

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和5年度～令和7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 既存添加物の品質確保を目的に、流通実態、自主規格、安全性評価状況の調査を行うと共に、入手できた品目について成分組成の調査、有効成分又は指標成分の同定、更に必要に応じて分析法の開発を行った。本研究で得られた成果は、各品目について公的な成分規格設定を行う際にその科学的な根拠情報として活用される予定である。具体的には、既存添加物の内、「カロブ色素」、「カシアガム」、「香辛料抽出物(シナモン、バジル、クローブ、コショウ、コリアンダー、セロリ)」、「アナトー色素」、「スピルリナ色素」、「ムラサキヤマイモ色素」、「メナキノン(抽出物)」、「酵素(ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ等)」等を対象品目とし、各品目に適した分析法の開発を行い、公的な試験法への実用化を検討した。

「カロブ色素」については、主色素成分の同定し、確認試験法及び RMS を利用した定量法(RMS 法)の規格試験への導入を検討した。「カシアガム」については、不純物であるアントラキノン類の抽出法及び定量法を検討し、JECFA 法よりも正確な純度試験法が設定可能であることを見出した。「香辛料抽出物」については、流通製品及び基原植物中の有効成分を $^1\text{H-qNMR}$ により直接定量でき、品質管理に応用可能であることを確認した。また、 $^1\text{H-qNMR}$ は、アントシアニン類の正確な純度評価において、最も信頼性の高い手法であり、アントシアニンを主色素成分とする既存添加物について RMS 法を導入する際に活用できることがわかった。「ムラサキヤマイモ色素」については、主色素成分がアントシアニン類であることを明らかとし、HSCCC による精製条件を決定した。「スペルリナ色素」については、HPLC 定量法及び HPLC-HRMS による定性法を確立した。「アナトー色素」及び「メナキノン(抽出物)」については、RMS 法が規格試験の定量法に導入可能であることを確認した。「酵素」については、基原微生物の同定法を検討し、マトリクスの変更や消化酵素の併用が検出ペプチド数を増加させ、Coverage を上昇できることを明らかとした。また、基原微生物の同定精度の向上には、国際整合を考慮した最新の分類情報を常に収集し、データベースの登録情報の更新が重要であることを明らかとした。

また、公的な試験法への導入のために、分析法の開発を行った。既に基盤技術となっている RMS 法の定量値の装置間差の要因を調べ、補正法を導入することにより精度向上が可能であることを明らかとした。更に、RMS 法に利用可能な校正物質の合成及びスペクトルデータの比較により、ユニバーサルな校正物質の創出に資する知見を得ることができた。

食品添加物中のPb及びAsの定量法としてEDXが利用可能であるか検討を行い、品質管理において十分な精度を有することを明らかとした。また、食品添加物中の窒素含量の定量に元素分析法が適用可能であることを確認した。EDX及び元素分析法には、専用の装置が必要という欠点があるが、試験者や環境への負荷を大幅に低減できるという大きな利点がある。従来法との比較により、各品目の公的な試験法への導入の推進に資する従来法と同等以上の性能を有することが確認できた。

研究分担者

	吉成知也	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	衛生微生物部第四室長
	食品添加物部長	中西早苗
阿部 裕	国立医薬品食品衛生研究所	短時間非常勤職員
	食品添加物部第二室長	船江元子
増本直子	国立医薬品食品衛生研究所	短時間非常勤職員
	生薬部第二室長	好村守生
辻巖一郎	国立医薬品食品衛生研究所	准教授
	有機化学部主任研究官	内倉 崇
渡辺麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所	特任助教
	衛生微生物部第三室長	高山卓大
西崎雄三	東洋大学食環境科学部	助教
	准教授	清水公徳
天倉吉章	松山大学薬学部	教授
	教授	伊藤紫野
井之上浩一	立命館大学薬学部	大学院生
	教授	松村雅彦
永津明人	金城学院大学薬学部	(一社)日本食品添加物協会
	教授	専務理事
大槻 崇	日本大学生物資源科学部	藤井結花
	准教授	(一社)日本食品添加物協会
		常務理事
		木戸啓之
		(一社)日本食品添加物協会
		常務理事

研究協力者

川末慎葉	国立医薬品食品衛生研究所	御所窪誠	(一社)日本食品分析センター
	食品添加物部研究員	渡辺実薫	(一社)日本食品分析センター
石附京子	国立医薬品食品衛生研究所	座間俊輔	(一社)日本食品分析センター
	食品添加物部研究員	伊藤朱美	(一社)日本食品分析センター
中島 馨	国立医薬品食品衛生研究所	藤松芽生	(一社)日本食品分析センター
	食品添加物部研究員		

A. 研究目的

令和6年(2024年)2月に第10版食品添加物公定書(以下、第10版公定書)が告示され、成分規格が未設定の既存添加物は全357品目中99品目となった(枝番品目は一部でも設定済のとき、その品目の成分規格は設定済とした場合)。更に、令和7年(2025年)に既存添加物の第5次消除が実施され、全327品目中67品目の成分規格が未設定となっている。これら成分規格が未設定の品目については、1. 基原・製法・本質、2. 有効成分又は指標成分、3. 分析法、等の調査及び検討を行い、成分規格設定のための基礎情報の収集が急務となっている。

本研究では、このような要求に対し、(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、安全性評価状況等の調査を行う、(2) 既存添加物の有効成分の解明：最新の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情報として、有効成分あるいは指標成分を明らかにする、(3) 試験法及び分析法の開発：定量用標品の代替物質の合成・供給、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、新規分析法を開発、次いで実用化を行う。について検討した。すなわち、本研究では、既存添加物の公的な成分規格の設定及び改正に繋がる基礎情報の収集と同時に科学技術発展に資する新規分析法の開発・実用化、公的試験法への導入を検討した。

B. 研究方法

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

既存添加物の公的な成分規格設定のための基礎情報を得ることを目的に、主に第10版公定

書に未収載品について、自主規格又は自社規格の整備状況、公的な規格案の作成状況、流通実態、国内外の安全性評価状況等について調査した。

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

成分規格の設定又は改正が望まれる品目の内、流通が確認され試料が入手できた品目について成分組成を分析し、有効成分又は指標成分を探索した。また、必要に応じて次項「3. 分析法及び試験法に関する研究」で検討した手法を応用した。具体的には「カロブ色素」、「カシアガム」、「香辛料抽出物(シナモン、バジル、クローブ、コショウ、コリアンダー、セロリ)」、「アナトー色素」、「スピルリナ色素」、「ムラサキヤマイモ色素」、「メナキノン(抽出物)」、「酵素(ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ等)」について検討した。

