

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～令和4年度

総合研究報告書

研究代表者	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	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5(2023)年3月



目次	001
1) 総合研究報告書(総括)	
既存添加物の品質向上に資する研究	003
研究代表者：杉本直樹	
2) 総合分担研究報告書	
1. 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)	020
業務受託者：背黒 勝也	
研究協力者：藤井 結花	
研究協力者：京極 泰久	
研究協力者：等々力 博志	
2. 既存添加物の成分分析と分析法の検討	022
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：西崎 雄三	
研究協力者：増本 直子	
3. 既存添加物の有効成分の探索	032
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	
研究協力者：杉本 直樹	
研究協力者：西崎 雄三	
研究協力者：増本 直子	
4. 酵素処理ナリンジン及びヒマワリ種子抽出物の 規格試験法の確立に関する検討	043
研究分担者：大槻 崇	
5. 外部標準法定量 NMR の自動測定スクリプトの開発及び ニガヨモギ抽出物と乾留抽出物添加物の成分分析	090
研究分担者：西崎 雄三	
研究協力者：石附 京子	

研究協力者：中島 馨  
研究協力者：杉本 直樹  
研究協力者：増本 直子  
研究協力者：加藤 菜帆  
研究協力者：吉村 弘伸  
研究協力者：松熊 伸也  
研究協力者：朝倉 克夫  
研究協力者：末松 孝子

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 106  
研究分担者：永津 明人

7. 既存添加物の分析法及び試験法の検討 142  
研究分担者：井之上 浩一  
研究協力者：布目 真梨  
研究協力者：高橋 未来

8. PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討 191  
研究分担者：出水 庸介  
研究協力者：辻 巖一郎

9. 真菌基原の添加物の分析法の開発及び真菌数試験の比較検討 208  
研究分担者：渡辺 麻衣子  
協力研究者：吉成 知也  
協力研究者：杉本 直樹  
協力研究者：多田 敦子  
協力研究者：西崎 雄三  
協力研究者：中西 早苗  
協力研究者：船江 元子

3) 研究成果の刊行に関する一覧表(令和 2~4 年度) 233

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～令和4年度(令和元年度) 総合研究報告書

研究代表者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

**研究要旨** 既存添加物について、流通実態及び基原・製法・本質、海外規格及び自主規格、安全性情報の調査を行うと共に、入手できた製品を用いて有効成分又は指標成分の同定、成分組成の確認、分析法の開発を行った。すなわち、流通実態、規格情報及び安全性情報から製品としての品質を、実際の分析結果から各品目の公的な成分規格設定に資する根拠情報を、両面から総合的に収集した。成分規格が未設定、あるいは成分規格が設定されていたとしても技術的に改良可能な品目(「キトサン」、「オリゴガラクチュロン酸」、「キハダ抽出物」、「ショウガ抽出物」、「ヒマワリ種子抽出物」、「酵素処理ナリンジン」、「ニガヨモギ抽出物」、「木酢液」、「チャ乾留物」、「モウソウチク乾留物」、「ウコン色素」、「シタン色素」、「アナトー色素」、「香辛料抽出物(コショウ、オールスパイス、フェンネル、バニラ、ケイヒ、ローズマリー等)」、「アミラーゼ」、「ガラクトシダーゼ」、「セルラーゼ」、「ヘミセルラーゼ」、「プロテアーゼ」)を成分分析及び分析法の開発対象とし、各種NMR測定、qNMR、HPLC、分取HPLC、RMS(相対モル感度)を用いた定量法、LC/MS、GC/MS、TLC、HSCCC、DPPHアッセイ、MALDI-ToF MS、微生物限度試験等により検討した。

「キトサン」の脱アセチル化度の測定法として<sup>13</sup>C-CP/MAS-NMR及び滴定法を検討した。

「オリゴガラクチュロン酸」の成分組成及び含量を<sup>1</sup>H-qNMR及び滴定法を用いて検討した。

「キハダ抽出物」についてUPLC/PDA/MSにより分析し、TLCによる確認試験法が設定可能であることを確認した。「ショウガ抽出物」については、成分分析の結果、流通製品として既存添加物と考えられる「ショウガ抽出物」製品と天然香料と考えられる製品が混在していることを明らかとした。「ヒマワリ種子抽出物」については、成分分析の結果、モノカフェオイルキナ酸の他にジカフェオイルキナ酸等から構成され、更にDPPHアッセイによる抗酸化能の評価により、これらが有効成分であることを明らかとした。「酵素処理ナリンジン」については、分析対象物質の定量用標品を必要としないRMSを用いたSR-HPLCが定量法として十分に機能し、成分規格作成に応用できると考えられた。「ウコン色素」及び「アナトー色素」についてもRMSを用いたSR-HPLCが適用可能であると考えられた。「シタン色素」について主色素成分2種以外に未知の色素が検出され更に検討が必要であった。「ニガヨモギ抽出物」については苦味成分と考えられるセスキテルペンラク톤の他にフラボノイド等が含有されることを確認すると共にTLCによる確認試験が設定可能であると考えられた。「木酢液」、「チャ乾留物」、「モウソウチク乾留物」についてはGC/MS分析により熱分解に由来するカルボニル化合物、フラン類、ピラン類、フェノール類及び含窒素化合物の存在が示唆されたが、最大で0.5%、合算で1~4%であることがわかった。香辛料抽出物につ

いては、 $^1\text{H-qNMR}$ によりそれぞれの指標成分が十分な精度で定量可能であることが確認できた。更に、分析法の開発として以下について検討した。外部標準法定量NMR (EC-qNMR)の自動測定スクリプトの開発を行った結果、本法は測定対象物質を回収可能であるだけでなく、試料液はそのまま濃度既知の標準液として利用できる点においても実用化の意義があると考えられた。また、PDA検出器とするHPLC装置でRMSを用いたSR-HPLCを実施するとき、PDAの校正法の確立は利便性の向上及び高精度化を目指す上で避けて通れないため、校正に利用可能な化合物を数種デザインした。これらは校正物質以外にSR-HPLCの基準物質としても利用可能であることが示唆された。酵素品目については、MALDI-ToF MSによる分析を行うPMF解析を用いた基原菌種の特異性を検討した結果、有効な手段の一つとなり得ることが示唆された。食品添加物公定書の微生物限度試験で規定されている試験条件を、その他試験条件と比較し集落の生育性をもって真菌数計測の正確性と効率を評価した結果、場合によっては、代替法として寒天培地の種類の変更や、接種試験液の希釈、培養日数の短縮も検討する必要があることが示された。

#### 研究分担者

#### 常務理事

杉本直樹	国立医薬品食品衛生研究所 室長	京極泰久	(一社)日本食品添加物協会 参事
天倉吉章	松山大学薬学部 教授	増本直子	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
井之上浩一	立命館大学薬学部 教授	石附京子	国立医薬品食品衛生研究所 研究員
永津明人	金城学院大学薬学部 教授	中島 馨	国立医薬品食品衛生研究所 研究員
大槻 崇	日本大学生物資源学部 准教授	好村守生	松山大学薬学部 准教授
西崎雄三	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官	内倉 崇	松山大学薬学部 特任助教
出水庸介	国立医薬品食品衛生研究所 部長	布目真梨	立命館大学大学院 助教
渡辺麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所 室長	辻厳一郎	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
<b>研究協力者</b>		吉成知也	国立医薬品食品衛生研究所 室長
背黒勝也	(一社)日本食品添加物協会 専務理事	中西早苗	国立医薬品食品衛生研究所 短時間非常勤職員
藤井結花	(一社)日本食品添加物協会		

## 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, 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.

本研究では, このような問題を解決することに焦点を絞り, (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, 海外規格及び自主規格等の調査を行う. (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を行い, 成分規格の設定に必要な指標成分を明らかとする. (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又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. すなわち, 本研究では, 公的な成分規格設定のための情報を収集し, 且つ, 科学技術の発展に繋がる成果を得た.

## B. 研究方法

### 1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の公的な成分規格設定を目的に, 主に第 9 版食品添加物公定書に未収載品について, 検証用規格及び自主規格を含めた成分規格の整備状況, 安全性試験実施状況, 国内外規格の有無, 流通実態等を調査した. 基原・製法・本質に記載されている基原種について, 削除, 変更又は拡大の必要性の有無の調査した. 酵素品目について, 基原種の同定及び分類, 成分規格の定義の学名の設定方法等について考え方をまとめた.

### 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

1) 流通が確認されサンプルが入手できた品目について有効成分の探索, 必要に応じて分析法及び試験法の開発を行った. すなわち, 既存添加物の内, 「キトサン」, 「オリゴガラクトチュロン酸」, 「キハダ抽出物」, 「ショウガ抽出物」, 「ヒマワリ種子抽出物」, 「酵素処理ナリンジン」, 「ニガヨモギ抽出物」, 「木酢液」, 「チャ乾留物」, 「モウソウチク乾留物」, 「ウコン色素」, 「シタン色素」, 「アナトー色素」, 「香辛料抽出物(コショウ, オールスパイス, フェネル, バニラ, ケイヒ, ローズマリー等)」, 「アミラーゼ」, 「ガラクトシダーゼ」, 「セルラーゼ」, 「ヘミセルラーゼ」, 「プロテアーゼ」について検討した.

2) 1)に示した品目に対して, 有効成分や指標成

分等の単離精製，構造決定，定性分析，定量分析等を行った．各品目に適した分析法を選択しそれを適用した．適した分析法がない場合は，分析法を開発しそれを適用した．本研究で用いた分析法及び試験法は，各種 NMR 測定，qNMR，HPLC，分取 HPLC，RMS(相対モル感度)を用いた定量法，LC/MS，GC/MS，TLC，HSCCC，DPPH アッセイ，MALDI-ToF MS，微生物限度試験等である．

### C. 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) 主に第 9 版食品添加物公定書未収載品について，①自主規格(案)及び第 10 版食品添加物公定書成分規格案の作成状況，②試験法に関する第 3 者及び自社検証実施状況，③国内外の規格，④流通実態，⑤安全性評価の実施状況，等について調査結果をまとめた．これらの調査結果は，既存添加物の成分規格設定の優先順位だけでなく，消除対象の選出の指標とする予定である．

成分規格や流通実態の調査において，当該添加物の製造又は輸入に携わる事業者が見つからず，成分規格案の策定が困難な品目があった．自主規格がある品目に関しても，成分規格案の作成作業に伴う事業者の負担が小さくないこと等の理由で，公的に規格化を審議する上で必要な検証データが集まらない例もあった．したがって，引き続き，既存添加物に関わる事業者を調査すると共に，公的な成分規格の設定のメリット，あるいは設定しない場合のデメリットを明確化する等，既存添加物の規格化について更に別の方策を講じる必要があると考えられた．

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

1) 既存添加物「キトサン」の脱アセチル化度の測定法について検討した．成分規格の試験法としては滴定法を設定する予定であるが，滴定法が正しい値を求めているかどうか不明であったため，固体 NMR による手法( $^{13}\text{C}$ -CP/MAS-NMR)を用いて検証した．その結果，両法によりほぼ等しい値が求められたことから，滴定法が規格試験法として十分に機能することが確認できた．

2) 既存添加物「オリゴガラクトン酸」の成分規格の設定のための基礎情報を得ることを目的として，入手できた製品中の成分組成を  $^1\text{H}$ -qNMR，HPLC 及びカルバズール-硫酸法で確認した．モノガラクトン酸(mGA)，ジガラクトン酸(dGA)及びトリガラクトン酸(tGA)の合算として，HPLC では 31.8%， $^1\text{H}$ -qNMR では 31.1%とほぼ等しい値を示した．一方，カルバズール-硫酸法では，製品中の含量を mGA として求めたところ，43.4%と算出され，HPLC 又は  $^1\text{H}$ -qNMR で求めた値と 10%程度異なった．これは，カルバズール-硫酸法では，反応する成分全てが mGA として求められることから，HPLC 又は  $^1\text{H}$ -qNMR ではピーク又はシグナルとして検出されず定量できない成分も合算されているためと考えられた．しかし，mGA，dGA 及び tGA の純度既知の定量用標品の供給は困難であると考えられることから，成分規格に適用できる試験法は，現状ではカルバズール-硫酸法以外に選択肢はないと思われた．

3) キハダ抽出物の成分規格設定のための基礎

情報を得る目的で成分分析を行った。UPLC/PDA/MS より、ベルベリン、パルマチン、ジャトリジン、フェロデンドリン、マグノフロリン、3-フェルロイルキナ酸及び5-フェルロイルキナ酸の存在が示唆された。また、<sup>1</sup>H-qNMR により、製品中のベルベリン含量は2.83%と算出された。更に、日本薬局方のオウバクの成分規格を参考に TLC による確認試験を実施したところ、適用できることがわかった。「キハダ抽出物」としては1製品しか流通が確認できなかったため、異なる製品においても成分組成が一定であるか確認できていない。また、本製品はベルベリンを含有することから、食薬区分についても考慮して成分規格を設定するべきと考えられた。

- 4) 既存添加物「ショウガ抽出物」について成分規格設定の基礎情報を得る目的で成分分析を行った。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製品も認められた。その他の成分についても、検出は製品により一定ではなかった。ショウガ由来の添加物には、ショウガ抽出物及び香辛料抽出物がある。①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物、②はショウガ抽出物、③は香辛料抽出物、とするもので用途により成分分布が異なることが確認された。よって、[6]-gingerol 及び[6]-shogaol をいずれか又はどちらかを検出することでショウガ抽出物であることを確認できると考えられた。
- 5) 既存添加物「ヒマワリ種子抽出物」の有効成分の確認のため、成分分析及び有効性評価を

行った。構造解析の結果、モノカフェオイルキナ酸類 (chlorogenic acid, 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid) と同定した。その他に、ジカフェオイルキナ酸類 (イソクロロゲン酸類 : 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid) を同定した。また、文献未記載の化合物2種を単離し、化合物1はキナ酸の5位にカフェオイル基、3位に2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合した構造と決定した。化合物2はキナ酸の5位にカフェオイル基、4位に2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合したものと構造決定した。

DPPH ラジカル消去活性を指標に活性画分について検討した結果、主検出する3種のモノカフェオイルキナ酸類の他、その他の同定した化合物の寄与が示唆され、これらが有効成分であると考えられた。

- 6) 既存添加物「酵素処理ナリンジン」について定量法を検討した。RMS を用いた SR-HPLC の当該分析への応用に関する検討を実施し、基準物質である4-ヒドロキシ安息香酸メチル及びカフェインに対するナリンギン、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン及びナリンゲニン 7-O-グルコシドの RMS を明らかにした。また、実試料を用いた検討において、SR-HPLC 法により得られたナリンギン及び $\alpha$ -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 SR-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ギン及び

$\alpha$ -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。

- 7) 既存添加物「ウコン色素」について、RMS を用いた SR-HPLC の適用を検討した。高純度な主成分の入手法には HSCCC を用いた。また、SR はクルクミンから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ものを用いた。<sup>1</sup>H-qNMR に基づいた定量値を用いて RMS を算出し、ウコン色素製品を 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た。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ことから本法がウコン色素の定量法に適用できると結論した。今後、成分規格の定量法とするため、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必要がある。
- 8) 既存添加物「シタン色素」の主成分の分析法を検討した。HSCCC を用いて、主成分であるサンタリン A 及び B の単離精製した。同時に未知の色素成分が得られたが、分析が困難であり同定に至らなかった。次に、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 R<sub>f</sub> 値を求めることができた。
- 9) 既存添加物「アナトー色素」の主成分であるノルビキシン(NBx)及びビキシン(Bx)の定量法を検討した。市販の NBx は純度が 91.1% であり Bx の混入が確認され、定量用標品として不適であったため、HSCCC により NBx の単離精製する必要がある。NBx 及び Bx に対し新たに SR をデザインし、保持時間等を確認した結果、n-C<sub>9</sub> 及び n-C<sub>11</sub> の側鎖を持つ誘導体が SR 候補物質として有効と考えら

れた。NBx, Bx 及び SR 候補物質について検量線を作成した結果、相関係数 0.997 以上と良好な結果が得られた。よって、SR 候補物質に対する RMS を求めることで SR-HPLC による定量分析が可能と考えられた。今後、*trans* 体の NBx 及び Bx の精製等を行い、RMS の算出を行う予定である。

- 10) 既存添加物「ニガヨモギ抽出物」の成分規格の基礎情報を得る目的で、入手できた製品について分析した。LC/MS 分析の結果、製品中にセスキテルペンラクトンである absinthin, anabsin 及び anabsinthin が同定され、これらが本抽出物の本質、すなわち苦味成分であり、成分規格試験の指標成分として有用と考えられた。その他の成分としてはフラボノイドである artemetin, またリグナンである yangambin, epiyangambin, diayangambin, sesartemin, episesartemin A, episesartemin B 及び diasesartemin の 7 成分が確認された。HPLC 分析が、absinthin の定量法及び確認試験として期待できたが、別に純度既知の定量用標品の規格化が問題となると考えられた。TLC 分析では順相条件及び逆相条件共に absinthin の濃度に比例した明瞭なスポットが確認され、TLC による R<sub>f</sub> 値を規定した確認試験が設定できると考えられた。
- 11) 乾留抽出物添加物(木酢液, チャ乾留物, モウソウチク乾留物)について成分分析を行った。GC/MS クロマトグラム上に多数のピークが観察され、NIST ライブラリと照合した結果、原料の熱分解に由来するカルボニル化合物、フラン類、ピラン類、フェノール類及び含窒素化合物の存在が示唆された。

これらの成分について、製品中の含量を算出したところ、最大で 0.5%、合算で 1~4%程度と微量であった。これらの品目の成分規格設定の根拠データとする予定である。

12)  $^1\text{H-qNMR}$  により、香辛料抽出物中の指標成分の直接定量を検討した。コショウ種子は piperine, オールスパイスは eugenol, フェンネルは anethole, バニラは vanilline, ethylvanillin, ケイヒは cinnamualdehyde, ローズマリーは rosemarinic acid を指標成分とし、 $^1\text{H-qNMR}$  を用いた定量を試みた結果、十分な精度で含量を算出することが可能であった。また、ケイヒ中の cinnamualdehyde は HPLC による定量時に不安定であることが示唆され、直接且つ短時間で測定できる  $^1\text{H-qNMR}$  が優れた定量法であることが示された。

13) DPPH を用いた抗酸化能の評価法 (DPPH 法)が既存添加物の規格試験に適用できるかどうか検討した。DPPH 法は、過去の本研究班においてバリデーションを行い、標準的手法として提案している。また、一般試験法への導入も検討されている。本手法は、吸光度測定(検出波長：517 nm)によりトロロックス(基準物質)と相対的に抗酸化能を評価する(トロロックス等価活性値, TEAC)ため、簡便且つ迅速な試験法である。しかしながら、96 ウェルプレートを用いた試験キットの妥当性評価が十分に検討されていないため、実験手技や実験環境を軸に DPPH 法の再現性や汎用性を評価した。没食子酸(酸化防止剤)を用いて試薬や調製溶媒を変更して DPPH 法を実施した結果、いずれもバラつき

の少なく TEAC を得ることができた。しかしながら、様々な既存添加物に応用した際、特に低極性の化合物に関して試験溶液が白濁し、測定が困難であり、限定的に適用できると考えられた。

14) 分析法の開発として、外部標準法定量 NMR (EC-qNMR)の自動測定スクリプトの開発に取り組んだ。既存添加物に含まれる成分は希少なものが多く、これらの試薬又は標品は一般的に高価である。EC-qNMR の場合、その試料液は、内部標準の汚染もなく、純度又は含量の測定後は、濃度既知の標準液として検量線の作成に利用できるのも魅力的である。今後は、EC-qNMR の社会実装に取り組んでいく予定である。

15) 既存添加物の有効成分又は指標成分の定量法を設定する上で定量用標品の供給問題がある。このため、分析対象物質の定量用標品を必要としない定量分析法の開発が求められている。PDA は広範囲の波長域における吸収を検出できるため、HPLC などの分析機器の検出器として汎用されている。PDA 検出器を用いた定量分析においては、正確な校正が可能となれば、飛躍的に利便性が向上する。そこで本研究では、PDA の校正に利用可能な化合物、また、RMS を用いた HPLC による定量法にも利用できる化合物を探索した。導入する官能基やビルディングブロックの変更によって物理的特性の調整し、目的に適した化合物を合成した。誘導体化の容易さやスペクトルの長波長化の観点からビスアリールマレイミド誘導体や 1,4-ナフトキノン誘導体を選択した。これら

分子においては、共通の中間体に対して、それぞれ種々の芳香族化合物や様々なアミンやフェノール化合物を一段階で導入可能であるため、多種類の化合物を効率的に合成することができた。合成した誘導体の UV-Vis スペクトルを測定した結果、長波長域における吸収にはジメチルアミノ基の導入が有効であることが分かった。また、ビスアリアルマレイミド誘導体においてはイミドの側鎖として、1,4-ナフトキノン誘導体においてはクロロ基の置換によるポリエチレングリコール分子などの導入によって水溶性の向上などさらなる機能化を図ることもできる。カロテノイド類の HPLC を用いた定量に利用可能な SR については、ビスインドリルマレイミド分子を母骨格として同時に複数種類の分子を合成し、それらを逆相 HPLC 上で分離することで、HPLC 上での保持時間の異なる他種類の化合物をスクリーニング的に得ることができた。今回検討した手法を発展させることで様々な SR を簡便に設計できると考えられる。

- 16) 入手できた酵素製品を用いて、SDS-PAGE によって添加物酵素に含まれる個々のタンパク質を分離した後に、それぞれのタンパク質について MALDI-ToF MS による分析を行う PMF 解析を用いて、基原菌種の特定を行った。36 製品中 30 製品の基原が特定できたことから、PMF 解析は酵素品目の生物基原を調べるための有効な手段であることが明らかになった。しかしながら、近縁種のタンパク質も候補として提示してしまうことや、SwissProt に登録の無い生物種由来の製品については対応できないという問題点

が認められた。複数種の消化酵素を用い、ペプチドのパターンを増やすことで同定の精度を高める等の改良を行い、より精度の高い基原種同定法の構築を今後検討する。

- 17) 食品添加物公定書の微生物限度試験で規定されている試験条件を、その他試験条件と比較し、集落の生育性をもって真菌数計測の正確性と効率を評価した。その結果、公定書で規定の DG-18 寒天培地を用いて、規定の菌濃度を接種し 4 晩の培養後、集落の発育が過剰となり集落数の計測が不可能となる真菌群があった。ここには公定法に記載された *Aspergillus brasiliensis* も含まれた。また、同条件の培養条件で発育速度が遅く小さな集落が発育するため、最低 5 晩の培養が必要となる真菌群もあった。ここには公定法に記載された *Candida albicans* も含まれた。これらの群は両方とも環境中に高い頻度で分布するため、食品添加物に混入することは十分に考えられた。添加物公定書では、規定法と同等以上の検出感度及び精度を有する場合には、代替法の適用も可能であるとされているため、検出が予測される菌種によっては、代替法として寒天培地の種類の変更や、接種試験液の一層の希釈、培養日数の短縮も検討する必要があることが示された。

#### D. 健康危機情報

なし

#### E. 研究発表

##### E-1) 学会発表

##### E-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).
- 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).
  - 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*- $\alpha$ -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).
  - 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).
  - 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).
  - 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).
  - 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<sup>3)</sup>, 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).
  - 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).
  - 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: <sup>13</sup>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).
  - 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: <sup>31</sup>P 核を用いた <sup>31</sup>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).
  - 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研究会年会(2020.12).
- 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).
  - 13) 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).
  - 14) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物中の窒素定量分析~燃烧法 vs ケルダール法~. 食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.6).
  - 15) 建部千絵, 藤原由美子, 長久保直也, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 久保田浩樹, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた食用タール色素中の 6,6'-オキシビス(2-ナフトレンスルホン酸) 二ナトリウムの定量法の検討. 食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.6).
  - 16) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: Single-reference HPLC 法によるアントシアニンの定量に関する研究. 日本食品化学学会第 27 回学術大会(2021.6).
  - 17) 高木映里, 高橋未来, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析. 食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.6).
  - 18) 日置冬子, 多田敦子, 西崎雄三, 古庄紀子, 石附京子, 久保田浩樹, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物ジフェノコナゾールの規格試験法の検討及び異性体組成分析. 食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.6).
  - 19) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いたアントシアニンの定量に関する研究. 日本食品科学工学会第 68 回大会(2022.8).
  - 20) 長井理夏子, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章: 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析. 第 60 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(2021.10).
  - 21) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji T, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Iwamoto Y, Yoshiaki Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Absolute determination of an organophosphorus pharmaceutical, auranofin, using quantitative <sup>31</sup>P-NMR. The 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2021)(2021.8).
  - 22) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 丸山剛史, 浅野龍二, 三浦亨, 岩本芳明, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 定量 NMR を用いた日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした生薬等の定量指標成分アミグダリン及びアルブチンの絶対純度の測定. 日本生薬学会第 67 回年会(2021.9).
  - 23) 廣瀬昌平, 渡辺麻衣子, 多田敦子, 杉本

- 直樹, 佐藤恭子, 工藤由起子: 第9版食品添加物公定書における微生物限度試験法の大腸菌試験に関する検討. 第57回全国衛生化学技術協議会年会(2021.11).
- 24) 多田敦子, 堀江正一, 内山陽介, 栗田史子, 中村理奈, 杉浦潤, 井原紗弥香, 櫻井光, 久保田浩樹, 建部千絵, 寺見祥子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(令和2年度). 第57回全国衛生化学技術協議会年会(2021.11).
- 25) 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定量に関する研究, 第3回日本定量NMR研究会(2021.12).
- 26) 西崎雄三, 建部千絵, 吉田久美, 杉本直樹, 佐藤恭子: 外部標準法定量NMR(EC-qNMR)によるアントシアニン市販試薬の純度測定. 日本農芸化学会2022年度京都大会(2022.3).
- 27) 加納優奈, 今川真由香, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量NMR( $^1\text{H}$ -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量~オールスパイス中の eugenol およびケイヒ中の cinnamaldehyde の定量~. 日本薬学会第142年会(2022.3).
- 28) 増本直子, 大野拓巳, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 中島馨, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: サフラン中の香気成分サフラナルの相対モル感度を用いたGC-FIDによる定量. 日本薬学会第142年会(2022.3).
- 29) 増本直子, 中島馨, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: クロロゲン酸類縁体の構造と相対モル感度の関係. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 30) 田村夏希, 高橋未来, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: DPPH Antioxidant assay の技能向上に関する基礎検討. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 31) 加藤菜帆, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 天然苦味料ニガヨモギ抽出物の成分規格作成を目的とした基礎的検討. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 32) 西崎雄三, 建部千絵, 石附京子, 増本直子, 中島馨, 吉田久美, 杉本直樹, 佐藤恭子: 外部標準法定量NMR(EC-qNMR)によるアントシアニンの純度測定. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 33) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: りんごに含まれるクロロゲン酸類の相対モル感度を用いた定量法の確立. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 34) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 定量NMRに基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について. 日本食品科学工学会第69回大会(2022.8).
- 35) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 鈴木梓, 浅野龍二, 五十嵐靖, 三浦亨, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 古川茶勲, 嶋田典基, 合田幸広: プシモノエステルアルカロイドの相対モル感度(RMS)を用いた日本薬局方定量法の検討. 日本生薬学会第68回年会(2022.9).

- 36) 阿部裕, 山口未来, 六鹿元雄, 佐藤恭子, 杉本直樹: 電子レンジ調理食品用器具・容器包装の溶出試験条件の検討. 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2022.9).
- 37) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹: 既存添加物: 乾留抽出物製品の PAHs 定量分析法の開発と実態調査. 第59回全国衛生化学技術協議会年会(2022.10).
- 38) 西崎雄三, 石附京子, 吉村弘伸, 松熊伸也, 朝倉克夫, 末松孝子, 杉本直樹: Q値を指標にした外部標準法定量 NMR(EC-qNMR)の測定自動化とその定量精度について. 第61回 NMR 討論会(2022.11).
- 39) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 乾留抽出により得られる既存添加物の成分比較(木酢液・チャ乾留物・モウソウチク乾留物). 日本食品衛生学会第118回学術講演会(2022.11).
- 40) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン SR-HPLC 法によるアナトー色素の定量評価の構築. 日本食品衛生学会第118回学術講演会(2022.11).
- 41) 都築明日香, 西崎雄三, 増本直子, 鈴木俊宏, 兎川忠晴, 杉本直樹: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR): 試料間でレシーバーゲインが異なるときの補正について. 第4回日本定量 NMR 研究会年会(2022.12).
- 42) 黄奕, 大槻崇, 森川悟, 松藤寛, 治療薬物モニタリング(薬物濃度測定)における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用. 第4回日本定量 NMR 研究会年会(2022.12).
- 43) 内山奈穂子, 清田浩平, 細江潤子, 小松功典, 杉本直樹, 石附京子, 小出達夫, 村林美香, 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, 藤田和弘, 武藤仁美, 小浜亜以, 五島隆志, 安田万寿, 植田知彦, 合田幸広:  $^{31}\text{P}$ -qNMR を利用した有機リン化合物ソフスブビルブシモノエステルアルカロイドの相対モル感度(RMS)を用いた日本薬局方定量法の検討. 第4回日本定量 NMR 研究会年会(2022.12).
- 44) 岡庭寛昂, 池上美音, 宮下采佳, 大槻崇, 松藤寛, 長田和実, 中西祐輔, 高橋恭子, 酪酸が腸管上皮バリアへ与える影響. 日本農芸化学会 2023 年度大会(2023.3).
- 45) 伊藤遥菜, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 定量 NMR ( $^1\text{H}$ -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量~バニラおよびバニラ香料中の vanillin および ethylvanillin の定量~, 日本薬学会第143年会(2023.3).
- 46) 二村佳音, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 定量 NMR ( $^1\text{H}$ -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量~ウイキョウおよび類似生薬中の anethole の定量~, 日本薬学会第143年会(2023.3).
- 47) 天倉吉章, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹: 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の成分解析, 日本薬学会第143年会(2023.3).
- 48) 渡辺麻衣子, 吉成知也, 西崎雄三, 増本直子, 多田敦子, 工藤由起子, 杉本直樹: 食品添加物の微生物限度試験におけ

る真菌数試験法の比較検討. 日本農芸化学会 2023 年度大会(2023.3).

- 49) 吉成知也, 関根葵, 小林直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 工藤由起子, 渡辺麻衣子: MALDI-ToF MS を用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究. 日本農芸化学会 2023 年度大会 (2023.3).

#### E-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 研究会年会(2020.12).
- 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)(USP on-line).
- 3) Sugimoto N: Virtual Roundtable Panelist. Emerging Technologies: Quantitative NMR and digital data-overview and perspectives. (2020.11)(USP on-line).
- 4) 杉本直樹: LC/MS を用いた定量分析における課題と解決事例 2021~定量のものさしである標準物質について~. 日本質量分析総合討論会(2021.5).
- 5) 杉本直樹, 齋藤剛, 末松孝子: qNMR による純度測定的一般要求事項に関する ISO 規格の概要. 第4回日本定量 NMR 研究会年会(2022.12).
- 6) 杉本直樹: 医薬品, 食品分野等における定量 NMR の実装とこれから. 定量 NMR の標準化と実用化. 日本薬学会第 143 年

会一般シンポジウム(2023.3).

#### E-2) 論文発表等

##### E-2-1) 論文等

- 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) Takashina S, Igarashi Y, Takahashi M, Kondo Y, Inoue K: Screening Method for the Quality Evaluation of Cannabidiols in Water-based Products Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Anal. Sci., 2020; 36: 1427-1430.
- 3) 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
- 4) 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. Chem., 2021; 37: 917-919.
- 5) 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.
- 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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 <sup>1</sup>H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. PLoS ONE., 2020; 15(12): e0243175.
  - 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. Regul. Toxicol. Pharmacol., 2020; (doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104664)
  - 11) 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 <sup>1</sup>H quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. Chem. Pharm. Bull. 2020; 68: 868-878.
  - 12) 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.
  - 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) 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  $^1\text{H}$  quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull.*, 2020; 68: 868-878.
- 15) Tsutumiuchi K, Toyoshima T, Hasegawa F, Terasawa R, Honda W, Sakakibara M, Ishida Y, Ikai Y, Ishibashi R, Furuya K, Morimoto T, Ishizuki K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Oka H: Molecular Structure of Gardenia Blue Pigments by Reaction of Genipin with Benzylamine and Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.* 2021; 69: 3904-3911.
- 16) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度に基づくシングルリファレンス GC 法および HPLC 法によるカラシ抽出物およびセイヨウワサビ抽出物中のイソチオシアン酸アリの定量. *食衛誌*, 2021; 62: 73-78.
- 17) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, 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, Iwamoto Y, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Purity Determination of Cyclophosphamide Hydrate by Quantitative  $^{31}\text{P}$ -NMR and Method Validation. *Chem. Pharm. Bull.*, 2021; 69 (7): 630–638.
- 18) 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.
- 19) Takahashi M, Morimoto K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Study on the synthesis of methylated reference and their application in the quantity of curcuminoids using single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *Chem. Pharm. Bull.*, 2022;70(1): 25–31.
- 20) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, 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, Iwamoto Y, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Purity Determination of Cyclophosphamide Hydrate by Quantitative  $^{31}\text{P}$ -NMR and Method Validation. *Chem. Pharm. Bull.*, 2021; 69 (7): 630–638.
- 21) 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*, 2021; 21: 894-901.
- 22) Bayrakceken GZ, Dogan Z, Saracoglu I, Picot L, Nagatsu A, Basaran AA: Food Plant with Antioxidant, Tyrosinase Inhibitory and Antimelanoma Activity: Prunus mahaleb L. *Food Bioscience*, 2022; 48: 101804.

- 23) Uchiyama N, Kiyota K, Hosoe J, Komatsu T, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Fujita K, Makino Y, Iwamoto Y, Miura T, Muto Y, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Quantitative <sup>31</sup>P-NMR for purity determination of sofosbuvir and method validation. Chem. Pharm Bull., 2022; 70: 892-900.
- 24) Ohtsuki T, Friesen JB, Chen SN, McAlpine JB, Pauli GF: Selective Preparation and High Dynamic-Range Analysis of Cannabinoids in "CBD Oil" and Other Cannabis sativa Preparations. J. Nat. Prod., 2022; 85(3): 634-645 (doi: 10.1021/acs.jnatprod.1c00976.)
- 25) Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y: Evaluation on suitability of culture broth and conditions for Escherichia coli growth and gas production test of food additives. Food Hyg. Safety Sci., In press.
- 26) Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara-Kudo Y, Watanabe M: Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. Food Addit. Contam. Part A, Submitted.
- 27) Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on <sup>1</sup>H-qNMR for khellactone esters from *Peucedanum japonicum* root extract. Food Chem., Submitted.

### E-2-2) 総説等

- 1) 永津明人：第7章「定量NMR(<sup>1</sup>H-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～」．生薬・薬用植物の技術と市場，2020: 71-78.
- 2) 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.
- 3) 杉本直樹: 既存添加物の化学的安全性確保. 食品衛生研究 2022; 72: 5.
- 4) 杉本直樹: 食品添加物公定書 10 版は予定通りの発刊へ. フードケミカル 2022; 9: 2-5.
- 5) 杉本直樹: 食品添加物の化学的安全性確保とこれからの課題. FFI ジャーナル, 2022; 227: 343-346.
- 6) 西崎雄三: qNMR に基づく相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量分析. 日本食品衛生学雑誌, 2022; 63(3): J51-J53.
- 7) 西崎雄三: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ. ぶんせき, 2022; 12: 498-503.

### E-2-3) 単行本等

- 1) Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: "Comprehensive Natural Products III", Volume 7; New Methods in Natural Products Chemistry, 7.04 Application of <sup>1</sup>H-quantitative NMR From the Viewpoint of Regulatory Science, Elsevier. Netherland, pp.50-60 (2020).

E. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度～令和4年度 総合分担研究報告書

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 背黒 勝也 一般社団法人日本食品添加物協会 専務理事

**研究要旨** 令和2年度から令和4年度にかけて、既存添加物の品質向上に資する研究として既存添加物の成分規格に関する各種調査に取り組んだ。各年度の実施内容を以下に示す。

令和2年度

- ・ 既存添加物成分規格案の整備状況
- ・ 第10版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目
- ・ 第5版既存添加物自主規格

令和3年度

- ・ 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況
- ・ 流通実態，使用実態
- ・ 今後（第5次）の消除に向けた調査
- ・ 安全性評価の状況調査
- ・ 第10版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目

令和4年度

- ・ 既存添加物の国内外の安全性評価情報について
- ・ 酵素の規格の業界の考え方について（微生物の基原に関する研究）
- ・ 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況
- ・ 既存添加物の品目ごとの基原生物（植物）の調査

これらの活動について報告する。

研究協力者

藤井結花 (一社)日本食品添加物協会  
常務理事

等々力博志 元(一社)日本食品添加物協会  
常務理事

京極泰久 (一社)日本食品添加物協会  
参事

**A. 研究方法**

既存添加物の成分規格の作成状況，安全性評価状況，流通実態を調査した。また，酵素品目の規格について業界の考え方をまとめた。既存添加物の基原生物の調査を行った。詳細については，各年度の報告書に記載したとおりである。

**B. 研究結果**

各年度の報告書に詳細を示したので参照していただきたい。

**C. 考察**

令和2年度から令和4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164成分規格（品目としては146）が存在しており，うち54品目は，公定規格案及び自主規格がないものであった。多くは当該添加物の製造又は輸入に携わる事業者が協会会員の中に見つからず，公定書収載に向けた規格案の策定が困難と言える。自主規格が有る添加物に関しても，公定書成分規格案の作成作業に伴う事業者の負担が小さ

くないことなどから公定書収載を要請に至らない例もある。

地道な事業者探索活動とともに、成分規格設定による事業者のメリットの明確化など現状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。

#### **D. 謝辞**

各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部長杉本直樹先生、前部長佐藤恭子先生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る次第である。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度～令和4年度 総合分担研究報告書

既存添加物の有効成分の解明

既存添加物の成分分析と分析法の検討

分担研究者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

**研究要旨** 既存添加物の品質確保のためには、それぞれの品目に対して成分規格の設定が必要である。しかし、既存添加物の多くは複雑な混合物であり、有効成分又は指標成分が不明、且つ従来法では成分規格が設定できないものも多い。本研究では、既存添加物の成分規格を設定する上で必要な基礎情報を得ることを目的として、「キトサン」、「オリゴガラクチュロン酸」及び「キハダ抽出物」について検討した。「キトサン」については、固体 NMR により、従来法のポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)によるコロイド滴定が脱アセチル化度を算出するための試験法として、「オリゴガラクチュロン酸」については、<sup>1</sup>H-qNMR により、従来法のカルバゾール-硫酸法がガラクルロン酸の定量法として、十分機能することが確認できた。また、「キハダ抽出物」については、UPLC/PDA/MS により、ベルベリン等のアルカロイドが含まれること、<sup>1</sup>H-qNMR によりベルベリン含量を明らかとした。

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 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り、食品添加物公定書に記載されている(令和 4 年 12 月現在)。残り 151 品目(枝番込み)と香辛料抽出物 1 品目(74 基原)の内、約 50 品目については、令和元年~令和 3 年に開催された食品添加物公定書作成検討会(全 12 回)において、公的な成分規格案が作成され、令和 5 年度に刊行予定の第 10 版食品添加物公定書に記載される見込みとなっている。

食品添加物公定書作成検討会では、既存添加

物の成分規格案の設定根拠が要求される。すなわち、1.基原や有効成分又は指標成分に関する基礎情報、2.分析法又は試験法に関する情報、3.設定する試験法の妥当性が要求される。しかし、既存添加物には、有効成分や指標成分が明らかでない品目、従来法では分析できない品目、有効成分や指標成分が明らかであっても標品の不在から試験法が設定できない品目がある。このため、既存添加物に関する本研究は、流通が確認されサンプルが入手できた品目について検討、必要に応じて分析法の開発を行うことを目的としている。また、これまでの研究成果は、食品添加物公定書作成検討会に提出される成分規格案及びその設定根拠の基礎情報として用いられている。

本研究では、サンプルが入手できた既存添加物の内、「キトサン」、「オリゴガラクチュロン酸」及び「キハダ抽出物」について、分析法の検討及び成分確認を行った。

## B. 研究方法

**B-1) <sup>13</sup>C-CP/MAS-NMR による既存添加物キトサンの脱アセチル化度の測定**

### B-1-1) 固体 NMR による定量

キチン製品は国内で入手可能な試薬 7 製品 (CN1-7) 及び別に入手した食品添加物原料 1 製品 (CN8), キトサン製品は食品添加物 5 製品 (CS1-5) を試料として用いた。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。試料を 4 mm 固体 NMR 試料管に詰め、室温条件下、 $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  の 2 つの核種を測定した。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% とされており、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。そこで、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、観察されるシグナル比からキトサン製品中のアセチルグルコサミン (AGU) 含量を相対的な量として求めた。また、脱アセチル化度は、 $\text{脱アセチル化度}(\text{mol}\%) = \text{GU 含量}(\text{mol}\%) = 100 - \text{AGU 含量}(\text{mol}\%)$  で求めた。

### B-1-2) コロイド滴定による $\text{NH}_2$ 基の定量

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。そこで本滴定法により、 $\text{NH}_2$  基の含量 = GU 含量 (mol%) を求め、脱アセチル化度を算出した。

### B-2) 既存添加物オリゴガラクトuron酸の分析法の検討

オリゴガラクトuron酸は国内で入手した食品添加物 1 製品 (液体) (oGA) (C2218) を試料として用いた。また、比較試料として、食品添加物として流通しているペクチン 1 製品 (PT) (A108) 及びペクチン分解物 3 製品 (PD1, PD2, PD3) (A38, A446, A558) を用いた。市販のガラクトuron酸 (mGA), ジガラクトuron酸 (dGA), トリガラクトuron酸 (tGA) 及びグルコース (Glu) の純度を  $^1\text{H}$ -qNMR (DSS- $d_6$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ) により求め、HPLC 分析の標品として用いた。添加物製品 (oGA) 中の各成分の含量を、直接  $^1\text{H}$ -qNMR によ

り直接、HPLC により間接に定量した。また、第 9 版食品添加物公定書収載の「ペクチン分解物」の成分規格の定量法に倣い、カルバゾール-硫酸法により定量した。

### B-3) 既存添加物キハダ抽出物の成分分析

キハダ抽出物製品として、市場に流通しているオウバクエキス製品 (C2221) を用いた。この製品を溶解したものについて UPLC/PDA/MS により分析した。製品中のベルベリン含量は、 $^1\text{H}$ -qNMR により算出した。

## C. 結果及び考察

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

#### C-1-1) 固体 NMR による定量

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。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、MAS (Magic Angle Spinning) と呼ばれる技法が用いられる。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 ( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  等) から磁気回転比の小さい核、すなわち、感度の低い核 ( $^{13}\text{C}$  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。

キチンとキトサンの  $^1\text{H}$  の縦緩和時間  $T_{1\text{H}}$  を測定した結果、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はあるが、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。次に、キチンについて  $^{13}\text{C}$  の縦緩和時間  $T_{1\text{C}}$  を測定したところ、C1 位が最長で約 100 s であった。よって、キトサン中の AGU

含量の測定にはCP/MASが妥当であると判断した。

処理条件及び解析条件を検討し最適化した後に同一条件でキチン製品及びキトサン製品について測定した。キチン製品 CN1 を基準物質とし、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。その結果、AGU 含量は製品によって異なり、4~22%であった。

### C-1-2) 滴定による NH<sub>2</sub> 基の定量

キトサンの脱アセチル化度は、一定の品質・性質を担保する上で重要な指標である。キトサンは、キチンを 70%脱アセチル化したものとされていることから、成分規格には脱アセチル化度 70.0%以上と規定し、その試験法としては安価な滴定法が適当であると考えられる。滴定法は、試料中の GU の-NH<sub>2</sub> 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異なるが、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。

滴定法と今回検討した固体 NMR (<sup>13</sup>C-CP/MAS)によって求めたキトサン(CS1-4)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-NH<sub>2</sub> 基を測定していることから、GU 以外の-NH<sub>2</sub> 基を合算して測定している可能性があると考えられる。

<sup>13</sup>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るため、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、既存添加物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。

### C-2) オリゴガラクトン酸の分析

ピラノースは他の糖とグルコシド結合していない 1 位の α 及び β 異性体が存在する。α 及び β 異性体のプロトンシグナルが観察される複雑なスペクトルとなる。<sup>1</sup>H-qNMR において各シグナルの帰属情報は正確に定量するために必須であることから、2D NMR (COSY)測定により mGA, dGA, tGA, Glu のシグナルを可能な限り帰属した。市販の mGA 試薬の α 及び β 異性体のシグナルから求めた両異性体の含量は 78.05%となった。mGA 試薬が一水和物とされているものがあること、食品添加物公定書の試薬の項には「D-ガラクトン酸、定量用」の化学式が一水和物で表されていることを考慮し、一水和物で再計算した場合は 85.29%となった。したがって、試薬の mGA の純度は、無水物換算で 78.05%であり、純度が低いことがわかった。(ただし、二水和物換算で 92.54%、酸水和物換算で 99.78%となることから、mGA は実際には三水和物として流通している可能性がある。)同様にして <sup>1</sup>H-qNMR により、dGA が 69.84%、tGA が 73.50%、Glu が 99.50%と算出された。よって、mGA, dGA 及び tGA は純度が低く、定量用標品として用いることは不適切であると考えられた。

次に、mGA, dGA, tGA, Glu のシグナル帰属情報を元に、oGA 製品中の各成分の含量を <sup>1</sup>H-qNMR により算出した。ガラクトン酸類はそれ自身が酸であるため、調製濃度、成分組成により pH が変化し、それぞれのシグナルの化学シフトが移動してしまう場合がある。そのため Glu 及び mGA のシグナルについてはそれぞれを標準添加することによって強度が増すシグナルを確認し帰属した。また、dGA 及び tGA のシグナルについては、それぞれのスペクトルとの比較により推測した。それぞれのシグナル積分値から添加物製品(oGA)中の成分の含量を求めた結果、mGA が 5.26%、dGA が 8.58%、tGA が 17.3%で 3 種の合計が 31.1%であり、Glu が 10.3%とかなりの量含まれることがわかった。

「オリゴガラクトン酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトン酸の 1~9

量体の混合物からなる。」とされており、Gluが含まれるとは記載されていない。基原・製法・本質のこの記載中の「ペクチン」は既存添加物のペクチンを指す。第9版食品添加物公定書の「ペクチン」の成分規格によれば、「本品は、かんきつ類、リンゴ等から得られた、部分的にメチルエステル化されたポリガラクトン酸等の水溶性多糖類を成分とするものである。ショ糖、ブドウ糖、乳糖又はデキストリンを含むことがある。」と定義されている。したがって、ショ糖、ブドウ糖、乳糖又はデキストリンを含んだ「ペクチン」を原料としてを製造したとすれば、「オリゴガラクトン酸」製品<C2218>にGluが含まれているとの説明ができる。

次に、HPLCにより、オリゴガラクトン酸の内容物の分析を行った。既存添加物「オリゴガラクトン酸」の基原・製法・本質には「ガラクトン酸の1~9量体の混合物からなる」とされているが、HPLCの結果から、今回入手したoGA製品はガラクトン酸の3量体までで構成されているものと判断された。更に、mGA, dGA, tGAの検量線(<sup>1</sup>H-qNMRにより純度を補正)を用い、添加物製品(oGA)中の各成分の含量を求めた結果、mGA 5.25%, dGA 8.81%, tGA 17.8%で合算すると31.8%となった。この結果は<sup>1</sup>H qNMRによる定量結果とよく一致した。

次に、第9版食品添加物公定書のペクチン分解物の定量法を参考に、カルバゾール-硫酸法によるガラクトン酸の定量を検討した。mGAの検量線(<sup>1</sup>H-qNMRにより純度を補正)から定量値を求めた結果、添加物製品 oGA 中の濃度はmGAとして43.4%と算出された。カルバゾール-硫酸法による定量値は、HPLCのそれよりも大きい値となったが、これはGluの存在だけでは説明できず、HPLCでは検出できていない4量体以上のオリゴマーの存在を示唆するものであったが、これ以上の情報を得ることはできなかった。

### C-3) 既存添加物キハダ抽出物の成分分析

キハダ抽出物製品の分析に先立ち、溶媒への溶解性を確認した。まず、5 mg/mLとなるように、水、水/メタノール(50/50)混液、メタノール

またはDMSOを加え、超音波下で溶解しようと試みたが、いずれの溶媒でも微細なゼリー状の溶け残りが生じた。さらに溶媒を加え2 mg/mLとしたが、完全に溶けなかった。日本薬局方に収載されているオウバクはキハダの樹皮であり、確認試験に「本品の粉末に水を加えてかき混ぜるとき、液は粘液のためゲル状を呈する」とある。キハダ抽出物製品を水などの溶媒に溶かした際に生じたゼリー状の溶け残りはこの粘液と考えられる。

次に、それぞれの溶媒で調製した試料溶液及びその上澄みをUPLC/PDA/MSに付し、クロマトグラムを比較したところ、差違は観察されなかった。よって、UPLC/PDA/MSで確認できる成分は十分に溶解していると判断した。DMSOが最も溶け残りが少なく、透明度も高かったことから、<sup>1</sup>H-qNMRによるベルベリンの定量にはDMSO-*d*<sub>6</sub>を用いることとした。

UPLC/PDA/MSにより、キハダ抽出物製品にもオウバク同様、パルマチンが含まれており、ベルベリンの直前にパルマチン(*m/z* 352)のピークが観察された。また、ベルベリン及びパルマチン以外に観察された各ピークは、MSスペクトルより、ジャトリジン(*m/z* 338)、フェロドリン(*m/z* 342)、マグノフロリン(*m/z* 342)、3-フェルロイルキナ酸(*m/z* 368)、5-フェルロイルキナ酸(*m/z* 368)と推定された。一方、オウバクの成分とされているオバクノン及びリモニンを確認できなかった。

「キハダ抽出物」製品をDMSO-*d*<sub>6</sub>に溶解し、<sup>1</sup>H-qNMR測定に付し、製品中のベルベリンの含量を求めた。δ 0 ppm付近のDSS-*d*<sub>6</sub>のシグナル(9H)を基準とし、δ 6.170 ppm (-OCH<sub>2</sub>O-, 2H)のベルベリンのシグナルの定量用とした。その結果、「キハダ抽出物」製品中のベルベリン含有量は2.83%と算出された。

### D. 結論

本研究では、キトサン、オリゴガラクトン酸及びキハダ抽出物について、成分規格設定に資する基礎情報を得る目的で分析を行った。

キトサンの脱アセチル化度の測定法について

て検討した。成分規格の試験法として滴定法を設定する予定であるが、滴定法が正しい値を求めているかどうか不明であったため、固体NMRによる手法( $^{13}\text{C}$ -CP/MAS-NMR)を用いて検証した。その結果、両法によりほぼ等しい値が求められたことから、滴定法が規格試験法として十分に機能することが確認できた。

オリゴガラクトン酸の成分規格の設定のための基礎情報を得るために、入手できた添加物製品 *oGA* 中の成分組成を  $^1\text{H}$ -qNMR, HPLC 及びカルバゾール-硫酸法で確認した。カルバゾール-硫酸法で添加物製品 *oGA* 中の含量を *mGA* として求めたところ、43.4%と算出され、HPLC 又は  $^1\text{H}$ -qNMR で求めた値と 10%程度異なった。カルバゾール-硫酸法では、反応する成分全てが *mGA* として求められることから、HPLC 又は  $^1\text{H}$ -qNMR ではピーク又はシグナルとして検出されず定量できない成分も合算されていると考えられた。しかし、*mGA*, *dGA* 及び *tGA* の純度既知の定量用標品の供給は困難であると考えられることから、成分規格に適用できる試験法は、現状ではカルバゾール-硫酸法以外に選択肢はないと思われた。

キハダ抽出物の成分規格設定のための基礎情報を得る目的で成分分析を行った。UPLC/PDA/MS より、ベルベリン、パルマチン、ジャトリジン、フェロデンドリン、マグノフロリン、3-フェルロイルキナ酸及び 5-フェルロイルキナ酸の存在が示唆された。また、 $^1\text{H}$ -qNMR により、製品中のベルベリン含量は 2.83%と算出された。しかしながら、これまでに 1 製品しか流通が確認できておらず、異なる製品においても成分組成が一定であるか確認できていない。また、本製品はベルベリンを含有することから、食薬区分についても考慮して成分規格を設定すべきと考えられた。

## E. 研究発表

### E-1) 学会発表

#### E-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).

- 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).
- 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*- $\alpha$ -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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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:  $^{13}\text{C}$ -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).
- 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:  $^{31}\text{P}$ 核を用いた  $^{31}\text{P}$ -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研究会年会(2020.12).
  - 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研究会年会(2020.12).
  - 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).
  - 13) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物中の窒素定量分析~燃焼法 vs ケルダール法~. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6).
  - 14) 建部千絵, 藤原由美子, 長久保直也, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 久保田浩樹, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた食用タール色素中の 6, 6'-オキシビス(2-ナフトレンスルホン酸) ニナトリウムの定量法の検討. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6).
  - 15) 高木映里, 高橋未来, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6).
  - 16) 日置冬子, 多田敦子, 西崎雄三, 古庄紀子, 石附京子, 久保田浩樹, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物ジフェノコナゾールの規格試験法の検討及び異性体組成分析. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6).
  - 17) 長井理夏子, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章: 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析. 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(2021.10).
  - 18) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji T, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Iwamoto Y, Yoshiaki Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Absolute determination of an organophosphorus pharmaceutical, auranofin, using quantitative  $^{31}\text{P}$ -NMR. The 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2021)(2021.8).
  - 19) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 丸山剛史, 浅野龍二, 三浦亨, 岩本芳明, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田基, 合田幸広: 定量NMRを用いた日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした生薬等の定量指標成分アミグダリン及びアルブチンの絶対純度の測定. 日本生薬学会第67回年会(2021.9).
  - 20) 長井理夏子, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析, 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(2021.11).
  - 21) 廣瀬昌平, 渡辺麻衣子, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 工藤由起子: 第9版食品添加物公定書における微生物限度試験法の大腸菌試験に関する検討, 第57回全国衛生化学技術協議会年会(2021.11).
  - 22) 多田敦子, 堀江正一, 内山陽介, 栗田史子, 中村理奈, 杉浦潤, 井原紗弥香, 櫻井光, 久保田浩樹, 建部千絵, 寺見祥子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(令和2年度), 第57回全国衛生化学技術協議会年会(2021.11).
  - 23) 西崎雄三, 建部千絵, 吉田久美, 杉本直樹, 佐藤恭子: 外部標準法定量NMR (EC-qNMR) によるアントシアニン市販試薬の純度測定. 日本農芸化学会2022年度京都大会(2022.3).
  - 24) 加納優奈, 今川真由香, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量NMR (1H-qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量~オールスパイス中のeugenolおよびケイヒ中のcinnamaldehydeの定量~. 日本薬学会第142年会(2022.3).

- 25) 増本直子, 大野拓巳, 鈴木俊宏, 兎川忠晴, 中島馨, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: サフラン中の香氣成分サフランールの相対モル感度を用いたGC-FIDによる定量. 日本薬学会第142年会(2022.3).
- 26) 増本直子, 中島馨, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: クロロゲン酸類縁体の構造と相対モル感度の関係. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 27) 田村夏希, 高橋未来, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: DPPH Antioxidant assay の技能向上に関する基礎検討. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 28) 加藤菜帆, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 天然苦味料ニガヨモギ抽出物の成分規格作成を目的とした基礎的検討. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 29) 西崎雄三, 建部千絵, 石附京子, 増本直子, 中島馨, 吉田久美, 杉本直樹, 佐藤恭子: 外部標準法定量 NMR(EC-qNMR)によるアントシアニンの純度測定. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 30) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: りんごに含まれるクロロゲン酸類の相対モル感度を用いた定量法の確立. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会(2022.5).
- 31) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 鈴木梓, 浅野龍二, 五十嵐靖, 三浦亨, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 古川茶勲, 嶋田典基, 合田幸広: ブシモノエステルアルカロイドの相対モル感度(RMS)を用いた日本薬局方定量法の検討. 日本生薬学会第68回年会(2022.9).
- 32) 阿部裕, 山口未来, 六鹿元雄, 佐藤恭子, 杉本直樹: 電子レンジ調理食品用器具・容器包装の溶出試験条件の検討. 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2022.9).
- 33) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹: 既存添加物: 乾留抽出物製品のPAHs定量分析法の開発と実態調査. 第59回全国衛生化学技術協議会年会(2022.10).
- 34) 西崎雄三, 石附京子, 吉村弘伸, 松熊伸也, 朝倉克夫, 末松孝子, 杉本直樹: Q 値を指標にした外部標準法定量 NMR(EC-qNMR)の測定自動化とその定量精度について. 第61回 NMR討論会(2022.11).
- 35) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 乾留抽出により得られる既存添加物の成分比較(木酢液・チャ乾留物・モウソウチク乾留物). 日本食品衛生学会第118回学術講演会(2022.11).
- 36) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン SR-HPLC法によるアナトー色素の定量評価の構築. 日本食品衛生学会第118回学術講演会(2022.11).
- 37) 都築明日香, 西崎雄三, 増本直子, 鈴木俊宏, 兎川忠晴, 杉本直樹: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR): 試料間でレシーバーゲインが異なるときの補正について. 第4回日本定量NMR研究会年会(2022.12).
- 38) 内山奈穂子, 清田浩平, 細江潤子, 小松功典, 杉本直樹, 石附京子, 小出達夫, 村林美香, 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, 藤田和弘, 武藤仁美, 小浜亜以, 五島隆志, 安田万寿, 植田知彦, 合田幸広: <sup>31</sup>P-qNMRを利用した有機リン化合物ソフスビルブシモノエステルアルカロイドの相対モル感度(RMS)を用いた日本薬局方定量法の検討. 第4回日本定量NMR研究会年会(2022.12).
- 39) 伊藤遥菜, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 定量NMR (1H-qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量～バニラおよびバニラ香料中のvanillinおよびethylvanillinの定量～, 日本薬学会第143年会(2023.3).
- 40) 二村佳音, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 定量NMR (<sup>1</sup>H-qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量～ウイキョウおよび類似生薬中のanetholeの定量～, 日本薬学会第143年会(2023.3).
- 41) 天倉吉章, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹: 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の成分解析, 日本薬学会第143年会(2023.3).
- 42) 渡辺麻衣子, 吉成知也, 西崎雄三, 増本直子, 多田敦子, 工藤由起子, 杉本直樹: 食品添加物の微生物限度試験における真菌数試

験法の比較検討. 日本農芸化学会2023年度大会(2023.3).

- 43) 吉成知也, 関根葵, 小林直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 工藤由起子, 渡辺麻衣子: MALDI-ToF MSを用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究. 日本農芸化学会2023年度大会(2023.3).

## E-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研究会年会.(2020.12).
- 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)(USP on-line).
- 3) Sugimoto N: Virtual Roundtable Panelist. Emerging Technologies: Quantitative NMR and digital data-overview and perspectives. (2020.11)(USP on-line).
- 4) 杉本直樹: LC/MSを用いた定量分析における課題と解決事例2021~定量のものさしである標準物質について~. 日本質量分析総合討論会(2021.5).
- 5) 杉本直樹, 齋藤剛, 末松孝子: qNMRによる純度測定的一般要求事項に関するISO規格の概要. 第4回日本定量NMR研究会年会(2022.12).
- 6) 杉本直樹: 医薬品, 食品分野等における定量NMRの実装とこれから. 定量NMRの標準化と実用化. 日本薬学会第143年会一般シンポジウム(2023.3).

## E-2) 論文発表等

### E-2-1) 論文等

- 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; 37: 917-919.

- 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 <sup>1</sup>H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. PLoS ONE, 2020; 15(12): e0243175.
- 8) 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
- 9) 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 <sup>1</sup>H quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull.* 2020; 68: 868-878.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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 <sup>1</sup>H quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull.* 2020; 68: 868-878. Tsutumiuchi K, Toyoshima T, Hasegawa F, Terasawa R, Honda W, Sakakibara M, Ishida Y, Ikai Y, Ishibashi R, Furuya K, Morimoto T, Ishizuki K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Oka H: Molecular Structure of Gardenia Blue Pigments by Reaction of Genipin with Benzylamine and Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.*, 2021; 69 3904-3911.
- 13) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度に基づくシングルリファレンス GC 法および HPLC 法によるカラシ抽出物およびセイヨウワサビ抽出物中のイソチオシアン酸アリの定量. *食衛誌*, 2021; 62: 73-78.
- 14) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, 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, Iwamoto Y, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Purity Determination of Cyclophosphamide Hydrate by Quantitative <sup>31</sup>P-NMR and Method Validation. *Chem. Pharm. Bull.*, 2021; 69 (7): 630-638.
- 15) Takahashi M, Morimoto K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Study on the synthesis of methylated reference and their application in the quantity of curcuminoids using single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *Chem. Pharm. Bull.*, 2022; 70(1) 25-31.

## E-2-2) 総説等

- 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) 杉本直樹: 既存添加物の化学的安全性確保. *食品衛生研究* 2022; 72: 5.
- 3) 杉本直樹: 食品添加物公定書 10 版は予定通りの発刊へ. *フードケミカル* 2022; 9: 2-5.
- 4) 杉本直樹: 食品添加物の化学的安全性確保とこれからの課題. *FFI ジャーナル*, 2022; 227: 343-346.

### E-2-3) 単行本等

- 1) Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: "Comprehensive Natural Products III", Volume 7; New Methods in Natural Products Chemistry, 7.04 Application of  $^1\text{H}$ -quantitative NMR From the Viewpoint of Regulatory Science, Elsevier. Netherland, pp.50-60 (2020).

### F. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

**研究要旨** 1) ショウガ抽出物について、添加物12製品のHPLCによる成分比較を行った結果、ピークパターンから3グループ（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）に分類されることが明らかとなった。製品用途からみると，①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物，②はショウガ抽出物，③は香辛料抽出物で，用途により成分分布が異なることが確認された。それゆえ，ショウガ抽出物を用途とする場合，[6]-gingerol及び[6]-shogaolのいずれも又はいずれかを確認することで対応できることが考察された。2) ヒマワリ種子抽出物について，添加物3製品のHPLC分析により主検出される3ピークについて成分精査を行い，モノカフェオイルキナ酸類〔chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid〕とともにcaffeic acidを単離，同定した。また主検出ピーク以外の成分についてさらに成分精査を進め，ジカフェオイルキナ酸類 (3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid) を単離，同定した。さらに文献未記載である2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acidユニットを含むカフェオイルキナ酸2種を単離，構造決定した。単離した化合物について，DPPHラジカル消去活性を評価した結果，いずれも高い活性値を示し，活性への寄与が考察され，モノ及びジカフェオイルキナ酸が有効成分として示唆された。3) キハダ抽出物について，添加物製品のTLC分析を日本薬局方（局方）のオウバクの確認試験を準用して行った結果，オウバクと同様にberberine, palmatineのスポットが観察され，berberineが主検出して認められた。それゆえ，局方と同じTLC試験法で対応可能であることが示唆された。

#### 研究協力者

好村守生 松山大学薬学部 准教授  
内倉 崇 松山大学薬学部 特任助教授  
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 部長  
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 主任研究員

#### A. 研究目的

1) ショウガ抽出物は，既存添加物名簿<sup>1)</sup>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ウ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，第十八改正日本薬局方（局方）<sup>2)</sup>記載の生薬〔ショウキョウ（生姜），カンキョウ（乾姜）〕の原料でもあり，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5版既存添加物自主規格<sup>3)</sup>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。そこで本研究では，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。

2) ヒマワリ種子抽出物は、既存添加物名簿に記載され、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5版既存添加物自主規格に記載され、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸の定量法が記載されているが、種子中にはネオクロロゲン酸やカフェー酸も含まれるとされ、実データに乏しい。そこで本研究では、本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品の成分解析について検討を行った。

3) キハダ抽出物は、既存添加物名簿に記載され、「ミカン科キハダ (*Phellodendron amurense* RUPR) の樹皮より水又はエタノールで抽出して得たものである。主成分はベルベリンである」と定義される苦味料等である。局方には、同じ基原を原料とする生薬オウバクが記載されており、その中で TLC を用いた確認試験が規定されているが、本添加物については成分情報が乏しい。そこで本研究では添加物製品の TLC 分析を行った。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

1) ショウガ抽出物の添加物製品 (1~12) は、日本食品添加物協会を通じて入手した。化合物の同定、成分解析に標品として用いた [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol, [6]-shogaol, [8]-shogaol, zingiberene, citral は、富士フィルム和光純薬株式会社製、フナコシ製、またはコスモバイオ製を用いた。試薬はすべて特級または HPLC 用を用いた。

2) ヒマワリ種子抽出物の添加物製品 [1 (管理番号 A1089), 2 (管理番号 A1090), 3 (管理番号 A2241)] は、日本食品添加物協会を通じて入手した。標品として用いた chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid は長良サイエンス株式会社製、

3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid は MedChemExpress 製, caffeic acid は東京化成製を用いた。活性評価については、DPPH Antioxidant Assay Kit (同人化学) を用いて測定した。

3) キハダ抽出物の添加物製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した。標品として用いた berberine, palmatine, coptisine, jateorrhizine, magnoflorine は富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた。試薬はすべて特級を用いた。

### B-2) 装置及び測定条件

1) ショウガ抽出物: 逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。カラムに L-column ODS (150 × 2.1 mm i.d., CERI) を使用し、移動相に (A) 0.1% ぎ酸-蒸留水, (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%)] の溶出条件, 流速 0.3 mL/min (40°C), 検出波長 254, 280 nm で測定した。NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒としてメタノール (MeOH) -*d*<sub>4</sub> を用いた。ケミカルシフトは溶媒由来ピーク [MeOH-*d*<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H: 3.30 ppm, <sup>13</sup>C: 49.0 ppm)] を基準とした。高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用した。

2) ヒマワリ種子抽出物: 逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。カラムに L-column ODS (150 × 2.1 mm i.d., CERI) を使用し、移動相に (A) 5% 酢酸, (B) アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A) : 0→30 min (B: 0→50%), 30→35 min (B: 50→85%), 35→40 min (B: 85%), 40→50 min (B: 85→100%)] の溶出条件, 流速 0.3 mL/min (40°C), 検出波長 280 nm で測定した。NMR は Bruker AVANCE500 (<sup>1</sup>H-NMR: 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒として MeOH-*d*<sub>4</sub> を用いた。HR-ESI-MS は micrOTOF-Q を使用した。

3) キハダ抽出物: TLC は、HPTLC Silica gel 60F<sub>254</sub> Glass plate (Merck 社製) を用いた。展開溶媒は *n*-ブタノール/酢酸/水 (7:1:2), 注入量は 5 μL

で行った。

### B-3) 試料調製

1) ショウガ抽出物：各試料について、1 mg/mL になるよう MeOH 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。ショウガ、ショウキョウ、カンキョウについて、エタノール、アセトン、*n*-ヘキサンエキスを調製し、添加物製品と含有成分の比較検討を行った。ショウガ抽出物 (4.1 g) に水 (50 mL) を加え、*n*-ヘキサン (50 mL×3) で液液分配した。得られた *n*-ヘキサンエキス (1.0 g) を各種カラムクロマトグラフィー (YMC gel ODS-AQ, Chromatorex ODS, 分取 TLC) による分離精製を繰り返し、化合物の単離を試みた。単離した化合物については標品の分析データとの直接比較、あるいは文献値と比較することにより行った。

2) ヒマワリ種子抽出物：各添加物試料について、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 分析に供した。分離精製は、試料 (100 g) を水に溶解し、Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより分画し、3 画分〔① 水溶出部 (62.5 g), ② 30%MeOH 溶出部 (20.8 g), ③ MeOH 溶出部 (1.4 g)〕を得た。MeOH 溶出部について、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより 3 画分〔④ 50%MeOH 溶出部 (976.7 mg), ⑤ 80%MeOH 溶出部 (546.4 mg), ⑥ 70% acetone 溶出部 (70.4 mg)〕に分画し、カラムクロマトグラフィーに供した。酸化防止の評価については、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を DPPH Antioxidant Assay Kit を用いて測定した。コントロールの吸光度に対する試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を算出し、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めた。また、Trolox の IC<sub>50</sub> を求め、TEAC (Trolox の IC<sub>50</sub>/試料の IC<sub>50</sub>) を算出した。

3) キハダ抽出物：添加物試料 15 mg に MeOH 1 mL を加えて溶解し、試料溶液とした。また各生薬末 (オウレン及びオウバク) 100 mg に MeOH 10 mL を加えて 5 分間超音波処理後、遠心分離した上澄みを生薬の試料溶液とした。標品とし

た化合物 (5 成分) については、1 mg/mL (MeOH) に調製し、標準溶液とした。

### C. 結果及び考察

#### C-1) ショウガ抽出物

ショウガ抽出物 (4.1 g) について、液液分配、次いで各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製の結果、[6]-gingerol (63.8 mg), [8]-gingerol (3.4 mg), [10]-gingerol (7.0 mg), [6]-shogaol (13.6 mg) を単離、同定した。得られた化合物は、NMR, MS の機器分析データに基づき解析し、これらも標品として用いた。ショウガ抽出物の主成分とされる [6]-gingerol, [6]-shogaol, その他の化学構造について図 1 に示す。

試料溶液について HPLC 分析を行った結果、2 成分 ([6]-gingerol, [6]-shogaol) のピークが主検出されて観察され、それ以外のピークについて標品と直接比較した結果、citrinal (neral, geranial の混合物), [8]-shogaol, zingiberene,  $\beta$ -phellandrene のピークを同定した (図 2)。HPLC 結果からわかるように、主成分とされる 2 成分以外の成分についても、製品により検出は一定ではないことが示された。ピークパターンから製品間の違いを検討した結果、① [6]-gingerol が主検出 (製品 1~3), ② [6]-gingerol 及び [6]-shogaol いずれも検出 (製品 7~9), ③ 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。①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物、②はショウガ抽出物、③は香辛料抽出物とするもので、用途により成分分布が異なることが分析データからも確認された (図 2)。よって、用途をショウガ抽出物とする場合、[6]-gingerol 及び [6]-shogaol をどちらかあるいはいずれも検出することを確認する等に対応できることが考察された。

食品のショウガ、生薬のショウキョウ、カンキョウについて、それぞれについて調製したアセトンエキス、酢酸エチルエキス、*n*-ヘキサンエキスについて HPLC 分析を行った。いずれのエキスについても、ショウガは [6]-gingerol が主検出され、ショウキョウ、カンキョウは [6]-gingerol 及び [6]-shogaol が検出され、生薬は日本薬局方において規定されている指標成分が観

察された (図 3).

