

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）

(H29-食品-一般-007)

平成29年度 総括研究報告書

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

研究代表者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究要旨

1) 既存添加物の成分規格試験法に関する研究

成分規格が未設定の既存添加物の成分規格の整備状況を調査し成分規格案を検討した。酵素品目については、基原の呼称変更等への対応及び留意点について調査した。また、既存添加物トマト色素の主色素成分リコペンの定量法の改正案を作成するためその手法を検討した。

2) 既存添加物の基原同定手法に関する研究

ペプチドを指標とした基原同定法について検討した。既存添加物名簿収載品目の一つである「香辛料抽出物」について、規格案作成に向けた情報収集を行った。

3) 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

ルチン(抽出物)はアズキ、エンジュ及びソバの3種の基原を区別するため、HPLCプロファイリングを検討した。その結果、エンジュ中の成分が基原同定指標となり得る可能性が示唆された。また、レイシ抽出物の化学的検討として、HPLC及びTLCによる予備的分析を行った結果、HPLCによる確認試験の設定が困難であることがわかった。

4) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

ゴマ油不けん化物中のゴマリグナン類、ベニコウジ黄色素中のキサントモナシン類の定量法として相対モル感度(RMS)によるシングルリファレンスHPLCが有効であることが示唆された。

5) qNMRを用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

ベニバナ赤色素中のcarthaminは、¹H-qNMR法で値付けしたcarthaminを定量用標準品としてHPLCによる定量法が有効であることが示唆された。また、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中のanisaldehydeは、¹H-qNMR法により直接定量可能であったが、含有率が低く、試料溶液濃度を高める工夫の余地があると考えられた。

6) qNMRを用いた既存添加物の分析手法に関する研究

ラカンカ抽出物中のモグロシドV含量の測定法として、¹H-qNMR及びRMSを用いた定量法について検討を行った。その結果、RMSを用いた定量法が有効であることがわかった。

7) 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難な既存添加物の指標成分であるクロセチン、カプサイシン及びカピリンについて全合成ルートを確立した。

研究分担者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 室長
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
天倉吉章 松山大学薬学部 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
大槻崇 日本大学生物資源学部 専任講師
出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所 部長

研究協力者

上田要一 日本食品添加物協会 専務理事
樋口彰 日本食品添加物協会 常務理事
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
好村守生 松山大学薬学部 准教授

A. 研究目的

既存添加物 365 品目(枝番込み 382 品目, 但し, 香辛料抽出物を 1 品目(74 基原)とする)の内, 第 9 版食品添加物公定書には 217 品目の成分規格が収載される。しかし, 残り 164 品目(枝番込み)と香辛料抽出物 1 品目(74 基原)の成分規格が未設定であり, すなわち, 既存添加物名簿に収載される全品目の内, 国の成分規格が設定されるものは実質的に未だ半数以下に過ぎない。また, 自主規格が設定されている品目についても, 検証試験が不十分で信頼性が低い, 有効性と有効成分が解明できていないもの等もあり, 基原同定及び成分分析等を継続し, 更に新しい概念に基づく評価・分析手法の導入を行う以外に, 成分規格試験の設定, すなわち, 既存添加物の品質確保は困難な状況にある。

本研究では, 既存添加物の品質確保を目的に, (1) 成分規格が未設定である 164 品目及び香辛料抽出物(1 品目 74 基原)について, 流通実態や

自主規格の有無を調査する。(2) 基原が明確でないものについては基原種の調査を行う。また, 含有成分や有効成分の解析を行い, 成分規格試験法の設定に必要な指標成分を明らかとする。(3) 従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難なものについては, 指標成分と同一の若しくは代替物質の定性用又は定量用標準品の全合成ルートを確立すると共に新規分析法の開発を行い, 簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化する。(4) 分子生物学的手法を応用した酵素等の基原種の同定法を検討する。等, 調査, 基礎研究及びその応用による評価手法の確立を検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 既存添加物の成分規格試験法に関する研究
 - 1) 食品添加物公定書への既存添加物の新規収載を目標に, 成分規格の整備状況を調査した。成分規格案が未設定の品目について規格案を検討すると共に, 一部品目について見直しあるいは裏付け試験を実施した。また, 酵素品目については, 基原としての微生物について分類学の発達に伴う呼称の変更等への対応及び留意点について調査した結果をまとめた。
 - 2) 既存添加物トマト色素の主色素成分リコペンの定量法を検討した。相対モル感度係数(RMS: relative molar sensitivity), または重量ベースに換算した相対感度係数(RRF: relative response factor)を利用したリコペンの定量法を検討した。
2. 既存添加物の基原同定手法に関する研究
 - 1) 既存添加物酵素 2 品目 18 製品 (α -アミラーゼ 10 製品, グルコアミラーゼ 8 製品) を試料として, ペプチドを指標とした基原同定法

