

図 5. 塩化コリン (ペースト法 : NaCl 板, すり混ぜ短時間)

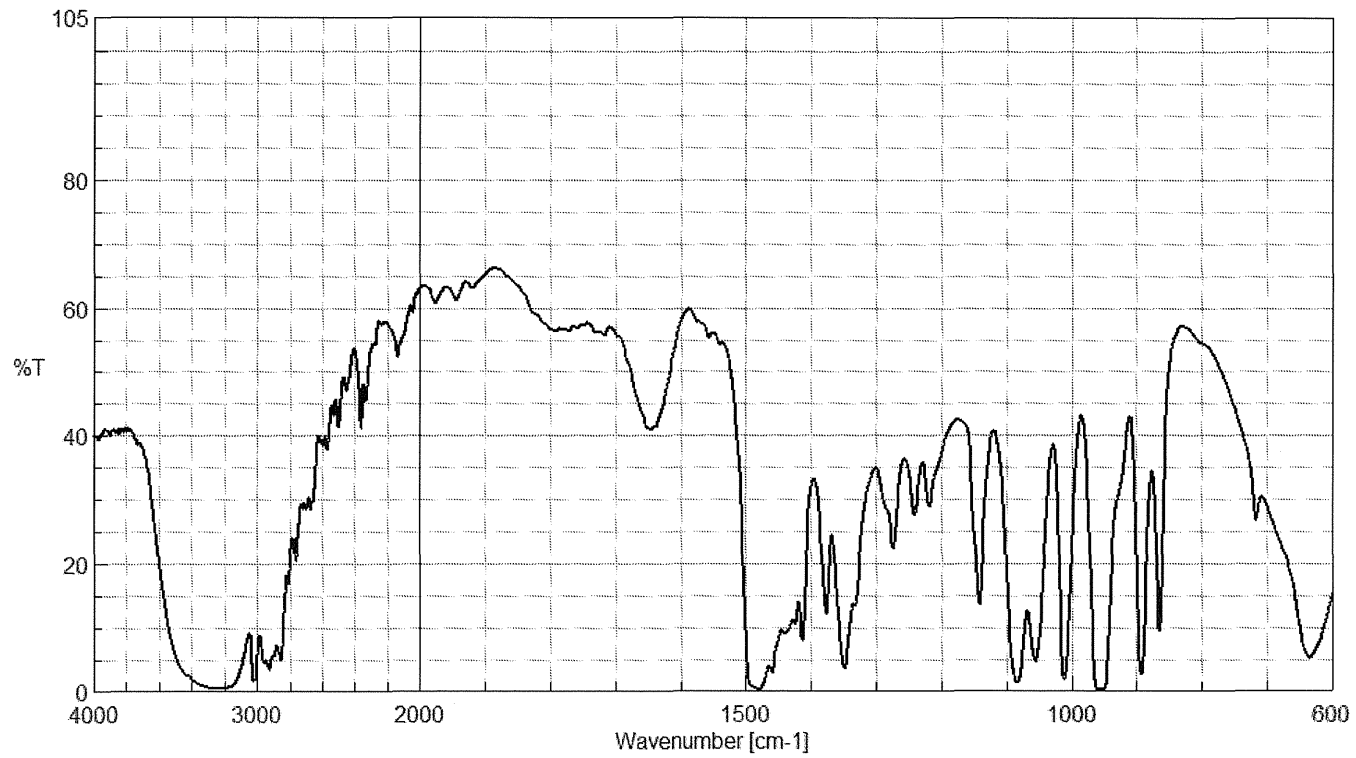


図 6. 塩化コリン (ペースト法 : KBr 板, すり混ぜ長時間)

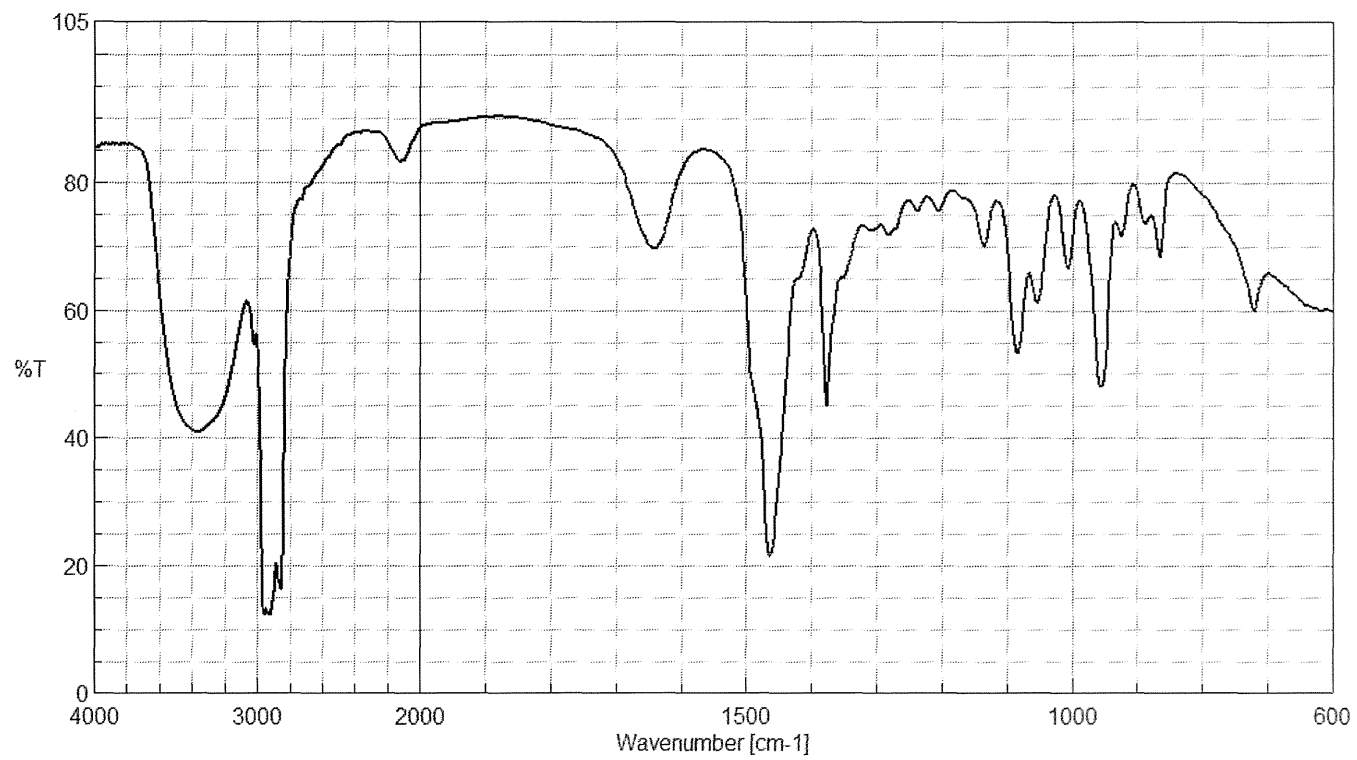


図 7. 塩化コリン (ペースト法 : KBr 板, すり混ぜ短時間)

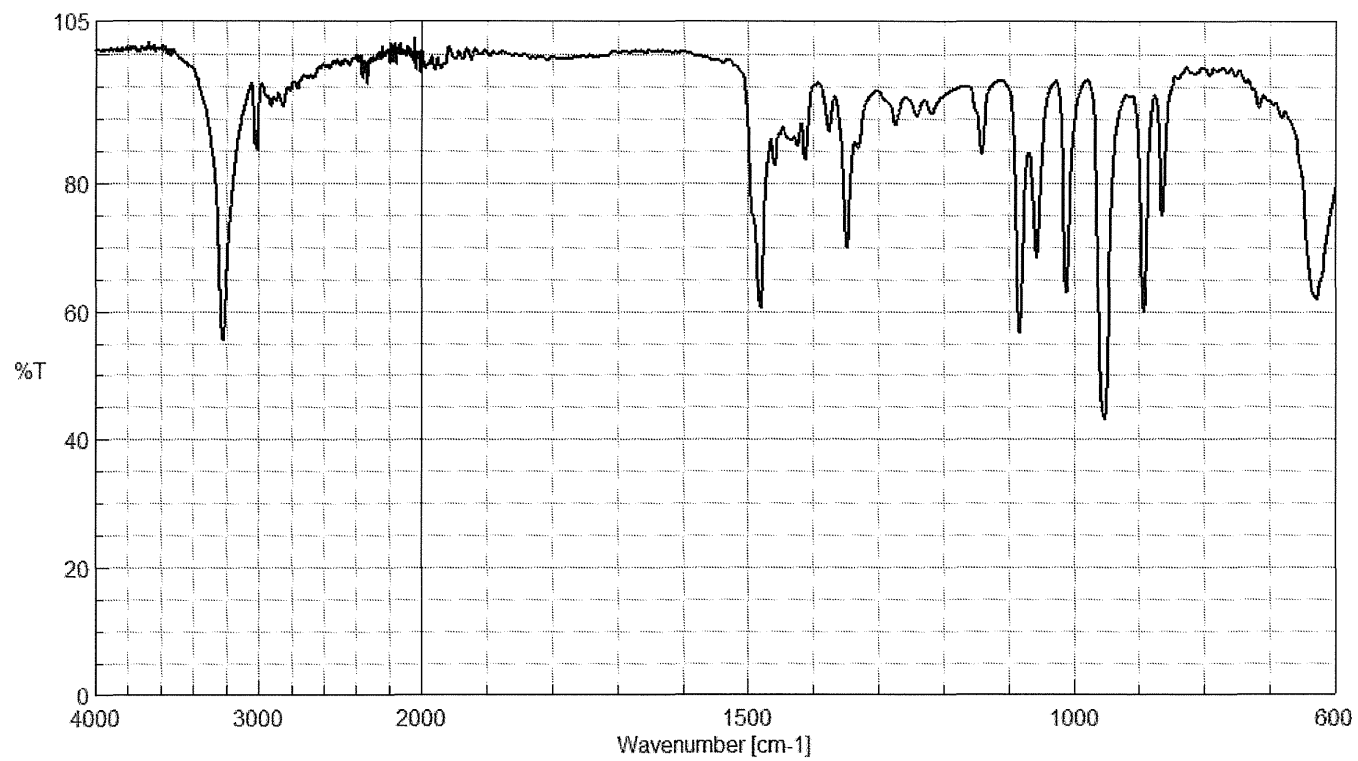


図 8. 塩化コリン (ATR 法：すり混ぜ短時間)

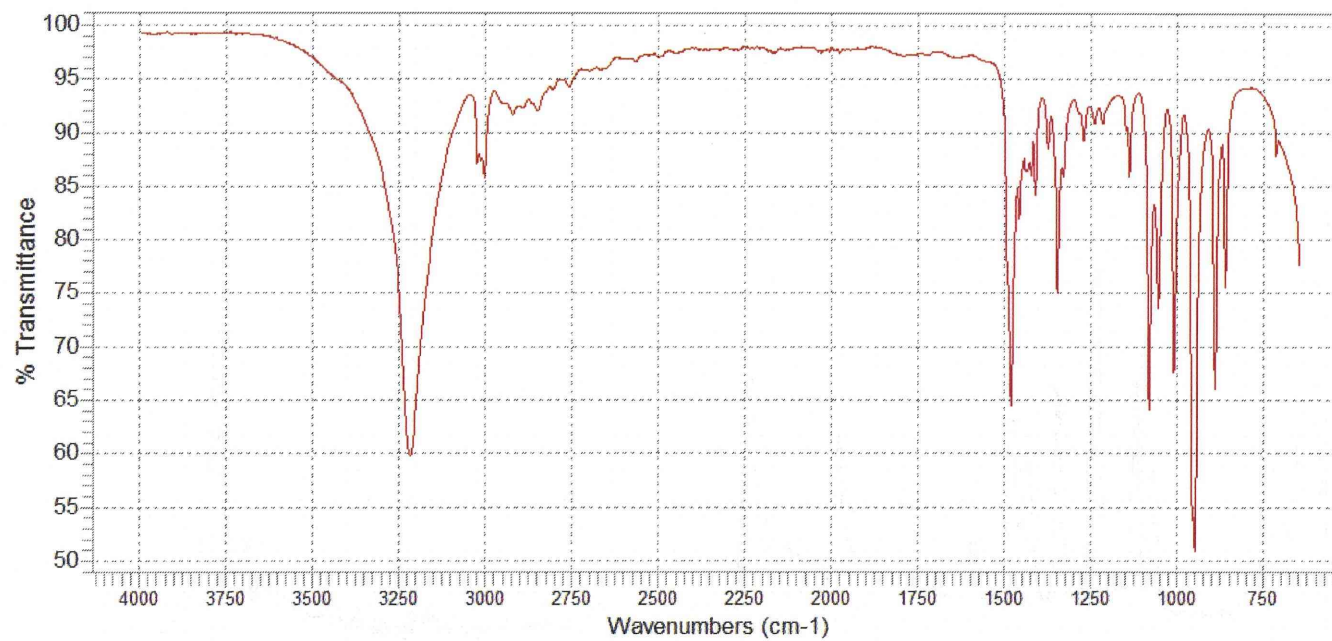


図 9. 塩化コリン (ATR スペクトル Sigma-Aldrich 社 Spectral Viewer 収載)

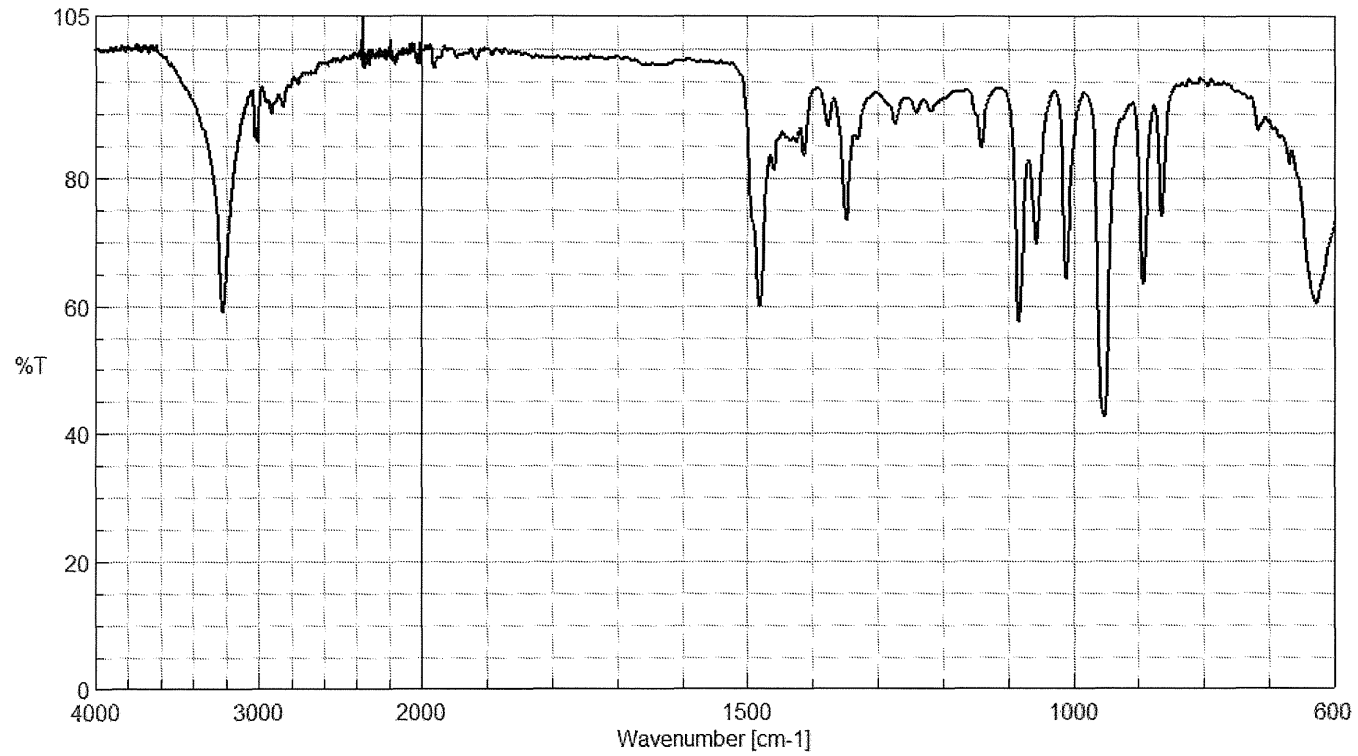


図 10. 塩化コリン (ATR 法 : すり混ぜ長時間)

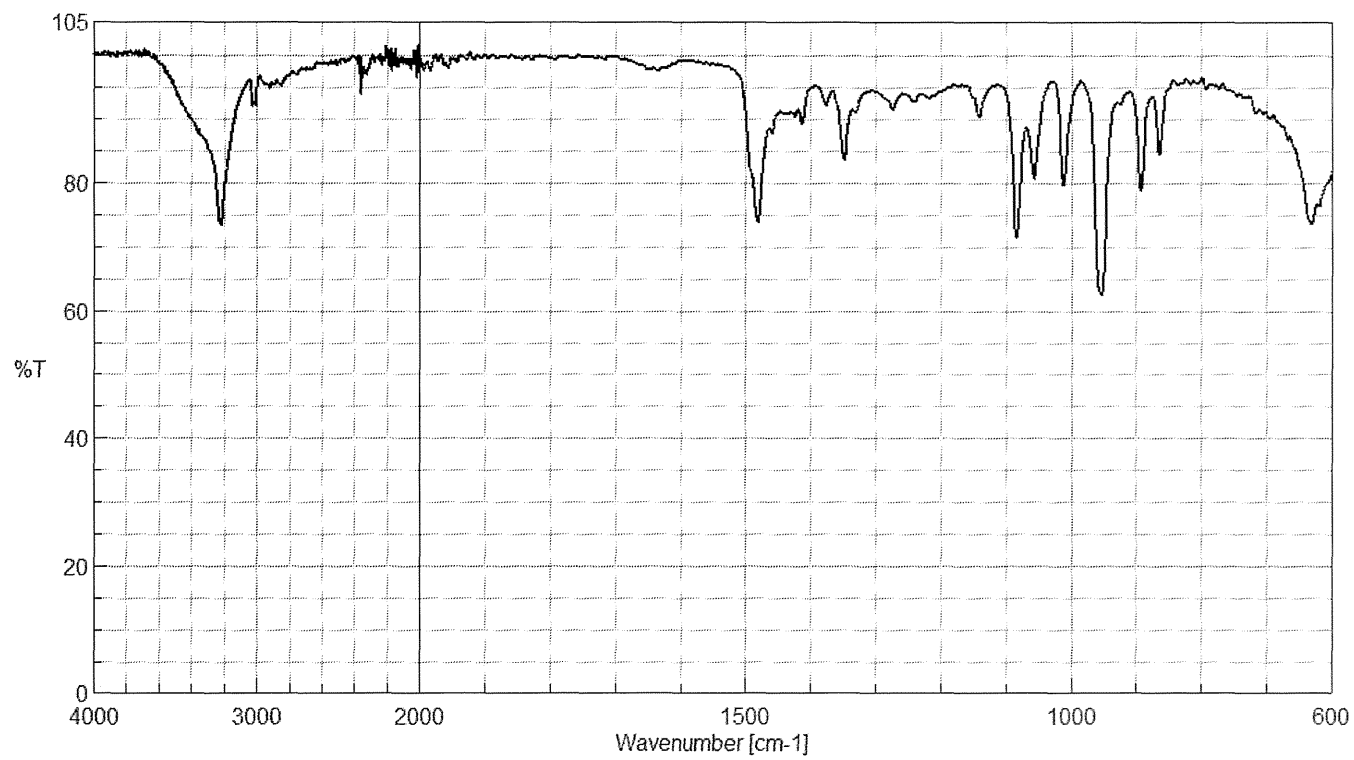


図 11. 塩化コリン (ATR 法 : NaCl 粉末添加すり混ぜ)

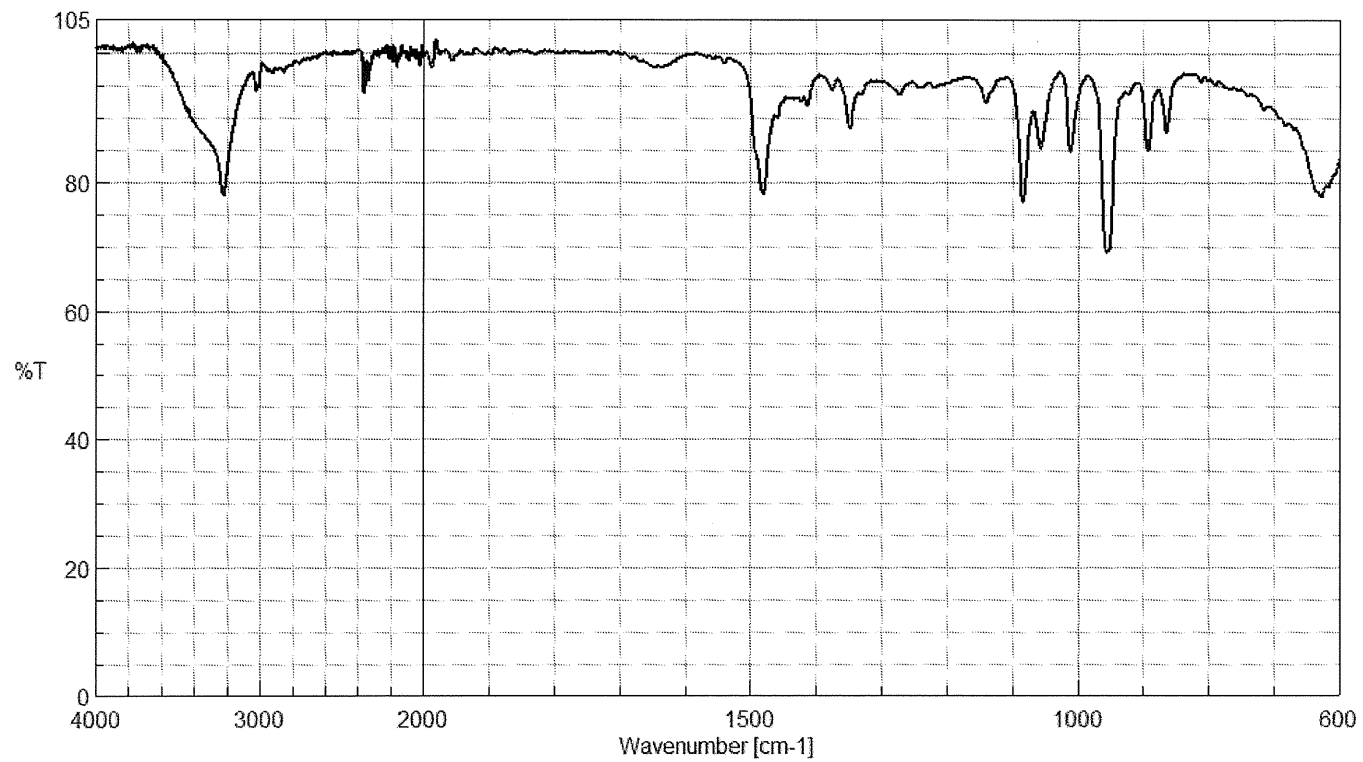


図 12. 塩化コリン (ATR 法 : KCl 粉末添加すり混ぜ)

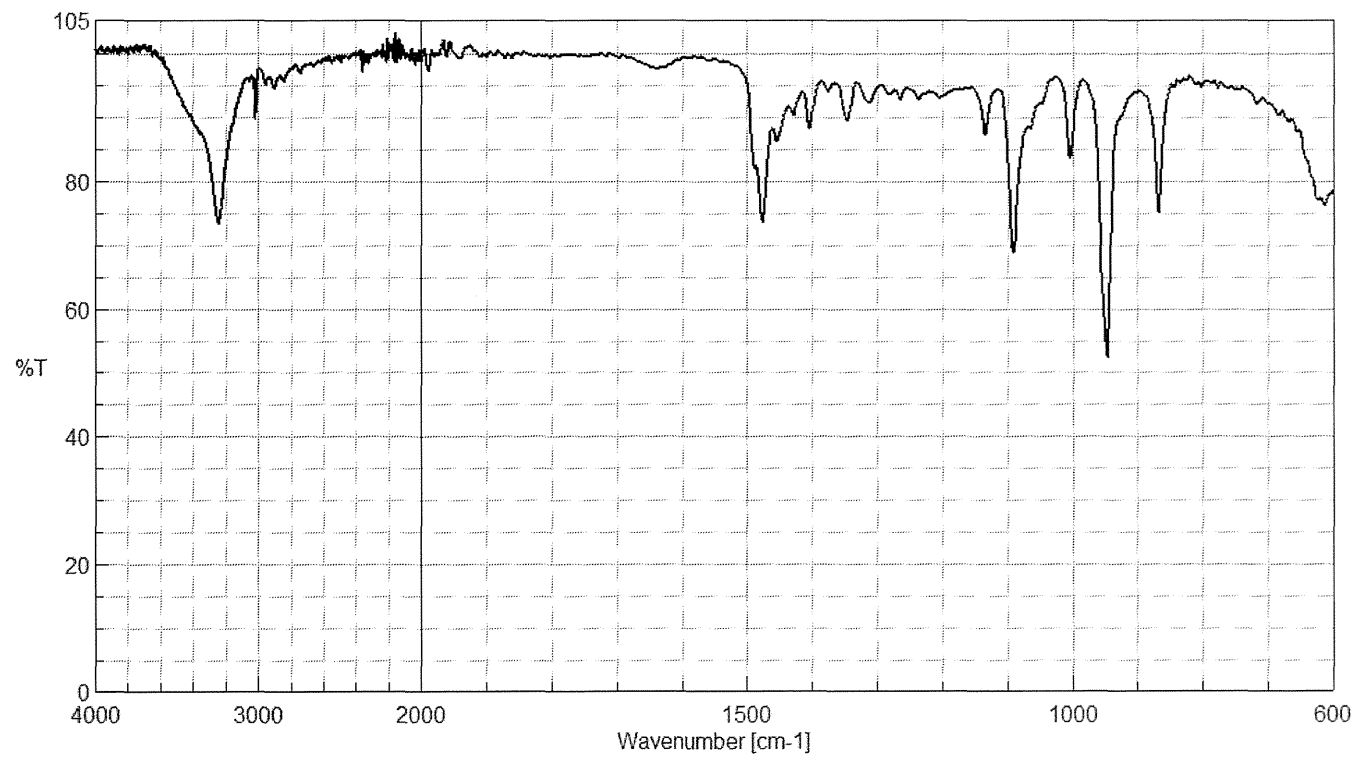


図 13. 塩化コリン (ATR 法 : KBr 粉末添加すり混ぜ)

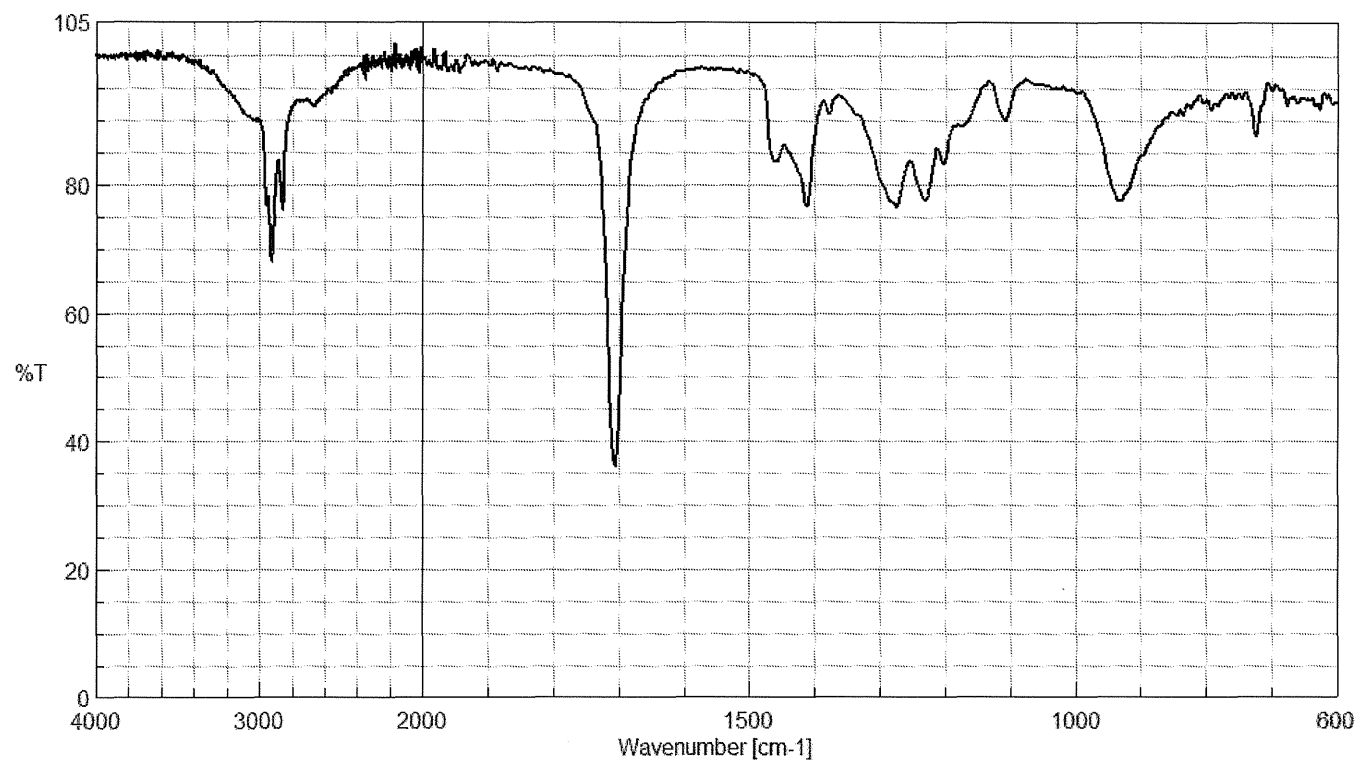


図 14. オクタン酸 (液膜法)

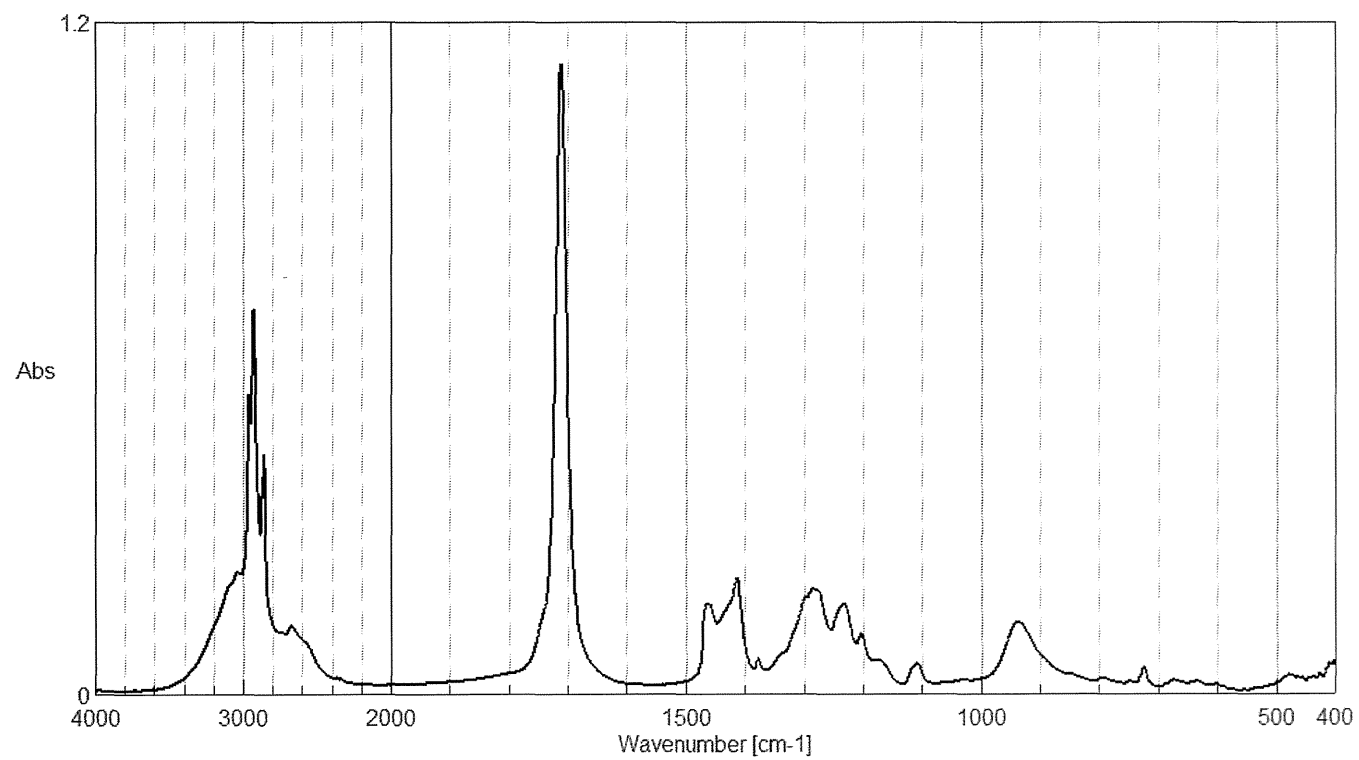


図 15. オクタン酸 (液膜法 : Abs 表示)

99 Octanoic acid

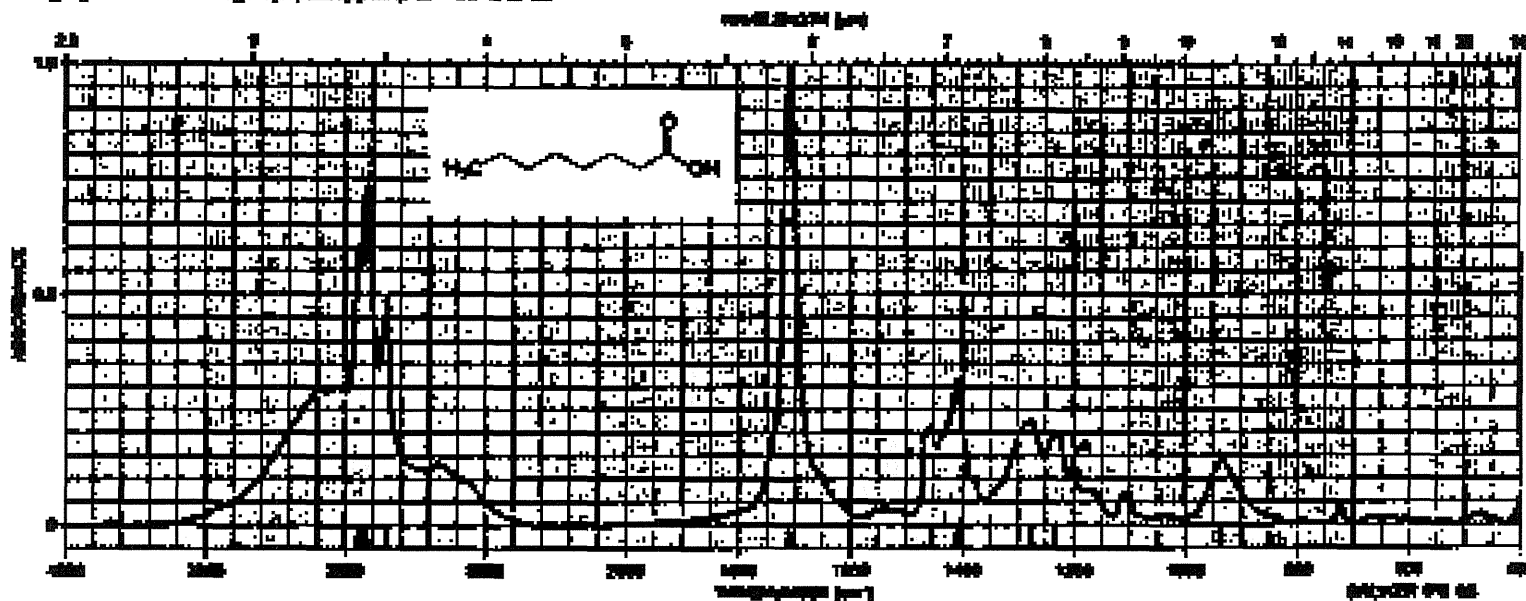


図 16. オクタン酸 (液膜法 : Abs 表示, JECFA)

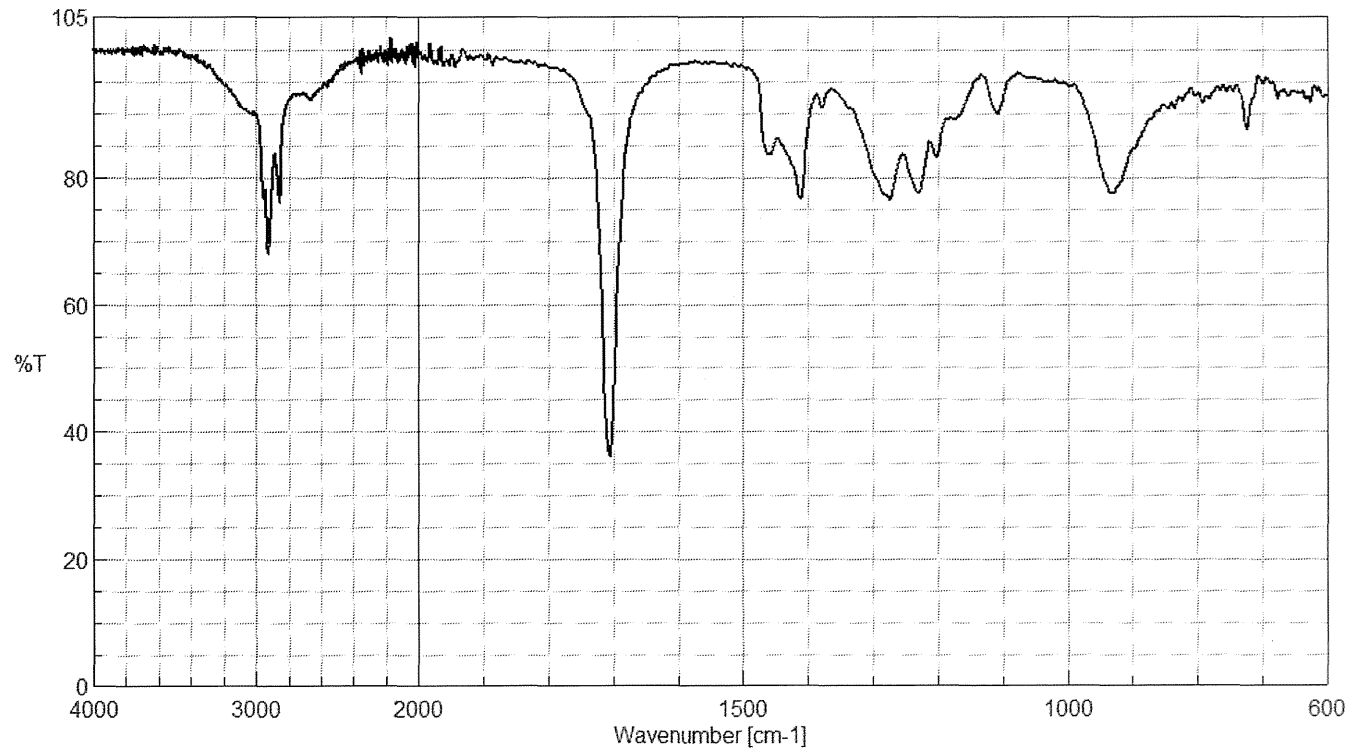


図 17. オクタン酸 (ATR 法)

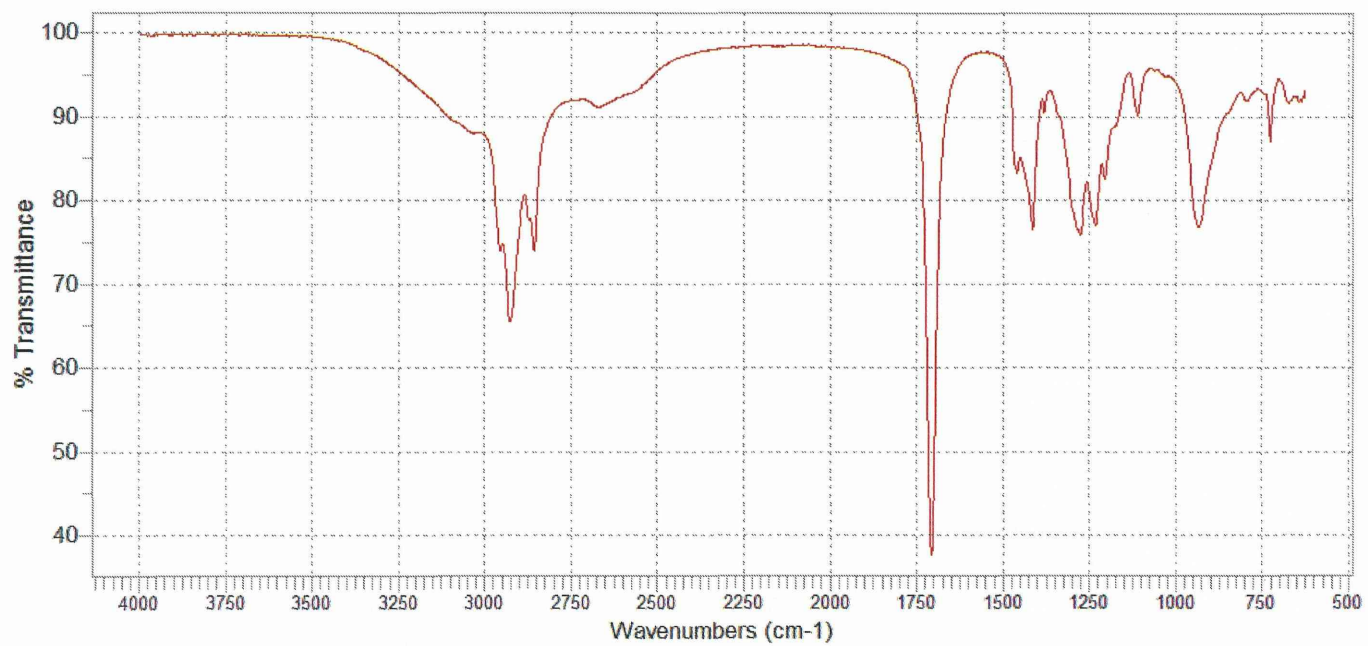


図 18. オクタン酸 (ATR スペクトル Sigma-Aldrich 社 Spectral Viewer 収載)

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 5-Benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acid (DKP) の定量分析に関する検討を行った。その結果、定量 NMR は本化合物の定量において優れた分析精度を有することが明らかとなった。

A. 研究目的

日本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）などの成分規格や食品添加物を使用できる食品の種類、使用量など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。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おり、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である。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 (¹H-qNMR)は、定量性が確保された測定条件を用いることで、2つの化合物間のシグナル面積強度比が「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認証標準物質のような SI へのトレーサビリティが確保された標品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。このような定量値の計量計測トレーサビリティを確保した ¹H-qNMR は、AQARI (Accurate QuAntitative NMR with Internal reference material) とも呼ばれている。

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、他の分析法に比べ迅速性や環境負荷の低減の面でも格段と優れている。さ

らに、混合物分析においては、 ^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、煩雑なクリーンアップや誘導体化等の前処理は不要となり、迅速かつ簡便な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、 ^1H -qNMR は、残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬などの純度分析^{2, 3, 4)}、生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析⁵⁻⁷⁾へ利用されている。また、当部ではこれまで食品添加物分析への ^1H -qNMR 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、高甘味度甘味料の 1 つであるアスパルテームの成分規格において、アスパルテーム中の残存量に関する規定が設けられている 5-Benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acid (DKP) の定量分析における ^1H -qNMR の有効性に関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬

DKP 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.TLP6524, 純度 92.5%, 拡張不確かさ: 0.6%) を用いた。重ジメチルスルホキシド (DMSO- d_6) は Aldrich 製を用いた。

2) 装置

核磁気共鳴装置 (NMR): ECA600 (プロトン共鳴周波数 600 MHz) (日本電子製)

3) DKP の NMR 分析 (シグナルの帰属)

DKP 約 10 mg を量りとり、DMSO- d_6 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, ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC) を行った。

4) ^1H -qNMR による DKP の定量

DKP 約 10 mg 及び DSS- d_6 約 4 mg をそれぞれ精密に量り、DMSO- d_6 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 DKP 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、DKP 含量 (C_{DKP} , %) を算出した。

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

ただし、 I_{DKP} , I_{DSS} は DKP 及び DSS- d_6 のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.00), H_{DKP} , H_{DSS} は DKP 及び DSS- d_6 の特定基の水素数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3 = 9$), M_{DKP} , M_{DSS} は DKP 及び DSS- d_6 の分子量 (DKP: 262.26, DSS- d_6 : 224.36), W_{DKP} , W_{DSS} は DKP 及び DSS- d_6 の秤取量 (mg) である。

5) ^1H -qNMR 測定条件及びデータの解析

^1H -qNMR 測定の基本条件を表 1 に示した。なお、 ^1H -qNMR 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 (zero filling=1) 及び位相補正を行った。DSS- d_6 及び DKP 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 DKP 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) ^1H -qNMR による DKP」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 for qNMR ver.2 を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

C. 結果及び考察

1) DKP の各水素シグナルの帰属

^1H -qNMR により精密な定量を行うには、試料に由来する NMR シグナルを帰属するとともに、分析対象成分及び標準物質のシグナルに夾雑物や溶媒由来のシグナルが重ならないこと、各シグナルの S/N などを確認しなければならない。そこで、DKP 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、各水素シグナルを帰属した (図 2)。なお、これらのケミカルシフトは、

2) の検討と整合させるため、DSS- d_6 の水素シグナルを基準シグナル (δ 0) としたときの、 δ 値 (ppm) として示した。

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) ^1H -qNMR による DKP 含量の測定

^1H -qNMR 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、計量計測トレーサビリティが確保された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、本法の食品添加物や純度規定が設けられている物質への適用性を明らかにするため、アスパルテームの分解産物である DKP について ^1H -qNMR 測定を行った。通常、 ^1H -qNMR では、定量性を確保した条件を用いる必要がある。代表的な測定条件を表 1 に示す。本研究では、この測定条件を用いて ^1H -qNMR を行った。その結果、 δ_{H} 1.59, δ_{H} 2.07, δ_{H} 4.06, δ_{H} 4.23 及び δ_{H} 7.1-7.4 のシグナルより算出された DKP 含量は、96.0~96.5% であった。一方、 δ_{H} 2.96, δ_{H} 3.12, δ_{H} 7.88 及び δ_{H} 8.14 より算出された DKP 含量はそれぞれ、97.3%, 100.2%, 94.0% 及び 94.7% であり、他のシグナルから得られた DKP 含量と比べ 1~4% 程度差が認められた。これは、 δ_{H} 2.96 については、シグナルの左裾が δ_{H} 3.12 のシグナルの裾と隣接していること、 δ_{H} 3.12 については、 δ_{H} 3.3 付近に観察される DMSO- d_6 中の水に由来するシグナルの裾が δ_{H} 3.12 のシグナルと重なり、適切な積分範囲を設定できていないため、定量値が高くなったと考えられた。また、 δ_{H} 7.88 及び δ_{H} 8.14 については、それぞれ分子内の窒素に結合した水素が交換性の性質を有しているため、定量値は低く観察され、正確な定量は困難と考えられた。

なお、 δ_{H} 7.1-7.4 のシグナル群より算出された DKP の定量値は、他のシグナルとほぼ同等であったが、これらを定量用シグナルと

して用いる場合、製品の純度によっては、これらのシグナルの範囲内に夾雑物由来のシグナルが重なる可能性も懸念される。以上の点を考慮すると、DKPの定量には、 δ_H 1.59, δ_H 2.07, δ_H 4.06, δ_H 4.23 を用いることが適切と考えられた (DKP 平均含量 : 96.1%)。また、これら4種のシグナルから算出された相対標準偏差 (RSD) は 0.1~0.3 %と良好であった。

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、 1H -qNMRによるDKPの定量に関する検討を行った。本法は良好な分析精度を有し、DKP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、DKP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、将来的な定量用試薬の分析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. "Quantification of acesulfame potassium in processed foods by quantitative 1H NMR", 12th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science (2014.5) (イタリア).

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.*, 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) 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.
- 5) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H. *J. Nat. Med.*, 65, 262 (2011).
- 6) 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).
- 7) Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H. *Chem. Pharm. Bull.*, 61, 1264 (2013).

表 1 ^1H -qNMR 測定条件

Spectrometer	JEOL 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 DKP 含量の比較 (n=3)

δ_{H} (ppm)	Content (%)	RSD (%)
1.59	96.1	0.3
2.07	96.1	0.1
2.96	97.3	0.6
3.12	100.2	1.3
4.06	96.0	0.2
4.23	96.0	0.1
7.1-7.4	96.5	0.2
7.88	94.0	0.4
8.14	94.7	0.4

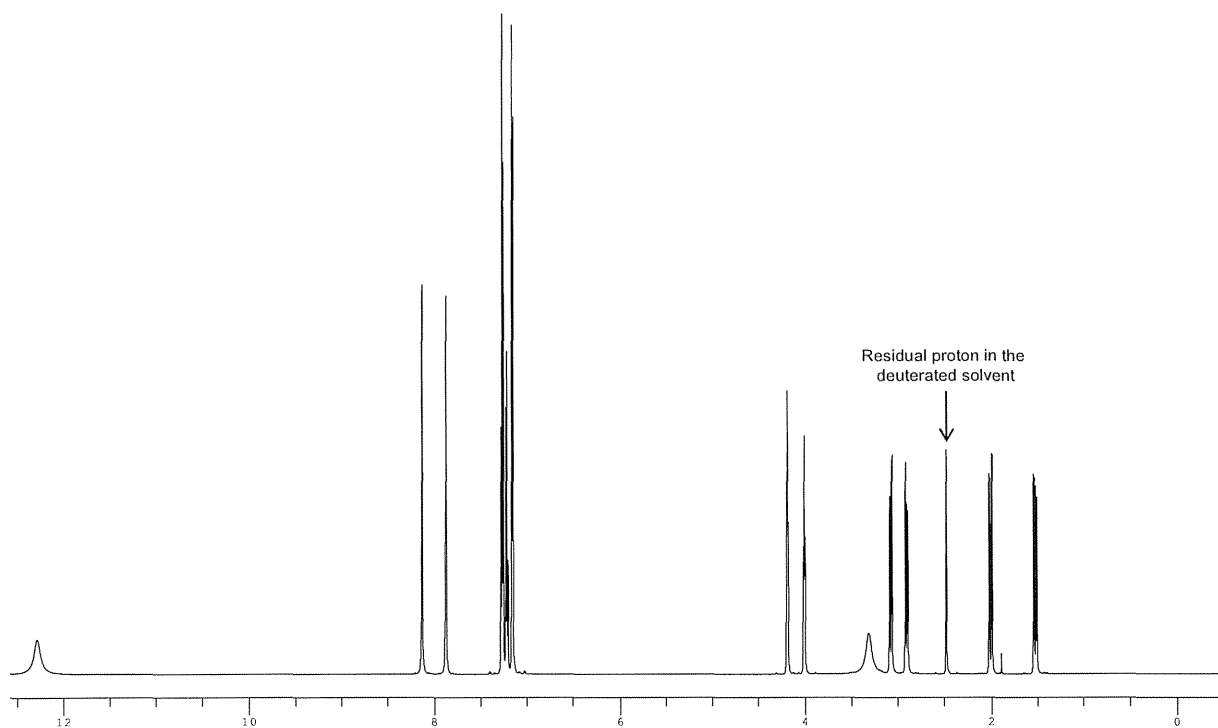


図1 DKPの ^1H NMR スペクトル (測定溶媒: $\text{DMSO-}d_6$)

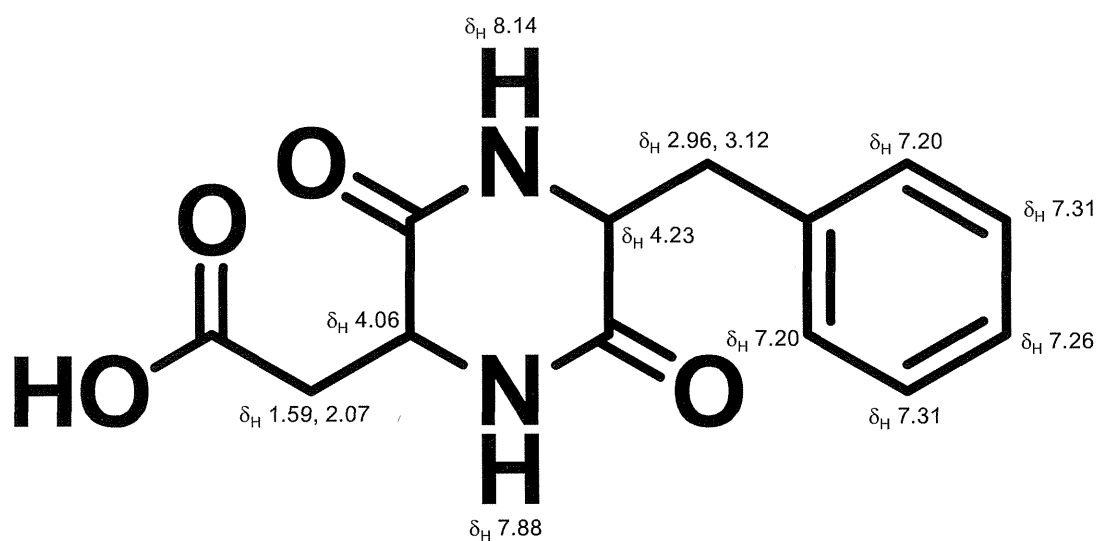


図2 DKPの化学構造及び ^1H NMR 化学シフト