析の迅速化、効率化、精度向上を目的として、qNMR 法の食品添加物分析への応用に関する検討を行った。まず、保存料 3 種 (ソルビン酸、安息香酸、デヒドロ酢酸) および酸化防止剤 2 種 (BHT, BHA) を対象に、これらの ^1H NMR を測定し、スペクトルパターン情報を収集した。また、これらのうちソルビン酸および安息香酸について qNMR 測定を行い、定量に最適なシグナルを選別するとともに、各シグナルから得られる定量値の精度、定量再現性が良好であることを明らかにした。さらに、qNMR を用いた食品中のソルビン酸分析法 (試験溶液調製: 溶媒抽出, 分析: qNMR) の確立を目指し、ソルビン酸の使用が認められている食品 11 種類を選択し、添加回収試験を行った。その結果、回収率はすべての試料で良好な回収率および定量再現性が得られた。また、本法のソルビン酸を含有する市販食品への適用を明らかにするため、5 種類の食品を対象に、これらに含まれるソルビン酸含量を測定し、通知法 (試験溶液調製: 水蒸気蒸留, 分析: 逆相 HPLC) の結果と比較した。その結果、すべての食品において、本法と通知法の結果はほぼ同等であることが確認され、本法は通知法と同程度に正確な定量結果を与えることが判明した。また、通知法と比べ分析時間が大幅に短縮されるとともに、SI にトレーサブルな qNMR 用標準物質を用いることにより、得られる分析値の信頼性も向上した。以上より、本法は新たな食品中のソルビン酸分析法として極めて有用であることが判明した。

A. 研究目的

最近の食品の安全性の確保に対する国民の要請は強いものがあり、食品添加物についても基準への適合性、安全性の評価、国際的整合化に向けた基準や分析法の開発、改良が求められている。食品中の食品添加物分析については、平成12年3月通知の「衛化第15号」¹⁾の別添「第2版 食品中の食品添加物分析法」により試験法が定められており、分析法の改良や添加物の新規指定に伴い改正が行われている。現在の食品中の食品添加物分析法では、主にクロマトグラフ法などが用いられている。しかし、これらの測定方法は煩雑で長時間を要するクリーンアップや誘導体化の処理などを必要とするものもあり、迅速かつ簡便な検体処理を行うため、改善を望む声大きい。また、これらの測定法は相対定量法であるため、測定対象の食品添加物と同一かつ信頼性の高い定量用標準品が必要である。しかし、実際、定量に用いられている試薬の純度値は、メーカーが品質保証の意味で評価した値であり、計量学的に正確に値付けされたものではない。従って計量学的に不正確な標準物質を用いて各試験法を実施した場合、得られる分析値の信頼性は損なわれる。申請者は、これらの問題を解決するため、NMRを用いた食品添加物の絶対定量法に関する研究を計画した。

NMRは有機化合物の化学構造の決定などに用いる定性分析法として広く利用されているが、近年のNMR装置の高度化、プローブの改良、シグナル処理技術などにより、有機化合物の定量に対する有用な分析技術とも考えられている。実際、¹Hや¹³Cなどの核種を用いたNMRによる天然抽出物や食品の含有成分の定量分析への利用例も報告されている²⁻⁵⁾。特に¹H NMRを用いた定量法は、スペクトル上に観察される内部標準および測定対象物質のシグナル面積強度比が「モル濃度×水素数」に比例す

ることから、測定対象物質およ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)を求めることが可能である。斎藤や杉本らは、この内部標準に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用いた定量NMR法(qNMR法)を報告している^{6,7)}。このような内部標準を用いることにより、得られる定量値のSIトレーサビリティは確保されるとともにqNMR法の信頼性がより高まったと言え、本法は農薬、添加物、生薬、天然化合物などの定量分析へ応用されている⁸⁻¹¹⁾。また、qNMR法は化学構造に応じたレスポンスファクターに依存しない方法であることから、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、広範な有機化合物の絶対定量が可能となるとともに簡便性、迅速性、環境負荷の低減の面でも格段と優れている。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、国際整合性も確保されていると言え

る。そこで本研究では、食品中の食品添加物分析の迅速化、効率化、精度向上を目的として、qNMR法の食品添加物分析への応用に関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 試料

チーズ、ちくわ、ソーセージ、さきいか、シロップ、福神漬、ジャム、みそ、つゆ、ケチャップ、乳酸菌飲料は都内のスーパーマーケットで購入したものを

いた。

2) 試薬

ソルビン酸は関東化学(株)製の標準物質および特級品を用いた。安息香酸は和光純薬(株)製および関東化学(株)製の特級品を用いた。デヒドロ酢酸は関東化学(株)製の標準物質を用いた。ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)およびブチルヒドロキシアニソール(BHA)は和光純薬(株)製の標準物質を用いた。2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸- d_6 ナトリウム塩(sodium3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3- d_6 -sulfonate, DSS- d_6)は Isotec 製を用いた。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 $92.2 \pm 1.0\%$)を用いた。高純度フタル酸ジエチル(diethyl phthalate:DEP)認証標準物質(品番 NMIJ-CRM 4022-b:純度 $99.74 \pm 0.09\%$)は(独)産業技術総合研究所製を用いた。重ジメチルスルホキシ(DMSO- d_6)および重メタノールは 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) 各試料標準品および特級品の NMR 測定

各試料約 10 mg を精密に量り, qNMR 標準溶液または重溶媒約 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 NMR に付した。

5) 試験溶液の調製

5-1) 溶媒抽出法

チーズ, ソーセージ:細切した試料 5 g を遠沈管に採り, 飽和塩化ナトリウム水溶液 20 mL, 10%硫酸 4 mL を加えて酸性とした。ジエチルエーテル 20 mL を加えて, ホモジナイザーを用いて試料をホモジナイズした後, 遠心分離(3000 rpm, 5 min)しジエチルエーテル層を採った。残渣にジエチルエーテル 20 mL を加え同様の抽出操作を行った。これらのジエチルエーテル層を合わせ 40°C以下で減圧濃縮した後, メタノール 20 mL を加え振り混ぜた。メタノール層を分取し減圧下乾燥後, 得られた残渣にあらかじめ DSS- d_6 の濃度を校正した qNMR 標準溶液(DMSO- d_6)1 g を正確に加えたものを qNMR 試験溶液とした。

乳酸菌飲料:試料 50 g を遠沈管に採り, 10%硫酸 10 mL, ジエチルエーテル 100 mL を加えホモジナイザーを用いて試料をホモジナイズした後, 遠心分離(1000 rpm, 5 min)しジエチルエーテル層を採った。残渣にジエチルエーテル 100 mL を加え同様の抽出操作を行った。これらのジエチルエーテル層を合わせ 40°C以下で減圧下乾燥後, 得られた残渣にあらかじめ DSS- d_6 の濃度を校正した qNMR 標準溶液(DMSO- d_6)1 g を正確に加えたものを qNMR 試験溶液とした。

その他の試料:試料 5 g を遠沈管に採り, 飽和塩化ナトリウム水溶液 20 mL, 10%硫酸 4 mL を加えて酸性とした。ジエチルエーテル 20 mL を加えて, ホモジナイザーを用いて試料をホモジナイズした後, 遠心分離(3000 rpm, 5 min)しジエチルエーテル層を採った。残渣にジエチルエーテル 20 mL を加え同様の抽出操作を行った。これらのジエチルエーテル層を合わせ 40°C以下で減圧下乾燥後, 得られた残渣にあらかじめ DSS- d_6 の濃度を校正した qNMR 標

準溶液(DMSO- d_6) 1 gを正確に加えたものをqNMR試験溶液とした。

5-2) 水蒸気蒸留法

試料 5 gを丸型フラスコに採り、水 100 mL、塩化ナトリウム 60 g、15 w/v% 酒石酸溶液 10 mLを加え毎分 10 mLの蒸留速度で水蒸気蒸留に付し、留液 490 mLを捕集した。留液に水を加えて 500 mLに定容した後、メンブランフィルター(関東化学製 HLC-DISK、水系、0.45 μ m)でろ過し HPLC 試験溶液とした。

6) ソルビン酸の定量分析

6-1) qNMR 法

6-1-1) qNMR 標準溶液の調製

DSS- d_6 15.64 mgを精密に量り、DMSO- d_6 100 gを加え qNMR 標準溶液とした。qNMR 標準溶液の DSS- d_6 濃度(0.156 mg/g)は、下記に従い DEPにより校正し算出した。すなわち、DEP 約 10 mgを精密に量り、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 試料管に入れ、密閉し、qNMR に付した。 δ_H 4.30 ppmに観測される DEPに由来するプロトンシグナル(4H)および δ_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。

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

ただし、 C_{DSS} =DSS- d_6 濃度 (mg/g)、 M_{DSS} 、 M_{DEP} =DSS- d_6 および DEPの分子量(MW:224.36 および 222.24)、 I_{DSS} 、 I_{DEP} =DSS- d_6 および DEPの特定基のシグナル面積強度、 H_{DSS} 、 H_{DEP} =DSS- d_6 および

DEPの特定基のプロトン数(DSS- d_6 : $CH_3 \times 3=9$, DEP: $CH_2 \times 2=4$) W_{DEP} =DEPの秤量濃度(mg/g)、 P_{DEP} =DEPの純度(99.74%)。

6-1-2) 食品中および市販試薬中のソルビン酸含量の測定

食品中のソルビン酸含量測定は以下のように行った。すなわち、qNMR 試験溶液を外径 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 としたときのソ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、食品中のソルビン酸含量(g/kg)を算出した。

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

ただし、 C_{SA} =ソルビン酸含量(g/kg)、 I_{SA} 、 I_{DSS} =ソルビン酸および DSS- d_6 のシグナル面積強度(DSS- d_6 : 9.000)、 H_{SA} 、 H_{DSS} =ソルビン酸および DSS- d_6 の特定基のプロトン数(DSS- d_6 : $CH_3 \times 3=9$)、 M_{SA} 、 M_{DSS} =ソルビン酸および DSS- d_6 の分子量(MW:112.12 および 224.36)、 W_{FD} =各食品の秤量濃度(g/g)(=各食品 5 g/qNMR 試験溶液 1 g)、 C_{DSS} =DSS- d_6 濃度(0.156 mg/g)。

また、ソルビン酸試薬(標準物質および特級品)の含量測定は、以下のように行った。すなわち、ソルビン酸試薬約 10 mgを精密に量り、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 としたときのソ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(3)に代入し、ソルビン酸含量(%)を算出した。

$$C_{SA} = \left(\frac{I_{SA}/H_{SA}}{I_{DSS}/H_{DSS}} \times \frac{M_{SA}/W_{SA}}{M_{DSS}/C_{DSS}} \right) \times 100 \quad (3)$$

ただし、 C_{SA} =ソルビン酸含量(%), W_{SA} =ソルビン酸試薬の秤量濃度(mg/g) (=ソルビン酸 10 mg/qNMR 試験溶液 1 g), その他は式(2)と同様である。

6-1-3) qNMR 測定条件およびデータの解析

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(δ 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) および位相補正を行った。DSS- d_6 およ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 としたときのソ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、ソ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。

6-2) 滴定法

第 8 版食品添加物公定書に記載されたソルビン酸定量法を参考に分析した。すなわち、ソルビン酸 250 mg を精密に量り、中和エタノールを加えて 25 mL とし、指示薬としてフェノールフタレイン試薬を添加し 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。滴下した水酸化ナトリウム溶液量などを式(4)に代入し、ソルビン酸含量(%)を算出した。

$$C = \frac{11.21 \times F \times V}{W} \times 100 \quad (4)$$

ただし、 C =ソルビン酸含量(%), F =0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター(1.003), V =滴下した水酸化ナトリウム溶液量(mL), W =ソルビン酸の秤取量(mg)

6-3) HPLC 法

水蒸気蒸留法により得られた HPLC 試験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:メタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液(pH4.0)(36:59:5), 流速:1.0 mL/min, カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 検出:230 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、ソルビン酸濃度が 3.1~50 μ g/mL の範囲になるように検量線用ソルビン酸標準溶液を注入し、得られた 5 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ソルビン酸濃度(μ g/mL)を求め、式(5)により食品中のソルビン酸含量(%)を算出した。

$$C = \frac{VA}{W \times 1000} \quad (5)$$

ただし、 C =ソルビン酸含量(%), V =試料液量(500 mL), A =試料溶液中のソルビン酸濃度(μ g/mL), W =試料の秤取量(g)

7) 安息香酸の定量分析

7-1) qNMR 法

7-1-1) qNMR 標準溶液の調製

DSS- d_6 標準物質 41.76 mg を精密に量り、DMSO- d_6 100 gを加え qNMR 標準溶液とした。qNMR 標準溶液の DSS- d_6 濃度(0.385 mg/g)は、DSS- d_6 標準物質の純度値(92.2%)および秤量値より算出した。

7-1-2) 市販試薬中の安息香酸含量の測定

安息香酸特級品の含量測定は、以下のように行った。すなわち、試料約 10 mg を精密に量り、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 としたときの安息香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(6)に代入し、安息香酸含量(%)を算出した。

$$C_{BA} = \left(\frac{I_{BA}/H_{BA}}{I_{DSS}/H_{DSS}} \times \frac{M_{BA}/W_{BA}}{M_{DSS}/C_{DSS}} \right) \times 100 \quad (6)$$

ただし、 C_{BA} =安息香酸含量(%), I_{SA} , I_{DSS} =安息香酸および DSS- d_6 のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.000), H_{BA} , H_{DSS} =安息香酸および DSS- d_6 の特定基のプロトン数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3=9$), M_{BA} , M_{DSS} =安息香酸および DSS- d_6 の分子量 (MW:122.12 および 224.36), W_{BA} =安息香酸試薬の秤量濃度 (mg/g) (=安息香酸 10 mg/qNMR 試験溶液 1 g), C_{DSS} =DSS- d_6 濃度 (0.385 mg/g)。

7-1-3) qNMR 測定条件およびデータの解析

6-1-3)に示した qNMR 測定条件ならびに解析方法を準用した。

7-2) 滴定法

第 8 版食品添加物公定書に記載されたソルビン酸定量法を参考に分析した。すなわち、ソルビン酸 250 mg を精密に量り、50%中和エタノールを加えて 25 mL とし、指示薬としてフェノールレッド試薬を添加し 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。滴下した水酸化ナトリウム溶液量などを式(7)に代入し、安息香酸含量(%)を算出した。

$$C = \frac{12.21 \times F \times V}{W} \times 100 \quad (7)$$

ただし、 C =安息香酸含量(%), $F=0.1$ mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファクター (1.003), V =滴下した水酸化ナトリウム溶液量 (mL), W =安息香酸の秤取量 (mg)

C. 結果および考察

1) 食品添加物 5 種の ^1H NMR スペクトル分析

qNMR 法による精密な定量には、各試料に由来する NMR シグナルの帰属、シグナルの S/N 比、それぞれのシグナルの分離度などの情報が不可欠である。そこで、本研究では保存料 3 種 (ソルビン酸、安息香酸、デヒドロ酢酸) および酸化防止剤 2 種 (BHT, BHA) を対象に、これらの ^1H NMR を測定し、スペクトルパターン情報を収集した。各試料の ^1H NMR スペクトルおよびケミカルシフトを Fig.1-5 に示す。なお、各シグナルは ^1H および ^{13}C NMR および各種 2 次元 NMR (^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC) スペクトルの詳細な解析により帰属した。得られたスペクトルパターン情報を基に、次の検討を行った。

2) qNMR 法によるソルビン酸および安息香酸の含量測定

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、本法の食品中の食品添加物分析への適用性を明らかにするため、食品添加物のうち、比較的使用量が多い保存料を対象に検討を行うことにした。今年度は、ソルビン酸およ

び安息香酸を試料として選択し、ソルビン酸については標準品および特級品、安息香酸については特級品2種についてqNMR測定を行い、定量に適用可能なシグナルの確認を行った。ソルビン酸標準物質および特級品の¹H NMRチャートをFig.6、安息香酸特級品2種(sample A および B)の¹H NMRチャートをFig.7、qNMR法による各試薬のソルビン酸含量をTable 2、安息香酸含量をTable 3にそれぞれ示す。ソルビン酸の場合、 δ 1.84 ppm(水素数3)、 δ 5.79 ppm(水素数1)、 δ 6.26 ppm(水素数2)、 δ 7.18 ppm(水素数1)および δ 12.2 ppm(水素数1)にソルビン酸に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのうち、 δ 12.2 ppmのシグナルはカルボン酸のヒドロキシ基に由来するものであるが、このような交換性のプロトンシグナルは、正確なシグナル面積強度を算出できない恐れがあり定量には不適である。そこでソルビン酸含量の算出には、 δ 12.2 ppmのシグナルを除く他の4種のシグナルを用いることとした。その結果、各シグナルより算出されたソルビン酸含量の平均は、標準物質で99.3%、特級品で99.1%であった。各シグナルから得られた含量値に着目すると、標準物質における δ 6.26 ppmより得られた含量値(99.5%)は、他の3種のシグナルから得られる含量値(δ 1.84 ppm:99.2%、 δ 5.79 ppm:99.3%、 δ 7.18 ppm:99.0%)より0.3~0.6%高めに算出された。この傾向は特級品においても同様であった。 δ 6.26 ppm付近には、メチル基に隣接する多スピン系のメチンプロトンシグナルおよびそれに隣接する2スピン系のメチンプロトンシグナルが存在している。また、これらのシグナルは部分的に重なりあうとともに左右に若干幅が広がったシグナルとして観察された。従って、定量の際、このシグナルの積分範囲が他のシグナルより若干広がるため、得られる含量値が高めに算出されたと考えられた。以上の結果およびシグナル面積強度の信頼性を考慮すると、積分範囲が狭く、

多重度の小さい3種のシグナル(δ 1.84 ppm、 δ 5.79 ppm、 δ 7.18 ppm)より得られる含量値が、真値に近いものと考えられた。なお、相対標準偏差(RSD)は標準物質で0.6%、特級品で0.3%であり定量再現性は良好であった。

一方、安息香酸の場合、 δ 7.54 ppm(水素数2)、 δ 7.66 ppm(水素数1)、 δ 7.98 ppm(水素数2)および δ 13.0 ppm(水素数1)に安息香酸に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのうち、 δ 13.0 ppmのシグナルはカルボン酸のヒドロキシ基に由来するものであるが、ソルビン酸のときと同様にこのような交換性のプロトンシグナルは定量に不適である。そこで安息香酸含量の算出には、 δ 13.0 ppmのシグナルを除く他の3種のシグナルを用いた。その結果、各シグナルより算出された安息香酸含量の平均は、sample A および sample Bともに99.6%であった。各シグナルから得られた含量値に着目すると、sample A および sample Bともに3種のシグナルから得られる含量値は、ほぼ同等と考えられ、これらのシグナルは、安息香酸含量の算出に適用可能であることが判明した。なお、RSDはsample Aで0.2%、sample Bで0.1%であり定量再現性は良好であった。

3) qNMR法および滴定法によるソルビン酸および安息香酸含量の比較

第8版食品添加物公定書では、ソルビン酸および安息香酸の定量法として中和滴定法が示されている。そこで、ソルビン酸標準物質および安息香酸特級品を用いてqNMR法と滴定法により算出されるソルビン酸および安息香酸含量をそれぞれ比較した。ソルビン酸の場合、Table 4に示すようにqNMR法の含量値は、滴定の結果とほぼ一致した。同様に、安息香酸においてもqNMR法の含量値は、滴定の結果とほぼ一致し(Table 5)、qNMR法は、滴定法と同等の精度を有することが確認された。qNMR法お

よび滴定法はともに測定対象物質と同一の標準物質に基づく測定値(検量線)との比較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。

