

**既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究**

研究代表者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

**研究要旨**

(1) 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

第 9 版食品添加物公定書に未記載の既存添加物の中から、第 10 版公定書の作成に備え検証規格の作成を実施した。既存添加物の中から第 10 版食品添加物公定書収載をめざし、いままでに作成した検証用規格案、関連資料を見直し、改正した。また、検証用規格案の妥当性検討の為、裏付け試験を実施した。残された既存添加物については第 5 版自主規格の作成を目指して検討を行った。また成分規格案の作成及び裏付け試験を実施した。

(2) 含有成分解析と成分規格試験法の検討

1) 「生コーヒー豆抽出物」: 生コーヒー豆抽出物の製品中から 19 種の化合物が単離・同定された。DPPH ラジカル消去活性を指標に酸化防止効果を検討した結果、カフェー酸誘導体が添加物活性への寄与に大きく影響していることが示唆された。

2) 「モウソウチク抽出物」: 昨年までに含有成分として 11 種の既知化合物を明らかにしている。本年度は他の製品を分析し製品間における成分比較を行った結果、3 製品間で共通の成分が観察され、本研究で明らかにした成分が指標成分の候補となり得ることが考察された。

3) 「カキ色素」: カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として、構造不特定の縮合型タンニン類が豊富に含まれることが示唆されたことから、高分子領域の分子量について GPC により測定したところ、重量平均分子量約 20 万であることが明らかとなった。

4) 「ゴマ油不けん化物」: 既存添加物ゴマ油不けん化物の定量分析用セサミンおよびセサモリンは、HSCCC により簡便かつ安価に単離精製できることが判明した。本標準品は、ゴマ油不けん化物の確認試験のみならず、様々なゴマ油由来の製品に応用可能と考えられる。

5) 「ベニコウジ色素」: ベニコウジ黄色素では、キサントモナシン A および B が主成分として単離精製および同定が可能であった。

6) 「クチナシ青色素」: クチナシ青色素の色素生成メカニズムを明らかとするため、モデル実験下、色調変化の観察と共に青色素 B1 及び B2 を単離し、その構造を推定した。生成した青色素成分の混合物より青色素 B1 及び B2 を精製し、その化学構造を LC/TOF-MS 及び NMR により解析した結果、Y2 の 6 位と 10 位が脱水結合して共役二重結合を形成し、更に繰り返し結合した重合物であると推定された。

7) 「クローブ抽出物」・「ベニバナ赤色素」: 「クローブ抽出物」では eugenol の定量条件が既存測定条件である HPLC 法と矛盾なく測定できることを確認した。「ベニバナ赤色素」では、定量用標準品が手に入らないことから、まずその単離精製から行い、赤色の化合物である carthamin の単離と <sup>1</sup>H-qNMR 法に応用可能な溶媒の選択、HPLC での測定条件を確立した。「ベニバナ黄色素」も黄色の本体とされる safflor yellow 類の個々の化合物の標準品が手に入らないことから、単離精製を行った。

8)「カンゾウ油性抽出物」: カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性に glabridin だけではなく, licochalcone B, kanzonol X, hispaglabridin A, 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin および glabrene 等多数の化合物が関与していることが示された。

(3) 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

既存添加物に分類される酸化防止剤の抗酸化力価評価に関する一般試験法案を作成し, DPPH 法に基づく一般試験法案が酸化防止剤の力価評価において広い適用性と高い再現性を示すことが明らかとなった。今後は, 各種酸化防止剤に関する個別の手順の作成を目指す。

(4) 日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討カワラヨモギ抽出物の有効成分であるカピリンの定量法を検討した。本研究で算出されたヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF を適用して HPLC/PDA によるカワラヨモギ抽出物中のカピリンの定量を行なった。算出された定量値は, 純度 99.5% のカピリンの量値と殆ど差はなく (0.002% 以下), 検量線から求めた値を真値とすると, RRF を用いた定量法の真度は 91~94% であった。本研究において確立した RRF を適用した定量法は, カピリンの定量用標準品を必要とせず, カワラヨモギ抽出物の規格試験法として有用であることが明らかとなった。

(5) 酵素の基原の解析法の確立 第 9 版公定書に記載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について, 16S rDNA または ITS 配列が国際塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。その結果, 「細菌」52/56 基原, 「放線菌」17/19 基原, 「酵母」6/6 基原, 「糸状菌」57/65 基原, 「担子菌」6/6 基原の配列が登録されていた。NCBI Taxonomy から得られる旧名と現行名を確認することで, 基原の使用の是非を判断するなど, 今後, 一定の判断基準を設定しておく必要があると思われる。

**研究分担者**

天倉 吉章 松山大学薬学部 教授  
 多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所  
 室長  
 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
 室長  
 受田 浩之 高知大学教育研究部自然科学  
 系生命環境医学部門 教授  
 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授  
 永津 明人 金城学院大学薬学部 教授

主任研究官  
 西崎 雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
 研究員  
 石附 京子 国立医薬品食品衛生研究所  
 好村 守生 松山大学薬学部 講師  
 杉脇 秀美 松山大学薬学部 嘱託職員  
 島村 智子 高知大学教育研究部総合科学  
 系生命環境医学部門 准教授  
 細谷 孝博 静岡県立大学食品栄養科学部  
 助教

**研究協力者**

上田 要一 日本食品添加物協会 専務理事  
 森 将人 日本食品添加物協会 常務理事  
 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所  
 部長  
 建部 千絵 国立医薬品食品衛生研究所

小出 知己 株式会社テクノスルガ・ラボ  
 卯津羅健作 ナガセケムテックス株式会社

**A. 研究目的**

既存添加物 365 品目のうち 国の成分規格  
 設定済は約 130 品目にとどまっている 現在  
 検討中の第 9 版公定書には酵素 62 品目を含  
 む 87 品目が新規既存添加物として収載され

る予定である。しかし依然として約 140 品目の成分規格が未設定である。また自主規格が定められている品目に関しても規格の内容が不十分で信頼性が低いと考えられ、さらに添加物としての有効性と有効成分自体が明確でない品目や流通実態が不明確な品目がある。これは成分分析や基原等の解析において高度な科学的解析手法が必要な場合がある故に規格設定が困難であると考えられる。

本研究では、国の成分規格が設定されていない既存添加物約 140 品目について、流通実態や今後の成分規格作成の技術的実現性を調査研究し、今後の成分規格作成の優先順序を判断する。また今後の規格設定が可能と考えられる品目については、含有成分の解析と基原確認及び成分規格試験法の検討を進める。また規格試験として、酸化防止剤には抗酸化活性測定法の導入を検討し、酸化防止剤の規格試験法素案を作成する。また苦味料や増粘剤等、複雑な混合物の品目に関する特性値を指標とした規格試験法の開発を模索する。また第 9 版公定書に収載予定の酵素の基原に関しては、種の同定に至っていない菌種があることから、種の同定を解析する方法を確立する。

## B. 研究方法

### 1. 成分規格未設定の既存添加物の現状整理：

#### 1) 既存添加物の成分規格の整備状況，安全性試験実施状況，国内外規格の有無等の調査

第 9 版食品添加物公定書未収載品について、本年度作成する検証用規格及び自主規格を含め成分規格の整備状況、安全性試験実施状況、国内外規格の有無等を調査した。

#### 2) 10 版公定書に向けた検証用規格の見直し及び裏付け試験

既存添加物 365 品目中、第 8 版食品添加物公定書に収載されている 128 品目、第 9 版食品添加物公定書に収載される予定の 87 品目を除く残りの品目について、昨年度までに作成した成分規格検証用規格案について、一部見直しあるいは裏付け試験を実施した。

#### 3) 既存添加物の第 5 版自主規格に向けた成分規格の検討

検証用できなかった品目について、成分規格が設定可能なものから自主規格案を作成するとともに、規格設定の根拠となる関連情報（海外規格を含む各種規格との対比）を調査した。

#### 4) 既存添加物の品目ごとの基原生物の調査

既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種について、削除、変更又は拡大の必要性の有無を調査した。

### 2. 含有成分解析と成分規格試験法の検討：

成分規格未設定の品目（生コーヒー豆抽出物、カキ色素、モウソウチク抽出物、クチナシ青色色素、ムラサキイモ色素、クエルセチン、グルコサミン、ヤマモモ抽出物、生コーヒー豆抽出物、モウソウチク抽出物）について機器分析を用いて含有成分を解析した。

### 3. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究：

抗酸化活性測定法は、酸化防止剤の抗酸化活性を測定する方法である。DPPH ラジカル消去率を求め、(±)-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸（トロロックス）等価活性（TEAC）で表した。

### 4. 日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討：

カワラヨモギ抽出物製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した A 社製品 1（暗褐色）、製品 2（黄褐色）及び製品 3（黄褐色）計 3 製品を用いた。既存添加物カワラヨモギ抽出物流通製品 3 種類を用い、乾燥減量試験法の開発、LC/UV

及び LC/MS による定量法の開発を行った。A 社標品（非売品）である <sup>1</sup>H-qNMR 純度 99.5% のカピリン単離・精製品は、日本食品添加物協会を通じて入手し、カピリン標準品として使用した。qNMR を応用し、カピリン単離標品の正確な純度を求め、また添加物製品についても、カピリン標品を使用しない qNMR による直接定量を行った。

#### 5. 酵素の基原の解析法の確立：

第 9 版公定書に記載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、「細菌」、「放線菌」、「酵母」、「糸状菌」、「担子菌」の 5 つの群に分類した。GenBank 上の 16S rDNA または ITS1 塩基配列情報の登録の有無の確認を行った。

#### 倫理面への配慮

特になし

#### C・D 研究結果及び考察

1) 既存添加物の成分規格の整備状況、安全性試験実施状況、国内外規格の有無等の調査 第 10 版食品添加物公定書収載成分規格（案）及び第 5 版既存添加物自主規格成分規格（案）の整備状況、安全性試験実施状況、国内外の規格の有無について調査を行った。