について検討した。

- 2) 第 9 版食品添加物公定書作成時の基原生物の学名と標準和名の調査法に従い、香辛料抽出物 74 品目について基原生物の学名と標準和名を以下のデータベースより調査した。

学名及び英語慣用名：a) Tropicos (<http://www.tropicos.org/>), b) 和名：YList (<http://ylist.info>).

さらに、FCC (Food Chemicals Codex)及び CFR (Code of Federal Regulation Title 21)に規格が記載されているかどうかについても調査した。

3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

- 1) エンジュのつぼみ(カイカ) 50%エタノール抽出物について、各種カラムクロマトグラフィー (YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20 他) による分離精製を繰り返し、化合物の単離を行った。単離した化合物については標品の分析データとの直接比較、あるいは文献値と比較することにより同定した。
- 2) レイシ抽出物製品約 0.1 g をメタノール 10 mL に加え超音波処理後、遠心分離して得られた上澄みを試料溶液 1 とした。日本食品添加物協会発行の第 4 版既存添加物自主規格記載の確認試験に準じて試料溶液 2 を調製した。試料溶液 1 について HPLC 分析、試料溶液 2 について TLC 分析を行った。

4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

- 1) 既存添加物ゴマ油不けん化物製品、ゴマ油は国内で市販されているものを用いた。4 種のゴマリグナン類及び 4 種のデザインしたシ

0~100 μ M で絶対検量線を作成した。各シグマリファレンスに対するゴマリグナン類の検量線の傾きの比より、RMS を算出した。RMS 及び絶対検量線法の定量値を比較し、本法の妥当性を評価した。

- 2) 既存添加物ベニコウジ色素製品及びベニコウジ黄色素製品は国内で流通しているものを用いた。HSCCC により、ベニコウジ黄色素製品中のキサントモナシン A 及び B を単離精製した。カルバゾクロムを指標に RMS を算出し、定量法を確立した。

5. qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

- 1) 既存添加物ベニバナ赤色素製品から carthamin の単離し、 ^1H -qNMR の測定を行って純度を決定し carthamin 標準品とした。また、その ^1H -qNMR の測定を行った溶液を標準液として定量の基準とした。 ^1H -qNMR の測定に用いた溶液を 5 倍ずつ 4 段階に希釈し、それぞれから得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。ベニバナ赤色素製品に溶媒 (MeOH-水) 1.0 mL を加えて超音波下抽出し、ろ液を HPLC 用の溶液とした。各クロマトグラムのピーク面積と検量線から各試料の carthamin の含有率を算出した。

また、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の定量を ^1H -qNMR により行った。

6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

- 1) 既存添加物ラカンカ抽出物製品を試料とした。市販試薬モグロシド V を ^1H -qNMR によ

り純度決定し定量用標準品として用いた。また、ラカンカ抽出物製品を¹H-qNMR 標準溶液に溶解し、製品中のモグロシド V 含量を求めた。別に、HPLC による絶対検量線法及び RMS による定量法により、製品中のモグロシド V 含量を求め、RMS による定量法を評価した。

7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

- 1) クチナシ黄色素の色素成分クロセチン、トウガラシ色素の色素成分のカプサイシン、カワラヨモギ抽出物の抗菌成分カピリンについて常法により合成した。得られた化合物について NMR 及び MS により構造確認した。

C. D. 研究結果及び考察

1. 既存添加物の成分規格試験法に関する研究

- 1) 規格未設定の既存添加物の新規収載のため、成分規格の整備状況を調査した。成分規格案が未設定の品目については新たに規格案を検討した。また、規格案が設定済である品目については見直しあるいは裏付け試験を実施した。

酵素品目については、基原としての微生物について分類学の発達に伴う呼称の変更等への対応及び留意点について調査した結果をまとめた。すなわち、微生物においては、分類学、及び同定の技術、手法の進歩により、基原の呼称が改正されることが少なからず発生することがある。その際、事業使用されている基原自体に変更はなくとも、呼称変更により食品添加物公定書収載の基原名との齟齬が生じることになる場合もあるが、このことが問題とならないように対応策を検討

した。

- 2) 既存添加物トマト色素の成分規格の改正案を作成するため、主色素成分リコペンの定量法を検討した。トマト色素の成分規格試験法を比較すると、海外ではリコペンの定量法として HPLC を用いた方法を採用しているが、我が国(食品添加物公定書)では、定量法の代わりに色価測定法を採用しており、成分規格の不整合が生じている。しかし、HPLC を用いた定量法では、主色素成分リコペンの定量用標準品が必要であるが、安定性が悪いいため純度既知の定量用標準品が流通しておらず、正確な濃度の検量線を作ることが困難であるという問題があった。この問題を回避するため、リコペンの定量用標準品を必要としない HPLC による定量分析法とした RMS または RRF を利用した方法を検討した。

その結果、HPLC 及び qNMR により、リコペンのスダン I に対する RMS を正確に求めることによって、安価なスダン I を内標準物質とし、HPLC クロマトグラム上に観察される試料中のリコピンとスダン I のピーク面積、RMS の関係からリコペンの定量用標準品を必要としない定量法が構築できた。

2. 既存添加物の基原同定手法に関する研究

- 1) 市場に流通する食品添加物製品からダイレクトに基原を同定できる手法があれば、例えば添加物原料の特定の助力となると考えられる。そこで、ペプチドを指標とした基原同定法について検討した。タンパク質を主成分とする品目、あるいは残存すると予想された品目からタンパク質を抽出し、これを任意の消化酵素で切断、回収したペプチド断片を精密質量分析計に付し、質量スペクトルにマッ

チするペプチドを、任意のデータベースから検索・同定し、同定したペプチドが帰属するタンパク質及び基原情報を取得する方法を検討した。既存添加物酵素 2 品目 18 製品を対象にして、製品から生成したペプチドのマススペクトルを Mascot search に付し、帰属される基原と製品付帯情報を比較した。その結果、18 製品中 17 製品で Mascot search の結果と、製品に付帯する基原情報が一致した。一致しなかった製品は、由来する基原のタンパク質がデータベース上に登録されていないことが原因で、属レベルでは一致したことからこの手法が基原同定のために有効であることが示唆された。

2) 植物由来の香辛料抽出物 74 品目について、基原植物の和名及び学名を調査検討した。多くの基原について、基原製法本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、また、誤記と推測されるものが散見された。学名の命名者についても省略表記及び追記・修正などの変更が必要と判断された。また、和名においても標準和名ではなく別名が用いられている基原が複数存在した。これらの基原については詳細な調査が必要と考えた。

3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

1) 既存添加物ルチン（抽出物）は、「アズキの全草、エンジュのつぼみ若しくは花又はソバの全草から得られた、ルチンを主成分とするものをいう」と定義されており、アズキ、エンジュ、ソバの 3 原料由来のものが添加物とされる。一方、その原料由来のものを示す根拠となる化学的資料は乏しい。そこで、まず原料の含有成分の解析を行い、特徴づけでき

る成分の有無を確認することを目的に、検討を行うこととした。本研究では、3 原料のうち、エンジュのつぼみについて成分精査を実施した。

その結果、16 種の化合物〔rutin (1), quercetin (2), gallic acid (3), protocatechuic acid (4), maltol (5), ethylrutinoside (6), 4-hydroxybenzoic acid (7), maltol-3-*O*-{4'-*O*-*p*-coumaroyl-6'-*O*-(3-hydroxyl-3-methylglutaryl)} glucoside (8), kaempferol-3-*O*-rutinoside (9), kaempferol (10), *trans*-*p*-hydroxycinnamic acid (11), *cis*-*p*-hydroxycinnamic acid (12), *N*-*p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (13), *N,N'*-diferuloyl-putrescine (14), *N,N'*-dicoumaroylputrescine (15), isorhamnetin 3-*O*-rutinoside (16)〕を単離同定した。