3. 分析法及び試験法に関する研究

2に示した品目の内、「アナトー色素」、「スピルリナ色素」、「ムラサキヤマイモ色素」、「メナキノン(抽出物)」、「酵素(ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ等)」に対して、各品目に適した分析法及び試験法を検討した。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。本研究で用いた手法は、qNMR、各種NMR測定、HPLC、分取HPLC、相対モル感度(RMS)を用いた定量法、LC/MS、GC/MS、TLC、HSCCC、元素分析、XRF、MALDI-ToF-MS、ペプチドマスフィンガープリント法(PMF)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

第 10 版公定書未収載品について、①自主規格(案)及び第 11 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国内食品市場における流通実態、④国内外の安全性評価の実施状況、等について調査結果をまとめた。また、第 10 版公定書既収載品目の内、改正が必要とされた品目については、その成分規格案をまとめた。

具体的には、令和 5 年度は、成分規格が未設定である既存添加物について、日本食品添加物協会の協力を得て、自主規格、自社規格、又は業界団体が提案する成分規格案を、令和 6 年度は国内市場における流通・使用実態調査を、令和 7 年度は既存添加物全品目の安全性評価状況を調査し、これらをまとめた。計 3 年間の調査、本研究班で得られた知見から、別に成分規格案を修正、あるいは新規作成し、業界団体にフィードバックし試験データの提供を依頼する予定である。更に得られた情報から成分規格設定が実現可能な品目を選出し、別に第 3 者検証を行い、第 11 版公定書作成検討会(間に合わない場合は第 12 版公定書作成検討会)に成分規格案を提出する予定である。

自主規格、流通実態及び安全性評価状況の調査において、第 10 版公定書未収載品の内、情報に乏しく、製造又は輸入に携わる国内事業者が見つからず、試験に供する原体の入手が困難であり、成分規格案の策定や安全性評価が実質的に不可能と判断できる品目があった。これらの品目については、引き続き調査が必要であるが、消除手続きを進める、あるいは別の方策を講じる必要がある。令和 7 年 2 月 18 日の食品衛生基準審議会添加物部会において「既存添加物の取扱いにかかる今後の方針について」が示され通り、安全性評価が完了していないもの及び成

分規格が設定されていないものについて、製造や使用実態に関する情報を収集し、毒性試験や成分規格の設定が不要な場合、使用基準又は製造基準を設定し、製品としての安全性及び品質を確保する方針で今後検討する予定である。

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分研究

食品添加物カロブ色素は、第 10 版食品添加物公定書に収載されている着色料であるが、確認試験は呈色を確認する定性試験のみであり、本添加物の特徴成分を具体的に確認する試験法の提案が望まれる。本研究では、カロブ色素の主要成分を解明することで、高度な品質保証のための試験法の提案につなげることを目的に検討を行った。

カロブ色素製品の成分精査を行った結果、5 つの化合物(dihydrophaseic acid β -D-glucoside, 2 種の schaftoside 配糖体, schaftoside, isoschaftoside)を単離し、HPLC 分析における指標成分候補として schaftoside が確認された。

分析検討の過程で、含有成分として複数の schaftoside 配糖体の含有が認められた。これら配糖体は天然物である原料によって含有量にばらつきが生じることも考察されたため、定量分析として、schaftoside を直接分析する方法と、酵素分解により schaftoside に誘導して分析する方法を検討し、いずれにおいても定量値を算出することができた。指標成分候補とした schaftoside について、TLC 分析による確認試験を検討した結果、H₂O または 50%MeOH を抽出溶媒として調製した試料溶液をシリカゲル板にスポットし、*n*-ブタノール/酢酸/水系溶媒で展開し、UV (254 nm)照射することで、*R_f* 0.4 付近に schaftoside の明瞭なスポットを確認すること

ができ、分析可能であることが示唆された。

食品添加物カロブ色素製品に含有する schaftoside の定量分析に関する検討として、H₂O, 50%MeOH, 50%EtOH, MeOH, EtOH でそれぞれ抽出したものを試料溶液とし、HPLC による絶対検量線法により schaftoside の定量分析を行った結果、抽出溶媒としては H₂O の抽出効率がよく、次いで 50%MeOH, 50%EtOH で、含水の方の抽出量が高い傾向が示唆された。また、RMS 法による分析について、rutin 3 水和物を基準物質した定量法について検討した結果、絶対検量線法による定量データとほぼ近い値となり、グラジエント溶出条件においても定量分析可能であることが示唆された。

2) 既存添加物の基準策定のための ¹H-qNMR を用いた成分定量

既存添加物「香辛料抽出物」の規格試験法への ¹H-qNMR の適用のため、「クローブ抽出物」「クローブ香料」等、クローブ関連製品中の eugenol の含有率の定量、バジル関連製品中の rosmarinic acid の定量、「コリアンダーオイル」とコリアンダー種子関連製品の linalol の定量、さらに、「セロリーシードオイル」とセロリー種子関連製品中の butylphthalide の定量について検討した。

2-1) チョウジ、クローブ末、「クローブ香料」、 「クローブ抽出物」、オールスパイス末中の eugenol の定量

Eugenol 標準品中の eugenol の含有率は 97.34% と見積もられた。生薬チョウジ中の eugenol 含有率は 13.01±0.32%、市販クローブ末では 8.11～14.83%、市販オールスパイス末では 2.14～2.67% という結果を得た。「クローブ香料」の eugenol 含有率は 81.58%、「クローブ抽出物」は 31.93% であった。HPLC から得られた各試料中

の eugenol の含有率は ¹H-qNMR での定量値に極めて近似した値であった。ゆえに、¹H-qNMR が HPLC の代わりになり得る方法であることが確認できた。

2-2) バジル中の rosmarinic acid の定量

市販バジル末中の rosmarinic acid の含有率は、2 製品ではそれぞれ 1.51% と 0.70%、他の 2 製品ではシグナルが観測されず、測定不能だった。栽培した 5 品種では、葉における含有率が 0.83～1.90% であったのに対して、茎ではシグナルを観測できない(4 品種)か測定可能でもわずか(1 品種, 0.14%) であった。このようにバジル由来の製品の rosmarinic acid の定量が ¹H-qNMR を用いて可能であることが確認できたと同時に、rosmarinic acid の有無によって用部がバジルの植物体のどの部分かの判断材料になることもわかった。

2-3) 「ブラックペッパーオイル」及びコショウ 末中の β-caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイル中の β-caryophyllene を ¹H-qNMR では 1.55% で測定が可能ながわかった。ただし、スペクトル中でシグナルが混んでいる領域であることから、精密な測定という観点ではあまり精度の高いものではないと考えられた。また、原料となるコショウの試料では ¹H-qNMR で測定ができず、β-caryophyllene を原料の管理の指標とすることはできないと考えられた。

2-4) 「コリアンダーオイル」及びコリアンダー 種子中の linalol の定量

¹H-qNMR では、試薬中の linalol の含有率は 89.47% だった。一方、「コリアンダーオイル」中

の含有率は 69.33%, 種子試料 2 種中では 0.15 と 0.17%であった。この結果は、HPLC による定量結果とほぼ等しいことから、¹H-qNMR による linalol の定量が「コリアンダーオイル」等コリアンダー関連製品の品質管理に有効である可能性が示された。

2-5) 「セロリシードオイル」及びセロリ種子中の butylphthlide の定量

¹H-qNMR 法において、butylphthlide の 7-H のシグナルの積分値を用いて各試料の含有率を算出した。試薬中の含有率は 89.86%だった。「セロリシードオイル」中の含有率は 2.14%, 種子 4 試料のうち栽培用は 0.24 と 0.10%, 食品用のものは 0.50 と 0.38%であった。この結果は、HPLC による定量結果とほぼ等しいことから、¹H-qNMR による butylphthlide の定量が「セロリシードオイル」等セロリ種子関連製品の品質管理に有効である可能性が示された。一方、含有率が 1%を切るような低含油率のオイル(液体)製品での定量は困難であることもわかった。

3) 天然色素に含まれる色素成分の定量的分析法の開発

天然由来の色素品目の多くは、成分規格に「色価」が規定されているのみで、主色素成分の含量及び定量法が規定されていない。これらの色素品目は国内流通において問題はないが、国際的な評価に耐えられるものではないと考えられる。このような背景から、天然色素に含まれる色素成分の定量的分析法の開発を行った。

3-1) アナトー色素ノルビキシン及びビキシンを指標とする新たな SR-HPLC 法の開発

アナトー色素におけるノルビキシン(NBx)及びビキシン(Bx)の SR-HPLC 定量法を構築した。まず、標準品が入手困難である *trans*-NBx 及び

trans-Bx さらに SR を合成し得ることができた。そして、¹H-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、RMS が算出できた。今後、RMS を用いてアナトー色素製品中の NBx 及び Bx の定量を行い、絶対検量線法とほぼ同じ定量値との比較を行う予定である。公的な規格試験法として成立させるためには、様々な条件下(室間、日間、カラム等)における定量値の再現性を確認することが更に必要である。

3-2) ムラサキヤマイモ色素に含まれるアントシアニン化合物の定量的分析法の開発

ムラサキヤマイモ色素におけるアントシアニン類を指標とした HPLC 定量法の構築を目指し、各種検討を実施し、入手した 2 ロットにおける共通主要成分 3 成分の構造推定を実施した。結果として、既報とは配糖体の数は異なっていたが、類似した構造として推定するに至った。これらの構造決定及び定量用標準品の獲得に向け、HSCCC による単離精製を検討した。大容量のカラムにおいて高濃度の濃縮溶液を注入可能な条件を確立し、主成分及び副成分の 1 つを単離精製可能な手法を構築した。

3-3) スピルリナ色素の発色成分であるフィコシアニンを指標とする新たな定量的分析法の開発

スピルリナ色素の HPLC 定量法及び HPLC-HRMS による定性法を構築した。まず、バイオカラムによる測定によりフィコシアニン由来の明瞭なピークを得ることができることが明らかとなった。次に、定性分析法としてトリプシン修飾カートリッジを用いた温和且つ迅速な条件で、フィコシアノビルリン結合断片のペプ

チドシーケンス解析が可能となった。また MS/MS のフラグメンテーションでは、 m/z 587 が PCB 特徴的断片として得られた。フィコシアニンは生物性タンパク質であるが、上記特徴的断片を用いることで、種や株の差にも対応可能と考えられる。

3. 分析法及び試験法に関する研究

1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価
 ^1H -qNMR によるアントシアニンの絶対純度算出法について検討した。モデル試料として市販のシアニジン 3-グルコシド塩化物($\text{Cy3G}\cdot\text{Cl}$)を用い、まず測定溶媒の最適化を行った。

まず、 $\text{Cy3G}\cdot\text{Cl}$ を用い、重溶媒の種類と酸濃度の組み合わせが ^1H -qNMR 定量値に及ぼす影響を検討した。その結果、アントシアニンを ^1H -qNMR により定量するには、添加した酸が十分に解離可能な一定量の D_2O を含む測定溶媒を用い、アントシアニンを安定なフラビリウムイオン型へ完全にシフトさせる必要があることが明らかとなった。推奨測定溶媒としては、アントシアニンのアグリコンも溶解可能な 5 %TFA- d 含有重メタノール/重水(9:1)が適切であると判断した。なお、本測定溶媒における ^1H -qNMR 用基準物質 DMSO_2 及び $\text{DSS-}d_6$ の安定性を検討したところ、分解物由来のシグナルは観察されず、両物質とも安定であることが確認された。

また、市販 $\text{Cy3G}\cdot\text{Cl}$ 7 試薬の実態調査では、純度は 61.4 %~93.7 %と製造元により大きく異なっていた。また、試薬ラベルに表示された HPLC 純度と一致するものではなく、いずれも ^1H -qNMR 純度より高値に見積もられていた。各試薬を用いて HPLC 絶対検量線を作成したところ、検量線傾きのばらつきは RSD 15%であった。一方、 ^1H -qNMR 純度で補正した濃度に基づき再作成した絶対検量線

では、傾きのばらつきは RSD 2%まで収束した。さらに、 ^1H -qNMR 以外の手法として、イオンクロマトグラフィーにより塩化物量を定量し $\text{Cy3G}\cdot\text{Cl}$ 純度へ換算する方法も検討した。しかし、本法は Cy3G^+ と Cl^- が等量で存在する場合にのみ成立し、塩化物化過程で過剰の Cl^- が残存すると純度を過大評価することが明らかとなった。

以上より、アントシアニンの正確な純度評価には ^1H -qNMR による絶対定量が最も信頼性の高い手法であると結論づけられる。さらに、本研究で確立した純度評価法は、アントシアニンを主成分とする食品添加物の HPLC 成分規格試験及び RMS 法を開発する際の重要な知見となる。アントシアニンを主成分とする食品添加物公定書収載品の HPLC 成分規格試験及び RMS 法の構築に有用な基礎資料となるものである。

2) 相対モル感度(RMS)を利用した定量法の検討

分析対象物質とは異なる物質を基準とし、その相対モル感度 (RMS) を利用する定量法 (RMS 法) が、様々な天然物中の成分測定に用いられている。UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法では、1) RMS 決定時に必要な定量対象と同一の物質の入手も困難な場合がある、2) 基準物質と分析対象物質の測定波長が異なる場合、装置間差が大きくなる、といった課題がある。そこで、この二つの課題の解決策について検討した。

2-1) RMS 法における類似構造間での法則性の調査

1) ナフトキノン骨格を持つフェナキノン類やメナキノン類を分析対象とした RMS 値及び 2) クロロゲン酸類を分析対象とした RMS 値を算出し、類似構造間で RMS 値にどのような変化があるか調査した。

