

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 30 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	増本 直子	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 31 (2019)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(委託調査)	16
業務受託者：上田要一	
研究協力者：樋口彰	
研究協力者：林清	
研究協力者：卯津羅健作	
2) $^{13}\text{C}$ -qNMR に関する基礎的検討	32
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酵素の基原同定法の検討	52
研究分担者：増本直子	
研究協力者：杉本直樹	
研究協力者：西崎雄三	
2) 香辛料抽出物と他規格との基原生物の比較調査	59
研究分担者：増本直子	
研究協力者：中島馨	
研究協力者：杉本直樹	
3) RMS を用いた single-reference HPLC 法によるペリルアルデヒドの定量	66
研究分担者：増本直子	
研究協力者：丸山剛史	
研究協力者：五十嵐靖	
研究協力者：杉本直樹	
研究協力者：西崎雄三	
研究協力者：中島馨	
3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究	

1)	カキ色素の成分研究	81
	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)	ベニバナ黄色素の成分規格の検討	87
	研究分担者：井之上浩一	
2)	チャ抽出物の成分規格の検討	97
	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	109
	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)	相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法に関する研究	121
	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	139
	研究分担者：出水庸介	
	研究協力者：辻巖一郎	
3)	研究成果の刊行に関する一覧表	157

## 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作成のため、その参考となる国内及び海外の規格情報を調査した。既存添加物に特有の基原製法本質及びこれに関連する酵素の基原微生物の確認等についても継続的に調査した。また、既存添加物の有効成分または指標成分の定量用標品の供給の問題を解消するため、分析対象物質の標準物質を必要としない定量分析の手法として、 $^{13}\text{C}$ 核を用いたqNMR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

昨年度に引き続き、既存添加物酵素の本質であるタンパク質からペプチドを生成し、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。「香辛料抽出物」の規格作成にむけて、同種を用いていると思われる天然香料の基原と比較したほか、海外における規格の有無を調査した。生薬としても用いられるシソに含まれる易分解性のペリルアルデヒドについて、RMS法が有効であるかどうか適用することで、易分解性の定量用標準品を用いることなく正確な定量が可能であるか複数機関で検討した。

### 3) 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

カキ色素の含有成分について検討した。カラムクロマトグラフィーによる分離、精製を繰り返し実施したが、単一の化合物は得られなかった。マグネシウム-塩酸反応、*n*-ブタノール-塩酸反応、 $^1\text{H}$ 及び $^{13}\text{C}$ -NMR測定を行った結果、フラボノイドや縮合型タンニンによる検出は観察されなかった。カキ色素の本質は既存添加物名簿に記載されているフラボノイドではなく、別の化合物であることが示唆された。

### 4) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

ベニバナ黄色素の成分規格の改正のため含有成分をLC/MSにより解析した結果、サフロミンA及びサフロミンBであること確認できた。また、HSCCCにより成分評価を行い同色素の成分規格を検討した。また、チャ抽出物の規格作成のためカテキン類の組成を分析し、得られた結果を元に定量法を検討した。

### 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

昨年度に引き続き「香辛料抽出物」の規格試験法への $^1\text{H}$ -qNMRの適用の可能性を検討とした。クミン種子を原材料とするものでは、指標成分として適切と考えられるcuminaldehydeの $^1\text{H}$ -qNMRを用いた定量を検討した。また、フェヌグreekを原材料とするものでは、化合物探索の結



果, trigonellineが指標成分になることがわかった.

#### 6) qNMRを用いた既存添加物の分析手法に関する研究

酵素処理ナリンジン中のナリンジン及び主要な糖転位ナリンジン類 (ナリンジンのグルコースの3位にグルコースが $\alpha$ -1,4結合で順次1~4個結合した化合物) の定量にRMS法のへ適用を検討した.

#### 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内, カロテノイド系色素であるlycopene, クチナシ果実等に含まれるcrocin, ウコン等に含まれる色素であるcurcuminについて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

増本直子 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

卯津羅健作 日本食品添加物協会

第7部会長

林 清 東洋大学

教授

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

研究員

西崎雄三 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

辻巖一郎 国立医薬品食品衛生研究所

主任研究官

### 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認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) 昨年度より継続して、食品添加物公定書への既存添加物の新規収載を目標に、今年度は検証用規格及び自主規格を含め成分規格の整備状況、安全性試験実施状況、国内外規格の有無等を調査した。第 10 版収載候補品目の基原・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行った。また、酵素品目については、基原種の同定、分類、考え方について継続して調査した。

2) 既存添加物の有効成分または指標成分の定量用標品の供給の問題を解消するため、分析対象物質の標準物質を必要としない定量分析の手法として  $^1\text{H}$  quantitative NMR( $^1\text{H}$ -qNMR)をこれまで開発してきた。その結果、 $^1\text{H}$ -qNMR は SI トレーサブルな標準物質供

給の手法の一つとなった。しかし、既存添加物の定量用標品の純度決定及び供給には未だ応用されていない。その理由として、未知の不純物が混入している場合、 $^1\text{H}$ -qNMR では分解能が足りず精確な純度値が求められない可能性が挙げられる。そこで分解能に優れた  $^{13}\text{C}$  核を用いた qNMR の手法( $^{13}\text{C}$ -qNMR)の開発のため基礎的検討を行った。

### 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 3 品目 16 製品 ( $\beta$ -アミラーゼ 3 製品,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ 4 製品, セルラーゼ 9 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・評価した。

2) 「香辛料抽出物」について、今後の規格作成に当たり、定義に関する情報収集を行った。香辛料抽出物の 74 種の基原を、同種を用いていると思われる天然香料の基原と比較したほか、海外における規格(FCC11, CFR, GB2760-2014)の有無を調査した。

3) シソを原材料とする既存添加物、香辛料抽出物の天然香料中の指標成分、易分解性のペリラルデヒドを相対モル感度(RMS)を利用した分析法により正確に定量可能であるかどうか検討した。

### 3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

1) カキ色素の化学的情報の集積を目的に、含有成分の分離精製を行った。製品を水に溶解し、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配して各分画物を得た。そのうち、*n*-ブタノール分画物について、各種カラムクロマトグラフィー (YMC GEL ODS-AQ, SEPABEADS SP850,

Develosil Lop ODS 等) による分離精製を行った。また、マグネシウム-塩酸反応、*n*-ブタノール-塩酸反応による定性試験を行うと共に、製品自体の NMR 測定による成分解析を行った。

#### 4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) ベニバナ黄色素の成分規格の改正を目的に、LC/MS による成分組成の分析及び HSCCC による含有成分の精製を検討した。

2) 第 4 版既存添加物自主規格にはチャ抽出物の主成分はカテキン類とされ、吸光度法による総量の定量試験が設定されている。しかし、主なカテキン類 8 種の成分組成は規定されていない。そこで、チャ抽出物の成分規格設定を目的に HPLC-UV-FL による分析を行った。

#### 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) クミン種子を原材料とする既存添加物の規格試験法の設定を目的に、指標成分として適切と考えられる cuminaldehyde の <sup>1</sup>H-qNMR を用いた定量法を検討した。また、フェヌグリークを原材料とする既存添加物の規格試験法設定へのアプローチとして、指標成分となる化合物探索を行った。

#### 6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

1) 既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、酵素処理ナリンジン中のナリンジン及び主要な糖転位ナリンジン類の定量分析に、<sup>1</sup>H-qNMR と LC を組み合わせ相対モル感度 (RMS) が適用可能であ

るかどうか検討した。

#### 7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

1) 指標成分と同一もしくは代替定量用標品としてカロテノイド系色素であるリコペン、クチナシ果実等に含まれるクロシン、ウコン等に含まれる色素であるクルクミンの合成ルートの確立を検討した。

### 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) 第 9 版食品添加物公定書未収載品について①自主規格 (案) 及び第 10 版食品添加物公定書成分規格案の作成状況、②試験法に関する第 3 者及び自社検証実施状況、③国内外規格の有無、④安全性評価の実施状況、について調査を行い、それをまとめた。定義、製法、本質の基原生物の調査を行い、修正案を作成し、その理由・根拠をまとめた。酵素品目については、昨年度に引き続き、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) <sup>13</sup>C-NMR により定量分析が行えることは古くから知られているが、その定量精度に関する情報は少なく、また、高精度な定量結果が得られる測定条件は未だ確立されていない。そこで本研究では、<sup>13</sup>C-qNMR の技術を確立するため基礎情報を得るために純度既知の化合物を用いてモデル実験を行った。データポイント数、パルス繰り返し時間、積算回数、S/N 比、スペクトル解析条件等、定量精度に関係すると考えられるパラメータを検討し、最適化を行った結果、現時点では定量

結果に約 5%のばらつきが生じることがわかった。一方で、スペクトルの分離能は  $^{13}\text{C}$ -qNMR は  $^1\text{H}$ -qNMR よりも優れていることから、約 5%のばらつきを許容できるとき、類似化合物の混合物の直接定量に応用可能であると考えられた。

## 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酵素製品の基原同定法について検討した。16 製品を用いて検討した結果、 $\beta$ -アミラーゼ及び  $\beta$ -ガラクトシダーゼでは、すべての製品で酵素品目名と一致するタンパク質がヒットした。さらに、このヒットしたタンパク質の基原は、製品付帯情報との一致が確認された。セルラーゼでは、9 製品中 8 製品で酵素品目名と一致するタンパク質がヒットした。残りの 1 製品は、Mascot search から何の結果も得られず、その原因について明らかにする必要があった。ヒットしたタンパク質の基原を確認したところ、3 製品で付帯情報との矛盾が生じた。製品付帯情報が誤っている可能性が示唆された。
- 2) 香辛料抽出物のうち、天然香料の基原と全く同じ種を用いていると思われるものは、ちょうど半数の 38 品目であった。また、両者を比較して、天然香料の方が幅広い基原を用いていると思われるものが 26 品目、香辛料抽出物のほうがより多くの種を基原としていると思われるものが 4 品目であった。さらに、香辛料抽出物と天然香料とで異なる植物種を基原としていると思われるものが 6 品目あった。また、トウガラシとパプリカのように、香辛料抽出物では別品目として扱われているが、天然香料では 1 品目として扱われて

いるものもあった。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。次に海外規格について調査した結果、今回調査した規格に記載されていなかった品目は、アサノミ、アジョワン、カレーリーフ、クレソン、シャロット、ソーレル、ミョウガ、ワサビの 8 品目であった。また、今回調べたどの規格でもほぼ同じ基原種が用いられていたものは 43 品目であった。

- 3) シソ中に含まれるペリルアルデヒドを対象とした RMS 法の基準物質として、安定、安価かつ高純度の市販試薬が入手可能であるジフェニルスルホンを選択した。ジフェニルスルホンは、局方で定められているペリルアルデヒドの定量法（以下、従来法）に記載の HPLC 分析条件を変更することなく分析可能であるため、基準物質として妥当であると判断した。ジフェニルスルホンを基準物質としたペリルアルデヒドの RMS を 2 つの研究機関で検討した結果、得られた RMS の室間精度（RSD%）は 1.2%程度であった。また、3 ロットのソヨウについて、得られた RMS を用いて定量した結果、従来法（ $^1\text{H}$ -qNMR 補正あり）と RMS 法の間ほとんど差異はないことが示された。

## 3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

- 1) カキ色素は赤褐色を呈し、主色素はフラボノ

イドとされているが、成分の詳細が明らかにされていない。そこで本研究では、成分規格の設定に資する化学的情報の集積を目的に含有成分の分析を行った。HPLC で若干のピークが認められたカキ色素の *n*-ブタノール分画物について、カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し試みたが、いずれの充填剤に対しても親和性を認めず、単一な化合物は得られなかった。しかし、粗分画物には <sup>1</sup>H-NMR 及び HPLC による分析結果より、*trans-p*-coumaric acid が含まれることが確認された。フラボノイドの定性試験としてマグネシウム-塩酸反応、縮合型タンニンの定性試験として *n*-ブタノール-塩酸反応では、いずれも呈色反応を示さず、さらに <sup>13</sup>C-NMR 測定において縮合型タンニンに特徴的なカテキンユニット由来のシグナルを認めなかったことから、カキ色素の本質はフラボノイドやタンニンに由来するものではなく、これらは加工の過程において分解されていることが示唆された。カキ色素の主要な色素成分は、アミノ酸と糖によって生成したメラノイジンの可能性が考えられた。

#### 4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) ベニバナ黄色素の成分規格を改正するために、まず確認試験を実施した結果、極大吸収部及び水酸化ナトリウム溶液による色の変化に関して適合した。一方、現在の成分規格には、色価や薄層クロマトグラフィーが設定されているが、含有成分の同定法は設定されていない。そこで LC/MS を用いて主成分解析を検討した結果、サフロミン A 及び B が主要な黄色素であることが確認できた。しかし、サフロミン A 及び B のみでは色価が

不足しており、カラム充填剤に不可逆的吸着し検知できない成分の存在が疑われた。そこで充填剤を用いない HSCCC による分析を行った結果、未知の黄色成分が観察された。

2) 既存添加物チャ抽出物におけるカテキン類の含有解析及び定量分析を HPLC-UV-FL により実施した。分析条件を検討した結果、逆相 LC にて、移動相は 0.1% ギ酸水溶液/0.1% ギ酸メタノール、カラムは TSKgel ODS-100Z で良好な分離が示され、8 種のカテキン類を分析することができた。ガロカテキン、エピガロカテキンガレート、エピカテキン、ガロカテキンガレート及びエピカテキンガレートは UV 検出器で、カテキン及びエピカテキンは FL 検出器で定量可能であることが確認できた。

#### 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) 香辛料抽出物の成分規格を設定するために <sup>1</sup>H-qNMR を用いた基礎検討を行った。クミン種子抽出物で観測された独立したシグナル( $\delta$ 9.92 ppm)が、クミン種子に含有される特徴的な精油成分である cuminaldehyde のホルミル基プロトン由来と特定できた。Cuminaldehyde 標準品と 4 種類のクミン種子粉末を用い、DSS-*d*<sub>6</sub> を内部標準として methanol-*d*<sub>4</sub> で <sup>1</sup>H-qNMR の測定を実施した。その結果、cuminaldehyde 標準品中の cuminaldehyde の純度は 92.3±1.4% で、97%以上という数字より若干小さな値となった。この数字の差は、メーカーが純度測定に用いている GC では検出できない夾雑物の存在や、精油の揮発性によるものと考えられた。クミン種子粉末 4 サンプルの cuminaldehyde の含

有率は  $0.36 \pm 0.02\%$  ~  $1.84 \pm 0.06\%$  という結果を得た。サンプル間の差はサンプル差とともに粉末にしてからの時間経過も大きく関与していると考えられた。クミンから製造された既存添加物の「香辛料抽出物」は入手できず、今年度は既存添加物での試験ができなかった。また、フェヌグリークの種子 50 g の MeOH 抽出物を駅液分配、カラムクロマトグラフィーを用いて分画し、目的のシグナルを持つ化合物を単離した。各種 NMR スペクトルの解析の結果、目的とする化合物は trigonelline であることがわかった。また、フェヌグリークに特徴的なシグナル(DMSO- $d_6$  中で 9.16 ppm)が、trigonelline の 2 位プロトンのもので特定することができ、trigonelline がフェヌグリーク含有の「香辛料抽出物」の規格基準策定の指標成分として活用できる見込みがたった。

#### 6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

- 1)  $^1\text{H}$ -qNMR と LC を組み合わせた相対モル感度 (RMS) 法の酵素処理ナリンジン中の主要な糖転位ナリンジン類 (ナリンジンのグルコースの 3 位にグルコースが  $\alpha$ -1,4 結合で順次 1~4 個結合した化合物) の定量への適用性について検討した。定量用標品としては、4-ヒドロキシ安息香酸メチル及びナリンジンを選択した。なお、RMS の算出に必要な糖転位ナリンジン類は、酵素処理ナリンジン製品から単離し、定量用標品と併せて  $^1\text{H}$ -qNMR より各化合物の含量 (純度) をそれぞれ算出した。まず、4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジン及び糖転位ナリンジン類の RMS を検討したところ、1.23~1.24 であ

ることが判明した。また、ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS は 0.994~1.00 であった。さらに、これらの RMS に基づき、酵素処理ナリンジン製品中のナリンジン及び糖転位ナリンジンの含量を算出したところ、各測定対象を標品とする絶対検量線法と同程度に正確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) カロテノイド系色素であるリコペン (lycopene)、クチナシ果実等に含まれるクロシン (crocin)、ウコン等に含まれる色素であるクルクミン (curcumin) を対象とした合成ルートの確立を行った。リコペンは pseudoionone を出発原料として 3 工程で合成し、クルクミンは vanillin と acetylacetone の縮合により 1 工程で合成した。また、昨年合成を達成したクロセチンからクロシンを立体選択的に合成することを目的に、モデル反応化合物 (crocin moiety) を設計し反応条件を検討するための化合物 (sugar moiety) 合成を行なった。

#### E. 結論

1. 既存添加物の成分規格試験法に関する研究
  - 1) 既存添加物の自主規格等、国内外の情報を整理しているところであり、流通実態の有無についても考慮し規格作成の優先順位を明確にしていくべきと考えられた。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等を策定していく上で、最新の科学技術による基原同定に関する情報をどのように考慮すべきか引き続き検討する必要があると考えられた。

2)  $^{13}\text{C}$ -qNMR の開発のため基礎的検討を行った結果、 $^{13}\text{C}$ -qNMR では S/N 比を向上させても約 5% のばらつきが生じることから精確な絶対定量には困難であり、化合物の純度決定には適さないと考えられた。しかし、多少のばらつきは生じるが類似化合物の混合物から目的成分を単離せずに直接定量が可能であることが証明され、この点において天然由来の添加物の有効成分または指標成分を迅速に定量する手法として有用であると考えられた。

## 2. 既存添加物の基原同定手法に関する研究

1) 既存添加物である酵素の場合、その本質であるタンパク質から得たペプチドの質量情報と一致するものをデータベースから探索し、そのペプチドが帰属されるタンパク質の基原情報を確認する方法が有効と思われる。この考えに基づき、また基原同定法としての可能性を検討した結果、これまでのデータからは一定の精度で応用可能であると考えられた。今後、酵素の種類を増やし検討する必要がある。

2) 香辛料抽出物について、本品目に含有されている 74 種の基原を用いていることがその名称から予想される天然香料について、示された和名及び学名の妥当性を YList 及び Tropicos をもとに検討したところ、半数程度が全く同じ植物種を基原としていることが明らかとなった。その一方で、同じ名称であっても香辛料抽出物と天然香料とで異なる基原を用いているものもあった。さらに、昨年度の FCC や CFR の調査に加え、中国食添使用基準 (GB2760-2014) とも比較し、学名まで精査したところ、日本独自の基原のもの

や、日本では 2 つの基原として区別して扱われているものが他国ではひとつの基原として示されているものもあった。前年度・今年度の調査で、基原によっては規格案作成の際に詳細な検討が必要と思われるものが浮き彫りになった。

3) 易分解性があり標準物質の調達が困難であるペリルアルデヒドの定量について、ジフェニルスルホンを基準物質とした RMS 法を複数の機関で検討することにより、その実現可能性を探索した。試料としたソヨウ中のペリルアルデヒド含量について、RMS 法から得られた結果、従来法と比較してほとんど差異はなかった。これらの結果は研究機関による違いがなかったため、正確な RMS が算出されれば、HPLC による定量分析経験者であれば誰にでも、分析対象物質の認証標準物質等を必要とせずに、 $^1\text{H}$ -qNMR と同等の HPLC による定量分析が可能であると考えられた。現行の JP17 でも用いられているペリルアルデヒド標準品の易分解性を考慮すると、本研究で提案したジフェニルスルホンを基準物質とした RMS 法は、その正確性はもちろんコストの点からも優れた定量法であり、成分規格試験としても相応しい手法である。

## 3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

1) カキ色素の含有成分について精査した結果、フラボノイドやタンニンに由来するものではなく別の化合物であることが示唆された。カキ色素の主要な色素成分として、アミノ酸と糖によって生成したメラノイジン等が予想されるが、明らかにするためには更に検討が必要である。

#### 4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) ベニバナ黄色素の主色素成分がサフロミン A 及び B であることが確認できた。しかし、サフロミン A 及び B のみではベニバナ黄色素製品の色価の値が説明できず、検知できていない成分の存在が示唆された。HSCCC による分析では、未知の黄色成分が観察されたことから HPLC のカラムでは分離分析できない未知成分が存在すると考えられた。今後、未知成分の解析を進める予定である。

3) 既存添加物チャ抽出物におけるカテキン類の含有解析及び定量分析を HPLC-UV-FL により実施した結果、ガロカテキン、エピガロカテキンガレート、エピカテキン、ガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、カテキン及びエピカテキンが定量可能であると考えられた。現在、チャ抽出物中のカテキンの定量試験として吸光度法が用いられることが多いが、この試験ではカテキン類の総量が求められるのみである。一方、チャ抽出物のカテキン類の組成は製品間やメーカー間で異なっている。故に、今回検討した HPLC 条件を採用し、且つ RMS を利用した簡便な分析法の検討を継続する予定である。

#### 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) 香辛料抽出物の成分規格を設定するために  $^1\text{H-qNMR}$  を用いた基礎検討を行った。クミンを主な基原とする「香辛料抽出物」中の規格基準を策定する場合の指標成分として cuminaldehyde を対象とし、そのアルデヒド基のシグナル(methanol- $d_4$  中で  $\delta 9.92$  ppm)を測定する  $^1\text{H-qNMR}$  を用いた定量で規格が

定められる可能性が確認できた。フェヌグリークでは、NMR スペクトルにおいて特徴的で  $^1\text{H-qNMR}$  が適用可能なシグナル示す化合物が trigonelline であり、そのシグナルは2位プロトン(DMSO- $d_6$  中で 9.16 ppm)のものであると帰属した。 $^1\text{H-qNMR}$  法で trigonelline の定量を行うことで、フェヌグリークを原材料する香辛料抽出物の成分規格の策定ができる可能性が示された。

#### 6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

1) 既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、酵素処理ナリンジン製品中のナリンジン及び糖転位ナリンジン(Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G)を対象とした RMS 法による定量法について検討を行った。測定対象とは異なる定量用標品(4-ヒドロキシ安息香酸メチル)に対するナリンジン及び糖転位ナリンジンの RMS (1.23~1.24)により算出された各測定対象の含量は、従来法(各測定対象を標品とした絶対検量線法)より得られた含量と有意な差は認められなかった。同様に、ナリンジンに対する糖転位ナリンジンの RMS (0.994~1.00)により算出された糖転位ナリンジン含量は従来法より得られた含量と有意な差は認められなかった。一方、酵素処理ナリンジン製品中の糖転位ナリンジンについては、Naringin-4G にさらに様々な鎖長のポリマルトースが付加した化合物が存在していることが明白であるが、これらの検知は困難である。従って、定量試験として本法を適用するためには、どの糖鎖長の糖転位ナリンジンまでを定量対象とするか明確にする



必要があると考えられた。

#### 7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

- 1) カロテノイド系色素であるリコペン (lycopene), クチナシ果実等に含まれるクロシン(crocin), ウコン等に含まれる色素であるクルクミン(curcumin)を対象とした合成ルートを確立した。既存添加物の品質確保のためには有効成分の定量試験の設定が望ましい。故に、定量用標品又は代替標品の供給問題を解消する必要がある。今後、同様にして指標成分の部分骨格を持つ代替化合物の合成を行い、指標成分と代替定量用標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) Nishizaki Y, Sato-Masumoto N, Yokota A, Mikawa T, Nakashima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Ito Y, Sugimoto N, Sato K: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Addit. Contam. A*, **2018**; 35, 838-847.
- 2) Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K: Phytochemical profiling of rosemary extract products distributed as food additives in the Japanese market. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **2018**; 25, 105-113.
- 3) 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 中島馨, 杉本直樹, 多田敦子, 曹永晩, 小川久美子, 佐

藤恭子: 香料 2,4-ジメチル-4-フェニルテトラヒドロフランの異性体存在比の決定. *日食化誌*, **2019**; 26, in press.

- 4) 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 食品分析の信頼性確保における定量 NMR に基づく相対モル感度の役割—分析種の定量用標品不要なクロマトグラフィーの開発—. *FFI ジャーナル*, **2019**; 2, in press.

- 5) Saito N, Kitamaki Y, Otsuka S, Yamanaka N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata H, Ihara T: Extended internal standard method for quantitative  $^1\text{H}$  NMR assisted by chromatography (EIC) for analyte overlapping impurity on  $^1\text{H}$  NMR spectra. *Talanta*, **2018**; 184, 484-490.

- 6) 黒江美穂, 齋藤直樹, 山崎太一, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英:  $^1\text{H}$  核定量核磁気共鳴分光法と HPLC の組合せによるヘプタオキシエチレンデシルエーテル標準液の値付け. *分析科学*; **2018**, 67, 541-549.

- 7) Nishizaki Y, Masumoto N, Nakajima K, Ishizuki K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Tada A, Sugimoto N, Sato K: Relative molar sensitivities of carnosol and carnosic acid with respect to diphenylamine allow accurate quantification of antioxidants in rosemary extract. *Food Addit. Contam. A*, **2019**; 36, 203-211.

- 8) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Single reference quantitative analysis of xanthomonasin A and B in *Monascus* yellow colorant using high-performance liquid chromatography with relative molar sensitivity based on high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2018**; 1555, 45-55.

- 9) Takahashi, M, Nishizaki, Y, Morimoto, K, Sugimoto, N, Sato, K, Inoue, K: Design of synthetic single reference standards for the simultaneous determination of sesamin, sesamol, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity. *Sep. Sci. Plus*, **2018**; *1*, 498-505.
- 10) Nishitsuji K, Watanabe S, Xiao J, Nagatomo R, Ogawa H, Tsunematsu T, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K: Effect of coffee or coffee components on gut microbiome and short-chain fatty acids in a mouse model of metabolic syndrome. *Sci. Rep.*, **2018**; *8*, 16173.
- 11) Fukaya S, Yoshioka H, Nagatsu A: The Kampo formula “Juzen-taiho-to” exerts protective effects on ethanol-induced liver injury in mice. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **2018**; *5*, 105-112.
- 12) 田原麻衣子, 杉本直樹, 香川(田中)聡子, 坂井信夫, 五十嵐良明, 神野透人: ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの定量分析における qNMR を用いたトレーサビリティの確保. *薬学雑誌*, **2018**; *138*, 551-557.
- 13) Fuji Y, Uchida A, Fukahori M, Chino M, Ohtsuki T, Matsufuji H: Chemical characterization and biological activity in young sesame leaves (*Sesamum indicum* L.) and changes in iridoid and polyphenol content at different growth stages. *PLoS One*, **2018**; *13*, e0194449.
- 14) Fuji Y, Ohtsuki T, Matsufuji H: Accumulation and subcellular localization of acteoside in sesame plants (*Sesamum indicum* L.). *ACS Omega*, **2018**; *3*, 17287-17294.
2. 学会発表
- 1) Sugimoto N, Nishizaki Y, Masumoto N, Sato K, Suematsu T, Miura T, Yamada Y, Kitawaki Y, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T: Development of single reference liquid chromatography quantitative analysis based on relative molar sensitivity. AOAC 132nd Annual Meeting (2018.8) (Toronto).
- 2) Miura T, Sugimoto N: Quantitation paradigm and preparation of quantitative reference standards. AOAC 132nd Annual Meeting, Symposium: Practicality of quantitative NMR in quality control (2018.8) (Toronto).
- 3) Sugimoto N: Development of single-reference HPLC quantitative analysis for chemical compounds derived from natural sources based on relative molar sensitivity. 2018 APEC workshop on food safety and food adulterated with drugs (2018.9)(Taipei).
- 4) Sugimoto N, Saito T, Miura T: New Proposal regarding “Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy — Quantification of reference compounds used for foods and food products — General requirements” ISO/TC34 plenary meeting (2018.10.18-20).
- 5) Sugimoto N: Overview of food additive regulation in Japan. 1st TISTR and JAIMA conjoint conference (2018.11)(Bangkok).
- 6) 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物・シタン色素の成分解析. 日本食品衛生学会第114回学術講演会(2018.11)(広島市).
- 7) 寺見祥子, 多田敦子, 久保田浩樹, 佐野誠, 鈴木一平, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 試薬中のノルビキシン及びビキシン簡易濃

- 度測定法の検討. 日本食品衛生学会第 114 回  
学術講演会(2018.11)(広島市).
- 8) 杉本直樹:天然添加物の品質保証:qNMR の  
応用と展開. 第 55 回植物化学シンポジウム  
(2018.11)(東京)
- 9) 多田敦子, 堀江正一, 関戸晴子, 橋口成喜,  
小林千種, 勝原美紀, 大槻崇, 中島安基江,  
高橋直矢, 久保田浩樹, 建部千絵, 寺見祥子,  
杉本直樹, 佐藤恭子:食品中の食品添加物分  
析法改正に向けた検討. 第 55 回全国衛生化  
学技術協議会(2018.11)(横浜市).
- 10) 杉本直樹:qNMR 法の国際標準化による波  
及効果. 日本薬学会第 139 年会一般シンポ  
ジウム「品質評価(Quality)のレギュラトリ  
ーサイエンスと分析科学の新機軸」  
(2019.3)(幕張市).
- 11) 黒江美穂、斎藤直樹、増本直子、西崎雄三、  
杉本直樹、沼田雅彦、井原俊英:非イオン  
界面活性剤の簡易定量に向けた HPLC-RI  
における相対モル感度の頑健性評価. 日本  
化学会年会第 99 春期年会(2019.3)(神戸市).
- 12) 西崎雄三, 鈴木綾乃, 良永裕子, 増本直子,  
石附京子, 中島馨, 原園景, 木吉真人, 石  
井明子, 杉本直樹, 佐藤恭子, ペプチドを  
指標にした既存添加物の基原同定法の検  
討(1)~酵素製品について~, 日本食品化学  
学会第 24 回総会・学術大会(2018.4)(東京).
- 13) 鈴木綾乃, 西崎雄三, 良永裕子, 増本直子,  
石附京子, 中島馨, 原園景, 木吉真人, 石  
井明子, 杉本直樹, 佐藤恭子, ペプチドを  
指標にした既存添加物の基原同定法の検  
討(2)~酵素製品について~, 日本食品化学  
学会第 24 回総会・学術大会(2018.4)(東京).
- 14) 中島馨, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子,  
多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子:既存添加  
物トウガラシ水性抽出物中の抗菌成分の  
特定. 第 55 回全国衛生化学技術協議会  
(2018.11)(横浜市).
- 15) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 石附京子,  
杉本直樹, 佐藤恭子:フォトダイオードア  
レイ検出器による測定値のばらつきの原因.  
第 55 回全国衛生科学技術協議会年会  
(2018.11)(横浜市).
- 16) 増本直子:相対モル感度を利用したシング  
ルリファレンス HPLC 分析法の応用. 第 55  
回全国衛生科学技術協議会年会  
(2018.11)(横浜市).
- 17) 増本直子, 西崎雄三, 丸山剛史, 五十嵐靖,  
中島馨, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦,  
井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子:相対モル  
感度を利用したペリルアルデヒド定量法  
の検討. 第 7 回定量 NMR クラブ  
(2018.12)(東京).
- 18) 高橋未来, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子,  
中島馨,杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一:  
Single Reference HPLC 法によるセサモール,  
セサミン, エピセサミン, セサモリンの一  
斉分析法の構築. 日本食品化学学会第 24 回  
総会・学術大会(2018.5)(東京).
- 19) 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:シングルリファレンス HPLC 法による  
ゴマリグナン類の相対感度定量法の開発  
と食品応用. 第 78 回分析化学討論会  
(2018.5)(宇部市).
- 20) 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(2018.5)(大

阪).

- 21) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Single-reference HPLC analysis for natural components based on relative molar sensitivity. PITTCON 2019 (2019.3) (Philadelphia).
- 22) 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, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 「定量 NMR(<sup>1</sup>H-qNMR)を応用したベニバナ赤色色素・carthamin の定量」, 第 17 回新規素材探索研究会セミナー, P26, (2018.6)(横浜市).
- 23) 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, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 「定量 NMR 法を応用したベニバナ赤色素 carthamin の吸光係数の検証」, 第 64 回日本薬学会東海支部大会, H-7S, (2018.6)(名古屋市).
- 24) 藤原裕未, 本間篤史, 永津明人, 「カエデ属植物の遺伝子鑑別法の開発」, 日本生薬学会第 65 年会, 1P-87, (2018.9)(広島市).
- 25) 大槻崇, 松田美優, 松下明里, 小島豪, 松岡聖朗, 西崎雄三, 増本直子, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛: 日本薬学会第 139 年会 (2019.3) (千葉市).
- 26) 辻巖一郎, 杉本直樹, 出水庸介: 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 (P-18). 日本食品衛生学会第 114 回学術講演会(2018.11)(広島市).

#### H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成 30 年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法に関する研究

～既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)～

業務受託者 上田要一 一般社団法人日本食品添加物協会 専務理事

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

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

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

国の成分規格が設定されていない既存添加物については、

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

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

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

研究協力者

樋口彰 (一社)日本食品添加物協会  
常務理事

林 清 東洋大学  
食環境科学部食環境科学科  
教授

卯津羅健作 (一社)日本食品添加物協会  
第 7(酵素)部会長

## A. 研究方法

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

第 9 版食品添加物公定書未収載品について、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実施した。過去 4 年間のまとめを、その理由・根拠を含め一覧表にした。

### (3) 酵素品目に関する調査

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

## B. 研究結果

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

第9版食品添加物公定書未収載品について次の事項について調査を行い、部会別および品目順に Table 1 にまとめた。

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

## (2) 第10版収載既存添加物候補品目定義及び製法・本質の基原生物の調査

過去4年間のまとめを、その理由・根拠を含め Table 2 に示した。

## (3) 添加物酵素の基原種の同定、分類の考え方について

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

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

しかし、生物においては、分類学、および同定の技術・手法の進歩により、基原の呼称が改正されることが少なからず発生することがある。また、このことは、予め想定できるものでもない。

その際、事業使用されている基原自体に変更はなくとも、呼称変更により食品添加物公定書収載の基原名との齟齬が生じることになる場合もあるが、このことが問題とならないよう、対応策を検討しておく必要がある。もっとも、食品添加物として使用される酵素の安全性の確保においては、当該酵素の基原の病原性、および毒素産生性の有無がその判断材料となるが、当該基原の呼称変更においては分類学上の改正であり、当該基原生物自体が他の基原生物に変わるわけではないので、その安全性が変わるものではない。

このような背景から、分類学上の改正、または

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

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

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

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

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

と考えられる。

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

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

#### ・微生物について

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

（同定の指標となる遺伝子の配列解析）

細菌類：16S rDNA 解析など

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

酵母：ITS rDNA 解析，26S rDNA-D1/D2 解析など

（当該遺伝子配列を用いた相同性検索）

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

（上記外の手法による解析）

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

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

また、当該微生物の同定において、必要に応じ

て、他の適切な最新技術も適用する。

（学名について）

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

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

#### ・動植物について

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

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

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

### C. 考察

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

### D. 謝辞

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

Table 1. 成分規格の整備状況等の調査結果まとめ

部会	用途分類	既添番号	規格名称	第10版案作成	第5版案作成	第4版案作成	第3版案作成	第10版関連	食衛生管理者問題	安全性評価	90日反復投与	遺伝毒性試験	他の安全性試験	J E C C F A 規格	J F C C 規格	E U 規格	日本薬局方	外原規格	国内規格	他の国内規格	他の海外規格	備考
01	甘味料	170	ステビア系							○8(基原等)			○8(ステビア抽出物に類似)									
01	甘味料	270	ブラジルカンゾウ抽出物							○8(基原等)			○8(カンゾウ抽出物に類似)									
02	着色料	024	アルミニウム							◎JECFA			○8(JECFA)									
02	着色料	047	オレンジ色素							◎11	○11	○11(小核試験)										
02	着色料	051	カキ色素							◎15	○15	○15(小核試験)										
02	着色料	087	魚鱗糖							◎16	○16	○16(小核試験)										
02	着色料・製造用剤	089	金							◎8(JECFA)			○8(JECFA EU)									
02	着色料・製造用剤	090	銀							◎8(EU)			○8(EU)									
02	着色料	114	クローロフィルン							◎15	○15	○15(小核試験)	○8(クロロフィルに類似)									
02	着色料	116	クローロフィルン							○8(基原等)			○8(植物炭素色素に類似)									
02	着色料	135	骨炭色素							○8(基原等)	○18	○18(小核試験)										
02	着色料	149	シアナト色素							○8	○8		○8(染身体)									
02	着色料	159	シタン色素							○8	○8		○8(EU)									
02	着色料	165	植物炭素色素							◎8												
02	着色料	256	フアラシア色素							◎11	○11	○11(小核試験)										
02	着色料	282	ペカンナツツ色素							◎11	○11	○11(小核試験)										
02	着色料	324	ムラサキヤマイモ色素							◎8			○8(EU)									
02	着色料	362	ロウウチ色素							◎16	○16	○16(小核試験)										
03	保存料	074	カワラナモミ抽出物							◎26	○25	○25(28日)										
03	製造用剤/日特	113	グレープフルーツ種子抽出物							?												外原類グレープフルーツエキス
03	製造用剤/日特	162	ショウガ抽出物							◎8												
03	製造用剤/日特	175	セイヨウウサビ抽出物							◎23	○23	○23(小核試験)	○23(慢性毒性・発がん性併合試験)									
03	製造用剤/日特	216	トウガラシ水性抽出物							◎8			○8(米国)									
03	製造用剤/日特	266	フトウ果皮抽出物							◎26	○25	○25(小核試験)										第9版ブドウ果皮色素
03	製造用剤/日特	329	モウソウチク乾留物							○8(くん液関連)			○8(くん液に類似)									
03	製造用剤/日特	330	モウソウチク抽出物							◎11	○11	○11(小核試験)										
04	増粘安定剤	001	アウレオパシジウム糖蜜液(液体品)							◎15	○15	○15(小核試験)										
04	増粘安定剤	001	アウレオパシジウム糖蜜液(粉末品)							◎15	○15	○15(小核試験)										
04	増粘安定剤	004	アグロパテリウムスクワリガン							◎16	○16	○16(小核試験)										
04	増粘安定剤	013	アマシードガム							◎16	○16	○16(小核試験)										
04	増粘安定剤	019	アラビガラクトン							○8(単糖関連)			○8(単糖であるアラビノース、ガラクトースよりなる)									
04	増粘安定剤/ガムベア	040	エレミ樹脂							◎19	○19	○19(小核試験)										
04	増粘安定剤	053	カンアガム							◎JECFA			JECFA									
04	増粘安定剤	061	ユーカラ藻菜							◎カラギナン			JECFA(カラギナン)									
04	増粘安定剤	082	キチン							◎11	○11	○11(小核試験)										
04	増粘安定剤・製造用剤	084	キトサン							○8			○8(特定保健用食品として許可)									



部会	用途分類	既添番号	規格名称	第10版関連				安全性資料				国内外規格				備考			
				第10版業作成	第5版業作成	第4版自検	第3版社検	衛生管理問題	安全性評価	90日反復投与	遺伝毒性試験	他の安全性試験	J E C F A 規格	F U C 規格	E U 規格		日本薬高方	外原規	薬蒸規
04	増粘安定剤	092	グアーガム酵素分解物	○	○	○	○	○8(特保関連)	○8(復帰)	○特保保健康用食品として許可	○	○	○	○	○	○	特保原料規格		
04	増粘安定剤	104	グルコサミン	○	○	○	○	○8(単糖関連)	○8(復帰)		○	○	○	○	○	○			
04	増粘安定剤・製薬用剤	145	サハクソモキシンドガム	○	○	○	○	○15	○15(小核試験)		○15	○	○	○	○	○			
04	増粘安定剤	229	トロロアオイ	○	○	○	○	○19	○19(小核試験)		○19	○	○	○	○	○			
04	増粘安定剤	257	ブアーセラン	○	○	○	○	○8	○8(JECFA 米国 EU)		○8	○	○	○	○	○			
04	増粘安定剤	336	モモ樹脂	○	○	○	○	○21	○21(小核試験)		○21	○	○	○	○	○			
04	増粘安定剤	359	レバシ	○	○	○	○	○11	○11(小核試験)		○11	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	091	カチキン	○	○	○	○	○20	○20(年間反復投与)		○20	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤/日時	076	カンゾウ油性抽出物	○	○	○	○	○11	○11(小核試験)		○11	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	093	グアヤク脂	○	○	○	○	○8(JECFA)		○8(JEFA)	○	○	○	○	○	○			Guayule Resin と同義 JPE8収載
05	酸化防止剤	095	クエルセチン	○	○	○	○	○(8)		○8(64週 410日 発がん) ○8(繁殖 催奇形性)	○	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤/日時	115	クローブ抽出物	○	○	○	○	○8		○8(米国)	○	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	129	酵素分解リンゴ抽出物					○8(基原等)		○8(リンゴの果実を酵素分解したモノ)	○	○	○	○	○	○			外原規リンゴタンニン
05	酸化防止剤	138	ゴア油不けん化物					○21	○21(小核試験)		○21	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	141	コメヌカ酵素分解物					○18	○18(小核試験)		○18	○	○	○	○	○			外原規コメヌカ発酵エキス
05	酸化防止剤	174	精油除去ウイキョウ抽出物					○15	○15(小核試験)		○15	○	○	○	○	○			外原規ウイキョウエキス
05	酸化防止剤	178	セージ抽出物					○8			○8	○	○	○	○	○			日局ウイキョウ
05	酸化防止剤	196	単糖・アミノ酸複合物	○	○	○	○	○8(基原等)		○8(単糖及びアミノ酸の複合体)	○	○	○	○	○	○			外原規セージエキス
05	酸化防止剤	202	チヤ抽出物	○	○	○	○	○8		○8(米国)	○	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	232	生コーヒー豆抽出物	○	○	○	○	○8		○8(米国)	○	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	255	ヒマワリ種子抽出物	○	○	○	○	○H8		○8(後糖変異)	○	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	276	プロポリス抽出物	○	○	○	○	○23		△23(26週及び52週) ○23(発がん性)	○	○	○	○	○	○			日健栄協プロポリス食品
05	酸化防止剤	287	ヘゴ・イチヂク抽出物					?			?	○	○	○	○	○			日健栄協イチヂク食品
05	酸化防止剤	306	没食子酸	○	○	○	○	○20	○20(小核試験)		○20	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	328	メロイカ精油					○8(基原等)		○8(精油)	○	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	355	ルチン(抽出物)(アズキ全草抽出物)	○	○	○	○	○8	○8(小核試験)		○8	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	355	ルチン(抽出物)(ソバ全草抽出物)	○	○	○	○	○8	○8(小核試験)		○8	○	○	○	○	○			
05	酸化防止剤	365	ローズマリー抽出物	○	○	○	○	○8	○8(小核試験)		○8	○	○	○	○	○			
06	カラム光沢	036	カルシウム抽出物	○	○	○	○	○18	○18(小核試験)		○18	○	○	○	○	○			
06	カラムス	042	オノクライト	○	○	○	○	?			?	○	○	○	○	○			
06	カラムス	094	グアヤク樹脂	○	○	○	○	○8(JECFA)		○8(JEFA)	○	○	○	○	○	○			
06	カラムス	099	グアヤクタン	○	○	○	○	○8		○8(米国)	○	○	○	○	○	○			

部会	用途分類	原添番号	規格名称	第10版関連					安全性資料					国内外規格					備考	
				第10版案作成	第5版案作成	第4版案作成	第3版案作成	自社検証試験年度	食衛管理者問題	安全性評価	90日反復投与	遺伝毒性試験	他の安全性試験	J E C F A規格	F C C規格	E U規格	日本薬局方	外原規		薬蒸規
06	甘味料	100	グッタベルカ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	138	ゴム	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	139	ゴム分解糖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	142	ゴム糖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	144	サトウキビ糖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	152	シエラック糖	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	154	ジェルトン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	185	ソルバ	除	暫	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	186	ソルペンハ	除	暫	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	199	チクル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	203	チルテ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	205	ツヌー	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	208	低分子ゴム	除	暫	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	235	ニガエグツタ																	
06	甘味料	281	粉末モミガラ																	
06	甘味料	285	ベネズエラチクル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	307	ホホバ油	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	312	マスチック	暫	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	313	マッサラントハチヨコレート	除	暫	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	314	マッサラントハチラタ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	321	ミル	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	333	モクロー	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	356	レッシュデハバ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	363	ロシチンハ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
06	甘味料	364	ロシチン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
07	酵素	028	インマルトキキストラーゼ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
08	酸味料	029	イタコン酸	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
09	苦味料	027	イノアルファー苦味酸	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
09	調味料	041	塩水湖水低塩化ナトリウム液	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
09	苦味料	085	キナ抽出物																	
09	苦味料	086	キハダ抽出物																	
09	苦味料	120	ゲンチアナ抽出物	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
09	苦味料	124	糖業処理ナリジン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
09	苦味料	161	ジャマイカカウツア抽出物	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
09	調味料	182	粗製水塩化カリウム	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
09	苦味料	209	テオブロミン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
09	苦味料	236	ニガヨモギ抽出物	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
09	苦味料	357	レイシ抽出物	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		

部会	用途分類	既添番号	規格名称	第10版関連			安全性資料				国内外規格				備考		
				第10版案作成	第5版案作成	第4版主規格	第3社者検証試験年度	衛生管理者問題	安全性評価	90日反復投与	遺伝毒性試験	他の安全性試験	J E C F A 規格	F C C 規格		日本薬局方	外原規
10	乳化剤	127	酵素処理レシチン	○	○	○	○	○16	○16(小核試験)	○8(レシチン関連)	○	○	○	○	○	第9版レシチン	
10	乳化剤	172	スフィンゴ脂質	○	○	○			○20(小核試験)							日健栄協ダイズサボニン食品	
10	乳化剤	187	ダイオキシン	○	○	○											
10	乳化剤	195	胆汁末	○	○	○											
13	製造用剤	009	アスベルギルステラス難たん白質	○	○	○		○8	○8(復帰染色体)	○8(JECFA 米国)							
13	製造用剤	030	イナウラ抽出物							○8(基原等)							
13	製造用剤	043	オゾン	○	○	○	●(自家消費)	◎米									
13	製造用剤	043	オゾン水	○	○	○	●(自家消費)	◎米									
13	製造用剤	044	オリゴガラクチロニン酸					◎米									
13	製造用剤	046	オレガノ抽出物					◎米									
13	製造用剤	048	海藻抽出物	○				○8(基原等)									
13	製造用剤	052	花ごま炭	○	○	○		○8(鉱物)									
13	製造用剤	101	クリストバル石	○	○	○		○8(基原等)									
13	製造用剤	118	くん液	○	○	○		◎JECFA									
13	製造用剤	120	高級脂肪酸(カプリル酸)	○	○	○	○29	◎8									
13	製造用剤	120	高級脂肪酸(カプリン酸)	○	○	○	○29	◎8									
13	製造用剤	120	高級脂肪酸(ステアリン酸)	○	○	○	○26	◎8									
13	製造用剤	120	高級脂肪酸(パルミチン酸)	○	○	○	○26	◎8									
13	製造用剤	120	高級脂肪酸(ベヘニン酸)	○	○	○	○26	◎8									
13	製造用剤	120	高級脂肪酸(ミリスチン酸)	○	○	○	○29	◎8									
13	製造用剤	120	高級脂肪酸(ラウリン酸)	○	○	○	○29	◎8									
13	製造用剤	120	高級脂肪酸[全般]					◎8									
13	製造用剤	137	ゴマ柄区抽出物					○8(基原等)									
13	製造用剤	148	酸素	○				○8(日局)									
13	製造用剤	155	分岐シクロデキストリン	○	○	○		◎8									
13	製造用剤	158	シロ抽出物	○				◎15	○15(小核試験)								
13	製造用剤/強化剤	163	ウニ殻焼成カルシウム				○27	◎8									
13	製造用剤/強化剤	163	造礁サンゴ焼成カルシウム				○27	◎8									
13	製造用剤/強化剤	163	乳清焼成カルシウム				○27	◎8									
13	製造用剤	166	水素				●	○8(基原等)									
13	製造用剤	173	生石灰	○	○	○		JECFA									
13	製造用剤	176	ゼイン					◎8									
13	製造用剤	177	ゼオライト					○8(基原等)									
13	製造用剤	179	ゼビオライト					○8(基原等)									
13	製造用剤	184	ソノ柄区抽出物					○8(基原等)									
13	製造用剤	198	柿タンニン	○	○	○	●	◎8									長官指定告示物品規格柿タンニン
13	製造用剤	198	ミモザタンニン	○	○	○		◎8									
13	製造用剤	200	鹽素	○	○	○	●	◎8									

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

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

Table 2. 基原・製法等改正要望まとめ(過去4年間)

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

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

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



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

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法に関する研究

～<sup>13</sup>C-qNMRに関する基礎的検討～

研究分担者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

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

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 研究員

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 研究員

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 研究員

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

#### A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

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

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

試料には diethyl phthalate (DEP)標準物質(NMIJ CRM 4022-b, No. 125, 純度  $99.98\pm 0.01\%$ , 和光純薬工業(株)製), benzoic acid (BA) (020-00982, Lot. No. wKJ8374, 和光純薬工業(株)製), rutin trihydrate (Rutin) (Cat. No. R0035, Lot. No. SDLXE, 東京化成工業(株)製) ( $^1\text{H}$ -qNMR より anhydrate としての純度  $90.2\pm 0.3\%$ ), quercetin xH<sub>2</sub>O (Quercetin) (Cat. No. P0042, Lot. No. GM01, 東京

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

## B-2) 装置及び測定条件

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

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

## B-3) qNMR 試料作製

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

## B-4) 絶対量計算

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

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

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

## B-5) 測定方法

### B-5-1) $^{13}\text{C}$ -qNMR の測定条件の検討

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

#### B-5-1-1) データポイント数 (X\_point)

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

#### B-5-1-2) パルス繰り返し時間(Repetition\_time)及びフリップ角(X\_angle)

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

### B-5-1-3) 積算回数(Scans)

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

### B-5-2) スペクトル解析条件

#### B-5-2-1) 位相補正及びベースライン補正

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

#### B-5-2-2) 積分範囲

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

#### B-5-2-3) ゼロフィリング(ZEROFILL)

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

### B-5-3) $^{13}\text{C}$ -qNMRの定量性検証

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

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

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

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

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

## C. 結果及び考察

### C-1) データポイント数(X\_point)

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



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

### C-2) パルス繰り返し時間(Repetition\_time)

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

### C-3) 積算回数(Scans)

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

### C-4) 位相補正及びベースライン補正

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

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

### C-5) 積分範囲

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

### C-6) ゼロフィリング(ZEROFILL)

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

### C-7) 基礎条件の総括

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

### C-8) DMSO2 to benzoic acid / DEP

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

### C-9) DMSO2 to rutin / quercetin

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

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

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

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

### D. 結論

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

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

## E. 参考文献

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

## F. 研究業績

### 1. 学会発表

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

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

### 2. 論文発表

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

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

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

105-113 (2018).

**G. 知的財産権の出願. 登録状況**  
なし

Table 1 qNMR 測定で用いた試料

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

Table 2 qNMR 試料秤量値

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

Table 3 検討前の <sup>13</sup>C-qNMR 測定条件

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

Table 4 データポイント数を検討した <sup>13</sup>C-qNMR 測定条件

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

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

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

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

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

Table 7 積算回数を検討した <sup>13</sup>C-qNMR 測定条件

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

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

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

Table 9 ZEROFILL で検討した測定条件

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

Table 10 <sup>13</sup>C-qNMR 測定条件及び解析条件

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

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

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

Table 12 Benzoic acid / DEP chemical shift, S/N 比, *T*<sub>1</sub>,(sample3, Average, n = 3)

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

Table 13 <sup>1</sup>H-qNMR 測定条件 (sample4, 5, 6)

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



Table 14 <sup>13</sup>C-qNMR 測定条件 (sample 4)

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

Table 15 <sup>13</sup>C-qNMR 測定条件 (sample 5, 6)

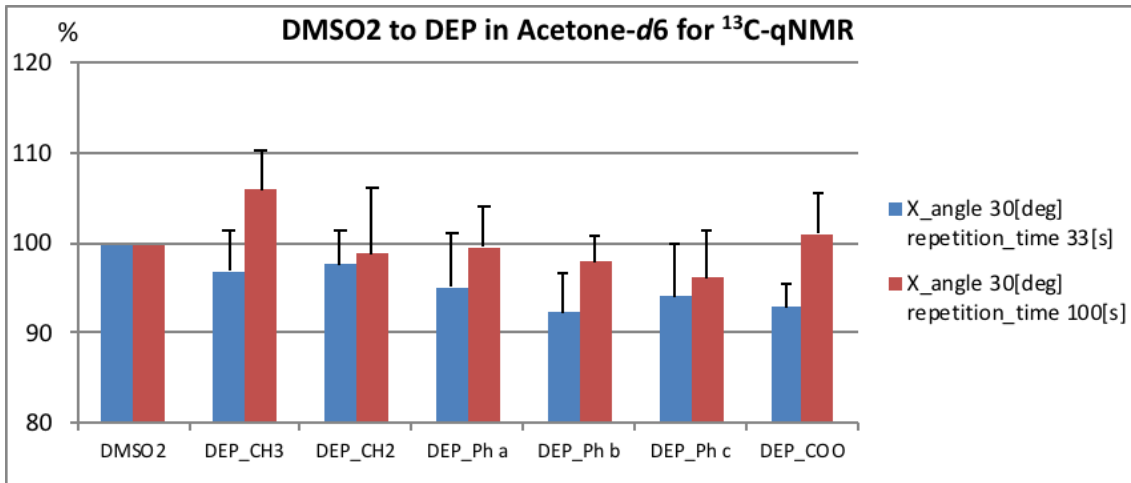
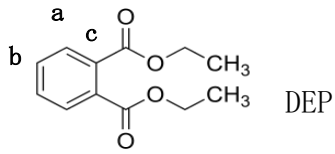
装置	ECZ600(JEOL)
Probe	JEOL CH UltraCOOL probe
Spectral width	-25—225 ppm
X_point	131072
Filter Factor	8
X_angle	90 [deg]
Repetition_time	100 [s]
Scan	32-512
スピニング	off
プローブ温度	30°C
重溶媒	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>
標準物質	DMSO2

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

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

Table 17 Rutin / quercetin  $T_1$ 

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



Average + SD, n=3, 積分範囲±0.30 ppm

Fig. 1 パルス繰り返し時間及びフリップ角の測定条件のばらつき

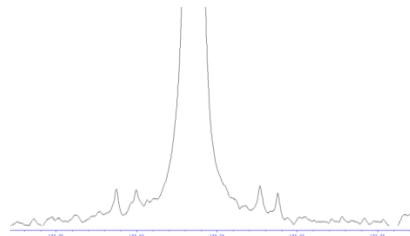


Fig. 2 DEP\_Ph c の <sup>13</sup>C サテライト

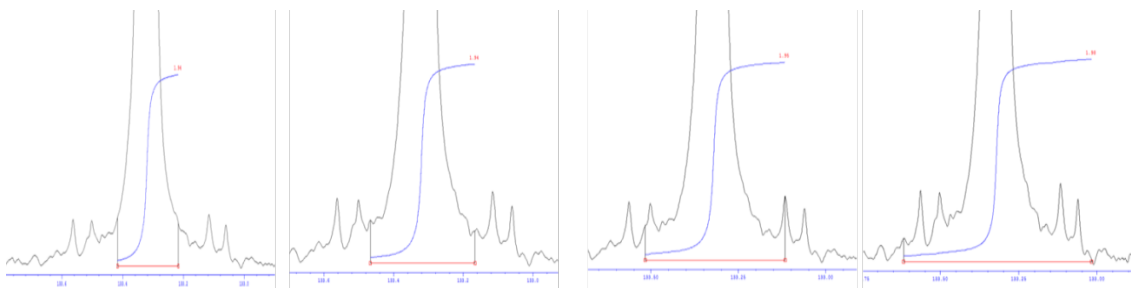
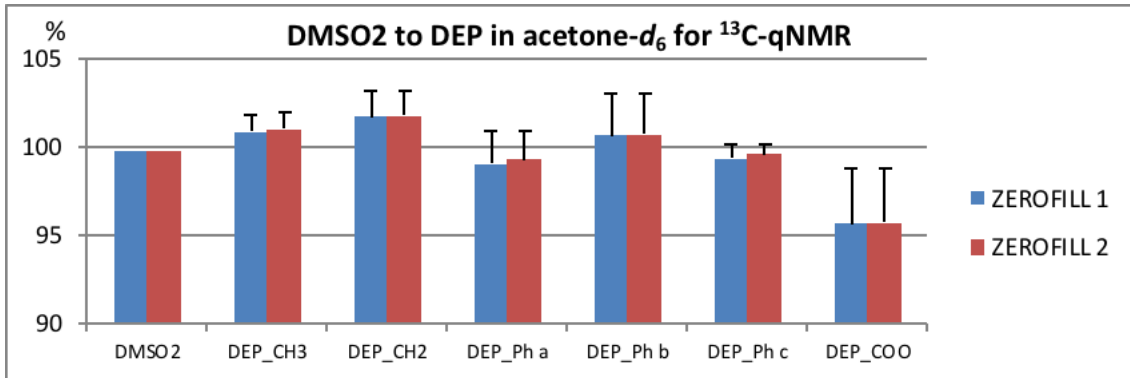
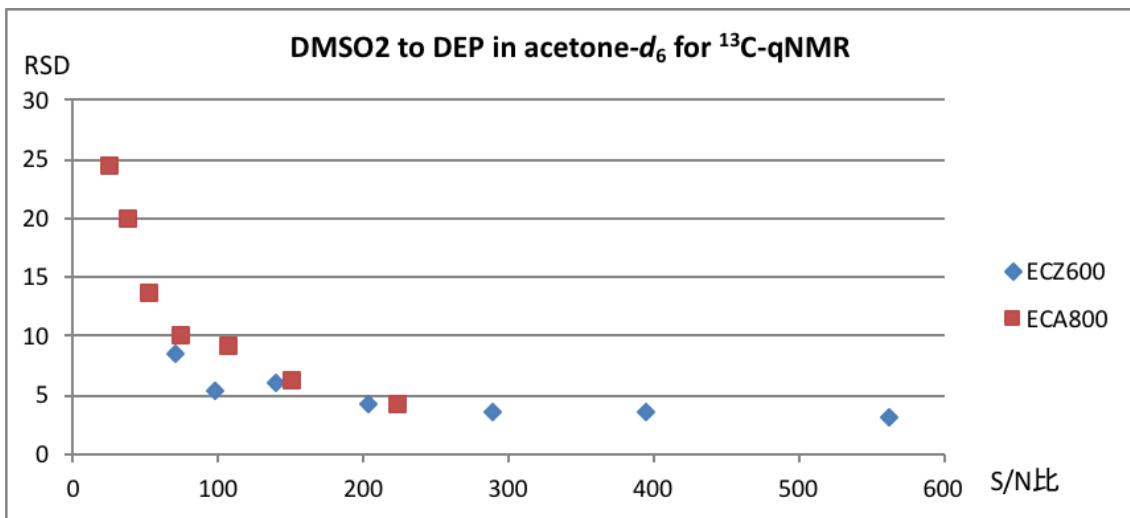


Fig. 3 Scan491, DEP\_c に対して±0.10, 0.15, 0.20, 0.30 ppm の積分範囲



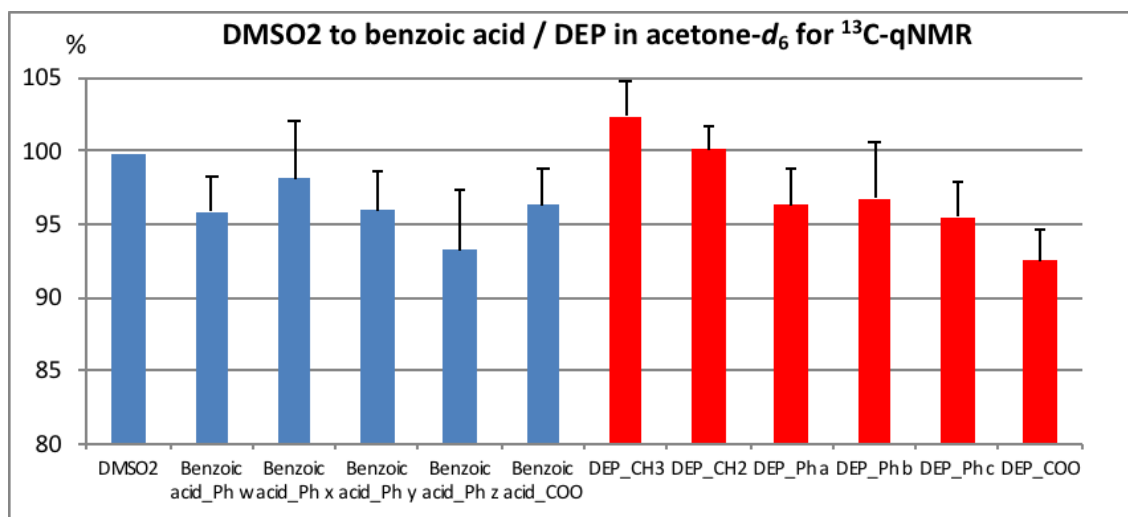
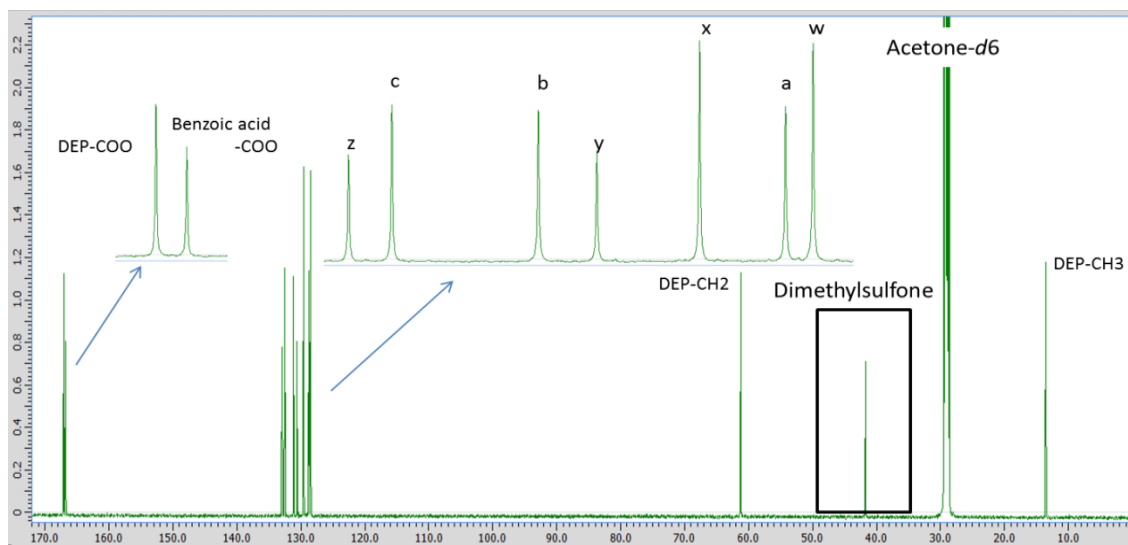
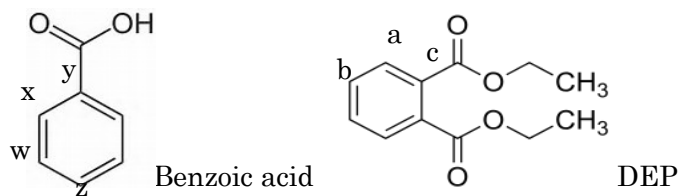
Average±SD, n = 3, 積分範囲 ±0.30ppm (sample 1)

Fig. 4 ZEROFILL 1,2 の比較



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

Fig. 5 S/N 比と RSD の関係



Average±SD, n = 3, (sample 3)

積分範囲±0.30ppm...benzoic acid\_Ph x, DEP\_CH<sub>3</sub>, DEP\_CH<sub>2</sub>

Fig. 6 DMSO2 to benzoic acid / DEP in acetone-*d*<sub>6</sub> for <sup>13</sup>C-qNMR

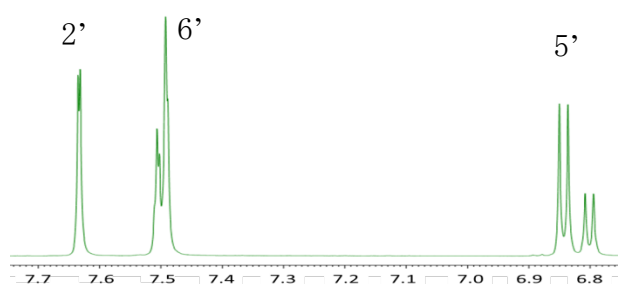
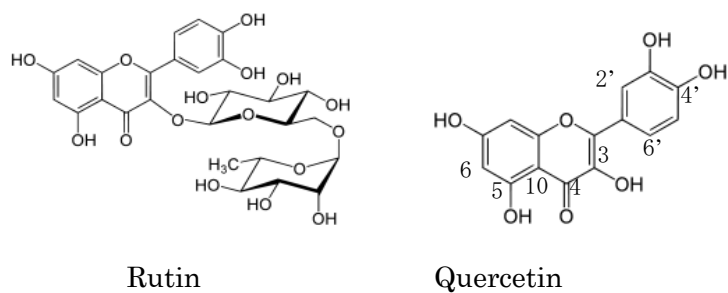


Fig. 7 DMSO2 to rutin / quercetin in DMSO- $d_6$  for  $^1\text{H}$ -qNMR (sample 5)

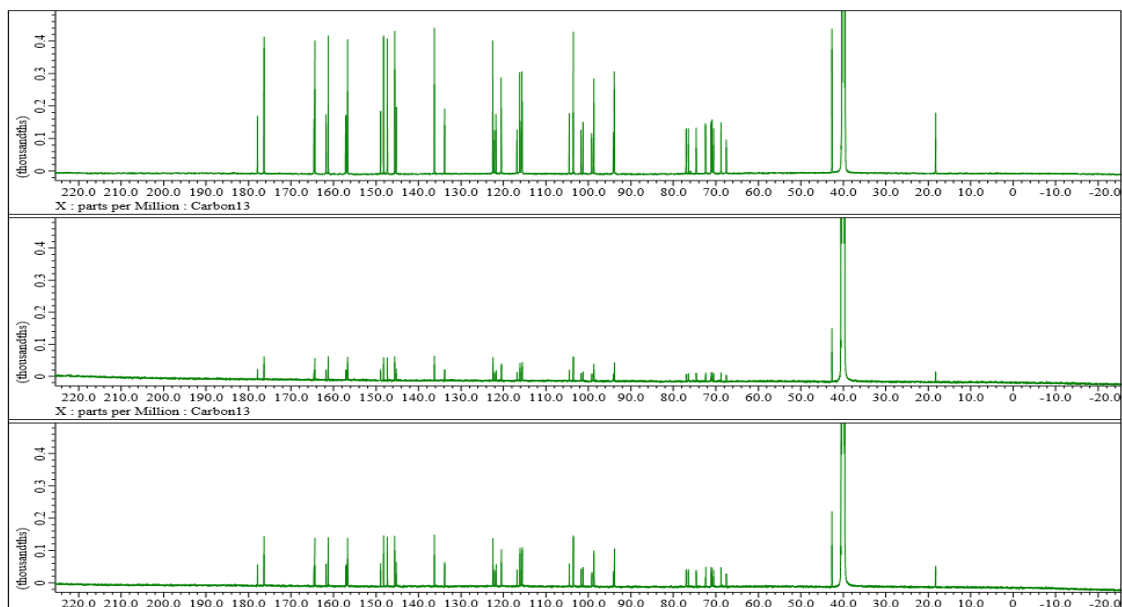
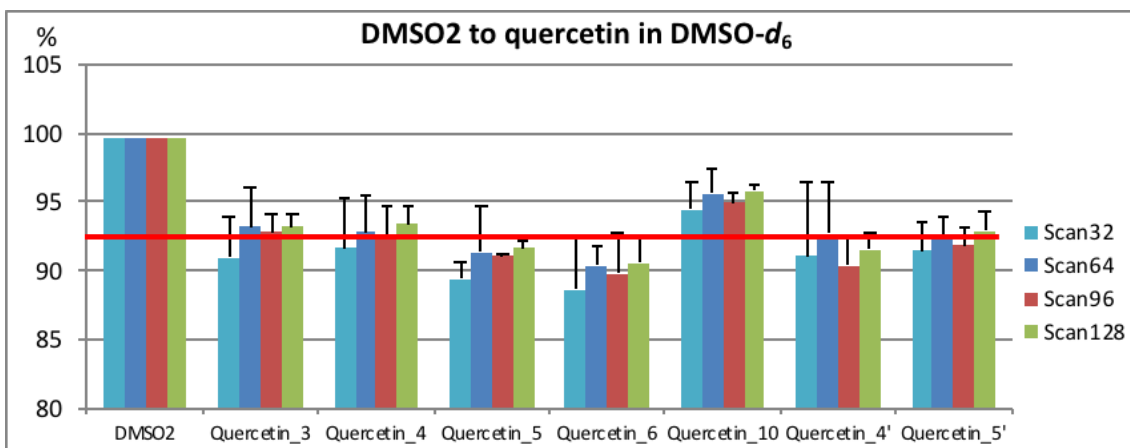
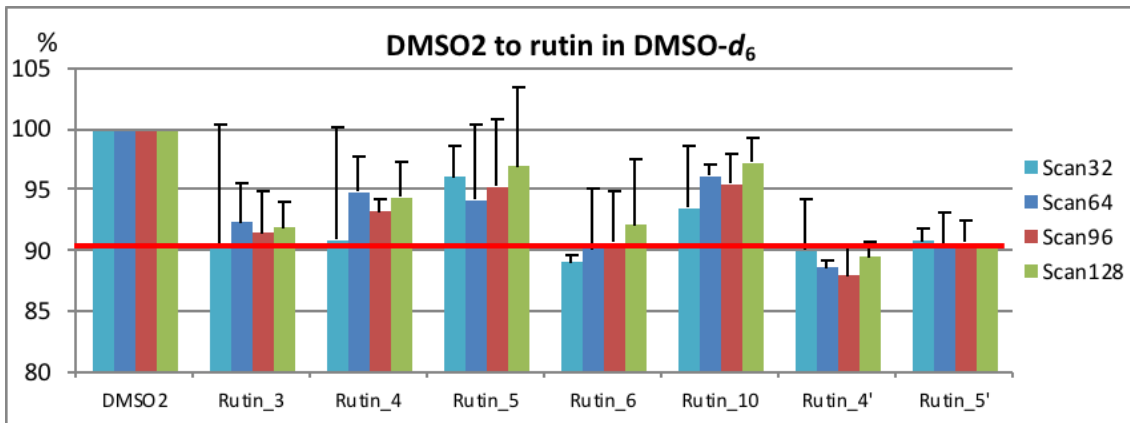
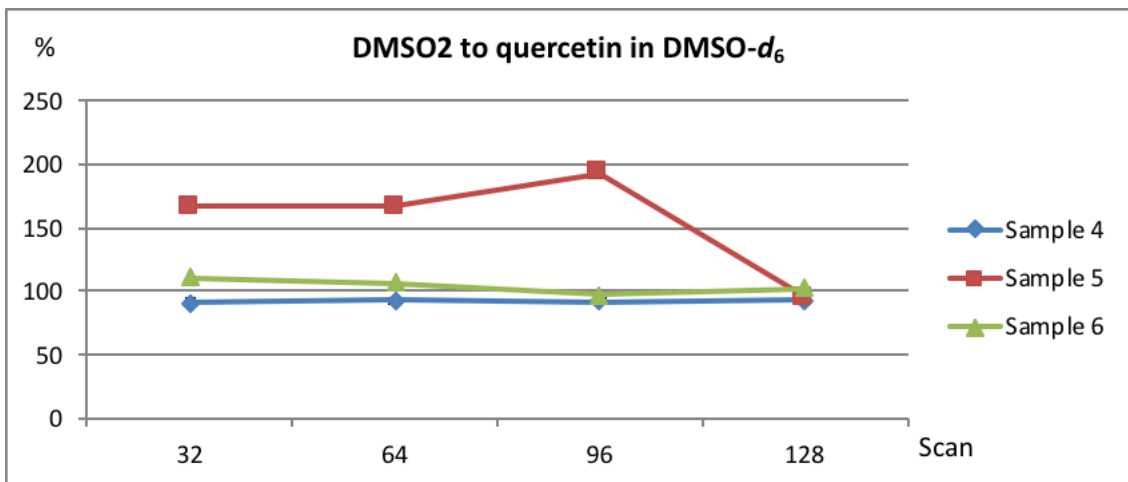
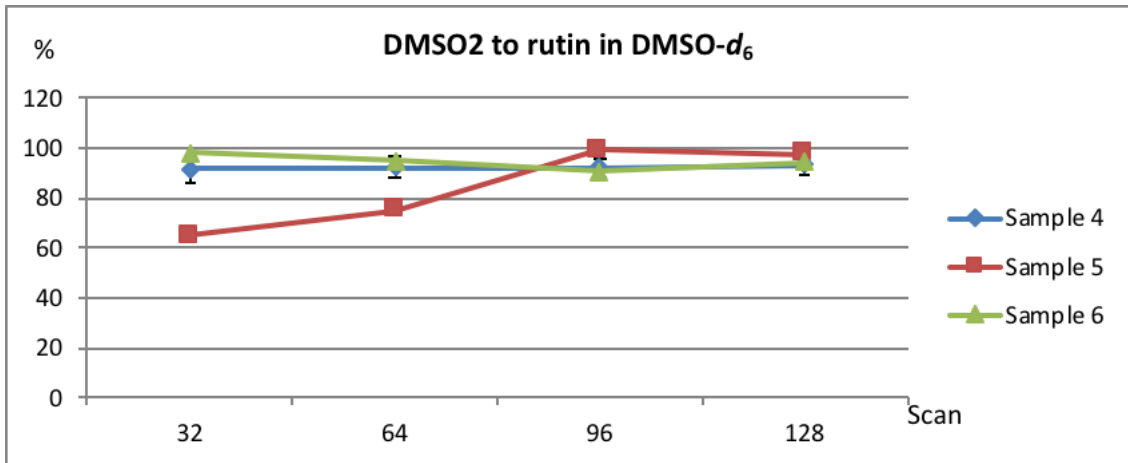


Fig. 8 DMSO2 to rutin / quercetin in DMSO- $d_6$  for  $^{13}\text{C}$ -qNMR (sample 4, 5, 6)



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

Fig. 9 Sample 4 の各シグナルと Scan の推移



Sample 4

Average±SD, n =3

積分範囲 ±0.20 ppm...6 位, 5'位

±0.30 ppm...3 位, 4 位, 5 位, 10 位, 4'位

Sample 5, 6

n =1

積分範囲 ±0.20 ppm...5 位, 6 位, 5'位

±0.30 ppm...3 位, 4 位, 10 位, 4'位

Fig. 10 Rutin 及び quercetin の濃度差による比較

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



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

既存添加物の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酵素の基原同定法の検討～

研究分担者 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

**研究要旨** 既存添加物酵素の本質であ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3品目16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・評価した。

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

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

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β-アミラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、セルラーゼ3品目16製品の既存添加物酵素を試料として用いた。内訳は、β-アミラーゼ2基原3試料、β-ガラクトシダーゼ2基原4試料、セルラーゼ5基原9試料。付帯する基原情報は、Tableに記載した。

## A. 研究目的

既存添加物として流通する酵素は、生産性の高さから、主に微生物を基原とする製品である。微生物の中には、有害物質を生産するものもあるため、販売業者・使用者が、製品の基原を把握することは重要である。しかしながら、酵素製品は菌体外に排出された酵素タンパク質を製剤化したものがほとんどであるため、遺伝子解析などによる基原の確認はほぼ不可能である。したがって、使用者は、販売業社が提供する情報に依存する以外に手段がない。そこで本研究では、流通する酵素製品から基原を確認する方法として、酵素の本質であるタンパク質から得たペプチドを指標成分とした基原の同定法を検討する。酵素3品目16製品を対象に、取得した基原情報と製品付帯情報に矛盾がないか、また基原同定法としての可能性について検討する。

## B. 研究方法

### B-1. 試料

### 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。

### 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  $\mu$ L に対し、0.5 M DTT 1  $\mu$ L 添加し、37°C で 90 分反応させた後、1M ヨード酢酸 1.2  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L に溶解し、0.5 mL チューブに 20 $\mu$ L ずつ分注した。それぞれのチューブに 1 $\mu$ g/ $\mu$ L の Trypsin 0.5 $\mu$ L と 0.2 $\mu$ g/ $\mu$ L の rLys-C 1 $\mu$ 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  $\mu$ L を添加して反応を止めた後、水 60  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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<sup>E</sup>, 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  $\mu$ 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. $\beta$ -アミラーゼ (EC 3.2.1.2)

【試料 1, 2】 *G. max* 由来  $\beta$ -アミラーゼ [AMYB\_SOYBN] がヒットし、製品に付帯する

基原情報 *G. max* と一致した。β-アミラーゼ以外に、レクチンなどもヒットしたが、すべて *G. max* 由来であった。

【試料 3】*H. vulgare* 由来 β-アミラーゼ [AMYB\_HORVU] および [AMYB\_HORVS] の 2 件ヒットし、製品に付帯する基原情報 *H. vulgare* と一致した。β-アミラーゼ以外のタンパク質もヒットしたが、すべて *H. vulgare* 由来であった。

試料に付帯する基原情報との一致率は 3/3 であった。

### C-2. β-ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23)

【試料 4~6】*A. oryzae* 由来 β-ガラクトシダーゼ [BGALA\_ASPOR] がヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. oryzae* と一致した。一方、*A. flavus* 由来 β-ガラクトシダーゼ [BGALA\_ASPFN] も同じ順位でヒットしていた。両アミノ酸配列の相動性を調べたところ、100%であった。したがって、これ以上、基原を絞り込むことができなかった。

【試料 7】データベース Swiss-Prot には、*B. circulans* 由来 β-ガラクトシダーゼが登録されていない。そこで、TrEMBL から“galactosidase”で検索・抽出した 80,323 件のアミノ酸配列をデータベースとして使用したところ、*B. circulans* 由来 β-ガラクトシダーゼ [E5RWQ2\_BACCI] がヒットした。

試料に付帯する基原情報との一致率は 4/4 であった。

### C-3. セルラーゼ (EC 3.2.1.4, EC 3.2.1.91)

【試料 8~10】セルラーゼ関連酵素エキソグルカナーゼが複数ヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. oryzae* と一致した。その他、ヘミセルラーゼに分類される酵素 (EC 3.2.1.8) もヒットしていた。

【試料 11】データベース Swiss-Prot には、*P. coccineus* 由来タンパク質の登録がない。そこで、TrEMBL から“cellulase”で検索・抽出した 79,571 件のアミノ酸配列データベース (*P. coccineus* 由来セルラーゼ関連タンパク質 30 件含む) を使用したが、何の結果も得られな

かった。本研究ではこの原因について明らかにすることができなかった。

【試料 12, 13, 16】セルラーゼ関連酵素エキソグルカナーゼがヒットした。しかしヒットした酵素の基原は、試料付帯情報の基原と属レベルで一致するものの、種レベルで矛盾が生じていた。この 3 試料に記載された基原に由来するセルラーゼ関連酵素は、Swiss-Prot 上に登録があったため、試料付帯情報が誤っている可能性がある。

【試料 14, 15】セルラーゼ関連酵素エキソグルカナーゼが複数ヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。

試料に付帯する基原情報との一致率は 5/9 であった。

## D. 結論

既存添加物酵素 β-アミラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、セルラーゼの 3 品目 16 製品を対象にして、製品から生成したペプチドのマスマスペクトルを 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、16 製品中 12 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。しかし、別の基原のタンパク質が同順位でヒットし、基原を一つに絞り込めないことも確認された。

セルラーゼ 4 製品で基原の矛盾が生じた。このうち 3 製品は、付帯情報の基原に由来するタンパク質がデータベースに登録されていたため、付帯情報が誤っている可能性がある。これについて、例えば、販売業者が遺伝子解析または形態観察で基原を同定したのか、その経緯を確認する必要がある。残りの 1 製品は、Mascot search から何の結果も得られなかった。

本研究で検討した方法は、Mascot Search の結果に対して十分吟味する必要がある。しかし、販売業者の情報提供に依存することなく、科学的に基原を推定できる可能性がある。特にデータベースの充実化とともに、本法は精巧な同定が期待できる。

## E. 研究発表

## 学会発表

- 1) 西崎雄三, 鈴木綾乃, 良永裕子, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 原園景, 木吉真人, 石井明子, 杉本直樹, 佐藤恭子, ペプチドを指標にした既存添加物の基原同定法の検討(1)～酵素製品について～, 日本食品化学学会 第24回 総会・学術大会 (2018年4月, 東京)
- 2) 鈴木綾乃, 西崎雄三, 良永裕子, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 原園景, 木吉真人, 石井明子, 杉本直樹, 佐藤恭子, ペプチドを指標にした既存添加物の基原同定法の検討(20)～酵素製品について～, 日本食品化学学会 第24回 総会・学術大会 (2018年4月, 東京)
- 3)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

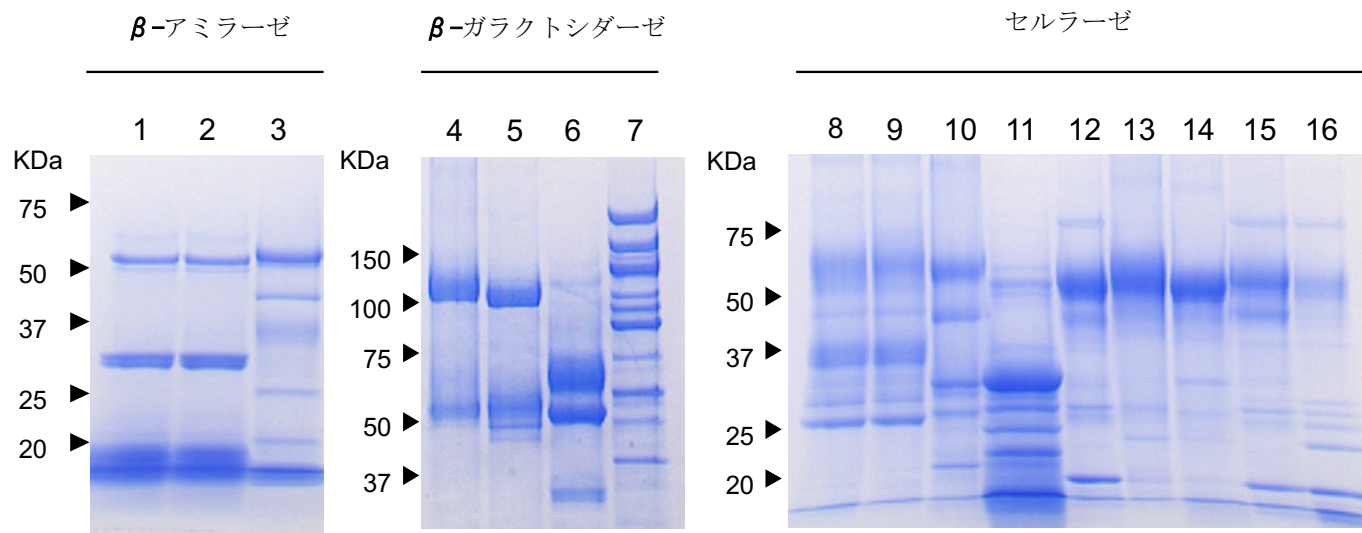


Fig. 1 酵素製品の SDS-PAGE の結果

Table 1  $\beta$ -アミラーゼの Mascot search の結果

試料付帯情報			Mascot searchの結果						
試料	基原	分子量	順位	基原	登録名	EC番号	タンパク質	分子量	カバー率
1	<i>Glycine max</i>	54, 30, 16 kDa	1	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-	Lectin	31 kDa	43%
			2	<i>G. max</i>	AMYB_SOYBN	EC 3.2.1.2	Beta-amylase	56 kDa	13%
			3	<i>G. max</i>	ITRA_SOYBN	-	Trypsin inhibitor A	24 kDa	35%
			4	<i>G. max</i>	KTII_SOYBN	-	Kunitz-type trypsin inhibitor KTII	23 kDa	31%
			5	<i>G. max</i>	IBB1_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	13 kDa	39%
			6	<i>G. max</i>	IBBD2_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor D-II	10 kDa	44%
			8	<i>G. max</i>	2SS_SOYBN	-	2S albumin	19 kDa	12%
			2	<i>Glycine max</i>	54, 30, 16 kDa	1	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-
2	<i>G. max</i>	ITRA_SOYBN				-	Trypsin inhibitor A	24 kDa	40%
3	<i>G. max</i>	AMYB_SOYBN				EC 3.2.1.2	Beta-amylase	56 kDa	18%
4	<i>G. max</i>	IBB1_SOYBN				-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	13 kDa	39%
5	<i>G. max</i>	KTII_SOYBN				-	Kunitz-type trypsin inhibitor KTII	23 kDa	26%
6	<i>G. max</i>	IBBD2_SOYBN				-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor D-II	10 kDa	44%
3	<i>Hordeum vulgare</i>	54, 42, 35, 25, 19 kDa	1	<i>H. vulgare</i>	AMYB_HORVU	EC 3.2.1.2	Beta-amylase	60 kDa	30%
			2	<i>H. vulgare</i>	AMYB_HORVS	EC 3.2.1.2	Beta-amylase	60 kDa	30%
			3	<i>H. vulgare</i>	NLTP1_HORVU	-	Non-specific lipid-transfer protein 1	13 kDa	58%
			5	<i>H. vulgare</i>	IAAB_HORVU	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMB	17 kDa	18%
			7	<i>H. vulgare</i>	SPZ4_HORVU	-	Serpin-Z4	43 kDa	13%
			8	<i>H. vulgare</i>	BSZ7_HORVU	-	Serpin-Z7	43 kDa	8%
			12	<i>H. vulgare</i>	IAAA_HORVU	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor Cma	16 kDa	16%

Table 2  $\beta$ -ガラクトシダーゼの Mascot search の結果

試料付帯情報			Mascot searchの結果						
試料	基原	分子量	順位	基原	登録名	EC番号	タンパク質	分子量	カバー率
4	<i>Aspergillus oryzae</i>	111, 55 kDa	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	42%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	42%
5	<i>Aspergillus oryzae</i>	105, 55 kDa	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	36%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	36%
6	<i>Aspergillus oryzae</i>	67, 51, 31 kDa	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	40%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	40%
7	<i>Bacillus circulans</i>	225, 146, 127 kDa	1	<i>B. circulans</i>	E5RWQ2_BACCI	-	Beta galactosidase	192 kDa	35%

Table 3 セルラーゼの Mascot search の結果

試料付帯情報			Mascot searchの結果						
試料	基原	分子量	順位	基原	登録名	EC番号	タンパク質	分子量	カバー率
8	<i>Aspergillus niger</i>	66, 38, 27, 25 kDa	1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	32%
			1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	32%
			2	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC 3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	42 kDa	37%
			3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	58 kDa	22%
			3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	58 kDa	22%
			4	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	21%
			5	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	21%
9	<i>Aspergillus niger</i>	66, 38, 27, 25 kDa	6	<i>A. niger</i>	CBHC_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	49 kDa	14%
			7	<i>A. niger</i>	XYNC_ASPNC	EC 3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	36 kDa	10%
			1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	32%
			1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	32%
			2	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC 3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	42 kDa	30%
			3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	58 kDa	22%
			3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	58 kDa	22%
10	<i>Aspergillus niger</i>	61, 45, 29, 25, 19 kDa	4	<i>A. niger</i>	CBHC_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	49 kDa	16%
			5	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	14%
			5	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	14%
			6	<i>A. kawachii</i>	GUNA_ASPKW	EC 3.2.1.4	Endoglucanase A	26 kDa	4%
			1	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNG	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	23%
			1	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	23%
11	<i>Pycnoporus coccineus</i>	30, 26 kDa	3	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	4%
			3	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	4%
			No data						
			No data						
12	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	53, 16 kDa	1	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	29%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	18%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	18%
			4	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	21 kDa	20%
13	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	54 kDa	4	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	4%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	33%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	33%
			1	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	33%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	20%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	20%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC 3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49 kDa	3%
14	<i>Trichoderma reesei</i>	55 kDa	4	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC 3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49 kDa	3%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC 3.2.1.4	Endoglucanase-4	36 kDa	3%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	34%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	34%
			1	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	34%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	15%
15	<i>Trichoderma viride</i>	56, 48, 17 kDa	2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	15%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC 3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49 kDa	3%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC 3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49 kDa	3%
16	<i>Trichoderma viride</i>	58, 29, 22, 19 kDa	1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPRU	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	29%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	18%
			2	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	21 kDa	23%
			2	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJQ	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24 kDa	20%
2	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJR	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24 kDa	20%			

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

（H29-食品-一般-007）

平成30年度研究分担報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～香辛料抽出物と他規格との基原生物の比較調査～

研究分担者 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

**研究要旨** 昨年度に引き続き、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、今後の規格作成に当たり、定義に関する情報収集を行った。香辛料抽出物の74種の基原を、同種を用いていると思われる天然香料の基原と比較したほか、海外における規格の有無を調査した。その結果、天然香料では半数の基原で香辛料抽出物と完全に一致した。また、日本の香辛料抽出物の基原として記載されているが、海外規格（アメリカ及び中国）と比較したときその記載がないものが、8基原存在した。「香辛料抽出物」の規格作成時には、他の規格の基原を考慮しながら、本研究で報告する情報を元に、基原生物について再検討を行う必要がある。

研究協力者

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  
中島 馨 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事は、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。このような背景から、昨年度は「香辛料抽出物」の74基原の和名及び学名について、一般的に認知されたデータベース（Ylist 及び Tropicos）をもとに再調査を行った。その結果、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。

一方、「香辛料抽出物」と似た基原物質を用いている食品添加物のひとつに天然香料がある。天然香料は、食品衛生法第四条第3項において、「動植物から得られたもの又はその混合物で、食品の着工の目的で使用される添加物」と定義されたものである。天然香料の基原物質名及び別名は、「天然香料基原物質リスト」<sup>1)</sup>に記載されており、香辛料抽出物として流通する食品添加物と基原生物が重なると思われるものが複数存在しているものの、リストには基原生物の学名は記載されておらず、どのような植物種が基原となっているかの詳細な情報は得ることはできない。しかし、今回、日本添加物協会の協力により、現在日本国内で流通していると思われる天然香料の原料について学名等の情報を得られた。これらの情報を香辛料抽出物の基原生物と比較することも、基原についての情報を整理する上で不可欠であると考えられる。

さらに、「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基原について天然香料の基原との比較、及び、昨年度に引き続き(2)海外規格の調査とその基原生物との比較を行った。

## 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。
  - a) 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、植物に関しては、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。
- 5) 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。

- 6) 和名学名の確認には、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・琉球大学〕）を中心に作成された。

## 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前年度に引き続き調査した。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) FCC11：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) GB2760-2014：中国食添使用基準

## C. 結果および考察

### C-1. 国内で流通する天然香料との比較

日本添加物協会から得られた、国内で流通する天然香料の原料について、香辛料抽出物の74基原の基原生物と比較した(表1)。なお、天然香料原料として報告された学名についても Tropicos で確認した上で比較した。

74基原のうち、トウガラシとパプリカについては香辛料抽出物と天然香料とで扱いが異なっていた。香辛料抽出物ではトウガラシと

パプリカは別の品目として扱われており、トウガラシの基原物質は「トウガラシ」と「キダチトウガラシ」であるのに対し、パプリカの基原物質は「トウガラシ」のみ(使用部位はトウガラシと同じ)と、区別されている。一方、天然香料では、トウガラシとパプリカは同一のものとして扱われているようであった。今回の調査では、香辛料抽出物のパプリカは天然香料のトウガラシとの比較することで考察した。

香辛料抽出物のうち、天然香料の基原と全く同じ種を用いていると思われるものは、ちょうど半数の38品目であった。また、両者を比較して、天然香料の方が幅広い基原を用いていると思われるものが26品目、香辛料抽出物のほうがより多くの種を基原としていると思われるものが4品目であった。さらに、香辛料抽出物と天然香料とで異なる植物種を基原としていると思われるものが6品目あった。以下に詳細を示す。

#### a) 香辛料抽出物のうち、天然香料の基原と全く同じ種を用いている品目

アサノミ、アニス、ウイキョウ、オールスパイス、カシヨウ、カレーリーフ、キャラウェイ、クミン、クレソン、クローブ、ゴマ、コリアンダー、サッサfras、サフラン、サルビア、サンショウ、シソ、ジュニパーベリー、ショウガ、スターアニス、セイヨウワサビ、セロリー、タマネギ、タマリンド、タラゴン、チャイブ、チャービル、デイル、ニンジン、パセリ、ハッカ、ヒソップ、フェネリグ、ペパーミント、ミョウガ、レモングラス、レモンバーム、ローズマリー

特筆すべきものについて、以下に示す。

○6. ウイキョウ：香辛料抽出物、天然香料ともに *Foeniculum* 属植物を基原としており、共通して基原種に挙げられているのは、「*Foeniculum vulgare* Mill.」である。天然香料では「*F. vulgare* Miller spp. *Piperita* (Ucria) Countinho」も基原種とされており、おそらく「*F. vulgare* subsp. *Piperitum* Cont. (*Foeniculum vulgare* Mill.のシノニム)」のことであると思われる。また、天然香料の原料として挙げられて

いる「*Foeniculum vulgare* var. *dulce* (Mill.) Batt. & Trab.」は Tropicos に記載がなかったが、「*Foeniculum vulgare* Mill.」のシノニムであるという見解もあり<sup>3)</sup>、すべて「*Foeniculum vulgare* Mill.」由来である可能性が示唆された。しかし、天然香料と比較する際にはより詳細な調査が必要である。

○31. サルビア：香辛料抽出物では「*Salvia lacandulaefolia*」が基原として挙げられているが、これに該当する学名が Tropicos にはない。しかし、天然香料原料の基原として示されている「*Salvia lavandulifolia* Vahl」の誤記と思われる。この推測どおりであれば、本品目については香辛料抽出物も天然香料も同じ基原種を用いているといえる。

○57. パセリ：Tropicos では、香辛料抽出物で基原として挙げられている「*Petroselinum sativum* Hoffm.」と天然香料で基原として挙げられている「*Apium petroselinum* L.」とはシノニムの関係にあるとされている。両者は、香辛料抽出物と天然香料の基原物質の記載には、「パセリ (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss)」ともシノニムの関係にあるとされているが、Tropicos においてはシノニムの関係にあるかどうか言及されていない。

#### b) 香辛料抽出物のうち、天然香料の方がより広い植物種を原料にしている品目

アサフェチダ、ウイキョウ、ウコン、オレガノ、カモミール、カラシナ、カルダモン、カンゾウ、クチナシ、ケシノミ、サボリー、シナモン、スペアミント、タイム、トウガラシ、ナツメグ、ニガヨモギ、ニジェラ、バジル、パプリカ、ホースミント、マジョラム、リンデン、ローズ、ローレル、ワサビ

以上に挙げたもののうち、アサフェチダ、ウコン、カンゾウ、シナモン、トウガラシ、ナツメグ、ニガヨモギ、ラベンダー、ローレルの9品目では、天然香料の基原として例示されている植物種は香辛料抽出物のものと全く同じだが、天然香料の場合はその近縁植物も含む旨の記載があり、原料種が広範囲になっている。この場合の近縁植物がどこまでを指すのかについては不明である。

そのほかの特筆すべきものについて、以下に示す。

○8. オレガノ：シソ科の「*Origanum vulgare* L.」は天然香料でも香辛料抽出物でも基原とされている。天然香料はクマツヅラ科の *Lippia* 属（イワダレソウ属）も基原としており、科の異なる植物が原料となっている。

○13. カモミール：香辛料抽出物、天然香料ともにキク科植物が基原として挙げられており、「*Anthemis nobilis* L.」や「*Matricaria chamomilla* L.」は両者で共通している基原種である。天然香料の原料として挙げられている「*Ormenis multicaulis*」は、Tropicos に該当する種が収載されていなかったが、「*Cladanthus mixtus* (L.) Chevall.」のシノニムであるという見解もあった<sup>4)</sup>。本種についての学名には諸説あり、天然香料において実際に原料となっているものが何なのか調査する必要があると思われる。

○15. カルダモン：香辛料抽出物、天然香料ともにショウガ科の「*Elettaria cardamomum* (L.) Maton var. *minuscula* Burkill」を基原としており、天然香料の場合は *Elettaria* 属にまで基原を広げている。なお、天然香料の原料和名として挙げられている「ショウズク」は「*Elettaria cardamomum* (L.) Maton」の果実から得られる生薬であり、その英名が「Cardamon」である<sup>5)</sup>。

○19. クチナシ：天然香料の原料として「コクチナシ」が挙げられているが、YList で確認したところ「コクチナシ」の学名は「*Gardenia jasminoides* Ellis var. *radicans* (Thunb.) Makino ex H.Hara」であり、「*Gardenia augusta* Merr.」の標準和名は収載されていなかった。Tropicos によると、「*Gardenia jasminoides* Ellis var. *radicans* (Thunb.) Makino ex H.Hara」と「*Gardenia augusta* Merr.」は異なる種であると思われる。「*Gardenia augusta* Merr.」は「クチナシ (*Gardenia jasminoides* J. Ellis)」のシノニムであった。

○23. ケシノミ：天然香料は、「ヒナゲシ (*Papaver rhoeas* L.)」も基原としている。

○39. スペアミント：香辛料抽出物も天然香料ともに「*Mentha spicata* L.」を基原としている

が、天然香料は「*Mentha cardiaca* J. Gerard ex Baker」という種も基原としている。

○64. ホースミント：香辛料抽出物と天然香料はともに「ケショウヤグルマハッカ *Monarda punctata* L.」及び「ヤグルマハッカ（標準）*Monarda fistulosa* L.」を基原としているが、天然香料はこれに加えて「ナガバハッカ *Mentha longifolia* (L.) Huds.」も基原として挙げられている。ナガバハッカは *Mentha* 属であり、他の基原物質と属が異なっている。

#### c) 香辛料抽出物のうち、香辛料抽出物の方がより広い植物種を基原にしている品目

アンゼリカ、ケーパー、コショウ、ニンニク

○5. アンゼリカ：天然香料の原料植物には含まれていない *Peucedanum* 属植物も基原物質として定義されている。

○24. ケーパー：基原として挙げられている学名は香辛料抽出物も天然香料も同じ「*Capparis spinosa* L.」だが、香辛料抽出物の基原種の和名であるフウチョウボクは「*Capparis micracantha* var. *henryi* (Matsum.) Jacobs」という別の学名が当てられており、別種であると考えられる。そのため、香辛料抽出物ではどちらの種を基原としているのか（あるいは両方なのか）、精査する必要がある。

○25. コショウ：香辛料抽出物と天然香料とではほぼ同じ植物種が基原であるが、香辛料抽出物では「*Piper officinarum* (Miq.) C. DC.」も基原として挙げられている。

○55. ニンニク：香辛料抽出物と天然香料とではほぼ同じ植物種が基原であるが、香辛料抽出物では「オオニンニク (*Allium sativum* L. var. *pekinense* (Prokh.) F.Maek.)」も基原として挙げられている。

#### d) 香辛料抽出物と天然香料とで基原が異なっていた品目

アジョワン、オレンジピール、カシヤ、シャロット、ソーレル、バニラ

○3. アジョワン：香辛料抽出物、天然香料ともに *Carum* 属植物を基原としているが、異なる種のものを用いていると思われた。しかし、天然香料で原料種とされている「*Trachyspermum ammi* Sprague」のシノニムのひとつに、香辛料

抽出物の基原である「*Carum ajowan* Benth. & Hook.f.」があるとする見解もあり<sup>2)</sup>、詳細な検討の必要がある。

○10. オレンジピール：香辛料抽出物、天然香料ともにミカン科 *Citrus* 属を基原としており、とくに「*Citrus sinensis* (L.) Osbeck」は共通の基原種である。しかし、香辛料抽出物では「*C. japonica* Thunb.」「*C. reticulata* Blanco」が基原とされているのに対し、天然香料では「*C. aurantium* L.」が基原とされている。*Citrus* 属は種間の関係が複雑であり、実態について調査する必要があると思われた。

○12. カシヤ：香辛料抽出物はクスノキ科の「*Cinnamomum cassia* (L.) D. Don」が基原だが、天然香料はマメ科の「*Cassia fistula* L.」が基原であり、全く異なっている。既存添加物品目リストには、香辛料抽出物カシヤの別名としてカシヤフィスチュラが挙げられており、これは天然香料の基原である *Cassia fistula* L. のカタカナ表記と同じである。香辛料抽出物のカシヤとして流通しているものの中に、基原の混同が見られる可能性もあり、詳細な検討が必要と考えられる。

○35. シャロット：香辛料抽出物、天然香料ともに *Allium* 属の植物を基原としており、植物和名としても「シャロット」を挙げているが、両者が挙げている学名が異なる種のようなものである。

○42. ソーレル：香辛料抽出物では「スイバ (*Rumex acetosa* L.)」が、天然香料では「ギンギシ (*Rumex japonicus* Houtt.)、ナガバギンギシ (*Rumex crispus* L.)、エゾノギンギシ (*Rumex obtusifolius* L.)」がそれぞれ基原となっており、どちらも *Rumex* 属ではあるが種の異なる植物が挙げられている。香辛料抽出物と天然香料とでは原料として使われている植物のうち重複しているものはない。

○59. バニラ：香辛料抽出物、天然香料ともに「バニラ」を基原としているが、これに加えて香辛料抽出物では「タヒチバニラ」を、天然香料では「ニシインドバニラ」をそれぞれ基原としている。

## 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、米国（FCC11及びCFR Title21）及び中国（GB2760-2014）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。F調査した結果を表2示す。

既存添加物である香辛料抽出物のうち、今回調査した規格に記載されていなかった品目は、アサノミ、アジョワン、カレーリーフ、クレソン、シャロット、ソーレル、ミョウガ、ワサビの8品目であった。

また、今回調べたどの規格でもほぼ同じ基原種が用いられていた品目は、アサフェチダ、ウイキョウ、ウコン、オールスパイス、カシヤ、カモミール、カンゾウ、キャラウェイ、クミン、クローブ、ケシノミ、ケーパー、ゴマ、コリアンダー、サッサfras、サフラン、サボリー、サルビア、シソ、ショウガ、スターアニス、セイヨウワサビ、セロリー、タマネギ、タマリンド、タラゴン、チャイブ、トウガラシ、ナツメグ、ニガヨモギ、ニジェラ、ニンジン、バジル、パセリ、パプリカ、ヒソップ、フェネリーグ、ペパーミント、リンデン、レモングラス、レモンバーム、ローズマリー、ローレルの43品目であり、半数以上であった（表3）。このほかに特筆すべきものについて以下に詳細を示す。

○4. アニス：どの規格も、日本で基原としている「アニス (*Pimpinella anisum* L.)」を基原として挙げているが、FCC11のみ、「トウシキミ (*Illicium verum* Hook.f.)」も基原生物として挙げられている。香辛料抽出物においては、*Illicium verum* Hook.f.はスターアニスの基原種としているが、FCC11のSpice Oleoresinではアニスと区別していない。

○8. オレガノ：香辛料抽出物とCFRでは*Origanum*属が基原とされており、FCC11も同様であるが、FCC11はこれに加えて「*Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link」も基原植物として挙げられていた。一方、中国では*Lippia*属のみが基原として挙げられており、国によっ

て基原種がかなり異なっていた。なお、日本の天然香料のオレガノの基原には*Lippia*属が含まれており、中国の現状も考慮されていると思われた。

○10. オレンジピール：各国少しずつ基原が異なっているが、「*Citrus sinensis* (L.) Osbeck」「*Citrus reticulata* Blanco」の2種はどの国も基原として挙げられていた。

○11. カシヨウと32. サンシヨウ：香辛料抽出物はカシヨウとサンシヨウの2つの品目に分けられているが、中国では基原が「*Zanthoxylum*属」となっており、特に区別はされていない。

○14. カラシナ：各国「クロガラシ (*Brassica nigra* (L.) W.D.J. Koch)」を含む*Brassica*属を基原としていたが、香辛料抽出物のみ属の異なる「*Sinapis alba* L.」も基原として挙げている。

○15. カルダモン：日本以外の国は、「*Elettaria cardamomum* (L.) Maton」を基原としているが、日本はこの変種 (*varietas*) を基原として挙げている。Tropicosには両者がシノニムであるという記述はなく、変種であっても別の種として扱われている例 (*Mentha arvensis* var. *piperascens* と *M. arvensis* など) もあることから、精査の必要があると思われる。

○25. コシヨウ：日本以外の国は、「*Piper nigrum* L.」のみを基原として挙げているが、日本は「インドナガコシヨウ *Piper longum* L.」なども基原としている。インドナガコシヨウは天然香料の原料としても使われている。

○34. シナモン：各国少しずつ基原が異なるが、「セイロンニッケイ *Cinnamomum verum* J.Presl (*Cinnamomum zeylanicum* Blumeはシノニム.)」はどの国も基原として挙げられていた。

○36. ジュニパーベリー：「*Juniperus communis* L.」を基原として挙げている国が多いが、日本ではこのほかに「セイヨウネズ *Juniperus communis* L. var. *communis*」を、FCC11では「*Juniperus communis* var. *erecta* Pursh」をそれぞれ基原に挙げている。どちらも*Juniperus communis* L.とシノニムであるという記載がTropicosになく、精査が必要である。

○39. スペアミント：香辛料抽出物、CFRでは「*Mentha spicata* L.」のみが基原として挙げら

れているが、FCCと中国では「*Mentha cardiaca* L.」も基原として挙げられている。中国では、使用基準が記載されている GB2760-2014 では *Mentha cardiaca* L. を基原としているが、その成分規格である GB1886.36-2015 (食品添加剤 留兰香油) では *Mentha spicata* L. が基原とされており、混乱があると思われる。なお、日本の天然香料の基原はどちらの種も用いられているようである。

○55. ニンニク：FCC11 と中国は「*Allium sativum* L.」のみが基原としているが、香辛料抽出物には同属異種も複数基原に含まれている。

○65. マジョラム：各国少しずつ基原が異なっているが、「*Majorana hortensis* Moench」はどの国も基原として挙げられている。香辛料抽出物と中国ではこれに加えて「*Origanum majorana* L.」が、FCC11 は「*Thymus mastichina* L.」が基原として挙げられている。いずれもシソ科である。

#### 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 種の基原を用いていることがその名称から予想される天然香料について、示された和名及び学名の妥当性を YList 及び Tropicos をもとに検討したところ、半数程度が全く同じ植物種を基原としていることが明らかとなった。その一方で、同じ名称であっても香辛料抽出物と天然香料とで異なる基原を用いているものもあった。さらに、昨年度の FCC や CFR の調査に加え、中国食添使用基準 (GB2760-2014) とも比較し、学名まで精査したところ、日本独自の基原のものや、日本では 2 つの基原として区別して扱われているものが他国ではひとつの基原として示されているものもあった。前年度・今年度の調査で、基原によっては規格案作成の際に詳細な検討が必要と思われるものが浮き彫りになった。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検討を行う必

要がある。

#### E. 参考文献

- 1) 消費者庁通知「食品衛生法に基づく添加物の表示等について」消食表第 377 号，平成 22 年 10 月 20 日。
- 2) The Plant List <  
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2438394>>(accessed 2018-12-21).
- 3) The Plant List <  
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2906377>>(accessed 2018-12-21).
- 4) The Plant List <  
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-91453>>(accessed 2019-1-17).
- 5) 厚生労働省．第十七改正日本薬局方．2016.

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物の基原同定手法に関する研究

～RMS を用いた single-reference HPLC 法によるペリルアルデヒドの定量～

研究分担者 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

**研究要旨** 既存添加物の品質確保には有効成分量のモニタリングが重要であり、多くの場合、その手法としてクロマトグラフィーが採用されている。正確な定量には純度の明らかな定量用標準品が必須であるが、天然由来である既存添加物において分析対象物質と同一の定量用標準品の入手は困難な場合が多く、既存添加物の規格化にあたりひとつの大きな障害となっている。我々はこれまで、本課題への対策として、定量NMRとHPLC/PDAを組み合わせ、相対モル感度（relative molar sensitivity: RMS）を用いた定量法（以下、RMS法）を確立し提案してきた。本研究では、既存添加物や生薬としても用いられるシソに含まれるペリルアルデヒドについて、RMS法を適用することで、易分解性の定量用標準品を用いることなく正確な定量が可能であるか、複数機関で検討したので報告する。

研究協力者

丸山剛史 株式会社ツムラ

五十嵐靖 株式会社ツムラ

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

中島馨 国立医薬品食品衛生研究所

供給時に純度の値付けがなされていても、易分解性の化合物の場合、定量分析使用時の正確な純度が不明なものもある。正確な成分定量は、食品や医薬品の質を確保するうえで重要であるが、純度の明らかな標準物質の入手が困難なためにその品質を正しく評価できない場合も多い。

#### A. 研究目的

天然物を由来とする食品添加物や生薬は、それらに含まれる主成分や指標成分を定量することで安全性や有効性などの品質を担保している。定量法には、分離能と感度に優れたHPLCやGCなどのクロマトグラフィーが用いられることが多い。通常、クロマトグラフィーによる定量では、分析対象成分の濃度とピークの応答量との相関関係を示す検量線の作成が必要となるため、分析対象と同一で純度の明らかな定量用の標準物質を入手しなければならない。しかし、定量したい成分について必ずしも標準物質が供給されているとは限らず、天然由来成分にいたっては市販試薬すら流通していない場合もある。また、標準物質として供給されているもので

このような課題に対し、我々はひとつの解決策として、相対モル感度（relative molar sensitivity: RMS）を用いたシングルリファレンス HPLC 法（以下、RMS 法）を考案し研究を重ねてきた。分析種の量（濃度）と検出器の応答量に比例関係があるクロマトグラフィーの検出器においては、分析種によって単位量あたりの応答量が異なる。RMS は、基準物質（single reference）と分析対象物質の2化合物間における単位モルあたりの応答量の比をとった値であり、分析条件が同一であれば、RMS は化合物間で固有の値である。そのため、基準物質に対する分析対象物質のRMS が明らかな場合、基準物質を内標準物質として用い、基準物質及び分析対象物質の検出器における応答値と RMS の関係から、分析対

象物質と同一の標準物質を必要としないクロマトグラフィーを利用した定量分析が可能である。

また、RMSの算出においても、定量NMR ( $^1\text{H-qNMR}$ )を組み合わせることで標準物質を使用することなく正確な値を求めることが可能である。 $^1\text{H-qNMR}$ は、クロマトグラフィーと比べて分離能と検出感度は劣るが、化合物の定量性に優れている分析手法である。 $^1\text{H-qNMR}$ は、複数の化合物が試料液中に存在し、それら由来のシグナルが完全に分離しているとき、1つの化学シフト軸上にみられる化合物間のシグナル面積比が、それぞれの「物質質量×水素数」の比として原理的に正確に反映される<sup>1,2)</sup>。この原理を利用すれば、基準物質と分析対象物質の混合標準液を調製し、 $^1\text{H-qNMR}$ とクロマトグラフィーの両方にそれを付し、クロマトグラフィーの検出器における両化合物の応答比を、 $^1\text{H-qNMR}$ から得られるモル比で除することにより、正確なRMSが算出される。このように、RMS法には分析対象物質の標準物質が必要ない。我々はこれまでの研究で、本法を天然物由来のさまざまな食品添加物における有効成分の定量に応用してきた<sup>3-5)</sup>。

本研究では、RMS法のさらなる可能性を探索するため、易分解性が報告されているペリラルアルデヒド<sup>6)</sup>の定量法への応用について検討した。ペリラルアルデヒドは、シソ (*Perilla frutescens* Britton)の精油成分のひとつである。シソは食品として広く摂取されているほか、既存添加物であるシソ抽出物や第十七改正日本薬局方 (JP17) 収載生薬であるソヨウの基原植物である。とくにソヨウについては、JP17においてペリラルアルデヒドの含量規格が定められており、その定量法として紫外可視分光光度計を検出器とした外標準法によるHPLC法が示されている。定量には、ペリラルアルデヒドの標準物質が必要であり、アルゴンが封入されたアンプル入りのものが局方生薬試験用 (定量用標準物質) として販売されている。しかし、この定量用標準物質は高価であるうえ、ペリラルアルデヒドはメタノ

ール中においてとくに不安定であるため<sup>6)</sup>、定量用の標準溶液を専事調製する必要がある。天然物由来の医薬品や添加物の安全性・有効性を確保するためには、指標成分や主成分の正確な定量が不可欠であるが、現状ではそのための検査に費用と手間がかかりすぎ、正確な定量が困難であるという課題がある。そこで、ジフェニルスルホンを経典物質としたRMS法をペリラルアルデヒドの定量に応用することで課題の解決を試みたので報告する。

## B. 研究方法

### 試料・試薬

本研究に用いた試料及び試薬を表1に示す。表1記載のもの以外の試薬は、すべて特級あるいはHPLC用グレードのものを用いた。

### ジフェニルスルホンに対するペリラルアルデヒドのRMSの算出

ペリラルアルデヒド約4 mg、ジフェニルスルホン約10 mg、及びDSS-*d*<sub>6</sub>標準物質約2 mgをそれぞれ精密に量り、10 mL容のスクリーバイアルにあわせて入れ、DMSO-*d*<sub>6</sub> 4 mLを正確に加えて溶かし、NMR測定用試料溶液とした。この液0.6 mLを外径5 mmのNMR試料管に封入した。調製は3回行い、それぞれNMR測定用試料溶液1~3とし、表2に示す条件で $^1\text{H-qNMR}$ により測定した。得られた $^1\text{H-qNMR}$ データを解析ソフト (Purity Pro qNMR ANALYSIS Software, 日本電子製) で解析し、式(1)を用いて物質質量比 ( $R_n$ ) を求めた。

$$R_n = \frac{n_{\text{PRL}}}{n_{\text{DS}}} = \frac{S_{\text{PRL}}}{S_{\text{DS}}} \times \frac{H_{\text{DS}}}{H_{\text{PRL}}} \quad (1)$$

ただし、PRL、ペリラルアルデヒド; DS、ジフェニルスルホン;  $n$ 、物質質量 (mol);  $S$ 、シグナル面積;  $H$ 、 $S$ に由来するプロトン数。

次に、NMR測定用試料溶液1~3について1 mLを正確に量り、メタノールを加えて正確に250 mLに定容したものを、HPLC測定用試料溶液1~3とした (ペリラルアルデヒド濃度約4  $\mu\text{g/mL}$ 、ジフェニルスルホン濃度約10  $\mu\text{g/mL}$ )。これらについて、表3に示す条件で



HPLC/PDA による測定を行った。得られたピーク面積  $A$  から、式 (2) を用いて応答比 ( $R_r$ ) を求めた。

$$R_r = \frac{A_{PRL}}{A_{DS}} \quad (2)$$

得られた物質比 ( $R_n$ ) 及び応答比 ( $R_r$ ) を式 (3) に代入し、ジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの RMS を求めた。

$$RMS = \frac{R_r}{R_n} \quad (3)$$

### ソヨウ中のペリルアルデヒド含量の算出

#### 1) 試料溶液及び標準溶液の調製

試料調製：JP17「ソヨウ」の定量法<sup>7)</sup>に準じて行った。すなわち、ソヨウの粉末約 0.2 g を精密に量り、メタノール 20 mL を加えて 10 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取した。残留物にさらにメタノール 20 mL を加え、同様に操作した。全抽出液を合わせ、メタノールを加えて正確に 50 mL に定容し、試料溶液とした。

標準溶液：ペリルアルデヒド約 10 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 100 mL に定容した。この液 10 mL を正確に量り、メタノールを加えて正確に 100 mL に定容したものをペリルアルデヒド標準溶液とした。ジフェニルスルホンについても同様に操作し、ジフェニルスルホン標準溶液とした。

#### 2) RMS 法による定量

1) で作製した試料溶液と標準溶液を表 3 に示す条件で HPLC/PDA で測定した。試料溶液中に見られるペリルアルデヒド標準溶液と保持時間が一致するピークについて、試料溶液の該当ピーク面積  $A_{PRL}$  とジフェニルスルホン標準溶液のピーク面積  $A_{DS}$  から、式 (4) によりソヨウ中のペリルアルデヒド含量 ( $X_{PRL}$  (mg)) を求めた。

$$X_{PRL} = \frac{A_{PRL}}{A_{DS}} \times \frac{m_{PRL}}{m_{DS}} \times W_{DS} \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{RMS} \quad (4)$$

ただし、 $m$ , 分子量;  $W_{DS}$ , ジフェニルスルホンの秤量値 (mg)。

#### 3) 従来法 (JP17) による定量

ペリルアルデヒド含量定量に先立ち、使用

したペリルアルデヒド試薬の純度を、先述の NMR 測定用試料溶液 1~3 を <sup>1</sup>H-qNMR にて測定することにより算出した。すなわち、DSS-*d*<sub>6</sub> のメチル基由来のプロトンシグナル (s, CH<sub>3</sub>×3) を基準 (δ 0 ppm) としたとき、このシグナルとペリルアルデヒドの δ 9.45 ppm のシグナル (s, CH) を用いて、式 (5) によりペリルアルデヒド試薬の純度を算出した。

$$P_{PRL} = \frac{S_{PRL}}{S_{DSS}} \times \frac{H_{DSS}}{H_{PRL}} \times \frac{M_{PRL}}{M_{DSS}} \times \frac{W_{DSS}}{W_{PRL}} \times P_{DSS} \quad (5)$$

ただし、 $S$ , シグナル面積;  $H$ ,  $S$  に由来するプロトン数;  $M$ , モル質量 (g/mol);  $W$ , 秤量値 (g);  $P$ , 純度 (wt%)。

次に、1) で作製した試料溶液と標準溶液を表 3 に示す条件で HPLC/PDA で測定した。試料溶液中に見られるペリルアルデヒド標準溶液と保持時間が一致するピークについて、試料溶液のピーク面積  $A_T$  とペリルアルデヒド標準溶液のピーク面積  $A_S$  から、式 (6) によりソヨウ中のペリルアルデヒド含量 ( $X_{PRL}$  (mg)) を求めた。

$$X_{PRL} = W_{PRL} \times P_{PRL} \times \frac{1}{100} \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{20} \quad (6)$$

ただし、 $W_{PRL}$ , 定量用ペリルアルデヒドの秤取量 (mg);  $P_{PRL}$ , qNMR から算出した定量用ペリルアルデヒドの純度 (%)。

## C. 結果と考察

### RMS の算出

#### 1) 基準物質の選定

RMS 算出にあたり、分析対象物質に対する適切な基準物質を選定することは、正確な定量のために不可欠である。基準物質としては、安定かつ高純度、安価であり、分析対象物質と同じ吸収極大 ( $\lambda_{max}$ ) であるものが適している。また、ソヨウ中のペリルアルデヒド定量に応用することを想定し、現在 JP17 に記載されている定量法の HPLC 条件と同条件で分析可能なものが望ましい。以上の条件を満たす化合物として、いくつかの化合物を精査した結果、ジフェニルスルホンが適当と考えられた。そこで、ペリルアルデヒドとジフェ

ニルスルホン を JP17 の HPLC 条件で chromatograph A にて分析すると、ジフェニルスルホン、ペリルアルデヒドの順に溶出した (図 1 (A)). このときのペリルアルデヒドの  $\lambda_{\max}$  は 234 nm, ジフェニルスルホンの  $\lambda_{\max}$  は 235 nm であった (図 1 (B)). さらに, ジフェニルスルホン及びペリルアルデヒドのテーリングファクタはそれぞれ 1.01 及び 1.03 であり, ピーク形状は良好であった. また, ジフェニルスルホンの市販試薬 (東京化成工業製 Lot. 8NBTM-KT) について  $^1\text{H-qNMR}$  により純度を算出したところ, 99.98% であった. 以上から, RMS 算出におけるペリルアルデヒドの基準物質として, ジフェニルスルホンは妥当であると考えられた.

#### 2) 物質質量比の算出についての検討

ジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの正確な RMS を算出するために, まず  $^1\text{H-qNMR}$  スペクトル上で両化合物が良好に分離し, 定量に適したシグナルの有無を確認した (図 2).  $^1\text{H-qNMR}$  の定量用シグナルとしては, 目的のシグナルが他のシグナルと十分に分離しており, かつ含まれている不純物のシグナルと重ならないものを選択することが重要である. qNMR 用基準物質である DSS- $d_6$  のメチル基を  $\delta 0$  ppm としたとき, ペリルアルデヒドにおいては 7 位のプロトンに由来する  $\delta 9.45$  ppm が定量用シグナルとして適当と考えられた.  $\delta 7.00$  ppm のシグナルも他のシグナルと十分に分離していたが, 不純物と思われるもののピークとの分離が悪かった. 他方, ジフェニルスルホン由来のシグナルはどれも定量用シグナルとして適当と思われたため, 2, 6, 2', 6' 位のプロトンに由来する  $\delta 7.99$  ppm を定量用シグナルとして選定した. これらシグナルを用いて, NMR 測定用試料溶液 1~3 についてジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの物質質量比を算出することとした. なお, 上述のシグナルはすべて S/N 比が 500 以上であり, NMR 測定用試料溶液調製時の両化合物の秤取量は妥当であると考えられた.

#### 3) 応答比の算出についての検討

本法をソヨウ中のペリルアルデヒドの定量に応用することを想定すると, JP17 におけるペリルアルデヒド含量規格値の付近で, 正確な定量が可能であることが必須である. そのため, RMS 算出に用いる応答比は規格値付近で測定したものをを用いるのが妥当と判断し, ペリルアルデヒド濃度が約  $4 \mu\text{g/mL}$  となるよう NMR 測定用試料溶液 1~3 を希釈したものをを用いることとした. 正確な RMS を得るには, PDA 検出器のスペクトル分解能の影響を受けにくい  $\lambda_{\max}$  における応答量から応答比を求めることがよいと考えられるため, ペリルアルデヒドの  $\lambda_{\max}$  である 234 nm で測定するのが好ましい. しかし, 現行のペリルアルデヒド定量法において, 検出波長は 230 nm と定められている. さらに, 定量時の検出器としては PDA 検出器だけでなく可変波長 (VWD) 検出器も用いられている. そこで, 本研究では PDA, VWD 両検出器を用いて, 230 nm 及び 234 nm における応答比を算出することとした.

#### 4) RMS の算出

ジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの RMS を, 機関 1 及び機関 2 の計 2 機関でそれぞれ算出した. 得られたペリルアルデヒドのジフェニルスルホンに対する物質質量比 ( $R_n$ ) を表 4 に, 応答比 ( $R_r$ ) と RMS を表 5 に示す. さらに, RMS は測定波長によって異なるため波長ごとにまとめたところ (表 6), ジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの RMS は, 230 nm では 1.034, 234 nm では 0.976 であった. 本研究では, 測定装置・カラム, 試験者, 実施研究室などの条件が異なっていたが (表 1-3), 同一とみなせる試料を用い同一の手法で算出された RMS である. 厚生労働省が示す, 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン<sup>8)</sup>に準じ, RMS の併行精度及び室間精度を一元配置分散分析により算出したところ, 234 nm 測定時で併行精度 (RSD%) は 0.76%, 室間精度 (RSD%) は 1.16% であった. また, 230 nm では併行精度 (RSD%) は 0.85%, 室間精度 (RSD%) は 1.33% であった.

以上の結果は、RMS 法の研究結果<sup>3-5)</sup>と比較しても許容範囲のばらつきと考えられ、試験手法に問題はないと思われた。

他方、得られた RMS の正確さについても検討した。RMS 算出で使用したペリルアルデヒド試薬について、<sup>1</sup>H-qNMR で求めたペリルアルデヒドの純度を、ジフェニルスルホンを経験物質とする RMS 法で求めた純度と比較した (表 7)。なお、<sup>1</sup>H-qNMR におけるペリルアルデヒドの純度は、式 (5) に従い算出した。また、RMS 法では、230 nm と 234 nm の両波長について、本研究で得られた RMS を用いて算出した。両手法におけるペリルアルデヒド試薬の純度の差は、測定波長が 230 nm のとき 0.98% 以下、234 nm のとき 1.28% 以下であった。RMS 法を用いて算出した試薬の純度は <sup>1</sup>H-qNMR で求めた純度とほぼ一致しており、本研究で得られた RMS の正確性は高いと考えられた。

#### JP17 記載の従来法と RMS 法との比較

JP17 において、ソヨウ中のペリルアルデヒド含量の測定には、局方生薬試験用 (定量用・薄層クロマトグラフィー用) ペリルアルデヒドを外部標準とした定量法が採用されている。この従来法と、本研究で検討した RMS 法とで、ソヨウに含まれるペリルアルデヒドの含量をそれぞれ算出し、得られた値を比較した。なお、より正確な値を算出するために、従来法で用いる外部標準のペリルアルデヒドは、<sup>1</sup>H-qNMR で求めた純度で補正した。

3 ロットのソヨウについて、従来法 (<sup>1</sup>H-qNMR 補正あり) と RMS 法とでペリルアルデヒド含量を求めたところ (表 8)、どのロットでも RMS 法で求めた含量がわずかに大きな値となったが、その差は最大でも 0.011% であった。JP17 ではソヨウの乾燥物に対し 0.08% 以上のペリルアルデヒドを含むことと規定されているが、規格値により近いペリルアルデヒドを含むソヨウ 1 では、従来法 (<sup>1</sup>H-qNMR 補正あり) と RMS 法との差が最大で 0.005% であった。以上より、両定量法で求めた含量にほとんど差異はないことが示され

た。

#### D. 結論

本研究では、易分解性があり標準物質の調達が困難であるペリルアルデヒドの定量について、ジフェニルスルホンを標準物質とした RMS 法を複数の機関で検討することにより、その実現可能性を探索した。様々な要因が異なる環境下で算出した RMS の RSD は 1.2% 程度であり、真度は 99.9~101.4% であった。ソヨウ中のペリルアルデヒド含量について、RMS 法から得られた結果は、<sup>1</sup>H-qNMR 補正を行った従来法と比較してほとんど差異はなかった。これらの結果は研究機関による違いがなかったため、正確な RMS が算出されれば、HPLC による定量分析経験者であれば誰にでも、分析対象物質の認証標準物質等を必要とせずに、<sup>1</sup>H-qNMR と同等の HPLC による定量分析が可能であると思われた。

現行の JP17 でも用いられているペリルアルデヒド標準品の易分解性を考慮すると、本研究で提案したジフェニルスルホンを標準物質とした RMS 法は、その正確性はもちろんコストの点からも優れた定量法であり、成分規格試験としても相応しい手法といえる。

#### E. 参考文献

- 1) 末松孝子. 有機化合物の純度をはかる一核磁気共鳴法 (NMR) を用いた SI (国際単位系) トレーサブルな定量分析技術— 化学と生物. **52**, 473-477 (2014).
- 2) 大槻崇. qNMR の食品添加物分析への応用. 化学と生物. **52**, 622-626 (2014).
- 3) 西崎雄三, 多田敦子, 石附京子, 伊藤裕才, 小野田絢, 杉本直樹, 穂山浩. モル吸光係数比を利用したジャマイカカシア抽出物中のクアシンおよびネオクアシンの新規定量法の開発. 日本食品衛生学雑誌, **56**, 185-193 (2015).
- 4) 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. 日本食品衛生学雑誌, **59**, 1-10 (2018).

- 5) Nishizaki Y., Sato-Masumoto N., Mikawa T., Nakashima K., Yamazaki T., Kuroe M., Numata M., Ihara T., Ito Y., Sugimoto N., Kyoko S.: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Addit. Contam. A*, **35**, 838-847 (2018).
- 6) 瀧野裕之, 川原信夫, 木内文之. 生薬ソヨウの成分含量測定法とペリルアルデヒドの安定性に関する検討. *生薬学雑誌*, **64**(1), 7-14 (2010).
- 7) 厚生労働省告示第 64 号 (2016) “第十七改正日本薬局方” 平成 28 年 3 月 7 日.
- 8) 厚生労働省医薬食品局職食品安全部長”食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて” 平成 19 年 11 月 15 日, 食安発第 1115001 号 (2007).

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

- 1) 増本直子: 相対モル感度を利用したシングルリファレンス HPLC 分析法の応用. 第 55 回全国衛生科学技術協議会年会 (2018.11)(横浜市).
- 2) 中島馨, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物トウガラシ水性抽出物中の抗菌成分の特定. 第 55 回全国衛生化学技術協議会 (2018.11)(横浜市).
- 3) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: フォトダイオードアレイ検出器による測定値のばらつきの原因. 第 55 回全国衛生科学技術協議会年会 (2018.11)(横浜市).
- 4) 増本直子, 西崎雄三, 丸山剛史, 五十嵐靖, 中島馨, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦,

井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度を利用したペリルアルデヒド定量法の検討. 第 7 回定量 NMR クラブ (2018.12)(東京).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 本研究に用いた試料及び試薬

	機関 1	機関 2
ソヨウ (局方品)	ソヨウ 1	ソヨウ 2, ソヨウ 3
ペリルアルデヒド	局方生薬試験用 (定量用・薄層クロマトグラフィー用) 和光純薬工業 (Cat. No. 161-24161)	局方生薬試験用 (定量用・薄層クロマトグラフィー用) <sup>a)</sup>
ジフェニルスルホン	東京化成工業 (Cat. No. P0231) qNMR 純度 : 99.98% <sup>b)</sup>	東京化成工業 (Cat. No. P0231) qNMR 純度 : 100.00% <sup>b)</sup>
qNMR 用基準物質 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid- <i>d</i> <sub>6</sub> sodium salt (DSS- <i>d</i> <sub>6</sub> )	和光純薬工業 (Cat. No. 044-31671) certified purity 92.3% (Lot. AWH6585)	和光純薬工業 (Cat. No. 044-31671) certified purity 92.4% (Lot. TWK6177)
ジメチルスルホキシド- <i>d</i> <sub>6</sub> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	MERCK (Cat. 1.03424.010)	ACROS ORGANICS (Cat. 320760075)

a) Aldrich 製品を機関 2 にて精製し, JP17 規格に適合させたもの

b) DSS-*d*<sub>6</sub> のメチル基を  $\delta$  0 ppm としたときの  $\delta$  7.99 ppm のシグナルを用い, <sup>1</sup>H-qNMR によりそれぞれの機関で定量したもの

表 2 <sup>1</sup>H-qNMR 測定条件

	機関 1	機関 2
装置	JNM-ECA600 (JEOL Ltd.)	JNM-ECA600 (JEOL Ltd.)
プローブ	ROYAL プローブ(JEOL Ltd.)	ROYAL プローブ(JEOL Ltd.)
デジタル分解能	0.25 Hz	
観測スペクトル幅	-5~15 ppm	
スピニング	オフ	
パルス角	90°	
<sup>13</sup> C 核デカップリング	あり	
遅延時間	60 秒	
積算回数	8 回	
ダミーキャン	2 回	
測定回数	非連続 3 回	
測定温度	室温 (一定温度)	

表 3 HPLC/PDA 測定条件

Chromatograph No.	機関 1			機関 2
	A	B	C	D
装置	Series 1100&1200 (Agilent)	Prominence (Shimadzu)	1260 Infinity LC (Agilent)	Prominence
検出器 (PDA)	Series 1200 G1315B	SPD-M20A	G4212B	SPD-M20A
(VWD)	Series 1100 G1314A	SPD-20A	G1314F	SPD-20A
カラム	Wakopak wakosil-II 5C18RS (4.6×150 mm, 5μm)	Cosmosil 5C18-MS-II (4.6×150 mm, 5μm)	TSKgel ODS-80Ts QA (4.6×150 mm, 5μm)	YMC-pack ODS-A (4.6×150 mm, 5μm)
カラム温度	40°C			
移動相	水/アセトニトリル混液 (13 : 7)			
流量	1.0 mL/min			
注入量	10 μL			
分析時間	40 分			
検出波長	230 nm または 234 nm			

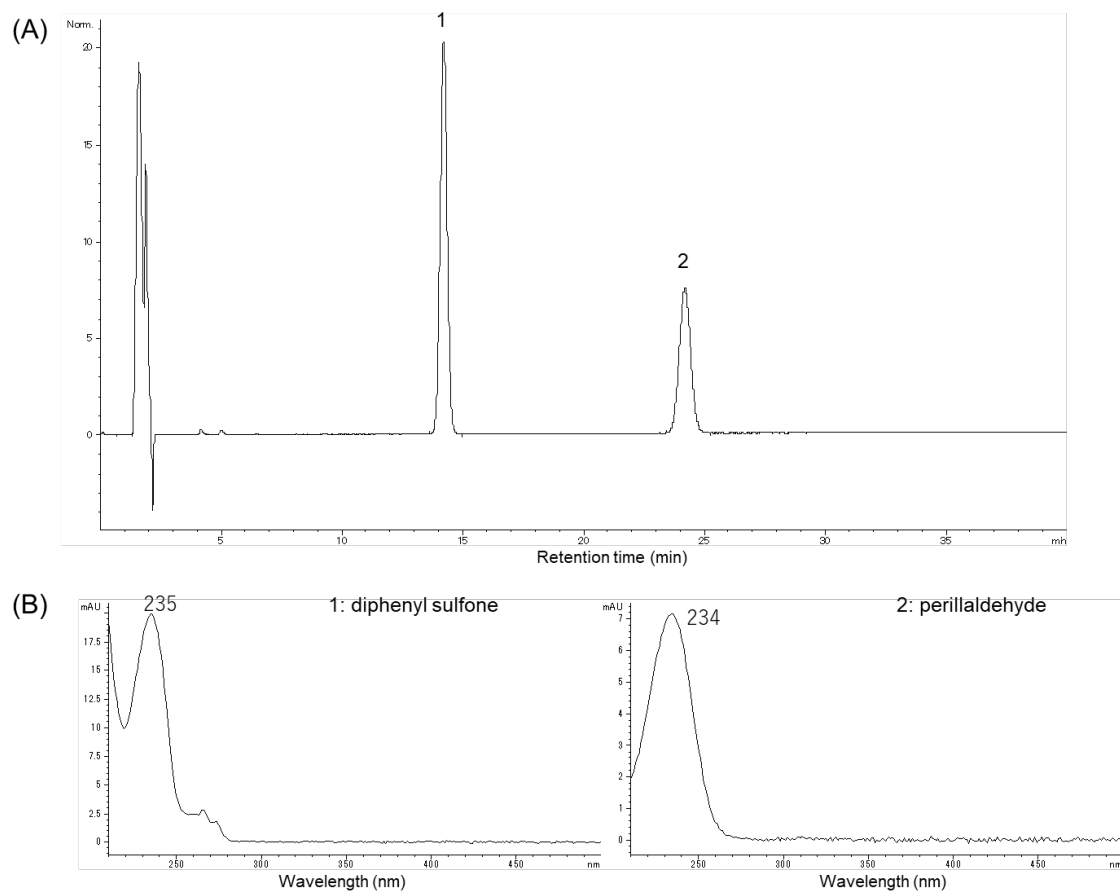


図1 ペリラルデヒドとジフェニルスルホンの HPLC 分析結果. (A) Chromatograph A にて分析した際の両化合物のクロマトグラム. ピーク 1 はジフェニルスルホン, ピーク 2 はペリラルデヒド. (B) 両化合物の吸収スペクトル. 数値は吸収極大波長.



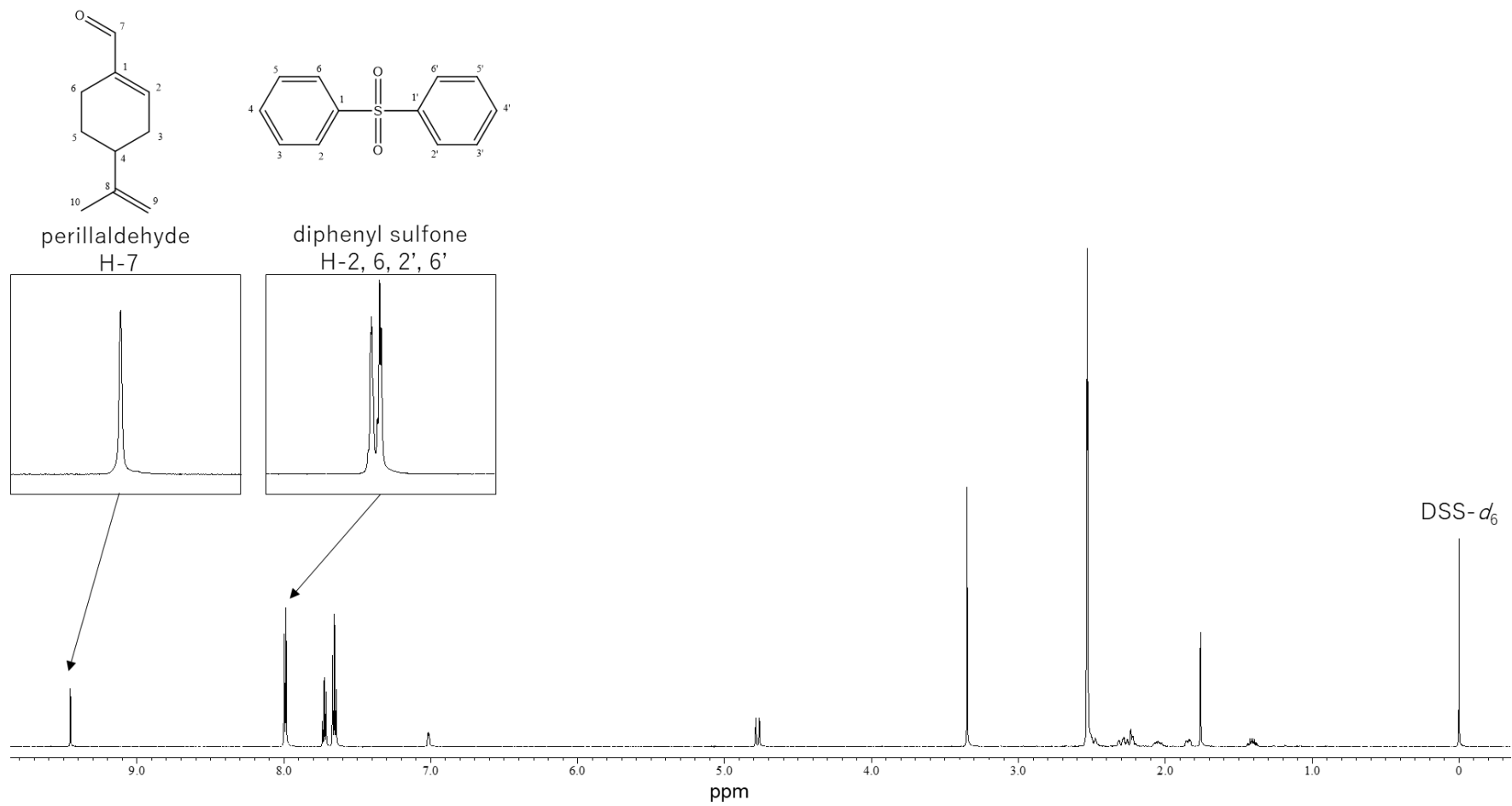


図2 NMR 測定用試料溶液（ペリラルデヒドとジフェニルスルホンの混合液）の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル。  
 拡大して示しているのは定量に用いたシグナル。

表 4 <sup>1</sup>H-qNMR により算出した各試料溶液中のペリルアルデヒド (PRL) のジフェニルスルホン (DS) に対する物質質量比

	機関 1			機関 2		
	DS	PRL	物質質量比	DS	PRL	物質質量比
	H2, H6, H2', H6'	H7	( $R_n$ )	H2, H6, H2', H6'	H7	( $R_n$ )
	$a$	$b$	$b/(a/4)$	$a$	$b$	$b/(a/4)$
試料溶液 <sup>NMR1</sup>	100	15.40 ± 0.07	0.616	100	13.61 ± 0.02	0.545
試料溶液 <sup>NMR2</sup>	100	15.03 ± 0.07	0.601	100	13.22 ± 0.02	0.529
試料溶液 <sup>NMR3</sup>	100	16.74 ± 0.06	0.670	100	14.23 ± 0.05	0.569

表 5 ペリルアルデヒド (PRL) のジフェニルスルホン (DS) に対する RMS

機関 1									
装置	検出器	検出波長		試料溶液 <sup>LC1</sup>	試料溶液 <sup>LC2</sup>	試料溶液 <sup>LC3</sup>	平均	RSD (%)	
Chromatograph A	PDA	230 nm	$R_r$	0.634 ± 0.001	0.620 ± 0.002	0.681 ± 0.003	—		
			RMS	1.030	1.031	1.017	1.026	0.724	
		234 nm	$R_r$	0.594 ± 0.002	0.580 ± 0.002	0.645 ± 0.000	—		
			RMS	0.969	0.964	0.962	0.965	0.338	
		VWD	230 nm	$R_r$	0.629 ± 0.001	0.615 ± 0.001	0.684 ± 0.000	—	
				RMS	1.022	1.023	1.021	1.022	0.097
	234 nm		$R_r$	0.596 ± 0.002	0.585 ± 0.001	0.646 ± 0.001	—		
			RMS	0.968	0.973	0.965	0.969	0.392	
	Chromatograph B	PDA	230 nm	$R_r$	0.627 ± 0.001	0.611 ± 0.001	0.680 ± 0.001	—	
				RMS	1.017	1.016	1.016	1.016	0.097
			234 nm	$R_r$	0.595 ± 0.001	0.581 ± 0.001	0.648 ± 0.002	—	
				RMS	0.966	0.967	0.967	0.967	0.059
VWD			230 nm	$R_r$	0.638 ± 0.002	0.622 ± 0.001	0.694 ± 0.002	—	
				RMS	1.035	1.034	1.036	1.035	0.108
		234 nm	$R_r$	0.602 ± 0.003	0.587 ± 0.002	0.654 ± 0.000	—		
			RMS	0.977	0.976	0.977	0.977	0.072	

表5 つづき

機関2								
装置	検出器	検出波長		試料溶液 <sup>LC1</sup>	試料溶液 <sup>LC2</sup>	試料溶液 <sup>LC3</sup>	平均	RSD (%)
Chromatograph C	PDA	230 nm	$R_r$	0.567±0.001	0.551±0.001	0.594±0.001	—	
			RMS	1.041	1.042	1.045	1.043	0.204
		234 nm	$R_r$	0.534±0.002	0.520±0.002	0.559±0.001	—	
			RMS	0.980	0.983	0.982	0.982	0.163
	VWD	230 nm	$R_r$	0.570±0.000	0.555±0.000	0.597±0.000	—	
			RMS	1.046	1.050	1.049	1.048	0.202
		234 nm	$R_r$	0.530±0.001	0.516±0.000	0.555±0.000	—	
			RMS	0.974	0.976	0.975	0.975	0.103
Chromatograph D	PDA	230 nm	$R_r$	0.560±0.002	0.548±0.003	0.588±0.002	—	
			RMS	1.028	1.036	1.034	1.033	0.390
		234 nm	$R_r$	0.531±0.002	0.519±0.002	0.556±0.002	—	
			RMS	0.975	0.982	0.978	0.978	0.340
	VWD	230 nm	$R_r$	0.571±0.001	0.557±0.000	0.588±0.002	—	
			RMS	1.049	1.053	1.051	1.051	0.197
		234 nm	$R_r$	0.543±0.000	0.528±0.001	0.567±0.001	—	
			RMS	0.996	0.998	0.997	0.997	0.095

表 6 波長ごとのジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの RMS

	230 nm	234 nm
平均値	1.034	0.976
併行精度 (RSD%)	0.85	0.759
室間精度 (RSD%)	1.33	1.16

表 7 <sup>1</sup>H-qNMR 及び RMS 法から算出したペリルアルデヒド試薬の純度

	<sup>1</sup> H-qNMR	RMS 法	
		230 nm	234 nm
Chromatograph A (PDA)	95.07 wt%	96.05 wt% (+0.98%)	95.58 wt% (+0.51%)
Chromatograph B (PDA)		95.09 wt% (+0.02%)	95.80 wt% (+0.73%)
Chromatograph C (PDA)	94.01 wt%	93.92 wt% (-0.09%)	95.29 wt% (+1.28%)
Chromatograph D (PDA)		93.96 wt% (-0.05%)	94.34 wt% (+0.33%)

括弧内の数値は、<sup>1</sup>H-qNMR による純度値との差を表している。

表 8 JP17 記載の従来法及び RMS 法により定量したソヨウ中のペリルアルデヒド含量

ソヨウ 1					
Chromatograph No.	A		B		平均
	PDA	VWD	PDA	VWD	
JP17 (230 nm)	0.200%	0.199%	0.200%	0.200%	0.200%
RMS 230 nm	0.201%	0.202%	0.202%	0.204%	0.202%
234 nm	0.202%	0.202%	0.201%	0.204%	
ソヨウ 2					
Chromatograph No.	C		D		平均
	PDA	VWD	PDA	VWD	
JP17 (230 nm)	0.632%	0.632%	0.626%	0.626%	0.629%
RMS 230 nm	0.626%	0.632%	0.626%	0.637%	0.631%
234 nm	0.632%	0.632%	0.626%	0.637%	
ソヨウ 3					
Chromatograph No.	C		D		平均
	PDA	VWD	PDA	VWD	
JP17 (230 nm)	0.625%	0.625%	0.619%	0.619%	0.622%
RMS 230 nm	0.625%	0.630%	0.619%	0.630%	0.626%
234 nm	0.630%	0.625%	0.619%	0.630%	

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

～カキ色素の成分研究～

研究分担者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

**研究要旨** 既存添加物名簿記載のカキ色素は、「カキノキ科カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) の果実を発酵後、焙焼したものより、温時含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はフラボノイドである。赤褐色を呈する」とされる。本研究では、カキ色素の品質規格作成のための化学的情報の集積を目的に検討を行った。これまでの検討から、HPLCで明瞭なピークが検出されないことが示唆されていることから、若干のピークが認められた*n*-ブタノール分画物について、カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し試みた。しかし、いずれの充填剤に対しても親和性を認めず、単一の化合物は得られなかった。粗分画物の<sup>1</sup>H-NMRの測定結果から、カキ色素には*trans-p-coumaric acid*が含まれることが推定され、HPLCによる標品との直接比較から同化合物の存在を明らかにした。一方で、カキの果実にはフラボノイドや縮合型タンニンの含有が報告されているため、それらの含有を予測して検討していたが、本製品についてマグネシウム-塩酸反応（フラボノイドの定性試験）及び*n*-ブタノール-塩酸反応（縮合型タンニンの定性試験）を行ったところ、いずれも呈色反応を示さなかった。また、<sup>13</sup>C-NMRの長時間測定においても、縮合型タンニンに特徴的なカテキンユニット由来のシグナルを認めなかったことから、カキ色素の本質は既存添加物名簿に記載されているフラボノイドやタンニンに由来するものではなく、それらは加工の過程において分解されていることが示唆された。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 准教授

## A. 研究目的

既存添加物名簿記載のカキ色素は、「カキの果実から得られた、フラボノイドを主成分とするもの」とされ、着色料として用いられる。また、その基原・製法・本質は、「カキノキ科カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) の果実を発酵後、焙焼したものより、温時含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はフラボノイドである。赤褐色を呈する」とされる<sup>1)</sup>。これまでカキ色素について、カキの果実に含まれるフラボ

ノイドや縮合型タンニンの含有を予測して含有成分について検討してきた。製品エキスの分離精製を何度と繰り返し、HPLCでほぼ1ピークのフラクションを得ることができたが、機器分析により構造解析を試みたところ、夾雑物が認められ、再現性のある単一のピークを得ることが困難であることが示唆された。そこで本研究では、カキ色素について、さらに製品中の含有成分を精査することを目的に検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

試料となるカキ色素製品 (Lot No. H26K041, A960) は日本食品添加物協会を通

じて入手した。分離、精製にはカラム充填剤として Diaion HP-20, SEPABEADS SP850 (三菱化学), YMC gel ODS-AQ (ワイエムシー), Develosil Lop ODS (野村化学), Cosmosil 75C18-PREP (ナカライテスク), カラムクロマト C18 75A (GL サイエンス), CHROMATOREX ODS (富士シリシア化学) を用いた。その他試薬はすべて特級また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 は, 検出器: SPD-20A, ポンプ: LC-20AT (島津製作所), カラム: L-column ODS L-C18 (5  $\mu$ m,  $\phi$  2.1 $\times$ 150 mm) (化学物質評価研究機構), 流速: 0.2 mL/min, 測定波長: 280 nm, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 移動相: 0.01 M リン酸緩衝液: アセトニトリル (85:15) を使用した。

NMR は, Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン) ( $^1\text{H-NMR}$ : 500MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$ : 126 MHz) を使用した。

UV は, Shimadzu UVmini-1240 (島津製作所) を使用した。

## B-3) 分離精製

カキ色素製品 (47 g) を水に溶解させた後, 酢酸エチル (EtOAc), *n*-ブタノール (BuOH) (各 3 L) で順次分配し, EtOAc 分画物 (129.4 mg), *n*-BuOH 分画物 (773.6 mg), 水分画物 (45.38 g) を得た。そのうち, *n*-BuOH 分画物 (703.6 mg) について, 各種カラムクロマトグラフィーによる分離, 精製を行った。

*n*-BuOH 分画物 (703.6 mg) について, 様々の充填剤 (YMC gel ODS-AQ, SEPABEADS SP850, Develosil Lop ODS, Cosmosil 75C18-PREP, CHROMATOREX ODS, カラムクロマト C18 75A) を使用してカラムクロマトグラフィーを繰り返し行ったが, 単一な化合物を単離するには至らなかった。得られたフラクションのうち, *n*-BuOH 分画物を YMC gel ODS-AQ カラムクロマトグラフィーにより得られた水溶出部をさらに CHROMATOREX ODS カラムクロマトグラ

フィーに付し, 分画物 A (0.5 mg) を得た。本分画物について,  $^1\text{H-NMR}$  測定の結果, 混合物が確認されたが, 芳香族領域に *trans-p*-coumaric acid に対応するシグナルが観察されたため, HPLC による標品との直接比較を行った結果, 同画分には *trans-p*-coumaric acid<sup>2)</sup> が含まれることが示された。

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}+\text{CD}_3\text{OD}$  (2:1))  $\delta$  7.48 (2H,  $J=7.5$  MHz, H-2, 6), 7.31 (1H,  $J=15$  MHz, H-8), 6.86 (2H,  $J=7.5$  MHz, H-3, 5), 6.34 (1H, d,  $J=15$  MHz, H-7)。

## B-4) カキ色素の分析

### (1) ブタノール-塩酸反応

カキ色素に *n*-BuOH と塩酸 (19:1) の混合溶液を 1 mL 加え, 90 $^{\circ}$ C で 2 時間加熱を行い, 得られた反応液の紅色領域 (600~750 nm) 付近の吸収を確認した。

### (2) マグネシウム-塩酸反応

カキ色素水溶液 (1 mg/mL) にマグネシウムリボン 1 片と塩酸 数滴加え, 色の変化を観察した。

## C. 結果及び考察

### C-1) 分離精製

HPLC で若干のピークが認められたカキ色素の *n*-BuOH 分画物について, 種々のカラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し試みたが, いずれの充填剤に対しても親和性を認めず, 単一な化合物は得られなかった。しかし, 粗分画物の  $^1\text{H-NMR}$  の測定結果から, カキ色素には *trans-p*-coumaric acid が含まれることが推定され, HPLC による標品との直接比較から同化合物の存在を明らかにした (図 1)。

### C-2) NMR 測定

カキの果実には縮合型タンニンやフラボノイドの含有が知られているため<sup>3)</sup>, 本色素の構成成分としてそれらの存在を確認する目的で, カキ色素自体の NMR 測定を行った。 $^1\text{H-NMR}$  を測定した結果, 供試したカキ色素には縮合型タンニンに特徴的な A 環及び B

環に由来する芳香族領域（約 6~8 ppm）のブロードなシグナルが観察されなかった（図 2）。さらに  $^{13}\text{C}$ -NMR を測定した結果、縮合型タンニンに特徴的なシグナル<sup>4)</sup>は観察されなかった（図 3）。よって、供試したカキ色素に縮合型タンニンは主に含有していないことが示唆された。

### C-3) 定性反応

NMR 測定の結果から、カキ色素には縮合型タンニンの含有が主に認められないことが示唆された。そこで、縮合型タンニンの存在を確認する目的で、縮合型タンニンの定性試験である *n*-ブタノール-塩酸反応を行った。その結果、カキ色素は本試験では紅色を呈さず、吸光度測定においても 600~750 nm 付近に吸収は観察されなかった（図 4）。

さらに、既存添加物名簿においてカキ色素は「カキの果実から得られたフラボノイドを主成分とするものをいう」と記載されている。そのため、フラボノイドの定性反応試験であるマグネシウム-塩酸反応を行い、カキ色素中のフラボノイドの含有について確認を行った。その結果、カキ色素は本試験で呈色を認めず、フラボノイドはほとんど存在しないことが示された（図 5）。

### D. 結論

既存添加物カキ色素について、カラムクロマトグラフィーによる分離、精製を繰り返し実施したが、いずれの充填剤を用いても、単一な化合物は得られなかった。しかし、分離したフラクションから、カキ色素には *trans-p*-coumaric acid が含まれることが示唆され、HPLC による標品との比較から同化合物の存在を明らかにした。本製品について、*n*-ブタノール-塩酸反応、マグネシウム-塩酸反応を試験した結果、いずれも呈色は観察されなかった。また  $^1\text{H}$ 及び  $^{13}\text{C}$ -NMR測定を行った結果、フラボノイドや縮合型タンニン由来のシグナルはほとんど観察されず、それゆえ、カキ色素の本質は既存添加物名簿に記載されているフラボノイドではなく、別の化合物で

あることが示唆された。カキ色素の着色は、アミノ酸と糖によって生成したメラノイジンの可能性も考えられる。今後、その本質を明らかにするためのさらなる検討が必要である。

### E. 参考文献

- 1) 厚生省告示第 120 号 (1996) “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日。
- 2) SDBSWeb. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. <http://sdbb.db.asist.go.jp>
- 3) 奥田拓男編 “最新生薬学” 東京、廣川書店、2007、p. 203.
- 4) Ito H, Kobayashi E, Takamatsu Y, Li S-H, Hatano T, Sakagami H, Kusawa K, Satoh K, Sugita D, Shimura S, Itoh Y, Yoshida T (2000) Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines. *Chem Pharm Bull* 48: 687-693.

### F. 研究業績

1. 学会発表  
なし
2. 論文発表  
なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



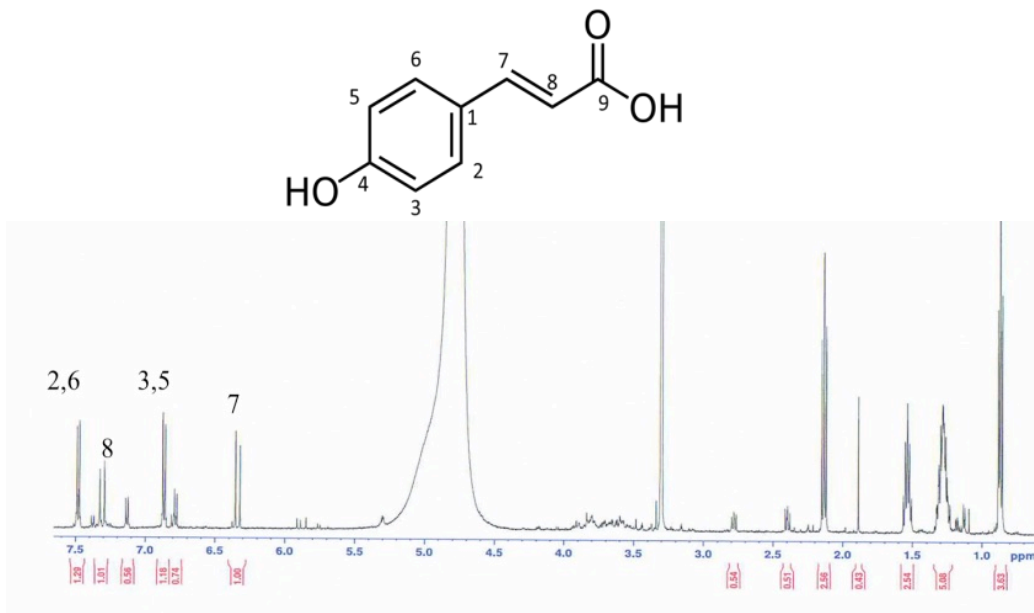


図 1. カキ色素由来の分画物 A の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + \text{CD}_3\text{OD}$  (2:1))

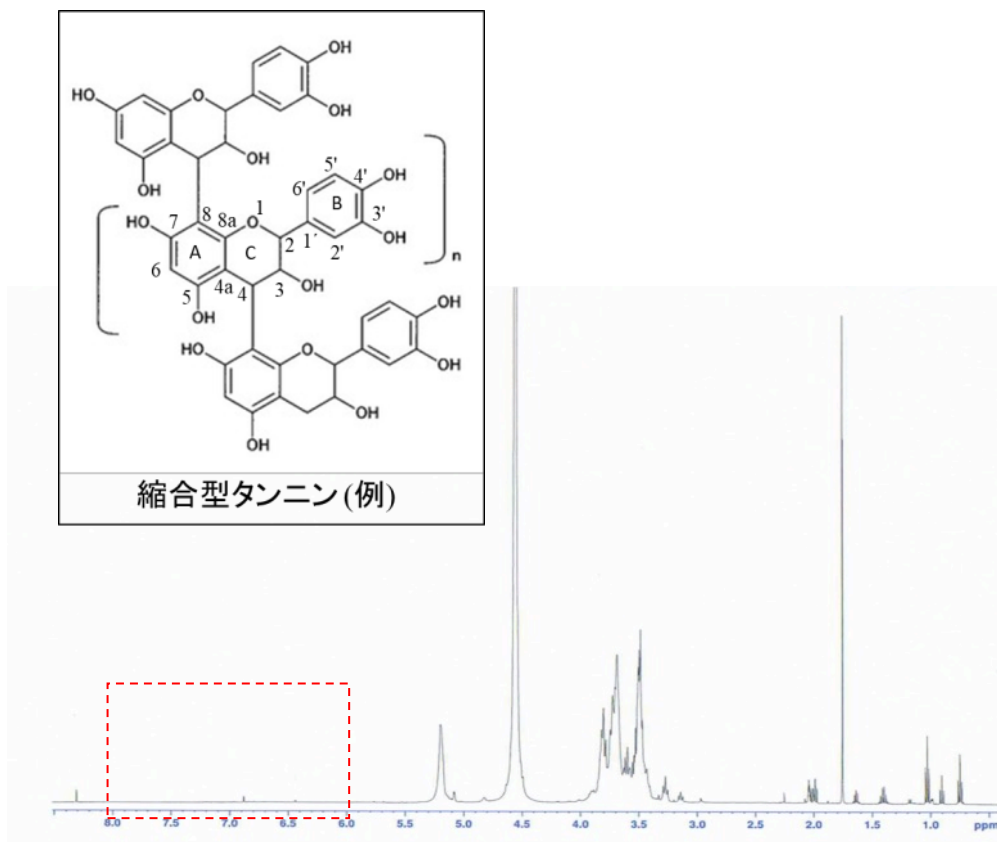


図 2. 供試したカキ色素の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O} + \text{acetone-}d_6$  (2:1))

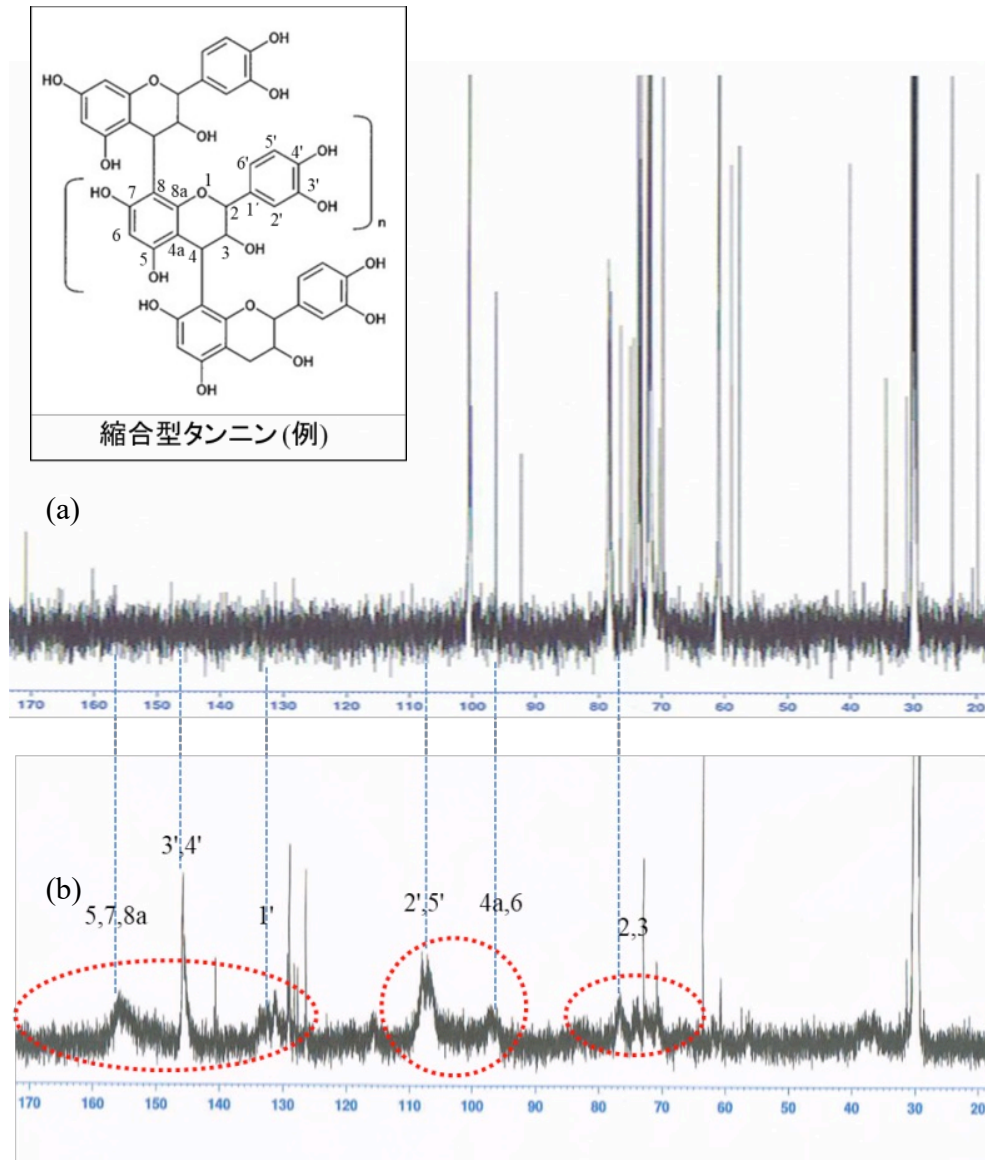


図3. 供試したカキ色素(a)と縮合型タンニン画分(例)(b)の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルの比較(126 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-*d*<sub>6</sub>(2:1))

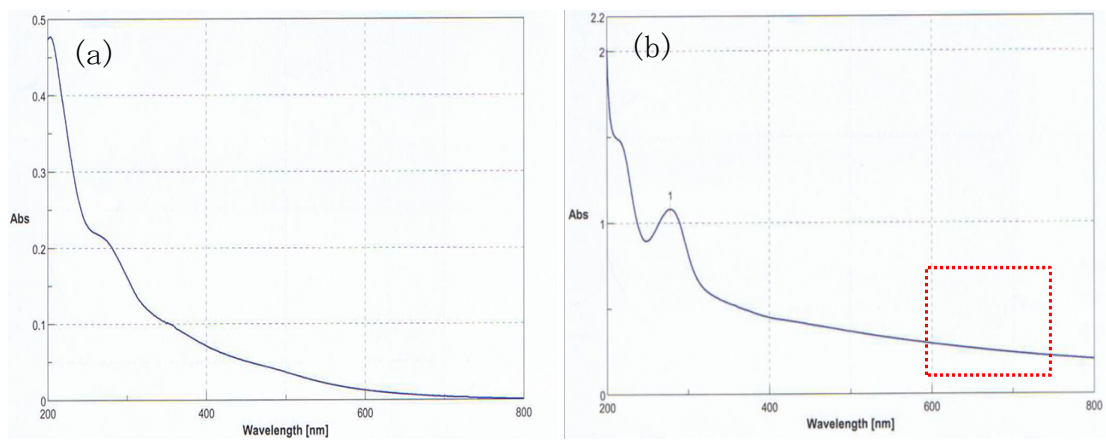


図 4. (a) カキ色素水溶液（反応前）と(b) ブタノール-塩酸反応後の吸収スペクトル

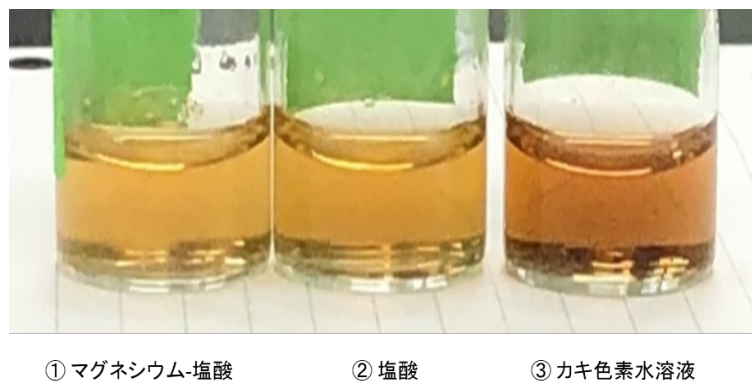


図 5. カキ色素のマグネシウム-塩酸反応

① マグネシウムリボン 1 片と塩酸（数滴）添加後、② 塩酸（数滴）添加後、③ カキ色素水溶液

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

ベニバナ黄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** ベニバナ黄色素 (Carthamus Yellow) は、ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linne) の花から得られたものと定義されている。ベニバナ黄色素の成分規格を改正するために、まずは確認試験を実施した。その結果、極大吸収部および水酸化ナトリウム溶液による色の変化に関して、規格基準として適合していた。現在の規格試験では、色価や薄層クロマトグラフィーにより実施されているが、明確な成分は解明されていない。そこで、HPLCを用いて主成分解析を検討した。HPLCの結果より、ベニバナ黄色素中に2つのピークが検出され、サフロミンAおよびサフロミンBであることがMSにより同定された。しかしながら、サフロミンAおよびサフロミンBのみでは黄色の色価が不足しているため、充填剤での不可逆的吸着した成分などが考えられた。そこで、固定相充填剤を用いない高速向流クロマトグラフィーによる分析を行った結果、未知の黄色成分が観察された。今後は大量精製を検討し、成分解析を進めることとする。

## A. 研究目的

ベニバナ黄色素 (Carthamus Yellow) は、ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linne) の花から得られたものであると定義づけられている<sup>1)</sup>。ベニバナは昔から布の染料、食品や化粧品（口紅）の着色料として用いられている。また、生薬「紅花（コウカ）」でもあり、血流の循環を改善し、女性特有の疾患に効果があると報告されている<sup>2)</sup>。さらに、最近の論文では、Chenらにより、ベニバナ黄色素がメラニン産生レベルを減少させ、美白効果も期待されている<sup>3)</sup>。また、ベニバナの主成分はサフライエロー類のサフロミンA (SF-A) およびサフロミンB (SF-B) である (Fig.1)<sup>1)</sup>。サフロミンA およびサフロミンB は血圧の低下、肝臓保護および神経保護が報告されており<sup>4)</sup>、機能性成分として注目されている。現在、ベニバナ黄色素の確認試験は、薄層クロマトグラフィーや色価により評価されている。これまで、学術論文にてベニバナ黄色素の解明はされてきつつあるが、主成分であるサフロミンA およびサフロミンB の定量分析は困難である。この理

由は、それらの定量用標準品が入手不可能であるためである。ゆえに、これまではベニバナから単離したサフロミンA およびサフロミンB を用いて定量されている。また、サフロミンA およびBは、比較的淡黄色を示しており、ベニバナ黄色を特徴とする色彩を十分に主成分として説明し難い。そこで、本研究では、まずHPLCを用いたベニバナ黄色素の解析を行い、その後、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いて解析を進めることとした。それに加え、ベニバナ黄色素からサフロミンA およびサフロミンB を単離精製し、定量用標準品が不必要である相対モル感度係数 (Relative Molar Sensitivity, RMS) によるシングルリファレンスHPLC 定量法を構築することとした。HSCCCは固定充填材を用いずに、液-液分配により化合物を単離精製する手法である。本手法は固定充填材との相互作用を受けずに獲得することができるため、ベニバナ黄色素中の全成分を解明することができる。ゆえに、ベニバナ黄色素をHSCCCにより成分評価を行い、規格検討をする

こととした。

## B. 研究方法

ベニバナ黄色素は、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。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

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

MS 装置：Xevo TQD

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

確認試験<sup>1)</sup>

- (1) 本品の表示量から、色価 100 に換算して 1 g に相当する量を取り、クエン酸緩衝液 (pH5.0)100 mL を加えて溶かした液は、黄色を呈し、波長 400~408 nm に極大吸収波がある。
- (2) (1)の液に水酸化ナトリウム溶液 (1→25) を加えてアルカリ性にするとき、液の色は、だいたい色を増す。

ベニバナ黄色素の LC 分離分析：対象試料は水/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、グラジエントにより 20 分間の分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100Z 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：405 nm)

注入量：10 μL

移動相：0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1% ギ酸メタノール (B)

グラジエント条件：A/B：87/13 (0 min) →50/50 (15 min) →10/90 (15.01 min) →10/90 (17.5 min) →87/13 (17.51 min) →87/13 (20 min)

MS 装置：測定条件は、エレクトロスプレーイオ

ン化法 (ESI：ポジティブモード) で行った。

Capillary voltage：2.0 kV

Extractor voltage：3 V

RF lens voltage：2.5 V

Source temperature：150°C

Desolvation temperature：400°C

Cone/desolvation gas flows：50/800 L/h

MS scan ranges：m/z 200-1200

ベニバナ黄色素の 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、*n*-ブタノール/水溶液 (50/50, V/V) を用いた。分離部は、Type-J コイルを用い、遠心スピードを 1000 rpm とした。また、コイル容量は、350 mL であり、固定相には、上層を充填した。移動相には下層を用い、流速 2.0 mL/min で送液した。

## C. 研究結果

ベニバナ黄色素を国内で流通している添加物用試料を用いて、第 4 版既存添加物自主規格の確認試験を実施した。検液を調製し、試験を実施した結果、規格基準にすべて従うことが確認できた。

(1) 黄色の色彩を示し、規格基準のにおいて、400~408 nm 付近での吸収極大波長を示した (Fig.2)。

(2) だいたい色の色彩を示し、アルカリによる色彩変化の判別は可能であった (Fig.3)。

まず、溶解性の検討を行った。メタノール、アセトニトリルおよび水を用いて、ベニバナ黄色素を溶解した結果、メタノールとアセトニトリルには不溶解、水のみ溶解した。そこで、メタノール/水 (50/50, V/V) 混液またはアセトニトリル/水 (50/50, V/V) 混液を検討した結果、いずれも溶解した。ゆえに、アセトニトリル/水 (50/50, V/V) 混液を希釈液として用いることとした。

次に、ベニバナ黄色素の HPLC 分離分析について検討した。まずは、ODS カラムの検討を行った。東ソー社製の同じ粒径や長さである TSKgel ODS-100V および TSKgel ODS-100Z を

用いて、分離やピーク形状を比較した。その結果の HPLC クロマトグラムを Fig.4 に示した。ゆえに、保持時間やピーク形状はいずれも違いはほぼ無かったが、よりシグナル/ノイズ比 (S/N) が良好な TSKgel ODS-100Z を用いることとした。

次いで、移動相条件を検討した。既報<sup>5)</sup>を参考にして、実験方法に記した移動相で分析した結果、サフロミン A は 4.7 min, サフロミン B は 8.4 min に検出することができた (Fig.5)。さらに、MS クロマトグラムおよび MS スペクトルにより、いずれも色素成分の推定をすることが達成できた (Fig.6)。

HPLC によりサフロミン A およびサフロミン B の分配係数と分離係数をそれぞれ算出し、最適な二相溶媒系を検討した。その結果を Table 1 に示す。その結果、*n*-ブタノール/水溶液 (50/50,v/v) を採用した。他の二相溶媒系は分配係数の値が 1 より大きく、HSCCC での良好な分離が望まれないため、今回は除外した。

ベニバナ黄色素は既報<sup>5)</sup>において、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 のクロマトグラムを Fig. 7 に示す。サフロミン A およびサフロミン B はいずれも HPLC や MS 分析より同定できたが、未知の黄色成分がフロントに検出された。本成分が殆どの黄色色素を示しており、主とする黄色成分と考えられる。しかしながら、HPLC 分析を行っても主たるピークは観察されず、今回の研究では同定することができなかった。

#### D. 考察

本研究では、ベニバナ黄色素 (Carthamus Yellow) は、ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linne) の花から得られたものである。ベニバナ黄色素は飲料や菓子類など様々な食品に利用されているが、明確な主成分は規定されていない。さらに、抽出方法や産地ごとに色素成分が異なる恐れがあるため、国内流通品において成分規格を作成することが求められている。そこで、本研究では、入手可能なベニバナ黄色素の解析を行なった。

まず、確認試験において、いずれの国内流通品は規格内であった。次に、ベニバナ黄色素を HPLC により色彩評価を実施した。その結果、明確な 2 本のピークが観察された。それらは MS 分析により、サフロミン A およびサフロミン B であると推定された。しかしながら、成分を確実に同定するため、HSCCC を用いて、色素成分の単離精製を検討した。良好にサフロミン A およびサフロミン B を単離することができたが、未知の色素成分も獲得することができた。今後は、その成分解析も含め、成分規格の作成へ検討していく予定である。

#### E. 結論

本結果より、既存添加物ベニバナ黄色素の成分規格案に関して、主成分はサフロミン A およびサフロミン B である。しかしながら、HPLC では検出されない他の黄色素成分の可能性も示唆された。ゆえに、HPLC および HSCCC を用いて、ベニバナ黄色素の主成分の再解析が必要であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takahashi M., Nishizaki Y., Sugimoto N., Sato K., Inoue K: J. Chromatogr. A. 1555, 45-52 (2018).
- 2) Takahashi M, Nishizaki Y, Morimoto K, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Sep. Sci. Plus. 1, 498-505 (2018).

##### 2. 学会発表

- 1) 高橋未来, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: Single Reference HPLC 法によるセサモール, セサミン, エピセサミン, セサモリンの一斉分析法の構築. 日本食品化学学会第 24 回総会・学術大会(2018.5)(東京).
- 2) 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: シングルフアレンス HPLC 法によるゴマリグナン類の相対感度定量法の開発と食品応用. 第 78 回分析化学討論会(2018.5)(宇部市).
- 3) 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(2018.5)(大阪).

- 4) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Single-reference HPLC analysis for natural components based on relative molar sensitivity. PITTCON 2019 (2019.3) (Philadelphia).

#### G. 知的財産権の出願, 登録状況

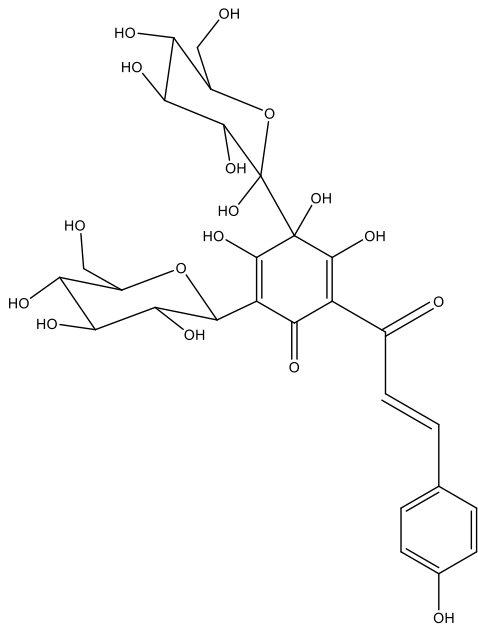
特になし

#### H. 健康危機情報

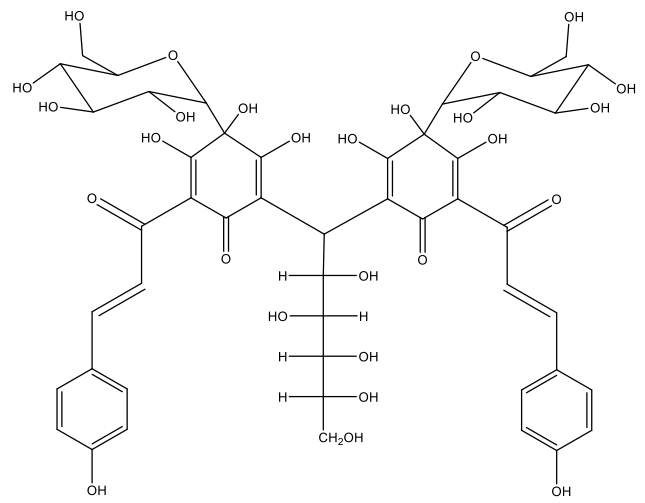
特になし

#### I. 参考文献

- 1) a) 日本食品添加物協会; 第4版既存添加物自主規格. b) 第9版食品添加物公定書.
- 2) Li Y, Piao D, Zhang H, Kim T, Lee SH, Chang HW, Woo MH, Son JK.; *Arch Pharm Res.* 38, 776-784 (2015).
- 3) Chen Y.S, Lee S.M, Lin C.C, Liu C.Y, Wu M.C, Shi W.L, *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 242-245 (2013).
- 4) Nie, P.H., L. Zhang, W.H. Zhang, W.F. Rong, J.M.Zhi.; *J. Ethnopharmacology.* 139, 746-750 (2012).
- 5) Inoue K, Nomura C, Mizuno Y, Yoshimi Y, Tsutsumiuchi K, Hino T, Oka H.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31, 1047-1059 (2008).



サフロミンA  
(Safflorin A, SF-A)



サフロミンB  
(Safflorin B, SF-B)

Fig. 1 サフロミン類の化学構造式



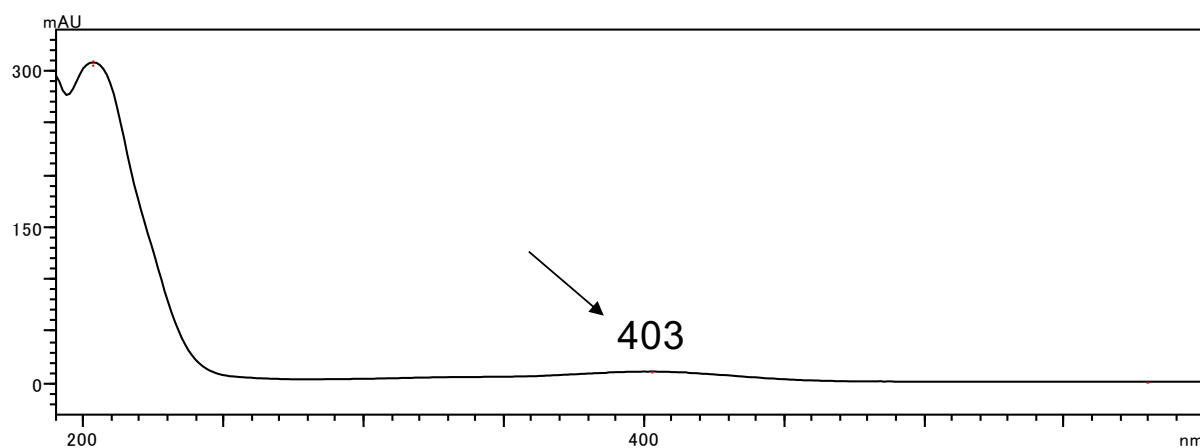
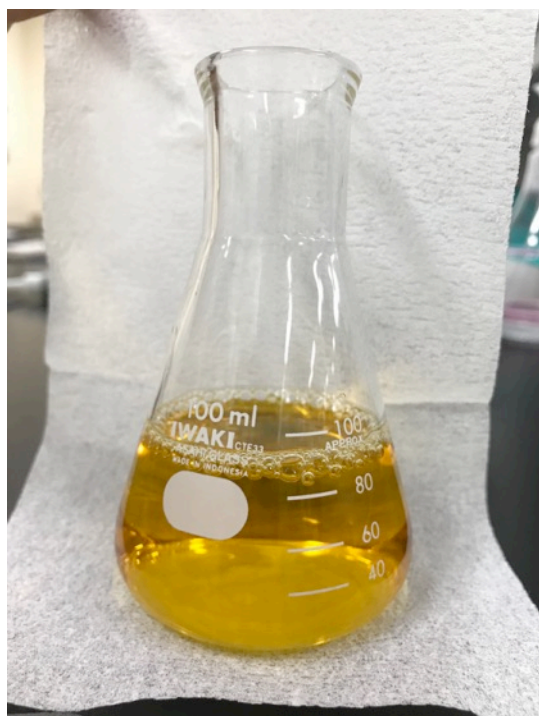
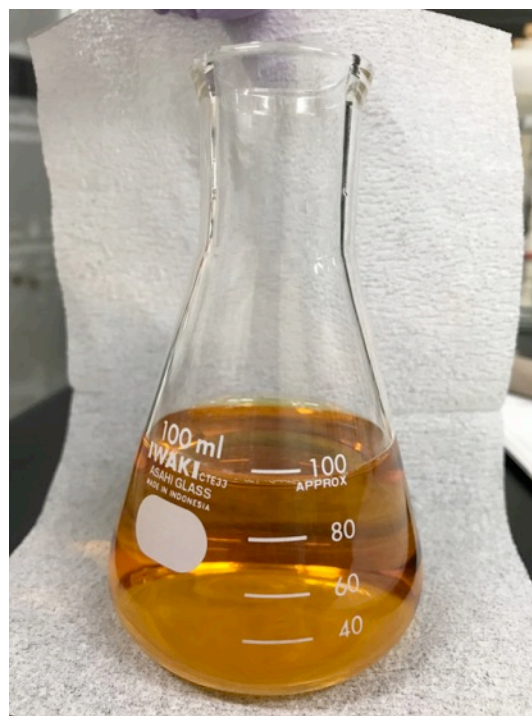


Fig. 2 ベニバナ黄色素の紫外可視吸収スペクトル



NaOH添加前



NaOH添加後

Fig. 3 ベニバナ黄色素の確認試験

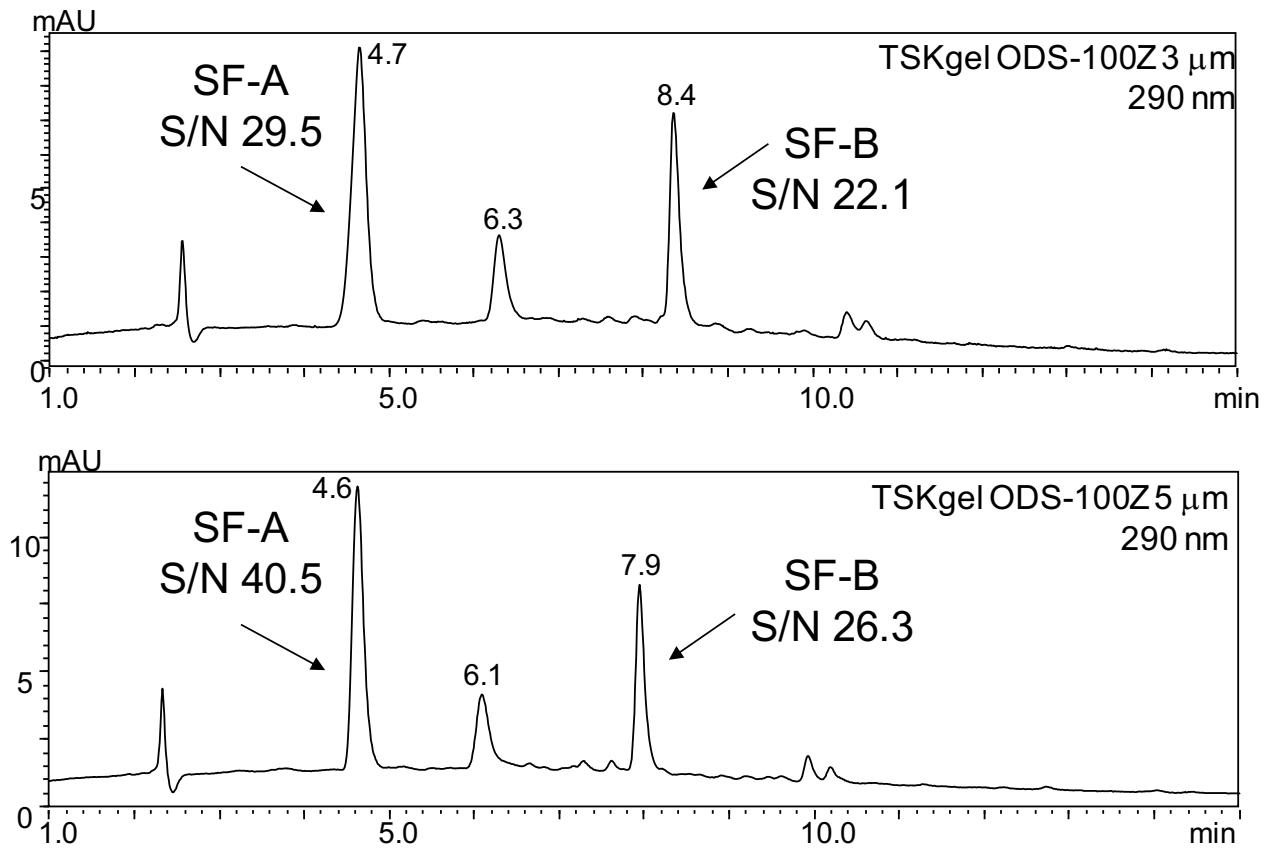


Fig. 4 ベニバナ黄色素のカラム検討

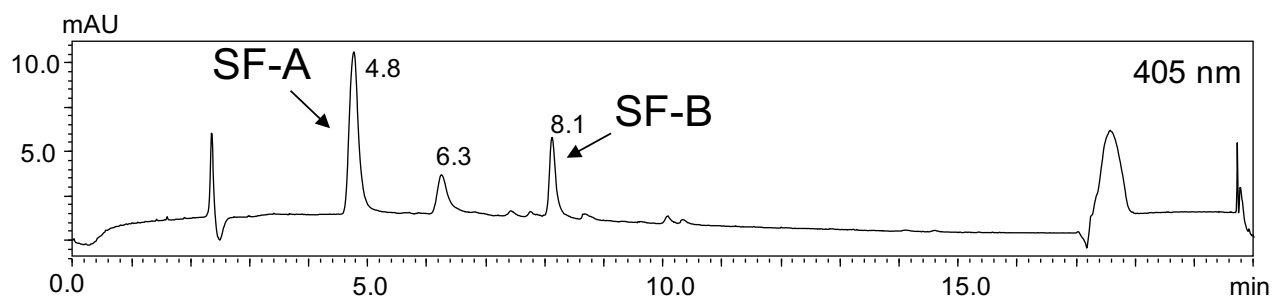


Fig.5 ベニバナ黄色素の HPLC クロマトグラム

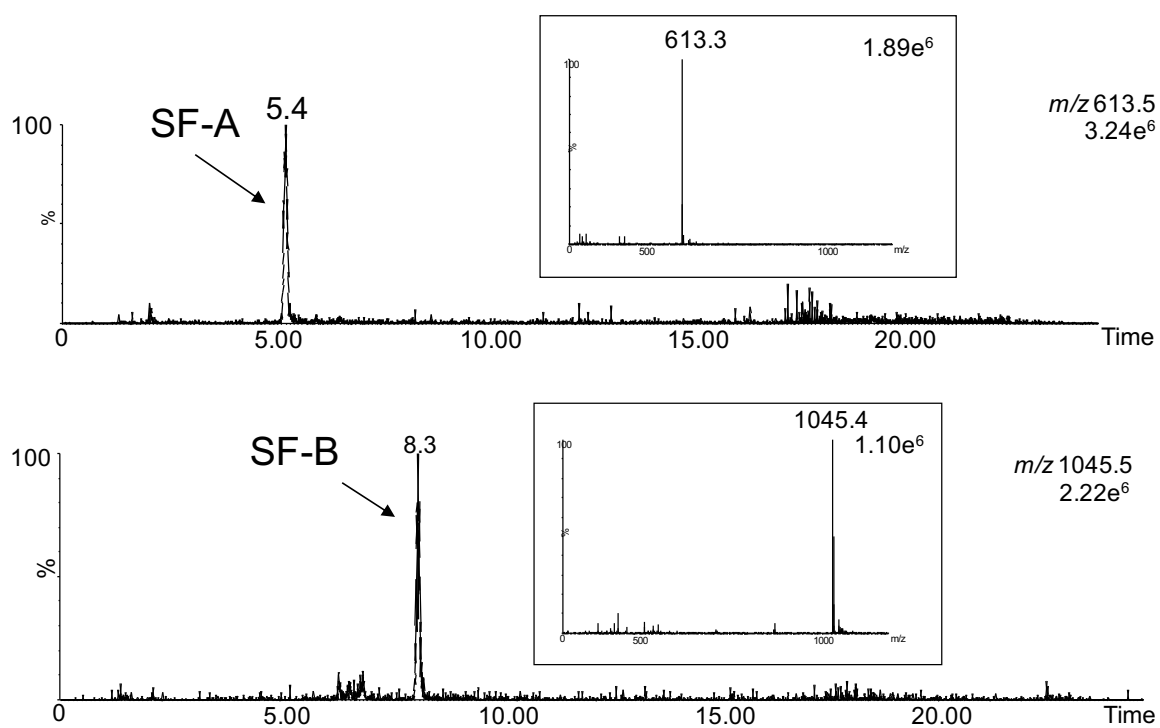


Fig. 6 ベニバナ黄色素の MS クロマトグラムおよび MS スペクトル

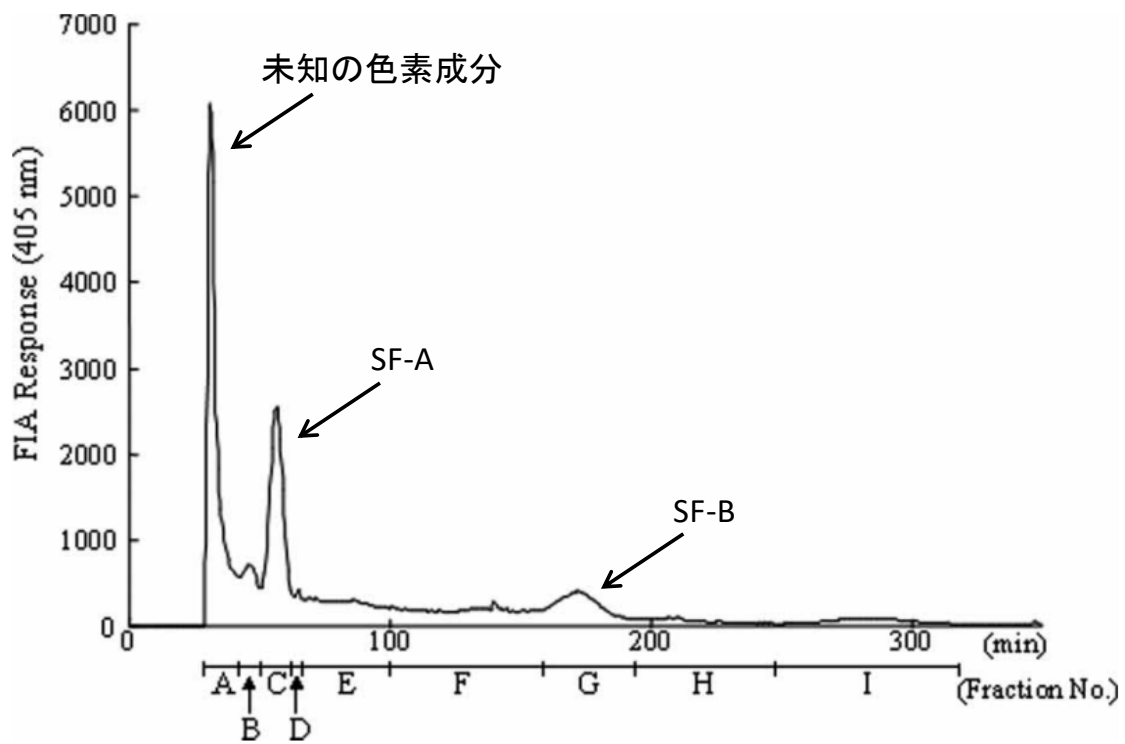


Fig. 7 ベニバナ黄色素の HSCCC クロマトグラム

Table 1 サフロミン A およびサフロミン B の分配係数

二相溶媒系			分配係数	
			SF-A	SF-B
<i>n</i> -ブタノール/水溶液	NA	5/5	0.04	0.30
	0.5% TFA		1.05	5.03
	0.5% FA		0.33	2.51
<i>t</i> -ブチルメチルエーテル/ <i>n</i> -ブタノール /アセトニトリル/水溶液	NA	2/2/1/5	0.02	0.11
	0.5% TFA	2/2/1/5	0.35	1.52
	0.5% FA	2/2/1/5	0.20	1.29

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

チャ抽出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** 第4版既存添加物自主規格には、チャ抽出物（Tea Extract）が記載されている。主成分は、カテキン類とされているが、確認試験などでは、吸光度法（540 nm）を用いて、カテキン類の総量を定量している。しかしながら、主なカテキン類は8種類あり、それらの成分組成は規定されていない。そこで、本研究では、チャ抽出物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。まず、チャ抽出物において、HPLC-UV-FL分析を実施した。カテキン類8種類の分析条件を検討し、移動相は0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸メタノールが最適であった。なお、UVは280 nm、FLは励起波長280 nmおよび蛍光波長310 nmにてモニタリングした。その結果、ガロカテキン、エピカテキン、エピガロカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エピカテキンガレートがUV検出器にて観察された。また、カテキンおよびエピカテキンがFL検出器にて確認された。その中で、エピガロカテキンが最も高い含有率を示し、103 ppmであった。今後は、カテキン類の相対モル感度係数を算出していく予定である。

#### A. 研究目的

チャ抽出物（Tea Extract）は、第4版既存添加物自主規格において、ツバキ科チャ（*Camellia sinensis* O. Kze.）の葉より、室温時、温時又は熱時、水、酸性水溶液、含水エタノール、エタノール、含水メタノール、アセトン、酢酸エチル又はグリセリン水溶液で抽出したものより得られたものと定義されている<sup>1)</sup>。既存添加物名簿収載リストでは、酸化防止剤、製造用剤として使用されており、水産加工品、食肉加工品や飲料など幅広く食品に用いられている。チャ抽出物は、茶葉の処理方法により、緑茶の抽出物またはウーロン茶またはウーロン茶及び紅茶の抽出物に分類される<sup>1)</sup>。しかしながら、これらの具体的な区別方法は記載されておらず、カテキン類と総称されている。カテキン類はカテキン、エピカテキンやガロカテキンなど主に8種が存在している（Fig.1）。なお、主な定量法では、吸光度法（540 nm）を用いてカテキン類の含量を算出する方法を採用している<sup>1)</sup>。カテキン類は抗酸化作用が強く、降圧作用、抗炎症作用または抗糖尿病など様々な薬理的な効果が報告されている<sup>2-3)</sup>。最

近では、特定保健用食品や機能性表示食品でもカテキン類は利用され、注目されている。しかしながら、カテキン類のチャ抽出物の製造工程において、抽出条件や精製条件により、成分組成が異なると言われている。これまでのカテキン類の分析方法は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、キャピラリー電気泳動、薄層クロマトグラフィーなどが挙げられる<sup>4)</sup>。しかし、既存添加物チャ抽出物を対象とした各カテキン類の成分評価法は未だ存在していない。そこで、チャ抽出物における含有成分の解析および各カテキン類の定量法を開発することとした。

#### B. 研究方法

チャ抽出物は、三栄源エフエフアイ社製のものを用いた。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52  
LC 装置：島津製作所社製 LC-20AD/SIL-20AC/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS システム

カテキン：(+)-Catechin Hydrate、東京化成社製、

C0705

エピカテキン：(-) -Epicatechin、東京化成社製、E1226

ガロカテキン：(-) -Gallocatechin、長良サイエンス社製、NH021202

エピガロカテキン：(-) -Epigallocatechin、東京化成社製、E1084

カテキンガレート：(-) -Catechin gallate、長良サイエンス社製、NH21302

エピカテキンガレート：(-) -Epicatechin gallate、東京化成社製、E0890

ガロカテキンガレート：(-) -Gallocatechin gallate、長良サイエンス社製、NH021402

エピガロカテキン：(-) -Epigallocatechin Gallate Hydrate 東京化成社製、E0694

確認試験(既存添加物自主規格)：チャ抽出物 0.1 g を 50%エタノール 10 mL に溶かし、この溶液に塩化第二鉄溶液 (1→50) 2~3 滴を加えるとき、緑紫~黒紫色に呈するか確認した。

チャ抽出物の LC 分離分析：対象試料は水/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：80/20 をグラジエントにより、30 分間の分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100Z column (4.6×150 mm, 5 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：280 nm)

注入量：10 μL

移動相：0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1% ギ酸メタノール (B)

グラジエント条件：A/B：80/20 (0 min) →60/40 (30 min) →5/95 (30.1 min) →5/95 (35 min) →80/20 (35.1 min) →80/20 (40 min)

### C. 研究結果

まず、本研究で用いたチャ抽出物について第4版既存添加物自主規格の確認試験を実施した。その結果は Fig.2 に示したとおり、いずれも現在

の自主規格に適合ことが判明した。

カテキン類の構造式を Fig.1 に示した。カテキン類は極性が高い物性を持つことが考えられるため、逆相系 LC における分析条件を検討し、移動相を 0.1% ギ酸水溶液/0.1% ギ酸メタノールを用いることとした。なお、いずれの対象試料をメタノールで溶解し、メタノール/水溶液 (50/50, V/V) で希釈することとした。

次に、逆相系 LC カラムを検討した。東ソー社製の TSKgel ODS-100V および TSKgel ODS-100Z にて各カテキン類の HPLC クロマトグラムを Fig.3 に示し、分離やピーク形状を比較した。その結果、ピーク形状に関してはいずれの分析カラムもほとんど同等であったが、EC と EGCg 分離に違いが観察された。その後、異なる移動相の組成においても、その分離が困難であったため、TSKgel ODS-100Z を最適なカラムとして選択した。

各カテキン類の紫外可視吸光光度における吸収極大波長を調べ、その吸収スペクトルを Fig.4 に示した。その結果、いずれも 280 nm 付近で吸収極大波長 (カテキン  $\lambda_{\max}=268$  nm, カテキンガレート  $\lambda_{\max}=277$  nm, エピカテキン  $\lambda_{\max}=278$  nm, エピカテキンガレート  $\lambda_{\max}=276$  nm, ガロカテキン  $\lambda_{\max}=268$  nm, ガロカテキンガレート  $\lambda_{\max}=273$  nm, エピガロカテキン  $\lambda_{\max}=279$  nm, エピガロカテキンガレート  $\lambda_{\max}=273$  nm) が観察された。

ゆえに、今後の定量評価において、検出波長を 280 nm にすることとした。なお、既報より、カテキンおよびエピカテキンは蛍光を示す化合物であり、励起波長 Ex を 280 nm, 蛍光波長 Em を 310 nm と設定し、紫外可視吸光光度と共に蛍光光度を用いてモニタリングした。

これまでの分析条件下で測定したカテキン類の HPLC クロマトグラムを Fig.5 に示した。その結果、いずれも 25 分以内に良好なピークを得ることができた。なお、蛍光光度における HPLC クロマトグラムにおいてもカテキンおよびエピカテキンのピークが確認された。本最適条件において、絶対検量線を作成し、検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ) を求めた (Fig.6 および Fig.7)。その結果、カテキン (LOD：0.50 μg/mL,

LOQ=1.0 µg/mL), カテキンガレート (LOD : 0.15 µg/mL, LOQ=0.30 µg/mL), エピカテキン (LOD : 0.50 µg/mL, LOQ=1.0 µg/mL), エピカテキンガレート (LOD : 0.15 µg/mL, LOQ=0.30 µg/mL), ガロカテキン (LOD : 1.0 µg/mL, LOQ=2.0 µg/mL), ガロカテキンガレート (LOD : 0.15 µg/mL, LOQ=0.30 µg/mL), エピガロカテキン (LOD : 0.50 µg/mL, LOQ=1.0 µg/mL), エピガロカテキンガレート (LOD : 0.15 µg/mL, LOQ=0.30 µg/mL) であった. いずれも, 絶対検量線の範囲 (LOQ~10 µg/mL) において, 相関係数が 0.996 以上の直線性が得られた.

本手法を用いて, チャ抽出物をメタノールで 10 倍希釈した試料溶液を HPLC 分析した. その HPLC クロマトグラムを Fig.8 に示した. なお, 絶対検量線法を用いて各カテキン類を定量した結果, ガロカテキン (4.6 mg/kg), エピガロカテキンガレート (103 mg/kg), エピカテキン (0.9 mg/kg), ガロカテキンガレート (0.5 mg/kg), エピカテキンガレート (2.5 mg/kg) がチャ抽出物に存在していることが判明した. ここで, 紫外可視吸光光度ではチャ抽出物中のカテキンおよびエピカテキンは不検出 (LOQ 以下) であったが, 蛍光光度ではカテキン (2.2 mg/kg), エピカテキン (9.9 mg/kg) が検出した. ゆえに, カテキンおよびエピカテキンに関して, 紫外可視吸光光度だけでなく, 蛍光光度も同時にモニタリングすることとした.

#### D. 考察

本研究では, チャ抽出物におけるカテキン類の含有解析および定量分析を実施した. 今年度, 分析条件を検討した結果, 逆相 LC にて, 移動相は 0.1% ギ酸水溶液/0.1% ギ酸メタノール, カラムは TSKgel ODS-100Z を採用した. 本結果より, 8 種のカテキン類を分析することができ, チャ抽出物において, 紫外可視吸光光度ではガロカテキン, エピガロカテキンガレート, エピカテキン, ガロカテキンガレート, エピカテキンガレート, 蛍光光度ではカテキンおよびエピカテキンを定量することができた. 特に, カテキンとエピカテキンは多くの健康食品や飲料に含有しており, それらを蛍光光度により, 高感

度に定量することが可能であると考えられる. 以上より, 本分析法は様々な食品に応用することができるといえる.

#### E. 結論

本結果より, カテキン類 8 種類を迅速かつ簡便に分析することができた. 現在, チャ抽出物はカテキンの総量を定量しているが, カテキン類の組成は製品間やメーカー間で異なっている. ゆえに, 本分析法に基づく試験の提案が求められる.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takahashi, M., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Sato, K., Inoue, K. ; J. Chromatogr. A. 1555, 45-52, (2018)
- 2) Takahashi, M., Nishizaki, Y., Morimoto, K., Sugimoto, N., Sato, K., Inoue, K. ; Sep. Sci. Plus. 1,498-505, (2018)

##### 2. 学会発表

- 1) 高橋未来, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一 : Single Reference HPLC 法によるセサモール, セサミン, エピセサミン, セサモリンの一斉分析法の構築 日本食品化学学会第 24 回総会・学術大会 (東京都江東区) (2018.5)
- 2) 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 : シングルリファレンス HPLC 法によるゴマリグナン類の相対感度定量法の開発と食品応用 第 78 回分析化学討論会 (山口県宇部市) (2018.5)
- 3) 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) (2018.3)
- 4) Miki Takahashi, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato, Koichi Inoue : Single-reference HPLC analysis for natural components based on relative molar sensitivity PITTCON 2019 (Philadelphia) (2019.3)



## G. 知的財産権の出願，登録状況

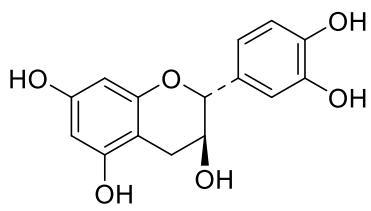
特になし

## H. 健康危機情報

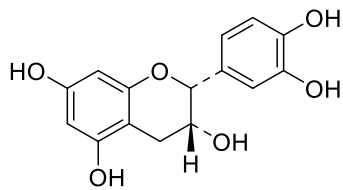
特になし

## I. 参考文献

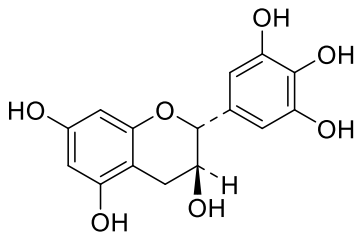
- 1) 日本食品添加物協会；第4版既存添加物自主規格 平成20年10月13日発行
- 2) Yang, C. S., Maliakal, P., & Meng, X.; *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.*16, 6477-6483. (2005)
- 3) Cheng, T. O.; *Am J Cardiol.*91, 1290-1291. (2003)
- 4) M.S. El-Shahawi., A. Hamza, S.O. Bahaffi, A.A. Al-Sibai, T.N. Abduljabbar; *Food Chem.* 134, 2268-2275. (2012)



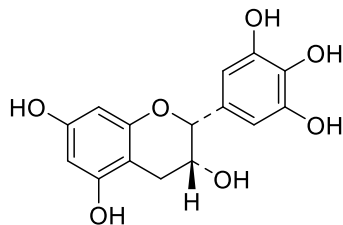
カテキン



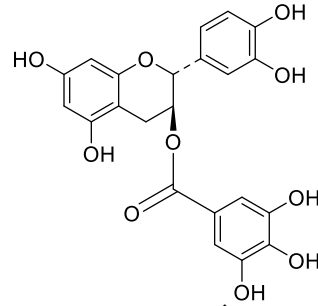
エピカテキン



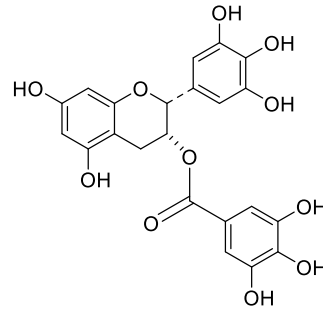
ガロカテキン



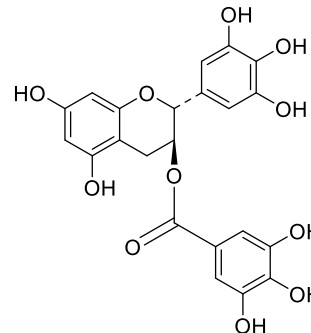
エピガロカテキン



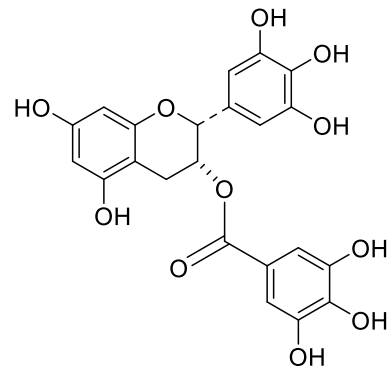
カテキンガレート



エピカテキンガレート



ガロカテキンガレート



エピガロカテキンガレート

Fig.1 各カテキン類の化学構造式



50% エタノール溶解後



第二鉄添加後

Fig.2 チャ抽出物の確認試験

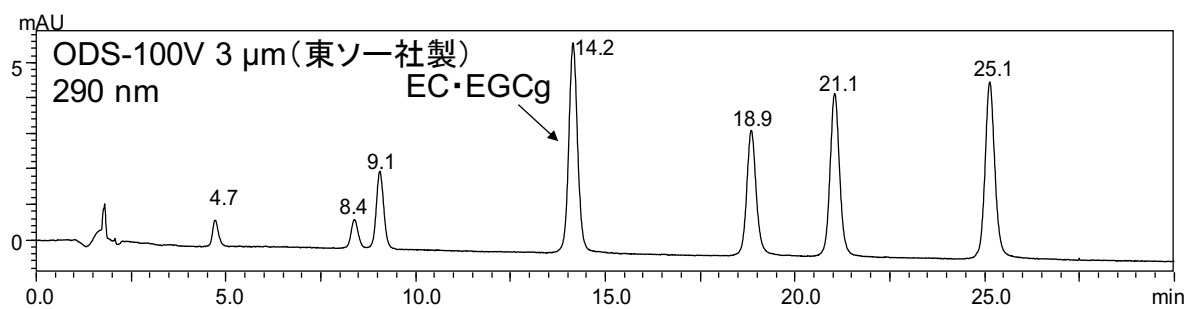
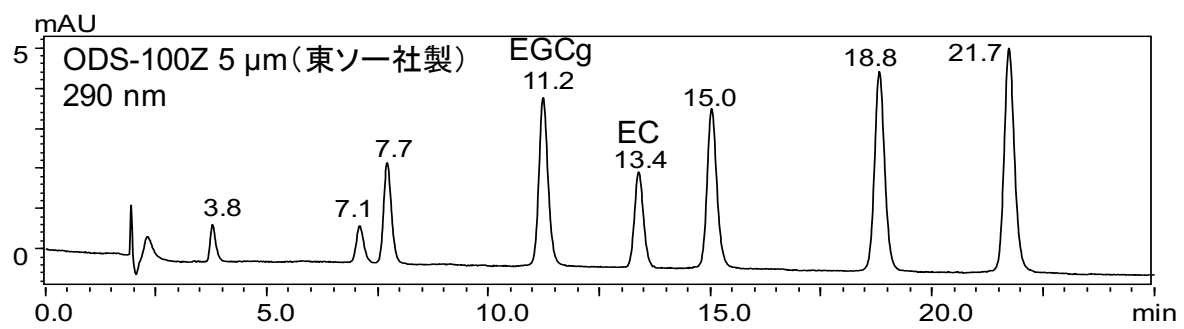


Fig.3 各カラムにおけるカテキン類の HPLC クロマトグラム

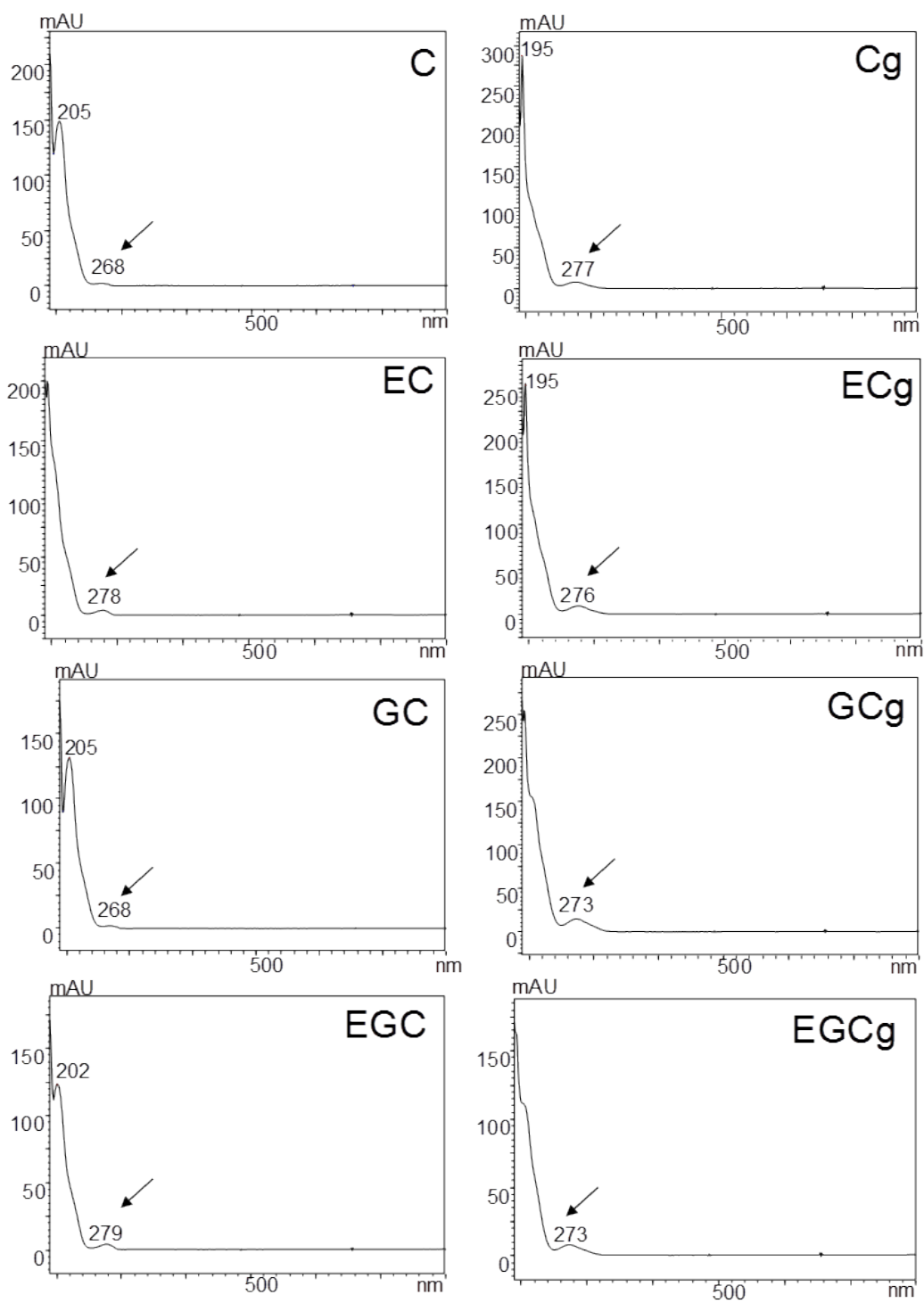


Fig.4 各カテキン類の紫外可視吸収スペクトル

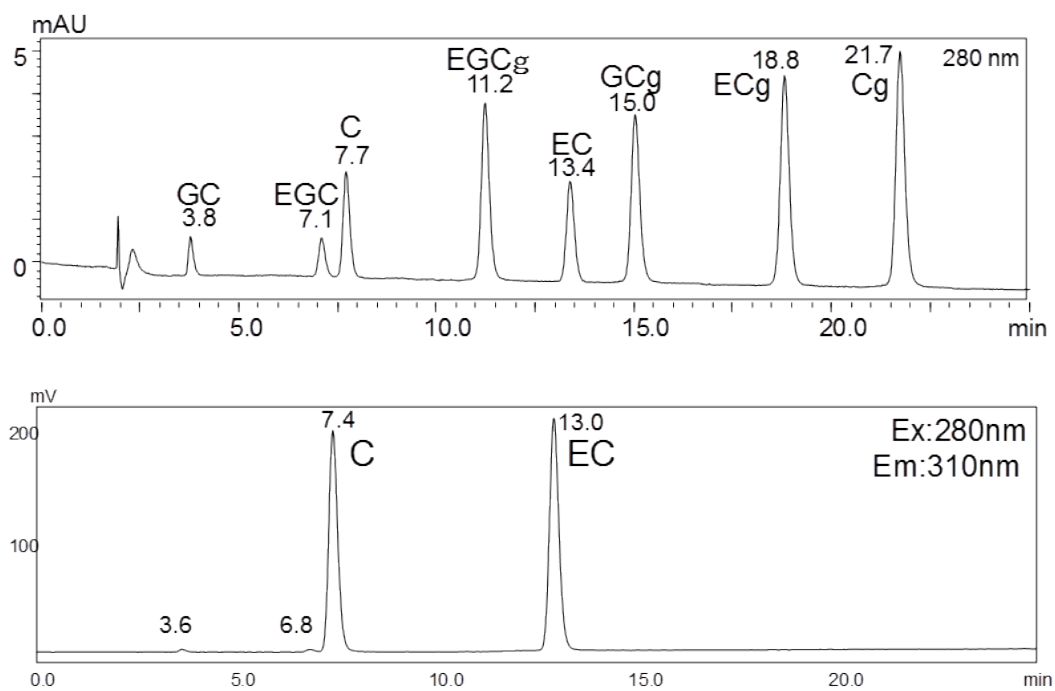


Fig.5 カテキン類の HPLC クロマトグラム

上：紫外可視吸光光度（280 nm）

下：蛍光光度（励起波長 280 nm、蛍光波長 310 nm）

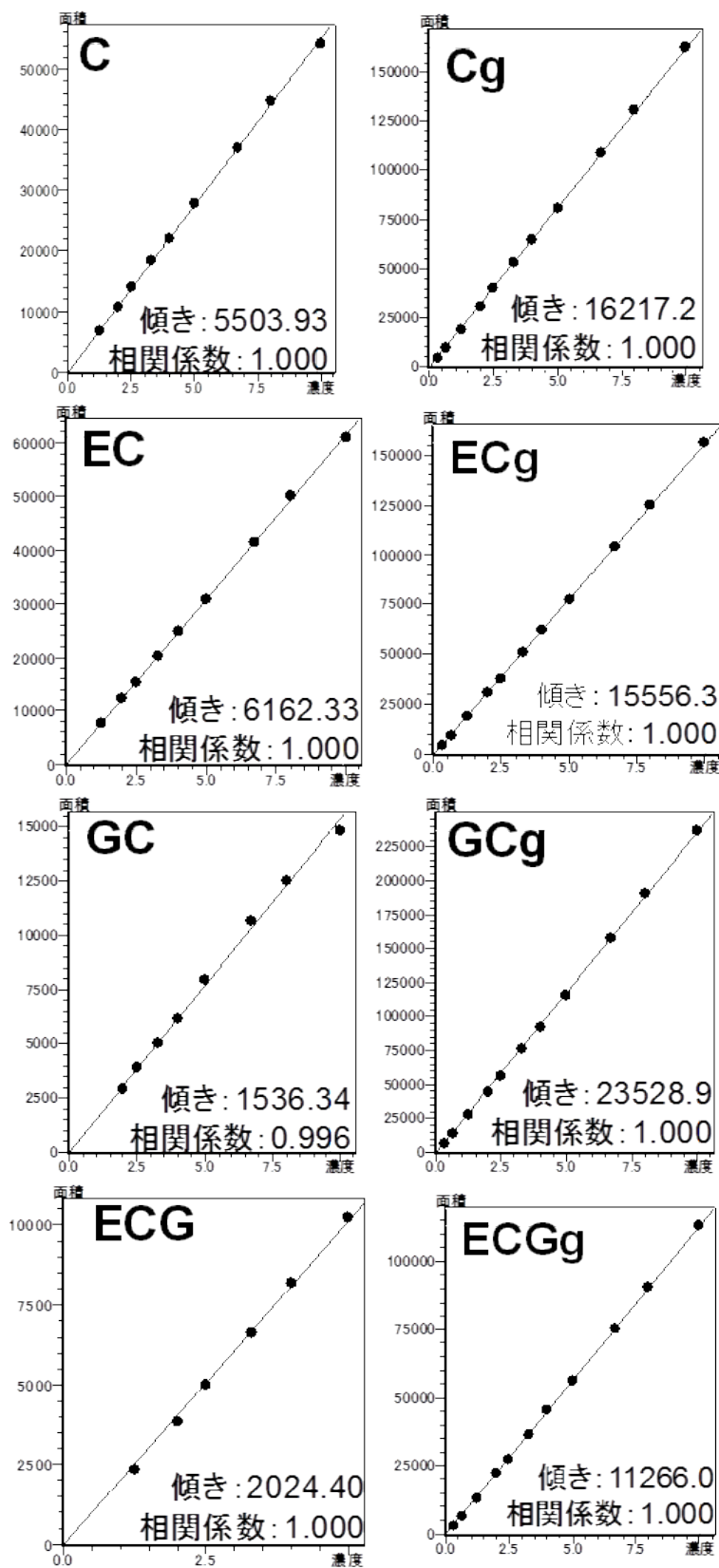


Fig.6 各カテキン類の絶対検量線 (UV)

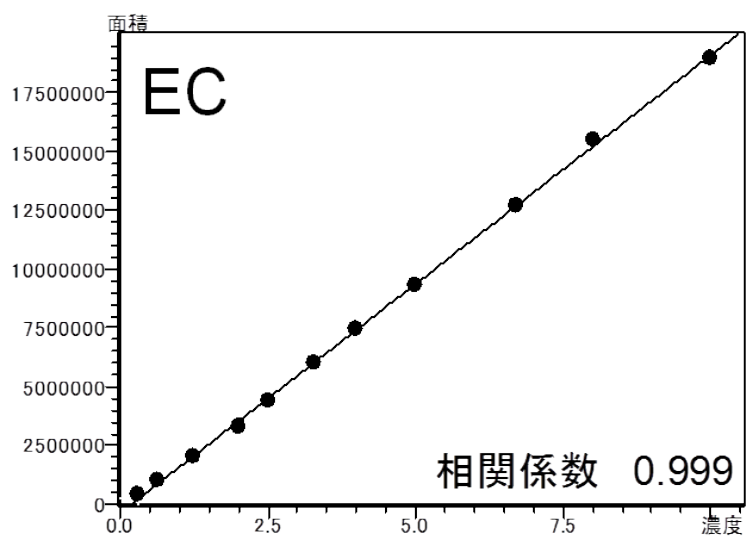
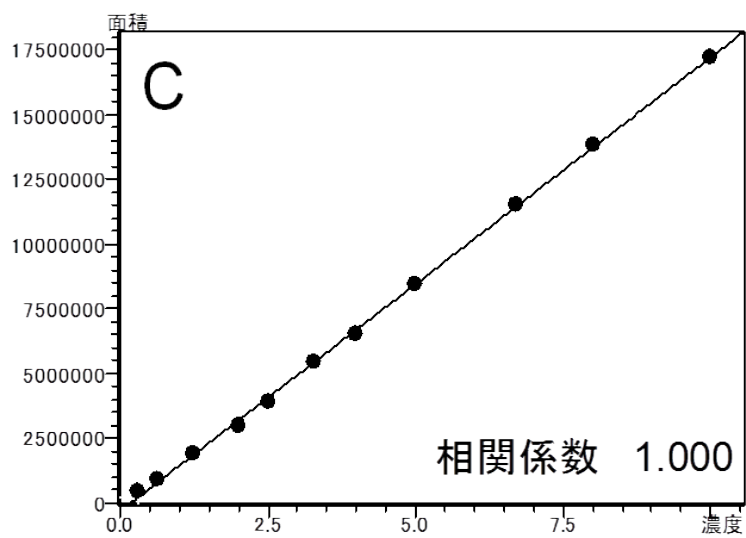


Fig.7 カテキンおよびエピカテキンの絶対検量線 (FL)



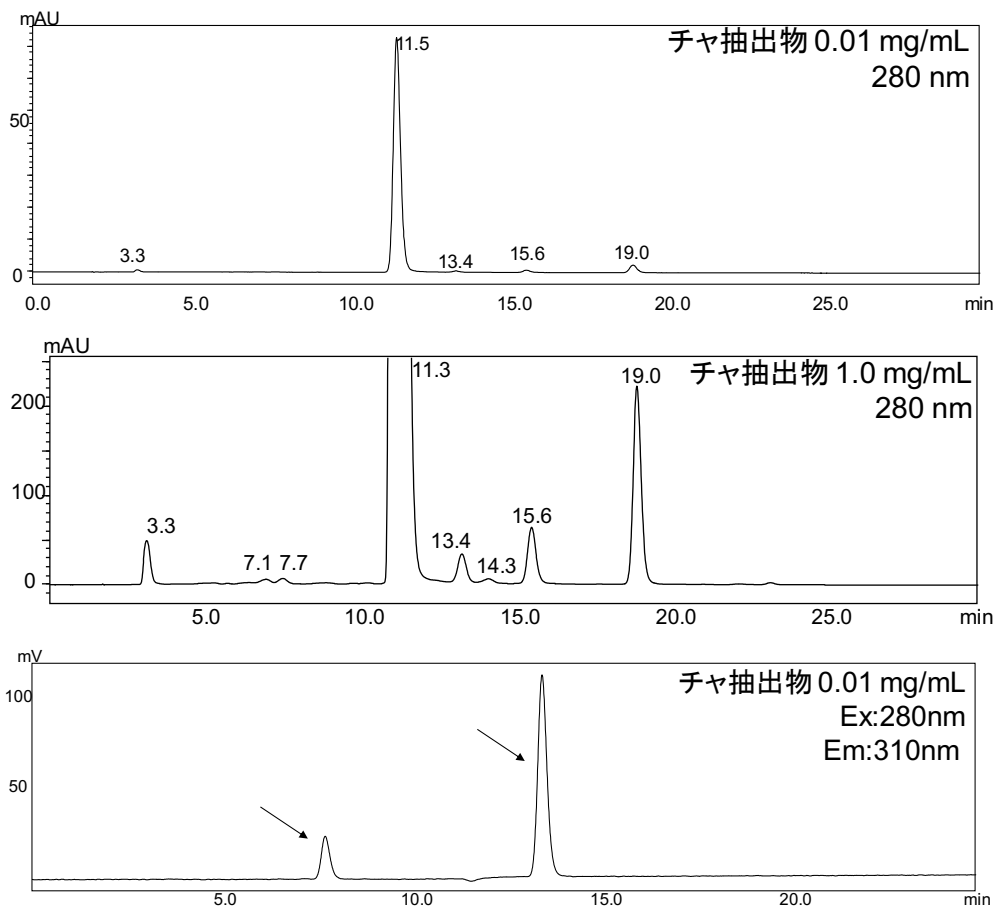


Fig.8 チャ抽出物の HPLC クロマトグラム (UV および FL)

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

平成30年度研究分担報告書

研究分担課題：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 教授

**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、 $^1\text{H}$ -qNMR法(定量 $^1\text{H}$ -NMR法)が試験法として適用可能であるか可能性を検討した上で、適用の可能性のあるものに関して、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て研究を行なった。30年度も引き続き「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討とした。「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、 $^1\text{H}$ -qNMR法での定量が可能かの検討を行った。30年度は、クミン種子を原材料とした既存添加物の規格試験法へのアプローチとして、クミンの指標成分として適切であろう cuminaldehyde の $^1\text{H}$ -qNMR法を用いた定量の検討を行い、クミン種子の抽出物中に含まれる cuminaldehyde の $^1\text{H}$ -qNMR法を用いた定量法を確立した。また、フェヌグリークを原材料とした既存添加物の規格試験法へのアプローチとして、まず指標成分となる化合物探索を行ない、trigonelline が指標成分になりうるということがわかった。

#### A. 研究目的

$^1\text{H}$ -qNMR法は、SIトレーサブルな認証標準物質を内部標準としてNMRスペクトルの測定することで、測定対象サンプルの絶対定量ができる方法である。対象化合物の標準品がなくても絶対定量が可能であることから、標準品が手に入りにくい天然物の定量に好適な測定法である。すなわち、対象物質の $^1\text{H}$ -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。

30年度も既存添加物である「香辛料抽出物」に着目して研究を行った。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。規格基準は

定められていないが、そもそも多くの素材が材料として規定されているため、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。29年度には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。その中でクミンの種子とフェヌグリークの種子の抽出物のスペクトルで、 $^1\text{H}$ -qNMRに適用できるシグナルが観測されていた。クミン種子では、含有される cuminaldehyde (Fig. 1)を定量できる可能性があることから、30年度はクミンを主な基原とする「香辛料抽出物」について $^1\text{H}$ -qNMR法を用いた cuminaldehyde の定量が適用できるかの検討を行うことにした。一方、フェヌグリークの種子では、 $^1\text{H}$ -qNMR法が適用可能と思われる特徴的なシグナルを与える成分が不明であった。そこで、フェヌグリークの種子ではまずその成分の特定から検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1) 試薬等

DSS- $d_6$  (Fig. 2)は和光純薬の Trace Sure®規格のものを用いた。Cuminaldehyde は東京化成のものを用いた。NMR 用溶媒の methanol- $d_4$  と dimethylsulfoxide (DMSO)- $d_6$  は Isotec Inc. のそれぞれ 99.8, 99.9 atom %D をを用いた。

### 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。

### B-3) $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いたクミン種子中の cuminaldehyde の定量

今年度は、クミン種子抽出物で観測された独立したシグナルが、クミン種子に含有される特徴的な精油成分である cuminaldehyde のホルミル基プロトン由来と推定された。市販の cuminaldehyde の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルと比較したところ、ホルミル基プロトンと特定できたことから、まず、cuminaldehyde の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの実施の条件検討と、粉末生薬中の cuminaldehyde の定量を行うことにした。

### B-3-a) $^1\text{H}$ -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- $d_6$  約 5 mg を精秤して 2.00 mL の methanol- $d_4$  に溶かして内部標準用溶液とした。

Cuminaldehyde 標準品を用いた  $^1\text{H}$ -qNMR は次のように行った。Cuminaldehyde は揮発性成分でもあるので、減圧下での乾燥などは行なわず、この cuminaldehyde 標準品の製品を開封してそのまま用いた。cuminaldehyde 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 DSS- $d_6$  溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して  $^1\text{H}$ -qNMR の測定に供

した。

クミン種子粉末は、まずデシケータ中で一晚乾燥させた。これらの約 100 mg を精秤して 1.00 mL の methanol- $d_3$  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 DSS- $d_6$  溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して  $^1\text{H}$ -qNMR の測定に供した。クミンから製造された既存添加物の「香辛料抽出物」は入手できず、既存添加物での試験ができなかった。

### B-3-b) $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの測定

Cuminaldehyde とクミン種子粉末抽出液の  $^1\text{H}$ -NMR を測定し、cuminaldehyde のホルミル基 H のシグナルが  $\delta 9.92$  ppm に現れることを確認した (Fig. 3)。 $^1\text{H}$ -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、cuminaldehyde のホルミル基 H のシグナルと 0.00 ppm とした DSS- $d_6$  のシグナルの面積を比較して次式に従って cuminaldehyde の濃度を算出した。

$$C_{ca} = \frac{I_{ca}}{I_D} \times C_D$$

ただし、 $C_D$ 、 $C_{ca}$  はそれぞれ DSS- $d_6$  及び cuminaldehyde のモル濃度 (mol/mL)、 $I_D$ 、 $I_{ca}$  はそれぞれ DSS- $d_6$  及び cuminaldehyde の水素 1 個あたりのシグナル面積。

### B-4) $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いたフェヌグリーク中の成分定量のための指標成分の単離と同定

フェヌグリークの種子粉末抽出液の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルで、 $^1\text{H}$ -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 (Fig. 4A) が、これを示す化合物が不明であった。そこでまず、この化合物の単離と同定を行なった。

フェヌグリークの種子 50 g を MeOH で抽出して 5.2 g の抽出物を得た。この抽出物を *n*-hexane と 80% MeOH-水で分配し、80% MeOH-水画分を乾固後、*n*-BuOH と水で分配し、それぞれを乾固して *n*-BuOH 画分 2.81 g、水画

分 1.45 g を得た。この水画分うちの 500 mg を順相シリカゲルクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-水=6:4:1) を用いて分画、さらに逆相 ODS カラムクロマトグラフィー (MeOH-水=4:1) で分画したところ、目的のシグナルを持つ化合物を 35.5 mg 得た。

## C. 結果及び考察

### C-1) 実験結果

#### C-1-a) クミン種子中の cuminaldehyde の定量

Cuminaldehyde 標準品中の cuminaldehyde の定量を <sup>1</sup>H-qNMR 法でおこなった結果、92.3±1.4% と見積もられた。

クミン種子の生薬粉末中の cuminaldehyde の定量では、4 サンプルについて <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量を実施し、0.36±0.02%~1.84±0.06% という結果を得た。以上の結果は Table 2 に示した。

#### C-1-b) フェヌグリーク中の成分定量のための指標成分の単離と同定

単離された化合物の <sup>1</sup>H-qNMR スペクトル (methanol-d<sub>4</sub> 中) を Fig. 4B に示した。目標としていた 9.19 ppm のシグナルが観測され、8.7 ppm に二重線と思われるシグナルが重なり合って 2 種類、8.05 ppm に三重線、4.21 ppm にメチル基と思われるシグナルが観測され、非常に単純な化合物であることが推定された。8.7 ppm 付近のシグナルが近接して解析しにくいことから溶媒を DMSO-d<sub>6</sub> に変えて測定したところ、各シグナルが分離された (Fig. 4C)。この状態で <sup>13</sup>C-NMR スペクトル (Fig. 5)、2次元 NMR スペクトル (Fig. 6) を測定したところ Table 3 に示すような化学シフト値、HMBC 相関などが見られたことから、この化合物を trigonelline と決定した (Fig. 7)。文献値の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルもよく一致した [1]。各炭素、水素の帰属は Table 3 に示した。

### C-2) 考察

#### C-2-a) クミン種子中の cuminaldehyde の定量

Cuminaldehyde 標準品中の含有率 92.3% 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。精油成分ということで、メーカーでの純度測定が GC でなされており、検出できない夾雑物が無視されて高く見積もられていると考えられる。また、開封後の水蒸気の混入や若干の揮発などで純度が下がったかなども要因と考えられ、従来法での精油成分の定量の難しさと、定量 NMR 法の優位性を示すデータと考えられる。

生薬粉末に含まれる cuminaldehyde は 0.36~1.84% という含有率で品目によって幅が広がった。購入時期がバラバラで、含有量が一番少ないクミン粉末は購入後 1 年以上のものであったこと、さらに cuminaldehyde が精油であることから、粉末化してからの時間経過により成分が揮散したことに起因することも考えられた。

クミン由来の「香辛料抽出物」が入手できずに今回測定できなかった。今後何らかの手立てを用いて入手を試みたい。

#### C-2-b) フェヌグリーク中の成分定量のための指標成分の単離と同定

フェヌグリークに特徴的なシグナルが、trigonelline の 2 位プロトンのもので特定することができ、trigonelline がフェヌグリーク含有の「香辛料抽出物」の規格基準策定の指標成分として活用できる見込みがあった。ところで、trigonelline はコーヒーの生豆に含有されていると報告はある [1]。そこで、コーヒーの生豆粉末の MeOH 抽出物の <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルも測定した。フェヌグリークと比較して芳香族領域のシグナルが多いことから、<sup>1</sup>H-qNMR スペクトルで十分に判別できると考えられた (Fig. 8)。

よって、この後、単離した trigonelline を標準物質としてフェヌグリーク種子中とフェヌグリーク由来の「香辛料抽出物」に含まれる trigonelline の定量に 9.16 ppm に観測される 2 位のプロトンシグナルを測定シグナルとして <sup>1</sup>H-qNMR 法を適用できるかの試験を行う。

## D. 結論

1) クミン粉末中の cuminaldehyde の定量条件を確立した。「香辛料抽出物」のうちクミンを主な基原とする「香辛料抽出物」中の規格基準を策定する場合の指標成分として cuminaldehyde を対象とし、その  $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。

2) フェヌグリークの抽出物の NMR スペクトルにおいて特徴的で定量 NMR 法適用可能なシグナル示す化合物が trigonelline で、そのシグナルは 2 位プロトン(DMSO- $d_6$  中で 9.16 ppm)のものであると帰属した。「香辛料抽出物」のうちフェヌグリークを主な基原とする「香辛料抽出物」では、この水素を用いた定量 NMR 法で trigonelline の定量を行うことで、規格基準の策定ができる可能性を示した。

## E. 参考文献

[1] Wu, T-S. ら, *Chem, Pharm. Bull.*, **53**(3), 347-349 (2005).

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Fukaya, Shiori; Yoshioka, Hiroki; Nagatsu, Akito, The Kampo formula “Juzen-taiho-to” exerts protective

effects on ethanol-induced liver injury in mice, *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**(3), 105-112 (2018).

## 2. 学会発表

1) 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, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 「定量 NMR( $^1\text{H-qNMR}$ )を応用したベニバナ赤色色素・carthamin の定量」, 第 17 回新規素材探索研究会セミナー, P26, (2018.6)(横浜市).

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, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 「定量 NMR 法を応用したベニバナ赤色色素 carthamin の吸光係数の検証」, 第 64 回日本薬学会東海支部大会, H-7S, (2018.6)(名古屋市).

3) 藤原裕未, 本間篤史, 永津明人, 「カエデ属植物の遺伝子鑑別法の開発」, 日本生薬学会第 65 年会, 1P-87, (2018.9)(広島市).

## 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

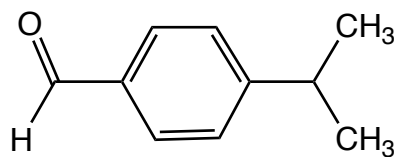


Fig. 1 Cuminaldehyde の構造

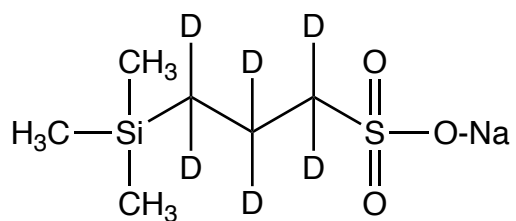


Fig. 2 DSS-*d*<sub>6</sub> の構造

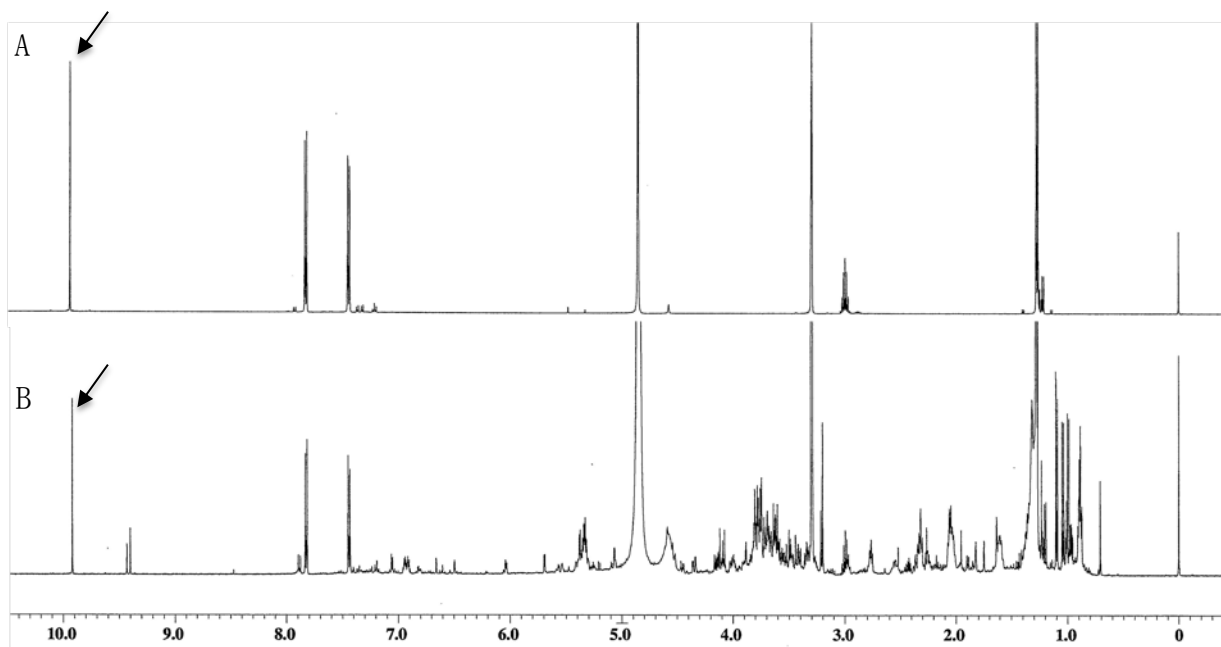


Fig. 3 Cuminaldehyde 標準品(A)とクミン粉末(B)の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (methanol- $d_3$ , 500 MHz)  
矢印のシグナルが cuminaldehyde のアルデヒド基の H シグナル ( $\delta$  9.92 ppm)

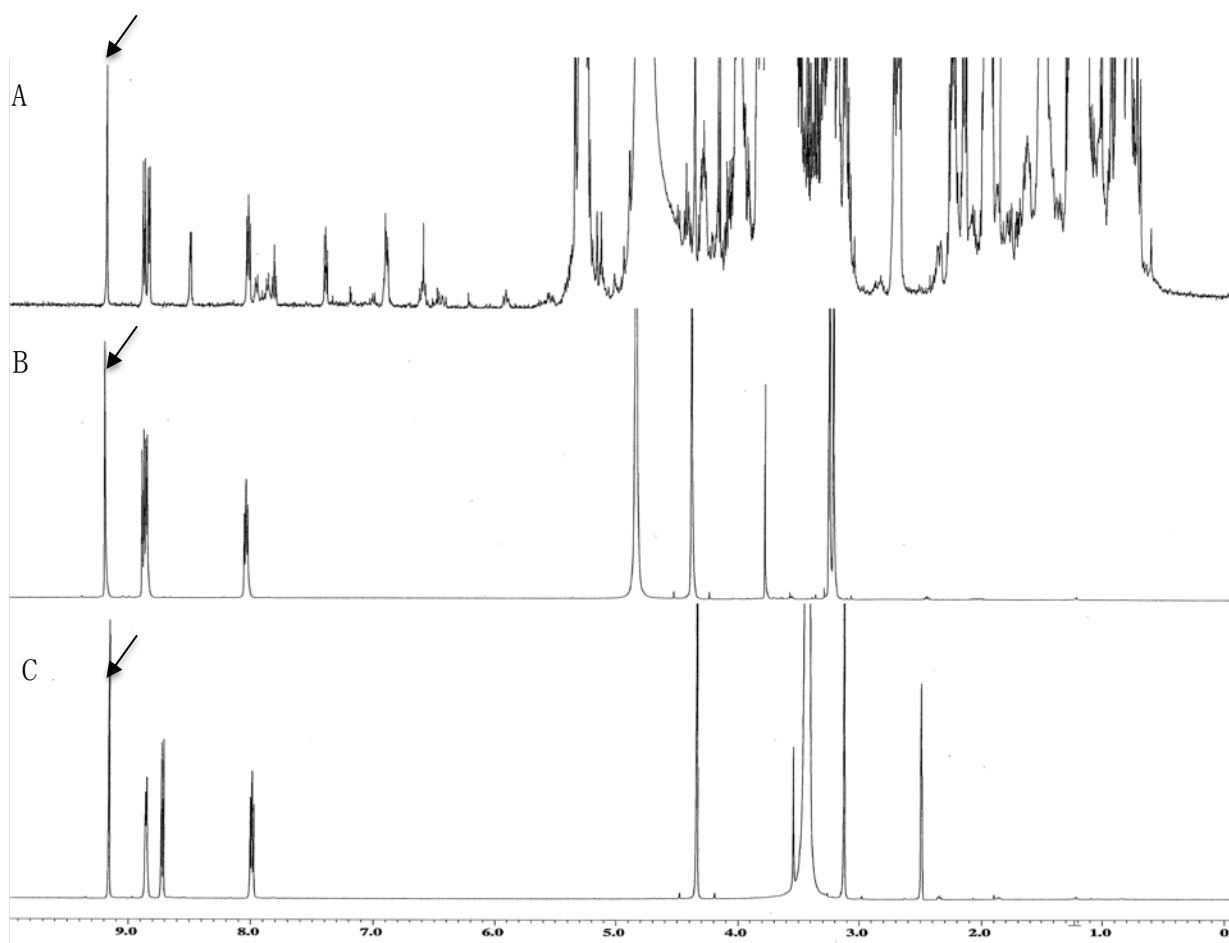


Fig. 4 フェヌグreek粉末の MeOH 抽出物(in methanol- $d_3$ , A)と単離した trigonelline の methanol- $d_3$  中 (B)と DMSO- $d_6$  中(C)の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (500 MHz)  
 矢印のシグナルが trigonelline の 2 位の H シグナル



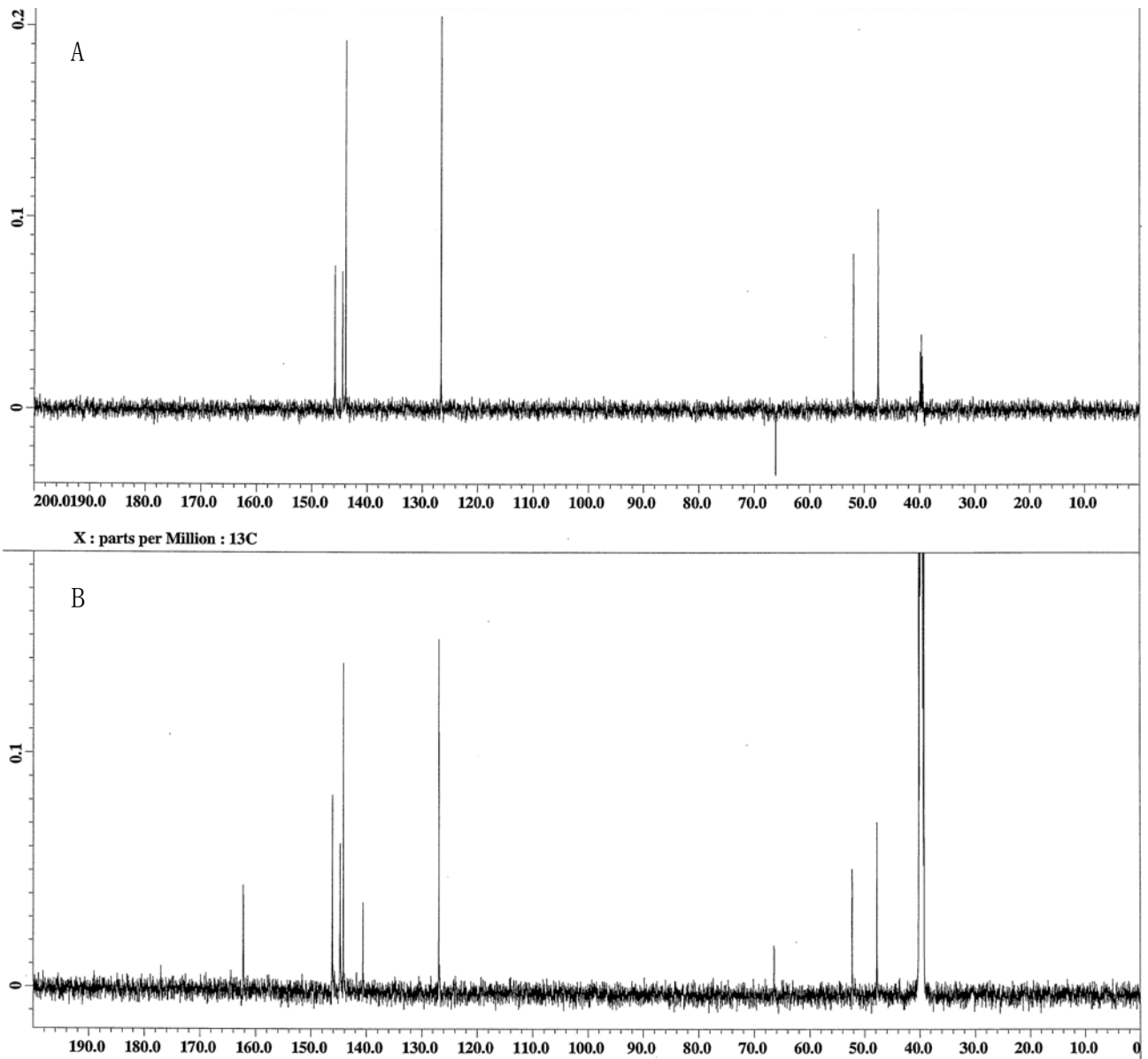


Fig. 5 Trigonelline の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz)  
DEPT135 (A)と完全デカップリング (B)

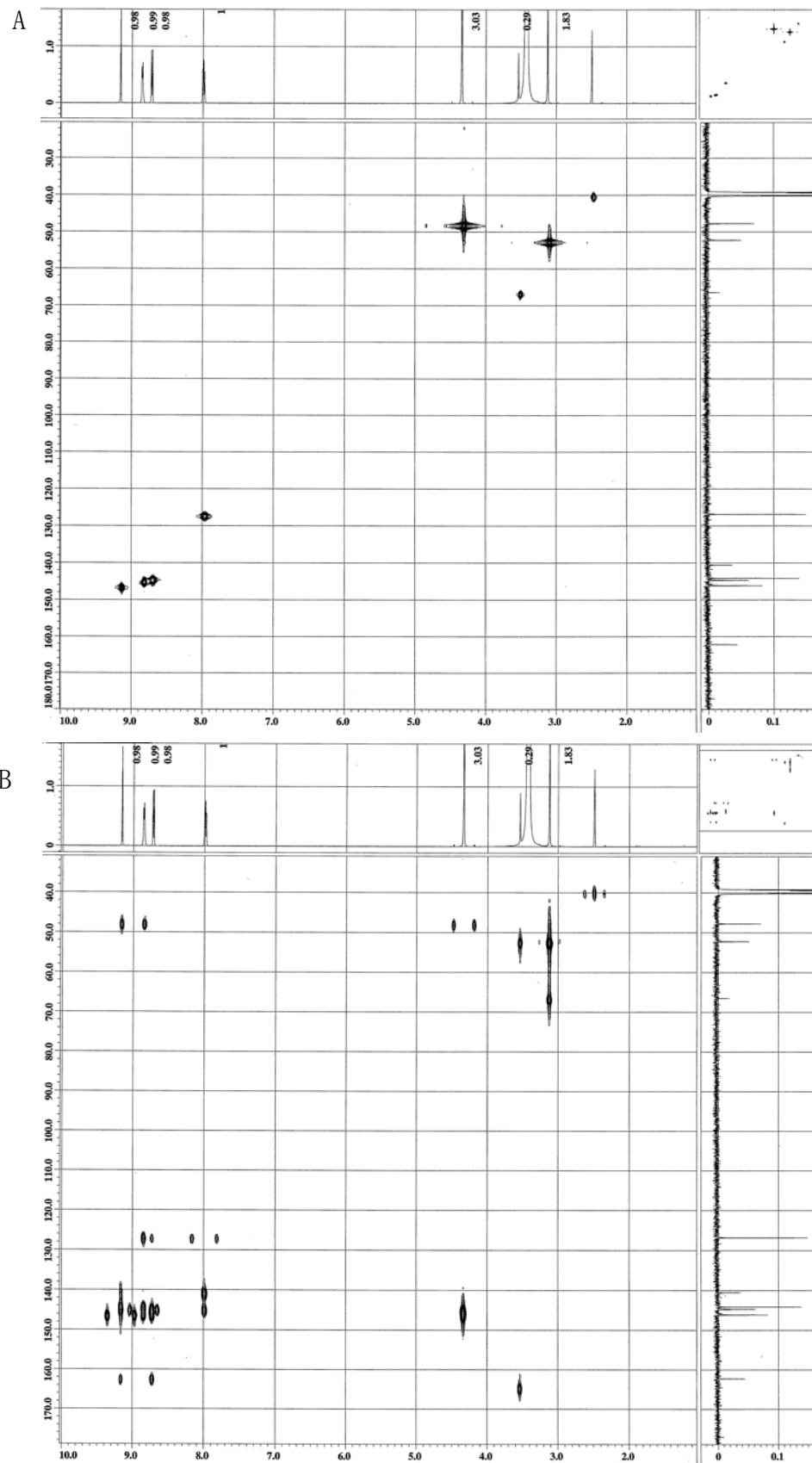


Fig. 6 Trigonelline の HMQC (A) と HMBC (B) のスペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)

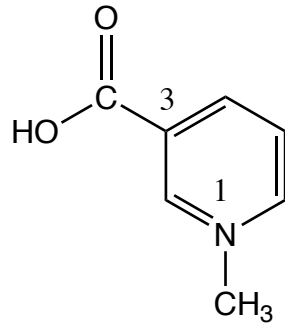


Fig. 7 trigonelline の構造

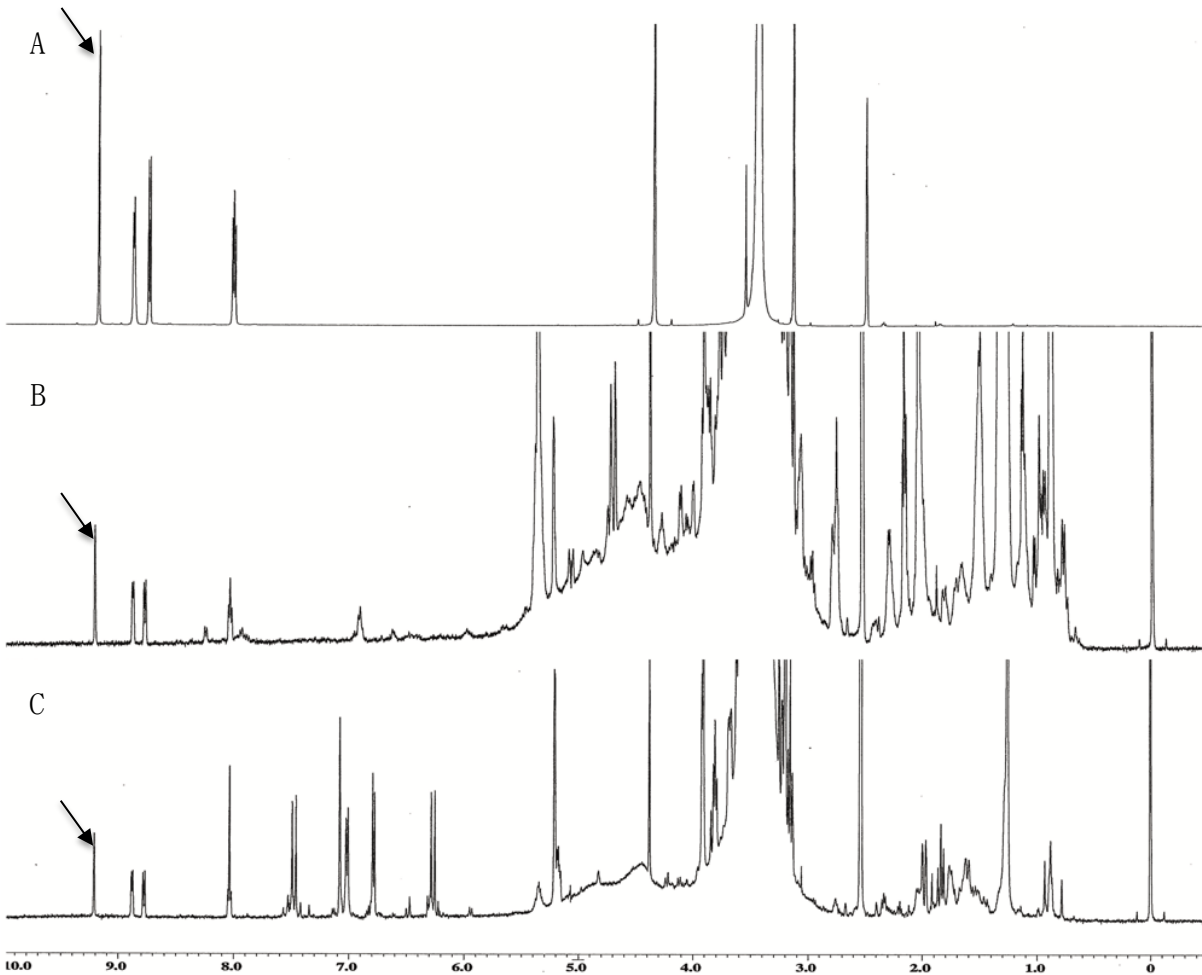


Fig. 8 単離した trigonelline (A), フェヌグreek 粉末の MeOH 抽出物(B)とコーヒー生豆粉末の MeOH 抽出物(C)の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  
 矢印のシグナルが trigonelline の 2 位の H シグナル( $\delta$  9.16 ppm)

Table 1 <sup>1</sup>H-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  $^1\text{H}$ -qNMR 法で定量された cuminaldehyde の含有率

samples		含有率(%) $\pm$ SD
cuminaldehyde 標準品	(n=3)	92.3 $\pm$ 1.4
生薬粉末	A (n=3)	0.36 $\pm$ 0.02
	B (n=3)	0.64 $\pm$ 0.02
	C (n=4)	1.06 $\pm$ 0.02
	D (n=3)	1.84 $\pm$ 0.06

Table 3 単離した trigonelline の NMR スペクトルデータ

(in DMSO- $d_6$ ,  $\delta_C$ : 125 MHz,  $\delta_H$ : 500 MHz)

No.	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2	146.1	9.16 (1H, br-s)	140.6, 144.7, 146.1, 162.3
3	140.6		
4	144.2	8.72 (1H, br-d, 7 Hz)	126.2, 144.7, 146.3, 162.3
5	126.9	7.95 (1H, t, 7 Hz)	140.6, 144.2
6	144.7	8.85 (1H, br-d, 7 Hz)	126.9, 144.2, 146.1
<i>N</i> -CH <sub>3</sub>	47.8	4.34 (3H, s)	144.7, 146.1
CO <sub>2</sub> H	162.3		

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

（H29-食品-一般-007）

平成30年度研究分担報告書

研究分担課題：qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究  
～相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法に関する研究～  
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、<sup>1</sup>H-qNMRとLCを組み合わせた相対モル感度（RMS）法の酵素処理ナリンジン中のナリンジンおよび主要な糖転位ナリンジン類（ナリンジンのグルコースの3位にグルコースが $\alpha$ -1,4結合で順次1～4個結合した化合物）の定量への適用性について検討した。ナリンジンおよび4-ヒドロキシ安息香酸メチルを定量用標品として選択し、得られたナリンジンまたは4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対する主ナリングニン配糖体のRMS（ナリンジン：0.994～1.00，4-ヒドロキシ安息香酸メチル：1.23～1.24）から酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび主要な糖転位ナリンジン類の含量を各測定対象を標品とする絶対検量線法と絶対検量線法と同程度に正確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9版食品添加物公定書に記載されている。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<sup>1)</sup>。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<sup>2,3)</sup>。qNMRのうち、<sup>1</sup>H-NMRを利用したqNMR（<sup>1</sup>H-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  $^1\text{H}$ -qNMR は、AQARI (Accurate QuAntitative NMR with Internal reference material) と呼ばれ、残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬などの純度分析<sup>4,5,6)</sup>、生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析<sup>7,8,9)</sup>へ利用されている。また、最近では、計量計測トレーサビリティを確保した  $^1\text{H}$ -qNMR と汎用性、普及性、分離性能が高いクロマトグラフィー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相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity, RMS) を用いた分析法 (RMS 法) が考案され、食品や食品添加物などの分析へ利用されている<sup>10-14)</sup>。

そこで本研究では、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、今年度は酵素処理ナリンジン中のナリンジン (図 1) および糖転位ナリンジン類の定量分析における RMS 法の適用性について検討した。

## B. 研究方法

### B-1) 試薬・試液等

酵素処理ナリンジン製品 (試料 1 : A172, 試料 2 : C2010) は国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部よりご供与いただいた。ナリンジンは、シグマアルドリッチ株式会社製 (Cat.No.71162-25G) を用いた。4-ヒドロキシ安息香酸メチルは、東京化成株式会社製 (Cat.No.H0216) を用いた。2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- $d_6$  sodium salt (DSS- $d_6$ ) は富士フィルム和光純薬 (株) 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。重ジメチルスルホキシド (DMSO- $d_6$ ) は関東化学 (株) 製を用いた。その他の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。

なお、試液は以下のように調製した。

$^1\text{H}$ -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  $^1\text{H}$ -qNMR 標準溶液とした。 $^1\text{H}$ -qNMR 標準溶液の DSS- $d_6$  濃度 (0.1999 mg/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) 製)

分析用 HPLC : 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, カラム恒温槽 : CTO-10AS, 紫外可視分光検出器 : SPD-10AV, 脱気装置 : DGU-12A, データ処理装置 : LabSolutions) ((株) 島津製作所製)。

分析用 HPLC : (株) 東ソー製 LC システム (ポンプ : CCPS, システムコントローラー : SC-8020, 脱気装置 : SD-8022) に紫外可視分光検出器 (SPD-10A, (株) 島津製作所製) およびカラム恒温槽 (CTO-6A, (株) 島津製作所製) を接続したもの。

マイクロ天秤 : BM-20 ((株) エー・アンド・デイ製)

セミマイクロ天秤 : AUW220D ((株) 島津製作所製)

### B-3) 相対モル感度 (RMS) を利用した HPLC によるナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の定量

#### B-3-1) 糖転位ナリンジン類の分画

試料 1 (A172) 4 g について分取 HPLC 条件 1 による分画を行い、Fr.A から Fr.H を得た。得られた画分のうち、Fr.D から Fr.H について、分取 HPLC 条件 2 による精製を行い、Fr.F, Fr.G および Fr.H より  $\alpha$ -Glycosyl naringin (Naringenin 7-*O*-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-G**, 8.4 mg), Fr.F より Naringenin 7-*O*-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-2G**, 15 mg), Fr.E より Naringenin 7-*O*-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-3G**, 9.0 mg) およ

び Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-4G**, 7.6 mg) をそれぞれ単離した。また、別途試料 2 (C-2010) 0.8 g について分取 HPLC 条件 1 および 2 による分画を行い、 $\alpha$ -Glycosylnaringin (**Naringin-G**) を 13.4 mg 単離した。

・分取 HPLC 条件 1

カラム：Develosil ODS-UG-5 (10  $\times$  250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m 野村化学株式会社製), カラム温度：45°C, 検出波長：280 nm, 流速：5.0 mL/min, 溶離液：20vol%アセトニトリル

・分取 HPLC 条件 2

カラム：Develosil ODS-UG-5 (4.6  $\times$  250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m, 野村化学 (株) 製), カラム温度：45°C, 検出波長：280 nm, 流速：1.0 mL/min, 溶離液：20vol%アセトニトリル

**B-3-2)  $^1$ H-qNMR によるナリンジン, 糖転位ナリンジン類および 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの純度測定**

Naringin-3G は 7.6 mg, Naringin-4G は 9.0 mg, ナリンジン, Naringin-G, Naringin-2G は 10 mg, ナリンジンおよび 4-ヒドロキシ安息香酸メチルは 15 mg を精密に量り,  $^1$ H-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  $^1$ H-qNMR 測定を行った。DSS- $d_6$  のシグナル面積強度を 9.000 としたときの各化合物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, 各試料の含量 (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,  $I_{\text{sample}}$  = 測定対象の特定基のシグナル面積強度,  $I_{\text{std}}$  = 内標準物質のシグナル面積強度 (DSS- $d_6$  : 9.000),  $H_{\text{sample}}$  = 測定対象の特

定基の水素数,  $H_{\text{std}}$  = 内標準物質の特定基の水素数 (DSS- $d_6$ :CH<sub>3</sub> $\times$ 3=9),  $M_{\text{sample}}$  = 測定対象の分子量,  $M_{\text{std}}$  = 内標準物質の分子量 (DSS- $d_6$  : 224.36),  $W_{\text{sample}}$  = 測定対象の秤取量 (mg),  $C_{\text{std}}$  =  $^1$ H-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 ( $\delta$  0 ppm) とし,  $\delta$  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-3-3) 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の RMS の算出**

4-ヒドロキシ安息香酸メチル, ナリンジン, 酵素処理ナリンジン類 (Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G) について,  $^1$ H-qNMR により算出された含量 (純度) に基づく次の濃度範囲 (ナリンジン : 1.3 ~ 105  $\mu$ mol/L, Naringin-G : 1.1 ~ 91  $\mu$ mol/L, Naringin-2G : 0.9 ~ 76  $\mu$ mol/L, Naringin-3G : 1.3 ~ 107  $\mu$ mol/L, Naringin-4G : 1.1 ~ 88  $\mu$ mol/L, 4-ヒドロキシ安息香酸 : 5.8 ~ 93  $\mu$ mol/L) で 9 ~ 10 点濃度の溶液 (溶媒 : 20vol%アセトニトリル) をそれぞれ調製し, これらの溶液を以下の HPLC 条件にて分析した。

カラム：Develosil ODS-UG-5 (4.6  $\times$  250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m, 野村化学 (株) 製), カラム温度：45°C, 検出波長：280 nm (ナリンジンおよび糖転位ナリンジン), 254 nm (4-ヒドロキシ安息香酸メチル), 流速：0.9 mL/min, 溶離液：0.1vol%ギ酸含有 20vol%アセトニトリル, 注入量：10  $\mu$ L

原点を通る各試料の回帰直線の傾き (モル吸光係数) を算出し, 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジンおよび酵素処理ナリンジン類の回帰直線の傾きの比 (ナリンジンまたは酵素処理ナリンジン類の傾き / 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの傾き) から 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジンおよび酵素処理ナリンジン類の RMS を算出した。



### B-3-4) ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS の算出

B-3-3 の項に示した各試料の回帰直線の傾き（モル吸光係数）を基に，ナリンジンに対する酵素処理ナリンジンの RMS を算出した。

### B-3-5) RMS を用いた酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジンの定量

試料約 10 mg を精密に量り，水を加え超音波で溶解し正確に 10 mL とした後，メンブランフィルター（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ）でろ過したものを試験溶液とした。標準溶液は，4-ヒドロキシ安息香酸メチルおよびナリンジンについて調製した。4-ヒドロキシ安息香酸メチル（純度：93.8%）では，本品 15 mg を精密に量り，20vol%アセトニトリルを加え 100 mL としたものを標準原液①とした（濃度：140  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準原液①1 mL を正確にとり，20vol%アセトニトリルを加え 10 mL とした（濃度：14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）後，この溶液 3 mL を正確にとり 20vol%アセトニトリルを加え 5 mL としたものを標準溶液①とした（0.0084  $\text{mg}/\text{mL}$ ，55  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）。ナリンジン（純度：81.1%）では，本品 15 mg を精密に量り，20vol%アセトニトリルを加え 100 mL としたものを標準原液②とした（濃度：122  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準原液②10 mL を正確にとり，20vol%アセトニトリルを加え 20 mL とした（濃度：61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）後，この溶液 5 mL を正確にとり 20vol%アセトニトリルを加え 10 mL としたものを標準溶液②とした（0.0031  $\text{mg}/\text{mL}$ ，53  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ）。これら試験溶液および標準溶液①または②を以下の HPLC 条件にて分析した。

カラム：Develosil ODS-UG-5（4.6 $\times$ 250 mm，粒子径 5  $\mu\text{m}$ ，野村化学（株）製），カラム温度：45 $^{\circ}\text{C}$ ，検出波長：280 nm（ナリンジンおよび糖転位ナリンジン），254 nm（4-ヒドロキシ安息香酸メチル），流速：0.9 mL/min，溶離液：0.1vol%ギ酸 20vol%アセトニトリル，注入量：10  $\mu\text{L}$

得られた試験溶液中のナリンジンおよび

糖転位ナリンジンのピーク面積  $A_{\text{Sample}}$  及び標準溶液中の4-ヒドロキシ安息香酸メチルまたはナリンジンのピーク面積  $A_{\text{Ref}}$  から，次式により含量を求めた。

$$\text{Content (\%)} = \frac{C_{\text{REF}}}{C_{\text{T}}} \times \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Ref}}} \times \frac{M_{\text{Sample}}}{M_{\text{Ref}}} \times \frac{1}{\text{RMS}} \times 100$$

ただし， $C_{\text{T}}$  は試験溶液 1 mL あたりの試料の量（mg）， $C_{\text{REF}}$  は標準溶液①または②1 mL あたりの4-ヒドロキシ安息香酸メチルまたは定量ナリンジンの量（mg）， $M_{\text{Sample}}$  は測定対象の分子量， $M_{\text{Ref}}$  は定量用標品（4-ヒドロキシ安息香酸メチル：152.15，ナリンジン：580.54）の分子量，RMS：4-ヒドロキシ安息香酸メチルまたはナリンジンに対する測定対象の相対モル感度である。

### B-3-6) 測定対象の絶対検量線法による酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジンの定量

試験溶液および HPLC 条件は，B-3-5 の項に示す方法に従った。なお，糖転位ナリンジン類の検量線用標準溶液は，各試料の含量（純度）に基づく次の濃度範囲（ナリンジン：0.76～61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，Naringin-G：0.85～68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，Naringin-2G：0.86～68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，Naringin-3G：1.4～114  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，Naringin-4G：1.3～108  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で9～10点濃度の溶液（溶媒：20vol%アセトニトリル）をそれぞれ調製した。

調製した試験溶液を分析し，ピーク面積と検量線によって得られた試験溶液中のナリンジンおよび各糖転位ナリンジン濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を求め，次式によって試料中の各糖転位ナリンジン含量（%）を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \frac{C \times W}{W \times 1000} \times 100$$

ただし，C は試験溶液 1 mL あたりの測定対象の量（ $\mu\text{g}$ ），V は試験溶液の量（mL），W は試料の採取量（mg）である。

### B-3-7) グルコアミラーゼを用いた酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の定量

食品添加物公定書に記載されている酵素処理ヘスペリジンの定量法を参考にナリンジン、 $\alpha$ -Glycosylnaringin、 $\alpha$ -グルコシル残基量を定量し、その合計から総ナリンゲニン配糖体の含量 (%) を求めた。

#### B-3-7-1) ナリンジンおよび Naringin-G の定量

乾燥した製品約 1 g を精密に量り、水 100 mL に溶解した。この溶液をアクリル酸エステル吸着用樹脂 (アンバーライト XAD-7HP) 50 mL を充填した内径約 25 mm のガラス管に注ぎ、1 分間に 2.5 mL の速さで流出させた後、水 250 mL で洗浄した。次に、50vol% エタノール 200 mL を 1 分間に 2.5 mL の速さで流し、吸着画分を溶出させた。この溶出液を濃縮して全量を約 40 mL とした後、グルコアミラーゼ 10000 単位を添加し 55°C で正確に 30 分間放置した。さらに、95°C で 30 分間加熱した後、室温まで冷却し水を加えて正確に 50 mL とし、A 液とした。この液 3 mL を正確に量り、20vol% アセトニトリルを加えて正確に 50 mL とし、試験溶液とした。別に乾燥した定量用 Naringin-G 約 10 mg を精密に量り、20vol% アセトニトリルに溶かして正確に 10 mL とし、標準溶液とした。試験溶液および標準溶液をそれぞれ 10  $\mu$ L ずつ量り、B-3-3 の項で示した HPLC 条件にて分析した。試験溶液のナリンジン及び Naringin-G のピーク面積  $A_N$  及び  $A_G$  並びに標準溶液の Naringin-G のピーク面積  $A_R$  を測定し、次式によりナリンジン及び Naringin-G の含量を算出した。

ナリンジン含量：

$$\text{Content (\%)} = \frac{C_G}{W} \times \frac{A_N}{A_R} \times \frac{50}{10} \times \frac{50}{3} \times \frac{580.53}{742.68} \times 100$$

Naringin-G 含量：

$$\text{Content (\%)} = \frac{C_G}{W} \times \frac{A_G}{A_R} \times \frac{50}{10} \times \frac{50}{3} \times 100$$

ただし、W は試料採取量 (g)、 $C_G$  は定量用 Naringin-G の採取量 (g) である。

#### B-3-7-2) グルコアミラーゼ処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基量の定量

B-3-7-1 の項で得られた A 液 20  $\mu$ L を量り、D-グルコース定量用発色試液 3 mL を正確に加えて振り混ぜた後、37°C で正確に 5 分間放置した。室温まで冷却したものを試験溶液とし、波長 505 nm における吸光度を測定した。対照には、水 20  $\mu$ L を用いて試験溶液と同様に操作した液を用いた。別に空試験を行い、補正した。ただし、空試験溶液は、水約 40 mL にグルコアミラーゼ 10000 単位を添加し、55°C で 30 分間放置した後、95°C で約 30 分間加熱した。室温まで冷却した後、水を加えて正確に 50 mL とし、空試験溶液を試験溶液と同様に操作して吸光度を測定した。別に D (+) -グルコース標準溶液 (濃度 0.5, 1, 2, 5 mg/mL) を調製した。これらの標準溶液については、試験溶液と同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作成した。この検量線と補正した検液の吸光度から試験溶液中の D (+) -グルコース濃度を求め、次式によりグルコアミラーゼ処理により遊離する  $\alpha$ -グルコシル残基量を求めた。

$$\text{Content (\%)} = \frac{C \times V}{W \times 1000} \times \frac{162}{180} \times 100$$

ただし、C は試験溶液 1 mL あたりの D (+) -グルコースの量 ( $\mu$ g)、V は試験溶液の量 (50 mL)、W は試料の採取量 (mg) である。

#### B-3-7-3)

##### 総ナリンゲニン配糖体含量の算出

次の計算式により、総ナリンゲニン配糖体の含量を求めた。

総ナリンゲニン配糖体含量 (%)  
= ナリンゲン含量 (%) +  $\alpha$ -Glycosyl  
naringin 含量 (%) + グルコアミラーゼ処理  
により遊離した  $\alpha$ -グルコシル残基量  
(%)

## C. 結果及び考察

### C-1) 糖転位ナリンジン類の分画

酵素処理ナリンジンは、ナリンジンにシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase) を作用させ、ナリンジンに様々な長鎖をもつ  $\alpha$ -1,4-glucan 鎖 (ポリマルトース) を付加して水溶性を高めた食品添加物であり、苦味料として利用されている。本研究では、酵素処理ナリンジン中のナリンジンや糖転位ナリンジンの定量分析における RMS 法の適用性を明らかにするため、RMS の算出に必要な糖転位ナリンジン類の単離を試みた。まず、酵素処理ナリンジン (試料 1 : A172, 試料 2 : C-2010) を HPLC で分析したところ、図 1 に示すクロマトグラムが得られた。そこで、Peak D (Fr.D), E (Fr.E), F (Fr.F), G (Fr.G) および H (Fr.H) を分画の対象とし、分取 HPLC による分画を行った。その結果、図 2 に示すように、試料 4 g を用いた分画では、Fr.F, Fr.G および Fr.H より  $\alpha$ -Glycosylnaringin (Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-G**, 8.4 mg), Fr.F より Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-2G**, 15 mg), Fr.E より Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-3G**, 9.0 mg) および Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-4G**, 7.6 mg) をそれぞれ単離した (図 3)。なお、

本分画より Naringin (4.8 mg) を併せて単離した。また、試料 2 (C-2010) 0.8 g を用いた分画から、Naringin-G を 13.3 mg を単離した (図 4)。なお、これらの化学構造は質量分析 (ESI, negative) および NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC) (Data not shown) より同定した。

ESI-MS (negative)

Naringin-G :  $m/z$  742 ( $M^-$ ), Naringin-2G : 904 ( $M^-$ ), Naringin-3G :  $m/z$  1066 ( $M^-$ ),

Naringin-4G : 1228 ( $M^-$ )

### C-2) $^1\text{H}$ -qNMR によるナリンジン、糖転位ナリンジン類および 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの純度測定

ナリンジン、糖転位ナリンジン類は、280 nm および 340 nm 付近に吸収極大をもつ化合物である。これらの吸収極大や文献<sup>13)</sup>を参考に、今回の RMS 法における定量用標品として 4-ヒドロキシ安息香酸メチルを選択した。また、ナリンジンを定量用標品とする RMS 法による糖転位ナリンジン類の定量について併せて検討した。まず、正確な RMS の算出にあたり、単離した化合物や市販試薬の正確な純度を明らかにすることは非常に重要である。そこで、これらの純度を明らかにするため、 $^1\text{H}$ -qNMR を用いることとした。 $^1\text{H}$ -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である。そこで、表 1 に示す測定条件を用いナリンジン、糖転位ナリンジン類および 4-ヒドロキシ安息香酸メチルについて  $^1\text{H}$ -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- $d_6$ :  $\delta$  0 ppm) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。ナリンジンおよび糖転位ナリンジンでは、図 5 に示すように、 $^1\text{H}$  NMR スペクトル上、 $\delta$  1.18 ppm 付

近にラムノースのメチル基に由来するシグナル、 $\delta$  2.70~5.60 ppm にアグリコン (ナリンゲニン) の 2 位, 3 位および糖部に由来するシグナル、 $\delta$  6.00~7.50 ppm にアグリコン (ナリンゲニン) に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのうち、 $\delta$  7.36 ppm に観察されたナリンゲニンの 2' 位および 6' 位の水素に由来するシグナルは、他の分子内のシグナルと十分に分離されていたため、ナリンジンおよび糖転位ナリンジン類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、これらの純度は表 2 に示す結果であることが判明した。

4-ヒドロキシ安息香酸メチルでは、 $\delta$  3.82 ppm にメトキシ基に由来するシグナル、 $\delta$  6.87 ppm に 3 位および 5 位の水素に由来するシグナル (水素数 2)、 $\delta$  7.84 ppm に 2 位および 6 位の水素に由来するシグナル (水素数 2) がそれぞれ観察された (図 6)。これらのうち、 $\delta$  6.87 ppm のシグナルおよび  $\delta$  7.84 ppm のシグナルより純度を算出したところ、93.9% ( $\delta$  6.87 ppm) および 93.8% ( $\delta$  7.84 ppm) 結果となった。このうち、 $\delta$  6.87 ppm より算出された純度 (93.8%) を 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの純度として採用した。

#### C-2-2) 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジン、糖転位ナリンジン類の RMS の算出

4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジン、糖転位ナリンジン類 (Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G) の RMS を検討するため、10 濃度 (5.8, 7.0, 9.3, 12, 23, 28, 46, 56, 74, 93  $\mu\text{mol/L}$ ) の 4-ヒドロキシ安息香酸メチル溶液、9 または 10 濃度のナリンジンおよび糖転位ナリンジン類溶液を B-3-3 に示す HPLC 条件を用いて分析し、得られた各回帰直線の傾きの比から RMS を算出した。図 7 に示すように、4-ヒドロキシ安息香酸メチル、ナリンジン、糖転位ナリンジン類の回帰直線の決定係数は 0.9997~0.9999 と良好であることが確認された。従っ

て、これらの回帰直線は RMS の算出に利用できると考えられた。そこで、各回帰直線の傾き (ナリンジン: 12795, Naringin-G: 12785, Naringin-2G: 12738, Naringin-3G: 12724, Naringin-4G: 12859, 4-ヒドロキシ安息香酸メチル: 10352) から 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジン、糖転位ナリンジン類の RMS を算出したところ、表 3 に示すように 1.23~1.24 であることが判明した。

#### C-2-3) ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS の算出

次に、ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS を検討した。C-2-2 の項で示した各回帰直線の傾きからナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS を算出したところ、表 4 に示すように 0.994~1.00 であることが判明した。

#### C-2-4) RMS を用いた酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジンの定量

酵素処理ナリンジン製品 2 種について、RMS によるナリンジンおよび糖転位ナリンジン (Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G) の含量測定を行い (n=3)、各測定対象を標品とした絶対検量線法により算出された含量と比較した。各酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジン含量を表 5 および表 6、各酵素処理ナリンジン製品の LC クロマトグラムは図 8 にそれぞれ示した。4-ヒドロキシ安息香酸メチルを定量用標品とした RMS により算出されたナリンジン、糖転位ナリンジン類 (Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G) の含量は各測定対象の標品を用いた絶対検量線法により算出された含量と有意な差は認められなかった。また、ナリンジンを定量用標品とした RMS により算出された糖転位ナリンジン類の含量についても、各測定対象の標品を用いた絶対検量線法により算出された含量と有意な差は認められなかった。

次に、食品添加物公定書において、酵素処理ヘスペリジン、酵素処理イソクエルシトリンの定量法で採用されている方法（従来法）に従って、酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量を算出し、先程示した4-ヒドロキシ安息香酸メチルを定量用標品とする RMS 法により求められたナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の含量の合算値と比較した。その結果、公定法により算出された総ナリンゲニン配糖体含量は試料 1 (A172) で 12.9%、試料 2 (C2010) で 29.3% であり、RMS 法により算出されたナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の合算値（試料 1 : 6.4%、試料 2 : 19.3%）より高い値を示した（表 7）。これは RMS の測定対象が Naringin-4G までであることに起因しており、それらより早く溶出する糖鎖長の長い糖転位ナリンジン類の各製品中の含量が両分析法の定量値の違いに大きく影響したものと考えられた。

#### 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、酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジン（Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G）を対象とした RMS 法による定量法について検討を行った。

測定対象とは異なる定量用標品（4-ヒドロキシ安息香酸メチル）に対するナリンジンおよび糖転位ナリンジンの RMS（1.23~1.24）により算出された各測定対象の含量は、従来法（各測定対象を標品とした絶対検量線法）より得られた含量と有意な差は認められなかった。同様に、ナリンジンに対する糖転位ナリンジンの RMS（0.994~1.00）により算出された糖転位ナリンジン含量は従来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、酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンや糖転位ナリンジン（Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G）の含量を正確かつ安価に定量できることが判明

した。一方、酵素処理ナリンジン製品中の糖転位ナリンジンについては、Naringin-4G にさらに様々な鎖長のポリマルトースが付加した化合物が存在していることが明白であることから、どのくらいの糖鎖長をもつ糖転位ナリンジンまでを定量の対象とするかを明確にすることで、酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の算出における RMS 法の有効性が高まるものと考えられた。

#### 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 <sup>1</sup>H-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. Nishizaki, Y., Sato-Masumoto, N., Yokota, A., Mikawa, T., Nakanishi, K., Yamazaki, T., Kuroe, M., Numata, M., Ihara, T., Ito, Y., Sugimoto, N., Sato, K.: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. Food Additives and contaminants: Part A, **35**, 838-847 (2018).
  11. 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 <sup>1</sup>H-quantitative NMR. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **59**, 1-10 (2018).
  12. Takahashi, M., Nishizaki, Y., Morimoto, K., Sugimoto, N., Sato, K., Inoue, K.: Design of synthetic single reference standards for the simultaneous determination of sesamin, sesamol, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity. Separation Science plus, **1**, 498-505 (2018).
  13. 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 <sup>1</sup>H-quantitative NMR. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **59**, 1-10 (2018).
  14. 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

### 学会発表

1. 大槻崇, 松田美優, 松下明里, 小島豪, 松岡聖朗, 西崎雄三, 増本直子, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛: 日本薬学会第 139 年会(2019.3) (千葉市).

## G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

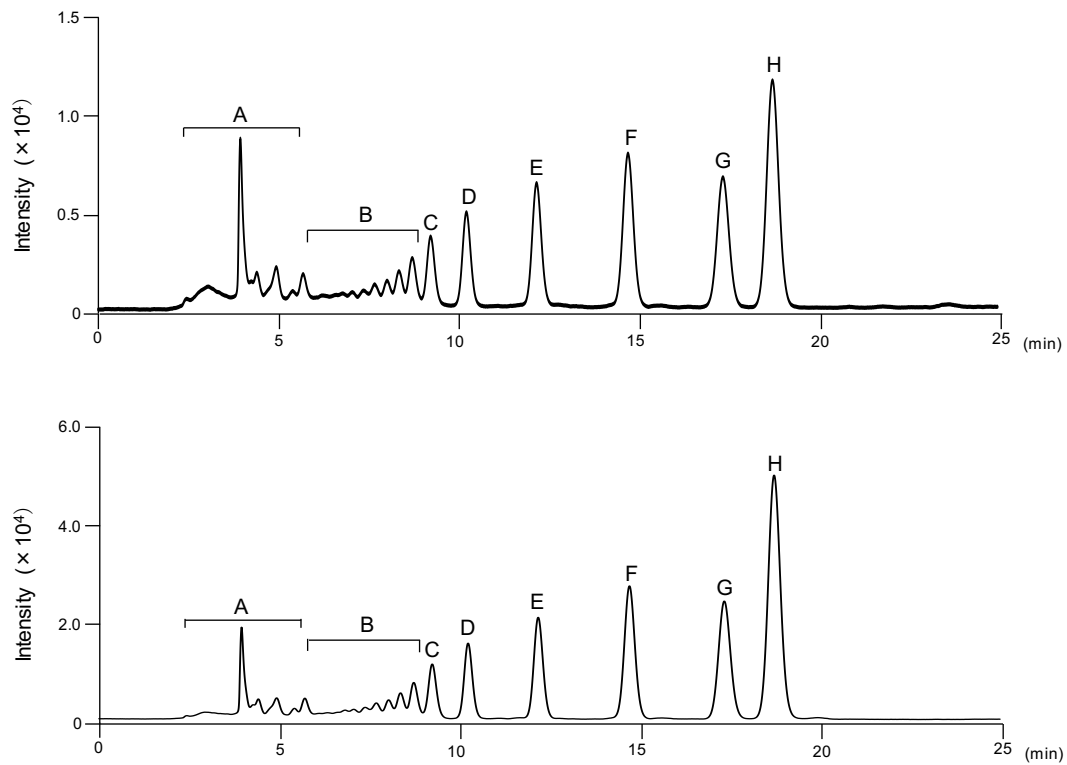


図1 酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム  
 上段：試料1 (A172)，下段：試料2 (C2010)

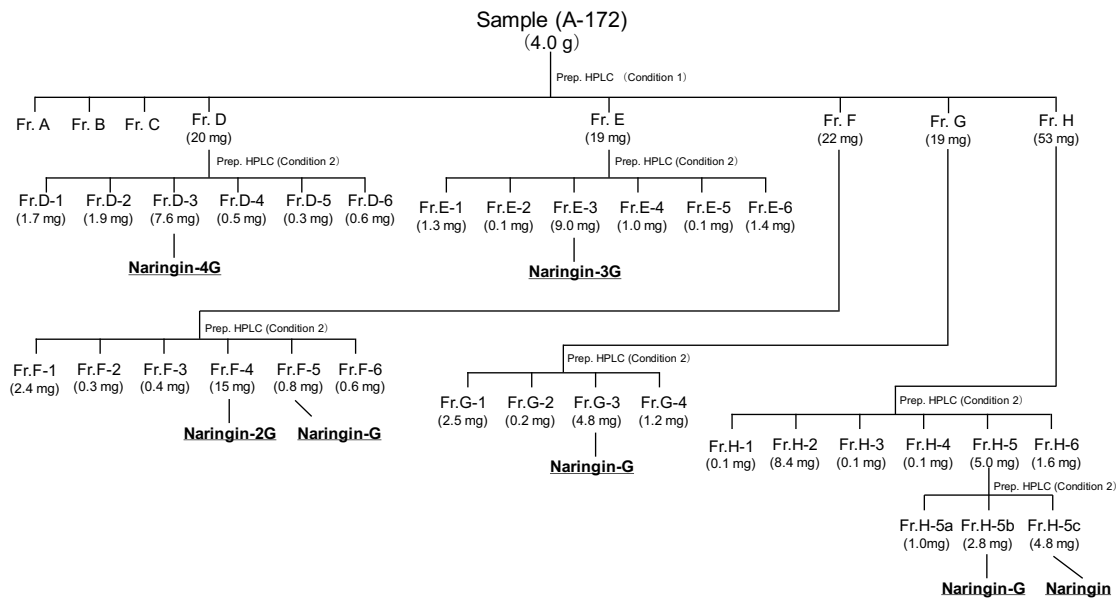


図2 酵素処理ナリンジン製品 (試料1：A172) からの糖転位ナリンジン類の単離

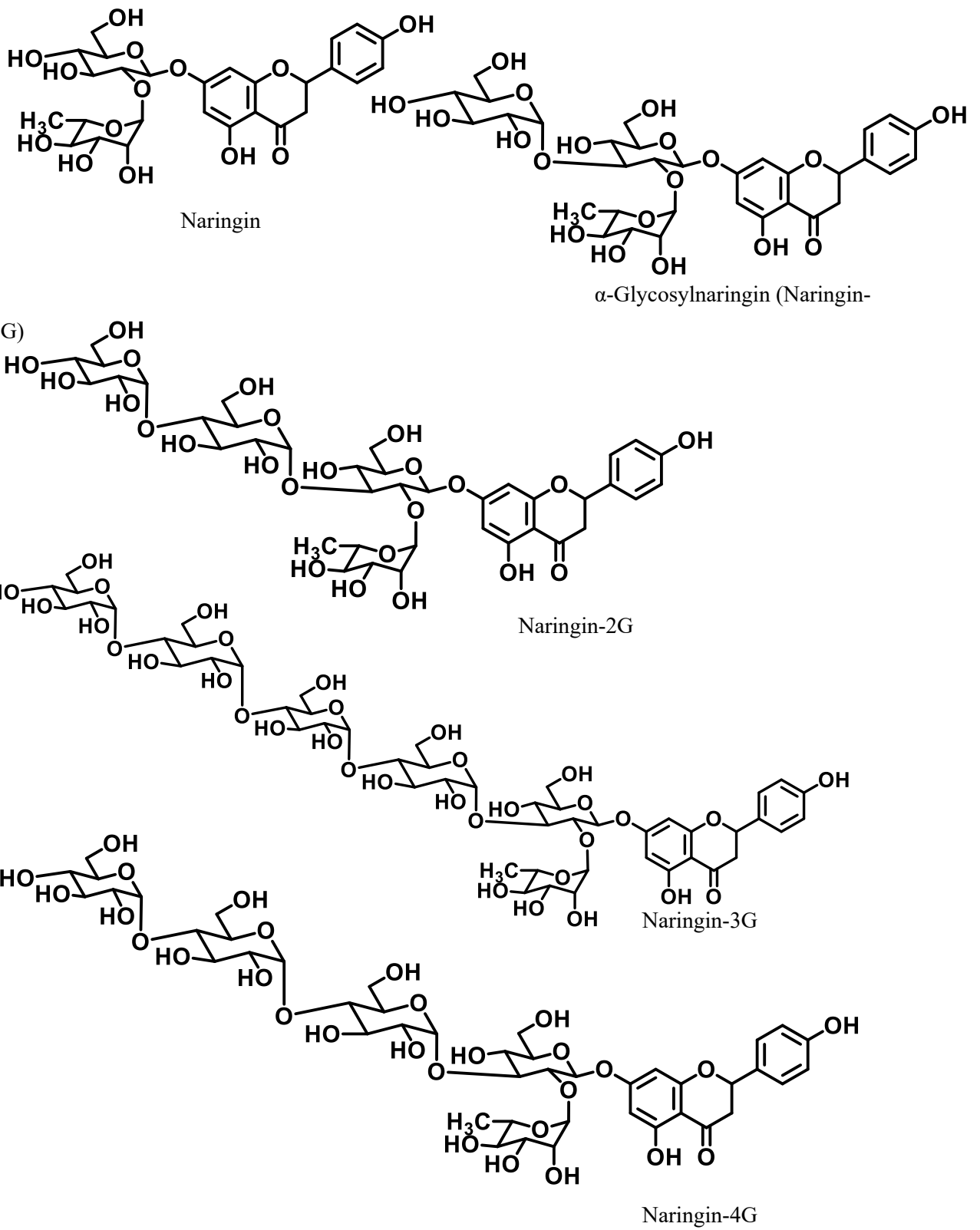


図3 ナリンジンおよび単離した糖転位ナリンジン類の化学構造



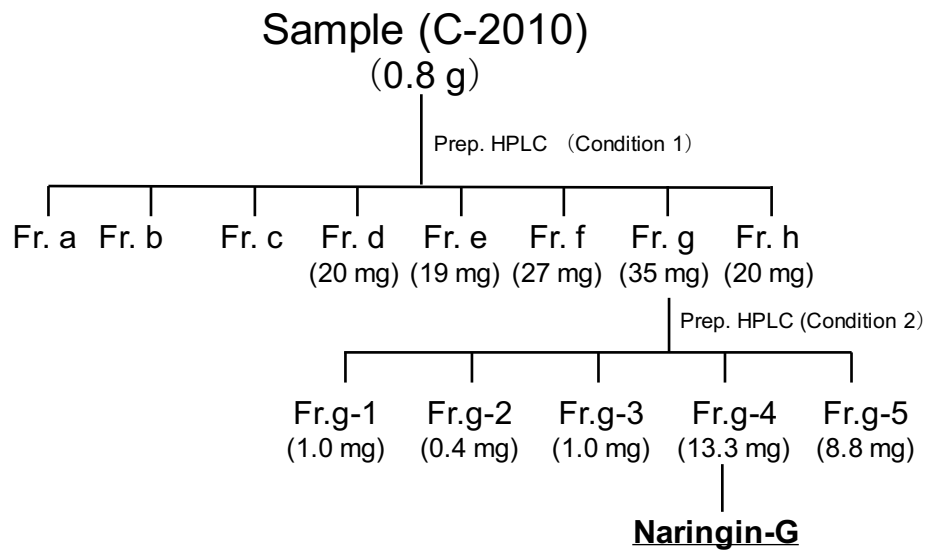


図4 酵素処理ナリンジン製品（試料2：C2010）からの  $\alpha$ -Glycosyl naringin (Naringin-G) の単離

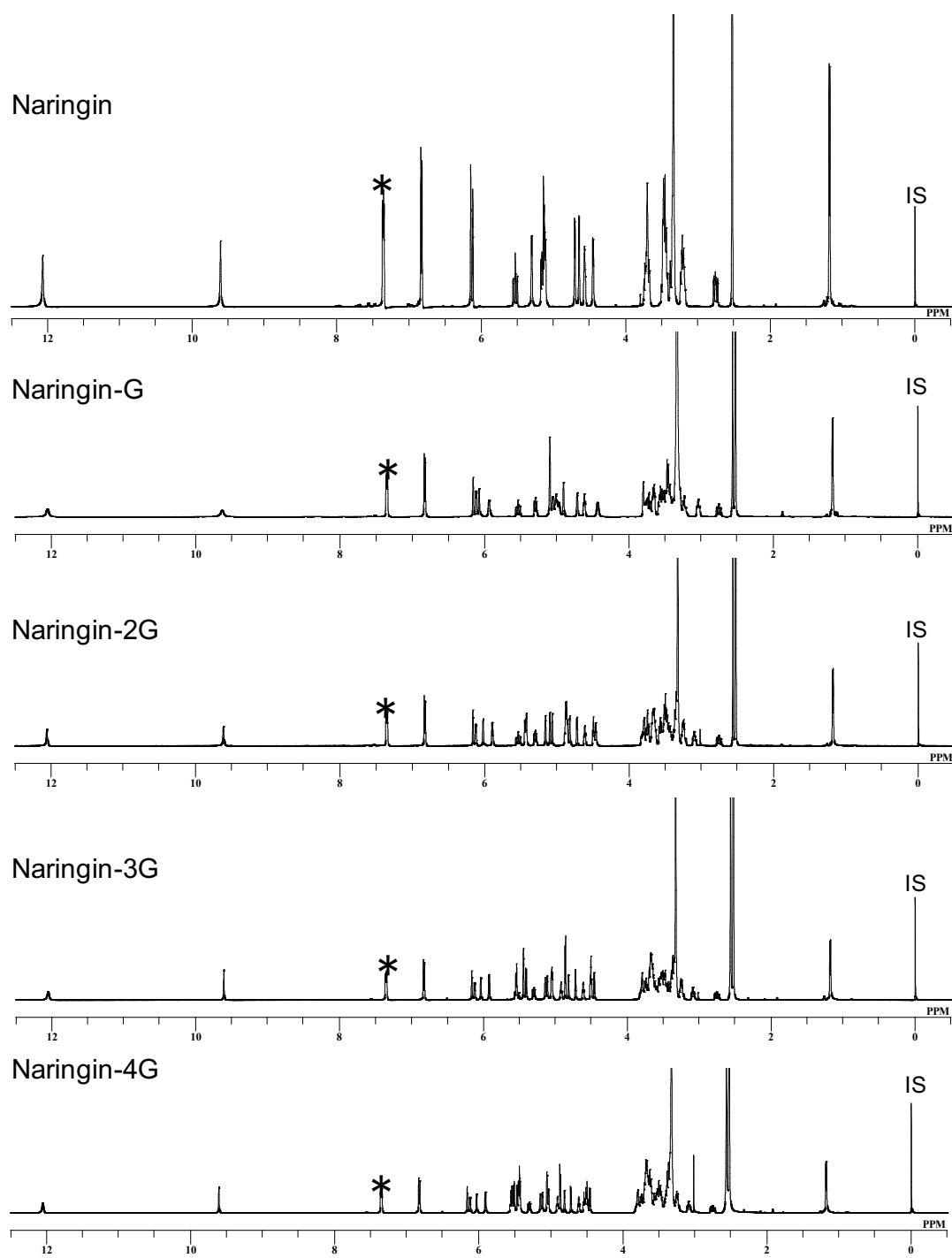


図5 ナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル  
\* : 定量シグナル

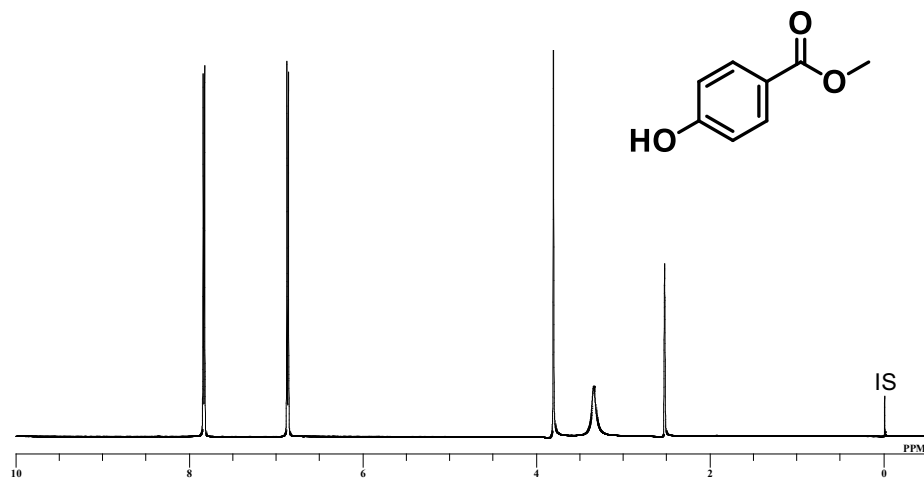


図 6 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの化学構造および<sup>1</sup>H-qNMR スペクトル

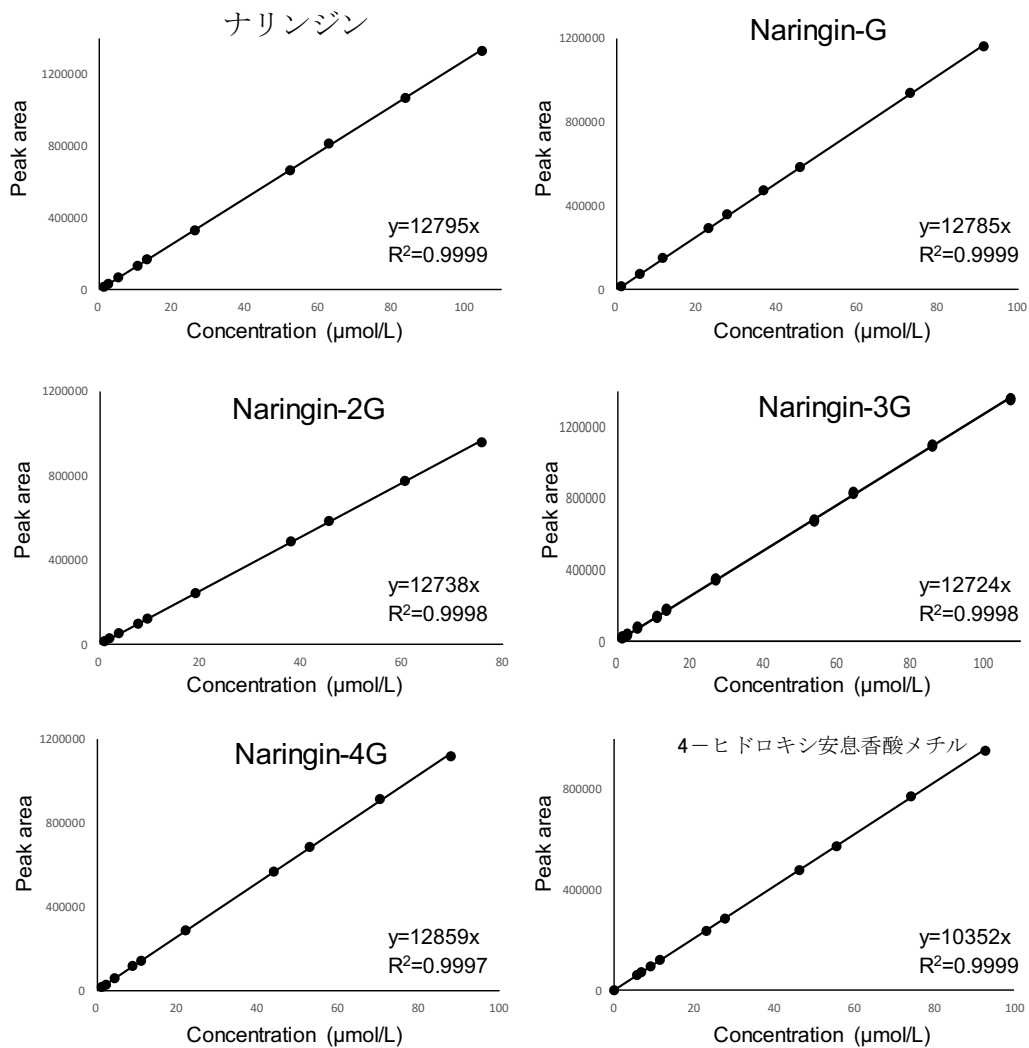


図 7 各測定対象および定量用標品の回帰直線

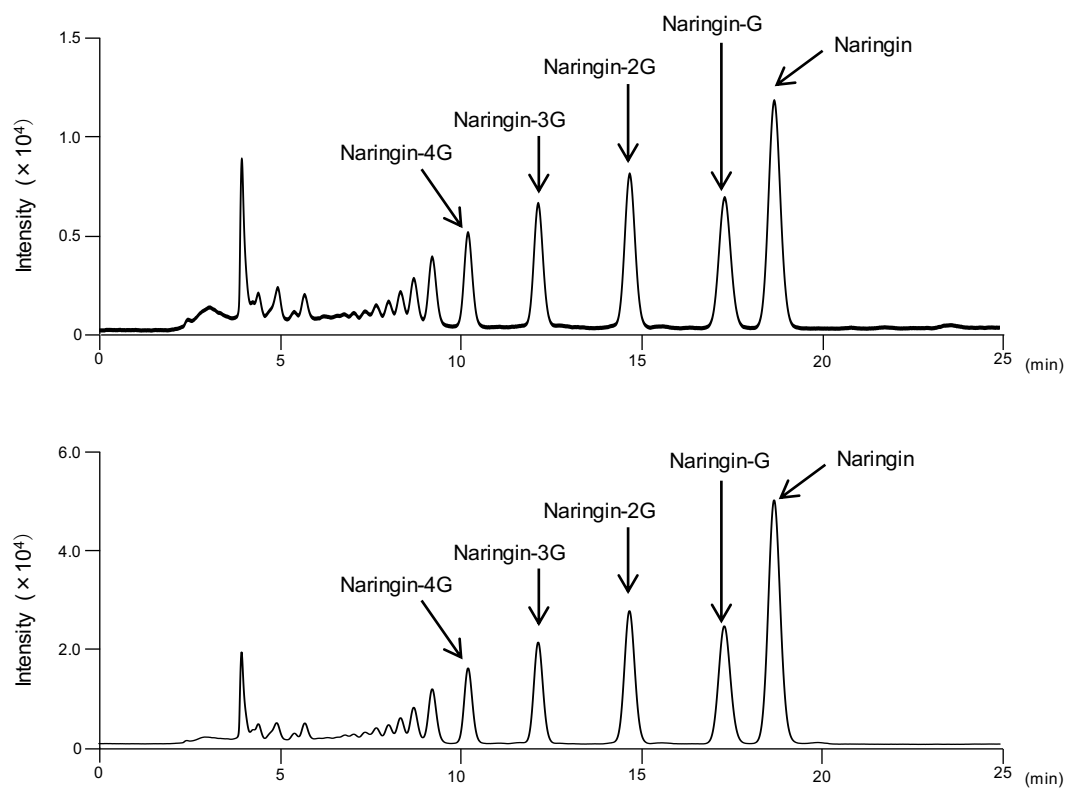


図8 酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム  
 上段：試料1 (A172), 下段：試料2 (C2010)

表 1 <sup>1</sup>H-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
<sup>13</sup> C decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2 <sup>1</sup>H-qNMR より算出されたナリンジン, 糖転位ナリンジン類, 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの含量 (純度)

	含量 (%)
ナリンジン	81.1
Naringin-G	65.8
Naringin-2G	61.3
Naringin-3G	55.9
Naringin-4G	60.9
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	93.8

表3 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジン，糖転位ナリンジン類の  
相対モル感度（RMS）

	RMS
ナリンジン	1.24
Naringin-G	1.24
Naringin-2G	1.23
Naringin-3G	1.23
Naringin-4G	1.24

表4 ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の相対モル感度（RMS）

	RMS
Naringin-G	0.999
Naringin-2G	0.995
Naringin-3G	0.994
Naringin-4G	1.00

表5 各分析手法による酵素処理ナリンジン製品（試料1：A172）中のナリンジン，  
糖転位ナリンジン含量の比較

	RMS法		RMS法		絶対検量線法	
	Standard: 4-ヒドロキシ安息香酸メチル		Standard: ナリンジン			
	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)
Naringin	1.6	0.1	-	-	1.6	0.2
Naringin-G	1.2	0.4	1.2	0.4	1.1	0.4
Naringin-2G	1.5	0.3	1.5	0.6	1.4	0.5
Naringin-3G	1.3	0.8	1.3	0.8	1.2	0.9
Naringin-4G	0.9	0.4	0.9	0.3	0.9	0.4

表 6 各分析手法による酵素処理ナリンジン製品（試料 2 : C2010）中のナリンジン、糖転位ナリンジン含量の比較

	RMS法		RMS法		絶対検量線法	
	Standard: 4-ヒドロキシ安息香酸メチル		Standard: ナリンジン			
	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)
Naringin	5.7	0.1	-	-	5.7	0.2
Naringin-G	3.5	0.9	3.5	0.9	3.5	1.0
Naringin-2G	4.2	1.0	4.2	0.9	4.2	1.0
Naringin-3G	3.4	1.0	3.4	1.0	3.4	1.0
Naringin-4G	2.5	1.0	2.5	1.2	2.5	1.1

表 7 RMS 法および従来法により算出された酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の比較

	RMS法 (%)	従来法 (%)
試料1	6.4	12.9
試料2	19.3	29.3

RMS 法の含量は、ナリンジンおよび糖転位ナリンジン（Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G）含量の合算値である。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

研究分担課題：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、簡便且つ正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、カロテノイド系色素であるリコペン (lycopene)、クチナシ果実等に含まれるクロシン (crocin)、ウコン等に含まれる色素であるクルクミン (curcumin) を対象とした合成ルートの確立を行った。

研究協力者

辻厳一郎 国立医薬品食品衛生研究所

有機化学部 主任研究官

## 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

且つ正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り、トマトなどに含まれるカロテノイド系色素であるリコペン (lycopene) の合成、またクチナシの果実などに含まれるクロシン (crocin) を対象とした合成ルート確立に関して検討を行った。さらにウコンなどに含まれる色素であるクルクミン (curcumin) を合成した。

## B. 研究方法

リコペン、クロシン、クルクミンはそれぞれ 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

リコペン、クルクミンを、それぞれ入手容易な出発原料から合成した。クロシンにおいては、その合成ルートを確立するためのモデル反応に関して検討した (Scheme 4, 5)。以下に、それぞれの合成工程について記載する。

### C-1) リコペンの合成 (Scheme 1)

化合物 1 の合成

水素化ナトリウム (60% oil suspension, 4.16 g,



0.10 mol) の THF 懸濁液 (100 mL) に 0°C にて trimethyl phosphonoacetate (14.6 mL, 0.10 mol) を滴下して加えた。そのままの温度で 1 時間攪拌した後、Pseudoionone (90%, 14.2 mL, 60.0 mmol) の THF 溶液 (100 mL) を滴下して加えた。その後、室温まで昇温して攪拌した。14 時間後、反応液に飽和食塩水を加えてジエチルエーテルで 3 回抽出後、合わせ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:クロロホルム=91:9 to 40:60) することで、化合物 1 を 17% (2.5 g) の収率で得た (Fig. 1)。

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.87-6.82 (m, 1H), 6.17 (t,  $J = 16.5$  Hz, 1H), 5.97 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.14-5.09 (m, 1H), 3.71-3.70 (s, 3H), 2.34-2.32 (m, 2H), 2.27-2.24 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.05-2.03 (m, 1H), 1.85 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.61 (s, 3H); [ESI(+)-TOF]:  $m/z$  [M+H] $^+$  249.

#### 化合物 2 の合成

化合物 1 (2.39 g, 9.62 mmol) を無水 THF (50 mL) に溶解し、0°C にて水素化アルミニウムリチウム (1.2g, 28.9 mmol) をゆっくりと加えた。そのままの温度で 1 時間攪拌した後、0°C にて反応液に水を加えて反応を停止させた。そこに 1M 塩酸を加えて、ジエチルエーテルで 3 回抽出後、合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。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 (1.56g) を得た。この粗生成物はこれ以上精製せず次の反応に用いた。

[ESI(+)-TOF]:  $m/z$  [M+H] $^+$  221.

粗アルコール体 (1.43 g, 6.5 mmol) の無水 THF 溶液 (43 mL) に室温にて  $\text{ZnI}_2$  (3.11 g, 9.75 mmol) を加えて 5 分間攪拌した。この溶液に triethyl phosphite (2.4 mL, 13.0 mmol) を加えて加熱 (65°C) 還流した。20 時間攪拌した後、反応液を室温に冷却して減圧濃縮した。残渣を 2M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて、ジエチルエーテルで 3 回抽出後、合わせ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=6:4 to 1:9) することで、化合物 2 を 10% (225 mg) の収率で得た (Fig. 2)。

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.41 (t,  $J = 13.2$  Hz, 1H), 6.18 (t,  $J = 16.5$  Hz, 1H), 5.90-5.87 (m, 1H), 5.46 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 5.15-5.09 (m, 1H), 4.10-4.07 (m, 4H), 2.72 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 2.12-2.09 (m, 4H), 1.82-1.79 (m, 6H), 1.68 (s, 3H), 1.61 (d,  $J = 5.1$  Hz, 3H) 1.31-1.29 (m, 6H); [ESI(+)-TOF]:  $m/z$  [M+Na] $^+$  363.

#### リコペンの合成

化合物 2 (52 mg, 0.15 mmol) に -30°C にて *t*-BuOK (52 mg, 0.15 mmol) の無水 THF (160  $\mu\text{L}$ ) /無水 DMSO (20  $\mu\text{L}$ ) 溶液を加えた。そのままの温度で 2 時間攪拌した後、(2*E*,4*E*,6*E*)-2,7-dimethylocta-2,4,6-trienedial (167 mg, 1.02 mmol) の無水 THF (160  $\mu\text{L}$ ) /無水 DMSO (20  $\mu\text{L}$ ) 溶液を加えた。そのままの温度で 15 分間攪拌した後、室温にて 1 時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈し、飽和食塩水で 3 回洗浄硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮することで、粗生成物を得た。これをエタノール中に懸濁させ、遠心分離して上清を除去することで赤色固体として 6.2% (2.3 mg) の収率で lycopene を得た (Fig. 3)。

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.64 (d,  $J = 13.8$  Hz, 4H), 6.49 (t,  $J = 12.3$  Hz, 2H), 6.35 (d,  $J = 13.8$  Hz, 2H), 6.25 (d,  $J = 12.6$  Hz, 4H), 6.18 (d,  $J = 10.2$  Hz, 2H), 5.95 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H), 5.13 (d,  $J = 25.2$  Hz, 2H), 2.17-2.11 (m, 12H), 1.97 (s, 12H), 1.82 (s, 6H), 1.69 (s, 8H).

#### C-2) クルクミンの合成 (Scheme 2) <sup>1</sup>

Vanillin (0.60 g, 5.00 mmol) と tributyl borate (2.75 mL, 14.0 mmol) を酢酸エチル (2.5 mL) に溶解し、室温にて acetylacetone (0.25 g, 2.50 mmol), boric anhydride (0.12 g, 1.70 mmol) を加えた。30 分間攪拌後、*n*-butylamine (75  $\mu\text{L}$ , 1.25 mmol) の酢酸エチル溶液 (1.3 mL) を 15 分間かけて滴下した。室温にて 10 時間攪拌後、60°C にて 0.4M 塩酸 (5 mL) を加えて 2 時間攪拌した。室温に戻した後、酢酸エチルで 2 回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄、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 to 1:2）することで，curcumin を 28% (410 mg) の収率で得た (Fig. 4).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.64 (s, 2H), 7.53 (d,  $J$  = 16.2 Hz, 2H), 7.31 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 2H), 7.14 (dd,  $J$  = 1.8, 8.4 Hz, 2H), 6.81 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 6.74 (d,  $J$  = 16.2 Hz, 2H), 6.05 (s, 1H), 3.83 (s, 6H); [ESI(+)-TOF]:  $m/z$  [M+H] $^+$  369.

### C-3) クロセチンの合成 (Scheme 3)

クロセチンを合成中間体としてクロシンを合成するルートを設計した。前年度報告したトリエンアルデヒドを出発原料とした合成法によって，クロシン前駆体としてのクロセチン (crocetin) の合成まで完了した。

### C-4) クロシン合成用モデル化合物の合成 (Scheme 4, 5)

立体選択的なクロシン合成のためのモデル反応を設定し，それを実施するための化合物 7-11 の合成<sup>2,3</sup>およびモデル反応を行なった。

#### 化合物 7 の合成

1.4M 水酸化ナトリウム水溶液 (129 mL, 0.18 mol) に 0°C にて 2,3-Dihydroxypyridine (10 g, 0.09 mol) を溶解させ，15 分間攪拌後，硫酸ジメチル (8.52 mL, 0.09 mmol) を滴下した。その後，反応液を室温に昇温し 3 時間攪拌した。反応液に酢酸を加えて pH を約 7 とし，クロロホルム (100 mL) で 6 回抽出した。合わせ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（クロロホルム：メタノール = 100 : 0 to 95 : 5）することで，化合物 7 を 17% (1.92 g) の収率で得た (Fig. 5).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.05 (dd,  $J$  = 1.5, 6.3 Hz, 1H), 6.77 (dd,  $J$  = 1.8, 7.8 Hz, 1H), 6.25 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H).

#### 化合物 8 の合成

硝酸銀 (3.12 g, 18.4 mmol) を水 (23 mL) に溶解させ，室温にて化合物 7 (2.30 g, 18.4 mmol)

の 0.4M 水酸化ナトリウム水溶液 (46 mL, 18.4 mmol) を加えた。室温にて 1 時間激しく攪拌した後，スラリー状の反応液を濾過し，固体を水 (138 mL)，次いでメタノール (20 mL) にて洗浄した。得られた固体を高真空下で一晩乾燥させ，化合物 8 を 89% (3.8 g) の収率で得た (Fig. 6).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.95 (dd,  $J$  = 1.5, 6.3 Hz, 1H), 6.73 (d,  $J$  = 7.8, 1H), 6.21, (t,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H).

#### 化合物 9 の合成

Pena-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranose (2.0 g, 5.1 mmol) のジクロロメタン溶液 (5 mL) に室温にて dichloromethyl methyl ether (0.45 mL, 5.1 mmol)，次いで ZnCl<sub>2</sub> (0.69 g, 5.1 mmol) をゆっくりと加えた。その後，反応液を 60°C にて 1 時間攪拌した。室温にまで冷却後，反応液をジクロロメタン (50 mL) で希釈し氷冷水 (30 mL x 2)，飽和炭酸水素ナトリウム水溶液，飽和食塩水にて洗浄，硫酸ナトリウムで乾燥，濾過し，濾液を濃縮，さらにトルエン (15 mL) にて共沸することで， $\alpha$ -クロロ置換体を得た。この粗生成物はこれ以上精製せず次の反応に全量用いた。粗生成物のトルエン溶液 (18 mL) に室温にて化合物 8 (1.4 g, 6.0 mmol) を加えた後，反応液を 110°C にて 6 時間攪拌した。室温にまで冷却後，反応液をセライト濾過し，得られた濾液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液，飽和食塩水にて洗浄，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 = 7 : 3 to 1 : 2）することで，化合物 9 を 59% (1.37 g) の収率で得た (Fig. 7).  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.71 (dd,  $J$  = 1.8, 5.4 Hz, 1H), 7.11 (dd,  $J$  = 1.2, 7.2 Hz, 1H), 6.94 (dd,  $J$  = 5.1, 8.1 Hz, 1H), 6.25 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 5.33-5.39 (m, 2H), 5.20 (t,  $J$  = 9.3 Hz, 1H), 4.26 (dd,  $J$  = 4.8, 12 Hz, 1H), 4.13 (dd,  $J$  = 2.4, 6.6 Hz, 1H), 3.93 (dq,  $J$  = 2.4, 9.9 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.03 (t,  $J$  = 3.0 Hz, 12H).

#### 化合物 10 の合成

化合物 9 (1.34 g, 2.94 mmol) のキシレン溶液

(15 mL) に室温にてHgBr<sub>2</sub> (0.53 g, 1.47 mmol) を加えた後、反応液を140°Cにて1時間加熱還流した。室温にまで冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、セライト濾過した。得られた濾液を水で洗浄後、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=7：3 to 5：5）することで、化合物**10**を14% (182 mg) の収率で得た (Fig. 8)。また原料である化合物**9** (287 mg, 21%) を回収した。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.72 (dd, *J* = 1.2, 4.8 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 1.2, 7.2 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 4.8, 7.8 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 5.74 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H), 5.18-5.22 (m, 2H), 4.31 (dq, *J* = 2.0, 10.2 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 4.2, 12.6 Hz, 1H), 4.05 (dd, *J* = 1.8, 12.6 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.04 (t, *J* = 9.3 Hz, 12H)。

#### 化合物 **11** の合成

化合物**10** (6.3 mg, 14 μmol) に室温にてNaOMeのメタノール溶液 (20 mM, 140 μL, 2.8 μmol) を加えた。15分間攪拌した後、反応液を濃縮後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製（ジクロロメタン：メタノール=85：15）することで、化合物**11**を49% (2 mg) の収率で得た (Fig. 9)。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.67 (dd, *J* = 1.8, 4.8 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 1.5, 8.1 Hz, 1H), 6.98 (dd, *J* = 4.8, 7.8 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 3.93 (t, *J* = 9.3, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.72-3.75 (m, 1H), 3.624-3.631 (m, 2H), 3.62 (dd, *J* = 3.0, 9.6 Hz, 1H)。

#### 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、リコペン、クルクミンの合成ルート確立を行った。またクロシン合成のためのモデル反応用化合物を合成した。現在、モデル反応として Scheme 5 に示すようなクロセチンの部分構造を有する

カルボン酸化合物を求核種とした、立体選択的なβ-グリコシル化反応の検討を実施しており、LC-MS 分析から目的物の検出まで確認している段階である。今後は、上記のモデル反応によって適切な反応条件を決定し、これをクロセチンを前駆体としたクロシン (crocin) の立体選択的合成に適用していく。また他のカロテノイド系色素であるアナトー色素に含まれるビキシン (bixin)、ファフィア色素に含まれるアスタキササンチン (astaxanthin) の合成も実施し、それらの成果をまとめて学術論文として投稿する予定である。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

- 1) Davis S, Mandabi A, Uzi S, Aharoni A, Meijler M: *ACS Chem. Biol.*, **2018**; *13*, 247-252.
- 2) Hanessian S, Saavedra O M., Mascitti V, Marterer W, Oehrlein R, Mak C-P: *Tetrahedron*, **2001**; *57*, 3267-3280.
- 3) Matsuo K, Nishikawa K, Shindo M: *Tetrahedron Lett.*, **2011**; *52*, 5866-5692.

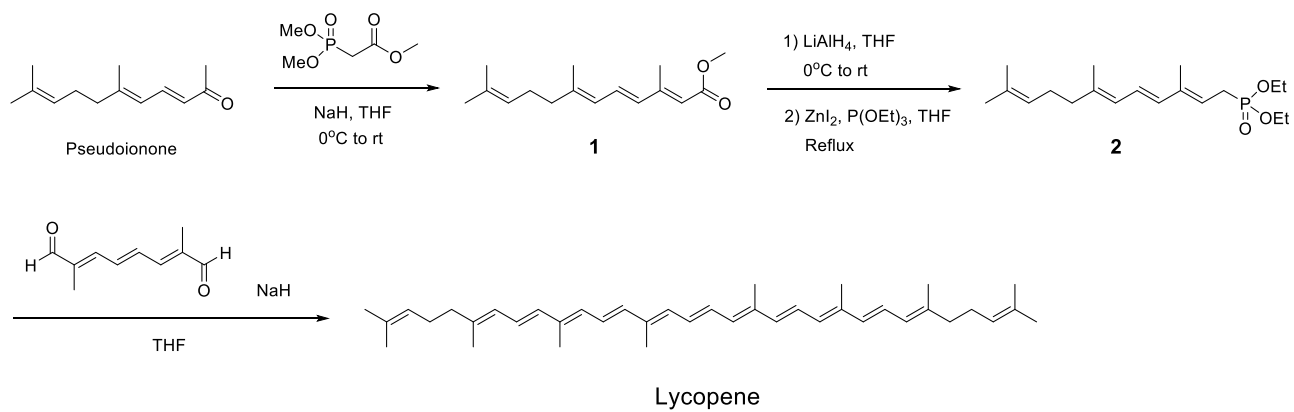
#### F. 研究業績

##### 1. 学会発表

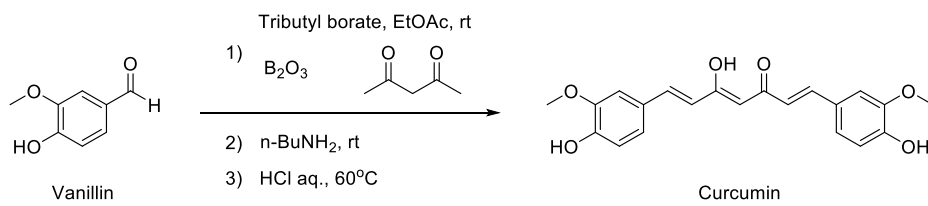
- 1) 辻巖一郎, 杉本直樹, 出水庸介: 化学合成による既存添加物の定量用標品の供給に関する研究 (P-18). 第114回 日本食品衛生学会 学術講演会(2018.11)(広島市).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

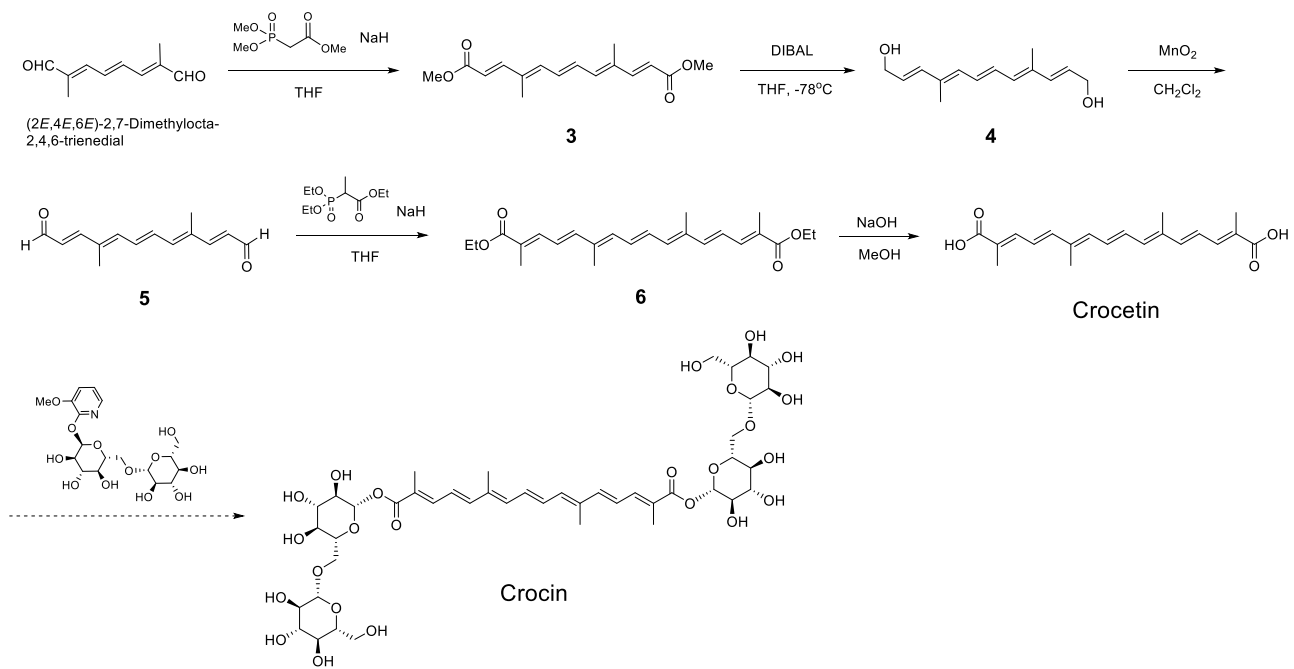
なし



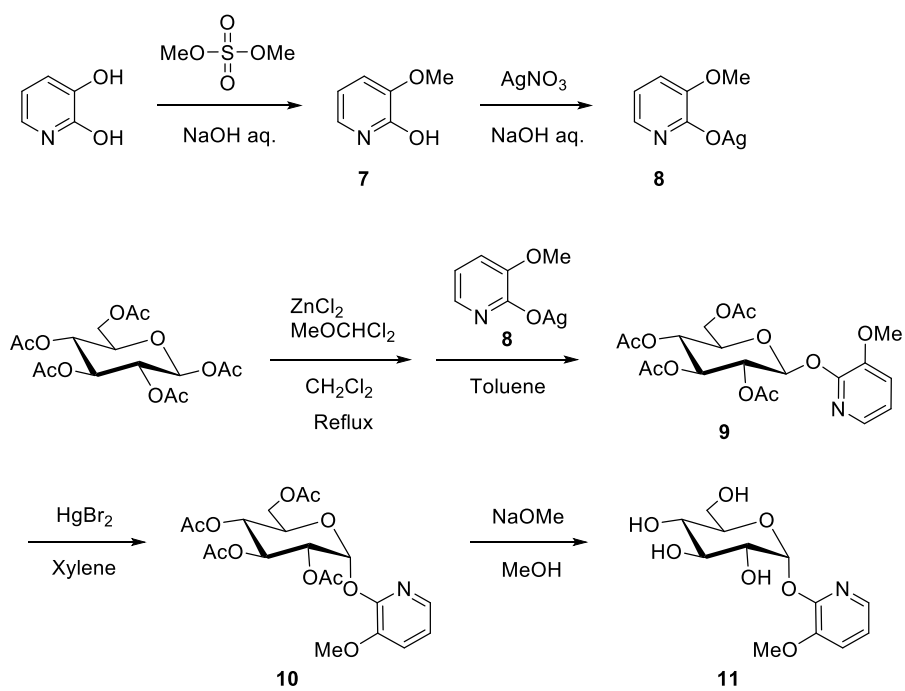
Scheme 1. Synthetic route of lycopene.



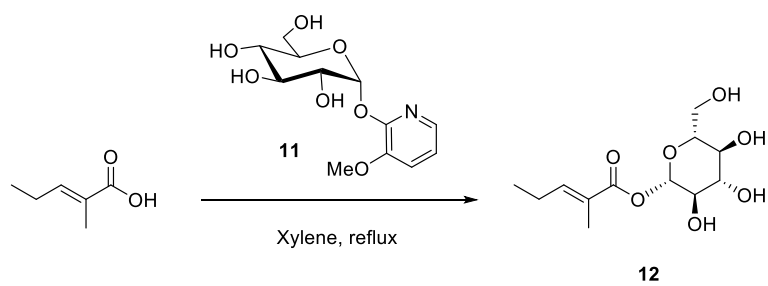
Scheme 2. Synthetic route of curcumin.<sup>1</sup>



Scheme 3. Synthetic route of crocin.



Scheme 4. Synthetic route of compounds for model reaction.



Scheme 5. Model reaction for a stereoselective synthesis of crocin.



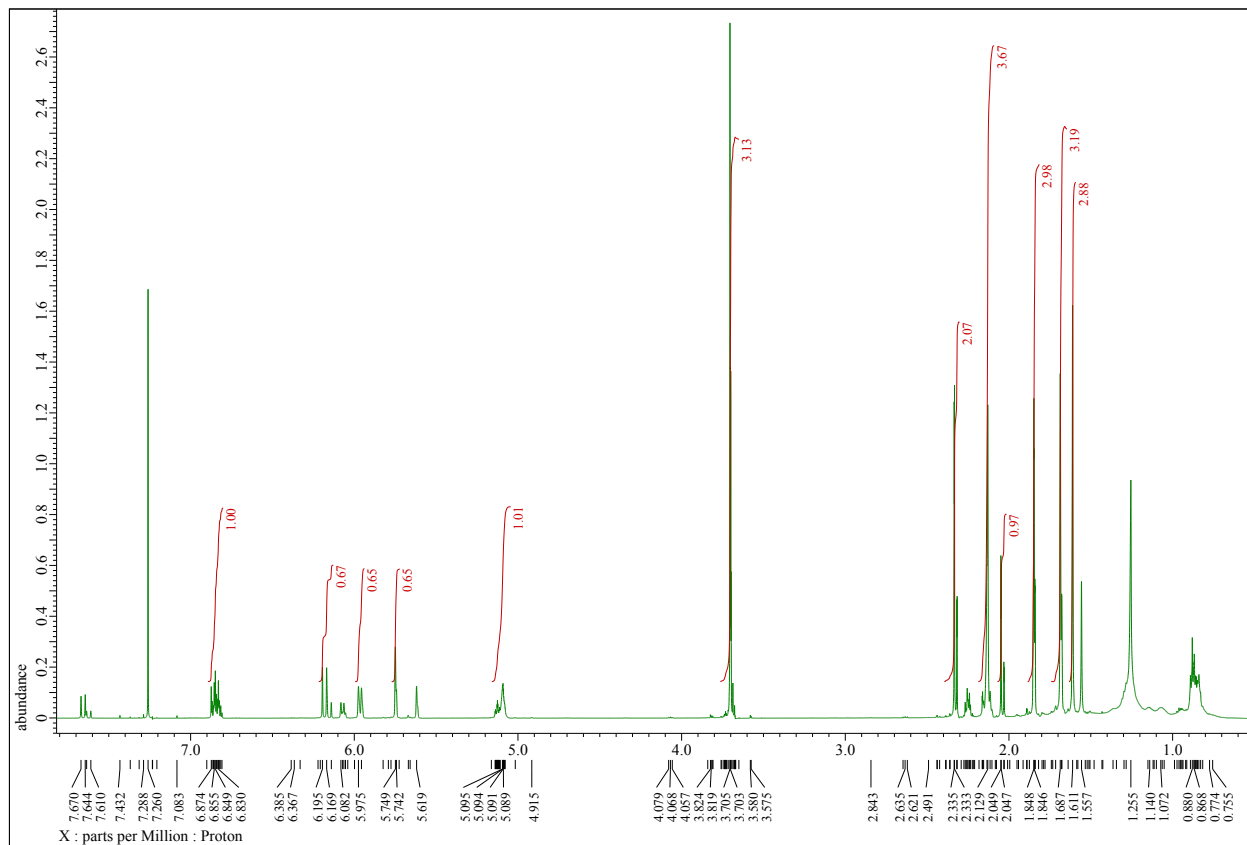


Fig. 1  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CDCl}_3$ .

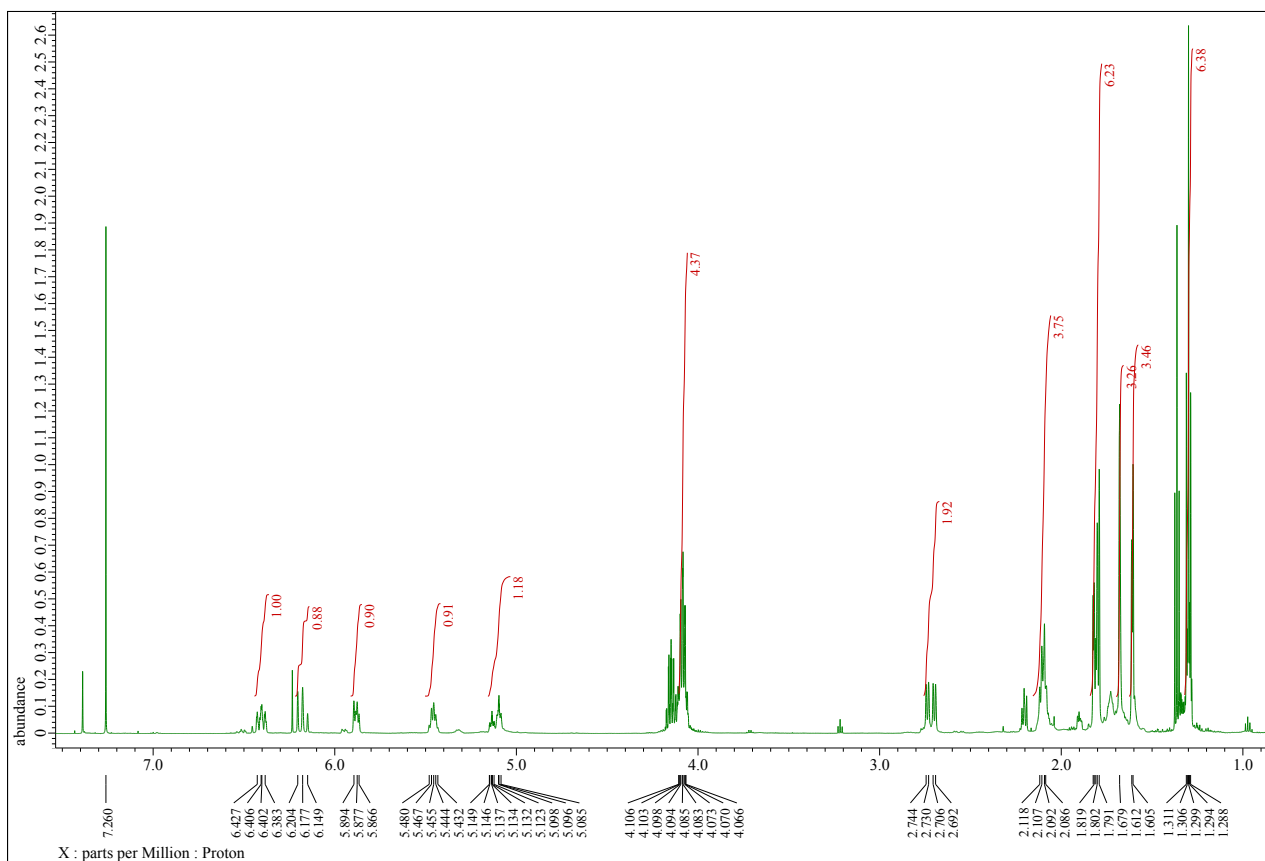


Fig. 2  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 2 in  $\text{CDCl}_3$ .

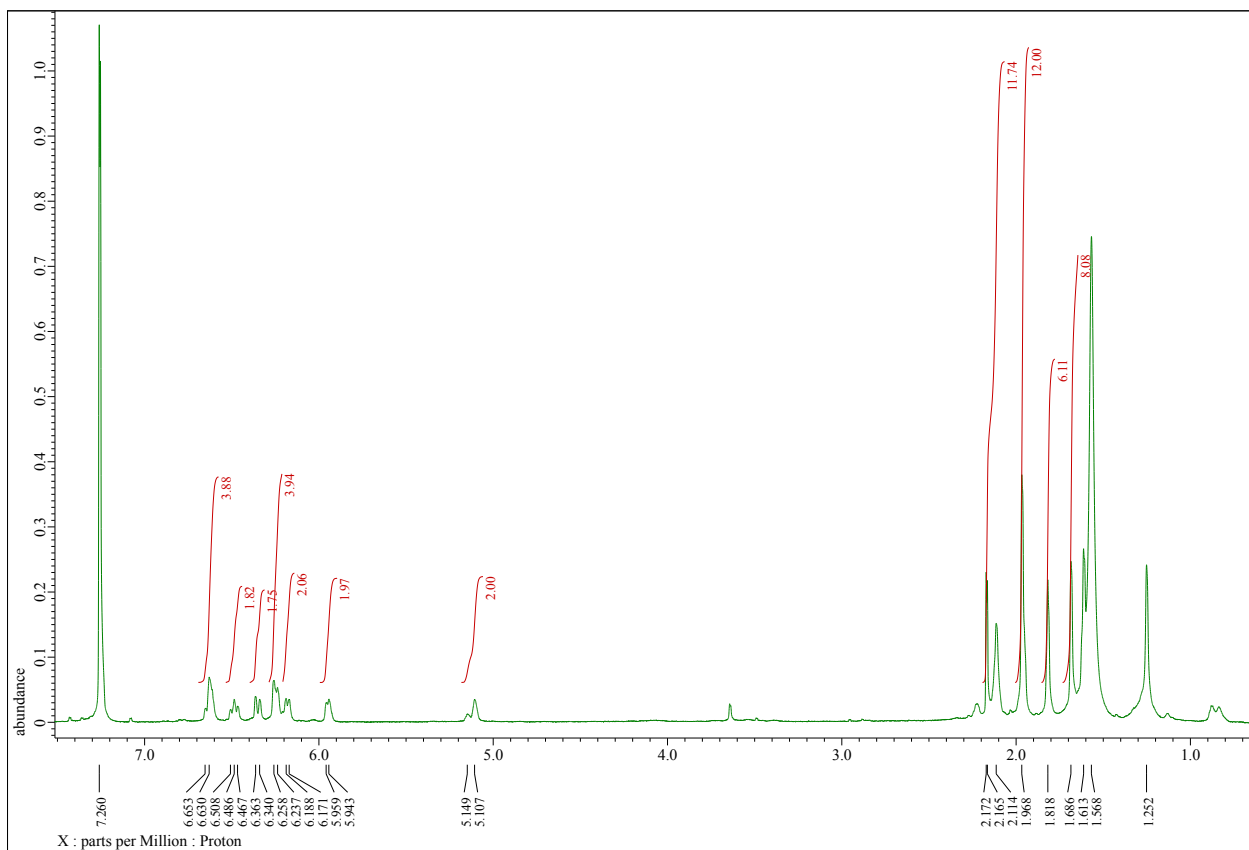


Fig. 3  $^1\text{H}$  NMR spectrum of lycopene in  $\text{CDCl}_3$ .

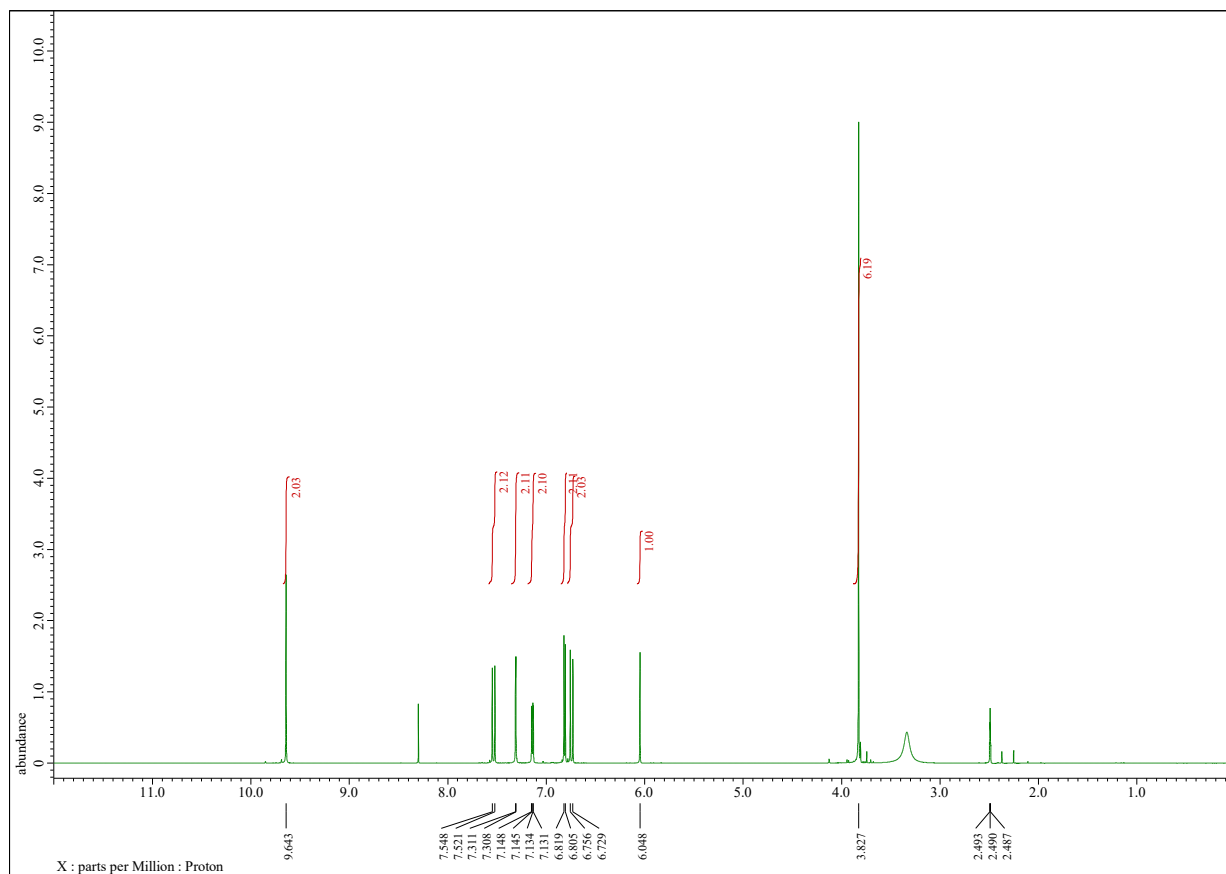


Fig. 4  $^1\text{H}$  NMR spectrum of curcumin in  $\text{DMSO-}d_6$ .

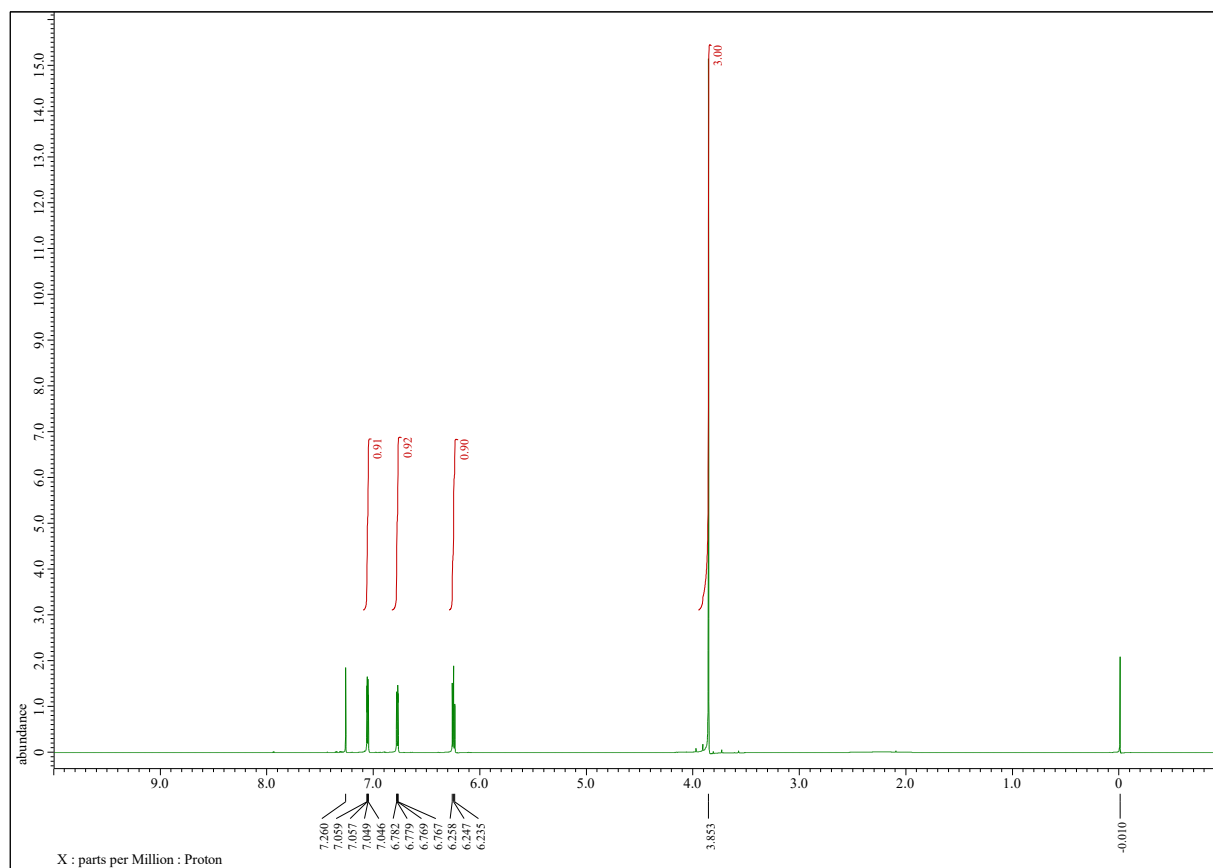


Fig. 5  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 7 in  $\text{CDCl}_3$ .

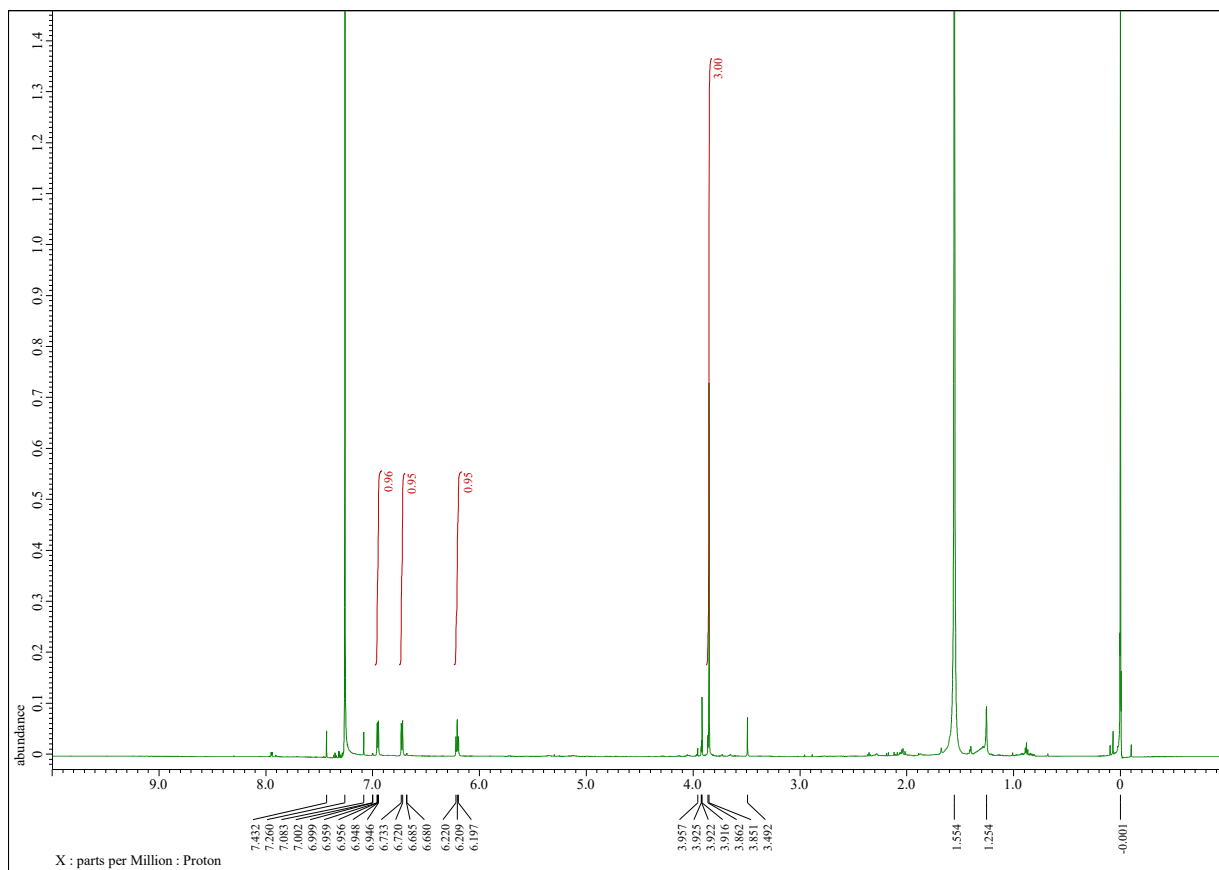


Fig. 6  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **8** in  $\text{CDCl}_3$ .

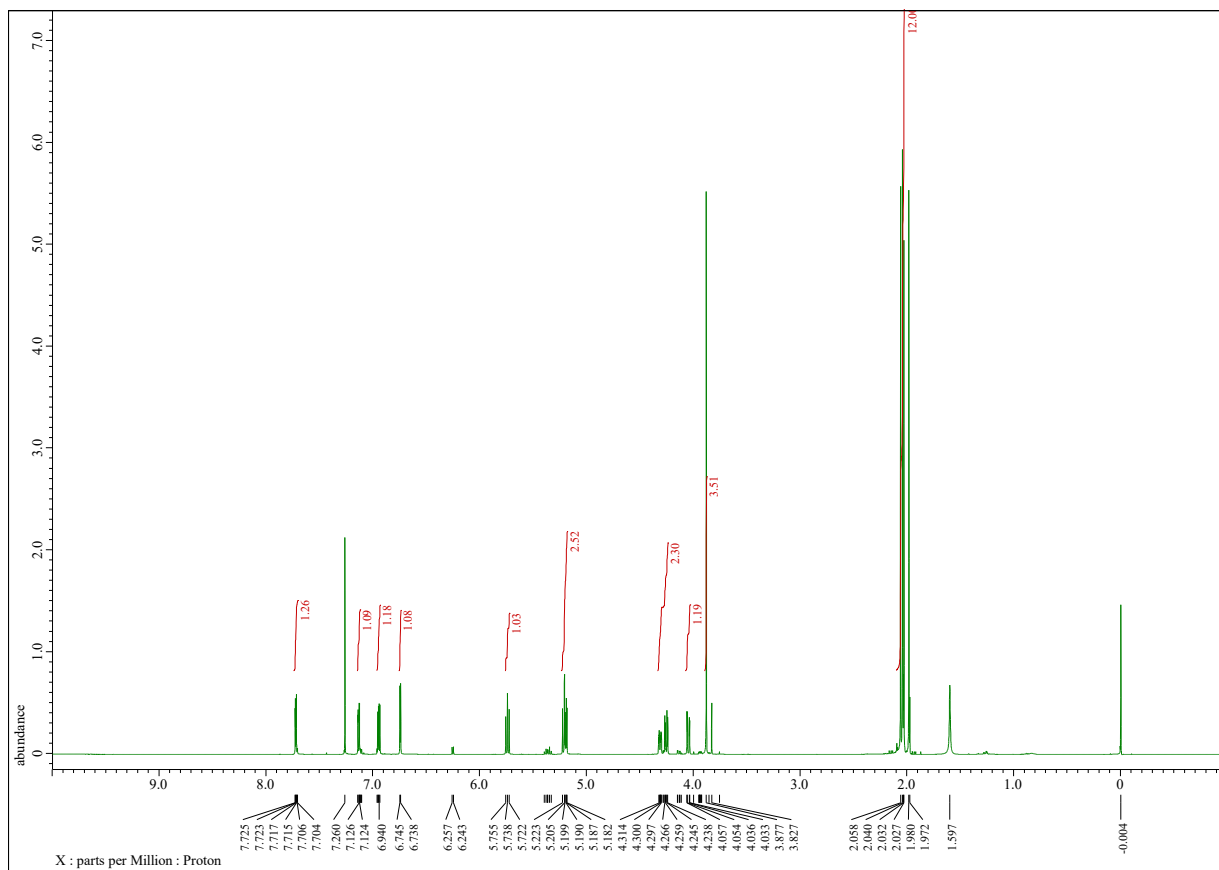


Fig. 7  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **9** in  $\text{CDCl}_3$ .

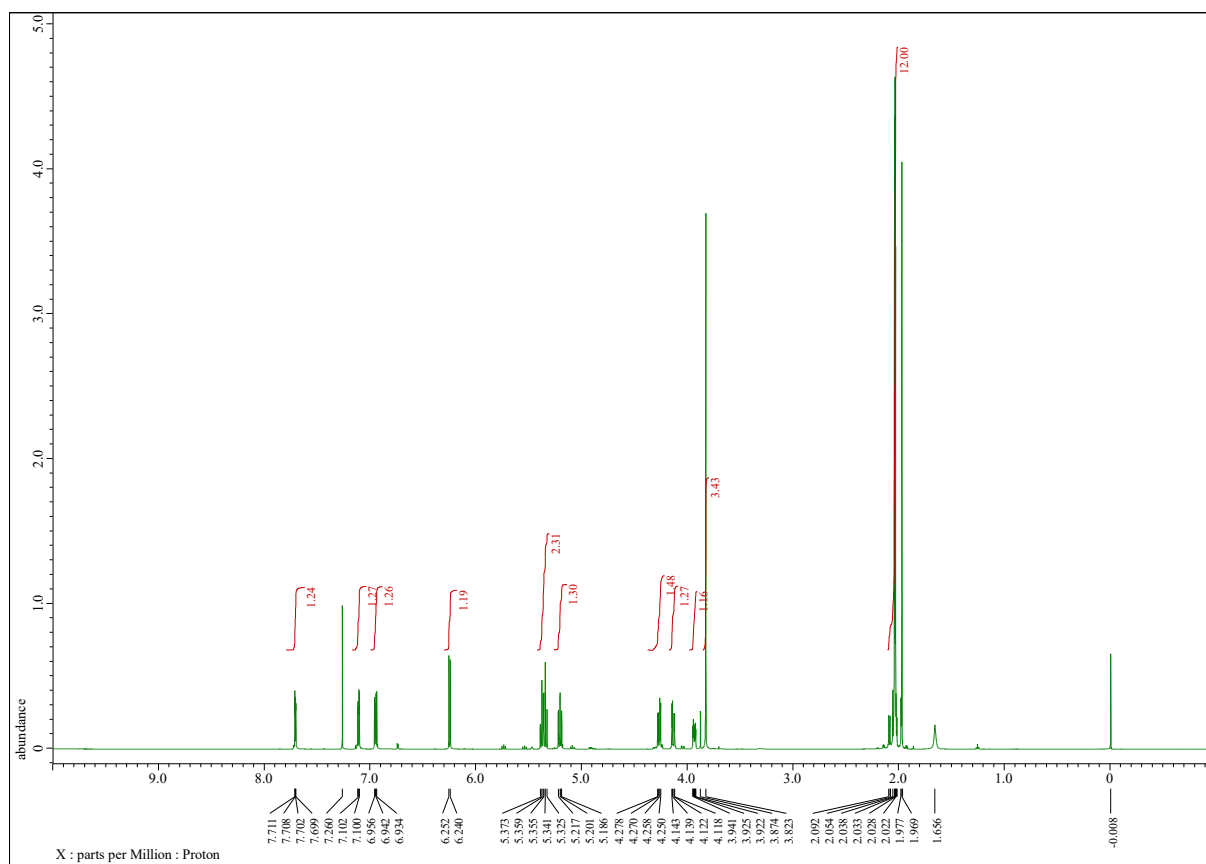


Fig. 8  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **10** in  $\text{CDCl}_3$ .



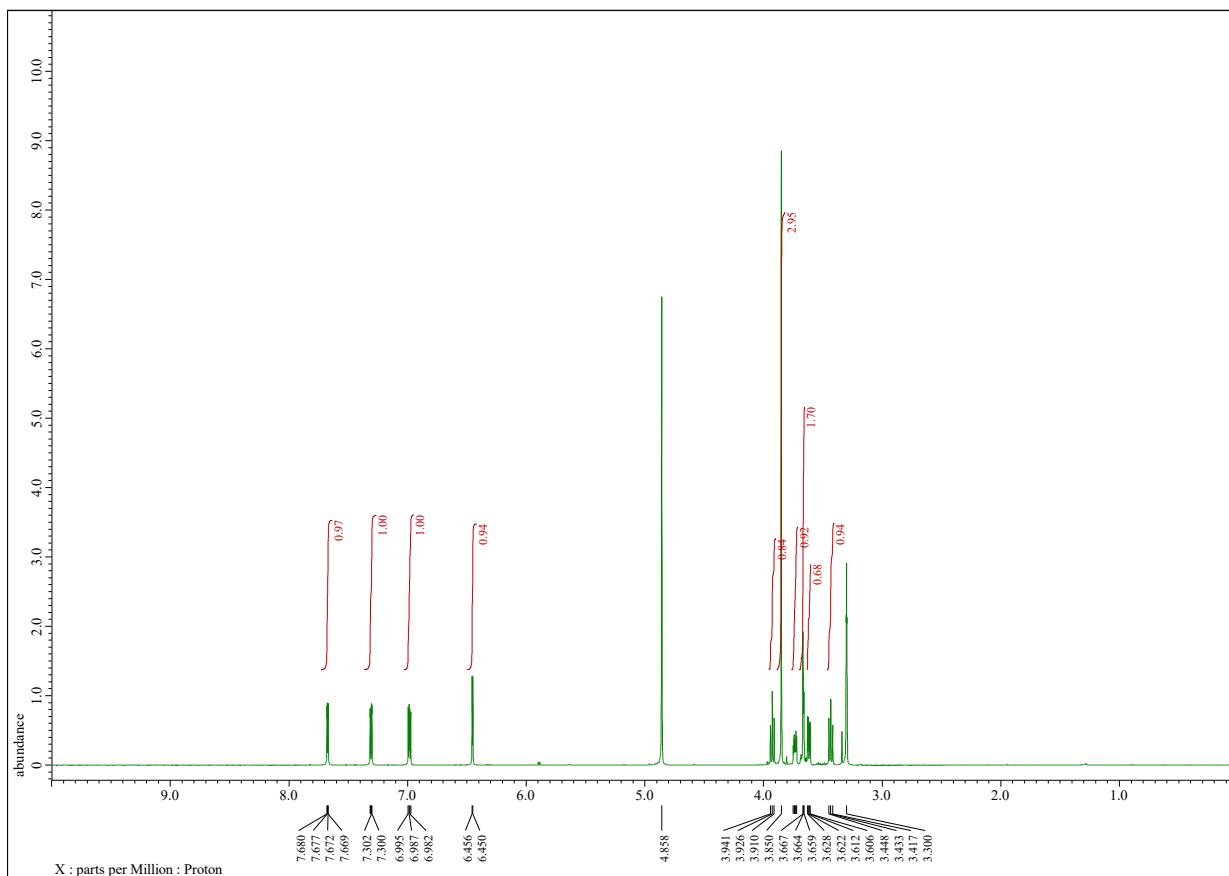


Fig. 9  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 11 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

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
Nishizaki Y, Sato-Masumoto N, Yokota A, Mikawa T, Nakashima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Ito Y, Sugimoto N, Sato K	HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine	Food Addit. Contam. A	35	838-847	2018
Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K	Phytochemical profiling of rosemary extract products distributed as food additives in the Japanese market	Jpn. J. Food Chem. Safety	25	105-113	2018
増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 中島馨, 杉本直樹, 多田敦子, 曹永晩, 小川久美子, 佐藤恭子	香料 2,4-ジメチル-4-フェニルテトラヒドロフランの異性体存在比の決定	日食化誌	26	In press	2019
西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹	食品分析の信頼性確保における定量 NMR に基づく相対モル感度の役割—分析種の定量用標品不要なクロマトグラフィーの開発—	FFI ジャーナル	2	In press	2019
Saito N, Kitamaki Y, Otsuka S, Yamanaka N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata H, Ihara T	Extended internal standard method for quantitative <sup>1</sup> H NMR assisted by chromatography (EIC) for analyte overlapping impurity on <sup>1</sup> H NMR spectra	Talanta	184	484-490	2018
黒江美穂, 斎藤直樹, 山崎太一, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英	<sup>1</sup> H 核定量核磁気共鳴分光法と HPLC の組合せによるヘプタオキシエチレンデシルエーテル標準液の値付け	分析化学	67	541-549	2018
Nishizaki Y, Masumoto N, Nakajima K, Ishizuki K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Tada A, Sugimoto N, Sato K	Relative molar sensitivities of carnosol and carnosic acid with respect to diphenylamine allow accurate quantification of antioxidants in rosemary extract.	Food Addit. Contam. A	36	203-211	2019
Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K	Single reference quantitative analysis of xanthomonasin A and B in <i>Monascus</i> yellow colorant using high-performance liquid chromatography with relative molar sensitivity based on high-speed countercurrent chromatography.	J. Chromatogr. A	1555	45-52	2018
Takahashi, M, Nishizaki, Y, Morimoto, K, Sugimoto, N, Sato, K, Inoue, K	Design of synthetic single reference standards for the simultaneous determination of sesamin, sesamolin, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity	Sep. Sci. Plus	1	498-505	2018
Nishitsuji K, Watanabe	Effect of coffee or coffee	Sci. Rep.	8	16173	2018

S, Xiao J, Nagatomo R, Ogawa H, Tsunematsu T, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K	components on gut microbiome and short-chain fatty acids in a mouse model of metabolic syndrome				
Fukaya S, Yoshioka H, Nagatsu A	The Kampo formula “Juzen-taiho-to” exerts protective effects on ethanol-induced liver injury in mice	Fundam. Toxicol. Sci.	5	105-112	2018
田原麻衣子, 杉本直樹, 香川(田中)聡子, 坂井信夫, 五十嵐良明, 神野透人	ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの定量分析における qNMR を用いたトレーサビリティの確保	薬学雑誌	138	551-557	2018
Fuji Y, Uchida A, Fukahori M, Chino M, Ohtsuki T, Matsufuji H	Chemical characterization and biological activity in young sesame leaves ( <i>Sesamum indicum</i> L.) and changes in iridoid and polyphenol content at different growth stages.	PLoS One	13	e0194449	2018
Fuji Y, Ohtsuki T, Matsufuji H	Accumulation and subcellular localization of acetoside in sesame plants ( <i>Sesamum indicum</i> L.)	ACS Omega	3	17287-17294	2018

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品添加物部 第二室長  
(氏名・フリガナ) 杉本 直樹 (スギモト ナオキ)

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 31 年 3 月 28 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 有機化学部 部長  
(氏名・フリガナ) 出水 庸介 (デミス ヨウスケ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立  
所属研究機関長 職名 所長  
氏名 奥田晴

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品添加物部 研究員  
(氏名・フリガナ) 増本 直子 (マスモト ナオコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 立命館大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 仲谷 善雄

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費補助金の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反の管理については以下の通りです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 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. 研究者名 (所属部局・職名) 薬学部 薬学科・准教授

(氏名・フリガナ) 井之上 浩一 ・ イノウエ コウイチ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口チェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年 3月 26日

厚生労働大臣  
~~(国立医薬品食品衛生研究所長)~~ 殿  
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 金城学院大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 奥村 隆

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益  
については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 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. 研究者名 (所属部局・職名) 薬学部 教授

(氏名・フリガナ) 永津 明人 ナガツ アキト

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



2019年 3月 15日

厚生労働大臣 殿

機関名 松山大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 溝上 達

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 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. 研究者名 (所属部局・職名) 松山大学薬学部 教授

(氏名・フリガナ) 天倉 吉章 (アマクラ ヨシアキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月29日

厚生労働大臣 殿

機関名 日本大学生物資源科学部

所属研究機関長 職名 学部長

氏名 大 矢 祐 浩

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の  
については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 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. 研究者名 (所属部局・職名) 生物資源科学部食品生命学科・専任講師  
(氏名・フリガナ) 大槻 崇・オオツキ タカシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称： )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。