#### 2) 10 版公定書に向けた検証用成分規格の見直し及び裏付け試験

第 10 版公定書に向けて昨年度までに作成した成分規格検証用の規格案、関連資料を見直し、改正した。また、検証用規格案の妥当性検討の為、セイヨウワサビ抽出物、カンゾウ油性抽出物等について裏付け試験を実施した。

#### 3) 第 5 版自主規格案の作成

第 9 版食品添加物公定書後に残ると考えられる既存添加物から、第 10 版公定書に向けた検証用規格を作成したものを除き、使用

実態の再調査及び第 5 版自主規格の作成を検討した。

#### 4) 既存添加物の品目ごとの基原生物等の調査

第 9 版食品添加物公定書未収載品目の基原植物、微生物等で既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種等について、削除、変更又は拡大の必要性の有無について昨年度に引き続きアンケート調査を実施した。

#### 2. 含有成分解析と成分規格試験法の検討：

##### [生コーヒー豆抽出物]

##### 1. 化合物の単離

生コーヒー豆抽出物の濃縮物について、カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、これまで単離、同定した 14 種の化合物に加え、vanillin (1) (1.0 mg), 3-O-caffeoyl-4-O-feruloylquinic acid (2) (4.5 mg), 4-O-caffeoyl-5-O-feruloylquinic acid (3) (55.3 mg), trans-feruloyl-L-tryptophan (4) (5.1 mg), trans-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester (5) (1.8 mg) の 5 種を新たに単離した。このうち、化合物 4, 5 については LC/MS による分析等に関する報告はあるが、単離報告は見あたらない。

##### 2. 生コーヒー豆抽出物の HPLC 分析

新たに単離した各化合物を標品として HPLC 分析を行い、5 化合物のデータを加えた。

##### 3. DPPH ラジカル消去活性の評価

単離した 5 化合物について、DPPH ラジカル消去活性を評価した。5-O-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) をはじめとするカフェー酸誘導体の活性が強いことを示唆した。

##### 4. SOD 様活性の評価

これまで単離した 19 化合物について、SOD 様活性を評価した。DPPH ラジカル消去活性と同様、カフェー酸誘導体の活性が顕著であった。

既存添加物名簿に生コーヒー抽出物の有効成分は、「クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。これまでの検討で、DPPH ラジカル消去活性を指標に酸化防止能を評価した結果、活性の強かった画分には 5-O-caffeoylquinic acid(クロロゲン酸)、4-O-caffeoylquinic acid、3-O-caffeoylquinic acid が主検出され、これらの添加物活性への寄与が大きいことを考察していた。今回の結果を加え、これまでの考察がさらに支持された。また、単離した 19 化合物について、DPPH ラジカル消去活性及び SOD 様活性を評価した結果、いずれの評価法においてもカフェー酸誘導体が顕著な活性を示した。よって、本添加物の活性への寄与はカフェー酸誘導体であることがあげられ、caffeoyl 基が活性に大きく影響していることが示唆された。

#### [カキ色素]

##### 1. 化合物の分離精製

カキ色素製品 (47.4 g) に蒸留水 1 L を加えて溶解させた後、酢酸エチル (1 L × 3)、n-ブタノール (1 L × 3) で順次分配を行い、各分画物 [酢酸エチル分画物 (129.4 mg)、n-ブタノール分画物 (773.6 mg)、水分画物 (45.4 g)] を得た。得られた水分画物のうち 20 g を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、8 画分を得た。このうち、Fr. 38-52 (1.0 g) について、さらに MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィーに付し、8 画分を得た。さらにこのうち、Fr. 8 (47.2 mg) について、Chromatorex ODS カラムクロマトグラフィーに付し、6 画分を得た。得られた 1 画分 (Fr. 13-17 (9.7 mg)) について、<sup>1</sup>H-NMR を測定したところ、高磁場側に夾雑物由来と思われるシグナルが観察され、さらに精製が必要であることが示唆された。

##### 2. GPC 分析

カキ色素製品中成分の分子量分布について、GPC により検討した結果、重量平均分子量約 20 万であった。今後これらの構造的特徴について検討が必要である。

[モウソウチク抽出物]

##### 1. 添加物製品の分析

モウソウチク抽出物製品について HPLC 分析を行った結果、単離した各化合物を標品として同条件で分析比較を行った。その結果、製品 A と同様のピークが 2 製品 (E, F) から観察されたが、その他の 3 製品はほとんどピークが検出されなかった。また、既存添加物名簿記載の主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は他の製品からもほとんど検出されなかった。

モウソウチク抽出物の 3 製品 (A, E, F) 間で共通の成分が観察されたことから、今回明らかにした成分が指標成分の候補となり得ることが考察される。一方で、今回の条件でピークが検出されない製品もあり、製品間でのばらつきが認められた。また、既存添加物名簿において主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は今回の測定条件ではいずれの製品中にもほとんど検出されておらず、製品の同等性を確保のための明瞭な指標成分の設定と、その分析実施の提案が示唆される。

[ゴマ油不けん化物]

ゴマ油不けん化物中のセサミン、セサモリンおよびセサモールの紫外可視吸光光度における極大吸収波長を調べた。いずれも、290 nm 付近で吸収極大波長 (セサモール  $\lambda_{\max} = 296$  nm, セサミン  $\lambda_{\max} = 286$  nm, セサモリン  $\lambda_{\max} = 289$  nm) が観察され、HSCCC などのモニタリングに用いることとした。それらの条件のもと、LC による分離分析も達成でき、HSCCC 分配係数の算出などに応用した。

LC法を用いて、セサミンおよびセサモリンのHSCCC用2相溶媒の分配係数および分離度の検討を行った。セサミンの分配係数 $0.84 \pm 0.18$ およびセサモリンの分配係数 $1.36 \pm 0.34$ であり、分離度 $1.61 \pm 0.05$ の条件、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)を採用することとした。

本条件を用いて、HSCCCによる単離精製の分析を行った際のクロマトグラムより、Fraction AおよびFraction Bを単離精製することができた。いずれも、絶対検量線法により定量した結果、Fraction Aにおいて、 $7.37$  mgおよびFraction Bにおいて、 $5.17$  mgとなった。また、MS/MSスペクトルにより、Fraction AおよびFraction Bは、セサミンおよびセサモリンであると同定できた。本試料をLC-フォトダイオードアレー分析(検出波長200-400 nm)した結果、それぞれの純度が99%以上となり、良好に単離精製できたものと考えられる。

本研究では、ゴマ油不けん化物の新たな確認試験法の基礎的な検討を実施した。昨年度報告した定義や定量法において、安価なセサミンおよびセサモリンの標準品が必要となった。そこで、本年度では、HSCCCによるセサミンおよびセサモリンの効率的な単離精製法の検討を行った。今回、HSCCCを用いて、ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを単離精製するため、2相溶媒系の比較した結果、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)が最適であるとの判断になった。本溶媒系を用いて、HSCCCによる分離を行った結果、主に2つのFractionを得ることができ、LC分析の結果、Fraction Aにおいてセサミン、Fraction Bにおいてセサモリンが高純度(LC評価:99%以上)の標準品を得ることができた。いずれも、セミ分取スケールで1回の操作で、数mgから数十mg程度は同時に単離精製できることが判明した。しかしながら、ゴマ油不

けん化物含有濃度が低いため、今回では、数mg程度の単離精製となった。

本標準試料は、ゴマ油不けん化物の確認試験のみならず、様々なゴマ油由来の製品に関する定量評価へ応用できるものと思われる。また、定量NMR/LC分析法との組み合わせにより、今後は、モル吸光度係数比による定量評価へ応用できるものと考えている。

#### [ベニコウジ色素]

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、いずれも国内で流通している試料を用いた。そこで、各試料について、第8版食品添加物公定書および4版自主規格の確認試験を実施した。その結果、国内流通品は、いずれも現在の規格基準に従うことが明らかになった。次に、HPLCによる分離分析を実施した。規格における色価では、ベニコウジ色素で波長480~520 nm、ベニコウジ黄色素では、458~468 nmとされている。そこで、各モニタリングをいずれも規格基準内波長である500 nm(ベニコウジ色素)および460 nm(ベニコウジ黄色素)を含むフォトダイオードアレーにて検出した。ベニコウジ色素は、各検体により、全く異なるクロマトグラムパターンを示し、いずれも培養技術やベニコウジカビの種類などが異なり、得られている成分が異なることが疑われた。また、種別によりHPLCによる分離分析は非常に困難であるとも判断された。そのなかでも、試料119において、比較的明確な4つピークが観察された。それぞれの吸光光度スペクトルを測定した結果、いずれも500 nm付近に吸収極大波長をもつため、いずれもベニコウジ色素の成分であることが判明した。一方で、ベニコウジ黄色素は、明確な2つのピークが観察され、いずれも色素成分である可能性が示唆された。それらの吸光光度スペクトルにおいても、吸収極大波長が400 nm付近であり、ベニコウジ黄色の色素成分であることが示唆された。

HPLC 法では、ベニコウジ色素の成分などが固定相カラムに吸着してしまい、良好な分離分析達成できなかつたと推定される。また、ベニコウジ黄色素も同様に吸着成分が存在している可能性も否定できない。そこで、吸着などの影響を受けず、回収率が 100% の分離手法である高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いて、成分解析を実施することとした。HSCCC による分離検討を実施するためには、2 相溶媒系を決定しなければならない。そこで、ベニコウジ色素では、試料 119 のクロマトグラムで示される 4 ピーク (A~D) を用いて、分配係数を算出し、2 相溶媒を検討した。また、ベニコウジ黄色素では、明確に検出されている 2 ピークを用いて実施した。その結果、ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素のいずれも分配係数 0.2~1.5 の間であり、分離度も 1.0 以上のものを選択し、各分離の 2 相溶媒として決定した。

2 相溶媒系の検討条件を用いて、HSCCC の分離分析を実施した。ベニコウジ色素については、主な色素成分 (赤色素) が、ソルベント付近に検出され、色彩より主成分である可能性が示された (色彩成分 X)。また、その後、色彩のある成分が溶出し、それをまとめて獲得した (色彩成分 Y)。色彩成分 X および Y を HPLC で分析した結果、色彩成分 X では、試料 119 のクロマトグラムで観察されたピーク A および B が検出されているが、明らかに大きなブロードの溶出成分が存在し、良好に評価できないことが判明した。また、色彩成分 Y では、試料 119 で観察されたピーク C および D が観察された。一方で、ベニコウジ黄色素は、我々の既報において、良好に各成分を単離精製することができた。各成分を  $^1\text{H-NMR}$  および LC-MS/MS (エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモードを採用した) を用いて、解析した結果、フラクション A が、キサントモン

シン A およびフラクション B がキサントモン B であることが判明した。

本研究では、ベニコウジカビ (*Monascus purpureus*) から生成されるベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素について、成分規格に伴う解析を実施した。ベニコウジカビは、育成する培地条件により様々な色彩成分を生成することや抽出条件により成分が異なることなどが報告されているため、国内流通品に関して、成分規格を定める必要がある。そこで、一般的に入手可能なベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の解析することとした。第 8 版食品添加物公定書および 4 版自主規格の確認試験では、主に色彩を評価するものであり、流通品ではすべて規格内であった。それらの製品を用いて、HPLC による色彩成分の評価を実施した。その結果、ベニコウジ色素の製品間において異なるクロマトグラムパターンを示し、色彩成分の違いなどが示唆された。そのうえ、様々な分離条件を検討したが、すべてに対して、良好なピーク分離が得られず、HPLC による評価は難しいことが判明した。一方で、ベニコウジ黄色素では、明確な 2 本のピークが観察された。しかしながら、それ自体が色彩の主成分とは断定することは難しく、色彩成分の回収率が 100% である HSCCC による分離評価が必要であることが分かった。HSCCC では、分配係数を算出しなければならず、ベニコウジ色素 (ピーク A~D) およびベニコウジ黄色素 (ピーク E, F) の HPLC 分析によるピークを基準に 2 相溶媒系を決定した。その結果、HSCCC の評価により、ベニコウジ色素において、色彩成分はフロント付近に大きく検出され、分配係数から想定される色彩ピークは後ろに溶出してきた。しかしながら、それを HPLC により評価した結果、主な色彩成分のピークを定めることができなかった。一方で、ベニコウジ黄色素は、HSCCC により、良好に単離精製することができ、

それぞれをキサントモナシン A およびキサントモナシン B と同定することができた。

[クチナシ青色]

#### 1) LC による Y1 及び Y2 の経時的観察

ゲニピンとベンジルアミンを混合した場合、その溶液中には黄色化合物 Y1 及び Y2 が生成し、次に溶液が青色に変化するに伴い、Y2 が減少することを昨年度報告した。このことから、黄色化合物 Y1 及び Y2 は青色素の前駆体であると考えられた。本年度は引き続き、溶液が青くなってからの挙動を観察した。

ゲニピン及びベンジルアミン 1:1 の混液では、液色が緑色となったとき、保持時間 16.5 分付近にピークが出現し、液色が青色に変化したときには、保持時間 10~20 分の幅広いピークとともに、15~17 分付近に数本飛び出たピークが生じた。さらに時間経過させると保持時間 10~20 分にわたる幅広いピークになることが確認された。

次に、Si オープンカラムにより精製した黄色化合物 Y1 及び Y2 画分を MeOH に再溶解し、同条件の LC に付し、液色の変化及びピークの出現を経時的に観察した。Y1 の溶液は薄い黄色溶液であったが、時間と共に色調が変化し、薄い水色に変化した。PDA(190-800 nm)により、保持時間 12 分に観察される Y1 のピーク面積の経時的な変化を確認したところ、ほとんど変化しなかった。一方、検出波長 600 nm のクロマトグラムでは保持時間 16 分付近に小さな幅広いピークが時間経過と共に出現した。したがって、黄色化合物 Y1 は青色素の前駆体ではあるが非常に反応速度が遅いと考えられた。一方、Y2 の溶液は橙色の溶液であったが、時間経過と共に青色に変色し、最終的に黒色に近い青色になった。別に PDA(190-800 nm)により、保持時間 14 分に観察される Y2 ピークの経時的な変化を確認したところ、完全に消失した。また、検出波長 600 nm におけるクロマトグラムの経

時的な変化は、ゲニピン及びベンジルアミン 1:1 の混液の挙動と類似していた。したがって、黄色化合物 Y2 は青色素の前駆体であり、生成後、直ちに青色素成分に変化するものと考えられた。

いずれの経時的な観察においても、検出波長 600 nm のクロマトグラム上には青色素成分に由来すると考えられるピークが幅広く観察されたことから、前駆体である Y1 及び Y2 が複雑に重合することによって青色素成分に変化していると考えられた。

#### 2) NMR による Y1 及び Y2 の経時的観察

Y1 及び Y2 は青色素成分の前駆物質であることは明らかである。そこで、その化学構造の変化を追跡するために NMR 測定を行った。予めゲニピンのみを MeOH-d<sub>4</sub> に溶解し、<sup>1</sup>H-qNMR 及び <sup>13</sup>C-NMR 測定した後、当モル量のベンジルアミンを添加し、混合直後からの経時変化を観察した。なお、生成物の濃度変化がわかるように内標(1,4-BTMSB-d<sub>4</sub>)を添加し、<sup>1</sup>H-qNMR と <sup>13</sup>C-NMR を 1 セットとして繰り返し測定を行った。その結果、時間の経過と共に NMR 試験液は赤褐色に変化し、ゲニピン由来のシグナルは消失し、Y2 由来のシグナルと考えられるものと共に非常に小さなシグナルが観察されるのみであった。更に 1.8 ヶ月後に測定してもスペクトルパターンに変化はなく、内標(1,4-BTMSB-d<sub>4</sub>)に対するシグナル強度が低下しただけであった。この反応液の NMR 試験管を傾けると溶液は赤褐色であるが、ガラス壁面が青色に着色していたことから、沈殿あるいはガラス面への吸着のために、NMR 試験液中に青色素成分はほとんど溶解して存在しておらず、NMR 測定によりシグナルとして観察できなかったと考えられた。この NMR 測定の結果との LC 分析の結果を合わせて考えると、生成する青色素成分は溶解度が非常に低



く、また、分子サイズの大きい複雑な重合物であることが推測された。

### 3) 青色素 B1 及び B2 の化学構造

ゲニピン及びベンジルアミンを当モル量反応させた溶液を LC 分析したとき、保持時間 10 ~ 20 分付近に青色素成分に由来する幅広いピークが観察される。この幅広いピークには、鋭いピークがいくつか含まれており、更に反応を継続するとこの鋭いピークは徐々に小さくなる。したがって、この鋭いピークはある程度重合したものでそれ以降重合反応が進みにくくなった化合物であると推定した。そこで、このピークに由来する青色素成分の単離を試みた。

ゲニピン及びベンジルアミンの反応液を水で希釈し、HCl 酸性にして酢酸エチルで液-液抽出したところ、酢酸エチル層に溶解する青色素画分が得られた。この画分を Si オープンカラムに付して更に精製した後、prepLC に付し、青色素成分 B1 及び B2 を得た。得られた青色素成分 B1 及び B2 を LC/MS に付し、その精製度を確認した。その結果、青色素成分 B1 は保持時間 16.0 分にシャープなピークを与え、極大吸収波長 604.9 nm、ESI positive モードにおいて  $m/z$  541.2 のイオンを与えるものであった。また、青色素成分 B2 は保持時間 16.4 分にシャープなピークを与え、極大吸収波長 617.9 nm、ESI positive モードにおいて  $m/z$  555.2 のイオンを与えるものであった。更に、青色素成分 B1 及び B2 について、UPLC/TOF-MS により精密質量を測定したところ、ESI positive モードにおいて、B1 が  $m/z$  541.2119、B2 が  $m/z$  555.2299 を与え、B1 に由来する positive イオンの組成式が  $C_{35}H_{29}N_2O_4$  (calcd.  $m/z$  541.2127)、B2 に由来する positive イオンの組成式が  $C_{36}H_{31}N_2O_4$  (calcd.  $m/z$  555.2284) と推定された。前駆物質 Y2 の組成式  $C_{18}H_{19}NO_3$  と比較すると、B1 が  $(Y_2+Y_2)-CH_{10}O_2$ 、B2 が  $(Y_2+Y_2)-H_8O_2$  に相当し、いずれも Y2 が 2 分

子脱水結合し、更に共役二重結合を形成した化合物であると推定された。

次に、B1 及び B2 を MeOH- $d_4$  に溶解し  $^1H$ -NMR を測定したところ、ベンジル基に由来するシグナルが 7.4 ppm 及び 5.7 ppm 付近に、メチルエステル基に由来するシグナルが 3.9 ppm 付近に観察されたが、いずれも Y2 の 5, 6 位のシグナルが消失し、更に 1, 3, 7, 10 位のシグナルが 7~9 ppm に低磁場シフトしていると考えられるスペクトルを示した。また、 $^{13}C$ -NMR では、ベンジル基に由来するシグナルが 128~135 ppm 及び 63 ppm 付近に、メチルエステル基に由来するシグナルが 52 ppm 及び 164 ppm 付近に観察されたが、いずれも Y2 の 5, 6 位のシグナルが消失し、低磁場領域にシフトしていると考えられるスペクトルを示した。次に、B1 について HMQC 及び HMBC 測定を行い、その相関より化学構造を推定したところ、部分構造が推定された。このように B1 は 2 つの Y2 が 6 位と 10 位で脱水縮合後、更に酸化され水素が脱離し、共役二重結合が生成し、共役系が延長された構造をとっていると考えられた。この推定部分構造では 2 位の N 基の電子が化合物全体に非局在化するため、深色化し青色を示す可能性が高く、B1 の部分構造として妥当であると考えられる。また、UPLC/TOF-MS により B1 は  $m/z$  541.2119 を与え、 $C_{35}H_{29}N_2O_4$  の positive イオンの組成式が推定され、この結果は B1 の部分構造のイオンに由来すると考えられる。更に B1 の NMR スペクトルが単純であることから、同じ立体配座の繰り返し構造をとっていると考えられる。一方、B2 は B1 に比べて複雑なスペクトルパターンを示すことから、B1 とは部分的に立体配座が異なる異性体であると推定される。

モデル実験により得られた結果より、青色素成分の生成機構をまとめた。すなわち、前駆体

Y2より中間体モノマーM2及びM3が生成した後、M2とM3が重合を繰り返し、B1やB2のような重合体が形成されると考えられる。重合を繰り返すことによって分子量は大きくなり溶解性は低下すると考えられることから、最終的にはある一定の範囲の重合度で反応が停止すると思われる。

[アンモニア処理ラック色素]

#### 1) アンモニア処理ラック色素のLC/MS分析

ラック色素及びアンモニア処理ラック色素について色調のpH依存性について検討したところ、ラック色素はpHが高くなるにつれて、橙色から紫色に変化した。一方、アンモニア処理ラック色素はpHに依存せず、紫色だった。

次にLC/MS分析を実施したところ、ラック色素及びアンモニア処理ラック色素において、それぞれ5つのピークが確認された(ピーク1~5, ラック色素; ピーク1~5, アンモニア処理ラック色素)。ピーク1~5の吸収スペクトルが490 nm付近に極大吸収波長を示したのに対して、ピーク1~5のそれは、550 nm付近に二つの極大吸収波長を示した。

各ピークに由来するマススペクトルを確認した結果、ピーク1, 2, 4及び5は、それぞれm/z 494, 538, 495及びm/z 536を与える脱プロトン分子[M-H]<sup>-</sup>のピークが強く観測され、それぞれをlaccaic acid E, C, B及びAと同定した。ピーク3に由来するマススペクトルには、m/z 359, 315及びm/z 271を与えるピークが観測された。これは、岡らがラック色素をLC/MS/MS分析した際に観測した、anthraquinonedicarboxylic acid誘導体に由来するm/z 359 [M-H]<sup>-</sup>, 315 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>及びm/z 271 [M-H-2CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>と一致していることから、ピーク3はanthraquinonedicarboxylic acid誘導体と推定した。

一方、ピーク1~5に由来するm/zは、それぞれピーク1~5に対して1少ない値を示

した。これは、既に杉本らが報告したように、カルミン酸をアンモニア処理した際、アントラキノ骨格の4位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH<sub>2</sub>)に置換し、分子量が1Da減少する結果と一致し、すなわち、ピーク1~5は、laccaic acid A, B, C, E及びanthraquinonedicarboxylic acid誘導体の4位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH<sub>2</sub>)に置換した色素化合物と推測された。

#### 2) Laccaic acid Cの構造解析

Laccaic acid及びアンモニア処理を施して得られる誘導体の化学構造を明らかにすることにした。しかし、現在はlaccaic acid A, B, C, Eの標準試薬は市販されていない。そこで本研究では、ラック色素からlaccaic acidを単離・精製した後、そのアンモニア処理誘導体をNMR分析に付すことで構造を明らかにする。

ラック色素をODSオープンカラムに付し、メタノールの濃度をステップワイズに上げて溶出した際、laccaic acid Cが他のlaccaic acidと容易に分離した。そこで、laccaic acid Cを含む画分を集めた後、分取LC/MSでさらに精製したところ、1.700 mgのlaccaic acid Cが得られた。500 mgのlaccaic acid Cを600 µLのDMSO-d<sub>6</sub>に溶解し、NMR分析に付した。

<sup>1</sup>H-NMRスペクトルには、芳香環に由来するH 6.92, 7.04, 7.13及びH 7.56のプロトンシグナルとH 3.11及びH 4.12のプロトンシグナルが観測された。<sup>13</sup>C-NMRスペクトルには、25のカーボンシグナルが観測された。HMQC分析において、H 3.11, 4.12, 6.92, 7.04, 7.13及びH 7.56は、それぞれ、C 35.36, 54.05, 116.48, 132.83, 130.82及びC 115.86との相関が観測された。また、HMBC分析では、H 6.92とC 119.36及びC 125.0, H 7.04とC 35.36, 125.55, 130.82及びC 155.00, H 7.13とC 132.83及びC 155.00,

H 7 . 56 と C 118 . 32 , 121 . 23 , 168 . 54 , 183 . 12 及び C 186 . 75 の相関が観測された . いずれのプロトンと相関が得られなかった 10 個のカーボンシグナルについては , 2D-INADEQUATE 分析で 13C-13C の相関を観測し , 帰属することにした . その結果 , 次に示す 13C-13C の相関が観測された .

C121 . 23-140 . 17-(169 . 53)-118 . 32-136 . 53-(115 . 86)-(169 . 65)-186 . 75-118 . 83-(104 . 90)-(183 . 12)-148 . 50-153 . 12-122 . 55-(158 . 93)-(104 . 90)-119 . 36-(155 . 00)- (116 . 48)-132 . 83-125 . 04-130 . 82 及び C 54 . 05 - 170 . 76 .

NMR 分析及び LC/MS 分析の結果から , 化学構造が導かれ , 既に報告されている laccaic acid C の化学構造と矛盾のない結果が得られた

13) .

### 3) 4-Aminolaccaic acid C の構造解析

C-2 で単離した laccaic acid C 800 mg をアンモニア処理し , LC/MS 分析に付した結果 , その保持時間 , 吸収スペクトル及びマススペクトルは , ピーク 2 のそれと一致した . 次に , アンモニア処理 laccaic acid C を NMR 分析に付した . 1H-NMR スペクトルには , 芳香環に由来する H 6 . 81 , 7 . 05 , 7 . 32 及び H 7 . 57 のプロトンシグナルと H 2 . 99 , 3 . 11 及び

H 3 . 83 のプロトンシグナルが観測された . 13C-NMR スペクトルには , 25 のカーボンシグナルが観測された . HMQC 分析において , H 3 . 83 , 6 . 81 , 7 . 05 , 7 . 32 , 及び H 7 . 57 は , それぞれ , C 54 . 99 , 118 . 12 , 129 . 06 , 133 . 78 及び C 113 . 88 との相関が観測された . また , H 2 . 99 及び H 3 . 11 は C 35 . 78 との相関が観測された . HMBC 分析では ,

H 6 . 81 と C 122 . 59 , 124 . 83 及び C 155 . 85 , H 7 . 05 と C 35 . 78 , 125 . 59 , 133 . 78 及び C 155 . 85 , H 7 . 32 と C 35 . 78 , 116 . 08 , 129 . 06 及び C 155 . 85 , H 7 . 57 と C 119 . 62 , 138 . 33 , 167 . 20 , 169 .

41 , 177 . 15 及び C 180 . 00 の相関が観測された . 2D-INADEQUATE 分析では次に示す 13C-13C の相関が観測された .

C 138 . 66-119 . 99-167 . 20-113 . 88-138 . 33-119 . 62- 138 . 66 , C 180 . 00-104 . 76-(144 . 11)-102 . 00-177 . 15 , C 116 . 08-122 . 59-133 . 78-124 . 83 及び C 129 . 06-118 . 12-155 . 85 .

残りの 4 つのカーボンシグナル( C 162 . 84 , 164 . 43 , 170 . 59 及び C 171 . 07)については , laccaic acid C のケミカルシフトから推定して , 帰属した .

Laccaic acid C と同じく , アンモニア処理 laccaic acid C もカーボンと隣接する 7 つのプロトン及び 25 のカーボンを有していた . このことから , laccaic acid C と比べてアンモニア処理 laccaic acid C が 1Da 少ない分子量を示すことは , アンモニア処理により , laccaic acid C のヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH<sub>2</sub>)に置換したためと推測された . そこで , アミノ基(-NH<sub>2</sub>)の置換位置を明らかにする目的で , laccaic acid C を 15NH<sub>4</sub>OH を用いてアンモニア処理し , NMR に付した . 14N のスピン量子数が 1 なのに対して , 15N のそれは 1/2 であるため , 13C-15N のカップリングが生じる 16) . 実際に , 13C-NMR スペクトルには 25 のカーボンシグナルが観測され , そのうち 4 位のカーボンシグナルは , ダブルレット(JCN = 15 . 41 Hz)のシグナルとして観測された . 以上の結果から laccaic acid C をアンモニア処理して得られる誘導体は , 4-aminolaccaic acid C であることを明らかにした .

Laccaic acid A , B 及び E のアントラキノン骨格に結合したヒドロキシ基の位置は , laccaic acid C のそれと同じである . また , LC/MS 分析から推定された anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体も , アンモニア処理により laccaic acid(A , B , C 及び E)と同様に , 分子量が 1 少なくなること , 極大吸収波長が長波長側にシフ

トすることから, laccaic acid(A, B, C 及び E) と同じアントラキノン骨格を持つと推測される。以上の理由から, 本研究ではピーク 1, 3, 4 及び 5 を, それぞれ, 4-aminolaccaic acid E, 4-aminoanthraquinonedicarboxylic acid 誘導体, 4-aminolaccaic acid B 及び 4-aminolaccaic acid A と結論した。

「カンゾウ油性抽出物」:

#### 1) Licochalcone B の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で yellow であった。LC/MS では, KZ34 frc11-22b と保持時間 (R.T.), UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH<sub>3</sub>CN (1.0 mL/min) で R.T.; 20.22 min, UV;  $\lambda_{\max}$  368 nm, MS;  $m/z$  285 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  287 [M-H]<sup>-</sup> であった。

NMR 測定は, acetone-*d*<sub>6</sub> および methanol-*d*<sub>4</sub> に溶解させて行った。また, 既報<sup>1)</sup>の文献値(溶媒: methanol-*d*<sub>4</sub>)をもとに帰属し licochalcone B と同定した。

#### 2) Glabridin の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で pearl であった。LC/MS では, KZ34 frc37-22b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 50% CH<sub>3</sub>CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 23.42 min, UV;  $\lambda_{\max}$  228, 281 nm, MS;  $m/z$  325 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  323 [M-H]<sup>-</sup> であった。

NMR 測定は, acetone-*d*<sub>6</sub> に溶解させて行った。市販標品のシフト値と比較し帰属した。

#### 3) Kanzonol X の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で brown であった。LC/MS では, KZ34 frc44, 45-29b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 50% CH<sub>3</sub>CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 49.52 min, UV;  $\lambda_{\max}$  207, 283 nm, MS;  $m/z$  395 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  393 [M-H]<sup>-</sup> であった。

NMR 測定は, acetone-*d*<sub>6</sub> に溶解させて行った。また, 既報の文献値(溶媒: acetone-*d*<sub>6</sub>)をもとに帰属した。

#### 4) Hispaglabridin A の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で brown であった。LC/MS では, KZ34 frc54-24c と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 55% CH<sub>3</sub>CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 56.95 min, UV;  $\lambda_{\max}$  229, 280, 293 nm, MS;  $m/z$  393 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  391 [M-H]<sup>-</sup> であった。

NMR 測定は, acetone-*d*<sub>6</sub> に溶解させて行った。また, chloroform-*d* に再溶解させて測定した。chloroform-*d* 中では, 難溶であり, C-7, C-9, C-2', C-4' の 4 級炭素が検出されなかったものの, 既報の文献値(溶媒: chloroform-*d*)をもとに帰属し hispaglabridin A と同定した。

#### 5) MW 354 の化合物の同定

LC/MS では, KZ34 frc44, 45-21b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, MS;  $m/z$  355 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  353 [M-H]<sup>-</sup> であった。

NMR 測定は, acetone-*d*<sub>6</sub> および chloroform-*d* にそれぞれ溶解させて行った。また, 既報の文献値(溶媒: chloroform-*d*)をもとに帰属し 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin と同定した。

#### 6) MW 322 の化合物の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で white であった。LC/MS では, KZ34 frc32-33b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 30% CH<sub>3</sub>CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 181.13 min, UV;  $\lambda_{\max}$  214, 248, 284, 295, 324 nm, MS;  $m/z$  323 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  321 [M-H]<sup>-</sup> であった。

Glabrene は, 既報の文献値(溶媒: methanol-*d*<sub>4</sub>: chloroform-*d*=1:1)をもとに NMR 測定を行った。その結果, <sup>1</sup>H NMR で -0.07 ppm

の誤差,  $^{13}\text{C}$  NMR で 0.8 ppm の誤差で帰属できた。なお, 2次元 NMR による帰属も一致し glabrenec( cas no. 60008-03-9 )と同一した。  
7) MW 358 の化合物の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で brown であった。LC/MS は, KZ34 frc25-28b と R.T., UV および MS スペクトル が一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 35%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1.0 mL/min) で, R.T.; 37.65 min, UV;  $\lambda_{\text{max}}$  230, 290 nm, MS;  $m/z$  359  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  357  $[\text{M}-\text{H}]^-$  であった。

NMR 測定は chloroform- $d$  に不溶であったため, methanol- $d_4$  および acetone- $d_6$  に溶解させて行った。その結果, 既知化合物であったため, 既報の文献値(溶媒: acetone- $d_6$ )をもとに帰属し cas no. 938190-35-3 の化合物であると同一した。

#### 8) MW 370 の化合物の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で yellow であった。LC/MS の分析値は, NAP カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 25%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1.0 mL/min) で, R.T.; 114.07 min, UV;  $\lambda_{\text{max}}$  255, 364 nm, MS;  $m/z$  371  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  369  $[\text{M}-\text{H}]^-$  であった。なお, この分析値は, 既報の LC/MS の UV および MS の値と一致した。

NMR 測定は chloroform- $d$  に難溶であったため, methanol- $d_4$  および acetone- $d_6$  に溶解させて行った。以上の結果, 既知化合物であった。よって, 既報の文献値(溶媒: acetone- $d_6$ )をもとに帰属し cas no. 905708-40-9 の化合物であると同一した。

#### 9) 単離・精製画分の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)

単離・精製画分の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)測定の結果では, いずれの画分も活性が認められた。

今後, 各画分に含まれる単離成分の純度を  $^1\text{H}$ -qNMR 等の手法により確認することで, 各

成分の単位量当たりの活性(比活性)を算出することができると考えられる。

「クローブ抽出物」中の eugenol の定量  
昨年度確立した内部標準を DMSO- $d_6$  溶液として加えて測定する方法で, eugenol の 6 位 H シグナル( 6.33 ppm )は独立しており, 「クローブ抽出物」のスペクトルにおいても他の夾雑物のシグナルとの重なりも観測されず, このプロトコールで eugenol が測定できることを改めて確認した。

試料中の eugenol の含有量の測定では, まず, eugenol 標準品の純度を測定したところ 92% 程度であった。「クローブ抽出物」の eugenol の含有率は 26.56%, 28.81% だった。

次に, HPLC での定量では, 今回の条件で eugenol が 280 nm において良好なピークとして検出できることを確認した。 $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いて求められた純度をもとに eugenol 溶液を順次希釈し HPLC のピーク面積を求めて検量線を作成した。その検量線も極めて良い直線性を示した。前年度に確立した  $^1\text{H}$ -qNMR による eugenol の定量法で, 試料の eugenol を含む試料は acetone- $d_6$  に溶解し, 認証標準物質の 1,4-BTMSB- $d_4$  は DMSO- $d_6$  に 2.5 mg/mL で溶解し, 両者を 5:1 で混合して測定に供するという方法で問題なく簡便に eugenol の 6 位 H のシグナル面積の測定ができた。よって, この測定法が利用できることを改めて確認した。

HPLC においては,  $^1\text{H}$ -qNMR で値付けをした eugenol 標準品溶液を用いた定量が可能であることも確認できた。また, 「クローブ抽出物」中の eugenol の定量値が  $^1\text{H}$ -qNMR における定量値と HPLC の定量値との比較では, HPLC での値がやや低かったが, ほぼ一致していることから,  $^1\text{H}$ -qNMR が既存の定量法に置き換えることのできる簡便な手段であることを確認できた。同時に, 万が一, 測定試料の

$^1\text{H-NMR}$  スペクトルで eugenol の 6 位 H にオーバーラップするシグナルがある場合、 $^1\text{H-qNMR}$  によって標準溶液の純度の値付けを行い、その標準溶液を用いて HPLC 法による定量をすることで、間接的な絶対定量が可能なることも確認できた。

$^1\text{H-qNMR}$  法は、このように揮発性で標準品の純度管理が難しい eugenol の定量を行う「クローブ抽出物」の品質管理でも極めて有効な手段であることを改めて確認した。

「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量  
Carthamin の単離では、「ベニバナ赤色素」に相当する製品から TLC 上で 1 spot の状態の carthamin を単離することができた。その NMR スペクトルを先の文献と比較して carthamin であることを確認した。

また、HPLC の条件検討では、酢酸を添加した MeOH-水のグラジエントの条件で、carthamin が良好なピークを与えることを確認した。まだ定量方法の確立には至っていないが、標準試料の単離方法を確立できた。標準試料として正確に秤量できるだけの物質量の確保を行っている。

定量方法の確立に先立って HPLC の条件設定を行ったが、carthamin のピークを良好に検出できる条件を見つけることができたので、少なくとも  $^1\text{H-qNMR}$  による標準品溶液の値付け。その標準溶液を基準とした HPLC 分析というプロトコールの実施に目処をつけたと言える。Carthamin 標準溶液の  $^1\text{H-qNMR}$  による値付けは先行例があるので、純度が極めて低く  $^1\text{H-qNMR}$  では直接定量が困難な試料での定量も目処をつけた。

「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

文献記載の方法で生薬コウカから safflor yellow 類の単離を試みたが、純度が低いと思われる粉末が得られたのみであった。

操作が簡便すぎることから、花卉に含まれる糖類などがまだ多く残っていることが考えられる。現在精製途上で単離には至っていない。Safflor yellow 類には幾つかの化合物があるので、どの化合物を定量の対象とすべきかについても、今後考える必要がある。

### 3. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

#### 1) トロロックスの $\text{IC}_{50}$

酸化防止剤の抗酸化力価評価においてトロロックスの  $\text{IC}_{50}$  は TEAC 算出の基礎となる重要な値である。そこで、一般試験法案に基づき、トロロックスの  $\text{IC}_{50}$  の算出に関する手順について繰り返し試験 ( $n = 8$ ) を実施し、その再現性を調べた。その結果、トロロックスの  $\text{IC}_{50}$  の平均は  $59.3 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$  であり、変動係数は 1.3% となった。この結果より、一般試験法案によるトロロックスの  $\text{IC}_{50}$  の算出に関しての再現性は問題ないと判断した。

#### 2) 酸化防止剤チャ抽出物の力価評価

酸化防止剤 19 種類 (サンフェノン EGCg, サンフェノン 90S, サンフェノン BG-3, カメリアエキス 30S, チャ抽出物, 茶抽出物 40, 茶抽出物 70, ポリフェノン PF, ポリフェノン 70S, ポリフェノン G, サンフード 100, テアビゴ, カメリア 50EX, d- $\delta$ -トコフェロール, 生コーヒー豆抽出物, ローズマリー抽出物, ヤマモモ抽出物, 酵素処理イソクエルシトリン, 酵素処理ルチン) を試料とし、上記の一般試験法案の手順に従い測定を行った。いずれの試料もエタノール (99.5) に溶解し、希釈もエタノール (99.5) で行った。

測定の結果、19 種類の酸化防止剤全てについて  $\text{IC}_{50}$  と TEAC を求めることが可能であった。このことから、一般試験法案の酸化防止剤への適用性は問題ないと判断した。また、TEAC の変動係数は 0.28~7.1% となった。特に、サンフェノン EGCg を除く 18 試料ではそ

の変動係数が4.3%以下となり非常に高い再現性を示した。

#### 4. 日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討：

##### 1) カピリン定量用内標準物質の選択

HPLC/PDA 分析条件下におけるカピリン定量用内標準物質を選択した。定量用内標準物質としては、安価でコンスタントに入手可能で、試薬メーカーが記載する純度値と<sup>1</sup>H-qNMRでの純度値に大きな差がないと予想されるものを考慮して、計13種の市販試薬を候補に挙げた。これらの市販試薬を、HPLC/PDA分析条件に付し、得られたHPLCクロマトグラムを、カワラヨモギ抽出物のそれと比較したところ、ヘプチルパラベンがカワラヨモギ抽出物中のカピリンおよび夾雑物との分離が良好であった。次に、ヘプチルパラベンの市販試薬がカピリンの定量用内標準物質として適しているのか検証を行なった。4社4製品のヘプチルパラベン市販試薬を<sup>1</sup>H-qNMRに付し、得られた純度値を各試薬のラベルに記載されている純度値と比較したところ、4製品全てにおいて<sup>1</sup>H-qNMRでの純度値とラベル記載の純度値に大きな差がなく(1.4%未満)、このことから、市販のヘプチルパラベンを購入して用いれば、メーカー間純度の差や表示純度との差をあまり気にせずに定量用内標準物質として使用できることが明らかとなった。

##### 2) ヘプチルパラベンに対するカピリンのRRFの算出

ヘプチルパラベンとカピリンを混合したRRF算出用試料液を<sup>1</sup>H-qNMRに付したところ、ヘプチルパラベンに由来するH-2+H-6およびH-3+H-5の2つのプロトンシグナルは、カピリンのH-2+H-6、H-4およびH-3+H-5の3つのプロトンシグナルと良好に分離しており、これらのプロトンシグナルから相対積分値を算出した後、各シグナルが由来するプロトン数で

除し、ヘプチルパラベンに対するカピリンのモル比の平均を求め、式1に代入した。各RRF算出用試料液中の平均モル比の値の相対標準偏差(RSD)は0.56%以下であり良好であった。

次にRRF算出用試料液を移動相で希釈しHPLC/PDAに付した。ヘプチルパラベンおよびカピリンの極大吸収波長は、256nmおよび284nmを示したため、ヘプチルパラベンのピーク面積を256nmで求め、カピリンのピーク面積は284nmで求めることにした。ピーク面積は、3社3製品のカラムを用いて求め、式1に代入することでヘプチルパラベンに対するカピリンのRRFを算出した。3社3製品のカラム(各カラム測定n=3)での平均RRFは1.31、RSD1.25%であり、カラムの影響を受けにくい堅牢な値であることが明らかとなった。したがって、RRFを適用したカピリン定量法には、ヘプチルパラベンに対するカピリンのRRF値として1.31を用いることとした。

##### 3) RRFを適用したHPLC/PDAによるカピリンの定量

ヘプチルパラベンと製品1~3を精密に秤量したHPLC/PDA分析用試料液をHPLC/PDAに付し、カワラヨモギ抽出物製品中のカピリンの定量を行なった。秤量値およびピーク面積を求め、式2に代入することでカピリンの含量を算出した。また、算出された含量について、昨年度報告された、カピリン標準品(非売品)の検量線(<sup>1</sup>H-qNMR純度で校正)から算出された含量と比較し、本研究で定めたRRFの評価を行なった。両定量法で算出された含量は、概ね一致しており、その差は0.002%以下であったため、本法で用いたRRF値が適切であるものと判断された。

#### 5. 酵素の基原の解析法の確立：

##### 1) 「細菌」及び「放線菌」に属す基原

第9版公定書には、「細菌」由来の既存添加物酵素として86基原が収載されている。基原

別による品目数を見てみると、Bacillus 属 16 品目、次いで Bacillus subtilis が 11 品目で最も多かった。冒頭で述べたように、Bacillus 属で定義されると、セレウス菌 (B. cereus) や炭疽菌 (B. anthracis) など基原として使用可能と解釈されることが懸念されるため、種まで明確にする必要がある。「放線菌」(広義には細菌)由来の既存添加物酵素では、25 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、Streptomyces thermoviolaceus と Streptomyces violaceoruber が共に 19 品目で最も多かった。「細菌」及び「放線菌」は DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が 70% 以上を示す菌株同士を 1 つの菌種と定義している 2)。16S rDNA の全長配列(約 1,500 bp)の相同値が 98.7% 以上の場合には、DNA-DNA 分子交雑試験の相同値が 70% 以上を示す可能性、つまり同種の可能性があるとされている。なお薬局方では 16S rDNA の上流約 800 bp または下流 800 bp の配列を指標にして、データベースと照合し、90% 以上合致する上位にランクされた菌種を同一種又は近縁種と判定する。そこで、属及び sp. で定義された基原を除く「細菌」56 基原と「放線菌」19 基原について、16S rDNA 配列が国際塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。「細菌」では、56 基原中 52 基原の 16S rDNA 配列が登録されていた。16S rDNA 配列が登録されていなかった 4 基原のうち、Bacillus coagulans J4 は、株レベルでの定義となっていた。16S rDNA 配列を指標にした同定法では株レベルでの分類には、分解能が低く対応できない。従って、トレサビリティの得られない学名と判断し、「グルコースイソメラーゼ」の基原 Bacillus coagulans と同様に、種レベルまでの定義とするのが望ましい。「放線菌」についても GenBank に 16S rDNA が登録されているのか調査したところ、19 基

原中 17 基原が登録されていた。16S rDNA 配列が登録されていなかった 2 基原のうち、「アスコルビン酸オキシダーゼ」の基原 Eupenicillium brefeldianum は「放線菌」ではなく、「糸状菌」に分類されるため、第 9 版公定書の「アスコルビン酸オキシダーゼ」の定義を一部修正する必要がある。

Thermomonospora viridis はトレサビリティの得られない学名であった。

## 2) 「酵母」に属す基原

第 9 版公定書には、「酵母」(広義には真菌)由来の既存添加物酵素として 10 基原が収載されている。薬局方では ITS1 配列を指標にして、データベースと照合し、90% 以上合致する上位にランクされた菌種を同一種又は近縁種と判定する。また、日本薬学会協定衛生試験法では、26S rDNA の部分塩基配列(D1/D2 領域)を指標にして、99% 以上の類似度を示した菌種を同一種と同定する 4)。杉田らは、「酵母」Trichosporon 属(17 種 5 変種)を用いて、同種の場合、DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が 80% 以上であり、その際に与えられる ITS1 及び ITS2 領域(5.8S rDNA と 26S rDNA 間のスペーサー領域)の相同値が 99% 以上であることを報告している。衛生試験法では、杉田らの報告を引用し、ITS 領域を指標にしても同等の結果が得られるとしている。そこで、属で定義された基原を除く 6 基原について、ITS 領域の配列(ITS1 及び ITS2 を含む)が GenBank に登録されているのか調査した。その結果、6 基原の ITS 配列が登録されていることを確認できた。

## 3) 「糸状菌」及び「担子菌」に属す基原

第 9 版公定書には、「糸状菌」由来の既存添加物酵素として 80 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、Aspergillus niger が 25 品目、次いで Aspergillus oryzae が 16 品目で最も多かった。「担子菌」由来の



既存添加物酵素では，11 基原が収載されている。「糸状菌」及び「担子菌」は，広義には真菌にあたり，同種間における任意の指標遺伝子の相同値についての知見は少ないが，多くの実験データに基づき，「D1/D2 領域又は ITS 領域の相同値が 99%以上のとき，同種とみなす」ことが支持されている．そこで，属及び sp. で定義された基原を除く「糸状菌」65 基原と「担子菌」6 基原について，ITS 配列が GenBank に登録されているのか調査した。「糸状菌」では 65 基原中 57 基原の ITS 配列が登録されていた．ITS 配列が登録されていなかった 8 基原のうち，4 基原は D1/D2 領域の配列も登録されていなかった．また残る 4 基原はトレーサビリティの得られない学名であった．「担子菌」では 6 基原中 6 基原の ITS 配列の登録が確認できた．

#### 4) 16S rDNA，ITS 配列以外の指標遺伝子

16S rDNA または ITS 配列を指標とした場合でも一義的に微生物種を同定することができないことも報告されている．特に「糸状菌」の *Aspergillus* 属，*Penicillium* 属では，異なる種間でも ITS の相同値が 99%以上となることもあることから，ITS 配列は種の絞り込みとして利用し，実際の同定は，別のタンパク質遺伝子を利用する．*Aspergillus* 属，*Penicillium* 属では -チューブリン遺伝子やカルモジュリン遺伝子が有効とされており，データベースも拡充されている．このことから，DNA を用いた種の再同定を実施するにあたり，合理性があれば，16S rDNA，ITS 配列以外の遺伝子も指標とするのが科学的に妥当である．

#### 5) 相同値の目安及び学名変更後の基原の使用是非の判断基準

日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」を参考に，「DNA を指標にした既存添加物酵素の基原同定法（仮称）」を酵素の基原の判断基準の仮案として別紙に示した。「細菌」

「放線菌」については，16S rDNA の全長配列を指標として，データベース上の塩基配列と 98.7%以上の相同値を示したとき，その塩基配列に由来する微生物種と同種と見なす．「酵母」「糸状菌」「担子菌」については，ITS1 配列を指標としてデータベース上の塩基配列と 99%以上の相同値を示したとき，その塩基配列に由来する微生物種と同種と見なす．なお，合理性があれば，16S rDNA 及び ITS1 以外の遺伝子配列も指標にして良いものとする．

既存添加物名簿作成から 20 年が経過しているが，本研究で提示した案，すなわち，DNA を指標にした同定法により，現時点での科学的に妥当と考えられる基原の学名を第 10 版公定書に反映可能であると考えられる．学名の設定根拠は，指標遺伝子配列及び国際塩基配列データベースをよりどころとするため，例えば，第 10 版公定書で学名を A と設定したが，最新の研究により学名が B となった場合でも，国際塩基配列データベースとリンクする NCBI Taxonomy から A と B の関係を確認できれば，トレーサビリティを確保していると判断し，その菌株の使用を認めるということが説明でき，そして，必要に応じて，学名 B は第 11 版公定書に反映することができるように整理した案である．ここで示した案には議論されるべきことが多く残されており，今後も検討が必要である．

## E. 結論

### 2. 含有成分解析と成分規格試験法の検討：

既存添加物名簿収載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物製品中の含有成分について検討した結果，これまで明らかにした 14 化合物に加え，新たに 5 種の化合物〔vanillin，3-O-trans-caffeoyl-4-O-trans-feruloylquinic acid，4-O-trans-caffeoyl-

5-O-trans-feruloylquinic acid ,  
trans-feruloyl-L- tryptophan ,  
trans-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester )を  
単離することができた .今回の結果を加えたこ  
れまでの検討から ,本添加物の主成分は  
caffeine 及び chlorogenic acid であり ,また  
DPPH ラジカル消去活性及び SOD 様活性を指  
標とした酸化防止能の結果から ,有効成分は  
chlorogenic acid をはじめとするカフェー酸誘  
導体であることが示唆された .

カキ色素の品質規格作成に供する化学的検  
討として ,製品中の成分精査を行った .HPLC  
でほぼ 1 ピークのフラクションを得ることが  
できたが ,機器分析による構造解析を行ったと  
ころ夾雑物が認められ ,今後さらなる精製を計  
画する .一方 ,本製品には構造不特定の縮合型  
タンニン類が豊富に含まれることが示唆され  
たことから ,高分子領域の分子量について  
GPC により測定したところ ,重量平均分子量  
約 20 万であることが明らかとなった .今後こ  
れらの構造的特徴についても検討が必要であ  
る .

モウソウチク抽出物製品について HPLC 分  
析を行った結果 ,3 製品間で共通の成分が観察  
され ,今回明らかにした成分が指標成分の候補  
となり得ることが示唆された .一方で ,今回の  
条件でピークが検出されない製品もあり ,製品  
間でのばらつきが認められた .また ,既存添加  
物名簿において主成分とされる

2,6-dimethoxy-1,4- benzoquinone は今回の測  
定条件ではいずれの製品中にもほとんど検出  
されなかった .

既存添加物ゴマ油不けん化物の定量分析用  
セサミンおよびセサモリンは ,HSCCC により  
簡便かつ安価に単離精製できることが判明し  
た .本標準品は ,ゴマ油不けん化物の確認試験  
のみならず ,様々なゴマ油由来の製品に応用可  
能と考えられる .

既存添加物ベニコウジ色素とベニコウジ黄  
色素の成分規格案について ,主成分も含めて再  
検討する必要性が挙げられた .そのためには ,  
今後 ,他の流通品も含めて ,自主規格案との比  
較検討を進める必要があると結論付けた .ベ  
ニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は ,培地  
条件や抽出条件により ,全く色彩成分が異なり ,  
明確な主成分を同定し ,それに基づく規格基準  
が必要と考えられた .

ベニコウジ色素 : 赤色の主な成分は ,HPLC  
による評価は困難であり ,今後 ,HSCCC など  
を利用した主成分の同定が必要であり ,それに  
基づく ,試験の提案も求められる .ベニコウジ  
黄色素 : 主にキサントモナシン A およびキサ  
ントモナシン B が主成分と想定される .しか  
しながら ,いずれの標準品も入手困難であるた  
め ,今後 ,その含量分析に関して ,検討する必  
要性がある .

既存添加物クチナシ青色素は ,ゲニピンと一  
級アミンの反応生成物が主色素成分とされる  
がその構造は未だ不明である .この主色素成分  
の生成過程および構造についての知見を得る  
ため ,ゲニピンとベンジルアミンを用いたモデ  
ル実験を行った .昨年度は ,青色素の前駆体と  
考えられる黄色素 Y1 及び Y2 の構造を明らか  
とした .本年度は引き続き ,クチナシ青色素の  
色素生成メカニズムを明らかとするため ,モデ  
ル実験下 ,色調変化の観察と共に青色素 B1 及  
び B2 を単離し ,その構造を推定した .その結  
果 ,ゲニピンは ,ベンジルアミンの 1 級アミン  
と反応し閉環した後 ,黄色素 Y1 とその異性体  
Y1'が生成した .次に ,1 位の OH 基と 9 位の  
プロトンが cis 配置した異性体 Y1'は ,速やか  
に脱水し黄色素 Y2 となった後 ,青色素成分へ  
変化または重合していくと考えられた .生成し  
た青色素成分の混合物より青色素 B1 及び B2  
を精製し ,その化学構造を LC/TOF-MS 及び  
NMR により解析した結果 ,Y2 の 6 位と 10 位

が脱水結合して共役二重結合を形成し、更に繰り返し結合した重合体であると推定された。

既存添加物「ラック色素」は、天然由来の着色料であり、コチニール色素と同様にアントラキノン骨格を有する色素を主成分とするが、コチニール色素が carminic acid の 1 成分からなるのに対し、ラック色素は laccaic acid A, B, C, E 等複数の成分から構成される。ラック色素をアンモニア処理することで、pH に依存しない色調が確認された。これは、ラック色素中の主色素成分 laccaic acid A, B, C 及び E の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH<sub>2</sub>)に置換した 4-aminolaccaic acid A, B, C 及び E に起因することを明らかにした。現時点では、ラック色素をアンモニア処理して合成された、いわゆる耐酸性ラック色素の報告例はないが、今後、流通が確認されたとき、これについても、耐酸性カルミンと同様に未指定添加物となることから、その分析法の確立が必要と考えられた。また、食品の製造過程において、ラック色素から意図せずに 4-aminolaccaic acid 類が産生される可能性は否定できない。この点については、耐酸性カルミン(4-aminocarminic acid)と同様に注意が必要であり、4-aminolaccaic acid 及び 4-aminocarminic acid が食品または添加物から検出された際、それらが意図せず産生されたものなのかの判断基準を整理しておく必要があると思われる。

「クローブ抽出物」中の eugenol 定量では、認証標準物質の DSS-d<sub>6</sub> を内部標準として用い、この DMSO-d<sub>6</sub> 溶液を測定試料の acetone-d<sub>6</sub> 溶液とを混合して NMR を測定し、eugenol の 6 位 H のシグナル ( 6.33 ppm ) を利用することで測定試料中の eugenol が定量できることがわかった。この数値は、既存の定量法である HPLC 法と良い一致を示した。これらのことから <sup>1</sup>H-qNMR 法が、既存の方法に変わり

うる、簡便で迅速な「クローブ抽出物」の品質管理法になりうることを示すことができた。

「ベニバナ赤色素」の本体である carthamin の HPLC 定量条件の設定ができたため、<sup>1</sup>H-qNMR では定量が困難な場合の代替手段として標準溶液の値付け HPLC 法を用いた定量という組み合わせでの絶対定量法の確立の目処をつけた。Carthamin の標準試料の測定に関しては先行例もあることから、引き続き、実際に <sup>1</sup>H-qNMR で「ベニバナ赤色素」が定量可能か、「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量には HPLC との組み合わせが必要かについて検討を行う。

「ベニバナ黄色素」に関しては、個々の safflor yellow 類の単離を引き続き行い、それぞれの <sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいて、独立したシグナルが得られるか、すなわち <sup>1</sup>H-qNMR の実施が可能かの確認をとりあえずの目標とする。

*G. glabra* 由来のカンゾウ油性抽出物流通製品において抗酸化活性寄与率の高かった 8 成分の単離・精製を行った。これらの単離・精製物は、LC/MS 分析で、各抗酸化活性物質の指標となる分画物試料と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。各単離・精製物構造解析結果から、未同定であった 4 成分の同定を行った。その結果、A 成分 ( MW 322, 354, 358, 370 ) の化合物を同定した。なお、これらの同定成分の内、MW 370 および MW 358 の化合物は、これまでの報告において DPPH ラジカル消去活性を有することは報告されていないが、今回のこれらの単離画分は抗酸化活性を示した。また、既に市販標品や単離標品との比較や LC/MS/MS により同定していた 4 種の抗酸化成分 ( glabridin, licochalcone B, kanzonol X および hispaglabridin A ) 相当画分についても単離・精製を行い、NMR 測定を行ったところ、同定に問題ないことが確認された。

カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性に glabridin だけではなく, licochalcone B, kanzonol X, hispaglabridin A, 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin および glabrene 等多数の化合物が関与していることが示された。

### 3. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

DPPH 法に基づく一般試験法案が酸化防止剤の力価評価において広い適用性と高い再現性を示すことが明らかとなった。今後は, 各種酸化防止剤に関する個別の手順の作成を目指す。

### 4. 日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討

本研究では, カワラヨモギ抽出物の有効成分であるカピリンの定量法を検討した。本研究で算出されたヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF を適用して HPLC/PDA によるカワラヨモギ抽出物中のカピリンの定量を行なった。算出された定量値は, 純度 99.5% のカピリンの量値と殆ど差はなく (0.002% 以下), 検量線から求めた値を真値とすると, RRF を用いた定量法の真度は 91~94% であった。本研究において確立した RRF を適用した定量法は, カピリンの定量用標準品を必要とせず, カワラヨモギ抽出物の規格試験法として有用であることが明らかとなった。

### 5. 酵素の基原の解析法の確立:

第 9 版公定書に記載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について, 16S rDNA または ITS 配列が国際塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。その結果, 「細菌」52/56 基原, 「放線菌」17/19 基原, 「酵母」6/6 基原, 「糸状菌」57/65 基原, 「担子菌」6/6 基原の配列が登録されていた。配列が登録されていなかった基原の中には, トレーサビリティの得られない学名, すなわち公

定書に記載する基原としてふさわしくない学名であるものが散見された。

微生物などの学名が流動的である基原に対して規格を整備するためには, 統一された方法, 指針に基づいて情報を整理する必要がある。本研究で提示する同定法を実施すると, 第 10 版で基原の大幅な改正が求められ, さらにその後も最新の研究により学名が変更となる基原もでてくることが予想されるが, これについては NCBI Taxonomy から得られる旧名と現行名を確認することで, 基原の使用の是非を判断するなど, 今後, 一定の判断基準を設定しておく必要があると思われる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Nishizaki, Y., Ishizuki, K., Akiyama, H., Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K., Preparation of ammonia-treated lac dye and structure elucidation of its main component. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **57**, 193-200 (2016).
- 2) Ueda T., Okumura, T., Tanaka, Y., Shimamura, T., Ukeda, H., Development of a new electrochemical evaluation method for antioxidant activity based on the redox properties of polyoxometalates and its application to the evaluation of antioxidant capacity of beverages, *Analytical Sciences*, **32**, 825-830 (2016).
- 3) 山内良子, 石井佐弥, 草場悠里, 小林弘司, 島村智子, 受田浩之, 穂山浩, 石川洋哉, 酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH ラジカル消去能測定におよぼす反応溶媒の影響, *日本食品保蔵科学会誌*, **42**, 189-196 (2016).

- 4) Enkhtuya, E., Shimamura, T., Kashiwagi, T., Ukeda, H., Antioxidative Constituents in the Leaves of *Paeonia anomala* Grown in Mongolia, *Food Science and Technology Research*, **23**, 63-70 (2017).
- 5) 島村智子,伊藤裕才,久保勇人,柏木丈弘,石川洋哉,松井利郎,山崎壮,多田敦子,杉本直樹,穂山浩,受田浩之,既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の関係,日本食品化学会会誌,印刷中.
- 6) Tanaka, R., Shibata, H., Sugimoto, N., Akiyama, H., Nagatsu, A., Application of a quantitative <sup>1</sup>H-NMR method for the determination of paeonol in Moutan cortex, Hachimijogan and Keishibukuryogan, *Journal of Natural Medicines* (2016), **70**(4), 797-802.
- 8) Tanaka, R., Inagaki, R., Sugimoto, N., Akiyama, H., Nagatsu, A., Application of a quantitative <sup>1</sup>H-NMR (<sup>1</sup>H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen, *Journal of Natural Medicines*, **71**, 315-320 (2017).
- 9) Takahashi, M., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Takeuchi, H., Nakagawa, K., Akiyama, H., Sato, K., Inoue, K. Determination and purification of sesamin and sesamol in sesame seed oil unsaponified matter using reversed-phase liquid chromatography coupled with photodiode array and tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.*, **39**, 3898-3905 (2016).
- 10) Akiyama, H., Nose, M., Ohtsuki, N., Hisaka, S., Takiguchi, H., Tada, A., Sugimoto, N., Fuchino, H., Inui, T., Kawano, N., Hayashi, S., Hishida, A., Kudo, T., Sugiyama, K., Abe, Y., Mutsuga, M., Kawahara, N., Yoshimatsu, K., Evaluation of the safety and efficacy of extracts of *Glycyrrhiza uralensis* roots produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems *J. Nat. Med.*, **71**, 265-271 (2017).
- 11) Amakura, Y., Yoshimura, M., Morimoto, S., Yoshida, T., Tada, A., Ito, Y., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Akiyama, H., Chromatographic evaluation and Characterization of Components of Gentian Root Extract Used as Food Additives, *Chem. Pharm. Bull.* **64**, 78-82 (2016).
- 12) Todoroki, K., Nakamura, M., Sato, Y., Goto, K., Nakano, T., Ishii, Y., Min, J.Z., Inoue, K., Toyooka, T., 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride as an Enantioseparation Enhancer for Chiral Derivatization-LC Analysis of D- and L-Amino acids., *Chromatography*, **37**, 23-28 (2016).
- 13) Inoue, K., Tanada, C., Hosoya, T., Yoshida, S., Akiba, T., Min, J.Z., Todoroki, K., Yamano, Y., Kumazawa, S., Toyooka, T., Principal component analysis of molecularly-based signals from infant formula contaminations using LC-MS and NMR in foodomics., *J. Sci. Food Agric.*, **96**, 3876-3881 (2016).
- 14) Inoue, K., Miyazaki, Y., Unno, K., Min, J.Z., Todoroki, K., Toyooka, T., Stable isotope dilution HILIC-MS/MS method for accurate quantification of glutamic acid, glutamine, pyroglutamic acid, GABA and theanine in mouse brain tissues., *Biomed. Chromatogr.*, **30**, 55-61 (2016).

## 2. 学会発表

- 1) 好村守生, 越智啓介, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山 浩, 天倉吉章, 既存添加物「モウソウ

- チク抽出物」の成分研究，日本生薬学会第 62 回年会，2015 年 9 月 11 日（岐阜）
- 2) 天倉吉章，吉田晴菜，杉脇秀美，好村守生，多田敦子，西崎雄三，杉本直樹，佐藤恭子，穠山 浩，既存添加物「生コーヒー豆抽出物」の成分研究，日本食品化学学会第 22 回総会・学術大会，2016 年 6 月 3 日（高知）
- 3) 石附京子，西崎雄三，多田敦子，箕川剛，中島光一，穠山浩，杉本直樹，佐藤恭子：既存添加物クチナシ青色素の色素生成メカニズムの解明：前駆体の構造決定．食品化学学会(2016．6)．
- 4) 杉本直樹：qNMR による相対感度係数の算出とその有効利用について．JAIA (2016．8)．
- 5) 杉本直樹：定量 NMR/LC を用いた天然有機化合物の定量分析法の開発(シンポジウム「定量 NMR から見えてくる世界」)．日本生薬学会第 63 回年会 (2016．9)．
- 6) 黒江美穂，山崎太一，斎藤直樹，中村哲枝，沼田雅彦，西崎雄三，杉本直樹，井原俊英：新規定量法である qNMR/LC 法による非イオン界面活性剤標準液の濃度評価．日本分析化学会第 65 回年会(2016．9)．
- 7) 斎藤直樹，北牧祐子，大塚聡子，西崎雄三，杉本直樹，井原俊英：定量 NMR における不純物の重なる信号に対するクロマトグラフィーを併用した新規評価法の確立．NMR 討論会(2016．11)．
- 8) 藤原裕未，田中理恵，杉本直樹，西崎雄三，穠山浩，永津明人：定量 NMR を利用した生薬成分の定量．第 45 回生薬分析シンポジウム(2016．11)．
- 9) 島村智子，伊藤裕才，久保勇人，柏木丈弘，石川洋哉，松井利郎，山崎壮，多田敦子，杉本直樹，穠山浩，受田浩之，既存添加物チャ抽出物中の成分含量と抗酸化力価の関係，日本食品化学学会 第 22 回総会・学術大会，2016 年 6 月 2-3 日（高知）．
- 10) 草場悠里，山内良子，小林弘司，島村智子，受田浩之，杉本直樹，穠山浩，石川洋哉，既存添加物チャ抽出物の各種抗酸化能評価，第 53 回化学関連支部合同九州大会，2016 年 7 月 2 日（福岡）．
- 11) 永津明人「定量 NMR を用いた生薬の分析」日本生薬学会第 63 年会，1A-SY1-2，2016 年 9 月（富山）
- 12) 藤原裕未，水野舞，永津明人，杉本直樹，西崎雄三，多田敦子，穠山浩「定量 NMR による生薬チョウジ中の eugenol の定量」日本生薬学会第 63 年会，2P-09，2016 年 9 月（富山）
- 13) 永津明人，加藤志保里，山田紗由美，藤原裕未，田中理恵，杉本直樹，西崎雄三，穠山浩「定量 NMR を用いたグルコサミンの定量法の確立」日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2016，D-34，2016 年 10 月（岐阜）
- 14) 藤原裕未，田中理恵，杉本直樹，西崎雄三，穠山浩，永津明人「定量 NMR を利用した生薬成分の定量」第 45 回生薬分析シンポジウム，2016 年 11 月（大阪）
- 15) 高橋未来，多田敦子，西崎雄三，杉本直樹，竹内弘明，中川一弥，穠山 浩，井之上浩一：高速向流クロマトグラフィーによるゴマ油不けん化物からの高純度セサミンおよびセサモリンの単離精製 日本食品化学学会第 22 回総会・学術大会（高知），2016 年 6 月

#### I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし