

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 20KA1008

既存添加物の品質向上に資する研究

令和2年度(2020年度)

総括・分担報告書

研究代表者	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	西崎 雄三	国立医薬品食品衛生研究所
	天倉 吉章	松山大学
	井之上 浩一	立命館大学
	大槻 崇	日本大学
	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
	渡辺 麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所

令和3(2021)年3月

目次	1
1) 総括研究報告書	
既存添加物の品質向上に資する研究	3
研究代表者：杉本直樹	
2) 分担研究報告書	
1. 既存添加物の成分規格に関する研究	
1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)	16
業務受託者：上田要一	
研究協力者：等々力博志	
2. 既存添加物の有効成分の解明	
1) ^{13}C -CP/MAS-NMR によるキトサンの脱アセチル化度の測定	30
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) ヒマワリ種子抽出物の成分解析	50
研究分担者：天倉吉章	
研究協力者：好村守生	
研究協力者：内倉崇	
3) ショウガ抽出物の成分解析	55
研究分担者：天倉吉章	
研究協力者：好村守生	
研究協力者：内倉崇	
4) ウコン色素の定量評価の基礎検討	60
研究分担者：井之上浩一	
研究協力者：高橋未来	
5) シタン色素の成分規格の検討	83
研究分担者：井之上浩一	
研究協力者：高橋未来	
6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究	93
研究分担者：永津明人	

3.	試験法及び分析法の開発	
1)	¹ H-qNMR に基づく相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの 分析手法に関する研究	114
	研究分担者：大槻崇	
2)	外部標準法定量 NMR (EC-qNMR)の自動化スクリプトの作成	133
	研究分担者：西崎雄三	
	研究協力者：末松孝子	
	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：杉本直樹	
3)	PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討	149
	研究分担者：出水庸介	
	研究協力者：辻巖一郎	
4)	真菌基原の添加物の分析法の開発	163
	研究分担者：渡辺麻衣子	
	協力研究者：吉成知也	
	協力研究者：大波純一	
	協力研究者：中西早苗	
	協力研究者：船江元子	
	協力研究者：久保文	
3)	研究成果の刊行に関する一覧表	185

研究要旨

1) 既存添加物の成分規格に関する研究

現時点における自主規格及び業界団体規格を収集した。また、試験成績等の具体的なデータが得られているものと得られていないものを整理した。データに基づき、公的な成分規格試験法の素案を作成し、この素案を業界にフィードバックし、検証結果を今後求める予定である。

2) 既存添加物の有効成分の解明、試験法及び分析法の開発

ヒマワリ種子抽出物、ショウガ抽出物、香辛料抽出物（コショウ、シナモン、オールスパイス）、クチナシ色素、シタン色素、ウコン色素、キトサン、酵素処理ナリンジン等の成分組成及び分析法の検討を実施した。

成分規格の定量法を確立するためには、qNMR及びRMSを利用した信頼性の高いSIにトレース可能な分析法の開発及び応用を検討した。qNMRの応用により、香辛料抽出物コショウ等の主成分を直接定量可能であることが確認できた。外部標準法定量NMR (EC-qNMR)の信頼性向上に関する検討を行い、完全自動化スクリプトを作成した。EC-qNMRは、内部標準法定量NMR (IC-qNMR)よりも分析値のバラつきが大きく、この原因の解明及び精度向上について検討しているところである。また、RMSを利用した方法では、酵素処理ナリンジン、シタン色素等、定量用標品が供給できない各種品目への応用を検討すると同時に、装置依存なく精確な定量値が得られるように、UV/Vis及びPDA検出器の応答能校正用物質の探索、全合成ルートを検討した。溶媒に不溶で成分組成または構造の解析が困難なため成分規格の設定が遅れている品目への対応のため、固体NMRの応用を検討し、 ^{13}C -CP/MAS NMRを用いることにより、キトサンの脱アセチル化度が測定できることを明らかとした。成分の単離精製にはCCCを用いる方法を検討し、効率よく主成分を分離できることが確認され、得られた化合物の物性の測定だけでなく誘導体化標品の製造原料とすることができた。酵素品目の基原同定のためには、MALDI/TOF-MSによるアミノ酸配列及びMascotサーチによるprotein blastサーチを実施し、基原同定の精度向上を検討した。その結果、明確な同定結果が得られない理由として、①アミノ酸配列の差異が少ないことによりデータベース登録配列と相同タンパクであることの判断が困難、②データベース(DB)に基原となった真菌種のアミノ酸配列の登録がなかった、③DB登録真菌の種名がシノニムにより解釈が難しいことが示された。

研究分担者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
室長

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

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所
部長

渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
室長

研究協力者

上田要一 (一社)日本食品添加物協会
専務理事

等々力博志 (一社)日本食品添加物協会
常務理事

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

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

内倉 崇 松山大学薬学部
特任助教

高橋未来 立命館大学大学院
博士課程大学院生

辻巖一郎 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

大波純一 国立情報研究所
オープンサイエンス基盤研究
センター

特任准教授

中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所
研究員

船江元子 国立医薬品食品衛生研究所
研究員

久保 文 国立医薬品食品衛生研究所
研究員

A. 研究目的

既存添加物 357 品目(枝番込み 374 品目, 但し, 香辛料抽出物を 1 品目(74 基原)とする)の内, 222 品目(枝番品目込み)の成分規格が設定済であるが, 残り 151 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(令和 2 年 12 月現在). 成分規格が未設定である理由として, 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, が挙げられる. すなわち, 少なくとも 1 に該当するものを除き, 2~4 の問題を解決することが必要である. また, 我が国の消費者の天然志向から天然由来の添加物である既存添加物の需要が合成由来の添加物に比べて高い. 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. 従って, 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も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である.

このような問題を解決することに焦点を絞り, 本研究では, (1) 既存添加物の成分規格に関する研究: 流通実態及び基原・製法・本質の調査及び自主規格等の調査. (2) 既存添加物の有効成分の解明: 最新の知見及び技術により詳細な成分解析による成分規格設定に必要な指標成分の同定. (3) 試験法及び分析法の開発: 従来法では試験法が設定困難なものについては, 指標成分又は代替物質の合成による定量用標品の供給体制の確立または定量用標品を必要としない相対モル感度(RMS)を用いた SI へのトレーサビリティを確保した定量法, 分子生物学的手法を応用した試験法, 等を検討したので報告する. (1)~(3)で得られる知見は, 既存添加物の成分規格の設定又は改正を迅速化し, 且つするための基礎情報として必須である.

B. 研究方法

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

食品添加物公定書への既存添加物の新規収載及び既収載品目の成分規格改正を目的として, 市場に流通する既存添加物及び一般飲食物添加物の成分規格情報(第 5 版自主規格, 第 10 版公定書規格案をまとめた. (一社)日本食品添加物協会に設置される自主規格専門委員会, 規格専門委

員会及び部会担当のメンバーにより, これらの成分規格の内容及び整備状況を精査した.

2. 既存添加物の有効成分の解明

1) ^{13}C -CP/MAS-NMR によるキトサンの脱アセチル化度の測定

既存添加物キトサンの物性は脱アセチル化度に大きく影響される. キトサンの脱アセチル化度の測定は, 一般的にポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)を用いた滴定法が用いられる. すなわち, 化学反応の度合いに比例関係が成立すると仮定して間接的に脱アセチル化度を求める. 本法が正しく機能していることを疑いようがないが, これまで証明されていない. キトサンの脱アセチル化度を前処理無しで固体のまま直接測定する方法として ^{13}C -CP/MAS-NMR による方法を検討した.

2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析

ヒマワリ種子抽出物の添加物製品自体の実データは乏しい. そこで, 本添加物の成分データの集積を目的に, 添加物製品間の成分比較について検討を行った. 日本食品添加物協会を通じて入手したヒマワリ種子抽出物の各試料について HPLC 分析した.

3) ショウガ抽出物の成分解析

ショウガ抽出物の成分データの集積のため, 添加物製品間の成分比較を実施した. 日本食品添加物協会を通じて入手したショウガ抽出物の各試料について HPLC 分析した.

4) ウコン色素の定量評価の基礎検討

ウコン色素の主成分を明確にし, 簡便且つ汎用性のある定量法であるシングルリ

ファレンス HPLC (SR-HPLC)を適用するため、ウコン色素の製品を用い、HPLC 分析、HSCCC による主成分の単離、次いで SR-HPLC の定量性を確認した。

5) シタン色素の成分規格の検討

シタン色素の成分規格の設定に必要な情報を得るため、シタン色素の製品を用い、HSCCC による主成分の単離、次いで TLC による分析等を行った。

6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討とした。「香辛料抽出物」の基原に上がっているもののうち、生薬として市販されているもの(コショウ種子末、ヒハツ種子末、ケイヒ末、スターアニス種子末)を原材料としそれぞれの抽出物を作成し、¹H-qNMR 法での定量が可能かどうか検討した。

3. 試験法及び分析法の開発

1) ¹H-qNMR に基づく相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法に関する研究

酵素処理ナリンジンの成分規格の設定のため、に必要な情報を得るため、主成分であるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジン)の定量法を検討した。相対モル感度(RMS)の基準物質にカフェインおよび 4-ヒドロキシ安息香酸メチル (MHB) を選択し、これらに対するナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの RMS を各検量線式の傾きの比より算出した。RMS の正確性や HPLC 分析における測定対象物質並びに基準物質(代

替定量用標品)の検出波長の報告例との整合性などを考慮し、本法の性能並びに規格試験への適用性を評価した。

2) 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR)の自動化スクリプトの作成

EC-qNMR の測定を完全自動化するスクリプトの作成を検討した。3 台の NMR 装置(600 MHz)を用いスクリプトの動作確認を行った。また、認証標準物質 DSS-d₆ およびマレイン酸 (MA) を用いて、スクリプトを適用した自動測定 EC-qNMR の精度を確認した。

3) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

PDA 検出器の校正物質を設計した。UV 吸収を示す化合物を複数連結させることで、広範囲の波長域に吸収を示す分子を設計するコンセプトを考案した。第 3 級アミン構造をもつビルディングブロックを設計した。また、連結させる UV 吸収を示す化合物として、ビスアリール化合物を設計した。

4) 真菌基原の添加物の分析法の開発

アミノ酸配列データベースの改良に資するデータ収集として、既存添加物の基原として広く用いられる真菌種のうち 3 分類群についてシノニム等についての情報を収集した。試料は、添加物酵素 6 種 (α -アミラーゼ試料 No.1 と No.2, β -ガラクトシダーゼ No.14 と No.16, グルコアミラーゼ No.18 と No.19) を用いた。酵素を SDS-PAGE で泳動した後、現れた主なバンドを切り出し、DTT で還元、ヨードアセトアミドでシステインをカルバミドメチル化し、修飾トリプシンで消化後、ZipTip C18-u で脱塩し、MALDI TOF-MS で測定した。

得られたペプチド質量を指標として、Mascot Search Peptide Mass Fingerprint によってタンパク質を同定した。

C. D. 研究結果及び考察

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究 (委託調査)

既存添加物及び一般飲食物添加物の成分規格情報(第 5 版自主規格, 第 10 版食品添加物公定書規格案をまとめた。既存添加物 100 品目, 一般飲食物添加物 20 品目の自主規格を作成した。これらの内, 第 10 版成分規格案を作成済のものは 49 である。規格設定が困難な品目については, 流通実態の把握と共に, 品質・有効性の明確化, 有効成分の明確化などが今なお課題である。

2. 既存添加物の有効成分の解明

1) ^{13}C -CP/MAS-NMR によるキトサンの脱アセチル化度の測定

キトサンは溶媒に難溶性であることから, 分析が困難な物質の 1 つである。また, 比較的高分子であるため, 構造解析や分離分析も困難である。このため, キトサンの品質評価には, 特徴的な物性の指標となる脱アセチル化度を測定する試験が一般的に設定される。キトサンは, グルコサミン (GU) とアセチルグルコサミン (AGU) から構成される多量体であることから, ポリビニル硫酸カリウム (PVS-K) によるコロイド滴定が利用される。本法は GU のアミノ基が酸性下でポリカチオンとなり, PVS-K のポリアニオンが強いクーロン引力によりポリイオンコンプレッ

クスを形成することに基づいている。原理的に, 本法によりキトサンの脱アセチル化度が精確に測定可能であると考えられるが, それを裏付ける方法がない。そこで固体 NMR を用いた分析法を検討した。固体 NMR は固体試料を溶媒に溶解する必要がないため, 難溶性の物質や溶解させることにより構造が変化する物質をそのまま測定することが可能である。測定条件を検討した結果, ^{13}C -CP/MAS-NMR による方法を採用した。CP/MAS 条件を最適化し測定した結果, 脱アセチル化度を直接測定することができた。従来法である滴定法の結果と固体 NMR により得られた結果を比較したところ, ほぼ同じ結果となった。以上のことから, いずれの方法においても脱アセチル化度が測定でき, 従来のポリビニル硫酸カリウム (PVS-K) によるコロイド滴定が精確な値を算出していることが確認できた。

2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析

ヒマワリ種子抽出物の各試料溶液について HPLC 分析を行った結果, 顕著な 3 ピークが共通して観察され, それらピークについて検討した結果, 標品との直接比較により, 3-O-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-O-caffeoylquinic acid と同定された。

3) ショウガ抽出物の成分解析

ショウガ抽出物の添加物製品 12 検体の逆相 HPLC による成分比較を行った結果, (1) [6]-gingerol が主検出, (2) [6]-gingerol 及び [6]-shogaol いずれも検出, (3) いずれも検出せずの 3 グループに分類され, 主成分がいずれも顕著に検出されない試料も認められた。

4) ウコン色素の定量評価の基礎検討

ウコン色素製品より、HSCCC を用いて主成分の 3 種類のクルクミノイドを単離精製した。また、ウコン色素中のクルクミノイドの定量分析に適したシングルリファレンス(SR)には、検出器の感度差や保持時間の影響を最小限にするためにクルクミンからデザインし、類似構造の化合物を合成した。単離したクルクミノイドを用い、qNMR により純度値を求め、次いで SR に対する相対モル感度(RMS)を算出した。ウコン色素製品を SR-HPLC 定量法で分析した結果、絶対検量線法と同等の定量性を示し、SR の濃度や他社の HPLC 装置に変更してもその再現性に影響しなかった。

5) シタン色素の成分規格の検討

シタン色素製品より、HSCCC を用いてサントリン A 及び B を単離精製すると共に未知の色素成分を得た。未知成分については HPLC による分析が困難であったため、TLC による分析を行い、シタン色素中に含まれるそれぞれの成分の Rf 値を求めることができた。

6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

「香辛料抽出物」の基原に上がっているものの内、生薬として流通しているものから抽出液を調製し、それをモデル抽出物として $^1\text{H-qNMR}$ により定量分析が可能かどうか確認した。コショウ種子末およびヒハツ種子末中の piperine の定量では pyridine- d_5 、ケイヒ末中の cinnamaldehyde の定量では dimethylsulfoxide (DMSO)- d_6 、スターアニス種子末中の eugenol の定量では

methanol- d_4 でそれぞれ抽出した抽出液を用いて $^1\text{H-qNMR}$ を測定したところ、各抽出液中の化合物が定量できることが確認できた。更に、 $^1\text{H-qNMR}$ の測定に供したのと同じ抽出液を用いて従来法の HPLC による定量を行ったところ、両法の定量値はよく一致した、あるいは近い数値を与え $^1\text{H-qNMR}$ が従来法と同等の定量結果を与えることがわかった。

3. 試験法及び分析法の開発

1) $^1\text{H-qNMR}$ に基づく相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法に関する研究

酵素処理ナリンジンの実試料を用いた検討において、SR-HPLC により得られたナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量値は、従来の HPLC による定量値と大きな違いは認められなかった。酵素処理ナリンジン中の総ナリンゲニン配糖体量を求める際にナリンジン及び α -モノグルコシルナリンジンの含量を正確に求める必要があるが、今回、各基準物質に対する測定対象物質の RMS を用いた SR-HPLC を適用することが有効な手段の 1 つであることが確認できた。

2) 外部標準法定量 NMR の自動化スクリプトの作成

開発したスクリプトでは、90PW 校正の前後でチューニングおよびマッチング(T&M)を重複して実行してしまうなどの不具合が確認されたが、複数のジョブを組み合わせることでこの問題を回避し、適切な手順に沿った EC-qNMR の完全自動化が可能となった。開発したスクリプトを実行した際の EC-qNMR の精度は、

プローブの応答能である DSS- d_6 および MA の Q 値をモニタリングすることで算出した。装置によって RSD が 2.5%となる場合もあったが、測定回数を増やすことにより、正確な絶対純度を算出できた。

3) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

購入可能な市販試薬から、ビルディングブロック部として異なる 3 つの連結点を有する化合物を合成した。また共通の中間体に対してカップリング反応を行うことで、異なる芳香環を導入したビスアリアル化合物を合成した。得られたビスアリアル化合物の吸収スペクトルを測定した結果、芳香環上の置換基によって吸収スペクトルの波長が変化することが分かった。

4) 真菌基原の添加物の分析法の開発

添加物基原として使用される真菌種のシノニムを整理して照合しなおした後、酵素試料について MALDI-TOF-MS で MS スペクトルを得る前に SDS-PAGE を行い、メジャーなバンドが複数現れた場合にはバンドを単離してから個々に分析した。その結果、今回試料として用いた 6 種類の添加物酵素全てにおいて製品の付帯情報と一致した同定結果が得られ、同定の確度は向上することが確認された。

E. 結論

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究 (委託調査)

成分規格が設定されていない既存添加物は 160 品目弱(枝番品目を含む)ある。その内、100 品目については自主規格又は第 10

版食品添加物公定書規格案が作成された。自主規格案には、製品に情報が少なくごく簡単な確認試験が設定され、その製品の品質を確保するには不十分とも考えられるものもある。しかしながら、食品添加物業界が提案できる現時点での最大努力の結果であると思われる。専門家がみて過不足のない成分規格を設定するには、分析法の開発、妥当性評価、製品の均一性の確認等、多大な作業が更に必要となる。これらの努力により公的な成分規格を設定することは、消費者の食品添加物に対する疑念を解消すると共に実質的な安全確保につながる。しかし、既存添加物については、長らく成分規格が設定されないまま使用が認められてきた品目が多く、これらに新たに成分規格を設定することは、道義的には安全性確保のために必要であると事業者は理解しているものの、その費用対効果は小さいと思うように進められない状態になっていると考えられる。

2. 既存添加物の有効成分の解明

1) ^{13}C -CP/MAS-NMR によるキトサンの脱アセチル化度の測定

既存添加物「キチン」及び「キトサン」の成分規格作成には、設定する試験項目及び試験法の検討が必要である。「キチン」はアセチルグルコサミン (AGU)から、「キトサン」はグルコサミン(GU)とアセチルグルコサミン (AGU)から構成された多量体であり、すなわち、両者の違いは脱アセチル化の度合いである。脱アセチル化の度合いは、両者の区別、あるいは品質確保の指標となる。脱アセチル化度測定には

ポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)によるコロイド滴定が一般的に用いられるが、正しい値が算出できているか証明した例はない。そこで、固体 NMR による脱アセチル化度測定を検討した。その結果、測定条件を最適化することによって ^{13}C -CP/MAS-NMR により脱アセチル化度を直接測定することができ、ポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)を用いた滴定法による結果とほぼ等しい値を示した。 ^{13}C -CP/MAS-NMR による方法は、試料を前処理することなく測定可能である点において優れているが、高価な NMR 装置を用いる必要があり、現時点では実用性は低い。一方、滴定法は操作が若干複雑であるが特別な装置を必要としない点において優れている。原理の異なる二つの測定法においてほぼ同様な結果が算出されたことから、「キトサン」の脱アセチル化度の試験法として従来法の滴定法を設定しても問題ないと結論した。

2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析

既存添加物ヒマワリ種子抽出物について、添加物製品 2 検体の逆相 HPLC による成分比較を行った結果、いずれの製品も同様のピークパターンを示し、3 ピークが主検出して観察された。それらピークについて解析した結果、3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid と同定された。一方、有効成分の一つとされるイソクロロゲン酸類 3 成分 (3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid) について標品と比較したがいずれの成分も顕著なピークとして観察されなかった。ヒマワリ種子抽出物の主たる有効成分の確認の

ために、DPPH ラジカル消去能を酸化防止活性の指標とした評価及び考察を引き続き行う予定である。

3) ショウガ抽出物の成分解析

既存添加物ショウガ抽出物 12 検体について HPLC による成分比較を行った結果、成分組成の違いにより 3 パターンに分類された。ショウガ抽出物は、既存添加物名簿に記載され、その有効成分は「ショウガの根茎から得られた、ショウガオール及びジンゲロールを主成分とするものをいう。」とされている。今回の結果より、この記述に合致しない製品が市場に流通していることが推測された。基原、産地、製法等の違いにより、組成の異なる製品が流通していると推測される。主成分以外の検出成分の解析を進めるとともに、いずれも基原が同じ食品のショウガと、生薬のショウキョウについて成分比較を行い、含有成分による用途別の特徴について引き続き考察する予定である。

4) ウコン色素の定量評価の基礎検討

ウコン色素は「第9版食品添加物公定書」に既に記載されており、その成分規格には、ウコン(*Crucuma longa* L.)の根茎から得られたクルクミンを主成分とするものであると定義され、色価、確認試験に TLC、と極大吸収部等が設定されているのみである。ウコン色素の品質確保には、主有効成分の精確な定量法の設定が望ましいが、純度既知の定量用標準品の入手が困難であることから、これまで実現できていない。そこで、SR-HPLC の適用を検討した結果、分析対象の標準品を用いることなく精度良く定量分析が可能であることを確認した。

5) シタン色素の成分規格の検討

シタン色素の公的な成分規格は現在設定されておらず、業界の自主規格により品質が制御されているのみである。シタン色素は、「第5版既存添加物自主規格」に記載され、シタン (*Pterocarpus santalinus* L.) 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、色価、確認試験に極大吸収部等が設定されているが、シタン色素の公的な成分規格設定には情報が不十分である。そこで、HSCCCにより、主色素成分の単離精製、同定を行った結果、既知のサンタリン A 及び B の他に未知の成分が得られた。未知成分は HPLC による分析が困難であったことから TLC による分析を行い、それぞれの Rf 値を求めることができた。未知成分の構造については更に検討する予定である。また、色素成分の定量法についても検討する予定である。

6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

香辛料抽出物は様々な基原の抽出物であることから、その有効成分も明らかとされていないものも多く、試験法が確立できていないことから現時点では公的な成分規格が設定されていない。従って、成分組成の確認、次いで対象成分の定量が成分規格設定のために情報として必要とされる。このとき様々な分析法が考えられるが、¹H-qNMR の適用が最も効率が良いと考えられる。なぜならば、¹H-qNMR は、SI トレーサブルな認証標準物質を基準物質として NMR スペクトルの測定することで、試料中の測定対象物質の絶対定量ができる方法であり、本法を用いること

によって、測定対象物質の定量用標準物質を必要とせず、直接定量分析が可能であるからである。今回、モデルとしてコシヨウ種子末、ヒハツ種子末及びケイヒ末より抽出物を調製し、¹H-qNMR により分析を行った結果、いずれも有効成分の同定と定量が可能であった。よって、¹H-qNMR は規格試験法としても十分機能すると考えられた。

3. 試験法及び分析法の開発

1) ¹H-qNMR に基づく相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法に関する研究

酵素処理ナリンジンは、公的な成分規格が設定されていない。主成分とされるナリンジンの他、 α -モノグルコシルナリンジン等の配糖化ナリンジンの定量法標品の入手が困難であることから、定量法及び含量の設定のための情報が得られないためである。定量法標品の入手が期待できないことから、分析対象物質とは別の物質を基準物質とした SR-HPLC による定量分析法を検討したところ、本法が有効な手段の1つとなると判断できる結果が得られた。すなわち各基準物質に対する測定対象物質の RMS を用いた SR-HPLC を適用することが有効な手段の1つであることが確認できた。今後、第三者検証試験を行い、成分規格試験法の根拠データを得る予定である。

2) 外部標準法定量 NMR の自動化スクリプトの作成

既存添加物の成分規格作成において、既存添加物製品の含有成分の含量を直接的に定量できる ¹H-qNMR による分析で

得られるデータは試験法の検討に非常に有用である。特に、既存添加物の指標成分等、希少な純度測定には、外部標準法定量 NMR (EC-qNMR)が有用である。しかし、EC-qNMR で精確な純度を値付けするためには、試料ごとに 90°パルス幅(90PW)を校正する必要がある等、常に装置の操作が常に必要である。今回、EC-qNMR の自動測定スクリプトを作成しその精度をモデル化合物を用いて確認したところ、試験法として十分な精度が得られた。今後、実際の試料の定量に応用する予定である。

3) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

HPLC/PDA を用いて SR-HPLC を実施するとき、連結される PDA 検出器の精度が定量精度に直結するため、異なる HPLC/PDA 装置を用いて同一の定量結果を得るためには、PDA 検出器の装置間の校正が必要である。校正物質は広い領域に吸収を持ち、安価で且つ扱いやすいものが望ましい。この目的で化合物の設計・合成を行った結果、化合物の構造と吸収等について知見が得られた。今回実施した化合物の設計・合成についてさらに検討することで、SR-HPLC に利用しやすい校正物質及び基準物質の創出が可能と思われる。低分子化合物の UV 吸収は、波長や強度においてある程度の加算性が成り立つこと、また官能基の変更によって溶解性などの物性を調整可能であることから、本研究における設計コンセプトは、任意の波長域に吸収を有する化合物の分子設計に適用可能と考えられる。

4) 真菌基原の添加物の分析法の開発

微生物由来基原の品目の同定精度の向上を目的とし、タンパク質アミノ酸配列を指標とした分子生物学的手法を応用した試験法に関する検討を行った。その結果、本法が有効に機能することが確認された。さらに多くの酵素製品で同様の作業や分析を行う、MS スペクトルからアミノ酸配列を予測するためのデータベースでの登録配列の充実化やシノニムの整理を行うことで、TOF-MS 分析で得られたスペクトルパターンから、多くの既存添加物酵素基原を正確に同定することが可能となると考えられた。引き続き検討する予定である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物である精油除去ウイキョウ抽出物に含まれる主成分の抗酸化能評価. 日本食品化学学会誌. 2020; 27, 164-172.
- 2) Kuroe M, Numata M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Itoh N: Use of Relative Molar Sensitivity as a Specific Value for Evaluating Heptaoxyethylene Dodecyl Ether Concentrations in Methanol Solution. Analytical Sciences. 2021; in press.
- 3) Uchiyama N, Hosoe J, Miura T, Sugimoto N, Ishizuki K, Yamada Y, Iwamoto Y, Suematsu T, Komatsu T, Maruyama T, Igarashi Y, Higano T, Shimada N, Goda Y: Determination

- of absolute purities of hygroscopic substances by quantitative NMR analysis for the standardization of quantitative reagents in the Japanese Pharmacopoeia (Part 2). *Chem. Pharm. Bull.* 2021; 69: 26-31.
- 4) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Ono M, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Yasobu N, Ohara T, Yamada Y, Suzuki H, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Kohama A, Goda Y: Absolute purity determination of a hygroscopic substance, indocyanine green, using quantitative NMR (qNMR). *Chem. Pharm. Bull.* 2021; 69: 118-123.
 - 5) 内山奈穂子, 細江潤子, 三浦亨, 杉本直樹, 石附京子, 山田裕子, 岩本芳明, 末松孝子, 小松功典, 丸山剛史, 五十嵐靖, 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 (Part 1). *薬学雑誌*, 2020; 140 1063-1069.
 - 6) Nishizaki Y, Ishizuki K, Masumoto N, Tada A, Sugimoto N, Sato K: HPLC determination of quercetin using relative molar sensitivity to methylparaben as a single reference. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 2020; 27: 42-52.
 - 7) Ohtsuki T, Matsuoka K, Fuji Y, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Matsufuji H: Development of an HPLC method with relative molar sensitivity based on ¹H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. *PLoS ONE*, 2020; 15(12): e0243175.
 - 8) Miura T, Sugimoto N, Bhavaraju S, Yamazaki T, Nishizaki Y, Liu Y, Bzhelyansky A, Amezcua C, Joseph Ray, Zailer E, Diehl B, Gallo V, Todisco S, Ofuji K, Fujita K, Higano K, Geletneky C, Hausler T, Singh N, Yamamoto K, Kato T, Sawa R, Watanabe R, Iwamoto Y, Goda Y: Collaborative Study to Validate Purity Determination by ¹H quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull.* 2020; 68: 868-878.
 - 9) Takahashi M, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Quantification of tea-derived catechins without the requirement for respective calibration curves by single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *J. Sci. Food Agric.*, 2020; DOI:10.1002/jsfa.11013
 - 10) Ide T, Mizuta Y, Akagi J, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Ogawa K, Cho Y: A 90-day repeated oral dose toxicity study of four stereoisomers of 2,4-dimethyl-4-phenyltetrahydrofuran, a synthetic flavoring substance, in F344 rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2020; DOI: 10.1016/j.yrtph.2020.104664.
 - 11) 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.* 2021; 69(1), 18-25.
 - 12) Nishizaki Y, Lankin D, Chen SN, Pauli G: Accurate and precise external

calibration enhances the versatility of quantitative NMR (qNMR). Anal. Chem., 2021; 93(5):2733-2741.

- 13) 酒井有希, 増本直子, 西崎雄三, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた single-reference HPLC 法が定量値に影響を及ぼす要因の検討と機能性表示食品中のルテイン定量への応用. 日本食品化学学会誌, 2020; 27: 123-134.
- 14) Fujiwara Y, Miwa M, Nagatsu A, Honma A: Identification of Maple Anthocyanin and Its Antiproliferative Activity against LLC, T47D and C3H10T1/2 Cells. Anti-cancer agents in medicinal chemistry, 2020, 21: 894-901.

1-2. 総説

- 1) Amakura Y, Yoshimura M, Sugimoto N, Akiyama H: Characterization of components in natural products for the evaluation of existing food additives in Japan. Chem. Pharm. Bull. 2021; 69: 11-17.

1-3. 単行本

- 1) Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: "Comprehensive Natural Products III", Volume 7; New Methods in Natural Products Chemistry, 7.04 Application of ¹H-quantitative NMR From the Viewpoint of Regulatory Science, Elsevier. Netherland, pp.50-60 (2020).
- 2) 永津明人, 生薬・薬用植物の技術と市場, 第7章「定量 NMR(¹H-qNMR)法による生薬成分の分析～生薬キョウニン, トウニン, ウバイに含まれる amygdalin の定量を例に～」, p.71-78, シーエムシー出版, 共著

(分担執筆), 東京(2020).

2. 学会発表等

2-1. 学会

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 精油除去ウイキョウ抽出物の成分規格作成に向けた基礎的検討. 日本食品化学学会第 26 回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上開催).
- 2) 寺澤陸, 本多亘, 榊原みなみ, 長谷川文哉, 豊島智三, 石田康行, 堤内要, 猪飼誉友, 石橋諒, 箕川剛, 古屋浩太, 森本隆司, 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 岡尚男: 固体 NMR と熱分解 GC-MS を用いたクチナシ青色素の構造解析. 日本食品化学学会第 26 回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表).
- 3) 多田敦子, 日置冬子, 石附京子, 久保田浩樹, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物 dl- α -トコフェロールの色調と純度について. 日本食品化学学会第 26 回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表).
- 4) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物「カラシ抽出物」および「セイヨウワサビ抽出物」に含まれるイソ治安酸アリル定量法の改良. 日本食品化学学会第 26 回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表).
- 5) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物「カラシ抽出物」および「セイヨウワサビ抽出物」に含まれるイソチオシアン酸アリル定量法の改良. 日本食品化学学会第 26 回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上開催).
- 6) 渡辺麻衣子, 青木渉, 渡辺雅樹, 寺島淳, 小西良子, 近藤一成, 工藤由紀子: COI 遺

- 伝子塩基配列における挿入/欠失パターンおよび系統解析に基づく日本国内に分布する *Entoloma sarcopum* とその近縁種の食用および毒キノコの識別. 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会 (2020.11.24-2020.12.8)(Web).
- 7) 堤内要, 寺澤陸, 本多亘, 榊原みなみ, 長谷川文哉, 豊島智三, 石田康行, 猪飼誉友, 石橋諒, 古屋浩太, 森本隆司, 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 岡尚男: 量子化学計算を用いたクチナン青色素の分子構造に関する研究. 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会(2020.11.24-2020.12.8)(Web).
- 8) 西崎雄三, 石附京子, 中島馨, 増本直子, 末松孝子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 外部標準法 qNMR の自動化スクリプトの作成. 第 2 回日本定量 NMR 研究会年 (2020.12.4)(LiSE 川崎生命科学・環境研究センター).
- 9) 石附京子, 建部千絵, 西崎雄三, 窪崎敦隆, 多々敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: ^{13}C -CP/MAS を用いた食品添加物キトサンの脱アセチル化度の測定. 第 2 回日本定量 NMR 研究会年 (2020.12.4)(LiSE 川崎生命科学・環境研究センター).
- 10) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 石附京子, 小出達夫, 村林美香, 宮下尚人, 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, 山田裕子, 岩本芳明, 三浦亨, 水井浩司, 朝倉克夫, 末松孝子, 小浜亜以, 後藤隆志, 安田万寿, 上田知彦, 合田幸広: ^{31}P 核を用いた ^{31}P -qNMR の検討(1) シクロホスファミド水和物の絶対純度の測定. 第 2 回日本定量 NMR 研究会年 (2020.12.4)(LiSE 川崎生命科学・環境研究センター).
- 11) 高橋未来, 高木映里, 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 HPLC によるクルクミン類の定量法の検討. 第 2 回日本定量 NMR 研究会年 (2020.12.4)(LiSE 川崎生命科学・環境研究センター).
- 12) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: 相対モル感度 (RMS) を用いたアントシアニンの純度評価. 日本食品科学工学会令和 3 年度関東支部大会 (2021.3.6) (オンライン)
- 13) Takahashi M: Single Reference HPLC Approach for Application of Food Analysis. AOAC 2021 Virtual Midyear Meeting (2021.3.19) (Online)
- 14) 坂口裕子, 高橋未来, 西崎雄三, 高木映里, 橋本 誠, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一, 一川暢宏: 相対モル感度に基づくカルバマゼピンとフェニトインのシングルリファレンス HPLC 定量法の構築と基礎検討. 日本薬学会第 141 年会 (2021.3.26-3.29)(広島国際会議場他).

1-2. シンポジウム等

- 1) 杉本直樹: 定量に用いる相対モル感度 (RMS) の求め方. 第 2 回日本定量 NMR 研究会年 (2020.12.4)(LiSE 川崎生命科学・環境研究センター, 約 70 名).
- 2) Sugimoto N: Measurement of relative molar sensitivity using the combination of qNMR and chromatography from the viewpoint of regulatory science. Virtual workshop, Emerging Technologies: Quantitative NMR and digital data-overview and perspectives.

(2020.11.19)(USP on-line, 約 120 名).

- 3) Sugimoto N: Virtual Roundtable Panelist.
Emerging Technologies: Quantitative NMR
and digital data-overview and perspectives.

(2020.11.19)(USP on-line, 約 120 名).

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格に関する研究

～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 357 品目の成分規格については、第 9 版食品添加物公定書に 89 品目、追補 1 に 2 品目が記載され、また、3 品目(9 成分規格)が告示されたが、なお、139 品目(159 成分規格)が未設定の状況で残る。

当協会は、これまで既存添加物について食品添加物公定書への新規収載を目標に、成分規格の策定を進めてきた。また、自主規格の策定及び見直しに関する検討を継続してきた。

しかしながら、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

といった課題のある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139品目については規格設定が困難な品目が残ったと言えるが、今後も着実な成分規格の作成が必要である。

本年度は、食品添加物公定書に記載されていない品目について、既存添加物 100 成分規格、一般飲食物添加物 20 成分規格について自主規格の作成を進め、「第 5 版既存添加物自主規格」にとりまとめた。

さらに第 10 版食品添加物公定書への新規収載に向けて成分規格案の作成を進めた。それらの内、5 品目が第 10 版食品添加物公定書作成検討会(第 8 回)で検討された。また、今後の検討会に提出するために 8 品目の成分規格案の検討を行った。さらに一般飲食物添加物についても 7 品目の成分規格案を検討した。

これらの活動について、本研究報告書にまとめて報告する。

研究協力者

等々力博志 (一社)日本食品添加物協会
常務理事

(2) 第 10 版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目

1) 作成・検討中の品目

現在の状況について、4 項目(①担当部会、②用途、③既存添加物番号、④品目名)でまとめた。

2) 第 10 版食品添加物公定書成分規格案に位置付けて第 5 版自主規格を作成した品目

作成状況について、4 項目(①担当部会、②用途、③既存添加物番号、④品目名)への対応)でまとめた。それらの成分規格案については、第 5 版既存添加物自主規格に収載する。

(3) 第 5 版既存添加物自主規格

既存添加物、一般飲食物添加物について自主規格を作成した。それらの品目名を別紙資料に収載した。

A. 研究方法

(1) 既存添加物成分規格案の整備状況

第 9 版食品添加物公定書未収載品について、2021 年 2 月時点での弊会内の検討状況を 8 項目(①第 10 版成分規格案を作成済の規格、②第 10 版成分規格案を第 5 版自主規格として作成した規格、③第 5 版自主規格を作成した規格、④第 4 版自主規格で作成していた規格、⑤成分規格案の作成における参考事項、⑥第 3 者検証を実施した年度及び項目、⑦自社検証を実施した年度及び項目、⑧食品衛生管理者の設置において問題がある品目)でまとめた。

(4) 調査研究者

これら評価・検討は自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーで実施した。メンバーは表3に記した。

B. 研究結果

(1) 既存添加物成分規格案の整備状況

2020年1月時点での弊会内の検討状況について、まとめた結果を表1に記した。

分類した12項目について規格数を以下に示した。成分規格が告示された品目、消除された品目は対象外とした。

- ①第10版成分規格案を作成済 : 49
(内訳一対応済:34, 検討中・対応中:7, 規格案を再検討中:5, 規格案作成済・課題あり:3)
- ②第10版成分規格案を第5版自主規格として作成 : 11
- ③第5版自主規格を作成 : 120
(内訳一既存添加物:100(暫定規格:6, 第4版から削除した暫定規格:4), 一般飲食物添加物:20)
- ④第4版自主規格で作成していた規格 : 80
(暫定規格:4)
- ⑤成分規格案の作成における参考事項 : 52
- ⑥第3者検証を実施した年度及び項目 : 62
- ⑦自社検証を実施した年度及び項目 : 26
- ⑧食品衛生管理者の設置において問題あり:19

(2) 第10版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目

1) 作成・検討中の規格

既存添加物は8規格、一般飲食物添加物は7規格(いずれも着色料)であった。現在の状況については表2-1にまとめた。

2) 第10版食品添加物公定書成分規格案に位置付けて第5版自主規格を作成した規格

該当する規格は11となった(表2-2)。それ

らの成分規格案については(3)第5版既存添加物自主規格の頁に収載した。

(3) 第5版既存添加物自主規格

既存添加物は100成分規格、一般飲食物添加物は20成分規格を作成した。それらは別紙資料2に収載した。

(4) 調査研究者

既存添加物、一般飲食物添加物の成分規格を検討した自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーを表3に記した。

C. 考察

今年度までの検討を振り返ると、成分規格が設定(告示)されていない既存添加物は139品目(159成分規格)存在している。それらの内、自主規格を作成したものは100成分規格であり、それらのうち、第10版成分規格案を作成済のものは49である。現時点では、残る39品目(59成分規格)は規格設定が困難な品目と言える。

規格設定が困難な品目については、流通実態の把握、添加物としての品質・有効性の明確化、有効成分の明確化などが課題であり、成分規格案作成作業に伴う負担もかなり大きいため、この状況の改善をはかることを目的とした思い切った対策を講じる必要があると考えられる。

また、自主規格の食品添加物公定書成分規格への収載を促進するためには、成分規格設定による事業者のメリットの明確化、基原設定ルールの改善、試験法の設定に関する支援などが必要と考えられる。

D. 謝辞

本年度の調査研究に際して、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の佐藤部長、杉本第二室長をはじめとする諸先生方に多大なるご指導をいただいた。心より感謝申し上げます。次第である。

表1 既存添加物成分規格案の整備状況

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号	規格名称	成分規格の整備状況						食衛管理者問題	
					(○：対応済, ●：規格案作成済・課題あり, △：検討・対応中, ▲：規格案再検討, 暫：暫定規格, 除：削除した暫定規格)							
					第10版成分規格案の作成		自主規格		参考事項	検証項目		
作成済	第5版自主規格として作成	第5版	第4版	第3者	自社							
1	甘味料	165	E00181	ステビア末					食品流通			
1	甘味料	264	E00284	ブラジルカンゾウ抽出物				○				
2	着色料	24	E00024	アルミニウム			暫	○				
2	着色料	46	E00048	オレンジ色素				○				
2	着色料・製造用剤	87	E00093	金	●		○	○		H28 全項目	H29 全項目	●
2	着色料・製造用剤	88	E00094	銀	●		○	○		H28 全項目	H29 全項目	●
2	着色料	113	E00120	クロロフィリン					規格情報無			
2	着色料	154	E00165	シタン色素	○		○	○		H30 全項目	H29 全項目	
2	着色料	160	E00177	植物炭末色素	○		○	○		H31 全項目	H29 全項目	
2	着色料	253	E00272	ファフィア色素	▲		○	○		H29 全項目	H29.30 全項目	
2	着色料	276	E00295	ペカンナッツ色素			暫	○				
2	着色料	317	E00342	ムラサキヤマイモ色素			○	○				
2	着色料	354	E00382	ログウッド色素					規格情報無			
3	保存料	73	E00078	カワラヨモギ抽出物	○		○	○		H29 全項目	H31 全項目	
3	製造用剤/日持	111	E00117	グレープフルーツ種子抽出物								
3	製造用剤/日持	157	E00168	ショウガ抽出物					規格情報無			
3	製造用剤/日持	170	E00186	セイヨウワサビ抽出物	○		○	○		H28 全項目		
3	製造用剤/日持	211	E00230	トウガラシ水性抽出物	○		○	○		H30 全項目	H31 全項目	
3	製造用剤/日持	262	E00282	ブドウ果皮抽出物			○	○				
3	製造用剤/日持	322	E00347	モウソウチク乾留物	▲		○	○		H31 全項目		
3	製造用剤/日持	323	E00348	モウソウチク抽出物	△		○	○				

部会	用途分類	既存 添加物 番号	コード 番号	規格名称	成分規格の整備状況 (○：対応済，●：規格案作成済・課題あり，△：検討・対応中，▲：規格案再検討， 暫：暫定規格，除：削除した暫定規格)						食 衛 管 理 者 問 題	
					第10版成分規格案の 作成		自主規格		参考事項	検証項目		
					作成済	第5版自主規格 として作成	第5版	第4版		第3者		自社
4	増粘安定剤	1	E00001	アウレオバシジウム培養液 (液体品)			○	○		H31 全項目		
4	増粘安定剤	1	E00001	アウレオバシジウム培養液 (粉末品)						H31 全項目		
4	増粘安定剤	4	E00004	アグロバクテリウムスクシノ グリカン	○		○			H31 全項目		
4	増粘安定剤	13	E00013	アマシードガム		○	○	○		H31 全項目		
4	増粘安定剤	19	E00019	アラビノガラクトン		○	○	○		H31 全項目		
4	増粘安定剤/ ガムベース	39	E00040	エレミ樹脂	○		○			H30 全項目	H29 全項目	
4	増粘安定剤	52	E00054	カシアガム		○	○	○		H30 全項目		
4	増粘安定剤	60	E00065	ユーケマ藻末					規格情報無			
4	増粘安定剤	81	E00086	キチン		○	○	○		H30 全項目		
4	増粘安定剤/ 製造用剤	83	E00088	キトサン		○	○	○		H30 全項目		
4	増粘安定剤	90	E00096	グァーガム酵素分解物	○		○	○		H30 全項目	H31 全項目	
4	増粘安定剤	102	E00108	グルコサミン	○		○	○		H27 全項目		
4	増粘安定剤/ 製造用剤	141	E00149	サバクヨモギシードガム	○		○	○		H30 全項目	H29 全項目	
4	増粘安定剤	224	E00243	トロロアオイ		○	○	○		H30 全項目		
4	増粘安定剤	252	E00271	ファーセララン		○	○	○		H30 全項目		
4	増粘安定剤	329	E00354	モモ樹脂		○	○	○		H30 全項目		

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号	規格名称	成分規格の整備状況							食 衛 管 理 者 問 題
					(○：対応済，●：規格案作成済・課題あり，△：検討・対応中，▲：規格案再検討， 暫：暫定規格，除：削除した暫定規格)							
					第10版成分規格案の作成		自主規格		参考事項	検証項目		
作成済	第5版自主規格として作成	第5版	第4版	第3者	自社							
5	酸化防止剤	57	E00059	カテキン	▲		○	○		H29 全項目		
5	酸化防止剤/日持	75	E00080	カンゾウ油性抽出物	○		○	○		H30 全項目	H29 全項目	
5	酸化防止剤	91	E00097	グアヤク脂			○					
5	酸化防止剤	93	E00099	クエルセチン	○		○	○		H30 全項目	H31 全項目	
5	酸化防止剤/日持	112	E00119	クローブ抽出物			暫	○				
5	酸化防止剤	126	E00134	酵素分解リンゴ抽出物					規格情報無			
5	酸化防止剤	132	E00140	ゴマ油不けん化物			○					
5	酸化防止剤	137	E00145	コメスカ酵素分解物					規格情報無			
5	酸化防止剤	169	E00185	精油除去ウイキョウ抽出物					規格情報無			
5	酸化防止剤	173	E00189	セージ抽出物					規格情報無			
5	酸化防止剤	191	E00207	単糖・アミノ酸複合物			○					
5	酸化防止剤	197	E00216	チャ抽出物	○		○	○			H31 全項目	
5	酸化防止剤	227	E00246	生コーヒー豆抽出物	△		○	○		H31 全項目		
5	酸化防止剤	250	E00269	ヒマワリ種子抽出物	○		○	○		H28 全項目	H29.30 全項目	
5	酸化防止剤	270	E00290	プロポリス抽出物					規格情報無			
5	酸化防止剤	299	E00319	没食子酸	○		○			H28 全項目	H30 全項目	
5	酸化防止剤	321	E00346	メラロイカ精油					規格情報無			
5	酸化防止剤	348	E00375	ルチン(抽出物)(アズキ全草抽出物)					規格情報無			
5	酸化防止剤	348	E00375	ルチン(抽出物)(ソバ全草抽出物)					規格情報無			
5	酸化防止剤	357	E00385	ローズマリー抽出物	△		○	○		H31 全項目		

部会	用途分類	既存 添加物 番号	コード 番号	規格名称	成分規格の整備状況 (○：対応済，●：規格案作成済・課題あり，△：検討・対応中，▲：規格案再検討， 暫：暫定規格，除：削除した暫定規格)							食 衛 管 理 者 問 題
					第10版成分規格案の 作成		自主規格		参考事項	検証項目		
					作成済	第5版自主規格 として作成	第5版	第4版		第3者	自社	
6	ガム・光沢	35	E00036	ウルシロウ	○		○	○		H30 全項目	H31 (酸化, 融点)	
6	ガムベース	41	E00042	オゾケライト			暫	○				
6	ガムベース	92	E00098	グアヤク樹脂			○	○				
6	ガムベース	97	E00103	グッタハンカン			暫	○				
6	ガムベース	98	E00104	グッタペルカ			○	○				
6	ガムベース	134	E00142	ゴム	△		○	○		H31 全項目		
6	ガムベース	135	E00143	ゴム分解樹脂				○				
6	ガム/光沢	138	E00146	コメヌカロウ	○		○	○		H29 全項目		
6	ガム/光沢	140	E00148	サトウキビロウ	○		○	○		H30 全項目		
6	ガム/光沢	147	E00158	シェラックロウ	○		○	○		H31 全項目		
6	ガムベース	149	E00160	ジェルトン	○		○	○		H31 全項目	H29 全項目	
6	ガムベース	180	E00196	ソルバ			除	暫	規格削除			
6	ガムベース	181	E00197	ソルビンハ			除	暫	規格削除			
6	ガムベース	194	E00213	チクル	○		○	○		H31 全項目	H29 全項目	
6	ガムベース	198	E00217	チルテ								
6	ガムベース	200	E00219	ツヌー					規格情報無			
6	ガムベース	203	E00222	低分子ゴム			除	暫	規格削除			
6	ガムベース	230	E00249	ニガーグッタ					規格情報無			
6	ガムベース	275	E00294	粉末モミガラ					規格情報無			
6	ガムベース	288	E00308	ベネズエラチクル					規格情報無			
6	ガムベース	300	E00320	ホホバロウ			○	○				
6	ガムベース	305	E00325	マスチック			暫	○		H31 全項目		

部会	用途分類	既存 添加物 番号	コード 番号	規格名称	成分規格の整備状況 (○：対応済，●：規格案作成済・課題あり，△：検討・対応中，▲：規格案再検討， 暫：暫定規格，除：削除した暫定規格)						食 衛 管 理 者 問 題	
					第10版成分規格案の 作成		自主規格		参考事項	検証項目		
					作成済	第5版自主規格 として作成	第5版	第4版		第3者		自社
6	ガムベース	306	E00326	マッサランドバチョコレート					規格情報無			
6	ガムベース	307	E00327	マッサランドババラタ			除	暫	規格削除			
6	ガムベース	314	E00339	ミルラ	○		○	○		H31 全項目	H29 全項目	
6	ガム/光沢	326	E00351	モクロウ	○		○	○		H30 全項目		
6	ガムベース	351	E00378	レッチュデバカ					規格情報無			
6	ガムベース	355	E00383	ロシディンハ					規格情報無			
6	ガムベース	356	E00384	ロシン	○		○	○		H30 全項目	H29 全項目	
9	調味料	40	E00041	塩水湖水低塩化ナトリウム液	○		○	○		H29 全項目	H29 全項目	
9	苦味料	84	E00089	キナ抽出物					規格情報無			
9	苦味料	85	E00090	キハダ抽出物					規格情報無			
9	苦味料	117	E00126	ゲンチアナ抽出物	○		○	○		H29 全項目	H29・30 全項目	
9	苦味料	121	E00130	酵素処理ナリンジン	△		○	○		H30 全項目		
9	苦味料	156	E00167	ジャマイカカッシア抽出物	○		○	○		H28 全項目	H28 全項目	
9	調味料	177	E00193	粗製海水塩化カリウム	△		○	○				
9	苦味料	204	E00223	テオブロミン					規格情報無			
9	苦味料	231	E00250	ニガヨモギ抽出物			○	○				
9	苦味料	350	E00377	レイシ抽出物	○		○	○		H30 全項目		
10	乳化剤	124	E00386	酵素処理レシチン	○		○	○		H26 全項目		
10	乳化剤	167	E00183	スフィンゴ脂質			○	○				
10	乳化剤	182	E00198	ダイズサポニン			○	○				
10	乳化剤	190	E00206	胆汁末			○	○				

部会	用途分類	既存 添加物 番号	コード 番号	規格名称	成分規格の整備状況 (○：対応済, ●：規格案作成済・課題あり, △：検討・対応中, ▲：規格案再検討, 暫：暫定規格, 除：削除した暫定規格)							食 衛 管 理 者 問 題
					第10版成分規格案の 作成		自主規格		参考事項	検証項目		
					作成済	第5版自主規格 として作成	第5版	第4版		第3者	自社	
13	製造用剤	9	E00009	アスペルギルスステレウス糖たん白質			○	○		H31 全項目		
13	製造用剤	29	E00030	イナワラ灰抽出物					規格情報無			
13	製造用剤	42	E00043	オゾン			○					●
13	製造用剤	42	E00043	オゾン水			○					●
13	製造用剤	43	E00044	オリゴガラクチュロン酸					規格情報無			
13	製造用剤	45	E00047	オレガノ抽出物					規格情報無			
13	製造用剤	47	E00049	海藻灰抽出物			○					
13	製造用剤	51	E00053	花こう斑岩			○	○				●
13	製造用剤	99	E00105	クリストバル石					規格情報無			
13	製造用剤	114	E00121	くん液		○	○			H31 全項目		
13	製造用剤	118	E00127A	高級脂肪酸								
13	製造用剤	133	E00141	ゴマ柄灰抽出物								
13	製造用剤	144	E00152	酸素			○					●
13	製造用剤	150	E00161	分岐シクロデキストリン			○	○		H31 全項目		
13	製造用剤	153	E00164	シソ抽出物			○					
13	製造用剤/強化剤	158	E00170	うに殻焼成カルシウム					規格情報無	H27 全項目		
13	製造用剤/強化剤	158	E00173	造礁サンゴ焼成カルシウム					規格情報無	H27 全項目		
13	製造用剤/強化剤	158	E00174	乳清焼成カルシウム	○		○			H27 全項目	H25, 26, 27 全項目	
13	製造用剤	163	E00179	水素					規格情報無			●
13	製造用剤	171	E00187	ゼイン					規格情報無			
13	製造用剤	172	E00188	ゼオライト					規格情報無			
13	製造用剤	174	E00190	セピオライト					規格情報無			
13	製造用剤	179	E00195	ソバ柄灰抽出物					規格情報無			
13	製造用剤	193	E00210	柿タンニン			○	○				●
13	製造用剤	193	E00212	ミモザタンニン			○					

部会	用途分類	既存 添加物 番号	コード 番号	規格名称	成分規格の整備状況						食 衛 管 理 者 問 題
					(○：対応済，●：規格案作成済・課題あり，△：検討・対応中，▲：規格案再検討， 暫：暫定規格，除：削除した暫定規格)						
					第10版成分規格案の 作成		自主規格		参考事項	検証項目	
作成済	第5版自主規格 として作成	第5版	第4版	第3者	自社						
13	製造用剤	195	E00214	窒素			○				●
13	製造用剤	196	E00215	チャ乾留物		○	○	○			
13	製造用剤/強化剤	207	E00226	鉄			○				●
13	製造用剤	209	E00228	銅					規格情報無		●
13	製造用剤	222	E00241	トレハロース	△		○	○		H27 全項目	
13	製造用剤	226	E00245	ナフサ							
13	製造用剤	232	E00251	ニッケル			○	○			
13	製造用剤	234	E00253	ばい煎コメヌカ抽出物	▲		○			H30 全項目	H31 全項目
13	製造用剤	235	E00254	ばい煎ダイズ抽出物	▲		○			H30 全項目	H31 全項目
13	製造用剤	237	E00256	白金					規格情報無		
13	製造用剤	241	E00260	パラジウム							
13	製造用剤	244	E00263	ヒアルロン酸	○		○	○		H28 全項目	
13	製造用剤	251	E00270	ひる石					規格情報無		
13	製造用剤	257	E00276	フィチン（抽出物）	○		○	○		H30 全項目	
13	製造用剤	260	E00280	ブタン			○				●
13	製造用剤	269	E00289	プロパン			○				●
13	製造用剤	290	E00310	ヘプタン*	●		○			H26 全項目	●
13	製造用剤	295	E00315	ヘリウム			○				●
13	製造用剤/強化剤	311	E00332	貝殻未焼成カルシウム	○		○			H27 全項目	
13	製造用剤/強化剤	311	E00333	骨未焼成カルシウム					規格情報無		
13	製造用剤/強化剤	311	E00335	真珠層未焼成カルシウム				○			
13	製造用剤/強化剤	311	E00336	卵殻未焼成カルシウム			○	○			
13	製造用剤	320	E00345	メバロン酸			○	○		H28 全項目	
13	製造用剤	324	E00349	木材チップ			○		規格情報無		●

*ヘプタン：製造事業者における食品衛生管理者設置の問題があり，パブコメでの対応が必要なため課題ありとして●で表示

部会	用途分類	既存 添加物 番号	コード 番号	規格名称	成分規格の整備状況						食 衛 管 理 者 問 題
					(○：対応済，●：規格案作成済・課題あり，△：検討・対応中，▲：規格案再検討， 暫：暫定規格，除：削除した暫定規格)						
					第10版成分規格案の 作成		自主規格		参考事項	検証項目	
作成済	第5版自主規格 として作成	第5版	第4版	第3者	自社						
13	製造用剤	325	E00350	木炭			○				●
13	製造用剤	327	E00352	木灰			○				●
13	製造用剤	328	E00353	木灰抽出物			○				●
13	製造用剤	346	E00370	リンターセルローズ					規格情報無		
13	製造用剤	349	E00376	ルテニウム			○				
14	香辛料抽出物	119	E00128	香辛料抽出物	○						

表2 第10版公定書成分規格案

表2-1 作成・検討中の第10版公定書成分規格案

部会	コード番号	既存添加物 番号	用途	品目名
既存添加物				
6	E00036	035	ガムベース・光沢剤	ウルシロウ
6	E00148	140	ガムベース・光沢剤	サトウキビロウ
6	E00160	149	ガムベース	ジェルトン
6	E00213	194	ガムベース	チクル
6	E00339	314	ガムベース	ミルラ
6	E00351	326	ガムベース・光沢剤	モクロウ
13	E00174	158	製造用剤・強化剤	乳清焼成カルシウム
13	E00332	311	製造用剤・強化剤	貝殻未焼成カルシウム
一般飲食物添加物				
2	I0003		着色料	アカダイコン色素
2	I0006		着色料	イカスミ色素
2	I0010		着色料	エルダベリー色素
2	I0061		着色料	サフラン色素
2	I0063		着色料	シソ色素
2	I0070		着色料	チコリ色素
2	I0082		着色料	ブドウ果汁色素

表2-2 第5版自主規格として作成した第10版公定書規格案

部会	コード番号	既存添加物 番号	用途	品目名
4	E00013	13	増粘安定剤	アマシードガム
4	E00019	19	増粘安定剤	アラビノガラクトン
4	E00054	52	増粘安定剤	カシアガム
4	E00086	81	増粘安定剤	キチン
4	E00088	83	増粘安定剤	キトサン
4	E00243	224	増粘安定剤	トロロアオイ
4	E00271	252	増粘安定剤	ファーセララン
4	E00354	329	増粘安定剤	モモ樹脂
9	E00193	177	調味料	粗製海水塩化カリウム
13	E00122	114	製造用剤	くん液
13	E00215	196	製造用剤	チャ乾留物

表3 調査研究者

日本食品添加物協会における役職	氏名	企業名
技術委員長	等々力 博志	一般社団法人日本食品添加物協会
自主規格・規格専門委員長, 部会長・部会担当	西宮 隆	株式会社タイショーテクノス
技術情報評価専門委員長	山田 益己	理研ビタミン株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	竹村 優子	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	大野 裕和	丸善製薬株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	西野 雅之	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	北村 智	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	松岡 賢一	DSP五協フード&ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	西川 秀二	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	深沢 徹也	三菱ケミカルフーズ株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	岸森 好明	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	卯津羅健作	ナガセケムテックス株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	小川 知成	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	植田実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	香村 正徳	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	近藤 直樹	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	小野 茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	坂井 昭浩	オルガノフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	村上 和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	深尾 正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	関谷 史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	稲井 隆之	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員	栗山 義顕	株式会社ウエノフードテクノ
自主規格・規格・技術情報評価専門委員	阿部 貴宏	三菱ケミカルフーズ株式会社
自主規格・規格専門委員	酒井 正典	ダイワ化成株式会社
規格・技術情報評価専門委員	小笠原 正志	三菱商事ライフサイエンス株式会社
技術委員, 自主規格・規格・技術情報評価専門委員	原田 健一	理研ビタミン株式会社
技術委員, 技術情報評価専門委員	大橋 篤志	小川香料株式会社
技術委員, 技術情報評価専門委員	加藤 茂	株式会社武蔵野化学研究所
技術委員, 技術情報評価専門委員	岡本 隆広	三菱ケミカルフーズ株式会社
技術委員, 技術情報評価専門委員	日俣 克一	山崎製パン株式会社
技術委員	米山 明美	三菱商事ライフサイエンス株式会社
技術情報評価専門委員	梅原 静代	BASF ジャパン株式会社
技術情報評価専門委員	芝田 美穂	第一工業製薬株式会社
技術情報評価専門委員	伊勢 啓弘	花王株式会社
部会長・部会担当	西山 浩司	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
技術特任アドバイザー	村田 義文	一般社団法人日本食品添加物協会

別紙資料 第5版既存添加物自主規格に記載した品目

【既存添加物】

アウレオバシジウム培養液
アグロバクテリウムスクシノグリカン
アスペルギルステレウス糖たん白質
アマシードガム
アラビノガラクトサン
アルミニウム
ウルシロウ
エレミ樹脂
塩水湖水低塩化ナトリウム液
オゾケライト
オゾン
オゾン水
貝殻未焼成カルシウム
海藻灰抽出物
柿タンニン
花こう斑岩
カシアガム
カテキン
カワラヨモギ抽出物
カンゾウ油性抽出物
キチン
キトサン
金
銀
グァーガム酵素分解物
グアヤク脂
グアヤク樹脂
クエルセチン
グッタハンカン
グッタペルカ
グルコサミン
クローブ抽出物
くん液
ゲンチアナ抽出物
酵素処理ナリンジン
酵素処理レシチン
ゴマ油不けん化物

ゴム
コメヌカロウ
サトウキビロウ
サバクヨモギシードガム
酸素
シェラックロウ
ジェルトン
シソ抽出物
シタン色素
ジャマイカカシミア抽出物
植物炭末色素
スフィンゴ脂質
セイヨウワサビ抽出物
粗製海水塩化カリウム
ダイズサポニン
胆汁末
単糖・アミノ酸複合物
チクル
窒素
チャ乾留物
チャ抽出物
鉄
トウガラシ水性抽出物
トレハロース
トロロアオイ
生コーヒー豆抽出物
ニガヨモギ抽出物
ニッケル
乳清焼成カルシウム
ばい煎コメヌカ抽出物
ばい煎ダイズ抽出物
ヒアルロン
ヒマワリ種子抽出物
ファーセララン
ファフィア色素
フィチン（抽出物）
ブタン
ブドウ果皮抽出物

プロパン
分岐シクロデキストリン
ペカンナッツ色素
ヘプタン
ヘリウム
没食子酸
ホホバロウ
マスチック
ミモザタンニン
ミルラ
ムラサキヤマイモ色素
メバロン酸
モウソウチク乾留物
モウソウチク抽出物
木材チップ
モクロウ
木炭
木灰
木灰抽出物
モモ樹脂
卵殻未焼成カルシウム
ルテニウム
レイシ抽出物（子実体）

ロシン
ローズマリー抽出物
【一般飲食物添加物】
アカゴメ色素
アカジャガイモ色素
アカダイコン色素
イカスミ色素
エルダーベリー色素
カンゾウ末
クランベリー色素
サフラン色素
シソ色素
チコリ色素
ノリ色素
ハイビスカス色素
パープルキャロット色素
ブドウ果汁色素
ブラックベリー色素
ブルーベリー色素
ボイセンベリー色素
ホワートルベリー色素
ラズベリー色素
レッドカーラント色素

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～¹³C-CP/MAS-NMRによるキトサンの脱アセチル化度の測定～

研究分担者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究要旨 キトサンの脱アセチル化度はその物性に大きな影響を与えることから、品質を制御するための重要な指標であると考えられる。そこで、食品添加物として流通しているキトサンの脱アセチル化度を前処理無しで固体のまま直接測定する方法として¹³C-CP/MAS-NMRによる方法を検討した。種々の条件検討を行い、CP/MAS条件を最適化し、測定した結果、測定条件を一定にすることによって固体NMRにより、脱アセチル化度を直接測定することができた。また、ポリビニル硫酸カリウムを用いた滴定法による結果と固体NMRにより得られた結果を比較したところ、ほぼ同じ結果となった。以上のことから、いずれの方法においても脱アセチル化度が測定できていることが確認できた。

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 主任研究官

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 主任研究官

A. 研究目的

既存添加物「キトサン」は基原・製法・本質として「キチン」を、温時～熱時水酸化ナトリウム水溶液で脱アセチル化したもので、D-グルコサミンの多量体からなる。」とされている。また、「キトサン」の原料となる既存添加物「キチン」の基原・製法・本質には、「エビ、カニ等甲殻類の甲殻又はイカの甲を、室温時～温時酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去した後、温時～熱時弱アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもので、N-アセチル-D-グルコサミンの多量体からなる。」と記載されている(消食表第 375号)。公的な成分規格がいずれも設定されておらず、早急な対応が要求されている。

基原・製法・本質に示されたとおり、「キトサン」は、「キチン」を脱アセチル化したものであり、その脱アセチル化度はおよそ 70%とされている。よって、「キトサン」は、グルコサミン(GU)とアセチルグルコサミン (AGU)から構成される多量体である(Fig. 1)。脱アセチル化度は大きく物性に影響を与えるため、品質評価のための重要な指標と考えられる。

キトサンの脱アセチル化度を測定する方法としてポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)によるコロイド滴定が知られている。本法は GU のアミノ基が酸性下でポリカチオンとなり、PVS-K のポリアニオンが強いクーロン引力で、瞬時にポリオンコンプレックスを形成することに基づいている。原理的に、本法によりキトサンの脱アセチル化度が精確に測定可能であると考えられるが、それを裏付ける方法がない。

そこで本研究では、固体 NMR により「キトサン」の分析を試みた。固体 NMR は固体試料をそのまま測定することが可能で前処理の必要がなく、得られた NMR スペクトルより試料の構造あるいは組成を直接観察することができる。PVS-K による滴定法と固体 NMR による定量値を比較し、PVS-K による滴定法で「キトサ

ン」の脱アセチル化度が精確に測定でき、公的な成分規格の試験法として検討に値するかどうか確認したので報告する。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

キチンは国内で入手可能な試薬 7 製品(CN1-7)及び別入手した食品添加物原料 1 製品(CN8), キトサンは食品添加物 5 製品(CS1-5)を試料として用いた(Table 1). これら製品をそのまま測定に供したが, CN8 については, NMR 試料管に詰めやすいようにはさみで細かく刻んで用いた. また, 本研究において以下の試薬等を試験に用いた. 0.0025 mol/L ポリビニル硫酸カリウム溶液(N/400 PVS-K 溶液)(富士フィルム和光純薬, 164-21655, LOT.PTF7686, $(C_2H_3KO_4S)_n = (162.20)_n$, 《管理番号 21-78c》), トルイジンブルー指示薬溶液(0.1g トルイジンブルー/100mL 水溶液)(富士フィルム和光純薬, 205-05811, LOT.PTH7553, 《管理番号 21-77c》), 超純水(Puric o). 《 》内は当研究室の管理番号を示す.

B-2) 固体 NMR 測定

固体 NMR 測定には, JNM-ECA400 装置(JEOL)を, 測定ソフトには Delta Ver.5.2, 解析には Ver.5.3 を使用した.

試料を 4 mm 固体 NMR 試料管に詰め, 室温条件下, 1H , ^{13}C の 2 つの核種を測定した. ^{13}C 化学シフト値は, テトラメチルシランからの外部基準として, 固体アダマンタンのメチンピーク(高磁場側)を 29.5 ppm に設定した. 1H は native scale で化学シフト値を表した. シグナル帰属は文献値¹⁻³⁾との比較により行った. 基本的な測定パラメータとパルスシーケンスを Table 2, Fig. 2 に示す.

B-2-1) 定量方法 (計算方法)

CP/MAS (Cross Polarization / Magic Angle Spinning)法で固体 NMR を測定するとき, 検出感度を優先していることから, 定量性に乏しいが, 同一条件で測定すればシグナル強度比は一定に測定できる. よって, 試薬キチンが完全に

アセチル化されていると仮定し, これを基準として, キトサン中の AGU 含量を相対的に求めることができる.

Fig. 3 のようにキチン由来の単独シグナル a の積分値を A, キチン+キトサンの混成シグナル b の積分値を B とする. B のうち分離はできないがキチン由来の成分の積分値を $B_{\text{キチン}}$, キトサン由来の積分値を $B_{\text{キトサン}}$ とした場合(簡略化のため核数は 1 とする), 溶液 qNMR ではスペクトル上の各シグナルの積分値は核数とモル濃度に比例するため, $A=B_{\text{キチン}}$ が成立し, 試料中の AGU 含量は

$$\begin{aligned} \text{AGU 含量(mol\%)} &= B_{\text{キチン}} / B * 100 \\ &= A / B * 100 \end{aligned}$$

で求められる. しかし, CP/MAS 法で測定した NMR スペクトルの場合, 各シグナルの積分値は測定対象の核の周囲の他の核, MAS 回転数の影響を受け, 核数とモル濃度に比例関係が成立しないことが多く, $A=B_{\text{キチン}}$ が通常成立しない. そこで, キチン試薬製品を基準物質としてそのシグナル感度比を用いて補正する方法を用いた. 同一条件で測定した基準物質のシグナル a の積分値を A_{ref} , シグナル b の積分値を B_{ref} とすると, 試料中の $B_{\text{キチン}} = A / (A_{\text{ref}} / B_{\text{ref}})$ で補正されるので,

$$\begin{aligned} \text{AGU 含量(mol\%)} &= B_{\text{キチン}} / B * 100 \\ &= (A / (A_{\text{ref}} / B_{\text{ref}})) / B * 100 \\ &= (A / B) / (A_{\text{ref}} / B_{\text{ref}}) * 100 \end{aligned}$$

の関係式より AGU のモルベースの含量が求められる. さらに, AGU と GU のユニット分子量から,

$$\begin{aligned} \text{AGU 含量(wt\%)} &= \text{AGU 含量(mol\%)} * 203 / [\text{AGU 含量(mol\%)} * 203 + (100 - \text{AGU 含量(mol\%)} * 203) * 161] * 100 \end{aligned}$$

と重量ベースの含量に換算することができる. また, 脱アセチル化度は,

$$\begin{aligned} \text{脱アセチル化度(mol\%)} &= \text{GU 含量(mol\%)} \\ &= 100 - \text{AGU 含量(mol\%)} \end{aligned}$$

で求めることができる。

ただし、シグナルが十分に分離しないため、積分比(A/B)を求めるキチン単独シグナル a に CH₃ または C=O を、混成シグナル b に C1, (C3,C4,C5) または (C2,C6) 領域をあてはめ、組み合わせを変えて計 6 つの積分比(A/B, 記号 r1 ~ r6) を求めた。なお、複数炭素領域の積分値は炭素数で割って比を求めた。

$$\begin{aligned} r1 &: \text{CH}_3/\text{C1} \\ r2 &: \text{CH}_3/((\text{C3},\text{C4},\text{C5})/3) \\ r3 &: \text{CH}_3/((\text{C2},\text{C6})/2) \\ r4 &: \text{C}=\text{O}/\text{C1} \\ r5 &: \text{C}=\text{O}/((\text{C3},\text{C4},\text{C5})/3) \\ r6 &: \text{C}=\text{O}/((\text{C2},\text{C6})/2) \end{aligned}$$

以上、基準物質と試料の 6 個の積分比からそれぞれ AGU 含量を求め、平均値を試料の AGU 含量とした。

B-2-2) 緩和時間の確認

測定パラメータの最適化のため、試薬キチンと食品添加物キトサンの ¹H の縦緩和時間 T_{1H} を Saturation Recovery(SR)(飽和回復)法で、試薬キチンの ¹³C の縦緩和時間 T_{1C} を Torchia(トーチヤ)法で測定した。SR 法は、最初に磁化を飽和させ、その回復を観測することで緩和時間を求める方法(Fig. 2e)である。Torchia 法は、交差分極を利用した反復回転法スペクトルと CP/MAS スペクトルの差スペクトルを測定することによって緩和時間を測定する方法(Fig. 2c)で、CP により待ち時間を短縮することができる。

B-2-3) ¹³C-CP/MAS 測定条件の検討

試料回転数、コンタクトタイム、待ち時間、積分回数を検討し、定量用の条件は、Table 2 の ¹³C-CP/MAS 測定条件に決定した。

B-2-4) キチンの ¹³C-CP/MAS 測定

メーカーの異なる試薬 CN1~7 と添加物原料 CN8 のキチンを測定・積分し、繰り返し測定時のばらつき、試料間差があるかどうかを調べた。

B-2-5) キトサン中の AGU 含量、脱アセチル化度の測定

キチン CN1 を基準物質とし、¹³C-CP/MAS スペクトルの積分比 (r1~r6) よりキトサン CS1~5 の AGU 含量と脱アセチル化度を求めた。

B-2-6) 混合試料による混合組成と AGU 含量の確認

¹³C-CP/MAS 測定により、AGU 含量が精確に測定できているかどうか確認するため、キチン CN1 とキトサン CS1 をモル比で 2:1, 1:1, 1:2 混合し、¹³C-CP/MAS 測定を行い、混合組成と算出した AGU 含量が一致するかどうかを調べた。

B-3) 滴定による NH₂ 基の定量

試料約 0.5 g を精密に量り、5 vol%酢酸約 90 mL で 100 mL メスフラスコに洗い込み、室温で一晩放置した、均一なゾル状になっているのを確認し、5 vol%酢酸で 100 mL に定容した。この液 1.0 mL を 50 mL 三角フラスコに分注し、水 30 mL とトルイジンブルー指示薬溶液(TB) 0.1 mL を加えたものを検液とした。検液をスターラーでかく拌しながら、ポリビニル硫酸カリウム溶液(N/400 = 0.0025 mol/L)(PVS-K)で滴定し、検液の色が 10 秒以上赤紫色を保持した点を終点とした(秤量 n3×測定 3 回)。別に 5 vol%酢酸 1 mL に水 30 mL と TB 0.1 mL を加えたものをブランク液(n3)とし、同様に滴定を行った。

次式により NH₂ 基の含量 = GU 含量(mol%) を計算した。

検液中の GU の質量(g):

$$X = 1/400 \times f \times (v-v') / 1000 \times 161$$

検液中の AGU の質量(g):

$$Y = w/100 - X$$

乾燥試料中の NH₂ 基の含量 = GU 含量 (mol%)
= $(X/161) / (X/161 + Y/203) \times 100$

v: 検液の PVS-K 滴定量 (mL)

v': ブランク液の VS-K 滴定量 (mL) (n3 平均)

f: PVS-K のファクター

w: 試料採取量 (g)

161: GU のモル質量

203: AGU のモル質量

ここから、AGU 含量 (mol%) = 100 - GU 含量 (mol%)

C. 結果及び考察

C-1) 固体 NMR と溶液 NMR の違い

固体 NMR は固体試料を溶媒に溶解する必要がないため、難溶性の物質や溶解させることにより構造が変化する物質をそのまま測定することが可能である。測定できる核種は溶液 NMR と同様である。固体測定用の NMR プローブ及び NMR 試料管を用いて固体試料を NMR 試料管に均一に密に詰め測定する。

溶液 NMR では平均化される化学シフト異方性と双極子相互作用が固体 NMR では平均化されずシグナルの線幅が広がるため、固体 NMR ではシグナルの分離能及び検出感度を向上させるための技法が用いられる。固体試料を詰めた NMR 試料管を B₀ 磁場方向に対して 54.7° の角度 (マジック角) に傾けて 4~120kHz で高速回転させる。この技法は MAS (Magic Angle Spinning) と呼ばれ、化学シフトの異方性と双極子-双極子相互作用を平均化する。また、MAS で平均化しきれない双極子-双極子相互作用などを除くために高出力デカップリングが併用される。さらに励起のために DP (Direct Polarization) 又は CP (Cross Polarization) という方法と組み合わせられて用いられる。DP/MAS ではシグナル面積強度比から各成分の比率を算出することが可能だが CP と比べ感度が低く、長時間の測定が必要である。一方、CP/MAS は磁気回転比の大きい核、すなわち、感度の高い核 (¹H, ¹⁹F 等) から磁気回転比の小さい核、すなわち、感度の低い核 (¹³C 等) への分極移動を利用して測定する手法であり、分子運動性が低く、且

つ、磁気回転比の高い核と低い核の空間的距離が近い試料の場合、高感度で測定できる。よって、本研究では、CP/MAS を用いることにした。

C-2) キチン、キトサンの緩和時間の確認

Table 2 の条件でキチンとキトサンの ¹H の縦緩和時間 T_{1H} を SR 法で、¹³C の縦緩和時間 T_{1C} をキチン CN1 についてのみ、Torchia 法で測定した。Fig. 4 にはキチン CN1 の T_{1H} 測定のカブフィットティングを例として示した。¹H スペクトルは H-H 双極子相互作用のため広幅化してしまい 3.5 ppm に 1 本のシグナルしか観察されなかったため、T_{1H} はこのシグナルに対してのみ測定した。キチン CN1~8 及びキトサン CS1~4 について測定した結果、キチン及びキトサンの T_{1H} は最長でも 2.4 s であった。シグナルを飽和させないためには、12 s 以上の繰り返し時間が適当であるが、同一条件で測定する限り、積算効率を優先し多少短くしても定量結果に影響を与えないと考えられた。

次に、キチン CN1 の ¹³C の縦緩和時間 T_{1C} を Torchia 法で測定した結果を Fig. 5, Table 3 に示した。C6 及び CH₃ 位の T_{1C} は比較的短かく運動性が高いと推定された。一方、その他の T_{1C} は長く、C1 位が最長で約 100 s であった。従って、定量性を確保した測定方法 (DP/MAS で繰り返し待ち時間を T_{1C} の 5 倍以上に設定する必要あり) を適用することは現実的ではないと判断できた。よって、キトサン中の AGU 含量の測定には CP/MAS が妥当であると確認できた。

C-3) ¹³C-CP/MAS 測定条件、解析条件の検討

処理条件をまず統一し、再現性や感度を考察した後、測定条件を検討し定量条件を決定した。

C-3-1) ウィンドウ関数

信号面積の精確さを保持し、且つ不要なノイズを除くため、

指数関数 (BF=20Hz) × 台形関数 (0,0,20,60%) で処理を統一した。その後、

ゼロフィリング × 4 倍 → フーリエ変換 → 位相補正 → ベースライン補正 → (波形分離) → 積

分

の順に処理を進めることに統一した。

なお、ベースラインは測定対象のシグナルの積分範囲以外に補正点を設定し補正した。波形分離関数のローレンツ／ガウス混合比は解析ソフト Delta により、シグナルごとにオートで最適化した。Fig. 6 には、キチンとキトサンの FID (緑色)とウィンドウ関数(茶色)を示した。

C-3-2) 積分

得られたキチンとキトサンの ^{13}C -NMR スペクトルを比較したところ、キチンにのみ由来する独立したシグナルは C=O と CH_3 のみであった。両者の母核のアミノ糖部分のスペクトルを比較すると、各シグナルはほぼ同じケミカルシフトで検出された(Fig. 7)。キチンに比べるとキトサンは C1, C2 及び C3 位が低磁場シフトし、C3 と C5 位が重なっており、また全体的に各シグナルが幅広く観察された。このため、積分範囲は、C=O, C1, (C3,C4,C5), (C2,C6), CH_3 の 5 領域に分けることにした。

C-3-5)において、シグナルの積分値の算出方法を示すが、実測スペクトルをベースラインから垂直分割してそのまま積分する方法と波形分離後に積分する方法で求めた(Fig. 8)。

C-3-3) MAS 回転数

200 ppm にわたる化学シフト異方性を消去し、スピニングサイドバンド(SSB)の影響がなく測定を行うには、 ^{13}C -100 MHz 装置では 20 kHz 以上で NMR 試料管を回転させる必要がある。しかし、試料管のサイズ、材質、測定温度により回転数に限界があり、今回用いた装置は 18 kHz が限界である。Fig. 9 には MAS 回転数を 15 kHz と 7 kHz として測定したキチン CN1 のスペクトルを示した。どちらも C=O シグナルに対してスピニングサイドバンド(SSB)が観察されており、15 kHz では CH_3 シグナルと、7 kHz では C1 シグナルと重なることが確認された。15 kHz で測定した場合においても化学シフト異方性は完全に消去できないため、メインシグナルから離れた小さな SSB 強度が観察される。C=O の積分

値としては SSB も含める必要があることから、左右の SSB の面積が同じと仮定し、低磁場側の面積の 2 倍を主シグナルに加え、高磁場側の SSB が含まれると推察される領域から、低磁場側と同じ面積を差し引くことで補正するという方法もある。一方で、MAS 回転数 15 kHz では、観察される SSB の強度は非常に弱いため、測定対象シグナルと重複していたとしても積分値に殆ど影響しないと考えられる。また、常に同一条件で測定するとき、SSB により増減する積分値は常に一定であると考えられる。よって、MAS 回転数は 15 kHz とし、SSB の影響を無視し、補正を行わないこととした。

C-3-4) コンタクトタイム

すべてのシグナルを感度よく測定するコンタクトタイムを設定するため、その値を 1~5 ms の範囲で比較した。キチン CN1 についてコンタクトタイムを変えたときの各シグナル強度の変化を Fig. 10 に示したが、2 ms のとき最大となり、3 ms 以上で感度が低下する傾向が観察された。この結果より、コンタクトタイムを 2 ms として測定することとした。なお、キチン CN1-8 及びキトサン CS1-4 を用いて確認したが、この傾向は変わらなかった。

C-3-5) 繰り返し待ち時間と積算回数

CP/MAS の繰り返し待ち時間は $T_{1H} \times 1.2$ 倍程度のとき積算効率が良い。しかし、シグナルを飽和させないためには T_{1H} の 5 倍以上を確保する必要があるとされている。C-2)で示したようにキチン CN1-8 及びキトサン CS1-4 を用いて T_{1H} を確認し、最長の T_{1H} が 2.4 s であることから、その 5 倍の 12 s 以上が繰り返し待ち時間として理想的であると考えられた。ただし、別に基準物質を用いて同一条件で測定しシグナル感度比を用いて補正するならば、再現性が確保され繰り返し待ち時間を T_{1H} の 5 倍とする必要は無いと考えられる。そこで繰り返し待ち時間を 5 s と 15 s で測定し、得られるシグナル面積の変化を観察した。

キチン CN1-7 について、繰り返し待ち時間 5

s と 15 s で測定をし、CH₃の面積を 1.000 としたときの C=O, C1, (C3, C4, C5), (C2, C6)領域のシグナル面積を求めた。各試料について、各領域のシグナル面積比(15 s の面積 / 5 s の面積)を計算した結果を Table 4 に示す。Fig. 8 に示すように、(a) キチン CN1 を垂直分割して積分した場合、(b) 波形分離を行ってから積分した場合の計算結果を Table 4a 及び Table 4b に示した。キチン CN1-7 間の積分方法によるばらつきを比べてみると、(a)の積分方法では、積分領域間のばらつきは、2.2~4.3%、試料間のばらつきは、3.1~6.6%であった。一方、(b)の波形分離後の積分では、積分領域間が 0.5~2.5%、試料間が 1.2~2.8%と波形分離してから積分し面積を求めた方が繰り返し待ち時間の違いによるばらつきが小さかった。S/N が悪いときやシグナル同士の重なりが大きいときは、波形分離した方がベースラインのノイズやシグナル同士の重なり部分をうまく処理でき、積分範囲の設定も容易と考えられた。よって、波形分離したシグナル積分面積値を使用することとした。

繰り返し待ち時間 5 s と 15 s での各積分領域の面積比(15 s の面積 / 5 s の面積)は、ほぼ 1 を示し同一領域でほぼ一定であったことから、繰り返し待ち時間 5 s とし積算効率を優先しても問題がないと判断した。よって、繰り返し待ち時間 5 s で測定し、キチン CN1 の C1 位の S/N(シグナル幅約 20 ppm に対して、ノイズ幅 20 ppm で計算)が 120 を超える 3000 回(測定時間約 4 時間)を定量時の積算回数に設定した。

C-4) ¹³C-CP/MAS スペクトルの比較

C-3-3)から C-3-5)の検討により、定量時の測定条件は Table 1 の ¹³C-CP/MAS 欄に示す通りとし、スペクトル上に観察されるシグナルを波形分離して解析を行うこととした。

Fig. 11 にはキチン CN1-8 (a-h)及びキトサン CS1-5 (i-m)から得られたスペクトルを示した。キチンには α 及び β の結晶形があり、自然界に圧倒的に多く見られるカニ・エビ由来の α -キチンは、*N*-アセチルグルコサミンの極性を交互に配列した逆平行鎖構造をとり、一方、イカの甲

に存在する β -キチンは方向がそろった平行鎖構造をとるとされている⁴⁾。試験に供したキチンのうち、エビ・カニ由来と明らかな試料は CN1, CN2, CN7 (Fig. 11 a), b), g))であり、ほぼ同一のスペクトルを示し、 α -キチンのスペクトルとも一致した。一方、イカ由来のキチン CN8 は、C3, C5 シグナルが重複する点等、 β -キチンのスペクトルの特徴が観察された(Fig. 11 h))。

また、キトサンのうち、試料 CS2 は特にアセチル基に由来する CH₃, C=O のシグナルが他の 4 検体に比べると小さく観察されたが、いずれの検体もアセチル基に由来するシグナルが検出され、いずれのキトサンも脱アセチル化度が 100%ではないことがスペクトルより推察された。

一般的に脱アセチル化度が 50%以下をキチンと呼び、50%以上をキトサンというが、今回測定したキチン及びキトサンの試料のアセチル基のシグナル強度を比較すると明らかにキトサンの強度が小さく、脱アセチル化度が 50%以上であることが推察された。

C-5) キチン基準物質の設定

LC や GC の標品の設定と同じく、¹³C-CP/MAS NMR においても信頼性の高い定量結果を得るためには、可能な限り純度が高く品質の安定したものを基準物質として設定する必要がある。また、同一の基準物質を用い、同一の測定・解析条件でシグナル積分比を求めなければならない。

キチンの CN1-3 を繰り返し 10 回ずつ測定し、積分比 r1~r6 をプロットし、ばらつきを調べた (Fig. 12a-c)。10 回測定の繰り返しのばらつきは、CN1 で 2.8%以内、CN2 で 2.2%以内、CN3 で 1.7%以内であり、また、CH₃よりも C=O が分子になった積分比の方が値が小さくばらつきが大きい傾向にあった。Fig. 12d には、CN1-3 の積分比の平均(各 n=10)と他 5 試料 CN4-8 の積分比(各 n=1)をプロットしたが、CN1-7 の 7 試料間の差は最大でも 3.4%であり大きな差ではないが、CN1 だけが CH₃ が分子の積分比(r1, r2, r3)は他よりも高かった。また、イカ由来の CN8 の積分

比 r1~r6 は他の試料とは若干異なっていた。よって、CN8 を除く CN1-7 はほぼ同等の品質を持つと考え、このうち最も安価に試薬として入手できる CN1 を基準物質として用いることとした。

C-6) キトサンの AGU 含量、脱アセチル化度の測定

キチン CN1 を基準物質とし、n=10 測定の平均の感度比を基準にキトサンの AGU 含量及び脱アセチル化度(各 n1 測定)を算出した(Table 5)。その結果、AGU 含量は試料によって異なり、4~22%であった。Fig. 11i~m にキトサン試料 CS1-5 のスペクトルを示したが、CS1, CS3, CS4 及び CS5 のスペクトルパターンはほぼ等しいが、CS2 のアセチル基のシグナル強度は他と比べて小さく、すなわち、AGU 含量が低く、脱アセチル化度が高かった。また、キトサンのシグナルがブロードで S/N が低いことから、シグナル積分比 (r1~r6) 間のばらつきが 5~10% と大きく、定量結果のばらつきの原因となったと考えられた。

C-7) キチン/キトサン混合試料による確認

C-6)において、キチンを基準物質として感度比補正し、キトサンの AGU 含量を求めた。この方法は、AGU と GU の含量に比例してシグナルが検出されることを前提条件としている。キチンとキトサンを一定量混合した試料を調製しそれを定量し、この前提条件が正しいかどうかを確認した。

粉末状で固体のまま均一に混合しやすい性状の製品であったキチン CN1 とキトサン CS1 を試料として用いた。キチン(CN1)及びキトサン CS1 をモル比で 1:0, 2:1, 1:1, 1:2, 0:1, すなわち、キチンの含量として 100%, 66.6%, 50%, 33.3%, 0% に混合し、¹³C-CP/MAS 測定を行い、混合組成と定量値の関係を調べた。

¹³C-CP/MAS スペクトルを測定し、波形処理を行った後、シグナル積分比(r1~r6)より定量値を算出した。キチン CN1 の n=10 測定の平均の感度比を基準として各混合試料の AGU 含量を求

めた(Fig. 13)。その結果、混合組成と求められた AGU 含量に比例関係が認められた。キトサン CS1 の AGU 含量が 17.7 mol%と先に求めたが(Table 5)、キチン 0%のときの値はこの値に一致し、キチン 100%のときの値が 100mol%を示し、キチンとキトサンの混合試料の AGU 含量は混合比に比例した。よって、¹³C-CP/MAS 測定の感度比補正による定量がうまく機能していると判断できた。

C-8) 滴定による脱アセチル化度の測定

キトサンの公的な成分規格の設定を検討しているところであるが、その中で、脱アセチル化度は一定の品質・性質を担保する上で重要であると考え、脱アセチル化度 70.0%以上と規定し、B-3)に示した滴定法を採用する方向で調整している。滴定法は、試料中の GU の-NH₂基を滴定して GU 含量を求め、残りを AGU と見なすものである。一方、今回検討した固体 NMR 法は、AGU 含量を求め、残りを GU と見なすものとなっている。すなわち、直接的に定量する対象がことになっているが、いずれも正しく測定できていれば、求められる脱アセチル化度は一致するはずである。

Table 6 には、滴定法と今回検討した固体 NMR (¹³C-CP/MAS)によって求めたキトサン(CS1-4)の脱アセチル化度を示した。両法により求めた各試料の脱アセチル化度を比較すると 3~5%程度の差でほぼ同じ値を示し、いずれの試料においても滴定法が大きめの値を示した。滴定法では、試料中に存在する-NH₂基を測定していることから、GU 以外の-NH₂基を合算して測定している可能性があると考えられた。

D. 結論

現在、既存添加物「キチン」及び「キトサン」の成分規格の作成のため、それに設定する項目及び試験法を検討しているところである。「キチン」はアセチルグルコサミン (AGU)から、「キトサン」はグルコサミン(GU)とアセチルグルコサミン (AGU)から構成された多量体である。脱アセチル化の割合によって、物性が大きく変

化することから、両者を区別、あるいは品質を確保するための指標となると考えられる。「キトサン」の脱アセチル化度を測定する方法としてポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)によるコロイド滴定が知られている。本法を脱アセチル化度の試験法に設定して問題はないと考えられるが、正しい値を算出できているか確認した例はない。そこで、 ^{13}C -CP/MAS-NMRにより、脱アセチル化度を求める方法を検討した。その結果、測定条件を最適化することによって試料を前処理することなく脱アセチル化度を直接測定することができた。ポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)を用いた滴定法による結果と固体NMRにより得られた結果を比較したところ、ほぼ同じ結果を示したことから、いずれの方法においても脱アセチル化度が測定できていることが確認できた。 ^{13}C -CP/MAS-NMRによる方法は、試料を前処理することなく測定可能である点において優れているが、高価なNMR装置を用いる必要があり、現時点では実用性は低い。一方、滴定法は操作が若干複雑であるが特別な装置を必要としない点において優れている。今回、原理の異なる二つの測定法においてほぼ同様な結果が算出されたことから、「キトサン」の脱アセチル化度の試験法として滴定法を設定しても問題ないと判断できた。

E. 参考文献

- 1) M.L. Duarte, M.C. Ferreira, M.R. Marvão, J. Rocha: Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* 2001, 28(5), 359-363.
 - 2) L. Heux, J. Brugnerotto, J. Desbrières, M.-F. Versali, M. Rinaudo: Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* 2000, 1(4), 746-751.
 - 3) H. Kono: Two-dimensional magic angle spinning NMR investigation of naturally occurring chitins: precise ^1H and ^{13}C resonance assignment of alpha- and beta-chitin. *Biopolymers* 2004, 75(3), 255-263.
 - 4) 桜井謙資, キチン・キトサンの構造, SEN-I GAKKAISHI(繊維と工業), 1990, 46(12), 553-557.
- #### F. 研究業績
1. 学会発表等
 - 1-1. 学会
 - 1) 西崎雄三, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 精油除去ウイキョウ抽出物の成分規格作成に向けた基礎的検討. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上開催).
 - 2) 寺澤陸, 本多亘, 榊原みなみ, 長谷川文哉, 豊島智三, 石田康行, 堤内要, 猪飼誉友, 石橋諒, 箕川剛, 古屋浩太, 森本隆司, 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 岡尚男: 固体NMRと熱分解GC-MSを用いたクチナシ青色素の構造解析. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表).
 - 3) 多田敦子, 日置冬子, 石附京子, 久保田浩樹, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物 *dl*- α -トコフェロールの色調と純度について. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表).
 - 4) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物「カラシ抽出物」および「セイヨウワサビ抽出物」に含まれるイソ治安酸アリル定量法の改良. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表).
 - 5) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物「カラシ抽出物」および「セイヨウワサビ抽出物」に含まれるイソチオシアン酸アリル定量法の改良. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上開催).
 - 6) 渡辺麻衣子, 青木渉, 渡辺雅樹, 寺島淳, 小西良子, 近藤一成, 工藤由紀子: CO1遺伝子塩基配列における挿入/欠失パターンおよび系統解析に基づく日本国内に分布する *Entoloma sarcopum* とその近縁種の食用および毒キノコの識別. 日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会(2020.11.24-2020.12.8)(Web).

- 7) 堤内要, 寺澤陸, 本多亘, 榊原みなみ, 長谷川文哉, 豊島智三, 石田康行, 猪飼誉友, 石橋諒, 古屋浩太, 森本隆司, 石附京子, 西崎雄三, 増本直子³⁾, 杉本直樹, 佐藤恭子, 岡尚男: 量子化学計算を用いたクチナシ青色素の分子構造に関する研究. 日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会(2020.11.24-2020.12.8)(Web).
- 8) 西崎雄三, 石附京子, 中島馨, 増本直子, 末松孝子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 外部標準法qNMRの自動化スクリプトの作成. 第2回日本定量NMR研究会年(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター).
- 9) 石附京子, 建部千絵, 西崎雄三, 窪崎敦隆, 多々敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: ¹³C-CP/MASを用いた食品添加物キトサンの脱アセチル化度の測定. 第2回日本定量NMR研究会年(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター).
- 10) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 石附京子, 小出達夫, 村林美香, 宮下尚人, 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, 山田裕子, 岩本芳明, 三浦亨, 水井浩司, 朝倉克夫, 末松孝子, 小浜亜以, 後藤隆志, 安田万寿, 上田知彦, 合田幸広: ³¹P核を用いた³¹P-qNMRの検討(1) シクロホスファミド水和物の絶対純度の測定. 第2回日本定量NMR研究会年(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター).
- 11) 高橋未来, 高木映里, 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HPLCによるクルクミン類の定量法の検討. 第2回日本定量NMR研究会年(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター).
- 12) 坂口裕子, 高橋未来, 西崎雄三, 高木映里, 橋本誠, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一, 一川暢宏: 相対モル感度に基づくカルバマゼピンとフェニトインのシングルリファレンスHPLC定量法の構築と基礎検討. 日本薬学会第141年会(2021.3.26-3.29)(広島国際会議場他).
- 1) 杉本直樹: 定量に用いる相対モル感度(RMS)の求め方. 第2回日本定量NMR研究会年(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター, 約70名).
- 2) Sugimoto N: Measurement of relative molar sensitivity using the combination of qNMR and chromatography from the viewpoint of regulatory science. Virtual workshop, Emerging Technologies: Quantitative NMR and digital data-overview and perspectives. (2020.11.19)(USP on-line, 約120名).
- 3) Sugimoto N: Virtual Roundtable Panelist. Emerging Technologies: Quantitative NMR and digital data-overview and perspectives. (2020.11.19)(USP on-line, 約120名).

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物である精油除去ウイキョウ抽出物中に含まれる主成分の抗酸化能評価. 日本食品化学学会誌. 2020; 27, 164-172.
- 2) Kuroe M, Numata M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Itoh N: Use of Relative Molar Sensitivity as a Specific Value for Evaluating Heptaoxyethylene Dodecyl Ether Concentrations in Methanol Solution. *Analytical chemistry*. 2021; in press.
- 3) Uchiyama N, Hosoe J, Miura T, Sugimoto N, Ishizuki K, Yamada Y, Iwamoto Y, Suematsu T, Komatsu T, Maruyama T, Igarashi Y, Higano T, Shimada N, Goda Y: Determination of absolute purities of hygroscopic substances by quantitative NMR analysis for the standardization of quantitative reagents in the Japanese Pharmacopoeia (Part 2). *Chem. Pharm. Bull.* 2021; 69: 26-31.
- 4) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Ono M, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Yasobu N, Ohara T, Yamada Y, Suzuki H, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Kohama A, Goda Y: Absolute purity

1-2. シンポジウム等

- determination of a hygroscopic substance, indocyanine green, using quantitative NMR (qNMR). *Chem. Pharm. Bull.* 2021; 69: 118-123.
- 5) 内山奈穂子, 細江潤子, 三浦亨, 杉本直樹, 石附京子, 山田裕子, 岩本芳明, 末松孝子, 小松功典, 丸山剛史, 五十嵐靖, 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 (Part 1). *薬学雑誌*, 2020; 140 1063-1069.
- 6) Nishizaki Y, Ishizuki K, Masumoto N, Tada A, Sugimoto N, Sato K: HPLC determination of quercetin using relative molar sensitivity to methylparaben as a single reference. *Jpn. J. Food Chem. Safety* 2020; 27: 42-52.
- 7) Ohtsuki T, Matsuoka K, Fuji Y, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Matsufuji H: Development of an HPLC method with relative molar sensitivity based on ¹H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. *PLoS ONE*, 2020; 15(12): e0243175.
- 8) Miura T, Sugimoto N, Bhavaraju S, Yamazaki T, Nishizaki Y, Liu Y, Bzhelyansky A, Amezcua C, Joseph Ray, Zailer E, Diehl B, Gallo V, Todisco S, Ofuji K, Fujita K, Higano K, Geletneky C, Hausler T, Singh N, Yamamoto K, Kato T, Sawa R, Watanabe R, Iwamoto Y, Goda Y: Collaborative Study to Validate Purity Determination by ¹H quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull.* 2020; 68: 868-878.
- 9) 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.* 2021; 69(1), 18-25.
- 10) 酒井有希, 増本直子, 西崎雄三, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた single-reference HPLC 法が定量値に影響を及ぼす要因の検討と機能性表示食品中のルテイン定量への応用. *日本食品化学学会誌*, 2020; 27: 123-134.
- 2-2. 総説
- 1) Amakura Y, Yoshimura M, Sugimoto N, Akiyama H: Characterization of components in natural products for the evaluation of existing food additives in Japan. *Chem. Pharm. Bull.* 2021; 69: 11-17.
- 2-3. 単行本
- 1) Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: "Comprehensive Natural Products III", Volume 7; *New Methods in Natural Products Chemistry*, 7.04 Application of ¹H-quantitative NMR From the Viewpoint of Regulatory Science, Elsevier. Netherland, pp.50-60 (2020).
- G. 知的財産権の出願. 登録状況
なし

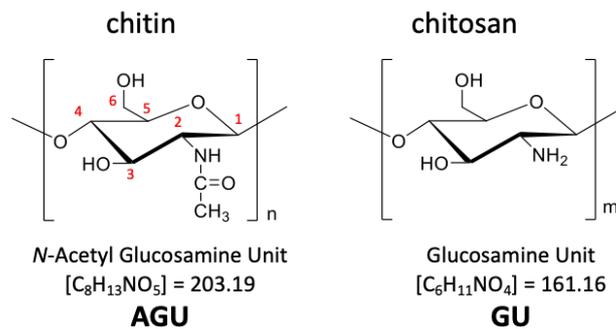


Fig.1 Structures of units of chitin and chitosan

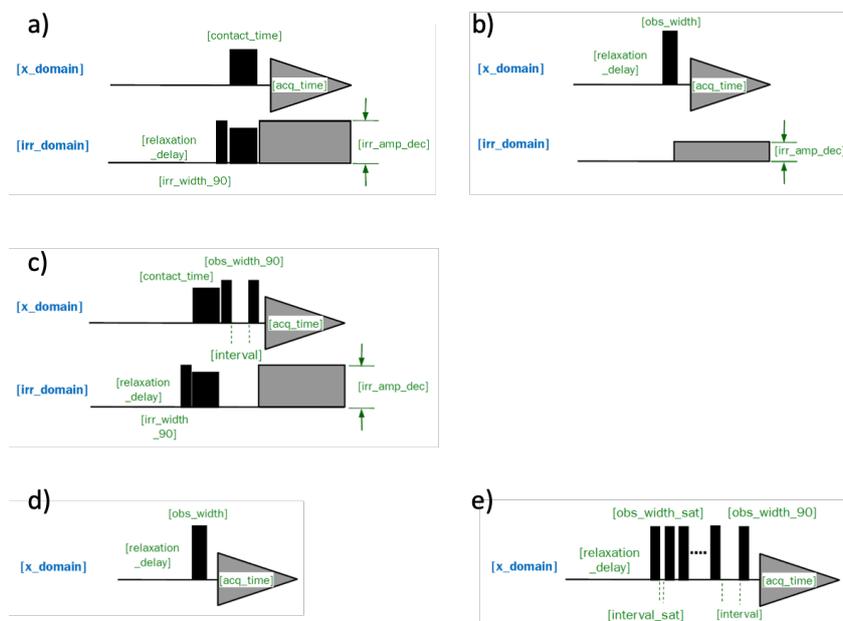


Fig. 2 Pulse sequences used for this study

a) CP/MAS (cpmas_advanced), b) DP/MAS (single_pulse_dec_solid),

c) ^{13}C - T_1 (torchiat1_cpmas), d) 1H (single_pulse_solid), e) 1H - T_1

(saturation_recovery)

These refer to NMR user's manual of JNM-ECZ series (JEOL).

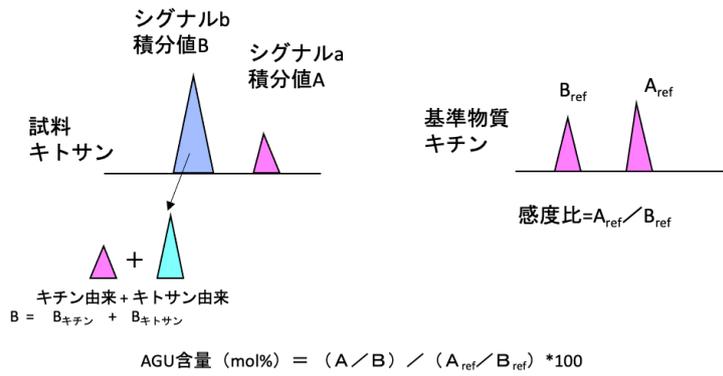


Fig. 3 基準物質のシグナル比で補正したAGU含量の求め方

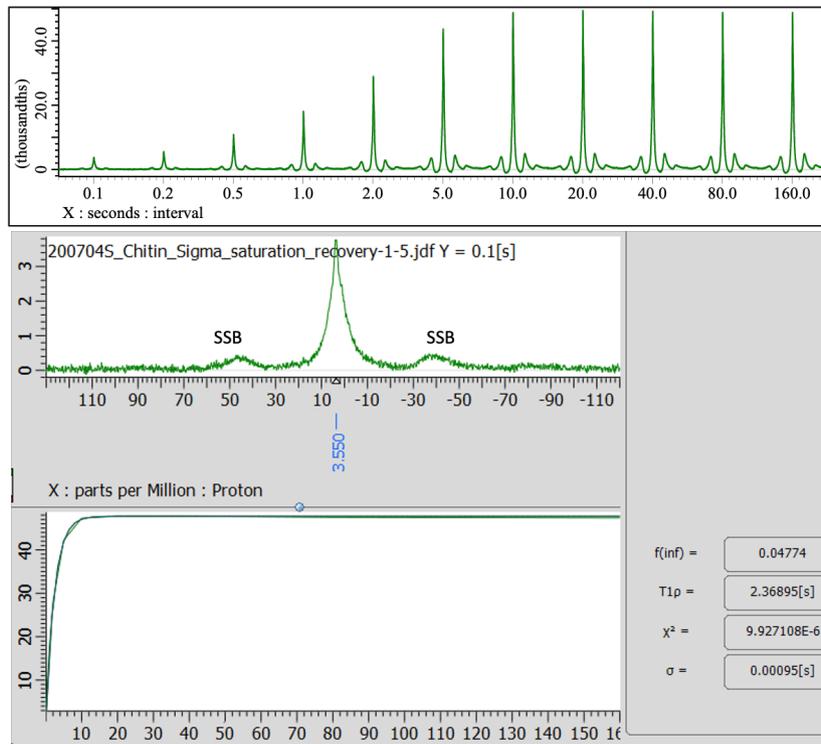


Fig. 4 キチン(CN1)のsaturation recovery法による T_{1H} 測定のカーブ
 フィッティング結果
 intervalを0.1~160 sに変わって測定, 回転数15 kHz, 積算2回

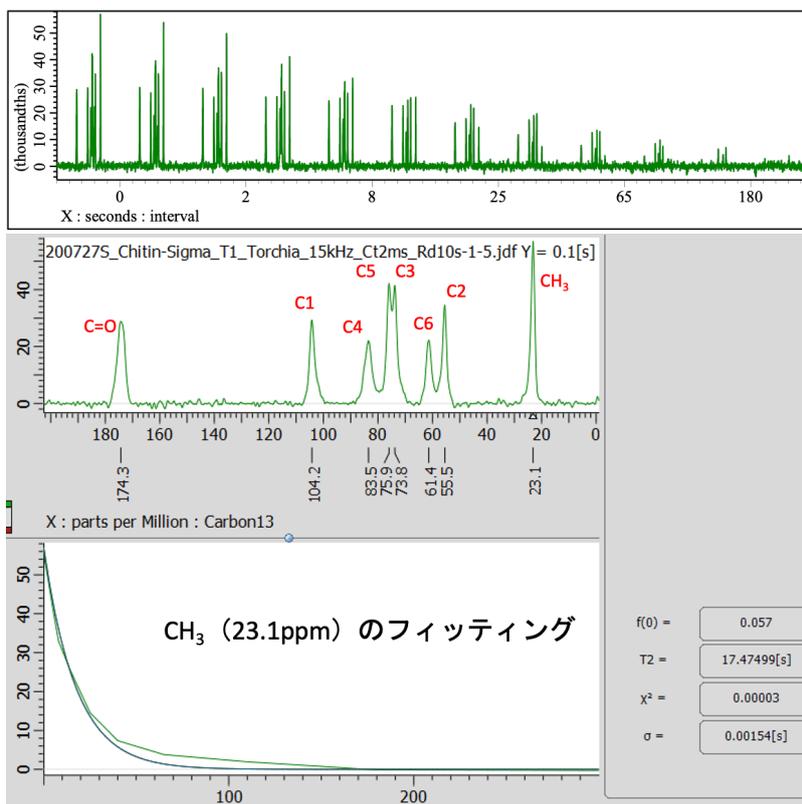
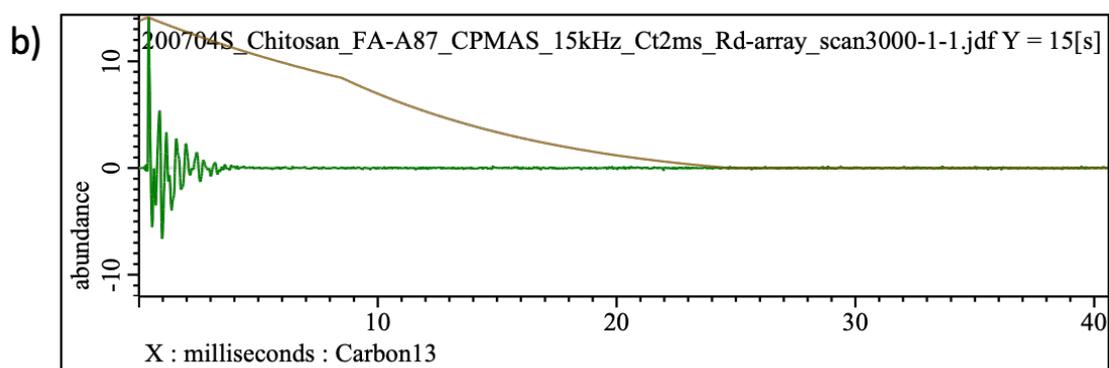
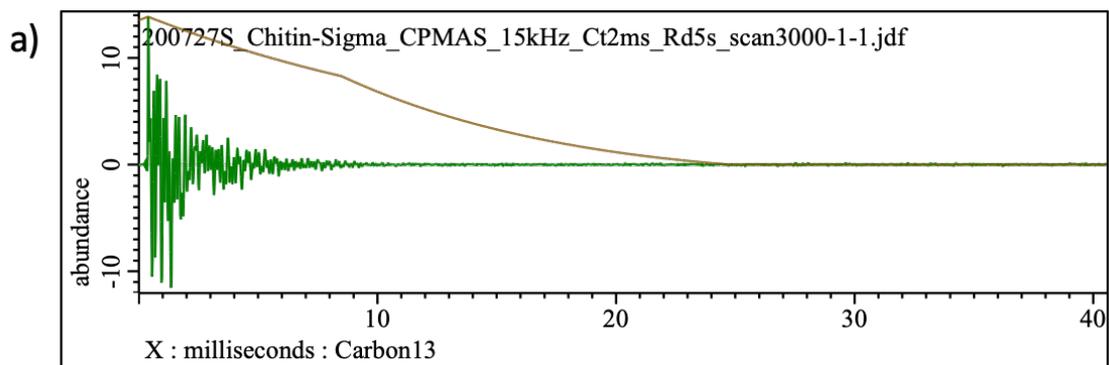


Fig. 5 キチン(CN1)のTorchia法による T_{1c} 測定のカブフィッティング結果
intervalを0.1~300 sに変えて測定, 回転数15 kHz, 積算110回



exp : 20.0[Hz] : 0.0[s]
 trapezoid3 : 0[%] : 20[%] : 60[%]
 zerofill : 4 : TRUE
 fft : 1 : TRUE : TRUE
 ppm

Fig. 6 ^{13}C -CP/MASのFIDとウィンドウ関数
 a) キチン試薬(CN1), b) キトサン食品添加物(CS1)

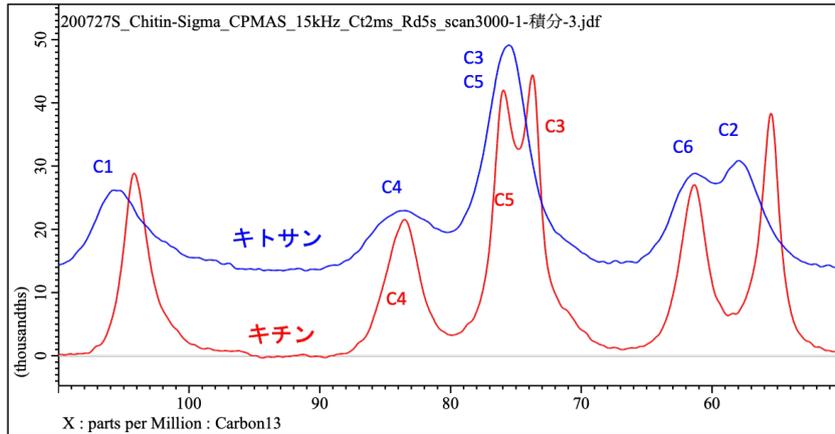


Fig. 7 キチン(CN1)とキトサン(CS3)の¹³C-CP/MASスペクトル(糖部分拡大)
 回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 待ち時間5 s, 積算3000回

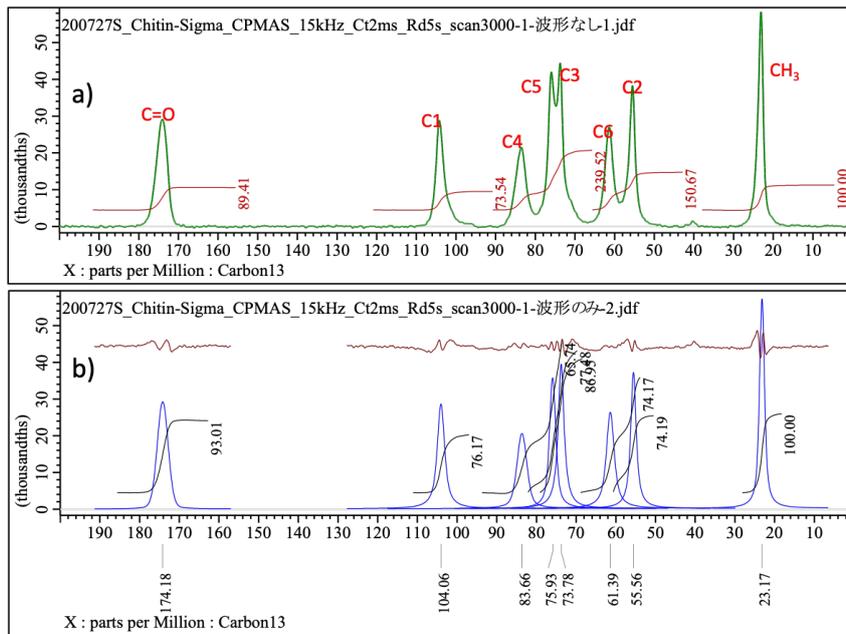


Fig. 8 キチン(CN1)の¹³C-CP/MASスペクトルの積分
 回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 待ち時間5 s, 積算3000回
 a)測定スペクトル(緑)を積分範囲ブロックごとにベースラインから垂直分割して積分, b)波形分離スペクトル(青)とその積分値と残差(赤)

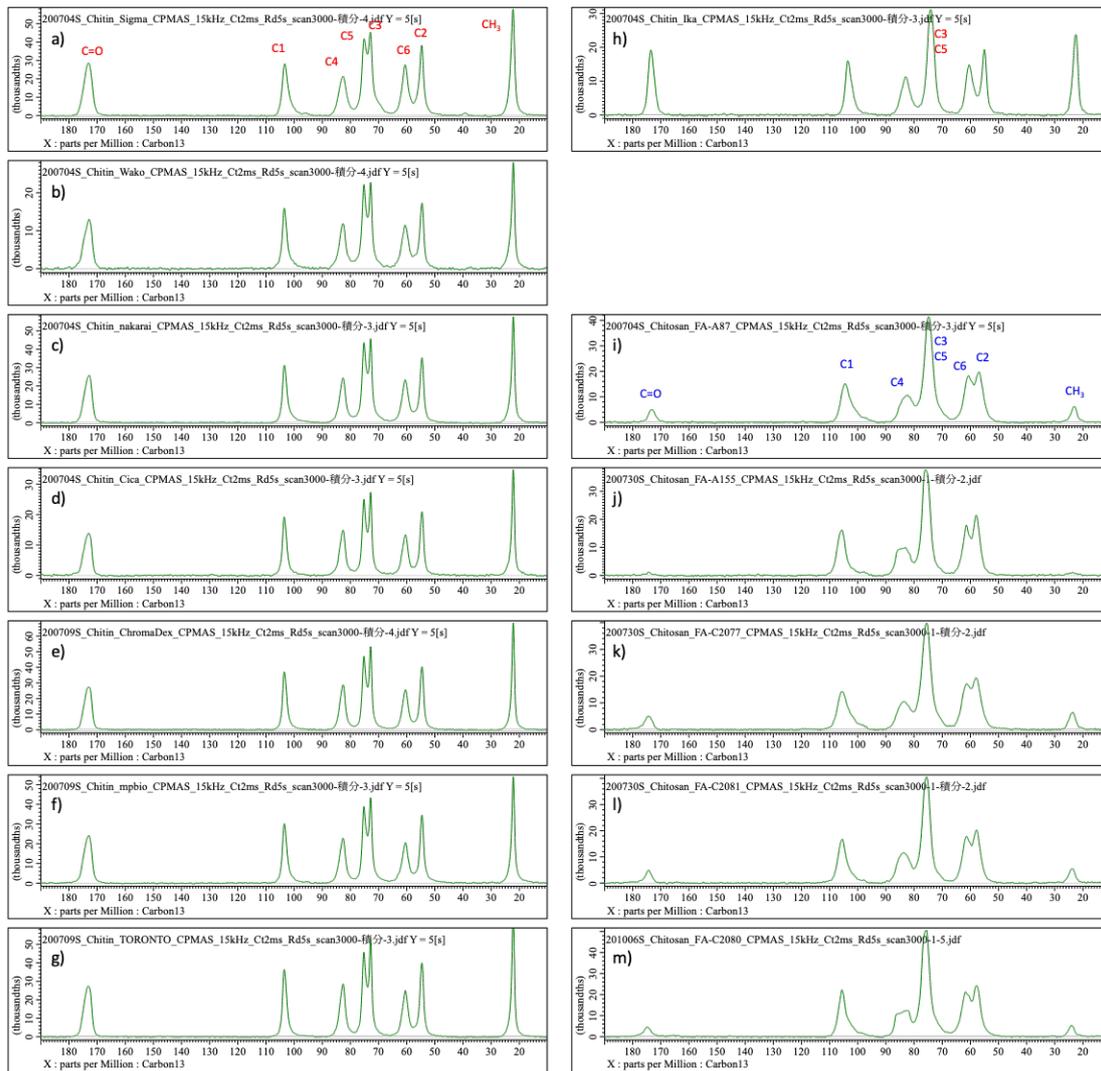


Fig. 11 キチン及びキトサン¹³C-CP/MASスペクトル

キチン: a) CN1, b) CN2, c) CN3, d) CN4, e) CN5, f) CN6, g) CN7, h) CN8.

キトサン: i) CS1, j) CS2, k) CS3, l) CS4, m) CS5

回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 待ち時間5 s, 積算3000回

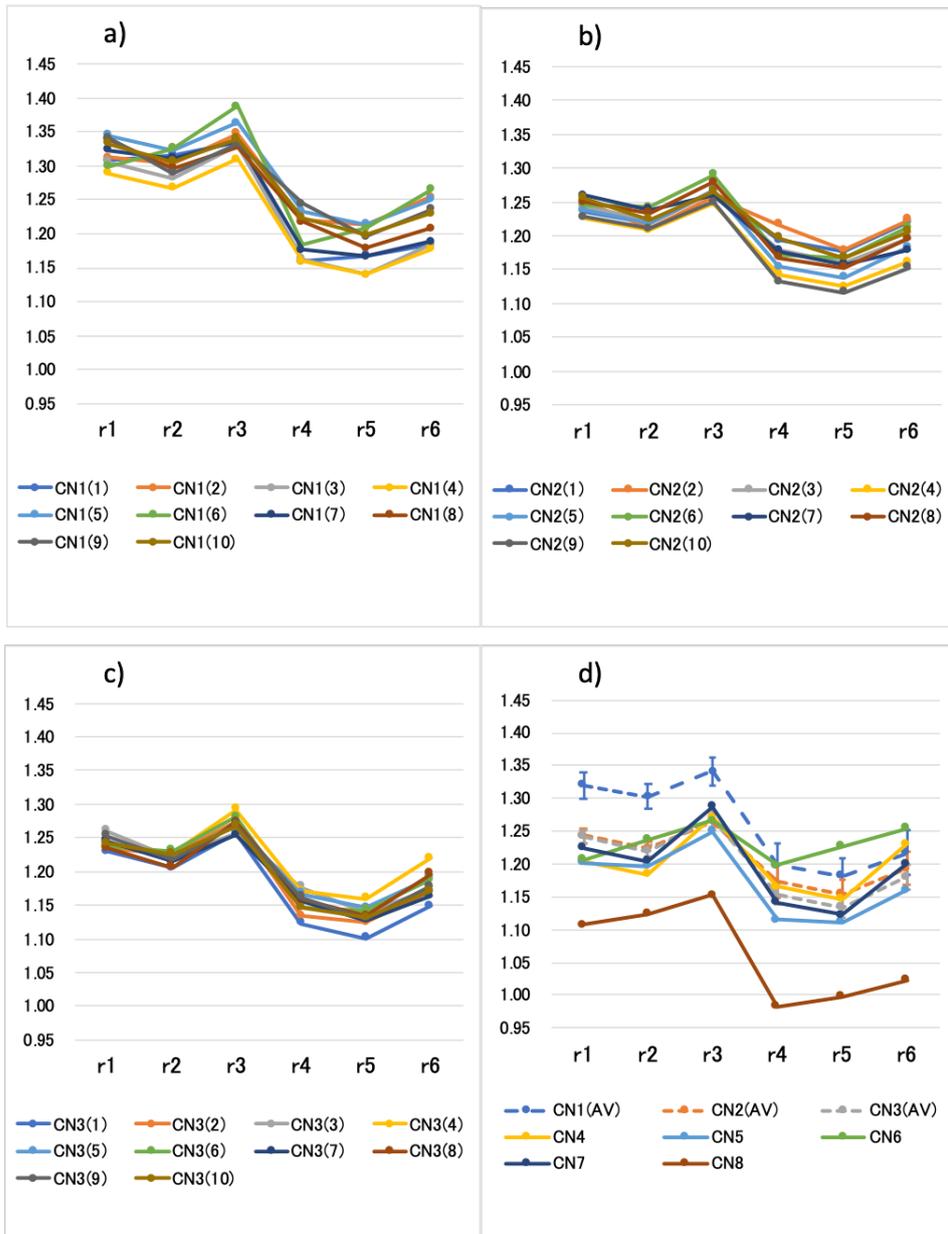


Fig. 12 ^{13}C -CP/MAS測定によるキッチンのシグナル面積比
a) CN1, b) CN2, c) CN3, d) CN1-8の比較(ただし, CN1-3はn=10のAV
回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 待ち時間5 s, 積算3000回,
繰り返し測定回数n=10

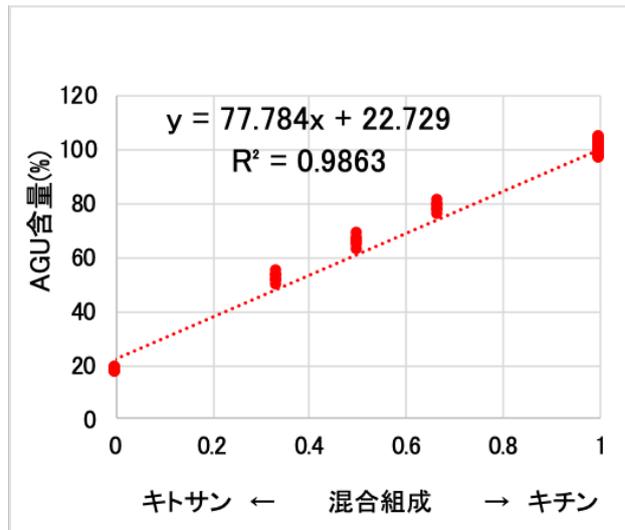


Fig. 13 キチン(CN1)とキトサン(CS1)の混合組成と¹³C-CP/MAS測定により求めたAGU含量の関係

Table 1 Sample information

Sample No.	Voucher code	Material	Grade	Origin
CN1	2T 31R	Chitin	Reagent	Shrimp
CN2	12000030	Chitin	Reagent	Crab
CN3	12000035	Chitin	Reagent	-
CN4	12000031	Chitin	Reagent	-
CN5	12000053	Chitin	Reagent	-
CN6	12000052	Chitin	Reagent	-
CN7	12000054	Chitin	Reagent	Shellfish
CN8	-	Chitin	Sample	Squid
CS1	A87	Chitosan	Food Additive	-
CS2	A155	Chitosan	Food Additive	-
CS3	C2077	Chitosan	Food Additive	Crab
CS4	C2081	Chitosan	Food Additive	-
CS5	C2080	Chitosan	Food Additive	Squid

Table 2 Measurement parameters

JNM-ECZ400 (JEOL)				
装置	NM-84001HXM4 (4 mm CP/MAS probe)			
プローブ	NM-05420ST4 (Zirconia 4 mm tube)			
試料管	9.34T			
磁場強度	9.34T			
測定内容	¹³ C-CP/MAS	T _{1ρ} (Torchia法)	¹³ C-DP/MAS	T _{1H} (SR法)
観測核	¹³ C	¹³ C	¹³ C	¹ H
シーケンス名	cpmas_advancedjxp	TorchiaT1_cpmasjxp	single_pulse_decjxp	saturation_recoveryjxp
共鳴周波数	¹³ C 100MHz	¹³ C 100MHz	¹³ C 100MHz	¹ H 400MHz
観測中心	100ppm	100ppm	100ppm	5ppm
観測範囲	400ppm	400ppm	400ppm	100kHz
デジタルフィルタ	ON × 8	ON × 8	ON × 8	ON × 8
ポイント数	2048	2048	2048	1024
デジタル分解能	24.6 Hz	24.6 Hz	24.6 Hz	122Hz
取り込み時間	40.6ms	40.6ms	40.6ms	8.2ms
パルス幅	¹ H90° 3.18us	¹ H90° 3.18us	-	-
パルス幅	-	-	¹³ C90° 2.82us	¹ H90° 3.18us
コンタクトタイム	2ms	2ms	-	-
CPモード	RAMP-CP	RAMP-CP	-	-
¹ Hスピンロック強度	ca.55kHz	-	-	-
Obsスピンロック強度	¹³ C ca.70kHz	-	-	-
連続測定変数	-	0.1 - 300s (12pt)	-	0.1 - 160s (11pt)
待ち時間	5 s	10s	550s	0.1s
繰り返し時間	5.04s	15 - 310s	550s	0.2 - 160.1s
MAS回転数	15kHz	15kHz	15kHz	15kHz
積算回数	3,000	110	1,000	2
デカップリング	SPINAL64	TPPM	SPINAL64	-
デカップリングパワー	78.6kHz	78.6kHz	78.6kHz	-
測定温度	room temp.	room temp.	room temp.	room temp.
測定時間	4.2hour	26.6hour	153hour	11min

Table 3 キチン試薬(CN1)の $T_{1\rho}$

Position	Chemical shift [ppm]	$T_{1\rho}$ [s]
C=O	174.3	46
C1	104.2	101
C4	83.5	84
C5	75.9	33
C3	73.8	70
C6	61.4	1
C2	55.5	88
CH ₃	23.1	18

Table 4a ¹³C-CP/MAS測定における繰り返し待ち時間(5 s, 15 s)の影響

Sample No.	波形分離せずに積分した場合の積分比(15s/5s)のばらつき					積分領域間のばらつき		
	C=O	C1	C3-C5	C2,C6	CH ₃	AVR	STDEV	CV%
CN1	1.073	0.966	0.999	0.992	1.000	1.006	0.040	4.0
CN2	0.951	0.894	0.941	0.976	1.000	0.952	0.040	4.2
CN3	1.024	0.975	0.954	0.959	1.000	0.983	0.030	3.0
CN4	1.099	1.117	1.051	1.050	1.000	1.063	0.046	4.3
CN5	1.009	0.969	0.966	0.961	1.000	0.981	0.022	2.2
CN6	0.937	0.935	0.946	0.980	1.000	0.960	0.029	3.0
CN7	0.933	0.969	0.946	0.958	1.000	0.961	0.025	2.6
AVR	1.004	0.975	0.972	0.982	1.000			
STDEV	0.061	0.064	0.037	0.030	0.000			
CV%	6.1	6.6	3.8	3.1	0.0			

*測定条件: 回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 積分回数3000回

Table 4b ¹³C-CP/MAS測定における繰り返し待ち時間(5 s, 15 s)の影響

Sample No.	波形分離した場合の積分比(15s/5s)のばらつき					各積分領域間のばらつき		
	C=O	C1	C3-C5	C2,C6	CH ₃	AVR	STDEV	CV%
CN1	1.042	0.974	1.000	0.996	1.000	1.002	0.025	2.5
CN2	1.026	0.989	0.997	1.014	1.000	1.005	0.015	1.5
CN3	1.055	1.006	1.002	1.002	1.000	1.013	0.023	2.3
CN4	0.981	1.031	1.011	1.022	1.000	1.009	0.020	1.9
CN5	1.009	0.992	0.994	0.982	1.000	0.995	0.010	1.0
CN6	0.978	0.983	0.970	0.977	1.000	0.982	0.011	1.1
CN7	0.990	1.003	0.995	0.998	1.000	0.997	0.005	0.5
AVR	1.012	0.997	0.996	0.999	1.000			
STDEV	0.028	0.017	0.012	0.015	0.000			
CV%	2.8	1.7	1.2	1.5	0.0			

*測定条件: 回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 積分回数3000回

Table 5 ¹³C-CP/MAS測定によるキトサンの積分比, AGU含量(mol%), 脱アセチル化度(mol%)

Category	Sample No.	Ratio of integral						AVR	STDEV	CV(%)
		CH ₃	CH ₃	CH ₃	C=O	C=O	C=O			
		/C1	/[(C3,C4,C5)/3]	/[(C2,C6)/2]	/C1	/[(C3,C4,C5)/3]	/[(C2,C6)/2]			
		r1	r2	r3	r4	r5	r6			
Chitin	CN1*	1.32	1.302	1.342	1.198	1.182	1.218	1.260	0.069	5.5
Chitosan	CS1	0.225	0.231	0.252	0.200	0.205	0.224	0.223	0.019	8.4
Chitosan	CS2	0.05	0.049	0.053	0.051	0.050	0.055	0.051	0.002	4.4
Chitosan	CS3	0.258	0.263	0.293	0.265	0.271	0.301	0.275	0.018	6.4
Chitosan	CS4	0.237	0.251	0.251	0.236	0.226	0.250	0.242	0.010	4.3
Chitosan	CS5	0.187	0.178	0.207	0.193	0.187	0.218	0.195	0.015	7.6
		Convert to AGU content (mol%)								
Chitosan	CS1	17.1	17.7	18.8	16.7	17.3	18.4	17.7	0.8	4.5
Chitosan	CS2	3.8	3.8	4.0	4.3	4.3	4.5	4.1	0.3	7.1
Chitosan	CS3	19.5	20.2	21.8	22.2	22.9	24.7	21.9	1.9	8.6
Chitosan	CS4	17.9	17.4	18.7	19.7	19.1	20.5	18.9	1.1	6.1
Chitosan	CS5	13.9	13.7	15.4	16.1	15.8	17.9	15.5	1.6	10.0
		Convert to deacetylation degree (mol%) (=100-AGU)								
Chitosan	CS1	82.9	82.3	81.2	83.3	82.7	81.6	82.3	0.8	1.0
Chitosan	CS2	96.2	96.2	96.0	95.7	95.7	95.5	95.9	0.3	0.3
Chitosan	CS3	80.5	79.8	78.2	77.8	77.1	75.3	78.1	1.9	2.4
Chitosan	CS4	82.1	82.6	81.3	80.3	80.9	79.5	81.1	1.1	1.4
Chitosan	CS5	86.1	86.3	84.6	83.9	84.2	82.1	84.5	1.6	1.8

* AV (n = 10)

待ち時間 5 s, 波形分離後積分

Table 6 キトサンの脱アセチル化度の比較

Sample No.	Titration		Solid NMR	
	AV (%)	CV(%)	AV (%)	CV(%)
CS1	86.48	0.36	82.32	0.98
CS2	99.53	1.15	95.90	0.30
CS3	84.44	0.84	78.11	2.41
CS4	86.63	1.81	81.11	1.42

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～ヒマワリ種子抽出物の成分解析～

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 ヒマワリ種子抽出物は既存添加物名簿に記載され、「キク科ヒマワリ (*Helianthus annuus* LINNE) の種子又は種子の搾油相より、熱時水又は含水エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸である」と定義される酸化防止剤である。本研究では、本添加物3製品について逆相HPLCによる成分比較を行った。その結果、いずれの製品も同様のピークパターンを示し、3ピークが主検出して観察された。それらピークについて解析した結果、chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acidと同定された。一方、有効成分の一つとされるイソクロロゲン酸はほとんど検出されなかった。今後、DPPHラジカル消去能を酸化防止活性の指標とし、添加物活性寄与成分の解明を試み、添加物としての品質評価に向けた考察を行う予定である。

研究協力者

好村守生 松山大学薬学部 准教授

内倉 崇 松山大学薬学部 特任助教

A. 研究目的

ヒマワリ種子抽出物は、既存添加物名簿¹⁾に記載され、ヒマワリの種子から得られた、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸を主成分とする。基原・製法・本質は、キク科ヒマワリ (*Helianthus annuus* LINNE) の種子又は種子の搾油相より、熱時水又は含水エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸であるとされ、酸化防止剤を用途とする。本添加物は、日本食品添加物協会発行の第4版既存添加物自主規格²⁾に記載され、イソクロロゲン酸、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、カフェー酸を検出する定量法が記載されているが、添加物自体の実データは乏しい。そこで、本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品間の成分比較について検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ヒマワリ種子抽出物の添加物製品〔1, 2 (C1089, C1090)〕は、日本食品添加物協会を通じて入手した。なお、()内は国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号を示す。製品の外観は黄褐色の粉末(図1)であり、いずれもわずかににおいがある。標品として用いた chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid は長良サイエンス株式会社、イソクロロゲン酸類(3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid) はナカライテスク株式会社より入手したものをを用いた。試薬はすべて特級または HPLC 用を用いた。

B-2) 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム(島津製作所)を使用した。測定条件を以下に記す。カラム:L-column ODS (2.1 i.d. × 150 mm)(化学物質評価研究機構), カラム温度: 40°C, 流速: 0.3 mL/min, 測定波長: 280 nm, 移動相: (A) 0.1% ぎ酸-蒸留水及び (B) 0.1vol% ぎ酸-アセトニトリル〔濃度勾配条件 (B in A): 0→30

min (0→50%), 30→35 min (50%→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85%→100%)].

B-3) 試料調製

各試料について、10 mg/mLになるよう蒸留水で溶解し、試料溶液とした。調製した各試料溶液について、逆相 HPLC 分析に用いた。

C. 結果及び考察

C-1) 試料の逆相 HPLC 分析

分析対象としたヒマワリ種子抽出物の有効成分とされるクロロゲン酸 [chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid)], イソクロロゲン酸 [di-*O*-caffeoylquinic acid 類 (3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid)], 及び 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid の化学構造を図 2 に示す。各試料溶液について HPLC 分析を行った結果を図 3 に示す。保持時間 17, 19, 20 分付近に顕著な 3 ピークが共通して観察され、それらピークについて検討した結果、標品との直接比較により、3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid と同定された。

一方で、有効成分の一つとされるイソクロロゲン酸について、3 成分 (3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid) の標品と直接比較した結果、いずれの成分についても顕著なピークとして観察されなかった。今後、DPPH ラジカル消去能を酸化防止活性の指標とし、添加物活性寄与成分の解明を試み、添加物としての品質評価に向けた考察を行う予定である。

D. 結論

既存添加物ヒマワリ種子抽出物について、添加物製品 2 検体の逆相 HPLC による成分比較を行った結果、いずれの製品も同様のピークパターンを示し、3 ピークが主検出して観察された。それらピークについて解析した結果、3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid と同定された。一方、有効成分の一つとされるイソクロロゲン酸類はほとん

ど検出されなかった。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第 120 号 (1996) “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日
- 2) 第 4 版既存添加物自主規格, 平成 20 年 10 月, 日本食品添加物協会

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし

2. 論文発表等

2-1. 総説

- 1) Amakura Y, Yoshimura M, Sugimoto N, Akiyama H: Characterization of components in natural products for the evaluation of existing food additives in Japan. *Chem. Pharm. Bull.*, **2021**; 69: 32-39.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

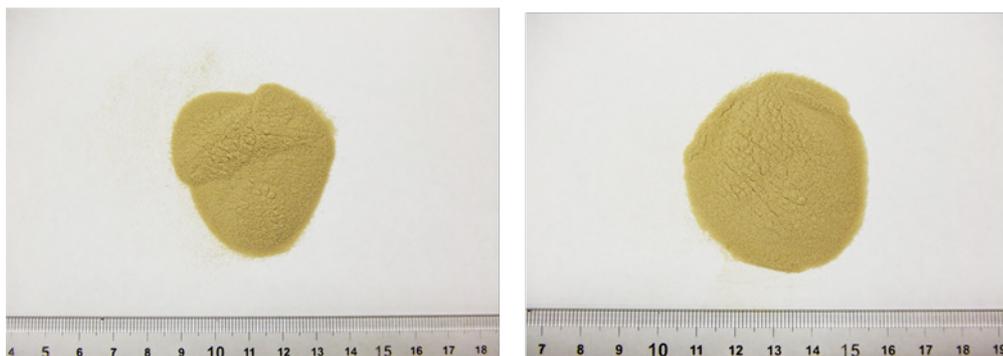
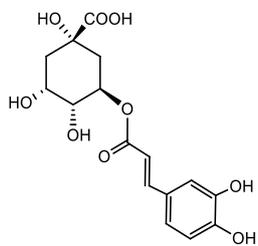
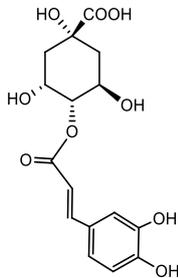


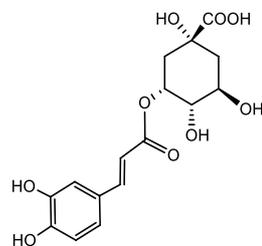
図1. ヒマワリ種子抽出物



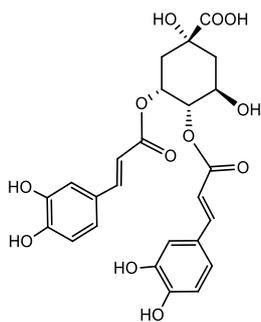
Chlorogenic



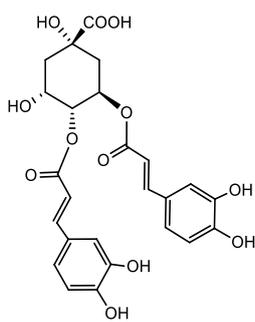
4-*O*-Caffeoylquinic



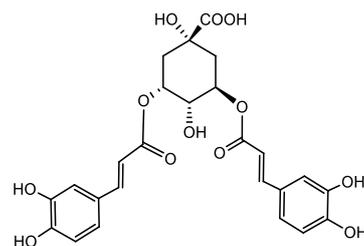
3-*O*-Caffeoylquinic



3,4-Di-*O*-caffeoylquinic



4,5-Di-*O*-caffeoylquinic



3,5-Di-*O*-caffeoylquinic

图 2

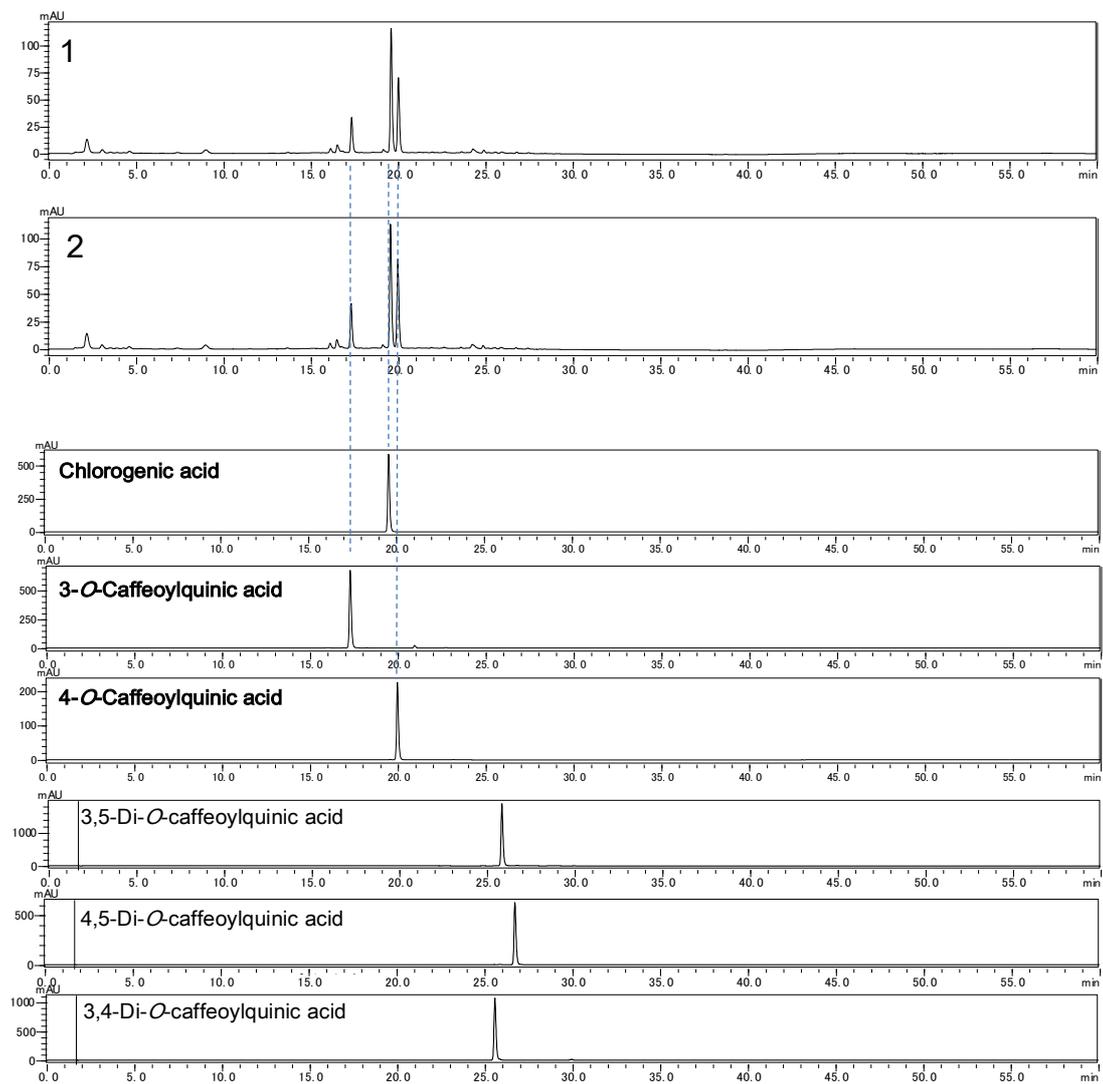


図 3. HPLC クロマトグラム (at 280 nm)

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～ショウガ抽出物の成分解析～

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 ショウガ抽出物は既存添加物名簿に収載され、「ショウガ科ショウガ (*Zingiber officinale* ROSC.) の根茎より、室温時エタノール、アセトン又はヘキサンで抽出して得られたものである。主成分はジンゲロール類及びショーガオール類である」と定義される製造用剤である。本添加物については成分情報が乏しいことから、本研究では添加物12製品の逆相HPLCによる成分比較を行った。その結果、(1) [6]-gingerolが主検出、(2) [6]-gingerol及び[6]-shogaolいずれも検出、(3) いずれも検出せずの3グループに分類され、主成分がいずれも顕著に検出されない試料も認められた。今後の予定として、主成分以外の検出成分の解析を進めるとともに、いずれも基原が同じ食品のショウガと、生薬のショウキョウについて成分比較を行い、含有成分による用途別の特徴について考察する。

研究協力者

好村守生 松山大学薬学部 准教授

内倉 崇 松山大学薬学部 特任助教

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物 研究員

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物 研究員

A. 研究目的

ショウガ抽出物は、既存添加物名簿¹⁾に収載され、ショウガの根茎から得られた、ショウガオール及びジンゲロールを主成分とするものをいう。基原・製法・本質は、ショウガ科ショウガ (*Zingiber officinale* ROSC.) の根茎より、室温時エタノール、アセトン又はヘキサンで抽出して得られたものである。主成分はジンゲロール類及びショーガオール類であるとされ、製造用剤を用途とする。基原となるショウガは食品であり、第十七改正日本薬局方(局方)²⁾収載の生薬(ショウキョウ)でもあり、食品添加物としても含め、その用途は広い。一方で、局方に

は確認試験が規定されているが、本添加物は、日本食品添加物協会発行の第4版既存添加物自主規格³⁾にも収載されておらず、品質管理に向けた科学データの集積が課題とされる。そこで本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品間の成分比較について検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ショウガ抽出物の添加物製品〔1～12 (C2185, C2186, C2187, C2194, C2195, C2196, C2197, C2198, C2199, B801, B803, B804)〕は、日本食品添加物協会を通じて入手した。なお、()内は国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号を示す。製品の外観は淡黄～茶褐色のペースト又は液体で、図1に示すような3パターン〔(a: 製品1～3, 7～8, b: 製品10～12, c: 製品4～6)〕あり、いずれもショウガ特有のにおいがある。標品として用いた[6]-gingerol, [6]-shogaolは、富士フイルム和光純薬株式会社製を用いた。試薬はすべて特級またはHPLC用を用いた。

B-2) 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。測定条件を以下に記す。カラム:L-column ODS (2.1 i.d. × 150 mm) (化学物質評価研究機構), カラム温度: 40°C, 流速: 0.3 mL/min, 測定波長: 254, 280 nm, 移動相: (A) 0.1% ぎ酸-蒸留水及び (B) 0.1 vol% ぎ酸-アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A): 0 → 5 min (50→85%), 5→10 min (85%), 10→20 min (85→100%), 20→40 min (100%)].

B-3) 試料調製

各試料について, 10 mg/mL になるようメタノールで溶解し, 試料溶液とした。調製した各試料溶液について, 逆相 HPLC 分析に用いた。

C. 結果及び考察

C-1) 試料の逆相 HPLC 分析

ショウガ抽出物の主成分とされる [6]-gingerol, [6]-shogaol の化学構造を図 2 に示す。各試料溶液及び [6]-gingerol, [6]-shogaol について, HPLC 分析を行った。その結果を図 3 (a: 検出 254 nm, b: 280 nm) に示す。本条件においては, [6]-gingerol が保持時間 4.5 分付近, [6]-shogaol が 11 分付近に検出された。試料においては, 主成分とされる 2 成分以外のピークも観察された。ピークパターンから製品間の違いを検討した結果, [6]-gingerol が主検出 (製品 1~3), [6]-gingerol 及び [6]-shogaol いずれも検出 (製品 7~9), いずれも検出せず (製品 4~6, 10~12) の 3 グループに分類され, 主成分がいずれも顕著に検出されない製品が 6 検体確認された。それゆえ, 添加物の品質確保のために, 主成分を指標に確認する試験等, 何らかの対策を講じる必要性が示唆された。

一方で, 主成分とされる 2 成分以外のピークも確認されたが, すべての試料に共通して顕著に認められるピークは観察されなかった。今後, これら成分について解析を行う予定である。さらに, 食品のショウガ, 生薬のショウキョウを添加物調製と同じ抽出法で試料調製し, それぞれの成分比較を行うことで, 添加物としての品

質評価に向けた考察を行う。

D. 結論

既存添加物ショウガ抽出物について, 添加物製品 12 検体の逆相 HPLC による成分比較を行った結果, (1) [6]-gingerol が主検出, (2) [6]-gingerol 及び [6]-shogaol いずれも検出, (3) いずれも検出せずの 3 グループに分類され, 主成分がいずれも顕著に検出されない試料も認められた。今後の予定として, 主成分以外の検出成分の解析を進めるとともに, いずれも基原が同じ食品のショウガと, 生薬のショウキョウについて成分比較を行い, 含有成分による用途別の特徴について考察する。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第 120 号 (1996) “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日
- 2) 第十七改正日本薬局方, p.1825, 厚生労働省 (2016).
- 3) 第 4 版既存添加物自主規格, p.418, 日本食品添加物協会 (2008).

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし

2. 論文発表等

2-1. 総説

- 1) Amakura Y, Yoshimura M, Sugimoto N, Akiyama H: Characterization of components in natural products for the evaluation of existing food additives in Japan. *Chem. Pharm. Bull.*, 2021; 69: 32-39.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

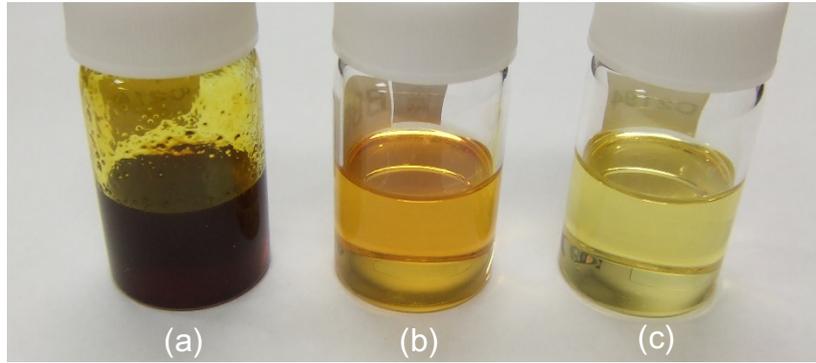
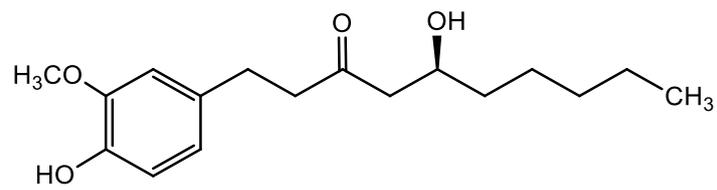
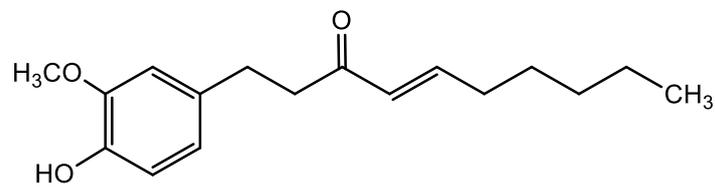


図 1. ショウガ抽出物



[6]-Gingerol



[6]-Shogaol

図 2

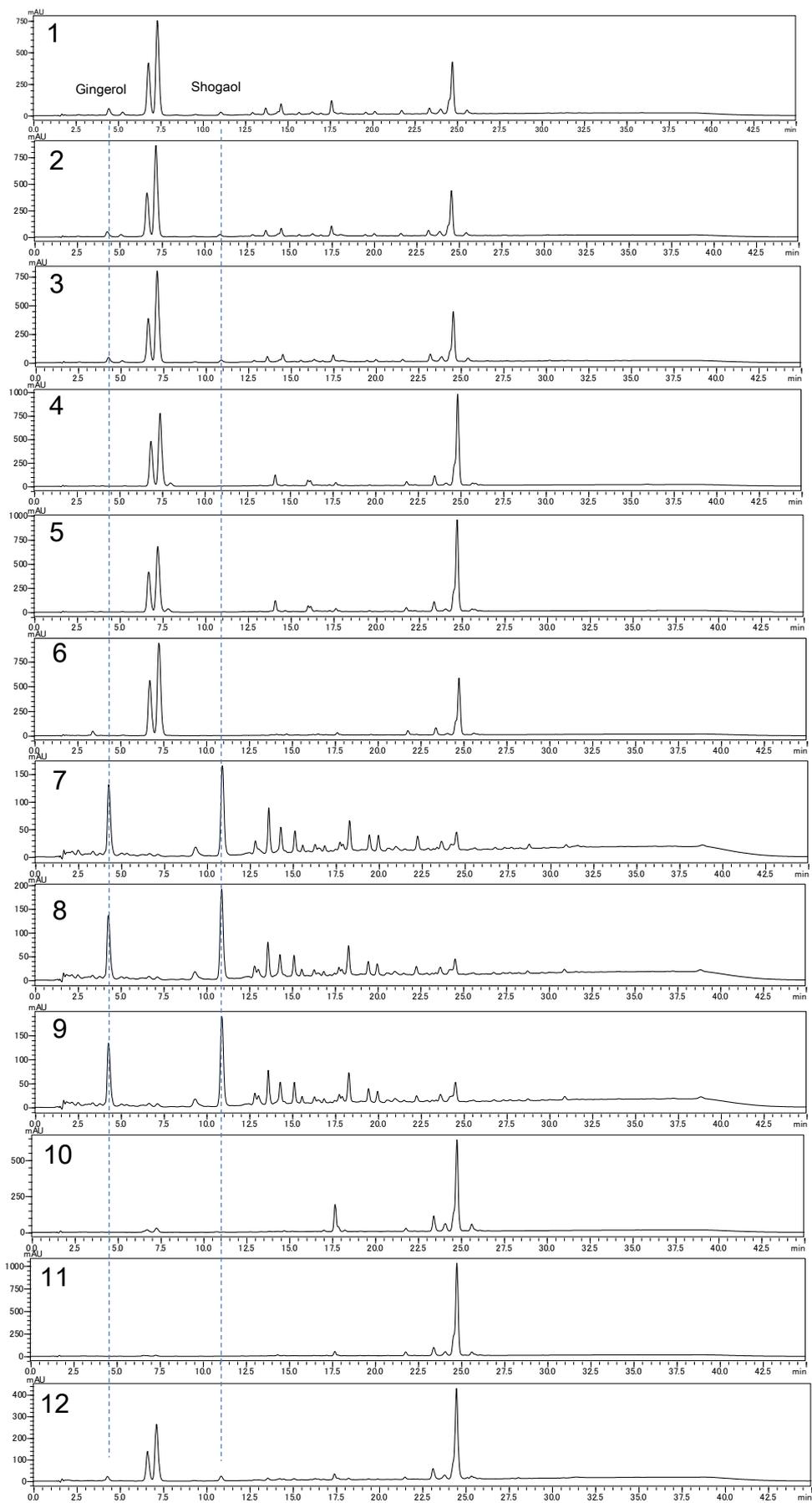


図 3a. HPLC クロマトグラム (at 254 nm)

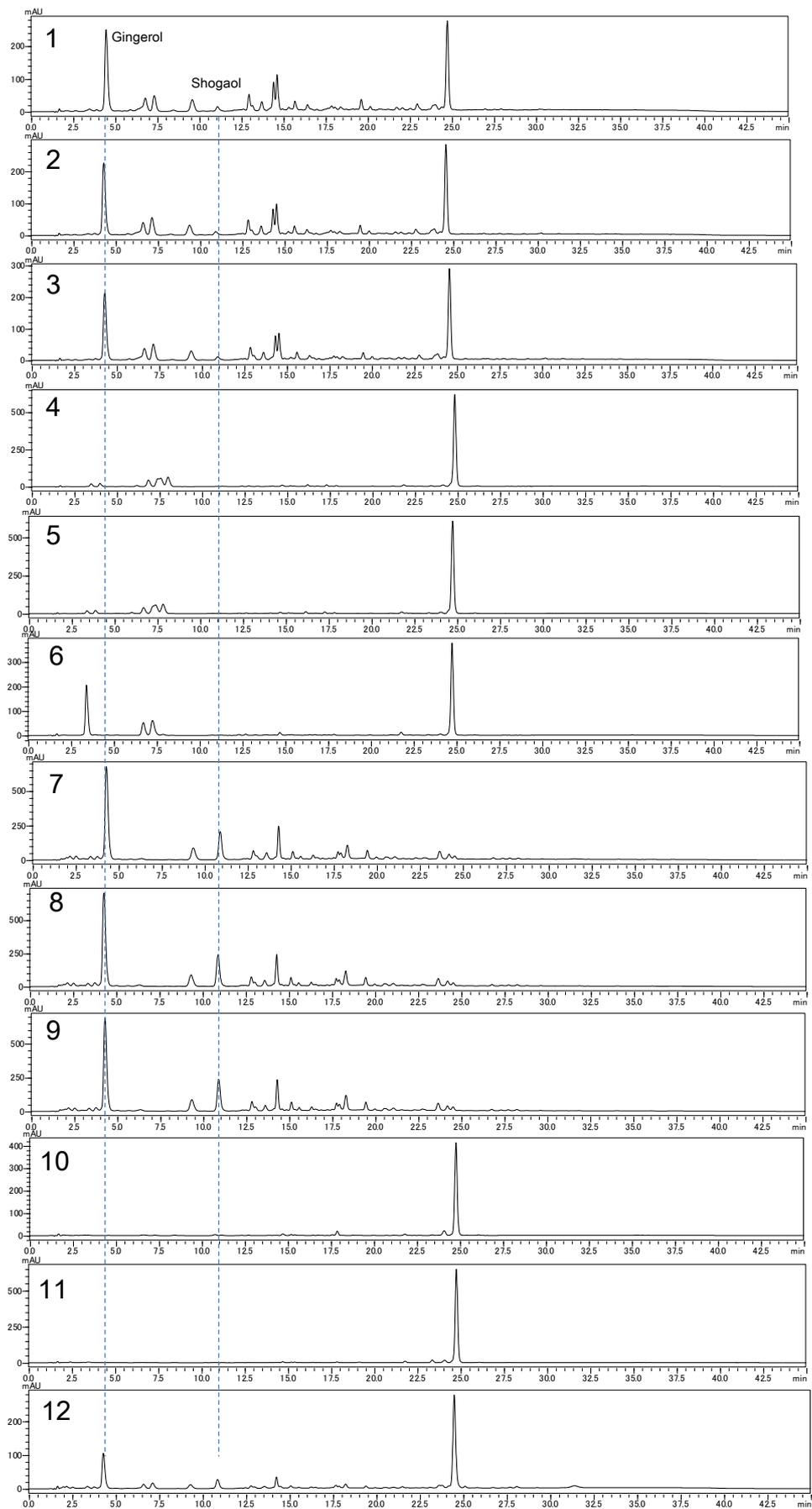


図 3b. HPLC クロマトグラム (at 280 nm)

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～ウコン色素の定量評価の基礎検討～

研究分担者 井之上浩一 立命館大学薬学部 臨床分析化学研究室 教授

研究要旨 ウコン色素は「第9版 食品添加物公定書」に記載されており、ウコン (*Crucuma longa* L.) の根茎から得られたクルクミンを主成分とするものであると定義されている。確認試験にはTLC、色価と極大吸収部の記述があるのみで、明確な成分は記載されていない。そこで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてウコン色素の主成分を明確にし、簡便かつ汎用性のある定量法を開発する必要がある。そこで、本研究では、分析対象物質の標準品を必要としない定量法「シングルリファレンス (SR) -HPLC定量法」を新たに構築した。高純度な主成分の入手法には高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いた。また、ウコン色素のSRにはクルクミンから合成デザインすることにより検出器の感度差や保持時間の影響を最小限にした。単離したクルクミノイドを、定量NMRに基づいた定量値を用いて相対モル感度 (RMS) を算出した。実際に、ウコン色素をSR-HPLC定量法で分析した結果、従来の絶対検量線法と同等の定量性を示し、SRの濃度や他社装置に変更しても再現性に影響しなかった。

研究協力者

高橋未来 立命館大学大学院薬学研究科
博士課程

A. 研究目的

ウコン色素は、「第9版 食品添加物公定書」(以下、公定書)において、ウコン (*Crucuma longa* L.) の根茎から得られたクルクミンを主成分とするものである。食用油脂を含むことがあると定義されている。¹⁾ ウコン色素は、抗炎症作用、抗酸化作用または抗がん作用などの様々な薬理作用があるため、クルクミノイドは注目されている機能性成分といえる²⁻⁴⁾。しかしながら、公定法におけるウコン色素の定量法では薄層クロマトグラフィーが規定されており、類似色素との区別が困難である。これまで、クルクミノイドの分析法として、高速薄層クロマトグラフィー (HPTLC)⁵⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁶⁻⁸⁾、質量分析 (MS)⁹⁻¹¹⁾ などが報告されている。しかしながら、クルクミノイド

の信頼性かつ高純度な標準品は高価格であるため、市販の標準品を入手することは容易ではない。先行研究において、ウコン色素にはクルクミン (CI)、デメトキシクルクミン (CII) およびビスデメトキシクルクミン (CIII) が主要成分であり、高速向流クロマトグラフィー (High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) により、これらクルクミノイドが単離精製されている (図1)¹²⁾。HSCCCは二相溶媒系を用いる液液分配を原理とした液体クロマトグラフィーであり、効率的かつ網羅的な単離精製法である。HSCCCは特殊な機器を用いるため、汎用性が乏しい。そこで、本研究では、HSCCCで得られたクルクミノイドに対する対応量標準品 (Single Reference, SR) に値付けした値 (相対モル感度, Relative Molar Sensitivity, RMS) を用いた SR-HPLC 定量法を開発することとした。ウコン色素からCI~CIIIを安価に獲得し、化学・物理的性質の類似性を考慮したSRを化学合成によりデザインする。そして、SRに基づいて

RMS を値付けすることにより、迅速かつ完全に定量値を求めることができる。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ウコン色素は、ターメリック色素（三栄源エフエフアイ社製、粉末）、クルクミン GS（ダイワ化成社製、液状）およびクルクミン S（保土谷化学工業社製、液状）を購入し、用いた。

n-ヘキサン、アセトニトリル、クロロホルム、メタノール、1,4-BTMSB-*d*₆、クルクミン標準品、ヨードメタン、アセトン、炭酸カリウムおよびギ酸（LC/MS 用、約 99%）は富士フイルム和光純薬社製を用いた。重アセトンはメルク社製を用いた。また、超純水は PURELAB flex5 system（ELGA 社製）を用いて得た。試料の希釈溶媒として、アセトニトリル/水（50/50, *V/V*）混液を用いた。

B-2) 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52
遠心分離機：日立工機社製 Himac CF15RN
ロータリーエバポレーター：東京理化学器械社製 N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000
凍結乾燥機：東京理化学器械社製 FDU-1200

HPLC 装置：島津製作所社製 LC-20AD/SIL-20AC/RF-10AXL/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS，日立ハイテクサイエンス社 Chromaster 5160 / 5280 / 5310 / 5430，Waters 社製 Acquity UPLC H-Class

MS 装置：Waters 社製 Xevo TQD

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

定量 NMR (¹H-qNMR) 装置：JEOL 社製 ECA600

B-3) LC 分離分析

先行研究より、ウコン色素はメタノールで溶解し、希釈溶媒を用いて調製した。移動相には、0.1vol% ギ酸水溶液（A）/0.1vol%ギ酸アセトニトリル（B）を使用し、A/B：50/50をアイソクラティック条件により、20分の分析を行った¹²⁾。カラム：TSKgel ODS-100V column（4.6×150 mm，5 μm，東ソー社製）
カラム温度：40℃
流速：1.0 mL/min
検出波長：405 nm
注入量：10 μL

B-4) HSCCC の分離分析

まず、三栄源エフエフアイ社製のウコン色素にメタノール 20 mL を加え、高速振とう（1,000 rpm，10 min）することにより抽出した。その後、遠心分離（10,000 rpm，10 分）し、上清を回収した。この操作を 2 回繰り返した。上清を濃縮乾固し、二相溶媒系の上層/下層（50/50, *V/V*）混液に溶解したものを注入試料とした。二相溶媒系は、ヘキサン/クロロホルム/メタノール/水溶液（5/10/7.5/2.5, *V/V/V/V*）を用いた。分離部は、Type-J コイルを用い、遠心スピードを 1000 rpm とした。また、コイル容量は、350 mL であり、固定相には、上層を充填した。移動相には下層を用い、流速 1.5 mL/min で送液した。分取した試料は、島津製作所社製の HPLC を用いて確認し、最終的に獲得したクルクミノイドを凍結乾燥した。

B-5) クルクミノイドの SR 合成デザイン

クルクミン標準品 500 mg にヨードメタン 4.0mL を加え、テトラメチルクルクミンを合成した。触媒として、炭酸カリウム 500 mg，アセトン 15 mL を用いた。なお、合成した SR を島津製作所社製 HPLC と MS により同定および純度評価した。

B-7) ¹H-qNMR による単離したクルクミン類と SR の絶対定量

10 mg CI~CIII を重アセトン 1.0 mL に溶解した。また、10 mg SSR を重アセトン 2.0 mL に溶解した。1.0 mL 溶解液のうち 0.6 mL を NMR 管に移し、qNMR で外部標準法により定量した。

Data points : 60,000

Flip angle : 90°

Pulse delay : 60 s

Scans : 16 times

Probe : room temperature

Software : JEOL 社製 Purity Pro qNMR

ANALYSIS Software

B-8) クルクミン類の RMS 算出

qNMR 管中の CI~CIII および SR を、希釈溶媒により HPLC 標準溶液を調製した。qNMR の定量結果を用いて、絶対検量線の範囲は、0~100 μmol/L と設定し、RMS を求めた。まず、RMS を算出するとき、ランベルト・ベールの法則の式を下記のように式変形した。なお、吸光度 (R) は、吸光係数 (ε)、濃度 (C) および層長 (l) で表される。

$$R = \varepsilon \times C \times l$$

$$\frac{R_{analyte}}{(\varepsilon_{analyte} \times C_{analyte})} = \frac{R_{SR}}{(\varepsilon_{SR} \times C_{SR})}$$

$$\left(\frac{\varepsilon_{analyte}}{\varepsilon_{SR}}\right) \times C_{analyte} = \left(\frac{R_{analyte}}{R_{SR}}\right) \times C_{SR}$$

$$\frac{\varepsilon_{analyte}}{\varepsilon_{SR}} = \left(\frac{R_{analyte}}{R_{SR}}\right) \times \left(\frac{C_{SR}}{C_{analyte}}\right) = \text{RMS}$$

上記より、CI~CIII の RMS を、SR に対する CI~CIII の絶対検量線の傾きの比より算出した。なお、0 μmol/L のピーク面積は検量線の原点とした。また、今回の研究では、3 日間それぞれ RMS を算出し、再現性を確認した。

B-9) SR-HPLC 法を用いたウコン色素中のクル

クミン類の定量

RMS に基づいて 3 製品のウコン色素を SR-HPLC 法で定量し、従来の絶対検量線法による定量結果と比較した。クルクミン GS (ダイワ化成社製) およびクルクミン W (保土谷化学工業社製) は原液を希釈溶媒により調製した。また、ターメリック色素 (三栄源エフエフアイ社製) は試料 0.5 g をメタノール 10 mL で抽出し、希釈溶媒で調製した。なお、絶対検量線による定量は、qNMR 試料液を希釈溶媒により調製した。さらに、異なる HPLC 装置における SR-HPLC 定量法の再現性を検証するため、健康食品およびサプリメント (A~E) を用いて、島津製作所社製、Waters 社製および日立ハイテクサイエンス社製の HPLC 装置で CI~CIII を RMS に基づき定量した。

C. 結果及び考察

C-1) LC 分離分析

先行研究により、移動相は 0.1vol%ギ酸水溶液と 0.1vol%ギ酸アセトニトリルを用いて、最適な分析カラムを検討した¹²⁾。使用したカラムは東ソー社製 TSKgel ODS-80Ts および TSKgel ODS-100V カラムであり、どのカラムサイズも内径 4.6×長さ 150 mm、粒子径は 5 μm であった。HPLC クロマトグラムピーク形状や分離度を比較した結果、TSKgel ODS-100V を採用することとした (図 2)。

C-2) HSCCC の単離分析

二相溶媒系ヘキサン/クロロホルム/メタノール/水溶液 (5/10/7.5/2.5, V/V/V/V) を用いて、メタノール抽出したウコン色素を HSCCC で単離精製した。図 3 にウコン色素の HSCCC クロマトグラムを示した。その結果、固定相における上層の保持率は 50%であり、3 つの主要なピークが確認された (Fraction 2~4)。なお、分析時間は 450 分であった。これら分取物の MS スペクトルでは、いずれもクルクミノイドの [M-H]⁻ (Fraction 2 : m/z 367, Fraction 3 : m/z 337, Fraction 4 : m/z 307) が観察された (図 4)。さらに、HPLC

で測定した結果、いずれも単一ピークであった(図5)。また、Fraction 1およびHSCCCカラム内の固定相のHPLCクロマトグラムを図6に示した。その結果、どちらにもCI~CIIIがほとんど残っていないことが確認された。以上より、ウコン色素(15.5 g)からCIは146.6 mg(収率:0.94%)、CIIは98.3 mg(収率:0.64%)およびCIIIは141.7 mg(収率:0.91%)を入手することができた。

C-4) クルクミン類のSR合成デザイン

分析対象物質の最適なSRの条件は、分析対象物質に類似した吸収極大波長を持つこと、物理的に安定であること、分析対象物質と十分なLC分離が可能であること、高純度および安価であることである。そこで、本研究では、比較的安価に入手可能であるCIを用いて、SRの合成デザイン(アルキル化)を検討した(図7)。生成物をMSやNMRを用いて同定した結果、テトラメチルクルクミンであった(図8)。このSRをウコン色素に添加してHPLCで測定すると、CI~CIIIと良好な分離で検出された(図9)。以上より、本研究で合成デザインされたSRは、RMSを用いたクルクミノイドのHPLC定量法に適応可能であると考えた。

C-5) ¹H-qNMRによる単離したクルクミン類とSRの絶対定量

本研究では、qNMR用標準物質として、1,4-BTMSB-*d*₄を用いた。1,4-BTMSB-*d*₄の純度(99.8%)に基づいて、単離したCI~CIIIとSRをqNMRにより定量した。それらのqNMRスペクトルを図10に示した。その結果、CIは21.5 mmol/L、CIIは25.6 mmol/L、CIIIは20.3 mmol/LおよびSRは19.1 mmol/Lであった。

C-6) クルクミン類のRMS算出

単離したCI~CIIIとSRのNMR管の試料溶液を用いて、HPLC用標準溶液を調製し、絶対検量線を作成し(原点通過, 0~100 μmol/L), 図11に示した。さらに、検量線の様々な濃度幅

においてRMSを3日間連続で検量線を作成することによりRMS算出した。CI~CIIIのRMSの平均値±RSD%を求めた結果、CIは8.9±1.2、CIIは9.6±0.9およびCIIIは8.9±2.0であった。以上より、本研究では、検量線の濃度幅や日間の影響を受けずに、高精度かつ堅固なRMSを算出することができたといえる。

C-7) SR-HPLC法を用いたウコン色素中のクルクミン類の定量

算出したCI~CIIIのクルクミノイドのRMSに基づいて、各メーカーのウコン色素をSR-HPLC定量法で分析した。なお、添加するSR濃度は、25 μmol/L、50 μmol/Lおよび100 μmol/Lとした。そのときのHPLCクロマトグラムを図12に示した。その結果、今回の研究で合成デザインしたSRはウコン色素中の成分に影響なくピークを検出することができた。そして、各SR濃度におけるCI~CIIIの定量値を表1にまとめた。なお、CI~CIIIのqNMR試料液を用いて、絶対検量線法による定量値も算出した。その結果、どのウコン色素においても、従来の絶対検量線と同等の定量値を示した。さらに、健康食品およびサプリメント(A~E)を島津製作所社製、Waters社製および日立ハイテクサイエンス社製のHPLC装置でSR-HPLC定量分析を行った。各HPLC装置の健康食品およびサプリメントのHPLCクロマトグラムを図13~15に示し、定量結果を図16にまとめた。その結果、島津製作所社製のHPLC装置でRMSを算出した場合、他社のHPLC装置においても、本手法は適応可能であると考えられた。

D. 結論

本研究では、既存添加物ウコン色素に含まれるCI~CIIIのSR-HPLC定量法を構築した。まず、標準品が入手困難であるCI~CIIIをHSCCCにより単離精製した結果、それぞれ高純度な単一成分を得ることができた。そして、qNMRにより絶対定量を行い、その定量値に基づいて検量線を作成した結果、再現性の保証されたRMSを

算出できた。それらの RMS を用いて流通しているウコン色素中の CI~CIII を定量した結果、絶対検量線法とほぼ同じ定量値を示し、他社の HPLC 装置で定量を実施しても大きな誤差は確認されなかった。以上より、本分析法を用いることにより、ウコン色素中の主成分を迅速かつ簡便に定量可能であり、その値は堅固かつ信頼性のあるといえる。今後は、様々な条件下（研究室間、日間、カラムなど）における定量値の再現性を確認することが必要であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 第9版食品添加物公定書, 厚生労働省(2017).
- 2) Ramsewak R. S, Dewitt D. L, Nair M. G.: Cytotoxicity antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumin 1-3 from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*, **2000**; 7: 303-308.
- 3) Menon V. P, Sudheer A. R: Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2007**; 595: 105-125.
- 4) Maheshwari R. K, Singh A. K, Gaddipati J, Srimal R. C: Multiple biological activities of curcumin. *Life Sci.*, **2006**; 78: 2081-2087.
- 5) Ansari M. J, Ahmad S, Kohli K, Ali J, Khar R. K: Stability indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**; 39: 132-138.
- 6) Jayaprakasha G. K, Jagan Mohan Rao L, Sakariah K. K: Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**; 50: 3668-3672.
- 7) Heath D. D, Pruitt M. A, Brenner D. E, Rock C. L: Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography, **2003**; 783: 287-295.
- 8) Gonza'lez M, Gallego M, Valca'rcel M: Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid-phase extraction system. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**; 51: 2121-2129.
- 9) Inoue K, Hamasaki S, Yoshimura Y, Yamada M, Nakamura M, Ito Y, Nakazawa H: Validation of LC/electrospray-MS for determination of major curcuminoids in foods. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **2003**; 26: 53-62.
- 10) Liu A, Lou H, Zhao, L, Fan P: Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**; 40: 720-727.
- 11) Jiang H, Somogyi A, Jacobsen N. E, Timmermann B. N, Gang D. R: Analysis of curcuminoids by positive and negative electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**; 20: 1001-1012.
- 12) Inoue K, Nomura C, Ito S, Nagatsu M, Hino T, Oka H: Purification of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin by High-Speed Countercurrent chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**; 56: 9328-9336.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 高橋未来, 高木映里, 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HPLCによるクルクミン類の定量法の検討. 第2回日本定量NMR研究会 (2020.12.4)(川崎市)
- 2) Takahashi M.: Single Reference HPLC Approach for Application of Food Analysis. AOAC 2021 Virtual Midyear Meeting (2021.3.19) (Online)

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Takahashi M, Nishizaki Y, Maruyama T, Sugimoto N, Kyoko S, Inoue K: Quantification of tea - derived catechins without the requirement

for respective calibration curves by single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *J. Sci. Food Agric.*, **2020** DOI 10.1002/jsfa.11013

2-2. 総説

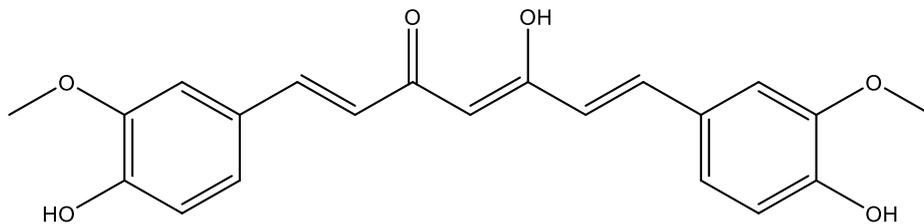
なし

2-3. 単行本

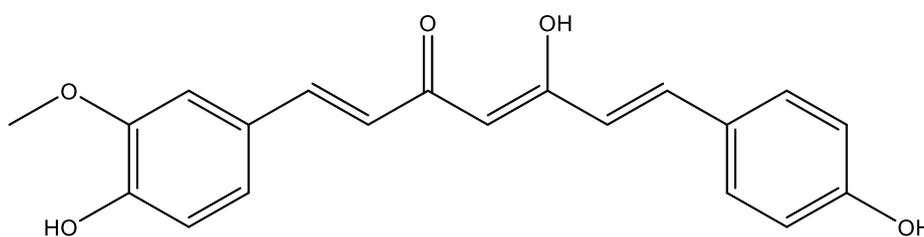
なし

G. 知的財産権の出願. 登録状況

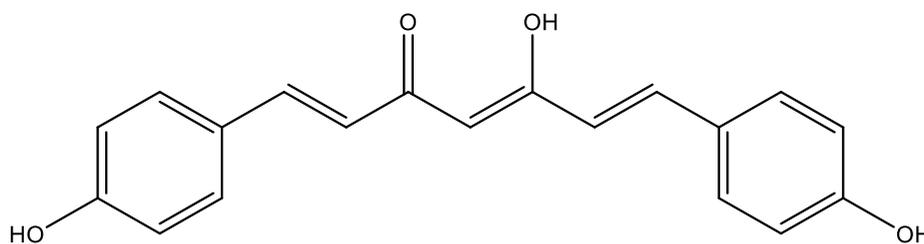
なし



クルクミン (CI)



デメトキシクルクミン (CII)



ビスデメトキシクルクミン (CIII)

図1 クルクミノイドの化学構造式

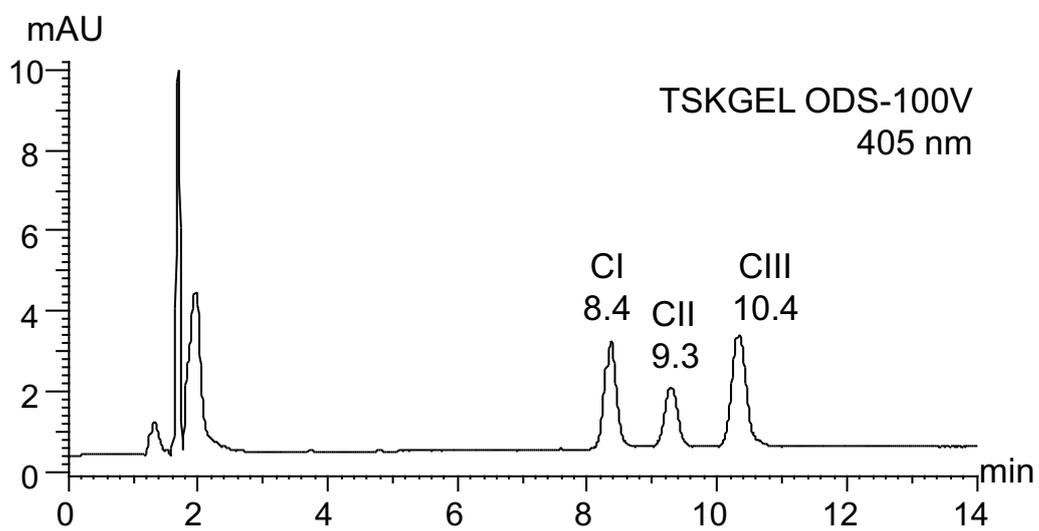
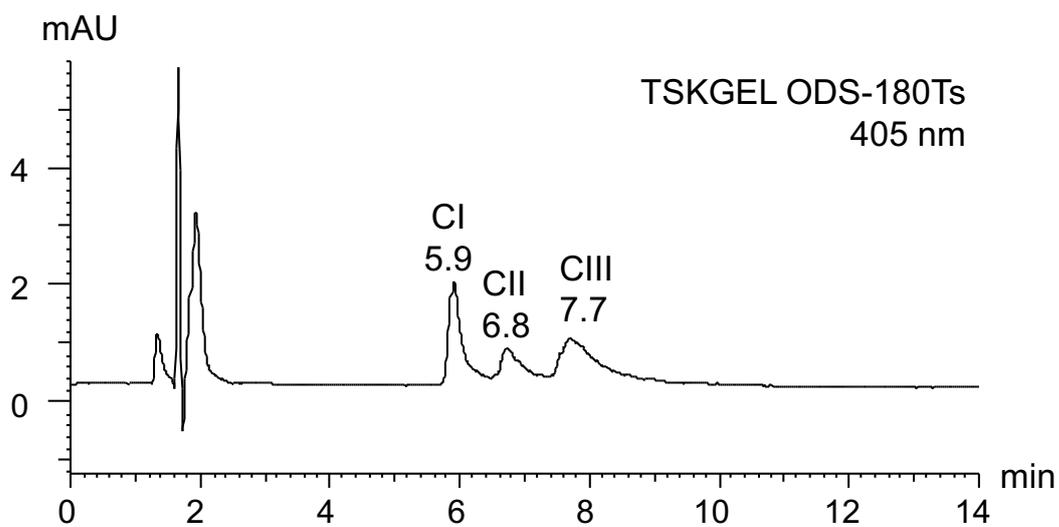


図 2 TSKgel ODS-80Ts および TSKgel ODS-100V における
ウコン色素の HPLC クロマトグラム

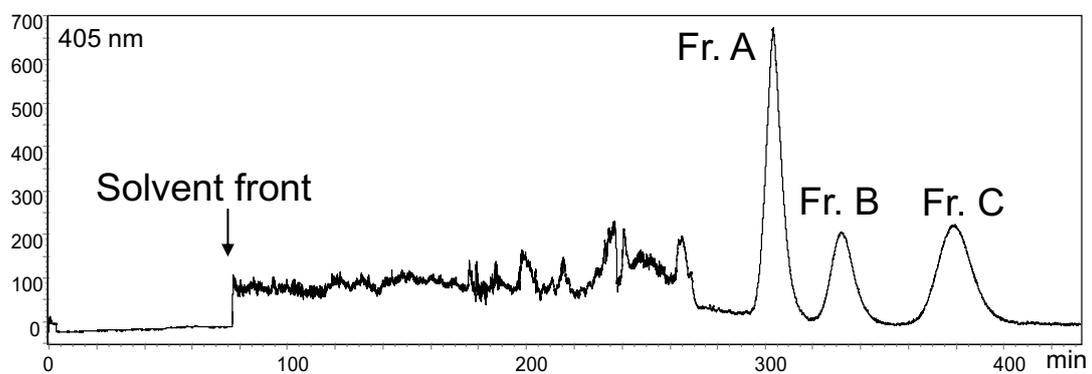


図3 ウコン色素の HSCCC クロマトグラム

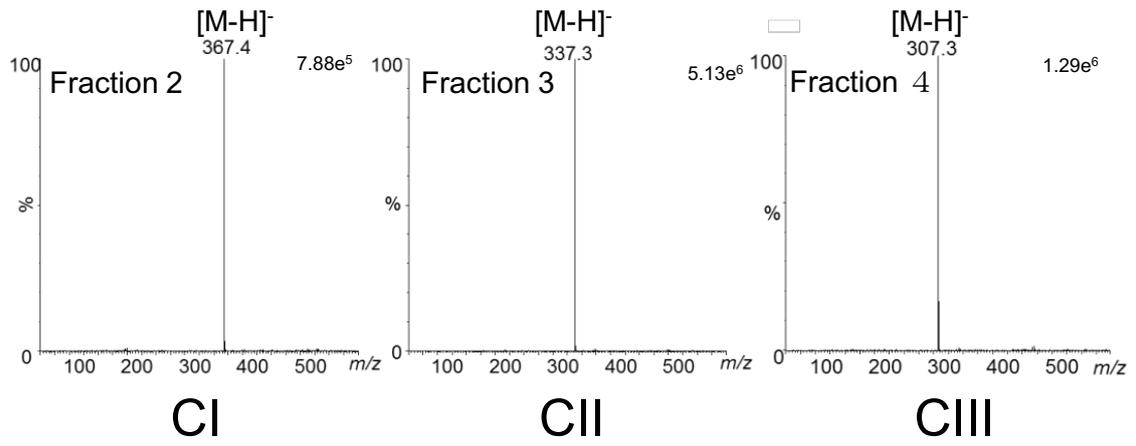


図 4 Fraction 2~4 の MS スペクトル

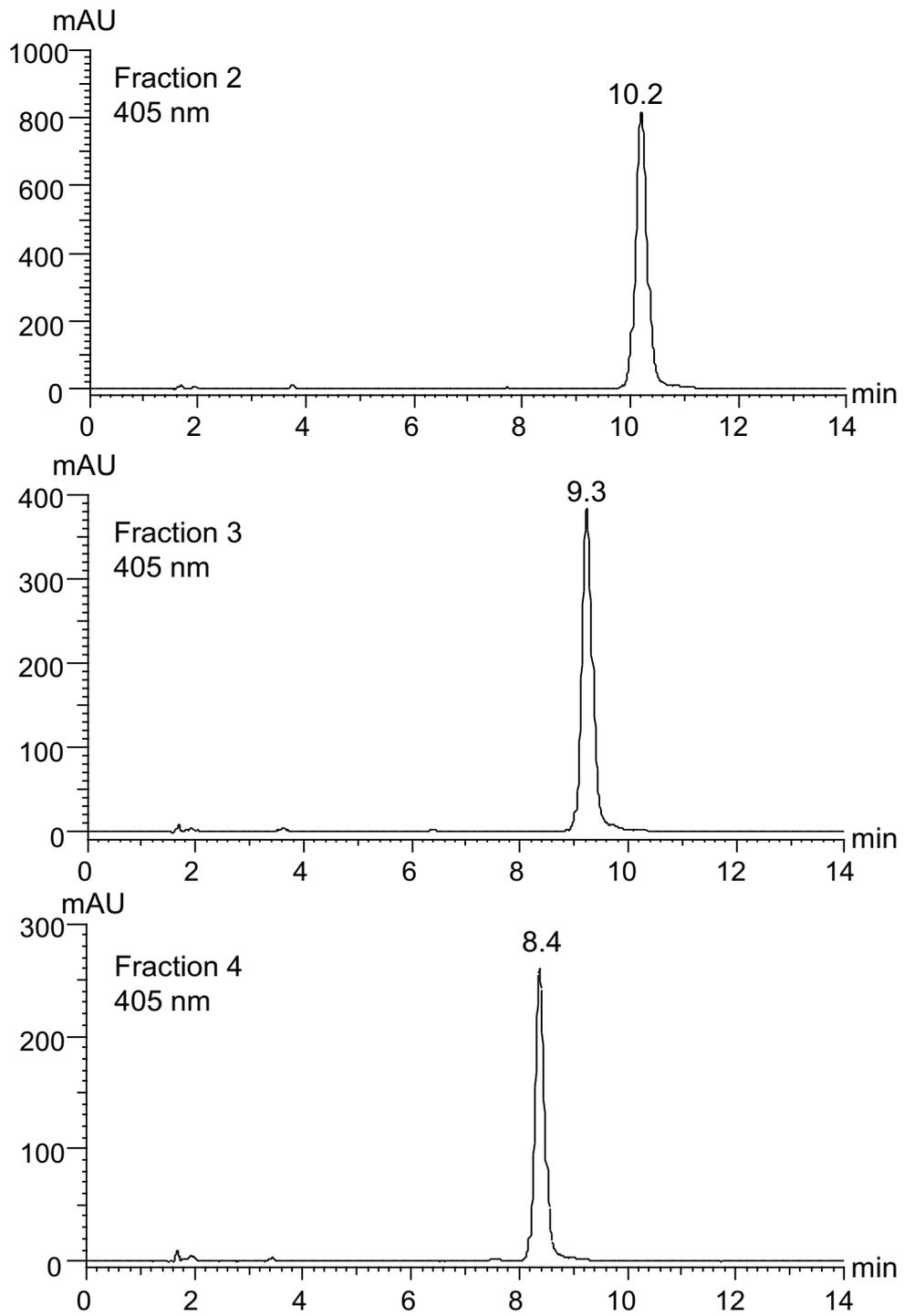


図 5 Fraction 2~4 の HPLC クロマトグラム

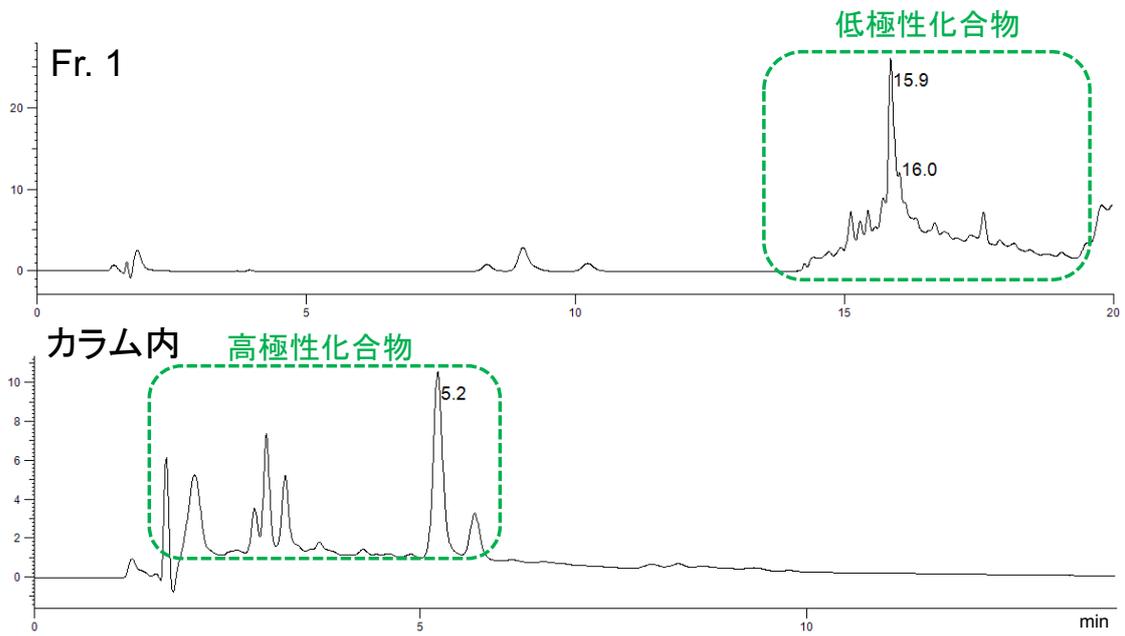


図 6 Fraction 1 およびカラム内（固定相）溶媒の HPLC クロマトグラム

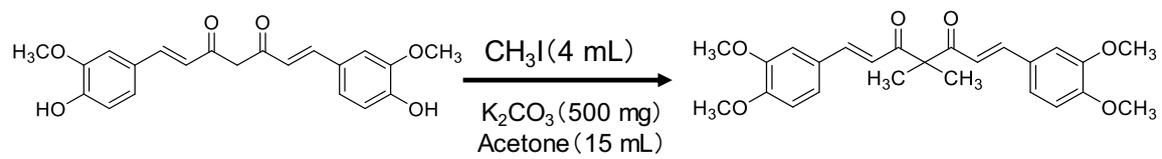


図 7 SR の合成デザインにおける化学反応式

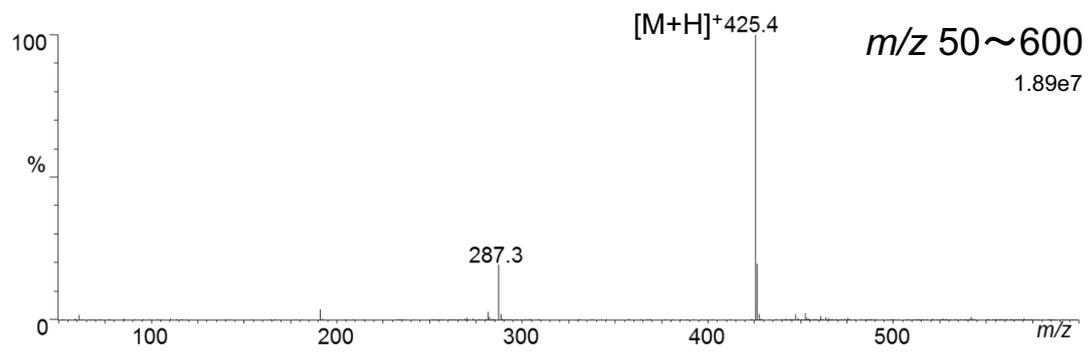


図 8 合成デザインした SR の MS スペクトル

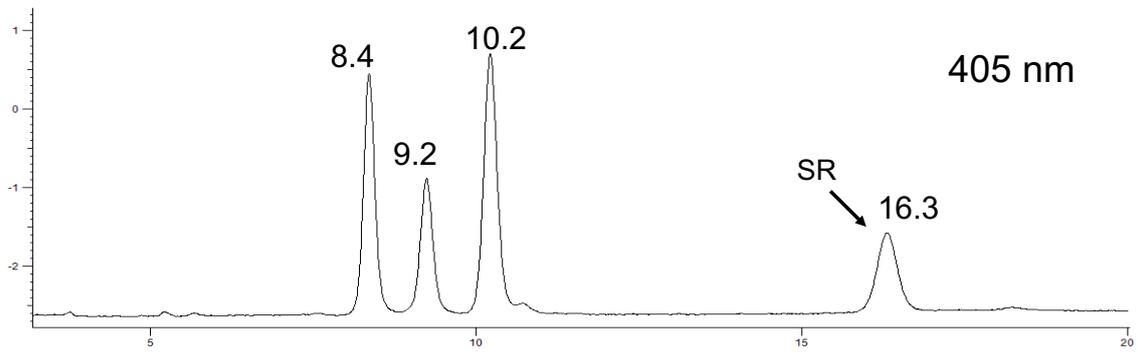
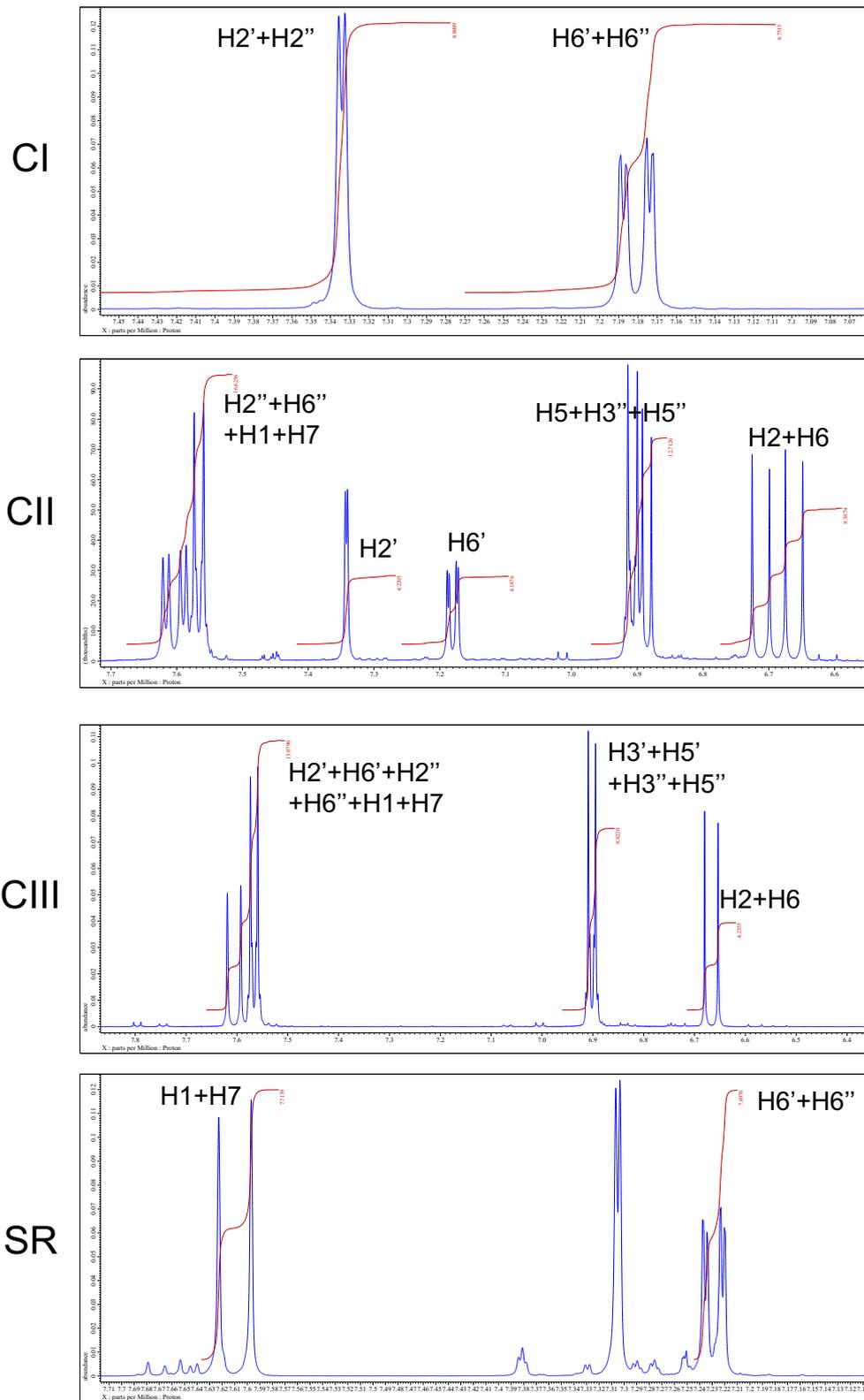


図9 合成デザインした SR の HPLC クロマトグラム



☒ 10 HSCCC で単離した CI~CIII および SR の qNMR スペクトル

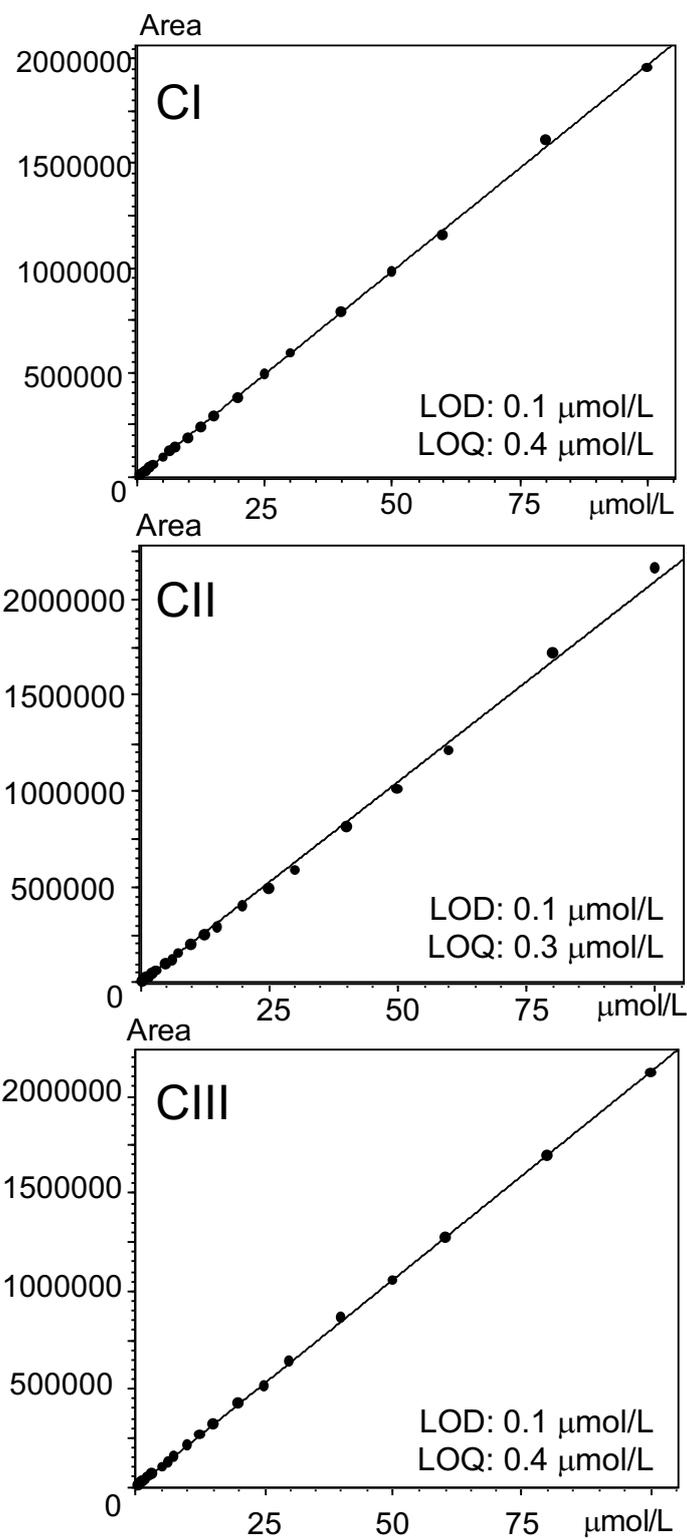


図 11 CI~CIII の絶対検量線 (LOQ~100 μmol/L)

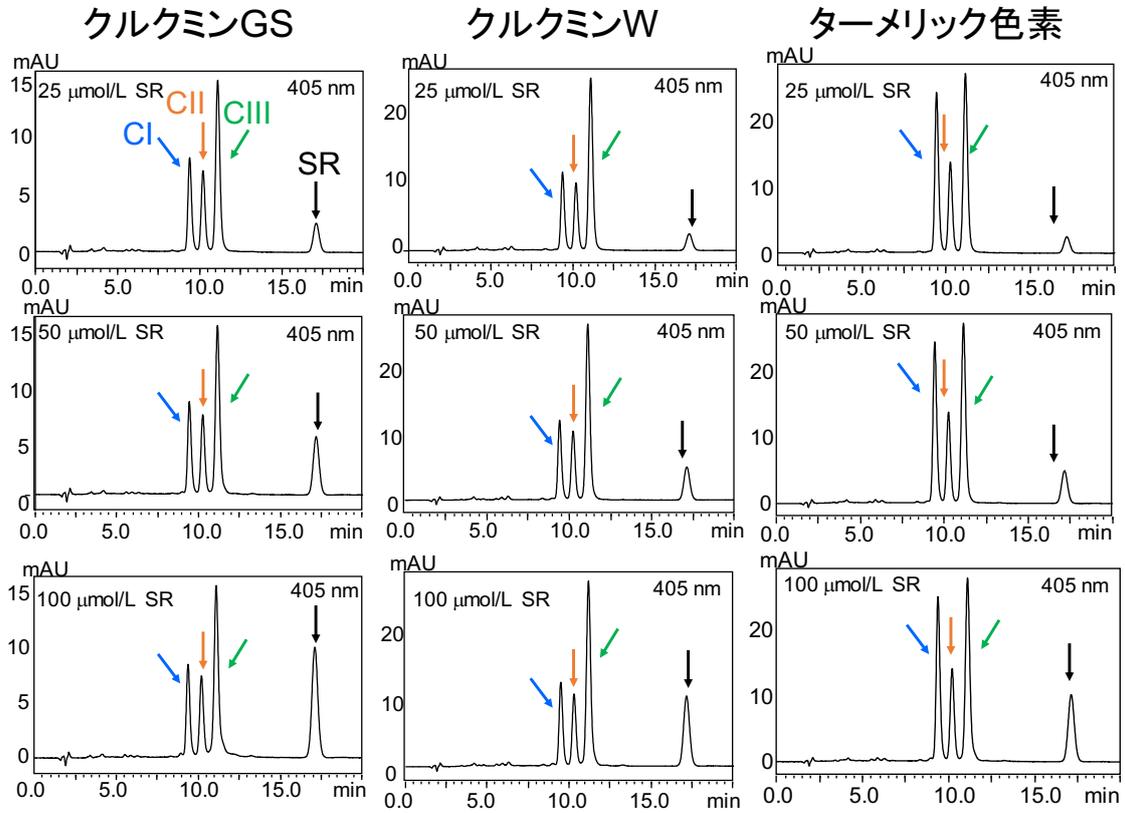


図 12 SR を添加したウコン色素製品の HPLC クロマトグラム

表 1 SR-HPLC 定量法および絶対検量線法による
ウコン色素製品中の CI~CIII の定量結果

		クルクミンGS			クルクミンW			ターメリック色素		
		CI	CII	CIII	CI	CII	CIII	CI	CII	CIII
SR μmol/L	25	11.9±0.7	5.1±0.7	5.2±0.7	20.8±1.2	7.5±1.9	7.6±2.0	22.0±0.2	10.3±0.3	16.0±0.4
	50	11.9±0.3	5.1±0.4	5.2±0.2	21.4±0.1	7.7±0.2	7.8±0.4	22.2±0.2	10.3±0.2	16.0±0.2
	100	13.0±1.2	5.3±1.0	5.4±0.2	21.6±0.2	7.5±0.3	7.7±0.2	22.2±0.2	10.1±0.2	15.7±0.2
絶対検量線法		12.3±0.2	5.2±0.4	5.2±0.6	21.7±0.1	7.5±0.4	7.4±0.3	22.4±0.4	10.2±0.3	15.2±0.1

n=3

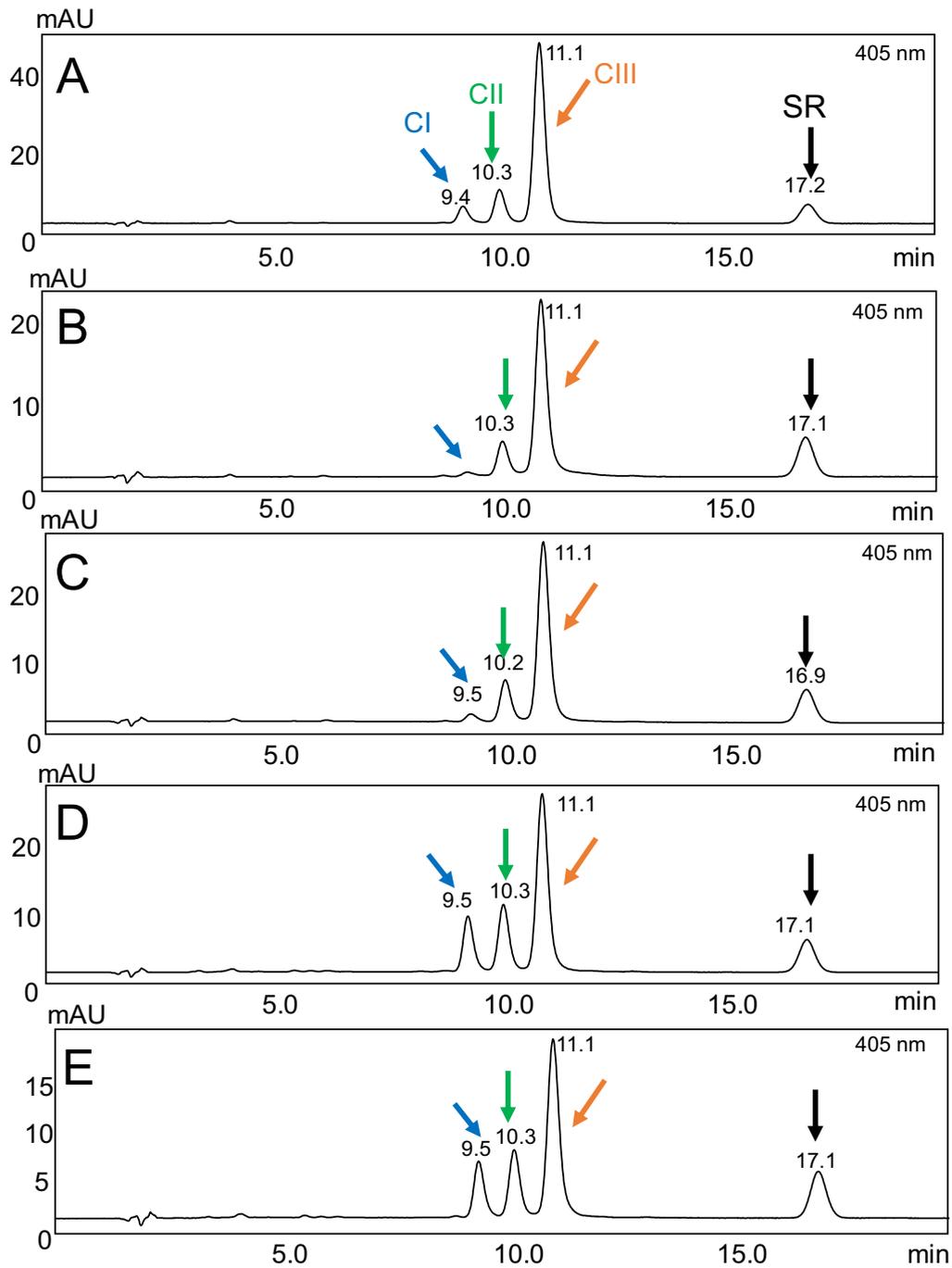


図 13 SR を添加したウコン関連の健康食品およびサプリメントの HPLC クロマトグラム (島津社製 HPLC 装置)

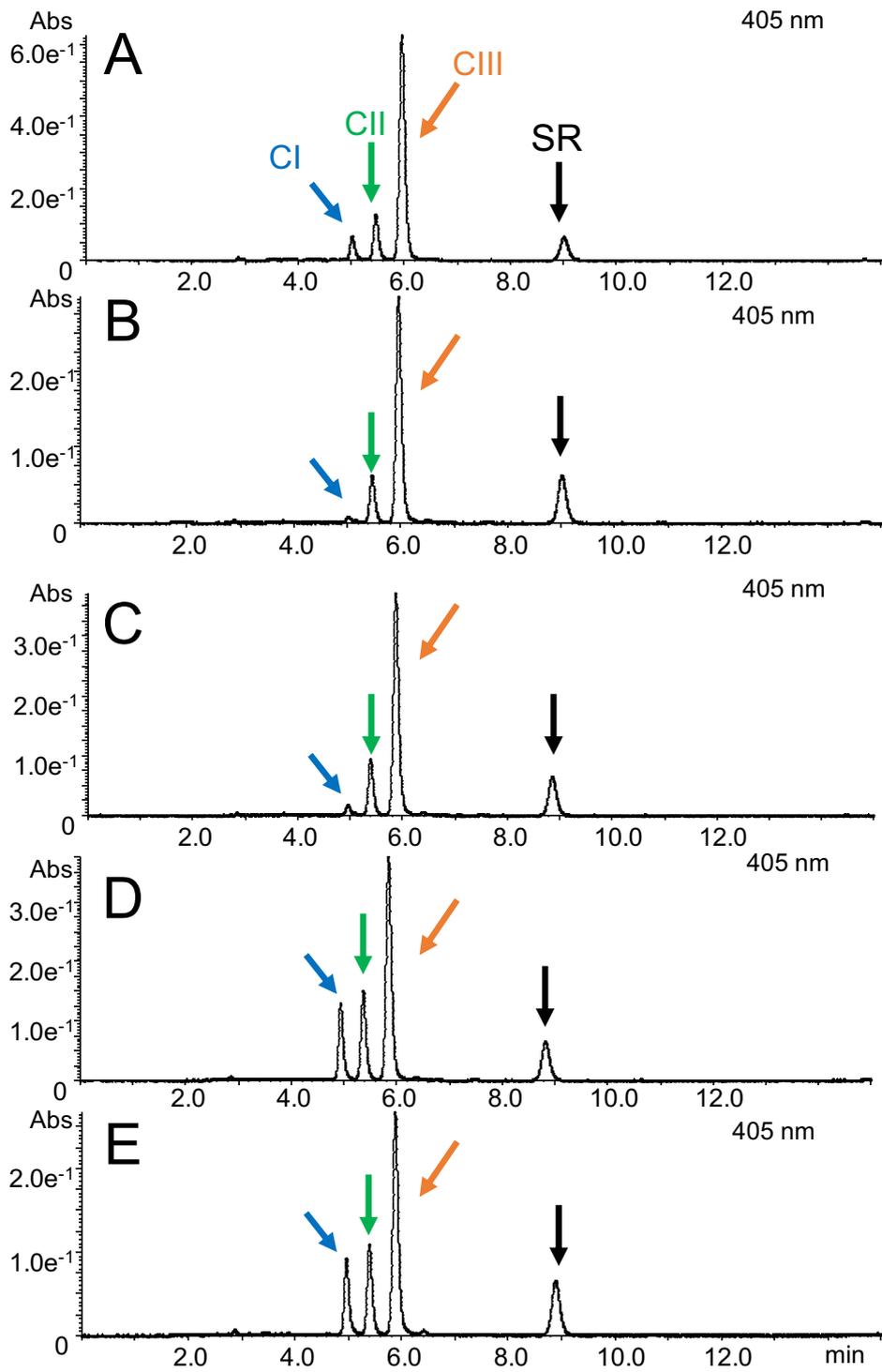


図 14 SR を添加したウコン関連の健康食品およびサプリメントの HPLC クロマトグラム (Water 社製 HPLC 装置)

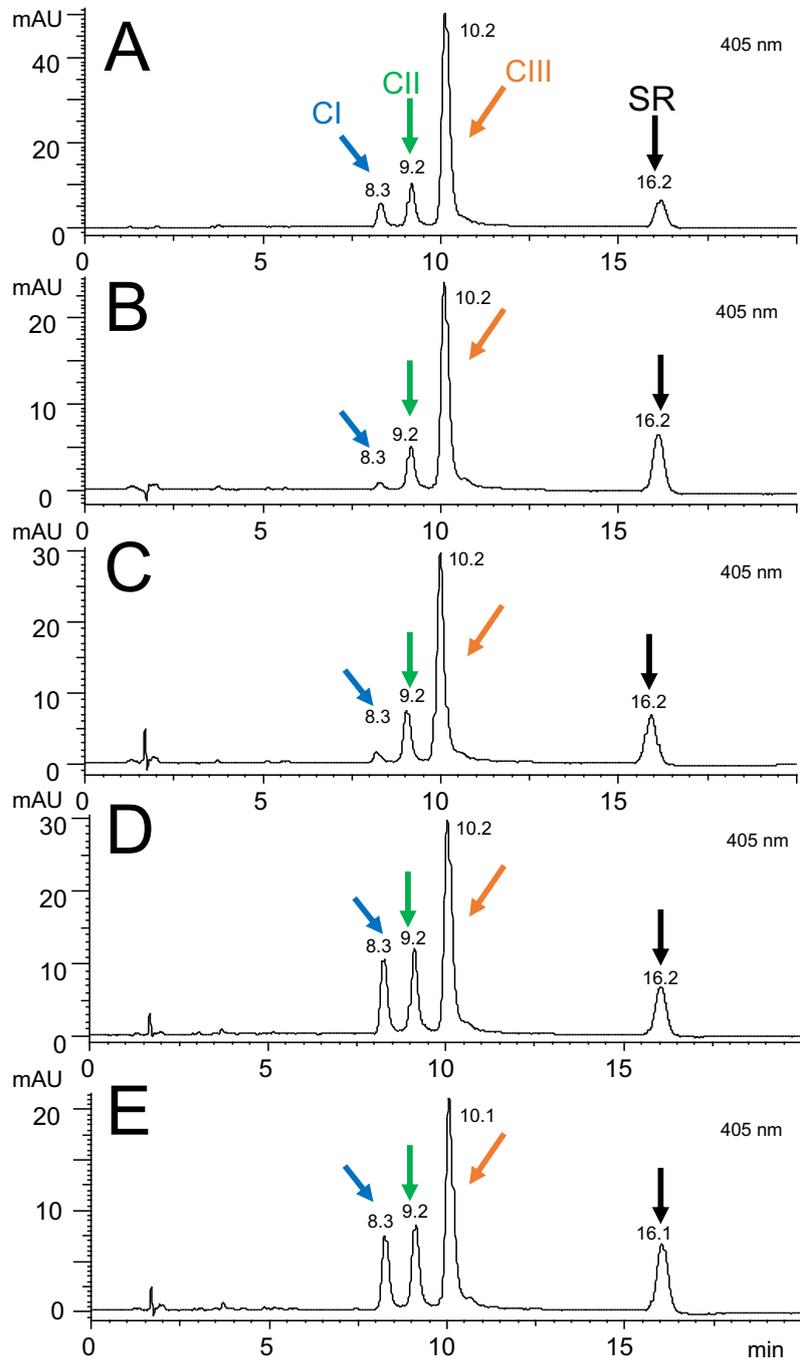


図 15 SR を添加したウコン関連の健康食品および
 サプリメントの HPLC クロマトグラム (日立ハイテクサイエンス社製 HPLC 装置)

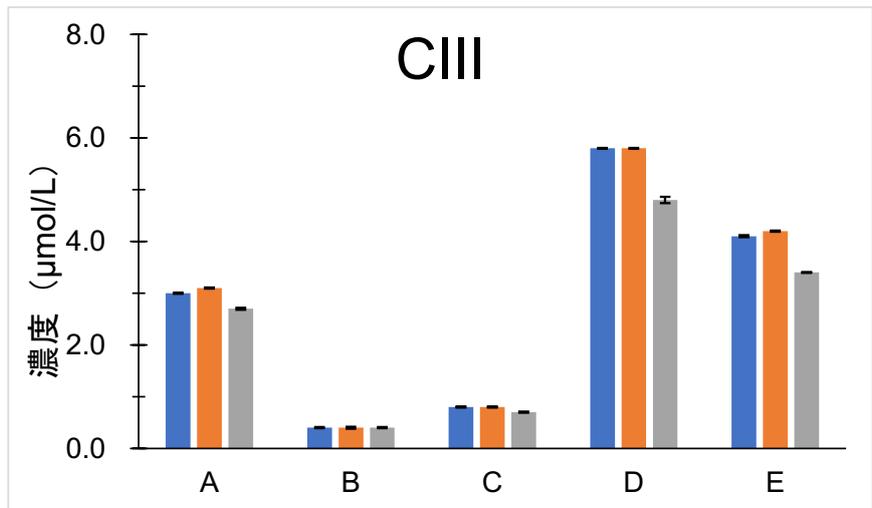
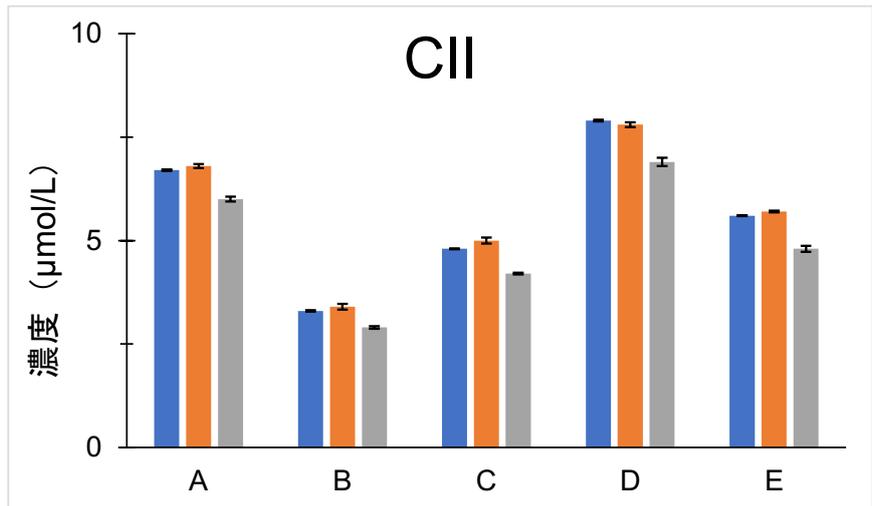
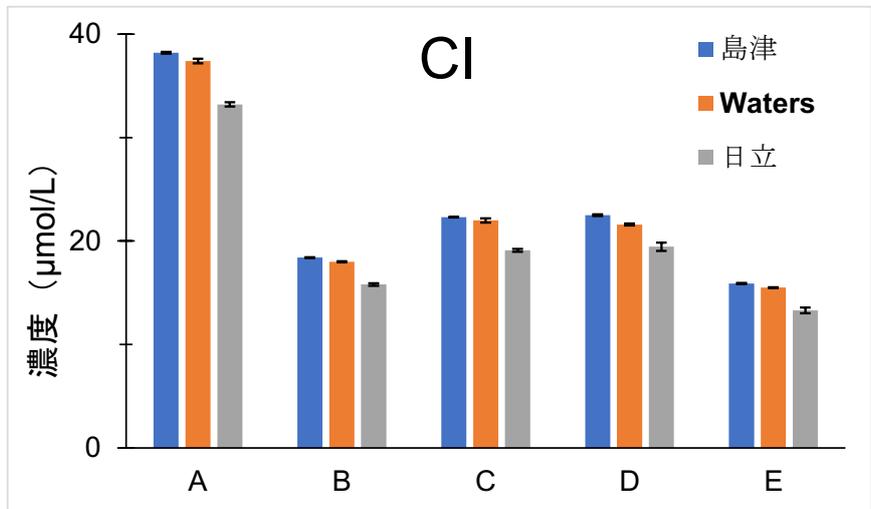


図 16 各メーカーの HPLC 装置における SR-HPLC 定量法を用いたウコン関連製品中の CI~CIII 定量結果

研究要旨 シタン色素（Sandalwood Red）は日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」に記載されており、シタン（*Pterocarpus santalinus* L.）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。確認試験には色価と極大吸収部の記述があるのみで、明確な成分は記載されていない。昨年度に高速向流クロマトグラフィー（HSCCC）を用いてサンタリンAおよびBの単離精製を行なった結果、高純度のサンタリンA（SA）およびサンタリンB（SB）が得られたが、同時に未知の色素成分も獲得することができた。そして、この成分をHPLCで測定したが検出感度が低かったため、再解析を行なった。HSCCCやHPLCの測定条件について再検討したが、分析は困難であると判断した。そこで、TLCによる分析を行い、その結果、シタン色素に含まれる成分のRf値を求めることができた。今後さらに成分解析を進めていくために、成分の再評価と HSCCCによる単離精製の検討を合わせて進めていくこととする。

研究協力者

高橋未来 立命館大学大学院薬学研究科
博士課程

現在のシタン色素の確認試験では、色価や極大吸収波長により評価されている。しかしながら、主成分である SA および 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 および SB の定量分析は困難である。

A. 研究目的

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。¹⁾ 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。シタンにはフラボノイド、テルペノイド、フェノール化合物、サポニンなどの成分が含まれていると言われている。また、シタン色素の主成分であるサンタリン A（SA）およびサンタリン B（SB）は、抗糖尿病作用、抗酸化作用や肝臓保護作用が報告されている。そしてインドでは、皮膚疾患、黄疸、創傷治癒の外用薬として用いられていたことも報告されている。²⁾ また、人工皮膚の着色の技術も開発されている。³⁾

昨年度は、高速向流クロマトグラフィー（High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC）を用いてシタン色素から SA 及び SB の単離精製を行い、同時に未知の色素成分(Fr.1)も獲得することができた。しかし、この成分は検出感度が低かった。

ゆえに、HSCCC を用いて再びシタン色素の主成分評価を行い、HPLC 及び TLC を用いて分析条件の検討を行うこととした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

シタン色素は、粉末のジーエスインターナショナル社製<B140>と液状の三栄源エフエフアイ社製<C2012>を用いた。なお、<>内は国

立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号を示す。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52
ロータリーエバポレーター：東京理化学器械社製 N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000
薄層板：Merck 社製 Silica gel 60 F₂₅₄

HPLC 装置：日立ハイテクサイエンス社製 Chromaster 5160 / 5280 / 5310 / 5430
MS 装置：Waters 社製 Xevo TQD
HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge), GL サイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761

B-2) 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 をアイソクラティック条件により、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)

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-540 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)

アイソクラティック条件：A/B : 45/55 (0 min) →45/55 (20 min) →5/95 (20.1 min) →5/95 (25 min) →45/55 (25.1 min) →45/55 (30 min)

B-3) シタン色素の HSCCC の分離分析

対象試料にはジーエスインターナショナル社製から獲得した Fr.1 を用い、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、メチル *t*-ブチルエーテル/アセトニトリル/水溶液 (4/1/5, V/V/V) を用いた。分離部は、Type-J コイルを用い、遠心スピードを 1000 rpm とした。また、コイル容量は、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。

B-4) シタン色素の TLC の分離分析

対象試料はシタン色素、単離精製によって獲得した SA, SB, Fr.1 とし、メタノールで調製した。展開溶媒には酢酸エチル：メタノール(9:1)を用い、自然光および254 nm でスポットを確認した。

C. 結果及び考察

C-1) シタン色素の LC 分離分析

昨年度のシタン色素の HSCCC による単離で獲得した Fr.1 についての追加検討を行った。

まず始めに、HPLC にて測定条件の検討として、検出波長及び濃度の検討を行った。

赤色色素に関する文献を参考にして、検出波長 535 nm, 500 nm, 480 nm, 254 nm で測定し、ピーク強度を比較した。その結果の HPLC クロマトグラムを図 1 に示した。最もピーク強度が大きかったのは 500 nm であったため、従来通りの 500 nm で検出を行うこととした。

また、試料濃度によるピーク強度の変化の確認を行った。Fr.1 166 mg をメタノール 10 mL に溶解したものを基準溶液としてメタノールで希釈を行い、10 倍希釈、100 倍希釈、1000 倍希釈溶液を作成し、測定を行った。その結果の HPLC クロマトグラムを図 2 に示した。これより、希釈を行うことでピーク強度が小さくなったため、希釈をせずに測定を行うこととした。

以上の検討により、測定条件を決定し、Fr.1 を測定した結果、その結果、5.8 min と 8.2min にピークを検出した。(図 3)

C-2) シタン色素の HSCCC の分離分析

HSCCC による単離を再度実施するにあたり、二層溶媒の再検討を行った。その結果、メチル *t*-ブチルエーテル/アセトニトリル/水溶液 (4/1/5, V/V/V) を採用した。

Fr.1 の HSCCC による単離を実施した。二層

溶媒にはメチル *t*-ブチルエーテル/アセトニトリル/水溶液 (4/1/5, V/V/V) を用いた。なお、固定相の保持率は 47 % であり、分析時間は 150 分であった。HSCCC クロマトグラム (図 4) より、明確なピークは検出されず、また、上層に赤い成分が多く残り、分取することができなかった。

以上の結果より、HPLC および HSCCC による Fr.1 の分析は困難であると考えたため、TLC を用いて検討することとした。

C-3) シタン色素の TLC の分離分析

薄層版に Silica gel 60 F₂₅₄ を用いて展開溶媒の検討を行った結果、酢酸エチル:メタノール(9:1) で分離を行うことができた (図 5)。また、スポットの R_f 値を求め、表 1 に示した。この結果より、Fr.1, SA および SB の R_f 値を求めることができた。またシタン色素中にも同成分が含まれていることを確認することができたが、一方でスポット 1-5 のように、上記の成分以外のスポットも観察された。

D. 結論

本研究では、既存添加物シタン色素に含まれる、HPLC での検出が困難である Fr.1 を TLC によって分析することができた。しかし、同時にシタン色素には Fr.1, SA, SB 以外の成分が含まれていることが確認できた。今後は、シタン色素の成分の再評価と、主成分解析を行うために SA 及び

SB の更なる単離精製が必要であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 日本食品添加物協会；第4版 既存添加物自主規格 平成20年10月13日発行
- 2) Bulle S, Reddyvari H, Nallanchakravarthula V, Vaddi DR; Therapeutic Potential of Pterocarpus santalinus L.: *An Update. Pharmacognosy*, 43-9 (2016)
- 3) レアル. ダルマントン, パトリック. 皮膚の人工的着色のためのサンタリン又はサンタル人工的着色のためのサンタリン又はサンタルピンを含有する組成物. 特表 2000-513015. 2000-10-0

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
2-1. 論文
なし
2-2. 総説
なし
2-3. 単行本
なし

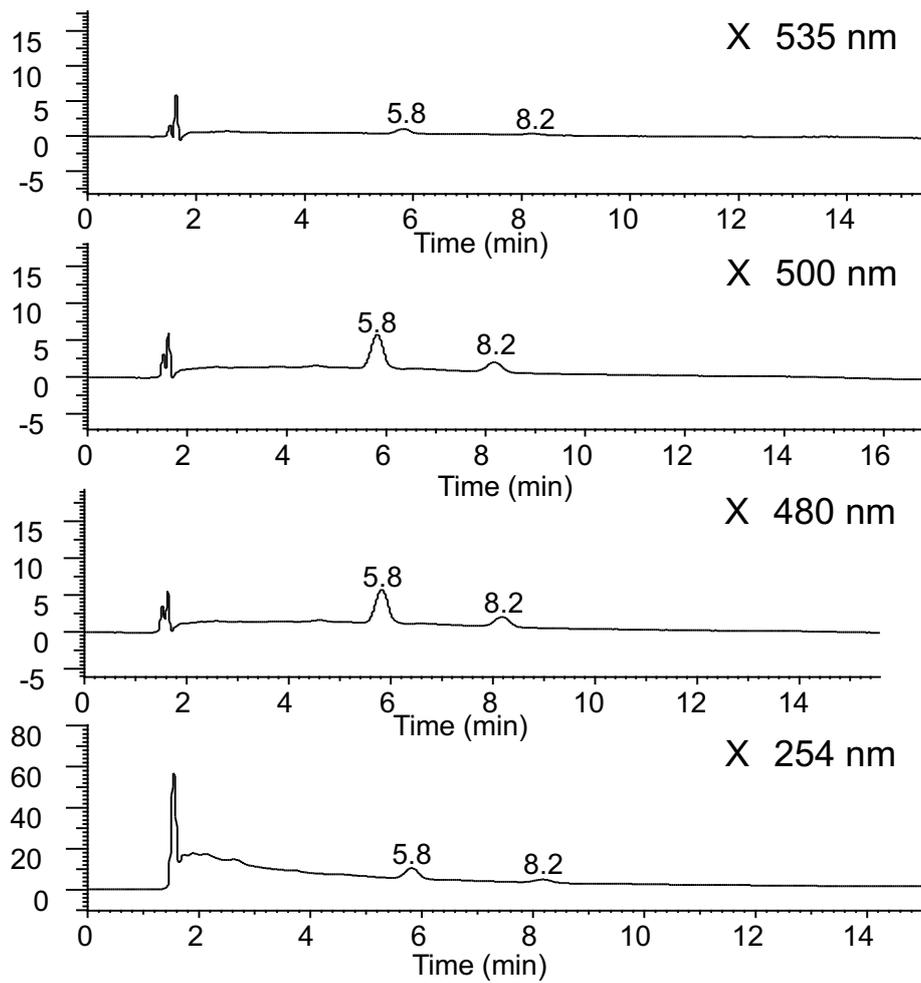


図1 シタン色素の HPLC クロマトグラム(検出波長)

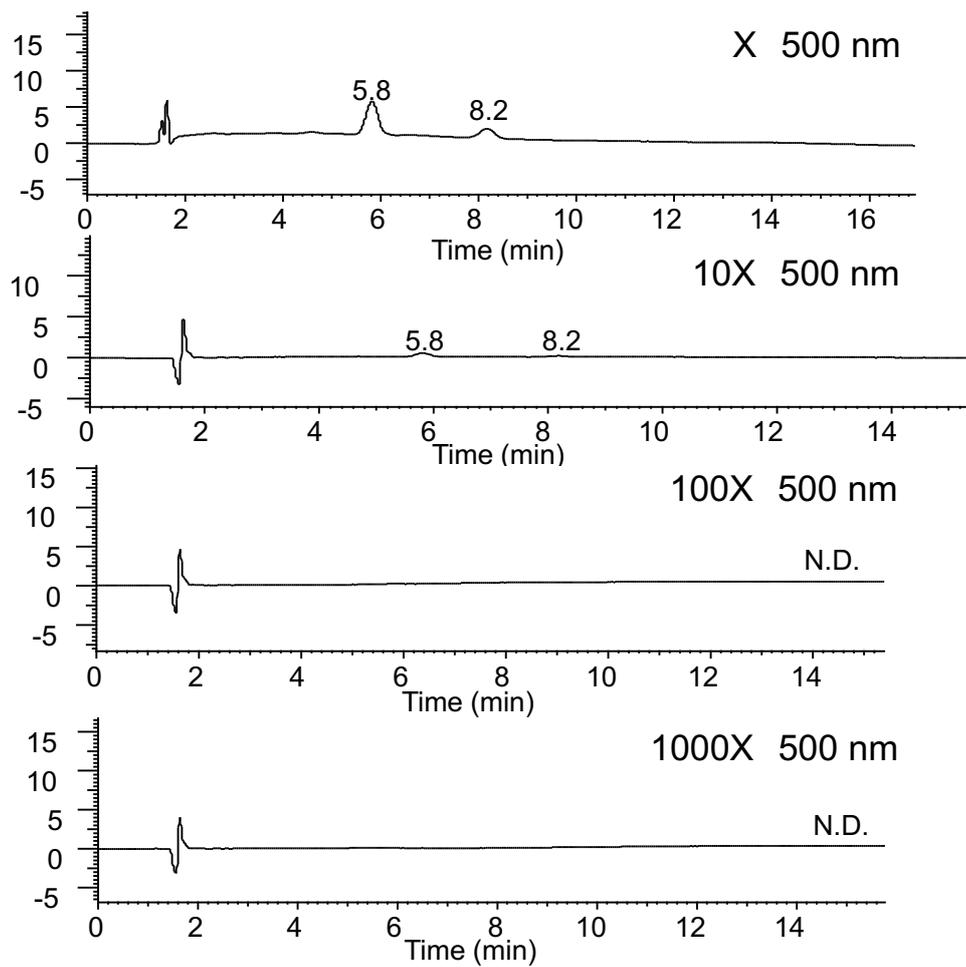


図 2 シタン色素の HPLC クロマトグラム(試料濃度)

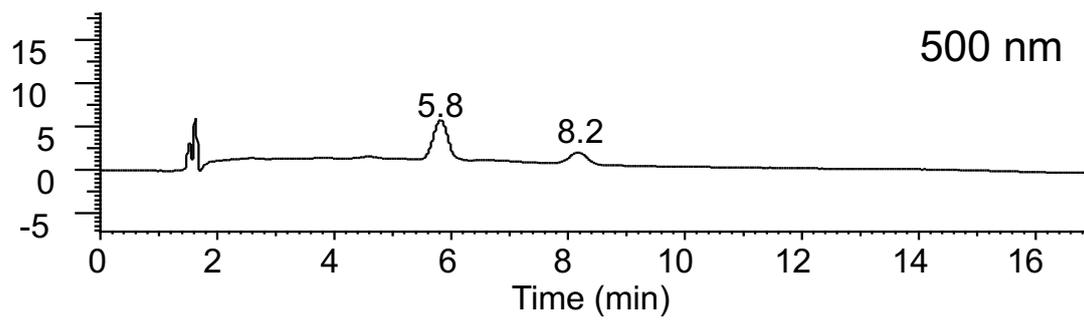


図3 シタン色素のHPLCクロマトグラム

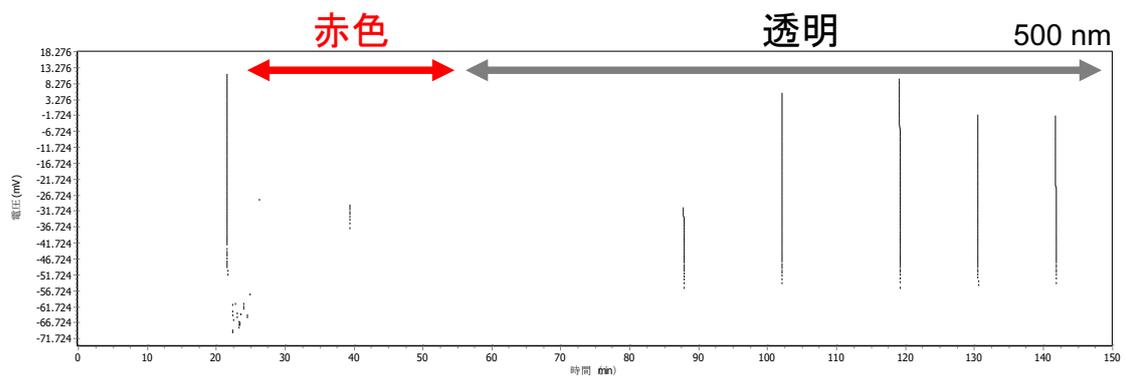


図4 シタン色素の HSCCC クロマトグラム

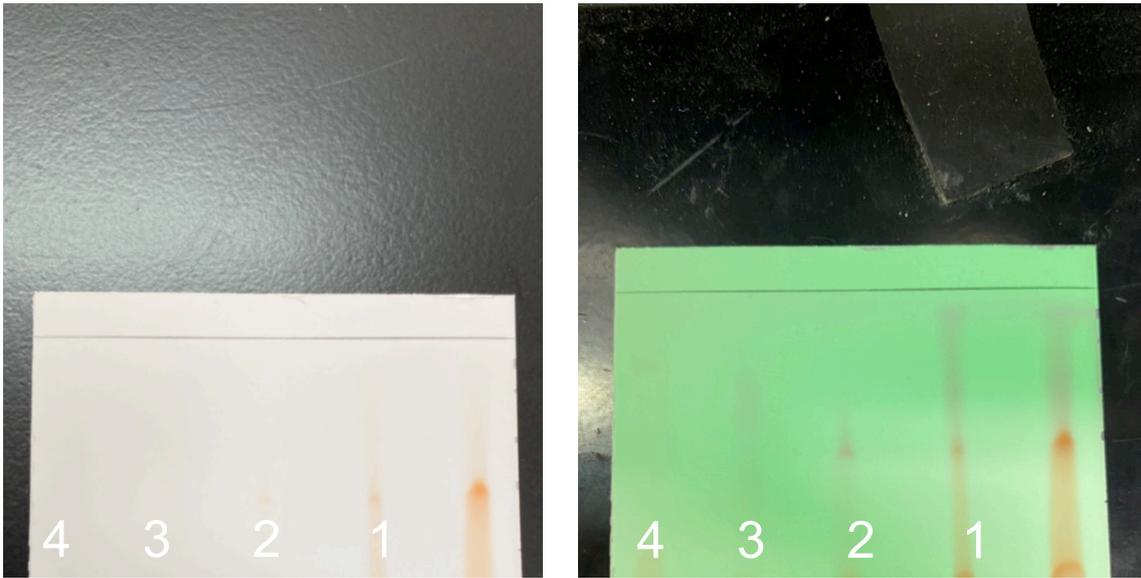


図 5 TLC 展開結果 (左 : 自然光, 右: 254 nm)

1:シタン色素 2: Fr.1 3:SA 4:SB

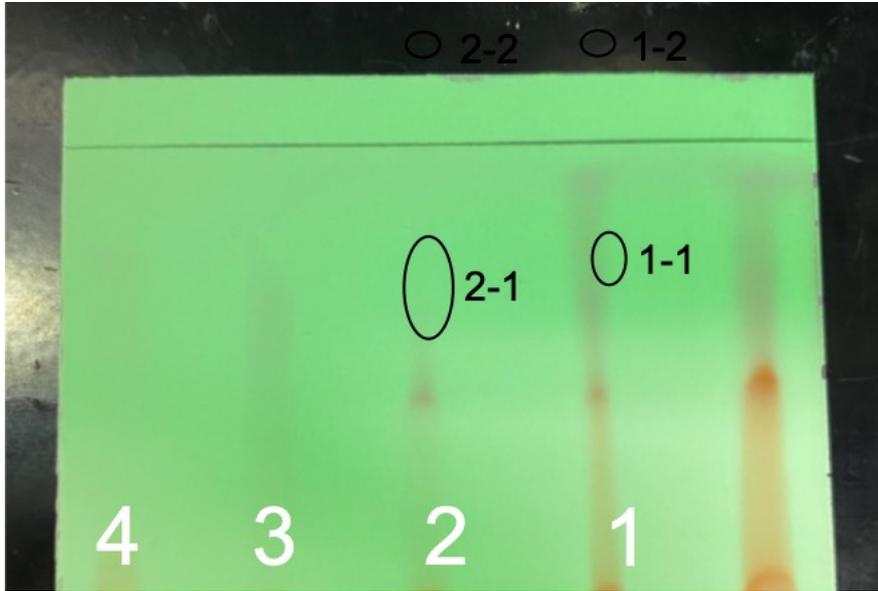


図6 スポット番号

表1 Rf値

サンプル名	a (cm)	b (cm)	Rf値(b/a)
1-1	4.05	1.00	0.25
1-2		2.85	0.70
1-3		3.00	0.74
1-4		3.35	0.82
1-5		3.85	0.95
2-1	4.10	0.90	0.22
2-2		2.90	0.71
3	4.10	2.95	0.72
4	4.10	3.40	0.83

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～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可能性を検討した上で、適用の可能性のあるものに関して、実際に適用する場合の測定条件の確立、あるいはそれを応用した正確な定量法の検討を目的として研究を行なった。令和2年度も引き続き「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討とした。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、「香辛料抽出物」の基原に上がっているもののうち、生薬として市販されているものの抽出物を作成し、 ^1H -qNMR法での定量が可能かの検討を行った。令和2年度は、コショウ種子、ケイヒ、オールスパイス種子を原材料とした既存添加物の規格試験法へのアプローチとして、コショウ種子の指標成分として適切であろう piperine、ケイヒの指標成分として適切であろう cinnamaldehyde、オールスパイス種子の指標成分として適切であろう eugenol の ^1H -qNMR法を用いた定量の検討を行い、各抽出物中に含まれるそれぞれ piperine、cinnamaldehyde、eugenolが ^1H -qNMR法で定量可能であることを示した。また、既存のHPLC法との同等性を確認することで、 ^1H -qNMR法がHPLC法に代わりうる定量法であり、規格基準の策定に応用できる可能性を示した。

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の存在がHPLC法などの従来法では必須であるのに対して、それら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。

令和2年度も引き続き既存添加物である「香辛料抽出物」に着目して研究を行った。既存添加物の「香辛料抽出物」は、アサノミ以下73種類の植物から「抽出またはこれを水蒸気蒸留して得られたもの」とされている。基原が多様な上、用部も明確には書かれておらず、規格

基準は定められていない既存添加物である。規格基準を決めるには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。また、基準物質が精油成分である場合、たとえ市販標準物質があっても揮発性であるがゆえにその純度が変化しやすく、正確な純度を得にくい。そのため、その正確な純度を得るには ^1H -qNMR法が適していると考えられる。そこで29年度には揮発性成分が主成分と考えられる20種類の粉末生薬のMeOH抽出物の ^1H -NMRスペクトルを測定して、 ^1H -qNMR法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と判断できるものを選抜した。これまでにその中からスターアニス中の anisaldehyde、クミン中の cuminaldehyde、フェネグreek中の trigonelline が指標成分になりうると考え、その定量方法に関する検討を行なった。令和2年度は、前年度に ^1H -qNMR法に適用が可能と確認したコショウについて、piperine (Fig. 1)の ^1H -qNMR法での定量の検討と、従来法であるHPLC法と同等

の結果が得られるかについての検討を行なった。あわせて、同じく piperine を特徴的な成分として含有するヒハツの種子中の piperine の定量も検討した。さらに、ケイヒ中の cinnamaldehyde (Fig. 2), スターアニス中の eugenol (Fig. 3)についても $^1\text{H-qNMR}$ 法を適用した定量が可能であることを示すことを目的として、同様に研究を進めることとした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

$^1\text{H-qNMR}$ 測定時の内部標準物質として用いる 3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt- d_6 (DSS- d_6 , Fig. 4)と 1,4-Bis(trimethylsilyl)-benzene- d_4 (1,4-BTMSB- d_4 , Fig. 4)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 , methanol- d_4 , pyridine- d_5 はそれぞれ Isotec Inc.の 99.9, 99.8, 99.5 atom %D を用いた。Piperine は富士フィルム和光純薬の生化学用試薬を、cinnamaldehyde は富士フィルム和光純薬局方生薬試験用を eugenol は富士フィルム和光純薬 1 級試薬を用いた。コショウ種子およびヒハツ種子は、スパイスとして市販されている粉末を令和 2 年 4 月に購入した。ケイヒは、スパイスとして市販されている粉末を令和 1 年 10 月に購入したものと、切断生薬として令和 2 年 4 月に購入したものを実験前に粉末化して使用した。オールスパイスは、スパイスとして市販されている粉末 2 種類を令和 2 年 10 月に購入して使用した。

B-2) 装置等 秤量には島津製作所の精密電子天秤 AUW120D を用いた。分注操作で用いる電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x を使用した。超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S で、遠沈操作は遠心器 TOMY PMC-060 を用いた。NMR 装置は日本電子 JNM-ECA500 を使用した。HPLC はポンプとして JASCO PU-2089, カラムオープンに Shimadzu CTO-20AC を、検出器はフォトダイオードアレイ検出器 JASCO MD-2010 を用いて行った。

B-3) $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いたコショウ種子中およびヒハツ種子中 piperine の定量

令和元年度の研究でコショウ種子およびヒハツ種子の抽出物で観測された独立したシグナルが、含有される piperine (Fig. 1)の 3 位のプロトンシグナルと特定できたことから、まず、piperine の $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの実施の条件検討と、粉末生薬中の piperine の定量を行うことにした。また、HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-3-a) $^1\text{H-qNMR}$ 法に用いる試料の調製

1,4-BTMSB- d_4 はデシケータ中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 2.00 ml の pyridine- d_5 に溶かして内部標準用溶液とした。

piperine 標準品はデシケータ中で一晚乾燥させ、約 10 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 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して $^1\text{H-qNMR}$ の測定に供した。コショウ種子およびヒハツ種子粉末中の piperine の測定は、乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して pyridine- d_5 (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 1,4-BTMSB- d_4 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して $^1\text{H-qNMR}$ の測定に供した。

B-3-b) $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの測定

piperine とコショウ種子およびヒハツ種子の抽出液の $^1\text{H-NMR}$ を測定し、piperine (Fig. 1)の 3 位のプロトンシグナルが 7.52 ppm に現れることを確認した。(Fig. 5) $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、piperine の 3 位のシグナルと 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB- d_4 のメチル基プロトン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 1,4-BTMSB- d_4 及び piperine のモル濃度(mol/mL), I_B , I_P はそれぞれ

1,4-BTMSB- d_4 及び piperine の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-3-c) HPLC を用いたコショウ種子中およびヒハツ種子中 piperine の定量

HPLC は Cosmosil 5C18-AR-II 250 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い、40°Cで MeOH : H₂O の系で初期条件 70 : 30 → 25 min で 90 : 10 というグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、342 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。(Fig. 6)

¹H-qNMR 法で定量した piperine 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 7)それぞれの生薬試料は、H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で希釈し、その試料溶液を 10μL 注入して得られたクロマトグラムの piperine のピークの面積からその定量を行った。(Fig. 6)

B-4)¹H-qNMR 法を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

香辛料抽出物の原材料であるケイヒについて、その粉末の抽出物の¹H-qNMR スペクトルから、ケイヒの重要な精油成分である cinnamaldehyde (Fig. 2)のアルデヒド基のプロトンシグナルが独立して観測できることがわかった。よって、このシグナルを利用した¹H-qNMR スペクトルの実施について、抽出と測定に用いる溶媒を検討し、粉末生薬中の cinnamaldehyde の定量を行うことにした。また、HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-4-a) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

最も抽出効率の良い溶媒を検討した。ケイヒ末 100 mg を NMR の測定に利用する、DMSO- d_6 , methanol- d_4 , pyridine- d_5 , CDCl₃ に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈操作をしたところ、CDCl₃ 中では粉末が沈殿せず、上清を得ることができなかった。上清が得られた3種の溶媒でアルデヒド基の積分値を比較したところ DMSO- d_6 で抽出したものが最も大きく観測されたことから、DMSO- d_6 を用いて抽出、測定することにした。

内部標準としては DMSO- d_6 にも易溶な DSS- d_6

を用いた。DSS- d_6 はデシケーター中で over night 乾燥させたのち、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。

Cinnamaldehyde 標準品は液体のため特に処理をせず約 10 mg を精秤して DMSO- d_6 1.00mL 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。(Fig. 8) ケイヒ末中の cinnamaldehyde の測定は、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。

B-4-b) ¹H-qNMR スペクトルの測定

Cinnamaldehyde とケイヒ末抽出液の¹H-NMR を測定し、cinnamaldehyde (Fig. 2)のアルデヒド基のプロトンシグナルが 9.69 ppm に現れることを確認した。(Fig. 8) ¹H-qNMR スペクトルの測定条件は Table1 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、cinnamaldehyde のアルデヒド基プロトンのシグナルと 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 cinnamaldehyde の濃度を算出した。

$$C_C = \frac{I_C}{I_D} \times C_D$$

ただし、 C_D , C_C はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び piperine のモル濃度(mol/mL), I_D , I_C はそれぞれ DSS- d_6 及び piperine の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-4-c) HPLC を用いた cinnamaldehyde の定量

HPLC は Cosmosil 5C18-AR-II 250 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い、40°Cで MeOH : H₂O の系で初期条件 40 : 60 → 20 min で 70 : 30 というグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、254 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。(Fig. 9)

¹H-qNMR 法で定量した cinnamaldehyde 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 10) それぞれの生薬試料は、H-qNMR スペ

クトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で希釈し、その試料溶液を 10 μ L 注入して得られたクロマトグラムの cinnamaldehyde のピークの面積からその定量を行った。(Fig. 9)

B-5)¹H-qNMR 法を用いたオールスパイス中の eugenol の定量

香辛料抽出物の原材料であるオールスパイスについて、その種子の粉末の抽出物の ¹H-qNMR スペクトルから、オールスパイスの重要な精油成分である eugenol (Fig. 3) の 6 位のプロトンシグナルが独立して観測できることがわかった。よって、このシグナルを利用した ¹H-qNMR スペクトルの実施について検討した。また、HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-5-a) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

平成 28 年度の研究で報告したクローブ抽出物中の eugenol の定量¹⁾ では acetone-*d*₆ 中での測定を行っていたが、オールスパイス種子では methanol-*d*₄ 中で測定したスペクトルの方が eugenol の 6 位プロトンのシグナルがより独立して観測されたことや溶媒の揮発性が methanol-*d*₄ の方が低く取り扱い中の濃度変化をより少なくできると考えたことから methanol-*d*₄ を用いて抽出、測定することにした。

内部標準としては methanol-*d*₄ に易溶な DSS-*d*₆ を用いた。DSS-*d*₆ はデシケーター中で over night 乾燥させたのち、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。eugenol 標準品も液体のため特に処理をせず約 10 mg を精秤して methanol-*d*₄ 1.00 mL 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。(Fig. 11) オールスパイス種子末中の cinnamaldehyde の測定は、乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して methanol-*d*₄ (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 methanol-*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-5-b) ¹H-qNMR スペクトルの測定

Eugenol とオールスパイス種子末抽出液の ¹H-NMR を測定し、eugenol (Fig. 3) の 6 位のプロトンシグナルが 5.93 ppm に現れることを確認した。(Fig. 11) 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、eugenol の 6 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 eugenol の濃度を算出した。

$$C_E = \frac{I_E}{I_B} \times C_B$$

ただし、 C_B 、 C_E はそれぞれ 1,4-BTMSB-*d*₄ 及び piperine のモル濃度 (mol/mL)、 I_B 、 I_E はそれぞれ DSS-*d*₆ 及び piperine の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-5-c) HPLC を用いた eugenol の定量

HPLC は Cosmosil 5C18-MS-II 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い、40°C で MeOH : H₂O の系で初期条件 50 : 50 → 20 min で 90 : 10 というグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、275 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。(Fig. 12)

¹H-qNMR 法で定量した eugenol 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 13) それぞれの生薬試料は、¹H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で希釈し、その試料溶液を 10 μ L 注入して得られたクロマトグラムの eugenol のピークの面積からその定量を行った。(Fig. 12)

C. 結果及び考察

C-1) コショウ種子中およびヒハツ種子中 piperine の定量

Piperine 標準品中の piperine の定量を ¹H-qNMR 法でおこなった結果、83.0 \pm 0.0% と見積もられ、試薬の純度表示よりも 10% 以上小さな値となった。コショウ種子およびヒハツ種子粉末中の piperine の ¹H-qNMR 法を用いた定量では、コショウ種子 3.10 \pm 0.09%、ヒハツ種子中では 3.10 \pm 0.19% という結果を得た。(Table 2) HPLC で piperine の検量線を作成したところ、良好な

相関の検量線を得ることができた。この検量線からコショウ種子およびヒハツ種子粉末の piperine の含有率を算出したところ、ヒハツ種子中では $2.96 \pm 0.03\%$ という結果を得られ、 $^1\text{H-qNMR}$ 法での数値よりやや小さめではあるもののほぼ同じ値であることが確認でき、 $^1\text{H-qNMR}$ 法が HPLC の代わりにとり得る方法であることが確認できた。一方、コショウ種子に関しては、 $2.19 \pm 0.07\%$ となり、 $^1\text{H-qNMR}$ 法での測定値より小さな数値となった。現在、この数値が正しい数値か、 $^1\text{H-qNMR}$ 法と大きく異なる要因は何かの確認をしている。

C-2) ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

Cinnamaldehyde 標準品中の cinnamaldehyde の定量を $^1\text{H-qNMR}$ 法でおこなった結果、 $83.3 \pm 0.0\%$ と見積もられ、これも試薬の純度表示よりも 10% 以上小さな値となった。揮発性の試薬なので保存中の純度変化と考えられた。

ケイヒ末中の cinnamaldehyde の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量では、生薬のケイヒ末として入手した試料 1 では $5.66 \pm 0.13\%$ となった一方、食品のシナモン末として入手した試料 2 では $0.73 \pm 0.06\%$ となった。(Table 3) HPLC で cinnamaldehyde の検量線を作成したところ、良好な相関の検量線を得ることができた。ケイヒ末の抽出液の HPLC におけるクロマトグラムでは、保持時間が 8 分、11 分、14 分付近に大きなピークが観測された。(Fig. 9) この内、14 分のピークが標準品の保持時間と一致することから、このピークの面積をもって cinnamaldehyde の含有率を求めた。2 種類の試料の含有率を算出したところ、試料 1 では $5.36 \pm 0.20\%$ 、試料 2 では $0.66 \pm 0.04\%$ となった。(Table 3) いずれの試料でも $^1\text{H-qNMR}$ 法での数値よりやや小さめではあるもののほぼ同じ値であることが確認でき、ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量においても $^1\text{H-qNMR}$ 法が HPLC の代わりにとり得る方法であることが確認できた。試料 2 で cinnamaldehyde の含有率が試料 1 に比べ低かった点については、医薬品扱いの商品と食品として扱われるものの差もあるが、試料 2 が購入後

の約 1 年という時間が経っている点が大きいものと考えられた。

C-3) オールスパイス中の eugenol の定量

Eugenol 標準品中の eugenol の定量を $^1\text{H-qNMR}$ 法でおこなった結果、 $94.0 \pm 0.0\%$ と見積もられ、この試薬に関しては純度表示に近い値となった。

オールスパイス末 2 試料中の eugenol を $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いて定量したところ、試料 1 では $3.14 \pm 0.11\%$ 、試料 2 では $2.46 \pm 0.13\%$ となった。いずれもばらつきがあまり多くない結果だった。(Table 4) HPLC で eugenol の検量線を作成したところ、良好な相関の検量線を得ることができた。また、オールスパイス末の抽出液のクロマトグラムでは 9.5 分付近の eugenol のピークの近くに小さなピークが散見されるものの定量には支障のない状況であった。(Fig. 12) HPLC における 2 試料中の eugenol の含有率を算出したところ、試料 1 では $3.75 \pm 0.67\%$ 、試料 2 では $2.67 \pm 0.16\%$ となった。いずれも $^1\text{H-qNMR}$ 法での数値に近い値ではあったものの、やや大きめの数値となり、ばらつきも大きめであった。このように、オールスパイス中の eugenol の定量においては $^1\text{H-qNMR}$ 法は HPLC 法より安定的な測定が可能で、HPLC 法の代わりにとり得る方法である可能性を示した。

D. 結論

1) コショウ種子中の piperine の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量条件を確立した。コショウを主な基原とする「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 piperine を対象として、その $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。あわせてヒハツ種子中の piperine の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量条件も確立した。

2) ケイヒ中の cinnamaldehyde の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量条件を確立した。ケイヒあるいはシナモ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 cinnamaldehyde を対象として、その $^1\text{H-qNMR}$ 法

を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。

3) オールスパイス中のeugenolの¹H-qNMR法を用いた定量条件を確立した。オールスパイスを主な基原とする「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eugenol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。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究（H26-食品-一般-001）平成 28 年度研究分担報告書（2017）。

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Fujiwara Y, Miwa M, Nagatsu A, Honma A: Identification of Maple Anthocyanin and Its Antiproliferative Activity against LLC, T47D and C3H10T1/2 Cells. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, **2020**, *21*: 894-901.

2-2. 総説

- 1) 永津明人，生薬・薬用植物の技術と市場，第7章「定量 NMR(¹H-qNMR)法による生薬成分の分析～生薬キョウニン，トウニン，ウバイに含まれる amygdalin の定量を例に～」，p.71-78，シーエムシー出版，共著(分担執筆)，東京(2020)。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

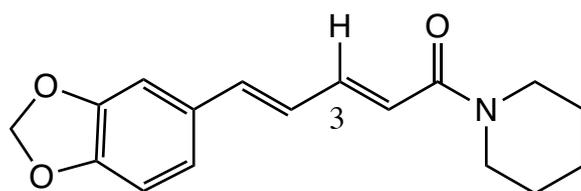


Fig. 1 piperine の構造

3 位の H と書かれたプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

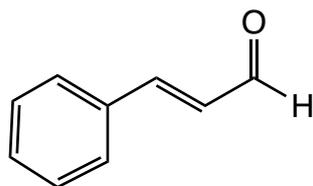


Fig. 2 cinnamaldehyde の構造

アルデヒド基の H と書かれたプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

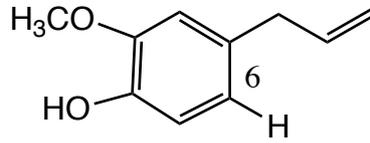


Fig. 3 eugenol の構造

6 位の H と書かれたプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

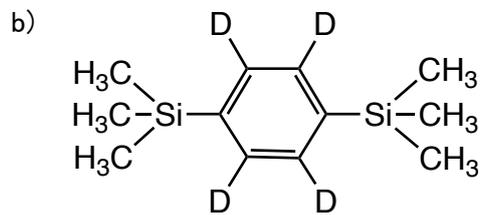
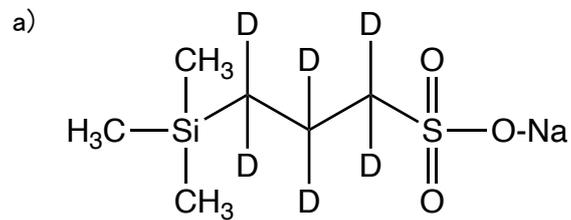


Fig. 4 定量用の認証標準物質

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

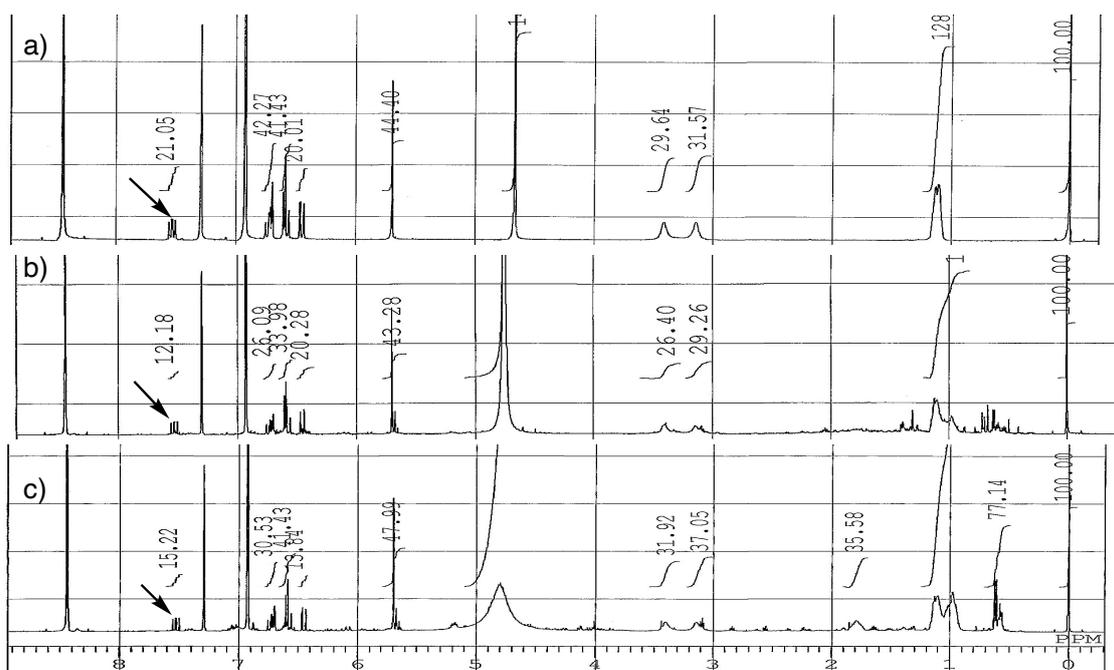


Fig. 5 a) piperine 標準試薬と b) コシヨウ種子抽出物と c) ヒハツ種子抽出物の ^1H -qNMR スペクトル (in $\text{pyridine-}d_5$) 矢印は piperine の 3 位プロトンのシグナル.

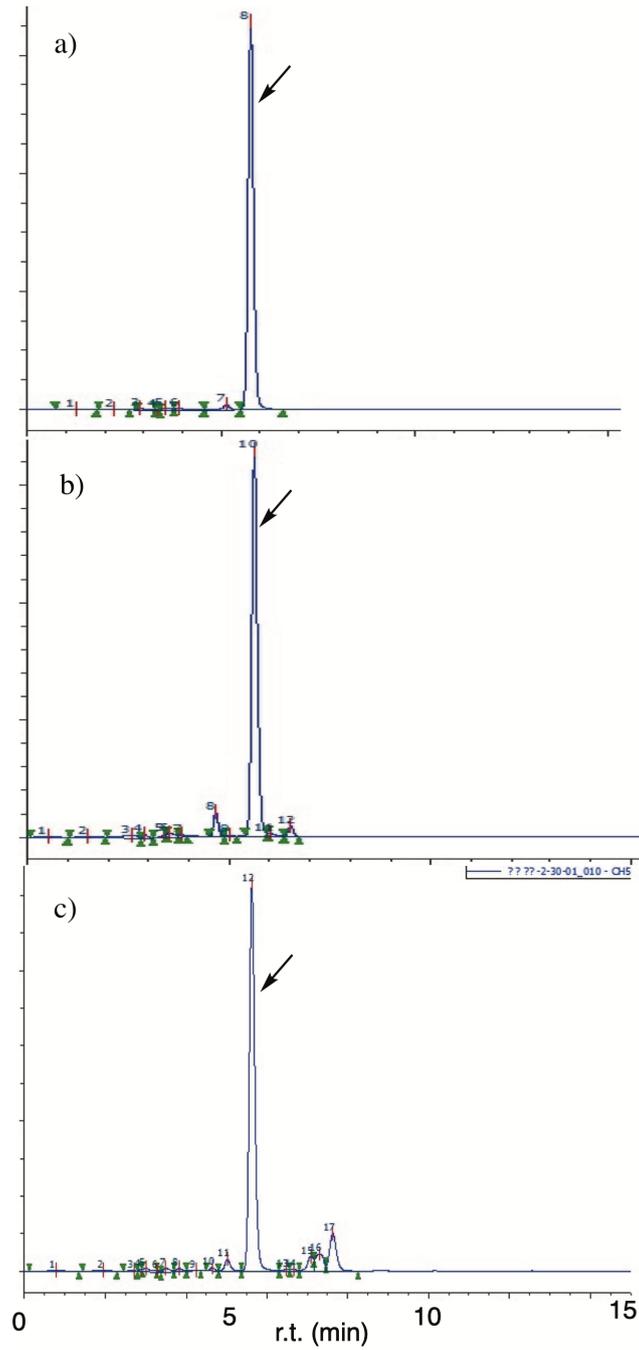


Fig. 6 a) piperine 標準試薬と b) コショウ種子抽出物と c) ヒハツ種子抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は piperine のピーク.

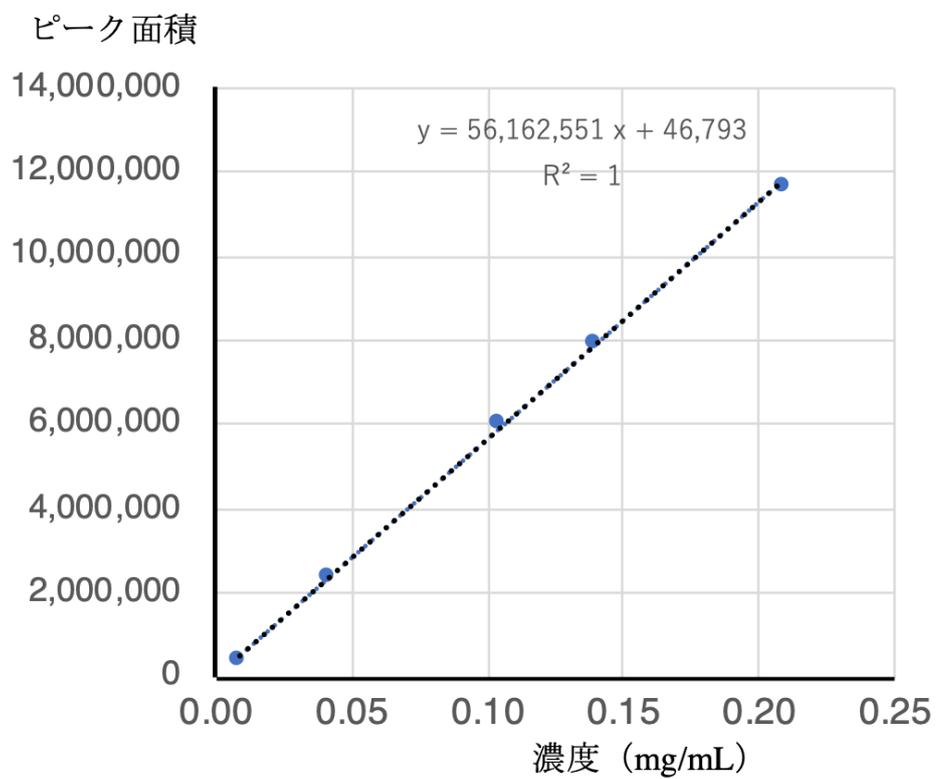


Fig. 7 HPLCにおける piperine の検量線

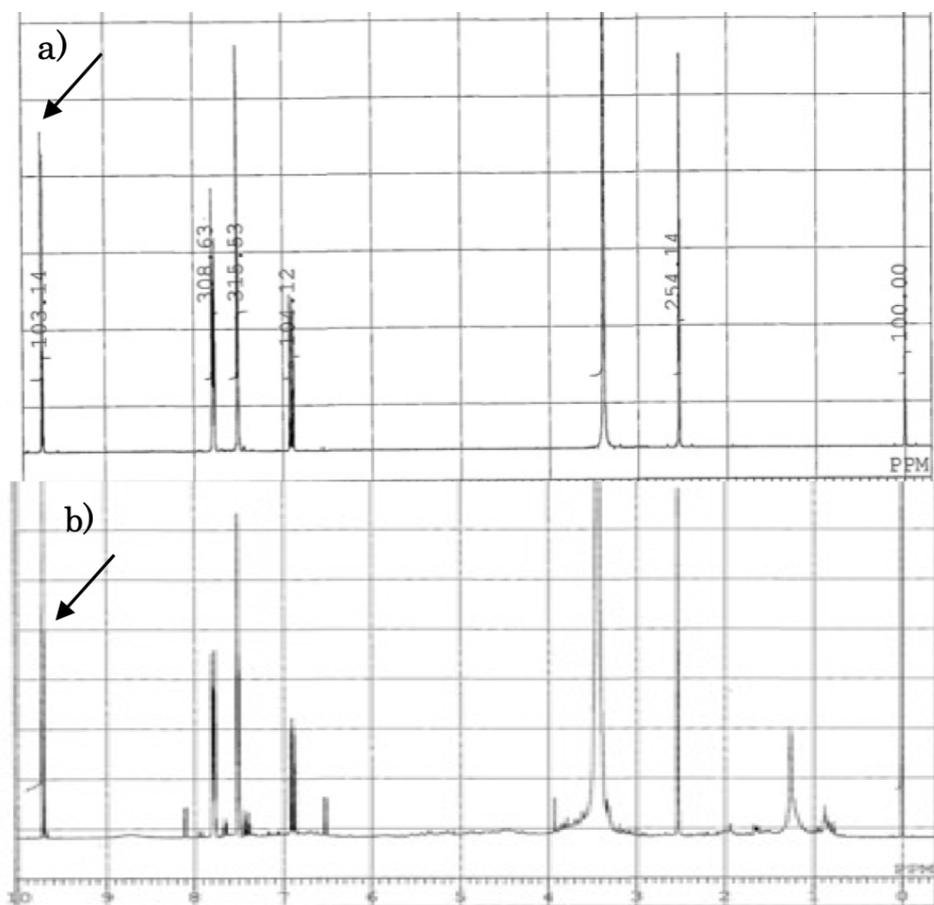


Fig. 8 a) cinnamaldehyde 標準試薬と b) ケイヒ末抽出物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (in $\text{DMSO-}d_6$) 矢印は cinnamaldehyde のアルデヒド基プロトンのシグナル.

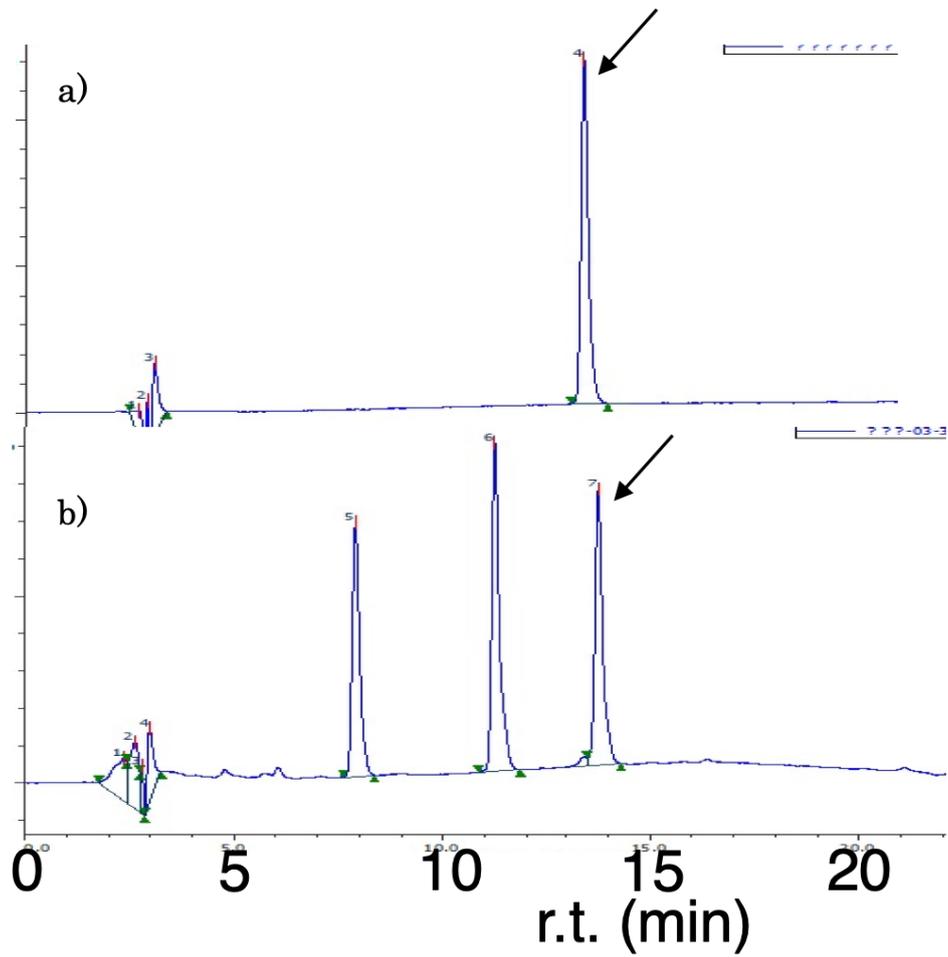


Fig. 9 a) cinnamaldehyde 標準試薬と b) ケイヒ末抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は cinnamaldehyde のピーク

ピーク面積

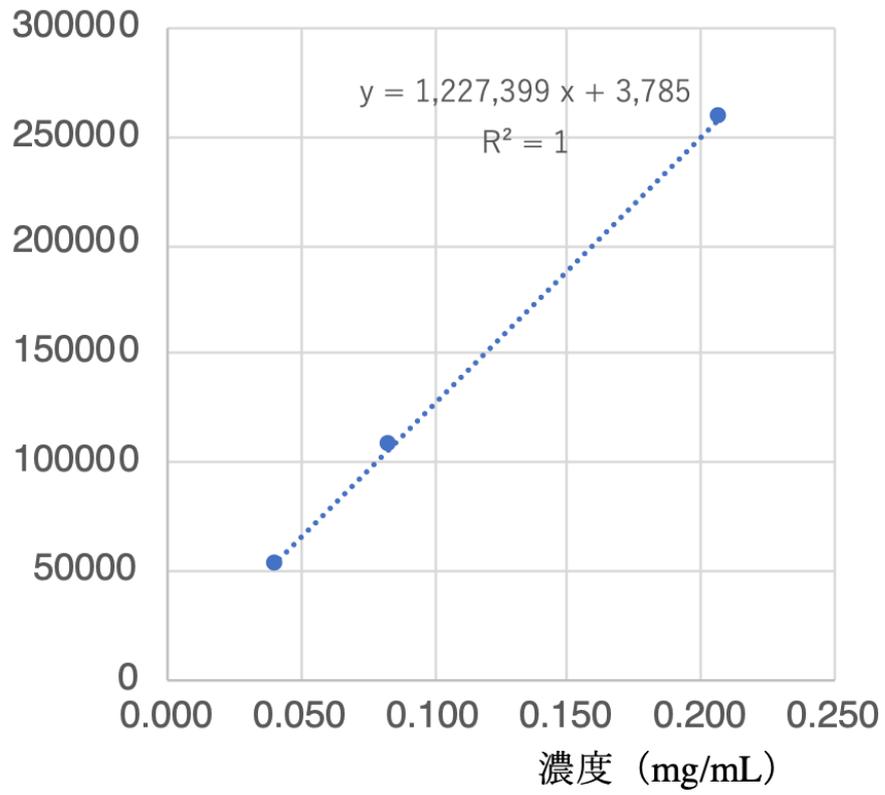


Fig. 10 HPLCにおける cinnamaldehyde の検量線

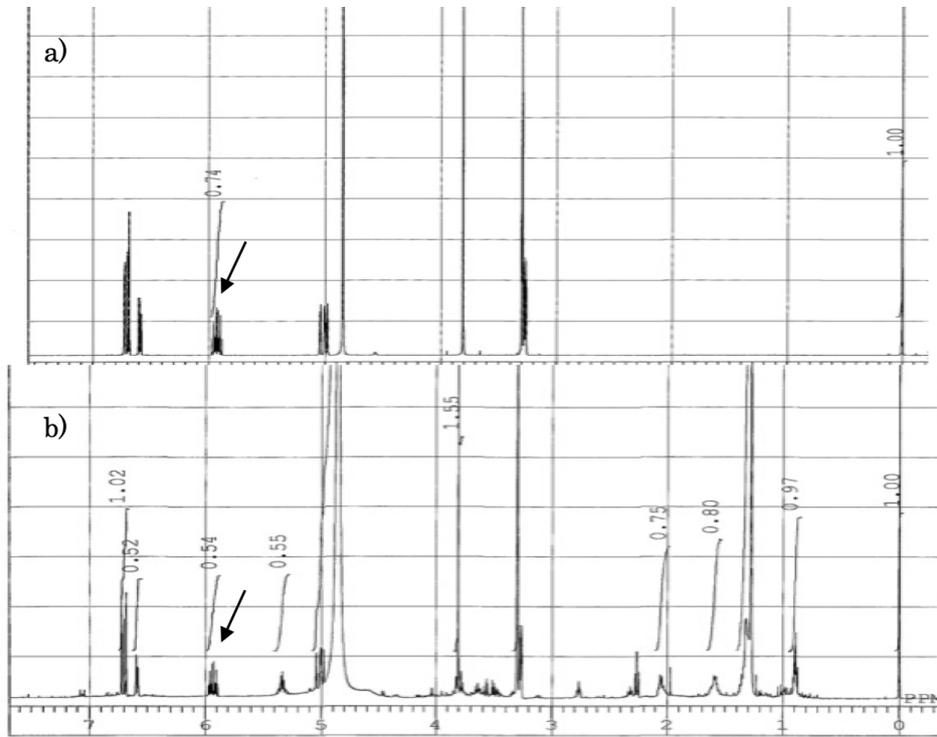


Fig. 11 a) eugenol 標準試薬と b) オールスパイス末抽出物の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4) 矢印は eugenol の 6 位プロトンのシグナル.

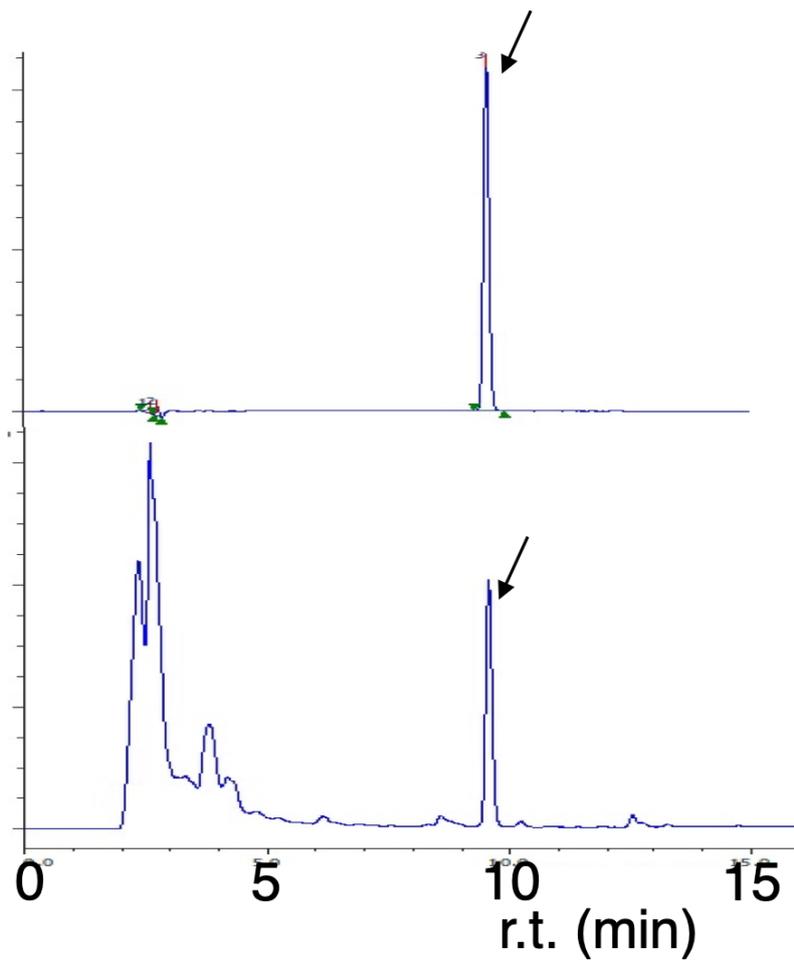


Fig. 12 a) eugenol 標準試薬と b) オールスパイス末抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は eugenol のピーク

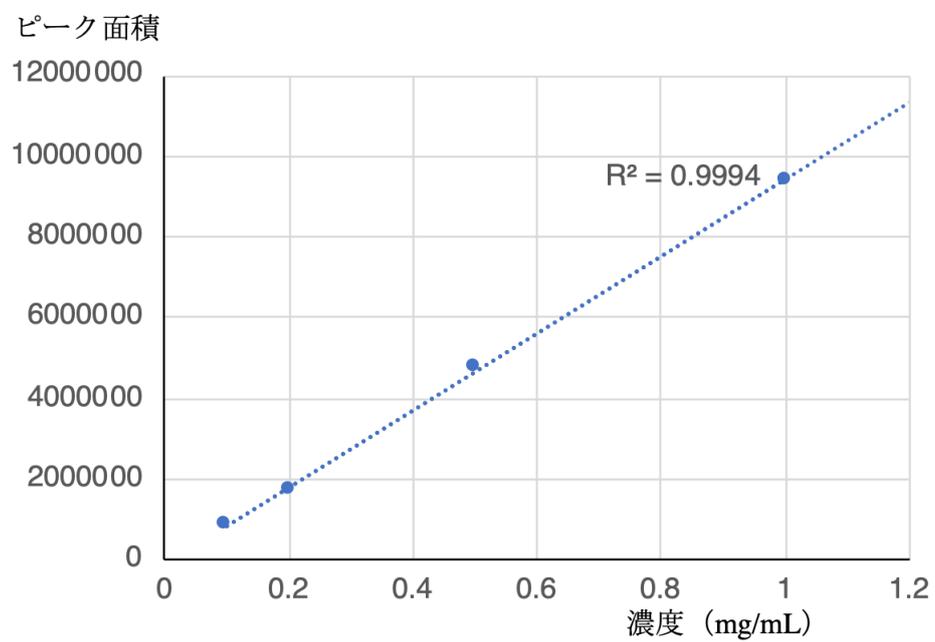


Fig. 13 HPLCにおける eugenol の検量線

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 Piperine 標準試薬, コショウ種子末とヒハツ種子末中の piperine の含有率

samples	¹ H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
piperine 標準品#	83.0	±0.00	(n = 3)			
コショウ	3.10	±0.09	(n = 3)	2.19	±0.07	(n = 3)
ヒハツ	3.10	±0.19	(n = 4)	2.96	±0.03	(n = 4)

試薬の純度表示は 95%

Table 3 Cinnamaldehyde 標準試薬とケイヒ末中の cinnamaldehyde の含有率

samples	¹ H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
cinnamaldehyde 標準品#	83.3	±0.00	(n = 3)			
ケイヒ末						
試料 1	5.61	±0.13	(n = 3)	5.36	±0.20	(n = 3)
試料 2	0.73	±0.06	(n = 3)	0.66	±0.04	(n = 3)

試薬の純度表示は>97%

Table 4 Eugenol 標準試薬とオールスパイス末中の eugenol の含有率

samples	¹ H-qNMR での含有率(%)		HPLC での含有率(%)	
	平均±SEM		平均±SEM	
eugenol 標準品#	94.0	±0.00 (n = 3)		
オールスパイス末				
試料 1	3.14	±0.11 (n = 3)	3.75	±0.67 (n = 3)
試料 2	2.46	±0.13 (n = 3)	2.67	±0.16 (n = 3)

試薬の純度表示は 95+%

～¹H-qNMRに基づく相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法に関する研究～
分担研究者 大槻 崇 日本大学 生物資源科学部 食品生命学科 専任講師

研究要旨 本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、現在、成分規格が未設定である酵素処理ナリンジンを対象にその成分規格における定量法の確立に関する検討を行った。今年度は、¹H-qNMRに基づく相対モル感度（RMS）の正確性や測定対象物質並びにHPLC分析における基準物質（代替定量用標品）の検出波長の報告例との整合性を考慮し、RMSを用いたシングルリファレンスHPLC法の性能を評価した。その結果、実試料を用い検討において、シングルリファレンスHPLC法と従来法で前処理後の測定対象物質2種の含量に大きな違いは認められなかった。従って、本検討で算出した各基準物質の測定対象物質2種に対するRMSを用いることにより、シングルリファレンスHPLC法からこれら2種の正確な定量が可能であることが判明した。

A. 研究目的

酵素処理ナリンジンは、既存添加物名簿収載品目リストに記載されている既存添加物の1つであり、苦味料等として、チューイングガムや清涼飲料水のアクセントとして使用される¹。この食品添加物は、食品衛生法第11条第1項の定めにより告示される「食品、添加物等の規格基準」に基づく成分規格が制定されておらず、現在は、日本食品添加物協会が作成した第4版既存添加物自主規格²に基づいて製造、使用、流通している。一方で、平成7年以降、既存添加物の安全性確保を求める国会の附帯決議も踏まえ、既存添加物については、その品質を確保し、食の安全に寄与するため、個々の成分規格を設定した上、食品添加物公定書への収載が進められており、この酵素処理ナリンジンも「食品、添加物等の規格基準」の策定および第10版食品添加物公定書への収載に向けた検討が進められている。このうち、成分規格に関して、第4版既存添加物自主規格では「本品を乾燥物換算したものは、総ナリンゲニン配糖体として30.0%以上を含む」とされており、公的な

成分規格においてもこれを踏襲すると考えられる。その場合、この規格の適合性を判定するため、「総ナリンゲニン配糖体」の定量法の確立が必要となる。この定量法の確立にあたっては、酵素処理ナリンジンと類似した添加物であり「食品、添加物等の規格基準」が既に設定されている酵素処理ヘスペリジンの定量法³が参考になるものと考えられる。すなわち、酵素処理ヘスペリジンの成分規格は、「本品を乾燥したものは、総ヘスペレチン配糖体として30.0%以上を含む。」とされており、この総ヘスペレチン配糖体量は、酵素処理ヘスペリジンのグルコアミラーゼ処理により得られる「ヘスペリジン」、「 α -モノグルコシルヘスペリジン」および「遊離する α -グルコシル残基」の合計値から算出している。この定量の考え方は酵素処理ナリンジンにおける「総ナリンゲニン配糖体」含量の算出に適用可能と考えられるが、この場合の測定対象となりHPLCで分析が必要なナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンのうち、 α -モノグルコシルナリンジンはその定量用標品が市販されていないため、通常の絶対

検量線法では定量が困難である。また、ナリンジンの市販試薬はナリンジン水和物として販売されており、正確な純度は明示されていないのが現状である。そのため、ナリンジン市販試薬をそのまま定量用標品としてHPLC分析に供した場合、定量値の信頼性は保証できず、現在、これらの問題点について解決が望まれている。このような定量用標品の入手および定量値の正確性の問題を解決する方法の1つとして、近年、 $^1\text{H-qNMR}$ に基づく相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity : RMS) を用いたシングルリファレンス HPLC 法が注目を集めている^{4,6}。これは、測定対象物質および測定対象物質とは異なる基準物質 (代替定量用標品) との正確な RMS を明らかにすることにより、「基準物質」、「RMS」および「測定対象物質と基準物質の分子量比」から測定対象物質の定量を可能とする方法である。また、RMS は、計量学的に正確な定量が可能である定量 $^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{H-qNMR}$) に基づき算出されているため、シングルリファレンス HPLC 法より得られる定量値の信頼性も高いと言える。これまでに、分担研究者は、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、酵素処理ナリンジンの規格試験法の確立に関する検討を継続的に実施しているが、本研究では、RMS の正確性や HPLC 分析における測定対象物質並びに基準物質の検出波長の整合⁷などを考慮し、グルコアミラーゼ処理により得られるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量分析における $^1\text{H-qNMR}$ に基づくシングルリファレンス HPLC 法の性能を評価した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

酵素処理ナリンジン (食品添加物製品) (名称: 糖転位ナリンジン<管理番号 A-172>) 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、Acros Organics 社製 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No.A0407598), シグマアルドリッチ (株) 製 (Cat.No.10236-47-2, Lot No. BCCB6611), 東

京化成工業 (株) 製 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No.IFV8M-OC), 富士フイルム和光純薬 (株) 製 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No. LKE0701 および SKN5454) を用いた。4-ヒドロキシ安息香酸メチル (MHB) は、シグマアルドリッチ (株) 製の認証標準物質 (Cat. No. 99-79-3, Lot No. BCBX5970, 認証値: 99.8%, 拡張不確かさ: 0.3%), カフェインはシグマアルドリッチ (株) 製の認証標準物質 (Cat. No. 58-08-2, Lot No. BCCC1661, 認証値: 99.9%, 拡張不確かさ: 0.2%) をそれぞれ用いた。2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- d_6 sodium salt (DSS- d_6) は富士フイルム和光純薬 (株) 標準物質 (Cat. No.284664-85-3, Lot.No.KCF6177, 認証値: 92.4%, 拡張不確かさ: 0.5%) を用いた。重ジメチルスルホキシド (DMSO- d_6) は関東化学 (株) 製を用いた。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。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) 製)

分析用 HPLC ポンプ: LC-20AD (低圧グラジエントユニット内蔵), オートサンプラ: SIL-20AC, カラム恒温槽: CTO-1010AS_{VP}, 多波長検出器: SPD-M10A_{VP}, システムコントローラ: CBM-20Alite, 分析データ処理システム: LabSolutions (以上 (株) 島津製作所製), 脱気装置: AG-34 ((株) フロム製)。

分取用 HPLC ポンプ: LC-10AD, 低圧グラジエントユニット: FCV-10AL, オートサンプラ: SIL-20A, カラム恒温槽: CTO-10AS_{VP}, 紫外可視分光検出器: SPD-10AV_{VP}: システムコントローラ: SCL-10A_{VP}, フラクシオンコレクタ: FRC-10A, 分析データ処理システム: LabSolutions (以上 (株) 島津製作所製), 脱気装置: AG-34 ((株) フロム製)。

マイクロ天秤: BM-20 ((株) エー・アンド・デイ製)

セミマイクロ天秤：AUW220D（（株）島津製作所製）

B-3) 相対モル感度 (RMS) を利用したシングルリファレンス LC 法によるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量

B-3-1) α -モノグルコシルナリンジンの単離

α -モノグルコシルナリンジンは定量用標品や試薬が市販されていないため、酵素処理ナリンジン（食品添加物製品）より調製することとした。すなわち、本品約 4 g について分取 HPLC 条件 1 を用いて分画を行い（図 1）、得られた Fr.A について、分取 HPLC 条件 2 を用いてさらに分画を行い、Fr.A-1 より α -モノグルコシルナリンジン (24.2 mg) を単離した（図 2）。

・分取 HPLC 条件 1

カラム：Develosil ODS-UG-5（10 × 250 mm，粒子径 5 μ m，野村化学株式会社製），カラム温度：45°C，検出波長：283 nm，流速：3.0 mL/min，移動相：水／アセトニトリル混液（85：15）

・分取 HPLC 条件 2

カラム：Develosil ODS-UG-5（4.6 × 250 mm，粒子径 5 μ m，野村化学（株）製），カラム温度：40°C，検出波長：283 nm，流速：1.0 mL/min，移動相：水／アセトニトリル混液（85：15）

B-3-2) $^1\text{H-qNMR}$ によるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの純度測定

4 メーカーのナリンジン試薬は約 10 mg， α -モノグルコシルナリンジン約 5 mg を精密に量り，それぞれサンプル管に入れた。別に DSS- d_6 約 5 mg を精密に量り，先程のサンプル管に入れた後，DMSO- d_6 約 1 g に溶解し $^1\text{H-qNMR}$ 用試験溶液とした。各測定対象物質につき 3 併行で試験溶液を調製し，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 $^1\text{H-qNMR}$ 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，濃度等を次の式に代入し，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} = 測定対象物質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} = 測定対象物質の特定基の水素数
 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} = 測定対象物質の分子量

M_{std} = 内標準物質の分子量 (DSS- d_6 : 224.36)

W_{sample} = 測定対象物質の秤取量 (mg)

C_{std} = $^1\text{H-qNMR}$ 標準溶液の DSS- d_6 濃度

なお， $^1\text{H-qNMR}$ 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，Delta (Ver.5.3.0) (日本電子 (株)) を用いた。

B-3-3) 基準物質 (MHB およびカフェイン) に対するナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの RMS の算出

ナリンジン， α -モノグルコシルナリンジンでは各 $^1\text{H-qNMR}$ 用試験溶液を濃度が約 500 $\mu\text{mol/L}$ となるように 20 mL 容メスフラスコへ必要量を入れ，20%アセトニトリルを加え調製した。その後 20%アセトニトリルを用いて公比 2 で希釈を行い，約 1.0~500 $\mu\text{mol/L}$ の間で 10 濃度の HPLC 用試験溶液を作製した。

MHB およびカフェインでは，認証標準表に記載の純度を考慮し，MHB およびカフェインを正確に量りとり，約 1.0 $\mu\text{mol/L}$ ~ 約 500 $\mu\text{mol/L}$ の間で 10 点の濃度の HPLC 用試験溶液（溶媒：20%アセトニトリル）を各試料 3 併行で作製した。

作製された各試験溶液について，次の HPLC 条件で分析した。

カラム：Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm, ナカライテスク (株) 製), カラム温度：40°C, 検出波長：283 nm (ナリンジンおよびα-モノグルコシルナリンジン), 255 nm (MHB), カフェイン (205 および 274 nm), 流速：1.0 mL/min, 移動相：水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 注入量：10 μL

各溶液のモル濃度を X 軸に, 検出器の応答値 (ピーク面積値) を Y 軸にプロットし, Excel を用いて原点を通る (X : 0, Y : 0) 回帰直線を作成し, これを検量線とした. なお, 各溶液におけるクロマトグラム上のピークの S/N が 10 以上, シンメトリ係数が 0.8~1.8 となる濃度範囲で検量線を作成した.

得られた測定対象物質および基準物質の検量線の検量線式の傾き (モル吸光係数) の比 (測定対象物質/基準物質) から基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出した.

B-3-4) ナリンジンに対する α-モノグルコシルナリンジンの RMS の算出

B-3-3 の項に示した各試料の回帰直線の傾きを基に, ナリンジンに対する α-モノグルコシルナリンジンの RMS を算出した.

B-3-5) 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

「酵素処理ヘスペリジン」の定量法⁵⁾を参考に試験溶液等の調製を行い, グルコアミラーゼ処理後のナリンジン, α-モノグルコシルナリンジンおよび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-3-5-1) シングルリファレンス HPLC 法を用いたグルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび α-モノグルコシルナリンジンの定量

乾燥した酵素処理ナリンジン (食品添加物製

品) 1 g を精密に量り取り, 水 100 mL に溶解させた. その後, アクリル酸エステル系吸着用樹脂 (アンバーライト XAD7HP) 50 mL が充填されたガラス管 (内径 約 2.5 cm, 長さ : 55 cm) にこの溶液を注ぎ, 1 分間に 2.5 mL 以下の速さで流出させた後, 水 250 mL で洗浄した. 次に, 50%エタノール 200mL を 1 分間に 2.5 mL 以下の速さで流し, 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, この液にグルコアミラーゼ 10000 単位を約 3 g 添加した後, 振とうしながら 55 °C で約 30 分放置した. さらに 95 °C で 30 分加熱した後, 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 A 液 3 mL を正確に量り, 0.1%酢酸含有 20%アセトニトリル (移動相) を加え正確に 50 mL とし, HPLC 用試験溶液とした. この HPLC 用試験溶液を B-3-3 に示した HPLC 条件で分析した.

各試験溶液中のナリンジンおよび α-モノグルコシルナリンジンのピーク面積値を別に作成した基準物質の検量線式に代入し, 試験溶液中のナリンジンおよび α-モノグルコシルナリンジンの濃度 (μmol/L) を求め, 次の式より各測定対象物質の含量を算出した.

ナリンジンまたは α-モノグルコシルナリンジン含量 (%) =

$$= \frac{(C \times M) \times V}{W \times 10^6} \times \frac{50}{3} \times 100$$

ただし,

C : HPLC 用試験溶液中の測定対象物質の濃度 [μmol/L]

V : 試験溶液の量 [L] (0.05 L)

M : 測定対象物質の分子量 (ナリンジン = 580.54, α-モノグルコシルナリンジン = 742.70)

10⁶ : 試料の秤量値の単位 [g] から [μg] への単位の変換係数

W : 試料の摂取量 (g)

なお, 別にナリンジンおよび α-モノグル

コシルナリンジンについて、従来法用の検量線を作成し、RMS法の比較対照とした。

B-3-5-2) グルコアミラーゼ処理後の α -グルコシル残基量の定量

B-3-5-1の項で得られたA液20 μ Lを量り、D-グルコース定量用発色試液3mLを正確に加えて振り混ぜた後、37 $^{\circ}$ 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505nmにおける吸光度を測定した。対照には、水20 μ Lを用いて試験溶液と同様に操作した液を用いた。別に空試験を行い、補正した。ただし、空試験溶液は、水約40mLにグルコアミラーゼ10000単位を添加し、55 $^{\circ}$ Cで30分間放置した後、95 $^{\circ}$ 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50mL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、各濃度のグルコース標準溶液(0.5mg/mL, 1.0mg/mL, 2.0mg/mL, 5.0mg/mL)について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算出した。

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

ただし、

C: 試験溶液1mLあたりのD(+)-グルコースの量(μ g)

V: 試験溶液の量(50mL)

W: 試料の採取量(mg)である。

B-3-5-3) 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(%)

=グルコアミラーゼ処理後のナリンゲニン配糖体(ナリンジン+ α -モノグルコシルナリンジン)(%) + 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) α -モノグルコシルナリンジンの単離

RMSの算出にあたり、商業的に入手が困難な α -モノグルコシルナリンジンについて、酵素処理ナリンジン(食品添加物製品)より単離することとした。すなわち、酵素処理ナリンジン4gについて分取HPLCによる分画を行い(図1)、 α -モノグルコシルナリンジンおよびナリンジンが集約しているFr.AについてさらにLCによる分画を行い、Fr.A-1より α -モノグルコシルナリンジンを単離した(図2)。なお、単離した当該化合物は、以前に当研究室で単離した α -モノグルコシルナリンジンとの直接比較により、その化学構造が同定された。

C-2) $^1\text{H-qNMR}$ によるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの純度測定

正確なRMSの算出にあたり、測定対象物質の市販試薬や単離品の正確な純度を明らかにすることは非常に重要である。そこで、これらの純度を明らかにするため、 $^1\text{H-qNMR}$ を用いることとした。 $^1\text{H-qNMR}$ は、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度とモル濃度の関係から、測定対象物質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てナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンについて $^1\text{H-qNMR}$ を行った。なお、化学シフト値は、内標準物質のメチルプロトンシグナルを基準(DSS- d_6 : δ 0ppm)とし、 δ 値をppm単位で表した。図3および4に示すように、 $^1\text{H NMR}$ スペクトル上、 δ 1.18ppm付近にラムノースのメチル基に由来するシグナル、 δ 2.70~5.60ppm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 6.00~7.50ppm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、他の分子内並びに夾雑成分に由来する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 α -モノグルコシルナリンジン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3併行で調製された4メーカーのナリンジン試薬および単離した α -モノグルコシルナリンジンの純度を算出したところ、各検体(1~3)の純度は表2に示す結果であることが判明した。

C-3) 基準物質 (MHB およびカフェイン) に対するナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの RMS の算出

基準物質に対するナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの RMS を算出するため、各検体の¹H-qNMRによる純度に基づいて調製されたナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジン標準溶液並びに認証書に記載の認証値(純度値)に基づき調製されたMHBおよびカフェイン標準溶液を用いて、B-3-3に示すHPLC条件よりPDA検出器が接続されたHPLCで分析を行った(図5)。そして、得られた原点を通る各検量線の検量線式の傾きの比(測定対象物質/基準物質)から基準物質に対する測定対象物質のRMSを算出した。まず、各検量線の直線性を評価したところ、ナリンジン、 α -モノグルコシルナリンジン、MHB、カフェインの全ての検体の検量線の決定係数は0.9991~1.00と良好であることが確認された。各測定対象物質および基準物質の代表的な検量線を図6に示す。以上の結果より、これらの検量線はRMSの算出に利用可能であることが明らかとなった。

そこで、化合物ごとに3併行の検量線の傾きの平均値を算出したところ、ナリンジンでは10284(4メーカー(n=3)の平均値)(検出波長:283 nm)、 α -モノグルコシルナリンジンは11042(検出波長:283 nm)、MHBでは8931(検出波長:255 nm)、カフェイン:5388(検出波長:274 nm)、11598(検出波長:205 nm)

であることが判明した。得られたこれらのデータより、基準物質に対するナリンジン、 α -モノグルコシルナリンジンのRMSを算出したところ、表3に示す値であることが判明した。

C-4) シングルリファレンス HPLC 法を用いたグルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量および総ナリンゲニン配糖体含量の算出

次に、算出したRMSの妥当性を評価するため、酵素処理ナリンジン製品を用いて、常法に従いグルコアミラーゼ処理により得られたHPLC用試験溶液を用いて、酵素処理ナリンジンのグルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの含量について各基準物質およびRMSを用いたシングルリファレンスHPLC法で算出し、各測定対象物質を定量用標品とした絶対検量線法(従来法)により算出された含量と比較した。試験溶液のクロマトグラムを図7に示す。その結果、シングルリファレンスHPLC法においては、表4に示すように基準物質の違いによりナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジン含量に大きな違いは認められなかった。また、シングルリファレンスHPLC法により得られた各測定対象物質の定量値は、各測定対象物質の標品を用いた絶対検量線法(従来法)の結果と大きな違いは認められなかった。また、シングルリファレンスHPLC法のRSDは、すべてのデータにおいて1.2%以下と良好であった。以上の結果より、各基準物質を定量用標品としたシングルリファレンスHPLC法は、グルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量に有効と考えられた。なお、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別途定量し、上記の結果と合算して求めた総ナリンゲニン配糖体量について、表5にそれぞれ示した。

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、¹H-qNMRに基づくRMSを用いたシングルリファレンスHPLC法による酵素処理ナリンジンの規格試験法の確立についての検討を行った。実試料を用いた検討において、シングルリファレンスHPLC法により得られたナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量値は従来法と大きな違いは認められなかった。従って、今回求められた各基準物質に対する測定対象物質のRMSを用いたシングルリファレンスHPLC法より、酵素処理ナリンジン中の総ナリンゲニン配糖体量を求める際に必要なナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの含量を正確に定量可能であることが判明した。

なお、既存添加物自主規格における成分規格では「本品を乾燥物換算したものは、総ナリンゲニン配糖体として30.0%以上を含む」と規定されているが、今回検討した酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体量はこの規格値を満たしていない。本検討では、この自主規格に基づきグルコアミラーゼによる酵素処理（加水分解）を前処理法として用いたが、規定された方法では酵素加水分解が不十分であることが示唆され、今後、酵素処理として α -グルコシダーゼの併用や反応時間の変更など、前処理の改善に向けた検討が必要と考えられた。

E. 参考文献

- 1) 食品添加物事典，日高徹，湯川宗昭編著．東京，食品化学新聞社（2001）
- 2) 第4版 既存添加物自主規格，日本食品添加物協会（2008）
- 3) 第9版食品添加物公定書，厚生労働省(2017)．
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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)*, **2018**; *59*: 1-10.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 酒井有希，大槻崇，松藤寛：相対モル感度（RMS）を用いたアントシアニンの純度評価。日本食品科学工学会令和3年度関東支部大会（2021.3.6）（オンライン）

2. 論文発表等

- 1) Ohtsuki T, Matsuoka K, Fuji Y, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Matsufuji H.: Development of an HPLC method with relative molar sensitivity based on ¹H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. *PLOS ONE.*, **2020**; *15*: e0243175.

G. 知的財産権の出願．登録状況

なし

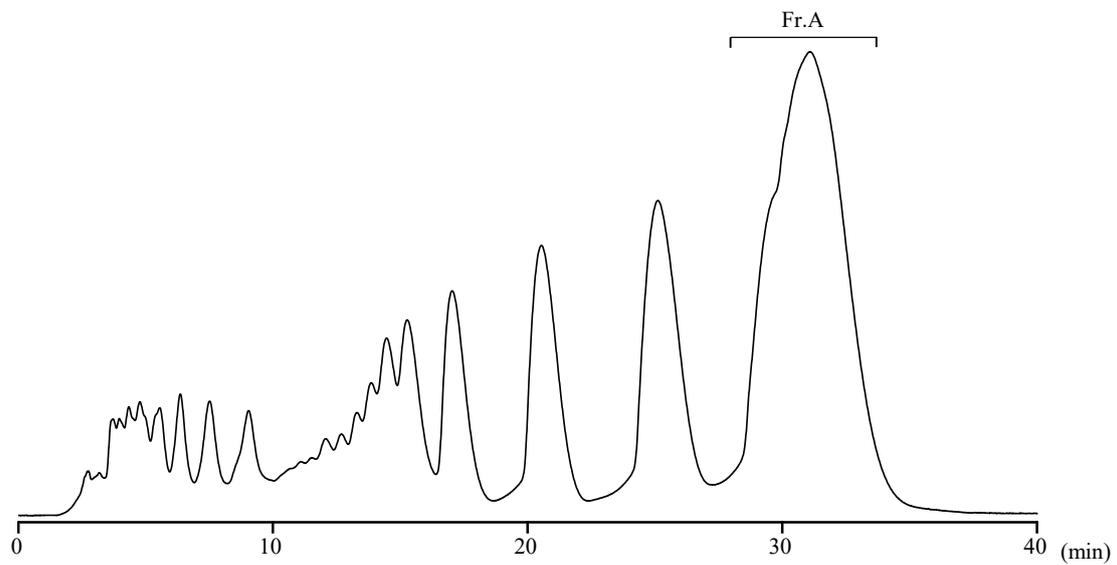


図1 酵素処理ナリンジン（食品添加物製品）のHPLCクロマトグラム（分取）

HPLC条件（分取HPLC条件1）

カラム：Develosil ODS-UG-5（10×250 mm，粒子径5 μm，野村化学株式会社製），カラム温度：45°C，
検出波長：283 nm，流速：3.0 mL/min，溶離液：15%アセトニトリル

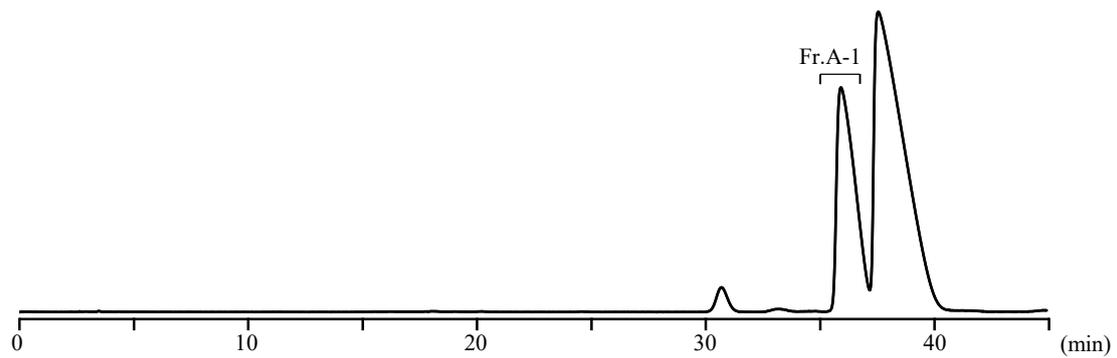


図2 Fr.AのHPLCクロマトグラム(分取)

HPLC条件(分取HPLC条件2)

カラム: Develosil ODS-UG-5 (4.6 × 250 mm, 粒径5 μm, 野村化学(株)製), カラム温度: 40°C,
検出波長: 283 nm, 流速: 1.0 mL/min, 溶離液: 15%アセトニトリル

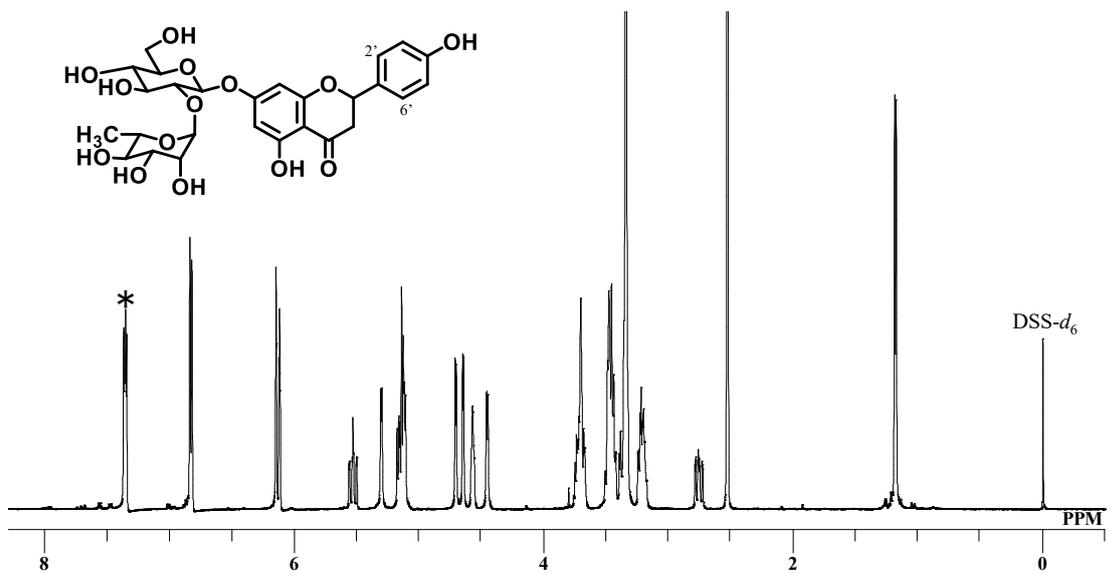


図3 ナリンジンの化学構造および¹H-NMR スペクトル

測定溶媒：DMSO-*d*₆, *：定量用シグナル (H-2' and H-6')

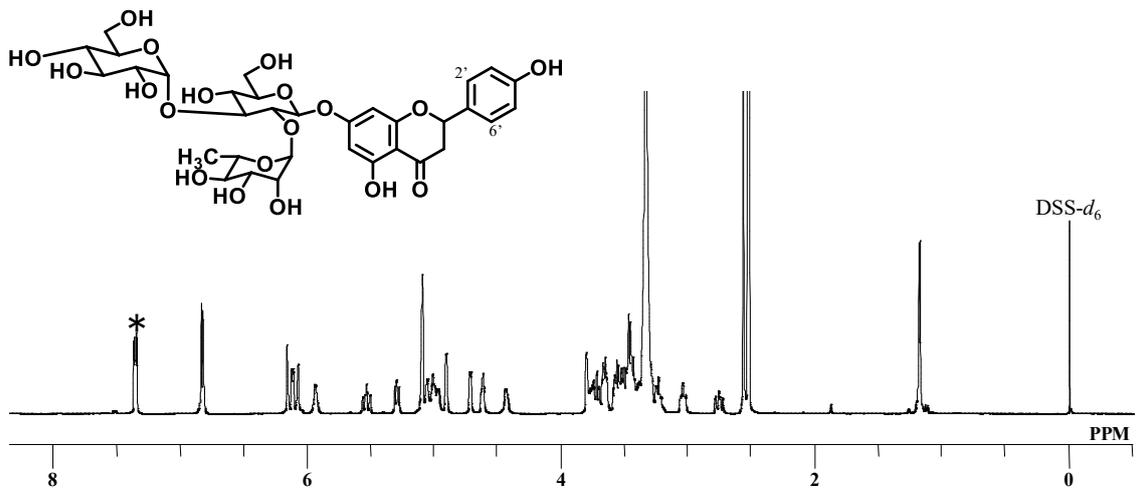


図4 α -モノグルコシルナリンジンの化学構造および $^1\text{H-qNMR}$ スペクトル
 測定溶媒: $\text{DMSO-}d_6$, *: 定量用シグナル (H-2' and H-6')

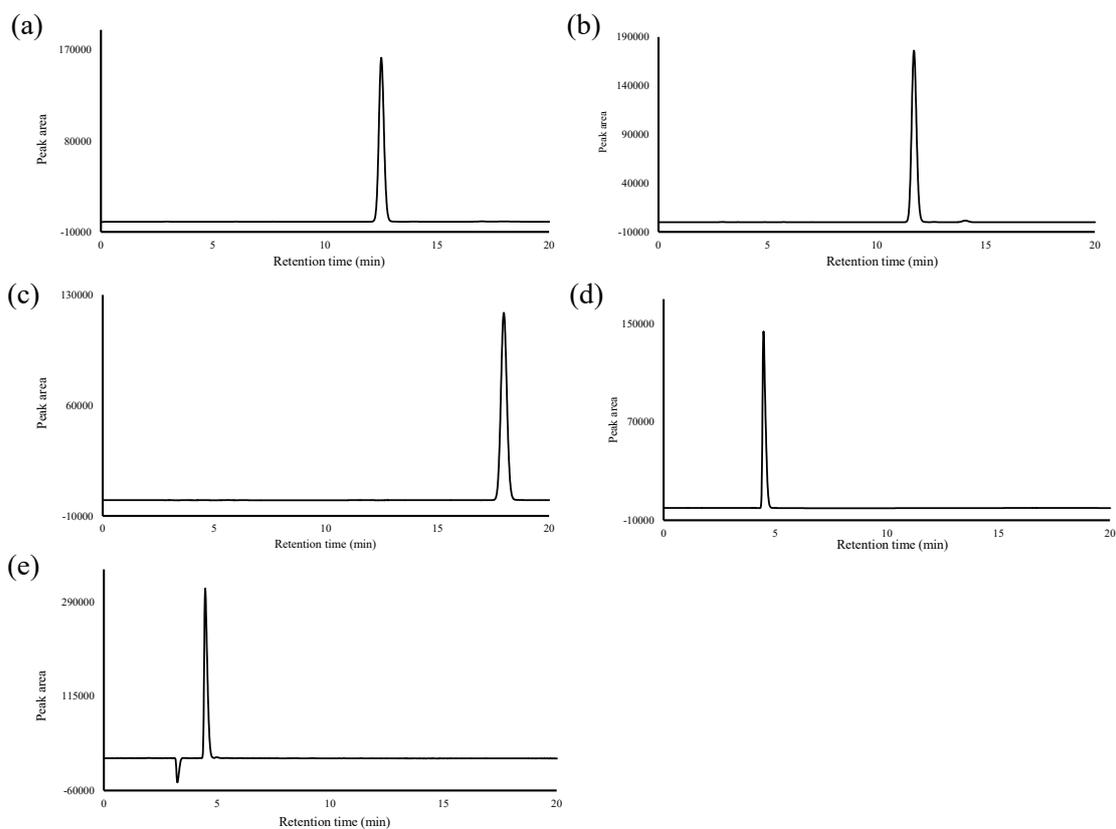


図5 ナリンジン (a), α -モノグルコシルナリンジン (b), MHB (c), カフェイン (dおよびe) の HPLC クロマトグラム

HPLC 条件

カラム：COSMASIL 5C18-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μ m) (株)ナカライテスク製, カラム
 温度：40 $^{\circ}$ C, 検出波長：283 nm (ナリンジン(a)および α -モノグルコシルナリンジン (b)), 255 nm (MHB (c)), 274 nm (カフェイン (d)), 205 nm (カフェイン (e)), 移動相：水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流速：1.0 mL/min

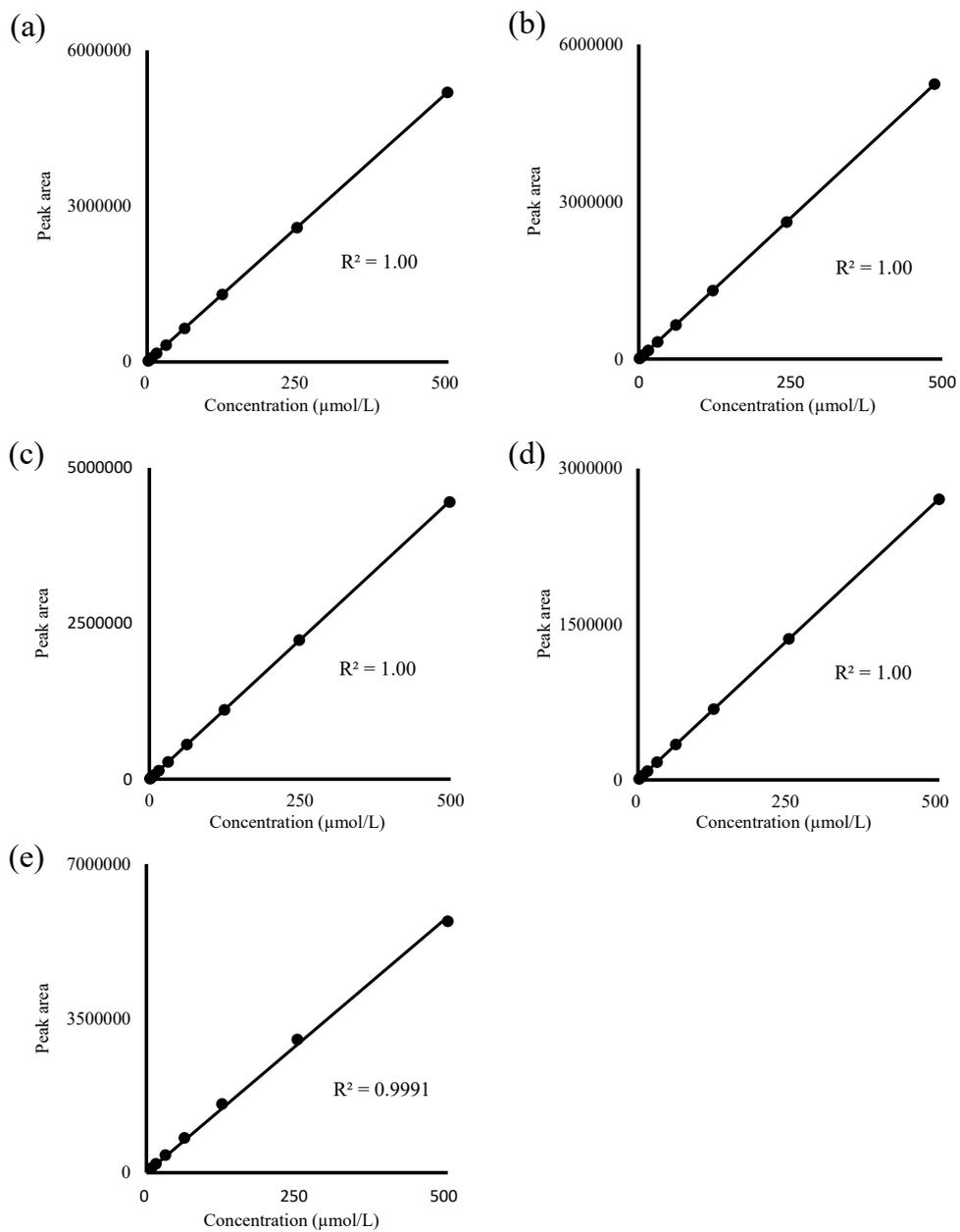


図6 ナリンジン (a), α -モノグルコシルナリンジン (b), MHB (c), カフェイン (dおよびe) の代表的な検量線

(d) : 274 nm のデータより作成した検量線, (e) : 205 nm のデータより作成した検量線

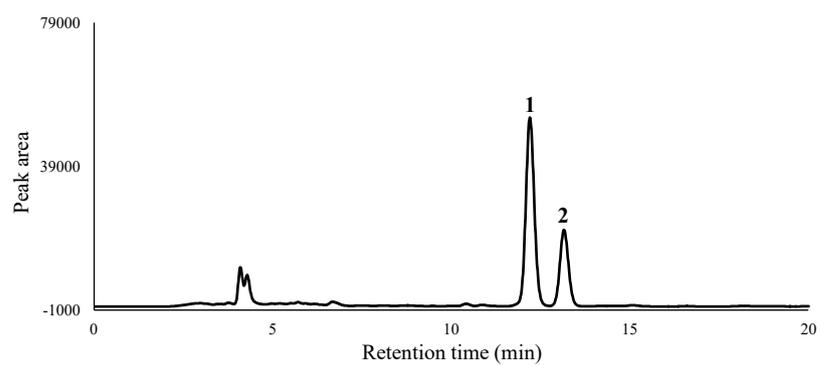


図7 試験溶液のHPLCクロマトグラム

表 1 ナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの純度測定における
 ^1H -qNMR 条件

装置	JEOL ECA 500 spectrometer
スペクトル幅	15 ppm (-2.5–12.5 ppm)
データポイント数	32768
オートフィルター	on (eight times)
取り込み期間	4.37 秒
フリップ角	90°
取り込み待ち時間	60 秒
スキャン回数	8
スピニング	off
^{13}C デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2 ^1H -qNMR より算出されたナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの各検体の純度 (%)

	メーカー名	検体 1	検体 2	検体 3
ナリンジン	Acros Organics	91.9	92.7	83.7
	シグマ アルドリッチ	90.4	90.7	89.2
	東京化成工業	88.0	88.4	85.7
	富士フイルム 和光純薬	85.1	88.6	89.9
α -モノグルコシル ナリンジン	(単離品)	75.8	65.2	82.5

表3 各基準物質に対するナリンジン, α -モノグルコシルナリンジンのRMS

		基準物質			
		MHB	カフェイン		ナリンジン
			検出波長 274 nm	検出波長 205 nm	
測定対象物質	ナリンジン	1.15	1.91	0.89	-
	α -モノグルコシル ナリンジン	1.24	2.05	0.95	1.07

表 4 シングルリファレンス HPLC 法および従来法におけるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジン含量の比較

(a) 基準物質：MHB

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
α -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8

(b) 基準物質：カフェイン（検出波長：274 nm）

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
α -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8

(c) 基準物質：カフェイン（検出波長：205 nm）

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
α -モノグルコシルナリンジン	5.0	0.8	4.9	0.8

(d) 基準物質：ナリンジン

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
α -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8

表 5 両法における総ナリンゲニン配糖体量の比較

(a) 基準物質：MHB

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
α -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8
α -グルコシル残基	5.6	1.4	5.6	1.4
総ナリンゲニン配糖体	12.2	1.1	12.2	1.1

(b) 基準物質：カフェイン（検出波長：274 nm）

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
α -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8
α -グルコシル残基	5.6	1.4	5.6	1.4
総ナリンゲニン配糖体	12.2	1.1	12.2	1.1

(c) 基準物質：カフェイン（検出波長：205 nm）

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
α -モノグルコシルナリンジン	5.0	0.8	4.9	0.8
α -グルコシル残基	5.6	1.4	5.6	1.4
総ナリンゲニン配糖体	12.2	1.1	12.2	1.1

(d) 基準物質：ナリンジン

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
α -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8
α -グルコシル残基	5.6	1.4	5.6	1.4
総ナリンゲニン配糖体	12.2	1.1	12.2	1.1

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

試験法及び分析法の開発

～外部標準法定量 NMR の自動化スクリプトの作成～

研究分担者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究要旨 既存添加物は多成分系からなる天然の添加物であり、成分規格の作成にあたっては、含有成分の含量や物性に関する科学的根拠データを用いて、試験法の設定を行う。各種成分の根拠データを定量的に扱うためには、対象成分それぞれの標準品の純度評価が必要不可欠である。既存添加物の研究業務で取り扱う標準品は希少なものが多く、純度測定終了後に試料汚染がなく全量回収可能な外部標準法定量NMR（EC-qNMR）は、既存添加物の成分規格化を迅速化する強力な純度測定法と言える。本研究では、EC-qNMRを完全自動化するスクリプトを開発した。開発したスクリプトは、Tuning&Matching（T&M）が90°パルス幅校正前後で、重複して実行する不具合があったが、複数のJobを組み合わせることで、この問題を回避し、適切な手順にそったEC-qNMRが実行可能であることを確認できた。また、スクリプトを実行した際のEC-qNMRの精度について、3台のNMR装置を用いて検証した。プローブの応答能であるQ値をプロットしたところ、装置によって2.5%程度のQ値の変動が確認されたが、測定回数を増やして平均値を採用すれば、正確な純度を算出できることが示された。

研究協力者

末松孝子 株式会社 JEOL RESONANCE

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

中島馨 国立医薬品食品衛生研究所

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

て、単一の成分としたものがほとんどである。これらの標準品に記載されている純度は、クロマトグラフ法で算出された相対純度であり、クロマトグラム上に現れない水分や不純物の含量は、無視されることが多い。既存添加物の成分規格試験法の作成にあたっては、根拠データを定量的に扱う必要があり、すなわち、標準品を個別に用意することに加えて、これらの絶対純度についても考慮する必要がある。

絶対純度の算出方法としては、 ^1H 核を対象とする内部標準法定量 NMR（IC-qNMR：internal calibration quantitative NMR）が広く利用されている。IC-qNMRでは、低分子化合物の場合、約1～5 mg程度の分析種（用意した標準品）および internal calibrant (IC) を精密に量り込み、NMR測定用重溶媒に溶かしたものを NMR 用試料液とする。この NMR 用試料液を、定量用に最適化した NMR 測定条件下で測定すると、得られるスペクトルには、分析種および IC に由来するシグナルが共鳴周波数に応じて出現する。こ

A. 研究目的

既存添加物は多成分系からなる天然の添加物である。既存添加物の品質を確認するための成分規格試験法の作成にあたっては、実際に流通している添加物製品を入手し、含有成分の含量や物性に関する科学的根拠データに基づき、試験法を設定する必要がある。したがって、根拠データの取得にあたっては、既存添加物中の指標となる成分たちの標準品やそれに準ずるものを個別に用意する必要がある。

既存添加物の場合、天然に由来する成分が指標となるため、試薬メーカーが販売しているこれらの標準品も、天然原料から精製を繰り返し

のとき、それぞれのシグナルの積分強度は、由来する物質の物質量および（分子上の）プロトン数の積と相関するため、純度が明らかな IC を基準として用いれば、分析種の純度を算出することが可能である。現在、国際単位系 (SI) にトレーサブルな IC が試薬メーカーから販売されており、これらの IC を基準にして qNMR から算出された絶対純度は、SI トレーサブルな純度値として認識される。そのため、食品添加物公定書や日本薬局方における一部の定量用標準品は、IC-qNMR を用いて規格化されており、これらの定量用標準品は、試薬メーカーによって IC-qNMR で純度が値付けされた後、分析者たちに販売される体制がすでに整備されている。しかしながら、試薬メーカーが qNMR で値付けする標準品は、法規制上重要となる物質のみである。そのため、既存添加物の根拠データを取得する際、指標成分の候補となる成分たちの標準品については、qNMR を用いて自ら純度を算出する必要がある。

試薬メーカーから購入する天然由来の標準品は高価で、¥30,000/mg に達するものもある。さらに、標準品が販売されていない場合は、自ら単離精製して用意する必要がある。このように、既存添加物の根拠データを取得する際に必要となる標準品は、高価で希少な物質が多い。そのため、qNMR で絶対純度を算出する際、IC を添加しても良い、あるいは IC-qNMR 測定後に NMR 用試料液を捨てて良いと判断できるほど、すべての標準品に対して、十分な量を用意することは、金額・時間および労力が必要となり、非常に困難である。以上のことから、qNMR 測定時に IC による試料汚染もなく、100%の回収が可能な外部標準法 qNMR (EC-qNMR : external calibration qNMR) は、根拠データを取得するための研究業務を迅速化できる方法として、大いに期待できる。

EC-qNMR では、NMR 試料管間の環境差を相殺する必要があり、その方法として相反定理が良く用いられる¹⁾。ここでいう相反定理とは、「信号の強度（またはプローブの品質係数 Q 値）がパルス幅に反比例する」を意味する。NMR 試

料管中の成分組成により誘電率は異なるため、最適なパルス幅の値も異なってくる。したがって、EC-qNMR では、各 NMR 試料管に対して①ラジオ波 (rf) をラーモア周波数にチューニング、②インピーダンスを 50Ω までマッチング、③正確な 90°パルス幅 (90PW) 測定および④校正した 90PW を qNMR に適用することが、相反定理を成立させる上で（正確な定量値を導く上で）、重要となってくる。このとき、NMR 試料管中の分析種の濃度は次のように示すことができる。

$$\text{Molar Conc.}_A = \text{Molar Conc.}_C \times S_A/S_C \times H_C/H_A \times 90PW_A/90PW_C \quad \text{— equation (1)}$$

A, Analyte; C, Calibrant; Molar Conc., concentration; S, absolute integral value; H, number of protons; 90PW, 90° pulse width

このように EC-qNMR は、特定の装置やソフトウェアに依存せず、誰でも実施可能であるが、一般に、IC-qNMR と比べると、精度が大きく劣ると認識されてきた。しかし、著者らは EC-qNMR で分析値にバラつきを与える要因を抽出した結果、Fig. 1 (A) に示す適切な手順で実施した場合、得られる測定値の誤差は 1%以内に収束することを証明した²⁾。この精度は、既存添加物の根拠データを定量的に扱う上で十分な精度である。しかしながら、Fig. 1 (A) に示した手順を完全自動化するスクリプトは開発されておらず、オペレーターは、NMR 試料管ごとに、校正した 90PW を qNMR の測定条件に入力することが強いられ、装置から離れることができないでいた。そこで、本研究では Fig. 1 (A) に示した手順を完全自動化するスクリプトを開発することを目的とした。また開発したスクリプトを実行した際に確認された不具合などを抽出した。なお、本研究で開発するスクリプトは日本電子製の NMR のみに対応可能であり、Bruker 製の NMR については検討していない。

B. 研究方法

B-1) 装置

日本電子 (株) 製の 600MHz (¹H) の装置とし

て, JNM-ECA600 および ECZ600 を 2 台用いた. JNM-ECA600 には室温の Royal プローブが, ECZ600 の 2 台には UltraCOOL の CH プローブが備え付けられている. ECZ600 の 2 台については, 以降, 国立衛研での通称名である FullJEOL と NewCH と記載する.

B-2) 試料及び試薬

認証標準物質 (CRM) である DSS- d_6 (Cat No 044-31671, 92.4%) およびマレイン酸 (MA, Cat No 135-17951, 99.9%), NMR 用重溶媒 DMSO- d_6 (Cat No 11560-23) および NMR 試料管 (Cat No 293-47953) は, 全て富士フィルム和光純薬 (株) より購入した.

B-3) スクリプトの作成

(株) JEOL RESONANCE で作成した. スクリプトのファイル, 自動測定の際に使用する FID 処理ファイルなどを分光計にインストールしてスクリプトを実行させた.

B-4) EC-qNMR 用試料の調製

DSS- d_6 約 16 mg および MA 約 60 mg を同一のバイアルに精密に量りこみ, DMSO- d_6 15 mL を加えて溶解させたものを NMR 用試料液とした. この液を 0.6 mL ずつ, 18 本の NMR 試料管に分注し, すべてトーチバーナーで封管した. ECA600 用, FullJEOL 用, NewCH 用として各 6 本ずつ使用した. 測定していない期間は, 冷蔵庫に保管した.

B-5) EC-qNMR の測定条件

下記のスクリプト測定条件にしたがって EC-qNMR を実行した.

```
calc90_relax_delay, 30 sec ; receiver_gain, 30 ;
scans, 8 ; dummy_scans, 4 ; x_offset, 5 ppm ;
x_sweep, 20 ppm ; data_points, 65536 ;
relaxation_delay, 30 sec.
```

90PW 校正パラメーターには, 精度良く校正するため, 分光計に記録されている初期値の 90PW に対して, 10PW~450PW 間の 10 ポイントをアレイ測定するスクリプト条件とした. 以

下, 分光計ごとにその条件を示す.

ECA600 : start90, 1.1 μ sec ; end90, 42 μ sec ;
step90, 4.5 μ sec.

FullJEOL : start90, 2 μ sec ; end90, 76 μ sec ;
step90, 8.2 μ sec.

NewCH : start90, 1.4 μ sec ; end90, 54 μ sec ;
step90, 5.78 μ sec.

B-6) qNMR 測定データの処理

Delta v5.3.2 で処理した. 取得した FID に対して, 窓関数の設定を外し, ゼロフィルでポイント数を 4 倍に増やした. フーリエ変換を行った後, 位相とベースライン (Akima) をマニュアルで補正し, qNMR スペクトルとした. FullJEOL で得られた NMR 試料管 1 本目のスペクトルを参考に, DSS- d_6 および MA の積分範囲を決定した. この積分範囲を Delta v5.3.2 の積分範囲移植ツールを用いて, ECA600, NewCH および FullJEOL で得られた残りの qNMR スペクトルに対して積分を行った. すなわち, 全ての qNMR スペクトルで得られたシグナルの積分範囲は統一された.

プローブの応答能を示す Q 値は, 以下の式 (2) から算出した.

$$Q \text{ value} = S \times 90PW / H / \text{Molar Conc.} - \text{equation (2)}$$

S , absolute integral value; $90PW$, 90° pulse width;
 H , number of protons; Molar Conc. , concentration (mmol/L).

C. 結果及び考察

C-1) 開発するスクリプトの対象範囲

Fig. 1A に示す手順の内, Step 1~Step 3 は, Delta ソフトウェア上のサンプル定義からコントロール可能なため, 本研究で開発するスクリプトの対象範囲から除いた. 具体的には, Fig. 2 に示すように, サンプル定義にグラジエントシム, プローブの設定温度, 安定化時間を入力して, 定義したサンプルに対して適当な Job を測定登録すると, Step 1→Step 2→Step 3→Job の順に測定が実行される. この時, Job の測定 Method に高速シムを選択して測定登録すると, Fig. 1A

に示された Step 1→Step 2→Step 3→Step 4 (高速シム) の順に測定が実行される。なお、qNMR 測定ではスピニングサイドバンドの影響をなくすために、サンプルの回転を止めて測定するのが一般的であり、サンプル定義の spin_state は SPIN OFF としている。

よって、本研究で作成するスクリプトの対象範囲は、Step 5～Step 7 とした。また、国立衛研では、旧型分光計 ECA で制御された NMR 装置 (ECA600) と、新型分光計 ECZ で制御された NMR 装置 (FullJEOL および NewCH) が稼働しているため、両分光計で実施可能なスクリプトを開発することとした。

C-2) 90PW 校正方法の検討

90PW 校正は、EC-qNMR を精度よく実施するための重要な手順である。90PW は、プローブを最適化した状態で実施する必要があり、すなわち、チューニングおよびマッチング (T&M) を実行した後に 90PW を校正する必要がある。一般に 90PW の校正には、緩和時間 T_1 の影響が小さい 360PW 付近をアレイ測定し、手動でヌルポイントを探す方法が一般的だが、この方法は、EC-qNMR の完全自動化という本研究の目的から脱線しているため、採用しないこととした。そこで、Kurimoto らが報告したカーブフィッティングによるパルス幅校正法 (MUSASHI) を採用することとした³⁾。具体的には、10PW～450PW をアレイ測定した後、分光計が各パルス幅におけるシグナル強度をプロットし、正弦曲線とのフィッティングを行うことで、自動的に 90PW が校正するようにした。アレイ測定時は、オフレゾナンス効果による正弦曲線の歪みを除去するため、任意のシグナルを照射中心として設定する必要がある。理論的には、どのシグナルを照射中心として設定しても、得られる 90PW は同じである。そこで、分光計がアレイ測定時の照射中心を簡単に選択できるようにするため、アレイ測定前に Scout scan (1 スキャンの ^1H 測定) を実行させて、このときに得られるスペクトル上の、最も S/N の大きいシグナルが照射中心となるように、スクリプトを開発す

ることとした (Fig. 1B, C)。

C-3) 90PW 校正時の Scout scan およびアレイ測定条件の検討

90PW 校正の際に実行される、Scout scan およびアレイ測定の両パルスシーケンスについて、測定条件の検討を行うこととした。

Scout scan では、 ^1H 核の共鳴周波数領域を網羅できるように、照射中心を 5 ppm、観測幅を 25 ppm (データクリップ後 20 ppm) とした。データポイント数は 16,384 とし、積算回数は 1 回に設定した。これらの測定条件は、オペレーターが変更できない固定のパラメーターとした。また、 ^{13}C デカップリングの有無は、Scout scan の S/N の大きいシグナルを見つけるという目的と関係がなく、また ^{13}C デカップリング時の熱の発生をなくすため、常に OFF となるよう固定した。上記測定条件下での FID 取り込み時間 (AQ) は、400MHz、600MHz および 800MHz の装置でそれぞれ 1.64 sec、1.09 sec および 0.82 sec である。一部のシグナルでは、FID が減衰しきらないと想定されるため、FID の処理として、窓関数は台形関数のみを適用することとした。

アレイ測定では、照射中心は Scout scan で選択された最も S/N の大きいシグナル、観測幅 1.25 kHz (データクリップ後 1 kHz) とした。データポイント数は 1,024 とし、積算回数は各 1 回に設定した。熱の発生により、アレイ測定後に描かれる正弦曲線が歪む可能性があるため、 ^{13}C デカップリングは常に OFF とした。これらの測定条件は、Scout scan と同様に、固定のパラメーターとした。このときの AQ は、磁場に関係なく 0.82 sec となり、窓関数は Scout scan と同様に、台形関数のみの適用とした。

C-4) アレイ測定時の遅延時間 D_1 の検討

式 (1) に示すように、相反定理に基づく EC-qNMR では、計算式に校正後の 90PW の値が組み込まれている。すなわち 90PW の校正精度が、EC-qNMR の測定値に対して、直接的に影響を与えるため、開発するスクリプトの 90PW 校正精度を、どのようにして担保するのか検討を行

った。

先行研究では²⁾、緩和時間 T_1 の長いシグナルを照射中心とした場合、アレイ測定後の正弦曲線が歪み、フィッティングが機能せず、正しい 90PW が算出されないことを報告している (Fig. 3)。**C-2)**および**C-3)**で説明したように、本研究で開発するスクリプトでは、Scout scan 時に S/N の大きいシグナルがアレイ測定の照射中心となる。希少な試料である場合、高濃度の NMR 用試料液を調製できず、Scout scan 時に T_1 の長い溶媒シグナルがアレイ測定の照射中心となることが想定された。そこで、**C-3)**で固定した測定条件の他に、アレイ測定ではパルス幅の配列パラメーターおよび遅延時間 D_1 を任意に設定できるようにした (Fig. 4)。Fig. 4 に示した「start90」、「end90」、「step90」が配列パラメーターに相当し、「calc90_relax_delay」がアレイ測定時の D_1 に相当する。先行研究では、プローブの 90PW 初期値に対して、10~450PW の範囲を 10 ポイントでアレイ測定し、 D_1 は対象シグナルの $T_1 \times 2$ 倍以上で設定すると精度良く 90PW を校正できたと報告している²⁾。このポイント数で D_1 を 10 sec, 30 sec, 60 sec, 120 sec と設定したときのアレイ測定時間は、それぞれ 2 分, 5 分, 10 分, 20 分となる。 ^1H 核の場合、アレイ測定時の D_1 を、60 sec 以上に設定しておけば、ほとんどのシグナルに対して精度良く 90PW が校正できる。なお、照射中心を決定する Scout scan の D_1 は、「calc90_relax_delay」が反映されるように設計した。

C-5) qNMR 測定条件の検討

開発するスクリプトには、qNMR 測定条件として、「force_tune」、「autogain」、「receiver_gain」、「scans」、「dummy_scans」、「x_angle」、「x_offset」、「x_sweep」、「data_points」、「relaxation_delay」、「inv_gated_noe」、「decoupling」、「decoupling_modulation」、「spinner_frequency」、「spinner_state」、「turn_off_spin」を設けて、柔軟に測定条件を変更できるようにした (Fig. 4)。EC-qNMR の場合、分析種と EC のスペクトルデータを、同じゲイン値で比較する必要があるた

め、ほとんどの場合、「autogain」は OFF にして、共通のゲイン値を「receiver_gain」に入力することになるが、「autogain」も選択できるようにしてある。

C-6) 開発したスクリプトの動作確認

ECA600, FullJEOL および NewCH に対して、開発した EC-qNMR のスクリプトを実行し、動作に問題がないか確認した。EC-qNMR では、T&M をとった後に 90PW を校正する必要があるため、Fig. 5A に示すパターン①のように、パラメーターの「force tune」にチェックを入れて、「decoupling」を外した測定条件を実行させた。すると、まず HF1 (^1H 核) の T&M が実行され、90PW 校正が行われたが、校正終了後に 2 回目の HF1 の T&M が実行され、qNMR 測定となった。

次に、パラメーター中の「force tune」および「decoupling」にチェックを入れたパターン②を実行させたところ、HF1 の T&M が実行された後、90PW の校正が行われ、次に LF1 (^{13}C 核) と HF1 の T&M が実行され、qNMR 測定となった。パターン③のように、「force tune」のチェックを外すと、T&M は実行されず、90PW の校正の後、qNMR 測定となった。このように、開発したスクリプトでは、パラメーターに「force tune」のチェックを入れると、90PW 校正の前後で T&M が実行された。90PW 校正は、T&M でプローブを最適化した後に実施するが、校正終了後に再度の T&M を実施すると、プローブの状態が変わってしまうため、90PW の値とプローブの状態との関係性が崩れてしまう。特にパターン②のように、 ^{13}C デカップリングを適用して qNMR 測定する場合、90PW 校正前に HF1 だけを T&M したプローブ状態と、校正終了後に LH1 および HF1 を T&M したプローブの状態は異なる。

また、もう一つの不具合として、ECA600 では、スクリプトの qNMR パラメーターである「inv_gated_noe」と「decoupling」のチェックを外しても、qNMR 測定で AQ と D_1 中に ^{13}C デカップリングが適用されていた。そこで、詳細メ

ソッドパラメーターを確認したところ、「noe」と「decoupling」にチェックが入っており (Fig. 5B), 入力したスクリプトのパラメーターが, qNMR パルスシーケンスに反映されていなかった。そこで, 詳細メソッドパラメーターの「noe」と「decoupling」のチェックを外したところ, ^{13}C デカップリングなしに qNMR 測定となったため, ECA600 でスクリプトを実行する際は, 詳細メソッドパラメーターの「noe」と「decoupling」もあわせて確認をとる必要がある。なお, ECZ では上記の問題は確認されなかった。

以上のことから, 開発したスクリプトは以下の点について改善すべきである。

- スクリプトのパラメーターに「force tune」のチェックを入れた際, 90PW 校正終了後の T&M を実行しないよう改善する。
- スクリプトのパラメーターに「force tune」と「decoupling」にチェックを入れたとき, LF1 と HF1 を対象に T&M を 90PW 校正前に実行し, 校正終了後は 90PW 校正を実行しないよう改善する。
- ECA 分光計について, スクリプトの qNMR 測定パラメーター中の「inv_gated_noe」と「decoupling」について, qNMR のパルスシーケンスに反映されるよう改善する。

C-7) 開発したスクリプトで得られる EC-qNMR の精度

ECA600, FullJEOL および NewCH の 3 台の NMR 装置上で, 開発したスクリプトを用いて, EC-qNMR を実施し, その際に得られる測定値の精度について検証することとした。検証にあたっては, DSS- d_6 および MA 混合液を 6 本の NMR 試料管に分注し, それぞれの試料管から得られる DSS- d_6 および MA シグナル由来の Q 値をプロットして, その変動を確認した。また, DSS- d_6 を基準として MA を値付けし, MA の認証値と比較することで, IC-qNMR の精度を確認した。qNMR 測定中の ^{13}C デカップリングの有無 (AQ のみ適用) についても検証した。デカップリング方法として GARP, MPF8 および

MPF10 の 3 種を用いることとした。

NMR 試料溶液中の DSS- d_6 , MA および DMSO- d_5 それぞれの T_1 は, 3 sec, 3 sec および 15 sec であった。本研究では, 90PW 校正時間を短くして効率よく検証を進めるために, Scout scan で常に T_1 が短い MA が選択されるように, MA の濃度を意図的に濃くした。90PW アレイ測定の PW ポイント数および D_1 は, 先行研究と同様に²⁾, 10PW~450PW の間を 10 ポイント, 30 sec (T_1 ×2 倍以上) とした。qNMR 測定時の D_1 は, 30 sec とした。

Fig.1 にそった手順で EC-qNMR が実行されるように, Fig. 6 に示す 3 つの Job を組み合わせた。まず, Fig. 2 に示すようにサンプル定義に必要事項を入力し, さらに高速シムを選択した Job①を測定登録することで, Step 1~Step 4 を実行させた。なお, C-6) において, 開発したスクリプトでは「force tune」にチェックを入れると, 90PW 校正終了後に 2 回目の T&M が実行されたため, 「force tune」にはチェックを入れず, スクリプトの前に, T&M を実行する 1 スキャンのダミーパルスを選択した Job②を測定登録した。 ^{13}C デカップリングで qNMR 測定する場合は, このダミーパルスに single_pulse_dec を用いて, LF1 および HF1 に対して T&M が実行されるようにした。なお, このダミーパルスのフリップ核と D_1 は, それぞれ 10PW と 30 sec 程度に設定し, パルス照射後, すぐに平衡状態に戻るようにした。最後に, 本研究で開発したスクリプトを選択した Job③を測定登録し, Fig.1 にそった手順の EC-qNMR を実行させた。

Fig. 7 に, ECA600, FullJEOL および NewCH で行った検証結果を, 比較できるようにまとめた。全ての ^{13}C デカップリングパターンで, ECA600 の Q 値の変動が大きかった (non-dec, 1.0%; GARP, 1.3%; MPF8, 2.5%; MPF10, 1.9%)。また, 同じ時間軸で測定を行った IC-qNMR についても, ECA600 の RSD (%) が最も大きかった。すなわち, この変動の結果から判断すると, ECZ 分光計で制御された FullJEOL および NewCH の方が, 装置の安定性が高く, qNMR 測定に適した装置と言える。ただし, 複数の NMR

試料管から得られた IC-qNMR の MA 純度結果を平均すれば、その結果は真値 (MA の認証値) と 1%以内で一致するので、ほとんどの研究分野において十分な精度であり、研究業務を進めるうえでまったく問題にはならない。さらに、本報告書では詳細を説明しないが、シム調整の簡便さ、シグナルの裾がシャープに減衰する綺麗さは、ECA600の方が優れており、例えば、シグナルが混雑するような化合物の場合、ECA600の方がqNMRに適した装置といえる。Fig. 8に示すように、FullJEOLおよびNewCHで、特に¹³Cデカップリング時に、シグナルの裾がなぜ左右対称にならないのかは、プローブにコールドシステムを採用している両装置の宿命なのか、あるいは国立衛研の地盤や、近接する羽田空港から離陸する飛行機の騒音などを、感度の良いコールドシステムがシグナルとして検出しているのか、はっきりしていない。この点は、より良いqNMRスペクトルを取得するために、改善すべき問題である。

D. 結論

既存添加物の成分規格作成に関する研究業務の迅速化を目指し、EC-qNMRを完全自動化するスクリプトを開発した。開発したスクリプトでは、90PW校正の前後でT&Mを重複して実行してしまうなどの不具合が確認されたが、複数のJobを組み合わせることでこの問題を回避し、先行研究で示された適切な手順²⁾に沿ったEC-qNMRの完全自動化が可能となった。また、開発したスクリプトを実行した際のEC-qNMRの精度は、装置によってRSDが2.5%となる場合もあったが、測定回数を増やすことにより、正確な絶対純度を算出できると思われる。

本研究で開発したスクリプトには、オペレーターが柔軟に、90PW校正やqNMRの測定条件を変更できるように、編集可能なパラメーターが残されている。これらのパラメーターは、EC-qNMRの精度に大きな影響を与えるため、スクリプトの使用に当たっては、利用者が各パラメーターの役割などを十分理解しておく必要がある。

EC-qNMRの完全自動化スクリプトは、既存添加物の研究業務に限らず、あらゆる分野の研究業務の効率化に寄与できると大いに期待できる。

E. 参考文献

- 1) Burton I.W., Quilliam M.A., Walter J.A.: Quantitative ¹H NMR with External Standards: Use in Preparation of Calibration Solutions for Algal Toxins and Other Natural Products. *Anal. Chem.*, 2005; 77(10):3123-3131.
- 2) Nishizaki Y, Lankin D, Chen SN, Pauli G: Accurate and precise external calibration enhances the versatility of quantitative NMR (qNMR). *Anal. Chem.*, 2021; 93(5):2733-2741.
- 3) Kurimoto T, Asakura K, Yamasaki C, Nemoto N: MUSASHI: NMR Pulse Width Determination Method by Nonlinear Least Square Curve Fitting. *Chem. Lett.* 2005; 34, 540-541.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 精油除去ウイキョウ抽出物の成分規格作成に向けた基礎的検討. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会 (2020.5.28)(誌上発表)
- 2) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物「カラシ抽出物」および「セイヨウワサビ抽出物」に含まれるイソチオシアン酸アリル定量法の改良. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会 (2020.5.28)(誌上発表)
- 3) 西崎雄三, 石附京子, 中島馨, 増本直子, 末松孝子, 杉本直樹, 佐藤恭子: ¹³C-CP/MASを用いた食品添加物キトサンの脱アセチル化度の測定. 第2回日本定量NMR研究会年会 (2020.12.4)(神奈川)
- 4) 石附京子, 建部千絵, 西崎雄三, 窪崎敦隆, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 外部標準法qNMRの自動化スクリプトの作成. 第2回日本定量NMR研究会年会 (2020.12.4)(神奈川)

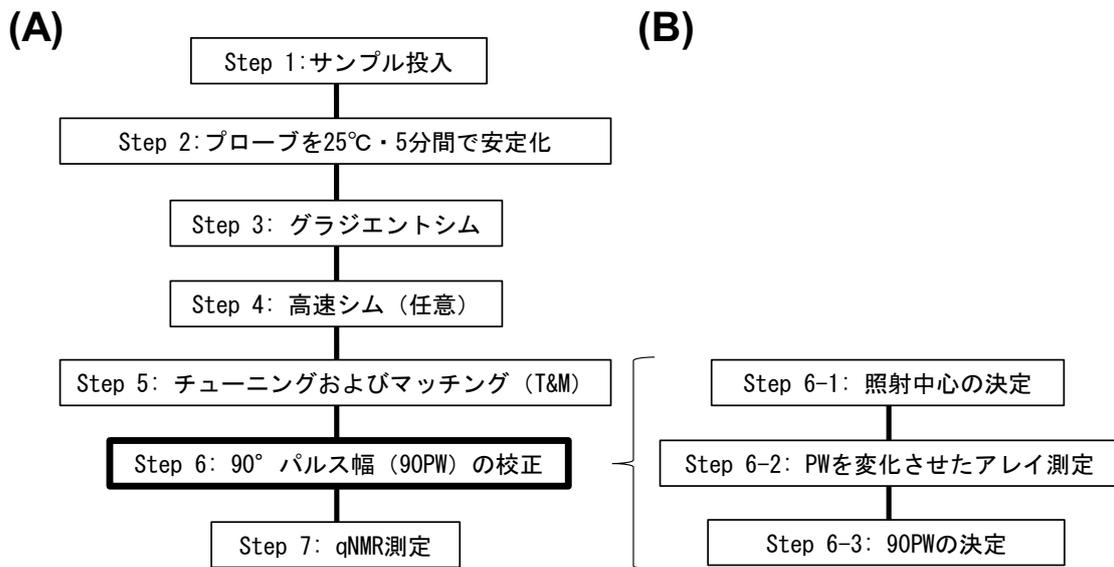
- 5) 高橋未来, 高木映里, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: シングルリファレンスHPLCによるクルクミン類の定量法の検討. 第2回日本定量NMR研究会年会(2020.12.4)(神奈川)

2. 論文発表等

- 1) Nishizaki Y, Ishizuki K, Masumoto N, Tada A, Sugimoto N, Sato K: HPLC determination of quercetin using relative molar sensitivity to methylparaben as a single reference. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 2020; 27(2): 42-52.
- 2) Miura T, Sugimoto N, Bhavaraju S, Yamazaki T, Nishizaki Y, Liu Y, Bzhelyansky A, Amezcua C, Ray J, Zailer E, Diehl B, Gallo V, Todisco S, Ofuji K, Fujita K, Higano T, Geletneky C, Hausler T, Singh N, Yamamoto K, Kato T, Sawa R, Watanabe R, Iwamoto Y, Goda Y: Collaborative study to validate purity determination by ¹H quantitative NMR spectroscopy by using internal calibration methodology. *Chem. Pharm. Bull.*, 2020; 68(9):868-878.
- 3) Ohtsuki T, Matsuoka K, Fujii Y, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Matsufuji H: Development of an HPLC method with relative molar sensitivity based on ¹H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. *PLoS ONE.*, 2020; e0243175:1-12.
- 4) 酒井有希, 増本直子, 西崎雄三, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた single-reference HPLC 法が定量値に影響を及ぼす要因の検討と機能性表示食品中のルテイン定量への応用. *日本食品化学学会誌*, 2020; 27(3): 123-134.
- 5) 西崎雄三, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物である精油除去ウイキョウ抽出物中に含まれる主成分の抗酸化能評価. *日本食品化学学会誌*, 2020; 27(3): 164-172.
- 6) 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.*, 2021; 69(1):18-25.
- 7) Nishizaki Y, Lankin D, Chen SN, Pauli G: Accurate and precise external calibration enhances the versatility of quantitative NMR (qNMR). *Anal. Chem.*, 2021; 93(5):2733-2741.
- 8) Kuroe M, Numata M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Itoh N: Use of relative molar sensitivity as a specific value for evaluating heptaoxyethylene dodecyl ether concentrations in methanol solution. *Anal. Sci.*, in press.
- 9) Takahashi M, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Quantification of tea - derived catechins without the requirement for respective calibration curves by single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *J. Sci. Food Agric.*, in press.

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし



(C)

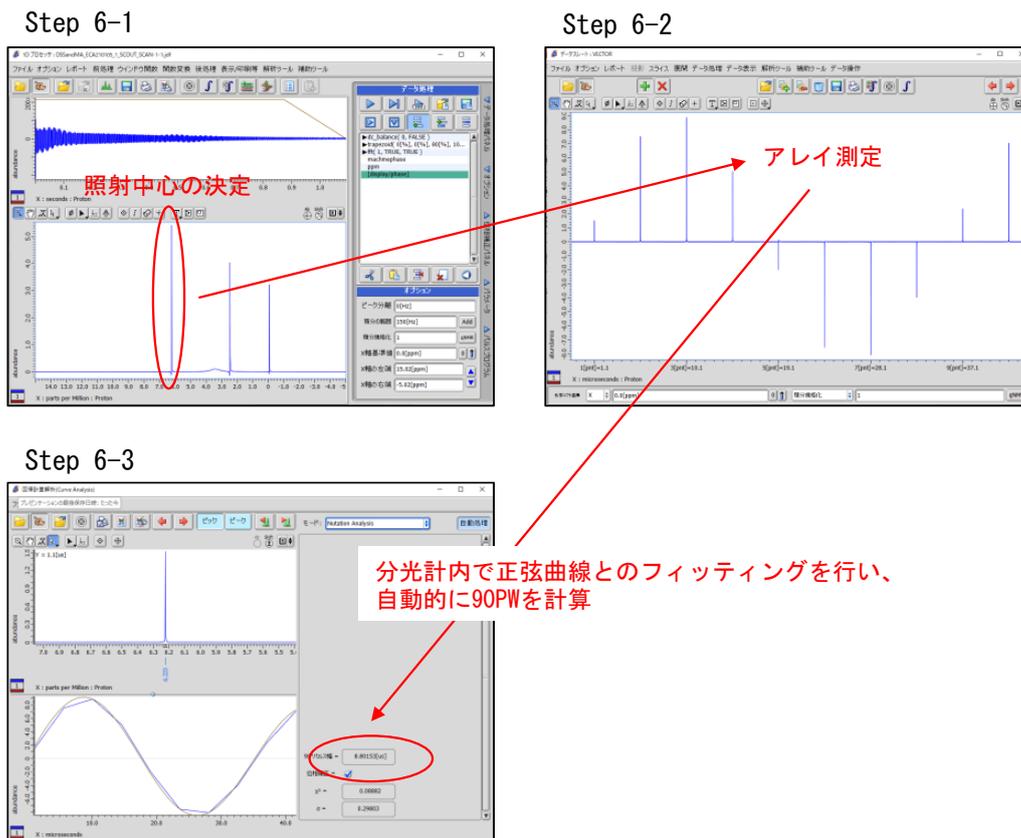


Fig. 1 EC-qNMR の手順

(A)および(B) 先行究²⁾で示された適切な EC-qNMR の測定順序

(C)90PW 校正のイメージ

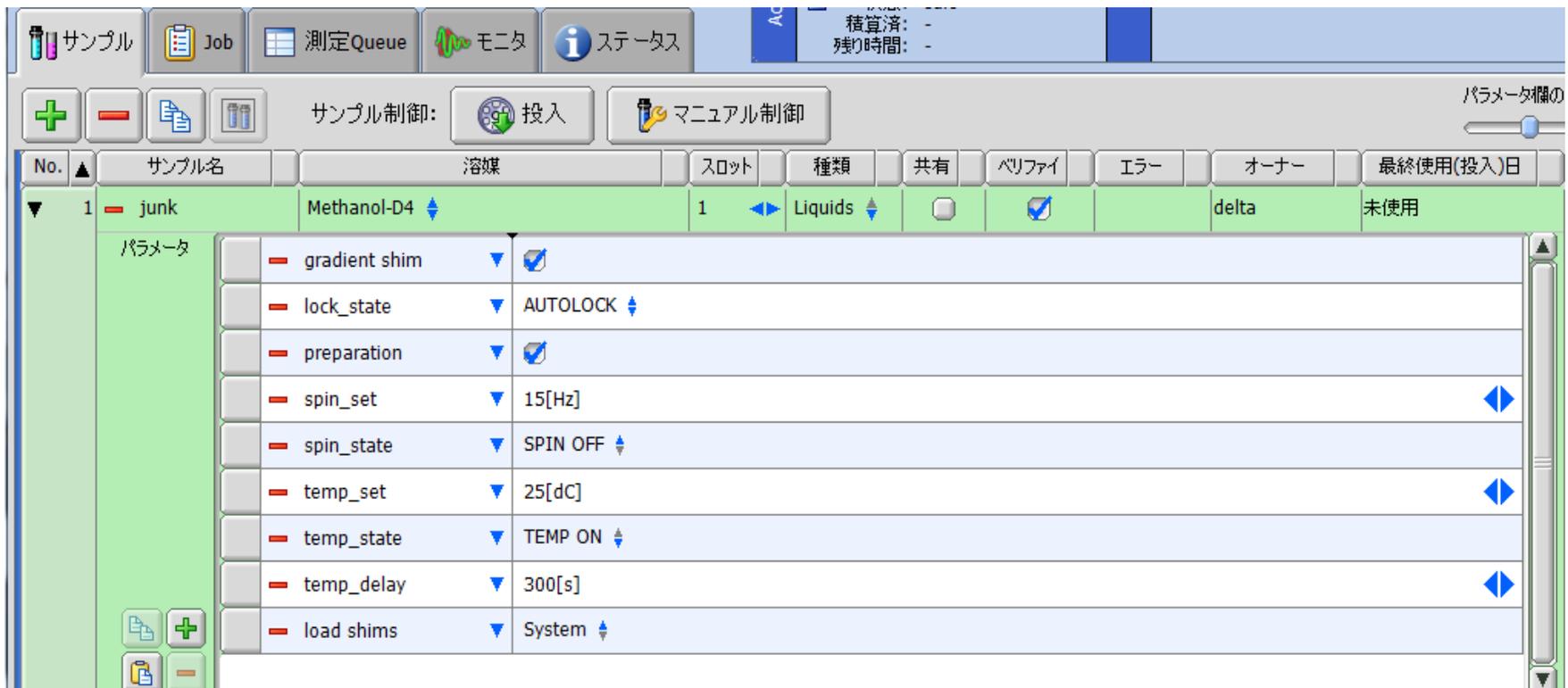


Fig. 2 Delta ソフトウェア上のサンプル定義

Fig. 1 の Step1～Step 3 をここで設定できる. temp_delay は 300[s]以上が望ましい²⁾.

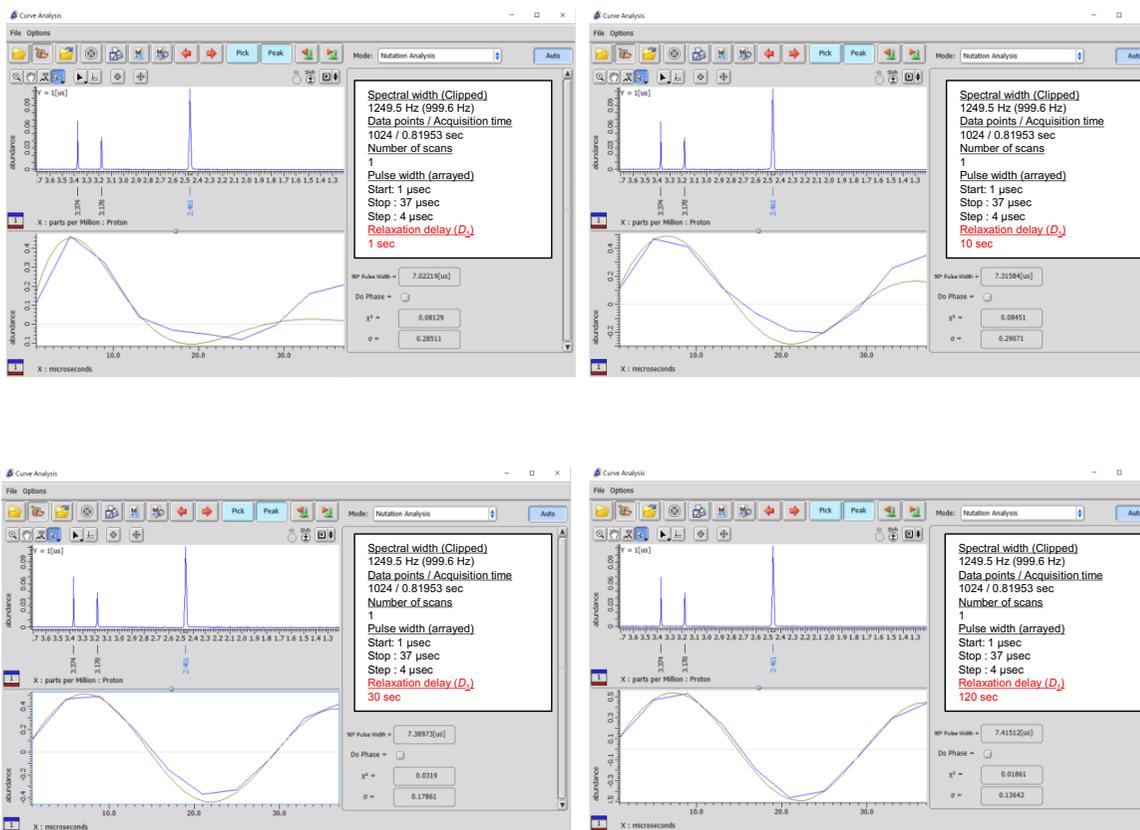
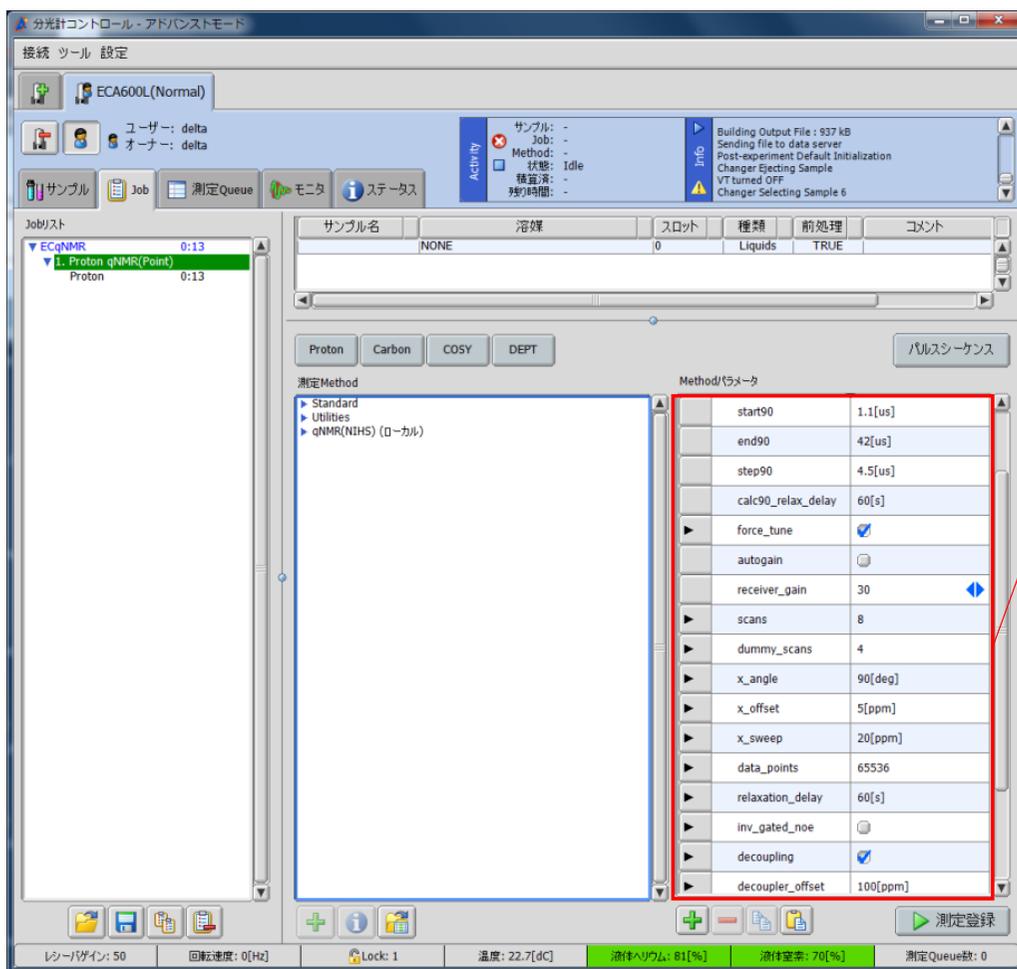


Fig. 3 T_1 が長いシグナルを照射中心とした時のPWアレイ測定結果

アレイ測定中の D_1 が短いと、アレイ測定後の正弦曲線が歪み、フィッティングが精度良く機能しない²⁾。照射中心、 T_1 が15secのDMSO-d₅ (溶媒シグナル)。左上→右上→左下→右下の順に、アレイ測定中の D_1 がそれぞれ1 sec, 10 sec, 30 sec, 120 sec。アレイ測定中の D_1 が長いほど、綺麗にフィッティングする。



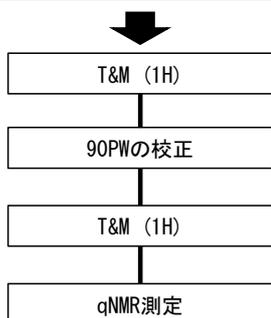
▶	return_data_to_screen	<input checked="" type="checkbox"/>
▶	filename_part2	qH
▶	calculate_proton_90	<input checked="" type="checkbox"/>
	start90	1.1[us]
	end90	42[us]
	step90	4.5[us]
	calc90_relax_delay	10[s]
▶	force_tune	<input checked="" type="checkbox"/>
	autogain	<input type="checkbox"/>
	receiver_gain	30 <input type="text"/>
▶	scans	8
▶	dummy_scans	4
▶	x_angle	90[deg]
▶	x_offset	5[ppm]
▶	x_sweep	20[ppm]
▶	data_points	65536
▶	relaxation_delay	30[s]
▶	inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>
▶	decoupling	<input checked="" type="checkbox"/>
▶	decoupler_offset	70[ppm]
▶	decoupler_modulation	MPF8 <input type="text"/>
	spinner_frequency	15[Hz]
	spinner_state	SPIN OFF <input type="text"/>
▶	turn_off_spin	<input checked="" type="checkbox"/>

Fig. 4 開発したスクリプトで編集できる測定条件

(A)

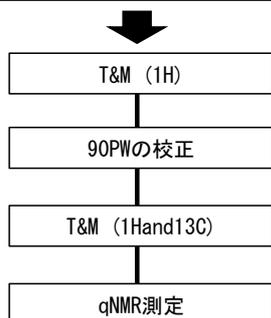
パターン①

return_data_to_screen	<input checked="" type="checkbox"/>
filename_part2	qH
calculate_proton_90	<input checked="" type="checkbox"/>
start90	1.1[us]
end90	42[us]
step90	4.5[us]
calc90_relax_delay	10[s]
force_tune	<input checked="" type="checkbox"/>
autogain	<input type="checkbox"/>
receiver_gain	30
scans	8
dummy_scans	4
x_angle	90[deg]
x_offset	5[ppm]
x_sweep	20[ppm]
data_points	65536
relaxation_delay	30[s]
inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>
decoupling	<input type="checkbox"/>
decoupler_offset	70[ppm]
decoupler_modulation	MPF8 ↓
spinner_frequency	15[Hz]
spinner_state	SPIN OFF ↓
turn_off_spin	<input checked="" type="checkbox"/>



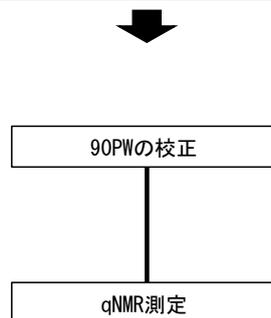
パターン②

return_data_to_screen	<input checked="" type="checkbox"/>
filename_part2	qH
calculate_proton_90	<input checked="" type="checkbox"/>
start90	1.1[us]
end90	42[us]
step90	4.5[us]
calc90_relax_delay	10[s]
force_tune	<input checked="" type="checkbox"/>
autogain	<input type="checkbox"/>
receiver_gain	30
scans	8
dummy_scans	4
x_angle	90[deg]
x_offset	5[ppm]
x_sweep	20[ppm]
data_points	65536
relaxation_delay	30[s]
inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>
decoupling	<input checked="" type="checkbox"/>
decoupler_offset	70[ppm]
decoupler_modulation	MPF8 ↓
spinner_frequency	15[Hz]
spinner_state	SPIN OFF ↓
turn_off_spin	<input checked="" type="checkbox"/>



パターン③

return_data_to_screen	<input checked="" type="checkbox"/>
filename_part2	qH
calculate_proton_90	<input checked="" type="checkbox"/>
start90	1.1[us]
end90	42[us]
step90	4.5[us]
calc90_relax_delay	10[s]
force_tune	<input type="checkbox"/>
autogain	<input type="checkbox"/>
receiver_gain	30
scans	8
dummy_scans	4
x_angle	90[deg]
x_offset	5[ppm]
x_sweep	20[ppm]
data_points	65536
relaxation_delay	30[s]
inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>
decoupling	<input checked="" type="checkbox"/>
decoupler_offset	70[ppm]
decoupler_modulation	MPF8 ↓
spinner_frequency	15[Hz]
spinner_state	SPIN OFF ↓
turn_off_spin	<input checked="" type="checkbox"/>



(B)

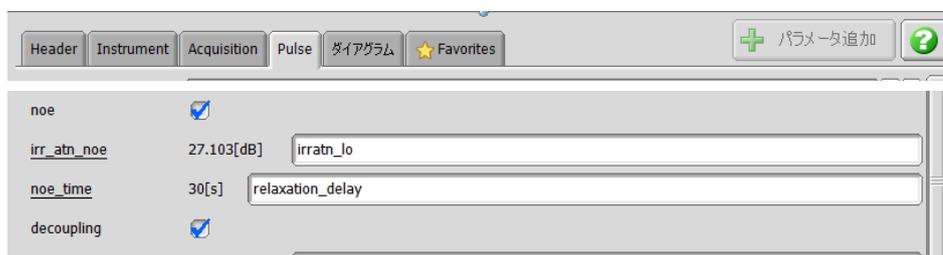


Fig. 5 スクリプトの動作確認

(A) スクリプトの測定条件を変更した際の分光計の挙動.

(B) 詳細メソッドパラメーター. ECA600では, スクリプトの測定条件 ^{13}C デカップリングを外しても, 詳細メソッドの *noe*, *decoupling* のチェックが外れているか, 確認する必要がある.

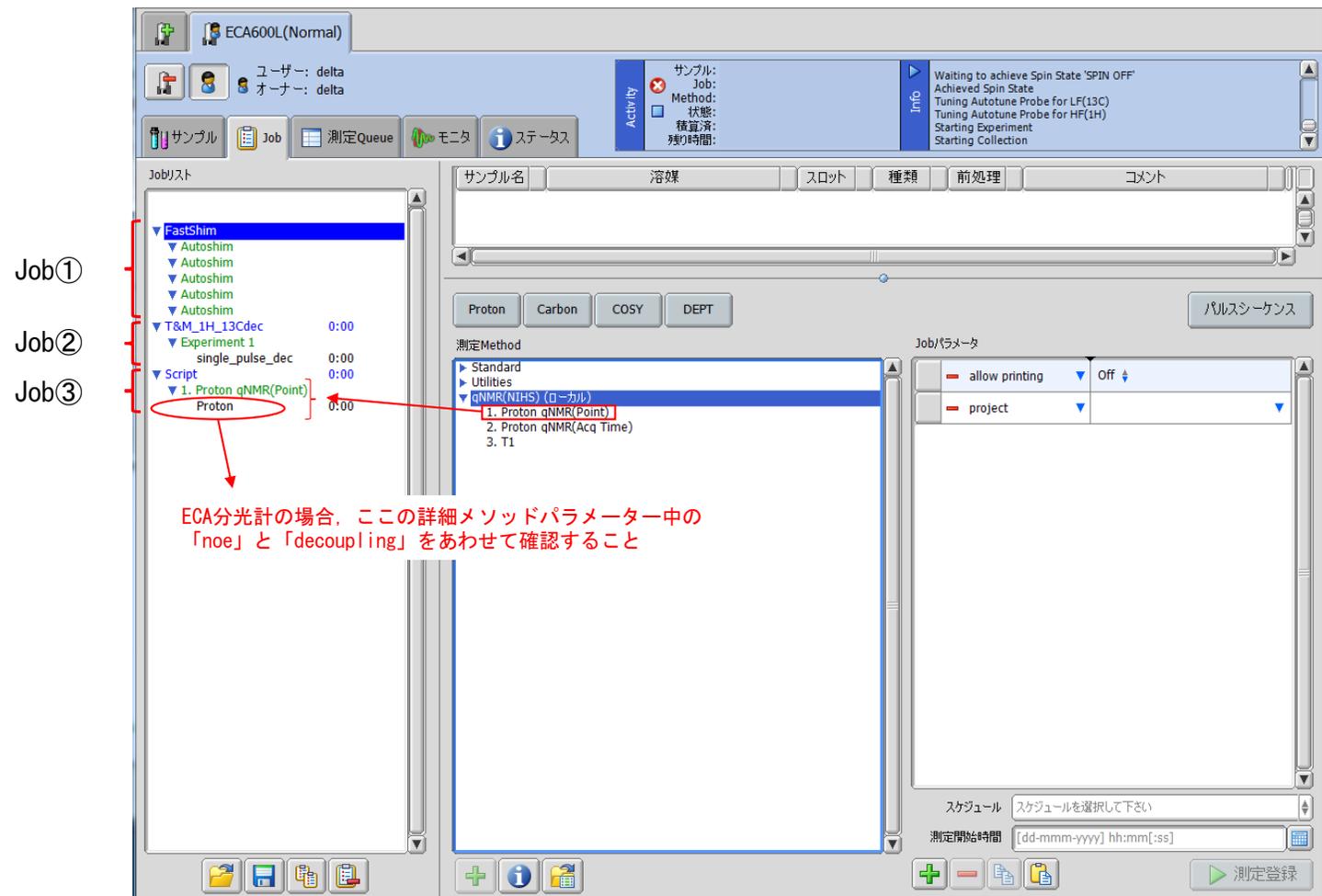


Fig. 6 Fig. 1 に示した手順に沿った EC-qNMR を実施するための Jon の組み合わせ.

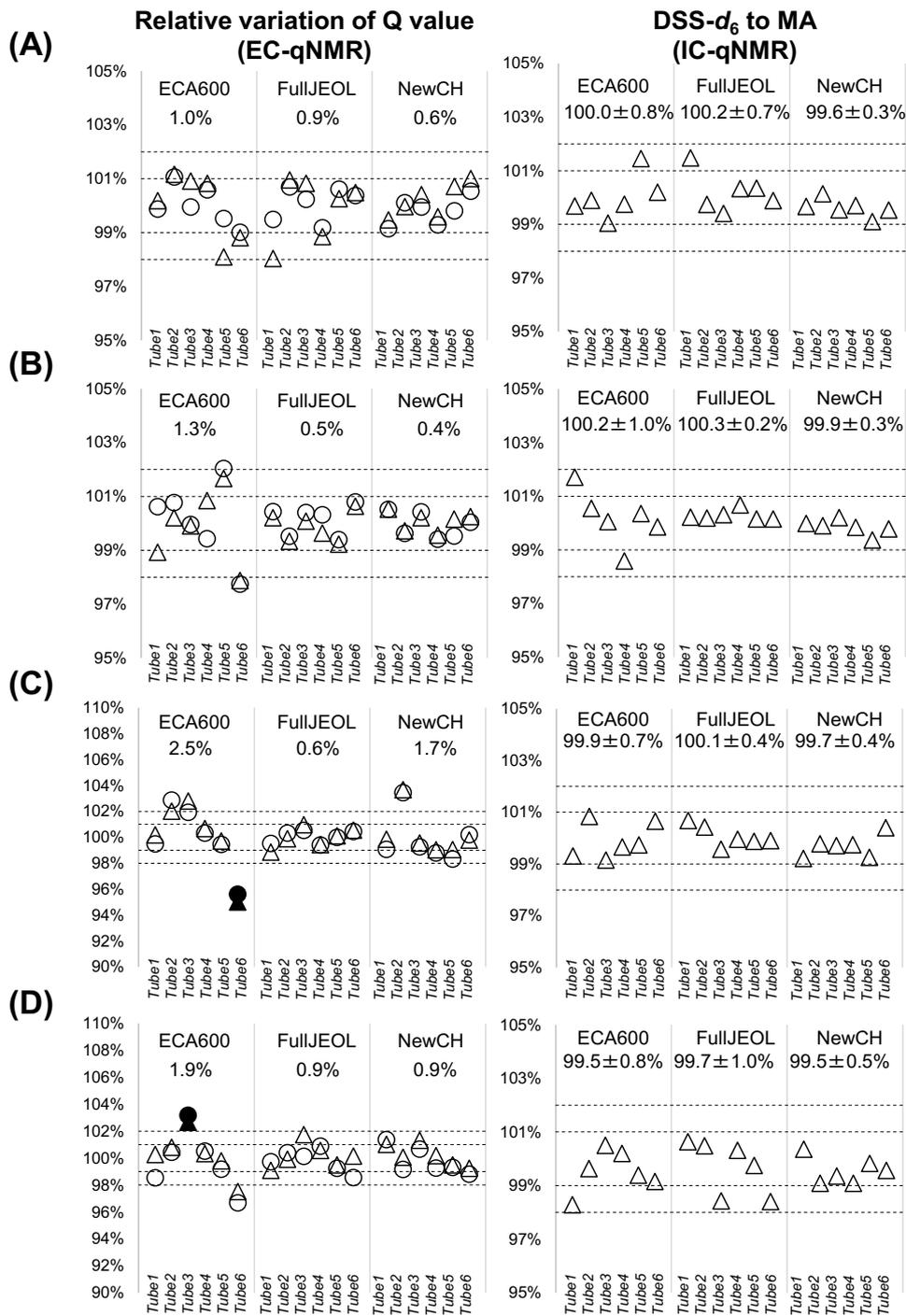
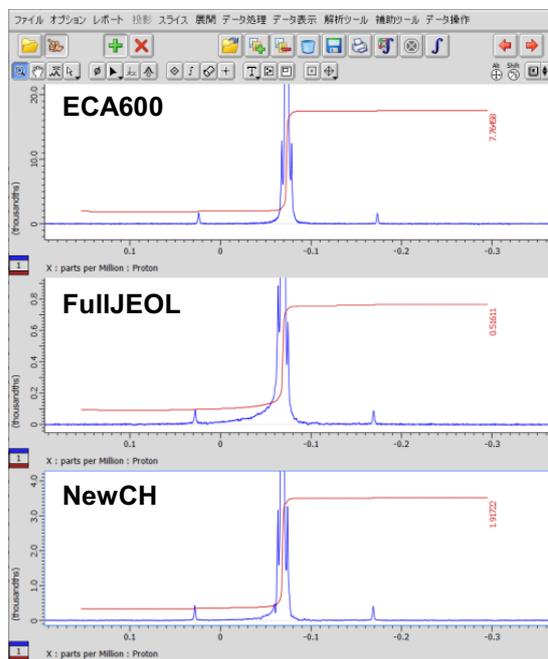


Fig. 7 Fig. 6 に示した Job の組み合わせで実行した EC-qNMR の精度.

(A) non-¹³Cdecoupling. (B) GARP-¹³Cdecoupling. (C) MPF8-¹³Cdecoupling. (D) MPF10-¹³Cdecoupling. 黒いマーカーは、著しくシムが悪かったスペクトル. IC-qNMR では、MA の認証値に対する相対純度をプロットした.

○, DSS-d₆ ; △, MA.

(A)



(B)

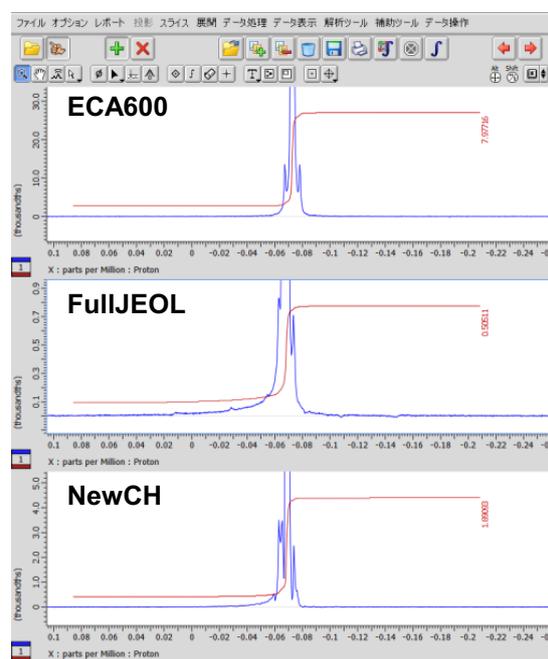


Fig. 8 ECA600, FullJEOL および NewCH でのスペクトル (裾部分) の拡大.

(A) non-¹³Cdecoupling. (B) MPF8-¹³Cdecoupling.

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

試験法及び分析法の開発

～PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討～

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 研究分担者らは、既存添加物の有効成分または指標成分の定量用標品の供給問題を解消するため、分析対象物質の標準物質を必要としない定量分析法の開発を行っている。現在、HPLCにおける検出器として、フォトダイオードアレイ(PDA)が広く利用されている。PDAは広範囲の波長域における吸収を検出できることが利点であるが、検出されるシグナルを用いた定量は装置間、また、異なる波長域における誤差が大きいことが問題点となる。この問題点に対しては、広範囲に吸収をもつ基準物質となる化合物を利用して校正を行うことが望ましい。本研究では、PDA校正用として利用可能な性質、すなわち広範囲に吸収を有し、かつ溶解性などが担保された分子の探索を目的とした。すなわち、異なる波長域に吸収を有する化合物を複数個連結させることで広波長範囲において吸収を有する分子を創出するコンセプトで研究を遂行した。本年度は、複数の化合物を連結するためのビルディングブロックの構築と、連結するための色素化合物の合成について検討した。その結果、色素化合物としてビスアリアル化合物を用いることで、置換基の変更によって吸収波長を調節できることを明らかとした。

研究協力者

辻巖一郎 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、HPLCをはじめとした分析機器の検出器として汎用的に利用されているフォトダイオードアレイ(PDA)の校正用化合物として利用可能な分子創出を目的とし、広範囲の波長域において吸収を示す化合物の合成について検討した。食品添加物の試験では、HPLCを用いた分析法が設定されているものが多く、異なる装置間での分析における正確さを担保することは重要である。PDAは、広範囲の波長域の化合物を検出できることからHPLC検出器に広く利用されているが、正確な分析を実施するために、装置間における校正を行う際には基準となる化合物が必要となる。特定波長の吸収における装置

間校正は、対象とする波長に対して適切なシングルリファレンスを設定することで対応が可能であるが、PDAのカバーする広範囲の波長域において一種の化合物を使用して校正を実施できることが望ましい。そこで本研究では、広い波長域にUV吸収を示す化合物を合成するために、異なる波長領域に吸収を持つ複数分子を連結することを提案した(Figure 1)。具体的には、①複数分子を連結可能なビルディングブロック部の合成、②UV吸収を示す化合物として、ビスアリアル化合物を合成した。

B. 研究方法

B-1) 分子設計・合成経路

化合物の合成は、入手容易な出発原料を利用したルートを計画した。異なる種類の色素化合物を連結可能なビルディングブロックとして、第3級アミンを含む構造を選択し、そ

の合成経路に関して検討した。同時に広範囲の波長域吸収を有する色素化合物の合成を目標として、官能基の変更による吸収波長の変化を期待して、ビスアリールマレイミド誘導体を得るための合成経路の確立を検討した。ビルディングブロック、および、それに連結するための色素化合物はそれぞれ Scheme 1 と 2 に示すルートで合成する計画を立てた。以下、本研究において使用した市販試薬等の情報を示す。

B-2) 試料及び試薬

・ *N*-Boc-ethylenediamine : Combi-Blocks, Cat. AM-1613. 重クロロホルム (CDCl₃), 重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆) : 関東化学. 分光分析用ジメチルスルホキシド : FUJIFILM 和光純薬, Cat. 045-28335. その他, ジクロロメタン, アセトン, 酢酸, 1,4-ジオキサン, テトラヒドロフラン, トルエン, 酢酸エチル, ヘキサン, アセトン, 水酸化カリウム(KOH) はすべて市販特級品を用いた。

B-3) 化合物の合成

特に断りがない限り、全ての試薬は試薬会社から購入したものをそのまま使用した。反応の追跡は薄層クロマトグラフィー (TLC)(60 F254, Merck 社)を使用し、スポットの可視化はハンディ UV ランプ (254/365 nm)(UVP 社)による紫外線照射、およびヨウ素蒸気またはニンヒドリン試液によって行った。カラムクロマトグラフィー用のシリカゲルには、関東化学 60N (球状、中性)、もしくは中圧カラムクロマトグラフィー装置 (Smart Flash)(山善)、および中圧カラムクロマトグラフィー用充填カラム (Hi-Flash column / Inject column (山善)を使用した。 ¹H および ¹³C-NMR スペクトルは NMR 測定用の重水素化溶媒を使用して、ECZ 600 spectrometer (JEOL)にて測定した。化学シフト値 (ppm)はテトラメチルシラン (TMS) (CDCl₃: 0 for ¹H-NMR), もしくは残留溶媒のシグナルを内部標準として補正した (77.0 for ¹³C-NMR; DMSO-*d*₆: 2.50 for ¹H-NMR, 39.5 for ¹³C-NMR)。

シグナルの分裂様式は以下に示す通りである (singlet (s), doublet (d), triplet (t), double of doublets (dd), multiplet (m), broad (br))。高分解能質量分析 (HRMS)は Shimadzu IT-TOF MS (島津)にて、エレクトロスプレーイオン化法にて測定した。

B-3) 化合物の紫外可視吸光スペクトル

得られた化合物については UV スペクトルを取得して、吸収波長を確認した。それぞれの化合物を精密に量りとり、ジメチルスルホキシド (分光分析用)に溶解させて 10 mM の溶液としたものをストック溶液とした。これを段階的に希釈することで 50 μM のジメチルスルホキシド溶液とした。スペクトルの測定には、V-730 (日本分光)を使用し、石英セル (1 x 1 cm) を用いて室温にて測定を行った。

C. 結果及び考察

C-1) 化合物の合成

本研究では、幅広い波長領域に吸収をもつ化合物の合成法として、ビルディングブロックに複数の色素化合物を連結させることをコンセプトとした。ビルディングブロック構造としては、合成が比較的容易で、複数の異なる色素化合物との連結部位を構築可能、かつ溶解性を担保するために化合物 **5** のような構造を選択した。ビルディングブロック部は Scheme 1 に示すルートで合成した。一方で、色素化合物は紫外可視吸光(UV-Vis)スペクトルにおける吸光度の波長域を、官能基の変化で行えるような構造をモデルとして選択することとした。具体的には、マレイミド骨格に2つの芳香環を導入した、ビスアリールマレイミド骨格を有する化合物を用いた (Scheme 2)。ビルディングブロックの合成は、文献記載の方法¹⁾を参考に、部分的に経路を変更して行った。すなわち、2-ブロモエタノールに対してアジ化ナトリウムを作用させることでアジド化合物とし、これを続けてメシル化の反応に供することで化合物 **2** を得た。化合物 **2** を Boc 基で片方のアミノ基

を保護したエチレンジアミン **3** に付加させることでジアジド化合物 **4** を合成した。化合物 **4** のアジド基をシュタウディンガー反応によって還元し、化合物 **5** へと変換した。一方で、色素化合物に関しては、化合物 **6** から Pinnick 酸化によってジカルボン酸を合成し、続いて酸触媒存在下にて塩化アセチルを作用させることで酸無水物とした。この化合物は水分に対して不安定であるため、ベンジルアミンと反応させてイミドとすることで後のカップリング反応条件に耐えうる構造 **8** へと変換した。マレイミド中間体化合物 **8** から、Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応によって、種々の芳香環を導入することでビスアリアルマレイミド骨格を構築した。このマレイミド誘導体をアルカリ加水分解、続く酸処理によって対応する酸無水物へと導くことでビルディングブロックのアミン部位との反応点とした。

C-1-1) ビルディングブロック部の合成

化合物 **2** の合成

2-ブロモエタノール (**1**) (5.0 g, 40.0 mmol) の水溶液 (20 mL) にアジ化ナトリウム (3.9 g, 60.0 mol) を加え、110°Cにて12時間攪拌した。室温に冷却後、反応液に飽和食塩水を加えてジクロロメタンで抽出した (40 mL x 3)。合わせた有機層を水、次いで飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた化合物 (1.72 g, 淡黄色液体) はこれ以上精製せずに次の反応に用いた。得られた粗生成物 (1.7 g, as 19 mmol) とトリエチルアミン (5.44 mL, 39.0 mmol) のジクロロメタン溶液 (14 mL) に、メタンスルホニルクロリド (1.66 mL, 21.5 mmol) のジクロロメタン溶液 (5 mL) を0°Cにて滴下した。そのままの温度にて1時間攪拌後、反応液をジクロロメタン (10 mL) にて希釈し、1M 塩酸次いで飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた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 1 : 3) することで、化合物 **2** を 59% (2.56 g) の収率で得た。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4.36 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.60 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.09 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 67.4, 49.8, 37.8.

化合物 **4** の合成

N-Boc-ethylenediamine (**3**) (0.9 g, 5.0 mmol) と *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (2.14 mL, 12.0 mmol) のアセトニトリル溶液 (20 mL) に化合物 **2** (1.98 g, 12.0 mmol) を加えて80°Cにて48時間攪拌した。室温に冷却後、反応液を減圧濃縮し、得られた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 3 : 1) することで、化合物 **4** を 92% (1.38 g) の収率で得た。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 5.06 (br, 1H), 3.34 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.22-3.19 (m, 2H), 2.74 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.65 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 1.45 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 156.1, 79.2, 54.1, 53.8, 49.6, 38.5, 28.4.

化合物 **5** の合成

化合物 **4** (68 mg, 0.23 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (1.0 mL) にトリフェニルホスフィン (63 mg, 0.24 mmol) を加えた後、水 (0.1 mL) を加えた。室温にて48時間攪拌した後、反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を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 = 19 : 1 to 3 : 1) することで、化合物 **5** を 43% (27 mg) の収率で得た。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 5.39 (br, 1H), 3.19 (br, 2H), 2.76 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.56 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.53 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 1.44 (s, 9H).

C-1-2) 色素化合物の合成

化合物 **8** の合成

ムコブROM酸 (**6**) (4.64 g, 18.0 mmol) と 2-メチル-2-ブテン (9.5 mL, 90.0 mmol) のアセトン溶液 (73 mL) に亜塩素酸ナトリウム (80%) (3.9 g, 60.0 mol) のりん酸二水素ナトリウム (13.5 g, 72.0 mol) 水溶液 (73 mL) を0°Cにて滴下した。反応液を室温にて3時間攪拌した後、0°Cにて10%塩酸 (73 mL) を加えてジ

エチルエーテルで抽出した (150 mL x 4). 合わせた有機層を水, 次いで飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を減圧濃縮した. 得られた粗生成物 **7** (6.2 g) はこれ以上精製せずに次の反応に用いた.

化合物 **7** (3.5 g, as 9 mmol) に塩化アセチル (6.8 mL, 90 mmol), 次いで硫酸をパスツールピペットで一滴加えた. 室温で 1.5 時間攪拌した後, 反応液を減圧濃縮した後, 残渣に対してトルエンで共沸を行った (10 mL x 2). 得られた粗生成物はこれ以上精製せずに次の反応に用いた. 上記の粗生成物を酢酸 (18 mL) に溶解させ, ベンジルアミン (1.18 mL, 10.8 mmol) を加えた後, 110°C にて 3 時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 減圧濃縮し, 得られた残渣を酢酸エチルに溶解させ, 水で洗浄した. 有機層を 2M 塩酸, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を減圧濃縮した. 得られた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 1 : 3) することで, 化合物 **8** を 46% (1.44 g) の収率で得た. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.36 (m, 2H), 7.35-7.30 (m, 3H), 4.75 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 163.7, 135.3, 129.6, 129.0, 128.9, 128.5, 43.4.

化合物 **9** の合成²⁾

化合物 **8** (137 mg, 0.40 mmol), 4-メトキシフェニルボロン酸 (182 mg, 1.2 mmol), ビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) ジクロリド (58 mg, 0.10 mmol), フッ化セシウム (365 mg, 2.4 mmol) の 1,4-ジオキサン (4 mL) /水 (1 mL) 溶液を 110°C にて 12 時間攪拌した. 室温に冷却後, 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で順次洗浄後, 溶液硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を減圧濃縮した. 得られた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 3 : 1) することで, 化合物 **9** を 79% (126 mg) の収率で得た.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.47 (d, $J=9.0$ Hz,

4H), 7.45 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.33 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.29-7.26 (m, 1H), 6.86 (d, $J=9.0$ Hz, 4H), 7.35-7.30 (m, 3H), 4.78 (s, 2H), 3.82 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 171.1, 160.8, 136.8, 134.2, 131.6, 128.9, 128.8, 127.9, 121.4, 114.2, 55.4, 42.0.

化合物 **11** の合成

化合物 **9** (63 mg, 0.16 mmol) のエタノール溶液 (1.5 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (1 mL) を加え, 60°C にて 2 時間攪拌した. 0°C に冷却後, 反応液に 10% 塩酸を加えて酸性とした (pH ~2). 生じた沈殿をろ取して, 水で洗浄, 真空乾燥することで黄色固体 (45 mg) を得た.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.30-7.28 (m, 4H), 6.95 (d, $J=9.0$ Hz, 4H), 3.68 (s, 6H).

化合物 **10** の合成³⁾

化合物 **8** (345 mg, 1.0 mmol), 2-ナフタレンボロン酸 (413 mg, 2.4 mmol), ビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) ジクロリド (35 mg, 0.05 mmol), フッ化セシウム (810 mg, 4.8 mmol), テトラブチルアンモニウムクロリド (28 mg, 0.1 mmol) のトルエン (6.7 mL) /水 (3.3 mL) 溶液を 80°C にて 12 時間攪拌した. 室温に冷却後, 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水で洗浄した. 有機層を 2M 塩酸, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を減圧濃縮した. 得られた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 = 10 : 0 to 8 : 2) することで, 化合物 **10** を 97% (0.43 g) の収率で得た.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (s, 2H), 7.83 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.54-7.48 (m, 6H), 7.38-7.35 (m, 4H), 7.31 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 4.88 (s, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 170.7, 136.6, 136.0, 133.8, 133.2, 130.9, 129.1, 129.0, 128.9, 128.2, 128.1, 127.8, 127.6, 126.7, 126.5, 126.2, 42.3.

化合物 12 の合成

化合物 10 (320 mg, 0.7 mmol) のエタノール溶液 (7.5 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (5 mL) を加え、60°C にて 5 時間攪拌した。0°C に冷却後、反応液に 10% 塩酸を加えて酸性とした (pH ~2)。生じた沈殿をろ取して、水で洗浄、真空乾燥することで淡黄色固体 (250 mg) を得た。

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.74-7.72 (m, 3H), 7.67-7.66 (m, 3H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.43-7.36 (m, 6H).

C-2) 化合物の紫外可視吸光スペクトル測定

合成したビスアリアル酸無水物のジメチルスルホキシド中の紫外可視吸光スペクトルを取得したところ、化合物に導入した芳香環、および芳香環上の置換基によってスペクトルが異なることが分かった (Figure 2)。当初、フェニル基の共役系を拡大したものとしてナフチル基を導入した化合物 12 は、より長波長域に吸収を示すことを期待していた (Figure 2, B)。しかしながら、化合物 12 は特定の波長における吸光度は増加したものの、共役系の拡大による紫外可視吸光スペクトルにおける吸収の長波長化は確認されなかった。この結果から、ビスアリアル化合物は、芳香環の共役系を単純に拡大することによって吸収スペクトルの長波長化が可能と示唆された。一方で、化合物 11 はフェニル基の 4 位にメトキシ基を導入することによって、強度は弱いものの、スペクトルにおける吸収の長波長化が確認された (Figure 2, C)。このことから、今回合成したビスアリアル化合物は芳香環上への適切な置換基の導入によって吸収波長域を調節できることが予想される。化合物 11 においてフェニル基に導入したメトキシ基は電子供与性基であり、この官能基の導入により、フェニル基のみが導入された化合物と比較して長波長域に吸収を示したことから、水酸基など他の電子供与基を利用することでスペクトルの長波長化や水溶性の改善などが期待される。

D. 結論

HPLC を用いた定量分析法において、PDA 検出器の装置間での校正に利用可能な化合物の開発を目的として検討を行った。本研究では、幅広い領域に UV 吸収を有する化合物の合成法として、ビルディングブロックとなる構造に、異なる複数の化合物を連結する分子設計を用いた。化合物を連結するビルディングブロック部としては、合成の簡便さ、溶解性などの物性を考慮して、第 3 級アミン構造を含むものを設計・合成した。ビルディングブロックに連結する化合物としては、結晶性などの物性や置換基効果による吸収スペクトル変化などを期待してビスアリアルマレイミド誘導体を選択した。ビスアリアル化合物は導入する官能基によって紫外可視吸光スペクトルにおける吸収波長が変化することが分かった。今後、この性質を利用して幅広い波長域に吸収を示す色素分子を探索し、さらにそれらを複数個、ビルディングブロックに導入することで、より幅広い波長域をカバーできるような分子の創出について引き続き検討を行う。RMS を用いた定量法に利用する内標準物質の条件として、安価、高純度、純度既知、安定、入手しやすいものであること、測定対象の化合物と物理的な特性 (極性、極大吸収波長等) が類似し、HPLC で試料中の夾雑物及び測定対象の化合物と分離すること、等が挙げられる。今回実施した化合物の設計・合成についてさらに検討することで、これらの条件を満たすことも検討する必要がある。低分子化合物の UV 吸収は、波長や強度においてある程度の加算性が成り立つこと、また官能基の変更によって溶解性などの物性を調整可能であることから、本研究における設計コンセプトは、任意の波長域に吸収を有する化合物の分子設計に適用可能と考えられる。

E. 参考文献

- 1) Defaye J, Balbuena P, Benito M J, Diaz A M, Di C G, Garcia J F, Geze A, Gomez M G,

- Ortiz C M, Vierling P, Wouessidjewe D: Preparation of nanosphere amphiphilic cyclodextrin derivatives as biological transporters, PCT Int. Appl., 2008009831, 24 Jan 2008.
- 2) Shorunova S V, Krayushkina M M, Stoyanovicha F M, Irie M: A Convenient synthesis of 3,4-diaryl(hetaryl)-substituted maleimides and maleic anhydrides. Russ. J. Org. Chem., **2006**; *42*:1490-1497.
- 3) Doi I, Tsuji G, Kawakami K, Nakagawa O, Taniguchi Y, Sasaki S: The spermine-bisaryl conjugate as a potent inducer of B- to Z-DNA

transition. Chem. Eur. J., **2010**; *16*:11993-11999.

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
2-1. 論文
なし

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

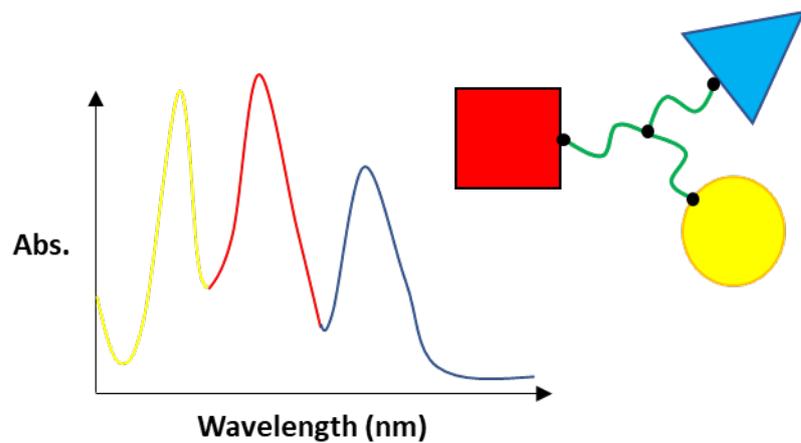


Figure 1. Conceptual structure as PDA standards in this study.

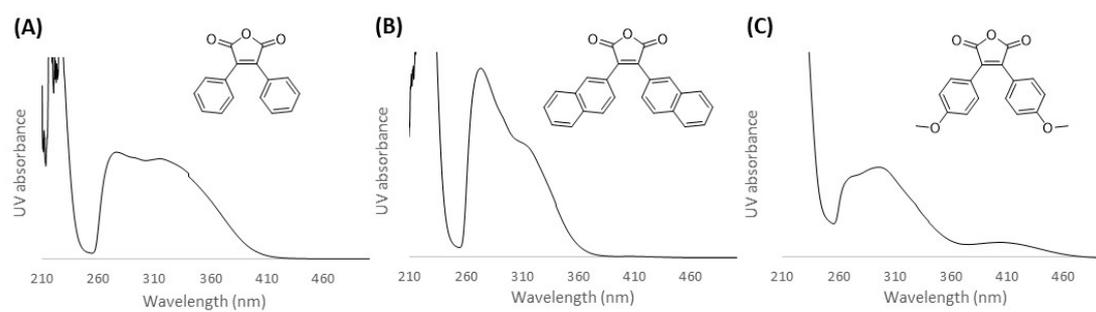
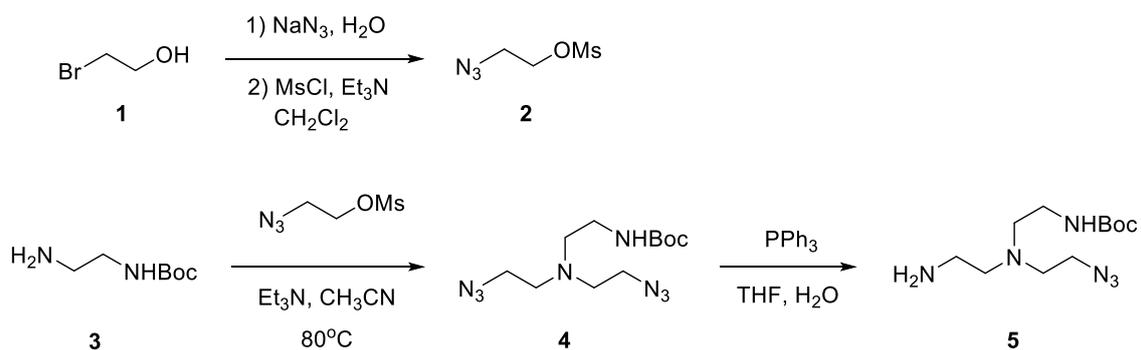
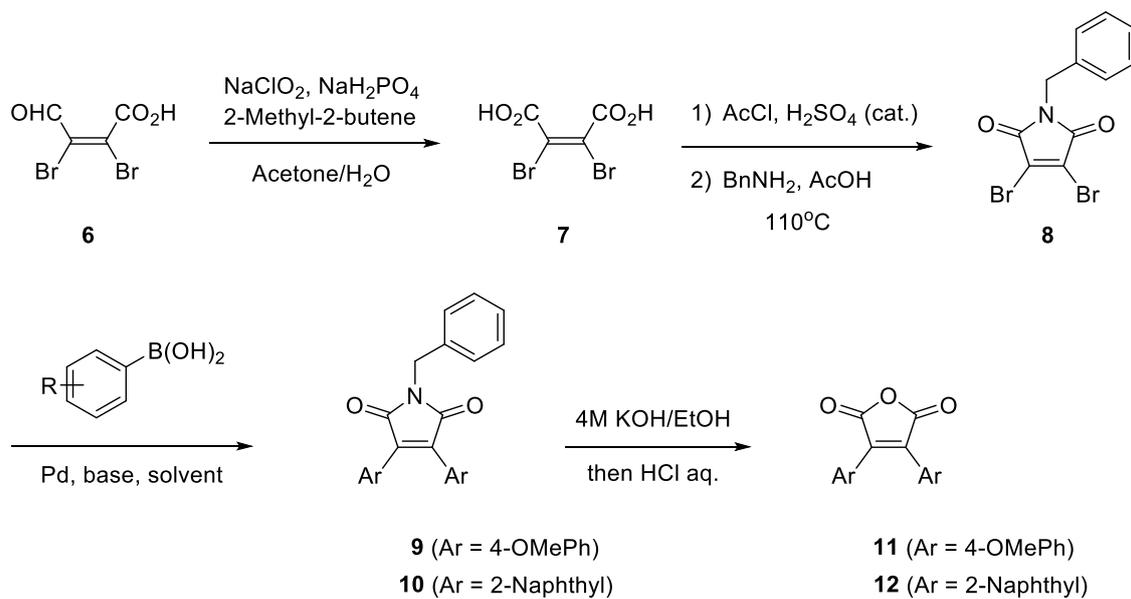


Figure. 2 UV-Vis spectra of bis-aryl maleic anhydride derivatives (50 μ M in DMSO); (A) Bisphenyl, (B) Bis(2-naphthyl), and (C) Bis(4-Methoxyphenyl).



Scheme 1. Synthetic route of a building block 5.



Scheme 2. Synthetic route of bis-aryl compounds.

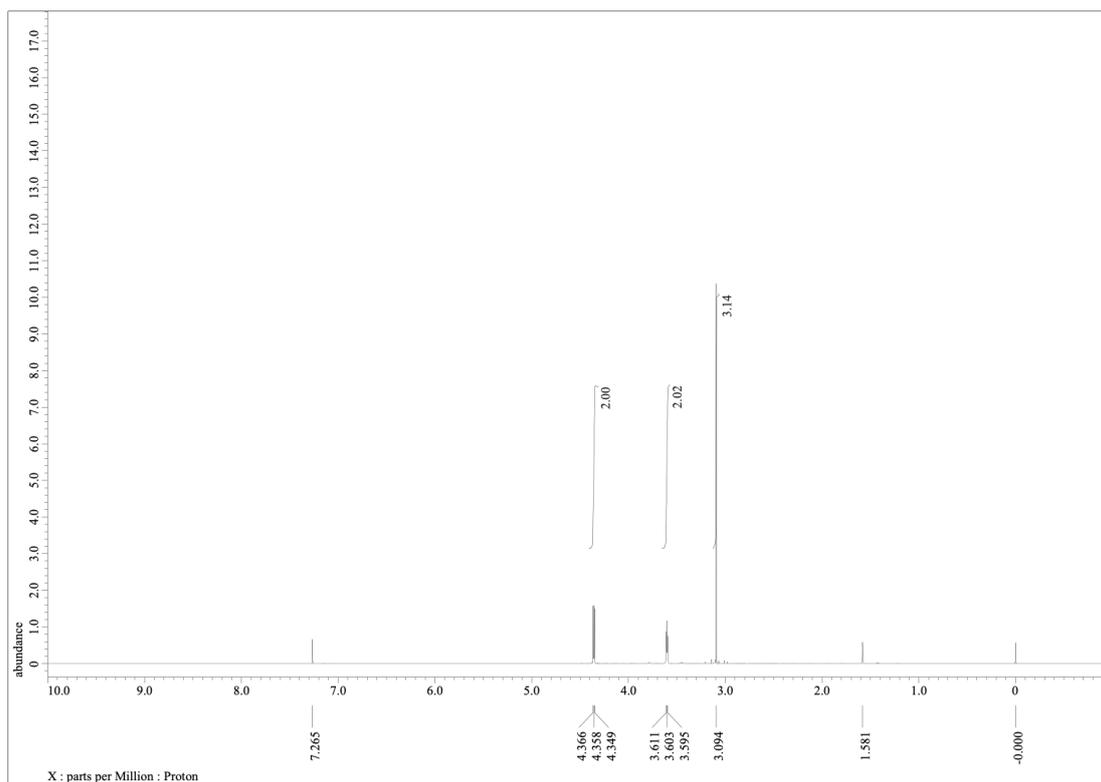


Fig. 3 ¹H NMR spectrum of compound 2 in CDCl₃.

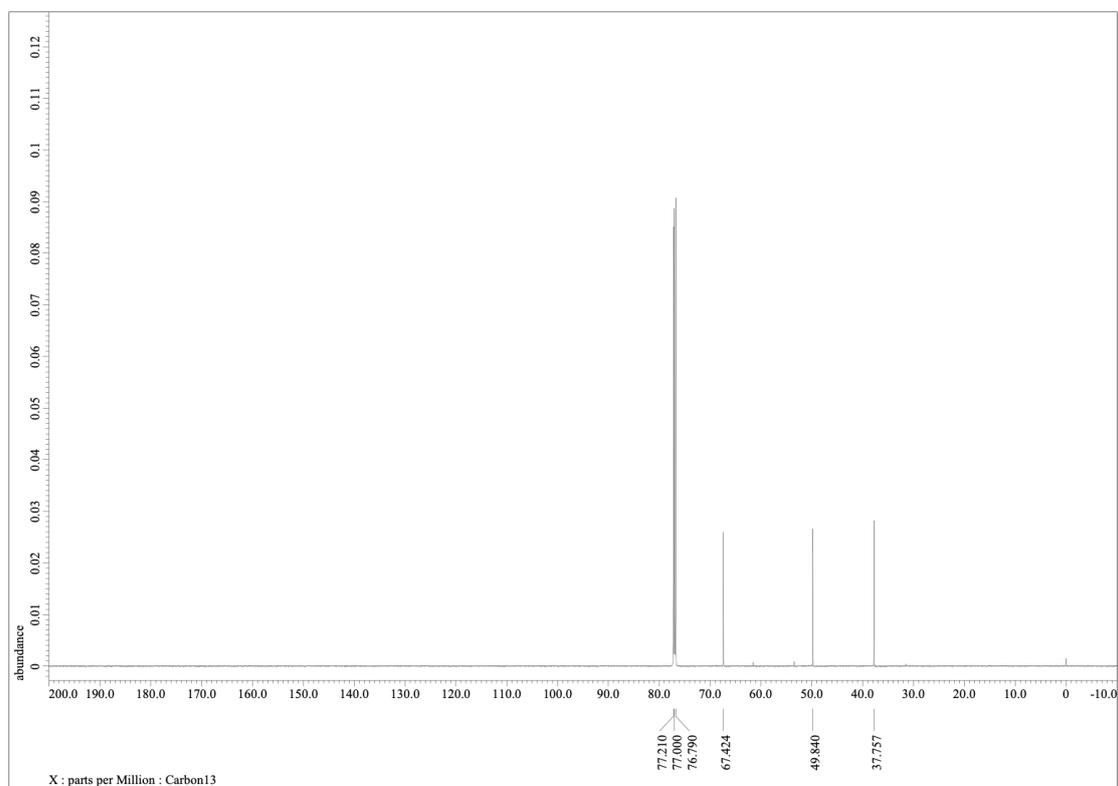


Fig. 4 ¹³C NMR spectrum of compound 2 in CDCl₃.

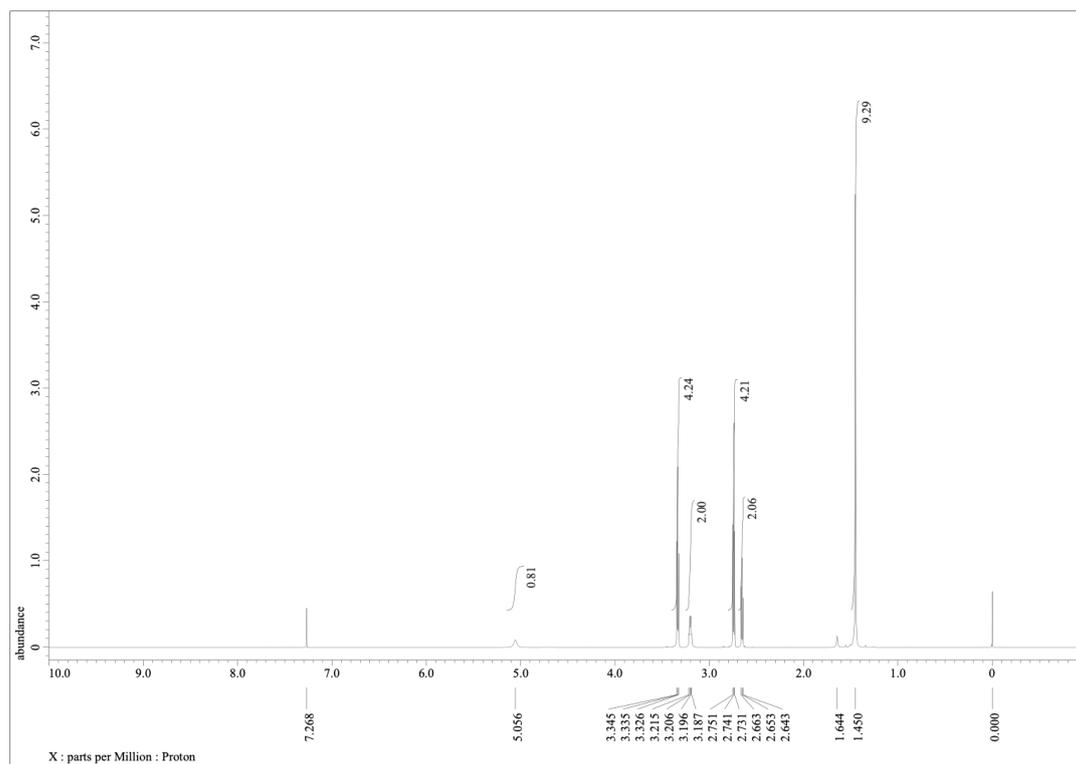


Fig. 5 ^1H NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

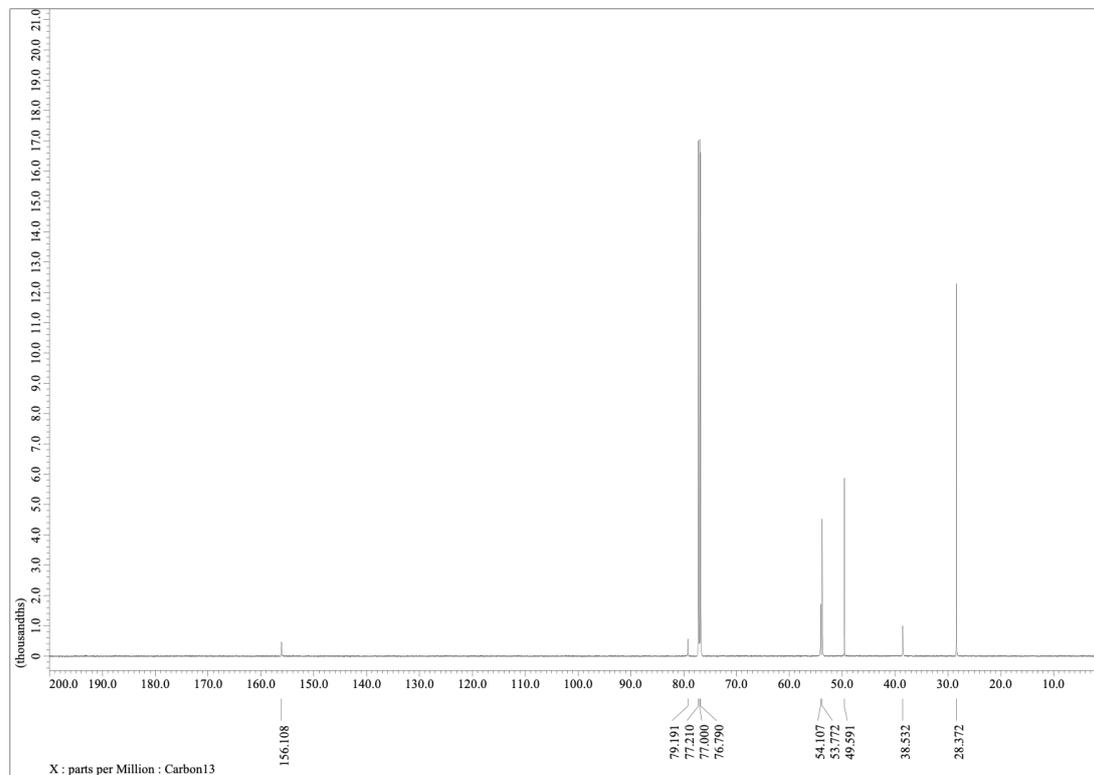


Fig. 6 ^{13}C NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3 .

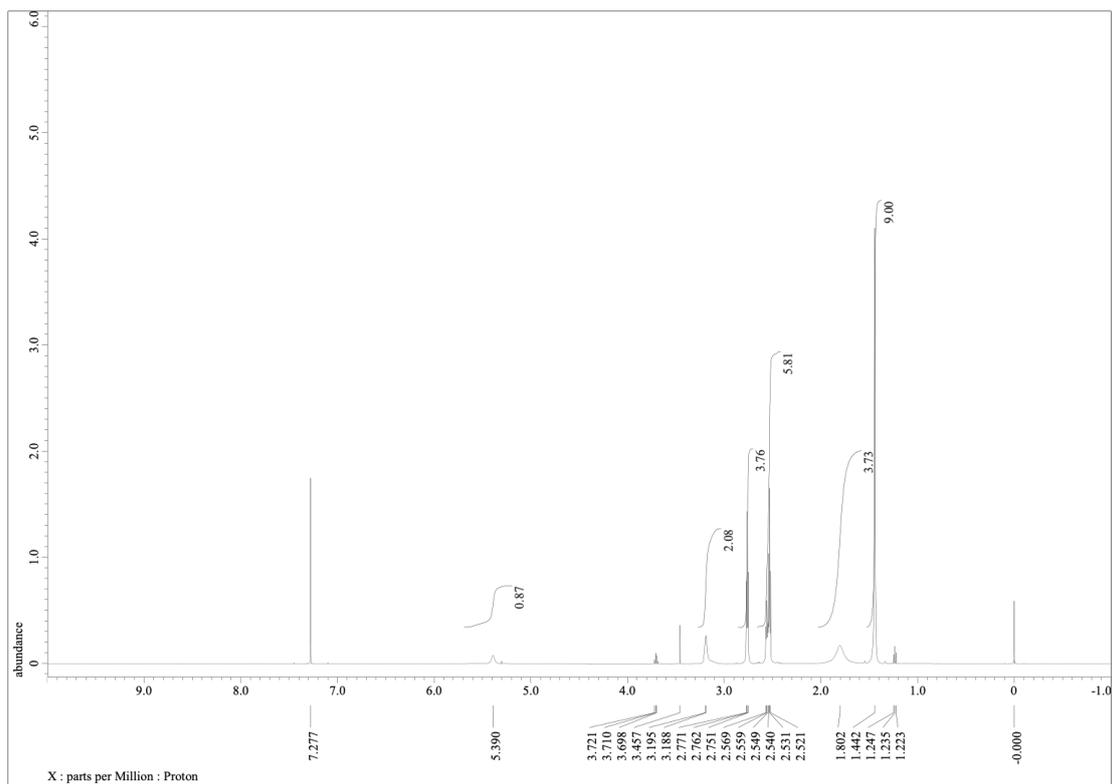


Fig. 7 ^1H NMR spectrum of compound **5** in CDCl_3 .

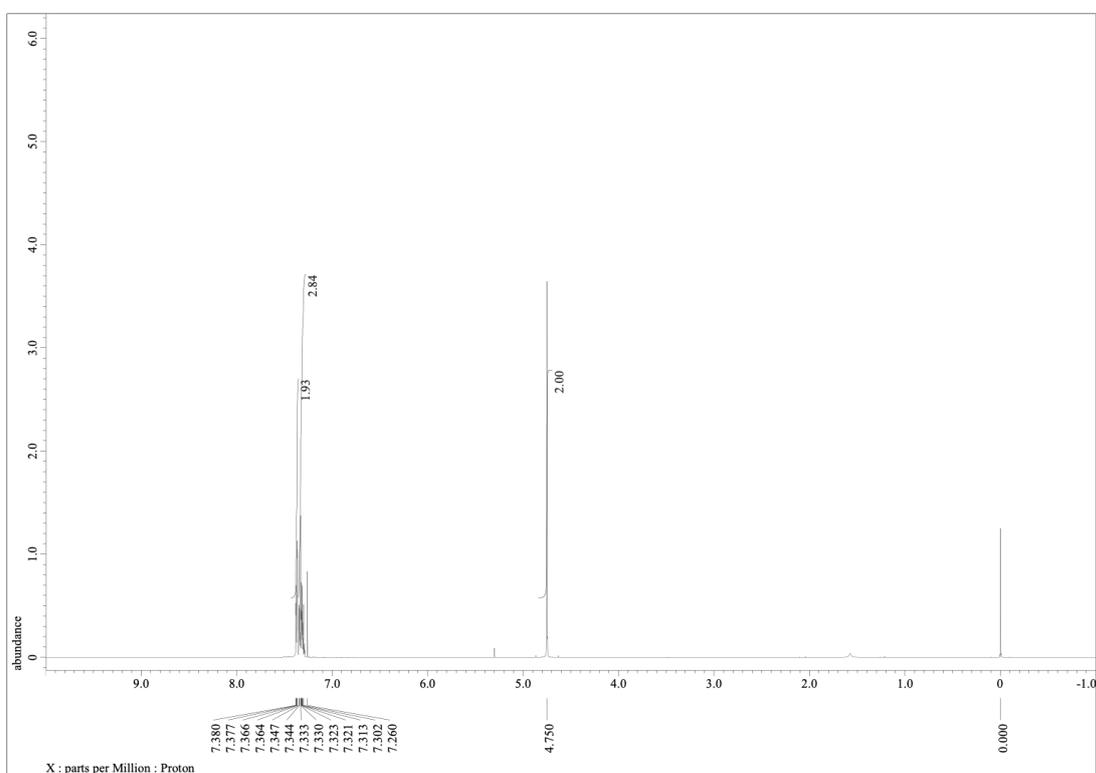


Fig. 8 ^1H NMR spectrum of compound **8** in CDCl_3 .

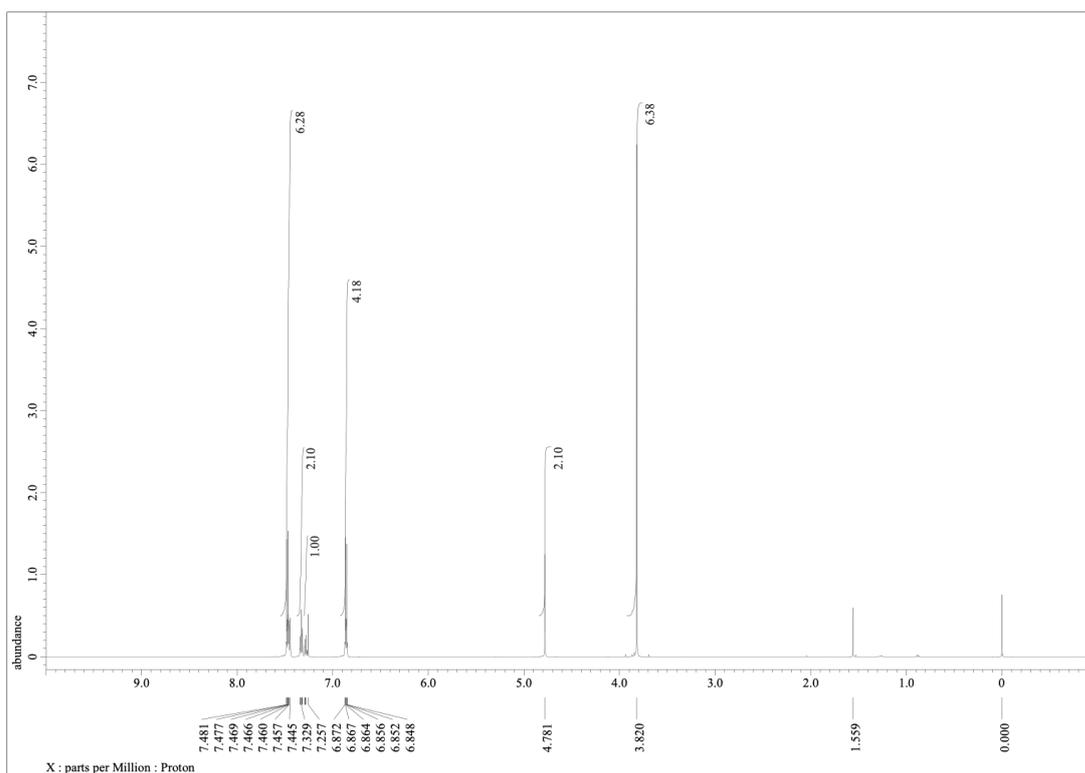


Fig. 9 ¹H NMR spectrum of compound 9 in CDCl₃.

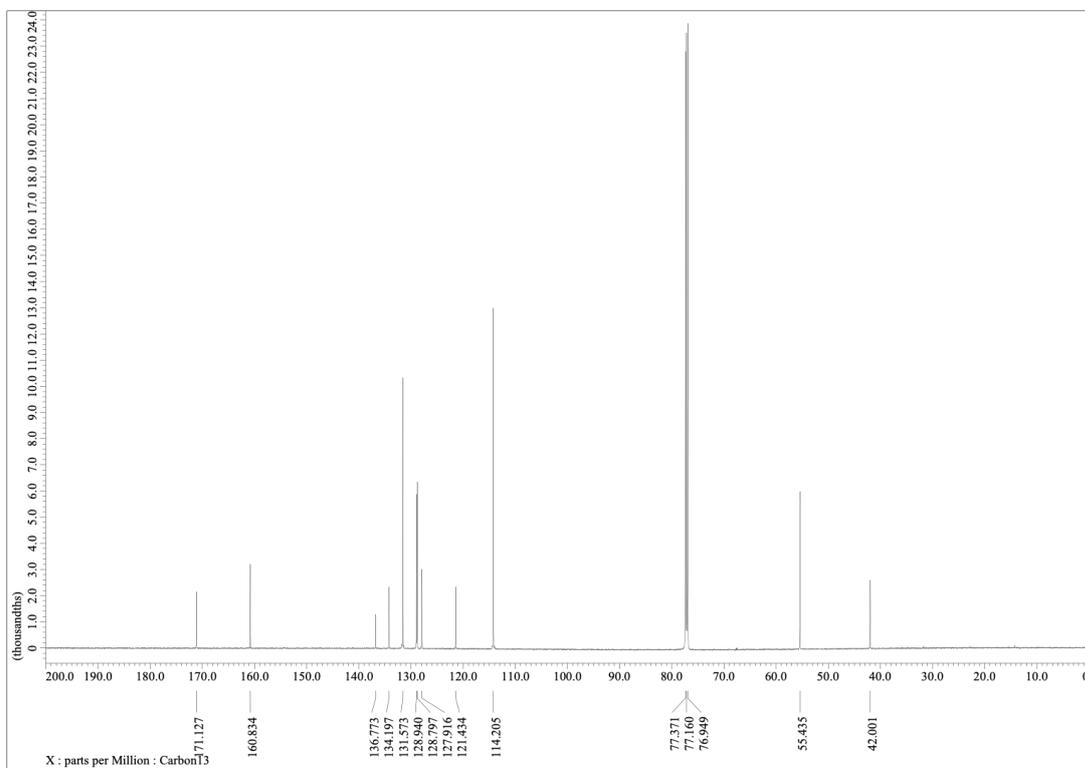


Fig. 10 ¹³C NMR spectrum of compound 9 in CDCl₃

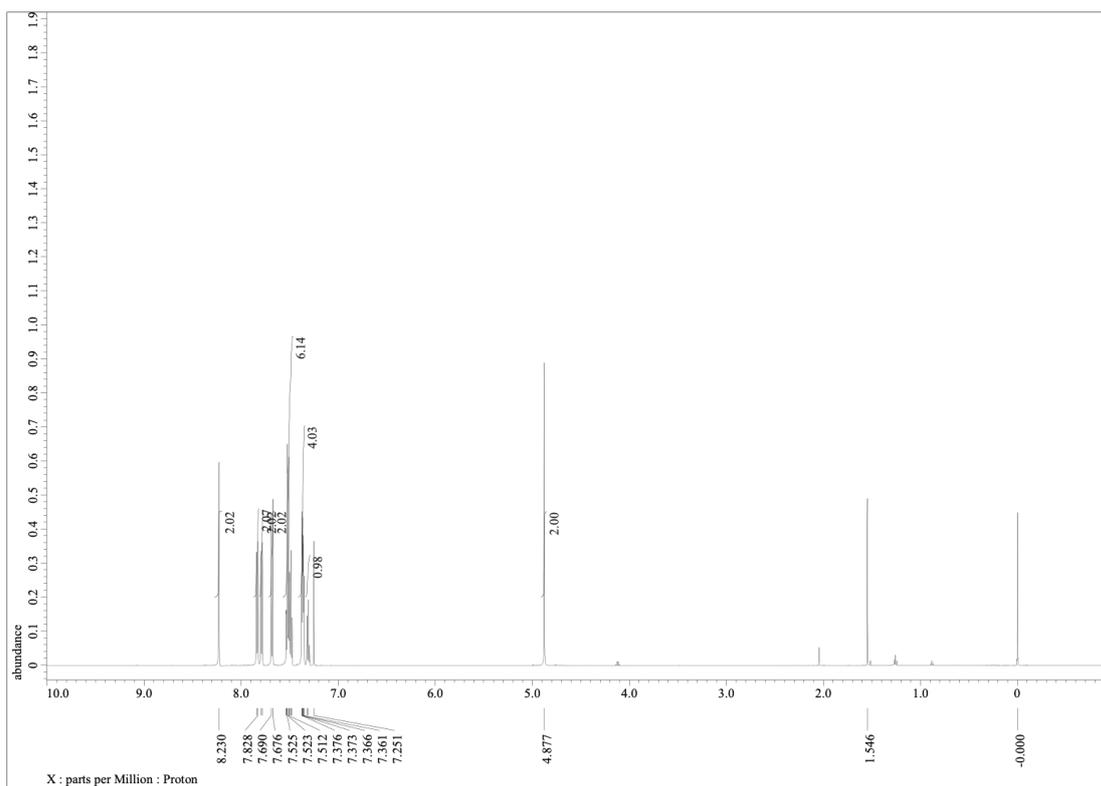


Fig. 11 ^1H NMR spectrum of compound **10** in CDCl_3 .

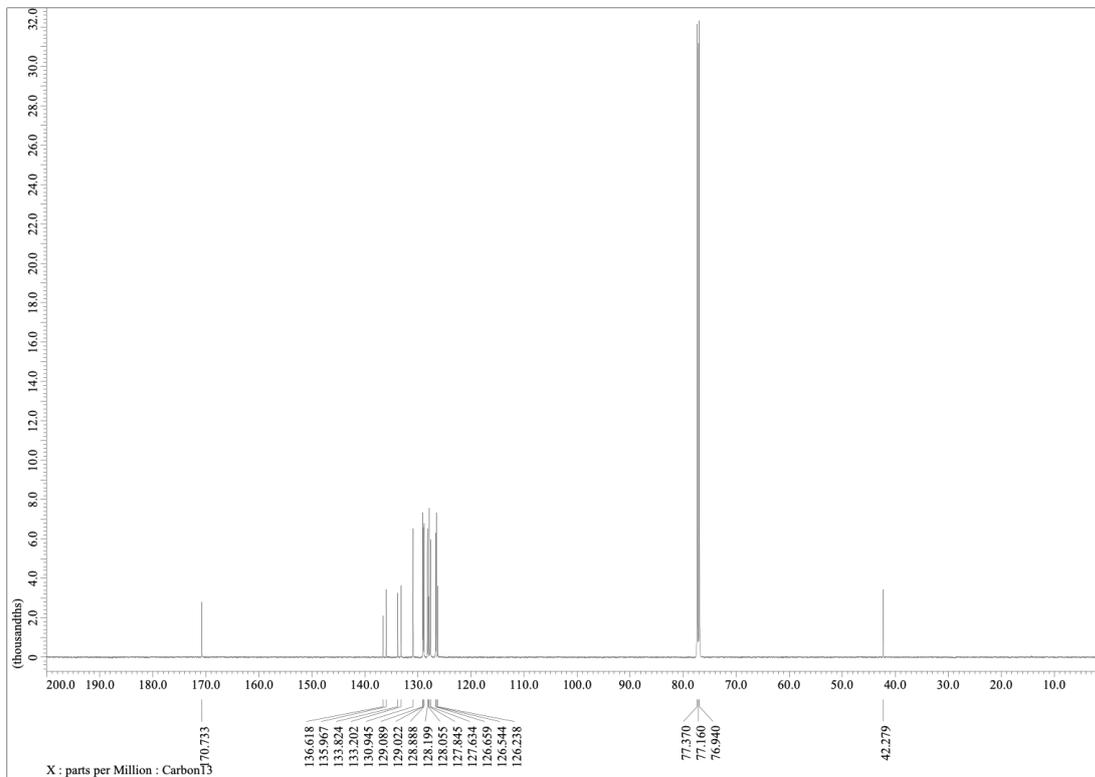


Fig. 12 ^{13}C NMR spectrum of compound **10** in CDCl_3 .

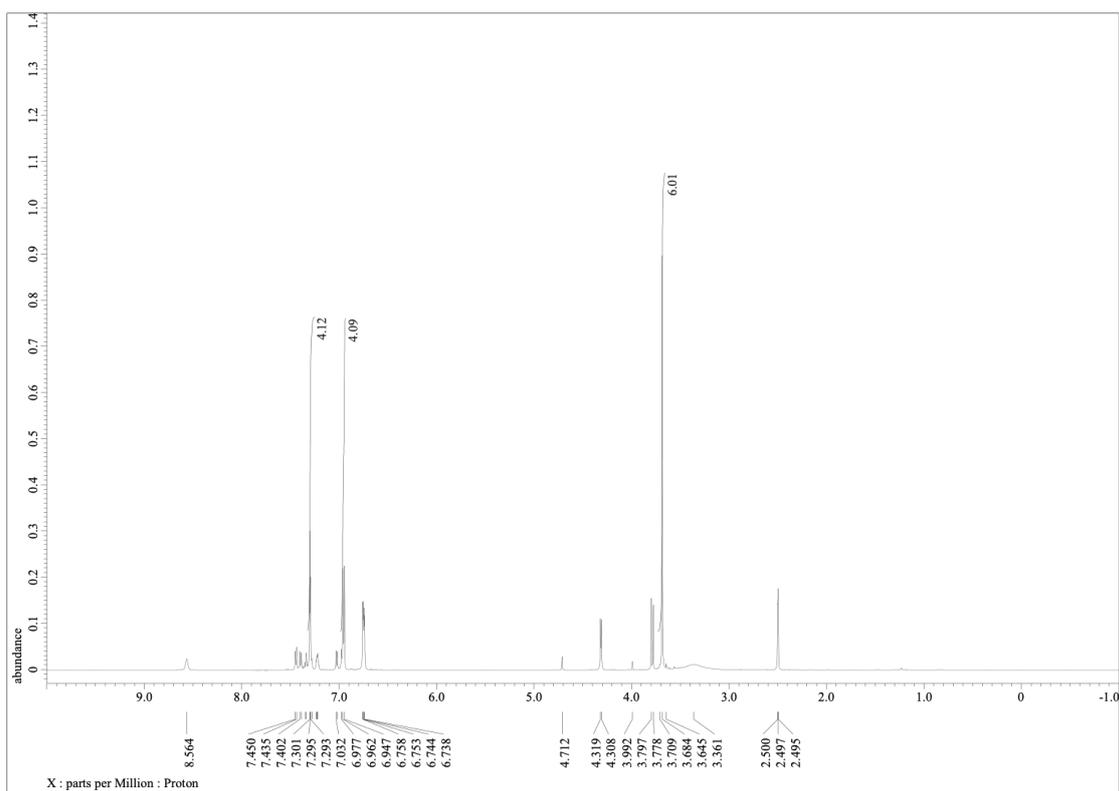


Fig. 13 ^1H NMR spectrum of compound **11** in $\text{DMSO-}d_6$.

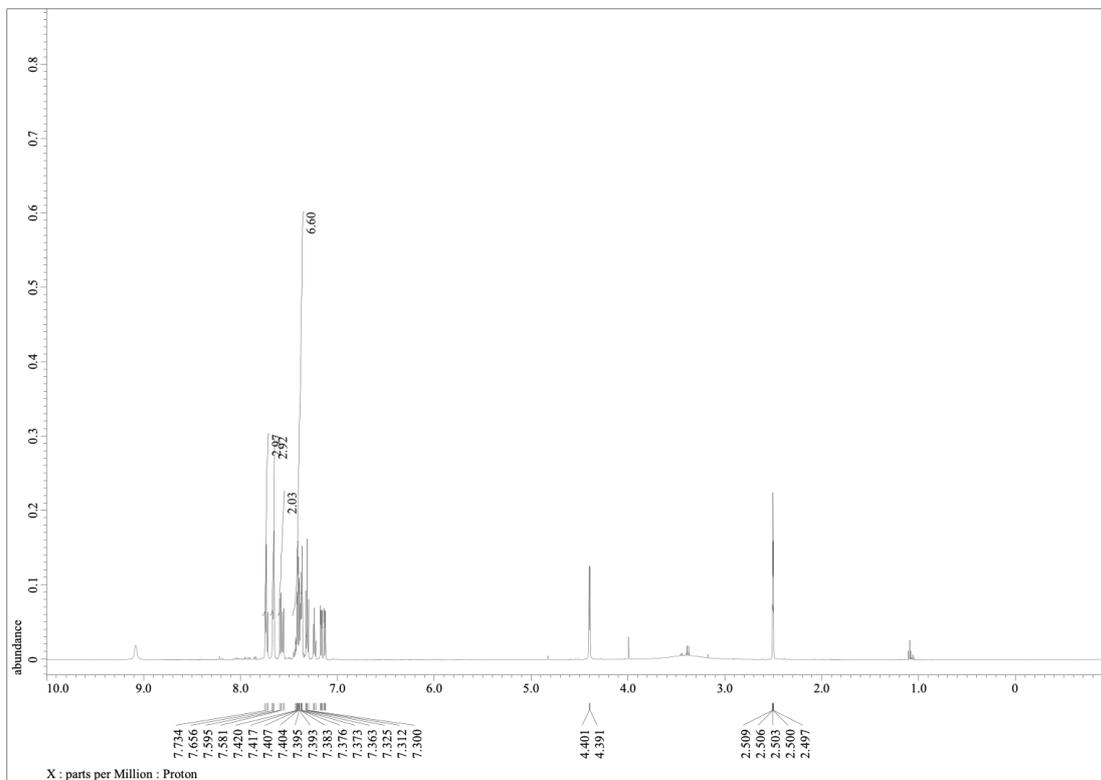


Fig. 14 ^1H NMR spectrum of compound **12** in $\text{DMSO-}d_6$.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度研究分担報告書

試験法及び分析法の開発

～真菌基原の添加物の分析法の開発～

研究分担者 渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

研究要旨 微生物由来基原の品目の同定精度の向上を目的としタンパクアミノ配列を指標とした分子生物学的手法を応用した試験法に関する検討を行った。過去の研究成果から、既存食品添加物酵素の MS スペクトルから予測したアミノ酸配列の Mascot search において、製品情報における基原として明確に菌種同定できなかった添加物が存在した。そこで、本年度は、その原因の解明を試みた。明確な同定結果が得られなかった場合の理由として、データベースに基原となった真菌種のアミノ酸配列の登録がなかった、データベースに登録されている真菌の種名において多様なシノニムが併用されていて解釈が難しかった、またはデータベース登録配列と比較してアミノ酸配列に変異が生じていたため相同なタンパクであることの判断が困難だった、以上が起こっていたことを確認した。これらを解消する措置として、添加物基原として使用される真菌種のシノニムを整理して照合しなおす、MALDI-TOF-MS で MS スペクトルを得る前に SDS-PAGE を行い、メジャーなバンドが複数現れた場合にはバンドを単離してから個々に分析を行うといった作業を行うことで、確度の高い同定結果が得られることを確認した。

研究協力者

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 主任研究員
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 室長
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
大波純一 国立情報研究所
オープンサイエンス基盤研究センター
特任准教授
中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 短時間非常勤職員
船江元子 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 短時間非常勤職員
久保 文 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 実験補助員

A. 研究目的

既存添加物製品において、既存添加物名簿収

載品目リストには、添加物の基原、製法、本質が記載されている。既存添加物酵素は、細菌、放線菌、真菌などの微生物を基原とするものが多い。既存添加物酵素の基原は一つの微生物種に規定されておらず、異なる種に由来する製品であっても、酵素活性が同じであれば同一の品目とみなされる。また、微生物の中には二次代謝産物としてヒトへ危害性を有する物質を産生するものがある。したがって、酵素の流通製品から基原を調査する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うえで重要な検討項目であるが、その一方で、既存添加物の流通製品を分析すると、基原の判断が難しい品目は多いことが知られている。そこで、微生物由来基原の品目の同定法の構築を目的とし、タンパク質アミノ配列を指標とした分子生物学的手法を応用した試験法に関する検討を行う。

過去の研究成果から¹⁾、既存食品添加物酵素

の LC-TOF-MS 分析でアミノ酸配列を推定し Mascot サーチで基原の菌種を検索すると、①確からしい検索結果が得られたが製品付帯情報による基原菌種と一致しなかった、②いずれの菌種もヒットせず同定できなかった、③SDS-PAGE でのバンドパターンが複雑となり Mascot サーチの結果の解釈が難しかった、といった結果となった添加物が存在したことを確認した。

①が発生した原因は、データベース登録菌種名の分類学上の混乱と考えた。製品情報から得られた基原菌種と、Mascot サーチによって得られた菌種名は実は一致していたにも関わらず、そのことが認識できなかった可能性がある。真菌は、生物学的に1菌種であっても、二重命名法（生物学的に同一の菌種が有性世代と無性世代で異なる菌名を持つ）や分類の過度な細分化によって、シノニムを複数持つ菌種が多数存在する。特に、多くの既存添加物の基原となっている *Aspergillus niger* および *Aspergillus oryzae* 等の *Aspergillus* 属菌では、この傾向が強いことが広く知られている。添加物基原真菌種について、シノニムを整理して同一であることが明確となるように、データベース登録情報を整理する必要がある。②が発生した原因は、データベースに登録された配列の不足と考えた。その添加物製品の基原菌種や、これと近縁でアミノ酸配列の相同性が高い菌種の配列がデータベースにまったく登録されておらず、いずれの配列ともある程度の相同性が得られず同定できなかった可能性がある。同定精度は使用するデータベースに大きく依存することから、データベースを整備し登録情報の学術的な正確性を向上させ、登録情報を厚くする必要があると考えられる。③が発生した原因は、分解や化学的変性や、製造工程に含まれる別タンパクの添加、コンタミネーションなどにより複数種類のタンパク質が含まれた状態であったと考えた。今後、既存添加物の、精度の高い基原同定手法を開発するために、昨年度アミノ酸配列の解析による同定が困難だった添加物をモデルケースとしてその原因解明を行うことによって、有用な情報が得られると考えられる。

本年度は、アミノ酸配列データベースの改良点の抽出、および SDS-PAGE によって得た複数分子量のバンドについて MS スペクトルからの予測によって得たアミノ酸配列比較解析を行うことによって、同定が困難だった場合の原因解明、および結果の改善効果についての検証を行った。

B. 研究方法

B-1) 分析機器

既存添加物の質量分析には、MALDI TOF-MS (Spiral TOF-plus JMS-S3000; 日本電子株式会社) を使用した。

B-2) 試料

研究対象とした既存添加物試料には、過去の研究¹⁾において分析した添加物酵素6種 (α -ミラーゼ試料 No.1 < B613 > および No.2 < B614 > , β -ガラクトシダーゼ No.14 < B654 > および No.16 < B656 > , グルコアミラーゼ No.18 < B573 > および No.19 < B662 >) を用いた。なお、< 内は国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号を示す。

B-3) 質量分析用検体の調製

各試料は精製水に以下の濃度となるよう溶解した。No.1 : 20 mg/mL, No.2 : 5 mg/mL, No.14 : 10 mg/mL, No.16 : 4 mg/mL, No.18 : 2 mg/mL, No.19 : 0.5 mg/mL, No.28 : 3 mg/mL。それぞれ等量の $2 \times$ laemmli sample buffer (Bio-Rad 社) と混合後、20 μ L を SDS-PAGE に供した。CBB 染色像を Figure 1 に示した。SDS-PAGE 像において複数分子量のバンドが確認された場合、それらの MS スペクトルを個別に取得して解析をより詳細に行うため、CBB 染色後、ゲルからバンドを切り出し、約 1 mm 立方に細かく切り刻み、1.5 mL 容のマイクロチューブに入れた。チューブに脱色液 (50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 150 μ L を加え、10 分間振盪 (1000 rpm) 後、溶液を除去した。同じ操作をもう 1 回繰り返した。アセトニトリル 100 μ L を加え、10 分間インキュベートした。ア

セトニトリルを除去後、減圧容器を用いて乾燥させた。還元用バッファー（10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液）100 μ L を加え、56°C で 45 分振盪（1000 rpm）した。溶液を除去後、アルキル化用バッファー（55 mM ヨードアセトアミドを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液）100 μ L を加え、暗所下で 30 分間振盪（1000 rpm）した。溶液を除去後、チューブに脱色液（50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液）150 μ L を加え、10 分間振盪（1000 rpm）後、溶液を除去した。同じ操作をもう 1 回繰り返した。アセトニトリル 100 μ L を加え、10 分間インキュベートした。アセトニトリルを除去後、減圧容器を用いて乾燥させた。トリプシン溶液（Sequencing Grade Modified Trypsin; Promega 社）10 μ g/mL を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液）20 μ L を加え、37°C 一晩インキュベートした。0.1% TFA を 100 μ L 加え、15 分間インキュベート後に上清を回収した。同様の操作を合計 3 回行い、全ての上清をまとめて、窒素気流で 20 μ L 程度まで濃縮した。0.1% トリフロオロ酢酸を含む 50% アセトニトリル水溶液、続いて 0.1% トリフロオロ酢酸水溶液で平衡化した ZipTip 0.2 μ L-C18（ミリポア社製）にトリプシン消化産物を吸着させ、0.1% トリフロオロ酢酸水溶液で洗浄後、0.1% トリフロオロ酢酸と 10 mg/mL のマトリクスを含む 50% アセトニトリル水溶液で MALDI-TOF MS のサンプルプレート上に直接溶出した。試料 No.1, 2, 18, および 19 では α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸（富士フィルム和光純薬社）を、試料 No.14 及び 16 では 4-クロロ- α -シアノケイ皮酸（シグマアルドリッチ社）をマトリクスとして用いた。完全に乾燥させた後、MALDI-TOF MS（SpiralTOF-plus; 日本電社）を用いてスパイラルモードでマススペクトルを測定した。キャリブレーションには、ProteoMass Peptide MALDI-MS Calibration Kit（シグマアルドリッチ社）を用いた。

タンパク質の同定は、Matrix Science のウェブ上のプログラム Mascot Search Peptide Mass Fingerprint を用いて行った。主要なペプチドの

質量を入力し、検索条件は以下のように設定した；Database : Swiss-Prot, Taxonomy : Other Fungi, Enzyme : Trypsin, Allow up to : 1, Fixed modification : Carbamidomethyl(C), Peptide tolerance : 0.5Da, Mass values: MH⁺。

B-4) アミノ酸配列データベースの改良に資するデータ収集

既存添加物の基原として広く用いられる真菌種のうち、分類が細分化傾向にあり分類体系に混乱がある群として、*A. niger*, *Aspergillus luchuensis* および *Trichoderma longibrachiatum* を選択し、分類体系の変遷を調査して、シノニム等についての情報を収集した。

C. 結果及び考察

C-1) MALDI/TOF-MS による予測アミノ酸配列を指標とした基原同定

製品の MALDI-TOF/MS スペクトルから予測したアミノ酸配列を指標として基原を検索した。Figure 1 に各試料の SDS-PAGE 像、Figure 2 ~10 に、各試料由来のペプチドの MALDI-TOF/MS スペクトル、Table 1 に各試料の由来、SDS-PAGE 像から推定した分子量、および MALDI-TOF/MS による同定結果（タンパク質名、生物種、質量、Coverage）を示した。

試料 1；本試料の基原は、製品の付帯情報によると *Aspergillus foetidus* の α -アミラーゼである。SDS-PAGE 像において、異なる分子量を持つ 2 種のバンドが確認された（Figure 1）。それぞれの MS スペクトルを取得し Mascot Search したところ、低分子量のバンドは、トップヒットは *A. oryzae* および *Aspergillus shirousami*、続いて高い確度で *Aspergillus awamori* もヒットした（Table 1）。*A. foetidus* は焼酎やプーアル茶などの発酵食品を製造するための発酵菌としても広く用いられ、シノニムが多く存在する。近年、混乱した分類体系を分子系統分類学的知見から細分類する試みが複数の研究グループによってなされ、現在は *A. awamori*, *Aspergillus acidus*, *A. foetidus*, *Aspergillus kawachii*, *A. shirousami* など多数の菌名は *A. luchuensis* のシ

ノニムとして認識され、1 菌種にまとめるという分類体系が主流である^{2,3)} (Table 2). 本試料の Mascot search による検索では、Swiss-Prot 上に”*A. foetidus*”由来のタンパク質の情報が収録されていなかったため、*A. foetidus* としてはヒットしなかったが、上述の通り本菌種と、今回トップヒットした *A. shirousami* は両者とも実際は *A. luchuensis* のシノニムであり生物学的には同一種であると解釈できるため、製品の付帯情報による基原と、本分析バンドの MS スペクトルからの予測アミノ酸配列から同定した菌種は一致していたことが示された。さらに、このことを確認するため、Mascot search から予測した本分析バンドのアミノ酸配列 (Swiss-Prot に登録された *A. shirousami* の配列由来) を NCBI の protein Blast search (blastp) で検索し、*A. luchuensis* の α -アミラーゼの登録データがヒットするかを確認した。その結果、*A. luchuensis* の α -アミラーゼと 100%match でヒットし、間違いなく本菌種であることが確認できた。

高分子量のバンドは、トップヒットが *A. kawachii* のグルコアミラーゼと検索された (Table 1)。上述の通り本菌種も *A. foetidus* 同様に *A. luchuensis* のシノニムであることから、菌種同定の結果としては製品付帯情報と一致した。SDS-PAGE 像から推定した分子量 (110kDa) とヒットしたタンパク質の分子量 (69kDa) が大きく異なっていたが、これは、 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、添加されたものと推察される。Mascot search から予測した本分析バンドのアミノ酸配列 (*A. kawachii* 由来グルコアミラーゼ) を用い blastp 検索を行った結果、70kDa 程度と SDS-PAGE 像から推定したアミノ酸分子量よりも短い、*Aspergillus* 属のグルコアミラーゼがトップヒットした。その他 130kDa 程度のタンパク質も比較的高い相同性でヒットした。このことから、添加されたグルコアミラーゼがこのような 100kDa を超えるタンパク質である可能性が考えられた。

試料 2 ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. niger* の α -アミラーゼである。Mascot

Search の検索結果と製品の付帯情報からの菌種は一致した (Table 1) が、SDS-PAGE 像から推定した分子量 (70kDa) と Mascot Search でヒットしたタンパク質の分子量 (55kDa) が異なっていた。ヒットした *A. niger* の酸耐性 α -アミラーゼのアミノ酸配列を用い、blastp 検索を行った結果、相同性が 97% で質量が 69kDa の *A. niger* の α -アミラーゼがヒットした。このことから、Mascot search でヒットした 55kDa の酸耐性 α -アミラーゼは、69kDa の α -アミラーゼ由来の部分配列であり、試料に含まれているのは全長の 69kDa の α -アミラーゼであったと考えられた。今後、本試料中から 55kDa の酸耐性 α -アミラーゼが欠損している部分配列由来のペプチドも検出されるかどうかの検証を行う必要がある。

試料 14 ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. oryzae* の β -ガラクトシダーゼであるが、SDS-PAGE 像において、2 種のバンドが確認され、両者とも Mascot search で *A. oryzae* の β -ガラクトシダーゼがトップヒットした。SDS-PAGE 像で推定 110kDa のバンドについては、この分子量とヒットした β -ガラクトシダーゼの分子量が一致していたことから、タンパク質全長と考えられる。分子量の小さい SDS-PAGE 像での推定 55kDa のバンドについては、MS で検出されたペプチドは、Mascot search の結果ヒットした *A. oryzae* 由来アミノ酸配列の N 末端側および C 末端側両方に亘っていたことから、特定の分解物ではないと考えられた (Figure 11)。そこで、二次元電気泳動法を用いて、より精密に分離を行ったところ、複数の等電点を持つ細かいスポットに分かれていることが確認された (Figure 12)。この結果より、この低分子量のバンドは、 β -ガラクトシダーゼが分解したタンパク質が複数種混合したものと考えられた。

試料 16 ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. oryzae* の β -ガラクトシダーゼである。SDS-PAGE 像において、2 種のバンドが確認され、両者とも Mascot Search の検索では *A. oryzae* の β -ガラクトシダーゼがトップヒットしたことから、同定結果は正確に得られたことを確認できた。しかし試料 2 と同様に、SDS-PAGE

像から推定した分子量 (70kDa と 50kDa) とヒットしたタンパク質の分子量 (110kDa) が異なっていた。SDS-PAGE 像での推定 70kDa のバンドからは N 末端側由来のペプチドが、推定 50kDa のバンドからは C 末端側由来のペプチドが、それぞれ検出された (Figure 13)。この結果より、試料 16 は β -ガラクトシダーゼが分解した 2 種類のポリペプチドに分かれた状態にあると考えられた。

試料 18 ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. niger* のグルコアミラーゼであり、Mascot Search の検索では *A. niger* のグルコアミラーゼがトップヒットしたことから、同定結果は正確に得られたことを確認できた。しかし SDS-PAGE 像から推定した分子量 (100kDa) と Mascot Search でヒットしたタンパク質の分子量 (69kDa) が異なっていた。試料 18 の MALDI-TOF/MS スペクトルが No.1 と非常に似かよっていることから、これらの分子量が異なった理由は No.1 と同様と考えられた。

試料 19 ; 本試料の基原は、製品の付帯情報によると *A. niger* のグルコアミラーゼであり、Mascot Search の検索では *A. niger* のグルコアミラーゼがトップヒットし、一致したことを確認できた。SDS-PAGE 像から推定した分子量 (70kDa) とヒットしたタンパク質の分子量 (69kDa) も一致した。

本研究の検討結果から、基原として同一の菌種・同一の酵素種類と同定されていても、登録アミノ酸配列と SDS-PAGE 像の配列長が大きく異なるという現象が、複数の酵素製品で確認されていた¹⁾。そのような場合でも、ひとまずアミノ酸配列断片を得て基原菌種の同定を達成することは可能であるが、配列長からも矛盾なく酵素種類を同定するためには、この配列長の矛盾の原因を解明する必要がある。今回、タンパク質に変異や分解が起こっている可能性があることが、複数試料において確認されたことから、今後、詳細な配列比較解析が必要であると考えられた。

C-2)アミノ酸配列データベースの改良に資す

るデータ収集

既存添加物酵素の基原として頻繁に使用される真菌種を抽出したところ、*A. awamori* を含む *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp., *Mucor* spp., *Monascus* spp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Pycnoporus coccineus* であった。このうち、*A. luchuensis*, *A. niger* および *Trichoderma* spp. は特に分類の細分化が進み、分類体系が混乱したりシノニムが多く存在する。これらの分類群の分類体系のまとめを Table 2 に示した。文献調査や実験的に遺伝的距離を調査し近縁種を整理することによって、アミノ酸配列データベース上での菌名の整理が必要である。

Aspergillus flavus および *A. luchuensis* のシノニム (Table 1 では *A. awamori*) が、製品の付帯情報による基原と異なる菌種としてヒットしている製品がいくつか確認された (Table 1 ; 酵素製品 No. 14, 16, 18, 19)。この現象は、*A. flavus* は *A. oryzae* と、*A. luchuensis* は *A. niger* と、それぞれ極近縁で遺伝的距離が非常に近いため、MS スペクトルから予測されたアミノ酸部分配列の相同部分が互いに 100% 一致していることが原因であった。近縁な菌種間ではしばしば同様の現象が見られると考えられるが、こういった場合はこのタンパク質アミノ酸配列を指標としては、完全に識別できないということを意味する。また逆に、同一の菌種の異なる菌株間で、相同なタンパク質アミノ酸配列が異なることもある。MS スペクトルから予測したアミノ酸配列が基原菌種の同定にどの程度有効かを幅広く評価するために、今後、同種の複数菌株から得た配列間の変異程度を確認する必要がある。

また、MS スペクトルを Mascot Search で検索した結果、まったく何の登録配列もヒットしない場合がある¹⁾。これは Swiss-Prot に、基原となった菌種も、これと近縁な菌種の配列も、まったく登録が無い場合に発生する。*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属といった子囊菌類、および *Mucor* 属や *Rhizopus* 属といった接合菌類については分子生物学的研究が進行しているためデ

データベース登録情報が厚いが、*Pycnoporus* 属など担子菌類は Swiss-Prot でも比較的登録情報が不足している状況にある。このような菌種の既存添加物酵素のアミノ酸配列を全てデータベースに登録することで、この問題は解消すると考えられる。今後、既存添加物の基原となる菌種のうち Swiss-Prot に登録が無い菌種を特定し、全ゲノム塩基配列シーケンスを行って ORF 推定を行い、全 ORF のアミノ酸配列を決定するか、または添加物酵素タンパクのアミノ酸配列のみを決定し、Swiss-Prot またはローカルで検索可能なデータベースに収録する必要がある。

D. 結論

真菌を基原とした添加物を TOF-MS で分析して得られた MS スペクトルからアミノ酸配列を予測し、その配列を指標としてアミノ酸配列データベース上で検索し、添加物基原菌種の同定を試みた。明確な同定結果が得られなかった場合の理由として、データベースに基原となった真菌種のアミノ酸配列の登録がなかった、データベースに登録されている真菌の種名において多様なシノニムが併用されていて解釈が難しかった、またはデータベース登録配列と比較してアミノ酸配列に変異が生じていたため相同なタンパクであることの判断が困難だった、以上が起こっていたことを確認した。これらを解消する措置として、添加物基原として使用される真菌種のシノニムを整理して照合しなおす、MALDI-TOF-MS で MS スペクトルを得る前に SDS-PAGE を行い、メジャーなバンドが複数現れた場合にはバンドを単離してから個々に分析を行うといった作業を行うことで、6 種類の添加物酵素全てにおいて製品の付帯情報と一致した同定結果が得られ、同定の確度は向上することが確認された。今後は、さらに多くの酵素製品で同様の作業や分析を行う、さらに MS スペクトルからアミノ酸配列を予測するためのデータベースでの登録配列を充実化させる、これらを行うことで、TOF-MS 分析で得られたスペクトルパターンから、多くの既存添加物酵素基原を正確に同定することが可能とな

ると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 増本直子, 杉本直樹, 西崎雄三: 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〜. 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業 H29-食品-一般-007), 既存添加物の品質向上に資する研究 平成 29〜31 年度総合分担報告, 2020.
- 2) Yokoyama K, Wang L, Miyaji M, Nishimura K: Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2018; 200: 241-246.
- 3) Hong SB, Yamada O, Samson RA.: Taxonomic re-evaluation of black koji molds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014; 98: 555-561.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 渡辺麻衣子, 青木渉, 渡辺雅樹, 寺島淳, 小西良子, 近藤一成, 工藤由紀子: CO1 遺伝子塩基配列における挿入/欠失パターンおよび系統解析に基づく日本国内に分布する *Entoloma sarcopum* とその近縁種の食用および毒キノコの識別. 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会(2020.11.24-2020.12.8)(Web).

2. 論文発表等

2-1. 論文

なし

2-2. 総説

なし

2-3. 単行本

なし

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

Table 1 Mascot Search による試料由来のタンパク質の同定結果

Product No.	Provided information from the product		Mass from SDS-PAGE (kDa)	Identification by Mascot search with SwissProt				
	Protein	Organism		Protein	Species	Mass (kDa)	pI	Coverage (%)
No.1	α -amylase	<i>Aspergillus foetidus</i>	100	Glucoamylase	<i>A. kawachii</i>	68.8	4.33	16
				Glucoamylase	<i>A. shirousami</i>	68.7	4.3	13
				Glucoamylase	<i>A. awamori</i>	68.8	4.25	12
				Glucoamylase	<i>A. niger</i>	68.8	4.25	12
			50	α -amylase A tyle-1/2	<i>A. oryzae</i>	55.3	4.48	27
				α -amylase A tyle-3	<i>A. oryzae</i>	55.3	4.52	27
				α -amylase	<i>A. shirousami</i>	55.3	4.48	27
				α -amylase A	<i>A. awamori</i>	55.4	4.52	23
α -amylase B	<i>A. awamori</i>	55.4	4.52	23				
No.2	α -amylase	<i>Aspergillus niger</i>	70	acid a-amylase	<i>A. niger</i>	53.4	4.22	14
No.14	β -galactosidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	110	β -galactosidase A	<i>A. flavus</i>	110.1	5.33	16
				β -galactosidase A	<i>A. oryzae</i>	110.1	5.33	16
		<i>Aspergillus oryzae</i>	55	β -galactosidase A	<i>A. flavus</i>	110.1	5.33	14
				β -galactosidase A	<i>A. oryzae</i>	110.1	5.33	14
No.16	β -galactosidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	70	β -galactosidase A	<i>A. flavus</i>	110.1	5.33	12
				β -galactosidase A	<i>A. oryzae</i>	110.1	5.33	12
		<i>Aspergillus oryzae</i>	50	β -galactosidase A	<i>A. flavus</i>	110.1	5.33	4
				β -galactosidase A	<i>A. oryzae</i>	110.1	5.33	4
No.18	Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	100	Glucoamylase	<i>A. awamori</i>	68.8	4.25	19
				Glucoamylase	<i>A. niger</i>	68.8	4.25	19
No.19	Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	70	Glucoamylase	<i>A. awamori</i>	68.8	4.25	18
				Glucoamylase	<i>A. niger</i>	68.8	4.25	18

Table 2 既存添加物酵素基原として使用される代表的な真菌の分類体系

現在主流として用いられる菌種名	分類体系に関係した問題
<i>Aspergillus luchuensis</i>	シノニムが多い
	シノニム ;
	<i>Aspergillus awamori</i> *
	<i>Aspergillus foetidus</i> *
	<i>Aspergillus inuii</i>
	<i>Aspergillus acidus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	シノニムが多い
	シノニム ;
	<i>Aspergillus aureus</i>
	<i>Aspergillus awamori</i> *
	<i>Aspergillus foetidus</i> *
	<i>Aspergillus usamii</i>
<i>Aspergillus tubingensis</i>	シノニムが多い
	シノニム ;
	<i>Aspergillus phoenicis</i>
<i>Trichoderma viride</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichoderma koningii</i>	互いに極近縁なため酵素アミノ酸配列が100%一致する、またはMascot searchでのヒットテーブルで菌種名のヒット順に矛盾が生じる（入れ子上に菌種名が現れる）可能性がある。

*学術発表後の再分類による菌種名変更、または配列登録時の誤同定のため、再分類の結果、*A. awamori* および *A. foetidus* 菌株群は *A. luchuensis* および *A. niger* 群それぞれに分かれた。

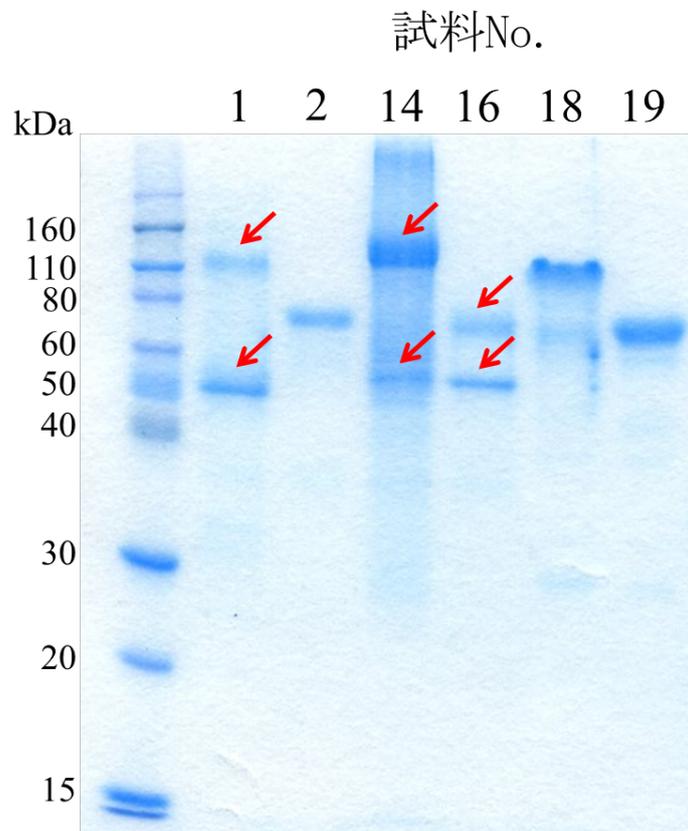


Figure 1. 試料の SDS-PAGE 像

No.1, 14, 16 については、それぞれ 2 種のバンドを解析した (赤色の矢印).

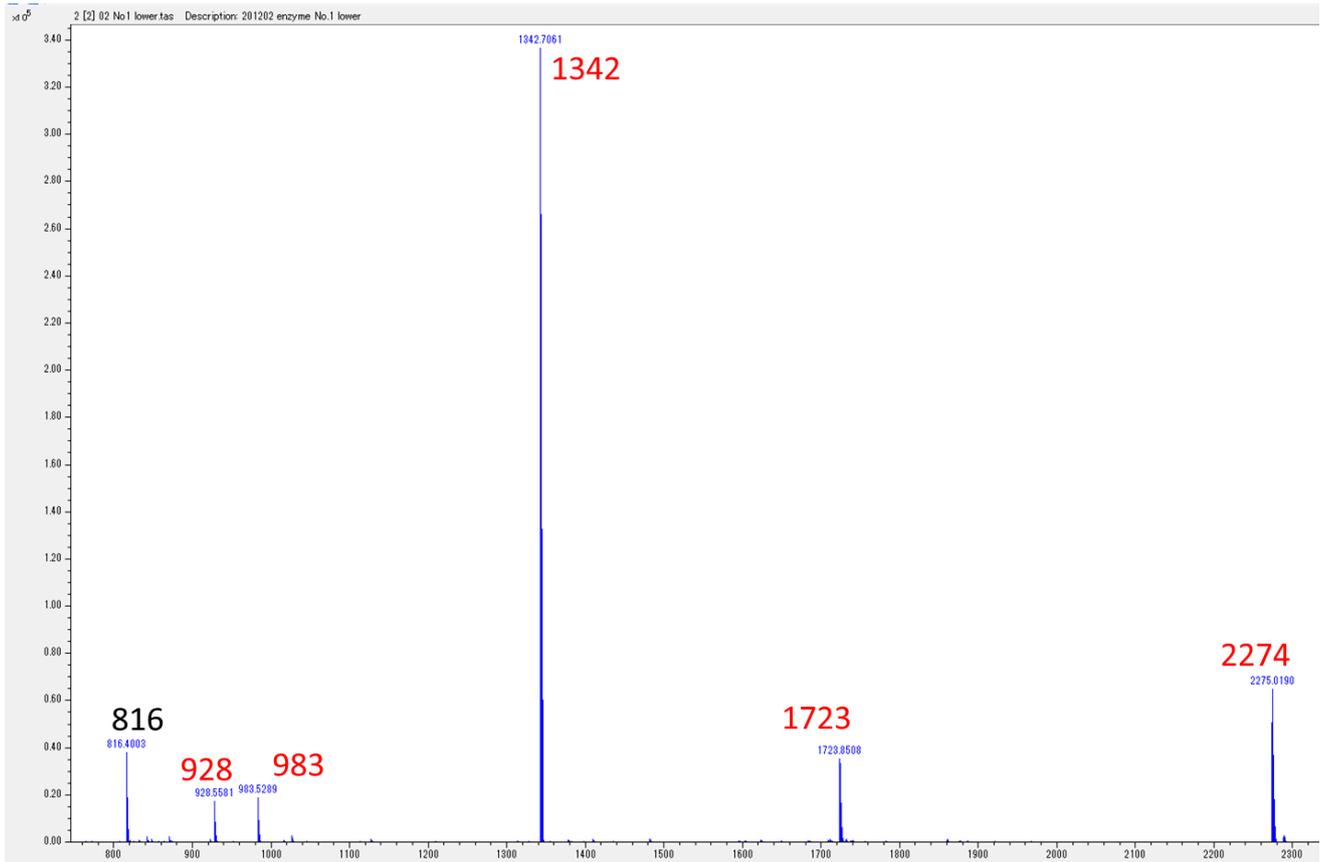


Figure 2. 試料 No.1 の下のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

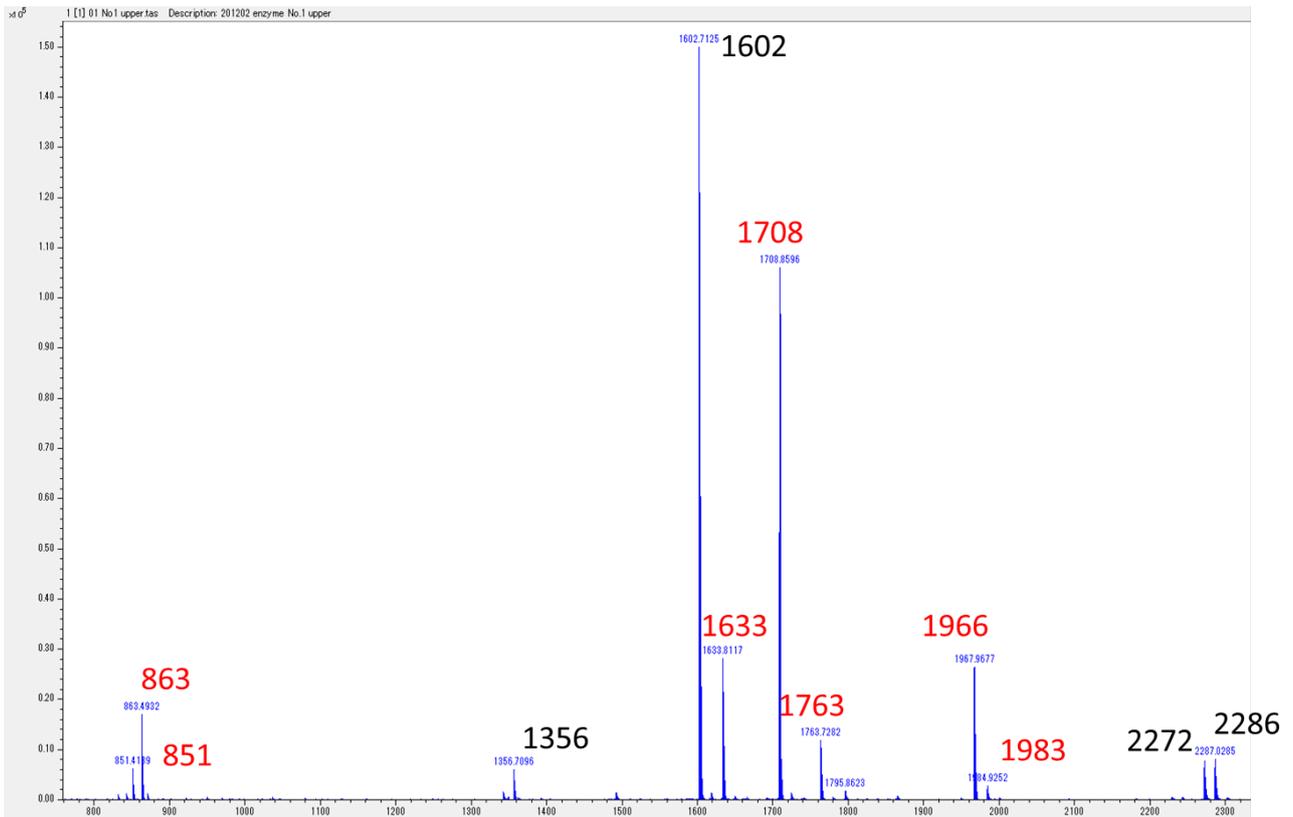


Figure 3. 試料 No.1 の上のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

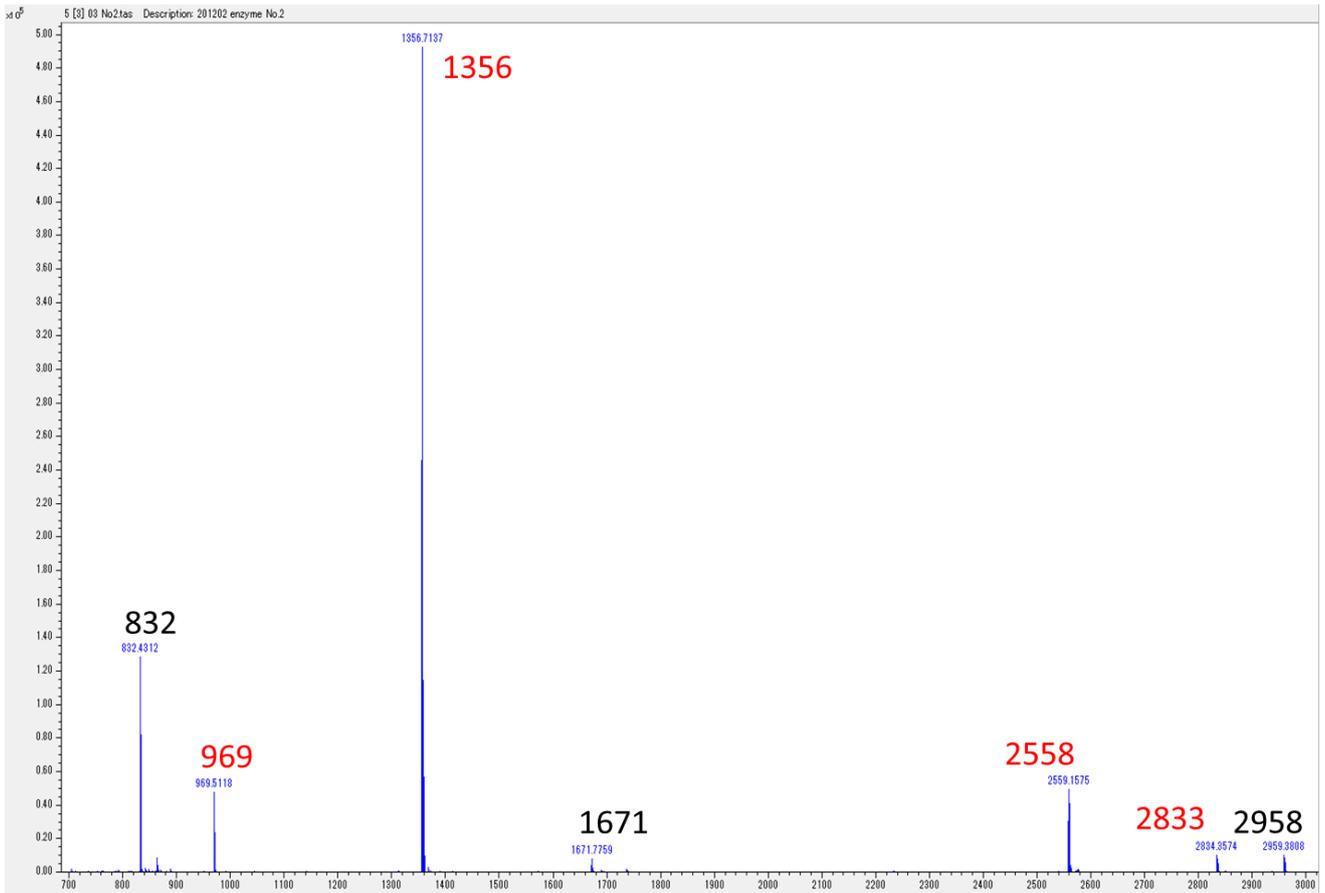


Figure 4. 試料 No.2 のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

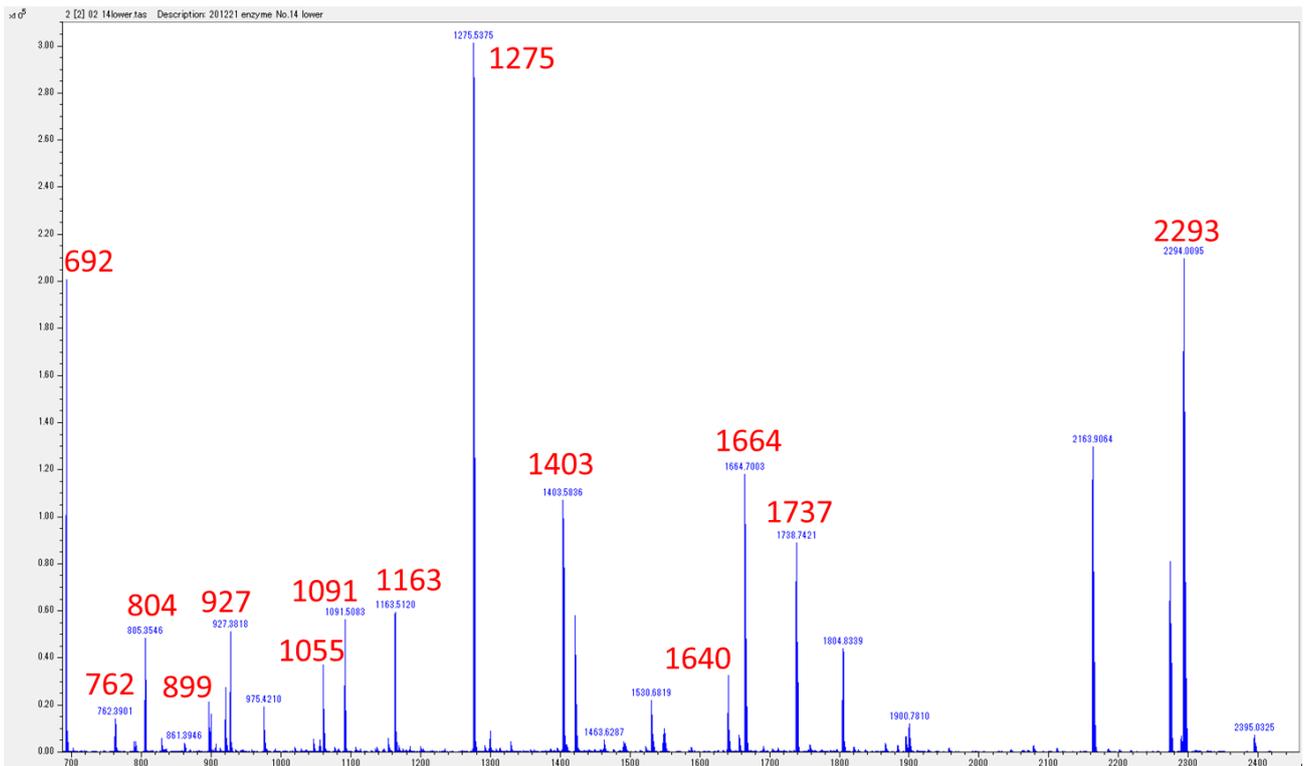


Figure 5. 試料 No.14 の下のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム
 (赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

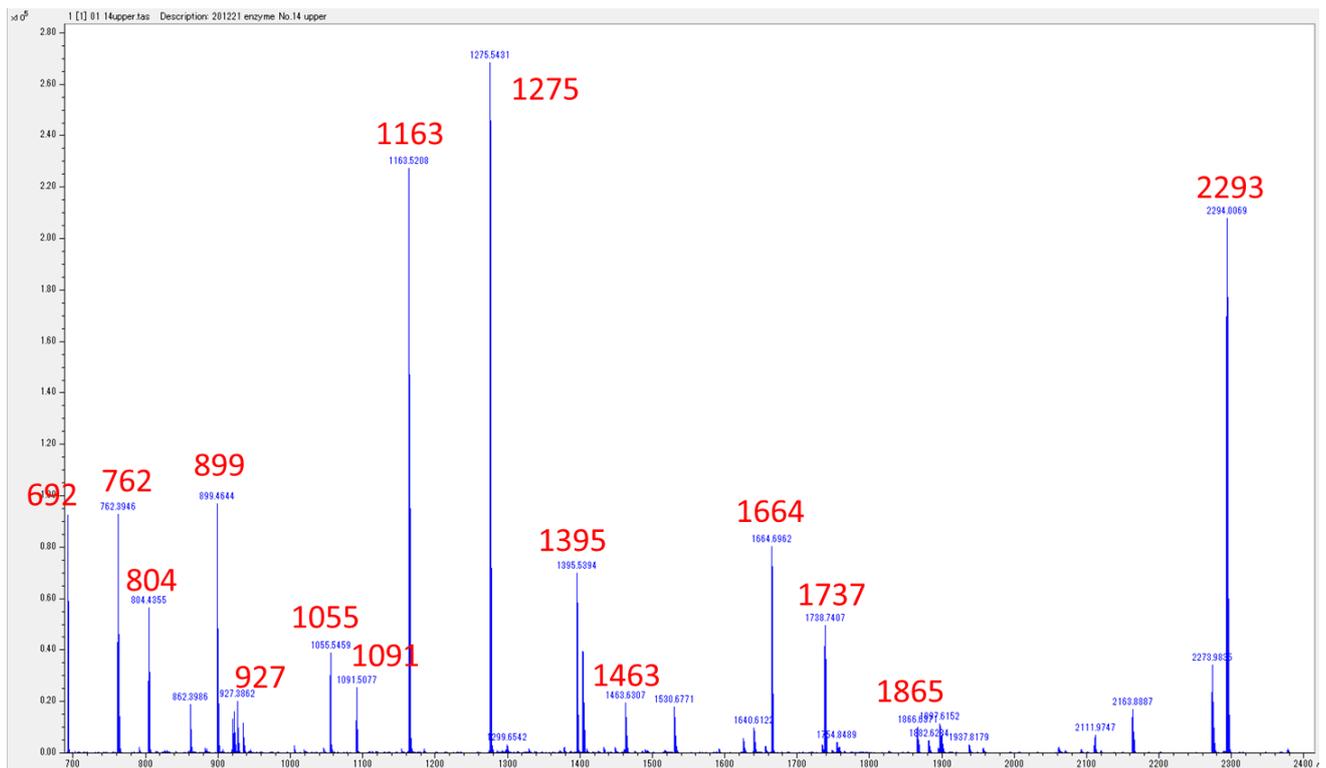


Figure 6. 試料 No.14 の上のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

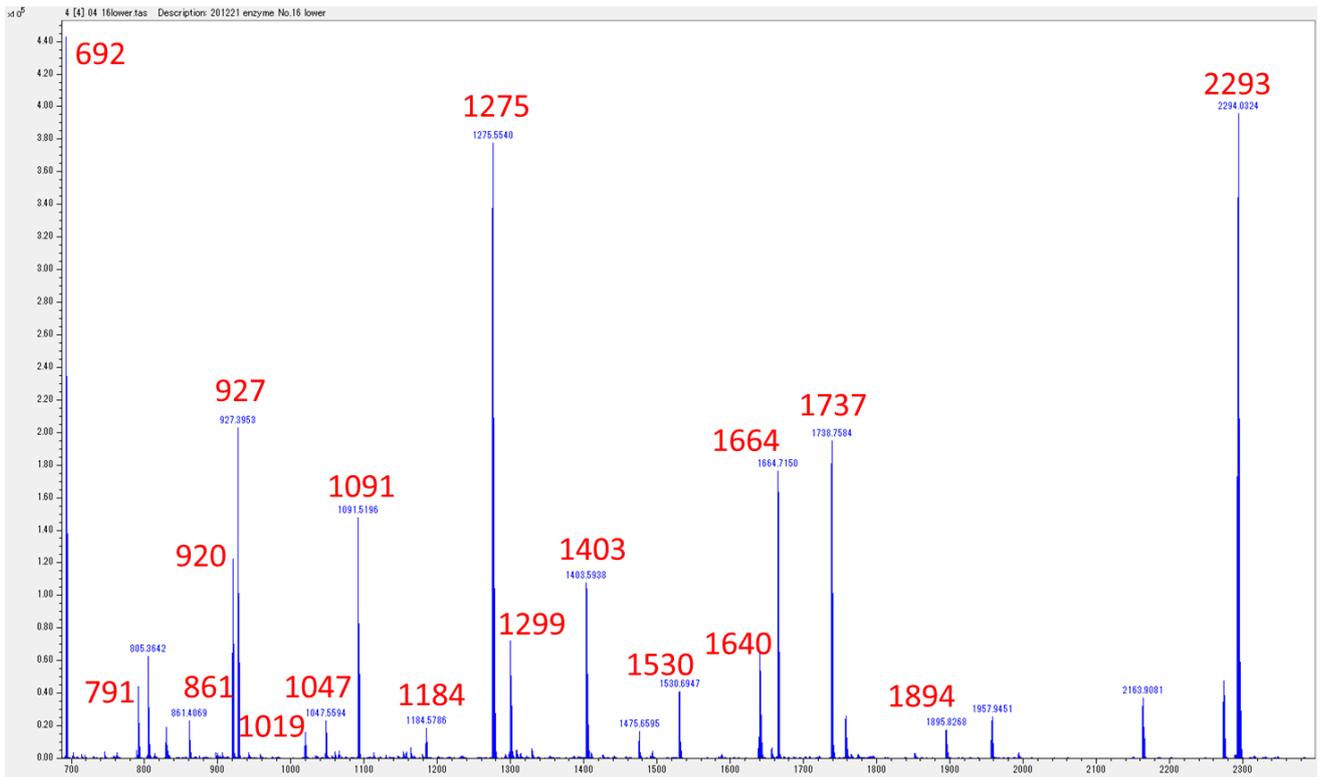


Figure 7. 試料 No.16 の下のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

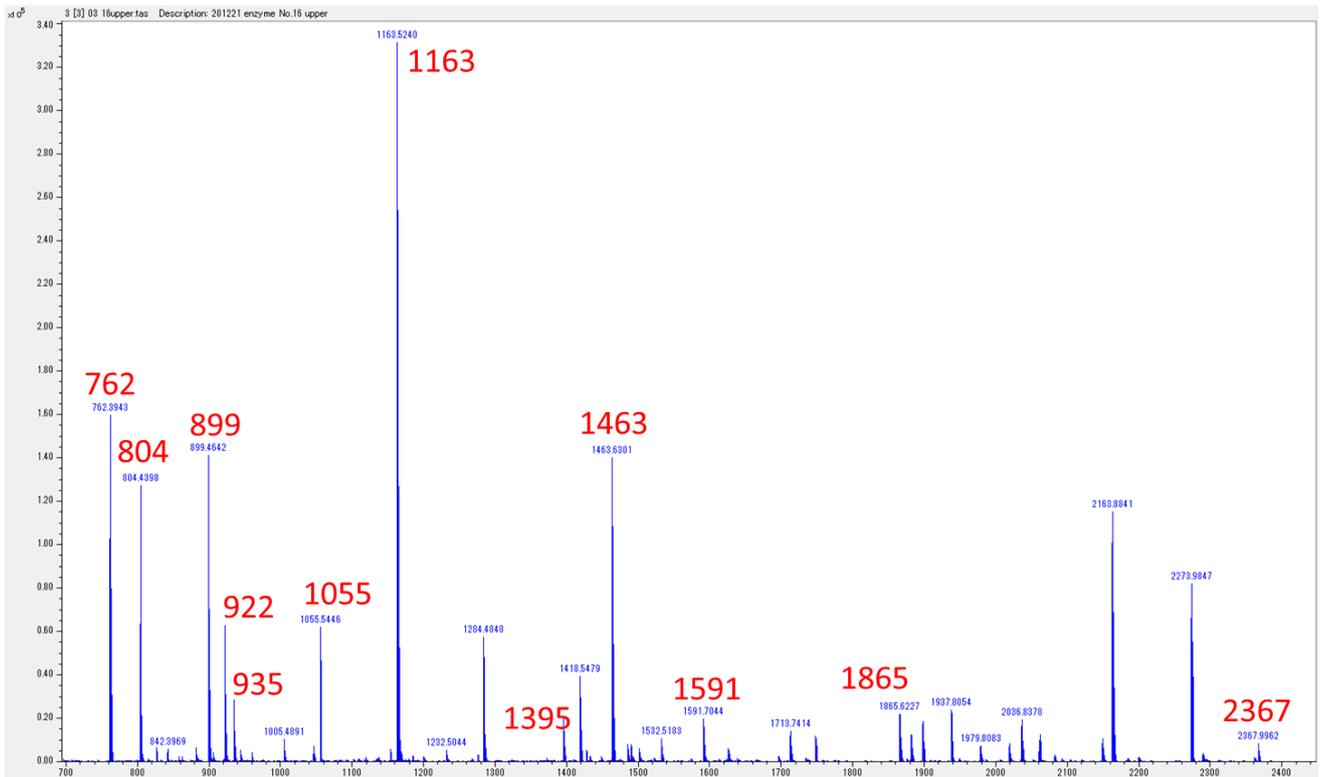


Figure 8. 試料 No.16 の上のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

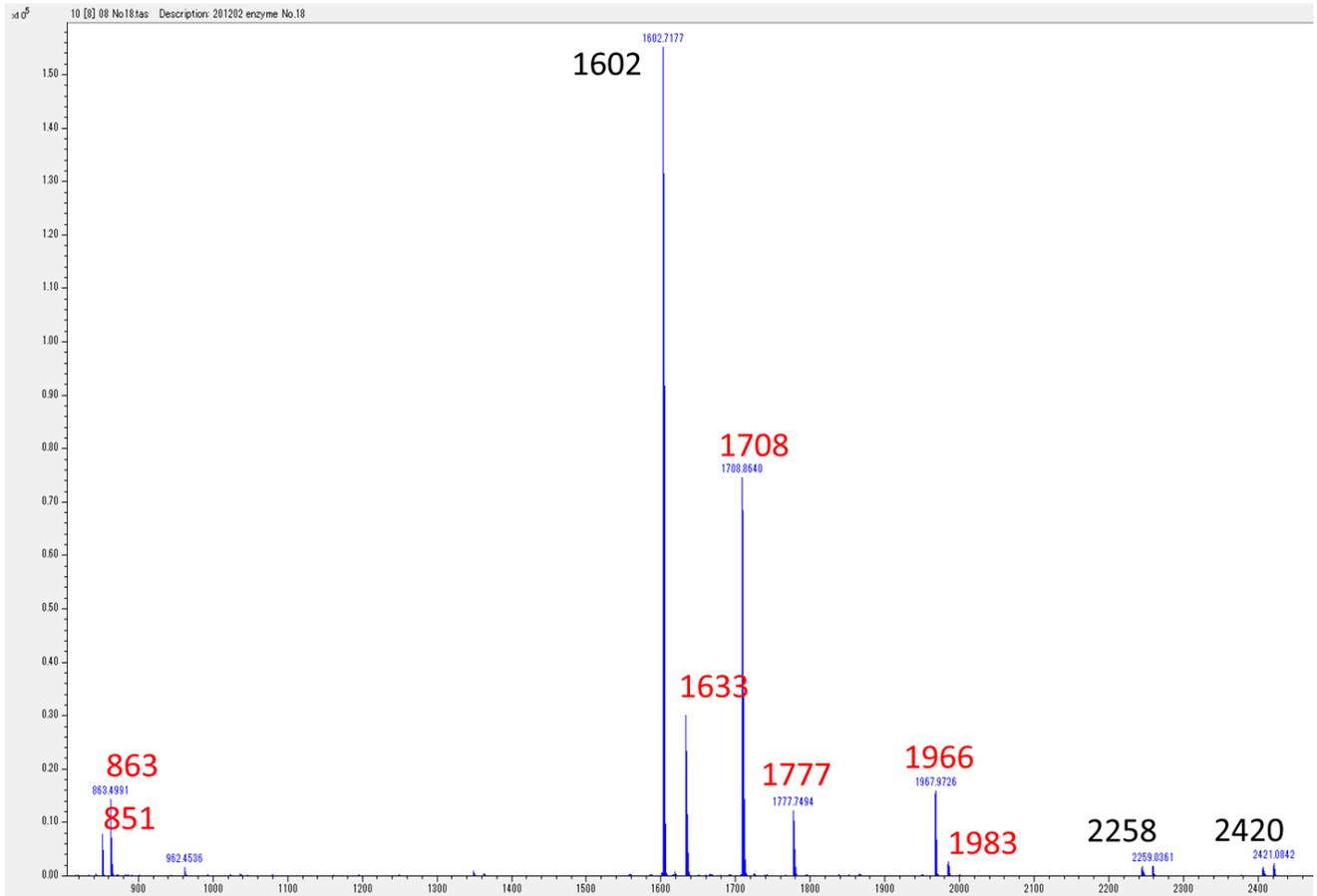


Figure 9. 試料 No.18 のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

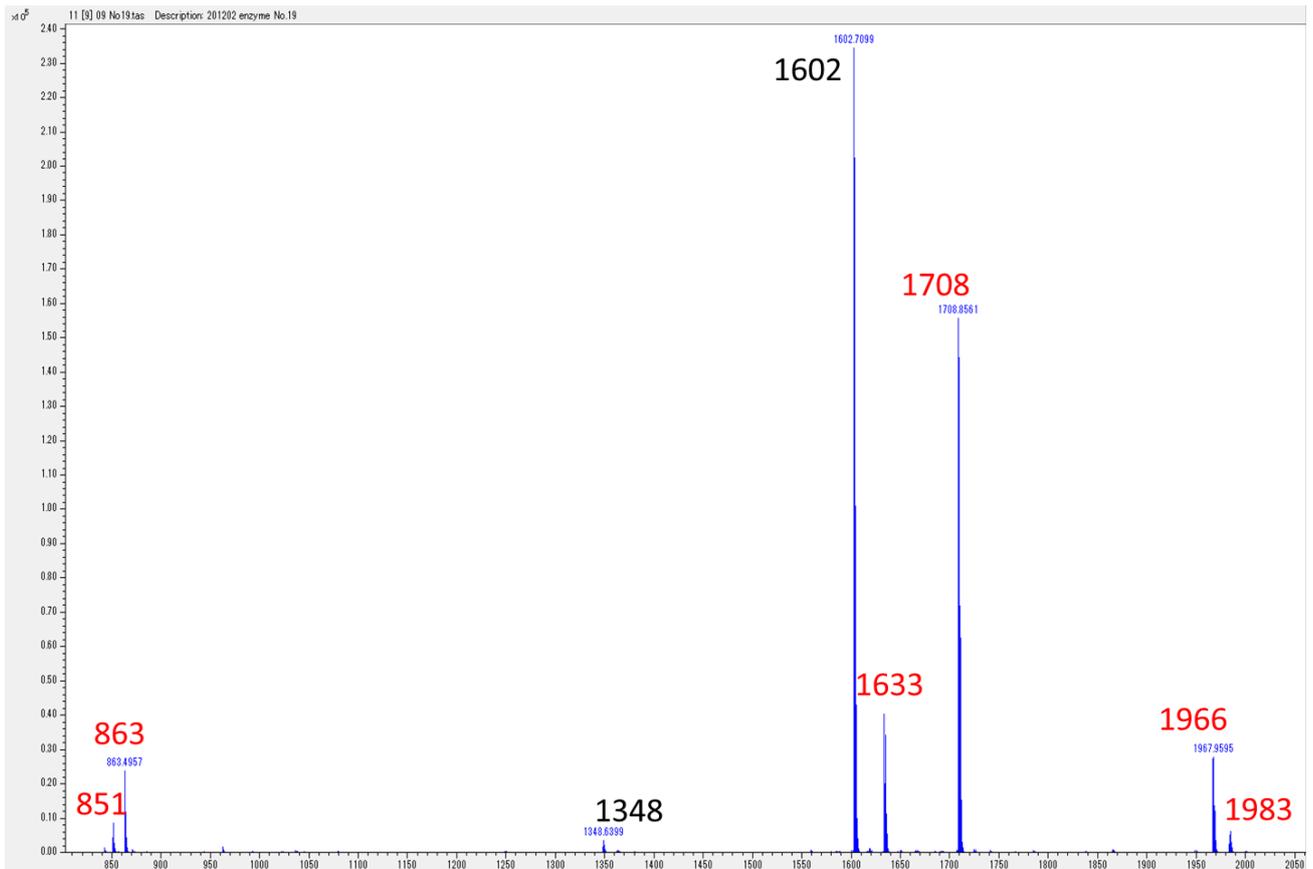


Figure 10. 試料 No.19 のバンドの MALDI-TOF/MS クロマトグラム
(赤字は Mascot search でヒットしたペプチド)

(A)

```
1 MKLLSVAAVA LLAAQAAGAS IKHRLNGFTI LEHPDPAKRD LLQDIVTWDD
51 KSLFINGERI MLFSGEVHPF RLPVPSLWLD IFHKIRALGF NCVSFYIDWA
101 LLEGKPGDYR AEGIFALEPF FDAAKEAGIY LIARPGSYIN AEVSGGGFFG
151 WLQRVNGTLR SSDEPFLKAT DNYIANAAAA VAKAQITNGG PVILYQPENE
201 YSGGCCGVKY PDADYMQYVM DQARKADIVV PFISNDASPS GHNAPGSGTG
251 AVDIYGHDSY PLGFDCANPS VWPEGKLPDN FRTLHLEQSP STPYSLLEFQ
301 AGAFDPWGGP GFEKCYALVN HEFSRVFYRN DLSFGVSTFN LYMTFGGTNW
351 GNLGHPGGYT SYDYGSPITE TRNVTREKYS DIKLLANFVK ASPSYLTATP
401 RNLTGVTYTD TSDLAVTPLI GDSPGSFFVW RHTDYSSQES TSYKCLKPTS
451 AGNLTIPQLE GTLSLNGRDS KIHVVVDYNVS GTNIIYSTAE VFTWKKFDGN
501 KVLVLYGGPK EHHELAIASK SNVTIIEGSD SGIVSTRKGS SVIIGWDVSS
551 TRRIVQVGD LRVFLDRNSA YNYWVPELPT EGTSPGFSTS KTTASSIIVK
601 AGYLLRGAHL DGADLHLTAD FNATTPIEVI GAPTGAKNLF VNGEKASHTV
651 DKNGIWSSEV KYAAPEIKLP GLKDLDWKYL DTLPEIKSSY DDSAWVSADL
701 PKTKNTHRPL DTPTSLSYSS YGFHTGYLIY RGHFVANGKE SEFFIRTQGG
751 SAFGSSVWLN ETYLGSWTGA DYAMDGNSTY KLSQLESGKN YVITVVIDNL
801 GLDENWTVGE ETMKNPRGIL SYKLSGQDAS AITWKLGTNL GGEDYQDKVR
851 GPLNEGGLYA ERQGFHQPP PSESWESGSP LEGLSKPGIG FYTAQFDLDD
901 PKGWDVPLYF NFGNNTQAAR AQLYVNGYQY GKFTGNVGPQ TSFPVPEGIL
951 NYRGTNYVAL SLWALESDGA KLGSELSYT TPVLTGYGNV ESPEQPKYEQ
1001 RKGAY
```

(B)

```
1 MKLLSVAAVA LLAAQAAGAS IKHRLNGFTI LEHPDPAKRD LLQDIVTWDD
51 KSLFINGERI MLFSGEVHPF RLPVPSLWLD IFHKIRALGF NCVSFYIDWA
101 LLEGKPGDYR AEGIFALEPF FDAAKEAGIY LIARPGSYIN AEVSGGGFFG
151 WLQRVNGTLR SSDEPFLKAT DNYIANAAAA VAKAQITNGG PVILYQPENE
201 YSGGCCGVKY PDADYMQYVM DQARKADIVV PFISNDASPS GHNAPGSGTG
251 AVDIYGHDSY PLGFDCANPS VWPEGKLPDN FRTLHLEQSP STPYSLLEFQ
301 AGAFDPWGGP GFEKCYALVN HEFSRVFYRN DLSFGVSTFN LYMTFGGTNW
351 GNLGHPGGYT SYDYGSPITE TRNVTREKYS DIKLLANFVK ASPSYLTATP
401 RNLTGVTYTD TSDLAVTPLI GDSPGSFFVW RHTDYSSQES TSYKCLKPTS
451 AGNLTIPQLE GTLSLNGRDS KIHVVVDYNVS GTNIIYSTAE VFTWKKFDGN
501 KVLVLYGGPK EHHELAIASK SNVTIIEGSD SGIVSTRKGS SVIIGWDVSS
551 TRRIVQVGD LRVFLDRNSA YNYWVPELPT EGTSPGFSTS KTTASSIIVK
601 AGYLLRGAHL DGADLHLTAD FNATTPIEVI GAPTGAKNLF VNGEKASHTV
651 DKNGIWSSEV KYAAPEIKLP GLKDLDWKYL DTLPEIKSSY DDSAWVSADL
701 PKTKNTHRPL DTPTSLSYSS YGFHTGYLIY RGHFVANGKE SEFFIRTQGG
751 SAFGSSVWLN ETYLGSWTGA DYAMDGNSTY KLSQLESGKN YVITVVIDNL
801 GLDENWTVGE ETMKNPRGIL SYKLSGQDAS AITWKLGTNL GGEDYQDKVR
851 GPLNEGGLYA ERQGFHQPP PSESWESGSP LEGLSKPGIG FYTAQFDLDD
901 PKGWDVPLYF NFGNNTQAAR AQLYVNGYQY GKFTGNVGPQ TSFPVPEGIL
951 NYRGTNYVAL SLWALESDGA KLGSELSYT TPVLTGYGNV ESPEQPKYEQ
1001 RKGAY
```

Figure 11. 試料 No.14 の同定されたタンパク質のアミノ酸配列
(A)SDS-PAGE 像で推定 110kDa のバンド, (B) SDS-PAGE 像で推定 55kDa のバンド
赤字は, 検出されたペプチド

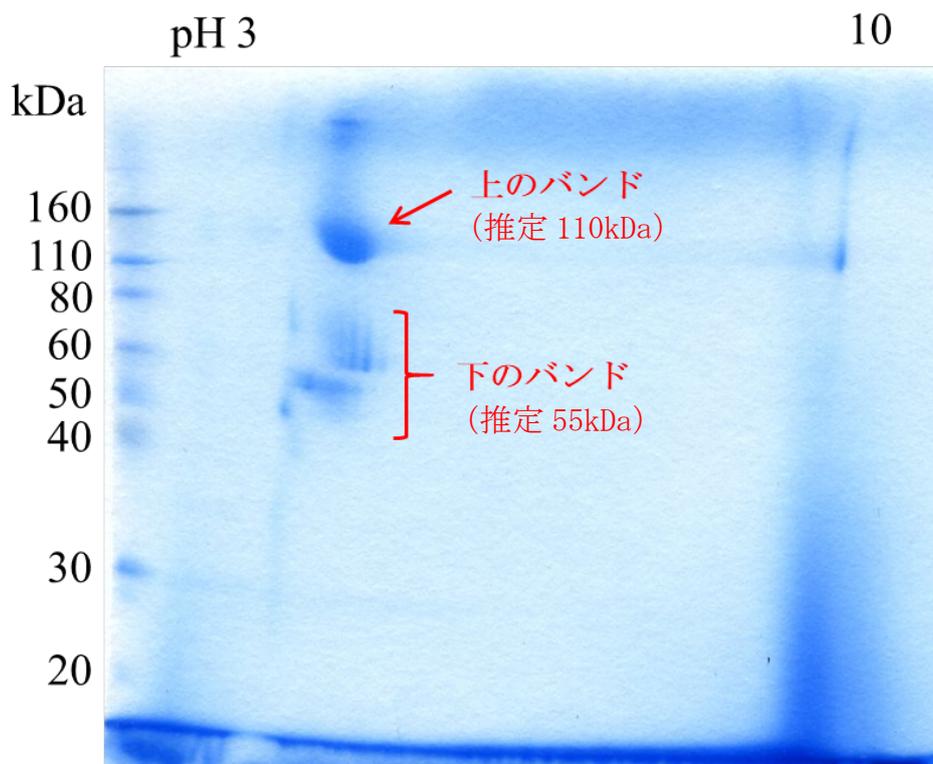


Figure 12. 試料 14 の二次元電気泳動像

(A)

```
1 MKLLSVAAVA LLAAQAAGAS IKHRLNGFTI LEHPDPAKRD LLQDIVTWDD
51 KSLFINGERI MLFSGEVHPF RLPVPSLWLD IFHKIRALGF NCVSFYIDWA
101 LLEGKPGDYR AEGIFALEPF FDAAKEAGIY LIARPGSYIN AEVSGGGFFG
151 WLQRVNGTLR SSDEPFLKAT DNYIANAAAA VAKAQITNGG PVILYQPENE
201 YSGGCCGVKY PDADYMQYVM DQARKADIVV PFISNDASPS GHNAPGSGTG
251 AVDIYGHDSY PLGFDCANPS VWPEGKLPDN FRTLHLEQSP STPYSLLEFQ
301 AGAFDPWGGP GFEKCYALVN HEFSRVFYRN DLSFGVSTFN LYMTFGGTNW
351 GNLGHPGGYT SYDYGSPITE TRNVTREKYS DIKLLANFVK ASPSYLTATP
401 RNLTIGVYTD TSDLAVIPLI GDSPGSFFVW RHTDYSSQES TSYKCLKPTS
451 AGNLTIPQLE GTLSLNGRDS KIHVVDYNVS GTNIIYSTAE VFTWKKFDGN
501 KVLVLYGGPK EHHELAIASK SNVTIIEGSD SGIVSTRKGS SVIIGWDVSS
551 TRRIVQVGD LRVFLDRNSA YNYWVPELPT EGTSPGFSTS KITASSIIVK
601 AGYLLRGAHL DGADLHLTAD FNATPIEVI GAPTGAKNLF VNGEKASHTV
651 DKNGIWSSEV KYAAPEIKLP GLKDLWKYL DTLPEIKSSY DDSAWVSADL
701 PKTKNTHRPL DTPTSLYSSD YGFHTGYLIY RGHFVANGKE SEFFIRTQGG
751 SAFGSSVWLN ETYLGSWTGA DYAMDGNSTY KLSQLESGKN YVITVVIDNL
801 GLDENWTVGE ETMKNPRGIL SYKLSGQDAS AITWKLGTNL GGEDYQDKVR
851 GPLNEGGLYA ERQGFHQPP PSESWESESP LEGLSKPGIG FYTAQFDL DL
901 PKGWDVPLYF NFGNNTQAAR AQLYVNGYQY GKFTGNVGPQ TSFPVPEGIL
951 NYRGTNYVAL SLWALESDGA KLGSEFELSYT TPVLTGYGNV ESPEQPKYEQ
1001 RKGAY
```

(B)

```
1 MKLLSVAAVA LLAAQAAGAS IKHRLNGFTI LEHPDPAKRD LLQDIVTWDD
51 KSLFINGERI MLFSGEVHPF RLPVPSLWLD IFHKIRALGF NCVSFYIDWA
101 LLEGKPGDYR AEGIFALEPF FDAAKEAGIY LIARPGSYIN AEVSGGGFFG
151 WLQRVNGTLR SSDEPFLKAT DNYIANAAAA VAKAQITNGG PVILYQPENE
201 YSGGCCGVKY PDADYMQYVM DQARKADIVV PFISNDASPS GHNAPGSGTG
251 AVDIYGHDSY PLGFDCANPS VWPEGKLPDN FRTLHLEQSP STPYSLLEFQ
301 AGAFDPWGGP GFEKCYALVN HEFSRVFYRN DLSFGVSTFN LYMTFGGTNW
351 GNLGHPGGYT SYDYGSPITE TRNVTREKYS DIKLLANFVK ASPSYLTATP
401 RNLTIGVYTD TSDLAVIPLI GDSPGSFFVW RHTDYSSQES TSYKCLKPTS
451 AGNLTIPQLE GTLSLNGRDS KIHVVDYNVS GTNIIYSTAE VFTWKKFDGN
501 KVLVLYGGPK EHHELAIASK SNVTIIEGSD SGIVSTRKGS SVIIGWDVSS
551 TRRIVQVGD LRVFLDRNSA YNYWVPELPT EGTSPGFSTS KITASSIIVK
601 AGYLLRGAHL DGADLHLTAD FNATPIEVI GAPTGAKNLF VNGEKASHTV
651 DKNGIWSSEV KYAAPEIKLP GLKDLWKYL DTLPEIKSSY DDSAWVSADL
701 PKTKNTHRPL DTPTSLYSSD YGFHTGYLIY RGHFVANGKE SEFFIRTQGG
751 SAFGSSVWLN ETYLGSWTGA DYAMDGNSTY KLSQLESGKN YVITVVIDNL
801 GLDENWTVGE ETMKNPRGIL SYKLSGQDAS AITWKLGTNL GGEDYQDKVR
851 GPLNEGGLYA ERQGFHQPP PSESWESESP LEGLSKPGIG FYTAQFDL DL
901 PKGWDVPLYF NFGNNTQAAR AQLYVNGYQY GKFTGNVGPQ TSFPVPEGIL
951 NYRGTNYVAL SLWALESDGA KLGSEFELSYT TPVLTGYGNV ESPEQPKYEQ
1001 RKGAY
```

Figure 13. 試料 No.16 の同定されたタンパク質のアミノ酸配列
(A)上のバンド, (B)下のバンド
赤文字は, 検出されたペプチド

目次	1
1) 総括研究報告書	
既存添加物の品質向上に資する研究	3
研究代表者：杉本直樹	
2) 分担研究報告書	
1. 既存添加物の成分規格に関する研究	
1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)	16
業務受託者：上田要一	
研究協力者：等々力博志	
2. 既存添加物の有効成分の解明	
1) ^{13}C -CP/MAS-NMR によるキトサンの脱アセチル化度の測定	30
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) ヒマワリ種子抽出物の成分解析	50
研究分担者：天倉吉章	
研究協力者：好村守生	
研究協力者：内倉崇	
3) ショウガ抽出物の成分解析	55
研究分担者：天倉吉章	
研究協力者：好村守生	
研究協力者：内倉崇	
4) ウコン色素の定量評価の基礎検討	60
研究分担者：井之上浩一	
研究協力者：高橋未来	
5) シタン色素の成分規格の検討	83
研究分担者：井之上浩一	
研究協力者：高橋未来	
6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究	93
研究分担者：永津明人	

3.	試験法及び分析法の開発	
1)	^1H -qNMR に基づく相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの 分析手法に関する研究	114
	研究分担者：大槻崇	
2)	外部標準法定量 NMR (EC-qNMR)の自動化スクリプトの作成	133
	研究分担者：西崎雄三	
	研究協力者：末松孝子	
	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：杉本直樹	
3)	PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討	149
	研究分担者：出水庸介	
	研究協力者：辻巖一郎	
4)	真菌基原の添加物の分析法の開発	163
	研究分担者：渡辺麻衣子	
	協力研究者：吉成知也	
	協力研究者：大波純一	
	協力研究者：中西早苗	
	協力研究者：船江元子	
	協力研究者：久保文	
3)	研究成果の刊行に関する一覧表	185

令和3年 3月 29日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸彦

次の職員のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究 (20KA1008)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品添加物部 第二室長

(氏名・フリガナ) 杉本 直樹 (スギモト ナオキ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究 (20KA1008)

3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品添加物部 研究員

(氏名・フリガナ) 西崎 雄三 (ニシザキ ユウゾウ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品
 所属研究機関長 職名 所長、
 氏名 合田 幸彦

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究 (20KA1008)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 有機化学部・部長
 (氏名・フリガナ) 合田幸彦

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究(20KA1008)
- 研究者名 (所属部局・職名) 衛生微生物部 第三室長
(氏名・フリガナ) 渡辺 麻衣子 (ワタナベ マイコ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

機関名 立命館大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 仲谷 善雄

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費補助金の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反の管理については以下の通りです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬学部 薬学科・教授(氏名・フリガナ) 井之上 浩一 ・ イノウエ コウイチ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

機関名 金城学院大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 小室 尚子



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬学部 教授
(氏名・フリガナ) 永津 明人 ナガツ アキト

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

機関名 松山大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 新井 英夫

次の職員の令和 2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 松山大学薬学部 教授
(氏名・フリガナ) 天倉 吉章 (アマクラ ヨシアキ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

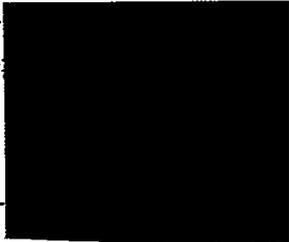
研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

機関名 日本大学 生物資
所属研究機関長 職 名 学部長
氏 名 大矢 祐治



次の職員の令和 2 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 生物資源科学部・専任講師
(氏名・フリガナ) 大槻 崇 (オオツキ タカシ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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