1) の分析対象物質では、ナフトキノン骨格に由来する UV 吸収帯とナフトキノンに結合した側鎖の二重結合に由来する UV 吸収帯が存在すると考えられる。メナキノン-4(MK-4), メナキノン-7(MK-7)及びフィトナジオン(K₁)において、側鎖の構造は様々であるが、ナフトキノン骨格は共通しているため、この骨格のみに由来する UV 吸収帯を測定波長として設定すれば、同一の基準物質に対する RMS は同一になることが予想された。2 台の HPLC-PDA にて、基準物質 D4HB に対する MK-4, MK-7 及び K₁ の RMS を求めたところ、いずれも 1.06 であった。このとき、分析対象物質の測定波長は、ナフトキノン骨格に由来する 247 nm とした。ナフトキノン骨格をもつビタミン K 類は、本研究で対象とした化合物以外にも側鎖の異なる十数種類存在する。本研究により、側鎖が異なってもナフトキノン骨格由来の UV 吸収帯に影響する発色団がほかに存在しなければ、すべて同一の RMS で定量可能であることが示唆された。

次に、発色団の数と RMS の関係を調べるため、2) のクロロゲン酸類を対象とした実験を行った。クロロゲン酸類は、キナ酸にカフェ酸等のケイ皮酸誘導体が結合した化合物群である。

キナ酸に一つカフェ酸が結合したモノカフェオイルキナ酸(CQA)のうち、結合位置だけが異なる 3CQA, 4CQA 及び 5CQA の RMS はほぼ同一であった。キナ酸に一つフェルラ酸が結合し FQA のうち、結合位置だけが異なる 3FQA, 4FQA 及び 5FQA の RMS は、4FQA 及び 5FQA はほぼ同一の RMS であったが、3FQA のみ大きな値となった。この理由は不明であるが、ケイ皮酸誘導体のキナ酸への結合数が一つである場合、ケイ皮酸誘導体の化合物種が同じであれば、同一の RMS を用いても定量値への影響はせいぜい 1%程度と考えられた。

一方、5CQA の RMS に対する CQA 及び FQA (3FQA を除く)の RMS の比を算出したところ、FQA は CQA よりも 10%程度大きな値であった。フェルラ酸はカフェ酸の 3 位の水酸基がメトキシル基となった構造である。基準物質と 4FQA 及び 5FQA は溶出時の移動相条件が異なるため、CQA と 4FQA 及び 5FQA の RMS の違いは構造もしくは溶媒による深色効果／淡色効果によるものと推測された。クロマトグラフィーの分析条件にもよるが、ケイ皮酸誘導体の種類が異なる場合、この構造が発色団であることから、同一の RMS と見なす前に一考が必要である。

キナ酸にカフェ酸が二つ結合した diCQA のうち、3,4-diCQA, 3,5-diCQA 及び 4,5-diCQA の RMS はそれぞれ 2.175, 2.268 及び 2.151 であった。5CQA の RMS に対するこれらの RMS の比はそれぞれ 1.95, 2.03 及び 1.93 であった。発色団のカフェ酸の数が単純に 2 倍に増えると RMS も 2 倍になると予想していたが、3,4-diCQA 及び 4,5-diCQA では 1.9 倍程度とわずかに小さな値となった。3,4-diCQA 及び 4,5-diCQA の二つのカフェ酸はキナ酸の隣り合った炭素に結合しており、二つのカフェ酸が隣り合っていない 3,5-diCQA と比較して立体障害の影響があるのではと考えられた。

以上の結果から、クロロゲン酸類の場合、立体障害等の影響もあり、発色団であるケイ皮酸誘導体の数が増えたからといって、その RMS が単純に 2 倍等になるとは限らないことが示された。しかし、キナ酸にケイ皮酸誘導体が一つであれば、その位置異性体はほぼ同一の RMS であること、ケイ皮酸誘導体が 2 つだから RMS も 2 倍にしたとしても定量値への影響は 10%程度であることが示唆された。

2-2) PDA 検出器の吸収スペクトル特性調査

2-2-1) 各検出器の直線性

試験液の測定は、分光光度計(1 台)及び HPLC-PDA(6 台、装置 A～F)にて実施した。検出器によって直線性に特徴があるかを確認するため、各試験液の吸収スペクトルから各測定波長(273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm)における吸光度を得た。分光光度計では、すべての測定波長において、濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性を示した。PDA 検出器は、装置 A, B 及び C は、分光光度計同様 4 波長すべてにおいて濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性を示した。装置 D 及び E では、273 nm で測定した場合は濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性を示した。しかし、418 nm, 522 nm, 及び 629 nm の 3 波長における吸光度は、濃度 0.10～2.0 の範囲では直線性が見られたものの、濃度 3.0 で極端に大きな値を示し、濃度 0.10～3.0 の範囲での直線性は不良であった。装置 F でも、装置 D 及び E と同様に直線性が不良な波長があった。

2-2-2) 分光光度計における吸光度を基準としたときの各 PDA 検出器の実測値比較

次に、いずれの装置 A～F においても良好な直線性があった濃度範囲 0.1～1.0 での 4 波長における各装置の吸光度が、分光光度計における吸光度と比較してどのように異なっているかを調査した。分光光度計における吸光度を 1 としたときの各装置の吸光度比を算出したところ、差が大きい装置で 15%程度であった。同一装置内において検出波長ごとに比較したところ、装置 A～F のすべてにおいて、分光光度計に対する吸光度比の濃度による遷移パターンが、273 nm で測定したときと、それ以外の 3 波長で測定したときの 2 つのパターンに大別された。どの装置も光源に重水素ランプとタングステンランプの二つを搭載しており、380～400nm 付近でこの二つのランプ

を切り替えている。分光光度計との吸光度比の差には、光源ランプの違い(消耗度等を含む)が大きく寄与すると考えられた。しかし、同一の光源ランプ種である場合でも、測定波長によって分光光度計に対する吸光度比は一定ではなかった。さらに、分光光度計に対する吸光度比を装置 B と C とで比較すると、装置 B では 418 nm > 522 nm > 629 nm の順に吸光度比が小さくなるが、装置 C では 522 nm > 418 nm > 629 nm の順に小さくなっており、同一の光源ランプ種内でも装置間で必ずしも同様の強度比とはならなかった。これは、濃度に対する検出器の応答値をとった検量線の傾きが装置間で逆転することを示しており、検量線の傾きの比で求められる RMS 値への影響が大きいことが示唆された。

