

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
課題番号 H29-食品-一般-007

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

平成 29 年度 総括・分担報告書

研究代表者	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	西崎 雄三	国立医薬品食品衛生研究所
	天倉 吉章	松山大学
	井之上 浩一	立命館大学
	永津 明人	金城学院大学
	出水 庸介	国立医薬品食品衛生研究所
	大槻 崇	日本大学

平成 30 (2018)年 3 月

目次	1
1) 総括研究報告書	
既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究	3
研究代表者：杉本直樹	
2) 分担研究報告書	
1. 既存添加物の成分規格試験法に関する研究	
1) 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究	16
研究協力者：日本食品添加物協会	
2) トマト色素中のリコピン分析法	29
研究分担者：杉本直樹	
研究協力者：石附京子	
研究協力者：増本直子	
研究協力者：西崎雄三	
2. 既存添加物の基原同定手法に関する研究	
1) ペプチドを指標とした既存添加物の基原同定法の検討	55
研究分担者：西崎雄三	
研究協力者：杉本直樹	
研究協力者：増本直子	
2) 香辛料抽出物の基原生物の学名調査	61
研究分担者：西崎雄三	
研究協力者：増本直子	
研究協力者：杉本直樹	
3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究	
1) ルチン（抽出物）の原料エンジュつぼみの成分解析	88
研究分担者：天倉吉章	
研究協力者：好村守生	
2) レイシ抽出物の成分解析	94
研究分担者：天倉吉章	
研究協力者：好村守生	
4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究	
1) 既存添加物ゴマ油不けん化物の成分規格の検討	98

研究分担者：井之上浩一	
2) 既存添加物ベニコウジ色素の成分規格の検討	118
研究分担者：井之上浩一	
5. qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究	
1) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究	139
研究分担者：永津明人	
6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究	
1) ラカンカ抽出物のモグロシド V 分析法	156
研究分担者：大槻崇	
7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究	
1) 化学合成による既存添加物の定量用標品の供給に関する研究	175
研究分担者：出水庸介	
3) 研究成果の刊行に関する一覧表	185

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

(H29-食品-一般-007)

平成29年度 総括研究報告書

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

研究代表者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究要旨

1) 既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

2) 既存添加物の基原同定手法に関する研究

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

3) 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

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

4) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

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

5) qNMRを用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

6) qNMRを用いた既存添加物の分析手法に関する研究

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

7) 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

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

研究分担者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 室長
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
天倉吉章 松山大学薬学部 教授
井之上浩一 立命館大学薬学部 准教授
永津明人 金城学院大学薬学部 教授
大槻崇 日本大学生物資源学部 専任講師
出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所 部長

研究協力者

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

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

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

について検討した。

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

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

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

3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

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

4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

- 1) 既存添加物ゴマ油不けん化物製品、ゴマ油は国内で市販されているものを用いた。4 種のゴマリグナン類及び 4 種のデザインしたシングルリファレンスについて HPLC に付し、

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

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

5. qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

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

6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

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

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

7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

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

C. D. 研究結果及び考察

1. 既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

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

した。

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

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

2. 既存添加物の基原同定手法に関する研究

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

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

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

3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

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

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

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

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

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

4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

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

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

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

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

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

5. qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

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

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

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

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

6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

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

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

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

7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

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

E. 結論

1. 既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

2. 既存添加物の基原同定手法に関する研究

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

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

3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

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

物の同定を試み、判定基準となるかどうか検討する予定である。

4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

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

5. qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

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

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

6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

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

含量を正確かつ安価に定量できることが判明した。

7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

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

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N: Kinetic Study of the Equilibration between Carminic Acid and Its Two Isomers Isolated from Cochineal Dye. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*, 306-310.
- 2) 島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈弘, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩, 受田浩之: 既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の

関係. *日食化誌*, **2017**; *24*, 10-15.

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

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

2. 学会発表

- 1) 石附京子, 西崎雄三, 多田敦子, 箕川剛, 中

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

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

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

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

平成29年度「既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究」

— 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

一般社団法人日本食品添加物協会

研究報告書

平成29年度「既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究」

—既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

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 樋口 彰 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。

本年度は、平成28年度までに作成した第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、昨年度に引き続き、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, 本年度作成する検証用規格および自主規格を含め成分規格の整備状況, 安全性試験実施状況, 国内外規格の有無等を調査した。

(2) 第10版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た89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, 一部見直しを実施した。

(3) 第10版収載既存添加物候補品目定義及び製法・本質の基原生物の調査

第10版収載既存添加物候補品目の基原・製法・本質に記載されている基原種について, 削除, 変更又は拡大の必要性の有無の調査を継続した。

(4) 第5版既存添加物自主規格刊行に向けた成分規格収載案の作成

昨年度に引き続き, 前項の検証用とできなかった品目について, 成分規格の収載が可能なものから新規に自主規格案を作成した。

2. 調査研究者

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により, 評価・検討を行った。

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。

(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

昨年度までに作成した成分規格検証用規格案について, 一部見直しを行い, 部会別, 品目順に整理した。

表1に対象品目を示す。

表1 第10版既存添加物成分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	89	着色料	金

2	51	着色料	カキ色素
2	90	着色料	銀
2	159	着色料	シタン色素
2	165	着色料	植物炭末色素
2	258	着色料	ファフィア色素
2	324	着色料	ムラサキヤマイモ色素
4	40	増粘安定剤	エレミ樹脂
4	145	増粘安定剤	サバクヨモギシードガム
4	359	増粘安定剤	レバン
4	229	増粘安定剤	トロロオアオイ
5	76	酸化防止剤	カンゾウ油性抽出物
5	58	酸化防止剤	ヒマワリ種子抽出物
5	58	酸化防止剤	カテキン
5	202	酸化防止剤	チャ抽出物
5	365	酸化防止剤	ローズマリー抽出物
6	154	ガムベース	ジェルトン
6	199	ガムベース	チクル
6	321	ガムベース	ミルラ
6	364	ガムベース	ロシン
7	148	酵素	イソマルトデキストラナーゼ
9	27	調味料・苦味料	イソアルファー苦味酸
9	120	調味料・苦味料	ゲンチアナ抽出物
9	161	調味料・苦味料	ジャマイカカシミア抽出物

※:既添 No:数字は既存添加物番号

(3)第10版収載既存添加物候補品目定義及び製法・本質の基原生物の調査

昨年度までに作成した改正要望について、一部削除、変更又は拡大を盛り込んだ。

(4)第5版既存添加物自主規格刊行に向けた最終取りまとめ

①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。対象品目を表2に記載した。

新規作成及び見直しを行っ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、昨年度までの報告分を含め、部会別に整理した。

②通則、一般試験法、試薬・試液等についてまとめた。

表2 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	2	024	着色料	アルミニウム ^{※※}
2	2	047	着色料	オレンジ色素 ^{※※}
3	2	051	着色料	カキ色素
4	2	087	着色料	魚鱗箔 ^{※※}
5	2	089	着色料・製造用剤	金
6	2	090	着色料・製造用剤	銀
7	2	114	着色料	クーロー色素 ^{※※}
8	2	135	着色料	骨炭色素
9	2	149	着色料	シアナット色素 ^{※※}
10	2	159	着色料	シタン色素
11	2	165	着色料	植物炭末色素
12	2	258	着色料	ファフィア色素
13	2	282	着色料	ペカンナッツ色素 ^{※※}
14	2	324	着色料	ムラサキヤマイモ色素
15	2	飲食	着色料	アカゴメ色素 ^{※※}
16	2	飲食	着色料	アカダイコン色素
17	2	飲食	着色料	イカスミ色素
18	2	飲食	着色料	エルダーベリー色素
19	2	飲食	着色料	クランベリー色素 ^{※※}
20	2	飲食	着色料	サフラン色素
21	2	飲食	着色料	シソ色素
22	2	飲食	着色料	ストロベリー色素 ^{※※}
23	2	飲食	着色料	チョコリ色素
24	2	飲食	着色料	ノリ色素 ^{※※}
25	2	飲食	着色料	ハイビスカス色素
26	2	飲食	着色料	ブドウ果汁色素
27	2	飲食	着色料	ブラックベリー色素 ^{※※}
28	2	飲食	着色料	ブルーベリー色素 ^{※※}
29	2	飲食	着色料	ボイセンベリー色素 ^{※※}
30	2	飲食	着色料	ホワートルベリー色素 ^{※※}
31	2	飲食	着色料	ラズベリー色素 ^{※※}
32	2	飲食	着色料	レッドカーラント色素 ^{※※}
33	2	飲食	着色料	パープルキャロット色素
34	2	飲食	着色料	アカジャガイモ色素

35	3	074	保存料	カワラヨモギ抽出物
36	3	175	製造用剤／日持向上剤	セイヨウワサビ抽出物
37	3	216	製造用剤／日持向上剤	トウガラシ水性抽出物
38	3	268	製造用剤／日持向上剤	ブドウ果皮抽出物
39	3	329	製造用剤／日持向上剤	モウソウチク乾留物
40	3	330	製造用剤／日持向上剤	モウソウチク抽出物
41	4	001	増粘安定剤	アウレオバシジウム培養液
42	4	004	増粘安定剤	アグロバクテリウムスクシノグリカン
43	4	013	増粘安定剤	アマシードガム
44	4	019	増粘安定剤	アラビノガラクトン
45	4	040	増粘安定剤/ガムベース	エレミ樹脂
46	4	053	増粘安定剤	カシアガム
47	4	062	増粘安定剤	キチン
48	4	064	増粘安定剤・製造用剤	キトサン
49	4	92	増粘安定剤	グァーガム酵素分解物
50	4	104	増粘安定剤	グルコサミン
51	4	145	増粘安定剤・製造用剤	サバクヨモギシードガム
52	4	229	増粘安定剤	トロロアオイ
53	4	257	増粘安定剤	ファーセララン
54	4	336	増粘安定剤	モモ樹脂
55	4	359	増粘安定剤	レバン
56	5	076	酸化防止剤	カテキン
57	5	091	酸化防止剤/日持	カンゾウ油性抽出物
58	5	093	酸化防止剤	グアヤク脂
59	5	095	酸化防止剤	クエルセチン
60	5	115	酸化防止剤/日持	クローブ抽出物***
61	5	136	酸化防止剤	ゴマ油不けん化物
62	5	196	酸化防止剤	単糖・アミノ酸複合物
63	5	202	酸化防止剤	チャ抽出物
64	5	232	酸化防止剤	生コーヒー豆抽出物
65	5	255	酸化防止剤	ヒマワリ種子抽出物
66	5	306	酸化防止剤	没食子酸
67	5	365	酸化防止剤	ローズマリー抽出物
68	5	036	ガムベース/光沢剤	ウルシロウ
69	6	042	ガムベース	オゾケライト***
70	6	094	ガムベース	グアヤク樹脂

71	6	099	ガムベース	グッタハンカン***
72	6	100	ガムベース	グッタペルカ
73	6	138	ガムベース	ゴム
74	6	142	ガムベース/光沢剤	コメヌカロウ
75	6	144	ガムベース/光沢剤	サトウキビロウ
76	6	152	ガムベース/光沢剤	シェラックロウ
77	6	154	ガムベース	ジェルトン
78	6	199	ガムベース	チクル
79	6	307	ガムベース	ホホバロウ***
80	6	312	ガムベース	マスチック
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	8	029	酸味料	イタコン酸***
85	9	027	苦味料	イソアルファー苦味酸
86	9	041	調味料	塩水湖水低塩化ナトリウム液
87	9	120	苦味料	ゲンチアナ抽出物
88	9	124	苦味料	酵素処理ナリンジン***
89	9	161	苦味料	ジャマイカカッシア抽出物
90	9	182	調味料	粗製海水塩化カリウム
91	9	236	苦味料	ニガヨモギ抽出物***
92	9	357	苦味料	レイシ抽出物
93	9	127	乳化剤	酵素処理レシチン
94	10	172	乳化剤	スフィンゴ脂質
95	10	187	乳化剤	ダイズサポニン
96	10	195	乳化剤	胆汁末***
97	10	009	製造用剤	アスペルギルスステレウス糖たん白質
98	13	30	製造用剤	イナワラ灰抽出物
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	137	製造用剤	ゴマ柄灰抽出物
112	13	155	製造用剤	分岐 シクロデキストリン
113	13	158	製造用剤	シソ抽出物
114	13	163	製造用剤	乳清焼成カルシウム
115	13	168	製造用剤	水素
116	13	173	製造用剤	生石灰
117	13	176	製造用剤	ゼイン
118	13	184	製造用剤	ソバ柄灰抽出物
119	13	198	製造用剤	柿タンニン
120	13	198	製造用剤	ミモザタンニン
121	13	200	製造用剤	窒素
122	13	201	製造用剤	チャ乾留物
123	13	212	製造用剤	鉄
124	13	214	製造用剤	銅
125	13	227	製造用剤	トレハロース
126	13	237	製造用剤	ニッケル
127	13	239	製造用剤	ばい煎コメヌカ抽出物
128	13	240	製造用剤	ばい煎ダイズ抽出物
129	13	242	製造用剤	白金
130	13	246	製造用剤	パラジウム
131	13	249	製造用剤	ヒアルロン酸
132	13	262	製造用剤	フィチン(抽出物)
133	13	266	製造用剤	ブタン
134	13	275	製造用剤	プロパン
135	13	297	製造用剤	ヘプタン
136	13	302	製造用剤	ヘリウム
137	13	318	製造用剤	貝殻未焼成カルシウム
138	13	318	製造用剤	卵殻未焼成カルシウム
139	13	327	製造用剤	メバロン酸
140	13	331	製造用剤	木材チップ
141	13	334	製造用剤	木灰
142	13	335	製造用剤	木炭抽出物
143	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

(5) 添加物酵素の基原種の種類, 同定について

酵素の基原としての微生物について, 分類学の発達に伴う呼称の変更等への対応および留意点について調査した結果をまとめた.

添加物酵素の基原種の同定, 分類について

平成 30 年 2 月 26 日

東洋大学 食環境科学部 健康栄養学科 教授 林 清
日本食品添加物協会 第 7 (酵素) 部会長 卯津羅健作

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

自然界に多様に分布する酵素は, 従前「天然添加物」とされていたが, 平成 8 年に「既存添加物名簿」に収載され, ほぼ同時期に「既存添加物名簿収載品目リスト」が通知された. 本リストには, 各添加物酵素について, その「基原・製法・本質」が示された.

また, 食品添加物公定書第 9 版改正においては, 上述の既存添加物名簿収載品目リストに収載された基原に加え, 同リスト発行から本改正に際する検討までの間に事業使用が確認されたものが収載されることとなった.

他方, 酵素の事業化のための発酵生産においては, その生産性の優位性 (※) より, 微生物が酵素の基原として用いられることがほとんどである.

(※) 動植物とは異なり, 微生物による発酵生産は, 季節・天候等の影響を受けず, 短時間に集約かつ計画的な酵素の安定生産が可能となること.

しかし, 微生物においては, 分類学, および同定の技術, 手法の進歩により, 基原の呼称が改正されることが少なからず発生することがある. その際, 事業使用されている基原自体に変更はなくとも, 呼称変更により公定書収載の基原名との齟齬が生じることになる場合もあるが, このことが問題とならないよう, 対応策を検討しておく必要がある.

微生物をはじめ全ての生命体は地球上にある一つの始原細胞 (生命) の誕生に端を発し, 30 数億年の歳月をかけ, 現在のような多種多様な生態系に進化してきている. 逆の見方をすると, 夫々の生物間において, 近い, 遠いの差はあれ, 元来, ひとつの系統で繋がっているものである.

我々は, 多様な生物種を系統的に取り扱いができるよう, このような多様な系統を類縁の近い, 遠いで模式的に表現した分類体系を作り上げてきた. 例えば, Haeckel による生物の系統樹などがある¹⁾.

微生物においても, その分類体系において「種」の概念が共有化できるよう科学的根拠に基づく境界線を設け, 個々の識別ができるようにされてきた. そのために各微生物群の科学的特徴を見出し, 各系統の範囲・定義を定め, 各々の系統毎に学術名を与える分類学が発達してきた.

また、分類学の発達にともない、系統をより明確に表示するために分類階級が定められた（表1は、*Bacillus subtilis* の分類階級の事例）。分類の最小単位が「種 (species)」, 「種」の集合が「属 (genes)」, 「属」の集合が「科 (family)」というように、進化・系統を反映させ、それぞれの集合毎の階級にまとめられている。ただ、ここで重要なことは、「種」や「属」は概念的なものであるのに対し、実存する微生物は個体（株：strain）であることである。

表1 分類階級の事例

階級	Rank	<i>Bacillus subtilis</i>
ドメイン	Domain	Bacteria
界	Kingdom	Bacteria
門	Division	Fermicutes
綱	Class	Bacilli
目	Order	Bacillales
科	Family	Bacillaceae
属	Genus	<i>Bacillus</i>
種	Species	<i>Bacillus subtilis</i>

微生物の分類については、微生物の形態的特徴（コロニーの形状や細胞の形など）、生理・生化学的性状（糖の資化性・発酵性、生育する温度や pH の範囲・至適条件など）、化学分類学的性状（菌体の脂肪酸組成、キノン組成など）等の違いの比較（同定）により行われてきた。

ただ、これらの同定法においては、微生物の多様性ゆえ、同定結果による分類の判定が明確に行えないこともある。例えば、表2（*B.subtilis* の生理・生化学的性質の一部）に示されるように分類の最小単位である「種」の中に分布する「株 (Strain)」により多様な性状を示すことがあるからである。

表2 *Bacillus subtilis* の生理・生化学的性状 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Volume 3, p79 Table 4 から抜粋)

Characteristic	<i>Bacillus subtilis</i>
Oxidase	d
β-Galactosidase	+
Lysine decarboxylase	—
Acid from N-Acetyl-D-glucosamine	d
Acid from Cellobiose	+
Acid from Fructose	+
Acid from Galactose	d
Acid from Sorbose	—
Acid from L-Xylose	—

＋：85%以上の株 (Strain) が陽性

d：株 (Strain) により多様 (16～84%の株が陽性)

－：0～15%の株が陽性

一方、近年の分子生物学や遺伝学的分析法の進歩、および分析結果を解析するコンピュータ（ハード、ソフト両面）の発達により、種々の遺伝子情報がより精密に解析され、かつ豊富で良質な情報が蓄積されてきた。これらの知見に基づき、微生物の系統解析を効率的に行うための適切な遺伝子領域も見出されている。現在、系統解析に、一般的に用いられる遺伝子として、細菌では16S rDNA 遺伝子、真菌では18S rDNA 遺伝子、28S rDNA 遺伝子のD1/D2 領域、および両遺伝子の間に存在するITS 領域などがある。

これらの遺伝子情報を指標にして、従来の形態的特徴や生理・生化学的性状などに基づいて系統解析（分類）された微生物について、再解析（分類）が活発に行われており、系統解析の情報がデータベースに蓄積されてきている。

遺伝子領域による微生物の系統解析においては、被検菌株の遺伝子情報（例 細菌の場合は16S rDNA 遺伝子の塩基配列）と蓄積された遺伝子情報との客観性のある相同値をもって判定を行うため、試験者の主観が入らず、より客観的な結果が得られる。例えば、細菌の「種」はDNA-DNA 分子交雑試験による相同値が70%以上を示す菌株（Strain）同士を1菌種と定義している²⁾。また、16S rDNA の全塩基配列（約1,500 塩基）の相同値が98.7%以上の場合は、DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が70%以上を示す可能性、つまり同種の可能性がある、とされている³⁾。本法による細菌の同定の事例として、「16S rDNA を指標としたアルギン酸リアーゼ生産菌の種の同定」⁴⁾がある。

このような背景から、近年、微生物の系統解析は、遺伝子領域による手法が主流となってきている。しかしながら、従来の形態的特徴や生理・生化学的性状などに基づく系統解析（分類）と近年の遺伝子領域の情報の基づく系統解析とは、必ずしも一致しない場合もあり菌株の分類学上の呼称変更に至る場合がある（後述の事例1、事例2）。

また、過去において、命名された学名に混乱がみられていたものがあり、学術的見地からの確認をもって当該学名が整備され、呼称変更に至ったケースもある（後述の事例3）。

これらの事例の詳細を後述するが（事例1～3）、このようなことより、食品添加物公定書の酵素の各条に記載されている基原においても同様に呼称変更が生じることもありえる。ただ、その呼称変更の背景等は下記の事例に限定されるものではなく、また予め想定できるものでもない。

他方、食品添加物として使用される添加物酵素の安全性の確保においては、当該酵素の基原の病原性、および毒素産生性の有無が判断材料となる。当該基原の呼称変更については分類学上の改正であり、当該基原微生物自体が他の基原微生物に変わることはないので、その安全性を左右するものではない。

このような背景から、分類学上の改正、または同定技術の進歩により、当該基原の呼称変更が生じた場合であっても、それらの科学的な背景、および当該基原微生物自体が他の基原微生物に変わっていないことが確認できれば、その安全性に問題が生じることもないので、新呼称への読替えを施し、公定規格上何ら問題なく添加物酵素製造に使用できるとする措置が妥当である。なお、新呼称の公定書規格への収載は、公定書改正の際の検討課題とすることでよいと考える。

【分類学上の呼称変更の事例】

(事例1) *Lactobacillus fermentum*

Bergey's Manual of Systematic Bacteriologyによると、「生理学的検査のみでは、類縁の *Lactobacillus reuteri* と区別ができない。両者の区別には遺伝子型の検査が必要である。」とあるため、生理学的検査において *Lactobacillus fermentum* と同定・分類されたものが、遺伝子情報の解析により *Lactobacillus reuteri* と同定されることもある。

以下は、上記のことを示す記述を Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Volume 3 *Lactobacillus* の章より抜粋したものである。

30. *Lactobacillus fermentum*

Additional remarks : *Lactobacillus fermentum* cannot be distinguished from *Lactobacillus reuteri* by simple physiological tests. The genotypical methods used provide clear results (Dellaglio et.al. 2004)

77. *Lactobacillus reuteri*

Additional remarks : *Lactobacillus reuteri* cannot be distinguished from *Lactobacillus fermentum* by simple physiological tests. Determination of Diamino acid of peptidoglycan or preferentially, genotypical methods clearly Separate the two species.

(事例2) *Bacillus amyloliquefaciens*

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Volume 3 *Bacillus* の章の 1a. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* の項に、"Strains formerly designated "*Bacillus amyloliquefaciens*" or "*Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*" are now accommodated within *Bacillus amyloliquefaciens*"と記されており、*Bacillus amyloliquefaciens* が *Bacillus subtilis* から明確に分けられた。これにより、従前 *Bacillus subtilis* と分類されていた一部の株は、*Bacillus amyloliquefaciens* に分類された。

なお、上述は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Volume 3 *Bacillus* の章より抜粋したものである。

(事例3) 黒麹菌

黒麹菌は、泡盛麹から分離された当初は、*Aspergillus luchuensis* とされたが、後に黒麹菌として *Aspergillus awamoris* を提唱されるなどその学名に混乱が見られた。近年の確認により、*Aspergillus awamoris* と分類されている株には、*Aspergillus luchuensis* のみならず *Aspergillus niger* も混在していることが示され、結局、*Aspergillus awamoris* の学名は「doubtable (疑問)」であり、分類学上の混乱を避けるため廃止された。このことにより、黒麹菌の学名は、*Aspergillus luchuensis* とされ、*Aspergillus niger* などのクロカビとは別種として分類されることとなった⁵⁾。

参考文献

- 1) E. Haeckel : "Generelle Morphologie der Organismen" Vol.2 Reimer, Berlin, 1866

- 2) Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, L., Moore, L.H., Moore, W.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., and Trüper, H.G: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 463-464 (1987)
- 3) Stackebrandt, E. and Ebers, J.: Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today*, 33, 152-155 (2006)
- 4) 穂山浩:「研究分担課題:16S rDNA を指標にしたアルギン酸リアーゼ生産菌種の同定」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)
- 5) 山田修:「黒麹菌の学名が *Aspergillus luchuensis* になりました」日本醸造協会誌 第 110 卷 第 2 号 P64-67 (2015)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法に関する研究

～トマト色素中のリコピン分析法～

研究分担者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究要旨 既存添加物「トマト色素」の定量法として色価測定法が適用されているが、HPLCによる分析法を今後導入していくには、主色素成分であるリコペンの定量用標準品を必要としない定量法が望ましい。HPLC及びqNMRにより、リコペンのスタンIに対する相対モル感度(RMS: relative molar sensitivity)を正確に求めることによって、安価なスタンIを内標準物質とし、HPLCクロマトグラム上に観察される試料中のリコピンとスタンIのピーク面積、RMSの関係からリコペンの定量用標準品を必要としない定量法を構築した。その結果、絶対検量線法とほぼ同等の精度が得られたことから、本法が色価測定法に代わる定量法として有効であると考えられた。

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

A. 研究目的

食品添加物公定書¹⁾において、既存添加物「トマト色素」は、『トマト(*Lycopersicon esculentum* Miller)の果実から得られた、リコピン(lycopene)を主成分とするものである。食用油脂を含むことがある。』と定義され、また、既存添加物名簿収載品目リスト注解書²⁾には、その基原・製法・本質として『ナス科トマト(*Lycopersicon esculentum* Mill.)の果実より、油脂で抽出したもの、果実を脱水し、室温時若しくは熱時、ヘキササン、酢酸エチル若しくはアセトンで抽出し、溶媒を留去したもの、又はトマトの果実の搾汁より分離して得られる。』と記載されている。トマト色素は、黄色～橙色系が主体のカロテノ

イド系色素の中で例外的に赤～ピンクの色調を呈すること、原料の身近さなどから、天然由来の着色料として需要が高い。トマト色素の主色素成分はリコペン(ドイツ語読みでリコピンと呼ばれていたが、現在、英語読みが奨励されているため、以下リコペンとする。)であり、トマトに多く含まれるほか、スイカ、ニンジン、パパイヤなどの赤色の野菜・果物に all-trans 体として存在するが、加工、調理、保存、露光により容易に異性化することが知られている。また、主色素成分のリコペンについては、抗酸化機能、がん抑制効果、コレステロール低下作用など様々な健康機能効果についても研究が進み、健康食品分野で急激に注目を集めている。

米国では着色料は食品添加物とは別扱いになっており、既存添加物「トマト色素」に相当する「tomato lycopene extract」と「tomato lycopene concentrate」が、アナトーエキスやβ-カロテンとともに検定不要(exempt from certification)の食用色素として21 CFR 73.585³⁾に収載されている。「tomato lycopene extract」はトマトより酢酸エチルで抽出され、オレオレジン 5.5%以上、

「tomato lycopene concentrate」はオレオレジン60%以上のリコペンと規定されている。また、FDAはGRAS通知(GRAS notice)⁴⁾において、2003年に「synthetic lycopene」、2005年に「tomato lycopene extract 6 percent, tomato lycopene extract 1.5 percent, and crystallized tomato lycopene extract」及び「lycopene from *Blakeslea trispora*」、2006年に「concentrated tomato lycopene extract」について、当該品がGRAS物質であるという見解に疑問はない(no questions)というコメントを出している。すなわち、米国では、天然、合成に関わらず、リコペンは規定された条件下で食品加工及び食品用途にその使用が認められている。一方、EUでは、着色料E160d LYCOPENEとして(i) SYNTHETIC LYCOPENE, (ii) LYCOPENE FROM RED TOMATOES, (iii) LYCOPENE FROM *BLAKESLEA TRISPORA*, が登録されている⁵⁾。更に、JECFAには、LYCOPENE (SYNTHETIC)(用途：着色料・栄養補助食品), LYCOPENE EXTRACT FROM TOMATO (着色料), LYCOPENE FROM *BLAKESLEA TRISPORA*(着色料)があり⁶⁾、いずれもHPLCを用いた定量法を規定している。2009年にグループADIを特定しない(not specified)と定められている。

我が国では、前述したとおり、既存添加物「トマト色素」のみが使用できるとされており、海外で使用が許可されているトマト由来以外の合成および発酵法によって製造されるリコペンは現在わが国では食品添加物として使用できないが、輸入食品に入っている可能性は否定できない状況にある。

トマト色素の成分規格試験法を比較すると、海外ではリコペンの定量法としてHPLCを用いた方法を採用しているが、我が国(食品添加物公定書¹⁾)では、定量法の代わりに色価測定法を採用している。色価は同一の着色料において、色素濃度を相対的に評価する値であり、すなわち、同じ色価であっても、副色素成分と主色素成分を合算して相対値として求められるため、主色素成分の濃度が求められるものではない。したがって、品質と安全性をより確保するためには、主色素成分を特異的に検出でき、その濃度を正確に求めることができる方法への改正が必要

と考えられる。しかし、一般的なHPLCを用いた定量法では、主色素成分の定量用標準品が必要であるが、リコペンは安定性が悪いため純度既知の定量用標準品が流通しておらず、正確な濃度の検量線を作ることが困難である。

このため、本研究では、相対モル感度係数(RMS: relative molar sensitivity), または重量ベースに換算した相対感度係数(RRF: relative response factor)を利用したリコペンの定量法を検討することとした。本法は、定量用標準品を用いて絶対検量線を作成せずに、測定対象物質とは別の安価な標準物質と測定対象物質のRMSまたはRRFを利用することによって、すなわち、測定対象物質と同一の定量用標準品を必要とせずに正確な定量値を簡便且つ迅速に求める方法である。トマト色素に本法が適用可能かどうか、また、その定量精度が吸光度法や絶対検量線法と比較して妥当かどうか検証したので報告する。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

リコペン、スダンI (Fig. 1)は、現時点では共に純度既知の標準品の流通が確認できなかったため、該当する試薬を¹H qNMRで値付けして用いた。なお、試薬リコペンは分解しやすいため、吸光度測定やLC絶対検量線作成に必要な標準液を調製する際には、¹H qNMRによりリコペンの絶対純度をその都度確認して用いた。本研究で使用した試薬を以下に示す。

・リコペン(lycopene): Wako, 生化学用, 125-04341, Lot.SAN4711 と LKP4227, -80°C保管。

なお、*trans/cis* の記載はないが、CAS No.が[502-65-8]と記載されていることから、*all-trans* 体と推定されるものを用いた。

・スダンI (sudan I, 1-Phenylazo-2-naphthol): TCI, P0585, Lot.GM01, 室温保管。LC定量用内標準物質として用いた。

・1,4-BTMSB-*d*₄(1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-*d*₄): Wako, TraceSure(R), 024-17031, Lot.ECG4815, 99.9%。 ¹H qNMR用基準物質として用いた。

・4-ヒドロキシ-3-*tert*-ブチルアニソール(4-hydroxy-3-*tert*-butylanisole, BHA): TCI, EP,

B0723, Lot.7GRAI-GQ. リコペンの分解を抑えるために酸化防止剤として用いた.

・重ベンゼン(C₆D₆): ISOTEC, 151815, Lot.MKBF9301.

・アセトニトリル(CH₃CN): Sigma-Aldrich, HPLC用, 34888.

・エタノール(99.5)(エタノール, EtOH): Wako, HPLC用, 056-03341.

・*n*-ヘキサン(ヘキサン): Wako, 特級, 085-00416. その他の試薬はすべて市販特級品を用いた.

国内流通の既存添加物トマト色素製品 6 試料を Table 1 に示す. 日本添加物協会を通じて入手し, 当部において試料保管しているものを用いた.

B-2) 装置及び測定条件

吸光度, ¹H qNMR, LC 定量分析データの取得に用いた装置・条件を Table 2~4 に示す.

B-3) トマト色素製品の色価測定とリコペンの吸光係数測定

第 8 版食品添加物公定書¹⁾のトマト色素の色価測定法の記載「試料をアセトン/シクロヘキサン混液に溶解したのちヘキサンで 200 倍以上に希釈して吸光度(0.3~0.7 の範囲内)を測定する」に準じたが一部操作手順を変更した.

トマト色素製品試料 W mg を精密に量りとり, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)を加え, 超音波処理(2 分以内)を行い溶解させた後, 25 mL (V)に定容した. その 1.0 mL を量りとり, ヘキサンで 20 mL に定容した. さらにこの液 1.0 mL を分注し, ヘキサンで 10 mL に定容し(F = 20×10), 色価測定用検液とした(調製 n = 3). Table 2 の条件下, ヘキサンを対照液として波長 465 ~ 475 nm の極大吸収部(λ_{max})における吸光度 (Abs)を測定し, 以下の式により, 色価(E^{10%}_{1cm})を求めた. ただし, トマト色素製品試料 A1207 のみ, アセトン/シクロヘキサン混液に液滴となってほとんど溶解しなかったため, 調製法を変更せずに, 元の公定書記載の通りにした. すなわち, 試料を 100 mL メスフラスコに量りとり, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)を 25 mL 加えたのち, ヘキサンで 100 mL (V)に定容

し, 更にヘキサンで 50 倍希釈(F = 50)したものを色価測定用検液とした.

$$\text{色価}(E_{1\text{cm}}^{10\%}) = \frac{\text{Abs} \times V \times F \times 100}{W}$$

Abs: 検液の吸光度, V: 定容量(mL), F: 希釈率, W: トマト色素採取量(mg)

リコペンの吸光係数(E^{1%}_{1cm,ヘキサン})測定も同様に, 第 8 版食品添加物公定書¹⁾のトマト色素の色価測定法の記載に準じた. 200 mL メスフラスコに, 試薬リコペン 2 mg (W_L)を精密に量りとり, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)10 mL に溶解したのち, ヘキサンで 200 mL (V)に定容した. この液 1.0 mL を分注し, ヘキサンで 10 mL に定容(F = 10)したものを吸光係数測定用検液とした(調製 n = 3). Table 2 の条件下, ヘキサンを対照液として波長 465 ~ 475 nm の極大吸収部(λ_{max})における吸光度(Abs)を測定し, 以下の式により, 吸光係数(E^{1%}_{1cm})を求めた. なお, 試薬リコペン採取量は, II. 5) の操作で求める調製時の試薬の絶対純度(P_L)を用いて絶対量に換算し(リコペン以外の成分は λ_{max} に吸収がないと仮定して), リコペンの吸光係数を計算した.

$$\text{吸光係数}(E_{1\text{cm}}^{1\%}) = \frac{\text{Abs} \times V \times F \times 10}{W_L \times \frac{P_L}{100}}$$

Abs, 検液の吸光度; V, 定容量(mL); F, 希釈率; W_L, 試薬リコペン採取量(mg); P_L, ¹H qNMR により求めた調製時のリコペン純度(%).

色価とリコペンの吸光係数から, 製品試料中のリコペン含有量を求めた.

$$\text{リコペン含有量}(\%) =$$

$$\frac{\text{色価}(E^{10\%})}{10 \times \text{リコペンの吸光係数}(E^{1\%})} \times 100$$

B-3) リコペン及びスダン I の純度算出

リコペン 2 mg, スダン I 4 mg, BHA 5 mg, 1,4-BTMSB-d₄ 1 mg を精密に量りとり, C₆D₆ 2.0

mLに溶解したものをqNMR用試料液とした(調製 n=3). この溶液 0.6 mL を 5 mm φ NMR 試料管に移し, Table 3 の条件の ^1H qNMR に付した. なお, 残りの qNMR 用試料液は, B-4) に示す操作で希釈し, LC 定量用標準液とした.

qNMR 用解析ソフト Alice を用い, ^1H qNMR 用基準物質 1,4-BTMSB- d_4 のシグナル(18H, 0 ppm)を基準とし, リコペンの 2 位(2H, 4.99 ppm), スダン I の 8 位(1H, 8.45 ppm)シグナルの積分比から純度を算出した.

B-4) リコペン及びスダン I の絶対検量線の作成, 並びに相対モル感度係数(RMS)の確認

B-3) で調製した qNMR 用試料液のうち, ^1H qNMR 測定に用いなかった残液 0.5 mL を量りとり, 0.5w/v% BHA 含有 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{EtOH}$ (1:1) 溶液(以下, BHA 含有希釈液と略す)で 50 mL に定容し, リコペン 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液とした. この液 2.5 mL をとり, BHA 含有希釈液で 10 mL に定容し, リコペン 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液とした. この液 3.0 mL に BHA 含有希釈液 3.0 mL 加え, リコペン 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準液とした. 以下, 順次 2 倍希釈を行い, リコペン 0.625, 0.313, 0.156, 0.078 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準液を調製した. 0.078~2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 6 濃度の標準液を Table 4 の条件の HPLC に付し, 波長 475 nm (± 4 nm), smoothing (± 3 scans $\times 2$ 回)のクロマトグラムを積分し, リコペンとスダン I のピーク面積を求めた. ^1H qNMR により得られた調製時の純度からリコペンとスダン I の正確なモル濃度を算出し, 原点を通る絶対検量線(x 軸=モル濃度, y 軸=ピーク面積)をそれぞれ作成した. なお, 絶対検量線の作成は, 異なる日に 3 回(各調製 n=3)行い, 絶対検量線の(リコペンの傾き) \div (スダン I の傾き)から相対モル感度係数(RMS)を求めた.

B-5) トマト色素製品中のリコペンの定量

スダン I 2 mg を精密に量り取り(W_s), BHA 含有希釈液を加え 50 mL に定容した. この液 4.33 mL を分注し, BHA 含有希釈液で 100 mL に定容し, 定量用内標準液とした. なお, 定量用内標準液中のスダン I の絶対濃度は, ^1H qNMR により得られた絶対純度で調製濃度を補

正して求めた(スダン I 調製濃度 1.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 絶対濃度 1.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (純度補正後の値)).

トマト色素製品 W mg を精秤し, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)で 25 mL (V)に定容した(B-3) 色価測定用に調製したものを使用). この液 0.4 mL を正確に量り, BHA 含有希釈液で 20 mL に定容し, 試料液とした. 試料液 1.0 mL と, 定量用内標準液 4.0 mL を混合し($F = 20/0.4 \times 5$), LC 定量用検液とした. Table 4 の条件下, LC 定量用検液を HPLC に付し, 波長 475 nm (± 4 nm), smoothing (± 3 scans $\times 2$ 回)のクロマトグラムを積分し, リコペンとスダン I のピーク面積を求めた. 以下の式により, 検液中のスダン I のモル濃度からリコペンのモル濃度を求め, さらに, 採取量 \cdot 希釈率 \cdot 分子量からトマト色素中のリコペン含有量(%)を計算した.

ただし, トマト色素製品試料 A1207 のみ, アセトン/シクロヘキサン混液に液滴となつてほとんど溶解しなかったため, 調製法を変更した. 試料を 100 mL メスフラスコに採取し, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)を 25 mL 加えたのち, BHA 含有希釈液で 100 mL (V)に定容し, この液 1.6 mL をとり BHA 含有希釈液で 20 mL に定容したものを試料液とした. 試料液 1.0 mL と, 定量用内標準液 4.0 mL を混合し($F = 20/1.6 \times 5$), LC 定量用検液とした.

検液中のスダン I ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$) のモル濃度

$$C_s(\text{m_mol}/\text{mL}) = \frac{W_s}{50} \times \frac{P_s}{100} \times \frac{1}{M_s} \times \frac{4.33}{100} \times \frac{4}{5}$$

W_s , スダン I 採取量(mg); P_s , ^1H qNMR により求めたスダン I 純度(%); M_s , スダン I 分子量 (248.285).

検液中のリコペン ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) のモル濃度

$$C_L(\text{m_mol}/\text{mL}) = \frac{\frac{A_L}{A_s} \times C_s}{\text{RMS}}$$

A_L , リコペンのピーク面積; A_s , スダン I のピーク面積; C_s , 検液中のスダン I のモル濃度 ($\text{m_mol}/\text{mL}$); RMS, 相対モル感度係数.

試料中のリコペン(C₄₀H₅₆)の含有量(%) =

$$\frac{C_L \times M_L \times V \times F \times 100}{W}$$

C_L, 検液中のリコペンのモル濃度(mol/mL);
M_L, リコペン分子量(536.888); V, 定容量(mL); F,
希釈率; W, トマト色素採取量(mg).

C. 結果及び考察

C-1) トマト色素製品の色価測定とリコペンの吸光係数測定

第8版食品添加物公定書¹⁾記載のトマト色素の色価測定法では、『本品を精密に量り、アセトン/シクロヘキサン混液(1:1) 25 mLを加えて溶かし、ヘキサンを加えて正確に100 mLとする。その2 mLを正確に量り、ヘキサンを加えて正確に100 mLとし、必要があれば遠心分離し、その上澄液を検液とする。色価測定法により次の操作条件で試験を行う。操作条件: 測定溶媒 ヘキサン, 測定波長 波長 465~475 nmの極大吸収部』と規定されており、また、その吸光度が0.3~0.7の範囲になるよう調製する必要がある。すなわち、色価30000の試料の場合、5 mg採取して調製するとその吸光度が0.3、11.7mg採取で吸光度が0.7ということになる。さらに、記載の通りの溶媒組成で測定するためには(検液中のアセトン/シクロヘキサン混液の割合を測定溶媒であるヘキサンの1/200以下)、試料を5~11.7 mg採取して、アセトン/シクロヘキサン混液25 mLに完全に溶解させなくてはならない。しかしながら、トマト色素はアセトン/シクロヘキサン混液にはあまり溶解性が高くないという問題がある。

このことから、予試験として吸光度測定用の検液の調製を記載に従って行った。その結果、アセトン/シクロヘキサン混液25 mLで溶解したように見え、ヘキサンで100 mLに定容した液も透明で均一に溶けているように見えたが、一晩放置すると赤褐色の細かい沈殿が生じることが確認された。したがって、試料が完全に溶けているわけではなく、測定溶媒中で細かい粒子となって分散しているだけと考えられた。実際に、この液を50倍希釈して吸光度を測定したとき、想定される吸光度よりも低い値を示し、

そのばらつきも大きく生じたことから、均一に溶解しておらず、分散した液であることが示唆された。すなわち、記載の操作通りに、アセトン/シクロヘキサン混液で溶解した後、ヘキサンで4倍希釈した場合、試料が析出するかもしれないかの上限の濃度になっている可能性が高いと考えられた。この予試験の結果より、本試験では25 mLのアセトン/シクロヘキサン混液で定容した後、ヘキサンで20倍に希釈することとした。この調製法では、一日放置後でも沈殿は生じないが、多めの採取量の場合(吸光度が0.4くらい)、色価が想定よりやや低下する傾向にあった。吸光度測定用の検液の調製において、試料を最初に溶解させるアセトン/シクロヘキサン混液は溶解力が弱く、クロロホルム、ベンゼン、ジクロロメタン等の溶解力が強いものが望ましいが、これらは有害溶媒であることから、公定法に採用するには抵抗があると考えられた。

そこで、今回は、吸光度の下限0.3付近になるように検液を調製することにした(リコペン含量として1 µg/mL程度)。但し、実験の項で示したとおり、今回試料として用いた製品の内、A1207は揮発性が高く、ひょう量が困難であったため、他の試料とは異なりバイアル瓶に密封してセミマイクロ天秤でその重量を測定した。さらに、A1207は、アセトン/シクロヘキサン混液、クロロホルムにも溶けず、水に分散する水分散型リコペンと考えられる製品であり、ヘキサンで100 mLに定容すると、分離は解消されて懸濁したため、公定書の通りに検液を調製した。

トマト色素製品のUV/VisスペクトルをFig. 2に、λ_{max}と吸光度、求められた色価をTable 5-1に示す。260 nm付近のブロードな吸収は、アセトン/シクロヘキサン由来であり、製品の極大吸収部(λ_{max})は470.6~470.9 nmであった。トマト色素の成分規格に記載の色価測定条件「測定溶媒 ヘキサン, 測定波長 波長 465~475 nmの極大吸収部(λ_{max})」に従い、それぞれのλ_{max}において色価を求めたところ、粉末製品試料(A1201, A1205, A1208)の色価は22000~27000、液状製品試料(A1155, A1206, A1207)の色価は

700~2400 であった。食品添加物公定書¹⁾のトマト色素の成分規格には、「本品の色価($E^{10\%}_{1cm}$)は300以上で、その表示量の95~115%を含む。」と記載されている。今回使用した6製品試料は、色価300以上であり、色価表示された製品はA1205とA1206の2製品だけであったが、いずれも95~115%を満たしていた。

次に、Table 5-2 に色価の測定波長を470 nmに固定し、色価を求めた結果を示したが、 λ_{max} で求めた色価と殆ど同じ結果となったことから、465~475nmの極大吸収部(λ_{max})を指定しなくても、470 nm固定で再現良く色価が求められると考えられた。

Table 6 に報告されているリコペンの λ_{max} 、吸光係数、測定溶媒を示したが、リコペンは測定溶媒が異なると吸光係数が若干異なり、さらに *cis* 体の λ_{max} は *all-trans* 体に比べ短波長へシフトし、吸光係数も小さくなる傾向がみられる。また、リコペンの吸光係数($E^{1\%}$)は、測定溶媒及び報告によって異なるが *all-trans* 体で3000~3500と推定される。そこで、リコペンの吸光係数($E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}$)測定は、8版公定書¹⁾のトマト色素の色価測定法に準じるとし、リコペンの吸光係数が3000、採取量が2 mgと仮定すると、検液中のアセトン/シクロヘキサン混液(1:1)の割合を1/200以下にするためには、アセトン/シクロヘキサン混液(1:1) 10 mLに溶かし、その後ヘキサンで200倍希釈しないと吸光度が0.3を越えない計算となる。アセトン/シクロヘキサン混液10 mLで洗い込んでの定容は少量のため困難であること、ヘキサンでの低倍率の希釈の際に不溶化する可能性もあることから、B-3)に示したように、200 mLメスフラスコに精秤した試薬リコペン(2 mg)を、アセトン/シクロヘキサン混液(1:1) 10 mLで洗い込んで溶解した後、さらにヘキサンで洗い込んで200 mLに定容し、この液を10倍希釈して検液とすることにした。

試薬リコペン採取量を調製時のqNMR純度90.60%で補正した後にリコペンの吸光係数($E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}$)を求めたところ、 λ_{max} は471 nm、吸光係数は 3369 ± 31 (調製 $n=3$, 各2回測定, AV \pm SD)となった(Table 7-1)。また、測定波長470

nmで求めた吸光係数は、 3359 ± 31 (調製 $n=3$, 各2回測定, AV \pm SD)となった(Table 7-2)。今回実測した吸光係数 $E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}=3369$ と、JECFAで採用されている3450の値から、製品中のリコペン含有量(%)を求めた結果をTable 5-1に示したが、製品によってその含量は異なり2~80%であった。なお、Table 5-2には測定波長470 nmで求めた吸光係数の実測値 $E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}=3359$ から求めた製品中のリコペン含有量(%)の結果も示したが、 λ_{max} における計算結果とほとんど変わらず、2~80%であった。

JECFAにおいてリコペンのChemical namesには、*all-trans*-lycopeneと書かれており、*all-trans*とtotal lycopeneの含量を規定している⁶⁾。一方、米国21 CFR 73.585の定量法には、「Qualitative Analysis of Lycopene, Its Isomers・・・」と記載があり³⁾、異性体を区別して定量すると思われる。化学合成由来のリコペンは*all-trans*体>70%、5-*cis*体(20%以内)の組成であるためであると考えられるが、我が国で使用が認められているものは天然のトマト由来のトマト色素のみであることから、現在の色価による含量規定で概ね問題ないと考えられた。

C-2) リコペン及びスダン I の純度算出

相対モル感度係数(RMS)または相対感度係数(RRF)に利用する定量用内標準物質の条件として、安価、高純度、純度既知、安定、入手しやすい、測定対象と物理的特性、極性、極大吸収波長が近く、また、試料そのものに含まれず、LCで夾雑物及び測定対象と分離する、などが挙げられる。スダン I~IVは親油性アゾ化合物であり、発がん性が疑われるため、ほとんどの国で食品への使用は認められていないが、プラスチックや合成材料の着色に使用する工業用染料として広く使用されている。このうち、スダン Iは測定対象であるリコペンの物理的特性に類似しており、前述の条件にほぼ合致する化合物であったため、これをRMSによる定量用内標準物質として用いることとした。

RMSまたはRRFを決定するためには、両物質の精確な濃度が既知である必要がある。安定で純度既知の標準品が存在するなら、両物質の

調製時の濃度で LC 絶対検量線を作成し、その傾きから RMS または RRF を求めることが可能であるが、現段階ではスタン I、リコペンともに純度既知の標準品は販売されていない。さらにリコペンは非常に不安定であるため、調製中の分解や保存中の濃度低下が懸念される。このため、両物質を混合した液を調製し、 ^1H qNMR により混合液中の精確なモル濃度を直ちに求め、その後混合液を希釈して LC に付し、両物質の絶対検量線を作成して RMS を決定する手順をとった。なお、混合液に BHA(酸化防止剤)を添加することで、qNMR 試料液及び LC 定量用標準液中のリコペンの濃度は約 24 h 安定であった。

試薬リコペン、スタン I、BHA、1,4-BTMSB- d_4 (^1H qNMR 用基準物質)を C_6D_6 に溶解し、Table 3 の条件で qNMR を測定した。リコペンの 2 位 (4.99 ppm, 2H, t, $J=6.9$ Hz)、スタン I の 8 位 (8.45 ppm, 1H, d, $J=8.1$ Hz) が他シグナルとの分離が良好なため定量シグナルとした (Fig. 3)。また、予実験において、 ^1H qNMR 測定に 600 MHz NMR (UltraCOOL probe) を用いていたが、シグナルを比較すると Fig. 4 に示す通り、1,4-BTMSB- d_4 、リコペン 2 位シグナルは問題ないが、800 MHz NMR では、スタン I の 8 位シグナルの左裾に不純物が観察された。計 5 回の調製日 (各調製 $n=3$) で、スタン I の純度はほとんど変化しなかったが、リコペンの純度は試薬のロット、開封/未開封により異なった (90~94%) (Table 8)。スタン I は室温保管においても安定であるため、平均値を純度として用いても問題ないと判断され、不純物を差し引いてスタン I の純度を求めた場合は、 $93.17 \pm 0.31\%$ 、不純物込みの場合は $94.39 \pm 0.63\%$ となり、本実験における試薬スタン I の純度には平均値の 93.17% を用いた。一方、リコペンは -80°C で保管しているが、室温にして開封する度に異性化や酸化が起こり、純度が低下すると考えられ、リコペン濃度は、用事測定した ($n=3$ 平均) 値を絶対純度とすることにした。

C-3) 相対モル感度係数(RMS)の算出

Response factor (RF, 感度係数, 応答係数)と

は、分析物の濃度とその物質に対する検出器の応答との間の比として定義される。クロマトグラム上には検出器からの応答がピークとして表示されるので、そのピークを定量化する方法のひとつが積分(面積)であり、

$$\text{RF} = \text{ピーク面積} / \text{濃度}$$

で表される。次に、それぞれの物質について計算された RF を使用して、2 つの物質 (A と B) 間の relative response factor (RRF, 相対感度係数) を求める。

$$\text{RRF} = \text{RF}(A) / \text{RF}(B)$$

ここで、濃度を mol の単位で表示したものが relative molar sensitivity (RMS, 相対モル感度係数) であり、 $\text{RMS} = \text{RRF} \times \text{分子量}(A) / \text{分子量}(B)$ と換算される。RMS は、以下の式を使用して既知濃度 (mol) の分析物 B の存在下で、分析物 A の未知の濃度 (mol) を計算するために使用することができる。

$$\text{濃度 A (mol)} = \text{ピーク面積 A} / \text{ピーク面積 B} / \text{RMS} \times \text{濃度 B (mol)}$$

分析物の標準品が入手困難、高価、分解しやすいなどの場合は、RMS を用いた定量が有効である。

qNMR 用に調製した試料液を希釈して作成したリコペン $0.078 \sim 2.5 \mu\text{g/mL}$ の 6 濃度 (薄い濃度から LV1~LV6) の標準液を、Table 4 の条件で HPLC 測定を行った。スタン I は保持時間 4.7 分、リコペンは 13.2 分に観察され、LC クロマトグラム上での 2 成分の分離は良好であった (Fig. 5)。極大吸収波長は、リコペンが 473 nm、スタン I が 476 nm 付近にブロードな吸収を示したため、本測定における検出波長を 475 nm とした。

それぞれのピークを積分するにあたり、クロマトグラムの抽出幅 ($475 \pm \text{○}$ nm)、スムージングあり/なしの影響を確認した。LC の測定条件は Table 4 と同じ条件を用い、標準液 (調製 No:

std4, Table 8 参照)のデータについて、抽出幅とスムージングを変えて、リコペン/スダン I の面積比を計算した(Fig. 6). 散布図は、調製 n=3 回分のそれぞれの面積比をプロットしたものである(ただし、調製時のリコペンとスダン I の秤量値が異なるので、面積比は変わる). この結果、高濃度標準液(LV3~6)では波長抽出幅やスムージングによる影響は小さく、一方、低濃度標準液(LV1~2)では、波長抽出幅やスムージングによる面積比のばらつきが大きくなることが確認された.

次に、クロマトグラムの描画を波長 475 nm (± 4 nm), smoothing (± 3 scans $\times 2$ 回)とし、リコペンとスダン I のピーク面積を求め、それぞれ絶対検量線(x 軸=モル濃度, y 軸=ピーク面積)を作成した. 検量線の作成は日を変えて計 3 回(調製 No: std3~std5, 各調製 n=3)行った. 絶対検量線の作成に用いた標準液中の濃度は、別に ^1H qNMR により求めた調製時の化合物の純度により補正し、リコペンとスダン I の正確なモル濃度($m_{\text{mol/mL}}$)を用いた. 検量線は、原点を通す/通さない、計算に使用する濃度範囲を LV0~LV6/LV0~LV5 (blank =LV0)の 4 パターンで作成し(Fig. 7), RMS を求めた(Table 9). 参考として波長 475 nm (± 0.6 nm)スムージングなしのクロマトグラムから同様に計算した値を示した.

得られた RMS 及びリコペンの絶対検量線から、それぞれ残差%=(定量値-調製値)/調製値 $\times 100$)を求め、横軸にリコペン絶対濃度、縦軸に残差%をプロットした(Fig. 8). その結果、RMS の計算に用いたデータがばらついているためか、RMS 及び絶対検量線から算出された残差%に大きな差はなく、また、濃度 LV6 でも LV5 までの絶対検量線でもほとんど同じであった. 残差が 10%以内の濃度を範囲を直線性があるのみなし、RMS 及び検量線の適用範囲としたとき、その適用濃度範囲は LV3~LV5 または LV4~LV6 が適当と考えられた.

最終的に、波長 475 nm (± 4 nm), smoothing (± 3 scans $\times 2$ 回)のクロマトグラムを積分し、LV0~LV5 までの原点を通る直線の傾きから、相対モル感度係数 $\text{RMS} = 9.857$ [mol/mol] と決定し、

その適用範囲は LV3~LV5, すなわちリコペンの絶対濃度 $0.31 \sim 1.2 \mu\text{g/mL}$ ($0.57 \times 10^{-6} \sim 2.3 \times 10^{-6}$ mmol/mL), スダン I 絶対濃度 $0.57 \sim 2.3 \mu\text{g/mL}$ ($2.3 \times 10^{-6} \sim 9.3 \times 10^{-6}$ mmol/mL)とした.

なお、参考 4 に波長 475 nm (± 4 nm), smoothing (± 3 scans $\times 2$ 回)のクロマトグラムを積分して求めた $\text{RMS} = 9.857$ に、475 nm (± 0.6 nm), スムージングなしで処理した面積を使って定量した場合の残差%のグラフを示したが、低濃度ではばらつきが大きいものの、適用濃度範囲 (LV3~LV5) ではほとんど影響ないことが確認され、仮に解析ソフトによるクロマトグラム処理に違いがあったとしても大きな影響はでないと考えられる.

C-4) トマト色素製品中のリコペンの定量

試料からのリコペンの抽出、溶解にはクロロホルムが適しているが、公的な試験法として今後採用することを考えたとき、有害溶媒であるクロロホルムの使用は極力避けたい. そこで、トマト色素の色価測定法にならいうアセトン/シクロヘキサン混液(1:1)で溶解することとした. すなわち、II. 7) の調製法に記した通り、トマト色素製品をアセトン/シクロヘキサン混液(1:1)で 25 mL (V)に定容し(色価測定用に調製したものを使用)、この液 0.4 mL を正確に量り、BHA 含有希釈液で 20 mL に定容し、試料液とした. この試料液 1.0 mL とスダン I の定量用内標準液 4.0 mL を混合し LC 定量用検液とし、LC 測定した(Fig. 9, Fig. 10). Table 4 の条件下、LC 定量用検液を HPLC に付したところ、試薬リコペンと同一の保持時間及び UV/Vis スペクトルをもつピークが観察され、また、測定時間の範囲内にはリコペン以外の目立ったピークはないことが確認された.

リコペンとスダン I のピーク面積を求め、C-3) で得た相対モル感度係数($\text{RMS} = 9.857$), 及び添加したスダン I の絶対濃度を用いて、製品中のリコペン含有量を計算した(Table 10). 粉末試料では 69~81%, 液状試料で 2~7%だった. リコペンの絶対検量線($Y = 2.1190\text{E}+10 * X$, LV0~LV5, 原点通す)から求めた含有量と比較したところ、ほぼ同等の値が得られ、RMS と絶対検量

線の定量値の残差% $(= (\text{RMS 定量値} - \text{検量線定量値}) / \text{検量線定量値} \times 100)$ は4%以内であることが確認された。

以上のことから、RMSを利用したHPLCによるリコペンの定量法が色価測定法に代わる分析法として機能すると判断できる結果となった。

D. 結論

現在、食品添加物公定書には、既存添加物「トマト色素」の定量法として色価測定法が適用されているが、HPLCを今後導入していくにあたり、主色素成分であるリコペンの定量用標準品を必要としない方法を検討した。比較のためトマト色素製品の色価とリコペンの吸光係数を測定し、製品中のリコペン含有量を求めた。

色価測定法では、副色素成分及び不純物を分離せずに測定するため、後述するHPLCによる主色素成分の定量値より大きくなるはずであるが、今回検体として使用したトマト色素製品では、含有量の小さい液体製品でのみ、若干高めの定量値が算出されただけで、高含有量の粉末製品では、ほとんど同じ値を示した。

次に、スタンIに対するリコペンのRMSを検証し、RMSによる方法と絶対検量線法でリコペンを定量し、得られた値を比較した。その結果、RMS法による定量値と絶対検量線法による定量値はほぼ等しい値が得られたことから、色価測定法に代わる定量法としてRMSによる方法は有効であると考えられた。

現在、リコペンとスタンIのSIトレーサブルな標準品は市販されていない。スタンIは安価で安定な物質であるため、 ^1H qNMRを応用することによって、定量用標準品として供給可能であると考えられる。一方、リコペンは市販試薬として入手可能であるが、安定性が低く非常に高価であり、酸化・光分解により純度が低下するため、純度既知の定量用標準品を供給することは今後も不可能であると考えられる。したがって、今後、安価なスタンIの定量用標準品が供給されれば、RMSによる方法がトマト色素の定量法に適用でき、高価で不安定なリコペンについては定性用標準品の供給のみで純度既知の定量用

標準品の供給は必要ないこととなる。

ただし、今後、海外からの輸入品との成分規格の整合性を視野に入れると、トマト色素の色素成分としてall-trans-リコペンのみを測定対象とするのか、cis-リコペンも合算して測定対象として成分規格を設定するのか、実態調査を行い継続して検討する必要がある。

E. 参考文献

- 1) 第8版食品添加物公定書，厚生労働省(2007).
- 2) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書，日本添加物協会(1999).
- 3) http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=873a0cbdfb349e30b8bfc587638219af&mc=true&node=se21.1.73_1585&rgn=div8
- 4) http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=lycopene
- 5) <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2012:083:FULL&from=EN>
- 6) http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph7/additive-496-m7.pdf
- 7) http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph7/additive-517-m7.pdf
- 8) http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph7/additive-497-m7.pdf

F. 研究業績

1. 学会発表

- 1) 石附京子，西崎雄三，多田敦子，箕川剛，中島光一，大槻崇，穂山浩，杉本直樹，佐藤恭子：既存添加物クチナシ青色素の色素生成メカニズムの解明：青色素の推定構造. 食品化学学会(2017.6).
- 2) 杉本直樹，西崎雄三，佐藤(増本)直子，村島健司，北牧祐子，沼田雅彦，井原俊英，佐藤恭子：カワラヨモギ抽出物の成分規格試験法の検討：抗菌成分カピリンの定量法. 食品化学学会(2017.6).

- 3) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMRおよびHPLCによる機能性関与成分ルテインの定量. 食品化学学会(2017.6).
- 4) 箕川剛, 中島光一, 武川泰哲, 西崎雄三, 杉本直樹: オービトラップLC/MSのAIF測定による既存添加物スピルリナ青色素中の総ミクロシスチン定量法の検討. 食品化学学会(2017.6).
- 5) 北牧祐子, 斎藤直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英: ガスクロマトグラフィーの新たな展開 -定量NMRから求めたモル比を用いる一対多型の定量法の紹介-. 日本分析化学会シンポジウム(2017.9).
- 6) 杉本直樹: 定量NMRの公的な分析法への適用とその応用, NMRによる新しい定量技術~その基礎と食品, 化学品分析への応用, 第64回日本食品科学工学会シンポジウムB3 (2017.8).
- 7) 杉本直樹: qNMR/Chromatographyの開発と規格試験への応用. 日本分析化学会第66年会シンポジウム2 (2017.9).
- 8) Kuroe M, Yamazaki T, Saito N, Numata M, Ihara T, Nishizaki Y, Sugimoto N: Determination of a non-ionic surfactant without its own calibration standard by qNMR/chromatography. Asian Conference on Oleo Science 2017 (ACOS2017) (2017.9).
- 9) Sugimoto N, Nishizaki Y, Ishizuki K, Suematsu T, Miura T, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sato K: Determination of relative molar sensitivity (RMS) by combination of qNMR and chromatography: Application of RMS for quantification of lycopene in tomato colorant. 131st AOAC Annual Meeting (2017.9).
- 10) Sugimoto, N: qNMR in Japan's Specification and standards for food additives. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
- 11) Sugimoto, N: Overview of the Introductory Meeting on qNMR. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
- 12) 森美保菜, 寺倉理央奈, 間瀬貴巳, 藤原裕未, 永津 明人, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量NMR(¹H-qNMR)を応用した生薬コウカ中のcarthaminの定量. 日本薬学会第138回年会(2018.3).
- 13) 合田幸広, 小出達夫, 細江潤子, 内山奈穂子, 杉本直樹, 近藤加奈子, 村林美香, 藤谷敏彦, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 岡本寿美子, 大藤克也, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 小幡泰子, 山田裕子, 鈴木裕樹, 三浦亨, 水井浩司, 末松孝子, 朝倉克夫: 日本薬局方化学薬品を対象としたqNMRとマスバランス法の比較とqNMRの経済的利点. 日本薬学会第138回年会(2018.3).
- 14) 杉本直樹: 天然由来の食品添加物の利用と規制. 一般シンポジウムS26 食品にかかわる天然成分の安全性とその活用. 日本薬学会第138回年会(2018.3).

