

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、¹H-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、¹H-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) ¹³C-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、 ^1H , ^{13}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 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、 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 ^1H -qNMR (DSS- d_6 in D_2O) 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 ^1H -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、 ^1H -qNMR により算出した。

C. 結果及び考察

C-1) ^{13}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 (^1H , ^{19}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}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 ^1H 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}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 NH₂ 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-NH₂ 基を滴定して GU 含量を求め、残りを AGU と見なすものである。一方、今回検討した固体 NMR 法は、AGU 含量を求め、残りを GU と見なすものとなっている。すなわち、直接的に定量する対象が異なるが、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 (¹³C-CP/MAS)によって求めたキトサン(CS1-4)の脱アセチル化度を比較すると 3~5%程度の差でほぼ同じ値を示し、いずれの試料においても滴定法が大きめの値を示した。滴定法では、試料中に存在する-NH₂ 基を測定していることから、GU 以外の-NH₂ 基を合算して測定している可能性があると考えられる。

¹³C-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、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。¹H-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 ¹H-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 ¹H-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($^1\text{H-qNMR}$ 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 $^1\text{H qNMR}$ 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($^1\text{H-qNMR}$ 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、 $^1\text{H-qNMR}$ によるベルベリンの定量にはDMSO- d_6 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_6 に溶解し、 $^1\text{H-qNMR}$ 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_6 のシグナル(9H)を基準とし、 δ 6.170 ppm (-OCH₂O-, 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}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 ^1H -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 ^1H -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 ^1H -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、 ^1H -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*- α -トコフェロールの色調と純度について. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5).
- 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}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}P 核を用いた ^{31}P -qNMRの検討(1) シクロホスファミド水和物の絶対純度の測定. 第2回日本定量NMR研究会年会(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).
 - 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}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: ³¹P-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).
- 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 (¹H-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 ¹H-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 ¹H 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 ¹H quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull.* 2020; 68: 868-878. Tsutsumiuchi 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 ³¹P-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 ^1H -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