

図 10. 自作シリコンシート製液溜め（カバーガラス蓋）の写真及び模式図

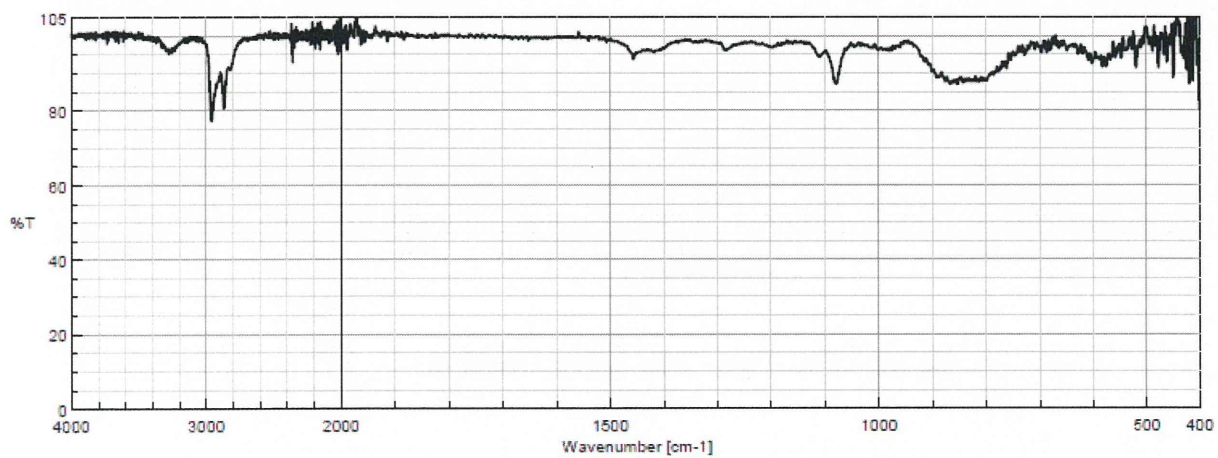


図 11. ピロリジン シリコン液溜め カバーガラス蓋 (ATR 法)

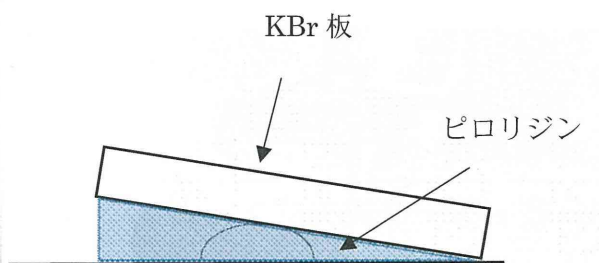
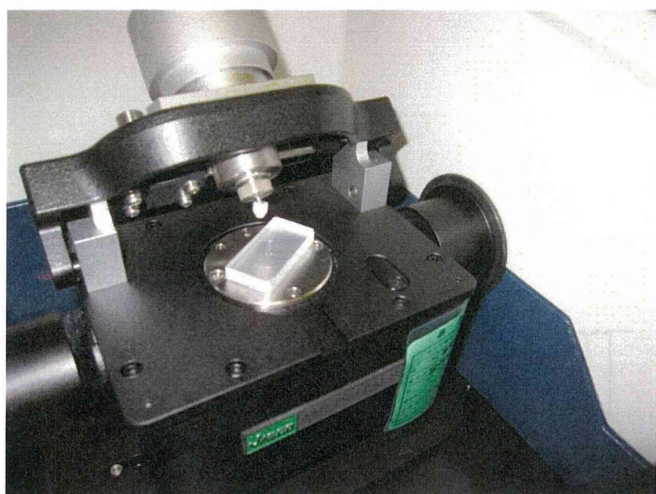


図 12. KBr 板による揮発防止とその模式図

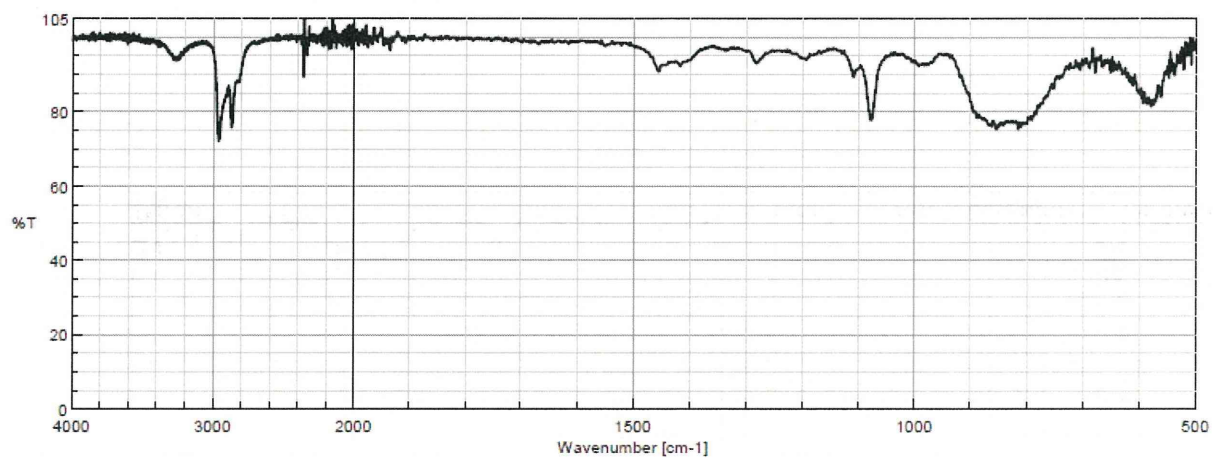


図 13. ピロリジン KBr 板のせ (ATR 法)

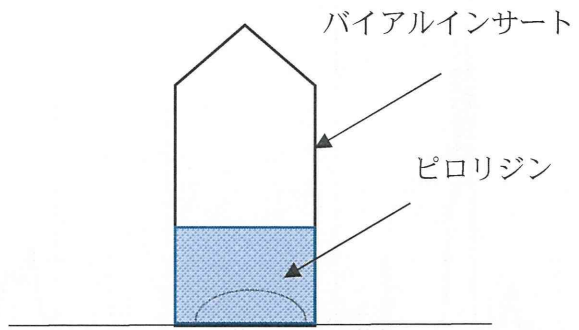


図 14. バイアルインサートによる液体試料保持の写真と模式図

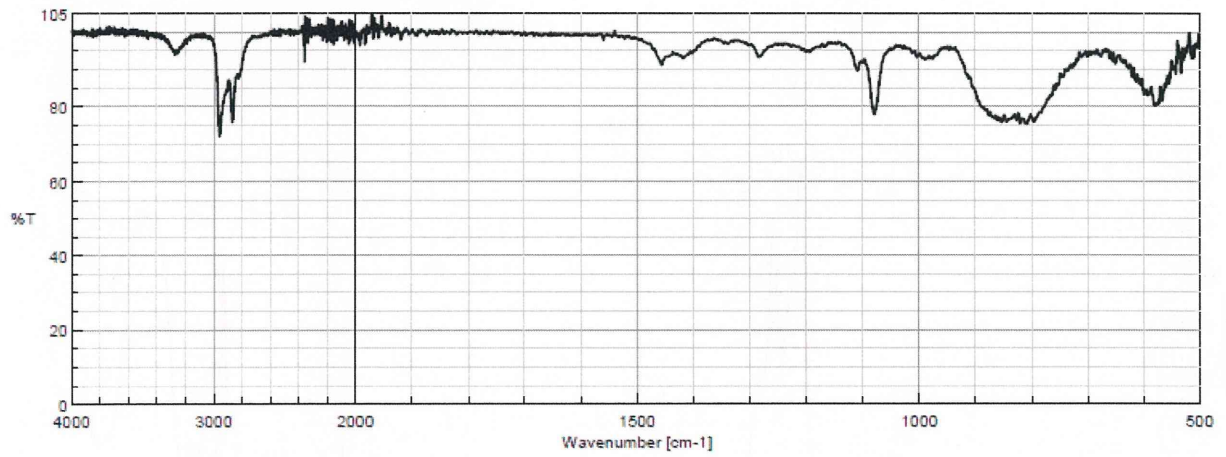


図 15. ピロリジン バイアルインサート (ATR 法)

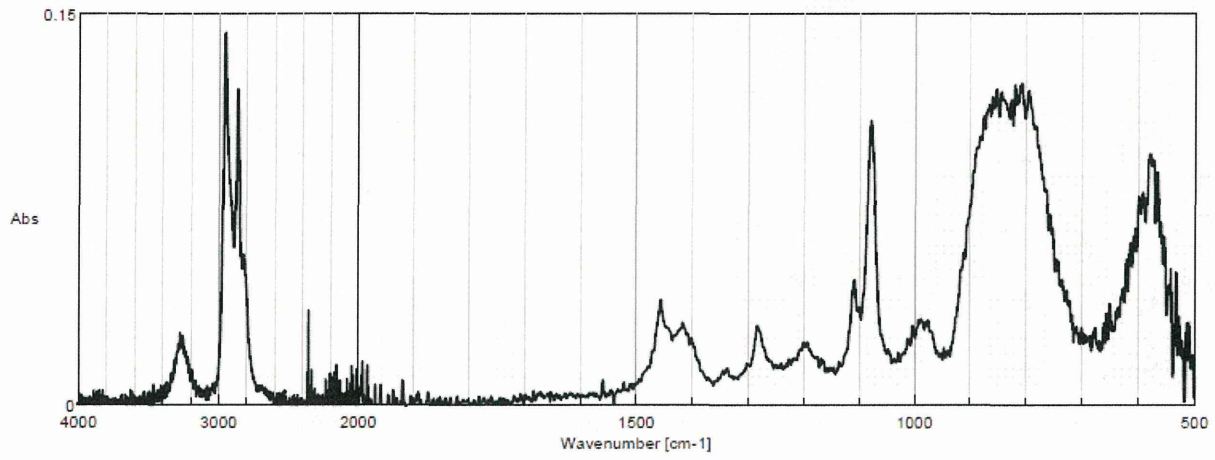


図 16. ピロリジン バイアルインサート Abs 表示 (ATR 法)

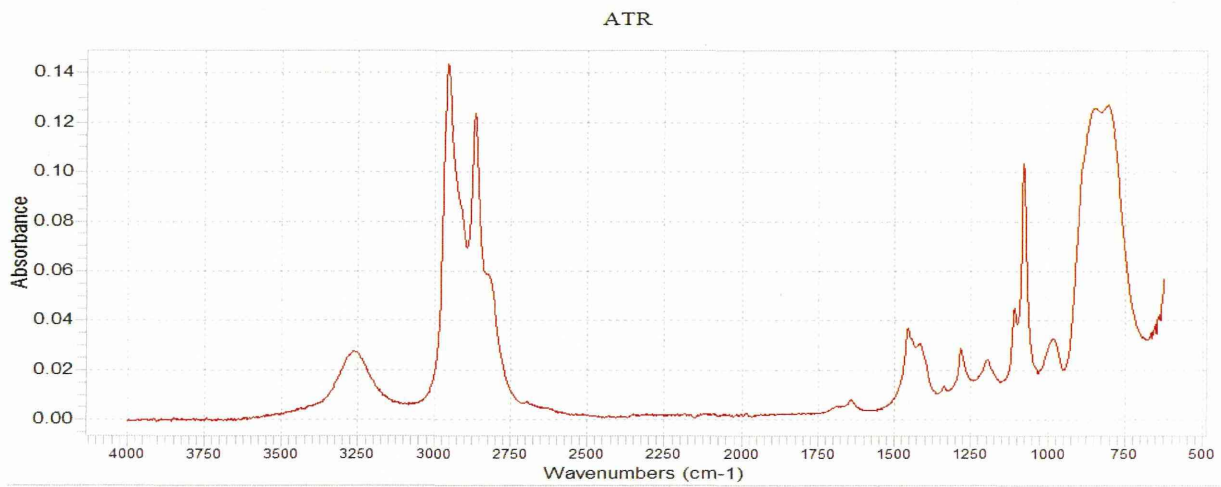


図 17. ピロリジンの ATR スペクトル (Sigma-Aldrich 社 Spectral Viewer 収載)

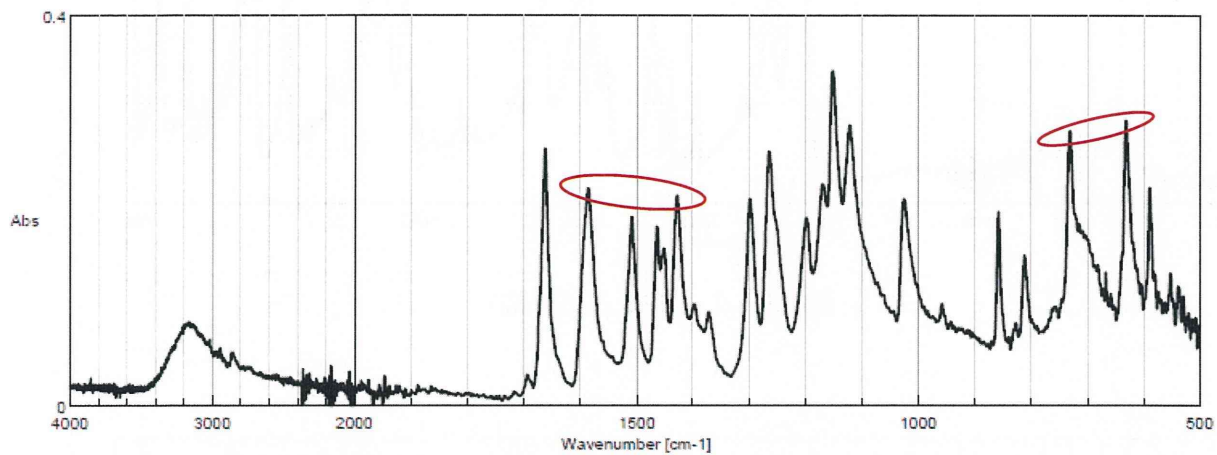


図 18. バニリン (ATR 法)

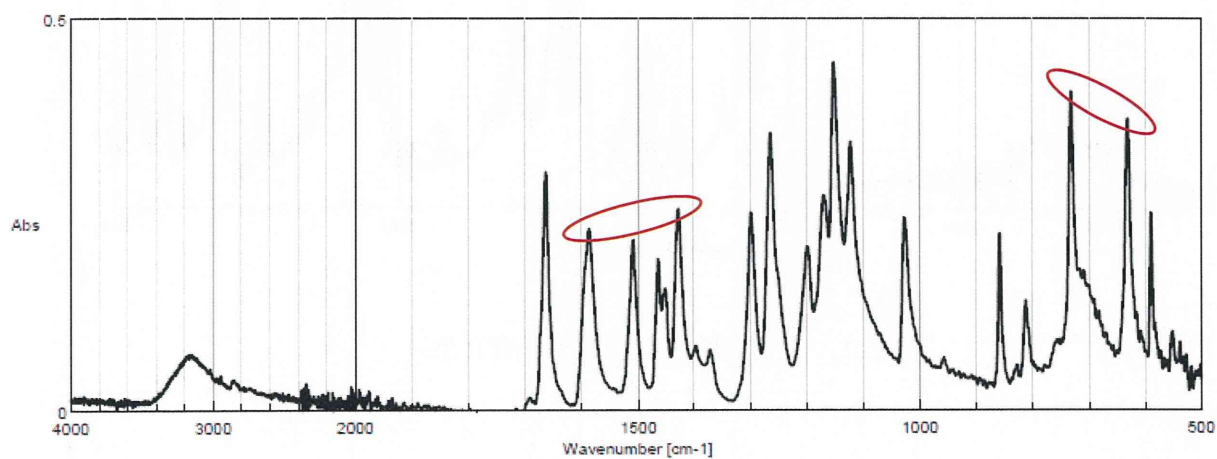


図 19. バニリンすりつぶし (ATR 法)

