

平成30年3月30日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業
研究成果報告書

課題番号：2903

食品中のピロリジジナルカロイド類を網羅的に検出できる分析法
の開発

研 究 期 間：平成29年度（1年間）

研究総括者名：小暮 紀行

試験研究機関名：国立大学法人 千葉大学

1 研究目的

海外ではピロリジジナルカロイド(PA)を含む食品の摂取による健康被害が多数報告され、WHOによりそれら食品の摂取が注意喚起はされているものの、未だ明確で統一的な管理基準は示されていない。また、海外においては食品に含まれるPAの分析方法が複数報告されているが、本邦においては本件に関する報告例は皆無であり、食品中のPAの管理・規制に関して欧米諸国に遅れを取っているのが現状である。

またPAは600種とも言われるほど非常に多くの種類の誘導体が存在する上に、標準品が入手できない化合物も多数あることから、これらPAを網羅的に分析可能な一般法を確立することは困難であるが喫緊の課題でもある。

今回の研究においては、海外で報告されている分析法を検証し改良するとともに、当研究グループにて開発中の分析法の検証を進めることとする。分析法を確立した後、さまざまな植物・食品サンプルを対象に含有実態を調査することを目標とする。

2 研究内容

(1) 研究課題

1) 中課題1：既存のピロリジジナルカロイド分析法の検証と改良

・小課題1：HPLC-ESI-MS/MSによる分析法の検証

Cramerらの報告に従い、HPLC-ESI-MS/MSを用いる分析法を検証する。Cramerらが用いているDiscovery HS 逆相カラム（アルドリッチ社より購入可能）またはそれと同等のカラムを用い、分析法の検証を行う。検証については、当研究グループ保有のPAサンプルを用いて分析条件が適当であるか確認し、その実用性、再現性、問題点を明らかにする。

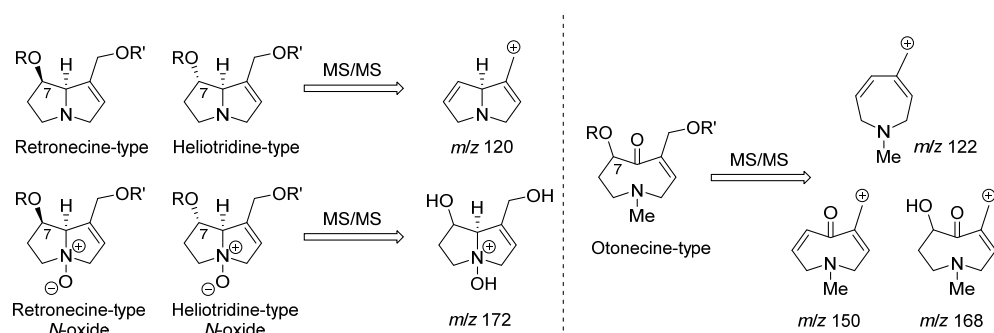
・小課題2：TLCによる分析法の検証

Mattocksらの報告に従い、肝毒性を有すると報告されているデヒドロ型のピロリジジナルカロイドへの変換およびTLCによる分析法について検証し、その実用性、再現性、問題点を明らかにする。本法についても、当研究グループ保有のPAサンプルを用いて有用性を確認した後、食品類の抽出物を用いて検証する。

2) 中課題2：当研究グループにて開発中のピロリジジナルカロイド定量分析法の改良と定量法の確立

LC-MS/MS分析によりPAの骨格を判別することができる。Retronecine typeとHeliotridine typeでは m/z 120にフラグメントのシグナルが観測され、一方、Otonecine typeでは m/z 122, 150, 168にフラグメントのシグナルが観測される

と報告されている。実際に我々も単離した各種 PA について LC-MS/MS 測定を行うことで、その知見を確認している。さらに、Retronecine type と Heliotridine type の *N*-oxide 体では *m/z* 120 のシグナルは観測されず、*m/z* 172 のシグナルが観測されると報告されていることから、LC-MS /MS を利用することにより、構造未知のサンプルであってもどの骨格の PA であるかを推定することが可能である。ただし、Retronecine type と Heliotridine type については、7 位の立体配置が異なるのみであるので一般的には MS からは区別できない。



さらに、構造未知のサンプルであっても、LC-MS/MS により分子量が決まり骨格が推定できるので、分子量が近く、構造既知の化合物で検量線を作成し、これを分析対象の PA に適用することで、その含有量を定量できる一般的な手法の確立を目指す。

すでに当研究グループで試行した定量分析について、その再現性、問題点を検証するとともに、LC-MS/MS を組み合わせることにより、どのような骨格のピロリジジンアルカロイドがどれだけ含まれているか、定量分析可能な方法を確立する。その後、農林水産省がサーベイランスの対象としている複数の食品類について分析を行い、その実用性の検証へと展開する。

(2) 年次計画

項目	平成29年度
1. 既存のピロリジジナルカロイド分析法の検証と改良 (1) HPLC-ESI-MS/MS による分析法の検証	← 分析法の検証 (千葉大学) →
(2) TLC による分析法の検証	← 分析法の検証 (千葉大学) →
2. 当研究グループにて開発中のピロリジジナルカロイド定量分析法の改良と定量法の確立	← 分析法の改良と定量法の確立 (千葉大学) →
所要経費 (合計)	8,163 千円

(3) 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	千葉大学	小暮 紀行	30
1. 既存のピロリジジナルカロイド分析法の検証と改良	千葉大学	○ 北島 満里子	15
(1) HPLC-ESI-MS/MS による分析法の検証	千葉大学	△ 北島 満里子	前出
(2) TLC による分析法の検証	千葉大学	△ 高山 廣光	10
2. 当研究グループにて開発中のピロリジジナルカロイド定量分析法の改良と定量法の確立	千葉大学	○ 小暮 紀行	前出

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

3 研究推進会議の開催状況

別紙の (1) のとおり

4 研究成果の概要

(1) 主要な成果

ア 成果の内容（別紙の（2）参照）

（ア）標準品を用いた PA 分析法の確立

食品等サンプル中に含有される構造既知の PA 定量分析法を確立した。まず、PA 標準品を用いて 8 種類程度の PA 濃度を UPLC にて分析し、そのピーク面積から検量線を作成する。実際に分析するサンプルを固相抽出等の前処理をすることにより、PA 画分を得る。その PA 画分を UPLC にて分析し、その保持時間と分子量、MS/MS 分析から PA の構造を推定する。構造推定された PA に対応する PA 標準品の検量線を用いて、含有濃度を推定することができる。

（イ）定量分析に用いる内部標準物質の設計

Cramer らが 2015 年に報告した改良法を参考に、内部標準物質として重水素原子を含むイソシアネート誘導体を設計した。重ベンゼンを原料として用い、3 工程にて Benzenesulfonyl isocyanate-*d*5 を合成した。本化合物を Retronecine と縮合させることにより内部標準物質の合成が可能となり、定量分析に用いることができる。

なお、現時点では目的の内部標準物質は得られていない。

イ 成果の活用（別紙の（2）参照）

特になし

(2) 各研究課題の成果

ア 中課題 1（既存のピロリジジナルカロイド分析法の検証と改良）の研究成果

（ア）工程管理及び成果目標

工程表
① 既存の分析法として TLC を用いた分析法を検証し、その有効性を検討し、実用可能かどうか検証する（小課題 2 関連）。 ↓
② 既存の分析法として LC-MS/MS による分析法を検証する。まずは標準サンプルを用いて検証を行い、その実用性・問題点等を明らかにし、改良を行う（小課題 1 関連）。 ↓
③ 上記①、②の検証を通して、実際の植物・食品等サンプルを用いた分析に適用可能なレベルまで分析法の精度を上げる。
成果目標：既存の分析法の検証を行い、実用的と判断できる場合は改良を進め実際の植物・食品サンプルの分析に適用する。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

ムラサキ科植物より単離した 4 種の PA (7-Acetyllycopsamine, Echihumiline *N*-oxide, 新規アルカロイド EP-2, Uplandicine) とコンフリーより単離した Echimidine (図 1) について、Mattocks 試薬を用いて検出を行った。スポットするサンプル量をいろいろと変えることにより、どの程度の PA 含有量であれば検出可能か精査したところ、検出には 5 μg 程度の PA が必要であると推定した (通常の SiO_2 プレート、非大環状構造の Retronecine type)。高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)を用いることにより、0.4~2 μg でも検出可能であった。

また、購入した Crotaline についても Mattocks 試薬を用いた検出を実施したところ、通常の TLC で 1 μg のスポット量で明瞭にスポットが確認されたことから、大環状ラクトン構造を有する PA は Mattocks 試薬による感度が高いと考えられた。Crotaline の検出に HPTLC を用いた場合、通常の TLC と比較してスポット面積が小さく、明瞭になり、0.2 μg でも発色を認め、より検出感度が高いことが明らかとなった。PA の構造により Mattocks 試薬による検出感度が異なるかどうかは、さらなる検証が必要である。

PA の構造の違い等によって検出感度が異なると考えられる結果が得られたため、スポットの強度を測定することで TLC による定量分析を行うのは難しいと考えられた。

ムラサキ科植物を蜜源とするハチミツを固相抽出して得られた PA 画分について Mattocks 試薬による検出を試みたが、6 mg/mL のサンプルを 4 μL スポットした場合においても検出することができなかった。ムラサキ科植物の MeOH エキスをアルカロイド処理して得た画分についても Mattocks 試薬による検出を試みたが、2 mg/mL のサンプルを 1 μL スポットした場合においても同様に検出することができなかった。

Mattocks 試薬

A : 1 % σ -Chloranil / Benzene

B : Ehrlich's reagent

p-Dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) 2.0 g + EtOH (100 mL) + Boron trifluoride etherate (2.0 mL)

C : 10 % Ac_2O / Benzene

手順

1. シリカゲル TLC にサンプルをスポットし、適当な溶媒で展開する。
2. TLC を乾かしたのち、A 液(*N*-oxide の場合は C 液)をスプレーし、1 分以内にホットプレートで軽く乾かす(約 1 分)。
3. B 液をスプレーし、もう一度ホットプレートで焼く(約 1 分)。

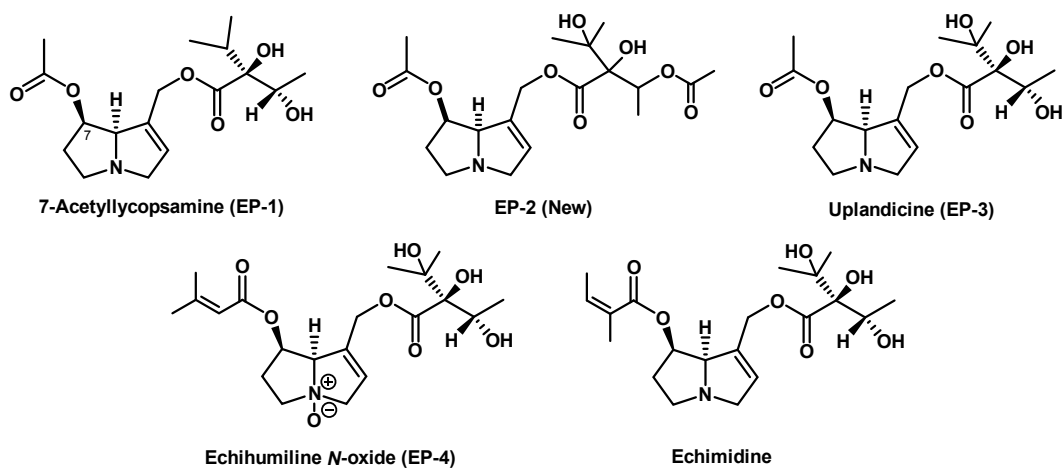
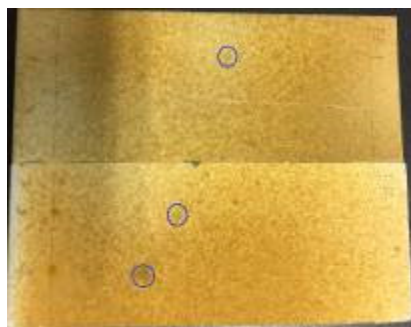


図1 Mattocks 試薬を用いて検出を確認した PA

7-Acetyllycopsamine



SiO₂ プレート

3.2 mg/mL の溶液を 1 μ L スポット (3.2 μ g)

0.32 mg/mL の溶液を 0.5 μ L スポット (0.16 μ g)

3.2 mg/mL の溶液を 3 μ L スポット (9.6 μ g)

3.2 mg/mL の溶液を 5 μ L スポット (16 μ g)

展開溶媒 : CHCl₃ : MeOH : NH₃ aq. = 82.5 : 15.5 : 2



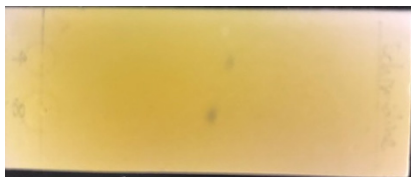
HPTLC SiO₂ プレート

0.4 mg/mL を 1 μ L スポット (0.4 μ g)

0.4 mg/mL を 5 μ L スポット (2 μ g)

展開溶媒 : CHCl₃ : MeOH : NH₃ aq. = 82.5 : 15.5 : 2

Echimidine



HPTLC SiO₂ プレート

0.1 mg/mL を 4 μ L スポット (0.4 μ g)

0.1 mg/mL を 8 μ L スポット (0.8 μ g)

展開溶媒 : CHCl₃ : MeOH : NH₃ aq. = 82.5 : 15.5 : 2

Echiumiline N-oxide



SiO₂ プレート

1.2 mg/mL の溶液を 1 μ L スポット (1.2 μ g)

0.12 mg/mL の溶液を 0.5 μ L スポット (0.06 μ g)

SiO₂ プレート

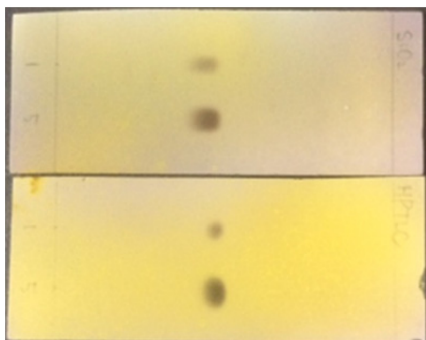
1.2 mg/mL の溶液を 3 μ L スポット (3.6 μ g)

1.2 mg/mL の溶液を 5 μ L スポット (6.0 μ g)

展開溶媒 : CHCl₃ : MeOH : NH₃ aq. = 82.5 : 15.5 : 2

EP-2, Uplandicine についても、スポットしたサンプル量は定かではないが Mattocks 試薬による発色を確認している。

Crotaline



SiO₂ プレート

1 mg/mL を 1 μ L スポット (1 μ g)

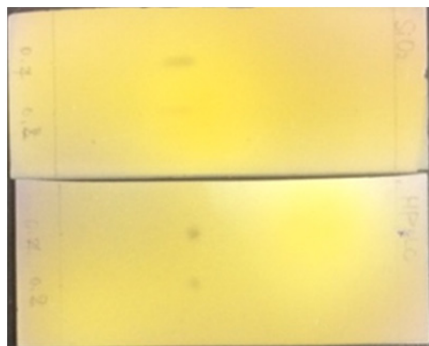
1 mg/mL を 5 μ L スポット (5 μ g)

HPTLC SiO₂ プレート

1 mg/mL を 1 μ L スポット (1 μ g)

1 mg/mL を 5 μ L スポット (5 μ g)

展開溶媒 : CHCl₃ : MeOH : NH₃ aq. = 82.5 : 15.5 : 2



SiO₂ プレート

1 mg/mL を 0.4 μ L スポット (0.4 μ g)

1 mg/mL を 0.2 μ L スポット (0.2 μ g)

HPTLC SiO₂ プレート

1 mg/mL を 0.4 μ L スポット (0.4 μ g)

1 mg/mL を 0.2 μ L スポット (0.2 μ g)

展開溶媒 : CHCl₃ : MeOH : NH₃ aq. = 82.5 : 15.5 : 2

以上より、単離した PA の検出においては TLC を用いた本分析法は有用であるといえる。

【工程表の②】

Cramer らが報告している HPLC-ESI-MS/MS を用いた分析法 (図 2, Method A) は、内部標準物質 (IST) の合成が困難であることと、分析を行う前に数段階の化学変換を経る必要があり、本分析法は簡便ではない。その後、Cramer らは本分析法の改良法を報告しており、その中で、イソシアネートを用いる誘導体化を利用している (図 2, Method B)。そこで、我々はイソシアネート部分に重水素を導入した化合物 (図 3、化合物 A'~C') を調製し、それを Retronecine と縮合させた化合物を内部標準物質とするより容易な定量分析法を考案した。なお、Cramer らの分析サンプルの前処理方法の中課題 2 へ適用することとした。

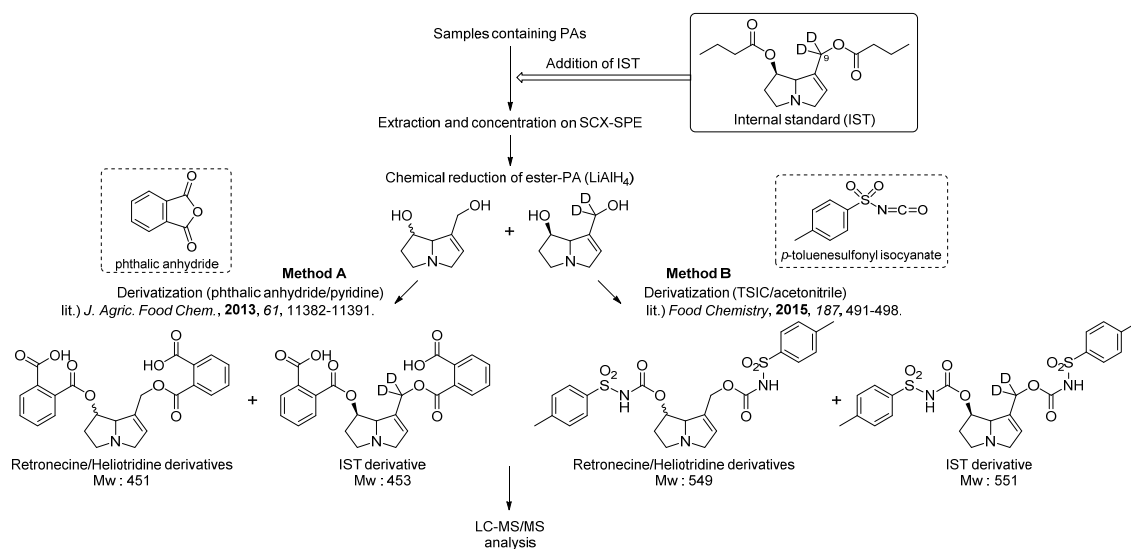


図 2 Cramer らの分析法

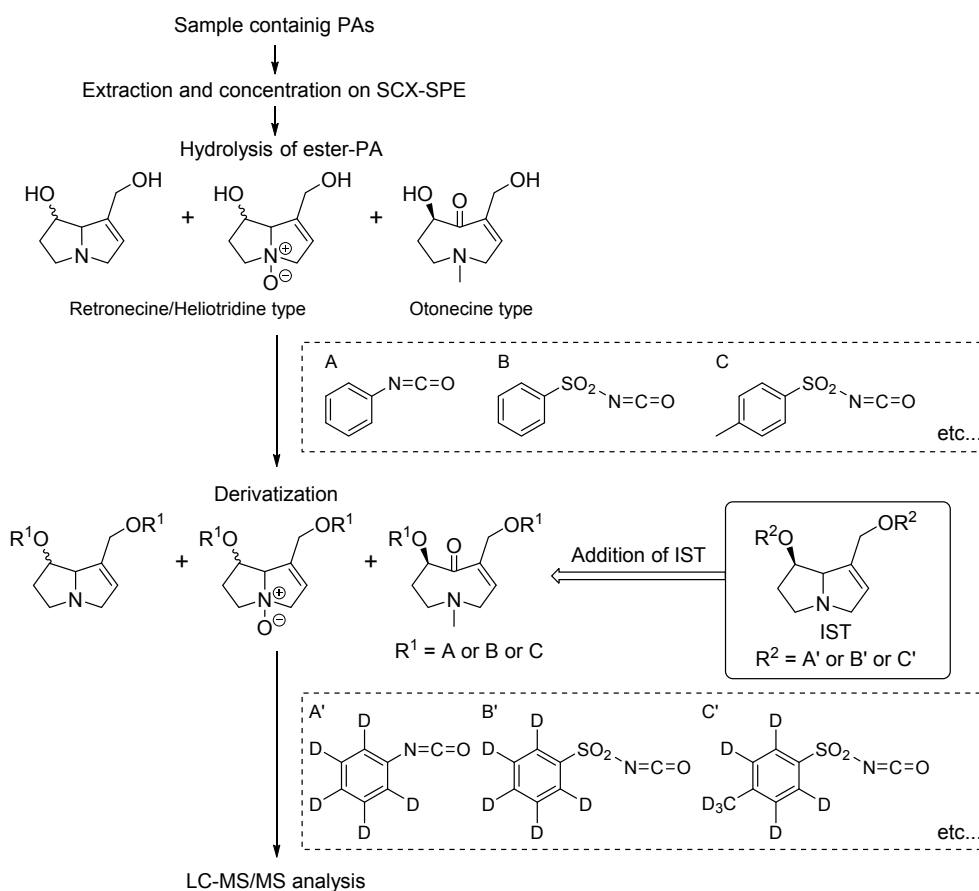


図 3 新たに考案した Cramer 法の改良分析法

【工程表の③】

【工程表の①】に示したとおり、TLC を用いた分析法は単離した PA など純度が高い PA の検出には有用であるが、定量分析は困難である。食品等のサンプルに対して PA 含有の有無を判断するためには、さらなる検証が必要である。

(ウ) 成果目標に対する達成状況

小課題 2 の TLC を用いた分析法は、標準品の検証は実施することができた。しかし、定量分析への応用は困難と考えられた。また、食品サンプルの抽出液を用いた場合は、PA の検出が可能であることを確認できなかった。

小課題 1 の既存の HPLC-ESI-MS/MS を用いた分析法については、内部標準物質の合成が困難であり、分析を行う前に数段階の化学変換を経る必要があることから本研究で目標とする簡便・簡易な分析法とは言えないことがわかった。また、本分析法の改良法が 2015 年に報告されたことから実施しなかった。ただし、その改良法を参考に、新たに内部標準物質として重水素を含むイソシアネート誘導体を設計し、当研究グループの分析法に用いることを計画した（中課題 2）。

イ 中課題 2（当研究グループにて開発中のピロリジジナルカロイド定量分析法の改良と定量法の確立）の研究成果の概要

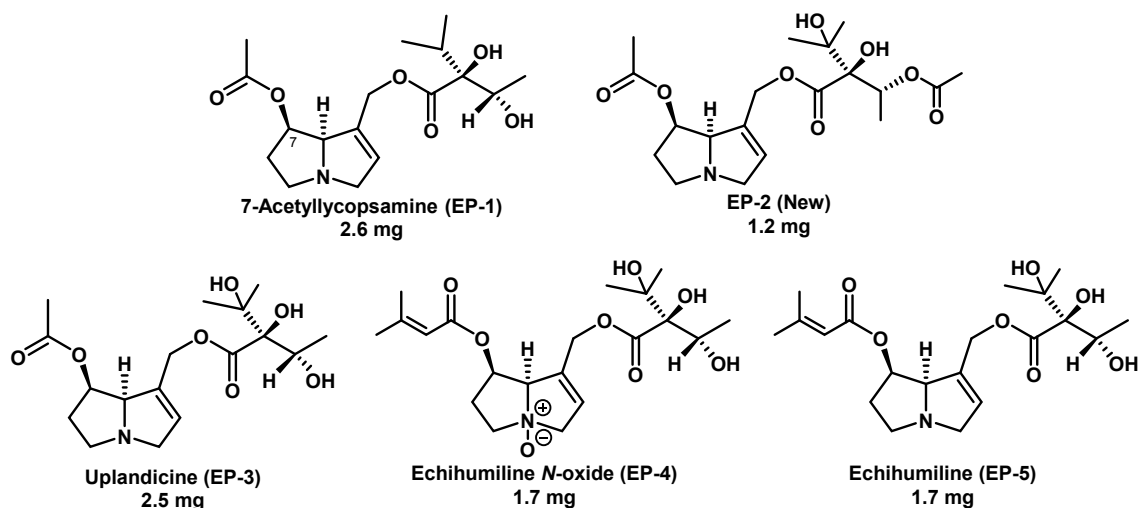
（ア）工程管理及び成果目標

工程表
① 当研究グループにて開発中の PA 分析法を用いて、当研究室保有の PA サンプルまたは購入したサンプルを分析することにより、再現性、問題点等を検証する。
↓
② 上記①で明らかとなった問題点について、条件検討を繰り返すことにより改良する。
↓
③ 農林水産省指定の植物・食品サンプルについて分析を行い、その分析精度・再現性・問題点等について検証する。
↓
④ 上記③で明らかとなった問題点があれば改良する。また、既知の分析法と比較を行い、それらの利点・欠点・課題等を整理する。
成果目標：構造未知の PA も分析可能な網羅的な分析方法を確立する。

（イ）各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

ムラサキ科植物の全草 7.74 kg を MeOH 抽出し、得られたメタノールエキスをアルカロイド処理して得られた粗塩基分画を各種クロマトグラフィーにより分離・精製し、新規 PA1 種を含む 5 種の PA を単離・構造決定した（全て Retronecine type）。



これらのサンプルを用いて UPLC 分析用のカラム・溶媒等の条件検討を重ね、下記の分析条件を確立した。この分析条件を用いて、最後に構造を決定した Echihumiline を除く、4 種のアルカロイドについて、種々の濃度の PA を注入して検量線を作成した。検量線は PDA (UV) 検出と MS 検出のそれぞれについて作成した。0.04~1 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で、いずれも相関係数 r (>0.99) の信頼度の高い検量線を作成することができた。

分析条件

Column: Kinetex C8 (Phenomenex) (2.6 μm , ϕ 3 x 150 mm)

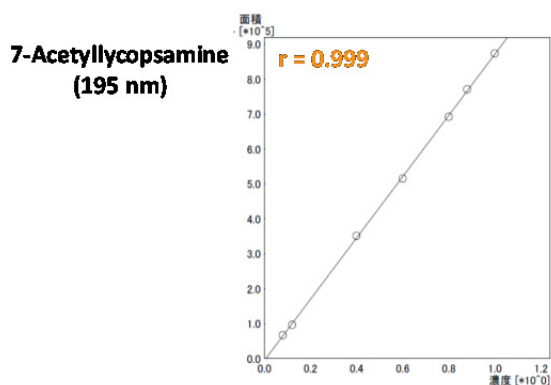
Column temp.: 40 $^{\circ}\text{C}$ Flow: 0.2 mL/min

Elu: A: 0.2 % $\text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O}$

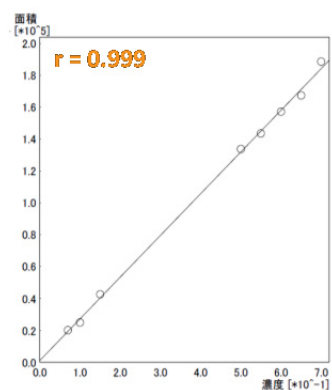
B: 0.2 % $\text{HCOOH}/\text{CH}_3\text{CN}$

time (min)	B conc. (%)
5.00	7
20.00	70
21.00	70
21.01	7
40.00	stop

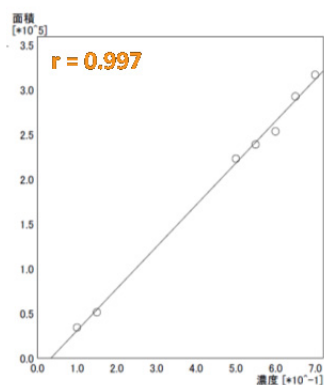
PDA (UV) 検出より作成した検量線



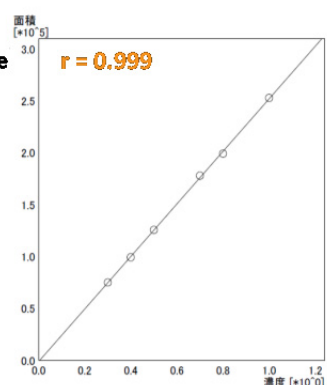
**EP-2 (New)
(190 nm)**



**Uplandicine
(190 nm)**

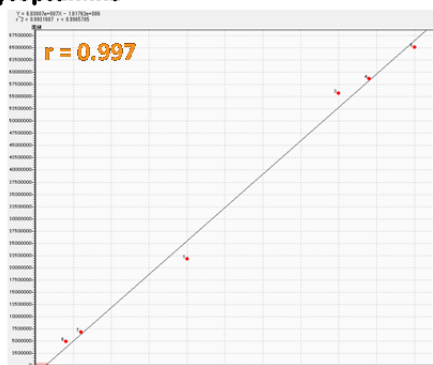


**Echihumiline N-oxide
(225 nm)**

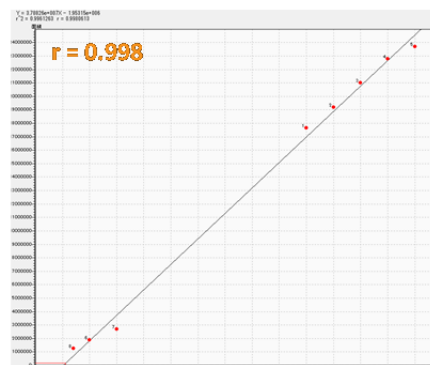


MS 検出より作成した検量線

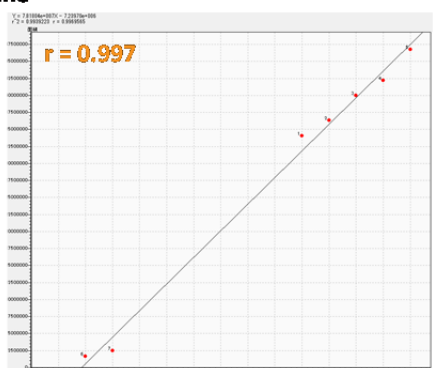
7-Acetyllycopsamine



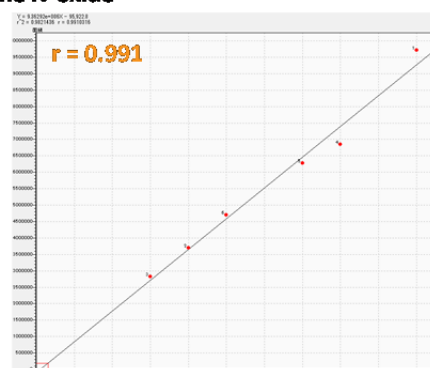
EP-2 (New)



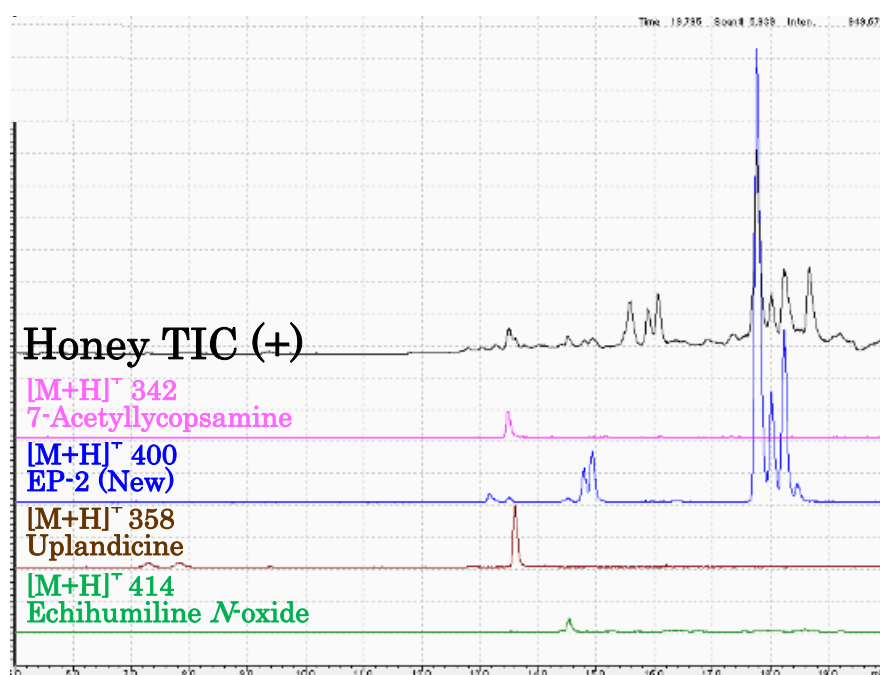
Uplandicine



Echihumiline N-oxide

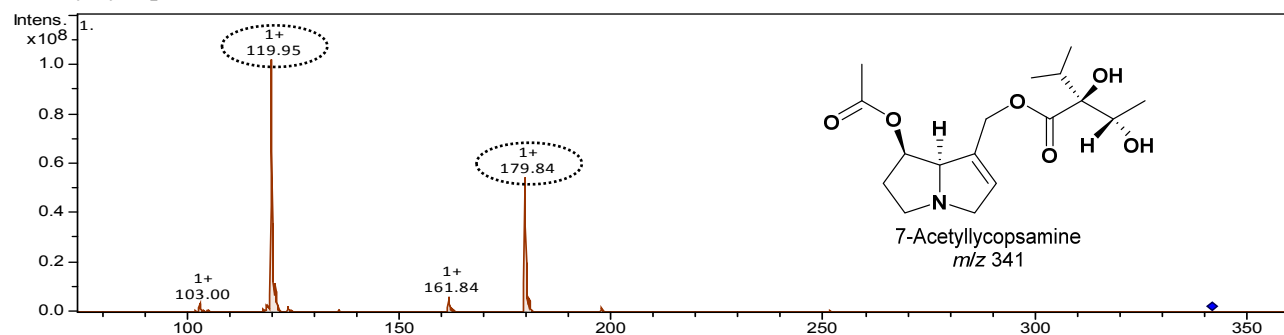


これらの検量線を用いて、UPLC 分析における保持時間、分子量から PA の構造を決定し、そのピーク面積からそれら食品サンプル（はちみつ）中の 4 種類の PA 濃度を算出することができた。

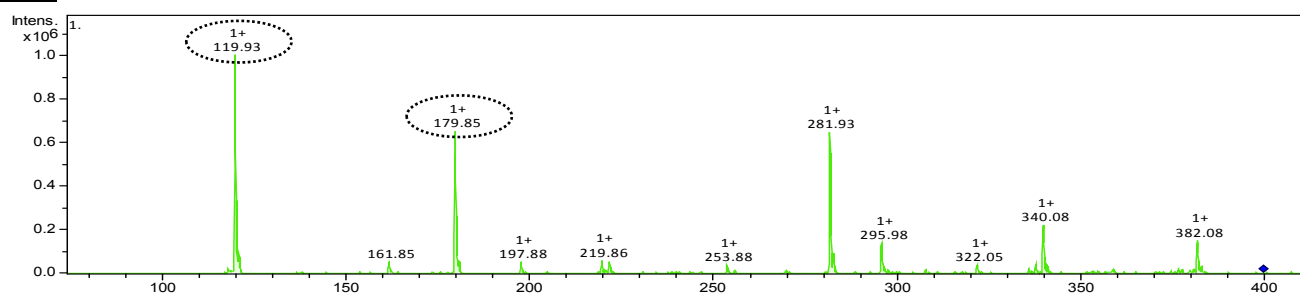


PA の各骨格に特有のフラグメントイオンが観測されることを確認するため、単離した PA について MS/MS 分析を行った。

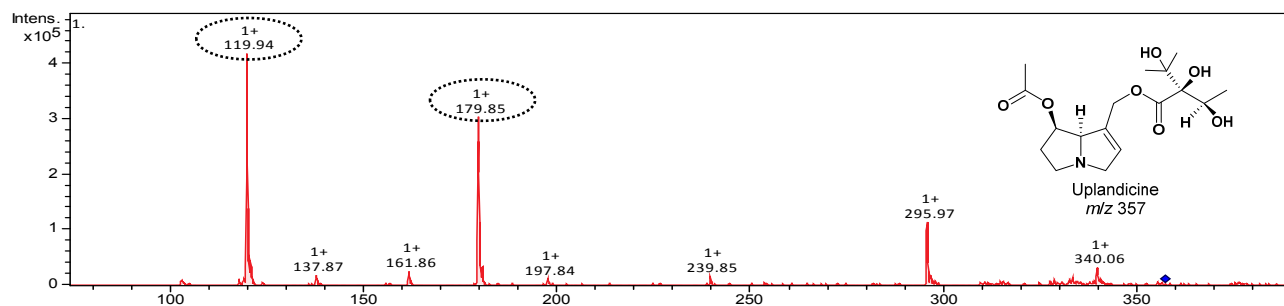
7-Acetyllycopsamine



EP-2



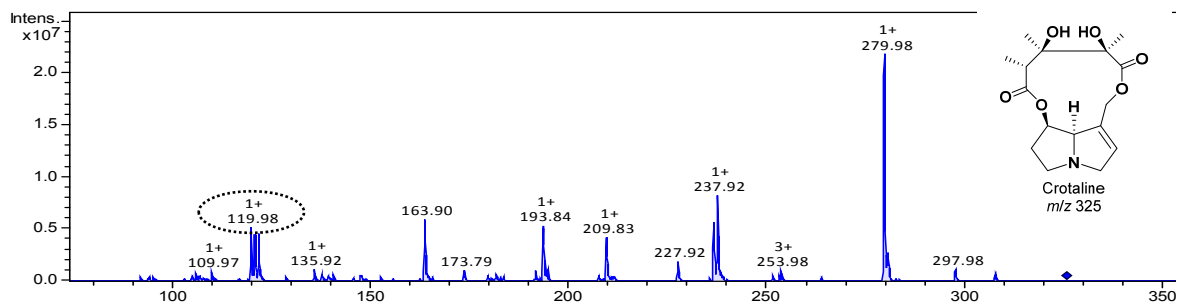
Uplandicine.



以上の Retronecine type のアルカロイドについては m/z 120, 180 のフラグメントを確認することができた。

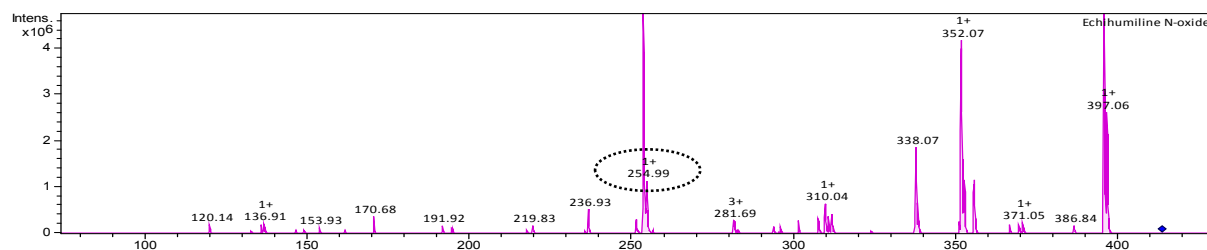
続いて、購入した大環状ラクトン構造を有する Retronecine type の PA である Crotaline についても分析を行った。

Crotaline



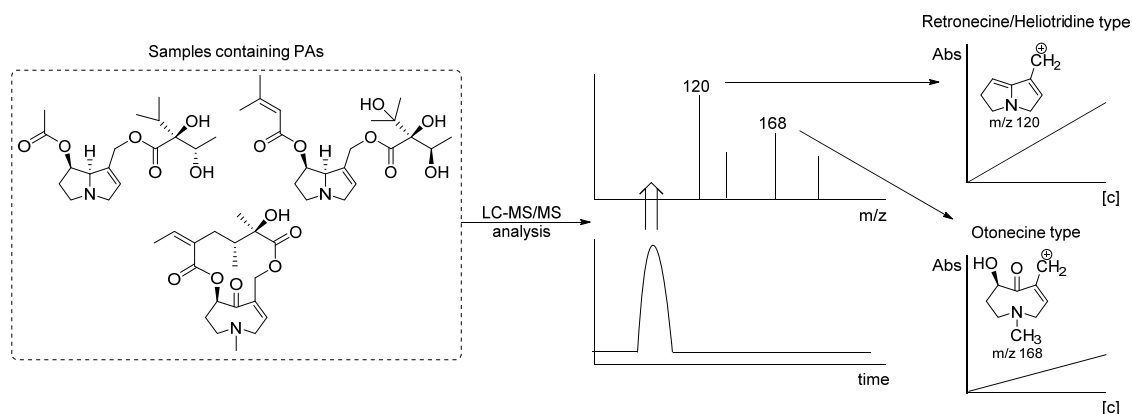
Retronecine type の PAs であるが、環状ジエステル体のためか m/z 120 のピークが小さく、 m/z 180 のピークが確認されなかった。

Echihumiline N-oxide

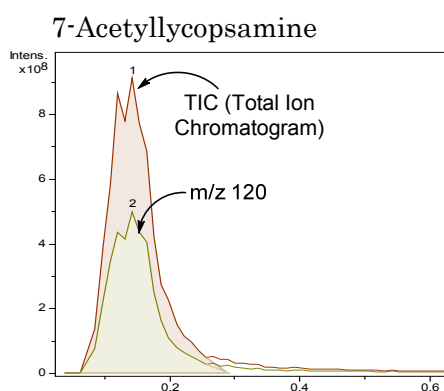


N -oxide 体において観測されると予想された m/z 172 のフラグメントは確認されず、 m/z 254 のフラグメントが確認された。 m/z 254 のフラグメントイオンは、文献 (*J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 594-600., *Phytochem. Anal.*, **2005**, *16*, 108-119.) において Retronecine /Heliotridine type の N -oxide 体を MS/MS 測定した際に観測されると報告されている。

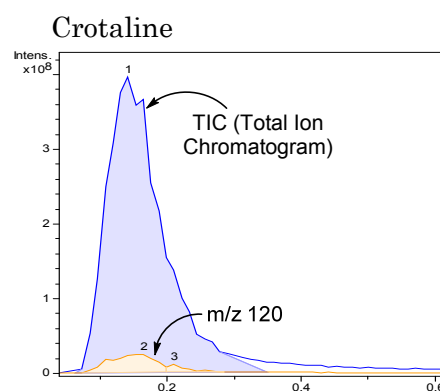
Retronecine/Heliotridine type、Otonecine type、 N -oxide のそれぞれで確認できる各骨格特有のフラグメントイオンを用いて検量線を作成した後、PAs を含有するサンプルの分析を行い、固有のフラグメントイオンごとに対応する検量線に当てはめる事により、サンプル中の PAs を定量できると考えた。



しかし Retronecine type の 7-Acetyllycopsamine と Crotaline では、 m/z 120 のフラグメントイオンの生成比が異なる事が分かった。



$$m/z\ 120 / \text{TIC} = 55.4\ \%$$



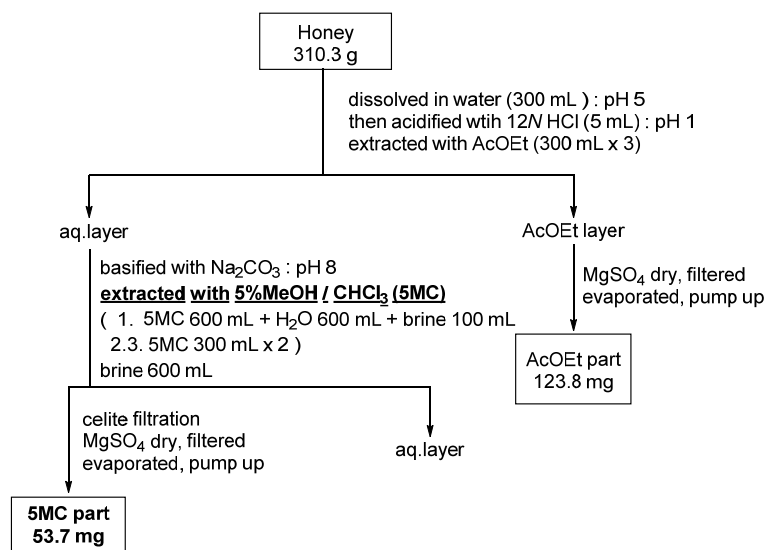
$$m/z\ 120 / \text{TIC} = 5.8\ \%$$

Retronecine/Heliotridine type の PA であっても、 PAs によって m/z 120 のフラグメントイオン生成比が異なるので、PAs の type ごとに特有のフラグメントイオンのシグナルに着目し、検量線を作成し、共通の基本骨格の PA を定量する事は不可能であると判断した。

【工程表の②】

分析の再現性を検証するため、分析サンプルの前処理方法について検証した。

ハチミツの前処理としてアルカロイド処理をしたところ、抽出操作の際にエマルジョンが生じ、その処置が困難であった。そこで、より簡便な前処理法を模索することとした。抽出溶媒の変更 (5 %MeOH / AcOEt) や、アルカロイド処理前に AcOEt で抽出し糖を除く試みや、アルカロイド処理を行わずに液液分配などを検討したが、得られた PA 画分の HPLC 分析を行ったところ、十分な再現性が得られなかった。



Cramer らの報告を参考に、ハチミツから PAs を抽出する際によく使われている、強カチオン交換担体を持つ SCX-SPE カラムを用いて固相抽出を行った。論文に従い、固相抽出用カラムに MeOH を通した後、0.05M 硫酸を流してプレコンディショニングした。一方、ハチミツは 0.05M 硫酸に溶かした後、グラスフィルターを用いてろ過した。そのハチミツ溶液を固相抽出カラムに通し、水 12 mL で洗浄、メタノール 12 mL で洗浄して酸性成分を洗い流した。その後、6 %NH₄OH / MeOH 溶液を流して PAs を溶出させ、溶出液を減圧留去して粗塩基画分を得た。

しかし、この方法ではハチミツに Crotaline を添加した時に十分に溶出できていないようだったので、溶出時の塩基濃度を 10 % NH₄OH / MeOH に上げ、また溶液量を 18 mL から 30 mL に増やしたところ、よい再現性で PAs を溶出させることができた (表 1)。

表1 ハチミツの固相抽出の検討

Run	(1) Honey	(2) 0.05M H ₂ SO ₄	(3) NH ₄ OH / MeOH	Crude
1	2.06 g	6 mL	18 mL (6%)	1.2 mg
2	2.06 g + Crotaline 1.6 mg	6 mL	18 mL (6%)	2.4 mg
3	2.11 g	6 mL	30 mL (10%)	1.2 mg
4	2.06 g	6 mL	30 mL (10%)	1.0 mg
5	2.06 g + Crotaline 1.6 mg	6 mL	30 mL (10%)	2.6 mg
6	2.03 g	6 mL	30 mL (10%)	1.2 mg
7	2.01 g + Crotaline 2.5 mg	6 mL	30 mL (10%)	3.1 mg

続いて、中課題 1 で述べた (P10) 内部標準物質の合成を試みた。Cramer らの改良法を参考に、下記のような分析法を立案した。すなわち、固相抽出によりサンプルから PAs を抽出し、加水分解に続くカルバメート化(図中 R¹)を行った後、内部標準物質 (IST) を添加し、内部標準法を適用する事で定量できると考えた。Cramer 法の中で用いられている LiAlH₄ 還元から、LiOH による加水分解に変更したことで Otonecine type の PAs も定量することが可能となる。また、カルバメート化には文献と同様に、反応性が高い A~C のようなイソシアネート類を使うこととした。

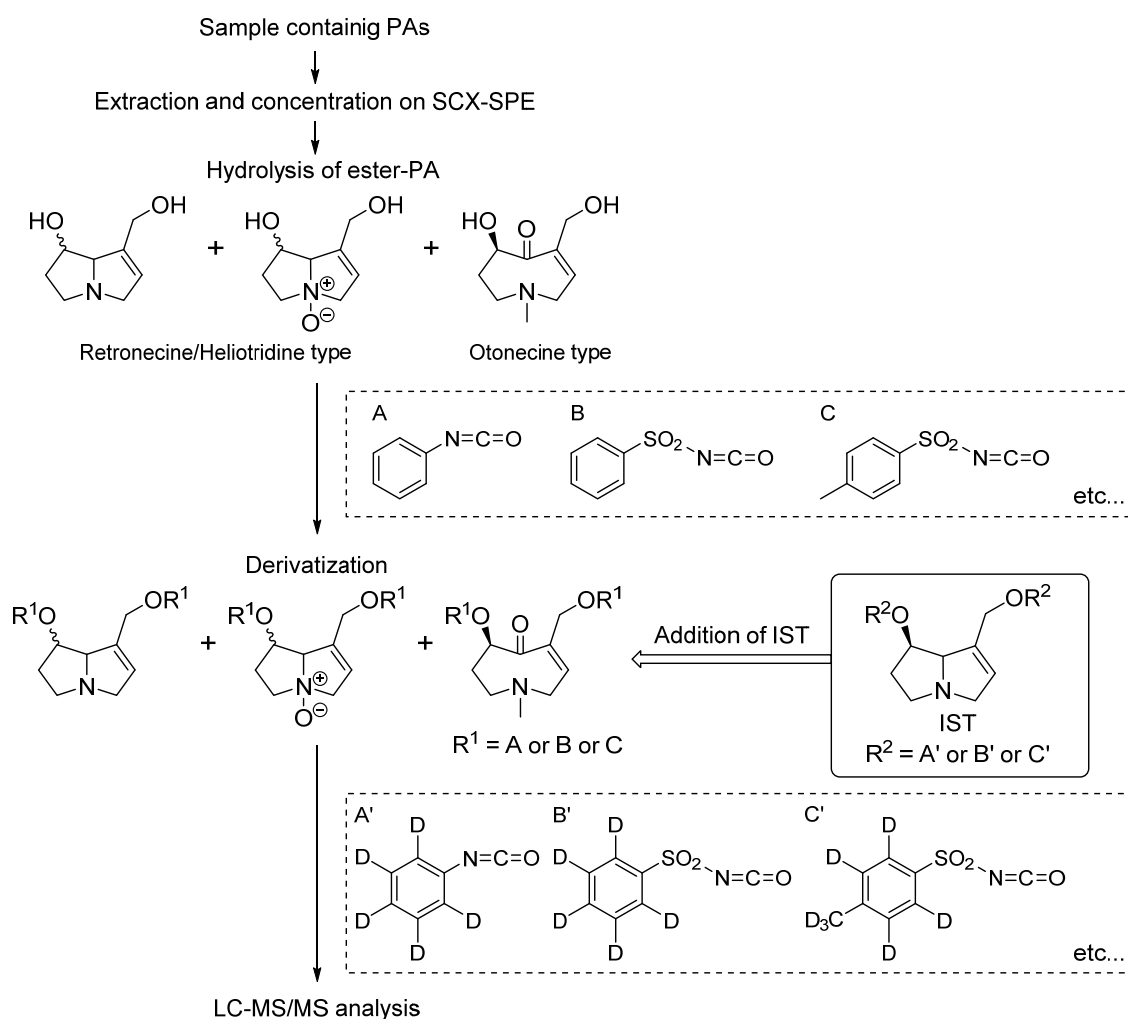
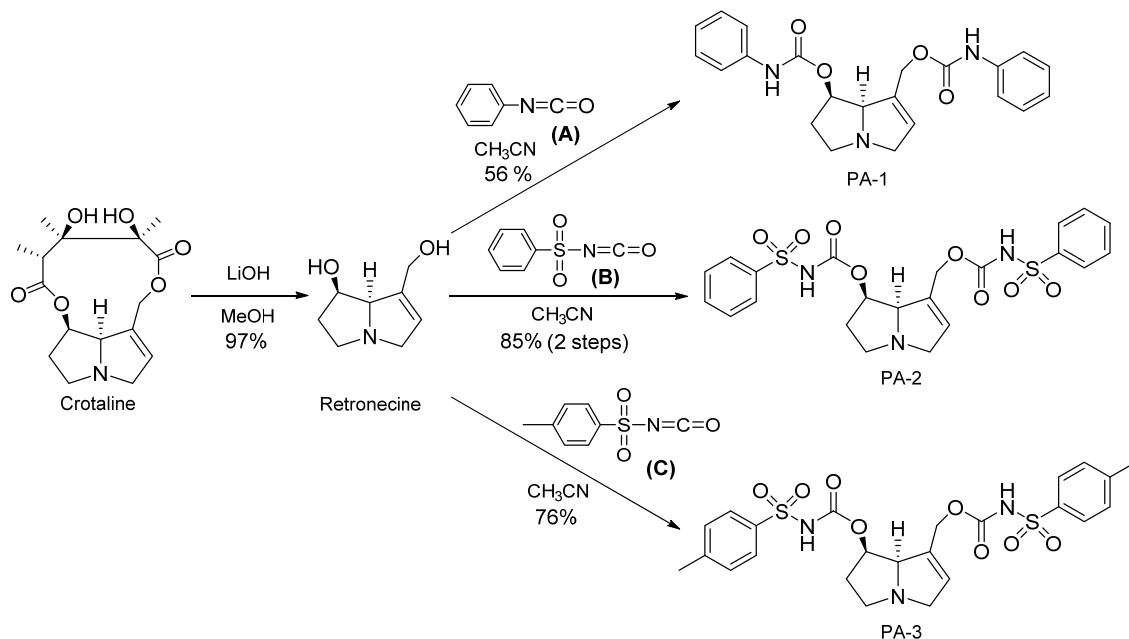
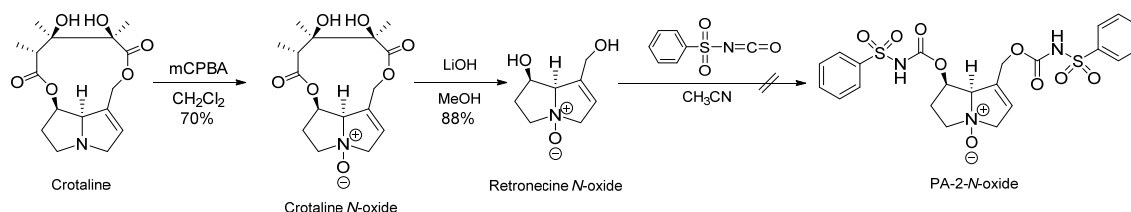


図 3 新たに考案した Cramer 法の改良分析法 (再掲)

まず、Crotaline を LiOH で加水分解して収率 97 %で Retronecine を得た。Retronecine を Phenyl isocyanate (A), Benzenesulfonyl isocyanate (B), *p*-Toluenesulfonyl isocyanate (C) とそれぞれ反応させたところ、後者の 2 つは良好な収率で目的物を与えた。この結果を受け、重水素体の合成も可能な Benzenesulfonyl isocyanate (B)を用いることとした。

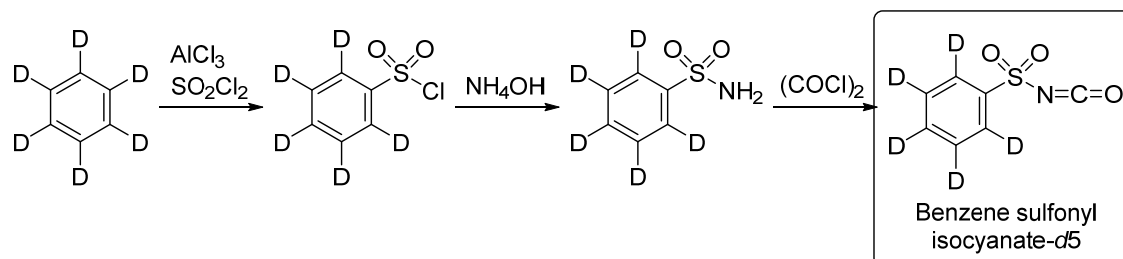


また、*N*-oxide 体の分析も目的とするため、*N*-oxide 体を合成した。すなわち、Crotaline を MCPBA で処理して *N*-oxide 体とした後、加水分解により Retronecine *N*-oxide を得た。それを Benzenesulfonyl isocyanate と反応させたところ、目的のカーバメート体は得られず、複数種の複雑な化合物を与えた。そのため、*N*-oxide 体の分析は一旦保留とした。



なお、Otonecine type の PA である Petasitenine を加水分解することにより、Otonecine が得られることを確認している。Otonecine とイソシアネート類の反応によりカーバメート体が得られると考えられるため、本改良法では Cramer 法では分析できない Otonecine type の PA の分析も可能である。しかし、Otonecine とイソシアネート類の反応の検証はできなかった。

続いて、重ベンゼンから Benzenesulfonyl isocyanate (B) の重水素体を合成することとした。重ベンゼンに塩化アルミニウム存在下チオニルクロリドと反応させた後、アンモニア水で処理してスルホンアミドとした。その後、オキサリルクロリドで処理することにより、現在のところ低収率ではあるが目的の重水素化体を得た。



合成した Benzenesulfonyl isocyanate-*d*5 を Retronecine と反応させて内部標準物質の合成を試みたが、重水素化により反応性が異なるためか、目的物は得られなかった。今後、反応条件の検討や内部標準物質の再設計を行う予定である。

【工程表の③】

新たに設計した内部標準物質の合成が達成できていないため、農林水産省指定の食品・植物サンプルの分析は未だ実施できていない。

(ウ) 成果目標に対する達成状況

ハチミツ中に含まれる既知 PA の分析法を確立することができた。既存の分析法を参考に、当研究グループにて新たな内部標準物質を設計したが、その内部標準物質の合成を達成できなかったため、構造未知の PA 分析法は確立できていない。

5 研究成果の発表（主要な論文、取得した（申請中）の特許等を記述）

別紙の（３）～（８）のとおり

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

中課題 2 に関しては、Retronecine type の PA の *N*-oxide 体のカーバメート体が得られていないこと、新たに内部標準物質作成用試薬として設計した重水素体（Benzene sulfonyl isocyanate-*d*5）と Retronecine の反応が進行しないことが問題点である。重水素体を付加した Retronecine が内部標準物質として微量でも得られれば、定量分析への適用は可能であるので、反応条件の検討または内部標準物質の再設計を行い、分析法の確立を目指す。

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表（論文、特許等）等

試験研究課題名	食品中のピロリジジナルカロイド類を網羅的に検出できる分析法の開発
---------	----------------------------------

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用し うる成 果の有 無	(3)学術論文数		(4)口頭発表回数		(5) 出版 図書数	(6)国内特許権等数		(7)国際特許権等数		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
2903	1	有	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	有

(1)研究推進会議等の開催実績

区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	第1回推進会議	平成29年7月20日	農林水産省消費・安全局	11	有	

(2)行政が活用しうる成果

区分:①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況
②	構造既知のピロリジジナルカロイド定量分析法の確立	食品中の既知ピロリジジナルカロイドの定量分析	なし
②	定量分析に用いる内部標準物質の設計	食品中のピロリジジナルカロイド類の含有実態調査	なし

(3) 学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

(4) 口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6)国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7)国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考