2-2-3) 異なる二つの $\lambda_{\max}$ を測定波長として求めた RMS 値の装置間差の補正

装置間差を小さくするために、RMS 法にて提示された RMS を求めた装置と分析者との装置との間での感度補正の方法の一つを提案した。具体的には、同一試料を両装置で分析した際の吸光度から補正係数を算出し、分析者の装置における補正 RMS を求めるものである。既に報告されている論文のデータをもとにこの補正方法を実践したところ、装置間差は補正前より小さくなった。

一方で、RMS 法における測定波長が 2 波長であっても、光源ランプ種の変更がなく、数十 nm の違い程度であれば、それほど装置間差が大きくなりえないとも思われた。これまでの研究で測定波長が 1 波長より 2 波長の方が装置間差が大きかった要因の一つとしては、検出に用いられる光源ランプ種の切り替わりが寄与していると考えられる。RMS 法における基準物質の選定においては、必ずしも分析対象物質の検出波長と同一にする必要はないが、光源ランプの切り替わり付近や離れすぎた波

長は避ける方が、装置間差を考慮すると望ましいといえる。

3) カシアガム中のアントラキノンの分析手法に関する研究

既存添加物の成分規格試験の効率化及び精度向上を目的として、成分規格が未制定であるカシアガムを対象に、アントラキノン類分析法の確立について検討した。

JECFA 法の検証では、前処理工程において加熱時間の短縮並びに抽出回数の変更が必要であることが明らかとなった。また、液液抽出におけるエマルジョンの形成に起因する二層分離の遅延が確認され、遠心分離操作の導入が分離効率の改善に有効であることが実証された。さらに、実試料においては測定対象物質のピーク近傍に夾雑成分が観察される場合があり、JECFA 法の HPLC 条件では測定対象物質と夾雑成分の分離が不十分となり得ることが示唆された。この点については、粒子径 $3\ \mu\text{m}$ のカラムを採用し、グラジエント条件を最適化することにより、高分離能を有する分析条件が確立された。

また、前処理における有害試薬の使用低減の観点からクロロホルムの代替溶媒を検討した結果、ジクロロメタン及び酢酸エチルの単独使用では、化合物によって回収率の低下等が認められた。そこで、ジクロロメタンによる抽出後に酢酸エチルで再抽出し、各有機層を統合せずに個別に濃縮して試験溶液を調製する段階抽出法を考案した。本法により、JECFA 規格の残留基準値($0.5\ \text{mg/kg}$)付近におけるアントラキノン類の抽出に適用可能かつクロロホルムを使用しない前処理法を確立した。

$^1\text{H-qNMR}$ に基づく RMS を用いた定量法の適用性については、正確な標準溶液濃度に基づいて作成した各検量線式の傾きの比(測定対象の傾き/

基準物質の傾き)より、基準物質 3 種に対する測定対象物質 5 種の各 RMS が算出された。これらの RMS の正確性は、モデル溶液を用いた検証により実証され、本手法が測定対象物質 5 種の効率的かつ信頼性の高い定量に資することが示された。

以上より、本研究で確立した前処理(エマルジョン対策を含む JECFA 法の改良)及び HPLC 条件(測定条件の最適化)を組み合わせた方法は、カシアガム中のアントラキノン類を良好な真度及び精度をもって分析可能であり、成分規格の策定に資する分析法として有用であることが明らかとなった。また、クロロホルムを使用しない段階抽出法や RMS に基づく定量法を活用することにより、作業者の安全性及び環境負荷の低減を図りつつ、分析の効率化及び信頼性向上に貢献できると考えられた。

4) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

本研究では、1) HPLC の汎用的な検出器としての 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を行った。検討した分子としては、広範囲の波長域に UV スペクトル吸収を有する化合物として、1,4-ナフトキノン誘導体の置換基導入による吸収波長の変化を確認した。また、2) 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開発の検討を行った。

まず、1,4-ナフトキノン誘導体に対して様々な置換基を導入した誘導体の合成経路においては、基本的に置換基としてアミノ基を導入した中間体化合物を調製し、1,4-ナフトキノン骨格へと導入することで化合物の合成を行うことができた。しかしながら、導入する置換基の電

子的な効果によって反応が進行しない、また望みのものとは別の構造が得られる場合もあった。合成した化合物の UV-Vis スペクトルを測定した結果、5 位にニトロ基を有する誘導体においてピークトップの長波長化が観測され、800 nm 以上の部分にも UV 吸収を示した。また 5 位及び 8 位にアミノ基を有する誘導体では、500–700 nm 付近における吸収において青色 3 号と類似性のあるスペクトルが得られた。これは分子内水素結合が形成可能な共通構造が、両化合物の UV スペクトルの類似性に寄与しているものと考えられた。合成した誘導体については固体ではあるものの、分析の際の秤量操作や精製しやすさなどを考慮すると、今後は結晶性を高めるための構造変換等も検討すべき事項である。

次に、シングルフアレンス(SR)分子の開発については、ビスアリールマレイミド分子に導入する芳香環の種類によって吸収波長域が変化するという性質を利用して吸収波長域の調整を行った。今回はビスインドリルマレイミドを母骨格とすることで、ビキシンと同様の吸収帯を付与することができた。この骨格に対して C5～C12 までの長さの直鎖炭化水素基を導入して疎水性を変化させることで、HPLC クロマトグラム上における保持時間をある程度の範囲内で制御することができた。これらの分子は 1 度の合成で一挙に複数の候補化合物を得ることが可能であり、逆相 HPLC によってそれぞれを分離することができるため、HPLC クロマトグラム上で定量対象であるビキシンやノルビキシン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探索・調製することが可能であった。また、親水性の高い官能基を有する炭化水素基を利用することで、分子としての親水性

の向上及び HPLC クロマトグラム上の保持時間の短縮もできることが分かった。この SR 分子デザインを利用することによって、既存添加物含め、標準品そのものの入手が困難な定量対象に対しても分析法を設定できるものと期待された。

5) 環境負荷及び試験者負担の軽減を目指した分析法の検討

食品添加物公定書の収載された分析法及び試験法の開発に関する研究として、主に環境負荷、試験者負担を軽減することを目的とし、エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の Pb 及び As の定量法の検討、窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較、EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討を行った。

5-1) EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討

EDX を用いて公定書における食品添加物中の Pb 及び As の定量法を検討した。回収率はいずれも 80%以上、特にケイソウ土では 100%に近い結果が得られた。卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンで回収率がケイソウ土に比べ低い値になった要因は、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの Pb 及び As の規格値がケイソウ土に比べ低いため装置の感度の問題があったと考えられた。また、これらの試料には若干の溶解性があり、添加試料や測定添加試料調製時に一部溶解し、そのため均一な試料調製ができなかった可能性も考えられた。

5-2) 窒素定量法の比較

窒素定量に課題がある「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を試料に用いて、公定法を含む複数の窒素定量法(①公定法(ケル

ダール法), ②公定法改法(公定法における試料採取量を減らしたもの), ③セミマイクロケルダール法, ④元素分析法(改良デュマ法), ⑤元素分析法(CHN コーダー法))の定量値及び操作性等を比較した。

定量値はいずれの定量法でもほぼ同程度の値が得られた。またいずれの精度も同等であった。ケルダール法は試験者や環境への負荷が大きい分析法であること、一方元素分析法は迅速かつ簡便ではあるが初期投資の負担が大きいことが改めて示された。

以上の結果を踏まえると、「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」に対しては、公定法の試料量を少なくした公定法改法を導入することが最も簡単であると考えられた。一方、元素分析法は複数の元素を測定可能な装置も有ることから、複数部署で共有して使用できると考えられる。したがって、将来的には試験者や環境への負荷低減のため元素分析法へシフトしていくべきであると考えられた。

5-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討

EDX を公定書における食品添加物中の Pb 及び As のスクリーニング法へ適用できるかどうかを検討した。その結果、散乱線内標準補正を行うことでより正確な判断が可能となること が示され、さらに、規格値の 1/2 の濃度の対照用標準溶液を基準として用いることで、規格値相当濃度含まれる Pb や As を見逃すことなく確実に選抜することができるうえ、これらを含む しない試料を誤って判定する可能性も極めて低いことが示された。EDX による分析は試薬を使用しないうえ、前処理は不要でさらに測定時間も短い。つまり環境や試験者への負荷も小さ

い分析法であるといえ、今後さらなる対象拡大へ向けて引き続き検討を行う予定である。

6) 真菌基原の添加物酵素の基原種同定法の開

発及び基原種に関する分類学的情報の収集

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。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、基原菌種の正確な同定法の確立が望まれている。また、データベースの改良を見据えた、基原となる真菌種の分類学的情報の収集が必要とされている。本研究では、これらの課題について検討した。

6-1) 添加物酵素の基原種同定法の開発

タンパク質のデータベースである UniProt から抽出したアミノ酸配列を用いて独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチを実施した結果、オンラインで検索した場合には同定できなかった β -ガラクトシダーゼやプロテアーゼの基原菌種を同定することができた。複数種の消化酵素を用いた解析を実施した結果、トリプシンを用いた場合には同定できなかったヘミセルラーゼやセルラーゼに含まれるタンパク質のバンドの基原菌種を同定することができた。また計 4 種の添加物酵素を二次元電気泳動法により解析した結果、一部の酵素については通常の SDS-PAGE による解析で同定不能であったタンパク質が同定され同定結果の正確性を向上させることができた。マトリクスの変更や消化酵素の併用による検出ペプチド数の増加程度を確認したところ、これまで用いていたマトリクスの CICCA では検出されなかった

ペプチドが複数種のマトリクスをそれぞれ用いた場合に検出され、また消化酵素の併用により検出ペプチド数が増えることが明らかとなった。さらに、複数のマトリクスとトリプシン/Lys-C 併用を組み合わせ Coverage 上昇程度を確認した結果、マトリクスに CICC のみ、消化酵素にトリプシンのみを用いた過去の結果より Coverage が上昇した。

これらの改良を加えたことによって、解析するタンパク質によっては、検出されるペプチドの種類が増え、Mascot サーチの結果における Coverage の向上が認められ、基原同定の精度を高めることに有用であることが明らかとなった。これらの方法を組み合わせることで、より精度高く酵素の基原種の同定が可能となると期待される。

6-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

データベース有効的な改良を見据えた分類学的情報の収集を行った。酵素の基原として使用される *A. niger* とその近縁種について、現在主流の分類体系では *A. niger*・*A. tubingensis*・*A. luchuensis* の 3 菌種にまとめられるが、これら以外に添加物基原種または SwissProt 等 DB 登録配列の由来種として使用され続けている学名は多く存在し、*A. awamori*, *A. kawachii*, *A. foetidus* などがしばしば見られることを把握した。データベースに登録する情報を精査すること、並びに酵素製品の付帯情報についても最新の真菌分類学的情報を元に整理する必要があると考えられた。添加物酵素の基原として用いられる *Trichoderma* 属 7 菌種のゲノムにおける特定の遺伝子アミノ酸配列における異種間での配列一致率を確認したところ、近縁菌種間では最高で 99.5% が一致することが判明した。こ

のことから、アミノ酸配列を指標として基原菌種をその近縁種と区別して識別するためには、0.5% 程度の差違を認識できる精度で分析する必要があることが示唆された。*A. terreus* に関する分類の変遷について文献情報を精査したところ、2011 年以降、広義の *A. terreus* は、狭義の *A. terreus* を含む 12 菌種に細分化されたため、これ以前に *A. terreus* と同定された基原菌株はこれらの菌種に再同定される可能性があり、注意が必要であることを確認した。

基原菌種の分類情報は今後も継続的に変遷すると予想されることから、基原微生物の学名について、国際整合を考慮した生物種の最新の分類情報を常に収集し、データベースや酵素製品の付帯情報での登録情報を継続して更新する必要があると考えられた。真菌分類学的情報を元に、継続して整理し使用する必要があると考えられた。

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) 草刈美玖, 西崎雄三, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 谷岡隆, 中室克彦, 中島馨, 石附京子, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: インジゴ法によるオゾン水中のオゾン定量法確立に向けた検討. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).
- 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(第 2 報). 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).

- 3) 中島馨, 西崎雄三, 草刈美玖, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 谷岡隆, 中室克彦, 石附京子, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 吸光光度法によるオゾン水中のオゾン定量法確立に向けた検討. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).
- 4) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 嶋田典基, 吉田久美, 阿部裕, 杉本直樹: 定量 NMR によるアントシアニンの純度測定～測定溶媒の最適化～. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).
- 5) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛: 健康食品中のアントシアニン定量における相対モル感度(RMS)を用いた Single-reference HPLC 法の適用について. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).
- 6) 岩崎大剛, 金澤まい, 川本扶佐子, 新穂大介, 村上敏之, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いた single-reference LC 法による長命草根由来ケルラクトン類の定量. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回総会(2023.7).
- 7) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 永津明人, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン Single reference-HPLC 法によるアナトー色素のビキシシン及びノルビキシシンの分析. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回総会(2023.7).
- 8) 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. 食品科学工学会第 70 回大会(2023.8).
- 9) 伊藤紫野, 西原秀典, 橋本一浩, 川上裕司, 後藤慶一, 水谷治, 山田修, 清水公德, 伴さやか, 矢口貴志, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指標を用いた型別. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会(2023.10).
- 10) 阿部 裕, 増本直子, 西崎雄三, 窪崎敦隆, 杉本直樹: 既存添加物に関する国立衛研の最近の取り組み, 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会(2023.10).
- 11) 岩崎大剛, 金澤まい, 川本扶佐子, 新穂大介, 村上敏之, 西崎雄三, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いた機能性成分の定量分析例: 長命草根由来ケルラクトン類. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 12) 石附京子, 西崎雄三, 杉本直樹, 山崎太一, 三浦亨, 武藤康弘, 岩本芳明, 吉田浩祐, 澤竜一, 久保田由美子, 加藤毅, 笛木周平, 山本佳奈, 小松功典, 朝倉克夫, 松熊伸也, 吉村弘伸, 末松孝子: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) 共同試験の結果報告. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 13) 加藤千穂, 西崎雄三, 大槻崇, 松藤寛, 阿部裕, 多田敦子, 杉本直樹: qNMR におけるピーク高さ法の検討: naringin の場合. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 14) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, ¹H-定量 NMR に基づいた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニン定量について, 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会 (2023.12).
- 15) 建部千絵, 藤原由美子, 久保田浩樹, 多田敦子, 杉本直樹: qNMR を用いた食用タール色素成分規格で使用される不純物定量用試薬の純度測定. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).

