

**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**

既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

平成 26～28 年度 総合研究報告書

| | | |
|--------------|--------------|---------------------|
| 研究代表者 | 穂山浩 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 研究分担者 | 天倉吉章 | 松山大学 |
| | 多田敦子 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| | 杉本直樹 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| | 受田浩之 | 高知大学 |
| | 井之上浩一 | 立命館大学 |
| | 永津明人 | 金城学院大学 |

平成 29(2017)年 3 月

目次

総合研究報告書

1. 既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
研究代表者 : 穂山浩 1

2. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究
研究協力者 : 日本食品添加物協会 29

3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究 41
研究分担者 : 天倉吉章
研究協力者 : 好村守生
研究協力者 : 杉脇秀美

4. 既存添加物の有効成分に関する研究 45
研究分担者 : 多田敦子
研究協力者 : 杉本直樹
研究協力者 : 西崎雄三
研究協力者 : 石附京子
研究協力者 : 受田浩之
研究協力者 : 島村智子
研究協力者 : 田邊思帆里
研究協力者 : 佐藤恭子
研究協力者 : 建部千絵
研究協力者 : 河崎裕美
研究協力者 : 加藤智久
研究協力者 : 松田 諭

| | |
|--------------------------------|-----|
| 5. 既存添加物の成分規格試験法の検討 | 49 |
| 研究分担者 : 杉本直樹 | |
| 研究協力者 : 多田敦子 | |
| 研究協力者 : 西崎雄三 | |
| 研究協力者 : 石附京子 | |
| 6. 既存添加物の基原の解析に関する検討 | 57 |
| 研究協力者 : 西崎雄三 | |
| 研究協力者 : 杉本直樹 | |
| 7. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究 | 61 |
| 研究分担者 : 受田浩之 | |
| 研究協力者 : 杉本直樹 | |
| 研究協力者 : 島村智子 | |
| 8. 既存添加物の含有成分解析に関する研究 | 67 |
| 研究分担者 : 井之上浩一 | |
| 9. NMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究 | 85 |
| 研究分担者 : 永津明人 | |
| . 研究成果の刊行に関する一覧表 | 107 |

既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

研究代表者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨

(1) 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

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

(2) 含有成分解析と成分規格試験法の検討

既存添加物名簿に記載されている生コーヒー豆抽出物、ゲンチアナ抽出物、モウソウチク抽出物、カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として、製品中の含有成分について精査した。各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、生コーヒー豆抽出物から 19 種の化合物を単離、構造解析し、主検出成分を明らかにした。また DPPH ラジカル消去活性を指標に有効成分について考察した。ゲンチアナ抽出物からは 17 種の化合物を単離、構造解析し、主成分、定性試験、定量分析について提案した。モウソウチク抽出物からは 12 種の化合物を単離、構造解析し、主検出成分について考察した。カキ色素については、縮合型タンニン高分子画分の存在が示唆されたため、製品中の平均分子量について検討した。これら結果に基づき、各添加物製品含有成分について、化学的特徴を考察することができた。

既存添加物等の成分規格試験法を設定あるいは改正するために必要な情報を得る目的で、一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索、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、未指定添加物「耐酸性カルミン」の主色素成分の化学構造の完全帰属、今後流通が懸念される未指定添加物「耐酸性ラック色素」の主色素成分の合成を行った。

第 8 版食品添加物公定書または日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第 4 版）」に記載されている既存添加物について、成分規格作成を実施した。対象物質は、ムラサキイモ色素・ムラサキヤマイモ色素、クチナシ黄色素、ゴマ油不けん化物、ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素である。結果として、ムラサキイモ色素、クチナシ黄色素、ゴマ油不けん化合物、ベニコウジ黄色素については、本分析法により含有成分の評価が可能であると考えられる。その他については異なる分析法の再検討が必要であると考えられた。

規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、¹H-qNMR 法(定量 ¹H-NMR 法)が試験法として適用可能であるか明らかにする目的で研究を行った。すなわち、適用の可能性の有無の判断と、可能性があるものに関しては実際に適用する場合の測定条件の確立を目的とした。「ヤマモモ抽出物」「グルコサミン」「クローブ抽出物」「ベニバナ赤色素」、「ベニバナ黄色素」に関する適用条件を探索した。「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の純度は、

認証標準物質として PHP，仲介物質として HMD を用い，methanol- d_4 中で測定したスペクトルの 6 位または 8 位の水素シグナル面積から測定可能可能であることを示した。「グルコサミン」中の glucosamine の純度は，DSS- d_6 を直接内部標準として用い， D_2O 中で測定したスペクトルの 2 つのアノマーの 2 位の水素シグナル面積の和から測定可能であることを示した。「クローブ抽出物」中の eugenol の定量では，「クローブ抽出物」の acetone- d_6 懸濁液上清に認証標準物質である 1,4-BTMSB- d_4 の DMSO- d_6 溶液を加えて測定し，1,4-BTMSB- d_4 のトリメチルシリル基のシグナルと eugenol の 2 位の H シグナルのシグナル面積を比較することで定量可能であることを確認した。「ベニバナ赤色素」，「ベニバナ黄色素」では，定量用標準品が手に入らないことから，まずそれらの本体である carthamin および safflor yellow 類の個々の化合物の単離精製から行っている。

(3) 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

各種抗酸化活性測定法の既存添加物の抗酸化力価評価への適用性を検討し，1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法に関する複数機関での評価研究を行い，最終的に DPPH 法を標準法の候補として選出した。DPPH 法と酸素ラジカル吸収能 (Oxygen radical absorbance capacity: ORAC) 法との比較を行うとともに，DPPH 法に基づく一般試験法案を作成し，その適用性，ならびに再現性に関する確認を行った。試験の結果より，酸化防止剤中の主要抗酸化成分の基本構造により DPPH 法と ORAC 法に対する応答が異なることが判明した。また，DPPH 法に基づく一般試験法案のトロックス，及び酸化防止剤への適用性，ならびに再現性に問題がないことを確認した。

(4) 日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討

既存添加物の有効成分に関する研究として，「ジャマイカカシア抽出物」の有効成分の新規定量分析法の検討，「クエルセチン」の定量法確立のための検討，粘度測定法に関する検討，「カンゾウ油性抽出物」の抗酸化成分の分離，解析及び単離・同定に関する研究，「カワヨモギ抽出物」の有効成分である抗菌活性成分の定量法の開発に関する研究を行った。

(5) 酵素の基原の解析法の確立 既存添加物の基原に由来する遺伝子の塩基配列情報を指標にして，国際塩基配列データベースとの照合結果から種を同定あるいは推定する方法について検討した。既存添加物酵素 67 品目の微生物由来の基原について，指標となる遺伝子が国際塩基配列データベースに登録されているかどうか調査し情報を整理した。また既存添加物酵素「アルギン酸リアーゼ」の生産菌 *Flavobacterium multivorum* について，検討した DNA を指標にした同定法を実施したところ，*Flavibacterium* 属の新種の可能性が高い *Flavobacterium* sp. と推定された。

研究分担者

天倉 吉章 松山大学薬学部 教授
 多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所
 室長
 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所
 室長

受田 浩之 高知大学教育研究部自然科学
 系生命環境医学部門 教授
 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授
 永津 明人 金城学院大学薬学部 教授

研究協力者

上田 要一 日本食品添加物協会 専務理事

| | |
|-------|----------------------------|
| 森 将人 | 日本食品添加物協会 常務理事 |
| 佐藤 恭子 | 国立医薬品食品衛生研究所 部長 |
| 建部 千絵 | 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官 |
| 大槻 崇 | 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官 |
| 西崎 雄三 | 国立医薬品食品衛生研究所 研究員 |
| 石附 京子 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 河崎裕美 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 加藤智久 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 松田 諭 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 好村 守生 | 松山大学薬学部 講師 |
| 杉脇 秀美 | 松山大学薬学部 嘱託職員 |
| 島村 智子 | 高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 准教授 |
| 細谷 孝博 | 静岡県立大学食品栄養科学部 助教 |
| 小出 知己 | 株式会社テクノスルガ・ラボ |
| 卯津羅健作 | ナガセケムテックス株式会社 |

A. 研究目的

既存添加物 365 品目のうち、国の成分規格設定済は約 130 品目にとどまっている。現在検討中の第 9 版公定書には酵素 62 品目を含む 87 品目が新規既存添加物として収載される予定である。しかし依然として約 140 品目の成分規格が未設定である。また自主規格が定められている品目に関しても規格の内容が不十分で信頼性が低いと考えられ、さらに添加物としての有効性と有効成分自体が明確でない品目や流通実態が不明確な品目がある。これは成分分析や基原等の解析において高度な科学的解析手法が必要な場合がある故に規格設定が困難であると考えられる。

本研究では、国の成分規格が設定されていない既存添加物約 140 品目について、流通実

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

B. 研究方法

1. 成分規格未設定の既存添加物の現状整理：

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

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

2) 10 版公定書に向けた検証用規格の見直し及び裏付け試験

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

3) 既存添加物の第 5 版自主規格に向けた成分規格の検討

検証用とできなかった品目について、成分規格が設定可能なものから自主規格案を作成するとともに、規格設定の根拠となる関連

情報(海外規格を含む各種規格との対比)を調査した。

4) 既存添加物の品目ごとの基原生物の調査

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

2. 含有成分解析と成分規格試験法の検討：

成分規格未設定の品目(生コーヒー豆抽出物、モウソウチク抽出物、クチナシ青色色素、ムラサキイモ色素、チコリ色素、クエルセチン、グルコサミン、ヤマモモ抽出物、生コーヒー豆抽出物、モウソウチク抽出物、ベニバナ赤色素、ベニバナ黄色素)について機器分析を用いて含有成分を解析した。有効成分(指標成分)の標準品設定のため、定量NMR(quantitative NMR: qNMR)を利用した純度検定等を行った。

3.天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究：

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

4.日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討：

既存添加物カワラヨモギ抽出物流通製品を用い、乾燥減量試験法の開発、LC/UV 及び LC/MS による定量法の開発を行った。qNMR を応用し、カピリン単離標品の正確な純度を求め、また添加物製品についても、カピリン標品を使用しない qNMR による直接定量を行った。

5.酵素の基原の解析法の確立：

既存添加物アルギン酸リアーゼの生産菌である細菌 *Sphingobacterium multivorum* の 71/58 株から抽出した DNA を鋳型として、16S rDNA

塩基配列解析を行った。DB-BA11.0(株)テクノスルガ・ラボ)や国際塩基配列データベースを用いて相同性解析を行った。

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

倫理面への配慮

特になし

C・D 研究結果及び考察

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

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

2) 10 版公定書に向けた検証用成分規格の見直し及び裏付け試験

第10版公定書に向けて作成した成分規格検証用の規格案、関連資料を見直し、改正した。また検証用規格案の妥当性検討の為、裏付け試験を実施した。

3) 第5版自主規格案の作成

第9版食品添加物公定書後に残ると考えられる既存添加物から、第10版公定書に向けた検証用規格を作成したものを除き、使用実態の再調査及び第5版自主規格の作成を検討した。

4) 既存添加物の品目ごとの基原生物等の調査

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

2. 含有成分解析と成分規格試験法の検討：

生コーヒー豆抽出物から、19種の化合物 [3-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), 3-*O*-*trans*-feruloylquinic acid, 4-*O*-*trans*-feruloylquinic acid, 5-*O*-*trans*-feruloylquinic acid, caffeine, 3,4-di-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid, *trans*-*p*-coumaroyl-L-tryptophan, 3,5-di-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid, ethyl chlorogenate, 3-*O*-*trans*-feruloyl-5-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid, *trans*-caffeoyl-L-tryptophan, vanillin, 3-*O*-*trans*-caffeoyl-4-*O*-*trans*-feruloylquinic acid, 4-*O*-*trans*-caffeoyl-5-*O*-*trans*-feruloylquinic acid, *trans*-feruloyl-L-tryptophan, *trans*-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester] を単離した。本検討から、主検出成分は caffeine 及び chlorogenic acid であり、また DPPH ラジカル消去活性を指標とした酸化防止能の結果から、有効成分は chlorogenic acid をはじめとするカフェー酸誘導体であることが示唆された。

ゲンチアナ抽出物からは、17 種の化合物 [anofinic acid, 2-methoxyanofinic acid, 5-hydroxymethyl-2-furfural, 2,3-dihydroxybenzoic acid, furan-2-carboxylic acid, loganic acid, gentiopicroside, isovitexin, sweroside, vanillic acid, gentisin, isogentisin, 6'-*O*-glucosylgentiopicroside, gentisin 7-*O*-primeveroside, isogentisin 3-*O*-primeveroside, swertiajaposide D, loganic acid 7-(2'-hydroxy-3'-*O*- β -D-glucopyranosyl)benzoate] を単離し、確認試験として HPLC 及び TLC による定性、定量分析について、gentiopicroside 及び amarogentin を指標成分として分析する方法を提案した。

モウソウチク抽出物からは、11 種の化合物 [5-hydroxymethyl-2-furfural, 4-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, *trans*-ferulic acid, *N,N'*-diferuloylputrescine, arbutin, tachioside, isotachioside, 3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside, koaburaside, lyoniresinol 9'-*O*-glucoside, propiofenone 4'-*O*-primeveroside] を単離し、その構造を明らかにした。また、単離した化合物を標準品として HPLC 分析を行った結果、主成分として *p*-coumaric acid, 3,4'-dihydroxypropiofenone 3-*O*-glucoside, lyoniresinol 9'-*O*-glucoside を検出した一方、本製品中の主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone はマイナー成分として観察されるのみであった。他の製品を分析し製品間における成分比較を行った結果、3 製品間で共通の成分が観察され、本研究で明らかにした成分が指標成分の候補となり得ることが考察されたが、ピークが検出されない製品もあり、製品間でのばらつきが認められた。また、既存添加物名簿において主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は今回の測定条件ではいずれの製品中にもほとんど検出されず、製品の同等性確保のためにも指標成分の提案が示唆された。

カキ色素については、製品の分離精製を繰り返し、HPLC でほぼ 1 ピークのフラクションを得ることができたが、機器分析により構造解析を試みたところ、夾雑物が認められさらなる精製を計画中である。一方、製品には構造不特定の縮合型タンニン類が含まれることが示唆されたことから、高分子領域の分子量について GPC により測定し、重量平均分子量約 20 万であることが明らかとなった。今後これらの構造的特徴についても検討を要する。

一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索

一般飲食物添加物は一般に飲食される食品等の抽出物であることから安全性に問題がないと考えられ、早急な成分規格設定は必要ないと考えられている。このため、一般飲食物添加物 106 品目のうち 3 品目について規格設定されているのみであり、規格設定が遅れている。そこで、本研究では一般飲食物添加物のうち、「チコリ色素」について、成分規格を設定するための基礎情報を得るために、指標成分となる特有の成分が含有されているかどうか検討した。

LC/MS により、チコリ色素製品中に観察された化合物 1 及び 2 を単離精製し、NMR によりその化学構造を決定した結果、化合物 1 が 5-(hydroxymethyl) furfural、化合物 2 が 4-hydroxyl -2-(hydroxymethyl)-5-methylfuran-3(2H)-one であり、いずれもチコリ色素製品を製造する際、焙煎の過程において糖類が変性し生じたと考えられる化合物であった。これらは、製造過程において焙煎処理を伴う他の添加物においても含有されると予想されることから、チコリ色素の指標成分としては不相当と考えられた。また、チコリ色素に特有な成分であるチコリ酸 (chicoric acid)、加水分解後のカフェ酸を定量分析した結果、加水分解後のカフェ酸の有無がチコリ色素の確認に応用可能と考えられた。

INADEQUATE によるカルミン酸、耐酸性カルミン(4-アミノカルミン酸)の ^{13}C -NMR スペクトルの完全帰属

既存添加物「コチニール色素」は「本品は、エンジムシ(*Dactylopius coccus* Costa (*Coccus cacti* Linnaeus))から得られた、カルミン酸 (carminic acid ($\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$))を主成分とするものである。」と記載されており、わが国では、

コチニール色素は食品への使用が許可されているが、コチニール色素の主色素成分カルミン酸を原料として化学的処理により構造を改変した色素はすべて化学的合成品扱いとなり、食品への使用は現在認められていない。

耐酸性カルミン(acid-stable carmine)と呼ばれるカルミン酸をアンモニアと反応させて生成したものと考えられる pH に依存せず、酸・アルカリ性条件下でも赤色を保つ色素が 2000 年頃から流通し始めた。この色素は化学的な構造改変を伴うものであり、世界的にも食品への使用は認められていない。このため、2002 年、我々の研究グループは、耐酸性カルミンの主色素の化学構造について検討し、カルミン酸の 4 位の水酸基がアミノ基に置換した 4-アミノカルミン酸 (4-aminocarminic acid)であると報告した。しかし、この報告では、カルミン酸とカルミン酸のアントラキノン部の kermesic acid に類似した構造を持つ purpurin の両者についてアミノ化、次いでメチル化を行い、両者の化学シフトの比較から、耐酸性カルミンの主色素成分が 4-aminocarminic acid であると推定したものであり、完全帰属に至っていない。

そこで本研究では、未指定添加物である耐酸性カルミンの主色素の化学構造が 4-aminocarminic acid であることを完全証明することを目的とした。 ^{13}C - ^{13}C 間の直接結合、すなわち、有機化合物の炭素骨格のつながりを完全に確認することができる INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment)を 4-aminocarminic acid の構造解析に適用した。また、安定同位体 ^{15}N を導入した 4-aminocarminic acid の合成を行い、 $1\text{D-}^1\text{H}$ 、 ^{13}C 、 ^{15}N -NMR 及び 2D-HMQC、HMBC、INADEQUATE の解析結果より、 NH_2 基の置

換位置を特定し、耐酸性カルミンの主色素の化学構造が 4-aminocarminic acid であることの確証を得ることができた。

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

既存添加物クチナシ青色素は、ゲニピンと一級アミンの反応生成物が主色素成分とされるがその構造は未だ不明である。この主色素成分の生成過程および構造についての知見を得るため、ゲニピンとベンジルアミンを用いたモデル実験を行った。LC/MS により経時的に反応液中の生成物を観察したところ、青色素が生成するまでに前駆体と考えられる黄色の化合物 Y1 及び Y2 が生成することが確認された。化合物 Y1 及び Y2 を分取 HPLC により単離し、NMR 等により構造解析したところ、化合物 Y1 及び Y2 は、ゲニピンが反応液中でジアルデヒド構造に開裂し、ベンジルアミンのアミノ基とカルボニル-アミノ反応を起こした後に閉環したものであった。また、単離した化合物 Y1 及び Y2 を再溶解した溶液を観察したところ、青色に経時的に変化することから、青色素の前駆体であることが確認された。したがって、ゲニピンは、ベンジルアミンの 1 級アミンと反応し閉環した後、黄色素 Y1 とその異性体 Y1' を生成する。次に、1 位の OH 基と 9 位のプロトンが *cis* 配置した異性体 Y1' は、速やかに脱水し黄色素 Y2 となった後、青色素成分へ変化または重合していくと考えられた。次に、生成した青色素成分の混合物より青色素 B1 及び B2 を精製し、その化学構造を LC/TOF-MS 及び NMR により解析した結果、Y2 の 6 位と 10 位が脱水結合して共役二重結合を形成し、更に繰り返し結合した重合物であると推定された。以上のことから、既存添加物クチナシ青色素の青色素成分は、ゲニピ

ンと一級アミンが重合的に反応して生成した化合物であると推定された。

ラック色素のアンモニア処理および構造解析

既存添加物「ラック色素」は、天然由来の着色料であり、コチニール色素と同様にアントラキノン骨格を有する色素を主成分とするが、コチニール色素が carminic acid の 1 成分からなるのに対し、ラック色素は、laccic acid A, B, C, E 等複数の成分から構成される。C-2) で述べたように、carminic acid をアンモニア処理することで、4 位ヒドロキシ基 (-OH) がアミノ基 (-NH₂) に容易に置換され、4-aminocarminic acid が合成される。このような置換反応は、アントラキノン骨格を持つ化合物、laccic acid に対して普遍的に起こりうると想像できる。現時点では、ラック色素をアンモニア処理して合成された、いわゆる耐酸性ラック色素の報告例はないが、今後、流通が確認されたとき、これについても、耐酸性カルミンと同様に未指定添加物となることから、その分析法の確立が望まれる。

そこで本研究では、ラック色素をアンモニア処理し、その色素成分について LC/MS および NMR を用いて解析を行った。ラック色素をアンモニア処理することで、pH に依存しない色調が確認された。LC/MS 分析により、アンモニア処理後のラック色素には、ラック色素の主色素成分 laccic acid A, B, C および E の 4 位ヒドロキシ基 (-OH) がアミノ基 (-NH₂) に置換した 4-aminolaccic acid A, B, C および E が主色素成分として含まれることが示唆された。また、単離精製した laccic acid C をアンモニア処理して得られた化合物について NMR 解析を行ったところ、4-aminolaccic acid C であることが確認された。

ムラサキイモ色素・ムラサキヤマイモ色素

1. HPLC による分離分析

8 版公定法 (515 ~ 535 nm) および 4 版自主規格 (525 ~ 545 nm) に検出波長を設定し、逆相分配モードによる成分分析を実施した。移動相の条件を検討した結果、ギ酸濃度を 1.0% 以上でないとは良好な分離が達成できなかった。また、トリフルオロ酢酸では、0.5% でも十分に良好な分離ができた。そのような結果より、LC-MS への連結を想定して、1.0% ギ酸水溶液/アセトニトリル系を用いることにした。ムラサキイモに関するクロマトグラムは、既報のピークパターンと類似しており、ほぼ良好な分離分析が達成できたと推定される。一方で、ムラサキヤマイモでは、ムラサキイモとは全く異なるピークパターンを示した。本クロマトグラムと比較検討できる研究報告はなく、各成分の比較同定などが必要と考えられる。これらのピークはいずれも 8 版公定法 (515 ~ 535 nm) および 4 版自主規格 (525 ~ 545 nm) の確認試験を示す由来成分である。そのため、これらの比較を行うことで、今後の規格試験へ応用できるものとする。そこで、各成分の LC-MS 分析を行うこととした。

2. LC-MS による同定分析

HPLC の分離条件を利用して、LC-MS による同定分析を実施した。検出波長 513 ~ 535 nm による主な検出は、14 ピーク観察され、いずれも ESI-Positive モード (m/z 200 ~ 2000) でマススペクトルを得ることができた。また、いずれも既報とのピークパターン、質量数 (理論値)、フラグメントイオンより、同定することが可能であった。ピーク 1 は、 $[M+H]^+$ m/z 773.212 (理論値: m/z 773.2135, $C_{33}H_{41}O_{21}$) となり、MS/MS では、 m/z 611, 499, 287 が検出され、cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 2 は、 $[M+H]^+$ m/z 787.229 (理論値:

m/z 787.2291, $C_{34}H_{43}O_{21}$) となり、MS/MS では、 m/z 625, 436, 301 が検出され、peonidin 3-sophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 3 は、 $[M+H]^+$ m/z 893.234 (理論値: m/z 893.2346, $C_{40}H_{45}O_{23}$) となり、MS/MS では、 m/z 731, 449, 287 が検出され、cyanidin 3-p-hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 4 は、 $[M+H]^+$ m/z 935.244 (理論値: m/z 935.2452, $C_{42}H_{47}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 773, 449, 287 が検出され、cyanidin 3-(6"-caffeoylsophoroside)-5-glucoside と同定できた。ピーク 5 は、 $[M+H]^+$ m/z 907.249 (理論値: m/z 907.2503, $C_{41}H_{47}O_{23}$) となり、MS/MS では、 m/z 745, 463, 301 が検出され、peonidin 3-p-hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 6 は、 $[M+H]^+$ m/z 949.260 (理論値: m/z 949.2608, $C_{43}H_{49}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 787, 463, 301 が検出され、peonidin 3-(6'''-caffeoylsophoroside)-5-glucoside と同定できた。ピーク 7 は、 $[M+H]^+$ m/z 949.260 (理論値: m/z 949.2608, $C_{43}H_{49}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 787, 449, 287 が検出され、cyanidin 3-ferulylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 8 は、 $[M+H]^+$ m/z 963.275 (理論値: m/z 963.2765, $C_{44}H_{51}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 801, 463, 301 が検出され、peonidin 3-ferulylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 9 は、 $[M+H]^+$ m/z 933.264 (理論値: m/z 933.2659, $C_{43}H_{49}O_{23}$) となり、MS/MS では、 m/z 771, 433, 271 が検出され、pelargonidin 3-ferulylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 10 は、 $[M+H]^+$ m/z 1097.275

(理論値: m/z 1097.2769, $C_{51}H_{53}O_{27}$) となり, MS/MS では, m/z 935, 499, 287 が検出され, cyanidin

3-(6",6"-dicafeoylsophoroside)-5-glucoside と同定できた. ピーク 11 は, $[M+H]^+$ m/z 949.260 (理論値: m/z 949.2608, $C_{43}H_{49}O_{24}$) となり, MS/MS では, m/z 787, 463, 301 が検出され, peonidin

3-cafeoylsophoroside-5-glucoside と同定できた. ピーク 12 は, $[M+H]^+$ m/z 1111.290 (理論値: m/z 1111.2925, $C_{52}H_{55}O_{27}$) となり, MS/MS では, m/z 949, 463, 301 が検出され, peonidin

3-dicafeoylsophoroside-5-glucoside と同定できた. ピーク 13 は, $[M+H]^+$ m/z 1125.306 (理論値: m/z 1125.3082, $C_{53}H_{57}O_{27}$) となり, MS/MS では, m/z 963, 463, 301 が検出され, peonidin

3-cafeoyl-feruloylsophoroside-5-glucoside と同定できた. ピーク 14 は, $[M+H]^+$ m/z 1095.297 (理論値: m/z 1095.2976, $C_{52}H_{55}O_{26}$) となり, MS/MS では, m/z 933, 583, 433 が検出され, pelargonidin

3-cafeoyl-p-coumaroylsophoroside-5-glucoside と同定できた.

一方で, ムラサキヤマモの LC-MS クロマトグラムより, 検出波長 523 ~ 545 nm における主な検出は, 8 ピーク観察され, いずれも ESI-Positive モード (m/z 200 ~ 2000) でマススペクトルを得ることができた. しかしながら, ムラサキイモのような報告例がなく, 同定することはできなかった. しかしながら, いずれの MS スペクトルは良好に取得することができ, 今後, 本ピークを同定することが必要と思われる.

本研究では, 8 版公定法および 4 版自主規格にて, ムラサキイモおよびムラサキヤマモの区別は不可能であったため, HPLC によ

るクロマトグラムパターンを比較した. その結果, 最大吸収波長 (ムラサキイモ: 515 ~ 535 nm, ムラサキヤマモ: 525 ~ 545 nm) によるピークが全く異なっていた. つまり, 各規格基準に準じるが, その由来成分は全く異なることが分かった. ゆえに, 各ピークの成分を同定し, 新たな規格基準指標をタンクする必要がある. そのため, LC-MS によって, 各ピークの同定を実施することとした. Table 1 にムラサキイモ色素の吸収極大波長および同定された物質名をまとめた. いずれも報告されている既知の物質であり, いずれも有効な指標物質になりえると考えられる. 一方で, ムラサキヤマモに関しては, いずれも良好な MS スペクトルを取得することができたが, 各ピークから物質を同定することができなかった. 今後の比較検討で各成分の同定は重要な情報となるため, 早急に NMR などを利用して, 確認する必要がある.

クチナシ黄色素

1. HPLC によるクロシン, クロセチンおよびゲニボシドの一斉分析

8 版公定法により, 評価したクロシン, クロセチンおよびゲニボシドの一斉分析法を検討した. A694 からは, 各種クロシンの異性体が検出され, 一部にクロセチンも確認された. 一方で, A694 のアルカリ加水分解および A12 では, クロセチンのみが観察された. Fig. 2-[A] に示す主な 3 つのピークは, *trans*-crocetin di(\square -D-gentiobiosyl) ester (ピーク 1; 最大吸収波長: 442 nm, 保持時間: 7.8 min), *trans*-crocetin \square -D-gentiobiosyl ester (ピーク 2; 最大吸収波長: 434 nm, 保持時間: 11.2 min) および *cis*-crocetin di(\square -D-gentiobiosyl) ester (ピーク 3; 最大吸収波長: 442 nm, 保持時間 11.7 min) であった. それらの TOF/MS ス

ペクトルでは、ピーク 1 は、 m/z 999.283 $[M+Na]^+$ 、ピーク 2 は、 m/z 837.522 $[M+Na]^+$ 、そして、ピーク 3 は、 m/z 999.282 $[M+Na]^+$ が検出され、いずれも既報を参考として確認できた。アルカリ加水分解およびクチナシ黄色素 A12 製品におけるクロマトグラムでは、主に 2 つのピーク 4 および 5 が検出された。それらの 2 つのピークは、*trans* および *cis*-crocetinins (ピーク 4; 最大吸収波長: 422 nm, 保持時間: 14.4 min) および (ピーク 5; 最大吸収波長: 422 nm, 保持時間: 15.9 min) であった。本ピークは、いずれも TOF/MS において、 m/z 329.441 $[M+H]^+$ が検出されている。

同一条件において、ゲニポシドおよびその分解物であるゲニピン (m/z 226.929, $[M+H]^+$) も測定することができた。

本手法を用いて、8 版公定法で用いるアルカリ加水分解の条件検討を実施した。0.02 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (50°C) において、クチナシ黄色素 A694 を用いて、加水分解した結果、ピーク 1 (保持時間: 7.8 min) および 4 (保持時間: 14.4 min) の経時変化を示すことができた。その結果、クロシンは、5 分程度で加水分解され、クロシンは、20~30 分程度で一定量を示すことが分かった。その一方で、不純物質であるゲニポシドは、120 分程度の経時により、ゲニピンへ分解することも判明した。

2. クロセチンの単離精製

クロセチンを指標としたクチナシ黄色素の定量評価を行うため、アルカリ分解試料より、クロセチンの単離精製を行った。まずは、固相抽出法により抽出を行った。クチナシ黄色素製剤 0.1 g から、加水分解および固相抽出による濃縮精製により、得られた成分 8.4 mg を HSCCC に注入することとした。また、同時に HSCCC の 2 相溶媒系を検討するこ

ととした結果、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1% ギ酸水溶液 (7/3/5/5) を最適として利用することとした。本条件により、固定相の保持率は 88% となり、単離精製には、8 時間を費やした。クロマトグラムより、Fraction A および B をそれぞれ 2.0 および 1.2 mg 得ることができた。Fraction A を HPLC で測定した結果、クロセチン標準試料として利用できる成分が単離できた。しかしながら、*trans* 型クロセチンに対して、*cis* 型が 15% の割合で、異性化反応が生じることが分かった。いずれも HPLC で単離精製を行っても同様の反応(変換効率)が起こり、常に 15% 程度の混合物となってしまった。しかしながら、他の不純物なども観察されず、安定なクロマトグラムを示したため、本試料を指標として、クチナシ黄色素の定量評価に用いることとした。

3. クロセチン指標によるクチナシ黄色素の定量評価

2 で開発した HPLC 法を用いて、3 で得た標準試料により、検量線を作成した結果、*trans* 型クロセチンにおいて、 $y=549.7x + 7374.6$ (相関係数 $r^2=0.998$) の検量線を得ることができた。本検量線を利用して、アルカリ分解後のクロセチン含有量は、A694 では 67.6%、A12 では 45.5% およびサフラン色素では 42.3% となった。

本研究では、8 版公定法を基盤に国内で流通するクチナシ黄色素 2 製品およびサフラン色素 1 製品の評価および新たな HPLC による一斉分析法の検討を実施し、試験法の妥当性および新たな問題点を検証した。8 版公定法に基づく評価では、サフラン色素とクチナシ黄色素を区別することが不可能であった。

そこで、HPLC によるクロシン、クロセチンおよびゲニポシドの一斉分析法を開発し、

アルカリ加水分解前後の評価を行った。逆相系グラジエントモードおよびDAD検出法を利用することで、各成分の分離分析が達成できた。本試験法を用いて、クチナシ黄色素A694製品を分析した結果、様々なクロシン異性体が検出された。そのため、クロシン異性体を用いたクチナシ黄色素の指標とすることは、複数存在するため困難であると判断した。そこで、アルカリ分解後のA694およびA12製品を測定した結果、ほぼ同様のクロマトグラムを得ることができ、*trans*型クロセチンが最も有効に検出することができ、本化合物を指標とすることとした。そこで、HSCCCによる*trans*型クロセチンの単離精製を試みた。その結果、Fraction Aとして、*trans*型クロセチンを得ることができた。しかしながら、*trans*型クロセチンは、容易に*cis*型へ15%程度変換してしまうことが判明した。その一方で、HSCCCを利用することで、他の不純物質なども含まず、*trans*型85%純度で定量を行うこととした。その結果、アルカリ分解後のクロセチン含有量は、A694では67.6%、A12では45.5%およびサフラン色素では42.3%となった。いずれにおいても、殆どその差は、見出すことができなかった。つまり、アルカリ分解の製剤に存在するクロセチン含量だけでは、クチナシ黄色素とサフラン色素を識別することが不可能であった。

また、ゲニポシドにおいては、クチナシ黄色素から僅かであるが検出することができた。その一方で、アルカリ加水分解すると、ゲニポシドのピークは減少し、新たにゲニピンのピークが検出された。つまり、加水分解過程において、ゲニポシドは、ゲニピンに変化することが判明した。ゲニピンは、アポトーシスの誘導や免疫系への影響など薬理活性を有しており、安全性からもモニタリング

が必要な物質である。8版公定法では、不純物質として、ゲニポシドのみ規格となっている。その一方で、加水分解処理されているクチナシ黄色素製品では、ゲニポシドが適合(0.5%以下)であったとしても、そのすべてもしくは一部がゲニピンに分解されている可能性が予想される。しかし、現在の8版公定法では、その点について、判断することはできない。今後、ゲニピンを含めた不純物質試験が要求されるものと思われる。本研究より、以下の新たな問題点および提案ができると思われる。

ゴマ油不けん化物

ゴマ油不けん化物中のセサモール、セサミン、セサモリンの紫外可視吸光光度における極大吸収波長を調べた。いずれも、290 nm付近で吸収極大波長(セサモール $\lambda_{\max} = 296$ nm, セサミン $\lambda_{\max} = 286$ nm, セサモリン $\lambda_{\max} = 289$ nm)が観察され、定量などの評価に用いることとした。本設定波長により、逆相系LCの各種パラメータを用いて、条件検討を実施した。その結果、セサモールのシンメトリー係数は僅かに低値を示し、他の値は殆ど同等であった。いずれも、15分以内に良好なピークを得ることができた。そのため、移動相には汎用性を考慮して、0.1%ギ酸水/アセトニトリル混合液を用いることとした。本最適条件において、検出限界(LOD)および定量限界(LOQ)は、セサモール(LOD:0.04 ppm, LOQ:0.15 ppm)、セサミン(LOD:0.02 ppm, LOQ:0.08 ppm)およびセサモリン(LOD:0.04 ppm, LOQ:0.15 ppm)となった。各検量線においても、LOQ~5 ppmの範囲において、相関係数(r)0.999以上を示した。本手法を用いて、ゴマ油不けん化物の50倍希釈(希釈溶媒:アセトニトリル/メタノール, 50/50)のクロマトグラムをFig. 4に示す。その際の定量値は、

セサモール：不検出（7.5 mg/kg 以下），セサミン（12.8 g/kg）およびセサモリン（9.4 g/kg）となった。本結果は，既報にあるゴマ油中の濃度よりも高含有存在していることが判明した。

本分析法は，逆相系 LC を用いているため，直接 MS に導入することも可能である。MS によるスペクトル情報があることで，飛躍的に同定能が向上する。そのため，本研究では，ESI-ポジティブモードを採用して，スペクトル解析を実施した。LC/MS には，逆相系 LC 条件をそのまま利用した。ESI-ポジティブモードにおいて，セサモール m/z 139，セサミン m/z 337 およびセサモリン m/z 233 が最も強度が高く検出された。それらをプレカーサーイオンとして採用し，プロダクトイオンスキャンにより，MS スペクトルを得た。いずれも，特異的なスペクトルを得ることができ，化合物同定に有益な情報を得ることができた。本手法を用いて，実際に検出されたゴマ油不けん化物からのピーク同定を試みた。その結果，標準溶液と同じスペクトルが検出され，確実な化合物の同定が達成できた。本結果より，順相系 LC では実施することができなかった MS による情報も同時に入手できる逆相系 LC の構築が達成できたものと判断できる。

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

HSCCC クロマトグラムより，Fraction A および Fraction B を単離精製することができた。いずれも，絶対検量線法により定量した結果，Fraction A において，7.37 mg およ

び Fraction B において，5.17 mg となった。また，MS/MS スペクトルにより，Fraction A および Fraction B は，セサミンおよびセサモリンであると同定できた。本試料を LC-フォトダイオードアレー分析（検出波長 200-400 nm）した結果，それぞれの純度が 99%以上となり，良好に単離精製できたものと考えられる。

本研究では，ゴマ油不けん化物の新たな確認試験法の基礎的な検討を実施した。試験法としては，逆相系 LC により，検出波長を 290 nm に設定して，セサモール，セサミンおよびセサモリンを分析するものである。本結果より，いずれもゴマ油不けん化物からの測定が可能であり，定量も達成できた。また，確実な同定を目指して直接 MS 分析することもでき，有効な MS スペクトルを得ることができた。以上より，今後は本手法と自主規格案を比較する必要もあり，様々な流通品や製品にも汎用できることを示す必要がある。

また，HSCCC によるセサミンおよびセサモリンの効率的な単離精製法の検討を行った。今回，HSCCC を用いて，ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを単離精製するため，2 相溶媒系の比較した結果，ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水 (7:3:7:3, V/V/V/V) が最適であるとの判断になった。本溶媒系を用いて，HSCCC による分離を行った結果，主に 2 つの Fraction を得ることができ，LC 分析の結果，Fraction A においてセサミン，Fraction B においてセサモリンが高純度（LC 評価：99%以上）の標準品を得ることができた。いずれも，セミ分取スケールで 1 回の操作で，数 mg から数十 mg 程度は同時に単離精製できることが判明した。しかしながら，ゴマ油不けん化物含有濃度が低いため，今回では，数 mg 程度の単離精製となった。

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

ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、いずれも国内で流通している試料を用いた。

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

HPLC 法では、ベニコウジ色素の成分などが固定相カラムに吸着してしまい、良好な分

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

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

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

トモナシン A およびキサントモナシン B と同定することができた。

「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の定量

今回、2ロットの試料についての測定を行った。積分値をとったシグナルごとで多少のばらつきが見られ、また、2試料で共通して大きめの値が算出されるシグナルと小さめの値が算出されるシグナルがあるという特徴も示唆された。YM 4は85%程度、YM 7は87%程度の純度であることがわかった。「ヤマモモ抽出物」においては、観測されたシグナルを精査すると、ベースライン上にも雑音が少なく、比較的シャープなシグナルとして観測される myricitrin の6位、8位のシグナルの積分値を定量時の算出に用いるのが好適ではないかと考えられる。今後、今回の各シグナル間での定量値の違いが、常にこの傾向であるのか否か、それぞれのシグナルの積分値のばらつきを、同じ試料の繰り返し測定で見極めるとともに、多種の試料の測定でも確認する必要があると思われる。

「グルコサミン」中の glucosamine の定量

内部標準の認証標準物質 DSS- d_6 のシグナルは他のシグナルが全くない0 ppm 付近に現れ、定量に用いた2つの配座異性体の2位Hのシグナル面積の合計で問題なく測定ができることを確認した。これらを用いて入手した5種類の市場品の「グルコサミン」中の glucosamine の定量をおこない、その結果を Table 3 に示した。表示に「グルコサミン」と書かれたものに関しては、glucosamine の分子量($C_6H_{13}NO_5$, MW: 179)で、塩酸塩とか書かれていたものは塩酸塩としての分子量($C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$, MW: 215.5)と合せて含有率を算出した。いずれの試料も glucosamine としての含有率は80%程度であった。塩酸塩に関しては、塩の分子量で計算すると95%以上という数字となった。「グルコサミン」におい

ては、得られたスペクトルを精査すると、1位の水素のシグナルのうちβアノマーの1位と帰属される水素(δ4.82 ppm)がD₂Oの残留水素のシグナルの裾に若干重なっている可能性が観察された。このため、2位の水素シグナル(δ2.89 ppmとδ3.18 ppm)の面積の和を純度算出に用いた方がよいと考えられる。「グルコサミン」中のglucosamineとしての含有率は80%程度であったが、塩酸塩とするとその純度は95%以上と非常に高いものになる。塩酸塩の表記がなかった製品に関して、塩酸塩として計算すれば95~99%という純度になることから、これらも全て塩酸塩として流通しているものと推定される。

この条件でのglucosamineでの定量は極めて簡便である。Glucosamineは紫外吸収を持たない分子であるためにHPLCでUV検出器での検出が困難で、HPLCを用いた分析をするには誘導体化か、検出の安定化に手間のかかる示差屈折計を用いる必要がある。この「グルコサミン」のglucosamine純度の測定に関しては¹H-qNMR法が極めて有利な方法と考えられる。ところで、水という表面張力の強い溶媒を用いるため、細いNMR試料管に測定溶液を注入するときには、多少のコツが必要である。

「クローブ抽出物」中のeugenolの定量

まず、「クローブ抽出物」のacetone-*d*₆中でのスペクトルにおいてeugenolの6位Hの位置(δ6.33 ppm)には他のシグナルは観測されなかった。また、内部標準をDMSO-*d*₆溶液として加えて測定してもeugenolの6位Hシグナルは独立しており、「クローブ抽出物」のスペクトルにおいても他の夾雑物のシグナルとの重なりも観測できなかった。検量線を作製した結果、少なくとも0.5~20 mg/mLの間では極めて高い直線性が示された。

試料中のeugenolの含有量の測定では、まず、eugenol標準品の純度を測定したところ92%程度であった。「クローブ抽出物」に関しては、いずれもeugenolの含有率が30%程度だった。次に、HPLCでの定量では、今回の条件でeugenolが280 nmにおいて良好なピークとして検出できることを確認した。¹H-qNMR法を用いて求められた純度をもとにeugenol標準品の溶液を順次希釈しHPLCのピーク面積を求めて検量線を作成した。その検量線も極めて良い直線性を示した。両法の比較に用いた「クローブ抽出物」のeugenolの含有率は26.56%、28.81%だったが、この検量線から算出したHPLC法での「クローブ抽出物」中のeugenolの定量値はそれぞれ24.94%、26.20%だった。

「クローブ抽出物」にはeugenol以外にもフェニルプロパンの精油成分が存在するので、芳香族領域は多くのシグナルの存在が懸念されたが、このシグナルが定量に好都合であることがわかった。検量線も極めてよい直線性を示し、特に検量線を引くことなく定量ができることも確認ができた。

今回、操作の簡便のために予め認証標準物質の濃度既知の溶液を作っておき、測定の際に測定溶液に標準物質の溶液を一定量加えるという方法を考えた。ストックの際に溶媒が揮発して濃度が変化しないよう、難揮発性のDMSOに溶解した、1,4-BTMSB-*d*₄はカタログ上でDMSOに難溶と表記されているが、今回用いた2.5 mg/mLという濃度であれば十分に溶解することがわかった。また、¹H-qNMRの測定時はacetone - DMSO = 5 : 1という混合溶媒で実施することになる。これも測定の結果、この混合溶媒でもeugenolの6位Hが独立したシグナルで観測され、問題なくシグナル面積の測定ができた。よって、1,4-BTMSB-*d*₄をDMSO-*d*₆溶液として用

いることで操作の簡便化も実現できた。また、eugenol は揮発性の精油で標準品の純度が変化しやすいことから、そのような化合物でも $^1\text{H-qNMR}$ を用いれば絶対定量が可能になることを示すことができた。

HPLC においては、 $^1\text{H-qNMR}$ で値付けをした eugenol 標準品溶液を用いた定量が可能であることも確認できた。また、「クローブ抽出物」中の eugenol の定量値が $^1\text{H-qNMR}$ における定量値と HPLC の定量値との比較では、HPLC での値がやや低かったが、ほぼ一致していることから、 $^1\text{H-qNMR}$ が既存の定量法に置き換えることのできる簡便な手段であることを確認できた。また、 $^1\text{H-qNMR}$ によって標準溶液の純度の値付けを行い、その標準溶液を用いて HPLC 法による定量をすることで、間接的な絶対定量が可能なることも確認できた。

「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

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

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

定量方法の確立に先立って HPLC の条件設定を行ったが、carthamin のピークを良好に検出できる条件を見つけることができたので、少なくとも $^1\text{H-qNMR}$ による標準品溶液の値付け→その標準溶液を基準とした HPLC 分析というプロトコルの実施に目処をつ

けたと言える。Carthamin 標準溶液の $^1\text{H-qNMR}$ による値付けは先行例があるので、純度が極めて低く $^1\text{H-qNMR}$ では直接定量が困難な試料での定量も目処をつけた。

「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

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

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

3. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

1) 酸化防止剤の力価評価における DPPH 法と ORAC 法の比較

ORAC 法は農産物・食品の抗酸化評価法として共同試験が近年実施され、この共同試験結果を受けて標準作業手順書が作成された。そこで、酸化防止剤の力価評価を ORAC 法、ならびに同じく複数試験機関による共同試験にてプロトコルの評価を行った DPPH 法とで行い、その結果について比較した。

チャ抽出物 5 種類、トコフェロール類 5 種類、ローズマリー抽出物 2 種類、単糖・アミノ酸複合物、生コーヒー豆抽出物、コメヌカ酵素分解物、フェルラ酸、ヤマモモ抽出物、エンジュ抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、ルチン、酵素処理ルチン、ルチン酵素分解物の計 22 種類の酸化防止剤について測定を行ったところ、DPPH 法では 20 種類、ORAC 法では 22 種類の抗酸化力価を求めることが可能であった。

また,DPPH法とORAC法の測定結果の相関を調べたところ,両者の間の相関係数は0.460 (n = 20) となった.相関関係は有意であったが ($p < 0.05$),直線性は高いものではなかった.同時に,酸化防止剤に含まれる主要抗酸化成分の種類により DPPH 法,及びORAC 法に対する挙動が大きく異なることが判明した.具体的には,カテキン類を主要抗酸化成分とするチャ抽出物では DPPH 法とORAC 法の測定結果の間に高い直線性が認められたのに対し ($r = 0.775, n = 5$),ケルセチン配糖体,及びその類縁化合物が主要抗酸化成分であるヤマモモ抽出物,エンジュ抽出物,ルチン類の場合,DPPH 法とORAC 法の測定結果の間に相関は認められなかった ($r = -0.239, n = 7$).このことから,主要抗酸化成分の基本構造がフラバノール,フラボン,あるいはその配糖体であるか否かにより,DPPH 法,及びORAC 法に対する挙動が異なることが判明した.

今後,DPPH 法の適用が困難な酸化防止剤の力価評価標準法を適宜検討する場合は,主要抗酸化成分の各種抗酸化活性測定法への応答の特徴を考慮する必要があると考えられた.

2) DPPH 法に基づく一般試験法案の適用性と再現性の検討

トロロックス,及び酸化防止剤 19 種類 (サンフェノン EGCg,サンフェノン 90S,サンフェノン BG-3,カメリアエキス 30S,チャ抽出物,茶抽出物 40,茶抽出物 70,ポリフェノン PF,ポリフェノン 70S,ポリフェノン G,サンフード 100,テアピゴ,カメリア 50EX,d- δ -トコフェロール,生コーヒー豆抽出物,ローズマリー抽出物,ヤマモモ抽出物,酵素処理イソクエルシトリン,酵素処理ルチン) を分析試料として用い,一般試験法案の適用性と再現性を確認した.いずれの酸化防止剤もエタノール

(99.5) に溶解し,希釈もエタノール (99.5) で行った.

酸化防止剤の抗酸化力価評価においてトロロックスの IC_{50} は TEAC 算出の基礎となる重要な値である.そこで,作成した一般試験法案に基づき,トロロックスの IC_{50} 算出に関する手順について繰り返し試験を実施した (n = 8).その結果, IC_{50} の平均は 59.3 ± 0.77 $\mu\text{g/mL}$ であり,変動係数は 1.30%となった.このことから,一般試験法案に基づくトロロックスの IC_{50} の算出に関する再現性は問題ないと判断した.

続いて,酸化防止剤 19 種類の抗酸化力価評価を行った.その結果,測定に用いたすべての酸化防止剤の TEAC を求めることが可能であり,その変動係数 (n = 3) は 0.28 ~ 7.1%となった.特に,サンフェノン EGCg を除く 18 試料の変動係数は 4.3%以下の範囲内となり高い再現性を示すことが判明した.

4.日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討:

1) 既存添加物ジャマイカカссия抽出物と天然香料クワツシャ中におけるクアシン,ネオクアシンの新規定量分析法の検討

「ジャマイカカссия抽出物」は天然由来の苦味料,「クワツシャ」は天然由来の香料として使用され,それぞれ既存添加物と天然香料に分類される食品添加物である.両品目の有効成分はいずれもクアシン及びネオクアシンとされているが,これら有効成分の定量用標準品は市販されていない.そこで,安価で入手しやすく,純度も高いと予想される 4-ヒドロキシ安息香酸 (4HBA) を両有効成分の定量用内標準物質として選定し,クアシン及びネオクアシンそのものの定量用標準品を必要としない HPLC/PDA による定量法を確立することを目的とした.¹H-qNMR から求めた 4HBA 市販試薬の純度は,試薬に記

載された純度値と殆ど差異はなく 100.43% であった。このことから、市販の 4HBA を購入して用いれば、表示純度との差を気にせずに定量用内標準として使用できると考えられた。そこで、4HBA とクアシン及びネオクアシンの混合液を用い、¹H-qNMR により正確なモル比を求め、HPLC/PDA により吸光度比を求め、これら得られた値を元に 4HBA に対するクアシン及びネオクアシンのモル吸光係数比を算出したところ、0.84 及び 0.85 であることが明らかとなった。純度既知の 4HBA を内標準として、モル吸光係数比を適用した HPLC/PDA により添加物製品中のクアシン及びネオクアシンを定量したところ、国際単位系 (SI) にトレーサブルな 1,4-BTMSB-*d*₄ を内標準とした ¹H-qNMR により求めたクアシン及びネオクアシンの定量値と殆ど差異はなかった (1.2 % 以下)。モル吸光係数比を適用した定量法は、クアシン及びネオクアシンそのものの定量用標準品を必要とせず、これらの製品中の含量を求められる試験法として有用であることが明らかとなった。

2) 既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を応用した検討

天然由来の酸化防止剤である既存添加物クエルセチンは、食品添加物公定書未収載であり、成分規格案の作成を行う上で定量法の確立が必要である。そこで本研究では、¹H-NMR による定量 NMR (quantitative NMR: qNMR) を適用し、試薬や添加物の正確な quercetin 含量を求めることにより、既存添加物クエルセチンの定量法確立のための基礎的検討を行った。本研究により、既存添加物クエルセチンの成分規格作成に有用な基礎データを得ることができた。また、これらの結果より、標準試薬 (qNMR 純度適用) を用い

た LC/UV による quercetin の定量が最も適切であることが示唆された。

3) 粘度測定法に関する検討

物質の粘度を測定する手法として、様々な粘度計が存在する。食品添加物公定書において粘度測定法は、毛細管粘度計法 (第 1 法) と回転粘度計法 (第 2 法) が規定されている。一方、日本工業規格 (JIS) における粘度測定法としては、細管粘度計、落球粘度計、共軸二重円筒形回転粘度計、単一円筒形回転粘度計、円すい - 平板形回転粘度計の他、近年、振動粘度計が追加されている。本報告では、食品添加物公定書、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JIS、JCSS 等における粘度測定法を調査し、比較整理したので報告する。また、JIS における振動粘度計の原理と各測定計との相違について調べ、考察した。

4) 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の分離

カンゾウ油性抽出物製品には、主要成分以外にも抗酸化活性寄与率が比較的高い成分が存在することが強く示唆され、ODS カラムを用いた分取 HPLC による 2 段階の分離及び分離画分の抗酸化活性測定を行い、活性画分の探索研究を行ってきた。今年度は、これまでの分離により抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 7 画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 8 画分につき、ODS とは異なる分離特性を有するカラムを用いてさらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。本研究により、各カンゾウ油性抽出物製品の活性ピークを分離・特定することができた。

5) 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の LC/TOF-MS による解析

カンゾウ油性抽出物製品の主要成分による全体の抗酸化力価への寄与率は高くないことが明らかとなり、HPLC による分離・分

画後、各画分の活性測定を行い、他の抗酸化成分を分離・特定した。さらに研究を進め、*Glycyrrhiza inflata* 由来製品及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品より単離した活性成分につき、LC/TOF-MS(MS)を用いて分析し、精密質量による組成解析から含有成分の推定を行い、市販試薬及び供与された単離標品との解析結果と比較した。その結果、カンゾウ油性抽出物製品中の6種の抗酸化活性成分及び2種の非活性成分を同定した。

6) 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の単離・同定

G. glabra 由来のカンゾウ油性抽出物製品では、主に抗酸化活性を示す8成分が確認された。この内、4成分については、市販標品や単離標品との比較やLC/MS/MSで同定したが、残りの4成分については、分子量(MW)370, 358, 322 および 354の化合物と推定されたが、同定はできていなかった。未同定の4成分の構造を明らかにする目的で、これら成分の単離・精製を行い、構造解析結果から化合物の同定を行った。その結果、4成分は glabrene, 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin 等の化合物であると同定した。なお、MW 370 および MW 358の化合物は、これまで DPPH ラジカル消去活性を有することは報告されていないが、本研究におけるこれらの単離画分は DPPH ラジカル消去活性を示した。

7) 既存添加物カワラヨモギ抽出物の乾燥減量試験法と qNMR を応用した定量法の開発

既存添加物製品の規格の設定は、品質や安全性確保の上から極めて重要である。既存添加物カワラヨモギ抽出物は、天然由来の保存料であり、抗菌作用があるとされている。本研究では、既存添加物カワラヨモギ抽出物の公的規格作成のため、本品目に適した乾燥減量試験法及び定量 NMR を応用した LC

定量法の開発を行った。その結果、溶液状態のカワラヨモギ抽出物製品に適した乾燥減量試験法を確立することができた。また、LC/UV 及び LC/MS によるカピリン定量条件を最適化し、qNMR を応用してカピリン標品の正確な純度値を付けて定量に用いることで、信頼性の高い LC 定量法を開発できた。さらに、カピリン標品を必要としない qNMR での直接定量法が、比較的カピリン含量の高いカワラヨモギ抽出物製品では、有用な定量法の1つとして選択可能であることを示した。

8) Relative response factor を用いた HPLC/PDA によるカワラヨモギ抽出物中のカピリン定量法の開発解析

既存添加物名簿に記載されている保存料「カワラヨモギ抽出物」中の抗菌成分カピリンの HPLC/PDA 定量法について検討した。カピリンの定量用標準品は市販されていないため、別の化合物をカピリンの基準物質として選定し、カピリンの定量用標準品を必要としない HPLC/PDA 定量法を確立することを目的とした。¹H-qNMR を利用してモル吸光係数比を算出し、定量法に用いた。このように内標準物質と定量対象化合物の検出感度の違いを係数として求めて定量法に応用する手法は、吸光度に限らず、他の検出方法でも適用可能であると考え、本項では、相対感度係数 (Relative response factor ; RRF) という語を用いて報告した。カピリンの定量用内標準物質として、¹H-qNMR スペクトル及び HPLC クロマトグラム上で、カピリンと良好に分離したヘプチルパラベンを選定した。4社4製品のヘプチルパラベン市販試薬を¹H-qNMR に付し、得られた純度値を各試薬のラベルに記載されている純度値と比較したところ、4製品全てにおいて¹H-qNMR での純度値とラベル記載の純度値に大きな差

がなく(1.4%未満),このことから,市販のヘ
プチルパラベンを購入して用いれば,メーカ
ー間の純度差や表示純度との差を気にせず
に定量用内標準として使用できると考えら
れた.ヘプチルパラベン及びカピリンの混合
液を調製し,ヘプチルパラベンに対するカピ
リンのRRFを算出したところ 1.31であった.
この値を適用してHPLC/PDAによる添加物
製品中のカピリン含量を算出したところ,カ
ピリン標準品を用いて作成した検量線
(¹H-qNMRによる純度値を適用)から求め
た含量と殆ど差はなかったため,RRFを適用
した定量法は,カピリンの定量用標準品を必
要とせず,カワラヨモギ抽出物の規格試験法
として有用であることが明らかとなった.

5.酵素の基原の解析法の確立:

1) 既存添加物酵素の基原由来塩基配列情報の取得

既存添加物酵素の微生物由来の基原につ
いて,「細菌」,「放線菌」,「糸状菌」,「酵母」,
「担子菌」の5つの群に分類し,各群に適し
た指標遺伝子について考察した.種々の公定
法や文献を参考にして,「細菌」及び「放線
菌」は,16S rDNA 塩基配列を指標とし,「糸
状菌」,「酵母」及び「担子菌」はITS1 塩基
配列を指標とした.属及び sp.で定義された
以外の基原について,国際塩基配列データベ
ース GenBank に指標遺伝子が登録されてい
るかどうか調査した.その結果,「細菌」52/56
基原,「放線菌」17/19 基原,「糸状菌」57/65
基原,「酵母」6/6 基原,「担子菌」6/6 基原の
配列が登録されていた.配列が登録されてい
なかった基原の中には,トレサビリティの
得られない学名,すなわち公定書に記載する
基原としてふさわしくない学名であるもの
が散見された.

2) アルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株の種 の同定

細菌に属すアルギン酸リアーゼの生産菌
71/58 株の 16S rDNA 塩基配列を決定し,国
際塩基配列データベースに対してblastn によ
る相同性検索を行った.検索結果の上位 20
配列中には *Flavobacterium* 属由来の塩基配列
が占めた.一方で,細菌において,同種の目
安とされる相同値が 98.7% 以上の 16S rDNA
塩基配列は,存在しなかった.

次に, *Flavobacterium* 属各種の 16S rDNA
塩基配列と 71/58 株の 16S rDNA 塩基配列を
用いて分子系統解析を行った.その結果,
71/58 株は *Flavobacterium* 属の種で形成され
るクラスター内に含まれたが,いずれの既知
種とも異なる分子系統学的位置を示し (Fig.
1), *Flavobacterium* 属の新種を構成する可能
性が高いと考えられ,71/58 株を
Flavobacterium sp.と同定した.

微生物などの学名が流動的である基原に
対して規格を整備するためには,統一された
方法,指針に基づいて情報を整理する必要が
ある.検討した DNA を指標にした同定法を
実施した場合,アルギン酸リアーゼ生産菌
71/58 株のように,第 9 版公定書に記された
基原の学名について,第 10 版で大幅な改正
が求められる可能性がある.このような問題
も含めて,今後 DNA を指標にした同定法に
ついて深く議論していく必要がある.

E. 結論

「ヤマモモ抽出物」では, methanol-*d*₄ 中,認証
標準物質として PHP を用い,仲介物質として
HMD を介することで, myricitrin の 6 位また
は 8 位の水素シグナル面積から含有される
myricitrin の定量が可能であることを示した.
「グルコサミン」では, D₂O 中,認証標準物質
の DSS-*d*₆ を直接内部標準として用
い, glucosamine の 2 つの配座異性体の 2 位の
水素シグナル (δ2.89 ppm と δ3.18 ppm) の面

積の和から,含有される glucosamine の定量が可能であることを示した.

「クローブ抽出物」中の eugenol の定量では認証標準物質の DSS- d_6 を内部標準として用い,この DMSO- d_6 溶液を測定試料の acetone- d_6 溶液とを混合して NMR を測定し,eugenol の 6 位 H のシグナル(δ 6.33 ppm) を利用することで測定試料中の eugenol が定量できることがわかった.また,定量値は,HPLC 法と良い一致を示したことから ^1H -qNMR 法が,既存の方法に変わりうる,簡便で迅速な「クローブ抽出物」の品質管理法になりうることを示すことができた.

「ベニバナ赤色素」では,その色素本体である carthamin の単離と HPLC 定量条件の設定ができたため, ^1H -qNMR では定量が困難な場合の代替手段として標準溶液の値付け →HPLC 法を用いた定量という組み合わせでの絶対定量法の確立の目処をつけた.

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

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は,培地条件や抽出条件により,全く色彩成分が異なり,明確な主成分を同定し,それに基づく規格基準が必要と考えられた.

ベニコウジ色素:赤色の主な成分は,HPLC による評価は困難であり,今後,HSCCC などを利用した主成分の同定が必要であり,それに基づく,試験の提案も求められる.

ベニコウジ黄色素:主にキサントモナシン A およびキサントモナシン B が主成分と想定される.しかしながら,いずれの標準品も

入手困難であるため,今後,その含量分析に関して,検討する必要性がある.

既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価標準法として,DPPH 法に基づく一般試験法案を作成し,その適用性,及び再現性に問題ないことが確認できた.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Tada A., Ito Y., Yamazaki T., Sugimoto N., Akiyama H., Chromatographic evaluation of the components of grape skin extract used as food additives, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **22**, 108-114 (2015).
- 2) Amakura Y., Yoshimura M., Morimoto S., Yoshida T., Tada A., Ito Y., Yamazaki T., Sugimoto N., Akiyama H., Chromatographic evaluation and characterization of components of gentian root extract used as food additives, *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 78-82 (2016).
- 3) 原田晋, 小川有子, 杉本直樹, 穠山浩, フランス製菓子赤色マカロン摂取後に生じた, コチニール色素によるアナフィラキシーの2症例, 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌, **8**, 180-186 (2014).
- 4) 山崎太一, 大槻崇, 三浦亨, 末松孝子, 堀之内嵩暁, 村上雅代, 齋藤剛, 井原俊英, 多田敦子, 田原麻衣子, 合田幸広, 穠山浩, 中尾慎治, 山田裕子, 小池亮, 杉本直樹, ¹H-NMR による精確な定量分析のための内標準液を用いる試料調製法の検討, 分析化学, **63**, 323-329 (2014).
- 5) Kawasaki H., Akiyama T., Tada A., Sekiguchi W., Nishizaki Y., Ito Y., Sugimoto N., Akiyama H., Development of HILIC-LC/MS method for direct quantitation of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole in caramel III with the qNMR certified standard, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **22**(2), 115-122 (2015).
- 6) Nishizaki Y., Ishizuki K., Akiyama H., Tada A., Sugimoto N., Sato K., Preparation of ammonia-treated lac dye and structure elucidation of its main component, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **57**, 193-200 (2016).
- 7) Tada A., Ishizuki K., Yamazaki T., Sugimoto N., Akiyama H., Method for the Determination of Natural Ester-Type Gum Bases Used as Food Additives via Direct Analysis of their Constituent Wax Esters Using High-Temperature GC/MS, *Food Science & Nutrition*, **2**, 417-425 (2014).
- 8) 多田敦子, 石附京子, 杉本直樹, 吉松嘉代, 川原信夫, 末松孝子, 有福和紀, 深井俊夫, 田村幸吉, 大槻崇, 田原麻衣子, 山崎壮, 穠山浩, 既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分組成の多変量解析に基づく基原植物種の検討, 日本食品衛生学雑誌, **56**, 217-227 (2015).
- 9) 多田敦子, 杉本直樹, 小林義和, 濱田ひかり, 石附京子, 秋山卓美, 伊藤裕才, 川原信夫, 山崎壮, 穠山浩, 味認識装置による既存添加物苦味料及び関連苦味化合物の品質評価, 日本食品化学学会誌, **22**, 25-31 (2015).
- 10) 西崎雄三, 多田敦子, 石附京子, 伊藤裕才, 小野田絢, 杉本直樹, 穠山浩, モル吸光係数比を利用したジャマイカカシア抽出物中のクアシンおよびネオクアシンの新規定量法の開発, 食品衛生学雑誌, **56**(5), 185-193 (2015).
- 11) Tanaka R., Nitta A., Nagatsu A., Application of a quantitative ¹H-NMR method for the determination of amygdalin in *Persica semen*, *Armeniaca semen* and *Mume fructus*, *Journal of Natural Medicines*, **68**(1), 225-230 (2014).

- 12) Tanaka R., Hasebe Y., Nagatsu A., Application of a quantitative $^1\text{H-NMR}$ method for the determination of gentiopicroside in *Gentianae radix* and *Gentianae scabrae radix*, *Journal of Natural Medicines*, **68**(3), 630-635 (2014).
- 13) Tanaka R., Shibata H., Sugimoto N., Akiyama H., Nagatsu A., Application of a quantitative $^1\text{H-NMR}$ method for the determination of paeonol in Moutan cortex, *Hachimijiogan* and *Keishibukuryogan*, *Journal of Natural Medicines*, **70**(4), 797-802 (2016).
- 14) Tanaka R., Inagaki R., Sugimoto N., Akiyama H., Nagatsu A., Application of a quantitative $^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{H-qNMR}$) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in *Plantaginis semen*, *Journal of Natural Medicines*, **71**(1), 315-320 (2017).
- 15) Inoue K., Tanada C., Nishikawa H., Matsuda S., Tada A., Ito Y., Min J. Z., Todoroki K., Sugimoto N., Toyo'oka T., Akiyama H., Evaluation of Gardenia Yellow using crocetin from alkaline hydrolysis based on ultra high-performance liquid chromatography and high-speed countercurrent chromatography, *J. Sep. Sci.* , **37** , 3619-3624 (2014).
- 16) Takahashi M., Nishizaki Y., Sugimoto N., Takeuchi H., Nakagawa K., Akiyama H., Sato K., Inoue K., Determination and purification of sesamin and sesamol in sesame seed oil unsaponified matter using reversed-phase liquid chromatography coupled with photodiode array and tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* **39**, 3898-3905 (2016).
- 17)Todoroki, K., Nakamura, M., Sato, Y., Goto, K., Nakano, T., Ishii, Y., Min, J.Z., Inoue, K., Toyo'oka, T. 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl) -4-methylmorpholinium Chloride as an Enantioseparation Enhancer for Chiral Derivatization-LC Analysis of D- and L-Amino acids., *Chromatography*, **37**, 23-28 (2016).
- 18) Inoue, K., Tanada, C., Hosoya, T., Yoshida, S., Akiba, T., Min, J.Z., Todoroki, K., Yamano, Y., Kumazawa, S., Toyo'oka, T., Principal component analysis of molecularly-based signals from infant formula contaminations using LC-MS and NMR in foodomics. *J. Sci. Food Agric.*, **96**, 3876-3881 (2016).
- 19) Inoue, K., Miyazaki, Y., Unno, K., Min, J.Z., Todoroki, K., Toyo'oka, T., Stable isotope dilution HILIC-MS/MS method for accurate quantification of glutamic acid, glutamine, pyroglutamic acid, GABA and theanine in mouse brain tissues. *Biomed. Chromatogr.* **30**, 55-61 (2016).
- 20) Todoroki K, Nakano T, Ishii Y, Goto K, Tomita R, Fujioka T, Min JZ, Inoue K, Toyo'oka T., Automatic analyzer for highly polar carboxylic acids based on fluorescence derivatization-liquid chromatography, *Biomed Chromatogr.*, **29**, 445-451 (2015).
- 21) Takayama T, Kuwabara T, Maeda T, Noge I, Kitagawa Y, Inoue K, Todoroki K, Min JZ, Toyo'oka T., Profiling of chiral and achiral carboxylic acid metabolomics: synthesis and evaluation of triazine-type chiral derivatization reagents for carboxylic acids by LC-ESI-MS/MS and the application to saliva of healthy volunteers and diabetic patients, *Anal Bioanal Chem.*, **407**, 1003-351 (2015).

- 22) Inoue K, Tsuchiya H, Takayama T, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto T, Matsukawa N, Toyooka T., Blood-based diagnosis of Alzheimer's disease using fingerprinting metabolomics based on hydrophilic interaction liquid chromatography with mass spectrometry and multivariate statistical analysis., *J Chromatogr B.*, 974, 24-34 (2015).
- 23) Min JZ, Tomiyasu Y, Morotomi T, Jiang YZ, Li G, Shi Q, Yu HF, Inoue K, Todoroki K, Toyooka T., First observation of N-acetyl leucine and N-acetyl isoleucine in diabetic patient hair and quantitative analysis by UPLC-ESI-MS/MS., *Clin Chim Acta.*, 444, 143-148 (2015).
- 24) Mochizuki T, Takayama T, Todoroki K, Inoue K, Min JZ, Toyooka T., Towards the chiral metabolomics: Liquid chromatography-mass spectrometry based DL-amino acid analysis after labeling with a new chiral reagent, (S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylate, and the application to saliva of healthy volunteers., *Anal Chim Acta.*, 22, 73-82 (2015)
- 25) Inoue K, Tanada C, Sakamoto T, Tsutsui H, Akiba T, Min JZ, Todoroki K, Yamano Y, Toyooka T. : Metabolomics approach of infant formula for the evaluation of contamination and degradation using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Food Chem.* 181, 318-324, (2015).
- 26) Min JZ, Morota Y, Jiang YZ, Li G, Kang D, Yu HF, Inoue K, Todoroki K, Toyooka T. : Rapid and sensitive determination of diacetylpolyamines in human fingernail by ultraperformance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom.* 20, 477-486, (2015).
- 27) Todoroki K, Ishii Y, Ide T, Min JZ, Inoue K, Huang X, Zhang W, Hamashima Y, Toyooka T. : Advanced dress-up chiral columns: New removable chiral stationary phases for enantioseparation of chiral carboxylic acids. *Anal Chim Acta.* 882, 101-111 (2015).
- 28) Nakano T, Todoroki K, Ishii Y, Miyauchi C, Palee A, Min JZ, Inoue K, Suzuki K, Toyooka T. : An easy-to-use excimer fluorescence derivatization reagent, 2-chloro-4-methoxy-6-(4-(pyren-4-yl)butoxy)-1,3,5-triazine, for use in the highly sensitive and selective liquid chromatography analysis of histamine in Japanese soy sauces. *Anal Chim Acta.* 880, 145-151, (2015).
- 29) Li XL, Li G, Jiang YZ, Kang D, Jin CH, Shi Q, Jin T, Inoue K, Todoroki K, Toyooka T, Min JZ. : Human nails metabolite analysis: A rapid and simple method for quantification of uric acid in human fingernail by high-performance liquid chromatography with UV-detection. *J Chromatogr B.* 1002, 394-398, (2015).
- 30) Takayama T, Mochizuki T, Todoroki K, Min JZ, Mizuno H, Inoue K, Akatsu H, Noge I, Toyooka T. : A novel approach for LC-MS/MS-based chiral metabolomics fingerprinting and chiral metabolomics extraction using a pair of enantiomers of chiral derivatization reagents. *Anal Chim Acta.* 898, 73-84, (2015).
- 31) Inoue K, Ozawa Y, Toyooka T. : Application of liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of sedative medicine in clinical stage. *Chromatography.* 36, 81-92 (2015).

- 32) Uno K, Takayama T, Todoroki K, Inoue K, Min JZ, Mizuno H, Toyooka T. : Evaluation of a Novel Positively-charged Pyrrolidine-based Chiral Derivatization Reagent for the Enantioseparation of Carboxylic Acids by LC-ESI-MS/MS. *Chromatography*. 36, 57-60, (2015).
- 33) Shimamura T., Sumikura Y., Yamazaki T., Tada A., Kashiwagi T., Ishikawa H., Matsui T., Sugimoto N., Akiyama H., Ukeda H., Applicability of DPPH Assay for Evaluation of Antioxidant Capacity of Food Additives -Inter-laboratory Evaluation Study-, *Analytical Sciences*, **30**, 717-721 (2014).
- 34) Ponhong K., Shimamura T., Higuchi K., Kashiwagi T., Grudpan K., Motomizu S., Ukeda H., Spectrophotometric Sequential Injection Analysis System for Estimating the Concentration of Lipid Hydroperoxides in Edible Oils, *Journal of Flow Injection Analysis*, **31**, 33-37 (2014).
- 35) Ueda T., Okumura T., Tanaka Y., Shimamura T., Ukeda H., Development of a new electrochemical evaluation method for antioxidant activity based on the redox properties of polyoxometalates and its application to the evaluation of antioxidant capacity of beverages, *Analytical Sciences*, **32**, 825-830 (2016).
- 36) 山内良子, 石井佐弥, 草場悠里, 小林弘司, 島村智子, 受田浩之, 穠山浩, 石川洋哉, 酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH ラジカル消去能測定におよぼす反応溶媒の影響, *日本食品保蔵科学会誌*, **42**, 189-196 (2016).
- 37) Enkhtuya E., Shimamura T, Kashiwagi T., Ukeda H., Antioxidative Constituents in the Leaves of *Paeonia anomala* Grown in Mongolia, *Food Science and Technology Research*, **23**, 63-70 (2017).
- 38) 島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈弘, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 穠山浩, 受田浩之, 既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の関係, *日本食品化学会会誌*, 印刷中.
- 39) Akiyama H, Nose M, Ohtsuki N, Hisaka S, Takiguchi H, Tada A, Sugimoto N, Fuchino H, Inui T, Kawano N, Hayashi S, Hishida A, Kudo T, Sugiyama K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshimatsu K, Evaluation of the safety and efficacy of extracts of *Glycyrrhiza uralensis* roots produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation system, *J. Nat. Med.*, 71, 265-271 (2017).

2. 学会発表

- 1) 天倉吉章, 好村守生, 森本沙羅, 吉田隆志, 多田敦子, 伊藤裕才, 杉本直樹, 山崎壮, 穠山浩, 既存添加物ゲンチアナ抽出物の成分研究, 日本食品化学学会第20回総会・学術大会, 2015.22.
- 2) 好村守生, 越智啓介, 多田敦子, 杉本直樹, 穠山浩, 天倉吉章, 既存添加物「モウソウチク抽出物」の成分研究, 日本生薬学会第62回年会, 2015.9.
- 3) 吉田晴菜, 杉脇秀美, 好村守生, 島村智子, 受田浩之, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 穠山浩, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物「生コーヒー豆抽出物」活性画分の成分解析, 第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2015.10.
- 4) 天倉吉章, 吉田晴菜, 杉脇秀美, 好村守生, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 穠山浩, 既存添加物「生コ

- 「一ヒ豆抽出物」の成分研究, 日本食品化学学会第 22 回総会・学術大会, 2016.6.
- 5) 田邊思帆里, 多田敦子, 古庄紀子, 建部千絵, 西川真寿美, 荒井なぎさ, 西崎雄三, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩, 食品添加物公定書における一般試験法の国際整合性に関する研究: 粘度測定法, 日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会, 2014.5.
- 6) 河崎裕美, 関口若菜, 多田敦子, 秋山卓美, 杉本直樹, 穠山浩, HILIC カラムを用いた LC/MS によるカラメル III 中の 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (THI) の直接定量, 日本食品衛生学会第 108 回学術講演会, 2014.12.
- 7) Sugimoto N., Takada M., Ishizuki K., Ohtsuki T., Tada A., Nishizaki Y., Suematsu T., Miura T., Yamada Y., Horinouchi T., Koike R., Kato T., Togawa T. Akiyama H., “AQARI” vs. “PULCON”, a comparison of qNMR: internal and external reference methods, *Pacificchem* 2015, 2015.12.
- 8) Miura T., Suematsu T., Sugimoto N., Nakao S., Takaoka S., Yamada Y., Development of quantity analytical standard by using qNMR, 3rd Annual Practical Applications of NMR in Industry Conference (PANIC), 2015.2.
- 9) 石附京子, 西崎雄三, 多田敦子, 箕川剛, 中島光一, 穠山浩, 杉本直樹, 佐藤恭子, 既存添加物クチナシ青色素の色素生成メカニズムの解明: 前駆体の構造決定, 食品化学学会, 2016.6.
- 10) 杉本直樹, qNMR による相対感度係数の算出とその有効利用について, *JAIAN*, 2016.8.
- 11) 杉本直樹, 定量 NMR/LC を用いた天然有機化合物の定量分析法の開発 (シンポジウム I 「定量 NMR から見えてくる世界」), 日本生薬学会第 63 回年会, 2016.9.
- 12) 黒江美穂, 山崎太一, 斎藤直樹, 中村哲枝, 沼田雅彦, 西崎雄三, 杉本直樹, 井原俊英, 新規定量法である qNMR/LC 法による非イオン界面活性剤標準液の濃度評価, 日本分析化学会第 65 回年会, 2016.9.
- 13) 斎藤直樹, 北牧祐子, 大塚聡子, 西崎雄三, 杉本直樹, 井原俊英, 定量 NMR における不純物の重なる信号に対するクロマトグラフィーを併用した新規評価法の確立, *NMR 討論会*, 2016.11.
- 14) 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穠山浩, 永津明人, 定量 NMR を利用した生薬成分の定量, 第 45 回生薬分析シンポジウム, 2016.11.
- 15) 田邊思帆里, 多田敦子, 古庄紀子, 建部千絵, 西川真寿美, 荒井なぎさ, 西崎雄三, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩, 食品添加物公定書における一般試験法の国際整合性に関する研究: 粘度測定法, 日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会, 2014.5.
- 16) 松田諭, 多田敦子, 大槻崇, 石附京子, 河崎裕美, 田原麻衣子, 杉本直樹, 穠山浩, 既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を用いた基礎的検討, 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会, 2014.12.
- 17) 西崎雄三, 多田敦子, 伊藤裕才, 大槻崇, 杉本直樹, 穠山浩, qNMR と HPLC を利用した天然苦味料ジャマイカカシア抽出物中のクアシン及びネオクアシンの新規定量法の開発, 日本薬学会第 135 回年会, 2015.3.
- 18) 加藤智久, 多田敦子, 河崎裕美, 西崎雄三, 石附京子, 建部千絵, 古庄紀

- 子, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩, NMR を用いた既存添加物カワラヨモギ抽出物の定量法の開発, 日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会, 2015.5.
- 19) Tada A., Sugimoto N., Nishizaki Y., Matsuda S., Kawasaki H., Ishizuki K., Ohtsuki T., Tahara M., Suematsu T., Yamada Y., Akiyama H., Examination of quantification methods of quercetin in food additives and reagents using ¹H quantitative NMR, Pacificchem 2015, 2015.12.
- 20) 藤原裕未, 大岩硯, 長坂泉紀, 永津明人, qHNMR 法を用いたカシュー中の anacardic acid の定量, 日本生薬学会第 62 年会, 2015.9.
- 21) 藤原裕未, 田中理恵, 永津明人, qHNMR 法による生薬シャゼンシ(車前子)中のゲニポシド酸の定量, 日本生薬学会第 61 年会, 2014.9.
- 22) 永津明人, 定量 NMR を用いた生薬の分析, 日本生薬学会第 63 年会, 2016.9.
- 23) 藤原裕未, 水野舞, 永津明人, 杉本直樹, 西崎雄三, 多田敦子, 穠山浩, 定量 NMR による生薬チョウジ中の eugenol の定量, 日本生薬学会第 63 年会, 2016.9.
- 24) 永津明人, 加藤志保里, 山田紗由美, 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穠山浩, 定量 NMR を用いたグルコサミンの定量法の確立, 日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, 2016.10.
- 25) 棚田千尋, 井之上浩一, 杉本直樹, 関俊哲, 轟木堅一郎, 豊岡利正, 穠山浩, UPLC によるクチナシ黄色素の成分分析に関する検討, 日本食品化学学会第 20 回総会・学術大会, 2013.8.
- 26) 井之上浩一, LC/MS を基盤とする天然添加物および含有成分の食品分析技術に関する研究, 日本食品化学学会第 20 回総会・学術大会, 2014.5.
- 27) 西川弘晃, 井之上浩一, 棚田千尋, 杉本直樹, 関俊哲, 轟木堅一郎, 穠山浩, 豊岡利正, 高速向流クロマトグラフィーによる加水分解クチナシ黄色素クロセチンの単離精製, 日本食品化学学会第 20 回総会・学術大会, 2014.5.
- 28) 高橋未来, 井之上浩一, 西崎雄三, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 穠山浩, 逆相系 HPLC による既存添加物・ゴマ油不けん化物の成分規格の検討, 日本薬学会第 136 年会, 2016.3.
- 29) 高橋未来, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 竹内弘明, 中川一弥, 穠山浩, 井之上浩一, 高速向流クロマトグラフィーによるゴマ油不けん化物からの高純度セサミンおよびセサモリンの単離精製, 日本食品化学学会第 22 回総会・学術大会, 2016.6.
- 30) 山内良子, 高野裕子, 小浜友紀子, 加治屋明子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穠山浩, 松井利郎, 石川洋哉, 酸化防止剤評価における各種抗酸化測定法の特性, 第 51 回化学関連支部合同九州大会, 2014.6.
- 31) 山内良子, 小浜友紀子, 加治屋明子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穠山浩, 松井利郎, 石川洋哉, 抗酸化能評価における一電子転移反応と水素原子転移反応の比較, 日本食品科学工学会第 61 回大会, 2014.8.
- 32) 田中由季乃, 上田忠治, 島村智子, 受田浩之, ポリオキソメタレート錯体固定化電極の酸化還元特性, 日本分析化学会第 63 年会, 2014.9.
- 33) Shimamura T., Ponghong K., Higuchi K., Kashiwagi T., Grudpan K., Ukeda H.,

Development of sequential injection analysis system for evaluating lipid peroxidation inhibitory activity of antioxidants, 19th International Conference on Flow Injection Analysis, 2014.11.

- 34) 島村智子, 吉田鉄平, 柏木丈拈, 受田浩之, 多田敦子, 杉本直樹, 穉山浩, ロダン鉄法による酸化防止剤の抗酸化力価評価, 第 27 回ビタミン研究会, 2016.1.
- 35) 島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈拈, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 穉山浩, 受田浩之, 既存添加物チャ抽出物中の成分含量と抗酸化力価の関係, 日本食品化学学会第 22 回総会・学術大会, 2016.6.
- 36) 草場悠里, 山内良子, 小林弘司, 島村智子, 受田浩之, 杉本直樹, 穉山浩, 石川洋哉, 既存添加物チャ抽出物の各種抗酸化能評価, 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 2016.7.

I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

平成26-28年度「既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究」

既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究
総合報告書

一般社団法人日本食品添加物協会

総合研究報告書

平成26-28年度「既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究」
既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究

業務受託者 上田 要一 所属 一般社団法人日本食品添加物協会 役職 専務理事
研究者 森 将人 所属 一般社団法人日本食品添加物協会 役職 常務理事

[はじめに]

既存添加物365品目中、成分規格の定められているものは128品目(130規格)にすぎず、約240品目(約250規格)については、未設定の状況にある。第9版食品添加物公定書は89品目が収載される予定であるが、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収載を目標に、自主規格の策定を進めてきた。

平成20年度には、第8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収載規格の見直しを実施し、「第4版既存添加物自主規格」を刊行し、既収載の142品目(既存添加物123品目及び一般飲食物添加物19品目)に加えて78品目を新規収載した。

また、既存添加物について自主規格案の策定検討及び見直し検討を推進してきた。

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。

本研究では作成した第10版食品添加物公定書に向けた検証用規格案及び第5版自主規格案の一部品目について、見直しあるいは裏付け試験を実施した。また、残された品目の中から情報の集まり、環境の整ったものについて新たに第5版自主規格案として成分規格案を作成した。更に、既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種について、削除、変更又は拡大の必要性の有無を調査した。

研究結果の概要と考察

1. 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収載品について、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版食品添加物公定書に向けた検証用規格の見直し及び裏付け試験

既存添加物365品目中、第8版食品添加物公定書に収載されている128品目、第9版食品添加物公定書に収載される予定の87品目を除く残りの品目について、成分規格検証用規格について見直しを実施した。

(3) 第5版既存添加物自主規格に向けた成分規格の検討

前項の検証用規格ができていない品目について、成分規格が設定可能なものから新規に自主規格案を作成するとともに、規格設定の根拠となる関連情報(海外規格を含む各種規格との対比)を調査した。また、作成した自主規格案について、見直しあるいは裏付け試験を実施した。

(4) 既存添加物の品目ごとの基原生物の調査

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

2. 調査研究者

これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

3. 研究結果の概要

(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目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まとめた。

既存添加物の成分規格(案)の整備状況ならびに及び国内外の規格の有無。

3年間における第10版食品添加物公定書収載成分規格(案)及び第5版既存添加物自主規格成分規格(案)の整備状況を年度毎に整理し資料に収載した。

自社内裏付け試験のデータが取得できている品目については、報告書記載ページを記載した。また、各品目における国内外の規格の有無についても合わせて記載した。参考までに平成25年度の規格作成状況も記載した。

既存添加物の安全性試験実施状況

各品目に関して実施された安全性試験及び実施年度等を資料に収載した。

(2) 第10版食品添加物公定書に向けた検証用成分規格の見直し

平成28年度に第10版食品添加物公定書に向けて、新たに2品目(表1)について成分規格検証用の規格案を作成した。また、平成26年度及び平成27年度に作成した規格案のうち、12品目(表2)について規格案、関連資料を見直し、改正した。新規作成及び改正後の規格案については関連資料とともに部会別に整理して資料に収載した。

表1 第10版食品添加物公定書第4次検証品目

| 部会 | 既存No | 用途 | 既存添加物名簿名称 |
|----|------|-------|-----------|
| 4 | 359 | 増粘安定剤 | レバン |
| 6 | 364 | ガムベース | ロシン |

表2 第10版食品添加物公定書 検証用成分規格見直し品目

| 部会 | 既存No | 用途 | 既存添加物名簿名称 |
|----|------|-------------|---------------|
| 4 | 040 | 増粘安定剤/ガムベース | エレミ樹脂 |
| 4 | 145 | 増粘安定剤・製造用剤 | サバクヨモギシードガム |
| 4 | 229 | 増粘安定剤 | トロロアオイ |
| 5 | 076 | 酸化防止剤 | カンゾウ油性抽出物 |
| 5 | 091 | 酸化防止剤 | カテキン |
| 5 | 202 | 酸化防止剤 | チャ抽出物 |
| 5 | 255 | 酸化防止剤 | ヒマワリ種子抽出物 |
| 9 | 027 | 苦味料 | イソアルファー苦味酸 |
| 9 | 120 | 苦味料 | ゲンチアナ抽出物 |
| 9 | 161 | 苦味料 | ジャマイカカссия抽出物 |
| 10 | 127 | 乳化剤 | 酵素処理レシチン |
| 10 | 172 | 乳化剤 | スフィンゴ脂質 |

:既添No:数字は既存添加物番号

本研究の3年間における第10版食品添加物公定書に向けた成分規格検証用の新規規格案作成状況について表3にまとめた。増粘安定剤、製造用剤をはじめ3年間の合計で30品目について新たに規格案を作成することができた。

現時点では、平成25年度に作成済みの35品目(うち9品目は一般飲食物添加物)と合わせて合計で65品目について検証用規格案の作成が終了している。

表3 第10版食品添加物公定書 新規規格案作成状況

| 部会 | 用途 | H26年度 | H27年度 | H28年度 | 合計 |
|----|-----------|-------|-------|-------|----|
| 2 | 着色料 | 1 | - | - | 1 |
| 4 | 増粘安定剤 | 10 | - | 1 | 11 |
| 5 | 酸化防止剤 | 5 | - | - | 5 |
| 6 | ガムベース・光沢剤 | 1 | - | 1 | 2 |
| 9 | 調味料・苦味料 | 2 | - | - | 2 |
| 10 | 乳化剤 | 1 | - | - | 1 |
| 13 | 製造用剤・ミネラル | 8 | - | - | 8 |
| | 合計 | 28 | 0 | 2 | 30 |

(3) 第5版既存添加物自主規格案の作成と見直し

第9版食品添加物公定書後に残ると考えられる既存添加物から、前述の第10版食品添加物公定書に向けた検証用規格を作成したものを除き、使用実態の再調査及び第5版既存添加物自主規格の作成を検討している。

本年度は成分規格案を作成するために必要な情報が揃った14品目(表4)について規格案を作成するとともに、昨年度までに作成した12品目の自主規格案(表5)について見直しあるいは裏付け試験を実施した。いずれも部会別に整理し別紙資料4に収載した。

表4 第5版既存添加物自主規格案新規作成品目

| 部会 | 既存 No | 用途 | 既存添加物名簿名称 |
|----|-------|-------------|-----------|
| 2 | 159 | 着色料 | シタン色素 |
| 6 | 036 | ガムベース / 光沢剤 | ウルシロウ |
| 6 | 094 | ガムベース | グアヤク樹脂 |
| 6 | 142 | ガムベース / 光沢剤 | コメヌカロウ |
| 6 | 144 | ガムベース / 光沢剤 | サトウキビロウ |
| 6 | 333 | ガムベース / 光沢剤 | モクロウ |
| 13 | 043 | 製造用剤 | オゾン |
| 13 | 168 | 製造用剤 | 水素 |
| 13 | 176 | 製造用剤 | ゼイン |
| 13 | 214 | 製造用剤 | 銅 |
| 13 | 242 | 製造用剤 | 白金 |
| 13 | 246 | 製造用剤 | パラジウム |
| 13 | 266 | 製造用剤 | ブタン |
| 13 | 275 | 製造用剤 | プロパン |

: 既添 No: 数字は既存添加物番号

表5 第5版既存添加物自主規格案見直し・裏付け試験実施品目

| 部会 | 規格見直し | 裏付け試験 | 既存 No | 用途 | 既存添加物名簿名称 |
|----|-------|-------|-------|-------------|---------------|
| 4 | | - | 001 | 増粘安定剤 | アウレオバシジウム培養液 |
| 5 | | - | 196 | 酸化防止剤 | 単糖・アミノ酸複合物 |
| 6 | | | 042 | ガムベース | オゾケライト |
| 6 | | - | 099 | ガムベース | グッタハンカン |
| 6 | - | | 100 | ガムベース | グッタペルカ |
| 6 | - | | 138 | ガムベース | ゴム |
| 6 | | - | 152 | ガムベース / 光沢剤 | シェラックロウ |
| 6 | | - | 307 | ガムベース | ホホバロウ |
| 9 | | - | 041 | 調味料 | 塩水湖水低塩化ナトリウム液 |
| 9 | | - | 357 | 苦味料 | レイシ抽出物 |
| 10 | | - | 187 | 乳化剤 | ダイズサポニン |
| 10 | | - | 195 | 乳化剤 | 胆汁末 |

: 既添 No: 数字は既存添加物番号

: 暫定規格

なお、第14部会においては、昨年度に引き続き基原別の香辛料抽出物について、自主規格設定のために必要な使用実態や関連規格などの調査を実施した。

以上、新規作成及び見直した自主規格案とその関連資料並びに調査結果については、部会別に整理して別紙資料4に収載した。

本年度を含む3年間における第5版既存添加物自主規格の新規規格案の作成状況は、表6にまとめた通りである。最も多い製造用剤25品目を含め3年間の合計で44品目(うち5品目については暫定規格)について新たに規格案を作成することができた。

第5版既存添加物自主規格の刊行に向けた中間取りまとめで後述するように、現時点での自主規

格案は合計で136品目となる。

表6 第5版既存添加物自主規格 新規規格案作成状況

| 部会 | 分野 | H26年度 | H27年度 | H28年度 | 合計 |
|----|-----------|-------|-------|-------|-------|
| 2 | 着色料 | - | 1 | 1 | 2 |
| 4 | 増粘安定剤 | - | - | - | - |
| 5 | 酸化防止剤 | 4(2) | - | - | 4(2) |
| 6 | ガムベース・光沢剤 | 3 | - | 5 | 8 |
| 9 | 調味料・苦味料 | 3(2) | - | - | 3(2) |
| 10 | 乳化剤 | 2(1) | - | - | 2(1) |
| 13 | 製造用剤・ミネラル | 16 | 1 | 8 | 25 |
| | 合計 | 28(5) | 2 | 14 | 44(5) |

カッコ内は暫定規格数

(4) 既存添加物の品目ごとの基原生物等の調査

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

3年間では、チャ抽出物、グルコサミン、キチン、キトサン、スフィンゴ脂質、ファフィア色素、トウガラシ水性抽出物、トウガラシ色素、生コーヒー豆抽出物、アグロバクテリウムスクシノグリカン及びローズマリー抽出物の計11品目の改正要望が寄せられた。これらの一覧表も資料に収載した。

基原生物等の調査については、規格案の完成度の高いものを優先して実施していることから、全ての品目において精査できていない為、今後も引き続き調査する必要があると考える。

(5) 第5版既存添加物自主規格の刊行に向けた中間取りまとめ

第10食品添加物公定書の検討に先立ち、今後、第5版既存添加物自主規格の刊行を予定している。収載する規格は、第5版既存添加物自主規格及び第10版食品添加物公定書に向けて作成した成分規格検証用の規格案を反映させた自主規格となる。

これまでに作成した自主規格136品目(表7)を取りまとめ、資料に収載した。

なお、参考規格を含め、今後見直しが予定されている品目の規格案については収載しなかった。

また、今回収載した規格についても、新たな情報や裏付け試験の結果により、今後も改正する予定である。

表7 第5版既存添加物自主規格収載予定品目

| 通しNo. | 部会 | 既存No | 用途 | 既存添加物名簿名称 |
|-------|----|------|----------|-------------|
| 1 | 1 | 270 | 甘味料 | ブラジルカンゾウ抽出物 |
| 2 | 1 | 飲食 | 甘味料 | カンゾウ末 |
| 3 | 2 | 024 | 着色料 | アルミニウム |
| 4 | 2 | 047 | 着色料 | オレンジ色素 |
| 5 | 2 | 051 | 着色料 | カキ色素 |
| 6 | 2 | 087 | 着色料 | 魚鱗箔 |
| 7 | 2 | 089 | 着色料・製造用剤 | 金 |
| 8 | 2 | 090 | 着色料・製造用剤 | 銀 |

| | | | | |
|----|---|-----|---------------|-------------------|
| 9 | 2 | 114 | 着色料 | クーロー色素 |
| 10 | 2 | 135 | 着色料 | 骨炭色素 |
| 11 | 2 | 149 | 着色料 | シアナット色素 |
| 12 | 2 | 159 | 着色料 | シタン色素 |
| 13 | 2 | 165 | 着色料 | 植物炭末色素 |
| 14 | 2 | 258 | 着色料 | ファフィア色素 |
| 15 | 2 | 282 | 着色料 | ペカンナッツ色素 |
| 16 | 2 | 324 | 着色料 | ムラサキヤマイモ色素 |
| 17 | 2 | 飲食 | 着色料 | アカゴメ色素 |
| 18 | 2 | 飲食 | 着色料 | アカダイコン色素 |
| 19 | 2 | 飲食 | 着色料 | イカスミ色素 |
| 20 | 2 | 飲食 | 着色料 | エルダーベリー色素 |
| 21 | 2 | 飲食 | 着色料 | クランベリー色素 |
| 22 | 2 | 飲食 | 着色料 | サフラン色素 |
| 23 | 2 | 飲食 | 着色料 | シソ色素 |
| 24 | 2 | 飲食 | 着色料 | ストロベリー色素 |
| 25 | 2 | 飲食 | 着色料 | チコリ色素 |
| 26 | 2 | 飲食 | 着色料 | リ色素 |
| 27 | 2 | 飲食 | 着色料 | ハイビスカス色素 |
| 28 | 2 | 飲食 | 着色料 | ブドウ果汁色素 |
| 29 | 2 | 飲食 | 着色料 | ブラックベリー色素 |
| 30 | 2 | 飲食 | 着色料 | ブルーベリー色素 |
| 31 | 2 | 飲食 | 着色料 | ポイセンベリー色素 |
| 32 | 2 | 飲食 | 着色料 | ホワートルベリー色素 |
| 33 | 2 | 飲食 | 着色料 | ラズベリー色素 |
| 34 | 2 | 飲食 | 着色料 | レッドカーラント色素 |
| 35 | 2 | 飲食 | 着色料 | パープルキャロット色素 |
| 36 | 2 | 飲食 | 着色料 | アカジャガイモ色素 |
| 37 | 3 | 074 | 保存料 | カワラヨモギ抽出物 |
| 38 | 3 | 175 | 製造用剤 / 日持向上剤 | セイヨウワサビ抽出物 |
| 39 | 3 | 216 | 製造用剤 / 日持向上剤 | トウガラシ水性抽出物 |
| 40 | 3 | 329 | 製造用剤 / 日持向上剤 | モウソウチク乾留物 |
| 41 | 3 | 330 | 製造用剤 / 日持向上剤 | モウソウチク抽出物 |
| 42 | 4 | 001 | 増粘安定剤 | アウレオバシジウム培養液 |
| 43 | 4 | 004 | 増粘安定剤 | アグロバクテリウムスクシノグリカン |
| 44 | 4 | 013 | 増粘安定剤 | アマシードガム |
| 45 | 4 | 019 | 増粘安定剤 | アラビノガラクトン |
| 46 | 4 | 040 | 増粘安定剤 / ガムベース | エレミ樹脂 |
| 47 | 4 | 053 | 増粘安定剤 | カシアガム |
| 48 | 4 | 062 | 増粘安定剤 | キチン |
| 49 | 4 | 064 | 増粘安定剤・製造用剤 | キトサン |
| 50 | 4 | 104 | 増粘安定剤 | グルコサミン |
| 51 | 4 | 92 | 増粘安定剤 | グァーガム酵素分解物 |
| 52 | 4 | 145 | 増粘安定剤・製造用剤 | サバクヨモギシードガム |
| 53 | 4 | 229 | 増粘安定剤 | トロロアオイ |
| 54 | 4 | 257 | 増粘安定剤 | ファーセララン |
| 55 | 4 | 336 | 増粘安定剤 | モモ樹脂 |

| | | | | |
|-----|----|-----|-----------|------------------|
| 56 | 4 | 359 | 増粘安定剤 | レバン |
| 57 | 5 | 076 | 酸化防止剤/日持 | カンソウ油性抽出物 |
| 58 | 5 | 091 | 酸化防止剤 | カテキン |
| 59 | 5 | 093 | 酸化防止剤 | グアヤク脂 |
| 60 | 5 | 095 | 酸化防止剤 | クエルセチン |
| 61 | 5 | 115 | 酸化防止剤/日持 | クローブ抽出物 |
| 62 | 5 | 136 | 酸化防止剤 | ゴマ油不けん化物 |
| 63 | 5 | 196 | 酸化防止剤 | 単糖・アミノ酸複合物 |
| 64 | 5 | 202 | 酸化防止剤 | チャ抽出物 |
| 65 | 5 | 232 | 酸化防止剤 | 生コーヒー豆抽出物 |
| 66 | 5 | 255 | 酸化防止剤 | ヒマワリ種子抽出物 |
| 67 | 5 | 306 | 酸化防止剤 | 没食子酸 |
| 68 | 5 | 365 | 酸化防止剤 | ローズマリー抽出物 |
| 69 | 6 | 036 | ガムベース/光沢剤 | ウルシロウ |
| 70 | 6 | 042 | ガムベース | オゾケライト |
| 71 | 6 | 094 | ガムベース | グアヤク樹脂 |
| 72 | 6 | 099 | ガムベース | グッタハンカン |
| 73 | 6 | 100 | ガムベース | グッタペルカ |
| 74 | 6 | 138 | ガムベース | ゴム |
| 75 | 6 | 142 | ガムベース/光沢剤 | コメヌカロウ |
| 76 | 6 | 144 | ガムベース/光沢剤 | サウキピロウ |
| 77 | 6 | 152 | ガムベース/光沢剤 | セラックロウ |
| 78 | 6 | 154 | ガムベース | ジェルトン |
| 79 | 6 | 199 | ガムベース | チクル |
| 80 | 6 | 307 | ガムベース | ホホバロウ |
| 81 | 6 | 321 | ガムベース | ミルラ |
| 82 | 6 | 333 | ガムベース/光沢剤 | モクロウ |
| 83 | 6 | 364 | ガムベース | ロシン |
| 84 | 7 | 028 | 酵素 | イソマルトデキストラナーゼ |
| 85 | 8 | 029 | 酸味料 | イタコン酸 |
| 86 | 9 | 027 | 苦味料 | イソアルファー苦味酸 |
| 87 | 9 | 041 | 調味料 | 塩水湖水低塩化ナトリウム液 |
| 88 | 9 | 120 | 苦味料 | ゲンチアナ抽出物 |
| 89 | 9 | 124 | 苦味料 | 酵素処理ナリンジン |
| 90 | 9 | 161 | 苦味料 | ジャマイカカссия抽出物 |
| 91 | 9 | 182 | 調味料 | 粗製海水塩化カリウム |
| 92 | 9 | 236 | 苦味料 | ニガヨモギ抽出物 |
| 93 | 9 | 357 | 苦味料 | レイシ抽出物 |
| 94 | 10 | 127 | 乳化剤 | 酵素処理レシチン |
| 95 | 10 | 172 | 乳化剤 | スフィンゴ脂質 |
| 96 | 10 | 187 | 乳化剤 | ダイズサポニン |
| 97 | 10 | 195 | 乳化剤 | 胆汁末 |
| 98 | 13 | 009 | 製造用剤 | アスペルギルステレウス糖たん白質 |
| 99 | 13 | 043 | 製造用剤 | オゾン |
| 100 | 13 | 048 | 製造用剤 | 海藻灰抽出物 |
| 101 | 13 | 052 | 製造用剤 | 花こう斑岩 |
| 102 | 13 | 118 | 製造用剤 | くん液 |

| | | | | |
|-----|----|-----|------|---------------|
| 103 | 13 | 120 | 製造用剤 | 高級脂肪酸(ステアリン酸) |
| 104 | 13 | 120 | 製造用剤 | 高級脂肪酸(ベヘニン酸) |
| 105 | 13 | 120 | 製造用剤 | 高級脂肪酸(パルミチン酸) |
| 106 | 13 | 120 | 製造用剤 | 高級脂肪酸(ラウリン酸) |
| 107 | 13 | 120 | 製造用剤 | 高級脂肪酸(カプリル酸) |
| 108 | 13 | 120 | 製造用剤 | 高級脂肪酸(カプリン酸) |
| 109 | 13 | 120 | 製造用剤 | 高級脂肪酸(ミリスチン酸) |
| 110 | 13 | 148 | 製造用剤 | 酸素 |
| 111 | 13 | 155 | 製造用剤 | 分岐 シクロデキストリン |
| 112 | 13 | 158 | 製造用剤 | シソ抽出物 |
| 113 | 13 | 163 | 製造用剤 | 乳清焼成カルシウム |
| 114 | 13 | 173 | 製造用剤 | 生石灰 |
| 115 | 13 | 198 | 製造用剤 | 柿タンニン |
| 116 | 13 | 198 | 製造用剤 | ミモザタンニン |
| 117 | 13 | 200 | 製造用剤 | 窒素 |
| 118 | 13 | 201 | 製造用剤 | チャ乾留物 |
| 119 | 13 | 212 | 製造用剤 | 鉄 |
| 120 | 13 | 214 | 製造用剤 | 銅 |
| 121 | 13 | 227 | 製造用剤 | トレハロース |
| 122 | 13 | 237 | 製造用剤 | ニッケル |
| 123 | 13 | 239 | 製造用剤 | ばい煎コメヌカ抽出物 |
| 124 | 13 | 240 | 製造用剤 | ばい煎ダイズ抽出物 |
| 125 | 13 | 249 | 製造用剤 | ヒアルロン酸 |
| 126 | 13 | 262 | 製造用剤 | フィチン(抽出物) |
| 127 | 13 | 266 | 製造用剤 | ブタン |
| 128 | 13 | 275 | 製造用剤 | プロパン |
| 129 | 13 | 297 | 製造用剤 | ヘブタン |
| 130 | 13 | 302 | 製造用剤 | ヘリウム |
| 131 | 13 | 318 | 製造用剤 | 貝殻未焼成カルシウム |
| 132 | 13 | 318 | 製造用剤 | 卵殻未焼成カルシウム |
| 133 | 13 | 327 | 製造用剤 | メバロン酸 |
| 134 | 13 | 331 | 製造用剤 | 木材チップ |
| 135 | 13 | 332 | 製造用剤 | 木炭 |
| 136 | 13 | 356 | 製造用剤 | ルテニウム |

: 既添 No: 数字は既存添加物番号

: 暫定規格

下線: 第 10 版食品添加物公定書の検証用規格あり

(6) 食品添加物公定書既収載品目の見直し

コチニール色素公定規格見直しの検討

海外でコチニール色素を化学反応させた 4-アミノカルミン酸(日本では未指定)が流通しており、日本においても 4-アミノカルミン酸で着色された食品の輸入が確認されている。一方、現状のコチニール色素の公定書規格では 4-アミノカルミン酸 100%品(原体)であれば、確認試験で不適となるが、配合量により適となる可能性がある。

ピロ亜硫酸ナトリウムに関する公定書の別名見直しの検討

食品衛生法施行規則の別表第一において、ピロ亜硫酸ナトリウムの別名として亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム及び酸性亜硫酸ソーダが設定されている。一方、ピロ亜硫酸ナトリウムの公定書規格の別名には亜硫酸水素ナトリウムが含まれていない。現状のままでは公定書規格に適合しない亜硫酸水素ナトリウムであっても指定添加物として使用可能である。

ピロ亜硫酸ナトリウムは指定添加物であり、本研究の対象ではないが、安全性確保の観点から、ピロ亜硫酸ナトリウムに関する日本薬局方等の他の規格との比較検討を行った。その結果、公定書の別名として亜硫酸水素ナトリウムを加えるだけで規格値を変更する必要はないことが判明した。

4. 考察

本研究の3年間の合計で30品目について新たに検証用規格案を作成することができた。現時点では、平成25年度に作成済みの35品目（うち9品目は一般飲食物添加物）と合わせて合計で、65品目について検証用規格案の作成が終了している。

作成した検証用規格案については、裏付けデータが取得できていない品目もあることから、今後も規格の妥当性を検証する為に、環境の整った品目から裏付け試験を行う等、規格の完成度向上に向け更なる検討が必要と考える。

残された既存添加物についても、第5版既存添加物自主規格の作成を目指して検討を行った。3年間の合計で44品目（うち5品目については暫定規格）について新たに自主規格案を作成することができた。

第5版既存添加物自主規格の刊行に向け、現時点で収載予定の136品目の自主規格を取りまとめたが、裏づけ試験等により見直しが必要な品目も含まれている。また、来年度に規格化が予定されている品目も含め、現時点で残された品目については、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、残された規格設定が困難な品目に関する今後の取扱いについても検討を開始する必要がある。

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穂山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。

以上

別紙

調査研究者名簿

| | 氏名 | 企業名 |
|----------------------|-------|--------------------|
| 技術委員長 | 森 将人 | 一般社団法人日本食品添加物協会 |
| 自主規格専門委員長,部会長・部会担当 | 西宮 隆 | 株式会社タイショーテクノス |
| 規格専門委員長 | 斎藤知明 | MCフードスペシャリティーズ株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 山本正次 | 丸善製薬株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 中島光一 | 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 北村 智 | 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 義平邦周 | 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 橋本成久 | 太陽化学株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 松岡賢一 | DSP五協フード&ケミカル株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 増田哲也 | エーザイフード・ケミカル株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 植田実木生 | 扶桑化学工業株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 尾崎史浩 | 株式会社ロッテ |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 卯津羅健作 | ナガセケムテックス株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 香村正徳 | 味の素株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 北川剛司 | 理研ビタミン株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 小野茂一 | 大宮糧食工業株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 坂井昭浩 | オルガノフードテック株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 村上和也 | 富田製薬株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 深尾 正 | 日本新薬株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 関谷史子 | 高砂香料工業株式会社 |
| 自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当 | 稲井隆之 | 長谷川香料株式会社 |
| 技術顧問 | 山田 隆 | 一般社団法人日本食品添加物協会 |
| 技術顧問 | 高橋仁一 | 一般社団法人日本食品添加物協会 |

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26～28年度分担総合研究報告書

研究分担課題：既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究
研究分担者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

要旨 既存添加物名簿に記載されている生コーヒー豆抽出物,ゲンチアナ抽出物,モウソウチク抽出物,カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として,製品中の含有成分について精査した.各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し,生コーヒー豆抽出物から19種の化合物を単離,構造解析し,主検出成分を明らかにした.またDPPHラジカル消去活性を指標に有効成分について考察した.ゲンチアナ抽出物からは17種の化合物を単離,構造解析し,主成分,定性試験,定量分析について提案した.モウソウチク抽出物からは12種の化合物を単離,構造解析し,主検出成分について考察した.カキ色素については,縮合型タンニン高分子画分の存在が示唆されたため,製品中の平均分子量について検討した.これら結果に基づき,各添加物製品含有成分について,化学的特徴を考察することができた.

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 講師
杉脇 秀美 松山大学薬学部 嘱託職員

A. 研究目的

既存添加物の多くは植物抽出物であり,多数の成分が含まれているため,その品質管理には詳細な成分解析に基づいた規格作成が必要であるが,未検討なものについては,その精査が求められる.本研究では,成分規格が設定されていない生コーヒー豆抽出物,ゲンチアナ抽出物,モウソウチク抽出物,カキ色素について,品質規格作成のための基礎的データの集積を目的に,製品中の含有成分について検討した.

B. 研究方法

生コーヒー豆抽出物,ゲンチアナ抽出物,モウソウチク抽出物,カキ色素について,それぞれ各種カラムクロマトグラフィー（YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20, Chromatorex ODS等）による分離・精製を繰り返し,化合物の単離を行った.単離した各化合物については,機器分析データの標品との直接比較あるいは文献値との

比較によって化合物の同定,構造解析を行った.高分子画分の分析はゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）により行った.

C. 研究結果及び考察

生コーヒー豆抽出物から,19種の化合物〔3-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid,4-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid,5-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid),3-*O*-*trans*-feruloylquinic acid,4-*O*-*trans*-feruloylquinic acid,5-*O*-*trans*-feruloylquinic acid,caffeine,3,4-di-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid,4,5-di-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid,*trans*-*p*-coumaroyl-L-tryptophan,3,5-di-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid,ethyl chlorogenate,3-*O*-*trans*-feruloyl-5-*O*-*trans*-caffeoylquinic acid,*trans*-caffeoyl-L-tryptophan,vanillin,3-*O*-*trans*-caffeoyl-4-*O*-*trans*-feruloylquinic acid,4-*O*-*trans*-caffeoyl-5-*O*-*trans*-feruloylquinic acid,*trans*-feruloyl-L-tryptophan,*trans*-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester〕を単離した.本検討から,主検出成分はcaffeine及びchlorogenic acidであり,またDPPHラジカル消去活性を指標とした酸化防止能の結果から,有効成分はchlorogenic acidをはじめと

するカフェー酸誘導体であることが示唆された。

ゲンチアナ抽出物からは、17 種の化合物〔anofinic acid, 2-methoxyanofinic acid, 5-hydroxymethyl-2-furfural, 2,3-dihydroxybenzoic acid, furan-2-carboxylic acid, loganic acid, gentiopicroside, isovitexin, sweroside, vanillic acid, gentisin, isogentisin, 6'-*O*-glucosylgentiopicroside, gentisin 7-*O*-primeveroside, isogentisin 3-*O*-primeveroside, swertiajaposide D, loganic acid 7-(2'-hydroxy-3'-*O*-β-D-glucopyranosyl)benzoate〕を単離し、確認試験として HPLC 及び TLC による定性、定量分析について、gentiopicroside 及び amarogentin を指標成分として分析する方法を提案した。

モウソウチク抽出物からは、11 種の化合物〔5-hydroxymethyl-2-furfural, 4-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, *trans*-ferulic acid, *N,N'*-diferuloylputrescine, arbutin, tachioside, isochlorogenic acid, 3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside, koaburaside, lyoniresinol 9'-*O*-glucoside, propiophenone 4'-*O*-primeveroside〕を単離し、その構造を明らかにした。また、単離した化合物を標準品として HPLC 分析を行った結果、主成分として *p*-coumaric acid, 3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside, lyoniresinol 9'-*O*-glucoside を検出した一方、本製品中の主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone はマイナー成分として観察されるのみであった。他の製品を分析し製品間における成分比較を行った結果、3 製品間で共通の成分が観察され、本研究で明らかにした成分が指標成分の候補となり得ることが考察されたが、ピークが検出されない製品もあり、製品間でのばらつきが認められた。また、既存添加物名簿において主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は今回の測定条件ではいずれの製品中にもほとんど検出されず、製品の同等性確保のためにも指標成分の提案が示唆された。

カキ色素については、製品の分離精製を繰り返し、HPLC でほぼ 1 ピークのフラクションを得

ることができたが、機器分析により構造解析を試みたところ、夾雑物が認められさらなる精製を計画中である。一方、製品には構造不特定の縮合型タンニン類が含まれることが示唆されたことから、高分子領域の分子量について GPC により測定し、重量平均分子量約 20 万であることが明らかとなった。今後これらの構造的特徴についても検討を要する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amakura Y, Yoshimura M, Yoshida T, Tada A, Ito Y, Yamazaki T, Sugimoto N, Akiyama H, “Chromatographic evaluation of the components of grape skin extract used as food additives”, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 22, 108-114 (2015).
- 2) Amakura Y, Yoshimura M, Morimoto S, Yoshida T, Tada A, Ito Y, Yamazaki T, Sugimoto N, Akiyama H, “Chromatographic evaluation and characterization of components of gentian root extract used as food additives”, *Chem. Pharm. Bull.*, 64, 78-82 (2016).

2. 学会発表

- 1) 天倉吉章, 好村守生, 森本沙羅, 吉田隆志, 多田敦子, 伊藤裕才, 杉本直樹, 山崎壮, 穠山浩, 既存添加物ゲンチアナ抽出物の成分研究, 日本食品化学学会第 20 回総会・学術大会, 2014 年 5 月 (東京)
- 2) 好村守生, 越智啓介, 多田敦子, 杉本直樹, 穠山浩, 天倉吉章, 既存添加物「モウソウチク抽出物」の成分研究, 日本生薬学会第 62 回年会, 2015 年 9 月 11 日 (岐阜)
- 3) 吉田晴菜, 杉脇秀美, 好村守生, 島村智子, 受田浩之, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 穠山浩, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物「生コーヒー豆抽出物」活性画分の成分解析, 第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2015 年 10 月 31 日 (高知)
- 4) 天倉吉章, 吉田晴菜, 杉脇秀美, 好村守生, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 穠

山 浩，既存添加物「生コーヒー豆抽出物」の
成分研究，日本食品化学学会第 22 回総会・学
術大会，2016 年 6 月 3 日（高知）

H. 健康危機情報
なし

G. 知的財産権の出願，登録状況
なし

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26～28年度分担総合研究報告書
既存添加物の有効成分に関する研究

分担研究者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

要旨 既存添加物の有効成分に関する研究として、「ジャマイカカussia抽出物」の有効成分の新規定量分析法の検討、「クエルセチン」の定量法確立のための検討、粘度測定法に関する検討、「カンゾウ油性抽出物」の抗酸化成分の分離、解析及び単離・同定に関する研究、「カワラヨモギ抽出物」の有効成分である抗菌活性成分の定量法の開発に関する研究を行った。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
受田浩之 高知大学
島村智子 高知大学
田邊思帆里 国立医薬品食品衛生研究所
佐藤恭子 国立医薬品食品衛生研究所
建部千絵 国立医薬品食品衛生研究所
河崎裕美 国立医薬品食品衛生研究所
加藤智久 国立医薬品食品衛生研究所
松田 諭 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

第8版公定書以降、既存添加物品目では、添加物としての有効性や正しい基原の原材料が使用されていること、有効成分の確認及びその含量が正しく測定できることが特に重要と考え、規格設定が行われてきた。しかしながら、既存添加物品目によっては、有効成分やその寄与率が明確でないものや、有効成分が明らかであっても、それを正確に定量する方法が確立されていないものが多数残されている。また、HPLC等による分析手法では、化合物により検出感度が固有であり異なることから、測定対象と同一の化合物の標準品を用い、これを基準に定量計算を行う方法が一般的である。しかしながら、既存添加物の有効成分に関しては、市販試薬の入手が困難かつ高価な場合があり、一般

的なクロマトグラフィーによる定量法の適用が困難であり、検討が必要とされている。本研究では、既存添加物の有効成分に関するこれらの課題を解決すべく、様々な手法を用いた研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

各既存添加物品目およびその有効成分の標準品について、国際単位系（SI）にトレーサブルな内標準物質を用いて定量 NMR を実施し、含有成分の正確な純度を求め、各研究に応用した。LC/MS(/MS)を活用し、各成分の定性に用いた。また、有効成分そのものの標準品の入手が困難な場合は、別に汎用性の高い分析用の内標準物質を定量用標準として立て、検出感度の正確な比を別に求め、両者を適用することで、相対感度係数を用いた定量を新たに検討した。

C. 結果及び考察

C-1) 既存添加物ジャマイカカussia抽出物と天然香料クワッシャ中におけるクアシン、ネオクアシンの新規定量分析法の検討

「ジャマイカカussia抽出物」は天然由来の苦味料、「クワッシャ」は天然由来の香料として使用され、それぞれ既存添加物と天然香料に分類される食品添加物である。両品目の有効成分はいずれもクアシン及びネオクアシンとされているが、これら有効成分の定量用標準品は市販されていない。そこで、安価で入手しやすく、

純度も高いと予想される 4-ヒドロキシ安息香酸 (4HBA) を両有効成分の定量用内標準物質として選定し、クアシン及びネオクアシンそのものの定量用標準品を必要としない

HPLC/PDA による定量法を確立することを目的とした ^1H -qNMR から求めた 4HBA 市販試薬の純度は、試薬に記載された純度値と殆ど差異はなく 100.43%であった。このことから、市販の 4HBA を購入して用いれば、表示純度との差を気にせずに定量用内標準として使用できると考えられた。そこで、4HBA とクアシン及びネオクアシンの混合液を用い、 ^1H -qNMR により正確なモル比を求め、HPLC/PDA により吸光度比を求め、これら得られた値を元に 4HBA に対するクアシン及びネオクアシンのモル吸光係数比を算出したところ、0.84 及び 0.85 であることが明らかとなった。純度既知の 4HBA を内標準として、モル吸光係数比を適用した HPLC/PDA により添加物製品中のクアシン及びネオクアシンを定量したところ、国際単位系 (SI) にトレサブルな 1,4-BTMSB- d_4 を内標準とした ^1H -qNMR により求めたクアシン及びネオクアシンの定量値と殆ど差異はなかった (1.2% 以下)。モル吸光係数比を適用した定量法は、クアシン及びネオクアシンそのものの定量用標準品を必要とせず、これらの製品中の含量を求められる試験法として有用であることが明らかとなった。

C-2) 既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を応用した検討

天然由来の酸化防止剤である既存添加物クエルセチンは、食品添加物公定書未収載であり、成分規格案の作成を行う上で定量法の確立が必要である。そこで本研究では、 ^1H -NMR による定量 NMR (quantitative NMR: qNMR) を適用し、試薬や添加物の正確な quercetin 含量を求めることにより、既存添加物クエルセチンの定量法確立のための基礎的検討を行った。本研究により、既存添加物クエルセチンの成分規格作成に有用な基礎データを得ることができた。また、これらの結果より、標準試薬 (qNMR 純度適用) を用いた LC/UV による quercetin の定量が最も

適切であることが示唆された。

C-3) 粘度測定法に関する検討

物質の粘度を測定する手法として、様々な粘度計が存在する。食品添加物公定書において粘度測定法は、毛細管粘度計法 (第 1 法) と回転粘度計法 (第 2 法) が規定されている。一方、日本工業規格 (JIS) における粘度測定法としては、細管粘度計、落球粘度計、共軸二重円筒形回転粘度計、単一円筒形回転粘度計、円すい - 平板形回転粘度計の他、近年、振動粘度計が追加されている。本報告では、食品添加物公定書、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JIS、JCSS 等における粘度測定法を調査し、比較整理したので報告する。また、JIS における振動粘度計の原理と各測定計との相違について調べ、考察した。

C-4) 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の分離

カンゾウ油性抽出物製品には、主要成分以外にも抗酸化活性寄与率が比較的高い成分が存在することが強く示唆され、ODS カラムを用いた分取 HPLC による 2 段階の分離及び分離画分の抗酸化活性測定を行い、活性画分の探索研究を行ってきた。今年度は、これまでの分離により抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 7 画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 8 画分につき、ODS とは異なる分離特性を有するカラムを用いてさらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。本研究により、各カンゾウ油性抽出物製品の活性ピークを分離・特定することができた。

C-5) 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の LC/TOF-MS による解析

カンゾウ油性抽出物製品の主要成分による全体の抗酸化力価への寄与率は高くないことが明らかとなり、HPLC による分離・分画後、各画分の活性測定を行い、他の抗酸化成分を分離・特定した。さらに研究を進め、*Glycyrrhiza inflata* 由来製品及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品より単離した活性成分につき、

LC/TOF-MS(/MS)を用いて分析し、精密質量による組成解析から含有成分の推定を行い、市販試薬及び供与された単離標品との解析結果と比較した。その結果、カンゾウ油性抽出物製品中の6種の抗酸化活性成分及び2種の非活性成分を同定した。

C-6) 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の単離・同定

G. glabra 由来のカンゾウ油性抽出物製品では、主に抗酸化活性を示す8成分が確認された。この内、4成分については、市販標品や単離標品との比較やLC/MS/MSで同定したが、残りの4成分については、分子量(MW)370, 358, 322および354の化合物と推定されたが、同定はできていなかった。未同定の4成分の構造を明らかにする目的で、これら成分の単離・精製を行い、構造解析結果から化合物の同定を行った。その結果、4成分は *glabrene*, 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin 等の化合物であると同定した。なお、MW 370およびMW 358の化合物は、これまでDPPHラジカル消去活性を有することは報告されていないが、本研究におけるこれらの単離画分はDPPHラジカル消去活性を示した。

C-7) 既存添加物カワラヨモギ抽出物の乾燥減量試験法とqNMRを応用した定量法の開発

既存添加物製品の規格の設定は、品質や安全性確保の上から極めて重要である。既存添加物カワラヨモギ抽出物は、天然由来の保存料であり、抗菌作用があるとされている。本研究では、既存添加物カワラヨモギ抽出物の公的規格作成のため、本品目に適した乾燥減量試験法及び定量NMRを応用したLC定量法の開発を行った。その結果、溶液状態のカワラヨモギ抽出物製品に適した乾燥減量試験法を確立することができた。また、LC/UV及びLC/MSによるカピリン定量条件を最適化し、qNMRを応用してカピリン標品の正確な純度値を付けて定量に用いることで、信頼性の高いLC定量法を開発できた。さらに、カピリン標品を必要としないqNMRでの直接定量法が、比較的カピリン含量の高いカワラヨモギ抽出物製品では、有用

な定量法の1つとして選択可能であることを示した。

C-4) Relative response factorを用いたHPLC/PDAによるカワラヨモギ抽出物中のカピリン定量法の開発解析

既存添加物名簿に記載されている保存料「カワラヨモギ抽出物」中の抗菌成分カピリンのHPLC/PDA定量法について検討した。カピリンの定量用標準品は市販されていないため、別の化合物をカピリンの基準物質として選定し、カピリンの定量用標準品を必要としないHPLC/PDA定量法を確立することを目的とした。¹H-qNMRを利用してモル吸光係数比を算出し、定量法に用いた。このように内標準物質と定量対象化合物の検出感度の違いを係数として求めて定量法に応用する手法は、吸光度に限らず、他の検出方法でも適用可能であると考え、本項では、相対感度係数(Relative response factor; RRF)という語を用いて報告した。カピリンの定量用内標準物質として、¹H-qNMRスペクトル及びHPLCクロマトグラム上で、カピリンと良好に分離したヘプチルパラベンを選定した。4社4製品のヘプチルパラベンの市販試薬を¹H-qNMRに付し、得られた純度値を各試薬のラベルに記載されている純度値と比較したところ、4製品全てにおいて¹H-qNMRでの純度値とラベル記載の純度値に大きな差がなく(1.4%未満)、このことから、市販のヘプチルパラベンを購入して用いれば、メーカー間の純度差や表示純度との差を気にせずに定量用内標準として使用できると考えられた。ヘプチルパラベン及びカピリンの混合液を調製し、ヘプチルパラベンに対するカピリンのRRFを算出したところ1.31であった。この値を適用してHPLC/PDAによる添加物製品中のカピリン含量を算出したところ、カピリン標準品を用いて作成した検量線(¹H-qNMRによる純度値を適用)から求めた含量と殆ど差はなかったため、RRFを適用した定量法は、カピリンの定量用標準品を必要とせず、カワラヨモギ抽出物の規格試験法として有用であることが明らかとなった。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada, A., Ishizuki, K., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Akiyama, H., Method for the Determination of Natural Ester-Type Gum Bases Used as Food Additives via Direct Analysis of their Constituent Wax Esters Using High-Temperature GC/MS, *Food Science & Nutrition*, 2, 417-425 (2014)
- 2) 多田敦子, 石附京子, 杉本直樹, 吉松嘉代, 川原信夫, 末松孝子, 有福和紀, 深井俊夫, 田村幸吉, 大槻崇, 田原麻衣子, 山崎壮, 穠山浩, 既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分組成の多変量解析に基づく基原植物種の検討, *日本食品衛生学雑誌*, 56, 217-227 (2015)
- 3) 多田敦子, 杉本直樹, 小林義和, 濱田ひかり, 石附京子, 秋山卓美, 伊藤裕才, 川原信夫, 山崎壮, 穠山浩, 味認識装置による既存添加物苦味料及び関連苦味化合物の品質評価, *日本食品化学学会誌*, 22, 25-31 (2015)
- 4) 西崎雄三, 多田敦子, 石附京子, 伊藤裕才, 小野田絢, 杉本直樹, 穠山浩, モル吸光係数比を利用したジャマイカカシヤ抽出物中のクアシンおよびネオクアシンの新規定量法の開発 *食品衛生学雑誌*, 56(5), 185-193 (2015)

2. 学会発表

- 1) 田邊思帆里, 多田敦子, 古庄紀子, 建部千絵, 西川真寿美, 荒井なぎさ, 西崎雄三, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩: 食品添加物公定書における一般試験法の国際整合性に関する研究: 粘度測定法, *日本食品化学学会第 21 回総*

会・学術大会(2014.5)

- 2) 松田 諭, 多田敦子, 大槻 崇, 石附京子, 河崎裕美, 田原麻衣子, 杉本直樹, 穠山 浩: 既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を用いた基礎的検討, 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014.12)
- 3) 河崎裕美, 関口若菜, 多田敦子, 秋山卓美, 杉本直樹, 穠山浩: HILIC カラムを用いた LC/MS によるカラメル III 中の 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (THI) の直接定量, *日本食品衛生学会第 108 回学術講演会*(2014.12)
- 4) 西崎雄三, 多田敦子, 伊藤裕才, 大槻崇, 杉本直樹, 穠山浩: qNMR と HPLC を利用した天然苦味料ジャマイカカシヤ抽出物中のクアシン及びネオクアシンの新規定量法の開発, *日本薬学会第 135 年会* (2015.3)
- 5) 加藤智久, 多田敦子, 河崎裕美, 西崎雄三, 石附京子, 建部千絵, 古庄紀子, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩: NMR を用いた既存添加物カワラヨモギ抽出物の定量法の開発, *日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会* (2015.5)
- 6) Tada A., Sugimoto N., Nishizaki Y., Matsuda S., Kawasaki H., Ishizuki K., Ohtsuki T., Tahara M., Suematsu T., Yamada Y., Akiyama H.: Examination of quantification methods of quercetin in food additives and reagents using ¹H quantitative NMR, *Pacificchem 2015* (2015.12)

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26～28年度分担総合研究報告書
既存添加物の成分規格試験法の検討

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

要旨 既存添加物等の成分規格試験法を設定あるいは改正するために必要な情報を得る目的で、一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索、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、未指定添加物「耐酸性カルミン」の主色素成分の化学構造の完全帰属、今後流通が懸念される未指定添加物「耐酸性ラック色素」の主色素成分の合成を行った。

研究協力者

多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

天然添加物は、平成7年（1995年）に食品衛生法が改正されるまでは、有害でない限り一般の食品と同様の扱いであり、添加物としての法的規制を受けていなかった。平成7年の食品衛生法改正によって天然添加物にも指定制度が導入された際、その時点で流通実態（製造、販売、使用、輸入）のあった天然添加物（法的には「化学的合成品以外の添加物」といった。）を既存添加物、天然香料、一般飲食物添加物の3グループに分類した。これらは指定制度の適用除外として引き続き使用が認められた。

このような歴史的経緯から、食品添加物は、法規制上次の4つに分類される。

指定添加物
既存添加物
天然香料
一般飲食物添加物

指定添加物は指定制度に基づく添加物であり、国が有効性と安全性を審査した上で使用を許可しており、公的な成分規格がそれぞれ設定

されている。一方、現在流通している既存添加物は国による事前の有効性・安全性審査を行った上で使用を認めたものではない。このため、既存添加物については、国の責任で安全性情報を収集して安全性を確認して公的な規格基準を設定することとなっている。しかし、指定添加物以外の添加物について公的な規格基準の設定は進んでいない。天然由来の既存添加物及び一般飲食物添加物は、ほとんどが天然物からの抽出物であり多成分からなり製品の成分が未解明なものが多い。また、近年、天然由来の成分の化学構造を化学的に一部改変した、いわゆる未指定添加物の流通も確認されており、これらの化学構造を明らかとすると共に分析法（試験法）の開発が望まれている。したがって、天然由来の添加物の成分規格設定には、不足している化学的データの収集が必要とされている。

このような背景から、本研究では、成分規格試験法を開発を目的に、既存添加物及び未指定添加物等について以下の検討を行ったので報告する。

一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索

INADEQUATEによるカルミン酸 耐酸性カルミン(4-アミノカルミン酸)の¹³C-NMR スペクトルの完全帰属

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

ラック色素のアンモニア処理および構造解析

B. 研究方法

B-1) 一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索

チコリ色素製品を LC/MS に付し、成分組成を確認した。次に、常法に従い分画し、LC/MS 上で主ピークとして確認された化合物 1 及び 2 を分取 HPLC により単離精製した。得られた化合物 1 及び 2 の化学構造について、LC/TOF-MS 及び NMR により解析した。

B-2) INADEQUATE によるカルミン酸、耐酸性カルミン(4-アミノカルミン酸)の ^{13}C -NMR スペクトルの完全帰属

カルミン酸を 28% アンモニア水($^{14}\text{NH}_3$ または $^{15}\text{NH}_3$ 水溶液)中で加熱し、生成した耐酸性カルミン(4-アミノカルミン酸)を単離精製した。精製した化合物について、 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, HMQC, HMBC, INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment)測定を行った。また、アミノ基の置換位置を特定するために $1\text{D-}^{15}\text{N}$ -NMR 測定を行い、得られたスペクトル情報を帰属した。

B-3) 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

クチナシ青色素のモデル合成実験として、ゲニピンとベンジルアミンを反応させた。LC/MS により、反応液中の生成物を経時的に観察し、反応中間体である黄色素 Y1 及び Y2, 最終生成物である青色素 B1 及び B2 を各種クロマトグラフィーにより精製した。得られた化合物について、LC/TOF-MS 及び NMR 測定を行い、その化学構造を解析した。

B-4) ラック色素のアンモニア処理および構造解析

ラック色素(粉末状)を 10% アンモニア水中で加熱し、アンモニア処理ラック色素を得た。こ

れを LC/MS に付し、生成した色素を観察した。また、分取 LC/MS を用いてラック色素より laccaic acid C を単離し、さらに、アンモニア処理し、4-aminolaccaic acid C を得た。精製した化合物について、 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, HMQC, HMBC, INADEQUATE 測定を行い、得られたスペクトル情報よりその構造を確認した。

C. 結果及び考察

C-1) 一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索

一般飲食物添加物は一般に飲食される食品等の抽出物であることから安全性に問題がないと考えられ、早急な成分規格設定は必要ないと考えられている。このため、一般飲食物添加物 106 品目のうち 3 品目について規格設定されているのみであり、規格設定が遅れている。そこで、本研究では一般飲食物添加物のうち、「チコリ色素」について、成分規格を設定するための基礎情報を得るために、指標成分となる特有の成分が含有されているかどうか検討した。

LC/MS により、チコリ色素製品中に観察された化合物 1 及び 2 を単離精製し、NMR によりその化学構造を決定した結果、化合物 1 が 5-(hydroxymethyl) furfural、化合物 2 が 4-hydroxyl-2-(hydroxymethyl)-5-methylfuran-3(2H)-one であり、いずれもチコリ色素製品を製造する際、焙煎の過程において糖類が変性し生じたと考えられる化合物であった(Fig. 1)。これらは、製造過程において焙煎処理を伴う他の添加物においても含有されると予想されることから、チコリ色素の指標成分としては不相当と考えられた。また、チコリ色素に特有な成分であるチコリ酸(chicoric acid)、加水分解後のカフェ酸を定量分析した結果、加水分解後のカフェ酸の有無がチコリ色素の確認に応用可能と考えられた(Fig. 2)。

C-2) INADEQUATE によるカルミン酸、耐酸性カルミン(4-アミノカルミン酸)の ^{13}C -NMR スペクトルの完全帰属

既存添加物「コチニール色素」は「本品は、

エンジムシ (*Dactylopius coccus* Costa (*Coccus cacti* Linnaeus)) から得られた、カルミン酸 (carminic acid ($C_{22}H_{20}O_{13}$)) を主成分とするものである。」と記載されており、わが国では、コチニール色素は食品への使用が許可されているが、コチニール色素の主色素成分カルミン酸を原料として化学的処理により構造を改変した色素はすべて化学的合成品扱いとなり、食品への使用は現在認められていない。

耐酸性カルミン (acid-stable carmine) と呼ばれるカルミン酸をアンモニアと反応させて生成したものと考えられる pH に依存せず、酸・アルカリ性条件下でも赤色を保つ色素が 2000 年頃から流通し始めた。この色素は化学的な構造改変を伴うものであり、世界的にも食品への使用は認められていない。このため、2002 年、我々の研究グループは、耐酸性カルミンの主色素の化学構造について検討し、カルミン酸の 4 位の水酸基がアミノ基に置換した 4-アミノカルミン酸 (4-aminocarminic acid) であると報告した (Sugimoto, N. et al. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **43**, 18-23 (2002))。しかし、この報告では、カルミン酸とカルミン酸のアントラキノンの kermesic acid に類似した構造を持つ purpurin の両者についてアミノ化、次いでメチル化を行い、両者の化学シフトの比較から、耐酸性カルミンの主色素成分が 4-aminocarminic acid であると推定したものであり、完全帰属に至っていない。

そこで本研究では、未指定添加物である耐酸性カルミンの主色素の化学構造が 4-aminocarminic acid であることを完全証明することを目的とした。 ^{13}C - ^{13}C 間の直接結合、すなわち、有機化合物の炭素骨格のつながりを完全に確認することができる INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment) を 4-aminocarminic acid の構造解析に適用した。また、安定同位体 ^{15}N を導入した 4-aminocarminic acid の合成を行い、1D- 1H , ^{13}C , ^{15}N -NMR 及び 2D-HMQC, HMBC, INADEQUATE の解析結果より、 NH_2 基の置換位置を特定し、耐酸性カルミンの主色素の化学構造が 4-aminocarminic acid であることの確証を得ることができた (Fig. 3)。

C-4) 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

既存添加物クチナシ青色素は、ゲニピンと一級アミンの反応生成物が主色素成分とされるがその構造は未だ不明である。この主色素成分の生成過程および構造についての知見を得るため、ゲニピンとベンジルアミンを用いたモデル実験を行った。LC/MS により経時的に反応液中の生成物を観察したところ、青色素が生成するまでに前駆体と考えられる黄色の化合物 Y1 及び Y2 が生成することが確認された。化合物 Y1 及び Y2 を分取 HPLC により単離し、NMR 等により構造解析したところ、化合物 Y1 及び Y2 は、ゲニピンが反応液中でジアルデヒド構造に開裂し、ベンジルアミンのアミノ基とカルボニル-アミノ反応を起こした後に閉環したものであった。また、単離した化合物 Y1 及び Y2 を再溶解した溶液を観察したところ、青色に経時的に変化することから、青色素の前駆体であることが確認された。したがって、ゲニピンは、ベンジルアミンの 1 級アミンと反応し閉環した後、黄色素 Y1 とその異性体 Y1' を生成する。次に、1 位の OH 基と 9 位のプロトンが *cis* 配置した異性体 Y1' は、速やかに脱水し黄色素 Y2 となった後、青色素成分へ変化または重合していくと考えられた (Fig. 4)。次に、生成した青色素成分の混合物より青色素 B1 及び B2 を精製し、その化学構造を LC/TOF-MS 及び NMR により解析した結果、Y2 の 6 位と 10 位が脱水結合して共役二重結合を形成し、更に繰り返し結合した重合物であると推定された。以上のことから、既存添加物クチナシ青色素の青色素成分は、ゲニピンと一級アミンが重合的に反応して生成した化合物であると推定された。

C-4) ラック色素のアンモニア処理および構造解析

既存添加物「ラック色素」は、天然由来の着色料であり、コチニール色素と同様にアントラキノ骨格を有する色素を主成分とするが、コチニール色素が carminic acid の 1 成分からなるのに対し、ラック色素は、laccic acid A, B, C,

E 等複数の成分から構成される。C-2)で述べたように、carminic acid をアンモニア処理することで、4位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に容易に置換され、4-aminocarminic acid が合成される。このような置換反応は、アントラキノン骨格を持つ化合物、laccaic acid に対して普遍的に起こりうると想像できる。現時点では、ラック色素をアンモニア処理して合成された、いわゆる耐酸性ラック色素の報告例はないが、今後、流通が確認されたとき、これについても、耐酸性カルミンと同様に未指定添加物となることから、その分析法の確立が望まれる。

そこで本研究では、ラック色素をアンモニア処理し、その色素成分について LC/MS および NMR を用いて解析を行った。ラック色素をアンモニア処理することで、pH に依存しない色調が確認された。LC/MS 分析により、アンモニア処理後のラック色素には、ラック色素の主色素成分 laccaic acid A, B, C および E の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換した 4-aminolaccaic acid A, B, C および E が主色素成分として含まれることが示唆された。また、単離精製した laccaic acid C をアンモニア処理して得られた化合物について NMR 解析を行ったところ、4-aminolaccaic acid C であることが確認された。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 原田晋, 小川有子, 杉本直樹, 穠山浩: フランス製菓子赤色マカロン摂取後に生じた、コチニール色素によるアナフィラキシーの 2 症例。日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌, 8, 180-186 (2014).
- 2) 山崎太一, 大槻崇, 三浦亨, 末松孝子, 堀之内高暁, 村上雅代, 齋藤剛, 井原俊英, 多田敦子, 田原麻衣子, 合田幸広, 穠山浩, 中尾慎治, 山田裕子, 小池亮, 杉本直樹: ¹H NMR による精確な定量分析のための内標準液を用いる試料調製法の検討。分析化学, 63, 323-329 (2014).
- 3) Kawasaki, H., Akiyama, T., Tada, A., Sekiguchi, W., Nishizaki, Y., Ito, Y., Sugimoto, N., Akiyama,

H.: Development of HILIC-LC/MS method for direct quantitation of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole in caramel III with the qNMR certified standard. Jpn. J. Food Chem. Safety, 22(2), 115-122 (2015).

- 4) Nishizaki, Y., Ishizuki, K., Akiyama, H., Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K.: Preparation of ammonia-treated lac dye and structure elucidation of its main component. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.), 57, 193-200 (2016).

2. 学会発表

- 1) 田邊思帆里, 多田敦子, 古庄紀子, 建部千絵, 西川真寿美, 荒井なぎさ, 西崎雄三, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩: 食品添加物公定書における一般試験法の国際整合性に関する研究: 粘度測定法。日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会(2014.5)。
- 2) 河崎裕美, 関口若菜, 多田敦子, 秋山卓美, 杉本直樹, 穠山浩: HILIC カラムを用いた LC/MS によるカラメル III 中の 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (THI) の直接定量。日本食品衛生学会第 108 回学術講演会(2014.12)
- 3) Sugimoto, N., Takada, M., Ishizuki, K., Ohtsuki, T., Tada, A., Nishizaki, Y., Suematsu, T., Miura, T., Yamada, Y., Horinouchi, T., Koike, R., Kato, T., Togawa, T., Akiyama, H.: "AQARI" vs. "PULCON", a comparison of qNMR: internal and external reference methods. Pacificchem2015 (2015.12).
- 4) Miura, T., Suematsu, T., Sugimoto, N., Nakao, S., Takaoka, S., Yamada, Y.: Development of quantity analytical standard by using qNMR. 3rd Annual Practical Applications of NMR in Industry Conference (PANIC)(2015.2).
- 5) 石附京子, 西崎雄三, 多田敦子, 箕川剛, 中島光一, 穠山浩, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物クチナシ青色色素の色素生成メカニズムの解明: 前駆体の構造決定。食品化学学会 (2016.6)。
- 6) 杉本直樹: qNMR による相対感度係数の算出

とその有効利用について．JAIAN (2016.8) ．

- 7) 杉本直樹：定量 NMR/LC を用いた天然有機化合物の定量分析法の開発(シンポジウム I 「定量 NMR から見えてくる世界」)．日本生薬学会第 63 回年会 (2016.9) ．
- 8) 黒江美穂，山崎太一，斎藤直樹，中村哲枝，沼田雅彦，西崎雄三，杉本直樹，井原俊英：新規定量法である qNMR/LC 法による非イオン界面活性剤標準液の濃度評価．日本分析化学会第 65 回年会(2016.9) ．
- 9) 斎藤直樹，北牧祐子，大塚聡子，西崎雄三，杉本直樹，井原俊英：定量 NMR における不純

物の重なる信号に対するクロマトグラフィーを併用した新規評価法の確立．NMR 討論会 (2016.11).

- 10) 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穂山浩, 永津明人：定量 NMR を利用した生薬成分の定量．第 45 回生薬分析シンポジウム (2016.11).

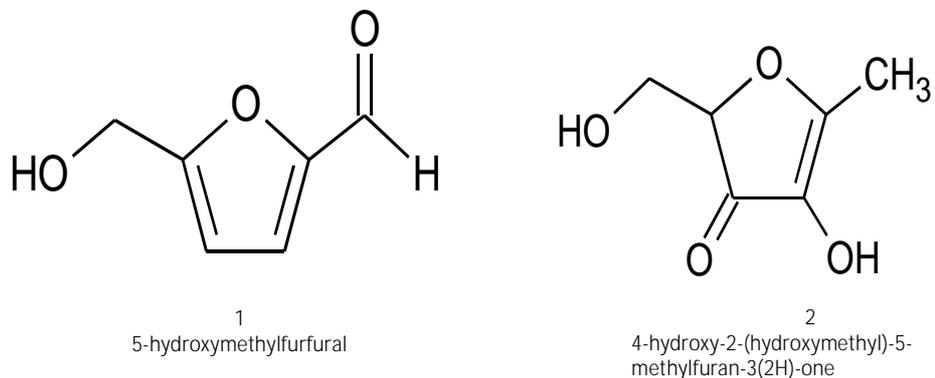


Fig. 1 Structures of compound 1 and 2 isolated from Chicori color product

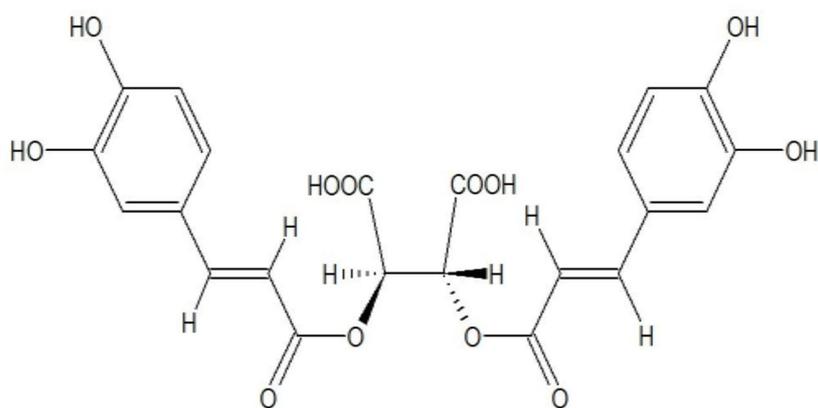


Fig. 2 Structure of chicoric acid

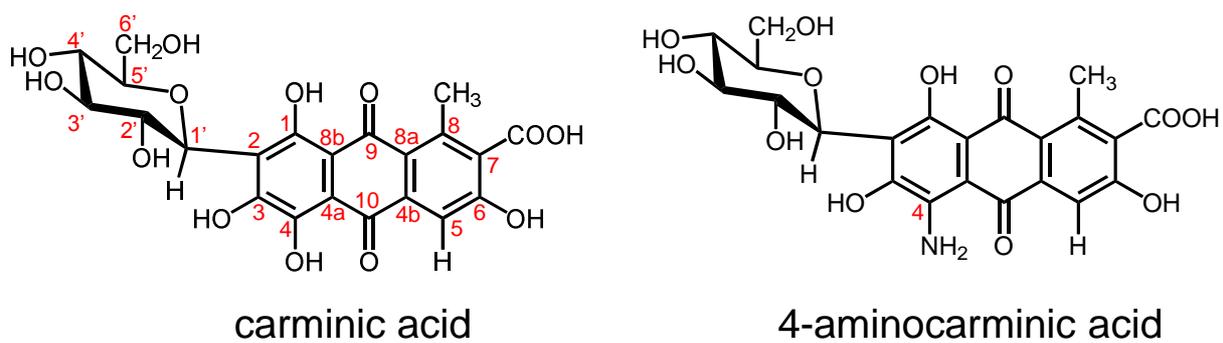


Fig. 3 Structure of carminic acid and 4-aminocarminic acid

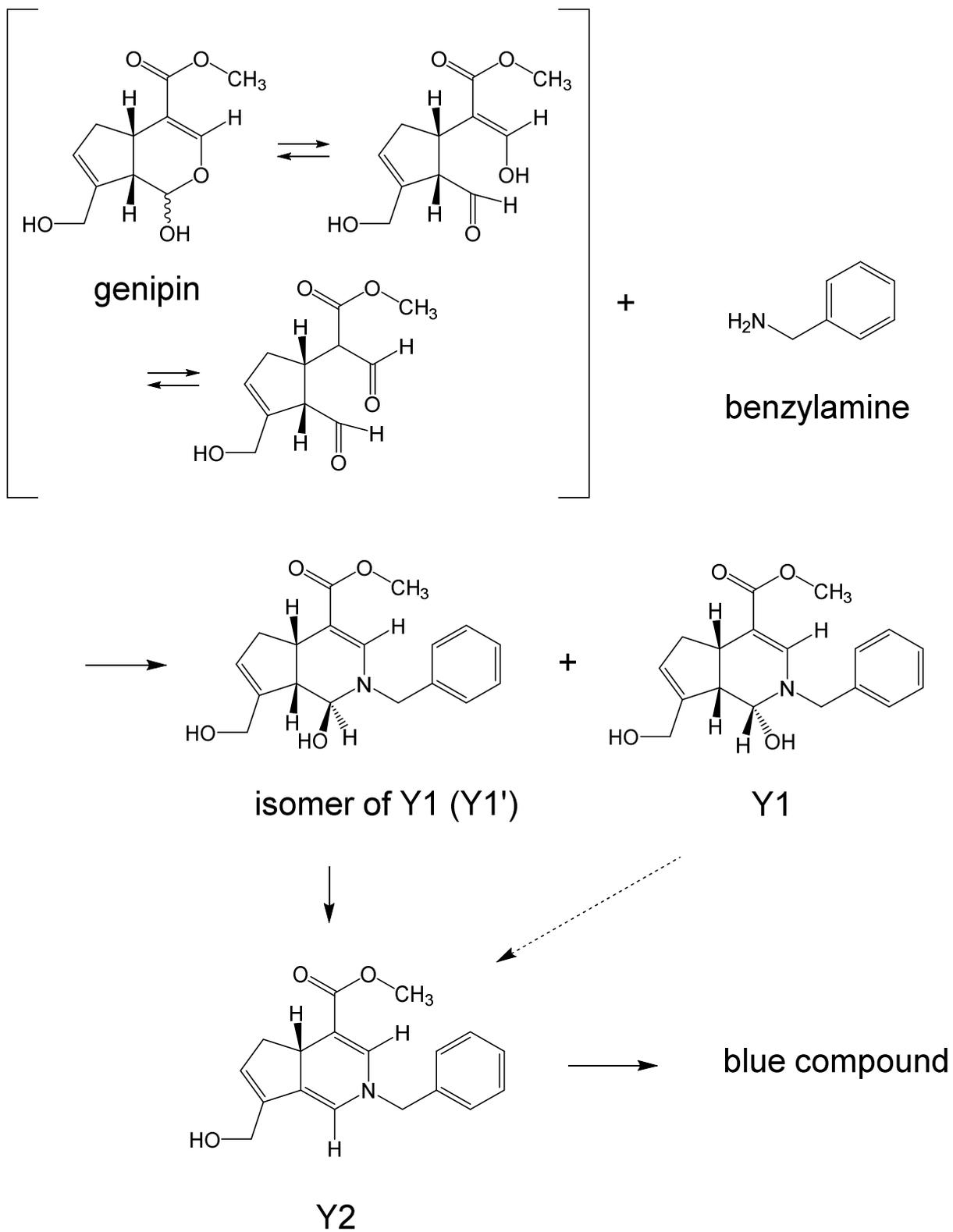


Fig. 4 Estimated reaction pathway of blue compound generation from genipin and benzylamine

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26～28年度分担総合研究報告書
既存添加物の基原の解析に関する検討

研究分担者 穰山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

要旨 既存添加物の基原に由来する遺伝子の塩基配列情報を指標にして、国際塩基配列データベースとの照合結果から種を同定あるいは推定する方法について検討した。既存添加物酵素67品目の微生物由来の基原について、指標となる遺伝子が国際塩基配列データベースに登録されているかどうか調査し情報を整理した。また既存添加物酵素「アルギン酸リアーゼ」の生産菌*Flavobacterium multivorum*について、検討したDNAを指標にした同定法を実施したところ、*Flavobacterium*属の新種の可能性が高い*Flavobacterium* sp.と推定された。

研究協力者

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

平成7年に食品衛生法が改正された際に流通実態のあった天然添加物のうち、一般飲食物添加物及び天然香料以外のものを、既存添加物と呼ぶ。長い食経験があり、一般に安全と見なされている既存添加物の規格を整備する上で、基原（由来）を明確に設定することは、想定外の原料、すなわち食品衛生法改正時に使用されていなかった原料が使用されることを防ぐ目的があり、食の安全を保障する上で重要である。

既存添加物のうち、第9版公定書に収載される酵素67品目の基原のほとんどは、微生物由来であり、また属までしか明らかにされていないものも見受けられる。特に微生物の学名は、専門家による最新の研究によって見解が変わることも多く、流動的であるため、法的拘束力をもつ公定書を運用する上では、学名の変更履歴をたどれるようなトレーサビリティを有した情報に基づいて、同定を行うことが望ましい。そこで、微生物の分類において、必須の項目となりつつある、遺伝子を指標にした分類法について、既存添加物酵素の微生物基原の同定に応用可能か検討することにした。

遺伝子を指標にした同定法では、基原に由来する任意の指標遺伝子の塩基配列情報を取得した後、国際塩基配列データベースと照合する。米国生物学情報センター（NCBI; National Center of Biotechnology Information）が提供するTaxonomyデータベースでは、国際塩基配列データベースに登録されている塩基配列に由来する生物種の学名の旧名と現行名を管理しているため、遺伝子を指標にした同定法を実施すれば、NCBI Taxonomyを参考にして、流動的である微生物の学名に付随する成分規格上の齟齬の問題を解消できる。さらに、従来法である形態観察及び生理・生化学性状試験では種を特定できなかった基原についても、塩基配列情報という、客観的かつ再現性の高い情報を指標にすれば、一義的に種を同定することも期待できる。

そこで、本研究では既存添加物酵素67品目の微生物由来の基原について、指標となる遺伝子が国際塩基配列データベースに登録されているかどうか調査し情報を整理した。また既存添加物酵素「アルギン酸リアーゼ」の生産菌*Flavobacterium multivorum*について、検討した同定法を実施したので報告する。

B. 研究方法

B-1) 国際塩基配列データベース上の既存添加

物の基原由来の塩基配列情報の取得

第9版公定書に収載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、公定書に記された学名を NCBI が提供する塩基配列データベース GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に入力し、16S rDNA または ITS1 配列の登録の有無を確認した。

B-2) アルギン酸リアーゼ生産菌の 16S rDNA 塩基配列情報の取得

日本食品添加物協会から供与されたアルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株から抽出した DNA を鋳型として、ユニバーサルプライマーを用いて 1,439 bp の 16S rDNA を増幅し、シーケンスし、塩基配列を決定した。

C. 研究及び考察

C-1) 既存添加物酵素の基原由来塩基配列情報の取得

既存添加物酵素の微生物由来の基原について、「細菌」、「放線菌」、「糸状菌」、「酵母」、「担子菌」の5つの群に分類し、各群に適した指標遺伝子について考察した。種々の公定法や文献を参考にして、「細菌」及び「放線菌」は、16S rDNA 塩基配列を指標とし、「糸状菌」、「酵母」及び「担子菌」は ITS1 塩基配列を指標とした。属及び sp. で定義された以外の基原について、国際塩基配列データベース GenBank に指標遺伝子が登録されているかどうか調査した。その結果、「細菌」52/56 基原、「放線菌」17/19 基原、「糸状菌」57/65 基原、「酵母」6/6 基原、「担子菌」6/6 基原の配列が登録されていた。配列が登録されていなかった基原の中には、トレーサビリティの得られない学名、すなわち公定書に記載する基原としてふさわしくない学名であるものが散見された。

C-2) アルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株の種の同定

細菌に属すアルギン酸リアーゼの生産菌 71/58 株の 16S rDNA 塩基配列を決定し、国際塩基配列データベースに対して blastn による相同性検索を行った。検索結果の上位 20 配列中には

Flavobacterium 属由来の塩基配列が占めた。一方で、細菌において、同種の目安とされる相同値が 98.7% 以上の 16S rDNA 塩基配列は、存在しなかった。

次に、*Flavobacterium* 属各種の 16S rDNA 塩基配列と 71/58 株の 16S rDNA 塩基配列を用いて分子系統解析を行った。その結果、71/58 株は *Flavobacterium* 属の種で形成されるクラスター内に含まれたが、いずれの既知種とも異なる分子系統学的位置を示し (Fig. 1), *Flavobacterium* 属の新種を構成する可能性が高いと考えられ、71/58 株を *Flavobacterium* sp. と同定した。

微生物などの学名が流動的である基原に対して規格を整備するためには、統一された方法、指針に基づいて情報を整理する必要がある。検討した DNA を指標にした同定法を実施した場合、アルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株のように、第9版公定書に記された基原の学名について、第10版で大幅な改正が求められる可能性がある。このような問題も含めて、今後 DNA を指標にした同定法について深く議論していく必要がある。

D. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

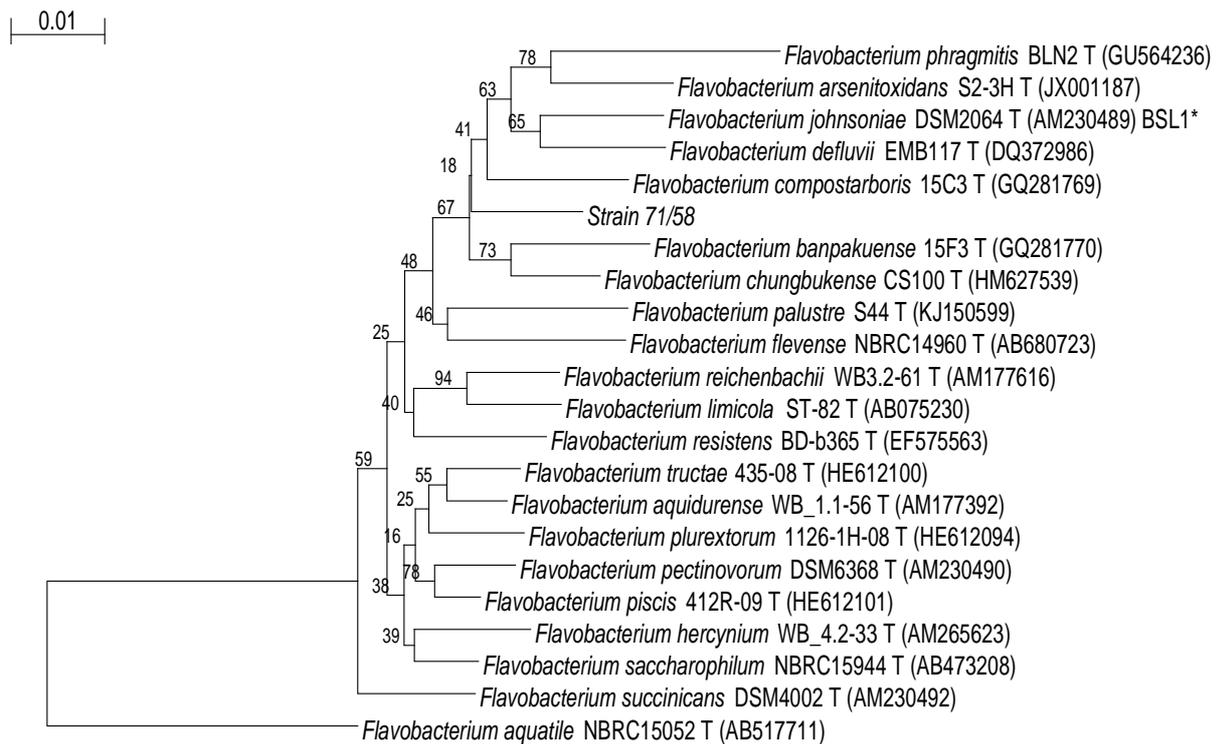


Fig. 1 BLAST 検索により近縁と考えられた *Flavobacterium* 属の既知種上位 20 種と 71/58 株の 16S rDNA に基づく分子系統樹。

左上の線はスケールバー、系統枝の分岐に位置する数字はブートストラップ値、株名の末尾の T はその種の基準株 (Type strain)、BSL はバイオセーフティレベル (BSL1*(日和見病原体)以上を表記) を示す。

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26～28年度分担総合研究報告書

研究分担課題：天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

研究分担者 受田浩之 高知大学教育研究部総合科学系 教授

要旨 これまでの研究において、各種抗酸化活性測定法の既存添加物の抗酸化力価評価への適用性を検討し、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法に関する複数機関での評価研究を行い、最終的に DPPH 法を標準法の候補として選出した。本研究期間においては、DPPH 法と酸素ラジカル吸収能 (Oxygen radical absorbance capacity: ORAC) 法との比較を行うとともに、DPPH 法に基づく一般試験法案を作成し、その適用性、ならびに再現性に関する確認を行った。試験の結果より、酸化防止剤中の主要抗酸化成分の基本構造により DPPH 法と ORAC 法に対する応答が異なることが判明した。また、DPPH 法に基づく一般試験法案のトロロックス、及び酸化防止剤への適用性、ならびに再現性に問題がないことを確認した。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部第二室 室長
島村智子 高知大学教育研究部総合科学系 准教授

A. 研究目的

既存添加物は 1995 年の食品衛生法の改正に伴い、経過措置的にその使用が認められている主に天然由来の添加物である。既存添加物については規格基準設定を目的として、成分組成の分析、有効成分の同定、及び定量法の開発が行われている。しかし、酸化防止用途の一部の既存添加物は多種類の成分が抗酸化力価に関与しており、すべての抗酸化物質の分析・同定を行うことが困難である。このような既存添加物では、成分組成に基づく規格が設定できないことから、品質確保のためには主要な成分組成と抗酸化力価の確認の組み合わせにより、規格設定することが望まれている。そのため、抗酸化力価の標準法の確立が必要と考えられる。このような状況のもと、これまでに各種抗酸化活性測定法の既存添加物の抗酸化力価評価への適

用性を検討し、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法に関する複数機関での評価研究を行い、最終的に DPPH 法を標準法の候補として選出した。H26～28 年度においては、DPPH 法と酸素ラジカル吸収能 (Oxygen radical absorbance capacity: ORAC) 法との比較を行うとともに、DPPH 法に基づく一般試験法案を作成し、その適用性、ならびに再現性に関する確認を行った。

B. 研究方法

1. DPPH 法一般試験法案

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

1-1. 操作法

(1) トロロックスの DPPH ラジカル消去率の測定

トロロックス 100 mg を精密に量りとり、エタノール (99.5) を加えて 100 mL とする。この液

50 mL を正確に量りとり、エタノール (99.5) を加え 500 mL とし、トロロックス標準原液とする。標準原液をエタノール (99.5) を加えて希釈し、40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL のトロロックス標準液を調製する¹。試験管にトロロックス標準液 200 µL を量りとり、抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加えて混合する。この液に DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 1000 µL を加え、直ちに 10 秒間攪拌後、室温暗所で 30 分間静置し、検液とする。別に標準液の代わりにエタノール (99.5) を用いて検液の調製と同様に操作し、比較液とする。エタノール (99.5) 1200 µL に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加え、混合したものを対照液とし、波長 517 nm における検液の吸光度 A_R 及び比較液 A_C を測定し、次式により DPPH ラジカルの消去率 (%) を求める。

$$\text{トロロックスの DPPH の消去率 (\%)} = \frac{(A_C - A_R)}{A_C} \times 100$$

¹ トロロックス試薬の純度は 97% であるため、実際の試験に用いるトロロックス標準液の濃度については純度を考慮した補正を行う。

(2) トロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) の算出

横軸に消去率 50% を挟む 2 点のトロロックス標準液の濃度 (40 µg/mL と 60 µg/mL, あるいは 60 µg/mL と 80 µg/mL), 縦軸に DPPH の消去率 (%) をとり、グラフにそれぞれの値をプロットする²。この 2 点を通る回帰線から、トロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求める。ただし、3 回の繰り返し測定を行い、その平均値をトロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) とする。

² 2 点の間に消去率 50% があることを確認する。いずれの濃度でも消去率 50% を挟まない場合は標準液の調製からやり直す。

(3) 試料の DPPH ラジカル消去率の測定

別に規定する量の試料を試験管に量りとり、別に規定する量の希釈溶媒を加えて希釈し、5 種以上の異なる濃度の試料液を調製する。試験管に試料液 200 µL を量りとり、抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加えて混合する。この液に DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 1000 µL を加え、直ちに 10 秒間攪拌後、室温暗所で 30 分間静置し、検液とする。別に試験液の代わりに希釈溶媒を用いて検液の調製と同様に操作し、比較液とする。エタノール (99.5) 1200 µL に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加え、混合したものを対照液とし、波長 517 nm における検液の吸光度 A_S 及び比較液 A_C を測定し、次式により DPPH ラジカルの消去率 (%) を求める。

$$\text{DPPH の消去率 (\%)} = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100$$

(4) 酸化防止剤試料の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) の算出

横軸に酸化防止剤試料液の濃度、縦軸に DPPH の消去率 (%) をとり、グラフにそれぞれの値をプロットする。DPPH の消去率 50% を挟む酸化防止剤試料液の濃度 2 点を通る回帰線から、トロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求める。ただし、3 回の繰り返し測定を行い、その平均値をトロロックスの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) とする。

(5) トロロックス等価活性 (TEAC) の算出

酸化防止剤試料液とのトロロックス標準液の IC_{50} が同一の活性を有しているとみなし、酸化防止剤の抗酸化活性をトロロックス等価活性 (TEAC) で表す。酸化防止剤のトロロックス等価活性は次式により求める。

$$\text{酸化防止剤のトロロックス等価活性 (TEAC: } \mu\text{g}/\mu\text{g)}^3 = \frac{\text{トロロックスの } IC_{50} (\mu\text{g}/\text{mL})}{\text{酸化防止剤試料液の } IC_{50} (\mu\text{g}/\text{mL})}$$

³ 同一日に測定した酸化防止剤試験溶液の IC_{50} とトロロックスの IC_{50} の値を用いて TEAC を求めることが望ましい。

1-2. 試薬, 試液, 標準品

(1) トロロックス標準溶液

(±)-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸, Aldrich 製, 233813, 純度 97%

(2) トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4), 抗酸化活性測定法用

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール⁴ 12.1 g を量り, 水を加えて溶かし, 塩酸試液 (1 mol/L) で pH 7.4 に調整し, 水を加えて 1000 mL とする.

⁴ 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール, 和光純薬工業 特級, 207-06275, 純度 99.0%

(3) DPPH 試液 (0.2 mmol/L)

DPPH⁵ 17 mg を精密に量りとり, エタノール (99.5) を加えて溶かし, 200 mL とし, 遮光して吸光度が定常状態に達するまで 2 時間放置する.
⁶ この液 1000 μL を試験管に正確に量りとり, エタノール (99.5) 200 μL と抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 μL を正確に加えて混合し検液とする. エタノール (99.5) 1200 μL に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 μL を加え, 混合したものを対照液とする. 検液につき 517 nm における吸光度を測定し, 検液の吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内であることを確認する. 検液の吸光度が 1.05 を超える場合はエタノール (99.5) を加えて希釈し, 検液の吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内に入るように調整する. 用事調製とする.

⁵ DPPH, Aldrich 製, D9132

⁶ DPPH 溶液は, 調製直後から 1 時間程度まで時間と共に吸光度が低下する. 2 時間放置することで吸光度が定常状態に達する.

2. ORAC 法

農業・食品産業技術総合研究機構より配布されている標準作業手順書, ならびに測定計算用テンプレートファイルを用いて測定を行った.

単糖・アミノ酸複合物, 生コーヒー豆抽出物, コメヌカ酵素分解物, 酵素処理イソクエルシトリンは 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解した. その他の酸化防止剤はメタノール: 水: 酢酸 (90: 9.5: 0.5) 混合溶液に溶解した.

蛍光用マイクロプレートに試料溶液 35 μL, 110.7 nM フルオレセイン溶液 115 μL を添加した後, 37 °C で 10 分間のプレインキュベーションを行った. その後, 蛍光強度 (励起波長 485 nm, 蛍光波長 530 nm) を測定した. その後, 31.7 mM AAPH 溶液 50 μL を加え, 2 分間隔で 90 分間蛍光強度 (励起波長 485 nm, 蛍光波長 530 nm) を測定した. 各測定前にマイクロプレートの攪拌を行った. 標準物質にはトロロックスを用いた. 試料溶液, 及びトロロックス添加時の net AUC (Area Under Curve) を算出した後, 20 μM トロロックスの net AUC を基準として, 各試料の ORAC 値 (μmol TE/g) を算出した.

C. 研究結果と考察

1. 酸化防止剤の力価評価における DPPH 法と ORAC 法の比較

ORAC 法は農産物・食品の抗酸化評価法として共同試験が近年実施され, この共同試験結果を受けて標準作業手順書が作成された. そこで, 酸化防止剤の力価評価を ORAC 法, ならびに同じく複数試験機関による共同試験にてプロトコールの評価を行った DPPH 法とで行い, その結果について比較した.

チャ抽出物 5 種類, トコフェロール類 5 種類, ローズマリー抽出物 2 種類, 単糖・アミノ酸複合物, 生コーヒー豆抽出物, コメヌカ酵素分解物, フェルラ酸, ヤマモモ抽出物, エンジュ抽出物, 酵素処理イソクエルシトリン, ルチン, 酵素処理ルチン, ルチン酵素分解物の計 22 種類の酸化防止剤について測定を行ったところ, DPPH 法では 20 種類, ORAC 法では 22 種類の抗酸化力価

を求めることが可能であった。

また, DPPH 法と ORAC 法の測定結果の相関を調べたところ, 両者の間の相関係数は 0.460 ($n = 20$) となった。相関関係は有意であったが ($p < 0.05$), 直線性は高いものではなかった。同時に, 酸化防止剤に含まれる主要抗酸化成分の種類により DPPH 法, 及び ORAC 法に対する挙動が大きく異なることが判明した。具体的には, カテキン類を主要抗酸化成分とするチャ抽出物では DPPH 法と ORAC 法の測定結果の間に高い直線性が認められたのに対し ($r = 0.775, n = 5$), ケルセチン配糖体, 及びその類縁化合物が主要抗酸化成分であるヤマモモ抽出物, エンジュ抽出物, ルチン類の場合, DPPH 法と ORAC 法の測定結果の間に相関は認められなかった ($r = -0.239, n = 7$)。このことから, 主要抗酸化成分の基本構造がフラバノール, フラボン, あるいはその配糖体であるか否かにより, DPPH 法, 及び ORAC 法に対する挙動が異なることが判明した。

今後, DPPH 法の適用が困難な酸化防止剤の力価評価標準法を適宜検討する場合は, 主要抗酸化成分の各種抗酸化活性測定法への応答の特徴を考慮する必要があると考えられた。

2. DPPH 法に基づく一般試験法案の適用性と再現性の検討

トロロックス, 及び酸化防止剤 19 種類 (サンフェノン EGCg, サンフェノン 90S, サンフェノン BG-3, カメリアエキス 30S, チャ抽出物, 茶抽出物 40, 茶抽出物 70, ポリフェノン PF, ポリフェノン 70S, ポリフェノン G, サンフード 100, テアピゴ, カメリア 50EX, d- δ -トコフェロール, 生コーヒー豆抽出物, ローズマリー抽出物, ヤマモモ抽出物, 酵素処理イソクエルシトリン, 酵素処理ルチン) を分析試料として用い, 一般試験法案の適用性と再現性を確認した。いずれの酸化防止剤もエタノール (99.5) に溶解し, 希釈もエタノール (99.5) で行った。

酸化防止剤の抗酸化力価評価においてトロロックスの IC_{50} は TEAC 算出の基礎となる重要な値である。そこで, 作成した一般試験法案に基づき, トロロックスの IC_{50} 算出に関する手順

について繰り返し試験を実施した ($n = 8$)。その結果, IC_{50} の平均は $59.3 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$ であり, 変動係数は 1.30% となった。このことから, 一般試験法案に基づくトロロックスの IC_{50} の算出に関する再現性は問題ないと判断した。

続いて, 酸化防止剤 19 種類の抗酸化力価評価を行った。その結果, 測定に用いたすべての酸化防止剤の TEAC を求めることが可能であり, その変動係数 ($n = 3$) は 0.28~7.1% となった。特に, サンフェノン EGCg を除く 18 試料の変動係数は 4.3% 以下の範囲内となり高い再現性を示すことが判明した。

D. 結論

H26~28 年度の試験結果より, 既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価標準法として, DPPH 法に基づく一般試験法案を作成し, その適用性, 及び再現性に問題ないことが確認できた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Tomoko Shimamura, Yoshihiro Sumikura, Takeshi Yamazaki, Atsuko Tada, Takehiro Kashiwagi, Hiroya Ishikawa, Toshiro Matsui, Naoki Sugimoto, Hiroshi Akiyama, and Hiroyuki Ukeda, Applicability of DPPH Assay for Evaluation of Antioxidant Capacity of Food Additives -Inter-laboratory Evaluation Study-, *Analytical Sciences*, **30**, 717-721 (2014).

2) Kraingkrai Ponghong, Tomoko Shimamura, Keiro Higuchi, Takehiro Kashiwagi, Kate Grudpan, Shoji Motomizu, Hiroyuki Ukeda, Spectrophotometric Sequential Injection Analysis System for Estimating the Concentration of Lipid Hydroperoxides in Edible Oils, *Journal of Flow Injection Analysis*, **31**, 33-37 (2014).

3) Tadaharu Ueda, Takashi Okumura, Yukino Tanaka, Tomoko Shimamura, Hiroyuki Ukeda, Development of a new electrochemical

evaluation method for antioxidant activity based on the redox properties of polyoxometalates and its application to the evaluation of antioxidant capacity of beverages, *Analytical Sciences*, **32**, 825-830 (2016).

4) 山内良子,石井佐弥,草場悠里,小林弘司,島村智子,受田浩之,穠山浩,石川洋哉,酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH ラジカル消去能測定におよぼす反応溶媒の影響,日本食品保蔵科学会誌,**42**,189-196 (2016).

5) Enkhtsetseg Enkhtuya, Tomoko Shimamura, Takehiro Kashiwagi, Hiroyuki Ukeda, Antioxidative Constituents in the Leaves of *Paeonia anomala* Grown in Mongolia, *Food Science and Technology Research*, **23**, 63-70 (2017).

6) 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,穠山浩,受田浩之,既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の関係,日本食品化学会誌,印刷中.

2. 学会発表

1) 山内良子,高野裕子,小浜友紀子,加治屋明子,島村智子,柏木丈拵,受田浩之,穠山浩,松井利郎,石川洋哉,酸化防止剤評価における各種抗酸化測定法の特性,第51回化学関連支部合同九州大会,2014年6月28日(福岡).

2) 山内良子,小浜友紀子,加治屋明子,島村智子,柏木丈拵,受田浩之,穠山浩,松井利郎,石川洋哉,抗酸化能評価における一電子転移反応と水素原子転移反応の比較,日本食品科学工学会第61回大会,2014年8月28-30日(福岡)

3) 田中由季乃,上田忠治,島村智子,受田浩之,ポリオキソメタレート錯体固定化電極の酸化還元特性,日本分析化学会第63年会,2014年9月17-19日(広島)

4) Tomoko Shimamura, Kraingkrai Ponghong, Keiro Higuchi, Takehiro Kashiwagi, Kate Grudpan, and Hiroyuki Ukeda, Development of sequential injection analysis system for evaluating lipid peroxidation inhibitory activity of antioxidants, 19th International Conference on Flow Injection Analysis, 2014/11/30-12/5, (Fukuoka)

5) 島村智子,吉田鉄平,柏木丈拵,受田浩之,多田敦子,杉本直樹,穠山浩,ロダン鉄法による酸化防止剤の抗酸化力価評価,第27回ビタミン研究会,2016年1月(香川)

6) 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,穠山浩,受田浩之,既存添加物チャ抽出物中の成分含量と抗酸化力価の関係,日本食品化学学会第22回総会・学術大会,2016年6月2-3日(高知).

7) 草場悠里,山内良子,小林弘司,島村智子,受田浩之,杉本直樹,穠山浩,石川洋哉,既存添加物チャ抽出物の各種抗酸化能評価,第53回化学関連支部合同九州大会,2016年7月2日(福岡)

F. 知的財産権の出願,登録状況

なし

G. 健康危機情報

なし

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26～28年度分担総合研究報告書

研究分担課題：既存添加物の含有成分解析に関する研究

研究分担者：井之上 浩一

要旨 第8版食品添加物公定書または日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第4版）」に記載されている既存添加物について、成分規格作成を実施した。対象物質は、ムラサキイモ色素・ムラサキヤマイモ色素、クチナシ黄色素、ゴマ油不けん化物、ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素である。結果として、ムラサキイモ色素、クチナシ黄色素、ゴマ油不けん化物、ベニコウジ黄色素については、本分析法により含有成分の評価が可能であると考えられる。その他については異なる分析法の再検討が必要であり、今後進めていくこととなる。

A. 研究目的

本研究では、既存添加物の含有成分解析に関する分析およびその化学物質の評価を実施した。具体的には、ムラサキイモ色素・ムラサキヤマイモ色素、クチナシ黄色素、ゴマ油不けん化物、ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素についてである。

ムラサキイモ色素・ムラサキヤマイモ色素

ムラサキイモ色素は、サツマイモ (*Ipomoea batatas* P.) の塊根から得られ、シアニジンアシルグルコシドおよびペオニジンアシルグルコシドを主成分とする。また、ムラサキヤマイモ色素は、ヤマノイモ科ヤマイモ (*Dioscorea alata* L.) の塊根より、水もしくは含有エタノールで抽出したものであり、ムラサキイモ色素と同じくシアニジンアシルグルコシドなどを主色素成分としている。いずれの色素も酸性溶液において、赤～暗赤紫色であり、アルカリ溶液では、暗緑色を呈する。これらの色素の確認試験は、第8版食品添加物公定書（以下、8版公定法）および日本食品添加物協会「第4版既存添加物自主規格」（以下、4版自主規格）に規格されている。ムラサキイモ色素は、8版公定法により、確認試験が記載され、ムラサキヤ

マイモ色素は、4版自主規格により確認試験がある。その一方で、ムラサキイモ色素およびムラサキヤマイモ色素の主成分は、シアニジンアシルグルコシドなどと示されているが、詳細な比較検討は実施されていない。つまり、今後の規格試験では、2種類の色素を比較しながら、指標となる成分の探索や試験法の検討を実施する必要がある。そこで、本研究では、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた各成分比較を実施することとした。

クチナシ黄色素

クチナシ黄色素は、アカネ科クチナシ (*Garden augusta Merrill* もしくは *Gardenia jasminoides Ellis*) の果実を水または、エタノールで抽出、若しくは加水分解を経て得られる色素であり、クロシンおよびクロセチンを主成分とする。また、一般的には、クチナシ黄色素は非色素成分としてゲニポシドも含まれている。本着色料製剤は、黄～暗赤色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なおいがある。現在、8版公定法では、クチナシ黄色素の確認試験、ゲニポシド純度試験、色価測定法が規定されている。特に、確認試験や色価測定法では、アルカリ条件下により、クロシンを加

水分解し、その殆どをクロセチンにしたものを分析対象としている。これは、クロセチン高含量（殆どクロシンを含有しない）製品が国内に流通していることから、本試験はクロシンおよびクロセチンのいずれかを主成分とする製品に対応するための規格としている。また、純度試験には、ゲニポシドを 0.5%以下（色価 100 に換算）として、HPLC による定量法が規格されている。さらに、サフラン色素（Saffron Color）は、欧米を中心に食品の着色に利用されており、クチナシ黄色素同様にクロシンおよびクロセチンを主成分としている。サフラン色素は、アヤメ科サフラン（*Crocus sativus* Line）の雌蕊頭から、エタノールで抽出され、ゲニポシドは含有していない。サフラン色素は、国内では一般飲食物添加物リストに記載されており、4 版自主規格に成分規格が示されている。クチナシ黄色素の分析については、色素成分（クロシン）またはゲニポシドを確認試験とする分析法が報告されている。しかしながら、クチナシ黄色素やサフラン色素製剤の成分は類似しており、色素成分およびゲニポシドのみの評価では限界があることが示唆されている。そこで、本研究では、8 版公定法に準じて、HPLC を用いた成分規格分析法の検討を実施した。また、その定量評価を目的として、クロセチンの単離精製を高速向流クロマトグラフィー（HSCCC）により実施し、その指標による製剤分析評価も行った。

ゴマ油不けん化物

ゴマ油不けん化物（Sesame Seed Oil Unsaponified Matter）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ものである。4 版自主規格の確認試験では、本品を直接順相系 HPLC により測定し、保持時間 8~23 分の間に認められる 5 本以上のピーク評価を行っている。しかしながら、条件にはセサミンの保持時間を 12 分に流速を調整する以外は、具体的な主成分の同定や定量分析は実施されていない。その規格は、「5 本以上検出されるピークのうち、最大ピーク面積を 100 とするとき、その他の 4 本のピーク面積比はいずれも 30 以上である」としている。つまり、複数のピークは面積比で主成分（セサモリン）に対して、30%以上の異なる物質含有を認めている。本自主規格案では、正確なセサモリンの評価は実施されておらず、具体的な定量や純度確認ではない。さらに、順相系 HPLC として移動相にヘキサン/酢酸エチルを用いているため、廃液処理などの観点からも汎用性に欠け、さらなる改良が必要と考えられる。そこで、本研究では、セサモリンやセサミンの分析法を基盤に逆相系 LC の検討を実施することとした。また、各成分の単離精製には、HSCCC を用いることとした。

ク面積比はいずれも 30 以上である」としている。つまり、複数のピークは面積比で主成分（セサモリン）に対して、30%以上の異なる物質含有を認めている。本自主規格案では、正確なセサモリンの評価は実施されておらず、具体的な定量や純度確認ではない。さらに、順相系 HPLC として移動相にヘキサン/酢酸エチルを用いているため、廃液処理などの観点からも汎用性に欠け、さらなる改良が必要と考えられる。そこで、本研究では、セサモリンやセサミンの分析法を基盤に逆相系 LC の検討を実施することとした。また、各成分の単離精製には、HSCCC を用いることとした。

ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、ベニコウジカビ（*Monascus purpureus*）から得られ、昔から沖縄などで、紅酒や豆腐のような発酵食品として利用されてきた。ベニコウジ色素は、培養した紅麹カビをプロピレングリコールやエタノールなど水溶性の溶剤で抽出し、一般的にはアンカフラビン、モナスコルブリンを色素の主成分としている。ベニコウジ黄色素は、同様のベニコウジカビを微温時弱塩酸性エタノールで抽出し、中和して得られたものとし、主色素はキサントモナシン類とされている。8 版公定法には、ベニコウジ色素（Monascus Color）が収載されている。確認試験では、主に色彩の評価のみであり、明確に主成分を定性し、分析するものとなっていない。また、純度試験では、シトリニンを 0.2 $\mu\text{g/g}$ 以下と定め、HPLC 法が規格化されている。主成分の定義は、アンカフラビン類およびモナスコルブリン類が記載されている。ベニコウジ黄色素（Monascus Yellow）は、4 版自主規格に規格されているが、確認試験では色彩の評価のみである。シトリニンの純度評価に関しては、示されていない。主成分では、キサントモナシン類と示されている。以上より、いずれも同じベニコウジカビから生成される色素成分であるが、培地条件や抽出方法により、異なる成分が含有することが考えられ、早急に主成分の規格などを示す必要がある。そこで、国内流通品であるベニコウジ色素および

ベニコウジ黄色素に関する色彩の成分規格および主成分の確定を検討することとした。

B. 研究方法

ムラサキイモ色素・ムラサキヤマイモ色素

1. 試料

平成 26 年度内に国内入手可能な 4 種類のムラサキイモ色素（株式会社パイオニア企画：アヤ紫さつま芋，三笠産業株式会社：ムラサキイモファインパウダー，藤元商店：紫芋パウダー，サンレッド YM 粉末ムラサキイモ色素）を試料とした。また，ムラサキイモ（千葉県産）およびムラサキヤマイモ（沖縄県産および自家栽培[静岡県立大学薬草園]）塊根を用いた。

2. 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER AE 100
遠心分離：クボタ製 KUBOTA 2410 および日立製作所製 HITACHI CF16RX2
恒温振盪水槽：NTS-400A，HU-M，東京理化工機（株）製
紫外可視分光光度計：日立製作所製 U-2010
HPLC 装置：Waters 社製 Waters Acquity H Class
MS 装置：Thermo Fisher Scientific 社製 Accela/Q-Exactive

3. 塊根からの色素成分の抽出

対象試料を水/エタノールによるミキサーで粉碎し，超音波抽出を行う。その後，遠心分離を行い，上清を 1 mL 採取し，精製水で 10 倍希釈する。本試料を固相抽出 Sep-Pak で精製したものを試料とした。

4. HPLC による分離分析

対象色素および塊根から抽出物は水/アセトニトリル混液（50/50，V/V）により調製した。移動相には，1.0% ギ酸水溶液/アセトニトリルを使用し，0分から30分かけて組成比 90/10 から 75/25 まで，グラジュエントを行い，その後，10/90 で 5 分間送液した。

カラム：TSKgel ODS column (2.0×150 mm，3 μm，東ソー社製)

カラム温度：40

移動相：1.0%ギ酸水溶液/1.0%ギ酸アセトニトリル(A/B:90/10(0-1 min) 40/60%(40 min))

流速：0.2 mL/min

検出波長：210-600 nm

注入量：5 μL

5. LC-MS による構造解析

測定条件は，エレクトロスプレーイオン化法（ESI：ポジティブモード）で行った。

MS 条件

Scan range: m/z 200–2000

Resolution: 70,000

Sheath gas flow rate: 40

Aux gas flow rate: 10

Spray voltage 3.80 kV

Capillary temperature: 350°C

Heater temperature: 300°C

MS/MS 条件

Scan range: m/z 150–150

Resolution: 70,000

Polarity: Positive

Sheath gas flow rate: 40

Aux gas flow rate: 10

Spray voltage 3.80 kV

Capillary temperature: 350°C

Heater temperature: 300°C

NCE: 15 eV

クチナシ黄色素

1. 試料

平成 26 年度内に国内入手可能なクチナシ黄色素製品（A694：水もしくは，エタノールで抽出，A12：加水分解を経て得られる色素）およびサフラン色素を試料とした。

2. 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER AE 100

遠心分離：クボタ製 KUBOTA 2410 および日立製

作所社製 HITACHI CF16RX2

恒温振盪水槽：NTS-400A，HU-M，東京理化学器械(株)製

紫外可視分光光度計：日立製作所社製 U-2010

HPLC 装置：Waters 社製 Waters Acquity H Class

MS 装置：Waters 社製 LCT Premier XE time-of-flight mass spectrometer (TOF-MS)

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge)，GL サ

イエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761 システム

3. HPLC によるクロシン，クロセチンおよびゲニポシドの一斉分析

対象試料及びゲニポシド溶液は水/メタノール混液 (50/50，V/V) により調製した。分析装置は上記のものを使用した。移動相には，0.1% ギ酸水溶液/メタノールを使用し，5 分間まで 80/20 で送液し，その後，15 分間で 10/90 にグラジュエントした。その後，17 分まで 10/90 とした後，初期条件で安定化を行った。

カラム：Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 × 100 mm，1.7 μm，Waters 社製)

カラム温度：40

移動相：0.1% ギ酸水溶液/0.1% ギ酸メタノール

流速：0.3 mL/min

検出波長：210-500 nm

注入量：10 μL

4. クロセチンの単離精製

クロセチンの単離精製には，HSCCC を用いた。2 相溶媒系には，ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1% ギ酸水溶液 (7/3/5/5，V/V/V/V) を用いた。HSCCC 用試料は，8 版公定法に従い，加水分解したクチナシ黄色素溶液を固相抽出 (Waters 社製 OASIS-HLB，200 mg/6 mL) により，精製したものを用いた。固相抽出カートリッジの洗浄には，メタノールおよび精製水 5 mL で行い，試料を精製水で 2 倍希釈したものを負荷した。その後，精製水 1 mL で洗浄後，メタノール 1 mL で溶出し，濃縮乾固したもの (8.4 mg) を 2 相溶媒 1 mL にて，再溶解したものを

用いた。カラム回転数は，1000 rpm として，2 相溶媒の上層を固定相として，下層を移動相とした。流速は，1.2 mL/min とした。本条件により，得られた分画は，それぞれ HPLC により純度など測定を行った。

5. 質量分析による構造解析

測定条件は，エレクトロスプレーイオン化法 (ESI：ポジティブモード) で行った。

Capillary voltage：3.0 kV，

Cone voltage：50V，

Source temperature：120，

Desolvation temperature：350，

Cone/desolvation gas flows：50/650 L/hr

Scan ranges：m/z 100 to 1000

ゴマ油不けん化物

1. 試料

ゴマ油不けん化物は長岡香料社製 (B478) を用いた。セサモールおよびセサミンは，和光純薬社製を用いた。セサモリンは，長良サイエンス社製を使用した。

2. 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

LC 装置：Waters 社製 Acquity H Class/PDAe

MS 装置：Waters 社製 Xevo TQD

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge)，GL サ

イエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761 システム

3. LC による分離分析

対象試料はアセトニトリル/メタノール混液 (50/50，V/V) により調製した。移動相には，0.1% ギ酸水溶液 (A) /アセトニトリル (B) を使用し，A/B：80/20 を 1 分間維持し，その後，15 分にて A/B：2/98 のグラジュエント分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100V column (2.0 × 150 mm，3 μm，東ソー社製)

カラム温度：40

流速：0.2 mL/min
検出波長：200-400 nm (定量：290 nm)
注入量：5 μ L

MS 装置

測定条件は、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI：ポジティブモード) で行った。

Capillary voltage: 2.0 kV
Extractor voltage: 3 V
RF lens voltage: 2.5 V
Source temperature: 150°C
Desolvation temperature: 400°C
Cone/desolvation gas flows: 50/800 L/hr
MS/daughter scan ranges: m/z 50 to 400
Cone voltage: 15-20 V
Collision energy: 15-25 eV

4. HSCCC の分離条件

対象試料は、0.5 g を 2 相溶媒それぞれ 1 mL に溶解し、0.8 μ m の LC 用フィルターを通し、試料溶液とした。2 相溶媒には、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V) を利用し、上層を固定相として、テフロンチューブ内(350 mL)に充填し、その後、遠心回転(1000 rpm)を行った。下層は、流速 2.0 mL/min において送液し、安定後、試料溶液を注入した。モニタリングには、290 nm を用いて、セサミンおよびセサモリンと想定されるピークをフラクションコレクターにより単離精製した。その後、エバポレータにより、濃縮乾固したものを、秤量した。秤量後、LC による分離分析に準じて、純度評価を行った。

ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素

1. 試料

ベニコウジ色素は、ヤエガキ発酵技研社製、グリコ栄養食品社製、三栄源エフエフアイ社製を用いた。ベニコウジ黄色素は、三栄源エフエフアイ社製を用いた。

2. 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52
LC 装置：島津製作所社製

LC-20AD/SIL-20AC/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10A
S システム

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge), GL サイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761 システム

3. ベニコウジ色素の LC 分離分析

対象試料はアセトニトリル/メタノール混液 (50/50, V/V) により調製した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液(A)/0.1%ギ酸メタノール(B) を使用し、A/B: 45/55 を 1.5 分間維持し、その後、15 分にて A/B: 2/98 のグラジエント分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100V column (4.6 \times 150 mm, 3 μ m, 東ソー社製)

カラム温度：40

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-550 nm (定量：500 nm)

注入量：10 μ L

4. ベニコウジ黄色素の LC 分離分析

対象試料は水/メタノール混液(30/70, V/V) により調製した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液(A)/0.1%ギ酸メタノール(B) を使用し、A/B: 70/30 をアイソクラティックにより、10 分間の分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100V column (4.6 \times 150 mm, 3 μ m, 東ソー社製)

カラム温度：40

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-500 nm (定量：460 nm)

注入量：10 μ L

5. ベニコウジ色素の HSCCC の分離分析

対象試料を上層および下層混合溶液(50/50, V/V) に溶解した。二相溶媒系は、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液(4/5/4/5, V/V/V) を用いた。分離部は、Type-J コイルを用い、遠心スピードを 1000 rpm とした。また、コイル容量は、350 mL であり、固定相には、上層を充填した。移動相には下層を用い、流速 2.0 mL/min で送液した。

6. ベニコウジ黄色素の HSCCC の分離分析

対象試料を上層および下層混合溶液 (50/50, V/V) に溶解した。二相溶媒系は、酢酸エチル/n-ブタノール/水(V/V/V)を用いた。分離部は、Type-J コイルを用い、遠心スピードを 1000 rpm とした。また、コイル容量は、350 mL であり、固定相には、上層を充填した。移動相には下層を用い、流速 2.0 mL/min で送液した。

C. 研究結果

ムラサキイモ色素・ムラサキヤマイモ色素

1. HPLC による分離分析

8 版公定法 (515 ~ 535 nm) および 4 版自主規格 (525 ~ 545 nm) に検出波長を設定し、逆相分配モードによる成分分析を実施した。移動相の条件を検討した結果、ギ酸濃度を 1.0% 以上でないと良好な分離が達成できなかった。また、トリフルオロ酢酸では、0.5% でも十分に良好な分離ができた。そのような結果より、LC-MS への連結を想定して、1.0% ギ酸水溶液/アセトニトリル系を用いることにした。ムラサキイモに関するクロマトグラムは、既報のピークパターンと類似しており、ほぼ良好な分離分析が達成できたと推定される。一方で、ムラサキヤマイモでは、ムラサキイモとは全く異なるピークパターンを示した。本クロマトグラムと比較検討できる研究報告はなく、各成分の比較同定などが必要と考えられる。これらのピークはいずれも 8 版公定法 (515 ~ 535 nm) および 4 版自主規格 (525 ~ 545 nm) の確認試験を示す由来成分である。そのため、これらの比較を行うことで、今後の規格試験へ応用できるものとする。そこで、各成分の LC-MS 分析を行うこととした。

2. LC-MS による同定分析

HPLC の分離条件を利用して、LC-MS による同定分析を実施した。ムラサキイモの LC-MS クロマトグラムを Fig. 1 に示す。検出波長 513 ~ 535 nm による主な検出は、14 ピーク観察され、いずれも ESI-Positive モード (m/z 200 ~ 2000)

でマススペクトルを得ることができた。また、いずれも既報とのピークパターン、質量数 (理論値)、フラグメントイオンより、同定することが可能であった。ピーク 1 は、 $[M+H]^+$ m/z 773.212 (理論値: m/z 773.2135, $C_{33}H_{41}O_{21}$) となり、MS/MS では、 m/z 611, 499, 287 が検出され、cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 2 は、 $[M+H]^+$ m/z 787.229 (理論値: m/z 787.2291, $C_{34}H_{43}O_{21}$) となり、MS/MS では、 m/z 625, 436, 301 が検出され、peonidin 3-sophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 3 は、 $[M+H]^+$ m/z 893.234 (理論値: m/z 893.2346, $C_{40}H_{45}O_{23}$) となり、MS/MS では、 m/z 731, 449, 287 が検出され、cyanidin 3-p-hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 4 は、 $[M+H]^+$ m/z 935.244 (理論値: m/z 935.2452, $C_{42}H_{47}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 773, 449, 287 が検出され、cyanidin 3-(6''-caffeoylsophoroside)-5-glucoside と同定できた。ピーク 5 は、 $[M+H]^+$ m/z 907.249 (理論値: m/z 907.2503, $C_{41}H_{47}O_{23}$) となり、MS/MS では、 m/z 745, 463, 301 が検出され、peonidin 3-p-hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 6 は、 $[M+H]^+$ m/z 949.260 (理論値: m/z 949.2608, $C_{43}H_{49}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 787, 463, 301 が検出され、peonidin 3-(6'''-caffeoylsophoroside)-5-glucoside と同定できた。ピーク 7 は、 $[M+H]^+$ m/z 949.260 (理論値: m/z 949.2608, $C_{43}H_{49}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 787, 449, 287 が検出され、cyanidin 3-feruloylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 8 は、 $[M+H]^+$ m/z 963.275 (理論値: m/z 963.2765, $C_{44}H_{51}O_{24}$) となり、MS/MS では、 m/z 801, 463, 301 が検出され、peonidin 3-feruloylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 9 は、 $[M+H]^+$ m/z 933.264 (理論値: m/z 933.2659, $C_{43}H_{49}O_{23}$) となり、MS/MS では、 m/z 771, 433, 271 が検出され、pelargonidin 3-feruloylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 10 は、 $[M+H]^+$ m/z 1097.275 (理論値: m/z 1097.2769, $C_{51}H_{53}O_{27}$) となり、MS/MS では、 m/z 935, 499, 287 が検出され、cyanidin 3-(6'',6'''-dicaffeoylsophoroside)-5-gluc

oside と同定できた。ピーク 11 は, $[M+H]^+$ m/z 949.260 (理論値: m/z 949.2608, $C_{43}H_{49}O_{24}$) となり, MS/MS では, m/z 787, 463, 301 が検出され, peonidin 3-caffeoylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 12 は, $[M+H]^+$ m/z 1111.290 (理論値: m/z 1111.2925, $C_{52}H_{55}O_{27}$) となり, MS/MS では, m/z 949, 463, 301 が検出され, peonidin 3-dicaffeoylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 13 は, $[M+H]^+$ m/z 1125.306 (理論値: m/z 1125.3082, $C_{53}H_{57}O_{27}$) となり, MS/MS では, m/z 963, 463, 301 が検出され, peonidin 3-caffeoyl-feruloylsophoroside-5-glucoside と同定できた。ピーク 14 は, $[M+H]^+$ m/z 1095.297 (理論値: m/z 1095.2976, $C_{52}H_{55}O_{26}$) となり, MS/MS では, m/z 933, 583, 433 が検出され, pelargonidin 3-caffeoyl-p-coumaroylsophoroside-5-glucoside と同定できた。

一方で, ムラサキヤマモの LC-MS クロマトグラムより, 検出波長 523~545 nm における主な検出は, 8 ピーク観察され, いずれも ESI-Positive モード (m/z 200~2000) でマススペクトルを得ることができた。しかしながら, ムラサキイモのような報告例がなく, 同定することはできなかった。しかしながら, いずれの MS スペクトルは良好に取得することができ, 今後, 本ピークを同定することが必要と思われる。

クチナシ黄色素

1. HPLC によるクロシン, クロセチンおよびゲニポシドの一斉分析

8 版公定法により, 評価したクロシン, クロセチンおよびゲニポシドの一斉分析法を検討した。その際のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。A694 からは, 各種クロシンの異性体が検出され, 一部にクロセチンも確認された。一方で, A694 のアルカリ加水分解および A12 では, クロセチンのみが観察された。Fig. 2-[A] に示す主な 3 つのピークは, *trans*-crocetin di(\square -D-gentiobiosyl) ester (ピーク 1; 最大吸収波長: 442 nm, 保持時間: 7.8 min), *trans*-crocetin \square -D-gentiobiosyl ester (ピ

ーク 2; 最大吸収波長: 434 nm, 保持時間: 11.2 min) および *cis*-crocetin di(\square -D-gentiobiosyl) ester (ピーク 3; 最大吸収波長: 442 nm, 保持時間 11.7 min) であった。それらの TOF/MS スペクトルでは, ピーク 1 は, m/z 999.283 $[M+Na]^+$, ピーク 2 は, m/z 837.522 $[M+Na]^+$ そして, ピーク 3 は, m/z 999.282 $[M+Na]^+$ が検出され, いずれも既報を参考として確認できた。アルカリ加水分解およびクチナシ黄色素 A12 製品におけるクロマトグラムでは, 主に 2 つのピーク 4 および 5 が検出された。それらの 2 つのピークは, *trans* および *cis*-crocetin (ピーク 4; 最大吸収波長: 422 nm, 保持時間: 14.4 min) および (ピーク 5; 最大吸収波長: 422 nm, 保持時間: 15.9 min) であった。本ピークは, いずれも TOF/MS において, m/z 329.441 $[M+H]^+$ が検出されている。

同一条件において, ゲニポシドおよびその分解物であるゲニピン (m/z 226.929, $[M+H]^+$) も測定することができた。

本手法を用いて, 8 版公定法で用いるアルカリ加水分解の条件検討を実施した。0.02 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (50°C) において, クチナシ黄色素 A694 を用いて, 加水分解した結果, ピーク 1 (保持時間: 7.8 min) および 4 (保持時間: 14.4 min) の経時変化を示すことができた。その結果, クロシンは, 5 分程度で加水分解され, クロセチンは, 20~30 分程度で一定量を示すことが分かった。その一方で, 不純物質であるゲニポシドは, 120 分程度の経時により, ゲニピンへ分解することも判明した。

2. クロセチンの単離精製

クロセチンを指標としたクチナシ黄色素の定量評価を行うため, アルカリ分解試料より, クロセチンの単離精製を行った。まずは, 固相抽出法により抽出を行った。クチナシ黄色素製剤 0.1 g から, 加水分解および固相抽出による濃縮精製により, 得られた成分 8.4 mg を HSCCC に注入することとした。また, 同時に HSCCC の 2 相溶媒系を検討することとした結果, ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1% ギ酸水溶液 (7/3/5/5) を最適として利用することとし

た．本条件により，固定相の保持率は 88%となり，単離精製には，8 時間を費やした．その際のクロマトグラムを Fig. 3 に示す．クロマトグラムより，Fraction A および B をそれぞれ 2.0 および 1.2 mg 得ることができた．Fraction A を HPLC で測定した結果，クロセチン標準試料として利用できる成分が単離できた．しかしながら，*trans* 型クロセチンに対して，*cis* 型が 15%の割合で，異性化反応が生じることが分かった．いずれも HPLC で単離精製を行っても同様の反応（変換効率）が起こり，常に 15%程度の混合物となってしまった．しかしながら，他の不純物なども観察されず，安定なクロマトグラムを示したため，本試料を指標として，クチナシ黄色素の定量評価に用いることとした．

3．クロセチン指標によるクチナシ黄色素の定量評価

2 で開発した HPLC 法を用いて，3 で得た標準試料により，検量線を作成した結果，*trans* 型クロセチンにおいて， $y=549.7x+7374.6$ （相関係数 $r^2=0.998$ ）の検量線を得ることができた．本検量線を利用して，アルカリ分解後のクロセチン含有量は，A694 では 67.6%，A12 では 45.5% およびサフラン色素では 42.3%となった．

ゴマ油不けん化物

ゴマ油不けん化物中のセサモール，セサミン，セサモリンの紫外可視吸光光度における極大吸収波長を調べた．いずれも，290 nm 付近で吸収極大波長（セサモール $\lambda_{\max}=296$ nm，セサミン $\lambda_{\max}=286$ nm，セサモリン $\lambda_{\max}=289$ nm）が観察され，定量などの評価に用いることとした．本設定波長により，逆相系 LC の各種パラメータを用いて，条件検討を実施した．その結果，セサモールのシンメトリー係数は僅かに低値を示し，他の値は殆ど同等であった．その際の逆相系 LC のクロマトグラムを Fig. 4 に示す．いずれも，15 分以内に良好なピークを得ることができた．そのため，移動相には汎用性などを考慮して，0.1% ギ酸水/アセトニトリル混合液を用いることとした．本最適条件において，検出限界（LOD）および定量限界（LOQ）は，セサ

モール（LOD:0.04 ppm，LOQ: 0.15 ppm），セサミン（LOD: 0.02 ppm，LOQ: 0.08 ppm）およびセサモリン（LOD: 0.04 ppm，LOQ: 0.15 ppm）となった．各検量線においても，LOQ~5 ppm の範囲において，相関係数（ r ）0.999 以上を示した．本手法を用いて，ゴマ油不けん化物の 50 倍希釈（希釈溶媒：アセトニトリル/メタノール 50/50）のクロマトグラムを Fig. 4 に示す．その際の定量値は，セサモール：不検出（7.5 mg/kg 以下），セサミン（12.8 g/kg）およびセサモリン（9.4 g/kg）となった．本結果は，既報にあるゴマ油中の濃度よりも高含有存在していることが判明した．

本分析法は，逆相系 LC を用いているため，直接 MS に導入することも可能である．MS によるスペクトル情報があることで，飛躍的に同定能が向上する．そのため，本研究では，ESI-ポジティブモードを採用して，スペクトル解析を実施した．LC/MS には，逆相系 LC 条件をそのまま利用した．ESI-ポジティブモードにおいて，セサモール m/z 139，セサミン m/z 337 およびセサモリン m/z 233 が最も強度が高く検出された．それらをプレカーサーイオンとして採用し，プロダクトイオンスキャンにより，MS スペクトルを得た．いずれも，特異的なスペクトルを得ることができ，化合物同定に有益な情報を得ることができた．本手法を用いて，実際に検出されたゴマ油不けん化物からのピーク同定を試みた．その結果，標準溶液と同じスペクトルが検出され，確実な化合物の同定が達成できた．本結果より，順相系 LC では実施することができなかった MS による情報も同時に入手できる逆相系 LC の構築が達成できたものと判断できる．

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

本条件を用いて，HSCCC による単離精製の分

析を行った際のクロマトグラムを Fig. 5 に示す。HSCCC クロマトグラムより、Fraction A および Fraction B を単離精製することができた。いずれも、絶対検量線法により定量した結果、Fraction A において、7.37 mg および Fraction B において、5.17 mg となった。また、MS/MS スペクトルにより、Fraction A および Fraction B は、セサミンおよびセサモリンであると同定できた。本試料を LC-フォトダイオードアレー分析（検出波長 200-400 nm）した結果、それぞれの純度が 99%以上となり、良好に単離精製できたものと考えられる。

ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、いずれも国内で流通している試料を用いた。

次に、HPLC による分離分析を実施した。規格における色価では、ベニコウジ色素で波長 480 ~ 520 nm、ベニコウジ黄色素では、458 ~ 468 nm とされている。そこで、各モニタリングをいずれも規格基準内波長である 500 nm（ベニコウジ色素）および 460 nm（ベニコウジ黄色素）を含むフォトダイオードアレーにて検出した。ベニコウジ色素は、各検体により、全く異なるクロマトグラムパターンを示し、いずれも培養技術やベニコウジカビの種類などが異なり、得られている成分が異なることが疑われた。また、種別により HPLC による分離分析は非常に困難であるとも判断された。そのなかでも、試料 119 において、比較的明確な 4 つピークが観察された（Fig. 6）。それぞれの吸光光度スペクトルを測定した結果、いずれも 500 nm 付近に吸収極大波長をもつため、いずれもベニコウジ色素の成分であることが判明した。一方で、ベニコウジ黄色素は、明確な 2 つのピークが観察され、いずれも色素成分である可能性が示唆された（Fig. 7）。それらの吸光光度スペクトルにおいても、吸収極大波長が 400 nm 付近であり、ベニコウジ黄色の色素成分であることが示唆された。

HPLC 法では、ベニコウジ色素の成分などが固定相カラムに吸着してしまい、良好な分離分析達成できなかったと推定される。また、ベニコ

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

2 相溶媒系の検討条件を用いて、HSCCC の分離分析を実施した。その結果、Fig. 8（ベニコウジ色素）および Fig.9（ベニコウジ黄色素）にそれぞれのクロマトグラムを示す。ベニコウジ色素については、主な色素成分（赤色素）が、ソルベント付近に検出され、色彩より主成分である可能性が示された（Fig. 8：色彩成分 X）。また、その後、色彩のある成分が溶出し、それをまとめて獲得した（Fig. 8：色彩成分 Y）。色彩成分 X および Y を HPLC で分析した結果、色彩成分 X では、試料 119 のクロマトグラムで観察されたピーク A および B が検出されているが、明らかに大きなブロードの溶出成分が存在し、良好に評価できないことが判明した。また、色彩成分 Y では、試料 119 で観察されたピーク C および D が観察された。一方で、ベニコウジ黄色素は、我々の既報⁵⁾において、良好に各成分を単離精製することができた。各成分を¹H-NMR および LC-MS/MS（エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモードを採用した）を用いて、解析した結果、Fraction A が、キサントモナシン A および Fraction B がキサントモナシン B であることが判明した。

D. 考察

ムラサキイモ色素・ムラサキヤマイモ色素

本研究では、8 版公定法および 4 版自主規格にて、ムラサキイモおよびムラサキヤマイモの区別は不可能であったため、HPLC によるクロマ

トグラムパターンを比較した。その結果、最大吸収波長（ムラサキイモ：515～535 nm，ムラサキヤマイモ：525～545 nm）によるピークが全く異なっていた。つまり、各規格基準に準じるが、その由来成分は全く異なることが分かった。ゆえに、各ピークの成分を同定し、新たな規格基準指標をタンクする必要がある。そのため、LC-MS によって、各ピークの同定を実施することとした。Table 1 にムラサキイモ色素の吸収極大波長および同定された物質名をまとめた。いずれも報告されている既知の物質であり、いずれも有効な指標物質になりえると考えられる。一方で、ムラサキヤマイモに関しては、いずれも良好な MS スペクトルを取得することができたが、各ピークから物質を同定することができなかった。今後の比較検討で各成分の同定は重要な情報となるため、早急に NMR などを利用して、確認する必要がある。

クチナシ黄色素

本研究では、8 版公定法を基盤に国内で流通するクチナシ黄色素 2 製品およびサフラン色素 1 製品の評価および新たな HPLC による一斉分析法の検討を実施し、試験法の妥当性および新たな問題点を検証した。8 版公定法に基づく評価では、サフラン色素とクチナシ黄色素を区別することが不可能であった。

そこで、HPLC によるクロシン、クロセチンおよびゲニポシドの一斉分析法を開発し、アルカリ加水分解前後の評価を行った。逆相系グラジエントモードおよび DAD 検出法を利用することで、各成分の分離分析が達成できた。本試験法を用いて、クチナシ黄色素 A694 製品を分析した結果、様々なクロシン異性体が検出された。そのため、クロシン異性体を用いたクチナシ黄色素の指標とすることは、複数存在するため困難であると判断した。そこで、アルカリ分解後の A694 および A12 製品を測定した結果、ほぼ同様のクロマトグラムを得ることができ、*trans* 型クロセチンが最も有効に検出することができ、本化合物を指標とすることとした。そこで、HSCCC による *trans* 型クロセチンの単離精製を試みた。その結果、Fraction A として、

trans 型クロセチンを得ることができた。しかしながら、*trans* 型クロセチンは、容易に *cis* 型へ 15%程度変換してしまうことが判明した。その一方で、HSCCC を利用することで、他の不純物質なども含まず、*trans* 型 85%純度で定量を行うこととした。その結果、アルカリ分解後のクロセチン含有量は、A694 では 67.6%、A12 では 45.5%およびサフラン色素では 42.3%となった。いずれにおいても、殆どその差は、見出すことができなかった。つまり、アルカリ分解の製剤に存在するクロセチン含量だけでは、クチナシ黄色素とサフラン色素を識別することが不可能であった。

また、ゲニポシドにおいては、クチナシ黄色素から僅かであるが検出することができた。その一方で、アルカリ加水分解すると、ゲニポシドのピークは減少し、新たにゲニピンのピークが検出された。つまり、加水分解過程において、ゲニポシドは、ゲニピンに変化することが判明した。ゲニピンは、アポトーシスの誘導や免疫系への影響など薬理活性を有しており、安全性からもモニタリングが必要な物質である。8 版公定法では、不純物質として、ゲニポシドのみ規格となっている。その一方で、加水分解処理されているクチナシ黄色素製品では、ゲニポシドが適合（0.5%以下）であったとしても、そのすべてもしくは一部がゲニピンに分解されている可能性が予想される。しかし、現在の 8 版公定法では、その点について、判断することはできない。今後、ゲニピンを含めた不純物質試験が要求されるものと思われる。本研究より、以下の新たな問題点および提案ができると思われる。

ゴマ油不けん化物

本研究では、ゴマ油不けん化物の新たな確認試験法の基礎的な検討を実施した。試験法としては、逆相系 LC により、検出波長を 290 nm に設定して、セサモール、セサミンおよびセサモリンを分析するものである。本結果より、いずれもゴマ油不けん化物からの測定が可能であり、定量も達成できた。また、確実な同定を目指して直接 MS 分析することもでき、有効な MS

スペクトルを得ることができた。以上より、今後は本手法と自主規格案を比較する必要もあり、様々な流通品や製品にも汎用できることを示す必要がある。

また、HSCCC によるセサミンおよびセサモリンの効率的な単離精製法の検討を行った。今回、HSCCC を用いて、ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを単離精製するため、2 相溶媒系の比較した結果、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)が最適であるとの判断になった。本溶媒系を用いて、HSCCC による分離を行った結果 (Fig. 5)、主に 2 つの Fraction を得ることができ LC 分析の結果、Fraction A においてセサミン、Fraction B においてセサモリンが高純度 (LC 評価:99%以上) の標準品を得ることができた。いずれも、セミ分取スケールで1回の操作で 数 mg から数十 mg 程度は同時に単離精製できることが判明した。しかしながら、ゴマ油不けん化物含有濃度が低いため、今回では、数 mg 程度の単離精製となった。

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

ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素

本研究では、ベニコウジカビ (*Monascus purpureus*) から生成されるベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素について、成分規格に伴う解析を実施した。ベニコウジカビは、育成する培地条件により様々な色彩成分を生成することや抽出条件により成分が異なることなどが報告されているため、国内流通品に関して、成分規格を定める必要がある。そこで、一般的に入手可能なベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の解析することとした。第 8 版食品添加物公定書および 4 版自主規格の確認試験では、主に色彩を評価するものであり、流通品ではすべて規格内であった。それらの製品を用い

て、HPLC による色彩成分の評価を実施した。その結果、ベニコウジ色素の製品間において異なるクロマトグラムパターンを示し、色彩成分の違いなどが示唆された。そのうえ、様々な分離条件を検討したが、すべてに対して、良好なピーク分離が得られず、HPLC による評価は難しいことが判明した。一方で、ベニコウジ黄色素では、明確な 2 本のピークが観察された。しかしながら、それ自体が色彩の主成分とは断定することは難しく、色彩成分の回収率が 100%である HSCCC による分離評価が必要であることが分かった。HSCCC では、分配係数を算出しなければならず、ベニコウジ色素 (ピーク A~D) およびベニコウジ黄色素 (ピーク E, F) の HPLC 分析によるピークを基準に 2 相溶媒系を決定した。その結果、HSCCC の評価により、ベニコウジ色素において、色彩成分はフロント付近に大きく検出され、分配係数から想定される色彩ピークは後ろに溶出してきた。しかしながら、それを HPLC により評価した結果、主な色彩成分のピークを定めることができなかった。一方で、ベニコウジ黄色素は、HSCCC により、良好に単離精製することで、それぞれをキサントモナシン A およびキサントモナシン B と同定することができた。

E. 結論

ムラサキイモ色素・ムラサキヤマイモ色素

国内流通のムラサキイモ色素、ムラサキイモ、ムラサキヤマイモの判断について、以下に示す。

・ムラサキイモとムラサキヤマイモの識別

HPLC 法による規格基準の波長領域において、各ピークパターンが全く異なり、識別は可能であった。

・各成分の同定

HPLC 法に準じ、検出されたピークの同定を試みた。その結果、ムラサキヤマイモについては、すべて同定することができた。一方で、ムラサキヤマイモについては、全く同定することができなかった。

・今後の検討

ムラサキヤマイモの成分を同定し、両色素の識別に有用な成分を探索することが必要である。また、加水分解法なども利用して、アグリコンによる簡便な分離分析なども検討する必要がある。

クチナシ黄色素

国内流通のクチナシ黄色素製品の判断について、以下に示す。

8 版公定法の確認試験において、両製品（水もしくはエタノール抽出製品および加水分解製品）を同一条件において、判断可能である。

・クチナシ黄色素とサフラン色素の識別

8 版公定法の確認試験およびクロセチン指標による HPLC 法では識別不可能である。今後、クロシンもしくはクロセチン以外の成分を用いるなど、他の試験法が必要と判断できる。

・純度試験（ゲニポシド）の試験

8 版公定法の純度評価としては、クチナシ黄色素およびサフラン色素では適合と判断できた（0.5%以下）。しかし、加水分解の過程でゲニポシドから薬理活性を有するゲニピンへ変化することが判明した。今後、ゲニピンに対する純度試験および国内流通製品での含有調査が必要だと考えられる。

ゴマ油不けん化物

本結果より、既存添加物ゴマ油不けん化物の自主規格案について、主成分も含めて再検討する必要性が挙げられる。そのためには、今後、他の流通品も含めて、自主規格案との比較検討を進める必要があると結論付けた。本結果からの改善点は下記に示す。

定義：本品は、ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた、セサミンおよびセサモリンを主成分とするものである。

確認試験：逆相系 LC によるセサモール、セサ

ミンおよびセサモリンの同時定量法（試料は適時、アセトニトリル/メタノール混合液（50/50, V/V）にて希釈して注入する）

規格基準：セサミンおよびセサモリンの含有率を提示する。さらに、セサモールは含まれない（もしくは規定の含有率以下とする）。

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

ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素

本結果より、既存添加物ベニコウジ色素とベニコウジ黄色素の成分規格案について、主成分も含めて再検討する必要性が挙げられた。そのためには、今後、他の流通品も含めて、自主規格案との比較検討を進める必要があると結論付けた。本研究からの結論は下記に示す。

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、培地条件や抽出条件により、全く色彩成分が異なり、明確な主成分を同定し、それに基づく規格基準が必要と考えられた。

ベニコウジ色素：赤色の主な成分は、HPLC による評価は困難であり、今後、HSCCC などを利用した主成分の同定が必要であり、それに基づく、試験の提案も求められる。

ベニコウジ黄色素：主にキサントモナシン A およびキサントモナシン B が主成分と想定される。しかしながら、いずれの標準品も入手困難であるため、今後、その含量分析に関して、検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Inoue, K., Tanada, C., Nishikawa, H., Matsuda, S., Tada, A., Ito, Y., Min, J. Z., Todoroki, K., Sugimoto, N., Toyooka, T., Akiyama, H. "Evaluation of Gardenia Yellow using crocetin from alkaline hydrolysis based on ultra high-performance liquid chromatography and high-speed countercurrent chromatography." *J. Sep. Sci.*, **37**, 3619-3624 (2014)

Takahashi, M., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Takeuchi, H., Nakagawa, K., Akiyama, H., Sato, K., Inoue, K. Determination and purification of sesamin and sesamol in sesame seed oil unsaponified matter using reversed-phase liquid chromatography coupled with photodiode array and tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* **39**, 3898-3905 (2016)

2. 学会発表

棚田千尋, 井之上浩一, 杉本直樹, 関俊哲, 轟木堅一郎, 豊岡利正, 穠山 浩「UPLCによるクチナシ黄色素の成分分析に関する検討」日本食品化学学会 第20回総会・学術大会, 2013年8月(名古屋)

井之上浩一「LC/MSを基盤とする天然添加物および含有成分の食品分析技術に関する研究」日本食品化学学会 第20回総会・学術大会, 2014年5月(東京)

西川弘晃, 井之上浩一, 棚田千尋, 杉本直樹, 関俊哲, 轟木堅一郎, 穠山 浩, 豊岡利正「高速向流クロマトグラフィーによる加水分解クチナシ黄色素クロセチンの単離精製」日本食品化学学会 第20回総会・学術大会, 2014年5月(東京)

高橋未来, 井之上浩一, 西崎雄三, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 穠山 浩; 逆相系 HPLC に

よる既存添加物・ゴマ油不けん化物の成分規格の検討. 日本薬学会第136年会(横浜)2016年3月26日~29日

高橋未来, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 竹内弘明, 中川一弥, 穠山 浩, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによるゴマ油不けん化物からの高純度セサミンおよびセサモリンの単離精製 日本食品化学学会第22回総会・学術大会(高知), 2016年6月

G. 知的財産権の出願, 登録状況
特になし

H. 健康危機情報
特になし

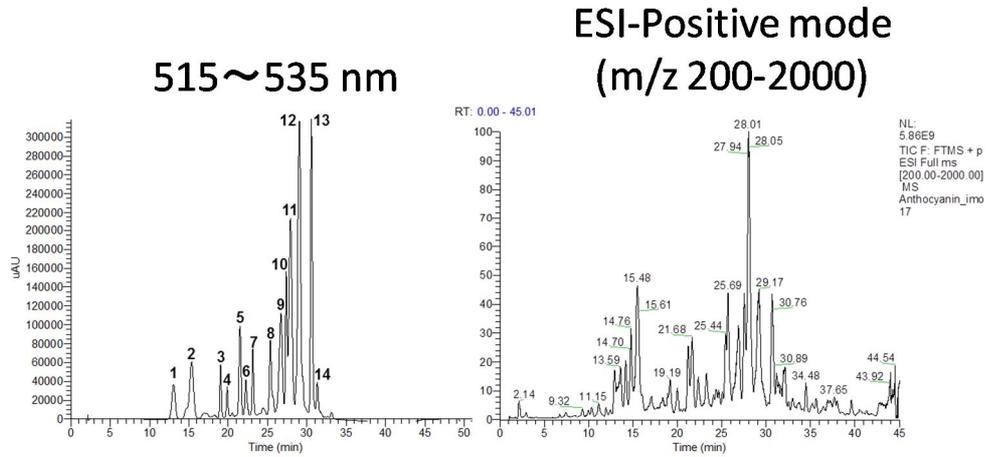


Fig. 1 ムラサキイモのLC-MSクロマトグラム

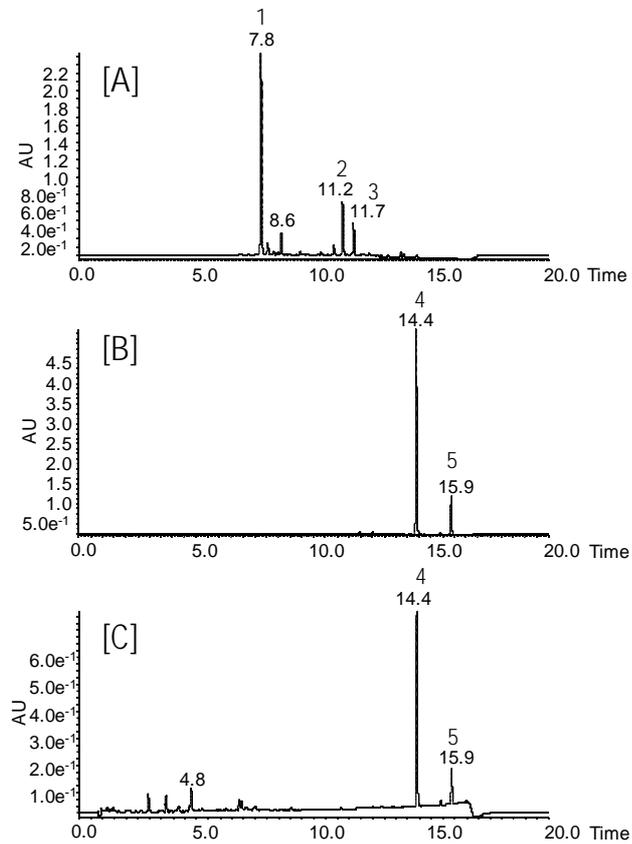


Fig. 2 クチナシ黄色素のHPLCクロマトグラム

- [A] クチナシ黄色素 (A694 : 加水分解なし)
- [B] クチナシ黄色素 (A12 : 加水分解なし)
- [C] クチナシ黄色素 (A694 : 加水分解あり)

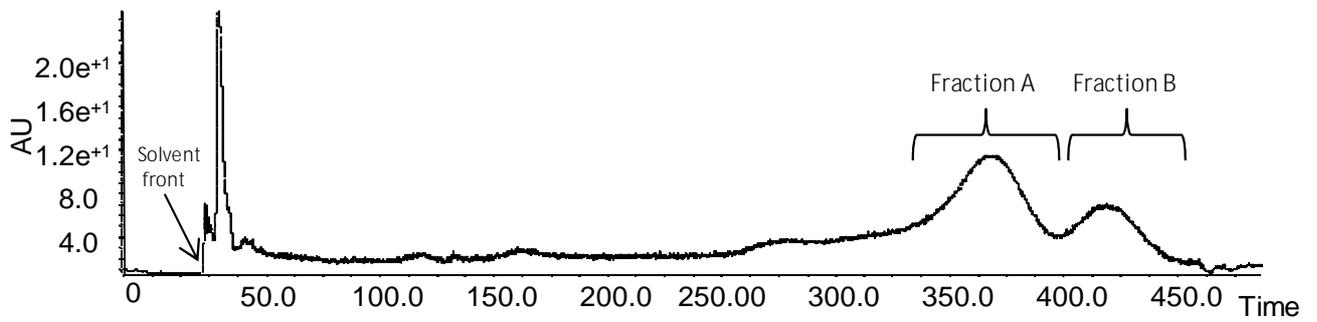


Fig. 3 加水分解クチナシ黄色素のHSCCCクロマトグラム

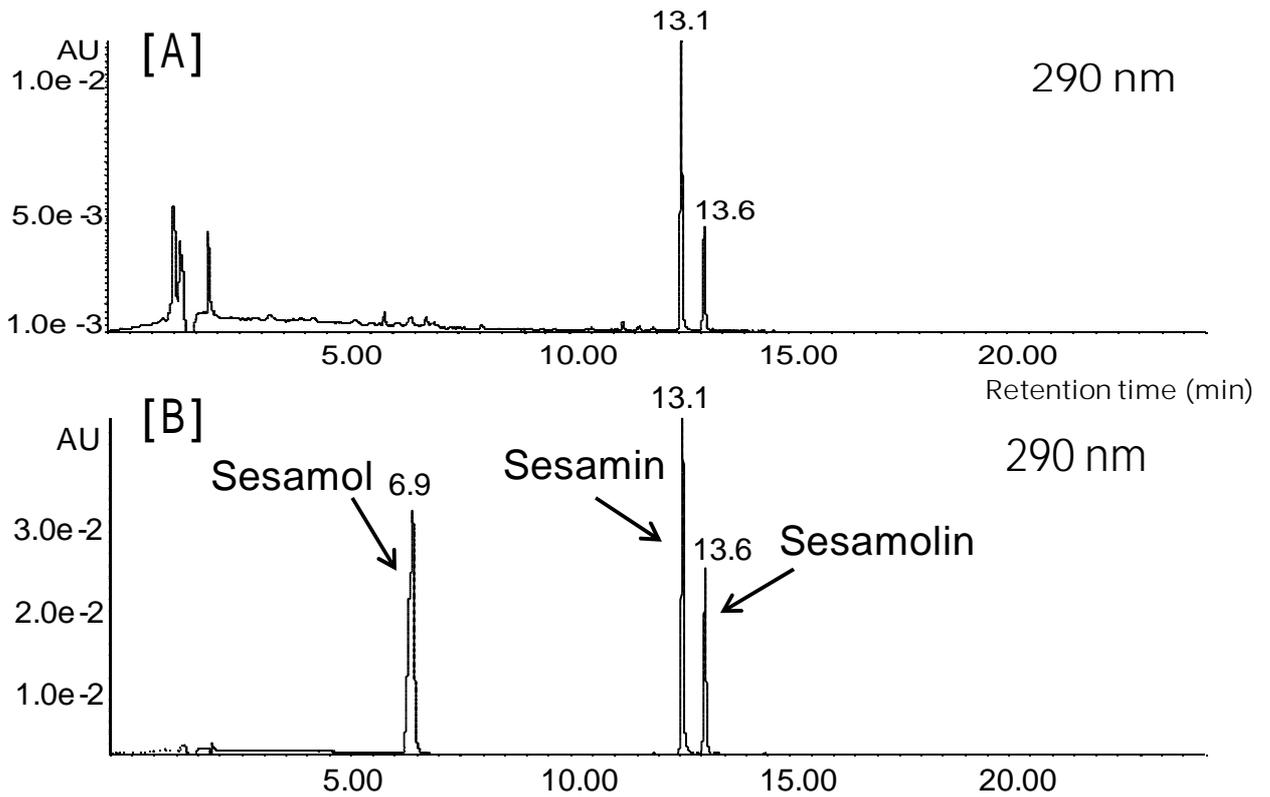


Fig. 4 LCクロマトグラム

[A]セサモール，セサミン，セサモリン，[B]ゴマ油不けん化物

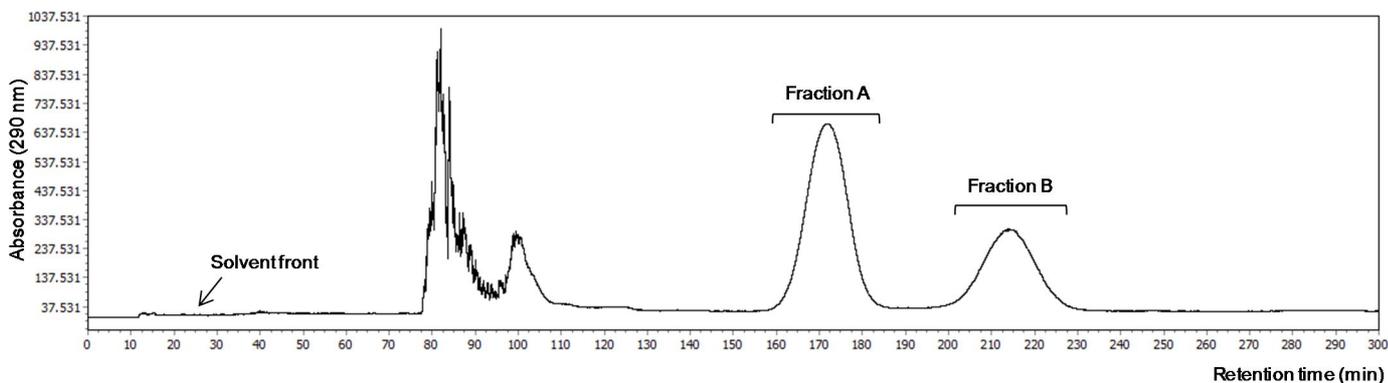


Fig. 5 ゴマ油不けん化物における HSCCC クロマトグラム
 Fraction A (40-90 min) および Fraction B (400-450 min)

119 ベニコウジ色素(粉末タイプ) 三栄源FFI(株)

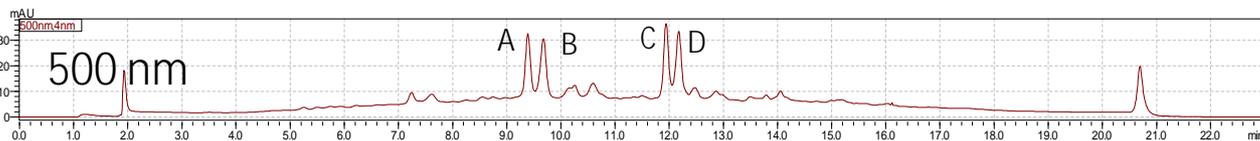


Fig. 6 ベニコウジ色素の HPLC クロマトグラム

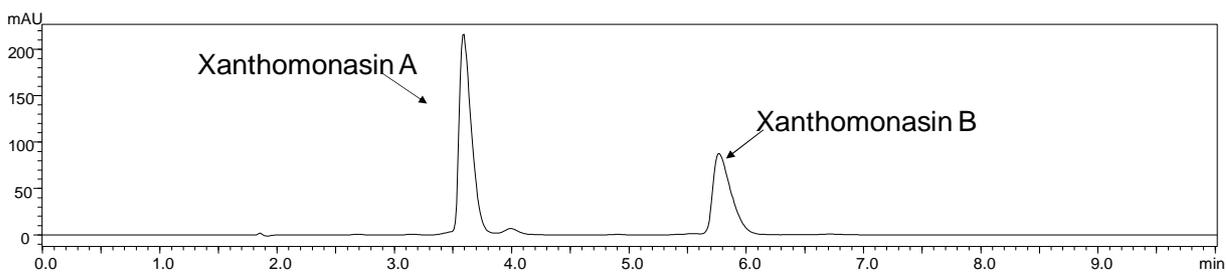


Fig. 7 ベニコウジ黄色素の HPLC クロマトグラム

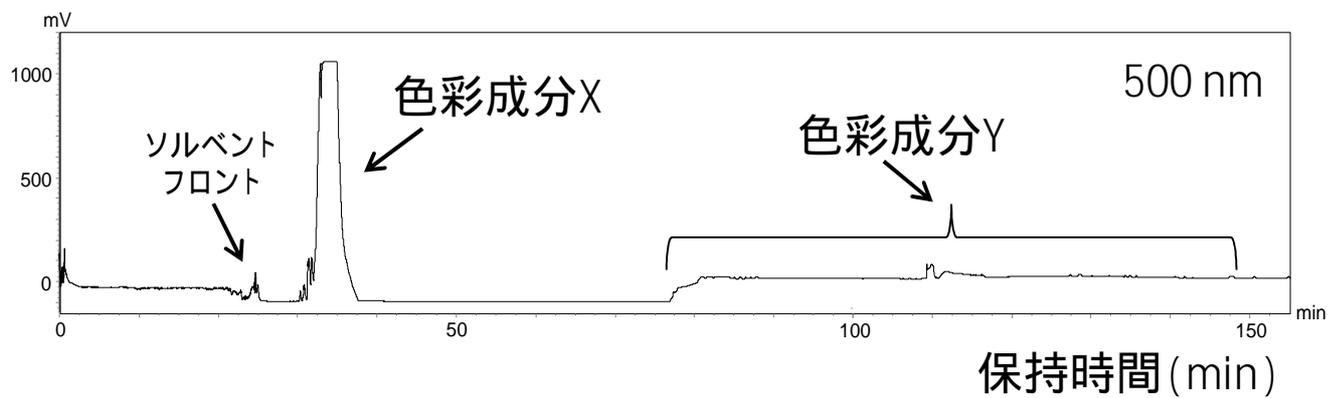


Fig. 8 ベニコウジ色素 (試料 119) の HSCCC クロマトグラム

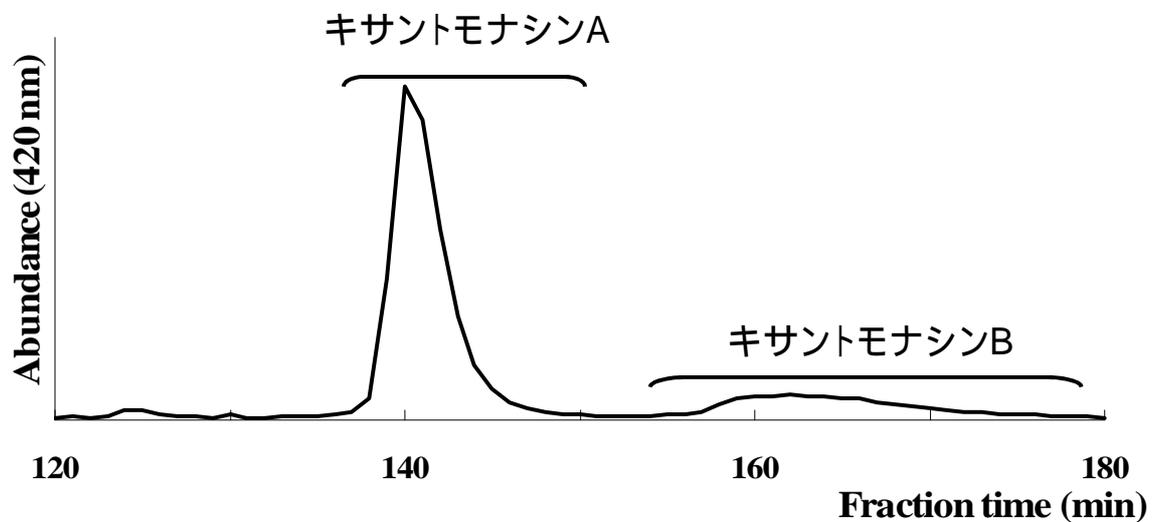


Fig. 9 ベニコウジ黄色素の HSCCC クロマトグラム

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）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26～28年度分担総合研究報告書

研究分担課題：NMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

研究分担者 永津明人 金城学院大学薬学部

要旨 規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、 ^1H -qNMR法(定量 ^1H -NMR法)が試験法として適用可能であるか明らかにする目的で研究を行った。すなわち、適用の可能性の有無の判断と、可能性があるものに関しては実際に適用する場合の測定条件の確立を目的とした。26～28年度の間で「ヤマモモ抽出物」「グルコサミン」「クローブ抽出物」「ベニバナ赤色素」「ベニバナ黄色素」に関する適用条件を探索した。「ヤマモモ抽出物」中のmyricitrinの純度は、認証標準物質としてPHP、仲介物質としてHMDを用い、methanol- d_4 中で測定したスペクトルの6位または8位の水素シグナル面積から測定可能であることを示した。「グルコサミン」中のglucosamineの純度は、DSS- d_6 を直接内部標準として用い、 D_2O 中で測定したスペクトルの2つのアノマーの2位の水素シグナル面積の和から測定可能であることを示した。「クローブ抽出物」中のeugenolの定量では、「クローブ抽出物」のacetone- d_6 懸濁液上清に認証標準物質である1,4-BTMSB- d_4 のDMSO- d_6 溶液を加えて測定し、1,4-BTMSB- d_4 のトリメチルシリル基のシグナルとeugenolの2位のHシグナルのシグナル面積を比較することで定量可能であることを確認した。「ベニバナ赤色素」「ベニバナ黄色素」では、定量用標準品が手に入らないことから、まずそれらの本体であるcarthaminおよびsafflor yellow類の個々の化合物の単離精製から行っている。

A. 研究目的

qHNMR法は、SIトレーサブルな認証標準物質を内部標準としてNMRスペクトルの測定することで、測定対象サンプルの絶対定量ができる方法である。対象化合物の標準品がなくても絶対定量が可能であることから、標準品が手に入りにくい天然物の定量に好適な測定法である。すなわち、対象物質の ^1H -NMRスペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となりうる。

本研究では、既存添加物のうち、規格基準が決められていない「ヤマモモ抽出物」「グルコサミン」「クローブ抽出物」を選択し、それぞれの主成分であるmyricitrin (Fig. 1)、glucosamine (Fig.

2)、eugenol (Fig. 3)の定量にqHNMR法を応用し、その定量法の確立を試みた。さらに「ベニバナ赤色素」「ベニバナ黄色素」についてもそれぞれの色素本体の化合物であるcarthamin (Fig. 4)とsafflor yellow類 (Fig. 5)を直接 ^1H -qNMR法で、あるいは標準品溶液を ^1H -qNMR法で定量したのちHPLC法で既存添加物の定量を行う方法で管理法が確立できるかの検討を行う目的で、その準備に当たる標準品となりうる化合物の単離を行った。

B. 研究方法

1) 「ヤマモモ抽出物」中のmyricitrin含有量の定量

「ヤマモモ抽出物」は、ヤマモモ (*Myrica rubra* Siebold *et* Zuccarini)の果実、樹皮または葉から抽

出して得られたもので、主成分は myricitrin であるとされている。主に酸化防止剤として用いられる既存添加物である。

今回用いた「ヤマモモ抽出物」は myricitrin 含量が高くほとんどメタノールに溶けるため、そのまま methanol- d_4 の qHNMR 用標準液を加えて溶解させたもので myricitrin の定量を行なうことにした。

1-1) qHNMR 用標準液の調製と hexamethyldisilane (HMD)濃度の決定

定量の基点となる認証標準物質はいくつか市販されているが、その $^1\text{H-NMR}$ におけるシグナルは測定対象の化合物のシグナルなどと重なり合うことが多い。そのため、報告のある方法でも 0 ppm 付近にシグナルを持つ hexamethyldisilane (HMD, Fig. 6)を仲介物質として測定している。今回もこの HMD を仲介物質として測定することにした。HMD 5.00 mg を methanol- d_4 に溶解して 20.0 ml としたものを qHNMR 用標準液(0.200 mg/ml)とした。この溶液 0.50 ml を認証標準物質 potassium hydrogen phthalate (PHP, Fig. 6) 12.00 mg を含む methanol- d_4 溶液 2.00 ml に加え、この混合溶液 0.60 ml を NMR 試料管にとり、qHNMR 用試料とした。7.57 ppm 及び 7.72 ppm 付近の PHP のシグナル面積と 0 ppm の HMD のシグナル面積を比較することにより(Fig. 7A),式 1 に従って qHNMR 用標準液中の HMD の濃度を決定した。NMR の測定条件については後述する。

$$C_{\text{HMD}} = 4 \times \frac{I_{\text{HMD}}}{I_{\text{PHP}}} \times C_{\text{PHP}} \quad (1)$$

ただし、 C_{HMD} , C_{PHP} はそれぞれ HMD 及び PHP のモル濃度(mol/ml), I_{HMD} , I_{ALK} はそれぞれ HMD の 6 個のメチル基及び PHP の芳香族水素 1 個あたりのシグナル面積。

1-2) qHNMR 法に用いる試料の調製

市販の「ヤマモモ抽出物」は減圧されたデシケーター中で over night 乾燥させた。

その後、約 5 mg を精秤して 1.00 ml の qHNMR 用標準液に溶かし、この溶液 0.60 ml を NMR 試料管にとったものを用いて qHNMR の測定に供した。

1-3) qHNMR スペクトルの測定

$^1\text{H-NMR}$ を測定し、myricitrin の水素シグナルが δ 0.95~6.94 ppm に現れることを確認した。Fig. 7B にそれぞれのスペクトルを示した。qHNMR は Table 1 に示した条件で測定した。前述の qHNMR 用標準液の HMD 濃度の算出のための測定も同じ条件で行なった。積算回数は、HMD 濃度の算出のための測定、および「ヤマモモ抽出物」の試料の測定では 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、myricitrin の水素シグナルと δ 0.04 ppm の HMD のシグナルの面積を比較して、式 2 に従って myricitrin の濃度を算出した。

$$C_{\text{MYR}} = \frac{I_{\text{MYR}}}{I_{\text{HMD}}} \times C_{\text{HMD}} \quad (2)$$

ただし、 C_{HMD} , C_{MYR} はそれぞれ HMD 及び myricitrin のモル濃度(mol/ml), I_{HMD} , I_{MYR} はそれぞれ HMD の 6 個のメチル基及び myricitrin の水素 1 個あたりのシグナル面積。

各試料とも 3 検体ずつ調製して測定を行った。

2) 「グルコサミン」中の glucosamine 含有量の定量

既存添加物の「グルコサミン」は、「キチン」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 glucosamine で増粘安定剤、製造用剤として用いられる。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定したところ、「グルコサミン」中の成分はほぼ glucosamine であると推定された。その glucosamine 定量にあたり、まず $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて glucosamine の各位置の水素シグナルが 2 ヶ所に別れて現れるということが判明した。これは、glucosamine の、それぞれのアノマーがある割合で平衡となって存在するからと考えられた。(Fig. 2) また、それぞれのアノマーの存在比はちょっとした

条件の相違で変化する可能性も考えられた。そこで、両アノマー分子中の同じ位置の水素シグナルの積分値の和から算出することにした。候補として1位または2位の水素シグナルが挙げられる。これらシグナルが独立して観測される溶媒の検討を行った。Methanol- d_4 , pyridine- d_5 , DMSO- d_6 , DMSO- d_6 とD₂Oの混合溶媒、D₂Oをそれぞれ溶媒として「グルコサミン」の¹H-NMRスペクトルを比較したところ、D₂O中で1位、2位の水素シグナルが他のシグナルと良好に分離することがわかり、好適であることがわかった。(Fig. 8) また、認証標準物質としては、水溶性でシグナルの化学シフト値が0 ppm付近にある3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid- d_6 sodium salt (DSS- d_6 , Fig. 6)を用いた。「グルコサミン」のD₂O溶液とDSS- d_6 のD₂O溶液を混合して定量することにした。

1-1) ¹H-qNMR法に用いる試料の調製

市販の「グルコサミン」とDSS- d_6 は減圧されたデシケーター中でover nightで乾燥させた。

「グルコサミン」約15 mgを精秤して1.50 mlのD₂Oに溶かした溶液と、DSS- d_6 約8 mgを精秤して1.50 mlのD₂Oに溶かした溶液を調製した。この2つの溶液を0.40 mLずつ取って混合し、この溶液0.60 mlをNMR試料管にとったものを用いて¹H-qNMRスペクトルの測定に供した。

測定に利用したDSS- d_6 は和光純薬のTrace Sure®規格のもの、D₂OはIsotec Inc.の99.9 atom %Dのもの、NMR測定管は和光純薬HGタイプ(φ5 mm)を用いた。秤量には精密電子天秤AUW120D(島津製作所)を用いた。

2-2) ¹H-qNMRスペクトルの測定

¹H-qNMRはTable 1に示した条件で測定した。積算回数は8回とした。測定によって得られたスペクトル(Fig. 8)から、glucosamineの2位Hのシグナル(δ2.89 ppm [Fig. 8のBのシグナル]とδ3.18 ppm [Fig. 8のCのシグナル])とDSS- d_6 のシグナルの面積を比較して、式3に従ってglucosamineの濃度を算出した。

$$C_{\text{GLA}} = \frac{I_{\text{GLA}}}{I_{\text{DSS}}} \times C_{\text{DSS}} \quad (3)$$

ただし、 C_{DSS} , C_{GLA} はそれぞれDSS- d_6 及びglucosamineのモル濃度(mol/ml)、 I_{DSS} , I_{GLA} はそれぞれDSS- d_6 及びglucosamineの水素1個あたりのシグナル面積。

各試料とも3検体ずつ調製して測定を行った。

3) 「クローブ抽出物」中のeugenol定量

既存添加物の「クローブ抽出物」は、「フトモモ科チョウジ(*Syzygium aromaticum* MERRILL et PERRY)のつぼみ、葉又は花より、エタノール又はアセトンで抽出して得られたもの、又は水蒸気蒸留により得られたものである。主成分はオイゲノール等である。」とされるもので、酸化防止剤として用いられる。今回用いた「クローブ抽出物」は水蒸気蒸留をした際の水とオレオレジンなどの炭化水素の乳濁液に精油としてeugenolを含んでいるという状態のものであった。

まず、市販のeugenol標準品の¹H-NMRスペクトルを種々の溶媒で測定し、個々のシグナルが他のシグナルと良い分離を示す条件を検討した。溶解度なども加味し、acetone- d_6 中での測定が適当と考えられた。(Fig. 9) 一方、内部標準として用いる認証標準物質としては汎用性を考え、0 ppm付近にシグナルが現れ、acetoneなど脂溶性の溶媒に可溶な1,4-(bistrimethylsilyl)benzene- d_4 (1,4-BTMSB- d_4 , Fig. 6)を用いることにした。ところでこの1,4-BTMSB- d_4 の溶液だが、これを内部標準用溶液として調製する場合、測定に供する溶媒で調製することが望ましい。しかしながら、今回の測定用の溶媒は揮発性の高いacetone溶液で、注意深く保存したとしても保存中の濃度変化のリスクがつきまとう。そこで、これを難揮発性溶媒であるDMSO- d_6 溶液として調製し用いることにした。

3-1) ¹H-qNMR法に用いる試料の調製

1,4-BTMSB- d_4 はデシケーター中でover night乾燥させた。約5 mgを精秤して2.00 mlのDMSO- d_6 に溶かし内部標準用溶液とした。

まず, eugenol の水素のシグナル面積と量とが比例関係にあるか検量線を作製した。すなわち, 市販 eugenol 標準品 20 mg/mL の acetone- d_6 溶液を調製したのち, これを段階希釈して 0.50, 1.25, 5.00 mg/mL の各 acetone- d_6 溶液を調製した。Eugenol は揮発性成分でもあるので, 減圧下での乾燥などは行わず, この eugenol 標準品の製品を開封してそのまま用いた。これらの溶液 0.50 mL と, 先に調製した 1,4-BTMSB- d_4 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり, 混和して ^1H -qNMR の測定に供した。各試料とも 3 検体ずつ調製して測定を行った。

「クローブ抽出物」はもともと水を含むものであることから, 乾燥などの特段の操作は行わず, そのままを試験に供した。約 10 mg を精秤して acetone- d_6 (1.00 mL) を加え, 10 分間超音波下においたのち 3 分間遠沈し, わずかに存在する固形物を除去した。この上清 0.50 mL と, 先に調製した 1,4-BTMSB- d_4 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり, 混和して ^1H -qNMR の測定に供した。各試料とも 5 検体ずつ調製して測定を行った。

測定に利用した 1,4-BTMSB- d_4 は和光純薬の Trace Sure®規格のもの, acetone- d_6 と DMSO- d_6 はいずれも Isotec Inc. の 99.9 atom %D を用いた。NMR 測定管は和光純薬 HG タイプ ($\phi 5$ mm) を用いた。秤量には精密電子天秤 AUW120D (島津製作所) を用いた。

3-2) ^1H -qNMR スペクトルの測定

^1H -NMR を測定し, eugenol の 6 位 H のシグナルが $\delta 6.33$ ppm に現れることを確認した。(Fig. 9 の A のシグナル) また, 「クローブ抽出物」においても eugenol の 6 位 H のシグナルが独立して観測されることを確認した。(Fig. 10) 測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから, eugenol の 6 位 H のシグナルと 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB- d_4 のシグナルの面積を比較して, 式 4 に従って eugenol の濃度を算出した。

$$C_{\text{EU}} = \frac{I_{\text{EU}}}{I_{\text{B}}} \times C_{\text{B}} \quad (4)$$

ただし, C_{B} , C_{EU} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4

及び eugenol のモル濃度 (mol/ml), I_{B} , I_{EU} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び eugenol の水素 1 個あたりのシグナル面積。

3-3) HPLC を用いた「クローブ抽出物」中の eugenol の定量

^1H -qNMR 法で可能で, 既存測定条件である HPLC 法と矛盾なく測定できることを確認する目的で HPLC を用いた「クローブ抽出物」中の eugenol の定量も行った。HPLC はポンプとして JASCO PU-2089 を用い, YMC-Pack ODS-AL s-5 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムをカラムオープン Shimadzu CTO-20AC 中で 37°C とし, $\text{H}_2\text{O} : \text{MeCN} : \text{MeOH} = 50 : 40 : 10$ の溶媒を流速 1.0 mL/min で溶出, JASCO MD-2010 を用いて 280 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。

^1H -qNMR 法で定量した eugenol 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。「クローブ抽出物」は, HPLC の展開溶媒で希釈し, その試料溶液を 10 μL 注入して定量を行った。

4) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

既存添加物の「ベニバナ赤色素」は「ベニバナの花から得られた, カルタミンを主成分とするものをいう。」と定義され, その本質は「ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linne) の花から得られた, カルタミンを主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」とされるもので, 赤色の着色料として用いられる。市販の carthamin が主成分として市販されている試薬の NMR スペクトルを測定した場合, 糖類に由来する巨大なシグナルが観測され, carthamin に由来する sp^2 領域のシグナルは極めて小さく, 既存添加物同様で大部分がデキストリンなどの添加物と考えられた。(Fig. 11) 純度の高い carthamin は市販されていないため, まず, ある程度の純度とした標準品用の carthamin を単離して得るということから行い, 得られた上で HPLC と ^1H -NMR による確認を行うことにした。

4-1) Carthamin の単離

水上らの方法 (Chem, Pharm. Bull.,

61(12),1264-1268(2013))に従い,市販既存添加物からの carthamin の単離を行った。すなわち,「ベニバナ赤色素」を MeOH 中で攪拌,濾過後,濾液の溶媒を留去,得られた残渣を ODS を担体としたオープンカラム (MeOH-水 = 60:40) で分離をし,TLC 上で 1 spot の状態の carthamin を単離した。

4-2) Carthamin の HPLC 分析法の確立

市販添加物中の carthamin 含有量が極めて少ないことが推定されることから,carthamin の絶対定量では標準品溶液の値付け→標準品溶液を使った HPLC 分析という手順を念頭に,carthamin の HPLC 分析の条件の確立をおこなった。

HPLC はポンプとして JASCO PU-2089 を用い,YMC-Pack ODS-AL s-5 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムをカラムオープン Shimadzu CTO-20AC 中で 37 とし,0.5%酢酸-MeOH 溶液:0.5%酢酸水溶液 1.0 ml/min のグラジエント (0 min: 50:50→20 min 80:20)で溶出,JASCO MD-2010 を用いて 520 nm における吸光度で化合物の検出を行うという分析条件を作った。

5)「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

既存添加物の「ベニバナ黄色素」は「ベニバナの花から得られた,サフライエロー類を主成分とするものをいう。」と定義され,その本質は「ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linne) の花から得られた,サフライエロー類を主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」とされるもので,黄色の着色料として用いられる。「ベニバナ黄色素」も「ベニバナ赤色素」と同様で,実際に購入できた製品は,NMR スペクトルは糖類に由来する巨大なシグナルが観測され,safflor yellow に由来する sp^2 領域のシグナルは極めて小さい。(Fig. 12) 純度の高い safflor yellow 類も販売されていない。極めて簡便に純度の高い safflor yellow を得ることができる方法(Indian Patent, IN 183773 A1 20000408, (2000))が文献上にあったことから,ある程度の純度の標準品用の safflor yellow 類を得るべく,生薬コウカからの分離精製を行

うことにした。

5-1) Safflor yellow 類の分離精製

生薬コウカ (35 g) を MeOH で 2 回抽出したのち乾燥させた。その乾燥物を水 300 mL で 2 回抽出,得られた水溶液を凍結乾燥し,凍結乾燥物を MeOH に懸濁,不溶物を濾取した。文献上ではこれが高純度の safflor yellow と記されていたが,TLC 上ではスミアーな状態に近い多くのスポットが確認された。さらに,ODS カラムクロマトグラフィーなどを用いて精製を進めている。

C. 研究結果

1)「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の定量

今回,2 ロットの試料についての測定を行った。測定の結果を Table 2 に示した。Fig. 7B のスペクトルでの a~h のシグナルそれぞれについて定量値を示した。積分値をとったシグナルごとで多少のばらつきが見られ,また,2 試料で共通して大きめの値が算出されるシグナルと小さめの値が算出されるシグナルがあるという特徴も示唆された。YM 4 は 85% 程度,YM 7 は 87% 程度の純度であることがわかった。

2)「グルコサミン」中の glucosamine の定量

内部標準の認証標準物質 DSS- d_6 のシグナルは他のシグナルが全くない 0 ppm 付近に現れ,定量に用いた 2 つの配座異性体の 2 位 H のシグナル面積の合計で問題なく測定ができることを確認した。(Fig. 8) これらを用いて入手した 5 種類の市場品の「グルコサミン」中の glucosamine の定量をおこない,その結果を Table 3 に示した。表示に「グルコサミン」と書かれたものに関しては,glucosamine の分子量 ($C_6H_{13}NO_5$, MW: 179)で,塩酸塩とか書かれていたものは塩酸塩としての分子量 ($C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$, MW: 215.5)と合せて含有率を算出した。いずれの試料も glucosamine としての含有率は 80% 程度であった。塩酸塩に関しては,塩の分子量で計算すると 95% 以上という数字となった。(Table 3)

3) 「クローブ抽出物」中の eugenol の定量

まず、「クローブ抽出物」の acetone- d_6 中でのスペクトルにおいて eugenol の 6 位 H の位置 (δ 6.33 ppm) には他のシグナルは観測されなかった。また、内部標準を DMSO- d_6 溶液として加えて測定しても eugenol の 6 位 H シグナルは独立しており、「クローブ抽出物」のスペクトルにおいても他の夾雑物のシグナルとの重なりも観測できなかった。(Fig. 10) 検量線を作製した結果、少なくとも 0.5 ~ 20 mg/mL の間では極めて高い直線性が示された。

試料中の eugenol の含有量の測定では、まず、eugenol 標準品の純度を測定したところ 92% 程度であった。「クローブ抽出物」に関しては、いずれも eugenol の含有率が 30% 程度だった。(Table 4)

次に、HPLC での定量では、今回の条件で eugenol が 280 nm において良好なピークとして検出できることを確認した。(Fig. 13) ^1H -qNMR 法を用いて求められた純度をもとに eugenol 標準品の溶液を順次希釈し HPLC のピーク面積を求めて検量線を作成した。その検量線も極めて良い直線性を示した。(Fig. 14)

両法の比較に用いた「クローブ抽出物」の eugenol の含有率は 26.56%, 28.81% だったが、この検量線から算出した HPLC 法での「クローブ抽出物」中の eugenol の定量値はそれぞれ 24.94%, 26.20% だった。(Table 5)

4) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

Carthamin の単離では、研究方法の操作で「ベニバナ赤色素」に相当する製品から TLC 上で 1 spot の状態の carthamin を単離することができた。その NMR スペクトル (Fig. 15) を水上らの文献と比較して carthamin であることを確認した。

また、HPLC の条件検討では、酢酸を添加した MeOH-水のグラジエントの条件で、carthamin が良好なピークを与えることを確認した。(Fig. 16)

5) 「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

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

D. 考察

1) 「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の定量

「ヤマモモ抽出物」においては、観測されたシグナルを精査すると、ベースライン上にも雑音が少なく、比較的シャープなシグナルとして観測される myricitrin の 6 位、8 位のシグナル (Fig. 7 の b, c のシグナル) の積分値を定量時の算出に用いるのが好適ではないかと考えられる。今後、今回の各シグナル間での定量値の違いが、常にこの傾向であるのか否か、それぞれのシグナルの積分値のばらつきを、同じ試料の繰り返し測定で見極めるとともに、多種の試料の測定でも確認する必要があると思われる。

2) 「グルコサミン」中の glucosamine の定量

「グルコサミン」においては、得られたスペクトルを精査すると、1 位の水素のシグナルのうち β アノマーの 1 位と帰属される水素 (δ 4.82 ppm) が D_2O の残留水素のシグナルの裾に若干重なっている可能性が観察された。このため、2 位の水素シグナル (δ 2.89 ppm と δ 3.18 ppm, Fig. 8 の B, C) の面積の和を純度算出に用いた方がよいと考えられる。「グルコサミン」中の glucosamine としての含有率は 80% 程度であったが、塩酸塩とするとその純度は 95% 以上と非常に高いものになる。塩酸塩の表記がなかった製品に関しても、塩酸塩として計算すれば 95~99% という純度になることから、これらも全て塩酸塩として流通しているものと推定される。

この条件での glucosamine での定量は極めて簡便である。Glucosamine は紫外吸収を持たない分子であるために HPLC で UV 検出器での検出がしにくく、HPLC を用いた分析をするには誘導体化が、検出の安定化に手間のかかる示差屈折計を用いる必要がある。この「グルコサミン」の glucosamine 純度の測定に関しては ^1H -qNMR 法が極めて有利な方法と考えられる。ところで、水

という表面張力の強い溶媒を用いるため、細い NMR 試料管に測定溶液を注入するときするには、多少のコツが必要である。

3) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量

「クローブ抽出物」には eugenol 以外にもフェニルプロパンの精油成分が存在するので、芳香族領域は多くのシグナルの存在が懸念されたが、このシグナルが定量に好都合であることがわかった。(Fig. 10) 検量線も極めてよい直線性を示し、特に検量線を引くことなく定量ができることも確認ができた。

今回、操作の簡便のために予め認証標準物質の濃度既知の溶液を作っておき、測定の際に測定溶液に標準物質の溶液を一定量加えるという方法を考えた。ストックの際に溶媒が揮発して濃度が変化しないよう、難揮発性の DMSO に溶解した 1,4-BTMSB- d_4 はカタログ上で DMSO に難溶と表記されているが、今回用いた 2.5 mg/mL という濃度であれば十分に溶解することがわかった。また、 $^1\text{H-qNMR}$ の測定時は acetone - DMSO = 5 : 1 という混合溶媒で実施することになる。これも測定の結果、この混合溶媒でも eugenol の 6 位 H が独立したシグナルで観測され、問題なくシグナル面積の測定ができた。よって、1,4-BTMSB- d_4 を DMSO- d_6 溶液として用いることで操作の簡便化も実現できた。また、eugenol は揮発性の精油で標準品の純度が変化しやすいことから、そのような化合物でも $^1\text{H-qNMR}$ を用いれば絶対定量が可能になることを示すことができた。

HPLC においては、 $^1\text{H-qNMR}$ で値付けをした eugenol 標準品溶液を用いた定量が可能であることも確認できた。また、「クローブ抽出物」中の eugenol の定量値が $^1\text{H-qNMR}$ における定量値と HPLC の定量値との比較では、HPLC での値がやや低かったが、ほぼ一致していることから (Table 5)、 $^1\text{H-qNMR}$ が既存の定量法に置き換えることのできる簡便な手段であることを確認できた。また、 $^1\text{H-qNMR}$ によって標準溶液の純度の値付けを行い、その標準溶液を用いて HPLC 法による定量をすることで、間接的な絶対定量

が可能なことも確認できた。

4) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

まだ定量方法の確立には至っていないが、標準試料の単離方法を確立できた。標準試料として正確に秤量できるだけの物質の確保を行っている。

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

5) 「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

操作が簡便すぎることから、花卉に含まれる糖類などがまだ多く残っていることが考えられる。現在精製途上で単離には至っていない。Safflor yellow 類には Fig.3 に示したように幾つかの化合物があるので、どの化合物を定量の対象とすべきかについても、今後考える必要がある。

E. 結論

1) 「ヤマモモ抽出物」では、methanol- d_4 中、認証標準物質として PHP を用い、仲介物質として HMD を介することで、myricitrin の 6 位または 8 位の水素シグナル面積から含有される myricitrin の定量が可能であることを示した。

2) 「グルコサミン」では、 D_2O 中、認証標準物質の DSS- d_6 を直接内部標準として用い、glucosamine の 2 つの配座異性体の 2 位の水素シグナル ($\delta 2.89$ ppm と $\delta 3.18$ ppm) の面積の和から、含有される glucosamine の定量が可能であることを示した。

3) 「クローブ抽出物」中の eugenol の定量では、認証標準物質の DSS- d_6 を内部標準として用い、

この DMSO- d_6 溶液を測定試料の acetone- d_6 溶液とを混合して NMR を測定し, eugenol の 6 位 H のシグナル (δ 6.33 ppm) を利用することで測定試料中の eugenol が定量できることがわかった。また, 定量値は, HPLC 法と良い一致を示したことから ^1H -qNMR 法が, 既存の方法に変わりうる, 簡便で迅速な「クローブ抽出物」の品質管理法になりうることを示すことができた。

4) 「ベニバナ赤色素」では, その色素本体である carthamin の単離と HPLC 定量条件の設定ができたため, ^1H -qNMR では定量が困難な場合の代替手段として標準溶液の値付け→HPLC 法を用いた定量という組み合わせでの絶対定量法の確立の目処をつけた。

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

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka, Rie; Nitta, Akane; Nagatsu, Akito
Application of a quantitative ^1H -NMR method for the determination of amigdalinal in *Persica semen*, *Armeniaca semen* and *Mume fructus*
Journal of Natural Medicines (2014), **68**(1), 225-230.

2) Tanaka, Rie; Hasebe, Yuko; Nagatsu, Akito
Application of a quantitative ^1H -NMR method for the determination of gentiopicroside in *Gentianae radix* and *Gentianae scabrae radix*
Journal of Natural Medicines (2014), **68**(3), 630-635.

3) Tanaka, Rie; Shibata, Hikari; Sugimoto, Naoki; Akiyama, Hiroshi; Nagatsu, Akito
Application of a quantitative ^1H -NMR method for the determination of paeonol in *Moutan cortex*, *Hachimijiogan* and *Keishibukuryogan*

Journal of Natural Medicines (2016), **70**(4), 797-802.

4) Tanaka, Rie; Inagaki, Risa; Sugimoto, Naoki; Akiyama, Hiroshi; Nagatsu, Akito
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**(1), 315-320.

2. 学会発表

1) 藤原裕未, 大岩 硯, 長坂 泉紀, 永津 明人
「qHNMR 法を用いたカシュー中の anacardic acid の定量」日本生薬学会第 62 年会, 2P-13, 2015 年 9 月 (岐阜)

2) 藤原裕未, 田中理恵, 永津明人
「qHNMR 法による生薬シャゼンシ (車前子) 中のゲニポシド酸の定量」日本生薬学会第 61 年会, 2P-67, 2014 年 9 月 (福岡)

3) 永津明人
「定量 NMR を用いた生薬の分析」日本生薬学会第 63 年会, 1A-SY1-2, 2016 年 9 月 (富山)

4) 藤原裕未, 水野舞, 永津明人, 杉本直樹, 西崎雄三, 多田敦子, 穠山浩
「定量 NMR による生薬チョウジ中の eugenol の定量」日本生薬学会第 63 年会, 2P-09, 2016 年 9 月 (富山)

5) 永津明人, 加藤志保里, 山田紗由美, 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穠山浩
「定量 NMR を用いたグルコサミンの定量法の確立」日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, D-34, 2016 年 10 月 (岐阜)

6) 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穠山浩, 永津明人
「定量 NMR を利用した生薬成分の定量」第 45 回生薬分析シンポジウム, 2016 年 11 月 (大阪)

G. 知的財産権の出願，登録状況
現在のところなし

H. 健康危機情報
特になし

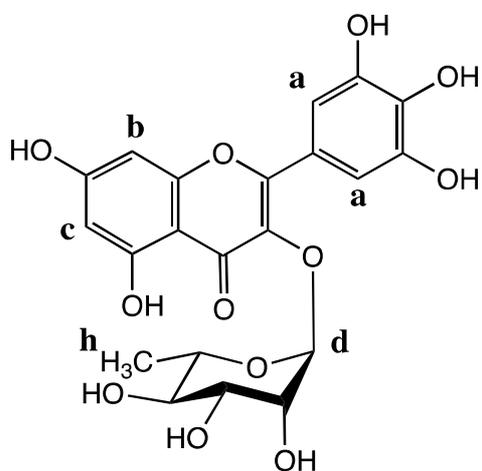


Fig. 1 myricitrin の構造

a,b,c,d,h は Fig. 4 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの対応するシグナルの水素

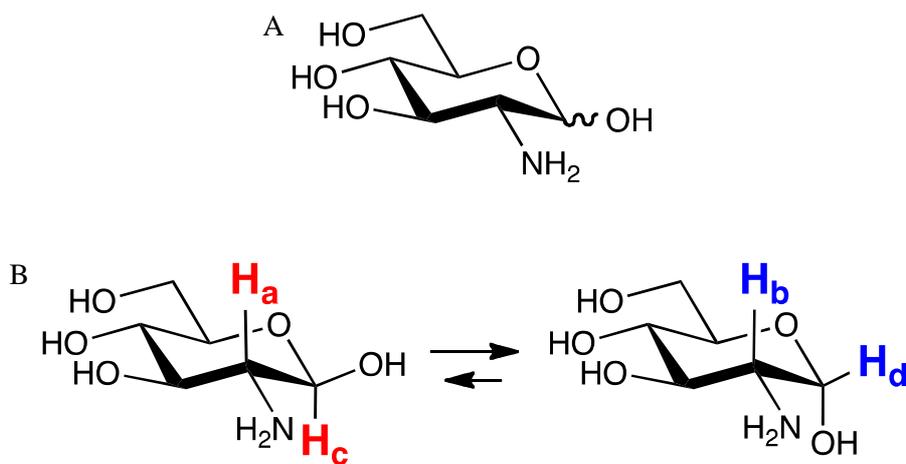


Fig. 2 glucosamine の構造

A: 一般式,

B: アノマーと アノマーの平衡.

Ha~Hd は Fig. 8 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの対応するシグナルの水素

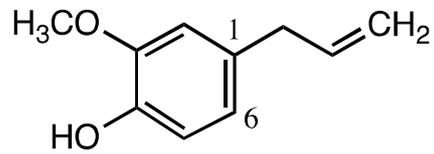


Fig. 3 Eugenolの構造

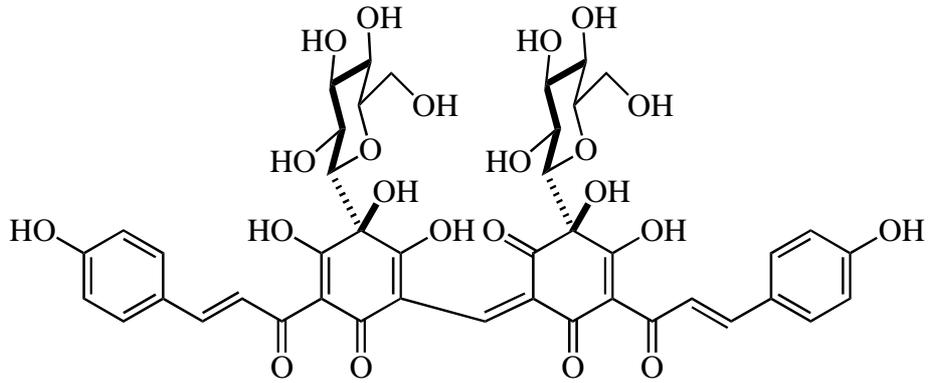


Fig. 4 Carthaminの構造

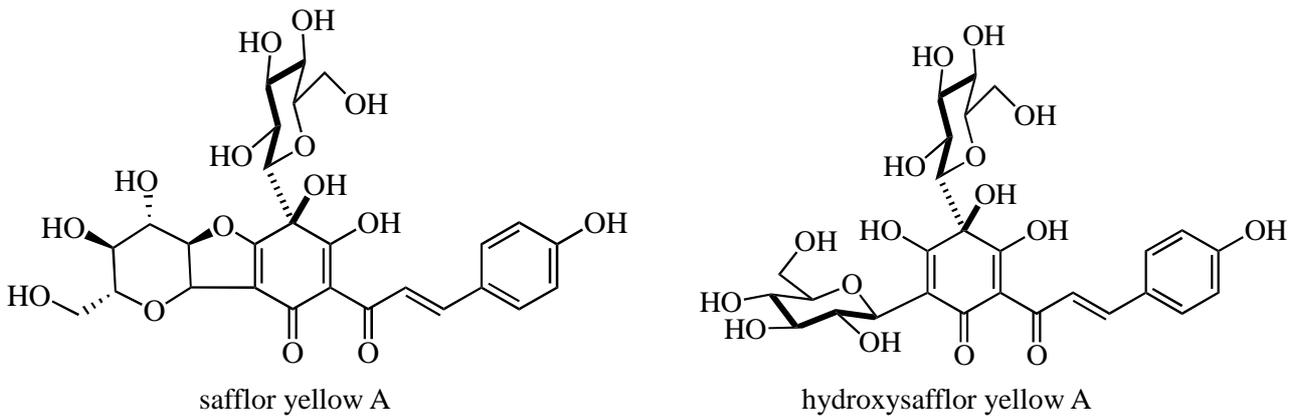
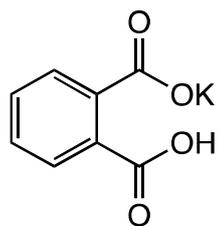
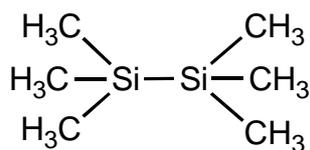


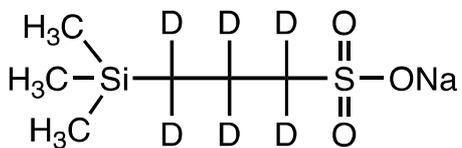
Fig. 5 Safflor yellow 類の構造



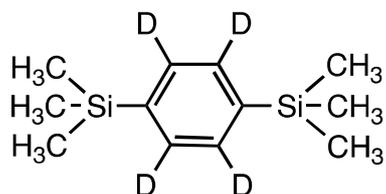
Potassium hydrogen phthalate (PHP)



Hexamethyldisilane (HMD)



3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid- d_6 sodium salt
(DSS- d_6)



1,4-(Bistrimethylsilyl)benzene- d_4
(1,4-BTMSB- d_4)

Fig. 6 各種基準物質の構造

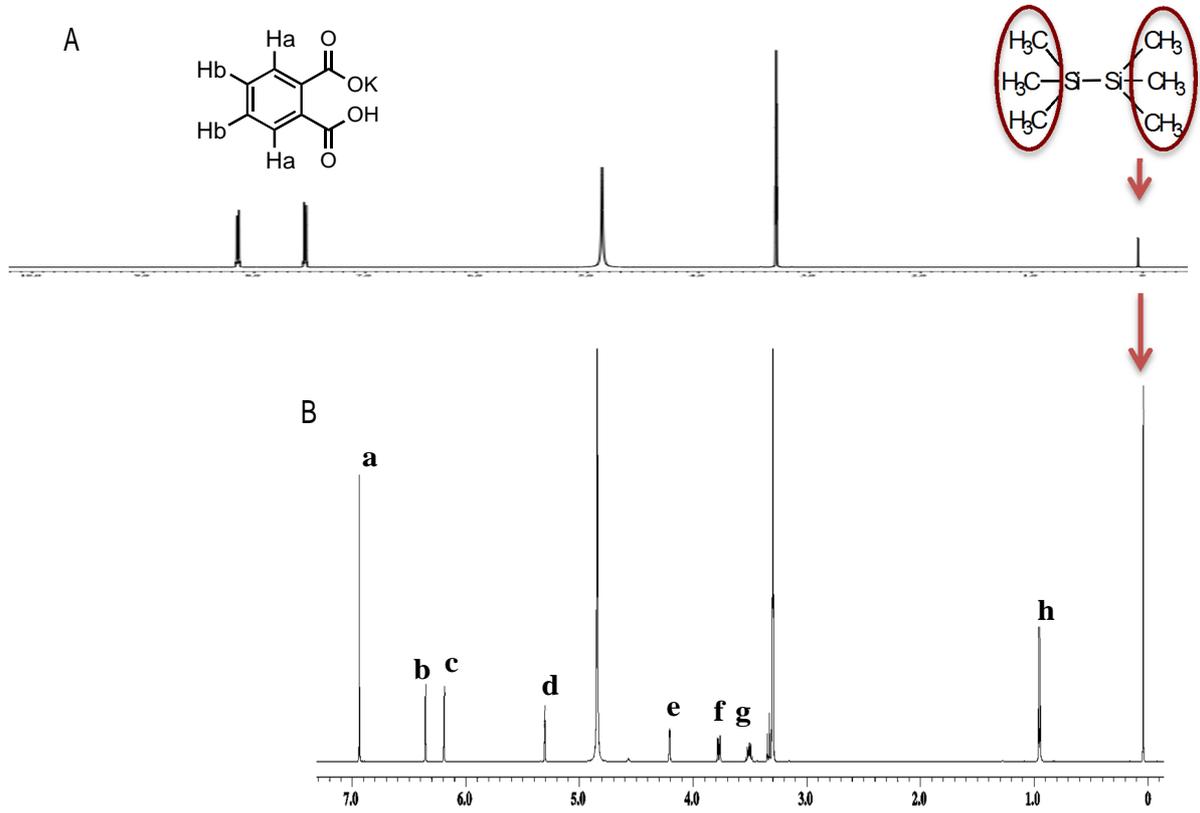


Fig. 7 「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin 定量時に測定された ¹H-NMR スペクトル
 A: qHNMR 用標準液に溶解した PHP のスペクトル.
 B: qHNMR 用標準液に溶解した「ヤマモモ抽出物」のスペクトル.
 a~h は myricitrin 由来のシグナル.

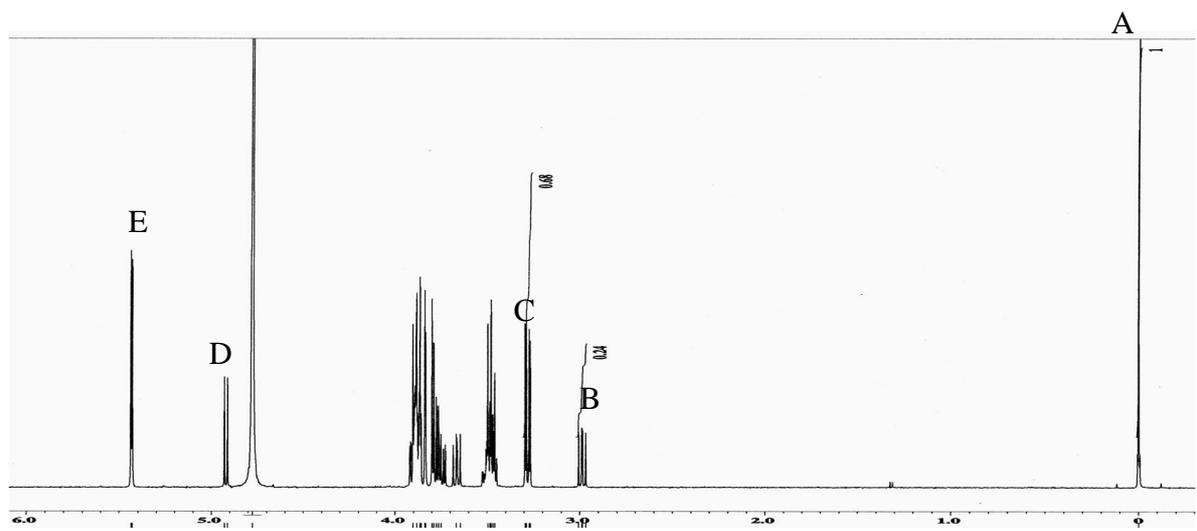


Fig. 8 Glucosamine の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (D_2O , 500 MHz)

A : $\text{DSS-}d_6$ のメチル基のシグナル, B : Fig. 2 の H_a のシグナル

C : Fig. 2 の H_b のシグナル, D : Fig. 2 の H_c のシグナル

E : Fig. 2 の H_d のシグナル

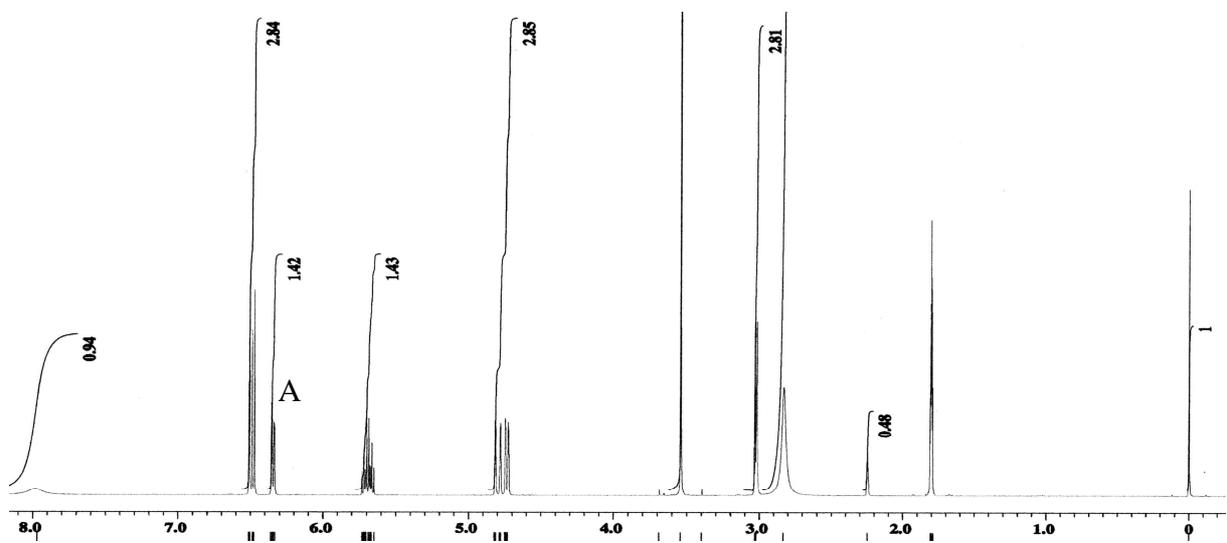


Fig. 9 Eugenol の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (acetone- d_6 , 500 MHz)

A: eugenol の 6 位 H のシグナル

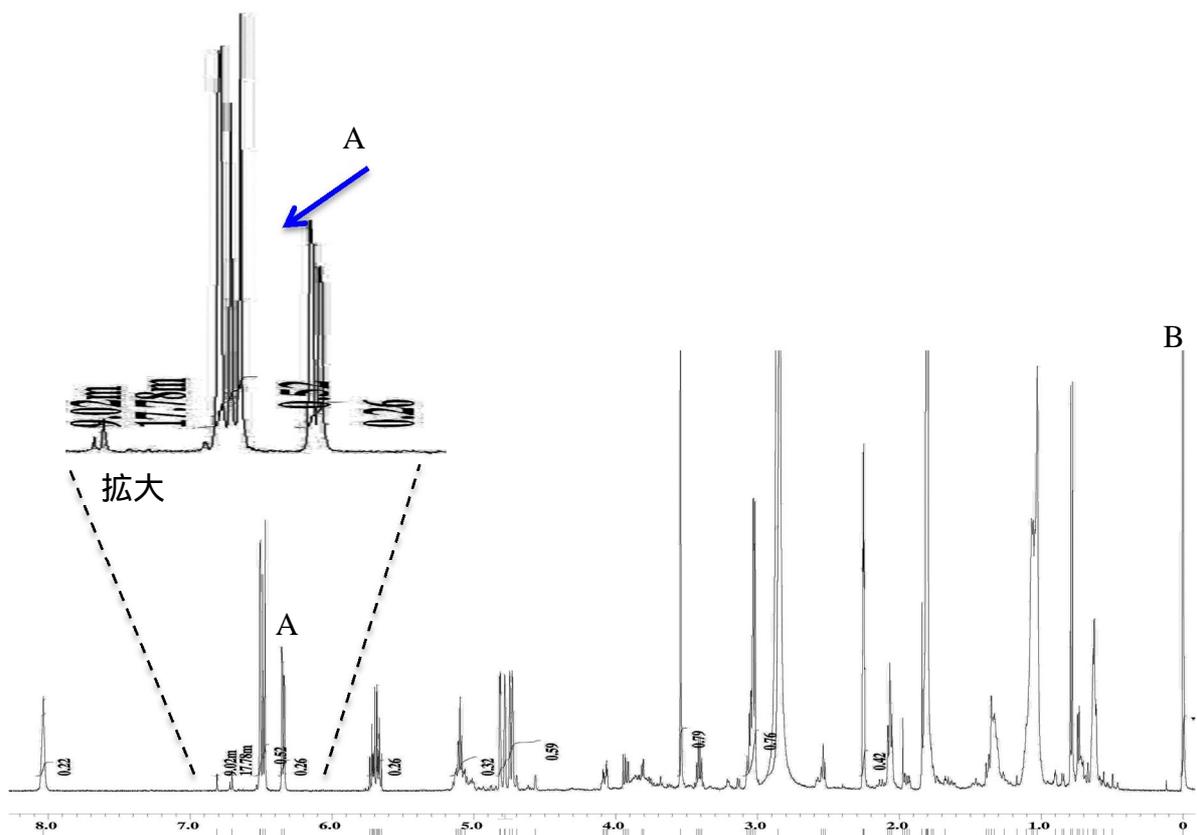


Fig. 10 「クローブ抽出物」の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (acetone- d_6 , 500 MHz)

A: eugenol の 6 位 H のシグナル B: 1,4-BTMSB- d_6 のメチル基のシグナル

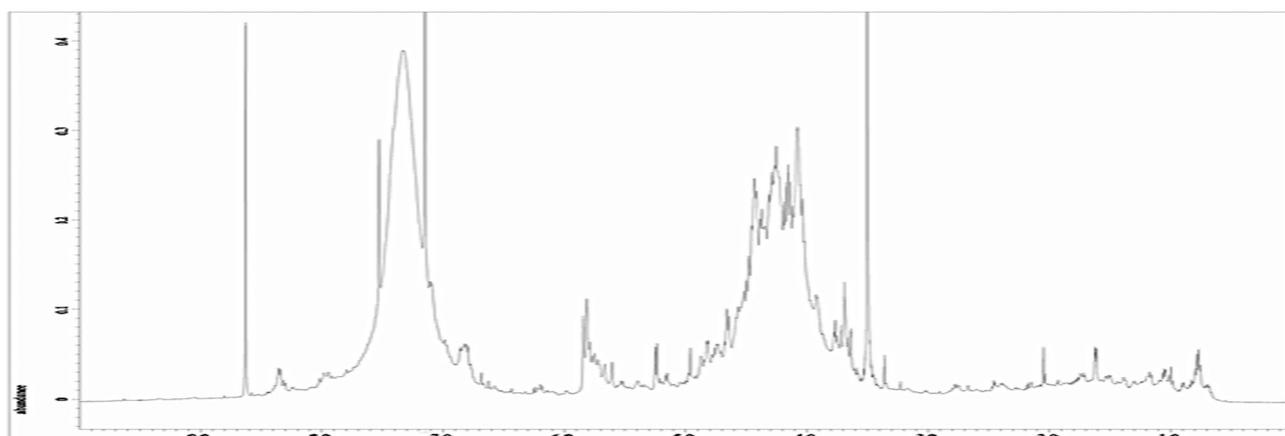


Fig. 11 主成分 carthamin として市販の色素の ^1H -NMR スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

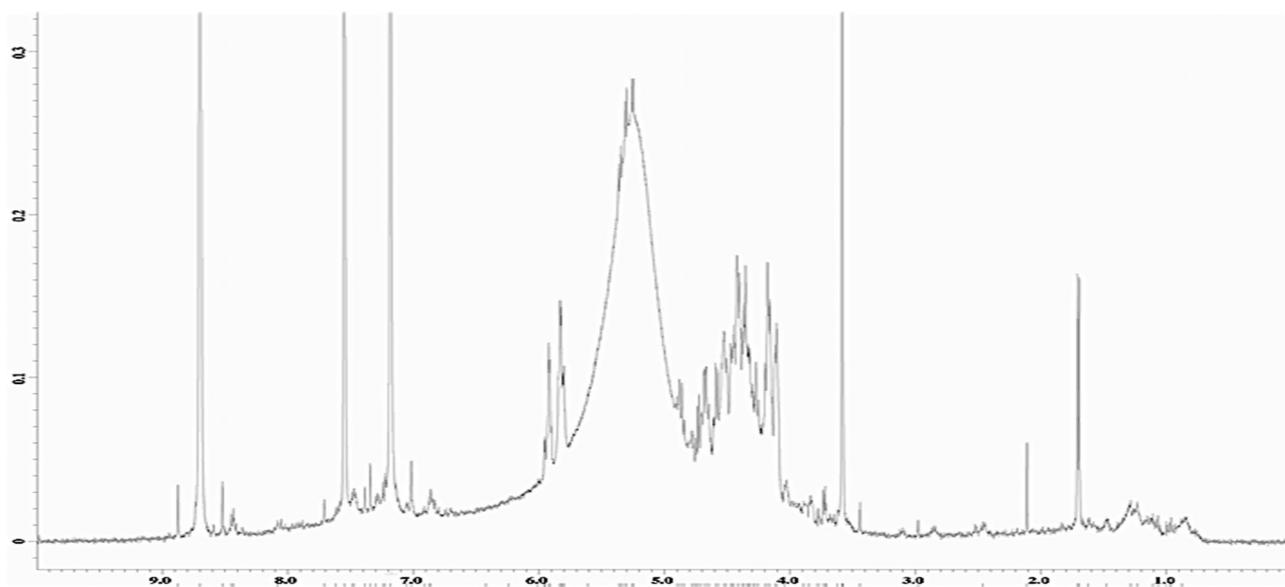


Fig. 12 「ベニバナ黄色素」の ^1H -NMR スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

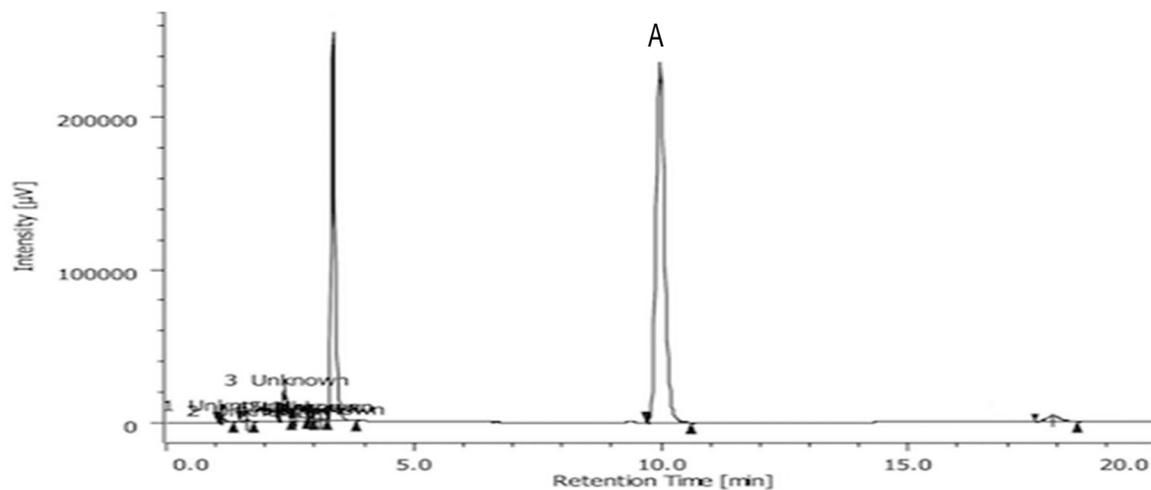


Fig. 13 Eugenol 標準品の HPLC クロマトグラム
A: eugenol のピーク

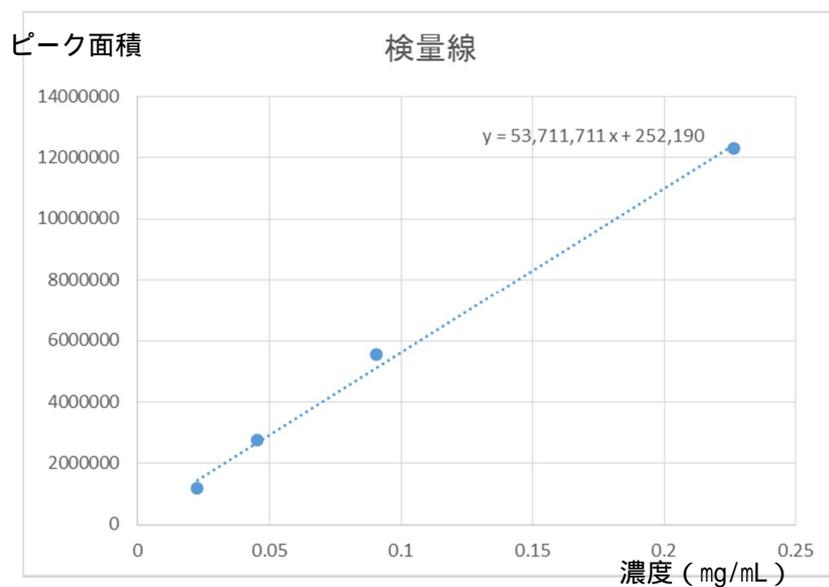


Fig. 14 Eugenol 標準品の HPLC におけるピーク面積から作成した検量線 ($r = 0.998$)

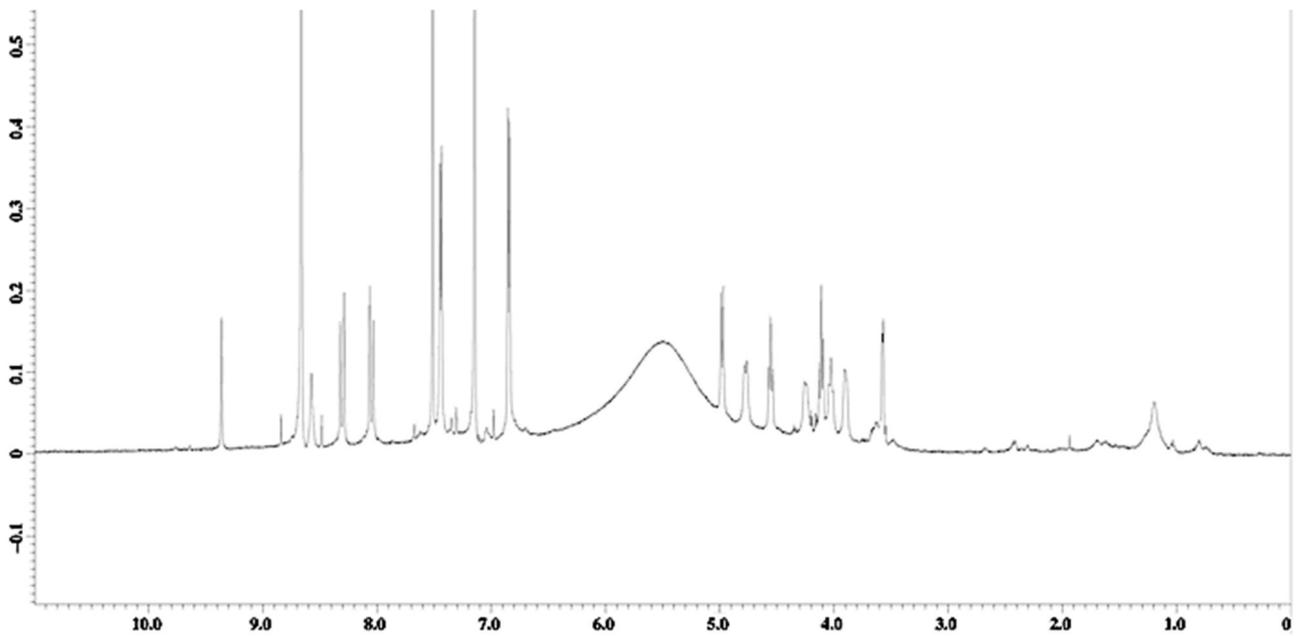


Fig. 15 単離した carthamin の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

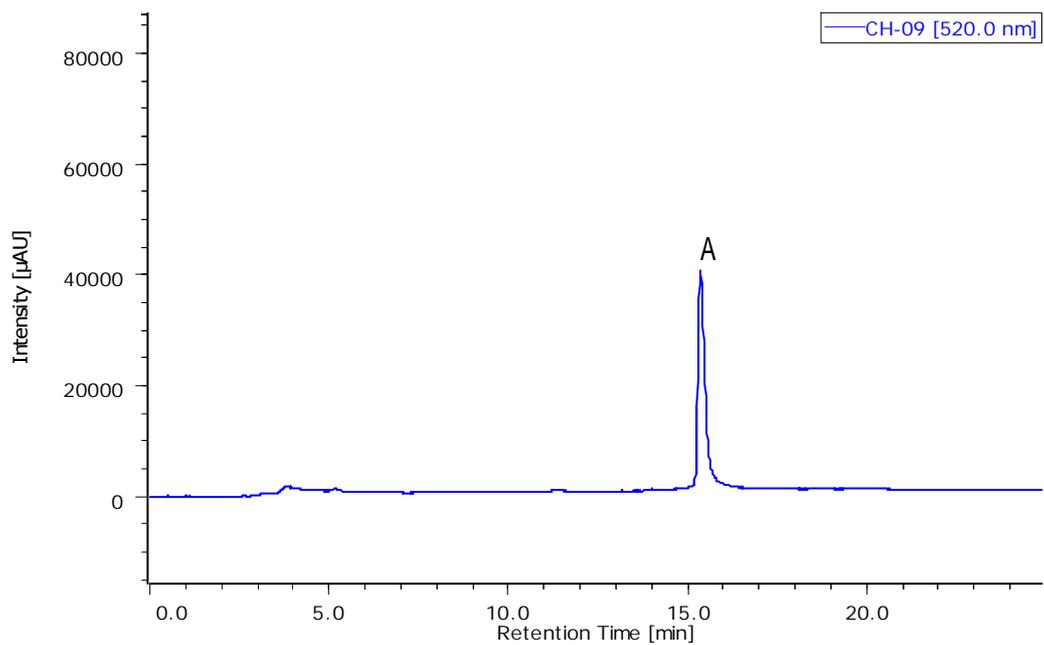


Fig.16 単離した carthamin の HPLC クロマトグラム

A: 検出波長 520 nm における carthamin のピーク

Table 1 qHNMR 法における装置と測定条件

| | |
|----------|--|
| 分光計 | 日本電子 ECA500 |
| 観測範囲 | -5 ~ 15 ppm |
| データポイント数 | 32000 |
| フリップアングル | 90° |
| パルス待ち時間 | 60 秒 |
| 積算回数 | 8 回 |
| スピン | なし |
| プローブ温度 | 25 |
| 溶媒 | methanol- <i>d</i> ₄ (myricitrin) D ₂ O (glucosamine) Acetone- <i>d</i> ₆ (eugenol) |

Table 2 qHNMR 法で各シグナルから算出される「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の純度 (平均 ± S.E., n = 3)

| シグナル (ppm) | 純度 (%) | |
|---------------|------------|------------|
| | YM7 | YM4 |
| a 6.94 | 86.61±0.57 | 82.09±5.18 |
| b 6.35 | 88.05±3.27 | 84.05±4.38 |
| c 6.19 | 86.83±2.45 | 85.96±2.90 |
| d 5.31 | 88.92±3.34 | 86.38±4.50 |
| e 4.21 | 88.97±1.49 | 85.99±4.10 |
| f 3.77 | 88.29±1.24 | 84.60±4.02 |
| g 3.50 | 83.09±3.39 | 81.05±3.65 |
| h 0.95 | 87.28±1.11 | 82.24±3.39 |

Table 3 ¹H-qNMR 法から定量された「グルコサミン」中の glucosamine の含有率

| 試料 | 含有率 (%) | | 平均 | |
|--------|--------------------------|-------|-------|-----------------------|
| | グルコサミン ^{a)} として | | | 塩酸塩 ^{b)} として |
| | 平均±SEM (n=3) | | | |
| A | 81.38 | ±2.21 | | |
| B | 82.26 | ±1.46 | | |
| C | 81.82 | ±1.28 | | |
| 塩酸塩 | 79.21 | ±1.71 | 95.36 | |
| 塩酸塩粉碎品 | 81.00 | ±1.47 | 97.52 | |

^{a)} C₆H₁₃NO₅ : MW 179 としての算出

^{b)} C₆H₁₃NO₅ · HCl : MW 215.5 としての算出

Table 4 ¹H-qNMR 法で定量された eugenol の含有率

| samples | 含有率(%) | | 表示 |
|-------------|------------------|--------|-------|
| | 平均 ± SEM (n=5) | | |
| eugenol 標準品 | | | |
| A | 92.47 | ± 1.31 | 99.8% |
| クローブ抽出物 | | | |
| B | 30.26 | ± 1.19 | |
| C | 30.47 | ± 1.55 | 38% |

Table 5 ¹H-qNMR 法と HPLC 法で定量されたクローブ抽出物の eugenol の含有率

| samples | 含有率(%) | |
|---------|---------------------|-------------------|
| | ¹ H-qNMR | HPLC ^a |
| D | 26.56 | 24.94 |
| E | 28.81 | 26.20 |

^a ¹H-qNMR 法から得られた eugenol 標準品の含有率をもとに算出

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|---|--------|---------|------|
| 島村智子、伊藤裕才、久保勇人、柏木丈弘、石川洋哉、松井利郎、山崎壮、多田敦子、杉本直樹、穠山浩、受田浩之 | 既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の関係 | 日本食品化学会会誌 | | | 印刷中 |
| Akiyama H, Nose M, Ohtsuki N, Hisaka S, Takiguchi H, Tada A, Sugimoto N, Fuchino H, Inui T, Kawano N, Hayashi S, Hishida A, Kudo T, Sugiyama K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshimatsu K, | Evaluation of the safety and efficacy of extracts of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> roots produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation system, | <i>J. Nat. Med.</i> | 71 | 265-271 | 2017 |
| Enkhtuya E., Shimamura T, Kashiwagi T., Ukedala H., | Antioxidative Constituents in the Leaves of <i>Paeonia anomala</i> Grown in Mongolia | <i>Food Science and Technology Research</i> | 23 | 63-70 | 2017 |
| Tanaka R., Inagaki R., Sugimoto N., Akiyama H., Nagatsu A., | Application of a quantitative ¹ H-NMR (¹ H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in <i>Plantaginis</i> semen | <i>Journal of Natural Medicines</i> | 71(1) | 315-320 | 2017 |
| 山内良子、石井佐弥、草場悠里、小林弘司、島村智子、受田浩之、穠山浩、石井洋哉 | 酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH ラジカル消去能測定におよぼす反応溶媒の影響 | 日本食品保蔵学会誌 | 42(5) | 189-196 | 2016 |
| Nishizaki Y., Ishizuki, K., Akiyama, H., Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K. | Preparation of a ammonia- treated lactone and structure elucidation of its main component | Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi) | 57 (6) | 193-200 | 2016 |
| Amakura Y., Yoshimura M., Morimoto S., Yoshida T., Tada A., Ito Y., Yamazaki T., Sugimoto N., Akiyama H., | Chromatographic evaluation and Characterization of Components of Gentian Root Extract Used as Food Additives | <i>Chem. Pharm. Bull.</i> | 64(1) | 78-82 | 2016 |

| | | | | | |
|--|--|-------------------------------------|-------|-----------|------|
| Tanaka R., Shibata H., Sugimoto N., Akiyama H., Nagatsu A., | Application of a quantitative ¹ H-NMR method for the determination of paeonol in Moutan cortex, Hachimijiogan and Keishibukuryogan | <i>Journal of Natural Medicines</i> | 70(4) | 797-802 | 2016 |
| Ueda T., Okumura T., Tanaka Y., Shimamura T., Ukeda H., | Development of a new electrochemical evaluation method for antioxidant activity based on the redox properties of polyoxometalates and its application to the evaluation of antioxidant capacity of beverages | Analytical Sciences | 32 | 825-830 | 2016 |
| Takahashi, M., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Takeuchi, H., Nakagawa, K., Akiyama, H., Sato, K., Inoue, K. | Determination and purification of sesamin and sesamol in sesame seed oil unsaponified matter using reversed-phase liquid chromatography coupled with photodiode array and tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography. | J. Sep. Sci. | 39 | 3898-3905 | 2016 |
| Todoroki, K., Nakamura, M., Sato, Y., Goto, K., Nakano, T., Ishii, Y., Min, J.Z., Inoue, K., Toyo'oka, T. | 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride as an Enantioseparation Enhancer for Chiral Derivatization-LC Analysis of D- and L-Amino acids. | Chromatography | 37 | 23-28 | 2016 |
| Inoue, K., Tanada, C., Hosoya, T., Yoshida, S., Akiba, T., Min, J.Z., Todoroki, K., Yamano, Y., Kumazawa, S., Toyo'oka, T. | Principal component analysis of molecularly-based signals from infant formula contaminations using LC-MS and NMR in foodomics. | J. Sci. Food Agric. | 96 | 3876-3881 | 2016 |

| | | | | | |
|---|--|---------------------------|-------|---------|------|
| Inoue, K., Miyazaki, Y., Unno, K., Min, J.Z., Todoroki, K., Toyo'oka, T. | Stable isotope dilution HILIC-MS/MS method for accurate quantification of glutamic acid, glutamine, pyroglutamic acid, GABA and theanine in mouse brain tissues. | Biomed. Chromatogr. | 30 | 55-61 | 2016 |
| Amakura Y, Yoshimura M, Yoshida T, Tada A, Ito Y, Yamazaki T, Sugimoto N, Akiyama H | Chromatographic evaluation of the components of grape skin extract used as food additives | Jpn. J. Food Chem. Safety | 22 | 108-114 | 2015 |
| Kawasaki H, Akiyama T, Tada A, Sekiguchi W, Nishizaki Y, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama, H. | Development of HILIC-MS method for direct quantitation of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole in caramel III with the qNMR certified standard. | Jpn. J. Food Chem. Safety | 22(2) | 115-122 | 2015 |
| 多田敦子, 石附京子, 杉本直樹, 吉松嘉代, 川原信夫, 末松孝子, 有福利紀, 深井俊夫, 田村幸吉, 大槻崇, 田原麻衣子, 山崎壮, 穠山浩 | 既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分組成の多変量解析に基づく基原植物種の検討 | 日本食品衛生学雑誌 | 56 | 217-227 | 2015 |
| 多田敦子, 杉本直樹, 小林義和, 濱田ひかり, 石附京子, 秋山卓美, 伊藤裕才, 川原信夫, 山崎壮, 穠山浩 | 味認識装置による既存添加物苦味料及び関連苦味化合物の品質評価 | 日本食品化学学会誌 | 22 | 25-31 | 2015 |
| 西崎雄三, 多田敦子, 石附京子, 伊藤裕才, 小野田絢, 杉本直樹, 穠山浩 | モル吸光係数比を利用したジャマイカカッシア抽出物中のクアシン及びネオクアシンの新規定量法の開発 | 日本食品衛生学雑誌 | 56 | 185-193 | 2015 |
| Todoroki K, Nakano T, Ishii Y, Goto K, Tomita R, Fujioka T, Min JZ, Inoue K, Toyo'oka T | Automatic analyzer for highly polar carboxylic acids based on fluorescence derivatization-liquid chromatography | Biomed Chromatogr | 29 | 445-451 | 2015 |

| | | | | | |
|---|--|-------------------|-----|-----------|------|
| Takayama T, Kuwabara T, Maeda T, Noge I, Kitagawa Y, Inoue K, Todoroki K, Min JZ, Toyo'oka T | Profiling of chiral and achiral carboxylic acid metabolomics: synthesis and evaluation of triazine-type chiral derivatization reagents for carboxylic acids by LC-ESI-MS/MS and the application to saliva of healthy volunteers and diabetic patients | Anal Bioanal Chem | 407 | 1003-1014 | 2015 |
| Inoue K, Tsuchiya H, Takayama T, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto T, Matsukawa N, Toyo'oka T | Blood-based diagnosis of Alzheimer's disease using fingerprinting metabolomics based on hydrophilic interaction liquid chromatography with mass spectrometry and multivariate statistical analysis. | J Chromatogr B | 974 | 24-34 | 2015 |
| Min JZ, Tomiyasu Y, Morotomi T, Jiang YZ, Li G, Shi Q, Yu HF, Inoue K, Todoroki K, Toyo'oka T | First observation of N-acetyl leucine and N-acetyl isoleucine in diabetic patient hair and quantitative analysis by UPLC-ESI-MS/MS. | Clin Chim Acta | 444 | 143-148 | 2015 |
| Mochizuki T, Takayama T, Todoroki K, Inoue K, Min JZ, Toyo'oka T | Towards the chiral metabolomics: Liquid chromatography-mass spectrometry based D/L-amino acid analysis after labeling with a new chiral reagent, (S)-2,5-dioxopyrrolidine-1-yl-1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylate, and the application to saliva of healthy volunteers. | Anal Chim Acta | 22 | 73-82 | 2015 |
| Inoue K, Tanada C, Sakamoto T, Tsutsui H, Akiba T, Min JZ, Todoroki K, Yamano Y, Toyo'oka T | Metabolomics approach of infant formula for the evaluation of contamination and degradation using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry. | Food Chem | 181 | 318-324 | 2015 |

| | | | | | |
|--|---|---------------------|------|---------|------|
| Min JZ, Morota Y, Jiang YZ, Li G, Kang D, Yu HF, Inoue K, Todoroki K, Toyo'oka T | Rapid and sensitive determination of diacetyl polyamines in human fingernail by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. | Eur J Mass Spectrom | 20 | 477-486 | 2015 |
| Todoroki K, Ishii Y, Ide T, Min JZ, Inoue K, Huang X, Zhang W, Hamashima Y, Toyo'oka T | Advanced dress-up chiral columns: New removable chiral stationary phases for enantioseparation of chiral carboxylic acids. | Anal Chim Acta | 882 | 101-111 | 2015 |
| Nakano T, Todoroki K, Ishii Y, Miyauchi C, Palee A, Min JZ, Inoue K, Suzuki K, Toyo'oka T. | An easy-to-use excimer fluorescence derivatization reagent, 2-chloro-4-methoxy-6-(4-(pyren-4-yl)butoxy)-1,3,5-triazine, for use in the highly sensitive and selective liquid chromatography analysis of histamine in Japanese soy sauces. | Anal Chim Acta | 880 | 145-151 | 2015 |
| Li XL, Li G, Jiang YZ, Kang D, Jin CH, Shi Q, Jin T, Inoue K, Todoroki K, Toyo'oka T, Min JZ | Human nails metabolite analysis: A rapid and simple method for quantification of uric acid in human fingernail by high-performance liquid chromatography with UV-detection. | J Chromatogr B | 1002 | 394-398 | 2015 |
| Takayama T, Mochizuki T, Todoroki K, Min JZ, Mizuno H, Inoue K, Akatsu H, Noge I, Toyo'oka T | A novel approach for LC-MS/MS-based chiral metabolomics fingerprinting and chiral metabolomics extraction using a pair of enantiomers of chiral derivatization reagents. | Anal Chim Acta | 898 | 73-84 | 2015 |
| Inoue K, Ozawa Y, Toyo'oka T | Application of liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry for the therapeutic drug monitoring of sedative medicine in clinical stage | Chromatography | 36 | 81-92 | 2015 |

| | | | | | |
|--|--|---|-------|---------|------|
| Uno K, Takayama T, Todoroki K, Inoue K, Min JZ, Mizuno H, Toyo'oka T | Evaluation of a Novel Positively-charged Pyrrolidine-based Chiral Derivatization Reagent for the Enantioseparation of Carboxylic Acids by LC-ESI-MS/MS | Chromatography | 36 | 57-60 | 2015 |
| Tomoko Shimamura, Yoshihiro Sumikura, Takeshi Yamazaki, Atsuko Tada, Takehiro Kashiwagi, Hiroya Ishikawa, Toshiro Matsui, Naoki Sugimoto, Hiroshi Akiyama, and Hiroyuki Ukeda, | Applicability of DPPH Assay for Evaluation of Antioxidant Capacity of Food Additives -Inter-laboratory Evaluation Study- | Analytical Sciences | 30 | 717-721 | 2014 |
| Kraingkrai Ponghong, Tomoko Shimamura, Keiro Higuchi, Takehiro Kashiwagi, Kate Grudpan, Shoji Motomizu, Hiroyuki Ukeda, | Spectrophotometric Sequential Injection Analysis System for Estimating the Concentration of Lipid Hydroperoxides in Edible Oils | <i>Journal of Flow Injection Analysis</i> | 31 | 33-37 | 2014 |
| Tanaka, Rie; Nitta, Akanoe; Nagatsu, Akito | Application of a quantitative ¹ H-NMR method for the determination of amygdalin in Persica semen, Armeniaca semen and Mume fructus | <i>Journal of Natural Medicines</i> | 68(1) | 225-230 | 2014 |
| Tanaka, Rie; Hasebe, Yuko; Nagatsu, Akito | Application of a quantitative ¹ H-NMR method for the determination of gentiopicroside in Gentiana radix and Gentiana scabra radix | <i>Journal of Natural Medicines</i> | 68(3) | 630-635 | 2014 |
| Atsuko Tada, Kyoko Ishizuki, Takeshi Yamazaki, Naoki Sugimoto, Hiroshi Akiyama | Method for the determination of natural ester-type gum bases used as food additives via direct analysis of their constituent wax esters using high-temperature GC/MS | <i>Food Science & Nutrition</i> | 2(4) | 417-425 | 2014 |