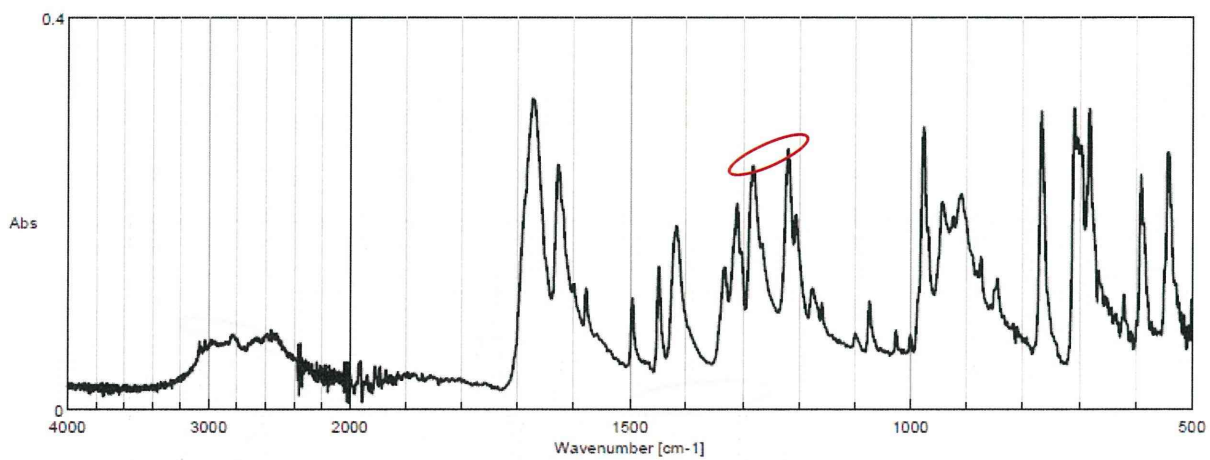


図 20. ケイ皮酸 (ATR 法)

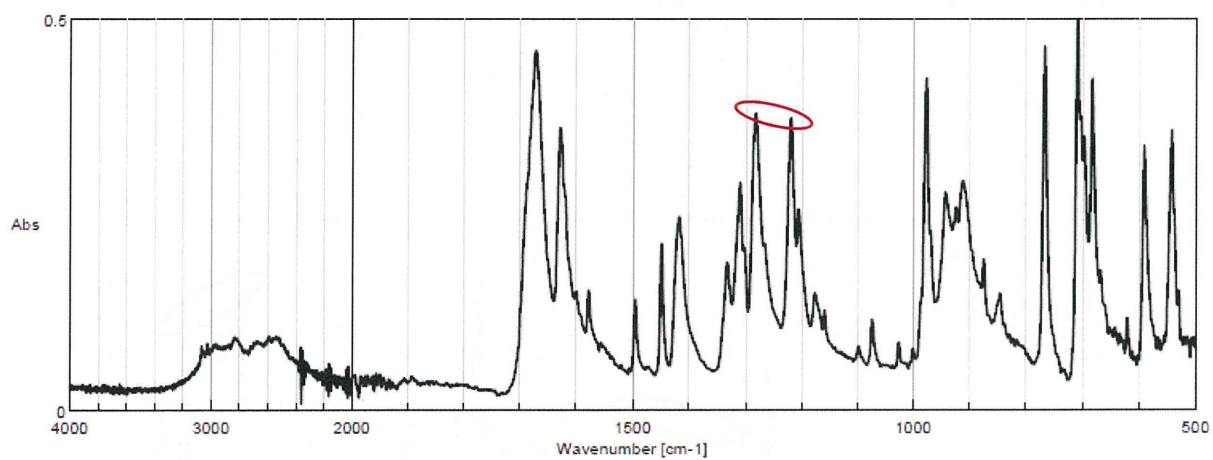


図 21. ケイ皮酸すりつぶし (ATR 法)

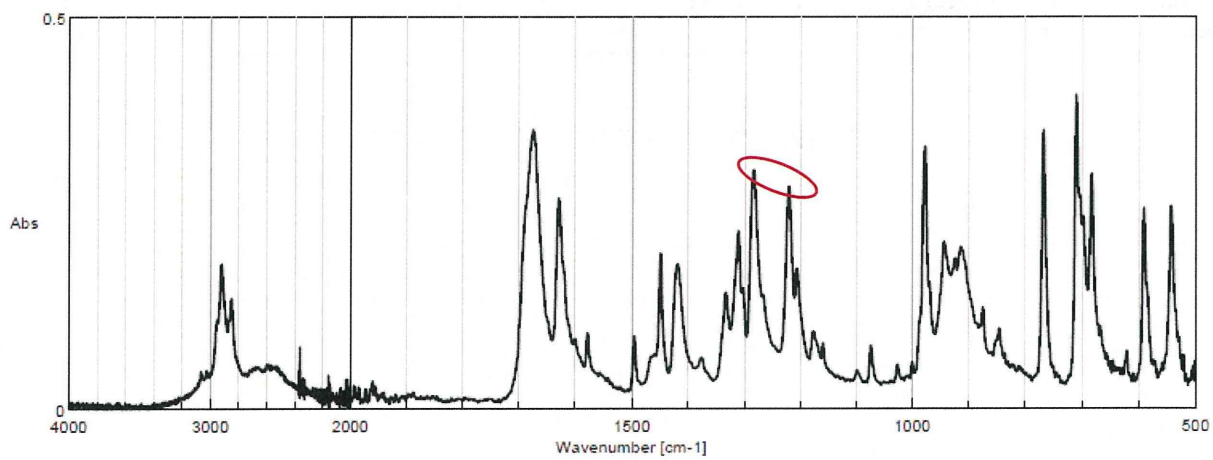


図 22. ケイ皮酸 Nujol 添加後すりつぶし (ATR 法)

食品添加物規格試験法の精度向上に向けた定量 NMR 法の適用に関する検討

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 法を用いたアゾキシストロビン及びピリメタニルの定量分析に関する検討を行った。その結果、本法は良好な真度、併行精度、直線性を有することが明らかとなり、本法がアゾキシストロビン及びピリメタニルの定量分析に適用できることが明らかとなった。

#### 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などが定められている。このうち、食品添加物の定量法としては、滴定法や吸光度法などが採用されているが、分析操作の煩雑性など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。従って計量学的に正確ではない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が損なわれることが懸念される。このように、食品、食品添加物製品の品質や安全性を確保する上で、より精度や信頼性の高い分析法の確立が急務である。近年、国際単位系（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、天然化合物などの定量分析へ応用されている<sup>1-9)</sup>。qNMR 法のうち、<sup>1</sup>H NMR を利用した qNMR（qHNMR）は、計量学的に正確な純度が付与された SI にトレーサブルな認証標準物質を内部標準として用い、測定対象物質と混合して <sup>1</sup>H

NMR 測定を行う。<sup>1</sup>H 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の強度比（積分値比）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しないとともに、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、混合物に含まれる測定対象物質を測定する際、<sup>1</sup>H NMR 上で測定対象物質と夾雑物質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。

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 qHNMR 法の適用に関する検討を行い、昨年度までにアスコルビン酸（酸化防止剤）、フルジオキシニル（防かび剤）及びチアベンダゾール（防かび剤）の分析において qHNMR 法は

精確な定量分析が可能であることを明らかにした。今年度は、食品添加物分析への qHNMR 法の有効性、汎用性を更に明らかにするため、アゾキシストロピン及びピリメタニルを対象に検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 試薬

アゾキシストロピンは和光純薬（株）製（残留農薬試験用標準品、Cat. No.015-19003、Lot. DCR2844）、ピリメタニルは和光純薬（株）製（TRM、Cat. No.024-17031、Lot. DCL5334）、1,4-ビス（トリメチルシリル）ベンゼン- $d_4$ （1,4-BTMSB- $d_4$ ）認証標準物質は、和光純薬製（Cat. No.024-17031、Lot.No.DCL 5334、純度 99.8%、拡張不確かさ：0.5%）を用いた。重水素化メタノール（MeOH- $d_4$ ）及び重水素化アセトニトリル（MeCN- $d_3$ ）は Acros 製を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

### 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）。

### 3) アゾキシストロピン及びピリメタニルの NMR 分析（シグナルの帰属）

各試料約 20.0 mg を精密に量りとり、アゾキシストロピンでは MeCN- $d_3$ 、ピリメタニルでは MeOH- $d_4$  約 2.0 g にそれぞれ溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、各種 NMR 測定（ $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、HMQC、HMBC）を行った。

### 4) qHNMR 法による定量

#### 4-1) アゾキシストロピンの含量測定

アゾキシストロピン約 20 mg 及び 1,4-BTMSB- $d_4$  約 4 mg をそれぞれ精密に量り、MeCN- $d_3$  2 mL を加えてこれらを溶解した。こ

の溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qHNMR 測定を行った。1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナル面積強度を 18.00 としたときのアゾキシストロピン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、アゾキシストロピン含量（ $C_{\text{AZ}}$ 、%）を算出した。

$$C_{\text{AZ}} = \frac{I_{\text{AZ}}/H_{\text{AZ}}}{I_{\text{BTMSB}}/H_{\text{BTMSB}}} \times \frac{M_{\text{AZ}}/W_{\text{AZ}}}{M_{\text{BTMSB}}/W_{\text{BTMSB}}} \times 100$$

ただし、 $I_{\text{AZ}}$ 、 $I_{\text{BTMSB}}$  はアゾキシストロピン及び 1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナル面積強度（1,4-BTMSB- $d_4$ ：18.00）、 $H_{\text{AZ}}$ 、 $H_{\text{BTMSB}}$  はアゾキシストロピン及び 1,4-BTMSB- $d_4$  の特定基の水素数（1,4-BTMSB- $d_4$ : $\text{CH}_3 \times 6 = 18$ ）、 $M_{\text{AZ}}$ 、 $M_{\text{BTMSB}}$  はアゾキシストロピン及び 1,4-BTMSB- $d_4$  の分子量（アゾキシストロピン：403.39、1,4-BTMSB- $d_4$ ：226.50）、 $W_{\text{AZ}}$ 、 $W_{\text{BTMSB}}$  はアゾキシストロピン及び 1,4-BTMSB- $d_4$  の秤取量（mg）である。

#### 4-2) ピリメタニルの含量測定

ピリメタニル約 20 mg 及び 1,4-BTMSB- $d_4$  約 4 mg をそれぞれ精密に量り、MeOH- $d_4$  2 mL を加えてこれらを溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qHNMR 測定を行った。1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナル面積強度を 18.00 としたときのピリメタニル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、ピリメタニル含量（ $C_{\text{PY}}$ 、%）を算出した。

$$C_{\text{PY}} = \frac{I_{\text{PY}}/H_{\text{PY}}}{I_{\text{BTMSB}}/H_{\text{BTMSB}}} \times \frac{M_{\text{PY}}/W_{\text{PY}}}{M_{\text{BTMSB}}/W_{\text{BTMSB}}} \times 100$$

#### 4-3) qHNMR 測定条件及びデータの解析

qHNMR 測定の基本条件を表 1 に示した。なお、qHNMR の化学シフト値は、1,4-BTMSB- $d_4$  の水素シグナルを基準シグナル（ $\delta$  0.23）とし、 $\delta$  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。1,4-BTMSB- $d_4$  及び定量シグナルの積分範囲を設定した後、1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナル面積強度を 18.00 としたときのアゾキシストロピンまたはピリメタニルに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を上記 4-2) 及び 4-3) で示した計算式に代入し、それぞれの含量を算出した。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 Alice 2 for qNMR ピュアリティ（(株) JEOL RESONANCE 製）を用いた。

### C. 結果および考察

#### 1) アゾキシストロピン及びピリメタニルの各水素シグナルの帰属

qHNMR 法による精密な定量には、試料に由来する NMR シグナルを帰属するとともに、各シグナルの S/N 比、各シグナル間または重溶媒中の水や残留プロトンのシグナルとの分離度などを確認しなければならない。そこで、アゾキシストロピン及びピリメタニルについて  $^1\text{H}$  NMR 測定を行い、スペクトルパターン情報を収集した。その結果、図 1 に示した  $^1\text{H}$  NMR スペクトルが得られた。また、本結果及び  $^{13}\text{C}$  NMR、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、各水素シグナルを帰属した (図 2)。なお、アゾキシストロピンについては、十分に分離されたシグナルのみ帰属した。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) qHNMR 法によるアゾキシストロピン及びピリメタニル含量の測定

qHNMR 法は、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度（積分値）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 にトレーサブルな標準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が大幅に向上した方法と言える。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、アゾキシストロピン及びピリメタニルについて qHNMR 測定を行った。なお、本法により得られた定量値の SI トレーサビリティを確保するため、認証標準物質である 1,4-BTMSB- $d_4$  を用いて各標準物質（または標準品）中のアゾキシストロピン、ピリメタニル含量を算出した。

その結果、アゾキシストロピンについては、図 3 に示したように、 $\delta_{\text{H}}$  3.53（水素数 3）、 $\delta_{\text{H}}$  3.70（水素数 3）、 $\delta_{\text{H}}$  6.43（水素数 1）、 $\delta_{\text{H}}$  7.22（水素数 1）、 $\delta_{\text{H}}$  7.26–7.36（水素数 3）、 $\delta_{\text{H}}$  7.38–7.48（水素数 3）、 $\delta_{\text{H}}$  7.73（水素数 1）、 $\delta_{\text{H}}$  7.80（水素数 1）及び  $\delta_{\text{H}}$  8.28（水素数 1）にアゾキシストロピンに由来するシグナルがそれぞれ観察された。また表 2 に示したように、これらのシグナルより算出されたアゾキシストロピン含量は 99.2%–99.8%、相対標準偏差 (RSD) は 0.1–0.4% と良好であった。これらのうち  $\delta_{\text{H}}$  7.22、 $\delta_{\text{H}}$  7.26–7.36、 $\delta_{\text{H}}$  7.38–7.48 に観察されたシグナルは、お互いのシグナルが近接していた。また、 $\delta_{\text{H}}$  7.73 及び  $\delta_{\text{H}}$  7.80 に観察されたシグナルについても同様であった。このようなシグナルを使って定量を行った場合、測定者により積分範囲の設定にずれが生じ、最終的に定量値の大きな誤差を生じる可能性が高いと考えられた。また、夾雑物が多く含まれる試料の場合、定量精度に疑義が生じる可能性も推測された。一方、 $\delta_{\text{H}}$  3.53、 $\delta_{\text{H}}$  3.70、 $\delta_{\text{H}}$  6.43 及び  $\delta_{\text{H}}$  8.28 に観察されたシグナルは、形状がシャープで多重度も小さく、近傍に他のシグナルも観察されなかった。qHNMR では、このようなシグナルを定量に用いることにより、より精密な定量が可能と考えられている。また、このようなシグナルは、夾雑物のシグナルの影響も受けにくい。さらに、S/N が大きいシグナル

を定量用シグナルとして選択することによって、より低い濃度（低い含量）における定量も可能となる。これらの点を考慮し、定量用シグナルとしては、 $\delta_{\text{H}}$  3.53、 $\delta_{\text{H}}$  3.70、 $\delta_{\text{H}}$  6.43 及び  $\delta_{\text{H}}$  8.28 を用いることが適切と考えられた。

ピリメタニルについては、図 3 に示したように、 $\delta_{\text{H}}$  2.32（水素数 6）、 $\delta_{\text{H}}$  6.56（水素数 1）、 $\delta_{\text{H}}$  6.94（水素数 1）、 $\delta_{\text{H}}$  7.25（水素数 2）及び  $\delta_{\text{H}}$  7.66（水素数 2）にピリメタニルに由来するシグナルがそれぞれ観察された。また表 3 に示したように、これらのシグナルより算出されたピリメタニル含量は 99.6%–99.9%、相対標準偏差 (RSD) は 0.04–0.2%と良好であった。また、観察された全てのシグナルの多重度は小さく、シグナル形状も良好であった。さらに、各シグナル間の分離も精確な定量には十分であった。以上より、ピリメタニルの定量には、全てのシグナルが適用可能と考えられた。なお、各定量用シグナルの縦緩和時間は、表 4 及び表 5 に示すとおりであった。

### 3) 本法の直線性の評価

次に、アゾキシストロビン及びピリメタニルの定量における直線性について検討を行った。アゾキシストロビンまたはピリメタニル標準物質を重水素化溶媒 2 mL に溶解し各濃度（アゾキシストロビン：1.0、2.6、5.1、10 及び 15 mg/mL、ピリメタニル：1.0、2.5、5.1 及び 10 mg/mL、各濃度 3 検体ずつ）に調製した。それぞれに 1,4-BTMSB- $d_4$  4 mg を溶解後、qHNMR 測定を行い、各化合物の定量用シグナルより得られたデータを用いてそれぞれ検量線を作成した。X 軸に各試料濃度、Y 軸に試料と内部標準 (1,4-BTMSB- $d_4$ ) のシグナル面積強度比をとり、検量線の決定係数 ( $R^2$ ) より直線性を評価した。その結果、図 4 に示したように、検討した濃度範囲において、アゾキシストロビンでは全てのシグナルで  $R^2=0.9999$ 、ピリメタニルでは全てのシグナルで  $R^2=0.9994-0.9995$

の良好な直線性が得られた。

### 4) 本法の真度及び精度の評価

次に、本法の真度及び精度について検討を行った。3)本法の直線性の評価で示した方法と同様に各濃度（アゾキシストロビン：1.0、2.6、5.1、10 及び 15 mg/mL、ピリメタニル：1.0、2.5、5.1 及び 10 mg/mL）3 検体ずつ試験溶液を調製し qHNMR 測定を行った。真度は、秤量濃度と qHNMR による実測値との相対誤差より評価した。また、精度（併行精度）は、各濃度 3 検体の実測値の RSD より評価した。

アゾキシストロビンでは、表 6 に示したように実測値との相対誤差は全てのシグナルで 0.4%以下であった。また、この濃度範囲における併行精度も 0.5%以下と良好であった。特に、試料濃度が 10 mg/mL 以上では、実測値との相対誤差は全てのシグナルで 0.2%以下、併行精度は 0.1%以下であることが明らかとなった。従って、より精度の高い定量を必要とする場合には、試料濃度を 10 mg/mL 以上に設定する必要があると考えられた。

ピリメタニルでは、表 7 に示したように実測値との相対誤差は全てのシグナルで 0.5%以下であった。また、この濃度範囲における併行精度も 0.3%以下と良好であった。また、試料濃度が 5.1 mg/mL 以上では、実測値との相対誤差は全てのシグナルで 0.2%以下、併行精度は 0.2%以下であることが確認された。従って、試料濃度を 5.1 mg/mL 以上であれば、より精度の高い定量が可能であることが確認された。

### 5) 本法の室内精度

本分析法の室内精度を確認するため、試料濃度が 10 mg/mL の試験溶液（試料：20 mg、重水素化溶媒：2 mL、内部標準：4 mg）を調製し、一日当たり 2 検体ずつ併行して分析し、この分析を 5 日間実施した。各シグナルより得られた含量値を一元配置の分散分析により解析し、

併行と日間条件下での分散を推定した。併行条件下での分散に基づき併行精度を、併行と日間条件下での分散を合成することで室内精度をそれぞれ算出した。

表 8 に示したように、アゾキシストロピンでは各シグナルより得られた含量値の併行精度 (RSD<sub>r</sub>) 及び室内精度 (RSD<sub>ip</sub>) は 0.2% 以下であった。また、ピリメタニルでは、表 9 に示したように、各シグナルより得られた含量値の併行精度 (RSD<sub>r</sub>) 及び室内精度 (RSD<sub>ip</sub>) は 0.1% であった。以上の結果より、アゾキシストロピン及びピリメタニル標準物質の純度分析において、本法は十分な精度を有する測定法であることが明らかとなった。

#### 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、qHNMR 法によるアゾキシストロピン及びピリメタニルの定量に関する検討を行った。本法は良好な真度、精度、直線性を有し、アゾキシストロピン及びピリメタニルの絶対定量に有効な分析法であることが判明した。本結果は、アゾキシストロピン及びピリメタニルの定量分析の精確さ及び信頼性を更に向上させる知見であり、将来的な定量用標準物質や食品添加物製品の規格試験法への本法の適用へ向けた基礎的データが得られたものとする。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Ohtsuki, T.; Sato, K.; Sugimoto, N.; Akiyama, H. "Absolute quantification for ascorbic acid and benzoic acid in foods using quantitative <sup>1</sup>H NMR", 2012 ISNFF Conference and Exhibition (2012.12) (米国) .

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

#### 参考文献

- 1) Saito, T.; Ihara, T.; Koike, M.; Kinugasa, S.; Fujimine, Y.; Nose, K.; Hira, T. *Accred. Qual. Assur.* **2009**, *14*, 79-86.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Hasada, K.; Yoshida, T.; Yamazaki, T.; Sugimoto, N.; Nishimura, T.; Nagatsu, A.; Mizukami, H. *J. Nat. Med.* **2010**, *64*, 161-166.
- 6) 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, 山崎壮, 河村葉子, 西村哲治, 食衛誌 **2010**, *51*, 19-27 .
- 7) Hasada, K.; Yoshida, T.; Yamazaki, T.; Sugimoto, N.; Nishimura, T.; Nagatsu, A.; Mizukami, H. *J.Nat. Med.* **2011**, *65*, 262-267.
- 8) 田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻崇, 多田敦子, 穠山浩, 合田幸広, 西村哲治: 環境化学 **2012**, *22*, 33-41.
- 9) Tada, A.; Takahashi, K.; Ishizuki, K.; Sugimoto, N.; Suematsu, T. Arifuku, K. Tahara, M.; Akiyama, T.; Ito, Y.; Yamazaki, T.; Akiyama, H.; Kawamura, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 33-38.

表 1 qHNMR 測定条件

Spectrometer	JEOL JNM-ECA600
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	20 ppm (-5-15 ppm)
Auto filter	on (eight times)
Acquisition time	4 s
Flip angle	90°
Pulse delay	アゾキシストロビン: 64 s ピリメタニル: 60 s
Scan times	8
Spining	off
<sup>13</sup> C decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2 各シグナルより算出されたアゾキシストロビンの純度の比較 (n=3)

$\delta_H$ (ppm)	Purity (%)	RSD (%)
3.53	99.8	0.1
3.70	99.6	0.1
6.43	99.7	0.1
7.22	99.5	0.4
7.26-7.36	99.4	0.2
7.38-7.48	99.2	0.1
7.73	99.4	0.2
7.80	99.5	0.1
8.28	99.5	0.1

表3 各シグナルより算出されたピリメタニルの純度の比較 (n=3)

$\delta_H$	Purity(%)	RSD (%)
2.32	99.9	0.04
6.56	99.7	0.1
6.94	99.6	0.1
7.25	99.6	0.2
7.66	99.7	0.1

表4 定量に用いたアゾキシストロピンの各シグナルの縦緩和時間

$\delta_H$	$T_1$ (sec)
3.53	2.0
3.70	2.0
6.43	5.9
8.28	6.3

表5 定量に用いたピリメタニルの各シグナルの縦緩和時間

$\delta_H$	$T_1$ (sec)
2.32	2.7
6.56	4.7
6.94	4.1
7.25	3.5
7.66	4.2

表6 アゾキシストロピンの各試験溶液濃度における秤量値と実測値の比較 (n=3)

Gravimetric value (mg/mL)	$\delta_H$ 3.53			$\delta_H$ 3.70			$\delta_H$ 6.43			$\delta_H$ 8.28		
	Experimental value (mg/mL)	RSD (%)	Relative error (%)	Experimental value (mg/mL)	RSD (%)	Relative error (%)	Experimental value (mg/mL)	RSD (%)	Relative error (%)	Experimental value (mg/mL)	RSD (%)	Relative error (%)
1.0	1.0	0.4	-0.1	1.0	0.4	-0.4	1.0	0.5	-0.2	1.0	0.5	-0.1
2.6	2.6	0.2	-0.1	2.6	0.1	-0.2	2.6	0.04	0.0	2.6	0.1	-0.2
5.1	5	0.1	0.1	5	0.0	-0.1	5	0.1	0.0	5	0.1	-0.3
10	10	0.1	0.1	10	0.0	0.0	10	0.1	-0.1	10	0.0	-0.1
15	15	0.00	0.0	15	0.1	-0.1	15	0.05	-0.1	15	0.1	-0.2

The relative error between the gravimetric value and experimental value calculated with the equation below  
 Relative error = (experimental value - gravimetric value) / experimental value  $\times$  100

表7 ピリメタニルの各試験溶液濃度における秤量値と実測値の比較 (n=3)

Gravimetric value (mg/mL)	$\delta_H$ 2.32			$\delta_H$ 6.56			$\delta_H$ 6.94			$\delta_H$ 7.25			$\delta_H$ 7.66		
	Experimental value (mg/mL)	RSD (%)	Relative error (%)	Experimental value (mg/mL)	RSD (%)	Relative error (%)	Experimental value (mg/mL)	RSD (%)	Relative error (%)	Experimental value (mg/mL)	RSD (%)	Relative error (%)	Experimental value (mg/mL)	RSD (%)	Relative error (%)
1.0	1.0	0.2	0.1	1.0	0.2	-0.4	1.0	0.3	-0.2	1.0	0.1	-0.5	1.0	0.2	-0.3
2.5	2.5	0.1	0.2	2.5	0.1	0.4	2.5	0.2	-0.3	2.5	0.1	-0.1	2.5	0.3	-0.1
5.1	5.2	0.1	0.2	5.1	0.1	0.1	5.1	0.1	-0.1	5.1	0.2	-0.1	5.1	0.1	0.04
10	10	0.2	-0.04	10	0.2	-0.1	10	0.02	0.04	10	0.02	-0.2	10	0.04	-0.01

The relative error between the gravimetric value and experimental value calculated with the equation below  
 Relative error = (experimental value - gravimetric value) / experimental value  $\times$  100

表8 アゾキシストロビンの純度分析における qHNMR 法の真度及び精度 (n=2/day  $\times$  5 day)

$\delta_H$ (ppm)	Purity (%)	RSDr (%)	RSDip (%)
3.53	99.8	0.1	0.1
3.70	99.7	0.1	0.1
6.43	99.6	0.1	0.1
8.28	99.5	0.1	0.1

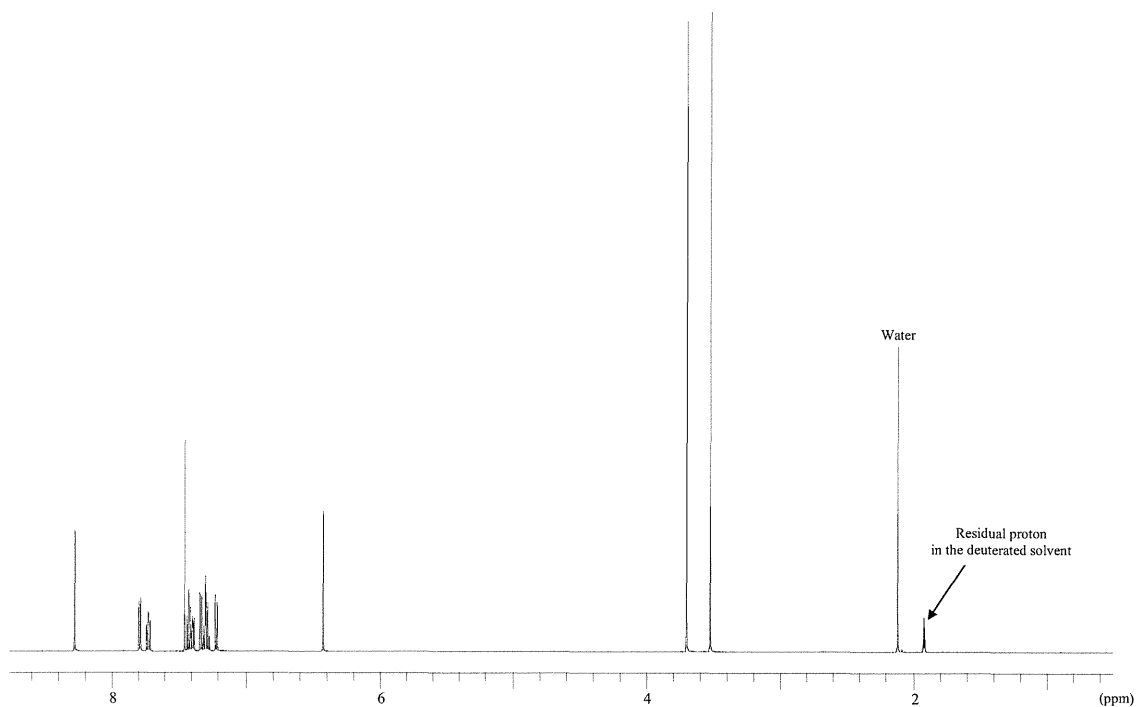
RSDr: 併行精度, RSDip: 室内精度

表9 ピリメタニルの純度分析における qHNMR 法の真度及び精度 (n=2/day  $\times$  5 day)

$\delta_H$ (ppm)	Purity (%)	RSDr (%)	RSDip (%)
2.32	99.8	0.1	0.1
6.56	99.7	0.2	0.2
6.94	99.8	0.2	0.2
7.25	99.6	0.1	0.1
7.66	99.7	0.1	0.1

RSDr: 併行精度, RSDip: 室内精度

(A)



(B)

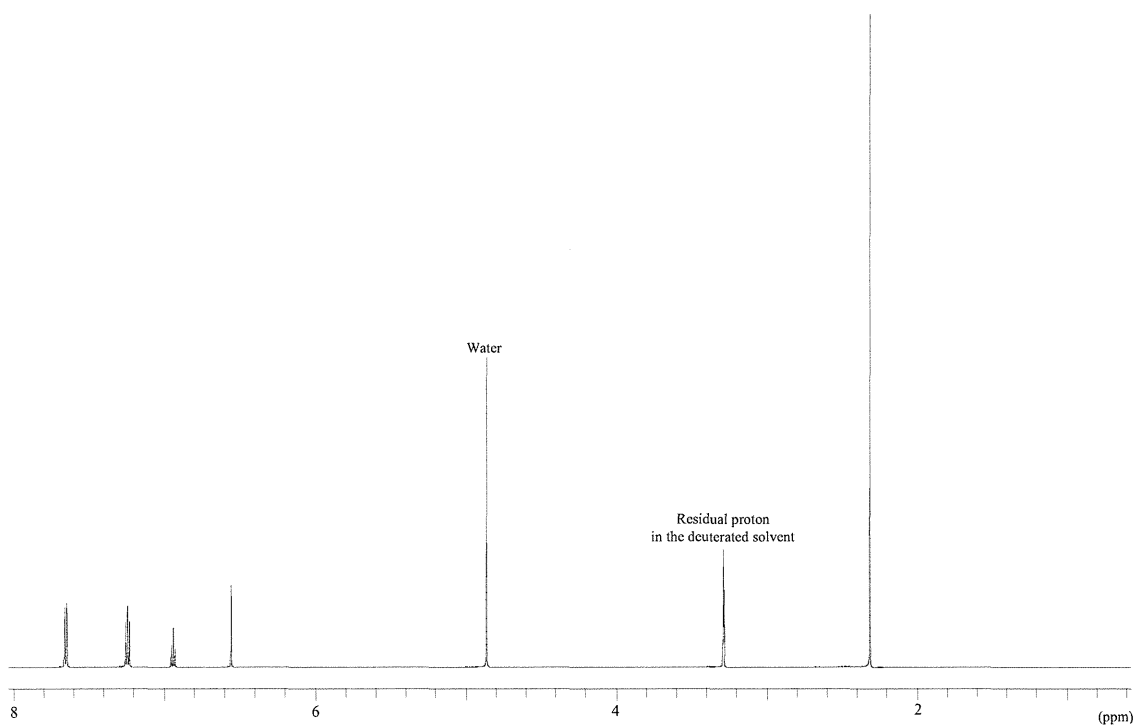
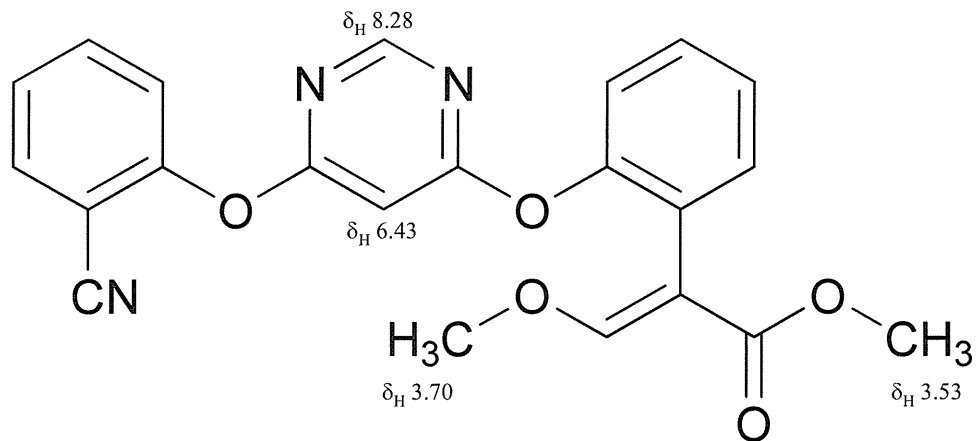


図1 アゾキシストロビン及びピリメタニルの  $^1\text{H}$  NMR スペクトル

(A) アゾキシストロビン (測定溶媒:  $\text{MeCN-}d_3$ ) (B) ピリメタニル (測定溶媒:  $\text{MeOH-}d_4$ )

(A)



(B)

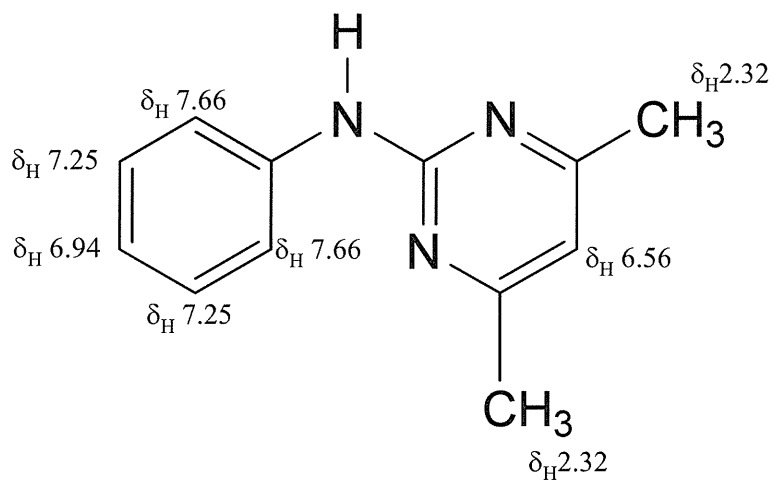
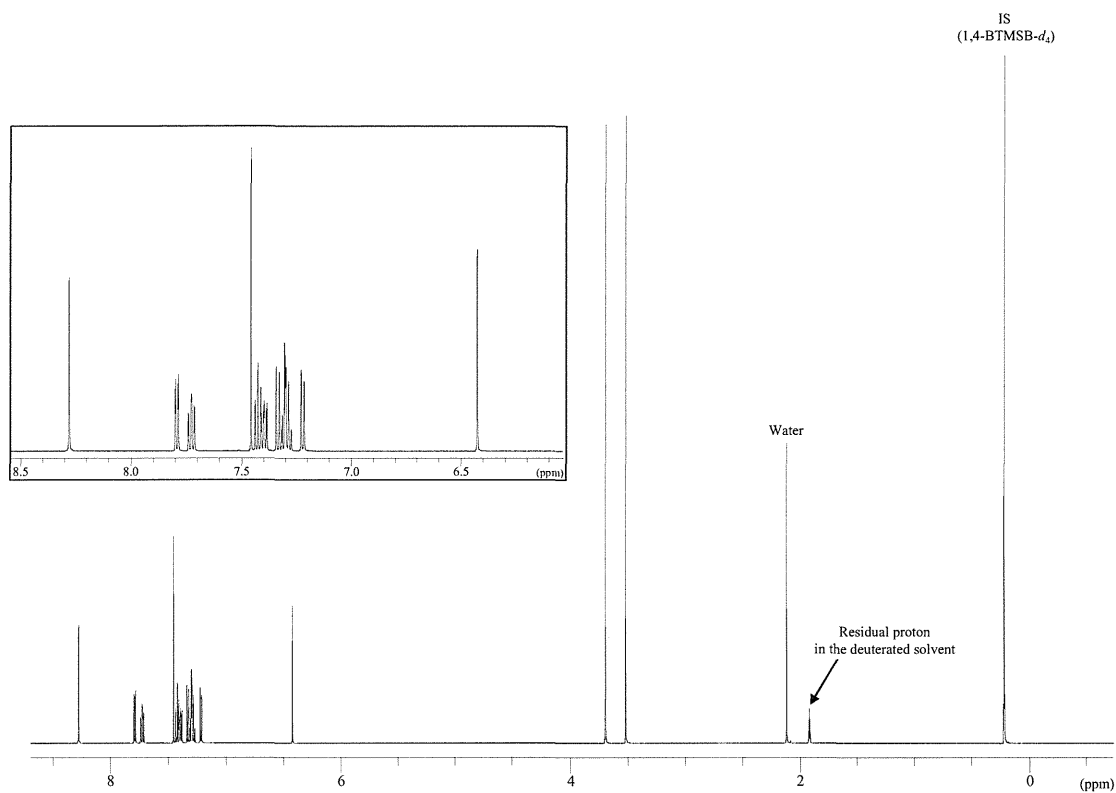


図2 アゾキシストロビン及びピリメタニルの化学構造及び $^1\text{H}$  NMR 化学シフト  
(A) アゾキシストロビン (測定溶媒:  $\text{MeCN-}d_3$ ) (B) ピリメタニル (測定溶媒:  $\text{MeOH-}d_4$ )



(A)



(B)

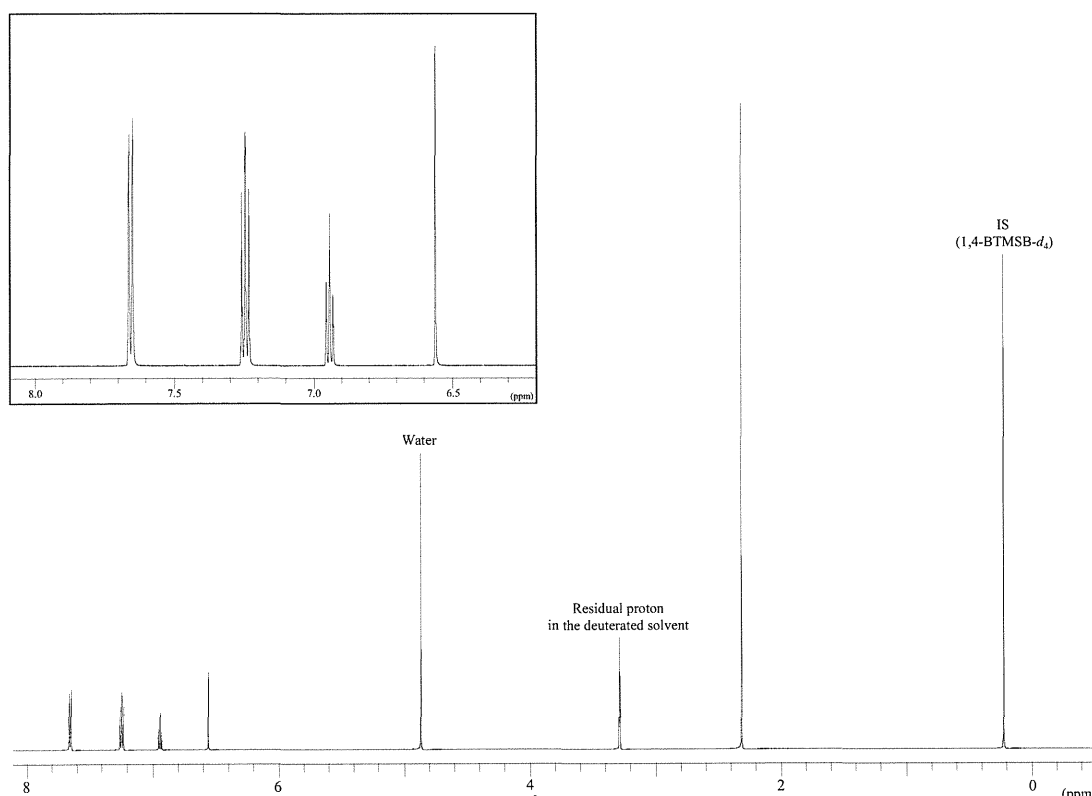
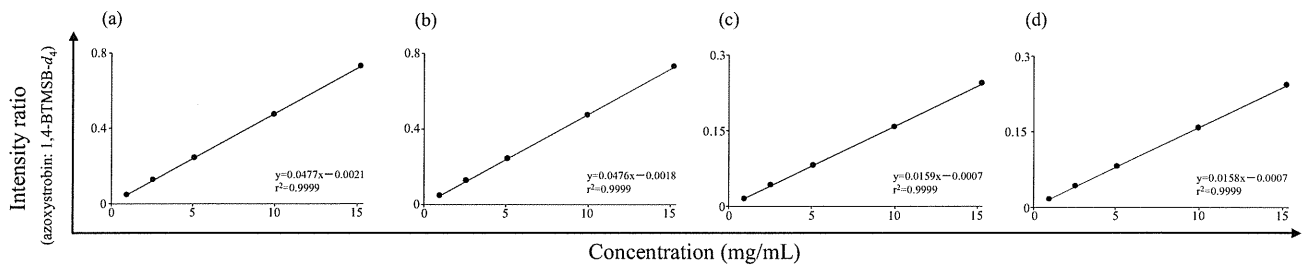


図3 アゾキシストロビン及びピリメタニルの<sup>1</sup>H NMR スペクトル (qHNMR 測定条件)  
(A) アゾキシストロビン (測定溶媒: MeCN-d<sub>3</sub>) (B) ピリメタニル (測定溶媒: MeOH-d<sub>4</sub>)

(A)



(B)

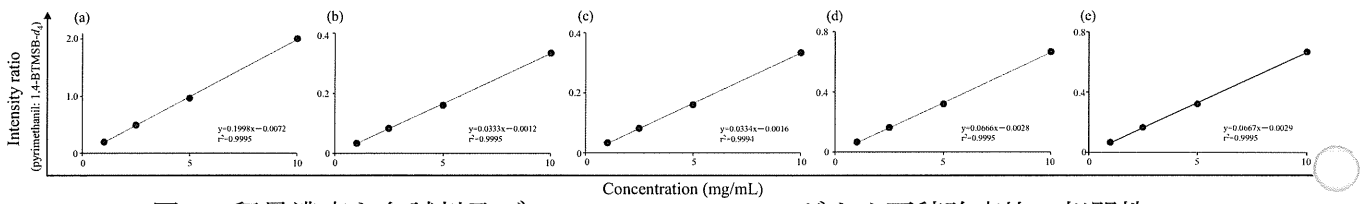


図4 秤量濃度と各試料及び1, 4-BTMSB- $d_4$ のシグナル面積強度比の相関性

(A) アゾキシストロビン (a)  $\delta_H$  3.53 (b)  $\delta_H$  3.70 (c)  $\delta_H$  6.43 (d)  $\delta_H$  8.28

(B) ピリメタニル (a)  $\delta_H$  2.32 (b)  $\delta_H$  6.56 (c)  $\delta_H$  6.94 (d)  $\delta_H$  7.25 (e)  $\delta_H$  7.66

香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究

研究分担者 山田雅巳 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第一室長

研究要旨 我が国独自の食品香料の中から、SAR のソフト 3 種類による予測がいずれかで陽性になったもの 43 品目について簡易遺伝毒性試験を実施したところ、陽性になったものは 14%であった。個々の SAR による遺伝毒性の予測の正確度は 4~11%であったことから、一つのソフトに絞って香料を対象にカスタマイズすることが効率よい安全性評価につながることを示唆された。

### A. 研究目的

欧米を中心として流通している食品香料のポジティブリスト化は、JECFA による安全性評価を軸として進行しており、国内における規格も、国際ハーモナイゼーションを踏まえた規格向上を検討することが望まれている。特に、我が国では独自に使用されている食品香料が多く、それらについては JECFA による安全性評価がなされていない。これらは種類が多いため、すべてについて遺伝毒性試験を実施することは、期間、費用の面で問題がある。構造活性相関手法（SAR）の導入が効率化の面で有用であると考えられる。

加えて、多くの食品香料は曝露量が微量であるため、毒性試験の実施にはこれらの年間使用量を上回る検体量を要することになる。最も簡便な *in vitro* スクリーニング遺伝毒性試験である Ames 試験を実施するにしても、数百 mg の検体を必要とする。一方、簡易スクリーニング法、フラクチュエーション Ames 試験（FAT）法は数 mg の検体量で判定結果を出すことができる。

以上を踏まえ、本研究では遺伝毒性に基づいた安全性規格の向上を効率的に進めるために、構造活性相関手法が遺伝毒性予測に適用できるかどうかを検討した。最終年度は、SAR の陽性結果を FAT で確認するとともに、新しいソフトウェア

TiMeS での予測も検討した。

### B. 研究方法

#### B-1 構造活性相関手法（SAR）

SAR のソフトウェアとして、遺伝毒性評価を目的とする次の 3 種類、DEREK (Lhasa Ltd.)、ADMEWORKS (AWorks ; 富士通九州システムエンジニアリング)、MULTICASE (MCase ; Multicase Inc.) を用いた。DEREK は、知識ベースのエキスパートシステムで、既知データから Ames 試験で陽性判定になる特徴的な部分構造を定義し、ルール化された経験則に基づき、定性的に Ames 試験結果の予測を行う。一方、AWorks は、人工知能型アプローチのシステムで、化学物質の構造をフラグメントに分解後、パラメータ（数値データ）に変換し、Ames 試験の陽性判定と相関の高いパラメータに基づき、多変量解析、パターン認識により試験結果を予測する。数値データから定量的な毒性の予測が可能である。したがってこれは定量的構造活性相関（QSAR）を調べることができるソフトである。MCase はこれらの中間で、化学物質の構造と特徴を表す構造記述子と、多数の部分的構造を機械的に検出し、統計理論から Ames 試験の陽性判定と相関する構造記述子を選別し、予測を行うシステムである。新しく

検討するTiMeSモデルは、ラット肝のS9での代謝反応、および非生物的反応の総合的ライブラリーと、代謝による変換確率の推定値を用いて妥当な代謝マップを創り出す帰納的アルゴリズムに基づくものである。構造クラスごとに一つ又は複数の記述子を用いた多変量モデルに基づく予測を行う。

#### B-2 FATに用いた検定菌

検定菌として *Salmonella typhimurium* TA100およびTA98を用いた。

#### B-3 FATに供した被験物質

結果C-1に示す順序で43物質(表1)を選択した。

#### B-4 被験物質溶液の調製

被験物質が液体の場合には、被験物質をジメチルスルホキシド(DMSO、和光純薬工業株)で所定の濃度に希釈した。被験物質が粉末の場合には、所定量秤量し、DMSOに溶解して最高用量の溶液を調製し、以下DMSOで段階希釈した。いずれの場合も被験物質溶液は用時調製とし、速やかに試験に供した。

#### B-5 陽性対照物質

反応液中(プレインキュベーション時)での濃度は次のとおり：S9 mix非存在下では、TA100およびTA98について、それぞれナトリウムアジド水溶液(1 µg/mL)と、4-ニトロキノリン-1-オキシドDMSO溶液(1 µg/mL)を用いた。S9 mix存在下では、TA100およびTA98について、いずれも2-アミノアントラセンDMSO溶液(1 µg/mL)を用いた。

#### B-6 試験材料

最小グルコース寒天平板培地と、代謝活性化を調べるためのラットS9はそれぞれ、極東製薬工業製、キッコーマン製を用いた。

#### B-7 FAT法

ニュートリエントブロス No.2 (Oxoid 製) を 12 mL 入れた L 字型試験管 (容積 : 29 mL) に、解凍した凍結保存菌 24 µL をすみやかに接種し、37°C で 10 時間、往復振とう培養して前培養菌液とした。増殖の確認は分光光度計により 660 nm の吸光度の測定により行った。段階希釈法 (10<sup>6</sup>

倍希釈) によって、前培養菌液中の生菌数を求めた。

24 ウェルマイクロプレートの所定のウェルに、S9 mix 非存在下では被験物質調製液 (10 µL/ウェル) および試験菌液 (490 µL/ウェル)、S9 mix 存在下では被験物質調製液 (10 µL/ウェル)、S9 mix (75 µL/ウェル) および試験菌液 (415 µL/ウェル) を分注する。ウェル数は、3 ウェル/用量/条件/菌を使用する。

分注操作終了後、24 ウェルマイクロプレートに蓋をし、回転振とう (37°C、90 分間、回転数 : 170 rpm) する (プレインキュベーション)。プレインキュベーション後、24 ウェルマイクロプレートの各ウェル中の被験物質に由来する沈殿の有無を目視により観察する。全ての群について、24 ウェルマイクロプレートにインジケータ培地 (2.5 mL/ウェル) を加え、混合液を調製して、再度沈殿の有無を目視により観察する。

マルチチャンネルマイクロピペットを用い、混合液を 24 ウェルマイクロプレート (1 ウェル) 1 枚から 384 ウェルマイクロプレート (48 ウェル) 3 枚へ分注する。分注量は、60 µL/ウェル (384 ウェルマイクロプレート) とする。

すべての分注操作終了後、384 ウェルマイクロプレート (蓋付き) をチャック付きビニール袋に入れ (プレート数 : 4 枚以下/袋)、チャックを閉めたのち、37°C で静置培養した。培養時間は TA100 の場合 48 時間、TA98 の場合 72 時間とした。

培養後、チャック付きビニール袋から 384 ウェルマイクロプレートを取り出し、全ての群について、混合液が黄色に変化したウェル数 (黄変ウェル数) を目視によって計測する。

同一用量における 3 区画の黄変ウェル数が全て 0 となる用量が連続して 2 用量以上認められる場合、それらの用量は生育阻害が認められるものと判断した。

数式を用いて、同一処理内容の 3 区画における平均黄変ウェル数および黄変ウェル出現頻度 (%) を算出する。なお、陰性対照群および陽性対照群