

## 研究要旨

### 1) 既存添加物の成分規格に関する研究

既存添加物の国内外の安全性評価情報を収集した。また、既存添加物の内、酵素品目の成分規格について業界の考え方をまとめた。さらに、令和3年度に引き続き、既存添加物の成分規格の整備状況を整理し植物の基原の調査を行った。

### 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

昨年度までに、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、アナトー色素、オリゴガラクチュロン酸、ニガヨモギ抽出物、香辛料抽出物（ローズマリー）について検討したが、本年度は、キハダ抽出物、チャ乾留物、モウソウチク乾留物、香辛料抽出物（フェンネル、バニラ）等を加えて、これらの成分組成について継続して検討した。また、昨年度に引き続き、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、DPPH を用いた抗酸化性を指標とした定量法、真菌数試験の比較等、成分規格の試験法への応用を主に検討した

キハダ抽出物については、入手できた製品について、UPLC/PDA/MS 及び NMR により成分分析を行った結果、ベルベリンが検出され、その含量は 2.83%であった。また、キハダ抽出物の確認試験に日本薬局方の生薬オウバクの TLC による確認試験が応用できることを確認した。ヒマワリ種子抽出物については、分取 HPLC により主な成分を単離構造決定し、DPPH ラジカル消去活性による評価により、モノ及びジカフェオイルキナ酸が有効成分であることを明らかとした。更に DPPH による試験法が確認試験として有効であると判断した。アナトー色素については、昨年度に引き続き、RMS を用いる SR-HPLC 法を検討した。乾留抽出物であるチャ乾留物及びモウソウチク乾留物については、主成分の酢酸以外について GC/MS による分析を行い、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が含まれると推定された。

qNMR の応用では、香辛料抽出物(フェンネル、バニラ)の主成分が定量可能であることが確認できた。SR-HPLC においては、PDA 検出器の応答の校正が定量精度の向上に繋がることから、校正用化合物候補のナフトキノ誘導体の効率的な合成、RMS 基準物質(SR 化合物)の設計及び合成について検討した。食品添加物公定書の微生物限度試験における真菌数試験について、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する目的で試験条件を比較検討した。

## 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  
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  
准教授

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

背黒勝也 (一社)日本食品添加物協会  
専務理事

藤井結花 (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

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

布目真梨 立命館大学大学院  
助教

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  
室長

中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所  
短時間非常勤職員

船江元子 国立医薬品食品衛生研究所  
短時間非常勤職員

## A. 研究目的

既存添加物には、公的な成分規格が未だ設定されていない品目がある。成分規格が未設定である理由として、1.基原・製法・本質が曖昧、2.有効成分が解明できていない、3.現時点の科学技術で妥当な規格試験法が設定できない、4.流通確認が取れない、が挙げられる。すなわち、1～3に係る情報の収集、技術開発等が既存添加物の成分規格設定において引き続き必要とされている。また、国外においても利用価値が高いと考えられる既存添加物については海外動向及び最新技術に基づいて成分規格のアップデートが必要である。このような背景から、本研究では、既存添加物の成分規格の設定又は改正を迅速化するための基礎情報を得ることを目的に、前述の(1)～(3)について検討してきた。

令和3年度に引き続き、本研究では、(1) 既存添加物の成分規格に関する研究：基原・製法・本質の調査及び自主規格、流通実態及び安全性評価状況等の調査。(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

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(SR-HPLC等)を検討した。また、微生物限度試験の試験法の改良を目指し試験条件を比較検討した。

## B. 研究方法

### 1. 既存添加物の成分規格に関する研究

#### 1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

安全性評価が完了していない品目(H8年に「基原、製法、本質からみて、現段階において安全性の検討を早急に行う必要はない」と判断された品目(消除された「骨炭色素」及び「フェリチン」を除いた107品目)のうちの安全性評価が未報告の品目及びこれまでに報告の無かった3品目(「グレープフルーツ種子抽出物」及び「ミルラ」)について、海外評価機関等における安全性評価の状況を調査した。業界の考え方も踏まえ酵素品目の基原に調査方法の改正について検討した。既存添加物の成分規格の整備状況と流通を調査し情報整理した。食品添加物公定書に未掲載の既存添加物の内、植物を基原とするものについて学名、和名、別名を調査した。

