

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
課題番号 H29-食品-一般-007

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

平成 29 年度～平成 31 年度(令和元年度)

総合研究報告書

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

令和 2 (2020)年 3 月

目次	1
1) 総合研究報告書(総括)	
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) 総合分担研究報告書	
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)	22
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) 新規分析手法の導入に関する研究	26
研究分担者：杉本直樹	
研究協力者：石附京子	
研究協力者：中島馨	
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	37
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) 香辛料抽出物と基原生物の学名調査	52
研究分担者：増本直子	
研究協力者：西崎雄三	
研究協力者：杉本直樹	
3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究	
1) 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究	57
研究分担者：天倉吉章	
研究協力者：好村守生	
4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究	

1)	既存添加物の含有成分解析に関する研究	59
	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	73
	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)	^1H -qNMR および相対モル感度を用いた分析手法に関する研究	96
	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	129
	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	148

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合研究報告書(総括)

研究代表者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究要旨

1) 既存添加物の成分規格試験法に関する研究

既存添加物の成分規格の整備のため、国の成分規格と日添協自主規格の整備状況、国内外の規格の有無等の調査及び厚生労働省による安全性評価の実施状況について公表されている内容を調査しまとめた。また、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。さらに、酵素品目については基原種の同定、分類の考え方について調査し、分類学及び同定技術の進歩により生じた呼称変更への対応及び基原の追加に関する検討事項等についてもまとめた。従来の分析手法では成分規格を設定できない問題を抱える品目について、新規分析法の開発、応用、導入によるこの問題を解決した試験法の設定を検討した。

2) 既存添加物の基原同定手法に関する研究

既存添加物の内、酵素品目について、その本質であるタンパク質からペプチドを生成し、Mascot searchで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6品目41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。検討した方法は、データベースの充実化によって、既存添加物製品から精巧な基原同定が可能であることを示唆された。既存添加物名簿収載品目のひとつである「香辛料抽出物」について、今後の規格作成に当たり、定義に含まれる73種の基原生物の学名・和名について調査した。また、相当する基原生物について、海外や天然香料における規格の有無を調査した。得られた情報をもとに、基原種として相応しいと思われる和名や学名に修正し、必要に応じて、類似する品目であると予想される天然香料や海外規格と比較しながら基原種の取捨選択を行った。本研究により、「香辛料抽出物」成分規格のうちの定義原案を整備した。

3) 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

既存添加物名簿に収載されているレイシ抽出物、カキ色素、ルチン(抽出物)の品質規格作成のための化学的検討として、レイシ抽出物から7種の化合物を同定し、薄層クロマトグラフィー(TLC)分析の指標候補成分を見出した。カキ色素については、既存添加物名簿に記載されているフラボノイドや含有が示唆される縮合型タンニンについては、それらの定性試験を実施したが呈色反応は認められなかった。ルチンについては、原料の一つとなるカイカ(エンジュのつぼみ)由来の成分を明らかにするため、50%エタノール抽出物から16種の化合物を単離、同定した。

4) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

既存添加物ベニコウジ色素，ベニコウジ黄色素，ゴマ油不けん化物，ベニバナ黄色素，チャ抽出物及びシタン色素について有効成分または指標成分について解析を行うと共にその定量法について検討した。これらの既存添加物に対して，シングルリファレンスHPLC定量法を構築した結果，分析対象物質の定量用標準品を用いなくても，相対モル感度を値付けすることで，簡便かつ再現性の高い定量法を適応することができた。

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

成分規格試験法が確立されていない既存添加物に対して，¹H-qNMR法が試験法として適用可能であるか明らかにする目的で，「ベニバナ赤色素」，「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討した。「ベニバナ赤色素」では，carthtaminの¹H-qNMR法を用いた定量と，その値付けをした溶液を用いてのHPLC定量を用いた実際の製品試料中のcarthtaminの定量の条件の検討を行った。「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」の内，スターアニス，クミン及びフェヌグリークを基原とするものについてそれぞれ検討し，anisaldehyde, cuminaldehyde及びtrigonellineをそれぞれ指標成分として¹H-qNMRの測定条件を確立し，¹H-qNMR法を用いた定量が実施できることを確認した。また，コショウでのpiperineの¹H-qNMR法での定量条件についても検討を行った。

6) qNMRを用いた既存添加物の分析手法に関する研究

既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上ならびに試験法が未設定である既存添加物の分析法の確立を目的に，ラカンカ抽出物及び酵素処理ナリンジンについて，¹H-qNMRとLCを組み合わせた相対モル感度（RMS）法を有効成分の定量に応用した。その結果，RMS法により，それぞれの定量用標品を用いることなく，計量計測トレーサビリティを確保した試験法設定が可能であることがわかった。

7) 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

既存添加物の品質確保のため，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品の全合成ルートの確立を検討した。クチナシ黄色素に含まれるクロセチン(croctin)，トウガラシ色素に含まれるカプサイシン(capsaicin)，カワラヨモギに含まれるカピリン(capillin)，トマト色素に含まれるリコペン(lycopene)，ウコン色素に含まれる色素であるクルクミン(curcumin)，クチナシ黄色素果に含まれるクロシン(crocin)，及びカロテノイド類縁化合物を対象とした合成ルートを確立させた。

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

研究協力者

上田要一	日本食品添加物協会 専務理事
樋口彰	日本食品添加物協会 常務理事
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
中島 馨	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(令和 2 年 2 月 26 日以前の品目数))の内, 第 9 版食品添加物公定書には 217 品目の成分規格が収載される. すなわち, 既存添加物名簿に収載される全品目の内, 国の成分規格が設定されたものは実質的に未だ半数, 残り 164 品目(枝番込み)と香辛料抽出物 1 品目(74 基原)の成分規格が未設定である. また, 有効性と有効成分が解明できていない品目, 自主規格が設定されているが検証試験が不十分で信頼性が低い品目が残されている. 従って, 既存添加物の成分規格を成立させるためには, 基原及び有効成分の同定に必要な調査研究の継続が必要である. また, 従来 of 機器分析法では, 既存添加物の多くが天然由来の混合物であることから, 成分の解明だけでなく品質評価に適した実効性の高い試験法が設定できない場合が多く, この問題を抜本的に解決するためには, 新しい概念に基づく評価・分析手法の開発, 実用化を自ら行う必要がある.

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し, 得られた情報を成分規格設定に活用する. (2) 基原が明確でないものについては基原種の調査を行い, 既存添加物の定義設定の基礎資料として活用する. また, 含有成分や有効成分の解析を行い, 成分規格試験法の設定に必要な指標成分を明らかとする. (3) 従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難なものについては, 指標成分と同一の若しくは代替物質の定性用又は定量用標準品の全合成ルートを確立すると共に新規分析法の

開発を行い、計量計測トレーサビリティを確保した簡便且つ正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、実用化により、成分規格設定に資する具体的な評価手法の確立を検討した。以上、本研究では、既存添加物の品質確保のため、公的な成分規格設定の基礎資料を集積すると同時に、我が国の天然物化学分野の発展、厚生労働行政の推進に資する成果を得た。

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) 既存添加物の公的な成分規格設定を目的に、第9版食品添加物公定書未収載品目について、検証用規格及び自主規格を含めた成分規格の整備状況、安全性試験実施状況、国内外規格の有無等を調査した。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について調査した。また、酵素品目に対する基原種の同定法、分類、考え方について調査した。酵素基原生物の分類学及び同定技術の進歩により生じる呼称変更への対応及び学術情報に沿った確認、食品添加物公定書に収載された添加物酵素の定義への基原の追加を想定して調査した。
- 2) 定量用標品を得ることができない既存添加物について、定量用標品を用いない新規定量法の開発及び実用化のための基礎検討を行った。¹H-qNMRの応用、¹³C-qNMRの実用化のための技術的基礎検討、相対モル感度(RMS: relative molar sensitivity)を応用した計量トレーサビリティを確保した定量分析法を検討した。

2. 既存添加物の基原同定手法に関する研究

- 1) 既存添加物の内、酵素品目の基原を同定するため、分子生物学的手法の応用を検討した。メタボローム解析などで多用される Mascot search を利用して既存添加物酵素の基原について、トレーサビリティ体系の構築を検討した。既存添加物酵素6品目41製品を試料とし、酵素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した。
 - 2) 食品添加物の成分規格作成の解説(http://www.nihs.go.jp/dfa/_src/624/sakuseiforweb_191018.pdf)に従い、香辛料抽出物に含まれる73基原の基原生物の学名及び和名を提案した。原則、和名は Ylist (<http://ylist.info/index.html>)、学名は Tropicos (<https://www.tropicos.org>) のものを採用した。この際、海外の規格や天然香料の規格についても基原生物を調査し、提案時の参考とした。また、学名について、Ylist と Tropicos が異なっている場合は、他規格も参考にしつつ、原則 Tropicos のものを採用した。一方、和名については、Ylist に記載のない基原生物の和名は基原に記載しない案を提案した。
- ### 3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究
- 1) 既存添加物の内、有効成分又は成分組成が明らかとされておらず、成分規格設定が難航している品目について、成分分析を行った。レイシ抽出物、カキ色素の添加物製品及びルチン(抽出物)の原料となるカイカ(エンジュのつぼみ)について、それぞれ各種カラムクロ

マトグラフィーによる分離精製を繰り返し、化合物の単離を行った。単離した各化合物については各種機器分析データに基づく構造解析、標品との直接比較等により化合物の構造解析を行った。また、カキ色素についてはマグネシウム-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。

4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) 既存添加物の内、有効成分又は成分組成が文献等によりある程度明らかであるが、従来の分析手法では成分規格試験法が設定できない品目、ベニコウジ色素、ベニコウジ黄色素、ゴマ油不けん化物、ベニバナ黄色素、チャ抽出物及びシタン色素について基礎検討した。

ベニコウジ色素、ベニコウジ黄色素及びシタン色素について HSCCC による色素成分の単離精製を検討した。ゴマ油不けん化物及びチャ抽出物について、RMS の算出を行った。また、RMS を利用したシングルリファレンス HPLC 定量法の妥当性評価を行った。

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) 定量用標品が入手できないため、既存添加物中の含量測定がこれまで実施できず、成分規格設定が困難とされてきた品目について、¹H-qNMR を応用し、有効成分の絶対定量を行った。

ベニバナ赤色素の carthamin の定量では、単離した carthamin を ¹H-qNMR で純度を測定し、その溶液を希釈したものを標準液とし、HPLC で絶対検量線を作成して定量した。

香辛料抽出物については、¹H-NMR で観測

されるそれぞれの基原に特徴的な各化合物のシグナルが独立したシグナルとして観測される条件を検討し、そのシグナルで ¹H-qNMR により直接定量が可能であるかどうか検討した。

6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

1) 既存添加物の品質確保のために成分規格試験法の効率化及び精度向上が必須である。この目的でラカンカ抽出物及び酵素処理ナリンジンの定量法について検討した。

ラカンカ抽出物については、入手できた 3 製品を用い、主成分モグロシド V の定量に ¹H-qNMR と LC を組み合わせた RMS 法により、カフェインを基準物質としてモグロシド V の含量が正確に定量できるかどうか検討した。

酵素処理ナリンジンについては、入手できた 2 製品を用い、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) が RMS 法により正確に定量できるかどうか検討した。また、グルコアミラーゼによる前処理を伴う方法により、ナリンジン及び Naringin-G の含量、 α -グルコシル残基量から正確な酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体の含量の算出が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) 定量用標品が入手不可能であるため成分規格設定が実現しない問題を有する既存添加物について検討した。クチナシ黄色素に含まれるクロセチン(croceatin), トウガラシ色素に

含まれるカプサイシン(capsaicin), カワラヨモギ抽出物に含まれるカピリン(capillin), トマト色素に含まれるリコペン (lycopene), ウコン色素に含まれるクルクミン (curcumin), クチナシ黄色素に含まれるクロシン(crocin)を対象とした合成ルートの実立を行った。

C. 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目について, 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試験法に関する第三者及び自社検証実施状況, ③国内外の規格, ④安全性評価の実施状況, 等について調査結果をまとめた。

酵素品目については, 酵素を食品添加物として使用する場合, 食品添加物公定書に規定された規格への適合が必要となり, 特にその基原は, 食品添加物公定書の D. 成分規格・保存基準各条にある各々の酵素の定義に記載されたものに限定される。一方, 生物種, 特に微生物においては, 分類学, 及び同定の技術・手法の進歩により, 基原の呼称が改正/変更されることが少なからず発生することがあり, これに伴い, 食品添加物公定書の各品目の定義の記載と齟齬が生じる可能性がある。すなわち, 実質的には定義を逸脱している原料を用いていなくても, 合否の判断基準がなければ, 原料の学名や名称が異なるために判断を誤る原因となる。この問題を避けるために, 基原の学名変更, 新しい知見による分類学上の種名変更等に対応した判断基準を具体的に検討した。

2) 既存添加物の内, 成分規格が未設定の品目について, 各種理化学分析によって得られたデ

ータに基づき, 順次, 妥当な成分規格を作成しているところであるが, 従来法では試験法が設定できない, あるいは従来法ではその品質を確保するには十分ではない品目が多くある。この問題を解決するためには, 従来法とは異なる新規分析法を開発し, それを実用化していく以外に方法が残されていない。そこで, これまでの NMR 及びクロマトグラフイーに関する知見を生かし, ^{13}C -qNMR の技術的開発及び相対モル感度(RMS: relative molar sensitivity)を利用した定量法の実用化を検討した。

^{13}C -qNMR の基礎的検討では, 測定条件を最適化することによって, 5%程度のばらつきを伴った定量値を算出可能とした。天然物, 類似化合物等の混合物をそれぞれの定量用標品を必要とせず直接定量できることが示唆された。精度向上は今後の課題ではあるが, 既存添加物の有効成分を直接定量し, 含量に関する基礎情報を得ることが可能と考えられ, 本法の応用が今後期待できる。

RMS の応用では, トマト色素中のリコペン, アナトー色素中のビキシン及びノルビキシンが簡便且つ精確に定量可能であることが確認できた。リコペン, ビキシン及びノルビキシンの純度既知の定量用標品は流通しておらず, また将来流通が期待できない。通常の HPLC 分析に RMS を利用することで, これらの定量用標品を必要としない定量法が公的な試験法として設定できると結論した。

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。Mascot search の結果は以下の 6 つのパターンに分類できた。①帰

属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致し、かつその基原が付帯情報と一致した。また、帰属されたタンパク質の分子量が SDS-PAGE の結果と一致する(23/41 製品)。

②帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致し、かつその基原が付帯情報と一致した。しかし、帰属されたタンパク質の分子量が SDS-PAGE の結果と一致しない(2/41 製品)。

③帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致し、かつその基原が付帯情報と一致した。また、帰属されたタンパク質の分子量が SDS-PAGE の結果と一致する。

しかし、別の基原に由来する同一機能でアミノ酸配列の相同性が 100%のタンパク質が同じ順位でヒットしたため、基原を 1 つに絞り込めない(6/41 製品)。

④帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致した。しかしデータベースの登録がなかったため、同定結果が基原と一致しなかった(3/41 製品)。

⑤データベースに登録がなかったため、なにもヒットしなかった(2/41 製品)。

⑥帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致した。データベースに登録があるにもかかわらず、帰属されたタンパク質の基原が付帯情報と一致しない(6/41 製品)。

以上、本法は、Mascot Search の結果を十分吟味することが必須だが、販売業者の情報提供に依存することなく、科学的に基原を判断することが可能であった。データベースの充実化とともに、より精巧な解析が期待できる。一方、Mascot search の結果が付帯情報と一致しない事例が確認された(パターン⑥)。これらについては、寄託機関あるいは販売業者から菌株を入手し、遺伝子レベルでの解析を行い、そもそも販売業者の付帯情報が妥当であったのか再確認

する必要がある。

- 2) 植物由来の香辛料抽出物 73 基原について、基原植物の和名及び学名を調査検討したところ、多くの基原について、基原・製法・本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、また、誤記と推測されるものが散見された。原則和名は Ylist、学名は Tropicos で標準とされているものを採用したが、調査した海外の規格や天然香料の規格を考慮し、基原種の取捨選択を行いながら、基原種として相応しいと思われる和名や学名を整備した。香辛料抽出物の基原生物となっている種には日本に自生していないものも多く、そもそも和名が存在しない種が多く存在した。第 9 版公定書作成時には和名の代わりに学名のラテン語読みをカタカナ表記で記載していたが、今回の基原種名の提案では、和名のないものは学名のみを記載することも併せて提案した。今後、提案した定義案をもとに、流通実態などの情報を収集し、成分規格案として整備していく予定である。

3. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

- 1) レイシ抽出物について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)及び薄層クロマトグラフィー(TLC)による分析を行った結果、逆相 HPLC では紫外線(UV)検出による主要なピークは認められなかった。一方、TLC 分析条件について、展開溶媒を検討した結果、酢酸エチル/メタノール/水/ぎ酸 (20 : 2 : 1 : 0.01) で展開し、UV (254 nm)照射することで R_f 値 0.6 付近に数個のスポットを確認した。これらスポット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い、各種機器分

析データに基づく成分解析の結果, TLC 分析における指標成分の候補として, *lucidenic acid A* 及び *D* の 2 成分が見出された.

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, 単一の化合物は得られなかった. 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, 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. その結果, 縮合型タンニンに特徴的なシグナルは観察されなかった. 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. 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.

ルチン(抽出物)の原料となるカイカの 50%EtOH 抽出物及びエタノール(EtOH)抽出物について, 各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し, 成分精査を行った結果, 16 種の化合物を単離, 同定した. 単離した化合物を標品とし, カイカ 50%EtOH 抽出物の HPLC 成分プロファイリングの結果, 主検出成分は *rutin* であり, その他の化合物はマイナー成分であった. これらのうち, *N-p-coumaroyl-N'-feruloylputrescin* , *N,N'-diferuloylputrescine* , *N,N'-dicoumaroylputrescine* は天然に稀少な化合物であるため, 特徴成分としてこれらを検出することで, その基原がエンジュ由来であることを示す指標となり得る可能性が考察された.

4. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) ベニコウジ色素, ベニコウジ黄色素, ベニバナ黄色素及びシタン色素に関して, HSCCC を用いて主成分の単離精製を行った結果, これらの主成分と報告されている化合物を高純度で獲得することができた. しかしながら, ベニコウジ色素, ベニバナ黄色素及びシタン色素に関して, 主色素成分とは別の大きなピークが検出された. このピークを HPLC で分析すると, 全くピークが検出されず, HPLC では検出できない未知の色素成分の存在が示唆された. よって, これらの品目については, さらに成分組成を分析する必要があると考えられた. 一方, ベニコウジ黄色素に関して, キサントモナシン A 及びキサントモナシン B が大きなピークとして確認され, これらが主色素成分であることが確認できた.

ゴマ油不けん化物, ベニコウジ黄色素及びチャ抽出物に関して, 主成分の市販標品及び HSCCC で単離した化合物を標品として用いたシングルリファレンス HPLC 定量法を構築した. 得られた標品の純度評価を $^1\text{H-qNMR}$ により行い, 化合物の絶対純度を決定した. 純度決定した分析対象物質及び分析対象とは異なる単一定量用基準物質(シングルリファレンス)を用いて絶対検量線を作成し, その傾きの比により, RMS を算出した. 得られた RMS 及びシングルリファレンスを用いた定量分析を実施した結果, 従来の絶対検量線法による定量値とほぼ同じであり, 分析カラムや移動相など分析条件を変更しても再現性に影響しないことが確認できた. 以上より, シングルリファレンス HPLC 定量法を用いることによ

り、分析対象物質の定量用標品を入手できない品目についても簡便且つ迅速に定量可能であると考えられた。

5. qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

- 1) ベニバナ赤色素中の carthamin の定量では、¹H-qNMR で値付けした carthamin の標準液を用いて絶対検量線を作成し、微量に含有される carthamin を HPLC により正確に定量する方法を確立した。¹H-qNMR による carthamin の直接定量は、認証標準物質の 1,4-BTMSB-d₄ を内部標準として使い、pyridine-d₅ 溶液と carthamin の溶液を混合して ¹H-qNMR を測定することによって可能となった。また、¹H-qNMR で値付けされた carthamin の各種溶媒での吸光係数の検証し、それぞれのモル吸光係数は DMF : 1.21 x 10⁵ (λ_{max} = 530), EtOH : 1.19 x 10⁵ (λ_{max} = 513), Pyridine : 1.48 x 10⁵ (λ_{max} = 540) と算出された。この値はいずれも文献値よりも大きく、¹H-qNMR が確立されていなかった当時では吸光係数の算出に用いた carthamin の純度が高く見積もられていたと考えられた。

香辛料抽出物の内、スターアニスを主な基原とするもの、あるいは生薬であるスターアニス種子の anisaldehyde の ¹H-qNMR による直接定量条件を確立した。その結果、香辛料抽出物中の含有率は 0.24~1.4%、生薬粉末も 0.32~0.62% の含有率で、¹H-qNMR が適用できる定量下限付近であることがわかった。揮発性の成分でもあることからあまり工程数を増やすことができないが、試料液の濃度を高める工夫の余地があると考えられた。

香辛料抽出物の内、クミンを基原とするも

の成分規格を作成するための基礎研究として、クミン粉末中の cuminaldehyde の ¹H-qNMR による定量条件を確立した。その結果、クミン粉末中の含有率は 0.36±0.02% ~ 1.84±0.06% と求められたことから、¹H-qNMR はクミンを基原とする香辛料抽出物にも十分適用可能であると考えられた。

また、フェネグreekを基原とする香辛料抽出物の成分規格作成に資する情報を得る目的で、フェネグreek種子粉末中の trigonelline の ¹H-qNMR による定量条件を確立した。その結果、フェネグreek種子中ではロットにより 0.36~0.38%、合わせて測定を行ってみたコーヒー種子中では 0.29~0.39% という数値が得られた。

同様にして、コショウなどの辛味成分である piperine の直接定量が ¹H-qNMR により可能であるか検討した。その結果、コショウを基原とする香辛料抽出物の成分規格設定に応用可能であることが確認できた。

6. qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

- 1) ラカンカ抽出物 3 製品について、¹H-qNMR により直接定量したところ、製品中のモグロシド V の含量値は、LC で得られた含量値と比較して 6~13% 程度高い結果を示した。直接定量に用いた 6 位の水素に由来するシグナルがモグロシド V の類縁物質に由来するシグナルと分離が不十分であることに起因すると考えられた。他のモグロシド V 由来のシグナルについても、分子内の他のシグナルや夾雑成分に由来するシグナルとの重なりが観察されたことから、前処理を一切伴わない ¹H-qNMR によるモグロシド V の直接定

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

酵素処理ナリンジンでは、RMS 法において、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。従って、本法により、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。また、酵素処理ヘスペリジンの成分規

格において規定されているグルコアミラーゼを用いた方法を参考として検討した提案法(A 法)は、酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体の定量法として有用であることが判明した。また、この方法では Naringin-G の定量を行う必要があるが、含量の算出において Naringin-G とナリンジンの分子量比を計算式に代入することにより、ナリンジンを定量用標品として Naringin-G の定量が可能となることが明らかとなった。これは、ナリンジンに対する Naringin-G の RMS がほぼ 1 であることからも妥当な結論と言える。なお、今回の提案法(A 法)におけるグルコアミラーゼによる前処理は、酵素処理ヘスペリジンの他に糖転位ルチン(抽出物)においても成分規格の定量法で採用されており、汎用性の点においても優れていると言え、本法の公的な規格試験法としての採用が期待される。

7. 既存添加物の定量用標品の合成に関する研究

1) 従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難な既存添加物について、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。クロセチン、カプサイシン、カピリン、リコペン、クルクミンについては合成が完了し、クロシンについては、モデル反応用化合物を合成し、反応の検討を行なった。また、クロシン合成のための別の方法として、クロセチンの部分構造を有するジカルボン酸化合物に対して、縮合剤を用いたカップリング

反応による種々のカロテノイド誘導体の合成も検討した。検討した方法を利用することで、クロシンの前駆体としての類縁体を合成することができた。以上、代替物質の定性用又は定量用標品における品質の向上及び安定供給が期待できる。

D. 健康危機情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表.

- 1) Tanaka R, Inagaki R, Sugimoto N, Akiyama H, Nagatsu A: Application of a quantitative ¹H-NMR (¹H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen. *J. Nat. Med.* **2017**; *71(1)*: 315-320.
- 2) Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N: Kinetic Study of the Equilibration between Carminic Acid and Its Two Isomers Isolated from Cochineal Dye. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*: 306-310.
- 3) 島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈 弘, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩, 受田浩之: 既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の関係. *日食化誌*, **2017**; *24*:10-15.
- 4) Yoshimura M, Ochi K, Sekiya H, Tamai E, Maki J, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Amakura Y: Identification of Characteristic Phenolic Constituents in Mousouchiku Extract Used as Food Additives. *Chem Pharm Bull.*, **2017**; *65*: 878-882.
- 5) Ito Y, Harikai N, Ishizuki K, Shinomiya K, Sugimoto N, Akiyama H: Spiroketalcarminic Acid, a Novel Minor Anthraquinone Pigment in Cochineal Extract Used in Food Additives. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*: 883-887.
- 6) Kitamaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata M, Ihara T. Determination of PAHs in Solution with a Single Reference Standard by a Combination of ¹H Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography. *Anal. Chem.*, **2017**; *89(13)*: 6963–6968.
- 7) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMR および HPLC による機能性表示食品中の機能性関与成分ルテインの定量. *日食化誌*, **2017**; *24(2)*:75-81.
- 8) 西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドウ, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量 NMR に基づく相対モル感度を利用した加工食品中のヘスペリジンおよびモノグルコシルヘスペリジンの定量. *食衛誌*, **2018**; *59(1)*: 1-10.
- 9) Akiyama H, Nose M, Ohtsuki N, Hisaka S, Takiguchi H, Tada A, Sugimoto N, Fuchino H, Inui T, Kawano N, Hayashi S, Hishida A, Kudo T, Sugiyama K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshimatsu K: Evaluation of the safety and efficacy of Glycyrrhiza uralensis root extracts produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems. *J. Nat. Med.*, **2017**; *71*: 265-271.
- 10) Tatebe C, Ohtsuki T, Fujita T, Nishiyama K, Itoh S, Sugimoto N, Kubota H,

- Tada A, Sato K, Akiyama, H: Determination of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in the Color Additive Food Red No. 106 (Sulforhodamine B) using High-Performance Liquid Chromatography. *Food Chem.* **2017**; *237*: 733-742.
- 11) 三浦 亨, 杉本 直樹, 渡邊 龍一, 末松 孝子, 高柳 庸一郎, 伊藤 喜之, 斎藤 直樹, 澤 竜一, 加藤 毅, 藤峰 慶徳, 小池 亮, 大福 裕 子, 山田 裕子, 内海 博明, 鈴木 敏之: ^1H 核 定量核磁気共鳴分光法の標準化のためのラ ウンドロビン試験による評価. *薬学雑誌*, **2017**; *137*: 1543-1553.
- 12) 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*(3): 105-112.
- 13) 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.
- 14) 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., A*, **2018**; *35*: 838–847.
- 15) Saito N, Kitamaki Y, Otsuka S, Yamanaka N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata H, Ihara T.: Extended internal standard method for quantitative ^1H NMR assisted by chromatography (EIC) for analyte overlapping impurity on ^1H NMR spectra. *Talanta*, **2018**; *184*: 484-490.
- 16) 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*(7): 498-505.
- 17) 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*: 45-52.
- 18) 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.
- 19) 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: ^1H 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*, **2018**; *67*: 541-549.
- 20) 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 中島 馨, 杉本直樹, 多田敦子, 曹永晚, 小川久美 子, 佐藤恭子: 香料 2,4-ジメチル-4-フェニル テトラヒドロフランの異性体存在比の決定. *食品化学学会誌*, **2019**; *26*: 63-67.
- 21) Masumoto N, Nishizaki Y, Maruyama T,

- Igarashi Y, Nakajima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K: Determination of perillaldehyde in perilla herbs using relative molar sensitivity to single-reference diphenyl sulfone. *J. Nat. Med.*, **2019**; *73*: 566-576.
- 22) Suwannarach N, Kumla J, Nishizaki Y, Sugimoto N, Meerak J, Matsui K, Lumyong S: Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2019**; *103*: 6973-6987.
- 23) Nishizaki Y, Masumoto N, Nakajima K, Ishizuki K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K.: Relative molar sensitivities of carnosol and carnosic acid with respect to diphenylamine allow accurate quantification of antioxidants in rosemary extract. *Food Addit. Contam., A*. **2019**; *36*: 203-211.
- 24) 水本俊行, 中野扶佐子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 相対モル感度を利用したヒハツ抽出物中のピペリン類の HPLC 定量分析. *食衛誌*, **2019**; *60*: 134-144.
- 25) 政田さやか, 水野沙稀, 小谷彩加, 藤原裕未, 内山奈穂子, 袴塚高志, 永津明人: ピペリン及びモノグルコシルヘスヘペリジンを機能性関与成分とする機能性表示食品の製剤学的品質評価と溶出試験法の検討. *日食化誌*, **2019**; *26*: 147-152.
- 2) 杉本直樹, 西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 村島健司, 北牧祐子, 沼田雅彦, 井原俊英, 佐藤恭子: カワラヨモギ抽出物の成分規格試験法の検討: 抗菌成分カピリンの定量法. 食品化学学会第 23 回総会・学術大会(2017.6)(志摩市).
- 3) 大槻崇, 鈴木一平, 建部千絵, 久保田浩樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: ¹H-qNMR を用いた食品中のサッカリンナトリウムの分析法の確立. 食品化学学会第 23 回総会・学術大会(2017.6)(志摩市).
- 4) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMR および HPLC による機能性関与成分ルテインの定量. 食品化学学会第 23 回総会・学術大会(2017.6.2)(志摩市).
- 5) 高橋未来, 西崎雄三, 多田敦子, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 穂山浩, 佐藤恭子, 井之上浩一: 相対モル感度係数を利用したベニコウジ黄色素中のキサントモナシン類の定量法の確立. 食品化学学会第 23 回総会・学術大会(2017.6)(志摩市).
- 6) 障子詩織, 高橋未来, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 穂山浩, 佐藤恭子, 井之上浩一: ベニコウジ色素の成分規格を目指した高速向流クロマトグラフィーによる解析法の検討. 食品化学学会第 23 回総会・学術大会(2017.6)(志摩市).
- 7) 箕川剛, 中島光一, 武川泰哲, 西崎雄三, 杉本直樹: オービトラップ LC/MS の AIF 測定による既存添加物スピルリナ青色素中の総

- ミクロシスチン定量法の検討. 食品化学学会 第 23 回総会・学術大会(2017.6)(志摩市).
- 8) Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K: Development of a HPLC/PDA method for quantitative analysis of food components without the need for analytical standards. 254th ACS National Meeting & Exposition. (2017.8)(Washington, DC).
- 9) 北牧祐子, 斎藤直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英: ガスクロマトグラフィーの新たな展開 -定量 NMR から求めたモル比を用いる一対多型の定量法の紹介-. 日本分析化学会シンポジウム(2017.9)(東京).
- 10) 杉本直樹: 定量 NMR の公的な分析法への適用とその応用, NMR による新しい定量技術~その基礎と食品, 化学品分析への応用, 第 64 回日本食品科学工学会シンポジウム B3 (2017.8)(藤沢市).
- 11) 杉本直樹: qNMR/Chromatography の開発と規格試験への応用. 日本分析化学会第 66 年会シンポジウム 2 (2017.9)(東京).
- 12) Kuroe M, Yamazaki T, Saito N, Numata M, Ihara T, Nishizaki Y, Sugimoto N: Determination of a non-ionic surfactant without its own calibration standard by qNMR/chromatography. Asian Conference on Oleo Science 2017 (ACOS2017), (2017.9)(Tokyo).
- 13) Sugimoto N, Nishizaki Y, Ishizuki K, Suematsu T, Miura T, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Yoshida Y, Sato K: Determination of relative molar sensitivity (RMS) by combination of qNMR and chromatography: Application of RMS for quantification of lycopene in tomato colorant. 131st AOAC Annual Meeting (2017.9)(Atranta).
- 14) 深谷栞, 吉岡弘毅, 市丸嘉, 三浦伸彦, 永津明人, 野々垣常正: アセトアミノフェンと四塩化炭素の併用による複合毒性の影響. フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー(2017.9)(仙台市).
- 15) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: HSCCC/qNMR-HPLC による相対モル感度係数を利用した天然色素中キサントモナシンの定量法の開発. 第 28 回クロマトグラフィー科学会議(2017.11)(東京).
- 16) 西崎雄三, 佐藤(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: 相対モル感度を利用した天然添加物ローズマリー抽出物中のカルノソールおよびカルノシン酸の定量分析. 日本食品衛生学会第 113 回学術講演会(2017.11)(東京).
- 17) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Development of quantitative analysis of main components in natural products by liquid chromatography with molar absorption coefficient ratio and high-speed countercurrent chromatography. Pittcon (2018.2)(Orlando).
- 18) Sugimoto, N: qNMR in Japan's Specification and standards for food additives. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1)(Tokyo).
- 19) Sugimoto, N: Overview of the Introductory Meeting on qNMR. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1)(Tokyo).
- 20) 森美保菜, 寺倉理央奈, 間瀬貴巳, 藤原裕未, 永津明人, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐

- 藤恭子：定量 NMR(¹H-qNMR)を応用した生薬コウカ中の carthamin の定量. 日本薬学会第 138 年会(2018.3)(金沢市).
- 21) 藤原裕未, 三輪真子, 本間篤, 永津明人: カエデ属植物に含まれるアントシアニン化合物とその機能性. 日本薬学会第 138 年会(2018.3)(金沢市).
- 22) 神谷万里子, 木村匡男, 森健, 山岸由佳, 三嶋廣繁, 永津明人, 野々垣常正, 池田義明: Tradescantia 属植物抽出液による pseudomonas aeruginosa 標準株の増殖とバイオフィーム形成に及ぼす影響. 日本薬学会第 138 年会(2018.3)(金沢市).
- 23)
- 24) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤直子, 石附京子, 中島馨, 佐藤恭子, 井之上浩一: 既存添加物の規格設定を目指したシングルリファレンス HPLC 定量法の開発 日本食品衛生学会 近畿地区勉強会(2018.3)(大坂市).
- 25) 高橋未来, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: シングルリファレンス定量分析: 相対モル感度に基づく新たな HPLC 定量法の開発とゴマリグナンへの応用. 日本薬学会第 138 回年会(2018.3)(金沢市).
- 26) 杉本直樹: 天然由来の食品添加物の利用と規制. 一般シンポジウム S26 食品にかかわる天然成分の安全性とその活用. 日本薬学会第 138 回年会(2018.3)(金沢市).
- 27) 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).
- 28) 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).
- 29) 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(2018.4)(東京).
- 30) 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).
- 31) 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 (¹H-qNMR)を応用したベニバナ赤色素・carthamin の定量. 第 17 回新規素材探索研究会セミナー(2018.6)(横浜市).
- 32) 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(2018.6)(名古屋市).
- 33) 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).
- 34) 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).
- 35) 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)
- 36) 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)(Washington DC).
- 37) Sugimoto N: Overview of food additive regulation in Japan. 1st TISTR and JAIMA conjoint conference (2018.11)(Bangkok).
- 38) 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)。
- 39) 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)。
- 40) 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。日本食品衛生学会第 114 回学術講演会(2018.11)(広島市)。
- 41) 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)。
- 42) 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要因。第 55 回全国衛生化学技術協議会 (2018.11)(横浜市)。
- 43) 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 回全国衛生化学技術協議会，部門別研究会食品部門(2018.11.29)(横浜市)。
- 44) 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。定量 NMR クラブ第 7 回会合 (2018.12)(東京)。
- 45) 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(2018.9)(広島市)。
- 46) 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).
- 47) 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：¹H-qNMR に基づく相対モル感度を用いたラカンカ抽出物中のモグロシド V 分析法の確立。日本薬学会第 139 年会(2019.3)(千葉市)。
- 48) 末松孝子, 小松孝典, 細江潤子, 内山奈穂子, 三浦亨, 鈴木裕樹, 山田裕子, 五十

- 嵐靖, 丸山剛史, 嶋田典基, 日向野太郎, 杉本直樹, 合田幸広: 定量 NMR 法における試料調製条件の一考察: 吸湿性試薬の場合. 第 86 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第 110 回計測自動制御学会力学量計測部会, 第 36 回合同シンポジウム(2019.6)(京都市).
- 49) 増本直子, 西崎雄三, 丸山剛史, 五十嵐靖, 中島馨, 細江潤子, 内山奈穂子, 高岡真也, 吉田佐奈枝, 三浦亨, 山田裕子, 日向野太郎, 末松孝子, 小松功典, 嶋田典基, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子, 合田幸広: 指標成分ペリラルデヒドの易分解性を考慮した局方生薬ソヨウの新しい分析法. 第 86 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第 110 回計測自動制御学会力学量計測部会, 第 36 回合同シンポジウム(2019.6)(京都市).
- 50) 合田幸広, 小出達夫, 細江潤子, 内山奈穂子, 杉本直樹, 村林美香, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 清水仁, 大藤克也, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 小幡泰子, 山田裕子, 鈴木裕樹, 三浦亨, 水井浩司, 朝倉克夫, 末松孝子: 定量 NMR は, マスバランス法より標準物質の定量においてより経済的である. 第 86 回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第 110 回計測自動制御学会力学量計測部会, 第 36 回合同シンポジウム(2019.6)(京都市).
- 51) 高橋未来, 高木映里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: カテキン類の一斉分析を目指したシングルリファレンス HPLC 定量法の開発. 日本食品化学学会第 25 回総会・学術大会(2019.6)(松本市).
- 52) 松岡聖朗, 大槻崇, 藤裕志郎, 松下明里, 松田美優, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛: $^1\text{H-qNMR}$ に基づく相対モル感度を用いたゴマ若葉抽出物等に含まれるアクテオシドの定量について. 食品化学学会第 25 回総会・学術大会(2019.6)(松山市).
- 53) 松岡聖朗, 大槻崇, 石附京子, 藤佑志郎, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛: フラバノン配糖体定量分析への $^1\text{H-qNMR}$ に基づく相対モル感度法の応用. 日本食品科学工学会第 65 回大会(2019.8)(札幌市).
- 54) 小泉茉友, 中島馨, 増本直子, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 杉本直樹, 佐藤恭子: 標品不要! ステビオール配糖体の一斉定量分析. 第 5 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9)(東京).
- 55) 酒井有希, 増本直子, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 機能性表示食品中のルテインの SI トレサブルな定量分析法の検討. 第 5 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9)(東京).
- 56) 長久保直也, 建部千絵, 石附京子, 増本直子, 大槻崇, 松藤寛, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: Single Reference HPLC 法を用いた食用タール色素中の不純物の定量. 第 5 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9)(東京).
- 57) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 五十嵐靖, 丸山剛史, 三浦亨, 水井浩司, 山田裕子, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋

- 田典基, 合田幸広: 日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした定量NMRを用いたエボジアミン及びマンギフェリンの絶対純度の測定. 日本生薬学会第66回年会(2019.9)(東京).
- 58) Uchiyama N, Masumoto N, Hosoe J, Sugimoto N, Maruyama T, Igarashi Y, Suematsu T, Komatsu T, Yamada Y, Takaoka S, Miura T, Mizui K, Higano T, Shimada N, Goda Y: Determination of perillaldehyde in perilla herbs based on relative molar sensitivity (RMS) using a combination of ¹H-quantitative NMR and HPLC/UV. GA2019 (67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research) (2019.9) (Innsbruck).
- 59) Miura T, Sugimoto N, Suematsu T: General rules for quantitative NMR spectroscopy (JIS K0138:2018). qNMR summit 2019 (2019.10) (Rockville).
- 60) Saito T, Suematsu T, Sugimoto N: Progress in proposal of an ISO standard for purity assessment by qNMR. qNMR summit 2019 (2019.10) (Rockville).
- 61) Nishizaki Y: External Standardization in qNMR. qNMR summit 2019 (2019.10) (Rockville).
- 62) 水野沙稀, 藤原裕未, 内山奈穂子, 袴塚高志, 永津明人, 政田さやか: 機能性表示食品の品質評価に関する研究(5): イチョウ葉エキスに由来する機能性表示食品の崩壊性と溶出性について. 第8回食品薬学シンポジウム(2019.10)(静岡市).
- 63) 石附京子, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物規格基準データベースの作成と公開. 第56回全国衛生化学技術協議会年会(2019.12)(広島市).
- 64) 多田敦子, 堀江正一, 関戸晴子, 橋口成喜, 小林千種, 杉浦潤, 大槻崇, 中島安基江, 濟田清隆, 久保田浩樹, 建部千絵, 柳本登紀子, 寺見祥子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(平成30年度). 第56回全国衛生化学技術協議会年会(2019.12)(広島市).
- 65) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 小出達夫, 村林美香, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 大藤克也, 清水仁, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 大原拓郎, 山田裕子, 鈴木裕樹, 三浦亨, 水井浩司, 朝倉克夫, 末松孝子, 小浜亜以, 合田幸広 日本薬局方外標準品インドシアニングリーンの恒温恒湿下における定量 NMR (qNMR) を用いた絶対純度. 日本定量 NMR 研究会 (2019.12)(東京).
- 66) 増本直子, 中島馨, 小泉茉友, 大内政輝, 西崎雄三, 石附京子, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 杉本直樹, 佐藤恭子: Single-reference HPLC 法によるステビオール配糖体の一斉定量. 日本定量 NMR 研究会(2019.12)(東京).
- 67) 西崎雄三: NMR 分析における外部標準法の有効性と分析値にバラつきを与える要因の整理. 日本定量 NMR 研究会 (2019.12)(東京).
- 68) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 石附京子, 丸山剛史, 五十嵐靖, 三浦亨, 山田裕子, 水井浩司, 高岡伸也, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした定量NMRを用いた吸湿性化合物の絶対純度

の測定. 日本薬学会第 140 年会 (2020.3) (京都市).

- 69) 天倉吉章, 好村守生, 村井望, 重松優里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物レイシ抽出物及びカキ色素の成分解析. 日本薬学会第 140 年会(2020.3)(日本薬学会第 140 年会 Web 要旨集).

3. 総説・単行本

- 1) 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 食品分析の信頼性確保における定量 NMR に基づく相対モル感度の役割—分析種の定量用標品不要なクロマトグラフィーの開発—. FFI ジャーナル, **2019**; 224: 123-130.
- 2) Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: Application of ¹H-Quantitative NMR From the Viewpoint of Regulatory Science. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, **2019**, (DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14681-5)

E. 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29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の成分規格試験法に関する研究

～既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)～

業務受託者 上田要一 一般社団法人日本食品添加物協会 専務理事

研究要旨 既存添加物 365 品目（既存添加物名簿改正（令和2年2月26日）以前の品目数）の成分規格については、第9版食品添加物公定書に89品目が収載されたが、なお約150品目（約160規格）が未設定となっている。

当協会は、これまでも既存添加物の食品添加物公定書への新規収載を目標に、自主規格の策定及び及び見直しの検討を継続してきた。

しかしながら、国の成分規格が設定されていない既存添加物については、

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

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

本研究では、平成29～31年度（令和元年度）において、既存添加物名簿及び既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種について、削除、変更又は拡大の必要性が生じているものの有無を確認した。

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

研究協力者

樋口彰 (一社)日本食品添加物協会
常務理事

林 清 東洋大学
食環境科学部食環境科学科
教授

卯津羅健作 (一社)日本食品添加物協会
第7(酵素)部会長

及び製法・本質の基原生物の調査

第10版収載既存添加物候補品目の基原・製法・本質に記載されている基原種について、削除、変更又は拡大の必要性の有無の調査を継続実施した。また、各品目の基原種については、Tropicos (<https://www.tropicos.org/home>), YList (<http://www.ylist.info/index.html>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)の各データベースにより、植物基原、和名、学名等を確認した。

A. 研究方法

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

第9版食品添加物公定書未収載品目について、検証用規格および自主規格を含めた成分規格の整備状況、安全性試験実施状況、国内外規格の有無等を調査した。

(2) 第10版収載既存添加物候補品目定義

(3) 酵素品目に関する調査

食品添加物として用いられる酵素品目について、基原種の同定、分類、考え方について調査を行なうとともに、酵素基原生物の分類学および同定技術の進歩により生じた呼称変更への対応及び学術情報に沿った確認等の実施について説明した。さらに最終年度では、食品添加

物公定書に記載された添加物酵素の定義への基原の追加を想定し調査を行った。

B. 研究結果

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

第9版食品添加物公定書未収載品について次の事項について調査を行い, 部会別および品目順に Table 1 (下記①, ②, ③), Table 2 (下記④) にまとめた。

- ①自主規格(案)及び第10版食品添加物公定書成分規格案の作成状況
- ②試験法に関する第三者及び自社検証実施状況
- ③国内外規格の有無
- ④安全性評価の実施状況

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

(2) 第10版収載既存添加物候補品目定義及び製法・本質の基原生物の調査

過去5年間のまとめを, その理由・根拠を含め一覧表にした。

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

(3) 添加物酵素の基原種の同定, 分類の考え方について(最終年度まとめ)

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

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

酵素を食品添加物として使用する場合, 食品添加物公定書に規定された規格への適合が必要となり, 特にその基原は, 食品添加物公定書のD. 成分規格・保存基準各条にある各々の酵素の定義に記載されたものに限定される。

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

生物種, 特に微生物においては, 分類学, および同定の技術・手法の進歩により, 基原の呼称が改正/変更されることが少なからず発生することがあるが, その際の食品添加物公定書収載の基原名の整備。

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

本調査の概要を以下に示す。

1) 酵素生産菌の基原名の呼称改正(変更)に際する対応策案

・微生物の場合

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

(同定の指標となる遺伝子の配列解析)

細菌類: 16S rDNA 解析など

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

酵母: ITS rDNA 解析, 26S rDNA-D1/D2 解析など

(当該遺伝子配列を用いた相同性検索)

上記の解析で得られたDNA塩基配列を国際塩基配列データベース(DDBJ/ENA(EMBL))

/GenBank) に対して相同性検索を行い、同定を行う。

(上記外の手法による解析)

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

(※) タンパク質マスマスペクトルパターンをデータベースと照合することで同定を行う手法. 第 17 改正日本薬局方参考情報にも掲載されている。

また, 当該微生物の同定において, 必要に応じて, 他の適切な最新技術も適用することが可能。

(学名について)

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

NCBI

①<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

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

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

- 分類学の成書等 (例: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Index Fungorum, MycoBank など) の呼称変更情報。

- 査読のある分類学分野の学術誌での呼称変更情報。

- 公的な菌株の保存機関 (例: American Type Culture Collection など) の菌株情報にある呼称変更情報。

- 海外の主要国 (参) の食品用酵素のポジティブリスト等における基原生物の属種に関する情報。

(参) 米国 GRAS, カナダ, オーストラリア・ニュージーランド, フランスなど

- その他, 科学的に妥当と判断できる公的の情報。

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

名とすることもできる, とする運用が妥当と考えられる。

・同定された時期が古く明確な呼称変更の確認ができない場合。

・他の機関・事業者からの譲渡等の菌株で確固とした同定記録がない場合。

また, 動植物由来の酵素の場合, その基原となる生物種の分類, 学術名の呼称変更などについては, 学術情報 (分類学の成書, 査読のある学術誌など) に従い学名の確認・変更を行うことが妥当と考えられる。なお, 学術名については, 第 9 版食品添加物公定書の規格策定の際によりどころとされた下記の URL で用いられているものによることとする。なお, 他の出典元とする場合はその根拠を示すこととする。

学名:

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

和名:

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

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

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

【基原の追加に際する検討事項案】

1. 分類学上の位置付け(種名(学名)・株名等)等に関する事項

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

2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

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

⇒国立感染症研究所病原体安全管理規定(病原体等のBSL分類)

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

⇒ATCC (American Type Culture Collection) の Biosafety Level

⇒EFSA の QPS (the Qualified Presumption of Safety)

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

など

3. 寄生性及び定着性に関する事項

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

4. 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

当該微生物が病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないこと。

5. 当該微生物の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

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

6. なお、以下の事項は、議論の進み具合により必要となった際に提示する。

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

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

(仏国：加工助剤に関するリスト)

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

(米国：GRAS Notice)

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

(米国：21CFR Chapter I Subchapter-B)

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

(FSANZ：Food Standards Code Schedule 18)

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

C. 考察

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

D. 謝辞

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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の成分規格試験法に関する研究

～新規分析手法の導入に関する研究～

分担研究者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

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

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

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

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

A. 研究目的

食品添加物の品質確保のため、各品目について成分規格が設定される。第9版食品添加物公定書には、指定添加物及び既存添加物の各品目の成分規格が記載されているが、既存添加物365品目(枝番込み382品目、但し、香辛料抽出物を1品目(74基原)とする(令和2年2月26日以前の品目数))については、217品目(枝番品目込み)の成分規格が設定済である。残り164品目(枝番込み)と香辛料抽出物1品目(74基原)の成分規格が未設定である。これらの品目の成分規格設定が急務とされている。

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

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

B. 研究方法

B-1) RMS を用いた分析法の導入

B-1-1) トマト色素中のリコペンの定量

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

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

B-1-2) アナトー色素中の主色素成分の定量

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

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

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

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

B-2) ^{13}C -qNMR に関する基礎的検討

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

qNMR 標準物質は SI にトレーサブルに純度が値づけされた 1,4-BTMSB- d_4 標準物質(純度 $99.9 \pm 0.5\%$)、DMSO2 標準物質(純度 $99.7 \pm 0.7\%$)を用いた。qNMR 測定溶媒には acetone- d_6 及び DMSO- d_6 を用いた。試料には diethyl phthalate (DEP) 標準物質(純度 $99.98 \pm 0.01\%$)、benzoic acid (BA), rutin trihydrate (Rutin) (^1H -qNMR より anhydrate としての純度 $90.2 \pm 0.3\%$ ¹⁾), quercetin xH₂O (Quercetin) (^1H -qNMR より anhydrate としての純度 $92.8 \pm 0.02\%$ ¹⁾)を用いた。これら純度既知の物質を用い調製した試料液を NMR に付し、 ^{13}C -qNMR の定量性に関係すると考えられる各種パラメータを変化させ、その影響を観察した。

C. 結果及び考察

C-1) RMS を用いた分析法の導入

C-1-1) トマト色素中のリコペンの定量

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

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

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

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

C-1-2) アナト一色素中の主色素成分の定量

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

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

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

C-2) ^{13}C -qNMRに関する基礎的検討

qNMRではSIにトレーサブルな標準物質を内標準物質として用いることにより対象物質の絶対量を求めることが可能である。核種には ^1H 核を用いる方法である ^1H -qNMRにより有機化合物の精確な定量が可能である。しかし、 ^1H -qNMRは、混合物の定量を行う場合において、観測範囲が約20 ppmと短く、類似化合物に由来するシグナルが重なるため個々の成分の直接定量が困難である。

^1H -qNMRのこの欠点を克服する手法として、 ^1H 核以外の核種として ^{13}C 核を用いたqNMRの手法が考えられる。 ^{13}C -NMRでは観測範囲が ^1H -NMRと比較して約20倍広く、観測されるシグナルもプロトンノイズデカップリングによりシングレットで検出されるため、類似化合物が共存した場合においても ^1H -NMRに比べてシグナルが重なる可能性は低く、個々の化合物を同時に定量できる可能性が高い。一方、 ^{13}C -NMRは ^1H -NMRに比べて感度が非常に悪く、通常の測定条件では定量性に乏しいという問題がある。本研究では、 ^{13}C -NMRに高い定量性を付与し、 ^{13}C -qNMRの手法を確立させるための基礎検討を行った。定量性の向上に関係すると考えられるパラメータ、すなわち、データポイント数、パルス繰り返し時間、積算回数、位相及びベースライン補正、積分範囲、ゼロフィリング等について検討した。

純度既知の標準物質1,4-BTMSB- d_4 、DMSO $_2$ 及びDEPを用い、各種パラメータの最適化を行った。その結果、 ^{13}C -qNMRでは約5%のばらつきを含む定量値が得られるようになった。従って、

精密な定量分析には化合物の純度決定には適さないと考えられた。

一方、 ^{13}C -qNMRにより、Quercetinとその配糖体であるRutinに定量分析を行った結果から、多少のばらつきは生じるが類似化合物の混合物から目的成分を単離せずに直接定量が可能であることが証明された。天然由来の添加物の有効成分または指標成分を迅速に定量する手法として有用であると考えられた。

D. 結論

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

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

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

E. 参考文献

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

本添加物協会(1999).

- 4) 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 斎藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎壮, 河村葉子: 定量NMRに基づく既存添加物中のクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量. 食衛誌, 51, 205-212(2010).
- 5)

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 石附京子, 西崎雄三, 多田敦子, 箕川剛, 中島光一, 大槻崇, 穂山浩, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物クチナシ青色素の色素生成メカニズムの解明: 青色素の推定構造. 食品化学学会(2017.6).
- 2) 杉本直樹, 西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 村島健司, 北牧祐子, 沼田雅彦, 井原俊英, 佐藤恭子: カワラヨモギ抽出物の成分規格試験法の検討: 抗菌成分カピリンの定量法. 食品化学学会(2017.6).
- 3) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMRおよびHPLCによる機能性関与成分ルテインの定量. 食品化学学会(2017.6).
- 4) 箕川剛, 中島光一, 武川泰哲, 西崎雄三, 杉本直樹: オービトラップLC/MSのAIF測定による既存添加物スピルリナ青色素中の総ミクロシスチン定量法の検討. 食品化学学会(2017.6).
- 5) 北牧祐子, 斎藤直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英: ガスクロマトグラフィーの新たな展開 -定量NMRから求めたモル比を用いる一対多型の定量法の紹介-. 日本分析化学会シンポジウム(2017.9).
- 6) 杉本直樹: 定量NMRの公的な分析法への適用とその応用, NMRによる新しい定量技術~その基礎と食品, 化学品分析への応用, 第64回日本食品科学工学会シンポジウムB3(2017.8).
- 7) 杉本直樹: qNMR/Chromatographyの開発と規格試験への応用. 日本分析化学会第66年会シンポジウム2(2017.9).

- 8) Kuroe M, Yamazaki T, Saito N, Numata M, Ihara T, Nishizaki Y, Sugimoto N: Determination of a non-ionic surfactant without its own calibration standard by qNMR/chromatography. Asian Conference on Oleo Science 2017 (ACOS2017) (2017.9).
- 9) Sugimoto N, Nishizaki Y, Ishizuki K, Suematsu T, Miura T, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sato K: Determination of relative molar sensitivity (RMS) by combination of qNMR and chromatography: Application of RMS for quantification of lycopene in tomato colorant. 131st AOAC Annual Meeting (2017.9).
- 10) Sugimoto N: qNMR in Japan's Specification and standards for food additives. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
- 11) Sugimoto N: Overview of the Introductory Meeting on qNMR. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
- 12) 森美保菜, 寺倉理央奈, 間瀬貴巳, 藤原裕未, 永津 明人, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量NMR(¹H-qNMR)を応用した生薬コウカ中のcarthaminの定量. 日本薬学会第138回年会(2018.3).
- 13) 合田幸広, 小出達夫, 細江潤子, 内山奈穂子, 杉本直樹, 近藤加奈子, 村林美香, 藤谷敏彦, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 岡本寿美子, 大藤克也, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 小幡泰子, 山田裕子, 鈴木裕樹, 三浦亨, 水井浩司, 末松孝子, 朝倉克夫: 日本薬局方化学薬品を対象としたqNMRとマスバランス法の比較とqNMRの経済的利点. 日本薬学会第138回年会(2018.3).
- 14) 杉本直樹: 天然由来の食品添加物の利用と規制. 一般シンポジウムS26 食品にかかわる天然成分の安全性とその活用. 日本薬学会第138回年会(2018.3).
- 15) Sugimoto N, Nishizaki Y, Masumoto N, Sato K, Suematsu T, Miura T, Yamada Y, Kitawaki Y, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T: Development of single reference liquid chromatography quantitative analysis based on relative molar sensitivity. AOAC 132nd Annual Meeting (2018.8).
- 16) Miura T, Sugimoto N: Quantitation paradigm and preparation of quantitative reference standards. AOAC 132nd Annual Meeting, Symposium: Practicality of quantitative NMR in quality control (2018.8).
- 17) Sugimoto N: Development of single-reference HPLC quantitative analysis for chemical compounds derived from natural sources based on relative molar sensitivity. 2018 APEC workshop on food safety and food adulterated with drugs (2018.9).
- 18) Sugimoto N, Saito T, Miura T: New Proposal regarding "Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy - Quantification of reference compounds used for foods and food products - General requirements" ISO/TC34 plenary meeting (2018.10).
- 19) Sugimoto N: Overview of food additive regulation in Japan. 1st TISTR and JAIMA conjoint conference (2018.11).
- 20) 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物・シタン色素の成分解析. 日本食品衛生学会第114回学術講演会(2018.11).
- 21) 寺見祥子, 多田敦子, 久保田浩樹, 佐野誠, 鈴木一平, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 試薬中のノルビキシン及びビキシン簡易濃度測定法の検討. 日本食品衛生学会第114回学術講演会(2018.11).
- 22) 杉本直樹: 天然添加物の品質保証: qNMRの応用と展開. 第55回植物化学シンポジウム(2018.11).
- 23) 多田敦子, 堀江正一, 関戸晴子, 橋口成喜, 小林千種, 勝原美紀, 大槻崇, 中島安基江, 高橋直矢, 久保田浩樹, 建部千絵, 寺見祥子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討. 第55回全国衛生化学技術協議会(2018.11).
- 24) 杉本直樹: qNMR法の国際標準化による波及効果. 日本薬学会第139年会一般シンポジウム「品質評価(Quality)のレギュラトリーサイエンスと分析科学の新機軸」(2019.3).
- 25) 黒江美穂, 斎藤直樹, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英: 非

- イオン界面活性剤の簡易定量に向けた HPLC-RIにおける相対モル感度の頑健性評価. 日本化学会年会第99春期年会(2019.3).
- 26) 末松孝子, 小松孝典, 細江潤子, 内山奈穂子, 三浦亨, 鈴木裕樹, 山田裕子, 五十嵐靖, 丸山剛史, 嶋田典基, 日向野太郎, 杉本直樹, 合田幸広: 定量NMR法における試料調製条件の一考察: 吸湿性試薬の場合. 第86回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第110回計測自動制御学会力学量計測部会, 第36回合同シンポジウム(2019.6).
- 27) 増本直子, 西崎雄三, 丸山剛史, 五十嵐靖, 中島馨, 細江潤子, 内山奈穂子, 高岡真也, 吉田佐奈枝, 三浦亨, 山田裕子, 日向野太郎, 末松孝子, 小松功典, 嶋田典基, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子, 合田幸広: 指標成分ペリルアルデヒドの易分解性を考慮した局方生薬ソヨウの新しい分析法. 第86回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第110回計測自動制御学会力学量計測部会, 第36回合同シンポジウム(2019.6).
- 28) 合田幸広, 小出達夫, 細江潤子, 内山奈穂子, 杉本直樹, 村林美香, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 清水仁, 大藤克也, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 小幡泰子, 山田裕子, 鈴木裕樹, 三浦亨, 水井浩司, 朝倉克夫, 末松孝子: 定量NMRは, マスバランス法より標準物質の定量においてより経済的である. 第86回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会, 第110回計測自動制御学会力学量計測部会, 第36回合同シンポジウム(2019.6).
- 29) 高橋未来, 高木映里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: カテキン類の一斉分析を目指したシングルリファレンスHPLC定量法の開発. 食品化学学会第25回総会・学術大会(2019.6).
- 30) 松岡聖朗, 大槻崇, 藤裕志郎, 松下明里, 松田美優, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛: ^1H -qNMRに基づく相対モル感度を用いたゴマ若葉抽出物等に含まれるアクテオシドの定量について. 食品化学学会第25回総会・学術大会(2019.6).
- 31) 小泉茉友, 中島馨, 増本直子, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 杉本直樹, 佐藤恭子: 標品不要! ステビオール配糖体の一斉定量分析. 第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9).
- 32) 酒井有希, 増本直子, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 機能性表示食品中のルテインのSIトレーサブルな定量分析法の検討. 第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9).
- 33) 長久保直也, 建部千絵, 石附京子, 増本直子, 大槻崇, 松藤寛, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: Single Reference HPLC法を用いた食用タール色素中の不純物の定量. 第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9).
- 34) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 五十嵐靖, 丸山剛史, 三浦亨, 水井浩司, 山田裕子, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした定量NMRを用いたエボジアミン及びマンギフェリンの絶対純度の測定. 日本生薬学会第66回年会(2019.9).
- 35) Uchiyama N, Masumoto N, Hosoe J, Sugimoto N, Maruyama T, Igarashi Y, Suematsu T, Komatsu T, Yamada Y, Takaoka S, Miura T, Mizui K, Higano T, Shimada N, Goda Y: Determination of perillaldehyde in perilla herbs based on relative molar sensitivity (RMS) using a combination of ^1H -quantitative NMR and HPLC/UV. GA2019 (67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research) (2019.9).
- 36) Miura T, Sugimoto N, Suematsu T: General rules for quantitative NMR spectroscopy (JIS K0138:2018). qNMR summit 2019 (2019.10).
- 37) Saito T, Suematsu T, Sugimoto N: Progress in proposal of an ISO standard for purity

assessment by qNMR. qNMR summit 2019 (2019.10).

- 38) Nishizaki Y: External Standardization in qNMR. qNMR summit 2019 (2019.10).
- 39) 石附京子, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物規格基準データベースの作成と公開. 第56回全国衛生化学技術協議会年会(2019.12).
- 40) 多田敦子, 堀江正一, 関戸晴子, 橋口成喜, 小林千種, 杉浦潤, 大槻崇, 中島安基江, 濟田清隆, 久保田浩樹, 建部千絵, 柳本登紀子, 寺見祥子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(平成30年度). 第56回全国衛生化学技術協議会年会(2019.12)
- 41) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 小出達夫, 村林美香, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 大藤克也, 清水仁, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 大原拓郎, 山田裕子, 鈴木裕樹, 三浦亨, 水井浩司, 朝倉克夫, 末松孝子, 小浜亜以, 合田幸広: 日本薬局方外標準品インドシアニングリーンの恒温恒湿下における定量NMR (qNMR)を用いた絶対純度. 日本定量NMR研究会(2019.12).
- 42) 増本直子, 中島馨, 小泉茉友, 大内政輝, 西崎雄三, 石附京子, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 杉本直樹, 佐藤恭子: Single-reference HPLC法によるステビオール配糖体の一斉定量. 日本定量NMR研究会 (2019.12).
- 43) 西崎雄三: NMR分析における外部標準法の有効性と分析値にバラつきを与える要因の整理. 日本定量NMR研究会 (2019.12).
- 44) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 石附京子, 丸山剛史, 五十嵐靖, 三浦亨, 山田裕子, 水井浩司, 高岡伸也, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした定量NMRを用いた吸湿性化合物の絶対純度の測定. 日本薬学会第140年会(2020.3).
- 45) 天倉吉章, 好村守生, 村井望, 重松優里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐

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

2. 論文発表

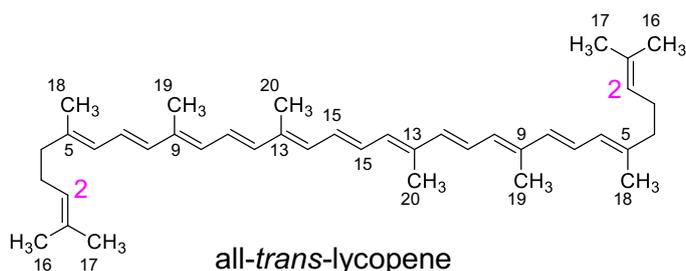
- 1) Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N: Kinetic Study of the Equilibration between Carminic Acid and Its Two Isomers Isolated from Cochineal Dye. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*, 306-310.
- 2) 島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈拵, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩, 受田浩之: 既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の関係. *日食化誌*, **2017**; *24*, 10-15.
- 3) Yoshimura M, Ochi K, Sekiya H, Tamai E, Maki J, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Amakura Y: Identification of Characteristic Phenolic Constituents in Mousouchiku Extract Used as Food Additives. *Chem Pharm Bull.*, **2017**; *65*, 878-882 (2017).
- 4) Ito Y, Harikai N, Ishizuki K, Shinomiya K, Sugimoto N, Akiyama H: Spiroketalcarminic Acid, a Novel Minor Anthraquinone Pigment in Cochineal Extract Used in Food Additives. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*, 883-887.
- 5) Kitamaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata M, Ihara T. Determination of PAHs in Solution with a Single Reference Standard by a Combination of ¹H Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography. *Anal. Chem.*, **2017**; *89* (13), 6963-6968
- 6) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMR および HPLC による機能性表示食品中の機能性関与成分ルテインの定量. *日食化誌*, **2017**; *24*(2),75-81.
- 7) 西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドウ, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量 NMR に基づく相対モル感

- 度を利用した加工食品中のヘスペリジンおよびモノグルコシルヘスペリジンの定量. 食衛誌, **2018**; *59(1)*, 1-10 (2018).
- 8) Akiyama H, Nose M, Ohtsuki N, Hisaka S, Takiguchi H, Tada A, Sugimoto N, Fuchino H, Inui T, Kawano N, Hayashi S, Hishida A, Kudo T, Sugiyama K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshimatsu K: Evaluation of the safety and efficacy of Glycyrrhiza uralensis root extracts produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems. *J. Nat. Med.*, **2017**; *71*, 265-271.
 - 9) Tatebe C, Ohtsuki T, Fujita T, Nishiyama K, Itoh S, Sugimoto N, Kubota H, Tada A, Sato K, Akiyama, H: Determination of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in the Color Additive Food Red No. 106 (Sulforhodamine B) using High-Performance Liquid Chromatography. *Food Chem.* **2017**; *237*: 733-742.
 - 10) 田原麻衣子, 杉本直樹, 香川(田中)聡子, 坂井信夫, 五十嵐良明, 神野透人: ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドの定量分析における qNMR を用いたトレーサビリティの確保. *薬学雑誌*, **2018**; *138*: 551-557.
 - 11) Nishizaki Y, Masumoto N, Yokota A, Mikawa T, Nakashima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Ito Y, Sugimoto N, Sato K.: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Addit. Contam.*, **2018**; *35*: 838-847.
 - 12) Saito N, Kitamaki Y, Otsuka S, Yamanaka N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata H, Ihara T.: Extended internal standard method for quantitative ¹H NMR assisted by chromatography (EIC) for analyte overlapping impurity on ¹H NMR spectra. *Talanta*, **2018**; *184*: 484-490.
 - 13) Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato, N: Phytochemical profiling of rosemary extract products distributed as food additives in the Japanese market. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **2018**; *25*: 105-113.
 - 14) 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 中島馨, 杉本直樹, 多田敦子, 曹永晩, 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. *食品化学学会誌*, **2019**; *26*: 63-67.
 - 15) Masumoto N, Nishizaki Y, Maruyama T, Igarashi Y, Nakajima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K: Determination of perillaldehyde in perilla herbs using relative molar sensitivity to single-reference diphenyl sulfone. *J. Nat. Med.*, **2019**; *73*: 566-576.
 - 16) Suwannarach N, Kumla J, Nishizaki Y, Sugimoto N, Meerak J, Matsui K, Lumyong S: Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2019**; *103*: 6973-6987.
 - 17) Nishizaki Y, Masumoto N, Nakajima K, Ishizuki K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K.: Relative molar sensitivities of carnosol and carnosic acid with respect to diphenylamine allow accurate quantification of antioxidants in rosemary extract. *Food Add. Contam., A.* **2019**; *36*: 203-211.
 - 18) 水本俊行, 中野扶佐子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 相対モル感度を利用したヒハツ抽出物中のピペリン類の HPLC 定量分析. *食衛誌*, **2019**; *60*: 134-144.
3. 総説
- 1) 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 食品分析の信頼性確保における定量NMRに基づく相対モル感度の役割—分析種の定量用標品不要なクロマトグラフィーの開発—. *FFIジャーナル*, **2019**; *224*: 123-130.
4. 単行本

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

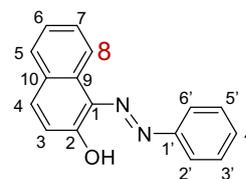


all-trans-lycopene

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

Exact Mass: 536.438

Molecular Weight: 536.888



sudan I

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

Exact Mass: 248.095

Molecular Weight: 248.285

Fig. 1 リコペンとスダン I の構造

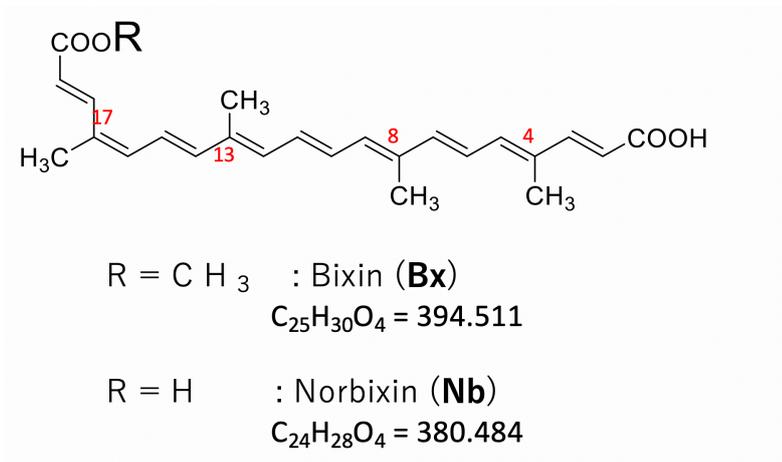


Fig. 2 ビキシンとノルビキシンの構造

Table 1 トマト色素製品中のリコペン分析用 HPLC 測定条件

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

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

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

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

Sample No.	lycopene area A _L	sudan I area A _S	採取量 W(mg)	定容量 V(mL)	希釈率 F	単位補正	RMS 法 (td3~5, LV0~LV5, 原点通ず) = 9.857				リコペン絶対検量線法 (td3~5, LV0~LV5, 原点通ず)				残差%= RMS-検 量線/検 量線×100		
							検液中の sudan I		検液中の lycopene		検液中の lycopene 濃度		検液中の lycopene 濃度				
							C _S (m_mol/mL)	C _L (m_mol/mL)	含有量 (%)	含有量 (%)	含有量 (%)	含有量 (%)					
A1155-n1	31634	11565	78.5650	25	250	100	5.40.E-06	1.500.E-06	6.40	AVR	6.35	1.49E-06	6.38	AVR	6.28	0.45	
A1155-n2	30427	11535	83.1612	25	250	100	5.40.E-06	1.446.E-06	5.83	STDEV	0.48	1.44E-06	5.79	STDEV	0.45	0.71	
A1155-n3	33008	11416	78.2514	25	250	100	5.40.E-06	1.585.E-06	6.80	CV%	7.63	1.56E-06	6.68	CV%	7.16	1.76	
A1201-n1	33488	11459	6.3519	25	250	100	5.40.E-06	1.602.E-06	84.64	AVR	81.3	1.58E-06	83.49	AVR	81.2	1.38	
A1201-n2	28473	11579	5.5922	25	250	100	5.40.E-06	1.348.E-06	80.90	STDEV	3.10	1.34E-06	80.63	STDEV	2.08	0.33	
A1201-n3	32149	11758	6.4088	25	250	100	5.40.E-06	1.499.E-06	78.49	CV%	3.81	1.52E-06	79.44	CV%	2.56	-1.20	
A1205-n1	43902	11740	10.8550	25	250	100	5.40.E-06	2.050.E-06	63.37	AVR	68.9	2.07E-06	64.05	AVR	68.3	-1.05	
A1205-n2	38281	11489	8.7242	25	250	100	5.40.E-06	1.827.E-06	70.26	STDEV	4.96	1.81E-06	69.48	STDEV	3.75	1.11	
A1205-n3	42404	11337	9.4262	25	250	100	5.40.E-06	2.050.E-06	72.99	CV%	7.20	2.00E-06	71.24	CV%	5.49	2.46	
A1206-n1	30136	11771	76.0766	25	250	100	5.40.E-06	1.404.E-06	6.19	AVR	6.56	1.42E-06	6.27	AVR	6.58	-1.31	
A1206-n2	30524	11592	73.1241	25	250	100	5.40.E-06	1.444.E-06	6.62	STDEV	0.34	1.44E-06	6.61	STDEV	0.29	0.22	
A1206-n3	32610	11581	75.4481	25	250	100	5.40.E-06	1.544.E-06	6.87	CV%	5.21	1.54E-06	6.84	CV%	4.37	0.31	
A1207-n11	18842	11685	161.99	100	62.5	100	5.40.E-06	8.841.E-07	1.73	AVR	1.82	8.89E-07	1.84	AVR	1.82	-0.58	
A1207-n12	29448	11544	262.52	100	62.5	100	5.40.E-06	1.399.E-06	1.79	STDEV	0.02	1.39E-06	1.78	STDEV	0.04	0.63	
A1207-n13	26705	11633	230.76	100	62.5	100	5.40.E-06	1.258.E-06	1.83	CV%	1.37	1.26E-06	1.83	CV%	1.95	-0.14	
A1208-n1	30052	12094	6.9338	25	250	100	5.40.E-06	1.362.E-06	65.93	AVR	79.1	1.42E-06	68.63	AVR	79.4	-3.95	
A1208-n2	36374	11740	7.0516	25	250	100	5.40.E-06	1.699.E-06	80.83	STDEV	7.10	1.72E-06	81.68	STDEV	5.76	-1.05	
A1208-n3	41766	11687	8.4429	25	250	100	5.40.E-06	1.959.E-06	77.86	CV%	8.97	1.97E-06	78.34	CV%	7.25	(n3) -0.60	
A1208-n4	31327	11616	6.1065	25	250	100	5.40.E-06	1.478.E-06	81.24			83.4	1.48E-06	81.24		82.5	0.01
A1208-n5	34225	11440	6.3314	25	250	100	5.40.E-06	1.640.E-06	86.93			3.10	1.62E-06	85.60		2.71	1.55
A1208-n6	31158	11431	6.1185	25	250	100	5.40.E-06	1.494.E-06	81.95			3.71	1.47E-06	80.64		3.28	1.63

*AXXXX = 製品試料番号, -nX = 測定回数

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

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

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

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の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 既存添加物製品から基原を同定できる手法について検討した。具体的には、既存添加物酵素6品目41製品をモデル試料として、ペプチドを指標としたMascot searchによる基原同定法を検討した。酵素製品由来ペプチドの試料調製方法、LC/MS条件、データベース解析条件について最適化を行った。同定結果は、データベースに大きく依存した。検討した方法は、データベースの充実化によって、既存添加物製品から精巧な基原同定が可能であることを期待させた。

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

A. 研究目的

天然添加物は、平成7年(1995年)に食品衛生法が改正されるまでは、有害でない限り一般の食品と同様の扱いであり、添加物としての法的規制を受けていなかった。しかし、平成7年の食品衛生法改正以降、添加物の指定制度は、天然添加物にも適用された。このとき、今まで使用できた天然添加物が規制されると、販売業者・消費者に混乱が生じるため、少なくとも平成7年までに流通実態のあった天然添加物は、既存添加物とみなし、指定制度の例外措置がとられた。ただし、今後の既存添加物の有効性や安全性を確保するためには、早急な成分規格の作成が必要不可欠である。

既存添加物の成分規格を作成するとき、その情報の拠り所となるのが、平成8年に告示された既存添加物名簿収載品目リストとなる。このリストには、既存添加物の基原・製法・本質が記載されている。実際の流通製品を分析することで、その基原や有効成分について科学的な情報が抽出される。これらのデ

ータは成分規格の定義・含量規定・確認試験を設定するための根拠データとして使用される。特に、定義で規定される基原の意義は大きく、想定外の原料が使用されることを防ぐ効果が期待されている。しかし、既存添加物の流通製品を分析しても、基原の判断が難しい品目が多く見受けられる。その代表例として既存添加物酵素が挙げられる。

酵素は、年間を通して生産可能な微生物を基原とする製品がほとんどである。流通製品から基原情報を抽出することが難しい理由として、①酵素は高分子化合物であり、従来のHPLC分析・MS分析では基原の判断が困難、②酵素は菌体外に排出されたタンパク質を製剤化したものであることがおおく、微生物基原の同定時に汎用される遺伝子解析が物理的に不可能、が挙げられる。

すでに第9版食品添加物公定書には、イソマルトデキストラナーゼを除く全ての既存添加物酵素が収載されている。公定書に規定された既存添加物酵素の基原は、販売業者からの情報提供に基づいている。また既存添加物酵素の基原は、ひとつの生物種に規定されていない。例えば、異なる生物種に由来する製品でも、酵素活性が同じであれば、同一の品目と見なされる。既存添加物酵素は、細菌、放線菌、酵母、糸状菌、担子菌などの微生物

を基原とするものが殆どである。微生物の中には、有害物質を生産するものもある。したがって、酵素の流通製品から基原をたどれるトレーサビリティ体系を構築することは、既存添加物酵素の安全性を確保する上で重要な検討項目といえる。

そこで、本研究ではメタボローム解析などで多用される Mascot search を利用して既存添加物酵素の基原について、トレーサビリティ体系の構築を検討することにした。具体的には、酵素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を検討した。モデル試料として、日本食品添加物協会から基原の情報とともに提供があった6品目41製品を用いた。Mascot search から得られた酵素製品の基原情報と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したので報告する。

B. 研究方法

B-1. 試料

既存添加物酵素の各製造企業で把握されている基原情報とともに日本食品添加物協会を通じて入手した。内訳は、 α -アミラーゼ6基原10試料、 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、グルコアミラーゼ3基原8試料、セルラーゼ5基原9試料、ヘミセルラーゼ4基原7試料。付帯する基原情報はTableに記載した。

B-2. 試薬

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

063-05895)は、和光純薬工業(株)より購入した。ジチオトレイトール(DTT)(Cat No. 20291)は、Thermo Scientific社より購入した。消化酵素 Trypsin(Cat No. V5280)および rLys-C(Cat No. V1671)は、Promega社より購入した。

B-3. 試料調製

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

B-4. 分析方法

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

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

MS/MS条件 イオン化モード : ESI+, キャピラリー電圧 : 3.0kV, コーン電圧 : 30V, 取り込みモード : MS^E, コリジョンエネルギー : 20-40V, ソース温度 : 120°C, 脱溶媒温度 : 450°C, コーンガス : 50L/h, 脱溶媒ガス :

800L/h.

B-5. 解析方法

データ抽出条件 ソフトウェア：

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

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

B-6. SDS-PAGE

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

C. 結果および考察

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

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

結果と比較し考察した. 考察は, 品目毎に下記に述べる.

C-1. α -アミラーゼ(EC 3.2.1.1, EC 3.2.1.141, EC 3.2.1.116, EC 3.2.1.133)

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

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

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

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

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

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

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

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

C-2. β -アミラーゼ (EC 3.2.1.2)

【試料 11, 12】 *G. max* 由来 β -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 13】 *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。

C-3. β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23)

【試料 14~16】 *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 17】 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かった。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。

C-4. グルコアミラーゼ (EC 3.2.1.3)

【試料 18 および 19】 *A. awamori* 由来 グルコアミラーゼ [AMYG_ASPAW] および *A. niger* 由来 グルコアミラーゼ [AMYG_ASPNG] が同順位でヒットした。両タンパク質のアミノ酸配列の相同性は 100% で、これ以上の絞り込みは不可能であった。SDS-PAGE で検出された試料 18 のマイナーバンド および 試料 19 のメインバンドの推定分子量 69kDa は、[AMYG_ASPNG] ([AMYG_ASPAW] 含む) のシグナルペプチドを除いた分子量 65kDa とよく一致した。SDS-PAGE で検出された試料 18 の推定分

子量 112kDa のバンドに興味もたれる。

【試料 20～25】 試料 20 および 21 は *R. oryzae* を、試料 15～18 は *Rhizopus* 属を基原とする製品である。Mascot search の結果は、試料 13～18 で *R. oryzae* 由来グルコアミラーゼ [AMYG_RHIOR] がヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。また、試料 13～18 の SDS-PAGE で検出されたバンドの推定分子量 66kDa は、[AMYG_RHIOR] のシグナルペプチドを除いた分子量(62kDa) とよく一致した。Mascot search の結果および SDS-PAGE のバンドパターンより、試料 22～25 も試料 18 および 19 と同じく *R. oryzae* を基原とする製品であると推察された。

C-5. セルラーゼ(EC 3.2.1.4, EC 3.2.1.91)

【試料 26～28】 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. niger* 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 29】 データベース Swiss-Prot および TrEMBL には、*P. coccineus* 由来ヘミセルラーゼ関連タンパク質は登録されていなかった。*P. coccineus* 由来セルラーゼ関連遺伝子を単離・同定した後、これをデータベースに登録して、Mascot search の同定精度が向上するのか興味もたれる。

【試料 30, 31, 34】 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 32, 33】 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。

C-6. ヘミセルラーゼ(EC 3.2.1.8, EC 3.2.1.32, EC 3.2.1.78, EC 3.2.1.89, EC 3.2.1.99)

【試料 35, 36】 *A. niger* 由来ヘミセルラーゼ

[MANA_ASPNC] が第一位でヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. niger* と一致した。次いで、セルラーゼに分類される酵素(EC 3.2.1.4 および 3.2.1.91) もヒットしていた。

【試料 37】 上位でヒットしたわけではないが、*A. niger* 由来ヘミセルラーゼ [XYNC_ASPNC] および [XYNC_ASPNG] の 2 件がヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. niger* と一致した。本製品には、別基原である *A. shirousami* 由来グルコアミラーゼや *A. awamori*, *A. oryzae* 由来 α -アミラーゼもヒットしており、複数の酵素品目を配合した酵素製品である可能性も考えられた。

【試料 38】 試料 29 と同じように、データベースにヘミセルラーゼ様タンパク質の登録がなかった。

【試料 39, 40】 データベース Swiss-Prot および TrEMBL には、*T. longibrachiatum* 由来ヘミセルラーゼの登録が確認されなかった。代わりに、*T. harzianum* や *T. reesei* 由来ヘミセルラーゼがヒットした。

【試料 41】 データベース Swiss-Prot および TrEMBL には、*T. viride* 由来ヘミセルラーゼの登録が確認されなかった。代わりに、まったく基原が異なるパンコムギ *T. aestivum* 由来タンパク質が 9 件ヒットしたが、これらのタンパク質は、付帯情報にあった製品中に添加された小麦粉に由来するものだと推察された。

D. まとめ

本研究で得られた同定結果は以下の 6 つのパターンに分類できた。

① 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致し、かつその基原が付帯情報と一致した。また、帰属されたタンパク質の分子量が SDS-PAGE の結果と一致する。

【試料 3-5, 7, 8, 11-13, 17, 20-28, 32, 33, 35-37】 の計 23 製品

② 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致し、かつその基原が付帯情報と一致した。しかし、帰属されたタンパク質の分子量が SDS-PAGE の結果と一致しない。

【試料 2】 の計 1 製品

- ③ 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致し、かつその基原が付帯情報と一致した。また、帰属されたタンパク質の分子量が SDS-PAGE の結果と一致する。しかし、別の基原に由来する同一機能でアミノ酸配列の相同性が 100% のタンパク質が同じ順位でヒットしたため、基原を 1 つに絞り込めない。

【試料 6, 14-16, 18, 19】の計 6 製品

- ④ 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致した。データベースの登録がなかったため、同定結果が基原と一致しなかった。

【試料 1, 39, 40】の計 3 製品

- ⑤ データベースに登録がなかったため、なにもヒットしなかった。

【試料 29, 38】の計 2 製品

- ⑥ 帰属されたタンパク質の機能が酵素の品目名と一致した。データベースに登録があるにもかかわらず、帰属されたタンパク質の基原が付帯情報と一致しない。

【試料 9*, 10*, 30, 31, 34, 41】の計 6 製品

*最近、種名の変更があったため、メーカーで基原情報が更新されていない可能性もある。

E. 結論

既存添加物酵素 6 品目 41 製品を対象にして、酵素製品から生成したペプチドのマスペクトルを Mascot search に付し、帰属される基原と製品付帯情報を比較した。ペプチド(アミノ酸)を指標にする本法は、種間を分類するための分解能が、遺伝子を指標にした方法よりも劣る。したがって、種を一つに絞り込めない場合があることを理解する必要がある。

本研究では、データベースに登録があるにもかかわらず、Mascot search の結果が付帯情報と一致しない事例が確認された(パターン⑥)。これらについては、寄託機関あるいは販売業者から菌株を入手し、遺伝子レベルでの解析を行い、そもそも販売業者の付帯情報が妥当であったのか再確認する必要がある。

本法は、Mascot Search の結果を十分吟味することが必須だが、販売業者の情報提供に依

存することなく、科学的に基原を判断することが可能で、データベースの充実化とともに、より精巧な解析が期待できる。また、タンパク質を含有する酵素以外の既存添加物製品への適用も興味もたれる。

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

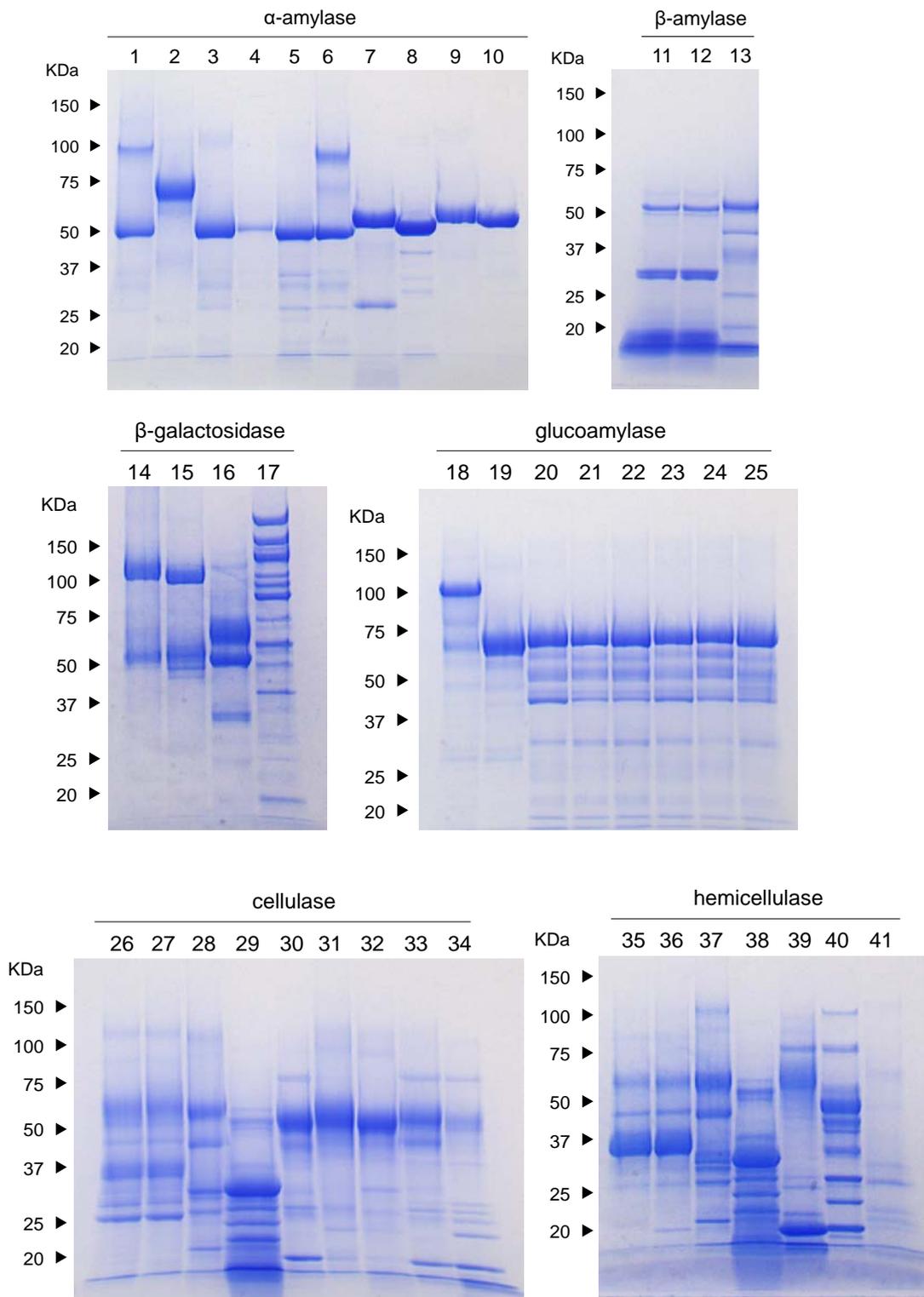


Fig. 1 酵素製品の SDS-PAGE の結果

Table 1

 α -amylase EC 3.2.1.1 EC 3.2.1.141 EC 3.2.1.116 EC 3.2.1.133

Provided information		Results of Mascot search										
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine			Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	rLys-C	
			Ranking	Organism	EC No						Ranking	Coverage
1	<i>Aspergillus foetidus</i>	95, 50	1	<i>A. oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	57%	1	45%	
			2	<i>A. shirousami</i>	AMYG_ASPSH	EC=3.2.1.3	Glucosylase	68669	42%	3	15%	
			3	<i>A. kawachii</i>	AMYG_ASPKA	EC=3.2.1.3	Glucosylase I	68752	36%	3	15%	
			4	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	23%	2	23%	
			4	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	23%	2	23%	
2	<i>Aspergillus niger</i>	65	5	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	23%	4	23%	
			5	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	23%	4	23%	
			1	<i>A. niger</i>	AMYA_ASPNG	EC=3.2.1.1	Acid alpha-amylase	53424	25%	1	13%	
			3	<i>Aspergillus oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	66%	1	59%	
			4	<i>Aspergillus oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	55%	1	59%	
5	<i>Aspergillus oryzae</i>	50	1	<i>A. oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	67%	1	59%	
			2	<i>A. flavus</i>	PEPA_ASPFN	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	42403	20%	2	9%	
			2	<i>A. oryzae</i>	PEPA_ASPOR	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	42403	20%	2	9%	
			1	<i>A. awamori</i>	AMYG_ASPAW	EC=3.2.1.3	Glucosylase	68847	47%	2	31%	
			1	<i>A. niger</i>	AMYG_ASPNG	EC=3.2.1.3	Glucosylase	68847	47%	2	31%	
7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	58, 25	2	<i>A. oryzae</i>	AMYAL_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	55%	1	59%	
			1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58425	9%	1	67%	
			1	<i>B. licheniformis</i>	AMY_BACLI	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58513	34%	1	31%	
			1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58425	12%	1	71%	
			1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	AMY_BACAM	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase	58425	48%	1	67%	

Table 1

 β -amylase_EC 3.2.1.2

Provided information		Results of Mascot search									
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine		Entry name	EC No	Protein	Mass	rLys-C		
			Ranking	Organism					Coverage	Ranking	Coverage
11	<i>Glycine max</i>	54, 30, 16	1	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-	Lectin	30909	43%	1	45%
			2	<i>G. max</i>	AMYB_SOYBN	EC=3.2.1.2	Beta-amylase	56455	13%	2	11%
			3	<i>G. max</i>	ITRA_SOYBN	-	Trypsin inhibitor A	24280	35%	4	29%
			4	<i>G. max</i>	KTI1_SOYBN	-	Kunitz-type trypsin inhibitor KTI1	22822	31%	3	37%
			5	<i>G. max</i>	IBB1_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	12954	39%	5	30%
			6	<i>G. max</i>	IBBD2_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor D-II	10331	44%	7	31%
			8	<i>G. max</i>	2SS_SOYBN	-	2S albumin	19028	12%	6	22%
			1	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-	Lectin	30909	43%	1	45%
12	<i>Glycine max</i>	54, 30, 16	2	<i>G. max</i>	ITRA_SOYBN	-	Trypsin inhibitor A	24280	40%	2	29%
			3	<i>G. max</i>	AMYB_SOYBN	EC=3.2.1.2	Beta-amylase	56455	18%	4	6%
			4	<i>G. max</i>	IBB1_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	12954	39%	3	30%
			5	<i>G. max</i>	KTI1_SOYBN	-	Kunitz-type trypsin inhibitor KTI1	22822	26%	5	23%
			6	<i>G. max</i>	IBBD2_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor D-II	10331	44%	6	31%
			1	<i>H. vulgare</i>	AMYB_HORVU	EC=3.2.1.2	Beta-amylase	59899	30%	1	28%
13	<i>Hordeum vulgare</i>	54, 42, 35, 25, 19	2	<i>H. vulgare</i>	AMYB_HORVS	EC=3.2.1.2	Beta-amylase	59891	30%	2	20%
			3	<i>H. vulgare</i>	NLTP1_HORVU	-	Non-specific lipid-transfer protein 1	12757	58%	3	70%
			5	<i>H. vulgare</i>	IAAB_HORVU	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMB	17211	18%	6	17%
			7	<i>H. vulgare</i>	SPZ4_HORVU	-	Serpin-Z4	43365	13%	5	5%
			8	<i>H. vulgare</i>	BSZ7_HORVU	-	Serpin-Z7	42852	8%	8	7%
			12	<i>H. vulgare</i>	IAAA_HORVU	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor Cma	16070	16%	7	16%

Table 1

 β -galactosidase_EC 3.2.1.23

Provided information		Results of Mascot search									
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	rLys-C Ranking	Coverage
14	<i>Aspergillus oryzae</i>	111, 55	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	42%	1	22%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	42%	1	22%
			4	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-	Lectin	30909	7%	2	11%
15	<i>Aspergillus oryzae</i>	105, 55	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	36%	1	13%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	36%	1	13%
			3	<i>Emicella nidulans</i>	BGALA_EMENI	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	111320	3%	2	2%
16	<i>Aspergillus oryzae</i>	67, 51, 31	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	40%	1	26%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC=3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110092	40%	1	26%
17	<i>Bacillus circulans</i>	225, 146, 127, 111, 100, 89, 74, 61, 49, 40	1	<i>B. circulans</i>	E5RWQ2_BACCI	-	Beta galactosidase	192298	35%	1	55%

Glucoamylase_EC 3.2.1.3

Provided information		Results of Mascot search									
Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	rLys-C Ranking	Coverage
18	<i>Aspergillus niger</i>	114, 70	1	<i>A. awamori</i>	AMYG_ASPAW	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68847	50%	1	31%
			1	<i>A. niger</i>	AMYG_ASPNG	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68847	50%	1	31%
19	<i>Aspergillus niger</i>	70	1	<i>A. awamori</i>	AMYG_ASPAW	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68847	44%	1	28%
			1	<i>A. niger</i>	AMYG_ASPNG	EC=3.2.1.3	Glucoamylase	68847	44%	1	28%
20	<i>Rhizopus oryzae</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	29%	1	7%
21	<i>Rhizopus oryzae</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	31%	1	10%
22	<i>Rhizopus sp.</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	37%	1	17%
23	<i>Rhizopus sp.</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	36%	1	14%
24	<i>Rhizopus sp.</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	37%	1	14%
25	<i>Rhizopus sp.</i>	74, 66, 56, 45	1	<i>R. oryzae</i>	AMYG_RHIOR	EC=3.2.1.3	Glucoamylase I	65296	37%	1	17%

Table 1

Cellulase (1/3)_EC 3.2.1.4 EC 3.2.1.91

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Results of				rLys-C				
			Trypsine Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	Ranking	Coverage
26	<i>Aspergillus niger</i>	66, 38, 27, 25	1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49260	32%	1	17%
	<i>A. niger</i>		1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	32%	1	17%
	<i>A. niger</i>		2	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	41627	37%	2	20%
	<i>A. niger</i>		3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	57503	22%	3	10%
	<i>A. niger</i>		3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	57517	22%	3	10%
	<i>A. awamori</i>		4	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	21%	5	27%
	<i>A. niger</i>		4	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	21%	5	27%
	<i>A. phoenicis</i>		5	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	21%	4	27%
	<i>A. niger</i>		6	<i>A. niger</i>	CBHC_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	48734	14%	6	10%
	<i>A. kawachii</i>		7	<i>A. kawachii</i>	XYNA_ASPKW	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase A	35574	10%	8	7%
	<i>A. niger</i>		7	<i>A. niger</i>	XYNC_ASPNC	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35580	10%	8	7%
	<i>A. niger</i>		7	<i>A. niger</i>	XYNC_ASPNG	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35570	10%	8	7%
	<i>A. kawachii</i>		8	<i>A. kawachii</i>	GUNA_ASPKW	EC=3.2.1.4	Endoglucanase A	25913	4%	9	4%
27	<i>Aspergillus niger</i>	66, 38, 27, 25	1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49260	32%	2	16%
	<i>A. niger</i>		1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	32%	2	16%
	<i>A. niger</i>		2	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	41627	30%	1	20%
	<i>A. niger</i>		3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	57503	22%	3	8%
	<i>A. niger</i>		3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	57517	22%	3	8%
	<i>A. niger</i>		4	<i>A. niger</i>	CBHC_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	48734	16%	4	10%
	<i>A. awamori</i>		5	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	14%	6	17%
	<i>A. niger</i>		5	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	14%	6	17%
	<i>A. phoenicis</i>		5	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	14%	5	17%
	<i>A. kawachii</i>		6	<i>A. kawachii</i>	GUNA_ASPKW	EC=3.2.1.4	Endoglucanase A	25913	4%	8	4%

Table 1

Cellulase (2/3)_EC 3.2.1.4 EC 3.2.1.91

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Results of				rLys-C				
			Trypsine Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	Ranking	Coverage
28	<i>Aspergillus niger</i>	61, 45, 29, 25	1	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	23%	1	17%
		19	1	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	23%	1	17%
			2	<i>A. awamori</i>	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	23%	2	17%
			2	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	23%	2	17%
			3	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49260	4%	3	3%
			3	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	4%	3	3%
			3	<i>Emicella nidulans</i>	CBHA_EMENI	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	48651	4%	4	3%
29	<i>Pycnoporus coccineus</i>	30, 26, 23, 19									
30	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	53, 16	1	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55360	29%	2	9%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	10%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	10%
			4	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	20691	20%	4	24%
			4	<i>T. harzianum</i>	XYN2_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	23809	17%	4	20%
31	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	54	1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	33%	2	10%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	33%	2	10%
			1	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	33%	2	10%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	20%	1	25%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	20%	1	25%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	3	5%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	3	5%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase-4	35953	3%	5	2%

Table 1

Cellulase (3/3)_EC 3.2.1.4 EC 3.2.1.91

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Results of					rLys-C			
			Ranking	Organism	Entry name	EC No	Protein	Mass	Coverage	Ranking	Coverage
32	<i>Trichoderma reesei</i>	55	1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	34%	2	10%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	34%	2	10%
			1	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	34%	2	10%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	15%	1	25%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	15%	1	25%
			4	<i>Triticum aestivum</i>	IAA1_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.19	13908	32%	4	21%
			4	<i>Triticum aestivum</i>	IAA5_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.53	13698	32%	4	21%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	3	8%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	3	8%
33	<i>Trichoderma viride</i>	56, 48, 17	1	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55360	29%	2	9%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	10%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	10%
34	<i>Trichoderma viride</i>	58, 29, 22, 19	1	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	2%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	18%	1	2%
			2	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	20691	23%	2	3%
			2	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJQ	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	20%	2	3%
			2	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJR	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	20%	2	3%
			2	<i>T. harzianum</i>	XYN2_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	23809	20%	2	3%

Table 1

Hemicellulase (1/2) EC 3.2.1.8 EC 3.2.1.32 EC 3.2.1.78 EC 3.2.1.89 EC 3.2.1.99

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Trypsine			Entry name	EC No	Protein	Mass	rLys-C			
			Ranking	Organism	Ranking					Coverage	Coverage		
35	<i>Aspergillus niger</i>	65, 50, 36	1	<i>A. niger</i>	1	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannan	41627	37%	1	20%	
			2	<i>A. niger</i>	2	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohy	49260	23%	2	16%	
			2	<i>A. niger</i>	2	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	23%	2	16%	
			3	<i>A. awamori</i>	3	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	7%	4	14%	
			3	<i>A. niger</i>	3	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	7%	4	14%	
			3	<i>A. niger</i>	3	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	7%	3	14%	
			3	<i>A. phoenicis</i>	3	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	7%	3	14%	
			1	<i>A. niger</i>	65, 50, 36	1	MANA_ASPNC	EC=3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannan	41627	37%	1	20%
			2	<i>A. niger</i>		2	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohy	49260	23%	4	7%
			2	<i>A. niger</i>		2	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	23%	4	7%
36	<i>Aspergillus niger</i>	65, 50, 36	3	<i>A. awamori</i>	3	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	17%	3	24%	
			3	<i>A. niger</i>	3	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	17%	3	24%	
			3	<i>A. phoenicis</i>	3	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	17%	2	24%	
			1	<i>A. niger</i>	63, 48, 33, 29	1	PEPA_ASPNG	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41321	25%	1	25%
			1	<i>A. phoenicis</i>	26, 19	1	PEPA_ASPPH	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41389	25%	1	25%
			2	<i>A. shirousami</i>		2	AMYG_ASPSH	EC=3.2.1.3	Glucosylase	68669	23%	4	15%
			3	<i>A. awamori</i>		3	PEPA_ASPAW	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41268	25%	2	34%
			3	<i>A. niger</i>		3	PEPA_ASPNC	EC=3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41367	25%	2	34%
			4	<i>A. awamori</i>		4	AMYA_ASPAW	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A	55367	9%	3	27%
			4	<i>A. awamori</i>		4	AMYB_ASPAW	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase B	55408	9%	3	27%
37	<i>Aspergillus niger</i>	63, 48, 33, 29	4	<i>A. oryzae</i>	4	AMYA1_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-1/2	55297	9%	3	27%	
			4	<i>A. oryzae</i>	4	AMYA3_ASPOR	EC=3.2.1.1	Alpha-amylase A type-3	55291	9%	3	27%	
			5	<i>A. niger</i>		5	CBHA_ASPNC	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohy	49260	4%	6	3%
			5	<i>A. niger</i>		5	CBHA_ASPNG	EC=3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49272	4%	6	3%
			5	<i>E. nidulans</i>		5	CBHA_EMENI	EC=3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohy	48651	4%	6	3%
			6	<i>A. kawachii</i>		6	XYNA_ASPKW	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase A	35574	10%	8	7%
			6	<i>A. niger</i>		6	XYNC_ASPNC	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35580	10%	8	7%
			6	<i>A. niger</i>		6	XYNC_ASPNG	EC=3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	35570	10%	8	7%
			7	<i>A. kawachii</i>		7	GUNA_ASPKW	EC=3.2.1.4	Endoglucanase A	25913	12%	9	7%

Table 1

Hemicellulase (2/2) EC 3.2.1.8 EC 3.2.1.32 EC 3.2.1.78 EC 3.2.1.89 EC 3.2.1.99

Sample No	Organism	Mass of major protein (kDa)	Results of Trypsine			Entry name	EC No	Protein	Mass	rLys-C	
			Ranking	Organism	Ranking					Coverage	Ranking
38	<i>Pycnoporus coccineus</i>	56, 33, 27, 24, 20	No data								
39	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	83, 63, 17	1	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	20691	20%	5	3%
			1	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJQ	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	17%	5	3%
			1	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJR	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24055	17%	5	3%
			1	<i>T. harzianum</i>	XYN2_TRIHA	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	23809	17%	5	3%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	8%	2	2%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	8%	2	2%
			2	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55360	8%	2	2%
			2	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	8%	2	2%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	2%	1	2%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	2%	1	2%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC=3.2.1.91	Endoglucanase-4	35953	2%	4	2%
40	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	115, 83, 51, 45, 35, 28, 22, 18	1	<i>T. reesei</i>	XYN3_HYPJQ	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 3	38227	26%	2	18%
			1	<i>T. reesei</i>	XYN3_HYPJR	EC=3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 3	38227	26%	2	18%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	12%	3	9%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55469	12%	3	9%
			2	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 1	55431	12%	3	9%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	13%	1	14%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC=3.2.1.91	Exoglucanase 2	50318	13%	1	14%
			6	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	6	5%
			6	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC=3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49453	3%	6	5%
			8	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC=3.2.1.4	Endoglucanase-4	35953	3%	7	2%
41	<i>Trichoderma viride</i>	26	1	<i>Triticum aestivum</i>	IAA1_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.19	13908	63%	1	21%
			2	<i>Triticum aestivum</i>	IAA5_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.53	13698	52%	1	21%
			3	<i>Triticum aestivum</i>	IAA2_WHEAT	-	Alpha-amylase inhibitor 0.28	17368	44%	6	7%
			6	<i>Triticum aestivum</i>	IAC16_WHEAT	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM16	16410	30%	5	18%
			9	<i>Triticum aestivum</i>	GLT4_WHEAT	-	Glutenin, high molecular weight subunit 89352	1	1%	2	6%
			9	<i>Triticum aestivum</i>	GLT5_WHEAT	-	Glutenin, high molecular weight subunit 90529	1	1%	2	6%
			13	<i>Triticum aestivum</i>	THNB_WHEAT	-	Purothionin A-1	15485	5%	3	6%
			13	<i>Triticum aestivum</i>	THN2_WHEAT	-	Alpha-2-purothionin	15418	5%	3	6%
			14	<i>Triticum aestivum</i>	IAAC2_WHEAT	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2	16030	16%	4	16%

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～香辛料抽出物の基原生物の学名調査～

研究分担者 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 既存添加物名簿収載品目のひとつである「香辛料抽出物」について、今後の規格作成に当たり、定義に含まれる73種の基原生物の学名・和名について、食品添加物の成分規格作成の解説¹⁾に従い調査した。また、相当する基原生物について、海外や天然香料における規格の有無を調査した。得られた情報をもとに、基原種として相応しいと思われる和名や学名に修正し、必要に応じて、類似する品目であると予想される天然香料や海外規格と比較しながら基原種の取捨選択を行った。本研究により、「香辛料抽出物」成分規格のうちの定義原案を整備した。

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

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。このうちのひとつであるチャービルは、平成31年に作成された第四次消除名簿に収載されているが、残り73基原についての規格は未整備のままである。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い。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いる。しかし、香辛料抽出物は流通量も比較的多いため、規格整備は大きな課題となっている。

既に流通しており、有効性と安全性が確認されているとみなされる既存添加物の規格整備において、規格の設定根拠となる情報収集は特に重要であり、由来(基原の学名・和名)と成分(含量)が正しく設定されているかという情報は

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

動植物や微生物の学名・和名は、専門家による最新の研究によって見解が変わることも多く、流動的である。法的な拘束力がある公的な規格を作成する際には、最新の知見も重要ではあるが、定義中の基原種の学名及び和名は、最新情報よりも設定根拠のトレーサビリティ、すなわち、堅牢性を重視して設定することされている。実際に、第9版食品添加物公定書を作成するにあたっては、一般的に認知されたデータベースや書籍を参照し、これらに示された学名と和名が既存添加物の定義に採用されており、設定根拠のトレーサビリティが確保されている。第10版食品添加物公定書の成分規格作成を行っている現在は、基原生物種の学名記載を

どのような根拠のもと行うかについて、食品添加物の成分規格作成の解説¹⁾に明記してある。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73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。

「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。また、「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」²⁾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。天然香料として用いられている基原生物と香辛料抽出物の基原生物とを比較することも、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。

そこで本研究では、「香辛料抽出物」の規格案作成にむけて、1)香辛料抽出物」記載73基原の学名と標準和名の検討、2)海外規格の調査とその基原生物との比較、3)天然香料の基原生物との比較を行った。さらに、香辛料抽出物の定義を提案すべく、本研究で収集した情報を元に基原案を作成した。

B. 研究方法

B-1.基原物質の学名及び標準和名調査

食品添加物の成分規格作成の解説¹⁾に記載の基原生物の学名と標準和名の調査法に従い、香辛料抽出物について基原生物の学名と標準和名を調査した。

基原の記載方針

- 1) 「和名(学名)」のスタイルで示す。
- 2) 学名は「属名+種小名」の二名法で記す。必

要なときは変種(var.)等を示し、三名法を用いる。

- 3) 種が特定できない場合は属名まで示す。その場合は「属」を付記する。
- 4) Synonym(シノニム=別名)が広く使用されている場合には、synonymをカッコ書きで併記する。
- 5) 学名の命名者は、各生物群の一般的な表記法(拠り所とした資料・データベース)を参考に、以下のように設定する。
 - a) 植物:短縮形がある命名者については短縮形で表し(例 Linné→L.)、さらに旧命名者をカッコ内に示す。
 - b) 動物・魚類・昆虫:ラテン語で表記する(例 Linné→Linnaeus)。
 - c) 藻類・菌類・細菌:命名者は示さない。
- 6) 和名は以下のスキームに従って設定する。

・リスト(カッコ書き・基原製法本質)に和名(カタカナ)はあるか?no→標準和名

↓ yes

・和名は正しく基原生物を表しているか?

↓ yes

no ↓修正して標準和名

・和名は学名のカタカナ読みか?

↓ no

yes ↓標準和名があるか?

↓

↓ no yes ↓標準和名

カッコ書き定義の和名を用いる(標準和名・別名・慣用名は問わない)

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

- 7) 和名学名の確認には、生物群ごとに以下に示した資料及びデータベースを用いて行う。○高等植物:東京大学小石川植物園園長の邑田仁教授のご指導のもと、以下に示す2つのデータベースを用いた。

a) 学名及び英語慣用名:Tropicos (<http://www.tropicos.org/>)

b) 和名:BG Plants 和名-学名インデックス BGplant が閉鎖のため現在は YList (<http://ylist.info>)

「BG Plants 和名-学名インデックス」は BG

Plants データベースで用いられる植物名、特に、日本産植物の和名と学名に関する詳細情報の整備を目的として、米倉浩司（東北大学）と梶田忠（東京大学〔現・千葉大学〕）を中心に作成された。

B-2. 海外規格の調査

香辛料抽出物に挙げられている 73 基原について、以下の海外規格に記載されているかを調査した。香辛料抽出物に挙げられている 73 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

B-3. 天然香料規格との比較

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。これらのうち、香辛料抽出物に挙げられている 73 基原について、Tropicos や Ylist を参考にしながら基原生物を比較した。

B-4. 「香辛料抽出物」定義案の作成

- ① 原則、
 - ・和名は Ylist (<http://ylist.info/index.html>),
 - ・学名は Tropicos (<https://www.tropicos.org>) のものを採用した。海外や天然香料の規格と比較して、どの規格でも全く同じ種を基原としているものについては、その種を基原生物として提案した。
- ② 海外や天然香料の規格で基原として挙げられていても、データベースなどの情報から現在の香辛料抽出物の基原種と別種と考えられる場合は、基原種の範囲を広げず、既存添加物名簿収載品目リスト注解書の基原生物を提案した（ただし、学名・和名は B-1. に示す基原の記載方針に則って修正した）。

なお、学名について、Ylist と Tropicos が異なる場合は、各国の規格も比較しつつ、原則 Tropicos のものを採用した。一方、和名については、Ylist に記載のない基原生物の和名は基原に記載しない案を提案した。

C. 結果および考察

C-1. 香辛料抽出物の基原物質の学名及び標準和名の検討

植物由来の香辛料抽出物 73 基原について、基原植物の和名および学名を調査検討した。和名については Ylist で確認し、学名については Tropicos および Ylist で確認した。多くの基原について、基原製法本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、また、誤記と推測されるものが散見された。学名の命名者についても省略表記及び追記・修正などの変更が必要と判断された。また、和名においても標準和名ではなく別名が用いられている基原が複数存在した。さらに、今回参考にしたデータベース間（Ylist と Tropicos）で学名に対する見解が異なるものも見られた。これらの基原については詳細な調査が必要と考える。

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 73 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。

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収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、シヨウガ、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。

一方で、ワサビなど日本の規格にのみ含まれているものも存在した。

C-3. 天然香料規格との比較

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73基原の基原生物と比較した。なお、天然香料原料として報告された学名については、Tropicosで確認した上で比較した。

73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、半数の37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（アジOWN、オレンジピール、カッシア、シャロット、ソーレル、バニラ）あった。

C-4. 「香辛料抽出物」定義案の作成

これまでの調査結果から得られた内容を精査

し、「香辛料抽出物」の基原としてふさわしいと判断し提案した73基原生物案を表1に示す。提案した基原生物種の学名および和名は、研究方法の項に示すとおり、これまでの調査結果に従い、和名はYlist、学名はTropicosで標準とされているものを採用した。

香辛料抽出物の基原生物となっている種には日本に自生していないものも多く、そもそも和名が存在しない種が多く存在した。このような場合、第9版公定書作成時には、和名の代わりに学名のラテン語読みをカタカナ表記で記載していた。しかし、今回の香辛料抽出物には、1品目中の基原種が多くそのほぼすべてに和名が存在しないといったケースがあり、学名のラテン語読みをカタカナ表記しては要領を得ないものが複数あった。学名がある時点で基原種は一義的であること、カタカナ表記にすることで余計な混乱が生じることやそれを上回るメリットが感じられないことから、今回の基原種名の提案では、和名のないものは学名のみを記載することも併せて提案した。

D. 結論

既存添加物名簿収載品目のひとつである香辛料抽出物について、73基原の情報収集を行い、それをもとに規格案作成を見据えて基原の提案を行った。

73種の基原について、示された和名及び学名の妥当性をYList及びTropicosをもとに検討したところ、多くの基原について、基原製法本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、また、誤記と推測されるものも散見された。このうち、誤記と思われるものについては、海外の規格でも同様の誤りが見られた。

また、約半数の基原で、天然香料の基原と一致していた。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、海外の規格とも比較し、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。

以上の情報をもとに、73種の基原について、食品添加物の成分規格作成の解説¹⁾に従いながら、基原種として相応しいと思われる和名や学名を整備した。必要に応じて、類似する品目であると予想される天然香料や海外規格と比較しながら基原種の取捨選択を行った。その結果を、成分規格の定義原案として提案した。

E. 参考資料

- 1) 食品添加物の成分規格作成の解説 <http://www.nihs.go.jp/dfa/_src/624/sakuseiforweb_191018.pdf> (accessed 2019-11-22).
- 2) 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。

F. 研究発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 既存添加物名簿に記載されているレイシ抽出物、カキ色素、ルチン（抽出物）の品質規格作成のための化学的検討として、主に製品中の含有成分について精査した。各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製及び標品との直接比較により、レイシ抽出物から7種の化合物を同定し、薄層クロマトグラフィー（TLC）分析の指標候補成分を見出した。カキ色素については、含有成分について分析した結果、単一の化合物は得られなかった。既存添加物名簿に記載されているフラボノイドや、含有が示唆される縮合型タンニンについては、それらの定性試験を実施したが呈色反応は認められなかった。それゆえ、カキ色素の本質はフラボノイドではなく、他の化合物であることが示唆された。ルチンについては、原料の一つとなるカイカ（エンジュのつぼみ）由来の成分を明らかにするため、50%エタノール抽出物から16種の化合物を単離、同定した。

研究協力者

好村守生 松山大学薬学部 准教授

A. 研究目的

既存添加物の多くは植物を原料とする抽出物であり、多種多様の成分が含まれているため、その品質管理には詳細な成分解析に基づいた品質規格作成が必要とされる。一方で、原料が天然物であるため、製品の製法や成分組成が不明瞭なものも多く、成分規格の整備が遅れているものがある。本研究では、成分規格が設定されていないレイシ抽出物、カキ色素について、品質規格作成のための基礎的データの集積を目的に、既存添加物製品中の含有成分の構造解析を行った。また、ルチン（抽出物）については「アズキの全草、エンジュのつぼみ若しくは花又はソバの全草から得られた、ルチンを主成分とするものをいう」と既存添加物名簿で定義されていることから、原料の成分比較となるデータ作成のための検討として、エンジュのつぼみ（カイカ）の成分精査を行った。

B. 研究方法

レイシ抽出物、カキ色素の添加物製品及びル

チン（抽出物）の原料となるカイカ（エンジュのつぼみ）について、それぞれ各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、化合物の単離を行った。単離した各化合物については各種機器分析データに基づく構造解析、標品との直接比較等により化合物の構造解析を行った。また、カキ色素についてはマグネシウム-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。

C. 結果及び考察

C-1) レイシ抽出物

レイシ抽出物について、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及び薄層クロマトグラフィー（TLC）による分析を行った結果、逆相 HPLC では紫外線（UV）検出による主要なピークは認められなかった。一方、TLC 分析条件について、展開溶媒を検討した結果、酢酸エチル（EtOAc）/メタノール（MeOH）/水（H₂O）/ギ酸（HCOOH）（20:2:1:0.01）で展開し、UV（254 nm）照射することで *R_f* 値 0.6 付近に数個のスポットを確認した。次に、抽出溶媒について検討した。レイシ抽出物を MeOH、アセトン、エタノール

(EtOH), H₂O, EtOAc で抽出し, 3 分間超音波処理後, 遠心分離した. 上澄みを試料溶液として用い, TLC による比較検討を行った結果, MeOH を抽出溶媒として用いた試料溶液のスポットが明瞭に検出された. スポットする試料濃度については 100 mg/mL の試料溶液 1 μ L の注入で明瞭にスポットが確認できた.

これらスポット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い, 各種機器分析データに基づく成分解析の結果, TLC 分析における指標成分の候補として, lucidenic acid A 及び D の 2 成分が見出された. また, HPLC 分析によりこれら 2 成分以外の 5 成分 (ganoderic acid A, B, C1, C2, H) のピークが認められた. 一方で, 明らかにした成分以外に, スポットやピークが複数観察されたため, その他の成分についてさらに検討が必要とされる. TLC による確認試験では, 一成分を指標とするのが相応しいが, レイシ抽出物については複数の成分を指標にする確認が適当であることが示唆された. 最も適した指標成分を明らかにすることで, 確認試験への応用が期待される.

C-2) カキ色素

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, 単一の化合物は得られなかった. 一方, 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.

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, 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. ¹H-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. さらに ¹³C-NMR を測定した結果, 縮合型タンニンに特徴的なシグナルは観察されなかった. 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. そこで, 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. 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.

C-3) ルチン (抽出物)

ルチン (抽出物) の原料となるカイカの 50%EtOH 抽出物及び EtOH 抽出物について, 各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し, 成分精査を行った結果, 16 種の化合物 [rutin, quercetin, gallic acid, protocatechuic acid, maltol, ethylrutinoside, 4-hydroxybenzoic acid, maltol-3-*O*-{4'-*O*-*p*-coumaroyl-6'-*O*-(3-hydroxyl-3-methyl glutaryl)} glucoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, kaempferol, *trans-p*-hydroxycinnamic acid, *cis-p*-hydroxycinnamic acid, *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine, *N,N'*-diferuloylputrescine, *N,N'*-dicoumaroylputrescine, isorhamnetin 3-*O*-rutinoside] を単離, 同定した.

単離した化合物を標品とし, カイカ 50%EtOH 抽出物の HPLC 成分プロファイリングの結果, 主検出成分は rutin であり, その他の化合物はマイナー成分であった. これらのうち, *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine, *N,N'*-diferuloylputrescine, *N,N'*-dicoumaroylputrescine は天然に稀少な化合物であるため, 特徴成分としてこれらを検出することで, その基原がエンジュ由来であることを示す指標となり得る可能性が考察された.

D. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 天倉吉章, 好村守生, 村井 望, 重松優里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物レイシ抽出物及びカキ色素の成分解析. 日本薬学会第140年会 (2020.3.5) (日本薬学会第140年会Web要旨集)

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H31-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の含有成分解析に関する研究

研究分担者 井之上浩一 立命館大学薬学部 准教授

研究要旨 「第8版食品添加物公定書」または日本食品添加物協会「既存添加物自主規格(第4版)」に記載されている既存添加物について、成分規格を作成した。対象の既存添加物はベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素、ゴマ油不けん化物、ベニバナ黄色素、チャ抽出物およびシタン色素である。これらの既存添加物に関して、シングルリファレンスHPLC定量法を構築することとした。その結果、分析対象物質の定量用標準品を用いなくても、相対モル感度を値付けすることで、簡便かつ再現性の高い定量法を適応することができた。

A. 研究目的

本研究では、既存添加物の含有成分解析に関する分析およびその化学物質の評価を実施した。具体的には、ベニコウジ色素、ゴマ油不けん化物、ベニバナ黄色素、チャ抽出物およびシタン色素についてである。これらは第8版食品添加物公定書または日本食品添加物協会「既存添加物自主規格(第4版)」に規定されている。その確認試験は色価、薄層クロマトグラフィーや吸光度法などであり、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が用いられていなかった。そこで、本研究では、既存添加物の主成分の成分規格を検討し、簡便かつ高精度なHPLC分析法を構築することとした。

ゴマ油不けん化物

ゴマ油不けん化物(Sesame Seed Oil Unsaponified Matter)は日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」(以下、4版自主規格)に規定されている。ゴマ油不けん化物の定義は、ゴマ(*Sesamum indicum* Linné)の種子から得られた、セサモリンを主成分とするものである。

本年度では、相対モル感度係数(Relative Molar Sensitivity, RMS)を用いたシングルリファレンス HPLC 定量法を構築することとした。

さらに、本手法をゴマ油不けん化物だけでなく、様々なゴマ関連食品への応用も検討した。なお、本研究における分析対象は、ゴマリグナン類のセサモール、セサミン、エピセサミンおよびセサモリンとした。さらに、ゴマリグナン類と同等の極大吸収波長を持つ化合物をシングルリファレンスとして採用するため、ゴマリグナン類と共通構造を持つ類似化合物を有機合成にてデザインし、その定量値の妥当性を評価することとした。

ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素

ベニコウジ色素(Monascus Color)は、第8版食品添加物公定書に記載されており、主成分はアンカフラビン類およびモナスコルブリン類が記載されている。一方、ベニコウジ黄色素(Monascus Yellow)は、日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」(以下、4版自主規格)に規格されている。しかしながら、HPLCを用いて、ベニコウジ色素の主成分を分析することは、ピークが検出されず困難であった。そのため、液-液抽出を原理とする高速向流クロマトグラフィー(High-speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)にて主成分解析をすることとした。一方で、ベニコウジ黄色素の主成分であるキサントモナシンAおよびキサントモナシンBでは、いずれも標準品が入手困難であった。そこで、RMSによるシングルリファレンス HPLC 定量法を

構築・検討することとした⁴⁾。

ベニバナ黄色素

ベニバナ黄色素 (Carthamus Yellow) は、ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linné) の花から得られたものであると第4版既存添加物自主規格にて定義づけられている。ベニバナの主成分はサフラノ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。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。そこで、本研究では、高速向流クロマトグラフィーを用いて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 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。

チャ抽出物

チャ抽出物 (Tea Extract) は、第4版既存添加物において、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。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¹⁾。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、主要成分のまたチャ抽出物の主成分はカテキン類と記載されている。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。なお、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¹⁾。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、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。しかし、既存添加物である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各カテキン類のシングルリファレンス HPLC 定量法を開発することとした。

シタン色素

シタン色素 (Sandalwood Red) は「第4版既存添加物自主規格」において、シタン (*Pterocarpus santalinus* Linné) の幹枝から得られたサンタリンを主成分とするものと定義されている。シタンは樹木の芯材が赤紫褐色と美しく、とても固い木であり、お餅の着色や染料、楽器に用いられている。シタン色素の主成分はサンタリン A (SA) およびサンタリン B (SB) であるが、確認試験では、色価や極大吸収波長により評価されている。しかし、主成分である SA 及び SB の定量用標準品が存在しておらず、入手不可能であるため、SA 及び SB の定量分析は困難である。そこで本研究では、色素中成分の単離精製が可能である、HSCCC を用いてシタン色素から SA 及び SB を単離精製することとした。ゆえに、シタン色素を HSCCC により主成分の評価を行い、規格検討をすることとした。

B. 研究方法

電子天秤：メトラ製 METTLER ML303/52
HPLC 装置：島津製作所社製 LC-20AD/SIL-20AC/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS
MS 装置：Xevo TQD
HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC, GLサイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761 システム

ゴマ油不けん化物

ゴマリグナン類のおよびシングルリファレンス LC 分離分析：対象試料はアセトニトリル/メタノール混液 (50/50, V/V) により調製した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1%

ギ酸アセトニトリル (B) を使用し, A/B : 55/45 のアイソクラティック分析を行った.
カラム : TSKgel ODS-100V column (4.6×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)
カラム温度 : 40°C
流速 : 1.0 mL/min
検出波長 : 190-800 nm (定量 : 290 nm)
注入量 : 10 μL

ゴマリグナン類に対するシングルリファレンスのデザイン : セサモールにジプロモメタン, 1-ブロモブタン, 1-ブロモヘキサンを反応させ, メチル誘導体, ブチル誘導体およびヘキシル誘導体を合成した.

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

シングルリファレンス HPLC 定量法の妥当性評価 : 求めた RMS を用いて, 絶対検量線法との定量値を比較した. なお, 絶対検量線法で用いた標準品には, また, 異なる分析条件 (カラムや移動相) や添加するシングルリファレンスの異なる濃度において定量値の再現性を確認した.

ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素

ベニコウジ色素の LC 分離分析 : 移動相には, 0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1%ギ酸メタノール (B) を使用し, A/B : 45/55 を 15 分間維持し, その後, 15 分にて A/B : 2/98 のグラジエント分析を行った.
カラム : TSKgel ODS-100V column (4.6×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)
カラム温度 : 40°C
流速 : 1.0 mL/min
検出波長 : 200-550 nm (定量 : 500 nm)
注入量 : 10 μL

ベニコウジ黄色素の LC 分離分析 : 移動相には, 0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1%ギ酸メタノール (B) を使用し, A/B : 70/30 をアイソクラティックにより, 10 分間の分析を行った.
カラム : TSKgel ODS-100V column (4.6×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)
カラム温度 : 40°C
流速 : 1.0 mL/min
検出波長 : 200-500 nm (定量 : 460 nm)
注入量 : 10 μL

ベニコウジ色素の HSCCC の分離分析 : 二相溶媒系は, ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液 (4/5/4/5, V/V/V) を用いた. 遠心スピードを 1000 rpm とし, コイル容量は 350 mL であり, 流速 2.0 mL/min で送液した. なお, 分析パターンを検討する際は, コイル容量は 75 mL, 流速は 1.0 mL/min で送液した.

ベニコウジ黄色素の HSCCC の分離分析 : 対象試料を上層および下層混合溶液 (50/50, V/V) に溶解した. 二相溶媒系は, ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液 (1/5/1/5, V/V/V) を用いた. 遠心スピードを 1000 rpm とし, コイル容量は 350 mL であり, 流速 1.5 mL/min で送液した.

RMS の算出 : キサントモナシン A および B カルバゾクロムスルホン酸 (シングルリファレンス) について, 絶対検量線を作成し, RMS を算出した.

シングルリファレンス HPLC 定量法の妥当性評価 : 求めた RMS を用いて, 絶対検量線法との定量値を比較した. なお, 絶対検量線法で用いた標準品には, また, 異なる分析条件 (カラムや移動相) や添加するシングルリファレンスの異なる濃度において, 定量値の再現性を確認した.

ベニバナ色素

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、A/B : 87/13 を Gradient 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)
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)

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。

チャ抽出物

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、40 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)
流速 : 1.0 mL/min
UV 検出波長 : 200-500 nm (定量 : 280 nm)
FL 検出波長 : 励起波長 280 nm, 蛍光波長 310 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)

カテキン類に対するシングルリファレンスのデザイン : カテキンにヨードメタンを反応させ、カテキンのメチル誘導体を合成した。ま

た、カテキン類の部分骨格に注目し、シングルリファレンス、DMP および DMB をシングルリファレンス候補化合物とした。

RMS の算出 : 8 種のカテキン類および 3 種のシングルリファレンス候補化合物について、0 ~100 μM で絶対検量線を作成した。各シングルリファレンスに対するカテキン類の検量線の傾きの比より、RMS を算出した。

シングルリファレンス-HPLC 定量法の妥当性評価 : 本分析法を用いて、チャ抽出物中における各カテキン類の定量を実施した。なお、それと同時に絶対検量線法による定量分析も行い、その定量値を比較した。さらに、異なる測定環境および HPLC 装置間において定量値の再現性を確認した。

シタン色素

HPLC 装置 : 日立ハイテクサイエンス社製
Chromaster 5160 / 5280 / 5310 / 5430

シタン色素の LC 分離分析 : 対象試料はメタノールで調製した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1%ギ酸メタノール (B) を使用し、A/B : 45 /55 を Isocratic により、30 分間の分析を行った。

カラム : X Bridge C18 (5 μm, 4.6×150 mm, Waters 社製)
流速 : 1.0 mL/min
検出波長 : 200-510 nm (定量 : 500 nm, 480 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)

シタン色素の HSCCC の分離分析 : 二相溶媒系は、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水溶液 (3/5/3/5, 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、75 mL であり、固定相には、上層を充填した。移動相には下層を用い、流速 1.0 mL/min で送液した。

C. 結果及び考察

ゴマ油不けん化物

ゴマリグナン類に類似構造をもつシングルリファレンスを得るために、セサモールのアルキル化によりメチル誘導体、ブチル誘導体、ヘキシル誘導体およびピペロナル（セサモールの類似化合物）を有機合成し、ゴマリグナン類および4種のシングルリファレンスのHPLCクロマトグラムを得た。絶対検量線の傾きの比よりRMSを求めた結果、どの濃度幅においても再現性の高いRMSが得られた（表1）。算出したRMSを用いて絶対検量線法と比較した結果、ヘキシル誘導体での定量値におきてばらつきが大きく、ピペロナルは最も定量性が高いことが確認された（表2）。また、カラムや移動相の条件を変更し、シングルリファレンスHPLC定量法を検討した結果、いずれもRSD 5%以下のゴマリグナン類の定量値が得られ、その中でセサモールのブチル誘導体が最もRSDの低い定量値を示した（図1）。ゆえに、本手法により、シングルリファレンスを用いることで、4種類のゴマリグナン類を標準品なしで一斉定量することができた。

ベニコウジ色素・ベニコウジ黄色素

ベニコウジ色素はHPLCでの分析は困難であったため、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液（4/5/4/5, v/v/v/v）の二相溶媒系を用いてHSCCCにて単離精製をした。その結果、3つのFractionに分取できた（図2）。分取したFractionをHPLC分析した結果、Fraction Iは明確なピークが得られなかったが、Fraction II～IIIにおいて、ピークが観察された。以上のことから、HSCCCによりベニコウジ色素の主成分を単離精製が達成することができたと見える。また、高極性物質を容易に分配させることができると考えられる二相溶媒系であるブタノール：酢酸エチル：水（4/1/5, v/v/v）に変更し、HSCCCでの分析を行った結果、国内流通品のベニコウジ色素にてHSCCC分離パターンがわずかに異なった。

ベニコウジ黄色素の主成分であるキサントモナシンAおよびBの標準品が入手不可能であるため、HSCCCにて単離精製を実施した。二相溶媒系の検討をした結果、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1%ギ酸水溶液（1/5/1/5, v/v/v/v）が最適であると判断した。その条件により主に2つのFractionを得ることができ、LC分析の結果、それらはキサントモナシンAおよびキサントモナシンBであると同定できた（図3）。それぞれ単離したキサントモナシン類を用いて、定量NMRにて純度評価を実施し、RMSを算出した。その結果、キサントモナシンAのRMSは8.75、キサントモナシンBのRMSは14.8であった。これらのRMSを用いて、ベニコウジ黄色素中のキサントモナシン類の定量した結果、従来の絶対検量線法から得られる定量値と同等の値を示し、さらにHPLCの分析条件（カラムや移動相）を変更しても高い再現性が確認された（表3および図4）。

ベニバナ黄色素

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の分析時間が超過する可能性があり、それらは除外した。

ベニバナ黄色素は我々の既報において、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のクロマトグラムより明確な2つのピーク（Fraction AおよびB）が検出され、単離精製することができた（図6）。しかしながら、それらよりもピーク強度が大きい未知ピークが観察された。それらも黄色素成分であるため、主成分の1つであると考えられる。

チャ抽出物

まず、8種のカテキン類の分離分析を検討し

た結果、TSKgel ODS-100Z カラムを用いて、40 分以内で全ての化合物が良好な分離で分析することができた。さらに、カテキンおよびエピカテキンにおいて、それぞれ蛍光検出器を用いてもピークが確認された。次いで、シングルリファレンス候補化合物の選定を検討した。本研究では、カテキンの全体構造ではなく、部分構造に着目し、セサモール

(SM)、ジメトキシフェノール (DMP) およびジメトキシベンゼン (DMB) をシングルリファレンス候補化合物として選定した。これらを HPLC で分析した結果、どれもカテキン類の UV 検出波長 (280 nm) かつ分析時間以内にピークが検出された (図 7)。

次に、カテキン類およびシングルリファレンス候補化合物の純度評価を、定量 NMR (^1H -qNMR) により実施した。その結果、どの化合物も純度が 85% 以上であり、その RSD% も 3% 以下であった。そして、LC 用原液を用いて作成した絶対検量線により、各シングルリファレンス候補化合物に対するカテキン類の RMS を求めた。

次に、算出した RMS を用いて、チャ抽出物中におけるカテキン類のシングルリファレンス HPLC 定量法を実施した。3 種類のシングルリファレンス候補化合物をそれぞれ用いてカテキン類を定量し、従来の絶対検量線法による定量値と比較してみた。その結果、UV 検出器を用いたエピカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレートの定量値は、絶対検量線法と同等であり、シングルリファレンスの添加濃度を変更しても定量値の変化はごく僅かであった。FL 検出器を用いた EC の定量値を絶対検量線法と比較すると、DMB ではほぼ同等の定量値であったが、SM では大きく異なっていた (表 4)。以上の結果より、UV 検出器かつ FL 検出器を用いて、8 種類のカテキン類のシングルリファレンス HPLC 法を構築した結果、カテキン類のシングルリファレンスは DMB が最適であり、その精度や再現性は絶対検量線法による定量値とほぼ同等であった。

シタン色素

シタン色素の 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。同じ粒径や長さである東ソー社製の TSKgel ODS-100V と TSKgel ODS-100Z、Waters 社製の X Bridge 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. 6 に示した。ゆえに、保持時間やピーク形状が良好な X Bridge を用いることとした。

HPLC によりサンタリン A およびサンタリン 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結果、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水溶液 (3/5/3/5, V/V) を採用した。

シタン色素の HSCCC による単離を実施した。なお、固定相の保持率は 53% であり、分析時間は 150 分であった。HSCCC クロマトグラムより、明確な 3 つのピークが検出された (図 8)。また 270 mg のシタン色素から、サンタリン A 1.3 mg 及びサンタリン B 0.3 g を単離精製することができた。そして HPLC で純度評価した結果、高純度のサンタリン A およびサンタリン B であった。しかし、それらよりもピーク強度が大きく最も濃い赤色であった未知ピークが観察された。それらも赤色素成分であるため、主成分の 1 つであると考えられる。

D. 研究発表

(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) 5 月 (2018 年)

(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) 5 月 (2018 年度)

(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) 3月 (2018 年度)

(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)

(5) 高橋未来, 高木映里, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: カテキン類の一斉分析を目指したシングルリファレンス HPLC 定量法の開発 日本食品化学学会第 25 回総会・学術大会 (長野県松本市) (2019. 6)

E. 知的財産権の出願・登録状況

該当無

表 1. 各シングルリファレンスに対するセサミン類の RMS

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

表 2. ゴマ油、セサミン EX およびゴマ油不けん化物における各セサミン類の定量値

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

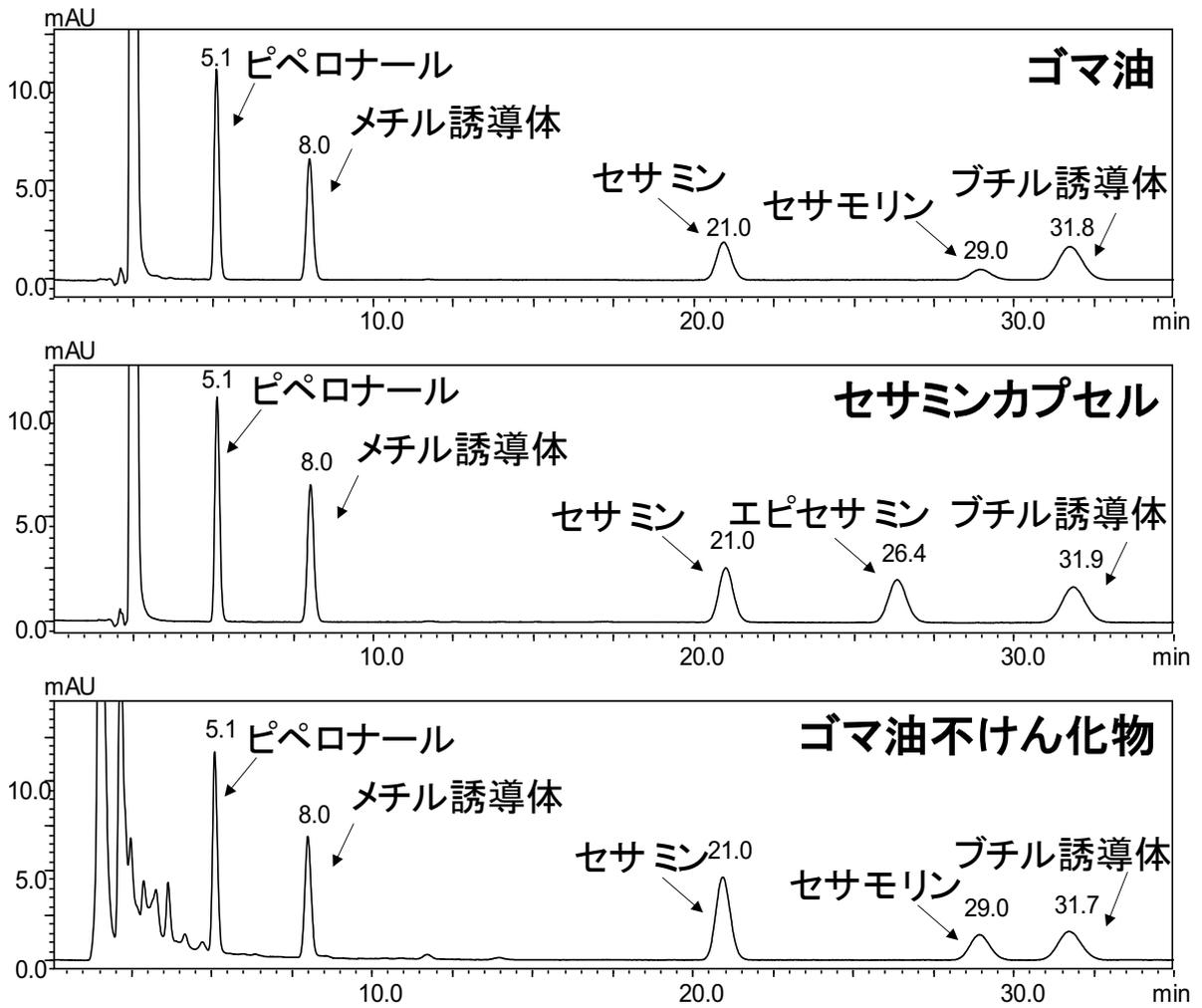


図 1. ゴマ油、セサミン EX およびゴマ油不けん化物の HPLC クロマトグラム

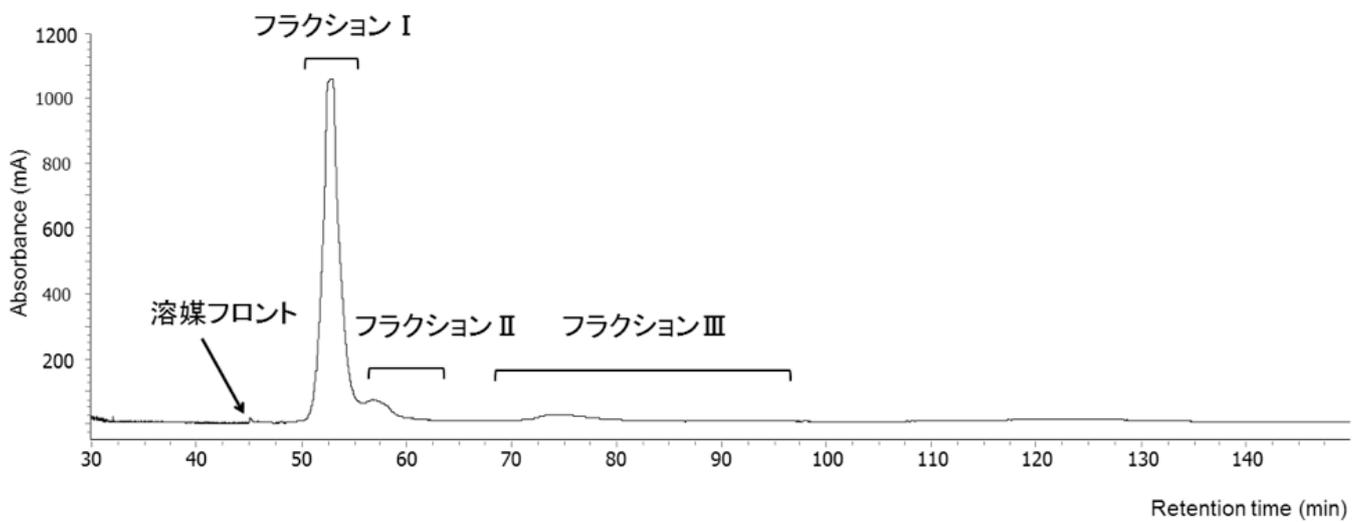


図 2. ベニコウジ色素の HSCCC クロマトグラム

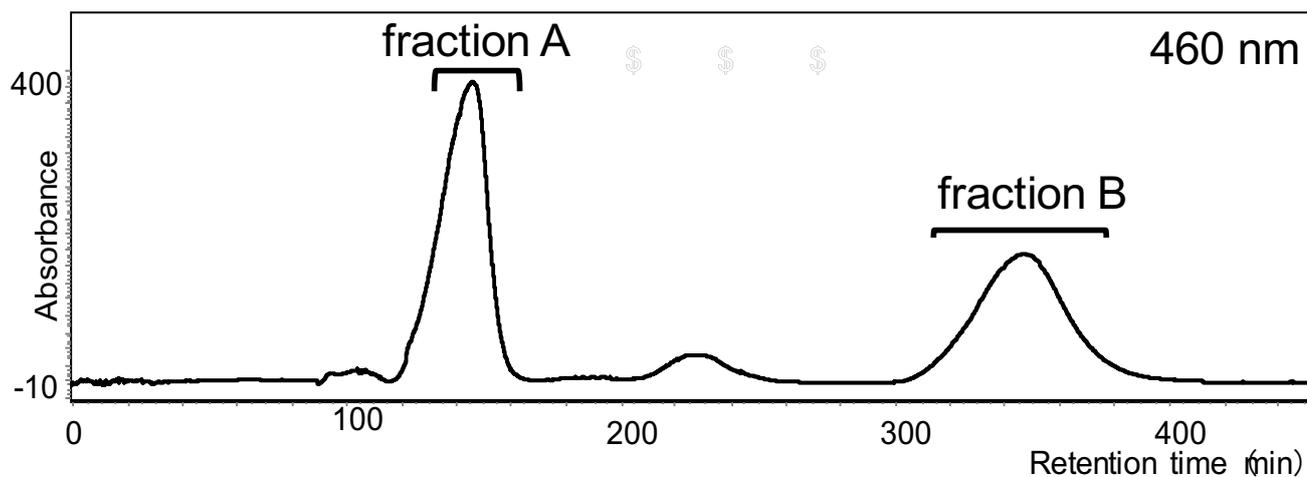


図 3.ベニコウジ黄色素の HSCCC クロマトグラム

表 3.ベニコウジ黄色素中のキサントモナシン類の定量値

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

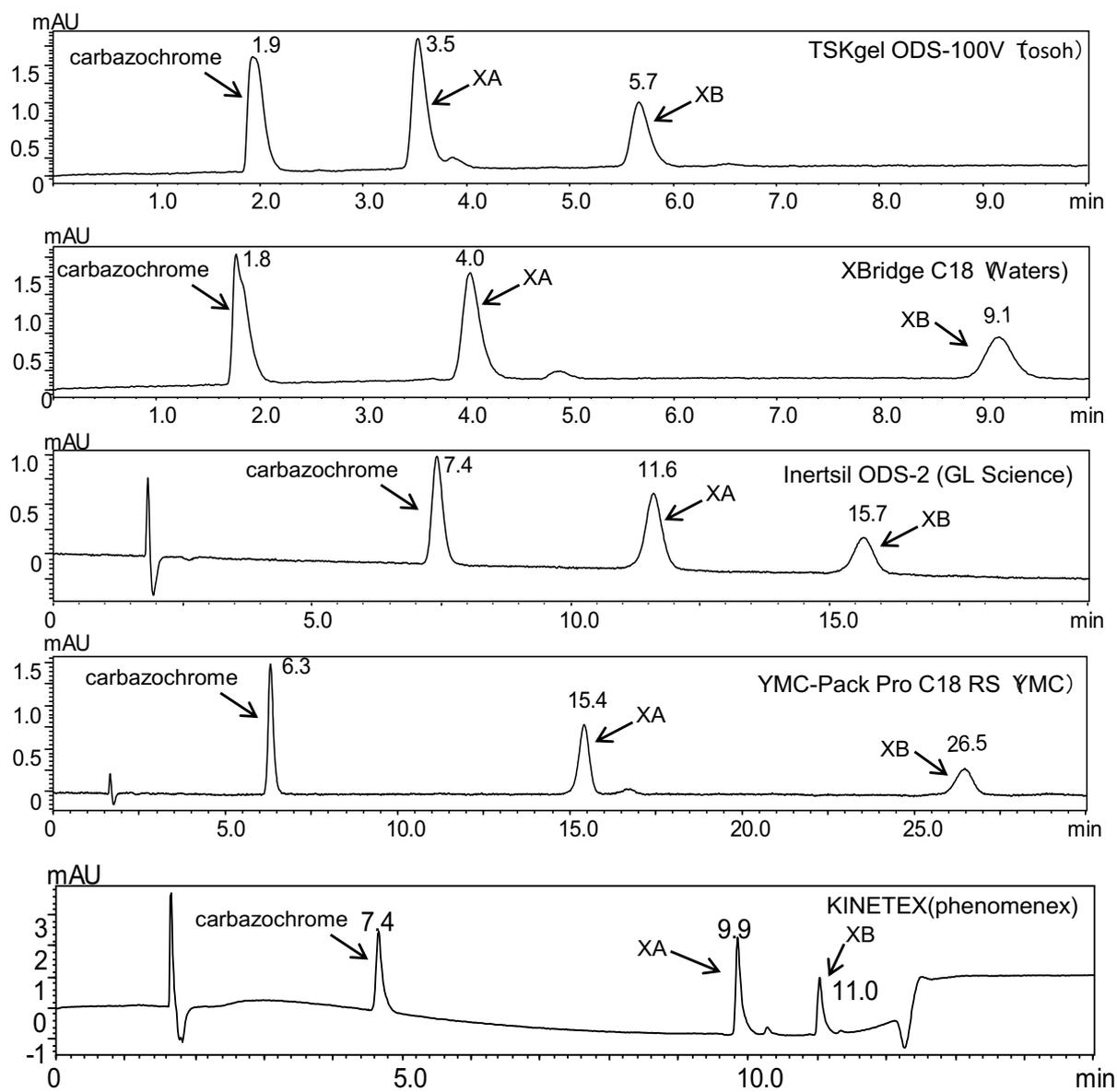


図 4.各分析カラムにおけるベニコウジ黄色素の HPLC クロマトグラム

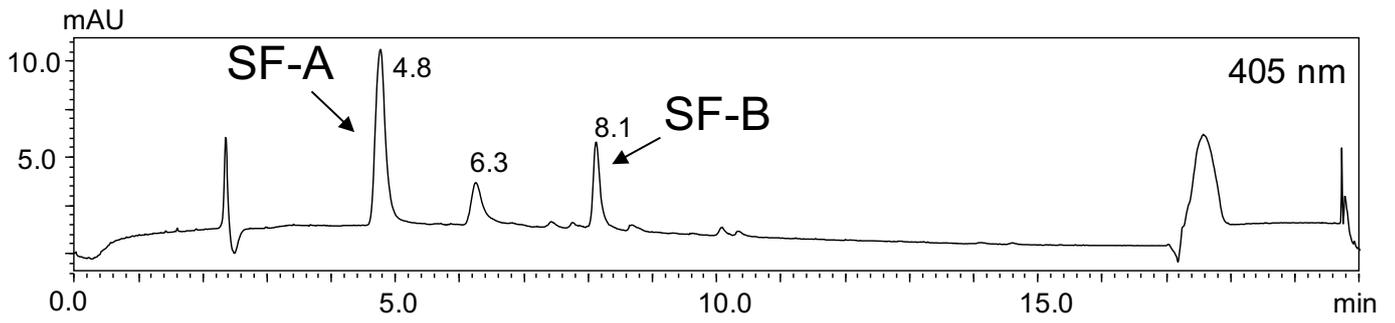


図 5. ベニバナ黄色素の HPLC クロマトグラム

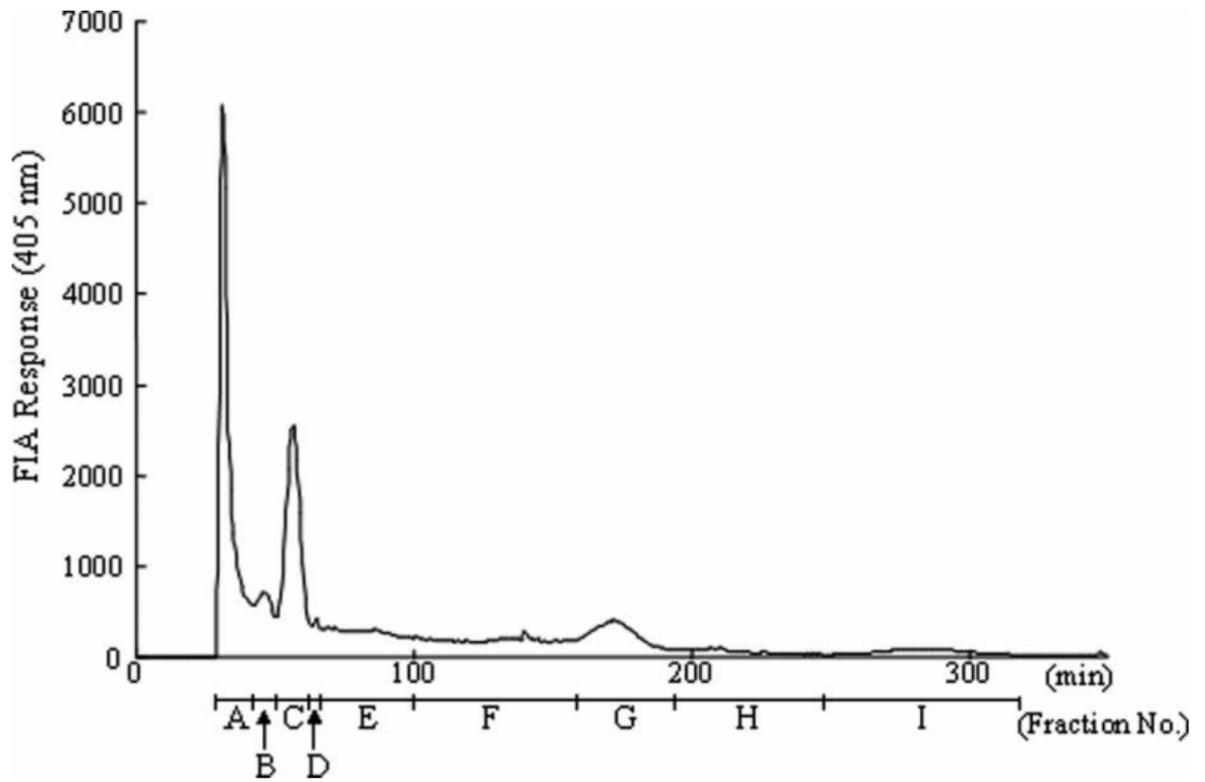


図 6. ベニバナ黄色素の HSCCC クロマトグラム

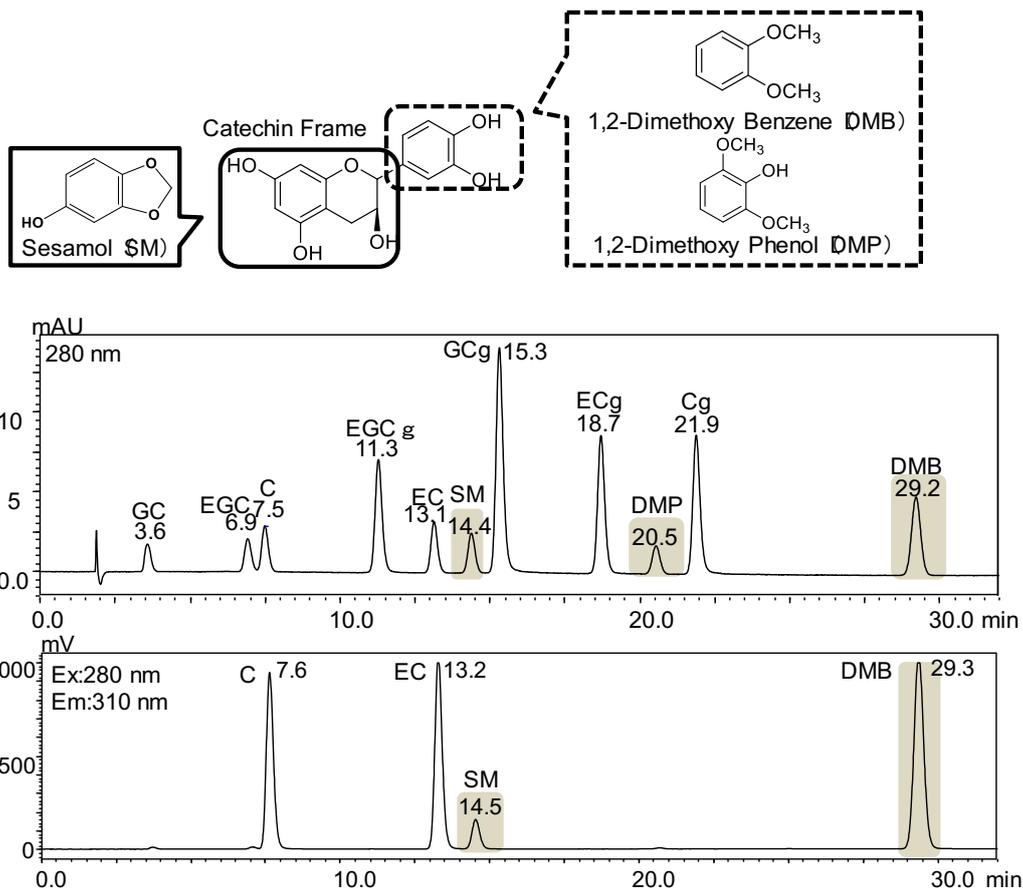


図 7. カテキン類の HPLC クロマトグラム

表 4. チャ抽出物におけるカテキン類の定量値

UV検出器	RMS法, 定量値 (ng/g)			絶対検量線法 定量値 (ng/g)
	SM	DMP	DMB	
SR 2.0 ppm	22	27	24	
ECg	SR 4.0 ppm	22	26	24
	SR 8.0 ppm	22	25	24
EGCg	SR 2.0 ppm	740	860	800
	SR 4.0 ppm	740	880	920
	SR 8.0 ppm	760	900	760
FL検出器	RMS法, 定量値 (mg/g)		絶対検量線法 定量値 (mg/g)	
	SM	DMB		
SR 2.0 ppm	0.0030	8.6		
EC	SR 4.0 ppm	0.0030	8.7	9.1
	SR 8.0 ppm	0.0027	9.0	

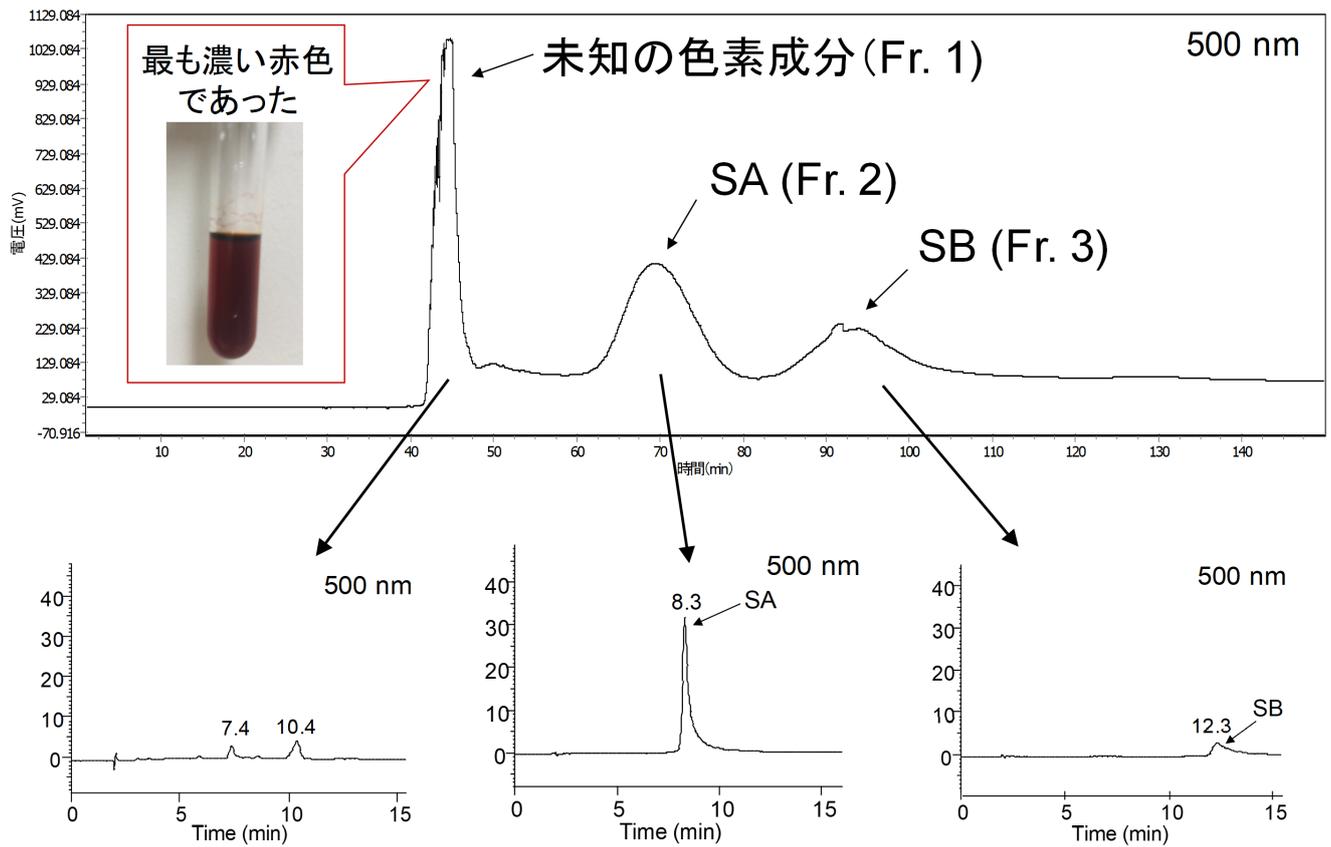


図 8. シタン色素の HSCCC クロマトグラム(上)と HPLC クロマトグラム(下)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29～31年度(令和元年) 総合分担研究報告書

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、 ^1H -qNMR法(定量 ^1H -NMR法)が試験法として適用可能であるか明らかにする目的で、「ベニバナ赤色素」、「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討した。「ベニバナ赤色素」では、赤色本体のcarthaminの ^1H -qNMR法を用いた定量と、その値付けをした溶液を用いてのHPLC定量を用いた実際の試料の定量の条件の検討を行った。また、 ^1H -qNMR法で純度を明らかにしたcarthaminのUVスペクトルを測定して吸光係数を算出した。「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、スターアニスではanisaldehydeを、クミンではcuminaldehydeを、フェヌグリークではtrigonellineを、それぞれ指標成分として ^1H -qNMRの測定条件を確立し、実際に ^1H -qNMR法を用いた定量が実施できることを確認した。コショウでのpiperineの ^1H -qNMR法での定量条件についても検討を行なった。

A. 研究目的

^1H -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 ^1H -NMRスペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となりうる。

既存添加物である「ベニバナ赤色素」が成分定量の方法を確立されておらず、規格基準が決められていないことから、色素本体の化合物であるcarthamin(Fig. 1)を直接 ^1H -qNMR法で、あるいは標準品溶液を ^1H -qNMR法で定量したのちHPLC法で既存添加物の定量を行う方法で管理が確立できるかの検討を行った。合わせて、 ^1H -qNMR法で純度を測定したcarthaminのUVスペクトルを測定して吸光係数の算出を試みた。吸光度からの絶対定量も可能になると考えられる。まず、これまでの文献値が、 ^1H -qNMR法による絶対定量で算出した吸光係数と一致する

かも検討した。これらを通じて、高純度での単離が難しく、試薬としても入手できないcarthaminの正確で簡便な定量法の確立を目指した。

「香辛料抽出物」も規格基準が決められていないが、そもそも多くの素材が材料として規定されていて、その素材ごとに基準物質を定めて基準の策定をしていく必要がある。今回は素材に上げられているもののうち、生薬として市販されているものの抽出物を作成し、 ^1H -qNMR法での測定が可能かどうかの検討を行った。そのうちスターアニスでは、含有されるanisaldehyde(Fig. 2)を定量できる可能性があることから、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」について ^1H -qNMR法を用いたanisaldehydeの定量が適用できるかの検討を行うことにした。クミンの種子の抽出物のスペクトルでは、 ^1H -qNMRに適用できるシグナルが含有されるcuminaldehyde(Fig. 3)のもので、そのcuminaldehydeを定量できる可能性があることから、クミンを主な基原とする「香辛料抽出物」について ^1H -qNMR法を用いたcuminaldehydeの定量が適用できるかの検討を行うことにした。フェネグリーク種子に関して

は, trigonelline (Fig. 4)が指標成分になりうると考え, その定量方法に関しての検討を行った. コショウ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コショウの辛味成分でもある piperine (Fig. 5)の定量を¹H-qNMRでも適用できるか否かについても検討を行った.

B. 研究方法

B-1) 試薬等

DSS-*d*₆ と BTMSB-*d*₄ (Fig. 6)は和光純薬の Trace Sure[®]規格のものを用いた. NMR 測定用溶媒の dimethylsulfoxide (DMSO)-*d*₆, methano-*d*₄, pyridine-*d*₅, chloroform-*d* はそれぞれ Isotec Inc. の 99.9, 99.8, 99.5, 99.8 atom %D を用いた. 抽出用の methanol は HPLC グレードのものを用いた. Piperine は和光純薬の生化学用試薬を用いた.

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) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

既存添加物の「ベニバナ赤色素」は「ベニバナの花から得られた, カルタミンを主成分とするものをいう。」と定義され, その本質は「ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linne) の花から得られた, カルタミンを主成分とするものである. デキストリン又は乳糖を含むことがある。」とされるもので, 赤色の着色料として用いられる. 純度の高い carthamin は市販されていないため, まず, 水上らの方法 [1]に従い, 市販既存添加物からの carthamin の単離を行った. 得られた carthamin の¹H-qNMR の測定を行って純度を決定し, その carthamin を carthamin 標準品, またその¹H-qNMR の測定を行った溶液を標準液として定量の基準とすることにした.

B-3-a) ¹H-qNMR スペクトルの測定

単離した carthamin 約 5 mg を精秤して 1.00 ml の pyridine-*d*₅ に溶かした. この溶液 0.50 ml と, 先に調製した 1,4-BTMSB-*d*₄ (Fig. 6) の溶液 (2.00 mg/mL, pyridine-*d*₅) 0.10 ml を NMR 試料管にとり, 混和して¹H-qNMR の測定に供した. 測定条件は Table 1 に示した条件で測定した. 積算回数は 8 回とした. 測定によって得られたスペクトル (Fig. 7) から, carthamin の 16 位 H のシグナル (δ 9.15 ppm) と 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB-*d*₄ のシグナルの面積を比較して, 式 1 に従って carthamin の濃度を算出した.

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

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

B-3-b) HPLC による carthamin の定量

市販添加物や生薬中の carthamin 含有量は極めて少ないことが推定されることから, carthamin の絶対定量では標準品溶液の値付け→標準品溶液を使った HPLC 分析という手順とった. HPLC の条件は, 昨年度までの研究で確立した条件で, カラムに YMC-Pack ODS-AL s-5 250 mm x 4.6 mm i. d., 温度 37°C で, 溶媒として 0.5%酢酸-MeOH 溶液と 0.5%酢酸水溶液のグラジエント (0 min: 50:50→20 min 80:20) を流速 1.0 ml/min で溶出し, 520 nm での吸収で検出した.

¹H-qNMR の測定に用いた溶液を 5 倍ずつ 4 段階に希釈し, それぞれから得られたクロマトグラム (Fig. 8) のピーク面積から, 検量線を作成した.

各試料の調製は, 「ベニバナ赤色素」の場合は約 5 mg, 生薬粉末では約 100 mg を精秤し, これに溶媒 (MeOH-水) 1.0 ml を加えて超音波下 30 分で抽出, 遠沈後その上清をフィルター濾過し, HPLC 用の溶液とした. 各クロマトグラムの

ピーク面積と検量線から各試料の carthamin の含有率を算出した。

B-3-c) carthamin の吸光係数

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

B-4) ^1H -qNMR 法を用いた「香辛料抽出物」中の成分定量

既存添加物の「香辛料抽出物」は、アサノミ以下 73 種類の植物から「抽出またはこれを水蒸気蒸留して得られたもの」とされている。多様な基原が含まれており、かつどの部位を用いたかも決められていないという、つかみどころのない基原の既存添加物である。しかしながらどれかは用いられているはずで、特定の基原を用いているものごとに規格基準を策定することは可能である。そこで、生薬として流通している基原を中心に検討をすることにした。すなわち、生薬として入手できた 20 種類の粉末生薬の MeOH 抽出物を作成し、それぞれの ^1H -NMR スペクトルを測定して ^1H -qNMR に適用できる独立したシグナルを持つスペクトルを与えるものを選抜した。その中でスターアニスの抽出物のスペクトルで独立したシグナルが観測された。この独立シグナルがスターアニスに特徴的な精油成分である anisaldehyde のホルミル基由来のプロトンと容易に特定できたことから、まず、anisaldehyde の ^1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde

の定量、さらに粉末生薬中の anisaldehyde の定量も合わせて行うことにした。

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

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

B-4-b) ^1H -qNMR 法を用いたスターアニス由来「香辛料抽出物」およびスターアニス種子中の anisaldehyde の定量

スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」について ^1H -qNMR 法を用いた anisaldehyde の定量が適用できるかの検討を行うことにした。また、あわせて、生薬として入手できるスターアニス種子中の anisaldehyde の定量も行なった。

B-4-b-1) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

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

Anisaldehyde 標準品を用いた ^1H -qNMR は次のように行った。Anisaldehyde は揮発性成分でもあるので、減圧下での乾燥などは行わず、この anisaldehyde 標準品の製品を開封してそのまま用いた。anisaldehyde 標準品を約 5 mg を精秤して 1.00 ml の methanol- d_4 に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した 1, 4-BTMSB- d_4 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ^1H -qNMR の測定に供した。

入手できた既存添加物「香辛料抽出物」のうち 4 種類は水蒸気蒸留で得られた水を含む液体であることから、乾燥などの特段の操作は行わず、

そのままを試験に供した。約 20 mg (20 μ L) を精秤して methanol- d_4 (1.00 mL)を加え、10 分間超音波下においたのち 3 分間遠沈し、わずかに存在する固形物を除去した。この上清 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB- d_4 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ^1H -qNMR の測定に供した。

粉末で入手された既存添加物「香辛料抽出物」1 種と粉末生薬の場合は、まずこれらの粉末をシケータ中で一晩乾燥させた。これらの約 200mg を精秤して 1.00 mL の methanol- d_4 に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈した。その上清 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB- d_4 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ^1H -qNMR の測定に供した。

B-4-b-2) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Anisaldehyde とスターアニス由来の「香辛料抽出物」、スターアニス生薬粉末の ^1H -NMR を測定し、anisaldehyde のホルミル基 H のシグナルが δ 9.82 ppm に現れることを確認した。 ^1H -qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、anisaldehyde のホルミル基 H のシグナルと 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB- d_4 のシグナルの面積を比較して、式 2 に従って anisaldehyde の濃度を算出した。

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

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

B-4-c) ^1H -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 ^1H -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 ^1H -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-4-c-1) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- d_6 はデシケータ中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 2.00 mL の methanol- d_4 に溶かして内部標準用溶液とした。

Cuminaldehyde 標準品を用いた ^1H -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 ^1H -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晩乾燥させた。これらの約 100mg 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 ^1H -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-4-c-2) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Cuminaldehyde とクミン種子粉末抽出液の ^1H -NMR を測定し、cuminaldehyde のホルミル基 H のシグナルが δ 9.92 ppm に現れることを確認した。(Fig. 3) ^1H -qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、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。

$$C_{\text{ca}} = \frac{I_{\text{ca}}}{I_{\text{D}}} \times C_{\text{D}}$$

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-d) ¹H-qNMR 法を用いたフェネグリーク種子中の trigonelline の定量

フェネグリークの種子粉末抽出液の ¹H-NMR スペクトルで、¹H-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. 15a) 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。

フェネグリークの種子 50 g を MeOH で抽出して 5.2g 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 1.45g 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 (CHCl₃-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。この化合物の構造を解析した結果 (Table 5)、この化合物は trigonelline (Fig. 4) であると同定された。

フェネグリーク種子抽出物で観測された独立したシグナルが、フェネグリーク種子に含有される trigonelline (Fig. 4) の 2 位のプロトンシグナルと特定できたことから、trigonelline の ¹H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と、粉末生薬中の trigonelline の定量を行うことにした。

B-4-d-1) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

DSS-*d*₆ はデシケータ中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 1.00 ml の DMSO-*d*₆ に溶かして内部標準用溶液とした。

Trigonelline 標準品としてはフェネグリーク種子から単離したものをを用いた。デシケータ中で一晩乾燥させた。約 5 mg を精秤して 1.00 mL の DMSO-*d*₆ 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 ¹H-qNMR の測定に供した。

フェネグリーク種子粉末中の trigonelline の抽出は 2 通りの方法で行なった。方法 1 として、まず粉末をデシケータ中で一晩乾燥させた。これらの約 100 mg を精秤して methanol (1.0 mL)

に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清を取り出した。この操作をさらに 2 回繰り返し、集めた methanol 抽出液を濃縮乾固した。この抽出物を 1.00 mL の DMSO-*d*₆ に溶かし、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 ¹H-qNMR の測定に供した。方法 2 として、乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して DMSO-*d*₆ (1.00 mL) に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、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 ¹H-qNMR の測定に供した。方法 2 は操作の簡便化が可能かの検討のため行なった。

ところで、フェネグリーク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はできなかった。一方、コーヒーの種子 (いわゆるコーヒー豆) にも trigonelline が含まれている [4] ことから、コーヒーの種子についても同様の実験を試みた。

B-4-d-2) ¹H-qNMR スペクトルの測定

trigonelline とフェネグリーク種子粉末抽出液の ¹H-NMR を測定し、trigonelline (Fig. 4) の 2 位のプロトンシグナルが 9.16 ppm に現れることを確認した。(Fig. 15) ¹H-qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、trigonelline の 2 位のシグナルと 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 trigonelline の濃度を算出した。

$$C_T = \frac{I_T}{I_D} \times C_D$$

ただし、*C*_D、*C*_T はそれぞれ DSS-*d*₆ 及び trigonelline のモル濃度 (mol/mL)、*I*_D、*I*_T はそれぞれ DSS-*d*₆ 及び trigonelline の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-4-e) ¹H-qNMR 法を用いた piperine の定量

BTMSB-*d*₄ はデシケータ中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 1.00 mL の pyridine-*d*₆ に溶かして内部標準用溶液とした。

市販試薬の piperine を用いた ¹H-qNMR は次

のように行った。Piperine をデシケータ中で一晩乾燥させたのち、約 10 mg を精秤して 1.00 mL の pyridine-*d*₆ に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した BTMSB-*d*₄ 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ¹H-qNMR の測定に供した。¹H-qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、piperine の 7.31 ppm のシグナルと 0.00 ppm とした BTMSB-*d*₄ のシグナルの面積を比較して次式に従って piperine の濃度を算出した。

$$C_P = \frac{I_P}{I_B} \times C_B$$

ただし、 C_B 、 C_P はそれぞれ BTMSB-*d*₄ 及び piperine のモル濃度 (mol/mL)、 I_B 、 I_P はそれぞれ BTMSB-*d*₄ 及び piperine の水素 1 個あたりのシグナル面積。

コショウ種子粉末、ヒハツ種子粉末に含有される piperine の検出では、それぞれの乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して pyridine-*d*₆ (1.00 mL) に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清 0.50 mL と、先に調製した BTMSB-*d*₄ 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ¹H-qNMR の測定に供した。

C. 結果および考察

C-1) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

C-1-a) HPLC による carthamin の定量

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

(Fig. 9)

各試料の調製は、「ベニバナ赤色素」または生薬粉末のからの抽出溶媒の検討を行った。MeOH-水の比率を 0%~100% まで 10% 刻みで MeOH 濃度を変えた溶媒で抽出を行い、ピーク面積を比較した。その結果、80%MeOH-水の条件のときに抽出効率が最大となることがわかった。

そこで、「ベニバナ赤色素」、生薬粉末を精秤し、これらに 80%MeOH-水 (1.0 mL) を加えて抽出して調製した試料の測定を行ったところ、「ベニバナ赤色素」の carthamin 含有率は 0.31%、生薬粉末は 0.22% と算出された。

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

C-1-b) Carthamin の吸光係数

Carthamin の吸光係数は EtOH 中と DMF 中で測定されているものが報告されていることから、ethanol-*d*₆ と DMF-*d*₇ 中での ¹H-qNMR を試みた。単離して得た carthamin 標準品 5 mg を秤量してそれぞれの溶媒 1 mL に溶解しようとしたが、全ては溶解しなかった。また、上清を取って ¹H-NMR を測定したが、carthamin の 16 位 H のシグナルを十分な大きさで観測することができず、これらの溶媒では ¹H-qNMR 法を適用するに足る十分な溶解度がないことがわかった。

そこで、まず carthamin 標準品をこれまでと同様に pyridine-*d*₆ 中で ¹H-qNMR を測定して純度を算出、同じロットの carthamin 標準品の EtOH 中、DMF 中での UV スペクトルの測定を行って吸光係数を算出することにした。すなわち、carthamin 標準品を約 5 mg を精秤して pyridine-*d*₆ (1.00 mL) に溶解し ¹H-qNMR の測定に用いた。その結果、まず、このとき標準とした carthamin の純度は ¹H-qNMR の測定より 44.1% と算出された。この標準品を用いて UV スペクトル測定に供する DMF 及び EtOH 溶液を調製し UV スペクトルの測定をした。(Fig. 10, 11) また、¹H-qNMR の測定に供した溶液を通常のスเปクトル用 pyridine で 1000 倍に希釈して pyridine 中での carthamin の UV スペクトルの測定をした。(Fig. 12) 測定の結果、それぞ

れのモル吸光係数は DMF : 1.21×10^5 ($\lambda_{\max} = 530$), EtOH : 1.19×10^5 ($\lambda_{\max} = 513$), Pyridine : 1.48×10^5 ($\lambda_{\max} = 540$) と算出された. (Table 2) Pyridine 中の値は今回初めて測定したもののだが, DMF 中の値は文献値の 1.3 倍, EtOH 中は 2.4 倍と, いずれも文献値よりも大きい値となった. これは, 先行研究における測定の際, 純度を大きく見積もっていたために起こったこととも考えられる. 再結晶を行って得た化合物の純度は 100% に近いものであるが, HPLC で精製したものの場合, 1 ピークを単離したつもりでもバックグラウンドの夾雑物が無視されたり, 乾燥が十分でなかったりして純度が実は十分ではないことがある. また, carthamin の場合, 熱や光に不安定でもあるので, 保存中の分解ということもある. 精製の仕方, 保存の仕方などで純度を高く見積もる要因は多くあり, ^1H -qNMR 法が確立されていなかった当時では検証の方法はほぼない状態であったので, 先行研究における吸光係数は小さく算出されていると考えられる.

^1H -qNMR 法での定量値から正確な吸光係数を算出できたことで, 吸光度から濃度を算出することができるようになり, 不安定な carthamin の簡便な定量に大きく貢献できるものと考えられる.

C-2) ^1H -qNMR 法を用いた「香辛料抽出物」中の成分定量

C-2-a) 「香辛料抽出物」の基原から ^1H -qNMR 法が適用できる生薬のスクリーニング

研究方法の項で述べたように「香辛料抽出物」の基原のうちの 16 種類の MeOH 抽出物を作成し, ^1H -NMR スペクトルを測定した結果, スターアニスのスペクトルで, ^1H -qNMR が適用できる独立したシグナルが 9.82 ppm に観測された. (Fig. 13A) そのスペクトルを市販の anisaldehyde のスペクトルと比較したところ一致したので, 9.82 ppm のシグナルは anisaldehyde のホルミル基の H のものと特定した. (Fig. 13B)

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

Anisaldehyde 標準品中の anisaldehyde の定

量を ^1H -qNMR 法でおこなった結果, $94.96 \pm 1.02\%$ と見積もられた.

次に「香辛料抽出物」のうちスターアニスを基原とするとされるもので入手できた 5 サンプルの ^1H -qNMR 測定を試みた. そのうち 2 サンプルは anisaldehyde のホルミル基 H に由来するシグナルが観測されなかった. 3 サンプルについて定量を行った結果, それぞれ含有率が 1.40%, 0.24%, 0.76% となった. これらの標準偏差は 0.07% で, 含有率が 1% を切る状態になると無視できない数字であった. スターアニスの生薬粉末中の anisaldehyde の定量では, これまでに 2 サンプルについて ^1H -qNMR 法を用いた定量を実施し, $0.62 \pm 0.03\%$, $0.32 \pm 0.04\%$ という結果を得た. 以上の結果は Table 3 に示した.

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

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

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

C-2-c) クミン種子中の cuminaldehyde の定量

Cuminaldehyde 標準品中の cuminaldehyde の定量を ^1H -qNMR 法でおこなった結果, $92.3 \pm$

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 $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量を実施し、 $0.36 \pm 0.02\% \sim 1.84 \pm 0.06\%$ という結果を得た。以上の結果は Table 2 に示した。

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 $0.36 \sim 1.84\%$ 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-d) フェネグreek 種子中の trigonelline の定量

単離によって得られた trigonelline 標準品中の trigonelline の定量を $^1\text{H-qNMR}$ 法でおこなった結果、 $71.3 \pm 0.3\%$ と見積もられた。

生薬粉末中の trigonelline の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量では、フェネグreek 種子 1 サンプルとコーヒー種子 2 サンプルについて方法 1 と方法 2 を比較した。その結果、方法 1 ではフェネグreek 種子中の trigonelline が $0.39 \pm 0.03\%$ 、コーヒー種子中では $0.27 \pm 0.02\%$ と $0.39 \pm 0.04\%$ 、方法 2 ではフェネグreek 種子中の trigonelline が $0.38 \pm 0.00\%$ 、コーヒー種子中では $0.29 \pm 0.02\%$ と $0.39 \pm 0.01\%$ という結果を得た。(Table 2) 方法 1 と 2 でほぼ同じ数値が得

られた。方法 2 でフェネグreek 種子をもう 1 サンプル測定したところ、 $0.36 \pm 0.01\%$ という結果が得られた。

フェネグreek 種子を素材とする既存添加物での試験はできなかったが、フェネグreek 種子の抽出物での試験結果、trigonelline を指標としてフェネグreek 種子由来の品質の確認ができることがわかった。また、methanol で抽出した上清を集めて作成した抽出物で定量した方法 1 の結果と、DMSO で抽出した上清で定量した方法 2 の結果とがほぼ同じであったことから、より簡便な方法 2 でも十分定量が可能であることがわかった。HPLC との同等性については検討を始めたところであるので、今後、HPLC 法での結果との比較を確認し、 $^1\text{H-qNMR}$ 法が HPLC より簡便で同等の結果が得られる方法であることを確かめる。

C-2-e) $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた piperine の定量

Piperine (Fig. 5) の NMR を各種溶媒で測定したところ、いずれの溶媒でもいくつかのプロトンシグナルが独立したシグナルとして観測された。その中でも、特に pyridine-*d*₆ 中で測定した場合、7.52 ppm に観測された 3 位にあたるカルボニル基 α 位のオレフィンプロトンシグナル [5] が piperine、コショウ種子粉末、ヒハツ種子粉末のいずれのスペクトルでも他のシグナルと離れて観測された。(Fig. 15) このシグナルを用いて定量を行った結果、市販の試薬の純度は 98.4% と見積もられた。

Piperine の定量では、試薬としての piperine を $^1\text{H-qNMR}$ 法で定量できることは確認できた。生薬としてのコショウ粉末の抽出物の NMR を測定したところでは、piperine の 3 位シグナルを独立したシグナルとして観測することができた。また、既存添加物の素材ではないが、健康食品などに用いられる香辛料であるヒハツ種子の抽出物でも 3 位シグナルを独立したシグナルとして観測され、 $^1\text{H-qNMR}$ 法で定量可能であることが示唆された。いずれもまだ実験回数が足りないため、今後、ばらつきなどのチェックと、さらに HPLC との同等性について検討を行う予定である。

D. 結論

1) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量では、¹H-qNMR 法で値付けされた標準の carthamin の溶液を用いて HPLC の検量線を作成、微量の含有率の carthamin を HPLC にて正確に定量する方法を確立した。¹H-qNMR 法による carthamin の定量は、昨年までの研究で確立した方法で、認証標準物質の 1,4-BTMSB-d₄ を内部標準として用い、pyridine-d₅ 溶液と carthamin の溶液を混合して ¹H-qNMR を測定し、carthamin の 16 位 H のシグナル (δ 9.15 ppm) を積分値から算出する方法を有効に活用した。また、¹H-qNMR 法で値付けされた試料をもとに carthamin の各種溶媒での吸光係数の検証をすることができた。

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

3) 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 ¹H-qNMR 法を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。

4) フェネ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を示す化合物が trigonelline で、そのシグナルは 2 位プロトン (DMSO-d₆ 中で 9.16 ppm) のものであると帰属した。フェネグリーク種子粉末中の trigonelline の定量条件を確立した。「香辛料抽出物」のうちフェネグリークを主な基原とする「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 trigonelline を対象として、その ¹H-qNMR 法を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。

5) コショウなどの辛味成分である piperine の

定量が 3 位プロトン (pyridine-d₅ 中で 7.52 ppm) を用いて可能であることを示した。コショウを基原とする「香辛料抽出物」の規格基準の策定ができる可能性を示した。

E. 参考資料

- [1] Mizukami ら, *Chem. Pharm. Bull.*, **61**(12), 1264-1268 (2013).
- [2] Kazuma ら, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 1588-1599 (2000).
- [3] Morimoto ら, *Jpn. J. Food Chem.*, **5**(2), 236-238 (1998).
- [4] Wu, T-S. ら, *Chem. Pharm. Bull.*, **53**(3), 347-349 (2005).
- [5] Sakpakdeejaroen I. ら, *J. Health Res.*, **23**(2), 71-76 (2009).

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka R, Inagaki R, Sugimoto N, Akiyama H, Nagatsu A: Application of a quantitative ¹H-NMR (¹H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen, *J. Nat. Med.*, **71**(1), 315-320 (2017).
- 2) 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**(3), 105-112 (2018).
- 3) 政田さやか, 水野沙稀, 小谷彩加, 藤原裕未, 内山奈穂子, 袴塚高志, 永津明人: ピペリン及びモノグルコシルヘスヘペリジンを機能性関与成分とする機能性表示食品の製剤学的品質評価と溶出試験法の検討: *日食化誌*, **26**(3), 147-152 (2019).

2. 学会発表

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

未, 永津明人, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子,
「定量NMR(¹H-qNMR)を応用した生薬コウカ中の
carthamin の定量」, 日本薬学会第 138 年会,
27PA-am205, 2018 年 3 月 (金沢)

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

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

5) 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(¹H-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 年 6 月
(横浜)

6) 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 年 6 月 (名
古屋)

7) 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 年 9 月 (広島)

8) 水野沙稀, 藤原裕未, 内山奈穂子, 袴塚高志,
永津明人, 政田さやか: 機能性表示食品の品質評
価に関する研究(5): イチョウ葉エキスに由来す
る機能性表示食品の崩壊性と溶出性について.
第 8 回食品薬学シンポジウム 2019 年 10 月 (静
岡)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

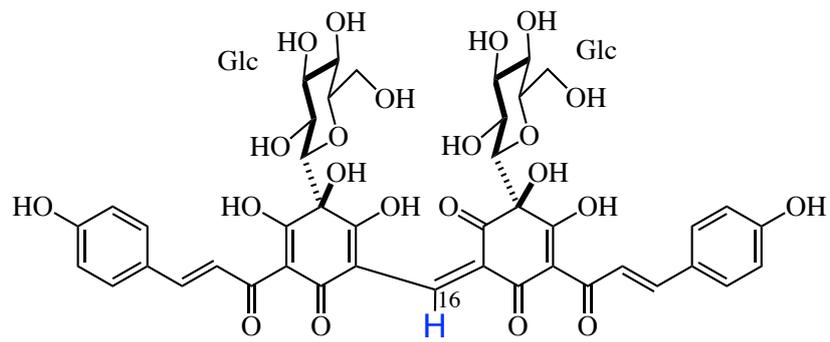


Fig. 1 Carthamin の構造

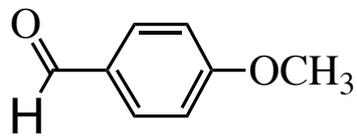


Fig. 2 Anisaldehyde の構造

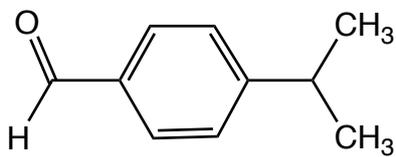


Fig. 3 Cuminaldehyde の構造

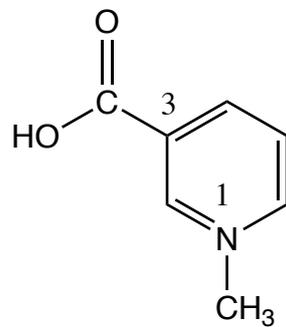


Fig. 4 trigonelline の構造

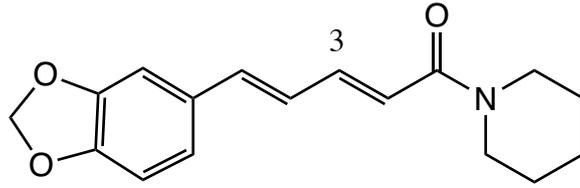


Fig. 5 piperine の構造

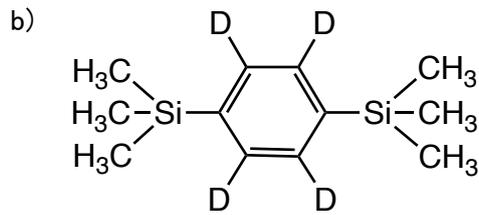
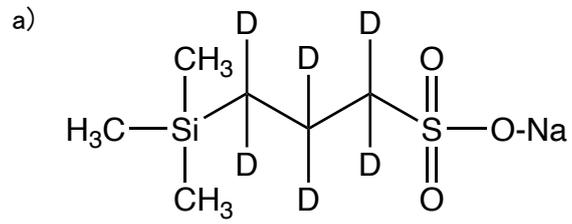


Fig. 6 定量用の認証標準物質

a) DSS- d_6 , b) 1,4-BTMSB- d_4

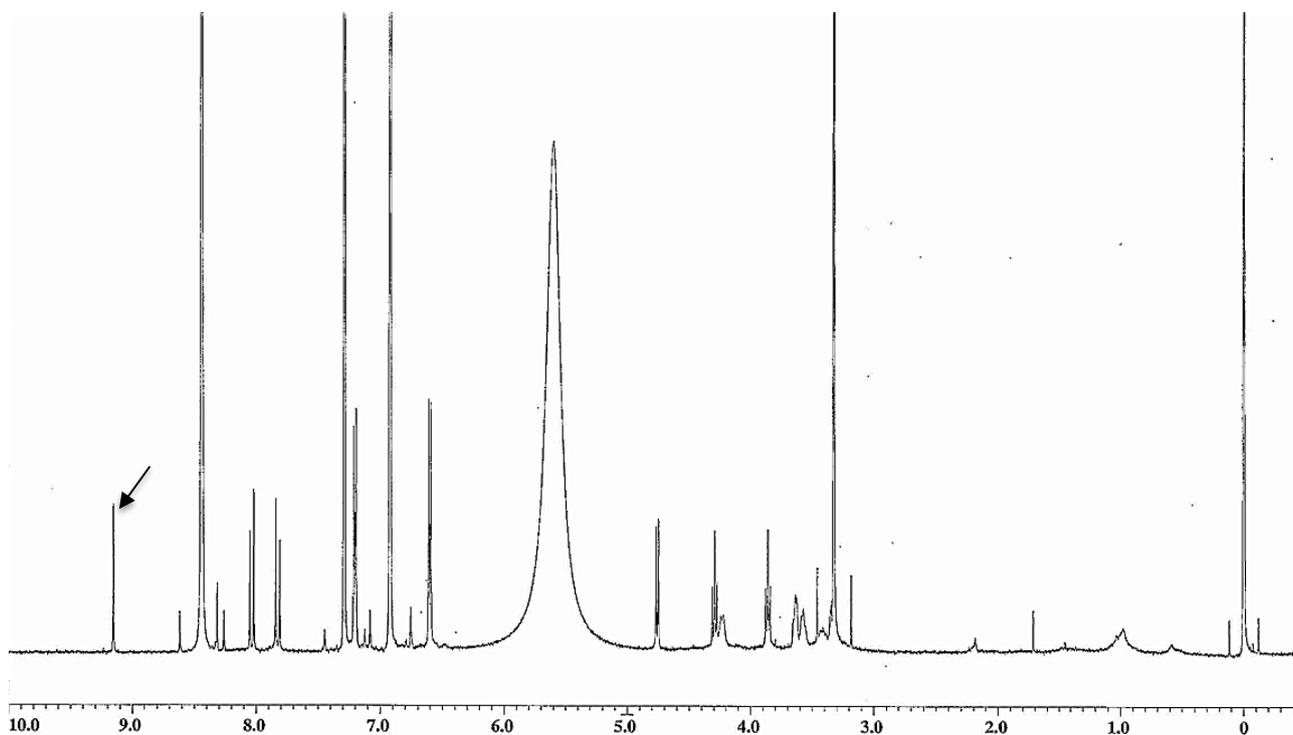


Fig. 7 単離した carthamin の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)
矢印のシグナルが carthamin の 16 位 H のシグナル (δ 9.15 ppm)

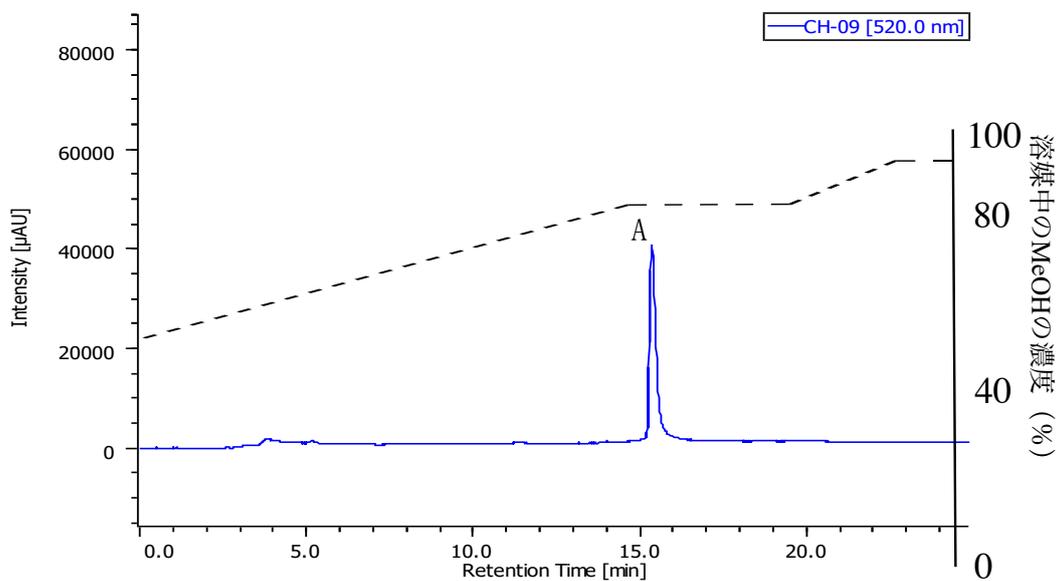


Fig.8 標準とした Carthamin の HPLC クロマトグラム
 A: 検出波長 520 nm における carthamin のピーク

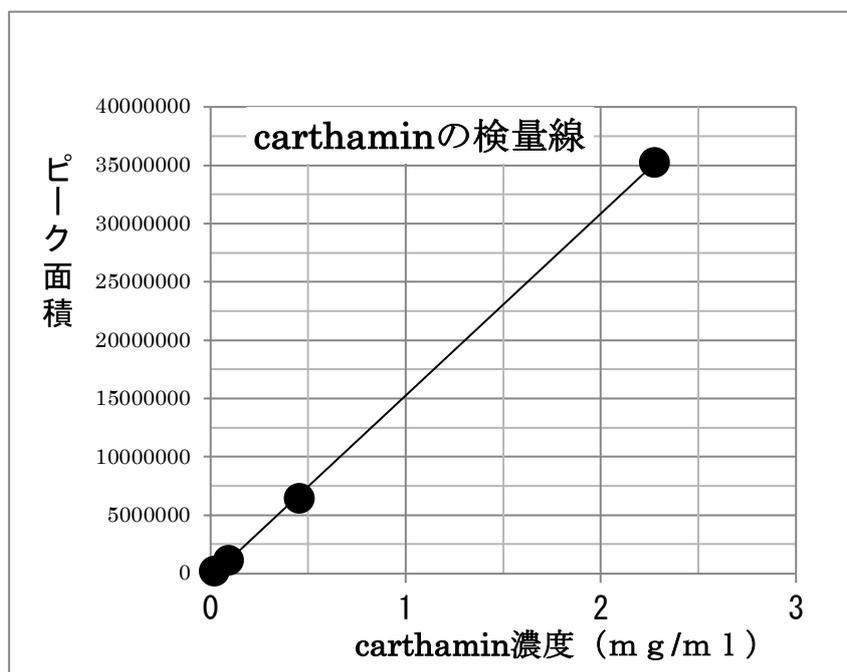


Fig.9 Carthamin の HPLC クロマトグラムにおける検量線

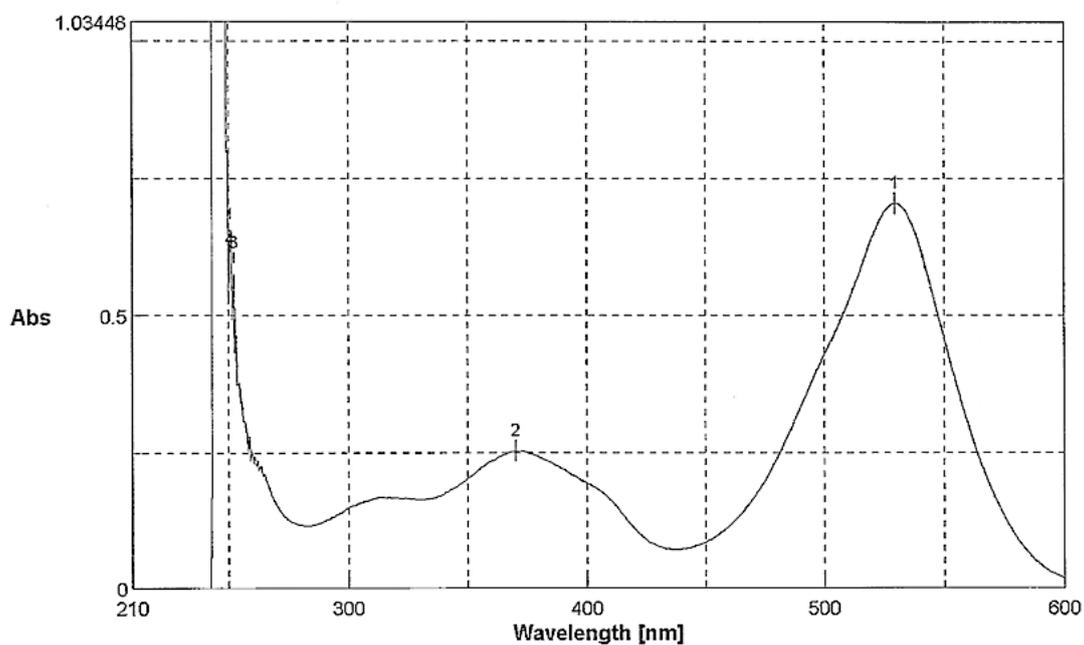


Fig. 10 DMF 中で測定した carthamin の UV スペクトル ($c = 5.80 \times 10^{-6}$ mol/L)

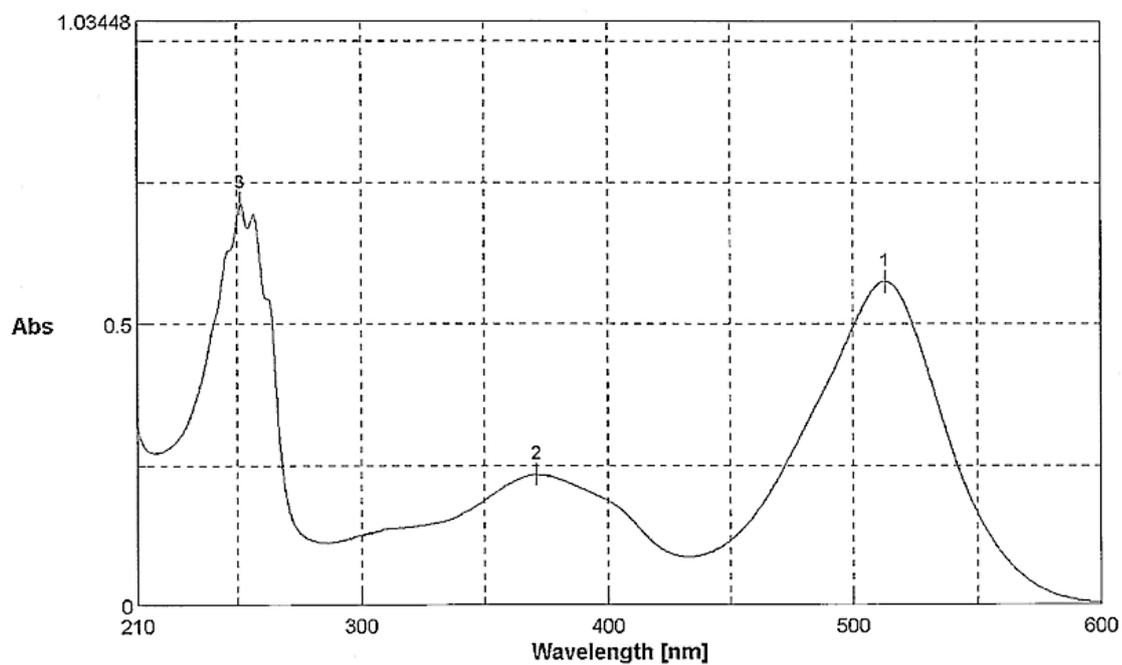


Fig. 11 EtOH 中で測定した carthamin の UV スペクトル ($c = 4.82 \times 10^{-6}$ mol/L)

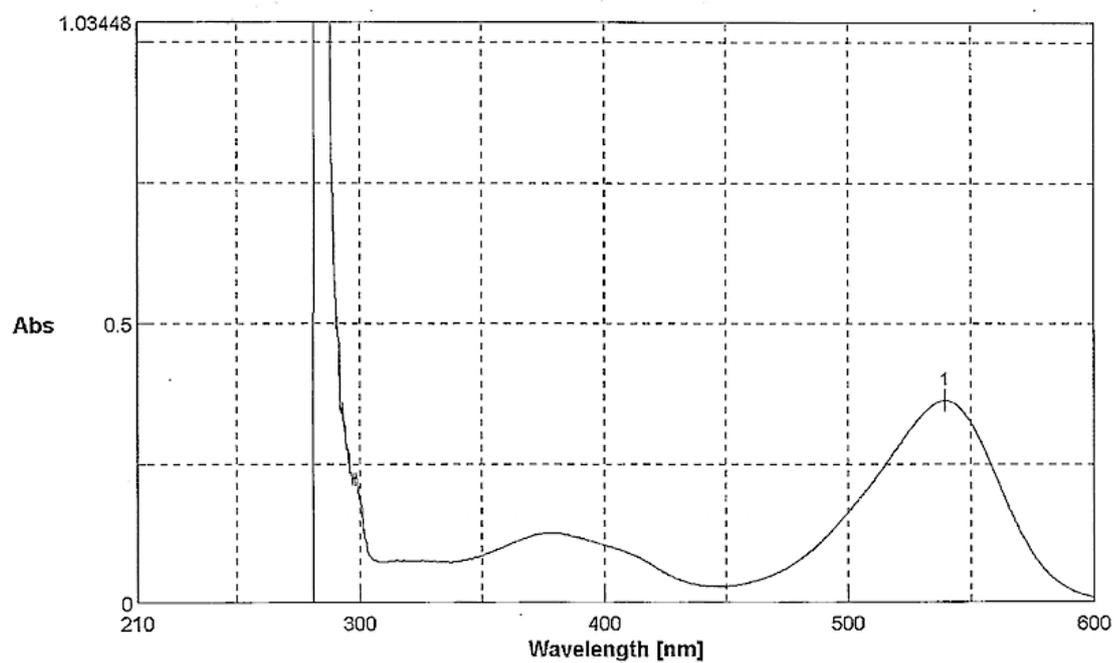


Fig. 12 Pyridine 中で測定した carthamin の UV スペクトル ($c = 2.41 \times 10^{-6}$ mol/L)

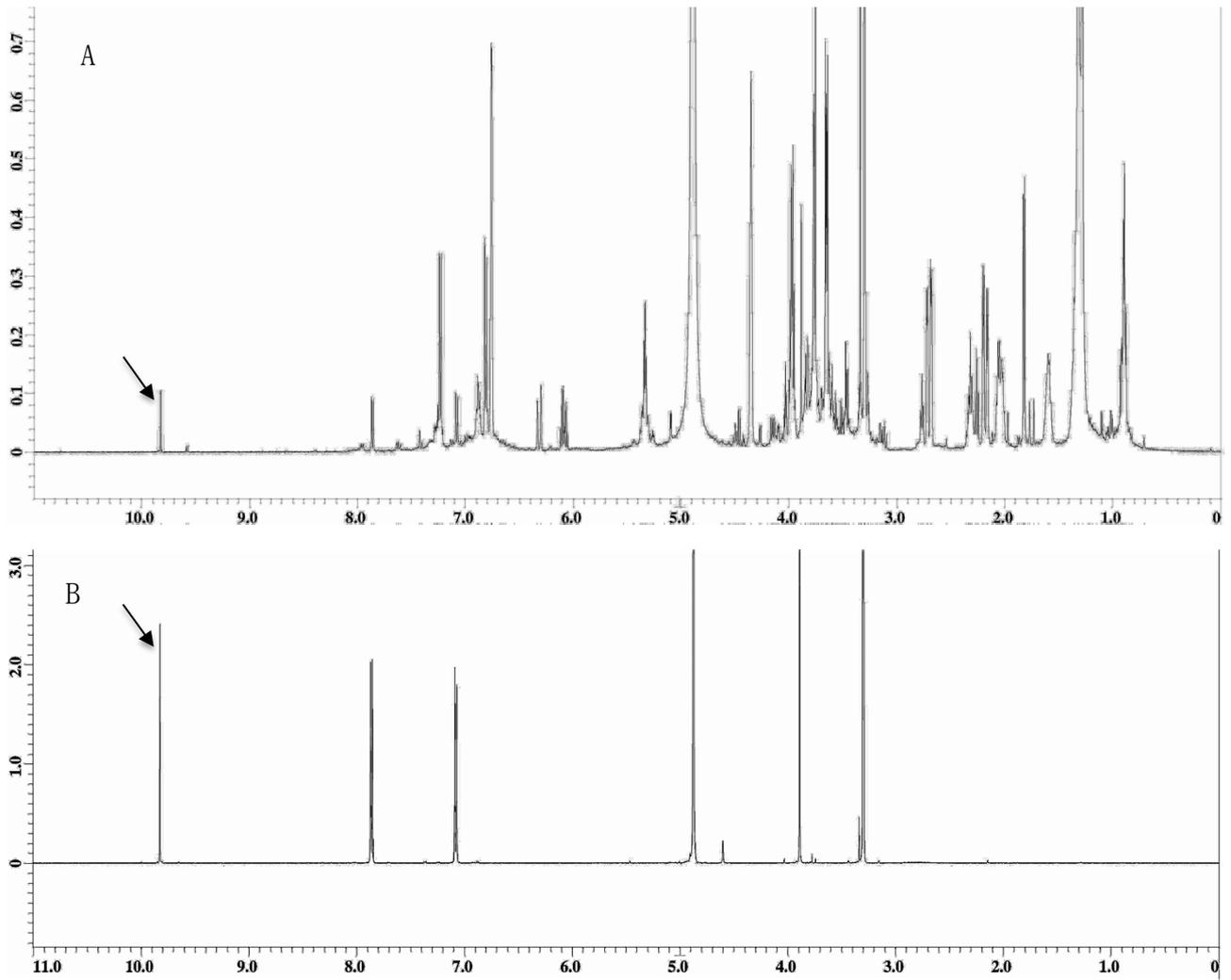


Fig. 13 スターアニス粉末の MeOH 抽出物(A)と anisaldehyde (B) の ¹H-NMR スペクトル
矢印のシグナルが anisaldehyde のホルミル基 H のシグナル (δ9.82 ppm)

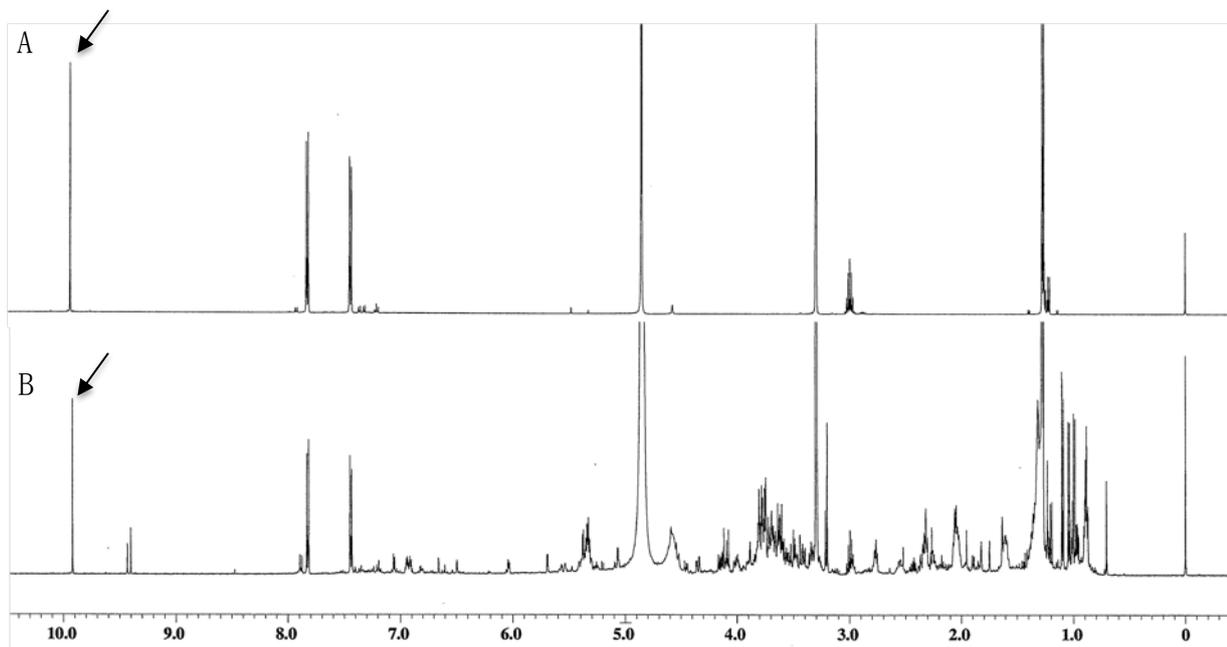


Fig. 14 Cuminaldehyde 標準品(A)とクミン粉末(B)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル ($\text{methanol-}d_3$, 500 MHz)
矢印のシグナルが cuminaldehyde のアルデヒド基の H シグナル (δ 9.92 ppm)

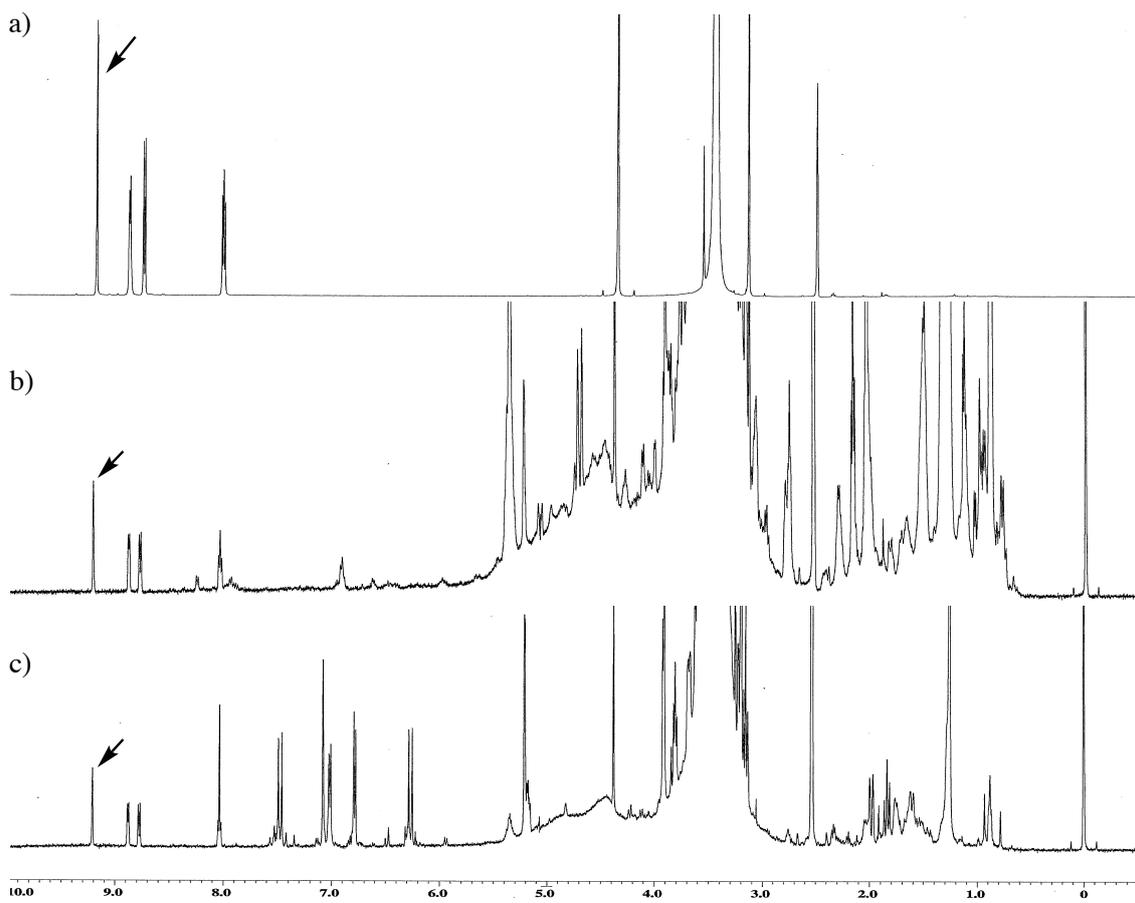


Fig. 15 a) trigonelline と b)フェネグreek種子抽出物と c)コーヒー種子抽出物の ¹H-qNMR スペクトル (in DMSO-*d*₆)
 矢印は trigonelline の 2 位プロトンのシグナル.

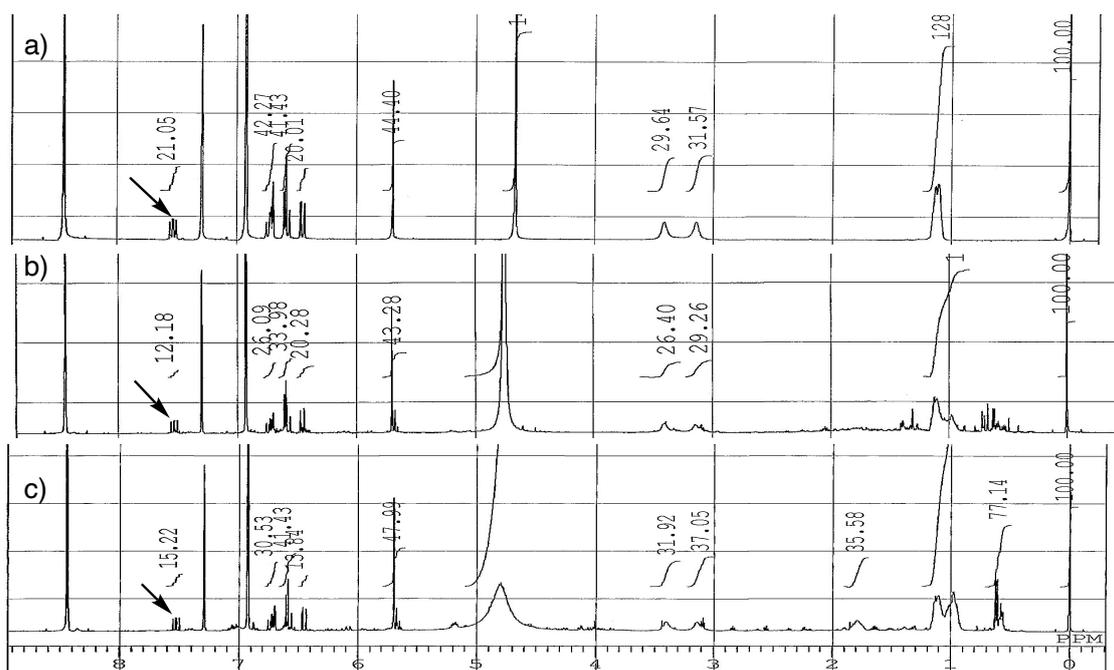


Fig. 16 a) piperine と b) コショウ種子抽出物 と c) ヒハツ種子抽出物の ^1H -qNMR スペクトル (in $\text{pyridine-}d_5$)

矢印は piperine の 3 位プロトンのシグナル.

Table 1 ¹H-qNMR スペクトルの測定条件

分光計	日本電子 ECA500
観測範囲	-5 ~ 15 ppm
データポイント数	32000
フリップアングル	90°
パルス待ち時間	60 秒
積算回数	8 回
スピン	なし
プローブ温度	25°C

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

溶媒	今回の値 (λ_{\max})	文献値 (λ_{\max})
DMF	1.21 x10 ⁵ (530 nm)	9.04 x10 ⁴ (530 nm)
EtOH	1.19 x10 ⁵ (513 nm)	4.90 x10 ⁴ (515 nm)
Pyridine	1.48 x10 ⁵ (540 nm)	-

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

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

* 「香辛料抽出物」 B は粉末の試料.

ND : anisaldehyde のシグナルを検出できなかった.

Table 4 ^1H -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 5 単離した trigonelline の NMR スペクトルデータ

(in DMSO-*d*₆, δ_C : 125 MHz, δ_H : 500 MHz)

No.	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	HMBC (H→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
N-CH ₃	47.8	4.34 (3H, s)	144.7, 146.1
CO ₂ H	162.3		

Table 2 ¹H-qNMR 法で定量された trigonelline の含有率

samples		含有率(%)±SD			
単離した trigonelline		(n=3)	71.3 ±0.3		
			方法 1	方法 2	
フェネグリーク種子粉末	1	(n=3)	0.39 ±0.03	0.38 ±0.00	
	2	(n=3)		0.36 ±0.01	
コーヒー種子粉末	1	(n=3)	0.27 ±0.02	0.29 ±0.02	
	2	(n=3)	0.39 ±0.04	0.39 ±0.01	

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

～¹H-qNMR および相対モル感度を用いた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ならびに試験法が未設定である既存添加物の分析法の確立を目的に、ラカンカ抽出物、酵素処理ナリンジンを対象に検討を行った。まず、ラカンカ抽出物では、主成分であるモグロシドVの定量では、¹H-qNMRとLCを組み合わせた相対モル感度(RMS)法によりカフェインからモグロシドVの含量を正確かつ安価に定量できることが明らかとなった。また、酵素処理ナリンジンでは、RMS法により、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。さらに、グルコアミラーゼによる前処理を伴う方法により、ナリンジンおよびNaringin-Gの含量およびα-グルコシル残基量から正確な酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体の含量の算出が可能であることが明らかとなった。

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¹⁾。このため、LC等の相対定量法では、試薬メーカーの標準品が一般的に利用されている。しかし、この純度は自社規格により保証されたもの、すなわち計量学的に正確とは言えず、結果として定量値の信頼性が損なわれる可能性を否定できない。また、天然由来成分の場合、定量用標品が販売されていないまたは販売されていたとしてもコストの面から供給が中止される可能性も考えられる。このように、食品添加物特に既存添加物を対象とした場合、

製品の品質の保証の観点から、このような問題を克服でき、かつ分析技術の進歩を考慮した信頼性の高い規格試験法の確立が急務と考えられる。

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

with Internal reference material) と呼ばれ、残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬などの純度分析^{4,5,6)}、生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析^{7,8,9)}へ利用されている。また、最近では、計量計測トレーサビリティを確保した¹H-qNMR と汎用性、普及性、分離性能が高いクロマトグラフィーを組み合わせた測定対象物質と同一の定量用標品を必要としない相対モル感度 (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¹⁰⁻¹⁴⁾。

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、ラカンカ抽出物および酵素処理ナリンジンを対象に、¹H-qNMR および¹H-qNMR とクロマトグラフィーを組み合わせた相対モル感度 (RMS) 法等を用いた分析法の確立について検討した。

B. 研究方法

B-1) 試薬等

3種のラカンカ抽出物のうち、サンナチュレ M30 (Lot.170526-01) (試料 1) およびサンナチュレ M50 (Lot.170621-01) (試料 2) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社よりご供与いただいた。ラカンカ抽出物 (羅漢果精製物) (Lot.G20030116) はサラヤ株式会社製 (試料 3) を用いた。モグロシド V は、和光純薬工業株式会社製標準品 (Lot.TWM3866) を用いた。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。D-グルコース定量用発色試薬は富士フイルム和光純薬 (株) 製グルコース CII-テストワコーを使用した。

2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate-*d*₆ sodium salt (DSS-*d*₆) は和光純薬工業株式会社製標準物質 (Cat. No.044-31671, Lot.No.ECL6585, 純度 92.3%, 拡張不確かさ : 0.8%) を用いた。重水 (D₂O) は関東化学製を用いた。その他溶媒は高速液体クロマトグラフィー用または特

級を用いた。

試液は以下のように調製した。

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

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。

B-2) 装置

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

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)。

分取用 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) ¹H-qNMR によるモグロシド V の定量

B-3-1) ¹H-qNMR によるモグロシド V 標準品の純度測定

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

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

ただし、 I_{sample} =モグロシド V の特定基のシグナル面積強度、 I_{std} =内標準物質のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.000)、 H_{sample} =モグロシド V の特定基の水素数、 H_{std} =内標準物質の特定基の水素数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3 = 9$)、 M_{sample} =モグロシド V の分子量、 M_{std} =内標準物質の分子量 (DSS- d_6 : 224.36)、 W_{sample} =モグロシド V の秤取量 (mg)、 C_{std} = ^1H -qNMR 標準溶液の DSS- d_6 濃度

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

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

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

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

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

ただし、 I_{sample} =試料中のモグロシド V の特定基のシグナル面積強度、 I_{std} =内標準のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.000)、 H_{sample} =試料中のモグロシド V の特定基の水素数、 H_{std} =内標準物質の特定基の水素数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3 = 9$)、 M_{sample} =試料中のモグロシド V の分子量 (1287.43)、 M_{std} =内標準物質の分子量 (DSS- d_6 : 224.36)、 W_{sample} =試

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

B-3-3) LC による各ラカンカ抽出中のモグロシド V の定量

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

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

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

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

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

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

純度 (%) である。

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

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

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

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

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

B-4-2) カフェインに対するモグロシド V の RMS の算出

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

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

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

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

B-4-3) RMS を用いたラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

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

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

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

B-5) 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-5-1) 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 α -Glycosyl naringin (Naringenin 7-*O*-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (**Naringin-G**, 8.4 mg), Fr.F より Naringenin 7-*O*-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (**Naringin-2G**, 15 mg), Fr.E より Naringenin 7-*O*-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (**Naringin-3G**, 9.0 mg) および Naringenin 7-*O*-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -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、 α -Glycosyl naringin (**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 μ m 野村化学株式会社製), カラム温度：45 $^{\circ}$ 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 μ m, 野村化学 (株) 製), カラム温度：45 $^{\circ}$ 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-5-2) 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_{sample} =測定対象の特定基のシグナル面積強度, I_{std} =内標準物質のシグナル面積強度 (DSS-*d*₆: 9.000), H_{sample} =測定対象の特定基の水素数, H_{std} =内標準物質の特定基の水素数 (DSS-*d*₆:CH₃ \times 3=9), M_{sample} =測定対象の分子量, M_{std} =内標準物質の分子量 (DSS-*d*₆: 224.36), W_{sample} =測定対象の秤取量 (mg), C_{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 (δ 0 ppm) とし, δ 値を ppm 単位で表した。また, データの解析は, フーリエ変換から含量の算出までを自動処理できる Alice 2 for qNMR “ピュアリティ” (日本電子 (株)) を用いた。

B-5-3) 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 μ mol/L, Naringin-G: 1.1~91 μ mol/L, Naringin-2G: 0.9~76 μ mol/L, Naringin-3G: 1.3~107 μ mol/L, Naringin-4G: 1.1~88 μ mol/L, 4-ヒドロキシ安息香酸: 5.8~93 μ 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 μ m, 野村化学 (株) 製), カラム温度：45 $^{\circ}$ 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 μ 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-5-4) ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS の算出

B-5-3 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-5-5) 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 μ 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 μ g/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 μ g/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 mg/mL, 55 μ mol/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 μ g/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 μ g/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 mg/mL, 53 μ mol/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 μ 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 20vol%アセトニトリル, 注入量: 10 μ 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_{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_{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_{T} は試験溶液 1 mL あたりの試料の量 (mg), C_{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_{Sample} は測定対象の分子量, M_{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-5-6) 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-5-5 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 μ g/mL, Naringin-G: 0.85 ~ 68 μ g/mL, Naringin-2G: 0.86 ~ 68 μ g/mL, Naringin-3G: 1.4 ~ 114 μ g/mL, Naringin-4G: 1.3 ~ 108 μ g/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 (μ g/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 (μg)、Vは試験溶液の量 (mL)、Wは試料の採取量 (mg) である。

B-5-7) 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、α-Glycosylnaringin、α-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-5-7-1) 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系吸着用樹脂 (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ナリンジンおよび 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 μL ずつ量り、B-5-3 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 並びに標準溶液のナリンジンまたは 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。

① ナリンジンを定量用標品とする場合
ナリンジン含量：

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

Naringin-G 含量：

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

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。

② Naringin-G を標品とする場合

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-5-7-2) グルコアミラーゼ処理により遊離する α-グルコシル残基量の定量

B-5-7-1 の項で得られた A 液 20 μL 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 μL 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 α -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 (μg)、V は試験溶液の量 (50 mL)、W は試料の採取量 (mg) である。

B-5-7-3) 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 (%)
= ナリンゲニン含量 (%) + α -Glycosyl naringin 含量 (%) + グルコアミラーゼ処理により遊離した α -グルコシル残基量 (%)

C. 結果及び考察

C-1) $^1\text{H-qNMR}$ によるラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

C-1-1) $^1\text{H-qNMR}$ によるモグロシド V 標準品の定量

$^1\text{H-qNMR}$ 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と言える。そこで、本法のモグロシド V 分析への適用性を明らかにするため、市販標準品について 3 併行で $^1\text{H-qNMR}$ 測定を行った。通常、 $^1\text{H-qNMR}$ では、定量性を確保した条件を用いる必要が

ある。代表的な測定条件を表 1 に示す。本研究では、この測定条件を用いて $^1\text{H-qNMR}$ 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 : δ 0 ppm) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。その結果、図 2 に示すように、 $^1\text{H-qNMR}$ 測定により得られたモグロシド V の $^1\text{H NMR}$ スペクトル上、 δ 0.8~3.0 ppm 付近には、アグリコンに由来する飽和炭化水素のシグナル群、 δ 3.2~5.0 ppm 付近には、糖部に由来する水素シグナル群がそれぞれ観察された。しかし、これらの領域に観察されたシグナル群は、分子内の他のシグナルと部分的または全体的に重なるため、定量における適切な積分範囲の設定が困難と考えられた。一方、 δ 5.57 ppm に観察された 6 位に由来する水素シグナルは、他の分子内のシグナルと十分に分離されていたため、モグロシド V の定量用シグナルとして適当と考えられた。そこで、このシグナルより純度を算出したところ、92.1% と算出された。また、このシグナルから算出された定量値の相対標準偏差 (RSD) は 0.2% と良好であった。

C-1-2) $^1\text{H-qNMR}$ によるラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

ラカンカ抽出物 3 種について、 $^1\text{H-qNMR}$ によるモグロシド V の含量測定を行い ($n=3$)、得られた結果を LC 法 ($n=3$) と比較した。なお、 $^1\text{H-qNMR}$ では、スペクトル上のモグロシド V 由来のシグナルと夾雑物のシグナルとの分離度などを考慮して、前項で示した δ 5.57 ppm (6 位) を用いてモグロシド V 含量を算出した。各ラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量を表 2、各抽出物の $^1\text{H NMR}$ スペクトルを図 3~5、LC クロマトグラムを図 6~8 にそれぞれ示した。表 2 に示すように、 $^1\text{H-qNMR}$ から算出されたモグロシド V の含量値は、LC より得られた含量値と比較して 6~13% 程度高い結果となった。そこで、試料 2 を用いて 2 次元 NMR 測定 (HMBC, HMQC) を行い、分子内の炭素と 6 位の水素との相関を確認したところ、HMQC では、6 位の炭素シグナルのみ、HMBC では 2~3 結合離れたモグロシド V の

炭素との相関が観察されたものの、他の化合物に由来すると考えられる相関は観察されなかった。Chaturvedulaらは、ラカンカより調製したラカンカ抽出物（50 g中）には、モグロシド類としてモグロシドVのほかモグロシドIVa, モグロシドVIなど、モグロシドVと共通のアグリコン（モグロール, Mogrol）をもつものや11位のヒドロキシ基がオキソ基に置換した11-オキソ-モグロシドVなどが存在することを報告している¹⁵⁾。これらのアグリコンの化学構造を考慮すると、モグロシドVの6位の水素シグナルは他のモグロシド類の6位の水素シグナルと十分に分離できず、結果として定量値が過大になったものと推測された。

C-2) RMSによるラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量

C-1-2で示したように、ラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量において、他の類縁物質との分離度との兼ね合いから前処理を伴わない¹H-qNMRでは定量が困難であることが確認された。そこで、この問題を解決する方法として、相対感度係数（Relative Response Factor, RRF）を用いた分析法に着目した。この方法は、基準物質に対する測定対象化合物のRRFが明らかな場合、基準物質を内標準物質として用い、基準物質および測定対象化合物の検出器における応答値とRRFの関係から、測定対象化合物と同一の定量用標品を必要としないクロマトグラフィーを利用した定量法である。最近では、¹H-qNMRとクロマトグラフィーを組み合わせ、任意の検出器における化合物間の正確な相対モル感度（Relative Molar Sensitivity, RMS）から測定対象化合物を定量する方法が考案され、食品添加物等への定量に利用されている¹⁰⁻¹⁴⁾。そこで、本項ではこのRMS法による定量法のモグロシドV分析への適用性について検討を行った。

C-2-1) モグロシドVおよびカフェインの¹H-qNMR測定

モグロシドVは、220 nmより短波長側に吸

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

C-2-2) カフェインに対するモグロシドVのRMSの算出

カフェインに対するモグロシドVのRMSを算出するため、3濃度（ 0.319×10^{-3} , 0.639×10^{-3} および 2.56×10^{-3} mol/L）のカフェインにおけるモグロシドVのRMSについて検討した。

なお、検討に使用したモグロシドVは6濃度（ 0.058×10^{-3} ~ 1.86×10^{-3} mol/L）とし、B-4-2に示すLC条件を用いて各濃度に調製したカフェイン・モグロシドV混液を分析し、各カフェイン濃度におけるRMSを算出した。表3、4および5に示すように、各カフェイン濃度より算出されたRMSの結果から、カフェインに対するモグロシドVのRMSは0.122であることが判明した。なお、モグロシドVは検討した濃度範囲において良好な直線性を示した。

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

確認された。

C-2-3) RMS を用いたラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

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

C-3) 酵素処理ナリンジン中ナリンジンおよび糖転位ナリンジンの定量

C-3-1) 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 α -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 14 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 15 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 α -Glycosyl naringin (Naringenin 7-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (**Naringin-G**, 8.4 mg), Fr.F より Naringenin 7-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (**Naringin-2G**, 15 mg), Fr.E より Naringenin 7-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (**Naringin-3G**, 9.0 mg) および Naringenin 7-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (**Naringin-4G**, 7.6 mg) をそれぞれ単離した (図 16)。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 17)。なお、これらの化学構造は質量分析 (ESI, negative) および NMR (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H 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⁻)

ESI-MS (negative)

Naringin-G : m/z 742 (M⁻), Naringin-2G : 904 (M⁻), Naringin-3G : m/z 1066 (M⁻), Naringin-4G : 1228 (M⁻)

C-3-2) ^1H -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¹³⁾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、 ^1H -qNMR を用いることとした。 ^1H -qNMR は、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度とモル濃度の関係から、測定対象化合物の濃度を絶対定量することが可能である。また、計量計測トレーサビリティが確保された標準物質を用いることにより、得られる定量値の

信頼性が大幅に向上した方法である。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¹H-qNMR を行った。なお、化学シフト値は、内標準物質のメチルプロトンシグナルを基準 (DSS-*d*₆: δ 0 ppm) とし、δ 値を ppm 単位で表した。ナリンジンおよび糖転位ナリンジンでは、図 18 に示すように、¹H NMR スペクトル上、δ 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、δ 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、δ 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、δ 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 10 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、δ 3.82 ppm にメトキシ基に由来するシグナル、δ 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)、δ 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 19)。これらのうち、δ 6.87 ppm のシグナルおよび δ 7.84 ppm のシグナルより純度を算出したところ、93.9% (δ 6.87 ppm) および 93.8% (δ 7.84 ppm) 結果となった。このうち、δ 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-3-3) 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 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 μmol/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 20 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 11 に示すように 1.23~1.24 であることが判明した。

C-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

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 12 に示すように 0.994~1.00 であることが判明した。

C-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

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 13 および表 14、各酵素処理ナリンジン製品の LC クロマトグラムは図 21 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等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 15）。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。

C-3-6) ナリンジンおよび Naringin-G を標品とする酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体の定量

前項でも示したように、第 9 版食品添加物公定書における酵素処理ヘスペリジンの成分規格において、総ヘスペレチン配糖体の含量の定量法としてグルコアミラーゼを用いた方法が規定されている。この方法では、試料のグルコアミラーゼ処理後、ヘスペリジン、モノグルコシルヘスペリジン（Hesperidin-G）および遊離した α -グルコシル残基量をそれぞれ定量し、その合算値を総ヘスペレチン配糖体の含量としている。本研究では、この方法を参考に酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体の定量法の確立を試みることにした。なお、総ヘスペレチン配糖体の定量においては、Hesperidin-G のみを定量用標品として用いてヘスペリジンおよび Hesperidin-G の含量を算出するよう規定されている。しかし、

酵素処理ナリンジンにおいて、Hesperidin-G に該当する Naringin-G は市販されていないことから、これを定量用標品とすることは困難である。一方で、ナリンジンは市販されており、比較的安価であることから、定量法標品として使用することには支障がないものと考えられた。そこで、本検討では、B-3-1 に示したように、ナリンジンを定量用標品としてナリンジンおよび Naringin-G を算出する方法（A 法）と酵素処理ヘスペリジンの成分規格に則した Naringin-G を定量法標品としてナリンジンおよび Naringin-G を算出する方法（B 法）の 2 つの方法について検討し、それぞれから得られたナリンジンおよび Naringin-G 含量と遊離した α -グルコシル残基量を合算し、両者の総ナリンゲニン配糖体含量を比較した。試料として、酵素処理ナリンジン製品 2 種を用いて検討を行った結果、図 22 および表 16 に示すように、両法より得られた総ナリンゲニン配糖体含量はほぼ同等であることが判明した。また、A 法の総ナリンゲニン配糖体含量の RSD は 3.1% 以下と良好であった。

D. 結論

本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、ラカンカ抽出物および酵素処理ナリンジンを対象とした $^1\text{H-qNMR}$ による定量および $^1\text{H-qNMR}$ と LC を組み合わせた相対モル感度（RMS）法を用いた定量法について検討を行った。

ラカンカ抽出物では、 $^1\text{H-qNMR}$ 法において、得られた 3 種のラカンカ抽出物中のモグロシド V の含量値は、LC の含量値と比較して 6~13% 程度高い結果を示した。これは、定量に用いた 6 位の水素に由来するシグナルがモグロシド V の類縁物質に由来するシグナルと十分な分離が果たせていないことに起因すると考えられた。他のモグロシド V 由来のシグナルについても、分子内の他のシグナルや夾雑成分に由来するシグナルとの重なりが観察されたことから、前処理を伴わない本法によるモグロシド V の定量は困難であり、前処理等の

更なる検討が必要と考えられた。

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

酵素処理ナリンジンでは、RMS法において、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こと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。

また、酵素処理ヘスペリジンの成分規格において規定されているグルコアミラーゼを用いた方法を参考として検討した提案法(A法)は、酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体の定量法として有用であることが判明した。また、この方法ではNaringin-Gの定量を行う必要があるが、含量の算出においてNaringin-Gとナリンジンの分子量比を計算

式に代入することにより、ナリンジンを定量用標品としてNaringin-Gの定量が可能となることが明らかとなった。これは、ナリンジンに対するNaringin-GのRMSがほぼ1であることから妥当な結論と言える。なお、今回の提案法(A法)におけるグルコアミラーゼによる前処理は、酵素処理ヘスペリジンの他に糖転位ルチン(抽出物)においても成分規格の定量法で採用されており、汎用性の点においても優れていると言え、本法の公的な規格試験法としての採用が期待される。

E. 参考文献

1. Zeleny, R.; Schimmel, H. *TrAC*, **33**, 107-116 (2012).
2. Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hira, T. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
3. Uchiyama, N., Masada, S., Hosoe, J., Hakamatsuka, T., Goda, Y.: Determination of absolute purities of commercial agents used for quantification of functional substances by quantitative NMR analysis. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **24**, 125-130 (2017).
4. Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **16**, 28-33 (2009).
5. Hosoe, J., Sugimoto, N., Goda, Y.: Trial study to determine absolute purities of chemical reagents used as reference standards in the Japanese Pharmacopoeia. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **41**, 960-970 (2010).
6. Tada, A., Takahashi, K., Ishizuki, K.; Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Tahara, M., Akiyama, T., Ito, Y., Yamazaki, T., Akiyama, H., Kawamura, Y., *Chem Pharm Bull.*, **61**, 33-38 (2013).
7. Tanaka, R., Hasebe, Y., Nagatsu, A.. *J. Nat.*

- Med., **68**, 630-635 (2014).
8. Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H.: Quantitative determination of carthamin in *Carthamus Red* by ¹H-NMR Spectroscopy. Chem. Pharm. Bull, **61**, 1264-1268 (2013).
 9. Tada, A., Takahashi, K., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Ishizuki, K., Nishimura, T., Yamazaki, T., Kawamura, Y.: Absolute quantitation of quercetin and the glycosides in natural food additives by quantitative NMR. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **51**, 205-212 (2010).
 10. 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 ¹H-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, sesamolin, 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 ¹H-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).
 15. Chaturvedula, V. S. S., Prakash, I.: Cucurbitane glycosides from *Siraitia grosvenorii*. J. Carbohydr. Chem., **30**, 16-26 (2011).
- F. 研究発表**
- 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 年 3 月, 千葉市)
 2. 松岡聖朗, 大槻崇, 藤裕志郎, 松下明里, 松田美優, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛, 食品化学学会第 25 回総会・学術大会(2019.6.7)(松山市)
 3. 松岡聖朗, 大槻崇, 石附京子, 藤佑志郎, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛: 日本食品科学工学会第 65 回大会 (2019.8.31) (札幌市)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
- なし

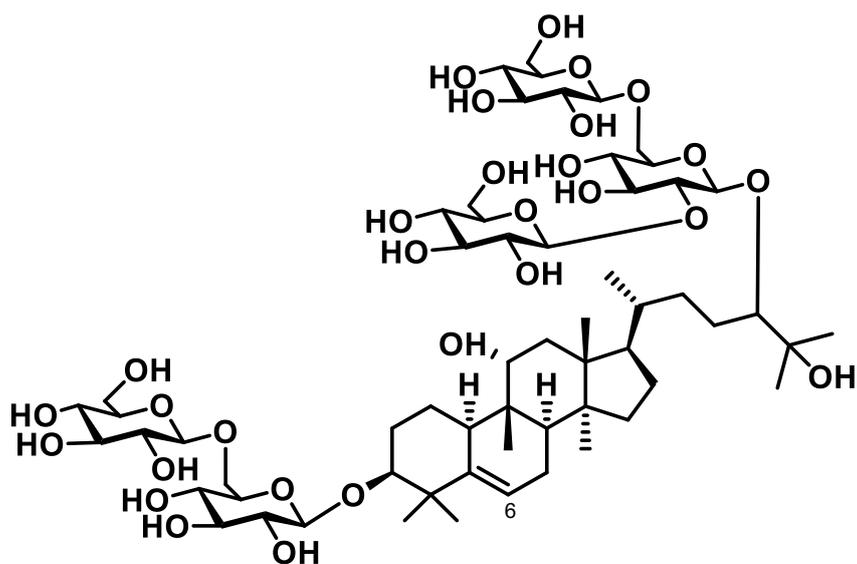


図1 モグロシドVの化学構造

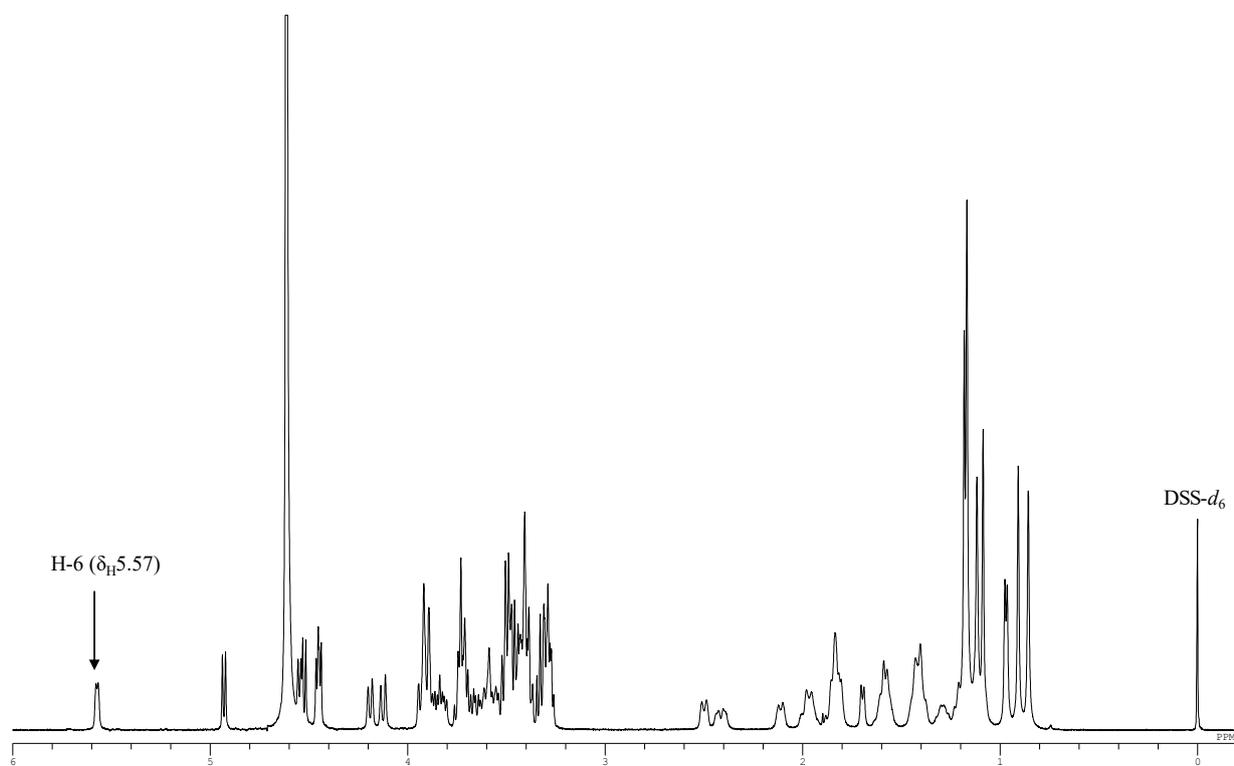


図2 モグロシドVの¹H-qNMR スペクトル

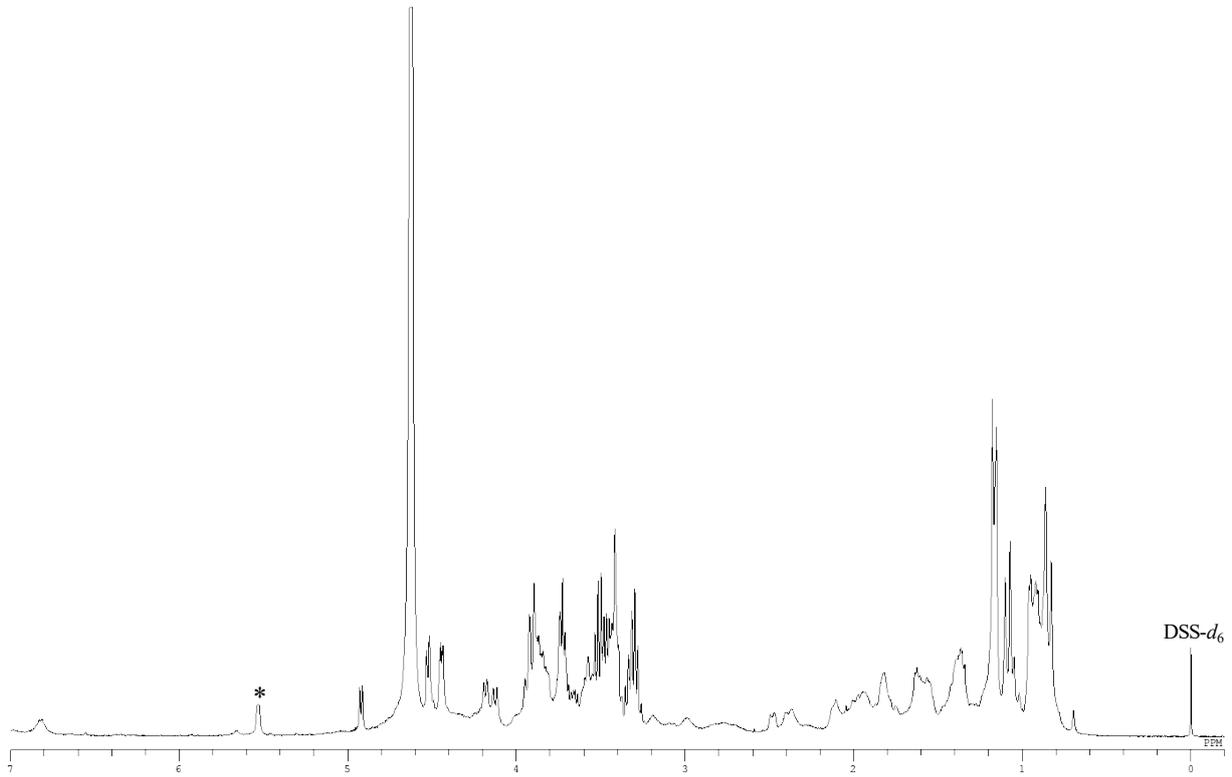


図3 ラカンカ抽出物（試料1）の ^1H -qNMR スペクトル
*：定量用シグナル

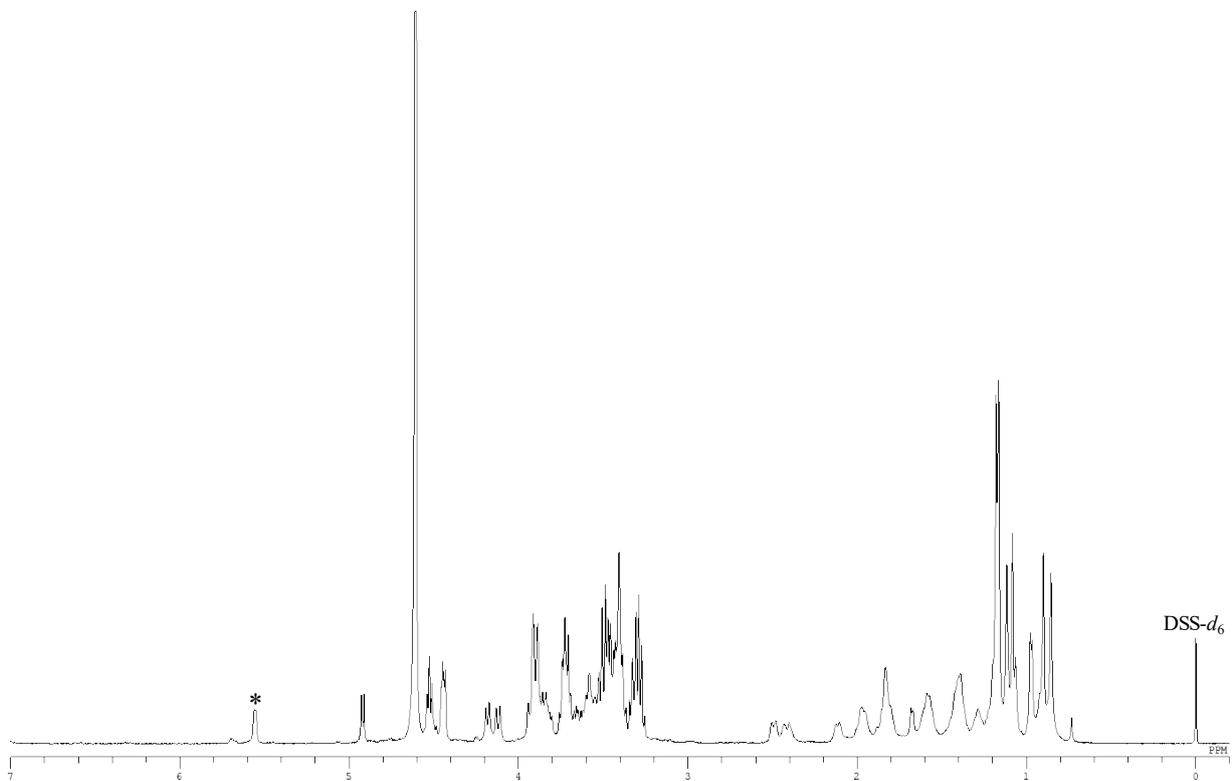


図4 ラカンカ抽出物（試料2）の ^1H -qNMR スペクトル
*：定量用シグナル

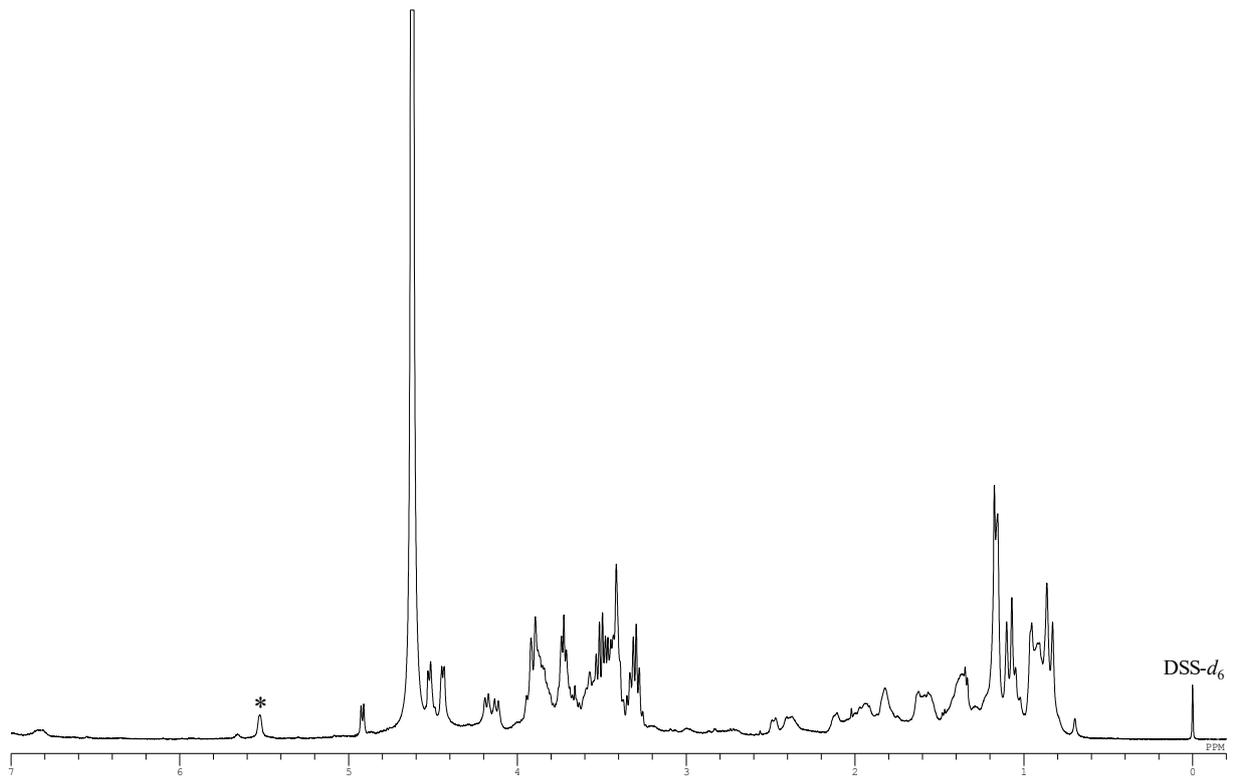


図5 ラカンカ抽出物（試料3）の¹H-qNMR スペクトル
*：定量用シグナル

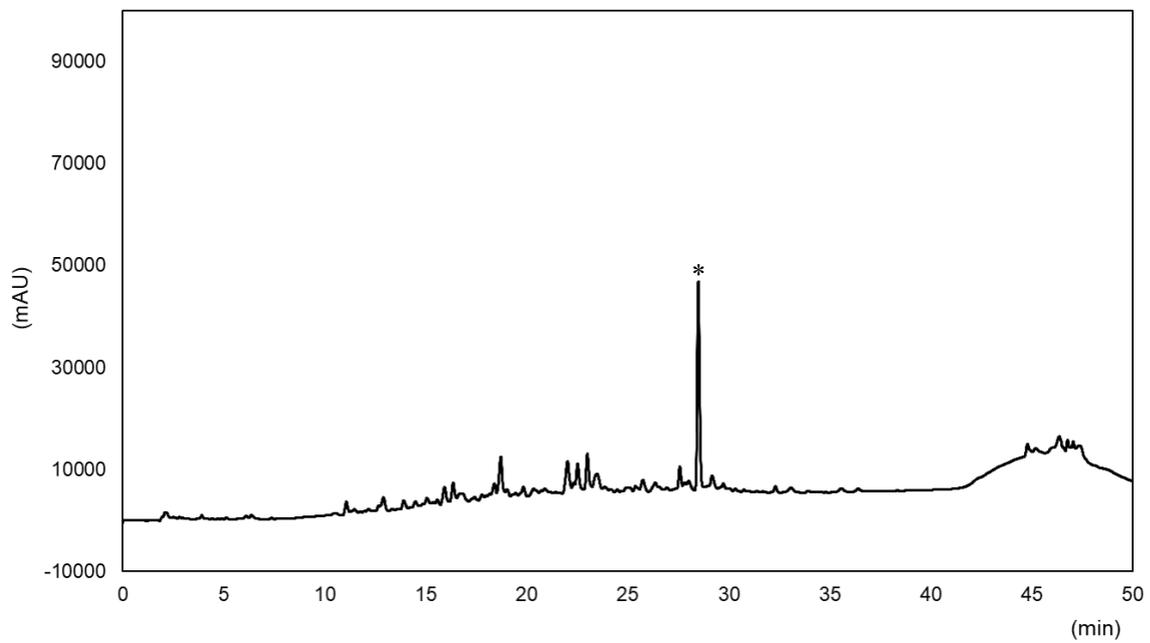


図6 ラカンカ抽出物（試料1）のLCクロマトグラム
*：モグロシドV

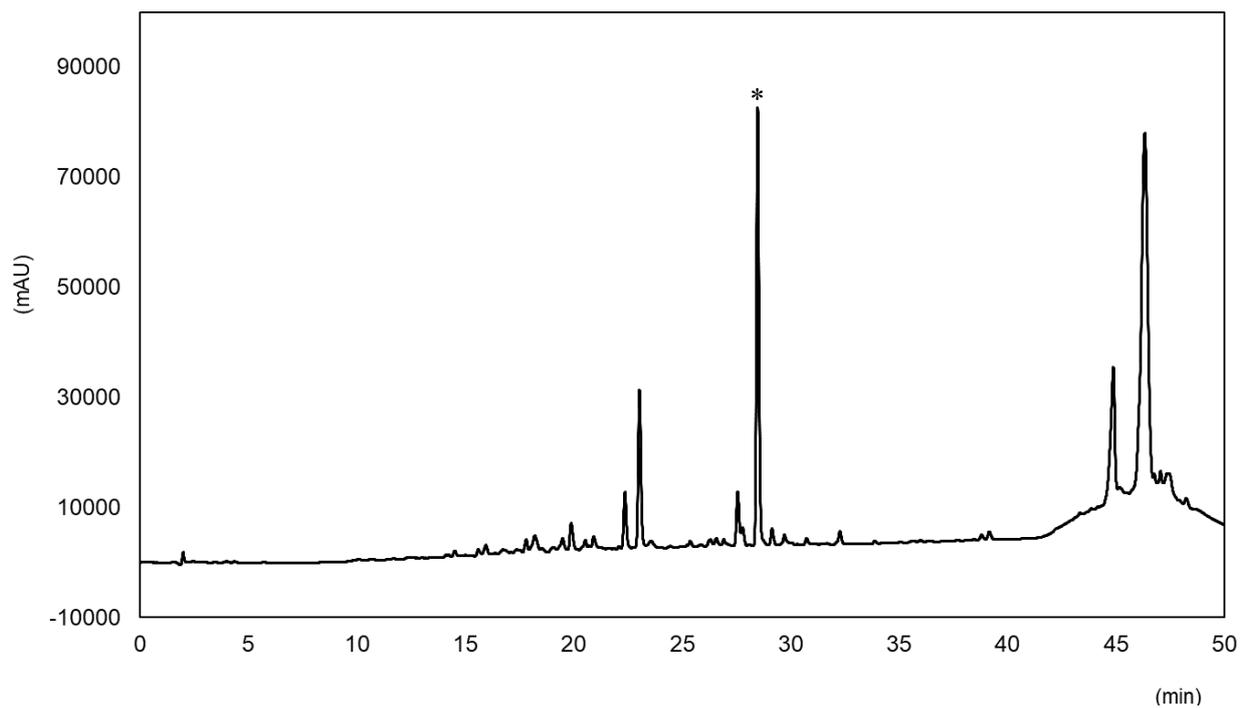


図7 ラカンカ抽出物（試料2）のLCクロマトグラム
*：モグロシドV

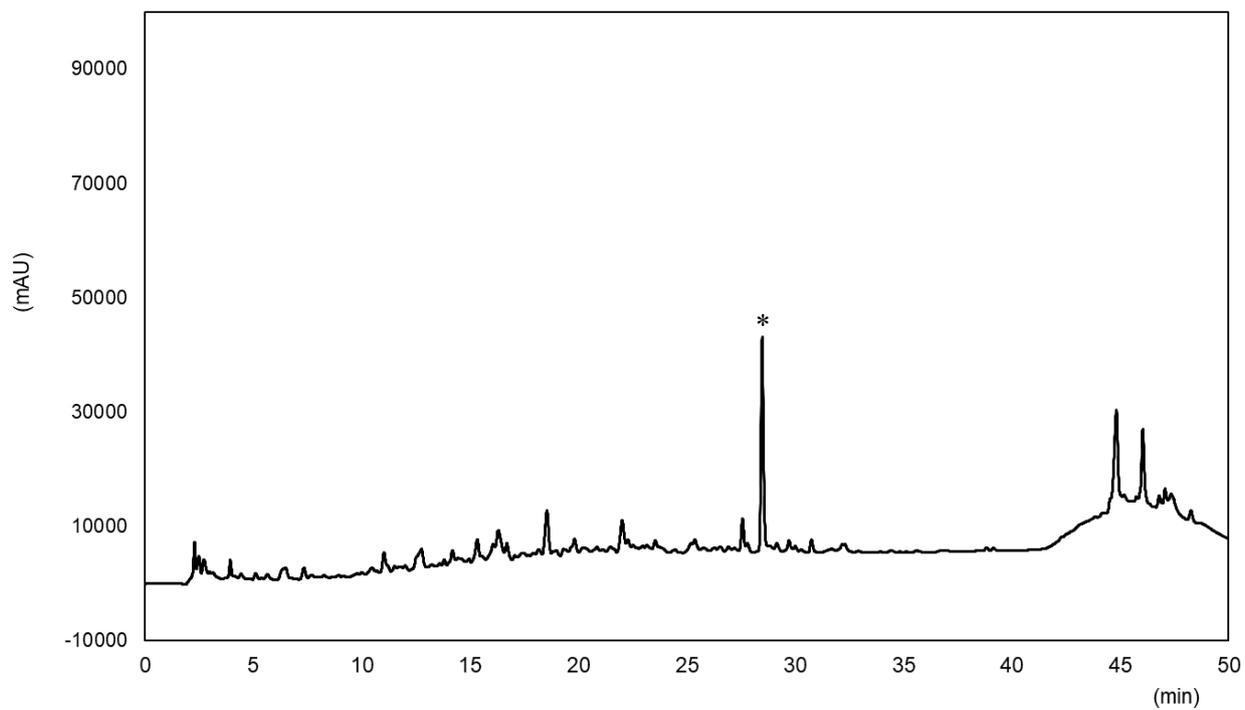


図8 ラカンカ抽出物（試料3）のLCクロマトグラム
*：モグロシドV

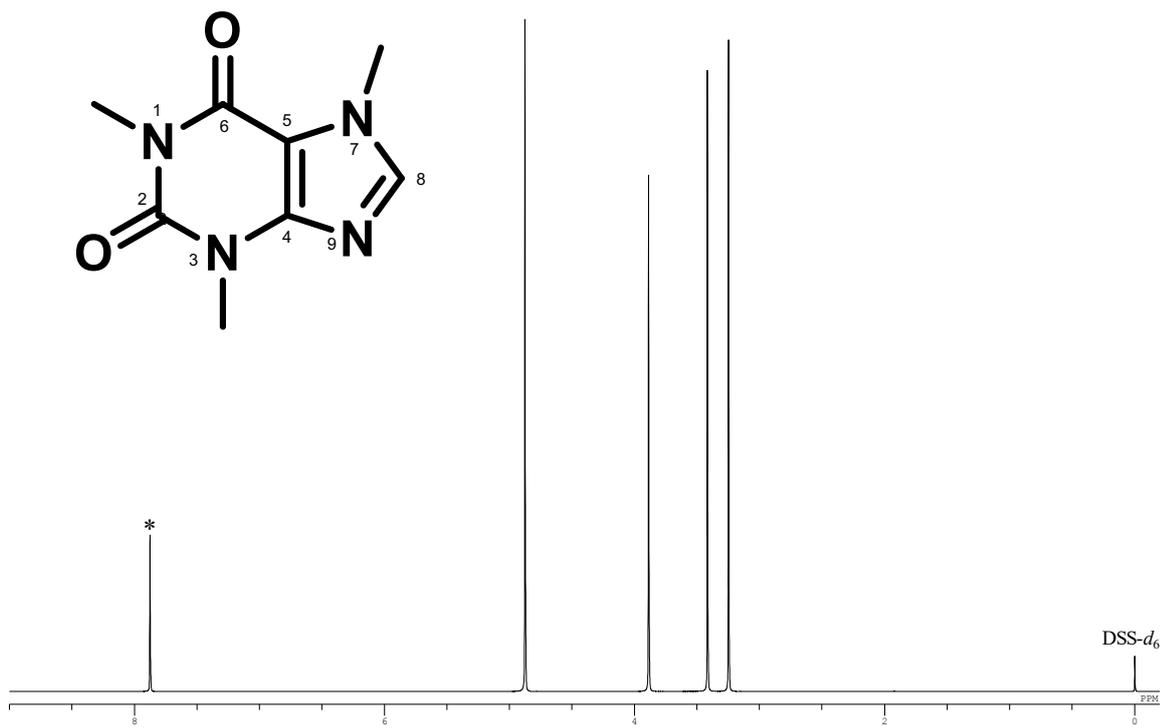


図9 カフェインの化学構造および¹H-qNMR スペクトル
* : 定量用シグナル

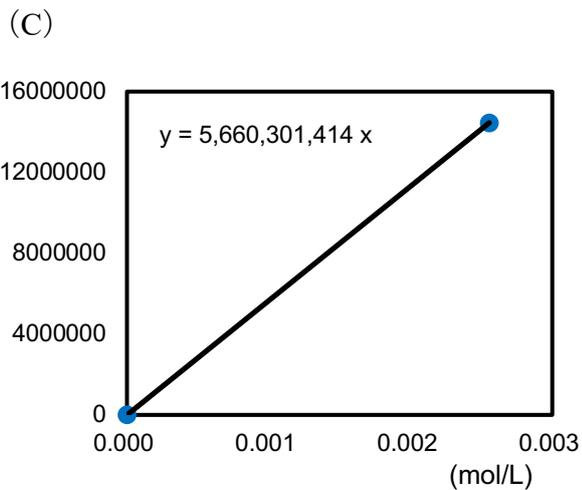
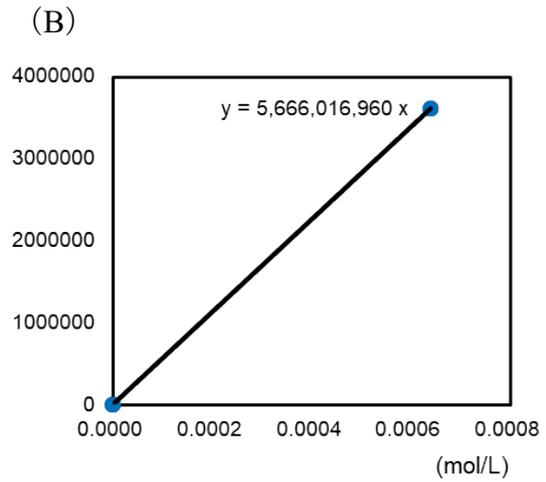
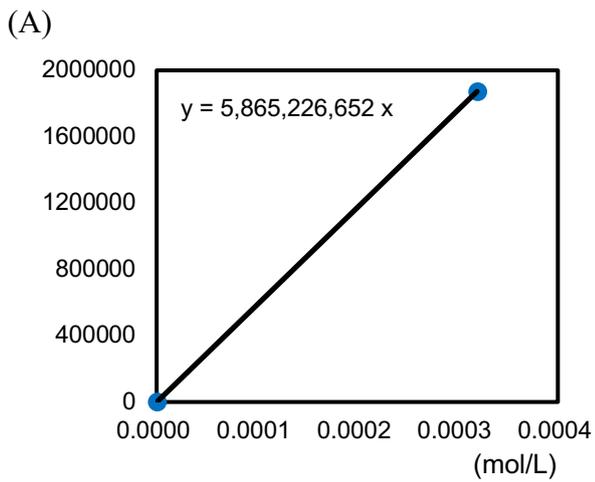


図 10 カフェインの検量線

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

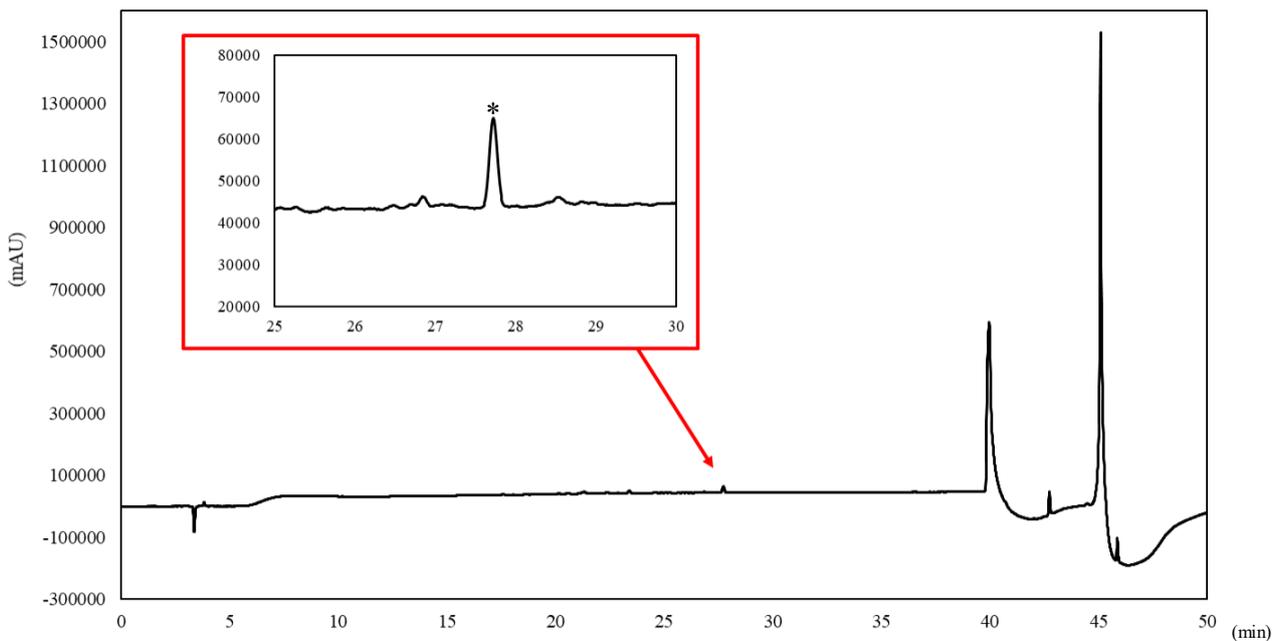


図 11 ラカンカ抽出物（試料 1）の LC クロマトグラム

* : モグロシド V

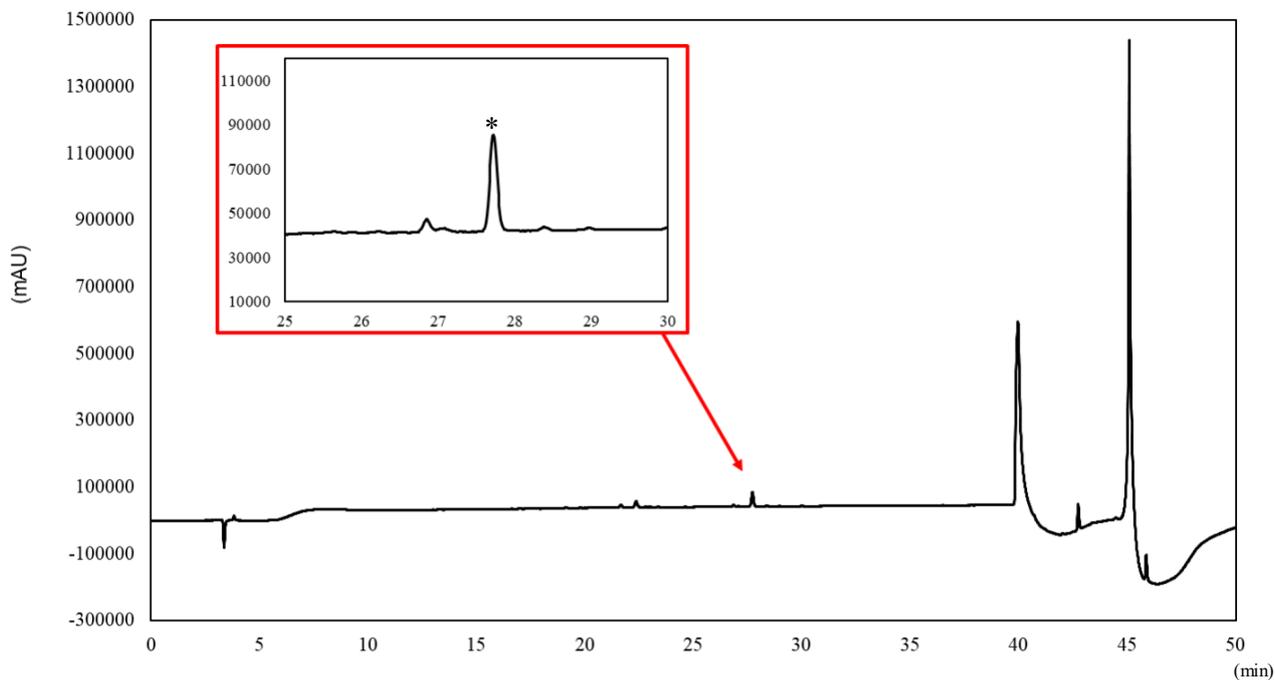


図 12 ラカンカ抽出物（試料 2）の LC クロマトグラム
* : モグロシド V

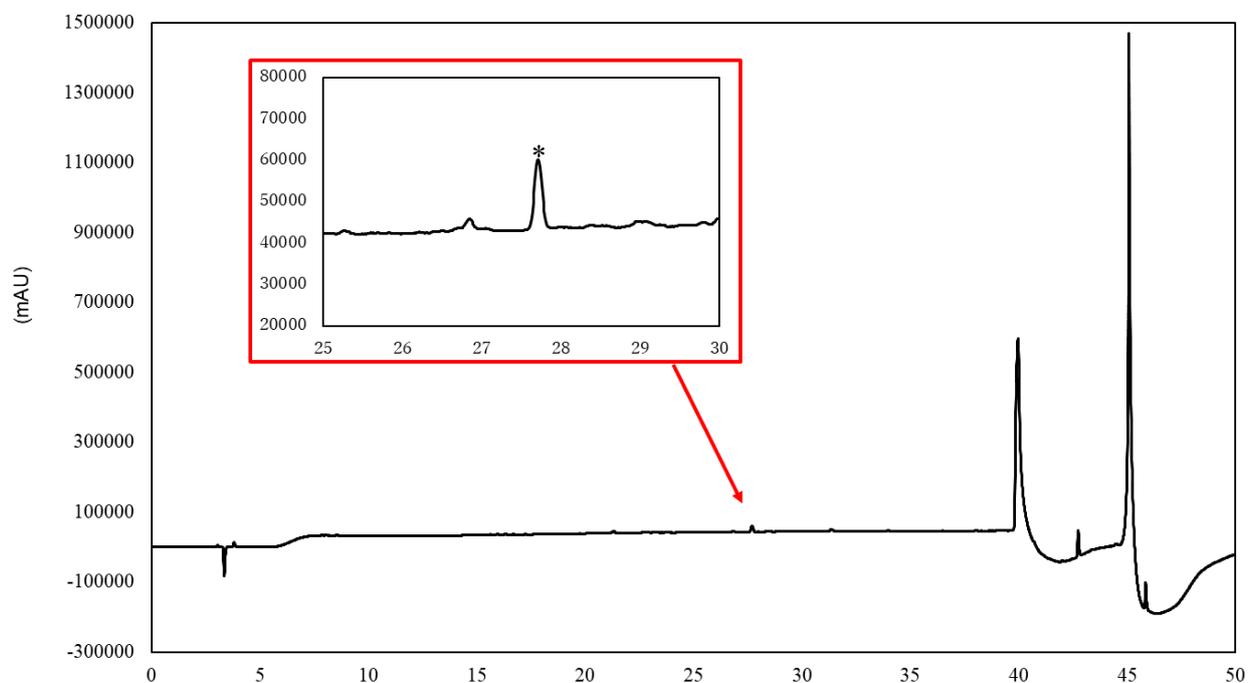


図 13 ラカンカ抽出物（試料 3）の LC クロマトグラム
* : モグロシド V

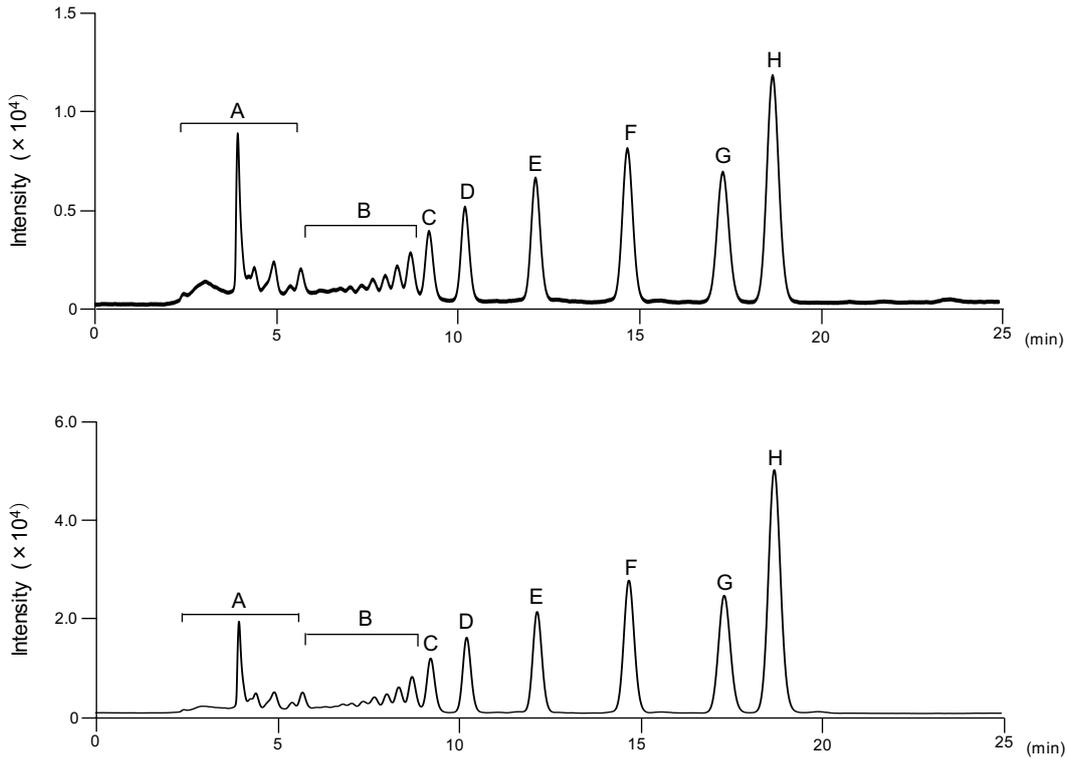


図 14 酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム
 上段：試料 1 (A172)，下段：試料 2 (C2010)

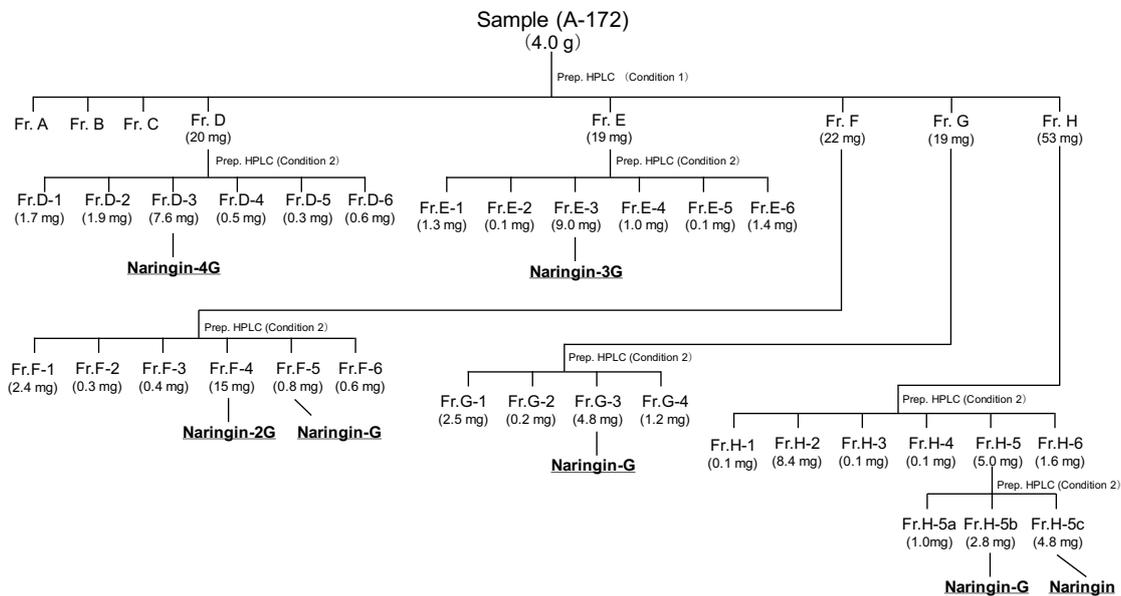


図 15 酵素処理ナリンジン製品 (試料 1 : A172) からの糖転位ナリンジン類の単離

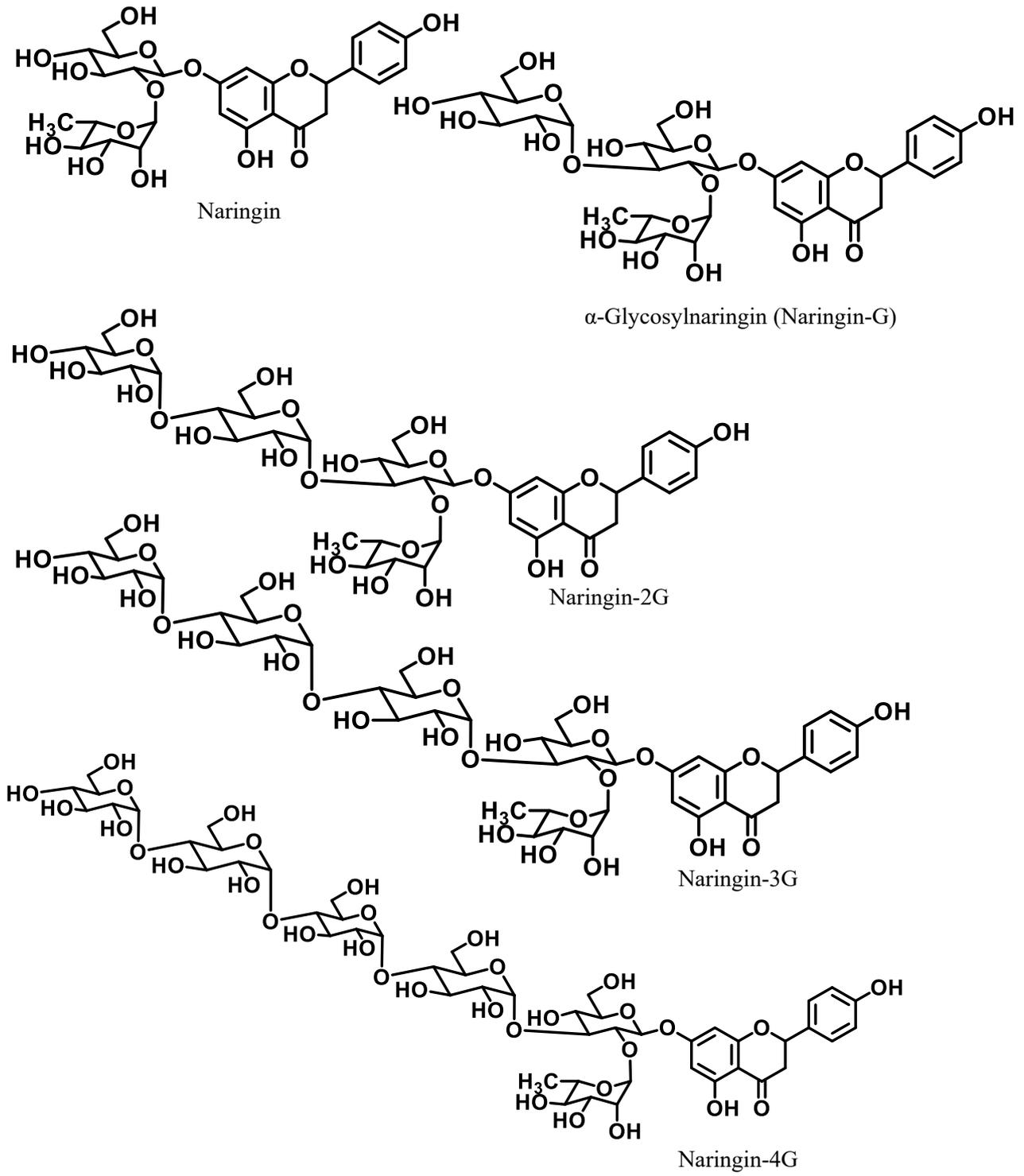


図 16 ナリンジンおよび単離した糖転位ナリンジン類の化学構造

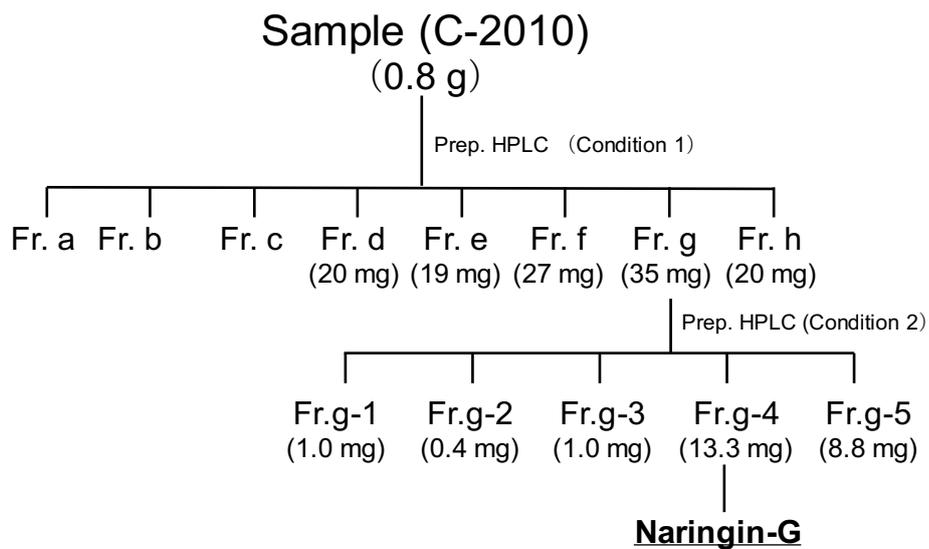


図 17 酵素処理ナリンジン製品（試料 2 : C2010）からの α -Glycosyl naringin (Naringin-G)の単離

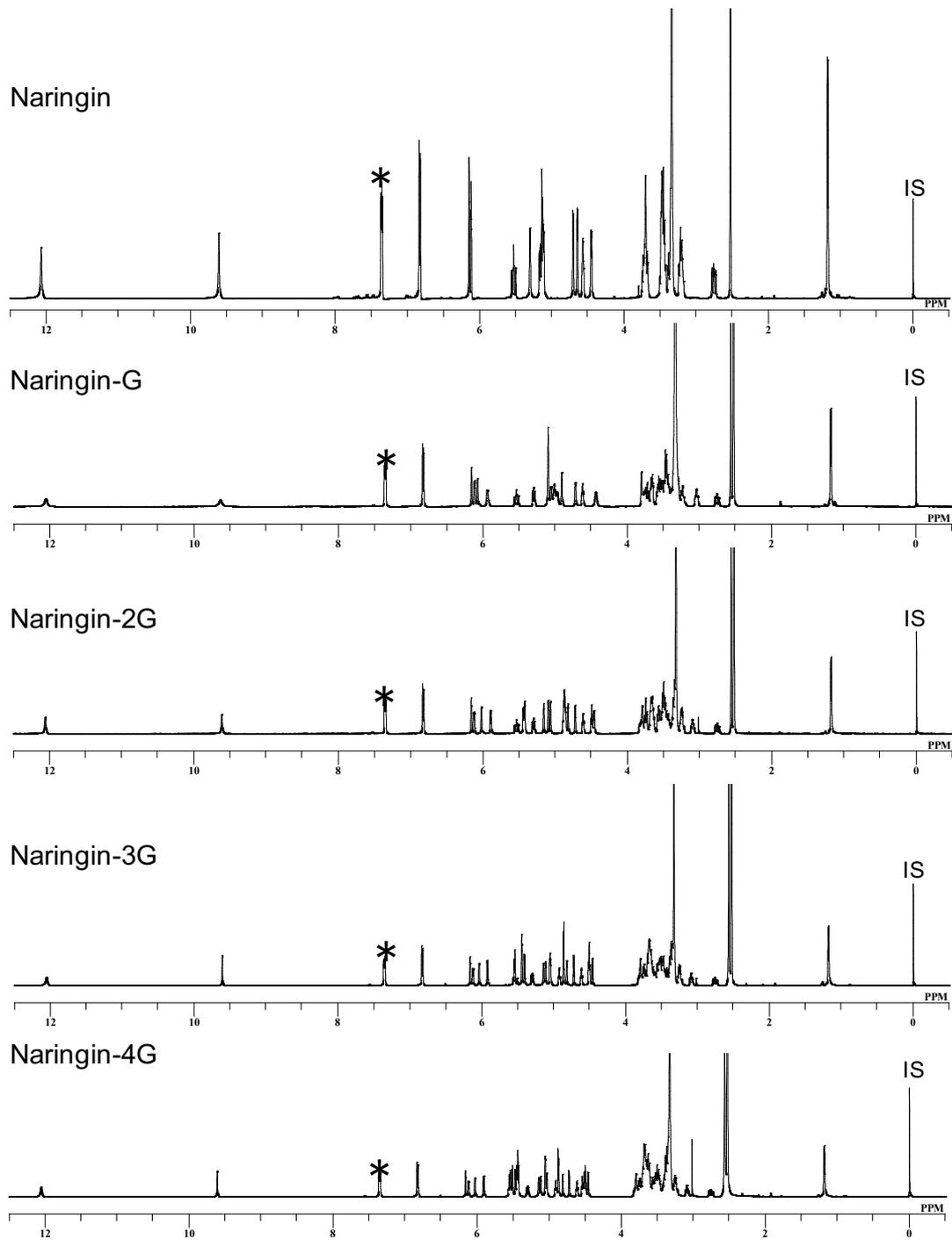


図 18 ナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の ^1H -qNMR スペクトル
 * : 定量シグナル

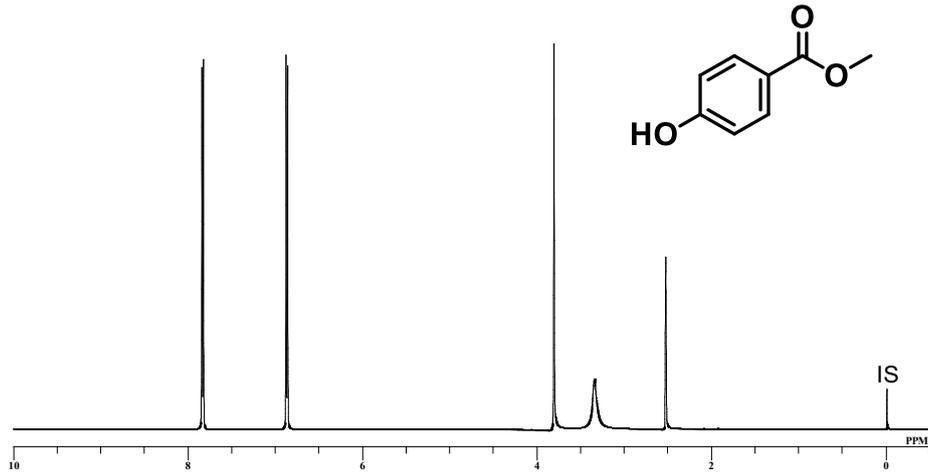


図 19 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの化学構造および¹H-NMR スペクトル

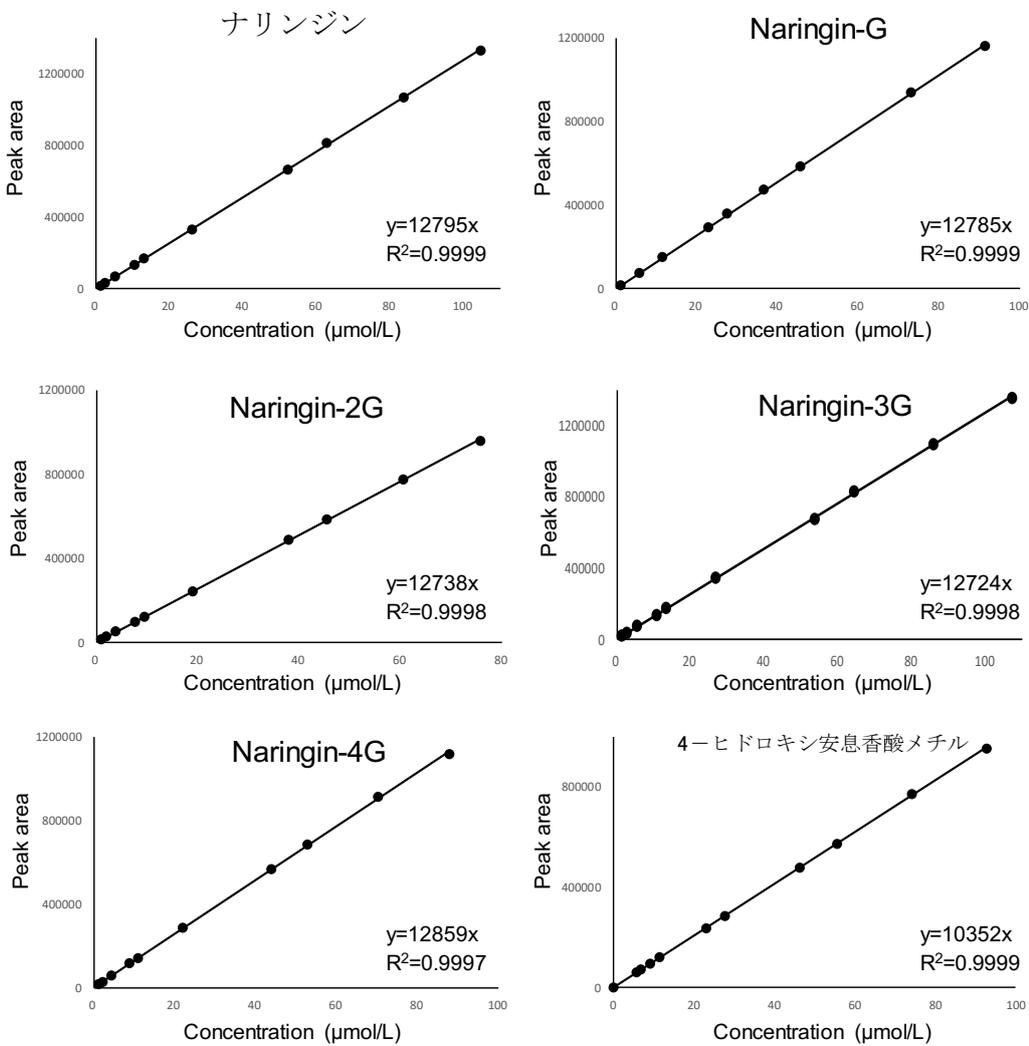


図 20 各測定対象および定量用標品の回帰直線

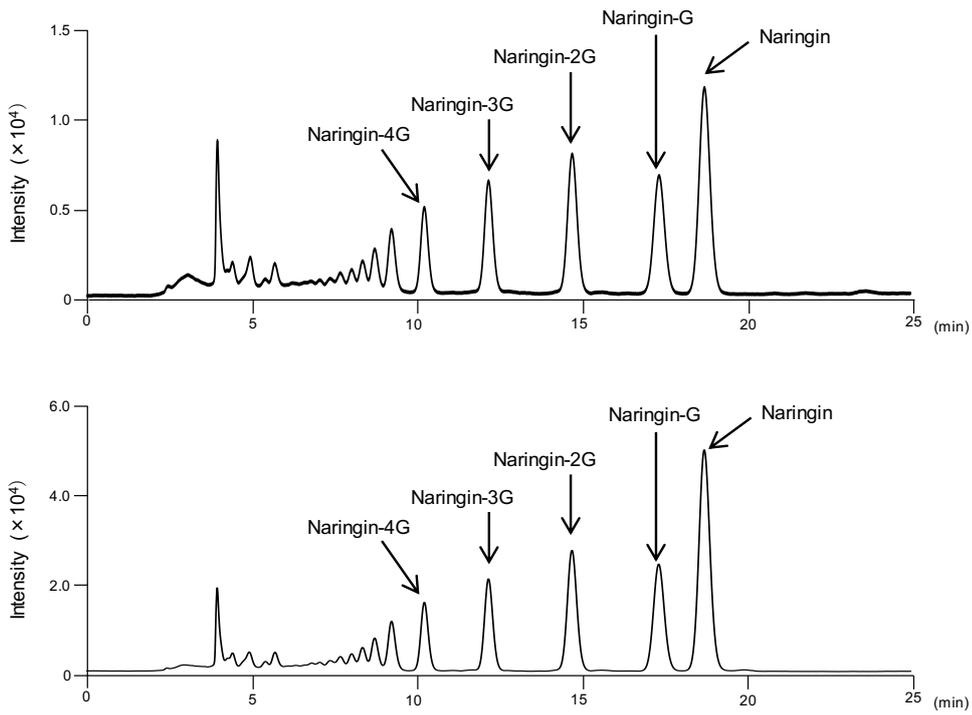


図 21 酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム

上段：試料 1 (A172)，下段：試料 2 (C2010)

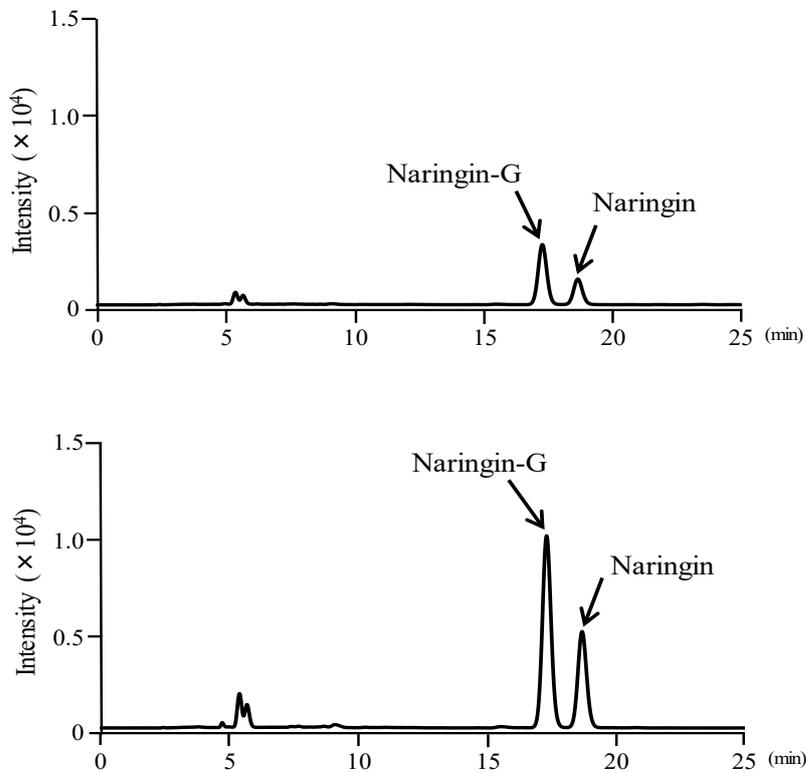


図 22 グルコアミラーゼ処理後の酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム

上段：試料 1 (A172)，下段：試料 2 (C2010)

表 1 ^1H -qNMR 測定条件

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

表 10 $^1\text{H-qNMR}$ 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 11 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 12 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 13 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 14 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 15 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	32.2

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.

表 16 各試料中の総ナリンゲニン配糖体含量 (n=3)

	試料1 (A172)				試料2 (C2010)			
	A法		B法		A法		B法	
	Content (%)	RSD (%)						
ナリンジン	1.7	4.6	1.7	4.6	5.8	4.9	5.7	4.9
Naringin-G	5.2	1.6	5.2	1.6	14.1	2.1	14.0	2.1
α -グルコシル残基	6.0	3.2	6.0	3.2	12.5	3.4	12.5	3.4
総ナリンゲニン配糖体	12.9	1.9	12.9	2.1	32.3	3.1	32.2	3.7

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

既存添加物の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。具体的には、クチナシ黄色に含まれるクロセチン (crocetin)、トウガラシ色素に含まれるカプサイシン (capsaicin)、またカワラヨモギに含まれるカピリン (capillin)、カロテノイド系色素であるリコペン (lycopene)、ウコン等に含まれる色素であるクルクミン (curcumin)、クチナシ果実等に含まれるクロシン (crocin)、およびカロテノイド類縁化合物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、簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化する。具体

的には、クチナシ黄色に含まれるクロセチン (crocetin)、トウガラシ色素に含まれるカプサイシン (capsaicin)、またカワラヨモギに含まれるカピリン (capillin)、カロテノイド系色素であるリコペン (lycopene)、ウコン等に含まれる色素であるクルクミン (curcumin)、クチナシ果実等に含まれるクロシン (crocin)、およびカロテノイド類縁化合物を対象とした合成ルートの確立を行った (Figure 1)。

B. 研究方法

B-1. クロセチンの合成ルート

クロセチンは、(2E,4E,6E)-2,7-Dimethylocta-2,4,6-trienedial を出発原料として Scheme 1 に示すルートにより 4 工程で合成する計画を立てた。

B-2. カプサイシンの合成ルート

カプサイシンは、4-(Aminomethyl)-2-methoxyphenol 塩酸塩を出発原料として Scheme 2 に示すルートにより 1 工程で合成する計画を立てた。

B-3. カピリンの合成ルート

カピリンは、Trimethylsilyl acetylene を出発原

料として Scheme 3 に示すルートにより 4 工程で合成する計画を立てた。

B-4. リコペンの合成ルート

リコペンは、(2*E*,4*E*,6*E*)-2,7-Dimethylocta-2,4,6-trienedial を出発原料として Scheme 4 に示すルートにより 4 工程で合成する計画を立てた。

B-5. クルクミンの合成ルート

クルクミンは、Vanillin を出発原料として Scheme 5 に示すルートにより 1 工程で合成する計画を立てた。

B-6. クロシン及びカロテノイド類縁化合物の合成ルート

クロシン及びカロテノイド類縁化合物は、(2*E*,4*E*,6*E*)-2,7-Dimethylocta-2,4,6-trienedial を出発原料とした合成ルートを計画した。Scheme 6-11 のルートでのクロシン合成を目指して、立体選択的なクロシン合成のためのモデル反応を検討した。また、ジカルボン酸中間体を用いた縮合反応によるクロシンおよびその類縁化合物の合成に関しても同時に検討した。

C. 結果および考察

C-1. クロセチンの合成 (各分析データは H29 報告書に記載)

化合物 1 の合成

Trimethyl phosphonoacetate (0.3 mL, 2.2 mmol) を THF (10 mL) に溶解し、0°C にて水素化ナトリウム (100 mg, 2.5 mmol) を加えた。0°C にて 15 分間攪拌後、(2*E*,4*E*,6*E*)-2,7-dimethylocta-2,4,6-trienedial (167 mg, 1.02 mmol) を加え、室温にて 15 時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (30 mL) を加え、酢酸エチルで 3 回抽出後、有機層を水と飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル=3:1) することで、化合物 1 を 67% (189 mg) の収率で得た。

化合物 2 の合成

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

化合物 3 の合成

Triethyl 2-phosphonopropionate (0.26 mL, 1.2 mmol) を THF (6 mL) に溶解し、0°C にて水素化ナトリウム (50 mg, 1.2 mmol) を加えた。0°C にて 10 分間攪拌後、化合物 2 (117 mg, 0.54 mmol) を加え、室温にて 22 時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液 (30 mL) を加え、ジクロロメタンで 3 回抽出後、有機層を水と飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル=4:1) することで、化合物 3 を 27% (57 mg) の収率で得た。

クロセチンの合成

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

C-2. カプサイシンの合成 (各分析データは H29 報告書に記載)

4-(Aminomethyl)-2-methoxyphenol 塩酸塩 (313.7 mg, 1.65 mmol), *N,N*-diisopropylamine (DIPEA)

(0.94 mL, 5.5 mmol) をジクロロメタン (6 mL) に溶解し、室温にて *trans*-8-methyl-6-nonenoyl chloride (0.362 mL, 1.82 mmol) を 3 分間かけて滴下した。室温にて 15 時間攪拌、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) を加え、ジクロロメタンにて 3 回抽出を行った。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン:酢酸エチル=5:1) することで、capsaicin を 89% (448 mg) の収率で得た。

C-3.カピリンの合成 (各分析データは H29 報告書に記載)

化合物 4 の合成

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

化合物 5 の合成

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

化合物 6 の合成

Propyne (3~4% in heptane) (1.5 mL) の THF (5 mL) 溶液に、 0°C にて *n*-BuLi (0.61 mL) を

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

カピリンの合成

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

C-4.リコペンの合成 (各分析データは H30 報告書に記載)

化合物 7 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 7 を 17% (2.5 g) の収率で得た。

化合物 8 の合成

化合物 7 (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。

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 ZnI₂ (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。残渣に 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 **8** を 10% (225 mg) の収率で得た。

リコペンの合成

化合物 **8** (52 mg, 0.15 mmol) に -30°C にて *t*-BuOK (52 mg, 0.15 mmol) の無水 THF (160 μL) / 無水 DMSO (20 μL) 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 μL) / 無水 DMSO (20 μL) 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 回洗浄し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。

C-5. クルクミンの合成¹ (各分析データは H30 報告書に記載)

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 μL, 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。

C-6. クロシン及びカロテノイド類縁化合物の合成 (各分析データは H31 報告書に記載)

化合物 **9** の合成

(2*E*,4*E*,6*E*)-2,7-Dimethylocta-2,4,6-trienedial (82 mg, 0.50 mmol) の THF (1 mL) / MeOH (1 mL) 溶液に水素化ホウ素ナトリウム (57 mg, 1.50 mol) をゆっくりと加えた。室温にて 8 時間攪拌した後、反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機層を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、濾液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 2 : 1 to 0 : 1) することで、化合物 **9** を 52% (44 mg) の収率で得た。

化合物 **10** の合成

化合物 **9** (0.82 g, 5.0 mmol) と 2-メチル-2-ブテン (5.3 mL, 50 mmol) のアセトン溶液 (15 mL) に、0°C にて亜塩素酸ナトリウム (2.26 g, 20.0 mmol) のリン酸二水素ナトリウム (3.36 g, 28.0 mmol) 水溶液 (15 mL) を滴下した。反応液を室温で 12 時間攪拌した後、0°C にて反応液に 2M 塩酸を加えて反応を停止させた。反応液をジエチルエーテル (30 mL) にて 3 回抽出し、合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を濃縮した。残渣にジエチルエーテルに懸濁させ、生じた固体をろ取り、ジエチルエーテルで洗浄、高真空下で乾燥させることで、化合物 **10** を 72% (710 mg) の収率で得た。

化合物 11 の合成

化合物 10 (39 mg, 0.2 mmol) のジクロロメタン (1 mL) /THF (0.5 mL) 溶液に *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) (90 mg, 0.44 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン(DMAP) (4.9 mg, 0.04 mmol) を加えて, 室温で 10 分間攪拌した. 反応液にメタノール (81 μ L, 2.0 mmol) を加えた. 室温で 8 時間攪拌した後, 沈殿物を濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 9:1 to 3:7) することで, 化合物 11 を 52% (51 mg) の収率で得た.

化合物 12 の合成

trans-2-Methyl-2-pentanoic acid (18 μ L, 0.12 mmol) と化合物 13 (46 mg, 0.10 mmol) のジクロロメタン溶液 (1.4 mL) に三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 ($\text{BF}_3\text{-OEt}_2$) (18 μ L, 0.11 mmol) を加えて室温で 1 時間攪拌した. 反応液をジクロロメタンで希釈し, 有機層を水, 1M 塩酸, 水で洗浄した. 硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を濃縮後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ジクロロメタン: メタノール = 100:0 to 83:17) することで, 化合物 12 を 20% (8.7 mg) の収率で得た.

次に上記の検討で得られた条件を用いて化合物 14 の合成を試みた. すなわち, 化合物 13 とクロセチンのモデル化合物 10 を, $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ を用いて反応させることで化合物 14 を合成できると考えた. しかしながら化合物 13 の反応溶媒に対する溶解性が低いために, 反応が進行せず目的物を得ることはできなかった (原料回収). そこで化合物溶解のために DMSO などの溶媒を使用して反応を実施したが, この場合には反応そのものが進行しなかった (Scheme 9). これは使用した溶媒がルイス酸を使用した反応には不適であるためと考えられた.

化合物 16 の合成

化合物 10 (49 mg, 0.25 mmol) と化合物 15⁴ (183 mg, 0.53 mmol) のジクロロメタン (1.2 mL) /*N,N*-ジメチルホルムアミド (0.6 mL) 溶液に *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)

(113 mg, 0.55 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン(DMAP) (6 mg, 0.05 mmol) を加えた. 反応液を室温で 8 時間攪拌した後, ジクロロメタンで希釈し, 沈殿物を濾過して濾液を濃縮後, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 9:1 to 2:8) することで, 化合物 16 を 44% (95 mg) の収率で得た.

化合物 17 の合成⁵

酢酸ナトリウム (53 mg, 0.65 mmol) と無水酢酸 (473 μ L, 0.65 mmol) の混合物に室温にて Gentiobiose (86 mg, 0.25 mmol) を加えた後, 反応液を 120°C にて 6 時間攪拌した. 反応液を 0°C に冷却後, 氷水 (15 mL) を加えて室温にて 30 分間攪拌した. 生じた沈殿物をろ取り, 水で洗浄, 高真空下にて乾燥することで, 化合物 17 (1'- α : 1'- β = 8:2 の異性体混合物) を 94% (160 mg) の収率で得た. 化合物 17 はそのまま次の反応に用いた.

化合物 18 の合成

化合物 17 (136 mg, 0.20 mmol) との無水 *N,N*-ジメチルホルムアミド (0.4 mL) 溶液に酢酸アンモニウム (31 mg, 0.40 mmol) を加えた. 反応液を室温で 24 時間攪拌した後, 酢酸エチル (15 mL) で希釈し, 水, 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, 濾液を濃縮後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ジクロロメタン: メタノール = 99:1 to 90:10) することで, 化合物 18 (1'- α : 1'- β = 7:3 の異性体混合物) を 72% (92 mg) の収率で得た.

化合物 19 の合成

Crocetin (33 mg, 0.10 mmol) と化合物 15⁴ (73 mg, 0.21 mmol) のジクロロメタン (0.75 mL) /*N,N*-ジメチルホルムアミド (0.25 mL) 溶液に *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (46 mg, 0.22 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン(DMAP) (2.5 mg, 0.02 mmol) を加えた. 反応液を室温で 12 時間攪拌した後, ジクロロメタンで希釈し, 沈殿物をアミノシリカゲルカラム

(Chromatorex NH-DM1020, 富士シリシア, $\Phi = 2$ cm, $h = 2$ cm)で濾過, ジクロロメタンにて洗浄することで化合物 **15** を除去し, 濾液を濃縮後, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 9:1 to 2:8) することで, 化合物 **19** を 8% (8 mg) の収率で得た.

化合物 **20** の合成

Crocetin (16 mg, 0.05 mmol) と化合物 **18** (67 mg, 0.11 mmol) のジクロロメタン (0.4 mL) / *N,N*-ジメチルホルムアミド (0.2 mL) 溶液に *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (23 mg, 0.11 mmol), 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (1.2 mg, 0.01 mmol) を加えた. 反応液を室温で 12 時間攪拌した後, ジクロロメタンで希釈し, 沈殿物をアミノシリカゲルカラム (Chromatorex NH-DM1020, 富士シリシア, $\Phi = 2$ cm, $h = 2$ cm) で濾過, ジクロロメタンにて洗浄することで化合物 **18** を除去し, 濾液を濃縮後, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 9:1 to 2:8) することで, 化合物 **20** を 3% (2.4 mg) の収率で得た.

D. 結論

従来の分析化学の手法では含量規格の設定が困難な添加物について, 指標成分と同一の若しくは代替物質の定性用又は定量用標準品の全合成ルートを確立することで新たな分析法の開発を行い, 簡便且つ精確な規格試験法の設定を具現化することを目的とした. 具体的には, クチナシ黄色に含まれるクロセチン (crocetin), トウガラシ色素に含まれるカプサイシン (capsaicin), またカワラヨモギに含まれるカピリン (capillin), カロテノイド系色素であるリコペン (lycopene), ウコン等に含まれる色素であるクルクミン (curcumin), クチナシ果実等に含まれるクロシン (crocin), およびカロテノイド類縁化合物を対象とした合成ルートの確立を行った. クロシンの合成においては, 立体選択的な合成のためのモデル反応用化合物を合成し, 反応の検討を行った. 今回は基質の溶解性の問題で立体選択的な合成法に適用すること

はできなかったが, 均一な成分の含量規格の設定のためには, 立体化学を制御可能な合成法は重要であるため, 継続して検討を行う必要がある. またクロシンの化学合成のための別の方法として, クロセチンの部分構造を有するジカルボン酸化合物に対して, 縮合剤を用いたカップリング反応による種々のカロテノイド誘導体の合成も検討した. 検討した方法を利用することで, クロシンの前駆体としての類縁体を合成することができた. 化合物の立体化学の制御や反応条件の検討による収率などに改善の余地があるものの, この方法においては, 試薬の当量数などの反応条件を調節することでクロシンの類縁化合物の他, 様々な誘導体も合成が可能と考えられる.

完全化学合成によるカロテノイドの安定供給ルートが確立された後は, 研究目的②に関する Proof of Concept (POF) Study Design として, トリエン, ペンタエン骨格を持つカロテノイドの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.

E. 参考資料

- 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.
- 4) Chittaboina S, Hodges B, Wang Q: *Lett. Org. Chem.*, **2006**; *3*, 35-38.
- 5) Chatterjee S, Moon S, Hentschel F, Gilmore K, Seeberger P-H: *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**; *140*, 11942-11953.

F. 研究発表

- 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

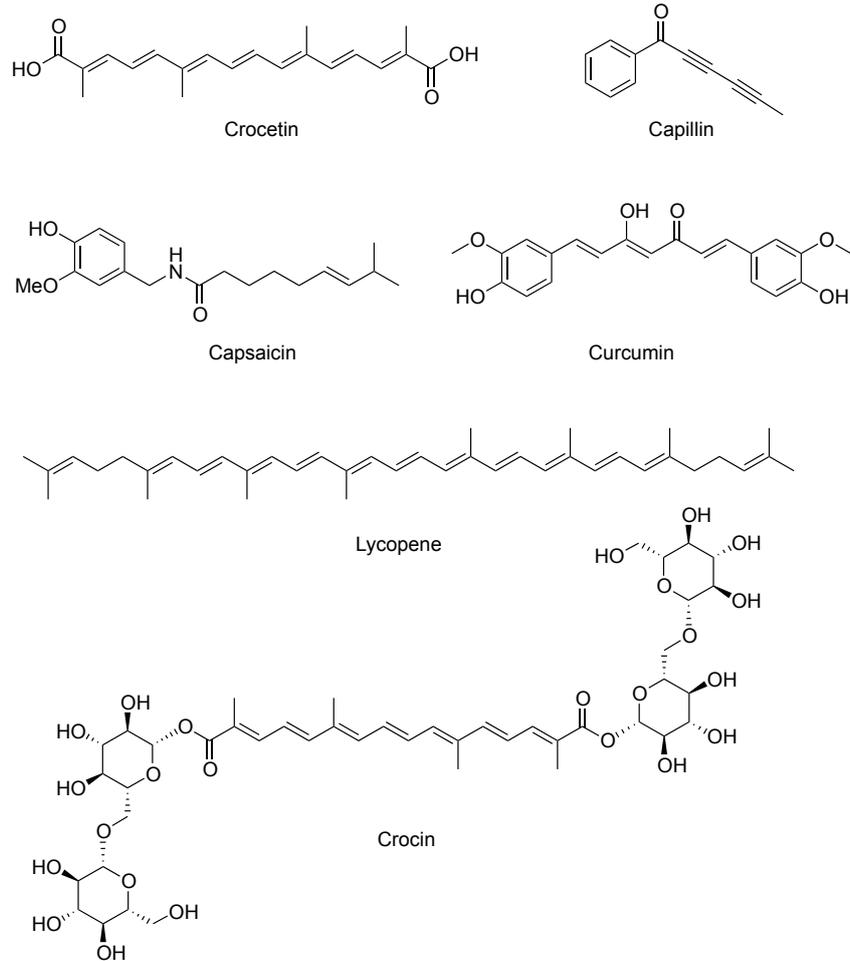
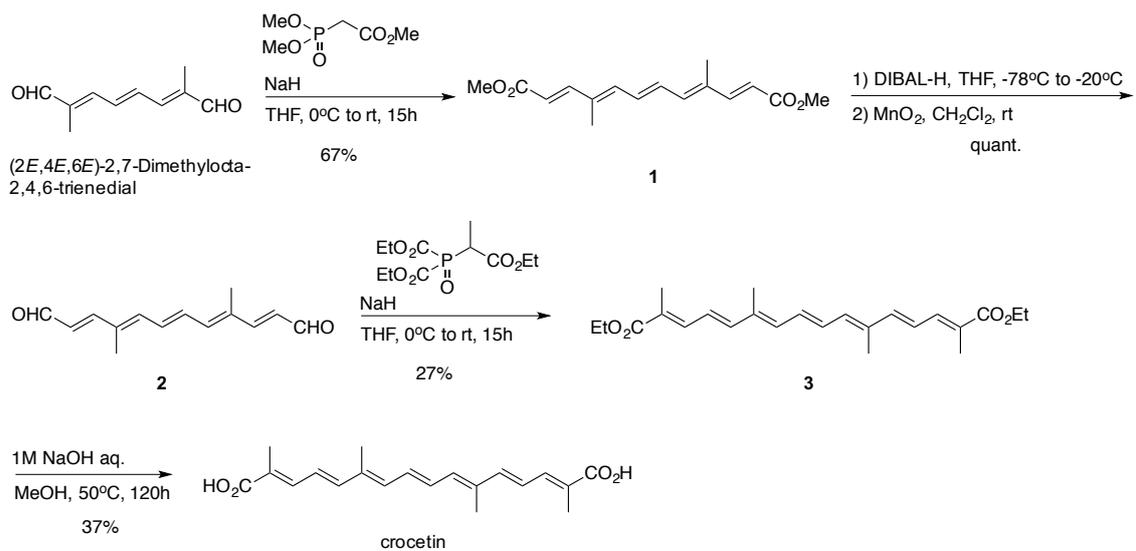
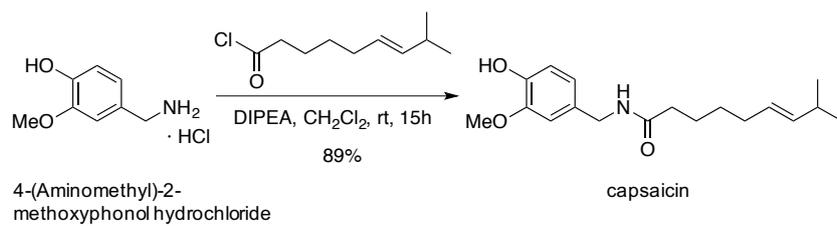


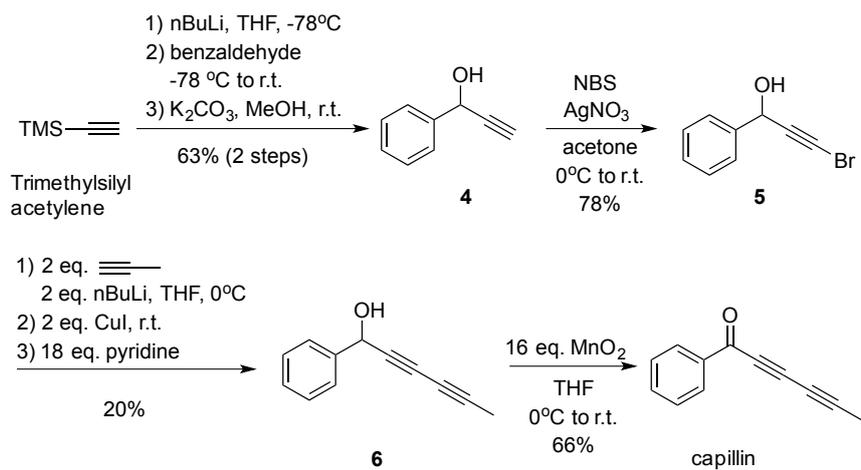
Figure 1. Chemical structures of target compounds



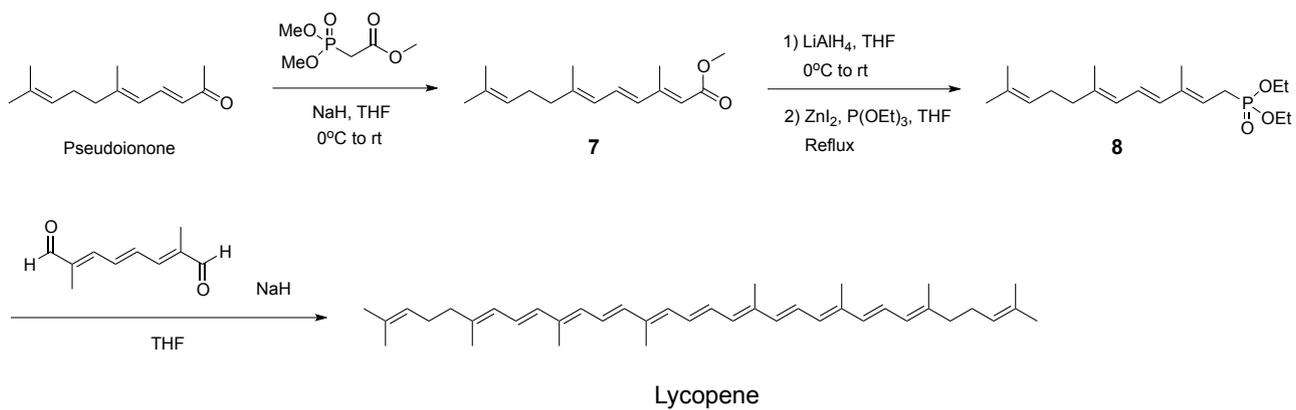
Scheme 1. Synthetic route of crocetin.



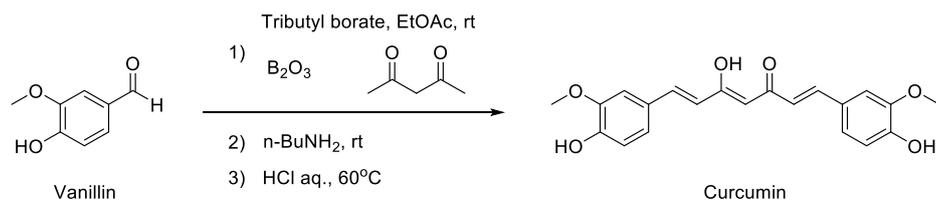
Scheme 2. Synthetic route of capsaicin.



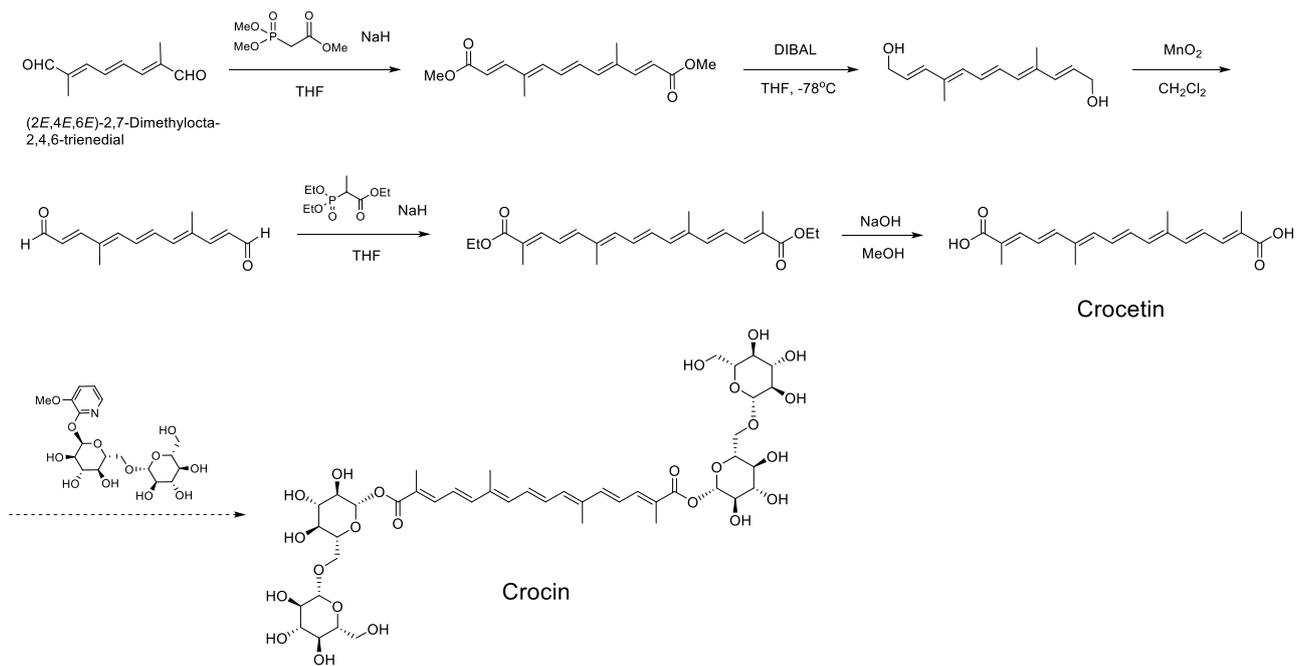
Scheme 3. Synthetic route of capillin.



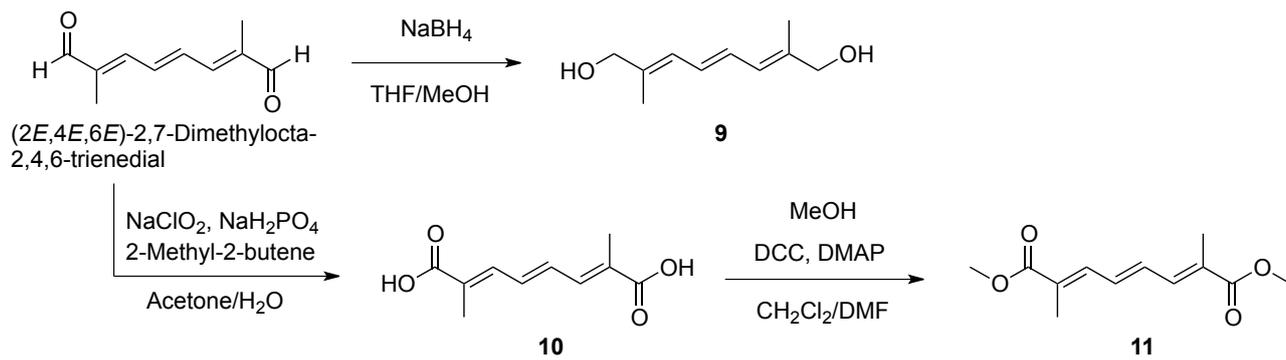
Scheme 4. Synthetic route of lycopene.



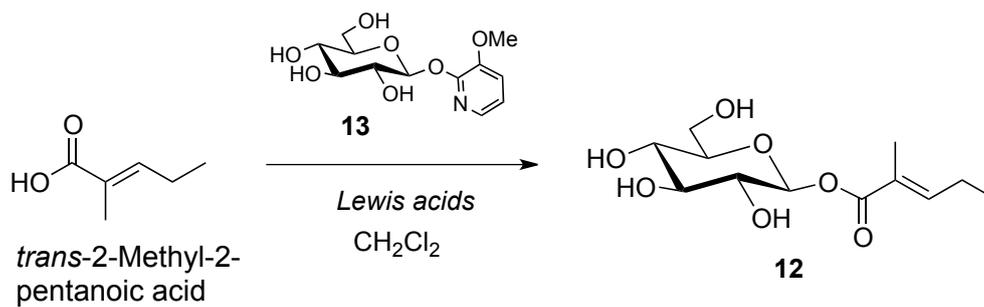
Scheme 5. Synthetic route of curcumin.



Scheme 6. Chemical synthetic route of crocin.

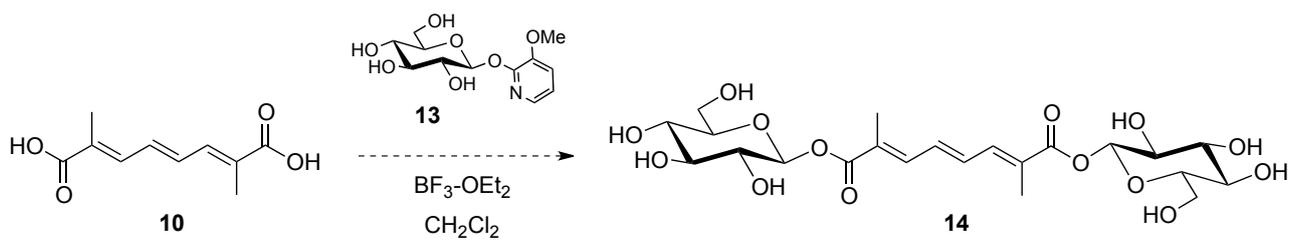


Scheme 7. Synthetic route of carotenoid compounds.

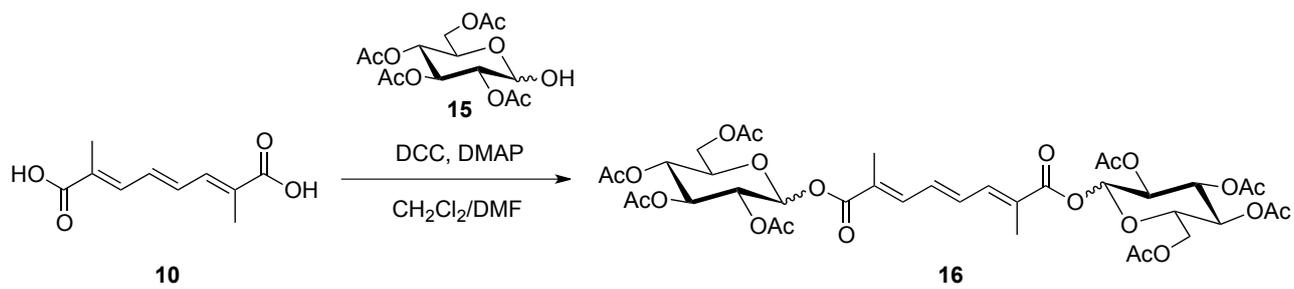


Lewis acids = AlCl₃, TiCl₄, HBF₄-OEt₂, BF₃-OEt₂ etc.

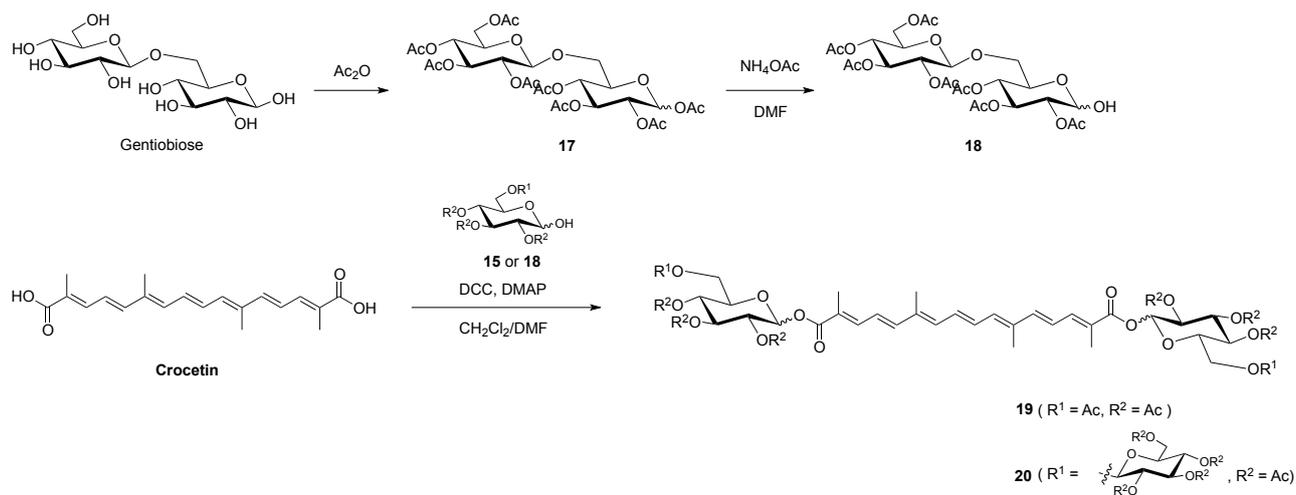
Scheme 8. Model reaction 1 for a stereoselective synthesis of crocin.



Scheme 9. Model reaction 2 for a stereoselective synthesis of crocin.



Scheme 10. Synthesis of carotenoid derivatives.



Scheme 11. Synthesis of crocin and crocin derivatives.

8. 研究成果の刊行に関する一覧表(平成 29 年度～平成 31 年度(令和元年度))

Nishizaki Y, Ishizuki K, Masumoto N, Tada A, Sato K	HPLC determination of quercetin using relative molar sensitivity to methylparaben as a single reference	Jpn. J. Food Chem. Saf.	submitted		2020
Masumoto N, Ishizuki K, Nishizaki Y, Ohtsuki T, Kuroe M, Yamazaki T, Numata M, Matsufuji H, Sugimoto N, Sato K	Determination of mogroside V in luohanguo extract for daily quality control operation using relative molar sensitivity to single-reference caffeine	Chem. Pharm. Bull.	submitted		2020
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	食品化学学会誌	26	63-67	2019
水本俊行, 中野扶佐子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹	相対モル感度を利用したヒハツ抽出物中のピペリン類の HPLC 定量分析	食衛誌	60	134-144	2019
Suwannarach N, Kumla J, Nishizaki Y, Sugimoto N, Meerak J, Matsui K, Lumyong S	Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, <i>Nigrospora aurantiaca</i> CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing	Appl. Microbiol. Biot echnol.	103	6973-6987	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 (総説)	224	123-130	2019
Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N	Application of ¹ H-quantitative NMR from the viewpoint of regulatory science	Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier (Review)		DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14681-5	2019
Masumoto N, Nishizaki Y, Maruyama T, Igarashi Y, Nakajima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K	Determination of perillaldehyde in perilla herbs using relative molar sensitivity to single-reference diphenyl sulfone.	J. Nat. Med.	73	566-576	2019
政田さやか, 水野沙稀, 小谷彩加, 藤原裕未, 内山奈穂子, 袴塚高志, 永津明人	ピペリン及びモノグルコシルヘスヘペリジンを機能性関与成分とする機能性表示食品の製剤学的品質評価と溶出試験法の検	食品化学学会誌	26	147-152	2019

	討				
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
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
Saito N, Kitamaki Y, Otsuka S, Yamanaka N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata H, Ihara T	Extended internal standard method for quantitative ¹ H NMR assisted by chromatography (EIC) for analyte overlapping impurity on ¹ 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	¹ 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
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, sesamol, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity	Sep. Sci. Plus	1	498-505	2018
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.	8	16173	2018
Fukaya S, Yoshioka H, Nagatsu A	The Kampo formula “Juzentaiho-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	ホルムアルデヒド及びア	薬学雑誌	138	551-557	2018

樹, 香川(田中)聡子, 坂井信夫, 五十嵐良 明, 神野透人	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				
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 acteoside in sesame plants (<i>Sesamum indicum</i> L.)	ACS Omega	3	17287- 17294	2018
西崎雄三, 佐藤 (増 本) 直子, 中西章 仁, 橋爪雄志, タン ジャマハマドゥ, 山 崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊 英, 杉本直樹, 佐藤 恭子	定量 NMR に基づく相対 モル感度を利用した加工 食品中のヘスペリジン及 びモノグルコシルヘスペ リジンの定量	食衛誌	59(1)	1-10	2018
Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N	Kinetic Study of the Equilibration between Carminic Acid and Its Two Isomers Isolated from Cochineal Dye	Chem. Pharm. Bull.	65	306-310	2017
島村智子, 伊藤裕 才, 久保勇人, 柏木 丈弘, 石川洋哉, 松 井利郎, 山崎壮, 多 田敦子, 杉本直樹, 穂山浩, 受田浩之	既存添加物チャ抽出物中 のカテキン類含量と抗酸 化力価の関係	日食化誌	24	10-15	2017
Yoshimura M, Ochi K, Sekiya H, Tamai E, Maki J, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Amakura Y	Identification of Characteristic Phenolic Constituents in Mousouchiku Extract Used as Food Additives	Chem. Pharm. Bull.	65	878-882	2017
Tanaka R, Inagaki R, Sugimoto N, Akiyama H, Nagatsu A	Application of a quantitative ¹ H-NMR (¹ H- qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in <i>Plantaginis</i> semen	J. Nat. Med.	71	315-320	2017
Fukaya S, Yoshioka H, Nagatsu A, Nonogaki T, Okano T, Onosaka S, Miura N	Non-toxic Level of Acetaminophen Potentiates Carbon Tetrachloride- Induced Hepatotoxicity in Mice	Biol. Pharm. Bull.	40(9)	1590- 1594	2017
Ito Y, Harikai N,	Spiroketalcarminic Acid, a	Chem. Pharm.	65	883-887	2017

Ishizuki K, Shinomiya K, Sugimoto N, Akiyama H	Novel Minor Anthraquinone Pigment in Cochineal Extract Used in Food Additives	Bull.			
Kitamaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata M, Ihara T.	Determination of PAHs in Solution with a Single Reference Standard by a Combination of ¹ H Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography	Anal. Chem.	89 (13)	6963–6968	2017
佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子	qNMR 及び HPLC による機能性表示食品中の機能性関与成分ルテインの定量	日食化誌	24(2)	75-81	2017
西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドゥ, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子	定量 NMR に基づく相対モル感度を利用した加工食品中のヘスペリジン及びモノグルコシルヘスペリジンの定量	食衛誌	59(1)	1-10	2018
Akiyama H, Nose M, Ohtsuki N, Hisaka S, Takiguchi H, Tada A, Sugimoto N, Fuchino H, Inui T, Kawano N, Hayashi S, Hishida A, Kudo T, Sugiyama K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshimatsu K	Evaluation of the safety and efficacy of Glycyrrhiza uralensis root extracts produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems	J. Nat. Med.	71	265-271	2017
Tatebe C, Ohtsuki T, Fujita T, Nishiyama K, Itoh S, Sugimoto N, Kubota H, Tada A, Sato K, Akiyama, H	Determination of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in the Color Additive Food Red No. 106 (Sulforhodamine B) using High-Performance Liquid Chromatography	Food Chem.	237	733-742	2017
Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K	Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome	Sci. Rep	7	15876	2017