

图 8. PVP30 (ATR 法)

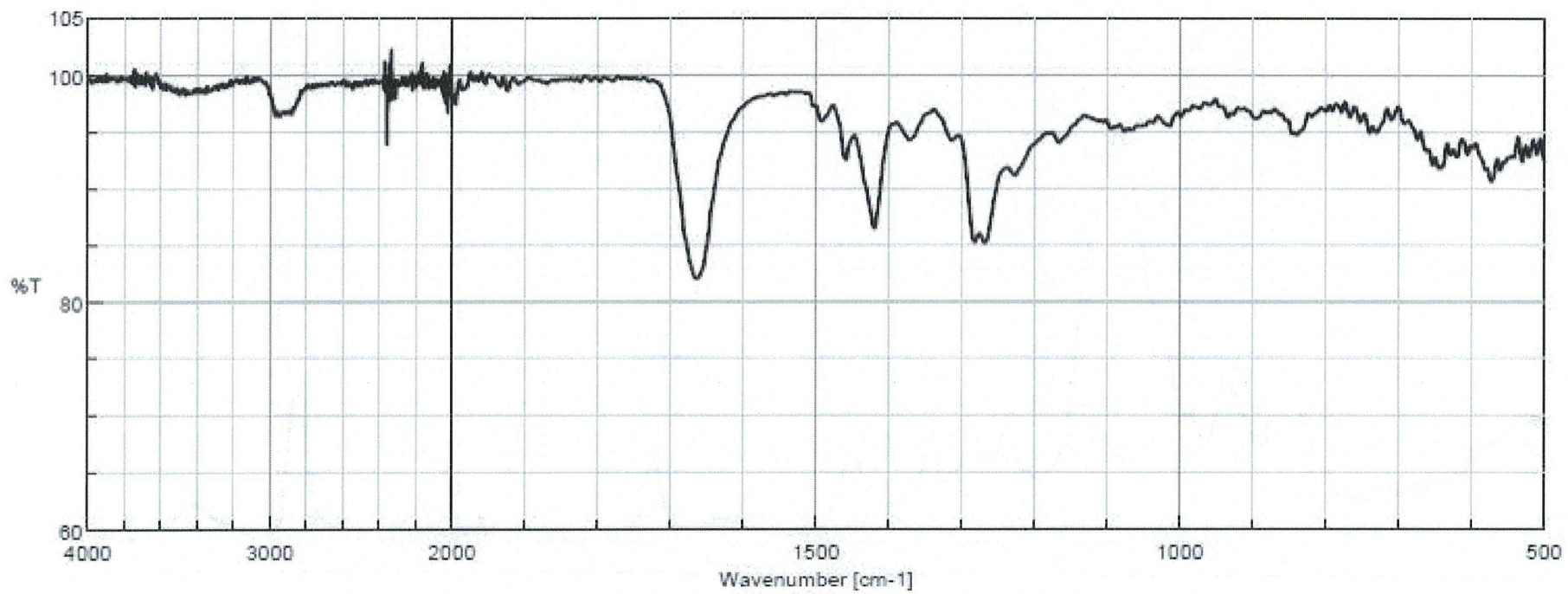


図 9. PVP90 (ATR 法)

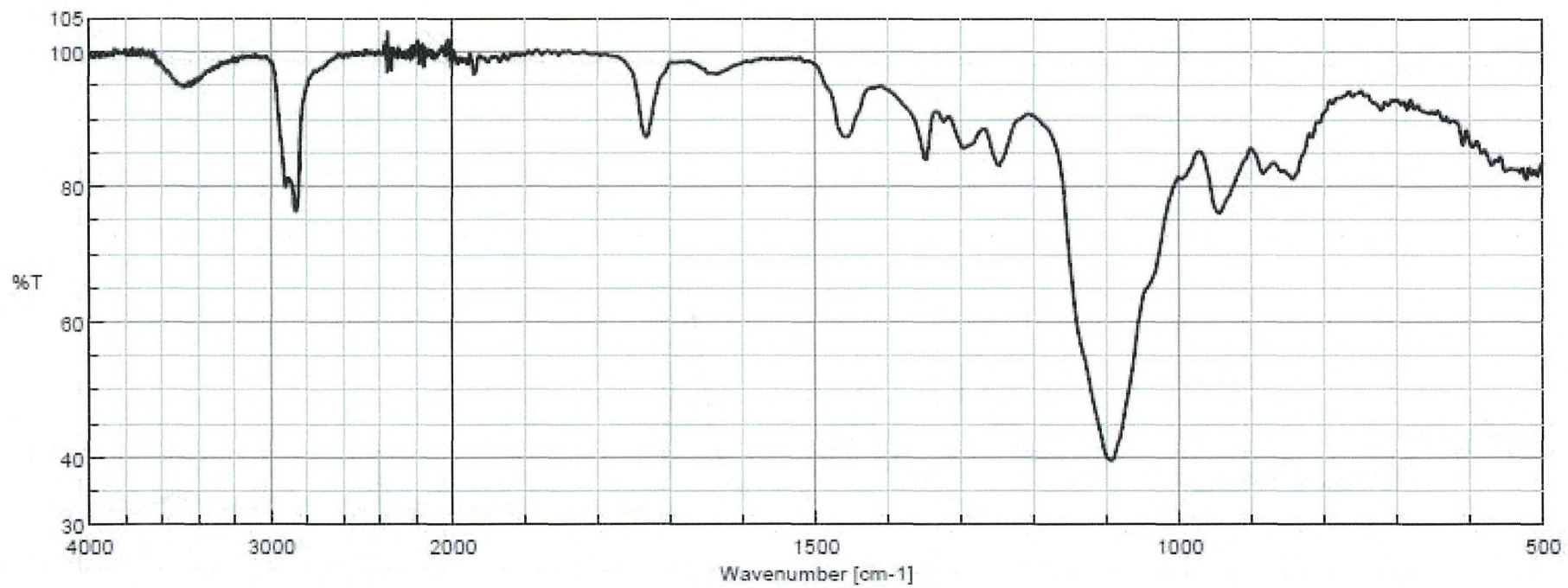


図 10. ポリソルベート 20 液状 (ATR 法)

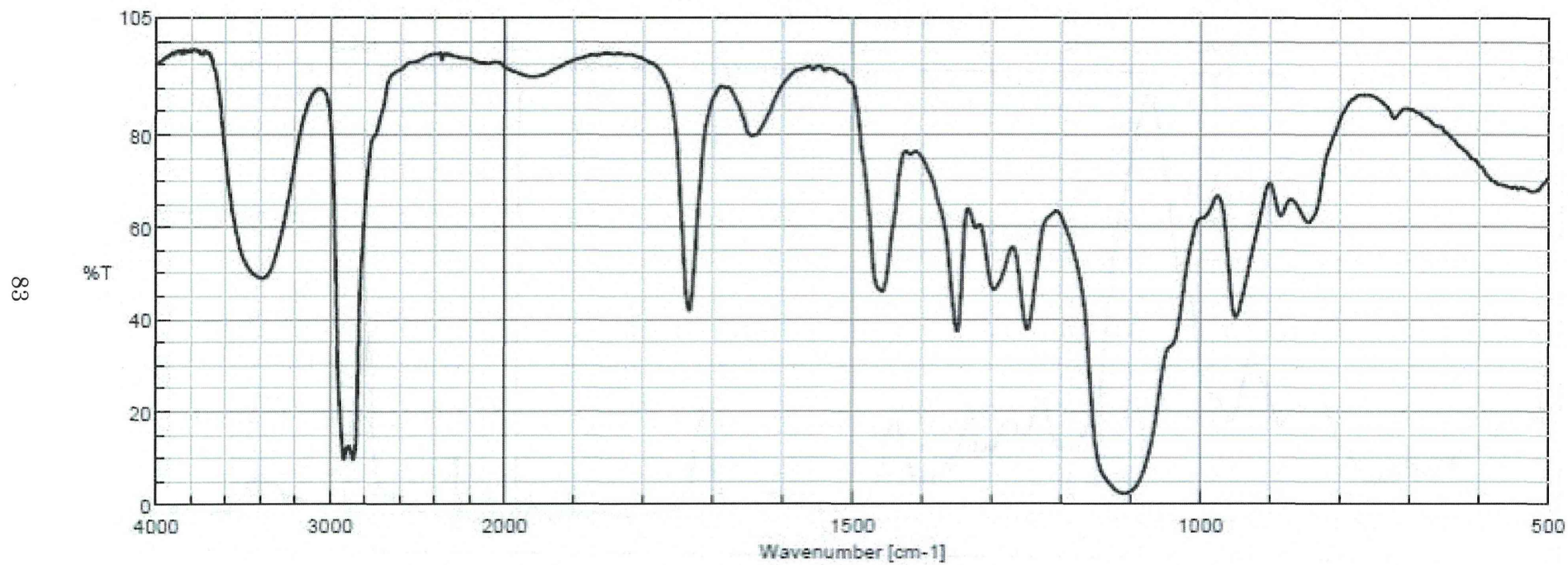


図 11. ポリソルベート 20 (液膜法)

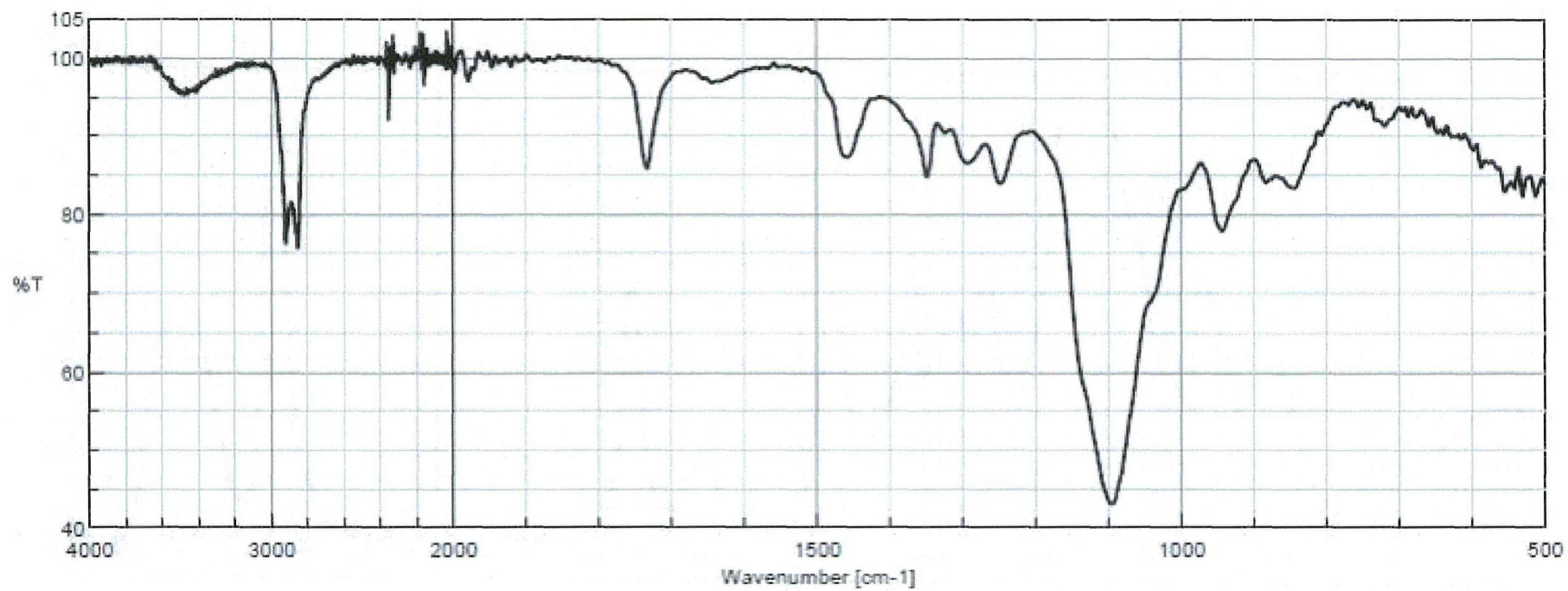


図 12. ポリソルベート 60 液状 (ATR 法)

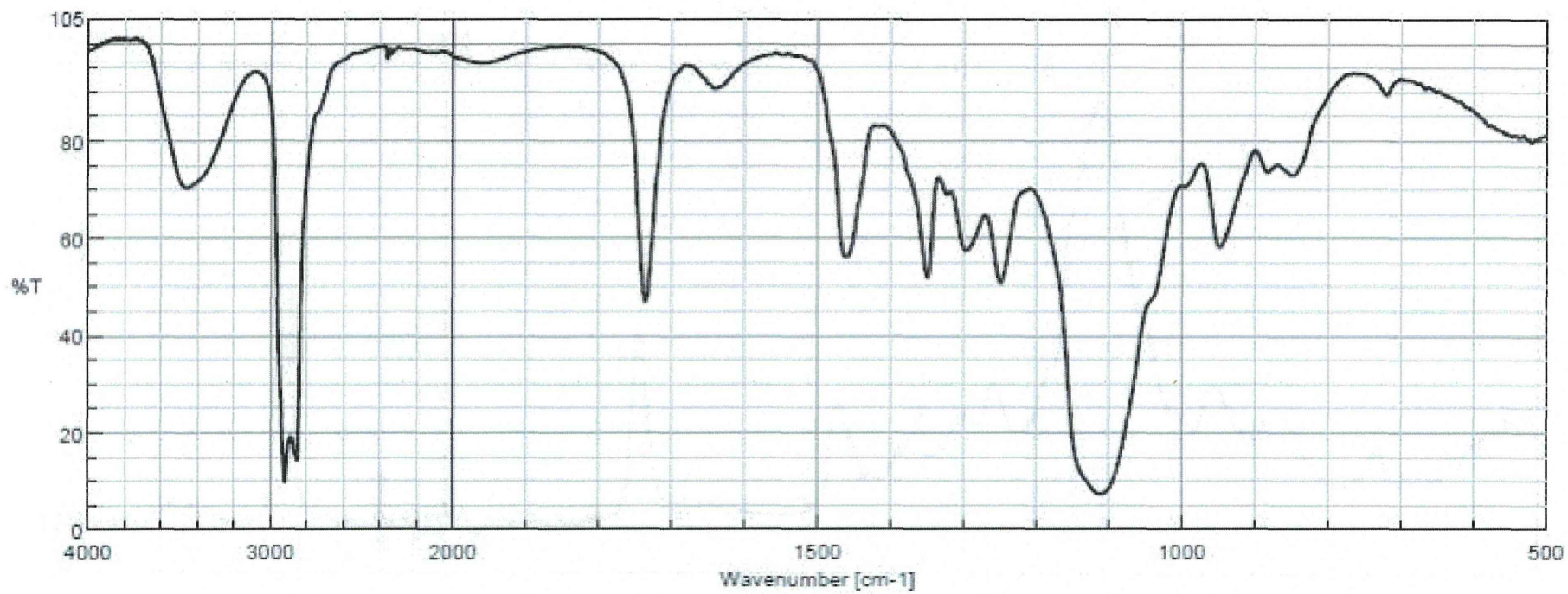


図 13. ポリソルベート 60 (液膜法)

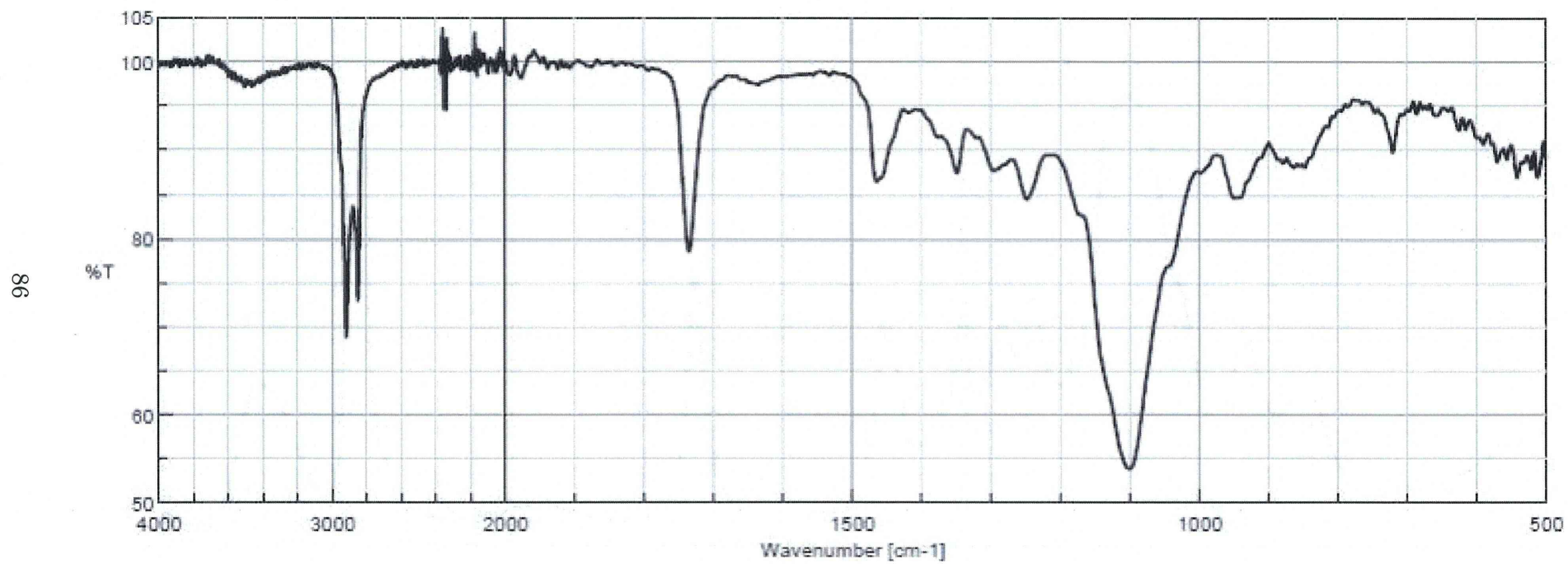


図 14. ポリソルベート 65 液状 (ATR 法)

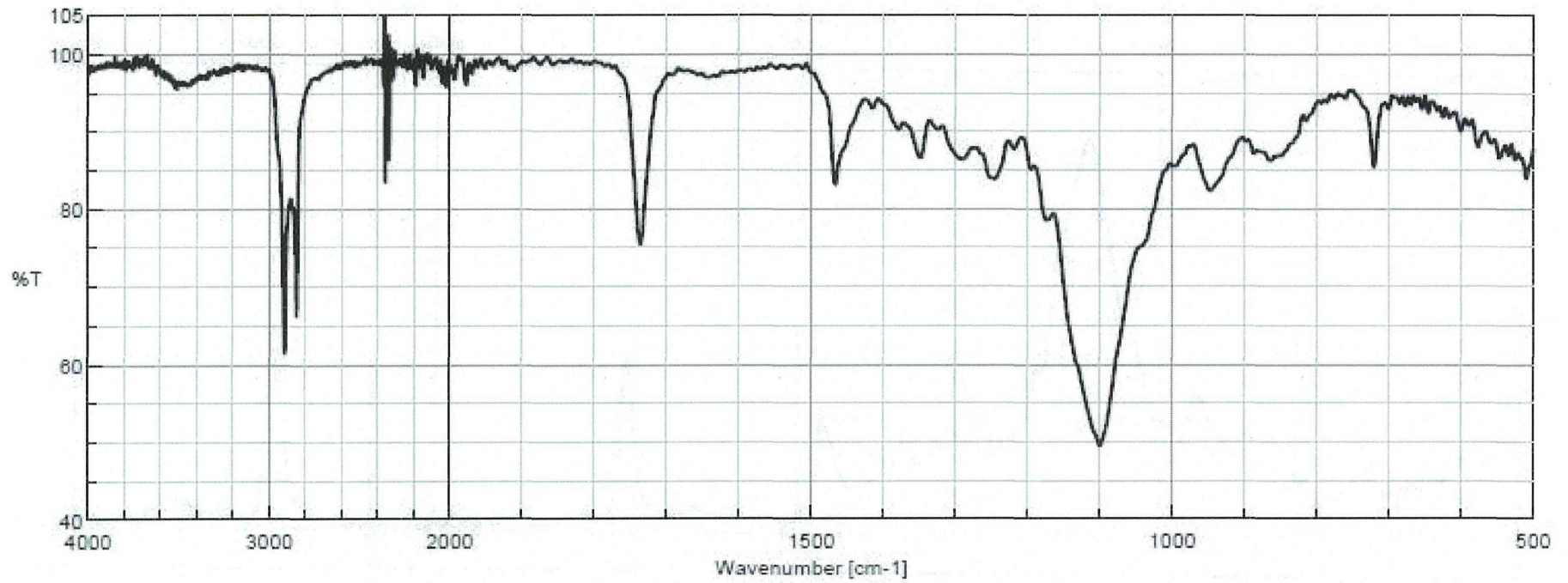


図 15. ポリソルベート 65 プリズム上で固化 (ATR 法)

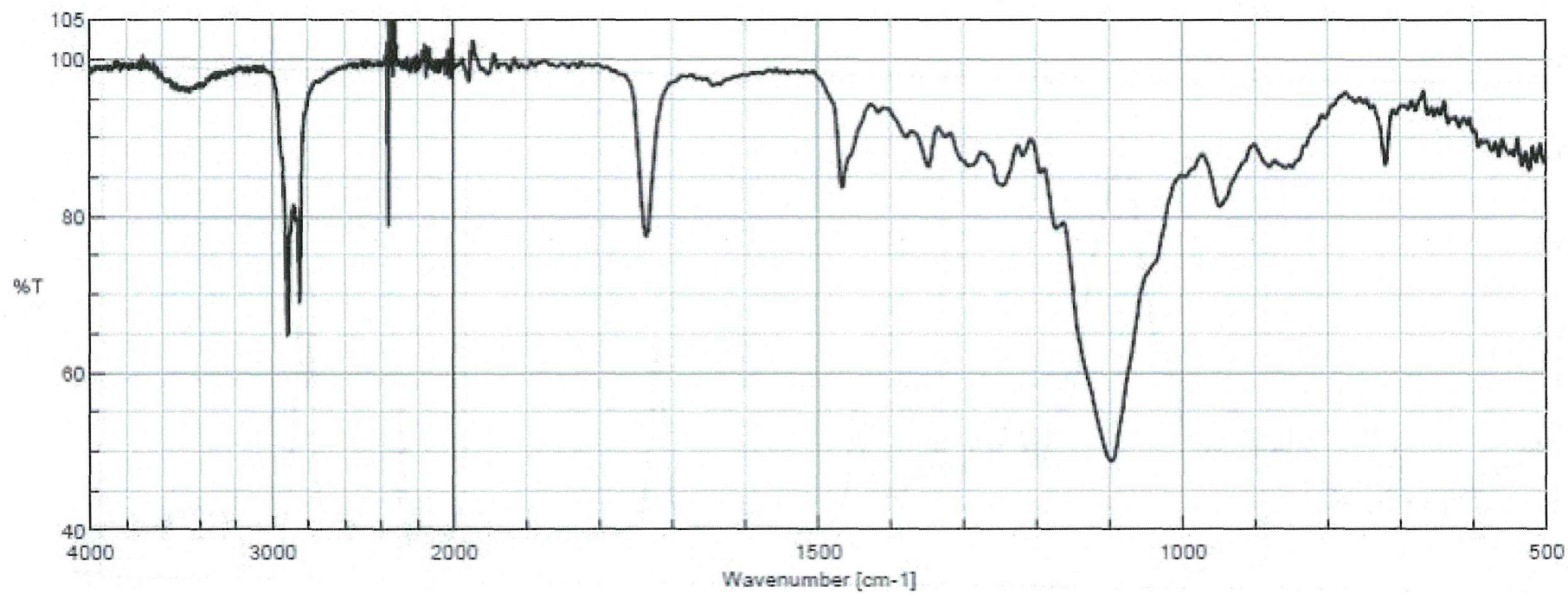


図 16. ポリソルベート 65 固体 (ATR 法)

