

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 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 用標準液の調製

1,4-BTMSB- d_4 1.1055 mg を精密に量り取り, acetonitrile- d_3 20 mL に定容し, この溶液を qNMR 用標準液 (1,4-BTMSB- d_4 調製値 = 55.275 $\mu\text{g/mL}$) とした.

4. qNMR による計量学的にトレーサブルな純度測定

既報¹⁴⁻²²⁾に準じた. マイコトキシ市販試薬 5 種 6 製品 (DON, 3-Ac-DON_A, 3-Ac-DON_B, 15-Ac-DON_B, NIV, T-2) をそれぞれ約 1~2 mg 精密に量り取り, 予め調製した qNMR 用標準液 1.0 mL に溶解した. なお, 15-Ac-DON_A は, 「100.0 $\mu\text{g/mL}$ 10.0 mL in Methanol」と表記された標準原液作成用の試薬として供給されていたため, これについては精密な秤量を行うことなく, qNMR 用標準液 1.0 mL で溶解し 1.0 mg/mL に調製した. 各溶液 0.6 mL を NMR 試験管 (5 mm ϕ x 200 mm, S-type, 和光純薬工業株式会社製) に封入したものを試料溶液とし, この試料溶液を Table 1 に示す測定条件の qNMR に付し, 得られた Free Induction Decay (FID) 信号データを定量解析ソフトウェア Alice2 for qNMR (日本電子株式会社 (現: 株式会社 JEOL RESONANCE) 製) に導入して自動処理した. すなわち, このソフトウェア上で, qNMR データをフーリエ変換および自動位相調整を行い, 1,4-BTMSB- d_4 および特定シグナルの積分範囲設定等を設定後, 予め入力した 1,4-BTMSB- d_4 およびマイコトキシンの等の化合物情報から自動解析処理を行い, 1,4-BTMSB- d_4 のシグナル強度面積, マイコトキシンの由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積, 分子量, 濃度, 特定基のプロトン数等を式 (a) に代入し, マイコトキシンの定量値 (純度%) を算出した.

$$P_{mt} = \frac{I_{mt} / H_{mt}}{I_{BTMSB} / H_{BTMSB}} \times \frac{M_{mt} / W_{mt}}{M_{BTMSB} / W_{BTMSB}} \times P_{BTMSB} \quad (\text{a})$$

ただし, W_{BTMSB} , W_{mt} = 1,4-BTMSB- d_4 およびマイコトキシンの濃度 (mg/mL), M_{BTMSB} , M_{mt} = 1,4-BTMSB- d_4 およびマイコトキシンの分子量 (1,4-BTMSB- d_4 , DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, NIV

Table 1. Instruments and acquisition parameters

Spectrometer	ECA600 (JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
^{13}C decoupling	Multi pulse decoupling with Phase and Frequency switching (MPF-8)
Spectral width	-5—15 ppm
Data points	64000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	room temperature
Sample solvent	acetonitrile- d_3
qNMR reference material	1,4-BTMSB- d_4

および T-2 それぞれ 226.49832, 296.3157, 338.3524, 338.3524, 312.3151, 466.5214), I_{BTMSB} , $I_{\text{mt}} = 1,4\text{-BTMSB-}d_4$ およびマイコトキシンの特定基のシグナル強度面積, H_{BTMSB} , $H_{\text{mt}} = 1,4\text{-BTMSB-}d_4$ およびマイコトキシンの特定基のプロトン数, P_{BTMSB} , $P_{\text{mt}} = 1,4\text{-BTMSB-}d_4$ の純度 (99.8% w/w) およびマイコトキシンの純度 (% w/w).

結果および考察

1. 市販試薬製品の純度の決定

NMR は、化合物の構造決定のための代表的な定性分析法の一つである。これは分子中の原子核が置かれている化学的環境によって共鳴する周波数が異なること、近傍にある他の原子核とのスピンスピン相互作用により信号の形が変わること、同じ数の原子が等しい信号強度として定量的に観察・測定可能であることを利用している。測定条件を定量用に最適化した qNMR では、測定対象化合物の分子構造に関わらず、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上に化学シフトの異なる各プロトンシグナル面

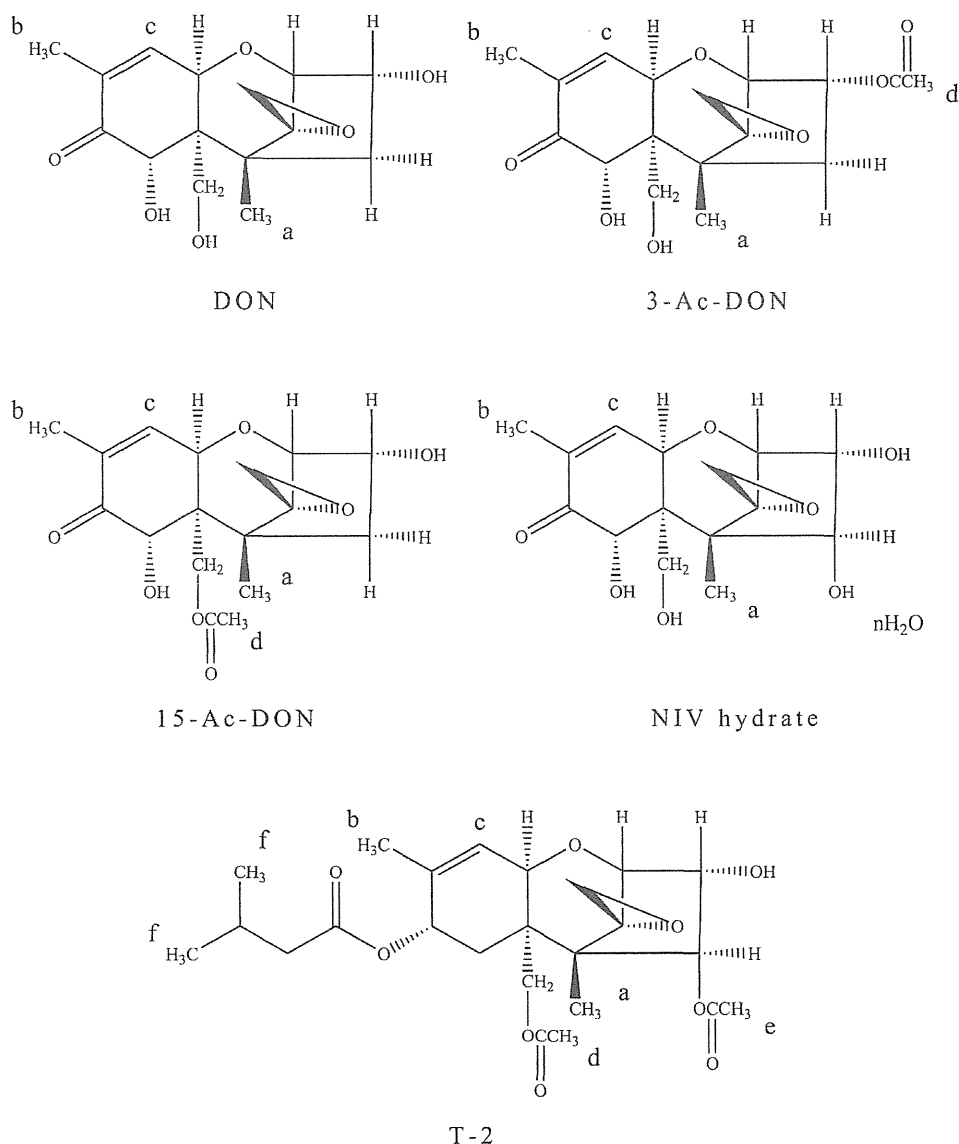


Fig. 1 Chemical structures of trichothecenes a~f : target functional groups to determine the purities using qNMR

積を精密に観測することが可能である。試料溶液中に2つの化合物が同時に存在し、一方の化合物の純度と濃度が明らかであれば、観察されるシグナル面積比と濃度調製値の比例関係式から、もう片方の化合物の含量や純度を求めることが出来る(式(a))。すなわち、qNMRは、測定対象と同一化合物の定量用標準物質を必要とせず、別の標準物質を上位標準としてあらゆる測定対象化合物の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「物質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。また、qNMRにより得られた測定値は高い再現性を示し、測定結果の不確かさは概ね1%以内が達成されている^{15,18-20}。

本研究では、計量学的に純度が証明された1,4-BTMSB- d_4 を用い、トリコテセン系マイコトキシン5種(DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, NIV, T-2 (Fig. 1))7製品の純度の決定を行い、1,4-BTMSB- d_4 を上位標準物質として得られた値のSIへのトレーサビリティを確保した。すなわち、1,4-BTMSB- d_4 を精密に秤量し、重溶媒 acetonitrile- d_3 により定容したqNMR標準液にそれぞれ溶解し、qNMR測定を行った。qNMRスペクトル上に観察された1,4-BTMSB- d_4 に由来するシグナルを基準シグナル、マイコトキシンそれぞれに由来する特徴的なシグナルを定量用シグナルとし、調製濃度、分子量、定量用シグナルのプロトン数および積分面積を式(a)に代入し、それぞれの純度を算出した。

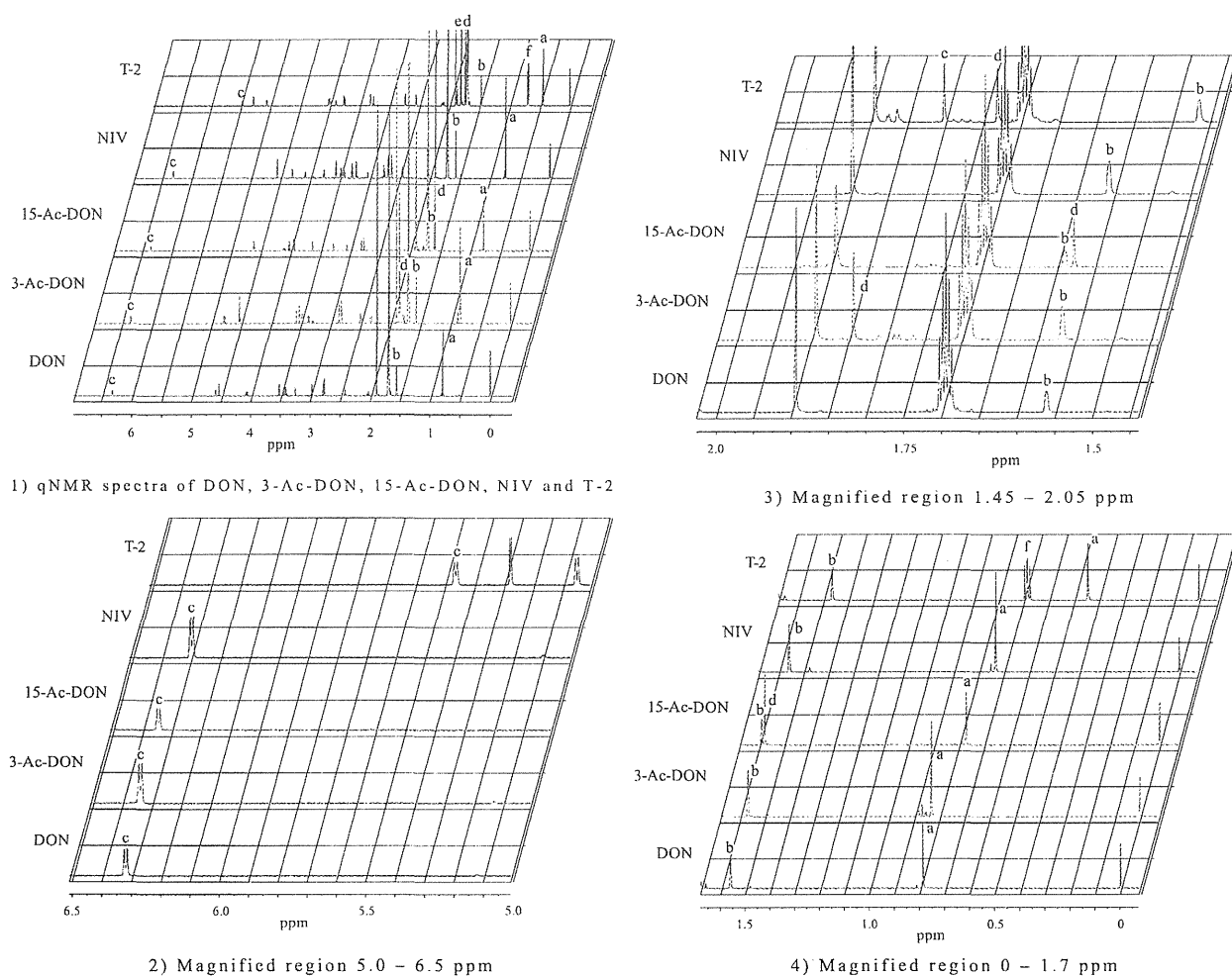


Fig. 2 qNMR spectra of commercial reagent products of trichothecenes 1,4-BTMSB- d_4 was used as a reference material for qNMR analysis. qNMR spectra of 3-Ac-DON and 15-Ac-DON are measured from the commercial reagent product A, respectively.

Fig. 2には、マイコトキシン5種 (DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, NIV, T-2) の代表的な qNMR スペクトルを示した。それぞれのマイコトキシンと基準物質 1,4-BTMSB- d_4 に由来するシグナルが観察されたが、分解物、同族体あるいは製造原料の不純物に由来すると考えられる小さなシグナルも 0.79-5.10 ppm の範囲に多数観察された。そこで、各マイコトキシンの定量用シグナルとしては、近傍に不純物のシグナルが観察されないこと、官能基が帰属されていることを条件にそれぞれ 10 位 (c), 14 位および 16 位の Me 基 (a, b), アセチル基の Me 基 (d, e), 8 位のイソペンタン酸エステル部分の 2 つの Me 基 (f) のプロトンシグナルの中から 3 つ以上のシグナルを選択した。また、実際の分析現場では、天然物等の貴重な化合物について、脱水処理等の前処理や実際の水分量を確認することは難しいため、試薬瓶の表示値を純度値、秤量値を無水和物の重量として計算しているのが現状だと考えられる。このことから、NIV の純度は無水物 (anhydrate) として算出した。

その結果、DON が 88.1% (RSD 1.9%), 3-Ac-DON_A が 89.8% (RSD 1.1%), 3-Ac-DON_B が 93.5% (RSD 1.1%), 15-Ac-DON_A が 89.5% (RSD 2.0%), 15-Ac-DON_B が 90.2% (RSD 1.3%), NIV が 82.9% (RSD 0.6%) (無水物として), T-2 が 98.7% (RSD 1.4%) の純度値を与えた (Table 2)。DON および 15-Ac-DON_A については、各定量シグナルから得られた純度値の RSD が約 2% と若干大きく観察されたことから、定量シグナルに不純物由来のシグナルが重なっている可能性が示唆された。よって、DON および 15-Ac-DON_A については、すべての定量シグナルから求めた平均値を純度値とせず、同属の化合物と重ならないシグナル (それぞれ a および d) を用いた純度値を採用すべきであり、DON および 15-Ac-DON_A の純度値は、それぞれ 86.5, 87.7% がより確からしいと考えられた。

次に、qNMR により得られた計量学的にトレーサブルな純度と試薬製品の添付成績書に記載の HPLC または GC 面積百分率による表示値純度と比較した (Table 3)。試薬メーカーの純度表示値がほぼ 100% であるのに対して、qNMR により求められた純度は、82.9-98.7% と品目によって大きく異なることがわかった。qNMR によって求めた T-2 の純度は、98.7% (RSD 1.4%) と表示値 99.5% (GC) とほぼ同じ値を示したが、DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, NIV の純度については、表示値より約 10% 下回る値を与えた。トリコセテン系マイコトキシン 5 種 (DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, NIV, T-2) の市販試薬製品は非常に高価であるため、製品数を増やして検討することはできなかった。しかし、これらは天然物より単離精製したものである以上、原料の差、抽出、単離工程

Table 2. Summary of the determined purities of commercial reagent products by using qNMR

Target signal	DON		3-Ac-DON		15-Ac-DON		NIV ^{a)}		T-2	
	Chemical shift (ppm)	Purity (%)	Chemical shift (ppm)	Purity (%) A ^{b)} B ^{b)}	Chemical shift (ppm)	Purity (%) A ^{b)} B ^{b)}	Chemical shift (ppm)	Purity (%)	Chemical shift (ppm)	Purity (%)
a	0.79	86.5	0.83	88.1 91.8	0.77	88.3 88.3	0.73	82.2	0.44	97.5
b	1.56	87.5	1.57	90.2 94.2	1.59	89.8 90.6	1.56	83.2	1.46	99.0
c	6.32	90.2	6.34	90.3 93.7	6.35	92.2 91.0	6.32	83.4	5.46	99.7
d	—	—	1.85	90.6 94.2	1.57	87.7 91.1	—	—	1.67	98.4
e	—	—	—	— —	—	— —	—	—	1.80	100.8
f	—	—	—	— —	—	— —	—	—	0.68	96.8
Average (%)		88.1		89.8 93.5		89.5 90.2		82.9		98.7
RSD ^{c)} (%)		1.9		1.1 1.1		2.0 1.3		0.6		1.4

a) The purity was calculated as NIV anhydrate.

b) The capital A and B are the commercial reagent products, respectively.

c) RSD: relative standard deviation

の差により、ロット間変動が大きく、純度の制御が困難であると予想されることから、実際に流通している市販試薬製品の純度値は表示値より低い、あるいは製品間差の存在が否定できないと考えられる。実際に、qNMRの応用により得られた天然由来の他の化合物の市販試薬等の計量学的にトレーサブルな純度値についても同様に表示値より低い結果が報告されている^{16,19,20,22)}。

2. qNMRによる計量学的にトレーサブルな純度決定の意義

定量分析では、試料の採取、試料調製、定量用標準品の入手、データ解析等これら分析操作のすべての過程が正確に行われなければ、得られた定量分析値の信頼性は確保できない。特に、定量用標準品については、その純度の誤差が定量分析の室内および室間の不確かさに大きく影響を与えるため²³⁾、純度や含量が精確に値付けられた定量用標準品の入手、あるいは、入手した定量用標準品の純度の確証が重要である。しかし、マイコトキシン類については、計量学的に精確に値付けられた定量用標準品の供給・入手が現状では不可能である。このような背景から、DON試験法でもそうであるように、これまで簡便で精確に純度値を付与する方法が存在しなかったために、市販試薬製品を定量用標準品の代用とすることが一般的化されている。

qNMRによるマイコトキシン類の市販試薬製品の純度測定の結果より、仮にこれら市販試薬製品の成績書記載の純度値を信用、もしくは純度100%としてクロマトグラフ法により検量線を作成し、定量分析を行った場合、その定量分析値は真値より0.8-16.8%の誤差が生じていることになる。DON試験法等の公的な試験法では、得られた定量分析値は法的な拘束力があるため、その信頼性には科学的な根拠が求められる。qNMRは、これら公的な試験法の標準品の純度を簡便に且つ迅速に、測定対象物質とは別の上位標準物質を参照することでSIにトレーサブルに精確に求められることから、今後重要なツールの1つとなると考えられる。

結 論

DON試験法を代表とするマイコトキシン類の高感度定量分析が期待されるクロマトグラフィは、精確な定量値を算出するために測定対象と同一の定量用標準品が必須である。科学的な根拠に基づく定量分析値の信頼性確保には、定量用標準品の代用となる市販試薬製品についてSIトレーサブルな純度の決定が最重要である。本研究において、qNMRによりマイコトキシン類の市販試薬5種(DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, NIV, T-2)7製品の純度決定を行った結果、T-2以外は成績書記載の純度値より約10%低いことが明らかとなった。

輸入および国内産食料の使用、海外での生産・加工等、食料産業の国際化に伴い、食料生産から消費までのリスク管理が重要となっている。今後、小麦玄麦のDONだけでなく、他の穀類や食品中のマイコトキシン類の基準値や試験法に関して審議され、それらの分析精度確保が特に重要と考

Table 3. Comparison between the purities determined by qNMR and those described as catalog specification of the commercial trichothecenes

Compound	Purity (%)	
	qNMR	Catalog spec.
DON	88.1	100.0(HPLC)
3-Ac-DON_A ^{a)}	89.8	99.7(HPLC)
3-Ac-DON_B ^{a)}	93.5	99.4 ^{b)}
15-Ac-DON_A ^{a)}	89.5	—
15-Ac-DON_B ^{a)}	90.2	98.8 ^{b)}
NIV	82.9 ^{c)}	99.7(HPLC)
T-2	98.7	99.5(GC)

a) The capital A and B are the commercial reagent products, respectively.

b) The values are based upon the results from several analytical techniques.

c) The purity was calculated as NIV anhydrate.

えられる。DON 試験法自体に問題はないが、定量用標準品の純度を証明する手法については法的な拘束がない。分析値の国際的な整合性を確保するためにも、qNMR による定量用標準品の純度規定や SI へのトレーサビリティの証明が今後重要であると思われる。

謝 辞

本研究は「健康安全確保のための研究費 健康食品等による健康被害防止に必要な標準物質（標準品）の整備と分析に関する研究」によって行われた。

引用文献

- 1) 高鳥浩介, 相原真紀, 小西良子: 国立衛研報, **124**, 21-29 (2006)
- 2) 上野芳夫: 衛生化学, **30**, 251-256 (1984)
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知: 食安発第 0521001 号 (2002)
- 4) Ikunaga, Y., Sato, I., Grond, S., Numaziri, N., Yoshida, S., Yamaya, H., Hiradate, S., Hasegawa, M., Toshima, H., Koitabashi, M., Ito, M., Karlovsky, P., Tsushima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 419-427 (2010)
- 5) Tanaka, K., Kobayashi, H., Nagata, T., Manabe, M.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **45**, 63-66 (2004)
- 6) Sinha, R.C., Savard, M.E., Lau, R.: *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1740-1744 (1995)
- 7) Razzazi-Fazeli, E., Böhm, J., Luf, W.: *Journal of Chromatography A*, **854**, 45-55 (1999)
- 8) C. Gottschalk, J. Barthel, G. Engelhardt, J. Bauer, K. Meyer: *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**, 1547-1553 (2007)
- 9) Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R.: *International Journal of Food Microbiology*, **119**, 33-37 (2007)
- 10) 須賀啓子, 田村昌義, 北川泰, 望月直樹: 日食化誌, **14**, 93-98 (2007)
- 11) Bretz, M., Beyer, M., Cramer, B., Humpf, H. U.: *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 251-260 (2006)
- 12) Klötzel, M., Lauber, U., Humpf, H. U.: *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 261-269 (2006)
- 13) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食安発第 0717001 号 (2003)
- 14) Ihara, T., Saito, T., Sugimoto, N.: *Synthesiology*, **2**, 12-22 (2009)
- 15) 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, 山崎壮, 棚元憲一, 中澤裕之, 西村哲治: 日食化誌, **16**, 28-33 (2009)
- 16) 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, **51**, 19-27 (2010)
- 17) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: *J. Nat. Med.*, **64**, 161-166 (2010)
- 18) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀: *FFI ジャーナル*, **215**, 129-136 (2010)
- 19) 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: 日食化誌, **17**, 179-184 (2010)
- 20) 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*, **41**, 960-970 (2010)
- 21) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: *J. Nat. Med.*, **65**, 262-267 (2011)
- 22) 細江潤子, 杉本直樹, 末松孝子, 山田裕子, 早川昌子, 勝原孝雄, 西村浩昭, 合田幸広, 医薬

品医療機器レギュラトリーサイエンス, 43, 182-193 (2012)

23) 田原麻衣子, 中島晋也, 杉本直樹, 有藺幸司, 西村哲治, 水道協会雑誌, 81, 10-16 (2012)

NMRによる有機化合物の絶対定量の可能性

杉本直樹^{1,*} 田原麻衣子¹ 末松孝子² 三浦亨³

NMR as a Potential Tool of Absolute Quantitative Analysis of Organic Compounds

Naoki SUGIMOTO^{1,*}, Maiko TAHARA¹, Takako SUEMATSU² and Toru MIURA³

¹Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences:

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

²Solution & Marketing Division, JEOL RESONANCE Inc.:

3-1-2 Musashino, Akishima-shi, Tokyo 196-8558, Japan;

³Reagent Research Laboratories, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.:

1633 Matoba, Kawagoe-shi, Saitama 350-1101, Japan; * Corresponding author

1. はじめに

有機化合物の定量分析には、主に、相対分析法のクロマトグラフ法が利用されているが、測定対象物質毎に検出器の感度が異なることから、正確な定量結果を得るためには、すべての測定対象物質についてそれと同一の標準物質を入手して検量線を作成し、これを参照する必要があるのは言うまでもない。一方、測定対象物質となりうる有機化合物は無限に増加する傾向にある。実際に、食品分析の分野においては、食品衛生法の改正に伴い、平成18年より残留農薬等に関するポジティブリスト制度が施行され、国内外約800種類の農薬類の流通に関して規制が強化されている。加えて、POPs類、RoHS指令、REACH規則など国際的に規制対象となる化合物が年々増加しており、基準値あるいは規制値が設定されたこれらの対象物質についても、特に正確な検査が求められている。基準値あるいは規制値を超える定量結果が得られたとき、流通が規制されるなど、市場に大きな影響を与えるばかりでなく、近年のグローバル化に伴い、場合によっては国際問題に発展する可能性も想定され、定量値の誤差の原因となる標準物質の純度の信頼性の確保が極めて重要視されてきている。

検査機関においては、自ら得た検査結果の信頼性を確保するために、検査法の妥当性確認だけでなく、規制対象物質の純度の確固たる保証を必要としているが、検査対象物質は大幅に増加し続けるに伴って標準物質の入手もさらに困難となり、仮に試薬メーカーや研究機関を通じて検査対象の化合物を標準品あるいは試薬として入手できたとしても、純度保証がされていない場合が多いことのジレンマに陥っていると思われる。これに対して、試薬メーカーにお

いては、これらの検査にかかわる市場の要求に応えるべく、いわゆる市販標準品の拡充に努めており、通常、GCやHPLCを用いた相対面積百分率で純度や含量を付与方法によりこれら市販標準品の品質保証を行っている。しかしながら、この方法で付与した値は、主成分と不純物のレスポンスファクターの差異等の理由から、計量学的に正確であるとは言えない場合が多いという問題を抱えている。このような状況を打破するために、検査機関や試薬メーカーだけでなく産業界は、これまでとは全く異なる原理に基づく定量分析法の技術開発と信頼性の高い純度値や含量値が付与された標準物質の供給体制の構築を求め続けている。

近年、信頼性の高い含量値または純度値を求めることができる強力なツールとして、定量NMR (quantitative NMR (qNMR)) が注目を集め始めている。本法は、これまでの定量分析法とは原理的に異なった概念に基づき、また、あらゆる分析化学の分野に容易に応用可能であり、本法を利用することによって、上述した問題を根本的に解決できると期待されている^{1),2)}。本稿では、食品分析に関連する市販標準品や試薬の絶対純度測定へのqNMRの応用例^{3)~7)}、国際単位系 (International System of Units; SI) への計量トレーサビリティの確保の重要性を通じて、今後予想される波及効果について紹介する。

2. qNMRの原理

NMRは一般的なクロマトグラフ法に比べて専門的な知識がなければ測定・解析できないというイメージから、低分子の定量分析法としては精度や汎用性が極めて低いと認識され、決して認知度の高いものではなかった。しかし、近年、NMR測定条件および解析条件を詳細に見直して、クロマトグラフ法とは全く異なった概念を有する個々の測定対象の標準物質を一切必要としない高精度の定量分析法としてqNMRが開発された。ここでは、qNMRによる定量分析の基本的な原理と分析精度を確保するための測定条

* 連絡先

¹ 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

² 株式会社JEOL RESONANCEソリューション・マーケティング部: 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2

³ 和光純薬工業株式会社試薬研究所: 〒350-1101 埼玉県川越市の場1633

件を示す。

^1H -NMRスペクトル上には、測定対象の化学構造によって異なった化学シフトに共鳴シグナルが観察されること、化学結合を通して隣接する炭素に結合する ^1H 核の数などに応じてシグナルが分裂を示すこと、信号強度(面積)が共鳴する ^1H 核の数に比例することなどの有機化合物の分子構造を示す情報が得られる。

同一分子内の異なる環境にある ^1H 核は、共鳴周波数に応じて異なる化学シフトを持つ分離したシグナルとして観測されるため、化学シフトが異なる2つのシグナル強度を比較することが可能となる。それぞれのシグナルの面積 S_i は、共鳴する ^1H 核の数 N_i 、溶液体積 V 、試料の質量 m 、分子量 M と純度 P 、励起パルス角 β 、信号を与える核の縦緩和時間 T_{1i} 、繰り返し積算を行う際の遅延時間 T_r と平衡磁化 M_0 で示されることになる(式(1))。ここで、添え字の i は異なるシグナルを示し、緩和時間は ^1H の環境によって異なる。 ^1H -NMRは一般に検出感度が良くないことからスペクトルを取得する際に複数回積算して信号雑音比(S/N 比)を向上させる。すなわち、通常の ^1H -NMRの場合には、 ^1H 核の数 N_i が整数比で確認できれば構造解析に十分であるため、遅延時間 T_r を短く設定して単位時間当たりの積算回数を稼ぐことにより、検出感度 S/N の向上を重視して定量性を犠牲にした測定条件となっている。このため、分子内のシグナル面積 S_i と ^1H 核の数 N_i の間に精密な比例関係は成立していない。一方、対象物質の中で最も長い T_1 より十分長い遅延時間 T_r で積算すると、測定対象となる化合物のすべてのシグナルに対して $1 - e^{-T_r/T_1} \approx 1$ の条件が満たされ、分子内のシグナル面積 S_i と ^1H 核の数 N_i の間に精密な比例関係が成立し定量性が確保される。さらに、定量性を確保した条件下で分子内の異なる化学シフトを示す共鳴ピークの面積を比較すると式(2)が成立する。このとき、シグナル面積 S_i と ^1H 核の数 N_i の比例関係は、異なる2分子間に由来するシグナルにも適用することができる。この場合、試料溶液を測定する際の励起パルス角や溶液の体積は化合物によらず一定と考えられるので、得られる面積 S が測定対象の分子の純度 P 、分子量 M 、質量 m など測定する化合物のみに依存する値に比例した式(3)が成立する(a, s は、それぞれ測定対象物質と仲介物質(内標準物質)、 i, j はそれぞれの物質の異なるピークを示す)。よって、qNMRによる定量分析は式(3)に基本原理が集約されている⁸⁾。

$$S_i \propto N_i \frac{m}{VM} p \sin \beta \frac{1 - e^{-T_r/T_{1i}}}{1 - e^{-T_r/T_{1h}} \cos \beta} M_0 \quad (1)$$

$$\frac{S_i}{S_j} = \frac{N_i}{N_j} \quad (2)$$

$$p_a = \frac{S_{ai}}{S_{sj}} \frac{N_{sj}}{N_{ai}} \frac{M_a}{M_s} \frac{m_s}{m_a} p_s \quad (3)$$

qNMR測定では、それぞれの分子が溶液中で反応などの相互作用を起こさないこと、異なる化学シフトに分離したシグナルを与えることなどの制限はあるものの、純度既

知の標準物質があれば、測定対象物質の純度や含量を評価できることになる。言い換えれば、正確な純度が付与された分子量が既知の基準物質が上位標準として用意されれば、同時に測定された同一溶液内の他の有機化合物の純度や含量が正確に決定できることを示している。さらに、クロマトグラフ法がUV、分子イオン化率などの個々の分子が持つ固有値を指標としているため、個々の測定対象の標準物質が必須であるのに対して、qNMRは分子上の最小単位である ^1H 核が異なる分子上にあっても等価であることを利用していることから、個々の測定対象の標準物質を全く必要としない。すなわち、これまでの定量分析が分子の特性値を指標とした「分子認識」による相対分析法であるのに対して、qNMRは「原子認識」による絶対分析法である点において全く異なる定量分析であると言える。

qNMRでは、基準物質と対象物質の正確なシグナル面積値が計算上必要なため、測定条件の最適化が必須である。シグナル面積値に影響を与える要因はいくつかあり、測定条件および装置的な要因に大別される。近年の技術進歩により装置的な要因は無視できるほど小さくなってきているが、測定条件的な要因は大きく、これは測定パラメータの1つであるパルス繰り返し時間の最適化によって大きく改善される。先に示したように、最適化には T_1 と呼ばれる物理定数が深くかかわっており、 $1 - e^{-T_r/T_1} \approx 1$ が満たされるときに ^1H -NMRスペクトル上に観察されるシグナルの定量性が確保される。

図1には、パルス繰り返し時間と縦磁化の回復の関係を示した。フリップ角を 45° パルスや 90° パルスに設定した場合、 T_1 の6~7倍で磁化が99.9%回復することから、NMRの定量性を確保するためには、この時間をパルス繰り返し時間に設定する必要があることが分かる。多くの有機化合物の T_1 は10秒以下であることが多く、パルス繰り返し時間を60秒以上に設定することによって、ほとんど

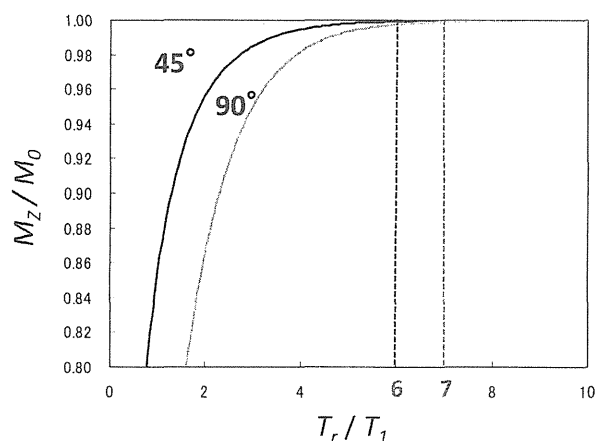


図1. パルス繰り返し時間と縦磁化の回復の関係

横軸: 縦緩和時間(T_1)に対するパルス繰り返し時間(T_r)の比率

縦軸: 熱平衡状態の磁化(M_0)に対する縦磁化(M_z)の回復度

の対象物質について高精度の定量分析が可能となる。

図2には、実験例として、ヒドロキシ安息香酸メチルとアセトアミノフェンを各30 mMの濃度でDMSO- d_6 に正確に溶解し、qNMR最適条件下で測定した結果を示したが、qNMRスペクトル上の両者のメチル基のシグナル面積に注目してほしい。両者のモル濃度が完全に等しいとき、qNMR条件下の測定で得られたスペクトル上の両者のメチル基のシグナル面積は完全に等しくなる。すなわち、測定対象を溶解した試料溶液に、正確な純度値が付与された物質（基準物質）を定量的に加え均一に溶解させた後、qNMR測定を行い、得られたスペクトルから読み取ったそれぞれの物質に起因するシグナル面積比から、両者のモル比が得られ、そのモル比をもとに、測定対象の純度や含量を知ることができる⁹⁾。

実際のqNMRの分析手順を図3に示した。qNMRでは、前述したように測定は定量用に最適化した条件で行うことが必須である。通常の ^1H -NMRによる定性分析では、対象化合物のシグナルが感度良く観察されれば構造解析には十分であるため、対象化合物や試料の重量を正確に量ることはまずないが、qNMRにより正確な定量値を得るため

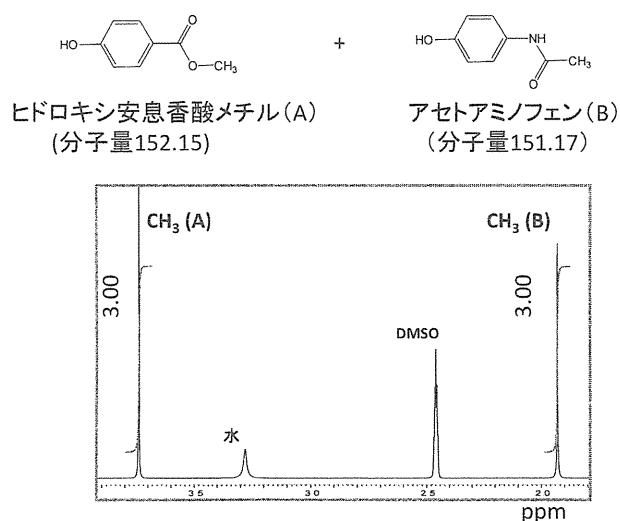


図2. 2つの化合物を同じモル濃度で混合したqNMRスペクトル

両者の CH_3 基のシグナル領域を拡大(各30 mM/DMSO- d_6 溶液)

には、他の定量分析と同様に実験操作上で注意しなければならない点がある。

- 基準物質（内標準物質）と測定対象物質の分子式と分子量が分かっていること
- 基準物質の純度が厳密に分かっていること（計量トレーサビリティが確保されていることが望ましい）
- 測定試料中の基準物質（内標準物質）と測定対象物質の重量または濃度が厳密に分かっていること

前述したようにqNMRの基本原理解は式(3)に集約されている以上、この式に代入する数値の信頼性は得られた結果と直結する。すなわち、現実の実験操作として、基準物質と測定対象の質量をそれぞれ精密に量り採ることが精度の高い測定のための重要な要素となる。

また、qNMRは、3項で述べる「一次標準測定法」として原理的に認められる分析技術である。したがって、SIへの計量トレーサビリティが証明されている基準物質を用いた場合には、これを上位標準として測定対象の純度や含量をSIトレーサブルな値として算出することができる。

3. SIトレーサビリティの確保

物質の絶対値は、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」は、物質質量諮問委員会(Consultative Committee for Amount of Substance: CCQM) (国際度量衡委員会(International Committee for Weights and Measures: CIPM) が1993年に設立した委員会)において「最高の計量学的特性を持ち、その操作を完全に記載及び理解でき、完全な不確かさの記載がSI単位に基づいて記載できる方法である」と定義されている¹⁰⁾。「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、「物質の基準となる他の化学物質を用いずに、自分自身で目的の化学物質の物質質量を測れる方法(絶対測定法)」であり、電量分析法、重量分析法および示差走査熱量計(DSC)を用いた凝固点降下法がある。これらの分析法は物質の絶対値が得られるが、分析できる物質の種類に限られる。一方、「一次比率法」は、「物質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質量を測れる方法」であり、すでに実用

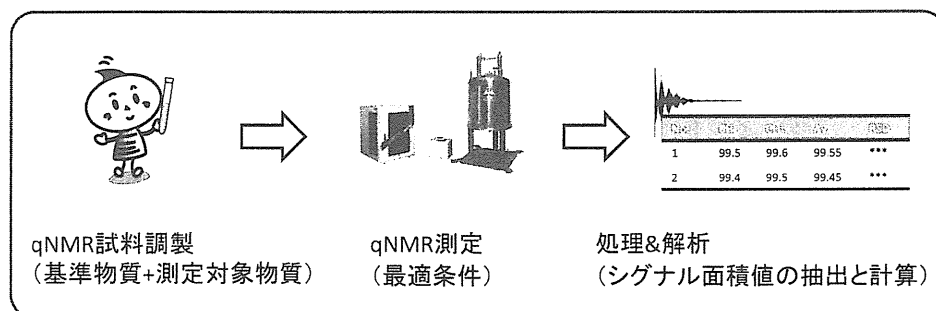


図3. qNMR測定の実際の手順

化されているものに滴定法及び同位体希釈質量分析法があるが、こちらも分析できる物質の量が限られており、一般に分析の迅速性に欠けるとされている。qNMRは「一次標準測定法」のうち、「一次比率法」の資格を原理的に有すると考えられ、上述したように、SIトレーサビリティが確保された基準物質を用いれば、得られた定量値のSIトレーサビリティを確保することが可能である。実際に、qNMRにより得られた定量値はDSCを用いた凝固点降下法等で求めた定量値と不確かさの範囲内で一致し¹⁾、十分な信頼性を有していることが実証されており、加えて他の研究結果からも、「一次標準測定法」として認められる分析技術であることが示されている。

これまで、いくつかの有機化合物が、基準物質の候補として報告されてきたが、測定対象の有機化合物のシグナルが重ならないことや重溶媒に対する溶解性等、測定対象ごとに測定条件を考慮する必要がある点で汎用性が乏しく、これがqNMRの有効利用を妨げる最大の弱点となっていた。近年、日本の国家計量機関である独立行政法人産業技術総合研究所計量標準総合センター(AIST NMIJ)により、DSCを用いて凝固点降下法およびqNMR(NMIJ CRM 4039-a (1,4-ジクロロベンゼン)を基準物質として使用)を用いてSIトレーサブルな値付けをされ、取り扱いの容易な固体化合物として、¹H-NMRで特異的な化学シフトに鋭い1本のピークを示す非水系用の1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン-*d*₄(1,4-BTMSB-*d*₄)および水系用の3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸-*d*₆-ナトリウム塩(DSS-*d*₆)が試薬メーカーから容易に入手可能となった。1,4-BTMSB-*d*₄とDSS-*d*₆は、テトラメチルシラン(TMS)と同様に0 ppm付近にシグナルを示し、通常の測定対象の化合物のシグナルと重なってしまうことがほとんどなく、定量分析だけでなく構造解析用にも使用可能であり、汎用性と利便性に優れた基準物質である。ま

た、NMRメーカーより、2項で述べた最適条件の測定シーケンスと解析ソフトが開発され、現在、qNMRは容易に実施できるようになっている。得られる定量値は高い再現性を示し、不確かさはおおむね1%以内であり、1測定当たりの所要時間は約10~20分である。

国家計量機関によって、SIトレーサブルな測定法を用いて生産された標準物質を国家標準物質という。国家標準物質は、最高の計量性能を持ったものであり、その生産には高度な技術と多大なコストが必要である。わが国の主な有機標準物質のトレーサビリティ体系においてはこの「国家標準物質」を出発点としたクロマトグラフによる同じ物質同士の校正の連鎖によって、実際の現場で利用される実用標準物質のSIトレーサビリティを確保している(図4左)。すなわち、このシステムにおいては、国家標準物質が整備されなければ、実用標準物質を整備することはできない。したがって、市場が要求する実用標準物質を校正するための国家標準物質を速やかに整備することが必要である。しかしながら、これらすべての「国家標準物質」を整備することはコスト面等から到底実現できないのが現状である。このため、試薬メーカーが供給する多くの「標準品」や「試薬」は独自の方法、例えば、比吸光度あるいはクロマトグラム上で観察される主ピークの面積百分率などから純度や含量を品質保証の目的で値付けて「標準品」や「試薬」として供給している。すなわち、現状では、市販の「標準品」や「試薬」の多くは、「国家標準物質」を上位標準とした標準物質供給システムで供給されておらず、SIトレーサビリティの連鎖から外れている。一方、qNMRでは、SIトレーサビリティが確保された1,4-BTMSB-*d*₄およびDSS-*d*₆を上位標準として、qNMRで適切に測定・解析することにより、市販の「標準品」だけでなく、単離精製した天然由来の化合物等をSIトレーサビリティの連鎖の中に置くことができる(図4)。

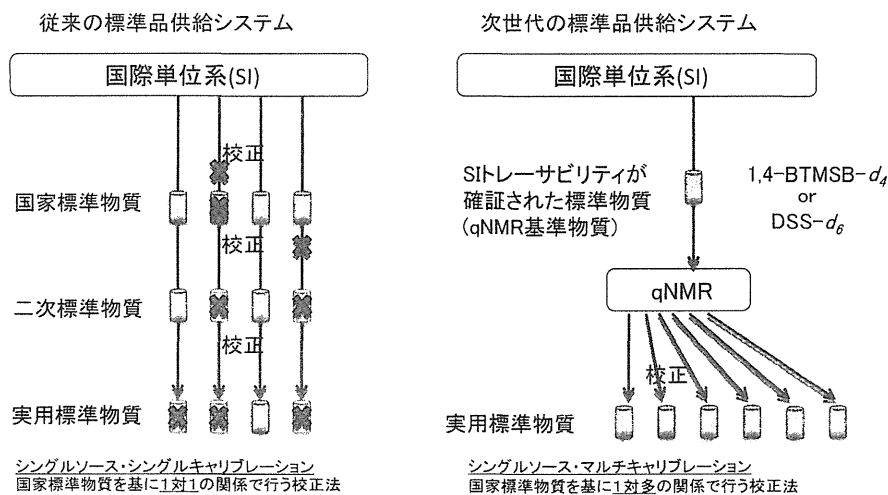


図4. 従来の標準物質供給システムとqNMRによるSIトレーサビリティ体系の再構築

qNMRでは、原理的に1つの上位標準を介した校正により、無限の有機化合物の市販標準品の純度を評価・供給することが可能。

4. 有機化合物の絶対定量への応用

qNMRの応用範囲は非常に広い。qNMRを応用した研究報告が年々増加しているが、ここでは、市販試薬製品等についてSIトレーサブルな純度を求めたqNMRの応用例のみを示す。

残留農薬試験用イソキサチオンオキソン (IXO) 市販標準品2ロットについて絶対純度を求めた結果、ロット1が75.4%、ロット2が98.5%であり、ロット1については試薬メーカーの表示値と大きく異なった。ロット1のqNMRスペクトル上にはIXOのシグナル以外に分解物に由来するいくつかのシグナルが観察され、保存中の分解によって絶対純度の低下が引き起こされたと考えられるものであった³⁾。また、農薬市販試薬41製品について、qNMRにより純度決定したところ、41製品中10製品の純度はメーカー表示値を大きく下回り、仮に、これらを定量用標準品としてクロマトグラフ法により定量値を求めたとき、真値より5~51%の誤差が生じると見積もられた⁴⁾。食品残留農薬のポジティブリスト制度の導入により、国内外で流通する農薬が規制の対象となり、食品の安全性と直結する残留農薬試験には高い分析精度が求められている。qNMRはこれらの残留農薬試験用標準品について絶対純度を付加できるだけでなく、日常的な品質管理に適用可能であり、科学的根拠に基づいた分析値の信頼性の確保にも重要であると言える。

次に、天然有機化合物の純度決定の例を示す。純度値が>70%および>95%とラベル表示されたカルミン酸 (CA) 市販試薬A, Bについて純度を求めたところ、それぞれ21.3%および78.3%であった。CA市販試薬のラベル表示値が、LC法または吸光度法により相対量を値付けただけであり、絶対量を示すものではないことが明らかとなった⁵⁾。また、代表的なフラボノイドであるクエルセチンやルチンの市販試薬各社製品について絶対純度を求めたところ、クエルセチン市販試薬製品については86.0~92.9% (無水物として換算)、ルチン市販試薬製品については71.0~90.2% (無水物として換算) と供給元の試薬メーカーによってその値が大きく異なることが明らかとなった^{6), 7)}。これらの結果は、従来法により求めた天然化合物の純度には問題があり、qNMRがこの問題を根本的に解決する方法として有望であることを示している。

5. 予想される波及効果

あらゆる定量値の精度を確保するため、分析用標品となる標準品や試薬の純度は科学的根拠に基づいて求められるべきである。よって、今後、あらゆる分野でqNMRの応用が開始されることになると考えられる。

日本薬局方に記載される生薬成分の定量用標準品の純度決定への応用が期待されている。現在、生薬および漢方処方エキス中の各条規格では、便宜上その時点で市販されている、あるいは市販可能な試薬について規格を試薬・試液の項で定め、その物質を分析用標品として、生薬および漢方

処方エキス中の指標成分の定量法と定量規格を規定している。しかし、これらの市販試薬の純度は、天然素材より単離精製したものであり、不純物規格や、乾燥減量等が規定されているものの、絶対純度は不明であり、結果として、科学的根拠に基づいた生薬類の規格設定のボトルネックになっている。そこでこの問題を解消すべく、qNMRの応用研究^{11)~13)}、また、その妥当性確認が開始されており¹⁴⁾、一定の評価ルールの下、これらの絶対純度が規格化できることが明らかとなってきている。

また、qNMRを用いた定量法は、新規指定食品添加物「フルジオキソニル」の定量用標準品の規格試験に導入され、また同時に、「国際単位系 (SI) へのトレーサビリティが確保されたDSS- d_6 」が上位標準として食品添加物公定書に記載された¹⁵⁾。これまで、食品添加物公定書に測定対象以外の物質を上位標準とした例はない。上位標準を定量用に採用した英断は、今後の公定法の規格設定や基準の考え方に大きな影響を与えることが予想される。

さらに、標準物質の値付けは、SIへのトレーサビリティ確保の観点より、「一次標準測定法」によって行われることが望ましいことから、市場が要求する多くの標準物質の生産フローにおいて、その値付け法の1つとしてqNMRの採用が期待されている。実際に、試薬メーカーからは、qNMRにより値付けし、SIトレーサビリティが確保された標準物質 (約100種) の供給が既に開始しており、qNMRの有用性や簡便性などの理由からも、今後さらにいろいろな標準物質の拡充が予想される。

6. 最後に

いわゆる試験検査だけでなく、学術的な研究結果に対する再現性、同一性、国際的な整合性は、近年のグローバル化によって、さらに問われることとなるだろう。しかしながら、食品分析化学の分野においては、計量学的に正確に純度が値付けられた有機化合物の標準物質の入手が困難であるがために、その分析結果の信頼性には今なお疑問が持たれ続けているように思えてならない。qNMRを通じた分析・評価結果のSIトレーサビリティの確保は、信頼性向上のための重要な「鍵」となることは間違いないと考えられる。

なお、本稿で述べた内容は、国立医薬品食品衛生研究所と独立行政法人産業技術総合研究所との共同研究「qNMR標準化のための測定法の確立」、「qNMR普及のためのインフラの整備」ならびに「qNMR標準化のための測定プロトコル作成」、さらに、経済産業省プロジェクト「1対多型校正技術の研究開発」において、日本電子株式会社 (現: 株式会社 JEOL RESONANCE)、花王株式会社および和光純薬工業株式会社との共同研究により実施されたものである。また、厚生労働科学研究費補助金により実施された内容の一部を含む。この場を借りて関係諸氏に感謝する。

文 献

- 1) Ihara, T., Saito, T., Sugimoto, N. Expansion of organic reference materials for the analysis of hazardous substances in food and the environment—Realization of an efficient metrological traceability using the quantitative NMR method—. *Synthesiology*, **2**, 13–24 (2009).
- 2) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K. Development of an absolute quantification method for organic compounds using quantitative NMR (qNMR) and Improvement of the reliability of food analysis. *FFI J.*, **215**, 129–136 (2010).
- 3) Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **16**, 28–33 (2009).
- 4) Tahara, M., Sugimoto, N., Ohtsuki, T., Tada, A., Akiyama, H., Goda, Y., Nishimura, T. Determination of the purities of commercial reagent products using qNMR for the ensuring the reliability of quantitative analysis. *J. Environ. Chem.*, **22**, 31–41 (2012).
- 5) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Ito, S., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T. Absolute quantification of carminic acid in Cochineal extract by quantitative NMR. *Food Hyg. Saf. Sci.*, **51**, 19–27 (2010).
- 6) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tahara, M., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, Kawamura, Y., Nishimura, T. Rapid quantification of quercetin in tartary buckwheat noodle by quantitative NMR. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **17**, 179–184 (2010).
- 7) Tada, A., Takahashi, K., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Ishizuki, K., Nishimura, T., Yamazaki, T., Kawamura, Y. Absolute quantitation of quercetin and the glycosides in natural food additives by quantitative NMR. *Food Hyg. Saf. Sci.*, **51**, 205–210 (2010).
- 8) “NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis”, Holzgrabe, U., Wawer, I., Diehl, B. eds., Elsevier, 2008. (ISBN978-0-444-53173-5)
- 9) Maniara, G., Rajamoorthi, K., Rajan, S., Stockton, G. W. Method performance and validation for quantitative analysis by ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy. Applications to analytical standards and agricultural chemicals. *Anal. Chem.*, **70**, 4921–4928 (1998).
- 10) JIS Q 0035, 標準物質—認証のための一般的及び統計的な原則 (2008).
- 11) 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*. *J. Nat. Med.*, **65**, 262–267 (2011).
- 12) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H. Quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* by ^1H -NMR spectrometry. *J. Nat. Med.*, **64**, 161–166 (2010).
- 13) Hosoe, J., Sugimoto, N., Goda, Y. Trial study to determine absolute purities of chemical reagents used as reference standards in the Japanese Pharmacopoeia by using quantitative NMR (qNMR). *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science (PMDRS)*, **41**, 960–970 (2010).
- 14) Hosoe, J., Sugimoto, N., Suematsu, T., Yamada, Y., Hayakawa, M., Katsuhara, T., Nishimura, H., Goda, Y. Validation Studies of qNMR for Chemical Reagents Used as Reference Standards for Quantitative Analyses of Crude Drugs in the Japanese Pharmacopoeia. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science (PMDRS)*, **43**, 182–193 (2012).
- 15) 官報, 号外第191号, 平成23年8月31日.

執筆者のPROFILE

杉本直樹 (Naoki SUGIMOTO)

国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長
金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻博士課程
修了 博士(薬学)
(専門分野) 有機化学, 天然物化学

田原麻衣子 (Maiko TAHARA)

国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 研究員
星薬科大学大学院薬学専攻修士課程修了
博士(薬学)
(専門分野) 分析化学

末松孝子 (Takako SUEMATSU)

株式会社JEOL RESONANCE ソリューション・
マーケティング部 研究員
九州大学大学院工学研究科合成化学専攻博士課程修了
博士(工学)

(専門分野) 有機化学

三浦 亨 (Toru MIURA)

和光純薬工業株式会社 試薬研究所 研究員
明治大学卒業



Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy

Takashi Ohtsuki*, Kyoko Sato, Naoki Sugimoto, Hiroshi Akiyama, Yoko Kawamura

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 November 2011
Received in revised form 24 April 2012
Accepted 26 April 2012
Available online 17 May 2012

Keywords:

Absolute quantification
Food analysis
Processed food
Quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
Sorbic acid

ABSTRACT

An analytical method using solvent extraction and quantitative proton nuclear magnetic resonance (qHNMR) spectroscopy was applied and validated for the absolute quantification of sorbic acid (SA) in processed foods. The proposed method showed good linearity. The recoveries for samples spiked at the maximum usage level specified for food in Japan and at 0.13 g kg^{-1} (beverage: 0.013 g kg^{-1}) were larger than 80%, whereas those for samples spiked at 0.063 g kg^{-1} (beverage: 0.0063 g kg^{-1}) were between 56.9 and 83.5%. The limit of quantification was 0.063 g kg^{-1} for foods (and 0.0063 g kg^{-1} for beverages containing *Lactobacillus* species). Analysis of the SA content of commercial processed foods revealed quantities equal to or greater than those measured using conventional steam-distillation extraction and high-performance liquid chromatography quantification. The proposed method was rapid, simple, accurate, and precise, and provided International System of Units traceability without the need for authentic analyte standards. It could therefore be used as an alternative to the quantification of SA in processed foods using conventional method.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sorbic acid (SA) and its potassium and calcium salts are extensively used as food preservatives to prevent the alteration of foods by microorganisms, as they inhibit the growth of fungi, yeasts, molds, and bacteria [1–3]. The toxicology of these compounds has been studied and they are classified as generally recognized as safe in the US [4]. For these reasons, they have been the leading preservatives in the global food sector over the past 30 years [5–7]. The acceptable daily intake value for SA and sorbate salts is 25 mg kg^{-1} body weight, accessed by the Joint US Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives [8]. The Codex Committee has set maximum usage levels of these preservatives for specific foods, and many countries regulate them according to specific legislation. However, a reliable analytical method is required to determine their levels in processed foods and to ensure that they remain within permitted ranges.

Several analytical methods, including high-performance liquid chromatography (HPLC) [9–13], gas chromatography [1,14–16], thin-layer chromatography [17], and capillary electrophoresis [18,19], have been developed for the determination of SA in various processed foods. These methods require complicated and time-consuming pre-treatments to extract and/or clean-up SA from

processed foods, such as steam distillation [9,10,18], liquid extraction [12,16,17], solid-phase extraction [11,13,15,19], headspace solid-phase micro extraction [14], and headspace liquid-phase micro extraction [1]. In addition, for accurate relative quantification, the methods require the use of an authentic standard, such as a certified reference material (CRM), which might be difficult to obtain and can be of questionable accuracy.

Quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy can analyze the absolute concentration of a substance without the need to use a reference material to quantify the analyte itself [20]. This method has additional advantages in terms of simple sample preparation, reduced sample consumption, rapid measurement, provisional qualification data, involved structural information, and non-destructive analysis [21–23]. Quantitative proton NMR (qHNMR) is the most commonly used approach because of its high sensitivity and the widespread presence of this hydrogen isotope in organic molecules, although most other NMR active nuclei can also be employed.

In qHNMR, the concentration of the analyte is obtained using the ratio between the area of a specific signal of the analyte and that of an accurate internal standard (IS). The intensities of a given NMR resonance are directly proportional to the molar concentrations of the analyte and the IS, respectively. qHNMR development has recently been accelerated because of substantial increases in the sensitivity of high-field NMR spectrometers, and the establishment of accurate and precise data-processing and data-evaluation methods [21]. qHNMR has consequently been used to study the

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9403; fax: +81 3 3700 9403.
E-mail address: ohtsuki@nihs.go.jp (T. Ohtsuki).

quantities of crude samples such as metabolites in urine or serum [24,25], naturally occurring compounds in medicinal plants [26,27], and organic compounds in pharmaceutical samples [28]. These studies have also used qHNMR to analyze beverages, including the quantification of organic and amino acids in beer [29], (–)-epicatechin [30] and formic acid in apple cider [31], malic and citric acids in fruit juices [32], methanol in a traditional Cypriot spirit [33], and organic compounds in vinegars [34] and wine [35].

In 2009, Saito et al. reported that using an International System of Units (SI)-traceable reference material as an IS could improve the measurement accuracy of qHNMR [20]. Accordingly, we proposed that qHNMR and an SI-traceable reference material could be used to determine the absolute content of quercetin in tartary buckwheat noodle [36]. However, there have been no reports for application of qHNMR with SI-traceability in processed foods such as cheese, sausage, jam, and miso paste.

In this study, we demonstrated about application and validation of the absolute quantification method of SA in processed foods using solvent extraction and qHNMR. We also demonstrated that the proposed method was simple, rapid, selective, accurate, and precise compared with conventional method using steam distillation and HPLC.

2. Materials and methods

2.1. Processed food samples

Eleven processed foods without SA (cheese, fish paste, sausage, dried cuttlefish, syrup, vegetables pickled in soybean sauce, jam, miso paste, noodle soup, ketchup, and a beverage containing *Lactobacillus* species) and six processed foods with SA (cheese, fish paste, sausage, dried cuttlefish, syrup, and jam) were purchased at markets in Tokyo, Japan.

2.2. Chemicals and reagents

All reagents were purchased from Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan), were of HPLC or analytical grade, and were used without further purification. SA standard and dimethyl sulfoxide (DMSO)- d_6 were purchased from Kanto Chemical Co. Inc. 2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- d_6 sodium salt (DSS- d_6) was obtained from ISOTEC (Miamisburg, OH). Diethyl phthalate (DEP) (NMIJ CRM 4022-b, purity: 99.74 ± 0.09%), which was the CRM standard, was purchased from the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba, Japan).

2.3. Instruments

The qHNMR spectrum was recorded on JEOL JNM ECA 600 spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). HPLC was performed on a Shimadzu HPLC system (LC-10A) equipped with an SPD-M10Avp diode array detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.4. Sample preparation and extraction

2.4.1. Solvent extraction

The solid samples (cheese, fish paste, sausage, and dried cuttlefish) were cut into small pieces before weighing. With the exception of the beverage containing *Lactobacillus* species, 5 g of each food was accurately weighed in glass centrifuge tubes. Saturated sodium chloride solution (20 mL), 10% sulfuric acid solution (10 mL), and diethyl ether (20 mL) were added, and the tubes were subjected to high-speed homogenization for approximately 1 min. The homogenate was centrifuged at 1500 × g for 5 min, and the upper layer was transferred into a clean flask. The residue was homogenized with 20 mL diethyl ether and centrifuged at 1500 × g

for 5 min. The upper-layer solution was again transferred into a clean flask, and then dried for 2 min to yield the extract for qHNMR analysis.

For cheese and sausage samples, 10 mL methanol was added to the extract to remove oil components. Subsequently, the methanol layer was evaporated to obtain the defatted extract for qHNMR analysis.

For the beverage containing *Lactobacillus* species, the quantities were modified as follows: 50 g of sample, 40 mL of saturated sodium chloride solution, 10 mL of 10% sulfuric acid solution, and 40 mL of diethyl ether.

2.4.2. Steam distillation

A 5 g sample was weighed into a 1 L distillation flask, and 100 mL ultrapure water, 10 mL of 15% (w/v) tartaric acid solution and 60 g sodium chloride were added. The mixture was distilled at a flow rate of 10 mL min⁻¹. When the volume in the flask reached approximately 490 mL, the distillate was transferred to a volumetric flask, and adjusted to 500 mL by adding ultra-pure water. The final solution was filtered with a 0.45 μm syringe filter and used for HPLC analysis.

2.5. qHNMR analysis

2.5.1. Preparation of stock solution and determination of DSS- d_6 concentration

DSS- d_6 (16.92 mg) was dissolved in 100 g DMSO- d_6 as the stock solution. The concentration of DSS- d_6 in the stock solution was accurately determined by qHNMR analysis using DEP as the CRM standard. DEP (10 mg) was accurately weighed and dissolved in 1 g stock solution. Approximately 600 μL of the solution was then introduced into an NMR tube with a 5 mm outer diameter (Kanto Chemical Co., Inc.) and subjected to qHNMR analysis, which enables to measure, automatically. The DSS- d_6 concentration in the stock solution was calculated using the ratio of the signal integral at δ_H 0 (DSS- d_6) to that at δ_H 4.29 (DEP). The concentration of DSS- d_6 was 0.1560 mg g⁻¹ according to the following equation (formula 1):

$$\text{Concentration (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{M_{\text{DSS}} \times I_{\text{DSS}} \times H_{\text{DEP}} \times W_{\text{DEP}} \times P_{\text{DEP}}}{H_{\text{DSS}} \times M_{\text{DEP}} \times I_{\text{DEP}} \times 100}$$

Here M_{DSS} and M_{DEP} are the molecular weights of DSS- d_6 and DEP, I_{DSS} and I_{DEP} are the signal integral values of DSS- d_6 and DEP, H_{DSS} and H_{DEP} are the numbers of protons of signal from DSS- d_6 and DEP, W_{DEP} is the concentration of DEP (mg g⁻¹), and P_{DEP} is the purity of DEP (99.74%).

2.5.2. qHNMR analysis of SA standard

A 12 mg sample of the SA standard was accurately weighed, dissolved in 1 g stock solution, and subjected to qHNMR analysis as described in Section 2.5.1. The purity of the SA standard was calculated using the following equation (formula 2):

$$\text{Purity (\%)} = \frac{I_{\text{SA}} \times H_{\text{DSS}} \times M_{\text{SA}} \times C_{\text{DSS}} \times 100}{H_{\text{SA}} \times I_{\text{DSS}} \times C_{\text{SA}} \times M_{\text{DSS}}}$$

Here I_{SA} and I_{DSS} are the signal integral values of SA and DSS- d_6 , H_{SA} and H_{DSS} are the numbers of protons of signal from SA and DSS- d_6 , M_{SA} and M_{DSS} are the molecular weights of SA and DSS- d_6 , C_{SA} is the concentration of SA (10 mg g⁻¹), and C_{DSS} is the DSS- d_6 concentration in the stock solution (0.1560 mg g⁻¹).

2.5.3. qHNMR analysis of SA in processed foods

The sample obtained from solvent extraction was dissolved in 1 g stock solution and subjected to qHNMR analysis as described

above. The SA content of the food sample was calculated using the following equation (formula 3):

$$\text{Content (g kg}^{-1}\text{)} = \frac{I_{\text{SA}} \times H_{\text{DSS}} \times M_{\text{SA}} \times C_{\text{DSS}}}{H_{\text{SA}} \times I_{\text{DSS}} \times W_{\text{FD}} \times M_{\text{DSS}}}$$

Here W_{FD} is the concentration of the food sample by weight (g g^{-1} ; 5 or 50 g food sample/1 g stock solution).

2.5.4. qHNMR measurement parameters

qHNMR was carried out with the following optimized parameters: irradiation frequency, 600 MHz; probe temperature, 25 °C; spinning, off; number of scans, 8; spectral width, 20 ppm; auto filter, on (eight times); acquisition time, 4 s; relaxation delay, 60 s; pulse angle, 90°; pulse width, 12.2 μs ; free induction decay (FID) data points, 64k; and ^{13}C decoupling, multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8). The data were processed with JEOL Alice 2 for qNMR software. The signal integral was used for quantitative analysis. The chemical shift of all data was referenced to the DSS- d_6 resonance at 0 ppm.

2.6. HPLC analysis

The extracted sample solution obtained from steam distillation was subjected to HPLC analysis on an L-column2 octadecyl silane column (4.6 mm \times 250 mm; Chemical Evaluation and Research Institute, Saitama, Japan) at 40 °C and a flow rate of 1.0 mL min^{-1} using MeOH–H₂O–200 mM phosphate buffer (pH 4.0) mixed solvents (36:59:5) as the mobile phase at 260 nm. The content of SA in the food sample was calculated from the following equation (formula 4):

$$\text{Content (g kg}^{-1}\text{)} = \frac{C \times V}{1000 \times W}$$

Here C is the content of SA in the sample extract solution, V is the volume of sample extract solution, and W is the weight of the sample (g).

2.7. Neutralization titration

Before titration, ethanol was neutralized by adding 0.8% (w/v) sodium hydroxide solution and several drops of phenolphthalein solution (1% in ethanol). SA standard (250 mg) was accurately weighed and dissolved in 25 mL neutralized ethanol. Subsequently, the obtained solution was titrated with 0.1 mol L^{-1} sodium hydroxide solution (factor: 1.003 at 20 °C) after the addition of a few drops of phenolphthalein solution. In this titration, 1 mL of 0.1 mol L^{-1} sodium hydroxide is used to neutralize 11.21 mg of SA. Therefore, the purity of the SA standard was calculated using the following equation (formula 5):

$$\text{Purity (\%)} = \frac{11.21 \times F \times V \times 100}{W}$$

Here F is the factor of sodium hydroxide (1.003), V is the volume of sodium hydroxide solution dropped into the sample solution, and W is the weight of SA (mg).

3. Results and discussion

3.1. qHNMR measurement of SA standard

To determine whether qHNMR could be used for quantification of the SA content in the processed foods, the SA standard was subjected to it and we analyzed the resolution of each individual signal on the ^1H NMR spectrum. As shown in Fig. 1, the ^1H NMR spectrum demonstrated characteristic proton signals: one doublet signal of methyl proton at δ_{H} 1.84 integrating for three protons (H-1

Table 1

Purity of SA standard determined by qHNMR.

Signal (δ , ppm)	Number of proton	Integral value ^a	Purity (%) ^b
1.84	3	451.1	99.2 \pm 0.3
5.79	1	150.5	99.3 \pm 0.3
6.26	2	302.2	99.7 \pm 0.3
7.18	1	150.0	99.0 \pm 0.3
12.2	1	139.6	92.1 \pm 0.6

^a Values represent the mean of three independent experiments.

^b Values represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

position); one doublet signal of olefinic methine proton at δ_{H} 5.79 integrating for one proton (H-5 position); overlapped signal of each olefinic methine proton at H-2 and H-3 at δ_{H} 6.26 integrating for two protons; one double doublet signal of olefinic methine proton at δ_{H} 7.18 integrating for one proton (H-4 position); and one broad singlet of carboxyl proton at δ_{H} 12.2 integrating for one proton. The absolute purity of SA was calibrated from the ratio of the signal integral values (signal area values) of each signal to that of DSS- d_6 . As shown in Table 1, the purities of SA calculated from the three signals (δ_{H} 1.84, 5.79, and 7.18) were similar; however, those calculated from signals at δ_{H} 6.26 and 12.2 deviated from these three signals.

It is generally believed that a desirable signal for qHNMR quantification is well resolved from other intra-molecular signals and not subjected to exchangeable protons such as hydroxyl groups or nitrogen-bearing protons [37]. Moreover, accurate quantification requires a good signal shape and low multiplicity of signal. On this basis, we confirmed that the three signals observed at δ_{H} 1.84, 5.79, and 7.18 were suitable for SA quantification by qHNMR.

To determine the linearity and the measuring range of the three signals, we prepared SA standards at eight different concentrations including 0.077, 0.16, 0.32, 0.63, 1.3, 2.5, 5.0, and 50 mg g^{-1} and plotted the ratio of the integral value of each individual signal to that of DSS- d_6 versus the SA concentration. In all calibration curves, good linearity was obtained in the range of 0.077–50 mg g^{-1} for the δ_{H} 1.84 signal and 0.32–50 mg g^{-1} for the other two signals (Fig. 2). The correlation coefficients of all calibration curves were equal to 0.9999.

3.2. Comparison of qHNMR and neutral titration methods

Next, we compared the purity of SA obtained by qHNMR and neutral titration methods, to evaluate the precision of absolute quantification by the former. As shown in Table 2, the purities were 99.2 \pm 0.3% and 99.4 \pm 0.1% (mean \pm standard deviation) from qHNMR and neutral titration, respectively, indicating that both methods showed similar accuracy and precision for the absolute quantification of SA.

3.3. Pre-treatment method of processed foods

Steam distillation is a conventional pre-treatment method for the quantification of SA in processed foods. However, water in the

Table 2

Comparison of purities determined by qHNMR and neutralization titration methods.

	Purity (%)
qHNMR	99.2 \pm 0.3 ^a
Neutralization titration	99.4 \pm 0.1 ^b

^a Values represent the mean \pm standard deviation of purities obtained from three signals (δ_{H} 1.86, 5.79, and 7.18).

^b Values represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

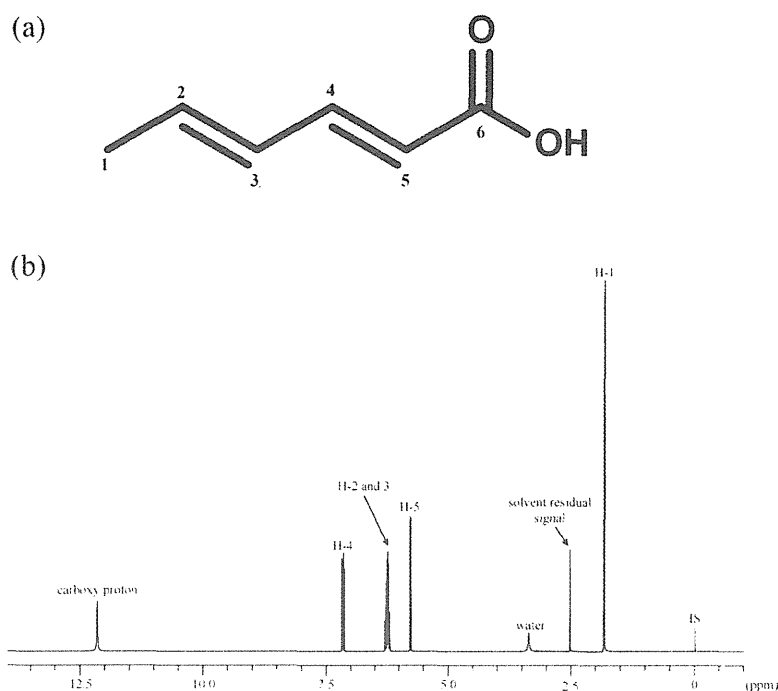


Fig. 1. Chemical structure of SA (a) and ^1H NMR spectrum of SA standard in $\text{DMSO}-d_6$ containing $\text{DSS}-d_6$ (b). IS, internal standard ($\text{DSS}-d_6$).

obtained distillation solution degrades the quality of ^1H NMR spectra resulting in a low spectrum resolution and an overlap of signals between water and samples. In addition, the complete evaporation of water from this solution *in vacuo* is a time-consuming process. To avoid these problems, we modified the previously reported solvent extraction method with diethyl ether [16] and used it as a pre-treatment. SA is quite soluble in diethyl ether. Diethyl ether does not also mix with water. Therefore, we estimated that diethyl ether is the best extraction solvent and the proposed pre-treatment give low intensity of interference water signal following qHNMR analysis. In addition, this pre-treatment is unnecessary in multi-step purifications, because the SA content of processed foods can be readily quantified if the SA signals on the ^1H NMR spectrum are sufficiently separated from interference signals. Moreover, the number of extraction cycle was optimized two cycles, which could be efficiency extraction of SA in processed food and save the solvent and pre-treatment time. Therefore, we estimated that the proposed pre-treatment is simple and rapid compared with steam distillation.

3.4. Recovery test

We investigated whether the proposed method, combined with solvent extraction and qHNMR, could be used to quantify SA in processed foods. To assess intra-day accuracy and precision, we performed the recovery tests at three different concentrations for 11 foods that are permitted to contain SA in Japan. Fig. 3 shows the ^1H NMR spectra of SA-spiked sample extracts and blank sample extracts. It is necessary that the overlapped signal for quantification should not overlap the other signals including those from other ingredients in processed foods, and that the quantification signal should show larger intensity and lower multiplicity than other SA signals.

Although the signal at δ_{H} 1.84 had a lower signal multiplicity and larger signal intensity than the other two signals (δ_{H} 5.79 and 7.18), whole and/or partial overlap of signals between it and other ingredients was observed in some processed foods. These overlap signals would particularly affect the accurate quantification at low concentrations of spiked SA. Therefore, the SA content of nine of

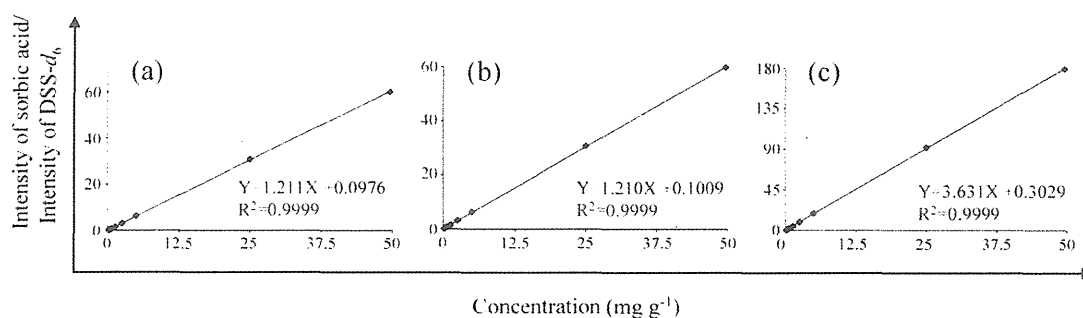


Fig. 2. Relationship between SA concentration and ratio of the integral of SA: $\text{DSS}-d_6$ signals. (a) δ_{H} 7.18, (b) δ_{H} 5.79, (c) δ_{H} 1.84.

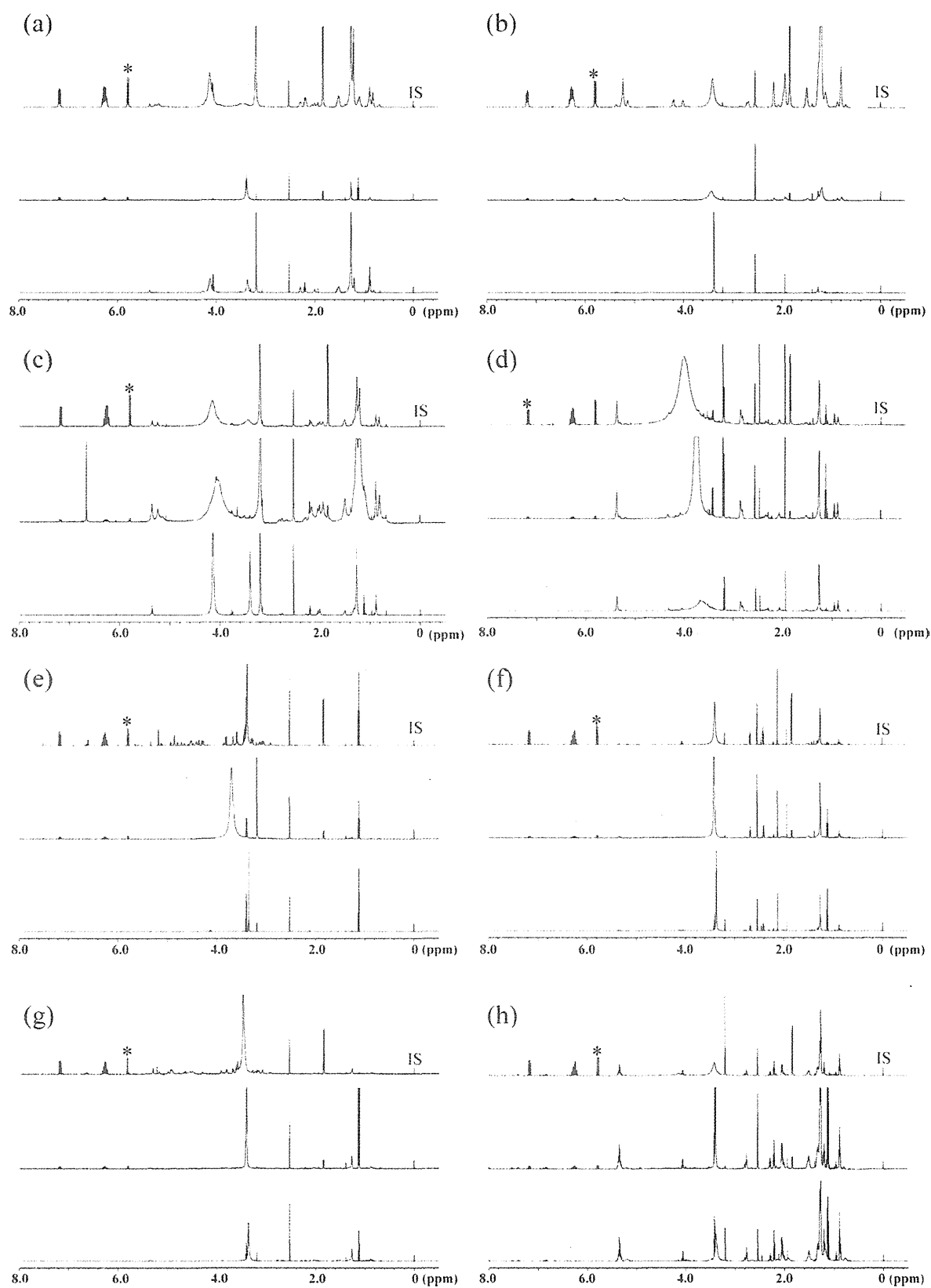


Fig. 3. ^1H NMR spectra (0–8 ppm) of each sample solution spiked with SA at the maximum usage level of each processed food (upper), at 0.13 g kg^{-1} (beverage containing *Lactobacillus* species, 0.013 g kg^{-1}) (middle), and blank (lower). (a) Cheese. (b) Fish paste. (c) Sausage. (d) Dried cuttlefish. (e) Syrup. (f) Vegetables pickled in soybean sauce. (g) Jam. (h) Soybean paste. (i) Noodle soup. (j) Ketchup. (k) Beverage containing *Lactobacillus* species. Signals marked with asterisks were used for quantification and the recoveries were calculated. IS, internal standard (DSS-d_6).

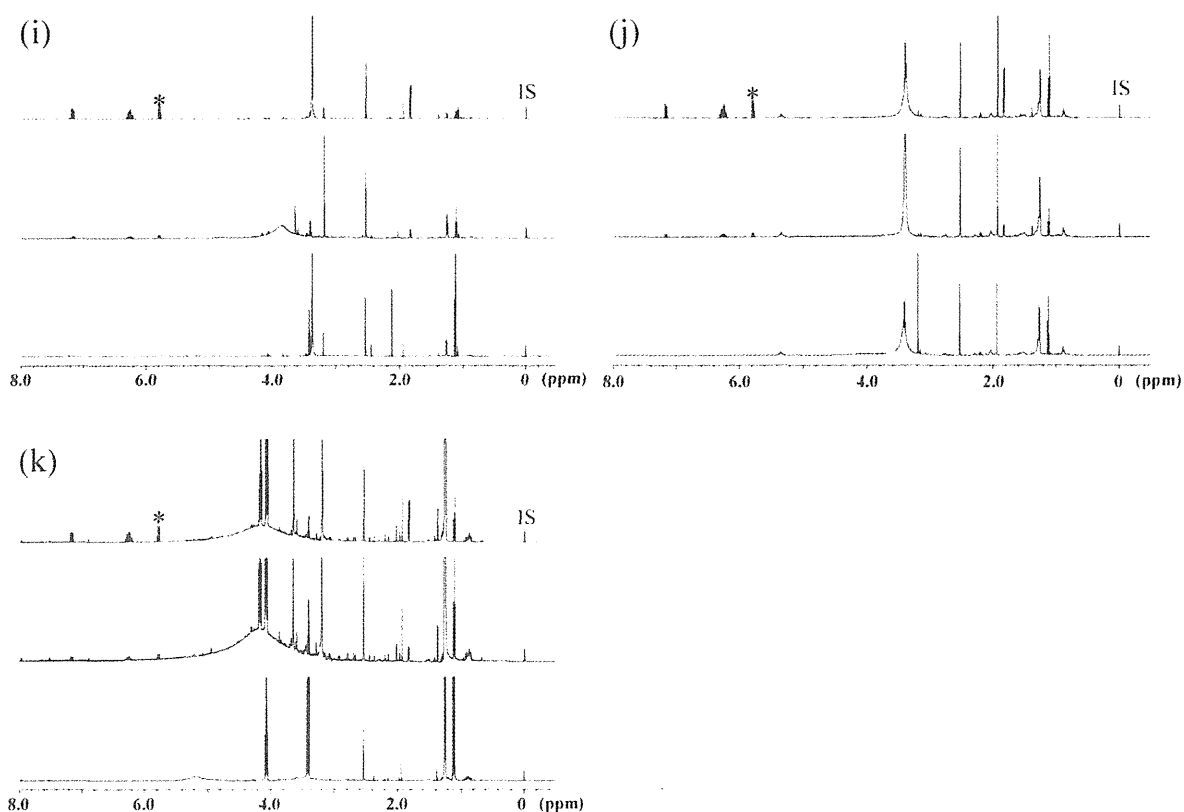


Fig. 3. (Continued)

the 11 processed foods, excluding dried cuttlefish and the beverage containing *Lactobacillus* species, was determined from the signal at δ_H 5.79, which showed relatively low multiplicity. By contrast, the SA quantities in dried cuttlefish and the beverage containing *Lactobacillus* species were determined from the signal at δ_H 7.18 because increased baseline distortion was observed in the signal at δ_H 5.79.

As shown in Table 3, the recoveries of samples spiked at the maximum usage level ranged from 89.1 to 100.2%, and the relative standard deviation (RSD) values ranged from 0.5 to 3.1%. At a concentration of 0.13 g kg^{-1} (beverage, 0.013 g kg^{-1}), the recoveries were larger than 80% with an RSD of 0.6–6.8%. At 0.063 g kg^{-1} (beverage, 0.0063 g kg^{-1}), the recoveries were 56.9–83.5% with an RSD of 0.2–8.9%, which were lower than those at the other two concentrations tested. On the basis of these results and the linearity of

the quantification signal, we conclude that this method efficiently quantifies SA in processed foods at concentrations greater than 0.063 g kg^{-1} (beverage, 0.0063 g kg^{-1}), which can be taken as the limit of quantification. As the maximum levels of SA permissible in processed foods in Japan are $0.050\text{--}3.0 \text{ g kg}^{-1}$, this method would be effective in 2.2–12.5% of the maximum allowed concentrations.

3.5. Inter-day precision

To investigate the inter-day precision and accuracy of the proposed method, we performed recovery tests on five different days using two concentrations: the maximum usage level of each processed food and 0.13 g kg^{-1} . We selected two food samples (sausage and noodle soup), and prepared them for the inter-day precision test using an extraction method with and without a degreasing step.

Table 3
Recoveries of SA from processed foods.

Sample	0.063 g kg^{-1} spiked (0.0063 g kg^{-1} spiked) ^a		0.13 g kg^{-1} spiked (0.013 g kg^{-1} spiked) ^a		Maximum usage level spiked		
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Level (g kg^{-1})	Recovery (%)	RSD (%)
Cheese	56.9	2.4	98.8	1.6	3.0	97.1	3.1
Fish paste	61.7	8.9	84.4	4.0	2.0	100.2	0.5
Sausage	61.2	4.5	81.1	4.3	2.0	89.1	2.1
Dried cuttlefish	60.1	5.8	99.7	0.6	1.5	94.5	0.8
Syrup	83.5	5.9	96.2	1.8	1.0	99.5	0.9
Vegetable pickled in soybean sauce	59.7	1.2	80.3	1.0	1.0	99.6	0.5
Jam	65.3	8.9	98.9	2.8	1.0	99.2	0.8
Soybean paste	75.0	0.2	90.5	6.7	1.0	92.8	2.3
Noodle soup	78.5	2.9	86.3	4.6	0.50	97.7	0.7
Ketchup	79.5	1.2	93.5	6.8	0.50	98.7	1.2
Beverage containing <i>Lactobacillus</i> species	71.2	3.4	86.4	2.0	0.050	93.3	3.0

Each recovery value represents the mean of three independent experiments on the same day. RSD, intra-day relative standard deviation.

^a Beverage containing *Lactobacillus* species.

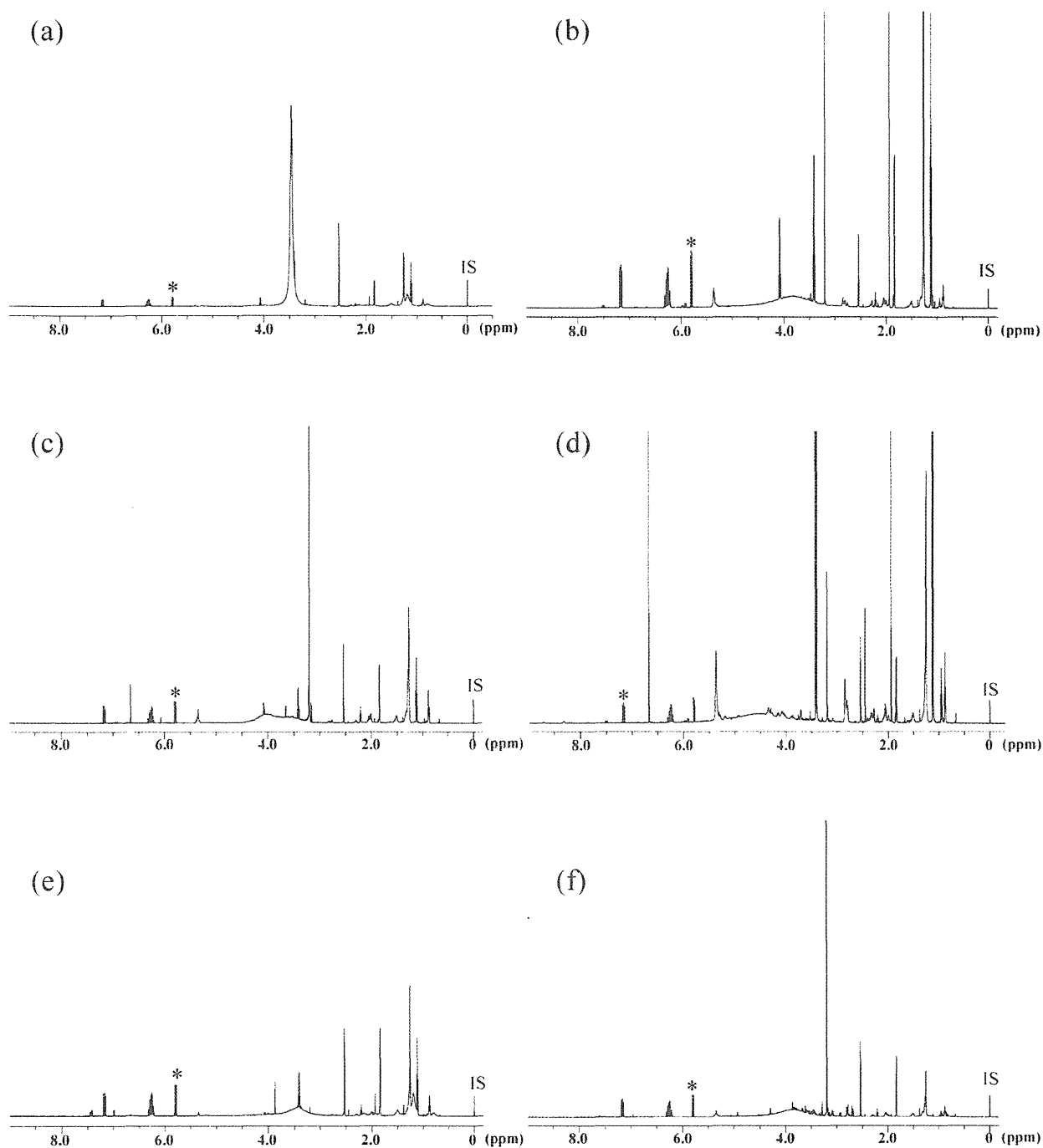


Fig. 4. ^1H NMR spectra of each sample solution from commercially produced food with SA. (a) Cheese. (b) Fish paste. (c) Sausage. (d) Dried cuttlefish. (e) Syrup. (f) Jam. Signals marked with asterisks were used for quantification and the contents were calculated. IS, internal standard ($\text{DSS-}d_6$).

Precise inter-day data were obtained from both spiked samples, for which the RSD ranged from 3.6 to 6.9% (Table 4). The recovery ranged from 81.3 to 91.7%, indicating that this method is both highly reliable and reproducible.

3.6. Determination of SA contents in processed foods

To investigate the applicability of the proposed method, we used it to examine the SA content of six commercial processed foods containing SA as a food additive, and compared the results with those obtained using steam distillation extraction and HPLC

quantification analysis. As shown in Fig. 4, the signals at δ_{H} 7.18 for dried cuttlefish and at δ_{H} 5.79 for five other foods (cheese, fish paste, sausage, syrup, and jam) were clearly separated from those signals derived from impurities in qHNMR analysis, and so could be used to determine the SA content of processed food.

As shown in Table 5, the results of the proposed method of SA content were in good agreement with those of the conventional method for five of the processed foods (cheese, fish paste, sausage, syrup, and jam), but not for dried cuttlefish. The observed differences were less than 10%, indicating that the proposed method was useful for determining the SA content directly in these