

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～ペプチドを指標とした既存添加物酵素の基原同定法の検討～

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究要旨 既存添加物酵素の本質であるタンパク質からペプチドを生成し、この質量スペクトルにマッチするペプチドをMascot searchで検索し、同定したペプチドが帰属するタンパク質の基原情報を得る方法を検討した。既存添加物酵素3品目16製品をモデルにして、製品に付帯する基原情報とMascot searchで同定した基原情報を比較・評価した。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 研究員

基原の情報とともに日本食品添加物協会を通じて入手したβ-アミラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、セルラーゼ3品目16製品の既存添加物酵素を試料として用いた。内訳は、β-アミラーゼ2基原3試料、β-ガラクトシダーゼ2基原4試料、セルラーゼ5基原9試料。付帯する基原情報は、Tableに記載した。

A. 研究目的

既存添加物として流通する酵素は、生産性の高さから、主に微生物を基原とする製品である。微生物の中には、有害物質を生産するものもあるため、販売業者・使用者が、製品の基原を把握することは重要である。しかしながら、酵素製品は菌体外に排出された酵素タンパク質を製剤化したものがほとんどであるため、遺伝子解析などによる基原の確認はほぼ不可能である。したがって、使用者は、販売業社が提供する情報に依存する以外に手段がない。そこで本研究では、流通する酵素製品から基原を確認する方法として、酵素の本質であるタンパク質から得たペプチドを指標成分とした基原の同定法を検討する。酵素3品目16製品を対象に、取得した基原情報と製品付帯情報に矛盾がないか、また基原同定法としての可能性について検討する。

B. 研究方法

B-1. 試料

B-2. 試薬

グアニジン塩酸塩 (Cat No. 17353-25) およびトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Cat No. 35434-05) は、ナカライテスク (株) より購入した。ヨード酢酸ナトリウム (Cat No. I2512-25G) および重炭酸アンモニウム (Cat No. A6141-500G) は、Sigma-Aldrich 社より購入した。エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム塩二水和物 (Cat No. 343-01861), HPLC用アセトニトリル (ACN) (Cat No. 015-08633), トリフルオロ酢酸 (Cat No. 208-02746) およびギ酸 (Cat No. 063-05895) は、和光純薬工業 (株) より購入した。ジチオトレイトール (DTT) (Cat No. 20291) は、Thermo Scientific 社より購入した。消化酵素 Trypsin (Cat No. V5280) および rLys-C (Cat No. V1671) は、Promega 社より購入した。

B-3. 試料調製

試料は、総タンパク質濃度が約 1 g/L となるように TEG (0.5 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 7M グアニジン (pH 8.0)) に溶解させた。この液 100 μ L に対し、0.5 M DTT 1 μ L 添加し、37°C で 90 分反応させた後、1M ヨード酢酸 1.2 μ L 添加し、37°C で 30 分間反応させ、タンパク質を還元、アルキル化した。続いて水を 400 μ L 添加し、あらかじめ水で平衡化させた PD Mini Trap G-25 (Cat No. 28918007, GE Healthcare 社製) に全量 (502.2 μ L) を付加した後、目的のタンパク質を水 1 mL で溶出させ、凍結乾燥処理した。得られた乾燥物は、50 mM 重炭酸アンモニウム 40 μ L に溶解し、0.5 mL チューブに 20 μ L ずつ分注した。それぞれのチューブに 1 μ g/ μ L の Trypsin 0.5 μ L と 0.2 μ g/ μ L の rLys-C 1 μ L を添加し、37°C で 16 時間消化させた。消化後、1%TFA 含有 2%ACN 20 μ L を添加して反応を止めた後、水 60 μ L を加えて LC/MS/MS 用試料液とした。

B-4. 分析方法

装置 超高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/TOF-MS) : Waters 社製 ACQUITY UPLC H-CLASS/Xevo G2 QToF

LC 条件 カラム : ACQUITY UPLC Peptide BEH300 C18 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m, 300Å), 流速 : 0.2 mL/min, カラム温度 : 40°C, 移動相 : 0.1%ギ酸/0.1%ギ酸含有 ACN = 99 : 1 (0 min) \rightarrow 65 : 35 (60 min) \rightarrow 50 : 50 (70 min) \rightarrow 10 : 90 (70~75 min) \rightarrow 99 : 1 (75~90 min), 注入量 : 2 μ L.

MS/MS 条件 イオン化モード : ESI+, キャピラリー電圧 : 3.0kV, コーン電圧 : 30V, 取り込みモード : MS^E, コリジョンエネルギー : 20-40V, ソース温度 : 120°C, 脱溶媒温度 : 450°C, コーンガス : 50L/h, 脱溶媒ガス : 800L/h.

B-5. 解析方法

データ抽出条件 ソフトウェア : BiopharmaLynx, 抽出範囲 : 全イオン電流クロマトグラム 5~70 min における信号強度の高い上位 300 件のマススペクトル.

検索条件 サーバー : Mascot Server, 検索モード : MS/MS Ions Search, データベース : Swiss-Prot, 消化酵素 : Trypsin または rLys-C, 修飾 : Carboxymethyl (C), 価数 : 1 価, データフォーマット : PKL.

B-6. SDS-PAGE

Bladford 法で、試料中の総タンパク量を測定し、1 レーンあたり 5 μ g 相当量をロードした。分子量マーカー : Precision Plus Protein Standard-Unstained (Cat No. 1610363, Bio-Rad 社製), ゲル : Bullet Page One Precast Gel (Cat No. 13077-04, ナカライテスク (株) 製), 染色液 : Bullet CBB Stain One (Cat No. 13542-81, ナカライテスク (株) 製), 泳動条件 : 定電圧 400V (10 min).

C. 結果および考察

試料中タンパク質からのペプチド断片の生成には、多くの論文で使用された実績があり、比較的安価に購入できる、Promega 社の消化酵素 Trypsin および rLys-C を使用することにした。質量分析計には、ペプチド断片の正確な質量情報を取得するために、TOF-MS を使用することにした。検索には Mascot Server を使用し、タンパク質アミノ酸配列データベースには、専門のキュレーターによるアノテーションを経た配列のみがまとめられた Swiss-Prot を使用した。

Trypsin を使用した際の Mascot search の結果と rLys-C を使用した際のそれから、重複でヒットしたタンパク質について、基原, Entry name, EC No, タンパク質名, 分子量およびアミノ酸配列カバー率の情報とともに Table にまとめた。Table には試料に付帯する基原情報と、SDS-PAGE で検出されたバンドの泳動度から推定した分子量情報を併記し (Fig. 1), Mascot search の結果と比較し考察した。考察は、品目毎に下記に述べる。

C-1. β -アミラーゼ (EC 3.2.1.2)

【試料 1, 2】 *G. max* 由来 β -アミラーゼ [AMYB_SOYBN] がヒットし、製品に付帯する

基原情報 *G. max* と一致した。β-アミラーゼ以外に、レクチンなどもヒットしたが、すべて *G. max* 由来であった。

【試料 3】*H. vulgare* 由来 β-アミラーゼ [AMYB_HORVU] および [AMYB_HORVS] の 2 件ヒットし、製品に付帯する基原情報 *H. vulgare* と一致した。β-アミラーゼ以外のタンパク質もヒットしたが、すべて *H. vulgare* 由来であった。

試料に付帯する基原情報との一致率は 3/3 であった。

C-2. β-ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23)

【試料 4~6】*A. oryzae* 由来 β-ガラクトシダーゼ [BGALA_ASPOR] がヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. oryzae* と一致した。一方、*A. flavus* 由来 β-ガラクトシダーゼ [BGALA_ASPFN] も同じ順位でヒットしていた。両アミノ酸配列の相動性を調べたところ、100%であった。したがって、これ以上、基原を絞り込むことができなかった。

【試料 7】データベース Swiss-Prot には、*B. circulans* 由来 β-ガラクトシダーゼが登録されていない。そこで、TrEMBL から“galactosidase”で検索・抽出した 80,323 件のアミノ酸配列をデータベースとして使用したところ、*B. circulans* 由来 β-ガラクトシダーゼ [E5RWQ2_BACCI] がヒットした。

試料に付帯する基原情報との一致率は 4/4 であった。

C-3. セルラーゼ (EC 3.2.1.4, EC 3.2.1.91)

【試料 8~10】セルラーゼ関連酵素エキソグルカナーゼが複数ヒットし、製品に付帯する基原情報 *A. oryzae* と一致した。その他、ヘミセルラーゼに分類される酵素 (EC 3.2.1.8) もヒットしていた。

【試料 11】データベース Swiss-Prot には、*P. coccineus* 由来タンパク質の登録がない。そこで、TrEMBL から“cellulase”で検索・抽出した 79,571 件のアミノ酸配列データベース (*P. coccineus* 由来セルラーゼ関連タンパク質 30 件含む) を使用したが、何の結果も得られな

かった。本研究ではこの原因について明らかにすることができなかった。

【試料 12, 13, 16】セルラーゼ関連酵素エキソグルカナーゼがヒットした。しかしヒットした酵素の基原は、試料付帯情報の基原と属レベルで一致するものの、種レベルで矛盾が生じていた。この 3 試料に記載された基原に由来するセルラーゼ関連酵素は、Swiss-Prot 上に登録があったため、試料付帯情報が誤っている可能性がある。

【試料 14, 15】セルラーゼ関連酵素エキソグルカナーゼが複数ヒットし、製品に付帯する基原情報と一致した。

試料に付帯する基原情報との一致率は 5/9 であった。

D. 結論

既存添加物酵素 β-アミラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、セルラーゼの 3 品目 16 製品を対象にして、製品から生成したペプチドのマスペクトルを Mascot search に付し、帰属される基原と製品付帯情報を比較した。その結果、16 製品中 12 製品で Mascot search の結果と、製品に付帯する基原情報が一致した。しかし、別の基原のタンパク質が同順位でヒットし、基原を一つに絞り込めないことも確認された。

セルラーゼ 4 製品で基原の矛盾が生じた。このうち 3 製品は、付帯情報の基原に由来するタンパク質がデータベースに登録されていたため、付帯情報が誤っている可能性がある。これについて、例えば、販売業者が遺伝子解析または形態観察で基原を同定したのか、その経緯を確認する必要がある。残りの 1 製品は、Mascot search から何の結果も得られなかった。

本研究で検討した方法は、Mascot Search の結果に対して十分吟味する必要がある。しかし、販売業者の情報提供に依存することなく、科学的に基原を推定できる可能性がある。特にデータベースの充実化とともに、本法は精巧な同定が期待できる。