2) レイシ抽出物は既存添加物名簿に収載され、「レイシ抽出物（マンネンタケ（*Ganoderma lucidum* Karst.）の菌糸体若しくは子実体又はその培養液から抽出して得られたものをいう）のうち、子実体から得られたものである」と定義されている。基原・製法・本質は、サルノコシカケ目マンネンタケ（*Ganoderma lucidum* KARST.）の菌糸体若しくは子実体、又はその培養液より、水、エタノール又は二酸化炭素で抽出して得た苦味料とされる。本添加物については、日本食品添加物協会発行の第 4 版既存添加物自主規格に確認試験が収載されているが、化学的データは乏しく、検討課題の一つとしてあげられる。そこで本研究では、本添加物の品質規格作成に向けたデータの集積を目的に、本添加物について HPLC 及び TLC 分析による予備検討を行った。

その結果, HPLC 分析では, 254 (or 280) nm 検出で保持時間がほぼ同じ範囲に 10 数ピークが観察され, 主たる検出ピークが認められず, HPLC 分析は困難であった. 第 4 版既存添加物自主規格記載の確認試験は HPLC でガノデリン酸 A を検出することが採用されているが判定困難であった. また, TLC 分析では, $R_f = 0.6$ 付近に明瞭な数個のスポットが確認された. このスポットの存否が確認試験に応用可能であるかどうかについては, 今後, 分離精製を行い化合物の同定を行い判断する予定である.

4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

- 1) 既存添加物ゴマ油不けん化物(Sesame Seed Oil Unsaponified Matter)の定義は, ゴマ (*Sesamum indicum* Linné) の種子から得られた, セサモリンを主成分とする. しかし, これまでの成分解析の報告では, セサミン及びセサモリンが主成分であり, セサモールは本品の不純物であることが確認されている. この際, セサミン類の標準品は非常に高価であり, また純度の制御が困難であるため, 通常の HPLC による定量分析法を規格試験法に設定することは困難である. そこで本研究では, RMS を用いたシングルリファレンス HPLC 定量法を構築した.

ゴマリグナン類に類似構造をもつシングルリファレンスを得るために, セサモールのアルキル化によりデザインした. それにより, シングルリファレンスとして, セサモールのメチル誘導体, ブチル誘導体, ヘキシル誘導体及びピペロナル (セサモールの類似化合物) を検討した. 4 種のゴマリグナン及びシングルリファレンスに関して, 絶対

検量線の傾きの比より RMS を求めた結果, どの濃度幅においても良好な RMS が得られた. 算出した RMS を用いて絶対検量線法と比較した結果, ヘキシル誘導体での定量値はばらつきが大きく, ピペロナルは最も定量性が高いことが確認された. また, カラムや移動相の条件を変更し, シングルリファレンス HPLC 定量法を検討した結果, いずれも RSD 5%以下のゴマリグナン類の定量値が得られ, その中でセサモールのブチル誘導体が最も RSD の低い定量値を示した. ゆえに, 本手法により, シングルリファレンスを用いることで, 4 種類のゴマリグナン類を標準品なしで一斉定量することが可能であることがわかった. また, 本結果より, 吸収極大も同じであるブチル誘導体が最適なゴマリグナン類のシングルリファレンスであることがわかった.

- 1) 既存添加物ベニコウジ色素及びベニコウジ黄色素の主成分であるアンカフラビン類, モナスコルブリン類, キサントモナシン類はいずれも標準品の入手が不可能である. このため, 我が国 (食品添加物公定書) では, 定量法の代わりに色価測定法を設定し, 色価を規定することによりその品質を確保している. しかし, 色価測定法は同色の色素類を分離して定量できないという欠点があり, HPLC 法への変更が望まれている. そこで本研究では, HSCCC により, ベニコウジ黄色素製品中の主色素成分であるキサントモナシン A 及び B を単離精製し, シングルリファレンスとしたカルバゾクロム (スルホン酸ナトリウム塩からカルバゾクロム重量換算) に対するそれぞれの RMS を求め, 標準品を必要としない定量法を検討した. 新たに開発したシングル

リファレンス HPLC 定量法により、絶対検量線法と同等の定量値が得られ、本法の有用性が証明できた。

5. qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

- 1) 既存添加物ベニバナ赤色素製品から単離を行って得られた粗 carthamin の ^1H -qNMR の測定を pyridine- d_5 中で行った。carthamin の 16 位 H のシグナル (δ 9.15 ppm) の積分値と内部標準の 1,4-BTMSB- d_4 の積分値から純度を決定し、これを carthamin 標準品とした。また、 ^1H -qNMR の測定を行った溶液を標準液とした。標準液を希釈して HPLC における検量線を作成し、80%MeOH-水で抽出を行って得た既存添加物「ベニバナ赤色素」、生薬コウカの粉末の試料中の含有率を測定したところ、「ベニバナ赤色素」の carthamin 含有率は 0.31%、生薬粉末は 0.22%と算出された。

また、carthamin 標準品を用いて UV スペクトルを測定、極大吸収におけるモル吸光係数を求めたところ、DMF : 1.21×10^5 ($\lambda_{\max} = 530$), EtOH : 1.19×10^5 ($\lambda_{\max} = 513$), Pyridine : 1.48×10^5 ($\lambda_{\max} = 540$) と算出された。Pyridine 中の値は今回初めて測定したもののだが、DMF 中の値は文献値の 1.3 倍、EtOH 中は 2.4 倍であった。文献の研究では、測定に供した carthamin の純度を高く見積もっていたと考えられた。

また、「香辛料抽出物」のうちスターアニスを基原とするとされるものについて検討した。Anisaldehyde の ^1H -qNMR 法による純度は、methanol- d_4 中で anisaldehyde のホルミル基 H の積分値と内部標準の 1,4-BTMSB- d_4 の積分値から求めることができた。

Anisaldehyde 標準品の純度は $94.96 \pm 1.02\%$ と見積もられた。

スターアニスを基原とする「香辛料抽出物」のうちで入手できた 5 サンプルの ^1H -qNMR 測定を試みた。そのうち 2 サンプルは anisaldehyde のホルミル基 H に由来するシグナルが観測されなかった。3 サンプルは測定可能で含有率が 1.40%, 0.24%, 0.76%であった。

6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

- 1) 既存添加物ラカンカ抽出物はラカンカ (*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C.Jeffrey ex A.M.Lu & Zhi Y.Zhang (*Momordica grosvenorii* Swingle)) の果実から得られた、モグロシド類を主成分とするものと定義されている。食品添加物公定書には、ラカンカ抽出物の成分規格は既に記載されており、主甘味成分であるモグロシド V の含量が規定されている。その定量法には、定量用モグロシド V を用いた HPLC による定量法が設定されているが、現在、モグロシド V は一部で流通するのみで、また入手できたとしても非常に高価であることから本定量法の改良が求められている。

そこで本研究では、甘味成分としてラカンカ抽出物 3 種について、RMS によるモグロシド V の含量測定を行い、モグロシド V 標準品を用いて作成した絶対検量線より算出された含量と比較した。各濃度のカフェインを用いて RMS との関係から算出された各ラカンカ抽出物中のモグロシド V の含量は、モグロシド V 標準品を用いて算出された含量と有意な差は認められなかった。したがっ

て、カフェインをシングルリファレンスとした RMS を用いた定量法は、ラカンカ抽出物製品中のモグロシド V の含量決定に有効と考えられた。

7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

- 1) クロセチン、カプサイシン、カピリンを、それぞれ入手容易な出発原料から合成するルートを確認した。クロセチンとカピリンにおいては、低収率の工程を改善する必要があるが、反応条件（試薬、溶媒、反応温度など）を精査することでクリアできると考えている。

E. 結論

1. 既存添加物の成分規格試験法に関する研究

- 1) 既存添加物の成分規格の整備状況を調査し、成分規格案を検討した。また、酵素品目については、基原の呼称変更等への対応及び留意点について調査した結果をまとめた。
- 2) 既存添加物トマト色素の主色素成分リコペンの定量法として RMS を利用した手法が有効である結果が得られたことから、今後、改正案としてまとめることとした。

2. 既存添加物の基原同定手法に関する研究

- 1) 市場に流通する食品添加物製品からダイレクトに基原を同定できる手法があれば、例えば添加物原料の特定の助力となると考えられる。そこで、ペプチドを指標とした基原同定法について検討した。
- 2) 既存添加物名簿収載品目の一つである「香辛料抽出物」について、規格案作成に向けた情報収集を行ったところ、多くの基原について、

基原製法本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、誤記と推測されるものも散見された。このうち、誤記と思われるものについては、FCC でも同様の記載が見られたため、規格案作成の際には詳細な検討が必要と思われる。また、「香辛料抽出物」74 基原種の多くが海外規格にも記載されていたが、ワサビなど日本の規格にのみ含まれているものの存在が判明した。「香辛料抽出物」の規格案作成時には、本研究で報告する情報をもとに、基原生物の学名等について再検討を行う必要がある。

3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

- 1) ルチン(抽出物)はアズキ、エンジュ及びソバの 3 種の基原としているが、これらを区別可能であるか定かではなく、情報に乏しい。そこで本研究では、エンジュのつぼみ(カイカ) 50%エタノール抽出物の HPLC 成分プロファイリングを行い、特徴付ける成分を精査した。その結果、主検出成分はルチンであり、その他の化合物はマイナー成分であり、これらのうち、**13~15** は天然に稀少な化合物であるため、特徴成分としてこれらを検出することで、その基原がエンジュ由来であることを示す指標となり得る可能性が考察された。
- 2) レイシ抽出物の化学的検討として、HPLC 及び TLC による予備的分析を行った。逆相 HPLC 分析の結果、UV 検出による主要なピークは認められなかった。一方、TLC 分析の結果、酢酸エチル/メタノール/水系溶媒で展開し、UV 照射による検出で、 $R_f = 0.6$ 付近に明瞭な数個のスポットが確認された。今後、このスポットについて分離精製を行い、化合

物の同定を試み、判定基準となるかどうか検討する予定である。

4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

- 1) 既存添加物ゴマ油不けん化物中のゴマリグナン類（セサモール、セサミン、エピセサミン及びセサモリン）は RMS によるシングルリファレンス HPLC 定量法により安価かつ簡便に定量することができることが確認された。
- 2) 既存添加物ベニコウジ黄色素中の主色素成分キサントモナシン A 及びキサントモナシン B の定量法として RMS によるシングルリファレンス HPLC 定量法が有効であることがわかった。

5. qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

- 1) 既存添加物ベニバナ赤色素中の carthamin の定量では、 ^1H -qNMR 法で値付けされた標準の carthamin の溶液を用いて HPLC の検量線を作成、微量の含有率の carthamin を HPLC にて正確に定量する方法を確立した。 ^1H -qNMR 法による carthamin の定量は、認証標準物質の 1,4-BTMSB- d_4 を内部標準として用い、pyridine- d_5 溶液と carthamin の溶液を混合して ^1H -qNMR を測定し、carthamin の 16 位 H のシグナル（ δ 9.15 ppm）を積分値から算出する方法を有効に活用した。また、 ^1H -qNMR 法で値付けされた試料をもとに carthamin の各種溶媒での吸光係数の検証をすることができた。

スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の ^1H -qNMR 法を用いた定量では、anisaldehyde の ^1H -qNMR 法

を用いた定量条件を確立した。しかしながら、入手した既存添加物試料では含有率が低く、 ^1H -qNMR 法を用いた定量が適用できる下限付近であることがわかった。揮発性の成分でもあることからあまり工程数を増やすことができないが、測定溶液濃度を高める工夫の余地があると考えられた。

6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

- 1) 既存添加物ラカンカ抽出物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、 ^1H -qNMR による定量及び ^1H -qNMR と LC を組み合わせた RMS を用いた定量法について検討を行った。 ^1H -qNMR では、得られた 3 種のラカンカ抽出物中のモグロシド V の含量値は、LC の含量値と比較して 6~13%程度高い結果を示した。これは、定量に用いた 6 位の水素に由来するシグナルがモグロシド V の類縁物質に由来するシグナルと十分な分離が果たせていないことに起因すると考えられた。他のモグロシド V 由来のシグナルについても、分子内の他のシグナルや夾雑成分に由来するシグナルとの重なりが観察されたことから、前処理を伴わない本法によるモグロシド V の定量は困難であり、前処理等の更なる検討が必要と考えられた。一方、RMS を用いた方法では、カフェインを定量用標品として、カフェインに対するモグロシド V の RMS (0.122) より算出されたモグロシド V の含量は、従来法（モグロシド V を定量用標品として用いた方法）より得られた含量と有意な差は認められなかった。したがって、今回求められた RMS を用いることにより、ラカンカ抽出物中のモグロシド V の

含量を正確かつ安価に定量できることが判明した。

7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

- 1) 従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難な添加物について、指標成分と同一の若しくは代替物質の定性用又は定量用標準品の全合成ルートを確立することで新たな分析法の開発を行い、簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化することを目的とした。本年度は、クロセチン、カプサイシン、カピリンの簡便な合成ルート確立を行った。今後は、他のカロテノイド類（クロシン、ビキシン、カプサイシン、アスタキサンチン）の合成を行う予定である。さらに、指標成分の部分骨格を持つ代替化合物の合成を通じ、定性用又は定量用標準品としての分析法の開発を行う予定である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N: Kinetic Study of the Equilibration between Carminic Acid and Its Two Isomers Isolated from Cochineal Dye. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*, 306-310.
- 2) 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. *日食化誌*, **2017**; *24*, 10-15.

- 3) Yoshimura M, Ochi K, Sekiya H, Tamai E, Maki J, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Amakura Y: Identification of Characteristic Phenolic Constituents in Mousouchiku Extract Used as Food Additives. *Chem Pharm Bull.*, **2017**; *65*, 878-882.
- 4) Tanaka R, Inagaki R, Sugimoto N, Akiyama H, Nagatsu A: Application of a quantitative ^1H -NMR (^1H -qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in *Plantaginis semen*. *Journal of Natural Medicines* **2017**; *71*, 315-320.
- 5) Fukaya S, Yoshioka H, Nagatsu A, Nonogaki T, Okano T, Onosaka S, Miura N: Non-toxic Level of Acetaminophen Potentiates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**; *40*(9), 1590-1594.
- 6) Ito Y, Harikai N, Ishizuki K, Shinomiya K, Sugimoto N, Akiyama H: Spiroketalcarminic Acid, a Novel Minor Anthraquinone Pigment in Cochineal Extract Used in Food Additives. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*, 883-887.
- 7) Kitamaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata M, Ihara T: Determination of PAHs in Solution with a Single Reference Standard by a Combination of ^1H Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography. *Anal. Chem.*, **2017**; *89* (13), 6963-6968.
- 8) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMR 及び HPLC による機能性表示食品中の機能性関与成分ルテインの定量. *日食化誌*, **2017**; *24*(2), 75-81.

- 9) 西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドゥ, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量 NMR に基づく相対モル感度を利用した加工食品中のヘスペリジン及びモノグルコシルヘスペリジンの定量. 食衛誌, **2018**; 59(1), 1-10.
- 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 Glycyrrhiza uralensis root extracts produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems. J. Nat. Med., **2017**; 71, 265-271.
- 11) Tatebe C, Ohtsuki T, Fujita T, Nishiyama K, Itoh S, Sugimoto N, Kubota H, Tada A, Sato K, Akiyama H: Determination of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in the Color Additive Food Red No. 106 (Sulforhodamine B) using High-Performance Liquid Chromatography. Food Chem. **2017**; 237: 733-742.
- 12) Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K: Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. Sci. Rep. **2017**; 7: 15876.
- 島光一, 大槻崇, 穂山浩, 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: 青色素の推定構造. 食品化学学会(2017.6).
- 2) 杉本直樹, 西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 村島健司, 北牧祐子, 沼田雅彦, 井原俊英, 佐藤恭子: カワラヨモギ抽出物の成分規格試験法の検討: 抗菌成分カピリンの定量法. 食品化学学会(2017.6).
- 3) 大槻崇, 鈴木一平, 建部千絵, 久保田浩樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: ¹H-qNMR を用いた食品中のサッカリンナトリウムの分析法の確立. 食品化学学会(2017.6).
- 4) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMR 及び HPLC による機能性関与成分ルテインの定量. 食品化学学会(2017.6).
- 5) 高橋未来, 西崎雄三, 多田敦子, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 穂山浩, 佐藤恭子, 井之上浩一: 相対モル感度係数を利用したベニコウジ黄色素中のキサントモナシン類の定量法の確立. 食品化学学会(2017.6).
- 6) 障子詩織, 高橋未来, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 穂山浩, 佐藤恭子, 井之上浩一: ベニコウジ色素の成分規格を目指した高速向流クロマトグラフィーによる解析法の検討. 食品化学学会(2017.6).
- 7) 箕川剛, 中島光一, 武川泰哲, 西崎雄三, 杉本直樹: オービトラップ LC/MS の AIF 測定による既存添加物スピルリナ青色素中の総ミクロシスチン定量法の検討. 食品化学学会(2017.6).
- 8) Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K: Development

2. 学会発表

- 1) 石附京子, 西崎雄三, 多田敦子, 箕川剛, 中

- of a HPLC/PDA method for quantitative analysis of food components without the need for analytical standards. 254th ACS National Meeting & Exposition. (2017.8).
- 9) 北牧祐子, 斎藤直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英: ガスクロマトグラフィーの新たな展開 -定量 NMR から求めたモル比を用いる一対多型の定量法の紹介-. 日本分析化学会シンポジウム(2017.9).
 - 10) 杉本直樹: 定量 NMR の公的な分析法への適用とその応用, NMR による新しい定量技術~その基礎と食品, 化学品分析への応用, 第 64 回日本食品科学工学会シンポジウム B3 (2017.8).
 - 11) 杉本直樹: qNMR/Chromatography の開発と規格試験への応用. 日本分析化学会第 66 年会シンポジウム 2 (2017.9).
 - 12) Kuroe M, Yamazaki T, Saito N, Numata M, Ihara T, Nishizaki Y, Sugimoto N: Determination of a non-ionic surfactant without its own calibration standard by qNMR/chromatography. Asian Conference on Oleo Science 2017 (ACOS2017), (2017.9).
 - 13) Sugimoto N, Nishizaki Y, Ishizuki K, Suematsu T, Miura T, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sato K: Determination of relative molar sensitivity (RMS) by combination of qNMR and chromatography: Application of RMS for quantification of lycopene in tomato colorant. 131st AOAC Annual Meeting (2017.9).
 - 14) 深谷栞, 吉岡弘毅, 市丸嘉, 三浦伸彦, 永津明人, 野々垣常正: アセトアミノフェンと四塩化炭素の併用による複合毒性の影響. フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2017.9).
 - 15) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: HSCCC/qNMR-HPLC による相対モル感度係数を利用した天然色素中キサントモナシンの定量法の開発. 第 28 回クロマトグラフィー科学会議(2017.11).
 - 16) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Development of quantitative analysis of main components in natural products by liquid chromatography with molar absorption coefficient ratio and high-speed countercurrent chromatography. PITTCON Conference & Expo (2018.2).
 - 17) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤直子, 石附京子, 中島馨, 佐藤恭子, 井之上浩一: 既存添加物の規格設定を目指したシングルリファレンス HPLC 定量法の開発. 日本食品衛生学会近畿地区勉強会(2018.3).
 - 18) Sugimoto, N: qNMR in Japan's Specification and standards for food additives. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
 - 19) Sugimoto, N: Overview of the Introductory Meeting on qNMR. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
 - 20) 森美保菜, 寺倉理央奈, 間瀬貴巳, 藤原裕未, 永津 明人, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量 NMR(^1H -qNMR)を応用した生薬コウカ中の carthamin の定量. 日本薬学会第 138 回年会(2018.3).
 - 21) 合田幸広, 小出達夫, 細江潤子, 内山奈穂子, 杉本直樹, 近藤加奈子, 村林美香, 藤谷敏彦, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 岡本寿美子, 大藤克也, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 小幡泰

子, 山田裕子, 鈴木裕樹, 三浦亨, 水井浩司, 末松孝子, 朝倉克夫: 日本薬局方化学薬品を対象とした qNMR とマスバランス法の比較と qNMR の経済的利点. 日本薬学会第 138 回年会(2018.3).

- 22) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: シングルリファレンス定量分析: 相対モル感度に基づく新たな HPLC 定量法の開発とゴマリグナンへの応用. 日本薬学会第 138 回年会(2018.3).
- 23) 杉本直樹: 天然由来の食品添加物の利用と規制. 一般シンポジウム S26 食品にかかわる天然成分の安全性とその活用. 日本薬学会第 138 回年会(2018.3).
- 24) 藤原裕未, 三輪真子, 本間篤, 永津明人: カエデ属植物に含まれるアントシアニン化合物とその機能性. 日本薬学会第 138 年会(2018.3).
- 25) 神谷万里子, 木村匡男, 森健, 山岸由佳, 三鴨廣繁, 永津明人, 野々垣常正, 池田義明: Tradescantia 属植物抽出液による pseudomonas aeruginosa 標準株の増殖とバイオフィルム形成に及ぼす影響. 日本薬学会第 138 年会(2018.3)

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし