

添加物 2-エチル-5-メチルピラジン（国際汎用香料）に関する追加資料
（評価依頼に際し提出した資料の誤りについて）

平成 21 年 9 月 18 日
厚生労働省医薬食品局
食品安全部基準審査課

1. 背景

2-エチル-5-メチルピラジンについては、平成 21 年 3 月 12 日付け厚生労働省発食安第 0312001 号により食品安全委員会に食品健康影響評価を依頼したところであり、食品安全委員会においては、本品目についての審議結果（案）の意見募集を 8 月 14 日に終了している。

今般、標記評価依頼に際し資料として提出した毒性試験報告書及びそれを引用した概要の一部に次のような誤りがあることが明らかとなった。（修正後の毒性試験報告書及び概要は、それぞれ添付資料 1 及び添付資料 2 のとおり。）

○引用文献 4「2-エチル-5-メチルピラジン及び 2-エチル-6-メチルピラジンの混合物のラットによる 90 日間反復経口投与毒性試験(2005)（(株)三菱化学安全科学研究所（厚生労働省委託試験））」

3.1 被験物質（その他関連の記載を含む。）

- （誤） 純度 99.71%（2-エチル-5-メチルピラジン 76.38%、2-エチル-6-メチルピラジン 23.33%）
- （正） 純度 99.71%（2-エチル-6-メチルピラジン 76.38%、2-エチル-5-メチルピラジン 23.33%）

○「2-エチル-5-メチルピラジンの概要」

3.(1) 反復投与毒性（その他関連の記載を含む。）

- （誤） 2-エチル-5-メチルピラジン 76.4%及び 2-エチル-6-メチルピラジン 23.3%の混合物
- （正） 2-エチル-6-メチルピラジン 76.4%及び 2-エチル-5-メチルピラジン 23.3%の混合物

以下、2-エチル-5-メチルピラジン及び 2-エチル-6-メチルピラジンの混合物を「混合物」、2-エチル-5-メチルピラジンを「5 メチル体」、2-エチル-6-メチルピラジンを「6 メチル体」という。

2. 評価依頼までの経緯

- (1) 混合物^{*1}の毒性試験は、厚生労働省の委託事業として、(株)三菱化学安全科学研究所(現在は三菱化学メディエンス(株)と改称)において実施されたものであり、その被験物質の組成について以下の経緯で確認が行われた。
- ・2005年11月、日本香料工業会は、製造元から購入した被験物質を(株)三菱化学安全科学研究所に提供した。その際に、製造元は、当該ロットは「異性体の合計で99%」である旨の分析証明を発行している(添付資料3)^{*2}。
 - ・2006年3月、(株)三菱化学安全科学研究所は、日本香料工業会から提供された被験物質のロットの5メチル体含有量について、製造元に直接、詳細に関する問合せを行った^{*2}。製造元はこのとき、当該ロットは「5メチル体及び6メチル体の混合物であり、純度99.71%(5メチル体76.38%、6メチル体23.33%の合計)」である旨の分析証明書を発行している(添付資料4)^{*3}。
 - ・また、2006年3月、日本香料工業会及び(株)三菱化学安全科学研究所は、製造元より、混合物の過去数ロットのGCクロマトグラムと二成分の含有比率に関するデータを得ている(添付資料5)。
- (2) (株)三菱化学安全科学研究所は、当該分析証明書に記載された含有比率を踏まえて毒性試験報告書を作成して厚生労働省に提出し、厚生労働省は、当該報告書に基づき資料を作成し、食品安全委員会に提出した。

3. 5メチル体と6メチル体の成分比率の確認経緯

厚生労働省では、食品安全委員会への『2-エチル-5-メチルピラジン』の評価依頼を行った後、日本香料工業会及び国立医薬品食品衛生研究所とともに、本品の成分規格の検討を開始した。その過程において、製造元が混合物のGCクロマトグラム上の2本のピークの5メチル体及び6メチル体への帰属を誤って逆にしている可能性が示唆された。