E. 研究発表

学会発表

- 1) 西崎雄三, 鈴木綾乃, 良永裕子, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 原園景, 木吉真人, 石井明子, 杉本直樹, 佐藤恭子, ペプチドを指標にした既存添加物の基原同定法の検討(1)～酵素製品について～, 日本食品化学学会 第24回 総会・学術大会 (2018年4月, 東京)
- 2) 鈴木綾乃, 西崎雄三, 良永裕子, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 原園景, 木吉真人, 石井明子, 杉本直樹, 佐藤恭子, ペプチドを指標にした既存添加物の基原同定法の検討(20)～酵素製品について～, 日本食品化学学会 第24回 総会・学術大会 (2018年4月, 東京)
- 3)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

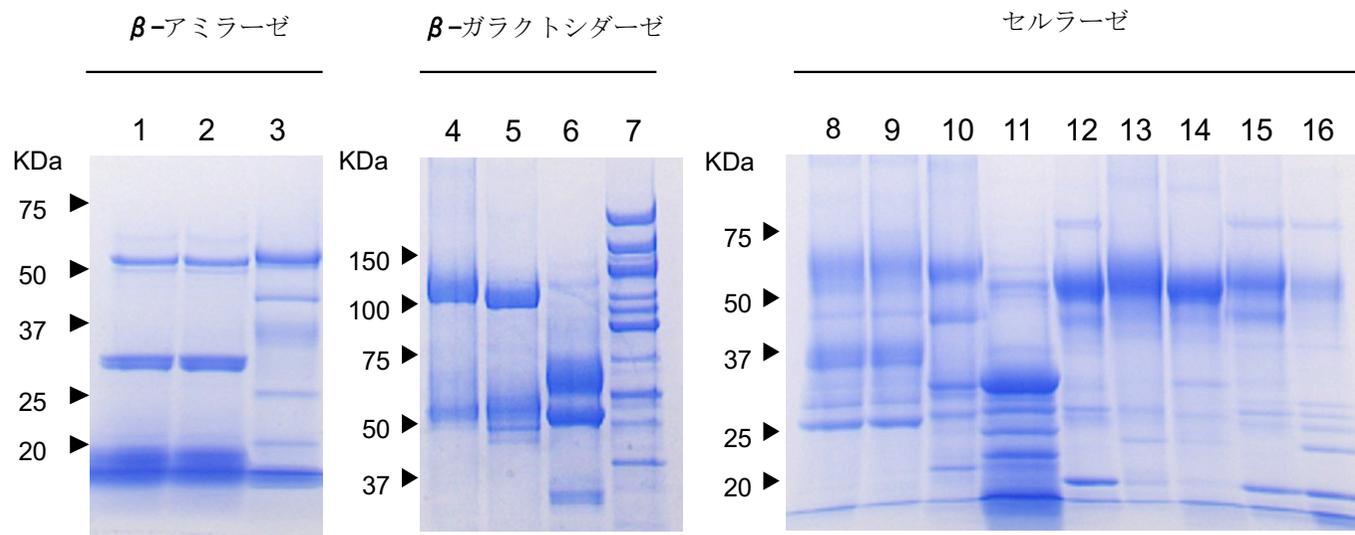


Fig. 1 酵素製品の SDS-PAGE の結果

Table 1 β-アミラーゼの Mascot search の結果

試料付帯情報			Mascot searchの結果						
試料	基原	分子量	順位	基原	登録名	EC番号	タンパク質	分子量	カバー率
1	<i>Glycine max</i>	54, 30, 16 kDa	1	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-	Lectin	31 kDa	43%
			2	<i>G. max</i>	AMYB_SOYBN	EC 3.2.1.2	Beta-amylase	56 kDa	13%
			3	<i>G. max</i>	ITRA_SOYBN	-	Trypsin inhibitor A	24 kDa	35%
			4	<i>G. max</i>	KTII_SOYBN	-	Kunitz-type trypsin inhibitor KTII	23 kDa	31%
			5	<i>G. max</i>	IBB1_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	13 kDa	39%
			6	<i>G. max</i>	IBBD2_SOYBN	-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor D-II	10 kDa	44%
			8	<i>G. max</i>	2SS_SOYBN	-	2S albumin	19 kDa	12%
			2	<i>Glycine max</i>	54, 30, 16 kDa	1	<i>G. max</i>	LEC_SOYBN	-
2	<i>G. max</i>	ITRA_SOYBN				-	Trypsin inhibitor A	24 kDa	40%
3	<i>G. max</i>	AMYB_SOYBN				EC 3.2.1.2	Beta-amylase	56 kDa	18%
4	<i>G. max</i>	IBB1_SOYBN				-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor	13 kDa	39%
5	<i>G. max</i>	KTII_SOYBN				-	Kunitz-type trypsin inhibitor KTII	23 kDa	26%
6	<i>G. max</i>	IBBD2_SOYBN				-	Bowman-Birk type proteinase inhibitor D-II	10 kDa	44%
3	<i>Hordeum vulgare</i>	54, 42, 35, 25, 19 kDa	1	<i>H. vulgare</i>	AMYB_HORVU	EC 3.2.1.2	Beta-amylase	60 kDa	30%
			2	<i>H. vulgare</i>	AMYB_HORVS	EC 3.2.1.2	Beta-amylase	60 kDa	30%
			3	<i>H. vulgare</i>	NLTP1_HORVU	-	Non-specific lipid-transfer protein 1	13 kDa	58%
			5	<i>H. vulgare</i>	IAAB_HORVU	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CMB	17 kDa	18%
			7	<i>H. vulgare</i>	SPZ4_HORVU	-	Serpin-Z4	43 kDa	13%
			8	<i>H. vulgare</i>	BSZ7_HORVU	-	Serpin-Z7	43 kDa	8%
			12	<i>H. vulgare</i>	IAAA_HORVU	-	Alpha-amylase/trypsin inhibitor Cma	16 kDa	16%

Table 2 β-ガラクトシダーゼの Mascot search の結果

試料付帯情報			Mascot searchの結果						
試料	基原	分子量	順位	基原	登録名	EC番号	タンパク質	分子量	カバー率
4	<i>Aspergillus oryzae</i>	111, 55 kDa	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	42%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	42%
5	<i>Aspergillus oryzae</i>	105, 55 kDa	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	36%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	36%
6	<i>Aspergillus oryzae</i>	67, 51, 31 kDa	1	<i>A. flavus</i>	BGALA_ASPFN	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	40%
			1	<i>A. oryzae</i>	BGALA_ASPOR	EC 3.2.1.23	Probable beta-galactosidase A	110 kDa	40%
7	<i>Bacillus circulans</i>	225, 146, 127 kDa	1	<i>B. circulans</i>	E5RWQ2_BACCI	-	Beta galactosidase	192 kDa	35%

Table 3 セルラーゼの Mascot search の結果

試料付帯情報			Mascot searchの結果						
試料	基原	分子量	順位	基原	登録名	EC番号	タンパク質	分子量	カバー率
8	<i>Aspergillus niger</i>	66, 38, 27, 25 kDa	1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	32%
			1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	32%
			2	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC 3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	42 kDa	37%
			3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	58 kDa	22%
			3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	58 kDa	22%
			4	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	21%
			5	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	21%
9	<i>Aspergillus niger</i>	66, 38, 27, 25 kDa	6	<i>A. niger</i>	CBHC_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	49 kDa	14%
			7	<i>A. niger</i>	XYNC_ASPNC	EC 3.2.1.8	Probable endo-1,4-beta-xylanase C	36 kDa	10%
			1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	32%
			1	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	32%
			2	<i>A. niger</i>	MANA_ASPNC	EC 3.2.1.78	Probable mannan endo-1,4-beta-mannosidase A	42 kDa	30%
			3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	58 kDa	22%
			3	<i>A. niger</i>	CBHB_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	58 kDa	22%
10	<i>Aspergillus niger</i>	61, 45, 29, 25, 19 kDa	4	<i>A. niger</i>	CBHC_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	49 kDa	16%
			5	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNC	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	14%
			5	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	14%
			6	<i>A. kawachii</i>	GUNA_ASPKW	EC 3.2.1.4	Endoglucanase A	26 kDa	4%
			1	<i>A. niger</i>	PEPA_ASPNG	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	23%
			1	<i>A. phoenicis</i>	PEPA_ASPPH	EC 3.4.23.18	Aspergillopepsin-1	41 kDa	23%
11	<i>Pycnoporus coccineus</i>	30, 26 kDa	3	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNC	EC 3.2.1.91	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	4%
			3	<i>A. niger</i>	CBHA_ASPNG	EC 3.2.1.91	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase A	49 kDa	4%
			No data						
			No data						
12	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	53, 16 kDa	1	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	29%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	18%
			3	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	18%
			4	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	21 kDa	20%
13	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	54 kDa	1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	33%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	33%
			1	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	33%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	20%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	20%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC 3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49 kDa	3%
			4	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC 3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49 kDa	3%
14	<i>Trichoderma reesei</i>	55 kDa	5	<i>T. reesei</i>	GUN4_HYPJE	EC 3.2.1.4	Endoglucanase-4	36 kDa	3%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	34%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX1_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	34%
			1	<i>T. koningii</i>	GUX1_TRIKO	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	34%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	15%
			2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	15%
15	<i>Trichoderma viride</i>	56, 48, 17 kDa	5	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJE	EC 3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49 kDa	3%
			5	<i>T. reesei</i>	GUN1_HYPJR	EC 3.2.1.4	Endoglucanase EG-1	49 kDa	3%
			1	<i>T. viride</i>	GUX1_HYPRU	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 1	55 kDa	29%
16	<i>Trichoderma viride</i>	58, 29, 22, 19 kDa	2	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJE	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	18%
			1	<i>T. reesei</i>	GUX2_HYPJR	EC 3.2.1.91	Exoglucanase 2	50 kDa	18%
			2	<i>T. harzianum</i>	XYN_TRIHA	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase	21 kDa	23%
			2	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJQ	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24 kDa	20%
2	<i>T. reesei</i>	XYN2_HYPJR	EC 3.2.1.8	Endo-1,4-beta-xylanase 2	24 kDa	20%			