2. 論文発表

- 1) Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N: Kinetic Study of the Equilibration between Carminic Acid and Its Two Isomers Isolated from Cochineal Dye. Chem. Pharm. Bull., **2017**; *65*, 306-310.
- 2) 島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈弘, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩, 受田浩之: 既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の関係. 日食化誌, **2017**; *24*, 10-15.
- 3) Yoshimura M, Ochi K, Sekiya H, Tamai E, Maki J, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Amakura Y: Identification of Characteristic Phenolic Constituents in Mousouchiku Extract Used as Food Additives. Chem Pharm Bull., **2017**; *65*, 878-882 (2017).
- 4) Ito Y, Harikai N, Ishizuki K, Shinomiya K, Sugimoto N, Akiyama H: Spiroketalcarminic Acid, a Novel Minor Anthraquinone Pigment in Cochineal Extract Used in Food Additives. Chem. Pharm. Bull., **2017**; *65*, 883-887.
- 5) Kitamaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata M, Ihara T. Determination of PAHs in

Solution with a Single Reference Standard by a Combination of ^1H Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography. *Anal. Chem.*, **2017**; *89* (13), 6963–6968

- 6) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMR および HPLC による機能性表示食品中の機能性関与成分ルテインの定量. 日食化誌, **2017**; *24*(2),75-81.
- 7) 西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドゥ, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量 NMR に基づく相対モル感度を利用した加工食品中のヘスペリジンおよびモノグルコシルヘスペリジンの定量. 食衛誌, **2018**; *59*(1), 1-10 (2018).
- 8) Akiyama H, Nose M, Ohtsuki N, Hisaka S, Takiguchi H, Tada A, Sugimoto N, Fuchino H,

Inui T, Kawano N, Hayashi S, Hishida A, Kudo T, Sugiyama K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshimatsu K: Evaluation of the safety and efficacy of Glycyrrhiza uralensis root extracts produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems. *J. Nat. Med.*, **2017**; *71*, 265-271.

- 9) Tatebe C, Ohtsuki T, Fujita T, Nishiyama K, Itoh S, Sugimoto N, Kubota H, Tada A, Sato K, Akiyama, H: Determination of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in the Color Additive Food Red No. 106 (Sulforhodamine B) using High-Performance Liquid Chromatography. *Food Chem.* **2017**; *237*: 733-742.

G. 知的財産権の出願. 登録状況
なし

Table 1 トマト色素製品試料

試料番号	外観	色価表示値
A1155	溶けたチョコレート状の粘性のある流体	記載なし
A1201	褐色粉末	記載なし
A1205	湿り気のある褐色粉末	20.125
A1206	溶けたチョコレート状の粘性のある流体	2.466
A1207	赤色液体	記載なし
A1208	湿り気のある褐色粉末	記載なし

* なお、試料番号は当部における管理番号と共通である。

Table 2 吸光度測定条件

spectrophotometer	V-650 (JASCO)
wavelength range	200 ~ 700 nm, 1 nm interval
wavelength	maximum absorption wavelength of 465-475 nm
data scan	0.1 nm
cell	1-cm quartz cell
reference solvent	n-hexane

Table 3 ^1H qNMR 測定条件

NMR	ECA800 (JEOL), (^1H : 800 MHz)
probe	H/CN
spectral width	-5 ~ 15 ppm
data points	80,000 (resolution 0.25 Hz)
digital filter	on ($\times 13$)
flip angle	90 deg
repetition time	64 s ($\triangleright T_1 \times 5$)
sample spin	off
probe temp	room temp.
scan times	64

Table 4 LC 測定条件

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

Table 5-1 トマト色素製品の465~475nmの極大吸収波長(λ_{max})における色価($E^{10\%}_{1cm}$, ヘキサン)とリコペン含有量(%)

☆☆☆ 色価@ λ_{max}												リコペンの吸光係数から計算した含有量(%)	
	λ_{max} [nm]	Abs	採取量 W(mg)	定容 V(mL)	希釈率 F	単位換算 mg→g	色価 $E^{10\%}$	AVR	STDEV	CV%	JECFA $E^{1\%}=3450$	実測@ λ_{max} $E^{1\%}=3369$	
A1155-n1	470.6	0.330690	78.5650	25	200	1000	2105	2087	25	1.19	6.10	6.25	
A1155-n2	470.7	0.342348	83.1612	25	200	1000	2058				5.97	6.11	
A1155-n3	470.7	0.328226	78.2514	25	200	1000	2097				6.08	6.23	
A1201-n1	470.9	0.341956	6.3519	25	200	1000	26918	27026	128	0.47	78.02	79.90	
A1201-n2	470.9	0.301897	5.5922	25	200	1000	26993				78.24	80.12	
A1201-n3	470.9	0.348213	6.4088	25	200	1000	27167				78.74	80.64	
A1205-n1	470.9	0.493012	10.8550	25	200	1000	22709	22930	253	1.10	65.82	67.41	
A1205-n2	470.9	0.404907	8.7242	25	200	1000	23206				67.26	68.88	
A1205-n3	470.9	0.431267	9.4262	25	200	1000	22876				66.31	67.90	
A1206-n1	470.6	0.363574	76.0766	25	200	1000	2390	2380	9	0.36	6.93	7.09	
A1206-n2	470.6	0.347376	73.1241	25	200	1000	2375				6.88	7.05	
A1206-n3	470.6	0.358286	75.4481	25	200	1000	2374				6.88	7.05	
A1207-n2	470.9	0.430973	342.62	100	50	1000	629	699	61	8.69	1.82	1.87	
A1207-n3	470.9	0.344117	234.16	100	50	1000	735				2.13	2.18	
A1207-n4	470.9	0.350232	238.70	100	50	1000	734				2.13	2.18	
A1207-n5	470.8	0.298468	198.37	100	50	1000	752				2.18	2.23	
A1208-n1	470.9	0.382174	6.9338	25	200	1000	27559	27117	626	2.31	79.88	81.80	
A1208-n2	470.9	0.373756	7.0516	25	200	1000	26502				76.82	78.66	
A1208-n3	470.9	0.441900	8.4429	25	200	1000	26170				75.85	77.68	
A1208-n4	470.9	0.337592	6.1065	25	200	1000	27642				80.12	82.05	
A1208-n5	470.9	0.348742	6.3314	25	200	1000	27541				79.83	81.75	
A1208-n6	470.9	0.333958	6.1185	25	200	1000	27291				79.10	81.01	

Table 5-2 トマト色素製品の 470nm における色価($E^{10\%}_{1\text{cm,ヘキサ}}$)とリコペン含有量(%)

☆☆☆ 色価@470nm											リコペンの吸光係数から計算した含有量(%)	
	λ [nm]	Abs	採取量 W(mg)	定容 V(mL)	希釈率 F	単位換算 mg→g	色価 $E^{10\%}$	AVR	STDEV	CV%	JECFA $E^{1\%}=3450$	実測@ λ_{max} $E^{1\%}=3359$
A1155-n1	470.0	0.330204	78.5650	25	200	1000	2101	2084	25	1.19	6.09	6.26
A1155-n2	470.0	0.341851	83.1612	25	200	1000	2055				5.96	6.12
A1155-n3	470.0	0.327693	78.2514	25	200	1000	2094				6.07	6.23
A1201-n1	470.0	0.341033	6.3519	25	200	1000	26845	26956	128	0.47	77.81	79.92
A1201-n2	470.0	0.301158	5.5922	25	200	1000	26927				78.05	80.16
A1201-n3	470.0	0.347303	6.4088	25	200	1000	27096				78.54	80.67
A1205-n1	470.0	0.491724	10.8550	25	200	1000	22650	22870	253	1.11	65.65	67.43
A1205-n2	470.0	0.403875	8.7242	25	200	1000	23147				67.09	68.91
A1205-n3	470.0	0.430094	9.4262	25	200	1000	22814				66.13	67.92
A1206-n1	470.0	0.363178	76.0766	25	200	1000	2387	2377	9	0.37	6.92	7.11
A1206-n2	470.0	0.346966	73.1241	25	200	1000	2372				6.88	7.06
A1206-n3	470.0	0.357832	75.4481	25	200	1000	2371				6.87	7.06
A1207-n2	470.0	0.429888	342.62	100	50	1000	627	697	61	8.70	1.82	1.87
A1207-n3	470.0	0.343246	234.16	100	50	1000	733				2.12	2.18
A1207-n4	470.0	0.349445	238.70	100	50	1000	732				2.12	2.18
A1207-n5	470.0	0.297807	198.37	100	50	1000	751				2.18	2.23
A1208-n1	470.0	0.381051	6.9338	25	200	1000	27478	27040	630	2.33	79.65	81.80
A1208-n2	470.0	0.372570	7.0516	25	200	1000	26417				76.57	78.65
A1208-n3	470.0	0.440462	8.4429	25	200	1000	26085				75.61	77.66
A1208-n4	470.0	0.336694	6.1065	25	200	1000	27568				79.91	82.07
A1208-n5	470.0	0.347823	6.3314	25	200	1000	27468				79.62	81.77
A1208-n6	470.0	0.333111	6.1185	25	200	1000	27222				78.90	81.04

Table 6 リコペンの極大吸収波長と吸光係数($E^{1\%}$)の報告例

lycopene isomer	λ_{max} (nm)	solvent	ϵ	$E^{1\%}$	reference
all- <i>trans</i>	470	hexane/ $\text{C}_2\text{H}_2\text{C}_2$ (98:2)	1.87E+05	3483	
5- <i>cis</i>	470	hexane/ $\text{C}_2\text{H}_2\text{C}_2$ (98:2)	1.84E+05	3427	Helvetica Chimica Acta,
7- <i>cis</i>	469	hexane/ $\text{C}_2\text{H}_2\text{C}_2$ (98:2)	1.54E+05	2868	75 (6), 1848-1865 (1992)
15- <i>cis</i>	468	hexane/ $\text{C}_2\text{H}_2\text{C}_2$ (98:2)	1.10E+05	2049	
all- <i>trans</i>	471	hexane	1.82E+05	3390	J. Agric. Food Chem.,
all- <i>trans</i>	470	hexane/ $\text{C}_2\text{H}_2\text{C}_2$ (98:2)	1.87E+05	3483	62 (1), 264-269 (2014)
all- <i>trans</i>	471	hexane	1.82E+05	3390	
9- <i>cis</i>	465	hexane	1.64E+05	3055	Food Chem., 171, 323-329
13- <i>cis</i>	464	hexane	1.37E+05	2552	(2015)
all- <i>trans</i>	471	hexane		3450	J. AOAC International,
					93 (2), 499-509 (2010)
all- <i>trans</i>	472	petroleum ether		3450	The Merck index, 13th ed.
15,15'- <i>cis</i>	470	petroleum ether		1660	(2001)

Table 7-1 465～475 nm の極大吸収波長(λ_{max})におけるリコペンの吸光係数($E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}$)実測値

☆☆☆ リコペン吸光係数 $E^{1\%}$,ヘキサン@ λ_{max}												
	λ_{max} [nm]	Abs	採取量 W_L (mg)	試薬純度 P_L (%)	定容 V(mL)	希釈率 F	単位換算 mg→g	吸光係数 $E^{1\%}$	AVR	STDEV	CV%	
lycopene-n1	470.9	0.284164	1.8688	90.60	200	10	1000	3357	3369	31	0.93	
lycopene-n1	471.0	0.427926	1.8688	90.60	200	6.67	1000	3370				
lycopene-n2	470.9	0.312187	2.0169	90.60	200	10	1000	3417				
lycopene-n2	470.9	0.465071	2.0169	90.60	200	6.67	1000	3393				
lycopene-n3	470.8	0.319455	2.1070	90.60	200	10	1000	3347				
lycopene-n3	470.9	0.477003	2.1070	90.60	200	6.67	1000	3332				

Table 7-2 470 nm におけるリコペンの吸光係数($E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}$)実測値

☆☆☆ リコペン吸光係数 $E^{1\%}$,ヘキサン@470nm												
	λ [nm]	Abs	採取量 W_L (mg)	試薬純度 P_L (%)	定容 V(mL)	希釈率 F	単位換算 mg→g	吸光係数 $E^{1\%}$	AVR	STDEV	CV%	
lycopene-n1	470.0	0.283380	1.8688	90.60	200	10	1000	3347	3359	31	0.92	
lycopene-n1	470.0	0.426564	1.8688	90.60	200	6.67	1000	3359				
lycopene-n2	470.0	0.311288	2.0169	90.60	200	10	1000	3407				
lycopene-n2	470.0	0.463590	2.0169	90.60	200	6.67	1000	3383				
lycopene-n3	470.0	0.318614	2.1070	90.60	200	10	1000	3338				
lycopene-n3	470.0	0.475590	2.1070	90.60	200	6.67	1000	3322				

Table 8 リコペン, スダン I の 1H qNMR 純度測定結果

H 数	18	2	1	1				
Int. start [ppm]	0.100	5.092	8.539	8.539				
Int. end [ppm]	-0.100	4.880	8.351 (不純物除外)	8.351 (不純物込み)				
No.	Lot.	1, 4-BTMSB- d_4 (%)	Lycopene 2 位 AV (%)	SD (%)	Sudan I 9 位 AV (%)	SD (%)	Sudan I 9 位 AV (%)	SD (%)
Std1	SAN4711		99.33	1.42	92.98	0.07	94.28	0.07
Std2	SAN4711		90.74	0.86	93.13	0.70	94.71	0.39
Std3	SAN4711	99.9	94.27	0.58	93.56	0.06	94.75	0.23
Std4	LKP4227		90.60	0.84	93.39	0.40	94.88	0.07
Std5	SAN4711		93.28	1.73	92.80	0.57	93.34	0.66
				AV (%)	93.17		94.39	
				SD (%)	0.306		0.630	
				CV (%)	0.33		0.67	

Table 9 絶対検量線の傾き, 相対モル感度係数(原点を通す/通さない, 計算に使用する濃度範囲を LV0~LV6/LV0~LV5)

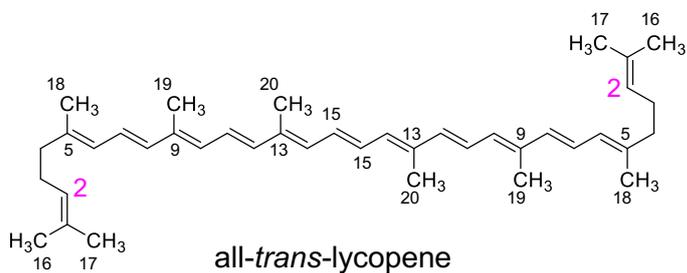
クロマトグラム処理	lycopen					sudan-I			RMS [mol/mol]
	傾き	切片	r2	傾き	切片	r2			
8Da_Mn, LV0~LV6	std3	原点通す	2.104E+10	0	0.9978	2.193E+09	0	0.9998	9.594
		通さない	2.092E+10	368.69	0.9962	2.198E+09	-60.70	0.9997	9.520
	std4	原点通す	2.118E+10	0	0.9999	2.158E+09	0	1.0000	9.813
		通さない	2.123E+10	-144.44	0.9999	2.158E+09	-2.76	0.9999	9.835
	std5	原点通す	2.141E+10	0	0.9991	2.142E+09	0	0.9999	9.995
		通さない	2.144E+10	-119.22	0.9984	2.147E+09	-66.90	0.9999	9.987
8Da_Mn, LV0~LV5	std3-5	原点通す	2.121E+10	0	0.9988	2.164E+09	0	0.9998	9.799
		通さない	2.120E+10	35.23	0.9980	2.168E+09	-43.35	0.9997	9.778
	std3	原点通す	2.128E+10	0	0.9985	2.177E+09	0	0.9998	9.773
		通さない	2.119E+10	145.78	0.9972	2.181E+09	-21.34	0.9997	9.717
	std4	原点通す	2.096E+10	0	0.9998	2.158E+09	0	1.0000	9.716
		通さない	2.096E+10	-2.91	0.9997	2.157E+09	0.74	0.9999	9.717
1.2Da_No, LV0~LV6	std5	原点通す	2.130E+10	0	0.9990	2.115E+09	0	0.9999	10.073
		通さない	2.136E+10	-88.65	0.9982	2.113E+09	13.38	0.9999	10.109
	std3-5	原点通す	2.119E+10	0	0.9990	2.150E+09	0	0.9998	9.857
		通さない	2.118E+10	11.67	0.9982	2.150E+09	-2.07	0.9995	9.852
	std3	原点通す	2.667E+09	0	0.9975	2.784E+08	0	0.9997	9.581
		通さない	2.655E+09	39.09	0.9958	2.787E+08	-4.28	0.9994	9.526
1.2Da_No, LV0~LV5	std4	原点通す	2.655E+09	0	0.9999	2.736E+08	0	0.9999	9.701
		通さない	2.655E+09	-0.54	0.9998	2.739E+08	-2.69	0.9999	9.694
	std5	原点通す	2.683E+09	0	0.9991	2.674E+08	0	0.9999	10.036
		通さない	2.689E+09	-16.82	0.9985	2.673E+08	1.52	0.9999	10.060
	std3-5	原点通す	2.669E+09	0	0.9988	2.731E+08	0	0.9996	9.772
		通さない	2.667E+09	6.66	0.9979	2.732E+08	-1.74	0.9993	9.759
1.2Da_No, LV0~LV5	std3	原点通す	2.699E+09	0	0.9981	2.765E+08	0	0.9997	9.761
		通さない	2.694E+09	7.05	0.9965	2.763E+08	1.04	0.9994	9.751
	std4	原点通す	2.654E+09	0	0.9996	2.737E+08	0	0.9999	9.694
		通さない	2.654E+09	0.18	0.9993	2.743E+08	-3.42	0.9998	9.675
	std5	原点通す	2.679E+09	0	0.9993	2.676E+08	0	0.9999	10.013
		通さない	2.692E+09	-20.76	0.9987	2.674E+08	1.14	0.9998	10.068
std3-5	原点通す	2.678E+09	0	0.9989	2.726E+08	0	0.9996	9.826	
	通さない	2.682E+09	-5.26	0.9980	2.726E+08	-0.37	0.9993	9.836	

8Da_Mn = 475 nm(±4 nm), smoothing(±3 scans×2回)

1.2Da_No = 475nm(±0.6 nm), no smoothing

Table 10 RMS (= 9.857) 法, およびリコペン絶対検量線(Y = 2.1190E+10 * X)法により求めたトマト色素製品中のリコペン含有量(%)

	lycopen area A _s	sudan I area A _s	採取量 W(mg)	定容量 V(mL)	希釈率 F	単位補正	RMS (std3~5, LV0~LV5, 原点通す) = 9.857			リコペン絶対検量線 (std3~5, LV0~LV5, 原点通す)			残差%= RMS-検 量線/検 量線×100				
							検液中の sudan I C _s (m_mol/mL)	検液中の lycopen C _L (m_mol/mL)	含有量 (%)	検液中の lycopen濃度 (m_mol/mL)	含有量 (%)	含有量 (%)					
A1155-n1	31634	11565	78.5650	25	250	100	5.40.E-06	1.500.E-06	6.40	AVR	6.35	1.49E-06	6.38	AVR	6.28	0.45	
A1155-n2-2	30427	11535	83.1612	25	250	100	5.40.E-06	1.446.E-06	5.83	STDEV	0.48	1.44E-06	5.79	STDEV	0.45	0.71	
A1155-n3	33008	11416	78.2514	25	250	100	5.40.E-06	1.585.E-06	6.80	CV%	7.63	1.56E-06	6.68	CV%	7.16	1.76	
A1201-n1	33488	11459	6.3519	25	250	100	5.40.E-06	1.602.E-06	84.64	AVR	81.3	1.58E-06	83.49	AVR	81.2	1.38	
A1201-n2	28473	11579	5.5922	25	250	100	5.40.E-06	1.348.E-06	80.90	STDEV	3.10	1.34E-06	80.63	STDEV	2.08	0.33	
A1201-n3	32149	11758	6.4088	25	250	100	5.40.E-06	1.499.E-06	78.49	CV%	3.81	1.52E-06	79.44	CV%	2.56	-1.20	
A1205-n1	43902	11740	10.8550	25	250	100	5.40.E-06	2.050.E-06	63.37	AVR	68.9	2.07E-06	64.05	AVR	68.3	-1.05	
A1205-n2	38281	11489	8.7242	25	250	100	5.40.E-06	1.827.E-06	70.26	STDEV	4.96	1.81E-06	69.48	STDEV	3.75	1.11	
A1205-n3	42404	11337	9.4262	25	250	100	5.40.E-06	2.050.E-06	72.99	CV%	7.20	2.00E-06	71.24	CV%	5.49	2.46	
A1206-n1	30136	11771	76.0766	25	250	100	5.40.E-06	1.404.E-06	6.19	AVR	6.56	1.42E-06	6.27	AVR	6.58	-1.31	
A1206-n2	30524	11592	73.1241	25	250	100	5.40.E-06	1.444.E-06	6.62	STDEV	0.34	1.44E-06	6.61	STDEV	0.29	0.22	
A1206-n3	32610	11581	75.4481	25	250	100	5.40.E-06	1.544.E-06	6.87	CV%	5.21	1.54E-06	6.84	CV%	4.37	0.31	
A1207-n11	18842	11685	161.99	100	62.5	100	5.40.E-06	8.841.E-07	1.83	AVR	1.82	8.89E-07	1.84	AVR	1.82	-0.58	
A1207-n12	29448	11544	262.52	100	62.5	100	5.40.E-06	1.399.E-06	1.79	STDEV	0.02	1.39E-06	1.78	STDEV	0.04	0.63	
A1207-n13	26705	11633	230.76	100	62.5	100	5.40.E-06	1.258.E-06	1.83	CV%	1.37	1.26E-06	1.83	CV%	1.95	-0.14	
A1208-n1	30052	12094	6.9338	25	250	100	5.40.E-06	1.362.E-06	65.93	AVR	79.1	1.42E-06	68.63	AVR	79.4	-3.95	
A1208-n2	36374	11740	7.0516	25	250	100	5.40.E-06	1.699.E-06	80.83	STDEV	7.10	1.72E-06	81.68	STDEV	5.76	-1.05	
A1208-n3	41766	11687	8.4429	25	250	100	5.40.E-06	1.959.E-06	77.86	CV%	8.97 (n3)	1.97E-06	78.34	CV%	7.25 (n3)	-0.60	
A1208-n4	31327	11616	6.1065	25	250	100	5.40.E-06	1.478.E-06	81.24			83.4	1.48E-06	81.24		82.5	0.01
A1208-n5	34225	11440	6.3314	25	250	100	5.40.E-06	1.640.E-06	86.93			3.10	1.62E-06	85.60		2.71	1.55
A1208-n6	31158	11431	6.1185	25	250	100	5.40.E-06	1.494.E-06	81.95			3.71	1.47E-06	80.64		3.28	1.63

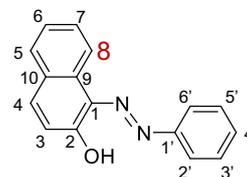


all-*trans*-lycopene

Chemical Formula: C₄₀H₅₆

Exact Mass: 536.438

Molecular Weight: 536.888



sudan I

Chemical Formula: C₁₆H₁₂N₂O

Exact Mass: 248.095

Molecular Weight: 248.285

Fig. 1 リコペンとスダンIの構造

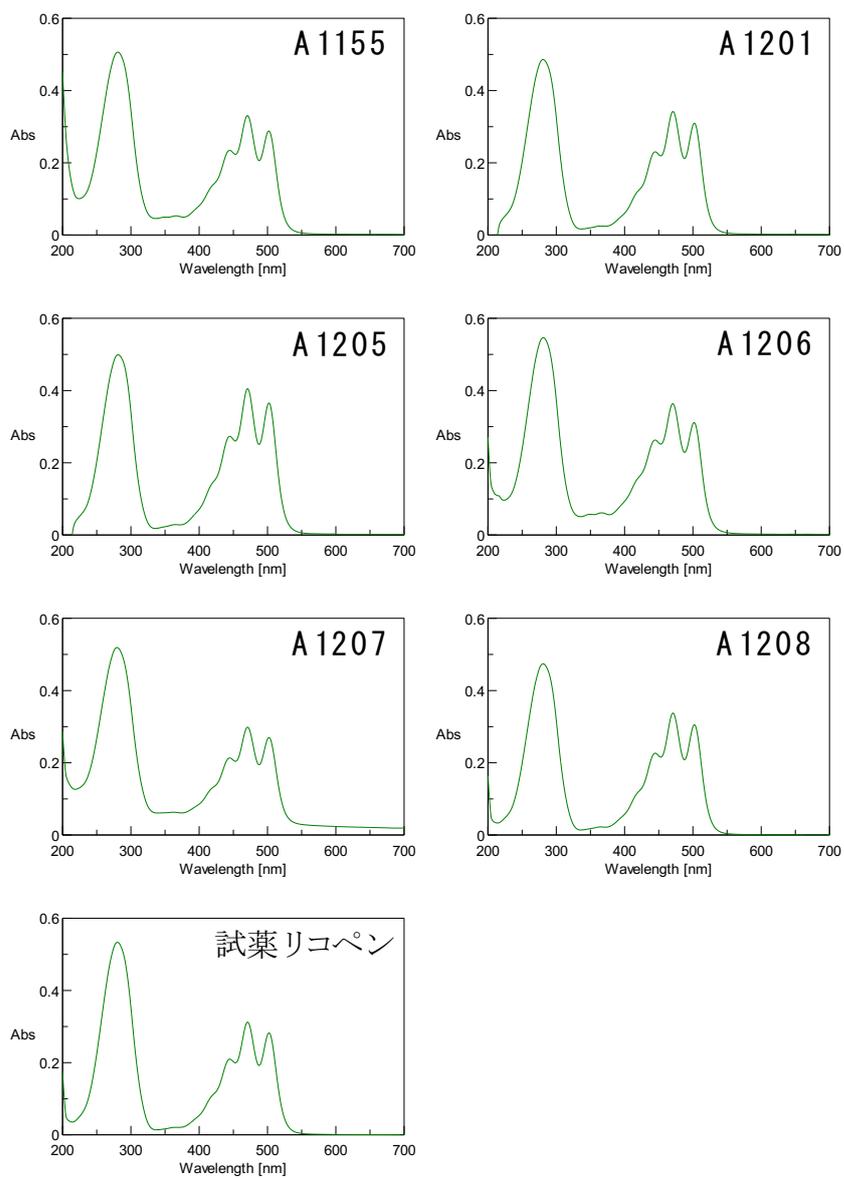


Fig. 2 トマト色素製品, 試薬リコペンの UV/Vis 吸収スペクトル

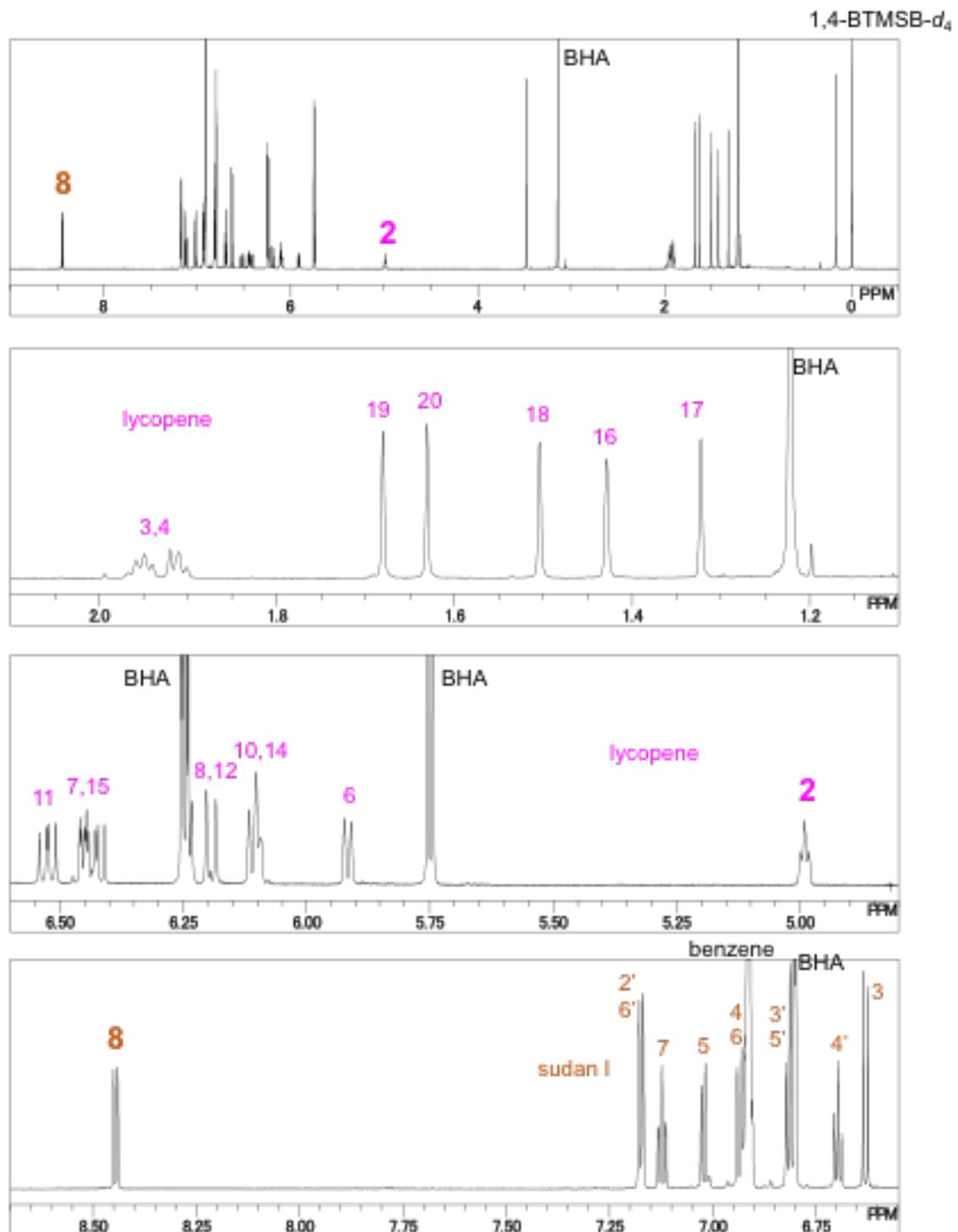


Fig. 3 リコペン, スダン I, BHA, 1,4-BTMSB- d_4 (C_6D_6 溶液)の 1H qNMR スペクトル(800 MHz)

なお, リコペンのシグナル帰属は J. Agric. Food Chem., **62** (1), 264–269 (2014)を, スダン Iは Food Chemistry, **217**, 418-424 (2017)を参考にした.

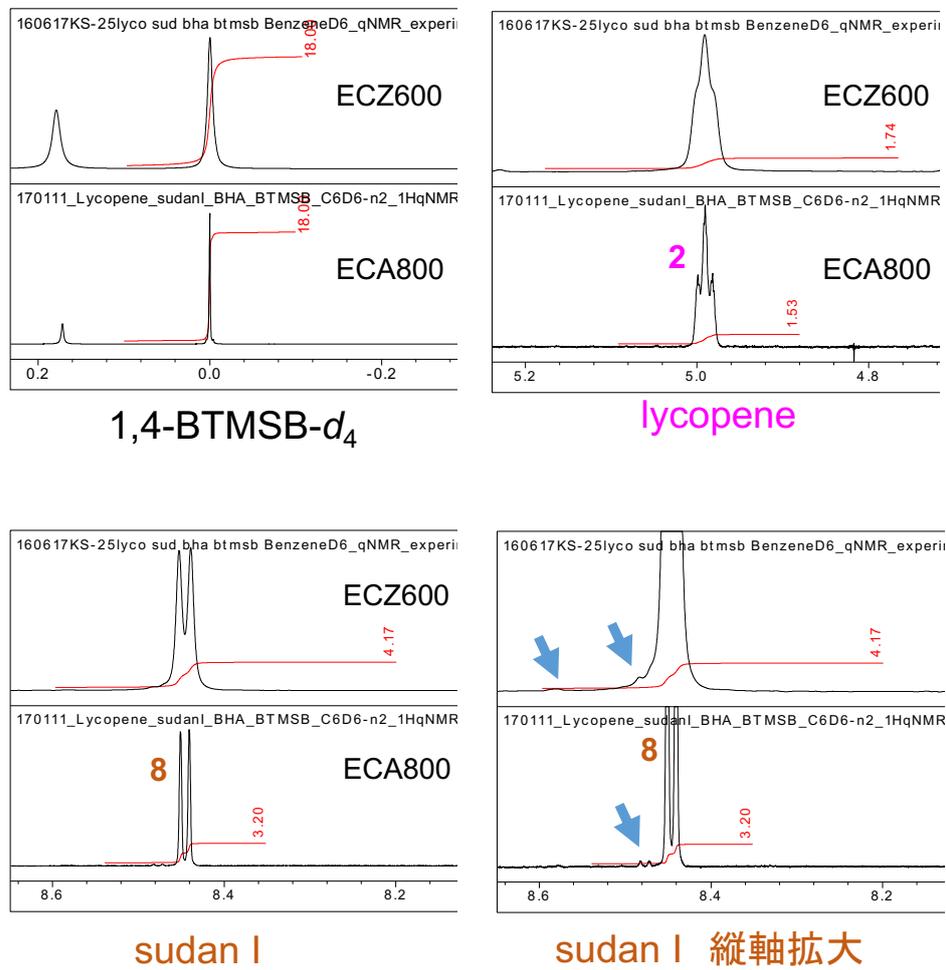


Fig. 4 測定した NMR 装置による 1,4-BTMSB- d_4 , リコペン(2 位), スダン I(8 位)シグナルの比較

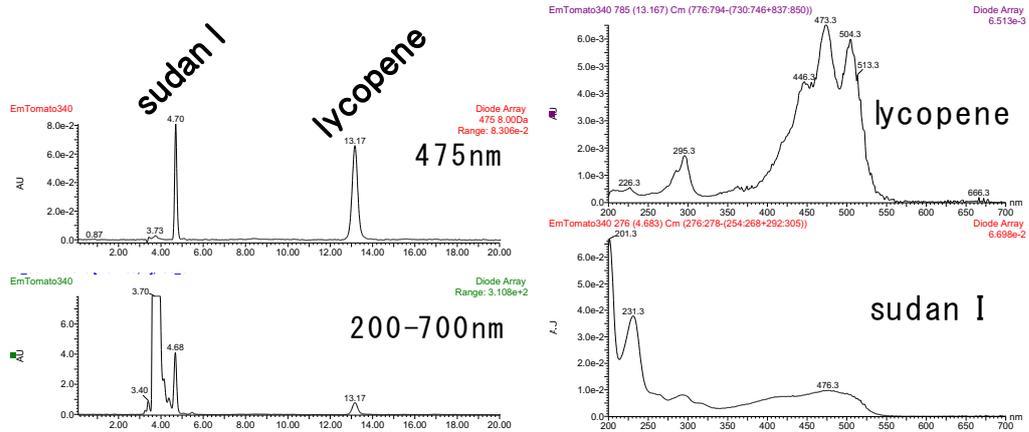


Fig. 5 リコペン(0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とスダン I (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合標準液(LV4)の LCクロマトグラムと UV スペクトル

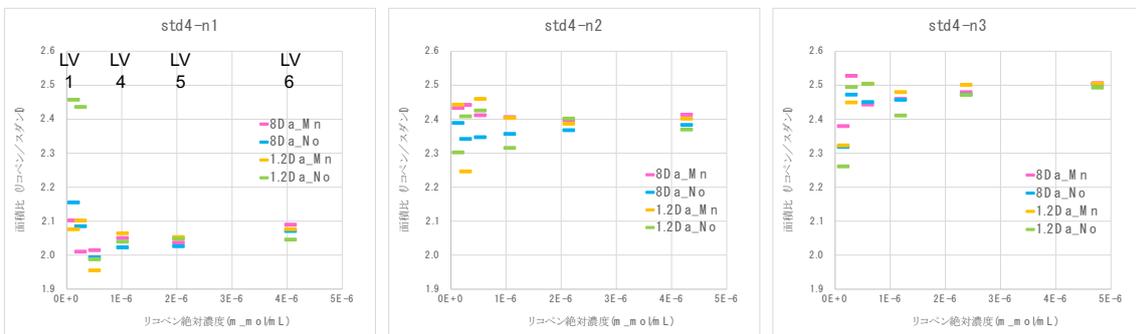
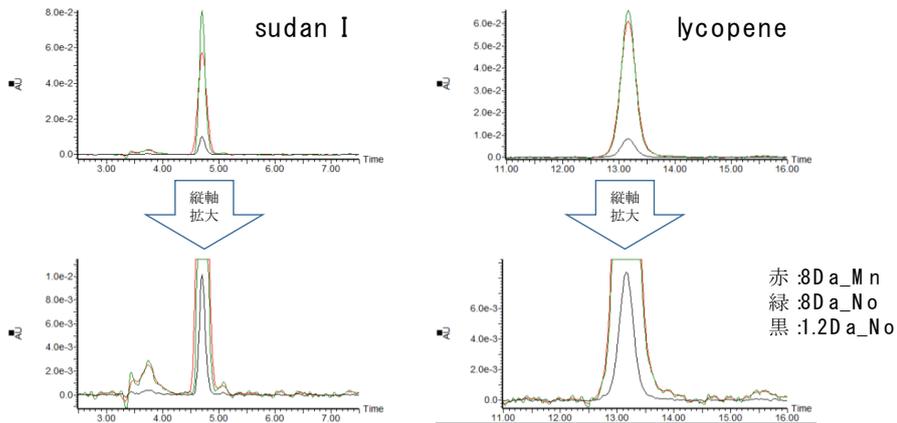


Fig. 6 クロマトグラムの抽出処理によるピーク形状の変化と、希釈濃度による面積比の比較

8Da_Mn : 抽出波長 475 nm (± 4 nm), smoothing (± 3 scans $\times 2$ 回)

8Da_No : 抽出波長 475 nm (± 4 nm), スムージングなし

1.2Da_Mn : 抽出波長 475 nm (± 0.6 nm), smoothing (± 3 scans $\times 2$ 回)

1.2Da_No : 抽出波長 475 nm (± 0.6 nm), スムージングなし

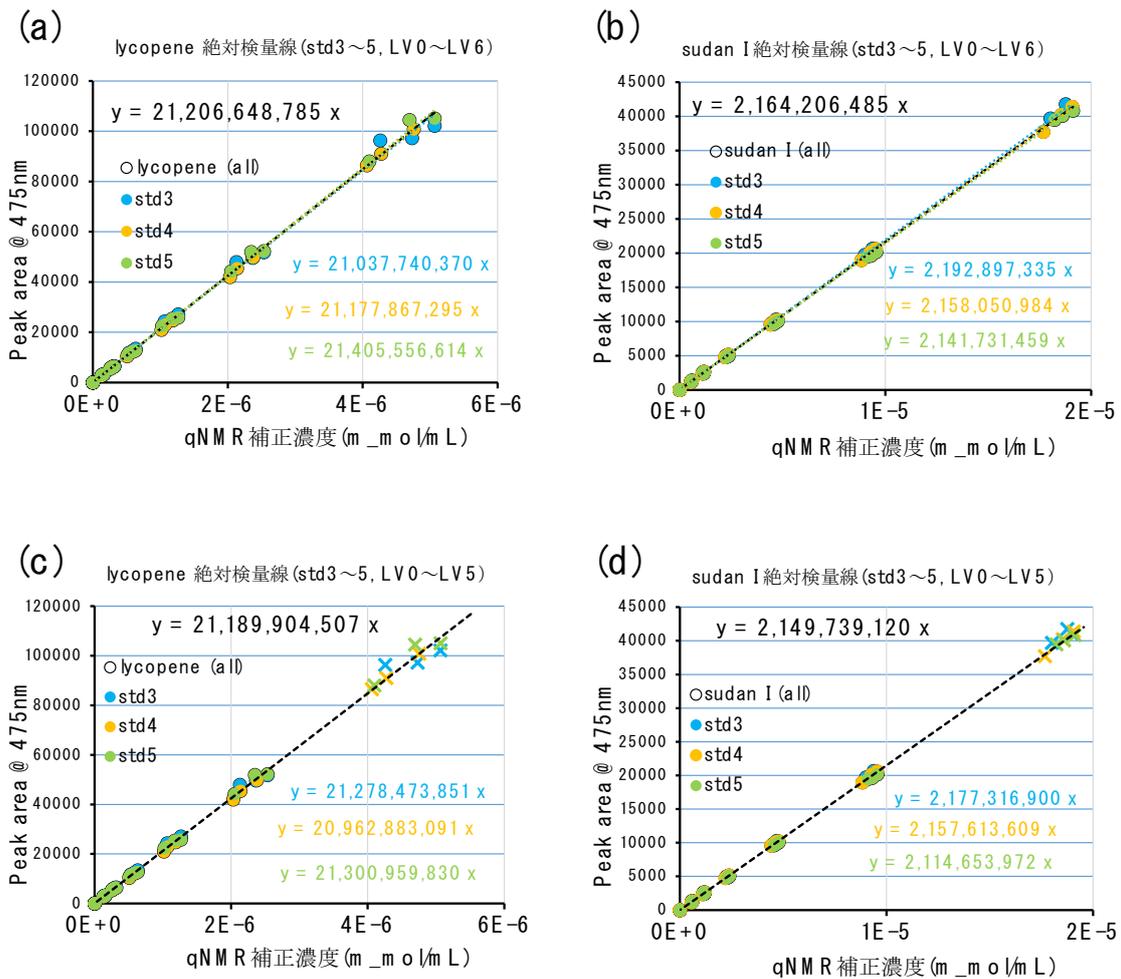


Fig. 7 リコペン及びスダン I の絶対検量線(原点を通す)

(a) リコペン(LV0~LV6), (b) スダン I(LV0~LV6), (c) リコペン(LV0~LV5), (d) スダン I(LV0~LV5)のデータを使用して計算

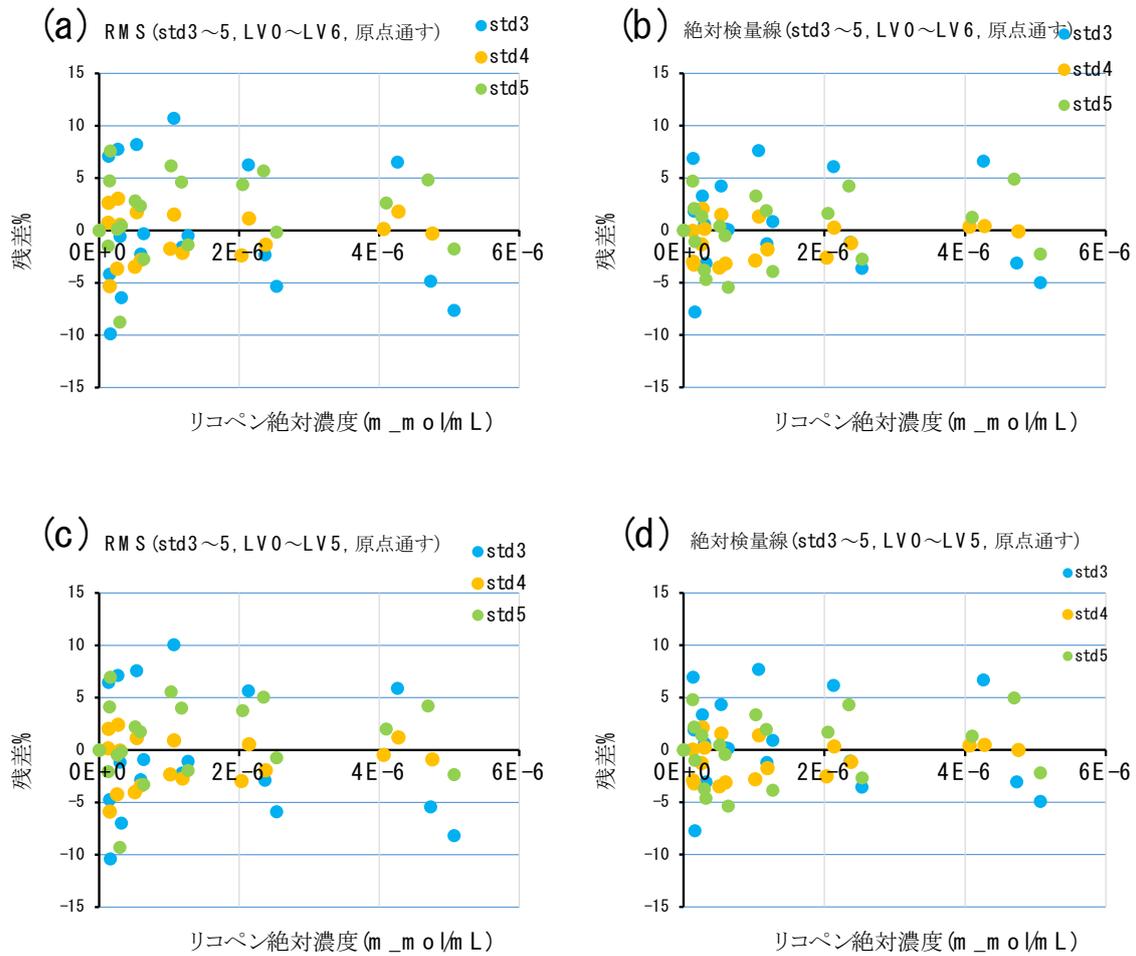
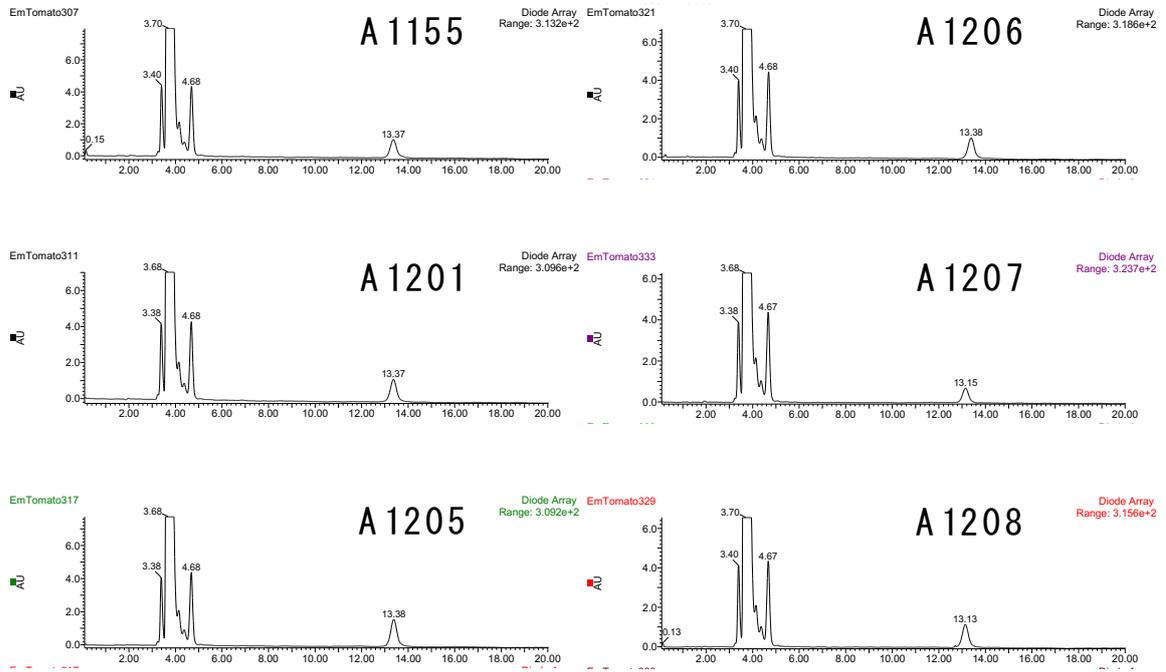


Fig. 8 標準液の戻し定量値の残差プロット (a)RMS(LV0~LV6), (b)絶対検量線(LV0~LV6), (c)RMS(LV0~LV5), (d)絶対検量線(LV0~LV5)

(a)



(b)

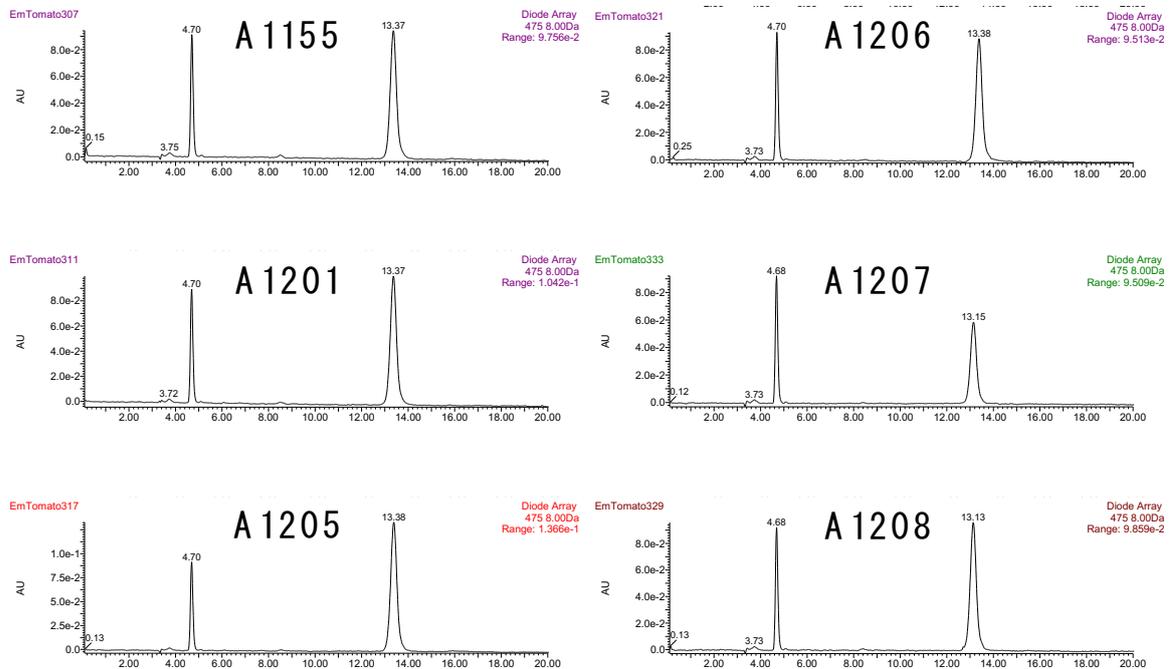


Fig. 9 トマト色素製品の LC クロマトグラム(スタン I 添加) (a)200-700 nm, (b)475 nm

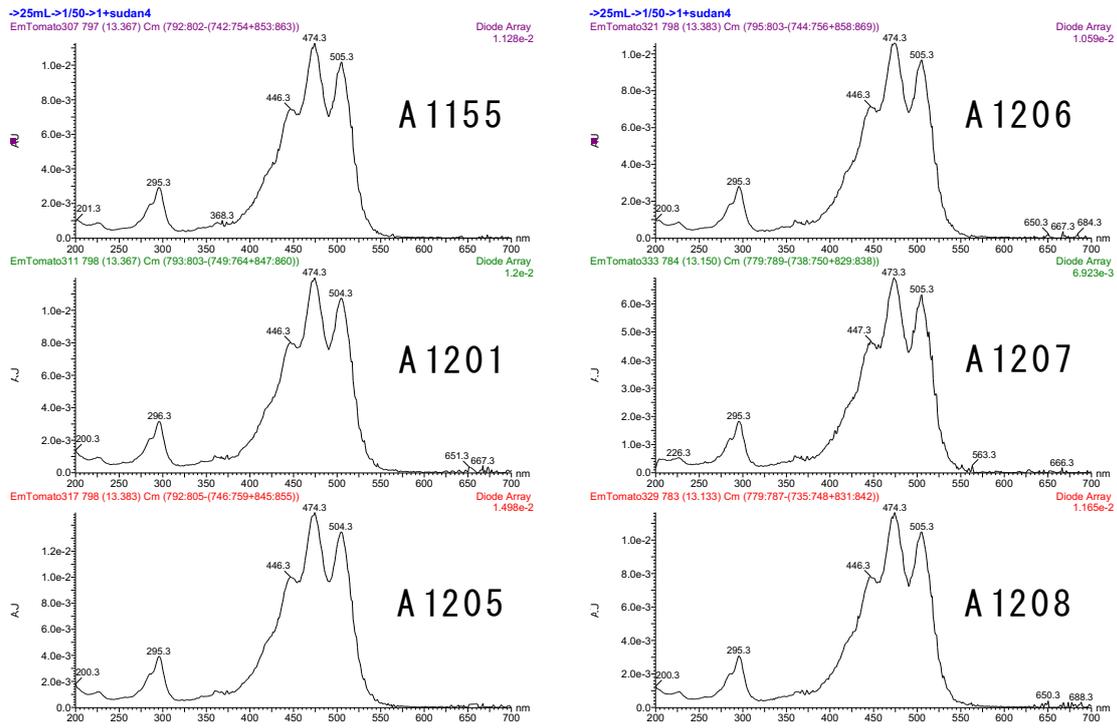


Fig. 10 トマト色素製品中のリコペンのHPLCピークのUV/Visスペクトル

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～ペプチドを指標とした既存添加物の基原同定法の検討～

研究分担者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究要旨 既存添加物製品に残存するタンパク質からペプチドを生成し、この質量スペクトルにマッチするペプチドをMascot searchで検索し、同定したペプチドが帰属するタンパク質の基原情報を得る方法を検討した。既存添加物酵素2品目18製品をモデルにして、製品に付帯する基原情報とMascot searchで同定した基原情報を比較した。その結果、18製品中17製品で、同定した基原が、製品に付帯する基原情報と一致した。一致しなかった製品は、由来する基原のタンパク質がデータベース上に登録されていないことが原因で、属レベルでは一致した。データベースの充実化により、本手法は精巧な基原同定が可能であることを示した。

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 室長

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

グルコアミラーゼ 8 製品) について調査し、帰属されたタンパク質と基原情報の結果について考察する。

A. 研究目的

既存添加物の成分規格の定義には、想定外の原料が使用されることを防ぐ目的で基原が規定される。規定された基原から抽出された添加物製品のみが流通することになるが、実際に流通する添加物製品から基原を同定できる手法があれば、違反原料の特定の手助けとなり、食の安全に貢献できる。本研究では、ペプチドを指標とした基原同定法について検討した。具体的には、タンパク質を主成分とする品目、あるいは残存すると予想された品目からタンパク質を抽出し、これを任意の消化酵素で切断、回収したペプチド断片を精密質量分析計に付し、質量スペクトルにマッチするペプチドを、任意のデータベースから検索・同定し、同定したペプチドが帰属するタンパク質および基原情報を取得する方法を検討した。本研究では、既存添加物酵素2品目18製品(α -アミラーゼ10製品、

B. 研究方法

B-1. 試料

基原の情報とともに日本食品添加物協会を通じて入手した α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ 2品目18製品の既存添加物酵素を試料として用いた。内訳は、 α -アミラーゼ 6基原10試料、グルコアミラーゼ 3基原8試料。付帯する基原情報は、Tableに記載した。

B-2. 試薬

グアニジン塩酸塩 (Cat No. 17353-25) および トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Cat No. 35434-05) は、ナカライテスク (株) より購入した。ヨード酢酸ナトリウム (Cat No. I2512-25G) および重炭酸アンモニウム (Cat No. A6141-500G) は、Sigma-Aldrich 社より購入した。エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム塩二水和物 (Cat No. 343-01861)、HPLC用アセトニトリル (ACN) (Cat No. 015-08633)、トリフルオロ酢酸 (Cat No. 208-02746) およびギ

酸 (Cat No. 063-05895) は、和光純薬工業 (株) より購入した。ジチオトレイトール (DTT) (Cat No. 20291) は、Thermo Scientific 社より購入した。消化酵素 Trypsin (Cat No. V5280) および rLys-C (Cat No. V1671) は、Promega 社より購入した。タンパク質の脱グルコシル化には、Deglycosylation MIX II (Cat No. P6044, NEW ENGLAND BioLabs 社製) を用いた。

B-3. 試料調製

試料は、総タンパク質濃度が約 1 g/L となるように TEG (0.5 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 7M グアニジン (pH 8.0)) に溶解させた。この液 100 μ L に対し、0.5 M DTT 1 μ L 添加し、37°C で 90 分反応させた後、1M ヨード酢酸 1.2 μ L 添加し、37°C で 30 分間反応させ、タンパク質を還元、アルキル化した。続いて水を 400 μ L 添加し、あらかじめ水で平衡化させた PD Mini Trap G-25 (Cat No. 28918007, GE Healthcare 社製) に全量 (502.2 μ L) を付加した後、目的のタンパク質を水 1 mL で溶出させ、凍結乾燥処理した。得られた乾燥物は、50 mM 重炭酸アンモニウム 40 μ L に溶解し、0.5 mL チューブに 20 μ L ずつ分注した。それぞれのチューブに 1 μ g/ μ L の Trypsin 0.5 μ L と 0.2 μ g/ μ L の rLys-C 1 μ L を添加し、37°C で 16 時間消化させた。消化後、1%TFA 含有 2%ACN 20 μ L を添加して反応を止めた後、水 60 μ L を加えて LC/MS/MS 用試料液とした。

B-4. 分析方法

装置 超高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/TOF-MS) : Waters 社製 ACQUITY UPLC H-CLASS/Xevo G2 QToF

LC 条件 カラム : ACQUITY UPLC Peptide BEH300 C18 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m, 300Å), 流速 : 0.2 mL/min, カラム温度 : 40°C, 移動相 : 0.1%ギ酸/0.1%ギ酸含有 ACN = 99 : 1 (0 min) \rightarrow 65 : 35 (60 min) \rightarrow 50 : 50 (70 min) \rightarrow 10 : 90 (70~75 min) \rightarrow 99 : 1 (75~90 min), 注入量 : 2 μ L.

MS/MS 条件 イオン化モード : ESI+, キャピラリー電圧 : 3.0kV, コーン電圧 : 30V, 取り込みモード : MS^E, コリジョンエネルギー : 20-40V,

ソース温度 : 120°C, 脱溶媒温度 : 450°C, コーンガス : 50L/h, 脱溶媒ガス : 800L/h.

B-5. 解析方法

データ抽出条件 ソフトウェア : BiopharmaLynx, 抽出範囲 : 全イオン電流クロマトグラム 5~70 min における信号強度の高い上位 300 件のマススペクトル.

検索条件 サーバー : Mascot Server, 検索モード : MS/MS Ions Search, データベース : Swiss-Prot, 消化酵素 : Trypsin または rLys-C, 修飾 : Carboxymethyl (C), 価数 : 1 価, データフォーマット : PKL.

B-6. SDS-PAGE

Bladford 法で、試料中の総タンパク量を測定し、1 レーンあたり 5 μ g 相当量をロードした。分子量マーカー : Precision Plus Protein Standard-Unstained (Cat No. 1610363, Bio-Rad 社製), ゲル : Bullet Page One Precast Gel (Cat No. 13077-04, ナカライテスク (株) 製), 染色液 : Bullet CBB Stain One (Cat No. 13542-81, ナカライテスク (株) 製), 泳動条件 : 定電圧 400V (10 min).

C. 結果および考察

試料中タンパク質からのペプチド断片の生成には、多くの論文で使用された実績があり、比較的安価に購入できる、Promega 社の消化酵素 Trypsin および rLys-C を使用することにした。質量分析計には、ペプチド断片の正確な質量情報を取得するために、TOF-MS を使用することにした。検索には Mascot Server を使用し、タンパク質アミノ酸配列データベースには、専門のキュレーターによるアノテーションを経た配列のみがまとめられた Swiss-Prot を使用した。

Trypsin を使用した際の Mascot search の結果と rLys-C を使用した際のそれから、重複でヒットしたタンパク質について、基原, Entry name, EC No, タンパク質名, 分子量およびアミノ酸配列カバー率の情報とともに Table にまとめた。Table には試料に付帯する基原情報と、SDS-PAGE で検出されたバンドの泳動度から推定した分子量情報を併記し (Fig. 1), Mascot search の

結果と比較し考察した。考察は、品目毎に下記に述べる。

C-1. α -アミラーゼ

【試料 1】*A. oryzae* 由来 α -アミラーゼ [AMYA1_ASPOR] がヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. foetidus* と一致しなかった。Swiss-Prot 上には、*Aspergillus* 属の α -アミラーゼとして、*A. oryzae* (2 件)、*A. niger*、*A. shirousami* および *A. awamori* (2 件) の計 4 基原 6 タンパク質が登録されており、*A. foetidus* 由来 α -アミラーゼは登録されていなかった。寄託機関から入手できる *A. foetidus* 基準株の α -アミラーゼ遺伝子を同定し、このアミノ酸配列を追加したデータベース利用した際、製品に付帯する基原情報と一致するのに興味をもたれる。

【試料 2】*A. niger* 由来 α -アミラーゼ [AMYA_ASPNG] がヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。一方で、[AMYA_ASPNG] の分子量が 53kDa であるのに対し、SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量は 68kDa と 15kDa 分の差異が確認された。この 15kDa の差異が [AMYA_ASPNG] の糖鎖修飾によるものと考えられたので、別に試料 2 に対して脱グリコシル化処理を施し、これを SDS-PAGE に付した。検出されたバンドの移動度は、糖鎖修飾を施していない試料 2 の移動度とほぼ変わらなかった (Fig. 2)。試料 2 については、使用した生産菌から α -アミラーゼ遺伝子を同定するとともに、現在の主流である分子生物学的手法に基づく基原の同定結果とあわせて考察する必要がある。

【試料 3~5】*A. oryzae* 由来 α -アミラーゼ [AMYA1_ASPOR] がヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。また、試料 3~5 の SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 49kDa は、[AMYA1_ASPOR] のシグナルペプチドを除いた分子量 (52kDa) とよく一致した。

【試料 6】*A. awamori* 由来グルコアミラーゼ [AMYG_ASPAW] および *A. niger* 由来グルコアミラーゼ [AMYG_ASPNG] が同順位でヒットした。両タンパク質アミノ酸配列の相同性は 100% で、これ以上の絞り込みは不可能であった。その他

A. oryzae 由来 α -アミラーゼ [AMYA1_ASPOR] がヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. niger* および *A. oryzae* と一致した。SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 71kDa と 49kDa が、それぞれ [AMYG_ASPNG] ([AMYG_ASPAW] 含む) と [AMYA1_ASPOR] のシグナルペプチドを除いた分子量とよく一致した。試料 6 は、デンプンやグリコーゲンを低分子化する α -アミラーゼ製品であるが、 α -アミラーゼにより生成した低分子の糖鎖をグルコース単位まで分解することを目的に、グルコアミラーゼが添加された混合製品であると推察された。

【試料 7】*B. amyloliquefaciens* 由来 α -アミラーゼ [AMY-BACAM] がヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。また SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 51kDa は、[AMY-BACAM] のシグナルペプチドを除いた分子量 (54kDa) とよく一致した。

【試料 8】*B. licheniformis* 由来 α -アミラーゼ [AMY_BACLI] がヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。また SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 49kDa は、[AMY_BACLI] のシグナルペプチドを除いた分子量 (55kDa) とよく一致した。

【試料 9 および 10】*B. amyloliquefaciens* 由来 α -アミラーゼ [AMY_BACAM] がヒットし、製品に付帯する基原情報 *B. subtilis* と一致しなかった。ただし、「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology」によると、*B. subtilis* と分類されていた一部の菌株は、*B. amyloliquefaciens* に再分類されたことが報告されており、すなわちメーカーにおいて、製品の基原情報 *B. subtilis* が *B. amyloliquefaciens* に更新されていない可能性がある。Swiss-Prot 上に登録されている *B. subtilis* 由来 α -アミラーゼ [AMY_BACSU] の分子量が 72kDa であるのに対し、*B. amyloliquefaciens* 由来 α -アミラーゼ [AMY_BACAM] の分子量は 58kDa であった。試料 9 および 10 の SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量は 51kDa で、[AMY-BACAM] のシグナルペプチドを除いた分子量 (54kDa) とよく一致した。この結果は、製品の基原情報が更新されていないことを支持する結果であった。

C-2. グルコアミラーゼ

【試料 11 および 12】 *A. awamori* 由来グルコアミラーゼ[AMYG_ASPAW]および *A. niger* 由来グルコアミラーゼ[AMYG_ASPNG]が同順位でヒットした。両タンパク質のアミノ酸配列の相同性は 100%で、これ以上の絞り込みは不可能であった。SDS-PAGE で検出された試料 11 のマイナーバンドおよび試料 12 のメインバンドの推定分子量 69kDa は、[AMYG_ASPNG] ([AMYG_ASPAW]含む) のシグナルペプチドを除いた分子量 65kDa とよく一致した。SDS-PAGE で検出された試料 11 の推定分子量 112kDa のバンドに興味もたれる。

【試料 13～18】 試料 13 および 14 は *R. oryzae* を、試料 15～18 は *Rhizopus* 属を基原とする製品である。Mascot search の結果は、試料 13～18 で *R. oryzae* 由来グルコアミラーゼ[AMYG_RHIOR]がヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。また、試料 13～18 の SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 66kDa は、[AMYG_RHIOR]のシグナルペプチドを除いた分子量(62kDa)とよく一致した。Mascot search の結果および SDS-PAGE のバンドパターンより、試料 15～18 も試料 11 および 12 と同じく *R. oryzae* を基原とする製品であると推察された。

D. 結論

既存添加物酵素 2 品目 18 製品を対象にして、製品から生成したペプチドのマススペクトルを Mascot search に付し、帰属される基原と製品付帯情報を比較した。その結果、18 製品中 17 製品で Mascot search の結果と、製品に付帯する基原情報が一致した。一致しなかった製品は、由来する基原のタンパク質がデータベース上に登録されていないことが原因で、属レベルでは一致した。データベースの充実化により、本手法は精巧な基原同定が可能であることを示した。

E. 参考文献

天野エンザイム株式会社ホームページ (酵素辞典) (<https://www.amano->

F. 研究発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

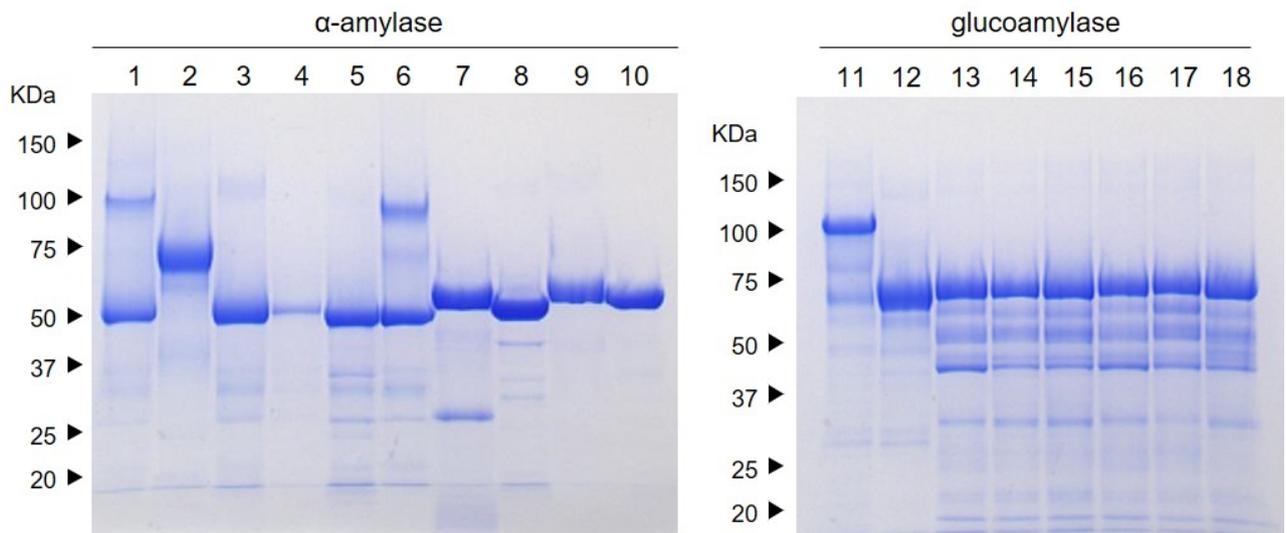


Fig. 1 SDS-PAGE of α -amylase and glucoamylase.

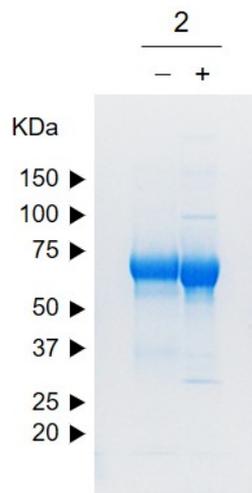


Fig. 2 SDS-PAGE of product 2 treated with deglycosylation.

—, product 2 without deglycosylation ; +, product 2 treated with deglycosylation.

Table 1 Results of Mascot search for α -amylase

Provided information			Results of Mascot search								
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine								
			Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	rLys-C Ranking	rLys-C Coverage
1	<i>Aspergillus foetidus</i>	104, 49	1	<i>A. oryzae</i>	AMYA1_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	54810	57%	1	45%
			2	<i>A. shirousami</i>	AMYG_ASPSH	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68131	42%	3	15%
			3	<i>A. kawachii</i>	AMYG_ASPKA	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	68272	36%	3	15%
			4	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41230	23%	2	23%
			4	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41298	23%	2	23%
			5	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41177	23%	4	23%
2	<i>Aspergillus niger</i>	68	5	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41276	23%	4	23%
			1	<i>A. niger</i>	AMYA_ASPNG	EC=3.2.1.1	Acid alpha-amylase	52935	25%	1	13%
3	<i>Aspergillus oryzae</i>	49	1	<i>A. oryzae</i>	AMYA1_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	54810	66%	1	59%
4	<i>Aspergillus oryzae</i>	49	1	<i>A. oryzae</i>	AMYA1_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	54810	55%	1	59%
5	<i>Aspergillus oryzae</i>	49	1	<i>A. oryzae</i>	AMYA1_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	54810	67%	1	59%
			2	<i>A. flavus</i>	PEPA_ASPFN	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	42313	20%	2	9%
			2	<i>A. oryzae</i>	PEPA_ASPOR	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	42313	20%	2	9%
6	<i>Aspergillus niger</i> and <i>A. oryzae</i>	94, 71, 49	1	<i>A. awamori</i>	AMYG_ASPAW	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68309	47%	2	31%
			1	<i>A. niger</i>	AMYG_ASPNG	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68309	47%	2	31%
			2	<i>A. oryzae</i>	AMYA1_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	54810	55%	1	59%
7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	51, 25	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58403	9%	1	67%
8	<i>Bacillus licheniformis</i>	49	1	<i>B. licheniformis</i>	AMY_BACLI	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58549	34%	1	31%
9	<i>Bacillus subtilis</i>	51	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58403	12%	1	71%
10	<i>Bacillus subtilis</i>	51	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58403	48%	1	67%

Table 2 Results of Mascot search for glucoamylase

Provided information			Results of Mascot search								
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine								
			Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	rLys-C Ranking	rLys-C Coverage
11	<i>Aspergillus niger</i>	111, 69	1	<i>A. awamori</i>	AMYG_ASPAW	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68309	50%	1	31%
			1	<i>A. niger</i>	AMYG_ASPNG	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68309	50%	1	31%
12	<i>Aspergillus niger</i>	69	1	<i>A. awamori</i>	AMYG_ASPAW	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68309	44%	1	28%
			1	<i>A. niger</i>	AMYG_ASPNG	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68309	44%	1	28%
13	<i>Rhizopus oryzae</i>	72, 66, 52, 43	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase 1	65162	29%	1	7%
14	<i>Rhizopus oryzae</i>	72, 66, 52, 43	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase 1	65162	31%	1	10%
15	<i>Rhizopus sp.</i>	72, 66, 52, 43	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase 1	65162	37%	1	17%
16	<i>Rhizopus sp.</i>	72, 66, 52, 43	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase 1	65162	36%	1	14%
17	<i>Rhizopus sp.</i>	72, 66, 52, 43	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase 1	65162	37%	1	14%
18	<i>Rhizopus sp.</i>	72, 66, 52, 43	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase 1	65162	37%	1	17%

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～香辛料抽出物の基原生物の学名調査～

研究分担者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究要旨 既存添加物名簿収載品目の一つに分類される「香辛料抽出物」について、今後、規格作成に当たり、定義に関する情報収集を行った。香辛料抽出物の74種の基原について、その学名及び和名の妥当性を一般に認知された学名・和名のデータベースを参照し検討した他、海外における規格の有無を調査した。その結果、香辛料抽出物の基原とされている学名及び和名には、一般的ではない学名の使用だけでなく誤記等が散見されることが明らかとなった。したがって、「香辛料抽出物」の規格作成時には、本研究で報告する情報を元に、基原生物の学名について再検討を行う必要がある。

研究協力者

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 室長

A. 研究目的

「香辛料抽出物」は、平成8年に作成された既存添加物名簿に収載されている品目の一つであり、74種の基原生物を原料とする抽出物である。これまで多くの既存添加物名簿収載品目の規格を整備し、食品添加物公定書(以下、公定書)への収載を行ってきたが、香辛料抽出物に関しては原料とする基原種が多く、このため実際に流通している製品の製法や成分組成が大きく異なることが予想されることから、成分規格の整備が遅れており、公定書に成分規格が収載されているものはない。しかし、香辛料抽出物は流通量も比較的多いため、規格整備は大きな課題となっている。

既に流通しており、有効性と安全性が確認さ

れているとみなされる既存添加物の規格整備において、規格の設定根拠となる情報収集は特に重要であり、由来(基原の学名・和名)と成分(含量)が正しく設定されているかという情報は規格整備時に不可欠である。このうち、基原の学名の設定は、その添加物に想定外の原料が使用されることを防ぐ目的がある。和名のみでは基原生物が一義的に特定されないことが少なくなく、この曖昧さが悪用されて原料の不正使用などが起こる恐れがある。また、既存添加物は国内で自生も栽培もされていない植物や海外で生産される微生物に由来するものも多く、適切な和名が存在しない基原もある。既存添加物の基原種を正しい学名で設定するということは、その添加物の品質と安全性を確保するために必須である。

動植物や微生物の学名・和名は、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。法的な拘束力がある公的な規格を作成する際には、最新の知見も重要ではあるが、定義中の基原種の学名及び和名は、最

新情報よりも設定根拠のトレーサビリティを、すなわち、堅牢性を重視して設定することされている。実際に、第9版食品添加物公定書を作成するにあたっては、一般的に認知されたデータベースや書籍を参照し、これらに示された学名と和名が既存添加物の定義に採用されており、設定根拠のトレーサビリティが確保されている。一方、既存添加物名簿作成時、基原の学名・和名については一定の基準の元に調査がなされたが、その当時より既に20年が経過しており、「香辛料抽出物」に含有される74種の基原の学名・和名については、規格案作成にあたって見直しが必要となっている。

また、「香辛料抽出物」の基原の多くは海外原産であり、海外の流通品を購入して使用するケースも多いことが予測される。したがって、規格案を検討するための参考資料として、海外の規格も考慮に入れる必要があると考えられる。

そこで本研究では、「香辛料抽出物」の規格案作成及び見直しに向けて、現在の情報を整理すべく(1)「香辛料抽出物」記載74基原の学名と標準和名の検討及び(2)海外規格の調査を行った。

B. 研究方法

B-1. 基原物質の学名及び標準和名調査

以下に示す第9版食品添加物公定書作成時の基原生物の学名と標準和名の調査法に従い、公定書に未収載の香辛料抽出物について基原生物の学名と標準和名を調査した。

基原の記載方針

- 1) 「和名 (学名)」のスタイルで示す。
- 2) 学名は「属名+種小名」の二名法で記す。必要なときは変種(var.)等を示し、三名法を用いる。
- 3) 種が特定できない場合は属名まで示す。その場合は「属」を付記する。
- 4) **Synonym** (シノニム=別名) が広く使用されている場合には、**synonym** をカッコ書きで併記する。
- 5) 学名の命名者は、各生物群の一般的な表記法(拠り所とした資料・データベース)を参考に、以下のように設定する。

- a) 植物：短縮形がある命名者については短縮形で表し(例 Linné→L.)、さらに旧命名者をカッコ内に示す。
- b) 動物・魚類・昆虫：ラテン語で表記する(例 Linné→Linnaeus)。
- c) 藻類・菌類・細菌：命名者は示さない。

- 6) 和名は以下のスキームに従って設定する。
 - ・リスト(カッコ書き・基原製法本質)に和名(カタカナ)はあるか? **no**→標準和名
 - ↓ **yes**
 - ・和名は正しく基原生物を表しているか?
 - ↓ **yes** **no**↳修正して標準和名
 - ・和名は学名のカタカナ読みか?
 - ↓ **no** **yes**↳標準和名があるか?
 - ↓ ↓ **no** **yes**↳標準和名
 カッコ書き定義の和名を用いる(標準和名・別名・慣用名は問わない)

なお、和名と学名が1:1対応でないものについては、表示された学名のみが基原であることを明示するために「～に限る。」を加える。

- 7) 和名学名の確認には、生物群ごとに以下に示した資料及びデータベースを用いて行う。
 - 高等植物：東京大学小石川植物園園長の邑田仁教授のご指導のもと、以下に示す2つのデータベースを用いた。
 - a) 学名及び英語慣用名：Tropicos (<http://www.tropicos.org/>)
 - b) 和名：BG Plants 和名-学名インデックス
BGplant が閉鎖のため現在は YList (<http://ylist.info>)
 「BG Plants 和名-学名インデックス」は BG Plants データベースで用いられる植物名、特に、日本産植物の和名と学名に関する詳細情報の整備を目的として、米倉浩司(東北大学)と梶田忠(東京大学〔現・千葉大学〕)を中心に作成された。
 - 魚類：「日本産魚類検索 全種の同定 第二版」(中坊徹次(京都大学総合博物館教授))
 - 藻類
 - a) 大型藻類：「新日本海藻誌—日本産海藻類総覧」(吉田忠生)

b) 緑藻類：米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI)の Taxonomy database. 補助的に各国のカルチャーコレクション(UTEX The culture collection of Algae, NIES collection (国立環境研究所・微生物系統保存施設))の保存株リストを参照した.

c) 藍藻類：NCBIの Taxonomy database. 補助的に PCC (Pasteur culture collection of cyanobacteria (フランス)) および UTEX, NIES collection の保存株リストを参照した.

○菌類・細菌類

・存在および学名の確認：NCBIの Taxonomy database

・学名(補助)および群の確認：農業資源生物研究所のジーンバンク(NIAS Genebank).

・菌類の和名の確認については、玉川大学の奥田徹教授(日本菌学会会長)のご指導のもと、「日本産菌類集覧」(勝本謙著, 2010)を参照した.

B-2. 海外規格の調査

香辛料抽出物に挙げられている74基原について、以下の海外規格に記載されているかを調査した。香辛料抽出物に挙げられている74基原と学名が一致している品目を規格ありとみなした。

a) FCC : Food Chemicals Codex (米国食品用公定化学品集)

b) CFR : Code of Federal Regulation Title 21 (米国FDAが規制する連邦食品医薬品化粧品法 (FFDCA : Federal Food, Drug, and Cosmetic Act))

C. 結果および考察

C-1. 香辛料抽出物の基原物質の学名及び標準和名の検討

植物由来の香辛料抽出物74基原について、基原植物の和名および学名を調査検討した(表1)。和名についてはYListで確認し、学名についてはTropicosおよびY-listで確認した。多くの基原について、基原製法本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、また、

誤記と推測されるものが散見された。学名の命名者についても省略表記及び追記・修正などの変更が必要と判断された。また、和名においても標準和名ではなく別名が用いられている基原が複数存在した。さらに、今回参考にしたデータベース間(YListとTropicos)で学名に対する見解が異なるものも見られた。これらの基原については詳細な調査が必要と考える。今回調査検討を行ったもののうち、特筆すべきものについて以下に示す。

1) アサフェチダ：アサフェチダという和名は確認できなかった。学名についても、「*Ferula marthex* BOISS」及び「*Ferula asafoetida* L.」はともにデータベース中に記載がなかった。ただし、両者については、*Ferula narthex* Boiss 及び *Ferula assa-foetida* L. の誤記であると考えられた。なお、*Ferula assa-foetida* L. の標準和名はアギである。

2) アジョワン：YListにおいて、アジョワンという和名は確認できなかった。

3) アンゼリカ：アンゼリカ(標準和名)の学名は *Angelica archangelica* L. である。基原植物として *Peucedanum praeruptorum* Dunn. も併記されているが、Tropicosには両者がシノニムであるという記載はなかった。なお、基原植物として記載されていた「*Angelica sylvestris* L. var. *archangelica* L.」に該当する学名は確認できなかった。

4) オレガノ：オレガノは別名であり、標準和名はハナハッカである。

5) オレンジピール：キンカン(標準)の学名は *Citrus japonica* Thunb. であり、基原植物として記載されている *Fortunella japonica* (命名者はL.ではなく(Thunb.) Swingle) はシノニムである。また、基原種のひとつである *Citrus sinensis* (L.) Osbeck の標準和名はキンクネンボであり、スイートオレンジはシノニムである。さらに、*Citrus reticulata* Blanco の標準和名はポンカンであり、マンダリンオレンジという和名は確認されなかった。

6) カショウ：基原植物として「*Xanthoxylum piperitum* L.」が挙げられているが、この学名はYList, Tropicosともに収

載されていなかった。しかし、*Zanthoxylum piperitum* DC. (標準和名はサンショウ) の誤記であるとも考えられた。

- 7) カシヤ: ケイは別名であり、標準和名はトンキンニッケイである。
- 8) カモミール: 基原種のひとつである *Anthemis nobilis* L. の標準和名はローマカミツレである。また、もうひとつの基原種である *Matricaria chamomilla* L. var. *recutita* L. は *Matricaria chamomilla* L. のシノニムであり、標準和名はカミツレである。ドイツカモミール及びカモミールの和名は確認できなかった。
- 9) カラシナ: 基原種のひとつであるクロガラシ (標準和名) の学名は *Brassica nigra* (L.) W.D.J.Koch である。また、シロガラシ (標準和名) の学名は *Sinapis alba* L. であり、併記されている *Brassica hirta* Moench. はシノニムである。一方、*Brassica juncea* (L.) Czern. の標準和名はカラシナであり、オウカラシという和名は確認できなかった。
- 10) カルダモン: カルダモンという和名は確認できなかった。
- 11) カレーリーフ: 基原植物として記載されている *Murraya koenigii* (L.) Spreng. の標準和名はオオバゲッキツであり、併記されている *Chalcas koenigii* (L.) Kurz はシノニムである。ナンヨウサンショウという和名は確認できなかった。
- 12) カンゾウ: カンゾウ (標準和名) の学名は *Glycyrrhiza glabra* L. であり、「*Glycyrrhiza glabra* L. var. *uralensis* FISCH.」という学名は確認できなかった。また、既存添加物「カンゾウ抽出物」、「酵素分解カンゾウ」の基原には、ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC.), チョウカカンゾウ (*Glycyrrhiza inflata* Batalin), ヨウカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* L.), 又はそれらの近縁植物が当てられており、これらとの基原・製法の関連性について調査が必要である。
- 13) クチナシ: クチナシ (標準和名) の学名は *Gardenia jasminoides* Ellis である。この学名と併記されている *Gardenia augusta* Merr. var. *grandiflora* (Lour.) Sasaki (「*Gardenia augusta* MERR. var. *glandiflora* HORT.」は誤記と思われる) について、Tropicos には互いにシノニムの関係にあるという記載はないため、別種である可能性がある。また、既存添加物「クチナシ青色素」、「クチナシ赤色素」、「クチナシ黄色素」の基原には、クチナシ (*Gardenia jasminoides* J. Ellis (*Gardenia augusta* Merr.)) が当てられており、香辛料抽出物のクチナシも同じ基原を用いていると考えられるが、調査が必要である。
- 14) クレソン: 基原植物は「セリ科のオランダカラシ (*Nasturtium officinale* R. BR.)」と記載されているが、オランダガラシ (標準和名) *Nasturtium officinale* R. Br. の誤記と思われる。
- 15) クローブ: 基原種学名である *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et L.M.Perry の標準和名はチョウジノキであり、チョウジは別名である。この学名と併記されている *Eugenia caryophyllata* Thunb. はシノニムであるが、Tropicos によると *Illegitimate* な学名とされている。また、既存添加物「クローブ抽出物」との関連性についても調査が必要であり、香辛料抽出物として流通しているのみであれば、既存添加物「クローブ抽出物」は削除すべきと考えられる。
- 16) ケーパー: 基原植物には「フウチョウソウ科のフウチョウボク (*Capparis spinosa* L.)」と記載があるが、フウチョウボク (標準和名) の学名は *Capparis micracantha* DC. var. *henryi* (Matsum.) Jacobs (または *Capparis henryi* Matsum. (Accepted name)), *Capparis spinosa* L. の標準和名はトゲフウチョウボクである。なお、両者の属する科はフウチョウボク科である。
- 17) コショウ: 基原種として「コショウ科のコショウ (*Piper nigrum* L., *P. longum* L., *P. officinarum* D. C.)」と記載があるが、コショウ (標準和名) の学名は *Piper nigrum* L. のみであり、*Piper longum* L. の標準和名はインドナガコショウである。また、*Piper officinarum* (Miq.) C. DC. という学名も Tropicos にて確認された (和名は不明)。

- 18) コリアンダー：コリアンダーは別名であり，標準和名はコエンドロである。
- 19) サッサfras：サッサfras（標準和名）の学名について，YListでは *Sassafras officinale* (L.) Nees et Th.Nees と記載されていたが，Tropicos では *Sassafras officinalis* T. Nees & C.H. Eberm. と記載されており，両データベース間で種小名に若干の違いが見られた。なお，基原種に併記されている「*Sassafras verrifolium* NEES」は *Sassafras variifolium* Kuntze の誤記と思われるが，これは *Sassafras officinalis* のシノニムである。
- 20) サボリー：セイボリー，キダチハッカ及びウインターセイボリーという和名は確認できなかった。基原植物として記載の属名「*Satureia*」は，*Satureja* の誤記と思われる。
- 21) サルビア：サルビアは別名であり，標準和名はセージである。一方，ダルマテイアン，アメリカンセージ，スパニッシュセージ，グリークセージという和名は確認できなかった。さらに，「*Salvia lacandulaefolia* VAHL.」及び「*Salvia tribora* L.」という学名も確認できなかった。しかし，「*Salvia tribora* L.」は *Salvia triloba* L. f. の誤記と思われた。
- 22) シソ：YListによると，アカジソ（標準和名）の学名は *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *crispa* (Benth.) W.Deane f. *purpurea* (Makino) Makino, チリメンアオジソ（標準和名，アオチリメンジソという和名は確認できず）の学名は *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *crispa* (Benth.) W.Deane 'Viridi-crispa' であった。しかし，Tropicos では，*Perilla frutescens* (L.) Britton var. *crispa* (Benth.) W.Deane という学名に留まっていた。また，既存添加物「シソ抽出物」との関連性についても調査が必要とされる。
- 23) シナモン：基原植物には「肉桂 (*Cinnamomum zeylanicum* BLUME, *Cinnamomum loureirii* NEES)」と記載されているが，ニッケイ（標準和名）の学名は *Cinnamomum sieboldii* Meisn. である。一方，*Cinnamomum zeylanicum* Blume は *Cinnamomum verum* J.Presl のシノニムであり，標準和名はセイロンニッケイである。*Cinnamomum loureirii* Nees は Tropicos にて *Illegitimate* な学名として記載があるが，その他認められている学名については不明だった。
- 24) シャロット：シャロット（標準和名）の学名は *Allium cepa* L. var. *aggregatum* G.Don であり，基原種に記載の *Allium ascalonicum* L. はシノニムである。
- 25) ジュニパーベリー：基原種には「セイヨウネズ (*Juniperus communis* L.)」とあるが，セイヨウネズ（標準和名）の学名は *Juniperus communis* L. var. *communis* である。Tropicos には，*Juniperus communis* L. var. *communis* とは別に *Juniperus communis* L. という学名も記載されている（互いにシノニムという記載はない）が，このものの和名は不明である。
- 26) スターアニス：ダイウイキョウは別名であり，標準和名はトウシキミである。なお，本基原種はマツブサ科に属する。
- 27) スペアミント：ミドリハッカ（標準和名）の学名は *Mentha spicata* L. であり，*Mentha spicata* L. var. *viridis* L. はシノニムである。
- 28) セイヨウワサビ：セイヨウワサビ（標準和名）の学名は *Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey. et Scherb. であり，基原種に記載の「*Armoracia ruticana* GAERTN.」の種小名は誤記と思われる。また，基原種に併記されている *Cochlearia armoracia* L. は *Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey. et Scherb. のシノニムである。また，既存添加物「セイヨウワサビ抽出物」との関連性についても調査が必要とされる。
- 29) セロリー：基原種として記載の「*Apium graveolens* L.」は広義のセロリを指している。セロリ（標準和名）の学名は，*Apium graveolens* L. var. *dulce* (Mill.) Pers. である。
- 30) タイム：タチジャコウソウ（標準和名）の学名は *Thymus vulgaris* L. のみである。基原種として記載のその他の学名は，Tropicos にて確認されたが，それらの学名は互いにシノニムという記載はなく別種である可能性がある。
- 31) タラゴン：基原種に記載の「*Artemisia*

- draucunculoides PURSH」という学名は確認できなかった。
- 32) チャイブ：チャイブという和名は確認できなかった。また，基原種に記されている *Allium schoenoprasum* L.のみを学名にもつ種は確認できず，種を特定するためには変種の記載も必要であった。
- 33) チャービル：チャービルは別名であり，標準和名はノハラジャクである。YList ではノハラジャクの学名は *Anthriscus scandicina* (F. Weber) Mansf.とされているが，Tropicos ではこの学名は *Anthriscus caucalis* M. Bieb. (Accepted name) のシノニムとして記載されている。なお，スイートチャービルという和名は確認できなかった。
- 34) トウガラシ：基原種には「トウガラシ (*Capsicum frutescens* L., または *C. annuum* L.)」と記載があるが，YList によるとトウガラシ (標準和名) の学名は *Capsicum annuum* L.のみであり，*Capsicum frutescens* L.には別の標準和名であるキダチトウガラシが対応するとされている。しかし，Tropicos においては，両学名はシノニムとして記載されている。また，既存添加物「トウガラシ色素」，「トウガラシ水性抽出物」との関連性についても調査が必要とされる。
- 35) ナツメグ：基原種として挙げられていた *Myristica fragrans* Houtt.の標準和名はニクズクであり，ナツメグという和名は確認できなかった。
- 36) ニジェラ：基原種として記載されている和名，学名，別名すべてにおいて情報を得られなかった。しかし，Tropicosにて *Nigella sativa* L. という種は記載されており，基原種に記載の「*Nigera sativa* L.」は誤記と考えられた。
- 37) ニンジン：YList によると，基原種に記載の *Daucus carota* L.は広義のニンジンであり，ニンジン (標準和名) の学名は *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang.であった。一方，Tropicos では *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang.は *Daucus sativus* Roehl. (Accepted name) のシノニムとして記載されていた。また，既存添加物「ニンジンカロテン」との関連性についても調査が必要とされる。
- 38) ニンニク：YList にてセイヨウニンニク (標準和名) の学名として挙がっていた *Allium sativum* L. var. *sativum* *Hibiscus mutabilis* L. 'Versicolor' は，Tropicos では確認できなかった。
- 39) バジル： *Ocimum basilicum* L.の標準和名はメボウキであり，スイートバジルという学名は確認できなかった。
- 40) パセリ：基原種には「セリ科のパセリ (*Petroselinum sativum* HOFFM, または *Petroselinum crispum* NYM.)」とあるが，この属名は *Petroselinum* の誤記と思われる。Tropicos において，*Petroselinum sativum* Hoffm. は Invalid な学名とされている。
- 41) ハッカ：ハッカ (標準和名) の学名は *Mentha canadensis* L.であり，*Mentha arvensis* L. var. *piperascens* (Malinv. Ex Holmes) H.Hara はシノニムである。
- 42) バニラ：YList では，バニラ (標準和名) の学名は *Vanilla mexicana* Mill.であり，*Vanilla planifolia* Andrews はシノニムとされているが，Tropicos では両学名はともに Accepted name であり，互いにシノニムの関係にあるとの記載はなかった。また，基原種のひとつとして記載されている「*Vanilla tahitiense* MOORE」という学名は確認できなかった。
- 43) パプリカ：パプリカという和名は確認できなかった。*Capsicum annuum* L.の標準和名はトウガラシである。また，香辛料抽出物「トウガラシ」，既存添加物「トウガラシ色素」との関連性についても調査が必要とされる。
- 44) ヒソップ：ヒソップは別名であり，標準和名はヤナギハッカである。
- 45) フェネグリーク：フェヌグリークは別名であり，標準和名はコロハ，学名は *Trigonella foenum-graecum* L. である。「フェネグリーク (*Trigenella foenum-graecum* L.)」は誤記と思われる。
- 46) ペパーミント：セイヨウハッカは別名であり，標準和名はコショウハッカである。学名は *Mentha × piperita* L.であり，基原種とし

て記載されている「*Mentha piperita* L.」は Tropicos において *Illegitimate* な学名とされている。

- 47) ホースミント：ヤマグルマハッカという和名は確認できなかった。*Monarda punctata* L. 及び *Monarda fistulosa* L. の標準和名は、それぞれケショウヤグルマハッカ及びヤグルマハッカである。これらは基原種ヤマグルマハッカの学名として併記されているが、互いにシノニムであるという記載はなかった。
- 48) マジョラム：マヨラナという和名は確認できなかった。*Origanum majorana* L. の標準和名はマジョラムである。
- 49) リンデン：基原種には「ボダイジュ (*Tilia cordata* MILL. または *Tilia vulgaris* L. var. *miqueliana* MAXIM.)」と記載されているが、*Tilia cordata* Mill. の標準和名はフユボダイジュであり、ボダイジュ (標準和名) の学名は、*Tilia miqueliana* Maxim. である。一方、「*Tilia vulgaris* L. var. *miqueliana* MAXIM.」という学名は確認できなかった。
- 50) レモングラス：Tropicos において、基原種レモングラスの学名のひとつとして挙げられている *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Will. Watson (Legitimate, 基原種に記載されている命名者 Stapf の学名は *Illegitimate*) は、もうひとつの学名である *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf とシノニムの関係にあるという記載はなかった。
- 51) レモンバーム：メリッサは別名であり、標準和名はコウスイハッカである。
- 52) ローズ：*Rosa damascena* Mill. (Tropicos では *Illegitimate* な学名とされ、Accepted name は *Rosa × damascena* Mill.) の標準和名はダマスクバラ、*Rosa gallica* L. の標準和名はガリカバラ、*Rosa × centifolia* の標準和名はセイヨウバラである。なお、ダマスクローズ、キャベジローズ、ローズガリカという和名は確認できなかった。
- 53) ローズマリー：ローズマリーは別名であり、標準和名はマンネンロウである。また、基原種に記載の「*Rosmarinus officinalis* L.」は、*Rosmarinus officinalis* L. の誤記と思われる。

また、既存添加物「ローズマリー抽出物」との関連性についても調査が必要とされる。

- 54) ワサビ：ワサビ (標準和名) の学名は *Eutrema japonicum* (Miq.) Koidz. であり、基原種記載の *Wasabia japonica* (Miq.) Matsum. はシノニムである。

C-2. 海外規格の調査

「香辛料抽出物」に含まれる植物由来の 74 種について、FCC 及び CFR Title21 にて品目の有無を調査した。品目は、既存添加物名簿に記載の学名のほか、今回の調査でより一般的と思われるものとして明らかになった学名でも検索を行った。FCC を調査した結果を表 2 に、CFR Title21 の結果を表 3 にそれぞれ示す。

FCC では、「香辛料抽出物」74 基原のうち 39 基原が各条 (Monograph) として収載されていた。これとは別に、各条「Spice Oleoresin」の項に記載されている基原もあり、Monograph が無い基原でもこの項に記載されているものが存在した。また、C-1 で学名の誤記ではないかと思われたもののうち、FCC と同じ記載がなされているものがあった。例えば、サボリーは FCC では「Savory Oil (Summer Variety)」に該当するが、この基原種は既存添加物名簿でも FCC でも *Satureia hortensis* L. と記載されている。この学名の属名は、C-1 20) でも述べたように YList 及び Tropicos には収載されていない。

CFR Title21 では、「香辛料抽出物」74 基原のうち品目があったもののほとんどが、一般に安全とみなされる物質として *Substances Generally Recognized as Safe* (GRAS 物質) に記載されていた。GRAS 物質は CFR Title21 part 182 に収載されている。多くが「香辛料及びその他の天然調味料・着香料として認められている」もののリストである part 182.10 と、「精油、含油樹脂 (無溶媒)、蒸留を含む天然抽出物」である part 182.20 の両方に記載されていたが、どちらかひとつの part のみに記載されているものも存在した (表 2)。一方、カンゾウやニンニクなどは「GRAS 確認済直接食品物質」である part 184 に記載されていた。これらはもともと part 182 に記載されていたものであるが、FDA が 1962

年以降に行った GRAS 物質に対する再検討の結果により、新規に移動された品目である¹⁾。

D. 結論

既存添加物名簿収載品目の一つである「香辛料抽出物」について、規格案作成に向けた情報収集を行った。本品目に含有されている 74 種の基原について、示された和名及び学名の妥当性を YList 及び Tropicós をもとに検討したところ、多くの基原について、基原製法本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、また、誤記と推測されるものも散見された。このうち、誤記と思われるものについては、FCC でも同様の記載が見られたため、規格案作成の際には詳細な検討が必要と思われる。また、「香辛料抽出物」74 基原種の多くが海外規格にも記載されていたが、ワサビなど日本の規格にのみ含まれているものの存在が判明した。「香辛料抽出物」の規格案作成時には、本研究で報告する情報をもとに、基原生物の学名等について再検討を行う必要がある。

E. 参考文献

1) 株式会社三菱総合研究所, 『諸外国における食品添加物の規制等に関する調査報告書』, 2014, p. 7.

F. 研究発表

1. 論文発表
該当無し
2. 学会発表
該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

枝番号	品目名	基原植物	Y-list	Tropicos
1	アサノミ	アサ科のアサ (<i>Cannabis sativa</i> L.)	アサ (標準) <i>Cannabis sativa</i> L.	<i>Cannabis sativa</i> L.
2	アサフェチダ	セリ科のアサフェチダ (<i>Ferula marthex</i> BOISS または <i>F. asafoetida</i> L.)	アギ (標準) <i>Ferula assafoetida</i> L.	○ <i>Ferula narthex</i> Boiss ○ <i>Ferula assafoetida</i> L. 両者がシノニムであるという記載はない。
3	アジョワン	セリ科のアジョワン (<i>Carum ajowan</i> BENTH.)	無	<i>Carum ajowan</i> Benth. & Hook. f.
4	アニス	セリ科のアニス (<i>Pimpinella anisum</i> L.)	アニス (標準) <i>Pimpinella anisum</i> L.	<i>Pimpinella anisum</i> L.
5	アンゼリカ	セリ科のアンゼリカ (<i>Peucedanum praeruptorum</i> DUMN., <i>Angelica sylvestris</i> L. var. <i>archangelica</i> L.) またはその他の <i>Angelica</i> 属	アンゼリカ (標準) <i>Angelica archangelica</i> L.	○ <i>Angelica archangelica</i> L. ○ <i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn. 両者がシノニムであるという記載はない。
6	ウイキョウ	セリ科のウイキョウ (<i>Foeniculum vulgare</i> GAERTN.)	ウイキョウ (標準) <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.
7	ウコン	ショウガ科のウコン (<i>Curcuma longa</i> L.)	ウコン (標準) <i>Curcuma longa</i> L.	<i>Curcuma longa</i> L.
8	オレガノ	シソ科のオレガノ (<i>Origanum vulgare</i> L.) またはその他の <i>Origanum</i> 属	ハナハッカ (標準) <i>Origanum vulgare</i> L. 別名: オレガノ	<i>Origanum vulgare</i> L.
9	オールスパイス	フトモモ科のオールスパイス (<i>Pimenta officinalis</i> LINDL., または <i>Myrtus pimenta</i> L., または <i>Pimenta dioica</i> MERR.)	オールスパイス (標準) <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr. (Accepted name) <i>Pimenta officinalis</i> Lindl. 及び <i>Myrtus pimenta</i> L. は, <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr. のシノニムである。

10	オレンジ ピール	ミカン科のキンカン (<i>Fortunella japonica</i> L.), スイートオレンジ (<i>Citrus sinensis</i> OSBECK), マンダリンオレンジ (<i>Citrus reticulata</i> BLANCO)	○キンカン (標準) <i>Citrus japonica</i> Thunb. <i>Fortunella japonica</i> (Thunb.) Swingle はシノニム. ○キンクネンボ (標準) <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck 別名: スイートオレンジ ○ポンカン (標準) <i>Citrus reticulata</i> Blanco	○ <i>Citrus japonica</i> Thunb. <i>Fortunella japonica</i> (Thunb.) Swingle はシノニム ○ <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck ○ <i>Citrus reticulata</i> Blanco
11	カショウ	ミカン科の (<i>Xanthoxylum piperitum</i> L.)	サンショウ (標準) <i>Zanthoxylum piperitum</i> (L.) DC.	<i>Zanthoxylum piperitum</i> DC.
12	カシヤ	クスノキ科のケイ (<i>Cinnamomum cassia</i> NEES ex. BLUME)	トンキンニッケイ (標準) <i>Cinnamomum cassia</i> (L.) D. Don 別名: ケイ	<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) D. Don
13	カモミール	キク科のカモミール (<i>Anthemis nobilis</i> L. —ローマンカモミール, <i>Matricaria chamomilla</i> L. var. <i>recutita</i> L. —ドイツカモミール)	○ローマカミツレ (標準) <i>Anthemis nobilis</i> L. ○カミツレ (標準) <i>Matricaria chamomilla</i> L.	○ <i>Anthemis nobilis</i> L. (Accepted name は <i>Chamaemelum nobile</i> (L.) All.) ○ <i>Matricaria chamomilla</i> L. (Legitimate) <i>Matricaria chamomilla</i> L. var. <i>recutita</i> (L.) Fiori はシノニム.
14	カラシナ	アブラナ科のクロガラシ (<i>Brassica nigra</i> KOCH), シロガラシ (<i>Sinapis alba</i> L., <i>B. hirta</i> MOENCH.), オウカラシ (<i>B. juncea</i> COSS.)	○クロガラシ (標準) <i>Brassica nigra</i> (L.) W. D. J. Koch ○シロガラシ (標準) <i>Sinapis alba</i> L. <i>Brassica hirta</i> Moench. はシノニム ○カラシナ (標準) <i>Brassica juncea</i> (L.) Czern	○ <i>Brassica nigra</i> (L.) W. D. J. Koch ○ <i>Sinapis alba</i> L. ○ <i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.

15	カルダモン	ショウガ科カルダモン (<i>Elettaria cardamomum</i> MATON var. <i>major</i> THAWAIFES-セイロンタイプ, <i>E. cardamomum</i> MATON var. <i>miniscula</i> BURKHILL-マラバルおよびマイソールタイプ)	無	○ <i>Elettaria cardamomum</i> (L.) Maton var. <i>major</i> (Sm.) Thwaites ○ <i>Elettaria cardamomum</i> (L.) Maton var. <i>minuscule</i> Burkill
16	カレーリーフ	ミカン科のナンヨウサンショウ (<i>Chalcas koenigii</i> または <i>Murraya koenigii</i> SPRENG.)	オオバゲツキツ (標準) <i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng.	<i>Murraya koenigii</i> (L.) Spreng. (Accepted name) <i>Chalcas koenigii</i> (L.) Kurz はシノニム
17	カンゾウ	マメ科のカンゾウ (<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. var. <i>uralensis</i> FISCH.)	カンゾウ (標準) <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.
18	キャラウェイ	セリ科のヒメウイキョウ (<i>Carum carvi</i> L.)	ヒメウイキョウ (標準) <i>Carum carvi</i> L.	<i>Carum carvi</i> L.
19	クチナシ	アカネ科のクチナシ (<i>Gardenia jasminoides</i> ELLIS または <i>G. augusta</i> MERR. var. <i>glandiflora</i> HORT.)	クチナシ (標準) <i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	○ <i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis ○ <i>Gardenia augusta</i> Merr. var. <i>grandiflora</i> (Lour.) Sasaki
20	クミン	セリ科のクミン (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	クミン (標準) <i>Cuminum cyminum</i> L.	<i>Cuminum cyminum</i> L.
21	クレソン	セリ科のオランダカラシ (<i>Nasturtium officinalis</i> R. BR.)	オランダガラシ (標準) <i>Nasturtium officinale</i> R. Br.	<i>Nasturtium officinale</i> W. T. Aiton (Accepted name) Legitimate な学名はシノニムである <i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i> (L.) Hayek である.
22	クローブ	フトモモ科のチョウジ (<i>Eugenia caryophyllata</i> THUMBERG, または <i>Syzygium aromaticum</i> MERR. Et PERRY)	チョウジノキ (標準) <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. Et L. M. Perry 別名: チョウジ	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. Et L. M. Perry <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb. (Illegitimate) はシノニム.

23	ケシノミ	ケシ科のケシ (<i>Papaver somniferum</i> L.)	ケシ (標準) <i>Papaver somniferum</i> L.	<i>Papaver somniferum</i> L.
24	ケーパー	フウチョウソウ科のフウチョウボク (<i>Capparis spinosa</i> L.)	○トゲフウチョウボク (標準) <i>Capparis spinosa</i> L. ○フウチョウボク (標準) <i>Capparis micracantha</i> DC. var. <i>henryi</i> (Matsum.) Jacobs どちらもフウチョウボク科	○ <i>Capparis spinosa</i> L. ○ <i>Capparis micracantha</i> var. <i>henryi</i> (Matsum.) Jacobs Accepted name はシノニムである <i>Capparis henryi</i> Matsum. である.
25	コショウ	コショウ科のコショウ (<i>Piper nigrum</i> L., <i>P. longum</i> L., <i>P. officinarum</i> D. C.)	○コショウ (標準) <i>Piper nigrum</i> L. ○インドナガコショウ (標準) <i>Piper longum</i> L.	○ <i>Piper nigrum</i> L. ○ <i>Piper longum</i> L. ○ <i>Piper officinarum</i> (Miq.) C. DC. Accepted name は, シノニムである <i>Piper retrofractum</i> Vahl である.
26	ゴマ	ゴマ科のゴマ (<i>Sesamum indicum</i> L.)	ゴマ (標準) <i>Sesamum indicum</i> L.	<i>Sesamum indicum</i> L. (Accepted name) 上記学名は non. cons. (保留名)
27	コリアンダー	セリ科のコリアンダー (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	コエンドロ (標準) <i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>Coriandrum sativum</i> L.
28	サッサfras	クスノキ科のサッサfras (<i>Sassafras verrifolium</i> NEES, または <i>Sassafras albidum</i> NEES)	サッサfras (標準) <i>Sassafras officinale</i> (L.) Nees et Th. Nees	<i>Sassafras albidum</i> (Nutt.) Nees (Accepted name) <i>Sassafras officinalis</i> T. Nees & C. H. Eberm. 及び <i>Sassafras variifolium</i> Kuntze はシノニム
29	サフラン	アヤメ科のサフラン (<i>Crocus sativus</i> L.)	サフラン (標準) <i>Crocus sativus</i> L.	<i>Crocus sativus</i> L.
30	サボリー	シソ科のセイボリー (<i>Satureia hortensis</i> L.ーキダチハッカ, <i>Satureia montana</i> L.ーウインターセイボリー)	無	○ <i>Satureia hortensis</i> L. ○ <i>Satureia montana</i> L. 互いにシノニムという記載はない.

31	サルビア	シソ科のサルビア (<i>Salvia officinalis</i> L. —ダルマテイアンおよびアメリカンセージ, <i>S. lacandulaefolia</i> VAHL. —スパニッシュセージ, <i>S. triloba</i> L. —グreekセージ)	セージ (標準) <i>Salvia officinalis</i> L. 別名: サルビア	○ <i>Salvia officinalis</i> L. ○ <i>Salvia triloba</i> L. f.
32	サンショウ	ミカン科のサンショウ (<i>Zanthoxylum piperitum</i> D. C.)	サンショウ (標準) <i>Zanthoxylum piperitum</i> (L.) D. C.	<i>Zanthoxylum piperitum</i> DC.
33	シソ	シソ科のシソ (<i>Perilla frutescens</i> BRITTON var. <i>acuta</i> KUDO—アカジソ, <i>P. forma viridicrispa</i> MAKINO—アオチリメンジソ)	○アカジソ (標準) <i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton var. <i>crispa</i> (Benth.) W. Deane f. <i>purpurea</i> (Makino) Makino ○チリメンアオジソ (標準) <i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton var. <i>crispa</i> (Benth.) W. Deane 'Viridi-crispa'	○ <i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton var. <i>crispa</i> (Benth.) W. Deane
34	シナモン	クスノキ科の肉桂 (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> BLUME, <i>Cinnamomum loureirii</i> NEES)	○セイロンニッケイ (標準) <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume はシノニム. ○ニッケイ (標準) <i>Cinnamomum sieboldii</i> Meisn.	○ <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl ○ <i>Cinnamomum sieboldii</i> Meisn. ○ <i>Cinnamomum loureirii</i> Nees (Illegitimate)
35	シャロット	ユリ科のシャロット (<i>Allium ascalonicum</i> L.)	シャロット (標準) <i>Allium cepa</i> L. var. <i>aggregatum</i> G. Don <i>Allium ascalonicum</i> L. はシノニム.	<i>Allium cepa</i> L. var. <i>aggregatum</i> G. Don

36	ジュニパーベリー	ヒノキ科のセイヨウネズ (<i>Juniperus communis</i> L.)	セイヨウネズ (標準) <i>Juniperus communis</i> L. var. <i>communis</i>	<i>Juniperus communis</i> L. var. <i>communis</i> これとは別に <i>Juniperus communis</i> L. も存在
37	ショウガ	ショウガ科のショウガ (<i>Zingiber officinale</i> ROSCOE)	ショウガ (標準) <i>Zingiber officinale</i> (Willd.) Roscoe	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe
38	スターアニス	モクレン科のダイウイキョウ (<i>Illicium verum</i> HOOK.)	トウシキミ (標準) <i>Illicium verum</i> Hook. f. 別名: ダイウイキョウ 科名: マツブサ科	<i>Illicium verum</i> Hook. f.
39	スペアミント	シソ科のミドリハッカ (<i>Mentha spicata</i> L. var. <i>viridis</i> L.)	ミドリハッカ (標準) <i>Mentha spicata</i> L.	<i>Mentha spicata</i> L. <i>Mentha spicata</i> L. var. <i>viridis</i> L. はシノニム.
40	セイヨウワサビ	アブラナ科のセイヨウワサビ (<i>Armoracia rusticana</i> GAERTN., <i>Cochlearia armoracia</i> L.) 等	セイヨウワサビ (標準) <i>Armoracia rusticana</i> P. Gaertn., B. Mey. et Scherb.	<i>Armoracia rusticana</i> P. Gaertn., B. Mey. et Scherb. (Accepted name) <i>Cochlearia armoracia</i> L. はシノニム.
41	セロリー	セリ科のセロリー (<i>Apium graveolens</i> L.)	セロリ (広義) <i>Apium graveolens</i> L. セロリ (標準) <i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> (Mill.) Pers.	<i>Apium graveolens</i> L. <i>Apium graveolens</i> var. <i>dulce</i> (Mill.) DC.
42	ソーレル	タデ科のスイバ (<i>Rumex acetosa</i> L.)	スイバ (標準) <i>Rumex acetosa</i> L.	<i>Rumex acetosa</i> L.
43	タイム	シソ科のタチジャコウソウ (<i>Thymus vulgaris</i> L. var. <i>capitatus</i> HOFFM., <i>Thymus serpyllum</i> L., <i>Thymus zygis</i> L.)	タチジャコウソウ (標準) <i>Thymus vulgaris</i> L.	○ <i>Thymus vulgaris</i> L. ○ <i>Thymus vulgaris</i> var. <i>capitatus</i> Willk. & Lange ○ <i>Thymus serpyllum</i> L. (Illegitimate, 他の名称不明)

				○ <i>Thymus zygis</i> L. これら4種は互いにシノニムの関係にはない。
44	タマネギ	ユリ科のタマネギ (<i>Allium cepa</i> L.)	タマネギ (標準) <i>Allium cepa</i> L.	<i>Allium cepa</i> L.
45	タマリンド	マメ科のタマリンド (<i>Tamarindus indica</i> L.)	タマリンド (標準) <i>Tamarindus indica</i> L.	<i>Tamarindus indica</i> L.
46	タラゴン	キク科のタラゴン (<i>Artemisia dracunculus</i> L. フランス種, <i>A. dracunculoides</i> PURSH—ロシア種)	タラゴン (標準) <i>Artemisia dracunculus</i> L.	<i>Artemisia dracunculus</i> L.
47	チャイブ	ユリ科のチャイブ (<i>Allium schoenoprasum</i> L.)	<i>Allium schoenoprasum</i> L. のみ 学名にもつ種は確認できず	<i>Allium schoenoprasum</i> L. のみ 学名にもつ種は確認できず
48	チャービル	セリ科のチャービル (<i>Anthriscus cerefolium</i> HOFFM.) またはスイートチャービル (<i>Myrrhis odorata</i> (L.) SCOPOLI)	ノハラジャク (標準) <i>Anthriscus scandicina</i> (F. Weber) Mansf 別名: チャービル	○ <i>Anthriscus caucalis</i> M. Bieb. (Accepted name) <i>Anthriscus scandicina</i> (F. Weber) Mansf. はシノニム ○ <i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm. ○ <i>Myrrhis odorata</i> (L.) Scop.
49	デイル	セリ科のイノンド (<i>Anethum graveolens</i> L.)	イノンド (標準) <i>Anethum graveolens</i> L.	<i>Anethum graveolens</i> L.
50	トウガラシ	ナス科のトウガラシ (<i>Capsicum frutescens</i> L., または <i>C. annum</i> L.)	○トウガラシ (標準) <i>Capsicum annum</i> L. ○キダチトウガラシ (標準) <i>Capsicum frutescens</i> L.	<i>Capsicum annum</i> L. (Accepted name) のシノニムとして <i>Capsicum frutescens</i> L. が記載されている。
51	ナツメグ	ニクズク科のナツメグ (<i>Myristica fragrans</i> HOUTTUYN)	ナツメグ (標準) <i>Myristica fragrans</i> Houtt.	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.

52	ニガヨモギ	キク科のニガヨモギ (<i>Artemisia absinthium</i> L.)	ニガヨモギ (標準) <i>Artemisia absinthium</i> L.	<i>Artemisia absinthium</i> L.
53	ニジェラ	キンポウゲ科のニジェラ (スモールフェネル) (<i>Nigella sativa</i> L.)	無	<i>Nigella sativa</i> L.
54	ニンジン	セリ科のニンジン (<i>Daucus carota</i> L.)	ニンジン (広義) <i>Daucus carota</i> L. ニンジン (標準) <i>Daucus carota</i> L. subsp. <i>sativus</i> (Hoffm.) Arcang.	<i>Daucus sativus</i> Roehl. (Accepted name) <i>Daucus carota</i> L. subsp. <i>sativus</i> (Hoffm.) Arcang はシノニム
55	ニンニク	ユリ科のニンニク (<i>Allium sativum</i> L. —セイヨウニンニク, <i>Allium sativum</i> L. forma <i>pekinense</i> MAKINO —オオニンニク)	○ニンニク (標準) <i>Allium sativum</i> L. ○セイヨウニンニク (標準) <i>Allium sativum</i> L. var. <i>sativum</i> <i>Hibiscus mutabilis</i> L. 'Versicolor' ○オオニンニク (標準) <i>Allium sativum</i> L. var. <i>pekinense</i> (Prokh.) F. Maek.	○ <i>Allium sativum</i> L. ○ <i>Allium sativum</i> L. var. <i>pekinense</i> (Prokhanov) F. Maek. ○YList で挙げた <i>Allium sativum</i> L. var. <i>sativum</i> <i>Hibiscus mutabilis</i> L. 'Versicolor' は記載がなかった。
56	バジル	シソ科のスイートバジル (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	メボウキ (標準) <i>Ocimum basilicum</i> L.	<i>Ocimum basilicum</i> L.
57	パセリ	セリ科のパセリ (<i>Petroselinum sativum</i> HOFFM, または <i>Petroselinum crispum</i> NYM.)	パセリ (標準) <i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Fuss	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Fuss <i>Petroselinum sativum</i> Hoffm. (Invalid) はシノニム.
58	ハッカ	シソ科のハッカ (<i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> MAL.)	ハッカ (標準) <i>Mentha canadensis</i> L. <i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> (Malinv. Ex Holmes) H. Hara はシノニム	<i>Mentha canadensis</i> L. <i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> (Malinv. Ex Holmes) H. Hara はシノニム

59	バニラ	ラン科のバニラ (<i>Vanilla planifolia</i> ANDREWS, <i>V. tahitiense</i> MOORE)	バニラ (標準) <i>Vanilla mexicana</i> Mill. <i>Vanilla planifolia</i> Andrews はシノニム.	○ <i>Vanilla mexicana</i> Mill. (Accepted name) ○ <i>Vanilla planifolia</i> Andrews (Accepted name) 両者がシノニムであるという記載はない.
60	パプリカ	ナス科のパプリカ (<i>Capsicum annum</i> L.)	トウガラシ (標準) <i>Capsicum annum</i> L.	<i>Capsicum annum</i> L.
61	ヒソップ	シソ科のヒソップ (<i>Hyssopus officinalis</i> L.)	ヤナギハッカ (標準) <i>Hyssopus officinalis</i> L. 別名: ヒソップ	<i>Hyssopus officinalis</i> L.
62	フェネグリーク	マメ科のフェネグリーク (<i>Trigenella foenum-graecum</i> L.)	コロハ (標準) <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. 別名: フェヌグリーク	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.
63	ペパーミント	シソ科のセイヨウハッカ (<i>Mentha piperita</i> L.)	コショウハッカ (標準) <i>Mentha × piperita</i> L. 別名: セイヨウハッカ	<i>Mentha × piperita</i> L. <i>Mentha piperita</i> L. は Illegitimate
64	ホースミント	シソ科のヤマグルマハッカ (<i>Monarda punctata</i> L., または <i>M. fistulosa</i> L.)	○ケショウヤグルマハッカ (標準) <i>Monarda punctata</i> L. ○ヤグルマハッカ (標準) <i>Monarda fistulosa</i> L.	○ <i>Monarda punctata</i> L. ○ <i>Monarda fistulosa</i> L.
65	マジョラム	マヨラナ (<i>Majorana hortensis</i> MOENCH. または <i>Origanum majorana</i>)	マジョラム (標準) <i>Origanum majorana</i> L.	○ <i>Origanum majorana</i> L. ○ <i>Majorana hortensis</i> Moench
66	ミョウガ	ショウガ科のミョウガ (<i>Zingiber mioga</i> THUNB.)	ミョウガ (標準) <i>Zingiber mioga</i> (Thunb.) Roscoe	<i>Zingiber mioga</i> (Thunb.) Roscoe
67	ラベンダー	シソ科のラベンダー (<i>Lavandula officinalis</i> L. または <i>L. vera</i> D. C.)	ラベンダー (標準) <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. <i>Lavandula officinalis</i> Chaix 及び <i>Lavandula vera</i> D. C. はシノニム.	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. <i>Lavandula officinalis</i> Chaix 及び <i>Lavandula vera</i> D. C. はシノニム.

68	リンデン	シナノキ科のボダイジュ (<i>Tilia cordata</i> MILL. または <i>Tilia vulgaris</i> L. var. <i>miqueliana</i> MAXIM.)	○ボダイジュ (標準) <i>Tilia miqueliana</i> Maxim. ○フユボダイジュ (標準) <i>Tilia cordata</i> Mill.	○ <i>Tilia miqueliana</i> Maxim. ○ <i>Tilia cordata</i> Mill.
69	レモングラス	イネ科のレモングラス (<i>Cymbopogon citratus</i> STAPF, および <i>Cymbopogon flexuosus</i> STAPF)	レモングラス (標準) <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	○ <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf ○ <i>Cymbopogon flexuosus</i> (Nees ex Steud.) Will. Watson (Legitimate , 命名者 Stapf の学名は Illegitimate) 両者がシノニムであるという記載はない。
70	レモンバーム	シソ科のメリッサ (<i>Melissa officinalis</i> L.)	コウスイハッカ (標準) <i>Melissa officinalis</i> L. 別名: メリッサ	<i>Melissa officinalis</i> L.
71	ローズ	バラ科のバラ (<i>Rosa damascena</i> MILL. —ダマスクローズ, <i>R. centifolia</i> L. —キャベジローズ, <i>R. gallica</i> L. —ローズガリカ)	○ダマスクバラ (標準) <i>Rosa damascena</i> Mill. ○ガリカバラ (標準) <i>Rosa gallica</i> L. ○セイヨウバラ (標準) <i>Rosa</i> × <i>centifolia</i>	○ <i>Rosa</i> × <i>damascena</i> Mill. (Accepted name) <i>Rosa damascena</i> Mill. は Illegitimate ○ <i>Rosa gallica</i> L. ○ <i>Rosa</i> × <i>centifolia</i>
72	ローズマリー	シソ科のローズマリー (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	マンネンロウ (標準) <i>Rosmarinus officinalis</i> L. 別名: ローズマリー	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
73	ローレル	クスノキ科のゲッケイジュ (<i>Laurus nobilis</i> L.)	ゲッケイジュ (標準) <i>Laurus nobilis</i> L.	<i>Laurus nobilis</i> L.
74	ワサビ	アブラナ科のワサビ (<i>Wasabia japonica</i> MATSUMURA)	ワサビ (標準) <i>Eutrema japonicum</i> (Miq.) Koidz. <i>Wasabia japonica</i> (Miq.) Matsum. はシノニム.	<i>Eutrema japonicum</i> (Miq.) Koidz. <i>Wasabia japonica</i> (Miq.) Matsum. はシノニム.

表2 FCC10 との比較

品目名	規格の有無		
	Spice Oleoresin	FCC10	
		有 無	その他 FCC での品目名
1. アサノミ			
2. アサフェチダ			
3. アジョワン			
4. アニス	○	○	Anise Oil
5. アンゼリカ	○	○	Angelica Root Oil Angelica Seed Oil
6. ウイキョウ	○	○	Fennel Oil
7. ウコン		○	Turmeric Oleoresin
8. オレガノ	○	○	Origanum Oil, Spanish Type
9. オールスパイス	○	○	Pimenta Oil Pimenta Leaf Oil
10. オレンジピール		○	Orange Oil, Distilled Orange Oil, Cold-pressed Orange Oil, Bitter, Cold-pressed Tangerine Oil, Coldpressed Mandarin Oil, Cold-pressed
11. カショウ			
12. カシミア		○	Cassia Oil
13. カモミール		○	Chamomile Oil, German Type Chamomile Oil, English Type
14. カラシナ		○	Mustard Oil
15. カルダモン	○	○	Cardamom Oil
16. カレーリーフ			
17. カンゾウ			
18. キャラウエー	○	○	Caraway Oil
19. クチナシ			
20. クミン	○	○	Cumin Oil
21. クレソン			
22. クローブ		○	Clove Oil Clove Stem Oil Clove Leaf Oil
23. ケシノミ			
24. ケーパー			
25. コショウ	○	○	Black Pepper Oil
26. ゴマ			
27. コリアンダー	○	○	Coriander Oil
28. サッサfras			
29. サフラン			
30. サボリー		○	Savory Oil (Summer Variety)

31. サルビア		○	Sage Oil, Spanish Type Sage Oil, Dalmatian Type
32. サンショウ			
33. シソ			
34. シナモン		○	Cinnamon Bark Oil, Ceylon Type Cinnamon Leaf Oil
35. シャロット			
36. ジュニパーベリー		○	JuniperBerries Oil
37. ショウガ	○	○	Ginger Oil
38. スターアニス			
39. スペアミント		○	Spearmint Oil
40. セイヨウワサビ			
41. セロリー	○	○	Celery Seed Oil
42. ソーレル			
43. タイム	○	○	Thyme Oil
44. タマネギ		○	Onion Oil
45. タマリンド			
46. タラゴン		○	Tarragon Oil
47. チャイブ			
48. チャービル			
49. デイル	○	○	Dill Seed Oil, Indian Type Dill Seed Oil, European Type Dillweed Oil, American Type
50. トウガラシ	○		
51. ナツメグ		○	Nutmeg Oil
52. ニガヨモギ			
53. ニジェラ			
54. ニンジン		○	Carrot Seed Oil
55. ニンニク		○	Garlic Oil
56. バジル	○	○	Basil Oil, Comoros Type Basil Oil, European Type
57. パセリ	○	○	Parsley Herb Oil Parsley Seed Oil
58. ハッカ		○	MenthaArvebsis Oil, Partially Dementholized
59. バニラ			
60. パプリカ	○		
61. ヒソップ			
62. フェネグリーク			
63. ペパーミント		○	Peppermint Oil
64. ホースミント			
65. マジョラム	○	○	Marjoram Oil, Sweet Marjoram Oil, Spanish Type
66. ミョウガ			

67. ラベンダー		○	Lavender Oil
68. リンデン			
69. レモングラス		○	Lemongrass Oil
70. レモンバーム			
71. ローズ		○	Rose Oil
72. ローズマリー	○	○	Rosemary Oil Rosemary Extract
73. ローレル	○	○	Laurel Leaf Oil
74. ワサビ			

表 3 CFR Title21 との比較

規格の有無 品目名	CFR Title21				その他のセクション
	GRAS Sec. 182.10 ^{a)}		GRAS Sec. 182.20 ^{b)}		
	有無	品目名	有無	品目名	
1. アサノミ					
2. アサフェチダ			○	Asafetida	
3. アジョワン					
4. アニス	○	Anise	○	Anise	
5. アンゼリカ	○	Angelica Angelica root Angelica seed	○	Angelica Angelica root Angelica seed	
6. ウイキョウ	○	Fennel, common	○	Fennel, sweet	
7. ウコン	○	Turmeric	○	Turmeric	
8. オレガノ			○	Origanum	
9. オールスパイス	○	Allspice	○	Allspice Pimenta Pimenta leaf	
10. オレンジピール			○	Citrus peels Mandarin Orange leaf Orange, sweet Orange, sweet, flowers Orange, sweet, peel Petitgrain mandarin or tangerine Tangerine	

11. カシヨウ					
12. カッシア	<input type="radio"/>	Cassia, Chinese Cinnamon, Chinese	<input type="radio"/>	Cassia bark, Chinese Cinnamon bark, Chinese Cinnamon leaf, Chinese	
13. カモミール	<input type="radio"/>	Camomile (chamomile), English or Roman Camomile (chamomile), German or Hungarian	<input type="radio"/>	Camomile (chamomile) flowers, Hungarian Camomile (chamomile) flowers, Roman or English	
14. カラシナ	<input type="radio"/>	Mustard, black or brown Mustard, brown Mustard, white or yellow	<input type="radio"/>	Mustard	
15. カルダモン	<input type="radio"/>	Cardamom (cardamom)	<input type="radio"/>	Cardamom seed (cardamom)	
16. カレーリーフ					
17. カンゾウ					Licorice [Sec. 184.1408] ^{c)}
18. キャラウエー	<input type="radio"/>	Caraway	<input type="radio"/>	Caraway	
19. クチナシ					
20. クミン	<input type="radio"/>	Cumin (cummin)	<input type="radio"/>	Cumin (cummin)	
21. クレソン					
22. クローブ					Clove [Sec. 184.1257] ^{c)}
23. ケシノミ	<input type="radio"/>	Poppy seed			
24. ケーパー	<input type="radio"/>	Capers			
25. コシヨウ	<input type="radio"/>	Pepper, black Pepper, white	<input type="radio"/>	Pepper, black Pepper, white	
26. ゴマ	<input type="radio"/>	Sesame			

27. コリアンダー	○	Coriander	○	Coriander	
28. サッサfras					Sassafras leaves (safrole free) [Sec. 172.510] ^{d)}
29. サフラン	○	Saffron	○	Saffron	
30. サボリー	○	Savory, summer Savory, winter	○	Savory, summer Savory, winter	
31. サルビア	○	Sage Sage, Greek	○	Sage Sage, Greek Sage, Spanish	
32. サンショウ					
33. シソ					
34. シナモン	○	Cassia, Saigon Cinnamon, Ceylon Cinnamon, Saigon	○	Cassia bark, Saigon Cinnamon bark, Ceylon Cinnamon bark, Saigon Cinnamon leaf, Ceylon Cinnamon leaf, Saigon	
35. シャロット					
36. ジュニパーベリー			○	Juniper (berries)	
37. ショウガ	○	Ginger	○	Ginger	
38. スターアニス	○	Anise, star Star anise			
39. スペアミント	○	Spearmint	○	Spearmint	
40. セイヨウワサビ	○	Horseradish			
41. セロリー	○	Celery seed	○	Celery seed	
42. ソーレル					

43. タイム	<input type="radio"/>	Thyme Thyme, wild or creepin	<input type="radio"/>	Thyme Thyme, white Thyme, wild or creeping	
44. タマネギ			<input type="radio"/>	Onion	
45. タマリンド			<input type="radio"/>	Tamarind	
46. タラゴン	<input type="radio"/>	Tarragon	<input type="radio"/>	Estragole (esdragol, esdragon, tarragon) Estragon (tarragon) Tarragon	
47. チャイブ	<input type="radio"/>	Chives			
48. チャービル	<input type="radio"/>	Chervil	<input type="radio"/>	Chervil	
49. デイル					Dill (American or European) [Sec. 184.1282] ^{c)}
50. トウガラシ	<input type="radio"/>	Capsicum Cayenne pepper Pepper, cayenne Pepper, red Paprika	<input type="radio"/>	Capsicum Paprika	
51. ナツメグ	<input type="radio"/>	Mace Nutmeg	<input type="radio"/>	Mace Nutmeg	
52. ニガヨモギ					
53. ニジェラ	<input type="radio"/>	Caraway, black (black cumin) Cumin, black (black caraway)			

54. ニンジン			○	Carrot	
55. ニンニク					Garlic [Sec. 184.1317] ^{c)}
56. バジル	○	Basil, sweet	○	Basil	
57. パセリ	○	Parsley	○	Parsley	
58. ハッカ					MenthaArvebsis Oil, Partially Dementholized
59. バニラ	○	Vanilla	○	Vanilla	
60. パプリカ	○	Paprika	○	Paprika	
61. ヒソップ	○	Hyssop	○	Hyssop	
62. フェネグreek	○	Fenugreek	○	Fenugreek	
63. ペパーミント	○	Peppermint	○	Peppermint	
64. ホースミント			○	Horsemint	
65. マジョラム	○	Marjoram, sweet	○	Marjoram, sweet	
66. ミョウガ					
67. ラベンダー	○	Lavender	○	Lavender	
68. リンデン	○	Linden flowers	○	Linden flowers	
69. レモングラス			○	Lemon grass	
70. レモンバーム	○	Balm (lemon balm)	○	Balm (lemon balm) Melissa	
71. ローズ			○	Rose absolute Rose (otto of roses, attar of roses) Rose buds Rose flowers	

				Rose fruit (hips) Rose leaves	
72. ローズマリー	<input type="radio"/>	Rosemary	<input type="radio"/>	Rosemary	
73. ローレル	<input type="radio"/>	Bay	<input type="radio"/>	Bay leaves Laurel berries Laurel leaves	
74. ワサビ					

- a) 一般に安全であると認められた物質のうち香辛料及びその他天然調味料・着香料
- b) 一般に安全であると認められた物質のうち精油，含油樹脂（無溶媒），蒸留を含む天然抽出物
- c) GRAS 確認済直接食品物質
- d) 食品添加物のうち着香料とあわせて用いる天然香料及び天然物

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

～ルチン（抽出物）の原料エンジュつぼみの成分解析～

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 既存添加物ルチン（抽出物）は、「アズキの全草，エンジュのつぼみ若しくは花又はソバの全草から得られた，ルチンを主成分とするものをいう」と定義されている．本研究では，原料となるエンジュのつぼみ（カイカ）の成分精査を目的に，カイカの50%エタノール抽出物を調製し，各種カラムクロマトグラフィーによる成分の単離精製を行った．その結果，16種の化合物〔rutin, quercetin, gallic acid, protocatechuic acid, maltol, ethylrutinoside, 4-hydroxybenzoic acid, maltol-3-*O*-{4'-*O*-*p*-coumaroyl-6'-*O*-(3-hydroxyl-3-methylglutaryl)}glucoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, kaempferol, *trans-p*-hydroxycinnamic acid, *cis-p*-hydroxycinnamic acid, *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (**13**), *N,N'*-diferuloylputrescine (**14**), *N,N'*-dicoumaroylputrescine (**15**), isorhamnetin 3-*O*-rutinoside〕を単離，同定した．カイカ50%エタノール抽出物のHPLC成分プロファイリングの結果，主検出成分はルチンであり，その他の化合物はマイナー成分であった．これらのうち，**13**～**15**は天然に稀少な化合物であるため，特徴成分としてこれらを検出することで，その基原がエンジュ由来であることを示す指標となり得る可能性が考察された．

研究協力者

好村守生 松山大学薬学部 准教授

A. 研究目的

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

本研究では，3原料のうち，エンジュのつぼみについて成分精査を実施した．

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

原料はカイカ（栃本天海堂製 Lot No. 021611002）を用いた．分離，精製にはカラム充填剤として YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシィ)，Chromatorex ODS（富士シリシア），MCI-gel CHP-20P（三菱化学），Sephadex LH-20（GE Healthcare），Develosil ODS（野村化学），Toyopearl HW-40F（東ソー）を用いた．その他の試薬はすべて特級又は高速液体クロマトグラフィー用を使用した．

B-2) 装置及び測定条件

逆相 HPLC（アイソクラティック溶出）は，以下の条件で測定した．カラム：YMC-pack ODS-AQ12S05-1502WT (2.0 i.d. × 150 mm) (YMC Co.,Ltd.)，検出器：SPD-20 A（島津製作所），ポンプ：LC-20 AT（島津製作所），カラム温

度: 40°C, 流速: 0.2 mL/min, 測定波長: 280 nm, 移動相: 0.01 M リン酸緩衝液: アセトニトリル混液 (75:25, 85:15, 9:1).

逆相 HPLC (グラジエント溶出) は, Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した.

測定条件を下記に記す. カラム: L-column ODS (2.1 i.d. × 150 mm) (化学物質評価研究機構), カラム温度: 40°C, 流速: 0.3 mL/min, 測定波長: 200~400 nm, 移動相: (A) 5%酢酸, 及び (B) アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A): 0→30 min (0→50%), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85→90%), 50→55 min (90→100%), 55→60 min (100%)].

NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) を使用し, 測定溶媒としてメタノール-*d*₄を用いた. ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [メタノール-*d*₄ (¹H: 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm)] を基準とした. 高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用した. 分光光度計は Shimadzu UV mini-1240 (島津製作所製) を使用した.

B-3) 抽出物の調製及び化合物の単離

カイカ 50%エタノール (EtOH) 抽出物について, 各種カラムクロマトグラフィー (YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20 他) による分離精製を繰り返し, 化合物の単離を行った. 単離した化合物については標品の分析データとの直接比較, あるいは文献値と比較することにより同定した.

C. 結果及び考察

C-1) 化合物の単離

カイカ (50 g) を 50%EtOH (500 mL) 中でホモジナイズし, ろ過, 濃縮後, 酢酸エチル (EtOAc) (300 mL) で分配を行った. この操作を 4 回繰り返し (計 200 g のカイカを使用), 得られた酢酸エチル分画物 (計 10.7 g) について各種カラムクロマトグラフィーにより分離精製を行った. また, 別途カイカ EtOH 抽出物についても調製し, 同様にカラムクロマトグラフィーによる分離精製を行い, 得られた各化合物について各種

機器分析データに基づいた構造解析を行った.

酢酸エチル分画物 (1.9 g) を EtOH に溶解させ, EtOH 不溶部に 50%メタノール (MeOH) を加えて遠心分離し, その沈殿部に更に MeOH を加え, 遠心分離を行った可溶部から単一の化合物が得られ, rutin (**1**) (71.7 mg) と同定した. また, 酢酸エチル分画物 (2.7 g) を EtOH に溶解させ, EtOH 可溶部を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し, EtOH 溶出部から quercetin (**2**) (90 mg) を得た. 次に酢酸エチル分画物 (10.7 g) の EtOH 溶出部で得られたフラクションについて各種カラムクロマトグラフィーを繰り返し, gallic acid (**3**), protocatechuic acid (**4**), maltol (**5**), ethylrutinoside (**6**), 4-hydroxybenzoic acid (**7**), maltol-3-*O*-[4'-*O*-*p*-coumaroyl-6'-*O*-(3-hydroxyl-3-methylglutaryl)] glucoside (**8**), kaempferol-3-*O*-rutinoside (**9**), kaempferol (**10**), *trans-p*-hydroxycinnamic acid (**11**), *cis-p*-hydroxycinnamic acid (**12**) を単離, 同定した.

カイカ EtOH 抽出物 (10.0 g) に EtOH を加え, 遠心分離を行った. この可溶部を各種カラムクロマトグラフィーに付し, *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (**13**), *N,N'*-diferuloyl-putrescine (**14**), *N,N'*-dicoumaroylputrescine (**15**), isorhamnetin 3-*O*-rutinoside (**16**) を単離, 同定した.

化合物の NMR データを以下に記す. 各化合物の構造を図 1 に示す.

Rutin (**1**): ¹H-NMR (500 Mz, CD₃OD) δ 7.66 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd, *J*=2.5, 8.5 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6, 8), 6.19 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6, 8), 5.08 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-1''), 4.52 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-1'''), 3.54 (1H, dd, *J*=2.0, 9.5 Hz, H-6''), 3.48 (1H, m, H-3'''), 3.40 (4H, m, H-2'', 3'', 6'', 5'''), 3.28 (1H, m, H-4'''), 1.11 (1H, d, *J*=6.5 Hz, H-6'''). ¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 179.3 (C-4), 165.4 (C-7), 162.9 (C-5), 159.3 (C-2), 158.4 (C-8a), 149.8 (C-4'), 145.8 (C-3'), 135.7 (C-3), 123.6 (C-6'), 123.1 (C-1'), 117.7 (C-2'), 116.0 (C-5'), 105.6 (C-4a), 104.9 (C-1''), 102.4 (C-1'''), 10.0 (C-6, 8), 94.9 (C-6, 8), 78.2 (C-3''), 77.1 (C-5''), 75.7 (C-2''), 74.0 (C-4'''), 72.2

(C-3'''), 71.3 (C-4''), 69.7 (C-5'''), 68.5 (C-6'').

Quercetin (**2**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 7.71 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-2'), 7.61 (1H, dd, $J=2.5, 8.5$ Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-6, 8), 6.16 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-6, 8)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ 177.2 (C-4), 165.5 (C-7), 162.5 (C-5), 158.2 (C-8a), 148.7 (C-4'), 148.0 (C-2), 146.2 (C-3'), 137.2 (C-3), 124.1 (C-1'), 121.7 (C-6'), 116.2 (C-5'), 116.0 (C-2'), 104.5 (C-4), 99.2 (C-6, 8), 94.4 (C-6, 8).

Maltol (**5**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 7.92 (1H, brs, H-2), 6.39 (1H, brs, H-3), 2.33 (3H, s, H-7).

Ethylrutinoside (**6**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 4.74 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-1'), 4.24 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1), 3.97 (1H, dd, $J=2.0, 11.5$ Hz, H-6), 3.89 (1H, m, H-1''), 3.82 (1H, dd, $J=2.0, 3.5$ Hz, H-2'), 3.65 (2H, m, H-3', 5'), 3.60 (2H, m, H-6, 1''), 3.38 (1H, m, H-5), 3.34 (2H, m, H-3, 4'), 3.26 (1H, m, H-4), 3.15 (1H, dd, $J=8.0, 9.0$ Hz, H-2), 1.25 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6'), 1.22 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-2'').

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) 104.0 (C-1), 102.2 (C-1'), 77.8 (C-3), 76.8 (C-5), 74.9 (C-2), 73.8 (C-4'), 72.1 (C-3'), 72.0 (C-2'), 71.6 (C-4), 69.7 (C-5'), 68.2 (C-6), 66.1 (C-1''), 18.0 (C-6'), 15.6 (C-2'').

4-Hydroxybenzoic acid (**7**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 7.86 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-2, 6), 6.80 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-3, 5). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ 163.3 (C-7), 133.0 (C-2, 6), 116.0 (C-3, 5).

Maltol-3-*O*-[4'-*O*-*p*-coumaroyl-6'-*O*-(3-hydroxyl-3-methylglutaryl)]glucoside (**8**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 8.02 (1H, d, $J=5.5$ Hz, H-2'''), 7.66 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7''), 7.46 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-2'', 6''), 6.79 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-3'', 5''), 6.45 (1H, d, $J=5.5$ Hz, H-3'''), 6.35 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8''), 4.92 (2H, m, H-1, 4), 4.12 (1H, m, H-6), 3.75 (1H, m, H-5), 3.70 (1H, m, H-3), 3.51 (1H, dd, $J=8.0, 9.5$ Hz, H-2), 2.52 (1H, m, H-2'), 1.22 (1H, m, H-4'), 1.24 (1H, s, H-3').

Kaempferol-3-*O*-rutinoside (**9**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD): δ 7.98 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-2', 6'), 6.70 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.09 (1H, d, $J=2$ Hz,

H-6), 5.96 (1H, d, $J=2$ Hz, H-8), 4.81 (1H, m, H-1''), 4.50 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-1'''), 3.81 (1H, m, H-5'''), 3.63 (1H, m, H-2'''), 3.52 (1H, m, H-3'''), 3.49 (2H, m, H-2'', 5''), 3.39 (1H, m, H-3''), 3.25 (1H, m, H-4''), 1.16 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-6''').

trans-p-Hydroxycinnamic acid (**11**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 7.53 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7), 7.42 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-2, 6), 6.79 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-3, 5), 6.29 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8).

cis-p-Hydroxycinnamic acid (**12**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 7.43 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-2, 6), 6.67 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-3, 5), 6.25 (1H, d, $J=13$ Hz, H-7), 5.86 (1H, d, $J=13$ Hz, H-8).

N-p-Coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (**13**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 7.435 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-7), 7.428 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-7'), 7.387 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-2, 6'), 7.106 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-2), 7.017 (1H, dd, $J=2.0$ Hz, 8.0 Hz, H-6), 6.786 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 6.777 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-3', 5'), 6.416 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-8), 6.396 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-8'), 3.873 (3H, s, -OMe), 3.324 (4H, m, H-10, 10'), 1.617 (4H, m, H-11, 11').

N,N'-Diferuloylputrescine (**14**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 7.43 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-7, 7'), 7.11 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2, 2'), 7.02 (1H, dd, $J=2.0$ Hz, 8.0 Hz, H-6, 6'), 6.79 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5, 5'), 6.42 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-8, 8'), 3.87 (3H, s, -OMe), 3.32 (4H, m, H-10, 10'), 1.62 (4H, m, H-11, 11').

N,N'-Dicoumaroylputrescine (**15**): $^1\text{H-NMR}$ (500 Mz, CD_3OD) δ 7.44 (2H, d, $J=16.0$ Hz, H-7, 7'), 7.39 (4H, d, $J=8.5$ Hz, H-2, 2', 6, 6'), 6.78 (4H, d, $J=8.5$ Hz, H-3, 3', 5, 5'), 6.40 (2H, d, $J=16.0$ Hz, 8, 8'), 3.32 (4H, m, 10, 10'), 1.62 (4H, m, 11, 11').

C-2) カイカ抽出物の HPLC 分析

単離した各化合物を標品とし、カイカ抽出物の HPLC 分析を行った。HPLC 成分プロファイルングデータを図 2 に示す。主検出成分は rutin (**1**)であった。

D. 結論

ルチン (抽出物) の原料となるエンジュのつ

ぼみ（カイカ）の成分精査を行った結果，16種の化合物〔rutin (1), quercetin (2), gallic acid (3), protocatechuic acid (4), maltol (5), ethylrutinoside (6), 4-hydroxybenzoic acid (7), maltol-3-*O*-{4'-*O*-*p*-coumaroyl-6'-*O*-(3-hydroxyl-3-methylglutaryl)} glucoside (8), kaempferol-3-*O*-rutinoside (9), kaempferol (10), *trans-p*-hydroxycinnamic acid (11), *cis-p*-hydroxycinnamic acid (12), *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (13), *N,N'*-diferuloylputrescine (14), *N,N'*-dicoumaroylputrescine (15), isorhamnetin 3-*O*-rutinoside (16)〕を単離，同定した．カイカ50%EtOH抽出物のHPLC成分プロファイリングの結果，主検出成分はrutin (1)であり，その他の化合物はマイナー成分であった．これらのうち，13～15は天然に稀少な化合物であるため，特徴成分としてこれらを検出することで，その基原がエンジュ由来であることを示す指標となり得る可能性が考察された．

E. 参考文献

- 1)厚生労働省告示第120号（1996）“既存添加物名簿”平成8年4月16日
- 2)Choi SW., Lee SK., Kim EO., Oh JH., Yoon KS., Parris N., Hicks KB., Moreau RA.; *J. Agric. Food Chem.* 55, 3920–3925 (2007)

F. 研究業績

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

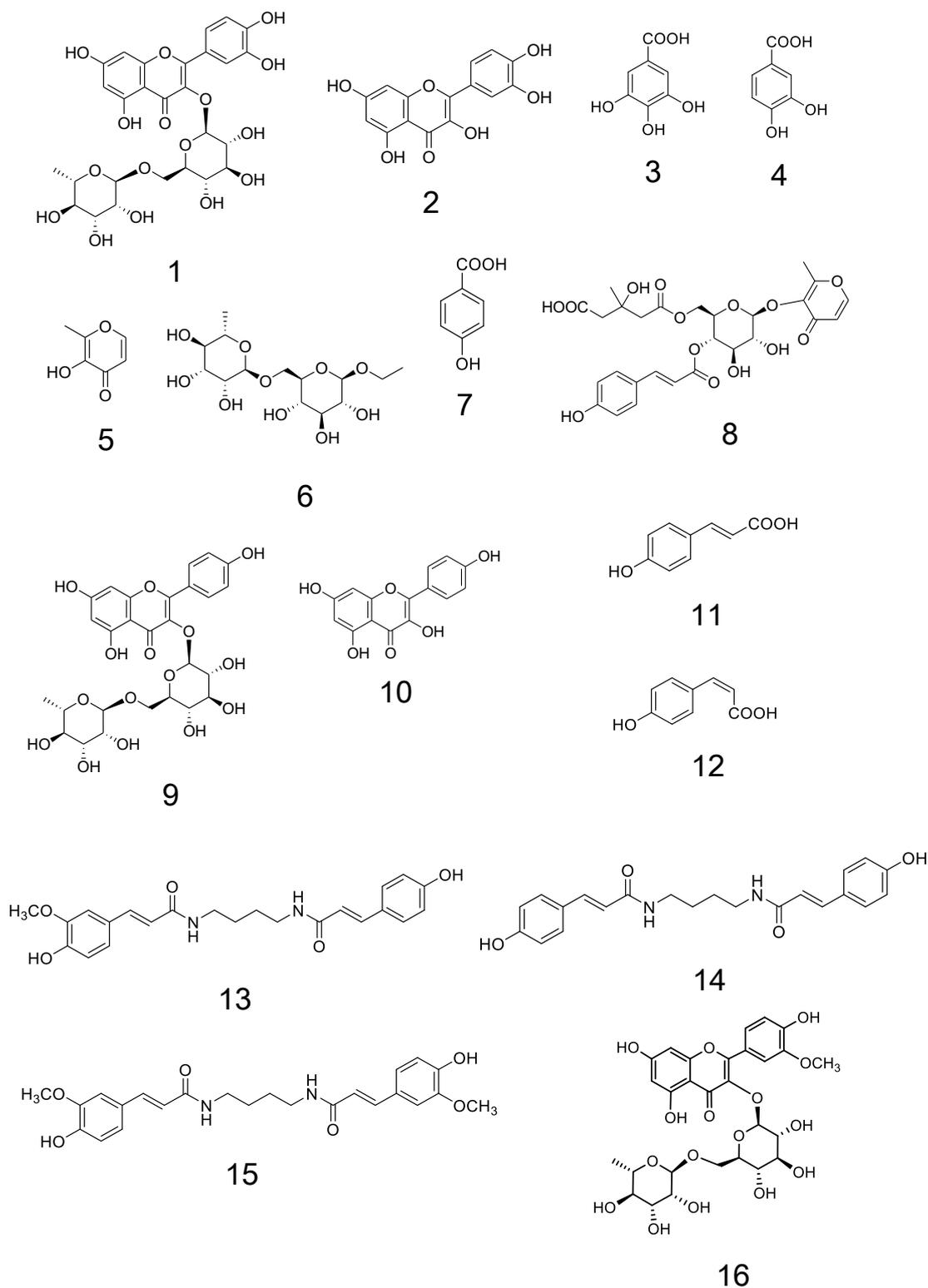


図1. 化合物の化学構造

1: rutin, 2: quercetin, 3: gallic acid, 4: protocatechuic acid, 5: maltol, 6: ethylrutinoside, 7: 4-hydroxybenzoic acid, 8: maltol-3-O-{4'-O-p-coumaroyl-6'-O-(3-hydroxyl-3-methylglutaryl)}glucoside, 9: kaempferol-3-O-rutinoside, 10: kaempferol, 11: *trans*-*p*-hydroxycinnamic acid, 12: *cis*-*p*-hydroxycinnamic acid, 13: *N*-*p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine, 14: *N,N'*-diferuloylputrescine, 15: *N,N'*-dicoumaroylputrescine, 16: isorhamnetin 3-O-rutinoside

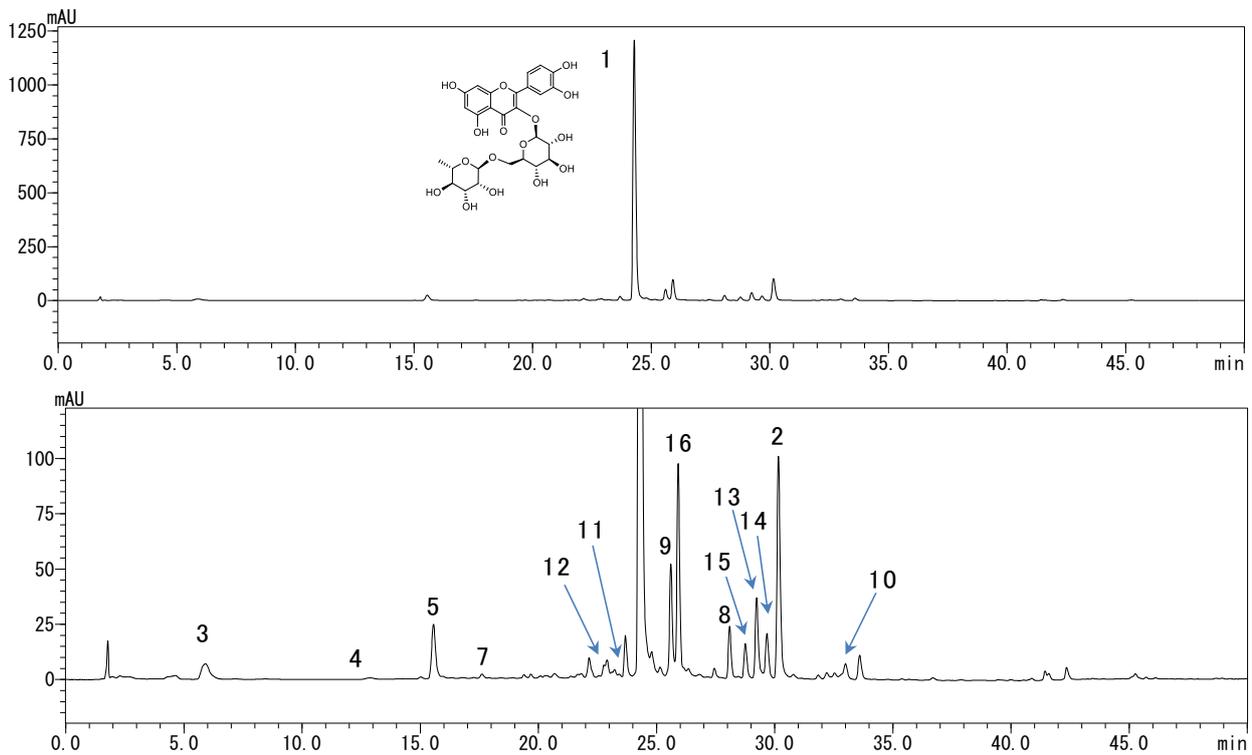


図 2. カイカ抽出物の HPLC 成分プロファイリング (at 280 nm)

1: rutin, 2: quercetin, 3: gallic acid, 4: protocatechuic acid, 5: maltol, 6: ethylrutinoside, 7: 4-hydroxybenzoic acid, 8: maltol-3-*O*-{4'-*O*-*p*-coumaroyl-6'-*O*-(3-hydroxyl-3-methylglutaryl)}glucoside, 9: kaempferol-3-*O*-rutinoside, 10: kaempferol, 11: *trans-p*-hydroxycinnamic acid, 12: *cis-p*-hydroxycinnamic acid, 13: *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine, 14: *N,N'*-diferuloylputrescine, 15: *N,N'*-dicoumaroylputrescine, 16: isorhamnetin 3-*O*-rutinoside

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

～レイシ抽出物の成分解析～

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 レイシ抽出物は既存添加物名簿に記載され、「レイシ抽出物（マンネンタケ（*Ganoderma lucidum* Karst.）の菌糸体若しくは子実体又はその培養液から抽出して得られたものをいう）のうち、子実体から得られたものである」と定義される苦味料である。本添加物に関する化学的データは乏しく、品質規格作成のための化学的検討として、HPLC及びTLCによる予備的分析を行った。逆相HPLC分析の結果、UV検出による主要なピークは認められなかった。一方、TLC分析の結果、酢酸エチル/メタノール/水系溶媒で展開し、UV照射による検出で、 R_f 0.6付近に明瞭な数個のスポットが確認された。今後、このスポットについて分離精製を行い、化合物の同定を試みる予定である。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 准教授

A. 研究目的

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

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

レイシ抽出物は日本食品添加物協会を通じて入手した。試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用を用いた。

B-2) 装置及び測定条件

逆相 HPLC は、Shimadzu Prominence システム（島津製作所）を使用した。測定条件を下記に記す。カラム：L-column ODS (2.1 i.d. × 150 mm)（化学物質評価研究機構）、カラム温度：40°C、流速：0.3 mL/min、測定波長：200～400 nm、移動相：(A) 5%酢酸、及び (B) アセトニトリル〔濃度勾配条件 (B in A)：0→30 min (0→50%)、30→35 min (50→85%)、35→40 min (85%)、40→50 min (85→90%)、50→55 min (90→100%)、55→60 min (100%)〕。薄層クロマトグラフィー（TLC）は、TLC Silica gel 60F₂₅₄ plate（Merck 社製）を用いた。展開溶媒は酢酸エチル/メタノール/水混液（7：2：1）、注入量は 1 μL。

B-3) 試料調製

試料約 0.1 g をメタノール 10 mL に加え超音波処理後、遠心分離して得られた上澄みを試料溶液 1 とした。また、日本食品添加物協会発行の第 4 版既存添加物自主規格記載の確認試験に準じて試料溶液 2 を調製した。

C. 結果及び考察

C-1) HPLC 分析

レイシ抽出物の試料溶液 1 について逆相 HPLC 分析を行った結果、254 (or 280) nm 検出で保持時間がほぼ同じ範囲に 10 数ピークが観察され、主たる検出ピークは認められなかった (図 1)。よって、本結果のみで判断すると HPLC による主成分分析は困難であることが示唆された。

第 4 版既存添加物自主規格記載の確認試験は HPLC でガノデリン酸 A を検出することが採用されている。本試験法記載に従って調製した試料溶液 2 について HPLC 分析した結果、同じように 10 数ピークが観察され、特にガノデリン酸 A を明瞭に分析できるものではなかった (図 2)。

C-2) TLC 分析

レイシ抽出物の試料溶液 1 について、TLC 分析を行った結果、 R_f 0.6 付近に明瞭な数個のスポットが確認された (図 3)。今後、このスポットについて分離精製を行い、化合物の同定を試みる予定である。

D. 結論

レイシ抽出物の化学的検討として、HPLC 及び TLC による予備的分析を行った。逆相 HPLC 分析の結果、UV 検出による主要なピークは認められなかった。一方、TLC 分析の結果、酢酸エチル/メタノール/水系溶媒で展開し、UV 照射による検出で、 R_f 0.6 付近に明瞭な数個のスポットが確認された。今後、このスポットについて分離精製を行い、化合物の同定を試みる予定である。

E. 参考文献

第 4 版既存添加物自主規格，平成 20 年 10 月，
日本食品添加物協会

F. 研究業績

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

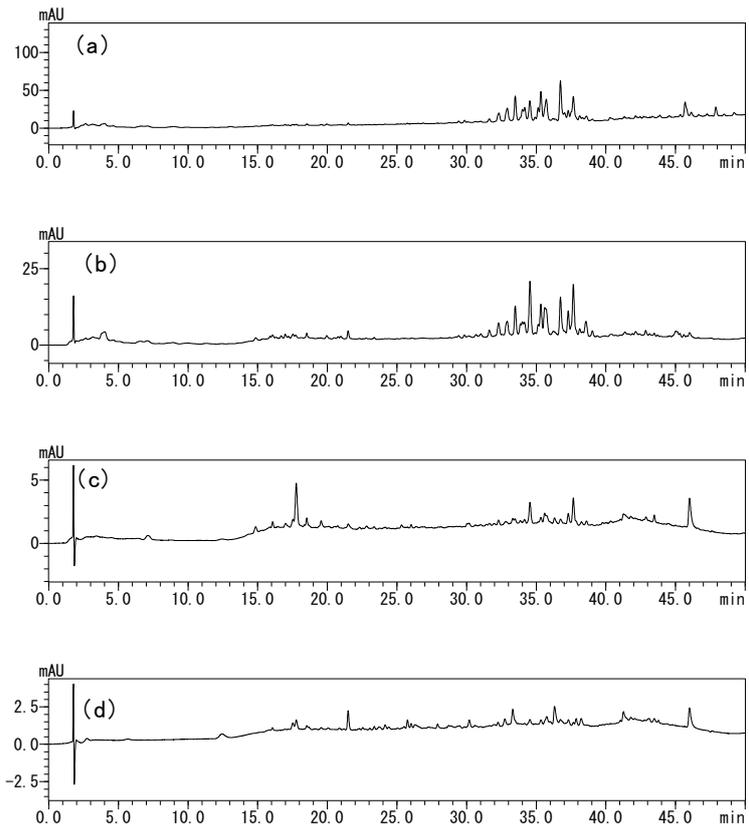


図 1. 試料溶液 1 の HPLC 分析

(a) 254 nm, (b) 280 nm, (c) 320 nm, (d) 360 nm 検出

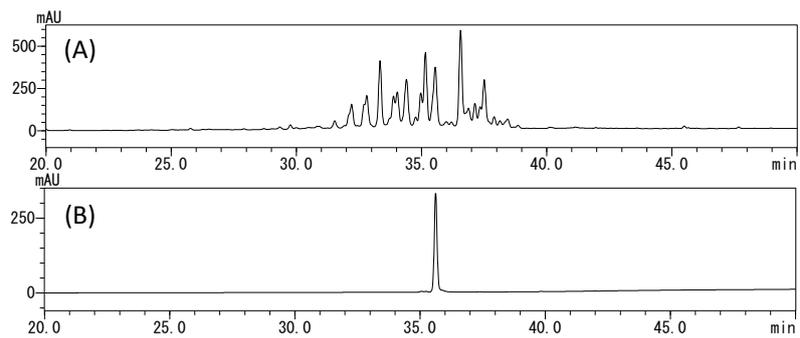


図 2. 試料溶液 2 の HPLC 分析 (at 254 nm)

(A) 試料溶液, (B) Ganoderic acid A

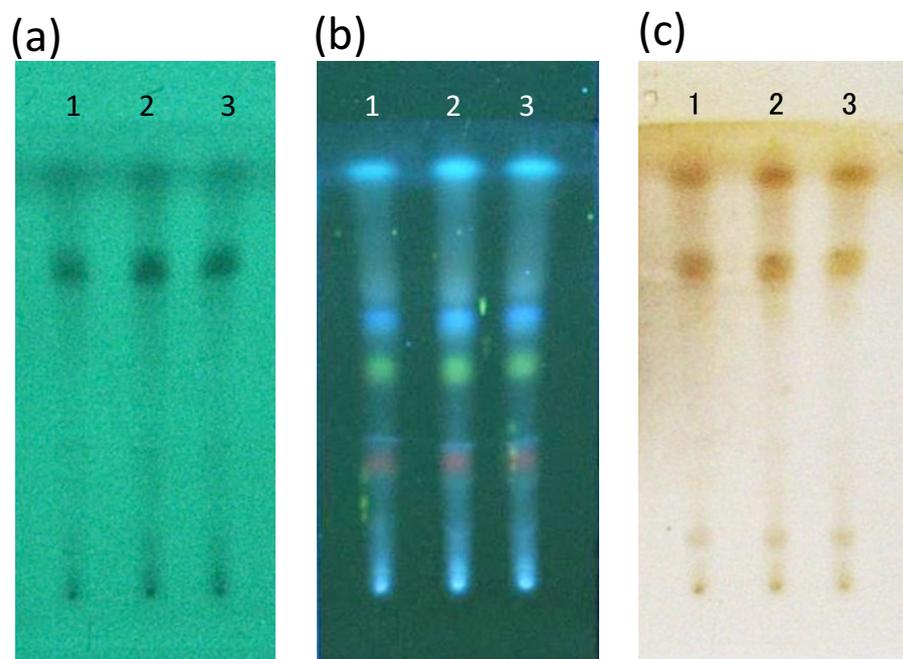


図 3. 試料溶液 1 の TLC 分析

1～3 は同じもの (3 回分析)

(a) 254 nm, (b) 366 nm, (c) 希硫酸試液噴霧後加熱

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の含有成分解析に関する研究

～既存添加物ゴマ油不けん化物の成分規格の検討～

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

研究要旨 昨年度に引き続き、日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第4版）」に記載されているゴマ油不けん化物の成分規格の検討を実施した。ゴマ油不けん化物は、ゴマ (*Sesamum indicum* Linné) の種子から得られた、セサミン及びセサモリンを主成分であると定義された。しかし、これらの標準品は高価格であり、定量評価が困難である。そこで、相対モル感度係数を用いたシングルリファレンスHPLC定量法を構築した。さらに、本手法をゴマ油不けん化物の試験法のみならず、様々なゴマ油由来製品に関する定量評価へ応用するため、分析対象をセサモール、セサミン、エピセサミン及びセサモリンとした。本手法では、ゴマリグナン類と極大吸収波長が類似であるシングルリファレンス（ピペロナル、セサモールのメチル誘導体、ブチル誘導体及びヘキシル誘導体）をデザインし、定量の妥当性を検討した。その結果、ピペロナル、セサモールのメチル誘導体及びブチル誘導体において、絶対検量線法と同等の定量性を示し、異なる分析条件でも高い再現性を保証することが確認された。

A. 研究目的

ゴマ油不けん化物(Sesame Seed Oil Unsaponified Matter)は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）に規定されている。ゴマ油不けん化物の定義は、ゴマ (*Sesamum indicum* Linné) の種子から得られた、セサモリンを主成分とするものである¹⁾。確認試験では、順相系液体クロマトグラフィーによる測定であったが、逆相系液体クロマトグラフィーにおいても分離分析が可能であった。また、成分解析では、セサミンおよびセサモリンが主成分であり、セサモールは本品の不純物であることが確認できた。以前では、逆相系液体クロマトグラフィーを用いた成分規格の設定を行い、その評価を実施したが、分析を行う上で高純度な標準品が必要となった。しかし、セサミンおよびセサモリンの標準品は高額であり、入手困難となっている。そこで、簡便かつ効率的な高速向流クロマトグラフィー(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)による単離精製を試み

た²⁻³⁾。二相溶媒系にはヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水溶液(7/3/7/3, v/v/v/v)を用いた結果、高純度のセサミンおよびセサモリンを単離精製することができた⁴⁾。

本年度では、ゴマ油不けん化物だけでなく、様々なゴマ関連食品に応用できる定量評価法を検討した。その方法として、相対モル感度係数(Relative Molar Sensitivity, RMS)を用いたシングルリファレンスHPLC定量法を構築することとした。本手法は、RMSとピーク面積比により分析対象物質を間接的に定量することが可能である。つまり、RMSを設定することにより、分析対象物質の標準品に頼らず定量可能な簡便かつ迅速な方法といえる⁵⁾。本研究における分析対象は、ゴマリグナン類のセサモール、セサミン、エピセサミンおよびセサモリンとした(Fig. 1)。さらに、ゴマリグナン類と同等の極大吸収波長を持つ化合物をシングルリファレンスとして採用するため、ゴマリグナン類と共通構造を持つ類似化合物を有機合成にてデザインすることを試みた⁶⁾。デザインした4種類のシ

シングルリファレンスを用いて、保持時間や定量の妥当性を比較し、ゴマリグナン類の最適なシングルリファレンス定量法を検討することとした。

B. 研究方法

ゴマ油不けん化物は国内で市販されているものを用いた。ゴマ油はかどや製油社製、セサミン EX はサントリーウエルネス社製を購入した。

電子天秤：メトラ製 METTLER ML303/52

LC 装置：島津製作所社製 LC-20AD/SIL-20AC/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS システム

定量 NMR 装置：日本電子社製 JMM-ECA 600MHz

ゴマリグナン類のおよびシングルリファレンス 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% ギ酸アセトニトリル (B) を使用し、A/B：55/45 のアイソクラティック分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100V column (4.6×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40℃

流速：1.0 mL/min

検出波長：190-800 nm (定量：290 nm)

注入量：10 μL

ゴマリグナン類に対するシングルリファレンスのデザイン：セサモールにヨードメタン、1-ブロモブタン、1-ブロモヘキサンを反応させ、メチル誘導体、ブチル誘導体およびヘキシル誘導体を合成した。触媒として、炭酸カリウムを使用した。また、流通されているゴマリグナン類の類似化合物として、ピペロナルも用いた。

定量 NMR による純度評価：試料として、セサモール、セサミンおよびピペロナルは和光純薬社製、エピセサミンおよびセサモリンはナカライテスク社製、メチル誘導体、ブチル誘導体およびヘキシル誘導体は本研究にて合成したものを用いた。

データ数：60,000

パルス角：90°

遅延時間：60 秒

繰り返し回数：8~16 回

観測幅：-5~15 ppm

溶媒：重クロロホルム

RMS の算出：4 種のゴマリグナン類および 4 種のデザインしたシングルリファレンスについて、0~100 μM で絶対検量線を作成した。各シングルリファレンスに対するゴマリグナン類の検量線の傾きの比より、RMS を算出した。

シングルリファレンス HPLC 定量法の妥当性評価：求めた RMS を用いて、絶対検量線法との定量値を比較した。また、異なる分析条件（カラムや移動相）でのシングルリファレンス HPLC 定量法での定量性を検討した。用いたカラムは TSKgel ODS-100V（東ソー社製）、XBridge C18（Waters 社製）、Inertsil ODS-2（GLサイエンス社製）、YMC-Pack Pro C18（YMC 社製）および KINETEX（Phenpmex 社製）である。さらに、添加するシングルリファレンスを 25 μM, 50 μM と 100 μM の 3 種類の異なる濃度において定量値の再現性を確認した。

C. 研究結果

HPLC による分離分析を実施した。各モニタリングする波長を決定するため、ゴマリグナン類をフォトダイオードアレーにて検出した。その結果の HPLC クロマトグラムをおよび紫外可視吸収スペクトルを Fig. 2 および 3 に示した。

ゴマリグナン類に対するシングルリファレンスをデザインし、有機合成を実施した。セサモールをアルキル化し、メチル誘導体、ブチル誘導体やヘキシル誘導体を合成した (Fig. 4)。さらに、セサモールの類似化合物としてピペロナルもシングルリファレンスとして検討することとした。なお、デザインしたシングルリファレンスにおいても、LC の分離分析を行い、各 HPLC クロマトグラムおよび紫外吸収スペクトルを得た (Fig.5 および 6)。

ゴマリグナン類およびシングルリファレンスを定量 NMR にて純度評価した。その結果を Fig.7 および Table 1 に示し、いずれも 97% 以上の高純度であることが確認された。

定量 NMR によって得られた定量値をもとに、各ゴマリグナン類およびシングルリファレンスの 0~100 μM の絶対検量線を作成した (Fig.8)。各シングルリファレンスに対するゴマリグナン類の検量線の傾きの比より、RMS を算出し Table 2 に示した。なお、セサモールのヘキシル誘導体は感度が低く、20~100 μM の範囲でしか検量線を作成できなかった。

次に、シングルリファレンス定量法で得られたゴマリグナン類の定量値と従来の絶対検量線法による定量値を比較し、本手法の妥当性を検討した結果を Table 3 に示す。ヘキシル誘導体はゴマリグナン類と大幅に保持時間がずれており、定量性に乏しく、シングルリファレンスとして不適合であると判断した。

また、5 種の異なるカラムや移動相を用いて、各ゴマリグナン類の定量値を算出した。各カラムでの HPLC クロマトグラムと各定量値を Fig.9~13 と Table 4~7 に記した。その結果、どのカラムを用いても、再現性の高い定量値が得られた。特に、セサモールのブチル誘導体が最もシングルリファレンスの中で RSD% の小さく良好な値を示した。

D. 考察

本研究では、ゴマ油不けん化物 (Sesame Seed Oil Unsaponified Matter) に含まれるセサミンおよびセサモリンの規格試験の検討、それらに加えて、ゴマ関連製品に含まれる他のゴマリグナン類であるセサモールおよびエピセサミンにおいて新たな定量評価法を構築した。ゴマリグナン類は標準品の価格が高く、入手困難であり、簡便かつ安価な定量法が求められていた。そこで、分析対象の標準品を用いない、RMS を用いたシングルリファレンス HPLC 定量法を新たに構築した。本研究では、ゴマリグナン類に類似構造をもつシングルリファレンスを得るために、セサモールのアルキル化によりデザインした。

それにより、シングルリファレンスとして、セサモールのメチル誘導体、ブチル誘導体、ヘキシル誘導体およびピペロナール (セサモールの類似化合物) を検討した。4 種のゴマリグナンおよびシングルリファレンスに関して、絶対検量線の傾きの比より RMS を求めた結果、どの濃度幅においても再現性の高い RMS が得られた。算出した RMS を用いて絶対検量線法と比較した結果、ヘキシル誘導体での定量値はばらつきが大きく、ピペロナールは最も定量性が高いことが確認された。また、カラムや移動相の条件を変更し、シングルリファレンス HPLC 定量法を検討した結果、いずれも RSD 5% 以下のゴマリグナン類の定量値が得られ、その中でセサモールのブチル誘導体が最も RSD の低い定量値を示した。ゆえに、本手法により、シングルリファレンスを用いることで、4 種類のゴマリグナン類を標準品なしで一斉定量することができた。本結果より、吸収極大も同じであるブチル誘導体が最適なゴマリグナン類のシングルリファレンスであるといえる。

E. 結論

本結果より、ゴマリグナン類 (セサモール、セサミン、エピセサミンおよびセサモリン) は RMS によるシングルリファレンス HPLC 定量法により既存添加物ゴマ油不けん化物だけでなく、ゴマ関連製品において安価かつ簡便に定量することができることが確認された。下記にその条件を示す。しかし、ゴマ油不けん化物やゴマ関連製品に唯一セサモールが含まれておらず、こちらの定量評価を実施する必要があると考えている。

シングルリファレンス HPLC 定量法の条件

移動相 : A/B=0.1%ギ酸メタノール/0.1%ギ酸水溶液

流速 : 1.0 mL/min

対象化合物 : セサモール、セサミン、エピセサミン、セサモリン

シングルリファレンス : セサモールのブチル誘導体

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: シングルリファレンス定量分析: 相対モル感度係数に基づく新たな HPLC 定量法の開発とゴマリグナンへの応用 日本薬学会第 138 年会 (金沢), 2018 年 3 月

G. 知的財産権の出願, 登録状況

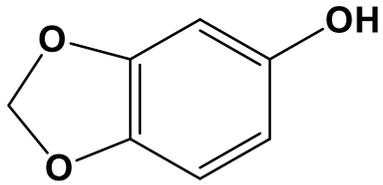
特になし

H. 健康危機情報

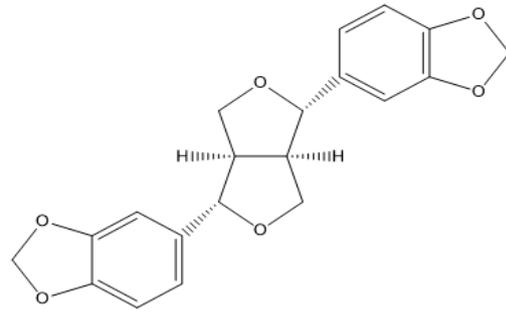
特になし

I. 参考文献

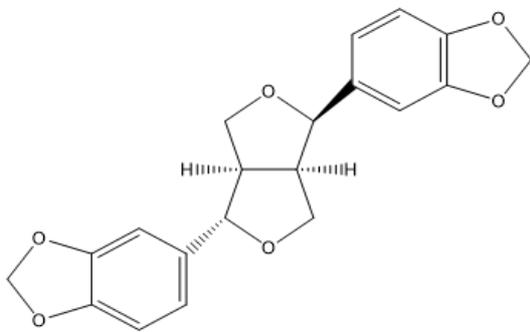
- 1) 日本食品添加物協会 ; 第 4 版 既存添加物自主規格 平成 20 年 10 月 13 日発行
- 2) Wang X, Lin Y, Geng Y, Li F, Wang D; *Cereal Chem.* 86, 23-25. (2009)
- 3) Jeon JS, Park CL, Syed AS, Kim YM, Cho IJ, Kim CY; *J. Chromatogr. B* 1011, 108-113
- 4) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Takeuchi H, Nakagawa K, Akiyama H, Sato K, Inoue K ; *J.Sep.Sci.* 39, 3898-3905 (2016)
- 5) Nishizaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Sugimoto N, Numata M, Ihara T; *Anal. Chem.* 89, 6963-6968 (2017)
- 6) Paul FS, William A; *J. Org. Chem.* 52, 1972-1979 (1987)



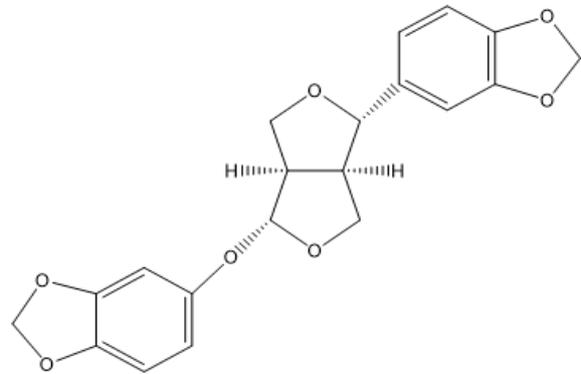
セサモール



セサミン



エピセサミン



セサモリン

Fig.1 ゴマリグナン類の構造

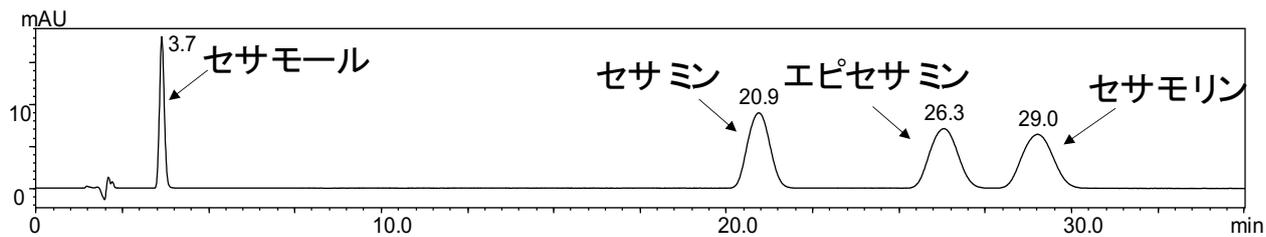


Fig. 2 ゴマリグナン類の HPLC クロマトグラム (検出波長：290 nm)

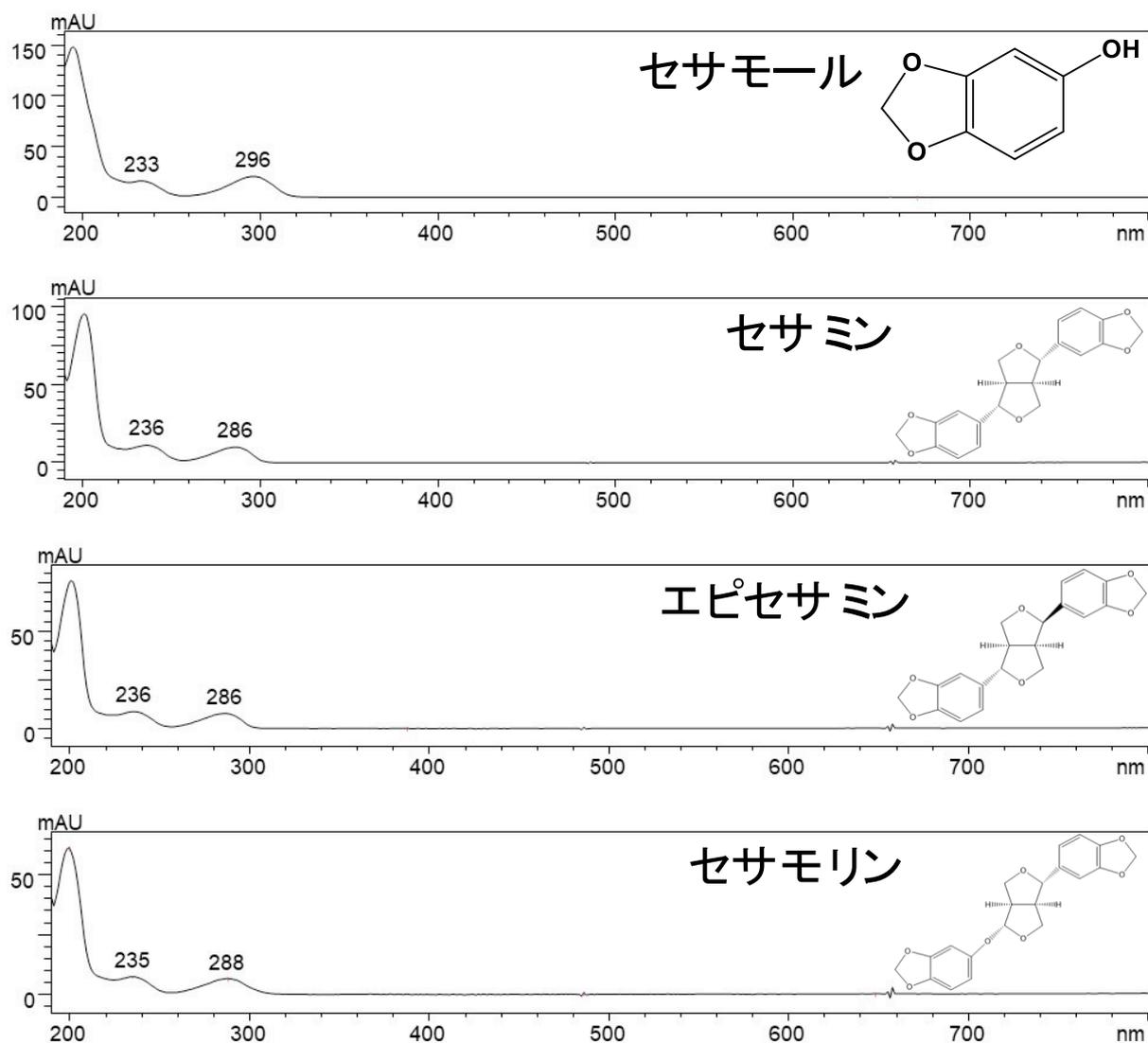


Fig. 3 ゴマリグナン類の紫外可視吸収スペクトル

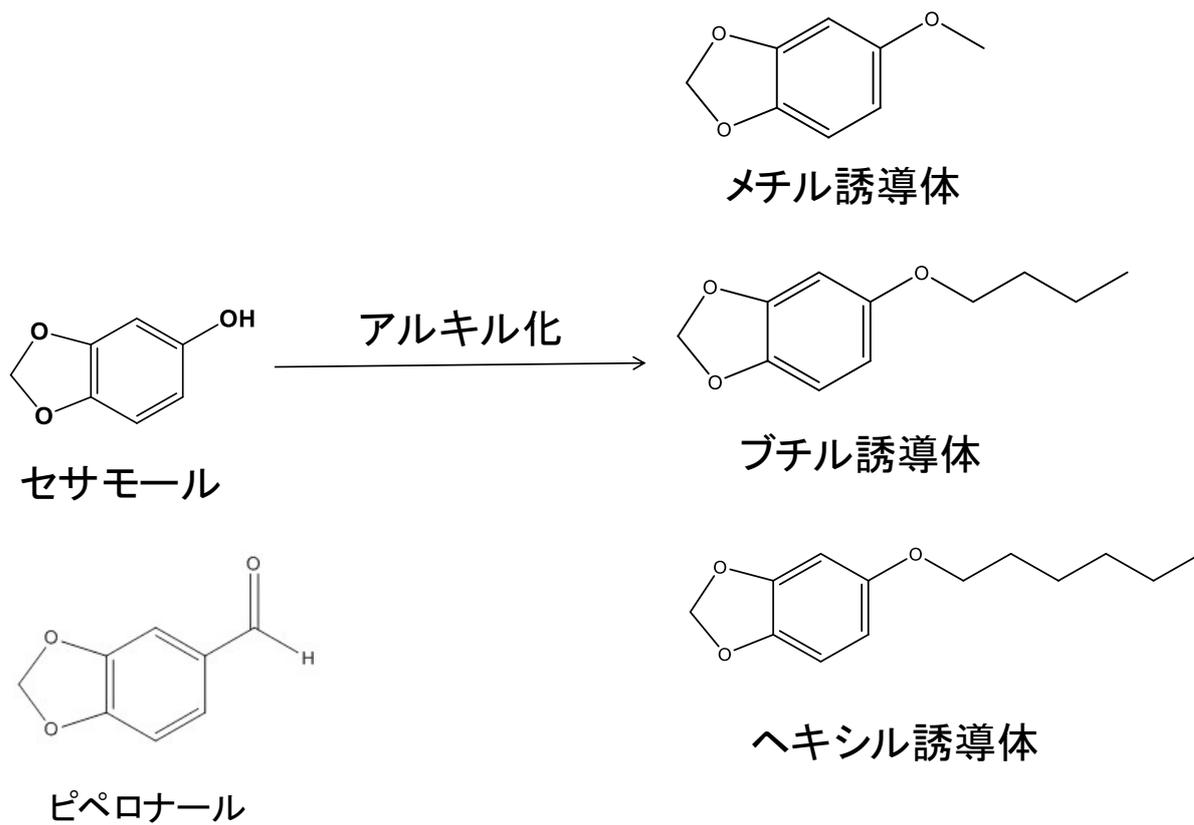


Fig. 4 シングルリファレンスの有機合成デザイン

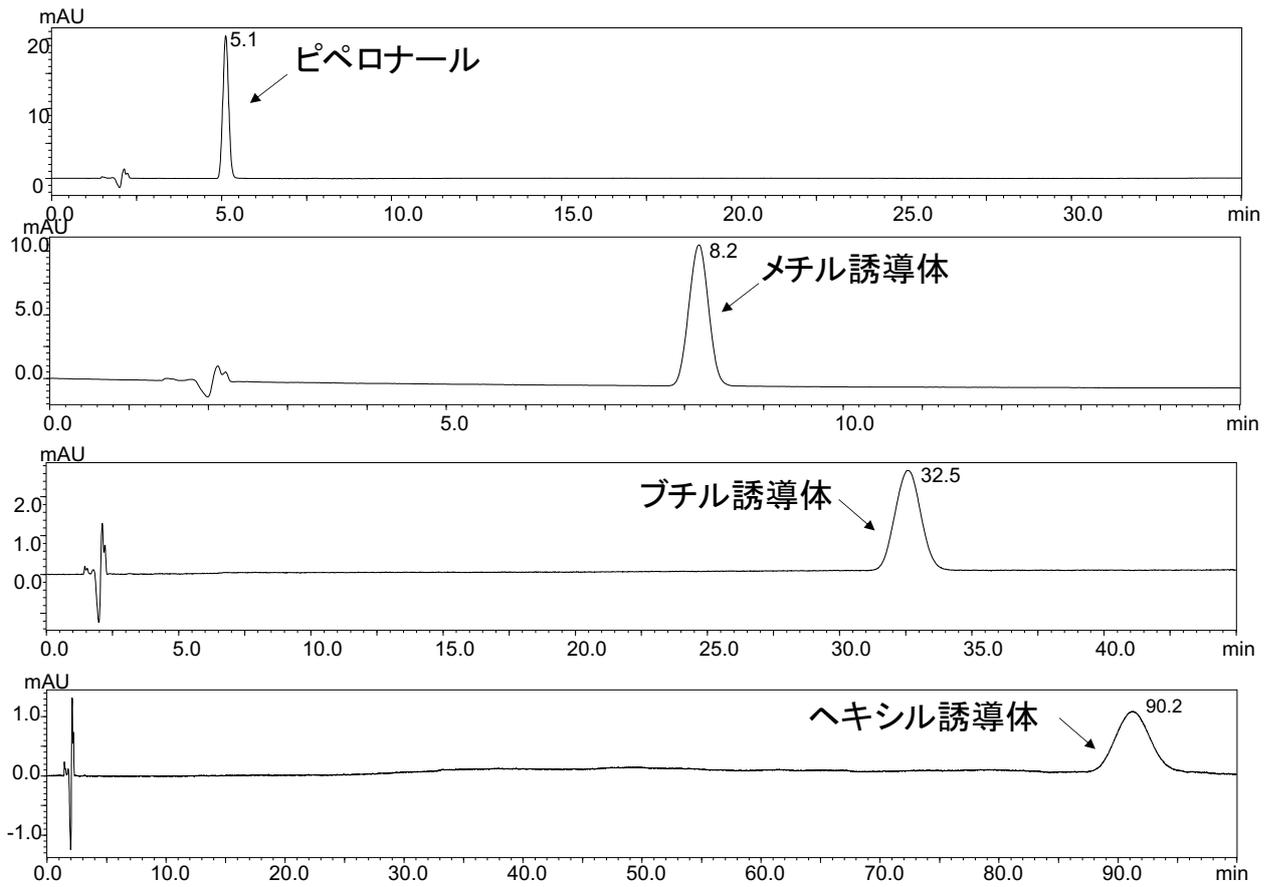


Fig.5 シングルリファレンスの HPLC クロマトグラム (検出波長 : 290 nm)

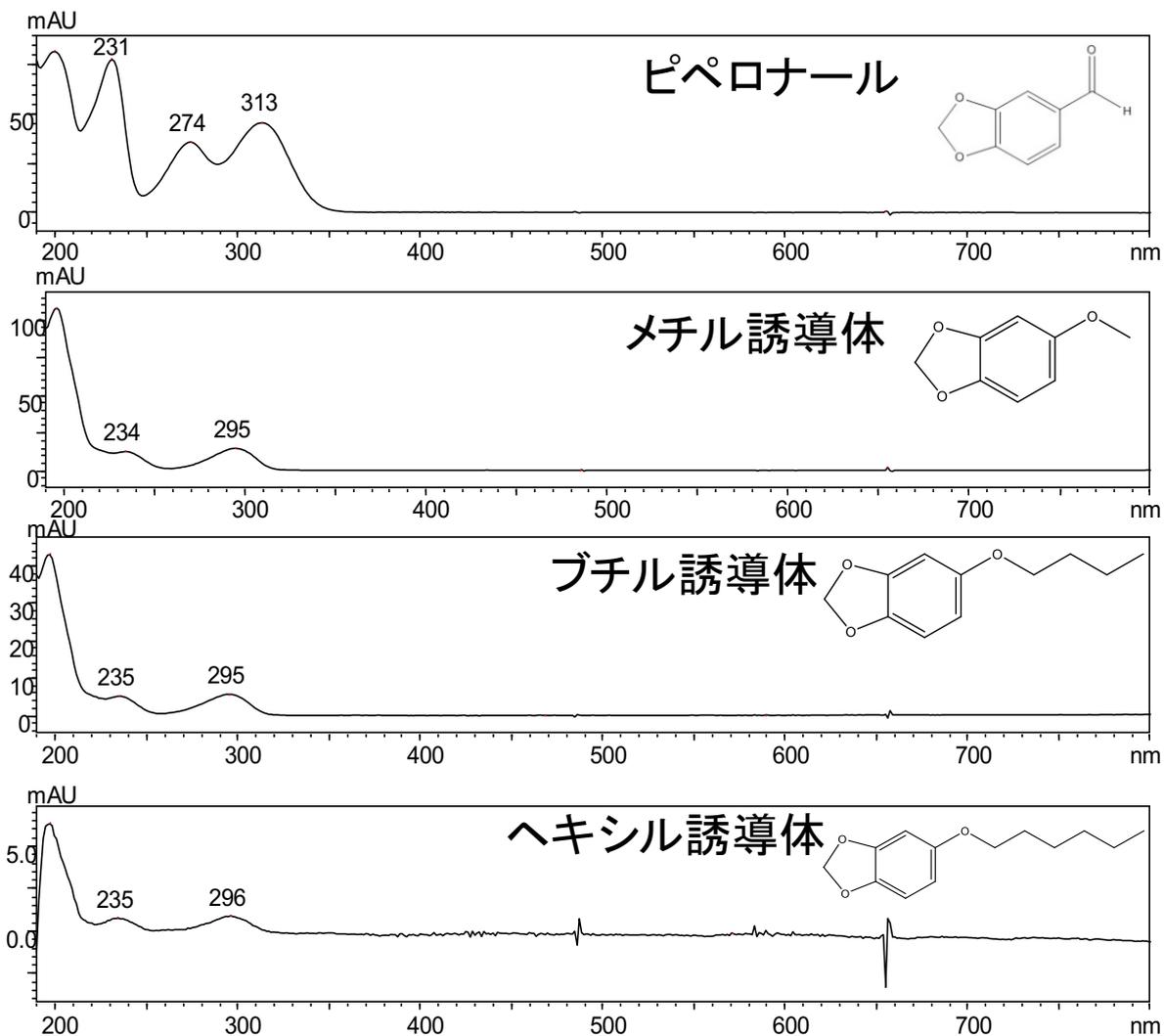


Fig.6 シングルリファレンスの紫外可視吸収スペクトル

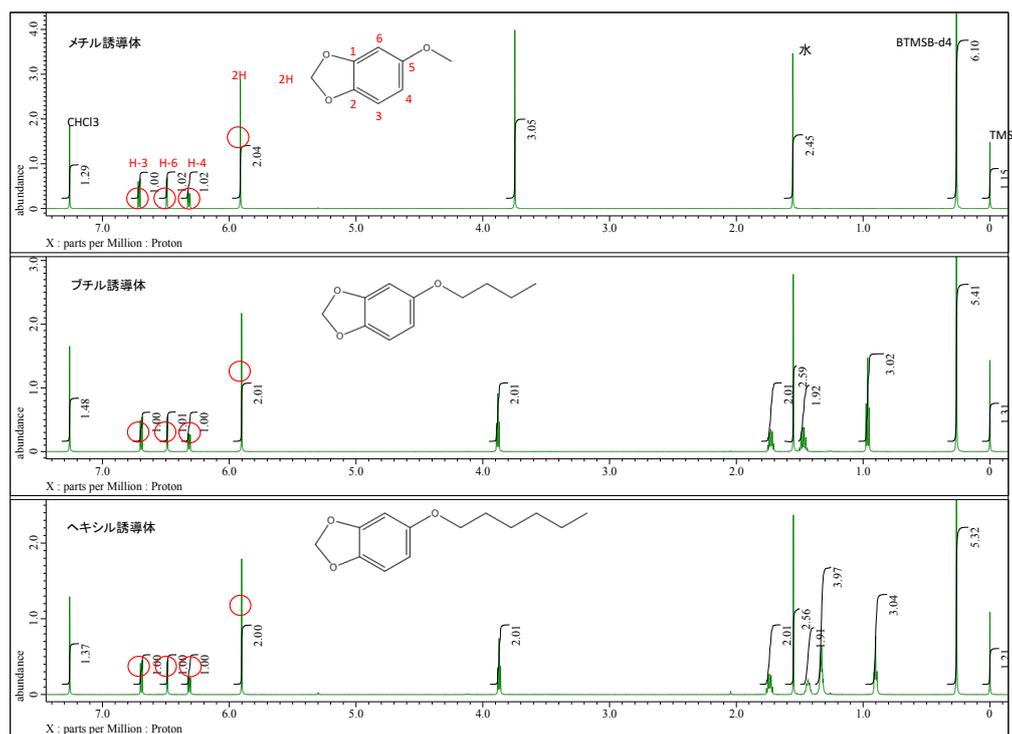


Fig. 7 デザインしたシングルリファレンスのNMR スペクトル

Table 1 定量NMRにおける純度評価

		含有量%
シングル リファレンス	ピペロナール	98.4
	メチル誘導体	97.3
	ブチル誘導体	98.1
	ヘキシル誘導体	97.6
ゴマリグナン類	セサモール	98.5
	セサミン	99.4
	(+)-エピセサミン	99.2
	(+)-セサモリン	98.5

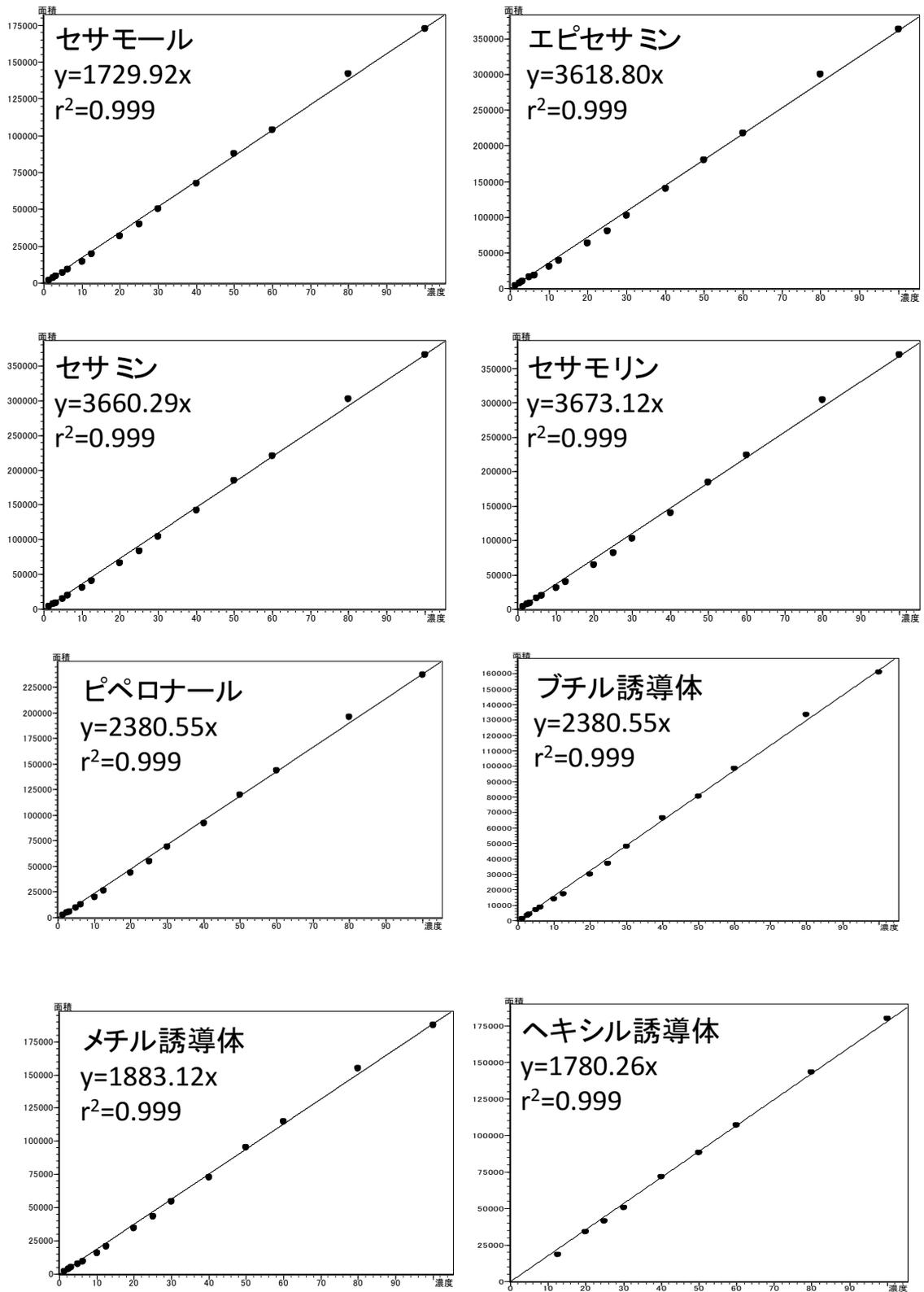


Fig. 8 絶対検量線 (0~100 μM)

Table 2 各シングルリファレンスに対する RMS の算出

シングルリファレンス	分析対象物質	1.25-12.5 μ M	20-100 μ M	0-100 μ M	平均 \pm SD
ピペロナル	セサモール	0.74	0.73	0.73	0.73 \pm 0.01
	セサミン	1.55	1.54	1.54	1.54 \pm 0.01
	エピセサミン	1.54	1.52	1.52	1.53 \pm 0.01
	セサモリン	1.56	1.54	1.54	1.55 \pm 0.01
メチル誘導体	セサモール	0.94	0.92	0.92	0.93 \pm 0.01
	セサミン	1.97	1.94	1.94	1.95 \pm 0.02
	エピセサミン	1.97	1.92	1.92	1.94 \pm 0.03
	セサモリン	1.99	1.95	1.95	1.96 \pm 0.02
ブチル誘導体	セサモール	1.06	1.07	1.07	1.07 \pm 0.01
	セサミン	2.23	2.25	2.25	2.25 \pm 0.01
	エピセサミン	2.23	2.23	2.23	2.23 \pm 0.00
	セサモリン	2.25	2.26	2.26	2.26 \pm 0.01
ヘキシル誘導体	セサモール	N.D.	0.47	N.D.	N.D.
	セサミン	N.D.	1.00	N.D.	N.D.
	エピセサミン	N.D.	0.99	N.D.	N.D.
	セサモリン	N.D.	1.00	N.D.	N.D.

Table 3 絶対検量線法とシングルリファレンス HPLC 定量法の定量値の比較

		絶対検量線法 定量値 mM ±SD	RMS法 定量値			
			ピペロナル mM ±SD	メチル誘導体 mM ±SD	ブチル誘導体 mM ±SD	ヘキシル誘導体 mM ±SD
ゴマ油	セサミン	15.7±0.12	15.9±0.21	16.9±0.28	14.7±0.16	30.7±0.67
	セサモリン	5.7±0.14	5.9±0.15	6.3±0.18	5.5±0.16	11.5±0.47
セサミンEX	セサミン	21.4±0.03	21.9±0.31	22.5±0.42	21.1±0.23	44.6±0.23
	エピセサミン	21.0±0.07	21.8±0.32	22.3±0.45	20.9±0.26	44.8±0.29
ゴマ油 不けん化物	セサミン	42.7±1.05	42.2±0.55	44.1±0.77	44.9±0.88	91.0±1.91
	セサモリン	17.6±0.15	17.7±0.29	18.5±0.25	18.9±0.22	38.5±1.47

Table 4 異なる分析条件でのゴマリグナン類の定量結果 (ピペロナル)

ピペロナル	SR添加濃度 $\mu\text{M} \pm \text{SD}$	ゴマ油		セサミンEX		ゴマ油不けん化物	
		セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\mu\text{M} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	エピセサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{M} \pm \text{SD}$
TSKge10DS-100V 東ソー社製)	25	17.5±0.1	6.2±0.8	24.4±0.1	24.4±0.3	42.1±1.2	17.7±0.3
	50	17.8±0.2	6.6±0.2	24.2±0.2	23.7±0.3	41.8±0.5	17.1±0.1
	100	17.0±0.2	6.0±0.3	22.4±0.5	21.9±0.5	42.4±0.4	17.7±0.1
Xbridge C18 Waters社製)	25	17.6±0.2	6.5±0.2	24.4±0.3	24.1±0.3	47.5±0.2	19.5±0.3
	50	17.8±0.2	6.4±0.2	23.7±0.2	23.3±0.3	44.9±0.5	18.7±0.5
	100	16.7±0.1	6.1±0.0	22.3±0.5	21.9±0.4	44.1±0.2	18.0±0.5
YMC-Pack Pro C18 RS YMC社製)	25	17.9±0.0	6.8±0.1	25.2±0.4	24.8±0.5	46.5±1.1	19.1±0.5
	50	18.0±0.1	6.7±0.0	24.6±0.1	24.4±0.2	44.0±1.0	18.6±0.6
	100	17.2±0.1	6.2±0.5	22.8±0.5	22.3±0.5	43.4±0.7	18.1±0.7
KNETEX Rhenomenex社製)	25	17.7±0.0	6.4±0.0	24.6±0.2	24.1±0.5	41.3±0.5	17.2±0.2
	50	17.8±0.1	6.6±0.1	24.2±0.1	23.7±0.2	41.8±0.5	17.4±0.2
	100	16.9±0.2	6.1±0.0	22.7±0.1	23.3±0.2	42.7±0.4	17.7±0.2
Inertstil0DS-2 GLサイエンス社製)	25	17.7±0.1	6.6±0.2	24.4±0.1	23.9±0.1	41.2±0.4	17.2±0.2
	50	18.2±0.1	6.6±0.1	24.2±0.4	23.8±0.3	42.2±0.5	17.7±0.2
	100	17.1±0.1	6.2±0.3	22.2±0.4	22.0±0.3	42.2±0.3	17.6±0.1
平均 $\text{mM} \pm \text{SD}$		17.5±0.43	6.4±0.24	23.8±0.96	23.4±0.94	43.3±1.86	18.0±0.7
RSD%		2.4	3.8	4.0	4.0	4.3	3.9

Table 5 異なる分析条件でのゴマリグナン類の定量結果 (メチル誘導体)

メチル誘導体	SR添加濃度 $\mu\text{M} \pm \text{SD}$	ゴマ油		セサミンEX		ゴマ油不けん化物	
		セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	エピセサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{mM} \pm \text{SD}$
TSKge10DS-100V 東ソー社製)	25	17.5±0.1	6.1±0.8	23.5±0.0	23.4±0.3	46.0±1.1	19.3±0.2
	50	18.1±0.3	6.6±0.3	23.1±0.3	22.8±0.4	41.4±0.8	17.7±0.1
	100	17.4±0.2	6.2±0.3	22.4±0.6	21.8±0.6	43.2±0.3	18.0±0.1
Xbridge C18 Waters社製)	25	17.7±0.3	6.6±0.2	23.7±0.2	23.4±0.2	43.7±0.5	17.9±0.3
	50	18.2±0.3	6.6±0.3	23.0±0.2	22.6±0.3	40.7±0.4	16.9±0.4
	100	17.1±0.2	6.3±0.0	22.4±0.6	22.0±0.5	43.0±0.1	17.5±0.4
YMC-Pack Pro C18 RS YMC社製)	25	17.8±0.0	6.7±0.1	24.3±0.6	23.9±0.8	44.7±0.3	18.3±0.2
	50	18.3±0.1	6.8±0.1	23.7±0.1	23.4±0.2	41.0±0.8	16.9±0.4
	100	17.5±0.1	6.3±0.5	22.8±0.5	22.3±0.6	42.7±0.8	17.8±0.7
KNETEX Rhenomenex社製)	25	17.7±0.1	6.4±0.0	22.8±0.5	23.4±0.4	45.6±0.1	19.0±0.2
	50	18.2±0.1	6.7±0.1	23.5±0.2	22.9±0.2	41.5±0.7	17.2±0.3
	100	17.3±0.2	6.3±0.1	22.8±0.2	22.4±0.3	44.0±0.4	18.2±0.2
Inertstil0DS-2 GLサイエンス社製)	25	17.8±0.1	6.6±0.2	23.4±0.2	22.9±0.1	44.6±0.7	18.5±0.3
	50	18.5±0.1	6.7±0.1	23.2±0.5	22.9±0.4	41.2±0.2	17.2±0.0
	100.0	17.4±0.1	6.3±0.3	22.1±0.5	21.7±0.4	43.2±0.6	18.0±0.2
平均 $\text{mM} \pm \text{SD}$		17.8±0.40	6.5±0.21	23.1±0.57	22.8±0.63	43.1±1.63	17.9±0.68
RSD%		2.2	3.2	2.5	2.8	3.8	3.8

Table 6 異なる分析条件でのゴマリグナン類の定量結果 (ブチル誘導体)

ブチル誘導体	SR添加濃度 $\mu\text{M} \pm \text{SD}$	ゴマ油		セサミンEX		ゴマ油不けん化物	
		セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	エピセサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサミン $\text{mM} \pm \text{SD}$	セサモリン $\text{mM} \pm \text{SD}$
TSKgeI ODS-100V 東ソー社製)	25	17.0 \pm 1.0	5.9 \pm 0.5	22.0 \pm 0.2	21.9 \pm 0.2	43.5 \pm 1.1	18.2 \pm 0.5
	50	15.8 \pm 0.1	5.9 \pm 0.2	21.7 \pm 0.2	21.3 \pm 0.3	41.4 \pm 0.8	16.7 \pm 0.2
	100	16.2 \pm 0.2	5.8 \pm 0.2	22.5 \pm 0.2	21.9 \pm 0.2	41.8 \pm 0.6	17.5 \pm 0.2
Xbridge C18 Waters社製)	25	16.2 \pm 0.2	6.0 \pm 0.1	22.2 \pm 0.3	21.9 \pm 0.3	43.7 \pm 0.2	17.9 \pm 0.2
	50	16.0 \pm 0.1	5.8 \pm 0.2	21.3 \pm 0.2	21.0 \pm 0.3	41.4 \pm 0.5	17.3 \pm 0.5
	100	16.0 \pm 0.0	5.9 \pm 0.0	22.2 \pm 0.1	21.8 \pm 0.2	41.3 \pm 0.1	16.8 \pm 0.4
YMC-Pack Pro C18 RS YMC社製)	25	16.0 \pm 0.3	6.1 \pm 0.2	22.6 \pm 0.3	22.2 \pm 0.3	44.4 \pm 0.2	18.2 \pm 0.0
	50	16.0 \pm 0.0	6.0 \pm 0.0	22.0 \pm 0.1	21.8 \pm 0.2	41.4 \pm 0.2	17.1 \pm 0.2
	100	16.3 \pm 0.1	5.9 \pm 0.4	22.5 \pm 0.1	22.0 \pm 0.2	41.5 \pm 0.7	17.3 \pm 0.6
KINETEX Phenom enex社製)	25	16.4 \pm 0.2	5.9 \pm 0.0	22.9 \pm 0.2	22.4 \pm 0.2	44.6 \pm 0.1	18.6 \pm 0.2
	50	16.0 \pm 0.1	5.9 \pm 0.1	21.7 \pm 0.1	21.3 \pm 0.2	41.2 \pm 0.3	17.1 \pm 0.2
	100	16.2 \pm 0.2	5.9 \pm 0.0	22.7 \pm 0.2	22.3 \pm 0.1	41.5 \pm 0.1	17.2 \pm 0.1
Inertsil ODS-2 GLサイエンス社製)	25	16.3 \pm 0.2	6.1 \pm 0.2	22.4 \pm 0.4	22.0 \pm 0.6	44.6 \pm 0.2	18.6 \pm 0.1
	50	16.3 \pm 0.2	5.9 \pm 0.2	22.2 \pm 0.4	21.8 \pm 0.3	40.6 \pm 0.2	17.0 \pm 0.1
	100	16.5 \pm 0.1	6.0 \pm 0.2	22.4 \pm 0.1	22.2 \pm 0.2	41.4 \pm 0.2	17.3 \pm 0.1
平均 $\text{mM} \pm \text{SD}$		16.1 \pm 0.18	5.9 \pm 0.09	22.2 \pm 0.42	21.9 \pm 0.39	42.2 \pm 1.38	17.5 \pm 0.60
RSD%		1.1	1.5	1.9	1.8	3.3	3.4

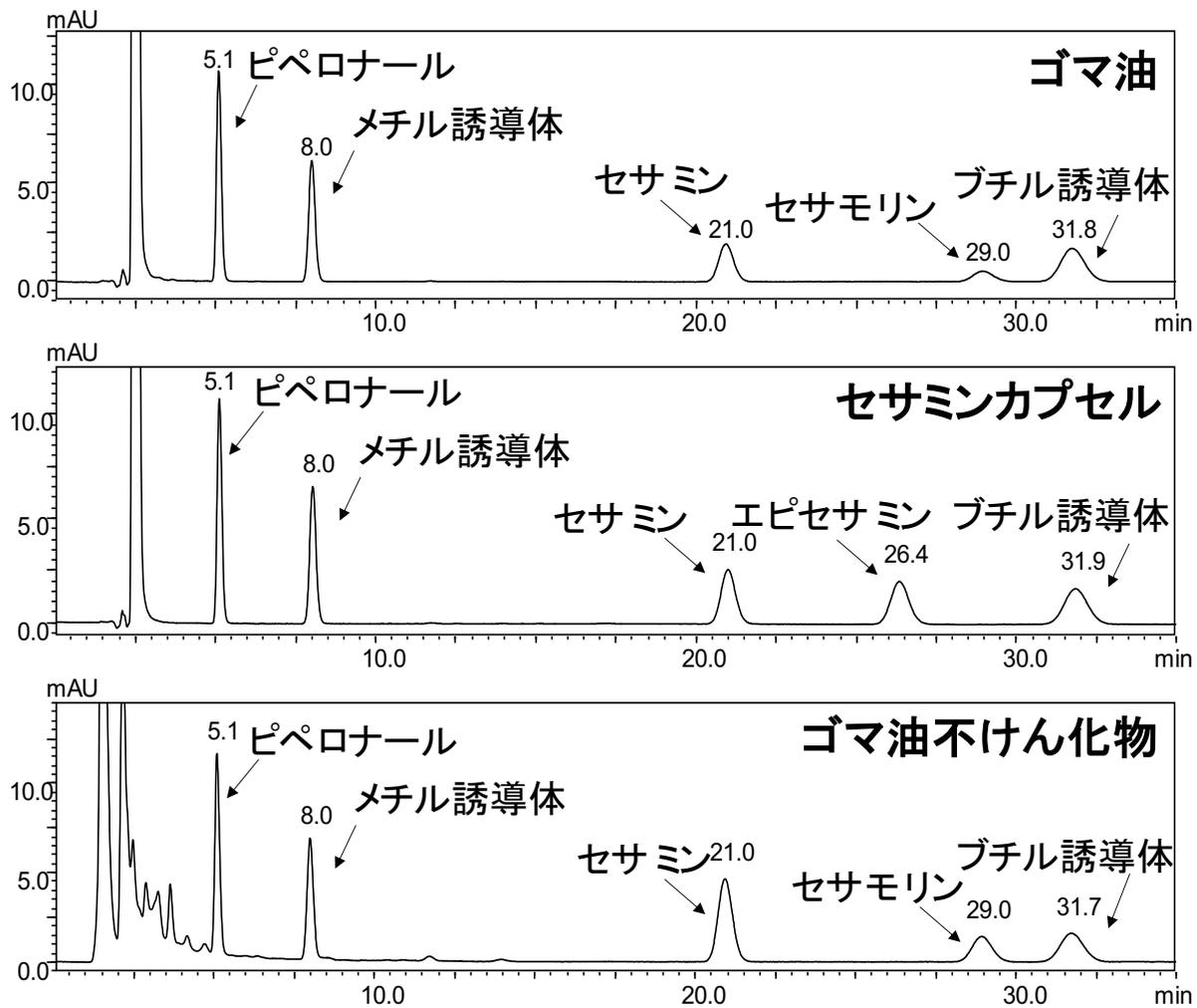


Fig.9 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム
(TSKgel ODS-100V, 東ソー社製)

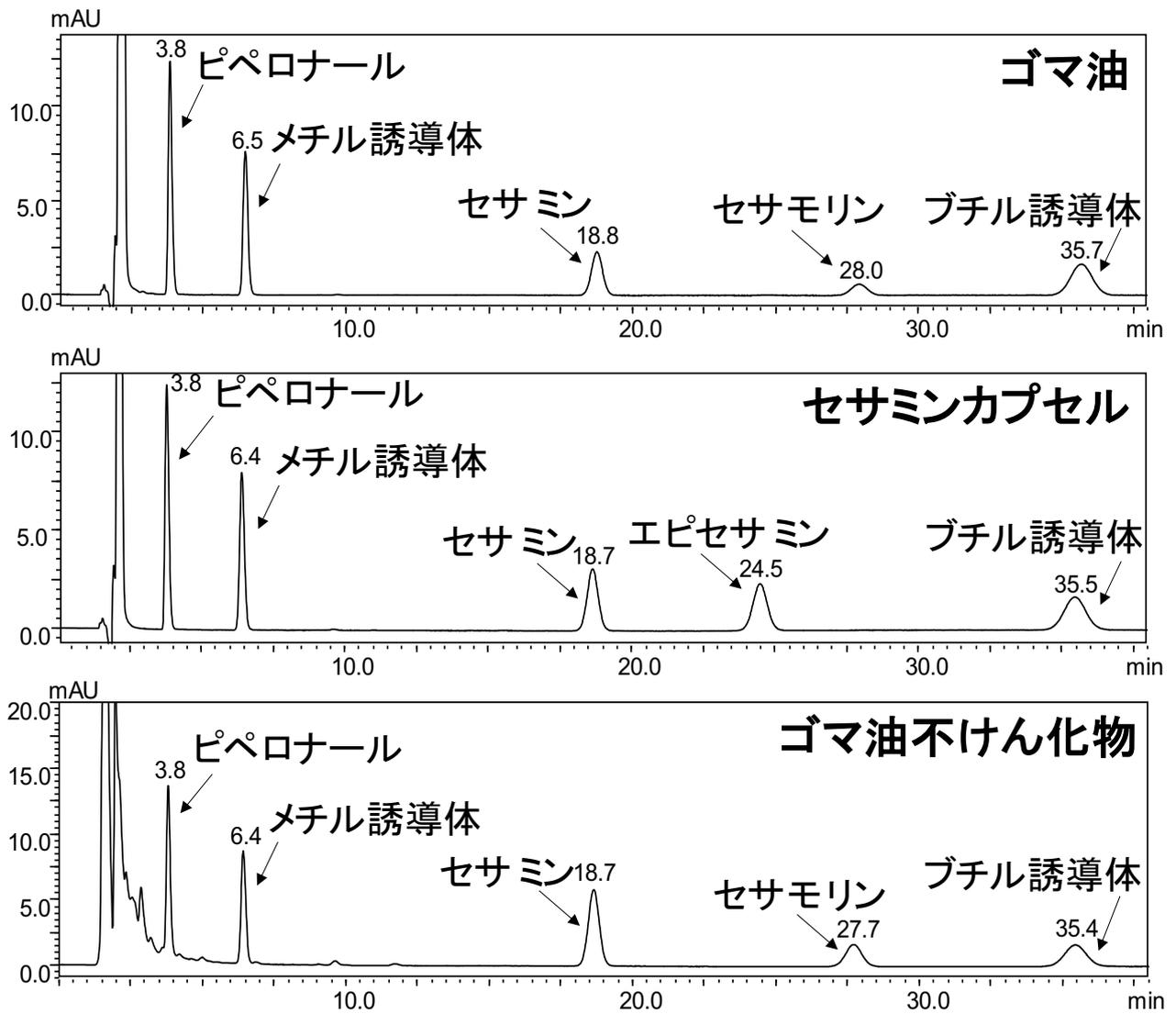


Fig. 10 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム
(XBridge C18, Waters 社製)

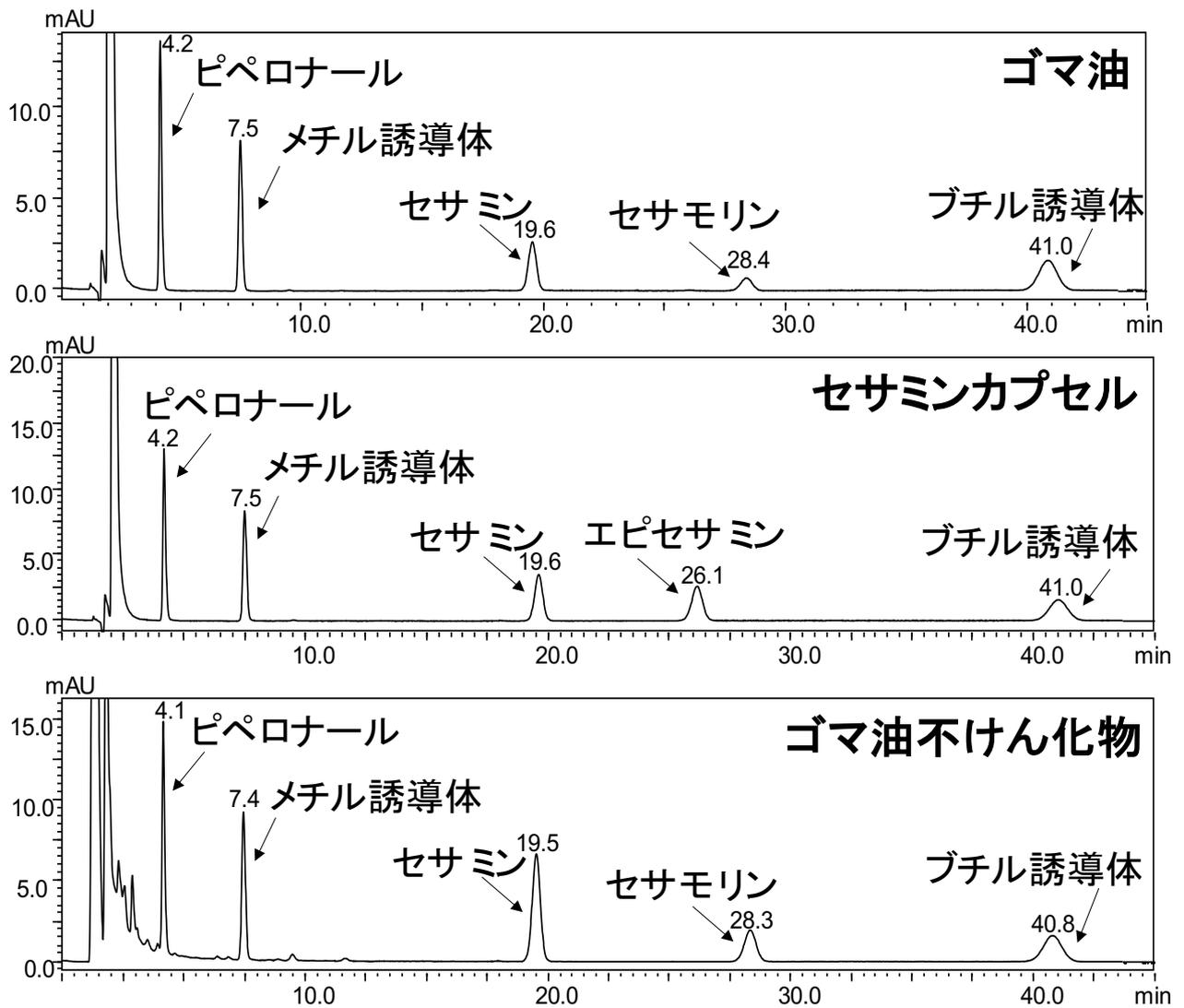


Fig. 11 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム
(YMC-Pack Pro C18, YMC 社製)

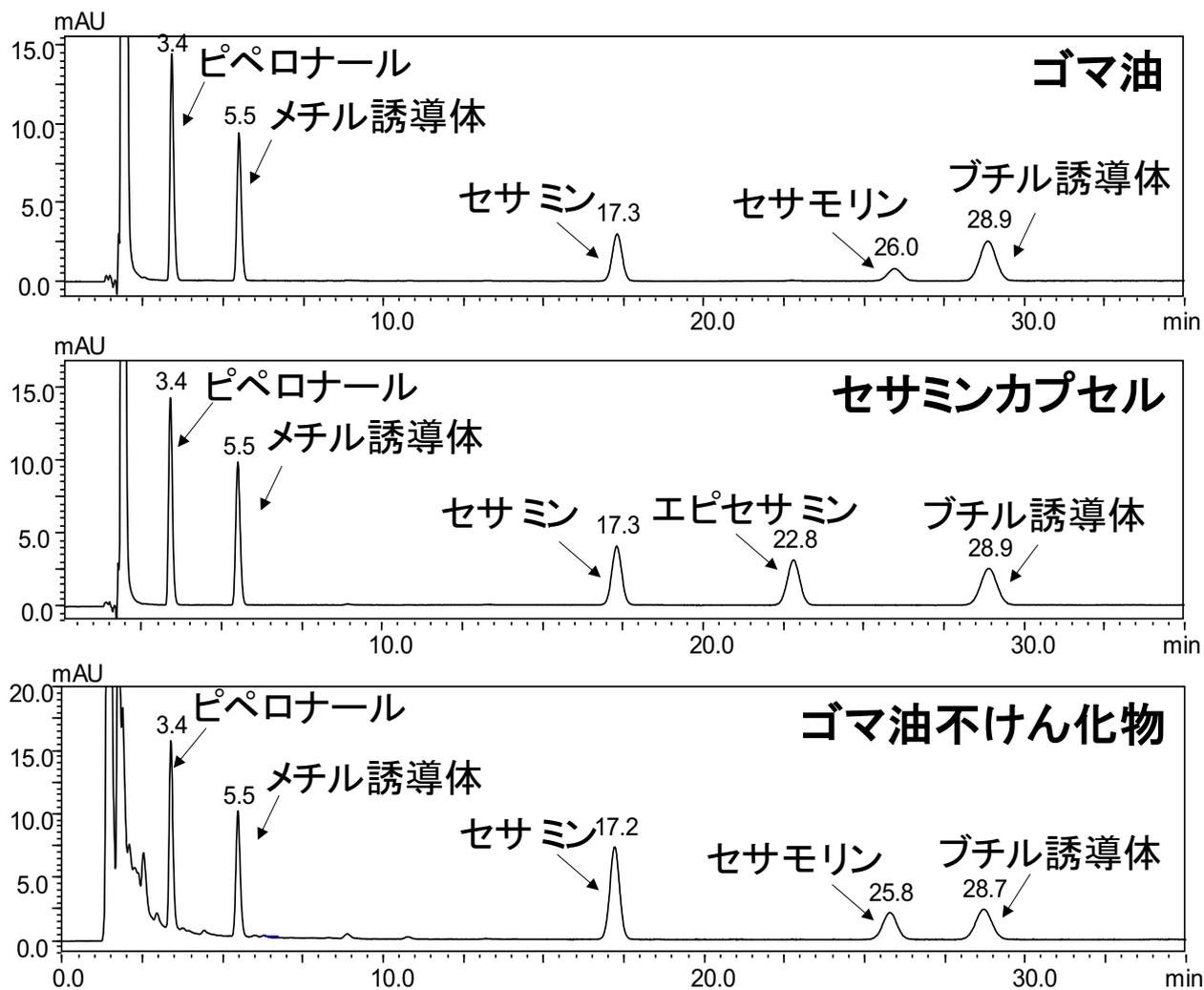


Fig. 12 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム
(KINETEX, Phenomenex 社製)

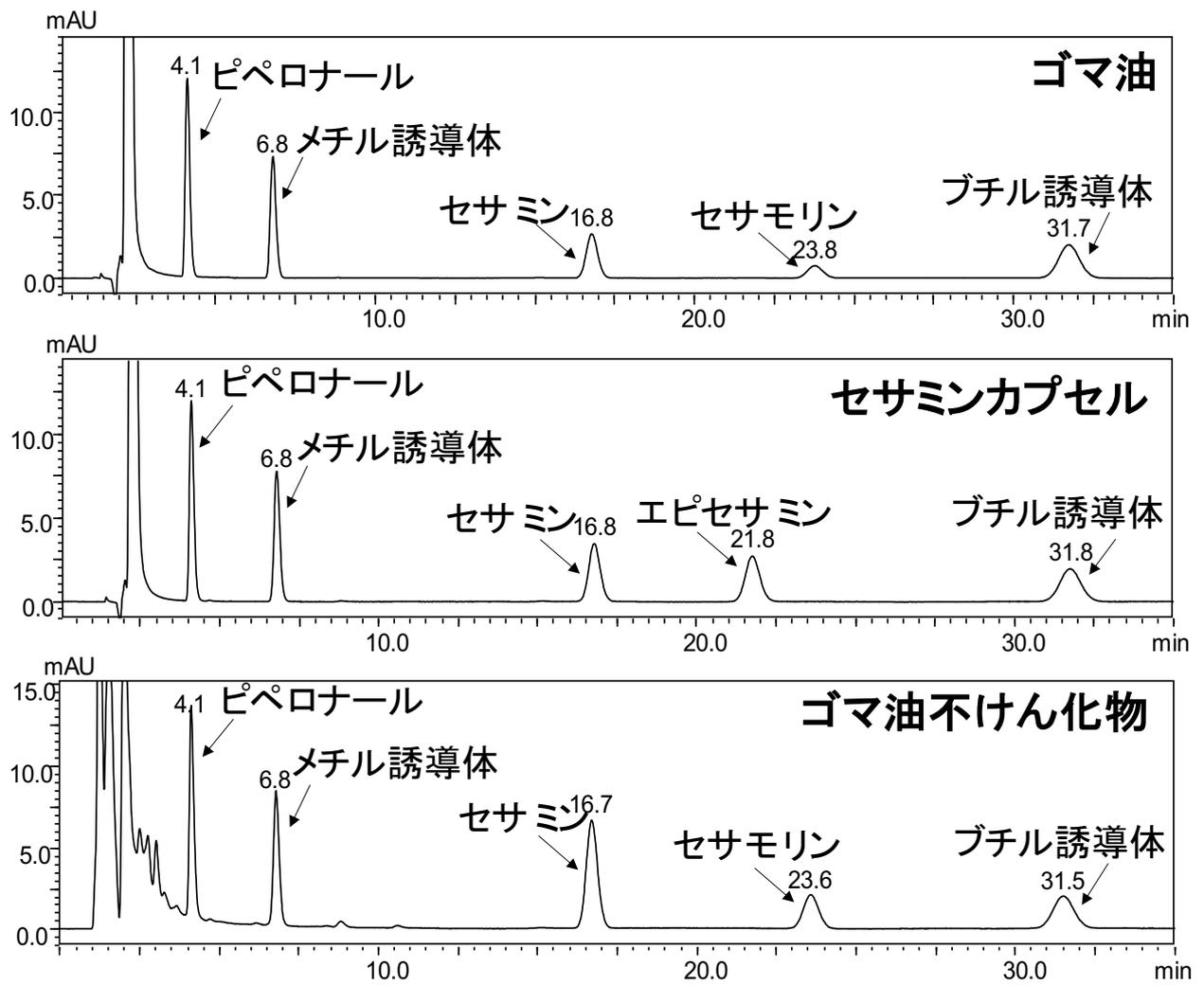


Fig. 13 シングルリファレンス HPLC 定量法での HPLC クロマトグラム
(Inertsil ODS-2, GL サイエンス社製)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の含有成分解析に関する研究

～既存添加物ベニコウジ色素の成分規格の検討～

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

研究要旨 第8版食品添加物公定書には、ベニコウジ色素（Monascus Color）が記載されている。また、第9版食品添加物公定書より、ベニコウジ黄色素（Monascus Yellow）が記載されている。いずれも、主成分は、アンカフラビン類、モナスコルブリン類、キサントモナシン類とされているが、確認試験などでは、色彩の評価のみである。そこで、本研究では、それぞれの主成分を明確にし、それに基づく成分規格を検討することとした。ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素において、HPLC分析を実施した。その結果、ベニコウジ黄色素では、明確な2つのピークが検出されたが、ベニコウジ色素は、製品間により、明確なピークが検出されなかった。その後、HSCCCによる評価を行った結果、ベニコウジ黄色素では、キサントモナシンAおよびBが主成分として単離精製および同定が可能であった。一方で、ベニコウジ色素は、主な成分がフロント付近に溶出し、それらはHPLCによる評価も達成できなかった。今後は、ベニコウジ色素の明確な成分解析を進めることとする。

A. 研究目的

ベニコウジ色素（Monascus Color）は、第8版食品添加物公定書に記載されており、主成分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¹⁾。一方、ベニコウジ黄色素（Monascus Yellow）は、第9版食品添加物公定書より記載され、主成分はキサントモナシン類と示されている。いずれもベニコウジカビ（*Monascus purpureus*）が生成している色素であるため、培地条件や抽出方法により異なる成分が含有する可能性がある²⁾。それゆえに、本研究では、国内流通品のベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の成分規格を検討することとした。

以前では、ベニコウジ色素の赤色の主成分は、HPLCによる評価は困難であった。そのため、高速向流クロマトグラフィー(HSCCC)などを利用した主成分の同定を試み、品質評価への展開を実施した。HSCCCは、液-液抽出に基づく液体

クロマトグラフィーであるため、サンプルの不可逆的吸着がなく、簡便かつ効率的な分離分析できる方法である³⁻⁴⁾。ゆえに、ベニコウジ色素をHSCCCにより成分評価を行い、規格の検討をすることとした。一方で、ベニコウジ黄色素の主成分は、HSCCCによりキサントモナシンAおよびキサントモナシンBが主成分と想定されたが、いずれの標準品が入手困難であった。そこで、簡便かつ汎用性の高い規格基準を設定するため、分析対象物質の標準品に頼らない、相対モル感度係数(Relative Molar Sensitivity, RMS)によるシングルリファレンス HPLC 定量法を構築・検討することとした⁵⁾。

B. 研究方法

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、三栄源エフエフアイ社製などの国内で入手可能なものを用いた。なお、キサントモナシンAおよびBのシングルリファレンスとして、和光純薬社製のカルバゾクロムスルホン酸ナトリ

ウム三水和物を用いた。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

LC 装置：島津製作所製 LC-20AD/SIL-20AC/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS 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

NMR 装置：日本電子社製 JNM ECA MHz spectrum

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 (4.6×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-550 nm (定量：500 nm)

注入量：10 μL

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 (4.6×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-500 nm (定量：460 nm)

注入量：10 μL

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。なお、分析パターンを検討する際は、コイル容量は 75 mL、流速は 1.0 mL/min で送液した。

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、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液(1/5/1/5, 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 1.5 mL/min で送液した。

単離したキサントモナシン A および B の定量
NMR：単離したキサントモナシン A および B を 0.2 mg/mL 1,4-BTMSB-*d*₄を含む重メタノール 1.0 mL で溶解し、そのうち 0.8 mL を NMR 菅チューブに移した。

データ数：60,000

パルス角：90°

遅延時間：60 秒

繰り返し回数：8~16 回

観測幅：-5~15 ppm

RMS の算出：キサントモナシン A および B とシングルリファレンスについて、絶対検量線を作成した。シングルリファレンス (カルバゾクロムスルホン酸ナトリウム三水和物の分子量からカルバゾクロムの重量を算出してフリー体とした) に対するキサントモナシン A および B の検量線の傾きの比より、RMS を算出した。

シングルリファレンス HPLC 定量法の妥当性評価：求めた RMS を用いて、絶対検量線法との定量値を比較した。なお、絶対検量線法で用いた標準品には、HSCCC にて単離精製したキサントモナシン A および B を用いた。また、異なる分析条件 (カラムや移動相) でのシングルリファレンス HPLC 定量法での定量性を検討した。用いた

カラムは TSKgel ODS-100V (東ソー社製), XBridge C18 (Waters 社製), Inertsil ODS-2 (GLサイエンス社製), YMC-Pack Pro C18 (YMC 社製) および KINETEX (Phenpmex 社製) である。さらに, 添加するシングルリファレンスを 25 μM , 50 μM と 100 μM の 3 種類の異なる濃度において定量値の再現性を確認した。

C. 研究結果

本研究では, 国内で流通している 6 種類のベニコウジ色素をサンプルとして用いた。それらの HPLC クロマトグラムを Fig. 1 に示す。その結果, A 社のサンプルでは明確な 4 つのピークが確認されたが, 他社のサンプルでは全く異なるクロマトグラムのパターンを示し, 明確な判別ができなかった。そこで, ベニコウジ色素の基礎的な HSCCC 検討には, A 社のサンプルを用いた。

A 社のサンプルを用いて, MS 分析により分子イオンピークを検出した。そのときのピーク a から d の MS スペクトルを Fig. 2 に示した。分析結果より, ピーク a と b, ピーク c と d はそれぞれ分子イオンピークが一致したため, 構造異性体の可能性が示唆された。

次に, HPLC により, A 社のピーク a から d の HSCCC で用いる最適な二層溶媒系を検討した。その二層溶媒系の分配係数および分離係数の結果を Table 1 に示した。その結果, ベニコウジ色素のピーク a から d の分配係数がそれぞれ 0.29, 0.26, 0.77, 0.72, 分離係数が A/C 2.66, B/D が 2.77 であるヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液 (4/5/4/5, v/v/v/v) を採用することとした。

本条件を用いて, HSCCC による単離精製を実施した。そのときに得られた HSCCC クロマトグラムを Fig. 3 に示した。HSCCC 分析結果により, 固定相の保持率は 70%, 分析時間は約 150 分であった。HSCCC クロマトグラムに置いて, 3 つのピークが確認されたため, Fraction I から III に分取した。また, メタノール置換によって, 全て

の色彩成分が回収できた (Fig. 4)。

HSCCC で分取した Fraction I から III をそれぞれ HPLC で分析した結果を Fig. 5 に示した。Fraction I では, 明確なピークが確認されなかったが, Fraction II および III ではそれぞれ 2 本のピークが確認された。しかし, HSCCC の結果より, Fraction I が最も赤色の吸収が強い 500 nm でのピーク強度が強く, 赤色成分を多く含有していたため, Fraction I が主成分であると判断した。

HSCCC による国内流通品ベニコウジ色素の分析を検討した。HPLC で分析が困難であった 6 種類のベニコウジ色素を用いて, HSCCC での分離パターンを検討した。今回は, 容易に高極性物質を分配可能な二相溶媒系であるブタノール:酢酸エチル:水溶液 (4/1/5, v/v/v) に変更し, HSCCC による分析を行うこととした。その HSCCC 分析結果を Fig. 6 および 7 に示した。保持率は 40% であり, 分析時間は 50 分であった。その結果より, サンプル A から F は分離パターンがわずかに異なり, 各サンプルによって含有する成分は異なった。

ベニコウジ黄色素において, 三栄源 FFI (株) のサンプルを用いた。HPLC によりキサントモナシン A および B の最適な二層溶媒系の分配係数と分離係数を検討した。その結果を Table 2 に示す。その結果, ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液 (1/5/1/5, v/v/v/v) を採用した。

その条件により, HSCCC による単離を実施した。なお, 固定相の保持率は 76% であり, 分析時間は 450 分であった。HSCCC のクロマトグラム (Fig. 8) より明確な 2 つのピーク (Fraction A および B) が検出され, 単離精製することができた。さらに, 単離精製した化合物を MS スペクトルや MS/MS スペクトルによりキサントモナシン類であると同定された (Fig. 10)。いずれも定量 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 11) により, NMR 菅チューブにキサントモナシン A は 2.94 $\text{mg}\pm 0.018$, キサントモナシン B は 1.40 $\text{mg}\pm 0.040$ であった。

定量 NMR で得られた定量値に基づき, キサン

トモナシン A および B, シングルリファレンス (カルバゾクロム:カルバゾクロムスルホン酸ナトリウム三水和物の分子量からカルバゾクロムの重量を算出してフリー体とした)について絶対検量線を作成し, RMS を求め, Fig. 12 および Table 3 に示した. その結果より, キサントモナシン A の RMS は 8.75 ± 0.06 , キサントモナシン B の RMS は 14.8 ± 0.25 であり, その値は異なる濃度幅において再現性の高い値であった.

4 種の国内流通しているベニコウジ黄色素製剤を用いて, 従来の絶対検量線法とシングルリファレンス HPLC 定量法にてキサントモナシン類の定量値を比較した. その結果を Fig. 14 と Table 4 に示した. 新たに開発した本定量法により, 絶対検量線法と同等の定量値が得られ, 正確な定量性が確認された.

また, 異なる HPLC の分析条件において, シングルリファレンス HPLC 定量法での定量値を検討した. 本研究では, 5 種のカラムとその移動相条件, 添加するシングルリファレンス濃度を変更し, その結果を Fig. 12 と Table 5 に示した. それぞれのカラムに最適な移動相条件を決定し, シングルリファレンス定量法で得られた定量値はキサントモナシン A では $9.2 \mu\text{mol/g} \pm 0.23$ (RSD 2.5%), キサントモナシン B では $3.2 \mu\text{mol/g} \pm 0.10$ (RSD 3.0%) であった.

D. 考察

本研究では, ベニコウジカビが生成するベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の新たな規格試験の検討を実施した. 以前では, ベニコウジ色素は HPLC での分析は困難であった. ゆえに, 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/v) の二相溶媒系を用いて HSCCC にて単離精製をした結果, 3 つの Fraction に分取できた. HPLC 分析を行った結果, Fraction I は明確なピークが得られなかったが, Fraction II ~ III において, ピークが観察された. 以上のことから, HSCCC によりベニコウジ色素の主成分を単離精製が達成することができたといえる. また, 高極性物質を容易に分配させる

ことができると考えられる二相溶媒系であるブタノール:酢酸エチル:水 (4/1/5, v/v/v) に変更し, HSCCC での分析を行うこととした結果, 国内流通品のベニコウジ色素にて HSCCC 分離パターンがわずかに異なった. 理由として, 各サンプルの培養条件が異なり, 含有する成分が異なることが挙げられる.

ベニコウジ黄色素の主成分であるキサントモナシン A および B の標準品が入手不可能であるため, HSCCC にて単離精製を実施した. 二相溶媒系の検討をした結果, ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液 (1/5/1/5, v/v/v/v) が最適であると判断した. その条件により主に 2 つの Fraction を得ることができ, LC 分析の結果, Fraction A はキサントモナシン A, Fraction B はキサントモナシン B であると同定できた. それぞれ単離したキサントモナシン類を用いて, 定量 NMR にて絶対量を求め, RMS を算出した. その結果, キサントモナシン A の RMS は 8.75, キサントモナシン B の RMS は 14.8 であった. これらの RMS を用いて, ベニコウジ黄色素中のキサントモナシン類の定量した結果, 従来の絶対検量線法から得られる定量値と同等の値を示し, さらに HPLC の分析条件 (カラムや移動相) を変更しても高い再現性が確認された.

E. 結論

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: 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, RMS によるシングルリファレンス

HPLC 定量法を構築した。その結果、標準品に頼らず、簡便で安価なキサントモナシン類の定量が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

- 1) 高橋未来, 西崎雄三, 多田敦子, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 穂山浩, 佐藤恭子, 井之上浩一: 相対モル感度係数を利用したベニコウジ黄色素中のキサントモナシン類の定量法の確立 日本食品化学学会第 23 回総会・学術大会 (三重県伊勢市) 6 月 (2017 年)
- 2) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: HSCCC/qNMR-HPLC による相対モル感度係数を利用した天然色素中のキサントモナシンの定量法の構築 第 28 回クロマトグラフィー科学会議 (京都) 11 月 (2017 年度)
- 3) Miki Takahashi, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato, Koichi Inoue : Development of Quantitative Analysis of Main Components in Natural Products by Liquid Chromatography with Molar Absorption Coefficient Ratio and High-speed Countercurrent Chromatography PITTCON 2018 (Orlando) 2 月 (2018 年)
- 4) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤直子, 石附京子, 中島馨, 佐藤恭子, 井之上浩一: 既存添加物の規格設定を目指したシングルリファレンス HPLC 定量法の開発 日本食品衛生学会 近畿地区勉強会 (大阪) 3 月 (2018 年)

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

I. 参考文献

- 1) 日本食品添加物協会; 第 8 版 食品添加物公定書 2007 年 8 月 31 日発行
- 2) Jung H, Kim C, Kim K, Shin CS.; *J. Agric. Food Chem.* 51, 1302-1306. (2003)
- 3) Inoue K, Ito Y, Hattori Y, Tsutsumiuchi K, Ito S, Hino T, Oka H; *Jpn. J. Food Chem. Safety* 17, 185-191. (2010)
- 4) Yamaguchi K, Kurata S; *Bunseki Kagaku* 54, 1091-1100. (2005).
- 5) Nishizaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Sugimoto N, Numata M, Ihara T; *Anal. Chem.* 89, 6963-6968 (2017)

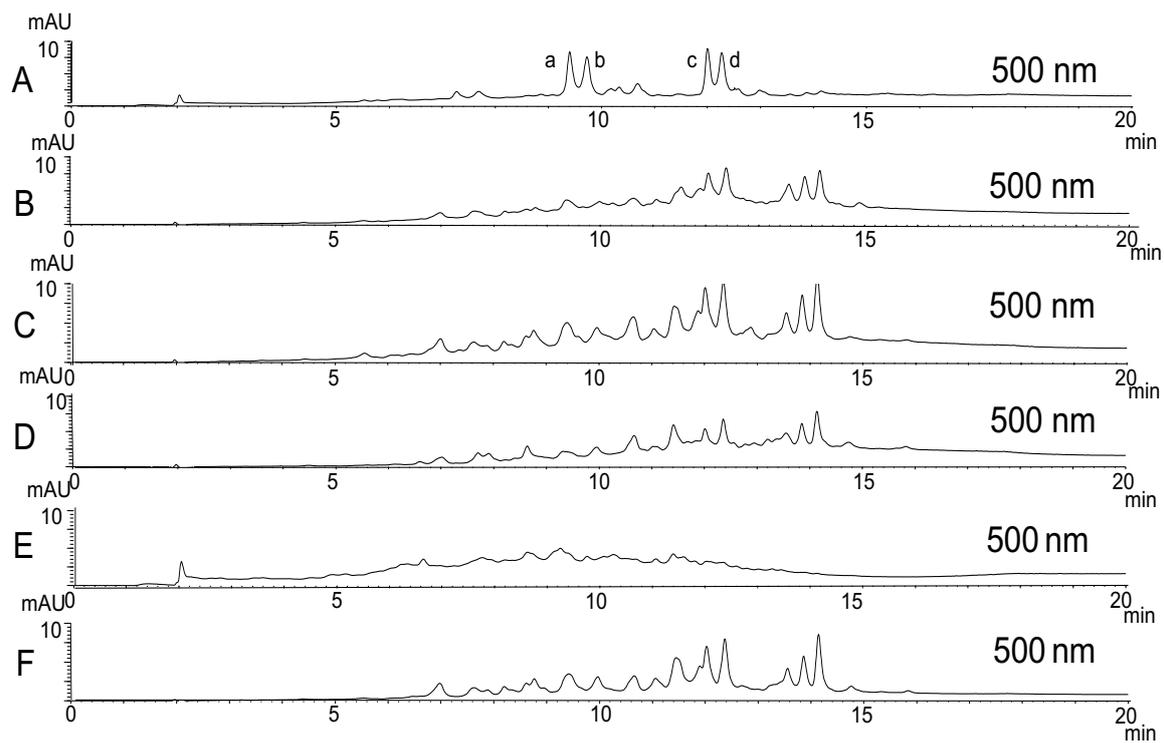


Fig. 1 国内流通品のベニコウジ色素における HPLC クロマトグラム

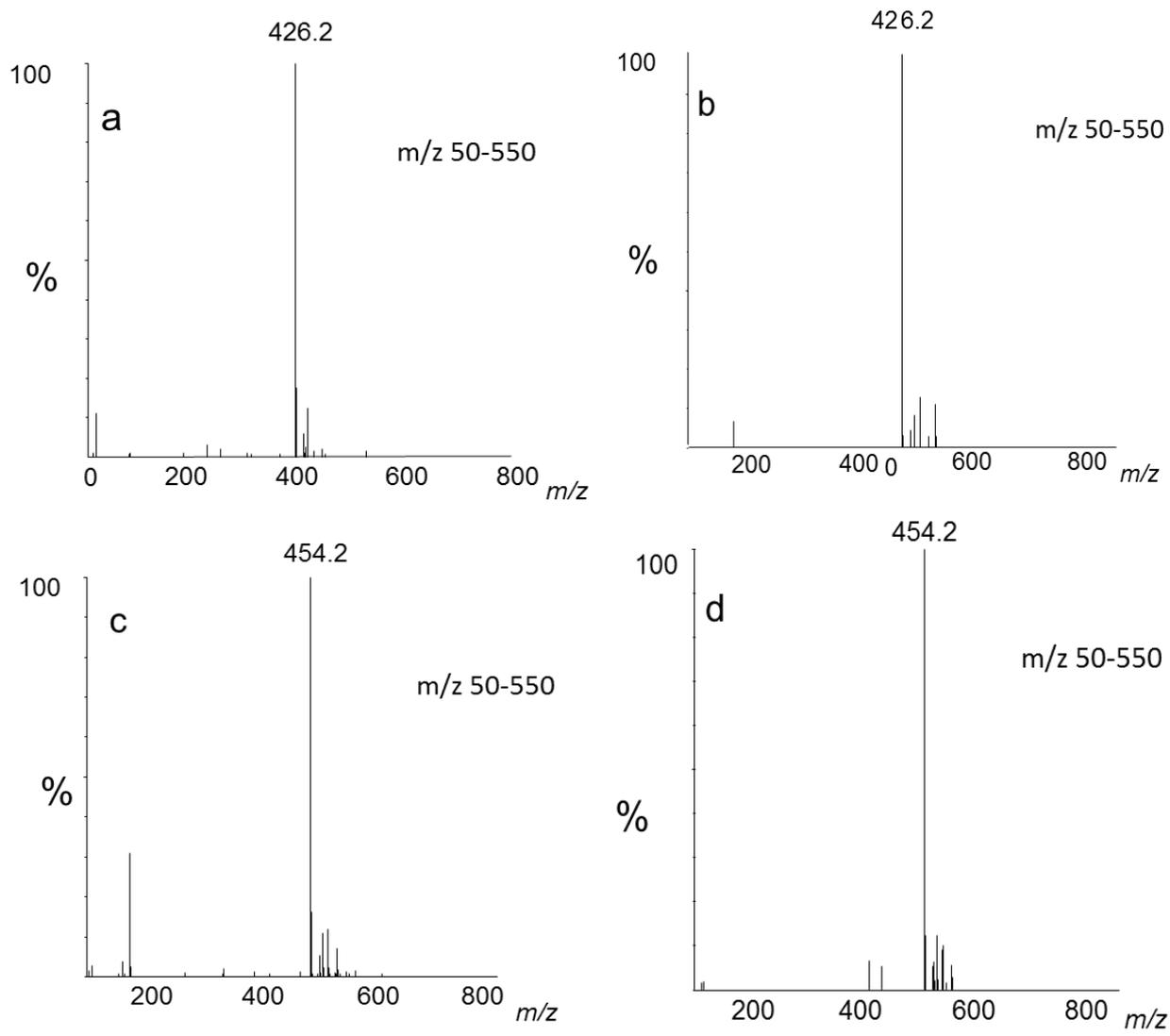


Fig. 2 A社のベニコウジ色素中のピークA~DのMSスペクトル

Table 1 ピーク A~D における二相溶媒系の分配係数 (K) および分離係数 (α)

Two-solvent system						K \pm SD				α	
ヘキサン	酢酸エチル	ブタノール	メタノール	水	0.1%ギ酸水溶液	a	b	c	d	a/c	b/d
0	5	0	0	5	0	0.21 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01	1.56 \pm 0.27	1.38 \pm 0.22	7.43	7.67
0	4	1	0	5	0	0.36 \pm 0.01	0.32 \pm 0.01	2.59 \pm 0.08	2.16 \pm 0.04	7.19	6.75
0	3	2	0	5	0	0.80 \pm 0.01	0.83 \pm 0.01	4.64 \pm 0.12	3.98 \pm 0.11	5.80	4.80
5	5	0	5	0	5	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.19 \pm 0.05	0.18 \pm 0.04	3.17	3.00
4	5	0	4	0	5	0.29 \pm 0.03	0.26 \pm 0.03	0.77 \pm 0.10	0.72 \pm 0.09	2.66	2.77
3.5	5	0	3.5	0	5	0.44 \pm 0.02	0.40 \pm 0.01	1.41 \pm 0.07	1.32 \pm 0.06	2.59	3.30
3	5	0	3	0	5	1.11 \pm 0.04	1.07 \pm 0.07	4.34 \pm 0.25	4.27 \pm 0.21	3.91	3.99

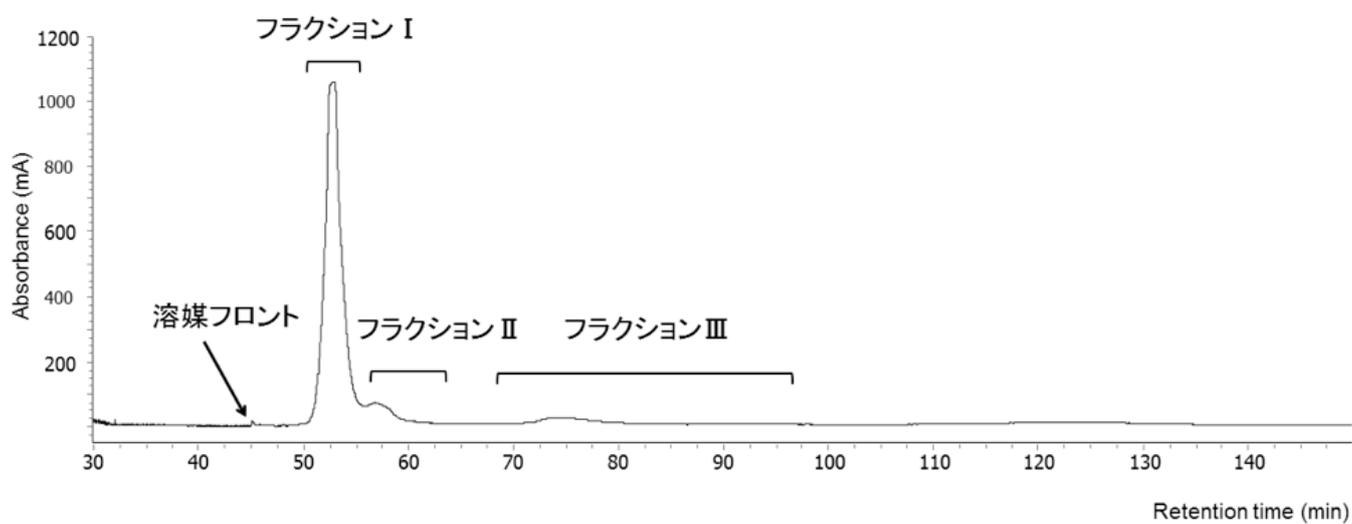
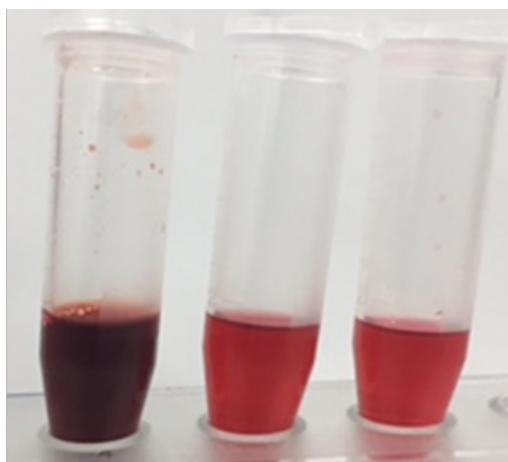


Fig. 3 ベニコウジ色素の HSCCC クロマトグラム (検出波長 : 500 nm)



フラクシオン I フラクシオン II フラクシオン III

Fig. 4 回収した各フラクシヨンの色彩成分

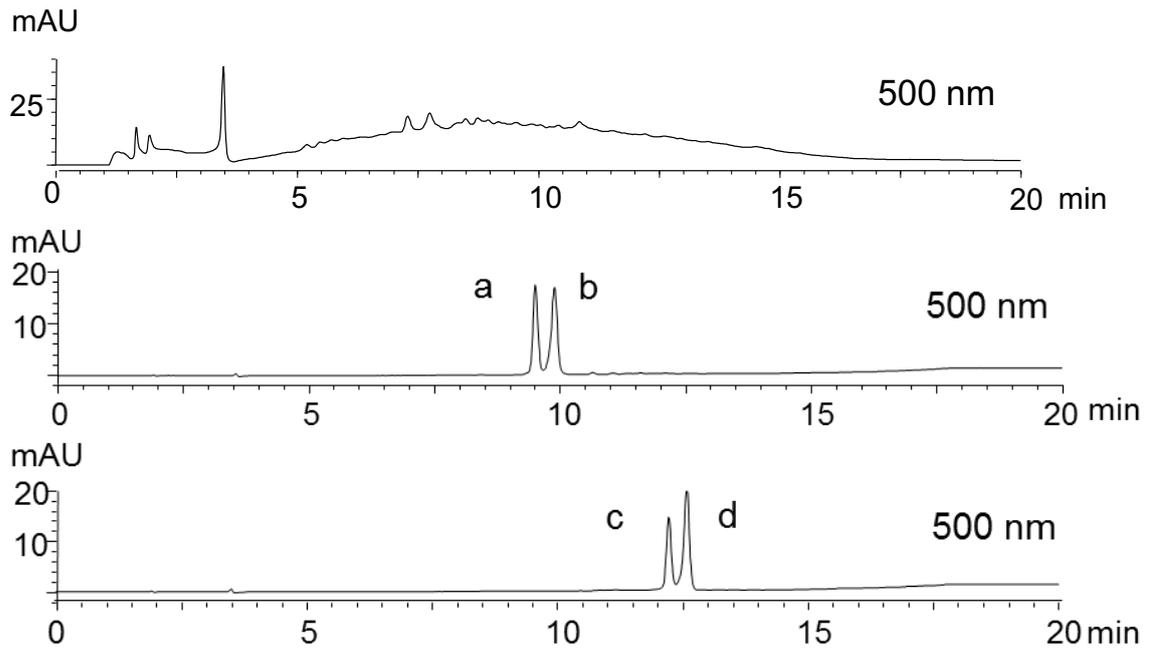


Fig. 5 分取した各フラクション I ~ III の HPLC クロマトグラム

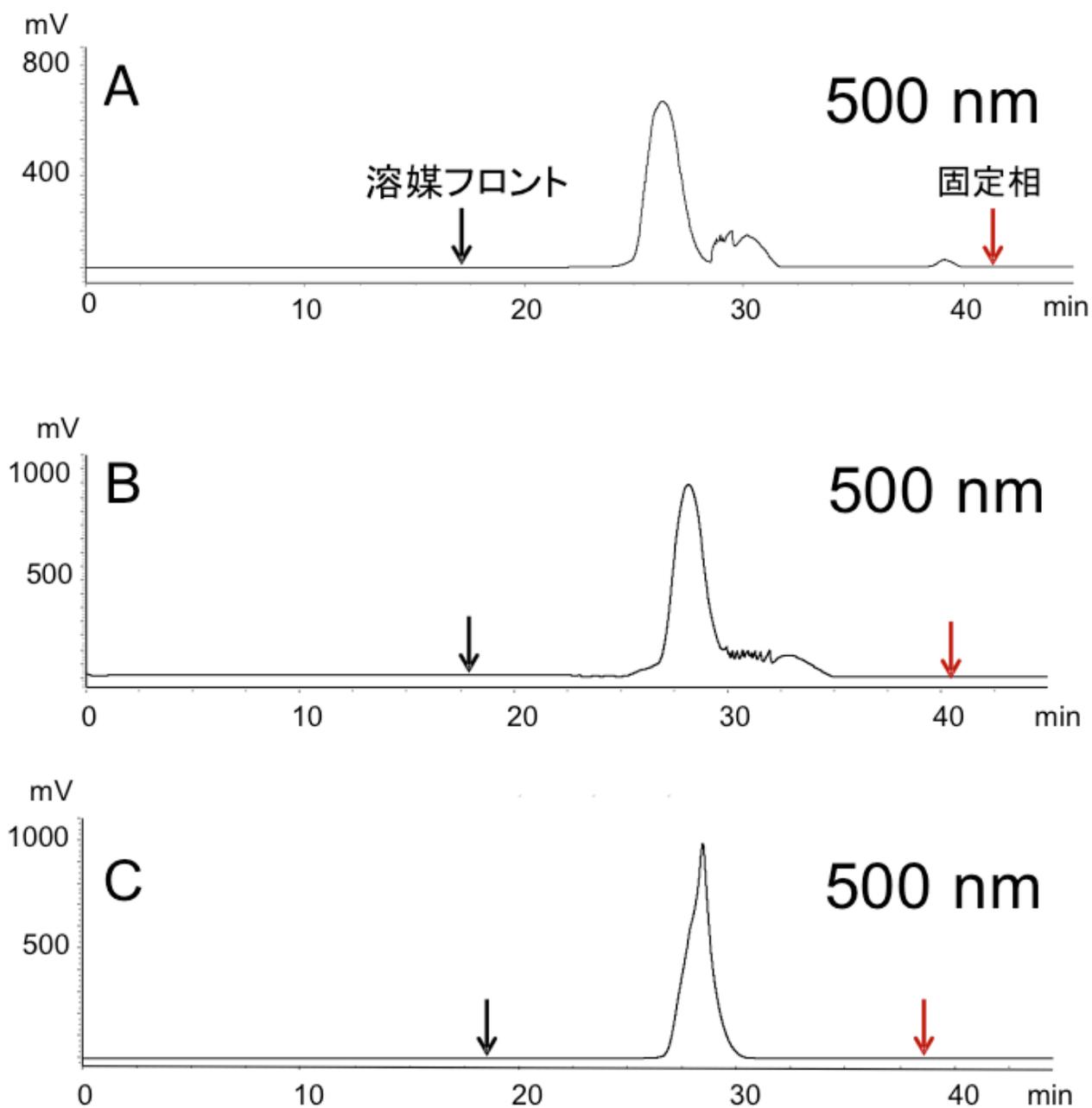


Fig. 6 A~C 社におけるベニコウジ色素の HSCCC クロマトグラム

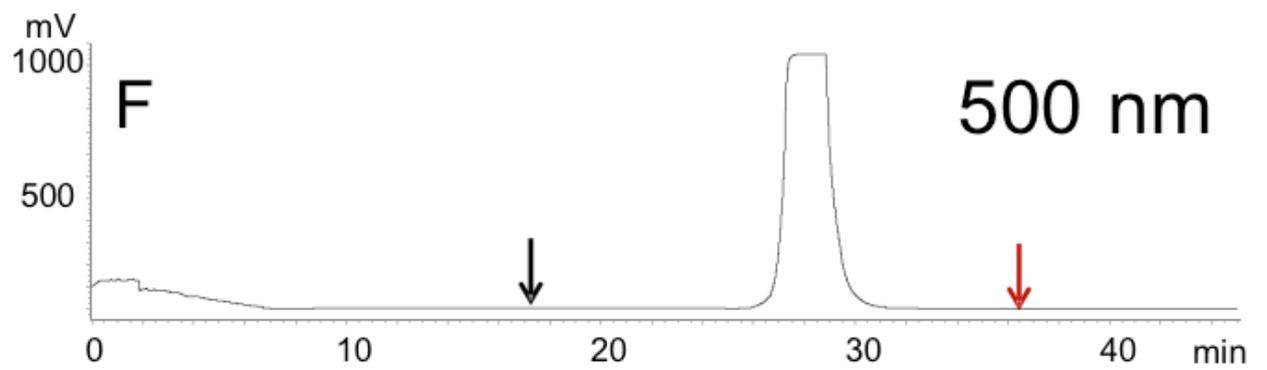
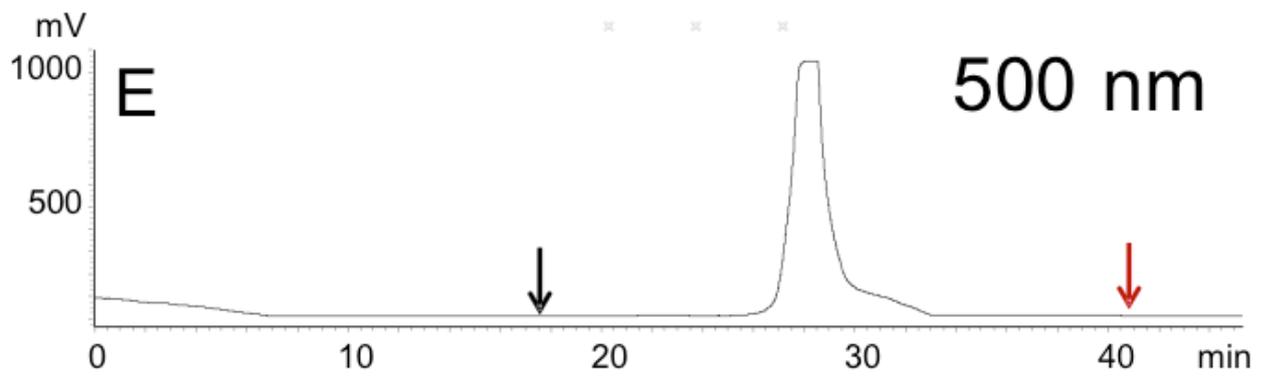
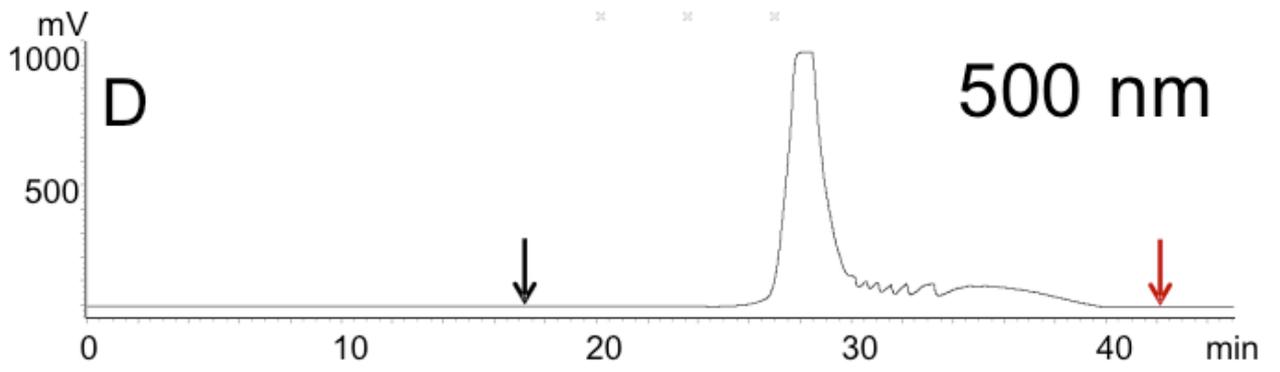


Fig. 7 D~F 社におけるベニコウジ色素の HSCCC クロマトグラム

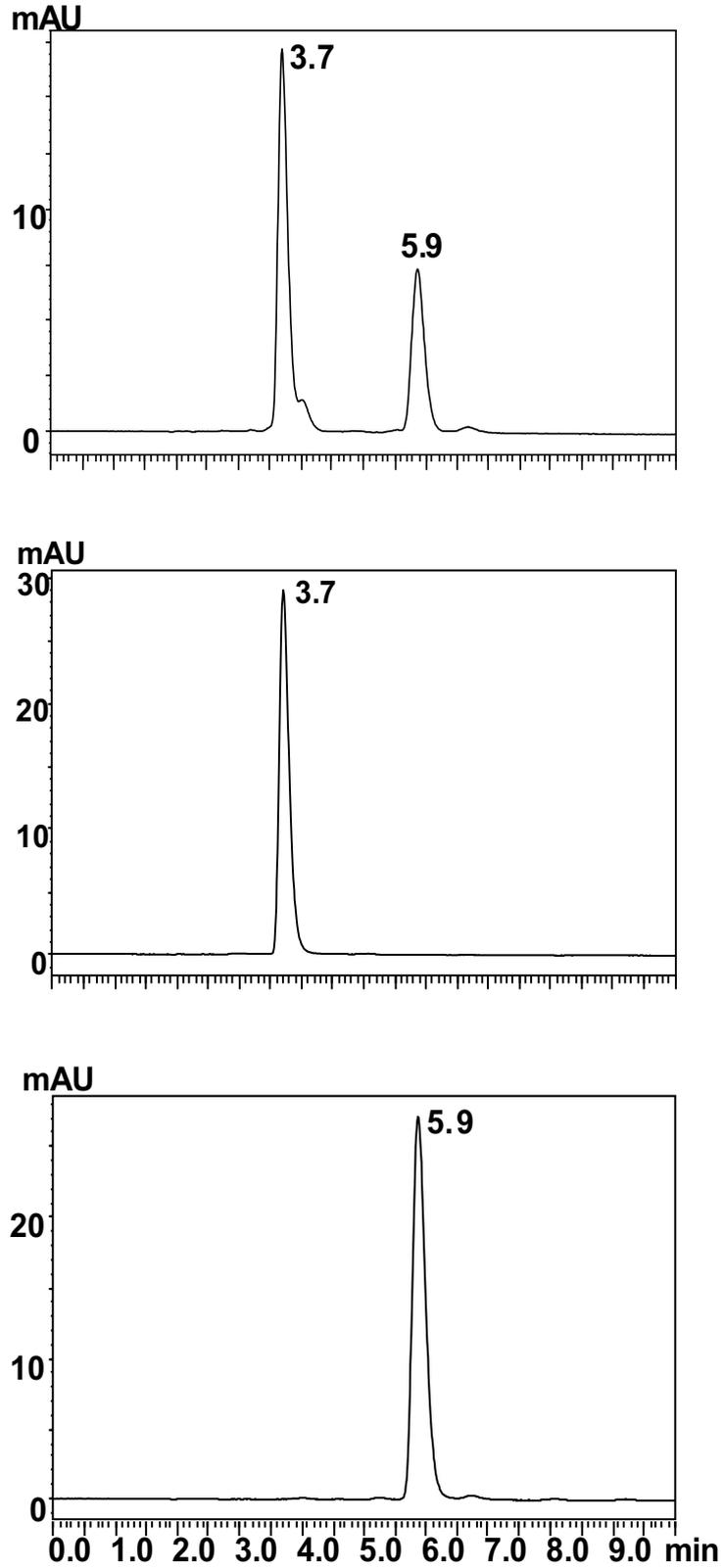


Fig. 8 HPLC クロマトグラム (検出波長 : 460 nm)
上 : ベニコウジ黄色素, 中 : キサントモナシン A, 下 : キサントモナシン B

Table 2 二相溶媒系におけるキサントモナシン A および B の分配係数および分離係数

Two-phase solvent system Hexane/ethyl acetate /methanol/0.1% FA in water	Partition coefficient (K) \pm SD (n=3)		Separation factor (α) \pm SD (n=3)
	XA	XB	
5/5/5/5	NC	NC	NC
4/5/4/5	NC	0.06 \pm 0.01	NC
3/5/3/5	0.01 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	3.52 \pm 0.05
2/5/2/5	0.09 \pm 0.01	0.43 \pm 0.02	4.78 \pm 0.08
1/5/1/5	0.33 \pm 0.03	2.02 \pm 0.14	6.05 \pm 0.14
0/5/0/5	0.72 \pm 0.09	9.55 \pm 0.70	6.33 \pm 0.20

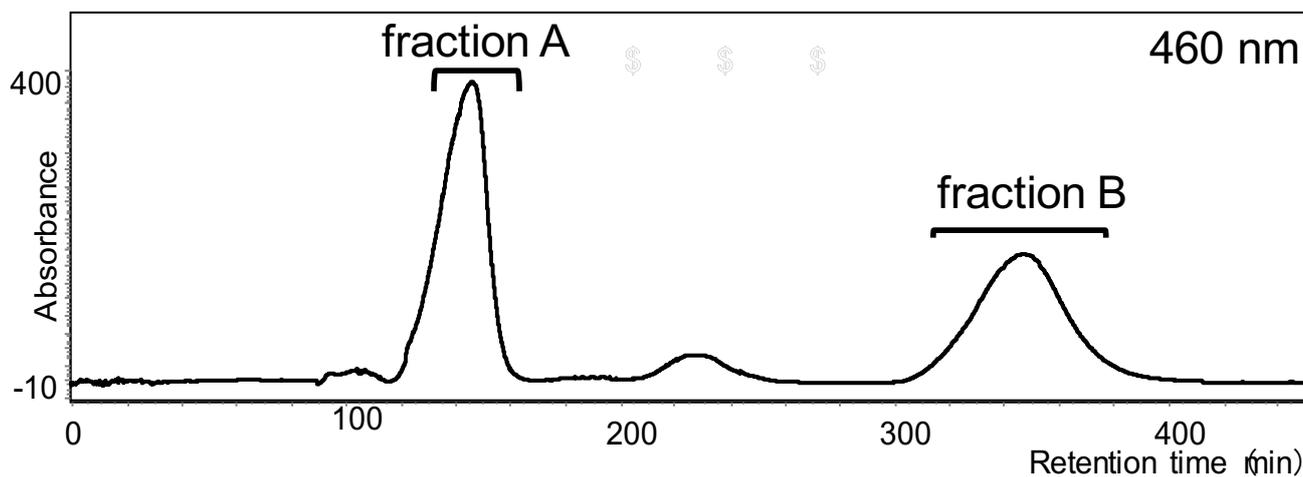


Fig. 9 ベニコウジ黄色素の HSCCC クロマトグラム (検出波長 : 460 nm)

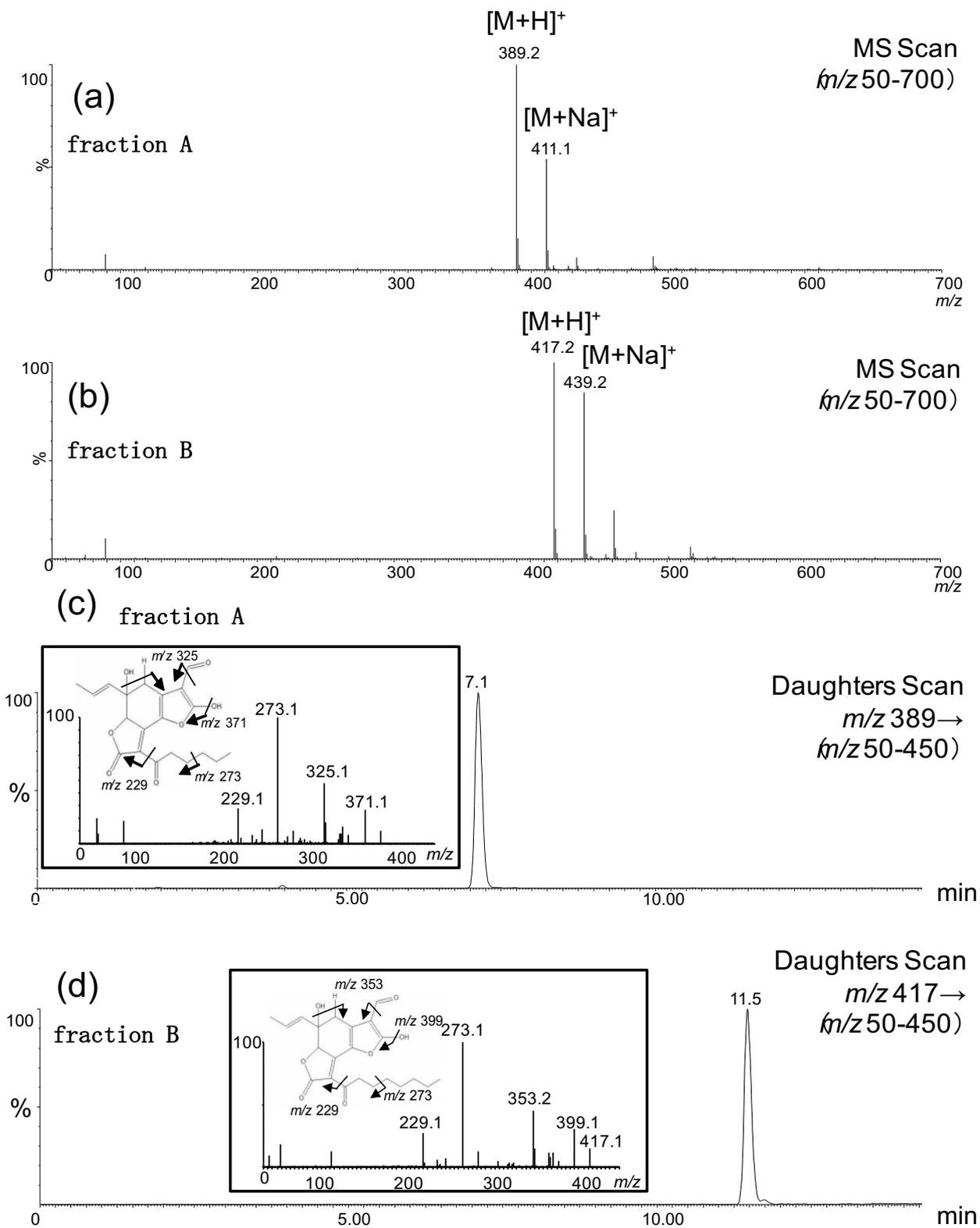


Fig. 10 単離精製した化合物の MS スペクトルおよび MS/MS スペクトル

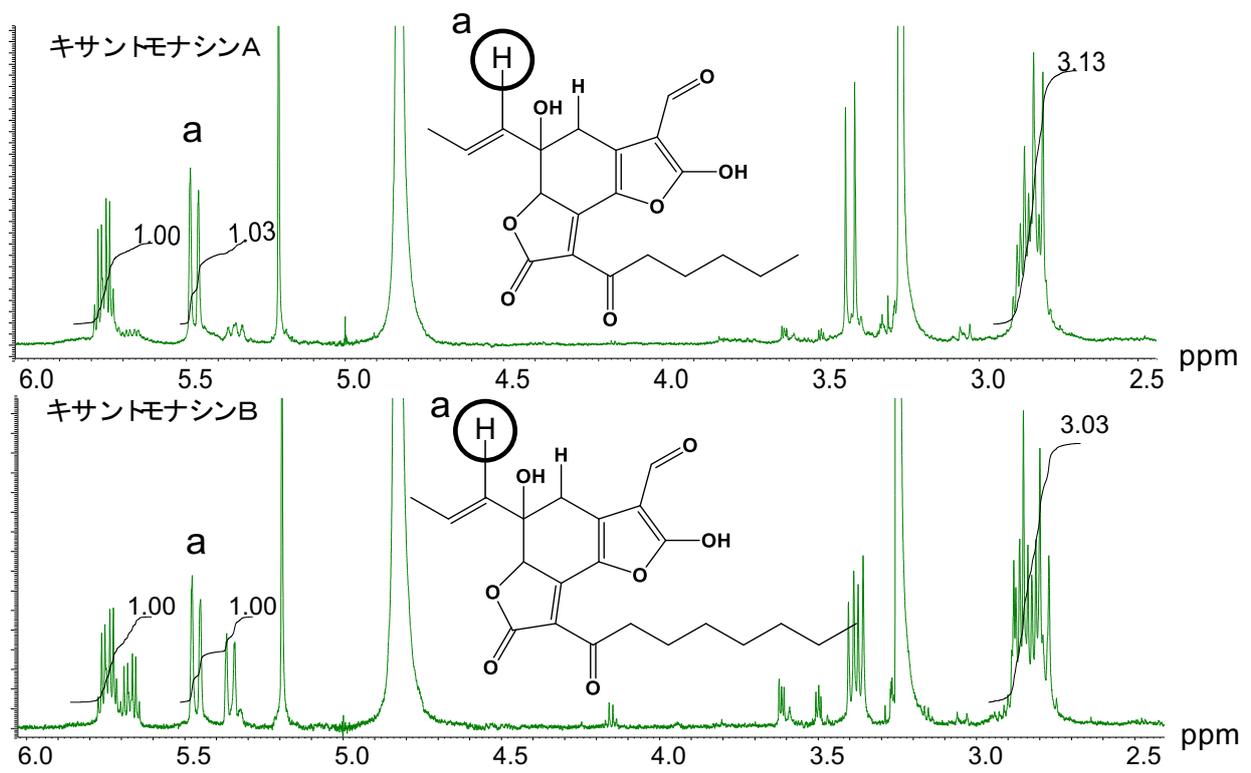


Fig. 11 単離したキサントモナシン A および B の定量 NMR

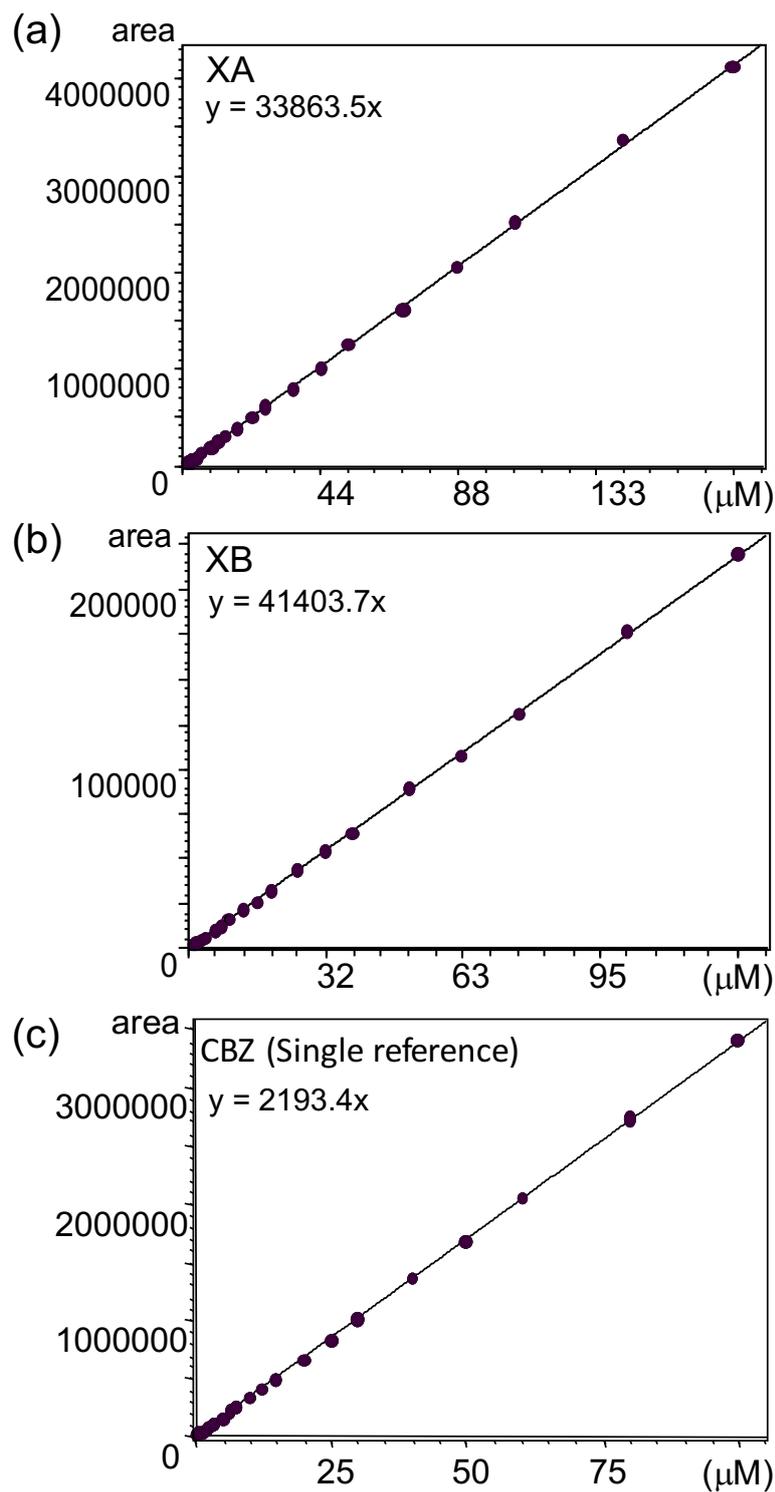


Fig. 12 絶対検量線

(a) キサントモナシン A, (b) キサントモナシン B, (c) カルバゾクロム (カルバゾクロムスルホン酸ナトリウム三水和物の分子量からカルバゾクロムの重量を算出してフリー体とした)

Table 3 検量線の異なる濃度幅における RMS の算出

	Range(μM)	相関係数	RMS
XA	0 - 11.1	0.999	8.85
	13.3 - 44.2	0.999	8.68
	53.0 - 177	0.999	8.73
	0 - 177	0.999	8.73
	平均 \pm SD		8.75 \pm 0.06
XB	0 - 7.94	0.999	15.0
	9.45 - 31.5	0.998	14.7
	37.8 - 126	0.999	14.4
	0 - 126	0.999	15.0
	平均 \pm SD		14.8 \pm 0.25

Table 4 絶対検量線法とシングルリファレンス HPLC 定量法との定量値の比較

ベニコウジ黄色素 サンプル	シングルリファレンスHPLC定量法		絶対検量線法	
	XA 定量値 ($\mu\text{mol/g}$) \pm SD	XB 定量値 ($\mu\text{mol/g}$) \pm SD	XA 定量値 ($\mu\text{mol/g}$) \pm SD	XB 定量値 ($\mu\text{mol/g}$) \pm SD
1	9.7 \pm 0.02	3.4 \pm 0.01	9.7 \pm 0.04	3.3 \pm 0.02
2	19.9 \pm 0.10	6.9 \pm 0.03	20.4 \pm 0.03	6.9 \pm 0.01
3	9.5 \pm 0.05	3.1 \pm 0.04	9.9 \pm 0.02	3.2 \pm 0.01
4	10.0 \pm 0.09	3.3 \pm 0.04	10.3 \pm 0.08	3.3 \pm 0.01

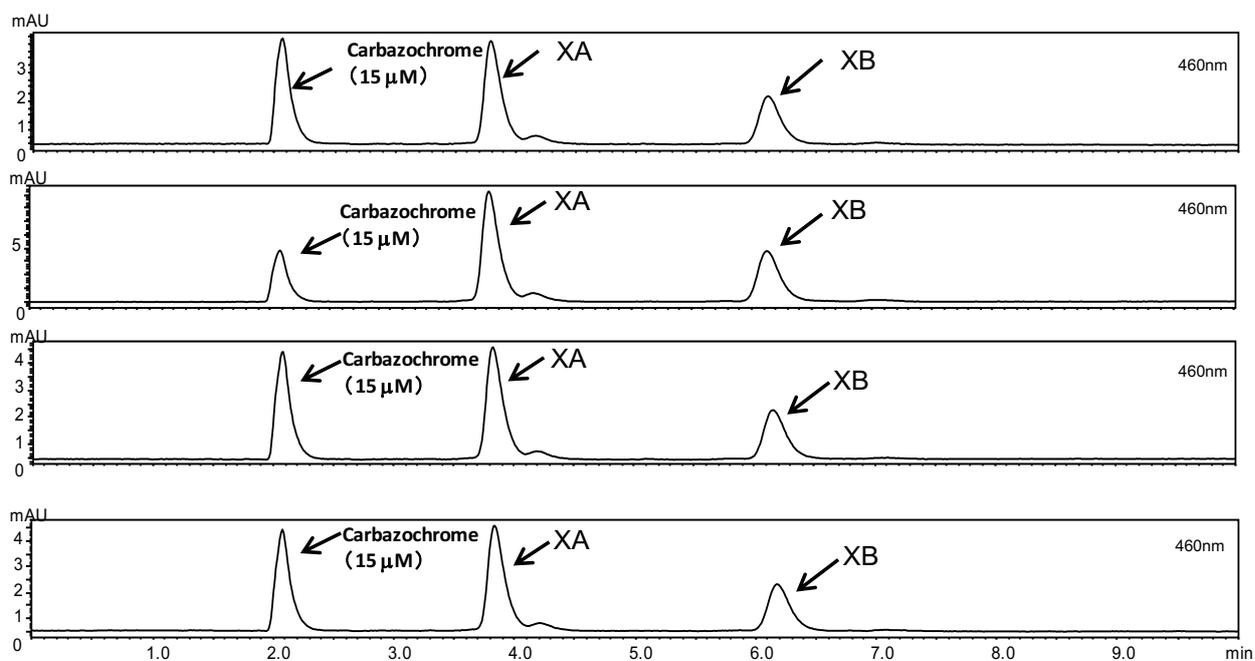


Fig. 13 各メーカーのベニコウジ黄色素でのシングルリファレンス HPLC 定量法

Table 5 異なる HPLC 分析条件におけるキサントモナシン類の定量値

HPLC 分析条件 (カラム) 移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液 移動相 B: 0.1%ギ酸メタノール	シングルリファレンス 添加濃度 (μM)	XA 定量値 (μmol/g) ± SD	XB 定量値 (μmol/g) ± SD
TSKgel ODS-100V [Tosoh, Co.] A/B: 30/70	5.0	9.1 ± 0.10	3.3 ± 0.04
	7.5	9.3 ± 0.12	3.3 ± 0.06
	15.0	9.1 ± 0.04	3.3 ± 0.03
Xbridge C18 [Waters, Co.] A/B: 20/80	5.0	8.8 ± 0.05	3.0 ± 0.08
	7.5	9.0 ± 0.09	3.2 ± 0.01
	15.0	8.9 ± 0.10	3.1 ± 0.01
Inertsil ODS-2 [GL Science, Co.] A/B: 15/85	5.0	9.1 ± 0.07	3.1 ± 0.03
	7.5	9.4 ± 0.09	3.3 ± 0.07
	15.0	9.2 ± 0.08	3.2 ± 0.03
YMC-Pack Pro C18 RS [YMC, Co.] A/B: 20/80	5.0	9.0 ± 0.18	3.3 ± 0.09
	7.5	9.2 ± 0.12	3.3 ± 0.06
	15.0	9.2 ± 0.03	3.3 ± 0.05
KINETEX [Phenomenex, Co.] A/B: 90/10 (0 min) → 10/90 (10 min) → 5/95 (10.1 min) → 5/95 (15 min)	5.0	9.8 ± 0.15	3.3 ± 0.07
	7.5	9.4 ± 0.06	3.2 ± 0.03
	15.0	9.1 ± 0.04	3.1 ± 0.03

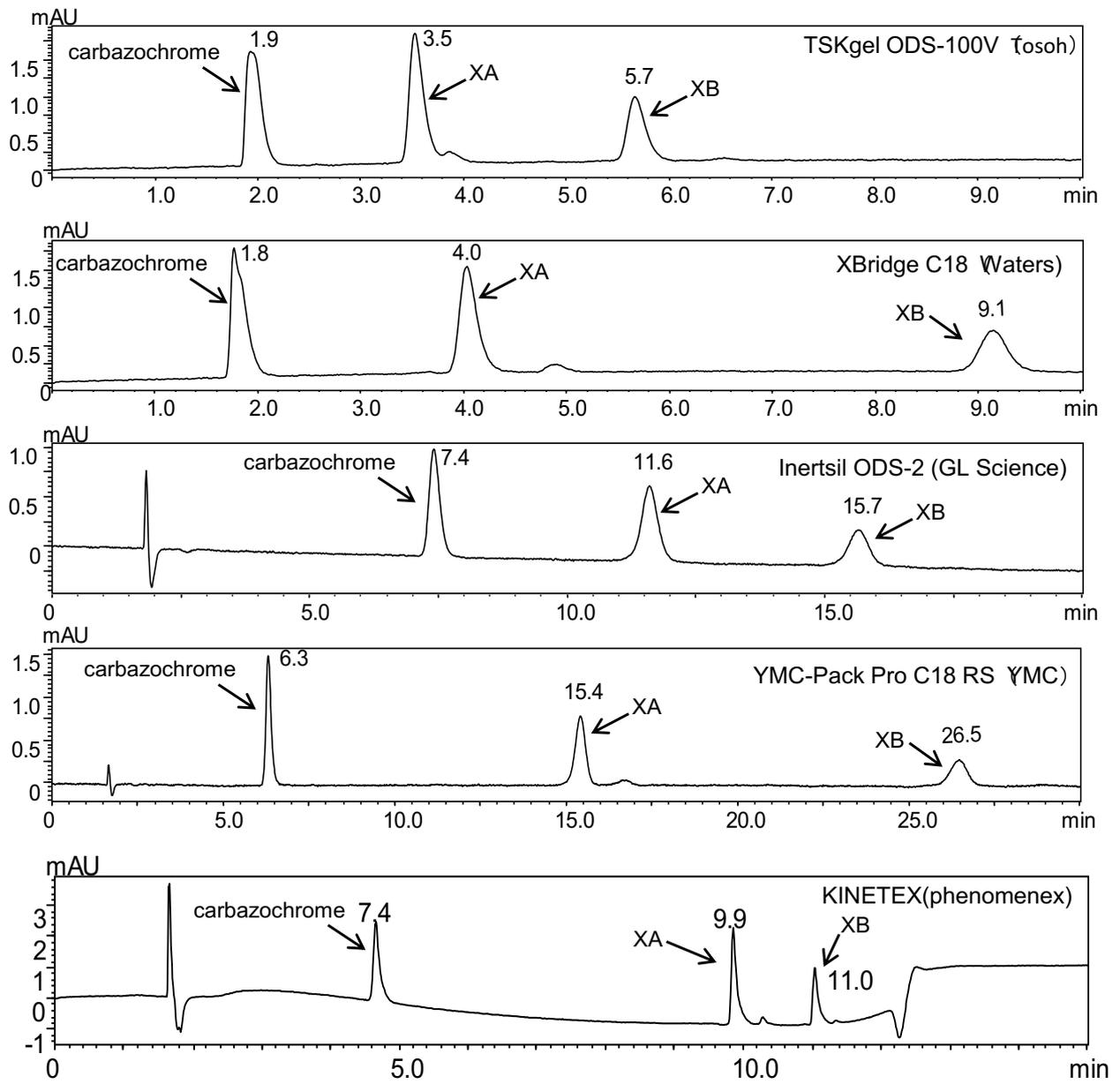


Fig. 13 異なるカラムでのベニコウジ黄色素のシングルリファレンス HPLC 定量法

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究
(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

qNMR 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

研究要旨 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。適用の可能性があるものに関して、実際に適用する場合の測定条件の確立、あるいはそれを応用した正確な定量法の検討を目的とした。29年度は「ベニバナ赤色素」、「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討した。「ベニバナ赤色素」では、これまでの研究で赤色本体の *carthamin* の ^1H -qNMR 法を用いた定量条件と、その値付けをした溶液を用いての HPLC 定量条件の確立までできていたことから、それらを用いた実際の試料の定量の条件の検討を行った。また、 ^1H -qNMR 法で純度を明らかにした *carthamin* の UV スペクトルを測定して吸光係数を算出し、これまでの文献値よりも吸光係数は大きいという結果を得た。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、「香辛料抽出物」の基原に上がっているもののうち、生薬として市販されているものの抽出物を作成し、 ^1H -qNMR 法での定量が可能かの検討を行った。そのうちスターアニスでは、含有される *anisaldehyde* を定量できる可能性がわかったことから、これを基準に品質管理ができると考え、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」について ^1H -qNMR 法を用いた *anisaldehyde* 定量を検討し、測定可能であることを明らかとした。

A. 研究目的

^1H -qNMR 法は、SI トレ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。

29年度の研究では既存添加物である「ベニバナ赤色素」が成分定量の方法を確立されておらず、規格基準が決められていないことから、色素本体の化合物である *carthamin*(Fig.

1)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った。合わせて、 ^1H -qNMR 法で純度を測定した *carthamin* の UV スペクトルを測定して吸光係数の算出を試みた。吸光度からの絶対定量も可能になると考えられる。まず、これまでの文献値が、 ^1H -qNMR 法による絶対定量で算出した吸光係数と一致するかも検討した。これらを通じて、高純度での単離が難しく、試薬としても入手できない *carthamin* の正確で簡便な定量法の確立を目指した。

「香辛料抽出物」も規格基準が決められていないが、そもそも多くの素材が材料として規定されていて、その素材ごとに基準物質を定めて基準の策定をしていく必要がある。今

回は素材に上げられているもののうち、生薬として市販されているものの抽出物を作成し、 ^1H -qNMR 法での測定が可能かどうかの検討を行った。そのうち、スターアニスで、含有される anisaldehyde (Fig. 2) を定量できる可能性があることから、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」について ^1H -qNMR 法を用いた anisaldehyde の定量が適用できるかの検討を行うことにした。

B. 研究方法

B-1) 試薬等

1,4-BTMSB- d_4 は和光純薬の Trace Sure® 規格のものを用いた。Anisaldehyde は和光純薬の試薬特級のものを用いた。NMR 用溶媒の pyridine- d_5 は Isotec Inc. の 99.5 atom %D を、ethanol- d_6 は Isotec Inc. の 99.5 atom %D を、DMF- d_7 は東京化成の 99.5 atom %D を用いた。UV スペクトル測定時の溶媒の EtOH は和光純薬、DMF は東京化成、pyridine はナカライテスクのそれぞれスペクトル用のものを用いた。HPLC 用溶媒の MeOH は和光純薬の HPLC 用のものを用いた。その他の溶媒はいずれも試薬特級のものを用いた。

B-2) 装置等

秤量には島津製作所の精密電子天秤 AUW120D を用いた。分注操作で用いる電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x を使用した。超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S で、遠沈操作は遠心器 TOMY PMC-060 を用いた。NMR 装置は日本電子 JNM-ECA500 を使用した。HPLC はポンプとして JASCO PU-2089、カラムオーブンに Shimadzu CTO-20AC を、検出器は JASCO MD-2010 を用いて行った。UV スペクトル測定は JASCO UV-530 を用いた。

B-3) 「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。純度の高い carthamin は市販されていないため、まず、水上らの方法 (参考文献[1]) に従い、市販既存添加物からの carthamin の単離を行った。得られた carthamin の ^1H -qNMR の測定を行って純度を決定し、その carthamin を carthamin 標準品、またその ^1H -qNMR の測定を行った溶液を標準液として定量の基準とすることにした。

B-3-a) ^1H -qNMR スペクトルの測定

単離した carthamin 約 5 mg を精秤して 1.00 ml の pyridine- d_5 に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB- d_4 (Fig. 3) の溶液 (2.00 mg/mL, pyridine- d_5) 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ^1H -qNMR の測定に供した。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 (Fig. 4) から、carthamin の 16 位 H のシグナル (δ 9.15 ppm) 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 1 に従って carthamin の濃度を算出した。

$$C_{ca} = \frac{I_{ca}}{I_B} \times C_B \quad (1)$$

ただし、 C_B 、 C_{ca} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び carthamin のモル濃度 (mol/ml)、 I_B 、 I_{ca} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び carthamin の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-3-b) HPLC による carthamin の定量

市販添加物や生薬中の carthamin 含有量は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 分析という手順とった。HPLC の条件は、昨年度までの研究で確立した条件で、カラムに YMC-Pack ODS-AL s-5 250 mm x 4.6 mm i.d., 温度 37°C で、溶媒として 0.5% 酢酸-MeOH 溶液と 0.5% 酢酸水溶液のグラジエント (0 min: 50:50→20

min 80:20)を流速 1.0 ml/min で溶出し、520 nm での吸収で検出した。

$^1\text{H-qNMR}$ の測定に用いた溶液を 5 倍ずつ 4 段階に希釈し、それぞれから得られたクロマトグラム(Fig. 5)のピーク面積から、検量線を作成した。

各試料の調製は、「ベニバナ赤色素」の場合は約 5 mg、生薬粉末では約 100 mg を精秤し、これに溶媒 (MeOH-水) 1.0 mL を加えて超音波下 30 分で抽出、遠沈後その上清をフィルター濾過し、HPLC 用の溶液とした。各クロマトグラムのピーク面積と検量線から各試料の carthamin の含有率を算出した。

B-3-c) carthamin の吸光係数

吸光係数の書かれた文献値では EtOH 中(参考文献[2])と DMF 中(参考文献[3])で測定されているものが報告されている。定量 NMR 法での carthamin の定量 pyridine 中での測定で確立しているが、pyridine は塩基性であり、この溶液を EtOH または DMF で希釈してもポリフェノリックな carthamin の極大波長と吸光係数は pyridine の存在による pH の変化に敏感に反応して変化することが考えられる。ゆえに、定量 NMR 法での carthamin の定量が ethanol- d_6 と DMF- d_7 中でも可能かの検討をした。可能であれば、その時の溶液を元に希釈して UV スペクトルを測定して、極大吸収波長での吸光係数を求めることにした。UV スペクトルは 23°C で測定した。

B-4) $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた「香辛料抽出物」中の成分定量

既存添加物の「香辛料抽出物」は、アサノミ以下 73 種類の植物から「抽出しまたはこれを水蒸気蒸留して得られたもの」とされている。多様な基原が含まれており、かつどの部位を用いたかも決められていないという、つかみどころのない基原の既存添加物である。しかしながらどれかは用いられているはずで、特定の基原を用いているものごとに規格基準を策定することは可能である。そこで、生薬として流通している基原を中心に検討をすることにした。すなわち、生薬として入

手できた 20 種類の粉末生薬の MeOH 抽出物を作成し、それぞれの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定して $^1\text{H-qNMR}$ に適用できる独立したシグナルを持つスペクトルを与えるものを選抜した。その中でスターアニスの抽出物のスペクトルで独立したシグナルが観測された。この独立シグナルがスターアニスに特徴的な精油成分である anisaldehyde のホルミル基由来のプロトンと容易に特定できたことから、まず、anisaldehyde の $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの実施の条件検討と、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の定量、さらに粉末生薬中の anisaldehyde の定量も合わせて行うことにした。

B-4-a) 「香辛料抽出物」の基原から $^1\text{H-qNMR}$ 法が適用できる生薬のスクリーニング

「香辛料抽出物」の基原のうち、市販で入手が容易であった、ウコン、オールスパイス、カルダモン、クミン、ケシノミ、コショウ、コリアンダー、シナモン(桂皮)、ショウガ、スターアニス、タイム、ディル、トウガラシ、ナツメグ、フェネグリーク、ニンニクの 16 種類の MeOH 抽出物を作成し、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。すなわち、各粉末 100 mg に MeOH (1 mL) を加えて超音波下 30 分抽出を行い、遠沈してその上清を得た。この操作を 3 回繰り返し、集めた上清を濃縮乾固、これを methanol- d_4 に溶かして $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。

B-4-b) $^1\text{H-qNMR}$ 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 methanol- d_4 に溶かし内部標準用溶液とした。

Anisaldehyde 標準品を用いた $^1\text{H-qNMR}$ は次のように行った。Anisaldehyde 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 anisaldehyde 標準品の製品を開封してそのまま用いた。anisaldehyde 標準品を約 5 mg を精秤して 1.00 ml の methanol- d_4 に溶かした。この溶液 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。

入手できた既存添加物「香辛料抽出物」のうち 4 種類は水蒸気蒸留で得られた水を含む液体であることから、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 20 mg (20 μL) を精秤して methanol- d_4 (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。

粉末で入手された既存添加物「香辛料抽出物」1 種と粉末生薬の場合は、まずこれらの粉末をシケータ中で一晩乾燥させた。これらの約 200mg を精秤して 1.00 mL の methanol- d_4 に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈した。その上清 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。

B-4-c) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Anisaldehyde とスターアニス由来の「香辛料抽出物」、スターアニス生薬粉末の ^1H -NMR を測定し、anisaldehyde のホルミル基 H のシグナルが $\delta 9.82$ ppm に現れることを確認した。 ^1H -qNMR スペクトルの測定条件は 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、anisaldehyde のホルミル基 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 2 に従って anisaldehyde の濃度を算出した。

$$C_{\text{an}} = \frac{I_{\text{an}}}{I_{\text{B}}} \times C_{\text{B}} \quad (2)$$

ただし、 C_{B} 、 C_{an} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び anisaldehyde 1 のモル濃度 (mol/mL)、 I_{B} 、 I_{an} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び anisaldehyde の水素 1 個あたりのシグナル面積。

C. 結果及び考察

C-1) 実験結果

C-1-a) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

C-1-a-1) HPLC による carthamin の定量

これまでに確立した ^1H -qNMR 法を用い、単離した carthamin の純度を算出したところ、 $54.5 \pm 0.3\%$ と算出された。この溶液を用いて順次希釈した溶液を用いて検量線を作成したところ、直線性のある検量線が得られた。

(Fig. 6)

各試料の調製は、「ベニバナ赤色素」または生薬粉末のからの抽出溶媒の検討を行った。MeOH-水の比率を 0%~100% まで 10% 刻みで MeOH 濃度を変えた溶媒で抽出を行い、ピーク面積を比較した。その結果、80% MeOH-水の条件のときに抽出効率が最大となることがわかった。そこで、「ベニバナ赤色素」、生薬粉末を精秤し、これらに 80% MeOH-水 (1.0 mL) を加えて抽出して調製した試料の測定を行ったところ、「ベニバナ赤色素」の carthamin 含有率は 0.31%、生薬粉末は 0.22% と算出された。

C-1-a-2) Carthamin の吸光係数

Carthamin の吸光係数は EtOH 中と DMF 中で測定されているものが報告されていることから、ethanol- d_6 と DMF- d_7 中での ^1H -qNMR を試みた。単離して得た carthamin 標準品 5 mg を秤量してそれぞれの溶媒 1 mL に溶解しようとしたが、全ては溶解しなかった。また、上清を取って ^1H -NMR を測定したが、carthamin の 16 位 H のシグナルを十分な大きさで観測することができず、これらの溶媒では ^1H -qNMR 法を適用するに足る十分な溶解度がないことがわかった。

そこで、まず carthamin 標準品をこれまでと同様に pyridine- d_5 中で ^1H -qNMR を測定して純度を算出、同じロットの carthamin 標準品の EtOH 中、DMF 中での UV スペクトルの測定を行って吸光係数を算出することにした。すなわち、carthamin 標準品を約 5 mg を精秤して pyridine- d_5 (1.00 mL) に溶解し ^1H -qNMR の測定に用いた。その結果、まず、このとき標準とした carthamin の純度は ^1H -qNMR の測定より 44.1% と算出された。この

標準品を用いて UV スペクトル測定に供する DMF 及び EtOH 溶液を調製し UV スペクトルの測定をした。(Fig. 7, 8) また, $^1\text{H-qNMR}$ の測定に供した溶液を通常のスเปクトル用 pyridine で 1000 倍に希釈して pyridine 中での carthamin の UV スペクトルの測定をした。

(Fig. 9) 測定の結果, それぞれのモル吸光係数は DMF : 1.21×10^5 ($\lambda_{\text{max}} = 530$), EtOH : 1.19×10^5 ($\lambda_{\text{max}} = 513$), Pyridine : 1.48×10^5 ($\lambda_{\text{max}} = 540$) と算出された。(Table 2) Pyridine 中の値は今回初めて測定したものだが, DMF 中の値は文献値の 1.3 倍, EtOH 中は 2.4 倍と, いずれも文献値よりも大きい値となった。

C-1-b) $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた「香辛料抽出物」中の成分定量

C-1-b-1) 「香辛料抽出物」の基原から $^1\text{H-qNMR}$ 法が適用できる生薬のスクリーニング

研究方法の項で述べたように「香辛料抽出物」の基原のうちの 16 種類の MeOH 抽出物を作成し, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した結果, スターアニスのスペクトルで, $^1\text{H-qNMR}$ が適用できる独立したシグナルが 9.82 ppm に観測された。(Fig. 10A) そのスペクトルを市販の anisaldehyde のスペクトルと比較したところ一致したので, 9.82 ppm のシグナルは anisaldehyde のホルミル基の H のものと特定した。(Fig. 10B)

C-1-b-2) スターアニス及びスターアニス由来の「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の定量

Anisaldehyde 標準品中の anisaldehyde の定量を $^1\text{H-qNMR}$ 法でおこなった結果, $94.96 \pm 1.02\%$ と見積もられた。

次に「香辛料抽出物」のうちスターアニスを基原とするとされるもので入手できた 5 サンプルの $^1\text{H-qNMR}$ 測定を試みた。そのうち 2 サンプルは anisaldehyde のホルミル基 H に由来するシグナルが観測されなかった。3 サンプルについて定量を行った結果, それぞれ含有率が 1.40%, 0.24%, 0.76% となった。これらの標準偏差は 0.07% で, 含有率が 1%

を切る状態になると無視できない数字であった。スターアニスの生薬粉末中の anisaldehyde の定量では, これまでに 2 サンプルについて $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量を実施し, $0.62 \pm 0.03\%$, $0.32 \pm 0.04\%$ という結果を得た。以上の結果は Table 3 に示した。

C-2) 考察

C-2-a) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

$^1\text{H-qNMR}$ による単離した carthamin の定量を行うことにより, 高純度でない試料でも容易に濃度の標準物質とすることができることがわかった。またそれを基準に HPLC で検量線を作成することで, 微量のサンプルであっても容易に正確な定量ができる方法を確立した。また, HPLC 用サンプルの調製において, 最も抽出効率の良い溶媒条件 (80% MeOH-水) も見つけることができた。今の所, 入手できた「ベニバナ赤色素」が 1 ロットだけのため, さらに試料を集めて検証したい。

また, $^1\text{H-qNMR}$ 法で定量した carthamin を用いて吸光係数を算出することもできた。この吸光係数はこれまでの報告のある数値よりも大きかった。(Table 2) これは, 先行研究における測定の際, 純度を大きく見積もっていたために起こったこととも考えられる。再結晶を行って得た化合物の純度は 100% に近いものであるが, HPLC で精製したものの場合, 1 ピークを単離したつもりでもバックグラウンドの夾雑物が無視されたり, 乾燥が十分でなかったりして純度が実は十分ではないことがある。また, carthamin の場合, 熱や光に不安定でもあるので, 保存中の分解ということもある。精製の仕方, 保存の仕方でも純度を高く見積もる要因は多くあり, $^1\text{H-qNMR}$ 法が確立されていなかった当時では検証の方法はほぼない状態であったので, 先行研究における吸光係数は小さく算出されていると考えられる。

$^1\text{H-qNMR}$ 法での定量値から正確な吸光係数を算出できたことで, 吸光度から濃度を算出できるようになり, 不安定な carthamin の簡便な定量に大きく貢献できる

ものと考ええる。

今回の結果は単離した carthamin の 1 ロットでの測定の結果であるため、このあと数回追試を重ね、現在の算出値が正しいか、ばらつきがないかなどの検証を行う。

C-2-b) 「香辛料抽出物」のうちスターアニスを基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量

Anisaldehyde 標準品中の含有率 94.96% はメーカーのラベルに書かれている 97% 以上という数字より若干小さな値となった。メーカーでの純度測定が GC によるものなので、その時の検出器で検出できない夾雑物が無視されて高く見積もられたか、開封後の水蒸気の混入などで純度が下がったかなどが要因と考えられる。

「香辛料抽出物」のうち anisaldehyde が検出できない（ホルミル基 H のシグナルがない）ものがあった。Anisaldehyde が含まれてなくても用途として成り立つのかもしれないが、スターアニスが主ではなく、使われていたとしてもごくわずかしき使われていない「香辛料抽出物」なのではないかと考えられた。また今回、そのような実情を明らかにできたと思われる。

一方、シグナルを検出、定量が可能であった「香辛料抽出物」は 0.24~1.4% という含有率だった。これらの標準偏差は 0.07% で、含有率が 1% を切る状態になると無視できない幅の数字であった。また、生薬粉末も 0.32~0.62% という含有率だった。いずれも非常に小さな値で、品質管理という観点から数値のばらつきを考えると、NMR 測定時の溶液濃度を高める工夫の余地があると考えられた。

D. 結論

1) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量では、 $^1\text{H-qNMR}$ 法で値付けされた標準の carthamin の溶液を用いて HPLC の検量線を作成、微量の含有率の carthamin を HPLC にて正確に定量する方法を確立した。 $^1\text{H-qNMR}$ 法による carthamin の定量は、昨年までの研究で確立した方法で、認証標準物質の

1,4-BTMSB- d_4 を内部標準として用い、pyridine- d_5 溶液と carthamin の溶液を混合して $^1\text{H-qNMR}$ を測定し、carthamin の 16 位 H のシグナル (δ 9.15 ppm) を積分値から算出する方法を有効に活用した。また、 $^1\text{H-qNMR}$ 法で値付けされた試料をもとに carthamin の各種溶媒での吸光係数の検証をすることができた。

2) 「香辛料抽出物」のうちスターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量では、anisaldehyde の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量条件を確立した。しかしながら、入手した既存添加物試料では含有率が低く、 $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量が適用できる下限付近であることがわかった。揮発性の成分でもあることからあまり工程数を増やすことができないが、測定溶液濃度を高める工夫の余地があると考えられた。

E. 参考文献

- [1] Mizukami ら, *Chem. Pharm. Bull.*, **61**(12), 1264-1268 (2013).
- [2] Kazuma ら, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 1588-1599 (2000).
- [3] Morimoto ら, *Jpn. J. Food Chem.*, **5**(2), 236-238 (1998).

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka, Rie; Inagaki, Risa; Sugimoto, Naoki; Akiyama, Hiroshi; Nagatsu, Akito, Application of a quantitative $^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{H-qNMR}$) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen, *J. Nat. Med.* (2017), **71**(1), 315-320.
- 2) Fukaya, Shiori; Yoshioka, Hiroki; Nagatsu, Akito; Nonogaki, Tsunemasa; Okano, Tadahiro; Onosaka, Satomi; Miura, Nobuhiko, Non-toxic Level of Acetaminophen Potentiates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice, *Biol. Pharm. Bull.* (2017), **40**(9), 1590-1594.

2. 学会発表

1) 深谷栞, 吉岡弘毅, 市丸嘉, 三浦伸彦, 永津明人, 野々垣常正, 「アセトアミノフェンと四塩化炭素の併用による複合毒性の影響」フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー, P-071, 2017年9月(仙台)

2) 森美保菜, 寺倉理央奈, 間瀬貴巳, 藤原裕未, 永津明人, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 「定量 NMR(¹H-qNMR)を応用した生薬コウカ中の carthamin の定量」, 日本薬学会第 138 年会, 27PA-am205, 2018年3月(金沢)

3) 藤原裕未, 三輪真子, 本間篤, 永津明人, 「カエデ属植物に含まれるアントシアニン化合物とその機能性」, 日本薬学会第 138 年会, 27PA-am264, 2018年3月(金沢)

4) 神谷万里子, 木村匡男, 森健, 山岸由佳, 三嶋廣繁, 永津明人, 野々垣常正, 池田義明 「Tradescantia 属植物抽出液による pseudomonas aeruginosa 標準株の増殖とバイオフィルム形成に及ぼす影響」, 日本薬学会第 138 年会, 26PA-pm110S, 2018年3月(金沢)

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

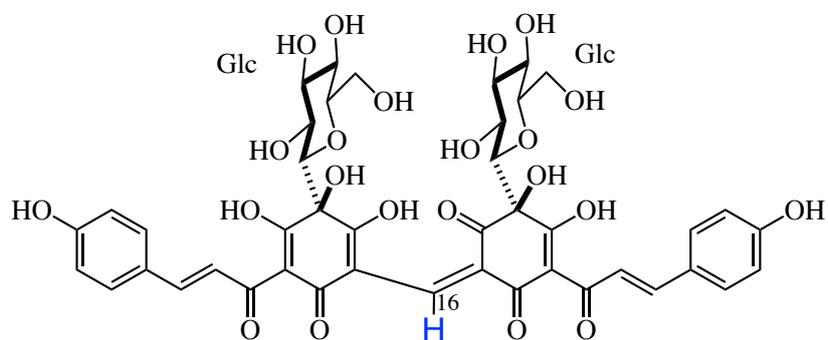


Fig. 1 Carthamin の構造

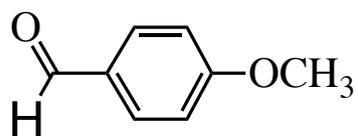


Fig. 2 Anisaldehyde の構造

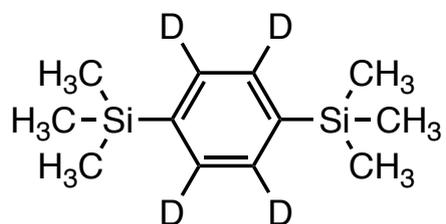


Fig. 3 1,4-(Bis(trimethylsilyl)benzene-d, (1,4-BTMSB-d.)の構造

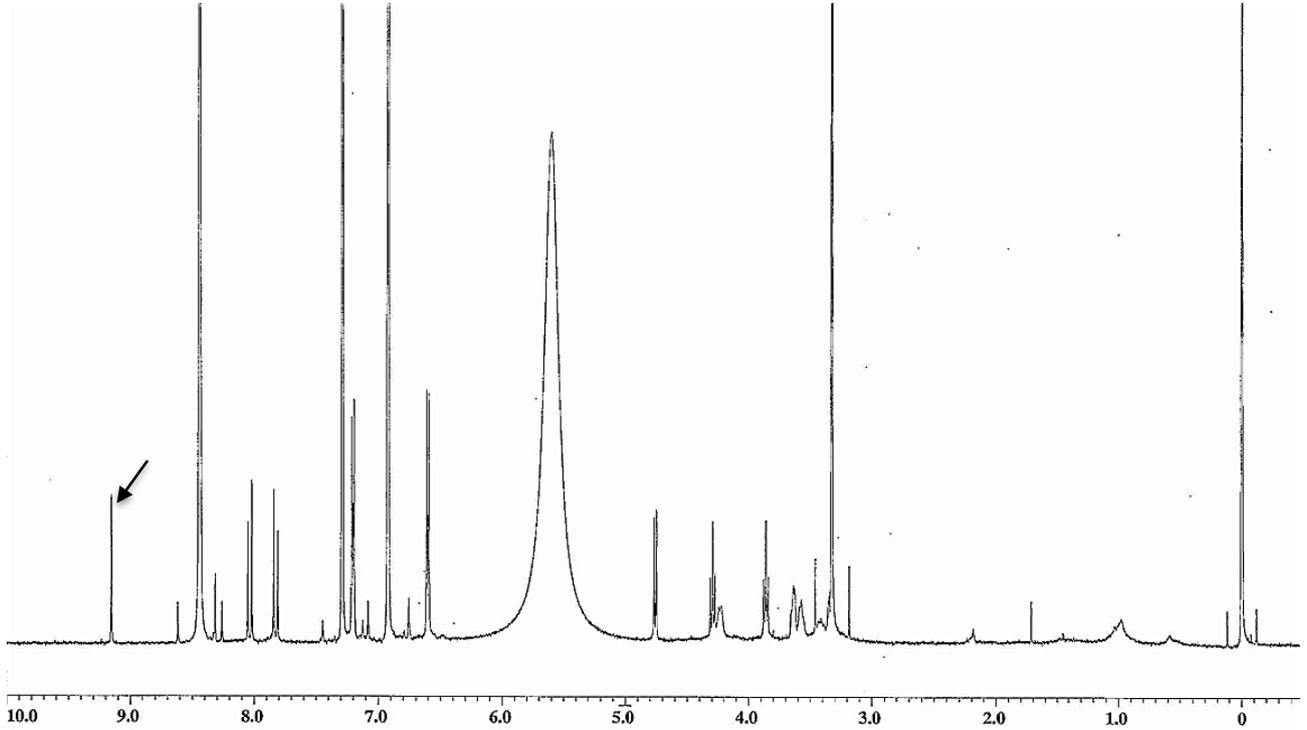


Fig. 4 単離した carthamin の ^1H -NMR スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)
矢印のシグナルが carthamin の 16 位 H のシグナル (δ 9.15 ppm)

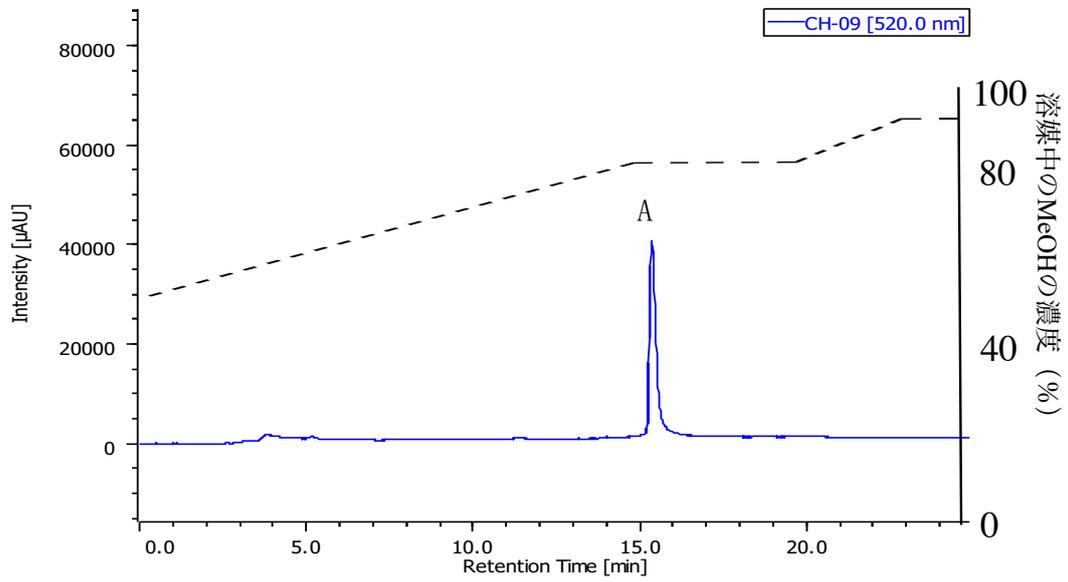


Fig.5 標準とした Carthamin の HPLC クロマトグラム

A: 検出波長 520 nm における carthamin のピーク

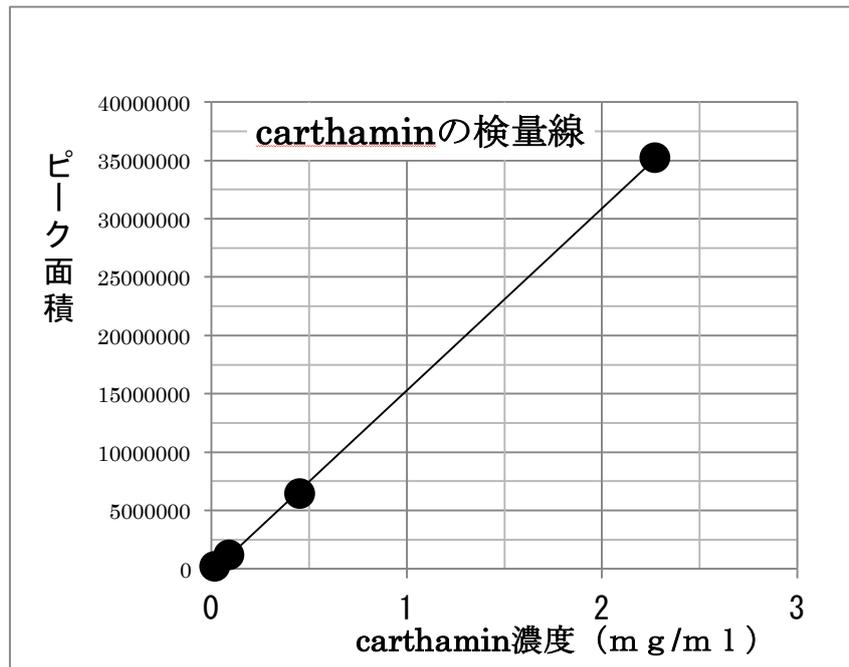


Fig. 6 Carthamin の HPLC クロマトグラムにおける検量線

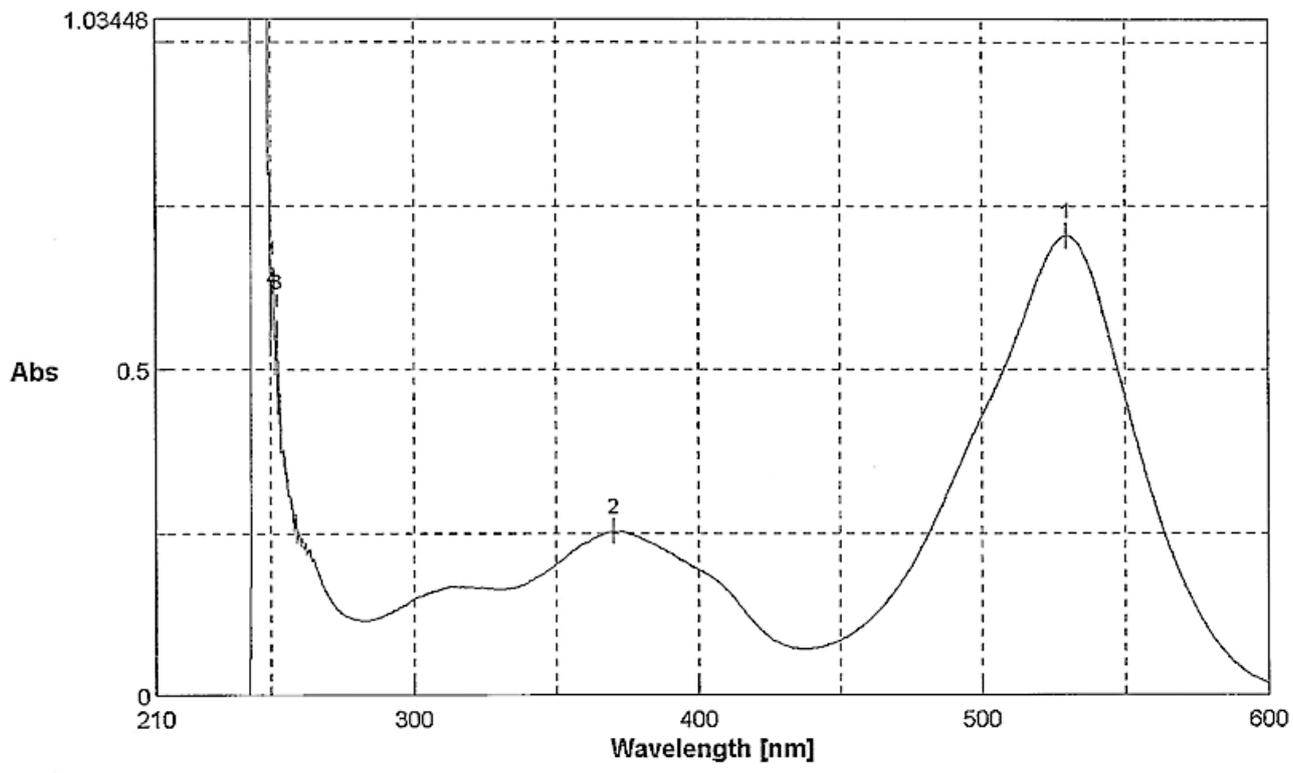


Fig. 7 DMF 中で測定した carthamin の UV スペクトル ($c = 5.80 \times 10^{-6}$ mol/L)

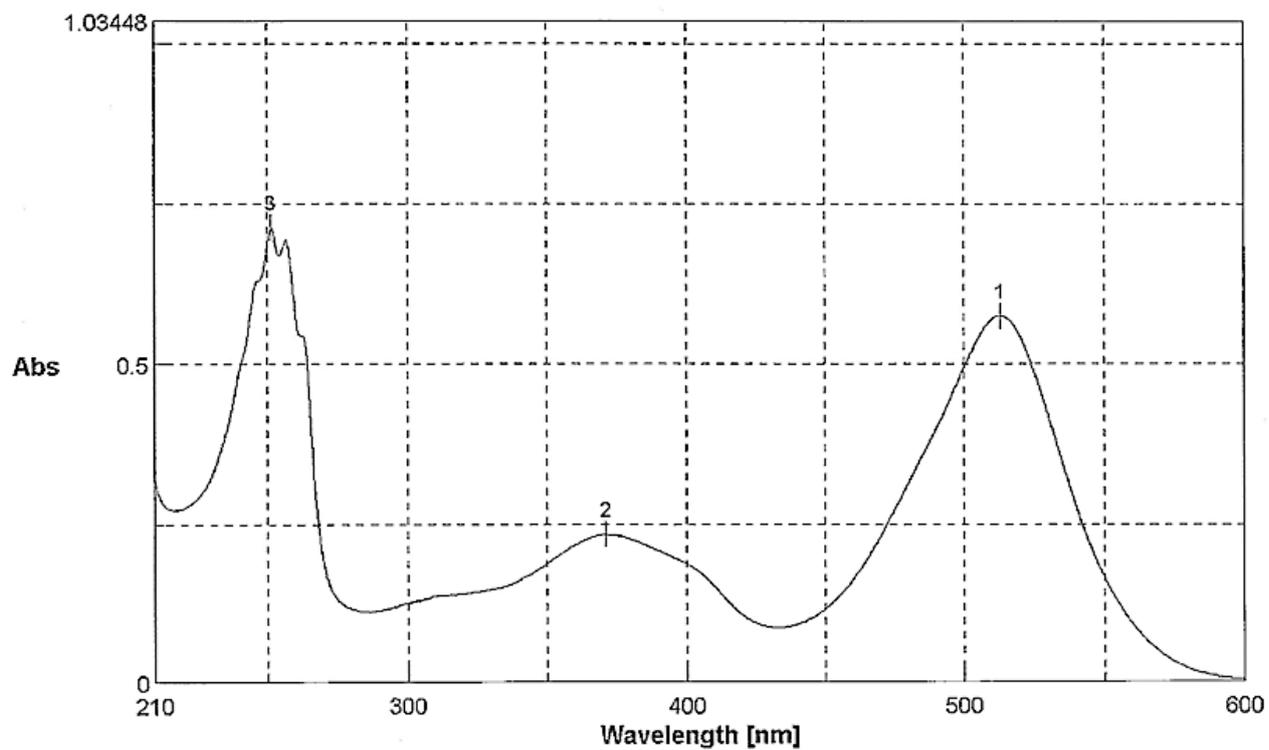


Fig. 8 EtOH 中で測定した carthamin の UV スペクトル ($c = 4.82 \times 10^{-6}$ mol/L)

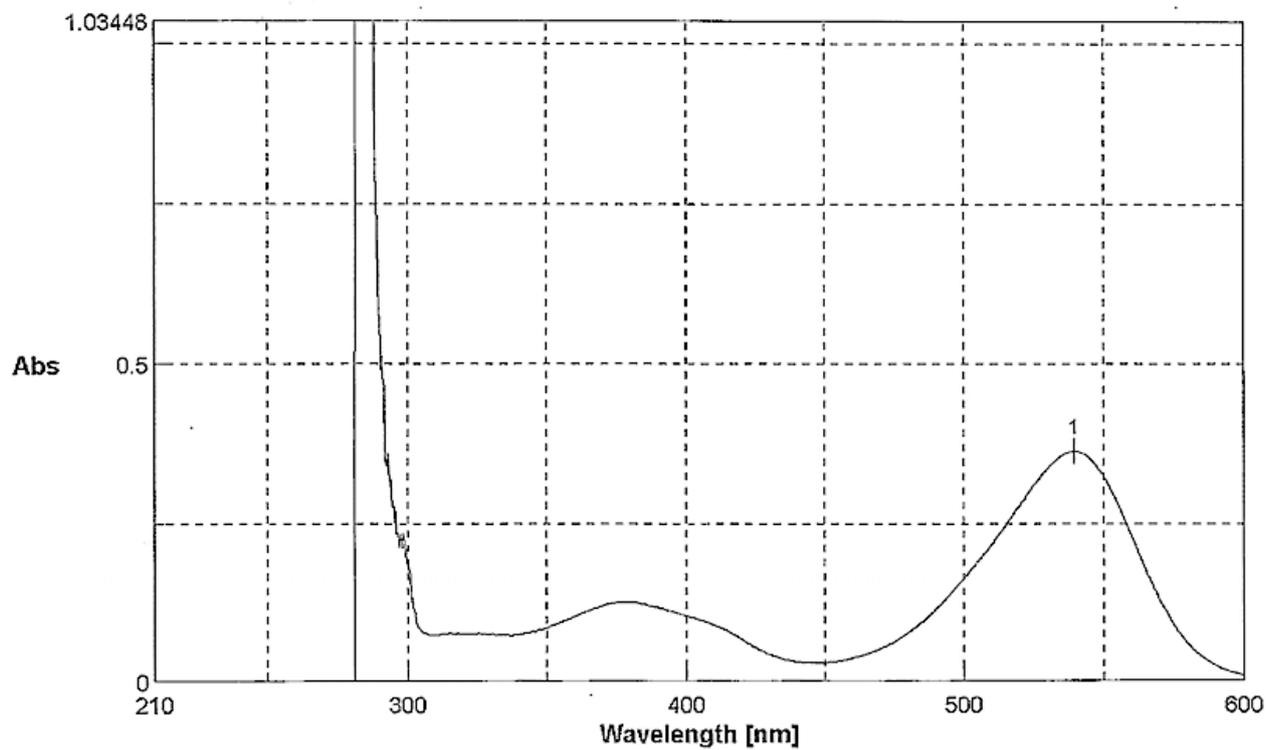


Fig. 9 Pyridine 中で測定した carthamin の UV スペクトル ($c = 2.41 \times 10^{-6}$ mol/L)

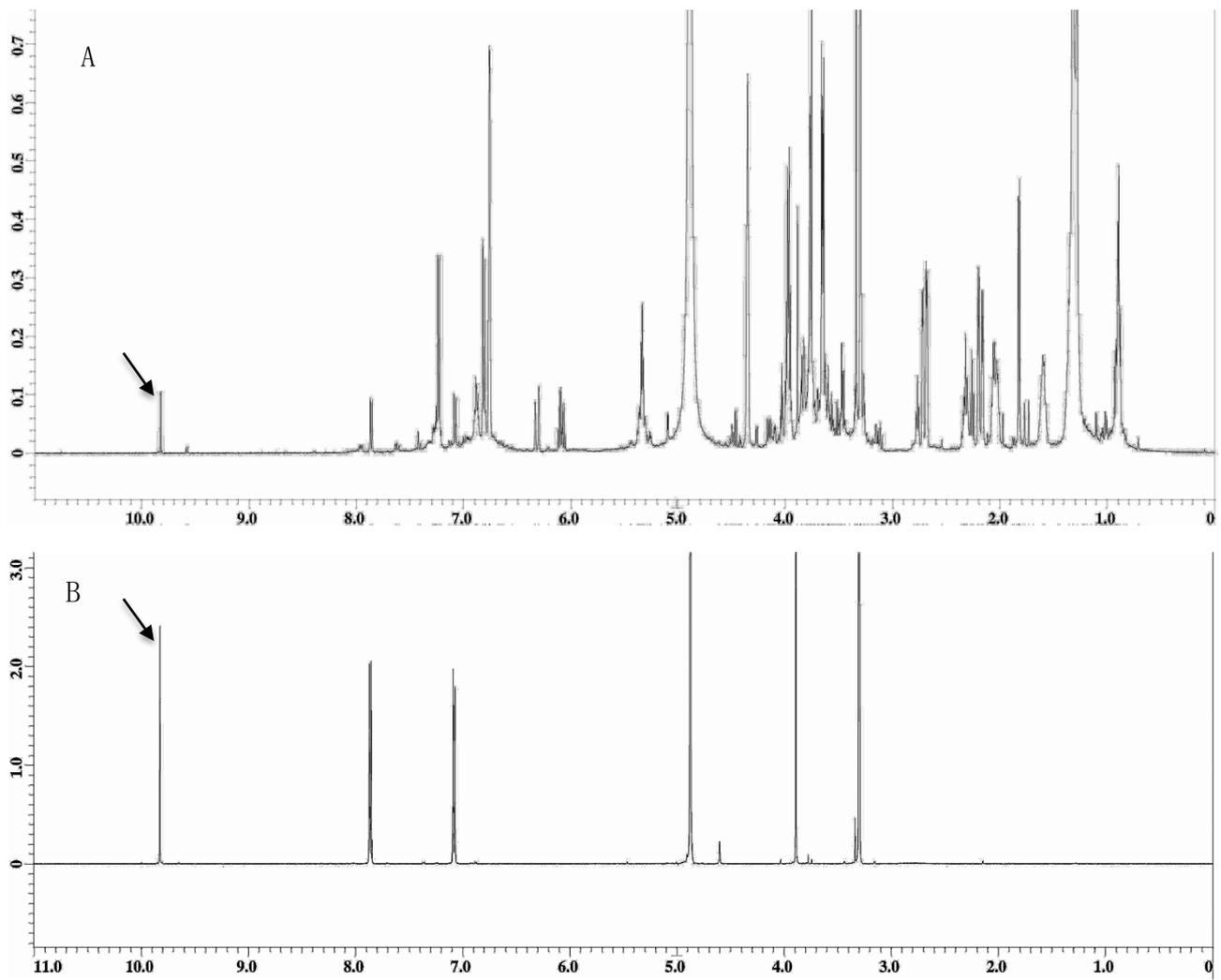


Fig. 10 スターアニス粉末の MeOH 抽出物(A)と anisaldehyde (B) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
 矢印のシグナルが anisaldehyde のホルミル基 H のシグナル ($\delta 9.82$ ppm)

Table 1 ^1H -qNMR スペクトルの測定条件

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°C

Table 2 ^1H -qNMR 法で純度決定した carthammin を用いて測定・算出したモル吸光係数

溶媒	今回の値 (λ_{max})	文献値 (λ_{max})
DMF	1.21×10^5 (530 nm)	9.04×10^4 (530 nm)
EtOH	1.19×10^5 (513 nm)	4.90×10^4 (515 nm)
Pyridine	1.48×10^5 (540 nm)	—

Table 3 ^1H -qNMR 法で定量された anisaldehyde の含有率

samples		含有率(%) \pm SD
eugenol 標準品	(n=6)	94.96 \pm 1.02
「香辛料抽出物」	A (n=5)	1.40 \pm 0.07
	B* (n=3)	0.24 \pm 0.06
	C (n=4)	0.43 \pm 0.08
	D	ND [#]
	E	ND [#]
生薬粉末	F (n=5)	0.62 \pm 0.03
	G (n=5)	0.32 \pm 0.04

* 「香辛料抽出物」 B は粉末の試料.

ND : anisaldehyde のシグナルを検出できなかった.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

（H29-食品-一般-007）

平成29年度研究分担報告書

qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

～ラカンカ抽出物のモグロシドV分析法～

分担研究者 大槻 崇 日本大学 生物資源科学部 食品生命学科 専任講師

研究要旨 本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、 ^1H -qNMRおよび ^1H -qNMRとLCを組み合わせた相対モル感度（RMS）法のラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量分析への適用性について検討した。3種のラカンカ抽出物を対象に検討を行った結果、 ^1H -qNMRでは、類縁物質のシグナルとの不分離によるものと考えられる含量値の増大が確認され、前処理等の更なる検討が必要であることが明らかとなった。一方、RMS法では、カフェインを定量用標品として選択し、得られたカフェインに対するモグロシドVのRMS（0.122）からラカンカ抽出物中のモグロシドVの含量を正確かつ安価に定量できることが判明した。

A. 研究目的

日本では食品添加物の安全性や品質を確保する目的で、食品添加物の性状、含量（純度）などの成分規格や食品添加物を使用できる食品の種類、使用量などの使用基準等が設定され、第8版食品添加物公定書に記載されている。また、既存添加物365品目（枝番込み382品目、ただし、香辛料抽出物を1品目とする）のうち、217品目の規格については、第9版食品添加物公定書に収載される予定である。この食品添加物の成分規格には、原則として含量とその分析法が定められており、同分析ではLC等が使用されることが多い。このような分析では測定対象化合物と同一かつ純度が正確な標準物質が必要であるが、計量学的に妥当な手順によって純度が算出された認証標準物質は非常に少ない¹⁾。このため、LC等の相対定量法では、試薬メーカーの標準品が一般的に利用されている。しかし、この純度は自社規格により保証されたもの、すなわち計量学的に正確とは言えず、結果として定量値の信頼性が損なわれる可能性を否定できない。また、天然由来成分の場合、定量用標

品が販売されていないまたは販売されていたとしてもコストの面から供給が中止される可能性も考えられる。このように、食品添加物特に既存添加物を対象とした場合、製品の品質の保証の観点から、このような問題を克服でき、かつ分析技術の進歩を考慮した信頼性の高い規格試験法の確立が急務と考えられる。

近年、国際単位系（SI）へのトレーサビリティが確保された絶対定量法として定量NMR（quantitative NMR；qNMR）が注目を集めている^{2,3)}。qNMRのうち、 ^1H NMRを利用したqNMR（ ^1H -qNMR）は、定量性が確保された測定条件を用いる事で、2つの化合物間のシグナル面積強度比が「各化合物のモル濃度×各置換基上の水素数」に比例する原理を利用した定量法である。NMRは原子核を対象に測定を行っているため、これら2つの化合物は同一の化学構造である必要はない。従って、計量学的に正確な純度が付与された認証標準物質のようなSIへのトレーサビリティが確保された標品を内標準物質として用いることにより、内標準物質と測定対象化合物のシグナル面積強度比、水素数、秤量濃

度の関係から、様々な測定対象化合物の含量や純度を求めることが可能である。このような定量値の計量計測トレーサビリティを確保した¹H-qNMRは、AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal reference material) と呼ばれている。また、本法は試料を正確に秤量して溶媒に溶解させるのみで測定が可能であることや使用する溶媒量は1検体あたり2 mL以下であることなど、他の分析法に比べ迅速性及び環境負荷の低減の面でも格段に優れている。さらに、混合物分析においては、¹H NMR上で測定対象物質と夾雑物質のシグナルが十分に分離されていれば、煩雑なクリーンアップや誘導体化等の前処理は不要となり、迅速かつ簡便な絶対定量が可能と考えられる。このように、本法は極めて汎用性の高い分析法であり、得られる定量値の信頼性、国際整合性も確保されていると言える。このような特徴から、¹H-qNMRは、残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬などの純度分析^{4,5,6)}、生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析^{7,8,9)}へ利用されている。そこで本研究は、既存添加物の成分規格試験法の向上を目指した研究の一環として、ラカンカ抽出物を対象とし、その主成分であるモグロシドVの定量分析における¹H-qNMRの有効性に関する検討を行った。また、¹H-qNMRとクロマトグラフィーを組み合わせた測定対象物質と同一の定量用標品を必要としないクロマトグラフィー(相対モル感度法)を用いたラカンカ抽出物中のモグロシドV(図1)の定量に関して併せて検討した。

B. 研究方法

B-1) 試薬等

3種のラカンカ抽出物のうち、サンナチュレM30 (Lot.170526-01) (試料1) およびサンナチュレM50 (Lot.170621-01) (試料2) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社よりご供与いただいた。ラカンカ抽出物(羅漢果精製物) (Lot.G20030116) はサラヤ株式会社製(試料3)を用いた。モグロシドVは、和光純薬工業株式会社製標準品(Lot.TWM3866)を用いた。2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate-*d*₆ sodium salt (DSS-*d*₆) は和光純薬工業株式会社

製標準物質 (Cat. No.044-31671, Lot.No.ECL6585, 純度 92.3%, 拡張不確かさ: 0.8%) を用いた。重水 (D₂O) は関東化学製を用いた。その他溶媒は高速液体クロマトグラフィー用または特級を用いた。

試液は以下のように調製した。

¹H-qNMR 標準溶液: DSS-*d*₆ 標準物質 8 mg を精密に量り、DMSO-*d*₆ 40 g を加え ¹H-qNMR 標準溶液とした。¹H-qNMR 標準溶液の DSS-*d*₆ 濃度 (0.2166 mg/g または 0.2165mg/g) は、DSS-*d*₆ の純度値 (92.3%) および秤量値より算出した。

B-2) 装置

核磁気共鳴装置 (NMR): ECA500 (プロトン共鳴周波数 500 MHz) (日本電子株式会社製)

高速液体クロマトグラフィー (LC): LC-10AD システム (ポンプ: LC-10AD, 低圧グラジエントユニット: FCV-10AL, 恒温槽: CTO-10AS, 紫外可視分光検出器: SPD-10AV, デガッサー: DGU-12A, データ処理装置: LabSolutions) (島津製作所製) および Prominence システム (オートサンプラー: SIL-20A, 送液ポンプ: LC-20AD, カラムオーブン: CTO-10AS, 多波長検出器: SPD-M20A, データ処理装置: LabSolutions) (株式会社島津製作所製) にデガッサーとして AG-34 (株式会社フロム製) を接続したもの

はかり: BM-20 (株式会社エー・アンド・デイ製)

B-3) ¹H-qNMR によるモグロシドVの定量

B-3-1) ¹H-qNMR によるモグロシドV標準品の純度測定

モグロシドV 標準品約 10 mg を精密に量り、¹H-qNMR 標準溶液 1 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し、表 1 に示す条件を用い ¹H-qNMR 測定を行った。DSS-*d*₆ のシグナル面積強度を 9.000 としたときのモグロシドV に由来する特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、モグロシドV 標準品の純度 (%) を算出した。

$$\text{Purity (\%)} = \frac{I_{\text{sample}}/H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}}/H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}}/W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}}/C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし、 I_{sample} =モグロシド V の特定基のシグナル面積強度、 I_{std} =内標準物質のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.000)、 H_{sample} =モグロシド V の特定基の水素数、 H_{std} =内標準物質の特定基の水素数 (DSS- d_6 :CH₃×3=9)、 M_{sample} =モグロシド V の分子量、 M_{std} =内標準物質の分子量 (DSS- d_6 : 224.36)、 W_{sample} =モグロシド V の秤取量 (mg)、 C_{std} =¹H-qNMR 標準溶液の DSS- d_6 濃度

なお、qNMR の化学シフト値は、DSS- d_6 のプロトンシグナルを基準 (δ 0 ppm) とし、δ 値を ppm 単位で表した。また、データの解析は、フーリエ変換から含量の算出までを自動処理できる Alice 2 for qNMR “ピュアリティ” (日本電子 (株)) を用いた。

B-3-2) ¹H-qNMR による各ラカンカ抽出中のモグロシド V の定量

3種のラカンカ抽出物のうち、試料 1 及び試料 3 は 50 mg、試料 2 は 20 mg を精密に量り、¹H-qNMR 標準溶液 1 g を入れ超音波処理により溶解したものを試験溶液とした。

この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し、表 1 に示す条件を用い ¹H-qNMR 測定を行った。DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.000 としたときの試料中のモグロシド V に由来する特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、各ラカンカ抽出中のモグロシド V 含量 (%) を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \frac{I_{\text{sample}}/H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}}/H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}}/W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}}/C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし、 I_{sample} =試料中のモグロシド V の特定基のシグナル面積強度、 I_{std} =内標準のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.000)、 H_{sample} =試料中のモグロシド V の特定基の水素数、 H_{std} =内標準物質の特定基の水素数 (DSS- d_6 : CH₃×3=9)、 M_{sample} =試料中のモグロシド V の分子量 (1287.43)、 M_{std} =内標準物質の分子量 (DSS- d_6 : 224.36)、 W_{sample} =試

料中の秤取量 (mg)、 C_{std} =¹H-qNMR 標準溶液の DSS- d_6 濃度

B-3-3) LC による各ラカンカ抽出中のモグロシド V の定量

3種のラカンカ抽出物のうち、サンナチュレ M30 及び試料 3 は 50 mg、試料 2 は 20 mg を精密に量り、水を加え超音波処理により溶解したものを試験溶液とした (抽出物濃度: 1 mg/mL)。この試験溶液を以下の LC 条件にて分析した。

カラム: Develosil ODS-UG-5 (5 μm, 4.6×250 mm, 野村化学株式会社製)、カラム温度: 40℃、検出波長: 210 nm、流速: 1.0 mL/min、溶離液 A: 水、溶離液 B: アセトニトリル、グラジエント条件: 0 min (5%B) → 35 min (40%B) → 35.01 min (100%B) → 40 min (100%B) → 40.01 min (5%B) → 50 min (5%B)、注入量: 10 μL

なお、検量線用標準溶液は以下のように作成した。すなわち、モグロシド V 標準品 5 mg を精密に量り、5 mL 容メスフラスコに入れ、水を加えて正確に 5 mL とし検量線用標準溶液①とした (モグロシド V 濃度: 1.0 mg/mL)。検量線用標準溶液①を水にて公比 2 で段階希釈したものを検量線用標準溶液②、③および④とした (モグロシド V 濃度: 0.5, 0.25 および 0.13 mg/mL)。

調製した試験溶液を上記に示した条件で LC にて分析し、得られたピーク面積と検量線によって得られた試験溶液中のモグロシド V 濃度 (mg/mL) を求め、次式によって試料中のモグロシド V 含量 (%) を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \frac{C \times V}{W} \times \frac{P}{100} \times 100$$

ただし、C は試験溶液中のモグロシド V 濃度 (mg/mL)、V は試験溶液の量 (mL)、W は試料の採取量 (mg)、P はモグロシド V 標準品の

純度 (%) である。

B-4) 相対モル感度 (RMS) を利用した LC によるモグロシド V の定量

B-4-1) ¹H-qNMR によるモグロシド V 標準品およびカフェインの純度測定

モグロシド V 標準品については、B-3-1 の項に示した。カフェインについては、約 10 mg を精密に量り、¹H-qNMR 標準溶液 1 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し、表 1 に示す条件を用い ¹H-qNMR 測定を行った。DSS-*d*₆ のシグナル面積強度を 9.000 としたときのカフェインに由来する特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、カフェインの純度 (%) を算出した。

$$\text{Purity (\%)} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし、 I_{sample} = カフェインの特定基のシグナル面積強度、 I_{std} = 内標準物質のシグナル面積強度 (DSS-*d*₆: 9.000)、 H_{sample} = カフェインの特定基の水素数、 H_{std} = 内標準物質の特定基の水素数 (DSS-*d*₆: CH₃×3=9)、 M_{sample} = カフェインの分子量 (194.19)、 M_{std} = 内標準物質の分子量 (DSS-*d*₆: 224.36)、 W_{sample} = カフェインの秤取量 (mg)、 C_{std} = ¹H-qNMR 標準溶液の DSS-*d*₆ 濃度

B-4-2) カフェインに対するモグロシド V の RMS の算出

各濃度のカフェイン (0.319×10⁻³ mol/L, 0.639×10⁻³ mol/L および 2.56×10⁻³ mol/L) に対する 6 濃度 (0.058×10⁻³, 0.116×10⁻³, 0.232×10⁻³, 0.464×10⁻³, 0.928×10⁻³ および 1.86×10⁻³ mol/L) のモグロシド V を含む水溶液を調製し、試験溶液とした。この溶液を以下の LC 条件にて分析した。

カラム: Develosil ODS-UG-5 (5 μm, 4.6×250 mm, 野村化学株式会社製), カラム温度: 40℃, 検出波長: 210 nm, 流速: 1.0 mL/min, 溶離液 A: 0.1%ギ酸, 溶離液 B: 0.1%ギ酸含有アセトニトリル, グラジエント条件: 0 min

(5%B) → 35 min (40%B) → 35.01 min
(100%B) → 40 min (100%B) → 40.01 min
(5%B) → 50 min (5%B), 注入量: 5 μL

モグロシド V およびカフェインのモル濃度比 (モグロシド V のモル濃度 / カフェインのモル濃度) から物質比 (モル比), LC 分析におけるモグロシド V およびカフェインのピーク面積比 (モグロシド V のピーク面積 / カフェインのピーク面積) から応答比 (吸光度比) を算出し、応答比および物質比の比 (応答比 / 物質比) からカフェインに対するモグロシド V の RMS を算出した。

B-4-3) RMS を用いたラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

3 種のラカンカ抽出物のうち、試料 1 及び試料 3 は 50 mg, 試料 2 は 20 mg を精密に量り、水を加え超音波処理により溶解したものを試験溶液とした (抽出物濃度: 1 mg/mL)。この試験溶液を B-4-2 に示した LC 条件にて分析し、得られたピーク面積とカフェインより作成した検量線によって得られた試験溶液中のモグロシド V 濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中のモグロシド V 含量 (%) を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \text{RMS} \times \frac{C \times V}{W} \times \frac{P}{100} \times 100$$

ただし、RMS はカフェインに対するモグロシド V (0.122)、C は試験溶液中のモグロシド V 濃度 (mg/mL)、V は試験溶液の量 (mL)、W は試料の採取量 (mg)、P はカフェインの純度 (%) である。

C. 結果及び考察

C-1) ¹H-qNMR によるラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

C-1-1) ¹H-qNMR によるモグロシド V 標準品の定量

¹H-qNMRは、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度とモル濃度の関係から、測定対象化合物の濃度を絶対定量することが可能である。また、計量計測トレーサビリティが確保された標準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が大幅に向上した方法と言える。そこで、本法のモグロシドV分析への適用性を明らかにするため、市販標準品について3併行で¹H-qNMR測定を行った。通常、¹H-qNMRでは、定量性を確保した条件を用いる必要がある。代表的な測定条件を表1に示す。本研究では、この測定条件を用いて¹H-qNMRを行った。なお、化学シフト値は、内標準物質のメチルプロトンシグナルを基準(DSS-*d*₆: δ 0 ppm)とし、δ値をppm単位で表した。その結果、図2に示すように、¹H-qNMR測定により得られたモグロシドVの¹H NMRスペクトル上、δ 0.8~3.0 ppm付近には、アグリコンに由来する飽和炭化水素のシグナル群、δ 3.2~5.0 ppm付近には、糖部に由来する水素シグナル群がそれぞれ観察された。しかし、これらの領域に観察されたシグナル群は、分子内の他のシグナルと部分的または全体的に重なるため、定量における適切な積分範囲の設定が困難と考えられた。一方、δ 5.57 ppmに観察された6位に由来する水素シグナルは、他の分子内のシグナルと十分に分離されていたため、モグロシドVの定量用シグナルとして適当と考えられた。そこで、このシグナルより純度を算出したところ、92.1%と算出された。また、このシグナルから算出された定量値の相対標準偏差(RSD)は0.2%と良好であった。

C-1-2) ¹H-qNMRによるラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量

ラカンカ抽出物3種について、¹H-qNMRによるモグロシドVの含量測定を行い(n=3)、得られた結果をLC法(n=3)と比較した。なお、¹H-qNMRでは、スペクトル上のモグロシドV由来のシグナルと夾雑物のシグナルとの分離度を考慮して、前項で示したδ 5.57 ppm(6位)を用いてモグロシドV含量を算出

した。各ラカンカ抽出物中のモグロシドV含量を表2、各抽出物の¹H NMRスペクトルを図3~5、LCクロマトグラムを図6~8にそれぞれ示した。表2に示すように、¹H-qNMRから算出されたモグロシドVの含量値は、LCより得られた含量値と比較して6~13%程度高い結果となった。そこで、試料2を用いて2次元NMR測定(HMBC, HMQC)を行い、分子内の炭素と6位の水素との相関を確認したところ、HMQCでは、6位の炭素シグナルのみ、HMBCでは2~3結合離れたモグロシドVの炭素との相関が観察されたものの、他の化合物に由来すると考えられる相関は観察されなかった。Chaturvedulaらは、ラカンカより調製したラカンカ抽出物(50 g中)には、モグロシド類としてモグロシドVのほかモグロシド□a、モグロシド□など、モグロシドVと共通のアグリコン(モグロール, Mogrol)をもつものや11位のヒドロキシ基がオキソ基に置換した11-オキソ-モグロシド□などが存在することを報告している¹⁰⁾。これらのアグリコンの化学構造を考慮すると、モグロシドVの6位の水素シグナルは他のモグロシド類の6位の水素シグナルと十分に分離できず、結果として定量値が過大になったものと推測された。

C-2) RMSによるラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量

C-1-2で示したように、ラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量において、他の類縁物質との分離度との兼ね合いから前処理を伴わない¹H-qNMRでは定量が困難であることが確認された。そこで、この問題を解決する方法として、相対感度係数(Relative Response Factor, RRF)を用いた分析法¹¹⁾に着目した。この方法は、基準物質に対する測定対象化合物のRRFが明らかな場合、基準物質を内標準物質として用い、基準物質および測定対象化合物の検出器における応答値とRRFの関係から、測定対象化合物と同一の定量用標品を必要としないクロマトグラフィーを利用した定量法である。最近では、¹H-qNMRとクロマト

グラフィーを組み合わせ、任意の検出器における化合物間の正確な相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity, RMS) から測定対象化合物を定量する方法が考案され、食品添加物等への定量に利用されている^{12,13)}。そこで、本項ではこの RMS 法による定量法のモグロシド V 分析への適用性について検討を行った。

C-2-1) モグロシド V およびカフェインの ¹H-qNMR 測定

モグロシド V は、220 nm より短波長側に吸収極大を有することから、今回の RMS 法における定量用標品として、短波長側に大きな吸収極大をもちかつ安価なカフェインを選択した。まず、RMS の算出に使用するモグロシド V 標準品およびカフェイン (無水) (特級グレード) の純度を ¹H-qNMR により算出した (n=3)。カフェインについては、図 9 に示すように、¹H-qNMR スペクトル上、 δ 3.0-3.9 ppm にメチル基に由来する 3 本のシグナル、 δ 7.86 ppm には、8 位の水素に由来するシグナルがそれぞれ検出された。このうち、 δ 7.86 ppm のシグナルを定量用シグナルとして選択し、カフェインの純度を算出したところ、98.5% (RSD 0.6%) であることが判明した。モグロシド V 標準品の純度については、C-1-1 に記載したように 92.1% (RSD 0.2%) であった。これらモグロシド V およびカフェインの純度を考慮し、以下の検討を行った。

C-2-2) カフェインに対するモグロシド V の RMS の算出

カフェインに対するモグロシド V の RMS を算出するため、3 濃度 (0.319×10^{-3} , 0.639×10^{-3} および 2.56×10^{-3} mol/L) のカフェインにおけるモグロシド V の RMS について検討した。なお、検討に使用したモグロシド V は 6 濃度 ($0.058 \times 10^{-3} \sim 1.86 \times 10^{-3}$ mol/L) とし、B-4-2 に示す LC 条件を用いて各濃度に調製したカフェイン・モグロシド V 混液を分析し、各カフェイン濃度における RMS を算出した。表 3, 4 および 5 に示すように、各カフェイン濃度より算出された RMS の結果から、カフェインに

対するモグロシド V の RMS は 0.122 であることが判明した。なお、モグロシド V は検討した濃度範囲において良好な直線性を示した。

次に、得られた RMS (0.122) の適用性を評価するため、各濃度のカフェインについて原点との一点検量線を作成し (図 10)、6 濃度のモグロシド V の面積値を代入し RMS を用いてモグロシド濃度を算出 (計算値) し、秤量濃度 (秤量値) と比較した。その結果、表 6, 7 および 8 に示すように全濃度のモグロシド V の秤量値と計算値の差は 6% 以下であることが確認された。

C-2-3) RMS を用いたラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

ラカンカ抽出物 3 種について、RMS によるモグロシド V の含量測定を行い (n=3)、モグロシド V 標準品を用いて作成した検量線より算出された含量と比較した。各ラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量を表 9、各抽出物の LC クロマトグラムを図 11~13 にそれぞれ示した。各濃度のカフェインを用いて算出された各ラカンカ抽出物中のモグロシド V の含量は、モグロシド V 標準品を用いて算出された含量と有意な差は認められなかった。以上より、カフェインを定量用標品とした RMS を用いた分析法は、ラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量に有効と考えられた。

D. 結論

本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、ラカンカ抽出物中のモグロシド V を対象とした ¹H-qNMR による定量および ¹H-qNMR と LC を組み合わせた相対モル感度 (RMS) 法を用いた定量法について検討を行った。¹H-qNMR では、得られた 3 種のラカンカ抽出物中のモグロシド V の含量値は、LC の含量値と比較して 6~13% 程度高い結果を示した。これは、定量に用いた 6 位の水素に由来するシグナルがモグロシド V の類縁物質に由来するシグナルと十分な分離が果たせていないことに起因すると考えられた。他のモグロシド V 由来のシグ

ナルについても、分子内の他のシグナルや夾雑成分に由来するシグナルとの重なりが観察されたことから、前処理を伴わない本法によるモグロシドVの定量は困難であり、前処理等の更なる検討が必要と考えられた。

一方、RMSを用いた方法では、カフェインを定量用標品として、カフェインに対するモグロシドVのRMS(0.122)より算出されたモグロシドVの含量は、従来法(モグロシドVを定量用標品として用いた方法)より得られた含量と有意な差は認められなかった。従って、今回求められたRMSを用いることにより、ラカンカ抽出物中のモグロシドVの含量を正確かつ安価に定量できることが判明した。

E. 参考文献

1. Zeleny, R.; Schimmel, H. *TrAC*, **33**, 107-116 (2012).
2. Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hira, T. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
3. Uchiyama, N., Masada, S., Hosoe, J., Hakamatsuka, T., Goda, Y.: Determination of absolute purities of commercial agents used for quantification of functional substances by quantitative NMR analysis. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **24**, 125-130 (2017).
4. Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **16**, 28-33 (2009).
5. Hosoe, J., Sugimoto, N., Goda, Y.: Trial study to determine absolute purities of chemical reagents used as reference standards in the Japanese Pharmacopoeia. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **41**, 960-970 (2010).
6. Tada, A., Takahashi, K., Ishizuki, K.; Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Tahara, M., Akiyama, T., Ito, Y., Yamazaki, T., Akiyama, H., Kawamura, Y., *Chem Pharm Bull.*, **61**, 33-38 (2013).
7. Tanaka, R., Hasebe, Y., Nagatsu, A. *J. Nat. Med.*, **68**, 630-635 (2014).
8. Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H.: Quantitative determination of carthamin in *Carthamus Red* by ¹H-NMR Spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 1264-1268 (2013).
9. Tada, A., Takahashi, K., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Ishizuki, K., Nishimura, T., Yamazaki, T., Kawamura, Y.: Absolute quantitation of quercetin and the glycosides in natural food additives by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **51**, 205-212 (2010).
10. Chaturvedula, V. S. S., Prakash, I.: Cucurbitane glycosides from *Siraitia grosvenorii*. *J. Carbohydr. Chem.*, **30**, 16-26 (2011).
11. Kitamaki, Y., Saito, N., Yamazaki, T., Otsuka, S., Nakamura, S., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Numata, M., Ihara, T.: Determination of PAHs in solution with a single reference standard by a combination of ¹H quantitative NMR spectroscopy and chromatography. *Anal. Chem.*, **89**, 6963-6968 (2017).
12. Nishizaki, Y., Sato-Masumoto, N., Nakanishi, A., Hashizume, Y., Tandia, M., Yamazaki, T., Kuroe, M., Numata, M., Ihara, T., Sugimoto, N., Sato, K.: Determination of hesperidin and Monoglucosylhesperidin contents in processed foods using relative molar sensitivity based on ¹H-quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **59**, 1-10 (2018).
13. Nishizaki, Y., Tada, A., Ishizuki, K., Ito, Y., Onoda, A., Sugimoto, N., Akiyama, H.: Development of a novel method for quantifying quassin and neoquassin in *Jamaica quassia* extracts using the molar absorption

coefficient ratio. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **56**, 185-193 (2015).

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Tatebe C, Ohtsuki T, Fujita T, Nishiyama K, Itoh S, Sugimoto N, Kubota H, Tada A, Sato K, Akiyama, H: Determination of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in the Color Additive Food Red No. 106 (Sulforhodamine B) using High-Performance Liquid Chromatography. *Food Chem.* **2017**; *237*: 733-742.

2. 学会発表

- 1) 大槻崇, 鈴木一平, 建部千絵, 久保田浩樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: $^1\text{H-qNMR}$ を用いた食品中のサッカリンナトリウムの分析法の確立. 食品化学学会 (2017.6).

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

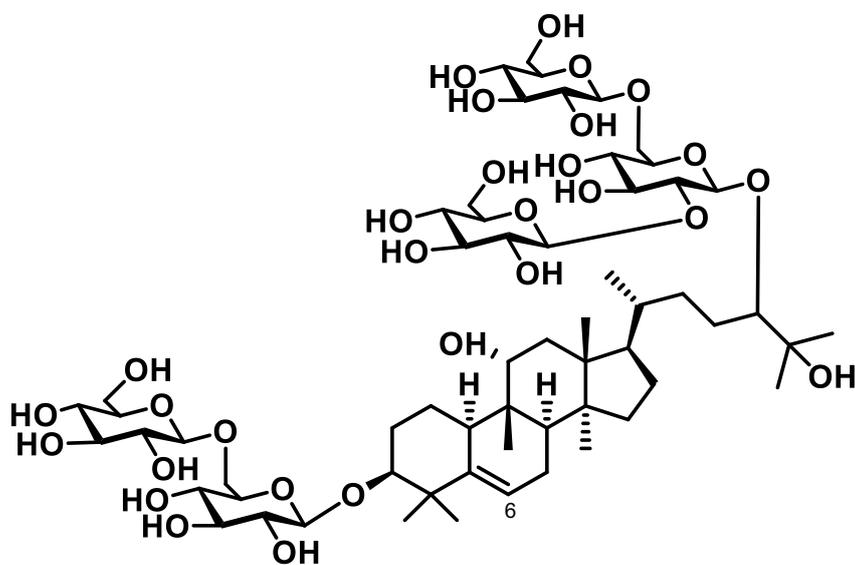


図 1 モグロシド V の化学構造

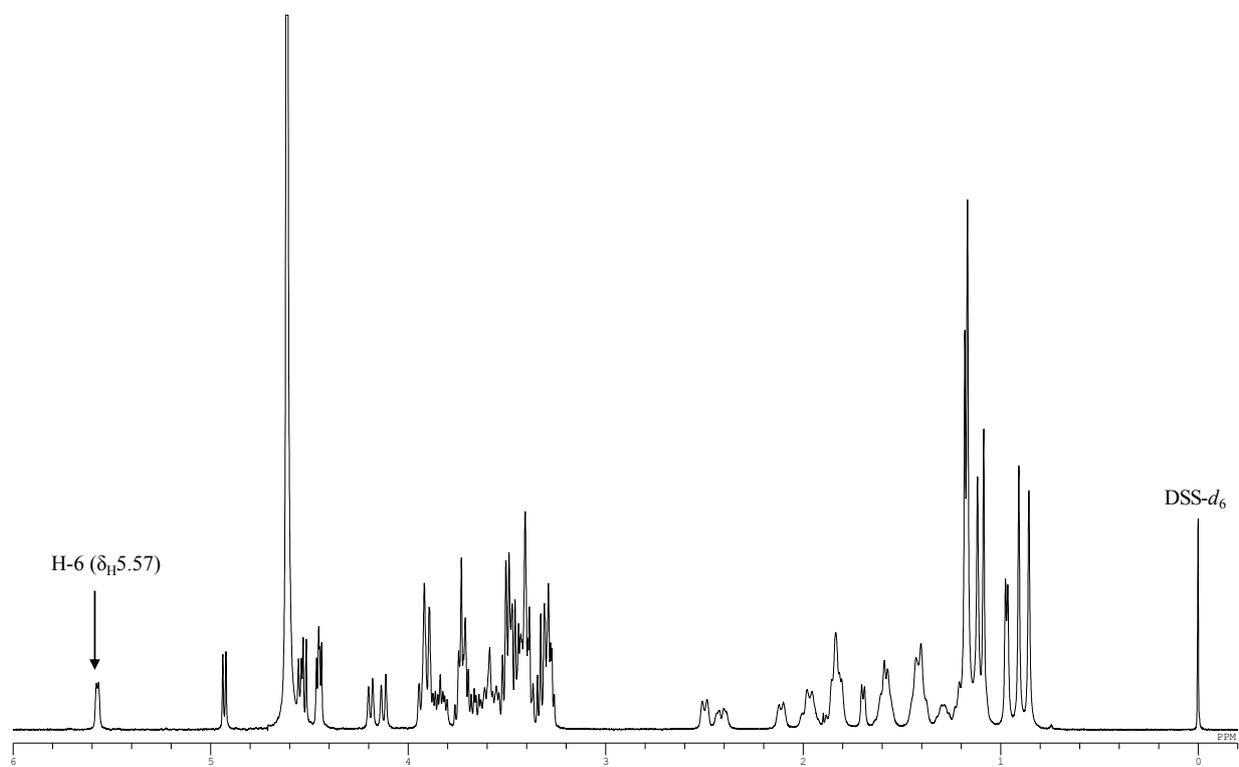


図 2 モグロシド V の ^1H -qNMR スペクトル

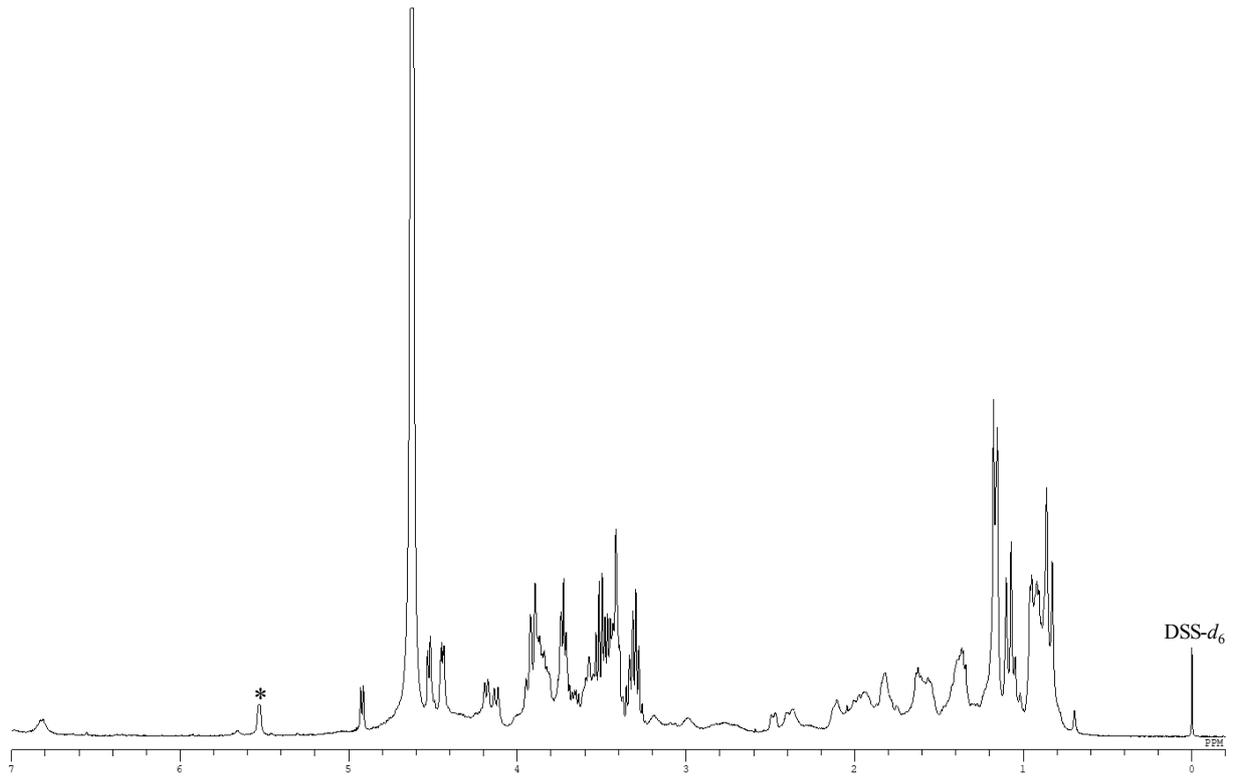


図3 試料1の¹H-qNMR スペクトル
* : 定量用シグナル

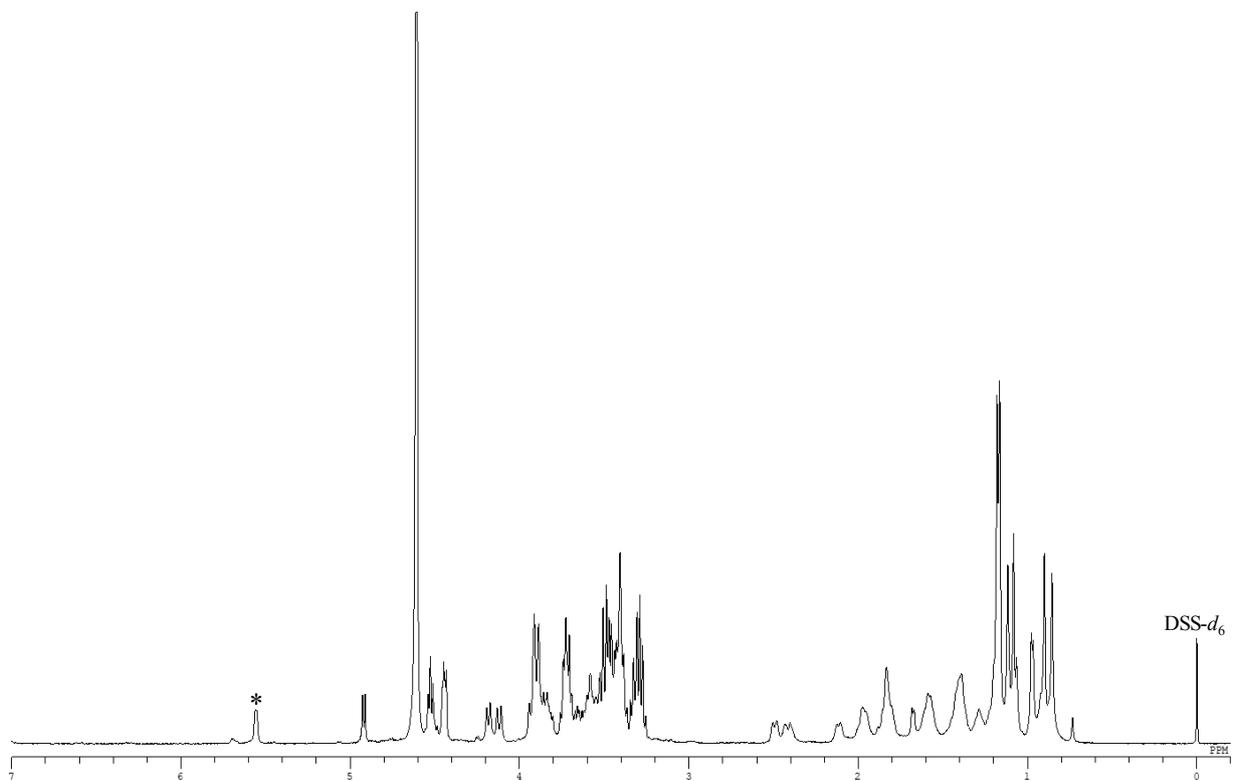


図4 試料2の¹H-qNMR スペクトル
* : 定量用シグナル

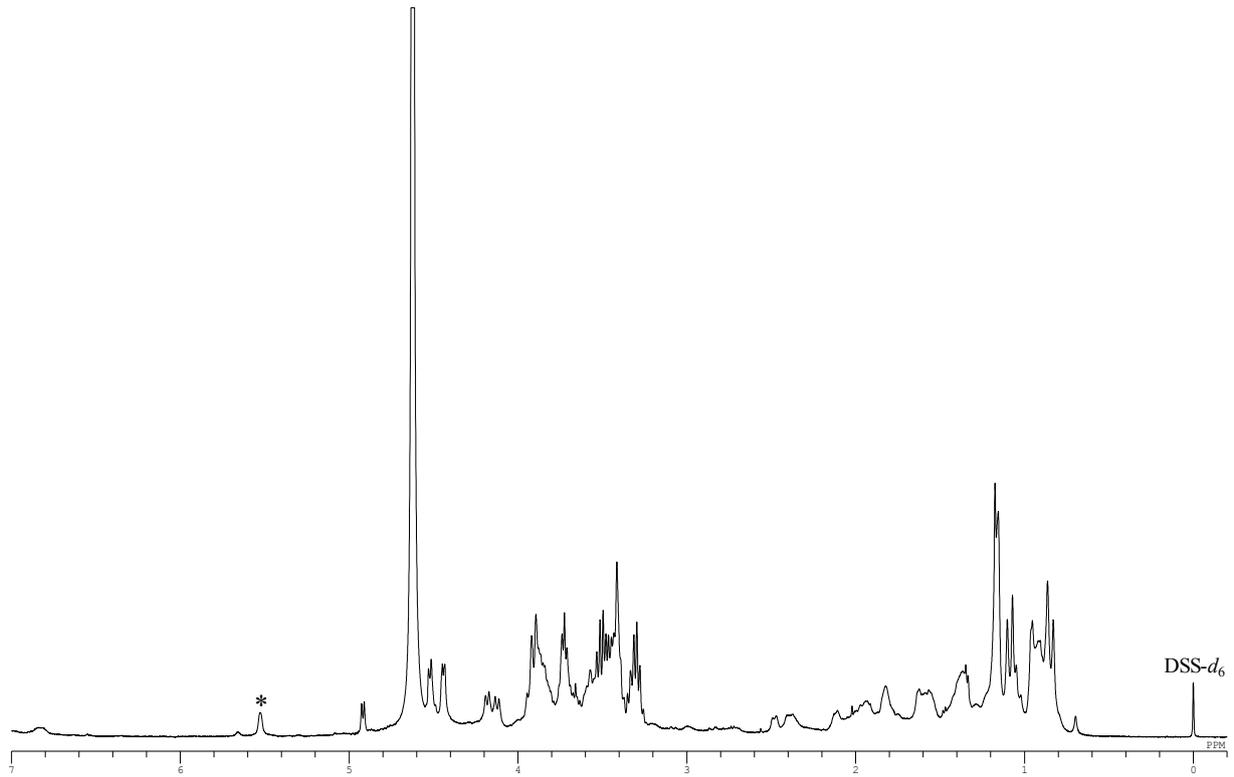


図5 試料3の¹H-qNMR スペクトル
* : 定量用シグナル

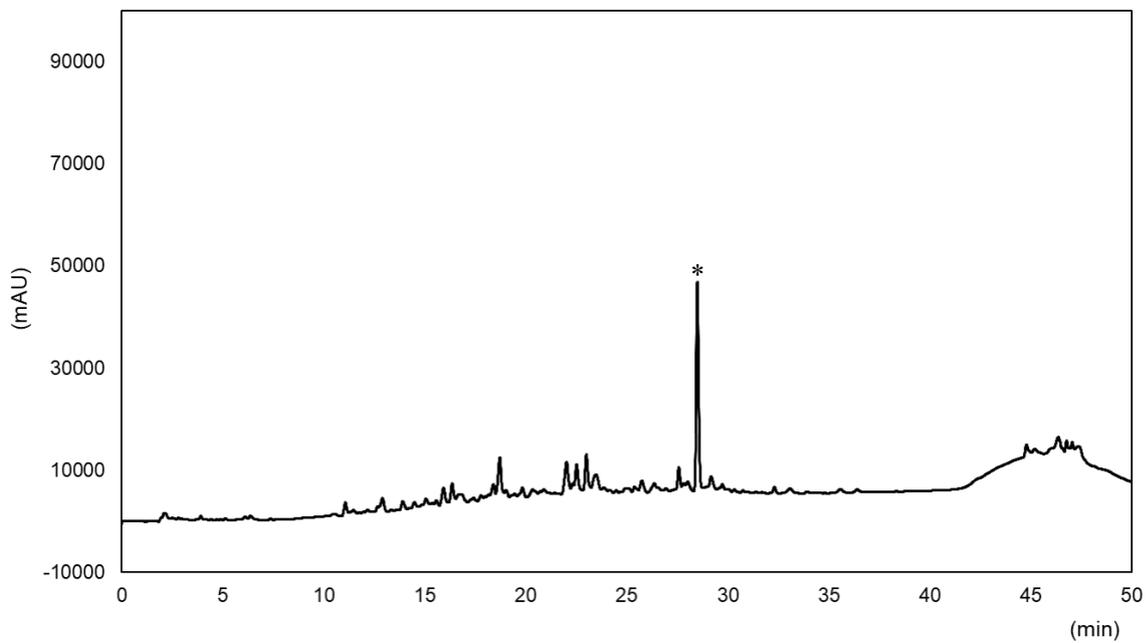


図6 試料1のLCクロマトグラム
* : モグロシドV

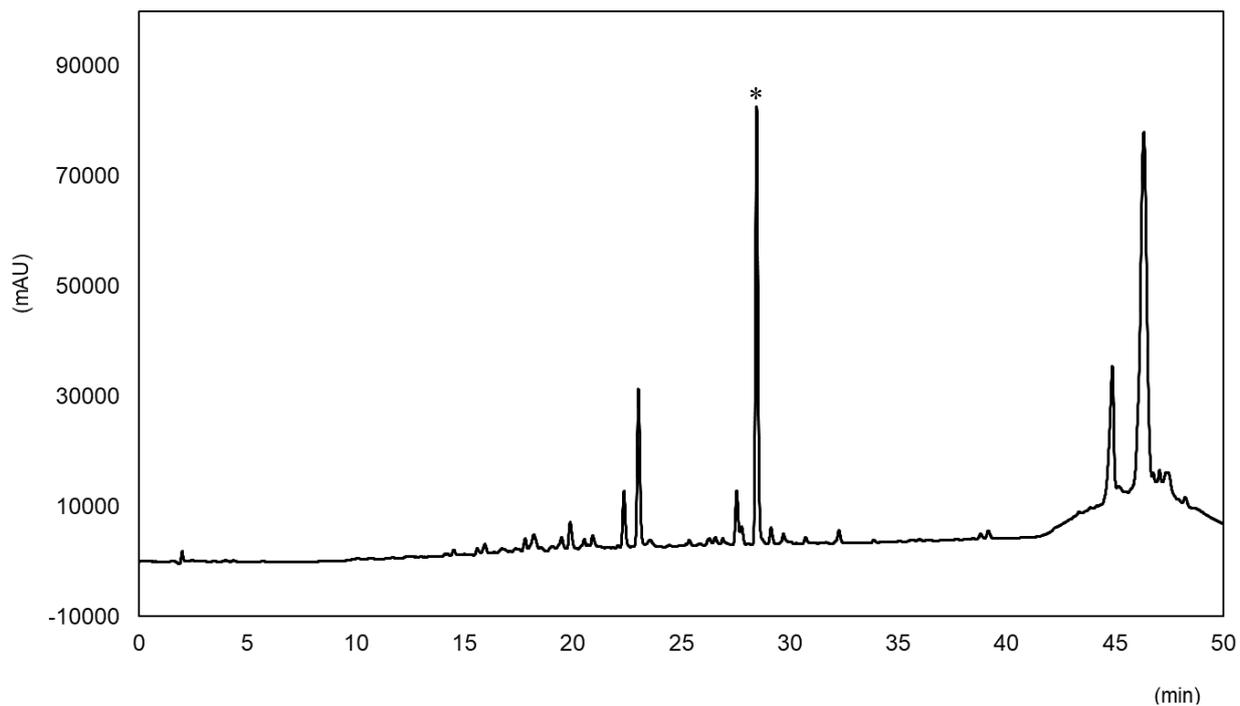


図7 試料2のLCクロマトグラム

* : モグロシドV

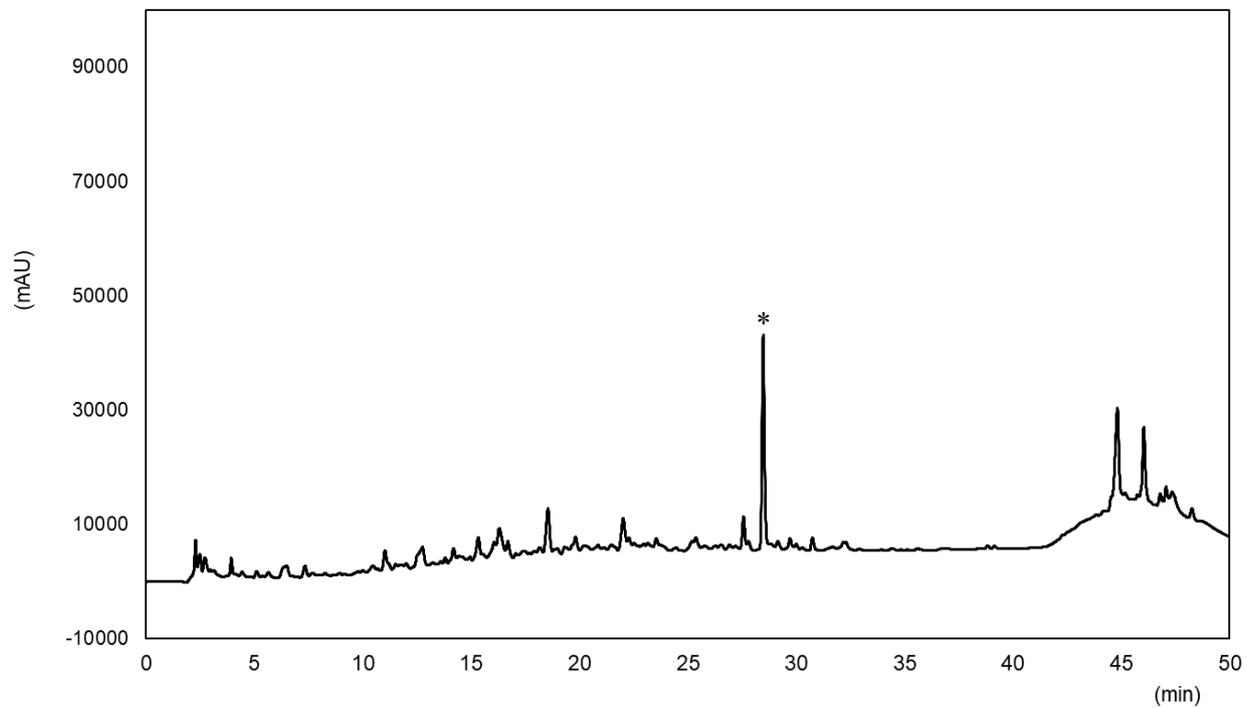


図8 試料3のLCクロマトグラム

* : モグロシドV

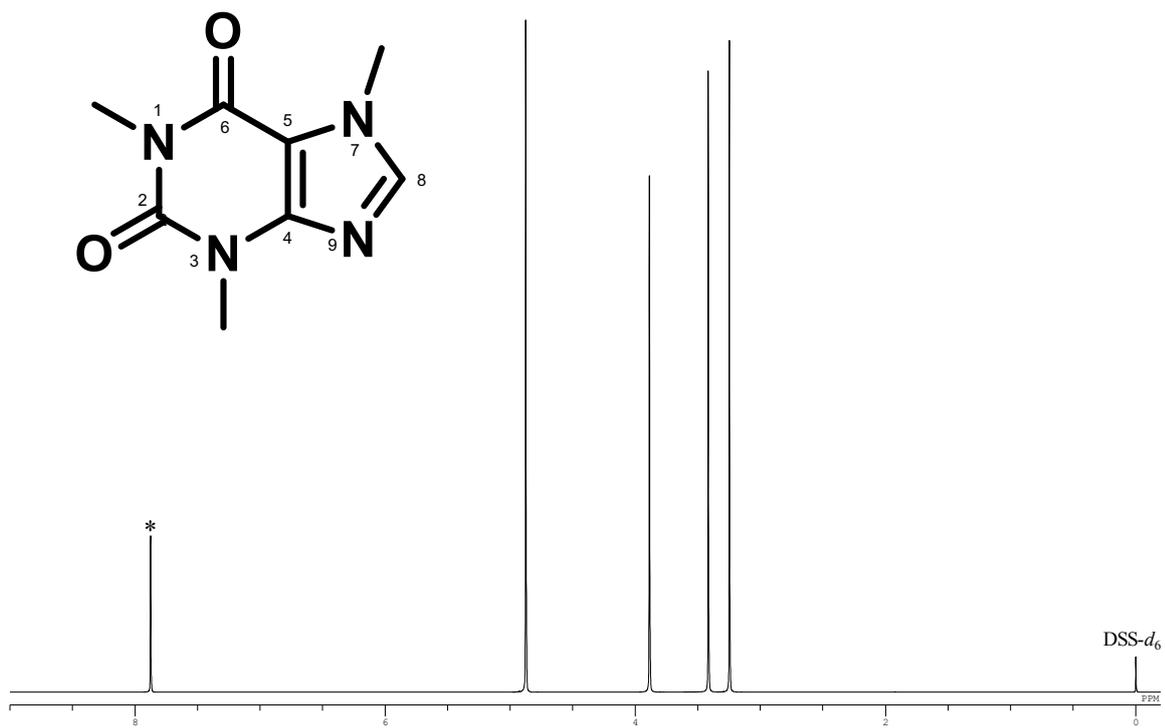


図9 カフェインの化学構造および¹H-qNMR スペクトル
* : 定量用シグナル

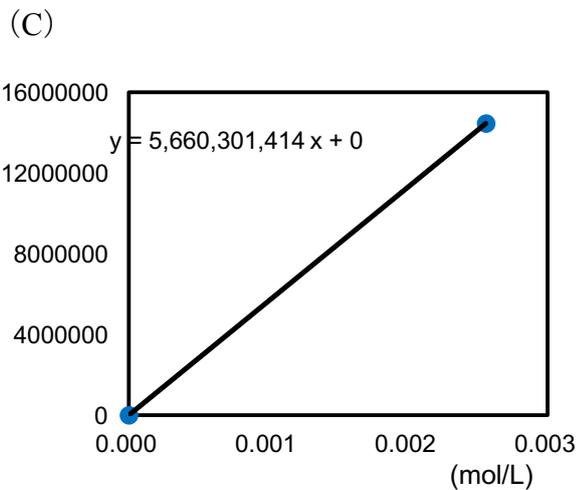
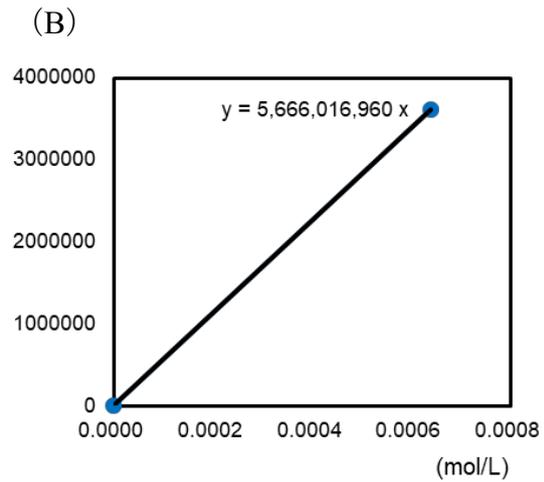
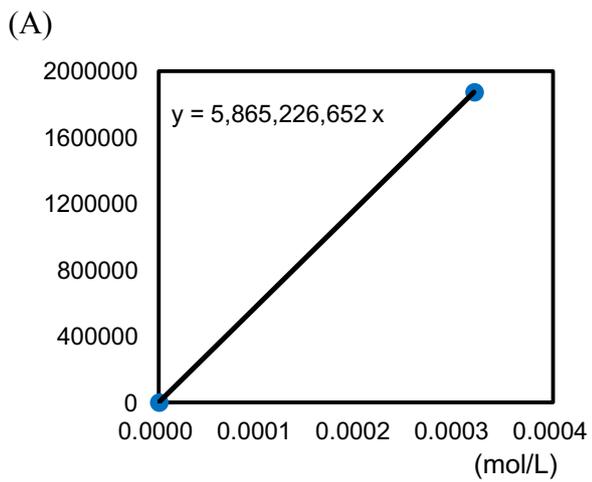


図 10 カフェインの検量線

(A) 0.319×10^{-3} mol/L, (B) 0.639×10^{-3} mol/L, (C) 2.56×10^{-3} mol/L

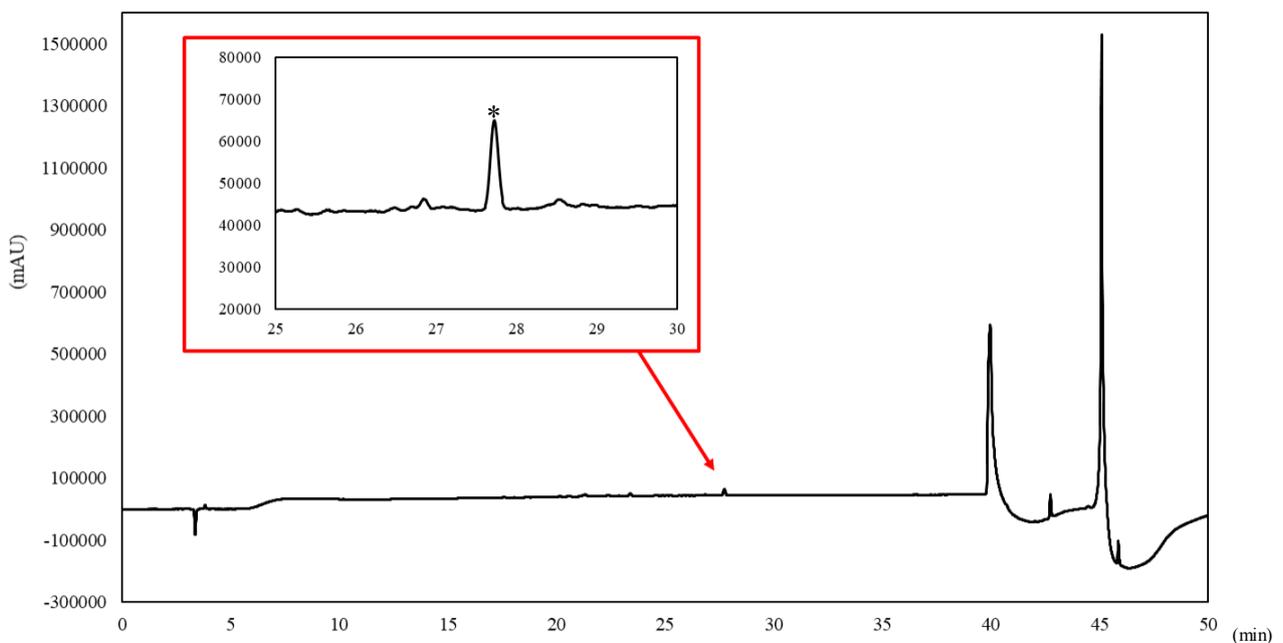


図 11 試料 1 の LC クロマトグラム

* : モグロシド V

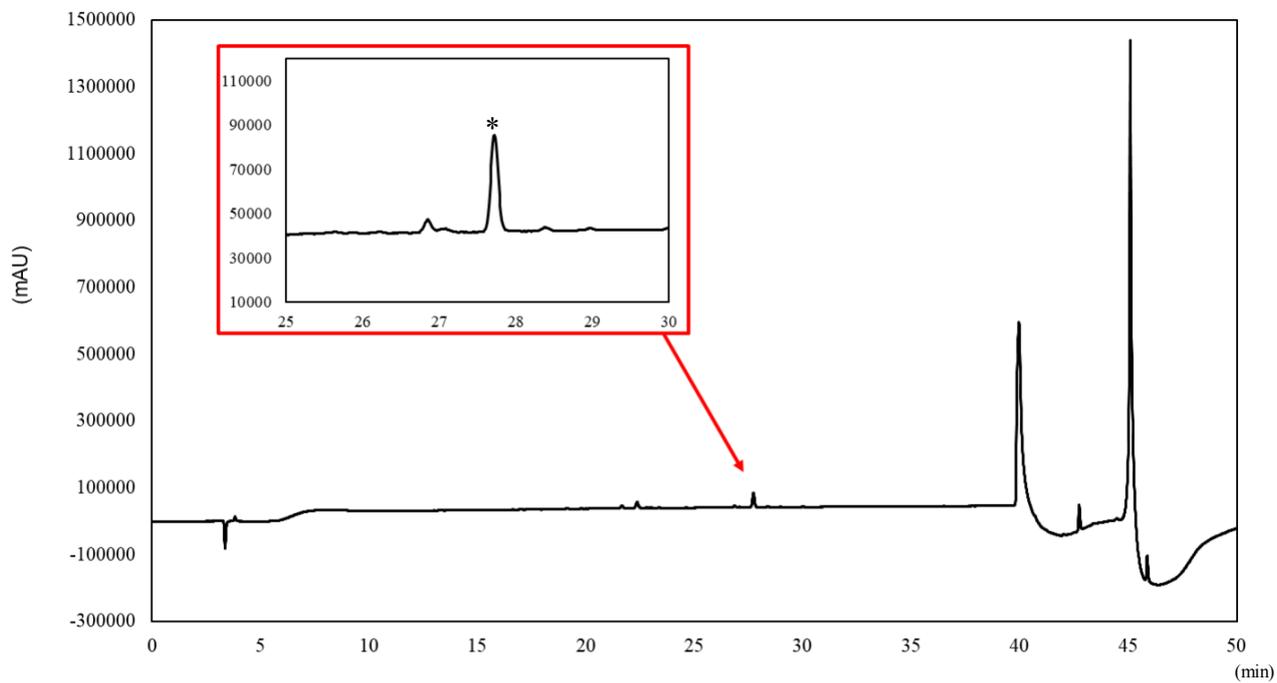


図 12 試料 2 の LC クロマトグラム

* : モグロシド V

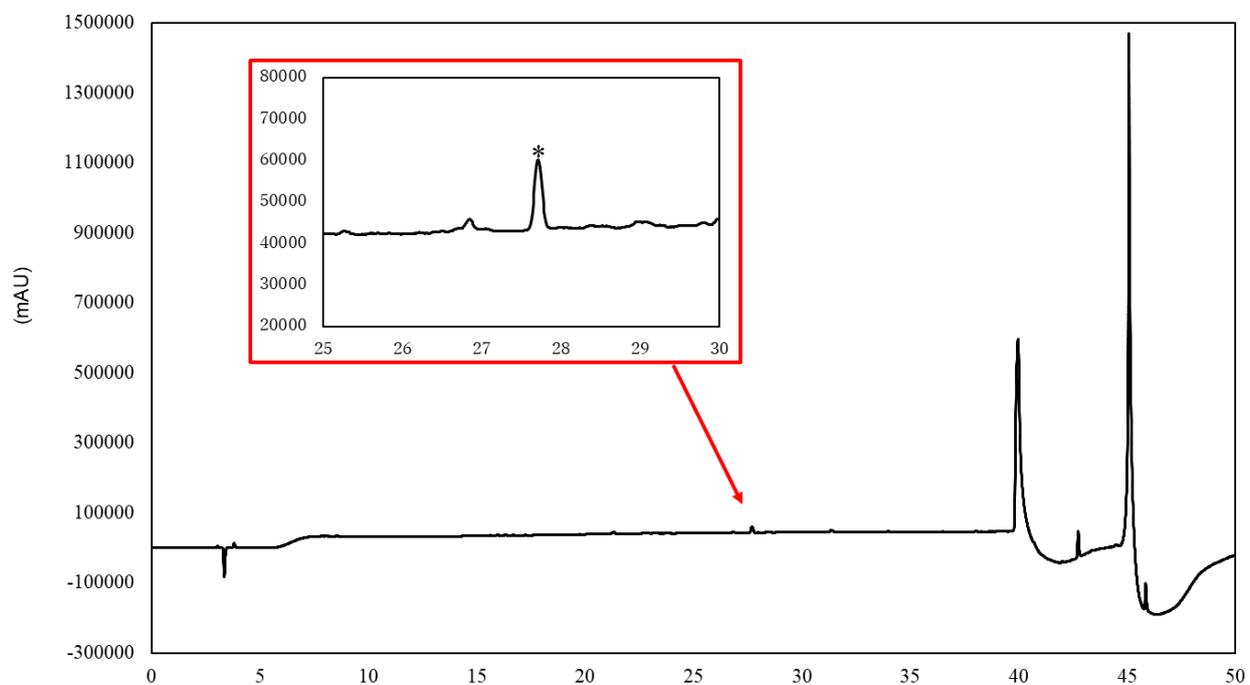


図 13 試料 3 の LC クロマトグラム

* : モグロシド V

表 1 ^1H -qNMR 測定条件

Spectrometer	JEOL ECA500 spectrometer
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	17.5 ppm (-2.5 ~ 15 ppm)
Autofilter	on (eighttimes)
Acquisition time	4 s
Flip angle	90°
Relaxation delay	60 s
Number of scans	8
Spinning	off
^{13}C decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2 ^1H -qNMR および LC による 3 種のラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量の比較 (n=3)

試料	含量 (%)	
	^1H -qNMR	LC
1	33.7 ± 0.4	27.1 ± 0.3
2	62.2 ± 0.8	49.6 ± 1.5
3	33.2 ± 0.7	22.0 ± 0.8

表 3 カフェイン (0.319×10^{-3} mol/L) に対する各モグロシド V 濃度より算出されたの相対モル感度

カフェイン		モグロシドV		相対モル感度
モル濃度 (mol/L)	ピーク面積値	モル濃度 (mol/L)	ピーク面積値	
0.319×10^{-3}	1873307	0.0580×10^{-3}	39944	0.117
		0.116×10^{-3}	80798	0.119
		0.232×10^{-3}	166419	0.122
		0.464×10^{-3}	326601	0.120
		0.928×10^{-3}	649288	0.119
		1.86×10^{-3}	1247291	0.115
平均				0.119
標準偏差				0.0026

表 4 カフェイン (0.639×10^{-3} mol/L) に対する各モグロシド V 濃度より算出されたの相対モル感度

カフェイン		モグロシドV		相対モル感度
モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	
0.639×10^{-3}	3619362	0.0580×10^{-3}	39944	0.121
		0.116×10^{-3}	80798	0.123
		0.232×10^{-3}	166419	0.127
		0.464×10^{-3}	326601	0.124
		0.928×10^{-3}	649288	0.123
		1.86×10^{-3}	1247291	0.119
平均				0.123
標準偏差				0.0027

表 5 カフェイン (2.56×10^{-3} mol/L) に対する各モグロシド V 濃度より算出されたの相対モル感度

カフェイン		モグロシドV		相対モル感度
モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	
2.56×10^{-3}	14462844	0.0580×10^{-3}	39944	0.122
		0.116×10^{-3}	80798	0.123
		0.232×10^{-3}	166419	0.127
		0.464×10^{-3}	326601	0.124
		0.928×10^{-3}	649288	0.124
		1.86×10^{-3}	1247291	0.119
平均				0.123
標準偏差				0.0027

表 6 モグロシド V の濃度に関する秤量値と計算値の比較 (カフェイン濃度 0.319×10^{-3} mol/L)

モグロシド V 濃度 (mol/L)		Bias (%)
秤量値	計算値	
0.0580×10^{-3}	0.0561×10^{-3}	3.4
0.116×10^{-3}	0.113×10^{-3}	2.3
0.232×10^{-3}	0.233×10^{-3}	-0.6
0.464×10^{-3}	0.458×10^{-3}	1.3
0.928×10^{-3}	0.911×10^{-3}	1.9
1.86×10^{-3}	1.75×10^{-3}	5.7

表 7 モグロシド V 濃度に関する秤量値と計算値の比較 (カフェイン濃度 0.639×10^{-3} mol/L)

モグロシド V 濃度 (mol/L)		Bias (%)
秤量値	計算値	
0.0580×10^{-3}	0.0580×10^{-3}	0.01
0.116×10^{-3}	0.117×10^{-3}	-1.1
0.232×10^{-3}	0.242×10^{-3}	-4.2
0.464×10^{-3}	0.474×10^{-3}	-2.2
0.928×10^{-3}	0.943×10^{-3}	-1.6
1.86×10^{-3}	1.81×10^{-3}	2.4

表 8 モグロシド V 濃度に関する秤量値と計算値の比較 (カフェイン濃度 2.56×10^{-3} mol/L)

モグロシド V 濃度 (mol/L)		Bias (%)
秤量値	計算値	
0.0580×10^{-3}	0.0581×10^{-3}	-0.1
0.116×10^{-3}	0.117×10^{-3}	-1.2
0.232×10^{-3}	0.241×10^{-3}	-4.3
0.464×10^{-3}	0.475×10^{-3}	-2.3
0.928×10^{-3}	0.944×10^{-3}	-1.7
1.86×10^{-3}	1.81×10^{-3}	2.3

表 9 2 種の方法による各ラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量の比較 (n=3)

試料	相対モル感度法			絶対検量線法
	カフェイン濃度 (mol/L)			
	2.56×10^{-3}	0.639×10^{-3}	0.319×10^{-3}	
1	27.9	27.9	27.0	26.9
2	54.1	54.1	52.2	52.0
3	24.6	24.5	23.7	23.6

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

（H29-食品-一般-007）

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

～化学合成による既存添加物の定量用標品の供給に関する研究～

研究分担者 出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 部長

研究要旨 既存添加物の品質確保のためには、高精度な分析・評価手法を開発することで成分規格試験を確立することが重要である。本研究では、従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難な添加物について、指標成分と同一の若しくは代替物質の定性用又は定量用標準品の全合成ルートを確立することで新たな分析法の開発を行い、簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化することを目的とした。本年度は、クチナシ黄色に含まれるクロセチン (crocetin)、トウガラシ色素に含まれるカプサイシン (capsaicin)、またカワラヨモギに含まれるカピリン (capillin) を対象とした合成ルートの確立を行った。

A. 研究目的

本研究では、既存（天然）添加物の規格試験設定をおこなうために「化学合成による既存添加物の定量用標品および内部標準物質の供給に関する研究」を目的とした。特に、①食品添加物の着色料として広く使用され、機能性表示食品にも含有されるカロテノイド類を中心とした標品の合成を行う。カロテノイドは自然界に広く分布する天然色素であり、現在までに700種類以上が発見されている。これらの添加物は天然原材料から得られ分析用の標品入手が困難であり、定量分析法においてはクロマトグラフ法と比較して正確性に欠ける比色法、色価測定法が設定されている。また現在においても、解析が不十分な機能や未知の機能が多々あり、その有用性を研究するためにも化学合成によるカロテノイドの標品を高純度で供給することは重要である。さらに、②指標成分の部分骨格を持つ代替化合物の合成と、定性用又は定量用標準品としての分析法の開発を行い、簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化する。本年度は、①のテーマに焦点を絞る、クチナシ黄

色に含まれるクロセチン (crocetin)、トウガラシ色素に含まれるカプサイシン (capsaicin)、またカワラヨモギに含まれるカピリン (capillin) を対象とした合成ルートの確立を行った。

B. 研究方法

クロセチン、カプサイシン、カピリンはそれぞれ Scheme 1～3 に示すルートで合成する計画を立てた。

C. 結果及び考察

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

C-1) クロセチンの合成 (Scheme 1)

化合物 1 の合成

Trimethyl phosphonoacetate (0.3 mL, 2.2 mmol) を THF (10 mL) に溶解し、0°Cにて水素化ナト

リウム (100 mg, 2.5 mmol) を加えた。0°Cにて15分間攪拌後、(2*E*,4*E*,6*E*)-2,7-dimethylocta-2,4,6-trienedial (167 mg, 1.02 mmol) を加え、室温にて15時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (30 mL) を加え、酢酸エチルで3回抽出後、有機層を水と飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン:酢酸エチル=3:1) することで、化合物 **1** を 67% (189 mg) の収率で得た (Fig. 1)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37 (2H, d, *J* = 15.6 Hz), 6.75 (2H, dd, *J* = 2.8, 7.6 Hz), 6.52 (2H, br d, *J* = 10.0 Hz), 5.95 (2H, d, *J* = 15.6 Hz), 3.77 (6H, s), 1.95 (6H, s); [ESI(+)-TOF]: *m/z* [M+H]⁺ 277.

化合物 **2** の合成

化合物 **1** (149 mg, 0.54 mmol) を THF (10 mL) に溶解し、-78°Cにて1M DIBAL-H トルエン溶液 (2.4 mL) を3分間かけて滴下した。-78°Cから-18°Cに1時間かけて昇温し、反応液にシリカゲル/水混合物 (6 g/2 mL) を加え1時間攪拌、炭酸カリウム (1.1 g)、硫酸マグネシウム (1.1 g) を加え30分攪拌した。反応液をセライト濾過し、ジエチルエーテルで3回洗浄後、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮することで、還元アルコール体を得た。粗アルコール体を THF (10 mL) に溶解し、0°Cにて二酸化マンガン (743 mg, 8.5 mmol) を加え、室温にて4時間攪拌した。反応液をセライト濾過し、ジエチルエーテルで3回洗浄後、濾液を濃縮することで、化合物 **2** (117 mg, quant.) を得た。得られた **2** は精製せず次の反応に用いた (Fig. 2)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.63 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.17 (2H, d, *J* = 15.6 Hz), 6.84 (2H, dd, *J* = 3.2, 8.0 Hz), 6.64 (2H, br d, *J* = 9.2 Hz), 6.26 (2H, dd, *J* = 8.0, 15.6 Hz), 2.02 (s, 6H); [ESI(+)-TOF]: *m/z* [M+H]⁺ 217.

化合物 **3** の合成

Triethyl 2-phosphonopropionate (0.26 mL, 1.2

mmol) を THF (6 mL) に溶解し、0°Cにて水素化ナトリウム (50 mg, 1.2 mmol) を加えた。0°Cにて10分間攪拌後、化合物 **2** (117 mg, 0.54 mmol) を加え、室温にて22時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (30 mL) を加え、ジクロロメタンで3回抽出後、有機層を水と飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン:酢酸エチル=4:1) することで、化合物 **3** を 27% (57 mg) の収率で得た (Fig. 3)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (2H, d, *J* = 10.8 Hz), 6.71 (2H, dd, *J* = 2.8, 8.0 Hz), 6.52-6.64 (4H, m), 6.36 (2H, br d, *J* = 10.4 Hz), 4.22 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 2.00 (12H, s), 1.32 (6H, t, *J* = 7.2 Hz); [ESI(+)-TOF]: *m/z* [M+H]⁺ 385.

クロセチンの合成

化合物 **3** (35.6 mg, 0.09 mmol) をメタノール (10 mL), 1M 水酸化ナトリウム水溶液 (5.6 mL) に溶解し、50°Cにて5日間攪拌した。反応液に2M 塩酸を加えpH = 2とした後、析出したオレンジ色の固体を濾取することで、crocetin を 37% (11.3 mg) の収率で得た (Fig. 4)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.2 (br s, 2H), 7.21 (2H, d, *J* = 11.2 Hz), 6.83 (2H, d, *J* = 10.8 Hz), 6.73 (2H, d, *J* = 14.8 Hz), 6.50 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.43 (2H, d, *J* = 14.8 Hz), 1.98 (6H, s), 1.92 (6H, s); [ESI(+)-TOF]: *m/z* [M+H]⁺ 329.

C-2) カプサイシンの合成 (Scheme 2)

4-(Aminomethyl)-2-methoxyphenol 塩酸塩 (313.7 mg, 1.65 mmol), *N,N*-diisopropylamine (DIPEA) (0.94 mL, 5.5 mmol) をジクロロメタン (6 mL) に溶解し、室温にて *trans*-8-methyl-6-nonenoyl chloride (0.362 mL, 1.82 mmol) を3分間かけて滴下した。室温にて15時間攪拌、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) を加え、ジクロロメタンにて3回抽出を行った。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン:酢酸エチル=5:1) することで、capsaicin

を 89% (448 mg) の収率で得た (Fig. 5).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.96 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.89 (1H, s), 6.83 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 5.69 (br s, 1H), 5.29-5.44 (3H, m), 4.41 (2H, d, $J = 5.6$ Hz), 3.80 (3H, s), 2.57 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.21 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.00-2.06 (2H, m), 1.35-1.80 (4H, m), 0.96 (6H, t, $J = 9.2$ Hz); [ESI(+)-TOF]: m/z [M+H] $^+$ 306.

C-3) カピリンの合成 (Scheme 3)

Trimethylsilyl acetylene を出発原料としてカピリンを合成するルートを設計した.

化合物 4 の合成

Trimethylsilyl acetylene (0.276 mL, 2.0 mmol) を THF (10 mL) に溶解し, -78°C にて $n\text{-BuLi}$ (1.5 mL) を 3 分間かけて滴下後, benzaldehyde (0.205 mL, 2.0 mmol) を加え, 室温まで昇温しながら 1 時間攪拌した. 反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (20 mL) を加え, ジクロロメタンで 3 回抽出後, 有機層を水と飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した. 有機層を硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を濃縮した. 残渣をメタノール (20 mL) に溶解し, 炭酸カリウム (1.4 g, 10.1 mmol) を加え室温にて 14 時間攪拌した. 反応液を濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 4:1) することで, 化合物 4 を 63% (168 mg) の収率で得た (Fig. 6).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.35-7.58 (5H, m), 5.48 (1H, dd, $J = 2.4, 6.0$ Hz), 2.67 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 2.20 (1H, d, $J = 6.0$ Hz).

化合物 5 の合成

化合物 4 (168 mg, 1.3 mmol) をアセトン (5 mL) に溶解し, 0°C にて $N\text{-bromosuccinimide}$ (NBS) (278 mg, 1.56 mmol), 硝酸銀 (29 mg, 0.17 mmol) を加え, 室温にて 2 時間攪拌した. 反応液を濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 6:1) することで, 化合物 5 を 78% (210 mg) の収率で得た (Fig. 7).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.33-7.54 (5H, m), 5.49 (1H, d, $J = 6.4$ Hz), 2.22 (1H, d, $J = 6.4$ Hz);

[ESI(+)-TOF]: m/z [M+H] $^+$ 211.

化合物 6 の合成

Propyne (3~4% in heptane) (1.5 mL) の THF (5 mL) 溶液に, 0°C にて $n\text{-BuLi}$ (0.61 mL) を 3 分間かけて滴下し, 0°C にて 1 時間攪拌後, 反応液を室温に昇温し, CuI (193 mg, 1.0 mmol) を加えさらに 1 時間攪拌した. 次いで 0°C にて反応液に化合物 4 (105.6 mg, 0.5 mmol) および pyridine (0.72 mL) の THF (5 mL) 溶液を加え, 自然昇温しながら 50 分間攪拌した. 反応液に 2M 塩酸 (30 mL) を加え, 酢酸エチルで 3 回抽出した. 有機層を硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 5:1) することで, 化合物 6 を 78% (210 mg) の収率で得た (Fig. 8).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.33-7.53 (5H, m), 5.49 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 2.23 (1H, br s), 1.95 (3H, s); [ESI(+)-TOF]: m/z [M+H] $^+$ 171.

カピリンの合成

化合物 6 (17.2 mg, 0.1 mmol) を THF (5 mL) に溶解し, 0°C にて二酸化マンガン (145 mg, 1.6 mmol) を加え, 室温にて 9 時間攪拌した. 反応液をセライト濾過し, ジエチルエーテルで 3 回洗浄後, 濾液を濃縮し, シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 6:1) することで, カピリン (11.2 mg, 66%) を得た (Fig. 9).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11-8.13 (2H, m), 7.62 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.47-7.51 (2H, m), 2.09 (3H, s); [ESI(+)-TOF]: m/z [M+H] $^+$ 169.

D. 結論

従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難な添加物について, 指標成分と同一の若しくは代替物質の定性用又は定量用標準品の全合成ルートを確立することで新たな分析法の開発を行い, 簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化することを目的とした. 本年度は, クロセチン, カプサイシン, カピリンの簡便な合

成ルート確立を行った。今後は、クロセチンの合成において出発原料とした(2E,4E,6E)-2,7-Dimethylocta-2,4,6-trienedial を共通骨格として利用できる、クチナシ黄色に含まれるクロシン (crocin)、アナトー色素に含まれるビキシン (bixin)、トウガラシ色素に含まれるカプサイシン (capsaicin)、ファフィア色素に含まれるアスタキサンチン (astaxanthin) の合成を計画する。さらに、研究目的②では、Proof of Concept (POF) Study Design として、カピリンの部分骨格を持つ代替化合物を合成し、クロマトグラフ法による定性用又は定量用標準品としての規格設定を行う。POF 実証後は、多くのカロテノイド類に含まれる共通部分骨格のトリエン、ペンタエン骨格を持つカロテノイド代替化合物を合成し、同様に規格設定の検討を行う。

E. 参考文献

なし

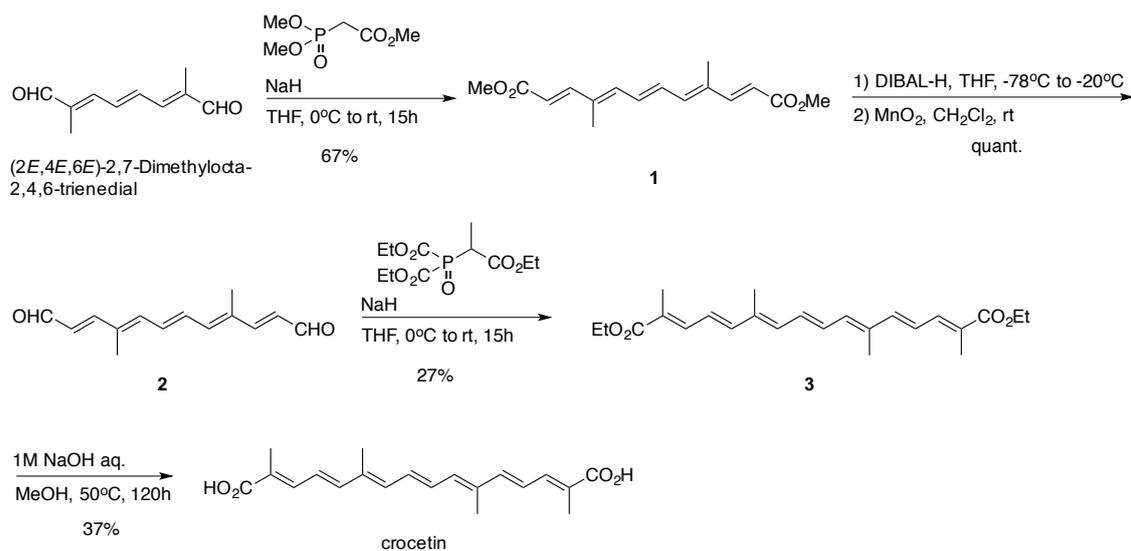
F. 研究業績

1. 学会発表

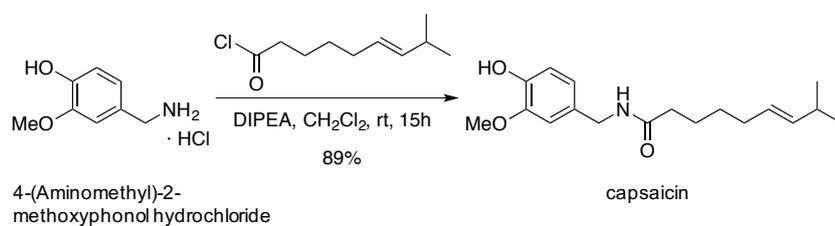
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

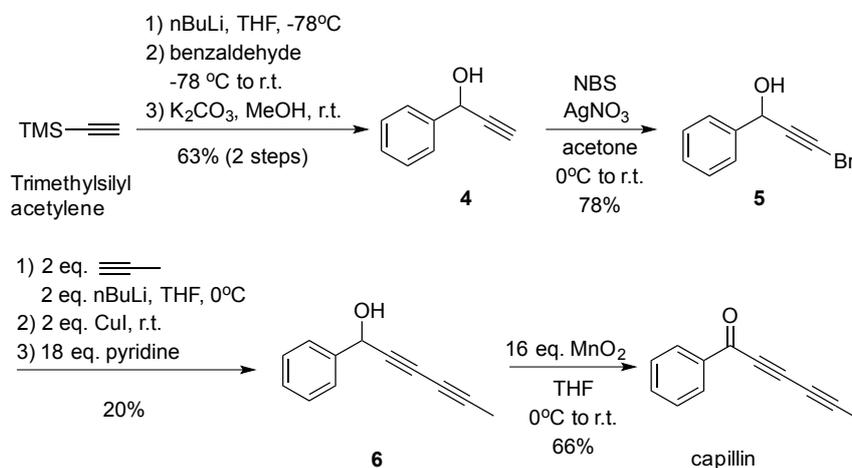
なし



Scheme 1. Synthetic route of crocetin.



Scheme 2. Synthetic route of capsaicin.



Scheme 3. Synthetic route of capillin.

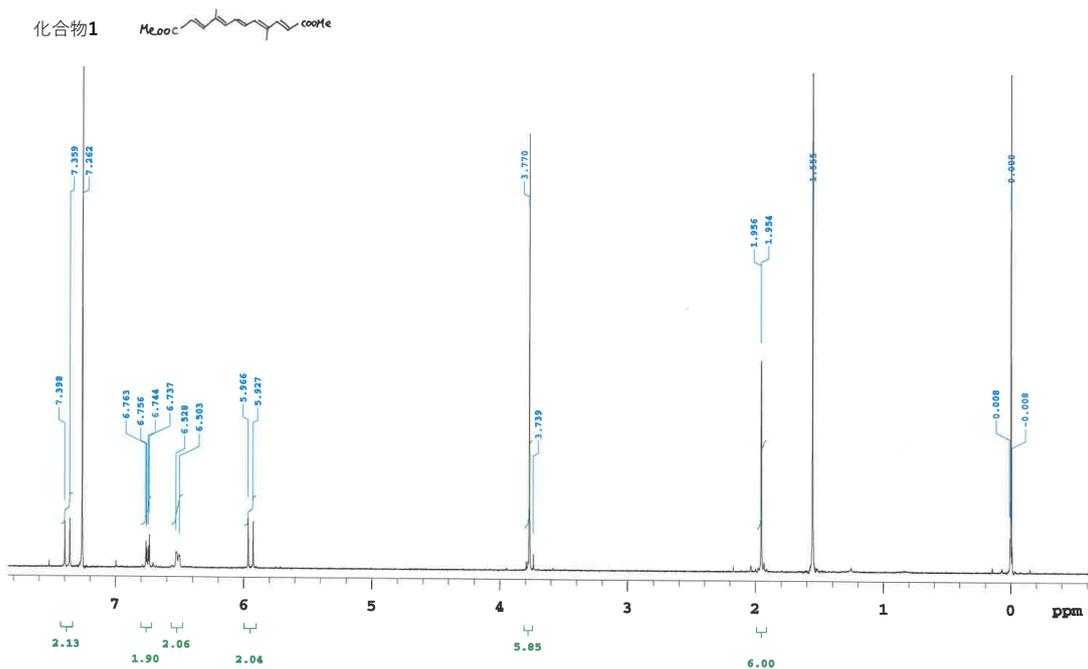


Fig. 1 ¹H NMR spectrum of compound 1 in CDCl₃.

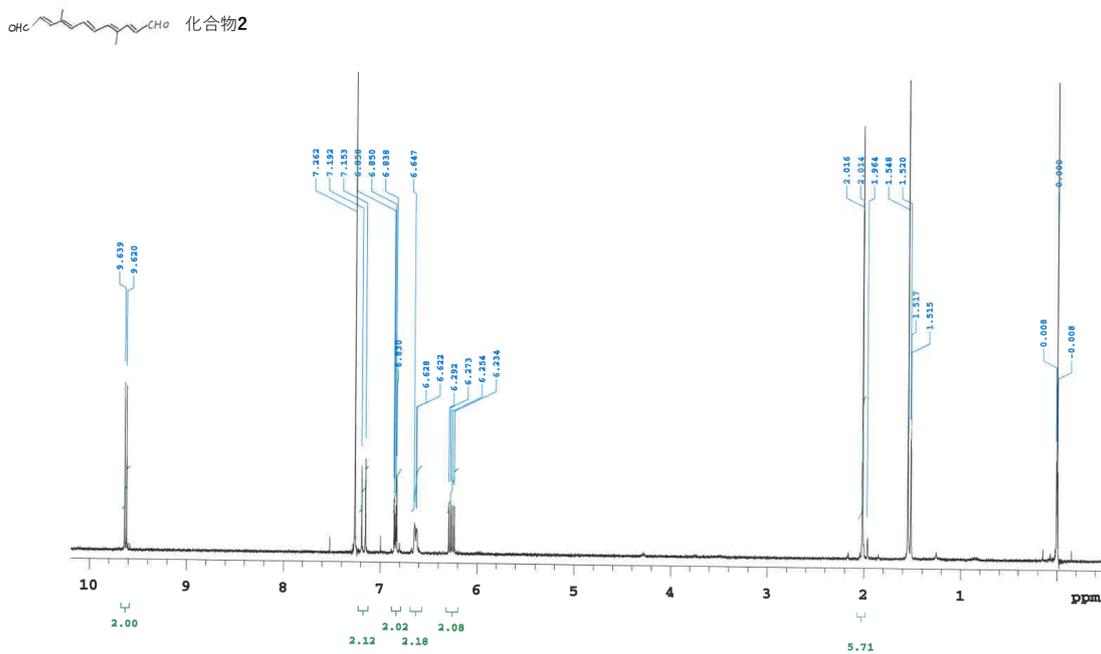


Fig. 2 ¹H NMR spectrum of compound 2 in CDCl₃.

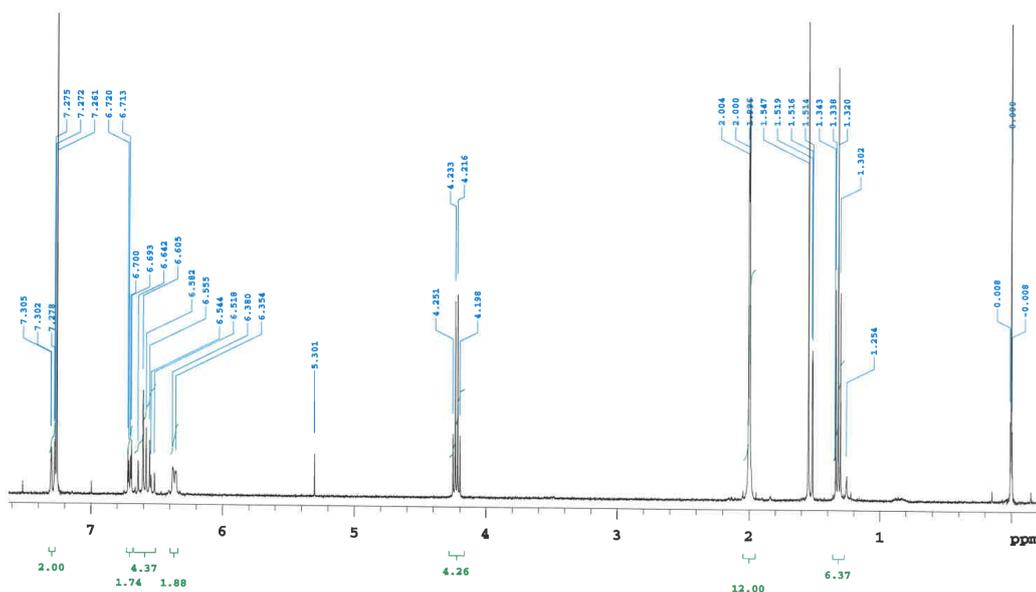
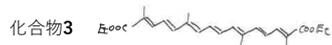


Fig. 3 ¹H NMR spectrum of compound 3 in CDCl₃.

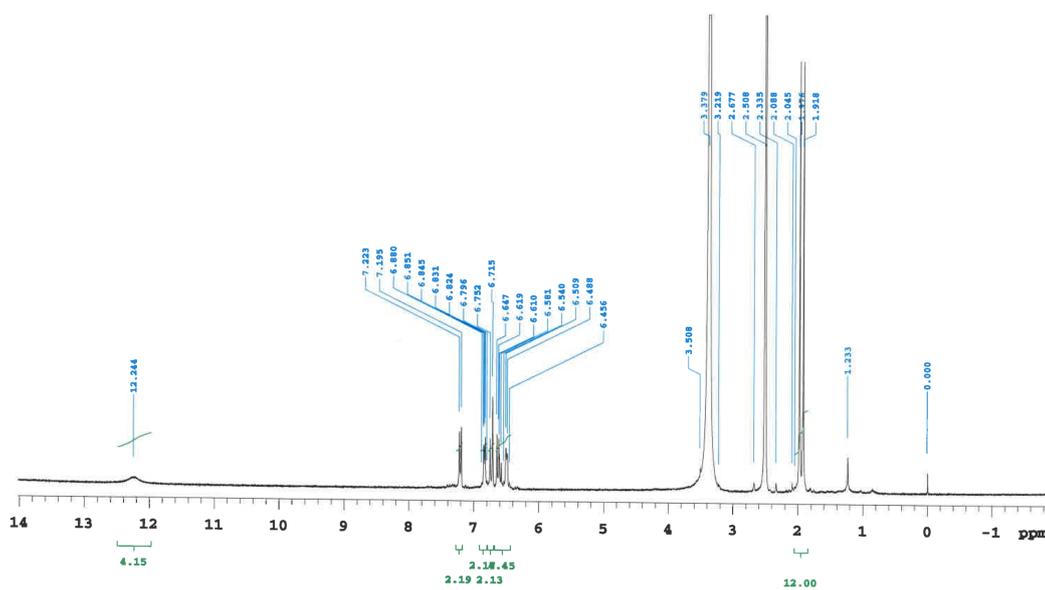
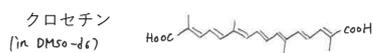


Fig. 4 ¹H NMR spectrum of crocetin in DMSO-d₆.

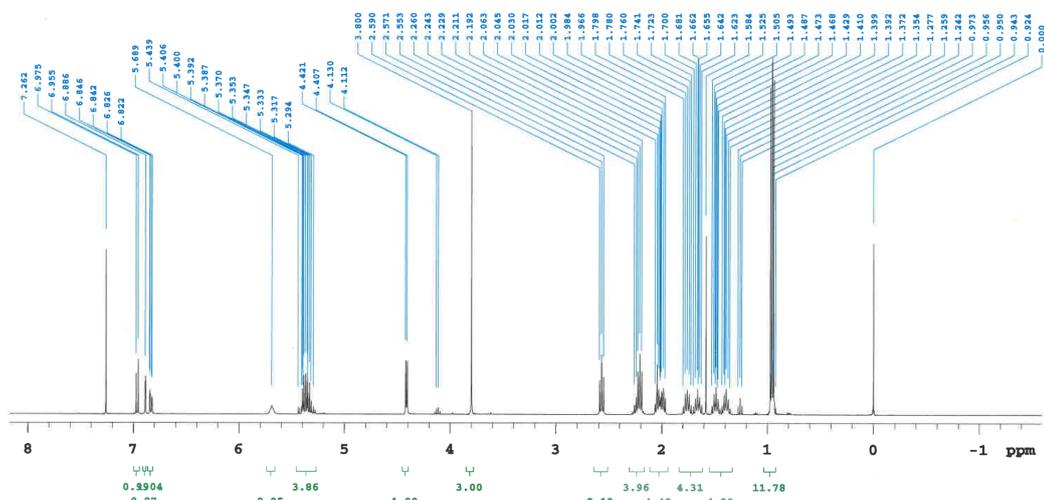
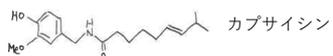


Fig. 5 ^1H NMR spectrum of capsaicin in CDCl_3 .

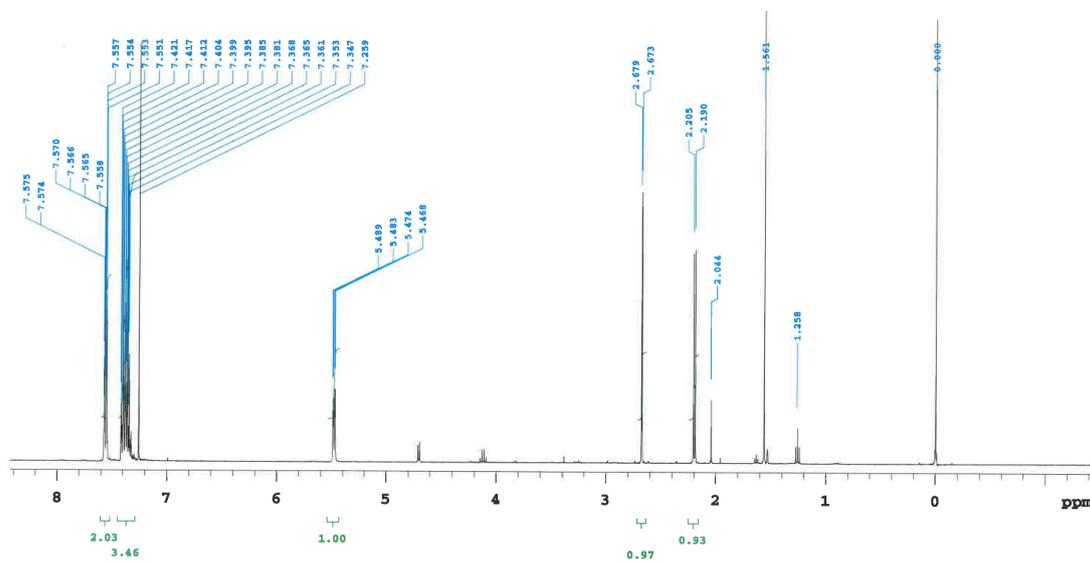
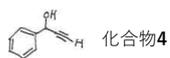
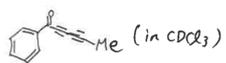


Fig. 6 ^1H NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3 .



カピリン

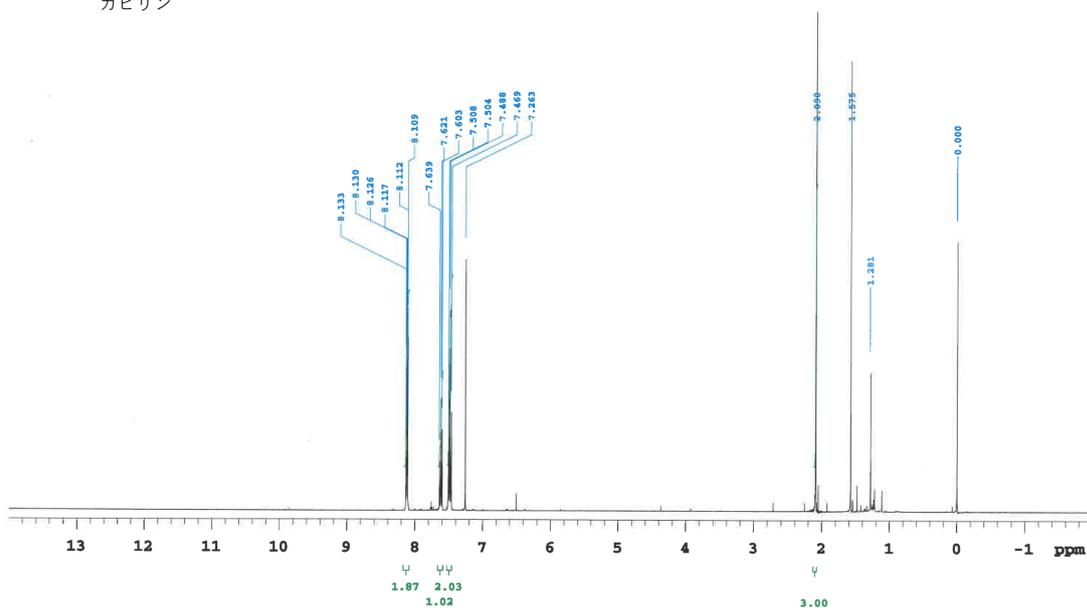


Fig. 9 ¹H NMR spectrum of capillin in CDCl₃.

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N	Kinetic Study of the Equilibration between Carminic Acid and Its Two Isomers Isolated from Cochineal Dye	Chem. Pharm. Bull.	65	306-310	2017
島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈弘, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩, 受田浩之	既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の関係	日食化誌	24	10-15	2017
Yoshimura M, Ochi K, Sekiya H, Tamai E, Maki J, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Amakura Y	Identification of Characteristic Phenolic Constituents in Mousouchiku Extract Used as Food Additives	Chem. Pharm. Bull.	65	878-882	2017
Tanaka R, Inagaki R, Sugimoto N, Akiyama H, Nagatsu A	Application of a quantitative ¹ H-NMR (1H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen	J. Nat. Med.	71	315-320	2017
Fukaya S, Yoshioka H, Nagatsu A, Nonogaki T, Okano T, Onosaka S, Miura N	Non-toxic Level of Acetaminophen Potentiates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice	Biol. Pharm. Bull.	40(9)	1590-1594	2017
Ito Y, Harikai N, Ishizuki K, Shinomiya K, Sugimoto N, Akiyama H	Spiroketalcarminic Acid, a Novel Minor Anthraquinone Pigment in Cochineal Extract Used in Food Additives	Chem. Pharm. Bull.	65	883-887	2017
Kitamaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata M, Ihara T.	Determination of PAHs in Solution with a Single Reference Standard by a Combination of ¹ H Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography	Anal. Chem.	89 (13)	6963-6968	2017
佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子	qNMR 及び HPLC による機能性表示食品中の機能性関与成分ルテインの定量	日食化誌	24(2)	75-81	2017
西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドゥ, 山崎太一, 黒江美穂,	定量 NMR に基づく相対モル感度を利用した加工食品中のヘスペリジン及びモノグルコシルヘスペリジンの定量	食衛誌	59(1)	1-10	2018

沼田雅彦, 井原俊 英, 杉本直樹, 佐藤 恭子					
Akiyama H, Nose M, Ohtsuki N, Hisaka S, Takiguchi H, Tada A, Sugimoto N, Fuchino H, Inui T, Kawano N, Hayashi S, Hishida A, Kudo T, Sugiyama K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshimatsu K	Evaluation of the safety and efficacy of Glycyrrhiza uralensis root extracts produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems	J. Nat. Med.	71	265-271	2017
Tatebe C, Ohtsuki T, Fujita T, Nishiyama K, Itoh S, Sugimoto N, Kubota H, Tada A, Sato K, Akiyama, H	Determination of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in the Color Additive Food Red No. 106 (Sulforhodamine B) using High-Performance Liquid Chromatography	Food Chem.	237	733-742	2017
Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K	Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome	Sci. Rep	7	15876	2017