4) 添加回収試験

3)の検討結果を基に、本項ではソルビン酸を対象にqNMR法による食品中のソルビン酸分析法の確立に関する検討を行った。まず、ソルビン酸およびその塩類の使用が認められている食品のうち、チーズ、ちくわ、ソーセージ、さきいか、シロップ、福神漬、ジャム、みそ、めんつゆ、ケチャップおよび乳酸菌飲料について添加回収試験を行った。ソルビン酸の添加濃度は、各食品の使用上限濃度で検討した。また、定量下限を算出する目的で乳酸菌飲料については0.013 g/kg、その他の食品については0.13 g/kgについても検討した。添加回収試験結果をTable 6、ソルビン酸未添加および添加した各食品の¹H NMRスペクトルをFig.8~17にそれぞれ示す。なお、ソルビン酸由来の各シグナルのS/N比、形状、シグナル近傍のベースライン、夾雑物のシグナルとの分離度合等を考慮して、さきいかおよび乳酸菌飲料は δ 7.18 ppm、その他の食品は δ 5.79 ppmのシグナルより回収率を算出した。各試料からのソルビン酸の回収率は、乳酸菌飲料を除く10種の食品では、使用上限濃度の添加で89.1~100.2%、0.13 g/kgの添加で80.3~99.7%と良好な回収率が得られた。特にチーズおよびソーセージについてはMeOHを用いた脱脂操作を行ったが、これら2種の回収率は良好であり脱脂操作による回収率の低下等の問題は生じないことが確認された。また、RSDは使用上限濃度添加時で0.5~3.1%、0.13 g/kg添加時で0.6~6.8%であり、定量再現性は良好であった。

乳酸菌飲料は、使用上限濃度が他の食品と比べ1オーダー小さいため、試料の秤取量が5 gではNMRの感度の問題からソルビン酸由来のシグナルを検出することが困難であると考えられた。そこで、秤取量を50 gにして検討したところ、ソルビン酸由来のシグナルは良好なS/N比を示し、回収率は使用上限濃度の添加で93.3%(RSD 3.0%)、0.013 g/kg添加で86.4%(RSD 2.0%)と良好であった。

4) qNMR法による食品中のソルビン酸含量の測定

次にソルビン酸の使用が表示されていた市販食品5種(ちくわ、ソーセージ、さきいか、シロップ、ジャム)について、qNMR法によるソルビン酸の含量測定を行い、得られた結果を通知法(HPLC法)と比較した。なお、抽出操作は、qNMRでは溶媒抽出法、通知法では水蒸気蒸留法をそれぞれ用いた。また、qNMR法ではソルビン酸由来のシグナルと夾雑物のシグナルとの分離度合などを考慮して、さきいかは δ 7.18 ppm、その他の食品は δ 5.79 ppmのシグナルを用いてソルビン酸含量を算出した。各食品のソルビン酸含量をTable 7、各食品の¹H NMRスペクトルをFig.18~22にそれぞれ示す。ちくわ、シロップ、ジャムでは、qNMR法により算出されたソルビン酸含量は通知法とほぼ同等であることが確認され、qNMR法は通知法と同程度に正確な定量結果を与えることが判明した。一方、さきいかでは、qNMR法によるソルビン酸含量は公定法の約1.2倍、また、ソーセージでは約0.9倍の定量値を示し、両法により得られるソルビン酸含量に差異が認められた。これは両法の抽出方法に起因するものと推定されたため、さきいかおよびソーセージについて添加回収試験を行った。その結果、さきいかでは、ソルビン酸カリウム0.75 g/kg(ソルビン酸換算)添加時の回収率がqNMR法(溶媒抽出法)で94.5%(n=3)、通知法(水蒸気蒸留法)で84.8%(n=3)であった。また、ソーセ

ージではソルビン酸 2.0 g/kg 添加時の回収率は qNMR 法で 89.1%(n=3), 通知法で 93.3%(n=3)であった。以上の結果より、さきいかおよびソーセージで確認された qNMR 法と通知法のソルビン酸含量に違いが認められたのは、両抽出方法の抽出効率(回収率)が主な原因と判明した。このように、ソーセージおよびさきいかでは qNMR 法と通知法の定量値に差異が認められたものの、添加回収試験の結果を考慮すると、得られた結果はほぼ同等と考えられた。また、qNMR 法は通知法と比べ分析時間が大幅に短縮されるとともに得られる定量値の信頼性も向上した。以上より、qNMR 法を利用した分析法は新たな食品中のソルビン酸分析法として有用であることが判明した。

D. 結論

本研究では、食品中の食品添加物分析法の効率化および精度向上を目指して、qNMR を用いた食品中の食品添加物分析法の確立に関する検討を行い以下の成果を得た。

1. 保存料 3 種(ソルビン酸, 安息香酸, デヒドロ酢酸)および酸化防止剤 2 種(BHT, BHA)を対象に、これらの ^1H NMR を測定し、そのスペクトルパターンを明らかにした。
2. ソルビン酸および安息香酸について qNMR 測定を行い、定量に最適なシグナルを選別するとともに、各シグナルから得られる定量値の精度、定量再現性が良好であることを明らかにした。
3. qNMR を用いた食品中のソルビン酸分析法の確立に関する検討を行い、本法は各種食品の添加回収試験において、良好な回収率、定量再現性が得られた。また、市販食品の分析より公定法と同程度に正確な定量結果を与えることが明らかとなった。さらに、公定法と比較して迅速な定量分析が可能となった。

確立した分析法は、迅速、簡便で、定量再現性が良好であるとともに、正確な純度が付与された標準物質を用いて定量を行うため、分析値の信頼性も向上した方法であり、新たな食品中のソルビン酸分析法として極めて有用であることが判明した。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

大槻崇, 佐藤恭子, 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 山崎壮, 西村哲治, 河村葉子, “定量 NMR を用いた食品中のソルビン酸分析法の検討”, 日本薬学会第 131 年会(2011.3)(静岡)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知 “食品中の食品添加物分析法について” 平成 12 年 3 月 30 日, 衛化第 15 号 (2000).
- 2) Ng,S., *J. American Oil Chemists' Society* **2000**, 77, 749-755.
- 3) Pauli.G.F.; Jaki, B.U.; Lankin, D.C., *J. Nat. Prod.*

- 2007,70, 589-595.
- 4) Berregi, I.; Campo, G.; Caracena, R.; Miranda, J.I., *Talanta* **2007**, 72, 1049-1053.
 - 5) Donarski, J.A.; Roberts, D.P.T.; Charlton, A.J., *Analytical Methods* **2010**, 2, 1479-1483.
 - 6) Saito, T.; Ihara, T.; Koike, M.; Kinugasa, S.; Fujimine, Y.; Nose, K.; Hira, T. *Accred. Qual. Assur.* **2009**, 14, 79-86.
 - 7) 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, 山崎壯, 棚元憲一, 中澤裕之, 西村哲治, 日食化誌 **2009**, 16, 28-33.
 - 8) 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, 山崎壯, 河村葉子, 西村哲治, 食衛視 **2009**, 16, 28-33.
 - 9) 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, 山崎壯, 河村葉子, 食衛誌 **2010**, 51, 205-212.
 - 10) 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.
 - 11) Hasada, K.; Yoshida, T.; Yamazaki, T.; Sugimoto, N.; Nishimura, T.; Nagatsu, A.; Mizukami, H. *J. Nat. Med.* **2010**, 65, 262-267.

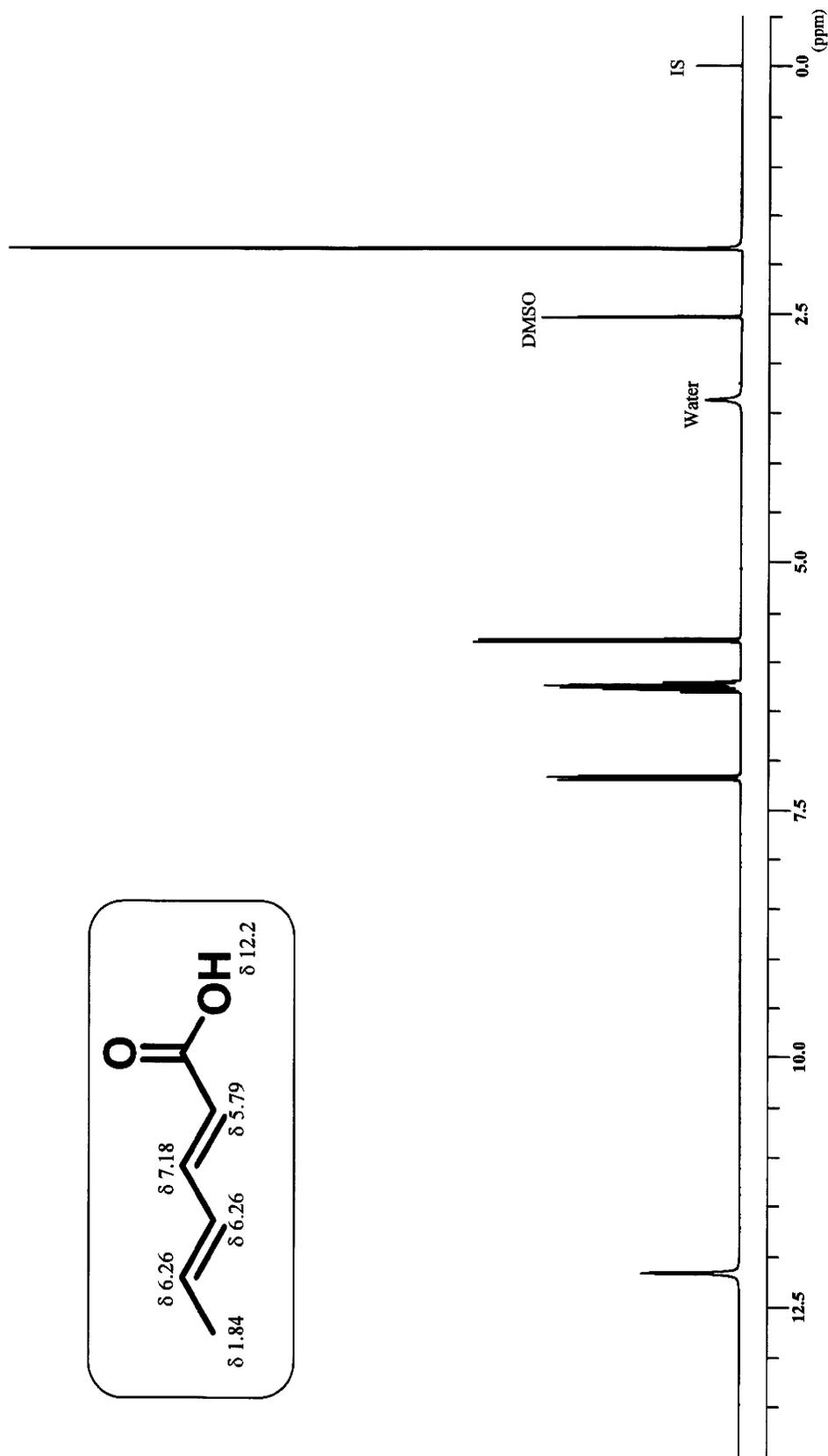


Fig.1 ¹H NMR spectrum of sorbic acid in DMSO-*d*₆ with the chemical structure and its chemical shifts

The chemical shifts (δ) are given in ppm relative to the signal for internal standard (DSS-*d*₆) (δ 0 ppm, DMSO-*d*₆), IS: internal standard

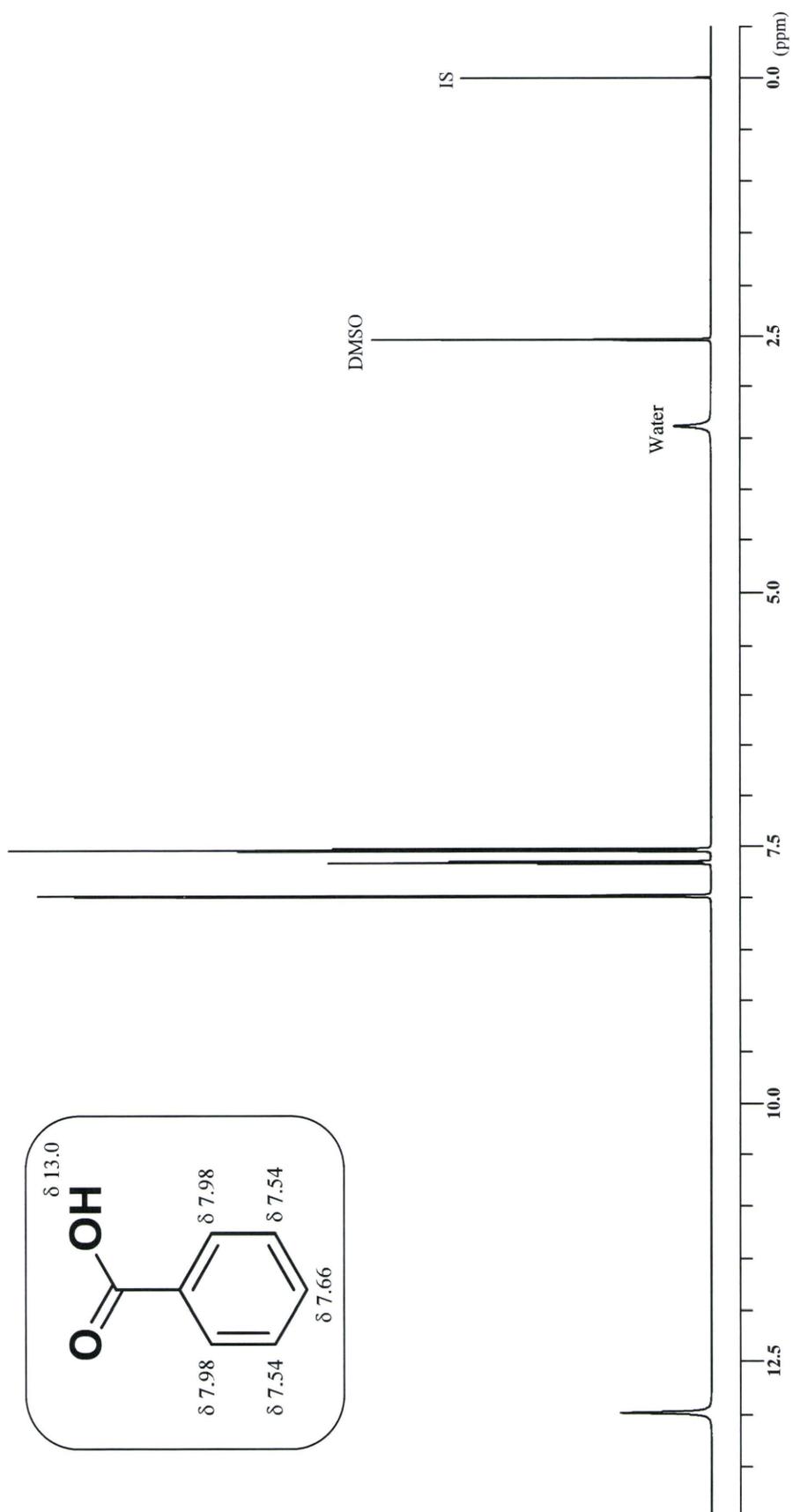


Fig.2 ¹H NMR spectrum of benzoic acid in DMSO-*d*₆ with the chemical structure and its chemical shifts

The chemical shifts (δ) are given in ppm relative to the signal for internal standard (DSS-*d*₆)(δ 0 ppm, DMSO-*d*₆), IS: internal standard

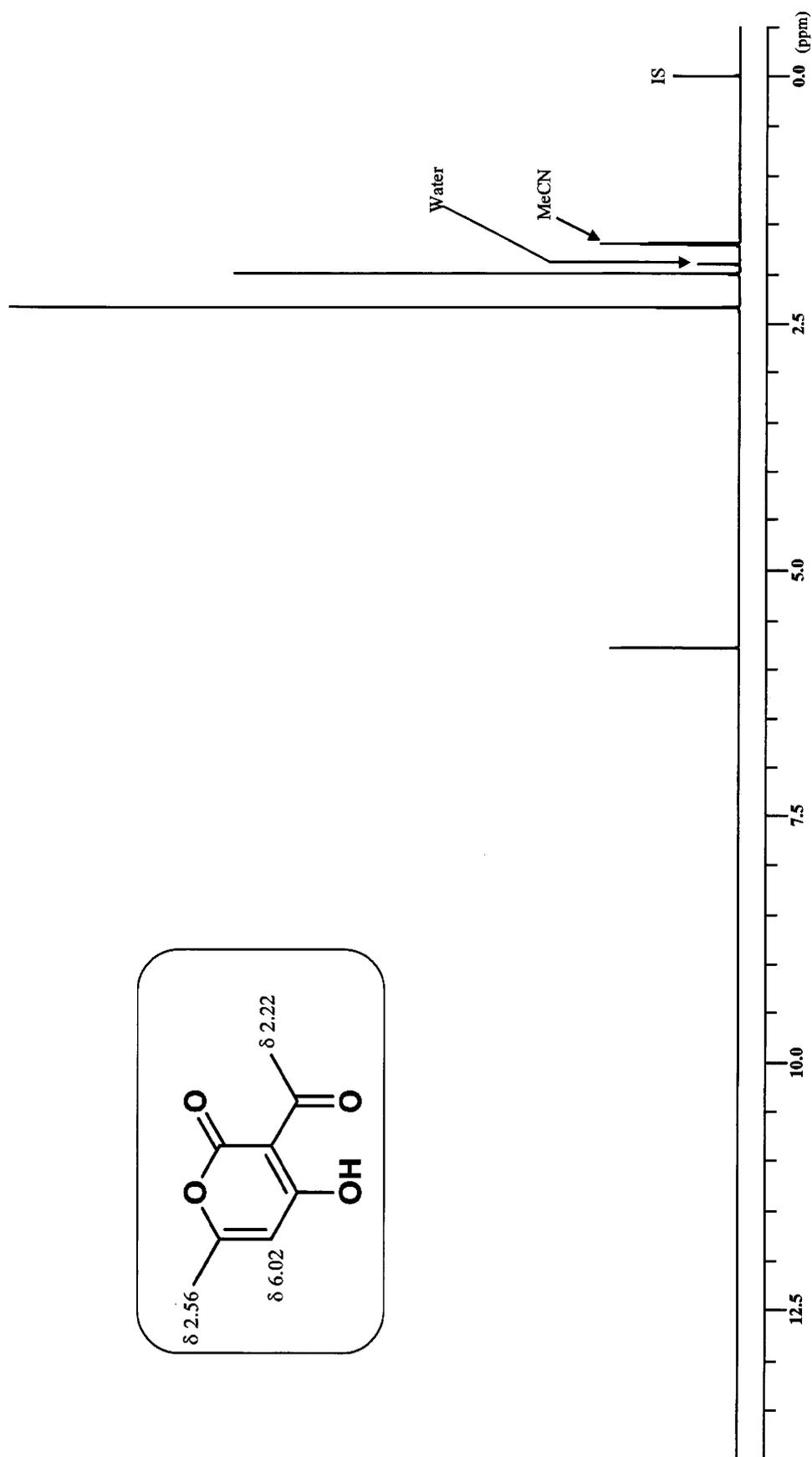


Fig.3 ^1H NMR spectrum of dehydroacetic acid in $\text{MeCN-}d_3$ with the chemical structure and its chemical shifts
 The chemical shifts (δ) are given in ppm relative to the signal for internal acetonitrile (δ 1.93 ppm, $\text{MeCN-}d_3$)

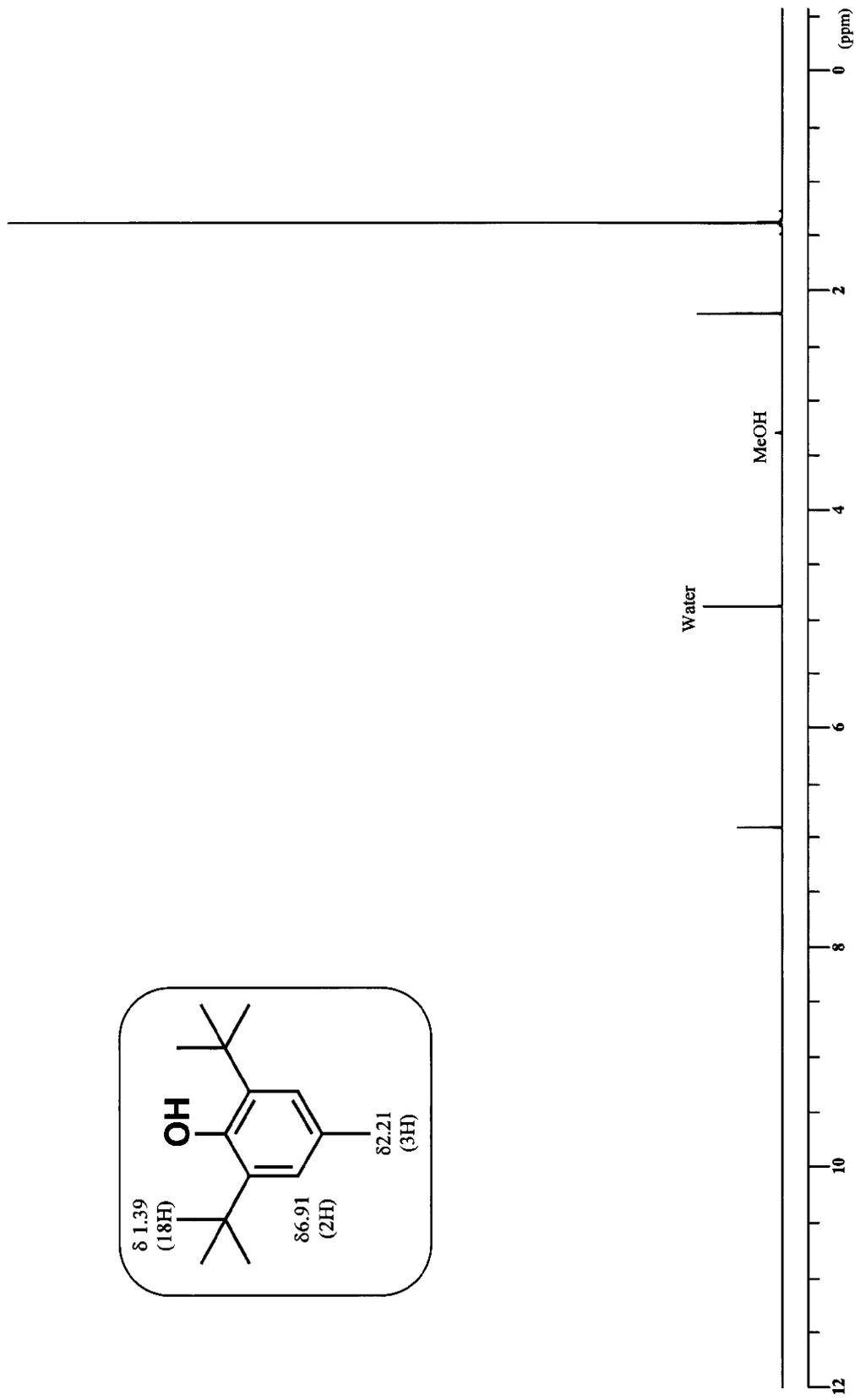


Fig.4 ¹H NMR spectrum of dibutylhydroxytoluene (BHT) in MeOH-*d*₄ with the chemical structure and its chemical shifts
The chemical shifts (δ) are given in ppm relative to the signal for internal methanol (δ 3.30 ppm, MeOH-*d*₄)

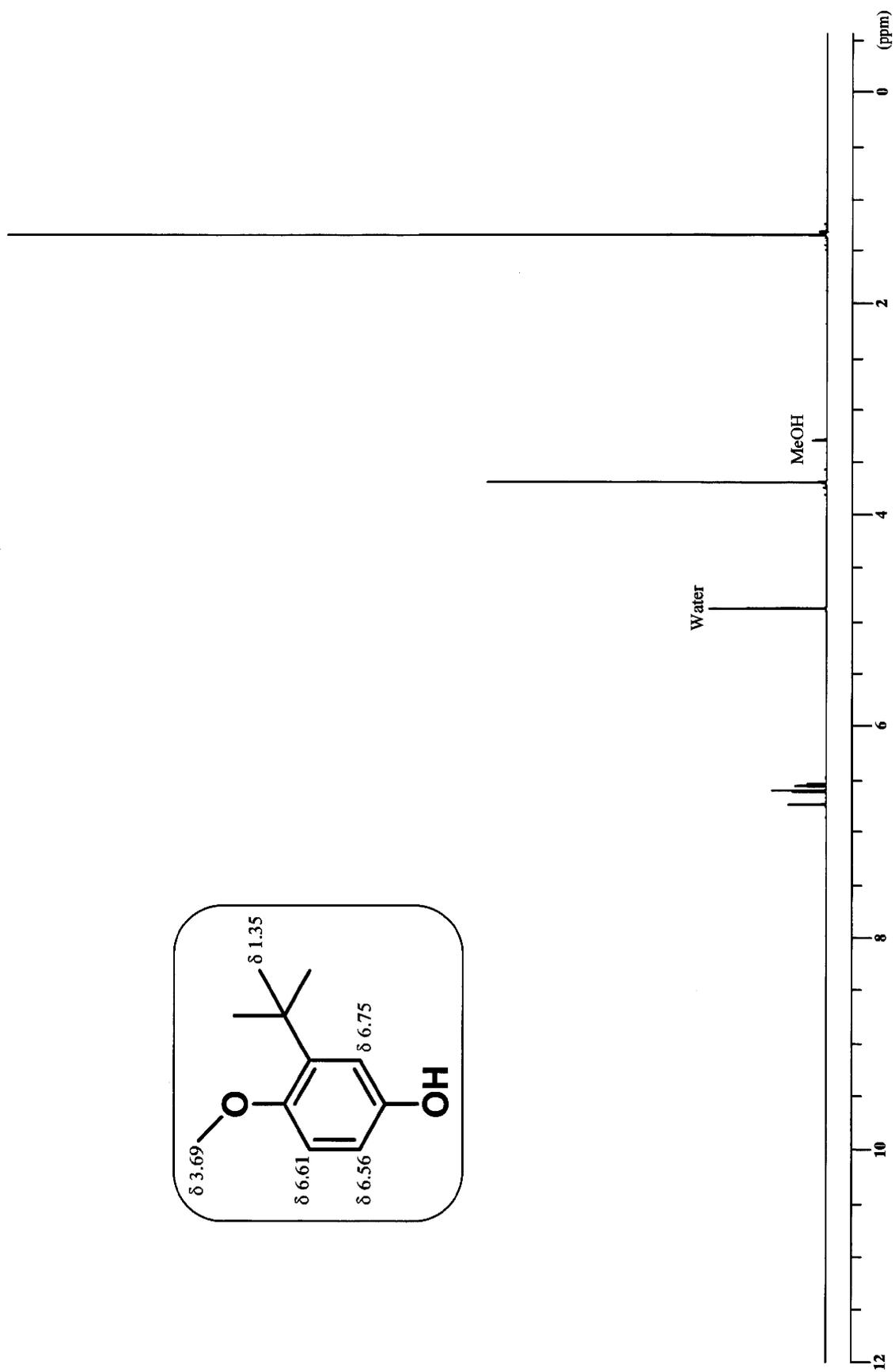
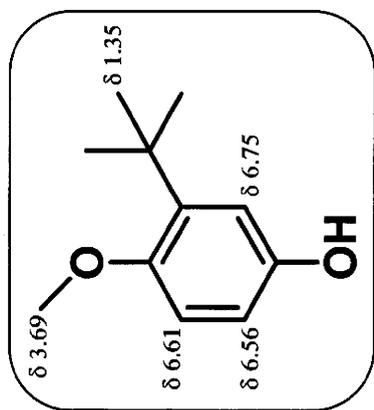


Fig.5 ^1H NMR spectrum of butylated hydroxyanisole (BHA) in $\text{MeOH-}d_4$ with the chemical structure and its chemical shifts

The chemical shifts (δ) are given in ppm relative to the signal for internal methanol (δ 3.30 ppm, $\text{MeOH-}d_4$)

Table 1 Acquisition parameters of qNMR analysis

Spectrometer	JEOL JNM-ECA600
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	- 5-15 ppm
Data points	64,000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s ($>5 \times T_1$)
Scan times	8
Sample spin	no spin
^{13}C decoupling	only acquisition time
Decoupling sequence	MPF8
Probe temperature	25°C

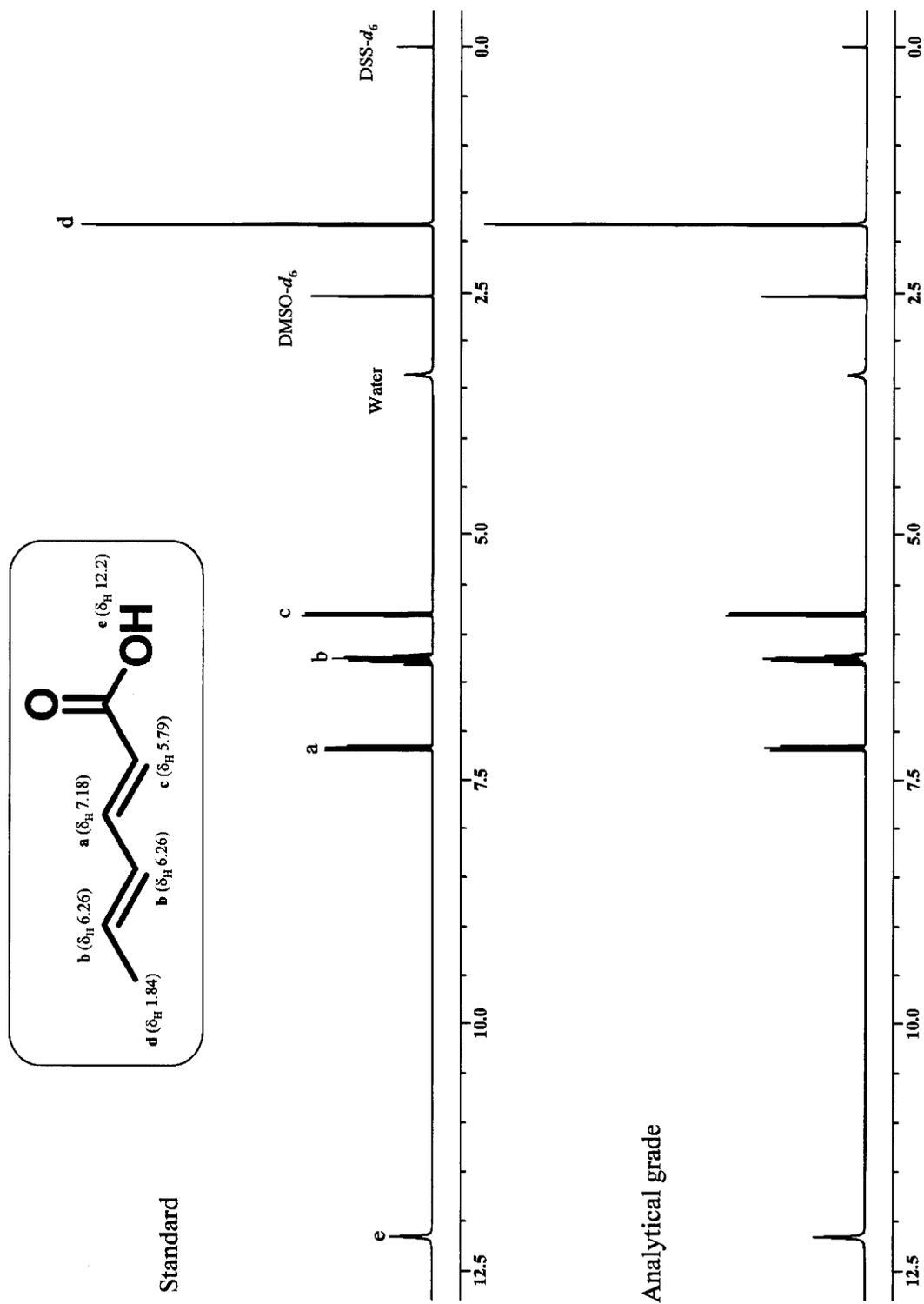


Fig.6 ¹H NMR spectra of standard and analytical grade of sorbic acid in DMSO-*d*₆ containing DSS-*d*₆

Table 2 Content of sorbic acid of standard and analytical grade determined from qNMR method

Signal (ppm)	Standard		Analytical grade	
	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)
1.84	99.2	0.6	99.0	0.3
5.79	99.3	0.6	99.0	0.3
6.26	99.5	0.6	99.4	0.2
7.18	99.0	0.6	98.8	0.2
Mean	99.3	0.6	99.1	0.3