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

（H29-食品-一般-007）

平成30年度研究分担報告書

既存添加物の基原同定手法に関する研究

～香辛料抽出物と他規格との基原生物の比較調査～

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究要旨 昨年度に引き続き、既存添加物名簿収載品目の一つに分類される「香辛料抽出物」について、今後の規格作成に当たり、定義に関する情報収集を行った。香辛料抽出物の74種の基原を、同種を用いていると思われる天然香料の基原と比較したほか、海外における規格の有無を調査した。その結果、天然香料では半数の基原で香辛料抽出物と完全に一致した。また、日本の香辛料抽出物の基原として記載されているが、海外規格（アメリカ及び中国）と比較したときその記載がないものが、8基原存在した。「香辛料抽出物」の規格作成時には、他の規格の基原を考慮しながら、本研究で報告する情報を元に、基原生物について再検討を行う必要がある。

研究協力者

西崎雄三 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
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 室長

において、規格の設定根拠となる情報収集は特に重要であり、由来（基原の学名・和名）と成分（含量）が正しく設定されているかという情報は規格整備時に不可欠である。このうち、基原の学名の設定は、その添加物に想定外の原料が使用されることを防ぐ目的がある。和名のみでは基原生物が一義的に特定されないことが少なくなく、この曖昧さが悪用されて原料の不正使用などが起こる恐れがある。また、既存添加物は国内で自生も栽培もされていない植物や海外で生産される微生物に由来するものも多く、適切な和名が存在しない基原もある。既存添加物の基原種を正しい学名で設定するという事は、その添加物の品質と安全性を確保するために必須である。

A. 研究目的

「香辛料抽出物」は、平成8年に作成された既存添加物名簿に収載されている品目の一つであり、74種の基原生物を原料とする抽出物である。これまで多くの既存添加物名簿収載品目の規格を整備し、食品添加物公定書（以下、公定書）への収載を行ってきたが、香辛料抽出物に関しては原料とする基原種が多く、このため実際に流通している製品の製法や成分組成が大きく異なることが予想されることから、成分規格の整備が遅れており、公定書に成分規格が収載されているものはない。しかし、香辛料抽出物は流通量も比較的多いため、規格整備は大きな課題となっている。

既に流通しており、有効性と安全性が確認されているとみなされる既存添加物の規格整備

動植物や微生物の学名・和名は、専門家による最新の研究によって見解が変わることも多く、流動的である。法的な拘束力がある公的な規格を作成する際には、最新の知見も重要ではあるが、定義中の基原種の学名及び和名は、最新情報よりも設定根拠のトレーサビリティを、すなわち、堅牢性を重視して設定されている。実際に、第9版食品添加物公定書を作成するにあたっては、一般的に認知さ

れたデータベースや書籍を参照し、これらに示された学名と和名が既存添加物の定義に採用されており、設定根拠のトレーサビリティが確保されている。一方、既存添加物名簿作成時、基原の学名・和名については一定の基準の元に調査がなされたが、その当時より既に20年が経過しており、「香辛料抽出物」に含有される74種の基原の学名・和名については、規格案作成にあたって見直しが必要となっている。このような背景から、昨年度は「香辛料抽出物」の74基原の和名及び学名について、一般的に認知されたデータベース（Ylist 及び Tropicos）をもとに再調査を行った。その結果、多くの基原について、基原製法本質に記載されている学名がシノニムであることが確認され、また、誤記と推測されるものも散見された。

一方、「香辛料抽出物」と似た基原物質を用いている食品添加物のひとつに天然香料がある。天然香料は、食品衛生法第四条第3項において、「動植物から得られたもの又はその混合物で、食品の着工の目的で使用される添加物」と定義されたものである。天然香料の基原物質名及び別名は、「天然香料基原物質リスト」¹⁾に記載されており、香辛料抽出物として流通する食品添加物と基原生物が重なると思われるものが複数存在しているものの、リストには基原生物の学名は記載されておらず、どのような植物種が基原となっているかの詳細な情報は得ることはできない。しかし、今回、日本添加物協会の協力により、現在日本国内で流通していると思われる天然香料の原料について学名等の情報を得られた。これらの情報を香辛料抽出物の基原生物と比較することも、基原についての情報を整理する上で不可欠であると考えられる。

さらに、「香辛料抽出物」の基原の多くは海外原産であり、海外の流通品を購入して使用するケースも多いことが予測される。したがって、規格案を検討するための参考資料として、海外の規格も考慮に入れる必要があると考えられる。

そこで本研究では、「香辛料抽出物」の規格案作成及び見直しに向けて、現在の情報を整

理すべく(1)「香辛料抽出物」記載74基原について天然香料の基原との比較、及び、昨年度に引き続き(2)海外規格の調査とその基原生物との比較を行った。

B. 研究方法

B-1. 基原物質の学名及び標準和名調査

以下に示す第9版食品添加物公定書作成時の基原生物の学名と標準和名の調査法に従い、公定書に未収載の香辛料抽出物について基原生物の学名と標準和名を調査した。

基原の記載方針

- 1) 「和名（学名）」のスタイルで示す。
- 2) 学名は「属名＋種小名」の二名法で記す。必要なときは変種 (var.) 等を示し、三名法を用いる。
- 3) 種が特定できない場合は属名まで示す。その場合は「属」を付記する。
- 4) **Synonym**（シノニム＝別名）が広く使用されている場合には、**synonym** をカッコ書きで併記する。
 - a) 学名の命名者は、各生物群の一般的な表記法（拠り所とした資料・データベース）を参考に、植物に関しては、短縮形がある命名者については短縮形で表し（例 Linné→L.）、さらに旧命名者をカッコ内に示す。
- 5) 和名は以下のスキームに従って設定する。
 - ・リスト（カッコ書き・基原製法本質）に和名（カタカナ）はあるか？ **no**→標準和名
↓ **yes**
 - ・和名は正しく基原生物を表しているか？
↓ **yes** **no**↳修正して標準和名
 - ・和名は学名のカタカナ読みか？
↓ **no** **yes**↳標準和名があるか？
 - ↓ ↓ **no** **yes**↳標準和名
カッコ書き定義の和名を用いる（標準和名・別名・慣用名は問わない）

なお、和名と学名が1:1対応でないものについては、表示された学名のみが基原で

あることを明示するために「～に限る。」を加える。

- 6) 和名学名の確認には、以下に示した資料及びデータベースを用いて行う。

○高等植物：東京大学小石川植物園園長の邑田仁教授のご指導のもと、以下に示す2つのデータベースを用いた。

a) 学名及び英語慣用名：Tropicos (<http://www.tropicos.org/>)

b) 和名：BG Plants 和名-学名インデックス BGplant が閉鎖のため現在は YList (<http://ylist.info>)

「BG Plants 和名-学名インデックス」は BG Plants データベースで用いられる植物名、特に、日本産植物の和名と学名に関する詳細情報の整備を目的として、米倉浩司（東北大学）と梶田忠（東京大学〔現・琉球大学〕）を中心に作成された。

B-2. 海外規格の調査

香辛料抽出物に挙げられている74基原について、以下の海外規格に記載されているかを前年度に引き続き調査した。香辛料抽出物に挙げられている74基原と学名が一致している品目を規格ありとみなした。

- a) FCC11：Food Chemicals Codex (米国食品用公定化学品集)
b) CFR：Code of Federal Regulation Title 21 (米国FDAが規制する連邦食品医薬品化粧品法(FFDCA：Federal Food, Drug, and Cosmetic Act))
c) GB2760-2014：中国食添使用基準

C. 結果および考察

C-1. 国内で流通する天然香料との比較

日本添加物協会から得られた、国内で流通する天然香料の原料について、香辛料抽出物の74基原の基原生物と比較した(表1)。なお、天然香料原料として報告された学名についても Tropicos で確認した上で比較した。

74基原のうち、トウガラシとパプリカについては香辛料抽出物と天然香料とで扱いが異なっていた。香辛料抽出物ではトウガラシと

パプリカは別の品目として扱われており、トウガラシの基原物質は「トウガラシ」と「キダチトウガラシ」であるのに対し、パプリカの基原物質は「トウガラシ」のみ(使用部位はトウガラシと同じ)と、区別されている。一方、天然香料では、トウガラシとパプリカは同一のものとして扱われているようであった。今回の調査では、香辛料抽出物のパプリカは天然香料のトウガラシとの比較することで考察した。

香辛料抽出物のうち、天然香料の基原と全く同じ種を用いていると思われるものは、ちょうど半数の38品目であった。また、両者を比較して、天然香料の方が幅広い基原を用いていると思われるものが26品目、香辛料抽出物のほうがより多くの種を基原としていると思われるものが4品目であった。さらに、香辛料抽出物と天然香料とで異なる植物種を基原としていると思われるものが6品目あった。以下に詳細を示す。

a) 香辛料抽出物のうち、天然香料の基原と全く同じ種を用いている品目

アサノミ、アニス、ウイキョウ、オールスパイス、カショウ、カレーリーフ、キャラウェイ、クミン、クレソン、クローブ、ゴマ、コリアンダー、サッサfras、サフラン、サルビア、サンショウ、シソ、ジュニパーベリー、ショウガ、スターアニス、セイヨウワサビ、セロリー、タマネギ、タマリンド、タラゴン、チャイブ、チャービル、デイル、ニンジン、パセリ、ハッカ、ヒソップ、フェネリグ、ペパーミント、ミョウガ、レモングラス、レモンバーム、ローズマリー

特筆すべきものについて、以下に示す。

○6. ウイキョウ：香辛料抽出物、天然香料ともに *Foeniculum* 属植物を基原としており、共通して基原種に挙げられているのは、「*Foeniculum vulgare* Mill.」である。天然香料では「*F. vulgare* Miller spp. *Piperita* (Ucria) Countinho」も基原種とされており、おそらく「*F. vulgare* subsp. *Piperitum* Cont. (*Foeniculum vulgare* Mill.のシノニム)」のことであると思われる。また、天然香料の原料として挙げられて

いる「*Foeniculum vulgare* var. *dulce* (Mill.) Batt. & Trab.」は Tropicos に記載がなかったが、「*Foeniculum vulgare* Mill.」のシノニムであるという見解もあり³⁾、すべて「*Foeniculum vulgare* Mill.」由来である可能性が示唆された。しかし、天然香料と比較するにはより詳細な調査が必要である。

○31. サルビア：香辛料抽出物では「*Salvia lacandulaefolia*」が基原として挙げられているが、これに該当する学名が Tropicos にはない。しかし、天然香料原料の基原として示されている「*Salvia lavandulifolia* Vahl」の誤記と思われる。この推測どおりであれば、本品目については香辛料抽出物も天然香料も同じ基原種を用いているといえる。

