

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成 30 年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法に関する研究

～既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)～

業務受託者 上田要一 一般社団法人日本食品添加物協会 専務理事

研究要旨 既存添加物 365 品目の成分規格については、第 9 版食品添加物公定書に 89 品目が記載されたが、なお、約 150 品目（約 160 規格）が未設定の状況で残る。

当協会は、これまでも既存添加物の食品添加物公定書への新規記載を目標に、自主規格の策定を進めてきた。

昨年度に引き続き平成 30 年度は、第 9 版食品添加物公定書の公表を機に、既存添加物等の自主規格案の策定・蓄積結果の集大成及び既記載規格の見直しを実施し、「第 5 版既存添加物自主規格」の刊行を目指し、自主規格案の策定検討及び見直し検討を行った。

国の成分規格が設定されていない既存添加物については、

- ・業界自主規格がない、またはあっても質が不十分
- ・添加物としての有効性と有効成分自体が不明確
- ・食品添加物としての流通実態が不明確
- ・正しい基原の原材料が使用されていることの確認が不十分

といった品目が多いことが指摘されている。これまでは、国が業界自主規格を技術的に検証した上で国の成分規格として整備してきた。上述の約 150 品目については規格設定が困難な品目が残ったと言えるが、今後も着実な成分規格の作成が必要である。

本年度は、既存添加物の成分規格作成に参考となる国内および海外の規格情報について調査を行うとともに、既存添加物に特有の基原製法本質及びこれに関連する酵素の基原微生物の確認等についても継続的に調査を行っている内容をまとめた。

研究協力者

樋口彰 (一社)日本食品添加物協会
常務理事

林 清 東洋大学
食環境科学部食環境科学科
教授

卯津羅健作 (一社)日本食品添加物協会
第 7(酵素)部会長

A. 研究方法

(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記載品目について、本年度作成する検証用規格およ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) 第 10 版記載既存添加物候補品目定義及び製法・本質の基原生物の調査

第 10 版記載既存添加物候補品目の基原・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の調査を継続実施した。過去 4 年間のまとめを、その理由・根拠を含め一覧表にした。

(3) 酵素品目に関する調査

食品添加物として用いられる酵素品目について、基原種の同定、分類、考え方について調査を継続的に行っている。昨年度は、添加物酵素の基原種の同定、分類について説明した。本年度については、酵素基原生物の分類学および同定技術の進歩により生じた呼称変更への対応及び学術情報に沿った確認等の実施について調査した。

B. 研究結果

(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次の事項について調査を行い、部会別および品目順に Table 1 にまとめた。

- ①自主規格（案）及び第10版食品添加物公定書成分規格案の作成状況
- ②試験法に関する第3者及び自社検証実施状況
- ③国内外規格の有無
- ④安全性評価の実施状況

(2) 第10版収載既存添加物候補品目定義及び製法・本質の基原生物の調査

過去4年間のまとめを、その理由・根拠を含め Table 2 に示した。

(3) 添加物酵素の基原種の同定、分類の考え方について

酵素は生体触媒であるゆえ多種多様な生物種に存在しており、また、その多様性ゆえ、様々な分野において事業化され、活用されている。特に、その安全性の高さより食品添加物酵素にも多く利用されている。

ここで、酵素を事業として食品添加物として使用する場合、特にその基原は、食品添加物公定書の D. 成分規格・保存基準各条にある各々の酵素の定義に記載されたものでなければならない。

しかし、生物においては、分類学、および同定の技術・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。また、このことは、予め想定できるものでもない。

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、対応策を検討しておく必要がある。もっとも、食品添加物として使用される酵素の安全性の確保においては、当該酵素の基原の病原性、および毒素産生性の有無がその判断材料となるが、当該基原の呼称変更においては分類学上の改正であり、当該基原生物自体が他の基原生物に変わるわけではないので、その安全性が変わるものではない。

このような背景から、分類学上の改正、または

同定技術の進歩により、当該基原の呼称変更が生じた場合であっても、それらの科学的な背景、および当該基原生物自体が他の基原生物に変わっていないことが確認できれば、その安全性に問題が生じることもないので、新呼称への読替えを行い、食品添加物公定書の規格上何ら問題なく添加物酵素製造の使用できるとする措置が妥当であると考えられる。なお、新呼称の基原についての食品添加物公定書への収載は、公定書改正の際の検討課題とすることでよいと考えられる。

これらのことの詳細については、平成29年度「既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究」—既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—において「添加物酵素の基原種の同定、分類について」の中で、説明した。

それに続いて、本稿では、酵素基原生物の分類学および同定技術の進歩により生じた呼称変更を正当に行うための方策について述べる。基原の呼称変更は原則として下記の学術情報等に基づく確認により行うことが妥当と考えられる。

- 1) 分類学の成書等（例：Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Index Fungorum, MycoBank など）の呼称変更情報。
 - 2) 査読のある分類学分野の学術誌での呼称変更情報。
 - 3) 公的な菌株の保存機関（例：American Type Culture Collection など）の菌株情報にある呼称変更情報。
 - 4) 海外の主要国（注）の食品用酵素のポジティブリスト等における基原生物の属種に関する情報。
- （注）米国 GRAS, カナダ, オーストラリア・ニュージーランド, フランスなど
- 5) その他、科学的に妥当と判断できる公的情報。

ただし、「下述のような事由により、直接、学術情報に沿った呼称変更の確認ができない場合は、従前からの製造記録等の客観的情報等に基づき、生産菌株の変更がないことを示し、最新の同定技術による最新の学名を正当な基原名とすることもできる。」とする運用が妥当

と考えられる。

- ・同定された時期が古く明確な呼称変更の確認ができない場合。
- ・他の機関・事業者からの譲渡等の菌株で確固とした同定記録がない場合。

また、動植物由来の酵素の場合、その基原となる生物種の分類、学術名の呼称変更などについては、学術情報（分類学の成書、査読のある学術誌など）に従い学名の確認・変更を行うことが妥当と考えられる。なお、上述の学術情報に沿った確認を行う際の当該基原生物の属種に関する科学的根拠を示すための手法につき、以下に記述する。

・微生物について

細胞の形態観察、生理・生化学的試験に加え、最新の分類同定技術（たとえば下記の解析）により同定を行う。なお、分類同定技術の進歩により適宜、同定法を最新のものに更新する。

（同定の指標となる遺伝子の配列解析）

細菌類：16S rDNA 解析など

糸状菌：ITS rDNA 解析，28S rDNA-D1/D2 解析， β -tubulin 遺伝子解析，calmodulin 遺伝子解析，TEF-1 α (transcribed elongation factor 1- α) 遺伝子解析など

酵母：ITS rDNA 解析，26S rDNA-D1/D2 解析など

（当該遺伝子配列を用いた相同性検索）

上記の解析で得られた DNA 塩基配列を国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA (EMBL) /GenBank) に対して相同性検索を行い、同定を行う。

（上記外の手法による解析）

細菌類，糸状菌，酵母につき、必要に応じ、MALDI-TOF MS 法(※)も並行して行う。

(※)タンパク質マスマスペクトルパターンをデータベースと照合することで同定を行う手法。第17改正日本薬局方参考情報：ペプチドマップ法，p.2404~2407。

また、当該微生物の同定において、必要に応じ

て、他の適切な最新技術も適用する。

（学名について）

学名については、以下の情報源で用いられているものによることとする。なお、他の出典元とする場合はその根拠を示すこととする。

NCBI ① <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>，② <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

・動植物について

当該分野の学術情報（分類学の成書、査読のある分類学分野の学術誌など）により、当該基原の分類を確認し、適切な基原名への呼称変更等を行うことが妥当と考えられる。なお、学術名については、第9版食品添加物公定書の規格策定の際によりどころとされた下記の webpage (情報源) で用いられているものによることとする。なお、他の出典元とする場合はその根拠を示すこととする。

Tropics <http://www.tropics.org>

和名：YList <http://ylist.info/index.html>

C. 考察

本年度は、今後、新たに成分規格を作成すべき品目を対象に調査を行った。今後も必要な情報を得るために更なる工夫が必要であるとともに、流通実態の有無についても見極め、規格作成の優先順位を明確にする必要がある。また、既に公定書に記載されている品目についても、必要に応じ見直しを行い、既存添加物全体の現状を把握していくことが必要と考えられる。

D. 謝辞

本年度の調査研究に際しては、国立医薬品食品衛生研究所食品部の佐藤部長をはじめとする諸先生方には多大なるご指導をいただいた。この場をお借りし心より感謝申し上げる次第である。

Table 1. 成分規格の整備状況等の調査結果まとめ

部会	用途分類	既添番号	規格名称	第10版関連						安全性資料				国内外規格			備考	
				第10版案作成	第5版案作成	第4版自主規格	第3版検査証	社検証	衛生管理者問題	安全性評価	90日反復投与	遺伝毒性試験	他の安全性試験	J E C C F A 規格	E U 規格	日本薬局方		外原規
01	甘味料	170	ステビア系															
01	甘味料	270	ブラジルカンゾウ抽出物															
02	着色料	024	アルミニウム															
02	着色料	047	オレンジ色素															
02	着色料	051	カキ色素															
02	着色料	087	魚鱗糖															
02	着色料・製造用剤	089	金															
02	着色料・製造用剤	090	銀															
02	着色料	114	クローロフィルン															
02	着色料	116	クローロフィルン															
02	着色料	135	骨炭色素															
02	着色料	149	シアナト色素															
02	着色料	159	シタン色素															
02	着色料	165	植物炭素色素															
02	着色料	256	フアラシア色素															
02	着色料	282	ペカンナツツ色素															
02	着色料	324	ムラサキヤマイモ色素															
02	着色料	362	ロウウチド色素															
03	保存料	074	カワラナモミ抽出物															
03	製造用剤/日特	113	グレープフルーツ種子抽出物															
03	製造用剤/日特	162	ショウガ抽出物															
03	製造用剤/日特	175	セイヨウウサビ抽出物															
03	製造用剤/日特	216	トウガラシ水性抽出物															
03	製造用剤/日特	266	フトウ果皮抽出物															
03	製造用剤/日特	329	モウソウチク乾留物															
03	製造用剤/日特	330	モウソウチク抽出物															
04	増粘安定剤	001	アウレオパシジウム糖蜜液(液体品)															
04	増粘安定剤	001	アウレオパシジウム糖蜜液(粉末品)															
04	増粘安定剤	004	アグロバクテリウムスクシノグリカン															
04	増粘安定剤	013	アマシードガム															
04	増粘安定剤	019	アラビガラクタン															
04	増粘安定剤/ガムベア	040	エレミ樹脂															
04	増粘安定剤	053	カンアガム															
04	増粘安定剤	061	ユーカラ藻菜															
04	増粘安定剤	082	キチン															
04	増粘安定剤・製造用剤	084	キトサン															

部会	用途分類	既添番号	規格名称	第10版関連					安全性資料					国内外規格					備考	
				第10版業作成	第5版業作成	第4版自検	第3版自検	第10版社検	衛生管理問題	安全性評価	90日反復投与	遺伝毒性試験	他の安全性試験	JECFA規格	FCC規格	EU規格	日本薬高方	外原規		薬規
04	増粘安定剤	092	グアーガム酵素分解物	○	○	○	○	○	○8(特保関連)	○8(復帰)	○特定制健康用食品として許可							特保原料規格		
04	増粘安定剤	104	グルコサミン	○	○	○	○	○	○8(単糖関連)											
04	増粘安定剤・製薬用剤	145	サハクソモキシンドガム	○	○	○	○	○	○15	○15(小核試験)										
04	増粘安定剤	229	トロロアオイ	○	○	○	○	○	○19	○19(小核試験)										
04	増粘安定剤	257	ブアーセラン	○	○	○	○	○	○8											
04	増粘安定剤	336	モモ樹膠	○	○	○	○	○	○21	○21(小核試験)										
04	増粘安定剤	359	レバソ	○	○	○	○	○	○11	○11(小核試験)										
05	酸化防止剤	091	カチキン	○	○	○	○	○	○20	○20(小核試験)										
05	酸化防止剤/日時	076	カンゾウ油性抽出物	○	○	○	○	○	○11	○11(小核試験)										
05	酸化防止剤	093	グアヤク脂	○	○	○	○	○	○8(JECFA)											Guayule Resinと同義 JPB記載
05	酸化防止剤	095	クエルセチン	○	○	○	○	○	○(8)											
05	酸化防止剤/日時	115	コロソブ抽出物	○	○	○	○	○	○8											
05	酸化防止剤	129	酵素分解リンゴ抽出物						○8(基原等)											外原規リンゴタンニン
05	酸化防止剤	138	ゴア油不けん化物						○21	○21(小核試験)										
05	酸化防止剤	141	コマタ酵素分解物						○18	○18(小核試験)										外原規コマタ酵素エキス
05	酸化防止剤	174	精油除去ウイキョウ抽出物						○15	○15(小核試験)										外原規ウイキョウエキス
05	酸化防止剤	178	セージ抽出物						○8											外原規セージエキス
05	酸化防止剤	196	単糖・アミノ酸複合物	○	○	○	○	○	○8(基原等)											
05	酸化防止剤	202	チヤ抽出物	○	○	○	○	○	○8											
05	酸化防止剤	232	生コーヒー豆抽出物	○	○	○	○	○	○8											
05	酸化防止剤	255	ヒマワリ種子抽出物	○	○	○	○	○	○H8											
05	酸化防止剤	276	プロポリス抽出物	○	○	○	○	○	○23											
05	酸化防止剤	287	ヘゴ・イチヨウ抽出物						?											
05	酸化防止剤	306	波食子酸	○	○	○	○	○	○20	○20(小核試験)										
05	酸化防止剤	328	メロイカ精油						○8(基原等)											
05	酸化防止剤	355	ルチン(抽出物)(アズキ全草抽出物)						○8	○8(小核試験)										
05	酸化防止剤	355	ルチン(抽出物)(ソバ全草抽出物)						○8	○8(小核試験)										
05	酸化防止剤	365	ローズマリー抽出物	○	○	○	○	○	○8											
06	カラム光沢	036	ケルシロウ	○	○	○	○	○	○18	○18(小核試験)										
06	カラムス	042	オノクライト	○	○	○	○	○	?											
06	カラムス	094	グアヤク樹膠	○	○	○	○	○	○8(JECFA)											
06	カラムス	099	グアヤクタン	○	○	○	○	○	○8											

部会	用途分類	原添番号	規格名称	第10版案作成	第5版案作成	第4版自主規格	第3版検査証試験年度	食衛生管理問題	安全性評価	90日反復投与	遺伝毒性試験	他の安全性試験	国内外規格	備考
06	甘味料	100	グッタベルカ	○	○	○			○8			○8(グッタベルカに類似)		
06	甘味料	138	ゴム	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	139	ゴム分解糖	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	142	ゴムカワ	○	○	○	28		○8			○8(米国)		
06	甘味料	144	サトウキビロウ	○	○	○			○8(ミソロウ関連)			○8(ミソロウに類似)		
06	甘味料	152	シエラックロウ	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	154	ジェルミン	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	185	ソルバ	除	暫				○8			○8(米国)		
06	甘味料	186	ソルペンハ	除	暫				○8			○8(米国)		
06	甘味料	199	チクル	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	203	チルテ	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	205	ツヌー	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	208	低分子ゴム	除	暫				○8			○8(米国)		
06	甘味料	235	ニガエグツタ						○8			○8(米国)		
06	甘味料	281	粉末モミガラ						○8(基原等)			○8(微結晶セルロース粉末セルロースに類似)		
06	甘味料	285	ベネズエラチクル	○	○	○			○18	○18	○18(小核試験)	○8(米国)		
06	甘味料	307	ホホバロウ	○	○	○			○15◎26	○25	○25(小核試験)	○25(慢性毒性・発がん性併合試験)		
06	甘味料	312	マスチック	暫	○				○8			○8(米国)		
06	甘味料	313	マッサランドハチヨコレート	除	暫				○8			○8(米国)		
06	甘味料	314	マッサランドハチラタ	暫					?			○8(米国)		
06	甘味料	321	ミルラ	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	333	モクロウ	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	358	レッヂェデハバ	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	363	ロシチンハ	○	○	○			○8			○8(米国)		
06	甘味料	364	ロシチン	○	○	○			○15	○15	○15(小核試験)	○8(糖素)		
07	糖素	028	イソマルトトキストラナーゼ	○	○	○			○8(糖素)			○8(糖素)		
08	酸味料	029	イタコン酸	消	○	○			○11	○11	○11(小核試験)	○8(米国)		
09	苦味料	027	イノアルファア-苦味酸	○	○	○	29		○11			○8(アルカリ金属等)		
09	苦味料	041	塩水湖水低塩化ナトリウム液	○	○	○	29		○8(アルカリ金属等)			○8(アルカリ金属等)		
09	苦味料	085	キナ抽出物						○8(基原等)			○8(医薬品であるキニーネ等よりなる)		
09	苦味料	086	キハダ抽出物						○8(基原等)			○8(医薬品であるペルベリン等よりなる)		
09	苦味料	120	ゲンチアナ抽出物	○	○	○	29		○8(基原等)			○8(ゲンチアナとして日局収載)		
09	苦味料	124	糖素処理ナリジン	○	○	○			○8(基原等)			○8(ナリジンに類似)		
09	苦味料	161	ジャマイカカウツア抽出物	○	○	○	28		○20	○20	○20(小核試験)	△20(中期肝発がん性) ○20(1年間反復投与)		
09	苦味料	182	粗製水塩化カリウム	○	○	○			○8(基原等)			○8(塩化カリウムを主成分とする)		
09	苦味料	209	テオブロミン	○	○	○			○8(基原等)			○8(カフェインに類似)		
09	苦味料	236	ニガヨモギ抽出物	○	○	○			○15	○15	○15(小核試験)	○8(カフエインに類似)		
09	苦味料	357	レイシ抽出物	○	○	○			○18	○18	○18(小核試験)	○8(カフエインに類似)		

部会	用途分類	既添番号	規格名称	第10版関連				安全性資料				国内外規格				備考	
				第10版案作成	第5版案作成	第4版自主規格	第3社者検証試験	衛生管理者問題	安全性評価	90日反復投与	遺伝毒性試験	他の安全性試験	J E C F A 規格	J E C F A 規格	日 本 薬 局 方		外 原 規 規
13	製造用剤	202	チャ乾留物	○	○			◎B				○	○				
13	製造用剤/強化剤	212	豚				●	◎B									
13	製造用剤	214	豚				●	◎B(基原等)									
13	製造用剤	227	ト/ハロース	○	○	○		◎B(基原等)・JEGFA									
13	製造用剤	231	ナフサ					◎B									
13	製造用剤	237	ニツアル	○	○			◎B									
13	製造用剤	239	ばい煎コマカ抽出物	○				◎20		○20							
13	製造用剤	240	ばい煎メイズ抽出物	○				◎21		△21							
13	製造用剤	242	白登					◎B(基原等)									
13	製造用剤	246	ハラシウム	○				◎B(基原等)									
13	製造用剤	249	ヒアルロン酸	○	○	○		◎B									
13	製造用剤	256	ひる石					◎B(基原等)									
13	製造用剤	262	フィチン(抽出物)	○	○			◎B									
13	強化剤	263	フェリチン		消	○		◎B									
13	製造用剤	266	ブタン				●	◎B									
13	製造用剤	275	プロパン	○			●	◎B									
13	製造用剤	297	ヘプタン	○	○	○	●	◎B									
13	製造用剤	302	ヘリウム	○				◎B									
13	製造用剤/強化剤	318	貝殻未焼成カルシウム	○				◎B									
13	製造用剤/強化剤	318	骨未焼成カルシウム					◎B									
13	製造用剤/強化剤	318	真珠層未焼成カルシウム	○				◎B									
13	製造用剤/強化剤	318	卵殻未焼成カルシウム	○				◎B									
13	製造用剤	327	メタロン酸			○		◎16		○16							
13	製造用剤	331	木材チップ				●	◎B(基原等)									
13	製造用剤	332	木炭				●	◎B(基原等)									
13	製造用剤	334	木灰					◎B(基原等)									
13	製造用剤	335	木灰抽出物				●	◎B(基原等)									
13	製造用剤	353	リンターセルローズ				●	◎B(基原等)									
13	着色料	飲食	ポイセンバリー色素														
13	着色料	飲食	ホワートルバリー色素														
13	製造用剤	356	ルチニウム	○				◎B(基原等)									
14	香料抽出物	122	香料抽出物(アニス)					◎B									
14	香料抽出物	122	香料抽出物(ウイキョウ)					◎B									
14	香料抽出物	122	香料抽出物(ワゴン)					◎B									
14	香料抽出物	122	香料抽出物(オレンジピール)					◎B									
14	香料抽出物	122	香料抽出物(ワヒミール)					◎B									
14	香料抽出物	122	香料抽出物(フランシ)					◎B									
14	香料抽出物	122	香料抽出物(カンゾウ)					◎B									
14	香料抽出物	122	香料抽出物(クチナン)					◎B									

部 会	用途分類	既添番号	規格名称	第10版関連				安全性資料				国内外規格				備 考		
				第10版案作成	第5版案作成	第4版主規格	第3版者検証	自社検証	食衛管理者問題	安全性評価	90日反復投与	遺伝毒性試験	他の安全性試験	J E C F A 規格	E U 規格		日本薬局方	外原規
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(クミン)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(クローブ)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(コマ)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(サフラン)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(サルビア)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(サンショウ)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(スベアミン)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(セイヨウウサビ)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(セロリ)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(タイム)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(タマネギ)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(トウガラシ)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(ニンジン)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(ニンニク)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(パセリ)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(パセリ)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(ペパーミント)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(ラベンダー)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物(ローズマリー)					◎8						◎				
14	香辛料抽出物	122	香辛料抽出物[全販]					◎8						◎				

Table 2. 基原・製法等改正要望まとめ(過去4年間)

既存添加物名称	既存添加物名簿定義	基原・製法・本質	第10版公定書定義案	改正理由等	備考
グルコサミン	—	キチン(エビ, カニ等甲殻類の甲殻又はイカの甲を, 室温時~温時酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去した後, 温時~熱時弱アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもので, <i>N</i> -アセチル- <i>D</i> -グルコサミンの多量体からなるものをいう。)を, 塩酸で加水分解し, 分離して得られたものである。成分はグルコサミンである。	本品は, キチン(エビ, カニ等甲殻類の甲殻若しくはイカの甲を, 酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去した後, アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもの若しくはアルカリ性水溶液でタンパク質を除去した後, 酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去したもの, 又は糸状菌 (<i>Aspergillus niger</i> に限る。)の培養液を, アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもので, <i>N</i> -アセチル- <i>D</i> -グルコサミンの多量体からなるものをいう。)を塩酸で加水分解し, 分離して得られたものである。	<ul style="list-style-type: none"> ・弱アルカリ性水溶液だけでなく, 強アルカリ性水溶液を使用している場合も多い。 ・酸性水溶液とアルカリ性水溶液の使用順番が逆のケースも多々ある。 ・糸状菌によるものは, エビ・カニ由来のアレルギー物質を含まず有用性が高い。 ・これらの製法によるものは, 国内において広く流通している。 ・糸状菌によるものは, 輸入時に検疫所で既存添加物に該当することを確認している。 	<p>含量本品を乾燥物換算したものは, <i>D</i>-グルコサミン塩酸塩($C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl=215.63$)として98%以上を含む。</p>
キチン	—	エビ, カニ等甲殻類の甲殻又はイカの甲を, 室温時~温時酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去した後, 温時~熱時弱アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもので, <i>N</i> -アセチル- <i>D</i> -グルコサミンの多量体からなる。	本品は, エビ, カニ等甲殻類の甲殻若しくはイカの甲を, 酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去した後, アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもの若しくはアルカリ性水溶液でタンパク質を除去した後, 酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去したもので, 又は糸状菌 (<i>Aspergillus niger</i> に限る。)の培養液を, アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもので, <i>N</i> -アセチル- <i>D</i> -グルコサミンの多量体からなるものである。	<ul style="list-style-type: none"> ・弱アルカリ性水溶液だけでなく, 強アルカリ性水溶液を使用している場合も多い。 ・酸性水溶液とアルカリ性水溶液の使用順番が逆のケースも多々ある。 ・糸状菌によるものは, エビ・カニ由来のアレルギー物質を含まず有用性が高い。 ・これらの製法によるものは, 国内において広く流通している。 ・グルコサミンの原料としてのキチンの定義と整合の必要がある。 	

