

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品添加物の試験法の検討及び摂取量に基づく安全性確保に向けた研究
令和4年度分担研究報告書

卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究
～食品添加物公定書における定量用標準品への qNMR の適用～
研究分担者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨

卓上 NMR (60MHz) を用いた定量 NMR (qNMR) を、食品添加物公定書に記載されている定量用標準品：アズキシストロビン、カフェイン、ジフェニルアミン、ジフェノコナゾール、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル、ピリメタニル、フルジオキソニル、プロピコナゾール及びロスマリン酸の計 10 種に適用した。卓上 NMR から得られた定量用標準品の qNMR 純度は、別に実施した高磁場 NMR から得られた qNMR 純度と差異 2%以内で良好に一致した。ただし、卓上 NMR の場合、共鳴信号の分離が悪くなるため、あらかじめ積分範囲を十分に吟味する必要があることが示唆された。

A. 研究目的

一般に、我々が手にする市販試薬（標準品）に表示された純度は、クロマトグラフィーによる面積百分率法で値付けされた相対純度である場合が多く、その場合クロマトグラム上で検出できない水分や不純物等の含量は無視される。したがって、食品や医薬品をはじめとする、これらの規格試験では、標準品を開発した試薬会社、購入してからの保管状態、不純物の組成の違いにより、分析結果や規格値に対する適否判定が、試験機関によって異なることが懸念される。このような問題の解決に、定量 NMR (qNMR) は非常に有効である。

現在、qNMR は、我が国の食品、医薬品の品質に関する公定法を収載した、食

品添加物公定書及び日本薬局方の中で、定量用標準品の規格試験として採用されている。NMR 装置としては ¹H 共鳴周波数 400 MHz 以上の高磁場 NMR の利用が規定されている。高磁場 NMR は、その装置の大きさ、導入費、ヘリウム充填による維持費がかかるため、必ずしも全ての分析機関に置かれているものではない。食品添加物公定書や日本薬局方において、定量用標準品の規格試験を実施するのは、400 MHz 以上の高磁場 NMR を保有し、定量用標準品を開発・販売する試薬会社である。したがって、上述の全ての分析機関に NMR 装置が普及していないことは問題とならない。しかしながら、NMR は高い定性能と定量能を兼ね備えた優れた分析機器である。定量用標

準品だけでなく、その他の試薬や各条品目の規格試験への展開が期待される。

近年、国内外で卓上 NMR の開発が進んでいる。卓上 NMR は LC/MS や GC/MS と同程度の価格で導入可能であり、さらにヘリウム充填が必要ないことから、今後は全ての分析機関に必ず 1 台置かれているような環境が整うと予想される。

そこで本研究では、卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究の一環として、第 9 版食品添加物公定書に記載されているアゾキシストロビン、カフェイン、ジフェニルアミン、ジフェノコナゾール、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル、ピリメタニル、フルジオキシニル、プロピコナゾール及びロスマリン酸の計 10 種の定量用標準品について、卓上 NMR を用いた qNMR の真度及び精度を評価することとした。

B. 研究方法

B-1) 装置

高磁場 NMR 装置として、日本電子(株)製の JNM-ECZL600G (600.17 MHz) を用いた。卓上 NMR は、マグリテック社製の Spinsolve 60ULTRA Carbon (62.38 MHz) を用いた。化学シフトは内部標準物質:1,4-BTMSB- d_4 または DSS- d_6 のピークを 0 ppm に合わせた。

B-2) 試薬類

アゾキシストロビン (Cat No. 010-24281)、ジフェノコナゾール (Cat No. 042-25241)、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル (Cat No. 138-02632)、ピリメタニル (Cat No. 164-21753)、フルジオキシニ

ル (Cat No. 064-06001)、プロピコナゾール (Cat No. 169-16771) 及びロスマリン酸 (Cat No. 182-02691) は富士フィルム和光純薬 (株) から購入した。カフェイン (Cat No. 56396-100MG) は Sigma-Aldrich 社、ジフェニルアミン (Cat No. D0872) は東京化成工業 (株)、*p*-ヒドロキシ安息香酸 (Cat No. 18508-62) はナカライテスク社製を用いた。

重アセトン (Cat No. 012-26681)、重アセトニトリル (Cat No. 019-26691)、重ジメチルスルホキシド (Cat No. 048-34251)、重水 (Cat No. 047-34243) 及び重メタノール (Cat No. 138-18703) は富士フィルム和光純薬 (株) から購入した。

qNMR 用基準物質である 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 (Cat No. 024-17031) 及び 3-(トリメチルシリル)-1-プロパン-1,1,2,2,3,3- d_6 -スルホン酸ナトリウム (DSS- d_6) 認証標準物質 (Cat No. 044-31671) は富士フィルム和光純薬 (株) から購入した。

B-3) 試料調製

冷蔵庫から取り出した試薬を室温に戻るまでデシケーターの中で静置させた。続いて、試薬の蓋を開封し、ウルトラミクロ天秤の側に 30 分以上静置させた。食品添加物公定書の試薬規格に倣い、試料を精密に量りとり、重水素化溶媒を加えて溶解させた。この液 0.6 mL を外径 5 mm の NMR 試料管に移して封管し、qNMR 測定に付した。

B-4) qNMR 測定条件

高磁場 NMR、卓上 NMR とともに定量

的な測定条件にしたがった。すなわち、遅延時間は 60 秒に設定した。また、公定法にしたがって、サンプルの回転は止めて、かつ ^{13}C デカップリングを有効にした。取り込み時間は、高磁場 NMR で 4 秒、卓上 NMR で 3.2 秒に設定した。なお、卓上 NMR で ^{13}C デカップリングを有効にすると、取り込み時間は 3.2 秒に固定される。qNMR は非連続に 3 回測定した。

B-5) データ処理

高磁場 NMR 及び卓上 NMR で取得した FID (free induction decay) は、MestReNova software v14.2.1 (Mestrelab 社) で処理した。窓関数の設定を外し、ゼロフィルでポイント数を 512K まで増やした。フーリエ変換を行った後、位相とベースラインをマニュアルで補正し、定量用の qNMR スペクトルとした。このスペクトル上の共鳴信号を積分し、下記の式にしたがって試料の絶対純度 (P_s) を算出した。

$$P_s = \frac{A_A}{A_{IC}} \times \frac{H_{IC}}{H_A} \times \frac{M_A}{M_{IC}} \times \frac{W_{IC}}{W_s} \times P_{IC}$$

ここで、 A 、面積； H 、プロトン数； M 、分子量 (g/mol)； W 、秤量値 (mg)； P 、絶対純度 (%)； A 、分析種； IC 、内部標準物質 (1,4-BTMSB- d_4 または DSS- d_6)； s 、試料。

(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

高磁場 NMR と卓上 NMR から得られたスペクトルを比較し、両スペクトルで積分範囲を統一した。卓上 NMR と高磁

場 NMR から得られる qNMR 純度の差を Table 1 に示した。以降は、試料毎に qNMR 測定の結果を考察する。

C-1) アゾキシストロビン

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 1 に示す。アゾキシストロビンの l 及び m の共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 0.8%であった。また、600 MHz 及び 60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値 (99.0%以上) を満たしていた。

C-2) カフェイン

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。カフェインの b、c 及び d の共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 0.6%であった。また、600 MHz 及び 60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値 (98.0%以上) を満たしていた。

C-3) ジフェニルアミン

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 3 に示す。ジフェニルアミンの a~j 全ての共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 0.5%であった。また、600 MHz 及び 60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値 (99%以上) を満たしていた。

C-4) ジフェノコナゾール

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 4 に示す。ジフェノコナゾールの a 及び b の共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 1.2%であった。ま

た、600 MHz 及び 60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値（97.0%以上）を満たしていた。

C-5) *p*-ヒドロキシ安息香酸

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 5 に示す。*p*-ヒドロキシ安息香酸の a~d 全ての共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 1.8%であった。また、600 MHz 及び 60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値（98.0%以上）を満たしていた。

C-6) *p*-ヒドロキシ安息香酸メチル

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 6 に示す。*p*-ヒドロキシ安息香酸メチルの a~d の共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 0.4%であった。また、600 MHz 及び 60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値（98.0%以上）を満たしていた。

C-7) ピリメタニル

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 7 に示す。ピリメタニルの a~f の共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 0.8%であった。また、600 MHz 及び 60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値（99.0%以上）を満たしていた。

C-8) フルジオキシソニル

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 8 に示す。フルジオキシソニルの b~f の共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 1.4%であった。また、

600 MHz 及び 60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値（99.0%以上）を満たしていた。

C-9) プロピコナゾール

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 9 に示す。プロピコナゾールの a 及び b の共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 0.4%であった。また、600 MHz 及び 60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値（97.0%以上）を満たしていた。

C-10) ロスマリン酸

共鳴周波数 600 MHz 及び 60 MHz で取得した NMR スペクトルを Fig. 10 に示す。ロスマリン酸の f~m の共鳴を用いて、絶対純度を算出したところ、600 MHz と 60 MHz の差は 1.4%であった。60 MHz の結果は、食品添加物公定書に記載されている規格値（95%以上）を下回っていた。この理由として、本研究で用いたロスマリン酸が定量用ではなく、細胞生物学用であったことが挙げられた。

D. 結論

本研究では計 10 種の定量用標準品に対して、卓上 NMR を用いた qNMR を検討した。Fig に示したとおり、卓上 NMR では磁場の大きさが小さくなるため、単純な化学構造をとるカフェイン、*p*-ヒドロキシ安息香酸及び *p*-ヒドロキシ安息香酸メチルでは問題にならないが、その他の物質については共鳴信号の分離が悪かった。そのため、不純物に由来する共鳴信号を避けるように積分範囲を設定したところ、卓上 NMR と高磁場 NMR

から得られる qNMR 純度の結果は、差異 2%以内で良好に一致した (Table 1)。

不純物由来の共鳴信号がスペクトル上の広範囲で観察される場合、卓上 NMR による定量は困難が予想される。本研究で用いた定量用標準品のように、高純度な試薬や添加物製品の品質管理においては、卓上 NMR も十分に活用できると考えられた。また、今回は積分による定量法を検討したが、不純物由来の信号を分離可能 (理論上) なピークフィッティング¹⁾や CRAFT²⁾ (complete reduction to amplitude frequency table) による手法、またピーク高さ法なども積極的に検討していく必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) Schoenberger, T.; Menges, S.; Bernstein, M. A.; Perez, M.; Seoane, F.; Sykora, S.; Cobas, C. *Anal. Chem.* (2016) 88, 3836–3843.
- 2) Krishnamurthy, K.; *Magn. Reson. Chem.* (2013) 51, 821–829.

F. 研究発表

1. 学会発表等

- 1) 加藤菜帆, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天然苦味料ニガヨモギ抽出物の成分規格作成を目的とした基礎的検討, 日本食品化学会 第28回総会・学術大会, 2022年5月19日
- 2) 西崎雄三, 建部千絵, 石附京子, 増本直子, 吉田久美, 杉本直樹, 佐藤恭子, 外部標準法定量NMR (EC-qNMR) によるアントシアニンの純度測定, 日本食品化学会 第28回総

会・学術大会, 2022年5月19日

- 3) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹: 既存添加物: 乾留抽出物製品のPAHs定量分析法の開発と実態調査. 第59回全国衛生化学技術協議会年会 (2022.10.31) (川崎市)
 - 4) 西崎雄三, 石附京子, 吉村弘伸, 松熊伸也, 朝倉克夫, 末松孝子, 杉本直樹: Q 値を指標にした外部標準法定量 NMR(EC-qNMR)の測定自動化とその定量精度について. 第61回NMR討論会(2022.11.8) (高知市)
 - 5) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 乾留抽出により得られる既存添加物の成分比較 (木酢液・チャ乾留物・モウソウチク乾留物). 日本食品衛生学会第118回学術講演会 (2022.11.11) (長崎市)
 - 6) 都築明日香, 西崎雄三, 増本直子, 鈴木俊宏, 兎川忠晴, 杉本直樹: 外部標準法定量NMR (EC-qNMR): 試料間でレシーバーゲインが異なるときの補正について. 第4回日本定量NMR研究会年会 (2022.12.16) (東京)
 - 7) 吉成知也, 関根葵, 小林直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 工藤由起子, 渡辺麻衣子: MALDI-ToF MSを用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究. 日本農芸化学会2023年度大会 (2023.3) (オンライン開催)
- ### 2. 論文発表等
- #### 2-1. 総説
- 1) 西崎雄三: qNMR に基づく相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量分析. 日本食品衛生学雑誌, 2022 6月;63(3), J51–J53.
 - 2) 西崎雄三: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ. ぶんせき,

2022 12 月;12, 498-503.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1. 各定量用標準品における 600 MHz と 60 MHz から算出した qNMR 純度の差

定量用標準品	規格値	絶対純度の差
アゾキシストロビン	99.0%以上	0.8%
カフェイン	98.0%以上	0.6%
ジフェニルアミン	99%以上	0.5%
ジフェノコナゾール	97.0%以上	1.2%
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸	98.0%以上	1.8%
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸メチル	98.0%以上	0.4%
ピリメタニル	99.0%以上	0.8%
フルジオキシニル	99.0%以上	1.4%
プロピコナゾール	97.0%以上	0.4%
ロスマリン酸	95%以上	1.4%

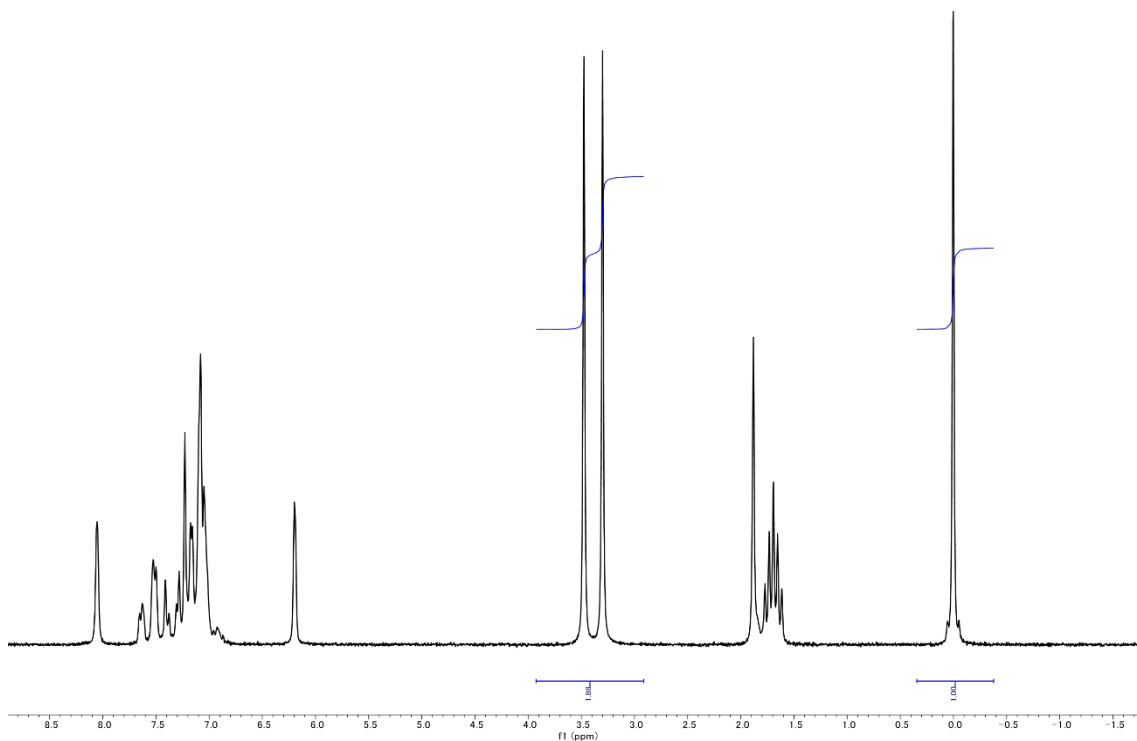
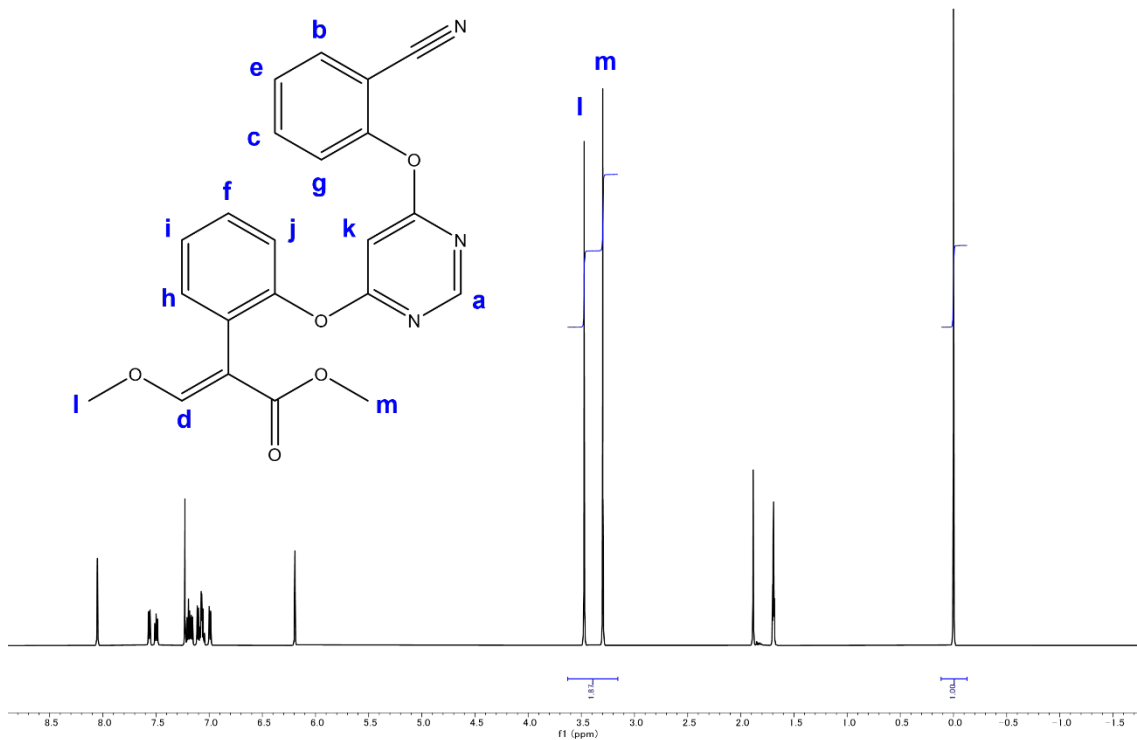


Fig. 1 アゾキシストロビンの qNMR スペクトル

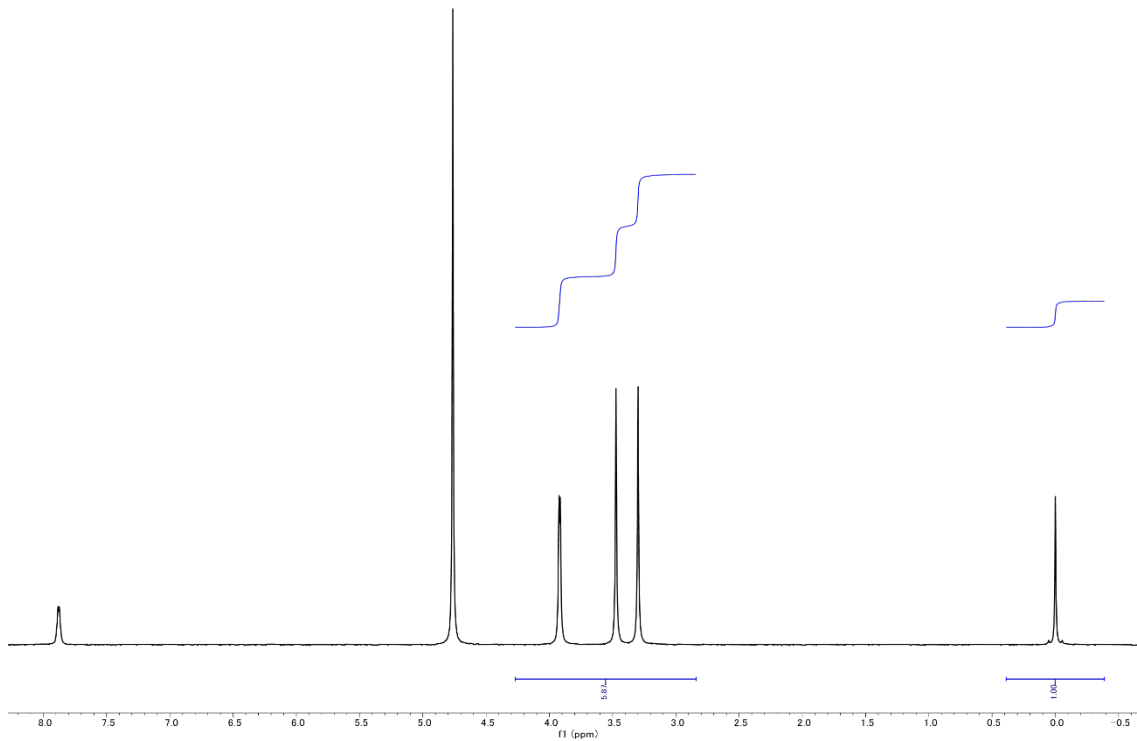
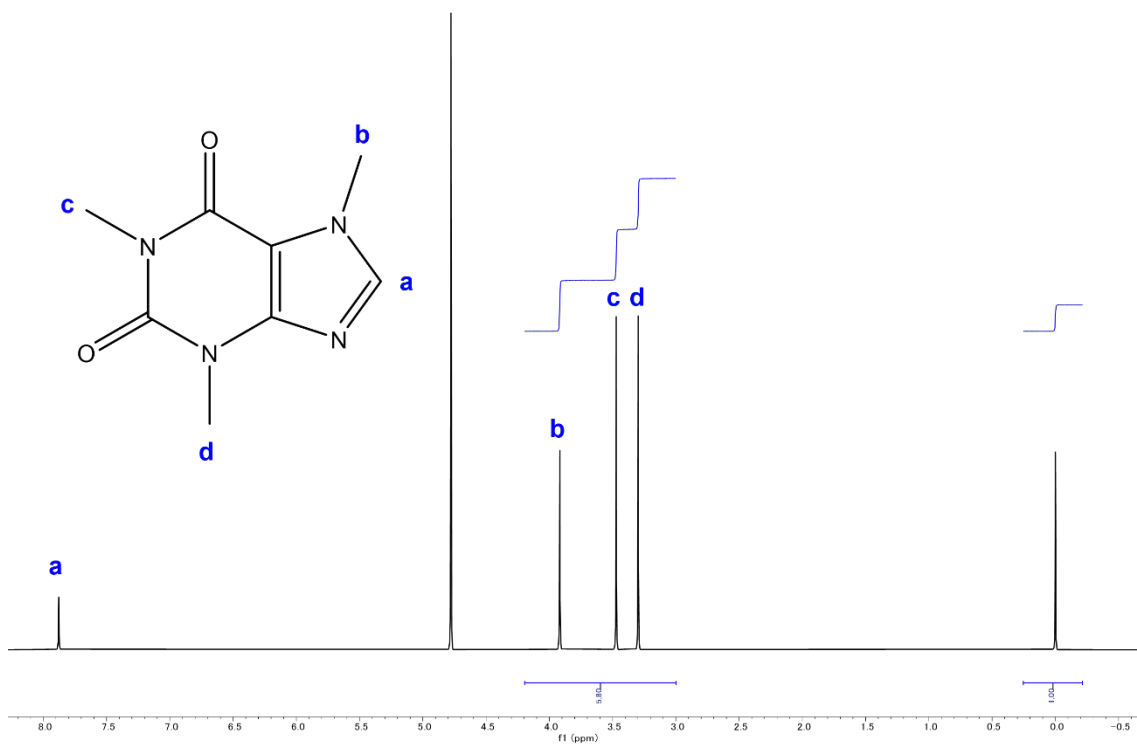


Fig. 2 カフェインのqNMR スペクトル

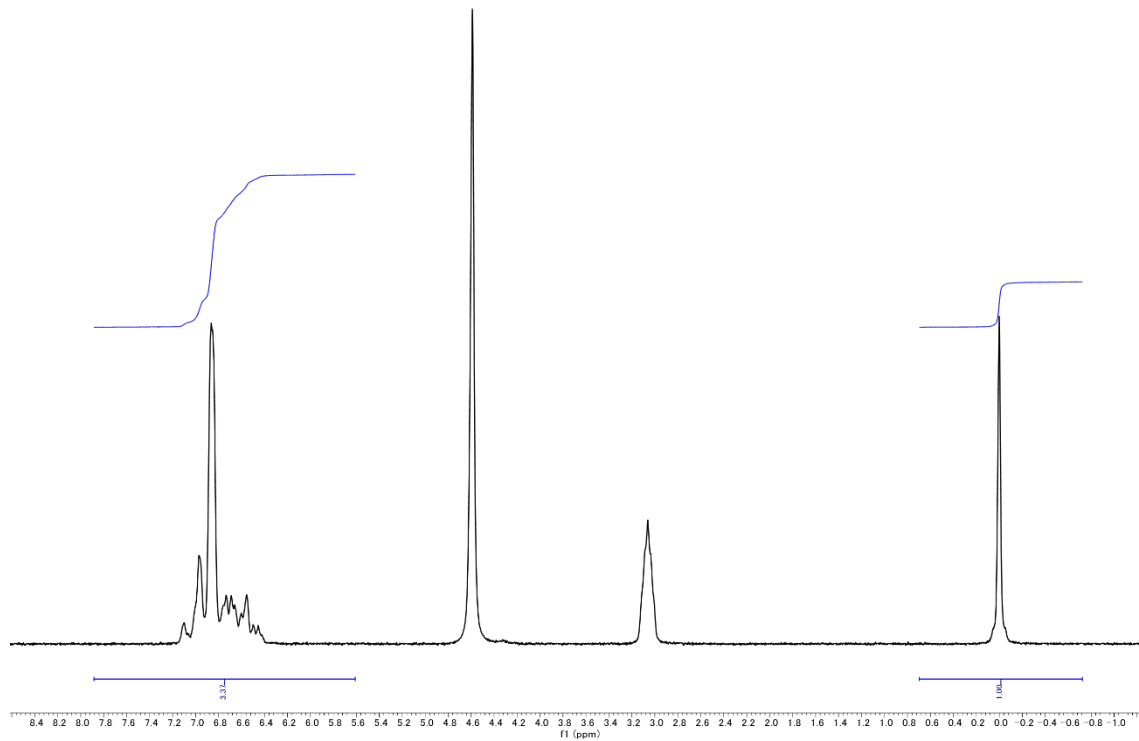
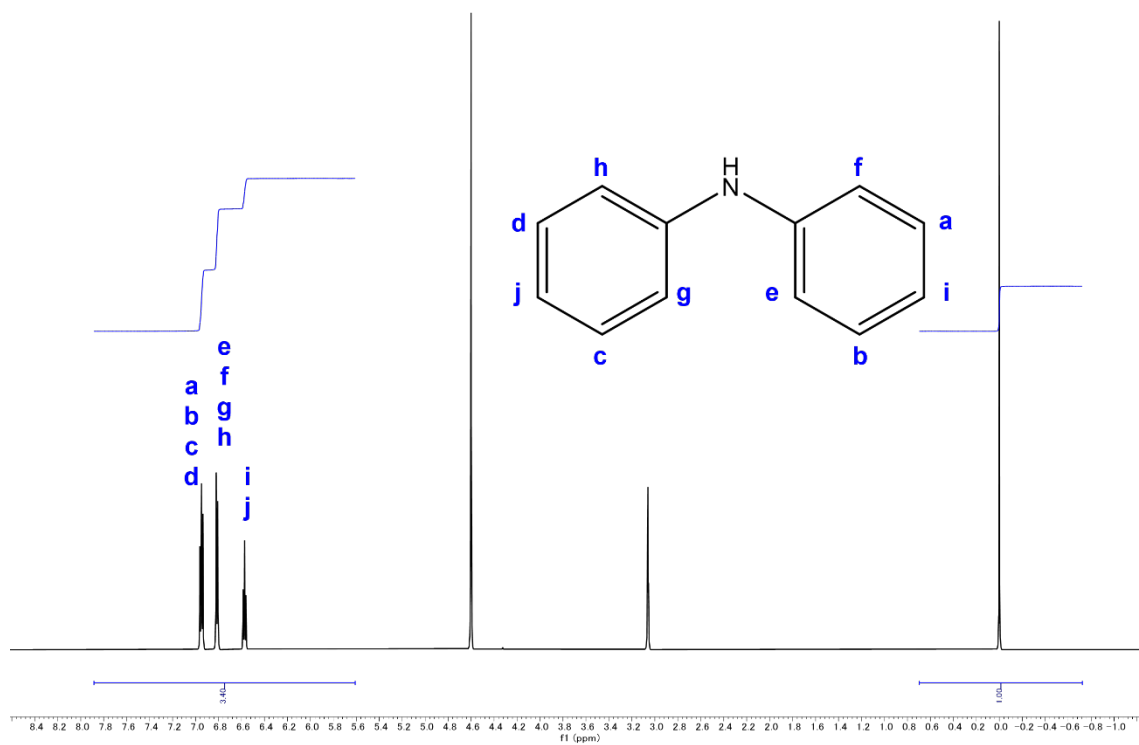


Fig. 3 ジフェニルアミンの qNMR スペクトル

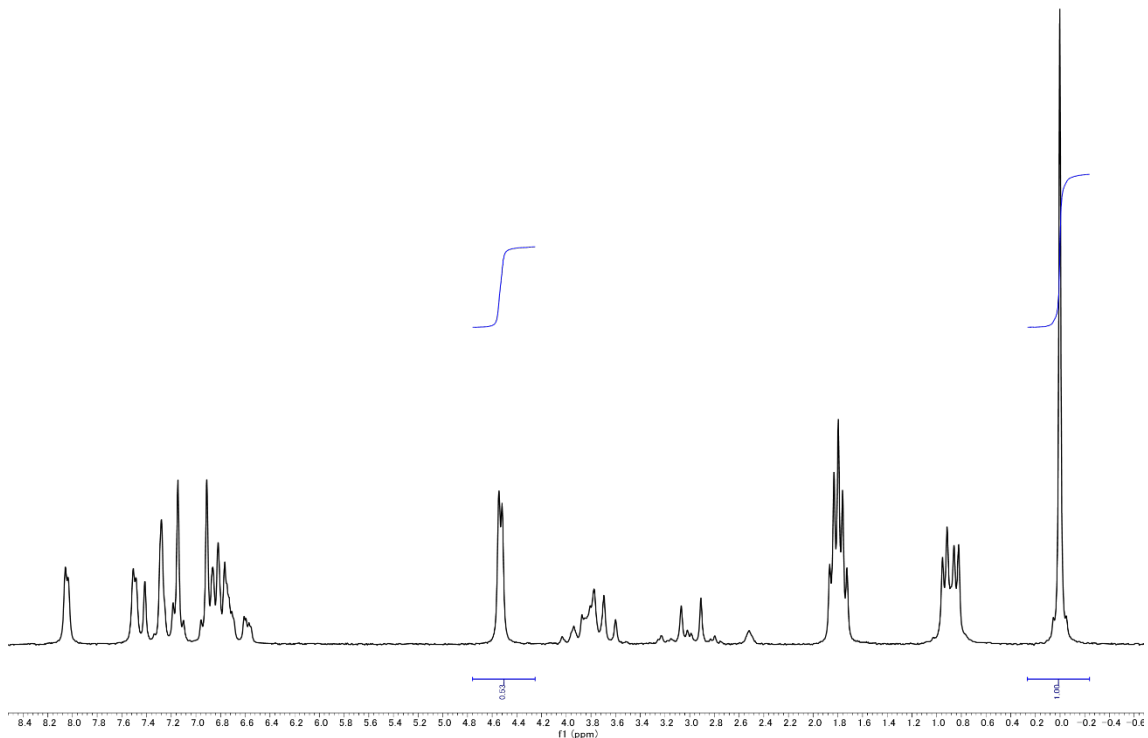
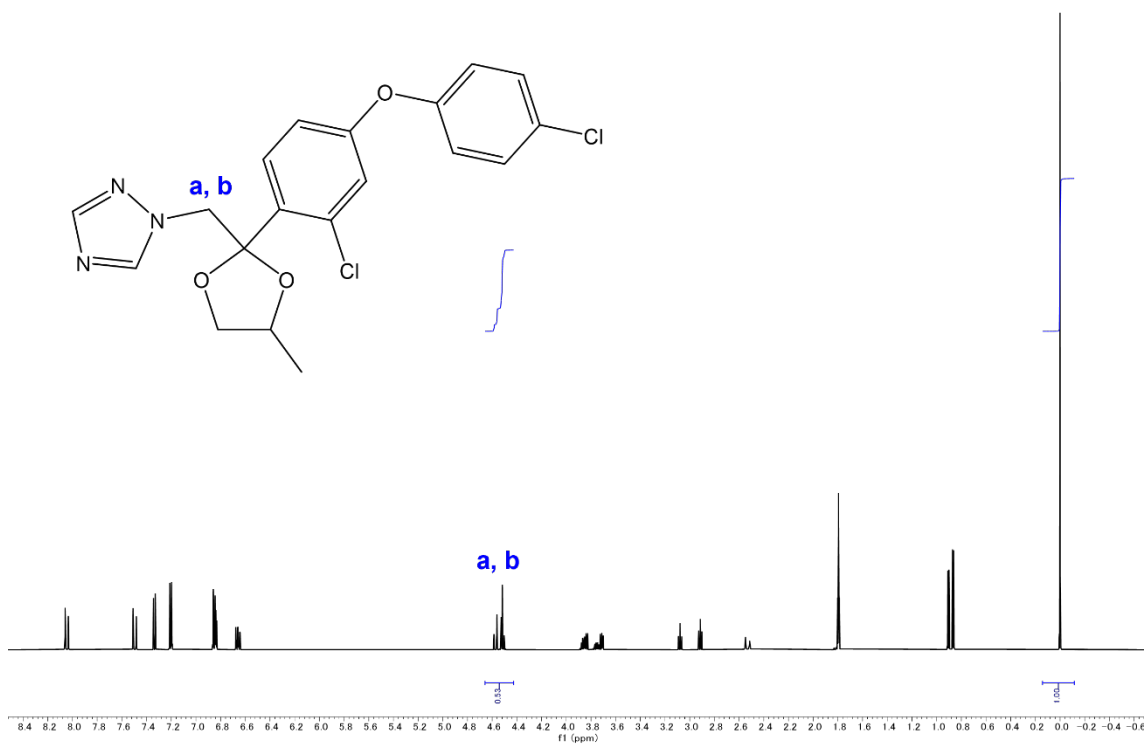


Fig. 4 ジフェノコナゾールの qNMR スペクトル

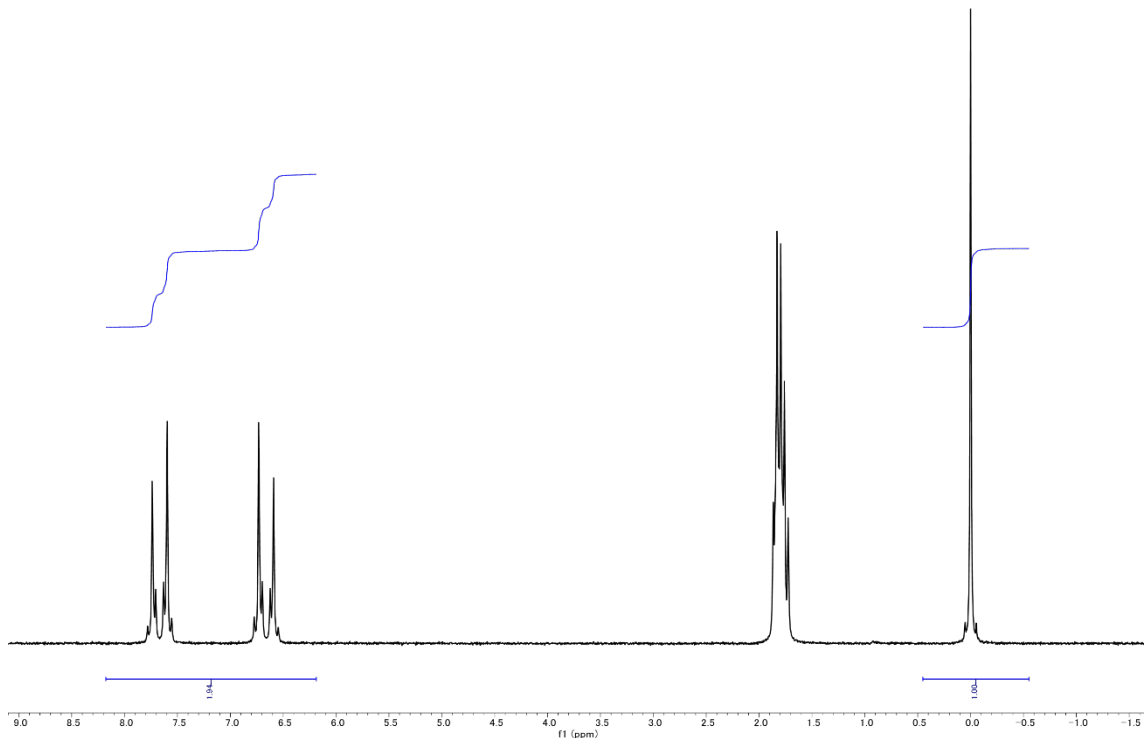
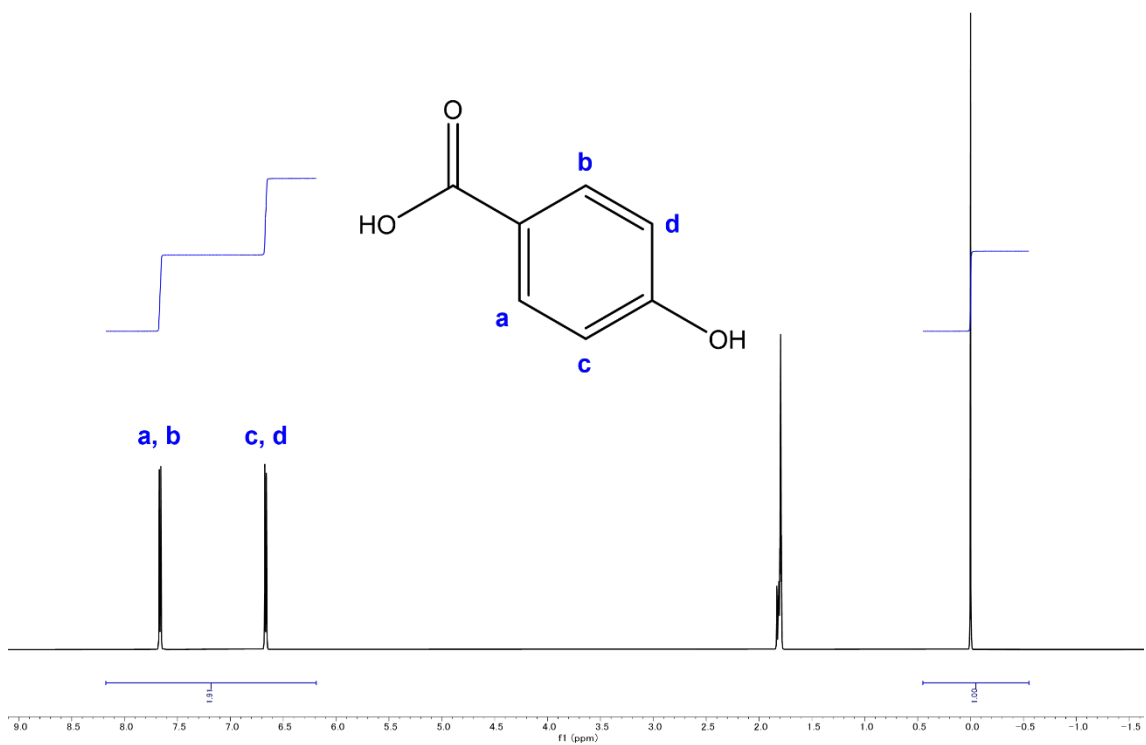


Fig. 5 *p*-ヒドロキシ安息香酸のqNMR スペクトル

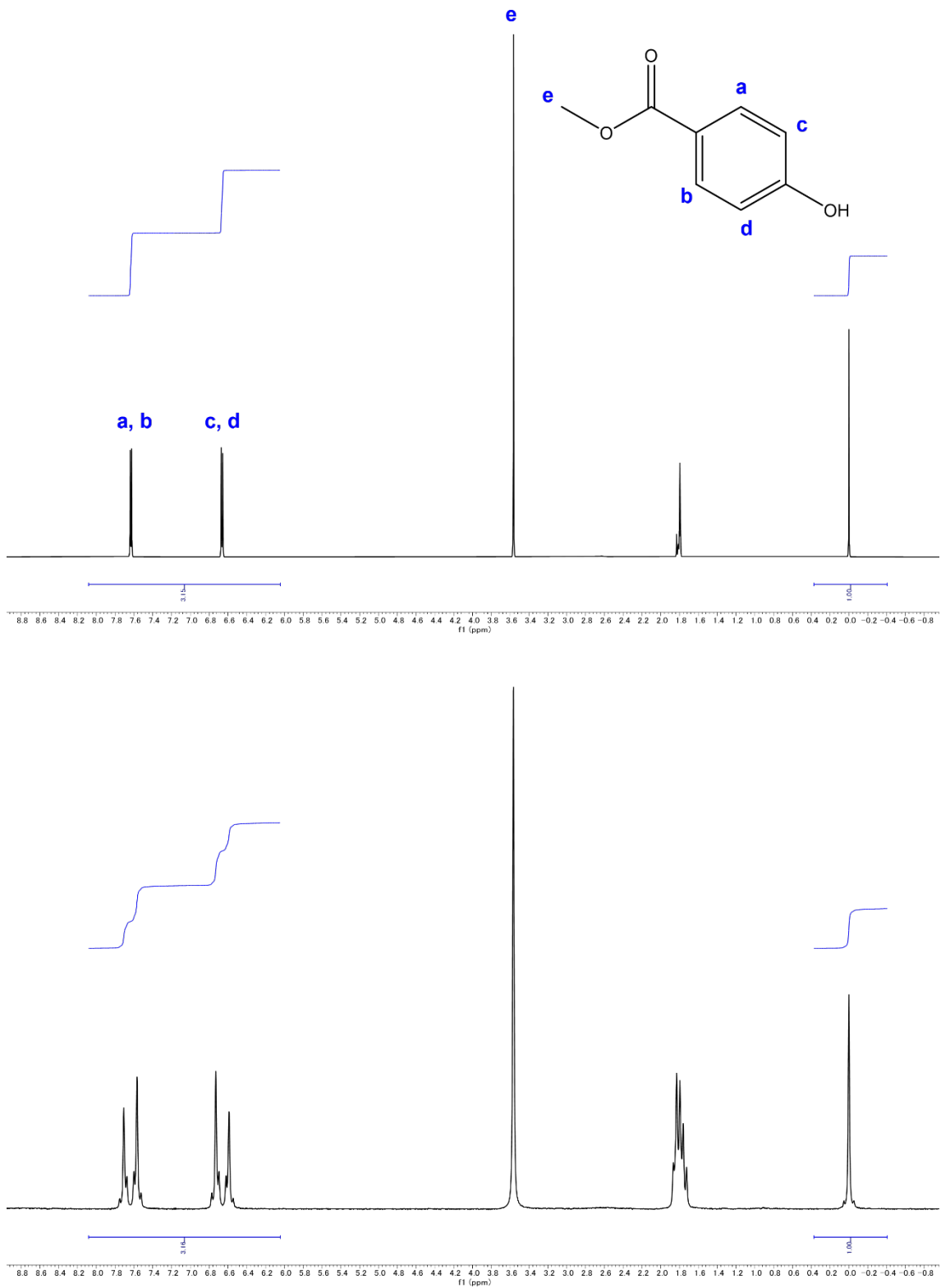


Fig. 6 *p*-ヒドロキシ安息香酸メチルの qNMR スペクトル

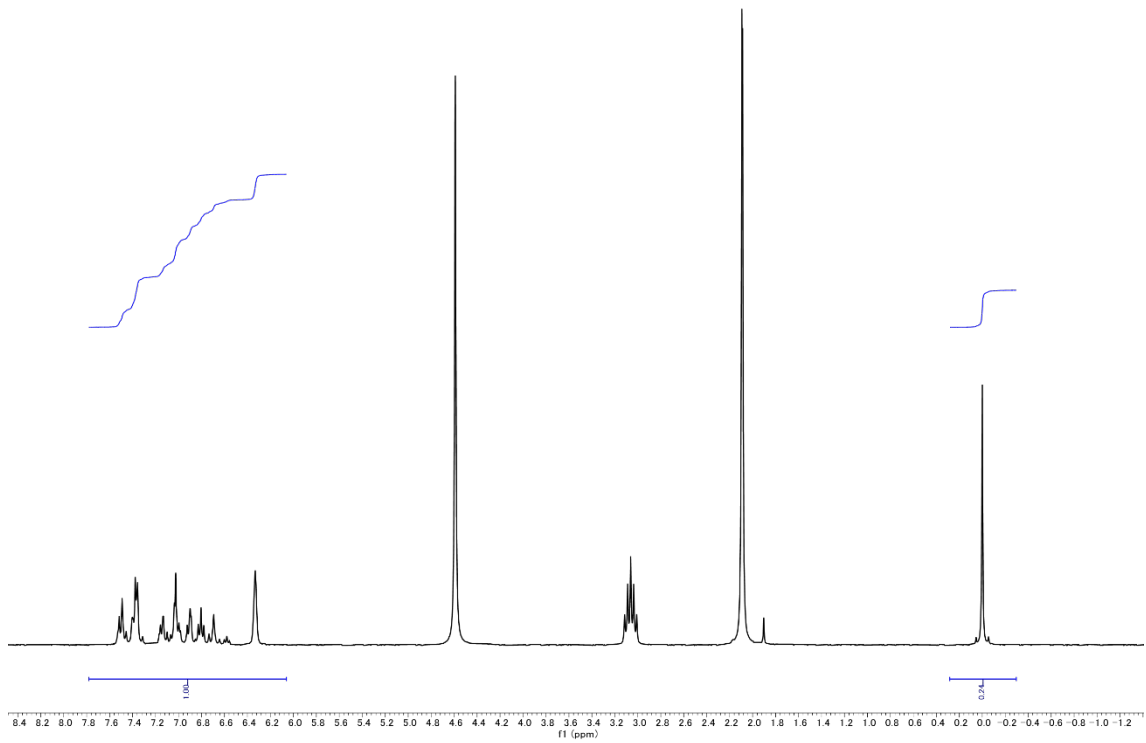
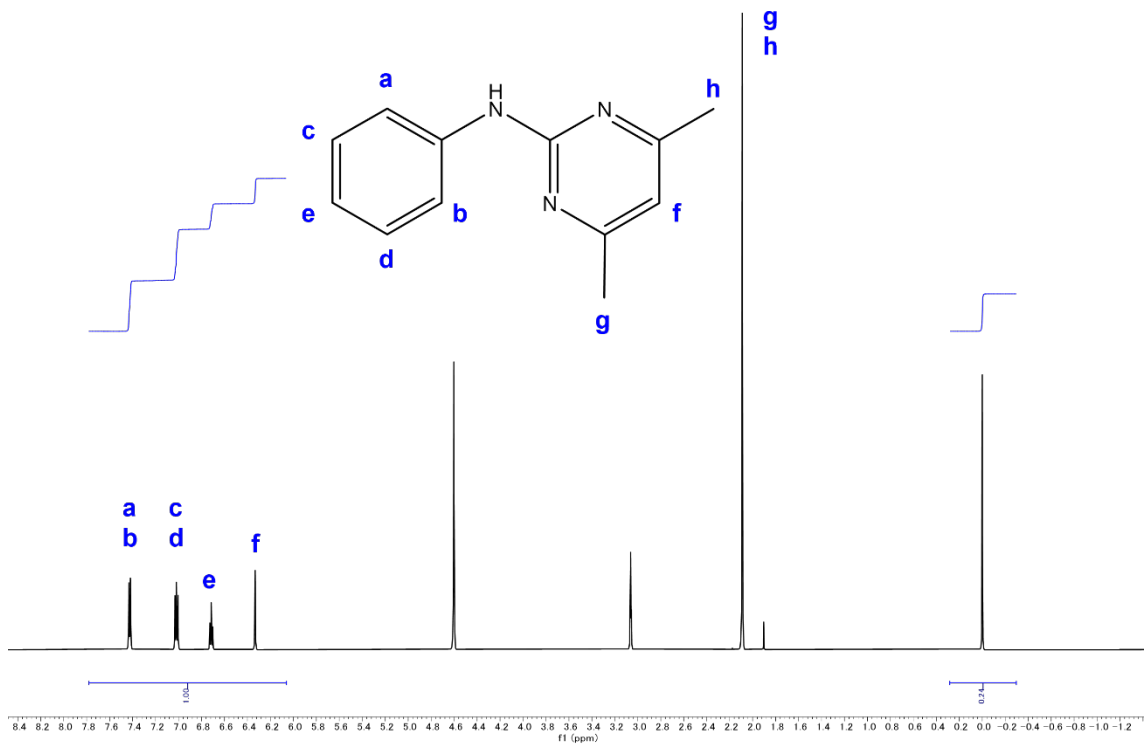


Fig. 7 ピリメタニルの qNMR スペクトル

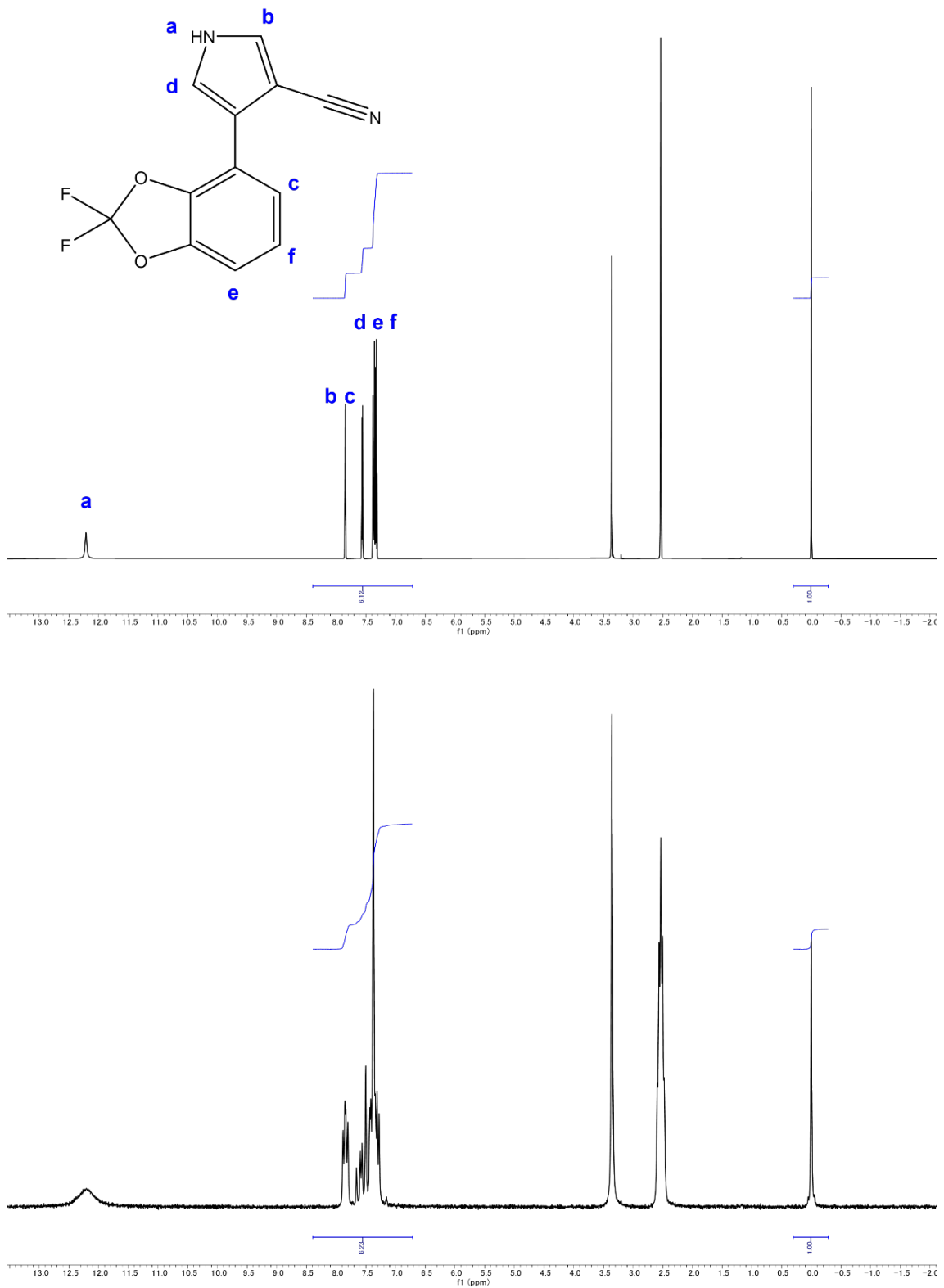


Fig. 8 フルジオキシニルの qNMR スペクトル

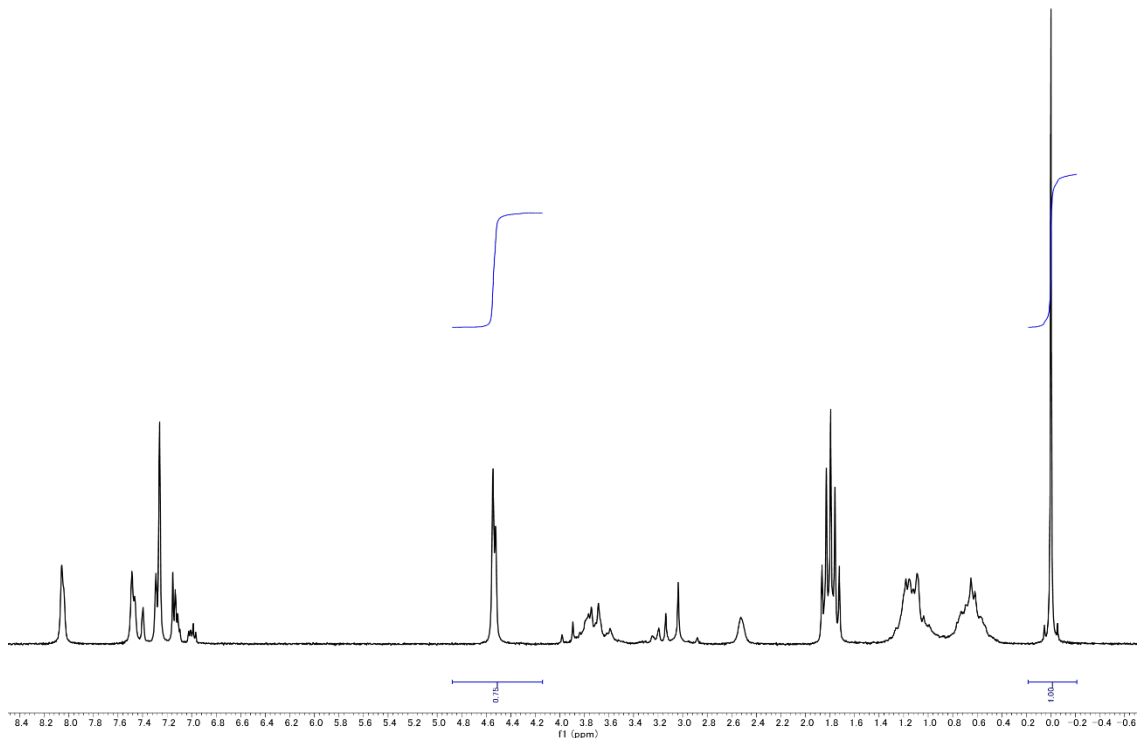
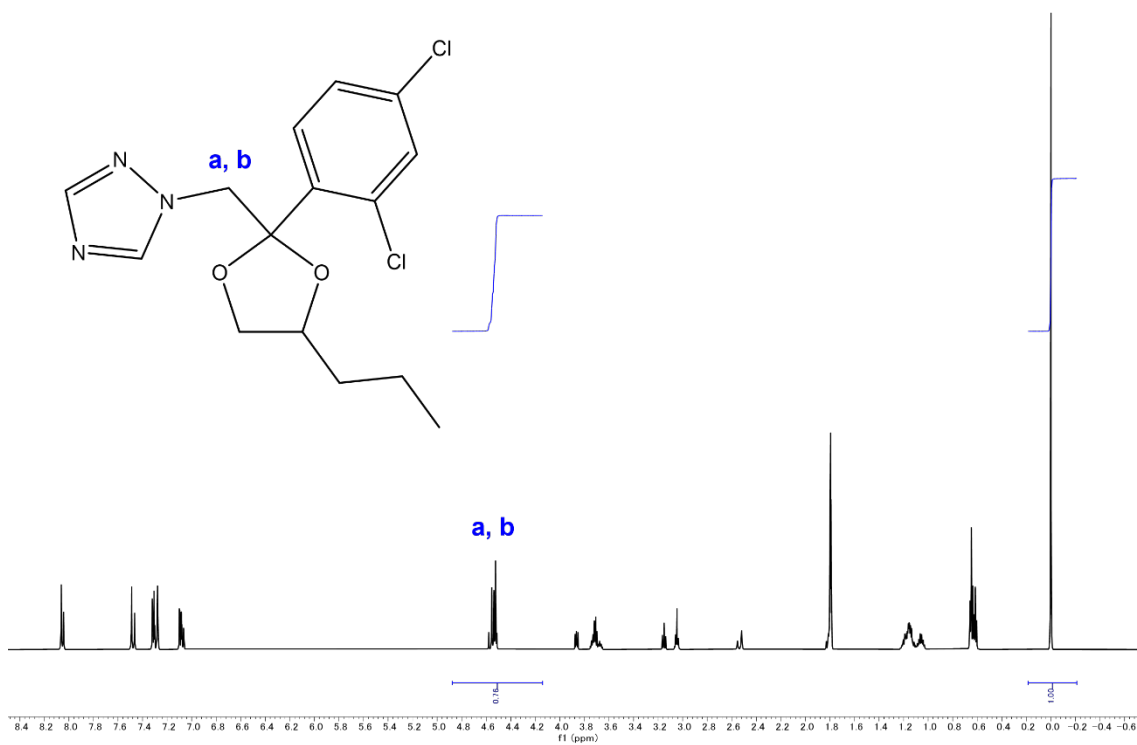


Fig. 9 プロピコナゾールの qNMR スペクトル

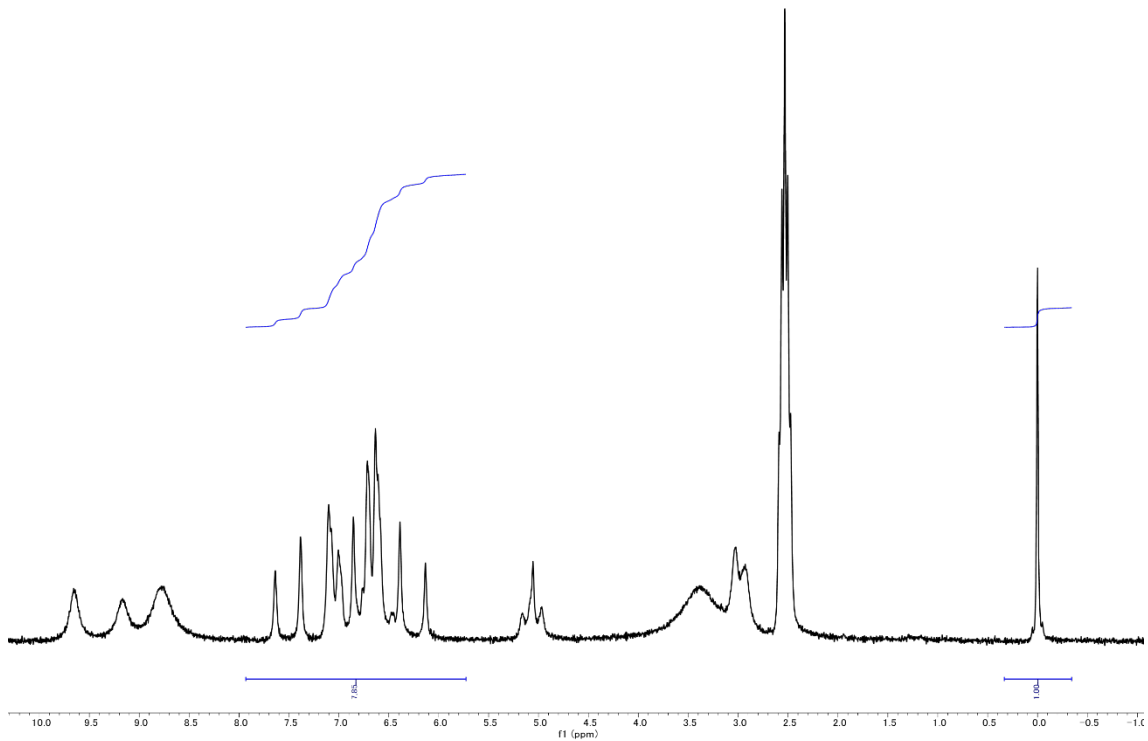
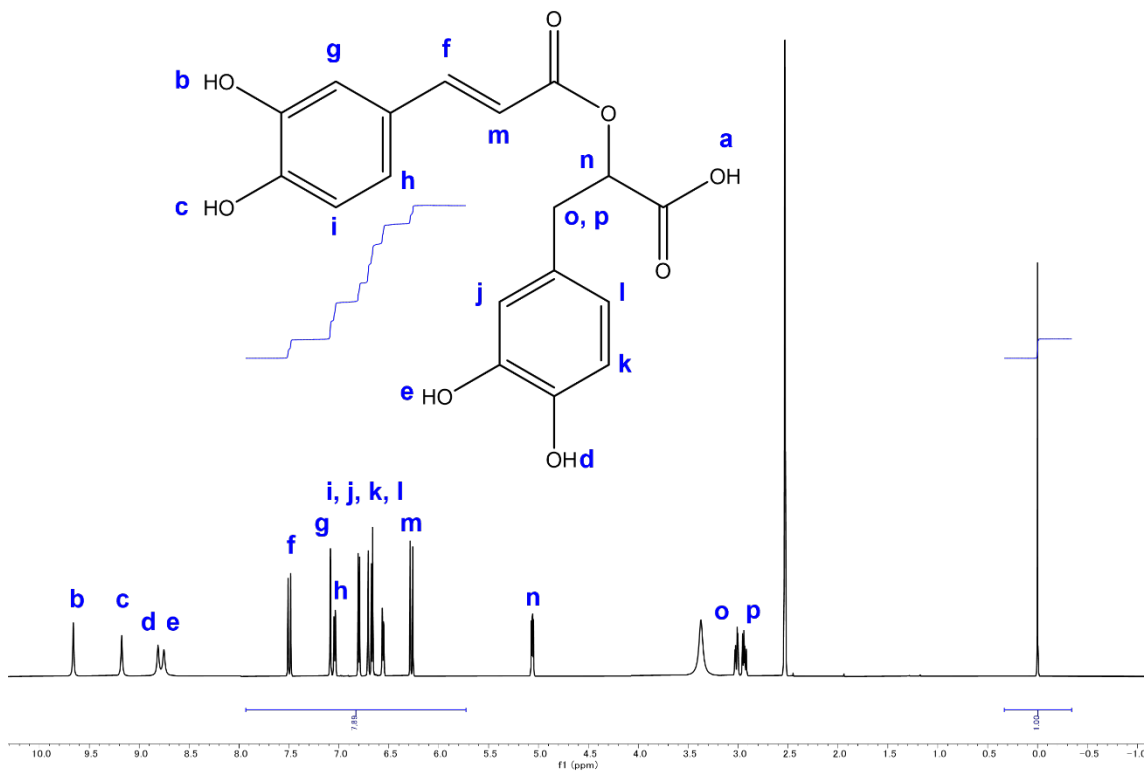


Fig. 10 ロスマリン酸の ^1H NMR スペクトル