そこで、日本香料工業会は混合物のMSスペクトルの比較、『2-エチル-5-メチルピラジン』添加の有無による混合物のGCクロマトグラムの比較並びに5メチル体及び6メチル体の独自合成品と混合物とのGCクロマトグラム比較を行い、国立医薬品食品衛生研究所は『2-エチル-5-メチルピラジン』と混合物についてGCクロマトグラムの比較及びNMR分析を行った結果、厚生労働省として、製造元によるピーク帰属は逆で誤りであり、被験物質は6メチル体を主成分とする混合物であったことをそれぞれ確認した。その詳細は次のとおり。

^{*1} JECFA 規格において、『2-エチル-5-メチルピラジン』の含量は5-メチル体のみで95%以上と設定されている。一方、混合物の含量は5メチル体と6メチル体の合計で95%以上と設定されているが、両者の比率は規定されていない。

^{*2} 製造元は、これまでの国際流通においては、混合物中の成分比率を規定していなくとも特段の不都合が無かったことから、異性体の合計として分析証明を発行したものと考えられる。しかしながら毒性試験においては、投与量の決定に際し各物質の比率を明確にする必要があったため、(株)三菱化学安全科学研究所から製造元に対して、さらに詳細について問い合わせが行われた。

^{*3} 製造元は、GCのクロマトグラム上の2本のピークのうち、早い時間に出現するピークを沸点がより低いと想定している5メチル体に、遅い時間に出現するピークを沸点がより高いと想定している6メチル体に帰属していた。(GC-MS分析等は特に実施していなかった。)

(1) 日本香料工業会における検討

『2-エチル-5-メチルピラジン』の GC-FID による純度測定を行った際、メインピークの前後に不純物として微少なピークが検出された(図1)。

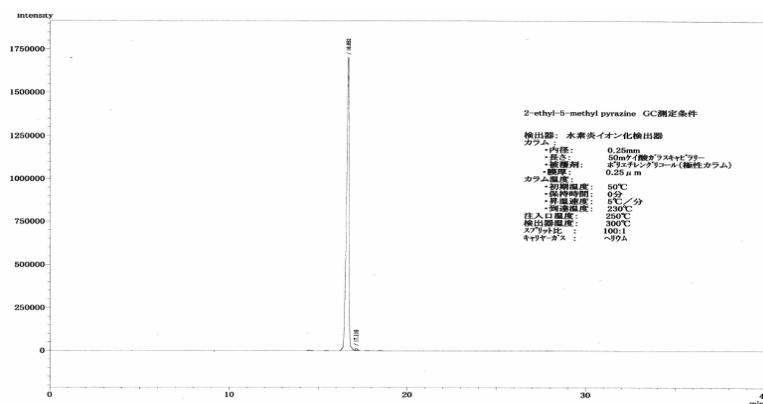


図1: 『2-エチル-5-メチルピラジン』の GC-FID クロマトグラム

混合物について製造元から提供されているデータでは溶出順が 5 メチル体⇒6 メチル体とされていたため、当初、不純物ピークのうちメインピークの直後に検出される不純物ピークを 6 メチル体と推定した。そこで、昇温条件等 GC の条件はほぼ変えずに『2-エチル-5-メチルピラジン』について GC-MS による確認を行った(図2)。ピーク No.1 はピーク No.2 と同様に m/z 122 に分子イオンピーク、m/z 121、94、56 及び 39 に特徴的なフラグメントイオンピークが観察されるなど、そのスペクトルパターンが類似していたが、ピーク No.3 及び No.4 の MS パターンはピーク No.2 のものとは大きく異なっていた。なおピーク No.3、4 についてはライブラリデータとの照合により、それぞれ 2,3,5-トリメチルピラジン、2-メチル-3-イソプロピルピラジンと同定された(添付資料6)。

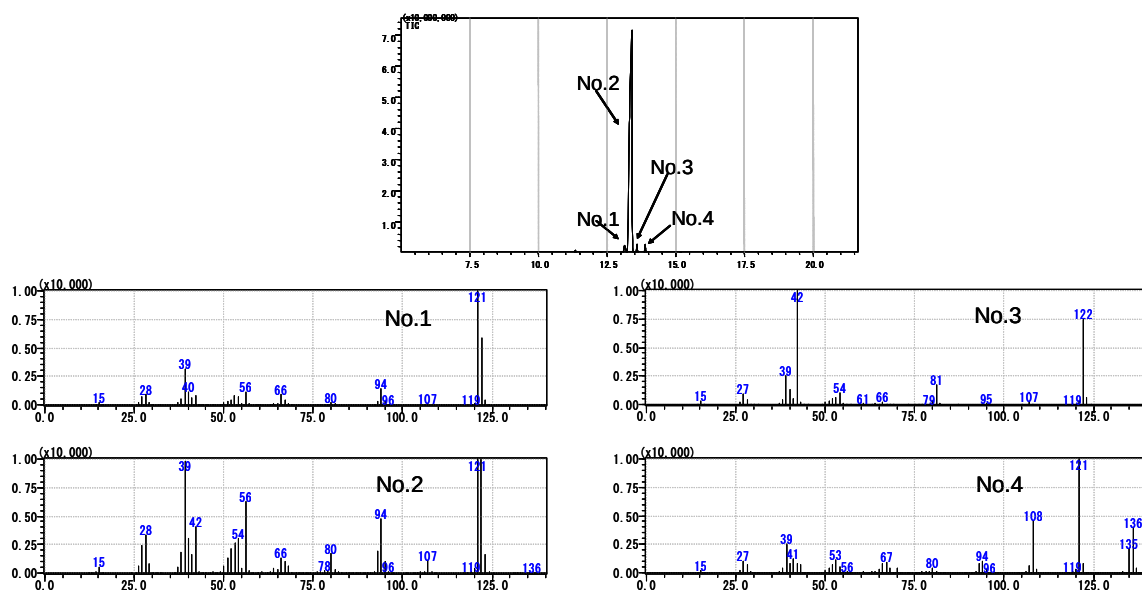


図2: 『2-エチル-5-メチルピラジン』の GC-MS 分析結果

さらに、混合物について GC-MS による確認を行ったところ（図 3）、『2-エチル-5-メチルピラジン』のピーク No.2 と溶出時間の一致するピーク No.2' の前に、『2-エチル-5-メチルピラジン』のピーク No.2 と同様の MS スペクトルを示すピーク No.1' が検出された。

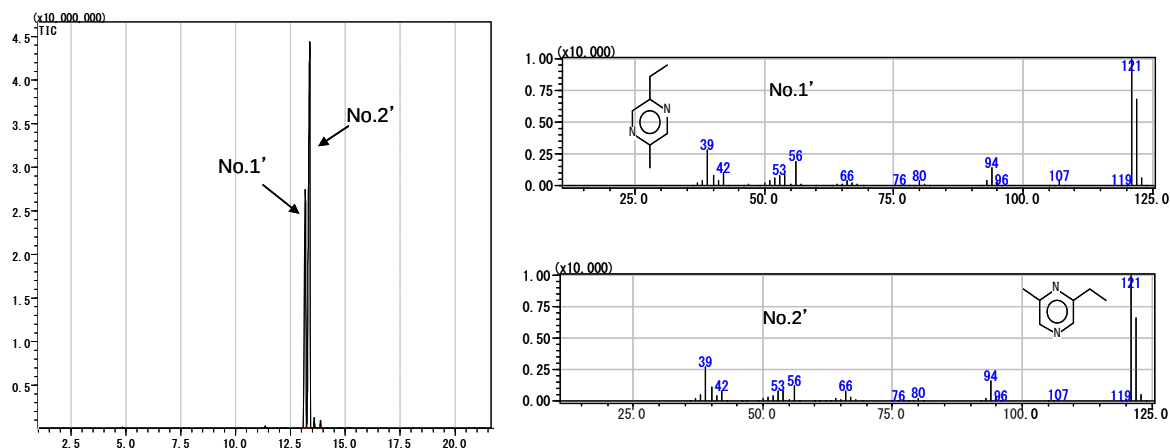


図 3：混合物の GC-MS 分析結果

これらのことから、被験物質の製造元が GC のクロマトグラム上の 2 本のピークの 5 メチル体及び 6 メチル体への帰属を誤って逆にしている可能性が示唆された。

そこで、別途購入した、被験物質とは別ロットの混合物に『2-エチル-5-メチルピラジン』を添加し GC-MS 分析を行ったところ、成分の組成比率が変わり、後方のピーク(製造元が 6 メチル体に帰属していたピーク)の比率が増大した(図 4)。したがって GC での溶出順は 6 メチル体⇒5 メチル体の順であり、被験物質は 6 メチル体を主成分とする混合物であることが判明した。

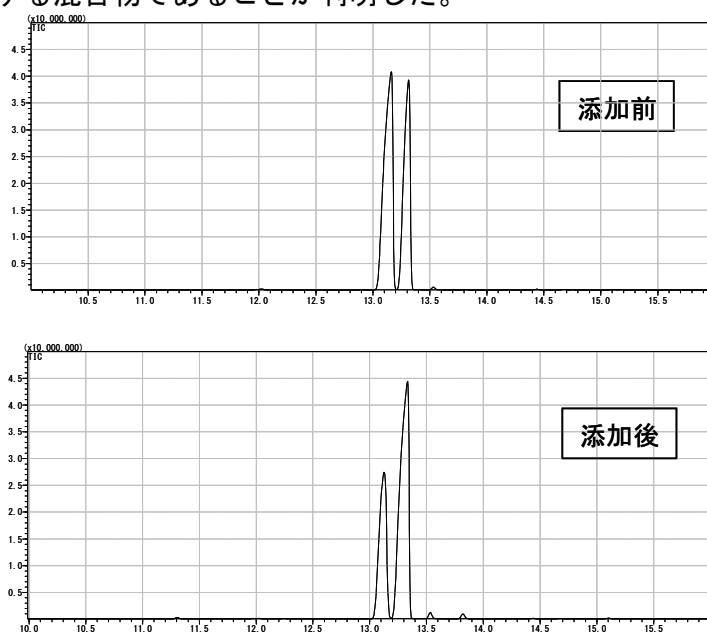


図 4：混合物への『2-エチル-5-メチルピラジン』の添加試験

また、GC での溶出順が 6 メチル体⇒5 メチル体であることを更に確認するべく、2,5-ジメチルピラジンおよび 2,6-ジメチルピラジンを用いて側鎖の増炭反応(図 5)を行うことで 5 メチル体と 6 メチル体を個々に合成して GC-FID 測定を行い、混合物と溶出時間を比較したところ、溶出順は、同じく 6 メチル体⇒5 メチル体の順であることを確認した(図 6)。

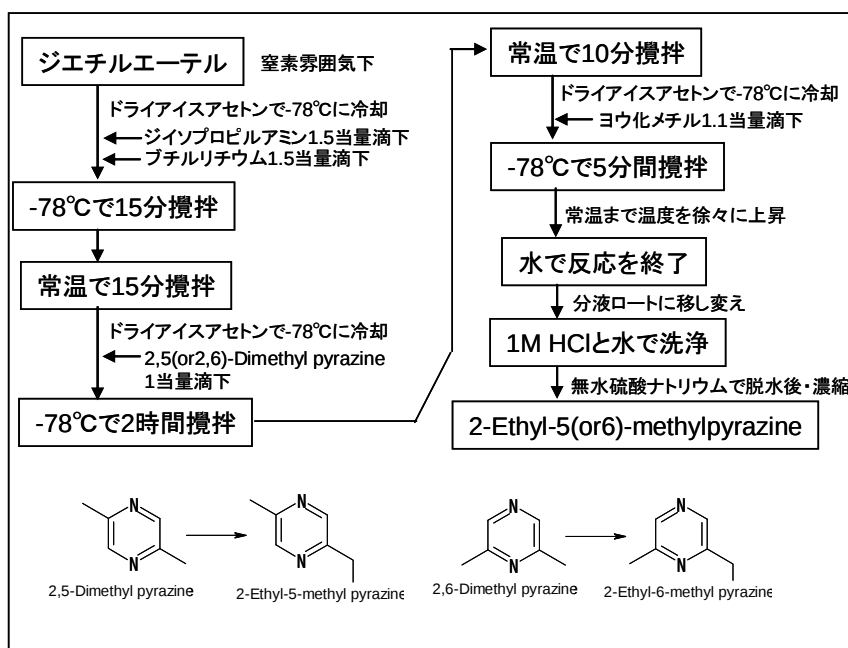


図 5 : 5 メチル体と 6 メチル体の合成経路

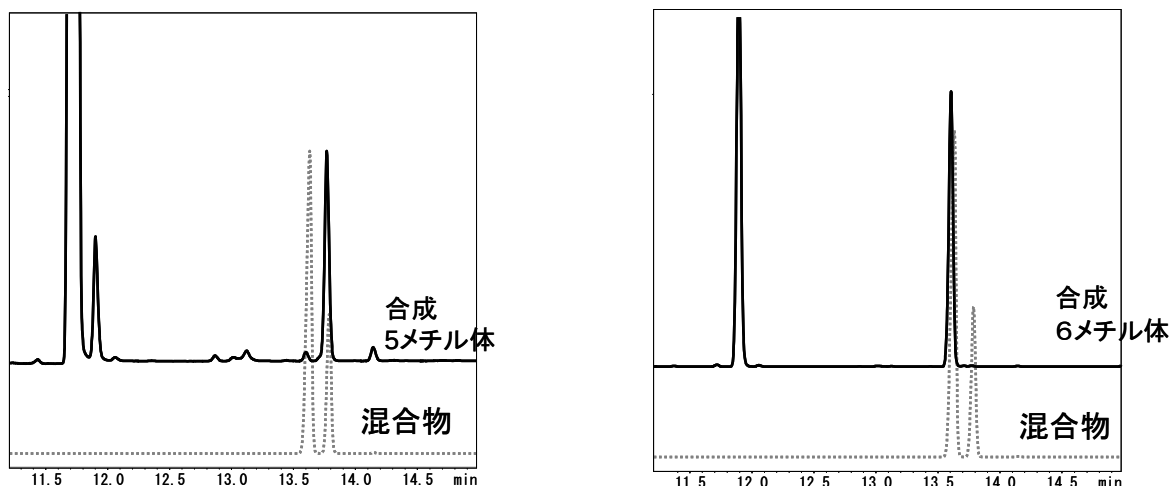
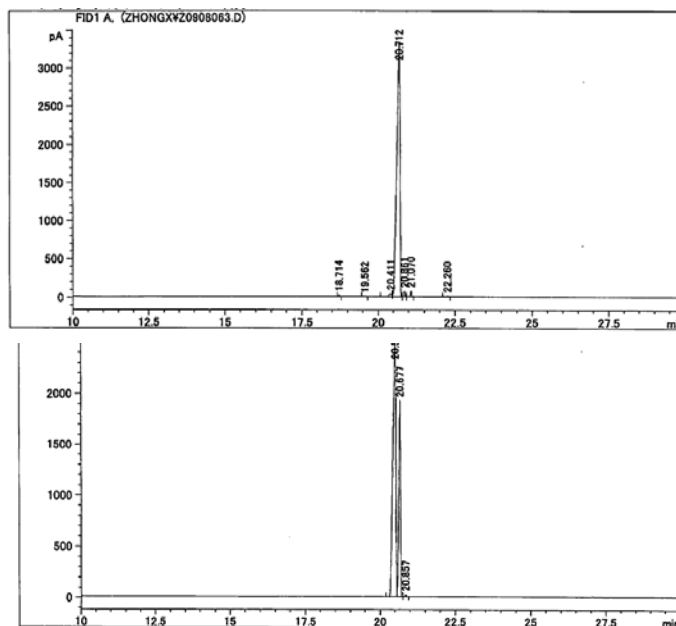


図 6 : 合成 5 メチル体、合成 6 メチル体の GC-FID クロマトグラムの比較

(2) 国立医薬品食品衛生研究所における検討

『2-エチル-5-メチルピラジン』および混合物について GC-FID 測定を行い、溶出時間の比較から、溶出順は 6 メチル体⇒5 メチル体であることを確認した(図 7)。

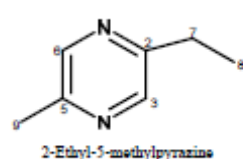


『2-エチル-5-メ
チルピラジン』
tR20.712 分

混合物
tR20.520 分、
20.699 分

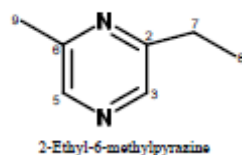
図 7 : 『2-エチル-5-メチルピラジン』及び混合物の GC-FID クロマトグラム

また、5 メチル体および 6 メチル体の構造を確認するため、『2-エチル-5-メチルピラジン』および混合物について NMR を測定した。まず、『2-エチル-5-メチルピラジン』は各種 NMR スペクトルデータより 5 メチル体と同定された。次に、混合物には 5 メチル体及び 6 メチル体の 2 種が含まれることが確認された(図 8)。さらに、混合物の 5 メチル体と 6 メチル体の存在比は ^1H NMR における低磁場領域のプロトン 2 個分のシグナル強度比より、およそ 3 : 7 と判明した(図 9)。(添付資料 7、8)



2-Ethyl-5-methyl pyrazine in CDCl_3			
position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	HMBC
2		155.4	
3	8.33 s	142.7	C-2, C-5
5		150.7	
6	8.34 s	143.6	C-2, C-5
7	2.79 q (7.8)	28.1	C-2, C-3, C-8
8	1.30 t (7.8)	13.6	C-2, C-7
9	2.51 s	21.0	C-5, C-6

5 メチル体



2-Ethyl-6-methyl pyrazine in CDCl_3			
position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	HMBC
2		157.6	
3	8.25 s	140.6	C-2, C-5
5	8.26 s	141.7	C-3, C-6
6		152.8	
7	2.79 q (7.9)	28.7	C-2, C-3, C-8
8	1.30 t (7.9)	13.8	C-2, C-7
9	2.52 s	21.5	C-5, C-6

6 メチル体

図 8 : 5 メチル体・6 メチル体の NMR データ(詳細は添付資料 7、8)

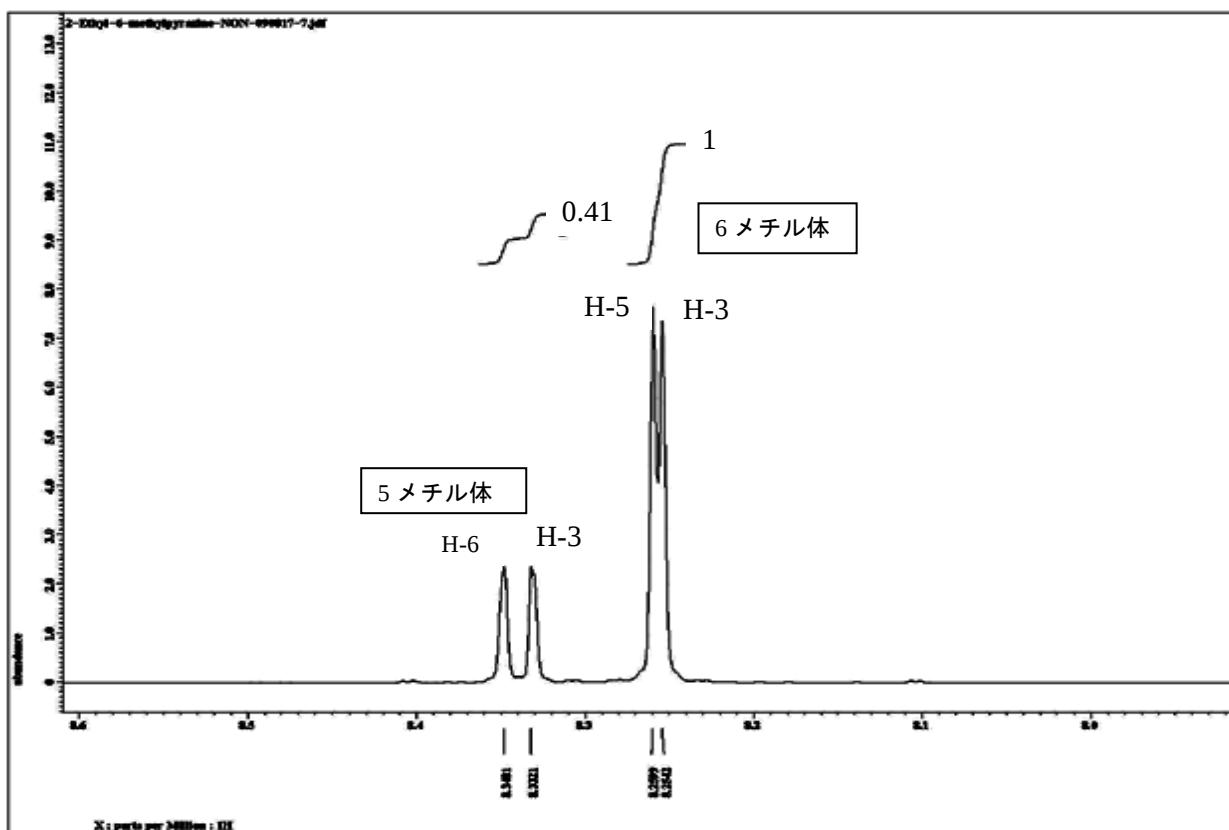


図9：混合物の ^1H NMR におけるシグナル強度比

上記の検討結果に基づき、被験物質の製造元は、GC のクロマトグラム上の 2 本のピークへの帰属を誤って逆にしているものと判断された。

4. 今後の対応

厚生労働省として、このような問題が今後発生することを防止するべく、今後評価依頼に係る資料作成のため試験を実施するに当たっては、被験物質の製造元から提供される情報の確認を一層厳格化するとともに、必要により被験物質の分析を行い、国立医薬品食品衛生研究所の専門家から問題がないことの確認を受けることとする。また、既に試験を終了しているものについても、可能な範囲において上記に準じた措置をとることにより、資料の信頼性の一層の向上に努めることとする。

添付資料

1. 引用文献4 「2-エチル-5-メチルピラジン及び 2-エチル-6-メチルピラジンの混合物のラットによる 90 日間反復経口投与毒性試験(2009 修正版) (三菱化学メディエンス(株) (厚生労働省委託試験))」

2. 「2-エチル-5-メチルピラジンの概要」（修正版）
3. 日本香料工業会が毒性試験用被験物質入手時に製造元から入手した分析証明書
4. (株)三菱化学安全科学研究所が毒性試験用量設定時に製造元から入手した分析証明書
5. 製造元から提出された被験物質と同グレード品の過去ロットの異性体比及び、GC 分析例
6. 『2-エチル-5-メチルピラジン』の GC-MS 分析結果(日本香料工業会)
7. 『2-エチル-5-メチルピラジン』の NMR 測定結果（国立医薬品食品衛生研究所）
8. 混合物の NMR 測定結果（国立医薬品食品衛生研究所）
9. 図 1-4 及び図 6、7 の分析条件