

201131034A

厚生労働科学研究費補助金

食品の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23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24(2012)年5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……………38

## 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分析は、主に GC, HPLC などが用いられているが、食品や測定対象物質によっては煩雑な前処理や低回収率等の多くの問題点がある。また、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り純度が算出されたものは限られている。従って、不正確な定量用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 は分子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) にトレーサブルな定量 NMR 用標準物質を内部標準として用いることにより、様々な有機化合物に対して分析値の信頼性を確保した絶対定量が可能である。また、測定対象物質の定量用シグナルが夾雑物質由来のシグナルや分子内の他のシグナルと十分に分離されていれば、測定対象物質の正確な定量が可能である。そのため、多段階のクリーンアップや誘導体化等の前処理操作が不要となる可能性がある。ゆえに、定量 NMR (qNMR) は迅速性、簡便性、選択性の面で従来法よりも優れた分析法であると考えられる。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、精度の向上を目的として、 $^1\text{H}$  NMR を用いた qNMR の食品添加物分析への応用に関する検討を行った。今年度は、デヒドロ酢酸、アセスルファムカリウム、アセスルファム、食用青色 2 号及びその副成色素を対象に、これらの  $^1\text{H}$  NMR を測定しスペクトルパターン情報を収集した。また、5 種の化合物について 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、本法の定量精度が良好であることを明らかにした。さらに、qNMR の適用が可能と判断された安息香酸及びデヒドロ酢酸について、qNMR を用いた食品中の添加物分析法の確立に関する検討を行った。その結果、添加回収試験では、良好な結果が得られた。また、これらの添加物を含有する市販食品への検討を行い、通知法の定量結果と比較した。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、本法は新たな加工食品中の安息香酸及びデヒドロ酢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

食品の安全性の確保に対する国民の要望は近年ますます高まっており、食品添加物についても基準への適合性、安全性評価、国際統合化に向けた基準の作成、分析法の確立が求められている。我が国では食品添加物の安全性や品質を確保する目的で、食品添加物の性状、含量(純度)等の「成分規格」や食品添加物を使用できる食品の種類、使用量等の「使用基準」等が設定され、『第8版食品添加物公定書』に記載されている。これに伴い、食品添加物の純度や食品中の食品添加物の使用量に関して規格、基準が守られているかを監視するための分析法が定められている。このうち、食品への使用量に関する試験については、平成12年3月通知の「衛化第15号」<sup>1)</sup>の別添「第2版 食品中の食品添加物分析法」によりその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適宜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GC、HPLCなどが用いられている。しかし、食品や測定対象物質によっては煩雑な前処理や低回収率等の多くの問題点が指摘されている。また、これらの分析手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物質が必要である。しかし、実際、定量に用いられている試薬の純度値は、試薬メーカーが品質保証の意味で評価した値であり、計量学的に正確に純度が算出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、シグナル処理技術の向上などにより、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、<sup>1</sup>H や<sup>13</sup>Cなどの核種を用いたNMRによる天然抽出物や食品中の含有成分、医薬品の代謝産物の定量分析への利用例も報告されている<sup>2-6)</sup>。特に<sup>1</sup>H NMRを用いた定量法(qNMR)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算出された国際単位系(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qNMR法を報告している<sup>6,7)</sup>。このような内部標準(上位標準)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本法の分析値の信頼性が向上し、本法は農薬、添加物、生薬などの定量分析へ応用されている<sup>7-13)</sup>。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である。さらに、食品などの混合物に含まれる測定対象成分を定量する際、<sup>1</sup>H 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、測定対象物質の精確な定量が可能である。そのため、多段階のクリーンアップや誘導体化等の前処理操作が不要となる可能性がある。ゆえに、定量NMRは迅速性、簡便性、選択性の面で従来法よりも優れた分析法であると考えられる。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、昨年度に引き続き、食品中の食品添加物分析の迅速化、効率化、精度の向上を

目的として、qNMR による食品中の食品添加物分析法の確立に関する検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 試料

キャビア, マーガリン, アボカドペースト, 清涼飲料水, シロップ, しょう油, バター及びチーズ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。

### 2) 試薬

安息香酸は和光純薬(株)製の特級品を用いた。デヒドロ酢酸は、関東化学(株)製の標準物質及び特級品を用いた。アセスルファムカリウムは関東化学(株)製の標準物質を用いた。アセスルファムは、アセスルファムカリウムの酸加水分解し、溶媒抽出による精製により得た。食用青色 2 号(インジゴカルミン)は、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団製の食品添加物公定書標準品を用いた。Sodium salt of 2-(1,3-dihydro-3-oxo-7-sulfo-2H-indol-2-ylidene)-2,3-dihydro-3-oxo-1H-indole-5-sulfonic acid (5,7'-体)及び sodium salt of 2-(1,3-dihydro-3-oxo-2H-indol-2-ylidene)-2,3-dihydro-3-oxo-1H-indole-5-sulfonic acid (5-体)は、食用青色 2 号色素製剤より単離したものをを用いた。

Sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3-d<sub>6</sub>-sulfonate (DSS-d<sub>6</sub>) 標準物質は、和光純薬製(Tracesure, Code No.044-31671, Lot.No.DCP5376: 純度 92.2±0.7%)を用いた。1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-d<sub>4</sub>(1,4-BTMSB-d<sub>4</sub>) 標準物質は、和光純薬製(Tracesure, Code No.024-17031, Lot.No.DCP 5375:純度 99.8±0.3%)を用いた。重水(D<sub>2</sub>O), 重ジメチルスルホキシド(DMSO-d<sub>6</sub>)および重アセトニトリル(MeCN-d<sub>3</sub>)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<sub>VP</sub> システム(ポンプ: LC-10AD<sub>VP</sub> x 2, 恒温槽: CTO-10A<sub>VP</sub>, 多波長検出器: SPD-M10A<sub>VP</sub>, デガッサー: DGU-14A, オートサンプラー: SIL-10AD<sub>VP</sub>, データ処理装置: LC solution) (島津製作所製)。

はかり: ME235S (ザルトリウスメカトロニクス製), BM-20 (エー・アンド・デイ製), XP2U (メトラー・トレド製)

### 4) 各化合物の標準物質または試薬特級品の qNMR 測定

#### 4-1) qNMR 標準溶液の調製

##### 4-1-1) 安息香酸

DSS-d<sub>6</sub> 標準物質 41.76 mg または 44.98 mg を精密に量り、DMSO-d<sub>6</sub> 100 g を加え qNMR 標準溶液とした。qNMR 標準溶液の DSS-d<sub>6</sub> 濃度 (0.385 mg/g または 0.415 mg/g) は、DSS-d<sub>6</sub> 標準物質の純度値 (92.2%) および秤量値より算出した。

##### 4-1-2) アセスルファム, 食用青色 2 号及び副成色素

DSS-d<sub>6</sub> 標準物質 21.91 mg を精密に量り、DMSO-d<sub>6</sub> 100 g を加え qNMR 標準溶液とした。qNMR 標準溶液の DSS-d<sub>6</sub> 濃度 (0.202 mg/g) は、DSS-d<sub>6</sub> 標準物質の純度値 (92.2%) および秤量値より算出した。

##### 4-1-3) デヒドロ酢酸

1,4-BTMSB-d<sub>4</sub> 標準物質 20.49 mg を精密に量り、MeCN-d<sub>3</sub> 100 g を加え qNMR 標準溶液とした。qNMR 標準溶液の 1,4-BTMSB-d<sub>4</sub> 濃度 (0.204 mg/g) は、1,4-BTMSB-d<sub>4</sub> 標準物質の純度値 (99.8%) 及び秤量値より算出した。

#### 4-2)qNMR 測定

各試料約 5~10 mg を精密に量り, qNMR 標準溶液に溶解した. この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し qNMR 測定を行った. なお, アセスルファミンについては, 測定直前に TFA- $d_1$  (終濃度: 5%) を NMR 試料管に入れ qNMR に付した. DSS- $d_6$  または 1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナル面積強度をそれぞれ 9.000 または 18.00 としたときの試料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, 濃度等を下記の式に代入し, 各標準物質または試薬特級品の純度 (%) を算出した.

$$\text{Purity (\%)} = \frac{I_{\text{sample}}/H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}}/H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}}/W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}}/C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし,  $I_{\text{sample}}$ =試料の特定基のシグナル面積強度,  $I_{\text{std}}$ =内部標準のシグナル面積強度 (DSS- $d_6$ :9.000, 1,4-BTMSB- $d_4$ :18.00),  $H_{\text{sample}}$ =試料の特定基の水素数,  $H_{\text{std}}$ =内部標準の特定基の水素数 (DSS- $d_6$ : $\text{CH}_3 \times 3=9$ , 1,4-BTMSB- $d_4$ : $\text{CH}_3 \times 6=18$ ),  $M_{\text{sample}}$ =試料の分子量,  $M_{\text{std}}$ =内部標準の分子量 (DSS- $d_6$ :224.36, 1,4-BTMSB- $d_4$ :226.50),  $W_{\text{sample}}$ =試料の秤取量 (mg),  $C_{\text{std}}$ = qNMR 標準溶液の DSS- $d_6$  または 1,4-BTMSB- $d_4$  濃度

#### 5) 滴定法

デヒドロ酢酸 500 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下記の式に代入し, デヒドロ酢酸の純度 (%) を算出した.

$$\text{Purity (\%)} = \frac{16.82 \times F \times V}{W} \times 100$$

ただし,  $F=0.1$  mol/L 水酸化ナトリウム溶液のファク

ター (1.004),  $V$ =滴下した水酸化ナトリウム溶液量 (mL),  $W$ =デヒドロ酢酸の秤取量 (mg)

#### 6) 食品中の食品添加物分析

##### 6-1) 試験溶液の調製

##### 6-1-1) 溶媒抽出法

キャビア, マーガリン, アボカドペースト, バター及びチーズ: 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分取した. 下層にジエチルエーテル 20 mL を加え同様に処理し, 上層を合わせ 40°C 以下で減圧濃縮した. メタノール 20 mL を加え振り混ぜた後, メタノール層を分取し減圧乾固した. 得られた抽出物に qNMR 標準溶液 1 g を正確に加えたものを qNMR 試験溶液とした.

しょう油: 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 を加えた. 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分取した. 下層にジエチルエーテル 20 mL を加え同様に処理し, 上層を合わせ 40°C 以下で減圧濃縮した. 得られた抽出物に qNMR 標準溶液 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分取した. 下層にジエチルエーテル 20 mL を加え

同様に処理し、上層を合わせ 40℃以下で減圧濃縮した。得られた抽出物に qNMR 標準溶液 1 g を正確に加えたものを qNMR 試験溶液とした。

#### 6-1-2) 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 μm）でろ過し HPLC 試験溶液とした。

#### 6-2) 食品中の安息香酸含量の測定

##### 6-2-1) qNMR 法

食品中の安息香酸含量の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。qNMR 測定の基本条件を Table 1 に示した。得られた FID データは、フーリエ変換及び位相補正を行った。DSS-*d*<sub>6</sub> および定量シグナルの積分範囲を設定した後、DSS-*d*<sub>6</sub> 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特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、食品中の安息香酸含量 (g/kg) を算出した。

$$\text{Content (g/kg)} = \frac{I_{\text{BA}}/H_{\text{BA}}}{I_{\text{DSS}}/H_{\text{DSS}}} \times \frac{M_{\text{BA}}/W_{\text{FD}}}{M_{\text{DSS}}/C_{\text{DSS}}}$$

ただし、 $I_{\text{BA}}$ =安息香酸の特定基のシグナル面積強度、 $I_{\text{DSS}}$ =DSS-*d*<sub>6</sub> のシグナル面積強度 (9.000)、 $H_{\text{BA}}$ =安息香酸の特定基のプロトン数、 $H_{\text{DSS}}$ =DSS-*d*<sub>6</sub> のプロトン数 ( $\text{CH}_3 \times 3=9$ )、 $M_{\text{BA}}$ =安息香酸の分子量 (122.12)、 $M_{\text{DSS}}$ =DSS-*d*<sub>6</sub> の分子量 (224.36)、 $W_{\text{FD}}$ =各食品の秤取量 (g)、 $C_{\text{DSS}}$ = qNMR 標準溶液の DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度 (0.385 mg/g または 0.415 mg/g)。

なお、qNMR の化学シフト値は、DSS-*d*<sub>6</sub> のプロトン

シグナルを基準 (δ 0 ppm) とし、δ 値を ppm 単位で表した。また、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 Alice 2 for qNMR “ピュアリティ” (日本電子 (株)) を用いた。

##### 6-2-2) 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 μm, 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℃, 検出: 230 nm, 注入量: 10 μL

なお、定量分析は絶対検量線法により行った。すなわち、安息香酸濃度が 3.1~50 μg/mL の範囲になるように検量線用安息香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安息香酸濃度 (μg/mL) を求め、下記の式により食品中の安息香酸含量 (g/kg) を算出した。

$$\text{Content (g/kg)} = \frac{C \times V}{1000 \times W}$$

ただし、 $C$ =試料溶液中の安息香酸濃度 (μg/mL)、 $V$ =試料液量 (500 mL)、 $W$ =試料の秤取量 (g)

#### 6-3) 食品中のデヒドロ酢酸含量の測定

##### 6-3-1) qNMR 法

食品中のデヒドロ酢酸含量の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。得られた FID データは、フーリエ変換及び位相補正を行った。1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> および定量シグナルの積分範囲を設定した後、1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> のシグナル面積強度を 18.00 としたときのデヒドロ酢酸に由来する特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の

式に代入し、食品中のデヒドロ酢酸含量(g/kg)を算出した。

$$\text{Content (g/kg)} = \frac{I_{\text{DA}}/H_{\text{DA}}}{I_{\text{BTMSB}}/H_{\text{BTMSB}}} \times \frac{M_{\text{DA}}/W_{\text{FD}}}{M_{\text{BTMSB}}/C_{\text{BTMSB}}}$$

ただし、 $C_{\text{DA}}$ =デヒドロ酢酸含量(g/kg),  $I_{\text{DA}}$ =デヒドロ酢酸の特定基のシグナル面積強度,  $I_{\text{BTMSB}}$ =1,4-BTMSB- $d_4$ のシグナル面積強度(18.00),  $H_{\text{DA}}$ =デヒドロ酢酸の特定基のプロトン数,  $H_{\text{BTMSB}}$ =1,4-BTMSB- $d_4$ のプロトン数( $\text{CH}_3 \times 6 = 18$ ),  $M_{\text{DA}}$ =デヒドロ酢酸の分子量(168.15),  $M_{\text{BTMSB}}$ =1,4-BTMSB- $d_4$ の分子量(226.50),  $W_{\text{FD}}$ =各食品の秤取量(g),  $C_{\text{BTMSB}}$ =qNMR標準溶液の1,4-BTMSB- $d_4$ 濃度(0.204 mg/g)。

なお、qNMRの化学シフト値は、1,4-BTMSB- $d_4$ のプロトンシグナルを基準( $\delta$  0.23 ppm)とし、 $\delta$ 値をppm単位で表した。また、データの解析は、6-2-1)と同様に Alice 2 for qNMR “ピュアリティ”を用いた。

### 6-3-2) HPLC 法

水蒸気蒸留法により得られた HPLC 試験溶液について、6-2-2)に示した測定条件を準用し、HPLCにて分析した。なお、定量分析は、6-2-2)と同様に絶対検量線法により行った。すなわち、デヒドロ酢酸濃度が 3.1~50  $\mu\text{g/mL}$  の範囲になるように検量線用デヒドロ酢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デヒドロ酢酸濃度( $\mu\text{g/mL}$ )を求め、下記の式により食品中のデヒドロ酢酸含量(g/kg)を算出した。

$$\text{Content (g/kg)} = \frac{C \times V}{1000 \times W}$$

ただし、 $C$ =試料溶液中のデヒドロ酢酸濃度( $\mu\text{g/mL}$ )、 $V$ =試料液量(500 mL)、 $W$ =試料の秤取量(g)

## C. 結果および考察

### 1)食品添加物及び副成色素の $^1\text{H}$ 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、分子内の各シグナルの分離度などの情報が不可欠である。そこで、本研究ではデヒドロ酢酸、アセスルファムカリウム、アセスルファム、食用青色 2 号及び副成色素 (Sodium salt of 2-(1,3-dihydro-3-oxo-7-sulfo-2H-indol-2-ylidene)-2,3-dihydro-3-oxo-1H-indole-5-sulfonic acid 及び sodium salt of 2-(1,3-dihydro-3-oxo-2H-indol-2-ylidene)-2,3-dihydro-3-oxo-1H-indole-5-sulfonic acid) を対象に、これらの  $^1\text{H}$  NMR を測定し、スペクトルパターン情報を収集した。得られたスペクトルパターン情報を基に、以下の qNMR に関する検討を行った。なお、検討した試料のうち、アセスルファムカリウムの  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを Fig.1 に示した。

### 2) qNMR 法によるデヒドロ酢酸、アセスルファム、食用青色 2 号及び副成色素の含量測定

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内部標準物質として用いることにより、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、前項で検討した化合物のうち、デヒドロ酢酸(標準物質及び特級品)、アセスルファム、食用青色 2 号及び 2 種の副成色素について 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。qNMR 測定により得られた各化合物の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを Fig.2~6、各化合物の含量を Table 2~6 にそれぞれ示した。なお、各シグナルは  $^1\text{H}$  および



$^{13}\text{C}$  NMR 及び各種 2 次元 NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC) スペクトルの詳細な解析により帰属した。また、化学シフト値は、内部標準のメチルプロトンシグナルを基準 (DSS- $d_6$ :  $\delta$  0 ppm, 1,4-BTMSB- $d_4$ : 0.23 ppm) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。

デヒドロ酢酸では、 $\delta$  2.22 ppm (水素数 3),  $\delta$  2.56 ppm (水素数 3) 及び  $\delta$  6.03 ppm (水素数 1) にデヒドロ酢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デヒドロ酢酸の平均含量は標準物質で 99.7%, 試薬特級品で 98.9% であった。各シグナルから得られた含量値に着目すると、3 種のシグナルから得られた含量値は、標準物質で 99.6%~99.7%, 試薬特級品で 98.8%~99.0% とほぼ同等であった。また、相対標準偏差 (RSD) は全てのシグナルで 0.1%~0.2% であり併行精度も良好であった。以上の結果より、デヒドロ酢酸の含量測定においては、これらのシグナルを用いることにより精確な定量が可能であることが判明した。

アセスルファムでは、 $\delta$  2.20 ppm (水素数 3) 及び  $\delta$  6.04 ppm (水素数 1) にアセスルファム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セスルファムの平均含量は 97.7% であった。各シグナルから得られた含量値に着目すると、2 種のシグナルから得られた含量値は、97.7% 及び 97.8% とほぼ同等であった。また、RSD は全てのシグナルで 0.1% であり併行精度も良好であった。以上の結果より、アセスルファムの含量測定においては、これらのシグナルを用いることにより精確な定量が可能であることが判明した。

食用青色 2 号 (インジゴカルミン) では、 $\delta$  7.28 ppm (水素数 2),  $\delta$  7.76 ppm (水素数 2),  $\delta$  7.80 ppm (水素数 2) 及び  $\delta$  10.7 ppm (水素数 2) に食用青色 2 号に由来するシグナルがそれぞれ観察された。各シグナルより得られた含量値に着目すると、 $\delta$  7.28 ppm,  $\delta$

7.76 ppm,  $\delta$  7.80 ppm より得られた含量値は、91.0%~91.5% であった。また、RSD は 0.1%~0.3% であり併行精度は良好であった。一方、 $\delta$  10.7 ppm より得られた含量値は、89.3% と他の 3 種のシグナルから得られる含量値より低めに算出された。一般的に、NH のような水素は交換性の水素であり、このような水素は正確なシグナル面積強度を算出できないことが知られている。今回の結果は、これを支持するものであり、 $\delta$  10.7 ppm のシグナルは定量に不適と判断した。以上の結果より、食用青色 2 号の含量測定においては、 $\delta$  7.28 ppm,  $\delta$  7.76 ppm,  $\delta$  7.80 ppm のシグナルを用いることにより精確な定量が可能であることが判明した。

Sodium salt of 2-(1,3-dihydro-3-oxo-7-sulfo-2H-indol-2-ylidene)-2,3-dihydro-3-oxo-1H-indole-5-sulfonic acid (5, 7'-体) では、Fig 5 に示したように  $\delta$  7.00 ppm~ $\delta$  10.3 ppm の範囲に、本化合物に由来するシグナルが観察された。これらのうち、分子内シグナル間の分離度、食用青色 2 号など本化合物以外に由来するシグナルとの分離度、シグナルの多重度などを考慮し、 $\delta$  7.67 ppm (水素数 1) 及び  $\delta$  7.71 ppm (水素数 1) を定量用のシグナルとして選択し、含量値を算出した。その結果、2 種のシグナルから得られた含量値は、ともに 40.1% と同等であった。また、RSD は両シグナルで 0.2% であり併行精度も良好であった。以上の結果より、本測定の試料として用いた 5, 7'-体の含量測定においては、これらのシグナルを用いることにより精確な定量が可能であることが明らかとなった。

sodium salt of 2-(1,3-dihydro-3-oxo-2H-indol-2-ylidene)-2,3-dihydro-3-oxo-1H-indole-5-sulfonic acid (5-体) では、Fig 6 に示したように  $\delta$  6.80 ppm~ $\delta$  11.0 ppm の範囲に、本化合物に由来するシグナルが観察された。これらのうち、分子内シグナル間の分離度、食用青色 2 号など本化合物以外に由来する

シグナルとの分離度、シグナルの多重度などを考慮し、 $\delta$  7.35 ppm(水素数 1)を定量用のシグナルとして選択し、含量値を算出した。その結果、このシグナルから得られた含量値は 63.9%であった。一方、 $\delta$  6.98 ppm(水素数 1)及び $\delta$  7.54 ppm(水素数 1)のシグナルより算出される含量値は 65.4%及び 67.3%であり、ともに  $\delta$  7.35 ppm より得られた含量値より高い結果となった。これは、各ピークに近傍に存在する夾雑物のピークの影響によるものと考えられ、この結果からも、 $\delta$  7.35 ppm のシグナルを定量に用いることが妥当であることが確認された。また、 $\delta$  7.35 ppm より得られた含量値の RSD は 0.1%であり、併行精度は良好であった。以上の結果より、本測定を試料として用いた 5-体の含量測定において、 $\delta$  6.98 ppm のシグナルを用いることにより精確な定量が可能であることが明らかとなった。

### 3) qNMR 法および滴定法によるデヒドロ酢酸含量の比較

qNMR 法の絶対定量性を確認するため、デヒドロ酢酸特級品を用いて qNMR 法と滴定法により算出されるデヒドロ酢酸含量をそれぞれ比較した。その結果、Table 7 に示すように qNMR 法の含量値は、滴定法の結果とほぼ一致した。また、RSD もほぼ同等であった。従って、qNMR 法は滴定法と同等の真度及び併行精度を有することが明らかとなった。

### 4) qNMR 法を用いた食品中の含量分析法の確立に関する検討

上記の検討結果並びに昨年度の検討結果を基に、本項では安息香酸及びデヒドロ酢酸を対象に qNMR 法を用いた食品中の含量分析法の確立に関する検討を行った。

#### 4-1) 安息香酸

##### 4-1-1)直線性

安息香酸の各シグナルの直線性は、8 点の濃度(0.16, 0.31, 0.62, 1.2, 2.5, 5.0, 25, 50 mg/g)のシグナル面積強度を基に作成した一次回帰直線の決定係数( $R^2$ )より評価した。その結果、Fig.7 に示すように、 $\delta$  7.53 ppm 及び  $\delta$  7.98 ppm のシグナルでは、0.16~50 mg/g、 $\delta$  7.65 ppm のシグナルでは、0.32~50 mg/g の濃度範囲で良好な直線性( $R^2$ :0.9999)を示すことが判明した。なお、各シグナルにおいて、直線性を示した濃度範囲における試料の秤量濃度と実測濃度の相対誤差は 1%以下であった。

##### 4-1-2)添加回収試験

安息香酸及びその塩類の使用が認められている食品のうち、キャビア、マーガリン、アボカドペースト、清涼飲料水、シロップ及びしょう油について添加回収試験を行った。デヒドロ酢酸の添加濃度は、各食品の使用上限濃度、0.13 g/kg, 0.063 g/kg で検討した。添加回収試験の結果を Table 8, 各食品の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを Fig.8~13 にそれぞれ示した。なお、安息香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などを考慮して、 $\delta$  7.53 ppm 及び  $\delta$  7.98 ppm のシグナルより回収率を算出した。 $\delta$  7.53 ppm のシグナルより算出された各試料の安息香酸の回収率は、使用上限濃度で 90.6~96.5%、0.13 g/kg で 86.7~97.7%、0.063 g/kg で 80.5~93.6%であった。食品衛生法施行規則第一八条の二の二第三号及び第一八条の六第三号ロに規定する精度管理に関する「精度管理の一般ガイドライン」では、内部精度管理における回収率の目標値を 70%~120%と定められている。今回の測定値は、いずれの試料及び添加濃度でもこの目標値を満たす結果であった。また、RSD は使用上限濃度で 0.8~3.6%、0.13 g/kg で 0.5~2.6%、0.063 g/kg で 0.2~3.9%であり、全ての濃度に

において良好な併行精度を示した。

$\delta$  7.98 ppm のシグナルでは、このシグナルより算出された各試料の安息香酸の回収率及び RSD は、 $\delta$  7.53 ppm のシグナルより算出された結果とほぼ同等であることが確認された。なお、キャビア、マーガリン、アボカドペーストについてはメタノールを用いた抽出操作により食品由来の油を除去する操作を行ったが、これら試料における回収率は良好であり、抽出操作による回収率の低下の問題は生じないことが確認された。

本法の定量下限については、定量に用いたシグナルの S/N 比、安息香酸の定量における本法の真度、精度を基に算出した。添加回収試験では、検討した濃度のうち最も低い濃度である 0.063 g/kg において、回収率は 70%以上、併行精度は 10%以下であった。また、この濃度における安息香酸のシグナルの S/N は 100 以上であった。シグナルの S/N と qNMR の分析精度については、近年報告<sup>14)</sup>がなされているが、我々の検討では S/N が 100 以上あれば、1%の誤差範囲で定量が可能であることを確認している。以上の結果及び 4-1-1) で示した直線性の検討結果より、 $\delta$  7.53 ppm 及び  $\delta$  7.98 ppm を定量用シグナルとして用いたときの本法の定量下限を 0.063 g/kg と設定した。我が国で安息香酸の使用が認められている食品の使用上限濃度は、0.6-2.5 g/kg であることを考慮すると、本法はこれらの食品中の安息香酸の定量に適用可能と考えられた。

#### 4-1-3) qNMR 法による食品中の安息香酸含量の測定

安息香酸の使用が表示された食品 4 種(マーガリン、清涼飲料水、シロップ及びしょう油)について、qNMR 法による安息香酸の含量測定(試料溶液調製:溶媒抽出、分析:qNMR)を行い、得られた結果を通知法(試料溶液調製:水蒸気蒸留、分析:逆相

HPLC)と比較した。なお、qNMR 法では、安息香酸由来のシグナルと夾雑物のシグナルとの分離度を考慮して、マーガリン、清涼飲料水及びシロップは  $\delta$  7.53 ppm 及び  $\delta$  7.98 ppm、しょう油は  $\delta$  7.53 ppm のシグナルを用いて安息香酸含量を算出した。各食品の安息香酸含量を Table 9、各食品の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを Fig.14 にそれぞれ示した。全ての試料において、qNMR を用いた分析法により算出された安息香酸含量は、通知法の結果と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、RSD については、本法は通知法と比べやや高い結果を示したが、最大で 5%以下であったことから、本法は実用上問題のない精度を有することが判明した。なお、本法の分析時間は 1 検体当たり最短で 55 分と通知法(125 分)と比べ分析時間が大幅に短縮され、通知法に比べ迅速性にも優れた方法であることが確認された。以上の結果より、今回確立した qNMR 法を利用した分析法は、食品中の安息香酸の含量分析法として極めて有用であることが判明した。

#### 4-2) デヒドロ酢酸

##### 4-2-1)直線性

デヒドロ酢酸の各シグナルの直線性は、6 点の濃度(0.16, 0.31, 0.62, 1.2, 2.5, 5.0 mg/g)のシグナル面積強度を基に作成した一次回帰直線の決定係数( $R^2$ )より評価した。その結果、Fig.15 に示すように、 $\delta$  2.22 ppm 及び  $\delta$  2.56 ppm のシグナルでは、0.16~5.0 mg/g、 $\delta$  6.03 ppm のシグナルでは、0.31~5.0 mg/g の濃度範囲で良好な直線性( $R^2$ :1.0)を示すことが判明した。なお、各シグナルにおいて、直線性を示した濃度範囲における試料の秤量濃度と実測濃度の相対誤差は 1%以下であった。

##### 4-2-2)添加回収試験

デヒドロ酢酸ナトリウムの使用が認められている食品3種(バター、チーズ、マーガリン)について、添加回収試験を行った(日内:n=3×1日間, 日間:n=2×5日間)。デヒドロ酢酸の添加濃度は、使用上限濃度(0.50 g/kg)及び0.13 g/kgで検討した。添加回収試験の結果をTable 10, 各食品の<sup>1</sup>H NMRスペクトルをFig.16にそれぞれ示した。なお、デヒドロ酢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などを考慮して, δ 6.03 ppmのシグナルより回収率を算出した。その結果, 日内の場合では, 各試料のデヒドロ酢酸の回収率が, 0.5 g/kgで90.4~96.9%, 0.13 g/kgで91.2~92.4%であった。また, RSDは0.5 g/kgで1.3~3.8%, 0.13 g/kgで1.8~4.6%であった。日間の場合では, 添加濃度が0.5 g/kgで回収率は89.4~94.6%, 併行精度は2.1~5.3%, 室内精度は4.4~6.0%, 添加濃度が0.13 g/kgで回収率は86.8~93.1%, 併行精度は3.1~6.6%, 室内精度は5.4~8.2%であった。食品添加物分析法の妥当性を評価する基準は示されていないが, 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(平成19年11月15日食安発第1115001号)では, 0.1 ppm以上の濃度における真度(回収率)の目標値は, 70~120%, 併行精度は10%以下, 室内精度は15%以下と設定されている。これらの値を参照すると, 今回の結果はいずれの試料及び添加濃度でもおおむね目標値を満たしているため, 本法は, 食品中のデヒドロ酢酸分析において十分な真度及び精度を有する妥当な測定法であると考えられた。

本法の定量下限については, デヒドロ酢酸の定量における本法の真度, 精度を基に算出した。添加回収試験では, 検討した濃度のうち最も低い濃度である0.13 g/kgにおいて, 回収率は70%以上, 併行精度は10%以下であった。また, この濃度より低い場合, S/Nの減少により, 真度や併行精度の低下が予

想されたこと及び4-2-1)で示した直線性の検討結果を考慮して, δ 6.03 ppmを定量用シグナルとして用いたときの本法の定量下限を0.13 g/kgと設定した。我が国でデヒドロ酢酸の使用が認められている食品の使用上限濃度は0.5 g/kgであることを考慮すると, 本法はこれらの食品中のデヒドロ酢酸の定量に適用可能と考えられた。

#### 4-2-3) qNMR法による食品中のデヒドロ酢酸含量の測定

デヒドロ酢酸の使用が表示された食品2種(バター及びチーズ)について, qNMR法によるデヒドロ酢酸の含量測定(試料溶液調製:溶媒抽出, 分析:qNMR)を行い, 得られた結果を通知法(試料溶液調製:水蒸気蒸留, 分析:逆相HPLC)と比較した。なお, qNMR法では, デヒドロ酢酸由来のシグナルと夾雑物のシグナルとの分離度などを考慮して, δ 6.03 ppmのシグナルを用いてデヒドロ酢酸含量を算出した。各食品のデヒドロ酢酸含量をTable 11, 各食品の<sup>1</sup>H NMRスペクトルをFig.17にそれぞれ示した。全ての試料において, qNMRを用いた分析法により算出されたデヒドロ酢酸含量は, 通知法の結果と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, RSDについては, チーズにおいて本法の結果(6.6%)は通知法(2.4%)と比べやや高い結果を示したものの, 通常の商品添加物試験法としては実用上問題のない精度であると考えられた。なお, 本法の分析時間は, 安息香酸分析と同様に通知法と比べ分析時間が大幅に短縮されるとともに, 国際単位系にトレーサブルな内部標準を用いたことにより, 得られる分析値の信頼性も向上した。

以上の結果より, 今回確立したqNMR法を利用した分析法は, 食品中のデヒドロ酢酸分析法として極め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及び精度の向上を目指して、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. デヒドロ酢酸, アセスルファムカリウム, アセスルファム, 食用青色2号及びその副成色素(2種)を対象に, これらの  $^1\text{H}$  NMR を測定し, そのスペクトルパターンを明らかにした。

2. デヒドロ酢酸, アセスルファム, 食用青色2号及び2種の副成色素について 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 を用いた食品中の安息香酸及びデヒドロ酢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, 良好な真度, 精度が得られた。また, これらの添加物を含有する市販食品の分析より, 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明らかとなった。さらに, 通知法と比較して迅速な定量分析が可能となった。

今回確立した分析法は, 迅速, 簡便で, 定量再現性が良好であるとともに, 計量学的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る。従って, 本法は, 食品中の安息香酸及びデヒドロ酢酸分析法として極めて有用であることが明らかとなった。

## 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

1) 大槻崇, 佐藤恭子, 杉本直樹, 西村哲治, 河村葉子, “定量 NMR を用いた食品中のソルビン酸および安息香酸分析法”, 日本食品化学学会 第 17 回 総会・学術大会 (2011.5)(東京)

2) 大槻崇, “定量 NMR の食品添加物分析への応用”, 日本分析化学会第 60 年会 特別シンポジウム (2011.9)(名古屋)

3) 大槻崇, 古庄紀子, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穂山浩, “定量NMRを用いた加工食品中のデヒドロ酢酸分析法の確立”, 日本薬学会第 132 年会 (2012.3) (札幌)

## 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) Salem, A. A.; Mossa, H. A. *Talanta* **2012**, 88,

104-114.

- 7) Saito, T.; Ihara, T.; Koike, M.; Kinugasa, S.; Fujimine, Y.; Nose, K.; Hira, T. *Accred. Qual. Assur.* **2009**, *14*, 79-86.
- 8) 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, 山崎壯, 棚元憲一, 中澤裕之, 西村哲治, 日食化誌 **2009**, *16*, 28-33.
- 9) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 斎藤剛, 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.
- 10) 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, 山崎壯, 河村葉子, 食衛誌 **2010**, *51*, 205-212.
- 11) 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.
- 12) Hasada, K.; Yoshida, T.; Yamazaki, T.; Sugimoto, N.; Nishimura, T.; Nagatsu, A.; Mizukami, H. *J. Nat. Med.* **2010**, *64*, 161-166.
- 13) Hasada, K.; Yoshida, T.; Yamazaki, T.; Sugimoto, N.; Nishimura, T.; Nagatsu, A.; Mizukami, H. *J. Nat. Med.* **2011**, *65*, 262-267.
- 14) Malz, F.; Jancke, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 813-823.

Table 1 Acquisition parameters of qNMR analysis

Spectrometer	JEOL ECA600 spectrometer
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	20 ppm (-5~15 ppm)
Autofilter	on (eighttimes)
Acquisition time	4 s
Flip angle	90°
Relaxation delay	60 s
Number of scans	8
Spinning	off
<sup>13</sup> C decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

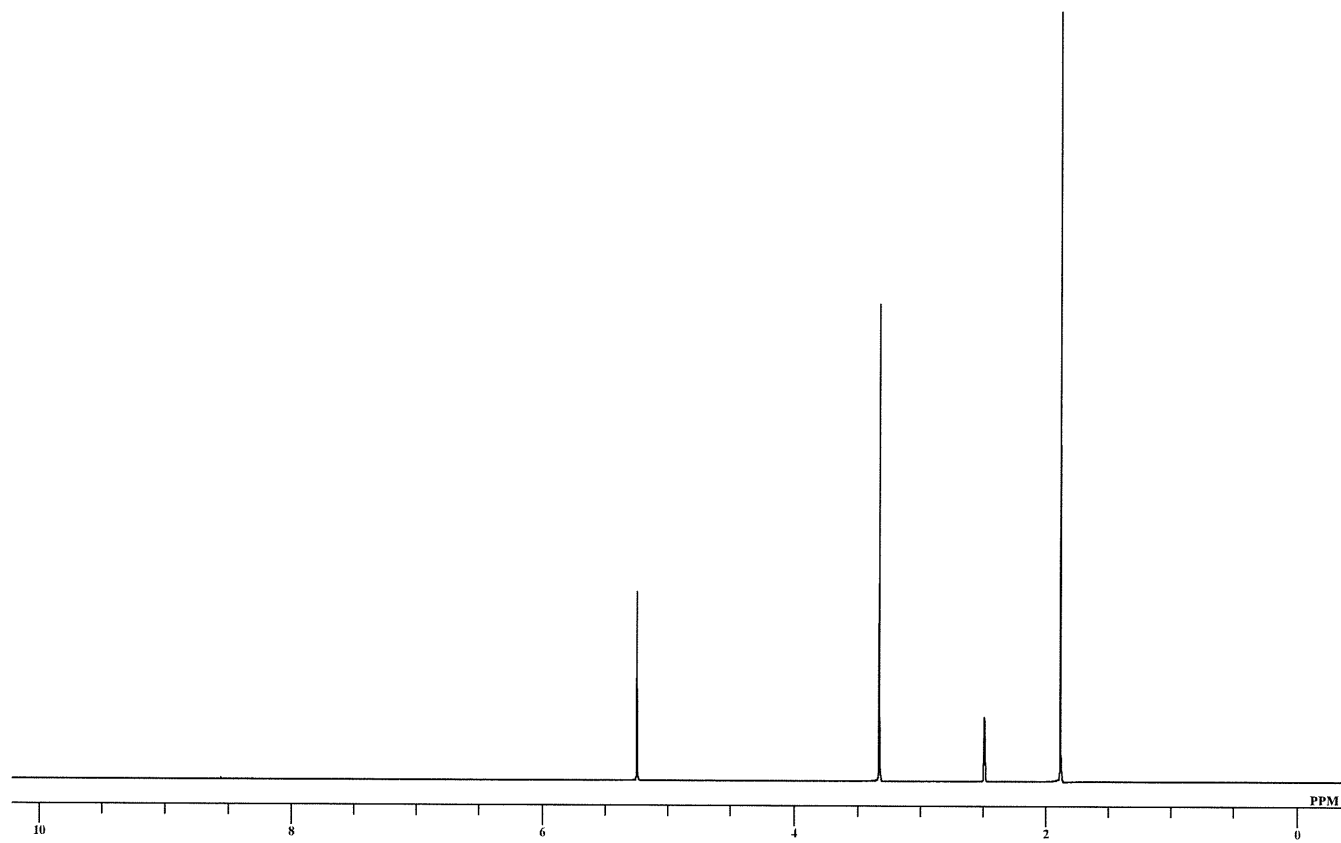


Fig.1  $^1\text{H}$  NMR spectrum of acesulfame potassium in  $\text{DMSO-}d_6$



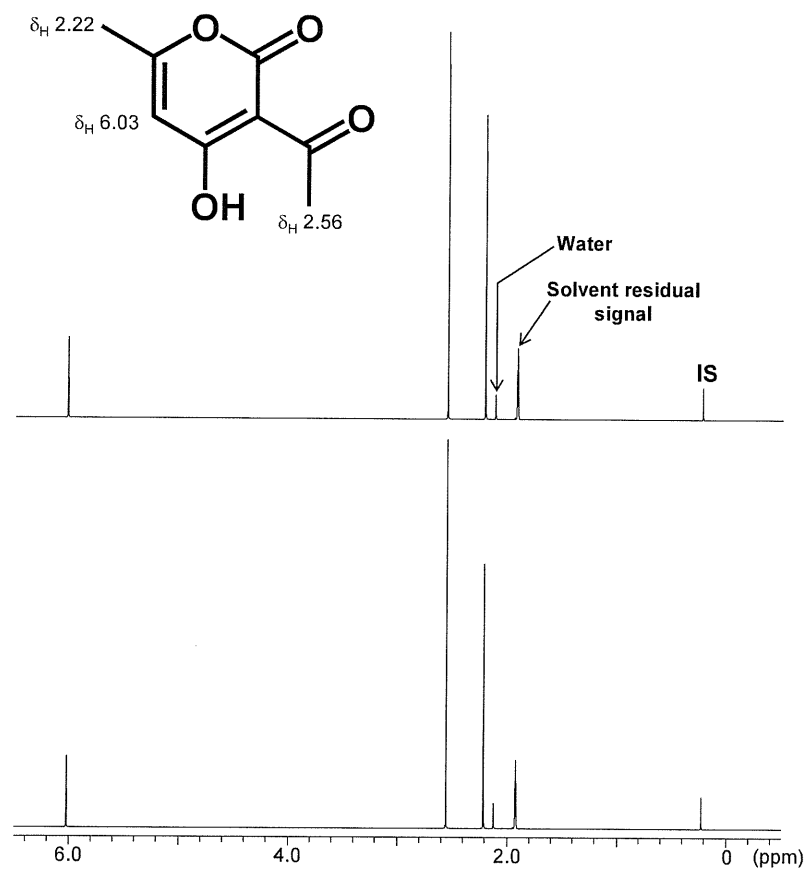


Fig.2  $^1\text{H}$  NMR spectra of dehydroacetic acid standard (top) and reagent (bottom) in acetonitrile- $d_3$  containing 1,4-BTMSB- $d_4$

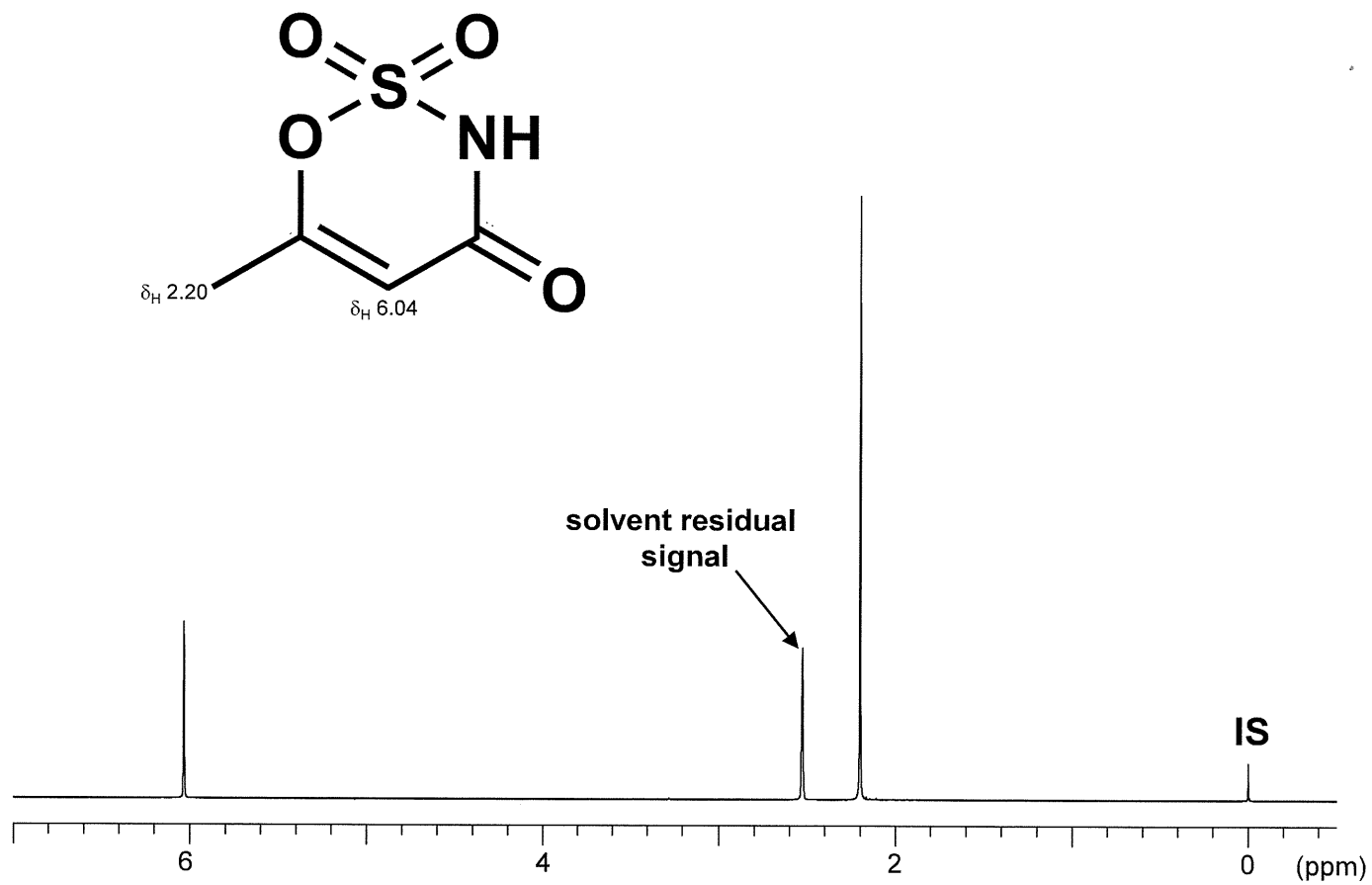


Fig.3  $^1\text{H}$  NMR spectrum of acesulfame in  $\text{DMSO-}d_6$  containing  $\text{DSS-}d_6$

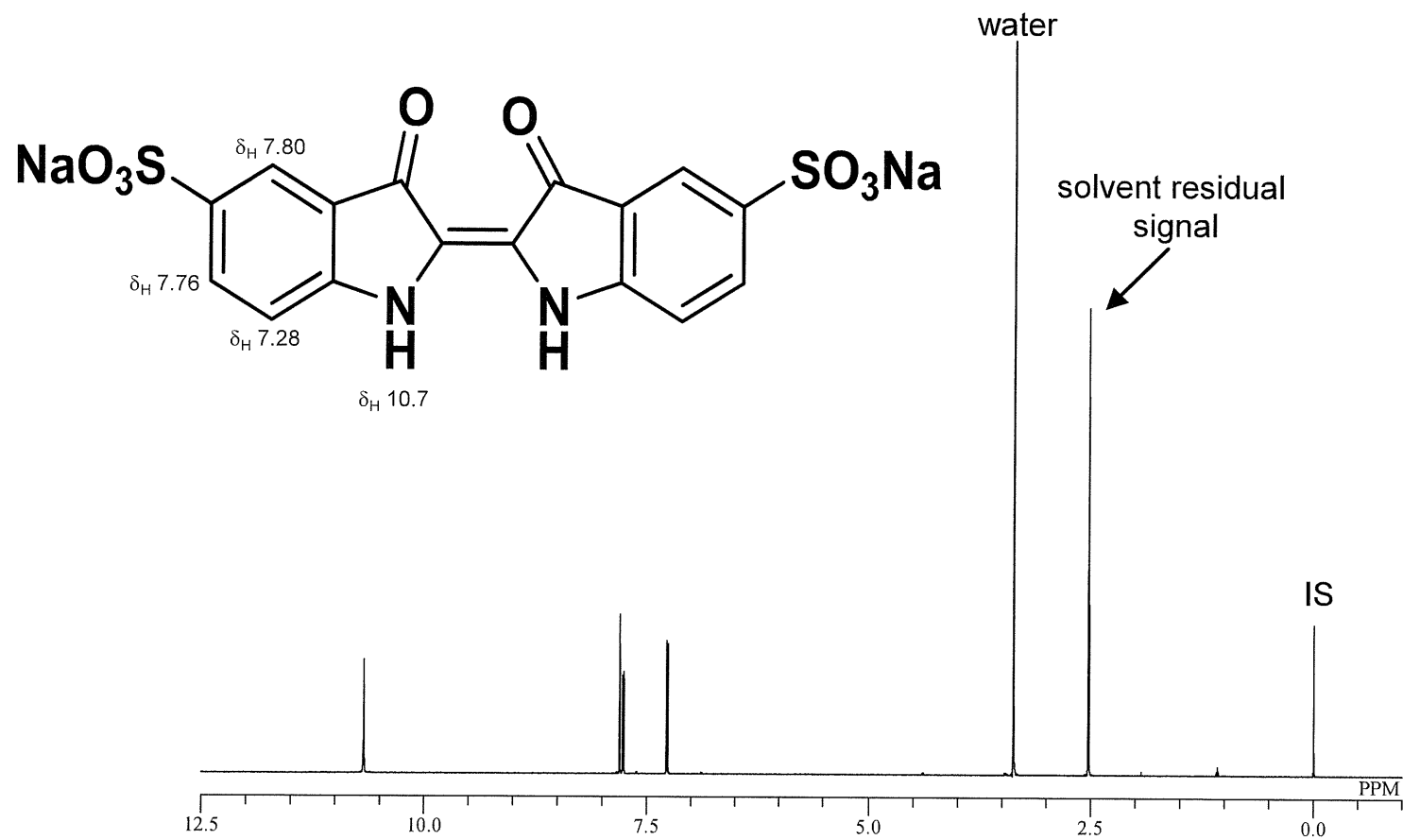


Fig.4  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Food color B2 in  $\text{DMSO}-d_6$  containing  $\text{DSS}-d_6$

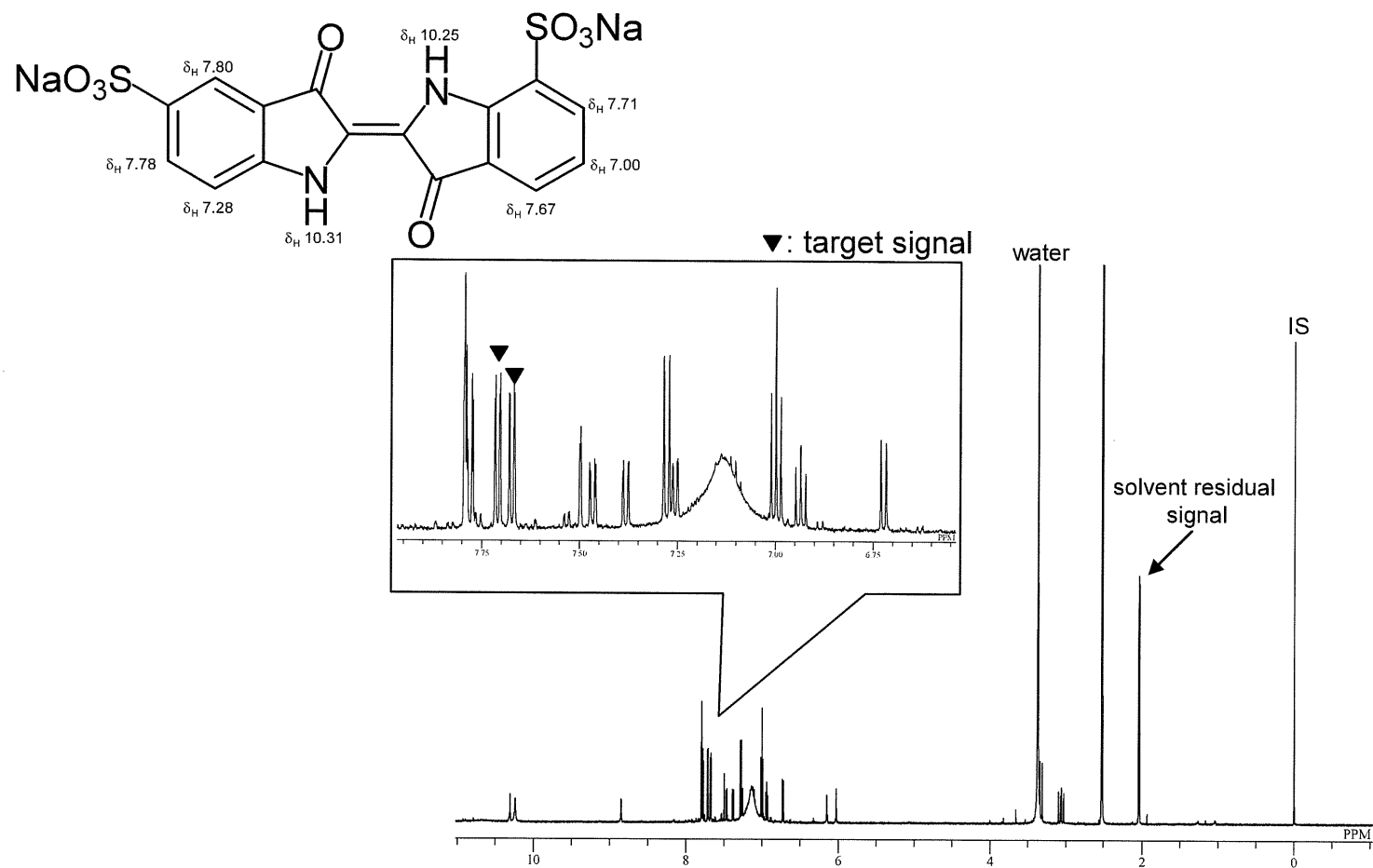


Fig.5  $^1\text{H}$  NMR spectrum of sodium salt of 2-(1,3-dihydro-3-oxo-7-sulfo-2H-indol-2-ylidene)-2,3-dihydro-3-oxo-1H-indole-5-sulfonic acid in  $\text{DMSO-}d_6$  containing  $\text{DSS-}d_6$