### 2. 既存添加物の有効成分の解明

#### 1) 既存添加物キハダ抽出物の成分分析

入手できた「キハダ抽出物」製品について、TLC、UPLC/PDA/MS及びNMRによ

り成分分析を行った。溶解性について、日本薬局方の「オウバク」の成分規格を参考に検討した。主成分とされるベルベリンの含量については、<sup>1</sup>H-qNMRにより算出した。

#### 2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析及び規格試験法の最適化

昨年度に引き続き、ヒマワリ種子抽出物の成分データの集積を目的に成分解析を行った。また、有効成分の確認のためDPPHラジカル消去活性による抗酸化能を評価すると共に、DPPHを用いた抗酸化性を指標とした定量法の構築を検討した。成分分析では、常法に従い、逆相HPLC、Diaion HP-20及びSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーを行い、製品より主成分を単離した。抗酸化性の評価には、DP市販のDPPH Antioxidant Assay Kit等を用い、製品の画分、又は必要に応じて主成分に対応する試薬等について評価し、各成分の寄与率を推定した。

#### 3) 既存添加物アナトー色素の定量評価の基礎検討

昨年度に引き続き、アナトー色素の主成分であるノルビキシン及びビキシンの定量法としてRMSを用いたSR-HPLCを検討した。HSCCCにより、ノルビキシン及びビキシンの異性体の単離を検討した。更に、類似した極大吸収波長を持つ基準物質(SR)をデザインし、その有効性を確認した。

#### 4) qNMRを用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

昨年度に引き続き、「香辛料抽出物」の規格試験法への<sup>1</sup>H-qNMR法の適用可能性を検討とした。「香辛料抽出物」の中から、フェネル及びバニラについて検討した。フェネルについては、anetholeが主要成分と考え、生薬ウイキョウ中のanetholeの定量法を検討した。また、anetholeが主な精油成分と考えられるダイウイキョウ及びアニスについても検討した。また、バニラではvanilline及びethylvanillineが指標成分と成り得ると考え、生薬バニラに含有されるこの2成分について検討した。それぞれについて<sup>1</sup>H-qNMR測定に適した試料溶液を調製し含量を測定した。

#### 5) 乾留抽出物添加物中の原料熱分解物の定量分析

乾留製法をとる既存添加物の品質確保のため、木酢液、チャ乾留液及びモウソウチク乾留物の成分分析を行った。入手した試料について、GC/MS分析に付し、NISTライブラリーと照合した。また、標準品が入手できたものについて定量分析を行った。

### 3. 試験法及び分析法の開発

#### 1) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

昨年度に引き続き、PDA検出器の校正物質を設計した。比較的長波長域に吸収帯を示す、4-ジメチルアミノアニリン構造とクロロ基を有するナフトキノ誘導体を基にして、置換基を種々変更することで広範囲の波長域に吸収を示す分子を探索した。定量用のシングルリファレンス化

化合物の設計においては、定量の対象としてカロテノイド類を想定し、類似の吸収波長を示す骨格構造の化合物を選択して、炭化水素基を導入することでHPLCクロマトグラム上での保持時間を調整した。

#### 2) 真菌数試験法の比較検討

公定書での「培地の性能及び試験法の適合性」を参照した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する目的で検討した。比較した供試菌としては、公定法で規定された*Candida albicans* NBRC 1594 および *Aspergillus 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。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。

### 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)

昨年度に引き続き、既存添加物の安全性評価が完了していない品目（H8年に「基原、製法、本質からみて、現段階において安全性の検討を早急に行う必要はない」と判断された品目）のうちの安全性評価が未報告の品目に関して、海外評価機関等の安全性の評価報告を調べた。その結果、安全性評価報告のあったものは、「アスコルビン酸オキシダーゼ」、「 $\alpha$ -グルコシダーゼ」、「L-アラビノース」、「酵素処理ヘスペリジン」、「植物性ステロール」、「微小繊維状セルロース（微結晶セルロースとして）」の6品目であった。

「食品添加物の成分規格作成の解説」の学名の調査方法の項(3.6.6)を基に、調査対象となるデータベースを追加し、学名の変更等が発生した場合の学名の正当性の確認方法などを加筆する形で改正案をまとめた。

公定書に未掲載の既存添加物について、成分規格の整備と流通の状況を整理した(2022.12時点の調査)。未掲載の既存添加物は164品目(枝番を除く品目数は146)、これらの内、それらのうち、公定規格案あるいは自主規格のあるものは110品目であり、ないものは54品目となった。

## 2. 既存添加物の有効成分の解明

### 1) 既存添加物キハダ抽出物の成分分析

入手できた「キハダ抽出部」製品について成分組成を調べた。分析に適した条件を得るため、まず、溶解性について検討した。本製品と基原のキハダは、日本薬局方に記載されている「オウバク」の基原と等しいため、「オウバク」の成分規格を参考に分析条件の検討を行った。主成分であ

るベルベリンは、HPLCによる分析法の適用が望ましいと考えられたことから、ベルベリンが十分に抽出できる溶媒を検討した。その結果、DMSOが適当であると判断した。DMSOにより抽出した溶液について、UPLC/PDA/MSにより分析した結果、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。ただし、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は確認できなかった。次に、 $^1\text{H-qNMR}$ によりベルベリンの含量を求めた。すなわち、「キハダ抽出物」製品をDMSO- $d_6$ に溶解し、ベルベリンのシグナルからその含量を直接求めた。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。また、日本薬局方の「オウバク」等の確認試験を参考にTLCによる分析を行ったところ、ベルベリンが検出可能であることが確認された。

### 2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析及び規格試験法の最適化

ヒマワリ抽出物製品より、文献未記載の2成分(化合物1及び2)を単離した。化合物1及び2の化学構造を、高分解能マスマスペクトル、各種NMRデータより決定した。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構造であることが確認された。また, 化合物2は化合物1と同様に3位は*S*配置であると構造決定した。

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。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。また, ヒマワリ抽出物製品のDPPHラジカル消去活性(IC<sub>50</sub>)は, 約2mg/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, 今回の製品の結果より, 測定で用いる試料の秤取量は40mg(40mg(秤量値)/20mL(試料溶液量))が適切と考えられた。

### 3) 既存添加物アナトー色素の定量評価の基礎検討

昨年度に引き続き, ノルビキシン及びビキシンのHPLC分析条件を検討した。HPLCのピーク面積からノルビキシンが91.1%, ビキシンが97.0%の純度と推定され, 且つ, 不純物としてノルビキシンにはビキシンが, ビキシンにはノルビキシンが混ざっている状態であった。このため,

両者の混合溶液には, 不純物として混入するものが加算されてしまい, 正確な濃度に調製できない。そこで両者をHSCCCにより単離し, それをRMS測定用の標品として用いた。また, 基準物質(SR)として460nm付近に吸収極大を持つ官能基に異なる長さの炭素鎖が結合した化合物をデザインした。炭素鎖の長さにより保持時間をコントロールし, ノルビキシン及びビキシンの保持時間に近いものを基準物質として用いた。それぞれの検量線の相関係数は0.997以上であり, 基準物質(SR)として十分に機能すると考えられた。

### 4) qNMRを用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

Anetholeの定量では, 独立して観測された7位プロトンシグナルを用いた。<sup>1</sup>H-qNMR測定の結果, 生薬ウイキョウ中のanethole含有率は0.54±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)5.48~7.32%, アニスでは1.14~1.33%という結果を得た。この定量値は, HPLCでの定量結果と近似し, <sup>1</sup>H-qNMRが有効であることが示唆された。

Vanilline及びethylvanillinの定量では, それぞれのアルデヒド基のプロトンシグナルが9.78ppm, 9.80ppmに極めて近接して観測されたが, シャープなシグナルで, 同時に存在しても別個に積分値を測定することができ, 2化合物の同時定量が可能であった。<sup>1</sup>H-qNMRにより, 生薬バニラにはvanillinが0.42~0.44%, ethylvanillinが0.039~0.045%と見積もられた。バニラエッセンスにはvanillinのみ

が 0.77%, バニラオイルでは vanillin が 0.65%, ethylvanillin 0.64% 含有されていることがわかった。この結果を HPLC と比較すると、両化合物の定量では、vanillin は <sup>1</sup>H-qNMR と極めて近似し、正しく定量できていると判断できたが、低含有率の場合には ethylvanillin の定量が困難であることがわかった。

Cinnamaldehyde の安定性の確認を、アルデヒド基のプロトンシグナル 9.65 ppm の積分値を指標にして行った。HPLC で用いられる溶媒中で経時的にどのように変化するか検討した結果、methanol-d<sub>4</sub> 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。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、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。

### 5) 乾留抽出物添加物中の原料熱分解物の定量分析

乾留抽出物中の熱分解物のうち、36 の標準品が入手できた 36 種について、GC/MS に付し、保持時間及び MS スペクトルの一致を確認し、試料中の化合物を同定した。同定した 36 化合物について、SIM 測定により定量分析を行った。これらの含量は最大で 0.5% 程度 (カフェイン)、合算で 1~4% 程度と微量であった。

## 3. 試験法及び分析法の開発

### 1) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

ナフトキノン誘導体の調製においては、共通の中間体を利用した一段階での合成

によって、置換基の異なる誘導体を効率的に得た。得られた化合物の吸収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ニリン構造が重要であり、一方でクロロ基の置換によってもスペクトルの長波長化や機能化が可能であることが分かった。基準物質(SR)の合成においては、共通の中間体としてビスインドリルマレイミドの酸無水物を利用し、一段階で多種の化合物の混合物を得た。これら混合物は HPLC 上で良好に分離可能であり、HPLC クロマトグラム上で定量対象の化合物と重ならない位置に溶出する分子をスクリーニング的に調製できた。今後は本分子を応用することでカロテノイド類の定量法に展開していく。

### 2) 真菌数試験法の比較検討

DG-18 寒天、ポテト・デキストロース寒天またはサブロー・ブドウ糖寒天を用い、混釈培養法または塗抹培養法にて培養を行った。培養期間は 3~5 日間、接種菌液濃度は 20 または 100 cfu/mL とした。培養に用いた菌種は、規定法として用いられる *Ca. albicans* および *A. brasiliensis* の他、普遍的な環境菌の 3 菌種を用いた。25±1°C で培養後、集落数を計測した。検討の結果、いずれの試験条件でも、培養 5 日後で小さな集落 (直径 1.5 cm 以下) が生育する性質の *Ca. albicans*, *C. sphaerospermum* および *P. citrinum* では集落数計測は可能であった。一方で集落生育が比較的早くかつ大きい *A. brasilliensis* および *M. hiemalis* 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。これに対し、

20 cfu/mL の接種菌液を使用する，または培養期間を規定法より短くすることで，集落数計測が可能となった。

## 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)

既存添加物の安全性確保のため，昨年度に引き続き安全性情報について調査したが，新しい情報は殆どなかった。また，成分規格案及び自主規格はないものは 54 品目であった。安全性情報の収集及び成分規格設定が困難な品目については，引き続き調査が必要である。また，成分規格設定については，事業者の意見を取り入れる必要がある。特に，基原生物の学名の記載については，その記載方法及び調査方法と共に，新しい知見により学名変更があった際の判断基準を明確にす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

#### 1) 既存添加物キハダ抽出物の成分分析

入手できた「キハダ抽出物」製品には，ベルベリンが主成分として含まれることがわかった。今回，ベルベリンの定量には<sup>1</sup>H-qNMR を用いたため，日本薬局方等を参考に更に一般的で且つ正確な定量分析法を検討することによって，成分規格に定量法を設定できると思われた。また，確認試験法は TLC が適用できると考えられた。しかしながら，現在，「キハダ抽出物」としては 1 製品しか流通が確認されていないため，製品間に成分組成に差がないことの確認が成分規格の設定には必要

である。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ながら，規格化を検討する必要があると判断した。

#### 2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析及び規格試験法の最適化

成分分析の結果，文献未記載の 2 成分(化合物 1 及び 2)を同定した。DPPH 消去活性を評価したところ，両化合物は有効成分の一つであることが確認できた。また，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，ヒマワリ抽出物は，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が準用できることがわかった。その試料秤取量は 40 mg が適切と考えられた。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。

#### 3) 既存添加物アナトー色素の定量評価の基礎検討

アナトー色素のノルビキシン及びビキシンについて，RMS を用いた SR-HPLC について検討した結果，分析条件と共に基準物質(SR)として適した化合物がデザインできた。1. *trans*-ノルビキシン及びビキシンの合成と純度評価，2. 基準物質(SR)の純度評価と分析対象の RMS の算出，3. 基準物質(SR)の大量合成と供給，について検討することによって，正確且つ信頼性の高いアナトー色素の分析法が構築できると考えられた。



#### 4) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

ウイキョウ、ダイウイキョウ、アニス中の anethole の  $^1\text{H}$ -qNMR を用いた定量条件を確立した。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  $^1\text{H}$ -qNMR 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。 $^1\text{H}$ -qNMR を用いることで、ケイヒの重要な精油成分である cinnamaldehyde は methanol- $d_4$  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) 乾留抽出物添加物中の原料熱分解物の定量分析

乾留抽出物である木酢液、チャ乾留物及びモウソウチク乾留物の品質確保を目的として、これら添加物中に含まれる原料由来の熱分解化合物について、GC/MS による定量分析を行ったところ、含量は最大で 0.5%程度、合算で 1~4%程度と微量であった。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。

### 3. 試験法及び分析法の開発

#### 1) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

昨年度に引き続いて、HPLC を用いた定量分析法において、PDA 検出器の装置間での校正に利用可能な化合物の開発を目的として検討を行った。本年度は広範囲

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 1,4-ナフトキノン誘導体を選択した。合成したナフトキノン誘導体の長波長域における吸収にはジメチルアミノ基が重要であることが分かった。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、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。ビスインドリルマレイミド分子を母骨格とし、炭化水素鎖を導入することで HPLC 上での保持時間の調整が可能となった。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。

#### 2) 真菌数試験法の比較検討

公定書の微生物限度試験の参考に資するために、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。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。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。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。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.*, 2022; submitted.
- 3) 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. Saf. Sci.*, in press.
- 4) 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.
- 5) 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: 25-31.
- 6) 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.*, 2022; in press. (doi: 10.1021/acs.jnatprod.1c00976.).
- 7) 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*, 2022; 48: 101804.
- 8) 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 Hygiene and Safety Science*. 2022; accepted.
- 9) 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 Additives & Contaminants: Part A. 2023; submitted.

## 2. 学会発表等

### 2-1. 学会

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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 法によるアナトール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)
  - 13) 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)
  - 14) 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): 試料間でレーザ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)
  - 15) 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)
  - 16) 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)
  - 17) 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)
  - 18) 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)
  - 19) 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)
  - 20) 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)
  - 21) 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)
  - 22) 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)
- 2-2. シンポジウム等
- 1) 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(2021.5.21) (Web, 約 200  
名).

**H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)**  
なし