### C-2) ヒマワリ種子抽出物

添加物 3 製品について逆相 HPLC で分析した結果, 共通して主検出する 3 つのピークを確認した (図 4). 製品のうちの一つについて, Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより 3 画分 (①~③) に分画し, さらに③MeOH 溶出部について, Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより 3 画分 (④~⑥) に分画した. 各画分の HPLC クロマトグラムを図 5 に示す. 成分精査を目的に, ②30%MeOH 溶出部について YMC GEL ODS カラムクロマトグラフィーを行った結果, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) 及び caffeic acid を単離, 同定した. さらに, ④~⑥について YMC GEL ODS カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返した結果, イソクロロゲン酸類 (3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid, 3,4-*di-O*-caffeoylquinic acid, 3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid) とともに, 文献未記載の化合物 1 及び 2 を単離した. 各化合物の構造を図 6 に示す.

化合物 1 は, 淡黄色無晶形粉末として得られ, 高分解能マスマスペクトルから, 分子式  $C_{26}H_{25}NO_{12}$  であることが示された. 各種 NMR データを解析した結果, キナ酸及びカフェオイル基各 1 個に特徴的なシグナルが観察された. その他のシグナルをみると, 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid に特徴的なシグナルが観察された. HMBC スペクトルにより各ユニットの結合位置について確認した結果, キナ酸の 5 位にカフェオイル基, 3 位に 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合した構造であることが確認された. また, CD スペクトルの結果から 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットの 3 位は *S* 配置であると構造決定した.

化合物 2 の NMR スペクトルデータは, 化合物 1 と同様に, キナ酸, カフェオイル基及び 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットに特徴的なシグナルが観察されたことから, これらを部分構造として構成される構造が推定され

た. 各ユニットのつながりを明らかにするため, HMBC スペクトルを測定したところ, キナ酸の 5 位にカフェオイル基, 4 位に 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットがエステル結合した構造であることが確認された. 化合物 1 と同様に, 2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acid ユニットの 3 位については, CD スペクトルの結果から *S* 配置であると構造決定した.

本添加物の活性本体を検討する目的で, 添加物 3 製品及び添加物の Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーによる分画物①~③の DPPH ラジカル消去活性について評価した. 各分画物については, 算出した TEAC 値に収量を乗じて全体の寄与度として求めた. 結果を表 1 に示す. その結果, ヒマワリ種子抽出物の活性への寄与は, ①H<sub>2</sub>O 溶出部, ②30%MeOH 溶出部が大きいことが示唆された. 一方, ③MeOH 溶出部の収量は少量であるが TEAC 値は高く, 本画分も活性に寄与していることが考察された. ①及び②画分の含有成分について HPLC の結果をみると, モノカフェオイルキナ酸類 [chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid] の含有が認められる. また, ③画分からはジカフェオイルキナ酸 [イソクロロゲン酸: 3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid, 3,4-*di-O*-caffeoylquinic acid, 3,5-*di-O*-caffeoylquinic acid] が単離された. よって, これら化合物が活性へ寄与することが考察される. そこで単離同定した各化合物の DPPH ラジカル消去活性を評価した. その結果を表 2 に示す. モノカフェオイルキナ酸類は IC<sub>50</sub>: 12.3~14.2 μM, ジカフェオイルキナ酸類は IC<sub>50</sub>: 6.1~7.0 μM で, いずれも Trolox (IC<sub>50</sub>: 24.1 μM) よりも強い活性を示し, caffeoyl 基の数により, 活性が高くなる傾向が認められた. 化合物 1 及び 2 については, ③画分から単離された. 同様に, 各化合物について DPPH ラジカル消去活性を評価した結果, 化合物 1 は IC<sub>50</sub>: 33.5 μM, 化合物 2 は 28.5 μM で, Trolox とほぼ同等の値を示し, これらも本添加物の有効成分の一つとして考察された.

### C-3) キハダ抽出物

局方のオウバクの確認試験を準用し, 生薬オ

ウバク、オウレンとキハダ抽出物の TLC 分析を行ったところ、キハダ抽出物はオウバクと同様のスポットを示し、berberine, palmatine を認められ、berberine が主検出して認められた (図 7)。それゆえ、局方と同じ試験法で対応可能であることが示唆された。

#### D. 結論

1) 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。その他の成分についても、検出は製品により一定ではなかった。製品用途からみると、①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物、②はショウガ抽出物、③は香辛料抽出物とするもので、用途により成分分布が異なることが確認された。よって、ショウガ抽出物を用途とする場合、[6]-gingerol 及び[6]-shogaolをいずれかまたはどちらかを認めることで対応できることが考察された。また、原料となるショウガは[6]-gingerolが主検出され、同じ基原を原料とする生薬のショウキョウ、カンキョウは[6]-gingerol及び[6]-shogaolが検出され、生薬は日本薬局方における指標成分が観察された。それゆえ、添加物についても成分規格を示し、一定の同等性を確認する必要性が考察された。

2) 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の含有成分について精査した結果、共通して主検出する3成分が認められ、構造解析の結果、モノカフェオイルキナ酸類 (chlorogenic acid, 3-O-caffeoyl quinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid) と同定した。その他の成分についても精査した結果、ジカフェオイルキナ酸類 (イソクロロゲン酸類: 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid) を単離同定した。また、文献未記載の化合物2種を単離し、化合物1はキナ酸の5位にカフェオイル基、3位に2-oxo-3-hydroxy-indole-3-acetic acidユニットがエステル結合した構造と決定した。化合物2はキナ酸の5位にカフェオイル基、4位に2-oxo-3-hydroxy-

indole-3-acetic acidユニットがエステル結合したものと構造決定した。活性に寄与する成分を明らかにするため、添加物試料溶液を分画し、DPPHラジカル消去活性を指標に活性画分について検討した結果、3種のモノカフェオイルキナ酸類の寄与が示唆された。また、収量の少ない画分に認められる3種のジカフェオイルキナ酸類も高い活性値を示し、これら成分も活性への寄与が考察され、モノ及びジカフェオイルキナ酸が有効成分として示唆された。また、化合物1及び2はTroloxとほぼ同等の活性値を示し、本添加物の有効成分の一つとして考察された。

3) 既存添加物キハダ抽出物の TLC 分析について、局方のオウバクの確認試験を準用して検討した結果、キハダ抽出物はオウバクと同様に berberine, palmatine のスポットを認め、berberine が主検出して確認された。

#### E. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第 120 号 (1996) “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日
- 2) 第十八改正日本薬局方, 厚生労働省(2021).
- 3) 第 5 版既存添加物自主規格, 2021 年 4 月, 一般社団法人日本食品添加物協会

#### F. 研究業績

##### 1. 学会発表等

- 1) 長井理夏子, 内倉 崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析, 第 60 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (2021.11.8~2021.11.21) (WEB 開催)
- 2) 天倉吉章, 内倉 崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の成分解析, 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.25~2023.3.28) (北海道)

##### 2. 論文発表等

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

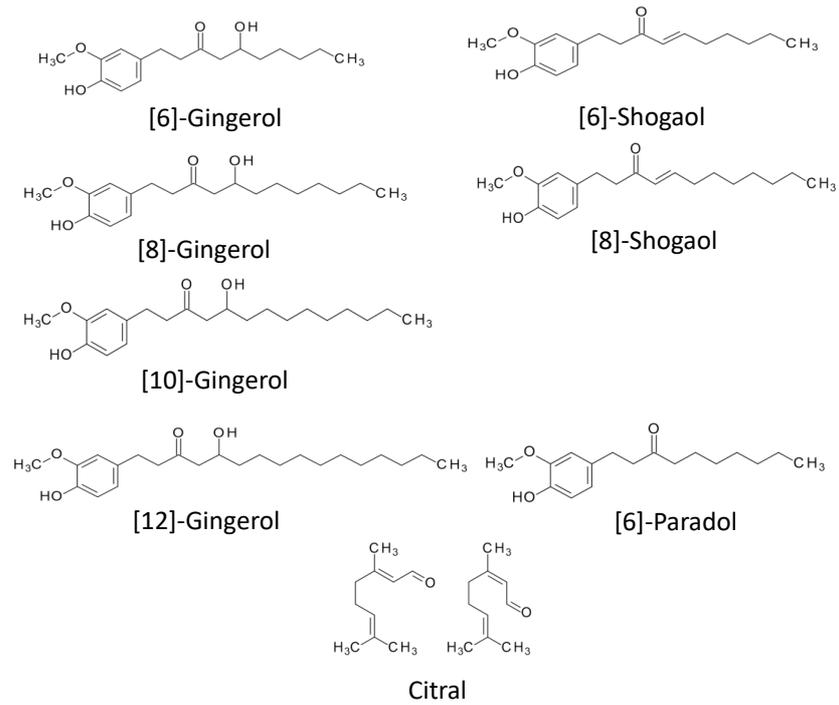


図 1. ショウガ抽出物含有成分の化学構造

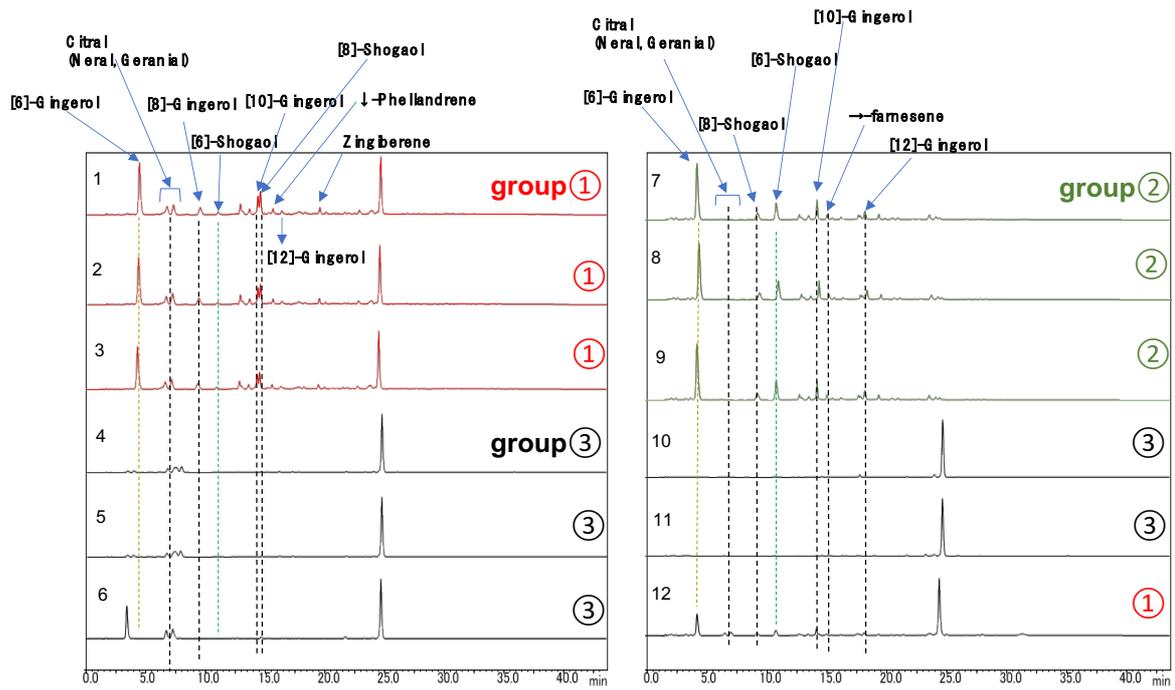


図2. ショウガ抽出物のHPLCクロマトグラム

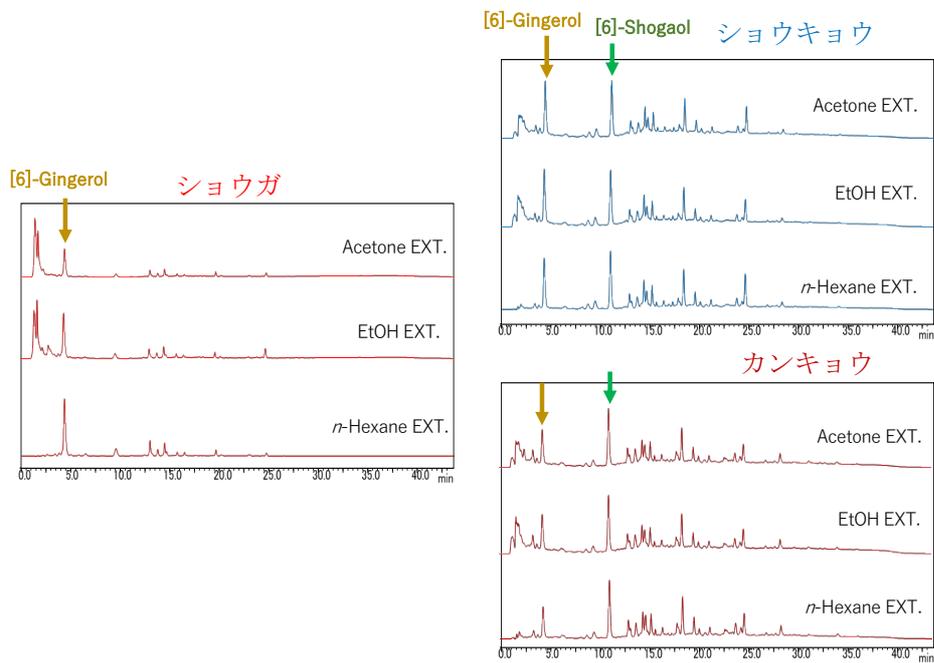


図3. ショウガ, ショウキョウ, カンキョウのHPLCクロマトグラム

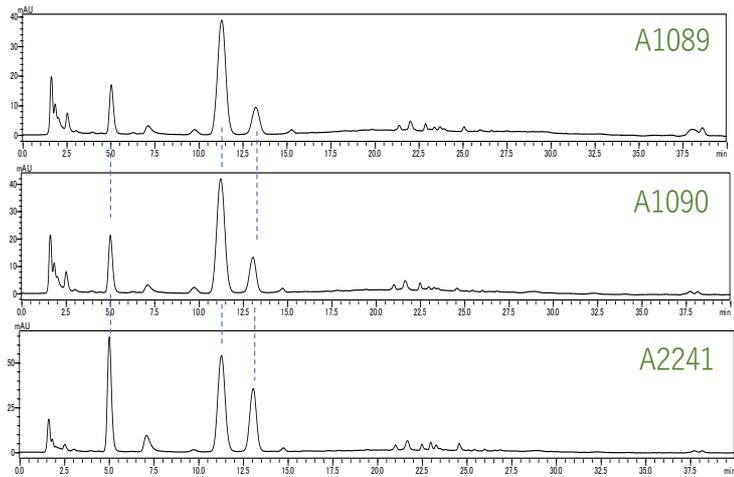


図4. ヒマワリ種子抽出物の HPLC クロマトグラム

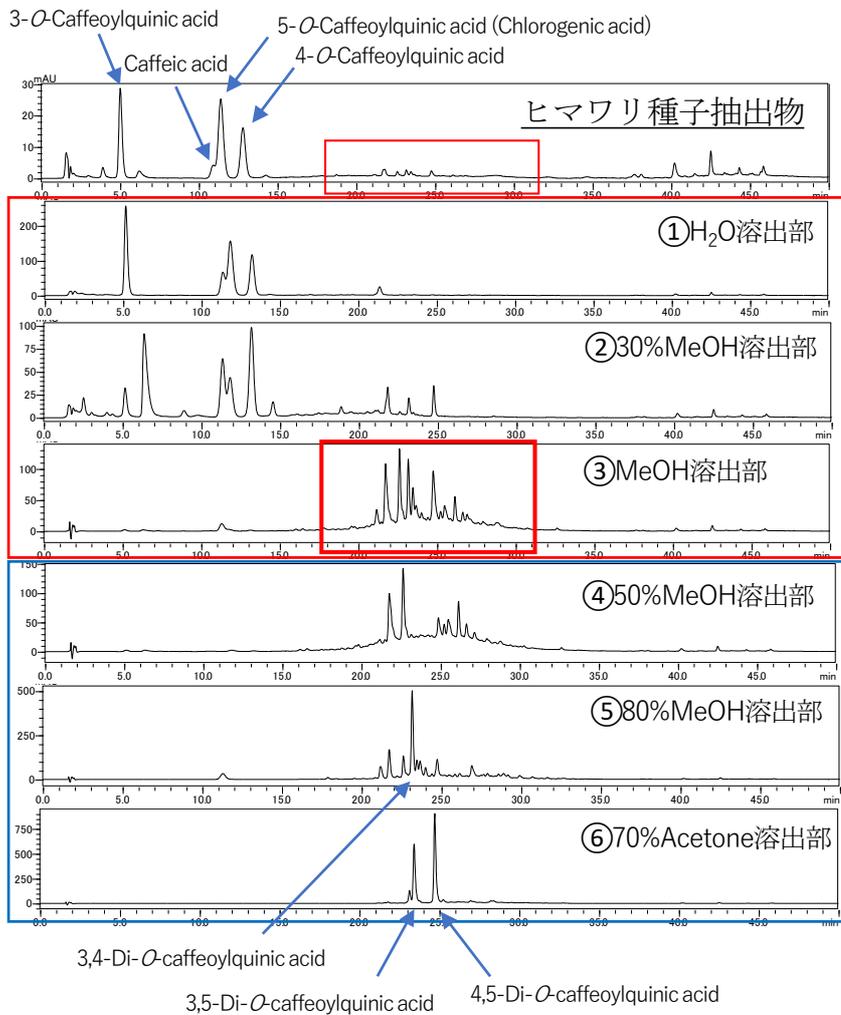


図5. ヒマワリ種子抽出物分画物の HPLC クロマトグラム

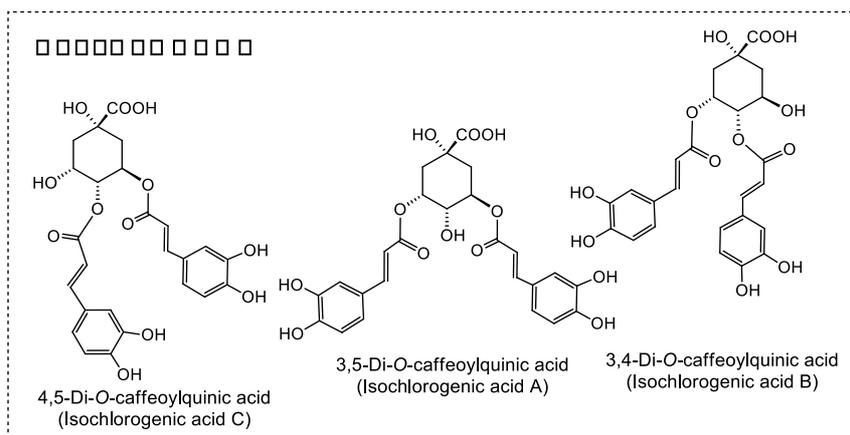
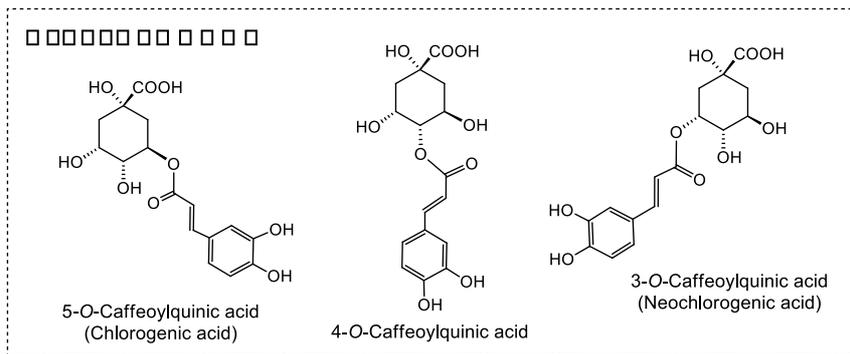
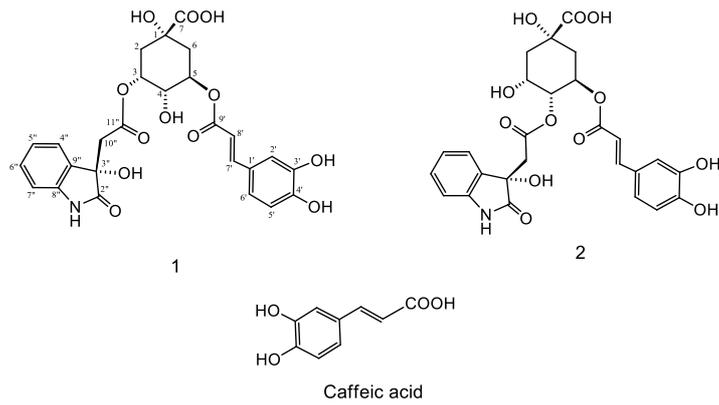


図 6. ヒマワリ種子抽出物含有成分の化学構造

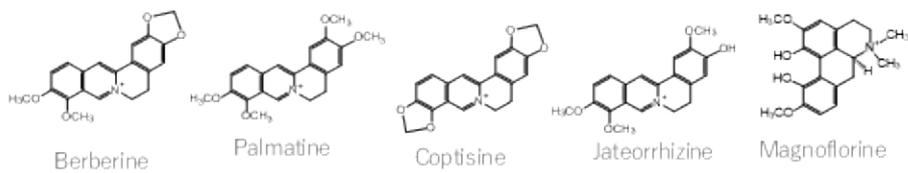
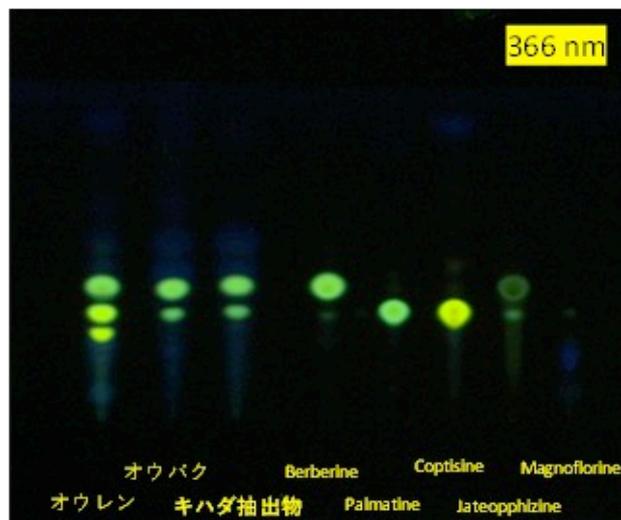
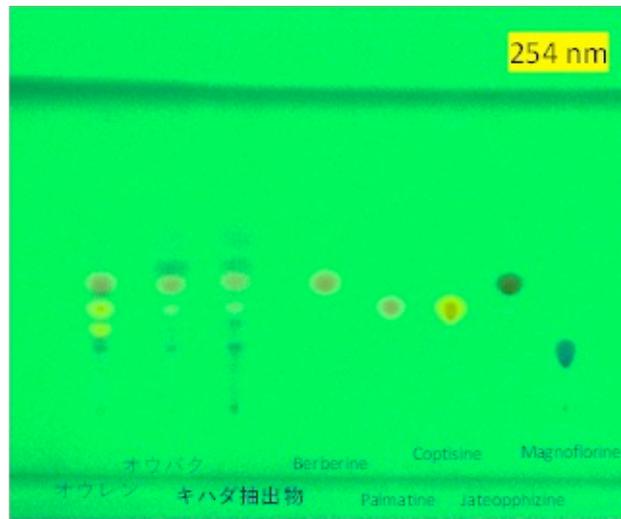


図 7. キハダ抽出物の TLC 分析

表 1. ヒマワリ種子抽出物及び分画物の DPPH ラジカル消去活性

	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	TEAC	収量 (寄与度)
添加物 (A1089)	229.5	0.028	
添加物 (A1090)	152.9	0.039	
添加物 (A2241)	136.4	0.047	
①H <sub>2</sub> O溶出部	115.6	0.054	62.5 (3.38)
②30%MeOH溶出部	97.8	0.065	20.8 (1.35)
③MeOH溶出物	23.5	0.268	1.4 (0.38)

表 2. ヒマワリ種子抽出物含有成分の DPPH ラジカル消去活性

	IC <sub>50</sub> (μM)	TEAC
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	14.2	1.27
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	12.3	1.46
Chlorogenic acid	13.8	1.30
Caffeic acid	32.1	1.05
3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	7.0	1.75
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	6.1	1.99
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	6.2	1.96

試験法及び分析法の開発

～酵素処理ナリンジン及びヒマワリ種子抽出物の規格試験法の確立に関する検討～

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 准教授

**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、精度の向上ならびに試験法が未設定である既存添加物の分析法の確立を目的に、酵素処理ナリンジンおよびヒマワリ種子抽出物を対象に検討を行った。酵素処理ナリンジンの検討では、<sup>1</sup>H-qNMRに基づく相対モル感度 (RMS) を用いたシングルリファレンスHPLC法の当該分析への応用に関する検討を実施し、基準物質である4-ヒドロキシ安息香酸メチル及びカフェインに対するナリンジン、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンおよびナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSを明らかにするとともに、実試料を用いた検討によりシングルリファレンスHPLC法から測定対象物質の正確な定量が可能であることが判明した。また、成分規格試験法（案）における前処理時のグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼを用いた酵素加水分解の反応効率について検討した結果、規定された反応時間、各酵素の添加量に問題は無いと考えられた。

ヒマワリ種子抽出物の検討では、DPPHを用いた抽出物製品の抗酸化性を指標とした定量法では、試料採取量を変更する必要ことで、精油除去ウイキョウ抽出物（酸化防止剤）における確認試験法（案）で採用されている方法を準用可能であることが判明した。また、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸が含まれていることを確認するためのHPLC分析法については、確認試験法（案）で規定されている測定条件のうち、移動相の組成比を変更する必要があることが明らかとなった。なお、ヒマワリ種子抽出物1製品を分析したところ、有効成分とされているイソクロロゲン酸は検出されず、主要成分であるクロロゲン酸類およびカフェ酸の抗酸化性への寄与率は86.6%であることが明らかとなった。

## 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収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<sup>1</sup>。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<sup>2</sup>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に関して「食品、添加物等の規格基準」の策定及び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（案）に関して、「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、この総ナリンゲニン配糖体含量は、酵素処理ナリンジンのグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼ処理後の「ナリンジン」、「モノグルコシルナリンジン」、「ナリンゲニン7-O-

グルコシド」及び「遊離する $\alpha$ -グルコシル残基」の各含量の合計値から算出することが規定されている。現在、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、この酵素処理ナリンジンの規格試験法における $^1\text{H-qNMR}$ 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<sup>3-5</sup>の応用に関する検討をすすめている。そこで、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<sup>7</sup>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 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンおよびナリンゲニン 7-*O*-グルコシド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。また、成分規格試験法 (案) に規定されている前処理におけるグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼを用いた酵素加水分解の反応効率について併せて検討した。

一方で、ヒマワリ種子抽出物は天然系の酸化防止剤として利用されている既存添加物であり、既存添加物名簿収載品目リスト注釈書では、基原・製法・本質において「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<sup>9</sup>である。」と記載されている<sup>8</sup>。現在、この添加物について、食品添加物公定書への収載へ向けて、成分規格や使用基準等の策定が進められている。そこで、規格試験法 (確認試験法) の確立、最適化に向けた検討として、① DPPH を用いた抽出物製品の抗酸化性を指標とした定量法および②抽出物製品にイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸が含まれていることを確認するための HPLC 分析法に関する検討を実施した。さらに、ヒマワリ種子抽出物に含まれる主要成分を明らかにし、これらの成分のヒマワリ種子抽出物における抗酸化性への活性寄与率を求め、当該添加物の定義の適格性を評価した。

## 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 A-172 および管理番号: C2204), グルコアミラーゼ (アミログルコシダーゼ, SIGMA 社製, Cat.No. 10113-1G, 力価: 103 U/mg (表示値)),  $\alpha$ -グルコシダーゼ (トランスグルコシダーゼ L「アマノ」S Lot.No.TGUS1152301LS, 力価: 317000 U/mg (提供情報)), ヒマワリ種子抽出物 (Code: A1091, LOT: 160223) 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), 富士フィルム和光純薬 (株) 製 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No. LKE0701 および SKN5454) を用いた。ナリンゲニン 7-*O*-グルコシドは、Extrasynthese 社製の一般試薬 (Cat.No.1160S, Batch: 07, ID: 0507/0), 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- $d_6$ ) は富士フィルム和光純薬 (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) 製または Eurisotop 社製を用いた。D-グルコース定量用発色試薬は富士フィルム和光純薬 (株) 製グルコース CII-テストワコーを使用した。5-*O*-カフェオイルキナ酸は東京化成工業製 (Cat.No. C0181, Lot.LFDJC-BW), 3-*O*-カフェオイルキナ酸は東京化成工業製 (Cat.No. N1155, Lot.CGLVE-Y2), 4-*O*-カフェオイルキナ酸は長良サイエンス株式会社製 (Code.NS430202, Lot.0002), カフェ酸は富士フィルム和光純薬工業製 (Cat.No. 040-

20982, Lot.SDE2297) を使用した. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) は富士フィルム和光純薬工業製 (Cat.No. 047-04051, Lot.KWM6401) を使用した. 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetrathylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は東京化成工業製 (Cat.No. H0726, Lot.CYPYL-JS) 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 HPLC① ポンプ : LC-20AD (低压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<sub>VP</sub>, 多波長検出器 : SPD-M10A<sub>VP</sub>, 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).

分析用 HPLC② ポンプ : LC-10AD<sub>VP</sub> (低压グラジエントユニット内蔵), オートサンプラ : SIL-10AP, カラム恒温槽 : CTO-10AS<sub>VP</sub>, 紫外可視分光検出器 : SPD-10A<sub>VP</sub>, システムコントローラ : CBM-20A, 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, 低压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<sub>VP</sub>, 紫外可視分光検出器 : SPD-10AV<sub>VP</sub> : システムコントローラ : SCL-10A<sub>VP</sub>, 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 および AP125WD ((株) 島津製作所製)

## 【酵素処理ナリンジン】

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  $\alpha$

## ーモノグルコシルナリンジンの定量

### B-3-1) $\alpha$ ーモノグルコシルナリンジンの単離

$\alpha$ ー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  $\alpha$ ー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  $\mu$ 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  $\mu$ 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) <sup>1</sup>H-qNMR によるナリンジンおよび $\alpha$ ー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,  $\alpha$ ー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*<sub>6</sub> 約 5 mg を精密に量り, 先程のサンプル管に入れた後, DMSO-*d*<sub>6</sub> 約 1 g に溶解し <sup>1</sup>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 <sup>1</sup>H-qNMR 測定を行った. DSS-*d*<sub>6</sub> 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、

$I_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の特定基のシグナル面積強度  
 $I_{\text{std}}$  = 内標準物質のシグナル面積強度 (DSS- $d_6$ : 9.000)

$H_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の特定基の水素数  
 $H_{\text{std}}$  = 内標準物質の特定基の水素数 (DSS- $d_6$ :  $\text{CH}_3 \times 3 = 9$ )

$M_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の分子量  
 $M_{\text{std}}$  = 内標準物質の分子量 (DSS- $d_6$ : 224.36)

$W_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の秤取量 (mg)

$C_{\text{std}}$  =  $^1\text{H-qNMR}$  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 ( $\delta 0$  ppm) とし、 $\delta$  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 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの RMS の算出

ナリンジン、 $\alpha$ -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 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6 × 250 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\alpha$ -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  $\mu\text{L}$

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 $\alpha$ -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  $\alpha$ -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<sup>5)</sup>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、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンおよび  $\alpha$ -グルコシル残基量を定量し、その合計から総ナリンゲニン配糖体の含量を求めた。

#### B-3-5-1) 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 $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) 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  $\alpha$ -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 [ $\mu\text{mol/L}$ ]

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,  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン = 742.70)

$10^6$  : 試料の秤量値の単位 [g] から [ $\mu\text{g}$ ] 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  $\alpha$ -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 $\alpha$ -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  $\mu\text{L}$  を量り、D-グルコース定量用発色試液 3 mL を正確に加

えて振り混ぜた後、37°C で正確に 5 分間放置した。室温まで冷却したものを試験溶液とし、波長 505 nm における吸光度を測定した。対照には、水 20  $\mu\text{L}$  を用いて試験溶液と同様に操作した液を用いた。別に空試験を行い、補正した。ただし、空試験溶液は、水約 40 mL にグルコアミラーゼ 10000 単位を添加し、55°C で 30 分間放置した後、95°C で約 30 分間加熱した。室温まで冷却した後、水を加えて正確に 50 mL とし、空試験溶液を試験溶液と同様に操作して吸光度を測定した。別に、各濃度のグルコース標準溶液 (0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 5.0 mg/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  $\alpha$ -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 1 mL あたりの D (+)-グルコースの量 ( $\mu\text{g}$ )

V : 試験溶液の量 (50 mL)

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 +  $\alpha$ -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  $\alpha$ -グルコシル残基量 (%)

### B-4) 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 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの定量

相対モル感度 (RMS) を用いたシングルリファレンス HPLC 法によるナリンゲニン 7-O-グル

## コシドの定量

### B-4-1) <sup>1</sup>H-qNMR によるナリンゲニン 7-O-グルコシドの純度測定

ナリンゲニン 7-O-グルコシド約 10 mg を精密に量り、サンプル管に入れた。別に DSS-*d*<sub>6</sub> 約 5 mg を精密に量り、先程のサンプル管に入れた後、DMSO-*d*<sub>6</sub> 約 1 g に溶解し <sup>1</sup>H-qNMR 用試験溶液とした。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 に示す条件を用いて <sup>1</sup>H-qNMR 測定を行った。DSS-*d*<sub>6</sub> 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、

$I_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の特定基のシグナル面積強度  
 $I_{\text{std}}$  = 内標準物質のシグナル面積強度 (DSS-*d*<sub>6</sub>: 9.000)

$H_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の特定基の水素数  
 $H_{\text{std}}$  = 内標準物質の特定基の水素数 (DSS-*d*<sub>6</sub>: CH<sub>3</sub> × 3 = 9)

$M_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の分子量  
 $M_{\text{std}}$  = 内標準物質の分子量 (DSS-*d*<sub>6</sub>: 224.36)  
 $W_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の秤取量 (mg)  
 $C_{\text{std}}$  = <sup>1</sup>H-qNMR 標準溶液の DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度

なお、<sup>1</sup>H-qNMR の化学シフト値は、DSS-*d*<sub>6</sub> 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-4-2) 基準物質 (MHB 及びカフェイン) に対するナリンゲニン 7-O-グルコシドの RMS の算出

ナリンゲニン 7-O-グルコシドでは、溶液濃度が約 500 μmol/L となるようにナリンゲニン 7-O-グルコシドの各 <sup>1</sup>H-qNMR 用試験溶液を 20 mL 容メスフラスコへ必要量入れ、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 で順次希釈し、約 1.0 ~ 500 μmol/L の間で 10 濃度の HPLC 用試験溶液を作製した。

MHB 及びカフェインでは、認証値 (純度) を考慮し、MHB 及びカフェインを正確に量りとり、約 1.0 μmol/L ~ 約 500 μmol/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 5C<sub>18</sub>-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 (ナリンゲニン 7-O-グルコシド), 255 nm (MHB), カフェイン (205 及び 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及び基準物質の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。

### B-4-3) 酵素処理ナリンゲン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の定量における酵素処理の反応効率の検討

#### B-4-3-1) 酵素処理後のナリンゲニン配糖体 (ナリンゲン, モノグルコシルナリンゲン, ナリンゲニン 7-O-グルコシド) の量

105°C で 3 時間乾燥させた酵素処理ナリンゲン 0.5 g を精密に量り、水 50 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) に酵素

処理ナリンジン溶液を注ぎ、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、80%エタノール200 mL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とした後、この液20 mLにグルコアミラーゼ2500単位及び $\alpha$ -グルコシダーゼ30000単位を添加し、55°Cで60分間放置した。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5 mLを正確に量り、水/アセトニトリル/酢酸混液(8000:2000:1)(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-4-2に示したHPLC条件で分析した。

各試験溶液中のナリンジンについて、そのピーク面積値を別に作成したナリンジン(<sup>1</sup>H-qNMRにより求められた純度に基づく標準溶液を使用。ナリンジン純度:85.2%)の検量線式に代入し、試験溶液中のナリンジン濃度( $\mu\text{mol/L}$ )を求め、次の式より試料中の含量を算出した。

$$\text{ナリンジンの量 (\%)} = \frac{(C \times M) \times V}{W \times 10^6} \times \frac{50}{5} \times 100$$

ただし、

C: HPLC用試験溶液中の測定対象物質の濃度 [ $\mu\text{mol/L}$ ]

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)

$10^6$ : 試料の秤量値の単位 [g] から [ $\mu\text{g}$ ] への単位の変換係数

W: 試料の摂取量 (g)

試験溶液中のモノグルコシルナリンジン及びナリンゲニン7-O-グルコシドについては、そのピーク面積値を上記のナリンジン標準溶液の検量線式に代入し、<sup>1</sup>H-qNMRに基づく各RMS(モノグルコシルナリンジン/ナリンジン=1.07, ナリンゲニン7-O-グルコシド/ナリン

ジン=0.98)を用いて試験溶液中のモノグルコシルナリンジンまたはナリンゲニン7-O-グルコシド濃度( $\mu\text{mol/L}$ )を求め、次の式より試料中の含量を算出した。

モノグルコシルナリンジンまたはナリンゲニン7-O-グルコシドの量 (%) =

$$= \frac{(C \times M) \times V}{W \times 10^6} \times \frac{50}{5} \times 100$$

ただし、

C: HPLC用試験溶液中の測定対象物質の濃度 [ $\mu\text{mol/L}$ ]

V: 試験溶液の量 [L] (0.05 L)

M: 測定対象物質の分子量 (モノグルコシルナリンジン=742.70, ナリンゲニン7-O-グルコシド=434.40)

$10^6$ : 試料の秤量値の単位 [g] から [ $\mu\text{g}$ ] への単位の変換係数

W: 試料の摂取量 (g)

#### B-4-3-2) 酵素処理後の $\alpha$ -グルコシル残基の量

B-4-1の項で得られたA液20  $\mu\text{L}$ を量り、D-グルコース定量用発色試液3 mLを正確に加えて振り混ぜた後、37°Cで正確に5分間放置した。室温まで冷却したものを試験溶液とし、波長505 nmにおける吸光度を測定した。対照には、水20  $\mu\text{L}$ を用いて試験溶液と同様に操作した液を用いた。また、別に空試験を行い、補正した。ただし、空試験溶液は、水約20 mLにグルコアミラーゼ2500単位及び $\alpha$ -グルコシダーゼ30000単位を添加し、55°Cで60分間放置した後、95°Cで約30分間加熱した。室温まで冷却した後、水を加えて正確に50 mLとし、空試験溶液を試験溶液と同様に操作して吸光度を測定した。別に、各濃度のグルコース標準溶液(0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL, 5.0 mg/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 $\alpha$ -グルコシル残基の

量を算出した。

$$\begin{aligned} & \alpha\text{-グルコシル残基の量 (\%)} \\ &= \frac{C \times 100}{W \times 1000} \times \frac{162}{180} \times 100 \end{aligned}$$

ただし、

C：試験溶液 1 mL あたりの D (+) -グルコースの量 (μg)

W：試料の採取量 (mg) である。

#### B-4-3-3) 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 (%)  
= 酵素処理後のナリンゲニン配糖体 (ナリンジン, モノグルコシルナリンジン, ナリンゲニン 7-O-グルコシド) の量 (%) + 酵素処理により遊離した α-グルコシル残基の量 (%)

### 【ヒマワリ種子抽出物】

#### B-5) ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性に関する検討

DPPH ラジカル消去活性は、精油除去ウイキョウ抽出物 (用途：酸化防止剤) の成分規格 (案) にて示されている方法に準じて行った。

#### B-5-1) DPPH 溶液の調製

DPPH 17 mg を秤量し、エタノール (99.5) に溶解後、200 mL に定容したものを DPPH 溶液とした (濃度：0.2 mmol/L)。DPPH 溶液は、調製直後から 1 時間程度までは時間とともに吸光度が低下することが知られている。そこで、遮光して 2 時間放置し、吸光度が安定してから DPPH ラジカル消去活性の測定に使用した。

#### B-5-2) DPPH ラジカル消去率の算出

ヒマワリ種子抽出物 10, 20, 30, 40 および 50 mg をそれぞれ精密に量りとり、水を加えて 20 mL としたものを試料溶液①～⑤ (濃度：0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/mL) とした。な

お、これら試料溶液は、1 濃度あたり 3 併行で作製した。調製された各試料溶液 0.5 mL を試験管に入れ、100 mM Tris-HCl buffer

(pH7.4) 2.0 mL を加えて混合した。DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 2.5 mL を加え、直ちに攪拌した後、暗所に 30 分間放置したものを試験溶液とし、吸光度 (波長：517 nm) を測定した。

試料溶液添加時の吸光度を  $A_s$ 、試料溶液の代わりにエタノール (99.5) を添加した際の吸光度を  $A_c$  とし、次の計算式からヒマワリ種子抽出物試料溶液の各濃度における DPPH ラジカル消去率 (%) を求めた。

DPPH ラジカル消去率 (%)

$$= \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

#### B-5-3) ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性 (IC<sub>50</sub>) の算出

1 つの標準液群 (濃度：0.5, 1.0, 1.5, 2.0 および 2.5 mg/mL) の各試料濃度 (x) に対する DPPH ラジカル消去率 (y) をプロットし、回帰直線 ( $y = ax + b$ ) を作成した。これらを標準液群ごと (計 3 種) に作成し、得られた各回帰式の y に 50 を代入したときの x (試料濃度) の平均値を DPPH ラジカル消去活性 (IC<sub>50</sub>, μg/mL) とした。

#### B-6) HPLC による確認試験法の確立に向けたヒマワリ種子抽出物分析における測定条件の検討

ヒマワリ種子抽出物の成分規格 (案) に示されている方法に準じて行った。すなわち、ヒマワリ種子抽出物 10 mg を精密に量り、0.1% ギ酸を加え、溶解し、1 mL に定容したものを試験溶液とした (濃度：10 mg/mL)。この試験溶液を以下に示す条件で HPLC 分析を行った。

### 【HPLC 条件】

カラム：ナカライテスク (株) 製 COSMOSIL 5C18-MS-II, ナカライテスク (株) 製 COSMOSIL 5C18-AR-II, 関東化学 (株) 製 Separar C18G,

STAR 製 Mightysil RP-18 GP II (すべて内径：4.6 mm, 長さ：250 mm, 粒子径：5 μm), 移動相：0.1%ギ酸/メタノール=75/25, 流速：1.0 mL/min, カラム温度：40°C, 検出波長：320 nm, 注入量：10 μL

#### B-7) ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要成分の寄与率の検討

ヒマワリ種子抽出物の抗酸化性に対する中の主要な含有成分(クロロゲン酸, カフェ酸, 4-O-カフェオイルキナ酸, 3-O-カフェオイルキナ酸)の寄与率を算出するため, 「4成分およびヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性」, 「4成分およびヒマワリ種子抽出物のトロロックス等価活性 (TEAC)」および「ヒマワリ種子抽出物中の4成分の含量 (%)」をそれぞれ求めた。

#### B-7-1) ヒマワリ種子抽出物中の各主要成分の含量 (%)

##### B-7-1-1) ヒマワリ種子抽出物の試験溶液の調製

ヒマワリ種子抽出物 10 mg を精密に量り, 0.1%ギ酸を加え, 溶解し, 10 mL に定容したものを試験溶液とした (濃度：1 mg/mL)。

##### B-7-1-2) クロロゲン酸検量線用標準溶液の調製

本化合物を精密に量りとり, 0.1%ギ酸で完全に溶解したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 μg/mL, 濃度は<sup>1</sup>H-qNMRに基づく)。この溶液を公比 2 で 0.1%ギ酸を用いて希釈し, 検量線用標準溶液②～⑤とした (濃度：100, 50, 25, 12.5 μg/mL)。

##### B-7-1-3) カフェ酸検量線用標準溶液の調製

本化合物を精密に量りとり, 10%メタノールで完全に溶解したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：120 μg/mL, 濃度は<sup>1</sup>H-qNMRに基づく)。この溶液を公比 2 で 10%メタノールを用いて希釈し, 検量線用標準溶液②～⑤とした (濃度：60, 30, 15, 7.5 μg/mL)。

##### B-7-1-4) 3-O-カフェオイルキナ酸検量線用標準

#### 溶液の調製

<sup>1</sup>H-qNMR により濃度を求めた標準原液 (50 mg/mL in DMSO-*d*<sub>6</sub>) を 40 μL 採り, 0.1%ギ酸を加え 10 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 μg/mL)。この溶液を公比 2 で 0.1%ギ酸を用いて希釈し, 検量線用標準溶液②～⑤とした (濃度：100, 50, 25, 12.5 μg/mL)。

#### B-7-1-5) 4-O-カフェオイルキナ酸検量線用標準溶液の調製

<sup>1</sup>H-qNMR により濃度を求めた標準原液 (5 mg/mL in DMSO-*d*<sub>6</sub>) を 80 μL 採り, 0.1%ギ酸を加え 2 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 μg/mL)。この溶液を公比 2 で 0.1%ギ酸を用いて希釈し, 検量線用標準溶液②～⑤とした (濃度：100, 50, 25, 12.5 μg/mL)。

#### B-7-1-6) ヒマワリ種子抽出物中の各主要成分の含量 (mg/g) の算出

得られたヒマワリ種子抽出物中の各主要成分のピーク面積を, 該当する標準溶液の検量線式に代入し試験溶液中の濃度 (C) を求め, 以下の計算式からヒマワリ種子抽出物中の各主要の含量 (mg/g) を求めた

各主要成分の含量 (mg/g)

$$= \frac{C \times V}{W}$$

C: 試験溶液の指標成分の濃度 (μg/mL)

V: 試験溶液の液量 (mL)

W: ヒマワリ種子抽出物の秤取量 (mg)

#### B-7-2) ヒマワリ種子抽出物および各指標成分の DPPH ラジカル消去活性

DPPH 溶液の調製は B-5-1, ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去率の算出 (%) は B-5-2 に示す手順でそれぞれ行った。

#### B-7-2-1) 各主要成分の DPPH ラジカル消去率の算出 (%)

クロロゲン酸は, 当該化合物 10 mg を精密に量り, 0.1%ギ酸を加えて 50 mL としたもの

(200 µg/mL) から希釈し、試料溶液①～④ (濃度：5, 10, 20, 40 µg/mL) とした。これらの溶液は定量用試薬の <sup>1</sup>H-qNMR の結果に基づき調製した。

カフェ酸では、試薬の <sup>1</sup>H-qNMR の結果に基づき当該化合物を精密に量り、10%メタノールを加えて完全に溶解したもの (濃度：120 µg/mL) から希釈し、試料溶液①～④ (濃度：3, 6, 12, 24 µg/mL) とした。

3-O-カフェオイルキナ酸では、<sup>1</sup>H-qNMR 用試験溶液 (50 mg/mL in DMSO-*d*<sub>6</sub>) を 20 µL 採り、0.1%ギ酸を加え 5 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 µg/mL) から希釈し、試料溶液①～④ (濃度：10, 20, 40, 50 µg/mL) とした。

4-O-カフェオイルキナ酸では、<sup>1</sup>H-qNMR 用試験溶液 (5 mg/mL in DMSO-*d*<sub>6</sub>) を 80 µL 採り、0.1%ギ酸を加え 2 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 µg/mL) から希釈し、試料溶液①～④ (濃度：10, 20, 40, 50 µg/mL) とした。

トロロックスでは、本化合物 20mg を正確に量り、エタノール (99.5) を加えて 100 mL としたものを (200µg/mL) から希釈し、試料溶液①～⑤ (濃度：25, 50, 80, 100µg/mL) とした。

なお、各化合物の試料溶液は、1 濃度あたり 3 併行で調製した。調製された各試料溶液 0.5 mL を試験管に入れ、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 2.0 mL を加えて混合した。DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 2.5 mL を加え、直ちに攪拌した後、暗所に 30 分間放置したものを試験溶液とし、吸光度 (波長：517 nm) を測定した。

試料溶液添加時の吸光度を *A*<sub>s</sub>、試料溶液の代わりにエタノール (99.5) を添加した際の吸光度を *A*<sub>c</sub> とし、B-5-2 で示した計算式から各試料溶液の濃度毎の DPPH ラジカル消去率 (%) を求めた。

#### B-7-2-2) DPPH ラジカル消去活性 (IC<sub>50</sub>) の算出

B-5-2-1 で調製した各化合物およびヒマワリ種子抽出物の試料溶液を用い、B-3-3 と同様の

方法により DPPH ラジカル消去活性 (IC<sub>50</sub>, µg/mL) を求めた。

#### B-7-2-3) トロロックス等価活性 (TEAC) の算出

文献報告に従い、次の計算式から、各主要成分の TEAC をそれぞれ求めた。

各主要成分の TEAC (µgTE/µg)

$$= \frac{\text{トロロックスの IC}_{50}}{\text{測定対象の IC}_{50}}$$

#### B-7-3) 各主要成分のヒマワリ種子抽出物の抗酸化性に対する寄与率の算出

B-7-1 および B-7-2 で求められた各データに基づき、次の式により各成分の寄与率をそれぞれ算出した。

寄与率 (%)

$$= \frac{\text{成分の TEAC} \times \text{抽出物中の含量 (\%)}}{\text{ヒマワリ種子抽出物の TEAC}}$$

### C. 結果及び考察

#### 【酵素処理ナリンジン】

##### 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 4 g 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) <sup>1</sup>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 $\alpha$ -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- $d_6$ :  $\delta$  0 ppm)とし、 $\delta$ 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、 $\delta$  1.18 ppm付近にラムノースのメチル基に由来するシグナル、 $\delta$  2.70~5.60 ppmにアグリコン(ナリンゲニン)の2位、3位および糖部に由来するシグナル、 $\delta$  6.00~7.50 ppmにアグリコン(ナリンゲニン)に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのうち、 $\delta$  7.36 ppmに観察されたナリンゲニンの2'位および6'位の水素に由来するシグナルは、他の分子内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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $^1\text{H-qNMR}$ による純度に基づいて調製されたナリンジンおよび $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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)、 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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ン配糖体量について、表 5 にそれぞれ示した。

### C-5) 相対モル感度 (RMS) を用いたシングルリファレンス HPLC 法によるナリンゲン 7-O-グルコシドの定量

#### C-5-1) $^1\text{H}$ -qNMR によるナリンゲン 7-O-グルコシドの純度測定

表 1 に示す測定条件を用いて、一般試薬のナリンゲン 7-O-グルコシドについて  $^1\text{H}$ -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 ( $\text{DSS-}d_6$ :  $\delta$  0 ppm) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。図 8 に示すように、 $^1\text{H}$  NMR スペクトル上、 $\delta$  2.70~5.60 ppm にアグリコン (ナリンゲン) の 2 位、3 位及び糖部に由来するシグナル、 $\delta$  6.00~7.50 ppm にアグリコン (ナリンゲン) に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのうち、 $\delta$  7.28 ppm に観察されたナリンゲンの 2' 位及び 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、ナリンゲン 7-O-グルコシド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 併行で調製されたナリンゲン 7-O-グルコシド試薬の純度を算出したところ、 $90.5 \pm 0.5\%$  であることが判明した。

#### C-5-2) 基準物質 (MHB 及びカフェイン) に対するナリンゲン 7-O-グルコシドの RMS の算出

基準物質に対するナリンゲン 7-O-グルコシドの RMS を算出するため、 $^1\text{H}$ -qNMR による純度に基づいて調製されたナリンゲン 7-O-グルコシド試験溶液並びに認証値 (純度) に基づき調製された MHB 及びカフェイン試験溶液を用いて、B-4-2 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 9)。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、ナリンゲン 7-O-グルコシド、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。ナリンゲン 7-O-グルコシド及び基準物質の代表的な検量線を図 10 に示す。以上の結果より、これらの検量線は RMS の算出に利用可能と判明した。

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、ナリンゲン 7-O-グルコシドでは 10047 (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) 及び 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ゲン 7-O-グルコシドの RMS を算出したところ、表 6 に示す値であることが判明した。

### C-6) 酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲン配糖体含量の定量における酵素処理の反応効率の検討

C-4 で示した方法とは異なるが、成分規格試験法 (案) における総ナリンゲン配糖体含量は、酵素処理ナリンジンのグルコアミラーゼ (500~2500 単位) 及び  $\alpha$ -グルコシダーゼ (15000~30000 単位) 処理後の「ナリンジンの量」、「モノグルコシルナリンジンの量」、「ナリンゲン 7-O-グルコシドの量」及び「遊離する  $\alpha$ -グルコシル残基の量」の合計値から求めることが規定されている。この成分規格試験法 (案) における検証を他機関が

実施したところ、酵素処理ナリンゲン製品 1 種 (C2204) において、① 総ナリンゲン配糖体含量が 30.0%を下まわること及び②定量値の再現性が良好ではないことが判明した。この原因として、酵素処理ナリンゲン類の酵素加水分解反応が十分ではないことが示唆されたことから、本研究では、酵素加水分解の反応条件の最適化に向け、反応時間及び酵素の添加量の両面で、その反応効率を検証した。なお、前処理において、アクリル酸エステル系吸着用樹脂による複数回のカラム精製により得られる各溶出液 (40 mL) は、すべて混ぜ合わせ、均一にした後、その 20 mL を採取し酵素加水分解反応に供した。また、反応時間については、成分規格試験法 (案) で示された 60 分に加え、90 分、120 分、グルコアミラーゼ及び  $\alpha$ -グルコシダーゼの添加量を規定量の最大量で酵素加水分解を行い、① 酵素処理後のナリンゲン配糖体の量、② 酵素処理後の  $\alpha$ -グルコシル残基の量及び③ 総ナリンゲン配糖体含量を算出した。各試験溶液のクロマトグラムを図 11 に示す。その結果、表 7 に示すように、反応時間の違いにより、①、②、③に大きな違いは認められなかった。そこで、グルコアミラーゼ及び  $\alpha$ -グルコシダーゼの添加量を規定量の最大量の 2 倍として同様の検討を行った。各試験溶液のクロマトグラムを図 11 に示す。表 8 に示すように、反応時間の違いにより、各種含量に大きな差はなく、また、表 7 に示す定量値とほぼ同等の結果であった。なお、これらのクロマトグラムを確認すると、保持時間が 5~6.5 分付近に、グルコシルナリンゲン類と考えられるピークが検出されたが (付録 1)、これらは S/N が 10 またはそれを下まわっており、ナリンゲン配糖体の定量値に影響は及ぼさないものと考えられた。また、検討したすべての試験溶液では、ナリンゲン 7-O-グルコシドの量は定量下限 (S/N 10) である 0.1%以下であった (表 7, 表 8, 付録 1)。

### 【ヒマワリ種子抽出物】

#### C-7) ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル

#### 消去活性に関する検討

ヒマワリ種子抽出物の成分規格 (案) における確認試験法として、精油除去ウイキョウ抽出物 (酸化防止剤) における確認試験法 (案) で採用されている DPPH 法を参考に、その適用性を検討した。

まず、各種濃度のヒマワリ種子抽出物試験溶液 (濃度 : 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 および 2.5 mg/mL) を用いて、DPPH 法の測定手順および直線性を評価した。その結果、図 12 に示すように、ヒマワリ種子抽出物の検討した試験溶液の濃度において、濃度とその DPPH ラジカル消去活性には良好な直線性が認められ (決定係数 : 0.9975)、検討した濃度範囲であれば、DPPH ラジカル消去活性を適切に評価できることが明らかとなった。なお、この回帰直線から求められる DPPH ラジカル消去活性 ( $IC_{50}$ ) は、約 2 mg/mL であることが確認された。確認試験法を規定する場合、活性値がおおよそ 50%となる濃度を試験溶液濃度とすると、今回のヒマワリ種子抽出物製品の結果より、測定で用いる試料の秤取量は 40 mg (40 mg (秤量値) / 20 mL (試料溶液量)) が適切と考えられた。

#### C-8) HPLC による確認試験法の確立に向けたヒマワリ種子抽出物分析における測定条件の検討

次に、ヒマワリ種子抽出物の成分規格 (案) において、指標成分が当該添加物に含まれていることを確認するために、HPLC を用いた確認試験法が規定される予定である。そこで、この確認試験法 (案) で規定されている測定条件の適用性を評価するため、4 種のカラムを使用してヒマワリ種子抽出物製品を分析した。その結果、図 13 に示すように、5 分以降に溶出される主要な 4 種のピークが確認された。ただし、2 種のカラム (Separar C18G および Mightysil RP-18 GP II) において、ピーク 2 および 3 の分離度が 0.75 以下であることが確認された。そこで、移動相 (0.1%ギ酸/メタノール) の組成比を 75/25 から 80/20 に変更し再度分析を行った。その結果、図 14 に示すようにすべてのカラムにおいて、ピーク 2 および 3 の分離度が 1.5 以上であり、

またヒマワリ種子抽出物に含まれる主要な4成分すべてが良好に分離されることが確認された。以上の結果より、確認試験法(案)で示されている測定条件のうち、移動相(0.1%ギ酸/メタノール)の組成比を75/25から80/20へ変更する必要があると考えられた。

### C-9) ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要成分の寄与率の検討

次に、ヒマワリ種子抽出物の成分規格

(案)と実試料の整合性やヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要成分の寄与率<sup>9-10</sup>を明らかにするための検討を行った。

まず、B-7-1-1に示すヒマワリ種子抽出物試験溶液について、C-8で示す0.1%ギ酸/メタノール=80/20を移動相とするHPLC条件を用いて分析したところ、図15に示すようにクロマトグラムが得られ、定量用標品との直接比較により、ピーク1が3-O-カフェオイルキナ酸、ピーク2がクロロゲン酸、ピーク3が4-O-カフェオイルキナ酸、ピーク4がカフェ酸であることが確認された。なお、保持時間3分のピークについては測定の度に面積値が大きく変動することから、単一の成分ではない可能性があると考えられた。また、成分規格(案)で示されているイソクロロゲン酸については、当該試料では検出されなかった。

そこで、これら4成分を対象に、ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する寄与率を求めることとした。寄与率の算出に当たり、①4成分およびヒマワリ種子抽出物のDPPHラジカル消去活性、②4成分およびヒマワリ種子抽出物のトロロックス等価活性(TEAC)および③ヒマワリ種子抽出物中の4成分の含量(%)について検討を行った。4成分およびヒマワリ種子抽出物のDPPHラジカル消去活性を図16および表9に、4成分の検量線を図17に、4成分およびヒマワリ種子抽出物のトロロックス等価活性(TEAC)を表10、ヒマワリ種子抽出物中の4成分の含量(%)を表11にそれぞれ示した。そこでこれらの結果に基づいて、ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要な4種の成分の寄与率を求めたところ、含量の多い順に

クロロゲン酸は41.2%、4-O-カフェオイルキナ酸は18.8%、3-O-カフェオイルキナ酸は16.8%、カフェ酸は9.8%であることが判明し、これら4種の寄与率の合計は86.6%であった。

### D. 結論

本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化、精度の向上ならびに試験法が未設定である既存添加物の分析法の確立を目的に、酵素処理ナリンジンおよびヒマワリ種子抽出物を対象に検討を行った。酵素処理ナリンジンの検討では、<sup>1</sup>H-qNMRに基づく相対モル感度(RMS)を用いたシングルリファレンスHPLC法の当該分析への応用に関する検討を実施し、基準物質である4-ヒドロキシ安息香酸メチル及びカフェインに対するナリンギン、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンおよびナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSを明らかにした。また、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ギンおよび $\alpha$ -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ギンおよび $\alpha$ -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。さらに、成分規格試験法(案)におけるグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼによる酵素加水分解反応の最適化に向け、その反応効率を検証した。その結果、反応時間及び添加する酵素量ともに規定値の2倍としても、定量値に大きな違いは認められなかった。なお、本研究において使用した酵素処理ナリンジン製品(C2204)の総ナリンゲニン配糖体含量は、規格値を満たしていない。この原因は不明ではあるが、前処理におけるカラム精製時の洗浄液へのナリンジン配糖体の溶出は認められないことから、この操作での損失はないものといえる。また、酵素処理後の試験溶液に残存するグルコシルナリンジン類の含量は非常に少ないこと、ナリンゲニン7-O-グルコシドの量は定量下限である0.1%

以下であること並びに他機関の検証における総ナリゲニン配糖体含量と本研究で明らかにした各種反応条件における同含量は近似したことを考え合わせると、成分規格試験法(案)において規定されている酵素加水分解の反応条件について、反応時間、酵素添加量には問題はないものと考えられた

ヒマワリ種子抽出物では、本研究では、既存添加物の成分規格(案)の最適化を目指して、ヒマワリ種子抽出物を対象に検討を行った。その結果、DPPHラジカル消去活性を指標とする確認試験法においては、精油除去ウイキョウ抽出物の成分規格(案)で示されている方法をおおよそ準用可能ではあるが、試料秤取量は40 mgが適切と考えられた。また、HPLCによる確認試験法においては、ヒマワリ種子抽出物の成分規格(案)で示されているHPLC条件のうち、移動相を0.1%ギ酸/メタノール=80/20へ変更する必要があると考えられた。さらに、食品添加物製品1種の分析を行ったところ、主要成分はクロロゲン酸、4-O-カフェオイルキナ酸、3-O-カフェオイルキナ酸およびカフェ酸であることが判明し、これらの抽出物の抗酸化性に対する寄与率は86.6%であることが明らかとなった。今回はヒマワリ種子抽出物1製品のみでの検討ではあるものの、成分規格(案)に示されているイソクロロゲン酸類は検出されなかったこと、一方でカフェ酸が検出され、この化合物も抗酸化性に寄与することから、今後、他の製品についても検討を行い、成分規格(案)の記載の最適化を進めていく必要があると考えられた。

#### 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 <sup>1</sup>H-quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **2018**; 59: 1-10.
- 8) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書, 日本食品添加物協会技術委員会 (1999)
- 9) Matsufuji T, Chino M, Yamagata K, Yamazaki T. Antioxidant compounds and their contribution to total antioxidant capacity in rosemary extracts, natural antioxidants. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, **2010**; 17: 164-170.
- 10) Shimamura T, Ito Y, Kubo Y, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Yamazaki T, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H. Relationship between catechin content and antioxidant capacity in natural food additive tea extract. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, **2017**; 24: 10-15.

#### F. 研究発表

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年3月 (オンライン)
  - 2) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: Single-reference HPLC 法によるアントシアニンの定量に関する研究, 日本食品化学学会 第 27 回学術大会, 2021 年 6 月, 川崎市産業振興会館 (神奈川県)
  - 3) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いたアントシアニンの定量に関する研究, 日本食品科学工学会 第 68 回大会, 2022 年 8 月, 東京農業大学 (東京)
  - 4) 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定量に関する研究, 第 3 回日本定量 NMR 研究会, 2021 年 12 月, Web 開催
  - 5) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について, 日本食品科学工学会第 69 回大会, 2022 年 8 月
  - 6) 黄奕, 大槻崇, 森川悟, 松藤寛, 治療薬物モニタリング (薬物濃度測定) における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用, 第 4 回日本定量 NMR 研究会年会, 2022 年 12 月
  - 7) 岡庭寛昂, 池上美音, 宮下采佳, 大槻崇, 松藤寛, 長田和実, 中西祐輔, 高橋恭子, 酪酸が腸管上皮バリアへ与える影響, 日本農芸化学会 2023 年度大会, 2023 年 3 月
- 2) Ohtsuki T., Friesen J.B., Chen S.N., McAlpine J.B., Pauli G.F.: Selective Preparation and High Dynamic-Range Analysis of Cannabinoids in "CBD Oil" and Other Cannabis sativa Preparations. *J. Nat. Prod.*, in press. (doi: 10.1021/acs.jnatprod.1c00976.)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## 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 <sup>1</sup>H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. *PLOS ONE.*, **2020**; *15*: e0243175.

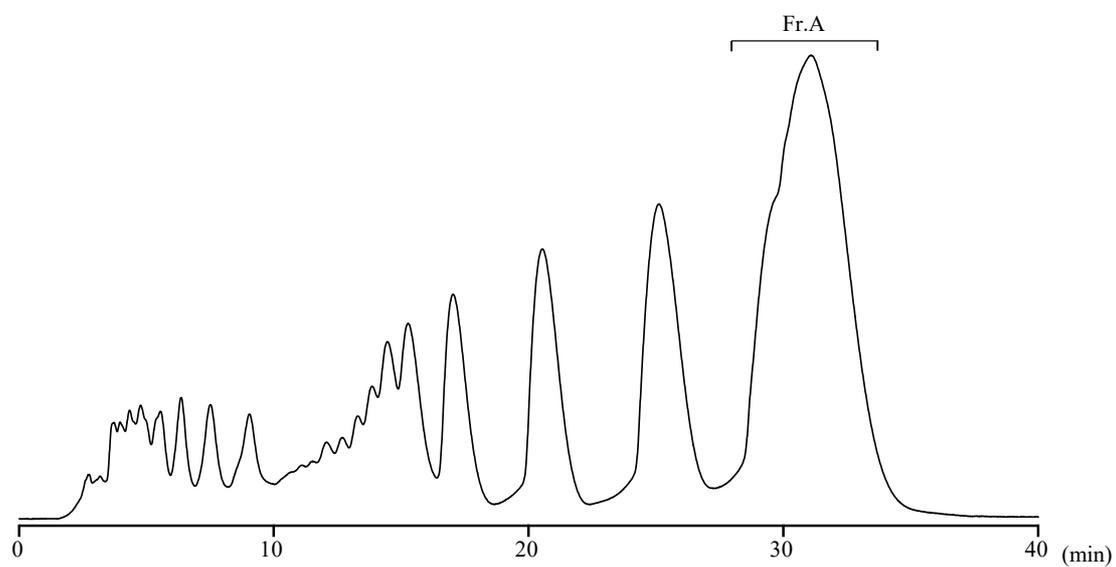


図1 酵素処理ナリンジン（食品添加物製品）のHPLCクロマトグラム（分取）

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

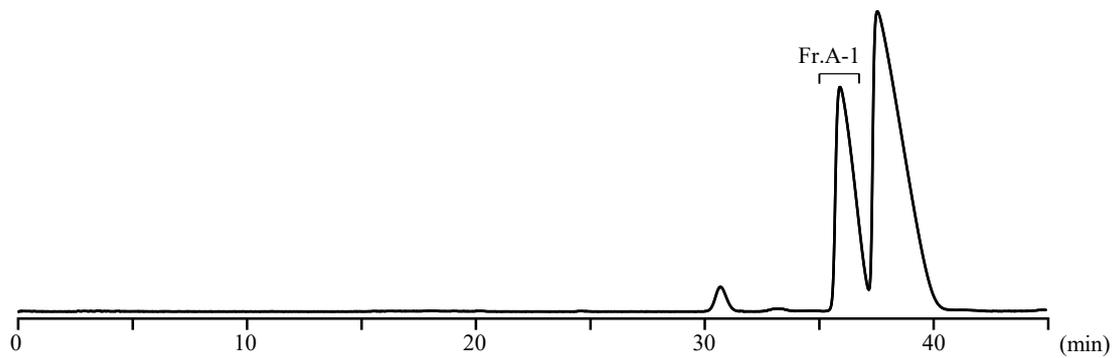


図2 Fr.AのHPLCクロマトグラム(分取)

HPLC条件(分取HPLC条件2)

カラム: Develosil ODS-UG-5 (4.6×250 mm, 粒子径 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

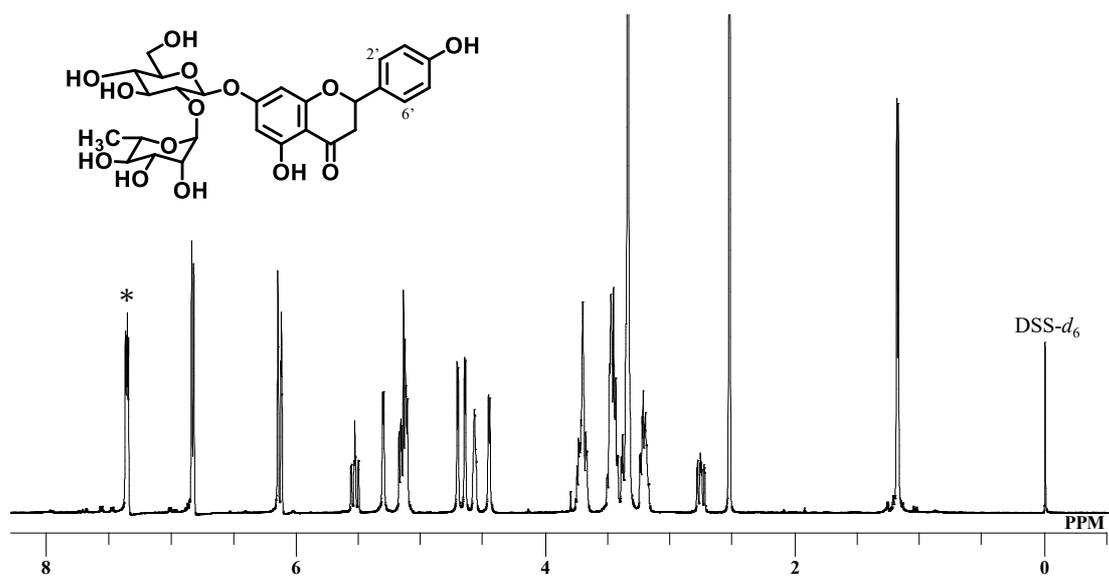


図3 ナリンジンの化学構造および<sup>1</sup>H-qNMR スペクトル

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

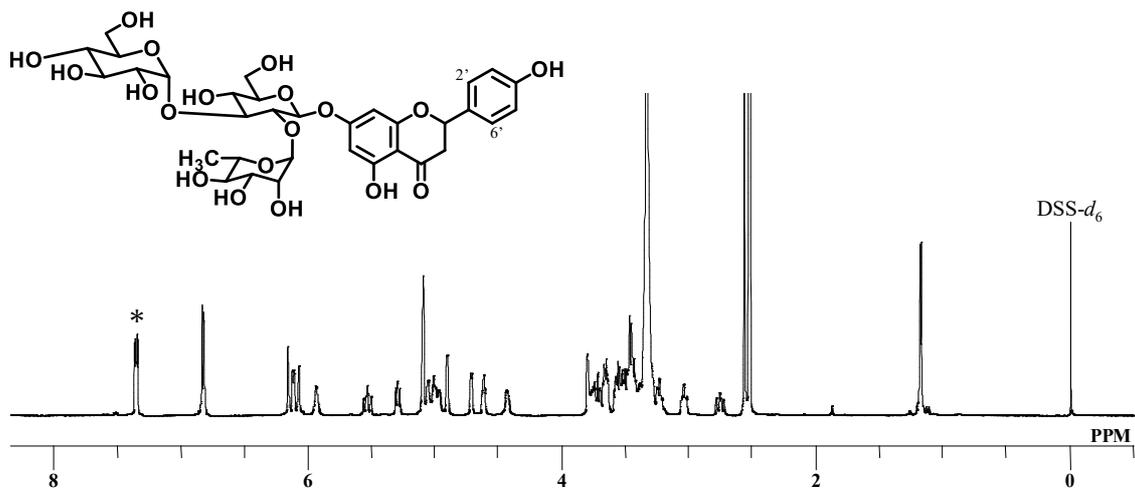


図4  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの化学構造および $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル  
 測定溶媒: DMSO- $d_6$ , \*: 定量用シグナル (H-2' and H-6')

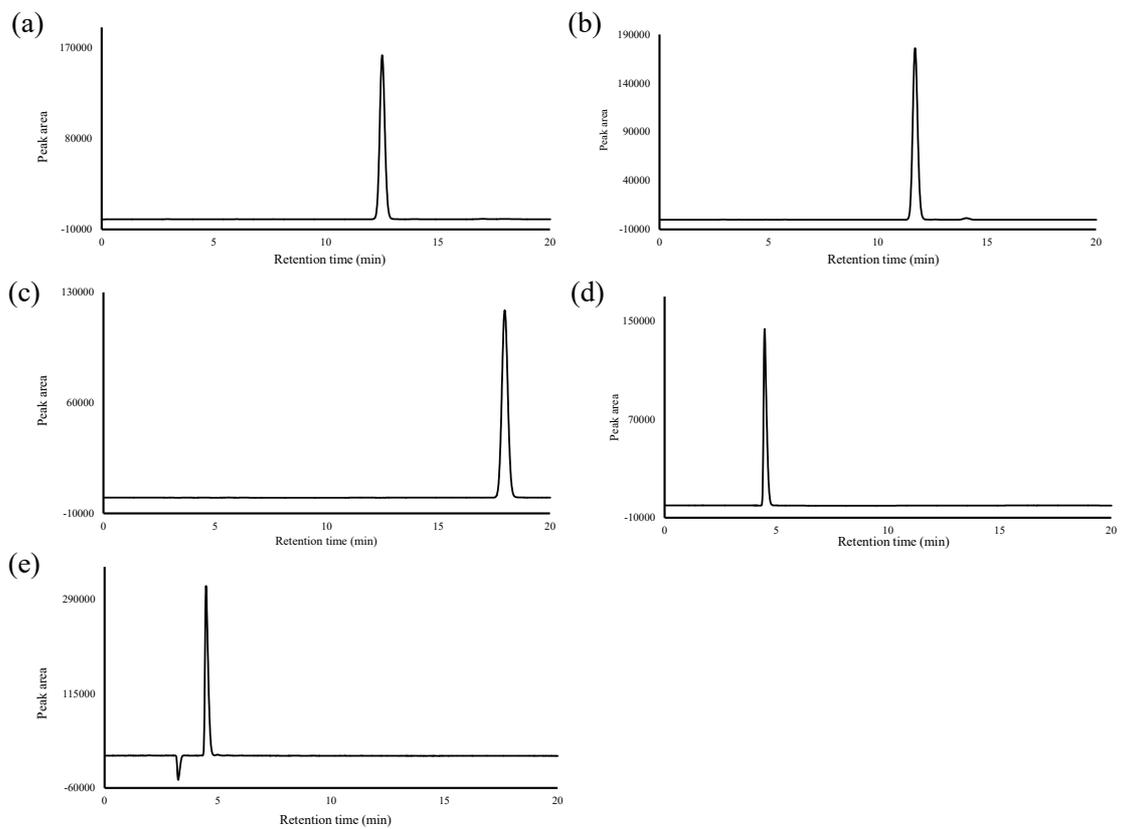


図5 ナリンジン (a),  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン (b), MHB (c), カフェイン (dおよびe) の HPLC クロマトグラム

HPLC 条件

カラム : COSMASIL 5C18-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5  $\mu$ 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  $\alpha$ -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

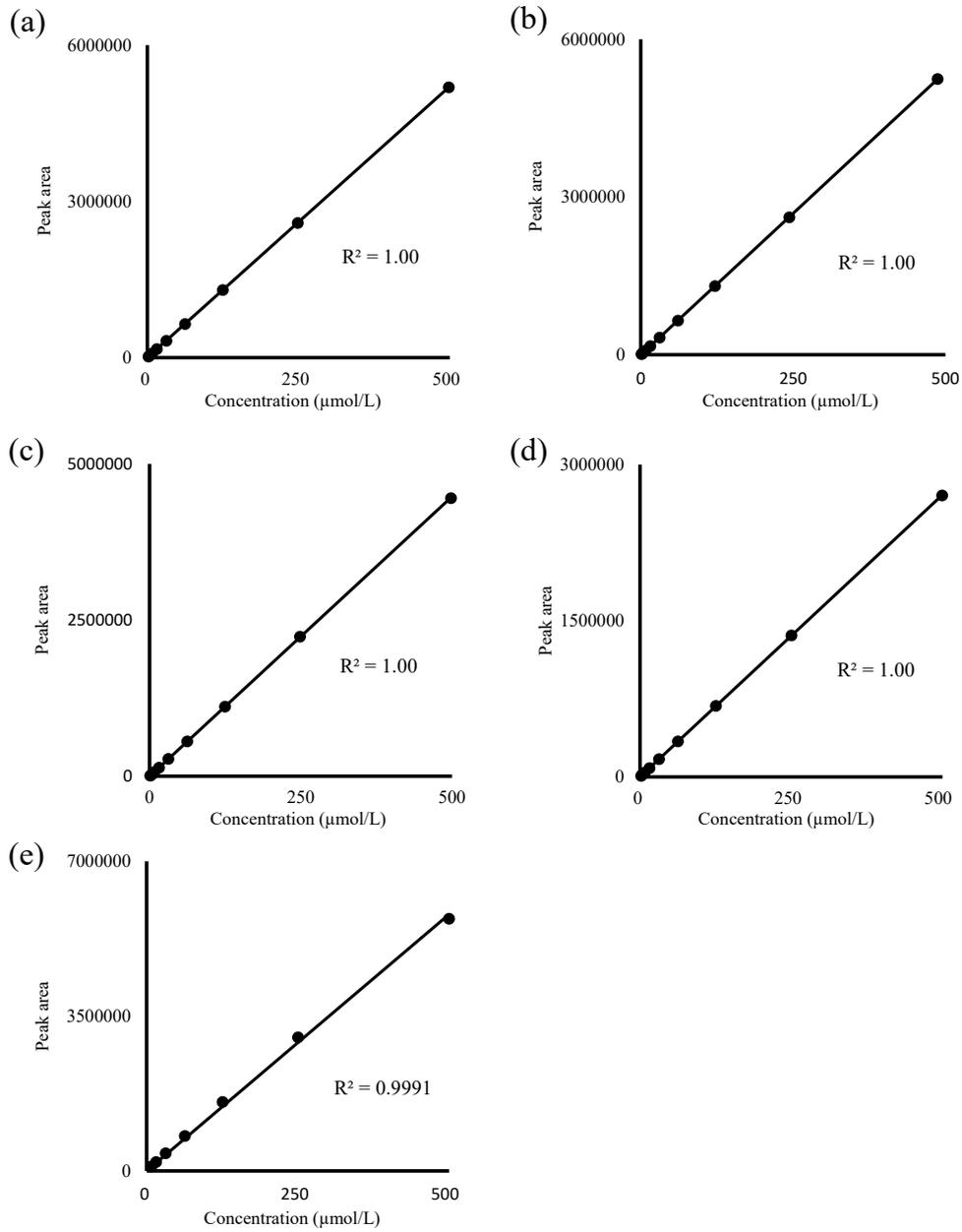


図6 ナリンジン (a), α-モノグルコシルナリンジン (b), MHB (c), カフェイン (dおよびe) の代表的な検量線

(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

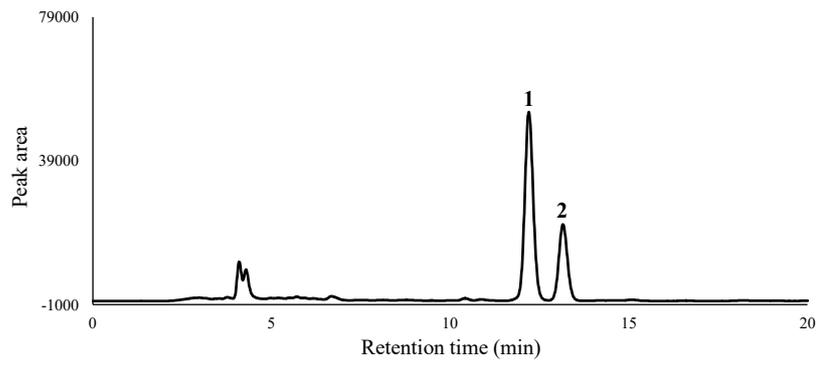


図7 試験溶液の HPLC クロマトグラム

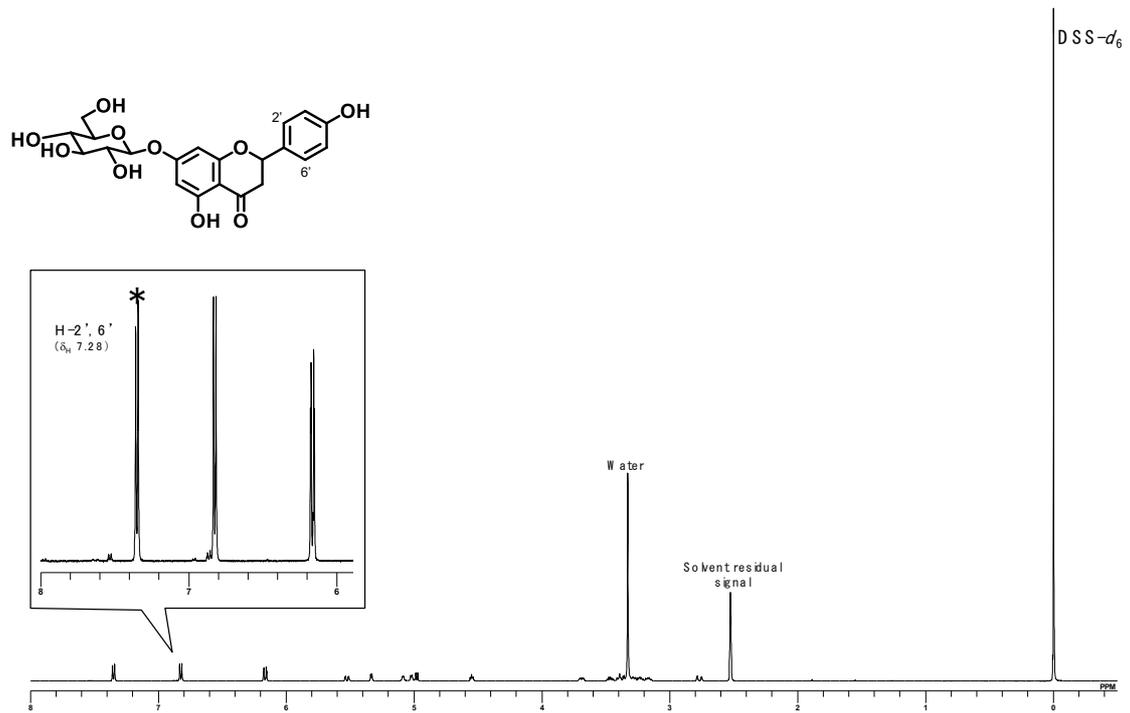


図 8 ナリンゲニン 7-O-グルコシドの化学構造及び  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル

測定溶媒 : DMSO- $d_6$ , \* : 定量用シグナル (H-2' and H-6')

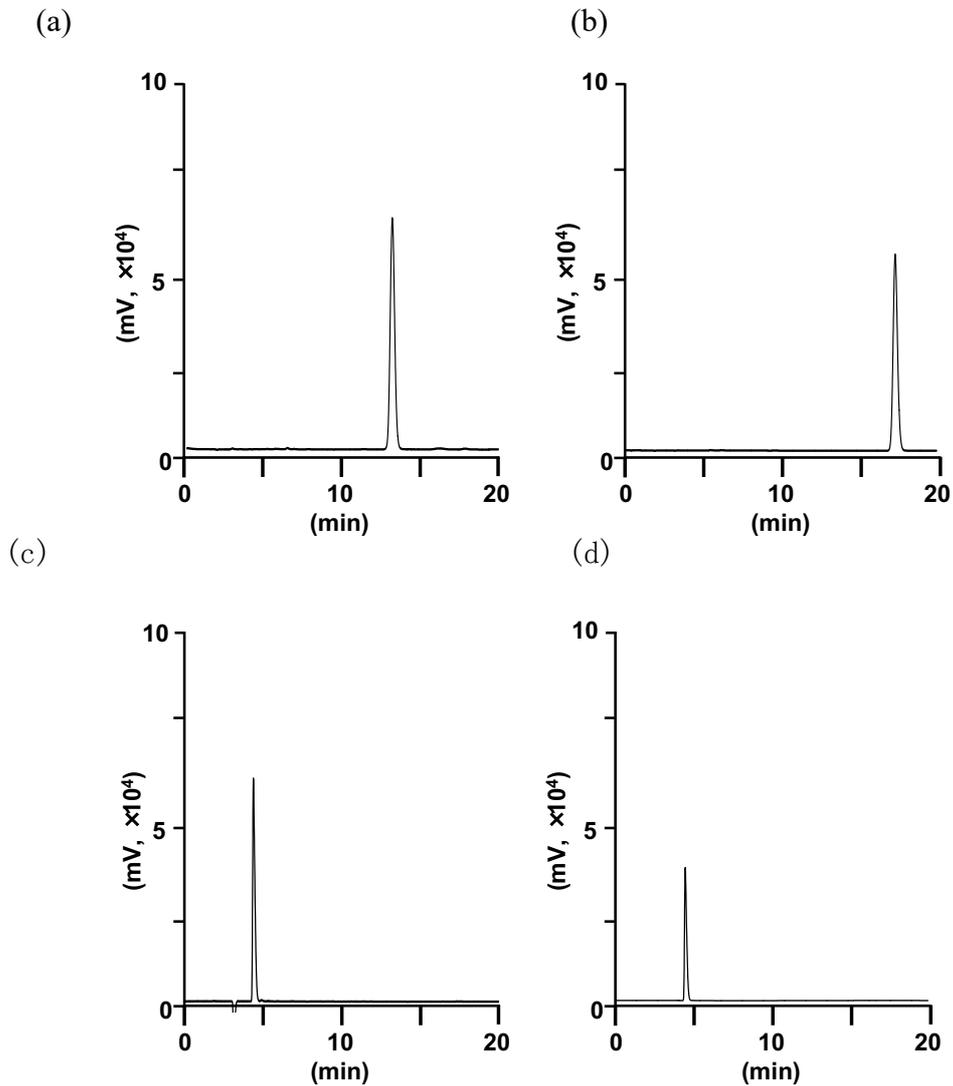


図9 ナリンゲニン 7-*O*-グルコシド (a), MHB (b), カフェイン (c及びd) の HPLC クロマトグラム

HPLC 条件

カラム：COSMASIL 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) (株)ナカライテスク製), カラム温度：40 °C,  
 検出波長：283 nm (ナリンゲニン 7-*O*-グルコシド(a)), 255 nm (MHB (b)), 274 nm (カフェイン (c)), 205 nm (カ  
 フェイン (d)), 移動相：水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流速：1.0 mL/min

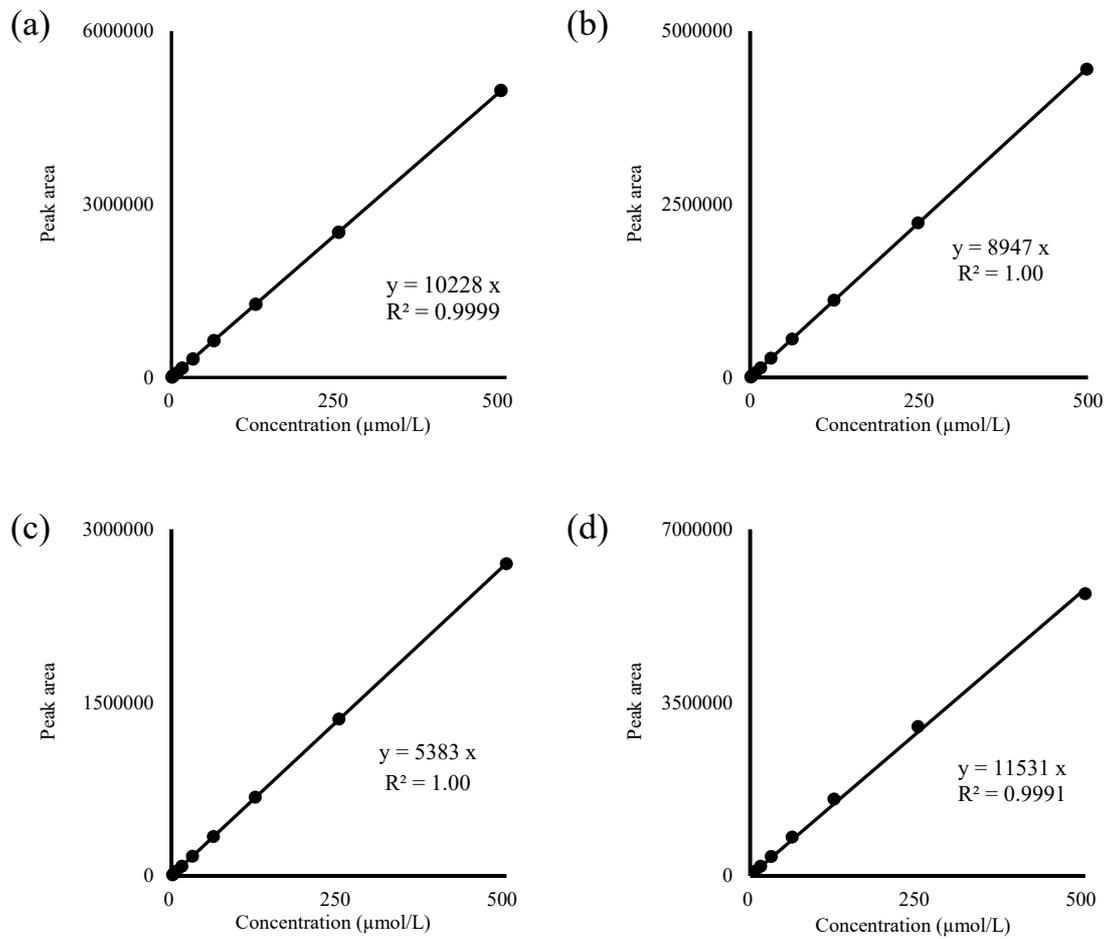


図 10 ナリンゲニン 7-O-グルコシド (a), MHB (b), カフェイン (c 及び d) の代表的な検量線

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

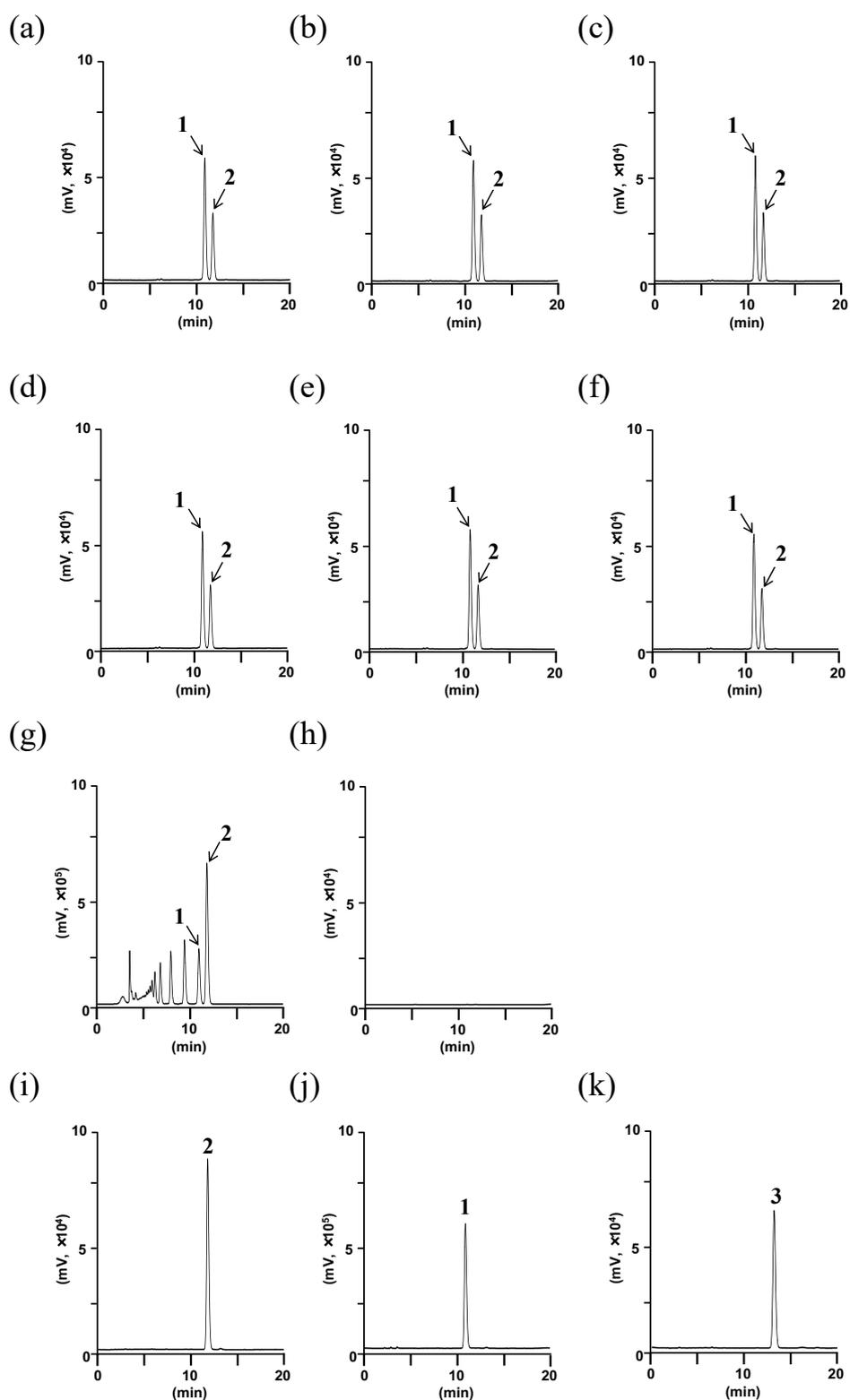


図 11 各試験溶液及び標準溶液の HPLC クロマトグラム

1. モノグルコシルナリンジン, 2. ナリンジン, 3. ナリンゲニン 7-O-グルコシド

HPLC 条件

カラム : COSMASIL 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) (株) ナカライテスク製, カラム温度 : 40 °C,  
 検出波長 : 283 nm, 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 11 のクロマトグラムについて

酵素		
	反応時間	添加量
(a)	60	規定量の最大量
(b)	90	規定量の最大量
(c)	120	規定量の最大量
(d)	60	規定量の最大量の 2 倍
(e)	90	規定量の最大量の 2 倍
(f)	120	規定量の最大量の 2 倍
(g)	溶出液 (酵素未処理)	
(h)	洗浄液 (酵素処理)	
(i)	ナリンジン	
(j)	モノグルコシルナリンジン	
(k)	ナリンゲニン 7-O-グルコシド	

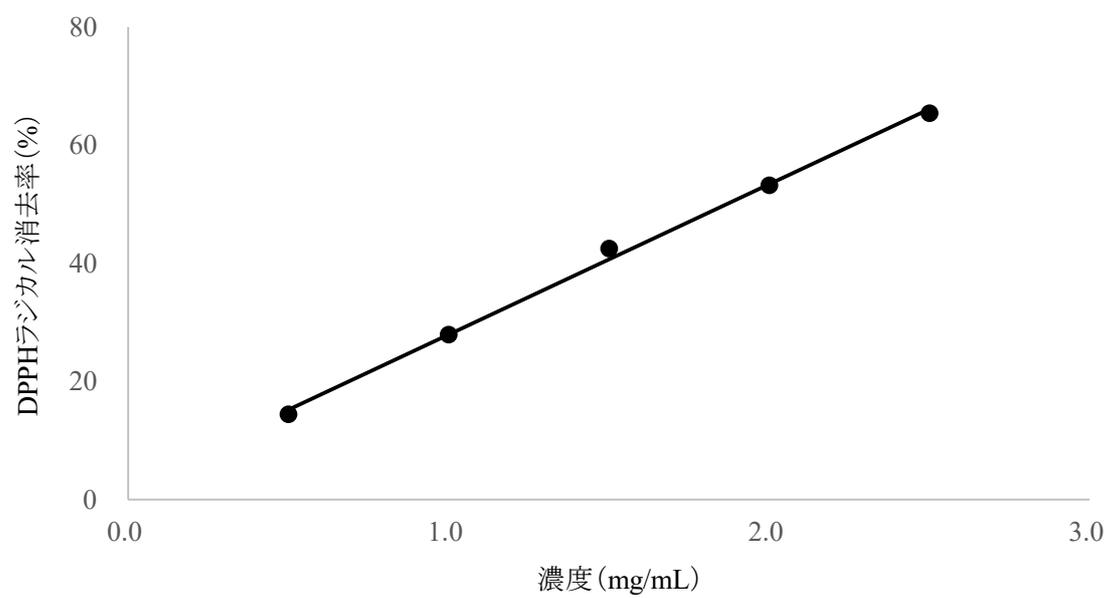


図 12 ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去率

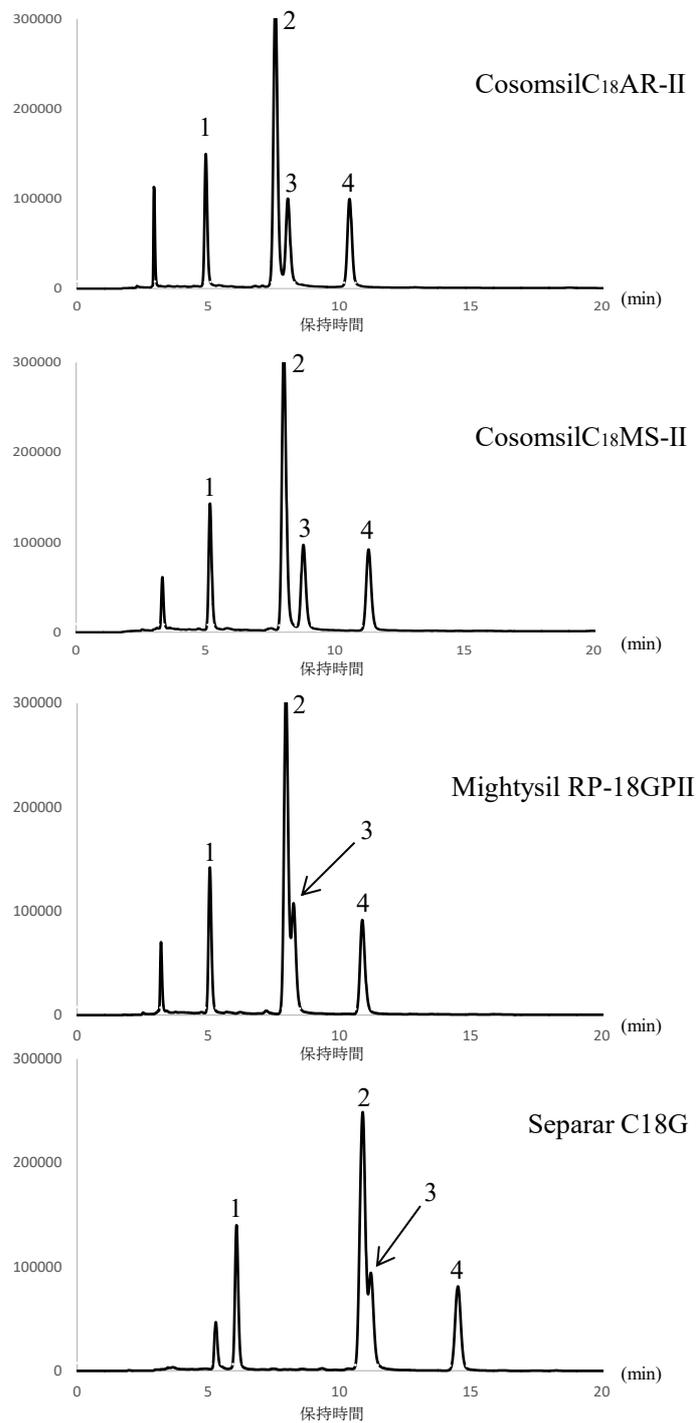


図 13 各種カラムにおけるヒマワリ種子抽出物製品のクロマトグラム

HPLC 条件

移動相：0.1%ギ酸/メタノール=75/25，流速：1.0 mL/min，カラム温度：40℃，検出波長：320 nm，注入量：10 μL

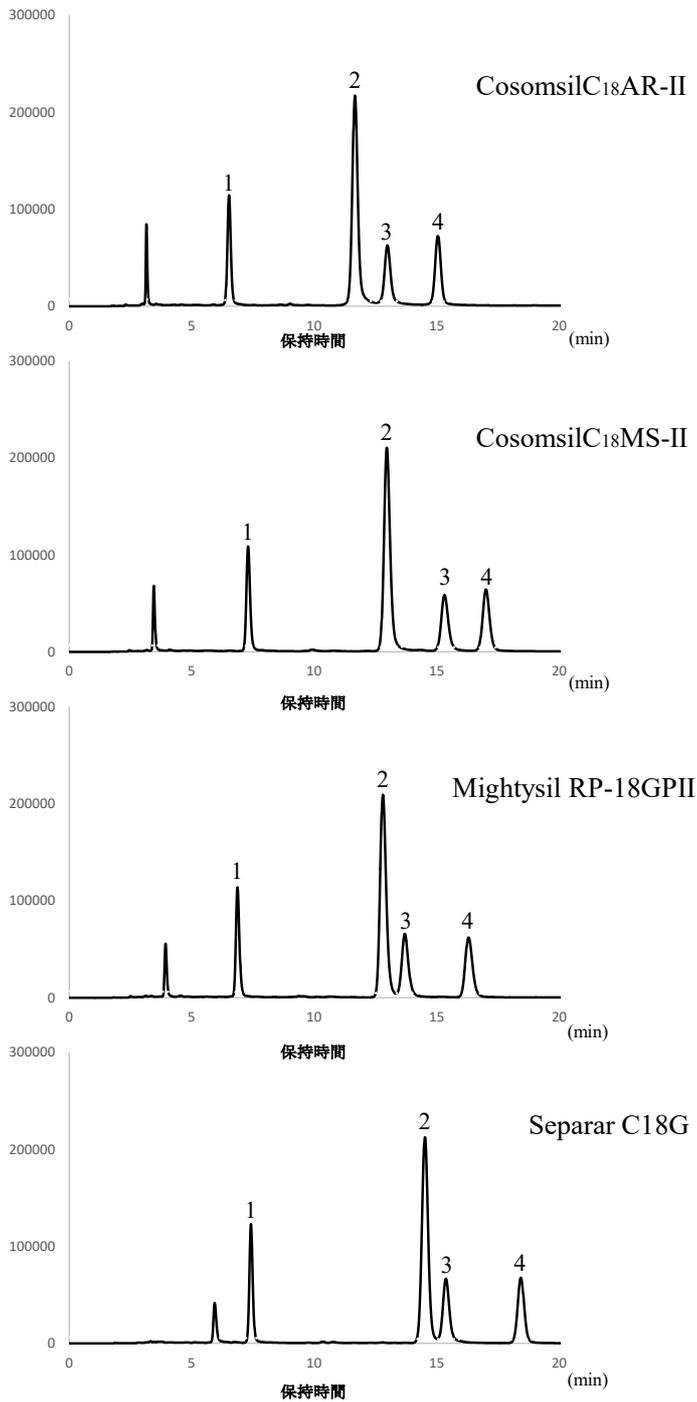


図 14 各種カラムにおけるヒマワリ種子抽出物製品のクロマトグラム

HPLC 条件

移動相：0.1%ギ酸/メタノール=80/20，流速：1.0 mL/min，カラム温度：40℃，検出波長：320 nm，注入量：10 μL

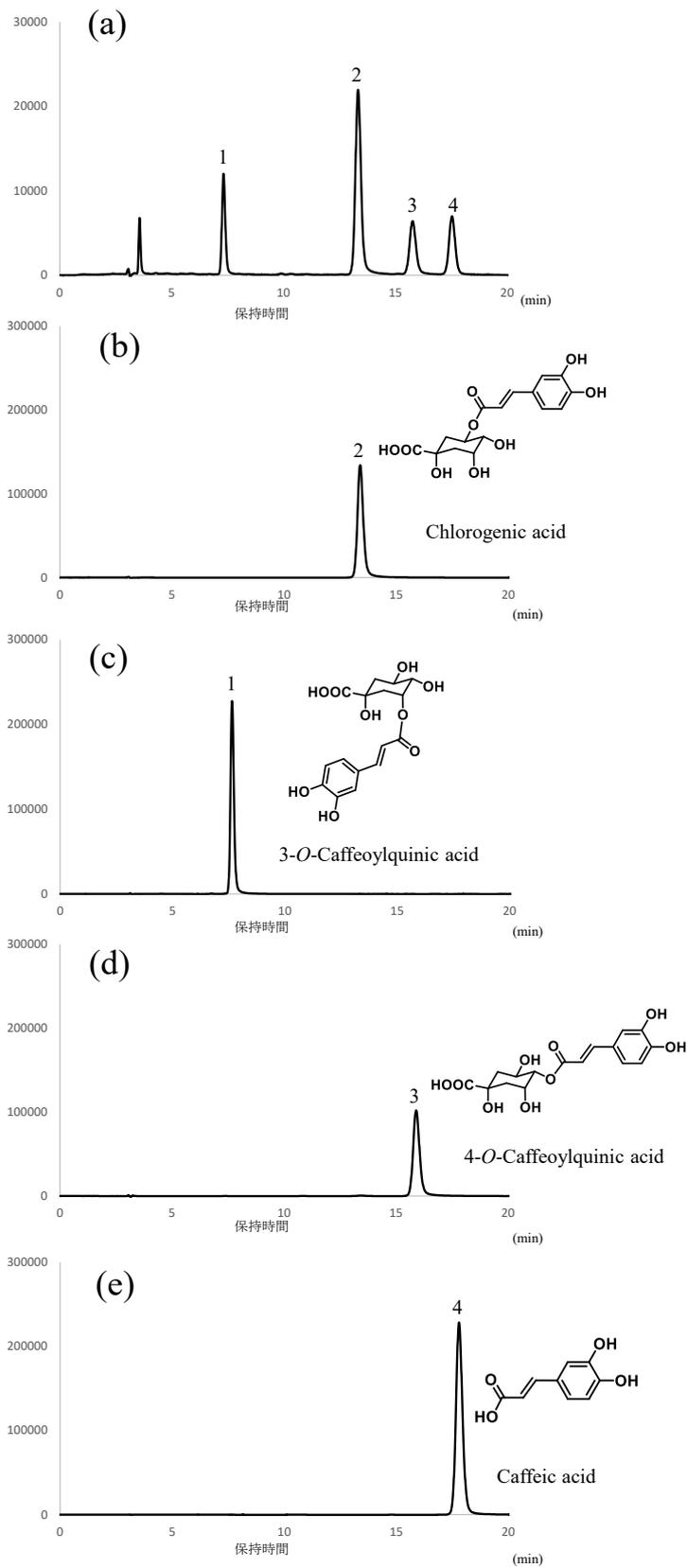


図 15 ヒマワリ種子抽出物 (a), クロロゲン酸 (b), 3-O-カフェオイルキナ酸 (c), 4-O-カフェオイルキナ酸 (d), カフェ酸 (e) のクロマトグラム

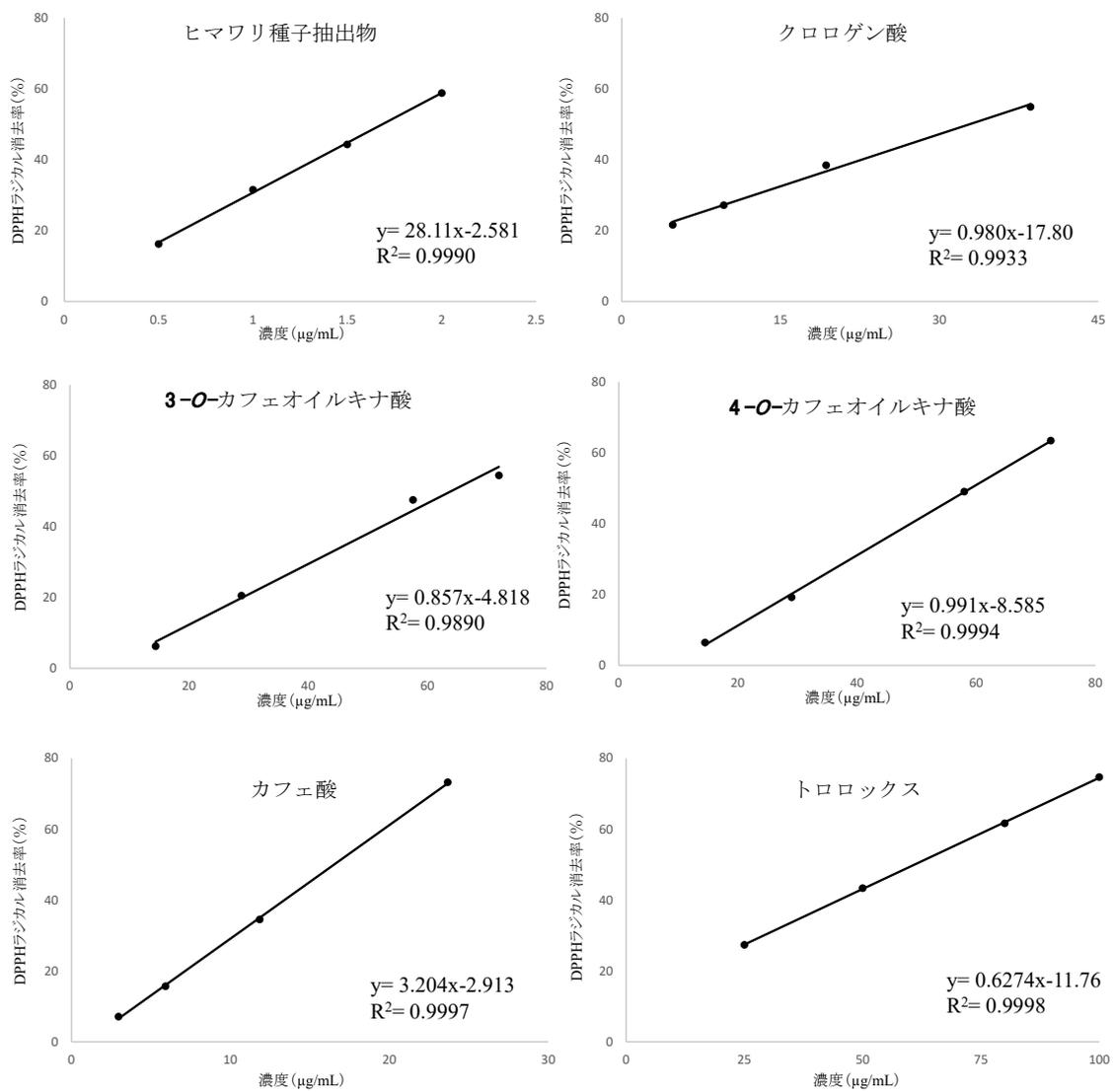


図 16 ヒマワリ種子抽出物および各成分の DPPH ラジカル消去活性

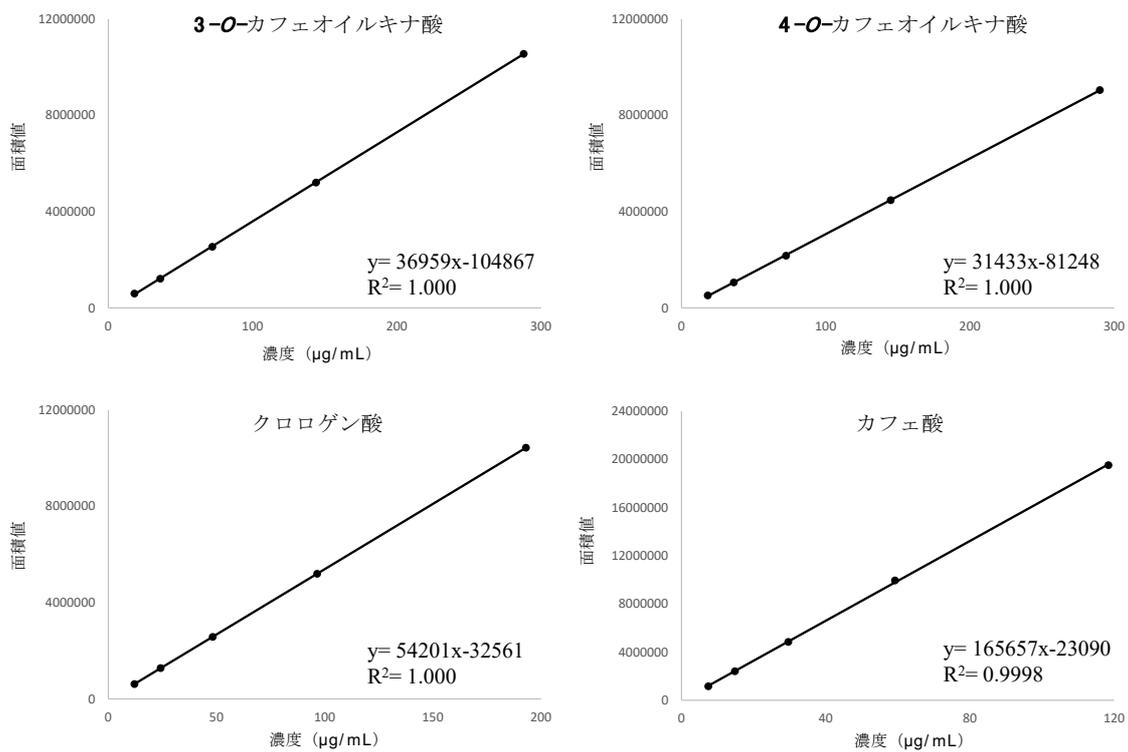


図 17 3-O-カフェオイルキナ酸, 4-O-カフェオイルキナ酸, クロロゲン酸, カフェ酸の代表的な検量線

表 1 純度測定における  $^1\text{H}$ -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
$^{13}\text{C}$ デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2 <sup>1</sup>H-qNMR より算出されたナリンジンおよび 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， $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの RMS

		基準物質			
		MHB	検出波長 274 nm	検出波長 205 nm	ナリンジン
測定対象物質	ナリンジン	1.15	1.91	0.89	-
	$\alpha$ -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 $\alpha$ -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
$\alpha$ -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
$\alpha$ -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
$\alpha$ -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 (%)
$\alpha$ -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
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8
$\alpha$ -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
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8
$\alpha$ -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
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	5.0	0.8	4.9	0.8
$\alpha$ -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
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8
$\alpha$ -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

表 6 各基準物質に対するナリンゲニン 7-*O*-グルコシドの RMS

	基準物質		
	MHB	カフェイン	
		検出波長 274 nm	検出波長 205 nm
ナリンゲニン 7- <i>O</i> -グルコシド	1.13	1.87	0.87

表 7 酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)  
 酵素の添加量：規定値の最大量 (グルコアミラーゼ：2500 単位,  $\alpha$ -グルコシダーゼ：30000 単位)

	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.3	0.1	3.3	0.01	3.4	0.03
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	7.1	0.2	7	0.02	7.2	0.1
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	10.5	0.3	10.2	0.02	10.6	0.1
酵素処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基の量 (%)	14.7	0.5	14.5	0.6	14.0	0.3
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	25.2	0.3	24.7	0.6	24.6	0.4

定量では、 $^1\text{H}$ -qNMR の結果に基づいて調製されたナリンジン標準溶液を使用した  
 (純度：85.2%)

表 8 酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)

酵素の添加量：規定値の最大量の 2 倍 (グルコアミラーゼ：5000 単位， $\alpha$ -グルコシダーゼ：60000 単位)

	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.2	0.1	3.1	0.03	3.2	0.2
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	7.0	0.1	6.8	0.1	7.1	0.3
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	10.2	0.2	9.9	0.2	10.3	0.5
酵素処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基の量 (%)	14.0	0.4	14.5	0.5	14.0	0.9
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	24.1	0.5	24.4	0.7	24.4	0.4

定量では， $^1\text{H-qNMR}$  の結果に基づいて調製されたナリンジン標準溶液を使用した (純度：85.2%)

表 9 ヒマワリ種子抽出物および各成分の DPPH ラジカル消去活性 (n=3)

	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	RSD (%)
3- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	63.5	1.8
4- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	59.0	2.7
クロロゲン酸	32.9	3.2
カフェ酸	16.5	0.1
トロロックス	61.2	1.3
ヒマワリ種子抽出物	1713	1.7

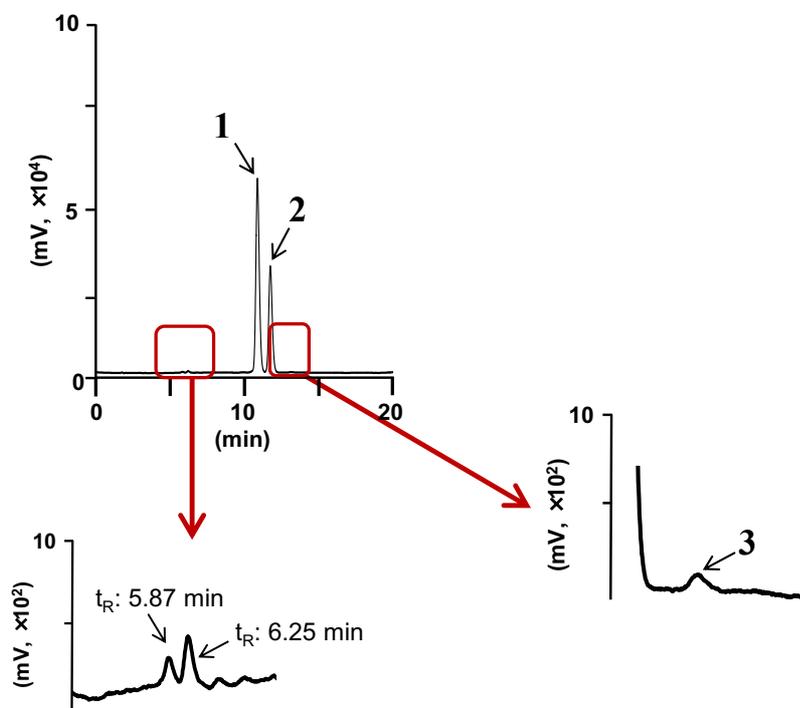
表 10 3-*O*-カフェオイルキナ酸, 4-*O*-カフェオイルキナ酸, クロロゲン酸, カフェ酸の TEAC

	TEAC
3- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	0.96
4- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	1.04
クロロゲン酸	1.86
カフェ酸	3.70

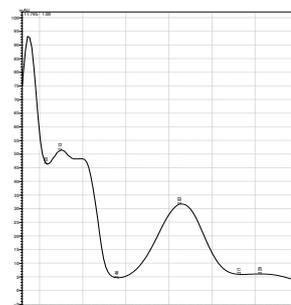
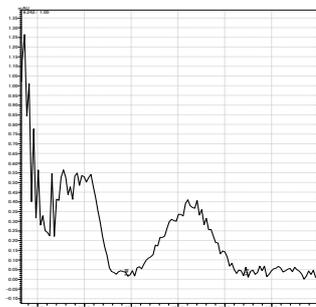
表 11 ヒマワリ種子抽出物に含まれる主要成分の含量 (%) (n=3)

	含量 (%)	RSD (%)
3- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	0.62	1.1
4- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	0.65	0.5
クロロゲン酸	0.79	0.4
カフェ酸	0.09	0.3

付録 1



$t_R$ : 6.25 minの化合物のUVスペクトル      ナリンジンのUVスペクトル



試験溶液(図 4 (a))の HPLC クロマトグラム, 拡大図等

1. モノグルコシルナリンジン, 2. ナリンジン, 3. ナリンゲニン 7-O-グルコシド

HPLC 条件

カラム: COSMASIL 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) (株) ナカライテスク製, カラム温度: 40 °C,  
 検出波長: 283 nm, 移動相: 水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流速: 1.0 mL/min

付録 2

酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)

酵素の添加量：規定値の最大量 (グルコアミラーゼ：2500 単位,  $\alpha$ -グルコシダーゼ：30000 単位)

(ナリンジン定量用標品の純度を 100%として計算)

	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.9	0.1	3.8	0.01	3.9	0.04
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	8.4	0.2	8.2	0.03	8.5	0.1
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	12.3	0.3	12.0	0.04	12.4	0.1
酵素処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基の量 (%)	14.7	0.5	14.5	0.6	14.0	0.3
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	27	0.3	26.5	0.6	26.4	0.4

付録 3

酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)

酵素の添加量：規定値の最大量の2倍 (グルコアミラーゼ：5000 単位,  $\alpha$ -グルコシダーゼ：60000 単位)

(ナリンジン定量用標品の純度を 100%として計算)

	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.8	0.1	3.7	0.04	3.8	0.2
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	8.2	0.2	8.0	0.1	8.3	0.4
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	12.0	0.3	11.7	0.2	12.1	0.6
酵素処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基の量 (%)	14.0	0.4	14.5	0.5	14.0	0.9
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	26.6	0.3	26.1	0.8	26.2	0.6

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～令和4年度 総合分担研究報告書

「試験法及び分析法の開発」及び「既存添加物の有効成分の解明」

～外部標準法定量 NMR の自動測定スクリプトの開発及び

ニガヨモギ抽出物と乾留抽出物添加物の成分分析～

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 主任研究官

**研究要旨** 既存添加物の品質向上に資する研究として、1) 試験法及び分析法の開発及び 2) 既存添加物の有効成分の解明を実施した。

1) 近年、試験に用いる試料や試薬の絶対純度の把握が重要視されていることを考慮し、誰もが簡便に純度測定できる分析法として外部標準法定量NMR（EC-qNMR）が挙げられた。しかしながら、EC-qNMRで正確な純度を算出するためには、qNMR測定の前に90°パルス幅（pw90）を校正する必要があるため、試料が複数ある場合、分析者はNMR装置の前に拘束されることになる。本研究ではこの問題を解消するために、EC-qNMRを完全自動化するスクリプトを開発した。本研究成果は、あらゆる分野における分析結果の信頼性向上が期待される。今後は本スクリプトの社会実装を進める予定である。

2) 天然苦味料であるニガヨモギ抽出物及び乾留抽出物添加物である木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物の成分分析を実施した。ニガヨモギ抽出物に対してLC/MS分析を実施した。ニガヨモギ抽出物は、苦味成分としてabsinthin, anabsin及びanabsinthinを含んでいた。その他の成分としてフラボノイドであるartemetin, またリグナンであるyangambin, epiyangambin, diayangambin, sesartemin, episesartemin A, episesartemin B及びdiasarteminの7成分が確認された。木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物に対してGC/MS分析を実施した。これら乾留物は、原料の熱分解に由来するカルボニル化合物、フラン類、ピラン類、フェノール類及び含窒素化合物を含んでいた。これらの成分について、添加物製品中の含量を算出したところ、最大で0.5%、合算で1～4%程度と微量であった。これらの品目は全て、第9版食品添加物公定書（以下、公定書）に未収載であるため、公的な成分規格の設定が急務となっている。したがって、本研究成果は成分規格を設定に資する根拠データといえる。今後は、本研究成果を添加物事業者と共有し、具体的な成分規格案の作成を進める予定である。

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所  
加藤菜帆 日本大学  
吉村弘伸 日本電子（株）  
松熊伸也 日本電子（株）  
朝倉克夫 日本電子（株）  
末松孝子 日本電子（株）  
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

A. 研究目的

1) 近年、試験に用いる試料や試薬の絶対純度の把握が重要視されている。誰もが簡便に絶対純度を算出できる手法として外部標準法定量NMR（EC-qNMR）が挙げられた。しかしながら、EC-qNMRで正確な純度を算出するためには、qNMR測定の前に90°パルス幅（pw90）を校正する必要があるため、試料が複数ある場合、分析者はNMR装置の前に拘束されることになる。この問題を解消するために、本研

究は EC-qNMR 測定を完全自動化するスクリプトを開発することとした。

2) 食品添加物公定書に未収載の既存添加物<sup>1)</sup>については、成分規格案作成のための根拠データの集積が必要不可欠である。本研究では、ニガヨモギ抽出物及び乾留抽出物添加物である木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物を対象に、LC/MS 及び GC/MS による成分分析を実施することとした。

## B. 研究方法

1) 日本電子と共同で自動測定スクリプトを作成し、国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）の3台の NMR 装置（すべて <sup>1</sup>H の共鳴周波数が 600 MHz）にインストールし、動作確認を行った。また、認証標準物質 DSS-d<sub>6</sub>（Cat No 044-31671, 92.4%）及びマレイン酸

（MA, Cat No 135-17951, 99.9%）を用いて、自動測定スクリプトで得られる EC-qNMR の定量精度を確認した。

プローブの応答能を示す Q 値は、以下の式 (1) から算出した。

$$Q \text{ value} = S \times pw90 / H / \text{Molar Conc.} \quad (1)$$

S, absolute integral value; pw90, 90° pulse width; H, number of protons; Molar Conc., concentration (mol/L).

2) 日本食品添加物協会を通じて入手したニガヨモギ抽出物、木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物を試料として用いた。LC/MS 分析は、Waters 社製 ACQUITY UPLC-Xevo G2 Qtof を用いて、主要成分の精密質量 MS を明らかにし、成分を同定した。GC/MS 分析は、7890B GC system（アジレント・テクノロジー製）及び JMS-Q1500GC（日本電子製）を用いた。また、定量分析における標準品は、試薬会社から購入したものを使用した。

### LC/MS 分析

装置、ACQUITY UPLC H-CLASS（Waters 社製）及び Xevo G2 QToF（Waters 社製）；カラム、ACQUITY UPLC BEH C18（2.1×100 mm, 1.7µm, Waters 社製）；カラム温度、40°C；A

液、10%メタノール水溶液；B液、メタノール；グラジエント、0.0 min（60：40）→20.0 min（60：40）→50 min（30：70）→60 min（0：100）；流速、0.2 mL/min；測定波長、210 nm；注入量、2 µL；ソース温度、120°C；脱溶媒温度、450 °C；脱溶媒ガス流量、800 L/hr；コーンガス流量、50 L/hr；キャピラリー電圧、2.5 kV；コーン電圧、30 V；走査範囲、m/z 100～1000；イオン化モード、ESI（pos.）。GC/MS 分析

装置、7890B GC system（アジレント・テクノロジー製）及び JMS-Q1500GC（JEOL 製）；カラム、DB-5MS（30 m×0.25 mm, 膜厚 0.25 µm, アジレント・テクノロジー製）；昇温条件、30°C（5分間保持）→Δ10°C/min→300°C（5分間保持）；注入口温度、250°C；キャリアーガス、He；流量、1.0 mL/min；スプリット比、20：1；注入量、1 µL；Q-Pole 温度、100°C；イオン源温度、230°C；トランスファーライン温度、250°C；イオン化法、EI；scan モード、m/z 20～400；SIM モード。

## C. 結果及び考察

1) pw90 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。pw90 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、チューニング及びマッチング

（T&M）を実行した後に pw90 を校正する必要がある。一般に pw90 の校正には、緩和時間 T<sub>1</sub> の影響が小さい pw360 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<sup>2)</sup>。具体的には、pw90～pw450 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 pw90 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 pw90 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  $^1\text{H}$  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。

pw90 校正の際に実行される、Scout scan 及びアレイ測定の間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、 $^1\text{H}$  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、 $^{13}\text{C}$  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  $^{13}\text{C}$  デカップリング時の熱の発生をなくするため、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 及び 800MHz の装置でそれぞれ 1.64 sec、1.09 sec 及び 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、 $^{13}\text{C}$  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。遅延時間や変化させるパルス幅はオペレーターが任意に変更できるように設定した (図 1)。

開発した自動測定スクリプトの動作確認を実施した。pw90 校正の前後両方でチューニングを重複して実行するという不具合が確認されたが、複数の Job メソッドを組み合わせることでこの問題を回避し、適切な測定手順に従った EC-qNMR の完全自動化が可能となった。自動測定スクリプトを利用した際の EC-qNMR の定量精度は、プローブの応答能である DSS- $d_6$  及び MA の Q 値をモニタリングすることで算出した。装置によっては RSD が 2.5% となる場合もあったが、測定回数を増やし、これらの平均を採用すると、正確な絶対純度が算出できると期待できた。本研究で開発したスクリプトを利用することで、既存添加物の成分規格作成に関する研究業務の迅速化が期待できる。

2) ニガヨモギ抽出物 3 製品について LC/MS 分析を実施したところ、**1**~**11** の主要なピークが観察された(図 2)。これらの PDA スペクトル及び MS スペクトルは試料間で一致した。このことから、成分 **1**~**11** はニガヨモギに共通した成分と考えられた。また、A650 と C2232 の入手年は、それぞれ 2005 年と 2021 年であるが、クロマトパターンに大きな差異がなかったことから、2005 年から現在にかけて、ニガヨモギ抽出物の基原・製法・本質は変わっていないが支持された。

LC/MS 分析で得られた  $m/z$  の値から成分 **1**~**11** の同定を試みた。

成分 **1** は  $m/z$  519.2721 を与えた。元素組成分析の結果、分子式として  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{Na}$  が考えられ、観測された  $m/z$  は absinthin  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6$  の  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  に相当する分子イオンと考えられた。別に absinthin 標品を用いて、保持時間、PDA スペクトル及び MS スペクトルの比較を行ったところ、すべて一致し、成分 **1** を absinthin と同定した。

成分 **2** は  $m/z$  535.2667 を与えた。元素組成分析の結果、分子式として  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}$  が考えられた。観測された  $m/z$  は anabsin  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_7$  の  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  に相当する分子イオンと考えられた。

成分 **3** は  $m/z$  519.2721 を与えた。元素組成分

析の結果、分子式として  $C_{30}H_{40}O_6Na$  が考えられた。観測された  $m/z$  は anabsinthin  $C_{30}H_{40}O_6$  の  $[M+Na]^+$  に相当する分子イオンと考えられた。

成分 4~6 はいずれも  $m/z$  469.1821 を与えた。分子式として  $C_{24}H_{30}O_8Na$ 、また互いに異性体と考えられたことから、観測された  $m/z$  は  $C_{24}H_{30}O_8$  の  $[M+Na]^+$  に相当する分子イオン、すなわち、yangambin, epiyangambin 及び diayangambin と考えられた。

成分 7~10 は  $m/z$  453.1529 を与えた。分子式として  $C_{23}H_{26}O_8Na$ 、また互いに異性体と考えられたことから、観測された  $m/z$  は  $C_{23}H_{26}O_8$  の  $[M+Na]^+$  に相当する分子イオン、すなわち sesartemin, episesartemin A, episesartemin B 及び diasesartemin と考えられた。このうち、Sesartemin はニガヨモギから単離された報告があり<sup>3)</sup>、すべての成分がニガヨモギ属で報告されている<sup>4)</sup>。

成分 11 は  $m/z$  411.1055 を与えた。元素組成分析の結果、分子式として  $C_{20}H_{21}O_8$  が考えられ、観測された  $m/z$  は artemetin  $C_{20}H_{20}O_8$  の  $[M+H]^+$  に相当する分子イオンと考えられた。別に、この成分を単離・精製して NMR に付したところ、artemetin に由来する  $^1H$  シグナルを確認できたことから、成分 11 を artemetin と同定した。

以上の同定及び推定の結果から、ニガヨモギ抽出物はセスキテルペンラクトンである absinthin, anabsin 及び anabsinthin を含んでおり、これらが本抽出物の本質、すなわち苦味成分であり、成分規格試験の指標成分として有用と考えられた。その他の成分としてはフラボノイドである artemetin, またリグナンである yangambin, epiyangambin, diayangambin, sesartemin, episesartemin A, episesartemin B 及び diasesartemin の 7 成分が確認された (図 3)。

標品が市販されている苦味成分 absinthin を本抽出物の指標成分として、HPLC 分析及び TLC 分析を検討した。HPLC 分析では、absinthin の絶対検量線が良好な直線性を示すことから、成分規格試験の定量法及び確認試験としての運用が期待できたが、別に absinthin

標品の規格化が必要であり、その際、absinthin 標品の価格や絶対純度について考慮する必要があった。TLC 分析では順相条件及び逆相条件について検討した。両条件とも absinthin の濃度に比例した明瞭なスポットが確認できたことから、標品を用いずとも Rf 値を規定することにより、absinthin の確認試験を設定できると考えられた (図 4)。本研究成果をもとにニガヨモギ抽出物の成分規格試験の作成を進めていくこととした。

乾留抽出物添加物について GC/MS による成分分析を実施したところ、クロマトグラム上に多数のピークが観察された。これらの MS スペクトルについて、NIST ライブラリと照合した結果、原料の熱分解に由来するカルボニル化合物、フラン類、ピラン類、フェノール類及び含窒素化合物の存在が示唆された。これら熱分解物の標準品を用意し (表 1)、保持時間及び MS スペクトルの一致を確認し、同定を行った。同定した 36 化合物について、SIM 測定による定量分析を行うこととした。SIM 測定では測定対象の数が多いため、2 つの MS メソッドを用意した (method-A 及び B) (図 5)。1 ピークあたりのポイント数を確保するため、定量イオンのみをモニタリングすることとした (表 1)。標準液各 5 濃度の検量線は、二次曲線で作成した。次に添加物試料 6 製品を測定し、得られた SIM スペクトルのピーク面積から定量を行った。定量結果を表 2 に示した。表中 ND は、SIM でピークが認められなかったもの、under は検量線の範囲外 (濃度レベル 10 以下) を表す。含量は最大で 0.5% 程度 (TD1 中のカフェイン)、合算で 1~4% 程度と微量であった。

## D. 結論

既存添加物の品質向上を念頭に、分析法の開発として、EC-qNMR 自動測定スクリプトの開発に取り組んだ。既存添加物で扱う成分は希少なものが多く、これらの試薬又は標品は一般的に高価である。EC-qNMR の場合、その試料液は、純度測定の基準となる内部標準物質の添加による汚染もなく、純度又は含量測

定後、濃度既知の標準液として検量線の作成に利用できるのも魅力的である。今後は、EC-qNMRの社会実装に取り組んでいく予定である。

既存添加物の有効成分の解明として、食品添加物公定書未収載の既存添加物：ニガヨモギ抽出物、木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物を対象に、LC/MSやGC/MSによる成分分析を実施した。いずれも国内で流通している添加物製品を試料として用いていることから、本研究成果は、これらの成分規格案を作成する際の有益な根拠データとなる。今後は添加物事業者と協議して、具体的な成分規格案の作成を進めていく。

## 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) 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.
- 3) Tulake, A., Jiang, Y., Tu, PF. Nine lignans from *Artemisia absinthium* L. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 360–363 (2012).
- 4) Ickovski, J.D., Pavlović, J.Lj. Mitić, M.N., Palić, I.R., Kostić, D.A., Petrović, G.M., Stojanović, G.S. Furofuran lignans of *Artemisia* genus: Isolation, biosynthesis and biological activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 85(5), 575–600 (2020).

## 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シル定量法の改良。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：<sup>13</sup>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)
- 6) 西崎雄三，石附京子，杉本直樹，佐藤恭子：食品添加物中の窒素定量分析~燃烧法 vs ケルダール法~。食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web))。
- 7) 建部千絵，藤原由美子，長久保直也，増本直子，西崎雄三，石附京子，久保田浩樹，杉本直樹，多田敦子，佐藤恭子：相対モル感度を用いた食用タール色素中の6,6'-オキシビス(2-ナフトレンスルホン酸)二ナトリウムの定量法の検討。食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web))。
- 8) 高木映里，高橋未来，増本直子，西崎雄三，杉本直樹，佐藤恭子，井之上浩一：高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析。食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web))。
- 9) 日置冬子，多田敦子，西崎雄三，古庄紀子，石附京子，久保田浩樹，建部千絵，杉本直樹，佐藤恭子：食品添加物ジフェノコナゾールの規格試験法の検討及び異性体組成分析。食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web))。
- 10) 長井理夏子，内倉崇，好村守生，増本直子，西崎雄三，杉本直樹，佐藤恭子，天倉吉章：既存添加物ショウガ抽出物の成分解析。第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日

本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会  
(2021.10.23-24)(松山市).

- 11) 加藤菜帆, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天然苦味料ニガヨモギ抽出物の成分規格作成を目的とした基礎的検討, 日本食品化学会 第28回総会・学術大会, 2022年5月19日
  - 12) 西崎雄三, 建部千絵, 石附京子, 増本直子, 吉田久美, 杉本直樹, 佐藤恭子, 外部標準法定量NMR (EC-qNMR) によるアントシアニンの純度測定, 日本食品化学会 第28回総会・学術大会, 2022年5月19日
  - 13) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: りんごに含まれるクロロゲン酸類の相対モル感度を用いた定量法の確立. 本食品化学会 第28回総会・学術大会, 2022年5月19日
  - 14) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹: 既存添加物: 乾留抽出物製品のPAHs定量分析法の開発と実態調査. 第59回全国衛生化学技術協議会年会 (2022.10.31) (川崎市)
  - 15) 西崎雄三, 石附京子, 吉村弘伸, 松熊伸也, 朝倉克夫, 末松孝子, 杉本直樹: Q値を指標にした外部標準法定量NMR(EC-qNMR)の測定自動化とその定量精度について. 第61回NMR討論会(2022.11.8) (高知市)
  - 16) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 乾留抽出により得られる既存添加物の成分比較 (木酢液・チャ乾留物・モウソウチク乾留物). 日本食品衛生学会第118回学術講演会 (2022.11.11) (長崎市)
  - 17) 都築明日香, 西崎雄三, 増本直子, 鈴木俊宏, 兎川忠晴, 杉本直樹: 外部標準法定量NMR (EC-qNMR): 試料間でレシーバーゲインが異なるときの補正について. 第4回日本定量NMR研究会年会 (2022.12.16) (東京)
  - 18) 吉成知也, 関根葵, 小林直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 工藤由起子, 渡辺麻衣子: MALDI-ToF MSを用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究. 日本農芸化学会2023年度大会 (2023.3) (オンライン開催)
2. 論文発表等
  - 2-1. 原著論文
    - 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 <sup>1</sup>H 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 <sup>1</sup>H-qNMR to determine acteoside and pedalin 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. Chem.*, 2021; 37: 917-919.
- 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) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度に基づくシングルリファレンス GC 法及び HPLC 法によるカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中のイソチオシアン酸アリルの定量. *食衛誌*, 2021; 62(3): 73-78.
- 11) Takahashi M, Morimoto K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Study on the synthesis of methylated reference and their application in the quantity of curcuminoids using single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *Chem. Pharm. Bull.*, 2022; 70(1): 25-31.
- 2-2. 総説
- 1) 西崎雄三: qNMR に基づく相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量分析. *日本食品衛生学雑誌*, 2022 6 月;63(3), J51-J53.
- 2) 西崎雄三: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ. *ぶんせき*, 2022 12 月;12, 498-503.
- 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 <sup>1</sup>H-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

Parameter	Value
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"/>

図1 開発したスクリプトで編集できる測定条件

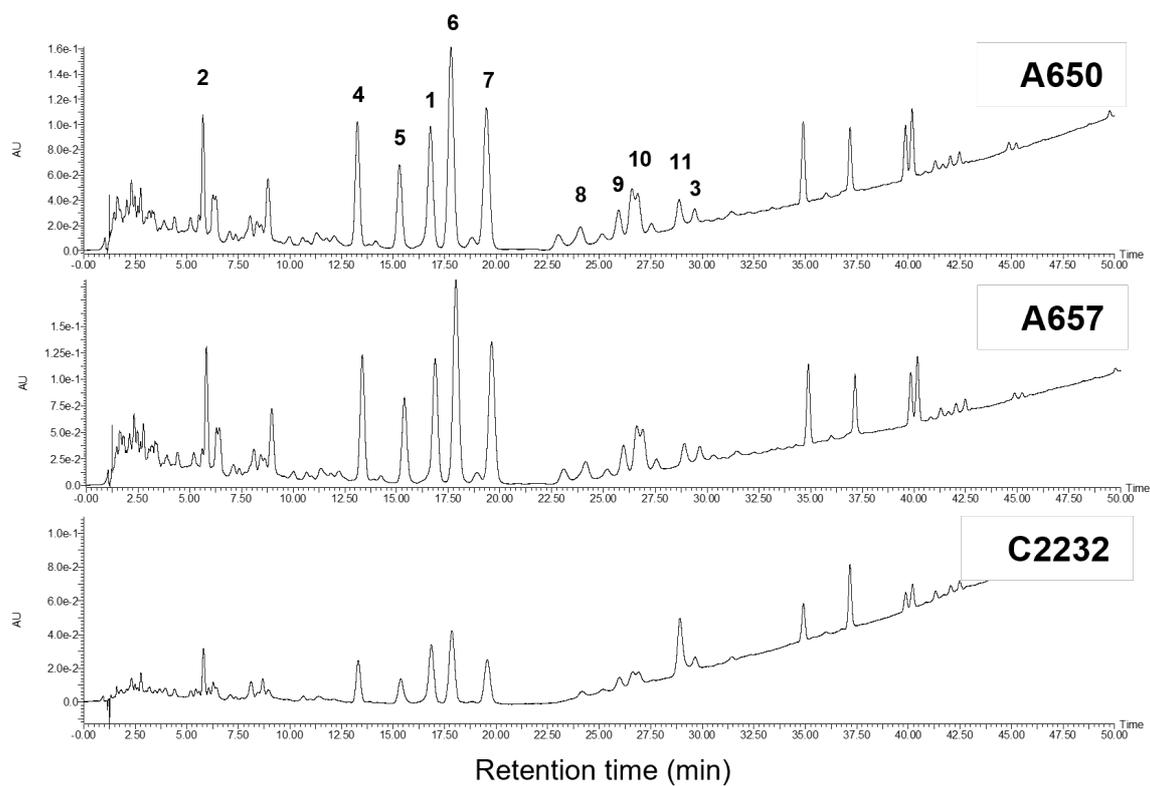


図2 ニガヨモギ抽出物 HPLC クロマトグラム (210 nm)

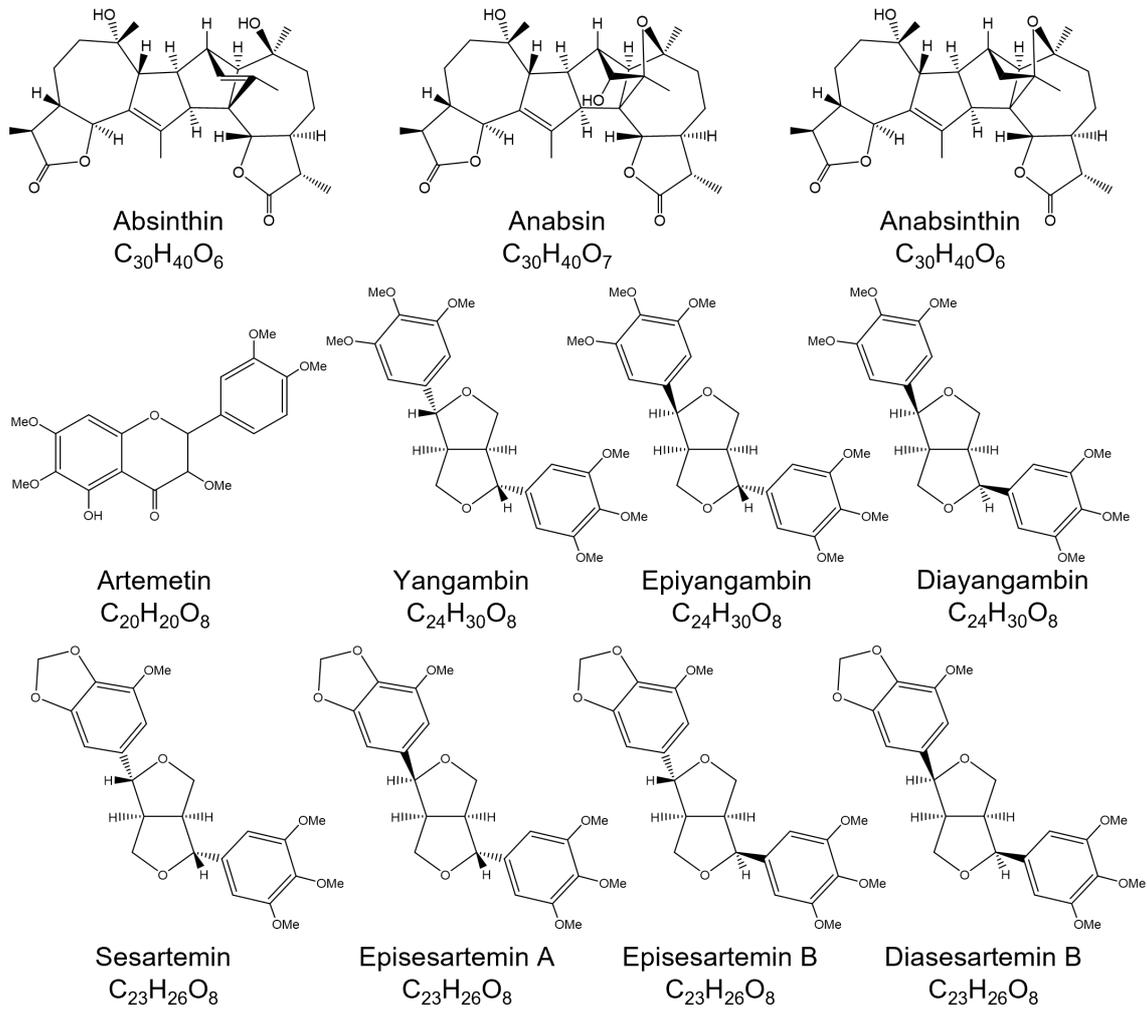


図3 ニガヨモギ抽出物中の主要成分

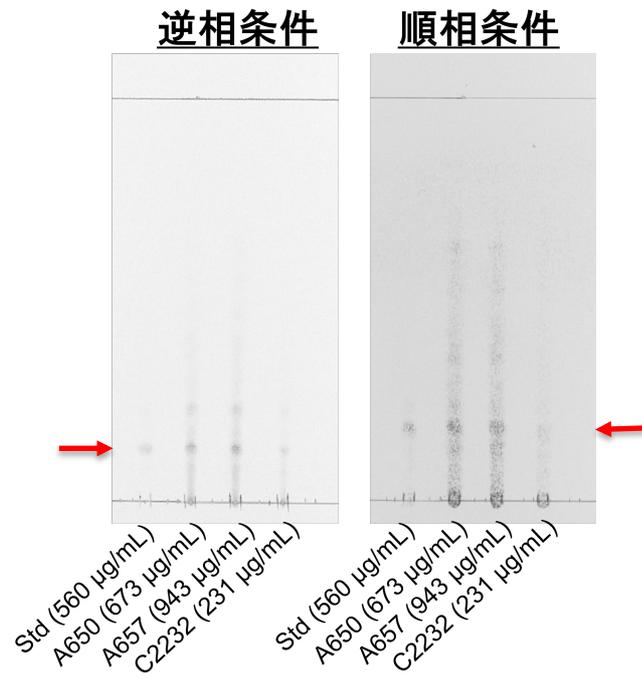
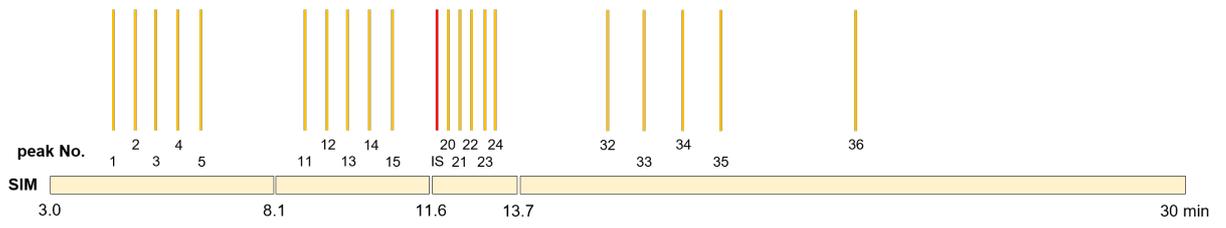


図4 逆相及び順相条件による absinthin の TLC 分析結果  
 逆相条件は Rf 値 0.14, 順相条件では Rf 値 0.19 に absinthin のスポットが確認された。試料に記載された濃度 (µg/mL) は absinthin の濃度。

**method-A**



**method-B**

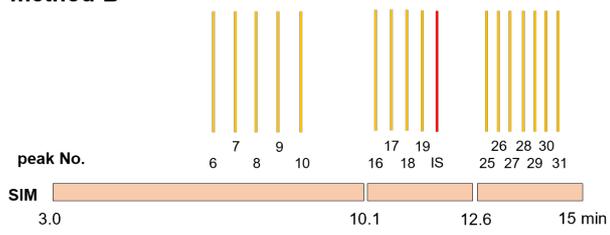


図 5. SIM測定メソッドの概略図

表1 本研究で用いた標準品の詳細

peak no.	化合物名	CAS No.	分子量	定量イオン	Rt (min)	当部管理番号	製品番号
1	ヒドロキシアセトン	[116-09-6]	74	74	3.46	22100041	SIGMA 138185
2	プロピオン酸	[79-09-4]	74	74	4.31	2T B	Wako 163-04726
3	アセトイン	[513-86-0]	88	88	4.49	2T 2LW	TCI H0225
4	プロピオン酸エチル	[105-37-3]	102	102	4.59	2T 23M	Wako 057-01693
5	シクロペンタノン	[120-92-3]	84	84	7.08	32000293	SIGMA C112402
6	<i>n</i> -酪酸	[107-92-6]	88	60	7.30	32000086	Wako 029-05393
7	酪酸エチル	[105-54-4]	116	71	7.48	2T 23N	Wako 052-00663
8	フルフラール	[98-01-1]	96	96	8.25	22100042	TCI F0073
9	2-シクロペンテン-1-オン	[930-30-3]	82	82	8.26	22100043	TCI C0794
10	フルフリルアルコール	[98-00-0]	98	98	8.88	2T 2E7	カライ 16426-92
11	アセトキシアセトン	[592-20-1]	116	43	9.22	22100044	Wako/Combi-Blocks QE-3101
12	2-フリルメチルケトン	[1192-62-7]	110	95	10.16	22100045	SIGMA A16254
13	$\gamma$ -ブチロラクトン	[96-48-0]	86	86	10.16	22100046	SIGMA B103608
14	アセトニルアセトン	[110-13-4]	114	99	10.55	22100047	TCI H0101
15	$\gamma$ -バレロラクトン	[108-29-2]	100	56	11.05	22100048	TCI V0007
16	5-メチルフルフラール	[620-02-0]	110	110	11.27	22100049	SIGMA 137316
17	3-メチル-2(5H)-フラノン	[22122-36-7]	98	98	11.48	22100050	SIGMA 393509
18	2-焦性粘液酸メチル	[611-13-2]	126	126	11.54	22100051	SIGMA 129852
19	フェノール	[108-95-2]	94	94	11.62	04-58b	Wako 167-01022
20	ピロール-2-カルボキシア ルデヒド	[1003-29-8]	95	95	12.28	00-42a	TCI P1246
21	3-メチル-1,2-シクロペン タンジオン	[765-70-8]	112	112	12.49	22100052	SIGMA 178500
22	ベンジルアルコール	[100-51-6]	108	108	12.70	2T 2E0	カライ 04521-02
23	1-エチル-1H-ピロール-2-カ ルボキシア ルデヒド	[2167-14-8]	123	123	12.95	22100054	TCI E1416
24	<i>o</i> -クレゾール	[95-48-7]	108	108	12.99	32000310	TCI C0402
25	2-アセチルピロール	[1072-83-9]	109	109	13.20	22100055	TCI A0894
26	<i>m</i> -クレゾール	[108-39-4]	108	108	13.36	32000309	TCI C0401
27	2-フルアルデヒドジエチルア セタール	[13529-27-6]	170	125	13.38	22100056	TCI F0929
28	<i>o</i> -メトキシフェノール	[90-05-1]	124	124	13.60	04-60b	Wako 133-08302

表1 (続き) 本研究で用いた標準品の詳細

peak no.	化合物名	CAS No.	分子量	定量イオン	Rt (min)	当部管理番号	製品番号
29	3-ヒドロキシピリジン	[109-00-2]	95	95	13.80	05-89a	TCI H0331
30	マルトール	[118-71-8]	126	126	13.99	22-36c	ナコシ (取扱中止) SSX 6555
31	3-エチル-2-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン	[21835-01-8]	126	126	14.10	22100057	TCI E0792
32	<i>o</i> -エチルフェノール	[90-00-6]	122	122	14.39	32000101	TCI E0160
33	<i>p</i> -エチルフェノール	[123-07-9]	122	122	14.87	32000116	TCI E0159
34	2-メトキシ-4-メチルフェノール	[93-51-6]	138	138	15.29	22100058	SIGMA 302880
35	2-メトキシ-4-エチルフェノール	[2785-89-9]	152	152	16.56	22100059	TCI E0353
36	カフェイン	[58-08-2]	194	194	23.52	24-08c	SIGMA 56396
IS	デカン	[124-18-5]	142	142	12.09	04-42b	Wako 043-24992

表 2 GC/MS による添加物製剤中における原料熱分解物の含量

peak no.	化合物名	TD1		TD2		MD1		MD2		WV1		WV2	
		含量 (%)	RSD (%)										
1	ヒドロキシアセトン	0.17	1.70	0.05	1.87	0.44	2.03	0.71	4.79	0.60	1.85	0.87	1.70
2	プロピオン酸	0.06	4.50	0.01	4.70	0.12	2.49	0.62	4.11	0.47	4.28	0.58	2.70
3	アセトイン	0.04	1.88	0.00	8.65	0.04	1.76	0.05	2.57	0.06	0.42	0.04	1.63
4	プロピオン酸エチル	ND		ND		0.12	13.58	ND		ND		ND	
5	シクロペンタノン	ND		ND		0.02	3.08	0.02	2.29	ND		ND	
6	<i>n</i> -酪酸	ND		ND		0.02	2.62	0.09	0.59	0.10	1.47	0.14	1.90
7	酪酸エチル	ND		ND		0.02	3.09	ND		ND		ND	
8	フルフラール	0.12	1.16	0.01	2.17	0.24	0.41	0.11	1.54	0.01	3.75	0.01	6.25
9	2-シクロペンテン-1-オール	ND		ND		0.02	1.41	0.06	4.58	0.07	0.61	0.07	3.18
10	フルフリルアルコール	0.06	2.65	0.02	4.10	ND		ND		ND		ND	
11	アセトキシアセトン	0.02	1.59	under		under		0.04	2.93	0.01	0.90	0.01	1.88
12	2-フリルメチルケトン	0.01	5.11	under		0.02	8.30	0.06	4.64	0.02	1.38	0.03	2.81
13	$\gamma$ -ブチロラクトン	0.03	5.23	0.01	2.23	0.02	2.79	0.36	1.17	0.19	3.53	0.27	3.40
14	アセトニルアセトン	ND		ND		under		0.02	2.34	0.03	1.85	0.03	2.99
15	$\gamma$ -バレロラクトン	ND		ND		ND		0.01	2.57	0.02	3.01	0.03	1.07
16	5-メチルフルフラール	0.03	7.84	under		0.01	3.64	0.01	6.92	0.01	3.84	0.01	3.85
17	3-メチル-2(5H)-フラン	under		ND		under		0.05	6.96	0.04	4.12	0.06	9.47
18	2-無性粘液酸メチル	0.01	8.15	under		0.01	4.28	0.02	9.57	under		under	
19	フェノール	0.01	11.02	under		0.04	7.43	0.21	4.02	0.09	3.52	0.11	2.95
20	ピロール-2-カルボキシアルデヒド	0.02	2.24	under		ND		ND		ND		ND	
21	3-メチル-1,2-シクロペンタジオン	0.01	2.66	ND		0.01	3.32	0.25	6.01	0.09	7.69	0.12	6.05
22	ベンジルアルコール	0.01	3.34	under		ND		ND		ND		ND	
23	1-エチル-1H-ピロール-2-カルボキシアルデヒド	0.01	5.06	under		ND		ND		ND		ND	
24	<i>o</i> -クレゾール	ND		ND		0.01	5.92	0.02	5.73	0.02	2.32	0.03	5.23
25	2-アセチルピロール	0.02	10.35	0.01	6.36	ND		ND		ND		ND	
26	<i>m</i> -クレゾール	ND		ND		0.01	5.49	0.06	11.07	0.03	6.39	0.05	11.39
27	2-フルアルデヒドジエチルアセタール	ND		ND		under		ND		ND		ND	
28	<i>o</i> -メトキシフェノール	under		under		0.08	9.15	0.31	4.65	0.15	3.66	0.21	3.48

表 2 (続き) GC/MS による添加物製品中における原料熱分解物の含量

peak no.	化合物名	TDD1		TD2		MD1		MD2		WV1		WV2	
		含量 (%)	RSD (%)										
29	3-ヒドロキシピリジン	0.06	3.28	ND									
30	マルトール	0.03	4.46	0.01	8.39	ND		0.18	3.43	0.02	4.62	0.04	7.47
31	3-エチル-2-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン	ND		ND		ND		0.13	1.98	0.02	2.85	0.03	7.34
32	<i>o</i> -エチルフェノール	ND		ND		under		0.00	3.86	under		under	
33	<i>p</i> -エチルフェノール	under		ND		0.01	4.49	0.10	9.50	0.01	3.13	0.01	3.71
34	2-メトキシ-4-メチルフェノール	under		ND		0.01	7.23	0.12	4.67	0.05	1.31	0.08	4.29
35	2-メトキシ-4-エチルフェノール	under		under		0.01	10.67	0.10	9.97	0.01	6.76	0.01	5.80
36	カフェイン	0.47	22.89	0.13	3.60	ND		ND		ND		ND	
	合計	1.19		0.25		1.25		3.70		2.13		2.83	

**研究要旨** 規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、 $^1\text{H}$ -qNMR法(定量 $^1\text{H}$ -NMR法)が試験法として適用可能であるか可能性を検討した上で、適用の可能性のあるものに関して、実際に適用する場合の測定条件の確立、あるいはそれを応用した正確な定量法の検討を目的として研究を行なった。令和4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、令和4年度はその中からコショウ種子、オールスパイス種子、フェンネル、バニラ、ケイヒ、ローズマリーをピックアップしそれぞれ $^1\text{H}$ -qNMR法での定量が可能かの検討を行った。コショウ種子ではpiperine, オールスパイスではeugenol, フェンネルではanethole, バニラではvanilline, ethylvanillin, ケイヒではcinnamaldehyde, ローズマリーではrosemarinic acidを指標成分に $^1\text{H}$ -qNMR法を用いた定量の検討を行い、それぞれの含有率の定量が $^1\text{H}$ -qNMR法で可能であることを示した。この時、同じ成分が指標成分となる類似生薬についても検討を行い、piperineを含むヒハツ, anetholeを含むダイウイキョウとアニスでもそれぞれの含有率の定量が $^1\text{H}$ -qNMR法で可能であることを示した。また、ケイヒ以外では既存のHPLC法との同等性を確認できた。一方、ケイヒの精油成分cinnamaldehydeの定量において、HPLCでのクロマトグラムが安定せず、その要因の検討を行った。Methanolとcinnamaldehydeを共存させておくとcinnamaldehydeのアルデヒド基のシグナル強度が経時的に減少し、Methanolが反応してアセタールが生成することを示唆する結果が得られた。

## A. 研究目的

$^1\text{H}$ -qNMR法は、SIトレーサブルな認証標準物質を内部標準としてNMRスペクトルの測定することで、測定対象サンプルの絶対定量ができる方法である。<sup>1,2)</sup> 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たいして、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 $^1\text{H}$ -NMRスペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となりうる。

令和4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。特に、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いため、その正確な純度を得るには $^1\text{H}$ -qNMR法が適していると考えられる。

令和2年度はコショウについて、piperine (Fig. 1)の $^1\text{H}$ -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、オールスパイス中のeugenol (Fig. 2)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。

令和3年度はその中から香辛料抽出物以外にもローズマリーとして既存添加物名簿に名前が上がっているローズマリーをピックアップし、rosmarinic acid (Fig. 3)が主要成分となると考えて、ローズマリーの葉に含まれる rosmarinic acid の定量方法の検討をおこなった。また、精油成分の含有量が要点となる素材のうち、既存添加物ではシナモンとして収載され、生薬としても重要なケイヒでは cinnamaldehyde (Fig. 4)が指標成分になりうると考え、この cinnamaldehyde の  $^1\text{H}$ -qNMR法を適用した定量方法に関しての検討を行なった。このときあわせて行った cinnamaldehyde の HPLCでの定量で結果にばらつきが大きいという状況が観察された。その要因が溶液中でのアルデヒド基に対する反応が起こっているのではないかと推定し、安定性についての確認も行った。

令和4年度はフェンネルとバニラに着目した。フェンネルでは, anethole (Fig. 5)が主要成分となると考えて、生薬ウイキョウ中の anethole の定量方法の検討をおこなった。あわせて anethole が主要な精油成分になると考えられる類似生薬のダイウイキョウとアニスについても検討した。また、バニラでは vanilline 及び ethylvanilline (Fig. 6)が指標成分になりうると考え、生薬バニラに含有されるこの2つの化合物の定量方法に関しての検討を行なった。あわせて食品添加物として販売されているバニラオイル、バニラエッセンスについても vanilline 及び ethylvanilline の定量を行った。

## 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 sodium 3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonate- $d_6$  (DSS- $d_6$ , Fig. 7)及び 1,4-bis(trimethylsilyl)-benzene- $d_4$  (BTMSB- $d_4$ , Fig. 7)はいずれも和光純薬の Trace Sure®規格のものを用いた。NMR 測定用溶媒の acetone- $d_6$ , acetonitril- $d_3$ , dimethylsulfoxide (DMSO)- $d_6$ , methanol- $d_4$ ,

pyridine- $d_5$ はそれぞれ Isotec Inc.の 99.9, 99.0, 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、rosmarinic acidは富士フィルム和光純薬の生化学用試薬を、cinnamaldehyde は東京化成 trans-cinnamaldehyde (試薬 A), 富士フィルム和光純の(E)-cinnamaldehyde 薬局方生薬試験用(試薬 B)と cinnamaldehyde 和光特級(試薬 C)を用いた。Anethole, vanillin, は東京化成から、ethylvanillin 富士フィルム和光純薬から購入の試薬を用いた。コショウ種子, ヒハツ種子およびオールスパイスはそれぞれ市販されている粉末, ローズマリーは, スパイスとして市販されているローズマリー葉の粉末および乾燥生薬を, ケイヒはスパイスとして市販されている粉末と切断生薬を, それぞれ購入した。ウイキョウは生薬として, ダイウイキョウ, アニスは, 食品として市販されている果実を購入して用いた。切断生薬または前傾生薬として購入したものは粉末化して用いた。また, 生薬バニラ, バニラオイル, バニラエッセンスも市販されているものを用いた。既存添加物として流通している水溶性ローズマリー抽出物および非水溶性ローズマリー抽出物も国立医薬品食品衛生研究所に保管中のものの供与を受けた。

### 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。生薬の粉末化には大阪ケミカル WB-1, 分注操作の電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x, 超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S, 遠沈操作は遠心器 AS One Mini Centrifugeをそれぞれ用いた。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-4180, カラムオープンに Shimadzu CTO-20AC, 検出器はフォトダイオードアレイ検出器 JASCO MD-4010を用いた。メンブランフィルターは Cosmonice Filter W 0.45  $\mu\text{m}$   $\phi$  13 mmを用いた。

### B-3)<sup>1</sup>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 <sup>1</sup>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) <sup>1</sup>H-qNMR 法に用いる試料の調製

1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> はデシケーター中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 2.00 ml の pyridine-*d*<sub>5</sub> 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ー中で一晩乾燥させ、約 10 mg を精秤して 1.00 mL の pyridine-*d*<sub>5</sub> に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>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*<sub>5</sub> (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*<sub>4</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。

#### B-3-b) <sup>1</sup>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 <sup>1</sup>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. 8) <sup>1</sup>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*<sub>4</sub> 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*<sub>4</sub> 及び piperine のモル濃度 (mol/mL)、 $I_B$ 、 $I_P$  はそれぞれ 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 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 : H<sub>2</sub>O 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. 9)

<sup>1</sup>H-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、<sup>1</sup>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 μL 注入して得られたクロマトグラムの piperine のピーク的面積からその定量を行った。(Fig. 10)

### B-4)<sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>H-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. 2) 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 <sup>1</sup>H-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-4-a) <sup>1</sup>H-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<sup>1)</sup> では acetone-*d*<sub>6</sub> 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*<sub>4</sub> 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*<sub>4</sub> 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*<sub>4</sub> 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*<sub>4</sub> に易溶な DSS-*d*<sub>6</sub> を用いた。DSS-*d*<sub>6</sub> 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*<sub>6</sub> 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*<sub>4</sub> 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  $^1\text{H}$ -qNMR の測定に供した。(Fig. 11) オールスパイス種子末中の eugenol 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  $^1\text{H}$ -qNMR の測定に供した。

#### B-4-b) $^1\text{H}$ -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  $^1\text{H}$ -NMR を測定し、eugenol (Fig. 2) 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)  $^1\text{H}$ -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、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-4-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 : H<sub>2</sub>O 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)

$^1\text{H}$ -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、 $^1\text{H}$ -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 $\mu\text{L}$  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)

#### B-5) $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いたローズマリー葉中および既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

まず、rosmarinic acid の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの実施の条件検討と、生薬中あるいは既存添加物中の rosmarinic acid 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-5-a) $^1\text{H}$ -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- $d_6$  はデシケーター中で保管乾燥させたものを用いた。約 10 mg を精秤して 20.00 ml の methanol- $d_4$  に溶かして内部標準用溶液とした。

Rosmarinic acid 標準品はデシケーター中で一晩乾燥させ、約 5 mg を精秤して 2.50 mL の内部標準用溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

ローズマリー葉粉末中および既存添加物中の rosmarinic acid の測定用試料の調製は、次のように行った。乾燥させた粉末生薬または既存添加物試料の約 100mg を精秤して acetone (1.00 mL) に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清をとって濃縮乾固した。この操作を 3 回繰り返した。集めた抽出物に内部標準用溶液 (1.00 mL) を加えて完全に溶解したのち、メンブランフィルターを用いて濾過し、濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 $^1\text{H}$ -qNMR の測定に供した。

#### B-5-b) $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの測定

Rosmarinic acid とローズマリー葉粉末中および既存添加物の水溶性の抽出液の  $^1\text{H}$ -NMR を測定し、rosmarinic acid (Fig. 3) の 8 位のプロトンシグナルが 6.25 ppm に現れることを確認した。(Fig. 14)  $^1\text{H}$ -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、rosmarinic acid の 3 位のシグナルと 0.00 ppm とした DSS- $d_6$  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 rosmarinic acid の濃度を算出した。

$$C_R = (I_R / I_D) \times C_D$$

ただし、 $C_D$ 、 $C_R$  はそれぞれ DSS- $d_6$  及び

rosmarinic acid のモル濃度(mol/mL),  $I_D$ ,  $I_R$  はそれぞれ DSS- $d_6$  及び rosmarinic acid の水素 1 個あたりのシグナル面積.

### B-5-c) HPLC を用いたローズマリー葉中および既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

HPLC は YMC-Triart C18 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い, 40°C で MeCN : 0.1% リン酸- $H_2O$  の 20 : 80, 流速 1.0 mL/min で溶出, 330 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. 15)

$^1H$ -qNMR 法で定量した rosmarinic acid 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した. (Fig. 16) 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 10 倍に希釈し, その試料溶液を 10  $\mu$ L 注入して得られたクロマトグラムの rosmarinic acid のピークの面積からその定量を行った.

### B-6) $^1H$ -qNMR 法を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

まず, cinnamaldehyde (Fig. 4) の  $^1H$ -qNMR スペクトルの実施の条件検討と, ケイヒ中の 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-6-a) $^1H$ -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- $d_6$  約 10 mg を精秤して 20.00 ml の methanol- $d_4$  に溶かした内部標準溶液を調製した.

各試薬の cinnamaldehyde は液体であるため特に前処理は行わず, 各約 5 mg を精秤して 1.00 mL の内部標準溶液に溶かした. この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した.

ケイヒは市販の食品用(ケイヒ末 A)の粉末はそのまま, 切断生薬として入手したケイヒは粉末化して用いた(ケイヒ末 B, C). 粉末中の cinnamaldehyde の測定用試料の調製は, 次のように行った. 乾燥させた粉末生薬の約 100 mg を精秤して内部標準用溶液 (1.00 mL) に懸濁し, 超音波下 30 分抽出を行い, 遠沈し, その上清をとってメンブランフィルターを用いて濾過し, 濾

液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり,  $^1H$ -qNMR の測定に供した.

#### B-6-b) $^1H$ -qNMR スペクトルの測定

Cinnamaldehyde とケイヒ末の抽出液の  $^1H$ -NMR を測定し, cinnamaldehyde (Fig. 4) のアルデヒド基のプロトンシグナルが 9.65 ppm に現れることを確認した. (Fig. 17)  $^1H$ -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, cinnamaldehyde のアルデヒド基のシグナルと 0.00 ppm とした DSS- $d_6$  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 cinnamaldehyde の濃度を算出した.

$$C_C = (I_C / I_D) \times C_D$$

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

また, 試薬の cinnamaldehyde のうち, 試薬 A の溶液を内部標準溶液で順次希釈し, 各希釈液の  $^1H$ -qNMR スペクトルを測定して, 検量線を作成した.

また添加回収実験を次のように行なった. ケイヒ末 C 約 100 mg を精秤し, cinnamaldehyde (試薬 A) 約 5 mg を精秤して内部標準用溶液 (1.00 mL) に溶解した溶液 1.00 mL に懸濁し, 超音波下 30 分抽出, 遠沈した. その上清をとってメンブランフィルターを用いて濾過し, 濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり,  $^1H$ -qNMR の測定に供した. この時の積分値(X)と, ケイヒ末 C 約 100 mg を内部標準用溶液 (1.00 mL) から同様に試料を調製して  $^1H$ -qNMR の測定した時の積分値(Y), cinnamaldehyde (試薬 A) 約 5 mg を精秤して内部標準用溶液 (1.00 mL) に溶解した溶液から調製した試料の  $^1H$ -qNMR 測定から得られた積分値(Z)から, 次式に従って添加回収率を算出した.

$$\text{添加回収率} = [X / (Y + Z)] \times 100 (\%)$$

### B-6-c) HPLC を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

HPLC は COSMOSIL 5C18-MS-IIあるいは COSMOSIL 5C18-AR-IIのそれぞれ 4.6 ID × 250 mm のカラムを用い、40°Cで MeCN-H<sub>2</sub>O または MeOH-H<sub>2</sub>O の溶媒系で初期条件 40 : 60 → 20 min に 55 : 45 → 25 min に 90 : 10 というグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、280 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。

<sup>1</sup>H-qNMR 法で定量した試薬の cinnamaldehyde うち、試薬 A の溶液を標準液として検量線を作成することを試みたが、結果で述べるように cinnamaldehyde のピークの形が時間経過とともに崩れてくる現象が観察された。(Fig. 18) 他の試薬でも同様であったため、HPLC における定量は断念した。

### B-6-d)<sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた溶液中の cinnamaldehyde の安定性の確認

Cinnamaldehyde (Fig.4)が HPLC で用いる溶媒に安定なのかの確認のため、cinnamaldehyde を methanol-*d*<sub>4</sub>, acetonitril-*d*<sub>3</sub>, それぞれと D<sub>2</sub>O との混合溶媒中で保存しながら <sup>1</sup>H-qNMR での cinnamaldehyde のアルデヒド基のシグナルを用いて定量を行うことにした。

DSS-*d*<sub>6</sub> 約 10 mg を精秤して 20.00 ml の methanol-*d*<sub>4</sub> に溶かした内部標準溶液、および BTMSB-*d*<sub>4</sub> 約 10 mg を精秤して 20.00 ml の acetonitril-*d*<sub>3</sub> に溶かした内部標準溶液を調製した。さらに、両方の標準溶液と D<sub>2</sub>O をそれぞれ 6 : 4 の割合で混合した、methanol-*d*<sub>4</sub>-D<sub>2</sub>O の混合溶液、acetonitril-*d*<sub>3</sub>-D<sub>2</sub>O の混合溶液を調製した。

Cinnamaldehyde は約 5 mg を精秤して 1.00 mL のそれぞれの内部標準溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり、<sup>1</sup>H-qNMR を Table 1 に示した条件で測定し、DSS-*d*<sub>6</sub> または BTMSB-*d*<sub>4</sub> のメチル基プロトンのシグナルの積分値に対する cinnamaldehyde (Fig. 4) のアルデヒド基のプロトンシグナル(9.65 ppm) の積分値を経時的に測定した。

### B-7)<sup>1</sup>H-qNMR 法を用いたウイキョウ、ダイウイキョウ、アニス中の anethole の定量

まず、anethole の <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と、生薬中の anethole 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-7-a)<sup>1</sup>H-qNMR 法に用いる試料の調製

BTMSB-*d*<sub>4</sub> はデシケーター中で保管乾燥させたものを用いた。約 10 mg を精秤して 20.00 ml の acetone-*d*<sub>6</sub> に溶かして内部標準溶液とした。

Anethole 標準品は、約 25 mg を精秤して 5.00 mL の内部標準溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

ウイキョウ、ダイウイキョウ、アニスの各果実中の anethole の測定用試料の調製は、次のように行った。各果実を粉末化したのち、乾燥させた粉末生薬の約 100mg を精秤して内部標準溶液 (1.00 mL) に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清をメンブランフィルターを用いて濾過し、濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、<sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。

#### B-7-b)<sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの測定

Anethole と各生薬粉末の抽出液の <sup>1</sup>H-NMR を測定し、anethole (Fig. 1) の 7 位のプロトンシグナルが 6.1 ppm に現れることを確認した。(Fig. 19) <sup>1</sup>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、anethole の 7 位のシグナルと 0.00 ppm とした BTMSB-*d*<sub>4</sub> 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 anethole の濃度を算出した。

$$C_A = (I_A / I_B) \times C_B$$

ただし、C<sub>B</sub>、C<sub>A</sub> はそれぞれ BTMSB-*d*<sub>4</sub> 及び anethole のモル濃度(mol/mL)、I<sub>B</sub>、I<sub>A</sub> はそれぞれ BTMSB-*d*<sub>4</sub> 及び anethole の水素 1 個あたりのシグナル面積。

#### B-7-c) HPLC を用いたウイキョウ、ダイウイキョウ、アニス中の anethole の定量

HPLC は Cosmosil 5C8-MS 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い、40°Cで MeOH : H<sub>2</sub>O = 75 : 25

(0 min)→90 : 10 (24 min)のグラジエント, 流速 1.0 mL/min で溶出, 250 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。<sup>9)</sup>(Fig. 20)

<sup>1</sup>H-qNMR 法で定量した anethole 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 21)それぞれの生薬試料は, <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 10 倍に希釈し, その試料溶液を 10 $\mu$ L 注入して得られたクロマトグラム of anethole のピークの面積からその定量を行った。

### B-8)<sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた生薬バニラ, バニラエッセンス, バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin の定量

まず, vanillin 及び ethylvanillin(Fig. 6)の <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と, 生薬中あるいはバニラエッセンス, バニラオイル中の量化合物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-8-a) <sup>1</sup>H-qNMR 法に用いる試料の調製

DSS-*d*<sub>6</sub> はデシケーター中で保管乾燥させたものを用いた。約 10 mg を精秤して 20.00 ml の DMSO-*d*<sub>6</sub> に溶かして内部標準溶液とした。

vanillin 及び ethylvanillin 標準品は, 約 5 mg を精秤して 5.00 mL の内部標準溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

生薬バニラの測定用試料の調製は, 次のように行った。生薬をハサミで細断したのち, 約 100mg を精秤して内部標準溶液 (1.00 mL) に懸濁し, 超音波下 60 分抽出を行い, 遠沈し, その上清をメンブランフィルターを用いて濾過し, 濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり, <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。バニラエッセンス, バニラオイルは液体であるため, 約 100mg を精秤して内部標準溶液 (1.00 mL) に溶解したのち, 念のため遠沈し, その上清をメンブランフィルターを用いて濾過し, 濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり, <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。

#### B-8-b) <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの測定

各試料から調製した測定試料の <sup>1</sup>H-NMR を測定し, vanilline 及び ethylvanillin (Fig. 6) のアルデヒド基のプロトンシグナルがそれぞれ 9.78

ppm, 9.80 ppm に現れることを確認した。(Fig. 22) 両者を混合すると極めて近接はしていたが, シャープなシグナルで, 別個に積分値を測定することができた。<sup>1</sup>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, vanilline 及び ethylvanillin のアルデヒド基のプロトンシグナルと 0.00 ppm とした DSS-*d*<sub>6</sub> 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 vanilline 及び ethylvanillin の濃度を算出した。

$$C_v = (I_v / I_D) \times C_D$$

ただし, C<sub>D</sub>, C<sub>V</sub> はそれぞれ DSS-*d*<sub>6</sub> 及び vanilline または ethylvanillin のモル濃度 (mol/mL), I<sub>D</sub>, I<sub>V</sub> はそれぞれ DSS-*d*<sub>6</sub> 及び vanilline または ethylvanillin の水素 1 個あたりのシグナル面積。

#### B-8-c) HPLC を用いた生薬バニラ, バニラエッセンス, バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin の定量

HPLC は YMC-Triart C18 s-5 150 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い, 40°C で MeCN : 0.1% リン酸 -H<sub>2</sub>O = 20 : 80 (0 min) → 80 : 20 (17 min) のグラジエント, 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. 23)

<sup>1</sup>H-qNMR 法で定量した vanilline 及び ethylvanillin 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 24) それぞれの試料は, <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 10 倍に希釈し, その試料溶液を 10 $\mu$ L 注入して得られたクロマトグラムの vanilline 及び ethylvanillin のピークの面積からその定量を行った。

## 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 <sup>1</sup>H-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  $^1\text{H-qNMR}$  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) 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 3) 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。

### C-3) ローズマリー葉中および既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

rosmarinic acid 標準品中の rosmarinic acid の定量を  $^1\text{H-qNMR}$  法でおこなった結果、 $89.2\pm 1.0\%$  と見積もられ、試薬の純度表示( $96\%$ 以上)よりも小さな値となった。

非水溶性ローズマリー抽出物では rosmarinic acid のシグナルは観測できなかったため、この試料での検討は行わなかった。ローズマリー葉中および既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid では、抽出溶媒を acetone, methanol, ethylacetate, DMSO, chloroform, pyridine で検討、測定溶媒を(DMSO)- $d_6$ , methanol- $d_4$ , pyridine- $d_5$ , acetone- $d_4$  で検討した。その結果、ローズマリー葉の粉末および水溶性ローズマリー抽出物では、rosmarinic acid のシグナルが観測され、そのシグナルの大きさから、抽出効率という点では各抽出溶媒で大きな違いは見られなかったものの、acetone 抽出を行うと 8-H 周辺で観測されるシグナルが少なくなり、さらに測定を methanol- $d_4$  で行うと 8-H の付近の小さなシグナルも 8-H から離れて観測される状況となった。よって、この acetone で抽出→methanol- $d_4$  で測定という組み合わせにして行うことにした。 $^1\text{H-qNMR}$  測定の結果、ローズマリー葉の粉末中の rosmarinic acid 含有率は  $0.35\pm 0.03\%$ 、水溶性ローズマリー抽出物中では  $0.60\pm 0.11\%$  という結果を得た。(Table 4) HPLC で rosmarinic acid 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。この検量線からローズマリー葉中および既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の含有率を算出したところ、ローズマリー葉中では  $0.34\pm 0.03\%$ 、水溶性ローズマリー抽出物中では  $0.60\pm 0.13\%$  という結果が得られ、 $^1\text{H-qNMR}$  法での数値に極めて近似した値が得られた。 $^1\text{H-qNMR}$  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、水溶性ローズマリーでは両測定法ともに測定値に対するばらつきが大きいと考えることもできる。特に  $^1\text{H-qNMR}$  法でのばらつきの大きさは、8-H のシグナルの裾に小さなシグナルが存在するようにも見えるため、このシグ

ナルと積分値の取り方との関係で、人為的なばらつきが出やすい状況になっているとも考えられる。Rosmarinic acid に関しては、標準品の rosmarinic acid 溶液を  $^1\text{H}$ -qNMR 法で値づけをして、その溶液を基に HPLC で定量するという方法が確立されている。<sup>3,4)</sup>  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いての水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の直接の定量も不可能ではないが、精密さという観点からは HPLC の利用の方が優位であると考えられた。

#### C-4) ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

Cinnamaldehyde 試薬 A, B, C 中の cinnamaldehyde の定量を  $^1\text{H}$ -qNMR 法でおこなった結果、それぞれ  $99.43 \pm 2.57\%$ ,  $92.04 \pm 1.03\%$ ,  $97.94 \pm 1.17\%$  と見積もられた。ケイヒ末 A, B, C 中の cinnamaldehyde の  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた定量では、それぞれ  $3.46 \pm 0.04\%$ ,  $2.39 \pm 0.06\%$ ,  $2.72 \pm 0.04\%$  と見積もられた。(Table 5)  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いることの信頼性の確認のため、積分値と濃度の相関、添加回収率、定量の限界についての確認も行った。Fig. 9 に示すように、積分値と濃度との間には極めて良い相関があることが確認できた。添加回収実験の結果、添加回収率は  $96.3\%$  で、極めて良好な回収率だった。また、濃度を変えながら純度測定を行った結果、 $0.1 \text{ mg/mL}$  程度の濃度までは誤差  $1\%$  程度に抑えられていることがわかった。故に  $0.1 \text{ mg/mL}$  程度の濃度までは  $^1\text{H}$ -qNMR 法で測定が可能であることがわかった。

次に、HPLC で cinnamaldehyde の測定を試みたが、上述のように cinnamaldehyde のピークの形が時間経過とともに崩れてくる現象が観察された。Cinnamaldehyde を MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  または  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$  に希釈して inject するが、MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  系の溶媒で展開するとメインのピークの後に分離しきれない形で小さな緩やかなピークが連なり始める状態となり、 $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$  系の溶媒で展開すると、メインのピークに鋭い小さなピークがついてくるという形になった。(Fig. 18) 溶液として保存している過程または展開中に cinnamaldehyde が変化していることを示唆していた。

そこで、溶液中の cinnamaldehyde の安定性の確認するために、DSS- $d_6$  または BTMSB- $d_4$  のメチル基プロトンのシグナルの積分値を基準として、試料調製直後 (0 日目) の cinnamaldehyde のアルデヒド基のプロトンシグナル ( $9.65 \text{ ppm}$ ) の積分値 100 として経時的に測定した。その結果、methanol- $d_4$  中では数日のうちにアルデヒド基のシグナルが大きく減少することがわかった。(Fig. 25) 他の溶媒では比較的安定であることもわかった。このことから、前年の cinnamaldehyde の定量において HPLC の測定値やクロマトグラムが安定しなかったのは測定溶媒や溶液の希釈に methanol- $d_4$  やメタノールを使用していたことに起因すると考えられた。アルデヒド基とアルコールが存在するとアセタールを生じる可能性は高く、この結果は cinnamaldehyde のアルデヒド基にメタノールが反応したものと強く示唆された。一方、水が共存するとその変化が抑制されている可能性もあることがわかった。しかしながら、水が存在すると液性によってはヘミアセタールや水和物を生成する可能性があることも示唆しており、アルデヒド基が存在する化合物の定量にはアルコール性の溶媒や含水溶媒は避けた方が安全であることもわかった。今回の研究では、 $^1\text{H}$ -qNMR を methanol- $d_4$  で実施していたが、こちらの値は大きなばらつきがなかった。これは、試料調製直後に測定していたため、目に見える量の反応の進行がなかったからと考えられる。

#### C-5) $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いたウイキョウ、ダイウイキョウ、アニス中の anethole の定量

Anethole 標準品中の anethole の定量を  $^1\text{H}$ -qNMR 法でおこなった結果、 $98.12$  と見積もられ、試薬の純度表示にほぼ沿ったものだった。

各生薬粉末から調製した試料で  $^1\text{H}$ -NMR を測定したところ、acetone- $d_4$  中で 7 位プロトンシグナルが独立して観測されたことから acetone- $d_4$  を溶媒として  $^1\text{H}$ -qNMR の測定をすることにした。 $^1\text{H}$ -qNMR 測定の結果、生薬ウイキョウ中の anethole 含有率は  $0.54 \pm 0.02\%$ 、ダイウイキョウでは、古い試料 (ダイウイキョウ A) が  $2.02\%$ 、新しい試料 (ダイウイキョウ B~D)  $5.48 \sim 7.32\%$ 、

アニスでは 1.14~1.33%という結果を得た。

(Table 6) HPLC で anethole 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。この検量線から各試料中の anethole の含有率を算出したところ、<sup>1</sup>H-qNMR 法での数値に極めて近似した値が得られた。お互いにそれぞれの試料の定量値のばらつきも極めて小さく、<sup>1</sup>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。

また、常識的なことではあるが、古い試料のダイウイキョウの anethole の含有率が新しいものの半分程度ということから、精油成分が大切な生薬はやはり新しさが大切であることも確認できた。

#### C-6) <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた生薬バニラ、バニラエッセンス、バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin の定量

Vanillin 及び ethylvanillin 標準品中のそれぞれの化合物の定量を <sup>1</sup>H-qNMR 法でおこなった結果、それぞれ 96.78%, 99.30%と見積もられ、試薬の純度表示にほぼ沿ったものだった。生薬バニラ A, B 中の vanillin 及び ethylvanillin の <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量では、vanillin が 0.42~0.44%, ethylvanillin がその 10 分の 1 程度である 0.039~0.045%と見積もられた。(Table 7) またバニラエッセンスでは vanillin が 0.77%の含有率で ethylvanillin は検出できず、バニラオイルでは vanillin が 0.65%, ethylvanillin 0.64%でほぼ等量含有されていることがわかった。また、vanillin と ethylvanillin の同時定量が可能であることも確認した。

次に、HPLC で vanillin 及び ethylvanillin の測定を試みた。HPLC で vanillin 及び ethylvanillin の検量線を作成したところ、両者とも良好な相関の検量線を得ることができた。この検量線から各試料中のそれぞれの含有率を算出したところ、vanillin は <sup>1</sup>H-qNMR 法での数値に極めて近似した値が得られたものの、生薬バニラ由来の試料 vanillin の定量に適した濃度の試料溶液では ethylvanillin の定量が困難であった。極めてよく似た化合物なので、HPLC でも同時定量が可能かと思われたが、今回の研究では不可能だ

った。

#### D. 結論

1) コショウ種子中の piperine の <sup>1</sup>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 <sup>1</sup>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 <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量条件も確立した。

2) オールスパイス中の eugenol の <sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>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) ローズマリー葉中、および既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。

4) ケイヒ中の cinnamaldehyde の <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。この過程で、HPLC を用いた cinnamaldehyde の定量時に cinnamaldehyde が不安定であるかことを示唆する現象が観察され、定量の信頼性という観点でも <sup>1</sup>H-qNMR 法が cinnamaldehyde の定量において優れた方法であることが示された。一方、ケイヒの重要な精油成分である cinnamaldehyde は methanol-*d*<sub>4</sub> 中で減少することが示された。アセタールが生成すると推定され、アルデヒド基のある化合物の定量時にアルコールを用いない方が安全であることがわかった。

5) ウイキョウ、ダイウイキョウ、アニス中の anethole の <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。

6) 生薬バニラ、バニラエッセンス、バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin の <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量条件を確立し、また、vanillin と ethylvanillin の同時定量が可能であることも確認した。

#### E. 参考文献

- 1) Tahara M, Sugimoto N, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara, T, Yoshida Y, Tada A, Kubota R, Shimizu K, Yamazaki T, Tanamoto K, Nakazawa H, Nishimura T. *Jpn J Food Chem Safety* **16**, 28-33 (2009).
- 2) 厚生労働省, 第 18 改正日本薬局方, pp2623 (2021).
- 3) 厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業) 既存添加物の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).
- 4) Naoko Masumoto, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato. *日本食品化学学会誌*, **25**(2), 105-113(2018).
- 5) Yuzo Nishizaki, Naoko Masumoto, Kaori Nakajima, Kyoko Ishizuki, Taichi Yamazaki, Miho Kuroe, Masahiko Numata, Toshihide Ihara, Atsuko Tada, Naoki Sugimoto and Kyoko Sato, *Food Additives & Contaminants, Part A*, **36**(2), 203-211 (2019).
- 6) Muthanna J. Mohammed *Journal of Pharmacy Research*, **2**(5), 915-919 (2009).

## F. 研究業績

### 1. 学会発表等

#### 1-1. 学会

- 1) 定量NMR ( $^1\text{H}$ -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量～オールスパイス中のeugenolおよびケイヒ中のcinnamaldehydeの定量～, 加納優奈, 今川真由香, 福本帆花, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, *日本薬学会第142年会*(2022年3月, 名古屋).
- 2) 定量NMR( $^1\text{H}$ -qNMR)を用いた生薬中の精油

成分の定量～ウイキョウおよび類似生薬中のanetholeの定量～, 二村佳音, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, *日本薬学会第143年会* (2023年3月, 札幌) .

- 3) 定量NMR ( $^1\text{H}$ -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量～バニラおよびバニラ香料中のvanillinおよびethylvanillinの定量～, 二村佳音, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, *日本薬学会第143年会* (2023年3月, 札幌) .

## 2. 論文発表等

### 2-1. 論文

- 1) Fujiwara, Yumi; Miwa, Mako; Nagatsu, Akito; Honma, Atsushi: Identification of Maple Anthocyanin and its Antiproliferative Activity against LLC, T47D and C3H10T1/2 Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **21**(7), 894-901(2021).
- 2) Bayrakceken G Z, Dogan Z, Saracoglu I, Picot L, Nagatsu A, Basaran A A: Food plant with antioxidant, tyrosinase inhibitory and antimelanoma activity: Prunus mahaleb L.: *Food Bioscience*, **48**, 101804 (2022).

### 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( $^1\text{H}$ -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

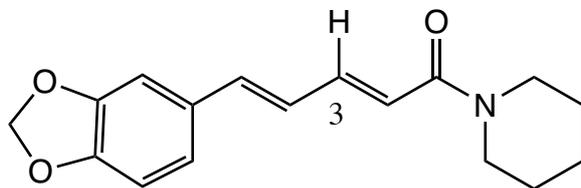


Fig. 1 Piperine の構造

3位のプロトンが<sup>1</sup>H-qNMR法を適用する際の積分値を測定したプロトン

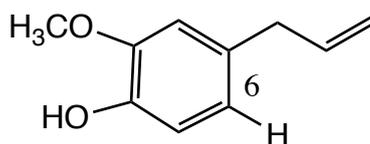


Fig. 2 Eugenol の構造

6位のプロトンが<sup>1</sup>H-qNMR法を適用する際の積分値を測定したプロトン

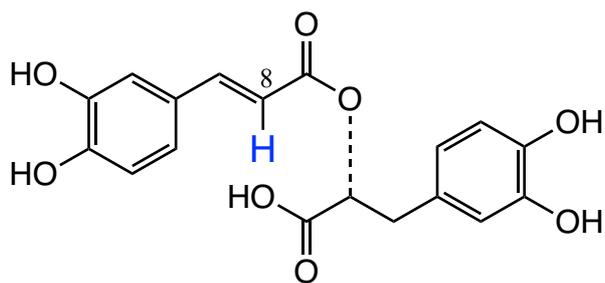


Fig. 3 Rosmarinic acid の構造

8位のプロトンが<sup>1</sup>H-qNMR法を適用する際の積分値を測定したプロトン

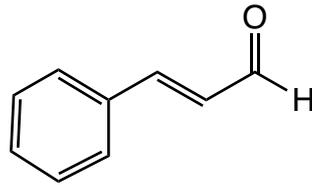


Fig. 4 Cinnamaldehyde の構造

アルデヒド基のプロトンが  $^1\text{H}$ -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

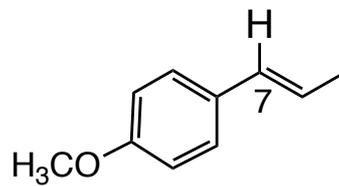


Fig. 5 Anethole の構造

7位のプロトンが  $^1\text{H}$ -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

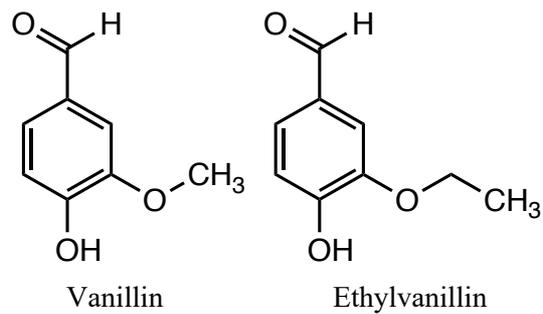
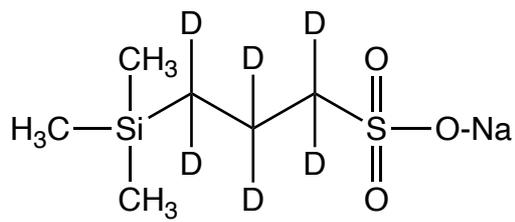
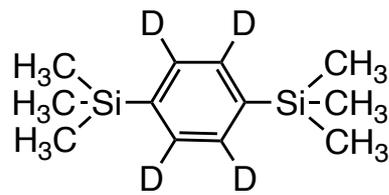


Fig. 6 Vanillin と ethylvanillin の構造

アルデヒド基のプロトンが  $^1\text{H}$ -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン



DSS-*d*<sub>6</sub>,



BTMSB-*d*<sub>4</sub>

Fig. 7 定量用の認証標準物質

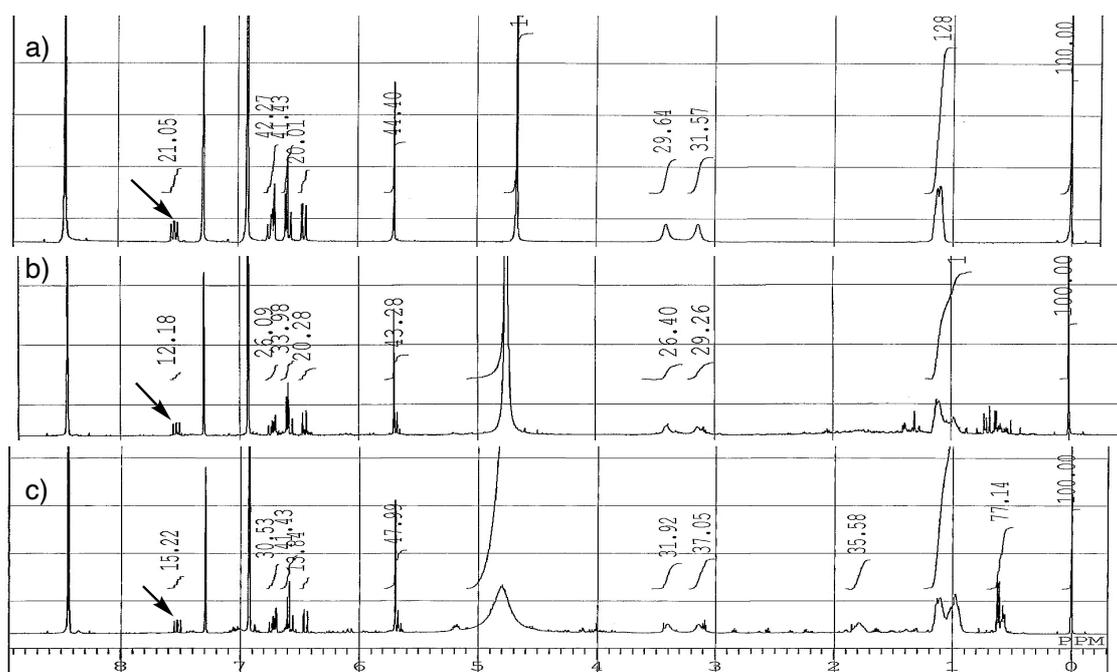


Fig. 8 a) piperine 標準試薬と b) コショウ種子抽出物と c) ヒハツ種子抽出物の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (in pyridine- $d_5$ ) 矢印は piperine の 3 位プロトンのシグナル.

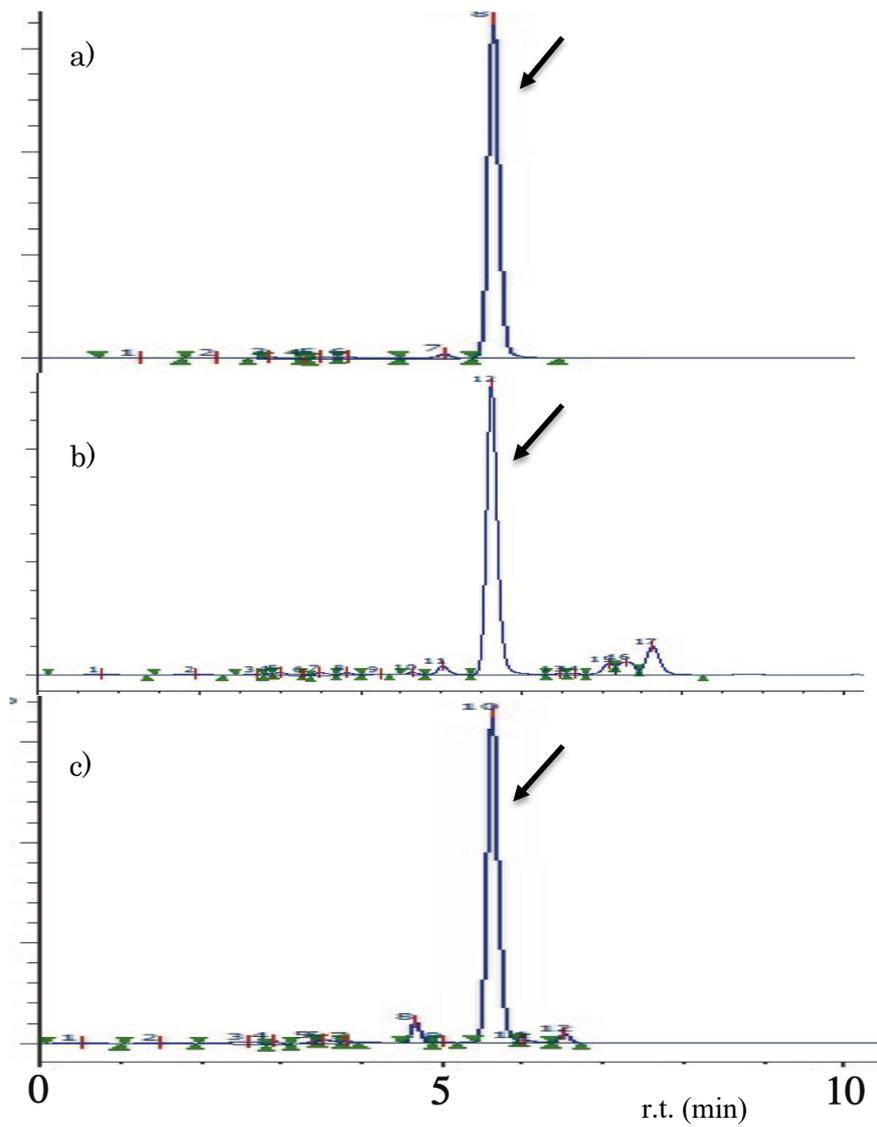


Fig. 9 a) piperine 標準試薬と b) コショウ種子抽出物と c) ヒハツ種子抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は piperine のピーク.

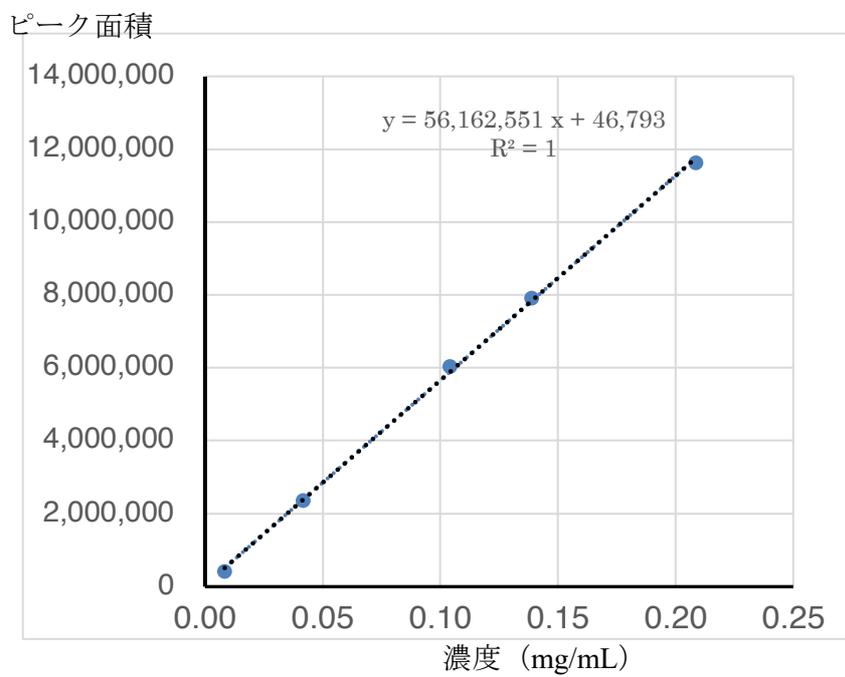


Fig. 10 HPLCにおける piperine の検量線

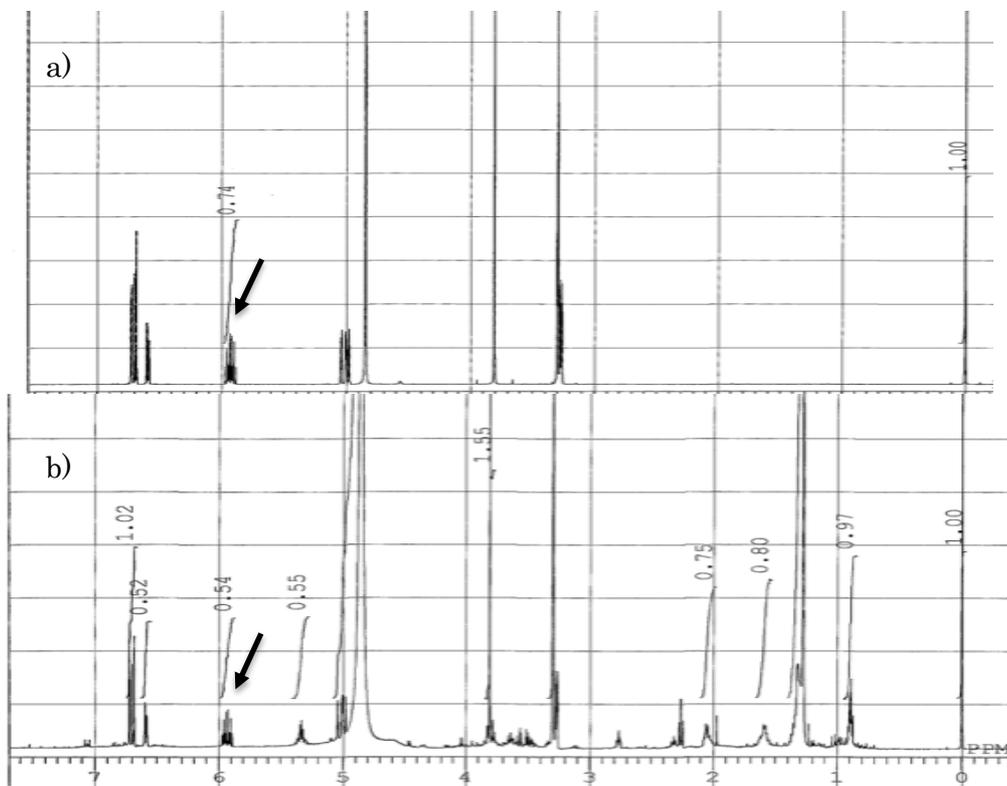


Fig. 11 a) eugenol 標準試薬と b) オールスパイス末抽出物の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in methanol- $d_4$ ) 矢印は eugenol の 6 位プロトンのシグナル.

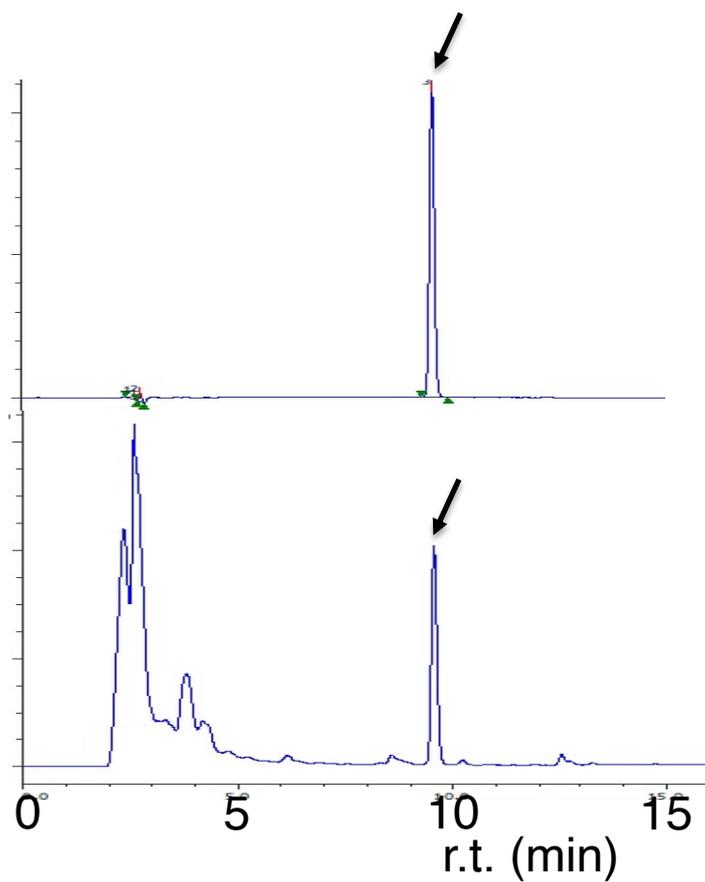


Fig. 12 a) eugenol 標準試薬と b) オールスパイス末抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は eugenol のピーク

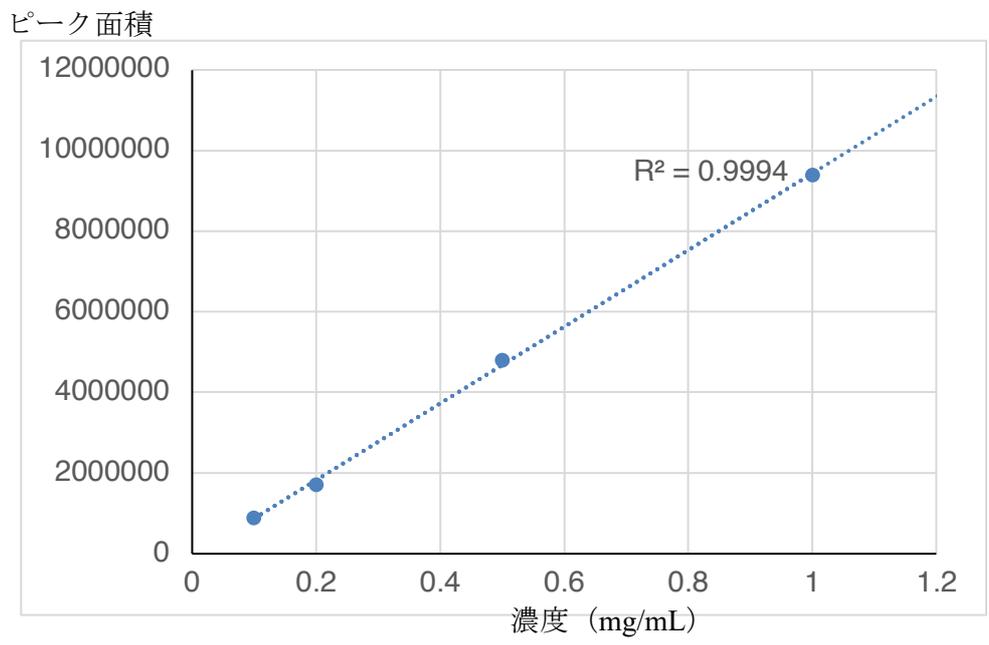


Fig. 13 HPLC における eugenol の検量線

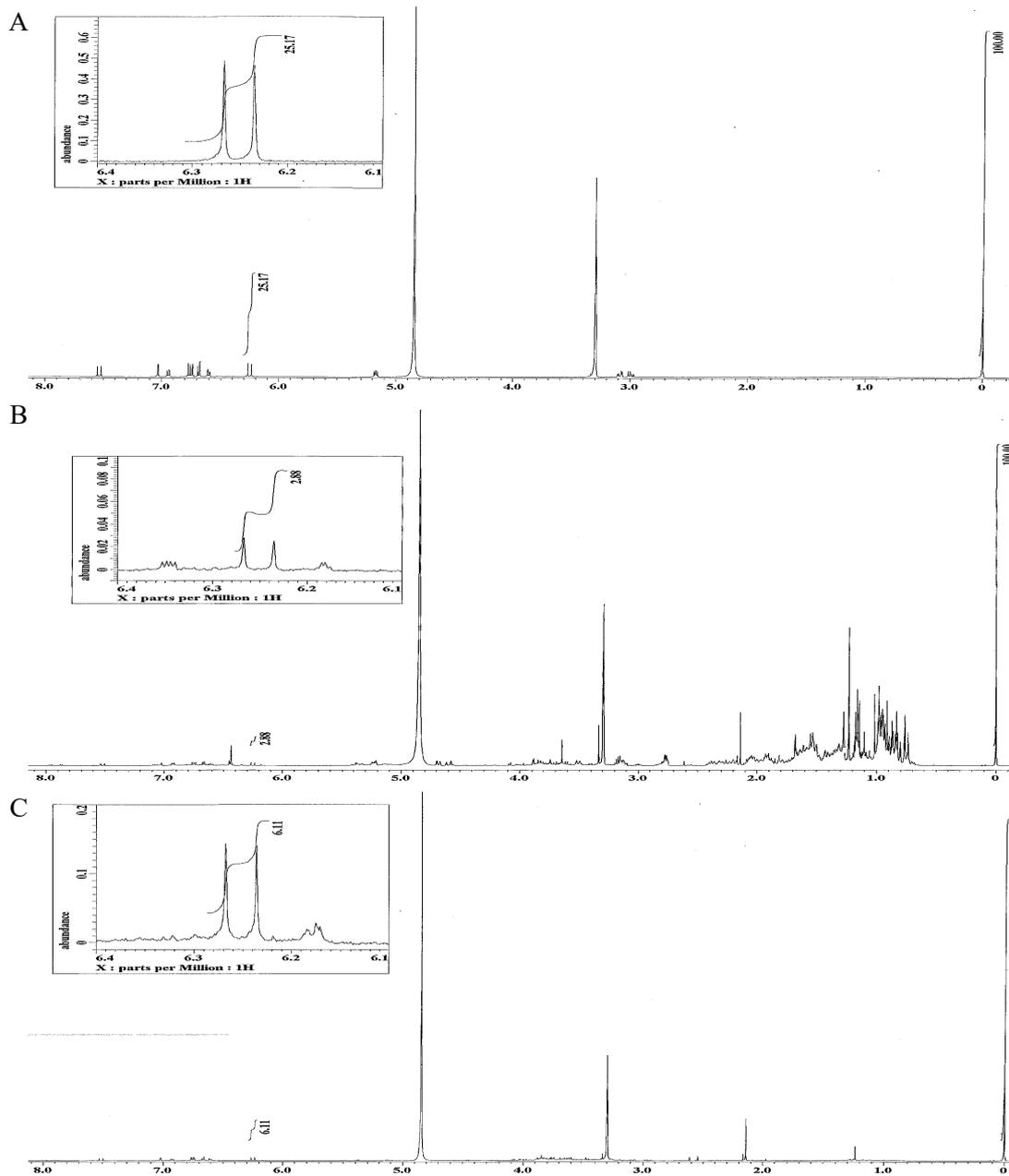


Fig. 14 Rosmarinic acid 試薬(A), ローズマリー葉(B)および既存添加物のローズマリー水性抽出物(C)の $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in methanol- $d_4$ , 500 MHz)  
 拡大図は rosmarinic acid の 8-H のシグナル.

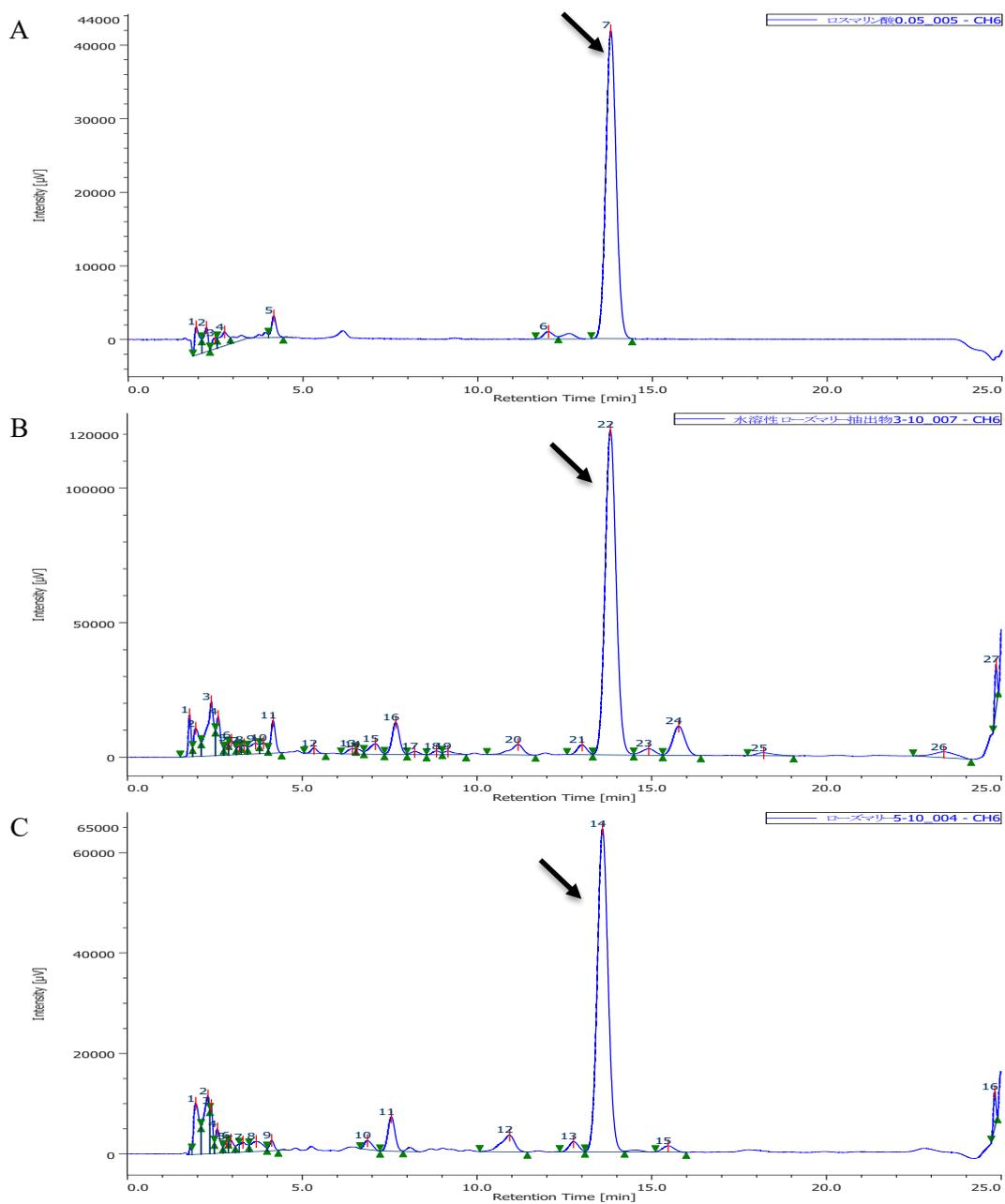


Fig. 15 Rosmarinic acid 試薬(A), ローズマリー葉(B)および既存添加物のローズマリー水性抽出物(C)の HPLC クロマトグラム  
矢印は rosmarinic acid のピーク.

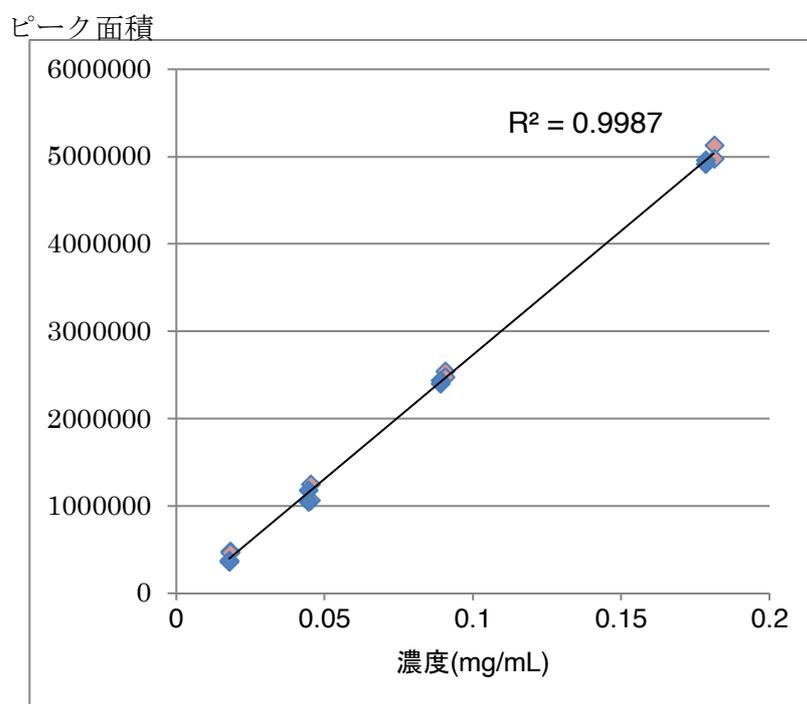


Fig. 16 HPLCにおける rosmarinic acid の検量線

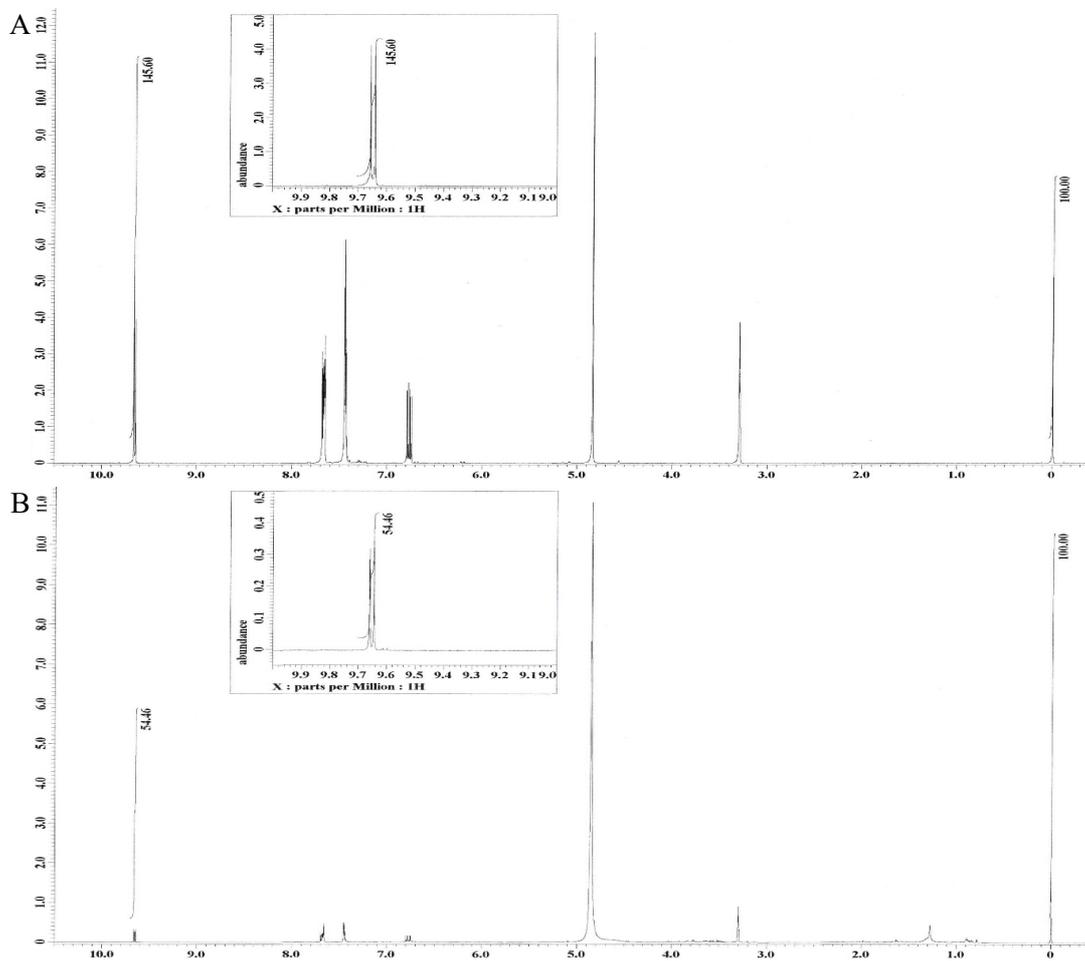


Fig. 17 Cinnamaldehyde 試薬 A (A)とケイヒ末 C (B)の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in  $\text{methanol-}d_4$ , 500 MHz)

拡大図は cinnamaldehyde のアルデヒド基プロトンのシグナル。

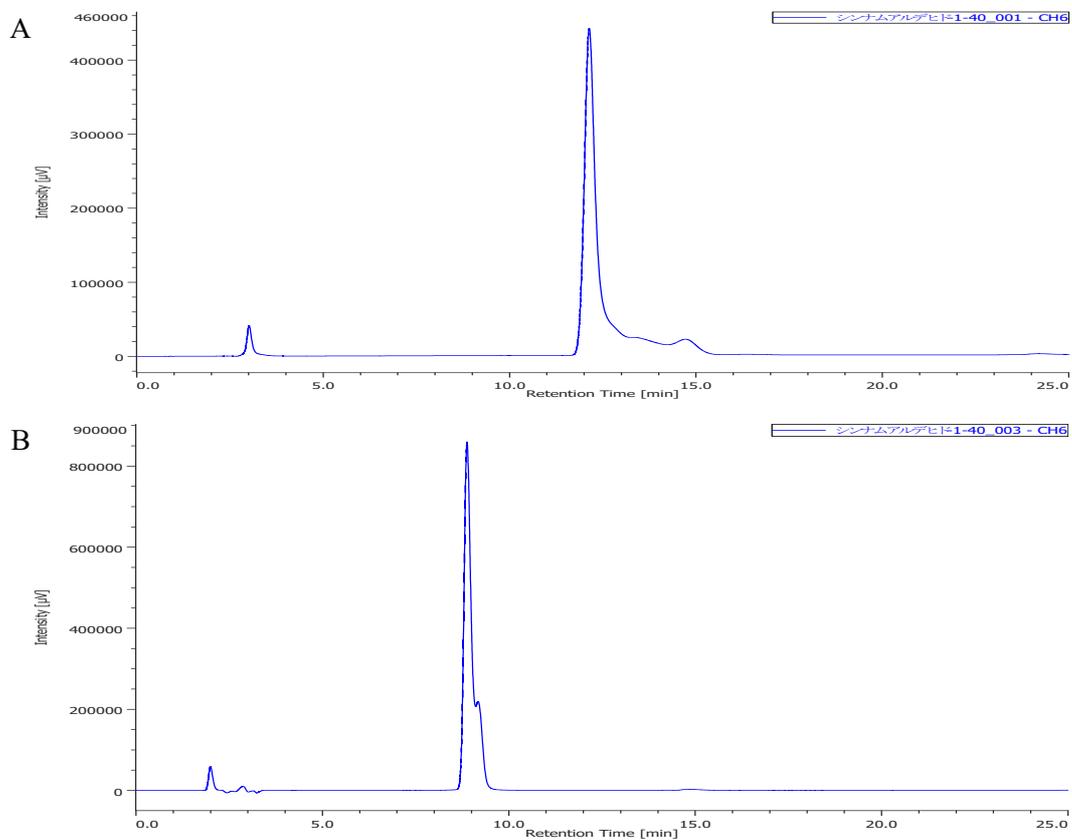


Fig. 18 Cinnamaldehyde 試薬の HPCL クロマトグラム

A は MeOH-H<sub>2</sub>O 系の溶媒で展開したときのクロマトグラム, B は CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 系の溶媒で展開したときのクロマトグラム.

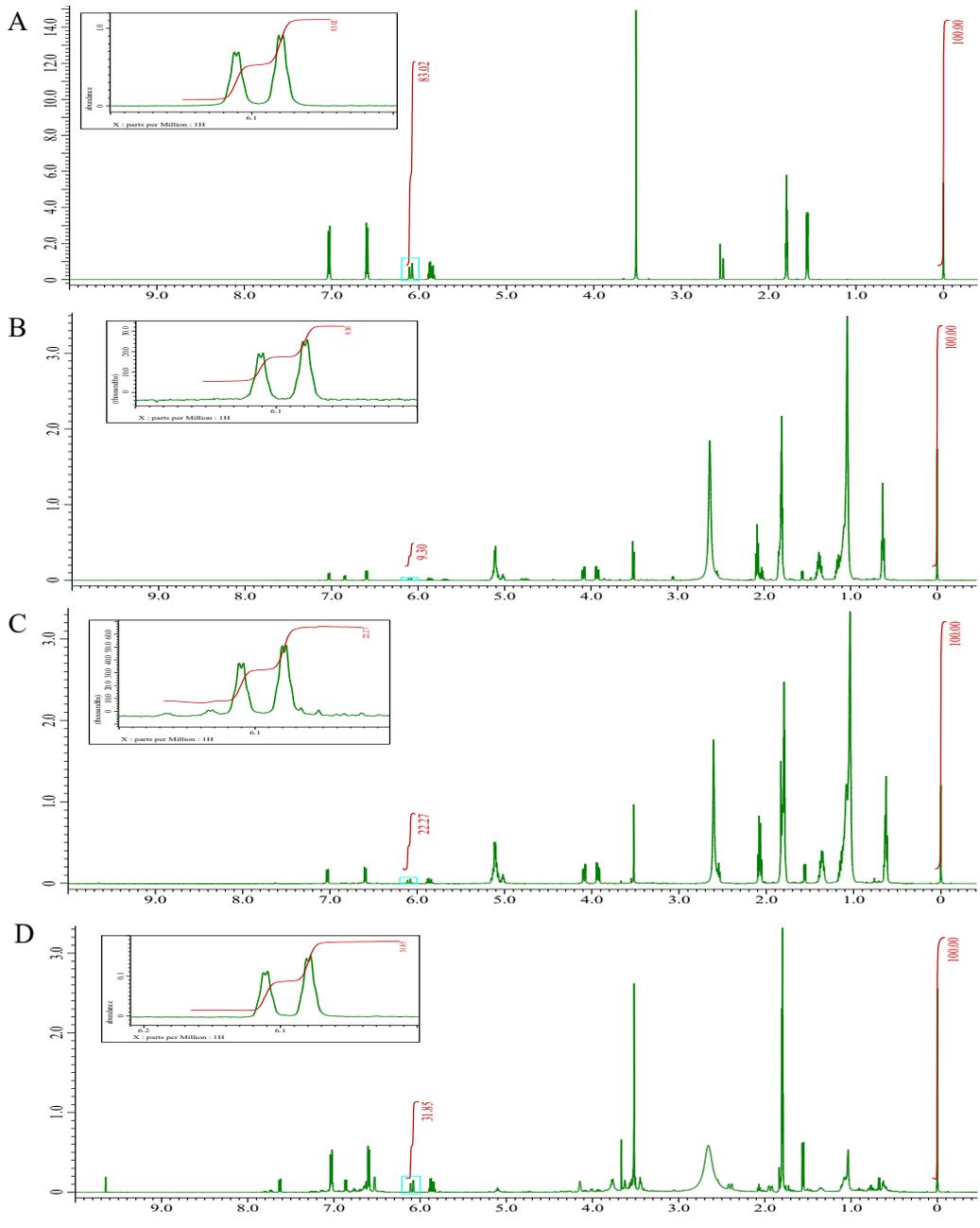
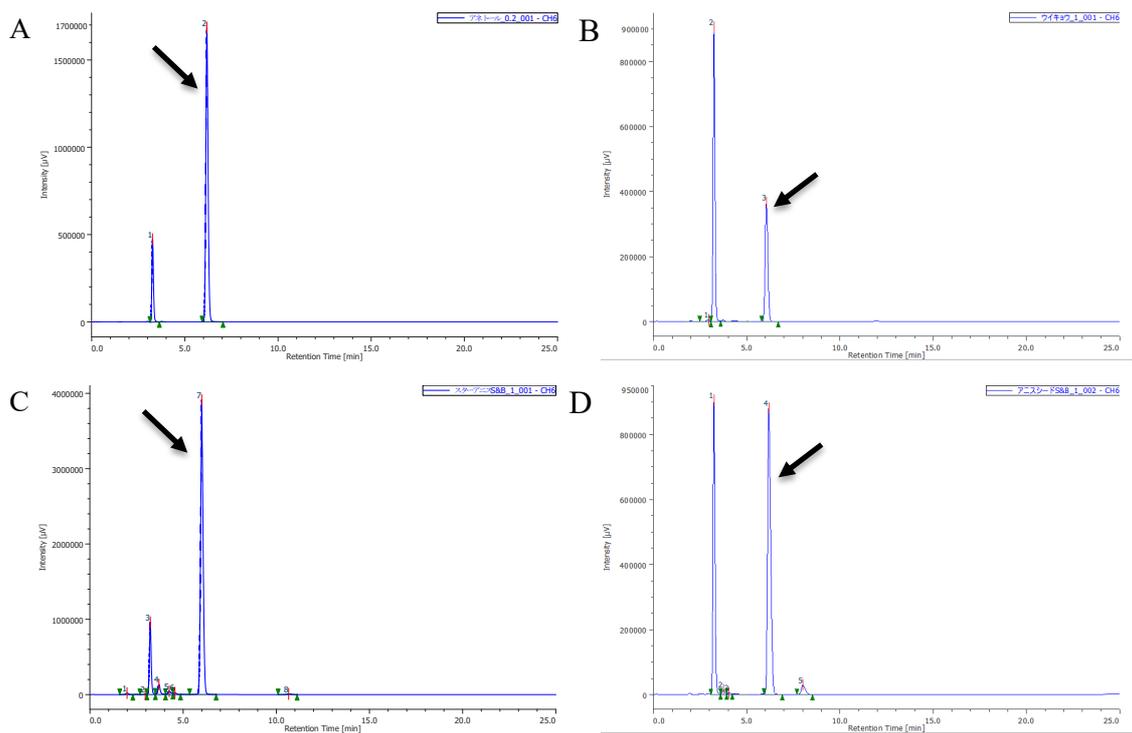


Fig. 19 Anethole 試薬(A), ウイキョウ(B), ダイウイキョウ(C) 及びアニス(D)の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (in acetone- $d_6$ , 500 MHz)

拡大図は anethole の 7-H のシグナル.



C

Fig. 20 Anethole 試薬(A), ウイキョウ(B), ダイウイキョウ(C) 及びアニス(D)の各試料の HPLC クロマトグラム  
矢印は anethole のピーク.

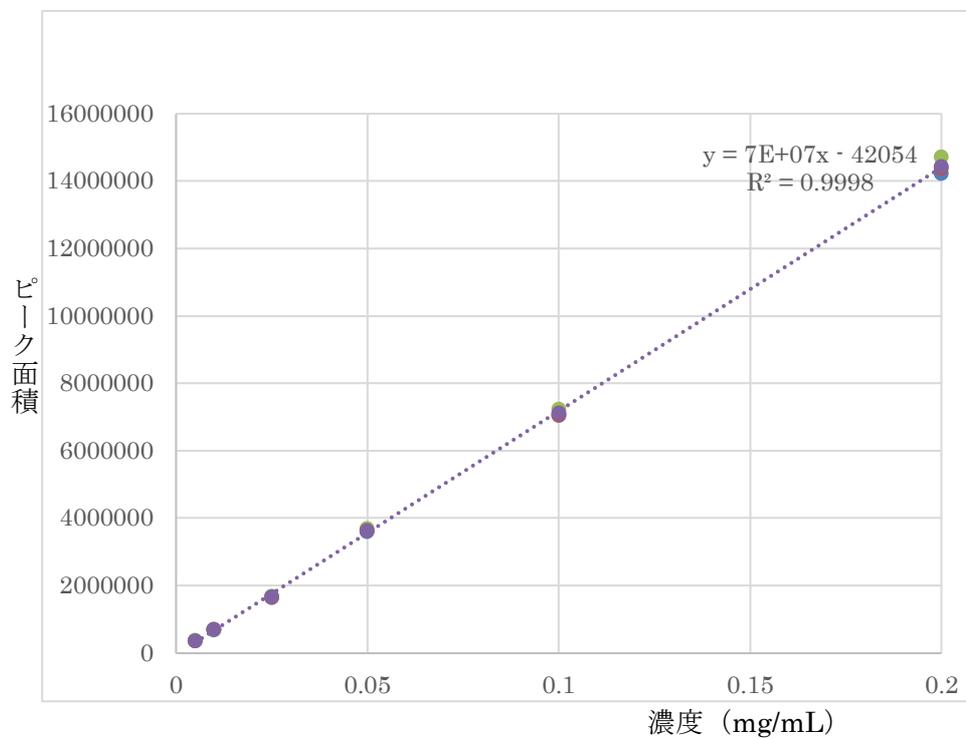


Fig.21 HPLCにおける anethole の検量線

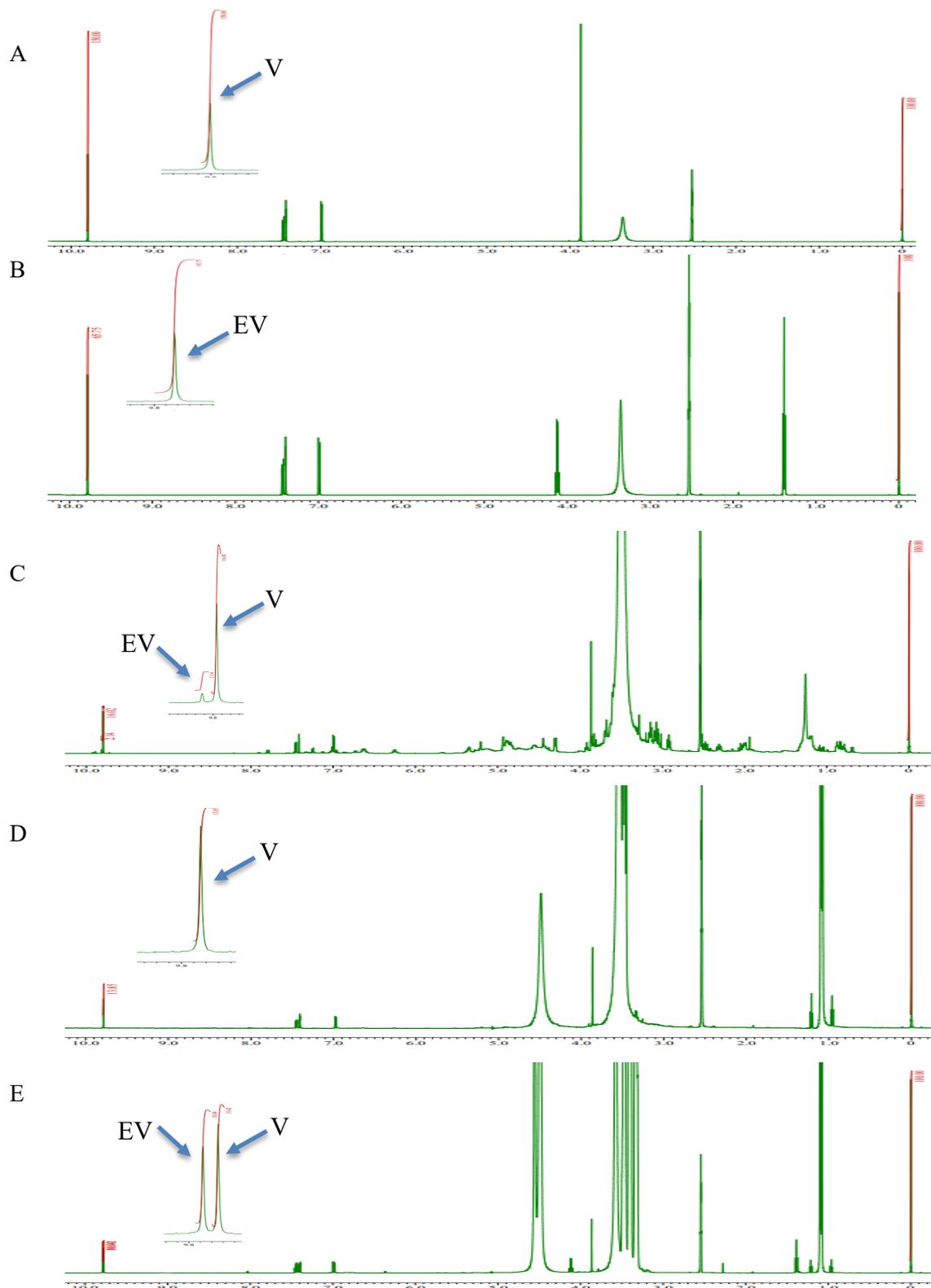


Fig. 22 Vanillin 試薬(A), ethylvanillin 試薬(B)と生薬バニラ(C), バニラエッセンス(D), バニラオイル(E)の各試料の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in  $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz)

拡大図のシグナルは vanillin (矢印 V) と ethylvanillin (矢印 EV) のアルデヒド基プロトンのシグナル

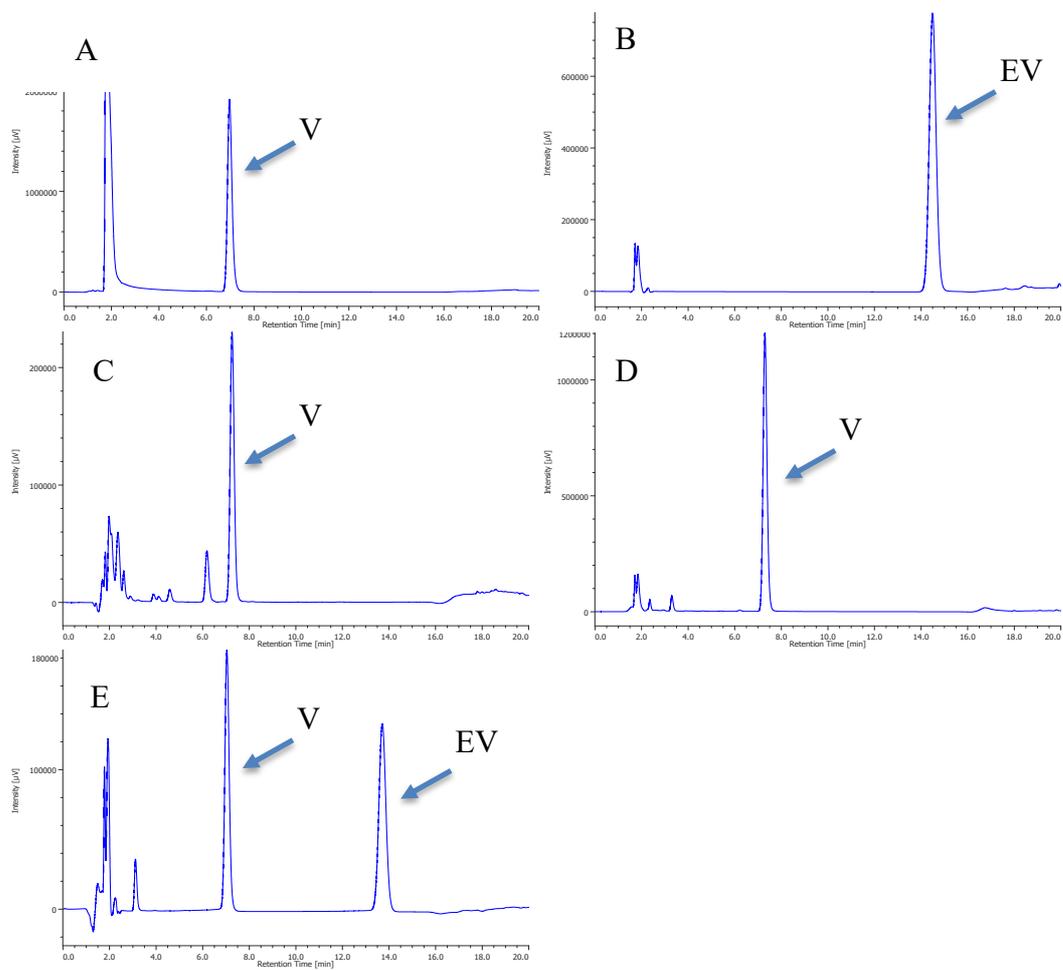


Fig. 23 Vanillin 試薬(A), ethylvanillin 試薬(B)と生薬バニラ(C), バニラエッセンス (D), バニラオイル(E)の各試料の HPLC クロマトグラム.

矢印 V と矢印 EV はそれぞれ vanillin と ethylvanillin のピーク

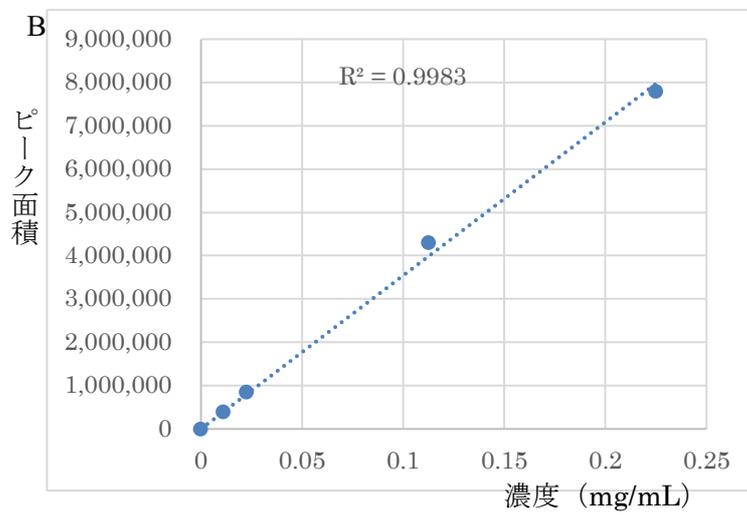
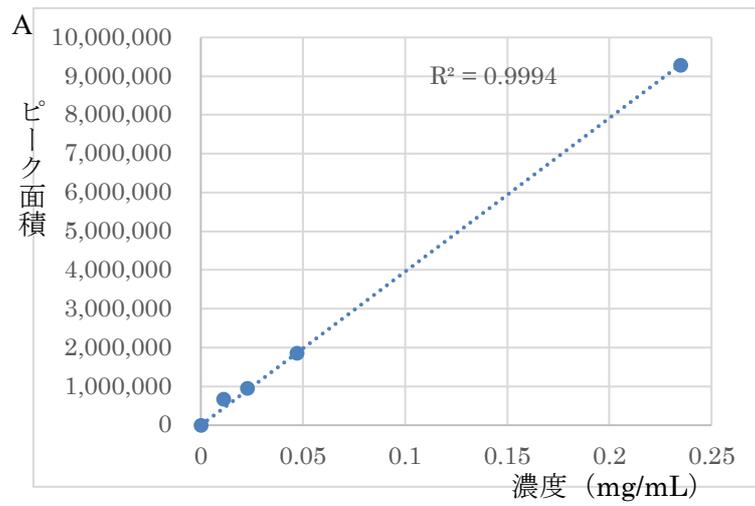


Fig.24 HPLCにおける vanillin (A)と ethylvanillin (B)の検量線

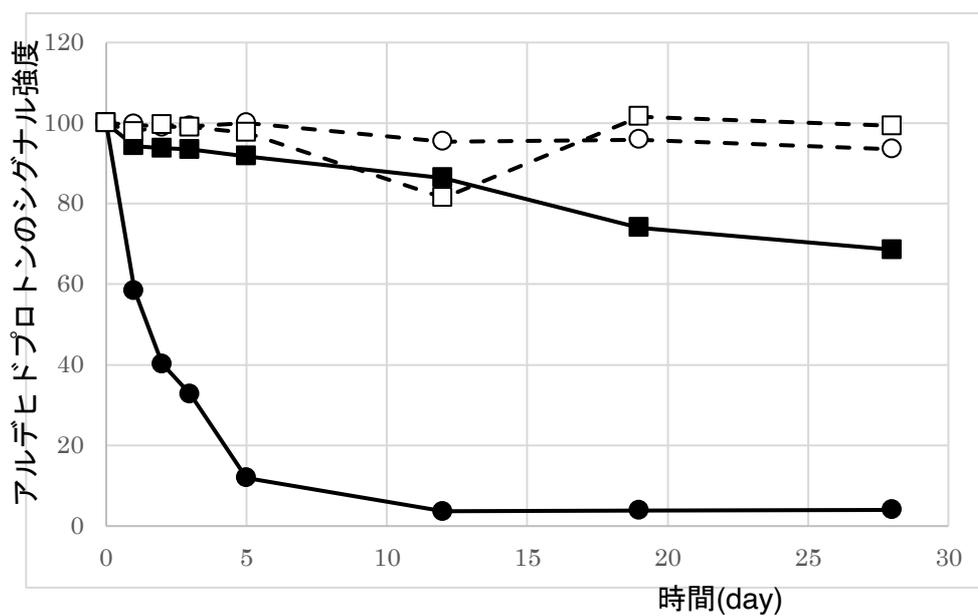


Fig.25 0日目を100としたときの cinnamaldehyde のアルデヒド基のプロトンシグナル積分値の変化

CD<sub>3</sub>OD 中 (●, 実線) , CD<sub>3</sub>CN 中 (■, 実線) CD<sub>3</sub>OD-D<sub>2</sub>O 中 (○, 点線)  
 CD<sub>3</sub>CN-D<sub>2</sub>O 中 (□, 点線) で測定

Table 1 <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの測定条件

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

Table 2 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	<sup>1</sup> 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 Eugenol 標準試薬とオールスパイス末中の eugenol の含有率

samples	<sup>1</sup> 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+%

Table 4 Rosmarinic acid 試薬, ローズマリー葉中および既存添加物のローズマリー水性抽出物中の rosmarinic acid の含有率

samples	<sup>1</sup> H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
試薬#	89.18	±1.06	(n = 3)			
ローズマリー葉末	0.35	±0.03	(n = 3)	0.34	±0.03	(n = 3)
ローズマリー水性抽出物	0.60	±0.11	(n = 3)	0.60	±0.13	(n = 3)

# 試薬の純度表示は>96%

Table 5 Cinnamaldehyde 試薬とケイヒ末中の cinnamaldehyde の含有率

samples	試薬の表示純度	<sup>1</sup> H-qNMR での含有率(%)		
		平均±SEM		
Cinnamaldehyde 試薬 A	>98% (GC)	98.51	±0.10	(n = 3)
試薬 B	>98% (HPLC)	92.04	±1.03	(n = 3)
試薬 C	>98% (Capillary GC)	97.94	±1.17	(n = 3)
ケイヒ末 A		3.46	±0.04	(n = 3)
ケイヒ末 B		2.39	±0.06	(n = 3)
ケイヒ末 C		2.72	±0.04	(n = 3)

Table 6 Anethole 試薬, ウイキョウ, ダイウイキョウ, アニス中の anethole の含有率

samples	<sup>1</sup> H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
Anethole 試薬	98.12	±0.03	(n = 3)			
日本薬局方ウイキョウ	0.54	±0.02	(n = 3)	0.54	±0.03	(n = 3)
ダイウイキョウ A	2.02	±0.03	(n = 3)	1.96	±0.02	(n = 3)
ダイウイキョウ B	7.32	±0.15	(n = 3)	6.82	±0.09	(n = 3)
ダイウイキョウ C	5.48	±0.11	(n = 3)	5.42	±0.20	(n = 3)
ダイウイキョウ D	5.99	±0.11	(n = 3)	5.82	±0.14	(n = 3)
アニス A	1.33	±0.01	(n = 3)	1.45	±0.02	(n = 3)
アニス B	1.14	±0.02	(n = 3)	1.25	±0.01	(n = 3)

# 試薬の純度表示は>96%

Table 7 Vanillin 試薬, ethylvanillin 試薬, 生薬バニラ, バニラエッセンス, バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin の含有率

samples	vanilline		ethylvanillin	
	<sup>1</sup> H-qNMR での含有率(%)	HPLC での含有率(%)	<sup>1</sup> H-qNMR での含有率(%)	HPLC での含有率(%)
	平均±SEM	平均±SEM	平均±SEM	平均±SEM
vanillin 試薬*	96.78	±0.09	n.d.	
ethylvanillin 試薬#	n.d.		99.30	±0.19
生薬バニラ A	0.44	±0.02	0.44	±0.03
生薬バニラ B	0.42	±0.01	0.42	±0.04
バニラエッセンス	0.77	±0.01	0.77	±0.01
バニラオイル	0.65	±0.02	0.72	±0.01
			0.64	±0.01
			0.59	±0.01

\*試薬の純度表示は>98% #試薬の純度表示は>97%

## 研究要旨

1) 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」に記載されており、ウコン (*Curcuma 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。

2) シタン色素の成分規格の検討：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。

3) DPPH法を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価：1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH)法は抗酸化能の評価法として、一般試験法の規格化が期待されている。本手法は、96ウェルを用いた吸光度測定 (検出波長：517 nm) によりトロロックス (基準物質) と相対的に抗酸化能を評価する (トロロックス等価活性値, TEAC) ため、簡便かつ迅速な試験法が可能となる。しかしながら、規格化に向けた妥当性評価が十分に検討されていないため、本年度では抗酸化能測定キットの内容に基づいて、実験手技や実験環境を軸にDPPH法の再現性や汎用性を評価することとした。没食子酸 (酸化防止剤) を用いて試薬や調製溶媒を変更してDPPH法を実施した結果、いずれもバラつきの少なくTEACを得ることができた。しかしながら、様々な既存添加物に応用した際、低極性の化合物に関して試験溶液が白濁し、正常にDPPH法を実施することが困難であった。

それゆえに、使用溶媒による溶解性を検討し、既存添加物への適応性を拡大することが求められる。さらに、マニュアルの簡易化や明確さにもさらに改良することにより、その汎用性も増すと考えられる。

#### 4) アナトー色素の定量評価の基礎検討

アナトー色素は、第9版食品添加物公定書においてベニノキ (*Bixa orellana* L.) の種子の被覆物から得られたものであり、ノルビキシン (NBx) を主成分とするもの及びビキシン (Bx) を主成分とするものと定義されている。確認試験では、逆相系高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定し、標準液のNBx及びBxのピークの保持時間と一致することにより評価している。しかしながら、定量法では、逆相系HPLCではなく、色価測定法によりNBx及びBxの含量を求めている。そのため、HPLCを用いた正確かつ汎用性のある定量法を開発する必要がある。そこで、令和3年度では、NBx及びBxの分析法の構築を試みた。その結果、分析時間10分にて良好な分離及びピーク形状を示す最適な条件を決定することができた。さらに、検出波長460 nmにおいて絶対検量線を作成した結果、定量限界が0.06 ppmと高感度に定量可能であることも確認できた。また、本条件を用いて6種類のアナトー色素関連製剤を分析した。その結果、いずれの製剤もNBx又はBxが検出された。問題点としてHPLCの絶対検量線では、幾何異性体などの問題より、信頼ある分析法は困難と考えた。そこで、令和4年度は令和3年度に引き続き、SR-HPLC法を目指した検討を実施した。HPLCによる分離分析を検討した結果、市販されるNBxで純度が91.1%であり、Bxの混入が確認された。そこで、NBxのHSCCC単離精製を検討した。2相溶媒系として、*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水 (8/2/5/5, V/V/V/V)を用いて実施した。これらによって、得られたNBx及びBxを混合した溶液とデザインしたSRの保持時間などを確認した結果、*n*-C<sub>9</sub>及び *n*-C<sub>11</sub>が有効と考えられた。つぎに、NBx, Bx, SR候補物質の検量線を作成した結果、相関係数0.997以上と良好な結果を得ることができた。今後の課題としては、*trans*体の精製とRMS算出などが挙げられる。

研究協力者

高橋未来 立命館大学薬学部 助教

布目真梨 立命館大学薬学部 助教

### 1) ウコン色素の定量評価の基礎検討

#### 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。<sup>1)</sup> 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<sup>2-4)</sup>。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)<sup>5)</sup>、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)<sup>6-8)</sup>、質量分析 (MS)<sup>9-11)</sup> 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)<sup>12)</sup>。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

イであり、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*<sub>6</sub>, 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: 東京理化器械社製 N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000  
凍結乾燥機: 東京理化器械社製 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 (<sup>1</sup>H-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<sup>12)</sup>。カラム: TSKgel ODS-100V column (4.6×150 mm, 5 μm, 東ソー社製)  
カラム温度: 40°C  
流速: 1.0 mL/min  
検出波長: 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) <sup>1</sup>H-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 ( $\epsilon$ )、濃度 ( $C$ ) および層長 ( $l$ ) で表される。

$$R = \epsilon \times C \times l$$

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

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

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

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<sup>12)</sup>。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]<sup>+</sup> (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) <sup>1</sup>H-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*<sub>4</sub> を用いた。1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 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**; for Application of Food Analysis. AOAC 2021 Virtual Midyear Meeting (2021.3.19) (Online)
- 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

## 2) シタン色素の成分規格の検討

### 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。<sup>13)</sup> 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。<sup>14)</sup> また、人工皮膚の着色の技術も開発されている。<sup>15)</sup>

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。

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：東京理化工学社製

N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000

薄層板：Merck 社製 Silica gel 60 F<sub>254</sub>

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 F<sub>254</sub> 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<sub>f</sub> 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<sub>f</sub> 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

- 13) 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
- 14) Bulle S, Reddyvari H, Nallanchakravarthula V, Vaddi DR; Therapeutic Potential of Pterocarpus santalinus L.: An Update. *Pharmacognosy*, 43-9 (2016)
- 15) 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ビ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

### 3) DPPH法を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価

#### A. 研究目的

既存添加物の規格基準について、これまで有効成分や構成成分の同定、各成分の分析法の開発をすることにより、成分規格試験を設定してきた<sup>16)</sup>。しかしながら、酸化防止剤として使用されている既存添加物では、様々な成分が抗酸化能に関与しているため、既存添加物中の全ての抗酸化物質を同定及び分析法を開発することは困難である。それゆえに、抗酸化能を持つ既存添加物に関して、主成分などの成分解析だけでなく、酸化防止剤としての抗酸化能の一般試験法化の設定が求められている。そこで、本年度では、高い再現性かつ汎用性のある抗酸化能測定法として、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH) 法の基礎検討を試みた。

DPPH は紫色の安定なラジカル化合物であり、抗酸化物質により還元されることにより無色に変化する(図7)。そのため、DPPH法はラジカルの消去活性を利用した簡便な抗酸化能の評価法として様々な分野で用いられている。さらに、DPPH法は吸光度測定(検出波長:517 nm)により実施されるため、マイクロプレートを用いた簡便かつ迅速な多検体の測定も可能である。しかしながら、DPPH法による抗酸化能は50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>)により評価されるが、その値の再現性の乏しさが課題として挙げられていた。そこで、既報において、トロロックスを基準物質として補正したトロロックス等価活性値(Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC)によるDPPH法が報告されている<sup>17)</sup>。さらに、DPPH法によるTEAC評価法はキット化(抗酸化能測定キット)されており、異なる試験機関における測定誤差がさらに少なくなると期待されている。そこで、本研究では、抗酸化能測定キットの手順や同封されている試薬類を用いて様々な既存添加物に応用することにより、その抗酸化能の再現性や適応性を評価することとした。

#### B. 研究方法

#### B-1) 試料及び試薬

抗酸化能測定キット(DPPH Antioxidant Assay Kit)は同仁化学社製を用い、DPPH試薬、トロロックス標準品及びアッセイバッファーがキットに同封されていたものを用いた。チャ抽出物、ターメリック色素、赤キャベツ色素、クチナシ黄色素、ベニバナ赤色素及びマリーゴールド色素は三栄源エフ・エフ・アイ社製を用いた。DPPHはCayman Chemical社製を用いた。没食子酸水物、トロロックス標準品、エタノール(特級)、メタノール(HPLC用)、アセトニトリル(HPLC用)及びアセトン(特級)は富士フィルム和光純薬社製を用いた。ジメチルスルホキシド(DMSO)はナカライテスク社製を用いた。また、超純水はPURELAB flex 5 system(ELGA社製)で精製したものを使用した。0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)は、株式会社ニッポン・ジーン製1M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)を用いて調製した。

#### 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  
吸光度計：コロナ電気株式会社製コロナマルチグレーティングマイクロプレートリーダー SH9000Lab

#### B-2) DPPH ラジカル消去活性試験法

試料が溶解可能である溶媒にてストック溶液を調製し、攪拌及び遠心分離(3,000 rpm, 5分)した後、上清を測定試料として用いた。また、トロロックス溶液及びDPPH溶液は、エタノールで溶解及び希釈することにより調製した。そして、96穴マイクロプレートに既存添加物又は80, 60, 40, 0 µg/mLの各濃度に希釈したトロロックス溶液20 µL, 0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)80 µL, 0.2 mM DPPH溶液100 µLを加え、暗室でインキュベート(25℃, 30分間)した。本溶液を吸光度計(コロナ電気株式会社製コロナマルチグレーティングマイクロプレートリーダーSH9000Lab)により517 nmの吸光度を測定した。さらに、ラジカル消去率を以下の式で求め

た。

$$\text{ラジカル消去率 (\%)} = (A_{cs} - A_s) / A_{cs} \times 100$$

A<sub>cs</sub>: 試料ブランク吸光度

A<sub>s</sub>: 試料吸光度

### B-3) TEAC 算出

試料及びトロロックス溶液をエタノールで希釈し、検量線を作成した。また、50%のラジカル消去率を含む範囲で、回帰直線を引き、算出された直線式より、IC<sub>50</sub>となる濃度を求めた。3回の操作により、TEACの平均値及び標準偏差(S.D.)を算出した。

$$\text{TEAC} = \text{Trolox の IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{試料の IC}_{50} (\mu\text{g/mL})$$

## C. 結果及び考察

まず、抗酸化能測定キット試薬と自ら調製した試薬の両方を用いて、酸化防止剤である没食子酸のTEACを確認した(表2)。その結果、全て調製した試薬を用いた場合においてもキット試薬と同等な抗酸化能を測定できる(RSD 3.3%以下)ことを確認した。以上より、それ以降のDPPH法の検討に関して調製した試薬を用いることとした。

次に、7種類の既存添加物を用いて、DPPH法による抗酸化能を評価した。これら試料を没食子酸と同様に、DPPHラジカル消去活性試験法を実施し、TEACを算出した結果を表3にまとめた。その結果、没食子酸及びチャ抽出物のTEACはそれぞれ3.70及び2.78であったが、ターメリック色素及び赤キャベツ色素のTEACは0.016及び0.013であり、ほとんど抗酸化能が確認されなかった。さらに、マリーゴールド色素、クチナシ黄色素及びベニバナ赤色素では、ウェル内の試験溶液が白濁し、正常に吸光度を測定することができなかった。これら既存添加物がDPPH法の測定が困難であった要因は、使用する溶媒への溶解性が低かったためであると考えられる。マリーゴールド色素、クチナシ黄色素及びベニバナ赤色素の溶解試験を実施した際、エタノール、メタノール、アセトン、アセ

トニトリル及び水に溶解せず、いずれもDMSOのみ溶解可能であった(図8)。そのため、既存添加物の試料溶液をウェルに入れ、他の試薬を添加した後、白濁してしまい、IC<sub>50</sub>が算出できなかった。このように、抗酸化能測定キットの手順では、実試料の希釈溶媒がエタノールであったため、没食子酸を用いて他の溶媒におけるTEACと比較した。比較溶媒は、水、エタノール、メタノール及びDMSOを用いた。各溶媒におけるTEACを図9に示した。その結果、没食子酸では、いずれの溶媒を用いて希釈してもTEACの結果に影響しない(RSD; 6.5%)が、極性の低い化合物の場合は溶解性が影響することが判明した。そのため、DPPH法は極性が高いもしくは中程度の化合物に適応可能であると考えられる。

次に、実験者間におけるDPPH法の測定結果の誤差を評価した。本研究では、DPPH法の一般試験法としての標準化を検討しているため、実験室環境下における複数の実験者によるDPPH法の再現性を調査した。3名の実験者(実験者A~C)に対して、キットに同封している手順書を確認し、没食子酸のDPPHラジカル消去活性試験法を実施し、TEACを算出した。次いで、実験者A~Cに、手順内容を図示化したプロトコール(図10)を確認してもらい、同様に没食子酸のDPPH法を実施した(図11)。その結果、実験者A及びBにおいて、1回目及び2回目のTEACはほとんど同じであった。それらに対して、実験者Cは、1回目では他の実験者とTEACが大きく異なっていたが、2回目のTEACは殆ど同等の値が得られた。2回目における全実験者によるTEACのRSDは10%以下であり、良好な再現性がみられた。これらの結果より、実験環境下における高い再現性を得るために、簡易かつ明確なマニュアルの工夫が必要であると考えられる。

## D. 結論

本研究では、既存添加物における酸化防止剤の抗酸化能評価法としてDPPH法の適応を目指して、再現性や汎用性など基礎検討した。その

結果，極性の高い又は中程度の化合物であれば，適応可能であり，その再現性も高かった．更なる適応拡大のために，使用溶媒による溶解性の検討が必要であると考えられる．さらに，異なる実験者における再現性の比較した結果，簡潔なマニュアルの作成をすることにより，実験者間の誤差を軽減することが可能であった．

#### E. 参考文献

- 16) 第9版食品添加物公定書，厚生労働省(2017).
- 17) Shimamura T, Sumikura Y, Yamazaki T, Tada A, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H, Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives - inter-laboratory evaluation study. *Anal. Sci.* 30, 717-721 (2014).

#### 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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 4) アナトー色素の定量評価の基礎検討

##### A. 研究目的

アナトー色素 (Annatto Extract) は第 9 版食品添加物公定書 (以下, 公定書) において, ベニノキ (*Bixa orellana* L.) の種子の被覆物から得られたものである。なお, ノルビキシン (Norbixin, NBx) を主成分とするもの及びビキシン (Bixin, Bx) を主成分とするものがあり, それぞれを NBx 及び Bx と定義されている<sup>18)</sup>。令和 3 年度において, 公定書による規格試験, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析, 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 定性を実施した。その中で, NBx 及び Bx の安定性や異性化などの問題点が挙げられた。つまり, これらを指標とする絶対検量線法では, 信頼性に欠けるため, 新たな分析法が求められると考えた。Scotter らの報告では, アナトーの主成分である NBx 及び Bx はそれぞれ *trans*-/*cis*-体が存在しており, それぞれを測り分ける必要がある (図 12)<sup>19)</sup>。幾何異性体は, 一般的に逆相系 ODS で分離可能である。そのため, 令和 3 年度に報告した HPLC 分析で検出された未知ピーク (図 13) は幾何異性体と推定される。一方で, これら NBx 及び Bx 幾何異性体の標準品は入手できない。そこで, 本年度では, 高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いた NBx 及び Bx 幾何異性体の単離精製を検討することとした。また, それらの状況を考慮して, 相対モル感度係数 (RMS) を用いた Single Reference (SR) HPLC の開発へ繋げることにした。SR-HPLC を開発するにあたり, これまで本研究班での検討の結果, 類似した最大吸収波長をもつものをデザインすることが望まれる<sup>20, 21)</sup>。そこで, 本研究では, 新たな赤色領域に特化した SR をデザインした。今回提案する SR は, アナトーを含めて, 天然カロテノイド色素に拡大できるものと思われる。

##### B. 研究方法

###### B-1) 試料及び試薬

アナトー色素製剤は, NBx (A 社製; 粉末), Bx (A 社製; 粉末) アナトー色素 B (水溶性

アナトー, B 社製; 液状), アナトー色素 C (水溶性アナトー, C 社製; 液状), アナトー色素 D (水溶性アナトー, D 社製; 液状) 及びアナトー色素 E (水溶性アナトー, E 社製; 液状) を入手した。なお, 水溶性アナトーは NBx をアルカリ処理したアルカリ塩 (カリウム塩, ナトリウム塩) であるため, 指定添加物として規格基準が定められている。

NBx 及び Bx 標準品は, 富士フイルム和光純薬社製を用いた。アナトー色素製剤は, ノルビキシン (三栄源エフ・エフ・アイ社製; 粉末) を用いた。

アセトニトリル (HPLC 用), アセトン (特級), メタノール (HPLC 用), ギ酸 (LC/MS 用, 約 99%) 及び酢酸 (LC/MS 用, 約 99%) は富士フイルム和光純薬社製を用いた。ジメチルスルホキシド (DMSO) はナカライテスク社製を用いた。超純水は PURELAB flex5 system (ELGA 社製) を用いて得た。

###### 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  
HPLC 装置: 島津製作所社製 HPLC-20AD/SIL-20AC/RF-10AXL/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS

###### B-3) 確認試験 (第 9 版食品添加物公定書)

###### ノルビキシン

- (1) 本品の表示量から, ノルビキシン含量 15% に換算して 0.1 g に相当する量を量り, 水 50 mL を加えて振り混ぜて溶解性を確認した。
- (2) 本品を水酸化カリウム (1→200) に溶かした液の極大吸収部を確認した

###### ビキシン

- (1) 本品の表示量から, ビキシン含量 25% に換算して 40 mg に相当する量を量り, 水 50 mL を加えて振り混ぜて溶解性を確認した。

(2) 本品をアセトンに溶かした液の極大吸収部を確認した。

#### B-4) HPLC 分離分析

粉末の対象試料は DMSO により溶解し、メタノール/水 (90/10, V/V) 混液を用いて希釈した。移動相には、0.1 vol% 酢酸水溶液/0.1 vol% 酢酸メタノールを使用し、10/90 をアイソクラティック条件により、10 分の分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100Z column (4.6×150 mm, 5 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

検出波長：460 nm

注入量：10 μL

#### B-5) LC-MS によるスペクトル解析

Ion mode：ESI (+)

Capillary voltage：2.0 kV

Extractor voltage：3.0 V

RF lens voltage：2.5 V

Source temperature：150°C

Desolvation temperature：400°C

Cone/desolvation gas flows：50/800 L/hr

MS scan range：*m/z* 200 to 500

Daughter scan range：*m/z* 50 to 500

Cone voltage：10-40 V

Collision energy：10-40 eV

#### B-6) HSCCC 単離精製

HSCCC 装置：easy-Prepccc (多層コイルプラネット) (クツワ産業社製)

分取システム：PU714MLC pump, UV702 detector, SC762 system controller, PLC761 fraction collector (GL Science 社製)

HSCCC 条件

二相溶媒系：*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水 (8/2/5/5, V/V/V/V)

分離部：Type-J コイル (コイル容量：350 mL)

遠心スピード：1000 rpm

流速：3.0 mL/min

NBx の DMSO 溶解液 10 μL をチューブに加えて濃縮乾固 (60°C, 30 分間) した。その後、残渣に各組成比 (表 5) のヘキサン/酢酸エチル/メタノール/超純水の混合液の上層および下層をそれぞれ 0.5 mL ずつ加えて再溶解した。その上層および下層をそれぞれ 100 μL 採り、濃縮乾固 (60°C, 1 時間) した。そして、残渣にメタノール/超純水 (90/10, v/v) 混液 100 μL で再溶解して、HPLC で分析して分配係数 (K) を以下の式を用いて求めた。0.5 ≤ K ≤ 2.0 の範囲で二層溶媒系を決定した。

分配係数 (K)

$$= \frac{\text{固定相(上層)における NBx のピーク面積}}{\text{移動相(下層)における NBx のピーク面積}}$$

決定した二相溶媒系より、HSCCC による対象物質の単離精製を行った。二相溶媒の上層を固定相、下層を移動相として用いた。まず、上層をコイルカラムに充填した後、HSCCC を 1000 rpm で回転させて、下層を流速 1.0 mL で流した。次いで、色素を濃縮乾固したものを下層 5 mL で溶解して、カラムに注入した。そして、HSCCC/UV (検出波長：460 nm) にて検出されたピークをそれぞれ分取した。分取した成分をエバポレーターで濃縮乾固後、メタノール/超純水 (90/10, v/v) 混液で再溶解して、HPLC (検出波長：460 nm) で分析した。

#### B-7) SR デザイン

国立医薬品食品衛生研究所有機化学部との共同による化合物を検討した。極大吸収波長 450~500 nm で検出できる化合物の合成を検討した (図 14)。

## B. 結果及び考察

### C-1) 確認試験

国内で流通しているアナトー色素を用いて、第 9 版食品添加物公定書の確認試験を実施した。

実試料を調製し、確認試験を実施した結果、いずれのアナトー色素製品も規格基準に従うことが確認できた。

- (1) 本品に水 50 mL を加えて振り混ぜた結果、いずれもほとんど溶けなかった (図 15)。
- (2) いずれも検液は橙色の色彩を示した。規格基準において Bx は波長 452~460 nm 及び 482~490 nm, NBx は波長 448~456 nm 及び 476~484 nm に極大吸収部が確認された (図 16)。

### C-2) HPLC の分離分析の検討

NBx 及び Bx は低極性な化合物であると考えられるため、溶解性を確認した。メタノール、アセトニトリル、アセトン、DMSO 及び水を用いた結果、DMSO が最も容易に溶解した。なお、メタノール及びアセトンにおいても溶解したが、完全溶解することは困難であった (図 17)。そのため、DMSO を標準原液の溶媒として用いて、最終的な移動相の組成比であるメタノール/水 (90/10, V/V) 混液を希釈液として用いることとした。また、保土谷工業社製の水分散性アナトー及び水溶性アナトーに関する溶解試験を実施した結果、水分散性アナトー色素ではエタノール、メタノール、アセトニトリル及びアセトンにおいて不溶解物が生じた (図 18)。水溶性アナトー色素ではエタノール、アセトニトリル及びアセトンにおいて不溶解物が生じた (図 19)。

ノルビアアナトー及び Bx の紫外可視吸収スペクトルによる極大吸収波長を確認した。確認試験 (2) におけるスペクトルより、いずれも 460 nm 付近にて吸収極大波長が確認されたため、定量及び定性分析する際のモニタリング波長として設定することとした (図 16) しかしながら、アナトー色素製剤の色素成分以外もモニタリングするため、254 nm も設定することとした。NBx 及び Bx の逆相系 HPLC の分離分析について検討した。まず、移動相条件 (アイソクラティック) を比較した。まず、有機溶媒系についてメタノール又はアセトニトリルを用いた際

の保持時間や不純物ピークとの分離や汎用性などを考慮した結果、メタノールを用いることとした (図 20)。次いで、移動相に添加する酢酸濃度を検討した。NBx 及び Bx は酸性物質であること、メタノールはギ酸と反応してしまうことより、酢酸を移動相に添加することとした。酢酸濃度を 0 vol%, 0.1 vol% 及び 0.5 vol% を用いて NBx 及び Bx のピーク形状 (シンメトリー係数及び理論段数) や分離度を比較した (表 4)。その結果、0 vol% では NBx 及び Bx のピークが完全分離しなかった。0.1 vol% 及び 0.5 vol% では、ピーク形状や分離に関して大きな差が見られなかったが、カラムへの負担や水溶性アナトー色素は酸性領域にて析出する可能性があることを考え、0.1 vol% が最適であると考えた。次いで、逆相系 HPLC カラムを検討した。東ソー社製の TSKgel ODS-100V, TSKgel ODS-100Z 及び TSKgel ODS-80Ts においても同様にピーク形状や分離を比較した。なお、いずれのカラムはサイズ 4.6 mm × 150 cm, 粒子系 5 µm に統一し、同じ移動相を用いた。各カラムにおける NBx 及び Bx 標準品の HPLC クロマトグラムを図 21 に示した。その結果、TSKgel ODS-100Z が最も夾雑ピークと分離・ピーク形状が良好であった。以上より、最適化した NBx 及び Bx 標準品の HPLC クロマトグラムを図 22 (460 nm 検出) 及び図 23 (254 nm 検出) に示した。本条件により、定量限界 (LOQ) から 10 ppm までの NBx 及び Bx の絶対検量線を作成し、図 24 に示した。絶対検量線法において、相関係数 ( $r^2$ ) は 0.999 以上の良好な直線性を示し、いずれも LOQ は 0.063 ppm 及び検出限界 (LOD) は 0.031 ppm であった。本手法により、国内に流通しているアナトー色素製剤の HPLC クロマトグラムを図 25 (460 nm 検出) 及び図 26 (254 nm 検出) に示した。なお、図 26 より、不純物と NBx 及び Bx は良好な分離を示し、アナトー色素 (粉末又は水分散性) よりも水溶性アナトーの方では不純物ピークが小さいという特徴がみられた。

以上の結果を踏まえ、測定を実施したところ、図 27 の HPLC クロマトグラムが得られた。ピ

ーク面積からその純度は、NBx で 91.1%及び Bx で 97.0%となった。また、既報<sup>19)</sup>の HPLC クロマトグラムと比較して、いずれも *cis* 体と考えられた。また、今回の HPLC 分離分析から、NBx/Bx 混合溶液を調製し、HPLC 定量分析を行ってしまうと、NBx 標準品に混入する Bx により過剰評価してしまう恐れが考えられた。さらに、本標準品は、100 mg が 3~4 万円と高額であり、汎用性に欠ける。さらに、今後、既存添加物の状態（温度、pH など）により、幾何異性化の可能性も否定できない。つまり、従来の標準品を用いた絶対検量線法では正確な定量評価が困難であることが分かった。

### C-3) LC-MS によるスペクトル解析

アナトー色素製剤中の NBx 及び Bx を高精度に同定するために、質量分析装置 (MS) を用いたスペクトル情報を収集した。本研究では、HPLC と同様の移動相条件において、Waters 社製の直接的に MS へ繋げることによりスペクトル解析を実施した。MS scan モードにおいて、Bx  $m/z$  395 ( $[M+H]^+$ ) 及び NBx  $m/z$  381 ( $[M+H]^+$ ) が最も強度が高く観察された (図 28)。そのため、それらをプリカーサーイオンとして設定した。なお、ESI (-) モードでは検出ピークが確認されなかった。次いで、Daughters scan モードにより、MS/MS スペクトルを確認した (図 29)。その結果、NBx 及び Bx 由来の特異的な MS/MS スペクトル  $m/z$  145 が得られた。さらに、NBx 及び Bx 標準品やアナトー色素製剤における不純物ピークの MS スペクトルを確認した (図 30)。その結果、不純物 I 及び II は NBx、不純物 III 及び IV は Bx の分子イオンが検出したため、これら不純物は NBx 又は Bx の *trans*-/*cis*-異性体の可能性が示唆された。これらスペクトル情報をもとに、各アナトー色素製剤中の Daughters scan 結果、いずれの製剤も NBx 又は Bx 標準品と同様のモニタリングイオンにおいてピークが検出され、より確実な含有成分の同定が可能となったといえる (図 31 及び図 32)。

### C-4) HSCCC 単離精製

C-2 から、従来の HPLC 法による定量分析が困難と分かったため、新たな RMS を用いた定量アプローチを考案した (図 33)。HPLC の結果より、NBx に関して Bx などの不純物が存在していることが分かる。そこで、まずは NBx に対して HSCCC を用いた単離精製を実施することとした。NBx 標準品は高額であるうえ、溶解性に優れない。そこで、本研究では、食品添加物の水溶性アナトー色素を用いることとした。初めに、NBx 及び不純物質の分配係数を求めた結果、*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/超純水 (8/2/5/5, V/V/V/V) 混合溶液を採用した。次いで、採用した二層溶媒を用いた HSCCC 分析の結果を示した。またこのときの保持率は 86% であり、分析時間は 100 分で行った。図 34 より、明確なピークが見られた画分を分取した。分取した画分を HPLC (検出波長: 460 nm) で分析を行った (図 35)。

### C-5) SR デザイン

C-4 から得た NBx/Bx 混合溶液を用いて、デザインした SR の評価を行うこととした。HPLC (検出波長: 460 nm) により、デザインした 6 種類の SR 及び NBx/Bx 混合溶液を用いて比較を行った結果、NBx と Bx の不純物を考慮して、NBx には *n*-C<sub>9</sub>、Bx には *n*-C<sub>11</sub> を用いることとした (図 36)。次に、NBx、Bx、*n*-C<sub>9</sub>、*n*-C<sub>11</sub> の検量線を作成した結果、相関係数 0.997 以上となった (図 37)。次に、qNMR で純度を算出し、RMS を求めることが可能となった。

## D. 結論

本研究では、アナトー色素における NBx 及び Bx の SR-HPLC 分析法に関する開発検討を実施した。その結果、いずれも良好な結果を得ることができた。しかしながら、以下の検討項目が今後必要と考える。

- *trans*-NBx 及び Bx の合成と純度評価
- SR 及び分析対象の純度評価と RMS 算出
- SR の大量合成と供給

以上を解決することで、正確かつ信頼性のあるアナトー色素の分離分析法が構築できると考える。

#### E. 参考文献

- 18) 第9版食品添加物公定書, 厚生労働省 (2017).
- 19) Scotter MJ, Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Food Addit. Contam.* 11, 301-315. (1994)
- 20) Takahashi M, Morimoto K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K. Study on the Synthesis of Methylated Reference and Their Application in the Quantity of Curcuminoids Using Single Reference Liquid Chromatography Based on Relative Molar Sensitivity. *Chem. Pharm. Bull.* 70, 25-31. (2022)
- 21) Takahashi, M., Nishizaki, Y., Morimoto, K., Sugimoto, N., Sato, K., Inoue, K. Design of synthetic single reference standards for the simultaneous determination of sesamin, sesamol, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity. *Sep. Sci. Plus* 1,

498-505. (2018)

#### F. 研究業績

##### 1. 学会発表等

- 1) 高木映里, 高橋未来, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.8.31) [誌上開催].
- 2) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 杉本直樹, 井之上浩一: デザインSR-HPLC法によるアナトー色素の定量評価の構築. 日本食品衛生学会第118回学術講演会(2022.11.10-11) [長崎].

##### 2-1. 論文発表等

特になし

##### 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

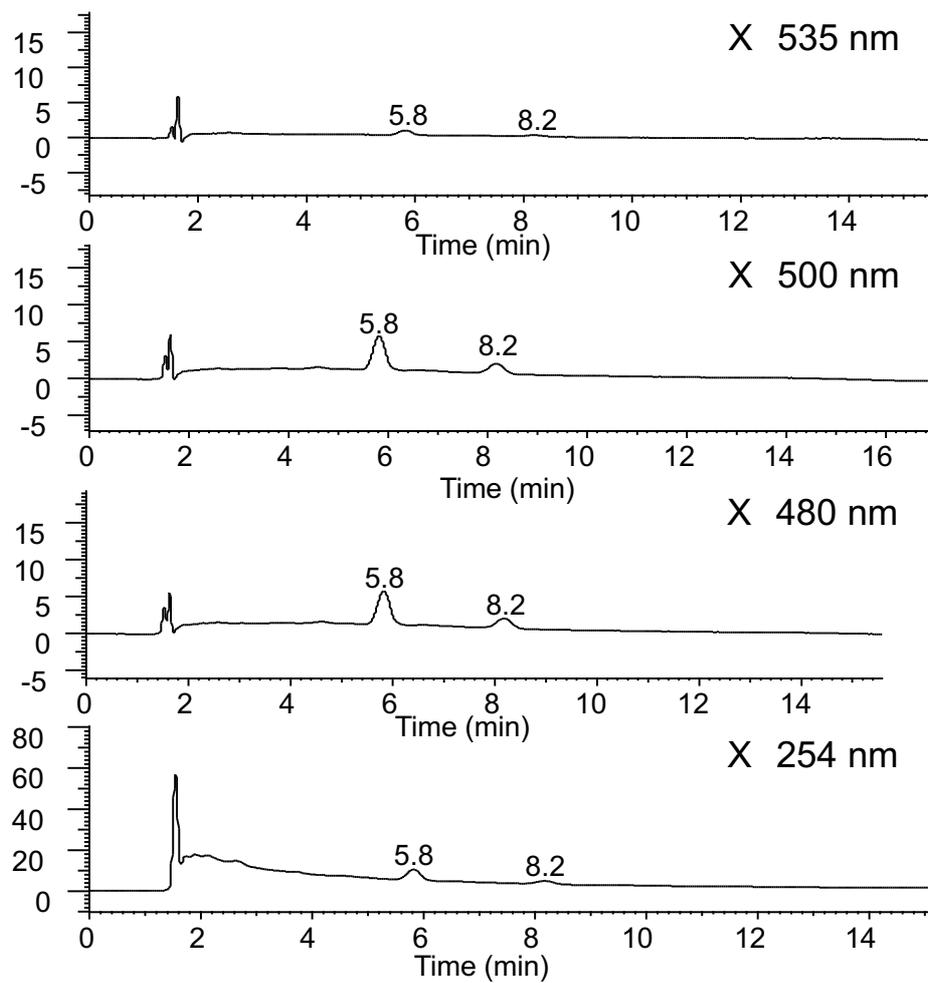


図1 シタン色素の HPLC クロマトグラム (検出波長)

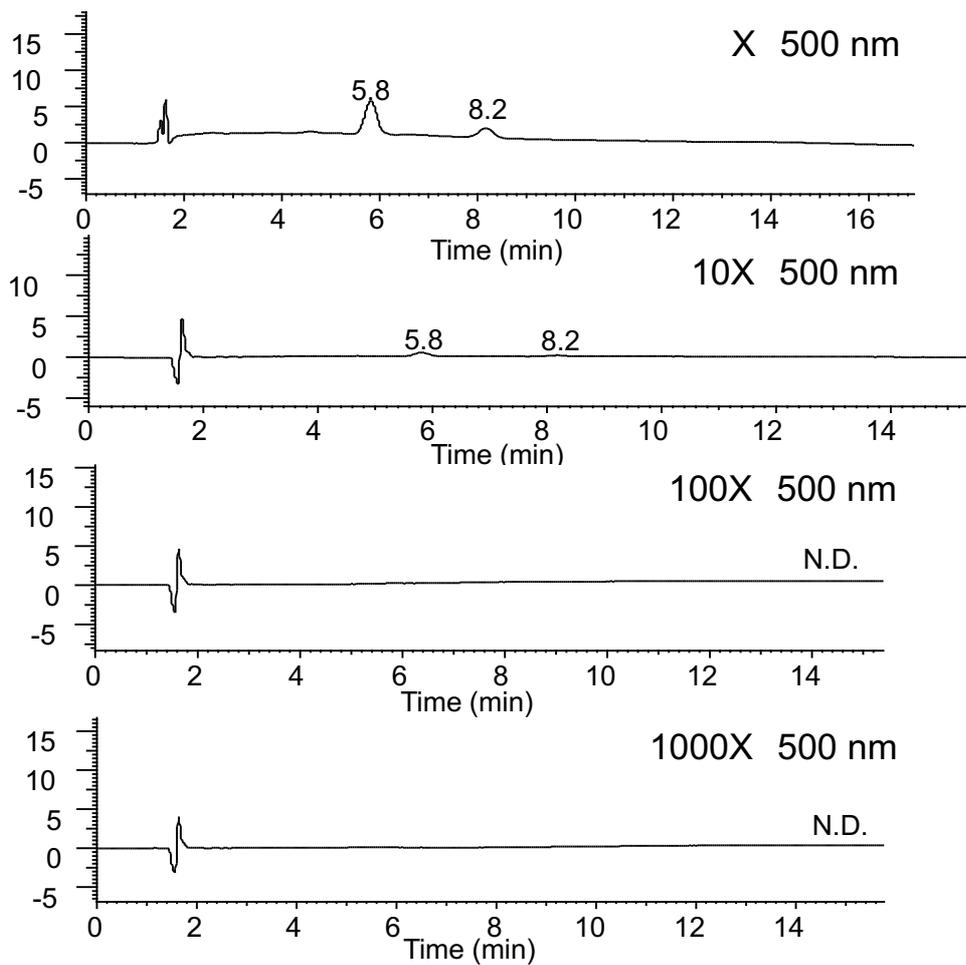


図2 シタン色素の HPLC クロマトグラム (試料濃度)

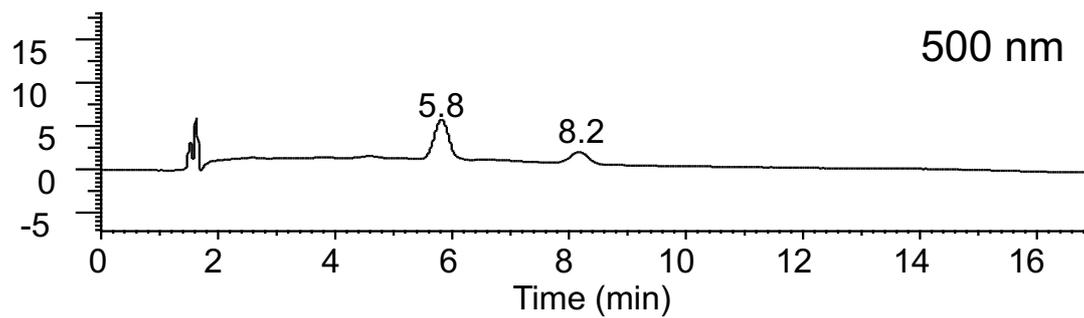


図3 シタン色素の HPLC クロマトグラム

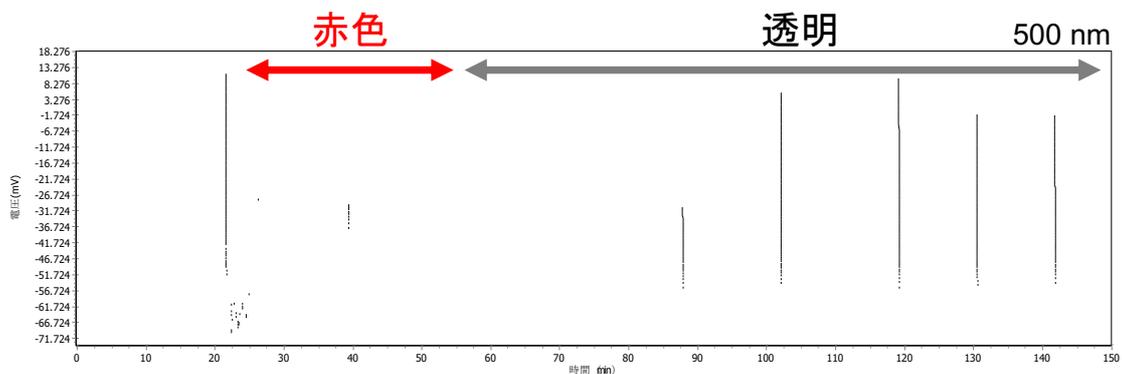


図4 シタン色素の HSCCC クロマトグラム

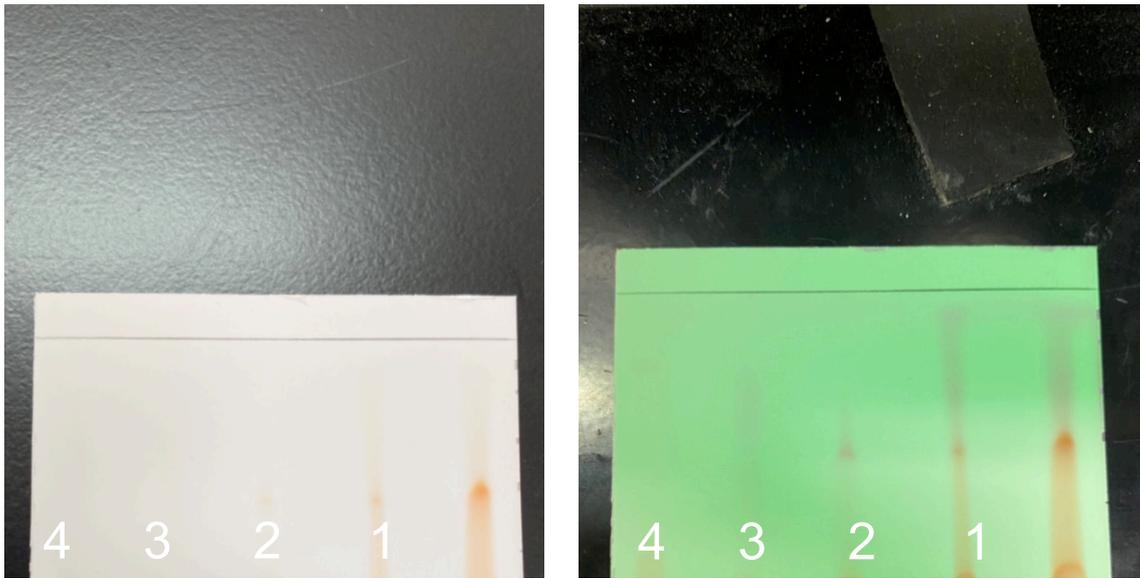


図5 TLC 展開結果 (左 : 自然光, 右 : 254 nm)  
 1 : シタン色素 2 : Fr.1 3 : SA 4 : SB

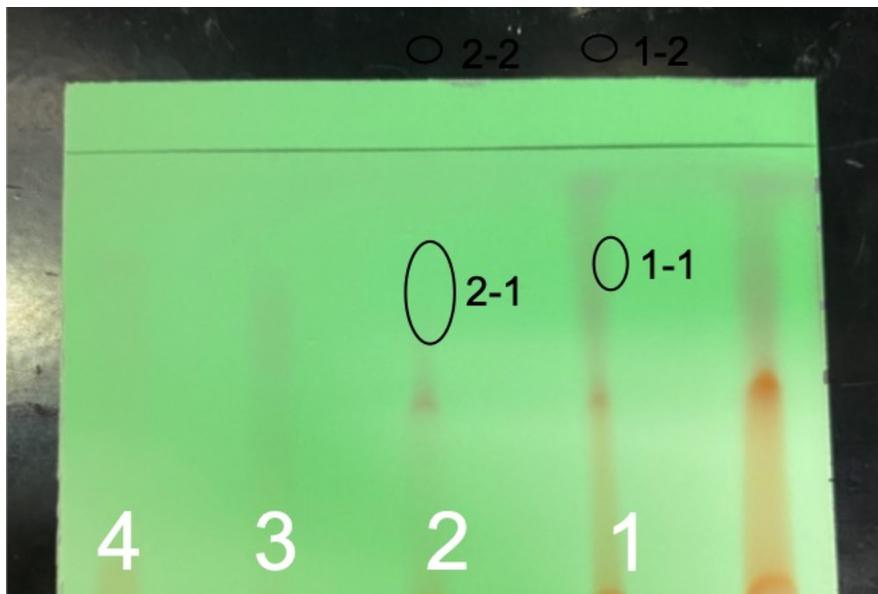


図6 スポット番号

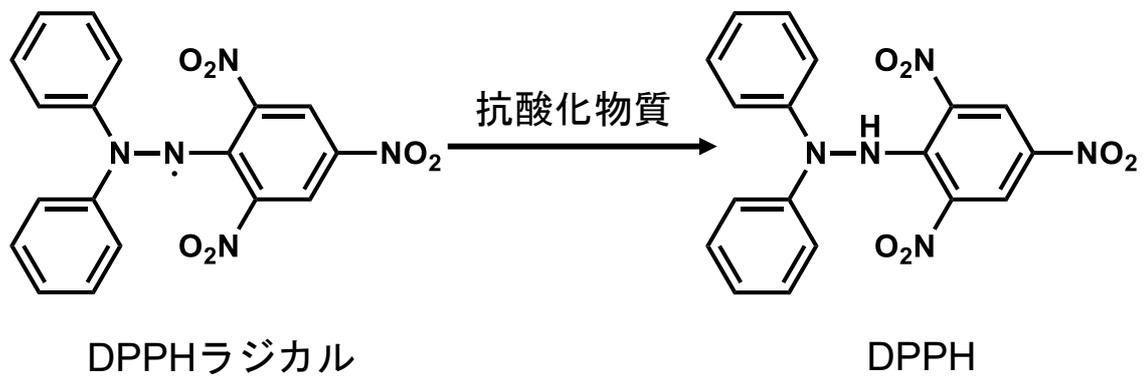
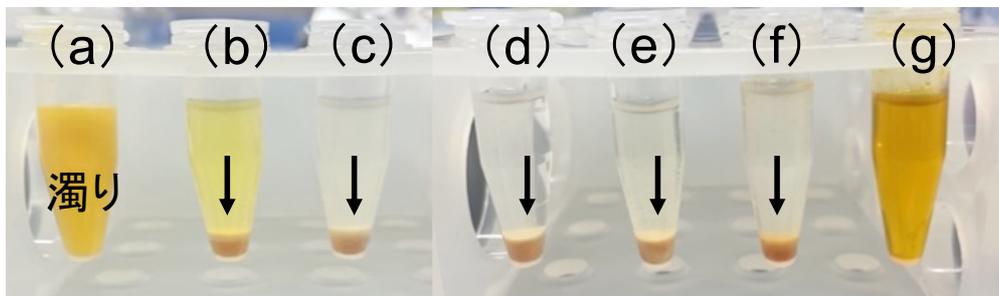
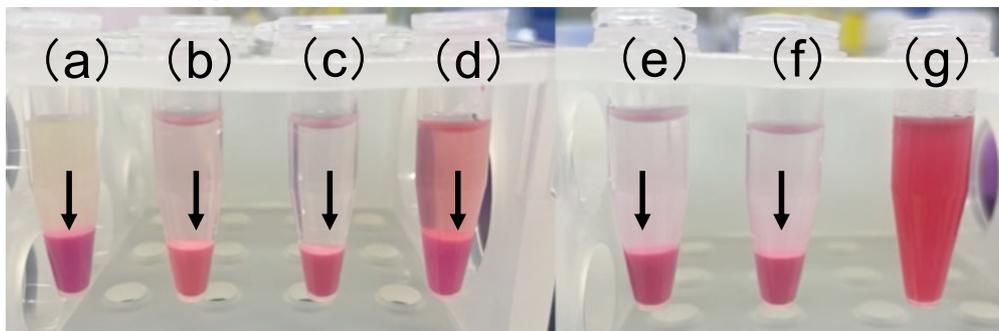


図 7. DPPH 法の反応式

### マリーゴールド色素



### ベニバナ赤色素



### クチナシ黄色素

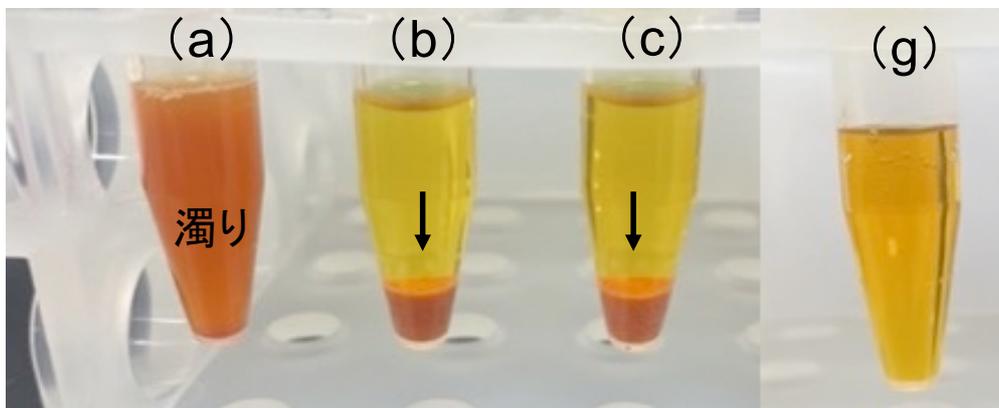


図 8. マリーゴールド色素, ベニバナ赤色素及びクチナシ黄色素の溶解試験  
(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) ジクロロメタン, (e) アセトン,  
(f) アセトニトリル, (g) DMSO

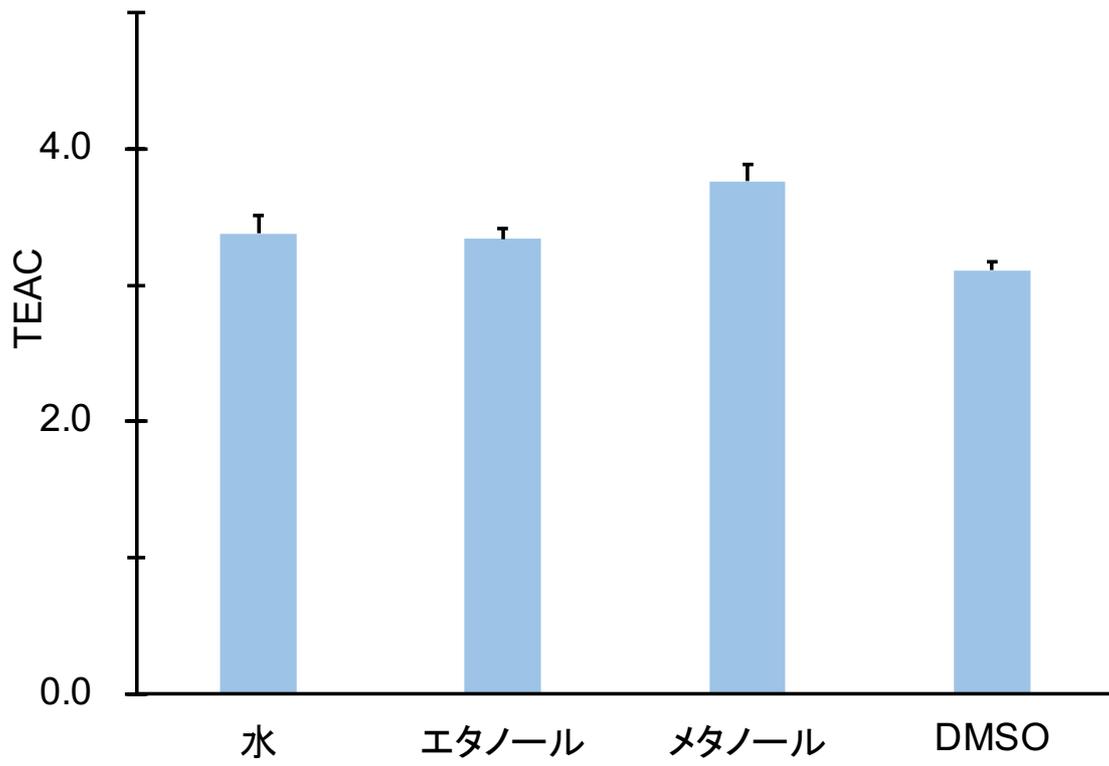
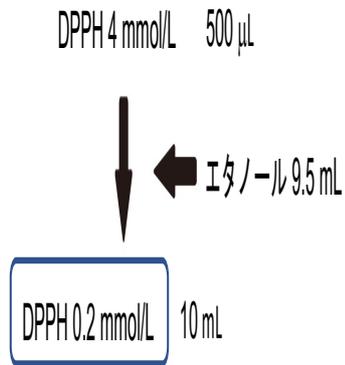


図9. 各溶媒を用いて溶解及び希釈した際の没食子酸の TEAC (n=3)

## DPPH



## Trolox

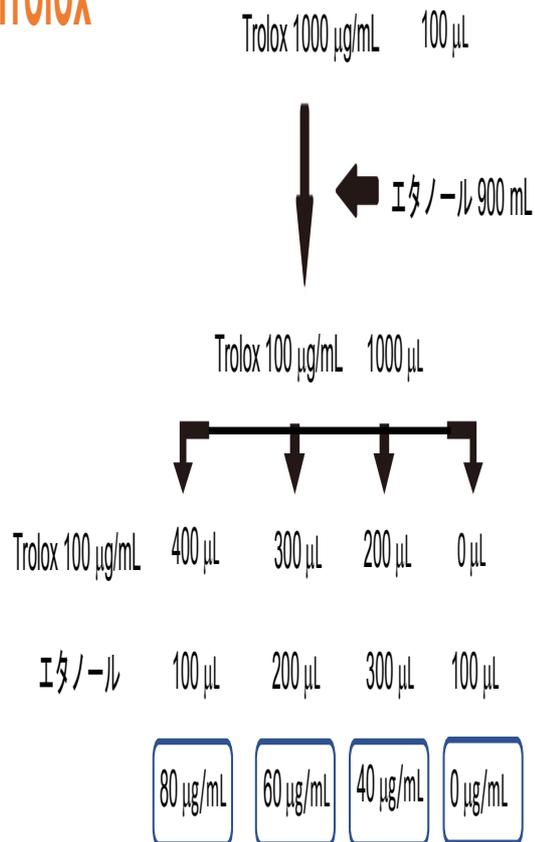


図 10. 実験者が DPPH 法を実施する際に渡したマニュアル

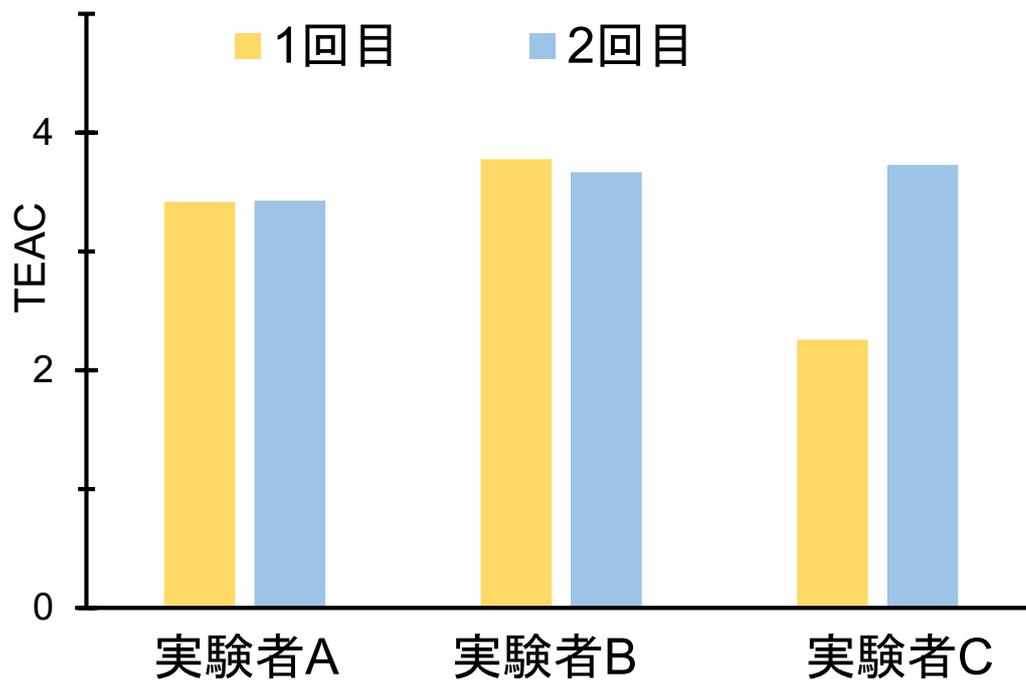
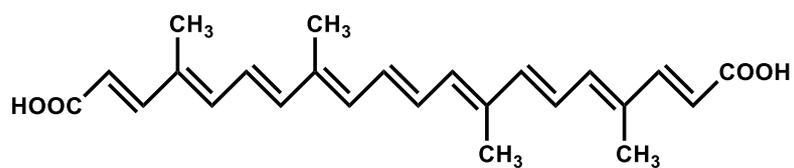
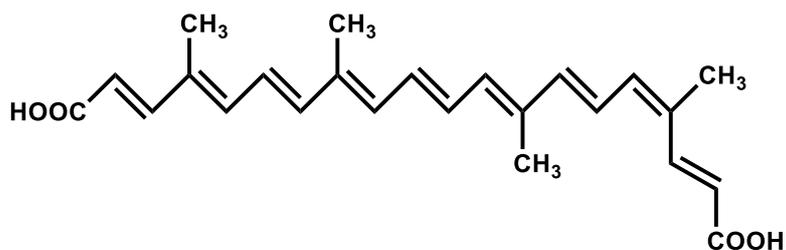


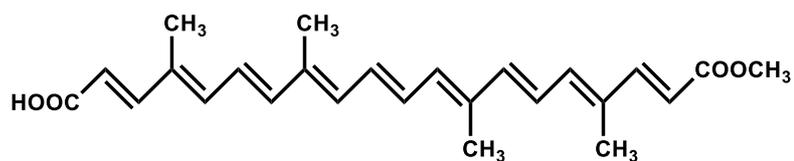
図 11. 実験者 A~C における没食子酸の TEAC  
(黄色 : 1 回目, 青 : 2 回目)



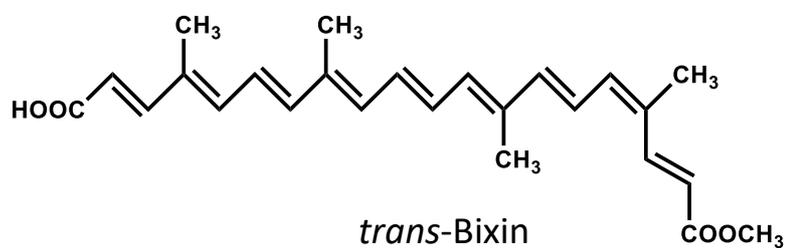
*cis*-Norbixin



*trans*-Norbixin



*cis*-Bixin



*trans*-Bixin

図 12. 分析対象物質の構造式 (幾何異性体)

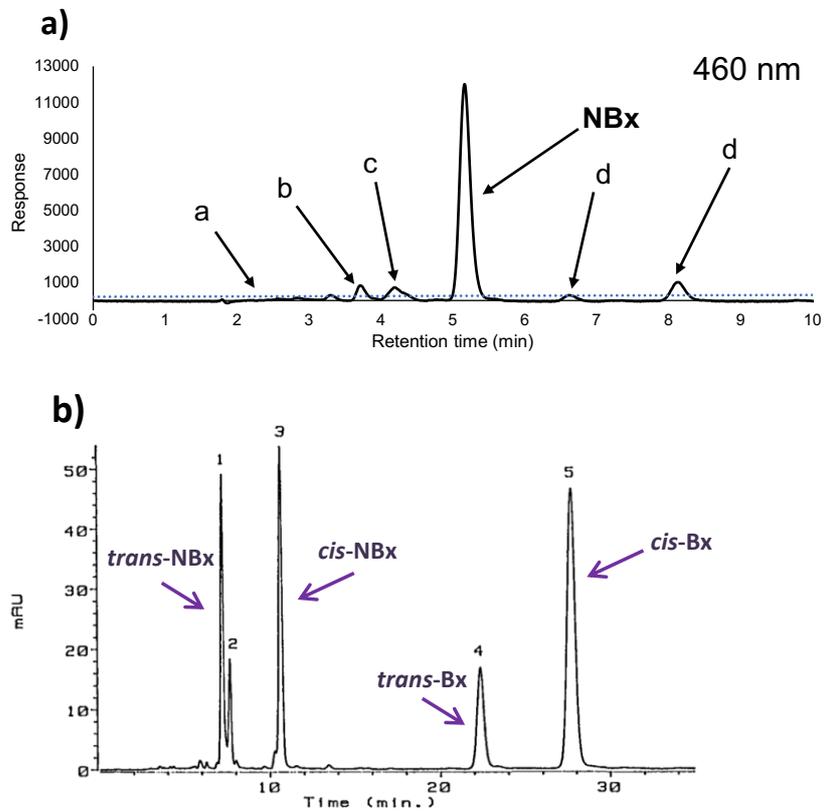


図 13. 幾何異性体 NBx 及び Bx の HPLC クロマトグラム

a) 令和 3 年度報告

b) 既報<sup>19)</sup>の報告

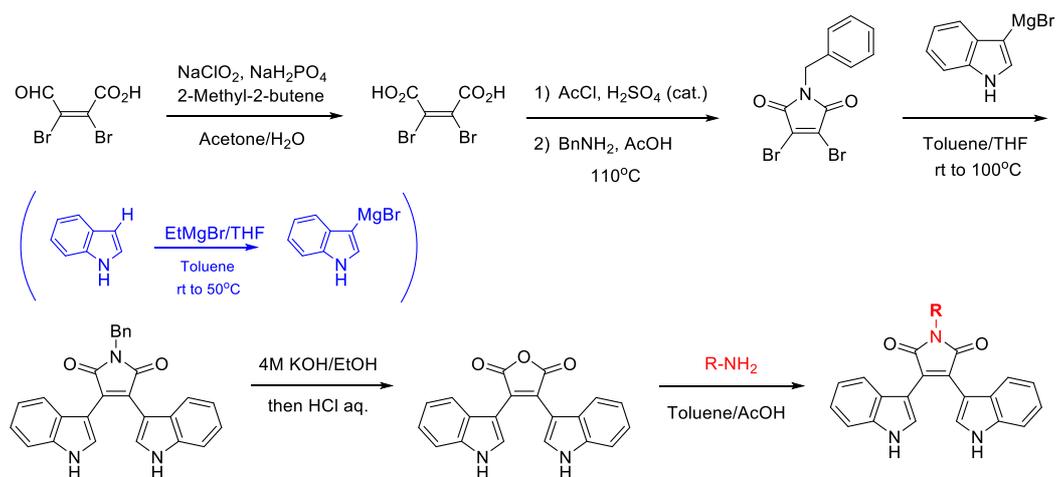


図 14. SR デザインの合成経路

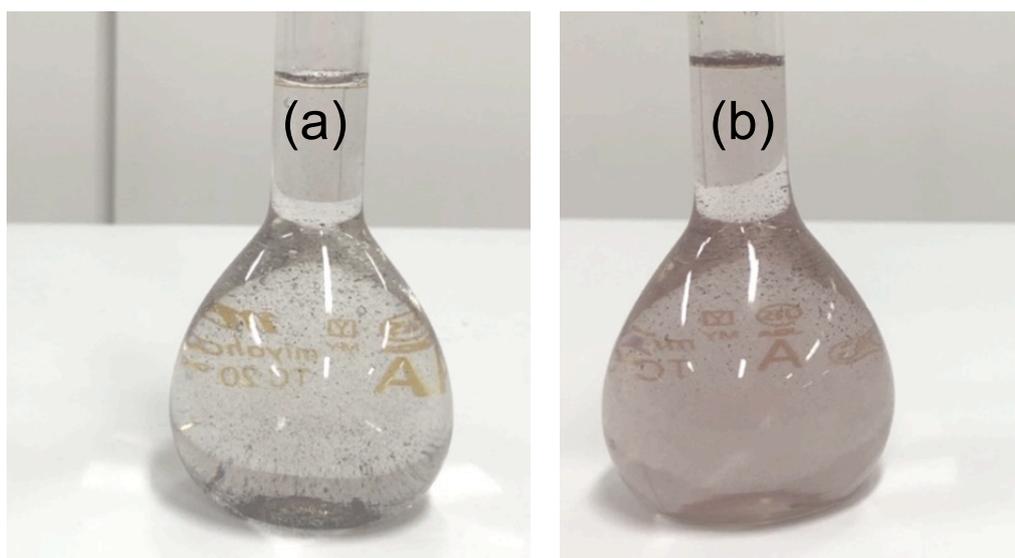


図 15. A 社製 NBx および Bx の確認試験 (1)

(a) NBx, (b) Bx

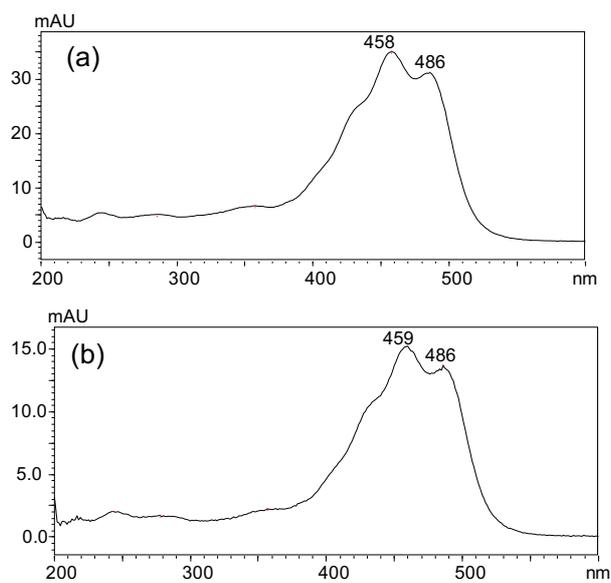


図 16. A 社製 NBx および Bx の確認試験 (2)

(a) NBx, (b) Bx

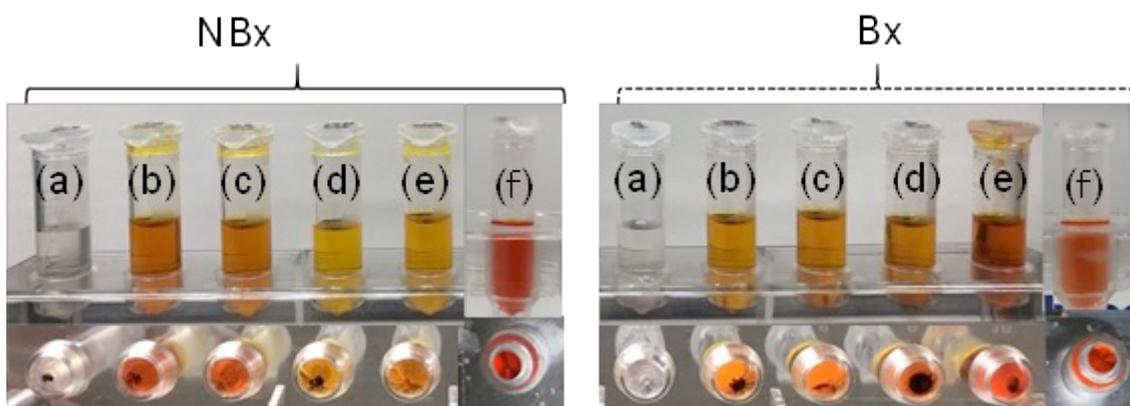


図 17. NBx 及び Bx 標準品の溶解性試験

(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d)アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

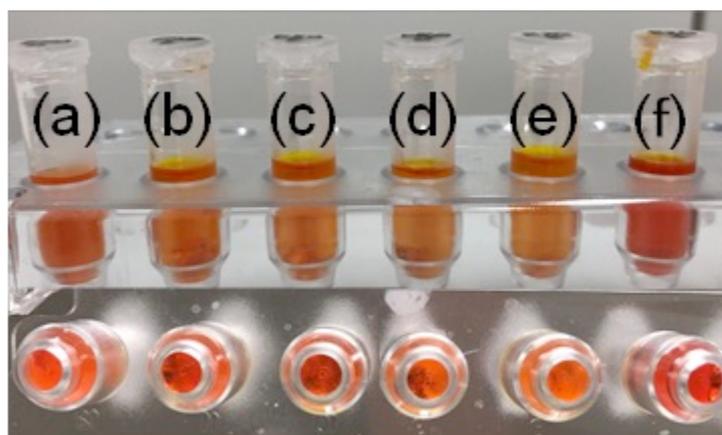


図 18. 水分散性アナトー（アンナット EXG）の溶解性試験  
 (a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d)アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

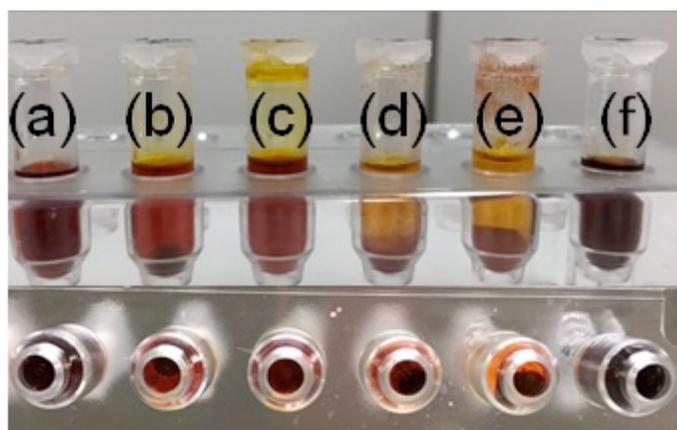


図 19. 水溶性アナトー（アンナット A-200）の溶解性試験  
 (a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール  
 (d)アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

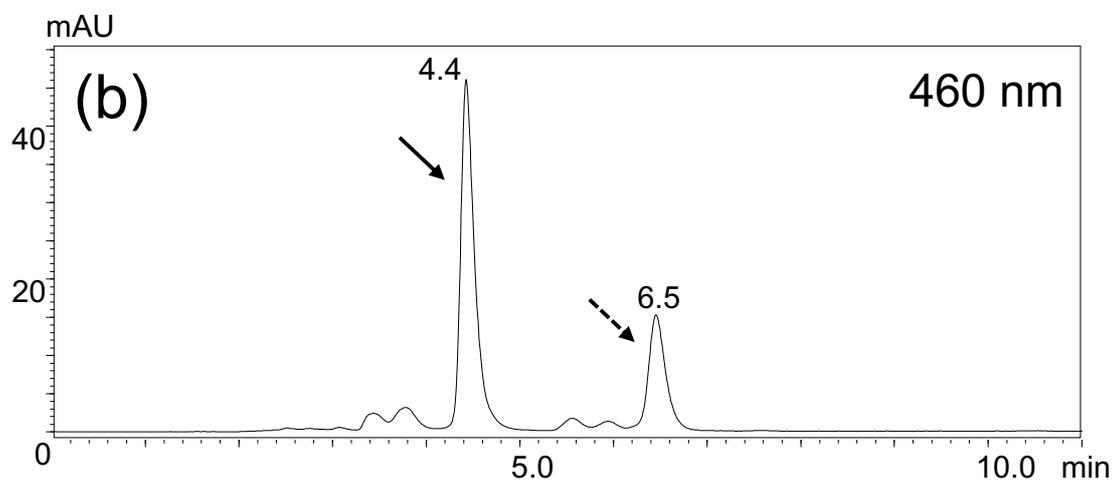
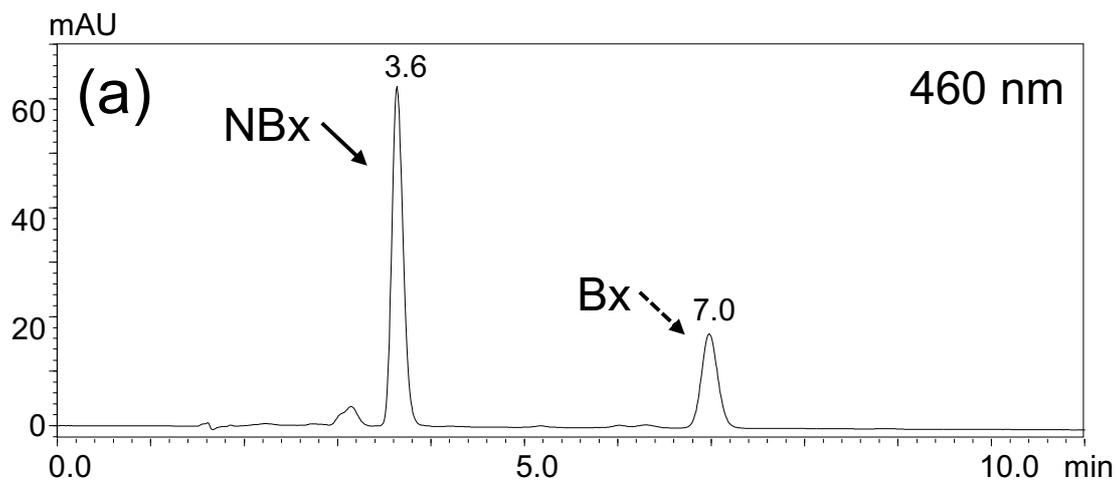


図 20. NBx 及び Bx 混合標準品を用いた移動相溶媒の検討  
(a) 0.1 vol% 酢酸アセトニトリル/0.1 vol% 酢酸水溶液 (80/20, V/V)  
(b) 0.1 vol% 酢酸メタノール/0.1 vol% 酢酸水溶液 (90/10, V/V)

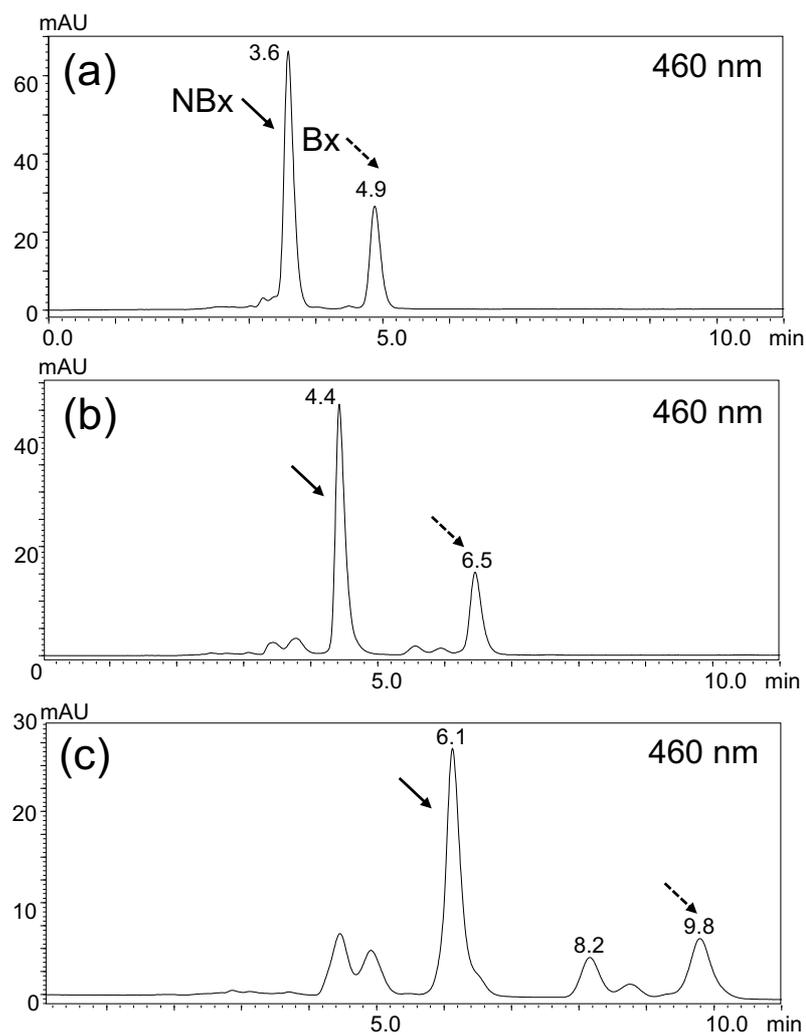


図 21. ノルビキシン及びビキシン混合標準品を用いた分析カラムの検討

(a) TSKgel ODS-100V (サイズ 4.6 mm×150 mm, 粒子径 5.0 μm)

(b) TSKgel ODS-100Z (サイズ 4.6 mm×150 mm, 粒子径 5.0 μm)

(c) TSKgel ODS-80Ts (サイズ 4.6 mm×150 mm, 粒子径 5.0 μm)

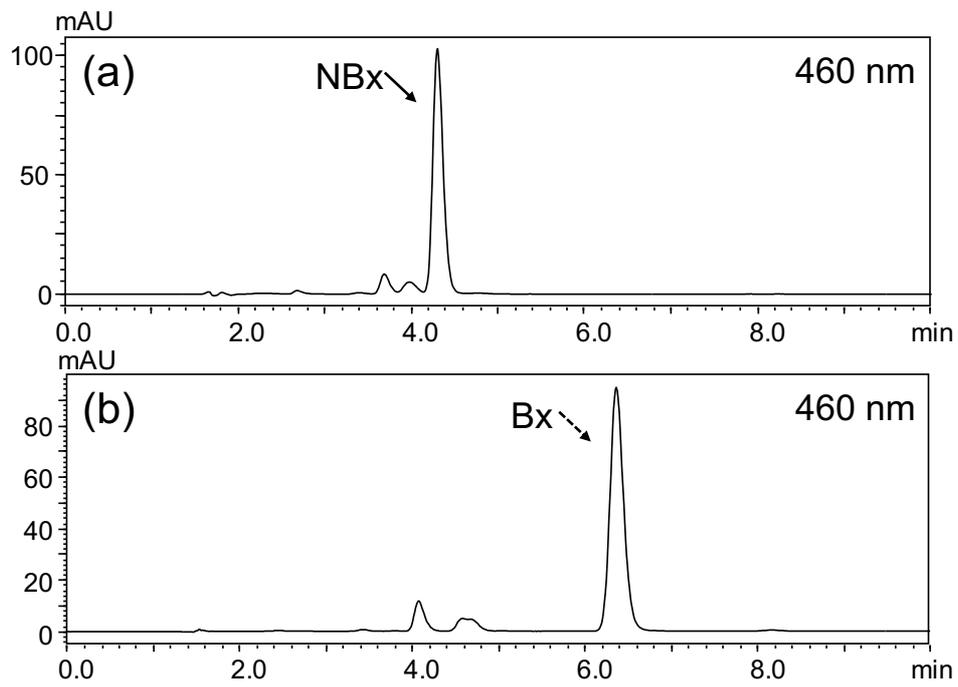


図 22. NBx 又は Bx 標準品の HPLC クロマトグラム (検出波長 460 nm)

(a) NBx, (b) Bx

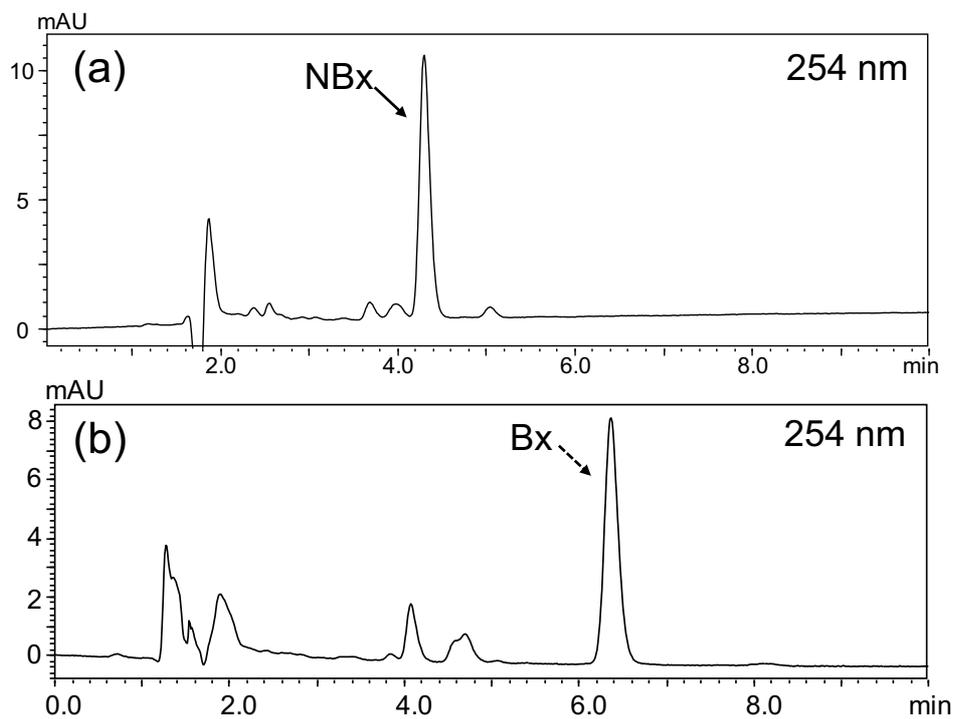


図 23. NBx 又は Bx 標準品の HPLC クロマトグラム (検出波長 254 nm)  
(a) ノルビキシシ, (b) ビキシシ

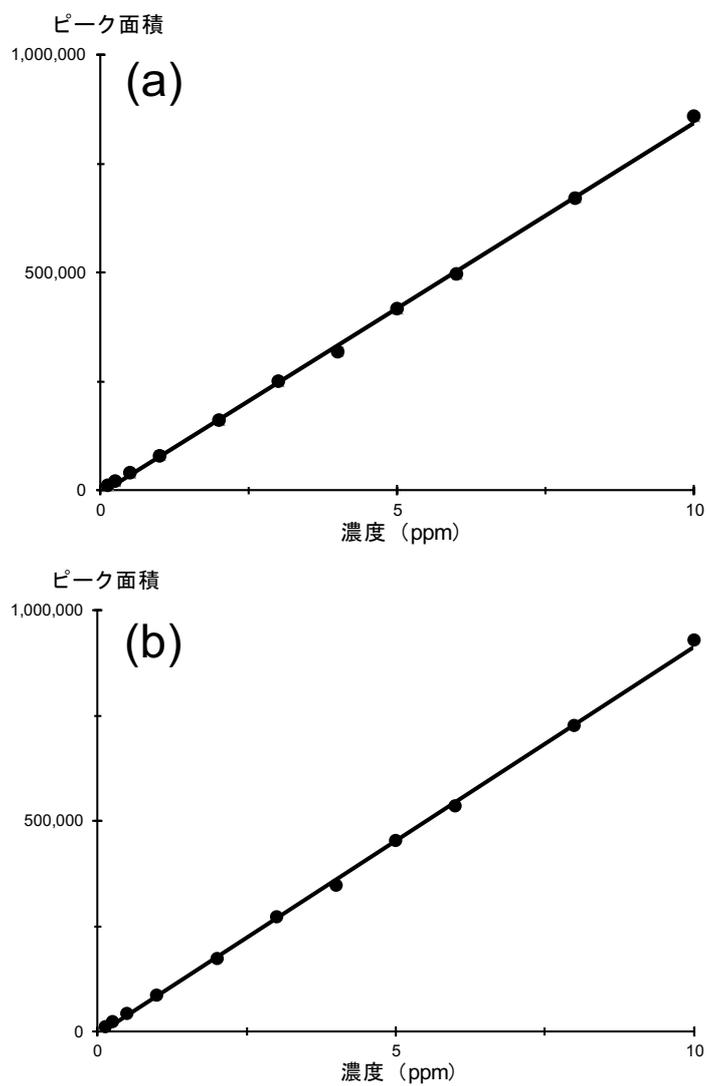


図 24. ノルビキシン及びビキシンの絶対検量線 (LOQ~10 ppm)  
 (a)ノルビキシン ( $y = 085108x - 76556$ , 相関係数 0.999, LOQ = 0.063 ppm)  
 (b) ビキシン ( $y = 85108x - 76556$ , 相関係数 0.999, LOQ = 0.063 ppm)

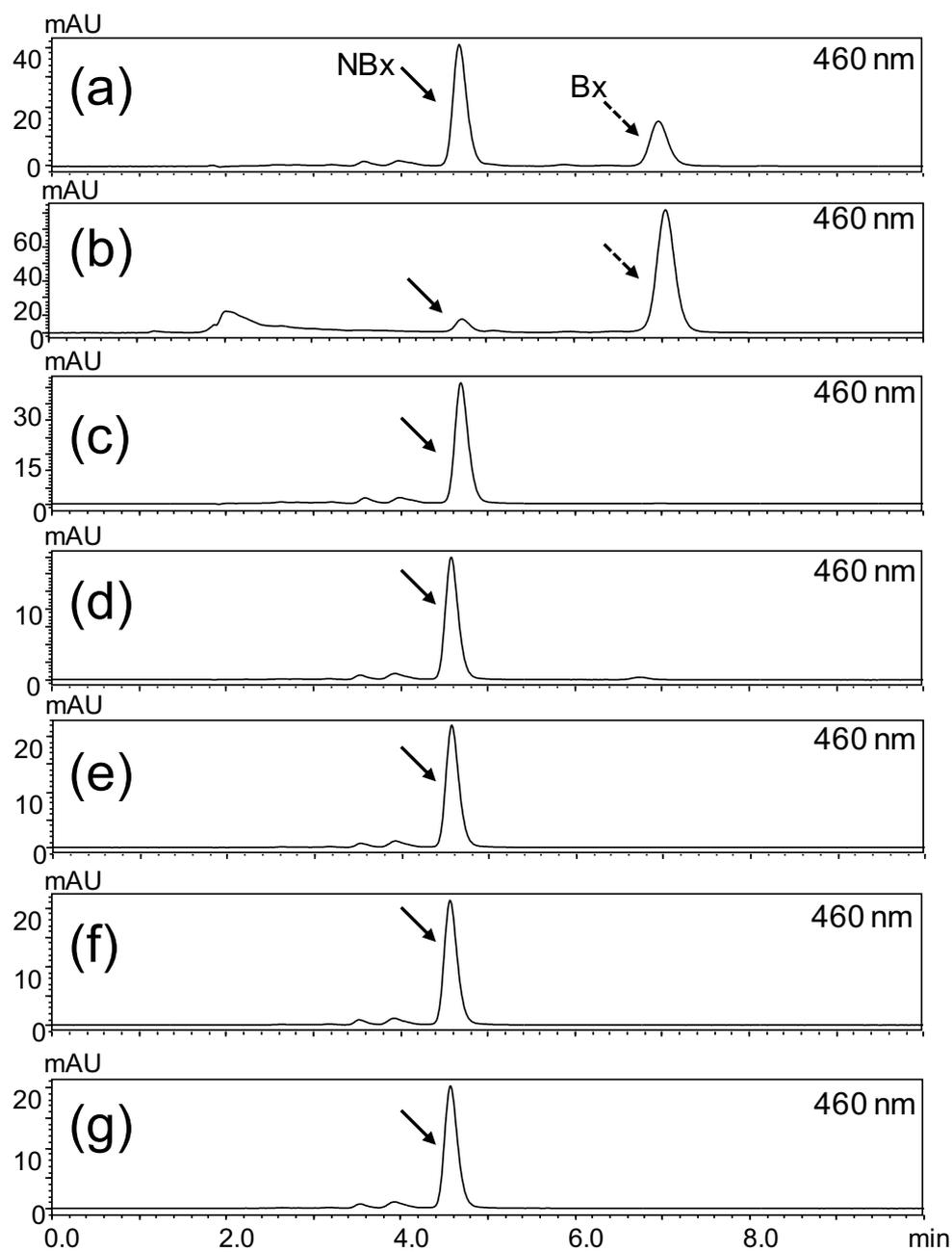


図 25. アナトー色素製剤の HPLC クロマトグラム (検出波長 460 nm)  
 (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品 (b) Bx (A 社製) (c) NBx (A 社製)  
 (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製)  
 (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

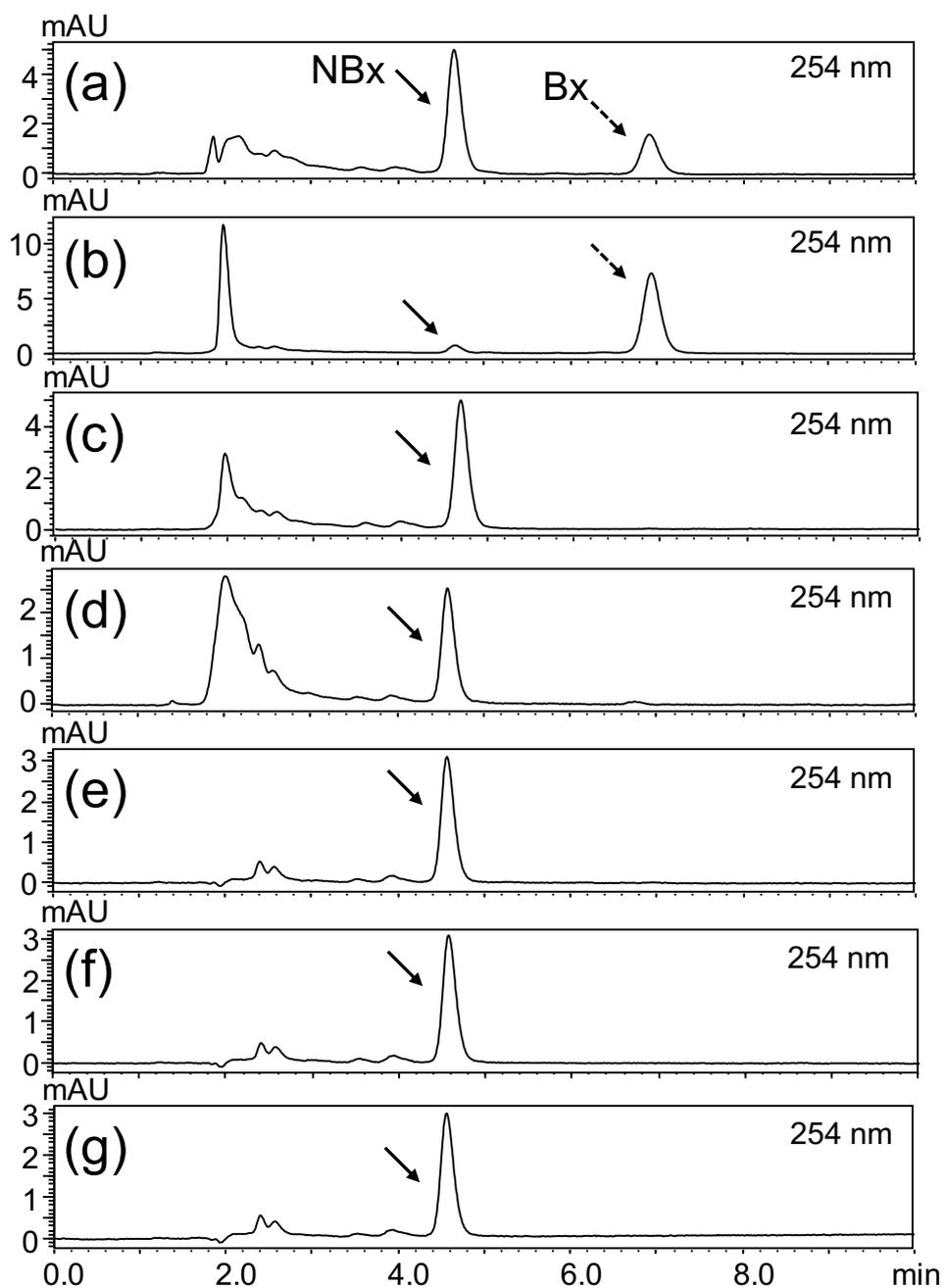


図 26. アナトー色素製剤の HPLC クロマトグラム (検出波長 254 nm)  
 (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品 (b) Bx (A 社製) (c) Nbx (A 社製)  
 (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製)  
 (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

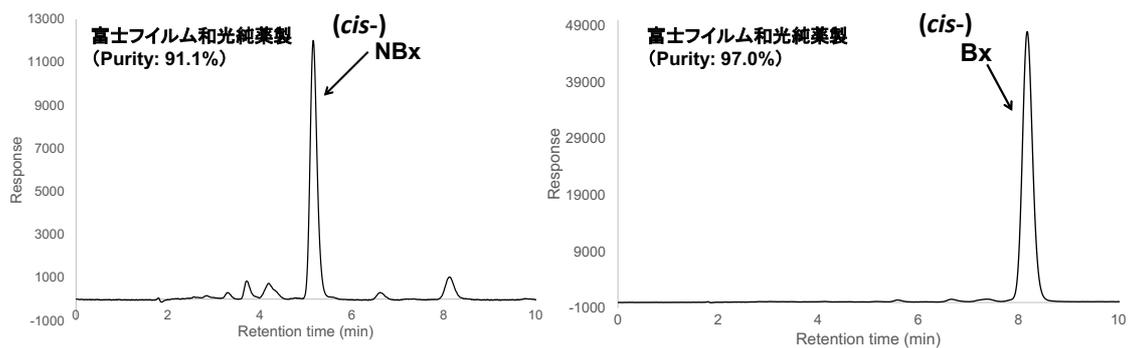


図 27. NBx 及び Bx 標準溶液の HPLC クロマトグラム

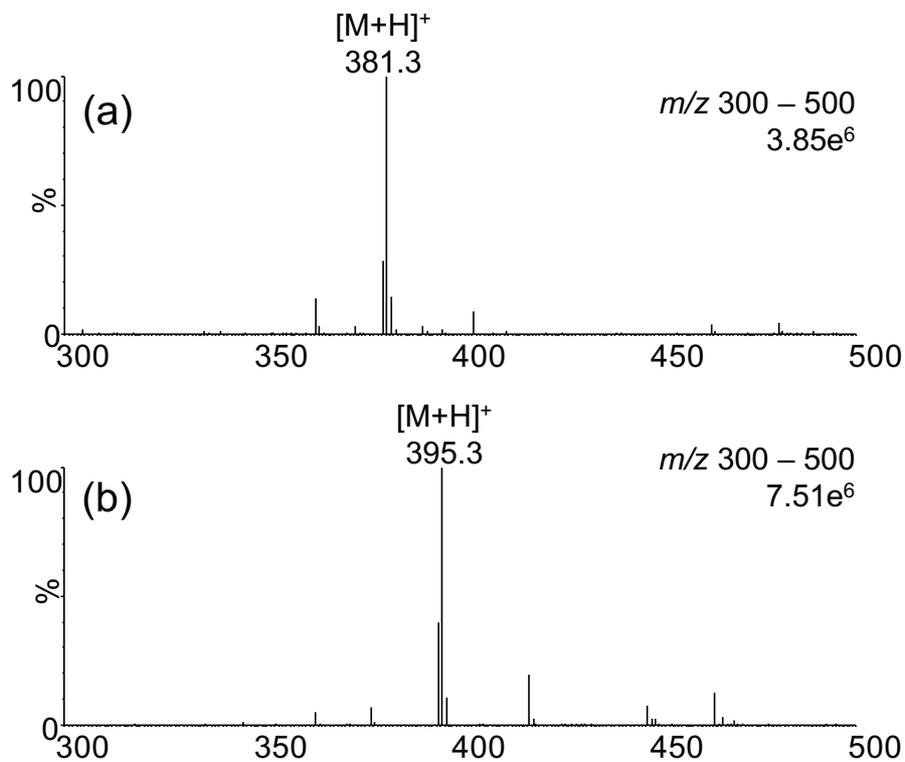


図 28. 標準品の MS スペクトル

(a) NBx, (b) Bx

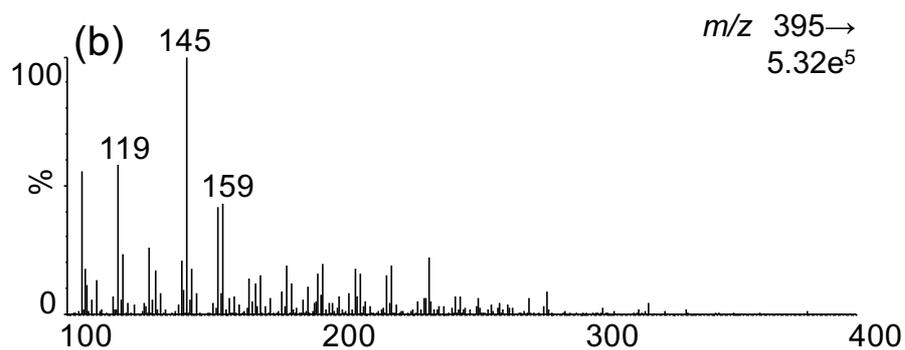
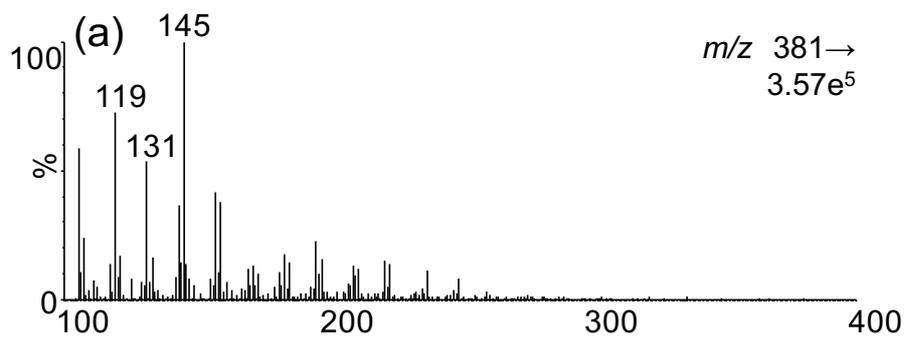


図 29.標準品の MS/MS スペクトル

(a) NBx, (b) Bx

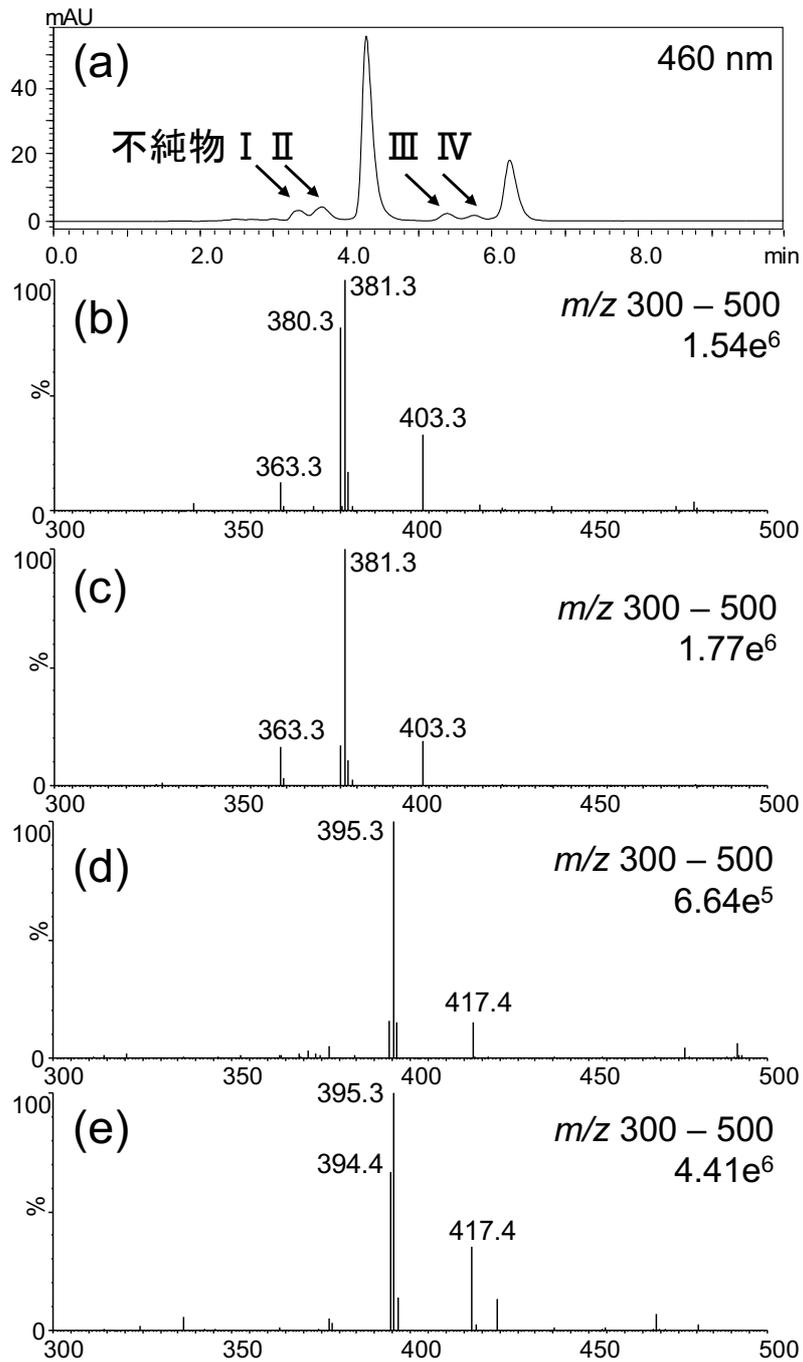


図 30. NBx 及び Bx 混合標準品の HPLC クロマトグラム  
 (検出波長 460 nm) 及び不純物ピークの MS スペクトル  
 (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品  
 (b) 不純物I, (c) 不純物II, (d) 不純物III, (e) 不純物IV

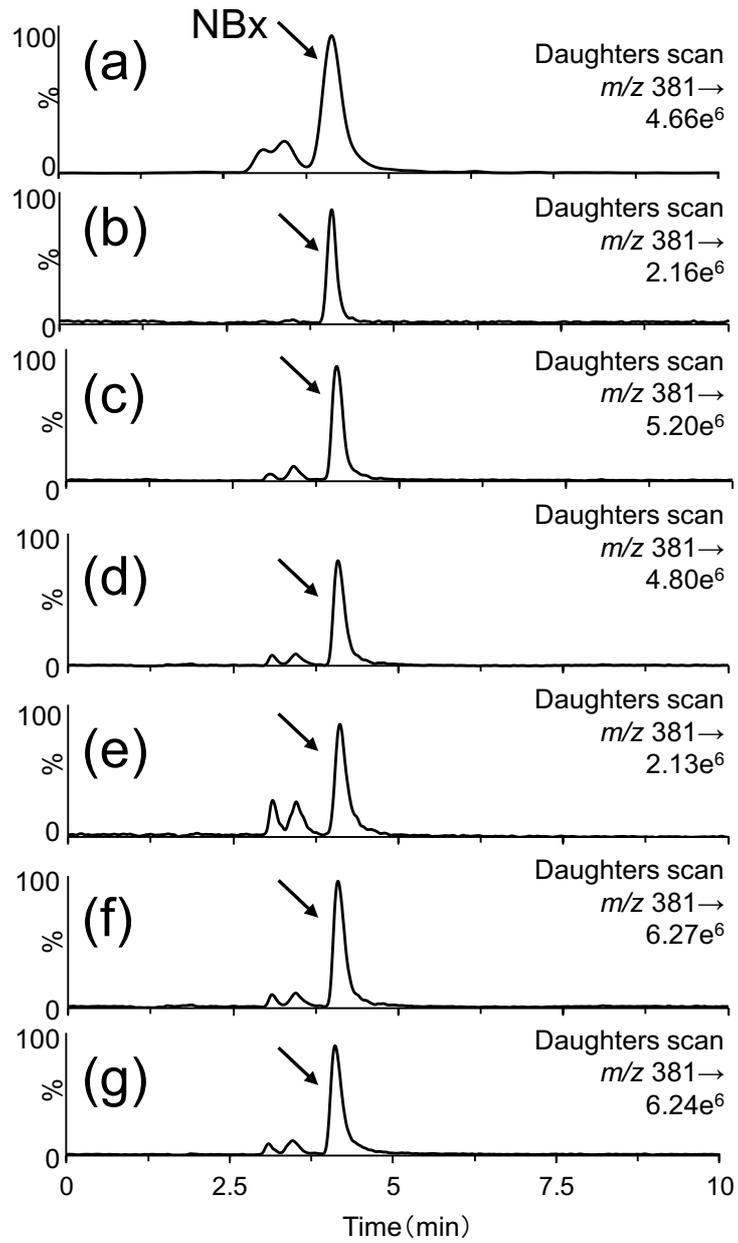


図 31. アナトー色素製剤を用いた NBx の Daughters scan

- (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品 (b) Bx (A 社製) (c) NBx (A 社製)  
 (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製)  
 (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

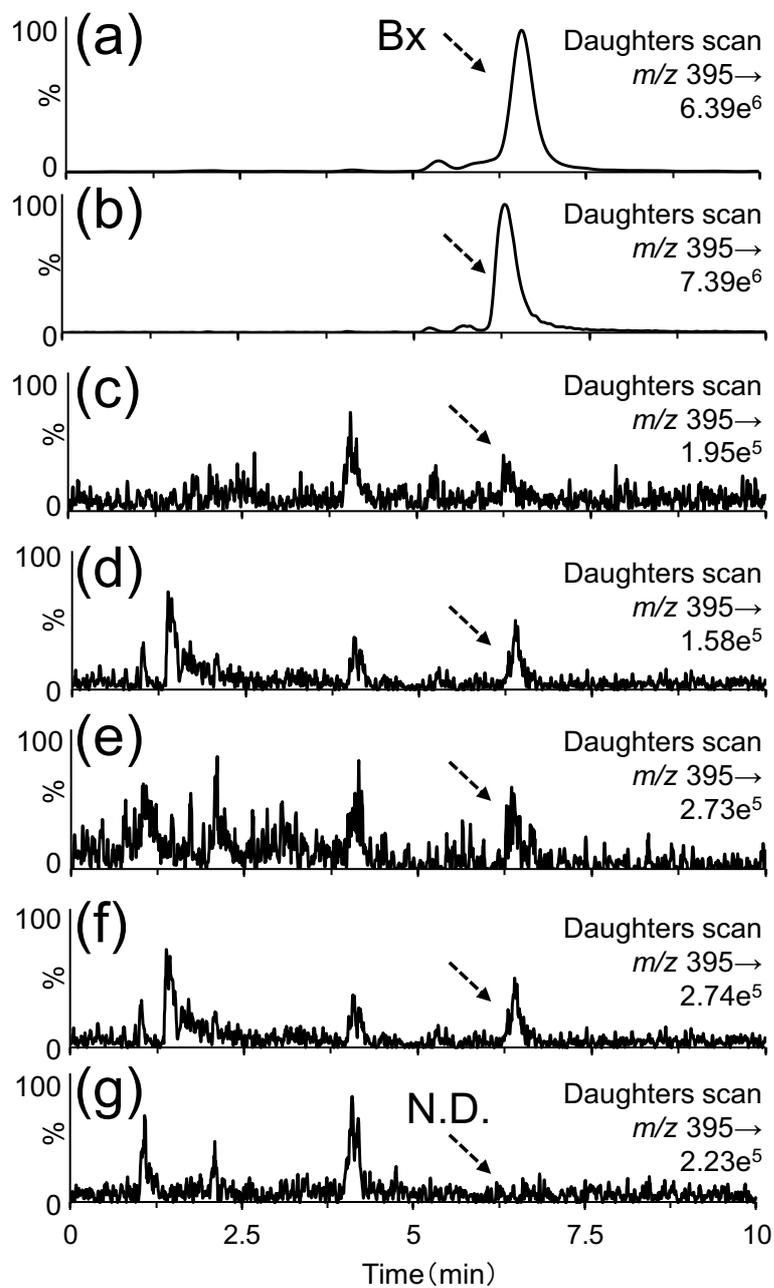


図 32. アナトー色素製剤を用いた NBx の Daughters scan  
 (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品 (b) Bx (A 社製) (c) NBx (A 社製)  
 (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製)  
 (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

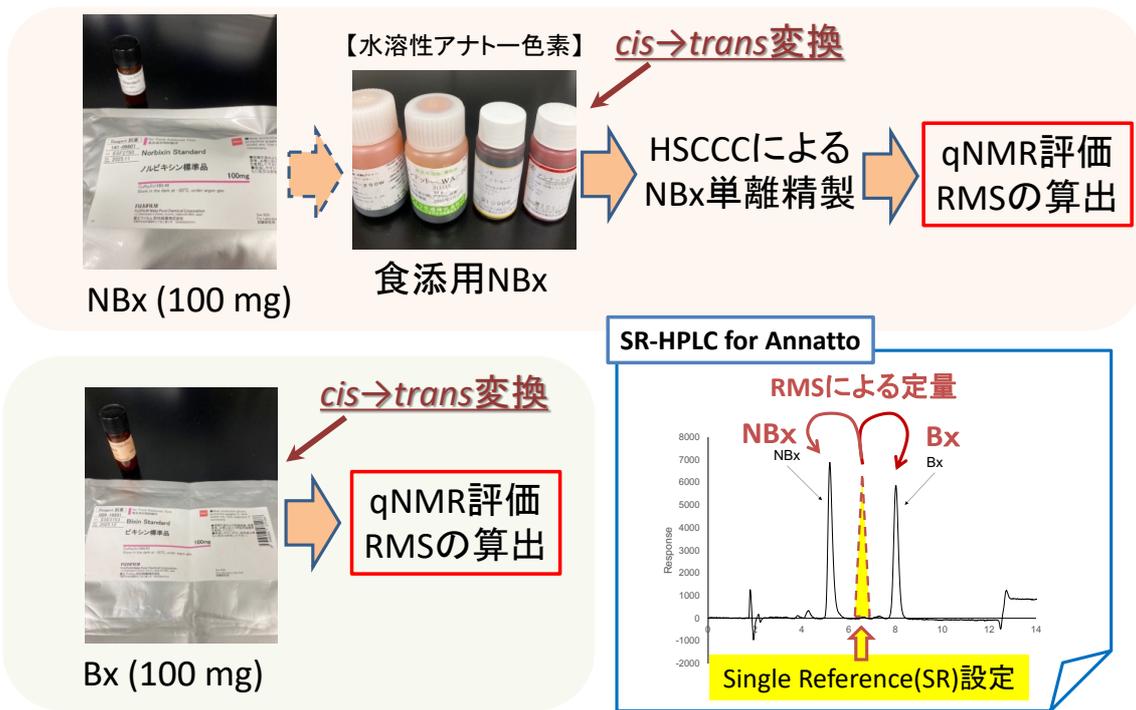


図 33. SR-HPLC によるアナトー色素の分析アプローチ

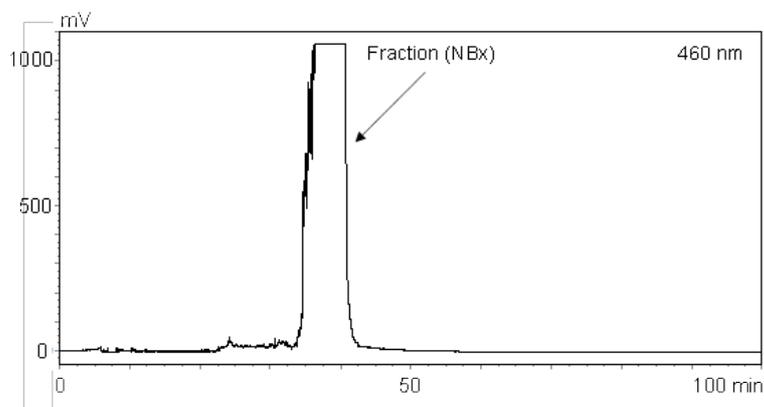


図 34. NBx の HSCCC クロマトグラム

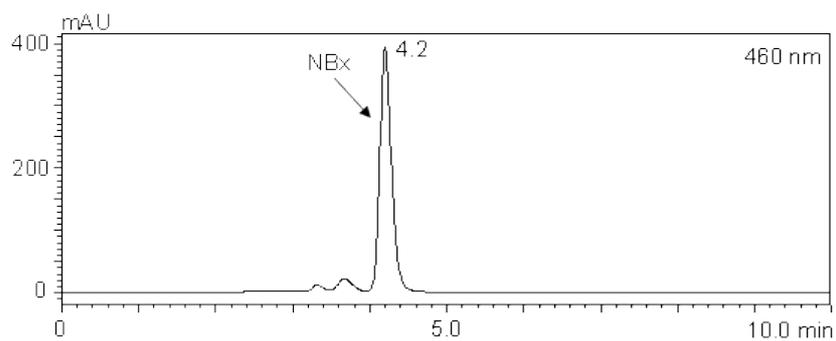


図 35. HSCCC 分画 (NBx) の HPLC クロマトグラム

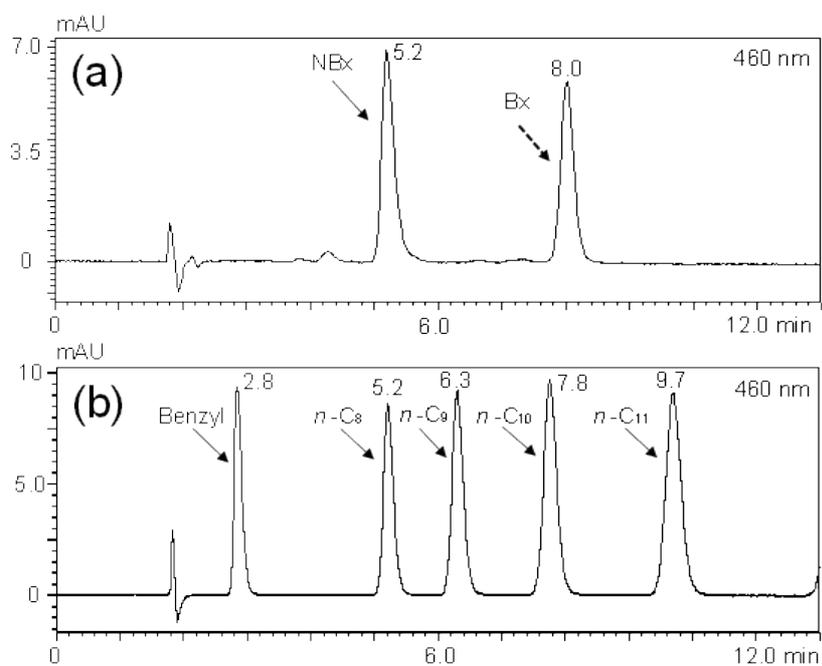


図 36. NBx/Bx 混合溶液及び SR 候補の HPLC クロマトグラム

(a) NBx/Bx 混合溶液

(b) SR 候補の混合溶液

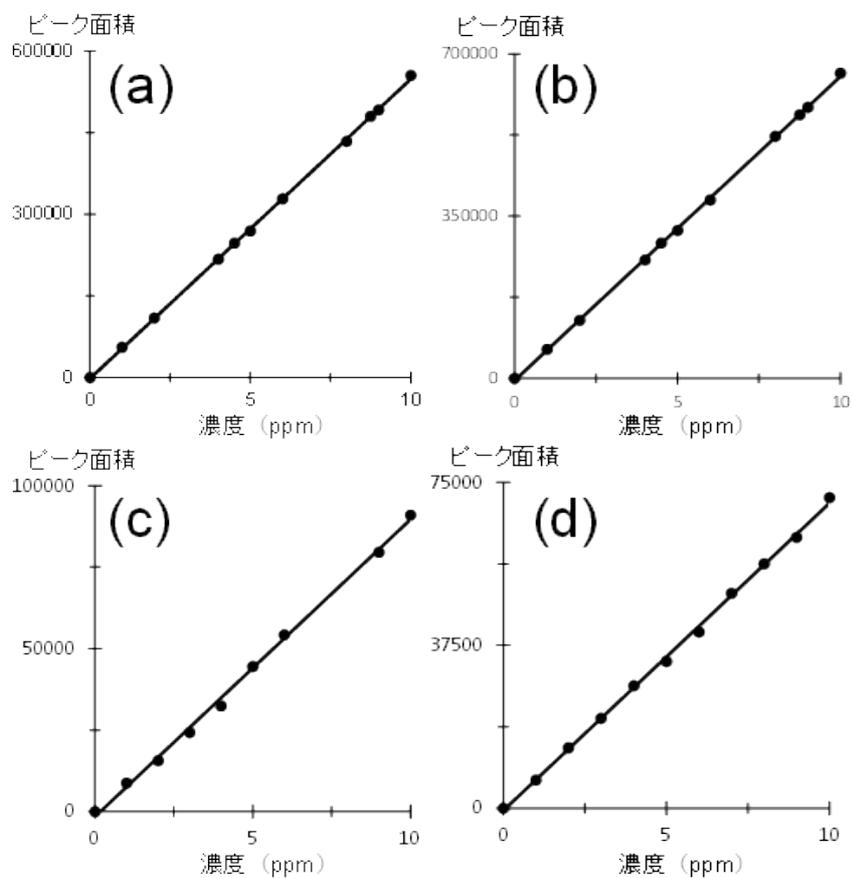


図 37. NBx, Bx,及び SR の検量線

(a) NBx ( $y = 54755x$ , 相関係数 0.999)

(b) Bx ( $y = 64989x$ , 相関係数 0.999)

(c) n-C<sub>9</sub> ( $y = 8893.3x$ , 相関係数 0.997)

(b) n-C<sub>11</sub> ( $y = 6995.9x$ , 相関係数 0.999)

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

表 2. 抗酸化能測定キットの各試薬を調製した場合の TEAC (n=3)

	試薬類			TEAC±S.D.
	トロロックス溶液	DPPH溶液	0.1M Tris-HCl緩衝液	
①	キット	キット	キット	3.42 ± 0.04
②	調製した試料	キット	キット	3.73 ± 0.05
③	キット	調製した試料	キット	3.63 ± 0.18
④	キット	キット	調製した試料	3.56 ± 0.09
⑤	調製した試料	調製した試料	調製した試料	3.67 ± 0.21

表 3. DPPH 法を用いた各既存添加物の TEAC (n=3)

試料	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	TEAC
没食子酸	18.6	3.70
チャ抽出物	24.8	2.78
ターメリック色素	4138	0.016
赤キャベツ色素	4903	0.013
マリーゴールド色素	-	-
クチナシ黄色素	-	-
ベニバナ赤色素	-	-

表 4. ノルビキシン及びビキシン混合標準品を用いた  
移動相中の酢酸濃度の検討 (n=3)

移動相	酢酸 濃度(vol%)	シンメトリー係数		理論段数		分離度
		Bx	NBx	Bx	NBx	
メタノール/水溶液 (90/10, V/V)	0	-	-	-	-	0.72 (3.5)
	0.1	1.14 (1.9)	1.23 (2.6)	5081 (0.5)	3848 (0.8)	6.85 (0.6)
	0.5	1.12 (2.0)	1.24 (3.0)	5084 (1.2)	3765 (0.7)	6.62 (2.8)

表 5. HSCCC の 2 相溶媒の検討項目

	n-ヘキサン	酢酸エチル	メタノール	超純水
↑ 無極性	10	0	5	5
	9	1	5	5
	8	2	5	5
	7	3	5	5
	6	4	5	5
	5	5	5	5
	4	5	4	5
	3	5	3	5
	2	5	2	5
	1	5	1	5
↓ 高極性	0	5	0	5

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2～4年度総合分担報告書

試験法及び分析法の開発

～PDA 検出器の校正用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** 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が求められている。フォトダイオードアレイ（PDA）は広範囲の波長域における吸収を検出できるため、HPLCなどの分析機器の検出器として汎用されている。PDA検出器を用いた定量においては広範囲に吸収をもつ化合物を基準物質とした校正により利便性の向上が期待されるが、現状、PDA校正用として汎用的に使用されている化合物は無い。本研究では、PDA検出器の校正に利用可能な性質、すなわち広範囲における吸収や水溶性といった物理的性質を有する分子の探索を目的とした。具体的には、広波長範囲において吸収を有する分子の探索としてビスアリアルマレイミドやナフトキノンの誘導体合成と吸収スペクトルについて検討した。また、HPLCを用いた定量に利用可能なシングルリファレンス化合物の簡便な設計・合成のための検討を行った。

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

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。フォトダイオードアレイ（PDA）は広範囲の波長域の吸収を一度に検出できることから、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。PDA検出器を利用したHPLCでの定量分析においては検出器の装置間校正が必要となる。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基準物質（シングルリファレンス）を個別に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。しかしながら、現状、そのような化合物は設定されていない。

本研究では、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UV吸収を示す化合物の開発について検討した。本研究における基本的な分子設計としては、異なる波長域に吸収を示すユニットや水溶性向上のためのビルディングブロックなどを複数連結させるという方針で機能化を目指した（Figure 1）。具体的には、①UV吸収を示す化合物の開発として、ビスアリアルマレイミド誘導体や1,4-ナフトキノンの効率的な合成法について検討した。また、②HPLCを用いた定量法に利用可能なシングルリファレンス物質の開発を目的とし、カロテノイド類を定量対象とした、ビスインドリルマレイミド誘導体の合成法について検討した。

## B. 研究方法

### B-1)ビスアリアルマレイミド誘導体の分子設計・合成経路

ビスアリアルマレイミド誘導体においては、マレイミド骨格に導入する芳香環の種類によって紫外可視吸収（UV-Vis）スペクトルが変化する。複数種類の芳香環を導入した誘導体を効

率的に合成するために、Scheme 1 および 2 に示すような、共通中間体 **3** を経由した鈴木-宮浦クロスカップリング反応<sup>1,2)</sup>によってアリールボロン酸を導入する合成計画を立てた。

## B-2) ナフトキノン誘導体の分子設計・合成経路

本研究で検討したナフトキノン誘導体については、寺山らが報告している、比較的長波長域に UV 吸収を示す 1,4-ナフトキノン誘導体 **21**<sup>3)</sup> を基にして誘導体化を実施した。具体的には、基となる **21** 中の 1)ジメチルアミノ基を種々変更したタイプの化合物、また、2)クロロ基を別の官能基に変更したタイプの化合物を設計した。Scheme 3~7 にそれぞれの合成経路を示している。

## C. 結果及び考察

### C-1) ビスアリールマレイミド誘導体の合成 (各化合物データは R2 報告書に記載)

本研究においては効率的に多種類の誘導体を合成するため、共通の中間体を利用し、一つのカップリング反応の系中に複数種類のアリールボロン酸を共存させて反応を行った (Scheme 1, 2)。この手法により、生成した誘導体を分離することで、多種類の化合物を同時に得ることが可能となった (Figure 2, 3)。

#### 化合物 **3** の合成

ムコブROM酸 (**1**) (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、溶液硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた粗生成物 **2** (6.2 g) はこれ以上精製せずに次の反応に用いた。

化合物 **2** (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、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 1 : 3) することで、化合物 **3** を無色固体 (1.44 g, 46%) の収率で得た。

#### 化合物 **4** の合成

化合物 **3** (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 **4** を 79% (126 mg) の収率で得た。

#### 化合物 **5** の合成

化合物 **3** (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、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 = 10:0 to 8:2）することで、化合物 **5** を 97% (0.43 g) の収率で得た。

#### 化合物 **6** の合成

化合物 **4** (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 **6** を黄色固体 (45 mg) として得た。

#### 化合物 **7** の合成

化合物 **5** (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 **7** を淡黄色固体 (250 mg) として得た。

#### 化合物 **10** の合成

4-ブロモアニリン (**8**) (1.72 g, 10.0 mmol) の 1M 塩酸溶液 (20 mL) に 0°C にて、亜硝酸ナトリウム (0.73 g, 10.5 mol) の水溶液 (2 mL) を 0°C にて滴下した。反応液をそのままの温度で 15 分間攪拌した後、*N,N*-ジメチルアニリン (1.33 g, 11.0 mmol)、次いで酢酸ナトリウム (1.33 g, 11.0 mmol) の水溶液 (10 mL) およびメタノール (5 mL) を加えた。反応液を室温にて 3 時間攪拌した後、水 (20 mL) およびメタノール (5 mL) を加えた。生じた沈殿をろ取して水 (50 mL)、次いでメタノール (5 mL) で洗浄し真空乾燥することで化合物 **9** を橙色粉末として得た (2.58 g, 85%)。

化合物 **9** (1.22 g, 4.0 mmol) の 1,4-ジオキサン溶液 (40 mL) にビス(ピナコラート)ジボロン (1.42 g, 5.6 mmol)、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィン)フェロセン]ジクロロパラジウム (II) -ジクロロメタン複合体 (0.33 g, 0.4 mmol)、酢酸カリウム (0.86 g, 8.8 mmol) を加えた後、90°C にて 14 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、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 ( $\Phi = 8.5$  cm,  $h = 3$  cm, ヘキサン：酢酸エチル = 9:1 to 4:1) することで、化合物 **10** を 89% (1.23 g) の収率で得た。

#### C-2) ビスアリールマレイミド誘導体の一斉合成 (各化合物データは R3 報告書に記載)

##### 化合物 **15-20** の合成

化合物 **3** (173 mg, 0.5 mmol)、フェニルボロン酸 (46 mg, 0.4 mmol)、6-メトキシナフチル-2-ボロン酸 (81 mg, 0.4 mmol)、化合物 **10** (140 mg, 0.4 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 (18 mg, 0.025 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (0) (29 mg, 0.025 mmol)、フッ化セシウム (90%, 405 mg, 2.4 mmol) の 1,4-ジオキサン (4.5 mL) /水 (0.5 mL) 溶液を 100°C にて 15 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、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣のエタノール溶液 (4 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (2 mL) を加え、40°C にて 4 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暗紫色粉末 (300 mg) を得た。この化合物 (150 mg, as 0.25 mmol) と化合物 **13** (73 mg, 0.25 mmol) のトルエン (1.9 mL) /DMF (0.1 mL) 溶液 (1.9 mL) を 100°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、1M 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 (ヘキサン：酢酸エチル = 9:1 to 0:1) に付すことで、化合物 **14** を得た。この化合物 (70 mg, as 0.125 mmol) を 4M 塩酸-ジオキサン溶液 (2 mL) /メタノール (0.5 mL) に溶解させ、室温にて 12 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣を分取 HPLC にて精製し、化合物 **15-20** を得た。

#### C-3) ナフトキノン誘導体の合成 (各化合物データは R4 報告書に記載)

ジメチルアミノ基を種々変更したタイプのナフトキノン誘導体は、共通の合成前駆体である 2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (**32**) に対して、アミンもしくはフェノール化合物を反応させることで合成した。また、クロロ基を変更したタイプのナフトキノン誘導体は、基本的にはクロロ基をそれぞれの置換基に置き換えた前駆体に対して *N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミンを反応させることで調製することができた。

### C-3-1) ジメチルアミノ基置換体の合成

#### 化合物 **21** の合成

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (**32**) (227 mg, 1.0 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (7 mL) に室温にて、*N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミン (143 mg, 1.05 mol) のテトラヒドロフラン溶液 (3 mL)、続いて炭酸ナトリウム (223 mg, 2.10 mmol) を加えた。反応液を 18 時間攪拌した後、減圧濃縮して大部分のテトラヒドロフランを除去し、酢酸エチル (40 mL) で希釈して水、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 2 : 8) することで、化合物 **21** を黒色粉末として得た (190 mg, 58%)。

#### 化合物 **22** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、アニリンを使用し、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 4 : 6) することで、化合物 **22** を淡赤色粉末として得た (収率 16%)。

#### 化合物 **23** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、4-ニトロアニリンを使用し、得られた残渣をジクロロメタンで洗浄することで、化合物 **23** を赤茶色固体として得た (収率 43%)。

#### 化合物 **24** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、*p*-アニシジンを使用し、水相中に生じた沈殿物を水、次いでジエ

チルエーテルで洗浄、真空乾燥することで化合物 **23** を暗褐色固体として得た (収率 76%)。

#### 化合物 **25** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、*p*-メトキシフェノールを使用し、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 4 : 6) することで化合物 **25** を暗褐色固体として得た (収率 86%)。

#### 化合物 **26** の合成

化合物 **21** と同様の方法にて、4-ジメチルアミノベンジルアミン二塩酸塩を使用し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン : 酢酸エチル = 9 : 1 to 2 : 8) することで、化合物 **26** を暗褐色固体として得た (収率 49%)。

### C-3-2) クロロ基置換体の合成

#### 化合物 **27** の合成

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (**32**) (1.14 g, 5.0 mmol) のメタノール懸濁液 (6.7 mL) に室温にて、亜硝酸ナトリウム (1.14 g, 16.5 mol) の水溶液 (8 mL) を滴下した。反応液を 70°C にて 4 時間、その後室温にて 12 時間攪拌した。反応液に水 (15 mL) を加え、生じた固体を濾取して水 (10 mL) で洗浄、真空乾燥した。一方、生じた水相を 2M 塩酸で酸性 (pH2) としてジエチルエーテル (30 mL) で抽出、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。それらを合わせて化合物 **33** を黄色固体として得た (1.01 g, 92%)。 **33** (440 mg, 2.0 mmol) のジクロロメタン懸濁液 (20 mL) に、室温にて塩化オキサリル (343  $\mu$ L, 4.0 mmol)、次いで *N,N*-ジメチルホルムアミド (1 drop) を加えた。室温にて 1 時間攪拌後、反応液を 0°C に冷却した後、氷水 (10 mL) を加えて 5 分間攪拌することで反応を停止させた。反応液をジクロロメタン (20 mL) で抽出し、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、濾液を減圧濃縮することで化合物 **34** を粗生成物として得た (淡黄色固体, 460 mg)。得られた化合物 **34** を用い、化合物 **1** と同様の方法にて反応させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン : 酢

酸エチル = 9 : 1 to 2 : 8) することで、化合物 **27** を暗褐色固体として得た (収率 76% for 2 steps).

#### 化合物 **28** の合成

1,4-ナフトキノン (**35**) (3.16 g, 20.0 mmol) の酢酸懸濁液 (30 mL) に室温にて、臭素 (6.39 g, 40.0 mol) の酢酸溶液 (20 mL) を加えた。反応液を 100°C にて 14 時間攪拌した後、0°C に冷却して氷水 (50 mL) を加えた。生じた沈殿物を濾取して水 (100 mL) で洗浄、真空乾燥することで化合物 **36** を黄褐色粉末として得た (5.94 g, 94%)。得られた化合物 **36** を用い、化合物 **21** と同様の方法にて反応させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン : 酢酸エチル = 9 : 1 to 2 : 8) することで、化合物 **28** を黒色固体として得た (収率 97%)。

#### 化合物 **29** の合成

化合物 **28** (74 mg, 0.2 mmol)、フェニルボロン酸 (37 mg, 0.3 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 (7 mg, 0.01 mmol)、炭酸セシウム (195 mg, 0.6 mmol) のトルエン (2.6 mL) / 水 (1.3 mL) 溶液を 100°C にて 15 時間攪拌した。室温に冷却後、反応液を酢酸エチル (26 mL) で希釈し、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、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 2 : 8) することで、化合物 **29** を濃紫色無定形固体として得た (29 mg, 39%)。

#### 化合物 **30** の合成

化合物 **21** (227 mg, 1.0 mmol) のテトラヒドロフラン懸濁液 (2 mL) に室温にて、ナトリウムメトキシド (5M in MeOH, 0.8 mL, 4.0 mol) を加えた。反応液を 60°C にて 14 時間攪拌した後、室温に冷却して酢酸エチルで希釈し、水、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 : 2) することで、化合物 **30** を黒色粉末として得た

(76 mg, 26%)。

#### 化合物 **31** の合成

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (**32**) (1.14 g, 5.0 mmol) のメタノール懸濁液 (20 mL) に室温にて、ナトリウムメトキシド (5M in MeOH, 6 mL, 30.0 mol) を滴下した。反応液を 60°C で 5 時間攪拌した後、室温まで冷却後に減圧濃縮して大部分のテトラヒドロフランを除去した。得られた残渣を 0°C に冷却後、氷水 (20 mL) を加え、生じた沈殿物を濾取して水、次いで少量のメタノールで洗浄、真空乾燥することで化合物 **37** を黄金色粉末として得た (440 mg, 40%)。

化合物 **37** (109 mg, 0.5 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (1 mL) に室温にて、*N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミン (136 mg, 1.0 mmol)、炭酸ナトリウム (212 mg, 2.0 mmol) を加えた。反応液を室温にて 7 日間攪拌した後、酢酸エチルで希釈し、水、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 2 : 8) することで、化合物 **31** を濃青色固体として得た (31 mg, 19%)。

#### C-4) シングルリファレンス候補化合物としてのビスインドリル誘導体の合成 (各化合物データは R4 報告書に記載)

##### 化合物 **33** の合成<sup>4)</sup>

インドール (1.03 g, 8.8 mmol) のトルエン溶液 (14 mL) に、攪拌下、室温にてエチルマグネシウムブロミド (1M in THF, 8.8 mL, 8.8 mmol) を 5 分間かけて滴下した後、50°C にて 1 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、化合物 **18** (690 mg, 2.0 mmol) のトルエン溶液 (14 mL) を滴下し、反応液を 100°C にて 14 時間攪拌した。反応液を 0°C に冷却し、2M 塩酸 (28 mL) を加えて反応を停止させ、酢酸エチル (56 mL) で抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をジクロロメタン/メタノール混液 (19 : 1, v/v) に懸濁させ、沈殿物を濾取して真空乾燥す

ることで化合物 **33** を赤色固体として得た (600 mg, 72%).

#### C-5)ビスインドリル誘導体の一斉合成の例

本研究における検討の途上において、Figure 8 に示すようなビスインドリル化合物 **33** がピキシンなどのカロテノイド化合物と類似の吸収帯 (460 nm 付近) を示すことが確認されたため、この分子を母骨格として選択した。対応する酸無水物 **34** と反応させるアミンを 1:1 の割合で脱水-閉環させることでイミド化合物を調製できた。またこの際、異なる複数種類のアミンを一度に反応させることで、一度の合成で異なる炭化水素側鎖を有する分子の混合物を得ることができた。これらの混合物は順相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーで全ての化合物を分離することは困難であった一方で、逆相 HPLC においては、各化合物を良好に分離することが可能であり、この合成法を利用することで、HPLC 上における保持時間の異なる分子をスクリーニング的に調製することができることが分かった (Scheme 8)。

#### 化合物 **35a** および **35b** の合成

化合物 **33** (417 mg, 1.0 mmol) のエタノール懸濁液 (4 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (2 mL) を加えて、40°C にて 4 時間攪拌した。反応液を 0°C に冷却し、10%塩酸 (8 mL) を加えて液性を酸性 (pH1~2) とした後、ジクロロメタン (20 mL x 2) で抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮することで化合物 **34** を赤色固体として得た (300 mg)。この化合物はこれ以上精製せずに次の反応に使用した。化合物 **34** (33 mg, 0.1 mmol) のトルエン (0.9 mL) /酢酸溶液 (0.1 mL) に、室温にて *n*-オクチルアミン (8.3  $\mu$ L, 0.05 mmol)、ノニルアミン (9.1  $\mu$ L, 0.05 mmol) を加え、反応液を 110°C にて 12 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、酢酸エチル (20 mL) で希釈し、1M 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上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。残渣を逆相 HPLC にて精製し、化合物 **35a** (7 mg, 32%) お

よび **35b** (6.5 mg, 29%) を赤色無定形固体としてそれぞれ得た。

#### C-6) ビスアリアルマレイミド誘導体の UV-Vis スペクトル

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。ナフチル基が導入されて共役系が拡大された化合物 **6** は、より長波長域に吸収を示すことを期待したが長波長化は確認されなかった (Figure 4B)。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のみでは吸収スペクトルの長波長化は困難であることが示唆された。一方、電子供与基であるメトキシ基を有する化合物 **7** においては吸収の強度は弱いものの、スペクトルにおける吸収の長波長化が確認された (Figure 4C)。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た。この知見を基に他の官能基を有する芳香環が導入された誘導体についても合成を行い、そのスペクトルを確認した。その結果、Figure 5 に示すような 4-ジメチルアミノアゾベンゼンを有する誘導体 **18-20** においては 550 nm 付近まで吸収帯が延長していることが分かった。このことからビスアリアルマレイミド誘導体においては電子供与基を芳香環に導入することで吸収波長の長波長化が可能であることが分かった。

#### C-7) 1,4-ナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル

合成したナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル (ジメチルスルホキシド中) を取得したところ、化合物に導入した芳香環上の置換基によりスペクトルが変化することが分かった。化合物 **21** においては、UV-Vis スペクトルにおいて 564 nm 付近に長波長側のピークトップがあることが確認された (Figure 6)。化合物 **21** の 4-ジメチルアミノ基を置換した **22** や **23** において

は、長波長域のピークトップがそれぞれ短波長側へとシフトすることが分かった。ジメチルアミノ基とは異なる電子供与基であるメトキシ基を有する **25** においても、**21** よりも短波長側にピークトップを示すことが確認された。また、アニリンではなくフェノール分子が導入された **25** や、ジメチルアニリンとナフトキノ骨格との間の共役系が途切れた構造の **26** との吸収スペクトルとの比較からも、長波長域における吸収にはジメチルアニリンとナフトキノの直接の連結構造が重要であることが分かった。また、化合物 **21** のクロロ基を置換したタイプの誘導体においても一定の置換基効果が現れていることが確認された (Figure 7)。そのため、置換基のさらなる検討によってさらなるスペクトルの長波長化や機能化が可能であると予想される。

#### C-8) シングルリファレンス候補化合物の HPLC 上における分離

合成したビスインドリル誘導体を逆相 HPLC で分析したところ、導入した炭化水素鎖の長さに応じた順序にて溶出しており、クロマトグラム上でそれぞれを良好に分離することが可能であった。Figure 9 には、**33** と C8~C12 までの直鎖炭化水素側鎖を有する第一級アミンを反応させたビスインドリル誘導体 (**35a**–**35e**) の混合物の HPLC による一斉分析の結果を示している。この結果からも、本研究における合成法によって多種の化合物を一度に得ることが可能であり、定量の対象となる分子と異なる保持時間に溶出される分子を簡便に確認および取得できると考えられる。

#### D. 結論

本研究で開発する分子は PDA の装置間校正に利用可能な化合物であるが、相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity; RMS) 法による HPLC を用いた定量法などにも利用できる。RMS を用いた定量法に利用するためには、高純度、安定供給可能である他、①測定対象と物理的な特性 (極性、極大吸収波長) が類似していること、②HPLC クロマトグラム上で試料中の

夾雑物や測定対象の化合物と分離すること、等が要件となる。本研究で開発を検討する化合物においては導入する官能基やビルディングブロックの変更によって物理的特性の調整が可能であるため、①および②の条件を満たすことが可能であると考えられる。

本研究では、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。広範囲に吸収を示す化合物として、誘導体化の容易さやスペクトルの長波長化の観点からビスアリアルマレイミド誘導体や 1,4-ナフトキノ誘導体を選択した。これら分子においては、共通の中間体に対して、それぞれ種々の芳香族化合物や様々なアミンやフェノール化合物を一段階で導入可能であるため、多種類の化合物を効率的に合成することができた。合成した誘導体の UV-Vis スペクトルを測定した結果、長波長域における吸収にはジメチルアミノ基の導入が有効であることが分かった。また、ビスアリアルマレイミド誘導体においてはイミドの側鎖として、1,4-ナフトキノ誘導体においてはクロロ基の置換によるポリエチレングリコール分子などの導入によって水溶性の向上などさらなる機能化を図ることもできる。

カロテノイド類の HPLC を用いた定量に利用可能なシングルリファレンス分子については、ビスインドリルマレイミド分子を母骨格として同時に複数種類の分子を合成し、それらを逆相 HPLC 上で分離することで、HPLC 上での保持時間の異なる他種類の化合物をスクリーニング的に得ることができた。今回検討した手法を発展させることで、化合物の母骨格と導入官能基の組み合わせによって、カロテノイド類以外の様々な分子についてもシングルリファレンス化合物を簡便に設計できると考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) Shorunova SV, Krayushkina MM, Stoyanovicha FM, Irie, M: A Convenient Synthesis of 3,4-Diaryl(hetaryl)-Substituted Maleimides and Maleic Anhydrides. *Russ. J. Org. Chem.*, 42, 1490-1497 (2006).

- 2) 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.*, 16, 11993-11999 (2010).
- 3) Terayama K, Sumita M, Tamura R, Payne DT, Chahal MK, Ishihara S, Tsuda K: Pushing property limits in materials discovery via boundless objective-free exploration. *Chem. Sci.*, 11, 5959-5968 (2020).
- 4) Lin Z, Chen HC, Sun S-S, Hsu C-P, Chow TJ: Bifunctional maleimide dyes as selective anion sensors. *Tetrahedron*, 65, 5216-5221 (2009).

## F. 研究業績

### 1. 学会発表等

- 1) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 杉本直樹, 井之上浩一: デザインSR-HPLC法によるアナトー色素の定量評価の構築, 日本食品衛生学会第118回学術講演会(2022.11)(長崎).

### 2. 論文発表等

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

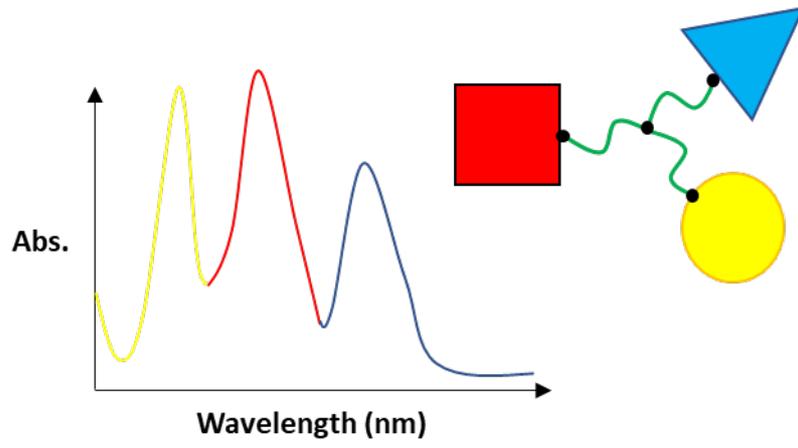
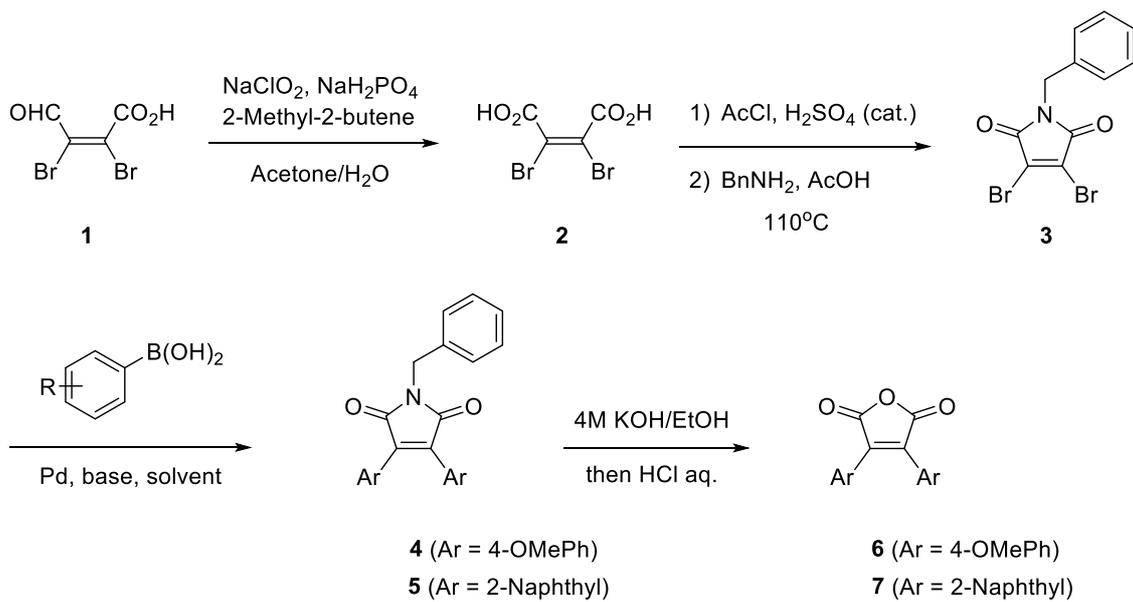
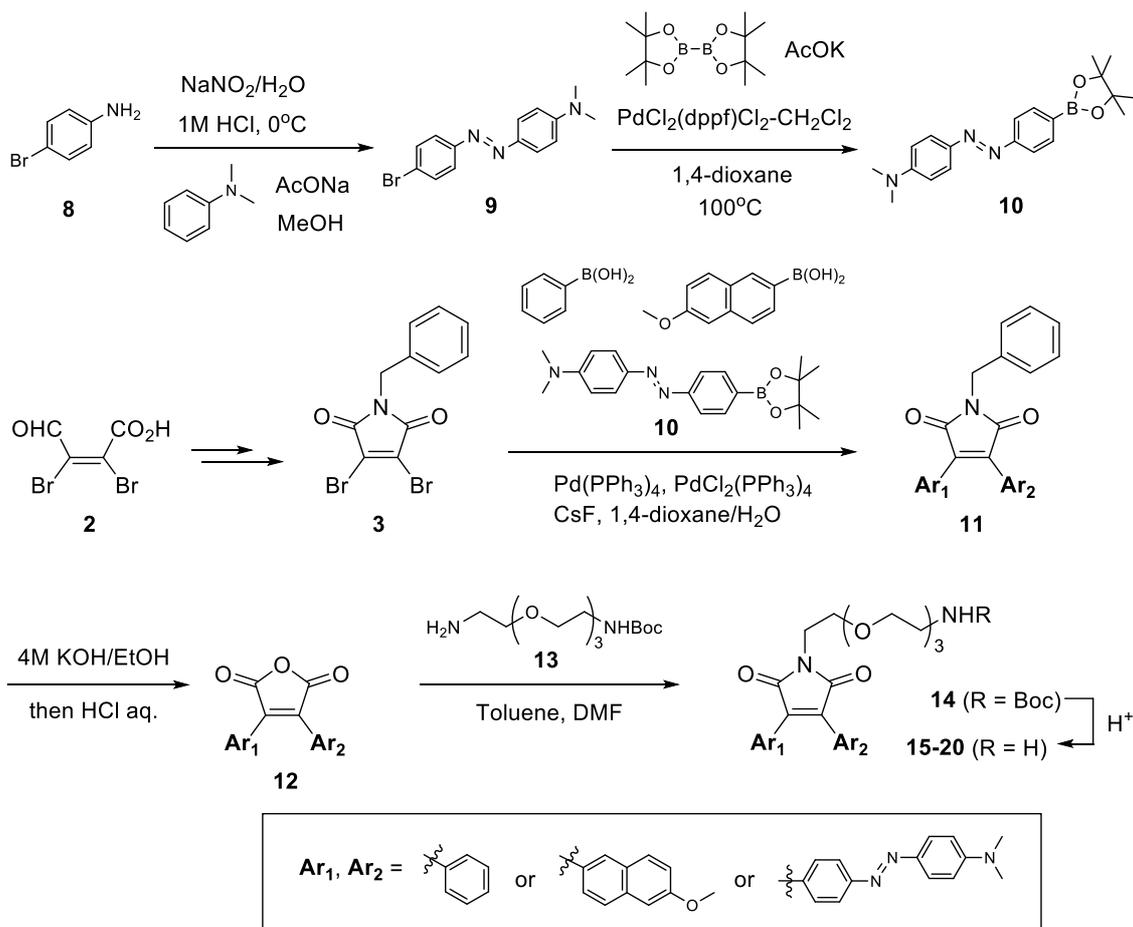


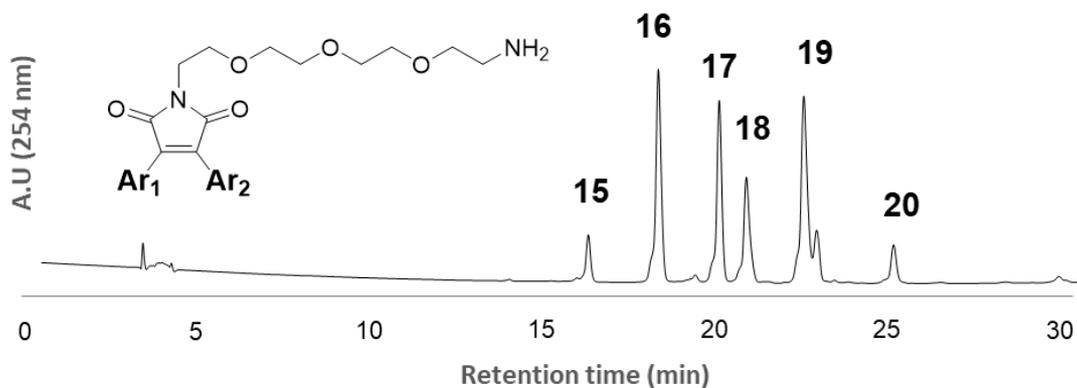
Fig. 1. 本研究における幅広い吸収波長を示す化合物の分子設計



Scheme 1. ビスアリアルマレイミド誘導体の合成



Scheme 2. 複数のアリアルボロン酸のカップリング反応によるビスアリアルマレイミド誘導体の合成



(HPLC conditions)

Column : CAPCEL PAK MG-II (C18, 4.6 I.Dx250 mm, 5 μm)(Osaka soda) flow rate : 1.0 mL/min, column temp. : 40 °C  
 Mobile phase; A : 0.1% Formic acid in H<sub>2</sub>O, B : 0.1% Formic acid in CH<sub>3</sub>CN Gradient B% : 10-100% (30 min)

**15** (Ar<sub>1</sub> = Ar<sub>2</sub> = Phenyl), **16** (Ar<sub>1</sub> = Phenyl, Ar<sub>2</sub> = 6-MeO-2-naphthyl), **17** (Ar<sub>1</sub> = Ar<sub>2</sub> = 6-MeO-2-naphthyl), **18** (Ar<sub>1</sub> = Phenyl, Ar<sub>2</sub> = 4'-Dimethylaminoazobenzene-4-yl), **19** (Ar<sub>1</sub> = 6-MeO-2-naphthyl, Ar<sub>2</sub> = 4'-Dimethylaminoazobenzene-4-yl), **20** (Ar<sub>1</sub> = Ar<sub>2</sub> = 4'-Dimethylaminoazobenzene-4-yl).

Fig. 2. 本研究の合成法で合成したビスアリアルマレイミド誘導体の HPLC 痕跡

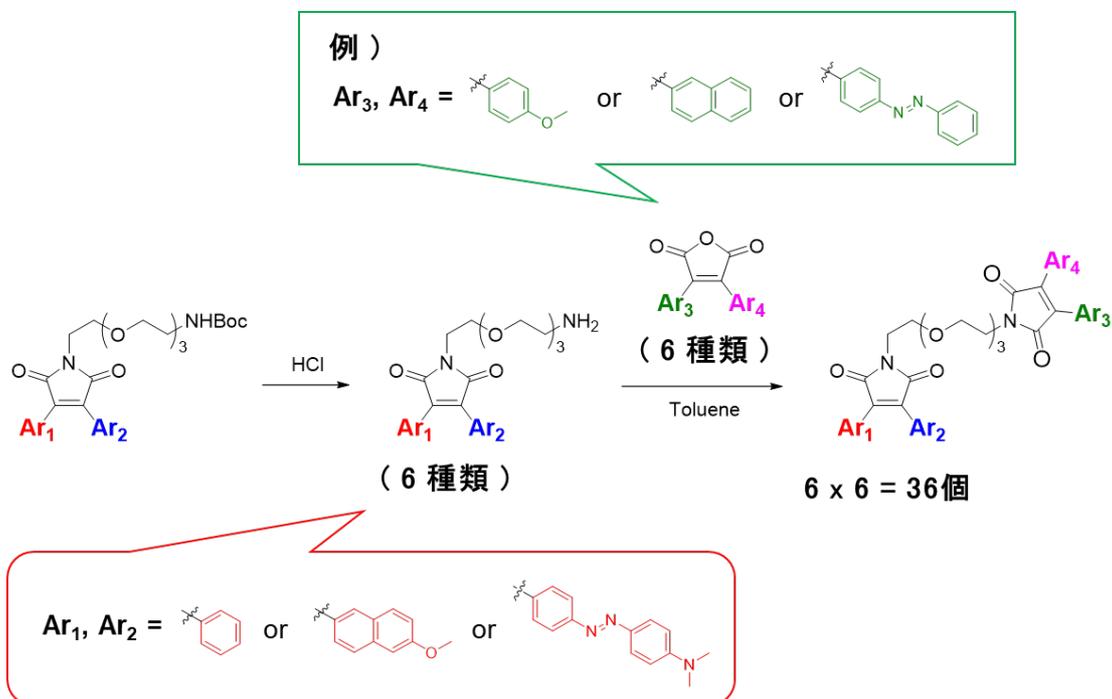


Fig. 3. 多種のビスアリアルマレイミド誘導体の同時合成

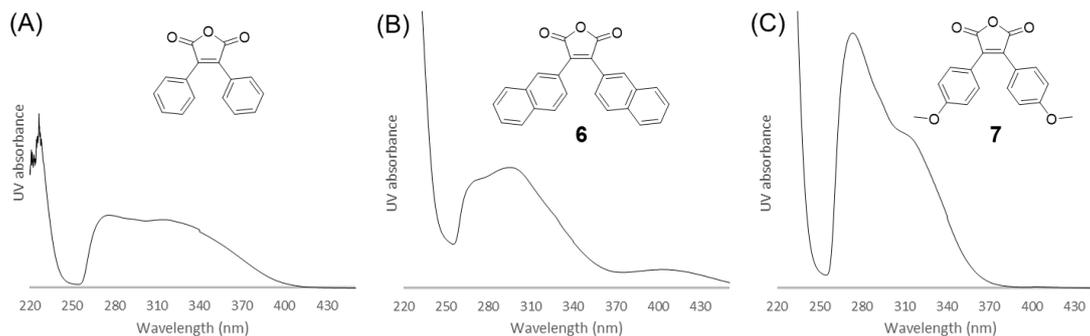


Fig. 4. ビスアリアルマレイン酸無水物の UV-Vis スペクトル(50  $\mu$ M in DMSO)

(A) Bisphenyl, (B) Bis(2-naphthyl), and (C) Bis(4-Methoxyphenyl).

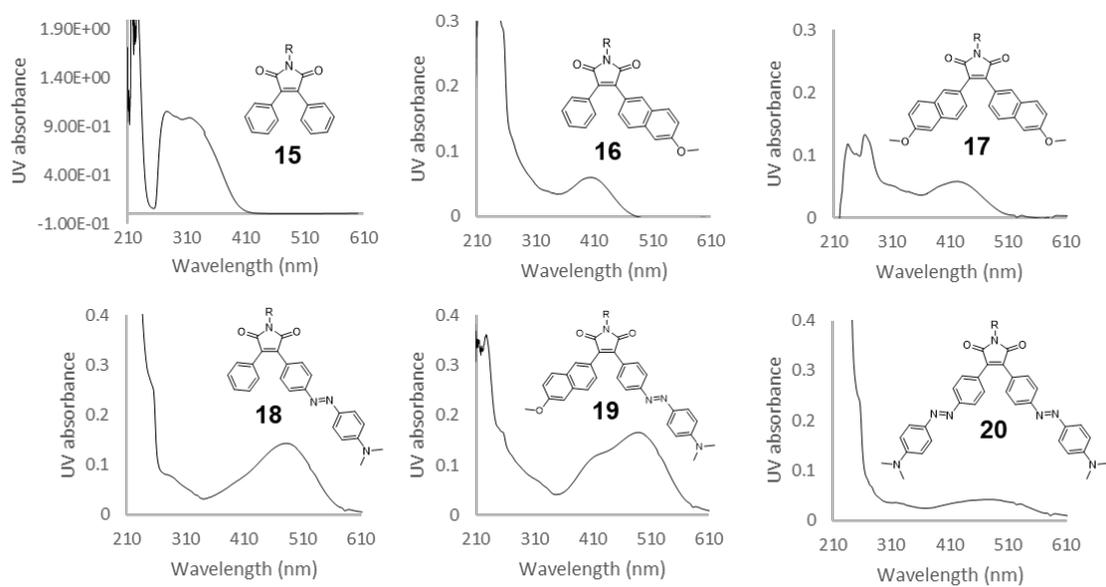
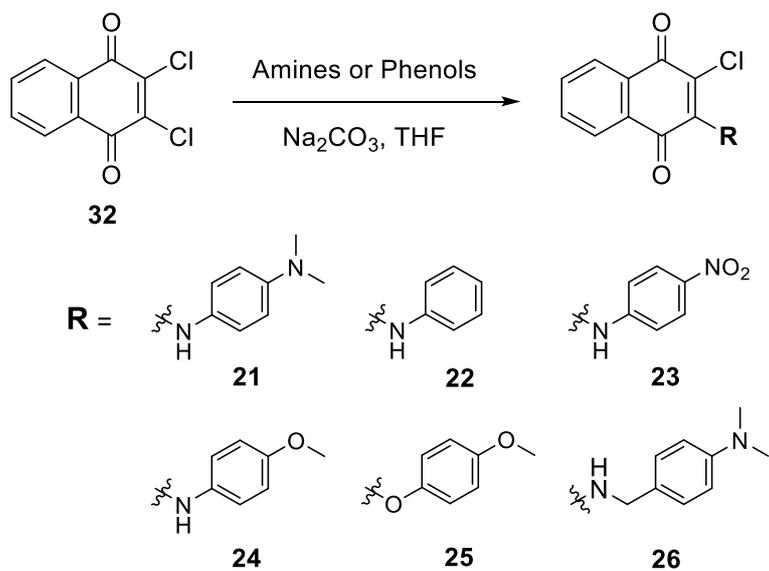
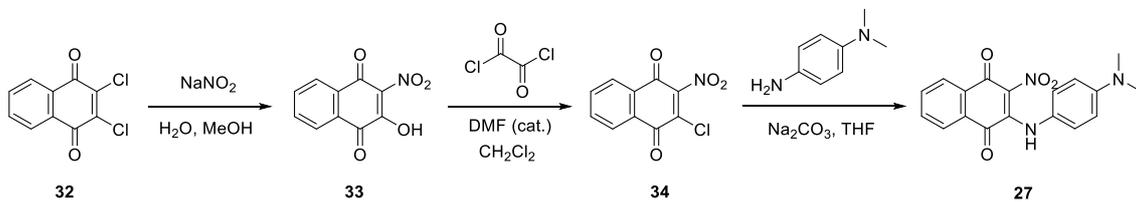


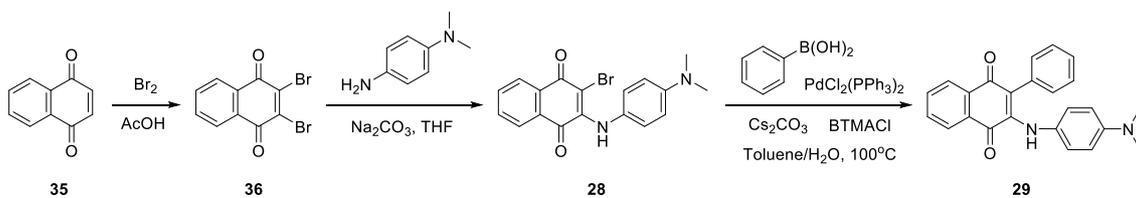
Fig. 5. ビスアリアルマレイミド誘導体 15-20 の UV-Vis 測定(DMSO 中)



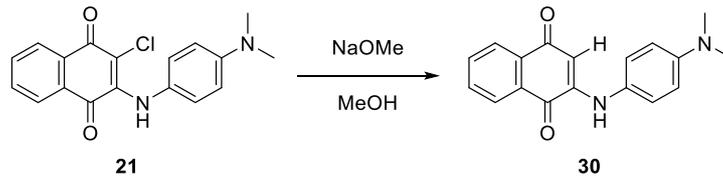
Scheme 3. *N,N*-ジメチルアミノ基を置換したナフトキノ誘導体 21-26 の合成



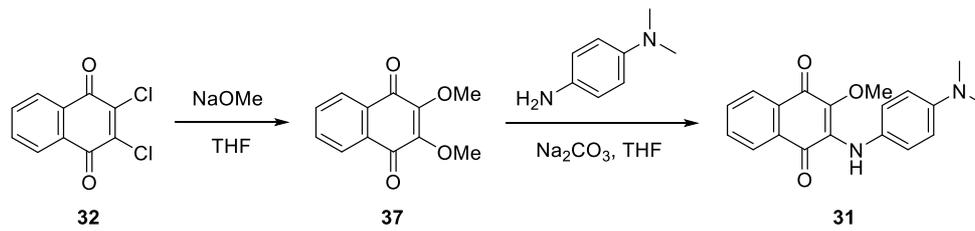
Scheme 4. ナフトキノ誘導体 27 の合成



Scheme 5. ナフトキノ誘導体 28 および 29 の合成



Scheme 6. ナフトキノ誘導体 30 の合成



Scheme 7. ナフトキノ誘導体 31 の合成

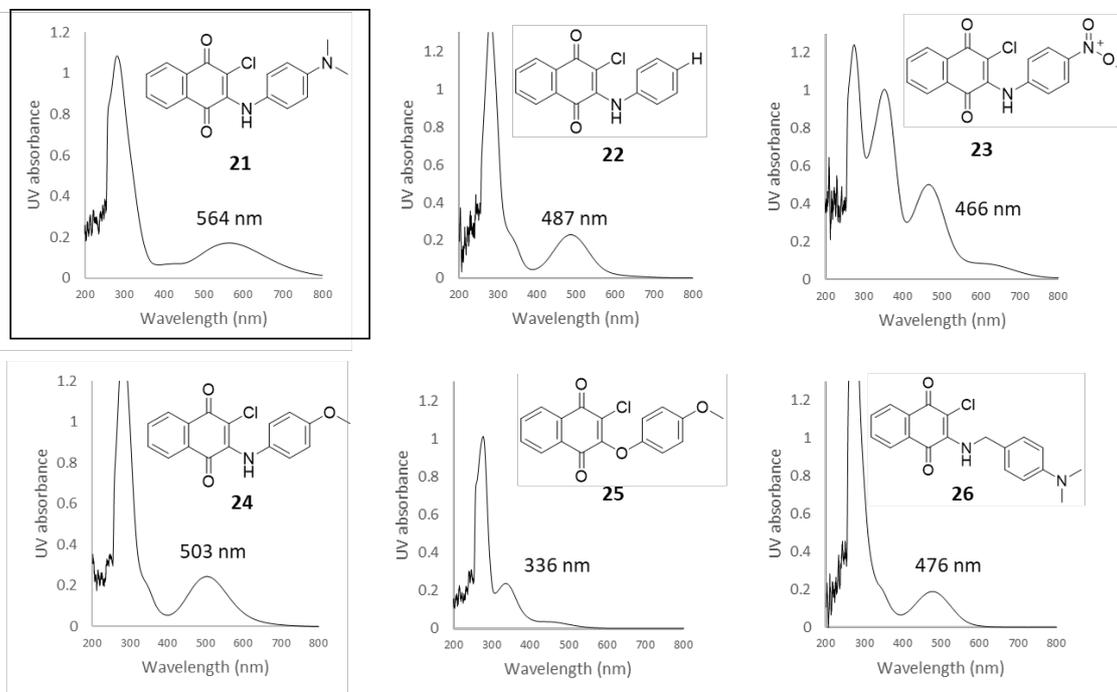


Fig. 6. ナフトキノ誘導体 21-26 の UV-Vis スペクトル (50  $\mu$ M in DMSO)

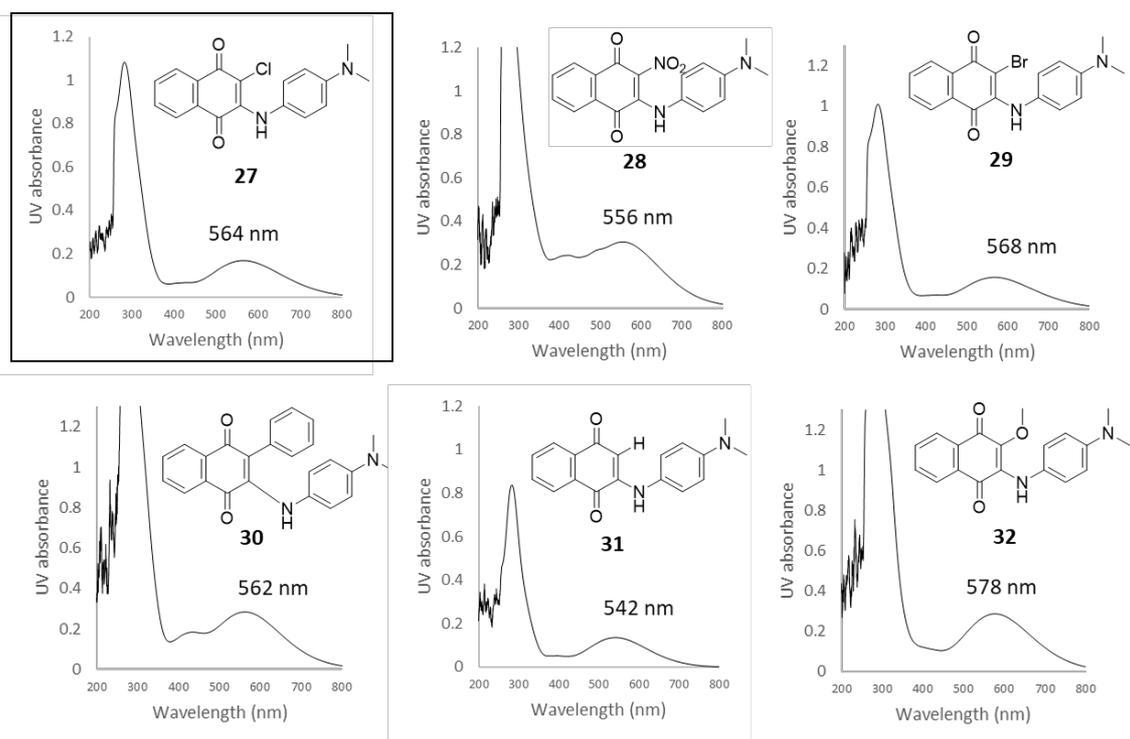


Fig. 7. ナフトキノン誘導体 27-32 の UV-Vis スペクトル (50 μM in DMSO)

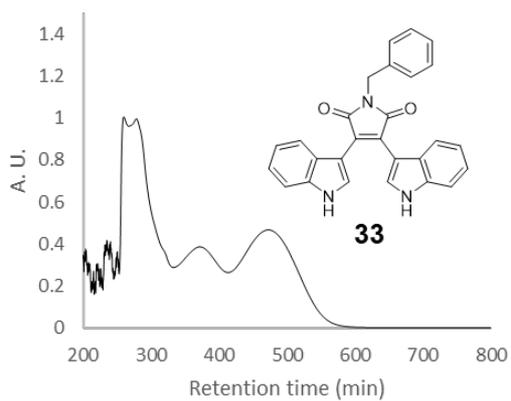
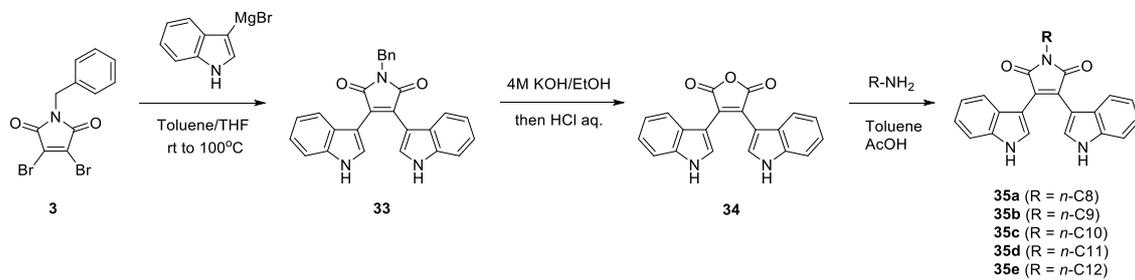


Fig. 8. ビスインドリルマレイミド誘導体 33 の UV-Vis スペクトル (50 μM in DMSO)



Scheme 8. ビスインドリルマレイミド誘導体 **35a-e** の合成

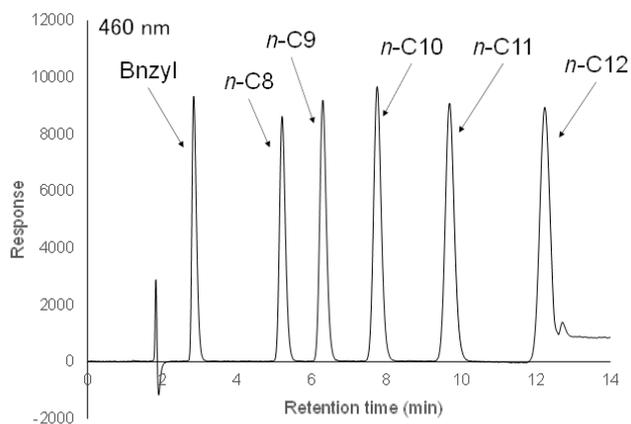


Fig. 9. ビスインドリルマレイミド誘導体 (**33** および **35a-e** の混合物) の HPLC 痕跡

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～令和4年度 総合分担研究報告書

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及び真菌数試験法の比較検討－

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** 既存添加物の品質向上に資する試験法及び分析法の開発を行う目的で、食品添加物のうち微生物を基原とする酵素について、MALDI-ToF MSによる予測アミノ酸配列を指標とした基原同定法としてペプチドマスフィンガープリンティング法（PMF法）の有用性を検討した。さらに、食品添加物公定書（公定書）の微生物限度試験における真菌数試験で規定されたジクロラン・グリセリン（DG-18）寒天培地による混釈培養法に対して、その他の試験条件と比較しての集落の生育性評価を行った。PMF法の基原同定については、添加物酵素を電気泳動後得られたバンドをトリプシンで消化し、ペプチドをMALDI-ToF MSを用いて解析して、その質量データを用いてデータベース検索によるタンパク質の同定を行った。その結果、供試した36製品中30製品について基原の情報が得られ、そのうち27製品において、製品に付帯する基原情報と解析から得られた結果が一致した。したがって、電気泳動法とMALDI-ToF MSを組み合わせた解析法は、酵素の基原の特定に有効であり、製品の安全性の確保に貢献できると考えられた。真菌数試験法の比較検討については、DG-18寒天の他2種類の寒天培地を用い、混釈培養法または塗抹培養法にて培養を行った。規定された2菌種を含む計5菌種を20または100 cfu/mLの濃度に調整して接種し、培養後、集落数を計測した。検討の結果、小さな集落が生育する性質の既定の*Candida albicans*を含む3菌種では、いずれの試験条件でも集落数計測は可能であった。一方で集落が早くかつ大きく生育する性質の既定の*Aspergillus brasiliensis*を含む2菌種では、100 cfu/mLの接種菌液では培養5日後でいずれの試験条件でも集落は密集し数の計測は困難であったが、20 cfu/mLの接種菌液を使用する、または培養期間を短くすることで、集落数計測が可能となった。したがって、場合によっては、代替法として寒天培地の種類の変更や、接種試験液の希釈、培養日数の短縮も検討する必要があることが示された。

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 室長

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 部長

多田敦子 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 主任研究官

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

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

A. 研究目的

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。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こ

とから、基原菌種の同定は重要である。その一方で、既存添加物の流通製品を分析すると、基原菌種の同定が難しい品目は多いことが知られている。微生物由来基原の品目の同定法として、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を開発する必要がある。添加物酵素は、分子量の大きいタンパク質であることから、HPLC や質量分析器による解析に適していない。また、微生物の分泌物から製造されていることから、核酸情報を基にしたアプローチも難しい。この問題を解決できる手法として、MALDI-ToF MS による予測アミノ酸配列を指標とした基原同定法が有用であると考え、ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法に着目した。本手法はタンパク質の構造解析法の一つとして頻繁に用いられている<sup>1)</sup>。PMF 法は、まずアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法によってタンパク質を分離した後、バンドを切り出してトリプシンなどのタンパク質分解酵素による消化を行う。得られたペプチドを飛行時間型質量分析器 (ToF MS) により網羅的に分析する。複数のペプチドの質量情報からデータベース検索 (Mascot サーチ) により、元のタンパク質を同定する。PMF 法が酵素添加物の基原の特定に有用かどうかを検証する必要がある。

また、第9版食品添加物公定書 (以下、公定書) では、微生物限度試験法のもと、真菌 (酵母及びカビ) 数試験の方法が規定されている。

「培地の性能及び試験法の適合性試験」として、試験菌として酵母である *Candida albicans* NBRC 1594 およびカビである *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9544 の計2菌種各1菌株を用いること、1 mL あたりの出現集落数が100以下となるように調整した試験菌液を使用すること、ジクロラン・グリセリン (DG-18) 寒天培地 15~20 mL と試験菌液 1 mL を使用しての混積培養を行うこと、25±1°C で5日間以内で培養するとき十分な増殖及び接種菌液の回収があること、といった試験法の規定がされている。混積培養法には、塗抹培養法と比較して大量の試験液を1枚の平板で試験できる、カビ集落が大きく発育しないため正確な計測がしやすい、

などといった実験上のメリットがある。一方で、試料中の菌が熱の影響を受ける可能性があること、完全な好气的条件での培養にはならないため特に好气的な真菌の発育性に影響することなどのデメリットもある。またこの影響の程度は、菌種によって様々であるとされる。これに対して、食品等の一般的な試験法として汎用される菌数測定法として、塗抹培養法<sup>2)</sup>がある。本培養法のメリットとしては、試料中の菌は熱の影響を受けないことがある。デメリットとしては、1枚の平板で試験できる試験液が混積培養法より少ないため試験での実験量が多くなること、平板上でカビ集落が大きく発育しやすいため集落が密集し正確な計測が不可能となりやすいことがあるとされる。以上の試験法の特徴をふまえると、公定書で規定された試験法の DG-18 寒天培地による混積培養法では、真菌種によっては生育効率が低い可能性がある。しかし現在のところ、これらの培養法による真菌集落の生育性や集落数の計測効率の違いについて、十分に評価されていない。

本研究では、既存添加物の品質向上に資する試験法及び分析法の開発を行う目的で、PMF 法の酵素に対する基原同定における有用性の検討、および公定書の微生物限度試験における真菌数試験法とその他の試験条件との比較評価を行った。

## B. 研究方法

### B-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

#### B-1-1) 分析機器

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-1-2) 試料

既存添加物試料は、日本食品添加物協会から分与されたアミラーゼ 10 種、ガラクトシダーゼ 3 種、セルラーゼ 5 種、ヘミセルラーゼ 5 種及びプロテアーゼ 13 種の計 36 製品を用いた。これらについて PMF 解析を行い、製造者から提供される付帯情報に記載の基原情報と解析から得られた結果が一致するかどうかを検討

した。その結果から、PMH法が酵素添加物の基原の特定に有用かどうかの検証を行った。

### B-1-3) 質量分析用検体の調製

各試料は、検体のタンパク質含有量に応じて5~100 mg/mLの濃度となるよう精製水に溶解した。それぞれ等量の2×laemmli sample buffer (Bio-Rad社)と混合後、SDS-PAGEに供した。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 µLを加え、10分間振盪(1,000 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 µL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 µL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 µL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 µL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 µL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(Trypsin Sequencing Grade, modified; Roche Diagnostics社)10 µg/mLを含む25 mM重炭酸アンモニウム水溶液)20 µLを加え、37°C一晩インキュベートした。0.1% TFAを100 µL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 µL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 µL-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(4-クロロ- $\alpha$ -シ

アノケイ皮酸;シグマアルドリッチ社)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。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ペクトルを測定した。キャリブレーションには、トリプシン由来の2種の自己消化ペプチド( $m/z$  805.4163及び2163.0564)を用いた。

### B-1-4) ペプチド質量を指標としたタンパク質の同定

マスペクトルから得られたペプチド質量を指標とし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: SwissProt, Enzyme: Trypsin, Allow up to: 1, Fixed modification: Carbamidomethyl(C), Peptide tolerance: 15ppm, Mass values: MH<sup>+</sup>。これによって確からしい菌種とタンパク質が同定できなかった場合、UniProt(<https://www.uniprot.org/>)データベースの検索により該当する菌種のタンパク質のアミノ酸配列がSwissProtに登録されているかを調べた。

## B-2) 真菌数試験法の比較検討

### B-2-1) 供試菌

比較した供試菌としては、添加物公定法で規定された *Ca. albicans* NBRC 1594 および *A. brasiliensis* の2種に加えて、規定の試験菌種には含まれないが環境中に分布頻度や濃度が高いことがしばしばある *Cladosporium sphaerospermum* NIHS 0378, *Penicillium citrinum* NIHS 0222 および *Mucor hiemalis* NIHS 0886 の3種、計5種各1菌株を供試した。

### B-2-2) 比較した培養条件

比較した培養条件としては、培養法については、規定法である混釈培養法およびその比較対象として塗抹培養法の2種類、寒天培地種類については、規定法であるDG-18寒天培地、およびその比較対象として食品等の一般的な試験法として汎用されるポテト・デキストロース寒

天 (PDA) 培地<sup>1)</sup>と日本薬局方の一般試験法微生物限度試験法〈4.05〉で規定されるサブロー・ブドウ糖カンテン (サブロー寒天) 培地<sup>2)</sup>の3種類を検討に加えた。また、菌濃度が濃かった場合の集落数計測の難易度についても評価するため、接種する菌液の濃度として、1 mLあたり40または100 cfuの濃度で作製した。平板1枚あたりの接種菌液体積は、混釈培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mLとした。B-1)の菌株およびこれらの培養法・寒天培地の種類・接種菌濃度をそれぞれ1種類ずつ組み合わせて1試験条件を設定して、培養3から6日目(培養2晩から5晩)で毎日集落数を計測し、測定集落数や実験効率を比較した。1試験条件では平板3枚で実験を行い、得られた測定集落数の平均値を算出した。以上の培養のセットを最大3回繰り返し、結果を比較評価した。

## 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

Figure 1-6に各試料のSDS-PAGE像、Table 1-5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(酵素名、生物種、質量、Coverage)を示した。

#### C-1-1) $\beta$ -ガラクトシダーゼ (試料1~3)

試料1と2は、いずれも*Aspergillus oryzae*の培養物から製造された製品であるが、PMF解析の結果、*A. oryzae*に加えて*A. flavus*の $\beta$ -ガラクトシダーゼも候補タンパク質としてヒットした。*A. oryzae*と*A. flavus*は非常に近縁であり、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのアミノ酸配列は完全に一致している。そのため、PMFでは判別出来なかったと考えられた。また、試料2のSDS-PAGE解析で認められたタンパク質のバンドは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの理論分子量よりも小さく、分解が起きていると推定された。

試料3は、*Niallia circulans*の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProtデータベースの検索を行った結果、*N. circulans*の $\beta$ -ガラクトシダーゼはSwissProtに登録されていなかったことから、同定出来なかつ

たと考えられた。

#### C-1-2) アミラーゼ (試料4~13)

*Aspergillus niger*由来の試料5、*Bacillus amyloliquefaciens*由来の試料7、*Bacillus licheniformis*由来の試料8及び*Rhizopus oryzae*由来の試料13については、付帯情報と同一の基原種由来の酵素が同定された。

試料4は、*Aspergillus foetidus*の培養物から製造された製品であるが、*A. usamii*と*A. oryzae*の $\alpha$ -アミラーゼが同定された。近年、*A. foetidus*と*A. usamii*は共に*A. niger*に再分類されたことから<sup>2)</sup>、付帯情報と一致した結果が得られたと考えられた。*A. oryzae*と*A. usamii*の $\alpha$ -アミラーゼは、アミノ酸配列の相同性が99%と非常に高いことからPMFでは判別出来なかったと考えられた。

試料6は、*A. oryzae*の培養物から製造された製品であるが、*A. oryzae*に加えて*A. usamii*の $\alpha$ -アミラーゼも候補タンパク質としてヒットした。試料4と同様、この2菌種の $\alpha$ -アミラーゼはアミノ酸配列の相同性が非常に高いことからPMFでは判別出来なかったと考えられた。

試料9は、*Bacillus subtilis*の培養物から製造された製品であるが、*B. amyloliquefaciens*の $\alpha$ -アミラーゼのみが候補タンパク質としてヒットした。SwissProtから*B. subtilis*の $\alpha$ -アミラーゼのアミノ酸配列を入手し、トリプシン消化して得られるペプチドの質量を算出した結果、試料9の52 kDaのバンド由来のペプチドのシグナルと全く一致しなかった。このことより、試料9の由来は*B. subtilis*ではなく、*B. amyloliquefaciens*と考えられた。近年、これまで*B. subtilis*と分類されていた菌の一部が、*B. amyloliquefaciens*に再分類された<sup>3)</sup>。この試料の製造に使われている*B. subtilis*は、*B. amyloliquefaciens*に再分類された菌であり、製造者の情報がアップデートされていない可能性が考えられた。

試料10は、*Glycine max* (大豆)から製造された製品であるが、50 kDa付近のバンドは*G. max*の $\beta$ -アミラーゼと同定されたが、28 kDa付近の主要なバンドは*G. max*由来のレクチンと同定

された。レクチンは、製造過程で混入したものと考えられた。

試料 11 と 12 は、共に *A. niger* の培養物から製造された製品であるが、*A. niger* に加えて *A. awamori* のグルコアミラーゼも候補タンパク質としてヒットした。*A. niger* と *A. awamorii* は近縁種であり、このグルコアミラーゼのアミノ酸配列が完全に一致していることから PMF では判別出来なかったと考えられた。試料 11 の 118 kDa のバンドは、同定されたグルコアミラーゼの分子量よりも大きくずれていた。何らかの翻訳後修飾による影響を推察された。

### C-1-3) セルラーゼ (試料 14~18)

試料 14 は、*A. niger* の培養物から製造された製品であるが、付帯情報と同一の基原種由来の酵素が同定された。

試料 15 は、*Pycnoporus coccineus* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果、*P. coccineus* のセルラーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

試料 16 は、*Trichoderma longibrachiatum* の培養物から製造された製品であるが、*Trichoderma viride* と *Trichoderma harzianum* のセルラーゼが候補タンパク質としてヒットした。UniProt データベースの検索を行った結果、*T. longibrachiatum* のセルラーゼは 1 種のみ SwissProt に登録されていたが、それはヒットした酵素と異なるものであった。SwissProt における *T. longibrachiatum* のセルラーゼの登録情報が十分でなかったことから、近縁種のセルラーゼが候補タンパク質としてヒットした可能性が考えられた。

試料 17 は、*Trichoderma reesei* の培養物から製造された製品であるが、*T. reesei* に加えて *Trichoderma koningii* のセルラーゼも候補タンパク質としてヒットした。*T. reesei* と *T. koningii* は近縁種であり、このセルラーゼのアミノ酸配列が完全に一致していることから PMF では判別出来なかったと考えられた。

試料 18 は、*T. viride* の培養物から製造された

製品であるが、55 kDa のバンドについては *T. viride* に加えて *T. koningii* と *T. reesei* のセルラーゼも候補タンパク質としてヒットした。これら 3 種の真菌は近縁種であり、このセルラーゼのアミノ酸配列の相同性が互いに 96% であることから PMF では判別出来なかったと考えられた。31 kDa 及び 19 kDa のバンドについては、*T. viride* 以外の真菌のキシラナーゼ (ヘミセルラーゼの 1 種) が候補化合物としてヒットした。UniProt データベースの検索を行った結果、*T. viride* のキシラナーゼは SwissProt に登録されていなかった。そのため、近縁種のキシラナーゼが候補タンパク質としてヒットした可能性が考えられた。

### C-1-4) ヘミセルラーゼ (試料 19~23)

試料 19 は、*A. niger* の培養物から製造された製品であるが、付帯情報と同一の基原種由来の酵素が同定された。

試料 20 は、*A. niger* の培養物から製造された製品であるが、58 kDa のバンドは、*A. niger* とその近縁の 2 種の真菌のグルコアミラーゼが候補化合物としてヒットした。このグルコアミラーゼは製造過程で混入した不純物と考えられた。33 kDa 及び 20 kDa のバンドについては、*A. niger* に加えて、*A. kawachii* のキシラナーゼも候補化合物としてヒットした。*A. niger* と *A. awamorii* は近縁種であり、これらキシラナーゼのアミノ酸配列の相同性が非常に高いことから PMF では判別出来なかったと考えられた。

試料 21 は、*P. coccineus* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果、*P. coccineus* のヘミセルラーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

試料 22 と 23 は、*T. longibrachiatum* の培養物から製造された製品であるが、他の *Trichoderma* 属真菌のヘミセルラーゼが候補タンパク質としてヒットした。試料 16 と同様、SwissProt における *T. longibrachiatum* のヘミセルラーゼの登録情報が十分でなかったことから、近縁種のヘミセルラーゼが候補タンパク質としてヒットし

た可能性が考えられた。

#### C-1-5) 真菌由来のプロテアーゼ (試料 24~31)

*A. niger* 由来の試料 25, *Aspergillus phenicis* 由来の試料 27 及び *Penicillium citrinum* 由来の試料 29 については、付帯情報と同一の基原種由来の酵素が同定された。

試料 24 は, *Aspergillus melleus* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果, *A. melleus* のプロテアーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

試料 26 は, *A. oryzae* の培養物から製造された製品であるが、47 kDa のバンドは *A. oryzae* とその近縁種の *A. usamii* の $\alpha$ -アミラーゼが候補タンパク質としてヒットした。この $\alpha$ -アミラーゼは製造過程で混入した不純物と考えられた。34 kDa 及び 23 kDa のバンドについては、試料 1 及び 2 の結果と同様に、*A. oryzae* に加えて近縁種の *A. flavus* のプロテアーゼも候補タンパク質としてヒットした。

試料 28 は, *Aspergillus* sp. の培養物から製造された製品であるが、種名は付帯情報に記載されていなかった。25 kDa のバンドの解析結果において、*A. oryzae* と *A. flavus* のプロテアーゼが候補タンパク質としてヒットした。アフラトキシンを産生する可能性のある真菌の *A. flavus* を酵素の製造に用いることはないため、この製品の由来は *A. oryzae* と考えられた。

試料 30 は, *P. coccineus* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果, *P. coccineus* のプロテアーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

#### C-1-6) バクテリア由来のプロテアーゼ (試料 32~36)

試料 31 は, *R. niveus* の培養物から製造された製品であるが、67 kDa のバンドは *R. oryzae* のグルコアミラーゼと同定された。SwissProt に *R. niveus* のグルコアミラーゼが登録されていない

ため、近縁種の酵素がヒットしたと考えられた。34 kDa のバンドは, *R. niveus* のプロテアーゼと同定された。

試料 32 は, *Sphingomonas paucimobilis* の培養物から製造された製品であるが、同定出来なかった。UniProt データベースの検索を行った結果, *S. paucimobilis* のプロテアーゼは SwissProt に登録されていなかったことから、同定出来なかったと考えられた。

試料 33 は, *Geobacillus stearothermophilus* の培養物から製造された製品であるが, *G. stearothermophilus* に加えて *Bacillus thermoproteolyticus* のプロテアーゼも候補タンパク質としてヒットした。このプロテアーゼの 2 菌種間におけるアミノ酸配列の相同性は非常に高い (99.3%) ことから PMF では判別出来なかったと考えられた。

試料 34 は, *B. subtilis* の培養物から製造された製品であるが、53 kDa と 29 kDa のバンドはそれぞれ *B. amyloliquefaciens* の $\alpha$ -アミラーゼ及びプロテアーゼと同定された。試料 9 と同様の解析を行った結果、この製品の由来は *B. amyloliquefaciens* の可能性が高く、製造者の付帯情報がアップデートされていないと考えられた。

試料 35 は, *Bacillus* sp. の培養物から製造された製品であるが、種名は付帯情報に記載されていなかった。30 kDa のバンドの解析結果において、*Bacillus licheniformis* のプロテアーゼが候補タンパク質としてヒットしたことから、この製品の由来は *B. licheniformis* と考えられた。

試料 36 は, *B. amyloliquefaciens* の培養物から製造された製品であるが、58 kDa と 29 kDa のバンドはそれぞれ付帯情報と同一の *B. amyloliquefaciens* の $\alpha$ -アミラーゼ及びプロテアーゼと同定された。

計 36 種の酵素製品について、電気泳動と MALDI-ToF MS による測定を組み合わせた PMF 解析を行った結果, 30 製品について基原種の情報得られた。それらのうち 25 製品については、製造者による付帯情報と一致した結果が得られた。ただ、その 25 製品のうち 14 製品については、付帯情報と一致する基原種に加え、

近縁種の酵素も候補タンパク質としてヒットした。PMF解析においては、トリプシン消化によって得られたペプチドをTOFMSで解析するため、イオン化効率が高い一部のペプチドの質量情報しか得られない。そのため、高い相同性を有するタンパク質を区別することが出来ない。そこで、解析するタンパク質に特異的なペプチドを検出することが重要となる。今回の解析においては、消化酵素としてトリプシンを用いたが、Arg-C, Asp-N, Lys-Cなど認識サイトが異なる消化酵素が他にも存在する。これらの酵素を用いた解析結果も用いることで、同定の精度を高められる可能性がある。

基原種の情報が得られた30製品のうち、5製品については製造者による付帯情報と同定されたタンパク質の基原種が異なっていた。この理由としては、製造に用いられた微生物のタンパク質情報がSwissProtに登録されていないため、近縁種のタンパク質がヒットしたこと、又は微生物の最新の分類法に合わせて製造者の情報がアップデートされていない可能性が考えられた。また、*A. melleus*, *B. circulans*, *P. coccineus* や *S. paucimobilis* 由来の製品については、基原種を同定出来なかった。現状ではこれらの生物種のタンパク質の情報がSwissProtに登録されていないが、今後データベースのアップデートにより、これら生物由来の酵素の同定も可能になることが期待される。

## C-2) 真菌数試験法の比較検討

### C-2-1) 添加物公定書での培養条件における各種真菌の培養結果の比較

公定書に既定の最大濃度である100 cfu/mLの接種菌液を接種し、最大培養期間である5日間(4晩目)培養を行った後での、供試5菌種(Figure 7)の培養結果を比較した。Figure 8に、培養像の代表として、公定法であるDG-18寒天を用いた混積培養法での集落像を示した。本表では、集落の発育性について、5菌種のうち、「培養5日後で小さな集落を形成する3菌種」をAとし、「集落生育が早く大きな集落を形成する2菌種」をBと分類し表記した。集落の発育性がタイプAの*Ca. albicans*, *Cl.*

*shaerospermum* および *P. citrinum* の3菌種では、比較した結果、今回試験したいずれの培地種類および培養法の組み合わせでも、集落は目視で観察可能な大きさとなり、いずれの培養法・寒天培地の組み合わせで集落数計測が可能であった。集落の発育性がタイプBの*A. brasiliensis* と *M. hiemalis* では、集落は密集し数の計測は困難となった。したがって、早く大きな集落を形成する菌種では、公定法に既定の培養条件の組み合わせで集落数計測が困難となったため、これらの菌種では、培養法、培地種類、接種菌液濃度、培養日数の組み合わせを変え、集落数計測が可能となる方法の検討が必要ということが確認された。

### C-2-2) 小さな集落を形成する菌種における真菌数計測結果の比較

集落の発育性がタイプA菌種(小さな集落を形成;*Ca. albicans*, *Cl. shaerospermum* および *P. citrinum*)で100 cfu/mLの接種菌液を用いての真菌数計測結果を、各培養条件間で比較した(Figure 9)。3菌種それぞれの結果から、*Ca. albicans* ではDG-18寒天培地を用いた混積培養法では4晩目で、その時接種した最大の菌数が出現していない状態であったものの、微生物限度試験法における真菌数試験法「培地の性能及び試験法の適合性試験」に既定の培養4晩目でも接種した菌数の80%以上は回収できていた(Figure 9)。日本薬局方の一般試験法微生物限度試験法(4.05)<sup>2)</sup>では、出現集落数は接種菌液から予想される菌数の1/2から2倍以内が適当と判断できると規定されていることから、今回の結果では十分な菌数が得られたものと判断した。しかし日本薬局方で使用される寒天培地の種類はサブロー寒天であり、培養法も平板塗抹法であることから、今後、DG-18寒天培地による混積培養法での検討回数を増やし、評価を確実なものとする必要がある。

### C-2-3) 大きな集落を形成する菌種における真菌数計測結果の比較

集落の発育性がタイプA(大きな集落を形成;*A. brasiliensis* および *M. hiemalis*)で40

cfu/mL の接種菌液を用いての真菌数計測結果を、各培養条件間で比較した (Figure 10). また、その際の集落培養像を比較した (Figure 11). 今回の比較検討の結果から、混釈・塗抹の両培養法で共通して DG-18 寒天培地では集落形成が遅く、最大の集落数が形成されるまでに最短でも 4 晩の培養が必要であることが確認された (Figure 10). 同時に、Figure 1 の培養像で示したとおり、DG-18 寒天培地では集落発育が他の 2 種類の培地と比較して小さく、集落数が計測しやすい結果となった. サブロー寒天培地では、菌量が平板 1 枚あたり 20 cfu と少ない塗抹培養でも、集落数測定期間最短の 2 晩の培養でもすでに集落の発育は過剰となって集落が密集しており、数の計測が不可能となった (Figure 11). 以上のことから、*A. brasiliensis* や *M. hiemalis* では、DG-18 寒天または PDA 寒天培地を用いて、3~4 晩以上の培養期間をみるといった注意が必要であると考えられた.

#### D. 結論

##### D-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

SDS-PAGE によって添加物酵素に含まれる個々のタンパク質を分離した後に、それぞれのタンパク質について MALDI-ToF MS による分析を行う PMF 解析を用いて微生物を基原とした酵素添加物の基原菌種の特定を行った. その結果、36 製品中 30 製品の基原を明らかにした. この結果より、PMF 解析は酵素添加物の生物基原を調べるために有効な手段であることが明らかになった. しかし、近縁種のタンパク質も候補として提示してしまうことや、SwissProt に登録の無い生物種由来の製品については対応できないという問題点が認められた. 今後は、複数種の消化酵素を用い、ペプチドのパターンを増やすことで同定の精度を高めるといった改良を行い、より精度の高い基原種同定法の構築を試みる.

##### D-2) 真菌数試験法の比較検討

公定書で規定の試験条件をその他試験条件と比較し、集落の生育性をもって真菌数計測の

正確性と効率を評価した. その結果、公定書で規定の DG-18 寒天培地を用いて、規定の菌濃度を接種し 4 晩の培養後、集落の発育が過剰となり集落数の計測が不可能となる真菌群があった. ここには公定法に記載された *A. brasiliensis* も含まれた. また同条件の培養条件で、発育速度が遅く小さな集落が発育するため最低 5 晩の培養が必要となる真菌群もあった. ここには公定法に記載された *Ca. albicans* も含まれた. これらの群は両方とも環境中に高い頻度で分布するため、食品添加物に混入することは十分に考えられた. 添加物公定書では、規定法と同等以上の検出感度および精度を有する場合には、代替法の適用も可能であるとされているため、検出が予測される菌種によっては、代替法として寒天培地の種類の変更や、接種試験液の一層の希釈、培養日数の短縮も検討する必要がある.

#### E. 参考文献

- 1) Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, et al. 2005. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 35(3):237-247.
- 2) 公益社団法人日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針 微生物編 改定第二版. 2018, p. 519-524.
- 3) Hong SB, Lee M, Kim DH, et al. 2013. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS One*. 8(5): e63769.
- 4) De Vos P, Garrity GM, Jones D, et al. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol.3: the Firmicutes. New York: Springer Press; p.181-184.
- 5) 厚生労働省. 第十八改正日本薬局方. 2021, p.122-130.

#### F. 研究業績

##### 1. 学会発表等

- 1) 渡辺麻衣子, 吉成知也, 西崎雄三, 増本直子, 多田敦子, 工藤由起子, 杉本直樹. 食品添加物の微生物限度試験における真菌数試験法の比較検討. 日本農芸化学会 2023 年度大会, 2023 年 3 月 (オンライン開催)

2) 吉成知也, 関根葵, 小林直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. MALDI-ToF MS を用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究. 日本農芸化学会 2023 年度大会, 2023 年 3 月 (オンライン開催)

## 2. 論文発表等

### 2-1. 論文

1) Shouhei Hirose, Maiko Watanabe, Atsuko Tada, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato, Yukiko Hara-Kudo. Evaluation on suitability of culture broth and conditions for Escherichia coli growth and gas production test of food additives. Food Hygiene and Safety Science. Accepted.

2) Tomoya Yoshinari, Aoi Sekine, Naoki Kobayashi, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Yukiko Hara-Kudo, Maiko Watanabe. Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. Food Additives & Contaminants: Part A. Submitted.

### 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

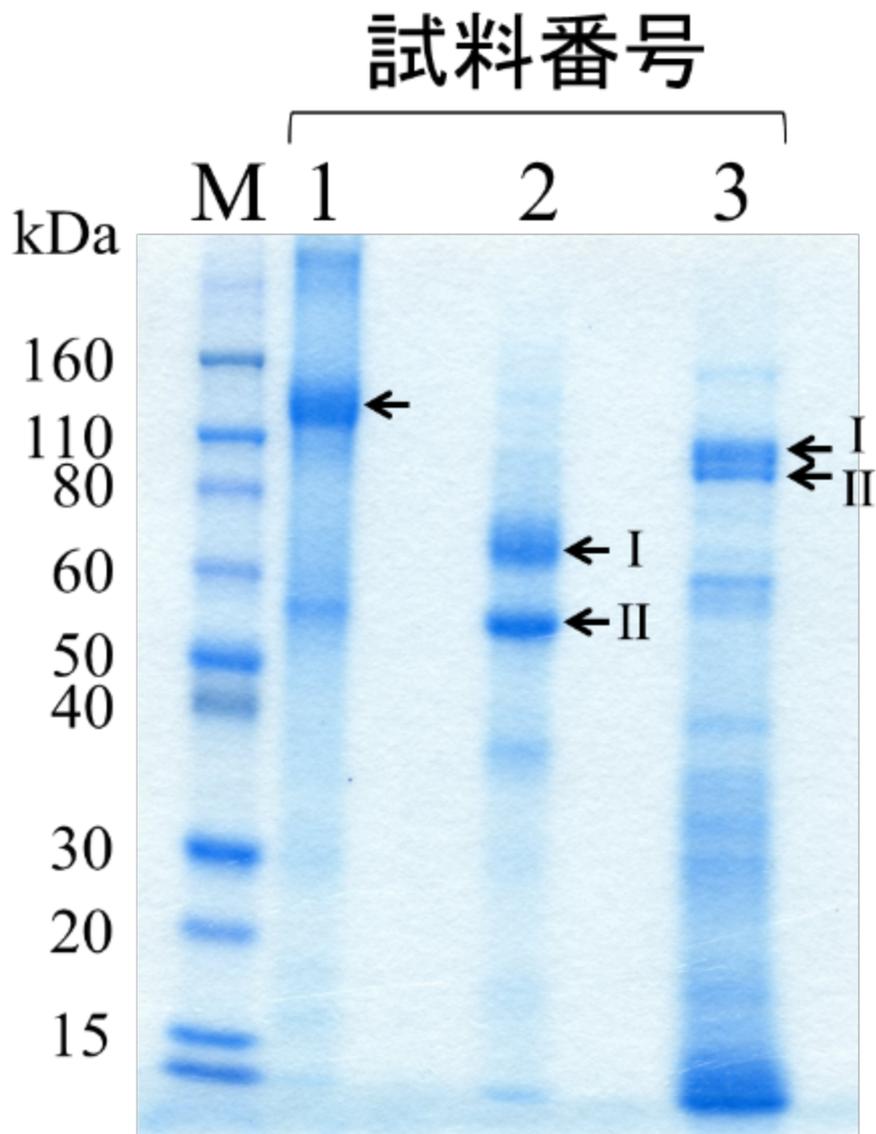


Figure 1.  $\beta$ -ガラクトシダーゼ 3 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 1: 100  $\mu$ g, 試料 2: 50  $\mu$ g, 試料 3: 100  $\mu$ g とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

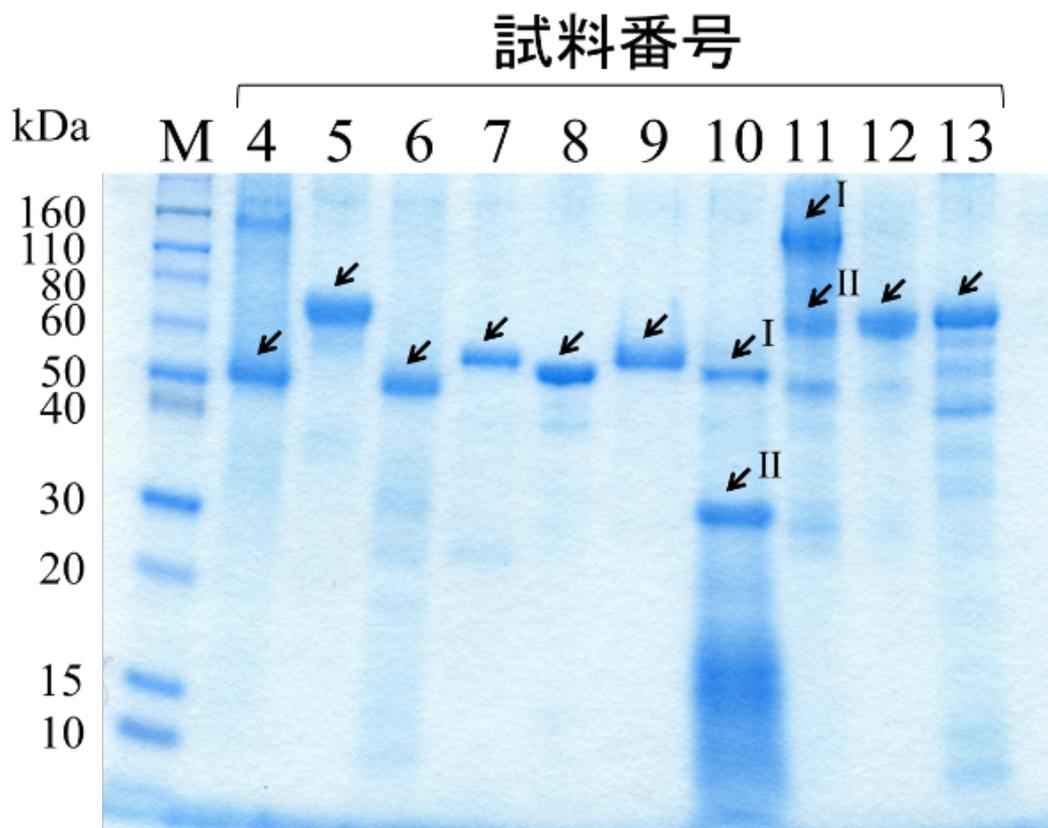


Figure 2. アミラーゼ 10 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 4: 150  $\mu\text{g}$ , 試料 5: 20  $\mu\text{g}$ , 試料 6: 15  $\mu\text{g}$ , 試料 7: 20  $\mu\text{g}$ , 試料 8: 5  $\mu\text{g}$ , 試料 9: 75  $\mu\text{g}$ , 試料 10: 75  $\mu\text{g}$ , 試料 11: 15  $\mu\text{g}$ , 試料 12: 5  $\mu\text{g}$ , 試料 13: 20  $\mu\text{g}$  とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

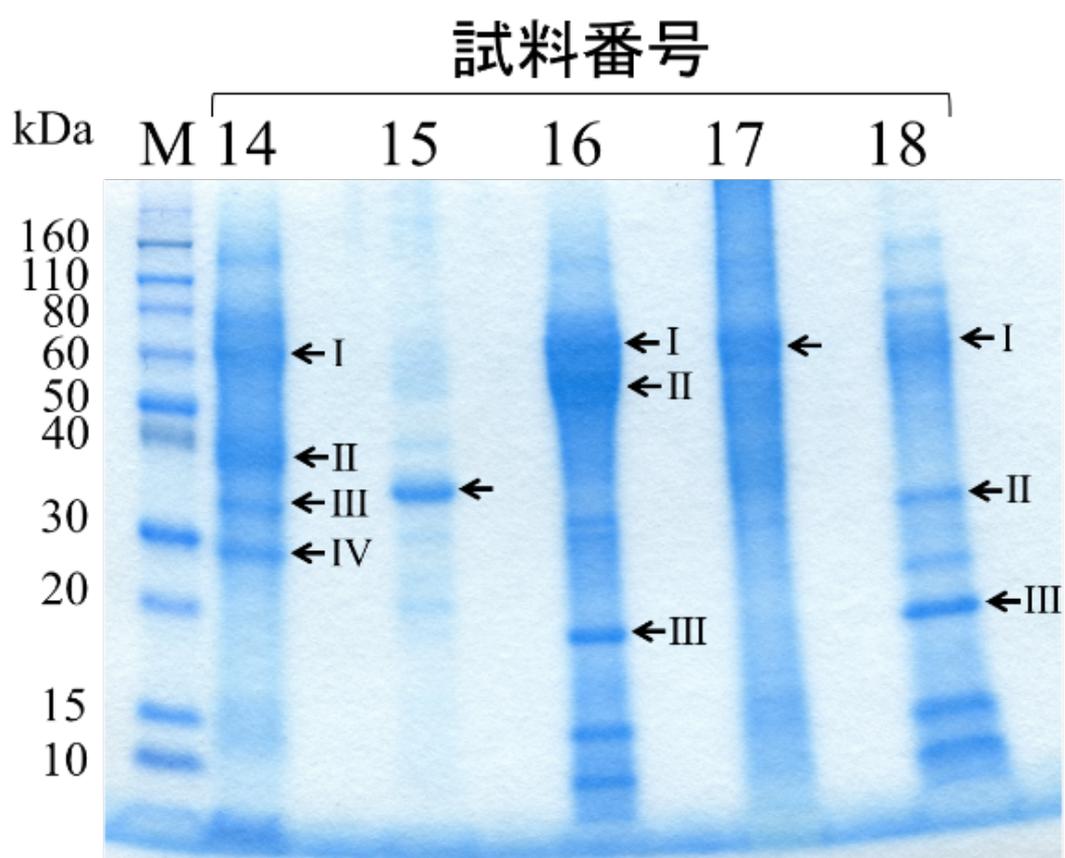


Figure 3. セルラーゼ 5 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 14: 150  $\mu$ g, 試料 15: 25  $\mu$ g, 試料 16: 120  $\mu$ g, 試料 17: 150  $\mu$ g, 試料 18: 300  $\mu$ g とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

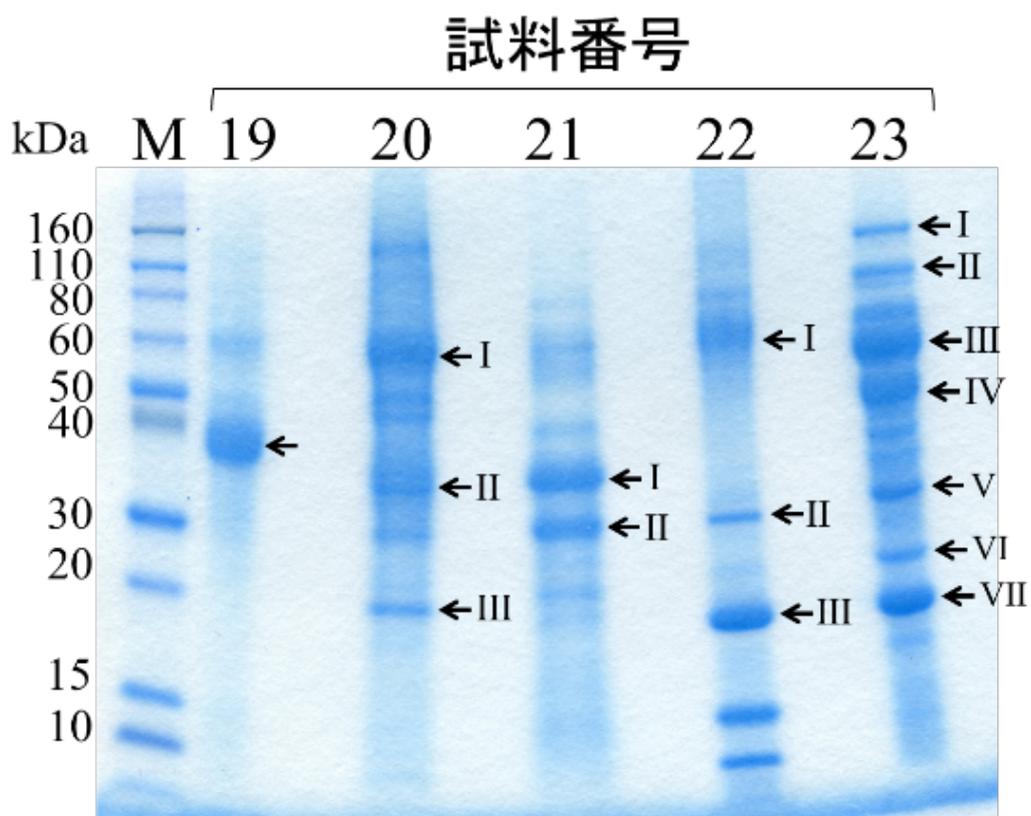


Figure 4. ヘミセルラーゼ 5 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 19: 30  $\mu\text{g}$ , 試料 20: 120  $\mu\text{g}$ , 試料 21: 120  $\mu\text{g}$ , 試料 22: 60  $\mu\text{g}$ , 試料 23: 40  $\mu\text{g}$  とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

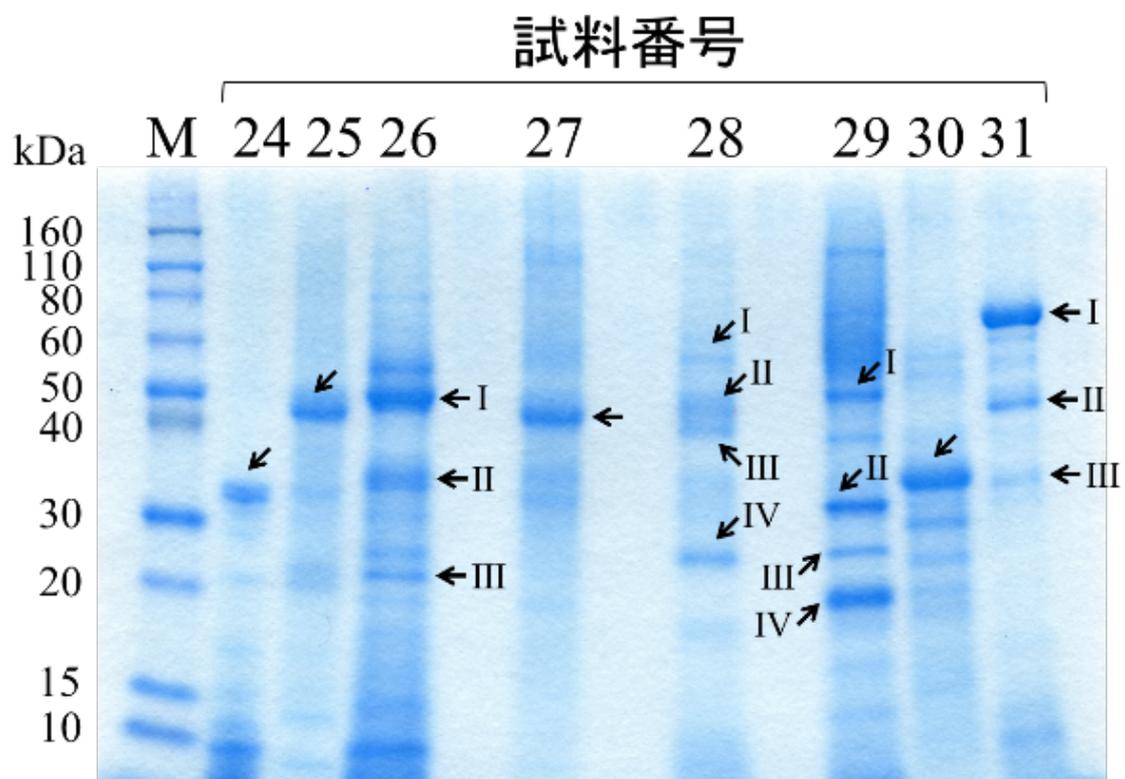


Figure 5. 真菌由来のプロテアーゼ 8 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 24: 2 ug, 試料 25: 25  $\mu$ g, 試料 26: 150  $\mu$ g, 試料 27: 100  $\mu$ g, 試料 28: 400  $\mu$ g, 試料 29: 150  $\mu$ g, 試料 30: 100  $\mu$ g, 試料 31: 20  $\mu$ g とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

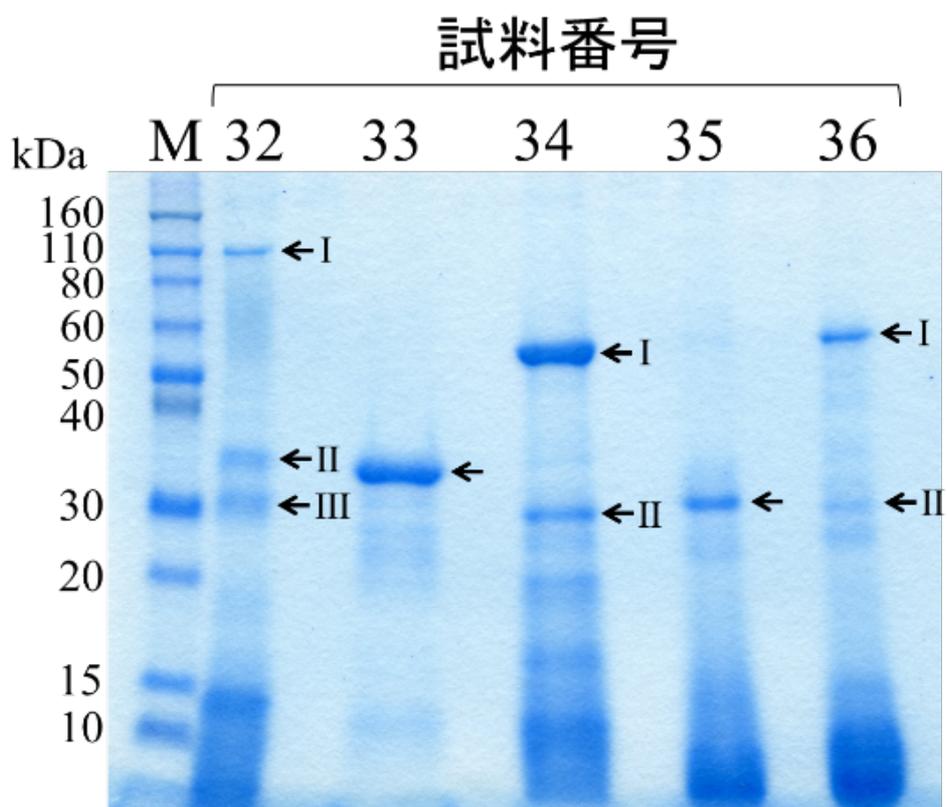


Figure 6. バクテリア由来のプロテアーゼ 8 製品の SDS-PAGE 像

M: タンパク質マーカー. 泳動した試料量は, 試料 32: 750  $\mu\text{g}$ , 試料 33: 500  $\mu\text{g}$ , 試料 34: 500  $\mu\text{g}$ , 試料 35: 600  $\mu\text{g}$ , 試料 36: 500  $\mu\text{g}$  とした. 解析を行ったバンドを矢印で示した.

Table 1 ガラク トシダーゼとアミラーゼ試料の解析結果

試料No.	付帯情報		SwissProtデータベースを用いたMascotサーチによる解析結果					
	酵素名	基原種	バンド No.	SDS-PAGE上の推定分子量 (kDa)	酵素名	基原種	分子量 (kDa)	Coverage (%)
1	$\beta$ -galactosidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	NA	123	$\beta$ -galactosidase A	<i>Aspergillus flavus</i>	110.1	19
2	$\beta$ -galactosidase	<i>Aspergillus oryzae</i>	I	71	$\beta$ -galactosidase A	<i>Aspergillus oryzae</i>	110.1	19
			II	53	$\beta$ -galactosidase A	<i>Aspergillus flavus</i>	110.1	19
3	$\beta$ -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	I	105	unidentified <sup>b</sup>	<i>Aspergillus oryzae</i>	110.1	19
			II	98	unidentified <sup>b</sup>	<i>Aspergillus niger</i>	110.1	19
4	$\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus foetidus</i>	NA	50	$\alpha$ -amylase A type-1/2	<i>Aspergillus niger</i>	55.3	28
5	$\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus niger</i>	NA	65	$\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus usamii</i>	55.3	28
6	$\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	NA	47	acid alpha-amylase	<i>Aspergillus niger</i>	53.4	21
7	$\alpha$ -amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NA	53	$\alpha$ -amylase A type-1/2	<i>Aspergillus oryzae</i>	55.3	32
8	$\alpha$ -amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>	NA	49	$\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus usamii</i>	55.3	32
9	$\alpha$ -amylase	<i>Bacillus subtilis</i>	NA	52	$\alpha$ -amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	58.4	55
10	$\beta$ -amylase	<i>Glycine max</i>	I	50	$\beta$ -amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>	58.5	28
			II	28	lectin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	58.4	58
11	glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	I	118	glucoamylase	<i>Glycine max</i>	56.4	45
			II	61	glucoamylase	<i>Glycine max</i>	30.9	35
12	glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	NA	62	glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	68.8	30
					glucoamylase	<i>Aspergillus awamori</i>	68.8	30
					glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	68.8	19
					glucoamylase	<i>Aspergillus awamori</i>	68.8	19
13	glucoamylase	<i>Rhizopus oryzae</i>	NA	62	glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	68.8	21
					glucoamylase	<i>Aspergillus awamori</i>	68.8	21
					glucoamylase 1	<i>Rhizopus oryzae</i>	65.3	45

Table 2 セルラーゼ試料の解析結果

試料No.	付帯情報		SwissProtデータベースを用いたMascotサーチによる解析結果					
	酵素名	基原種	バンド No.	SDS-PAGE上の推定分子量 (kDa)	酵素名	基原種	分子量 (kDa)	Coverage (%)
14	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	I	61	cellulose 1,4-β-cellobiosidase	<i>Aspergillus niger</i>	49.2	23
			II	40	maman endo-1,4-β-mannosidase A	<i>Aspergillus niger</i>	41.6	34
			III	33	endo-1,4-β-xylanase C	<i>Aspergillus niger</i>	35.6	51
			IV	27	unidentified			
15	cellulase	<i>Pycnoporus coccineus</i>	NA	33	unidentified			
16	cellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	I	58	cellulose 1,4-β-cellobiosidase	<i>Trichoderma viride</i>	55.3	21
			II	50	cellulose 1,4-β-cellobiosidase	<i>Trichoderma viride</i>	55.3	19
			III	18	endo-1,4-β-xylanase	<i>Trichoderma harzianum</i>	20.7	35
17	cellulase	<i>Trichoderma reesei</i>	NA	57	cellulose 1,4-β-cellobiosidase	<i>Trichoderma reesei</i>	55.4	21
					cellulose 1,4-beta-cellobiosidase	<i>Trichoderma koningii</i>	55.4	21
18	cellulase	<i>Trichoderma viride</i>	I	55	cellulose 1,4-β-cellobiosidase	<i>Trichoderma viride</i>	55.3	15
					cellulose 1,4-β-cellobiosidase	<i>Trichoderma koningii</i>	55.4	15
					cellulose 1,4-β-cellobiosidase	<i>Trichoderma reesei</i>	55.4	15
			II	31	endo-1,4-β-xylanase 3	<i>Trichoderma reesei</i>	38.2	25
					III	19	endo-1,4-β-xylanase	<i>Trichoderma harzianum</i>

Table 3 ヘミセルラーゼ試料の解析結果

試料No.	付帯情報		SDS-PAGE上の		SwissProtデータベースを用いた Mascotサーチによる解析結果			
	酵素名	基原種	バンド No.	推定分子量 (kDa)	酵素名	基原種	分子量 (kDa)	Coverage (%)
19	hemicellulase	<i>Aspergillus niger</i>	NA	39	mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase A	<i>Aspergillus niger</i>	41.6	34
20	hemicellulase	<i>Aspergillus niger</i>	I	58	glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>	68.8	11
					glucoamylase I	<i>Aspergillus kawachii</i>	68.7	11
					glucoamylase	<i>Aspergillus awamori</i>	68.8	11
					endo-1,4- $\beta$ -xylanase C	<i>Aspergillus kawachii</i>	35.6	51
					endo-1,4- $\beta$ -xylanase A	<i>Aspergillus niger</i>	35.6	45
21	hemicellulase	<i>Pyrenopeziza coccineus</i>	I	34	endo-1,4- $\beta$ -xylanase B	<i>Aspergillus kawachii</i>	24.2	27
					endo-1,4- $\beta$ -xylanase B	<i>Aspergillus niger</i>	24.1	15
					unidentified			
22	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	I	63	unidentified			
					unidentified			
					exoglucanase 1	<i>Trichoderma viride</i>	55.3	21
23	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	II	29	endo-1,4- $\beta$ -xylanase 2	<i>Trichoderma harzianum</i>	23.8	30
					endo-1,4- $\beta$ -xylanase 2	<i>Trichoderma harzianum</i>	23.8	20
					unidentified			
					xyloglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	87.3	31
					exoglucanase	<i>Trichoderma koningii</i>	55.4	17
					exoglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	55.4	17
					exoglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	50.3	18
endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	38.2	33					
24	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	III	18	unidentified			
					unidentified			
					endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	24.1	39

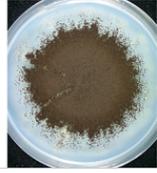
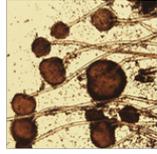
Table 4 真菌由来のプロテアーゼ試料の解析結果

試料No.	付帯情報		バンド No.	SDS-PAGE上の推定分子量 (kDa)		SwissProtデータベースを用いた Mascotサーチによる解析結果		
	酵素名	基原種		酵素名	基原種	分子量 (kDa)	Coverage (%)	
24	protease	<i>Aspergillus melleus</i>	NA	32	unidentified	unidentified		
25	protease	<i>Aspergillus niger</i>	NA	45	aspergillopepsin	<i>Aspergillus niger</i>	41.3	37
26	protease	<i>Aspergillus oryzae</i>	I	47	$\alpha$ -amylase A type-1/2	<i>Aspergillus oryzae</i>	55.3	25
			II	34	$\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus usamii</i>	55.3	25
			III	23	alkaline protease 1	<i>Aspergillus oryzae</i>	42.5	26
					alkaline protease 1	<i>Aspergillus flavus</i>	42.5	26
					alkaline protease 1	<i>Aspergillus oryzae</i>	42.5	21
					alkaline protease 1	<i>Aspergillus flavus</i>	42.5	21
27	protease	<i>Aspergillus phoenicis</i>	NA	44	aspergillopepsin-1	<i>Aspergillus phoenicis</i>	41.4	34
28	protease	<i>Aspergillus sp.</i>	I	56	unidentified			
			II	46	unidentified			
			III	42	unidentified			
			IV	25	neutral protease 2	<i>Aspergillus oryzae</i>	37.8	18
					neutral protease 2 homolog	<i>Aspergillus flavus</i>	30.6	22
29	protease	<i>Penicillium citrinum</i>	I	48	unidentified			
			II	31	subtilisin-like serine protease Pen c 1	<i>Penicillium citrinum</i>	40.5	23
			III	25	subtilisin-like serine protease Pen c 1	<i>Penicillium citrinum</i>	40.5	16
			IV	21	penicillolysin	<i>Penicillium citrinum</i>	37.7	9
30	protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	NA	34	unidentified			
31	protease	<i>Rhizopus niveus</i>	I	67	glucoamylase 1	<i>Rhizopus oryzae</i>	65.3	42
			II	47	unidentified			
			III	34	rhizopuspepsin-2	<i>Rhizopus niveus</i>	41.5	38

Table 5 バクテリア由来のプロテアーゼ試料の解析結果

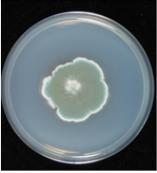
試料No.	付帯情報		バンド No.	SDS-PAGE上の 推定分子量 (kDa)	SwissProtデータベースを用いたMascotサーチによる解析結果			
	酵素名	基原種			酵素名	基原種	分子量 (kDa)	Coverage (%)
32	protease	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	I	110	unidentified			
			II	36	unidentified			
			III	30	unidentified			
33	protease	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NA	33	thermolysin	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	60.6	27
						<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	60.1	27
34	protease	<i>Bacillus subtilis</i>	I	53	$\alpha$ -amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	58.4	22
			II	29	subtilisin BPN'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	39.2	24
35	protease	<i>Bacillus sp.</i>	NA	30	subtilisin Carlsberg	<i>Bacillus licheniformis</i>	38.8	20
36	protease	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	I	58	$\alpha$ -amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	58.4	42
			II	29	subtilisin BPN'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	39.2	27

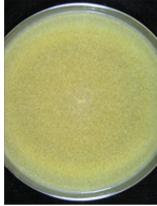


*Candida albicans* NBRC 1594      *Aspergillus brasiliensis* NBRC 9544  
 食品添加物公定法で規定








*Cladosporium sphaerospermum*      *Penicillium citrinum*      *Mucor hiemalis*  
 NIHS 0378      NIHS 0222      NIHS 0886  
 添加物公定法で規定無し、環境中に分布頻度・濃度高い

Figure 7. 供試菌株

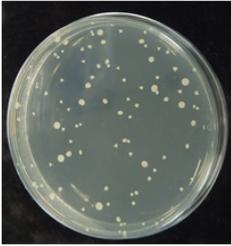
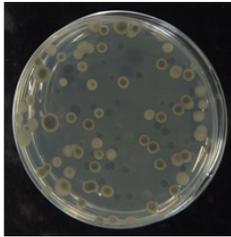
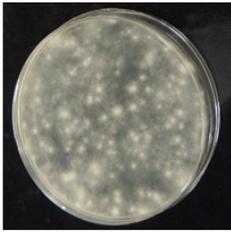
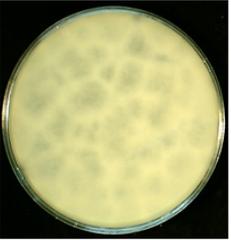
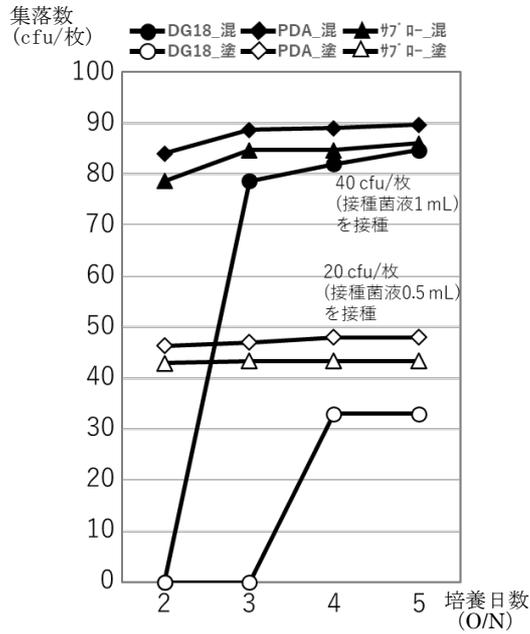
Species	<i>Ca. albicans</i>	<i>Cl. sphaerospermum</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>M. hiemalis</i>
公定法規定種	○	×	×	○	×
集落の発育性*	A	A	A	B	B
公定法 (混釈培養・ ジクローラン グリセリン 寒天)での 集落像					
集落数計測の 可・不可	いずれの培地種類・培養法でも集落数も計測可能		いずれの培地種類・培養法でも集落は 密集し数の計測は困難		

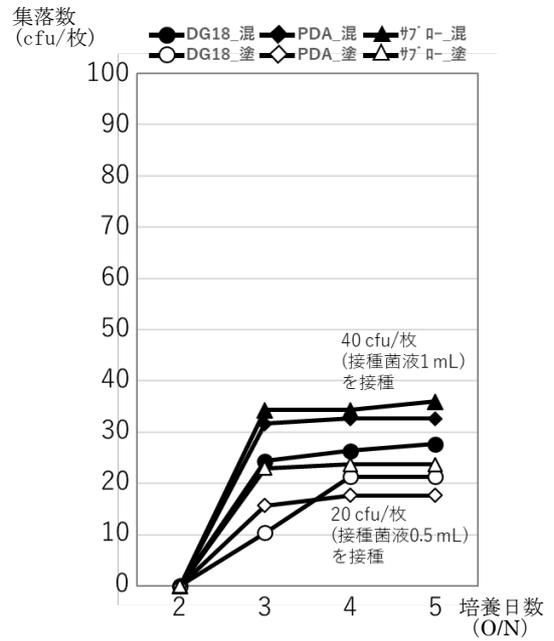
Figure 8. 公定法である DG-18 寒天を用いた混釈培養法での集落像および集落の発育状況

試験菌液の濃度は 100 cfu/mL に設定し接種した。培養 4 晩後の集落像を示した。集落の発育性 A：培養 4 晩後で小さな集落（直径 1.5 cm 以下）を形成する菌種、集落の発育性 B：A より生育が早く大きな集落を形成する菌種。

### A. *Ca. albicans*



### B. *Cl. sphaerospermum*



### C. *P. citrinum*

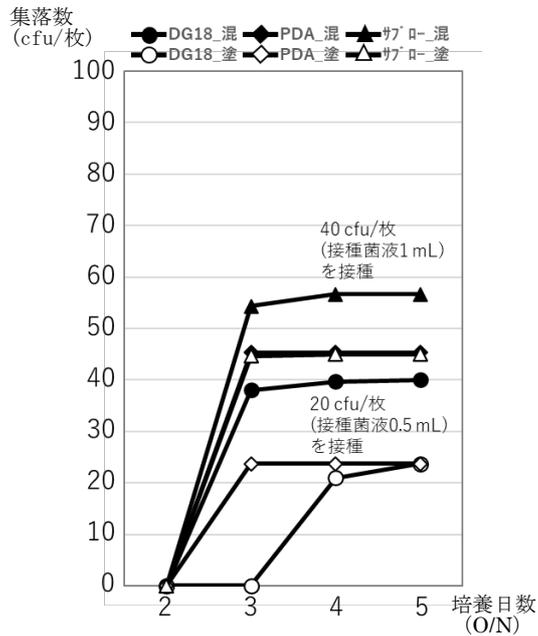


Figure 9. 小さな集落を形成する3菌種を用いた各培養条件間での真菌数計測結果の比較

混釈培養または塗抹培養と、DG-18培地・PDA培地・サブロー寒天培地の3種類の寒天培地の、それぞれ1種類ずつを組み合わせて培養条件を設定した。接種菌液は1 mLあたり100 cfuの濃度で作製し、これを平板1枚あたり、混釈培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mL接種した。3平板×3回繰り返し実験の集落数測定結果の平均値をプロットした。

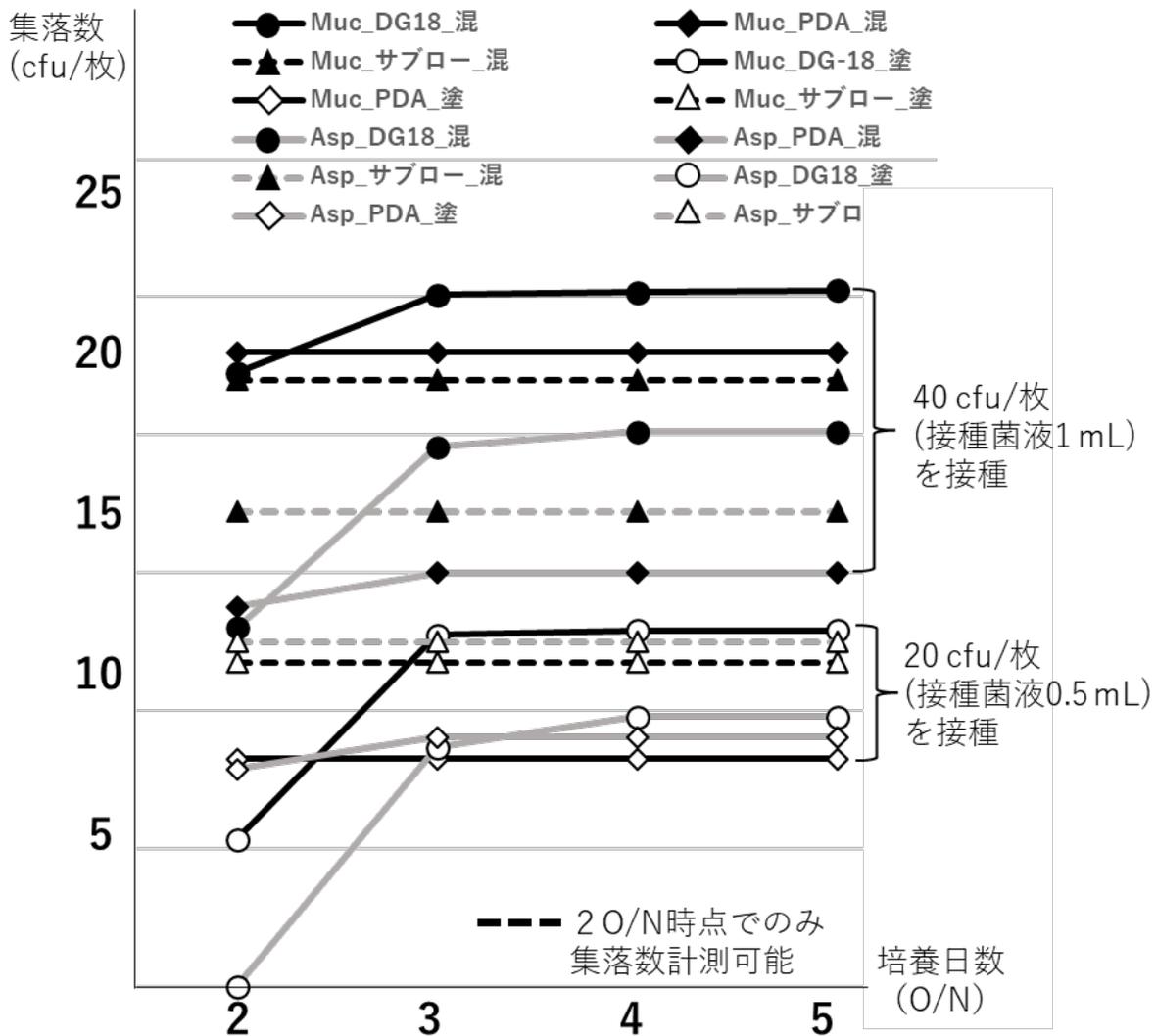


Figure 10. 大きな集落を形成する3菌種を用いた各培養条件間での真菌数計測結果の比較

混積培養または塗抹培養と、DG-18 培地・PDA 培地・サブロー寒天培地の3種類の寒天培地の、それぞれ1種類ずつを組み合わせる培養条件を設定した。接種菌液は1 mLあたり40 cfuの濃度で作製し、これを平板1枚あたり、混積培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mL接種した。3平板×3回繰り返し実験の集落数測定結果の平均値をプロットした。破線の折れ線グラフは、培養2晩目の時点では集落数の計測が可能であったが、翌日以降は集落が大きくなりすぎて、数の計測が不可能となったためデータが取得できなかったことを表す。

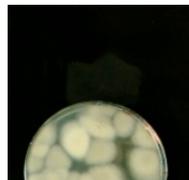
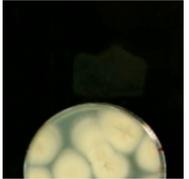
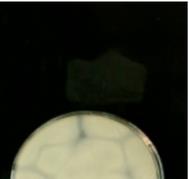
接種菌種	<i>A. brasiliensis</i> (5O/Nでの培養像)		
培地種類	DG-18	PDA	サブロー寒天
混積培養			
塗抹培養			
接種菌種	<i>M. hiemalis</i> (5O/Nでの培養像)		
混積培養			
塗抹培養			
集落計測の可・不可	集落数計測しやすい	集落は密集し数の計測は培養期間が5O/Nに近づくほど困難	

Figure 11. 大きな集落を形成する2菌種を用いた各培養条件間での集落発育状況の比較

混積培養または塗抹培養と、DG-18培地・PDA培地・サブロー寒天培地の3種類の寒天培地の、それぞれ1種類ずつを組み合わせる培養条件を設定した。接種菌液は1 mLあたり40 cfuの濃度で作製し、これを平板1枚あたり、混積培養法では1 mL、塗抹平板法では0.5 mL接種し、5晩培養後の培養像を示す。

3) 研究成果の刊行に関する一覧表(令和2~4年度)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takashina S, Igarashi Y, Takahashi M, Kondo Y, Inoue K	Screening Method for the Quality Evaluation of Cannabidiols in Water-based Products Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry.	Anal. Sci.	36	1427-1430	2020
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.	日食化誌	27	123-134	2020
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.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	DOI: 10.1016/j.yrtph.2020.104664		2020
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.	DOI: 10.1002/jsfa.11013		2020
Miura T, Sugimoto N, Bhavaraju S, Yamazaki T, Nishizaki Y, Liu	Collaborative Study to Validate Purity Determination by <sup>1</sup> H	Chem. Pharm. Bull.	68	868-878	2020

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	quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology.				
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.	日食化誌	27	164-172	2020
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 <sup>1</sup> H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods.	PLoS ONE	15(12)	e0243175	2020
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	27	42-52	2020
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	140	1063-1069	2020

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.	69	118-123	2021
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.	69	26-31	2021
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.	37	917-919	2021
Nishizaki Y, Lankin D, Chen SN, Pauli G	Accurate and precise external calibration enhances the versatility of quantitative NMR	Anal. Chem.	93(5)	2733-2741	2021

	(qNMR).				
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.	69(1)	18-25	2021
Amakura Y, Yoshimura M, Sugimoto N, Akiyama H	Characterization of components in natural products for the evaluation of existing food additives in Japan. (Review)	Chem. Pharm. Bull.	69	11-17	2021
Tsutumiuchi K, Toyoshima T, Hasegawa F, Terasawa R, Honda W, Sakakibara M, Ishida Y, Ikai Y, Ishibashi R, Furuya K, Morimoto T, Ishizuki K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Oka H	Molecular Structure of Gardenia Blue Pigments by Reaction of Genipin with Benzylamine and Amino Acids	J. Agric. Food Chem.	69	3904-3911	2021
増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子:	相対モル感度に基づくシングルリファレンス GC 法及び HPLC 法によるカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中のイソチオシアン酸アリルの定量	食衛誌	62	73-78	2021
Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K,	Purity Determination of Cyclophosphamide	Chem. Pharm. Bull.	69 (7)	630-638	2021

Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, 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, Iwamoto Y, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y	Hydrate by Quantitative <sup>31</sup> P-NMR and Method Validation				
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	21	894-901	2021
Takahashi M, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K	Study on the synthesis of methylated reference and their application in the quantity of curcuminoids using single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity	Chem. Pharm. Bull.	70	25-31	2022
Ohtsuki T, Friesen JB, Chen SN, McAlpine JB, Pauli GF	Selective Preparation and High Dynamic-Range Analysis of Cannabinoids in "CBD Oil" and Other Cannabis sativa Preparations	J. Nat. Prod.	85(3)	634-646	2022

Uchiyama N, Kiyota K, Hosoe J, Komatsu T, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Fujita K, Makino Y, Iwamoto Y, Miura T, Muto Y, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y	Quantitative <sup>31</sup> P-NMR for purity determination of sofosbuvir and method validation	Chem. Pharm Bull.	70	892-900	2022
Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N	A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on <sup>1</sup> H-qNMR for khellactone esters from <i>Peucedanum japonicum</i> root extract	Food Chem.		Submitted	2022
Bayrakceken GZ, Dogan Z, Saracoglu I, Picot L, Nagatsu A, Basaran AA	Food Plant with Antioxidant, Tyrosinase Inhibitory and Antimelanoma Activity: <i>Prunus mahaleb</i> L.	Food Bioscience	48	101804	2022
Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y	Evaluation on suitability of culture broth and conditions for <i>Escherichia coli</i> growth and gas production test of food additives	Food Hyg. Saf. Sci.		In press	

Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara-Kudo Y, Watanabe M	Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting	Food Add. Contam. A.		Submitted	