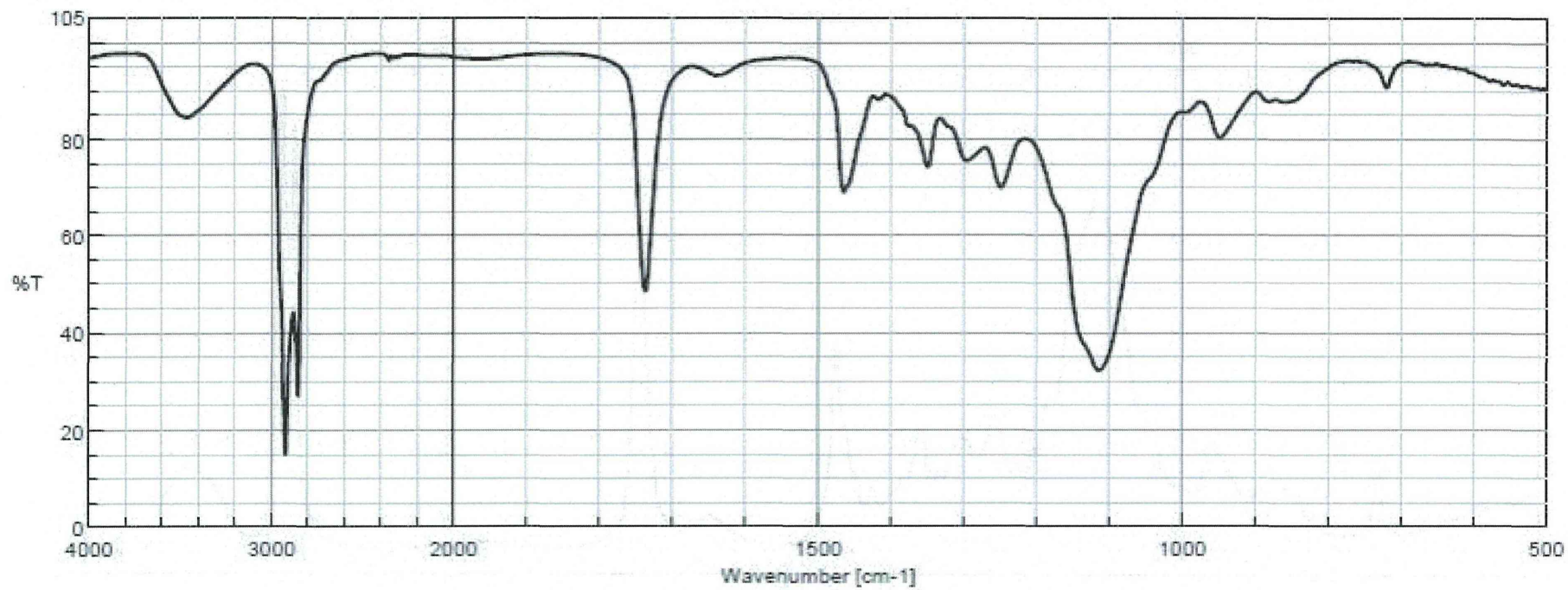


図 17. ポリソルベート 65 (液膜法)

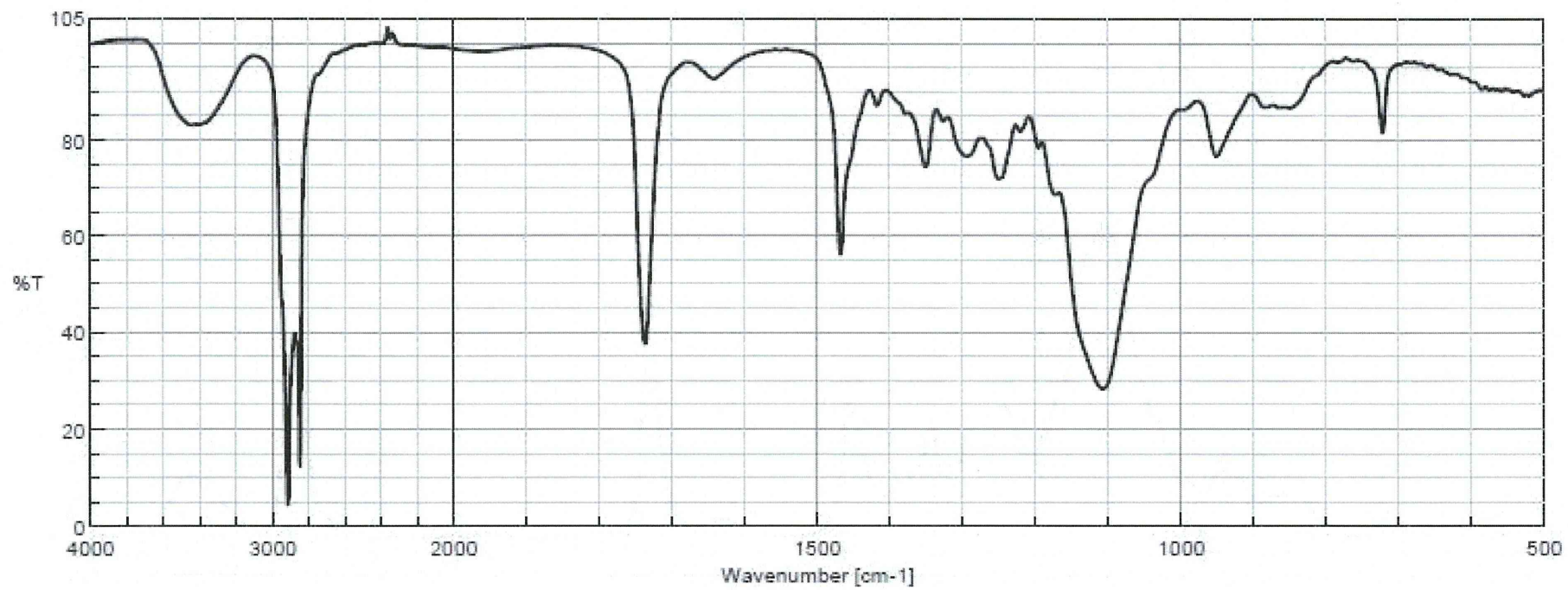


図 18. ポリソルベート 65 (薄膜法)

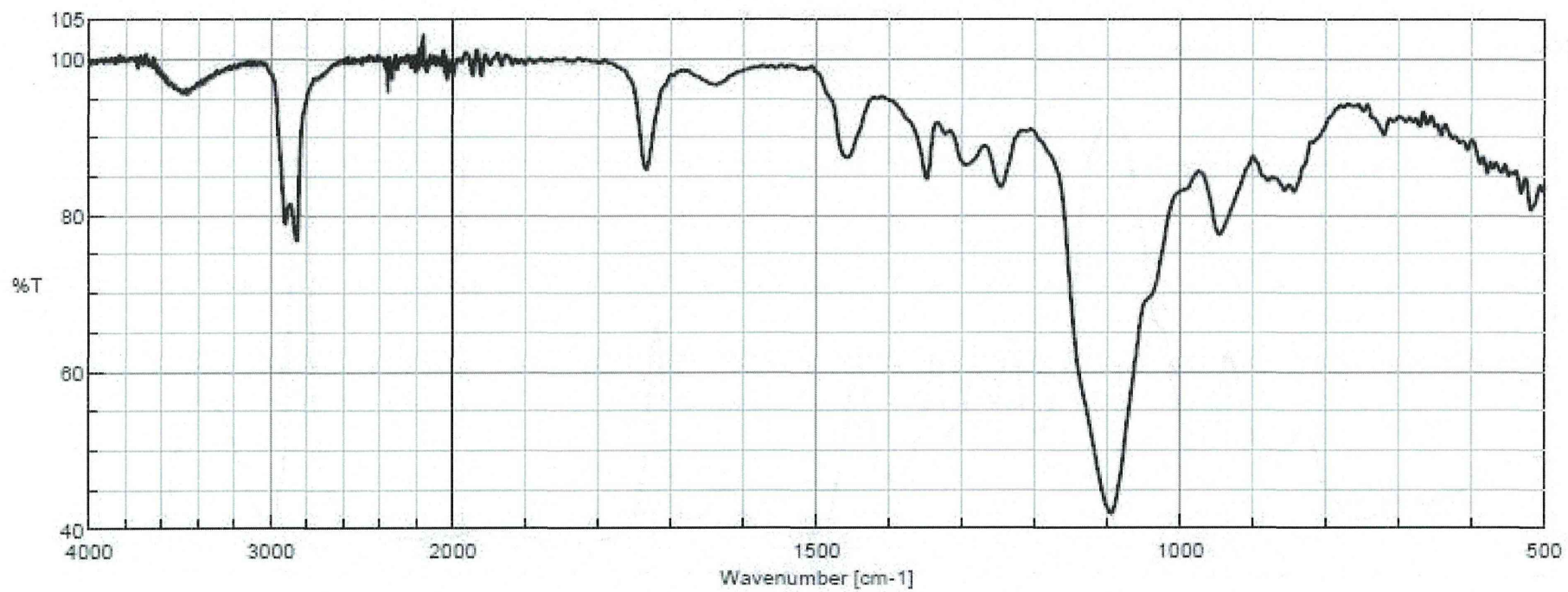


図 19. ポリソルベート 80 液状 (ATR 法)

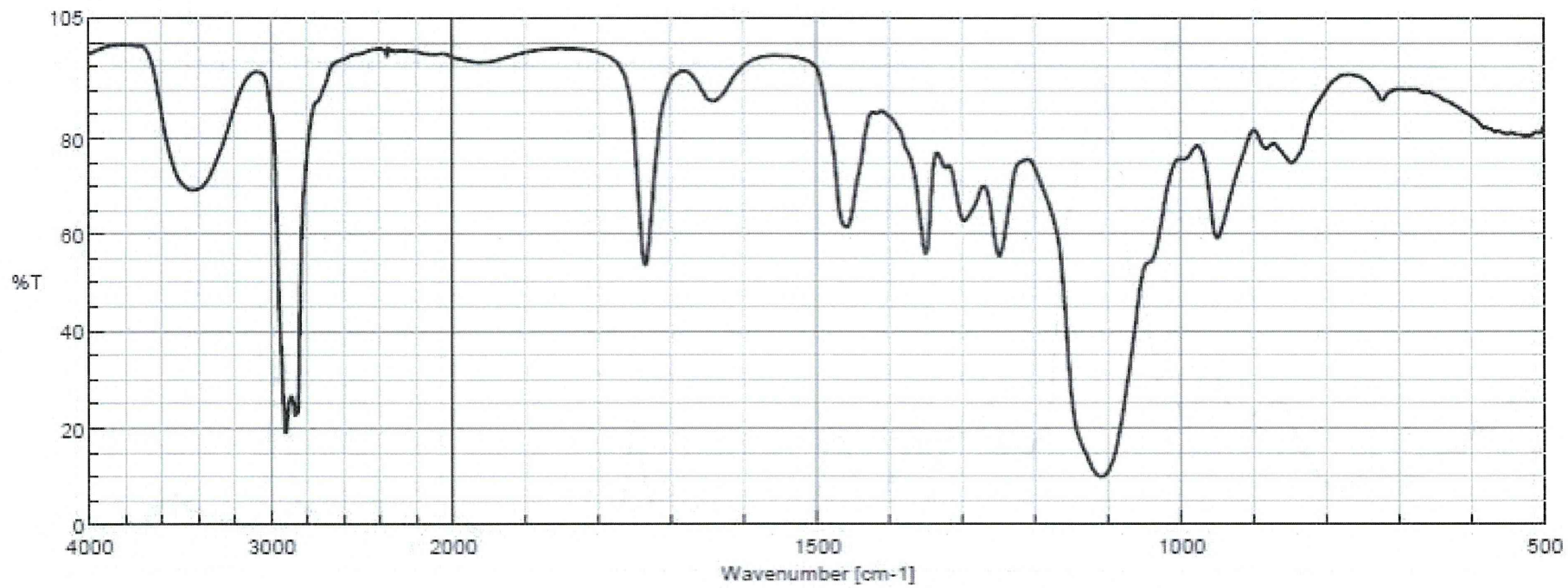


図 20. ポリソルベート 80 (液膜法)

定量 NMR 法による定量用標準物質の純度分析法の確立

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 を用いたグルタミンバルグリシンの定量分析に関する検討を行った。その結果、定量 NMR 法は本化合物の分析において良好な分析精度を有することが明らかとなった。

A. 研究目的

食品添加物は、その安全性を担保する品質確保の目的で、食品衛生法第 11 条第 1 項に基づき、成分規格や使用基準などが設定されている。成分規格には、原則として含量とその分析法が定められている。同分析では、HPLC 等が使用されることが多く、純度が正確な定量用標品が必要となる。しかし、標品となる定量用試薬の純度は、主に滴定や HPLC 等を用いて算出されているが、HPLC 等では必ずしも絶対純度が計測されていない。また、この純度は自社規格により保証されたもの、すなわち計量学的に正確とは言えず、結果として分析値の信頼性が損なわれる可能性を否定できない。従って、食品添加物の品質確保の観点から、信頼性の高い純度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) が注目を集めている¹⁾。qNMR のうち、¹H NMR を利用した qNMR (qHNMR) は、2 つの化合物間のシグナル面積強度 (積分値)

比が「各化合物のモル濃度×各置換基上の水素数」に比例する原理を利用した定量法である。NMR は原子核を対象に測定を行っているため、これら 2 つの化合物は同一の化学構造である必要はない。従って、計量学的に正確な純度が付与された SI にトレーサブルな標品すなわち認証標準物質を内標準物質として用いることにより、内標準物質と測定対象化合物のシグナル面積強度比、水素数、秤量濃度の関係から、様々な測定対象化合物の含量や純度を求めることが可能である。また、本法は試料を正確に秤量して溶媒に溶解させるのみで測定が可能であることや使用する溶媒量は 1 検体あたり 2 mL 以下であることなど、他の分析法に比べ簡便性、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、¹H 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．このような特徴から，qHNMRは，残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬の純度分析^{2,3)}，生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析⁴⁻⁶⁾へ利用されている．また，これまで食品添加物分析へのqHNMRの適用に関する検討を進め，防かび剤や酸化防止剤などの分析において，本法は精確な定量分析が可能であることを明らかにした．そこで本研究では，食品添加物の規格試験法の精度向上を目指した研究の一環として，グルタミルバリルグリシンを対象としたqHNMRの有効性に関する検討を行った．

B. 研究方法

1) 試薬

グルタミルバリルグリシンは，味の素株式会社よりご供与いただいた．

2,2-dimethyl-2-silapentane

-5-sulfonate-*d*₆ sodium salt (DSS-*d*₆)は和光純薬工業株式会社製定量 NMR 用内標準物質

(Cat. No.044-31671,

Lot.No.DCM1095, 純度 92.2%, 拡張不確かさ:0.7%)を用いた．重水(D₂O)はAldrich製を用いた．非水滴定用 0.1 mol/L 過塩素酸(酢酸溶媒)は和光純薬株式会社製の非水滴定用，酢酸は関東化学株式会社製の非水滴定用をそれぞれ用いた．ギ酸は関東化学株式会社製の特級品を用いた．

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) (日本電子製), 自動滴定装置 GT-100 型 (三菱化学アナリテック製)

3) グルタミルバリルグリシンの NMR 分析 (シグナルの帰属)

グルタミルバリルグリシン約 10.0 mg を量りとり，D₂O 約 0.75 mL に溶解した．この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に液高が約 4 cm になるように入れ，密閉し，各種 NMR 測定 (¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC) を行った．

4) qHNMR によるグルタミルバリルグリシンの定量

グルタミルバリルグリシン約 20 mg 及び DSS-*d*₆ 約 4 mg をそれぞれ精密に量り，D₂O 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 試料管に液高が約 4 cm になるように入れ，密閉し，qHNMR 測定を行った．DSS-*d*₆ のシグナル面積強度を 9.00 としたときのグルタミルバリルグリシ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，グルタミルバリルグリシン含量 (C_{GL}, %) を算出した．

$$C_{GL} = \frac{I_{GL}/H_{GL}}{I_{DSS}/H_{DSS}} \times \frac{M_{GL}/W_{GL}}{M_{DSS}/W_{DSS}} \times 100$$

ただし，I_{GL}，I_{DSS} はグルタミルバリルグリシン及び DSS-*d*₆ のシグナル面積強度 (DSS-*d*₆: 9.00)，H_{GL}，H_{DSS} はグルタミルバリルグリシン及び DSS-*d*₆ の特定基の水素数 (DSS-*d*₆: CH₃×3=9)，M_{GL}，M_{DSS} はグルタミルバリルグリシン及び DSS-*d*₆ の分子量 (グルタミルバリルグリシン: 303.31, DSS-*d*₆: 224.36)，W_{GL}，W_{DSS} はグルタミルバリルグリシン及び DSS-*d*₆ の秤取量 (mg) である．

5) 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、DSS- d_6 の水素シグナルを基準シグナル (δ 0) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。得られた FID データは、フーリエ変換 (Windows 関数: exponential function BF=0.12 Hz, zero filling=1, trapezoidal function T1=T2=0, T3=90, T4=100) 及び位相補正を行った。DSS- d_6 及びグルタミルバリルグリシンの定量シグナルの積分範囲を設定した後、DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.00 としたときのグルタミルバリルグリシンに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を「4) qHNMR によるグルタミルバリルグリシンの定量」で示した計算式に代入し、含量を算出した。なお、データの解析は、Alice 2 ver.5 (JEOL RESONANCE 製) を用いた。

C. 研究結果及び考察

1. グルタミルバリルグリシンの各水素シグナルの帰属

qHNMR 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、グルタミルバリルグリシンについて ^1H 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 ^1H NMR スペクトルが得られた。また、本結果及び ^{13}C NMR、各種 2 次元 NMR (^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC) スペクトルの詳細な解析により、各水素シグナル及び炭素シグナルを帰属した (図 2)。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 法によるグルタミルバリルグリシン含量の測定

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、グルタミルバリルグリシンについて qHNMR に関する検討を行った。通常、我々は qHNMR 測定を行う際に、多数の有機化合物を測定するために表 1 に示す条件を用いることが多い。特に、シグナルの正確な積分値 (面積強度) を得るためには、繰り返し待ち時間 (Pulse delay) を定量に用いるシグナルの縦緩和時間 (T_1) の 10 倍以上に設定する必要がある。そこで、グルタミルバリルグリシンの各シグナルの T_1 を測定したところ、図 3 に示すように、最大で 2.54 秒 (δ_{H} 3.82) であり、表 1 に示す繰り返し待ち時間 (60 秒) はグルタミルバリルグリシンの定量において適切であることが確認された。そこで、表 1 に示す条件を用いて qHNMR 測定を行い、グルタミルバリルグリシン含量を算出した。その結果、図 4 に示すように、 δ_{H} 0.97 (水素数 6), δ_{H} 2.10–2.20 (水素数 3), δ_{H} 2.54 (水素数 2), δ_{H} 3.82 (水素数 1), δ_{H} 3.97 (水素数 2) 及び δ_{H} 4.16 (水素数 1) にグルタミルバリルグリシ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

示すように、これらのシグナルより算出されたグルタミルバリルグリシン含量は、 δ_H 0.97, δ_H 2.54, δ_H 3.82, δ_H 3.97 及び δ_H 4.16 のシグナルでは、99.4%–99.5%と同等の結果であった。一方、 δ_H 2.10–2.22 のシグナルでは、99.9%と他のシグナルと比べ高い結果を示した。これらのシグナルは、 δ_H 2.13 (水素数 1) 及び δ_H 2.16 (水素数 2) のシグナルが部分的に重っており、シグナルはそれぞれ多重に分裂していることから、積分範囲が通常よりも広くなり、他のシグナルの定量値より大きくなったものと考えられた。これらの点を考慮し、定量用シグナルとしては、 δ_H 0.97, δ_H 2.54, δ_H 3.82, δ_H 3.97 及び δ_H 4.16 を用いることが適切と考えられた。なお、これらのシグナルの相対標準偏差 (RSD) は 0.1–0.2%と良好であった。

3) qHNMR 及び滴定によるグルタミルバリルグリシン含量の比較

グルタミルバリルグリシンの規格試験法案では、定量法として過塩素酸を用いた非水滴定が示されている。そこで、qHNMR と滴定によるグルタミルバリルグリシン含量を比較した。その結果、5種のシグナルより算出した qHNMR からのグルタミルバリルグリシンの含量及び RSD は、滴定の結果とほぼ同等であり、qHNMR により算出された定量値は正確であることが確認された。qHNMR 及び滴定はともに検量線を必要としない絶対定量法である。特に今回用いた qHNMR の場合、得られる定量値は計量学的に信頼性が高いことから、真値をより正確に反映した絶対定量法であると考えられた。

D. 結論

本研究では、食品添加物の規格試験法の精度の向上を目指して、qHNMR によるグルタミルバリルグリシンの定量に関する検討を行った。本法は良好な真度、精度を有し、グルタミルバリルグリシン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、グルタミルバリルグリシン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の規格試験法への本法の適用へ向けた基礎データが得られたものとする。

E. 研究発表

学会発表

1. Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H. "Absolute quantitative analysis of preservatives in processed foods by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy", 5th Asia-Pacific NMR Symposium in Conjunction with ANZMAG2013 (2013.10) (オーストラリア).
2. 大槻 崇, 佐藤 恭子, 杉本直樹, 多田敦子, 合田幸広, 河村葉子, 穂山 浩, "qNMR による添加物定量用試薬の規格試験法について" (2013.11) (富山).

F. 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.*, 14, 79-86 (2009).

- 2) 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. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 16, 28 (2009).
- 3) Hosoe, J., Sugimoto, N., Goda, Y., *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 41, 960 (2010).
- 4) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H. *J. Nat. Med.*, 65, 262 (2011).
- 5) Tada, A., Takahashi, K., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Ishizuki, K., Nishimura, T., Yamazaki, T., Kawamura, Y. *Food Hyg. Saf. Sci.*, 51, 205 (2010).
- 6) Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H. *Chem. Pharm. Bull.*, 61, 1264 (2013).

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	60 s
Scan times	8
Spining	off
¹³ C decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)
Probe temperature	30°C

表 2 各シグナルより算出されたグルタミルバリルグリシンの純度の比較 (n=3)

δ_{H} (ppm)	Purity (%)	RSD (%)
0.97	99.5	0.1
2.10-2.22	99.9	0.03
2.54	99.5	0.1
3.82	99.4	0.1
3.97	99.5	0.2
4.16	99.4	0.2

表 3 qHNMR 及び滴定により算出されたグルタミルバリルグリシン含量 (n=3)

	Purity (%)	RSD (%)
qHNMR	99.5	0.1
Titration	99.6	0.2

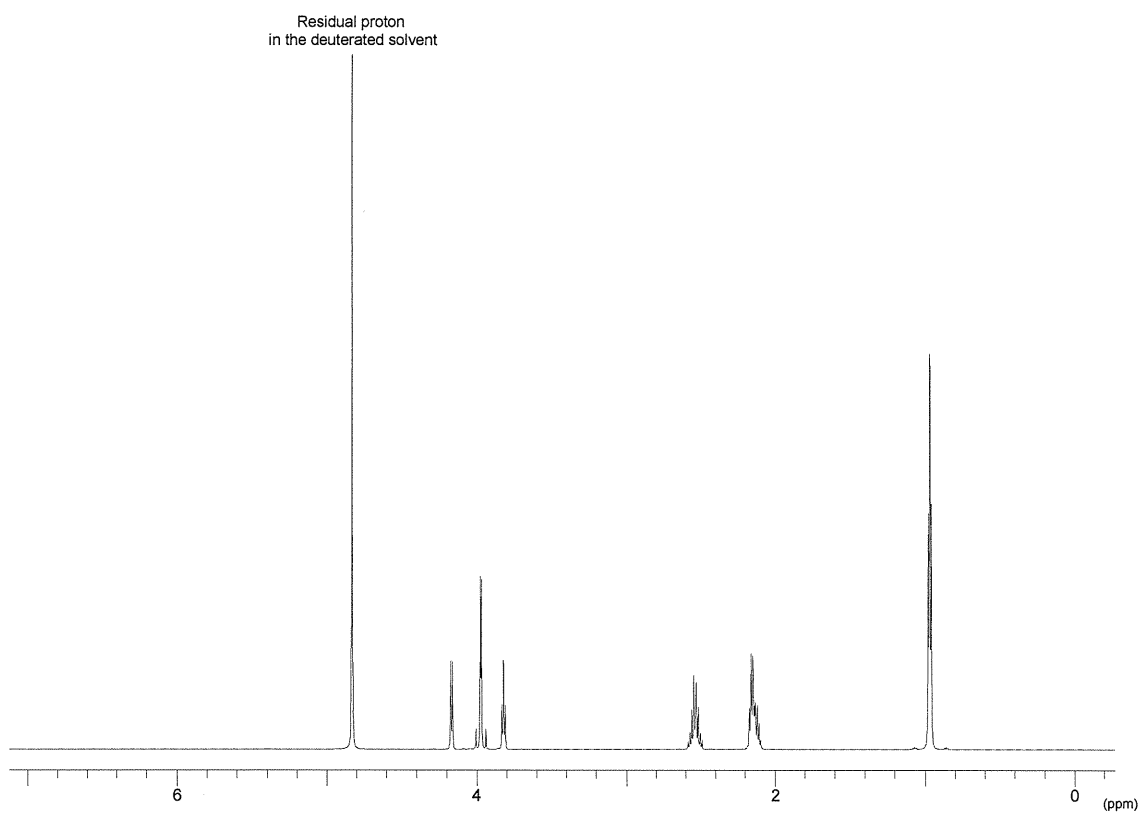


図1 グルタミルバリルグリシンの¹H NMR スペクトル (測定溶媒: D₂O)

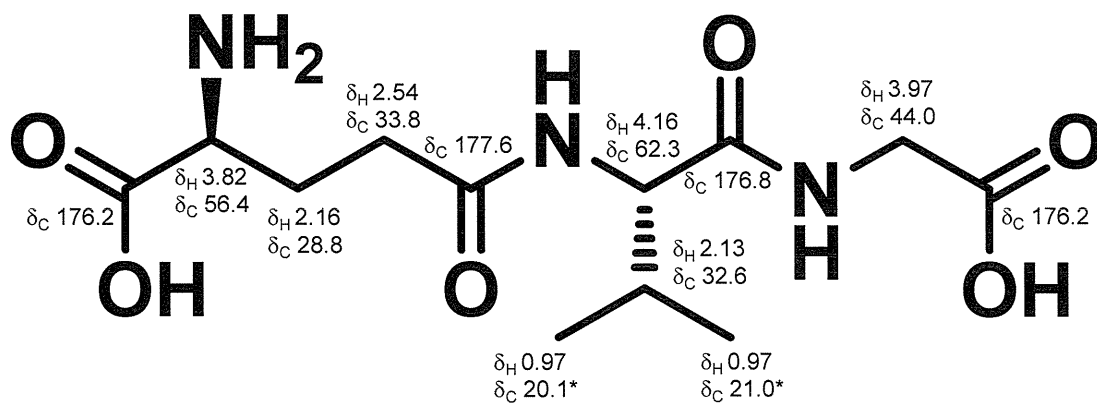


図2 グルタミルバリルグリシンの化学構造及び¹H及び¹³C NMR化学シフト