○57. パセリ：Tropicos では、香辛料抽出物で基原として挙げられている「*Petroselinum sativum* Hoffm.」と天然香料で基原として挙げられている「*Apium petroselinum* L.」とはシノニムの関係にあるとされている。両者は、香辛料抽出物と天然香料の基原物質の記載には、「パセリ (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss)」ともシノニムの関係にあるとされているが、Tropicos においてはシノニムの関係にあるかどうか言及されていない。

b) 香辛料抽出物のうち、天然香料の方がより広い植物種を原料にしている品目

アサフェチダ、ウイキョウ、ウコン、オレガノ、カモミール、カラシナ、カルダモン、カンゾウ、クチナシ、ケシノミ、サボリー、シナモン、スペアミント、タイム、トウガラシ、ナツメグ、ニガヨモギ、ニジェラ、バジル、パプリカ、ホースミント、マジョラム、リンデン、ローズ、ローレル、ワサビ

以上に挙げたもののうち、アサフェチダ、ウコン、カンゾウ、シナモン、トウガラシ、ナツメグ、ニガヨモギ、ラベンダー、ローレルの9品目では、天然香料の基原として例示されている植物種は香辛料抽出物のものと全く同じだが、天然香料の場合はその近縁植物も含む旨の記載があり、原料種が広範囲になっている。この場合の近縁植物がどこまでを指すのかについては不明である。

そのほかの特筆すべきものについて、以下に示す。

○8. オレガノ：シソ科の「*Origanum vulgare* L.」は天然香料でも香辛料抽出物でも基原とされている。天然香料はクマツヅラ科の *Lippia* 属（イワダレソウ属）も基原としており、科の異なる植物が原料となっている。

○13. カモミール：香辛料抽出物、天然香料ともにキク科植物が基原として挙げられており、「*Anthemis nobilis* L.」や「*Matricaria chamomilla* L.」は両者で共通している基原種である。天然香料の原料として挙げられている「*Ormenis multicaulis*」は、Tropicos に該当する種が収載されていなかったが、「*Cladanthus mixtus* (L.) Chevall.」のシノニムであるという見解もあった⁴⁾。本種についての学名には諸説あり、天然香料において実際に原料となっているものが何なのか調査する必要があると思われる。

○15. カルダモン：香辛料抽出物、天然香料ともにショウガ科の「*Elettaria cardamomum* (L.) Maton var. *minuscula* Burkill」を基原としており、天然香料の場合は *Elettaria* 属にまで基原を広げている。なお、天然香料の原料和名として挙げられている「ショウズク」は「*Elettaria cardamomum* (L.) Maton」の果実から得られる生薬であり、その英名が「Cardamon」である⁵⁾。

○19. クチナシ：天然香料の原料として「コクチナシ」が挙げられているが、YList で確認したところ「コクチナシ」の学名は「*Gardenia jasminoides* Ellis var. *radicans* (Thunb.) Makino ex H.Hara」であり、「*Gardenia augusta* Merr.」の標準和名は収載されていなかった。Tropicos によると、「*Gardenia jasminoides* Ellis var. *radicans* (Thunb.) Makino ex H.Hara」と「*Gardenia augusta* Merr.」は異なる種であると思われる。「*Gardenia augusta* Merr.」は「クチナシ (*Gardenia jasminoides* J. Ellis)」のシノニムであった。

○23. ケシノミ：天然香料は、「ヒナゲシ (*Papaver rhoeas* L.)」も基原としている。

○39. スペアミント：香辛料抽出物も天然香料ともに「*Mentha spicata* L.」を基原としている

が、天然香料は「*Mentha cardiaca* J. Gerard ex Baker」という種も基原としている。

○64. ホースミント：香辛料抽出物と天然香料はともに「ケショウヤグルマハッカ *Monarda punctata* L.」及び「ヤグルマハッカ（標準）*Monarda fistulosa* L.」を基原としているが、天然香料はこれに加えて「ナガバハッカ *Mentha longifolia* (L.) Huds.」も基原として挙げられている。ナガバハッカは *Mentha* 属であり、他の基原物質と属が異なっている。

c) 香辛料抽出物のうち、香辛料抽出物の方がより広い植物種を基原にしている品目

アンゼリカ、ケーパー、コショウ、ニンニク

○5. アンゼリカ：天然香料の原料植物には含まれていない *Peucedanum* 属植物も基原物質として定義されている。

○24. ケーパー：基原として挙げられている学名は香辛料抽出物も天然香料も同じ「*Capparis spinosa* L.」だが、香辛料抽出物の基原種の和名であるフウチョウボクは「*Capparis micracantha* var. *henryi* (Matsum.) Jacobs」という別の学名が当てられており、別種であると考えられる。そのため、香辛料抽出物ではどちらの種を基原としているのか（あるいは両方なのか）、精査する必要がある。

○25. コショウ：香辛料抽出物と天然香料とではほぼ同じ植物種が基原であるが、香辛料抽出物では「*Piper officinarum* (Miq.) C. DC.」も基原として挙げられている。

○55. ニンニク：香辛料抽出物と天然香料とではほぼ同じ植物種が基原であるが、香辛料抽出物では「オオニンニク (*Allium sativum* L. var. *pekinense* (Prokh.) F.Maek.)」も基原として挙げられている。

d) 香辛料抽出物と天然香料とで基原が異なっていた品目

アジョワン、オレンジピール、カシヤ、シャロット、ソーレル、バニラ

○3. アジョワン：香辛料抽出物、天然香料ともに *Carum* 属植物を基原としているが、異なる種のものを用いていると思われた。しかし、天然香料で原料種とされている「*Trachyspermum ammi* Sprague」のシノニムのひとつに、香辛料

抽出物の基原である「*Carum ajowan* Benth. & Hook.f.」があるとする見解もあり²⁾、詳細な検討の必要がある。

○10. オレンジピール：香辛料抽出物、天然香料ともにミカン科 *Citrus* 属を基原としており、とくに「*Citrus sinensis* (L.) Osbeck」は共通の基原種である。しかし、香辛料抽出物では「*C. japonica* Thunb.」「*C. reticulata* Blanco」が基原とされているのに対し、天然香料では「*C. aurantium* L.」が基原とされている。*Citrus* 属は種間の関係が複雑であり、実態について調査する必要があると思われた。

○12. カシヤ：香辛料抽出物はクスノキ科の「*Cinnamomum cassia* (L.) D. Don」が基原だが、天然香料はマメ科の「*Cassia fistula* L.」が基原であり、全く異なっている。既存添加物品目リストには、香辛料抽出物カシヤの別名としてカシヤフィスチュラが挙げられており、これは天然香料の基原である *Cassia fistula* L. のカタカナ表記と同じである。香辛料抽出物のカシヤとして流通しているものの中に、基原の混同が見られる可能性もあり、詳細な検討が必要と考えられる。

○35. シャロット：香辛料抽出物、天然香料ともに *Allium* 属の植物を基原としており、植物和名としても「シャロット」を挙げているが、両者が挙げている学名が異なる種のようなものである。

○42. ソーレル：香辛料抽出物では「スイバ (*Rumex acetosa* L.)」が、天然香料では「ギンギシ (*Rumex japonicus* Houtt.)、ナガバギンギシ (*Rumex crispus* L.)、エゾノギンギシ (*Rumex obtusifolius* L.)」がそれぞれ基原となっており、どちらも *Rumex* 属ではあるが種の異なる植物が挙げられている。香辛料抽出物と天然香料とでは原料として使われている植物のうち重複しているものはない。

○59. バニラ：香辛料抽出物、天然香料ともに「バニラ」を基原としているが、これに加えて香辛料抽出物では「タヒチバニラ」を、天然香料では「ニシインドバニラ」をそれぞれ基原としている。

C-2. 海外規格の調査

香辛料抽出物に含まれる植物由来の74種について、米国（FCC11 及び CFR Title21）及び中国（GB2760-2014）にて品目の有無を調査した。品目は、既存添加物名簿に記載の学名のほか、今回の調査でより一般的と思われるものとして明らかになった学名でも検索を行った。F 調査した結果を表 2 示す。

既存添加物である香辛料抽出物のうち、今回調査した規格に記載されていなかった品目は、アサノミ、アジowan、カレーリーフ、クレソン、シャロット、ソーレル、ミョウガ、ワサビの 8 品目であった。

また、今回調べたどの規格でもほぼ同じ基原種が用いられていた品目は、アサフェチダ、ウイキョウ、ウコン、オールスパイス、カシヤ、カモミール、カンゾウ、キャラウェイ、クミン、クローブ、ケシノミ、ケーパー、ゴマ、コリアンダー、サッサfras、サフラン、サボリー、サルビア、シソ、ショウガ、スターアニス、セイヨウワサビ、セロリー、タマネギ、タマリンド、タラゴン、チャイブ、トウガラシ、ナツメグ、ニガヨモギ、ニジェラ、ニンジン、バジル、パセリ、パプリカ、ヒソップ、フェネリーグ、ペパーミント、リンデン、レモングラス、レモンバーム、ローズマリー、ローレルの 43 品目であり、半数以上であった（表 3）。このほかに特筆すべきものについて以下に詳細を示す。

○4. アニス：どの規格も、日本で基原としている「アニス (*Pimpinella anisum* L.)」を基原として挙げているが、FCC11 のみ、「トウシキミ (*Illicium verum* Hook.f.)」も基原生物として挙げられている。香辛料抽出物においては、*Illicium verum* Hook.f. はスターアニスの基原種としているが、FCC11 の Spice Oleoresin ではアニスと区別していない。

○8. オレガノ：香辛料抽出物と CFR では *Origanum* 属が基原とされており、FCC11 も同様であるが、FCC11 はこれに加えて「*Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link」も基原植物として挙げられていた。一方、中国では *Lippia* 属のみが基原として挙げられており、国によっ

て基原種がかなり異なっていた。なお、日本の天然香料のオレガノの基原には *Lippia* 属が含まれており、中国の現状も考慮されていると思われた。

○10. オレンジピール：各国少しずつ基原が異なっているが、「*Citrus sinensis* (L.) Osbeck」「*Citrus reticulata* Blanco」の 2 種はどの国も基原として挙げられていた。

○11. カシヨウと 32. サンシヨウ：香辛料抽出物はカシヨウとサンシヨウの 2 つの品目に分けられているが、中国では基原が「*Zanthoxylum* 属」となっており、特に区別はされていない。

○14. カラシナ：各国「クロガラシ (*Brassica nigra* (L.) W.D.J. Koch)」を含む *Brassica* 属を基原としていたが、香辛料抽出物のみ属の異なる「*Sinapis alba* L.」も基原として挙げている。

○15. カルダモン：日本以外の国は、「*Elettaria cardamomum* (L.) Maton」を基原としているが、日本はこの変種 (varietas) を基原として挙げている。Tropicos には両者がシノニムであるという記述はなく、変種であっても別の種として扱われている例 (*Mentha arvensis* var. *piperascens* と *M. arvensis* など) もあることから、精査の必要があると思われる。

○25. コシヨウ：日本以外の国は、「*Piper nigrum* L.」のみを基原として挙げているが、日本は「インドナガコシヨウ *Piper longum* L.」なども基原としている。インドナガコシヨウは天然香料の原料としても使われている。

○34. シナモン：各国少しずつ基原が異なるが、「セイロンニッケイ *Cinnamomum verum* J.Presl (*Cinnamomum zeylanicum* Blume はシノニム.)」はどの国も基原として挙げられていた。

○36. ジュニパーベリー：「*Juniperus communis* L.」を基原として挙げている国が多いが、日本ではこのほかに「セイヨウネズ *Juniperus communis* L. var. *communis*」を、FCC11 では「*Juniperus communis* var. *erecta* Pursh」をそれぞれ基原に挙げている。どちらも *Juniperus communis* L. とシノニムであるという記載が Tropicos になく、精査が必要である。

○39. スペアミント：香辛料抽出物、CFR では「*Mentha spicata* L.」のみが基原として挙げら

れているが、FCCと中国では「*Mentha cardiaca* L.」も基原として挙げられている。中国では、使用基準が記載されている GB2760-2014 では *Mentha cardiaca* L. を基原としているが、その成分規格である GB1886.36-2015 (食品添加剤 留兰香油) では *Mentha spicata* L. が基原とされており、混乱があると思われる。なお、日本の天然香料の基原はどちらの種も用いられているようである。

○55. ニンニク：FCC11 と中国は「*Allium sativum* L.」のみが基原としているが、香辛料抽出物には同属異種も複数基原に含まれている。

○65. マジョラム：各国少しずつ基原が異なっているが、「*Majorana hortensis* Moench」はどの国も基原として挙げられている。香辛料抽出物と中国ではこれに加えて「*Origanum majorana* L.」が、FCC11 は「*Thymus mastichina* L.」が基原として挙げられている。いずれもシソ科である。

D. 結論

既存添加物名簿収載品目の一つである香辛料抽出物について、規格案作成に向けた情報収集を行った。本品目に含有されている 74 種の基原を用いていることがその名称から予想される天然香料について、示された和名及び学名の妥当性を YList 及び Tropicos をもとに検討したところ、半数程度が全く同じ植物種を基原としていることが明らかとなった。その一方で、同じ名称であっても香辛料抽出物と天然香料とで異なる基原を用いているものもあった。さらに、昨年度の FCC や CFR の調査に加え、中国食添使用基準 (GB2760-2014) とも比較し、学名まで精査したところ、日本独自の基原のものや、日本では 2 つの基原として区別して扱われているものが他国ではひとつの基原として示されているものもあった。前年度・今年度の調査で、基原によっては規格案作成の際に詳細な検討が必要と思われるものが浮き彫りになった。香辛料抽出物の規格案作成時には、本研究で報告する情報をもとに、基原生物の学名等について検討を行う必

要がある。

E. 参考文献

- 1) 消費者庁通知「食品衛生法に基づく添加物の表示等について」消食表第 377 号、平成 22 年 10 月 20 日。
- 2) The Plant List <
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2438394>>(accessed 2018-12-21).
- 3) The Plant List <
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2906377>>(accessed 2018-12-21).
- 4) The Plant List <
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-91453>>(accessed 2019-1-17).
- 5) 厚生労働省. 第十七改正日本薬局方. 2016.

F. 研究発表

1. 論文発表
該当無し
2. 学会発表
該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物の基原同定手法に関する研究

～RMS を用いた single-reference HPLC 法によるペリルアルデヒドの定量～

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 研究員

研究要旨 既存添加物の品質確保には有効成分量のモニタリングが重要であり、多くの場合、その手法としてクロマトグラフィーが採用されている。正確な定量には純度の明らかな定量用標準品が必須であるが、天然由来である既存添加物において分析対象物質と同一の定量用標準品の入手は困難な場合が多く、既存添加物の規格化にあたりひとつの大きな障害となっている。我々はこれまで、本課題への対策として、定量NMRとHPLC/PDAを組み合わせ、相対モル感度（relative molar sensitivity: RMS）を用いた定量法（以下、RMS法）を確立し提案してきた。本研究では、既存添加物や生薬としても用いられるシソに含まれるペリルアルデヒドについて、RMS法を適用することで、易分解性の定量用標準品を用いることなく正確な定量が可能であるか、複数機関で検討したので報告する。

研究協力者

丸山剛史 株式会社ツムラ

五十嵐靖 株式会社ツムラ

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

中島馨 国立医薬品食品衛生研究所

供給時に純度の値付けがなされていても、易分解性の化合物の場合、定量分析使用時の正確な純度が不明なものもある。正確な成分定量は、食品や医薬品の質を確保するうえで重要であるが、純度の明らかな標準物質の入手が困難なためにその品質を正しく評価できない場合も多い。

A. 研究目的

天然物を由来とする食品添加物や生薬は、それらに含まれる主成分や指標成分を定量することで安全性や有効性などの品質を担保している。定量法には、分離能と感度に優れたHPLCやGCなどのクロマトグラフィーが用いられることが多い。通常、クロマトグラフィーによる定量では、分析対象成分の濃度とピークの応答量との相関関係を示す検量線の作成が必要となるため、分析対象と同一で純度の明らかな定量用の標準物質を入手しなければならない。しかし、定量したい成分について必ずしも標準物質が供給されているとは限らず、天然由来成分にいたっては市販試薬すら流通していない場合もある。また、標準物質として供給されているもので

このような課題に対し、我々はひとつの解決策として、相対モル感度（relative molar sensitivity: RMS）を用いたシングルリファレンス HPLC 法（以下、RMS 法）を考案し研究を重ねてきた。分析種の量（濃度）と検出器の応答量に比例関係があるクロマトグラフィーの検出器においては、分析種によって単位量あたりの応答量が異なる。RMS は、基準物質（single reference）と分析対象物質の2化合物間における単位モルあたりの応答量の比をとった値であり、分析条件が同一であれば、RMS は化合物間で固有の値である。そのため、基準物質に対する分析対象物質のRMS が明らかな場合、基準物質を内標準物質として用い、基準物質及び分析対象物質の検出器における応答値と RMS の関係から、分析対

象物質と同一の標準物質を必要としないクロマトグラフィーを利用した定量分析が可能である。

また、RMSの算出においても、定量NMR ($^1\text{H-qNMR}$)を組み合わせることで標準物質を使用することなく正確な値を求めることが可能である。 $^1\text{H-qNMR}$ は、クロマトグラフィーと比べて分離能と検出感度は劣るが、化合物の定量性に優れている分析手法である。 $^1\text{H-qNMR}$ は、複数の化合物が試料液中に存在し、それら由来のシグナルが完全に分離しているとき、1つの化学シフト軸上にみられる化合物間のシグナル面積比が、それぞれの「物質質量×水素数」の比として原理的に正確に反映される^{1,2)}。この原理を利用すれば、基準物質と分析対象物質の混合標準液を調製し、 $^1\text{H-qNMR}$ とクロマトグラフィーの両方にそれを付し、クロマトグラフィーの検出器における両化合物の応答比を、 $^1\text{H-qNMR}$ から得られるモル比で除することにより、正確なRMSが算出される。このように、RMS法には分析対象物質の標準物質が必要ない。我々はこれまでの研究で、本法を天然物由来のさまざまな食品添加物における有効成分の定量に応用してきた³⁻⁵⁾。

本研究では、RMS法のさらなる可能性を探索するため、易分解性が報告されているペリラルアルデヒド⁶⁾の定量法への応用について検討した。ペリラルアルデヒドは、シソ (*Perilla frutescens* Britton)の精油成分のひとつである。シソは食品として広く摂取されているほか、既存添加物であるシソ抽出物や第十七改正日本薬局方 (JP17) 収載生薬であるソヨウの基原植物である。とくにソヨウについては、JP17においてペリラルアルデヒドの含量規格が定められており、その定量法として紫外可視分光光度計を検出器とした外標準法によるHPLC法が示されている。定量には、ペリラルアルデヒドの標準物質が必要であり、アルゴンが封入されたアンプル入りのものが局方生薬試験用 (定量用標準物質) として販売されている。しかし、この定量用標準物質は高価であるうえ、ペリラルアルデヒドはメタノ

ール中においてとくに不安定であるため⁶⁾、定量用の標準溶液を専事調製する必要がある。天然物由来の医薬品や添加物の安全性・有効性を確保するためには、指標成分や主成分の正確な定量が不可欠であるが、現状ではそのための検査に費用と手間がかかりすぎ、正確な定量が困難であるという課題がある。そこで、ジフェニルスルホンを経典物質としたRMS法をペリラルアルデヒドの定量に応用することで課題の解決を試みたので報告する。

B. 研究方法

試料・試薬

本研究に用いた試料及び試薬を表1に示す。表1記載のもの以外の試薬は、すべて特級あるいはHPLC用グレードのものを用いた。

ジフェニルスルホンに対するペリラルアルデヒドのRMSの算出

ペリラルアルデヒド約4 mg、ジフェニルスルホン約10 mg、及びDSS-*d*₆標準物質約2 mgをそれぞれ精密に量り、10 mL容のスクリーバイアルにあわせて入れ、DMSO-*d*₆ 4 mLを正確に加えて溶かし、NMR測定用試料溶液とした。この液0.6 mLを外径5 mmのNMR試料管に封入した。調製は3回行い、それぞれNMR測定用試料溶液1~3とし、表2に示す条件で $^1\text{H-qNMR}$ により測定した。得られた $^1\text{H-qNMR}$ データを解析ソフト (Purity Pro qNMR ANALYSIS Software, 日本電子製) で解析し、式(1)を用いて物質質量比 (R_n) を求めた。

$$R_n = \frac{n_{\text{PRL}}}{n_{\text{DS}}} = \frac{S_{\text{PRL}}}{S_{\text{DS}}} \times \frac{H_{\text{DS}}}{H_{\text{PRL}}} \quad (1)$$

ただし、PRL、ペリラルアルデヒド; DS、ジフェニルスルホン; n 、物質質量 (mol); S 、シグナル面積; H 、 S に由来するプロトン数。

次に、NMR測定用試料溶液1~3について1 mLを正確に量り、メタノールを加えて正確に250 mLに定容したものを、HPLC測定用試料溶液1~3とした (ペリラルアルデヒド濃度約4 $\mu\text{g/mL}$ 、ジフェニルスルホン濃度約10 $\mu\text{g/mL}$)。これらについて、表3に示す条件で

HPLC/PDA による測定を行った。得られたピーク面積 A から、式 (2) を用いて応答比 (R_r) を求めた。

$$R_r = \frac{A_{PRL}}{A_{DS}} \quad (2)$$

得られた物質比 (R_n) 及び応答比 (R_r) を式 (3) に代入し、ジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの RMS を求めた。

$$RMS = \frac{R_r}{R_n} \quad (3)$$

ソヨウ中のペリルアルデヒド含量の算出

1) 試料溶液及び標準溶液の調製

試料調製：JP17「ソヨウ」の定量法⁷⁾に準じて行った。すなわち、ソヨウの粉末約 0.2 g を精密に量り、メタノール 20 mL を加えて 10 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取した。残留物にさらにメタノール 20 mL を加え、同様に操作した。全抽出液を合わせ、メタノールを加えて正確に 50 mL に定容し、試料溶液とした。

標準溶液：ペリルアルデヒド約 10 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 100 mL に定容した。この液 10 mL を正確に量り、メタノールを加えて正確に 100 mL に定容したものをペリルアルデヒド標準溶液とした。ジフェニルスルホンについても同様に操作し、ジフェニルスルホン標準溶液とした。

2) RMS 法による定量

1) で作製した試料溶液と標準溶液を表 3 に示す条件で HPLC/PDA で測定した。試料溶液中に見られるペリルアルデヒド標準溶液と保持時間が一致するピークについて、試料溶液の該当ピーク面積 A_{PRL} とジフェニルスルホン標準溶液のピーク面積 A_{DS} から、式 (4) によりソヨウ中のペリルアルデヒド含量 (X_{PRL} (mg)) を求めた。

$$X_{PRL} = \frac{A_{PRL}}{A_{DS}} \times \frac{m_{PRL}}{m_{DS}} \times W_{DS} \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{RMS} \quad (4)$$

ただし、 m , 分子量; W_{DS} , ジフェニルスルホンの秤量値 (mg)。

3) 従来法 (JP17) による定量

ペリルアルデヒド含量定量に先立ち、使用

したペリルアルデヒド試薬の純度を、先述の NMR 測定用試料溶液 1~3 を ¹H-qNMR にて測定することにより算出した。すなわち、DSS-*d*₆ のメチル基由来のプロトンシグナル (s, CH₃×3) を基準 (δ 0 ppm) としたとき、このシグナルとペリルアルデヒドの δ 9.45 ppm のシグナル (s, CH) を用いて、式 (5) によりペリルアルデヒド試薬の純度を算出した。

$$P_{PRL} = \frac{S_{PRL}}{S_{DSS}} \times \frac{H_{DSS}}{H_{PRL}} \times \frac{M_{PRL}}{M_{DSS}} \times \frac{W_{DSS}}{W_{PRL}} \times P_{DSS} \quad (5)$$

ただし、 S , シグナル面積; H , S に由来するプロトン数; M , モル質量 (g/mol); W , 秤量値 (g); P , 純度 (wt%)。

次に、1) で作製した試料溶液と標準溶液を表 3 に示す条件で HPLC/PDA で測定した。試料溶液中に見られるペリルアルデヒド標準溶液と保持時間が一致するピークについて、試料溶液のピーク面積 A_T とペリルアルデヒド標準溶液のピーク面積 A_S から、式 (6) によりソヨウ中のペリルアルデヒド含量 (X_{PRL} (mg)) を求めた。

$$X_{PRL} = W_{PRL} \times P_{PRL} \times \frac{1}{100} \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{20} \quad (6)$$

ただし、 W_{PRL} , 定量用ペリルアルデヒドの秤取量 (mg); P_{PRL} , qNMR から算出した定量用ペリルアルデヒドの純度 (%)。

C. 結果と考察

RMS の算出

1) 基準物質の選定

RMS 算出にあたり、分析対象物質に対する適切な基準物質を選定することは、正確な定量のために不可欠である。基準物質としては、安定かつ高純度、安価であり、分析対象物質と同じ吸収極大 (λ_{max}) であるものが適している。また、ソヨウ中のペリルアルデヒド定量に応用することを想定し、現在 JP17 に記載されている定量法の HPLC 条件と同条件で分析可能なものが望ましい。以上の条件を満たす化合物として、いくつかの化合物を精査した結果、ジフェニルスルホンが適当と考えられた。そこで、ペリルアルデヒドとジフェ

ニルスルホン を JP17 の HPLC 条件で chromatograph A にて分析すると、ジフェニルスルホン、ペリルアルデヒドの順に溶出した (図 1 (A)). このときのペリルアルデヒドの λ_{\max} は 234 nm, ジフェニルスルホンの λ_{\max} は 235 nm であった (図 1 (B)). さらに、ジフェニルスルホン及びペリルアルデヒドのテーリングファクタはそれぞれ 1.01 及び 1.03 であり、ピーク形状は良好であった。また、ジフェニルスルホンの市販試薬 (東京化成工業製 Lot. 8NBTM-KT) について $^1\text{H-qNMR}$ により純度を算出したところ、99.98%であった。以上から、RMS 算出におけるペリルアルデヒドの基準物質として、ジフェニルスルホンは妥当であると考えられた。

2) 物質質量比の算出についての検討

ジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの正確な RMS を算出するために、まず $^1\text{H-qNMR}$ スペクトル上で両化合物が良好に分離し、定量に適したシグナルの有無を確認した (図 2)。 $^1\text{H-qNMR}$ の定量用シグナルとしては、目的のシグナルが他のシグナルと十分に分離しており、かつ含まれている不純物のシグナルと重ならないものを選択することが重要である。qNMR 用基準物質である DSS- d_6 のメチル基を $\delta 0$ ppm としたとき、ペリルアルデヒドにおいては 7 位のプロトンに由来する $\delta 9.45$ ppm が定量用シグナルとして適当と考えられた。 $\delta 7.00$ ppm のシグナルも他のシグナルと十分に分離していたが、不純物と思われるもののピークとの分離が悪かった。他方、ジフェニルスルホン由来のシグナルはどれも定量用シグナルとして適当と思われたため、2, 6, 2', 6' 位のプロトンに由来する $\delta 7.99$ ppm を定量用シグナルとして選定した。これらシグナルを用いて、NMR 測定用試料溶液 1~3 についてジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの物質質量比を算出することとした。なお、上述のシグナルはすべて S/N 比が 500 以上であり、NMR 測定用試料溶液調製時の両化合物の秤取量は妥当であると考えられた。

3) 応答比の算出についての検討

本法をソウ中のペリルアルデヒドの定量に応用することを想定すると、JP17 におけるペリルアルデヒド含量規格値の付近で、正確な定量が可能であることが必須である。そのため、RMS 算出に用いる応答比は規格値付近で測定したものをを用いるのが妥当と判断し、ペリルアルデヒド濃度が約 $4 \mu\text{g/mL}$ となるよう NMR 測定用試料溶液 1~3 を希釈したものをを用いることとした。正確な RMS を得るには、PDA 検出器のスペクトル分解能の影響を受けにくい λ_{\max} における応答量から応答比を求めることがよいと考えられるため、ペリルアルデヒドの λ_{\max} である 234 nm で測定するのが好ましい。しかし、現行のペリルアルデヒド定量法において、検出波長は 230 nm と定められている。さらに、定量時の検出器としては PDA 検出器だけでなく可変波長 (VWD) 検出器も用いられている。そこで、本研究では PDA, VWD 両検出器を用いて、230 nm 及び 234 nm における応答比を算出することとした。

4) RMS の算出

ジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの RMS を、機関 1 及び機関 2 の計 2 機関でそれぞれ算出した。得られたペリルアルデヒドのジフェニルスルホンに対する物質質量比 (R_n) を表 4 に、応答比 (R_r) と RMS を表 5 に示す。さらに、RMS は測定波長によって異なるため波長ごとにまとめたところ (表 6)、ジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの RMS は、230 nm では 1.034, 234 nm では 0.976 であった。本研究では、測定装置・カラム、試験者、実施研究室などの条件が異なっていたが (表 1-3)、同一とみなせる試料を用い同一の手法で算出された RMS である。厚生労働省が示す、食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン⁸⁾に準じ、RMS の併行精度及び室間精度を一元配置分散分析により算出したところ、234 nm 測定時で併行精度 (RSD%) は 0.76%, 室間精度 (RSD%) は 1.16% であった。また、230 nm では併行精度 (RSD%) は 0.85%, 室間精度 (RSD%) は 1.33% であった。

以上の結果は、RMS 法の研究結果³⁻⁵⁾と比較しても許容範囲のばらつきと考えられ、試験手法に問題はないと思われた。

他方、得られた RMS の正確さについても検討した。RMS 算出で使用したペリルアルデヒド試薬について、¹H-qNMR で求めたペリルアルデヒドの純度を、ジフェニルスルホンを経験物質とする RMS 法で求めた純度と比較した (表 7)。なお、¹H-qNMR におけるペリルアルデヒドの純度は、式 (5) に従い算出した。また、RMS 法では、230 nm と 234 nm の両波長について、本研究で得られた RMS を用いて算出した。両手法におけるペリルアルデヒド試薬の純度の差は、測定波長が 230 nm のとき 0.98% 以下、234 nm のとき 1.28% 以下であった。RMS 法を用いて算出した試薬の純度は ¹H-qNMR で求めた純度とほぼ一致しており、本研究で得られた RMS の正確性は高いと考えられた。

JP17 記載の従来法と RMS 法との比較

JP17 において、ソヨウ中のペリルアルデヒド含量の測定には、局方生薬試験用 (定量用・薄層クロマトグラフィー用) ペリルアルデヒドを外部標準とした定量法が採用されている。この従来法と、本研究で検討した RMS 法とで、ソヨウに含まれるペリルアルデヒドの含量をそれぞれ算出し、得られた値を比較した。なお、より正確な値を算出するために、従来法で用いる外部標準のペリルアルデヒドは、¹H-qNMR で求めた純度で補正した。

3 ロットのソヨウについて、従来法 (¹H-qNMR 補正あり) と RMS 法とでペリルアルデヒド含量を求めたところ (表 8)、どのロットでも RMS 法で求めた含量がわずかに大きな値となったが、その差は最大でも 0.011% であった。JP17 ではソヨウの乾燥物に対し 0.08% 以上のペリルアルデヒドを含むことと規定されているが、規格値により近いペリルアルデヒドを含むソヨウ 1 では、従来法 (¹H-qNMR 補正あり) と RMS 法との差が最大で 0.005% であった。以上より、両定量法で求めた含量にほとんど差異はないことが示され

た。

D. 結論

本研究では、易分解性があり標準物質の調達が困難であるペリルアルデヒドの定量について、ジフェニルスルホンを標準物質とした RMS 法を複数の機関で検討することにより、その実現可能性を探索した。様々な要因が異なる環境下で算出した RMS の RSD は 1.2% 程度であり、真度は 99.9~101.4% であった。ソヨウ中のペリルアルデヒド含量について、RMS 法から得られた結果は、¹H-qNMR 補正を行った従来法と比較してほとんど差異はなかった。これらの結果は研究機関による違いがなかったため、正確な RMS が算出されれば、HPLC による定量分析経験者であれば誰にでも、分析対象物質の認証標準物質等を必要とせずに、¹H-qNMR と同等の HPLC による定量分析が可能であると思われた。

現行の JP17 でも用いられているペリルアルデヒド標準品の易分解性を考慮すると、本研究で提案したジフェニルスルホンを標準物質とした RMS 法は、その正確性はもちろんコストの点からも優れた定量法であり、成分規格試験としても相応しい手法といえる。

E. 参考文献

- 1) 末松孝子. 有機化合物の純度をはかる一核磁気共鳴法 (NMR) を用いた SI (国際単位系) トレーサブルな定量分析技術— 化学と生物. **52**, 473-477 (2014).
- 2) 大槻崇. qNMR の食品添加物分析への応用. 化学と生物. **52**, 622-626 (2014).
- 3) 西崎雄三, 多田敦子, 石附京子, 伊藤裕才, 小野田絢, 杉本直樹, 穂山浩. モル吸光係数比を利用したジャマイカカシア抽出物中のクアシンおよびネオクアシンの新規定量法の開発. 日本食品衛生学雑誌, **56**, 185-193 (2015).
- 4) 西崎雄三, 佐藤 (増本) 直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドゥ, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子. 定量 NMR に基づく相対モル感

度を利用した加工食品中のヘスペリジンおよびモノグルコシルヘスペリジンの定量. 日本食品衛生学雑誌, **59**, 1-10 (2018).

- 5) Nishizaki Y., Sato-Masumoto N., Mikawa T., Nakashima K., Yamazaki T., Kuroe M., Numata M., Ihara T., Ito Y., Sugimoto N., Kyoko S.: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Addit. Contam. A*, **35**, 838-847 (2018).
- 6) 瀧野裕之, 川原信夫, 木内文之. 生薬ソヨウの成分含量測定法とペリルアルデヒドの安定性に関する検討. *生薬学雑誌*, **64**(1), 7-14 (2010).
- 7) 厚生労働省告示第 64 号 (2016) “第十七改正日本薬局方” 平成 28 年 3 月 7 日.
- 8) 厚生労働省医薬食品局職食品安全部長”食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて” 平成 19 年 11 月 15 日, 食安発第 1115001 号 (2007).

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) 増本直子: 相対モル感度を利用したシングルリファレンス HPLC 分析法の応用. 第 55 回全国衛生科学技術協議会年会 (2018.11)(横浜市).
- 2) 中島馨, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物トウガラシ水性抽出物中の抗菌成分の特定. 第 55 回全国衛生化学技術協議会 (2018.11)(横浜市).
- 3) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: フォトダイオードアレイ検出器による測定値のばらつきの原因. 第 55 回全国衛生科学技術協議会年会 (2018.11)(横浜市).
- 4) 増本直子, 西崎雄三, 丸山剛史, 五十嵐靖, 中島馨, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦,

井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度を利用したペリルアルデヒド定量法の検討. 第 7 回定量 NMR クラブ (2018.12)(東京).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 本研究に用いた試料及び試薬

	機関 1	機関 2
ソヨウ (局方品)	ソヨウ 1	ソヨウ 2, ソヨウ 3
ペリルアルデヒド	局方生薬試験用 (定量用・薄層クロマトグラフィー用) 和光純薬工業 (Cat. No. 161-24161)	局方生薬試験用 (定量用・薄層クロマトグラフィー用) ^{a)}
ジフェニルスルホン	東京化成工業 (Cat. No. P0231) qNMR 純度 : 99.98% ^{b)}	東京化成工業 (Cat. No. P0231) qNMR 純度 : 100.00% ^{b)}
qNMR 用基準物質 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid- <i>d</i> ₆ sodium salt (DSS- <i>d</i> ₆)	和光純薬工業 (Cat. No. 044-31671) certified purity 92.3% (Lot. AWH6585)	和光純薬工業 (Cat. No. 044-31671) certified purity 92.4% (Lot. TWK6177)
ジメチルスルホキシド- <i>d</i> ₆ (DMSO- <i>d</i> ₆)	MERCK (Cat. 1.03424.010)	ACROS ORGANICS (Cat. 320760075)

a) Aldrich 製品を機関 2 にて精製し, JP17 規格に適合させたもの

b) DSS-*d*₆ のメチル基を δ 0 ppm としたときの δ 7.99 ppm のシグナルを用い, ¹H-qNMR によりそれぞれの機関で定量したもの

表 2 ¹H-qNMR 測定条件

	機関 1	機関 2
装置	JNM-ECA600 (JEOL Ltd.)	JNM-ECA600 (JEOL Ltd.)
プローブ	ROYAL プローブ(JEOL Ltd.)	ROYAL プローブ(JEOL Ltd.)
デジタル分解能	0.25 Hz	
観測スペクトル幅	-5~15 ppm	
スピニング	オフ	
パルス角	90°	
¹³ C 核デカップリング	あり	
遅延時間	60 秒	
積算回数	8 回	
ダミーキャン	2 回	
測定回数	非連続 3 回	
測定温度	室温 (一定温度)	

表 3 HPLC/PDA 測定条件

Chromatograph No.	機関 1			機関 2
	A	B	C	D
装置	Series 1100&1200 (Agilent)	Prominence (Shimadzu)	1260 Infinity LC (Agilent)	Prominence
検出器 (PDA)	Series 1200 G1315B	SPD-M20A	G4212B	SPD-M20A
(VWD)	Series 1100 G1314A	SPD-20A	G1314F	SPD-20A
カラム	Wakopak wakosil-II 5C18RS (4.6×150 mm, 5μm)	Cosmosil 5C18-MS-II (4.6×150 mm, 5μm)	TSKgel ODS-80Ts QA (4.6×150 mm, 5μm)	YMC-pack ODS-A (4.6×150 mm, 5μm)
カラム温度	40°C			
移動相	水/アセトニトリル混液 (13 : 7)			
流量	1.0 mL/min			
注入量	10 μL			
分析時間	40 分			
検出波長	230 nm または 234 nm			

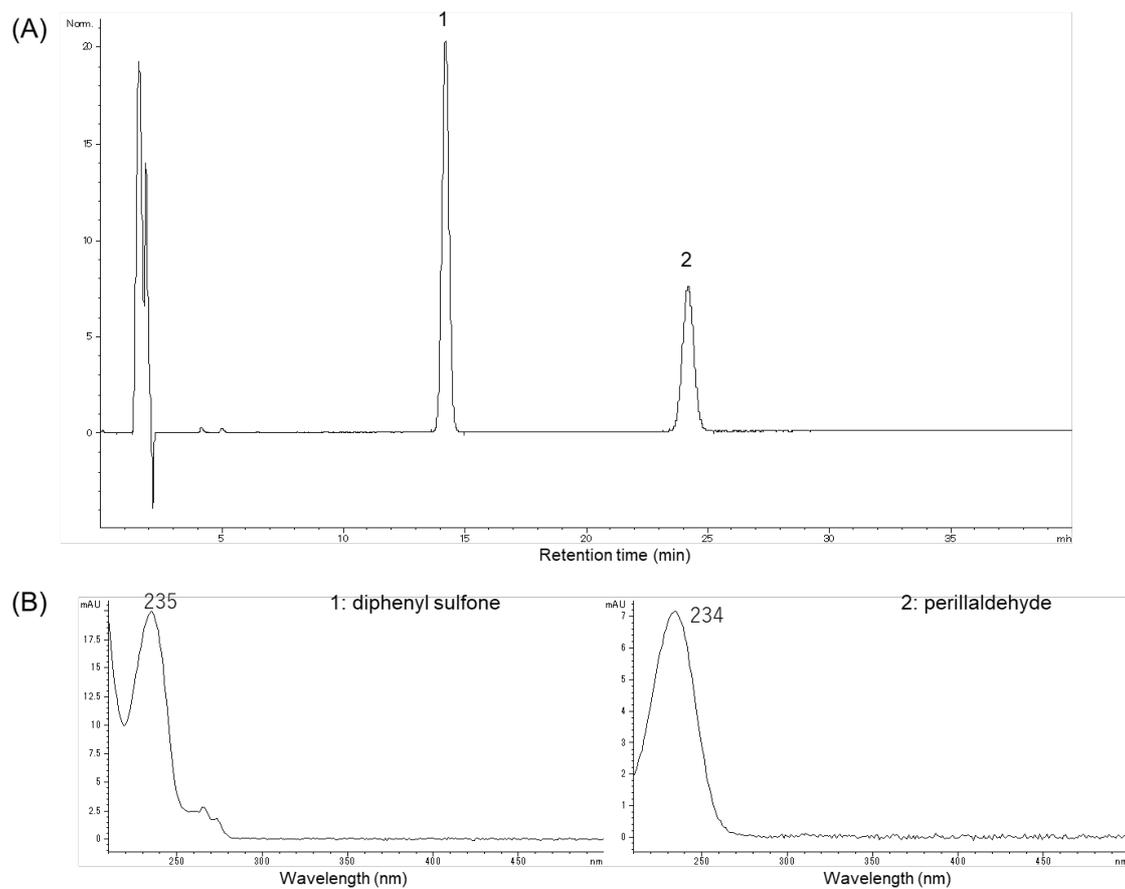


図1 ペリラルデヒドとジフェニルスルホンの HPLC 分析結果. (A) Chromatograph A にて分析した際の両化合物のクロマトグラム. ピーク 1 はジフェニルスルホン, ピーク 2 はペリラルデヒド. (B) 両化合物の吸収スペクトル. 数値は吸収極大波長.

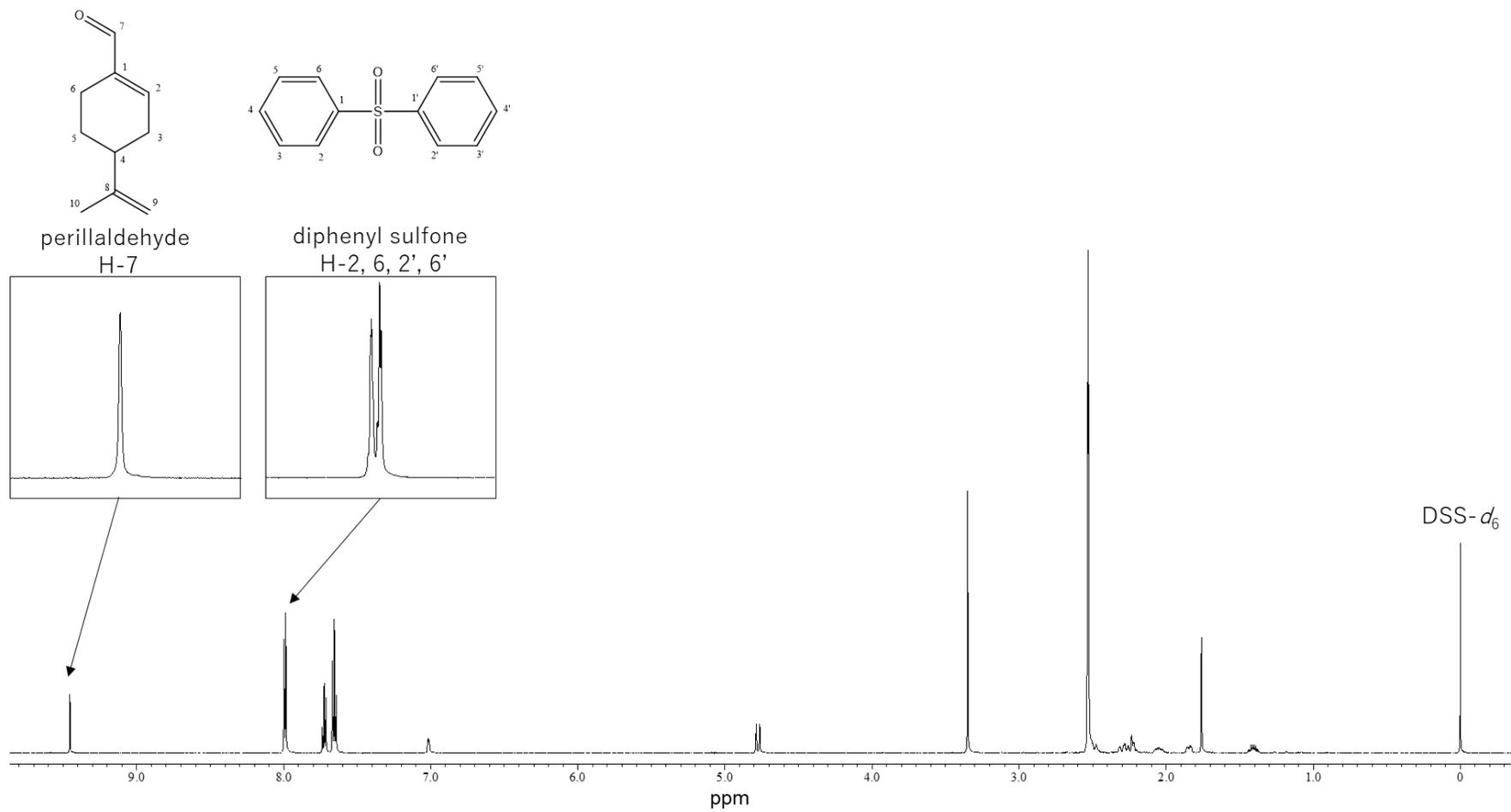


図2 NMR 測定用試料溶液（ペリラルデヒドとジフェニルスルホンの混合液）の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。
 拡大して示しているのは定量に用いたシグナル。

表 4 ^1H -qNMR により算出した各試料溶液中のペリルアルデヒド (PRL) のジフェニルスルホン (DS) に対する物質質量比

	機関 1			機関 2		
	DS	PRL	物質質量比	DS	PRL	物質質量比
	H2, H6, H2', H6'	H7	(R_n)	H2, H6, H2', H6'	H7	(R_n)
	a	b	$b/(a/4)$	a	b	$b/(a/4)$
試料溶液 ^{NMR1}	100	15.40 ± 0.07	0.616	100	13.61 ± 0.02	0.545
試料溶液 ^{NMR2}	100	15.03 ± 0.07	0.601	100	13.22 ± 0.02	0.529
試料溶液 ^{NMR3}	100	16.74 ± 0.06	0.670	100	14.23 ± 0.05	0.569

表 5 ペリルアルデヒド (PRL) のジフェニルスルホン (DS) に対する RMS

機関 1									
装置	検出器	検出波長		試料溶液 ^{LC1}	試料溶液 ^{LC2}	試料溶液 ^{LC3}	平均	RSD (%)	
Chromatograph A	PDA	230 nm	R_r	0.634±0.001	0.620±0.002	0.681±0.003	—		
			RMS	1.030	1.031	1.017	1.026	0.724	
		234 nm	R_r	0.594±0.002	0.580±0.002	0.645±0.000	—		
			RMS	0.969	0.964	0.962	0.965	0.338	
		VWD	230 nm	R_r	0.629±0.001	0.615±0.001	0.684±0.000	—	
				RMS	1.022	1.023	1.021	1.022	0.097
	234 nm		R_r	0.596±0.002	0.585±0.001	0.646±0.001	—		
			RMS	0.968	0.973	0.965	0.969	0.392	
	Chromatograph B	PDA	230 nm	R_r	0.627±0.001	0.611±0.001	0.680±0.001	—	
				RMS	1.017	1.016	1.016	1.016	0.097
			234 nm	R_r	0.595±0.001	0.581±0.001	0.648±0.002	—	
				RMS	0.966	0.967	0.967	0.967	0.059
VWD			230 nm	R_r	0.638±0.002	0.622±0.001	0.694±0.002	—	
				RMS	1.035	1.034	1.036	1.035	0.108
		234 nm	R_r	0.602±0.003	0.587±0.002	0.654±0.000	—		
			RMS	0.977	0.976	0.977	0.977	0.072	

表5 つづき

機関2								
装置	検出器	検出波長		試料溶液 ^{LC1}	試料溶液 ^{LC2}	試料溶液 ^{LC3}	平均	RSD (%)
Chromatograph C	PDA	230 nm	R_r	0.567 ± 0.001	0.551 ± 0.001	0.594 ± 0.001	—	
			RMS	1.041	1.042	1.045	1.043	0.204
		234 nm	R_r	0.534 ± 0.002	0.520 ± 0.002	0.559 ± 0.001	—	
			RMS	0.980	0.983	0.982	0.982	0.163
	VWD	230 nm	R_r	0.570 ± 0.000	0.555 ± 0.000	0.597 ± 0.000	—	
			RMS	1.046	1.050	1.049	1.048	0.202
		234 nm	R_r	0.530 ± 0.001	0.516 ± 0.000	0.555 ± 0.000	—	
			RMS	0.974	0.976	0.975	0.975	0.103
Chromatograph D	PDA	230 nm	R_r	0.560 ± 0.002	0.548 ± 0.003	0.588 ± 0.002	—	
			RMS	1.028	1.036	1.034	1.033	0.390
		234 nm	R_r	0.531 ± 0.002	0.519 ± 0.002	0.556 ± 0.002	—	
			RMS	0.975	0.982	0.978	0.978	0.340
	VWD	230 nm	R_r	0.571 ± 0.001	0.557 ± 0.000	0.588 ± 0.002	—	
			RMS	1.049	1.053	1.051	1.051	0.197
		234 nm	R_r	0.543 ± 0.000	0.528 ± 0.001	0.567 ± 0.001	—	
			RMS	0.996	0.998	0.997	0.997	0.095

表 6 波長ごとのジフェニルスルホンに対するペリルアルデヒドの RMS

	230 nm	234 nm
平均値	1.034	0.976
併行精度 (RSD%)	0.85	0.759
室間精度 (RSD%)	1.33	1.16

表 7 ¹H-qNMR 及び RMS 法から算出したペリルアルデヒド試薬の純度

	¹ H-qNMR	RMS 法	
		230 nm	234 nm
Chromatograph A (PDA)	95.07 wt%	96.05 wt% (+0.98%)	95.58 wt% (+0.51%)
Chromatograph B (PDA)		95.09 wt% (+0.02%)	95.80 wt% (+0.73%)
Chromatograph C (PDA)	94.01 wt%	93.92 wt% (-0.09%)	95.29 wt% (+1.28%)
Chromatograph D (PDA)		93.96 wt% (-0.05%)	94.34 wt% (+0.33%)

括弧内の数値は、¹H-qNMR による純度値との差を表している。

表 8 JP17 記載の従来法及び RMS 法により定量したソヨウ中のペリルアルデヒド含量

ソヨウ 1					
Chromatograph No.	A		B		平均
	PDA	VWD	PDA	VWD	
JP17 (230 nm)	0.200%	0.199%	0.200%	0.200%	0.200%
RMS 230 nm	0.201%	0.202%	0.202%	0.204%	0.202%
234 nm	0.202%	0.202%	0.201%	0.204%	
ソヨウ 2					
Chromatograph No.	C		D		平均
	PDA	VWD	PDA	VWD	
JP17 (230 nm)	0.632%	0.632%	0.626%	0.626%	0.629%
RMS 230 nm	0.626%	0.632%	0.626%	0.637%	0.631%
234 nm	0.632%	0.632%	0.626%	0.637%	
ソヨウ 3					
Chromatograph No.	C		D		平均
	PDA	VWD	PDA	VWD	
JP17 (230 nm)	0.625%	0.625%	0.619%	0.619%	0.622%
RMS 230 nm	0.625%	0.630%	0.619%	0.630%	0.626%
234 nm	0.630%	0.625%	0.619%	0.630%	