- 16) Sensoy M, Kutluay V M, Nagatsu A, Saracoglu I: Isoflavonoids from *Vuralia turcica* (Kit Tan, Vural & Kucukoduk) Uysal & Ertugrul. 日本薬学会第 144 年会(2024.3).
- 17) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹: ^1H スピン情報に基づいたクロロゲン酸類のデジタルリファレンススタンダード(dRS)の作成. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会(2024.5).
- 18) 大槻崇, 馬場萌加, 二見櫻子, 黄奕, 遠藤悠平, 金子剣伸, 松藤寛: ^1H -qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いた大豆イソフラボン類分析法の確立. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会(2024.5).
- 19) 伊藤紫野, 渡辺麻衣子, 西原秀典, 橋本一浩, 川上裕司, 小林直樹, 後藤慶一, 水谷治, 清水公德, 伴さやか, 矢口貴志, 工藤由起子, 大西貴弘: 発酵食品由来の黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指標を用いた分類学的検討. 第 45 回日本食品微生物学会学術総会(2024.9).
- 20) 森本深麗, 永津明人, 西崎雄三, 阿部裕, 増本直子, 杉本直樹: ^1H -qNMR 法を用いたクロブ由来既存添加物及びチョウジ末, オールスパイス末中の eugenol の定量. 日本生薬学会第 70 回年会(2024.9).
- 21) 鬼嶋七海, 内倉崇, 好村守生, 阿部裕, 杉本直樹: 食品添加物カロブ色素の成分研究. 第 63 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(2024.11).
- 22) 石附京子, 阿部裕, 杉本直樹: エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定呈法の検討, 第 61 回全国衛生化学技術協議会年会(2024.11).
- 23) 中島馨, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討〜クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係〜. 第 120 回日本食品衛生学会学術講演会(2024.11).
- 24) 大槻崇, 神谷彩音, 中山優希, 黄奕, 松下美由紀, 森川悟, 松藤寛: TDM 対象薬等医薬品 6 種の血中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 6 回日本定量 NMR 研究会年会(2024.12).
- 25) 渡辺実薫: 食品添加物公定書における窒素定量法の代替試験法の検証. 第 7 回(公社)日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会(2025.2).
- 26) 瀬川ひかり, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR) を用いたバジル(*Ocimum basilicum* L.)中の rosmarinic acid の定量. 日本薬学会第 145 年会(2025.3).
- 27) 内山奈穂子, 細江潤子, 清田浩平, 石附京子, 杉本直樹, 小出達夫, 田中誠司, 増本直子, 伊藤美千穂, 村林美香, 篠崎妙子, 藤峰慶徳, 大藤克也, 清水仁, 藤田和弘, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 牧野吉伸, 武藤康弘, 高岡真也, 中山貴寛, 朝倉克夫, 末松孝子, 阿部仁美, 小浜亜以, 五島隆志, 安田万寿, 諏訪博昭, 渡邊玲, 岡田ひとみ, 合田幸広: ^{19}F -qNMR を用いた医薬品中の残留溶媒としてのトリフルオロ酢酸(TFA)の定量に関する研究. 日本薬学会第 145 年会(2025.3).
- 28) Yuzo Nishizaki: A Case Study on Validation of

- External Calibration qNMR (EC-qNMR).
qNMR summit 2025 (2025.6).
- 29) 梶本りおん, 宮崎真奈, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR)を用いた生薬バニラ及びバニラ香料中の vanillin, ethylvanillin 及び *p*-hydroxybenzaldehyde の定量. 日本食品化学学会第 31 回総会・学術大会 (2025.6).
- 30) 石附京子, 川末慎葉, 阿部裕, 杉本直樹: キラヤ抽出物の定量法への RMS 導入に向けた検討(第 1 報). 日本食品化学学会第 31 回総会・学術大会 (2025.6).
- 31) 瀬川ひかり, 永津明人, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹: 定量 NMR 法を用いたブラックペッパーオイル中の β -Caryophyllene の定量. 日本生薬学会第 71 回年会 (2025.9).
- 32) 高田翔平, 日置冬子, 丸田知枝, 建部千絵, 久保田浩樹, 多田敦子, 杉本直樹: HPLC における相対モル感度法を応用した食品添加物中のソルビン酸異性体含量の評価. 第 121 回日本食品衛生学会学術講演会 (2025.10).
- 33) 中島馨, 川末慎葉, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度を用いたステビオール配糖体の定量法の検討(第 1 報). 第 121 回日本食品衛生学会学術講演会(2025.10).
- 34) 西川拓海, 阿部裕, 杉本直樹, 西崎雄三: 卓上 NMR を用いた ^1H スピン情報に基づく qNMR によるカラシ抽出物の定量法の検討. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
- 35) 藤原由美子, 建部千絵, 高田翔平, 久保田浩樹, 多田敦子, 杉本直樹: 相対モル感度 (RMS)を用いた食用緑色 3 号中の未反応原料及び反応中間体の定量法に関する検討. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
- 36) 山崎太一, Yang Liu, Carlos Amezcua, 大槻崇, 加藤毅, 神山和夫, 高岡信也, 水本俊行, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いた定量分析法の国際規格(ISO)化のための国際共同試験. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
- 37) 石附京子, 川末慎葉, 阿部裕, 杉本直樹: TRAQ-Chrom (Transmission-Referenced Absolute Quantification Chromatography) の検討. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
- 38) 今岡美史, 高田翔平, 黒原崇, 藤原由美子, 建部千絵, 窪崎敦隆, 大槻崇, 多田敦子, 松藤寛, 杉本直樹: タール色素不純物の NMR スペクトルに与える無機成分の影響. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
- 39) 梶本りおん, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR)を用いたコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalool の定量. 日本薬学会第 146 年会 (2026.3).
- 40) 高松さくら, 鬼嶋七海, 内倉崇, 好村守生, 阿部裕, 杉本直樹, 天倉吉章: 食品添加物カロブ色素中に含有する schaftoside の定量分析に関する検討. 日本薬学会第 146 年会(2026.3).
- 41) 田中誠司, 西崎雄三, 細江潤子, 増本直子, 伊藤美千穂, 内山奈穂子, 石附京子, 杉本直樹, 鈴木梓, 浅野龍二, 三浦亨, 武藤康弘, 朝倉克夫, 末松孝子, 小松功典, 古川茶勲, 合田幸広: ^1H スピン情報に基づいた参照 NMR スペクトルによる「定量用ヘスペリジン」の確認試験について. 日本薬学会第 146 年会(2026.3).

E-1-2) 講演等

- 1) Sugimoto N: A new approach to obtain accurate quantitative values by qNMR and chromatography. International Symposium in Okinawa, 2023, on Ciguatera and Related Marine Biotoxins (2023.11).
- 2) Masumoto N: A new quantitative method of lutein in foods without its analytical standard. International Workshop for “Functional Substances in Agricultural Products” (2023.11).
- 3) 西崎雄三: ^1H スピン情報による化学物質のデジタルリファレンススタンダード (dRS) 化: dRS を基準にした qNMR. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 4) 増本直子: 相対モル感度(RMS)を用いた定量法, 室間共同試験をしてみたら. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 5) 杉本直樹: 食品添加物の化学的安全性の確保. ifia JAPAN20224, 食の安全・科学セッション(2024.5).
- 6) 杉本直樹: 食品化学における定量分析の役割. 日本食品化学学会第 30 回総会学術大会(2024.5).
- 7) 杉本直樹: 第 10 版食品添加物公定書における主要な改正ポイント. 日本食品添加物協会拡大情報連絡会(2024.6).
- 8) 杉本直樹: 食品添加物の品質確保. 創立 150 周年記念特別衛研シンポジウム(2024.8).
- 9) 永津明人: 生薬等の品質管理での定量 NMR 法 (^1H -qNMR) の利用. 2024 年度分子研異分野技術交流セミナー(第 3 回), (2024.7).

- 10) 永津明人: 生薬の品質評価について. 令和 6 年度日本アロマセラピー学会中部北陸地方会・清水薬剤師会(2024.9).
- 11) 阿部裕: 天然由来の食品添加物のリスク管理〜これまでとこれから〜, 日本薬学会第 146 年会, 日本薬学会・日本食品化学学会ジョイントシンポジウム(2026.3).

E-2) 論文発表等

E-2-1) 論文等

- 1) Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y: Suitability of culture broth and conditions for *Escherichia coli* growth and gas production as a test of food additives in EC Broth. Food Hyg. Safety Sci., 2023; 64: 69-77.
- 2) 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, 2023; 40: 711-722.
- 3) 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 ^1H -qNMR for khellactone esters from *Peucedanum japonicum* root extract. Food Chem., 2023; 427: 136647.
- 4) 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物公定書収載品目における基原生物に使用される学名の考え方とその表記法. 食衛誌, 2023; 64: 77-88.

- 5) Masumoto N, Ohno T, Suzuki T, Togawa T, Sugimoto N: Application of the relative molar sensitivity method using GC-FID to quantify safranal in saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Nat. Med.*, 2023; 77: 829-838.
- 6) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 新井玲子, 杉本直樹, 鈴木梓, 浅野龍二, 五十嵐靖, 三浦亨, 武藤康弘, 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. *薬学雑誌*, 2023; 143: 951-962.
- 7) Bayrakceken G Z, Saracoglu I, Nagatsu A, Yilmaz M A, Basaran A A: Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from *Prunus mahaleb* L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 2023; 310: 116378.
- 8) 齋藤剛, 杉本直樹: 定量核磁気共鳴(qNMR)法を用いた有機化合物の純度測定に関する国際規格策定. *環境と測定技術*, 2023; 50: 13-17.
- 9) Uchiyama N, Hosoe J, Komatsu T, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Shinozaki T, Kobayashi K, Fujimine Y, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Muto Y, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Quantitative ³¹P-NMR for the purity determination of the organophosphorus compound brigatinib and its method validation. *Chem. Pharm. Bull.*, 2024; 72: 36-40.
- 10) Amakura Y, Uchikura T, Yoshimura M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N: Chromatographic evaluation and characterization of constituents of sunflower seed extract used as food additives. *Chem. Pharm. Bull.*, 2024; 72: 93-97.
- 11) Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen S-P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G. F: Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR Sustainability. *Analytical Chemistry*, 2024; 96(24): 9790-9798.
- 12) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 燃焼法による食品添加物中の窒素定量分析. *日本食品化学学会誌*, 2024; 31(1): 31-34.
- 13) Ohtsuki T, Huang Y, Kamiya A, Nakayama Y, Matsushita M, Morikawa S, Matsufuji H: Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of blood concentrations of nine pharmaceutical compounds. *J. Pharm. Health Care Sci.*, 2024; 10: 35.
- 14) Masumoto N, Yamazaki T, Miura T, Nakajima K, Yamamoto K, Kato T, Minamoto N, Suematsu T, Sato Y, Nomura A, Akagi M, Ohtsuki T, Koyama K, Mizumoto T, Miyashita T, Kawashima S, Saito T, Sugimoto N: Development of a Standard-Free Analytical Quantitative Method based on Liquid Chromatography Using Relative Molar Sensitivity for Chlorogenic Acid in Apple Juice. *Chem. Pharm. Bull.*, 2025; 73(7): 650-657.

- 15) Miura T, Liu Y, Bzhelyansky A, Ohtsuki T, Matsufuji H: Development of ^1H qNMR analytical procedure for purity determination of Imazosulfuron and 1,4-BTMSB- d_4 for ISO 17034 accreditation. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2025; qsaf099.

E-2-2) 総説等

- 1) 杉本直樹：定量 NMR の標準化と実用化. 薬学雑誌, 2024; 144: 353-357.
- 2) 杉本直樹：我が国の食品添加物の指定及び改正. Pharm Tech Japan, 2024; 40(8): 95-96.
- 3) 杉本直樹：既存添加物の取扱いに関する今後の方針について. 月刊フードケミカル, 2025; 5: 23-27.
- 4) 杉本直樹：定量分析値の SI トレーサビリティーの確保：qNMR/Chromatography (Ensuring SI traceability of quantitative analytical values: qNMR/Chromatography). ソフト・ドリンク技術資料, 2025; 207(3): 63-73.

E-2-3) 単行本等

- 1) 増本直子, 西崎雄三：第 2 章 食品中に含まれる不純物分析の手順, 第 6 節 RMS 法による天然物由来製品の品質評価, 不純物の分析法と化学物質の取り扱い, 技術情報協会(東京), pp.183-192, 2024.

E. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし