

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29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

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（既存添加物名簿改正（令和2年2月26日）以前の品目数）の成分規格については、第9版食品添加物公定書に 89 品目が収載されたが、なお約 150 品目（約 160 規格）が未設定となっている。

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収載を目標に、自主規格の策定及び及び見直しの検討を継続してきた。

しかしながら、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。

本研究では、平成 29～31 年度（令和元年度）において、既存添加物名簿及び既存添加物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が生じているものの有無を確認した。

また、国の成分規格と日添協自主規格の整備状況、国内外の規格の有無等の調査及び厚生労働省による安全性評価の実施状況について公表されている内容を調査しまとめた。さらに、酵素品目については基原種の同定、分類の考え方について調査し、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基原の追加に関する検討事項等についてもまとめた。

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

及び製法・本質の基原生物の調査

第10版収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。また、各品目の基原種については、Tropicos (<https://www.tropicos.org/home>), YList (<http://www.ylist.info/index.html>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の各データベースにより、植物基原、和名、学名等を確認した。

A. 研究方法

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

第9版食品添加物公定書未収載品目について、検証用規格および自主規格を含めた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版収載既存添加物候補品目定義

(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行なうとともに、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説明した。さらに最終年度では、食品添加

物公定書に記載された添加物酵素の定義への基原の追加を想定し調査を行った。

B. 研究結果

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

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 (下記①, ②, ③), Table 2 (下記④) 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試験法に関する第三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

なお, Table 1 に示した第10版食品添加物公定書規格案作成品目のうち, 公定書作成検討会に規格案を提出し審議された品目は, 第1回から第6回までで累計29品目(35規格)であり, このうちの2品目が食品, 添加物等の規格基準に加えられた(平成31年度(令和元年度)末時点)。これらの品目(規格)は, 第10版食品添加物公定書が作成されるまでは, 第9版食品添加物公定書追補に相当するものと考えられる。

(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5年間のまとめを, その理由・根拠を含め一覧表にした。

所定のデータベース検索により, 和名・一般名, 標準和名・別名, 標準学名・別名を調査し, 既存添加物名簿及び既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質の記載と比較した結果, 見直し等を要すると考えられる事項について Table 3 にまとめた。

(3) 添加物酵素の基原種の同定, 分類の考え方について(最終年度まとめ)

酵素は, 生体内で起こる種々の化学反応を触媒するタンパク質で多種多様な生物種に分布しており, その多様性, および温和な条件(温度, 圧力, pHなど)で高い特異性(基質や反応)が発揮される特長があることにより, 様々

な分野において広く利用されている。また, その安全性の高さより食品分野においても幅広く利用されている。

酵素を食品添加物として使用する場合, 食品添加物公定書に規定された規格への適合が必要となり, 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に限定される。

ここにおいて, 食品添加物公定書の規定に従って酵素の事業使用を円滑に行うため, 以下の2点につき, 対応の検討が必要であると思われた。本調査においてその対応策案の策定を行った。

生物種, 特に微生物においては, 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/変更されることが少なからず発生することがあるが, その際の食品添加物公定書収載の基原名の整備。

事業使用に際し, 種々の課題の克服のための改良・開発は重要であり, 広く自然界からより有用な酵素(およびその生産菌株)の探索が行われているが, 発掘された酵素は食品添加物酵素に収載されているものであるが, その基原微生物が収載されていない場合の対応。

本調査の概要を以下に示す。

1) 酵素生産菌の基原名の呼称改正(変更)に際する対応策案

・微生物の場合

当該微生物につき, 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(例えば下記の解析)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-alpha) 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にも掲載されている。

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ことが可能。

(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>

以上の同定により得られた結果を下記の情報と照合し, その呼称改正(変更)の正当性を確認する。

- 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。

- 査読のある分類学分野の学術誌での呼称変更情報。

- 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。

- 海外の主要国 (参) 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。

(参) 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

- その他, 科学的に妥当と判断できる公的の情報。

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, 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 URL 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。

学名:

Tropicos <http://www.tropicos.org>

和名:

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

2) 有用酵素の探索の結果, 発掘された酵素は食品添加物酵素に収載されているものであるが, その基原微生物が収載されていない場合の対応。

当該微生物が, 「非病原性の培養株以外のもの」, また「微生物の菌株として毒素を産生する可能性のある培養株を用いる場合, 精製の過程で毒素を除去すること」は大前提となるが, 食品添加物公定書に収載された添加物酵素の定義への基原の追加についての具体的な評価案として, 「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」において検討される「宿主に関する事項」をベースとした以下の考え方を対応策案として提示する。

【基原の追加に際する検討事項案】

1. 分類学上の位置付け(種名(学名)・株名等)等に関する事項

学名, 株名等が明らかであり, その微生物が添加物製造に安全に利用されてきた経験, 食用に利用されてきた歴史(食文化)又は産業上の使用経験等が明らかであること。例えば, 第 9 版食品添加物公定書に収載されている添加物酵素の基原として収載されているものなど。

2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

非病原性であること。また、有害生理活性物質を産生する場合、その種類、作用及び量が明らかであること。必要に応じて、当該菌株のアレルギー誘発性に関する知見が明らかであること。なお、病原性等に関しては、以下の情報等をベースにして確認する。

⇒国立感染症研究所病原体安全管理規定(病原体等のBSL分類)

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biosafe/8136-biosafe-kanritaikei.html>

⇒ATCC (American Type Culture Collection) の Biosafety Level

⇒EFSA の QPS (the Qualified Presumption of Safety)

<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>

など

3. 寄生性及び定着性に関する事項

当該微生物が、ヒトや他の生物に寄生又は定着するか否かが明らかであり、寄生・定着する場合、ヒトや他の生物に悪い影響を与えるか否かが明らかであること。

4. 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

当該微生物が病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないこと。

5. 当該微生物の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

近縁の株において、病原性がある場合や有害生理活性物質を産生するものがある場合、添加物の製造に用いた当該微生物においては、同様の病原性や有害生理活性物質の産生等の有無について明らかであること。なお、有害生理活性物質等の産生が認められる場合には、当該微生物を用いた製造に安全性上の問題がないと判断できる合理的な理由があること。

6. なお、以下の事項は、議論の進み具合により必要となった際に提示する。

当該酵素およびその基原が、海外の主要国(※)の酵素リストに記載されていること。

(※) EU (仏国)、米国 (GRAS)、オーストラリア・ニュージーランド (FSANZ) それぞれの URL を以下に示す。

(仏国：加工助剤に関するリスト)

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000020667468>

(米国：GRAS Notice)

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>

(米国：21CFR Chapter I Subchapter-B)

<https://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/chapter-I/subchapter-B>

(FSANZ：Food Standards Code Schedule 18)

<https://www.legislation.gov.au/Series/F2015L00452>

C. 考察

この度の調査研究により、今後の成分規格作成候補品目の定義及び製法・本質の基原生物については、名簿の定義を基本としつつ、より現実的な規格案としていくことも留意すべきと考えられた。添加物酵素の基原種の同定、分類については、基原微生物の追加も視野に、調査結果を活用し公定書規格の質的向上を図っていきたい。

D. 謝辞

本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。

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29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の成分規格試験法に関する研究

～新規分析手法の導入に関する研究～

分担研究者 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 既存添加物の品質確保のためには、それぞれの品目に対して適した成分規格の設定が必要である。しかし、既存添加物は様々な生物や鉱物を基原としており、且つ、複雑な混合物であることも多く、従来の分析手法では成分規格を設定できない品目が多く残されている。本研究では、既存添加物の成分規格試験法の確立を目的に、新規分析法の開発、応用、導入を検討した。トマト色素及びアナトー色素については、主成分の市販標準品が流通していないため、別の安価な物質を標準とし、相対モル感度(RMS)を利用した HPLC による手法を検討した。その結果、成分規格試験法として十分な定量精度を有し、本法が導入可能であると考えられた。また、これまで我々は $^1\text{H-qNMR}$ を積極的に導入してきたが、新たに $^{13}\text{C-qNMR}$ の開発のための基礎的検討を行った。その結果、 $^{13}\text{C-qNMR}$ は $^1\text{H-qNMR}$ に比べて定量精度は劣るが、分解能が高く、混合物中の成分の直接定量が対応する標準品なしで可能であり、既存添加物の成分分析に有用な分析手法となり得ることがわかった。

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

中島 馨 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

成分規格が未設定である品目は、1.流通確認が取れないもの、2.基原・製法・本質が曖昧なもの、3.有効成分が解明できていないもの、4.現時点の科学技術で妥当な規格試験法が設定できないもの、に分類される。すなわち、1に該当するものを除き、2～4の問題を解決することが成分規格設定に必要である。また、既存添加物は様々な加工食品に使用されているが、成分規格が設定されていても古い、若しくは国際的に認められていないものも多く残されており、国外への輸出の障害となっている。よって、流通量が多いあるいは国外においても利用価値が高いと考えられる既存添加物については海外動向及び最新技術に基づく成分規格のアップデートが必要となっている。

前述の 4 に相当する現時点の科学技術の限界により成分規格が未設定の品目、国外においても使用される品目、成分規格が古い品目については、新規分析手法の導入による成分規格設定の可能性を検討する必要がある。また、近年、あらゆる分析値に対して国際単位系(SI)への計量計測トレーサビリティの確保が求められる

A. 研究目的

食品添加物の品質確保のため、各品目について成分規格が設定される。第9版食品添加物公定書には、指定添加物及び既存添加物の各品目の成分規格が記載されているが、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(令和2年2月26日以前の品目数))については、217品目(枝番品目込み)の成分規格が設定済である。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る。これらの品目の成分規格設定が急務とされている。

ようになってきていることから、食品添加物だけでなく医薬品等の公的な成分規格についても今後対応が必要とされることは明らかである。

本研究では、これまでも ^1H -qNMR (quantitative Nuclear Magnetic Resonance) の規格試験への積極的導入を行ってきたが、新たに ^{13}C -qNMR の開発のための基礎的検討を行った。また、相対モル感度(RMS (Relative Molar Sensitivity))を利用した新規分析手法の導入を検討した。

B. 研究方法

B-1) RMS を用いた分析法の導入

B-1-1) トマト色素中のリコペンの定量

分析に用いたリコペン及び定量用内標準物質としたスダン I は、現時点では共に純度既知の市販標準品の流通が確認できなかったため、該当する試薬を ^1H -qNMR で値付けして用いた (Fig. 1)。これらを HPLC に付し、検出波長 475 nm のクロマトグラム上に観察されたリコペンとスダン I のピーク面積を求めた (Table 1)。 ^1H -qNMR により得られた調製時の純度からリコペンとスダン I の正確なモル濃度を算出し、原点を通る絶対検量線をそれぞれ作成した。絶対検量線の(リコペンの傾き) \div (スダン I の傾き)から相対モル感度係数(RMS)を求めた。

次に、トマト色素製品を溶かした試料液を調製し、別に調製したスダン I を溶解した定量用内標準液を精密に加え、LC 定量用検液とした。LC 定量用検液を HPLC に付し、RMS を求めた条件と同一の条件で分析し、リコペンとスダン I のピーク面積、RMS の関係からリコペンの含量を求めた。

B-1-2) アナトー色素中の主色素成分の定量

アナトー色素中の主色素成分であるビキシン (Bx) 及びノルビキシン (Nb) の高純度の市販試薬は流通していないため、日本食品添加物協会を通じて得たアナトー色素製品の内、Bx 及び Nb を主成分とする製品 Bx1 及び Nb1 を ^1H -qNMR で値付けして代用とした (Fig. 2)。また、分析に用いた定量用内標準物質としたスダン I (S1) 及びスダン II (S2) は、現時点では共

に純度既知の市販標準品の流通が確認できなかったため、該当する試薬を ^1H -qNMR で値付けして用いた。

^1H -qNMR による値付けを行う際に調製した試料液の残液を正確に混合し、ビキシン混合標準液及びノルビキシン混合標準液を調製した。混合標準液を希釈し、HPLC に付し、検出波長 460 nm のクロマトグラム上に観察された Bx, Nb, S1 及び S2 のそれぞれのピーク面積を求めた (Table 2)。それぞれの原点を通る絶対検量線の傾きの比から対応する RMS を求めた。

次に、アナトー色素製品を溶かした試料液と別に調製した S1 及び S2 を一定量精密に溶解した定量用内標準液を正確に混合し、LC 定量用検液とした。LC 定量用検液を HPLC に付し、RMS を求めた条件と同一の条件で分析し、それぞれのピーク面積、RMS の関係から Bx 及び Nb の含量を求めた。

B-2) ^{13}C -qNMR に関する基礎的検討

核磁気共鳴装置(NMR)にはオートサンプラー付き JNM-ECZ600 (CH UltraCOOL probe)、オートサンプラー付き JNM-ECA800 (CH probe) を用いた。

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-BTMSB- d_4 標準物質(純度 $99.9 \pm 0.5\%$)、DMSO2 標準物質(純度 $99.7 \pm 0.7\%$)を用いた。qNMR 測定溶媒には acetone- d_6 及び DMSO- d_6 を用いた。試料には diethyl phthalate (DEP) 標準物質(純度 $99.98 \pm 0.01\%$)、benzoic acid (BA), rutin trihydrate (Rutin) (^1H -qNMR より anhydrate としての純度 $90.2 \pm 0.3\%$ ¹⁾), quercetin xH₂O (Quercetin) (^1H -qNMR より anhydrate としての純度 $92.8 \pm 0.02\%$ ¹⁾)を用いた。これら純度既知の物質を用い調製した試料液を NMR に付し、 ^{13}C -qNMR の定量性に関係すると考えられる各種パラメータを変化させ、その影響を観察した。

C. 結果及び考察

C-1) RMS を用いた分析法の導入

C-1-1) トマト色素中のリコペンの定量

相対モル感度係数(RMS)に利用する定量用内標準物質の条件として、安価、高純度、純度既知、安定、入手しやすい、測定対象と物理的特性、極性、極大吸収波長が近く、また、試料そのものに含まれず、HPLCで夾雑物及び測定対象と分離する、などが挙げられる。スダンIは測定対象であるリコペンの物理的特性に類似しており、前述の条件にほぼ合致する化合物であったため、これをRMSによる定量用内標準物質として用いることとした。

スダンI及びリコペンは純度既知の市販標準品が販売されていない。さらにリコペンは非常に不安定であるため、調製中の分解や保存中の濃度低下が懸念される。このため、両物質を混合した液を調製し、 ^1H qNMRにより混合液中の精確なモル濃度を直ちに求め、その後、混合液を希釈してHPLCに付し、両物質の絶対検量線を作成してRMSを決定する手順をとった。

検出波長475 nmのHPLCに付し、リコペンとスダンIのピーク面積を求め、それぞれ原点を通る絶対検量線を作成し、傾きの比より $\text{RMS} = 9.857 [\text{mol/mol}]$ を求めた。次に、トマト色素製品にスダンIを一定量添加したLC定量用検液を調製し、HPLCに付し、リコペンとスダンIのピーク面積を求め、RMS、LC定量用検液中の添加したスダンIの絶対濃度との関係から製品中のリコペン含有量を計算した(Table 3)。その結果、粉末試料では69~81%、液状試料で2~7%だった。リコペンの絶対検量線から求めた含有量と比較したところ、ほぼ同等の値が得られ、RMSと絶対検量線の定量値の残差% $(= (\text{RMS 定量値} - \text{検量線定量値}) / \text{検量線定量値} \times 100)$ は4%以内であることが確認された。

以上、RMSを利用したHPLCによるリコペンの定量法が成分規格試験法として機能すると判断できる結果であった。

C-1-2) アナト一色素中の主色素成分の定量

絶対検量線法、RMSによる方法を用い、アナト一色素製品中のBx及びNb濃度を求めた。絶対検量線法とRMSによる方法から求めた含有量と比較したところ、同等の値が得られ残差% $(= (\text{RMS 定量値} - \text{検量線定量値}) / \text{検量線}$

定量値 $\times 100)$ は3%以内であった。また、流速1.0 mL/minと1.4 mL/minでの定量値は殆ど等しいことから、保持時間の変化は定量値に影響しないことが示唆された(Table 4)。

今回、内標準物質にS1及びS2の2種を用いたが、定量結果は同じであったので、食品添加物公定書の定量法として採用することを想定した場合、BxとNbの間に溶出する保持時間の短いS1が内標準物質として適当であると考えられた。

C-2) ^{13}C -qNMRに関する基礎的検討

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。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と短く、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直接定量が困難である。

^1H -qNMRのこ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。一方、 ^{13}C -NMRは ^1H -NMRに比べて感度が非常に悪く、通常の測定条件では定量性に乏しいという問題がある。本研究では、 ^{13}C -NMRに高い定量性を付与し、 ^{13}C -qNMRの手法を確立させるための基礎検討を行った。定量性の向上に関係すると考えられるパラメータ、すなわち、データポイント数、パルス繰り返し時間、積算回数、位相及びベースライン補正、積分範囲、ゼロフィリング等について検討した。

純度既知の標準物質1,4-BTMSB-*d*₄、DMSO₂及びDEPを用い、各種パラメータの最適化を行った。その結果、 ^{13}C -qNMRでは約5%のばらつきを含む定量値が得られるようになった。従って、

精密な定量分析には化合物の純度決定には適さないと考えられた。

一方、 ^{13}C -qNMRにより、Quercetinとその配糖体であるRutinに定量分析を行った結果から、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た。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。

D. 結論

本研究では、今後、新規分析手法を既存添加物の成分規格試験法に導入していくために、RMSの応用及び ^{13}C -qNMRの基礎的検討を行った。

RMSの応用では、トマト色素中のリコペン、アナトー色素中のビキシン及びノルビキシンが簡便且つ精確に定量可能であることが確認できた。リコペン、ビキシン及びノルビキシンの純度既知の標準品は流通しておらず、また将来流通が期待できない。通常のHPLC分析にRMSを利用することで、これらの標準品を必要としない定量試験法が設定できる点において非常に優れた方法である。

^{13}C -qNMRの基礎的検討では、測定条件を最適化することによって、5%程度のばらつきを伴った定量値を算出可能となった。精度向上は今後の課題ではあるが、天然物、類似化合物等の混合物をそれぞれの標準品を必要とせず直接定量できる。既存添加物の成分にはそれに対応する標準品又は試薬が得られないことが多い。このため、成分の含量情報が不足し、成分規格の設定に関する議論が難航することが多かったが、 ^{13}C -qNMRを応用することによって、この問題が解決できると期待できる。

E. 参考文献

- 1) 第8版食品添加物公定書，厚生労働省(2007).
- 2) 第9版食品添加物公定書，厚生労働省(2017).
- 3) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書，日

本添加物協会(1999).

- 4) 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, 山崎壮, 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).
- 5)

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 石附京子, 西崎雄三, 多田敦子, 箕川剛, 中島光一, 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) 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および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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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).

- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) Sugimoto N: qNMR in Japan's Specification and standards for food additives. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
- 11) Sugimoto N: Overview of the Introductory Meeting on qNMR. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 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).
- 19) Sugimoto N: Overview of food additive regulation in Japan. 1st TISTR and JAIMA conjoint conference (2018.11).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) 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).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 26) 末松孝子, 小松孝典, 細江潤子, 内山奈穂子, 三浦亨, 鈴木裕樹, 山田裕子, 五十嵐靖, 丸山剛史, 嶋田典基, 日向野太郎, 杉本直樹, 合田幸広: 定量NMR法における試料調製条件の一考察: 吸湿性試薬の場合. 第86回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第110回計測自動制御学会力学量計測部会, 第36回合同シンポジウム(2019.6).
- 27) 増本直子, 西崎雄三, 丸山剛史, 五十嵐靖, 中島馨, 細江潤子, 内山奈穂子, 高岡真也, 吉田佐奈枝, 三浦亨, 山田裕子, 日向野太郎, 末松孝子, 小松功典, 嶋田典基, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子, 合田幸広: 指標成分ペリルアルデヒドの易分解性を考慮した局方生薬ソヨウの新しい分析法. 第86回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第110回計測自動制御学会力学量計測部会, 第36回合同シンポジウム(2019.6).
- 28) 合田幸広, 小出達夫, 細江潤子, 内山奈穂子, 杉本直樹, 村林美香, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 清水仁, 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, 朝倉克夫, 末松孝子: 定量NMRは, マスバランス法より標準物質の定量においてより経済的である. 第86回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第110回計測自動制御学会力学量計測部会, 第36回合同シンポジウム(2019.6).
- 29) 高橋未来, 高木映里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: カテキン類の一斉分析を目指したシングルリファレンスHPLC定量法の開発. 食品化学学会第25回総会・学術大会(2019.6).
- 30) 松岡聖朗, 大槻崇, 藤裕志郎, 松下明里, 松田美優, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛: ^1H -qNMRに基づく相対モル感度を用いたゴマ若葉抽出物等に含まれるアクテオシドの定量について. 食品化学学会第25回総会・学術大会(2019.6).
- 31) 小泉茉友, 中島馨, 増本直子, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 杉本直樹, 佐藤恭子: 標品不要! ステビオール配糖体の一斉定量分析. 第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9).
- 32) 酒井有希, 増本直子, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 機能性表示食品中のルテインのSIトレーサブルな定量分析法の検討. 第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9).
- 33) 長久保直也, 建部千絵, 石附京子, 増本直子, 大槻崇, 松藤寛, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: Single Reference HPLC法を用いた食用タール色素中の不純物の定量. 第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9).
- 34) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 五十嵐靖, 丸山剛史, 三浦亨, 水井浩司, 山田裕子, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした定量NMRを用いたエボジアミン及びマンギフェリンの絶対純度の測定. 日本生薬学会第66回年会(2019.9).
- 35) Uchiyama N, Masumoto N, Hosoe J, Sugimoto N, Maruyama T, Igarashi Y, Suematsu T, Komatsu T, Yamada Y, Takaoka S, Miura T, Mizui K, Higano T, Shimada N, Goda Y: Determination of perillaldehyde in perilla herbs based on relative molar sensitivity (RMS) using a combination of ^1H -quantitative NMR and HPLC/UV. GA2019 (67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research) (2019.9).
- 36) Miura T, Sugimoto N, Suematsu T: General rules for quantitative NMR spectroscopy (JIS K0138:2018). qNMR summit 2019 (2019.10).
- 37) Saito T, Suematsu T, Sugimoto N: Progress in proposal of an ISO standard for purity

assessment by qNMR. qNMR summit 2019 (2019.10).

- 38) Nishizaki Y: External Standardization in qNMR. qNMR summit 2019 (2019.10).
- 39) 石附京子, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物規格基準データベースの作成と公開. 第56回全国衛生化学技術協議会年会(2019.12).
- 40) 多田敦子, 堀江正一, 関戸晴子, 橋口成喜, 小林千種, 杉浦潤, 大槻崇, 中島安基江, 濟田清隆, 久保田浩樹, 建部千絵, 柳本登紀子, 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(平成30年度). 第56回全国衛生化学技術協議会年会(2019.12)
- 41) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 小出達夫, 村林美香, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 大藤克也, 清水仁, 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, 大原拓郎, 山田裕子, 鈴木裕樹, 三浦亨, 水井浩司, 朝倉克夫, 末松孝子, 小浜亜以, 合田幸広: 日本薬局方外標準品インドシアニングリーンの恒温恒湿下における定量NMR (qNMR)を用いた絶対純度. 日本定量NMR研究会(2019.12).
- 42) 増本直子, 中島馨, 小泉茉友, 大内政輝, 西崎雄三, 石附京子, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 杉本直樹, 佐藤恭子: Single-reference HPLC法によるステビオール配糖体の一斉定量. 日本定量NMR研究会 (2019.12).
- 43) 西崎雄三: NMR分析における外部標準法の有効性と分析値にバラつきを与える要因の整理. 日本定量NMR研究会 (2019.12).
- 44) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 石附京子, 丸山剛史, 五十嵐靖, 三浦亨, 山田裕子, 水井浩司, 高岡伸也, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした定量NMRを用いた吸湿性化合物の絶対純度の測定. 日本薬学会第140年会(2020.3).
- 45) 天倉吉章, 好村守生, 村井望, 重松優里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐

藤恭子: 既存添加物レイシ抽出物及びカキ色素の成分解析. 日本薬学会第140年会 (2020.3).

2. 論文発表

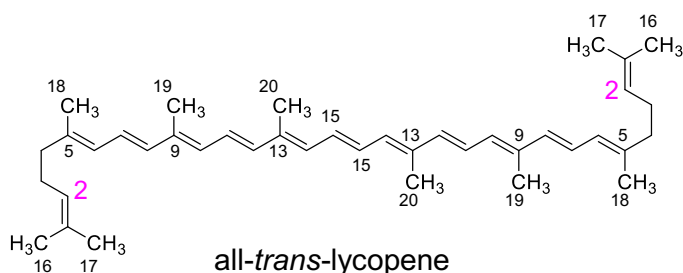
- 1) Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N: Kinetic Study of the Equilibration between Carminic Acid and Its Two Isomers Isolated from Cochineal Dye. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*, 306-310.
- 2) 島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈拵, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 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 (2017).
- 4) 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.
- 5) 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
- 6) 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 および 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.
- 7) 西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドウ, 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およ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 (2018).
- 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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*, **2018**; *138*: 551-557.
 - 11) 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.*, **2018**; *35*: 838-847.
 - 12) 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*, **2018**; *184*: 484-490.
 - 13) 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*, **2018**; *25*: 105-113.
 - 14) 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 中島馨, 杉本直樹, 多田敦子, 曹永暁, 小川久美子, 佐藤恭子: 香料 2,4-ジメチル-4-フェニルテトラヒドロフランの異性体存在比の決定. *食品化学学会誌*, **2019**; *26*: 63-67.
 - 15) Masumoto N, Nishizaki Y, Maruyama T, Igarashi Y, Nakajima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K: Determination of perillaldehyde in perilla herbs using relative molar sensitivity to single-reference diphenyl sulfone. *J. Nat. Med.*, **2019**; *73*: 566-576.
 - 16) Suwannarach N, Kumla J, Nishizaki Y, Sugimoto N, Meerak J, Matsui K, Lumyong S: Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2019**; *103*: 6973-6987.
 - 17) Nishizaki Y, Masumoto N, Nakajima K, Ishizuki K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K.: Relative molar sensitivities of carnosol and carnosic acid with respect to diphenylamine allow accurate quantification of antioxidants in rosemary extract. *Food Add. Contam., A.* **2019**; *36*: 203-211.
 - 18) 水本俊行, 中野扶佐子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 相対モル感度を利用したヒハツ抽出物中のピペリン類の HPLC 定量分析. *食衛誌*, **2019**; *60*: 134-144.
3. 総説
- 1) 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 食品分析の信頼性確保における定量NMRに基づく相対モル感度の役割—分析種の定量用標品不要なクロマトグラフィーの開発—. *FFIジャーナル*, **2019**; *224*: 123-130.
4. 単行本

- 1) Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: Application of ^1H -Quantitative NMR From the Viewpoint of Regulatory Science. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, **2019**, (DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14681-5).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

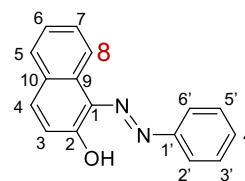


all-trans-lycopene

Chemical Formula: $C_{40}H_{56}$

Exact Mass: 536.438

Molecular Weight: 536.888



sudan I

Chemical Formula: $C_{16}H_{12}N_2O$

Exact Mass: 248.095

Molecular Weight: 248.285

Fig. 1 リコペンとスダン I の構造

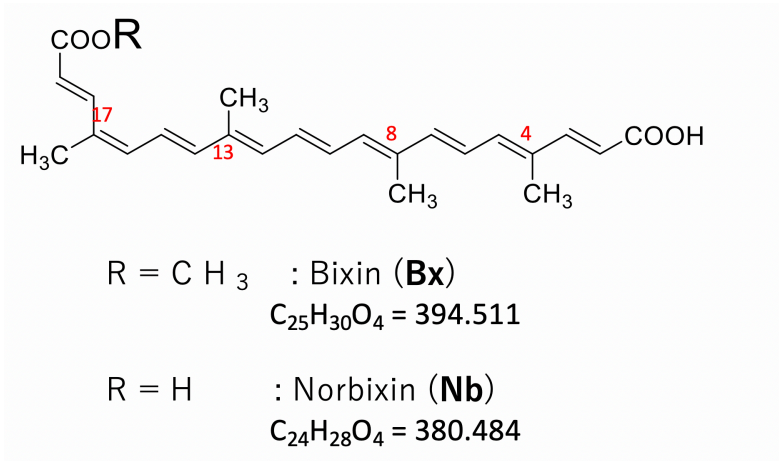


Fig. 2 ビキシンとノルビキシンの構造

Table 1 トマト色素製品中のリコペン分析用 HPLC 測定条件

HPLC	Waters LC : Alliance 2695, PDA : 2996 photodiode array detector
column	SunFire C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm, Waters)
column temp.	40°C
solvent	isocratic CH ₃ CN/EtOH (7:3), 30 min
flow rate	0.5 mL/min
PDA scan	200–700 nm (resolution 1.2 nm), detect 475 nm
sample temp.	4°C
injection volume	10 μL

Table 2 アナトー色素製品中のビキシシ及びノルビキシシ分析用 HPLC 測定条件

HPLC	Waters LC: Alliance 2695, PDA: 2996 photodiode array detector
Column	Inertsil ODS-4 (4.6×250 mm, 5µm, GL Sciences)
Column temp.	35°C
Solvent	isocratic 2% acetic acid aq.: CH ₃ CN (35 : 65)
Flow rate	1.0 or 1.4 mL/min
PDA scan	190-600 nm,
PDA detect	460 nm (±4 nm), smoothing (±3 scans x 2 times)
Sample temp.	10°C
Injection volume	10 µL

Table 3 RMS 法, および絶対検量線法により求めたトマト色素製品中のリコペン含有量(%)

Sample No.	lycopene area A _L	sudan I area A _S	採取量 W(mg)	定容量 V(mL)	希釈率 F	単位補正	RMS 法 (t _{d3} ~5, LV0~LV5, 原点通す) = 9.857				リコペン絶対検量線 法 (t _{d3} ~5, LV0~LV5, 原点通す)				残差%= RMS-検量線 / 検量線 × 100		
							C _S (m _{mol} /mL)	C _I (m _{mol} /mL)	含有量 (%)	AVR	STDEV	CV%	含有量 (%)	AVR		STDEV	CV%
A1155-n1	31634	11565	78.5650	25	250	100	5.40.E-06	1.500.E-06	6.40	AVR	6.35	1.49E-06	6.38	AVR	6.28	0.45	
A1155-n2	30427	11535	83.1612	25	250	100	5.40.E-06	1.446.E-06	5.83	STDEV	0.48	1.44E-06	5.79	STDEV	0.45	0.71	
A1155-n3	33008	11416	78.2514	25	250	100	5.40.E-06	1.585.E-06	6.80	CV%	7.63	1.56E-06	6.68	CV%	7.16	1.76	
A1201-n1	33488	11459	6.3519	25	250	100	5.40.E-06	1.602.E-06	84.64	AVR	81.3	1.58E-06	83.49	AVR	81.2	1.38	
A1201-n2	28473	11579	5.5922	25	250	100	5.40.E-06	1.348.E-06	80.90	STDEV	3.10	1.34E-06	80.63	STDEV	2.08	0.33	
A1201-n3	32149	11758	6.4088	25	250	100	5.40.E-06	1.499.E-06	78.49	CV%	3.81	1.52E-06	79.44	CV%	2.56	-1.20	
A1205-n1	43902	11740	10.8550	25	250	100	5.40.E-06	2.050.E-06	63.37	AVR	68.9	2.07E-06	64.05	AVR	68.3	-1.05	
A1205-n2	38281	11489	8.7242	25	250	100	5.40.E-06	1.827.E-06	70.26	STDEV	4.96	1.81E-06	69.48	STDEV	3.75	1.11	
A1205-n3	42404	11337	9.4262	25	250	100	5.40.E-06	2.050.E-06	72.99	CV%	7.20	2.00E-06	71.24	CV%	5.49	2.46	
A1206-n1	30136	11771	76.0766	25	250	100	5.40.E-06	1.404.E-06	6.19	AVR	6.56	1.42E-06	6.27	AVR	6.58	-1.31	
A1206-n2	30524	11592	73.1241	25	250	100	5.40.E-06	1.444.E-06	6.62	STDEV	0.34	1.44E-06	6.61	STDEV	0.29	0.22	
A1206-n3	32610	11581	75.4481	25	250	100	5.40.E-06	1.544.E-06	6.87	CV%	5.21	1.54E-06	6.84	CV%	4.37	0.31	
A1207-n11	18842	11685	161.99	100	62.5	100	5.40.E-06	8.841.E-07	1.73	AVR	1.82	8.89E-07	1.84	AVR	1.82	-0.58	
A1207-n12	29448	11544	262.52	100	62.5	100	5.40.E-06	1.399.E-06	1.79	STDEV	0.02	1.39E-06	1.78	STDEV	0.04	0.63	
A1207-n13	26705	11633	230.76	100	62.5	100	5.40.E-06	1.258.E-06	1.83	CV%	1.37	1.26E-06	1.83	CV%	1.95	-0.14	
A1208-n1	30052	12094	6.9338	25	250	100	5.40.E-06	1.362.E-06	65.93	AVR	79.1	1.42E-06	68.63	AVR	79.4	-3.95	
A1208-n2	36374	11740	7.0516	25	250	100	5.40.E-06	1.699.E-06	80.83	STDEV	7.10	1.72E-06	81.68	STDEV	5.76	-1.05	
A1208-n3	41766	11687	8.4429	25	250	100	5.40.E-06	1.959.E-06	77.86	CV%	8.97	1.97E-06	78.34	CV%	7.25	(n3)	
A1208-n4	31327	11616	6.1065	25	250	100	5.40.E-06	1.478.E-06	81.24			(n3)	83.4	1.48E-06	81.24	82.5	0.01
A1208-n5	34225	11440	6.3314	25	250	100	5.40.E-06	1.640.E-06	86.93			3.10	1.62E-06	85.60		2.71	1.55
A1208-n6	31158	11431	6.1185	25	250	100	5.40.E-06	1.494.E-06	81.95			3.71	1.47E-06	80.64		3.28	1.63

*AXXXX = 製品試料番号, -nX = 測定回数

Table 4 RMS 法, および絶対検量線法により求めたアナトー色素製品中のビキシシ(Bx)及びノルビキシシ(Nb)の含有量(%)

Sample No.	Labeled main component	Property	RMS method with sudan I (S1)						RMS method with sudan II (S2)						Absolute calibration curve method					
			Content of bixin (Bx) (%)			Content of norbixin (Nb) (%)			Content of bixin (Bx) (%)			Content of norbixin (Nb) (%)			Content of bixin (Bx) (%)			Content of norbixin (Nb) (%)		
AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%
Bx1	Bixin	Powder	71.95	0.12	0.2	1.39	0.01	0.4	71.80	0.20	0.3	1.39	0.01	0.4	71.40	0.05	0.1	1.38	0.01	0.5
Bx2	Bixin	Liquid	6.62	0.02	0.2	0.12	0.00	0.8	6.57	0.02	0.3	0.12	0.00	0.7	6.72	0.01	0.1	0.12	0.00	0.7
Bx3	Bixin	Powder	92.40	0.55	0.6	1.72	0.02	1.0	91.88	0.73	0.8	1.71	0.02	1.3	93.75	0.54	0.6	1.75	0.01	0.6
Bx4	(Bixin)	Liquid	2.58	0.02	0.7	0.03	0.00	1.4	2.57	0.02	0.9	0.03	0.00	1.6	2.61	0.03	1.3	0.03	0.00	1.7
Bx5	Bixin	Powder	14.45	0.07	0.5	0.33	0.03	9.7	14.40	0.07	0.5	0.33	0.03	9.6	14.68	0.08	0.5	0.34	0.03	9.6
Bx6	Bixin	Powder	3.86	0.04	1.0	0.04	0.00	1.7	3.86	0.04	1.0	0.04	0.00	1.7	3.93	0.04	1.0	0.04	0.00	1.7
Bx7	Bixin	Powder	6.89	0.08	0.9	1.91	0.16	8.6	6.88	0.10	1.1	1.90	0.16	8.6	9.08	0.09	1.0	1.95	0.17	8.7
Bx8	Bixin	Powder	83.27	0.98	1.2	1.27	0.00	0.3	83.09	0.99	1.2	1.27	0.00	0.3	82.36	0.78	0.9	1.26	0.00	0.3
Bx9	Bixin	Powder	70.71	0.63	0.9	0.69	0.03	3.8	70.67	0.61	0.9	0.69	0.03	3.7	70.12	0.48	0.7	0.69	0.03	3.8
Nb1	Norbixin	Powder	1.26	0.11	8.4	71.66	0.47	0.7	1.25	0.11	8.4	71.32	0.38	0.5	1.25	0.10	8.4	71.29	0.53	0.7
Nb2	Norbixin	Powder	0.01	0.00	8.4	16.35	0.12	0.7	0.01	0.00	8.5	16.29	0.11	0.7	0.01	0.00	8.6	16.52	0.10	0.6
Nb3	Norbixin	Powder	ND	ND	ND	19.07	0.76	4.0	ND	ND	ND	19.02	0.76	4.0	ND	ND	ND	19.25	0.79	4.1
Nb4	Norbixin	Powder	ND	ND	ND	38.29	0.28	0.7	ND	ND	ND	38.15	0.30	0.8	ND	ND	ND	38.54	0.51	1.3
Nb5	Norbixin	Powder	0.02	0.00	2.0	23.66	1.01	4.3	0.02	0.00	1.9	23.54	1.03	4.4	0.02	0.00	1.9	24.04	1.05	4.4
Nb6	Norbixin	Powder	0.04	0.00	11.3	13.71	0.05	0.3	0.04	0.00	11.3	13.65	0.05	0.3	0.04	0.00	11.7	13.82	0.01	0.1
Nb7	Norbixin	Powder	ND	ND	ND	19.44	0.19	1.0	ND	ND	ND	19.37	0.20	1.1	ND	ND	ND	19.58	0.18	0.9
Nb8	(Norbixin)	Liquid	ND	ND	ND	2.02	0.01	0.5	ND	ND	ND	2.02	0.01	0.4	ND	ND	ND	2.05	0.02	1.0
Nb9	Norbixin	Powder	ND	ND	ND	36.28	1.84	5.1	ND	ND	ND	36.13	1.86	5.1	ND	ND	ND	36.27	1.85	5.1
Nb10	Norbixin	Powder	1.10	0.03	2.3	34.02	0.67	2.0	1.09	0.03	2.4	33.92	0.69	2.0	1.10	0.02	2.1	34.20	0.66	1.9
Nb11	Norbixin	Powder	ND	ND	ND	33.02	0.13	0.4	ND	ND	ND	32.90	0.17	0.5	ND	ND	ND	33.32	0.04	0.1
Nb12	(Norbixin)	Powder	0.92	0.00	0.3	33.49	0.17	0.5	0.91	0.00	0.5	33.40	0.11	0.3	0.91	0.00	0.4	33.37	0.16	0.5
Nb13	Norbixin	Powder	ND	ND	ND	26.36	0.04	0.2	ND	ND	ND	26.30	0.03	0.1	ND	ND	ND	26.43	0.11	0.4
Nb14	Norbixin	Powder	ND	ND	ND	32.31	0.24	0.7	ND	ND	ND	32.17	0.22	0.7	ND	ND	ND	32.15	0.30	0.9
Nb15	(Norbixin)	Powder	ND	ND	ND	35.36	0.42	1.2	ND	ND	ND	35.17	0.50	1.4	ND	ND	ND	35.29	0.58	1.6
Nb16	Norbixin	Powder	1.09	0.01	0.6	33.24	0.19	0.6	1.09	0.01	0.6	33.18	0.20	0.6	1.09	0.01	0.6	33.20	0.19	0.6
Nb17	Norbixin	Powder	4.70	0.03	0.7	56.16	0.24	0.4	4.68	0.03	0.7	55.94	0.24	0.4	4.70	0.03	0.7	56.16	0.22	0.4
Nb18	Norbixin	Powder	1.11	0.31	27.9	71.42	0.57	0.8	1.10	0.31	27.9	71.25	0.71	1.0	1.11	0.31	28.0	71.77	0.49	0.7

*Bx1~Bx9 = ビキシシ(Bx)を主色素成分とする製品, Nb1~Nb18 = ノルビキシシ(Nb)を主色素成分とする製品。