<p>キトサン</p>	<p>—</p>	<p>キチン(エビ, カニ等甲殻類の甲殻又はイカの甲を, 室温時~温時酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去した後, 温時~熱時弱アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもので, <i>N</i>-アセチル-D-グルコサミンの多量体からなるものをいう。)を, 温時~熱時水酸化ナトリウム水溶液で脱アセチル化したもので, D-グルコサミンの多量体からなる。</p>	<p>本品は, キチン(エビ, カニ等甲殻類の甲殻)若しくはイカの甲を, 酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去した後, アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもの若しくはアルカリ性水溶液でタンパク質を除去した後, 酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去したもの, 又は糸状菌(<i>Aspergillus niger</i>に限る。)の培養液を, アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもので, <i>N</i>-アセチル-D-グルコサミンの多量体からなるものをいう。)を水酸化ナトリウム水溶液で脱アセチル化して得られたもので, D-グルコサミンの多量体からなるものである。 又は糸状菌(<i>Aspergillus niger</i>に限る)の培養液を水酸化ナトリウム水溶液でタンパク質除去及び脱アセチル化して得られたもので, D-グルコサミンの多量体からなるものである。</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・弱アルカリ性水溶液だけでなく, 強アルカリ性水溶液を使用している場合も多い。 ・酸性水溶液とアルカリ性水溶液の使用順番が逆のケースも多々ある。 ・糸状菌によるものは, エビ・カニ由来のアレルギー物質を含まず有用性が高い。 ・これらの製法によるものは, 国内において広く流通している。 ・グルコサミンの原料としてのキチンの定義と整合の必要がある。 ・糸状菌(<i>Aspergillus niger</i>に限る)の培養液から直接製造されたものも既存添加物として輸入され, 流通している。
<p>スフィンゴ脂質</p>	<p>米ぬかから得られた, スフィンゴシン誘導体を主成分とするものをいう。</p>	<p>イネ科イネ(<i>Oryza sativa</i> LINNE)の種子又は小麦(<i>Triticum aestivum</i> LINNE)の胚芽から得られた米ぬかより, 室温時~温時エタノール, 含水エタノール, イソプロピルアルコール, アセトン, ヘキササン又は酢酸エチルで抽出したものより得られたものである。主成分はスフィ</p>	<p>本品は, イネ(<i>Oryza sativa</i> L.)の種子又はイネ(<i>Oryza sativa</i> L.)の種子イネ(<i>Oryza sativa</i> L.), 小麦(<i>Triticum aestivum</i> L.), <u>ダイズ(<i>Glycine max</i> (L.) Merr.)又はトウモロコシ(<i>Zea mays</i> L.)の種子から得られたスフィンゴシン誘導体を主成分とするものである。</u> <u>デキストリンを含むことがある。</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> ・小麦フスマは, 米ぬかとは呼ばない。 ・胚芽由来のぬかの他に, 外皮, 外胚乳当由来のものも混入しており, 外原規の小麦フスマも『種子の外皮, 外胚乳, 胚芽等の粉末』とされている。米ぬかについても同様である。 ・ダイズの種子及びトウモロコシの

		ンゴシン誘導体である。		種子から得られたものも流通している。	
ファフィア色素	ファフィアの培養液から得られた、アスタキサンチンを主成分とするものをいう。	酵母(<i>Phaffia rhodozyma</i> MILLER)の培養液より、室温時アセトン、エタノール、含水エタノール、ヘキサン又はこれらの混合液で抽出し、溶媒を除去して得られたものである。主色素はアスタキサンチンである。橙色～赤色を呈する。	本品は、ファフィア(<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> Golubev)の培養液から得られたアスタキサンチンを主成分とするものである。食用油脂を含むことがある。	・ファフィア酵母の学名調査を行ったところ、学名としては『 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> Golubev』で登録されており、別名として『 <i>Phaffia rhodozyma</i> 』が登録されている。	
トウガラシ水性抽出物	トウガラシの果実から抽出して得られた、水溶性物質を主成分とするものをいう。	ナス科トウガラシ(<i>Capsicum annuum</i> LINNE)の果実より、室温時含水エタノールで抽出したもので、タンパク質、ペプチド、ビタミンCを含む。	本品は、トウガラシ(<i>Capsicum spp.</i>)の果実から抽出して得られた、水溶性物質を主成分とするものである。	・食品用途のトウガラシでは <i>C. annuum</i> L. 以外にも流通しており、交配種も多い。 ・米国薬局方では、 <i>C. annuum</i> L. に基原種を限定せず「fruit of various <i>Capsicum species</i> 」としている。	
トウガラシ色素	トウガラシの果実から得られた、カプサンチン類を主成分とするものをいう。	トウガラシ(<i>Capsicum annuum</i> Linné)の果実から得られた、カプサンチン類を主成分とするものである。食用油脂を含むことがある。	本品は、トウガラシ(<i>Capsicum spp.</i>)の果実から得られた、カプサンチン類を主成分とするものである。食用油脂を含むことがある。	・トウガラシ水性抽出物に合せて改正するのが適当である。	第9版食品添加物公定書の定義 本品は、トウガラシ(<i>Capsicum annuum</i> L.)の果実から得られた、カプサンチン類を主成分とするものである。食用油脂を含むことがある。
生コーヒー豆抽出物	コーヒーの種子から得られた、クロロ	アカネ科コーヒー(<i>Coffea arabica</i> LINNE)の種子より、	本品は、コーヒーノキ属(<i>Coffea spp.</i>)の種子から得られた、クロロゲ	・コーヒー豆はアラビカ種、ロブスター種、及びリベリカ種が流通し	

	ゲン酸及びポリフェノールを主成分とするものをいう。	温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである。	ン酸及びポリフェノールを主成分とするものである。	ている3原種であり、本品を製造する上でアラビカ種に限定することは製造上制約を受けることから、アラビカ種の他にロブスター種及びリベリカ種の追加の必要が極めて高い。(第9版食品添加物公定書・カフェイン(抽出物に合わせる))	
アグロバクテリウムスクシノグリカン	アグロバクテリウムの培養液から得られた、スクシノグリカンを主成分とするものをいう。	細菌(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)の培養液より、分離して得られた多糖類である。主成分はスクシノグリカンである。	本品は、細菌(<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>))に限る。)の培養液から得られた、スクシノグリカンを主成分とするものである。	・ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> の学名が変更になったため。	他の <i>Agrobacterium</i> 属細菌についても確認の必要がある。
ローズマリー抽出物	マンネンロウの葉又は花から得られた、カルノシン酸、カルノソール及びロスマノールを主成分とするものをいう。)	シソ科マンネンロウ(<i>Rosmarinus officinalis</i> LINNE)の葉又は花より、二酸化炭素、温時～熱時含水エタノール若しくはエタノールで抽出して得られたもの、又は温時～熱時ヘキサン、メタノール若しくは含水メタノールで抽出し、溶媒を除去して得られたものである。有効成分は、フェノール性ジテルペノイド(ロスマノール、カルノソール及びカルノシン酸等)である。	本品は、シソ科マンネンロウ(<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)の葉又は花から抽出して得られたもので、 <u>カルノシン酸及びカルノソールを主成分とするものとロスマリン酸を主成分とするものがあり、それぞれローズマリー抽出物(非水溶性)及びローズマリー抽出物(水溶性)と称する。</u> デキストリン又は乳糖を含むことがある。	・ローズマリー抽出物の主成分は、水溶性を示す製品と非水溶性を示す製品で異なり、水溶性を示す製品の主成分はロスマリン酸であるため。また、非水溶性を示す製品においては、ロスマノールを主成分としないものがあるため。	
チャ抽出物	チャの葉から得られた、カテキン類を主成分とするものをいう。	ツバキ科チャ(<i>Camellia sinensis</i> O.KZE.)の葉より製した茶より、室温時、温時又は熱時、水、酸性水溶液、含水エタノール、エタノール、含水メタノール	本品は、チャ(<i>Camellia sinensis</i> Kuntze)の葉より製した茶より得られた、カテキン類を主成分とするものである。本品には、原料の種類により、ウーロン茶抽出物、緑茶抽出	・紅茶抽出物については基原・製法・本質に基づく定義が規格化された場合、製造・流通できなくなるものと考えられる。茶については製法によりウーロン茶、緑茶及	既存添加物リストにおける別名は、ウーロンチャ抽出物及び緑茶抽出物とされ

		ル, メタノール, アセトン, 酢酸エチル又はグリセリン水溶液で抽出したものより得られたものである。成分としてカテキン類を含む。なお, チャの葉の処理方法によりウーロンチャ抽出物と呼ばれるものがある。	物及び紅茶抽出物がある。	び紅茶に分けられ, 紅茶より製造された紅茶抽出物については流通実態があり, 有用性も高い。また, 紅茶エキスとして外原規にも収載されている。	
没食子酸	—	ウルシ科ヌルデ (<i>Rhus javanica</i> LINNE) に発生する五倍子, ブナ科 (<i>Quercus infectoria</i> OIIV.) に発生する没食子より, 水, エタノール又は有機溶剤で抽出したタンニン, 又はマメ科タラ (<i>Caesalpinia spinosa</i> (MOLINA) KUNTZE) の実の夾より, 温時水で抽出したタンニンを, アルカリ又は酵素(タンナーゼ)により加水分解して得られたものである。成分は没食子酸である。	本品は, 五倍子, タラ末又は没食子から得られたタンニンを, アルカリ又は酵素(タンナーゼ)により加水分解して得られた没食子酸を成分とするものである。	ヌルデ及びタラについては栽培種の問題があり, ブナ科については種の特が困難であることから植物タンニンの成分規格の定義に合わせて設定するのが適当である。	
ヒアルロン酸	—	鶏冠より, 微温時～温時水, アルカリ性水溶液若しくは酸性水溶液で抽出し, エタノール若しくは含水エタノールで処理, 若しくは酵素処理した後エタノール若しくは含水エタノールで処理し, 精製して得られたもの, 又は細菌 (<i>Streptococcus zooepidemicus</i>) の培養液を, 冷時～温時, 除菌し, エタノール若しくは含水エタノールで処理し,	本品は, 鶏冠より, 水, アルカリ性水溶液若しくは酸性水溶液で抽出し, 除菌若しくは殺菌し, 精製し, 若しくは酵素処理した後精製して得られたヒアルロン酸を成分とするもの, 又は細菌 (<i>Streptococcus zooepidemicus</i> 又は <i>Streptococcus equi</i> に限る.) の培養液を, 除菌若しくは殺菌し, 精製して得られたヒアルロン酸を成分とするものである。本品には, 鶏冠より, 水, アルカリ性	基原微生物 <i>Streptococcus equi</i> については, 医薬部外品原料規格にも収載されており, 溶血性を持たないことから追加するのが適当である。	

		精製して得られたものである。成分はヒアルロン酸である。	水溶液若しくは酸性水溶液で抽出し、除菌若しくは殺菌し、精製し、若しくは酵素処理した後精製して得られたヒアルロン酸(鶏)と細菌(<i>Streptococcus zooepidemicus</i> 又は <i>Streptococcus equi</i> に限る。)の培養液を、除菌若しくは殺菌し、精製して得られたヒアルロン酸(発酵)がある		
ゲンチアナ抽出物	ゲンチアナの根又は根茎から得られたアマロゲンチン及びゲンチオピクロシドを主成分とするものをいう。	リンドウ科ゲンチアナ(<i>Gentiana lutea</i> LINNE)の根又は根茎より、水又はエタノールで抽出して得られたものである。有効成分はゲンチオピクロシド(ゲンチオピクリン)及びアマロゲンチンである。	<p>定義 本品は、ゲンチアナ(<i>Gentiana lutea</i> L.)の根又は根茎から得られたアマロゲンチン及びゲンチオピクロシドを主成分とするものである。</p> <p>確認試験 (2) 本品 0.5g にメタノール 10mL を加え、5分間振り混ぜて、ろ過し、ろ液を検液とする。別にアマロゲンチン及びゲンチオピクロシドをそれぞれ11mg ずつ量り、メタノール1mL を加えて溶かした液を対照液とする。検液及び対照液 10μ L につき、酢酸エチル/エタノール(99.5)/水混液(88:22:11)を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行い、展開溶媒の先端が原線から 10cm の高さ上昇したとき展開を止め、風乾した後、紫外線(主波長 254nm)下で観察するとき、検液は、対照液のアマロゲンチン又はゲンチオピクロシドのいずれかと同位置に主スポットを認める。ただし、薄層板は、薄層クロマトグ</p>	かなりの数の流通品について、分析した結果、全て片方の成分しか検出されない。	定義は名簿とおとりし、確認試験で対応する。

			ラフィー用シリカゲル(蛍光剤入り)を担体とし、110℃で1時間乾燥したものを使用する。		
--	--	--	---	--	--

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法に関する研究

～¹³C-qNMRに関する基礎的検討～

研究分担者 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 我々は、既存添加物の有効成分または指標成分の定量用標品の供給の問題を解消するため、分析対象物質の標準物質を必要としない定量分析の手法として¹H quantitative NMR(¹H-qNMR)を開発してきた。その結果、¹H-qNMR はSIトレーサブルな標準物質供給の手法の一つとして認知されたが、本手法は合成添加物、農薬、医薬品に応用されるに留まり、天然由来の食品添加物の定量用標品の供給には未だ応用されていない。その理由として、食品添加物の定量用標品の需要が低いことがあげられる。そこで、直接定量法として¹³C核を用いたqNMRの手法を検討することにした。本研究では、¹³C-qNMR測定条件の最適化のため、類似化合物の混合物を用い、種々のパラメータについて検討した。その結果、¹³C-qNMRは¹H-qNMRに比べ定量値にばらつきが大きく観察されたが、直接定量法として十分な性能を有することが示唆された。

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

(SI)にトレーサブルに純度が証明された標準物質は限られている。このため、クロマトグラフィーにより定量する際には純度が証明されていないものを定量用標品として代用し検量線を作成し、それとの比較により定量値を求めることが多い。しかし、純度が証明されていないもので検量線を作成しているため、得られた定量値には純度の誤差が含まれてしまい、精確かどうか見極めることができない。この問題を避けるため、食品添加物公定書や日本薬局方などの公定法を収載する書物においては、各品目の規格試験法の定量分析に用いる定量用標品を「標準品」若しくは「試薬・試液等」の項に規定することによって、間接的に精確さを限定する方策をとっている。

A. 研究目的

今日、食の安全性に関心が高まっており、既存添加物に関してもより正確な情報の供給と共に、各品目の品質確保が求められている。品質確保のためには、それに含まれる成分を正確に把握し、有効成分あるいは指標成分を正確に定量する試験法の設定が必要とされる。

通常、有機化合物の定量分析には微量分析や分解能に優れた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やガスクロマトグラフィー(GC)を用いるが、分析対象物質の定量用標品が不可欠である。しかし、数多くの化合物の中で国際単位系

一方、既存添加物の規格試験法設定においては、前述の方策をとれない場合が多い。すなわち、定量用標品として高純度であるものが必要となるが、天然由来の成分の定量用標品を設定する場合、単離精製且つ純度証明を行う必要があ

るが非常に製造コストが高く、仮に製造できたとしても定量用標品の価格が規格試験法にそぐわない非常に高額となるためである。そこで我々は、これまでに分析対象物質の標準物質を必要としない定量分析の手法として quantitative NMR(qNMR)を開発した。qNMR は分子内の原子核を直接測定することができることを利用した方法であり、測定で得られたシグナルには定量的な情報が含まれており、mol を直接測定できることから一次標準法の資格を有するとされている。qNMR では SI にトレーサブルな標準物質を内標準物質として用いることにより対象物質の絶対量を求めることが可能である。核種には ^1H 核を用いる方法である ^1H -qNMR により有機化合物の精確な定量が可能であると証明されている。しかし、 ^1H -qNMR は、混合物の定量を行う場合において、観測範囲が約 20 ppm と短いため、類似化合物に由来するシグナルが重なるため個々の成分の定量が困難であることが欠点とされている。この ^1H -qNMR の欠点により、既存添加物そのものの有効成分を直接定量することは困難である場合が多い。したがって、単離精製した有効成分の絶対純度を決定し、それを定量用標品としてクロマトグラフィーによる定量を行い、既存添加物の有効成分の含量を間接的に SI にトレーサブルに求める以外に方法がない。

^1H -qNMR の欠点を克服する手法として、 ^1H 核以外の核種として ^{13}C 核を用いた qNMR の手法が考えられる。 ^{13}C -NMR では S/N 比を向上させるために長時間測定を必要としていたが、近年、超高感度測定が可能な極低温プローブなどハード面の向上により測定時間の短縮が可能となっている。しかしながら、 ^{13}C -NMR は ^1H -NMR に比べて感度が非常に悪く、少しでもシグナルが観察されるように定量性を犠牲にした測定条件が設定されているため、通常の ^{13}C -NMR 測定ではシグナルは定量性に乏しいという問題がある。一方、 ^{13}C -NMR では観測範囲が ^1H -NMR と比較して約 20 倍広く、観測されるシグナルもプロトンノイズデカップリングによりシングルレットで検出されるため、類似化合物が共存した場合においても ^1H -NMR に比べてシグナル

が重なる可能性は低く、個々の化合物を同時に定量できる可能性が高いという利点がある。

^{13}C -NMR 測定に高い定量性を付与し、 ^{13}C -qNMR の手法を確立させるためには、少なくとも以下の問題を解決する必要がある。

- 1) 存在比が $^{12}\text{C}:^{13}\text{C}=100:1$ であるため、感度が悪い。
- 2) 観測範囲が長いことから測定して得られる FID データの Point 数が少ない。
- 3) 化合物の構造によって緩和時間 T_1 が短いものから長いものがあるため、シグナルの定量性の確保が困難。
- 4) 合成された化合物と生物が生合成した化合物の ^{13}C の比率が未知である。

このうち、1)~3)については測定条件の最適化を検討することによって技術的に解決可能であると考えられる。そこで本研究では、 ^{13}C -NMR で定量性のあるデータを得るための測定条件を検討し、 ^{13}C -qNMR の技術を確立するため基礎情報を得ることとした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

qNMR 標準物質は SI にトレーサブルに純度が値づけされた 1,4-bis-(trimethylsilyl)-benzene- d_4 (1,4-BTMSB- d_4)標準物質(Cat. No. 024-17031, Lot. No. KPQ4815, 純度 $99.9\pm 0.5\%$, 和光純薬工業(株)製), dimethyl sulfone (DMSO2)標準物質(Code. No. 047-31661, Lot. No. DCP5947, 純度 $99.7\pm 0.7\%$, 和光純薬工業(株)製)を用いた。

qNMR 測定溶媒には acetone- d_6 (Isotec 社製)及び dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6) (関東化学(株)製)を用いた。

試料には diethyl phthalate (DEP)標準物質(NMIJ CRM 4022-b, No. 125, 純度 $99.98\pm 0.01\%$, 和光純薬工業(株)製), benzoic acid (BA) (020-00982, Lot. No. wKJ8374, 和光純薬工業(株)製), rutin trihydrate (Rutin) (Cat. No. R0035, Lot. No. SDLXE, 東京化成工業(株)製) (^1H -qNMR より anhydrate としての純度 $90.2\pm 0.3\%$ 1), quercetin xH₂O (Quercetin) (Cat. No. P0042, Lot. No. GM01, 東京

化成工業(株)製 (^1H -qNMR より anhydrate としての純度 $92.8 \pm 0.02\%$)を用いた。

B-2) 装置及び測定条件

核磁気共鳴装置(NMR)はオートサンプラー付き JNM-ECZ600 (CH UltraCOOL probe) (日本電子(株)製), オートサンプラー付き JNM-ECA800 (CH probe) (日本電子(株)製)を用いて NMR 測定を行った。

解析ソフトは Alice for qNMR 2.0 (日本電子(株)製)を使用して上記の NMR 装置で得られたスペクトルのフーリエ変換(Window 関数: exponential function BF = 2.0 Hz, trapezoidal function T1 = T2 = 0, T3 = 80, T4 = 100)及びデータ解析を行った。また, JEOL Delta v5.0.5 を用いて S/N 比を算出した。

B-3) qNMR 試料作製

天秤にはウルトラマイクロ天秤(METTLER TOLEDO, XP2U, 最小秤量値 約 1.74 mg)を使用した。風袋には分析用アルミ丸皿(小) (ϕ 8 mm, capacity : 0.05 mL)を使用し, 量り込み法により NMR 試料を調製した。分析対象物質及び標準物質を精密に秤量し, 10 mL バイアルに風袋ごと入れた。それに重溶媒 1 mL を電動ピペットで加え, 約 10 分間超音波をあて完全に分析対象物質及び標準物質を溶解させた。これを NMR Test Tube S-Type 8 inch(和光純薬工業(株)製)に約 600 μ L 入れ, qNMR 試料とした。また, 重溶媒が Acetone- d_6 である sample 1, 2, 3 の NMR 管をバーナーで封をした。Table 1, 2 に測定に用いた試料及び秤量値の詳細を記載した。

B-4) 絶対量計算

内部標準物質を用いた定量法である AQARI (Accurate quantitative NMR with internal reference substance)に準じ, 解析ソフト Alice for qNMR を用いて測定して得られた FID 信号をデータセットとして分析対象物質の各シグナルについて, 以下の計算式により絶対量(純度%)を求めた。

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}}}{I_{\text{std}}} \times \frac{N_{\text{std}}}{N_{\text{sample}}} \times \frac{W_{\text{std}}}{W_{\text{sample}}} \times \frac{M_{\text{sample}}}{M_{\text{std}}} \times P_{\text{std}}$$

ただし, sample = 分析対象物質, std = 内標準物質, P = 純度%, I = 積分値, N = 核数, W = 重量, M = 分子量。

B-5) 測定方法

B-5-1) ^{13}C -qNMR の測定条件の検討

分析対象物質及び標準物質の純度が既知である sample 1 を用いて NMR 測定上のばらつきを明らかにするため条件を各々変えて ^{13}C -qNMR 測定に供した(Table 3)。

B-5-1-1) データポイント数 (X_point)

^1H -qNMR では観測範囲が約 20 ppm で X_point は約 6 万である。一方, ^{13}C -qNMR では観測範囲が約 250 ppm で約 6.5 万である。 ^{13}C -qNMR では 1 つのシグナルに対し ^1H -qNMR と比較すると約 1 / 12 倍少ないことになりポイント落ちが生じる。また, 取り込み時間=データポイント数/観測範囲の関係があるため, 取り込み時間の延長は核オーバーハウザー効果(NOE)の影響を受けてしまう。そのため, シグナルに NOE が上乘せされてしまい, 定量性のあるシグナルとは言えなくなる。ポイント落ちして正確に絶対量を測定できないことや NOE も考慮し, X_point を 65536 から 2 倍, 4 倍, 8 倍と増加させて ^{13}C -qNMR 測定に供した。

B-5-1-2) パルス繰り返し時間(Repetition_time)及びフリップ角(X_angle)

^{13}C の縦緩和時間(T_1)はカルボニルや 4 級炭素では長い傾向があり, 炭素ごとに大きく異なる。 T_1 が長いものでは磁場が十分に回復していない状態で再びパルスを受け, 励起して結果的に頭打ちになってしまうことが考えられる。つまりシグナルに定量性がない結果になってしまう。以上の問題を解決するために磁場が十分に回復するようにフリップ角を 90[deg]から 30[deg]に変更して測定した。また, パルス繰り返し時間 33[s], フリップ角 30 [deg]で測定を行い, ^{13}C -qNMR の元の条件より時間を 1 / 3 にした時にどのような傾向が見られるか確認するために測定を行った。

B-5-1-3) 積算回数(Scans)

S/N比 $\propto\sqrt{\text{積算回数(Scans)}}$ の関係があり、積算回数を増加させればS/N比が向上し、結果としてより正確な積分面積を得ることができると考えた。また、パルス繰り返し時間100[s]、フリップ角90[deg]で積算回数が32回の場合、約1時間程度の測定時間を要することも考慮し¹³C-qNMR測定に供した。

B-5-2) スペクトル解析条件

B-5-2-1) 位相補正及びベースライン補正

NMR測定して得られたFID信号を解析ソフトAlice for qNMRでフーリエ変換する際に位相補正とベースライン補正を行う。位相が合っていないとシグナルの正確な積分面積を求めることはできない。また、極低温プローブを用いて測定を行うと通常のプローブでは見られない特有のノイズが見られる。これを考慮しつつベースラインを適切に補正することで絶対量を正確に求めることができると考え、位相補正とベースライン補正について検討した。

B-5-2-2) 積分範囲

¹³C-NMRではプロトンノイズデカップリングの操作を行うことでシグナルがシングレットで検出されるため、一定の積分範囲を設定してシグナルごとのばらつきを少なくすることを検討した。検討した積分範囲はシグナルの中央から $\pm 0.10, 0.15, 0.20, 0.30$ ppmである。この積分範囲で各シグナルが重なることなく、パルス繰り返し時間に対して T_1 が十分短いものより絶対量を算出した。

B-5-2-3) ゼロフィリング(ZEROFILL)

ゼロフィリングとはFIDの後ろに強度ゼロのデータ点を付加する操作のことである。この操作によりデータ点が増加することで見かけ上のデジタル分解能を向上させることができる。前述のように¹³C-qNMRではポイント落ちすると考えられるため、ZEROFILL 1及び2で解析することとした。なお、ZEROFILL 1で2倍、ZEROFILL 2で4倍ポイント数を増加させることができる。

B-5-3) ¹³C-qNMRの定量性検証

Sample 1で検討を行った各条件により、2種の化合物の混合物を定量することが可能であるかどうかを確かめるために、benzoic acid / DEP (sample 3), rutin / quercetin (sample 4, 5, 6)の試料を用いて¹³C-qNMR測定を行った。

B-5-3-1) DMSO2 to benzoic acid / DEP

Sample 2を¹³C-qNMR測定を行って定量可能か確認した後にsample 3の検討を行った。benzoic acid及びDEPはベンゼン環、カルボニルを有する類似の化合物であるのでシグナルが重なることなく検出し、定量することが可能であるかどうか未知である。同一のmolで測定すると観測されるシグナルが近いためにbenzoic acid, DEP由来か区別することは困難である。そのため、mol比をbenzoic acid : DEP = 1 : 1.5に調整し検出されるシグナルの強度がbenzoic acid, DEPのどちらかわかるようにして測定を行った。

B-5-3-2) DMSO2 to rutin / quercetin

¹H-qNMRでは2'位を用いてrutin, quercetinの定量が可能であることは報告されている¹⁾。しかしながら、rutinとquercetinの混合物を同時に定量可能であることは証明されていない。そこで、sample 4, 5, 6を用いて¹H-qNMR及び¹³C-qNMR測定を行い、データを比較し、¹³C-qNMRの優位性の有無を検討した。なお、¹H-qNMRで報告されている2'位のプロトンと比較対象とし、mol比がrutin : quercetin = 1 : 2に調整し、¹³C-qNMRにおいて検出されるシグナルの強度比から由来する化合物がrutin及びquercetinかわかるようにして測定した。

C. 結果及び考察

C-1) データポイント数(X_point)

X-pointを262144以上で測定するとshimが変化してしまうことがわかった。その原因としてデカップリングパワーを照射する時間の延長により、試料に電子レンジ効果が生じ、試料液の温度が変化し、結果としてshimずれが起こっ

ていると考えられる。通常の ^{13}C -NMR では完全デカップリングを行っていることから、試料液の温度はある一定の温度まで上昇するがそのまま定温となることから、shim が変化することはない。しかし、 ^{13}C -qNMR では NOE の影響を避けるために取り込み時間内のみデカップリングパワーを照射し、待ち時間ではデカップリングパワーを照射しないように設定している。このため、試料の温度が上下に変化することで shim が変化しシグナルの形が崩れて定量性がなくなってしまうことが確認された。以上のことから、X_point は 131072 に設定することに決定した。Table 4 に測定条件を記載した。

C-2) パルス繰り返し時間(Repetition_time)

Scans 32 で各々測定条件を変更して測定した結果、ばらつきが大きく見られる結果になった (Fig. 1)。Table 5 に測定条件を Table 6 に各シグナルの積分範囲及び S/N 比、 T_1 を記載した。この結果から Repetition time 100 [s], X_angle 90[deg]で測定することに決定した。

C-3) 積算回数(Scans)

Scans を増加させた結果、ノイズに隠れていた ^{13}C サテライトが確認された (Fig. 2)。シグナル強度に対して約 1 %見られることがわかった。このため、Scans ではなく S/N 比を考えて測定することに決定した。また、この ^{13}C サテライトを積分範囲に含めることにした。Table 7 に測定条件を Table 8 には Scans に対する S/N 比を記載した。

C-4) 位相補正及びベースライン補正

解析ソフト Alice for qNMR 2.0 を用いて位相補正及びベースライン補正を行った。位相補正は重溶媒のシグナルに標準物質である DMSO2 が影響を受けないように設定する必要があることがわかった。ベースライン補正は Alice のアルゴリズムのまま計算したものと手動で補正したものを比較した。その結果、Alice のベースライン補正アルゴリズムのままで絶対量を算出すると Scans が多いと誤った数値になってしまうことがわかった。この理由として S/N 比が

良いことからベースライン補正点が減少すること、極低温プローブ特有のノイズによりシグナルのベースラインが安定せず、Alice のベースライン補正アルゴリズムがうまく機能しないことが原因だと考えられる。ベースライン補正アルゴリズムを改良することによって、この問題は回避できると考えられるが、現時点では、ベースライン補正が適切に行われるように必要に応じてベースライン補正点を追加し対応することとした。

C-5) 積分範囲

検討した積分範囲で ^{13}C サテライトを含むことができたのは ± 0.30 ppm であることがわかった (Fig. 3)。S/N 比が低い場合では、ノイズに ^{13}C サテライトが含まれていることになることから積分範囲は ± 0.30 ppm で解析することに決定した。しかし、化合物によっては T_2 (横緩和時間) が長いものがあるため、シグナルの半値幅が広がり、積分範囲を ± 0.30 ppm より若干大きくする必要が考えられた。

C-6) ゼロフィリング(ZEROFILL)

解析ソフト Alice for qNMR で ZEROFILL 1 または 2 で解析したが大きな差が見られないことがわかった (Fig. 4)。すなわち、元の FID のポイント数が十分か既にポイント落ちしており、ポイント数を仮想的に倍増しても結果に差を生じないことが示唆された。このため、ZEROFILL 1 で解析することに決定した。なお、Table 9 には ZEROFILL を検討した際の測定条件を記載した。

C-7) 基礎条件の総括

Sample 1 を用いてこれまで検討した条件を考慮し、ECZ600 (JEOL CH UltraCOOL probe, S/N 2070), ECA800 (JEOL CH probe, S/N 800) で ^{13}C -qNMR 測定及び解析を行った (Table 10)。DMSO2 のシグナルを基準として、DEP の全てのシグナルで S/N 比の平均と RSD を求めた (Fig. 5)。S/N 比が約 100 以上あれば RSD 10 %以内になることがわかった。Table 11 にこれまで検討 ^{13}C -qNMR 測定条件を記載した。

C-8) DMSO2 to benzoic acid / DEP

類似化合物の混合試料液 sample 3 (DMSO2 to benzoic acid / DEP)を用いて、 ^{13}C -qNMR 測定の検証を行った。Sample 3 について ^{13}C -qNMR 測定したシグナルが Fig. 6 のチャートである。両者共にシグナルが重なることなく検出されたが、積分範囲 $\pm 0.30\text{ppm}$ にすると隣接するシグナルの範囲を含む場合があったため、その場合は適切な範囲に設定した。その結果、mol 比に準じてシグナルの高さが異なることが確認され、各々のシグナルより求めた絶対量は、類似構造の化合物である Benzoic acid 及び DEP 共に約 5 % の誤差が生じたものの一定の値を示すことがわかった (Fig. 6)。なお、Table 11 に測定条件を Table 12 に積分範囲及び S/N 比、 T_1 を記載した。

C-9) DMSO2 to rutin / quercetin

C-8) に示したとおり、比較的良好な結果が得られたことから、さらに複雑な系としてケルセチンとその配糖体であるルチンを混合した混合試料液 sample 4, 5, 6 (DMSO2 to rutin / quercetin) を用いて ^1H -qNMR 及び ^{13}C -qNMR 測定し、その結果を検証した (Table 13, 14, 15)。 ^1H -qNMR による rutin の純度 (anhydrate) は $90.2 \pm 0.3\%$, RSD 0.4 %, quercetin の純度 (anhydrate) は $92.8 \pm 0.02\%$, RSD 0.03% と報告されている¹⁾。 ^1H -qNMR では 2' 位のシグナルが 6' 位のシグナルと重なっていることから両者を定量することは困難であった。重溶媒として methanol- d_4 を用いたとき両者が定量可能であると報告されているが¹⁾、今回は重溶媒に DMSO- d_6 を用いており、重溶媒の違いにより化学シフトが変化したためだと考えられる。しかし、5' 位は分離しており、 ^1H -qNMR でも両者は定量可能であった (Fig. 7)。

^{13}C -qNMR では rutin 及び quercetin のシグナルの多くは十分に離れて観察され定量可能であった (Fig. 8)。積分範囲をシグナル中心から $\pm 0.20\text{ppm}$, $\pm 0.30\text{ppm}$ としてもで計算可能なシグナルが多数あり、積分範囲が十分に取れない

ものを除き解析ソフト Alice for qNMR を用い絶対量を算出した (Fig. 9, 10)。Sample 4 では rutin, quercetin とともに絶対量の平均が約 90 % となった。この値は ^1H -qNMR で測定した値とほぼ等しいが、 ^1H -qNMR に比べ ^{13}C -NMR では、測定値のばらつきが大きく観察された。Sample 4, 5, 6 の濃度は、sample 4 を 50 としたとき、sample 5 が 5, sample 6 が 10 の比率であり、最も sample 5 の濃度が低い。このため、sample 5 では試料濃度が薄いために、精確な定量値を得るために S/N 比が十分にとれる積算回数として 128 回以上が必要であった。

以上より、類似化合物の rutin 及び quercetin 混合試料液においても、 ^{13}C -qNMR を用いてある程度の mol 濃度及び積分範囲が十分であれば定量することが可能であることが確認された。

D. 結論

現在、天然由来の添加物の有効成分や指標成分を精確に定量するためには、定量用標品が入手可能である場合は、クロマトグラフィーを用いることができる。一方、定量用標品が入手不可能である場合は、単離精製した有効成分の絶対純度を ^1H -qNMR で決定し、それを定量用標品としてクロマトグラフィーによる定量を行い、精確な含量を求めることができる。しかしながら、いずれも定量用標品を用いたクロマトグラフィーによる定量であり、定量用標品の準備が必要である。このため、特に定量用標品が入手不可能である場合には、非常に手間がかかり迅速に含量値を求めることができない。この問題は、qNMR により直接定量することで解消可能であるが、 ^1H -qNMR では分離能及び分解能が十分でないため、複雑あるいは類似化合物の混合物では達成できない。そこで、本研究では、分離能及び分解能がより優れた ^{13}C -qNMR の手法の確立のため、モデル実験を行い基礎情報を収集した。その結果、 ^{13}C -qNMR では S/N 比を向上させても約 5 % のばらつきが生じることから精確な絶対定量には困難であり、化合物の純度決定には適さないと考えられた。しかし、多少のばらつきは生じるが類似化合物の混合物から目的成分を単離せずに直接定量が可能である

ことが証明され、この点において天然由来の添加物の有効成分または指標成分を迅速に定量する手法として有用であると考えられた。ただし、今回、600 MHz NMRを用いて検討した結果であるため、これ未満の性能のNMRで行う場合は、各々条件を再検討する必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 斎藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎壯, 河村葉子: 定量 NMR に基づく既存添加物中のクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量. 食衛誌, 51, 205-212(2010).

F. 研究業績

1. 学会発表

- 1) Sugimoto N, Nishizaki Y, Masumoto N, Sato K, Suematsu T, Miura T, Yamada Y, Kitawaki Y, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T: Development of single reference liquid chromatography quantitative analysis based on relative molar sensitivity. AOAC 132nd Annual Meeting (2018.8.29) (Toronto).
- 2) Miura T, Sugimoto N: Quantitation paradigm and preparation of quantitative reference standards. AOAC 132nd Annual Meeting, Symposium: Practicality of quantitative NMR in quality control (2018.8.29) (Toronto).
- 3) Sugimoto N: Development of single-reference HPLC quantitative analysis for chemical compounds derived from natural sources based on relative molar sensitivity. 2018 APEC workshop on food safety and food adulterated with drugs (2018.9.13) (Taipei).
- 4) Sugimoto N, Saito T, Miura T: New Proposal regarding “Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy — Quantification of reference compounds used for foods and food products — General requirements” ISO/TC34 plenary meeting (2018.10.18-20).
- 5) Sugimoto N: Overview of food additive regulation in Japan. 1st TISTR and JAIMA conjoint conference (2018.11.13) (Bangkok).

- 6) 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物・シタン色素の成分解析. 日本食品衛生学会第114回学術講演会(2018.11.15)(広島市).
- 7) 寺見祥子, 多田敦子, 久保田浩樹, 佐野誠, 鈴木一平, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 試薬中のノルビキシン及びビキシン簡易濃度測定法の検討. 日本食品衛生学会第114回学術講演会(2018.11.15)(広島市).
- 8) 杉本直樹: 天然添加物の品質保証: qNMRの応用と展開. 第55回植物化学シンポジウム(2018.11.20)(東京)
- 9) 多田敦子, 堀江正一, 関戸晴子, 橋口成喜, 小林千種, 勝原美紀, 大槻崇, 中島安基江, 高橋直矢, 久保田浩樹, 建部千絵, 寺見祥子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討. 第55回全国衛生化学技術協議会(2018.11)(横浜市).
- 10) 杉本直樹: qNMR法の国際標準化による波及効果. 日本薬学会第139年会一般シンポジウム「品質評価(Quality)のレギュラトリーサイエンスと分析科学の新機軸」(2019.3.20)(幕張市).
- 11) 黒江美穂, 斎藤直樹, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英: 非イオン界面活性剤の簡易定量に向けたHPLC-RIにおける相対モル感度の頑健性評価. 日本化学会年会第99春期年会(2019.3.16)(神戸市).

2. 論文発表

- 1) 田原麻衣子, 杉本直樹, 香川(田中)聡子, 坂井信夫, 五十嵐良明, 神野透人: ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの定量分析におけるqNMRを用いたトレーサビリティの確保. 薬学雑誌, 138, 551-557 (2018).
- 2) Nishizaki Y, Masumoto N, Yokota A, Mikawa T, Nakashima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Ito Y, Sugimoto N, Sato K.: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Addit. Contam.*, 35, 838-847 (2018).
- 3) Saito N, Kitamaki Y, Otsuka S, Yamanaka N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata H, Ihara T.: Extended internal standard method for quantitative ^1H NMR assisted by chromatography (EIC) for analyte overlapping impurity on ^1H NMR spectra.

Talanta, **184**, 484-490 (2018).

- 4) Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato, N:
Phytochemical profiling of rosemary extract
products distributed as food additives in the
Japanese market. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **25**,

105-113 (2018).

G. 知的財産権の出願. 登録状況
なし

Table 1 qNMR 測定で用いた試料

Sample	作製日	分析対象物質	標準物質	重溶媒
1	2015/9/28	DEP	DMSO2	Acetone- <i>d</i> ₆
2	2015/9/30	Benzoic acid	DMSO2	Acetone- <i>d</i> ₆
3	2015/9/30	Benzoic acid / DEP	DMSO2	Acetone- <i>d</i> ₆
4	2015/11/6	Rutin / Quercetin	DMSO2	DMSO- <i>d</i> ₆
5	2015/11/11	Rutin / Quercetin	DMSO2	DMSO- <i>d</i> ₆
6	2015/11/11	Rutin / Quercetin	DMSO2	DMSO- <i>d</i> ₆

Table 2 qNMR 試料秤量値

Sample	分析対象物質	秤量値 (mg)	分子量	mol	標準物質	秤量値 (mg)	分子量	mol
1	DEP	18.8595	222.24	0.085	DMSO2	8.2518	94.13	0.088
2	Benzoic acid	16.6149	122.12	0.136	DMSO2	8.1750	94.13	0.087
3	DEP	21.3134	222.24	0.096	DMSO2	5.7714	94.13	0.061
	Benzoic acid	16.5074	122.12	0.135				
4	Rutin	50.026	610.52	0.082	DMSO2	7.0231	94.13	0.075
	Quercetin	49.992	302.24	0.165				
5	Rutin	4.9921	610.52	0.008	DMSO2	1.5034	94.13	0.016
	Quercetin	4.992	302.24	0.017				
6	Rutin	9.9954	610.52	0.016	DMSO2	1.9899	94.13	0.021
	Quercetin	10.0035	302.24	0.033				

Table 3 検討前の ¹³C-qNMR 測定条件

X_point	65536
Repetition_time	100 [s]
X_angle	90 [deg]
Scan	32

Table 4 データポイント数を検討した ¹³C-qNMR 測定条件

装置	ECZ600(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe
Spectral width	-25—225 ppm
X_point	65536, 131072, 262144, 524288
Filter Factor	16, 8, 4, 2
X_angle	90 [deg]
Repetition_time	100 [s]
Scan	32
スピニング	off
プローブ温度	室温
重溶媒	Acetone- <i>d</i> ₆
標準物質	DMSO2

Table 5 パルス繰り返し時間とフリップ角を検討した ¹³C-qNMR 測定条件

装置	ECZ600(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe
Spectral width	-25—225 ppm
X_point	131072
Filter Factor	8
X_angle	30 [deg]
Repetition_time	33, 100 [s]
Scan	32
スピニング	Off
プローブ温度	室温
重溶媒	Acetone- <i>d</i> ₆
標準物質	DMSO ₂

Table 6 DEP chemical shift, S/N 比, *T*₁(sample 1, scan32 : Average, n = 3)

Name	積分範囲(ppm)	S/N 比 30[deg], 33[s]	S/N 比 30[deg], 100[s]	<i>T</i> ₁ [s]
DMSO ₂	42.18 - 42.78	153.33	139.67	8.0
DEP_CH ₃	13.99 - 14.59	134	133.67	4.5
DEP_CH ₂	61.68 - 62.28	134.67	128.33	6.1
DEP_Ph a	129.25 - 129.85	129	126.67	3.1
DEP_Ph b	131.62 - 132.22	124.33	125.33	2.9
DEP_Ph c	133.02 - 133.62	133.67	132.67	14.4
DEP_COO	167.56 - 168.16	128.67	129.33	20.8

Table 7 積算回数を検討した ¹³C-qNMR 測定条件

装置	ECZ600(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe
Spectral width	-25—225 ppm
X_point	131072
Filter Factor	8
X_angle	90 [deg]
Repetition_time	100 [s]
Scan	32-480, 491
スピニング	off
プローブ温度	室温
重溶媒	Acetone- <i>d</i> ₆
標準物質	DMSO ₂

Table 8 DEP Scan : S/N 比(全てのシグナルの Average, n = 3)

Scan	S/N 比	Scan	S/N 比
32	309	288	931.67
64	431.33	320	993.84
96	523.67	352	991.17
128	614.5	384	1091.17
160	679.5	416	1157.33
192	725.17	448	1130.33
224	805.5	480	1198.5
256	862.5	491	1183.17

Table 9 ZEROFILL で検討した測定条件

装置	ECZ600(JEOL), ECA800(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe, CH probe
Spectral width	-25—225 ppm
X_point	131072
Filter Factor	8
X_angle	90 [deg]
Repetition_time	100 [s]
Scan	32
スピニング	off
プローブ温度	室温
重溶媒	Acetone- <i>d</i> ₆
標準物質	DMSO ₂

Table 10 ¹³C-qNMR 測定条件及び解析条件

装置	ECZ600(JEOL), ECA800(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe, CH probe
Spectral width	-25—225 ppm
X_point	131072
Filter Factor	8
X_angle	90 [deg]
Repetition_time	100 [s]
Scan	2-128
スピニング	off
プローブ温度	室温
重溶媒	Acetone- <i>d</i> ₆
標準物質	DMSO ₂
ベースライン補正	Alice Auto Baseline Correction
ZEROFILL	あり(2倍)

Table 11 DMSO2 to benzoic acid / DEP in acetone-*d*₆ for ¹³C-qNMR 測定条件

装置	ECZ600(JEOL), ECA800(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe, CH probe
Spectral width	-25—225 ppm
X_point	131072
Filter Factor	8
X_angle	90 [deg]
Repetition_time	100 [s]
Scan	32
スピニング	off
プローブ温度	室温
重溶媒	Acetone- <i>d</i> ₆
標準物質	DMSO2

Table 12 Benzoic acid / DEP chemical shift, S/N 比, T₁,(sample3, Average, n = 3)

Name	積分範囲	S/N 比	T ₁ [s]
Benzoic acid_Ph w	129.16 – 129.40	471.33	6.0
Benzoic acid_Ph x	130.07 – 130.67	486.67	6.0
Benzoic acid_Ph y	131.16 – 131.56	242.67	17.1
Benzoic acid_Ph z	133.58 – 133.88	230.0	2.9
Benzoic acid_COO	167.42 – 167.70	242.33	20.8
DEP_CH ₃	13.99 – 14.59	356.0	4.2
DEP_CH ₂	61.68 – 62.28	340.33	6.6
DEP_Ph a	129.43 – 129.67	366.67	3.1
DEP_Ph b	131.71 – 132.11	329.67	3.2
DEP_Ph c	133.18 – 133.48	346.67	16.7
DEP_COO	167.72 – 168.00	340.0	27

Table 13 ¹H-qNMR 測定条件 (sample4, 5, 6)

装置	ECZ600(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe
Spectral width	-5—15 ppm
X_point	60018
Filter Factor	8
X_angle	90 [deg]
Repetition_time	60 [s]
Scan	8
スピニング	off
プローブ温度	30°C
重溶媒	DMSO- <i>d</i> ₆
標準物質	DMSO2

Table 14 ¹³C-qNMR 測定条件 (sample 4)

装置	ECZ600(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe
Spectral width	-25—225 ppm
X_point	131072
Filter Factor	8
X_angle	90 [deg]
Repetition_time	100 [s]
Scan	32-128
スピニング	off
プローブ温度	30°C
重溶媒	DMSO- <i>d</i> ₆
標準物質	DMSO2

Table 15 ¹³C-qNMR 測定条件 (sample 5, 6)

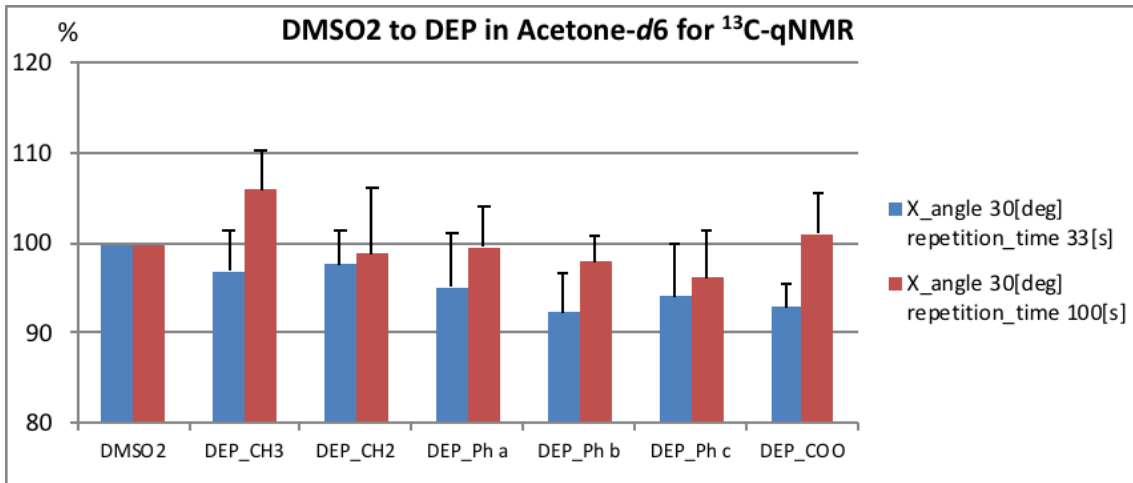
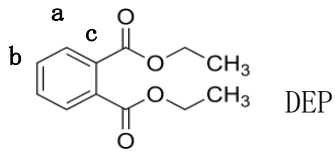
装置	ECZ600(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe
Spectral width	-25—225 ppm
X_point	131072
Filter Factor	8
X_angle	90 [deg]
Repetition_time	100 [s]
Scan	32-512
スピニング	off
プローブ温度	30°C
重溶媒	DMSO- <i>d</i> ₆
標準物質	DMSO2

Table 16 Rutin / quercetin chemical shift, S/N 比, *T*₁(sample 4,scan128 :Average, n = 3)

Rutin	積分範囲(ppm)	S/N 比	Quercetin	積分範囲(ppm)	S/N 比
3 位	133.08 - 133.68	148.67	3 位	135.48 - 136.08	336.33
4 位	177.14 - 177.74	134.33	4 位	175.59 - 176.19	318.0
5 位	160.98 - 161.58	134.67	5 位	160.58 - 160.98	319.0
6 位	98.55 - 98.95	91.33	6 位	98.06 - 98.46	215.67
10 位	103.75 - 104.35	139.0	10 位	102.78 - 103.38	324.0
4' 位	148.16 - 148.76	143.33	4' 位	147.44 - 148.04	319.67
5' 位	116.17 - 116.57	100.33	5' 位	115.48 - 115.88	227.0

Table 17 Rutin / quercetin T_1

Rutin	T_1 [s]	Quercetin	T_1 [s]
3 位	1.9	3 位	1.7
4 位	1.0	4 位	1.0
5 位	0.5	5 位	1.1
6 位	0.6	6 位	0.4
10 位	1.0	10 位	1.4
4' 位	1.4	4' 位	1.3
5' 位	0.4	5' 位	0.4



Average + SD, n=3, 積分範囲±0.30 ppm

Fig. 1 パルス繰り返し時間及びフリップ角の測定条件のばらつき

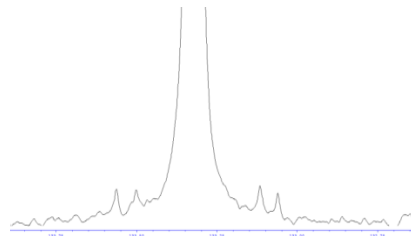


Fig. 2 DEP_Ph c の ¹³C サテライト

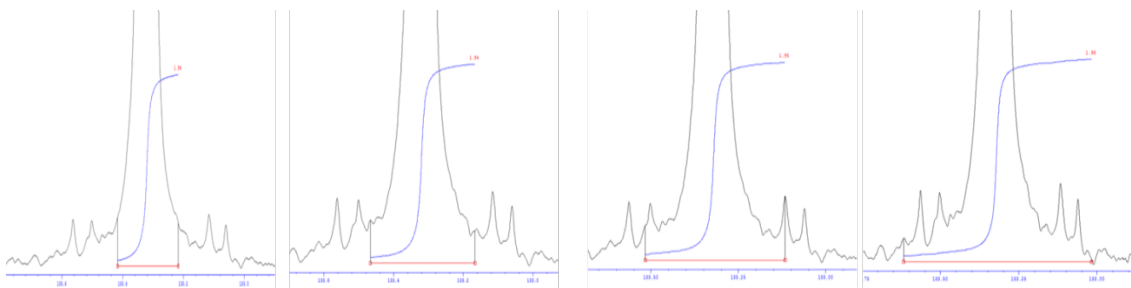
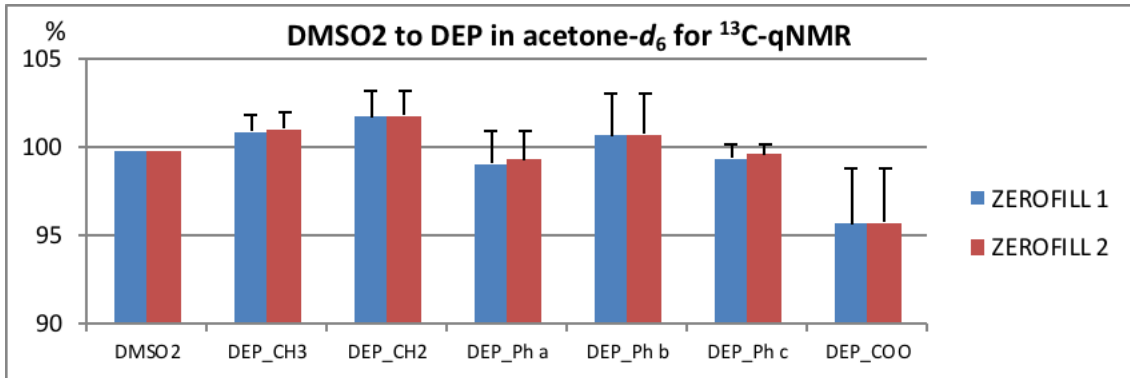
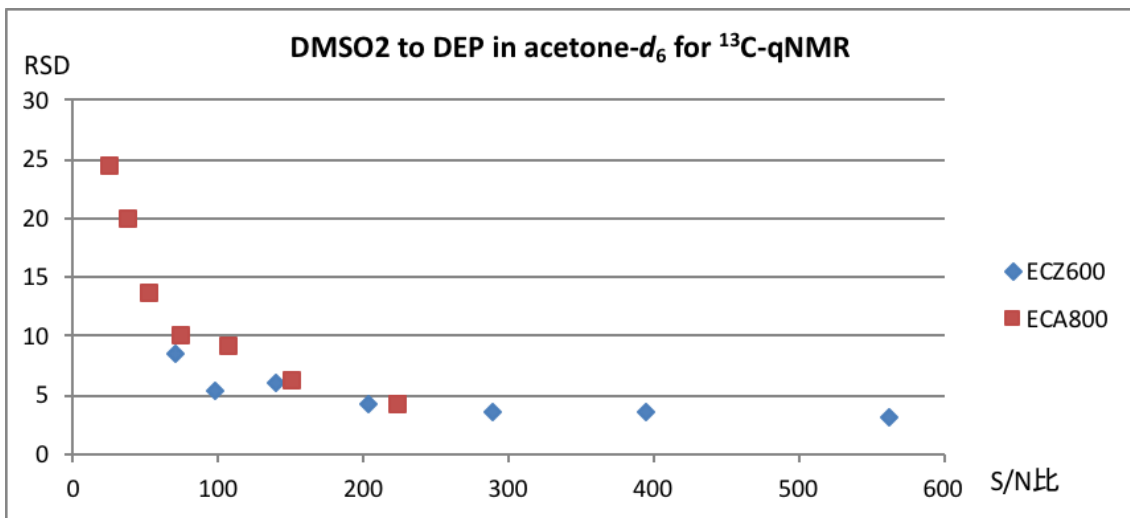


Fig. 3 Scan491, DEP_c に対して±0.10, 0.15, 0.20, 0.30 ppm の積分範囲



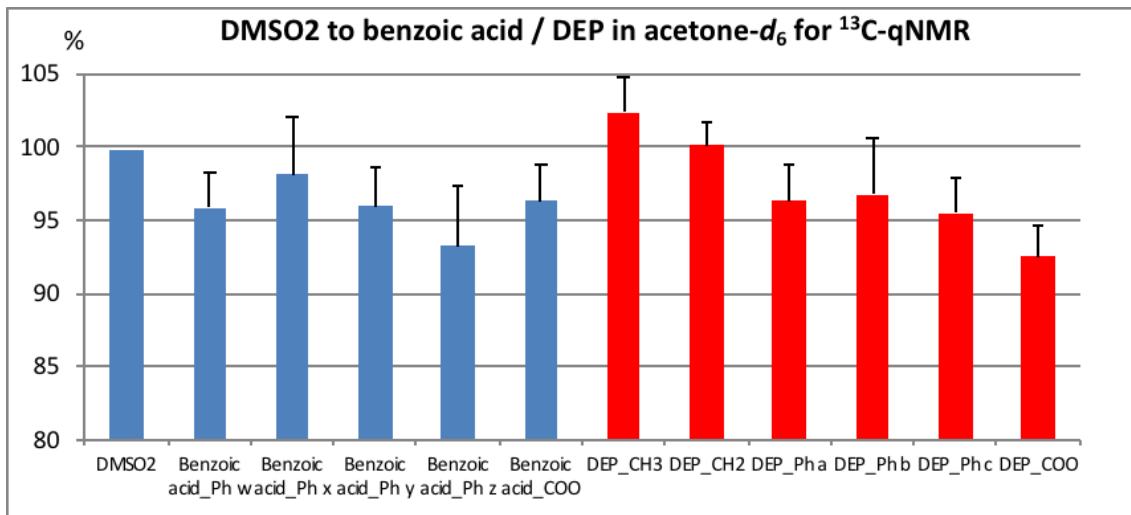
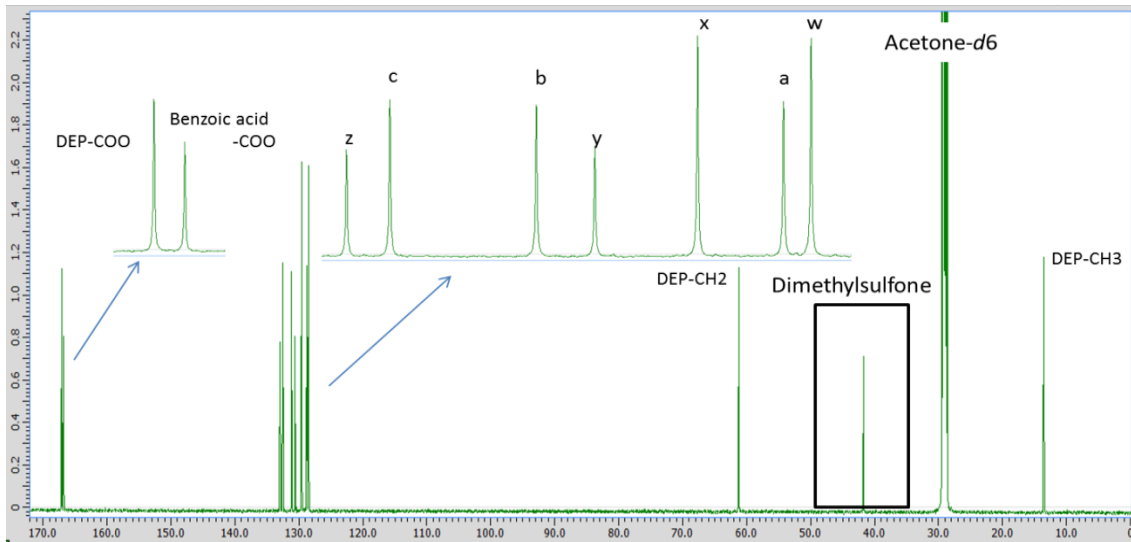
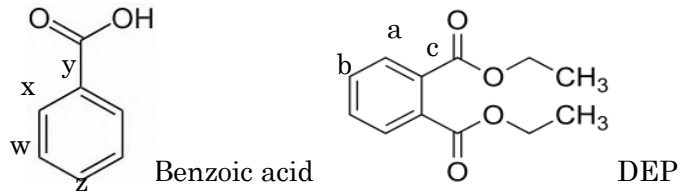
Average±SD, n = 3, 積分範囲 ±0.30ppm (sample 1)

Fig. 4 ZEROFILL 1,2 の比較



n = 5, DEP の全てのシグナル S/N 比の Average, DEP の全てのシグナル純度の RSD

Fig. 5 S/N 比と RSD の関係



Average±SD, n = 3, (sample 3)

積分範囲±0.30ppm...benzoic acid_Ph x, DEP_CH3, DEP_CH2

Fig. 6 DMSO2 to benzoic acid / DEP in acetone-d6 for ¹³C-qNMR

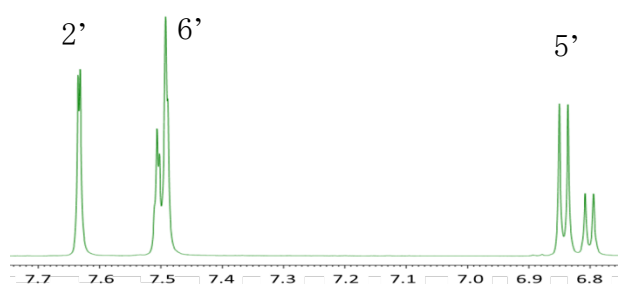
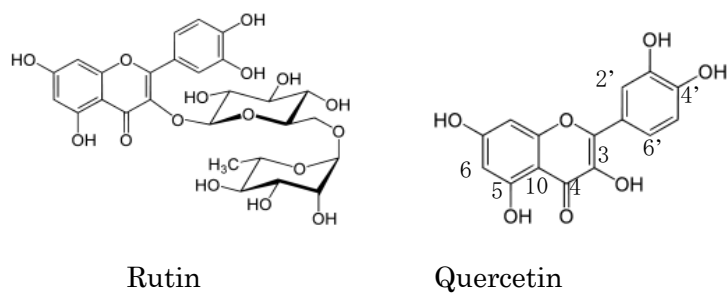


Fig. 7 DMSO2 to rutin / quercetin in DMSO- d_6 for ^1H -qNMR (sample 5)

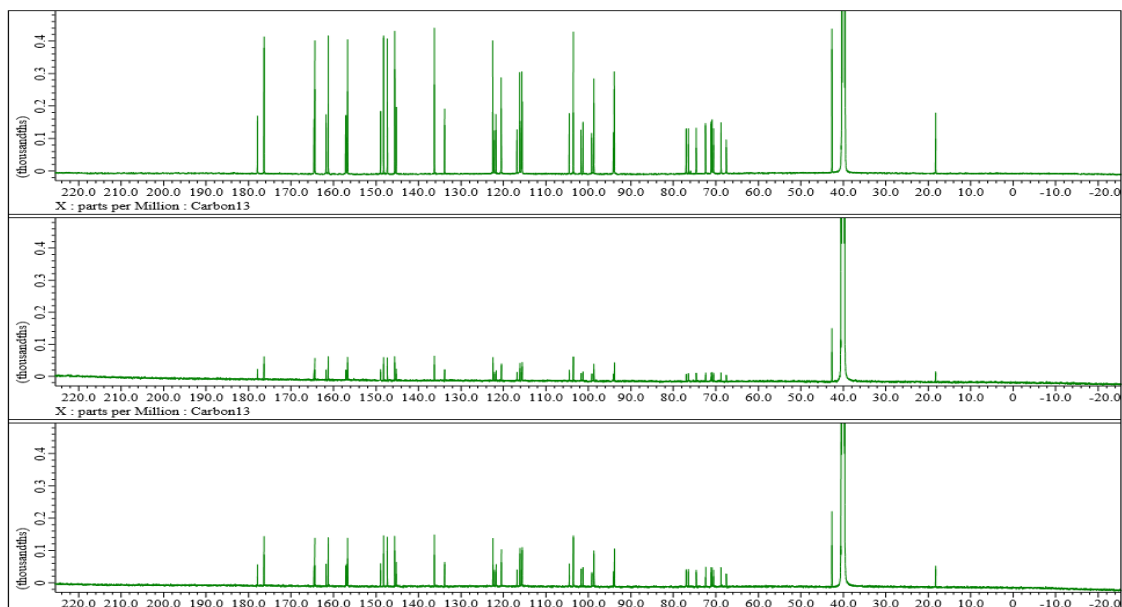
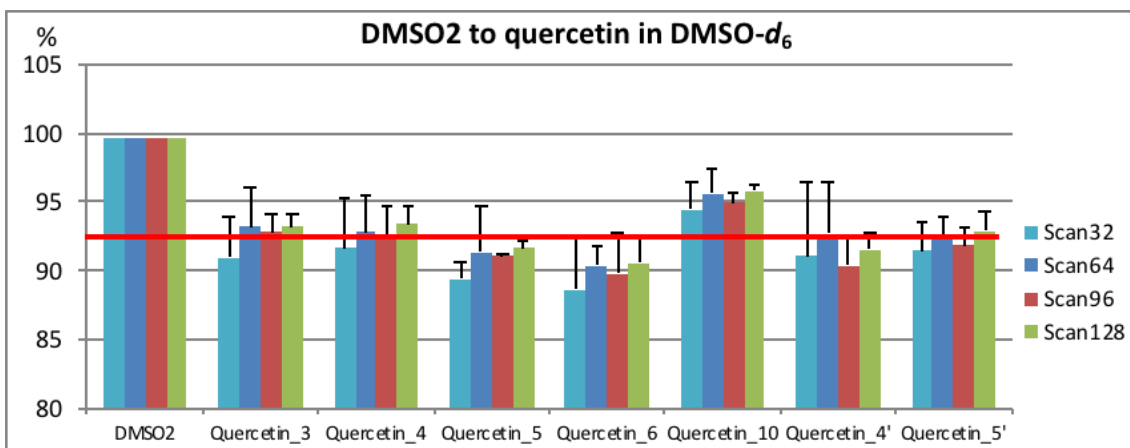
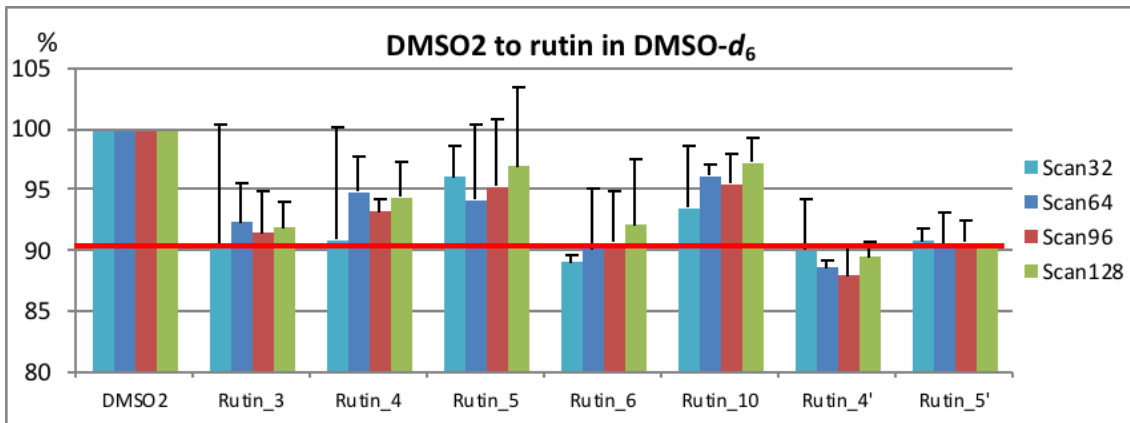
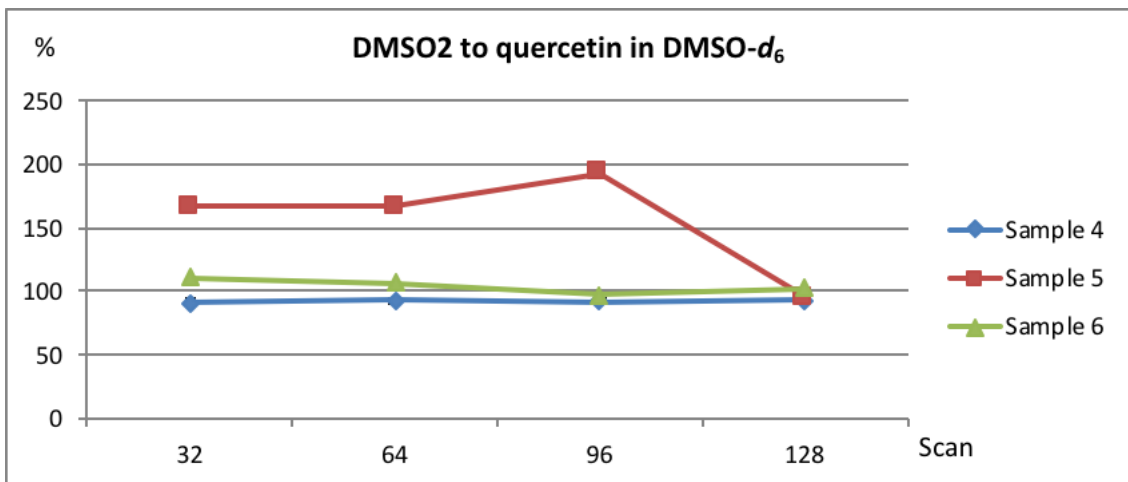
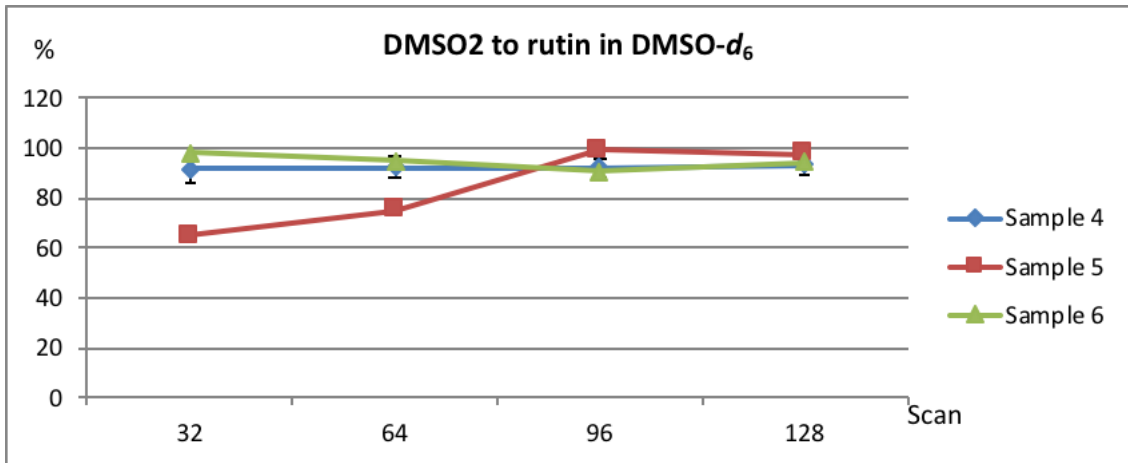


Fig. 8 DMSO2 to rutin / quercetin in DMSO- d_6 for ^{13}C -qNMR (sample 4, 5, 6)



Average±SD, n = 3 (sample 4), rutin = 90.2% (¹H-qNMR), quercetin = 92.8% (¹H-qNMR)

Fig. 9 Sample 4 の各シグナルと Scan の推移



Sample 4

Average±SD, n =3

積分範囲 ±0.20 ppm...6 位, 5'位

±0.30 ppm...3 位, 4 位, 5 位, 10 位, 4'位

Sample 5, 6

n =1

積分範囲 ±0.20 ppm...5 位, 6 位, 5'位

±0.30 ppm...3 位, 4 位, 10 位, 4'位

Fig. 10 Rutin 及び quercetin の濃度差による比較

(積分範囲±0.20, 0.30ppm の全シグナルの Average±SD)