

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850091

研究課題名(和文)核磁気共鳴(NMR)技術を利用した食品中の化学物質分析法の確立

研究課題名(英文)Development of an absolute quantification method for food components in processed foods by ¹H quantitative NMR

研究代表者

大槻 崇(Ohtsuki, Takashi)

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部・主任研究官

研究者番号：30401011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食品の品質や安全性の評価に関する分析値の質の保証が国内外で重要な課題となっており、食品中の様々な化学物質に対する信頼性の高い分析法の開発が望まれている。本研究では、食品添加物等を対象に定量核磁気共鳴を用いた信頼性が高く、高精度で迅速な食品中の化学物質分析法の確立に関する検討を行った。その結果、食品添加物であるサッカリンナトリウムでは、確立した分析法は十分な真度、精度を有するとともに従来法と同等の精度で迅速な分析が可能であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established and validated a method for determining the saccharin sodium content in various processed foods by solvent extraction and ¹H-qNMR. In the recovery test, the proposed method gave satisfactory recoveries (87.2-103.4%) and repeatabilities (0.4-9.9%) for various processed foods. In the analysis of commercially processed foods containing saccharin sodium, all saccharin sodium contents determined by the proposed method were in good agreement with those obtained by a conventional method based on dialysis and HPLC. Moreover, this method can achieve rapid quantification and yields analytical data with traceability to the International System of Units (SI) without the need for an authentic analyte standard. Therefore, the proposed method is a useful and practical tool for the determination of saccharin sodium in processed foods.

研究分野：食品科学

キーワード：NMR 定量 食品添加物

1. 研究開始当初の背景

食品の機能性や安全性への国民の関心は非常に高く、食品中の様々な有用成分、有害汚染物質等の定量法が国内外で開発、利用されている。これらの分析では、試料を精製した後、GC、LC等の機器を用いることが多いが、試料によっては煩雑な前処理等の多くの問題があり、有用な定量法が完全に確立されているとは言い難い。また、計量学的に正確な純度が付与された標準物質は少なく、得られる分析値の信頼性が損なわれる可能性を否定できない。さらに、新規化合物や天然化合物の多くは、定量用標準物質が無く、正確な定量が不可能な場合も多い。こうした従来の分析法の限界は、食品の品質や安全性を評価する上でも解決しなければならない大きな課題であった。

2. 研究の目的

食品の品質や安全性の評価に関する分析値の質の保証が国内外で重要な課題となっており、食品中の様々な化学物質に対する信頼性の高い分析法の開発が望まれている。

NMRは有機化合物の化学構造の決定などに用いる定性分析法として広く利用されているが、近年のNMR装置の高度化、プローブの改良、シグナル処理技術の向上などにより、有機化合物の定量に対する有用な分析技術とも考えられている。実際、 ^1H や ^{13}C などの核種を用いたNMRによる天然抽出物や食品中の含有成分、医薬品の代謝産物の定量分析への利用例も報告されている。特に ^1H NMRを用いた定量法(^1H -qNMR)は、スペクトル上に観察される内部標準および測定対象物質のシグナル面積強度比が「モル濃度×水素数」に比例することから、測定対象物質およ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)を求めることが可能である。最近では、この内部標準に計量学的に正確に純度が算出された国際単位系(SI)にトレーサブルな認証標準物質(Certified Reference Material: CRM)またはそれに準じた化合物を用いた ^1H -qNMRを報告されている¹⁾。このような内部標準を用いることにより、得られる定量値のSIトレーサビリティは確保されるとともに本法の分析値の信頼性が向上し、本法は農薬、添加物、生薬などの定量分析へ応用されている²⁻⁵⁾。また、 ^1H -qNMRは検出手法が化合物の物性値(吸光や蛍光等)に依存しない方法であることから、個々の測定対象物質と同一の定量用標準物質を必要とせず、広範な有機化合物の絶対定量が可能である。さらに、食品などの混合物に含まれる測定対象成分を定量する際、 ^1H NMR上で測定対象成分と夾雑成分のシグナルが十分に分離されていれば、測定対象物質の正確な定量が可能である。そのため、多段階のクリーンアップや誘導体化等の前処理操作が不要となる可能性がある。ゆえに、 ^1H -qNMR

は迅速性、簡便性、選択性の面で従来法よりも優れた分析法であると考えられる。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。

そこで、本研究では、食品添加物等を対象に ^1H -qNMRを用いた信頼性が高く、高精度、迅速、簡便な食品中の化学物質分析法を開発することを目的とした。また、開発した方法を市販食品の分析へ応用し、従来法との比較より本法の有効性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 試薬

DSS- d_6 標準物質は、和光純薬製を用いた(純度 $92.5 \pm 0.6\%$ (Lot.No.TLP6524)および $92.5 \pm 0.6\%$ (Lot.No.AWH6585))。 ^1H -qNMR測定溶媒は、0.5%TFAおよび0.1294 mg/g DSS- d_6 含有DMSO- d_6 を使用した。

(2) 装置

核磁気共鳴装置(NMR): オートサンプラー付きECA800(800 MHz)(日本電子(株)製)。

HPLC: LC-10AD_{VP}システム(ポンプ: LC-10AD_{VP} × 2, 恒温槽: CTO-10A_{VP}, 多波長検出器: SPD-M10A_{VP}, デガッサー: DGU-14A, オートサンプラー: SIL-10AD_{VP}, データ処理装置: LC solution)(島津製作所製)。

はかり: ME235S(ザルトリウスメカトロニクス製), BM-20(エー・アンド・デイ製), XP2U(メトラー・トレド製)

(3) 各標準物質のNMR測定

各試料約10 mgを精密に量り、 ^1H -qNMR標準溶液または重溶媒約1.0 gに溶解した。この溶液を外径5 mmのNMR試料管に入れ、密閉しNMRに付した。

(4) 食品中の化学物質分析

試験溶液の調製

食品試料5 gを遠沈管に採り、飽和塩化ナトリウム水溶液20 mL、10%硫酸4 mLを加えて酸性とした。ジエチルエーテル20 mLを加えて、ホモジナイザーを用いて試料をホモジナイズした後、遠心分離(3000 rpm, 5 min)し、ジエチルエーテル層を分取した。下層にジエチルエーテル20 mLを加え同様に処理し、上層を合わせ40 以下で減圧濃縮した。得られた抽出物に ^1H -qNMR標準溶液1 gを正確に加えたものを ^1H -qNMR試験溶液とした。

^1H -qNMR測定

^1H -qNMR試験溶液を外径5 mmのNMR試料管に入れ、密閉し、 ^1H -qNMRに付した。DSS- d_6 のシグナル面積強度を9.000としたときの測定対象の面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、食品中の測定対象の含量(g/kg)を算出した。

$$\text{Content (g/kg)} = \frac{I_{SM}/H_{SM}}{I_{DSS}/H_{DSS}} \times \frac{M_{SM}/W_{FD}}{M_{DSS}/C_{DSS}}$$

ただし、 I_{SM} =測定対象物質の特定基のシグナル面積強度、 I_{DSS} =DSS- d_6 のシグナル面積強度(9.000)、 H_{SM} =測定対象物質の特定基のプロトン数、 H_{DSS} =DSS- d_6 のプロトン数($\text{CH}_3 \times 3=9$)、 M_{SM} =測定対象物質の分子量、 M_{DSS} =DSS- d_6 の分子量(224.36)、 W_{FD} =各食品の秤取量(g)、 C_{DSS} = $^1\text{H-qNMR}$ 標準溶液のDSS- d_6 濃度(0.1294 mg/g)。

4. 研究成果

$^1\text{H-qNMR}$ による精密な定量には、各試料に由来するNMRシグナルの帰属、シグナルのS/N比、分子内の各シグナルの分離度などの情報が不可欠である。まず、甘味料等のスペクトルパターン情報を収集し、このうち、 $^1\text{H-qNMR}$ へ適用可能と判断されたサッカリンナトリウムを対象に $^1\text{H-qNMR}$ を用いた食品中の含量分析法の確立に関する検討を行った。

(1) 直線性

サッカリンの各シグナル(7.98ppm, 8.04 ppm, 8.19 ppm)の直線性は、8点の濃度(0.2-23.5 mg/g)のシグナル面積強度を基に作成した一回帰直線の決定係数(r^2)より評価した。その結果、全てシグナルで検討した濃度範囲で良好な直線性(R^2 : 0.9999)を示すことが判明した。

(2) 添加回収試験

食品衛生法で定める使用基準でサッカリンナトリウムの使用が認められている食品のうち、あん、キャンディー、ジャム、しょうゆ漬、シロップ、たくあん漬、煮豆、酢、清涼飲料水および粕漬けについて添加回収試験を行った。サッカリンナトリウムの添加濃度は、各食品の使用上限濃度および0.075 g/kgの2点で検討した。その結果、各試料からのサッカリンナトリウムの回収率は、使用上限濃度の添加で87.2~103.4%、0.075 g/kgの添加で90.9~101.4%と良好な回収率が得られた。また、相対標準偏差(RSD)は使用上限濃度では0.4~5.3%、0.075 g/kgの添加では0.8~9.9%であり、併行精度も良好であった。さらに、定量に用いたサッカリンの各シグナル間の定量値に大きな違いは認められなかった。なお、粕漬けでは8.19 ppmのシグナル、シロップでは8.19 ppmおよび8.04 ppmのシグナル、キャンディーでは8.19 ppmのシグナルについては、食品中の内在成分と考えられるシグナルと十分な分離が得られなかったため、定量には用いなかった。

本法の定量下限については、定量に用いたシグナルのS/N比、サッカリンナトリウムの定量における本法の真度、精度を基に算出した。添加回収試験では、検討した濃度のうち、

使用上限濃度及び0.075 g/kgにおいては、すべての試料で回収率は70%以上、併行精度は10%以下であった。食品衛生法施行規則第一八条の二の二第三号及び第一八条の六第三号に規定する精度管理に関する「精度管理の一般ガイドライン」では、内部精度管理における回収率の目標値を70%~120%と定められている。これらの値を参照すると、今回の結果はいずれの試料においても、0.075 g/kg以上ではおおむね目標値を満たしていることが確認された。また、 $^1\text{H-qNMR}$ において、S/Nが100以上あれば、1%の誤差範囲で正確な定量が可能であることを我々は確認している。以上の結果および直線性の検討結果を考慮して、本法の定量下限を0.040 g/kgとした。日本でサッカリンナトリウムの使用が認められている食品の使用上限濃度は、0.1~2.0 g/kgであることを考えると、本法はこれらの食品中のサッカリンナトリウムの定量に適用可能と考えられた。

(3) 室内精度

本法の室内精度を評価するため、サッカリンナトリウムの使用が認められている食品のうち、あん、たくあんおよび酢を選択し、試料毎に同様の添加回収試験を1日に2併行で5日間繰り返した。なお、定量値は7.98 ppmのシグナルを用いて算出した。その結果、全ての試料および添加濃度において、回収率は95.6%~99.6%、併行精度は1.9%~3.9%、室内精度は2.0%~4.8%であった。従って、本法は食品中に含まれるサッカリンナトリウムの分析において、十分な真度および精度を有する測定法であることが判明した。

(4) $^1\text{H-qNMR}$ による市販食品中の

サッカリンナトリウム含量の測定

サッカリンナトリウムの使用が表示された食品5種(酢漬け、しょうゆ漬け、シロップ、酢および菓子)について、 $^1\text{H-qNMR}$ によるサッカリンナトリウムの含量測定を行い、得られた結果を通知試験法(試料溶液の調製: 透析法、分析: HPLC)の結果と比較した。その結果、全ての試料において、 $^1\text{H-qNMR}$ により算出されたサッカリンナトリウム含量は、通知試験法の結果とほぼ同等であることが確認され、本法は通知試験法と同程度に正確な定量結果を与えることが判明した。また、RSDについては、 $^1\text{H-qNMR}$ では0.9~8.6%、通知試験法では0.7~9.3%と本法は通常の食品添加物試験法としては実用上問題のない精度であると考えられた。なお、本法の分析時間は、通知試験法と比べ分析時間が大幅に短縮されるとともに、国際単位系にトレーサブルな内部標準を用いたことにより、得られる分析値の信頼性も向上した。

以上の結果より、今回確立した $^1\text{H-qNMR}$ を利用した分析法は、食品中のサッカリンナトリウム分析法として極めて有用であることが判明した。なお、平成24年12月にサッ

カリンカルシウムが食品添加物として指定されたが、本法はサッカリンカルシウムが使用された食品に対しても使用が可能と考えられた。

<引用文献>

Saito, T.; Ihara, T.; Koike, M.; Kinugasa, S.; Fujimine, Y.; Nose, K.; Hira, T. *Accred. Qual. Assur.* **2009**, *14*, 79-86.

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* **2009**, *16*, 28-33.

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, *食衛視* **2009**, *16*, 28-33.

多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤剛, 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.

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. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Takashi Ohtsuki, Kyoko Sato, Yutaka Abe, Naoki Sugimoto, Hiroshi Akiyama.

Quantification of acesulfame potassium in processed foods by quantitative ¹H NMR.

Talanta 131 712-718 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計3件)

Takashi Ohtsuki, Kyoko Sato, Naoki Sugimoto, Atsuko Tada, Hiroshi Akiyama, Absolute Quantification of Analytical Standard for Food Additive by ¹H Quantitative NMR, 3rd annual practical applications of NMR in industry conference (2015)

大槻崇, 加工食品中の食品添加物等の分析法の確立に関する研究, 日本食品化学学会第21回学術大会(2015)

Takashi Ohtsuki, Kyoko Sato, Yutaka Abe, Atsuko Tada, Naoki Sugimoto, Hiroshi Akiyama, Development of an absolute quantification method for food additives in processed foods by ¹H quantitative NMR, *Pacificchem2015* (2015)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

大槻 崇 (OHTSUKI Takashi)

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部・主任研究官

研究者番号: 30401011