

研究要旨

1) 既存添加物の成分規格に関する研究

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

2) 既存添加物の有効成分の解明、試験法及び分析法の開発

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

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

研究分担者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
室長

天倉吉章 松山大学薬学部
教授

井之上浩一 立命館大学薬学部
准教授

永津明人 金城学院大学薬学部
教授

大槻 崇 日本大学生物資源学部
専任講師

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所
部長

渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
室長

研究協力者

上田要一 (一社)日本食品添加物協会
専務理事

等々力博志 (一社)日本食品添加物協会
常務理事

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
研究員

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
研究員

好村守生 松山大学薬学部
准教授

内倉 崇 松山大学薬学部
特任助教

高橋未来 立命館大学大学院
博士課程大学院生

辻巖一郎 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

大波純一 国立情報研究所
オープンサイエンス基盤研究
センター

特任准教授

中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所
研究員

船江元子 国立医薬品食品衛生研究所
研究員

久保 文 国立医薬品食品衛生研究所
研究員

A. 研究目的

既存添加物 357 品目(枝番込み 374 品目, 但し, 香辛料抽出物を 1 品目(74 基原)とする)の内, 222 品目(枝番品目込み)の成分規格が設定済であるが, 残り 151 品目(枝番込み)と香辛料抽出物 1 品目(74 基原)の成分規格が未設定である(令和 2 年 12 月現在). 成分規格が未設定である理由として, 1.流通確認が取れないもの, 2.基原・製法・本質が曖昧なもの, 3.有効成分が解明できていないもの, 4.現時点の科学技術で妥当な規格試験法が設定できないもの, が挙げられる. すなわち, 少なくとも 1 に該当するものを除き, 2~4 の問題を解決することが必要である. また, 我が国の消費者の天然志向から天然由来の添加物である既存添加物の需要が合成由来の添加物に比べて高い. 既存添加物は様々な加工食品に使用されているが, 成分規格が設定

されていても古い, 若しくは国際的に認められていないものも多く残されており, 国外への輸出の障害となっている. 従って, 流通量が多いあるいは国外においても利用価値が高いと考えられる既存添加物についても海外動向及び最新技術に基づく成分規格のアップデートが必要である.

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

B. 研究方法

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

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

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

2. 既存添加物の有効成分の解明

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

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

2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析

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

3) ショウガ抽出物の成分解析

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

4) ウコン色素の定量評価の基礎検討

ウコン色素の主成分を明確にし, 簡便且つ汎用性のある定量法であるシングルリ

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

5) シタン色素の成分規格の検討

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

6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

3. 試験法及び分析法の開発

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

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

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

2) 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR)の自動化スクリプトの作成

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

3) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

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

4) 真菌基原の添加物の分析法の開発

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

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

C. D. 研究結果及び考察

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究 (委託調査)

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

2. 既存添加物の有効成分の解明

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

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

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

2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析

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

3) ショウガ抽出物の成分解析

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

4) ウコン色素の定量評価の基礎検討

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

5) シタン色素の成分規格の検討

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

6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

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

3. 試験法及び分析法の開発

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

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

2) 外部標準法定量 NMR の自動化スクリプトの作成

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

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

3) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

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

4) 真菌基原の添加物の分析法の開発

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

E. 結論

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究 (委託調査)

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

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

2. 既存添加物の有効成分の解明

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

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

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

2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析

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

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

3) ショウガ抽出物の成分解析

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

4) ウコン色素の定量評価の基礎検討

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

5) シタン色素の成分規格の検討

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

6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

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

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

3. 試験法及び分析法の開発

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

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

2) 外部標準法定量 NMR の自動化スクリプトの作成

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

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

3) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

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

4) 真菌基原の添加物の分析法の開発

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

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

1-2. 総説

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

1-3. 単行本

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

(分担執筆), 東京(2020).

2. 学会発表等

2-1. 学会

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

- 伝子塩基配列における挿入/欠失パターンおよび系統解析に基づく日本国内に分布する *Entoloma sarcopum* とその近縁種の食用および毒キノコの識別. 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会 (2020.11.24-2020.12.8)(Web).
- 7) 堤内要, 寺澤陸, 本多亘, 榊原みなみ, 長谷川文哉, 豊島智三, 石田康行, 猪飼誉友, 石橋諒, 古屋浩太, 森本隆司, 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 岡尚男: 量子化学計算を用いたクチナン青色素の分子構造に関する研究. 日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会(2020.11.24-2020.12.8)(Web).
- 8) 西崎雄三, 石附京子, 中島馨, 増本直子, 末松孝子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 外部標準法 qNMR の自動化スクリプトの作成. 第 2 回日本定量 NMR 研究会年 (2020.12.4)(LiSE 川崎生命科学・環境研究センター).
- 9) 石附京子, 建部千絵, 西崎雄三, 窪崎敦隆, 多々敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: ^{13}C -CP/MAS を用いた食品添加物キトサンの脱アセチル化度の測定. 第 2 回日本定量 NMR 研究会年 (2020.12.4)(LiSE 川崎生命科学・環境研究センター).
- 10) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 石附京子, 小出達夫, 村林美香, 宮下尚人, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 大藤克也, 清水仁, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 山田裕子, 岩本芳明, 三浦亨, 水井浩司, 朝倉克夫, 末松孝子, 小浜亜以, 後藤隆志, 安田万寿, 上田知彦, 合田幸広: ^{31}P 核を用いた ^{31}P -qNMR の検討(1) シクロホスファミド水和物の絶対純度の測定. 第 2 回日本定量 NMR 研究会年 (2020.12.4)(LiSE 川崎生命科学・環境研究センター).
- 11) 高橋未来, 高木映里, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: シングルリファレンス HPLC によるクルクミン類の定量法の検討. 第 2 回日本定量 NMR 研究会年 (2020.12.4)(LiSE 川崎生命科学・環境研究センター).
- 12) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: 相対モル感度 (RMS) を用いたアントシアニンの純度評価. 日本食品科学工学会令和 3 年度関東支部大会 (2021.3.6) (オンライン)
- 13) Takahashi M: Single Reference HPLC Approach for Application of Food Analysis. AOAC 2021 Virtual Midyear Meeting (2021.3.19) (Online)
- 14) 坂口裕子, 高橋未来, 西崎雄三, 高木映里, 橋本 誠, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一, 一川暢宏: 相対モル感度に基づくカルバマゼピンとフェニトインのシングルリファレンス HPLC 定量法の構築と基礎検討. 日本薬学会第 141 年会 (2021.3.26-3.29)(広島国際会議場他).

1-2. シンポジウム等

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

(2020.11.19)(USP on-line, 約 120 名).

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

(2020.11.19)(USP on-line, 約 120 名).

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし