

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
課題番号 20KA1008

既存添加物の品質向上に資する研究

令和3年度(2021年度)

総括・分担報告書

研究代表者	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	西崎 雄三	国立医薬品食品衛生研究所
	天倉 吉章	松山大学
	井之上 浩一	立命館大学
	大槻 崇	日本大学
	永津 明人	金城学院大学
	出水 庸介	国立医薬品食品衛生研究所
	渡辺 麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所

令和4(2022)年3月

目次	1
1) 総括研究報告書	
既存添加物の品質向上に資する研究	3
研究代表者：杉本直樹	
2) 分担研究報告書	
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)	14
業務受託者：背黒 勝也	
研究協力者：等々力 博志	
研究協力者：京極 泰久	
2. 既存添加物の有効成分の解明	
1) 既存添加物オリゴガラクチュロン酸の分析法の検討	56
研究分担者：杉本 直樹	
研究協力者：石附 京子	
研究協力者：中島 馨	
研究協力者：増本 直子	
研究協力者：西崎 雄三	
2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析	78
研究分担者：天倉 吉章	
研究協力者：好村 守生	
研究協力者：内倉 崇	
研究協力者：杉本 直樹	
研究協力者：西崎 雄三	
研究協力者：増本 直子	
3) ショウガ抽出物の成分解析	85
研究分担者：天倉 吉章	
研究協力者：好村 守生	
研究協力者：内倉 崇	
研究協力者：杉本 直樹	
研究協力者：西崎 雄三	
研究協力者：増本 直子	
4) アナト一色素の定量評価の基礎検討	92
研究分担者：井之上 浩一	

	研究協力者：高橋 未来	
5)	DPPH を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価	110
	研究分担者：井之上 浩一	
	研究協力者：高橋 未来	
6)	qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究	118
	研究分担者：永津 明人	
7)	既存添加物ニガヨモギ抽出物の成分分析	136
	研究分担者：西崎 雄三	
	研究協力者：加藤 菜帆	
	研究協力者：石附 京子	
	研究協力者：中島 馨	
	研究協力者：増本 直子	
	研究協力者：杉本 直樹	
3.	試験法及び分析法の開発	
1)	^1H -qNMR に基づく相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの 分析手法に関する研究	147
	研究分担者：大槻 崇	
2)	PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討	167
	研究分担者：出水 庸介	
	研究協力者：辻 巖一郎	
3)	真菌基原の添加物の分析法の開発	184
	研究分担者：渡辺 麻衣子	
	協力研究者：吉成 知也	
	協力研究者：杉本 直樹	
	協力研究者：西崎 雄三	
	協力研究者：中西 早苗	
	協力研究者：船江 元子	
3)	研究成果の刊行に関する一覧表	204

研究要旨

1) 既存添加物の成分規格に関する研究

食品添加物公定書に記載されていない品目について自主規格の作成を進めた。また、流通実態、使用実態及び安全性情報を調査した。更に、製品情報及び流通実態の有無により、規格化の可能性が低いものとして55品目をリストアップした。

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、ヒマワリ種子抽出物，ショウガ抽出物，香辛料抽出物（コショウ，シナモン，オールスパイス），クチナシ色素，シタン色素，ウコン色素，キトサン，酵素処理ナリンジン等の8品目の成分組成及び有効成分を検討したが，本年度は，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）等を加え12品目16基原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にトレーサブルな分析法の開発，次いで規格試験法への応用を主に検討した

オリゴガラクチュロン酸については，¹H-qNMR，HPLC及びカルバズール-硫酸法による定量法を検討した結果，カルバズール-硫酸法が現時点では最良な試験法であることを確認した。アナトー色素については，主成分のHPLC分析条件を検討した。ニガヨモギ抽出物については，LC/MS分析等の結果より苦味成分が同定され，本品目の成分規格においてはTLCによる確認試験の設定が妥当であると考えられた。更に，有効性を指標とする試験法としてDPPHを用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価を行った。

qNMRの応用では，香辛料抽出物(シナモン，ローズマリー)の主成分が定量可能であることが確認できた。RMSを利用した分析法では，酵素処理ナリンジンの成分規格試験への応用を試み，酵素加水分解により生成するナリンゲニン 7-O-グルコシドをそれとは別の基準物質を用いて原理的に精確に定量可能であることを明らかとした。また，酵素加水分解反応の反応効率を検証し，条件を規定することによって安定した結果が得られることを確認した。RMSを利用したHPLC/PDA分析において，装置依存なく精確な定量値が得られるように，PDA検出器の校正物質の設計及び全合成を検討した。

微生物由来基原の酵素品目の同定法の構築のため，タンパク質アミノ配列を指標としたMALDI-TOF-MSによる同定手法を引き続き検討し，Mascotサーチ以外にNCBIデータベースから取得した配列データを比較し同定精度を検証した。

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
准教授

永津明人 金城学院大学薬学部
教授

大槻 崇 日本大学生物資源学部
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

等々力博志 (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

高橋未来 立命館大学大学院
助教

加藤菜帆 日本大学生物資源学部
実習生

辻巖一郎 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官

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

令和2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指標成分の同定。(3) 試験法及び分析法の開発：従来法では試験法が設定困難なものについては、指標成分又は代替物質の合成による定量用標品の供給体制の確立または定量用標品を必要としない相対モル感度(RMS)を用いたSIへのトレーサビリティを確保した定量法、分子生物学的手法を応用した試験法、等を検討した。

現在、既存添加物357品目(枝番込み374品目、但し、香辛料抽出物を1品目(73基原)とする)の内、222品目(枝番品目込み)の成分規格が設定済であるが、残り151品目(枝番込み)と香辛料抽出物1品目の成分規格が未設定である(令和2年12月現在)。成分規格が

未設定である理由として、1.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必要である。更に、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。

以上のことから、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)

第9版食品添加物公定書及び追補1への未収載品目について、2021年12月時点での日本食品添加物協会内の成分規格検討状況及び流通実態をまとめた。流通実態については、生産量統計調査等によりまとめた。安全性評価の状況については、安全性評価が完了していない品目(H8年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2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。

これらの検討・調査は日本食品添加物協

会の自主規格専門委員会、規格専門委員会と部会担当のメンバー及び安全性委員長で実施した。

2. 既存添加物の有効成分の解明

1) 既存添加物オリゴガラクトuron酸の分析法の検討

既存添加物「ペクチン」及び「ペクチン分解物」があり、それぞれ公的な成分規格が既に設定されている。一方、類似品目であるオリゴガラクトuron酸については流通実態が確認できなかったため成分組成が不明であった。そこで、構成成分と考えられるガラクトuron酸、ジガラクトuron酸、トリガラクトuron酸、グルコースの同定及び定量法をNMR、HPLC及びカルバツール-硫酸法を用いて検討した。

2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析

ヒマワリ種子抽出物の添加物製品自体の実データは乏しい。そこで、本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品間の成分比較について検討を行った。成分分析には逆相HPLCを用いた。また、酸化防止能については、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を評価した。

3) ショウガ抽出物の成分解析

ショウガ抽出物の成分データの集積を目的に、添加物製品間の成分比較についてHPLCを用いて検討した。

4) アナトー色素の定量評価の基礎検討

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は不安定な化合物であるため、逆相HPLCを用いて正確に定量する必要がある。そこで、アナトー色素の主成分を明確にし、分析条件を基礎検討し

た。

5) DPPH を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価

DPPH 法を既存添加物の抗酸化評価として一般試験法化が望まれている。そこで、DPPH 法における実験手技や環境を軸に、汎用性や再現性を評価した。

6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

「香辛料抽出物」の規格試験法への ¹H-qNMR 法の適用可能性を検討とした。「香辛料抽出物」の原料生薬の中から、ローズマリーについて主要成分となる rosmarinic acid と、シナモンや生薬ケイヒについて主要な精油成分となる cinnamaldehyde のそれぞれの定量方法の検討を行なった。なお、cinnamaldehyde については、HPLC での定量値が不安定で ¹H-qNMR 法との比較が不十分だったため再検討した。

7) 既存添加物ニガヨモギ抽出物の成分分析
既既存添加物ニガヨモギ抽出物は食品添加物公定書に未記載の品目であることから、成分規格の設定のため、LC/HR-MS を用いて検出される化合物の精密質量 MS を明らかにし、主要成分の同定を行った。

3. 試験法及び分析法の開発

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

昨年度に引き続き、酵素処理ナリンジンの成分規格の設定のため、¹H-qNMR に基づく相対モル感度 (relative molar sensitivity: RMS)を用いたシングルリファレンス HPLC 法(SR-HPLC)の応用を検討

した。基準物質としてカフェイン及び 4-ヒドロキシ安息香酸メチル(MHB)を選択し、これらに対するナリンゲニン 7-O-グルコシドの RMS を各検量線式の傾きの比より算出した。また、酵素加水分解の反応効率の検討では、反応時間(60 分, 90 分, 120 分)及び酵素の添加量(規定量の最大量及び規定量の最大量 2 倍)の両面で、その反応効率を検証した。

2) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

PDA 検出器の校正物質を設計した。UV 吸収を示す化合物を複数連結させることで、広範囲の波長域に吸収を示す分子を設計するコンセプトを考案した。UV 吸収を示す化合物としては合成の容易さや構造の多様性の観点からビスアリールマレイミド骨格の化合物を設計した。

3) 真菌基原の添加物の分析法の開発

微生物由来基原の既存添加物酵素品目の同定法の構築を目的に、タンパク質アミノ配列を指標とした同定手法を検討した。既存添加物酵素の質量分析には MALDI-TOF-MS を、試料には過去の研究で分析した添加物酵素 9 種を用いた。SDS-PAGE で泳動精製後、MALDI-TOF-MS で測定し、得られたマススペクトルを Mascot サーチで解析し同定した。同定できなかった試料については、NCBI データベースの検索により該当する菌種のタンパク質のアミノ酸配列を得て、酵素消化後のペプチド配列の in silico での予測と、TOF-MS 分析によって得たマススペクトルと照合することで同定した。

C. D. 研究結果及び考察

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究 (委託調査)

既存添加物の成分規格の作成状況をまとめた。第9版食品添加物公定書に記載されていない品目のうち、既存添加物102成分規格について自主規格の作成を進め、「第5版既存添加物自主規格」に記載した。一方、第10版成分規格案や業界自主規格等がない品目が55となった。流通状況の観点で分類した場合、生産量流通調査3回で報告がなく、技術委員会の調査でも流通情報が取得できなかった成分規格数は74であった。これらのうち、規格がなく流通の報告がない成分規格数は39であった。

次に、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」、「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5品目であった。

2. 既存添加物の有効成分の解明

1) 既存添加物オリゴガラクトン酸の分析法の検討

HPLCによる分析法を検討した結果、製品中にガラクトン酸の1~3量体が存在することが確認された。¹H-qNMRによる分析の結果、ガラクトン酸の1~3量体の

他にグルコースが10%程度含まれることが確認された。HPLCによる定量法を構築するため、ガラクトン酸の1~3量体の市販試薬の純度を¹H-qNMRにより確認したところ、シグナルにばらつきがあり精確な値を算出することが困難であり、またその純度は70%~80%程度と推定された。よって、HPLCによる定量法の設定は困難であると結論した。次に、カルバゾール-硫酸法による定量を試みた。ガラクトン酸の1~3量体の市販試薬を用いて、本法の妥当性を確認した結果、概ね定量できていると考えられた。しかし、共存するグルコースやきょう雑物の影響により、定量値が大きめに算出されていることが否定できない結果となった。

2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析

HPLCによる製品分析の結果、両製品ともchlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid), 4-O-caffeoylquinic acid, 3-O-caffeoylquinic acid及びcaffeic acidを主とするピークが検出された。また、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能を酸化防止活性の指標とし、分画した画分の活性評価と成分分析を行った結果、上述した成分に活性が認められ、本添加物活性への寄与が示された。

3) ショウガ抽出物の成分解析

ショウガ抽出物12製品(既存添加物及び香辛料抽出物として流通しているもの)について、逆相HPLCによる成分比較を行った結果、3グループ(①[6]-gingerolが主検出、②[6]-gingerol及び[6]-shogaolいずれも検出、③いずれも検出せず)に分類された。①は香辛料抽出物及び既存添加物ショウガ抽出物、②は既存添加物シ

ョウガ抽出物, ③は香辛料抽出物が該当し, 両者で成分分布が異なることが確認された. よって, 既存添加物ショウガ抽出物の場合, [6]-gingerol 及び[6]-shogaol をいずれかまたはどちらかを認する確認試験の設定が望ましいと考えられた.

- 4) アナト一色素の定量評価の基礎検討
ノルビキシン及びビキシンの分析条件を検討した結果, 移動相としてメタノール/水 (90/10, V/V) 混液, カラムを TSKgel ODS-100Z を用いた条件とした. 本手法を用いて, 6 種類のアナト一色素関連製剤に応用することができた.
- 5) DPPH を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価
市販の抗酸化能測定 DPPH キットを用いて, 7 種類の既存添加物製品を用いて抗酸化能評価をした結果, 希釈液や実験者間における差は殆どなかった. しかしながら, 低極性の化合物では抗酸化評価が困難であった. 従って, 低極性の化合物を本体とする既存添加物に対しては, 希釈溶媒を検討し, その適用性を調査する必要がある.
- 6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究
ローズマリー葉末と既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物を試料とした rosmarinic acid の定量の検討では, acetone 抽出→methanol- d_4 で測定という条件で $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量が可能で, 既存の HPLC 法との同等性も確認できた. 一方, 水溶性ローズマリー抽出物中の含有率の結果はばらつきが大きく, スペクトルの状況から精密さという観点で HPLC の利用の方が優位であると考えられた.

ケイヒ末を試料とした cinnamaldehyde の定量の検討では, methanol- d_4 での抽出・測定で $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量が可能で, 積分値と濃度との直線性や添加回収率も良好, 0.1 mg/mL 程度の濃度まで測定可能なことを確認した. また, HPLC 法の条件では cinnamaldehyde が不安定なことが確認され, $^1\text{H-qNMR}$ 法が HPLC 法よりも安定した定量法であることが示唆された.

- 7) 既存添加物ニガヨモギ抽出物の成分分析
ニガヨモギ抽出物は苦味成分として absinthin, anabsin 及び anabsinthin を含んでいた. その他の成分としてフラボノイドである artemetin, またリグナンである yangambin, epiyangambin, diayangambin, sesartemin, episesartemin A, episesartemin B 及び diasesartemin の 7 成分が確認された. また, 標品が市販されている苦味成分 absinthin を本抽出物の指標成分とした HPLC による定量法が有効であることを確認した. また同様に, TLC による確認試験も成立することを確認した.

3. 試験法及び分析法の開発

- 1) $^1\text{H-qNMR}$ に基づく相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法に関する研究
測定対象物質であるナリンゲニン 7-O-グルコシドの MHB 及びカフェインに対する RMS は 1.13 (MHB), 1.87 (カフェイン, 検出波長 274 nm), 0.87 (カフェイン, 検出波長 205 nm) であることが明らかとなった. また, 成分規格試験法 (案) における酵素加水分解反応の反応効率を検証した結果, 反応時間, 酵素の添加量について種々変更しても, 成分規格試験法 (案) に

において規定されている条件で得られる定量値と大きな違いは認められなかった。

また、酵素処理ナリンジンの実試料を用いた検討において、SR-HPLCにより得られたナリンジン及び α -モノグルコシルナリンジンの定量値は、従来のHPLCによる定量値と大きな違いは認められなかった。

2) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

ビスアリアルマレイミド誘導体の合成においては、共通の中間体に対して芳香環の導入を行うことで合成した。この時に複数の芳香環ユニットをカップリング反応で一度に導入することで、多種の誘導体を同時に得ることができた。得られたビスアリアル化合物の吸収スペクトルを測定した結果、芳香環の置換基として電子供与基を導入することで吸収スペクトルの長波長化が認められた。これらの分子をビルディングユニットに複数個導入することで、さらに広範囲の波長域の吸収をカバーできる分子の開発が期待される。

3) 真菌基原の添加物の分析法の開発

5種の酵素製品が Mascot サーチを用いた検索により、1種がNCBIのデータベースから取得したアミノ酸配列との比較により同定できた。その他の3種は、基原菌種のタンパク質情報がデータベースに含まれていないため同定できなかった。今後は、同定対象のタンパク質アミノ酸配列の種内多型の有無の確認、および本解析法の適用範囲を調べ、改善点を検証する予定である。

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)

第10版食品添加物公定書成分規格案及び自主規格はないものは55成分規格であり、それらは規格設定が困難な品目と考えられる。規格設定が困難な品目については、流通情報の把握、添加物としての品質・有効性の明確化、有効成分の明確化などが課題であり、成分規格案の作成作業に伴う負担もかなり大きい。この状況の改善をはかることを目的とした思い切った対策を講じる必要があると考えられる。また、自主規格の食品添加物公定書成分規格への収載を促進するためには、成分規格設定による事業者のメリットの明確化、基原設定ルールの改善、試験法の設定に関するさらなる支援などが必要と考えられる。

2. 既存添加物の有効成分の解明

1) 既存添加物オリゴガラクトン酸の分析法の検討

入手できた製品中の成分組成を確認した結果、主にmGA, dGA, tGAより構成されGluが含まれるものであることがわかった。したがって、「オリゴガラクトン酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトン酸の1~9量体の混合物からなる。」とされているが、今回試験に供した添加物製品oGAによれば、「・・・ガラクトン酸1~3量体の混合物からなる。」に修正

すべきと考えられた。成分規格に適用できる定量法を検討した結果、純度既知の標品の入手が困難であることから、現状ではカルバゾール-硫酸法以外に選択肢はないと結論した。

2) ヒマワリ種子抽出物の成分解析

逆相 HPLC による成分比較を行った結果、資料として用いた 2 製品とも chlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid), 4-O-caffeoylquinic acid, 3-O-caffeoylquinic acid 及び caffeic acid によるピークが主検出して観察され、有効成分の一つとされるイソクロロゲン酸は主検出されなかった。また、酸化防止活性に寄与する活性本体を検討する目的で、DPPH ラジカル消去能を酸化防止活性の指標として分画した画分の活性評価と成分分析を行った結果、上述した成分に活性が認められ、本添加物活性への寄与が示された。一方で、これら成分を検出しない画分において強い活性が認められたことから、他の成分の活性も示唆された。

3) ショウガ抽出物の成分解析

既存添加物ショウガ抽出物及び香辛料抽出物(基原物質: ショウガ)製品について成分比較を行った結果、既存添加物ショウガ抽出物は [6]-gingerol 及び[6]-shogaol をいずれかまたはどちらかを含有することが確認され、これを指標として判別できると考えられた。また、原料となるショウガでは、[6]-gingerol が主検出され、同じ基原を原料とする生薬のショウキョウ、カンキョウは[6]-gingerol 及び[6]-shogaol が検出され、生薬は日本薬局方における指標成分が観察された。従って、既存添加物ショウガ抽出物についても成分規格を

示し、一定の同等性を確認する必要性が示唆された。

4) アナトー色素の定量評価の基礎検討

アナトー色素におけるノルビキシン及びビキシンの逆相系 HPLC 分析法の検討及び MS スペクトル解析を実施した結果、分析時間 10 分にて良好なピーク形状及び分離を可能とする最適な条件を決定することができた。今後、ノルビキシン及びビキシンを効率的に単離精製した後、正確な定量法を構築するため、シングルリファレンス HPLC を応用する予定である。

5) DPPH を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価

抗酸化能評価法として DPPH 法を検討した結果、極性の高い又は中程度の化合物であれば、適応可能であり、その再現性も高かった。今後は希釈溶媒による溶解性の検討や簡潔なマニュアルの作成をすることにより、実験者間の誤差を減らしていく予定である。

6) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

ローズマリー葉中及び既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。ケイヒ中の cinnamaldehyde の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。定量の安定性という観点で HPLC 法よりも ¹H-qNMR 法が優位であると考えられた。

7) 既存添加物ニガヨモギ抽出物の成分分析

LC/HR-MS による本抽出物製品の成分分析の結果、7 成分が確認された。この内、苦味成分 absinthin を指標とした HPLC による定量法、TLC による確認試験が本品

目の成分規格設定において有効であると
考えられた。ただし、HPLCによる定量法
を設定する場合には、absinthin標品の規格
化が課題となると考えられた。今後、本研
究成果を根拠とし、ニガヨモギ抽出物の
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) ¹H-qNMRに基づく相対モル感度を用い た酵素処理ナリンジンの分析手法に関 する研究

酵素処理ナリンジンは、公的な成分規格
が設定されていない。定量用標品の入手
が期待できないことから、分析対象物質
とは別の物質を基準物質としたSR-
HPLCによる定量分析法を昨年度に引き
続き検討した。また、精確な定量値を得
るため、試料調製に必要な酵素加水分解
反応の反応効率が条件によって変化し
ないことを追加検証した。その結果、本
法が酵素処理ナリンジンの成分規格の
定量法として有効であることが確認で
きた。今後、本研究成果を根拠とし、本
品の成分規格案を作成し、第三者検証試
験を行う予定である。

2) PDA 検出器の校正化合物創出のための 基礎検討

フォトダイオードアレイ(PDA)は広範囲
の波長域における吸収を検出できるこ
とから、HPLCにおける検出器として、
広く利用されている。HPLCでの定量の
ための装置間校正においては通常、測定
対象とする分子に合わせた基準物質を
使用する必要がある。実際にはPDAのカ
バーする広範囲の波長域において一種
の化合物を使用して校正を実施できる

ことが望ましいと考えられる。しかしな
がら現状、PDAの校正用化合物として汎
用的に使用されているような化合物は
無い。そこで、広範囲の波長域に吸収を
もつ化合物の設計・合成を検討した。合
成したビスアリールマレイミド化合物
の吸収スペクトルを測定した結果、芳香
環への電子供与基の導入によって吸収
スペクトルの長波長化が可能であるこ
とが分かった。

3) 真菌基原の添加物の分析法の開発

微生物由来基原の品目の同定精度の向
上を目的とし、SDS-PAGEとMALDI-
TOF-MSを組み合わせた微生物由来酵素
の基原の同定法について、真菌由来の9
種の製品の解析を行った。検討した解析
法は、簡便に精度高く多様な添加物酵素
の同定に対して適用可能であるが、同定
の可否は検索用データベースの情報量
に依存することが示された。今後は、同
定対象のタンパク質アミノ酸配列の種
内多型の有無の確認、および本解析法の
適用範囲を調べ、改善点を検証する予定
である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsutumiuchi K, Toyoshima T, Hasegawa F, Terasawa R, Honda W, Sakakibara M, Ishida Y, Ikai Y, Ishibashi R, Furuya K, Morimoto T, Ishizuki K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Oka H: Molecular Structure of Gardenia Blue

- Pigments by Reaction of Genipin with Benzylamine and Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.*, 69, 3904-3911 (2021).
- 2) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度に基づくシングルリファレンス GC 法及び HPLC 法によるカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中のイソチオシアン酸アリルの定量. *食衛誌*, 62, 73-78 (2021).
 - 3) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Yasobu N, Iwamoto Y, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Purity Determination of Cyclophosphamide Hydrate by Quantitative ³¹P-NMR and Method Validation. *Chem. Pharm. Bull.*, 69 (7), 630–638 (2021).
 - 4) Fujiwara Y, Miwa M, Nagatsu A, Honma A: Identification of Maple Anthocyanin and its Antiproliferative Activity against LLC, T47D and C3H10T1/2 Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(7), 894-901(2021).
 - 5) Takahashi M, 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.*, 70, 25–31 (2022).
 - 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.*, in press. (2022) (doi: 10.1021/acs.jnatprod.1c00976.).
2. 学会発表等
 - 2-1. 学会
 - 1) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物中の窒素定量分析~燃焼法 vs ケルダール法~. 食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
 - 2) 建部千絵, 藤原由美子, 長久保直也, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 久保田浩樹, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた食用タール色素中の 6, 6'-オキシビス(2-ナフトレンスルホン酸) ニナトリウム法の検討. 食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
 - 3) 高木映里, 高橋未来, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析. 食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
 - 4) 日置冬子, 多田敦子, 西崎雄三, 古庄紀子, 石附京子, 久保田浩樹, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物ジフェノコナゾールの規格試験法の検討及び異性体組成分析. 食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
 - 5) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: Single-reference HPLC 法によるアントシアニンの定量に関する研究, 日本食品化学学会 第 27 回学術大会. 食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
 - 6) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: 定量 NMR に

- に基づいた相対モル感度を用いたアントシアニンの定量に関する研究, 日本食品科学工学会第 68 回大会 (2022.8.26-28) (東京 (Web)).
- 7) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji T, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Iwamoto Y, Yoshiaki Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Absolute determination of an organophosphorus pharmaceutical, auranofin, using quantitative ^{31}P -NMR. The 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2021) (2021.8.29-9.1) (Kyoto).
- 8) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 丸山剛史, 浅野龍二, 三浦亨, 岩本芳明, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 定量 NMR を用いた日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした生薬等の定量指標成分アミグダリン及びアルブチンの絶対純度の測定. 日本生薬学会第 67 回年会(2021.9.19-20) (東京 (Web)).
- 9) 長井理夏子, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析, 第 60 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 (2021.11.8-21) (Web).
- 10) 廣瀬昌平, 渡辺麻衣子, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 工藤由起子: 第 9 版食品添加物公定書における微生物限度試験法の大腸菌試験に関する検討, 第 57 回全国衛生化学技術協議会年会(2021.11.25-26) (Web).
- 11) 多田敦子, 堀江正一, 内山陽介, 栗田史子, 中村理奈, 杉浦潤, 井原紗弥香, 櫻井光, 久保田浩樹, 建部千絵, 寺見祥子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(令和 2 年度), 第 57 回全国衛生化学技術協議会年会 (2021.11.25-26) (Web).
- 12) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: 相対モル感度(RMS)を用いたアントシアニンの定量に関する研究, 第 3 回日本定量 NMR 研究会(2021.12.3) (Web).
- 13) 加納優奈, 今川真由香, 福本帆花, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量 NMR (^1H -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量～オールスパイス中の eugenol 及びケイヒ中の cinnamaldehyde の定量～, 日本薬学会第 142 年会(2022.3.27) (名古屋市).

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

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)

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格に関する研究

～既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)～

業務受託者 背黒 勝也 一般社団法人日本食品添加物協会 専務理事

研究要旨 既存添加物 357 品目の成分規格については、なお、147 品目 (163 成分規格) が未設定の状況で残っている。

当協会は、既存添加物について食品添加物公定書への新規収載を目標に、これまで成分規格の策定を進めてきた。また、自主規格の策定及び見直しに関する検討を継続してきた。

しかしながら、成分規格が設定されていない既存添加物の 147 品目 (163 成分規格) については規格設定が困難な品目であるが、本年度は、食品添加物公定書に収載されていない品目について、既存添加物 102 成分規格について自主規格の作成を進め、「第 5 版既存添加物自主規格」に収載した (暫定規格のうち 2 成分規格は未収載)。公定書の成分規格又は成分規格案はないが自主規格がある 58 成分規格については、今後も着実な成分規格案の作成検討が必要である。一方、規格設定が困難な品目は 55 成分規格と考えられた。

流通実態については、第 5～7 回生産量統計調査の結果及び当協会技術委員会での調査により、流通情報が取得できた品目は 279 (成分規格としては 290) であった。

使用実態については、既存添加物原体の製品名と用途及び事業者について調査した結果、既存添加物原体の使用状況が確認できたのは 259 品目 (成分規格数としては 290) であった。

さらに、既既存添加物の安全性評価が完了していない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 2 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結果、5 品目について情報が得られた。

これらの活動について、本研究報告書にまとめて報告する。

研究協力者

等々力博志 (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

題がある品目) でまとめた。さらに、成分規格の制定状況、流通の状況について調査した結果を付記した。

(2) 流通実態

流通実態については、第 5～7 回生産量統計調査 (平成 23 年、平成 26 年及び平成 29 年度対象) の結果及び当協会技術委員会に流通の報告のあった品目について、成分規格 (公定規格、公定規格案または自主規格) の制定状況とともにまとめた。

(3) 使用実態

既存添加物原体について、成分規格の制定状況、流通の状況とともにまとめた。

(4) 安全性評価の状況調査

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

A. 研究方法

(1) 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況

第 9 版食品添加物公定書および追補 1 への未収載品目について、2021 年 12 月時点での当協会内の検討状況を 8 項目 (①第 10 版成分規格案を作成済の規格、②第 10 版成分規格案を第 5 版自主規格として作成した規格、③第 5 版自主規格を作成した規格、④第 4 版自主規格で作成していた規格、⑤成分規格案の作成における参考事項、⑥第三者検証を実施した年度及び項目、⑦自社検証を実施した年度及び項目、⑧成分規格の制定において課

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2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。

調査においては、厚生労働省ホームページ既存添加物リストの英名を以下の各サイトに入力した。ヒットしない場合は、別名を調べ、別名（英語）を以下の各サイトに入力した。別名でもヒットしない場合は表3-1に“-”と記入した。

E F S A :

<https://www.efsa.europa.eu/en/publications>

J E C F A :

<http://www.fao.org/food-safety/resources/publications/en/>

F D A :

<https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>

F S A N Z A :

<https://www.foodstandards.gov.au/publications/Pages/default.aspx>

(5) 第10版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目

1) 作成・検討中の品目

7品目の作成状況について、5項目（①担当部会、②コード番号、③既存添加物番号、④用途、⑤品目名でまとめた。

2) 第10版食品添加物公定書成分規格案に位置付けて第5版自主規格を作成した品目

7品目の作成状況について、5項目（①担当部会、②コード番号、③既存添加物番号、④用途、⑤品目名でまとめた。

(6) 調査研究者

(1)～(5)の検討・調査は当協会の自主規格専門委員会、規格専門委員会と部会担当のメンバー及び安全性委員長で実施した。

B. 研究結果

(1) 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況

2021年12月時点での弊会内の検討状況について、まとめた結果を表1（その1～8）に記した。

検討状況を分類した8項目について成分規格数を以下に示した。調査においては、「アウレオバシジウム培養液（液体品）」及び「アウレオバシジウム培養液（粉末品）」、「オゾン」、「オゾン水」をそれぞれ1つの成分規格として取り扱った。また、小分類のある規格については、「カラギナン」、「ユーケマ藻末」、「ルチン（抽出物）」、「アズキ全草抽出物」、「ソバ全草抽出物」、「シェラック」、「くん液」、「木酢液」、「リキッドスモーク」、「焼成カルシウム」、「うに殻焼成カルシウム」、「造礁サンゴ焼成カルシウム」、「タンニン（抽出物）」、「柿タンニン」、「ミモザタンニン」、「未焼成カルシウム」、「貝殻未焼成カルシウム」、「骨未焼成カルシウム」、「真珠層未焼成カルシウム」、「卵殻未焼成カルシウム」をそれぞれ1つの成分規格として取り扱った。これにより、本研究の対象である未設定の成分規格は163成分規格（147品目）となった。

その成分規格の内容（分類）を以下に記す。

- ①第10版成分規格案を作成済： 58
- ②第10版成分規格案を第5版自主規格として作成： 11
- ③第5版自主規格を作成： 122
（内訳－既存添加物：102（暫定規格：8，第4版から削除した暫定規格：4），一般飲食物添加物：20）
- ④第4版自主規格で作成していた規格： 79
（暫定規格：4）
- ⑤成分規格案の作成における参考事項： 52
- ⑥第3者検証を実施した年度及び項目： 65
- ⑦自社検証を実施した年度及び項目： 27
- ⑧営業許可、食品衛生管理者の設置において問題あり：19
また、公定規格案（検討会で審議済みの規格案）及び自主規格の作成状況の観点で分類すると、成分規格数は、
ii：公定規格案があるが自主規格はない：6
iii：公定規格案があり自主規格もある：44
iv：公定規格・公定規格案はないが自主規格がある：58
v：規格がない：55
であった。

今年度は、第9版食品添加物公定書に収載されていない品目のうち、既存添加物102成分規

格について自主規格の作成を進め、「第5版既存添加物自主規格」に収載した（暫定規格のうち2成分規格は未収載）. iii: 公定の成分規格又は成分規格案はないが自主規格がある 58 成分規格については、今後も着実な成分規格案の作成検討が必要である。

また、流通状況の観点で分類した場合、成分規格が未設定の163成分規格のうち、生産量流通調査3回で報告がある、または技術委員会の調査により流通情報の取得できた成分規格数（A）は89、生産量流通調査3回で報告がなく、技術委員会の調査でも流通情報が取得できなかった成分規格数（B）は74であった。

それらのうち、大分類であり流通実態は確認できないが小分類の品目に流通実態のある成分規格数は6、規格がなく流通の報告がない成分規格数は39であった。

(2) 流通実態

既存添加物357品目（成分規格数は402）、の流通状況について、第5～7回生産量統計調査結果及び今回の調査で当協会技術委員会に報告のあった品目を規格の制定状況とともに、表2（その1～13）にまとめた。

流通状況について、今回の調査により流通情報が取得できた成分規格数（A）は296（品目数としては279）であった。その内訳は生産量統計調査3回により確認できた成分規格数が269、技術委員会の調査により確認した成分規格数が21、小分類において流通が確認できた大分類の規格は5であった。

一方、生産量流通調査3回で報告がなく、技術委員会の調査でも流通情報が取得できなかった成分規格数（B）は87（品目数としては78）、流通状況が把握できていない小分類の成分規格数は19であった。

それら402成分規格における規格の制定状況は、いずれも成分規格数としての集計となるが、

i: 公定規格がある: 239

ii: 公定規格案があるが自主規格はない: 6

iii: 公定規格案があり自主規格もある: 44

iv: 公定規格、公定規格案はないが自主規格がある: 58

v: 規格がない: 55

であった。

なお、それらのうち大分類であり規格がないが、小分類の品目に公定規格、公定規格案または自主規格がある成分規格数は6であった。

(3) 使用実態

既存添加物原体の製品名、用途又は事業者が確認できた品目（成分規格）について、成分規格の制定状況、流通の状況とともに表2（その1～13）に記した。

既存添加物原体の使用状況が確認できたのは259品目（成分規格数としては290）であった。

(4) 安全性評価の状況調査

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及びこれまでに報告の無かった2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結果を表3-1（その1～11）に、安全性の評価報告の収載先リンクを表3-2（その1～3）に記した。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」、「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5品目であった。

(5) 第10版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目

今後の検討会に提出するために8品目の成分規格案の検討を行った。

1) 作成・検討中の規格

1規格（「貝殻未焼成カルシウム」）について作成検討を行った。現在の状況については表4-1にまとめた。

2) 第10版食品添加物公定書成分規格案に位置付けて第5版自主規格を作成した規格該当する規格は7となった。作成状況および課題（第3者検証における課題など）への対応については表4-2にまとめた。

(6) 調査研究者

既存添加物の成分規格案の検討、実態調査を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会と

部会担当, 及び既存添加物の安全性を調査したメンバーを表5に記した.

C. 考察

今年度までの検討を振り返ると, 成分規格が設定(告示)されていない既存添加物は163成分規格(品目としては147)が存在している. それらの内, 公定規格案あるいは自主規格のあるものは108成分規格である. 一方, 公定規格案及び自主規格はないものは55成分規格であり, それらは規格設定が困難な品目と言える.

規格設定が困難な品目については, 流通情報の把握, 添加物としての品質・有効性の明確化, 有効成分の明確化などが課題であり, 成分規格案の作成作業に伴う負担もかなり大きいため, この状況の改善をはかることを目的とした思

い切った対策を講じる必要があると考えられる.

また, 自主規格の食品添加物公定書成分規格への掲載を促進するためには, 成分規格設定による事業者のメリットの明確化, 基原設定ルールの改善, 試験法の設定に関するさらなる支援などが必要と考えられる.

D. 謝辞

本年度の調査研究に際して, 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の佐藤部長, 杉本第二室長をはじめとする諸先生方に多大なるご指導をいただいた. 心より感謝申し上げる次第である.

表1 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況 その1

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号	規格名称	成分規格の整備状況 (○：対応済, ●：規格案作成済・課題あり, △：検討・対応中, ▲：規格案再検討, 暫：暫定規格, 除：削除した暫定規格)						課題の分類*1	規格の制定状況*2	流通の状況*3	規格及び流通の報告が無い品目*6
					第10版成分規格案の作成	自主規格		参考事項	検証項目					
					作成済	第5版主規格として作成	第5版第4版	参考事項	第三者	自社				
1	甘味料	165	E00181	ステビア末				食品流通			5	B	○	
1	甘味料	264	E00284	ブラジルカンゾウ抽出物		暫	○				4	B	—	
2	着色料	24	E00024	アルミニウム		暫					4	B	—	
2	着色料	46	E00048	オレンジ色素		暫	○				4	B	—	
2	着色料/製造用剤	87	E00093	金	●	○	○		H28 全項目	H29 全項目	②	A	—	
2	着色料/製造用剤	88	E00094	銀	●	○	○		H28 全項目	H29 全項目	②	A	—	
2	着色料	113	E00120	クロロフイリン				規格情報無			5	A	—	
2	着色料	154	E00165	シタン色素	○	○	○		H30 全項目	H29 全項目	3	B	—	
2	着色料	160	E00177	植物炭末色素	○	○	○		H31 全項目	H29 全項目	3	A	—	
2	着色料	253	E00272	ファイア色素	▲	○	○	規格案見直し	H29 全項目	H29.30 全項目	3	A	—	
2	着色料	276	E00295	ペカンナッツ色素		暫	○				4	B	—	
2	着色料	317	E00342	ムラサキヤマモイモ色素		○	○				4	A	—	
2	着色料	354	E00382	ログウツド色素				規格情報無			5	B	○	
3	保存料	73	E00078	カワラヨモギ抽出物	○	○	○		H29 全項目	H31 全項目	3	A	—	
3	製造用剤/日持	111	E00117	グレープフルーツ種子抽出物				合成抗菌剤			5	A	—	
3	製造用剤/日持	157	E00168	シヨウガ抽出物				規格情報無			5	A	—	
3	製造用剤/日持	170	E00186	セイヨウワサビ抽出物	○	○	○		H28 全項目, R2		3	A	—	
3	製造用剤/日持	211	E00230	トウガラシ水性抽出物	○	○	○		H30 全項目	H31 全項目	3	A	—	
3	製造用剤/日持	262	E00282	ブドウ果皮抽出物		○	○				4	A	—	
3	製造用剤/日持	322	E00347	モウソウウチク乾留物	▲	○	○	規格案再検討	H31 全項目		4	A	—	
3	製造用剤/日持	323	E00348	モウソウウチク抽出物	△	○	○	規格案再検討			4	A	—	

表1 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況 その2

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号	規格名称	成分規格の整備状況						課題の分類*1	規格の制定状況*2	流通の状況*3	規格及び流通の報告が無い品目*6
					第10版成分規格案の作成		自主規格		参考事項	検証項目				
					作成済	第5版自主規格として作成	第5版	第4版			第三者	自社		
4	増粘安定剤	1	E00001	アウレオバシジウム培養液 (液体品)			○	○		H31 全項目		A	—	
4	増粘安定剤	1	E00001	アウレオバシジウム培養液 (粉末品)						H31 全項目		A	—	
4	増粘安定剤	4	E00004	アグロバクテリウムスクリ ノグリカン	○		○	○		H31 全項目		A	—	
4	増粘安定剤	13	E00013	アマシードガム		○	○	○		H31 全項目		A	—	
4	増粘安定剤	19	E00019	アラビノガラクトタン		○	○	○		H31 全項目		A	—	
4	増粘安定剤/ ガムベース	39	E00040	エレミ樹脂	○		○			H30 全項目	H29 全項目	A	—	
4	増粘安定剤	52	E00054	カシアガム		○	○	○		H30 全項目		A	—	
4	増粘安定剤	60	E00062	カラギナン								5◇	A☆	—
4	増粘安定剤	60	E00065	ユークケマ藻末					規格情報無			5	B	○
4	増粘安定剤	81	E00086	キチン		○	○	○		H30 全項目		A	—	
4	増粘安定剤/ 製造用剤	83	E00088	キトサン		○	○	○		H30 全項目		A	—	
4	増粘安定剤	90	E00096	グァーガム酵素分解物	○		○	○		H30 全項目	H31 全項目	A	—	
4	増粘安定剤	102	E00108	グルコサミン	○		○	○		H27 全項目		A	—	
4	増粘安定剤/ 製造用剤	141	E00149	サブクヨモギシードガム	○		○	○		H30 全項目	H29 全項目	A	—	
4	増粘安定剤	224	E00243	トロロアオイ		○	○	○		H30 全項目		A	—	
4	増粘安定剤	252	E00271	フアーセララン		○	○	○		H30 全項目		A	—	
4	増粘安定剤	329	E00354	モモ樹脂		○	○	○		H30 全項目		A	—	

表1 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況 その3

部 会	用途分類	既存 添加 物 番号	コード 番号	規格名称	成分規格の整備状況						課題 の 分類 *1	規 格 の 制 定 状 況 *2	流 通 の 状 況 *3	規 格 及 び 流 通 の 報 告 が 無 い 品 目 *6
					第10版成分規格 案の作成		自主規格	参考事項	検証項目					
					作成済	第5版自 主規格と して作成			第5版	第4版				
5	酸化防止剤	57	E00059	カテキン	▲	○	○	○	規格案 再検討	H29 全項目	H29 全項目	4	A	—
5	酸化防止剤/日持	75	E00080	カンゾウ油性抽出物	○	○	○	○		H30 全項目	H29 全項目	3	A	—
5	酸化防止剤	91	E00097	グアヤク脂	○	○	○	○				4	B	—
5	酸化防止剤	93	E00099	クエルセチン	○	○	○	○		H30 全項目	H31 全項目	3	A	—
5	酸化防止剤/日持	112	E00119	クローブ抽出物	○	暫	○	○				4	B	—
5	酸化防止剤	126	E00134	酵素分解リンゴ抽出物					規格情報無			5	B	○
5	酸化防止剤	132	E00140	ゴマ油不けん化物								4	A	—
5	酸化防止剤	137	E00145	コメスカ酵素分解物					規格情報無			5	B	○
5	酸化防止剤	169	E00185	精油除去ウイキョウ抽出物	○				規格情報無			2	A	—
5	酸化防止剤	173	E00189	セージ抽出物					規格情報無			5	B	○
5	酸化防止剤	191	E00207	単糖・アミノ酸複合物			○					4	A	—
5	酸化防止剤	197	E00216	チャ抽出物	○			○			H31 全項目	3	A	—
5	酸化防止剤	227	E00246	生コーヒー豆抽出物	○			○		H31 全項目		3	A	—
5	酸化防止剤	250	E00269	ヒマワリ種子抽出物	○			○		H28 全項目	H29, 30 全項目	3	A	—
5	酸化防止剤	270	E00290	プロポリス抽出物					規格情報無			5	A	—
5	酸化防止剤	299	E00319	没食子酸	○			○		H28 全項目	H30 全項目	3	A	—
5	酸化防止剤	321	E00346	メロイカ精油					規格情報無			5	B	○
5	酸化防止剤	348	E00372	ルチン (抽出物)								5	◇	☆
5	酸化防止剤	348	E00374	アズキ全草抽出物					規格情報無			5	B	○
5	酸化防止剤	348	E00375	ソバ全草抽出物					規格情報無			5	B	○
5	酸化防止剤	357	E00385	ローズマリー抽出物	○			○		H31 全項目		3	A	—

表1 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況 その4

部 会	用途分類	既存 添加 物 番号	コード 番号	規格名称	成分規格の整備状況 (○：対応済, ●：規格案作成済・課題あり, △：検討・対応中, ▲：規格案再検討, ○：暫定規格, 除：削除した暫定規格)						課題 の 分類 *1	規 格 の 制 定 状 況 *2	流 通 の 状 況 *3	規 格 及 び 流 通 の 報 告 が 無 い 品 目 *6	
					第10版成分規格 案の作成		参考事項	自主規格		検証項目					
					作成済	第5版自 主規格と して作成		第5版	第4版	第三者					自社
6	ガム/光沢	35	E00036	ウルシロウ	○		○	○	H30 全項目	H31 (酸化, 融点)	3	A	—		
6	ガム・ス	41	E00042	オゾケライト			暫	○			4	B	—		
6	ガム・ス	92	E00098	グアヤク樹脂			○				4	B	—		
6	ガム・ス	97	E00103	グッタハンカン			○	○			4	B	—		
6	ガム・ス	98	E00104	グッタペルカ			○	○			4	B	—		
6	ガム・ス	134	E00142	ゴム	△		○	○	H31 全項目		4	A	—		
6	ガム・ス	135	E00143	ゴム分解樹脂							5	B	○		
6	ガム/光沢	138	E00146	コメスカロウ	○		○	○	H29 全項目		3	A	—		
6	ガム/光沢	140	E00148	サトウキビロウ	○		○	○	H30 全項目		3	A	—		
6	ガム/光沢	146	E00155	シェラック							5	◇	—		
6	ガム/光沢	147	E00158	シェラックロウ	○		○	○	H31 全項目		3	A	—		
6	ガム・ス	149	E00160	ジェルトン	○		○	○	案見直し	H29 全項目	3	A	—		
6	ガム・ス	180	E00196	ソルバ			除	暫	規格削除		5	B	○		
6	ガム・ス	181	E00197	ソルペンハ			除	暫	規格削除		5	B	○		
6	ガム・ス	194	E00213	チクル	○		○	○		H29 全項目	3	B	—		
6	ガム・ス	198	E00217	チルテ							5	B	○		
6	ガム・ス	200	E00219	ツヌー					規格情報無		5	B	○		
6	ガム・ス	203	E00222	低分子ゴム			除	暫	規格削除		5	B	○		
6	ガム・ス	230	E00249	ニガーグッタ					規格情報無		5	B	○		
6	ガム・ス	275	E00294	粉末モミガラ					規格情報無		5	A	—		
6	ガム・ス	288	E00308	ペネズエラチクル					規格情報無		5	B	○		
6	ガム・ス	300	E00320	ホホバロウ			○	○	R2 全項目		4	B	—		
6	ガム・ス	305	E00325	マスチック			暫	○	H31 全項目		4	B	—		
6	ガム・ス	306	E00326	マッサラントパバコロレート					規格情報無		5	B	○		

表1 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況 その5

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号	規格名称	成分規格の整備状況						課題の分類*1	規格の制定状況*2	流通の状況*3	規格及び流通の報告が無い品目*6	
					第10版成分規格案の作成		参考事項	自主規格		検証項目					
					作成済	第5版自主規格として作成		第5版	第4版	第三者					自社
6	ガムベース	307	E00327	マッサランドバパラタ			規格削除				5	B	○		
6	ガムベース	314	E00339	ミルラ	○				H31 全項目	H29 全項目	3	B	—		
6	ガム/光沢	326	E00351	モクロウ	○				H30 全項目		3	A	—		
6	ガムベース	351	E00378	レッチュエデバカ			規格情報無				5	B	○		
6	ガムベース	355	E00383	ロシゲインハ			規格情報無				5	B	○		
6	ガムベース	356	E00384	ロシン	○				H30 全項目	H29 全項目	3	A	—		
9	調味料	40	E00041	塩水湖水低塩化ナトリウム液	○				H29 全項目	H29 全項目	3	A	—		
9	苦味料等	84	E00089	キナ抽出物			規格情報無				5	B	○		
9	苦味料等	85	E00090	キハダ抽出物			規格情報無				5	B	○		
9	苦味料等	117	E00126	ゲンチアナ抽出物	○				H29 全項目	H29・30 全項目	3	A	—		
9	苦味料等	121	E00130	酵素処理ナリンジン	△	○			R2 全項目 (基原はグループ アップルーツ のみ)	R2 全項目 (基 原はグループ アップルーツ のみ)	4	A	—		
9	苦味料等	156	E00167	ジャマイカカカシニア抽出物	○				H28 全項目	H28 全項目	3	A	—		
9	調味料	177	E00193	粗製海水塩化カリウム	○				R2 全項目		3	A	—		
9	苦味料等	204	E00223	テオブロミン			規格情報無				5	B	○		
9	苦味料等	231	E00250	ニガヨモギ抽出物			暫	○			4	B	—		
9	苦味料等	350	E00377	レイシ抽出物	○				H30 全項目		3	A	—		
10	乳化剤	124	E00386	酵素処理レシチン	○				H26 全項目		3	B	—		
10	乳化剤	167	E00183	スフィンゴ脂質	○						4	B	—		
10	乳化剤	182	E00198	ダイズサポニン							4	A	—		
10	乳化剤	190	E00206	胆汁末							4	B	—		

表1 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況 その6

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号	規格名称	成分規格の整備状況						課題の分類*1	規格の制定状況*2	流通の状況*3	規格及び流通の報告が無い品目*6
					第10版成分規格案の作成		参考事項	自主規格		検証項目				
					作成済	第5版自 主規格と して作成		第5版	第4版					
13	製造用剤	9	E00009	アスペルギルスステレース糖 たん白質	○	○	○			H31 全項目		3	A	—
13	製造用剤	29	E00030	イナワラ灰抽出物					規格情報無			5	B	○
13	製造用剤	42	E00043	オゾン水		○					①	4	B	—
13	製造用剤	42	E00043	オゾン		○					①	4	B	—
13	製造用剤	43	E00044	オリゴガラクチュロン酸					規格情報無			5	B	○
13	製造用剤	45	E00047	オレガノ抽出物					規格情報無			5	A	—
13	製造用剤	47	E00049	海藻灰抽出物		○						4	A	—
13	製造用剤	51	E00053	花こう斑岩		○		○			②	4	B	—
13	製造用剤	99	E00105	クリストバル石					規格情報無			5	B	○
13	製造用剤	115	E00122	くん液	○	○	○	○		H31 全項目		3	A	—
13	製造用剤	115	E00123	木酢液	○							2	B	—
13	製造用剤	115	E00124	リキッドスモーク	○							2	B	—
13	製造用剤	118	E00127	高級脂肪酸								5	A	—
13	製造用剤	133	E00141	ゴマ柄灰抽出物								5	B	○
13	製造用剤	144	E00152	酸素				○			②	4	A	—
13	製造用剤	150	E00161 D	分岐シクロデキストリン	○			○		R2 全項目		3	A	—
13	製造用剤	153	E00164	シン抽出物				○				4	A	—
13	製造用剤	158	E00169	焼成カルシウム								5	◇	A ☆
13	製造用剤/強化剤	158	E00170	うに殻焼成カルシウム	○				規格情報無	H27 全項目		2	A	—
13	製造用剤/強化剤	158	E00173	造礁サンゴ焼成カルシウム	○				規格情報無	H27 全項目		2	A	—
13	製造用剤/強化剤	158	E00174	乳清焼成カルシウム	○			○		H27 全項目	H25, 26, 27 全項目	3	A	—

表1 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況 その7

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号	規格名称	成分規格の整備状況 (○：対応済, ●：規格案作成済・課題あり, △：検討・対応中, ▲：規格案再検討, 暫：暫定規格, 除：削除した暫定規格)						課題の分類*1	規格の制定状況*2	流通の状況*3	規格及び流通の報告が無い品目*6	
					第10版成分規格案の作成	自主規格	参考事項	検証項目							
13	製造用剤	163	E00179	水素	作成済				規格情報無		第三者	自社	5	A	—
13	製造用剤	171	E00187	ゼイン					規格情報無	R2全項目			5	A	—
13	製造用剤	172	E00188	ゼオライト					規格情報無				5	B	○
13	製造用剤	174	E00190	セピオライト					規格情報無				5	B	○
13	製造用剤	179	E00195	ソバ柄灰抽出物					規格情報無				5	B	○
13	製造用剤	193	E00209	タンニン(抽出物)									5	◇	☆
13	製造用剤	193	E00210	柿タンニン				○					4	A	—
13	製造用剤	193	E00212	ミモザタンニン				○					4	B	—
13	製造用剤	195	E00214	窒素				○					4	A	—
13	製造用剤	196	E00215	チャ乾留物				○					4	A	—
13	製造用剤/強化剤	207	E00226	鉄				○					4	B	—
13	製造用剤	209	E00228	銅					規格情報無				5	B	○
13	製造用剤	222	E00241	トレハロース	○			○		H27全項目			3	A	—
13	製造用剤	226	E00245	ナフサ									5	B	○
13	製造用剤	232	E00251	ニッケル				○					4	A	—
13	製造用剤	234	E00253	ばい蕪コメヌカ抽出物						規格案再検討	H30全項目	H31全項目	4	B	—
13	製造用剤	235	E00254	ばい蕪ダイズ抽出物						規格案再検討	H30全項目	H31全項目	4	B	—
13	製造用剤	237	E00256	白金					規格情報無				5	B	○
13	製造用剤	241	E00260	パラジウム									5	B	○
13	製造用剤	244	E00263	ヒアロン酸	○			○			H28全項目		3	A	—
13	製造用剤	251	E00270	ひる石					規格情報無				5	B	○
13	製造用剤	257	E00276	フィチン(抽出物)	○			○		H30全項目			3	A	—

表1 既存添加物の成分規格の整備と流通の状況 その8

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号	規格名称	成分規格の整備状況						課題の分類*1	規格の制定状況*2	流通の状況*3	規格及び流通の報告が無い品目*6		
					第10版成分規格案の作成		参考事項	自主規格		検証項目						
					作成済	第5版自主規格と主規格として作成		第5版	第4版	第三者					自社	
13	製造用剤	260	E00280	ブタン		○						②	4	B	—	
13	製造用剤	269	E00289	プロパン		○						②	4	B	—	
13	製造用剤	290	E00310	ヘプタン	●	○			H26 全項目			②	3	A	—	
13	製造用剤	295	E00315	ヘリウム		○						②	4	B	—	
13	製造用剤	311	E00331	未焼成カルシウム		○							5	◇	A	—
13	製造用剤/強化剤	311	E00332	貝殻未焼成カルシウム	○	○			H27 全項目				4	A	—	
13	製造用剤/強化剤	311	E00333	骨未焼成カルシウム					規格情報無				5	B	○	
13	製造用剤/強化剤	311	E00335	真珠層未焼成カルシウム									5	B	○	
13	製造用剤/強化剤	311	E00336	卵殻未焼成カルシウム		○							4	A	—	
13	製造用剤	320	E00345	メバロン酸	○	○			H28 全項目				3	B	—	
13	製造用剤	324	E00349	木材チップ		○			規格情報無			③	4	B	—	
13	製造用剤	325	E00350	木炭		○						②	4	A	—	
13	製造用剤	327	E00352	木灰		○						③	4	B	—	
13	製造用剤	328	E00353	木灰抽出物		○						③	4	B	—	
13	製造用剤	346	E00370	リンターセルローズ					規格情報無				5	B	○	
13	製造用剤	349	E00376	ルテニウム		○							4	A	—	
14	香辛料抽出物	119	E00128	香辛料抽出物	○								2	A	—	
				成分規格数：163	58	11	102	79	52	65	27	19			39	

表中の記号について

*1 課題の分類

- ①：営業許可問題（食品衛生法第13条第1項の規定により規格が定められた時には自家消費分等について営業許可の問題がある。）（成分規格数：2）
- ②：食品衛生管理者問題（食品衛生法第13条第1項の規定により規格が定められた時には食品衛生管理者設置の問題がある。）（成分規格：12）
- ③：管理者営業許可両問題：（食品衛生法第13条第1項の規定により規格が定められた時には、食品衛生管理者設置の問題及び、自家消費分等について営業許可の問題がある。）（成分規格数：3）

■：上記いずれかの課題があると見込まれるもの（成分規格数：2）

*2 規格の制定状況

- 1：公定規格がある品目（成分規格）
- 2：公定規格案があるが，自主規格はない品目（成分規格）：6
- 3：公定規格案があり，自主規格もある品目（成分規格）：44
- 4：公定規格，公定規格案はないが，自主規格がある品目（成分規格）：58
- 5：規格がない品目（成分規格）：55
- ◇：大分類であり規格がないが，小分類の品目に公定規格，公定規格案または自主規格がある品目：6

*3 流通の状況

- A：生産量流通調査3回で報告がある，または技術委員会の調査により流通情報の取得できた品目（成分規格）：89
- ☆：Aのうち大分類であり流通実態は確認できないが，小分類の品目に流通実態のある品目（成分規格）：6
- B：生産量流通調査3回で報告がなく，技術委員会の調査でも流通情報が取得できなかった品目（成分規格）：74

- *6 規格がなく，流通の報告がない品目：39

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その1

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の 制定 状況 *2	確認 品目		流通 の 状況 *3	規格がなく、 流通の報告 がない 品目 *6	添加物原 体の使用実 態が確認で きた規格 *7
			全体	既存				統計 調査 *4	委員 会 *5			
1	甘味料	20	FA004800	E00020	Ｌ-アラビノース		1			A	—	○
1	甘味料	74	FA015600	E00079	カンゾウ抽出物	カンゾウ抽出物(粗製物)	1			A	—	○
1	甘味料	74	FA015700	E00079B	カンゾウ抽出物	カンゾウ抽出物(精製物)	1			A	—	○
1	甘味料	79	FA016600	E00084	D-キシロース		1			A	—	○
1	甘味料	106	FA019400	E00112	α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア	α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア	1			A	—	○
1	甘味料	106	FA019500	E00112B	α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア	α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア配糖体	1			A	—	○
1	甘味料	125	FA023000	E00133	酵素分解カンゾウ		1			B	—	○
1	甘味料	164	FA035200	E00180	ステビア抽出物	ステビア抽出物	1			A	—	○
1	甘味料	164	FA035300	E00180B	ステビア抽出物	ステビアオール配糖体	1			A	—	○
1	甘味料	165		E00181	ステビア末		5			B	○	
1	甘味料	183	FA036500	E00199	タウマチン		1			A	—	○
1	甘味料	264		E00284	ブラジルカンゾウ抽出物		4			B	—	
1	甘味料	332	FA062200	E00357	ラカンカ抽出物		1			A	—	○
1	甘味料	338	FA063300	E00363	Ｌ-ラムノース		1			A	—	○
1	甘味料	344	FA064400	E00368	D-リボース		1			A	—	
2	着色料	12	FA003400	E00012	アナト一色素	アナト一色素(ノルピキシン)	1			A	—	○
2	着色料	12	FA003500	E00012B	アナト一色素	アナト一色素(ピキシン)	1			A	—	○
2	着色料	24		E00024	アルミニウム		4			B	—	
2	着色料	34	FA008900	E00035	ウコン色素		1			A	—	○
2	着色料	46		E00048	オレンジ色素		4			B	—	
2	着色料	49	FA012600	E00051	カカオ色素		1			A	—	○
2	着色料	50	FA012650	E00052	カキ色素		1			A	—	○
2	着色料	64	FA014000	E00069	カラメルⅠ		1			A	—	○
2	着色料	65	FA014100	E00070	カラメルⅡ		1			A	—	○
2	着色料	66	FA014200	E00071	カラメルⅢ		1			A	—	○
2	着色料	67	FA014300	E00072	カラメルⅣ		1			A	—	○
2	着色料	71	FA015100	E00076	カロブ色素		1			A	—	○
2	着色料/ 製造用剤	87		E00093	金		3			A	—	○
2	着色料/ 製造用剤	88		E00094	銀		3			A	—	○
2	着色料	94	FA018100	E00100	クチナシ青色素		1			A	—	○
2	着色料	95	FA018200	E00101	クチナシ赤色素		1			A	—	○
2	着色料	96	FA018300	E00102	クチナシ黄色素		1			A	—	○
2	着色料	113		E00120	クロロフィリン		5			A	—	
2	着色料	114	FA021500	E00121	クロロフィル		1			A	—	○
2	着色料	129	FA023400	E00136	コウリヤン色素		1			A	—	○
2	着色料	130	FA023500	E00137	コチニール色素		1			A	—	○
2	着色料	154		E00165	シタン色素		3			B	—	
2	着色料	160		E00177	植物炭末色素		3			A	—	○
2	着色料	166	FA035400	E00182	スピルリナ色素		1			A	—	○
2	着色料	185	FA036700	E00201	タマネギ色素		1			A	—	○
2	着色料	186	FA036800	E00202	タマリンド色素		1			A	—	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その2

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の 制定 状況 *2		確認 品目		流通 の 状況 *3	規格がなく、 流通の報告 がない 品目 *6	添加物原 体の使用実 態が確認で きた規格 *7
			全体	既存			統計 調査 *4	委員 会 *5					
2	着色料	208	FA040100	E00227	デュナリエラカロ テン		1		○		A	—	○
2	着色料	210	FA040400	E00229	トウガラシ色素		1		○		A	—	○
2	着色料	217	FA041500	E00236	トマト色素		1		○		A	—	○
2	着色料	233	FA044300	E00252	ニンジンカロテ ン		1		○		A	—	○
2	着色料	239	FA044900	E00258	パーム油カロテ ン		1		○		A	—	○
2	着色料	248	FA047100	E00267	ビートレッド		1		○		A	—	○
2	着色料	253		E00272	ファフィア色素		3		○		A	—	○
2	着色料	261	FA051600	E00281	ブドウ果皮色素		1		○		A	—	○
2	着色料	276		E00295	ペカンナッツ色 素		4				B	—	○
2	着色料	284	FA055100	E00304	ベニコウジ黄色 素		1		○		A	—	○
2	着色料	285	FA055200	E00305	ベニコウジ色素		1		○		A	—	○
2	着色料	286	FA055300	E00306	ベニバナ赤色素		1		○		A	—	○
2	着色料	287	FA055400	E00307	ベニバナ黄色素		1		○		A	—	○
2	着色料	292	FA055800	E00312	ヘマトコッカス藻 色素		1		○		A	—	○
2	着色料	308	FA058700	E00328	マリーゴールド 色素		1		○		A	—	○
2	着色料	315	FA059400	E00340	ムラサキイモ色 素		1		○		A	—	○
2	着色料	316	FA059500	E00341	ムラサキトウモロ コシ色素		1		○		A	—	○
2	着色料	317		E00342	ムラサキヤマ イモ色素		4		○		A	—	○
2	着色料	335	FA063000	E00360	ラック色素		1		○		A	—	○
2	着色料	354		E00382	ログウッド色素		5				B	○	
3	製造用 剤/日持	63	FA013900	E00068	カラシ抽出物		1		○		A	—	○
3	保存料	73		E00078	カワラヨモギ抽 出物		3			○	A	—	○
3	製造用 剤/日持	111		E00117	グレープフルー ツ種子抽出物		5		○		A	—	
3	製造用 剤/日持	157		E00168	ショウガ抽出物		5		○		A	—	
3	製造用 剤/日持	162	FA033600	E00178	しらこたん白抽 出物		1		○		A	—	
3	製造用 剤/日持	170		E00186	セイヨウワサビ抽 出物		3		○		A	—	
3	保存料	201	FA038900	E00220	ツヤプリシン(抽 出物)		1			○	A	—	○
3	製造用 剤/日持	211		E00230	トウガラシ水性 抽出物		3		○		A	—	
3	製造用 剤/日持	262		E00282	ブドウ果皮抽出 物		4		○		A	—	
3	製造用 剤/日持	263	FA051700	E00283	ブドウ種子抽出 物		1		○		A	—	
3	製造用 剤/日持	280	FA054700	E00299	ペクチン分解物		1		○		A	—	
3	製造用 剤/日持	302	FA058100	E00322	ε-ポリリシン		1		○		A	—	
3	製造用 剤/日持	322		E00347	モウソウチク乾 留物		4		○		A	—	
3	製造用 剤/日持	323		E00348	モウソウチク抽 出物		4		○		A	—	
4	増粘安 定剤	1		E00001	アウレオバシジ ウム培養液(液 体品)		4			○	A	—	○
4	増粘安 定剤	1		E00001	アウレオバシジ ウム培養液(粉 末品)		5			○	A	—	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その3

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の 制定 状況 *2		確認 品目		流通 の 状況 *3	規格がなく、 流通の報告 がない 品目 *6	添加物原 体の使用実 態が確認で きた規格 *7
			全体	既存			統計 調査 *4	委員 会 *5					
4	増粘安定剤	4		E00004	アグロバクテリウムスクシノグリカン		3		○		A	—	○
4	増粘安定剤	13		E00013	アマシードガム		4		○		A	—	○
4	増粘安定剤	18	FA004700	E00018	アラビアガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	19		E00019	アラビノガラクトン		4			○	A	—	
4	増粘安定剤	22	FA005400	E00022	アルギン酸		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	33	FA008800	E00034	ウェランガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤/ガムベース	39		E00040	エレミ樹脂		3		○		A	—	○
4	増粘安定剤	52		E00054	カシアガム		4		○		A	—	○
4	増粘安定剤	56	FA013400	E00058	ガティガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	58	FA013500	E00060	カードラン		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	60		E00062	カラギナン		5	◇			A	☆	○
4	増粘安定剤	60	FA012700	E00063	加工ユーケマ藻類		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	60	FA035500	E00064	精製カラギナン		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	60		E00065	ユーケマ藻末		5				B	○	
4	増粘安定剤	68	FA014400	E00073	カラヤガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	72	FA015200	E00077	カロブピンガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	77	FA016200	E00082	キサンタンガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	81		E00086	キチン		4		○		A	—	○
4	増粘安定剤/製造用剤	83		E00088	キトサン		4		○		A	—	○
4	増粘安定剤	89	FA017000	E00095	グァーガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	90		E00096	グァーガム酵素分解物		3		○		A	—	○
4	増粘安定剤	102		E00108	グルコサミン		3		○		A	—	○
4	増粘安定剤	128	FA023300	E00135	酵母細胞壁		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	139	FA024400	E00147	サイリウムシードガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤/製造用剤	141		E00149	サバクヨモギシードガム		3		○		A	—	○
4	増粘安定剤	148	FA028000	E00159	ジェランガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	187	FA036900	E00203	タマリンドシードガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	188	FA037000	E00204	タラガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	206	FA039600	E00225	デキストラン		1		○		A	—	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その4

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の 制定状況 *2		確認 品目		流通 の 状況 *3	規格がなく、 流通の報告 がない 品目 *6	添加物原 体の使用実 態が確認で きた規格 *7
			全体	既存			統計 調査 *4	委員 会 *5					
4	増粘安定剤	218	FA041600	E00237	トラガントガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	224		E00243	トロアオイ		4		○		A	—	○
4	増粘安定剤	225	FA042900	E00244	納豆菌ガム		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	246	FA046500	E00265	微小繊維状セル ロース		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	252		E00271	ファーセララン		4		○		A	—	○
4	増粘安定剤	259	FA051100	E00279	フクロノリ抽出物		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	267	FA052400	E00287	プルラン		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	279	FA054600	E00298	ペクチン		1		○		A	—	○
4	増粘安定剤	304	FA058600	E00324	マクロホモプシス ガム		1				B	—	○
4	増粘安定剤	329		E00354	モモ樹脂		4			○	A	—	○
4	増粘安定剤	337	FA063200	E00362	ラムザンガム		1				B	—	○
5	酸化防止剤	31	FA008400	E00032	イノシトール		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	44	FA012000	E00045	γ-オリザノール		1				B	—	
5	酸化防止剤	57		E00059	カテキン		4		○		A	—	○
5	酸化防止剤/日持	75		E00080	カンゾウ油性抽出物		3		○		A	—	○
5	酸化防止剤	91		E00097	グアヤク脂		4				B	—	
5	酸化防止剤	93		E00099	クエルセチン		3		○		A	—	
5	酸化防止剤/日持	112		E00119	クローブ抽出物		4				B	—	○
5	酸化防止剤	120	FA022700	E00129	酵素処理イソク エルシトリン		1		○		A	—	
5	酸化防止剤	122	FA022800	E00131	酵素処理ヘスペ リジン		1		○		A	—	
5	酸化防止剤	123	FA022900	E00132	酵素処理ルチン (抽出物)		1		○		A	—	
5	酸化防止剤	126		E00134	酵素分解リンゴ 抽出物		5				B	○	
5	酸化防止剤	132		E00140	ゴマ油不けん化 物		4			○	A	—	○
5	酸化防止剤	136	FA024100	E00144	コメヌカ油抽出 物		1				B	—	
5	酸化防止剤	137		E00145	コメヌカ酵素分 解物		5				B	○	
5	酸化防止剤	145	FA027500	E00154	シアノコバラミン		1		○		A	—	
5	酸化防止剤	169		E00185	精油除去ウイキ ョウ抽出物		2			○	A	—	
5	酸化防止剤	173		E00189	セージ抽出物		5				B	○	
5	酸化防止剤	191		E00207	単糖・アミノ酸複 合物		4		○		A	—	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その5

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制定状況*2		確認品目		流通の状況*3	規格がなく、流通の報告がない品目*6	添加物原体の使用実態が確認できた規格*7
			全体	既存			統計調査*4	委員会*5					
5	酸化防止剤	197		E00216	チャ抽出物		3		○		A	—	○
5	酸化防止剤	213	FA040800	E00232	トコリエノール		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	214	FA040900	E00233	d- α -トコフェロール		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	215	FA041000	E00234	d- γ -トコフェロール		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	216	FA041100	E00235	d- δ -トコフェロール		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	227		E00246	生コーヒー豆抽出物		3		○		A	—	○
5	酸化防止剤	250		E00269	ヒマワリ種子抽出物		3		○		A	—	○
5	酸化防止剤	258	FA050700	E00278	フェルラ酸		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	270		E00290	プロポリス抽出物		5		○		A	—	○
5	酸化防止剤	282	FA054900	E00302	ヘスペリジン		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	299		E00319	没食子酸		3		○		A	—	○
5	酸化防止剤	312	FA059200	E00337	ミックストコフェロール		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	319	FA061500	E00344	メナキノン(抽出物)		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	321		E00346	メラロイカ精油		5				B	○	○
5	酸化防止剤	330	FA061900	E00355	ヤマモモ抽出物		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	347	FA068100	E00371	ルチン酵素分解物		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	348		E00372	ルチン(抽出物)		5	◇			A	☆	○
5	酸化防止剤	348	FA011500	E00373	エンジュ抽出物		1		○		A	—	○
5	酸化防止剤	348		E00374	アズキ全草抽出物		5				B	○	○
5	酸化防止剤	348		E00375	ソバ全草抽出物		5				B	○	○
5	酸化防止剤	357		E00385	ローズマリー抽出物		3		○		A	—	○
6	ガムベース/光沢剤	35		E00036	ウルシロウ		3		○		A	—	○
6	ガムベース	41		E00042	オゾケライト		4				B	—	○
6	ガムベース/光沢剤	69	FA014600	E00074	カルナウバロウ		1		○		A	—	○
6	ガムベース/光沢剤	76	FA015800	E00081	カンデリラロウ		1		○		A	—	○
6	ガムベース	92		E00098	グアヤク樹脂		4				B	—	○
6	ガムベース	97		E00103	グッタハンカン		4				B	—	○
6	ガムベース	98		E00104	グッタバルカ		4				B	—	○
6	ガムベース	134		E00142	ゴム		4			○	A	—	○
6	ガムベース	135		E00143	ゴム分解樹脂		5				B	○	○
6	ガムベース/光沢剤	138		E00146	コメヌカロウ		3		○		A	—	○
6	ガムベース/光沢剤	140		E00148	サトウキビロウ		3		○		A	—	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その6

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の 制定 状況 *2		確認 品目		流通 の 状況 *3	規格がなく、 流通の報告 がない 品目 *6	添添加物 原体の使用 実態が確認 できた規格 *7	
			全体	既存			統計 調査 *4	委員 会 *5						
6	ガムベース /光沢剤	146		E00155	シェラック		5	◇			A	☆	—	○
6	ガムベース /光沢剤	146	FA027800	E00156	白シェラック		1		○		A		—	○
6	ガムベース /光沢剤	146	FA027900	E00157	精製シェラック		1		○		A		—	○
6	ガムベース /光沢剤	147		E00158	シェラックロウ		3		○		A		—	○
6	ガムベース	149		E00160	ジェルトン		3		○		A		—	○
6	ガムベース	180		E00196	ソルバ		5				B		○	
6	ガムベース	181		E00197	ソルピンハ		5				B		○	
6	ガムベース /光沢剤	189	FA037100	E00205	タルク		1		○		A		—	○
6	ガムベース	194		E00213	チクル		3				B		—	○
6	ガムベース	198		E00217	チルテ		5				B		○	
6	ガムベース	200		E00219	ツヌー		5				B		○	
6	ガムベース	203		E00222	低分子ゴム		5				B		○	
6	ガムベース	230		E00249	ニガーグッタ		5				B		○	
6	ガムベース /光沢剤	242	FA045600	E00261	パラフィンワックス		1				B		—	
6	ガムベース	275		E00294	粉末モミガラ		5		○		A		—	
6	ガムベース	288		E00308	ペネズエラチクル		5				B		○	
6	ガムベース	300		E00320	ホホバロウ		4				B		—	
6	ガムベース /光沢剤	303	FA058500	E00323	マイクロクリスタリンワックス		1		○		A		—	○
6	ガムベース	305		E00325	マスチック		4				B		—	○
6	ガムベース	306		E00326	マッサランドバチヨコレート		5				B		○	
6	ガムベース	307		E00327	マッサランドババラタ		5				B		○	
6	ガムベース /光沢剤	313	FA059300	E00338	ミツロウ		1		○		A		—	○
6	ガムベース	314		E00339	ミルラ		3				B		—	○
6	ガムベース /光沢剤	326		E00351	モクロウ		3		○		A		—	○
6	ガムベース /光沢剤	336	FA063100	E00361	ラノリン		1				B		—	
6	ガムベース	351		E00378	レッチュデバカ		5				B		○	
6	ガムベース	355		E00383	ロシディンハ		5				B		○	
6	ガムベース	356		E00384	ロシン		3		○		A		—	○
7	酵素	2	FA000500	E00002	アガラーゼ		1		○		A		—	○
7	酵素	3	FA000600	E00003	アクチニジン		1			○	A		—	○
7	酵素	5	FA001000	E00005	アンラーゼ		1		○		A		—	○
7	酵素	6	FA001200	E00006	アスコルビン酸オキシダーゼ		1		○		A		—	○
7	酵素	10	FA002900	E00010	α-アセトラクタートデカルボキシラーゼ		1		○		A		—	○
7	酵素	14	FA003900	E00014	アミノペプチダーゼ		1		○		A		—	○
7	酵素	15	FA004000	E00015	α-アミラーゼ		1		○		A		—	○
7	酵素	16	FA004100	E00016	β-アミラーゼ		1		○		A		—	○
7	酵素	23	FA006000	E00023	アルギン酸リアーゼ		1		○		A		—	○
7	酵素	25	FA006300	E00025	アントシアナーゼ		1				B		—	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その7

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の 制定 状況 *2	確認 品目		流通 の 状況 *3	規格がなく、 流通の報告 がない 品目 *6	添加物原 体の使用実 態が確認で きた規格 *7
			全体	既存				統計 調査 *4	委員 会 *5			
7	酵素	26	FA007000	E00026	イソアミラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	28	FA008150	E00028	イソマルトデキストラナーゼ		1		○	A	—	○
7	酵素	30	FA008300	E00031	イヌリナーゼ		1		○	A	—	○
7	酵素	32	FA008700	E00033	インベルターゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	36	FA009100	E00037	ウレアーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	37	FA009300	E00038	エキソマルトテトラオキシドラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	38	FA009400	E00039	エステラーゼ		1		○	A	—	○
7	酵素	53	FA013100	E00055	カタラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	61	FA013700	E00066	α-ガラクトシダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	62	FA013800	E00067	β-ガラクトシダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	70	FA014700	E00075	カルボキシペプチダーゼ		1		○	A	—	○
7	酵素	78	FA016400	E00083	キシラナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	80	FA016700	E00085	キチナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	82	FA016800	E00087	キトサナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	100	FA018900	E00106	グルカナナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	101	FA019000	E00107	グルコアミラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	103	FA019100	E00109	α-グルコシダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	104	FA019200	E00110	β-グルコシダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	105	FA019300	E00111	α-グルコシルトランスフェラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	107	FA019600	E00113	グルコースイソメラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	108	FA019700	E00114	グルコースオキシダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	109	FA020600	E00115	グルタミナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	143	FA027100	E00151	酸性ホスファターゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	151	FA028400	E00162	シクロデキストリングルカトランスフェラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	176	FA035700	E00192	セルラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	192	FA038000	E00208	タンナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	202	FA039100	E00221	5'-デアミナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	205	FA039500	E00224	デキストラナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	219	FA041700	E00238	トランスグルコシダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	220	FA041800	E00239	トランスグルタミナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	221	FA041900	E00240	トリプシン		1	○		A	—	○
7	酵素	223	FA042600	E00242	トレハロースホスホリラーゼ		1		○	A	—	○
7	酵素	228	FA043100	E00247	ナリンジナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	236	FA044600	E00255	パーオキシダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	238	FA044800	E00257	パペイン		1	○		A	—	○
7	酵素	243	FA046000	E00262	パンクレアチン		1	○		A	—	○
7	酵素	255	FA049800	E00274	フィターゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	254	FA049700	E00273	フィシン		1			B	—	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その8

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の 制定 状況 *2	確認 品目		流通 の 状況 *3	規格がなく、 流通の報告 がない 品目 *6	添加物原 体の使用実 態が確認で きた規格 *7
			全体	既存				統計 調査 *4	委員 会 *5			
7	酵素	265	FA052100	E00285	フルクトシルトランスフェラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	266	FA052300	E00286	ブルラナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	268	FA052500	E00288	プロテアーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	271	FA053600	E00291	プロメライン		1	○		A	—	○
7	酵素	278	FA054500	E00297	ペクチナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	281	FA054800	E00301	ヘスペリジナーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	289	FA055500	E00309	ペプシン		1	○		A	—	○
7	酵素	291	FA055700	E00311	ペプチダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	293	FA055900	E00313	ヘミセルラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	297	FA056800	E00317	ホスホジエステラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	298	FA056900	E00318	ホスホリパーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	301	FA057900	E00321	ポリフェノールオキシダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	309	FA058800	E00329	マルトースホスホリラーゼ		1		○	A	—	○
7	酵素	310	FA058900	E00330	マルトトリオヒドロラーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	318	FA059600	E00343	ムラミダーゼ		1		○	A	—	○
7	酵素	333	FA062800	E00358	ラクトパーオキシダーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	341	FA064000	E00365	リゾチーム		1	○		A	—	○
7	酵素	342	FA064200	E00366	リパーゼ		1	○		A	—	○
7	酵素	343	FA064300	E00367	リポキシゲナーゼ		1		○	A	—	○
7	酵素	352	FA068300	E00380	レンネット		1	○		A	—	○
8	酸味料	256	FA049900	E00275	フィチン酸	フィチン酸 (液体)	1	○		A	—	○
8	酸味料	256	FA050000	E00275B	フィチン酸	フィチン酸 (粉末)	1				—	○
9	調味料/ 強化剤	7	FA001800	E00007	L-アスパラギン		1			B	—	
9	調味料/ 強化剤	8	FA001900	E00008	L-アスパラギン酸		1	○		A	—	
9	調味料/ 強化剤	17	FA004500	E00017	L-アラニン		1	○		A	—	○
9	調味料/ 強化剤	17	FA004600	E00017B	L-アラニン	L-アラニン 液	1				—	
9	調味料/ 強化剤	21	FA005200	E00021	L-アルギニン		1	○		A	—	○
9	苦味料 等	27	FA007150	E00027	イソアルファー 苦味酸		1	○		A	—	○
9	調味料	40		E00041	塩水湖水低塩 化ナトリウム液		3	○		A	—	○
9	苦味料 等	59	FA013600	E00061	カフェイン(抽出 物)		1	○		A	—	○
9	苦味料 等	84		E00089	キナ抽出物		5			B	○	
9	苦味料 等	85		E00090	キハダ抽出物		5			B	○	
9	調味料/ 強化剤	110	FA020800	E00116	L-グルタミン		1	○		A	—	○
9	苦味料 等	117		E00126	ゲンチアナ抽出 物		3	○		A	—	○
9	苦味料 等	121		E00130	酵素処理ナリン ジン		4	○		A	—	○
9	調味料/ 強化剤	152	FA028600	E00163	L-シスチン		1	○		A	—	○
9	苦味料 等	156		E00167	ジャマイカカッ ア抽出物		3	○		A	—	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その9

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制定状況*2		確認品目		流通の状況*3	規格がなく、流通の報告がない品目*6	添加物原体の使用実態が確認できた規格*7
			全体	既存			統計調査*4	委員会*5					
9	調味料/強化剤	175	FA035600	E00191	Ｌ－セリン		1		○		A	－	○
9	調味料	177		E00193	粗製海水塩化カリウム		3		○		A	－	○
9	調味料/強化剤	184	FA036600	E00200	タウリン(抽出物)		1		○		A	－	○
9	調味料/強化剤	199	FA038800	E00218	Ｌ－チロシン		1		○		A	－	○
9	苦味料等	204		E00223	テオブロミン		5				B	○	
9	調味料/苦味料	229	FA043200	E00248	ナリンジン		1		○		A	－	○
9	苦味料等	231		E00250	ニガヨモギ抽出物		4				B	－	
9	調味料/強化剤	247	FA046600	E00266	Ｌ－ヒスチジン		1		○		A	－	○
9	調味料/強化剤	249	FA047800	E00268	Ｌ－ヒドロキシプロリン		1				B	－	
9	調味料/強化剤	272	FA053700	E00292	Ｌ－プロリン	Ｌ－プロリン	1		○		A	－	○
9	調味料/強化剤	272	FA053800	E00292B	Ｌ－プロリン	Ｌ－プロリン液	1						
9	調味料	283	FA055000	E00303	ベタイン		1		○		A	－	○
9	調味料/強化剤	340	FA063500	E00364	Ｌ－リシン	Ｌ－リシン	1		○		A	－	
9	調味料/強化剤	340	FA063600	E00364B	Ｌ－リシン	Ｌ－リシン液	1						
9	苦味料等	350		E00377	レイシ抽出物	2020年8月意見募集	3		○		A	－	○
9	調味料/強化剤	353	FA068400	E00381	Ｌ－ロイシン		1		○		A	－	○
10	乳化剤	86	FA016900	E00092	キラヤ抽出物		1		○		A	－	○
10	乳化剤	124		E00386	酵素処理レシチン		3				B	－	○
10	乳化剤	127	FA023100	E00387	酵素分解レシチン		1		○		A	－	○
10	乳化剤	159	FA031200	E00176	植物性ステロール	植物性ステロール(遊離体高濃度品)	1		○		A	－	○
10	乳化剤	159	FA031300	E00176B	植物性ステロール	植物性ステロール(遊離体低濃度品)	1						
10	乳化剤	161	FA068200	E00388	植物レシチン		1		○		A	－	○
10	乳化剤	167		E00183	スフィンゴ脂質		4				B	－	○
10	乳化剤	182		E00198	ダイズサポニン		4		○		A	－	
10	乳化剤	190		E00206	胆汁末		4				B	－	
10	乳化剤	212	FA040700	E00231	動物性ステロール		1		○		A	－	
10	乳化剤	273	FA068200	E00389	分別レシチン		1		○		A	－	○
10	乳化剤	331	FA062000	E00356	ユッカフォーム抽出物		1		○		A	－	○
10	乳化剤	339	FA068200	E00390	卵黄レシチン		1				B	－	
13	製造用剤	9		E00009	アスペルギルステレウス糖たん白質		3		○		A	－	○
13	製造用剤	11	FA003200	E00011	5'-アデニル酸		1		○		A	－	○
13	製造用剤	29		E00030	イナワラ灰抽出物		5				B	○	
13	製造用剤	42		E00043	オゾン		4				B	－	○
13	製造用剤	42		E00043	オゾン水		4				B	－	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その10

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の 制定状況 *2		確認 品目		流通 の 状況 *3	規格がなく、 流通の報告 がない 品目 *6	添加物原 体の使用実 態が確認で きた規格 *7
			全体	既存			統計調査 *4	委員会 *5					
13	製造用 剤	43		E00044	オリゴガラクチュ ロン酸		5				B	○	○
13	製造用 剤	45		E00047	オレガノ抽出物		5		○		A	—	
13	製造用 剤	47		E00049	海藻灰抽出物		4		○		A	—	
13	製造用 剤	48	FA012500	E00050	カオリン		1				B	—	○
13	製造用 剤	51		E00053	花こう斑岩		4				B	—	○
13	製造用 剤	54	FA013200	E00056	活性炭		1		○		A	—	○
13	製造用 剤	55	FA013300	E00057	活性白土		1		○		A	—	○
13	製造用 剤	99		E00105	クリストバル石		5				B	○	○
13	製造用 剤	115		E00122	くん液		3		○		A	—	○
13	製造用 剤	115		E00123	木酢液		2				B	—	
13	製造用 剤	115		E00124	リキッドスモー ク		2				B	—	
13	製造用 剤	116	FA021800	E00125	ケイソウ土		1		○		A	—	
13	製造用 剤	118		E00127	高級脂肪酸		5		○		A	—	○
13	製造用 剤	118	FA022310	E00127A	高級脂肪酸 高級脂肪酸 (カプリル酸)	1		—				○	
13	製造用 剤	118	FA022320	E00127B	高級脂肪酸 高級脂肪酸 (カプリン酸)	1		—				○	
13	製造用 剤	118	FA022330	E00127C	高級脂肪酸 高級脂肪酸 (ステアリン 酸)	1		—				○	
13	製造用 剤	118	FA022340	E00127D	高級脂肪酸 高級脂肪酸 (パルミチン 酸)	1		—				○	
13	製造用 剤	118	FA022350	E00127E	高級脂肪酸 高級脂肪酸 (ベヘニン 酸)	1		—				○	
13	製造用 剤	118	FA022360	E00127F	高級脂肪酸 高級脂肪酸 (ミスチン 酸)	1		—				○	
13	製造用 剤	118	FA022370	E00127G	高級脂肪酸 高級脂肪酸 (ラウリル酸)	1		—				○	
13	製造用 剤	131	FA023700	E00138	骨炭		1		○		A	—	
13	製造用 剤	133		E00141	ゴマ柄灰抽出物		5				B	○	○
13	製造用 剤	142	FA027000	E00150	酸性白土		1		○		A	—	○
13	製造用 剤	144		E00152	酸素		4		○		A	—	
13	製造用 剤	150	FA028100	E00161	シクロデキストリ ン	α-シクロデ キストリン	1		○		A	—	○
13	製造用 剤	150	FA028200	E00161B	シクロデキストリ ン	β-シクロデ キストリン	1					—	○
13	製造用 剤	150	FA028300	E00161C	シクロデキストリ ン	γ-シクロデ キストリン	1					—	○
13	製造用 剤	150		E00161D	シクロデキストリ ン	分岐シクロデ キストリン	3					—	○

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その11

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制定状況*2		確認品目		流通の状況*3	規格がなく、流通の報告がない品目*6	添加物原体の使用実態が確認できた規格*7	
			全体	既存			統計調査*4	委員会*5						
13	製造用剤	153		E00164	シソ抽出物		4		○		A	—		
13	製造用剤	155	FA028800	E00166	5'-シチジル酸		1		○		A	—		
13	製造用剤	158		E00169	焼成カルシウム		5	◇			A	☆	—	○
13	製造用剤/強化剤	158		E00170	うに殻焼成カルシウム		2			○	A	—	○	
13	製造用剤/強化剤	158	FA012400	E00171	貝殻焼成カルシウム		1		○		A	—	○	
13	製造用剤/強化剤	158	FA023600	E00172	骨焼成カルシウム		1		○		A	—	○	
13	製造用剤/強化剤	158		E00173	造礁サンゴ焼成カルシウム		2		○		A	—	○	
13	製造用剤/強化剤	158		E00174	乳清焼成カルシウム		3		○		A	—	○	
13	製造用剤	158	FA063400	E00175	卵殻焼成カルシウム		1		○		A	—	○	
13	製造用剤	163		E00179	水素		5		○		A	—	○	
13	製造用剤	168	FA035550	E00184	生石灰		1		○		A	—	○	
13	製造用剤	171		E00187	ゼイン		5		○		A	—	○	
13	製造用剤	172		E00188	ゼオライト		5				B	○	○	
13	製造用剤	174		E00190	セピオライト		5				B	○		
13	製造用剤	178	FA035800	E00194	粗製海水塩化マグネシウム		1		○		A	—	○	
13	製造用剤	179		E00195	ソバ柄灰抽出物		5				B	○	○	
13	製造用剤	193		E00209	タンニン(抽出物)		5	◇			A	☆	—	○
13	製造用剤	193		E00210	柿タンニン		4		○		A	—		
13	製造用剤	193	FA031400	E00211	植物タンニン		1		○		A	—		
13	製造用剤	193		E00212	ミモザタンニン		4				B	—		
13	製造用剤	195		E00214	窒素		4		○		A	—		
13	製造用剤	196		E00215	チャ乾留物		4		○		A	—	○	
13	製造用剤/強化剤	207		E00226	鉄		4				B	—		
13	製造用剤	209		E00228	銅		5				B	○		
13	製造用剤	222		E00241	トレハロース		3		○		A	—	○	
13	製造用剤	226		E00245	ナフサ		5				B	○		
13	製造用剤	232		E00251	ニッケル		4		○		A	—		
13	製造用剤	234		E00253	ばい煎コメスカ抽出物		4				B	—	○	

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その12

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の 制定状況 *2		確認 品目		流通 の 状況 *3	規格がなく、 流通の報告 がない 品目 *6	添加物原 体の使用実 態が確認で きた規格 *7	
			全体	既存			統計調査 *4	委員会 *5						
13	製造用 剤	235		E00254	ばい煎ダイズ抽出物		4				B	—	○	
13	製造用 剤	237		E00256	白金		5				B	○		
13	製造用 剤	240	FA045000	E00259	パーライト		1		○		A	—	○	
13	製造用 剤	241		E00260	パラジウム		5				B	○		
13	製造用 剤	244		E00263	ヒアルロン酸		3		○		A	—	○	
13	製造用 剤	245	FA046400	E00264	微結晶セルロース		1		○		A	—	○	
13	製造用 剤	251		E00270	ひる石		5				B	○		
13	製造用 剤	257		E00276	フィチン(抽出物)		3		○		A	—	○	
13	製造用 剤	260		E00280	ブタン		4				B	—		
13	製造用 剤	269		E00289	プロパン		4				B	—		
13	製造用 剤	274	FA053900	E00293	粉末セルロース		1		○		A	—		
13	製造用 剤	277	FA054100	E00296	ヘキササン		1		○		A	—	○	
13	製造用 剤	290		E00310	ヘプタン		3			○	A	—		
13	製造用 剤	294	FA056000	E00314	ヘム鉄		1		○		A	—	○	
13	製造用 剤	295		E00315	ヘリウム		4				B	—		
13	製造用 剤	296	FA056700	E00316	ベントナイト		1		○		A	—		
13	製造用 剤	311		E00331	未焼成カルシウム		5	◇			A	☆	—	○
13	製造用剤/ 強化剤	311		E00332	貝殻未焼成カルシウム		4		○		A	—	○	
13	製造用剤/ 強化剤	311		E00333	骨未焼成カルシウム		5				B	○	○	
13	製造用剤/ 強化剤	311	FA026900	E00334	サンゴ未焼成カルシウム		1		○		A	—	○	
13	製造用剤/ 強化剤	311		E00335	真珠層未焼成カルシウム		5				B	○	○	
13	製造用剤/ 強化剤	311		E00336	卵殻未焼成カルシウム		4		○		A	—	○	
13	製造用 剤	320		E00345	メバロン酸		3				B	—	○	
13	製造用 剤	324		E00349	木材チップ		4				B	—		
13	製造用 剤	325		E00350	木炭		4		○		A	—		
13	製造用 剤	327		E00352	木灰		4				B	—		
13	製造用 剤	328		E00353	木灰抽出物		4				B	—		
13	製造用 剤	334	FA062900	E00359	ラクトフェリン濃縮物		1		○		A	—	○	
13	製造用 剤	345	FA066100	E00369	流動パラフィン		1		○		A	—	○	

表2 既存添加物の流通実態及び使用実態の調査結果 その13

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制定状況*2		確認品目		流通の状況*3	規格がなく、流通の報告がない品目*6	添加物原体の使用実態が確認できた規格*7
			全体	既存			統計調査*4	委員会*5					
13	製造用剤	346		E00370	リンターセルローズ		5				B	○	
13	製造用剤	349		E00376	ルテニウム		4			○	A	—	○
14	香辛料抽出物	119		E00128	香辛料抽出物		2		○		A	—	○
												39	295

表中の記号について

*2 規格の制定状況

- 1：公定規格がある品目（成分規格数）：239
- 2：公定規格案があるが、自主規格はない品目（成分規格数）：6
- 3：公定規格案があり、自主規格もある品目（成分規格数）：44
- 4：公定規格、公定規格案はないが、自主規格がある品目（成分規格数）：58
- 5：規格がない品目（成分規格）：55
- ◇：大分類であり規格がないが、小分類の品目に公定規格、公定規格案または自主規格がある品目（成分規格数）：6

*3 流通の状況

- A：生産量流通調査3回で報告がある、または技術委員会の調査により流通情報の取得できた品目：279（成分規格数：296）
- ☆：Aのうち大分類であり流通実態は確認できないが、小分類の品目に流通実態のある品目（成分規格数）：6
- B：生産量流通調査3回で報告がなく、技術委員会の調査でも流通情報が取得できなかった品目：78（成分規格数：87）
（流通実態が把握できていない小分類の成分規格数）：19）

*4 確認品目－統計調査：生産量統計調査による確認品目（成分規格数）：269

*5 確認品目－委員会：技術委員会の調査による確認品目（成分規格数）：21

*6 規格がなく、流通の報告がない品目：39

*7 添加物原体の使用実態が確認できた規格：259（成分規格数：290）

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その1

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目	安全性評価報告*8	海外評価機関*9				調査日	
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	FSANZ		
1	7	酵素	2	FA000500	E00002	アガラーゼ	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30	
2	7	酵素	3	FA000600	E00003	アクチニジン	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30	
3	7	酵素	6	FA001200	E00006	アスコルビン酸オキシダーゼ	H8 基	○ Safety evaluation of the food enzyme l-ascorbate oxidase from Cucurbita pepo L. and Cucurbita moschata Duchesne	-	-	-	-	
4	7	酵素	10	FA002900	E00010	α-アセトラクタートデカルボキシラーゼ	H8 基 H30	△ Safety evaluation of the food enzyme acetolactate decarboxylase from a genetically modified Bacillus licheniformis (strain NZYM-JB) 当該遺伝子組み換え酵素は安全性の懸念なし	-	-	ALPHA-ACETOLACTATE DECARBOXYLASE ENZYME PREPARATION FROM BACILLUS SUBTILIS RECOMBINANT 21CFR173.115	-	2021/7/30
5	4	増粘安定剤	19		E00019	アラビノガラクトン	H8 基 R1	-	-	△ GRN No. 84 Arabinogalactan from Eastern Larch (Larix laricina) GRN No. 47 Arabinogalactan from Larix occidentalis	-	2021/7/30	
6	1	甘味料	20	FA004800	E00020	L-アラビノース	H8 基 R1	-	-	○ GRN No. 782 L-arabinose	-	2021/7/30	

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その2

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関*9				調査日
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	FSANZA	
7	7	酵素	23	FA006000	E00023	アルギン酸リ アーゼ	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
8	7	酵素	25	FA006300	E00025	アントシアナ ーゼ	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
9	7	酵素	28	FA008150	E00028	イノマルトデキ ストラナーゼ	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
10	13	製造 用剤	29		E00030	イナフラ灰抽 出物	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
11	7	酵素	30	FA008300	E00031	イヌリナーゼ	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
12	4	増粘 安定 剤	33	FA008800	E00034	ウエランガム	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
13	7	酵素	37	FA009300	E00038	エキソマルトト トラオヒドロラ ーゼ	H8 基 H30	-	-	-	-	2021/7/30
14	9	調味 料	40		E00041	塩水湖水低塩 化ナトリウム液	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
15	13	製造 用剤	43		E00044	オリゴガラクチ ュロン酸	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
16	13	製造 用剤	47		E00049	海藻灰抽出物	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
17	13	製造 用剤	51		E00053	花こう斑岩	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
18	13	製造 用剤	55	FA013300	E00057	活性白土	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
19	1	甘味 料	79	FA016600	E00084	D-キシロース	H8 基 R1	-	-	-	FEMA GRAS (No.3606)	2021/7/30

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その3

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関*9				調査日
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	FSANZ	
20	7	酵素	80	FA016700	E00085	キチナーゼ	H8 基	△ Safety evaluation of the food enzyme chitinase from <i>Streptomyces violaceoruber</i> (strain pChi) パネルは結論できず	-	-	-	2021/7/30
21	7	酵素	82	FA016800	E00087	キトサナーゼ	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
22	9	苦味料等	84		E00089	キノ抽出物	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
23	9	苦味料等	85		E00090	キノダ抽出物	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
24	6	カラムース	98		E00104	グッタペルカ	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30
25	7	酵素	103	FA019100	E00109	α-グルコシダーゼ	H8 基 H30	-	-	△ GRN No. 703 Alpha-glucosidase from <i>Aspergillus niger</i> produced by <i>Trichoderma reesei</i>	-	2021/7/30
26	7	酵素	104	FA019200	E00110	β-グルコシダーゼ	H8 基	-	-	△ GRN No. 750 Beta-glucosidase from <i>Aspergillus niger</i>	-	2021/7/30

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その4

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関*9				調査日
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	FSANZA	
27	7	酵素	105	FA019300	E00111	α-グルコシルトランスフェラーゼ	H8基 H30	△	-	-	-	2021/7/30
							<ul style="list-style-type: none"> • Safety evaluation of the food enzyme α-amylase and 1,4-α-glucan 6-α-glucosyltransferase from Paenibacillus alginolyticus • Safety evaluation of the food enzyme alternansucrase from Leuconostoc citreum strain NRRL B-30894 • Safety evaluation of the food enzyme cyclomaltodextrin glucanotransferase from Paenibacillus illinoisensis strain 107 • Safety evaluation of the food enzyme 4-α-glucanotransferase from Aeribacillus pallidus (strain AE-SAS) 安全上の懸念なし	△	-	-	-	2021/7/30
28	2	着色料	113		E00120	クロロフィリン	H8基	△	-	-	-	2021/7/30
							Scientific Opinion on re-evaluation of chlorophyllins (E 140(ii)) as food additives. ただし、結論は食品添加物として安全性を評価できないとしているため	△	-	-	-	2021/7/30

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その5

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関*9				調査日
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	FSANZA	
29	13	製造用剤	116	FA021800	E00125	ケイソウ土	H8基 H30	-	-	△ GRN No. 87 Composite filtration media (diatomaceous earth and perlite)Composite filtration media (diatomaceous earth and perlite) Perlite との混合物	-	2021/7/30
30	9	苦味料等	117		E00126	ゲンチアナ抽出物	H8基 R1	-	-	FEMA GRAS (No.2506)	-	2021/7/30
31	9	苦味料等	121		E00130	酵素処理ナリジン	H8基	-	-	-	-	2021/7/30
32	5	酸化防止剤	122	FA022800	E00131	酵素処理ヘスペリジン	H8基 R1	-	-	○ GRN No. 901 Glucosyl hesperidin	-	2021/7/30
33	5	酸化防止剤	123	FA022900	E00132	酵素処理ルチン(抽出物)	H8基	-	-	-	-	2021/7/30
34	10	乳化剤	124		E00386	酵素処理レシチン	H8基 R1	-	-	21CFR184.1063	-	2021/7/30
35	1	甘味料	125	FA023000	E00133	酵素分解カンソウ	H8基	-	-	-	-	2021/7/30
36	5	酸化防止剤	126		E00134	酵素分解リンゴ抽出物	H8基	-	-	-	-	2021/7/30
37	13	製造用剤	131	FA023700	E00138	骨炭	H8基 R1	-	-	-	-	2021/7/30
38	13	製造用剤	133		E00141	ゴマ柄灰抽出物	H8基	-	-	-	-	2021/7/30
39	6	ガムベース・光沢剤	140		E00148	サトウキビロウ	H8基	-	-	-	-	2021/7/30

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その6

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関*9				調査日	
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	FSANZA		
40	7	酵素	143	FA027100	E00151	酸性ホスファターゼ	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30	
41	10	乳化剤	159	FA031200	E00176	植物性ステロール	H8 基 H30	△ •Scientific Opinion on the safety of stigmastanol-rich plant sterols as food additive •Safety of the extension of use of plant sterol esters as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283	-	○ GRN No. 492 Phytosterols and phytosterol esters GRN No. 387 Plant-derived esterified and non-esterified sterols and stanols (phytosterols) GRN No. 250 Plant sterols and stanols from pine trees GRN No. 181 Phytosterols GRN No. 176 Plant sterols and plant sterol esters from vegetable oils or sterols/stanols from tall oil GRN No. 112 Phytosterols GRN No. 61 Plant sterols/Plant sterol esters	-	-	2021/7/30
42	13	製造用剤	174		E00190	セピオライト	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30	
43	9	調味料	177		E00193	粗製海水塩化カリウム	H8 基 H30	-	-	-	-	2021/7/30	
44	13	製造用剤	178	FA035800	E00194	粗製海水塩化マグネシウム	H8 基 H30	-	-	-	-	2021/7/30	
45	13	製造用剤	179		E00195	ソバ柄灰抽出物	H8 基	-	-	-	-	2021/7/30	
46	5	酸化防止剤	191		E00207	単糖・アミノ酸複合物	H8 基 R1	-	-	-	-	2021/7/30	

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その7

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関*9				調査日	
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	FSANZA		
47	7	酵素	192	FA038000	E00208	タンナーゼ	H8基	-	-	-	-	2021/7/30	
48	4	増粘安定剤	206	FA039600	E00225	デキストラン	H8基	-	-	21CFR186.1275	-	2021/7/30	
49	10	乳化剤	212	FA040700	E00231	動物性ステロール	H8基	-	-	-	-	2021/7/30	
50	7	酵素	223	FA042600	E00242	トレハロースホスホリラーゼ	H8基	-	-	-	-	2021/7/30	
51	7	酵素	228	FA043100	E00247	ナリンジナーゼ	H8基	-	-	-	-	2021/7/30	
52	13	製造用剤	240	FA045000	E00259	パーライト	H8基 R1	-	-	△ GRN No. 87 Composite filtration media (diatomaceous earth and perlite) Composite filtration media (diatomaceous earth and perlite) diatomaceous earth との混合物	-	2021/7/30	
53	4	増粘安定剤	246	FA046500	E00265	微小繊維状セルローズ(微結晶セルローズ)	H8基	○ •Re-evaluation of celluloses E 460(i) , E 460(ii), E 461, E 462, E 463, E 464, E 465, E 466, E 468 and E 469 as food additives •Safety of the proposed amendment of the specifications for microcrystalline cellulose (E 460(i)) as a food additive	-	-	△ GRN No. 487 Dried citrus pulp GRN No. 163 Tomato pulp powder GRN No. 154 Dried orange pulp	-	2021/7/30

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その8

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関*9			調査日
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	
54	9	調味料・強化剤	249	FA047800	E00268	L-ヒドロキシプロリン	H8 基	-	-	-	2021/8/2
55	13	製造用剤	251		E00270	ひる石	H8 基	-	-	-	2021/8/2
56	13	製造用剤	257		E00276	フィチン(抽出物)	H8 基 R1	-	-	-	2021/8/2
57	1	甘味料	264		E00284	ブラジルカンソウ抽出物	H8 基	-	-	-	2021/8/2
58	7	酵素	265	FA052100	E00285	フルクトシルトランスフェラーゼ	H8 基	-	-	-	2021/8/2
59	6	ガムベース	275		E00294	粉末モミガラ	H8 基	-	-	-	2021/8/2
60	3	製造用剤/日持	280	FA054700	E00299	ペクチン分解物	H8 基	-	-	△ GRN No. 972 Pectin hydrolysate from carrot pomace FDA 評価ペンデイング	2021/8/2
61	7	酵素	301	FA057900	E00321	ポリフェノールオキシダーゼ	H8 基 H30	-	-	-	2021/8/2
62	7	酵素	309	FA058800	E00329	マルトースホスホリアーゼ	H8 基	-	-	-	2021/8/2
63	7	酵素	310	FA058900	E00330	マルトトリオヒドロラーゼ	H8 基	-	-	-	2021/8/2
64	7	酵素	318	FA059600	E00343	ムラミダーゼ	H8 基 H30	△ Lysozyme の報告はあるが、Muramidaseとしての掲載はなかった。	-	△ Lysozyme の報告はあるが、Muramidaseとしての掲載はなかった。	2021/8/2

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その9

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関 *9				調査日	
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	FSANZA		
65	5	酸化防止剤	321		E00346	メロロイカ精油	H8 基	-	-	-	-	2021/8/2	
66	3	製造用剤/日持	322		E00347	モウソウチク乾留物	H8 基	-	-	-	-	2021/8/2	
67	13	製造用剤	324		E00349	木材チップ	H8 基	△ Update of the risk assessment of 'wood flour and fibres, untreated' (FCM No 96) for use in food contact materials, and criteria for future applications of materials from plant origin as additives for plastic food contact materials	-	-	-	-	2021/8/2
68	13	製造用剤	327		E00352	木灰	H8 基	-	-	-	-	-	2021/8/2
69	13	製造用剤	328		E00353	木灰抽出物	H8 基	-	-	-	-	-	2021/8/2

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その10

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関*9			調査日		
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA		FSANZA	
70	7	酵素	333	FA062800	E00358	ラクトパーオキシシダーゼ	H8 基 H30	-	△ LACTOPEROXIDASE/ E/ THIOCYANATE/ HYDROGEN PEROXIDE SYSTEM FOR MILK PRESERVATION PEROXYACID ANTIMICROBIAL SOLUTIONS CONTAINING 1- HYDROXYETHYLID ENE-1,1- DIPHOSPHONIC ACID (HEDP) AND THREE OR MORE OF THE FOLLOWING COMPONENTS: PEROXACETIC ACID, ACETIC ACID, HYDROGEN PEROXIDE, OCTANOIC ACID AND PEROXYOCTANOIC ACID (2004) 混合物 の評価のため	△ GRN No. 665 Lactoperoxidase system GRN No. 612 Fractionated whey protein isolate containing cows milk derived lactoferrin, lactoperoxidase, and transforming growth factor β 2 FDA 評価中止			2021/8/2
71	4	増粘安定剤	337	FA063200	E00362	ラムザンガム	H8 基 R1	-	-	-	-	-	2021/8/2
72	1	甘味料	338	FA063300	E00363	ラーラムノース	H8 基 R1	-	-	-	-	-	2021/8/2
73	7	酵素	343	FA064300	E00367	リボキシシダーゼ	H8 基	-	-	-	-	-	2021/8/2

表3-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果 その11

No.	部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性評価報告*8	海外評価機関*9				調査日
				全体コード	既存コード			EFSA	JECFA	FDA	FSANZ/A	
74	13	製造用剤	346		E00370	リンターセルロース	H8 基	-	△ Re-evaluation of celluloses E 460(i), E 460(ii), E 461, E 462, E 463, E 464, E 465, E 466, E 468 and E 469 as food additives	-	-	2021/8/2
75	13	製造用剤	349		E00376	ルテニウム	H8 基	-	-	-	-	2021/8/2
76	3	製造用剤/日持	111		E00117	グレープフルーツ種子抽出物	-	-	-	-	-	2021/9/22
77	6	ガムベース	314		E00339	ミルラ	-	-	-	21CFR172.510	-	2021/9/22

* 8 安全性評価報告

H○：確認された年度

H8 基：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ものと分類された品目

* 9 海外評価機関の報告

○：安全性評価報告のあるもの

－：安全性評価の報告がないもの

△：関連はあり安全性評価の報告はあるが直接的ではないもの

□：安全性データなく物理データのみのもの

記号無：記載があるが安全性に言及していないもの

表3-2 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性報告の取組先リンク その1

部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性報告の取組先リンク
			全体コード	既存コード		
7	酵素	6	FA001200	E00006	アスコルビン酸オキシダーゼ	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2019.5740
7	酵素	10	FA002900	E00010	α-アセトラクタートデカルボキシラーゼ	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5476
4	増粘安定剤	19		E00019	アラビノガラクトサン	http://wayback.archive-it.org/7993/20171031053519/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM266729.pdf http://wayback.archive-it.org/7993/20171031054221/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM266200.pdf
1	甘味料	20	FA004800	E00020	L-アラビノース	https://www.fda.gov/media/131846/download
7	酵素	80	FA016700	E00085	キチナーゼ	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5767
7	酵素	103	FA019100	E00109	α-グルコシダーゼ	https://www.fda.gov/media/109107/download
7	酵素	104	FA019200	E00110	β-グルコシダーゼ	https://www.fda.gov/media/117181/download https://www.fda.gov/media/117430/download https://www.fda.gov/media/117432/download
7	酵素	105	FA019300	E00111	α-グルコシトランスフェラーゼ	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5683
13	製造用剤	116	FA021800	E00125	ケインウス	http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055900/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM261673.pdf
5	酸化防止剤	122	FA022800	E00131	酵素処理ヘスペリジン	https://www.fda.gov/media/139254/download https://www.fda.gov/media/143884/download

表3-2 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果－安全性報告の掲載先リンク その2

部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性報告の掲載先リンク
			全体コード	既存コード		
10	乳化剤	159	FA031200	E00176	植物性ステロール	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2659
						https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2020.6135
						http://wayback.archive-it.org/7993/20171031035516/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM386798.pdf
						http://wayback.archive-it.org/7993/20171031045219/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM277195.pdf
						http://wayback.archive-it.org/7993/20171031051627/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM269134.pdf
						http://wayback.archive-it.org/7993/20171031052251/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM268976.pdf
						http://wayback.archive-it.org/7993/20171031052334/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM268878.pdf
						http://wayback.archive-it.org/7993/20171031060224/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM261014.pdf
						http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055900/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM261673.pdf
						13

表3-2 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性報告の調査結果－安全性報告の収載先リンク その3

部会	用途分類	既存添加物番号	整理番号		品目名称	安全性報告の収載先リンク
			全体コード	既存コード		
4	増粘安定剤	246	FA046500	E00265	微小繊維状セルロース (微結晶セルロース)	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5047 http://wayback.archive-it.org/7993/20171031042700/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM381225.pdf http://wayback.archive-it.org/7993/20171031052540/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM268845.pdf http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055446/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM264056.pdf
3	製造用剤/日持	280	FA054700	E00299	ペクチン分解物	https://www.fda.gov/media/150549/download
13	製造用剤	324		E00349	木材チップ	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5902 http://www.fao.org/documents/card/en/c/6918e7d3-ed6c-5769-8241-d8630cd6752c/
7	酵素	333	FA062800	E00358	ラクトパーオキシダーゼ	https://wayback.archive-it.org/7993/20180124132611/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM528631.pdf https://wayback.archive-it.org/7993/20180124030607/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventor%2FUCM497475.pdf
13	製造用剤	346		E00370	リンターセルロース	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5047

表 4-1 作成・検討中の食品添加物公定書成分規格案

部会	コード番号	既存 添加物 番号	用途	品目名
13	E00332	311	製造用剤・強化剤	貝殻未焼成カルシウム

表 4-2 第 5 版自主規格として作成した食品添加物公定書規格案

部会	コード番号	既存 添加物 番号	用途	品目名
4	E00019	19	増粘安定剤	アラビノガラクトン
4	E00054	52	増粘安定剤	カシアガム
4	E00086	81	増粘安定剤	キチン
4	E00088	83	増粘安定剤 ・製造用剤	キトサン
4	E00271	252	増粘安定剤	ファーセララン
4	E00354	329	増粘安定剤	モモ樹脂
13	E00215	196	製造用剤	チャ乾留物

表5 調査研究者

日本食品添加物協会における役職	氏名	企業名
技術委員長	等々力 博志	一般社団法人日本食品添加物協会
安全性委員長	松村 雅彦	一般社団法人日本食品添加物協会
自主規格・規格専門委員長, 部会長・部会担当	西宮 隆	株式会社タイショーテクノス
技術情報評価専門委員長	山田 益己	理研ビタミン株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	竹村 優子	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	大野 裕和	丸善製薬株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	西野 雅之	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	北村 智	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	廣崎 貴義	D S P 五協フード&ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	西川 秀二	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	深沢 徹也	三菱ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	岸森 好明	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	卯津羅健作	ナガセケムテックス株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	小川 知成	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	植田実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	香村 正徳	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	伊勢 啓弘	花王株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	大石 政樹	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	坂井 昭浩	オルガノフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	村上 和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	深尾 正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	関谷 史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	稲井 隆之	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員	栗山 義顕	株式会社ウエノフードテクノ
自主規格・規格・技術情報評価専門委員	阿部 貴宏	三菱ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員	酒井 正典	ダイワ化成株式会社
規格・技術情報評価専門委員	小笠原 正志	三菱商事ライフサイエンス株式会社
技術委員, 自主規格・規格・技術情報評価専門委員	原田 健一	理研ビタミン株式会社
技術委員, 技術情報評価専門委員	大橋 篤志	小川香料株式会社
技術委員, 技術情報評価専門委員	加藤 茂	株式会社武蔵野化学研究所
技術委員, 技術情報評価専門委員	岡本 隆広	三菱ケミカル株式会社
技術委員, 技術情報評価専門委員	日俣 克一	山崎製パン株式会社
技術委員	近藤 直樹	太陽化学株式会社
技術委員	米山 明美	三菱商事ライフサイエンス株式会社
技術情報評価専門委員	梅原 静代	BASF ジャパン株式会社
技術情報評価専門委員	芝田 美穂	第一工業製薬株式会社
部会長・部会担当	西山 浩司	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
技術特任アドバイザー	村田 義文	一般社団法人日本食品添加物協会
参事	京極 泰久	一般社団法人日本食品添加物協会
参事	藤井 結花	一般社団法人日本食品添加物協会

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～既存添加物オリゴガラクトuron酸の分析法の検討～

研究分担者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究要旨 既存添加物「オリゴガラクトuron酸」(oGA)の成分規格設定に必要な基礎情報を得る目的で、市場より入手できた1製品について、¹H qNMR 及び HPLC により成分分析及び内容物の定量を行った。¹H qNMR により、本製品は主にモノ、ジ及びトリガラクトuron酸(mGA, dGA, tGA)より構成され Glu が含まれるものであることがわかった。「オリゴガラクトuron酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトuron酸の 1~9 量体の混合物からなる。」とされているが、今回の試験によれば、「・・・ガラクトuron酸 1~3 量体の混合物からなる。」に修正すべきと考えられた。¹H qNMR により定量用標品として用いる市販試薬の mGA, dGA, tGA について純度を求めた結果、いずれの試薬も 70%~80%程度であり、定量用標品として用いるには十分に高い純度を持つものはなかった。また、¹H qNMR 及び HPLC により添加物製品 oGA 中の各成分を直接定量したところ、3種の合計が約 30%であった。別にカルバゾール-硫酸法により定量したところ、mGA として 43.4%と算出され、HPLC 又は ¹H qNMR で求めた値と 10%程度異なった。カルバゾール-硫酸法では、反応する成分全てが mGA として求められることから、¹H qNMR 又は HPLC ではピーク又はシグナルとして検出されず定量できない成分も合算されていると考えられた。いずれにしても、mGA, dGA 及び tGA の純度既知の定量用標品の供給は困難であると考えられるので、成分規格に適用できる試験法は、現状ではカルバゾール-硫酸法以外に選択肢はないと考えられる。

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

中島馨 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

とされている。「オリゴガラクトuron酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトuron酸の 1~9 量体の混合物からなる。」とされている。一方、「オリゴガラクトuron酸」と関連あるいは類似品目としては、既存添加物「ペクチン」及び「ペクチン分解物」があり、第9版食品添加物公定書に成分規格がそれぞれ既に収載されている。「ペクチン」の成分規格において、「本品は、かんきつ類、リンゴ等から得られた、部分的にメチルエステル化されたポリガラクトuron酸等の水溶性多糖類を成分とするものである。ショ糖、ブドウ糖、乳糖又はデキストリンを含むことがある。」と定義されて

A. 研究目的

既存添加物「オリゴガラクトuron酸」は、現在、第9版食品添加物公定書に成分規格が未収載の品目の一つであり、その品質及び化学的安全性を確保するために成分規格の設定が急務

いる。一方、「ペクチン分解物」は、「本品は、ペクチン(サトウダイコン(*Beta vulgaris* L. var. *rapa* Dum.), ヒマワリ(*Helianthus annuus* L.), アマダイダイ(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), グレープフルーツ(*Citrus* × *paradisi* Macfad.), ライム(*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle), レモン(*Citrus limon* (L.) Burm. f.)又はリンゴ(*Malus pumila* Mill.)から、水若しくは酸性水溶液で抽出したものから得られたもの又はこれをアルカリ性水溶液若しくは酵素で分解したものから得られたメチル化ポリガラクトロン酸等の多糖類を成分とするものをいう。)を酵素で分解して得られた、ガラクトロン酸を主成分とするものである。」と定義されている(galacturonic acid = ガラクチュロン酸又はガラクトロン酸であり、現在は後者の呼称が一般的である。). すなわち、「ペクチン」がポリガラクトロン酸、「ペクチン分解物」がガラクトロン酸から主に構成され、「オリゴガラクトロン酸」はその中間のオリゴマーから構成される添加物であると推定される。しかしながら、「オリゴガラクトロン酸」の食品添加物として流通している製品の実態がつかめなかったため、本品の成分組成に関する情報を得ることができなかった。

そこで本研究では、食品添加物として流通している「オリゴガラクトロン酸」を入手し、その成分組成の分析を試みたので報告する。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

オリゴガラクトロン酸は国内で入手した食品添加物 1 製品(液体)(oGA) <C2218>を試料として用いた。また、比較試料として、食品添加物として流通しているペクチン 1 製品(PT) <A108>及びペクチン分解物 3 製品(PD1, PD2, PD3) <A38, A446, A558>を用いた。

また、本研究において以下の試薬等を試験に用いた。D(+)-ガラクトロン酸一水和物(Wako, 326-50341, Lot: AWP0789) <09-38a>, D-ガラクトロン酸(ChromaDex, ASB-00007026-250, Lot: 00007026-474) <22100020>, D(+)-ガラクトロン酸一水和物(Supelco, 92478-25mg, Lot: BCCD9630) <22100019>, ジガラクトロン酸

(Sigma, D4288, Lot: SLBT8808) <22100017>, トリガラクトロン酸(Sigma, T7407, Lot: SLBJ2704V) <22100018>, α -D-グルコース(Aldrich, 特級, 07-0680-2-25G-J, Lot: U1830) <05-03b>, DSS- d_6 標準物質(富士フイルム和光, TraceSure, 040-31671, Lot: APL6177, 純度(質量分率)92.4%) <23-39c>, 重水(D₂O)(ISOTEC, NMR用, 151882-1KG, Lot: SZ1188) <08-99a>, リン酸二水素ナトリウム二水和物(SIGMA, JIS 特級, 28-3790-5, Lot: A2344) <03-35a>, カルバゾール(Wako, 035-01192, Lot: CDG0771) <04-51b>, 硫酸(Wako, 192-04696, Lot: TWP1706) <13-20b>, 四ほう酸ナトリウム十水和物(Wako, 194-01415, Lot: ASF2531) <2T93>, エタノール(99.5)(富士フイルム和光, 052-03343, Lot: ESR3705) <22000009>. 水はオルガノ製超純水製造装置ピューリックωにより製造された超純水を用いた。なお、<>は当部管理番号を示す。

B-2) ¹H qNMR による試薬純度測定及び添加物製品中の各成分の定量

ガラクトロン酸(mGA), ジガラクトロン酸(dGA), トリガラクトロン酸(tGA)及びグルコース(Glu)の純度を¹H qNMRにより求めた。装置はJNM-ECA600 (JEOL 製)を用い、試料濃度約10 mg/mLになるようにD₂Oに溶解し、DSS- d_6 をqNMR基準物質として定量条件で測定した。シグナルの化学シフト値は、DSS- d_6 を基準(0 ppm)とし、各シグナルは各種2D-NMR測定により帰属した。

添加物製品(oGA)中の各成分の含量を直接¹H qNMRにより測定した。すなわち、先に測定した試薬 mGA, dGA, tGA 及び Glu に由来するシグナルの化学シフト値との比較、又は標準添加(mGA, Glu)により添加物製品(oGA)中の各成分のシグナルを帰属し、mGA, dGA, tGA 及び Glu の含量を算出した。

B-3) HPLC による添加物製品中の各成分の定量

B-2)の¹H qNMR測定に用いたmGA, dGA及びtGAの溶液(約10 mg/mL)を水で2.5, 1.25, 0.25, 0.125 mg/mLに希釈し、絶対検量線用標準液と

した。なお、それぞれの標準液の濃度は ^1H qNMR で求めた純度値で補正したものをを用いた。添加物製品(oGA) 約 1 g を精密に量りとり、100 mL に水で定容した後、0.45 μm メンブランフィルターを通したものを検液とした。絶対検量線法により各成分の定量を行った。また、同データを用い、重合度(Dp)を計算した。

HPLC 条件：装置，HPLCprominence シリーズ (LC-20AT/SPD-20A/SIL-20AC/CBM-20A/CTO-20AC)(島津製作所製); カラム, Shodex NH2-P50 4E (4.6 x 250 mm, 5 μm); カラム温度, 40°C; 移動相, 0.3 mol/L NaH_2PO_4 ; 流速, 0.8 mL/min; 検出波長, UV 210 nm; 注入量, 10 μL 。

$$Dp = \frac{(A_{mGA} + A_{dGA} \times 2 + A_{tGA} \times 3)}{(A_{mGA} + A_{dGA} + A_{tGA})}$$

ただし、Dp：重合度，A：ピーク面積。

B-4) カルバゾール-硫酸法による定量

添加物製品(oGA)中のオリゴガラクトン酸の含量をガラクトン酸濃度として求めた。すなわち、第9版食品添加物公定書収載の「ペクチン分解物」の成分規格の定量法に倣い、カルバゾール硫酸法により定量した。以下に、ペクチン分解物の規格を引用する。本品をオリゴガラクトン酸製品とし、乾燥物換算のみ除外し定量した。

『定量法 本品約 1 g を精密に量り、水に溶かして正確に 100 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とし、試料液とする。試験管に四ホウ酸ナトリウム・硫酸試液 5 mL を正確にとって氷冷し、試料液 1 mL を正確に加え、試験管に蓋をして水浴中で 10 分間加熱した後、直ちに氷上で 5 分間冷却する。この液にカルバゾール・エタノール試液 0.2 mL を加えて水浴中で 15 分間加熱し、氷上で 5 分間冷却して検液とする。別に定量用ガラクトン酸を無水物として、0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL 及び 0.2 mg/mL となるよう水に溶かし、検液の調製と同様に操作し、標準液とする。検液と各標準液の 530 nm における吸光度を測定する。標準液の吸光度から検量線を作成する。

検液中のガラクトン酸濃度を検量線から求め、更に乾燥物換算を行う。』

C. 結果及び考察

C-1) ^1H qNMR 測定

mGA, dGA, tGA, Glu の構造式と ^1H NMR スペクトルを Fig. 1, 2 に示した。ピラノースは他の糖とグルコシド結合していない 1 位の α 及び β 異性体が存在する。 α 及び β 異性体のプロトンシグナルが観察される複雑なスペクトルとなる。 ^1H qNMR において各シグナルの帰属情報は正確に定量するために必須であることから、2D NMR (COSY)測定により可能な限り帰属した(Fig. 2)。

mGA のプロトンシグナルは、Fig. 2a に示すとおり、 $\alpha 1 \sim \alpha 5$ 位、 $\beta 1 \sim \beta 5$ 位のいずれもほぼ独立していたが、 $\beta 4$ と $\beta 5$ 位のシグナルの近傍に不純物が重なっていた。不純物を除くよう積分範囲を狭め、定量した結果を Table 1a に示した(調製 n=1, 測定 n3)。 α 及び β 異性体由来するシグナルから算出した α 及び β 異性体それぞれの含量値はほぼ同じであったことから、1 位から 5 位のシグナルより算出した値を平均し、両異性体の含量を合算した 78.05% を mGA 純度とした。試験に用いた試薬が一水和物とされているものがあること、食品添加物公定書の試薬の項には「D-ガラクトン酸、定量用」の化学式が一水和物で表されていることを考慮し、一水和物で再計算した場合は 85.29% となった。したがって、試薬の mGA の純度は、無水物換算で 78.05% であり、純度が低いことがわかった。(ただし、二水和物換算で 92.54%、酸水和物換算で 99.78% となることから、mGA は実際には三水和物として流通している可能性がある。)

dGA, tGA は、2D NMR (COSY)スペクトルによると、Fig. 1 に示した構造式のように 2 環目以降は α 結合していることがわかった。Table 1b, 1c には重複したシグナルも含めたすべての計算結果を表示したが、この中から独立したシグナルを選択し、dGA は $\alpha 1, \alpha 3, \alpha 4, \beta 2, \beta 4$ を、tGA は $\alpha 1, \beta 4, \beta 5$ を定量シグナルとして含量を算出し、 α 及び β 異性体の含量の平均

を合算して純度としたところ、dGAは69.84%、tGAは73.50%であった。

Gluも同様にして純度を算出したところ、99.50%であった(Table 1d)。

次に、mGA, dGA, tGA, Gluのシグナル帰属情報を元に、oGA製品中の各成分の含量を¹H qNMRにより算出した。まず、oGA製品に観察されるシグナルを帰属する必要があるが、Fig. 2からわかるように、3.4~4.0 ppm付近のシグナルは重複しており帰属は不可能であった。このため、1位のプロトンシグナルのみ帰属することとした。ガラクトン酸類はそれ自身が酸であるため、調製濃度、成分組成によりpHが変化し、それぞれのシグナルの化学シフトが移動してしまう場合がある。そのためGlu及びmGAのシグナルについてはそれぞれを標準添加することによって強度が増すシグナルを確認することによって帰属した(Fig. 3)。dGA及びtGAのシグナルについては、それぞれのスペクトルとの比較により推測した。

その結果、Fig. 3aのoGAスペクトルでは、Glu 1位(5.22, 4.64 ppm), mGA 1位(5.28, 4.56 ppm), dGA+tGA 1位(5.31, 4.61 ppm), dGA 1'位(5.08 ppm), tGA 1'又は1"位(5.10又は5.05 ppm)と帰属した。なお、oGAのシグナルには4.8 ppm付近に巨大な水シグナルが観察されたことから、液体試料ではかなりの量の水分を含むと推定された。Fig. 3dの水シグナルの近傍には3本のシグナルが見えているが、mGAを添加することによってpHが変化したことによりdGA, tGAの5', 5"位のシグナルがシフトして観察されたものと考えられた。

Fig. 4の○□△×でマークしたシグナルを定量に用いた。それぞれのシグナル積分値から添加物製品(oGA)中の成分の含量を求めた結果(調製n=1, 測定n=1), mGA 5.26%, dGA 8.58%, tGA 17.3%で3種の合計が31.1%であった。一方で、Gluが10.3%とかなりの量含まれることがわかった。「オリゴガラクトン酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトン酸の1~9量体の混合物からなる。」とされ

ており、Gluが含まれるとは記載されていない。基原・製法・本質のこの記載中の「ペクチン」は既存添加物のペクチンを指す。第9版食品添加物公定書の「ペクチン」の成分規格によれば、「本品は、かんきつ類、リンゴ等から得られた、部分的にメチルエステル化されたポリガラクトン酸等の水溶性多糖類を成分とするものである。ショ糖、ブドウ糖、乳糖又はデキストリンを含むことがある。」と定義されている。したがって、ショ糖、ブドウ糖、乳糖又はデキストリンを含んだ「ペクチン」を原料としてを製造したとすれば、「オリゴガラクトン酸」製品<C2218>にGluが含まれているとの説明ができる。

そこで、「オリゴガラクトン酸」製品の原料であるとされる「ペクチン」製品<A108>、「ペクチン」を原料として製造される「ペクチン分解物」製品<A38>の¹H qNMRスペクトルを比較した(Fig. 5)。その結果、これら3製品からはGlu由来のシグナルが検出された。「ペクチン」製品<A108>及び「ペクチン分解物」製品<A38>のスペクトルからはGluに由来するシグナル以外にガラクトン酸あるいは重合体に由来するシグナルが観察されなかったことから、両者はGluで殆ど構成される製品であると考えられた。

C-2) HPLCによる添加物製品中の各成分の定量

C-2-1) HPLC条件

Fig. 6a~dは、当部が保有する3つの異なるロットのShodex NH2-P50 4E (4.6 x 250 mm, 5 µm)カラムを用いて測定したHPLCクロマトグラムである。同一条件下(a), b), d)は流速0.8 mL/min, c)のみ流速1 mL/min)で測定したものであるが、カラムのロットによりmGA, dGA, tGAの保持時間に差が観察された。比較に用いた3ロットは購入後からの使用時間が異なり、d)は新品のカラムであるd)が一番保持時間が長かった。今回用いたアミノカラムは劣化が早いため、a)及びb)のカラムが多少劣化しており保持時間が短くなったと考えられる。したがって、仮にHPLCでの各成分の確認又は定量を規格化する

とすれば、カラムの使用中の劣化による保持時間の短縮化と夾雑物との分離を考慮すると、例えば、「mGA のピークが 5 min に検出されるように流速を調整する。」等の分析条件の規定が必要であると思われる。

今回の分析結果では、新品のカラムを用いた Fig. 6d では保持時間 40 分に 4 量体らしきピークが観察されたが、3 量体の tGA までしかはっきりと観察されなかった。また、4 量体以上の標品の入手は困難であるため、それが 4 量体であるかどうかの確認はできなかった。以上のことから、既存添加物「オリゴガラクトン酸」の基原・製法・本質には「ガラクトン酸の 1~9 量体の混合物からなる」とされているが、HPLC の結果から、今回入手した oGA 製品はガラクトン酸の 3 量体までで構成されているものと判断された。

次に、HPLC による定量値から重合度を計算した。積分ベースラインをどのように設定するかによって変化するが、ベースラインの盛り上がりを取り捨て、ピークの立ち上がりから終わりをピークとしたとき、oGA 製品の重合度(Dp)は 2.33 となった。

¹H qNMR による分析結果(C-1))では、oGA 製品中に Glu が 10%程度含まれることが確認されている。この Glu が mGA, dGA, tGA のピーク面積の測定に影響しないかどうかを確認するため、同一条件下で標準添加した Glu を測定した。その結果、Fig. 7 に示すように、Glu はかなり高濃度でないと検出されず、また、その保持時間はインジェクションショックと重なる 3.3 分であったことから、Glu の存在は HPLC による mGA, dGA, tGA の分析に影響しないことが確認された。

C-2-2) 検量線

C-1) ¹H qNMR 測定に用いた mGA, dGA, tGA の D₂O 溶液をそれぞれ水で希釈して絶対検量線作成用標準液とし、HPLC に付した(Fig. 8)。なお、新品のカラム Shodex NH2-P50 4E (4.6 x 250 mm, 5 μm) <LCc404>を試験に使用した。

¹H qNMR により試薬の純度が 80%以下であることが既に明らかであったが、HPLC クロマ

トグラム上でも、不純物のピークが検出された。mGA は 5.7 分にピークが検出されたが、その後 20 分付近にもピークが検出された。dGA は 8.2 分にピークが検出されたが、6 分付近にピークが観察された。tGA は 14.7 分に検出され、クロマトグラム上に殆ど不純物のピークが観察されなかった。いずれにしても、これらを混合し 3 種混合標準液とする不純物が各成分のピークと重なり面積が変化するため、それぞれ単品について絶対検量線作成用標準液を調製し、それらを測定し(調製 n=1, 測定 n=3), ¹H qNMR で求めた純度で補正した濃度とピーク面積から絶対検量線を作成した(Fig. 9)。mGA が重合し dGA, tGA となると分子量も 2 倍, 3 倍になるため、同じ重量濃度での吸光度はほぼ同じになると予想される。この予想通り、これら 3 化合物の重量濃度と吸光度(ピーク面積)の傾きはほぼ同じとなった。傾きが多少異なった理由としては、¹H qNMR により求めた dGA 及び tGA の純度が正確に測定できていない可能性があげられる。mGA と異なり、dGA, tGA では定量に用いたシグナルにより算出された純度値にばらつきが観察され、これは不純物が定量シグナルに重なっているためと推定される。

C-2-3) 定量

Fig. 9 の mGA, dGA, tGA の検量線を用い、添加物製品 oGA 中の各成分の含量を求めた(調製 n=3, 測定各 n=1)(Table 2a)。その結果、mGA 5.25%, dGA 8.81%, tGA 17.8%で合算すると 31.8%となった(Table 2b①)。この結果は ¹H qNMR による定量結果とよく一致した(Fig. 4)。

C-2-4) 定量用標品(市販試薬)について

今回、絶対検量線の作成に用いた定量用標品(市販試薬)は、mGA が約 8,000 円/5g, dGA が約 45,000 円/25mg, tGA が約 40,000 円/25mg であり、mGA 以外は非常に高価である。また、C-1) ¹H qNMR 測定で示したようにそれぞれの純度は 70%~80%程度であった。mGA の純度については ¹H qNMR によりシグナル毎にばらつきの小さい値を示したため信頼性が高いと考えられるが、dGA 及び tGA についてはシグナル毎

に大きなばらつきが観察されたことから ^1H qNMR による純度には疑問が残る。すなわち、mGA, dGA, tGA の絶対検量線を用いてそれぞれの定量値を求め、それらを合算しても dGA 及び tGA の純度の信頼性が低い以上、添加物製品 oGA 中の成分が精確に求められているとは言い難い。例えば、dGA 及び tGA の絶対検量線の傾きを mGA の傾きから分子量換算すると、Fig. 9 の分子量換算の傾きのセルに示したように、実測の傾きよりも大きくなる。更に、その値で定量した場合、それぞれの含量は dGA が 8.40%、tGA が 15.29%、合計 28.94% となる (Table 2b②)。更に簡略化して mGA の絶対検量線だけを用いて、mGA としての含量を求めた場合、dGA が 8.01%、tGA が 14.35%、合計 27.60% となる (Table 2b③)。

また、mGA の純度についても問題が残る。一水和物として 100% (無水物として 91.51%) と思って絶対検量線を作成する場合、 ^1H qNMR で純度を求めた後に、無水物として 78.05% として定量する場合では、定量値が大きく変わってしまう。更に、Table 2b④ に示したように、無水物 91.51% と仮定し、3 成分を mGA 換算した定量値は、mGA が 6.15%、dGA が 9.39%、tGA が 16.82%、合計 32.37% となり、 ^1H qNMR で各定量用標品の純度を求めて補正して求めた Table 2b① に近い値となった。しかしながら、この結果は様々な偶然が重なり合っただけに過ぎないため、純度の問題が解決されない。

更に、メーカー間の試薬の純度、吸湿の程度に違いがあるか確認する必要がある。このため、mGA の試薬として Wako 社製その他、ChromaDex 社製と Supelco 社製について、 ^1H qNMR により純度を求めた。保管中の吸湿をキャンセルするため、乾燥してから秤量することにした。

第 9 版食品添加物公定書の乾燥減量を確認したところ、ペクチンが 12.0% 以下 (105°C, 2 時間)、ペクチン分解物が 70% 以下 (105°C, 3 時間) とされていたため、これを参考に mGA を 105°C, 3 時間乾燥したところ、褐色に焦げた (Fig. 10)。念のため、焦げた mGA について ^1H qNMR を測定したところ、mGA のシグナルが小さくなり、別にシグナルが増えていることが確認された

(Fig. 11c)。更に、残存する mGA のシグナルより含量を算出したところ、 α 及び β 異性体の合計で約 10% 程度に低下しており、このことから 105°C, 3 時間乾燥は、mGA を分解することがわかった (Table 3c)。

そこで、乾燥なし (室温保管の状態) での純度 (Table 3a) と、室温でシリカゲルデシケーター内、24 時間乾燥後の純度 (Table 3b) を ^1H qNMR により求めた。mGA の 3 社の試薬の純度に大きな違いは見られず、デシケーター内で乾燥しても純度が低下しなかったことから、通常の保管状態の各社の試薬を標品として用いても大きな差が生じないと考えられた。

以上のことから、市販試薬の mGA を標品として HPLC 法による 1 点検量でも比較的ばらつきの少ない一定の値を算出できると予想され、オリゴガラクトuron酸の品質管理には利用できると考えられる。ただし、dGA 及び tGA の同定のために両者の試薬は必要である。

C-3) カルバゾール-硫酸法による定量

第 9 版食品添加物公定書のペクチン分解物の定量法を参考に、カルバゾール-硫酸法によるガラクトuron酸の定量を検討した。

まず、mGA, dGA, tGA, Glu の検量線を作成した。すなわち、それぞれの市販試薬を標品として用い、乾燥なし、 ^1H qNMR による濃度補正なしで、mGA (無水物として) 0.01~0.2 mg/mL の 7 段階 (n=3)、dGA 及び tGA が 0.01~0.05 mg/mL の 5 段階 (n=1)、Glu が 0.02~0.4 mg/mL の 5 段階 (n=3) の溶液を調製し、反応操作を行い標準液とし、波長 530 nm で吸光度を測定した。対照液に超純水を用い、超純水を用いて同様に反応させた液を blank とした。Fig. 12a は mGA (無水物として) 0.01~0.2 mg/mL の全濃度から作成した検量線であるが、最大濃度の吸光度が 3 以上となった。第 9 版食品添加物公定書の一般試験法の「17.紫外可視吸光度測定法」によると、『溶液の濃度は、単光束吸光度法で測定を行う場合には、測定で得た吸光度が 0.2~0.7 の範囲、複光束吸光度法で測定を行う場合には、0.4~1.4 の範囲となるものが適当で、…』とされており、これを考慮し mGA 検量線の濃度範

囲は 0.05 mg/mL 以下が適当であると判断した。Fig. 12b は、mGA(無水物として)が ~ 0.05 mg/mL, dGA 及び tGA が ~ 0.06 mg/mL の検量線であるが、ほぼ同じ傾きの良好な直線を示した。したがって、試料中にオリゴマーが混在していても、mGA(無水物として)の検量線を用いて定量値を算出しても問題ないと考えられた。ただし、カルバゾール-硫酸法は、糖から生成したフルフラール及びその誘導体とカルバゾールが反応して発色することを原理としていることから、mGA, dGA 及び tGA のようなカルボキシル基を持つuron酸を特異的に検出するものではない。Fig. 12c には Glu の検量線を示したが、検量線の傾きが mGA に比べて 6 分の 1 であることからわかるとおり、Glu の重量当たりの呈色は mGA に比べて小さいが濃度依存的に呈色することが明らかである。したがって、製品中に Glu 等の糖類が含まれる場合は、その量に応じて mGA の定量値が大きく見積もられると考えられる。

次に、添加物製品 oGA の試料液(0.1 mg/mL)を反応操作し、検液の吸光度を測定した。Fig. 12b の mGA(無水物として)の検量線(0 \sim 0.05 mg/mL)を用い、mGA 濃度を求めた。その結果、添加物製品 oGA 中の mGA 濃度は 43.4%と算出された(Table 4)。この結果は、HPLC による定量値 32.37% (Table 2b④)と比べるとかなり大きく、添加物製品 oGA 中の Glu やその他の不純物が寄与していると考えられる。

Table 4b には、添加物製品(oGA)試料液(0.1 mg/mL)中に Glu を 0.04, 0.10, 0.20 mg/mL 添加したとき、カルバゾール-硫酸法で得られる mGA としての定量値がどのように変化するか調べたものである。Glu 添加量と算出した含量をプロットすると、Glu 添加量に比例して含量が増加していることがわかる。添加物製品 oGA の ^1H qNMR により、製品中に Glu が約 10%存在すると算出されている。このことを考慮すると添加物製品(oGA)試料液(0.1 mg/mL)中には、Glu が 0.01 mg/mL 相当含まれることになる。Fig. 12c の Glu の検量線から、吸光度が 0.078 上乘せされており、これは試料中の mGA 含量に換算すると約 2%多く見積もられていることになる

が、これだけで定量値の増大を説明できない。4 量体以上の HPLC 上にピークとして検出できないオリゴマーや Glu 以外のきょう雑物が発色している可能性があるが、これ以上の情報を得ることができなかった。

D. 結論

既存添加物「オリゴガラクトuron酸」の成分規格案を設定するために、入手できた添加物製品 oGA 中の成分組成を確認した。 ^1H qNMR により、本製品は主に mGA, dGA, tGA より構成され Glu が含まれるものであることがわかった。したがって、「オリゴガラクトuron酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトuron酸の 1 \sim 9 量体の混合物からなる。」とされているが、今回試験に供した添加物製品 oGA によれば、「・・・ガラクトuron酸 1 \sim 3 量体の混合物からなる。」に修正すべきと考えられた。

次に、 ^1H qNMR 及び HPLC による各成分の定量を試みた。 ^1H qNMR により定量用標品として用いる市販試薬の mGA, dGA, tGA について純度を求めた結果、いずれの試薬も 70% \sim 80%程度であり、定量用標品として用いるには十分に高い純度を持つものはなかった。また、 ^1H qNMR により添加物製品 oGA 中の各成分を直接定量したところ、mGA 5.26%, dGA 8.58%, tGA 17.3%で 3 種の合計が 31.1%であった。更に、 ^1H qNMR により純度を算出した市販試薬を定量用標品として絶対検量線法により、各成分の含量を求めた。その結果、3 種の合計が 31.84%であり ^1H qNMR による直接定量の結果と一致した。ただし、dGA 及び tGA の試薬の ^1H qNMR ではシグナルにより定量値のばらつきがあり、正確に純度を算出できているかどうかは不明である。

一方、カルバゾール-硫酸法で添加物製品 oGA 中の含量を mGA として求めたところ、43.4%と算出され、HPLC 又は ^1H qNMR で求めた値と 10%程度異なった。カルバゾール-硫酸法では、反応する成分全てが mGA として求められることから、HPLC 又は ^1H qNMR ではピーク又はシ

グナルとして検出されず定量できない成分も合算されていると考えられる。

いずれにしても、mGA, dGA 及び tGA の純度既知の定量用標品の供給は困難であると考えられるので、成分規格に適用できる試験法は、現状ではカルバゾール-硫酸法以外に選択肢はないと思われる。

E. 参考文献

- 1) 古谷貞治, 箴島豊: ペクチンの比色定量. 九州大学農学部学藝雑誌, 22(1), 35-44 (1965).

F. 研究業績

1. 学会発表等

1-1. 学会

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物中の窒素定量分析~燃焼法 vs ケルダール法~. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
- 2) 建部千絵, 藤原由美子, 長久保直也, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 久保田浩樹, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた食用タール色素中の 6, 6'-オキシピス(2-ナフトレンスルホン酸) ニナトリウム の定量法の検討. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
- 3) 高木映里, 高橋未来, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
- 4) 日置冬子, 多田敦子, 西崎雄三, 古庄紀子, 石附京子, 久保田浩樹, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物ジフェノコナゾールの規格試験法の検討及び異性体組成分析. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
- 5) 長井理夏子, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章: 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析. 第60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(2021.10.23-24) (松山市).
- 6) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji T,

Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Iwamoto Y, Yoshiaki Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Absolute determination of an organophosphorus pharmaceutical, auranofin, using quantitative ³¹P-NMR. The 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2021)(2021.8.29-9.1)(Kyoto).

- 7) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 丸山剛史, 浅野龍二, 三浦亨, 岩本芳明, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 定量NMRを用いた日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした生薬等の定量指標成分アミグダリン及びアルブチンの絶対純度の測定. 日本生薬学会第67回年会(2021.9.19-20) (東京Web).
- 8) 長井理夏子, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析, 第60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(2021.11.8-21) (Web).
- 9) 廣瀬昌平, 渡辺麻衣子, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 工藤由起子: 第9版食品添加物公定書における微生物限度試験法の大腸菌試験に関する検討, 第57回全国衛生化学技術協議会年会(2021.11.25-26) (Web).
- 10) 多田敦子, 堀江正一, 内山陽介, 栗田史子, 中村理奈, 杉浦潤, 井原紗弥香, 櫻井光, 久保田浩樹, 建部千絵, 寺見祥子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(令和2年度), 第57回全国衛生化学技術協議会年会(2021.11.25-26) (Web).

1-2. 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).

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Miura T, Sugimoto N, Bhavaraju S, Yamazaki T, Nishizaki Y, Liu Y, Bzhelyansky A, Amezcua C, Joseph Ray, Zailer E, Diehl B, Gallo V, Todisco S, Ofuji K, Fujita K, Higano

- K, Geletneky C, Hausler T, Singh N, Yamamoto K, Kato T, Sawa R, Watanabe R, Iwamoto Y, Goda Y: Collaborative Study to Validate Purity Determination by ^1H quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull.* 2020; 68: 868-878. Tsutumiuchi K, Toyoshima T, Hasegawa F, Terasawa R, Honda W, Sakakibara M, Ishida Y, Ikai Y, Ishibashi R, Furuya K, Morimoto T, Ishizuki K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Oka H: Molecular Structure of Gardenia Blue Pigments by Reaction of Genipin with Benzylamine and Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.*, 69, 3904-3911 (2021).
- 2) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度に基づくシングルリファレンス GC 法および HPLC 法によるカラシ抽出物およびセイヨウワサビ抽出物中のイソチオシアン酸アリルの定量. *食衛誌*, 62, 73-78 (2021).
- 3) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Yasobu N, Iwamoto Y, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Purity Determination of Cyclophosphamide Hydrate by Quantitative ^{31}P -NMR and Method Validation. *Chem. Pharm. Bull.*, 69 (7), 630-638 (2021).
- 4)
- G. 知的財産権の出願. 登録状況**
なし

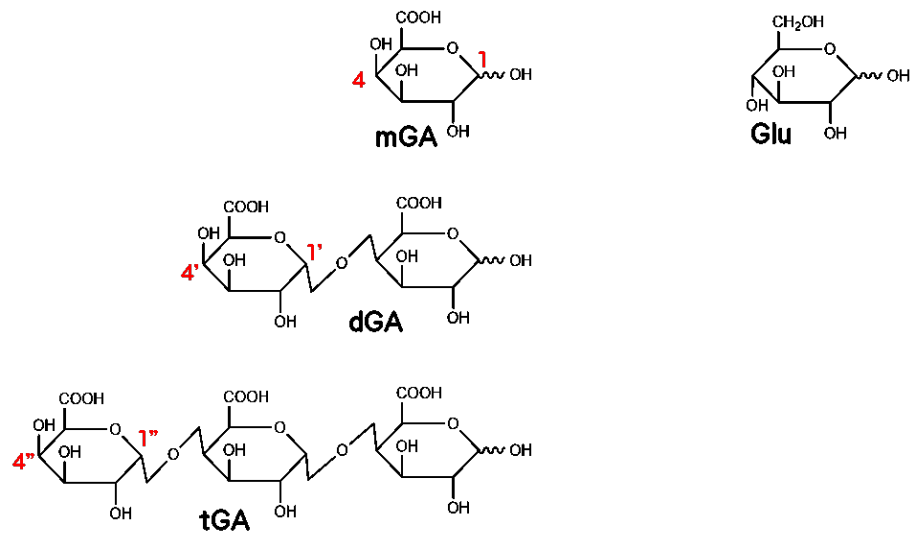


Fig. 1 ガラクツロン酸(mGA), ジガラクトロン酸(dGA), トリガラクトロン酸(tGA)及びグルコース(Glu)の構造式

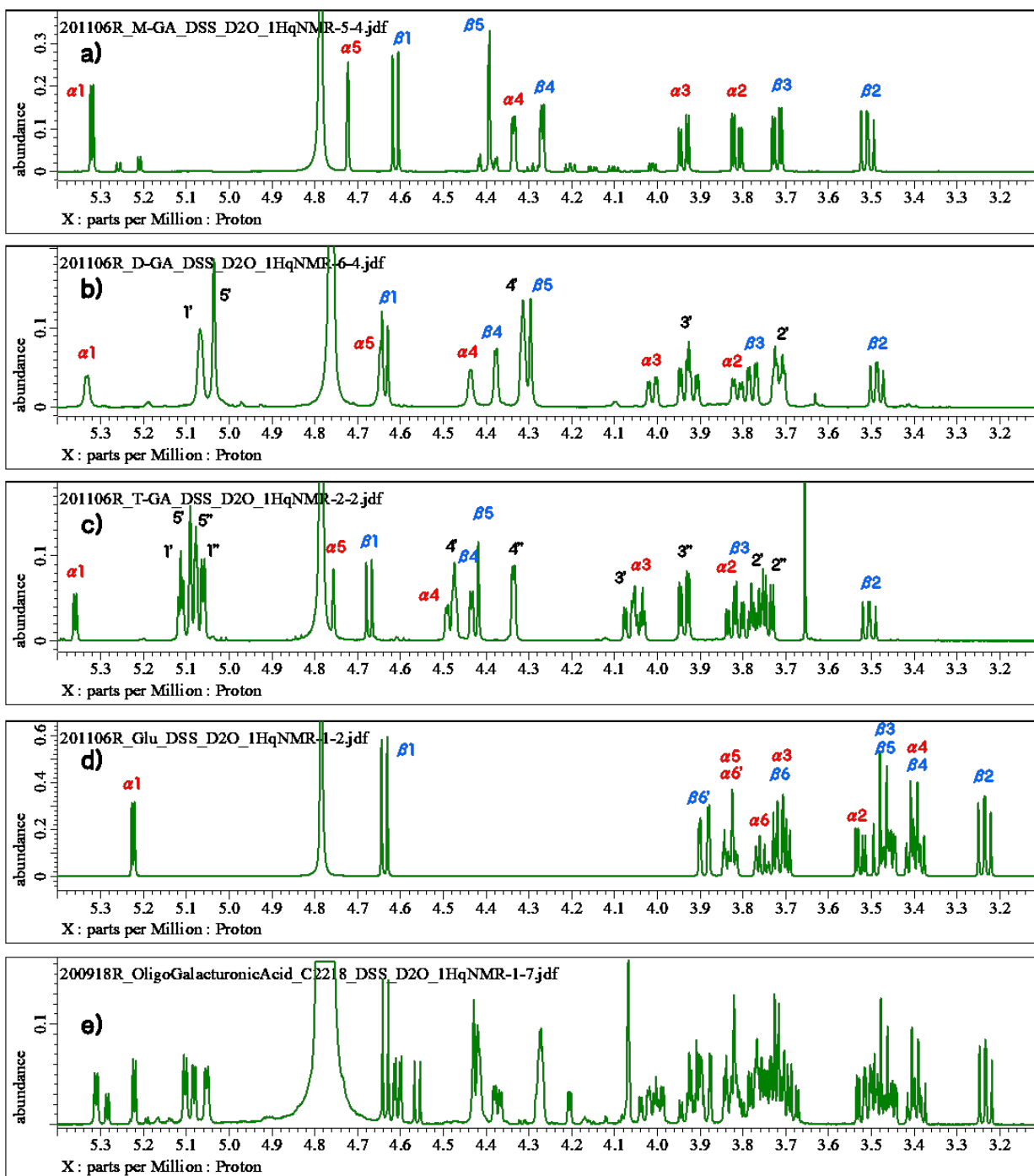


Fig. 2 ^1H -qNMR スペクトル (in D_2O)

a) mGA (Wako) 10 mg/mL, b) dGA 10 mg/mL, c) tGA 10 mg/mL, d) Glu 13 mg/mL, e) oGA 40 mg/mL

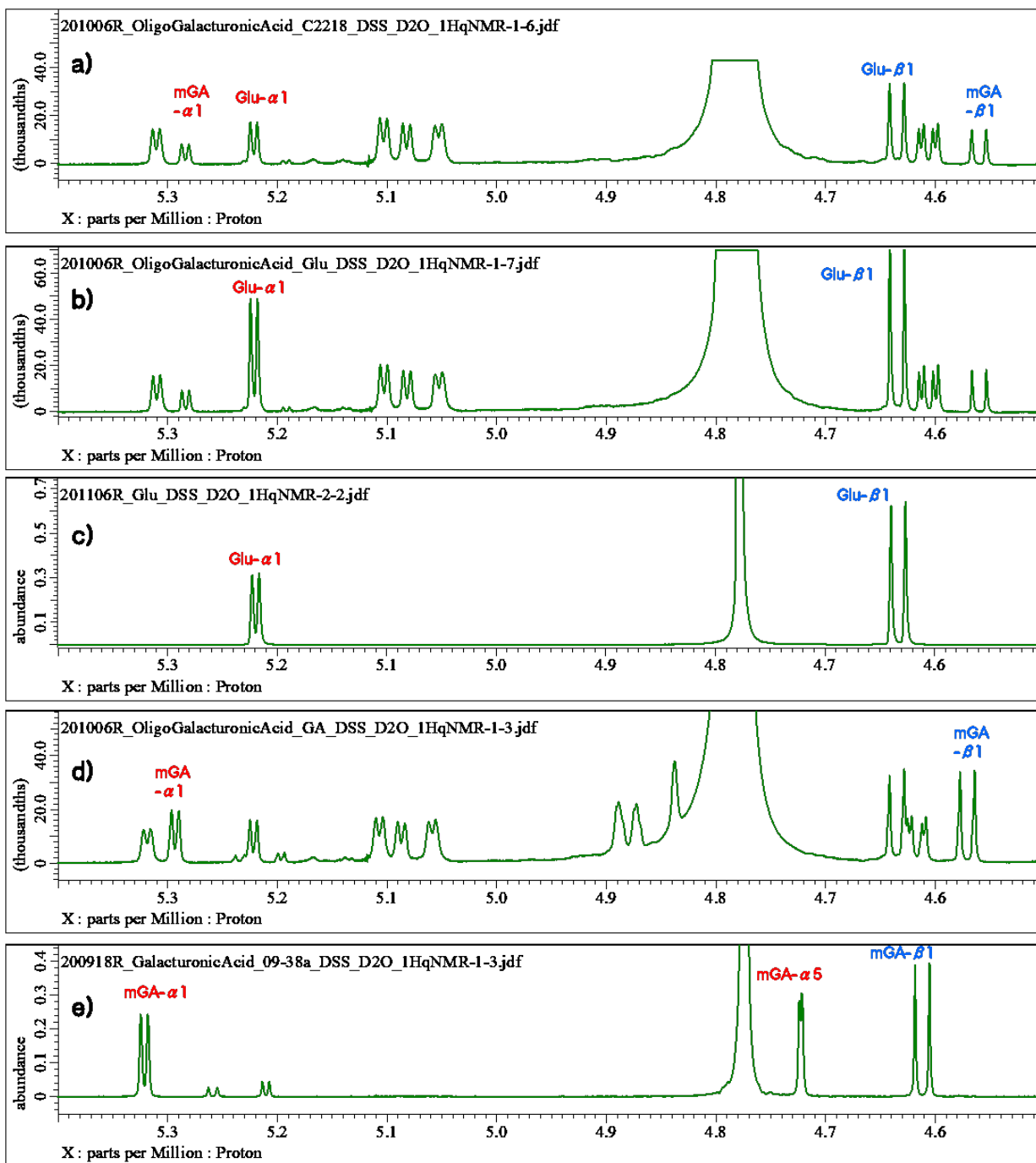
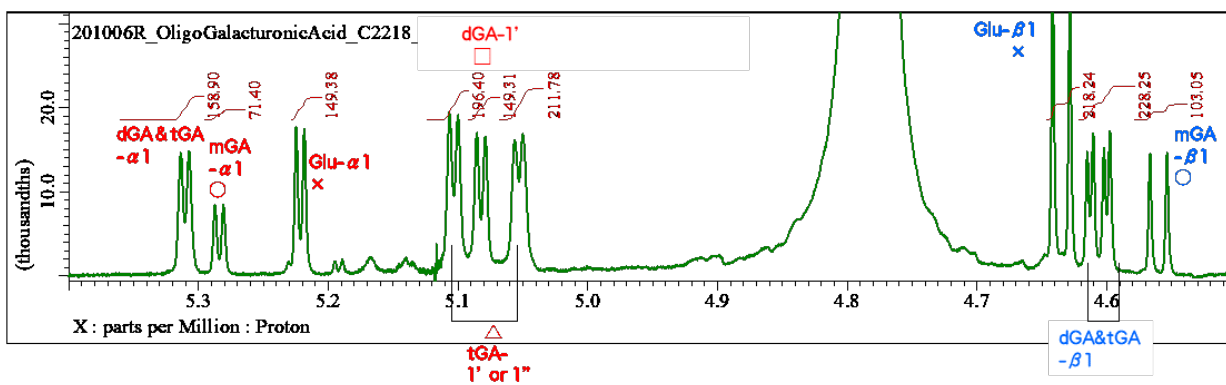


Fig. 3 添加物製品oGAに試薬Glu又はmGAを添加した¹H qNMRスペクトル(in D₂O)

a) oGA, b) oGA+Glu, c) Glu, d) oGA+mGA, e) mGA



	X(ppm)	Integral		MW			含量(wt%)	合計(m+d+t)
dGA&tGA-α1	5.31	158.90		DSS	224.36			
mGA-α1	5.28	71.40 ○		Glu	180.16	○	mGA	5.26
Glu-α1	5.22	149.38 ×		mGA	194.14	□	dGA	8.58
tGA-1' or 1''	5.10	196.40 △		dGA	370.26	△	tGA	17.31
dGA-1'	5.08	149.31 □		tGA	546.39	×	Glu	10.28
tGA-1' or 1''	5.05	211.78 △						
Glu-β1	4.64	218.24 ×			秤量値(mg)	純度(%)		
dGA&tGA-β1	4.61	228.25		DSS	1.2992	92.4		
mGA-β1	4.56	103.05 ○		oGA	310.16			
DSS	0.00	100.00		D2O	8mL			

Fig. 4 添加物製品oGAの¹H qNMRスペクトル(in D₂O)と各成分の定量値

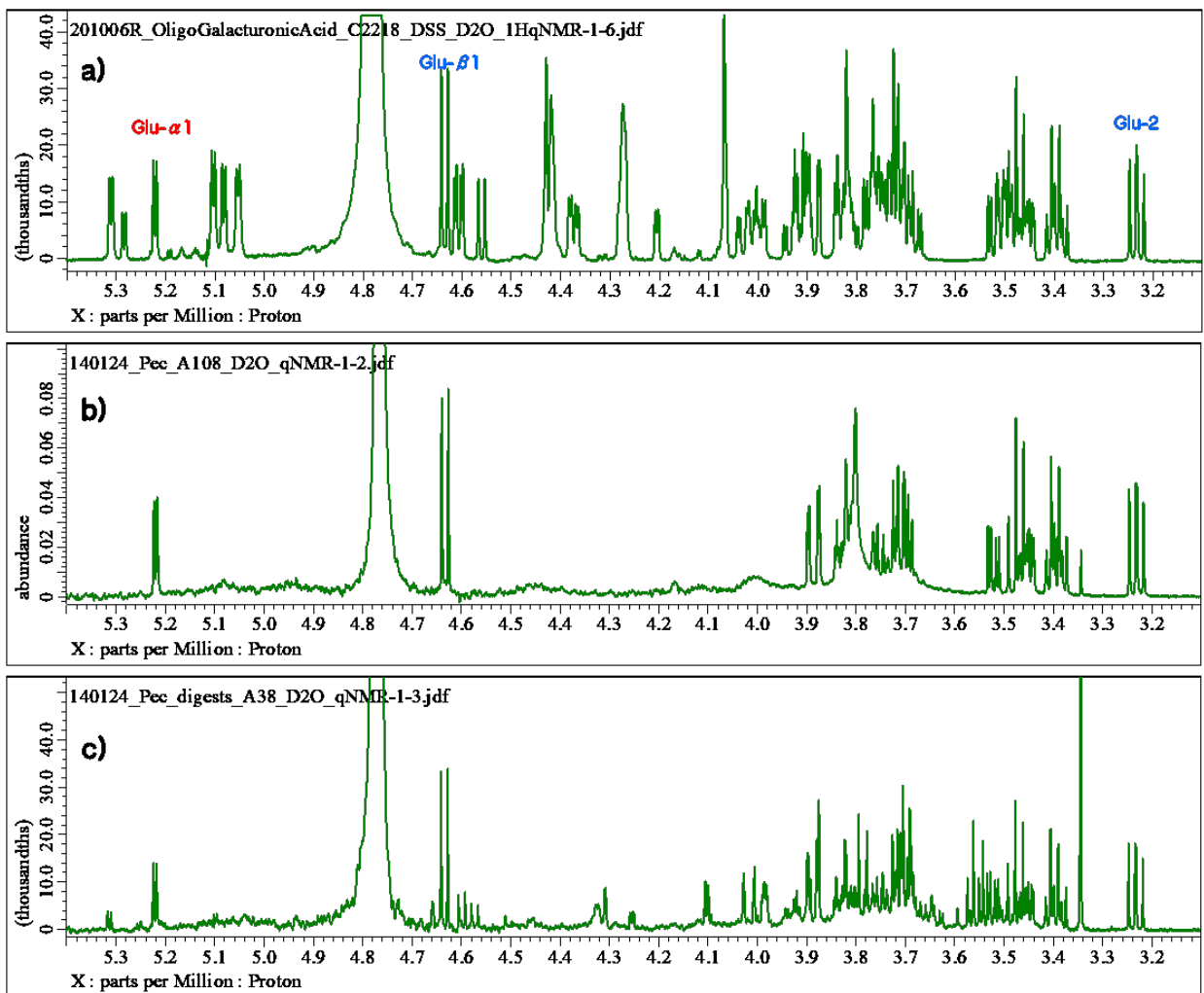


Fig. 5 ペクチン由来の添加物製品の¹H qNMRスペクトル(in D₂O)の比較
 a) オリゴガラクトン酸製品<C2218>, b) ペクチン製品<A108>, c) ペクチン分解物製品<A38>

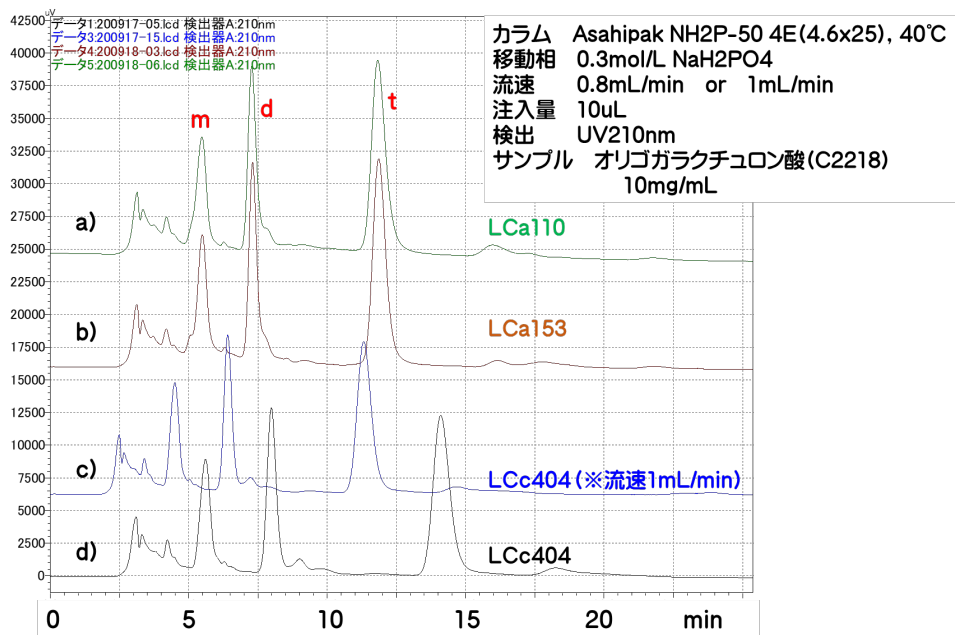


Fig. 6 異なるロットのカラムを用いたときのHPLCクロマトグラム

a) <LCa110>, b) <LCa153>, c) <LCc404> (※流速1 mL/min), d) <LCc404>.

カラム, Shodex NH2-P50 4E (4.6 x 250 mm, 5 μm); カラム温度, 40°C; 移動相, 0.3 mol/L NaH₂PO₄; 流速, 0.8 mL/min; 検出波長, UV 210 nm; 注入量, 10 μL. ただし, <>内は当部カラム管理番号.

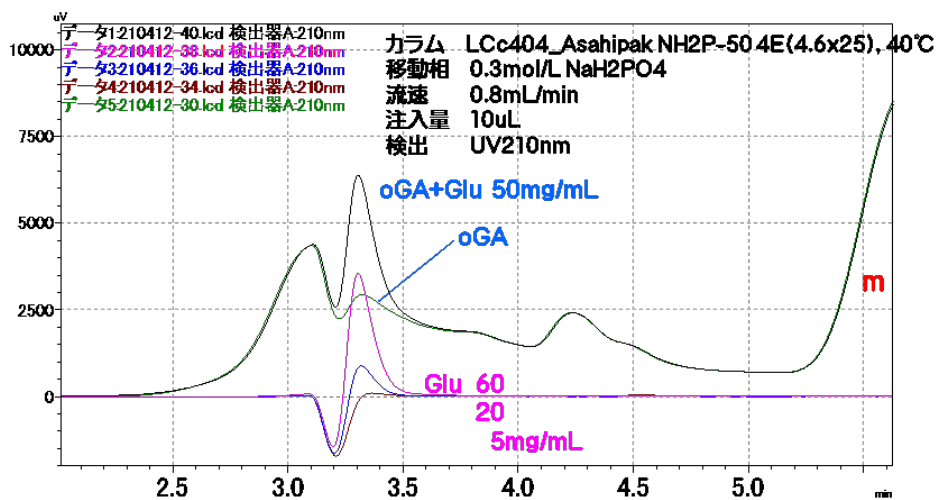


Fig. 7 添加物製品oGA及び試薬GluのHPLCクロマトグラム

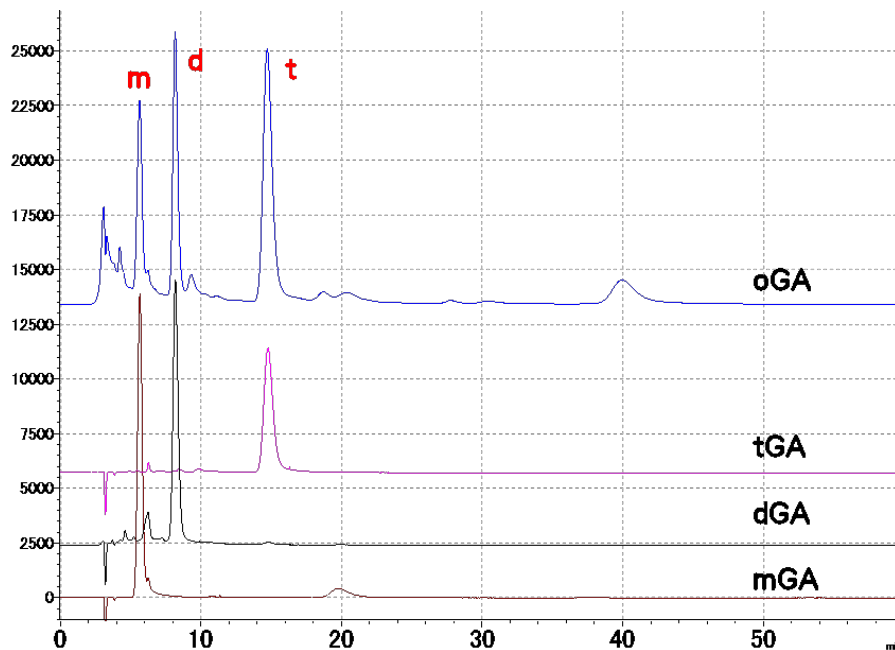
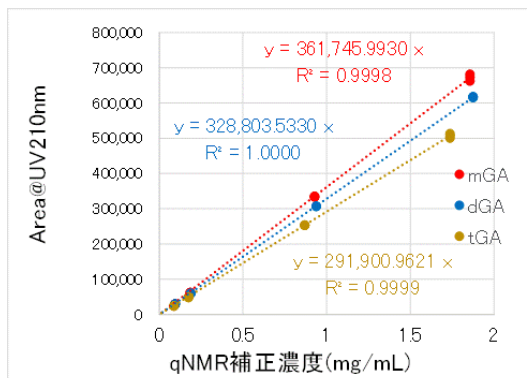


Fig. 8 試薬mGA, dGA, tGAと添加物製品oGAのHPLCクロマトグラム
 試料液の濃度：試薬, 約1 mg/mL; oGA, 10 mg/mL



採取量mg	9.5054		10.7335			9.4503
qNMR純度%	78.05		69.84			73.50
分子量→	194.14		370.26			546.39
qNMR検液濃度(mg/mL)→	7.4190		7.4963			6.9460
	mGA濃度 (mg/mL)	mGA	dGA濃度 (mg/mL)	dGA	tGA濃度 (mg/mL)	tGA
n1	0.093	28973	0.094	29685	0.087	24114
n1	0.185	62476	0.187	60038	0.174	49976
n1	0.927	335443	0.937	307426	0.868	254128
n1	1.855	681779	1.874	615144	1.736	512998
n2	0.093	28889	0.094	29386	0.087	24010
n2	0.185	62500	0.187	59708	0.174	48099
n2	0.927	334233	0.937	306353	0.868	253693
n2	1.855	672896	1.874	617687	1.736	507535
n3	0.093	29009	0.094	29688	0.087	24649
n3	0.185	62388	0.187	59770	0.174	48625
n3	0.927	332989	0.937	306845	0.868	252793
n3	1.855	662118	1.874	618327	1.736	500674
検量線の傾き→	361746		328804			291901
		分子量換算傾き→	344957			339367
試薬が一水和物100% と仮定した場合の傾き→	308535					

Fig. 9 mGA, dGA及びtGAの絶対検量線

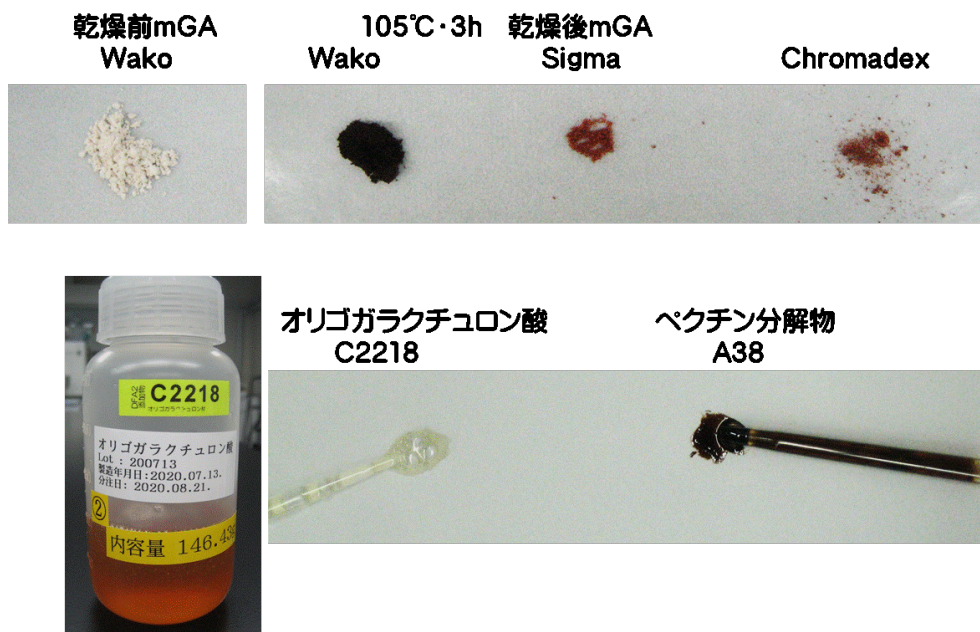


Fig. 10 乾燥前後の試薬mGA, 添加物製品oGA <C2218>及びペクチン分解物<A38>の外観の変化

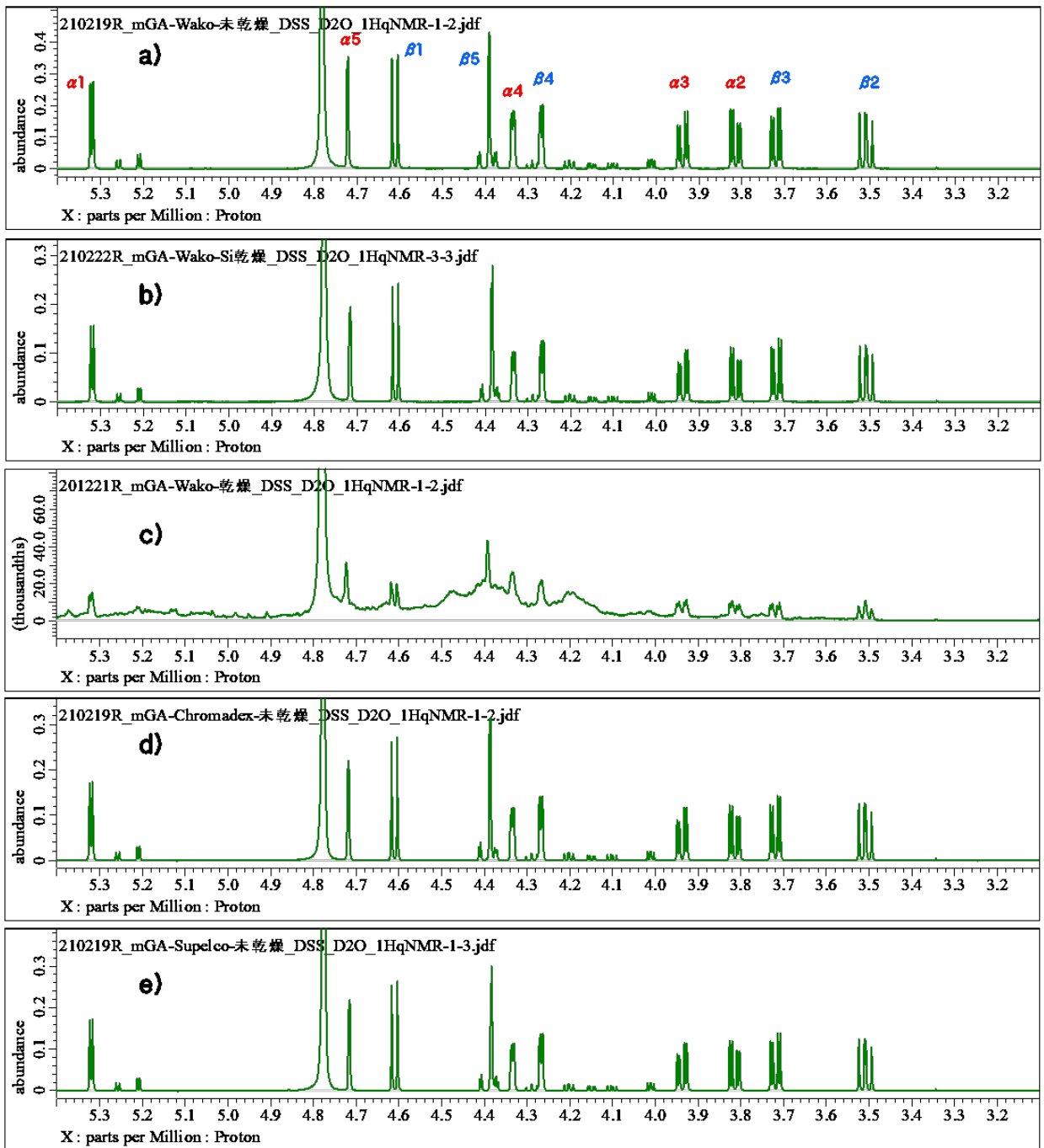
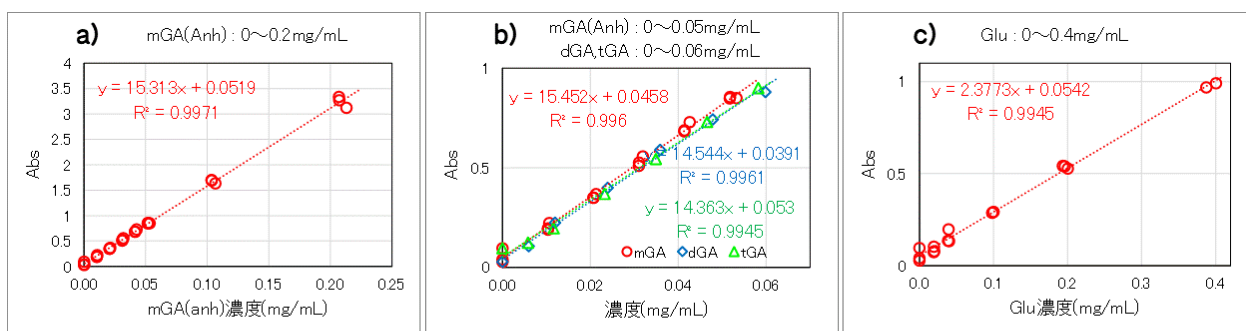


Fig. 11 3社の試薬mGAの¹H qNMRスペクトル(in D₂O)

a) mGA (Wako) 乾燥なし, b) mGA (Wako) シリカゲルデシケータ乾燥, c) mGA (Wako) 105°C乾燥, d) mGA (ChromaDex) 乾燥なし, e) mGA (Supelco) 乾燥なし



mGA濃度(Anh) mg/mL	Abs @530.0 nm
0.00	0.028
0.00	0.0961
0.00	0.0405
0.0107	0.2225
0.0104	0.1899
0.0103	0.196
0.0213	0.3685
0.0207	0.3508
0.0207	0.3494
0.0320	0.5572
0.0311	0.526
0.0310	0.5105
0.0426	0.7291
0.0414	0.6883
0.0414	0.6828
0.0533	0.8502
0.0518	0.8562
0.0517	0.8488
0.1065	1.835
0.1036	1.6938
0.1035	1.7008
0.2130	3.1221
0.2071	3.2701
0.2069	3.3373

dGA濃度 mg/mL	Abs @530.0 nm
0.00	0.028
0.006	0.1063
0.012	0.224
0.024	0.3995
0.036	0.5903
0.048	0.7433
0.060	0.881

tGA濃度 mg/mL	Abs @530.0 nm
0.00	0.0961
0.006	0.1243
0.012	0.1964
0.023	0.3691
0.035	0.5446
0.047	0.731
0.058	0.9008

Glu濃度 mg/mL	Abs @530.0 nm
0.00	0.028
0.00	0.0961
0.00	0.0405
0.0196	0.1029
0.0194	0.0736
0.0200	0.0789
0.0392	0.197
0.0387	0.1359
0.0400	0.133
0.0861	0.2868
0.1001	0.2927
0.1962	0.5394
0.1936	0.542
0.2002	0.5278
0.3872	0.9686
0.4004	0.9907

Fig. 12 カルバズール-硫酸法による検量線

Table 1 ¹H qNMRにより求めた各試薬の純度(%)

a)

mGAとして		純度(wt%)					
peak	[ppm]	n1	n2	n3	AVR	STDEV	CV%
mGA- α 1	5.32	36.91	36.88	36.90	36.56	0.31	0.88
mGA- α 2	3.81	36.88	36.54	36.51			
mGA- α 3	3.93	36.60	36.55	36.40			
mGA- α 4	4.33	36.78	36.76	36.52			
mGA- α 5	4.72	36.15	36.01	36.04			
mGA- β 1	4.61	41.97	42.02	41.97	41.49	0.52	1.24
mGA- β 2	3.50	42.08	41.91	41.78			
mGA- β 3	3.72	41.56	41.45	41.57			
mGA- β 4	4.26	40.84	41.10	40.52			
mGA- β 5	4.39	40.67	41.18	41.76			
合計 $\alpha+\beta$ (%)					78.05		
一水和物として(%)					85.29		

b)

dGAとして		純度(wt%)					
peak	[ppm]	n1	n2	n3	AVR	STDEV	CV%
dGA- α 1	5.33	28.17	28.35	28.35	29.74	1.28	4.29
dGA- α 3	4.01	30.01	30.63	30.55			
dGA- α 4	4.44	29.10	31.52	31.02			
dGA- β 2	3.49	43.94	43.03	43.37	40.10	3.68	9.17
dGA- β 4	4.38	36.78	36.82	36.65			
dGA-1'	5.07	68.53	72.13	65.01			
dGA-2'	3.71	73.82	74.57	74.00			
dGA-3'	3.93	73.81	74.18	74.12			
dGA-5'	5.04	75.59	78.23	67.25			
dGA- α 5, β 1	4.64	72.89	73.81	70.86			
dGA- β 5, 4'	4.33	120.24	120.21	120.90			
dGA- α 2, β 3	3.80	70.98	73.14	71.32			
合計 $\alpha+\beta$ (%)					69.84		

c)

tGAとして		純度(wt%)					
peak	[ppm]	n1	n2	n3	AVR	STDEV	CV%
tGA- α 1	5.36	32.08	31.97	31.26	31.77	0.45	1.40
tGA- α 5	4.76	27.13	28.06	28.37			
tGA- β 1	4.67	43.09	42.42	40.64			
tGA- β 2	3.51	44.42	43.26	44.47			
tGA- β 4, β 5	4.43	41.56	41.90	41.73	41.73	0.17	0.40
tGA-1', 1'', 5', 5''	5.09	75.88	75.77	76.05			
tGA-2', 2''	3.75	74.75	74.35	77.13			
tGA-3''	3.94	77.04	77.06	76.38			
tGA-4''	4.34	78.14	75.82	79.36			
tGA- α 4, 4'	4.48	51.50	51.67	51.87			
tGA- α 3, 3'	4.05	55.17	54.79	55.37			
tGA- α 2, β 3	3.81	70.92	70.49	75.18			
合計 $\alpha+\beta$ (%)					73.50		

d)

Gluとして		純度(wt%)					
peak	[ppm]	n1	n2	n3	AVR	STDEV	CV%
Glu- α 1	5.22	38.57	37.29	37.36	37.80	0.67	1.77
Glu- α 2	3.52	38.83	37.43	37.40			
Glu- α 5, α 6'	3.83	38.66	37.33	37.32			
Glu- β 1	4.63	60.43	61.84	61.83	61.70	0.71	1.15
Glu- β 2	3.23	60.93	62.25	62.28			
Glu- β 3, β 5	3.46	60.99	62.31	62.33			
Glu- β 6'	3.89	60.78	62.15	62.23			
Glu- α 3, α 6, β 6	3.73	46.09	45.66	45.66			
Glu- α 4, β 4	3.39	99.58	99.54	99.52			
合計 $\alpha+\beta$ (%)					99.50		

※赤枠及び青枠内を平均し、合計値を純度とした。

※灰色網掛け部分はシグナルが混在していてH数の設定ができない領域。

Table 2 HPLCによる添加物製品oGA中のmGA, dGA及びtGAの定量結果

a)

サンプル定量…それぞれの検量線使用				検液中の濃度 (mg/mL)	試料採取量(g)	定量 (mL)	含量(%)	含量 n3平均	
a)	5.7	mGA	n1	188754	0.522	1.0069	100	5.2	5.25
			n2	206035	0.570	1.0800	100	5.3	
			n3	194714	0.538	1.0184	100	5.3	
	8.2	dGA	n1	292646	0.890	1.0069	100	8.8	8.81
			n2	312539	0.951	1.0800	100	8.8	
			n3	294616	0.896	1.0184	100	8.8	
	14.7	tGA	n1	521820	1.788	1.0069	100	17.8	17.78
			n2	561575	1.924	1.0800	100	17.8	
			n3	528339	1.810	1.0184	100	17.8	
							合計	31.84	
	重合度	n1	2.33						
		n2	2.33						
		n3	2.33						

b)

	oGA製品中の含量(%)			合計
	mGA	dGA	tGA	
① qNMR補正あり それぞれの検量線使用	5.25	8.81	17.78	31.84
② qNMR補正あり mGAの傾きから、dGA、tGAの傾きを 分子量換算	5.25	8.40	15.29	28.94
③ qNMR補正あり mGAの検量線だけ使って定量	5.25	8.01	14.35	27.60
④ qNMR補正なし 試薬は一水和物100%と仮定し、 mGAの検量線だけで計算	6.15	9.39	16.82	32.37

- a) 各成分の絶対検量線を用いたときの定量(¹H qNMRで濃度補正済み)
 b) 定量に用いる絶対検量線を変えたときの定量値の変化

Table 3 3社の試薬mGAの乾燥前後の¹H qNMRによる純度

		a) 乾燥なし			b) 室温・シリカゲルデシケーター乾燥			c) 105°C・3h乾燥		
		AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%
Wako	α	37.75	1.24	3.28	36.71	0.74	2.03	4.43	0.32	7.27
	β	42.12	1.42	3.37	42.57	0.91	2.14	4.79	0.32	6.65
	α + β	79.87			79.28			9.22		
ChromaDex	α	38.11	0.87	2.29	37.97	0.87	2.29	3.54	0.60	16.89
	β	43.76	0.77	1.75	43.74	0.85	1.94	5.16	2.73	52.90
	α + β	81.87			81.71			8.70		
Supelco	α	38.06	1.03	2.70	37.77	1.13	2.99	5.21	0.55	10.63
	β	43.70	0.64	1.47	43.31	1.03	2.37	6.91	3.01	43.63
	α + β	81.76			81.08			12.12		

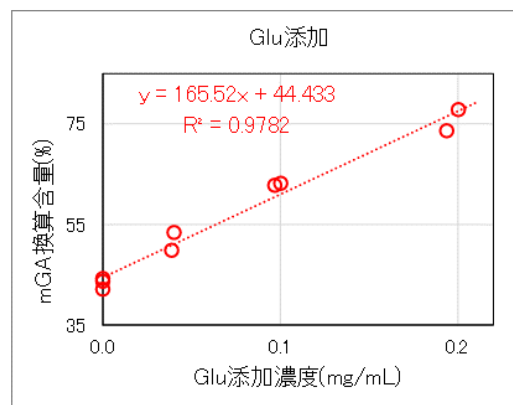
Table 4 添加物製品oGA中の含量(ガラクトロン酸(mGA)として)

a)

oGA秤量値(g)	Abs @530.0 nm	検液中のmGA 濃度(mg/mL)	mGA含量(%)	AVR/ STDEV/ CV%
1.098	0.7868	0.0480	43.68	43.35
0.9947	0.6933	0.0419	42.13	1.09
0.9924	0.7241	0.0439	44.24	2.5

b)

oGA秤量値(g)	Glu添加量 (mg/mL)	Abs @530.0 nm	検液中のmGA 濃度(mg/mL)	mGAとしての 含量(%)
0.9947	0.04	0.8119	0.0496	49.85
0.9924	0.04	0.8644	0.0530	53.38
0.9947	0.10	1.0107	0.0624	62.78
0.9924	0.10	1.0148	0.0627	63.19
0.9947	0.19	1.1776	0.0732	73.64
0.9924	0.20	1.2392	0.0772	77.82



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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～ヒマワリ種子抽出物の成分解析～

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 ヒマワリ種子抽出物は既存添加物名簿に記載され、「キク科ヒマワリ (*Helianthus annuus* LINNE) の種子又は種子の搾油相より、熱時水又は含水エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸である」と定義される酸化防止剤である。本研究では、本添加物2製品の逆相HPLCによる成分比較を行い、両製品ともchlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid及びcaffeic acidを主とするピークが観察され、有効成分の一つとされるイソクロロゲン酸は検出されなかった。また、酸化防止活性に寄与する活性本体を検討する目的で、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能を酸化防止活性の指標とし、分画した画分の活性評価と成分分析を行った。その結果、上述した成分に活性が認められ、本添加物活性への寄与が示された。一方で、これら成分を検出しない画分において強い活性が認められたことから、他の成分の活性も示唆された。本結果から、本添加物を確認する指標成分としては、明瞭に検出されるこれら3成分を指標とすることが考察される。

研究協力者

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

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物 研究員

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物 研究員

加物協会発行の第4版既存添加物自主規格²⁾に記載され、イソクロロゲン酸、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、カフェー酸を検出する定量法が記載されているが、添加物自体の実データは乏しい。そこで、本研究では、本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品間の成分比較について検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

A. 研究目的
ヒマワリ種子抽出物は、既存添加物名簿¹⁾に記載され、ヒマワリの種子から得られた、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸を主成分とする。基原・製法・本質は、キク科ヒマワリ (*Helianthus annuus* LINNE) の種子又は種子の搾油相より、熱時水又は含水エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸であるとされ、酸化防止剤を用途とする。本添加物は、日本食品添

加物協会発行の第4版既存添加物自主規格²⁾に記載され、イソクロロゲン酸、クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、カフェー酸を検出する定量法が記載されているが、添加物自体の実データは乏しい。そこで、本研究では、本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品間の成分比較について検討を行った。
ヒマワリ種子抽出物の添加物製品〔1（管理番号 C1089）、2（管理番号 C1090）〕は、日本食品添加物協会を通じて入手した。製品の外観は黄褐色の粉末（図1）であり、いずれもわずかににおいがある。標品として用いた chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid（図2）は長良サイエンス株式会社より入手したものをを用いた。試薬はすべて特級または HPLC 用を用いた。活性評価については、DPPH Antioxidant Assay Kit（同

人化学) を用いて測定した。

B-2) 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。測定条件を以下に記す。カラム: L-column ODS (2.1 i.d. × 150 mm) (化学物質評価研究機構), カラム温度: 40°C, 流速: 0.3 mL/min, 測定波長: 280 nm, 移動相: (A) 0.1% ぎ酸-蒸留水及び (B) 0.1vol% ぎ酸-アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A): 0→30 min (0→50%), 30→35 min (50%→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85%→100%)].

NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) を使用し, 測定溶媒としてメタノール (MeOH) -d₄ を用いた。ケミカルシフトは溶媒由来ピーク [MeOH-d₄ (¹H: 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm)] を基準とした。高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用した。

B-3) 試料調製

各添加物試料について, 10 mg/mL になるよう蒸留水で溶解し, 試料溶液とした。調製した各試料溶液について, 逆相 HPLC 分析に供した。

B-4) 分画物の調製

ヒマワリ種子抽出物 (5.0 g) を水に溶解し, YMC gel ODS-AQ カラムクロマトグラフィーにより分画し, 7 画分 [①水溶出部 (1.1 g)、②10%MeOH 溶出部 (1.5 g)、③20%MeOH 溶出部 (1.6 g)、④30%MeOH 溶出部 (105.8 mg)、⑤40%MeOH 溶出部 (30.4mg)、⑥50%MeOH 溶出部 (8.2 mg)、⑦MeOH 溶出部 (17.0 mg)] を得た。

B-5) DPPH ラジカル消去活性の評価

酸化防止能の評価については, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を DPPH Antioxidant Assay Kit (同人化学) を用いて測定した。コントロールの吸光度に対する試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を算出し, 50%阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。また、

trolox の IC₅₀ を求め, TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity) を算出した。

C. 結果及び考察

C-1) 分画物の逆相 HPLC 分析

前年度, 分析対象としたヒマワリ種子抽出物の有効成分とされるクロロゲン酸 [chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid)], イソクロロゲン酸 [di-*O*-caffeoylquinic acid 類 (3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid)], 及び 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid を標品として HPLC 分析を行い, 保持時間 17, 19, 20 分付近に顕著なピークが共通して観察され, 3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid と同定し報告している。今年度は, 添加物試料を 7 画分 (①~⑦) に分画し, 各分画物について HPLC 分析を行った。その結果, 10%~30%MeOH (②~④) 溶出部に 3 成分によるピークが認められた。10%MeOH 溶出部 (②) について, カラムクロマトグラフィーによる分離精製を試みたところ 3-*O*-caffeoylquinic acid 及び 3 成分以外の caffeic acid を同定した。20%MeOH 溶出部 (③) については 3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 30%MeOH 溶出部 (④) については chlorogenic acid を同定した (図 3)。

C-2) DPPH ラジカル消去活性の評価

ヒマワリ種子抽出物より得られた分画物①~⑦について, DPPH ラジカル消去活性を評価した。また, 各分画物の添加物への寄与度を考察するため, 各分画物の TEAC を求めた。各分画物の活性 (IC₅₀ 及び TEAC) を表 1 に示す。IC₅₀, TEAC を見ると, 水溶出部以外は活性が認められたが, 特に分画物④~⑦が強い活性を示した。添加物における活性寄与度を検討するため, TEAC に収量を乗じて活性寄与値としてみると, 分画物③ (活性寄与度 42.1), ② (27.9), ④ (21.9) の順に大きいことが示された。よって, HPLC 分析の結果, 4 成分 (3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, caffeic acid) が認められた画分の寄与が示唆さ

れた。そこで、これら4成分のDPPHラジカル消去活性を評価したところ、3成分(3-*O*-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid)はほぼ同等のDPPHラジカル消去活性を示し、いずれの化合物においても活性が認められた(表2)。それゆえ、これらcaffeoylquinic acid類が活性成分として示唆された。

一方で、収量が少ない分画物⑤～⑦についても強い活性が認められ、このフラクションには4化合物が殆ど検出されておらず、それゆえ、その他成分の活性への寄与も考察される。

D. 結論

既存添加物ヒマワリ種子抽出物について、添加物製品2検体の逆相HPLCによる成分比較を行った結果、両製品ともchlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid及びcaffeic acidによるピークが観察され、有効成分の一つとされるイソクロロゲン酸は検出されなかった。また、酸化防止活性に寄与する活性本体を検討する目的で、DPPHラジカル消去能を酸化防止活性の指標として分画した画分の活性評価と成分分析を行った。その結果、上述した成分に活性が認められ、本添加物活性への寄与が示された。一方で、これら成分を検出しない画分において強い活性が認められたことから、他の成分の活性も示唆された。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第120号(1996)“既存添加物名簿”平成8年4月16日
- 2) 第4版既存添加物自主規格, 平成20年10月, 日本食品添加物協会

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

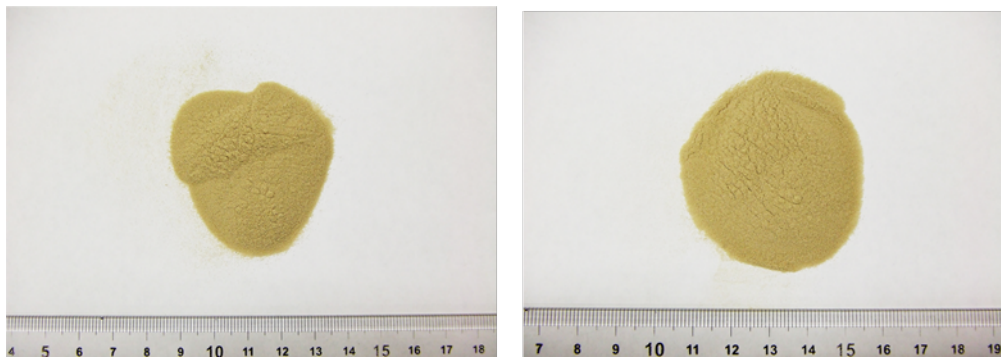
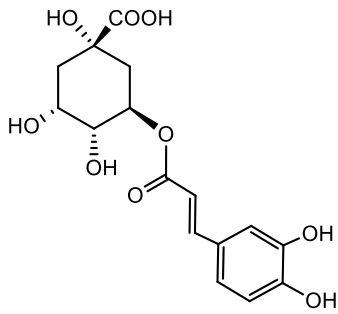
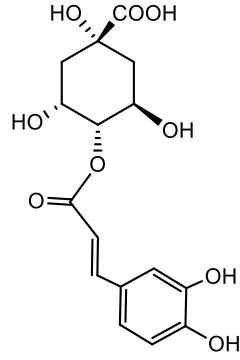


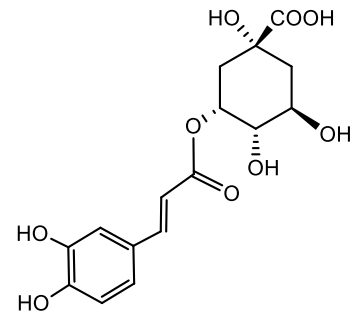
図1. ヒマワリ種子抽出物



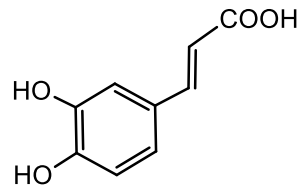
Chlorogenic acid



4-*O*-Caffeoylquinic acid



3-*O*-Caffeoylquinic acid



Caffeic acid

图 2. 構造式

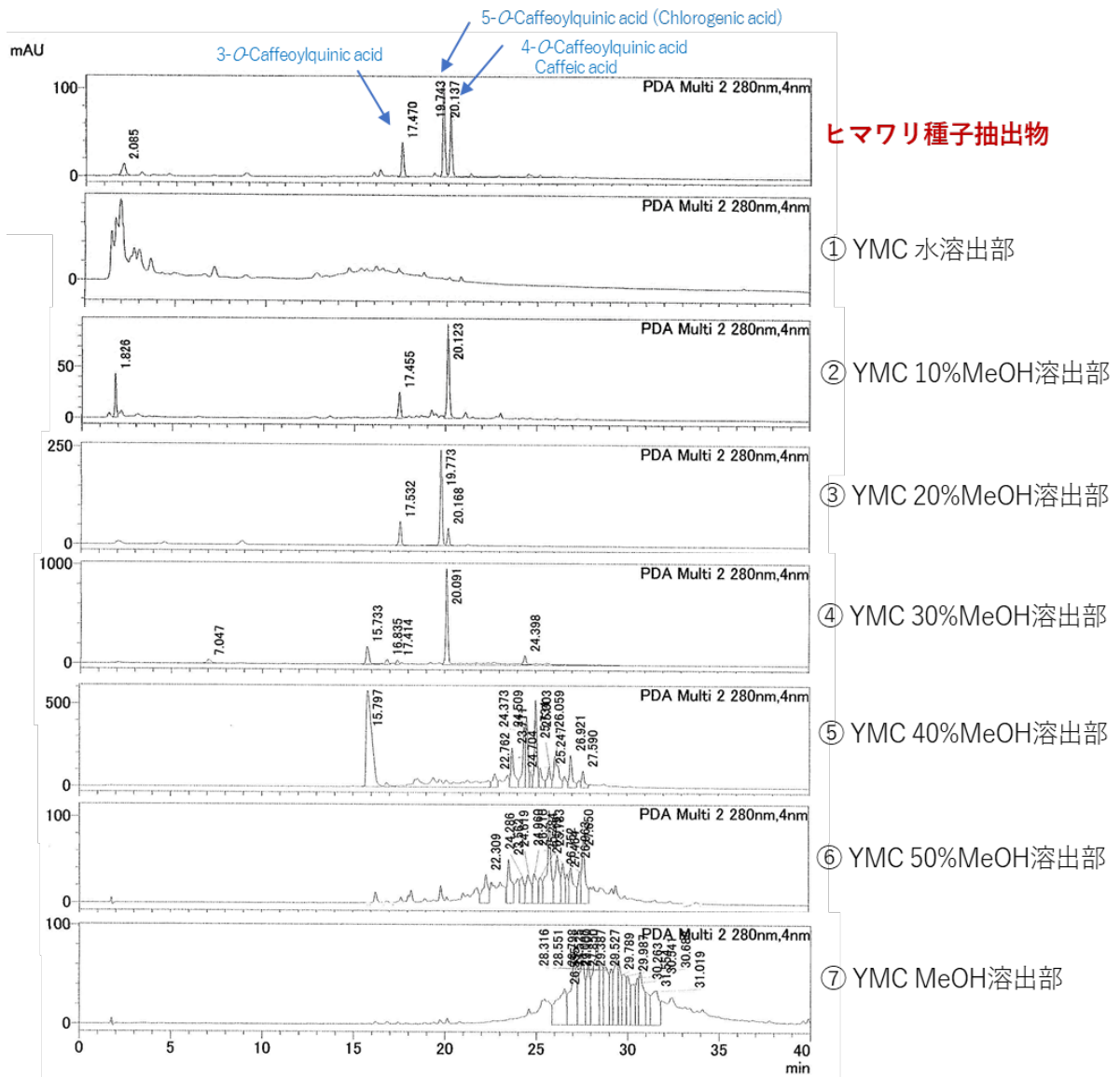


表 1

ヒマワリ種子抽出物	IC ₅₀ : 2363.2 µg/mL TEAC : 0.0247
①YMC水溶出部	5000 µg/mL <
②YMC10%MeOH溶出部	3917.6 µg/mL 0.0186 (27.9)
③YMC20%MeOH溶出部	2483.9 µg/mL 0.0263 (42.1)
④YMC30%MeOH溶出部	297.6 µg/mL 0.207 (21.9)
⑤YMC40%MeOH溶出部	109.1 µg/mL 0.567 (17.2)
⑥YMC50%MeOH溶出部	280.2 µg/mL 0.216 (1.8)
⑦YMCMeOH溶出部	267.1 µg/mL 0.230 (3.9)

表 2

	IC ₅₀	TEAC
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	156.4 µM	1.55
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	146.4 µM	1.66
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	146.7 µM	1.62
Caffeic acid	688.8 µM	0.35

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～ショウガ抽出物の成分解析～

研究分担者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨 ショウガ抽出物は既存添加物名簿に記載され、「ショウガ科ショウガ (*Zingiber officinale* ROSC.) の根茎より、室温時エタノール、アセトン又はヘキサンで抽出して得られたものである。主成分はジンゲロール類及びショーガオール類である」と定義される製造用剤である。本添加物については成分情報が乏しいことから、本研究では本添加物12製品の逆相HPLCによる成分比較を行った。今年度は新たに[8]-gingerol, [10]-gingerol, [8]-shogaol, citral, zingiberene, β -phellandreneを解析し、それらの分布も製品間で一定ではなかった。逆相HPLCによるピークパターンから製品間の違いをまとめると、3グループ(①[6]-gingerolが主検出, ②[6]-gingerol及び[6]-shogaolいずれも検出, ③いずれも検出せず)に分類された。製品用途からみると、①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物, ②はショウガ抽出物, ③は香辛料抽出物とするもので、用途により成分分布が異なることが確認された。よって、ショウガ抽出物を用途とする場合、[6]-gingerol及び[6]-shogaolのいずれかまたはどちらかを確認することで対応できることが考察された。一方で、原料となるショウガは[6]-gingerolが主検出され、同じ基原を原料とする生薬のショウキョウ、カンキョウは[6]-gingerol及び[6]-shogaolが検出され、生薬は日本薬局方における指標成分が観察された。添加物についても成分規格を示し、一定の同等性を確認して品質管理する必要性が示唆された。

研究協力者

好村守生 松山大学薬学部 准教授

内倉 崇 松山大学薬学部 特任助教授

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物 室長

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物 研究員

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物 研究員

A. 研究目的

ショウガ抽出物は、既存添加物名簿¹⁾に記載され、ショウガの根茎から得られた、ショウガオール及びジンゲロールを主成分とするものをいう。基原・製法・本質は、ショウガ科ショウガ (*Zingiber officinale* ROSC.) の根茎より、室温時エタノール、アセトン又はヘキサンで抽出

して得られたものである。主成分はジンゲロール類及びショーガオール類であるとされ、製造用剤を用途とする。基原となるショウガは食品であり、第十八改正日本薬局方(局方)²⁾記載の生薬〔ショウキョウ(生姜)、カンキョウ(乾姜)]の原料でもあり、食品添加物としても含め、その用途は広い。一方で、局方には確認試験が規定されているが、本添加物は、日本食品添加物協会発行の第4版既存添加物自主規格³⁾にも記載されておらず、品質管理に向けた科学データの集積が課題とされる。そこで本研究では、本添加物の成分データの集積を目的に、添加物製品間の成分比較について検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ショウガ抽出物の添加物製品(1~12)は、日

本食品添加物協会を通じて入手した(表1)。製品の外観は淡黄～茶褐色のペースト又は液体で、図1に示すような3パターン〔(a: 製品1～3, 7～9, b: 製品10～12, c: 製品4～6)〕あり、いずれもショウガ特有のにおいがある。化合物の同定、成分解析に標品として用いた[6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol, [6]-shogaol, [8]-shogaol, zingiberene, citralは、富士フィルム和光純薬株式会社製、フナコシ製、またはコスモバイオ製を用いた。試薬はすべて特級またはHPLC用を用いた。

B-2) 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム(島津製作所)を使用した。測定条件を以下に記す。カラム:L-column ODS (2.1 i.d. × 150 mm)(化学物質評価研究機構), カラム温度:40°C, 流速:0.3 mL/min, 測定波長:254, 280 nm, 移動相:(A) 0.1% ぎ酸-蒸留水及び (B) 0.1 vol% ぎ酸-アセトニトリル〔濃度勾配条件 (B in A): 0→5 min (50→85%), 5→10 min (85%), 10→20 min (85→100%), 20→40 min (100%)〕。

NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) を使用し、測定溶媒としてメタノール (MeOH) -d₄ を用いた。ケミカルシフトは溶媒由来ピーク [MeOH-d₄ (¹H: 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm)] を基準とした。高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用した。

B-3) 試料調製

各試料について、1 mg/mL になるようメタノールで溶解し、試料溶液とした。調製した各試料溶液について、逆相 HPLC 分析に用いた。

ショウガ(長崎県産)、ショウキョウ、カンキョウ(ウチダ和漢薬製)(図1)について、エタノール、アセトン、*n*-ヘキサンエキスを調製し、添加物製品と含有成分の比較検討を行った。具体的には、粉碎した各試料(1 g)に各溶媒(ショウガ/5 mL, ショウキョウ, カンキョウ/10 mL)を加え、超音波処理(5分間)後、遠心分離し、その上澄みを濃縮して各試料エキスとした。

B-4) 分離精製

ショウガ抽出物(製品1)(4.1 g)に水(50 mL)を加え、*n*-ヘキサン(50 mL×3)で液液分配した。得られた*n*-ヘキサンエキス(1.0 g)を各種カラムクロマトグラフィー(YMC gel ODS-AQ, Chromatorex ODS, 分取 TLC)による分離精製を繰り返し、化合物の単離を試みた。単離した化合物については標品の分析データとの直接比較、あるいは文献値と比較することにより行った。

C. 結果及び考察

C-1) 製品の分離精製

ショウガ抽出物(4.1 g)について、液液分配、次いで各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製の結果、[6]-gingerol (63.8 mg), [8]-gingerol (3.4 mg), [10]-gingerol (7.0 mg), [6]-shogaol (13.6 mg)を単離、同定した。得られた化合物は、NMR, MSの機器分析データに基づき解析し、これらも標品として用いた。

C-2) 試料の逆相 HPLC 分析

ショウガ抽出物の主成分とされる[6]-gingerol, [6]-shogaol, その他成分の化学構造について図2に示す。各試料溶液及び[6]-gingerol, [6]-shogaol について HPLC 分析を行った。その結果を図3(検出 254, 280 nm)に示す。本条件においては、[6]-gingerol が保持時間 4.5 分付近、[6]-shogaol が 11 分付近に検出された。また、各試料においては、主成分とされる2成分以外のピークも観察され、標品と直接比較した結果、citral (neral, geranial の混合物), [8]-shogaol, zingiberene, β-phellandrene のピークを同定した。HPLC 結果からわかるように、主成分とされる2成分以外の成分についても、製品により検出は一定ではないことが示された。

ピークパターンから製品間の違いを検討した結果、① [6]-gingerol が主検出(製品1～3), ② [6]-gingerol 及び[6]-shogaol いずれも検出(製品7～9), ③ いずれも検出せず(製品4～6, 10～12)の3グループに分類され、主成分がいずれも顕著に検出されない製品が6検体確認され

た。製品用途（表 1）からみると、①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物、②はショウガ抽出物、③は香辛料抽出物とするもので、用途により成分分布が異なることが分析データからも確認された。よって、用途をショウガ抽出物とする場合、[6]-gingerol 及び[6]-shogaol をどちらかあるいはいずれも検出することを確認する等で対応できることが考察された。

C-3) 食品（ショウガ）、生薬（ショウキョウ、カンキョウ）の逆相 HPLC 分析

ショウガ、ショウキョウ、カンキョウについて、調製したアセトンエキス、酢酸エチルエキス、*n*-ヘキサンエキスについて HPLC 分析を行った。いずれのエキスについても、ショウガは [6]-gingerol が主検出され、ショウキョウ、カンキョウは [6]-gingerol 及び [6]-shogaol が検出され、生薬は日本薬局方において規定されている指標成分が観察された。

D. 結論

既存添加物ショウガ抽出物について、添加物製品12検体の逆相HPLCによる成分比較を行った結果、① [6]-gingerolが主検出、② [6]-gingerol 及び [6]-shogaol いずれも検出、③ いずれも検出せずの3グループに分類され、主成分がいずれも顕著に検出されない試料も認められた。その他の成分についても、検出は製品により一定ではなかった。製品用途からみると、①は香辛料抽出物及びショウガ抽出物、②はショウガ抽出物、③は香辛料抽出物とするもので、用途により成分分布が異なることが確認された。よって、ショウガ抽出物を用途とする場合、[6]-gingerol 及び [6]-shogaol をいずれかまたはどちらかを認めることで対応できることが考察された。

また、原料となるショウガは [6]-gingerol が主検出され、同じ基原を原料とする生薬のショウキョウ、カンキョウは [6]-gingerol 及び [6]-shogaol が検出され、生薬は日本薬局方における指標成分が観察された。それゆえ、添加物についても成分規格を示し、一定の同等性を確認する必要性が示唆された。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第 120 号 (1996) “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日
- 2) 第十八改正日本薬局方, p.1907, 1964, 厚生労働省(2021).
- 3) 第 4 版既存添加物自主規格, p.418, 日本食品添加物協会(2008).

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 長井理夏子, 内倉 崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析, 第 60 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 (2021.11.8～2021.11.21) (WEB 開催)

2. 論文発表等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

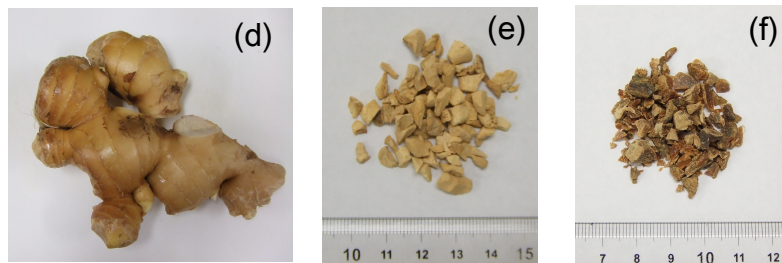
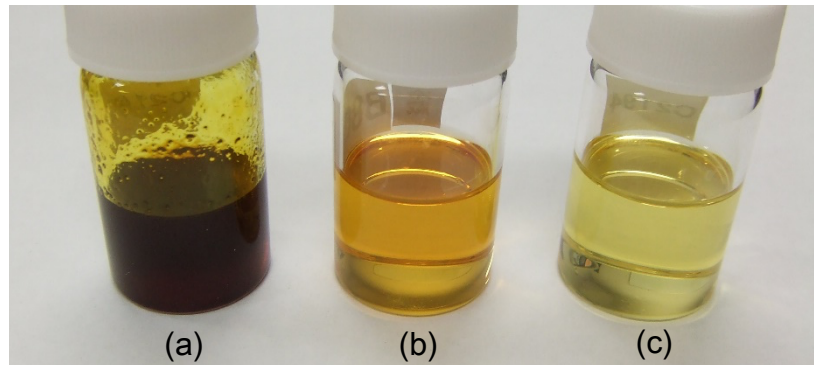
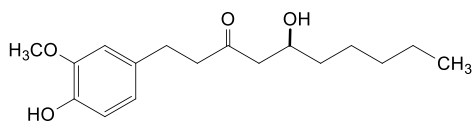
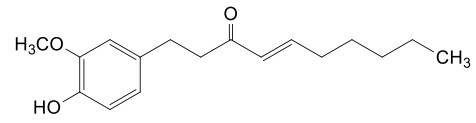


図1. 供試した試料

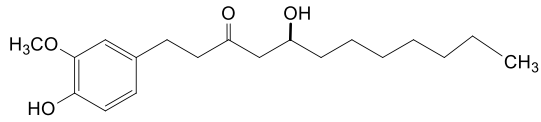
(a)～(c) 添加物試料の例, (d) ショウガ, (e) ショウキョウ, (f) カンキョウ



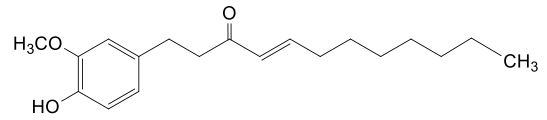
[6]-Gingerol



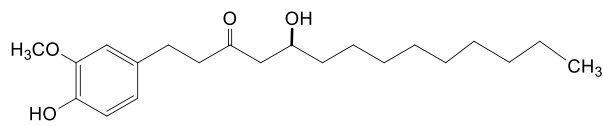
[6]-Shogaol



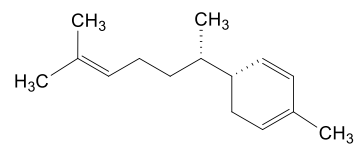
[8]-Gingerol



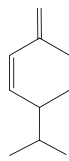
[8]-Shogaol



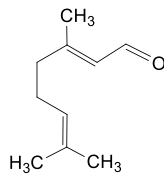
[10]-Gingerol



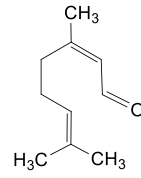
Zingiberene



β -Phelladrene



Geranial



Neral

Citral

图 2. 含有成分の化学構造

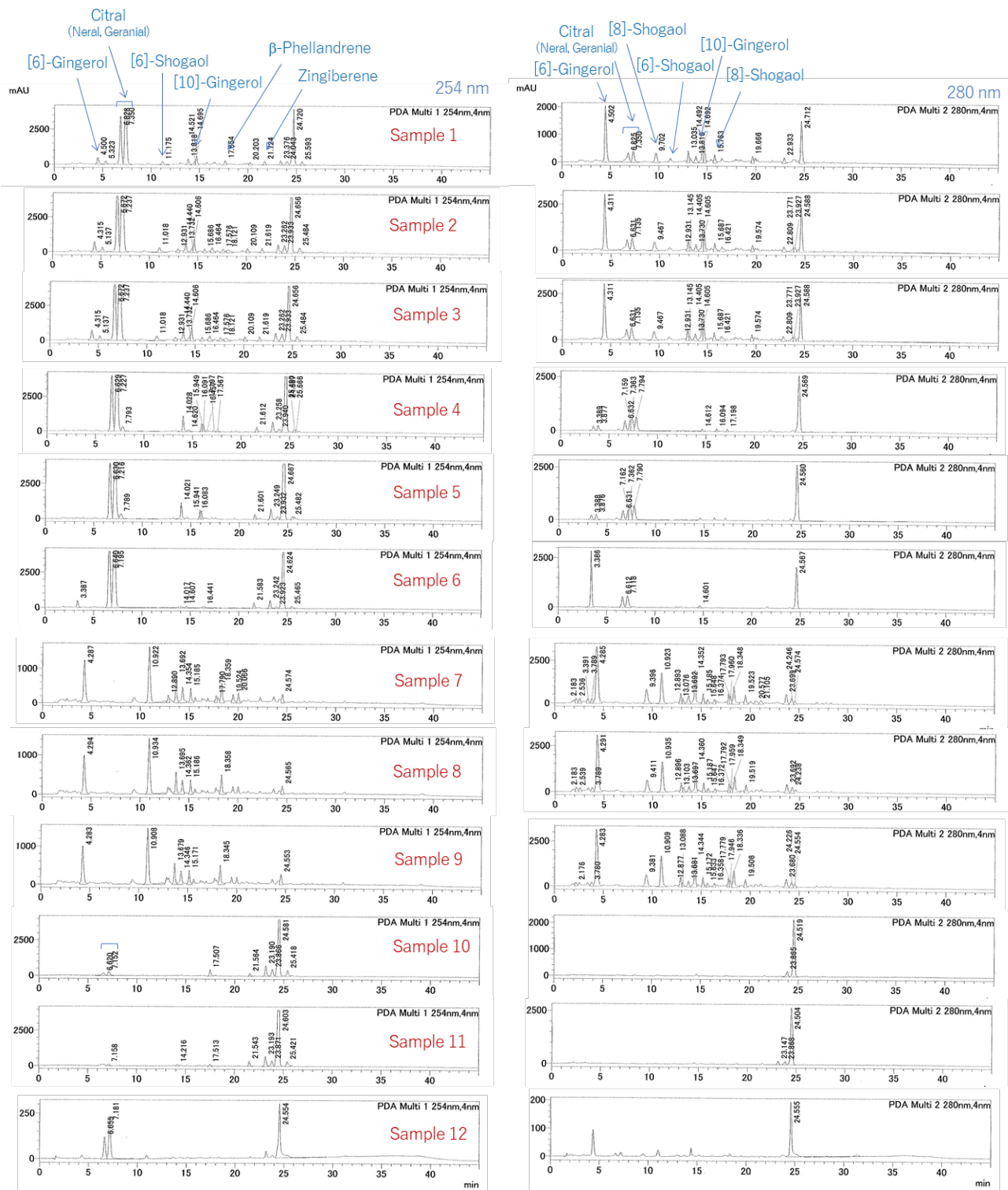


図 3. 逆相 HPLC クロマトグラム

表 1. 供試した添加物試料

添加物名称
1～3 : ショウガ抽出物 (しょうがオイル, 用途 : 天然香料, 香辛料抽出物, ショウガ抽出物) (管理番号 1; C2185, 2; C2186, 3; C2187)
4～6 : ショウガ抽出物 (GINGER OIL, 用途 : 香辛料抽出物) (管理番号 4; C2194, 5; C2195, 6; C2196)
7～9 : ショウガ抽出物 (GINGER EXTRACT, 用途 : ショウガ抽出物) (管理番号 7; C2197, 8; C2198, 9; C2199)
10 : 香辛料抽出物 (ショウガ) (GINGER OIL, 用途 : 香辛料抽出物) (管理番号 10; B801)
11 : 香辛料抽出物 (ショウガ) (ショウガ基原香辛料抽出物, 用途 : 香辛料抽出物) (管理番号 11; B803)
12 : 香辛料抽出物 (ショウガ) (ジンジャーオイル, 用途 : 香辛料抽出物) (管理番号 12; B804)

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格に関する研究

～アナトー色素の定量評価の基礎検討～

研究分担者 井之上浩一 立命館大学薬学部 臨床分析化学研究室 教授

研究要旨 アナトー色素は、第9版食品添加物公定書においてベニノキ (*Bixa orellana* L.) の種子の被覆物から得られたものであり、ノルビキシンを主成分とするもの及びビキシンを主成分とするものと定義されている。確認試験では、逆相系高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定し、標準液のノルビキシン及びビキシンのピークの保持時間と一致することにより評価している。しかしながら、定量法では、逆相系HPLCではなく、色価測定法によりノルビキシン及びビキシンの含量を求めている。そのため、HPLCを用いた正確かつ汎用性のある定量法を開発する必要がある。そこで、本年度では、ノルビキシン及びビキシンの分析法の構築を試みた。その結果、分析時間10分にて良好な分離及びピーク形状を示す最適な条件を決定することができた。さらに、検出波長460 nmにおいて絶対検量線を作成した結果、定量限界が0.06 ppmと高感度に定量可能であることも確認できた。また、本条件を用いて6種類のアナトー色素関連製剤を分析した。その結果、いずれの製剤もノルビキシン又はビキシンが検出された。

研究協力者

高橋未来 立命館大学薬学部 助教

A. 研究目的

アナトー色素 (Annatto Extract) は第9版食品添加物公定書 (以下、公定書) において、ベニノキ (*Bixa orellana* L.) の種子の被覆物から得られたものである。なお、ノルビキシン (Norbixin, NBx) を主成分とするもの及びビキシン (Bixin, Bx) を主成分とするものがあり、それぞれをノルビキシン及びビキシンと定義されている¹⁾。なお、ノルビキシン及びビキシンの構造式を図1に示した。アナトー色素は黄～黄みのオレンジ色の天然カロテノイド色素であり、バターやチーズなどの高脂肪乳製品、スナック、アイスクリーム、菓子類やソフトドリンクなどの食品に対して着色料として用いられている^{2,4)}。アナトー色素にはカロテノイド (ノルビキシン及びビキシン) だけでなく、フェノール化合物 (ケルセチン及び

ルチン等) も含まれており、いずれもフリーラジカルの消去作用による抗酸化能が報告されている⁵⁾。そのため、アナトー色素は抗炎症、心血管疾患、白内障や黄斑変性症などの様々な慢性変性疾患における発症リスクの抑制に関与していると言われている⁵⁾。しかしながら、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は物理的な環境要因 (光、温度、空気、pH) による影響を受けやすいことが報告されている⁶⁾。それゆえに、ノルビキシン及びビキシンの成分規格を設定し、天然着色料として品質を確保していくことが求められる。

アナトー色素中のノルビキシン及びビキシンは、これまで高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を中心に紫外可視吸光度計 (UV-Vis)、フォトダイオードアレイ (PDA) 及び質量分析 (MS) などの検出器と組み合わせた分析法が開発されてきた⁵⁾。現在、公定法における確認試験では、本品を逆相系 HPLC によ

り測定し、標準液のノルビキシシ及びビキシシのピークの保持時間と一致することにより評価している^リ。しかしながら、定量法では、逆相系 HPLC ではなく、色価測定法によりノルビキシシ及びビキシシの含量を求めている。ゆえに、本規格において、正確なノルビキシシ及びビキシシの定量分析や純度評価が十分に実施されていない。以上より、本年度では、ノルビキシシ及びビキシシの逆相系 HPLC を基盤とした汎用性かつ高精度な定量分析法の構築及び MS スペクトルによる成分解析など基礎検討することとした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

アナトー色素製剤は、ノルビキシシ (A 社製；粉末)、ビキシシ (A 社製；粉末) アナトー色素 B (水溶性アナトー, B 社製；液状)、アナトー色素 C (水溶性アナトー, C 社製；液状)、アナトー色素 D (水溶性アナトー, D 社製；液状) 及びアナトー色素 E (水溶性アナトー, E 社製；液状) を入手した。なお、水溶性アナトーはノルビキシシをアルカリ処理したアルカリ塩 (カリウム塩, ナトリウム塩) であるため、指定添加物として規格基準が定められている。

アセトニトリル (HPLC 用)、アセトン (特級)、メタノール (HPLC 用)、ギ酸 (LC/MS 用, 約 99%) 及び酢酸 (LC/MS 用, 約 99%) は富士フイルム和光純薬社製を用いた。ジメチルスルホキシド (DMSO) はナカライテスク社製を用いた。超純水は PURELAB flex5 system (ELGA 社製) を用いて得た。

B-2) 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52
遠心分離機：日立工機社製 Himac CF15RN
HPLC 装置：島津製作所社製 HPLC-20AD/SIL-20AC/RF-10AXL/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS

LC-MS 装置：Waters 社製 Acquity H Class/PDA e λ /Xevo TQD

B-2) 確認試験 (第 9 版食品添加物公定書)

ノルビキシシ

- (1) 本品の表示量から、ノルビキシシ含量 15% に換算して 0.1 g に相当する量を量り、水 50 mL を加えて振り混ぜて溶解性を確認した。
- (2) 本品を水酸化カリウム (1→200) に溶かした液の極大吸収部を確認した

ビキシシ

- (1) 本品の表示量から、ビキシシ含量 25% に換算して 40 mg に相当する量を量り、水 50 mL を加えて振り混ぜて溶解性を確認した。
- (2) 本品をアセトンに溶かした液の極大吸収部を確認した。

B-3) HPLC 分離分析

粉末の対象試料は DMSO により溶解し、メタノール/水 (90/10, V/V) 混液を用いて希釈した。移動相には、0.1 vol% 酢酸メタノール/0.1 vol% 酢酸水溶液を使用し、90/10 をアイソクラティック条件により、10 分の分析を行った。
カラム：TSKgel ODS-100Z column (4.6×150 mm, 5 μ m, 東ソー社製)
カラム温度：40°C
流速：1.0 mL/min
検出波長：460 nm
注入量：10 μ L

B-4) LC-MS によるスペクトル解析

Ion mode：ESI (+)
Capillary voltage：2.0 kV
Extractor voltage：3.0 V
RF lens voltage：2.5 V
Source temperature：150°C
Desolvation temperature：400°C
Cone/desolvation gas flows：50/800 L/hr
MS scan range：m/z 200 to 500

Daughter scan range : m/z 50 to 500

Cone voltage : 10-40 V

Collision energy : 10-40 eV

C. 結果及び考察

C-1) 確認試験

国内で流通しているアナトー色素を用いて、第 9 版食品添加物公定書の確認試験を実施した。実試料を調製し、確認試験を実施した結果、いずれのアナトー色素製品も規格基準に従うことが確認できた。

- (1) 本品に水 50 mL を加えて振り混ぜた結果、いずれもほとんど溶けなかった (図 2)。
- (2) いずれも検液は橙色の色彩を示した。規格基準においてビキシンは波長 452~460 nm 及び 482~490 nm, ノルビキシンは波長 448~456 nm 及び 476~484 nm に極大吸収部が確認された (図 3)。

C-2) HPLC の単離分析

ノルビキシン及びビキシンは低極性な化合物であると考えられるため、溶解性を確認した。メタノール、アセトニトリル、アセトン、DMSO 及び水を用いた結果、DMSO が最も容易に溶解した。なお、メタノール及びアセトンにおいても溶解したが、完全溶解することは困難であった (図 4)。そのため、DMSO を標準原液の溶媒として用いて、最終的な移動相の組成比であるメタノール/水 (90/10, V/V) 混液を希釈液として用いることとした。また、保土谷工業社製の水分散性アナトー及び水溶性アナトーに関する溶解試験を実施した結果、水分散性アナトー色素ではエタノール、メタノール、アセトニトリル及びアセトンにおいて不溶解物が生じた (図 5)。水溶性アナトー色素ではエタノール、アセトニトリル及びアセトンにおいて不溶解物が生じた (図 6)。

ノルビアナトー及びビキシンの紫外可視吸収スペクトルによる極大吸収波長を確認した。確認試験 (2) におけるスペクトルより、いずれも 460 nm 付近にて吸収極大波長が確認され

たため、定量及び定性分析する際のモニタリング波長として設定することとした (図 3) しかしながら、アナトー色素製剤の色素成分以外もモニタリングするため、254 nm も設定することとした。

ノルビキシン及びビキシンの逆相系 HPLC の分離分析について検討した。まず、移動相条件 (アイソクラティック) を比較した。まず、有機溶媒系についてメタノール又はアセトニトリルを用いた際の保持時間や不純物ピークとの分離や汎用性を考慮した結果、メタノールを用いることとした (図 7)。次いで、移動相に添加する酢酸濃度を検討した。ノルビキシン及びビキシンは酸性物質であること、メタノールはギ酸と反応してしまうことより、酢酸を移動相に添加することとした。酢酸濃度を 0 vol%, 0.1 vol% 及び 0.5 vol% を用いてノルビキシン及びビキシンのピーク形状 (シンメトリー係数及び理論段数) や分離度を比較した (表 1)。その結果、0 vol% ではノルビキシン及びビキシンのピークが完全分離しなかった。0.1 vol% 及び 0.5 vol% では、ピーク形状や分離に関して大きな差が見られなかったが、カラムへの負担や水溶性アナトー色素は酸性領域にて析出する可能性があることを考え、0.1 vol% が最適であると考えた。

次いで、逆相系 HPLC カラムを検討した。東ソー社製の TSKgel ODS-100V, TSKgel ODS-100Z 及び TSKgel ODS-80Ts においても同様にピーク形状や分離を比較した。なお、いずれのカラムはサイズ 4.6 mm×150 cm, 粒子系 5 μm に統一し、同じ移動相を用いた。各カラムにおけるノルビキシン及びビキシン標準品の HPLC クロマトグラムを図 8 に示した。その結果、TSKgel ODS-100Z が最も夾雑ピークと分離・ピーク形状が良好であった。以上より、最適化したノルビキシン及びビキシン標準品の HPLC クロマトグラムを図 9 (460 nm 検出) 及び図 10 (254 nm 検出) に示した。

本条件により、定量限界 (LOQ) から 10 ppm までのノルビキシン及びビキシンの絶対検量線を作成し、図 11 に示した。絶対検量線

法において、相関係数 (r^2) は 0.999 以上の良好な直線性を示し、いずれも LOQ は 0.063 ppm 及び検出限界 (LOD) は 0.031 ppm であった。本手法により、国内に流通しているアナトー色素製剤の HPLC クロマトグラムを図 12 (460 nm 検出) 及び図 13 (254 nm 検出) に示した。なお、図 13 より、不純物とノルビキシン及びビキシンの良好な分離を示し、アナトー色素 (粉末又は水分散性) よりも水溶性アナトーの方では不純物ピークが小さいという特徴がみられた。

C-3) LC-MS によるスペクトル解析

さらに、アナトー色素製剤中のノルビキシン及びビキシンを高精度に同定するために、質量分析装置 (MS) を用いたスペクトル情報を収集した。本研究では、HPLC と同様の移動相条件において、Waters 社製の直接的に MS へ繋げることによりスペクトル解析を実施した。MS scan モードにおいて、ビキシン m/z 395 ($[M+H]^+$) 及びノルビキシン m/z 381 ($[M+H]^+$) が最も強度が高く観察された (図 14)。そのため、それらをプリカーサーイオンとして設定した。なお、ESI (-) モードでは検出ピークが確認されなかった。次いで、Daughters scan モードにより、MS/MS スペクトルを確認した (図 15)。その結果、ノルビキシン及びビキシン由来の特異的な MS/MS スペクトル m/z 145 が得られた。さらに、ノルビキシン及びビキシン標準品やアナトー色素製剤における不純物ピークの MS スペクトルを確認した (図 16)。その結果、不純物 I 及び II はノルビキシン、不純物 III 及び IV はビキシンの分子イオンが検出したため、これら不純物はノルビキシン又はビキシンのシス-トランス異性体の可能性が示唆された。これらスペクトル情報をもとに、各アナトー色素製剤中の Daughters scan 結果、いずれの製剤もノルビキシン又はビキシン標準品と同様のモニタリングイオンにおいてピークが検出され、より確実な含有成分の同定が可能となったといえる (図 17 及び図 18)。

D. 結論

本研究では、アナトー色素におけるノルビキシン及びビキシンの HPLC 分析法の基礎検討及び MS スペクトル解析を実施した。その結果、分析時間 10 分で、良好なピーク形状及び分離を可能とする最適な条件を決定することができた。今後は、ノルビキシン及びビキシンの効率的に単離精製し、迅速かつ簡便な HPLC 定量法を構築していく。

E. 参考文献

- (1) 第 9 版食品添加物公定書, 厚生労働省 (2017).
- (2) Lancaster FE, Lawrence JF: High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, alpha- and beta-bixin, and alpha- and beta-norbixin, and the determination of carminic acid in foods. *J. Chromatogr. A*, 732, 394–98 (1996).
- (3) Scotter MJ, Castle L, Honeybone, CA Nelson C: Method development and analysis of retail foods for annatto food colouring material. *Food Addit. Contam.*, 19, 205–22 (2002).
- (4) Scotter MJ, Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR: Characterization of the principal HPLC colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Food Addit. Contam.*, 11, 301–15 (1994).
- (5) Chisté RC, Yamashita F, Gozzo FC, Mercadante AZ: Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *J. Chromatogr. A*, 1218, 57–63 (2011).
- (6) Noppe H, Abuin Martinez S, Verheyden K, Van Loco J, Companyo Beltran R, De Brabander HF: Determination of bixin and norbixin in meat using liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Addit. Contam. Part A*, 26, 17–24 (2009).

なし

F. 研究業績

1. 学会発表等

- (1) 高木映里, 高橋未来, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.8.31) [誌上開催].

2-1. 論文発表等

- (1) Takahashi M, 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.*, 70, 25–31 (2022).

2-2. 総説

なし

2-3. 単行本

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

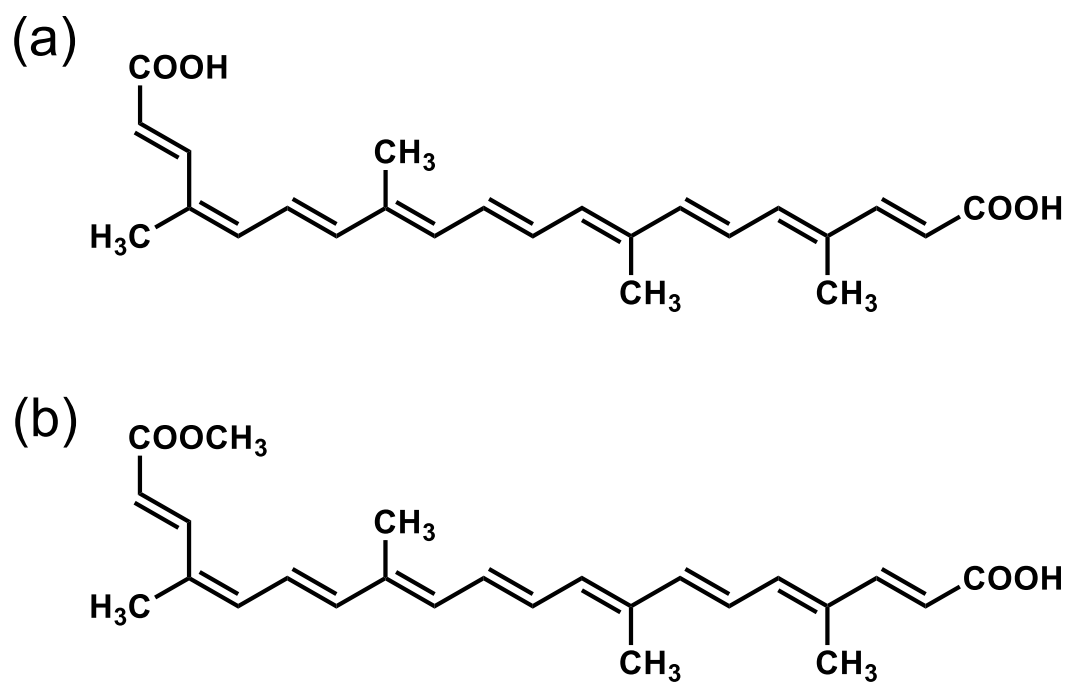


図 1. 分析対象物質の構造式
(a) ノルビキシシン, (b) ビキシシン

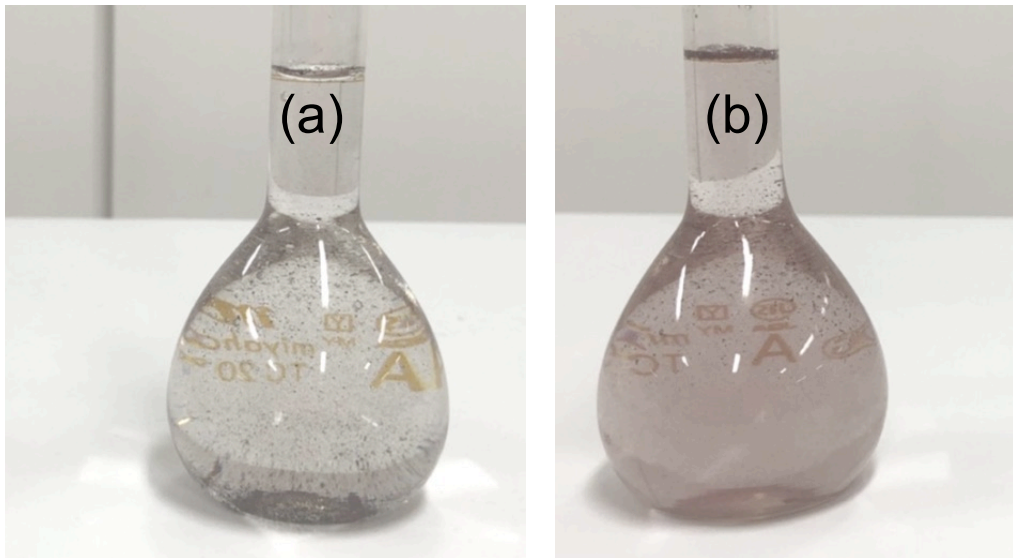


図 2. A 社製ノルビキシソおよびビキシソの確認試験 (1)
 (a) ノルビキシソ, (b) ビキシソ

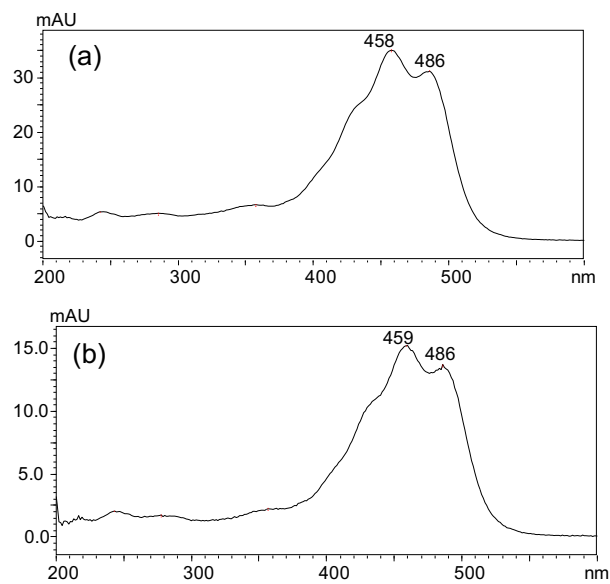


図 3. A 社製ノルビキシソおよびビキシソの確認試験 (2)
 (a) ノルビキシソ, (b) ビキシソ

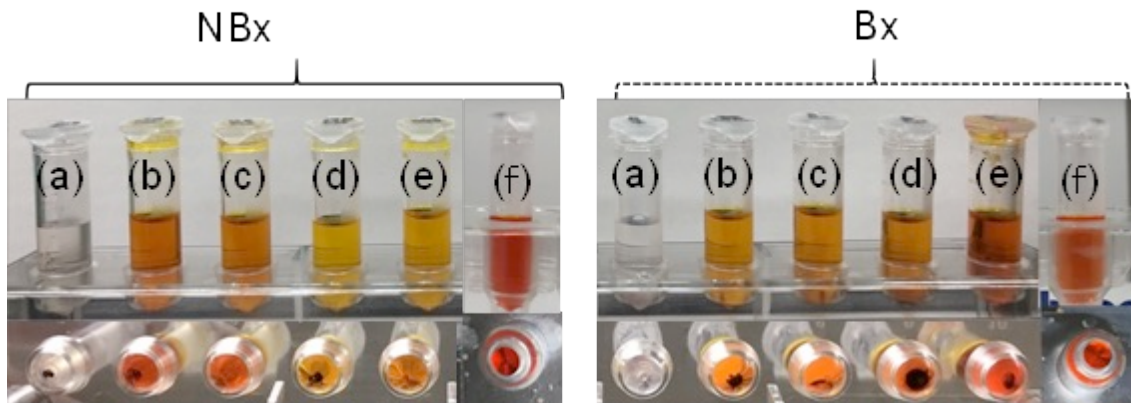


図 4. ノルビキシン及びビキシン標準品の溶解性試験

(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

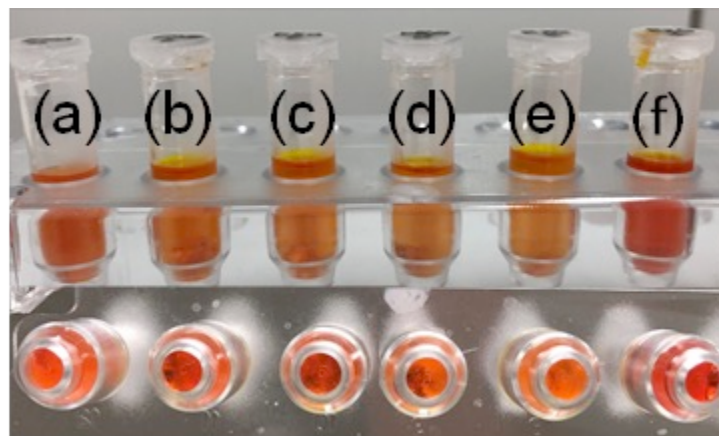


図 5. 水分散性アナトー（アンナット EXG）の溶解性試験

(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

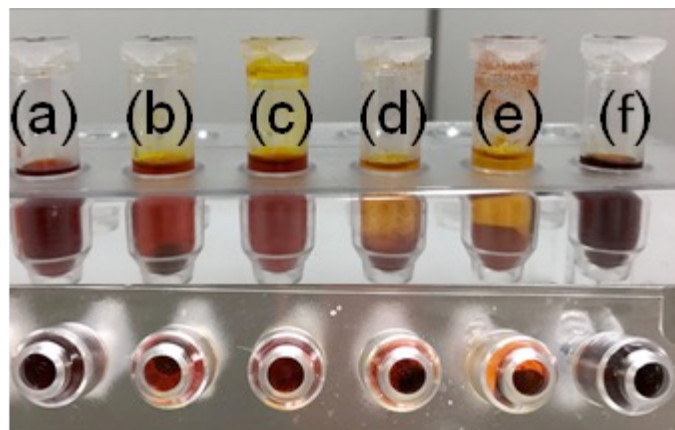


図 6. 水溶性アナトー（アンナット A-200）の溶解性試験

(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

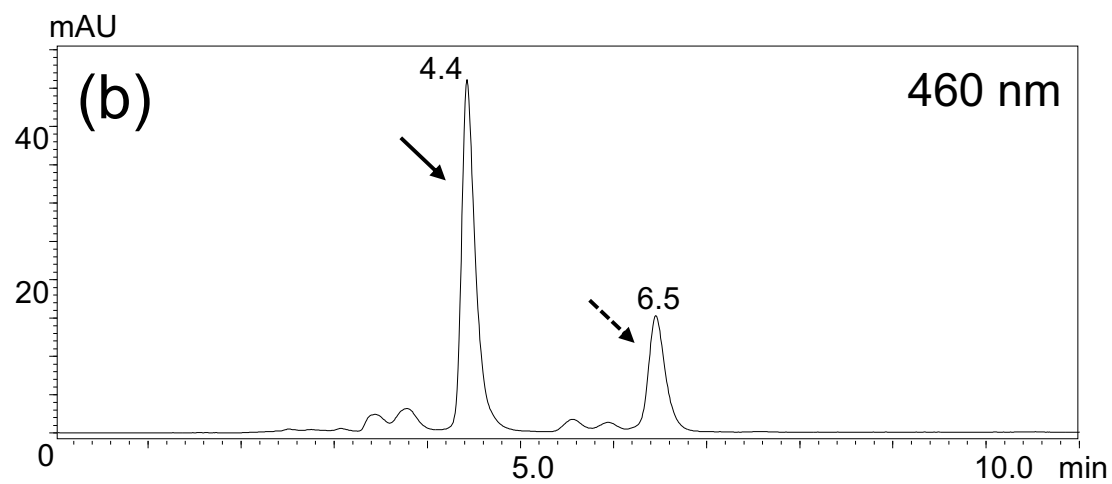
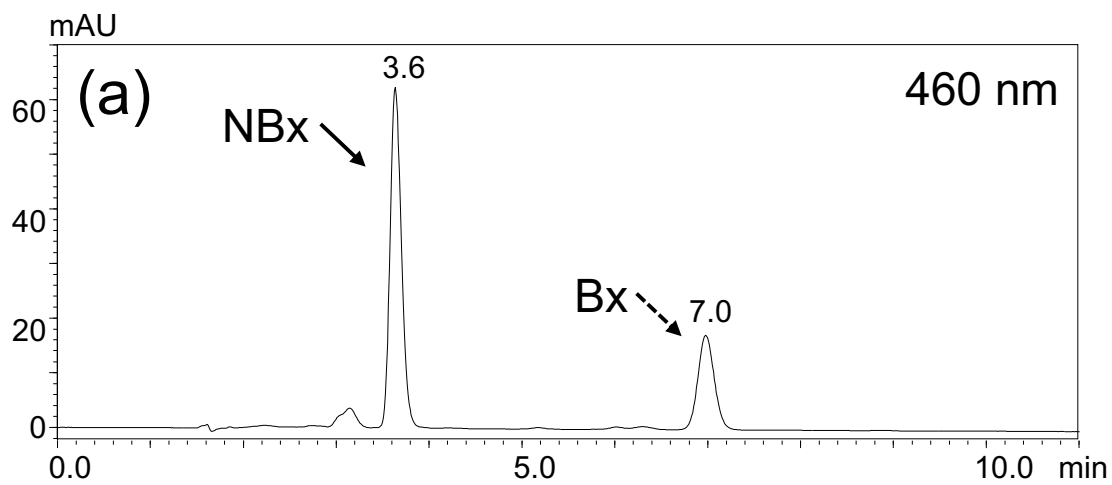


図 7. ノルビキシシ及びビキシシ混合標準品を用いた移動相溶媒の検討

(a) 0.1 vol%酢酸アセトニトリル/0.1 vol%酢酸水溶液 (80/20, *V/V*)

(b) 0.1 vol%酢酸メタノール/0.1 vol%酢酸水溶液 (90/10, *V/V*)

表 1. ノルビキシン及びビキシン混合標準品を用いた
移動相中の酢酸濃度の検討 (n=3)

移動相	酢酸 濃度(vol%)	シンメトリー係数		理論段数		分離度
		Bx	NBx	Bx	NBx	
メタノール/水溶液 (90/10, V/V)	0	-	-	-	-	0.72 (3.5)
	0.1	1.14 (1.9)	1.23 (2.6)	5081 (0.5)	3848 (0.8)	6.85 (0.6)
	0.5	1.12 (2.0)	1.24 (3.0)	5084 (1.2)	3765 (0.7)	6.62 (2.8)

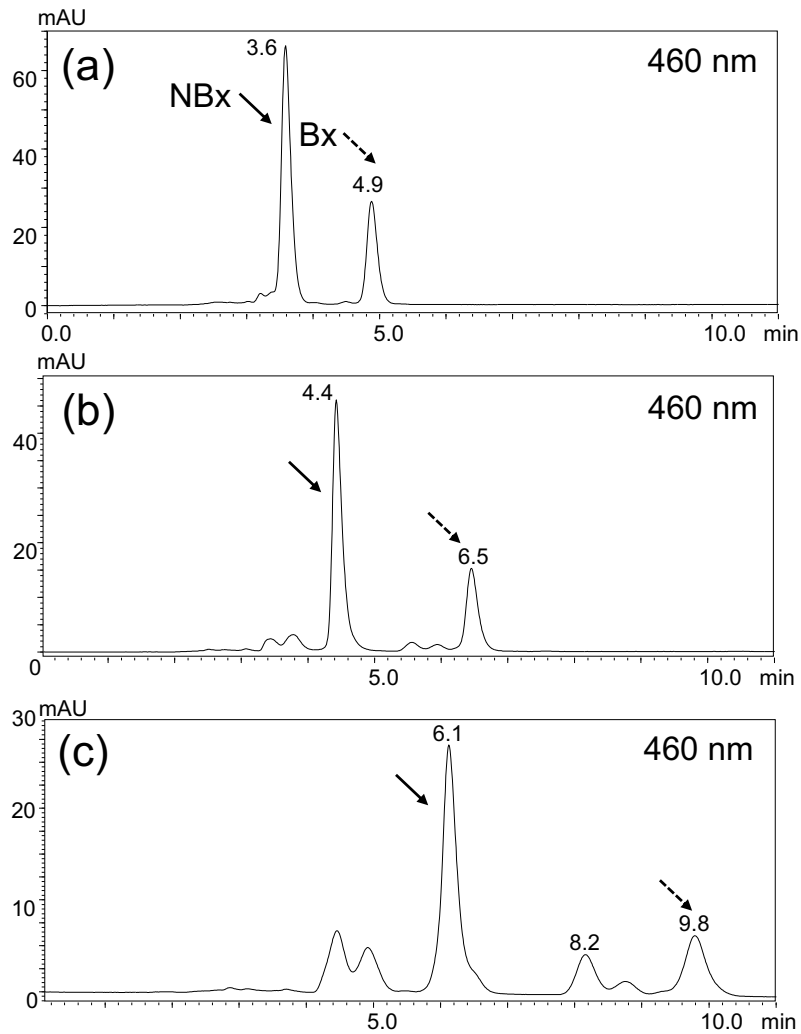


図 8. ノルビキシン及びビキシン混合標準品を用いた分析カラムの検討

- (a) TSKgel ODS-100V (サイズ 4.6 mm×150 mm, 粒子径 5.0 μm)
- (b) TSKgel ODS-100Z (サイズ 4.6 mm×150 mm, 粒子径 5.0 μm)
- (c) TSKgel ODS-80Ts (サイズ 4.6 mm×150 mm, 粒子径 5.0 μm)

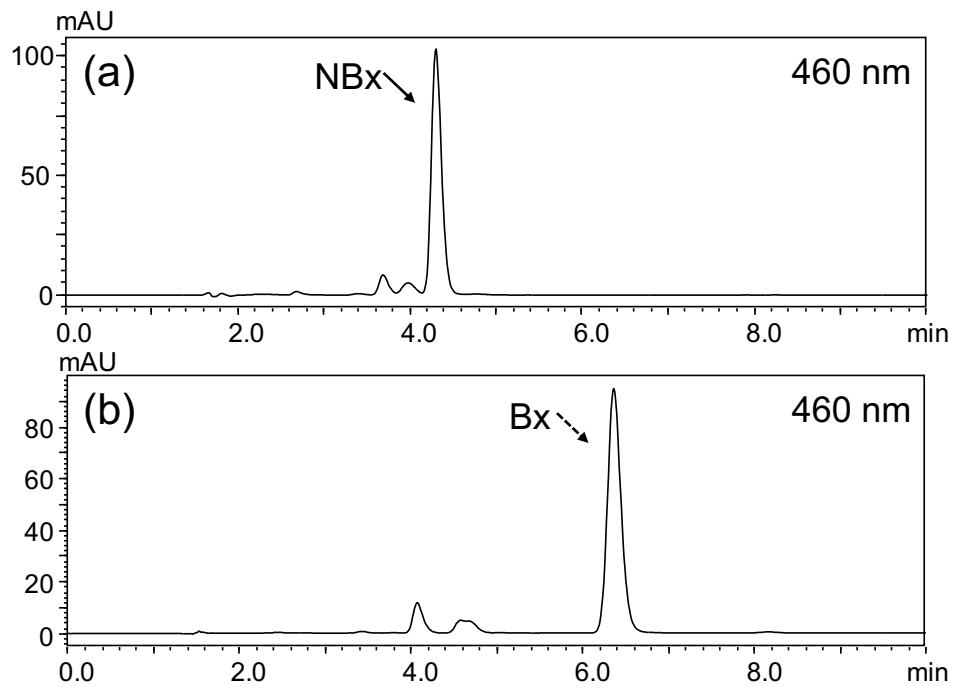


図 9. ノルビキシン又はビキシン標準品の HPLC クロマトグラム (検出波長 460 nm)

(a) ノルビキシン, (b) ビキシン

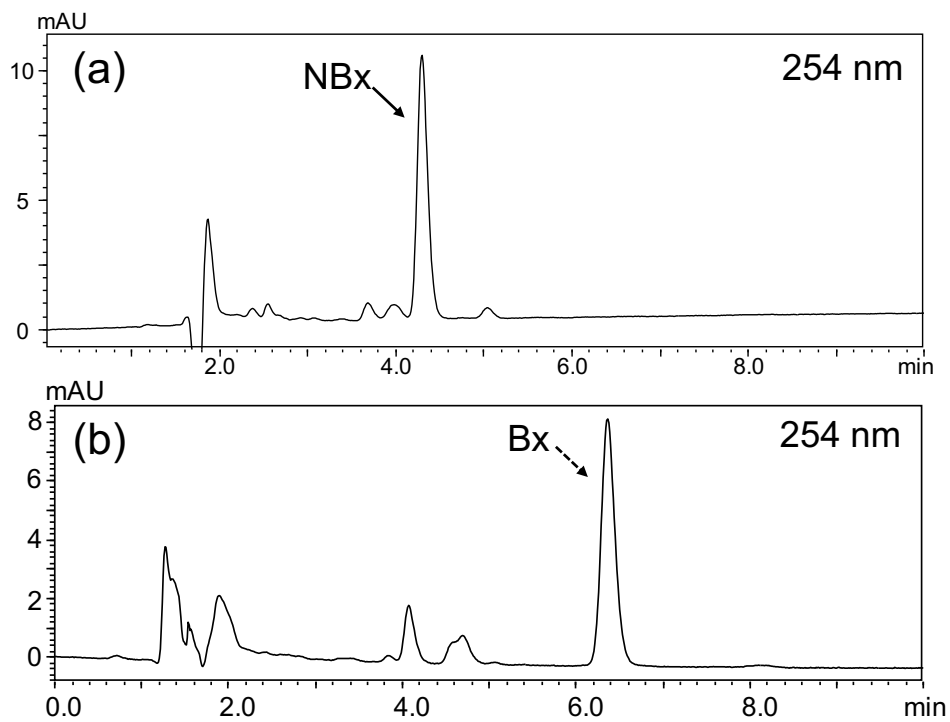


図 10. ノルビキシン又はビキシン標準品の HPLC クロマトグラム (検出波長 254 nm)

(a) ノルビキシン, (b) ビキシン

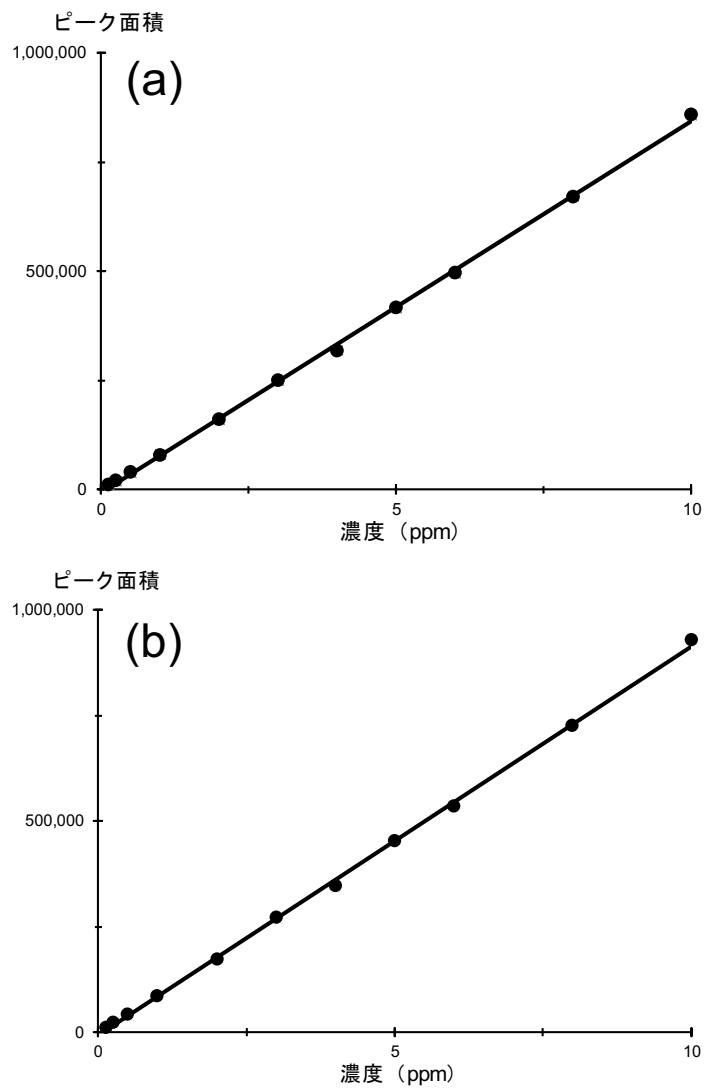


図 11. ノルビキシン及びビキシンの絶対検量線 (LOQ~10 ppm)
 (a)ノルビキシン ($y = 085108x - 7656$, 相関係数 0.999, LOQ = 0.063 ppm)
 (b) ビキシン ($y = 85108x - 76556$, 相関係数 0.999, LOQ = 0.063 ppm)

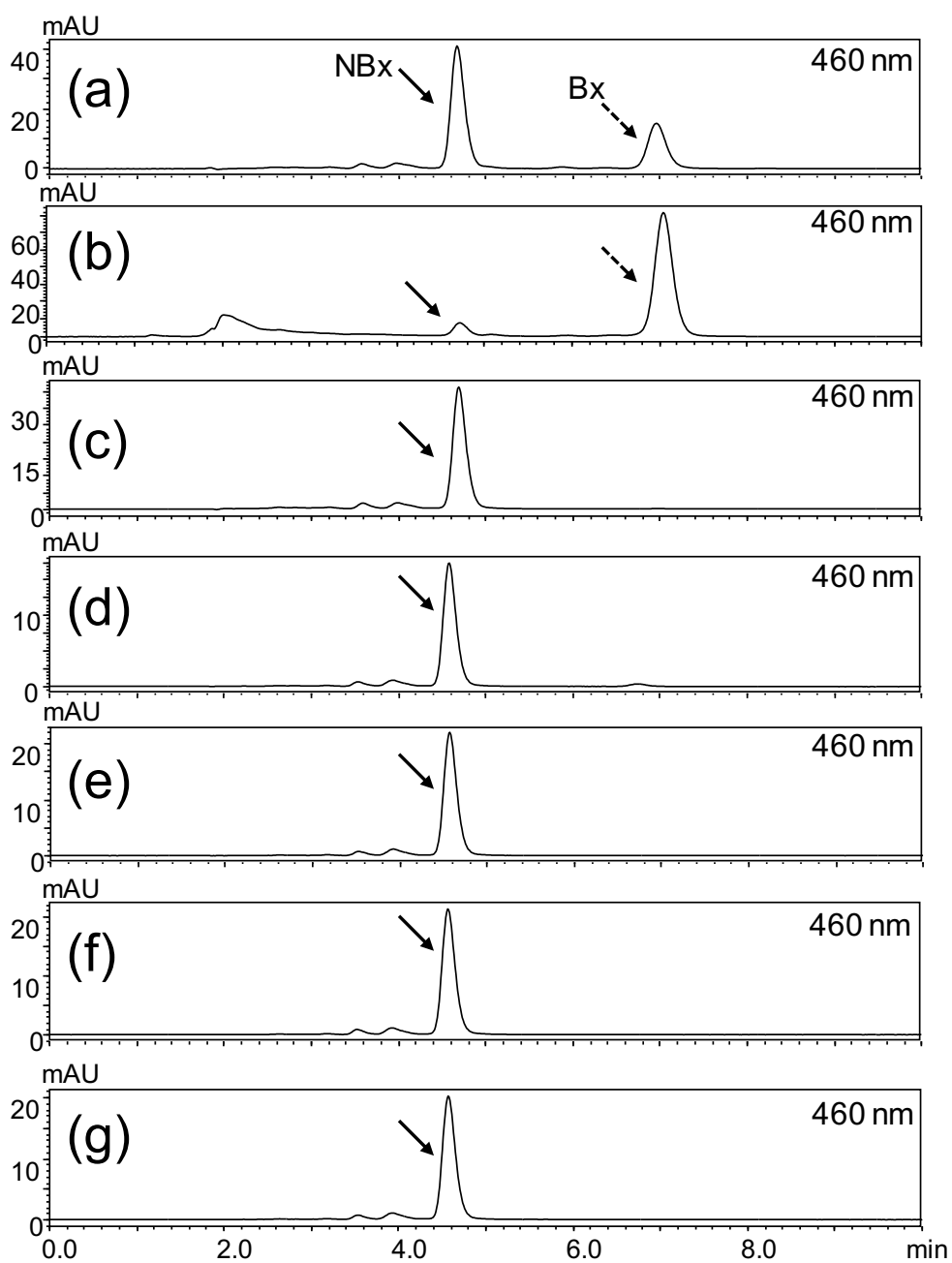


図 12. アナトー色素製剤の HPLC クロマトグラム (検出波長 460 nm)

(a) 10 ppm ノルビキシン及びビキシン混合標準品 (b) ビキシン (A 社製) (c) ノルビキシン (A 社製) (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製) (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

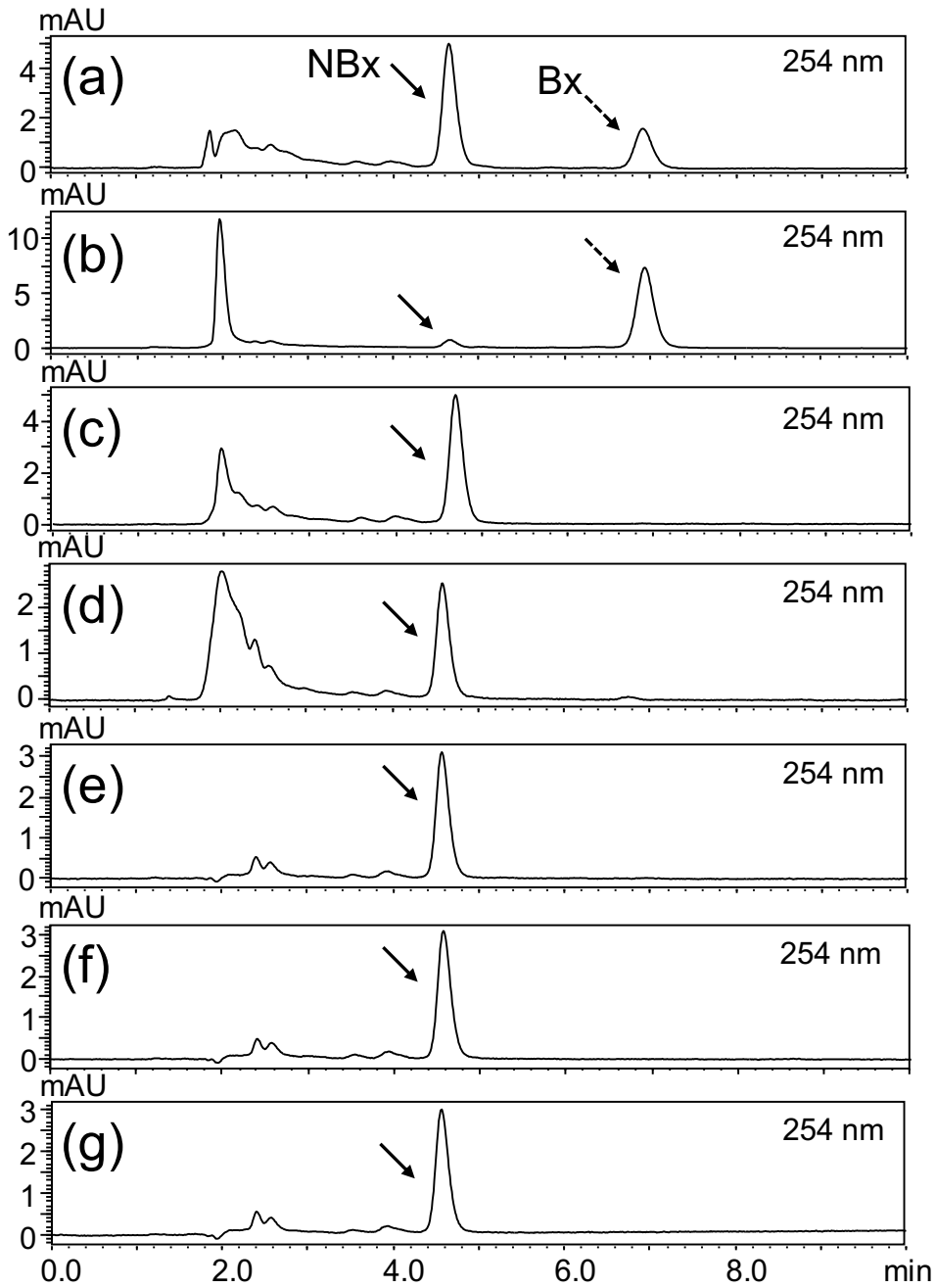


図 13. アナトー色素製剤の HPLC クロマトグラム (検出波長 254 nm)

(a) 10 ppm ノルビキシン及びビキシン混合標準品 (b) ビキシン (A 社製) (c) ノルビキシン (A 社製) (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製) (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

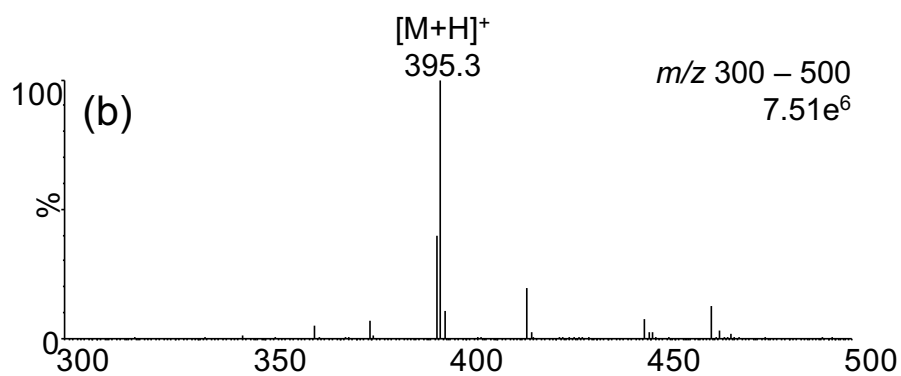
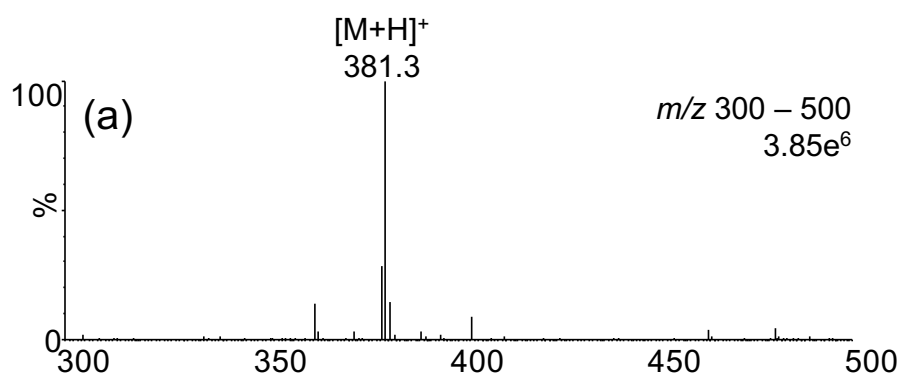


図 14. 標準品の MS スペクトル

(a) ノルビキシニン, (b) ビキシニン

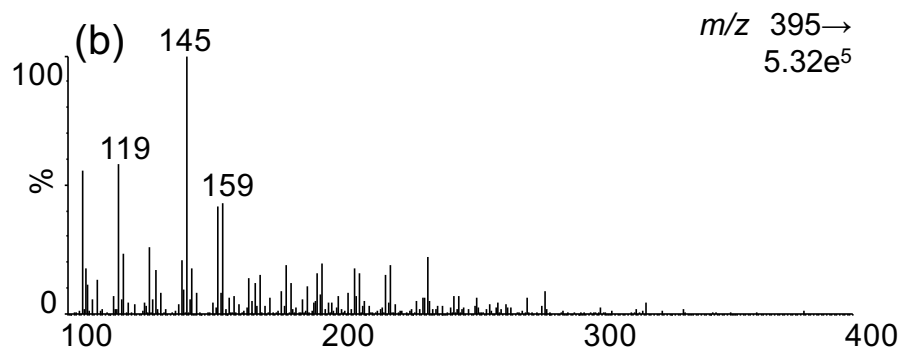
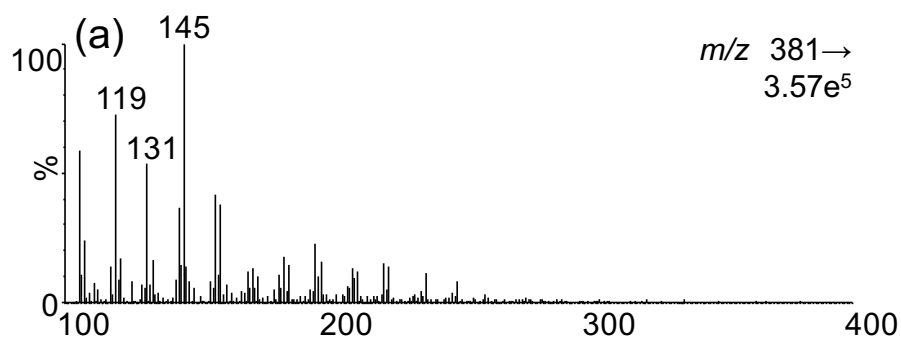


図 15. 標準品の MS/MS スペクトル

(a) ノルビキシニン, (b) ビキシニン

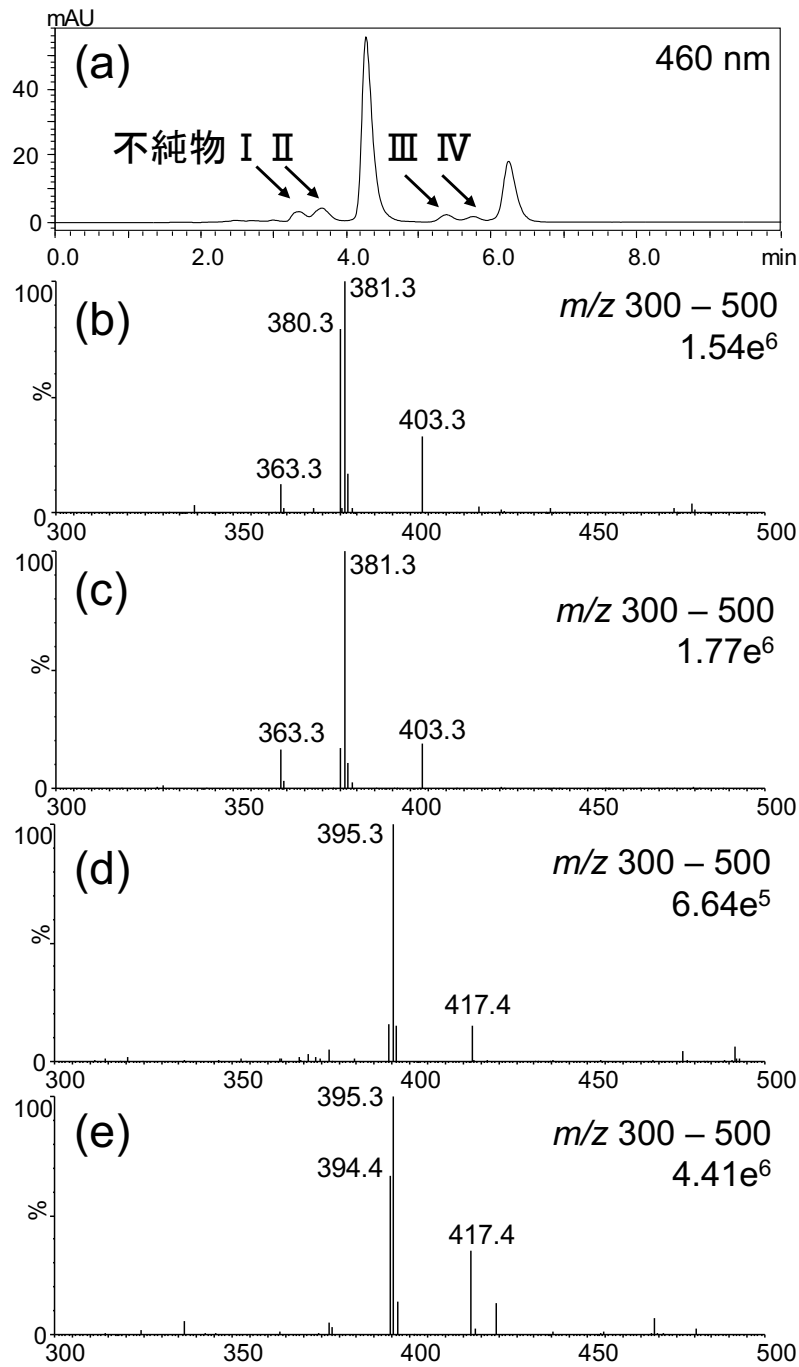


図 16. ノルビキシン及びビキシン混合標準品の HPLC クロマトグラム
 (検出波長 460 nm) 及び不純物ピークの MS スペクトル
 (a) 10 ppm ノルビキシン及びビキシン混合標準品
 (b) 不純物 I, (c) 不純物 II, (d) 不純物 III, (e) 不純物 IV

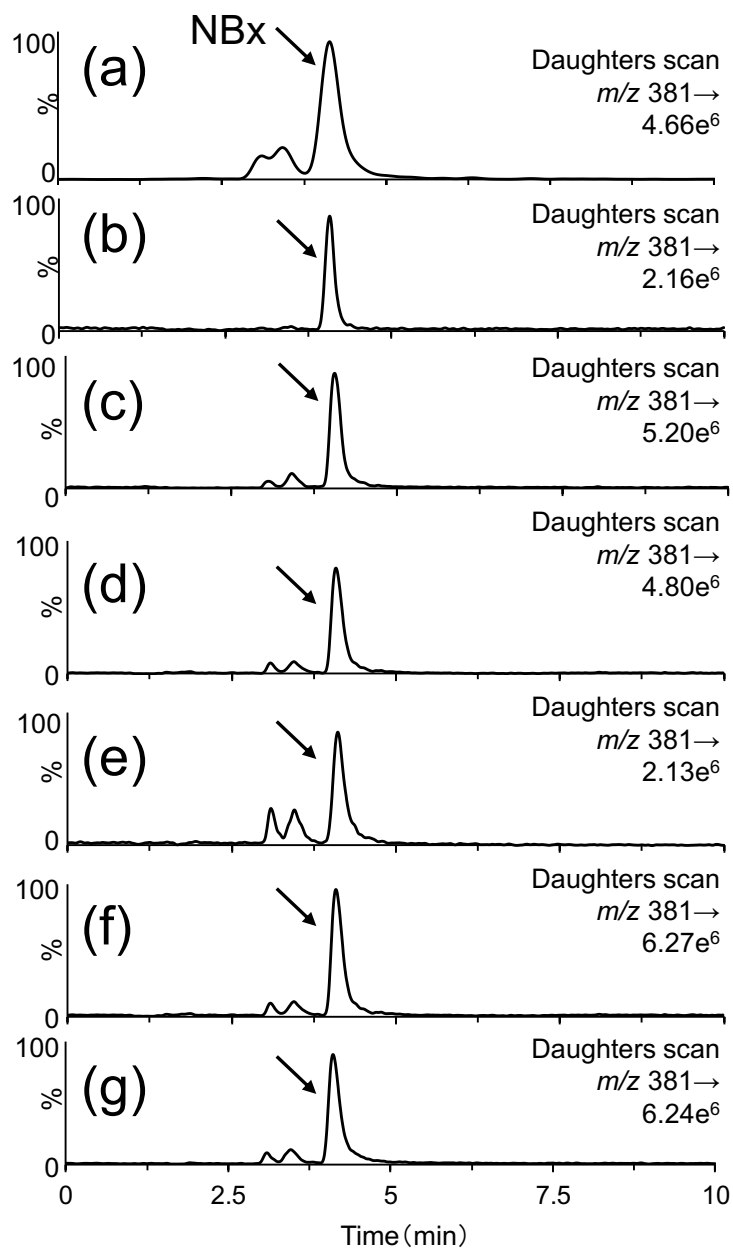


図 17. アナトー色素製剤を用いたノルビキシンの Daughters scan

(a) 10 ppm ノルビキシシン及びビキシシン混合標準品 (b) ビキシシン (A 社製) (c) ノルビキシシン (A 社製) (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製) (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

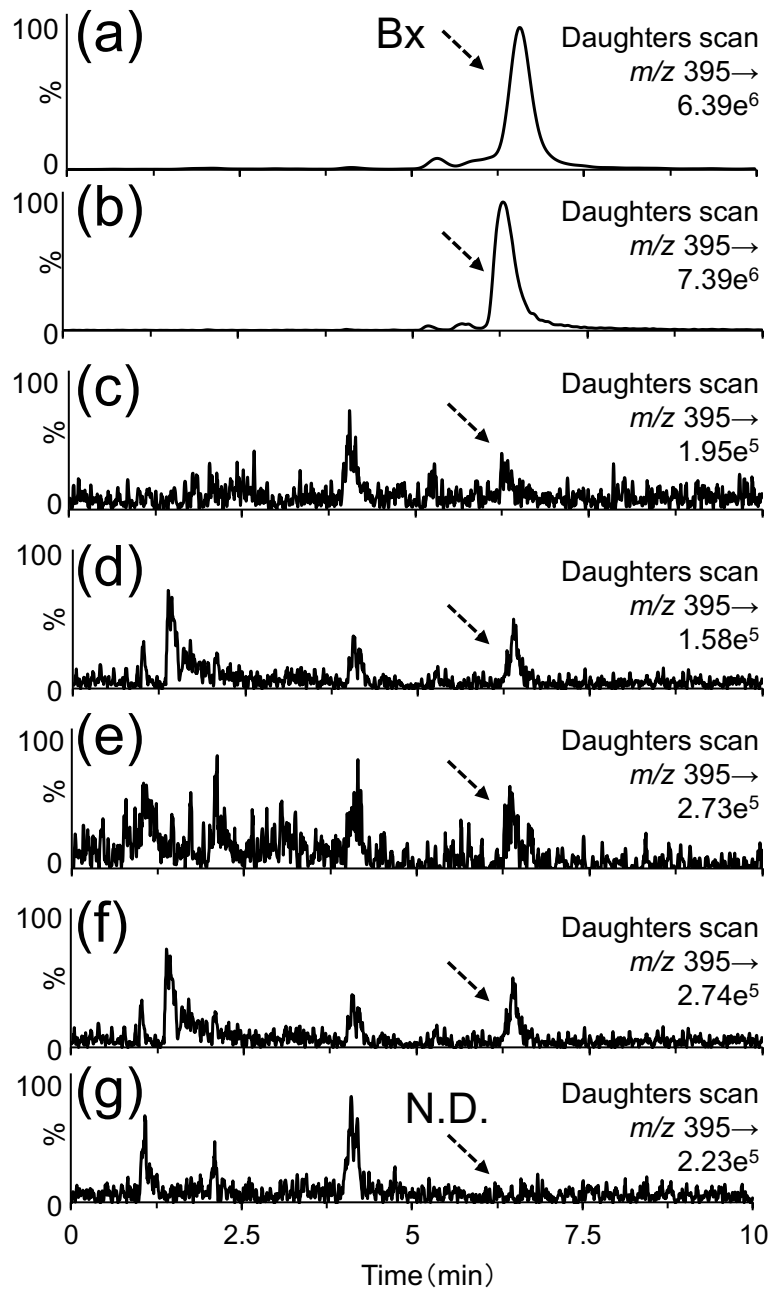


図 18. アナトー色素製剤を用いたノルビキシンの Daughters scan

(a) 10 ppm ノルビキシン及びビキシン混合標準品 (b) ビキシン (A 社製) (c) ノルビキシン (A 社製) (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製) (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格に関する研究

～DPPH法を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価～

研究分担者 井之上浩一 立命館大学薬学部 臨床分析化学研究室 教授

研究要旨 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH)法は抗酸化能の評価法として、一般試験法の規格化が期待されている。本手法は、96 ウェルを用いた吸光度測定（検出波長：517 nm）によりトロロックス（基準物質）と相対的に抗酸化能を評価する（トロロックス等価活性値，TEAC）ため、簡便かつ迅速な試験法が可能となる。しかしながら、規格化に向けた妥当性評価が十分に検討されていないため、本年度では抗酸化能測定キットの内容に基づいて、実験手技や実験環境を軸に DPPH 法の再現性や汎用性を評価することとした。没食子酸（酸化防止剤）を用いて試薬や調製溶媒を変更して DPPH 法を実施した結果、いずれもバラつきの少なく TEAC を得ることができた。しかしながら、様々な既存添加物に応用した際、低極性の化合物に関して試験溶液が白濁し、正常に DPPH 法を実施することが困難であった。それゆえに、使用溶媒による溶解性を検討し、既存添加物への適応性を拡大することが求められる。さらに、マニュアルの簡易化や明確さにもさらに改良することにより、その汎用性も増すと考えられる。

研究協力者

高橋未来 立命館大学薬学部 助教

A. 研究目的

既存添加物の規格基準について、これまで有効成分や構成成分の同定、各成分の分析法の開発をすることにより、成分規格試験を設定してきた¹⁾。しかしながら、酸化防止剤として使用されている既存添加物では、様々な成分が抗酸化能に関与しているため、既存添加物中の全ての抗酸化物質を同定及び分析法を開発することは困難である。それゆえに、抗酸化能を持つ既存添加物に関して、主成分などの成分解析だけでなく、酸化防止剤としての抗酸化能の一般試験法化の設定が求められている。そこで、本年度では、高い再現性かつ汎用性のある抗酸化能測定法として、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH) 法の基礎検討を試みた。

DPPH は紫色の安定なラジカル化合物であり、抗酸化物質により還元されることにより無色

に変化する（図 1）。そのため、DPPH 法はラジカルの消去活性を利用した簡便な抗酸化能の評価法として様々な分野で用いられている。さらに、DPPH 法は吸光度測定（検出波長：517 nm）により実施されるため、マイクロプレートを用いた簡便かつ迅速な多検体の測定も可能である。しかしながら、DPPH 法による抗酸化能は 50%阻害濃度 (IC₅₀) により評価されるが、その値の再現性の乏しさが課題として挙げられていた。そこで、既報において、トロロックスを基準物質として補正したトロロックス等価活性値 (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC) による DPPH 法が報告されている²⁾。さらに、DPPH 法による TEAC 評価法はキット化（抗酸化能測定キット）されており、異なる試験機関における測定誤差がさらに少なくなると期待されている。そこで、本研究では、抗酸化能測定キットの手順や同封されている試薬類を用いて様々な既存添加物に応用することにより、その抗酸化能の再現性や適応性を評価す

ることとした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

抗酸化能測定キット (DPPH Antioxidant Assay Kit) は同仁化学社製を用い、DPPH 試薬、トロロックス標準品及びアッセイバッファーがキットに同封されていたものを用いた。チャ抽出物、ターメリック色素、赤キャベツ色素、クチナシ黄色素、ベニバナ赤色素及びマリーゴールド色素は三栄源エフ・エフ・アイ社製を用いた。DPPH は Cayman Chemical 社製を用いた。没食子酸水物、トロロックス標準品、エタノール (特級)、メタノール (HPLC 用)、アセトニトリル (HPLC 用) 及びアセトン (特級) は富士フィルム和光純薬社製を用いた。ジメチルスルホキシド (DMSO) はナカライテスク社製を用いた。また、超純水は PURELAB flex 5 system (ELGA 社製) で精製したものを使用した。0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) は、株式会社ニッポン・ジーン製 1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) を用いて調製した。

B-2) 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52
遠心分離機：日立工機社製 Himac CF15RN
吸光度計：コロナ電気株式会社製コロナマルチグレーティングマイクロプレートリーダー SH9000Lab

B-2) DPPH ラジカル消去活性試験法

試料が溶解可能である溶媒にてストック溶液を調製し、攪拌及び遠心分離 (3,000 rpm, 5分) した後、上清を測定試料として用いた。また、トロロックス溶液及び DPPH 溶液は、エタノールで溶解及び希釈することにより調製した。そして、96 穴マイクロプレートに既存添加物又は 80, 60, 40, 0 $\mu\text{g/mL}$ の各濃度に希釈したトロロックス溶液 20 μL , 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) 80 μL , 0.2 mM DPPH 溶液 100 μL を加え、暗室でインキュベート (25 $^{\circ}\text{C}$, 30 分間) した。本溶

液を吸光度計 (コロナ電気株式会社製コロナマルチグレーティングマイクロプレートリーダー SH9000Lab) により 517 nm の吸光度を測定した。さらに、ラジカル消去率を以下の式で求めた。

$$\text{ラジカル消去率 (\%)} = (A_{CS} - A_S) / A_{CS} \times 100$$

A_{CS}: 試料ブランク吸光度

A_S: 試料吸光度

B-3) TEAC 算出

試料及びトロロックス溶液をエタノールで希釈し、検量線を作成した。また、50%のラジカル消去率を含む範囲で、回帰直線を引き、算出された直線式より、IC₅₀となる濃度を求めた。3回の操作により、TEAC の平均値及び標準偏差 (S.D.) を算出した。

$$\text{TEAC} = \text{Trolox の IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{試料の IC}_{50} (\mu\text{g/mL})$$

C. 結果及び考察

まず、抗酸化能測定キット試薬と自ら調製した試薬の両方を用いて、酸化防止剤である没食子酸の TEAC を確認した (表 1)。その結果、全て調製した試薬を用いた場合においてもキット試薬と同等な抗酸化能を測定できる (RSD 3.3%以下) ことを確認した。以上より、それ以降の DPPH 法の検討に関して調製した試薬を用いることとした。

次に、7種類の既存添加物を用いて、DPPH 法による抗酸化能を評価した。これら試料を没食子酸と同様に、DPPH ラジカル消去活性試験法を実施し、TEAC を算出した結果を表 2 にまとめた。その結果、没食子酸及びチャ抽出物の TEAC はそれぞれ 3.70 及び 2.78 であったが、ターメリック色素及び赤キャベツ色素の TEAC は 0.016 及び 0.013 であり、ほとんど抗酸化能が確認されなかった。さらに、マリーゴールド色素、クチナシ黄色素及びベニバナ赤色素では、ウェル内の試験溶液が白濁し、正常に吸光度を測定することができなかった。これら既存添加物が

DPPH 法の測定が困難であった要因は、使用する溶媒への溶解性が低かったためであると考えられる。マリーゴールド色素、クチナシ黄色素及びベニバナ赤色素の溶解試験を実施した際、エタノール、メタノール、アセトン、アセトニトリル及び水に溶解せず、いずれも DMSO のみ溶解可能であった (図 2)。そのため、既存添加物の試料溶液をウェルに入れ、他の試薬を添加した後、白濁してしまい、 IC_{50} が算出できなかった。このように、抗酸化能測定キットの手順では、実試料の希釈溶媒がエタノールであったため、没食子酸を用いて他の溶媒における TEAC と比較した。比較溶媒は、水、エタノール、メタノール及び DMSO を用いた。各溶媒における TEAC を図 3 に示した。その結果、没食子酸では、いずれの溶媒を用いて希釈しても TEAC の結果に影響しない (RSD; 6.5%) が、極性の低い化合物の場合は溶解性が影響することが判明した。そのため、DPPH 法は極性が高いもしくは中程度の化合物に適応可能であると考えられる。

次に、実験者間における DPPH 法の測定結果の誤差を評価した。本研究では、DPPH 法の一般試験法としての標準化を検討しているため、実験室環境下における複数の実験者による DPPH 法の再現性を調査した。3 名の実験者 (実験者 A~C) に対して、キットに同封している手順書を確認し、没食子酸の DPPH ラジカル消去活性試験法を実施し、TEAC を算出した。次いで、実験者 A~C に、手順内容を図示化したプロトコール (図 4) を確認してもらい、同様に没食子酸の DPPH 法を実施した (図 5)。その結果、実験者 A 及び B において、1 回目及び 2 回目の TEAC はほとんど同じであった。それらに対して、実験者 C は、1 回目では他の実験者と TEAC が大きく異なっていたが、2 回目の TEAC は殆ど同等の値が得られた。2 回目における全実験者による TEAC の RSD は 10% 以下であり、良好な再現性がみられた。これらの結

果より、実験環境下における高い再現性を得るために、簡易かつ明確なマニュアルの工夫化が必要であると考えられる。

D. 結論

本研究では、既存添加物における酸化防止剤の抗酸化能評価法として DPPH 法の適応を目指して、再現性や汎用性など基礎検討した。その結果、極性の高い又は中程度の化合物であれば、適応可能であり、その再現性も高かった。更なる適応拡大のために、使用溶媒による溶解性の検討が必要であると考えられる。さらに、異なる実験者における再現性の比較した結果、簡潔なマニュアルの作成をすることにより、実験者間の誤差を軽減することが可能であった。

E. 参考文献

- 1) 第 9 版食品添加物公定書, 厚生労働省(2017).
- 2) Shimamura T, Sumikura Y, Yamazaki T, Tada A, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H, Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives - inter-laboratory evaluation study. *Anal. Sci.* 30, 717-721 (2014).

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
2-1. 論文
なし
2-2. 総説
なし
2-3. 単行本
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

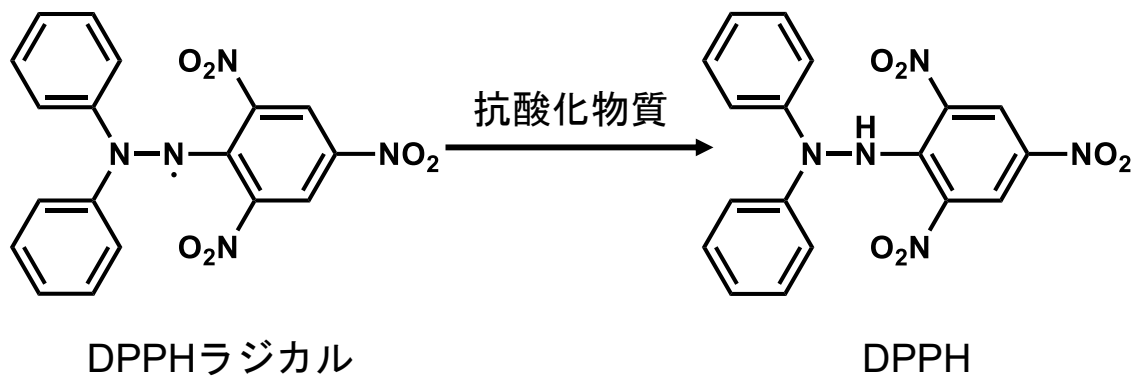


図 1. DPPH 法の反応式

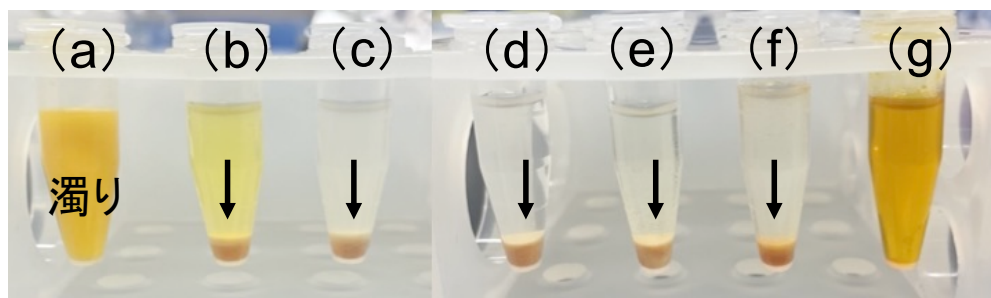
表 1. 抗酸化能測定キットの各試薬を調製した場合の TEAC (n=3)

	試薬類			TEAC±S.D.
	トロロックス溶液	DPPH溶液	0.1M Tris-HCl緩衝液	
①	キット	キット	キット	3.42 ± 0.04
②	調製した試料	キット	キット	3.73 ± 0.05
③	キット	調製した試料	キット	3.63 ± 0.18
④	キット	キット	調製した試料	3.56 ± 0.09
⑤	調製した試料	調製した試料	調製した試料	3.67 ± 0.21

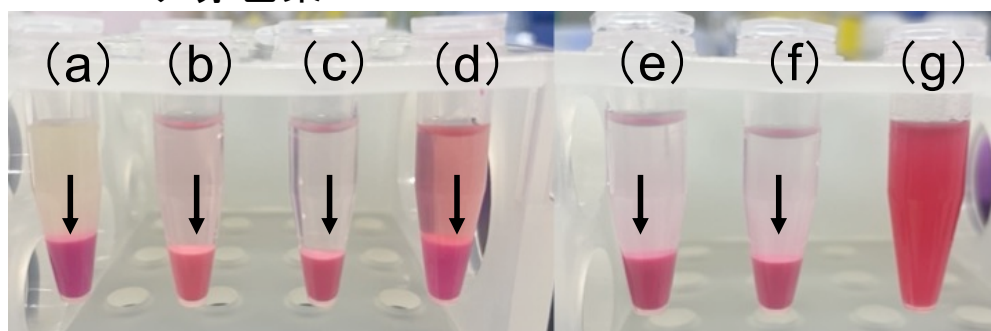
表 2. DPPH 法を用いた各既存添加物の TEAC (n=3)

試料	IC ₅₀ (μg/mL)	TEAC
没食子酸	18.6	3.70
チャ抽出物	24.8	2.78
ターメリック色素	4138	0.016
赤キャベツ色素	4903	0.013
マリーゴールド色素	-	-
クチナシ黄色素	-	-
ベニバナ赤色素	-	-

マリーゴールド色素



ベニバナ赤色素



クチナシ黄色素

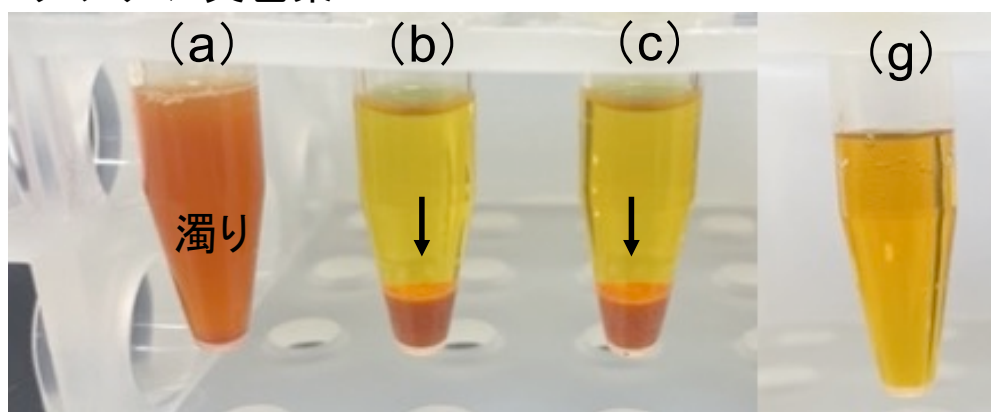


図 2. マリーゴールド色素, ベニバナ赤色素及びクチナシ黄色素の溶解試験
(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) ジクロロメタン, (e) アセトン,
(f) アセトニトリル, (g) DMSO

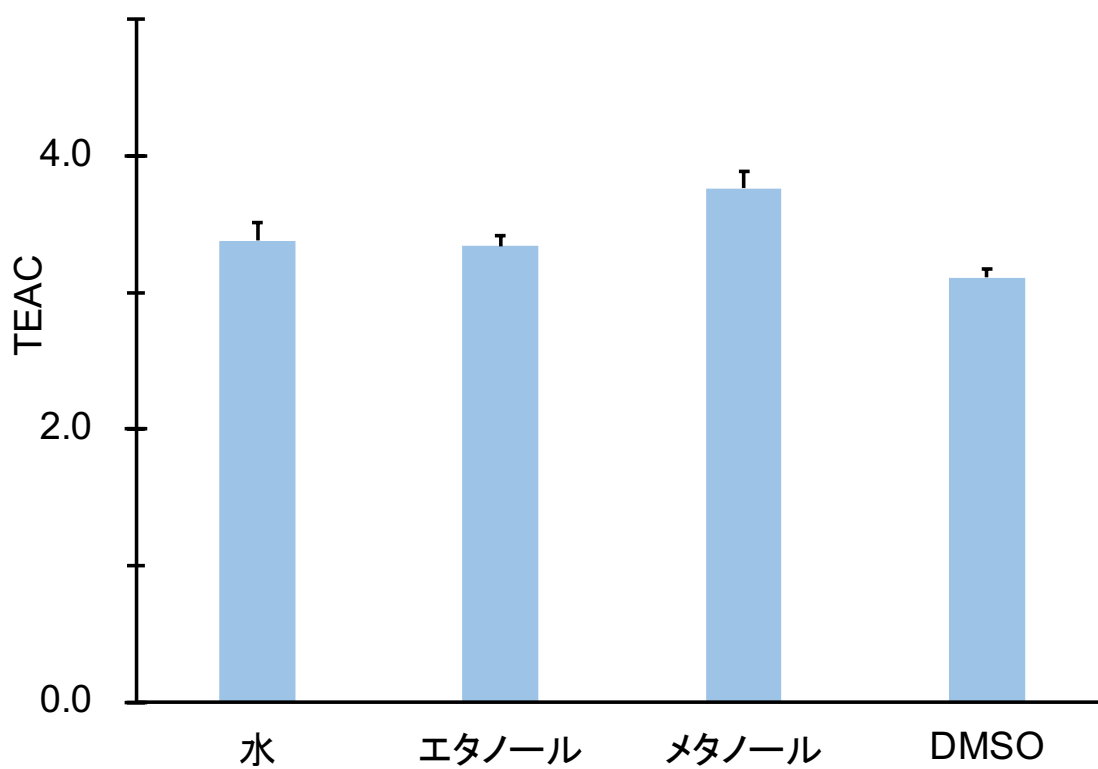


図 3. 各溶媒を用いて溶解及び希釈した際の没食子酸の TEAC (n=3)

DPPH

DPPH 4 mmol/L 500 μ L



← エタノール 9.5 mL

DPPH 0.2 mmol/L 10 mL

Trolox

Trolox 1000 μ g/mL 100 μ L



← エタノール 900 mL

Trolox 100 μ g/mL 1000 μ L



Trolox 100 μ g/mL 400 μ L 300 μ L 200 μ L 0 μ L

エタノール 100 μ L 200 μ L 300 μ L 100 μ L

80 μ g/mL

60 μ g/mL

40 μ g/mL

0 μ g/mL

図 4. 実験者が DPPH 法を実施する際に渡したマニュアル

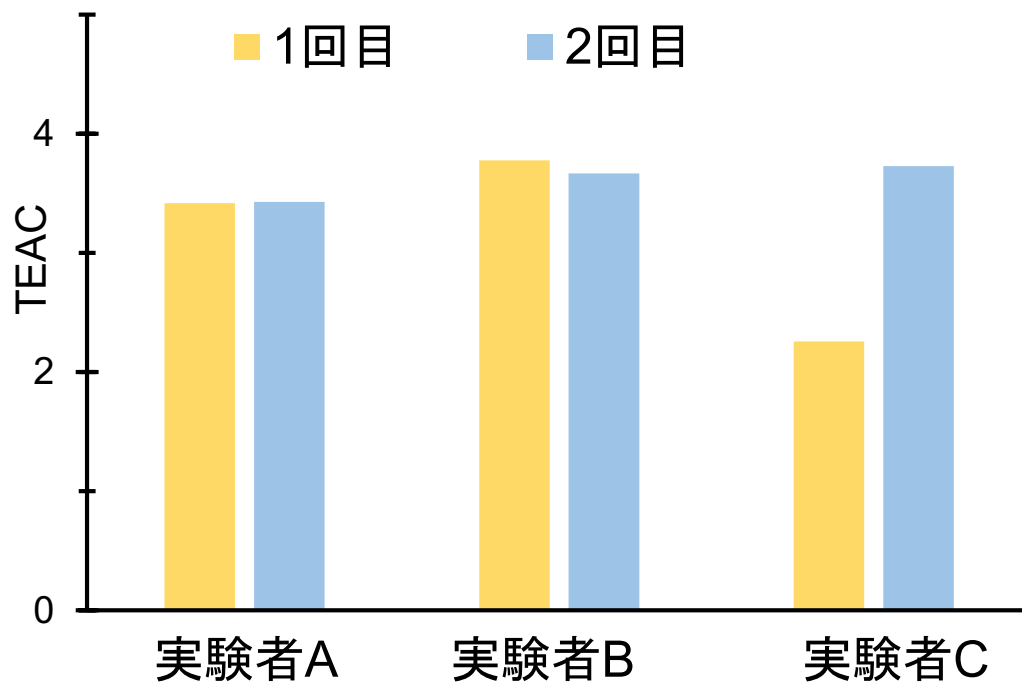


図 5. 実験者 A～C における没食子酸の TEAC
(黄色：1回目，青：2回目)

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究～

研究分担者 永津明人 金城学院大学薬学部 教授

研究要旨 規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、 ^1H -qNMR法(定量 ^1H -NMR法)が試験法として適用可能であるか可能性を検討した上で、適用の可能性のあるものに関して、実際に適用する場合の測定条件の確立、あるいはそれを応用した正確な定量法の検討を目的として研究を行なった。令和3年度も引き続き「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討とした。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、令和3年度はその中からローズマリーとケイヒを ^1H -qNMR法での定量が可能かの検討を行った。ローズマリーの検討では、指標成分として適切であろう rosmarinic acid の ^1H -qNMR法を用いた定量の検討を行い、 ^1H -qNMR法で定量可能であることを示し、既存のHPLC法との同等性を確認できた。ケイヒについては令和2年度にも検討を行ったが、HPLCとの比較において、HPLCでの定量でばらつきが大きかったこと、及び生薬としても重要な物であることから、追試として検討を行った。ケイヒの検討では、指標成分として適切であろう cinnamaldehyde の ^1H -qNMR法を用いた定量の検討を行い、 ^1H -qNMR法で定量可能であることを示し、また、 ^1H -qNMR法がHPLCよりも優位な cinnamaldehyde の定量法になりうることを示した。

A. 研究目的

^1H -qNMR法は、SIトレーサブルな認証標準物質を内部標準としてNMRスペクトルの測定することで、測定対象サンプルの絶対定量ができる方法である。¹²⁾対象化合物の標準品の存在がHPLC法などの従来法では必須であるのにたいして、それらがなくても絶対定量が可能であることから、標準品が手に入りにくい天然物の定量に好適な測定法である。すなわち、対象物質の ^1H -NMRスペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となりうる。

令和3年度も引き続き既存添加物である「香辛料抽出物」に着目して研究を行った。既存添加物の「香辛料抽出物」は、アサノミ以下73種類の植物から「抽出しまたはこれを水蒸気蒸留して得られたもの」とされている。基原が多様な上、用部も明確には書かれておらず、現時点では規格基準は定められていない既存添加物

である。規格基準を決めるには素材ごとに基準物質を定めて基準の策定をしていく必要がある。特に、基準物質が精油成分である場合、たとえ市販標準物質があっても揮発性であるがゆえにその純度が変化しやすく、正確な純度を得にくい。そのため、その正確な純度を得るには ^1H -qNMR法が適していると考えられる。令和3年度はその中から香辛料抽出物以外にもローズマリー抽出物として既存添加物名簿に名前が上げられているローズマリーをピックアップし、rosmarinic acid (Fig. 1)が主要成分となると考えて、ローズマリーの葉に含まれる rosmarinic acid の定量方法の検討を行った。また、精油成分の含有量が要点となる素材のうち、既存添加物ではシナモンとして収載され、生薬としても重要なケイヒでは cinnamaldehyde (Fig. 2)が指標成分になりうると考え、この cinnamaldehyde の定量方法に関する検討を行なった。ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量は、昨年度も検討を行っていたが、HPLCを用いた定量値が不安定で、

HPLC 値と ^1H -qNMR 法での測定値とどちらが信頼できるかという点で不安を残していた。そのため、その追試という位置付けも兼ねて今年度再度検討した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

^1H -qNMR 測定時の内部標準物質として用いる 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt- d_6 (DSS- d_6 , Fig. 3)は和光純薬の Trace Sure® 規格のものを用いた。NMR 測定用溶媒の dimethylsulfoxide (DMSO)- d_6 , methanol- d_4 , pyridine- d_5 , acetone- d_6 はそれぞれ Isotec Inc. の 99.9, 99.8, 99.5, 99.9 atom %D を用いた。Rosmarinic acid は富士フィルム和光純薬の生化学用試薬を、cinnamaldehyde は東京化成 *trans*-cinnamaldehyde (試薬 A), 富士フィルム和光純薬の (*E*)-cinnamaldehyde 薬局方生薬試験用 (試薬 B) と cinnamaldehyde 和光特級 (試薬 C) を用いた。ローズマリーは、スパイスとして市販されているローズマリー葉の粉末及び乾燥生薬を令和 3 年 8 月に購入した。既存添加物として流通している水溶性ローズマリー抽出物及び非水溶性ローズマリー抽出物も国立医薬品食品衛生研究所に保管中のものの供与を受けた。ケイヒは、スパイスとして市販されている粉末を令和 3 年 10 月に購入したもの(ケイヒ末 A)と、切断生薬として令和 2 年 4 月と令和 3 年 4 月に購入したものを実験前に粉末化(それぞれケイヒ末 B, C)して使用した。

B-2) 装置等

秤量には島津製作所の精密電子天秤 AUW120D を用いた。生薬の粉末化には大阪ケミカル WB-1, 分注操作の電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x, 超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S, 遠沈操作は遠心器 AS One Mini Centrifuge をそれぞれ用いた。NMR 装置は日本電子 JNM-ECA500 を使用した。HPLC は、ポンプとして JASCO PU-4180, カラムオーブンに Shimadzu CTO-20AC, 検出器はフォトダイオードアレイ検出器 JASCO MD-4010 を用いた。

メンブランフィルターは Cosmonice Filter W 0.45 μm ϕ 13 mm を用いた。

B-3) ^1H -qNMR 法を用いたローズマリー葉中及び既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

まず, rosmarinic acid の ^1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と, 生薬中あるいは既存添加物中の rosmarinic acid の定量を行うことにした。また, HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-3-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- d_6 はデシケーター中で保管乾燥させたものを用いた。約 10 mg を精秤して 20.00 mL の methanol- d_4 に溶かして内部標準用溶液とした。

Rosmarinic acid 標準品はデシケータ中で一晩乾燥させ, 約 5 mg を精秤して 2.50 mL の内部標準用溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

ローズマリー葉粉末中及び既存添加物中の rosmarinic acid の測定用試料の調製は, 次のように行った。乾燥させた粉末生薬または既存添加物試料の約 100mg を精秤して acetone (1.00 mL) に懸濁し, 超音波下 30 分抽出を行い, 遠沈し, その上清をとって濃縮乾固した。この操作を 3 回繰り返した。集めた抽出物に内部標準用溶液 (1.00 mL) を加えて完全に溶解したのち, メンブランフィルターを用いて濾過し, 濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり, ^1H -qNMR の測定に供した。

B-3-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Rosmarinic acid とローズマリー葉粉末中及び既存添加物の水溶性の抽出液の ^1H -NMR を測定し, rosmarinic acid (Fig. 1) の 8 位のプロトンシグナルが 6.25 ppm に現れることを確認した。(Fig. 4) ^1H -qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから, rosmarinic acid の 3 位のシグナルと 0.00 ppm とした DSS- d_6 のメチル基プロトンのシグナルの面積を比較して次式に従って rosmarinic acid の濃度を算

$$C_R = (I_R / I_D) \times C_D$$

ただし、 C_D 、 C_R はそれぞれ DSS- d_6 及び rosmarinic acid のモル濃度(mol/mL)、 I_D 、 I_R はそれぞれ DSS- d_6 及び rosmarinic acid の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-3-c) HPLC を用いたローズマリー葉中及び既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

HPLC は YMC-Triart C18 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い、40°Cで MeCN : 0.1%リン酸-H₂O の 20 : 80、流速 1.0 mL/min で溶出、330 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。(Fig. 5)

¹H-qNMR 法で定量した rosmarinic acid 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 6)それぞれの生薬試料は、¹H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 10 倍に希釈し、その試料溶液を 10 μ L 注入して得られたクロマトグラムの rosmarinic acid のピークの面積からその定量を行った。

B-4) ¹H-qNMR 法を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

まず、cinnamaldehyde の ¹H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と、ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量を行うことにした。また、HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-3-a) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

Rosmarinic acid の測定に用いたものと同じく、DSS- d_6 約 10 mg を精秤して 20.00 mL の methanol- d_4 に溶かした内部標準溶液を調製した。

各試薬の cinnamaldehyde は液体であるため特に前処理は行わず、各約 5 mg を精秤して 1.00 mL の内部標準溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

ケイヒは市販の食品用(ケイヒ末 A)の粉末はそのまま、切断生薬として入手したケイヒは粉末化して用いた(ケイヒ末 B, C)。粉末中の cinnamaldehyde の測定用試料の調製は、次のように行った。乾燥させた粉末生薬の約 100 mg を

精秤して内部標準用溶液(1.00 mL)に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清をとってメンブランフィルターを用いて濾過し、濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、¹H-qNMR の測定に供した。

B-4-b) ¹H-qNMR スペクトルの測定

Cinnamaldehyde とケイヒ末の抽出液の ¹H-NMR を測定し、cinnamaldehyde (Fig. 1)のアルデヒド基のプロトンシグナルが 9.65 ppm に現れることを確認した。(Fig. 7) ¹H-qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、cinnamaldehyde のアルデヒド基のシグナルと 0.00 ppm とした DSS- d_6 のメチル基プロトンのシグナルの面積を比較して次式に従って cinnamaldehyde の濃度を算出した。

$$C_C = (I_C / I_D) \times C_D$$

ただし、 C_D 、 C_C はそれぞれ DSS- d_6 及び cinnamaldehyde のモル濃度(mol/mL)、 I_D 、 I_C はそれぞれ DSS- d_6 及び cinnamaldehyde の水素 1 個あたりのシグナル面積。

また、試薬の cinnamaldehyde のうち、試薬 A の溶液を内部標準溶液で順次希釈し、各希釈液の ¹H-qNMR スペクトルを測定して、検量線を作成した。

また、添加回収実験を次のように行なった。ケイヒ末 C 約 100 mg を精秤し、cinnamaldehyde(試薬 A)約 5 mg を精秤して内部標準用溶液(1.00 mL)に溶解した溶液 1.00 mL に懸濁し、超音波下 30 分抽出、遠沈した。その上清をとってメンブランフィルターを用いて濾過し、濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、¹H-qNMR の測定に供した。この時の積分値(X)と、ケイヒ末 C 約 100 mg を内部標準用溶液(1.00 mL)から同様に試料を調製して ¹H-qNMR の測定した時の積分値(Y)、cinnamaldehyde(試薬 A)約 5 mg を精秤して内部標準用溶液(1.00 mL)に溶解した溶液から調製した試料の ¹H-qNMR 測定から得られた積分値(Z)から、次式に従って添加回収率を算出した。

$$\text{添加回収率} = [X / (Y + Z)] \times 100 (\%)$$

B-4-c) HPLC を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

HPLC は COSMOSIL 5C18-MS-IIあるいは COSMOSIL 5C18-AR-IIのそれぞれ 4.6 ID × 250 mm のカラムを用い、40°Cで MeCN-H₂O または MeOH-H₂O の溶媒系で初期条件 40 : 60 → 20 min に 55 : 45 → 25 min に 90 : 10 というグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、280 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。

¹H-qNMR 法で定量した試薬の cinnamaldehyde うち、試薬 A の溶液を標準液として検量線を作成することを試みたが、結果で述べるように cinnamaldehyde のピークの形が時間経過とともに崩れてくる現象が観察された。(Fig. 8) 他の試薬でも同様であったため、HPLC における定量は断念した。

C. 結果及び考察

C-1) ローズマリー葉中及び既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

Rosmarinic acid 標準品中の rosmarinic acid の定量を ¹H-qNMR 法で行った結果、89.2±1.0%と見積もられ、試薬の純度表示(96%以上)よりも小さな値となった。

非水溶性ローズマリー抽出物では rosmarinic acid のシグナルは観測できなかったため、この試料での検討は行わなかった。ローズマリー葉中及び既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid では、抽出溶媒を acetone, methanol, ethylacetate, DMSO, chloroform, pyridine で検討、測定溶媒を (DMSO)-d₆, methanol-d₄, pyridine-d₅, acetone-d₄ で検討した。その結果、ローズマリー葉の粉末及び水溶性ローズマリー抽出物では、rosmarinic acid のシグナルが観測され、そのシグナルの大きさから、抽出効率という点では各抽出溶媒で大きな違いは見られなかったものの、acetone 抽出を行うと 8-H 周辺で観測されるシグナルが少なくなり、さらに測定を methanol-d₄ で行うと 8-H の付近の小さなシグナルも 8-H から離れて観測される

状況となった。よって、この acetone で抽出 → methanol-d₄ で測定という組み合わせにして行うことにした。¹H-qNMR 測定の結果、ローズマリー葉の粉末中の rosmarinic acid 含有率は 0.35±0.03%、水溶性ローズマリー抽出物中では 0.60±0.11%という結果を得た。(Table 2) HPLC で rosmarinic acid の検量線を作成したところ、良好な相関の検量線を得ることができた。この検量線からローズマリー葉中及び既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の含有率を算出したところ、ローズマリー葉中では 0.34±0.03%、水溶性ローズマリー抽出物中では 0.60±0.13%という結果が得られ、¹H-qNMR 法での数値に極めて近似した値が得られた。¹H-qNMR 法が HPLC の代わりにとり得る方法であることが確認できた。

一方、水溶性ローズマリーでは両測定法ともに測定値に対するばらつきが大きいと考えることもできる。特に ¹H-qNMR 方でのばらつきの大きさは、8-H のシグナルの裾に小さなシグナルが存在するようにも見えるため、このシグナルと積分値の取り方との関係で、人為的なばらつきが出やすい状況になっているとも考えられる。Rosmarinic acid に関しては、標準品の rosmarinic acid 溶液を ¹H-qNMR 法で値づけをして、その溶液を基に HPLC で定量するという方法が確立されている。^{3,4)} ¹H-qNMR 法を用いての水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid も不可能ではないが、精密さという観点からは HPLC の利用の方が優位であると考えられた。

C-2) ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

Cinnamaldehyde 試薬 A, B, C 中の cinnamaldehyde の定量を ¹H-qNMR 法で行った結果、それぞれ 99.43±2.57%, 92.04±1.03%, 97.94±1.17%と見積もられた。ケイヒ末 A, B, C 中の cinnamaldehyde の ¹H-qNMR 法を用いた定量では、それぞれ 3.46±0.04%, 2.39±0.06%, 2.72±0.04%と見積もられた。(Table 3)

次に、HPLC で cinnamaldehyde の測定を試みたが、上述のように cinnamaldehyde のピークの形が時間経過とともに崩れてくる現象が観察さ

れた。Cinnamaldehyde を MeOH-H₂O または CH₃CN-H₂O に希釈して inject するが、MeOH-H₂O 系の溶媒で展開するとメインのピークの後に分離しきれない形で小さな緩やかなピークが連なり始める状態となり、CH₃CN-H₂O 系の溶媒で展開すると、メインのピークに鋭い小さなピークがついてくるという形になった。(Fig. 8) 溶液として保存している過程または展開中に cinnamaldehyde が変化していることを示唆している。この変化がどのような条件で起こり、何が生成しているかについては今後検討したい。

HPLC での定量は信頼性が低いと考えて、HPLC における定量と ¹H-qNMR を用いた定量との比較をすることは断念した。¹H-qNMR 法を用いることの信頼性の確認のため、積分値と濃度の相関、添加回収率、定量の限界についての確認も行った。Fig. 9 に示すように、積分値と濃度との間には極めて良い相関があることが確認できた。添加回収実験の結果、添加回収率は 96.3% で、極めて良好な回収率だった。また、濃度を変えながら純度測定を行った結果、0.1 mg/mL 程度の濃度までは誤差 1% 程度に抑えられていることがわかった。故に 0.1 mg/mL 程度の濃度までは ¹H-qNMR 法で測定が可能であることがわかった。

ところで、試薬の純度測定において試薬 B だけが表示の規格と大きく異なっていたが、この試薬 B は純度を HPLC で検査している旨の記載がされていた。Cinnamaldehyde の定量を HPLC で行っている報告は多数あるが、上記のように HPLC による定量の信頼性が低い可能性がある。試薬 B の純度だけが表示と大きく異なったのはこのようなことも関連しているかもしれない。他の試薬は GC で検証したとされている。この GC での検証の元となった標準物質の純度の検証については不明である。¹H-qNMR の特色を考えると、¹H-qNMR が cinnamaldehyde の唯一の正確な定量手段となる可能性が考えられる。

D. 結論

1) ローズマリー葉中、及び既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の ¹H-

qNMR 法を用いた定量条件を確立した。

2) ケイヒ中の cinnamaldehyde の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。この過程で、HPLC を用いた cinnamaldehyde の定量時に cinnamaldehyde が不安定であるかことを示唆する現象が観察され、定量の信頼性という観点でも ¹H-qNMR 法が cinnamaldehyde の定量において優れた方法であることが示された。既存添加物の規格を定める場合とともに、生薬ケイヒの品質管理にも適応できる可能性を示した。

E. 参考文献

- 1) Tahara M, Sugimoto N, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara, T, Yoshida Y, Tada A, Kubota R, Shimizu K, Yamazaki T, Tanamoto K, Nakazawa H, Nishimura T. *Jpn J Food Chem Safety* **16**, 28-33 (2009).
- 2) 厚生労働省, 第 18 改正日本薬局方, pp2623 (2021).
- 3) Naoko Masumoto, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato. *日本食品化学学会誌*, **25**(2), 105-113(2018).
- 4) Yuzo Nishizaki, Naoko Masumoto, Kaori Nakajima, Kyoko Ishizuki, Taichi Yamazaki, Miho Kuroe, Masahiko Numata, Toshihide Ihara, Atsuko Tada, Naoki Sugimoto and Kyoko Sato, *Food Additives & Contaminants, Part A*, **36**(2), 203-211 (2019).

F. 研究業績

1. 学会発表等

1-1. 学会

- 1) 定量NMR (¹H-qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量～オールスパイス中の eugenol 及びケイヒ中の cinnamaldehyde の定量～, 加納優奈, 今川真由香, 福本帆花, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, *日本薬学会第142年会*(2022年3月, 名古屋).

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Fujiwara, Yumi; Miwa, Mako; Nagatsu, Akito; Honma, Atsushi: Identification of Maple

Anthocyanin and its Antiproliferative Activity against LLC, T47D and C3H10T1/2 Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **21**(7), 894-901(2021).

G. 知的財産権の出願. 登録状況
なし

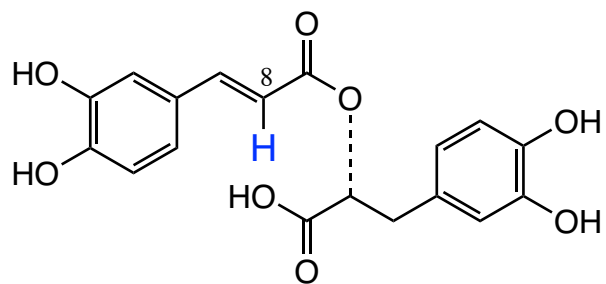


Fig. 1 Rosmarinic acid の構造

8 位のプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

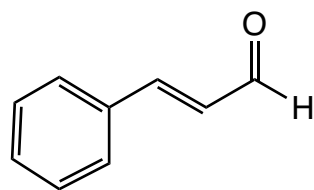


Fig. 2 Cinnamaldehyde の構造

アルデヒド基の H と書かれたプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

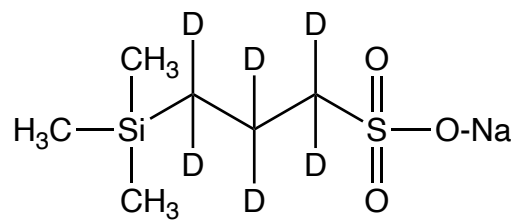


Fig. 3 定量用の認証標準物質: DSS-*d*₆

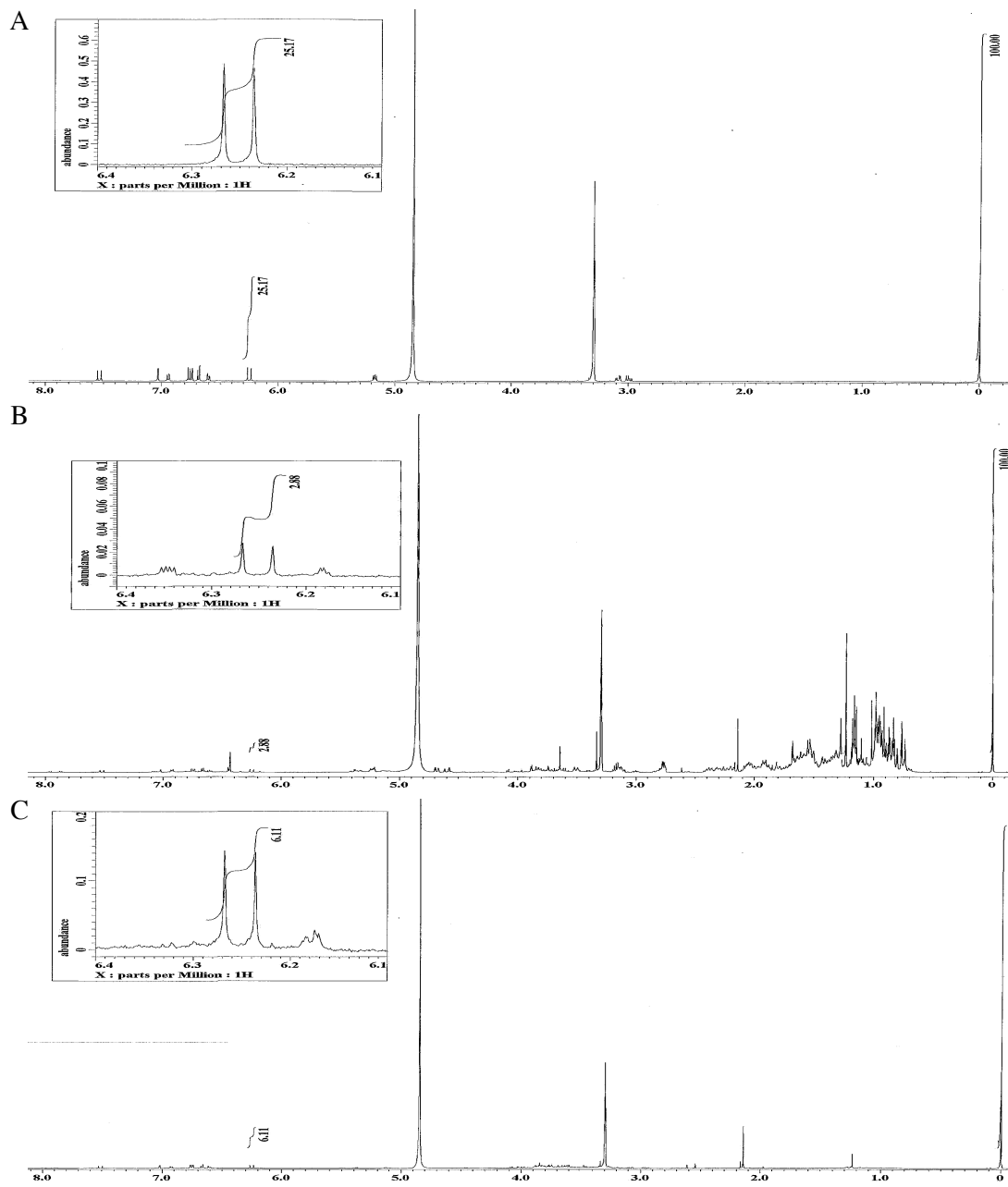


Fig. 4 Rosmarinic acid 試薬(A), ローズマリー葉(B)及び既存添加物のローズマリー水性抽出物(C)の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4 , 500 MHz)
 拡大図は rosmarinic acid の 8-H のシグナル.

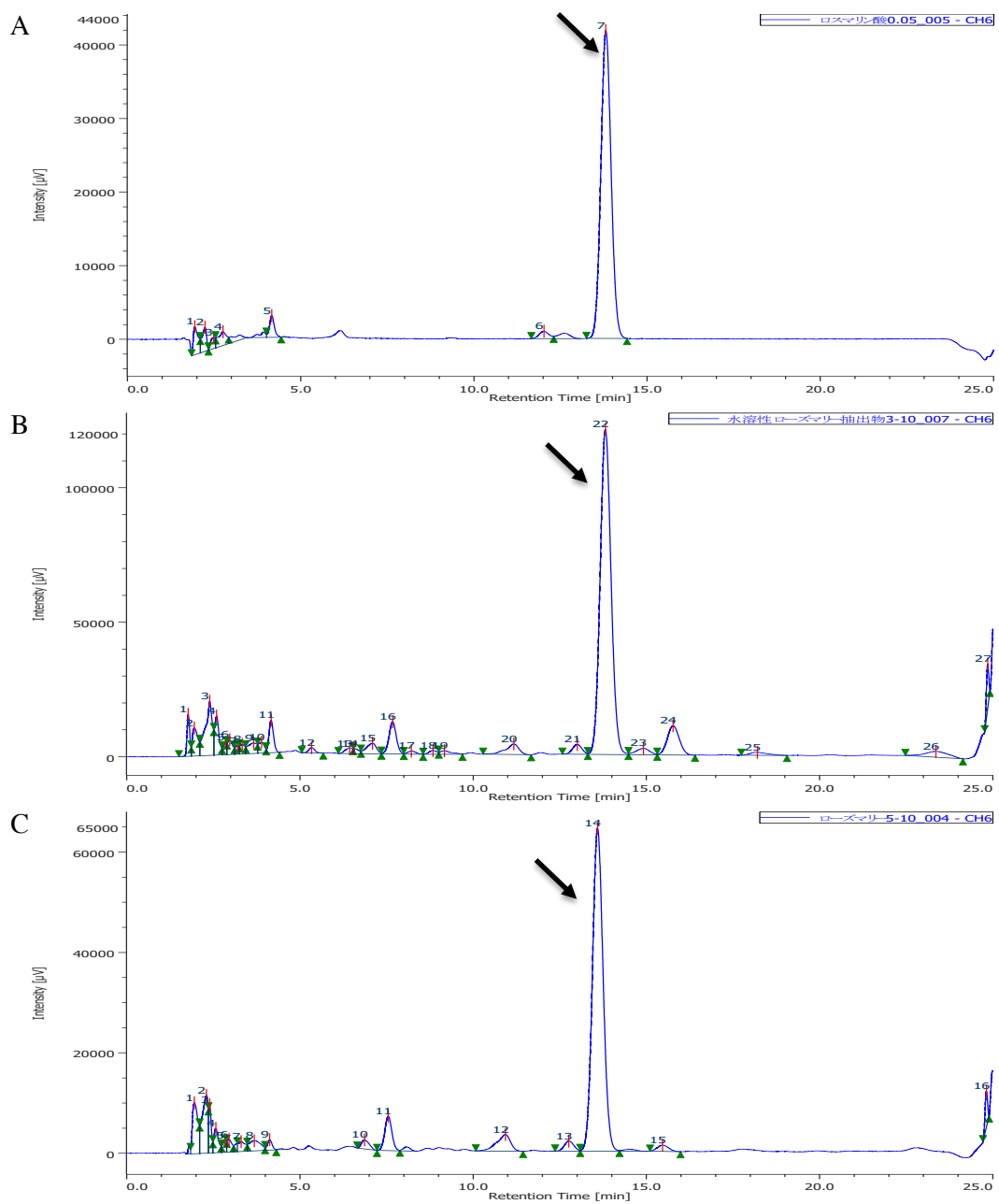


Fig. 5 Rosmarinic acid 試薬(A), ローズマリー葉(B)及び既存添加物のローズマリー水性抽出物(C)のHPCLクロマトグラム
矢印は rosmarinic acid のピーク.

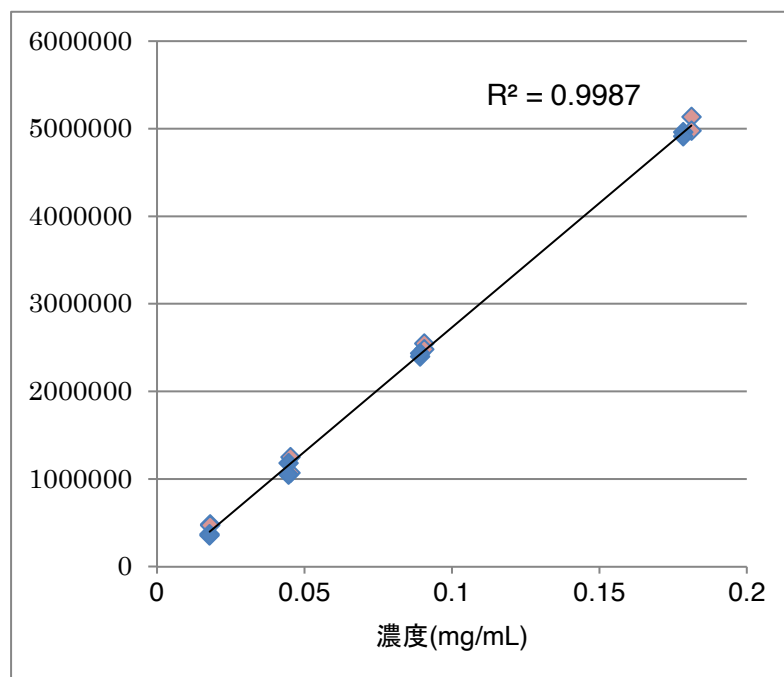


Fig. 6 HPLCにおける rosmarinic acid の検量線

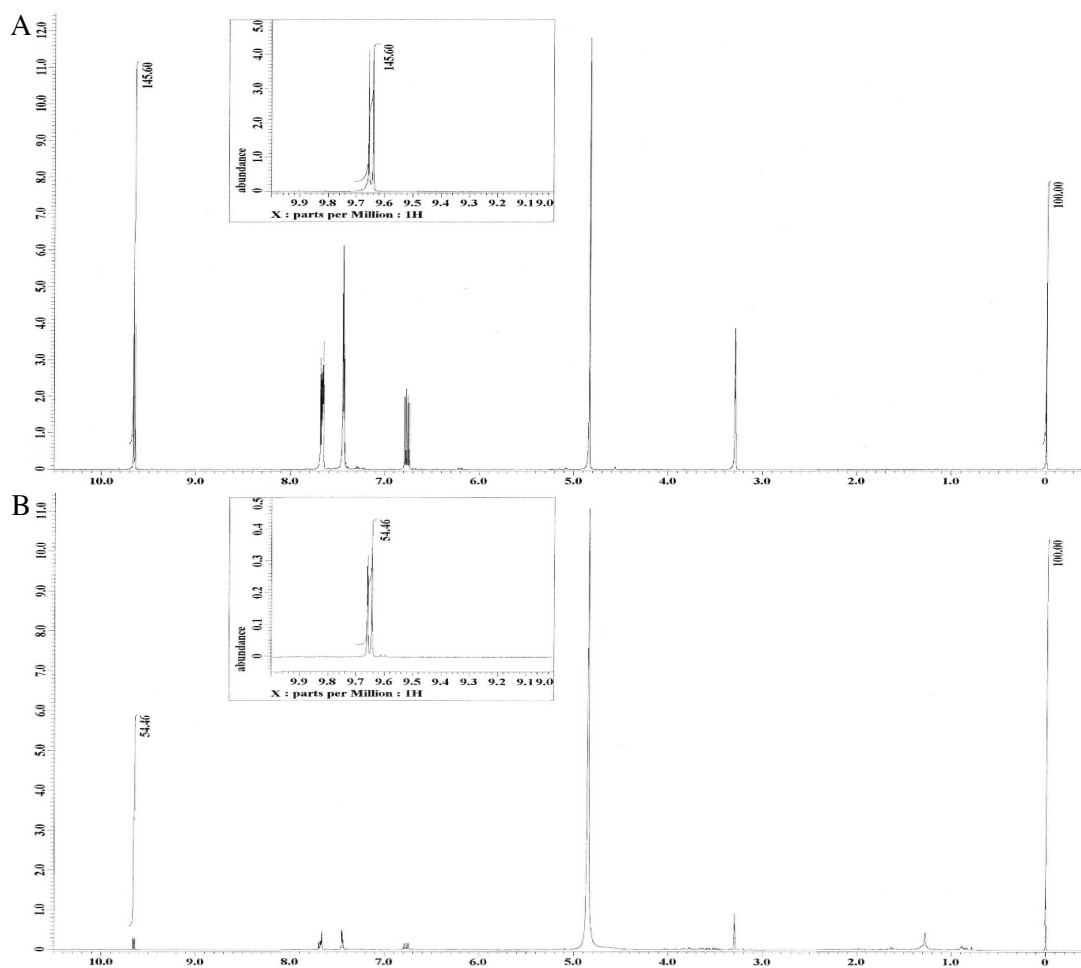


Fig. 7 Cinnamaldehyde 試薬 A (A)とケイヒ末 C (B)の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4 , 500 MHz)

拡大図は cinnamaldehyde のアルデヒド基プロトンのシグナル。

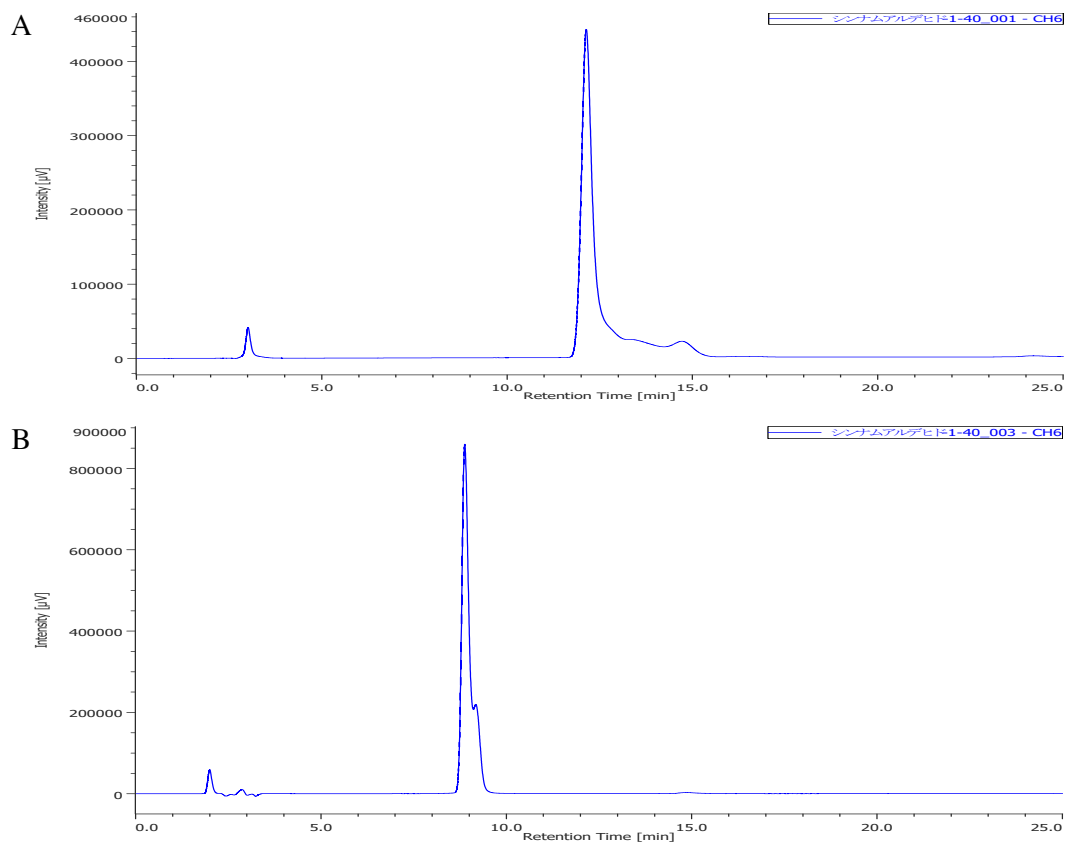


Fig. 8 Cinnamaldehyde 試薬の HPCL クロマトグラム

A は MeOH-H₂O 系の溶媒で展開したときのクロマトグラム, B は CH₃CN-H₂O 系の溶媒で展開したときのクロマトグラム.

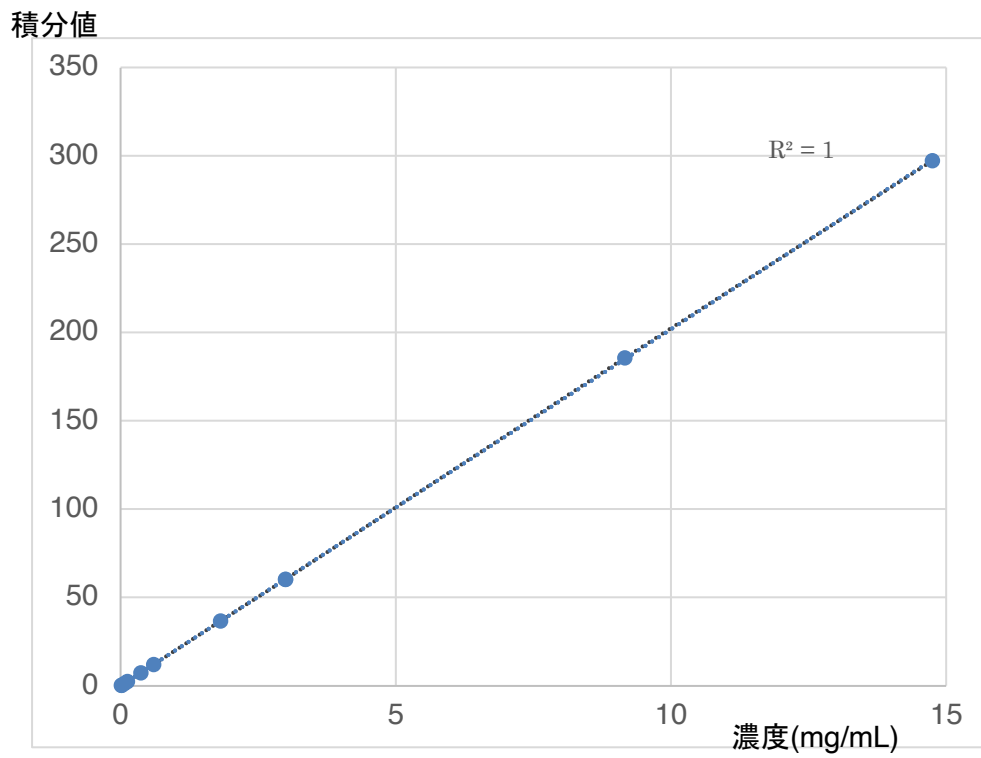


Fig.9 ^1H -qNMR 法での定量における cinnamaldehyde 濃度と積分値との相関

Table 1 ¹H-qNMR スペクトルの測定条件

分光計	日本電子 ECA500
観測範囲	-5 ~ 15 ppm
データポイント数	32000
フリップアングル	90°
パルス待ち時間	60 秒
積算回数	8 回
スピン	なし
プローブ温度	25°C

Table 2 Rosmarinic acid 試薬, ローズマリー葉中及び既存添加物のローズマリー水性抽出物中の rosmarinic acid の含有率

samples	¹ H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
試薬#	89.18	±1.06	(n = 3)			
ローズマリー葉末	0.35	±0.03	(n = 3)	0.34	±0.03	(n = 3)
ローズマリー水性抽出物	0.60	±0.11	(n = 3)	0.60	±0.13	(n = 3)

試薬の純度表示は>96%

Table 3 Cinnamaldehyde 試薬とケイヒ末中の cinnamaldehyde の含有率

samples	試薬の表示純度	¹ H-qNMR での含有率(%)		
		平均	±SEM	(n)
Cinnamaldehyde 試薬 A	>98% (GC)	98.51	±0.10	(n = 3)
試薬 B	>98% (HPLC)	92.04	±1.03	(n = 3)
試薬 C	>98% (Capillary GC)	97.94	±1.17	(n = 3)
ケイヒ末 A		3.46	±0.04	(n = 3)
ケイヒ末 B		2.39	±0.06	(n = 3)
ケイヒ末 C		2.72	±0.04	(n = 3)

Table 4 Cinnamaldehyde (試薬 A) の各濃度での ¹H-qNMR 測定から算出された純度

濃度 (mg/mL)	純度 (%)
14.74	98.51±0.10
9.16	100.68±0.04
3.00	100.09±0.17
1.81	99.80±0.02
0.60	100.85±0.55
0.37	100.81±1.00
0.12	102.87±6.96
0.07	98.55±1.04
0.02	91.82±3.16
0.01	94.93±6.78

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～既存添加物ニガヨモギ抽出物の成分分析～

研究分担者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官

研究要旨

天然由来の苦味料ニガヨモギ抽出物の成分規格を設定するために、本抽出物の含有成分について LC/MS を用いて検討した。観察された主要ピークの精密質量 MS から成分の同定を試みたところ、本抽出物は苦味成分として absinthin, anabsin 及び anabsinthin を含んでいた。その他の成分としてフラボノイドである artemetin, またリグナンである yangambin, epiyangambin, diayangambin, sesartemin, episesartemin A, episesartemin B 及び diasesartemin の 7 成分が確認された。標品が市販されている苦味成分 absinthin を本抽出物の指標成分として、HPLC 分析及び TLC 分析を検討した。HPLC 分析では、absinthin の絶対検量線が良好な直線性を示すことから、成分規格試験の定量法及び確認試験としての運用が期待できたが、別に absinthin 標品の規格化が必要であり、その際、absinthin 標品の価格や絶対純度について考慮する必要があった。TLC 分析では順相条件及び逆相条件について検討した。両条件とも absinthin の濃度に比例した明瞭なスポットが確認できたことから、標品を用いずとも Rf 値を規定することにより、absinthin の確認試験を設定できると考えられた。本研究成果をもとにニガヨモギ抽出物の成分規格試験の作成を進めていくこととした。

研究協力者

加藤菜帆 日本大学

生物資源科学部

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

A. 研究目的

ニガヨモギは、ヨーロッパとアジアのさまざまな地域に分布する黄色い花を咲かせるキク科に属する多年生植物で、ワームウッドとして知られており、駆虫効果、食欲不振及び消化不良の治療として古くから使用されてい

る。その抽出液は特異な苦味と香りを有することから、一時製造禁止となったが、ブランデーにニガヨモギを浸したお酒、アブサン酒などのアルコール飲料にも含まれている。

日本ではニガヨモギを基原とする天然由来の苦味料としてニガヨモギ抽出物がある。しかしながら、本抽出物は第9版食品添加物公定書に成分規格が未設定のままであり、その品質及び化学的安全性を確保するための成分規格の設定が急務とされている。ニガヨモギ抽出物は、既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質において、「キク科ニガヨモギ (*Artemisia absinthium* LINNE) の全草より、水又は室温時エタノールで抽出して得られたものである。主成分はセスキテルペン（アブシンチン等）である。」と記載されている。ニガヨモギそのものの含有成分については、いくつかの論文により報告されており、例え

ば、特徴的な苦味成分としてセスキテルペンラクトンの *absinthin*, *anabsin*, *ketopelenolide b*, *anabsinthin* が含まれている (Fig. 1)¹⁾。また、この他にリグナン類である *sesartemin*, *epiyangambin* がマウスに投与すると自発運動と隔離誘発性の攻撃性を低下させると報告され²⁾、このうち、*epiyangambin* は抗血小板凝集活性を示すことが報告されている^{3,4)}。さらに、フラボノイド類も含有成分として確認されており、*artemetin* は高い抗炎症、抗腫瘍及び抗増殖活性を示したと報告されている^{5,6)}。

このようにニガヨモギにはセスキテルペンラクトンの *absinthin* をはじめとする複数の成分が含まれており、これまで多くの研究がなされている。一方、食品添加物の成分組成に関する情報としては、*absinthin* と *anabsin* の2成分が報告されているのみで⁷⁾、その他の含有成分についての報告はない。

そこで本研究では、ニガヨモギ抽出物の品質を明らかにし成分規格及び規格試験法を設定するための基礎的データを得るために、ニガヨモギ抽出物の成分分析を行うこととした。さらに同定した成分につき、HPLCによる定量分析やTLCによる定性分析を実施し、ニガヨモギの品質を確保するための公定分析法として運用可能か評価した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ニガヨモギ抽出物 (A650, A657 及び C2232 の計3試料 (英数字は当部管理番号)) は、日本食品添加物協会を通じて入手した。これらの性状は、黄褐～暗褐色の液体であった。また、生薬として流通しているニガヨモギ (以下、クガイ (苦艾) (C2229, C2230 及び C2235) (英数字は当部管理番号)) は、(株) ツムラを通じて入手した。

Absinthin (Cat No A111600), *1,4-BTMSB-d₄* (Cat No 024-17031, 100% mass fraction), エタノール (99.5) (エタノール; Cat No 055-00457), 硫酸 (Cat No 22100038) 及びバニリン (Cat No 228-00685) は富士フィルム和光純薬 (株) より購入した。メタノール (Cat No

25183-2B) は関東化学 (株) 製の HPLC 用を使用した。重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆; Cat No 151874) は ISOTEC 社製のものを使用した。

水は、ピューリック ω (オルガノ (株) 製) により精製した超純水を用いた。その他の溶媒はすべて市販の特級品あるいは HPLC 用を用いた。

B-2) LC/MS 分析

セミマイクロ天秤を用いて、よく攪拌させたニガヨモギ抽出物製品約 20 mg と 200 mg を精密に量りとり、50%エタノール水溶液を加えて 2 mL に定容したものを LC/MS 用試料液とした (それぞれ 10 mg/mL と 100 mg/mL に相当)。

クガイについては、約 5 g を量りとり、50%エタノール水溶液 100 mL を加えて 4°C で 41 時間静置し、ろ過した (Cat No. 80621102, 東洋濾紙 (株) 製)。このろ液 20 mL をホールピペットで正確に量りとり、減圧乾固し、残さに対して水 10 mL 及び酢酸エチル 10 mL を加えてふり混ぜ、遠心分離機 (H-80R, (株) コクサン) で 3,000 rpm, 10 分間の遠心を行った。酢酸エチル層を取り出して減圧乾固し、残さに 50%エタノール水溶液 1 mL を正確に加えて溶解させたものを 100 μL 取り出し、50%エタノール 900 μL 加えて LC/MS 用試料液とした (100 mg/mL に相当)。

LC 条件: 装置, ACQUITY UPLC H-CLASS

(Waters 社製); カラム, ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7μm, Waters 社製); カラム温度, 40°C; A 液, 10%メタノール水溶液; B 液, メタノール; グラジエント, 0.0 min (60:40) →20.0 min (60:40) →50 min (30:70) →60 min (0:100); 流速, 0.2 mL/min; 測定波長, 210 nm; 注入量, 2 μL.

MS 条件: 装置, Xevo G2 QTof (Waters 社

製); ソース温度, 120°C; 脱溶媒温度, 450°C; 脱溶媒ガス流量, 800 L/hr; コーンガス流量, 50 L/hr; キャピラリー電圧, 2.5 kV; コーン電圧, 30 V; 走査範囲, m/z 100~1000; イオン化モード, ESI (pos.).

B-3) 成分 11 の単離・精製

クガイ (C2229) 400 g に 50% エタノール水溶液 8 L を加えて 4°C で 48 時間抽出した後、濾紙でろ過した。ろ液を約 4 L 以下まで減圧濃縮した後、酢酸エチル 4 L を加えて抽出した。静置後、酢酸エチル可溶部を取り出し減圧乾固して、残さ 12.56 g を得た。この残さをエタノール 70 mL に溶解し、サンプルット (Sfär Silica Samplet 60 µm 35 g, Cat No SAS-04450350 Biotage 社製) に負荷した。このサンプルットをフラッシュ自動精製システム (Isolera One, Biotage 社製) にのせて、シリカゲルカラム (Sfär Silica HC D 350 g, Cat No FSUD-0443-0350, Biotage 社製) 上で、ヘキサン/酢酸エチル混液 (1:1) 及びエタノールを用いて、ステップワイズに溶出させ、約 500 mL ずつ 11 のフラクションに分画した。LC/MS で確認を行い、成分 11 が溶出した画分を集めて減圧乾固し、粗成分 11 (0.63 g) を得た。さらにシリカゲルカラム (Sfär Silica HC D 10 g, Cat No FSUD-0443-0010, Biotage 社製) に負荷し、クロロホルム/アセトン混液 (15:1) を用いて、成分 2 を含む画分を集めた後、分取 LC ((株) 島津製作所製) を用いて成分 11 を精製した。

精製物は DMSO-*d*₆ に溶解させた後、NMR (Royal プローブ付 JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子 (株) 製)) を用いて、分子構造を確認した。

B-4) HPLC による Absinthin の定量

Absinthin 約 1 mg を精密に量りとり、エタノールを加えて 5 mL に定容したものを検量線用標準原液とした (200 µg/mL)。この標準原液に対して、50% エタノール水溶液を加えて、5 濃度の検量線用標準液 (12.5, 25, 50, 75, 100 µg/mL) を調製し、HPLC に付した。

Absinthin のピーク面積と標準液濃度 (µg/mL) の関係から絶対検量線を作成し、「B-2) LC/MS 分析」で調製した試料液中の absinthin の濃度を求めた後、式 (2) に示すように、ニガヨモギ抽出物中の absinthin 含量 (Cont.A) を求めた。

$$Cont.A = \frac{Conc.A \times V}{W_{sample}} \quad \text{式 (2)}$$

ここで、*Conc.*, 絶対検量線から求めた試料液中の absinthin 濃度 (µg/mL); *V*, 試料液量; *W*, 採取量。

B-5) TLC を用いた absinthin の確認試験の検討

薄層板に負荷する試料液は「B-2) LC/MS 分析」で調製した 7 種類 (検量線標準原液, 添加物製品は 200mg で調製した 3 試料及びクガイ 3 試料) のものを用いて 5 µL ずつ負荷し、以下の逆相条件と順相条件に従って展開した。なお、薄層板はあらかじめ 110 °C で 1 時間以上乾燥させたものを用いた。

逆相条件: 薄層板, TLC ガラスプレート RP-18 F_{254S} (Cat No 1.15389.0009, Merck 社製); 展開溶媒, メタノール/水混液 (3:2)。風乾後, 10% 硫酸溶液を噴霧し, 110 °C に設定したホットプレート (Fisher Scientific 社製) に乗せ呈色を観察した。

順相条件: 薄層板, TLC ガラスプレート シリカゲル 60 F₂₅₄ (Cat No 1.05715.0009, Merck 社製); 展開溶媒, 酢酸エチル/トルエン混液 (5:4)。風乾後, バニリン・硫酸溶液 (1→10) を噴霧し, 2 分間静置した後に呈色を観察した。呈色が観察できなかった場合, 110 °C に設定したホットプレートに乗せ呈色を観察した。本順相条件は, 第 5 版自主規格に記載のニガヨモギ抽出物 (暫定規格) の方法を採用している。

C. 結果及び考察

C-1) ニガヨモギ抽出物及びクガイの LC/MS 分析

ニガヨモギ抽出物 3 試料 (A650, A657 及び C2232) の含有成分を確認するため、クガイ 3 試料 (C2229, C2230 及び C2235) とあわせて、LC/MS による分析を行った (Fig. 2)。LC/MS による分析の結果、6 試料のクロマトグラムは類似しており、ニガヨモギに特有のクロマトパターンと考えられた。クロマトグラム上には 1~11 の主要なピークが観察され、これらの PDA スペクトル及び MS スペクトルは

試料間で一致した。このことから、成分 **1**~**11** はニガヨモギに共通した成分と考えられた。また、A650 と C2232 の入手年は、それぞれ 2005 年と 2021 年であるが、クロマトパターンに大きな差異がなかったことから、2005 年から現在にかけて、ニガヨモギ抽出物の基原・製法・本質は変わっていないが支持された。

C-2) ニガヨモギ抽出物製品の成分解析

LC/MS 分析で得られた m/z の値から成分 **1**~**11** の同定を試みた。

成分 **1** は m/z 519.2721 を与えた。元素組成分析の結果、分子式として $C_{30}H_{40}O_6Na$ が考えられ、観測された m/z は absinthin $C_{30}H_{40}O_6$ の $[M+Na]^+$ に相当する分子イオンと考えられた。別に absinthin 標品を用いて、保持時間、PDA スペクトル及び MS スペクトルの比較を行ったところ、すべて一致し、成分 **1** を absinthin と同定した。

成分 **2** は m/z 535.2667 を与えた。元素組成分析の結果、分子式として $C_{30}H_{40}O_7Na$ が考えられた。観測された m/z は anabsin $C_{30}H_{40}O_7$ の $[M+Na]^+$ に相当する分子イオンと考えられた。

成分 **3** は m/z 519.2721 を与えた。元素組成分析の結果、分子式として $C_{30}H_{40}O_6Na$ が考えられた。観測された m/z は anabsinthin $C_{30}H_{40}O_6$ の $[M+Na]^+$ に相当する分子イオンと考えられた。

成分 **4**~**6** はいずれも m/z 469.1821 を与えた。分子式として $C_{24}H_{30}O_8Na$ 、また互いに異性体と考えられたことから、観測された m/z は $C_{24}H_{30}O_8$ の $[M+Na]^+$ に相当する分子イオン、すなわち、yangambin, epiyangambin 及び diayangambin と考えられた。

成分 **7**~**10** は m/z 453.1529 を与えた。分子式として $C_{23}H_{26}O_8Na$ 、また互いに異性体と考えられたことから、観測された m/z は $C_{23}H_{26}O_8$ の $[M+Na]^+$ に相当する分子イオン、すなわち sesartemin, episesartemin A, episesartemin B 及び diasesartemin と考えられた。このうち、Sesartemin はニガヨモギから単離された報告があり⁸⁾、すべての成分がニガヨモギ属で報告されている⁹⁾。

成分 **11** は m/z 411.1055 を与えた。元素組成

分析の結果、分子式として $C_{20}H_{21}O_8$ が考えられ、観測された m/z は artemetin $C_{20}H_{20}O_8$ の $[M+H]^+$ に相当する分子イオンと考えられた。別に、この成分を単離・精製して NMR に付したところ、artemetin に由来する 1H シグナルを確認できたことから (Fig. 5)、成分 **11** を artemetin と同定した。

以上の同定及び推定の結果から、ニガヨモギ抽出物はセスキテルペンラクトンである absinthin, anabsin 及び anabsinthin を含んでおり、これらが本抽出物の本質、すなわち苦味成分であり、成分規格試験の指標成分として有用と考えられた。その他の成分としてはフラボノイドである artemetin, またリグナンである yangambin, epiyangambin, diayangambin, sesartemin, episesartemin A, episesartemin B 及び diasesartemin の 7 成分が確認された。

C-3) ニガヨモギ抽出物中の absinthin 含量

ここまでの結果から、ニガヨモギ抽出物はセスキテルペンラクトン、フラボノイド及びリグナンの複数の成分が混在する多成分系であることが分かった。添加物製品の品質を確保する上で、添加物の本質を担う成分のモニタリングは重要な試験項目である。今回確認された成分の情報からニガヨモギ抽出物の指標成分として、標品が購入可能かつ PDA 検出においてクロマトグラムにピークが分離良く観察された absinthin が適当と考えられた。そこで、成分規格試験として absinthin の HPLC 定量法を検討することとした。

absinthin 標品の濃度とピーク面積の関係を示す絶対検量線を HPLC 上で作成したところ、12.5-100 $\mu g/mL$ の範囲で $R^2 = 0.9994$ と良好な直線性を示した (Fig. 3)。作成した絶対検量線からニガヨモギ抽出物中の absinthin 含量を算出したところ、約 0.23%~0.78%であった (Table 1)。ただし、今回 HPLC 分析に付した添加物製品は全て液体製品であることから、absinthin の含量を規定する場合は、別に乾燥減量試験を実施する必要がある。

C-4) TLC を用いたニガヨモギ抽出物中の

absinthin の確認試験

成分規格試験を作成するにあたり、極力、高価な試薬や装置を用いず、食品添加物事業者や検査機関で簡便に実施できるように配慮することも重要である。

これまでの結果からニガヨモギ抽出物は多成分系であり、さらには異性体をもつ成分が複数含まれていることから、分離能に特化した HPLC による absinthin の定量は、成分規格試験として有用である。一方、absinthin 標品は 20,000 円/mg と非常に高価であり、さらに absinthin をはじめとするセスキテルペンラクトンは配座異性平衡や骨格転位を起こすことから純度コントロールが難しい物質であり、定量用標品や同定用標品としての規格化が困難と考えられる。

これに対して TLC は、適当な固定相で作られた薄層を用い、混合物をそれぞれの成分に分離する方法であり、薄層板さえ用意できれば、誰もが簡便に実施できる試験である。また Rf 値を規定することにより、目的の標品がなくとも、物質の確認試験として運用することができる。そこで、ニガヨモギ抽出物中の absinthin について、TLC を用いた確認試験を検討することとした。TLC 条件は、逆相条件と順相条件を検討することとした。逆相条件では展開溶媒にメタノール/水混液 (3 : 2)、順相条件では酢酸エチル/トルエン混液 (5 : 4) を検討することとした (第 5 版既存添加物自主規格に採用されている条件)。先の「C-3) ニガヨモギ抽出物中の absinthin 含量」で、Absinthin 濃度が明らかとなった LC/MS 分析試料液を用いて検討した。

逆相条件では Rf 値 0.14 に absinthin に由来する茶色のスポットが確認された (Fig. 4)。順相条件では、バニリン・硫酸を噴霧したあと、2 分間静置してスポットを観察したが、スポットが肉眼では確認できなかった。そこで、110°C に設定したホットプレートに乗せ呈色を観察したところ、Rf 値 0.19 に absinthin のスポットが確認された (Fig. 4)。両条件とも、各試料の absinthin のスポットの濃さは、薄層板に負荷した試料の absinthin 濃度と相関しており、他

の夾雑成分の影響を受けていないと考えられた。

D. 結論

本研究はニガヨモギ抽出物の成分規格設定を念頭に、本抽出物中の成分分析を行った。LC/MS 分析の結果、ニガヨモギ抽出物はセスキテルペンラクトンである absinthin、フラボノイドの artemetin 及び yangambin をはじめとするリグナン類を主要な成分として含むことを明らかとした。このうち苦味成分である absinthin を指標として HPLC による定量分析及び TLC による確認試験を検討したところ、両手法とも他の夾雑成分の影響を受けることなく absinthin をモニタリングできることを明らかにした。本研究成果をもとにニガヨモギ抽出物の成分規格及び試験法を進めていく予定である。

E. 参考文献

- 1) Aberham, A., Cicek, S.S., Schneider, P., Stuppner, H. Analysis of sesquiterpene lactones, lignans, and flavonoids in Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) using high-performance liquid chromatography (HPLC)–mass spectrometry, reversed phase HPLC, and HPLC–solid phase extraction–nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.*, 58(20), 10817–10823 (2010).
- 2) MacRae, W.D., Towers, G.H. An ethnopharmacological examination of *Virola elongata* bark: A South American arrow poison. *Journal of Ethnopharmacology*, 12(1), 75–92 (1984).
- 3) Castro-Faria-Neto, H.C., Martins, M.A., Silva, P.M., Bozza, P.T., Cruz, H.N., de Queiroz-Paulo, M., Kaplan, M.A., Cordeiro, R.S. Pharmacological profile of epiyangambin: a furofuran lignan with PAF antagonist activity. *Journal of lipid mediators*, 7(1), 1–9 (1993).
- 4) Chen, J.J., Chang, Y.L., Teng, C.M., Chen, I.S. Anti-platelet aggregation alkaloids and lignans

from *Hernandia nymphaeifolia*. *Planta medica*, 66(3), 251–256 (2000).

- 5) Sertić, J.A., Basile, A.C., Panizza, S., Matida, A.K., Zelnik, R. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. *Planta medica*, 56(1), 36–40 (1990).
- 6) Ko, W.G., Kang, T.H., Lee, S.J., Kim, N.Y., Kim, Y.C., Sohn, D.H., Lee, B.H. Polymethoxyflavonoids from *Vitex rotundifolia* inhibit proliferation by inducing apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Food Chem Toxicol.* 38(10), 861–865 (2000).
- 7) Yashiro, T., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Analysis of absinthin in absinth extract bittering agent, *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 11(2), 86–90 (2004).
- 8) Tulake, A., Jiang, Y., Tu, P.F. Nine lignans from *Artemisia absinthinum* L. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 360–363 (2012).
- 9) Ickovski, J.D., Pavlović, J.Lj. Mitić, M.N., Palić, I.R., Kostić, D.A., Petrović, G.M., Stojanović, G.S. Furofuran lignans of *Artemisia* genus: Isolation, biosynthesis and biological activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 85(5), 575–600 (2020).

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物中の窒素定量分析~燃焼法 vs ケルダール法~. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web)).
- 2) 建部千絵, 藤原由美子, 長久保直也, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 久保田浩樹, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた食用タール色素中の 6, 6'-オキ

シビス(2-ナフトレンスルホン酸) 二ナトリウムの定量法の検討. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web)).

- 3) 高木映里, 高橋未来, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web)).
- 4) 日置冬子, 多田敦子, 西崎雄三, 古庄紀子, 石附京子, 久保田浩樹, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物ジフェノコナゾールの規格試験法の検討及び異性体組成分析. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web)).
- 5) 長井理夏子, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章: 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析. 第60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(2021.10.23-24)(松山市).

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度に基づくシングルリファレンス GC 法及び HPLC 法によるカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中のイソチオシアン酸アリルの定量. *食衛誌*, 62(3), 73-78 (2021).
- 2) 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.*, 70(1), 25–31 (2022).

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

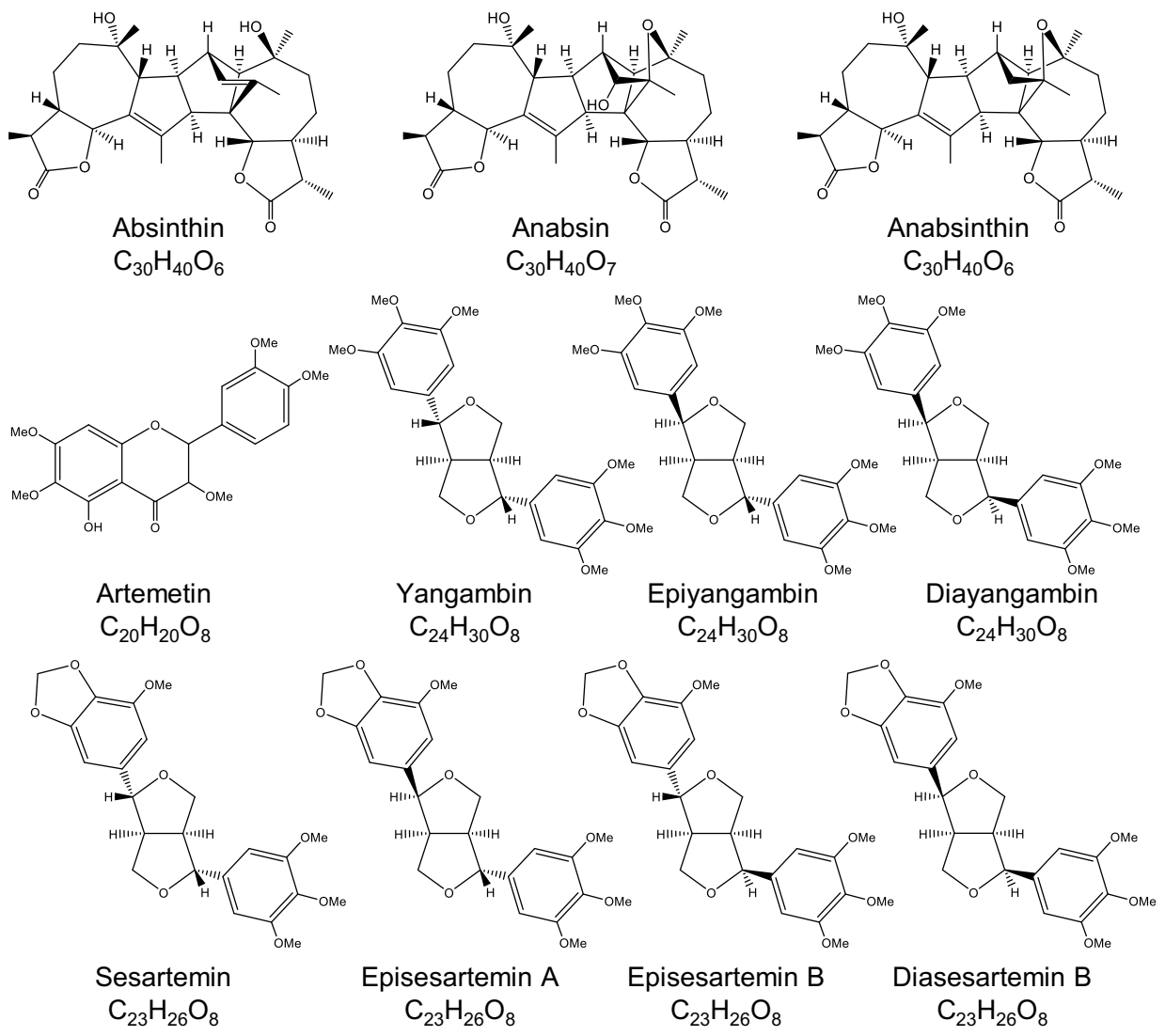


Fig. 1. ニガヨモギ抽出物中の主要成分

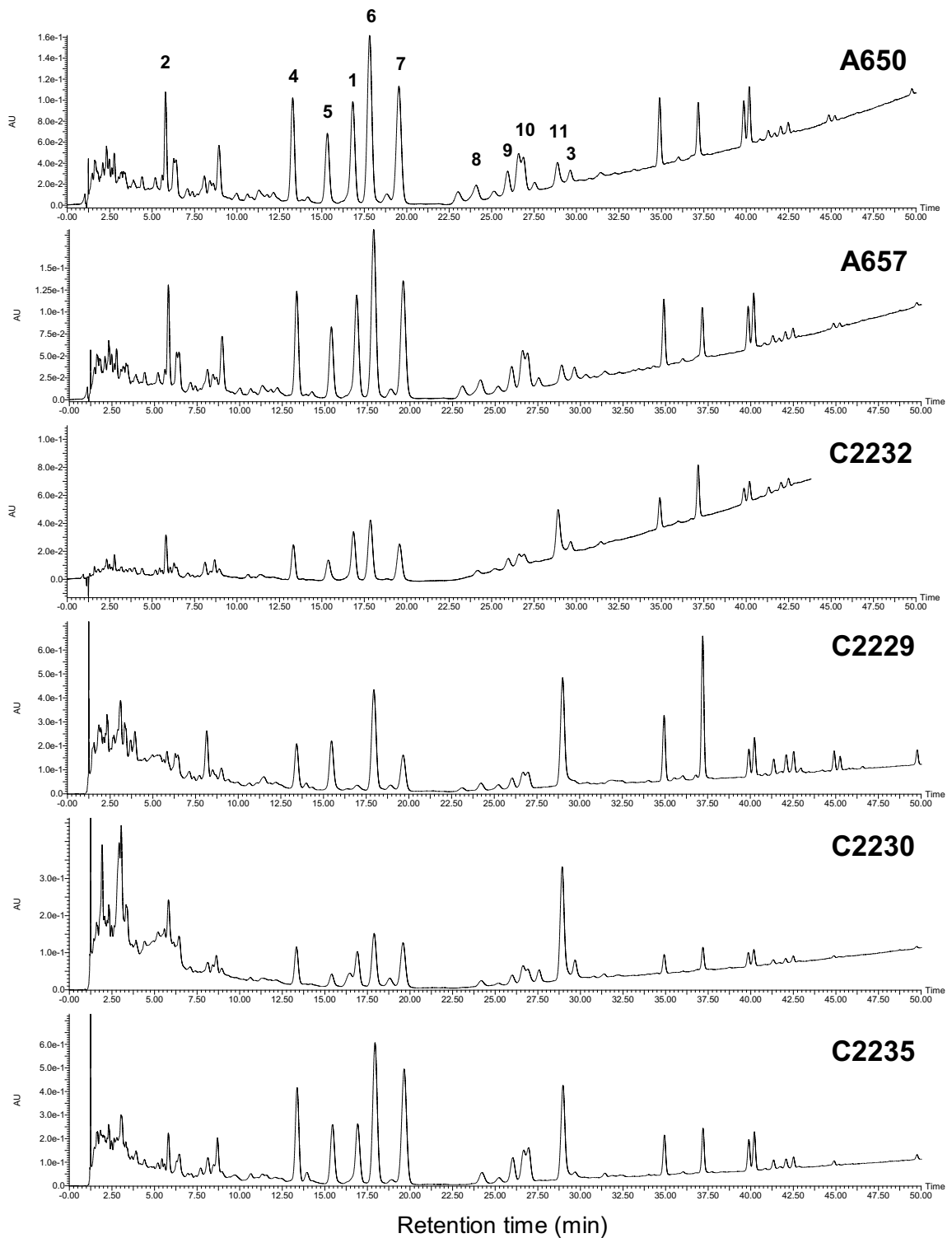


Fig. 2. ニガヨモギ抽出物およびクガイのHPLCクロマトグラム
A650, A657, C2232 : 添加物製品. C2229, C2230, C2235 : クガイ. クロマトグラ
ム : 210 nm ± 4 nm.

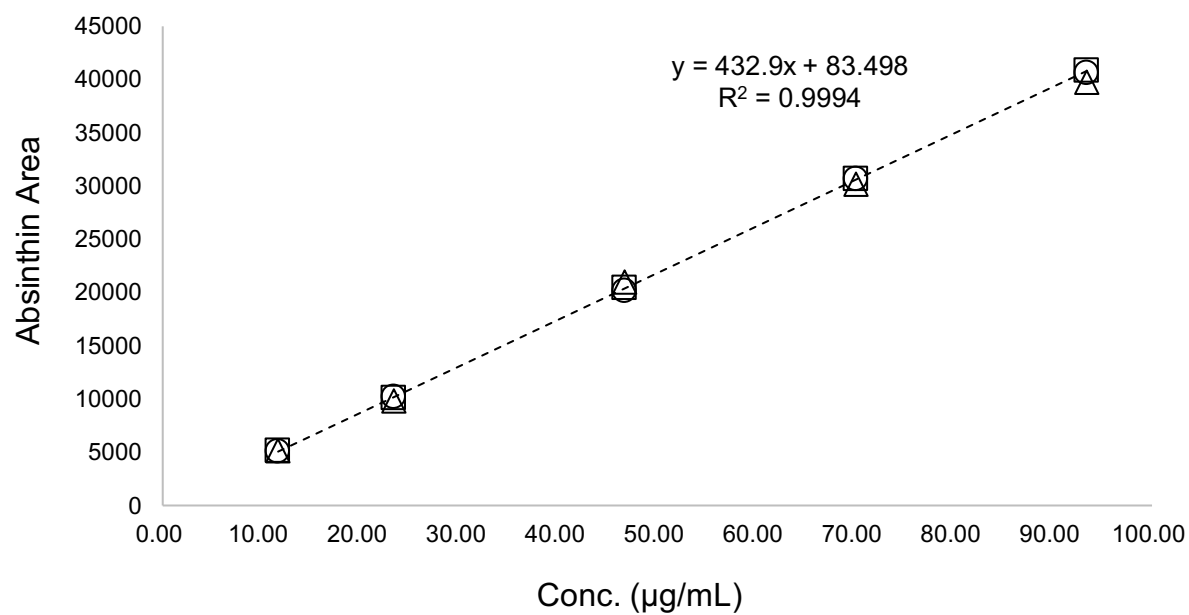
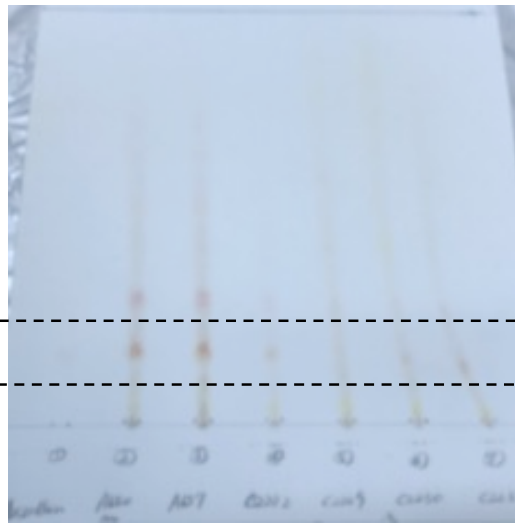


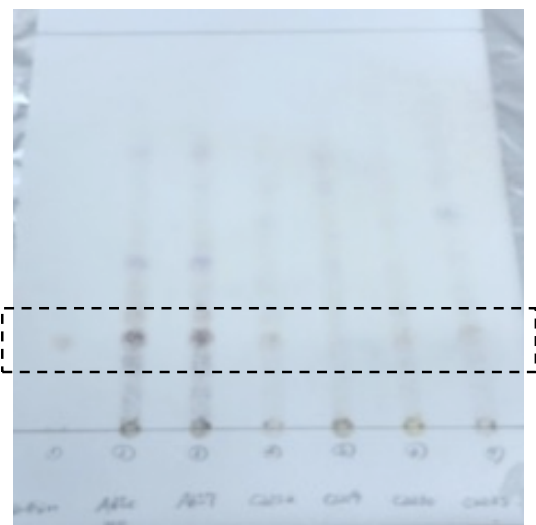
Fig. 3. Absinthin標品の絶対検量線
検出は210 nm ± 4 nm. △ : n1, ○ : n2, □ : n3.

逆相条件



Std (200 $\mu\text{g/mL}$)
A650 (657 $\mu\text{g/mL}$)
A651 (802 $\mu\text{g/mL}$)
C2232 (231 $\mu\text{g/mL}$)
C2229 (14.4 $\mu\text{g/mL}$)
C2230 (46.0 $\mu\text{g/mL}$)
C2235 (176 $\mu\text{g/mL}$)

順相条件



Std (200 $\mu\text{g/mL}$)
A650 (657 $\mu\text{g/mL}$)
A651 (802 $\mu\text{g/mL}$)
C2232 (231 $\mu\text{g/mL}$)
C2229 (14.4 $\mu\text{g/mL}$)
C2230 (46.0 $\mu\text{g/mL}$)
C2235 (176 $\mu\text{g/mL}$)

Fig. 4. 逆相及び順相条件によるabsinthinのTLC分析結果
逆相条件はRf値0.14, 順相条件ではRf値0.19にabsinthinのスポットが確認された. 試料に記載された濃度 ($\mu\text{g/mL}$) はabsinthinの濃度.

Table 1. Absinthin 定量結果 (wt%)

	ニガヨモギ抽出物				クガイ	
含量	0.66%	0.78%	0.23%	0.01%	0.05%	0.17%
RSD	1.9%	1.1%	2.0%	5.9%	2.0%	0.7%

試料調整 1 回，測定は非連続に 3 回行った。

研究要旨 本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、現状、成分規格が未設定である酵素処理ナリンジンを対象に、その成分規格（案）における定量法の確立に関する検討を行った。今年度は、昨年度に引き続き、¹H-qNMR に基づく相対モル感度（RMS）を用いたシングルリファレンス HPLC 法の当該分析への応用に関する検討を実施し、基準物質である 4-ヒドロキシ安息香酸メチル及びカフェインに対するナリンゲニン 7-O-グルコシドの RMS が 1.13（MHB）、1.87（カフェイン、検出波長 274 nm）、0.87（カフェイン、検出波長 205 nm）であることが明らかとなった。また、成分規格試験法（案）における前処理時のグルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼを用いた酵素加水分解の反応効率について検討した結果、規定された反応時間、各酵素の添加量に問題は無いと考えられた。

A. 研究目的

酵素処理ナリンジンは、既存添加物名簿収載品目リストに記載されている既存添加物の 1 つであり、苦味料等として、チューイングガムや清涼飲料水のアクセントとして使用される¹。この食品添加物は、食品衛生法第 11 条第 1 項の定めにより告示される「食品、添加物等の規格基準」に基づく成分規格が制定されておらず、現在は、日本食品添加物協会が作成した第 4 版既存添加物自主規格²に基づいて製造、使用、流通している。一方で、平成 7 年以降、既存添加物の安全性確保を求める国会の附帯決議も踏まえ、既存添加物については、その品質を確保し、食の安全に寄与するため、個々の成分規格を設定した上、食品添加物公定書への収載が進められており、この酵素処理ナリンジンに関して「食品、添加物等の規格基準」の策定及び食品添加物公定書への収載に向けた検討が進められている。このうち、成分規格（案）に関して、「本品を乾燥物換算したものは、総ナリンゲニン配糖体として 30.0%以上を含む」とされており、この総ナリンゲニン配糖体含量は、酵

素処理ナリンジンのグルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼ処理後の「ナリンジン」、「モノグルコシルナリンジン」、「ナリンゲニン 7-O-グルコシド」及び「遊離する α -グルコシル残基」の各含量の合計値から算出することが規定されている。現在、分担研究者は、既存添加物の成分規格試験法の向上を目指した研究の一環として、この酵素処理ナリンジンの規格試験法における ¹H-qNMR に基づく相対モル感度（Relative Molar Sensitivity : RMS）を用いたシングルリファレンス HPLC 法³⁻⁵の応用に関する検討をすすめている。これまでに、基準物質に対するナリンジン及びモノグルコシルナリンジンの RMS を明確にするとともに実試料を用い検討において、シングルリファレンス HPLC 法と従来法で前処理後のナリンジン及びモノグルコシルナリンジンの含量に大きな違いは認められず、この RMS を用いることにより、シングルリファレンス HPLC 法からこれら 2 種の正確な定量が可能であることを明らかにした。今年度は、シングルリファレンス HPLC 法の応用に関する検討の一環として、基準物質に対す

るナリンゲニン 7-O-グルコシドの RMS について検討した。

また、成分規格試験法（案）に規定されている前処理におけるグルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼを用いた酵素加水分解の反応効率について併せて検討した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

酵素処理ナリンジン（食品添加物製品）（管理番号：C2204）、グルコアミラーゼ（アミログルコシダーゼ，SIGMA 社製，Cat.No. 10113-1G，力価：103 U/mg（表示値））、 α -グルコシダーゼ（トランスグルコシダーゼ L「アマノ」S，Lot.No.TGUS1152301LS，力価：317000 U/mg（提供情報））は、国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部よりご供与いただいた。

ナリンジンは、Acros Organics 社製の一般試薬（Cat.No. 10236-47-2，Lot No.A0407598）、ナリンゲニン 7-O-グルコシドは、Extrasynthese 社製の一般試薬（Cat.No.1160S，Batch: 07，ID：0507/0）、4-ヒドロキシ安息香酸メチル（メチルパラベン，MHB）は、シグマアルドリッチ（株）製の認証標準物質（Cat. No. 99-79-3，Lot No. BCBX5970，認証値：99.8%，拡張不確かさ：0.3%）、カフェインはシグマアルドリッチ（株）製の認証標準物質（Cat. No. 58-08-2，Lot No. BCCC1661，認証値：99.9%，拡張不確かさ：0.2%）をそれぞれ用いた。2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- d_6 sodium salt（DSS- d_6 ）は富士フィルム和光純薬（株）製の認証標準物質（Code. No044-31671，Lot.No.ESH6525，認証値：92.3%，拡張不確かさ：0.8%）を用いた。重ジメチルスルホキシド（DMSO- d_6 ）は関東化学（株）製を用いた。D-グルコース定量用発色試薬は富士フィルム和光純薬（株）製グルコース CII-テストワコーを使用した。その他の溶媒は、高速液体クロマトグラフィー用または特級を用いた。

B-2) 装置

核磁気共鳴装置（NMR）：ECA500（プロトン

共鳴周波数：500 MHz）（日本電子（株）製）

分析用 HPLC ポンプ：LC-20AD（低圧グラフィエントユニット内蔵）、オートサンプラ：SIL-20AC，カラム恒温槽：CTO-10AS_{VP}，多波長検出器：SPD-M10A_{VP}，システムコントローラ：CBM-20A_{lite}，分析データ処理システム：LabSolutions（以上（株）島津製作所製），脱気装置：AG-34（（株）フロム製）。

マイクロ天秤：BM-20（（株）エー・アンド・デイ製）

セミマイクロ天秤：AUW220D（（株）島津製作所製）

B-3) 相対モル感度（RMS）を用いたシングルリファレンス HPLC 法によるナリンゲニン 7-O-グルコシドの定量

B-3-1) ¹H-qNMR によるナリンゲニン 7-O-グルコシドの純度測定

ナリンゲニン 7-O-グルコシド約 10 mg を精密に量り，サンプル管に入れた。別に DSS- d_6 約 5 mg を精密に量り，先程のサンプル管に入れた後，DMSO- d_6 約 1 g に溶解し ¹H-qNMR 用試験溶液とした。3 併行で試験溶液を調製し，この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し，表 1 に示す条件を用いて ¹H-qNMR 測定を行った。DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.000 としたときの各化合物に由来する特定基のシグナル面積強度，分子量，濃度等を次の式に代入し，各試料の含量（純度，%）を算出した。

$$\text{Purity (\%)} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし，

I_{sample} = 測定対象物質の特定基のシグナル面積強度
 I_{std} = 内標準物質のシグナル面積強度（DSS- d_6 : 9.000）

H_{sample} = 測定対象物質の特定基の水素数

H_{std} = 内標準物質の特定基の水素数（DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3 = 9$ ）

M_{sample} = 測定対象物質の分子量

M_{std} =内標準物質の分子量 (DSS- d_6 : 224.36)

W_{sample} =測定対象物質の秤取量 (mg)

C_{std} = $^1\text{H-qNMR}$ 標準溶液の DSS- d_6 濃度

なお、 $^1\text{H-qNMR}$ の化学シフト値は、DSS- d_6 のプロトンシグナルを基準 (δ 0 ppm) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。また、データの解析は、Delta (Ver.5.3.0) (日本電子 (株)) を用いた。

B-3-2) 基準物質 (MHB 及びカフェイン) に対するナリンゲニン 7-O-グルコシドの RMS の算出

ナリンゲニン 7-O-グルコシドでは、溶液濃度が約 500 $\mu\text{mol/L}$ となるようにナリンゲニン 7-O-グルコシドの各 $^1\text{H-qNMR}$ 用試験溶液を 20 mL 容メスフラスコへ必要量入れ、20%アセトニトリルを加え調製した。その後、20%アセトニトリルを用いて公比 2 で順次希釈し、約 1.0~500 $\mu\text{mol/L}$ の間で 10 濃度の HPLC 用試験溶液を作製した。

MHB 及びカフェインでは、認証値 (純度) を考慮し、MHB 及びカフェインを正確に量りとり、約 1.0 $\mu\text{mol/L}$ ~約 500 $\mu\text{mol/L}$ の間で 10 点の濃度の HPLC 用試験溶液 (溶媒 : 20%アセトニトリル) を各試料 3 併行で作製した。

作製された各試験溶液について、次の HPLC 条件で分析した。

カラム : Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm , ナカライテスク (株) 製), カラム温度 : 40°C, 検出波長 : 283 nm (ナリンゲニン 7-O-グルコシド), 255 nm (MHB), カフェイン (205 及び 274 nm), 流速 : 1.0 mL/min, 移動相 : 水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 注入量 : 10 μL

各溶液のモル濃度を X 軸に、検出器の応答値 (ピーク面積値) を Y 軸にプロットし、Excel を用いて原点を通る (X : 0, Y : 0) 回帰直線を作成し、これを検量線とした。なお、各溶液におけるクロマトグラム上のピークの S/N が 10 以上となる濃度範囲で検量線を作成した。

得られた測定対象物質及び基準物質の検量線の検量線式の傾きの比 (測定対象物質/基準

物質) から基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出した。

B-4) 酵素処理ナリンゲン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の定量における酵素処理の反応効率の検討

B-4-1) 酵素処理後のナリンゲニン配糖体 (ナリンゲン, モノグルコシルナリンゲン, ナリンゲニン 7-O-グルコシド) の量

105°C で 3 時間乾燥させた酵素処理ナリンゲン 0.5 g を精密に量り、水 50 mL に溶解させた。その後、アクリル酸エステル系吸着用樹脂 (アンバーライト XAD7HP) 50 mL が充填されたガラス管 (内径 約 2.5 cm, 長さ : 55 cm) に酵素処理ナリンゲン溶液を注ぎ、1 分間に 2.5 mL 以下の速さで流出させた後、水 250 mL で洗浄した。次に、80%エタノール 200mL を 1 分間に 2.5 mL 以下の速さで流し、吸着面分を溶出させた。この溶出液を濃縮して全量を約 40 mL とした後、この液 20 mL にグルコアミラーゼ 2500 単位及び α -グルコシダーゼ 30000 単位を添加し、55 °C で 60 分間放置した。さらに 95 °C で 30 分加熱した後、室温まで冷却し、水を加えて正確に 50 mL とし、A 液とした。この A 液 5 mL を正確に量り、水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1) (移動相) を加え正確に 50 mL とし、HPLC 用試験溶液とした。この HPLC 用試験溶液を B-3-2 に示した HPLC 条件で分析した。

各試験溶液中のナリンゲンについて、そのピーク面積値を別に作成したナリンゲン ($^1\text{H-qNMR}$ により求められた純度に基づく標準溶液を使用。ナリンゲン純度 : 85.2%) の検量線式に代入し、試験溶液中のナリンゲン濃度 ($\mu\text{mol/L}$) を求め、次の式より試料中の含量を算出した。

ナリンゲンの量 (%) =

$$= \frac{(C \times M) \times V}{W \times 10^6} \times \frac{50}{5} \times 100$$

ただし、

C : HPLC 用試験溶液中の測定対象物質の濃度 [$\mu\text{mol/L}$]

V : 試験溶液の量 [L] (0.05 L)

M : 測定対象物質の分子量 (ナリンジン=580.54)

10^6 : 試料の秤量値の単位 [g] から [μg] への単位の変換係数

W : 試料の摂取量 (g)

試験溶液中のモノグルコシルナリンジン及びナリンゲニン 7-O-グルコシドについては、そのピーク面積値を上記のナリンジン標準溶液の検量線式に代入し、 $^1\text{H-qNMR}$ に基づく各 RMS (モノグルコシルナリンジン/ナリンジン=1.07, ナリンゲニン 7-O-グルコシド/ナリンジン=0.98) を用いて試験溶液中のモノグルコシルナリンジンまたはナリンゲニン 7-O-グルコシド濃度 ($\mu\text{mol/L}$) を求め、次の式より試料中の含量を算出した。

モノグルコシルナリンジンまたはナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%) =

$$= \frac{(C \times M) \times V}{W \times 10^6} \times \frac{50}{5} \times 100$$

ただし、

C : HPLC 用試験溶液中の測定対象物質の濃度 [$\mu\text{mol/L}$]

V : 試験溶液の量 [L] (0.05 L)

M : 測定対象物質の分子量 (モノグルコシルナリンジン=742.70, ナリンゲニン 7-O-グルコシド=434.40)

10^6 : 試料の秤量値の単位 [g] から [μg] への単位の変換係数

W : 試料の摂取量 (g)

B-4-2) 酵素処理後の α -グルコシル残基の量

B-4-1 の項で得られた A 液 20 μL を量り、D-グルコース定量用発色試液 3mL を正確に加えて振り混ぜた後、37°C で正確に 5 分間放置した。室温まで冷却したものを試験溶液とし、波長 505 nm における吸光度を測定した。対照には、水 20 μL を用いて試験溶液と同様に

操作した液を用いた。また、別に空試験を行い、補正した。ただし、空試験溶液は、水約 20 mL にグルコアミラーゼ 2500 単位及び α -グルコシダーゼ 30000 単位を添加し、55°C で 60 分間放置した後、95°C で約 30 分間加熱した。室温まで冷却した後、水を加えて正確に 50 mL とし、空試験溶液を試験溶液と同様に操作して吸光度を測定した。別に、各濃度のグルコース標準溶液 (0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL, 5.0 mg/mL) について試験溶液と同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作成した。この検量線と補正した検液の吸光度から試験溶液中の D (+) -グルコース濃度を求め、次式によりグルコアミラーゼ処理により遊離する α -グルコシル残基の量を算出した。

$$\begin{aligned} & \alpha\text{-グルコシル残基の量 (\%)} \\ &= \frac{C \times 100}{W \times 1000} \times \frac{162}{180} \times 100 \end{aligned}$$

ただし、

C : 試験溶液 1 mL あたりの D (+) -グルコースの量 (μg)

W : 試料の採取量 (mg) である。

B-4-3) 総ナリンゲニン配糖体含量の算出

次の計算式により、総ナリンゲニン配糖体の含量を求めた。

総ナリンゲニン配糖体含量 (%)

= 酵素処理後のナリンゲニン配糖体 (ナリンジン, モノグルコシルナリンジン, ナリンゲニン 7-O-グルコシド) の量 (%) + 酵素処理により遊離した α -グルコシル残基の量 (%)

C. 結果及び考察

C-1) 相対モル感度 (RMS) を用いたシングルリファレンス HPLC 法によるナリンゲニン 7-O-グルコシドの定量

C-1-1) $^1\text{H-qNMR}$ によるナリンゲニン 7-O-グルコシドの純度測定

正確な RMS の算出にあたり、測定対象物質

の一般試薬の正確な純度を明らかにすることは非常に重要である。そこで、この純度を明らかにするため、¹H-qNMRを用いることとした。¹H-qNMRは、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度とモル濃度の関係から、測定対象物質の濃度を絶対定量することが可能である。また、計量計測トレーサビリティが確保された標準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が大幅に向上した方法である。そこで、表1に示す測定条件を用いて、一般試薬のナリンゲニン7-O-グルコシドについて¹H-qNMRを行った。なお、化学シフト値は、内標準物質のメチルプロトンシグナルを基準(DSS-d₆: δ 0 ppm)とし、δ値をppm単位で表した。図1に示すように、¹H NMRスペクトル上、δ 2.70~5.60 ppmにアグリコン(ナリンゲニン)の2位、3位及び糖部に由来するシグナル、δ 6.00~7.50 ppmにアグリコン(ナリンゲニン)に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのうち、δ 7.28 ppmに観察されたナリンゲニンの2'位及び6'位の水素に由来するシグナルは、他の分子内並びに夾雑成分に由来するシグナルと十分に分離されていたため、ナリンゲニン7-O-グルコシドの定量用シグナルとして適当と考えられた。そこで、このシグナルより3併行で調製されたナリンゲニン7-O-グルコシド試薬の純度を算出したところ、90.5 ± 0.5%であることが判明した。

C-1-2) 基準物質(MHB及びカフェイン)に対するナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSの算出

基準物質に対するナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSを算出するため、¹H-qNMRによる純度に基づいて調製されたナリンゲニン7-O-グルコシド試験溶液並びに認証値(純度)に基づき調製されたMHB及びカフェイン試験溶液を用いて、B-3-2に示すHPLC条件よりPDA検出器が接続されたHPLCで分析を行った(図2)。そして、得られた原点を通る各検量線の検量線式の傾きの比(測定対象物質/基準物質)から基準物質に対する測定対象物質のRMSを算出し

た。まず、各検量線の直線性を評価したところ、ナリンゲニン7-O-グルコシド、MHB、カフェインの全ての検体の検量線の決定係数は0.9991~1.00と良好であることが確認された(なお、MHB及びカフェインについては、昨年度の報告書で報告済みである)。ナリンゲニン7-O-グルコシド及び基準物質の代表的な検量線を図3に示す。以上の結果より、これらの検量線はRMSの算出に利用可能と判明した。

そこで、化合物ごとに3併行の検量線の傾きの平均値を算出したところ、ナリンゲニン7-O-グルコシドでは10047(検出波長:283 nm)、MHBでは8931(検出波長:255 nm)、カフェイン:5388(検出波長:274 nm)及び11598(検出波長:205 nm)であることが判明した(MHB及びカフェインについては、昨年度の報告書で報告済みである)。得られたこれらのデータより、基準物質に対するナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSを算出したところ、表2に示す値であることが判明した。

C-2) 酵素処理ナリンゲニン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の定量における酵素処理の反応効率の検討

成分規格試験法(案)における総ナリンゲニン配糖体含量は、酵素処理ナリンゲニンのグルコアミラーゼ(500~2500単位)及びα-グルコシダーゼ(15000~30000単位)処理後の「ナリンゲニンの量」、「モノグルコシルナリンゲニンの量」、「ナリンゲニン7-O-グルコシドの量」及び「遊離するα-グルコシル残基の量」の合計値から求めることが規定されている。この成分規格試験法(案)における検証を他機関が実施したところ、酵素処理ナリンゲニン製品1種(C2204)において、①総ナリンゲニン配糖体含量が30.0%を下まわること及び②定量値の再現性が良好ではないことが判明した。この原因として、酵素処理ナリンゲニン類の酵素加水分解反応が十分ではないことが示唆されたことから、本研究では、酵素加水分解の反応条件の最適化に向け、反応時間及び酵素の添加量の両面で、その反応効率を検証した。なお、前処理において、アクリル

酸エステル系吸着用樹脂による複数回のカラム精製により得られる各溶出液 (40 mL) は、すべて混ぜ合わせ、均一にした後、その 20 mL を採取し酵素加水分解反応に供した。また、反応時間については、成分規格試験法 (案) で示された 60 分に加え、90 分、120 分、グルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼの添加量を規定量の最大量で酵素加水分解を行い、① 酵素処理後のナリンゲニン配糖体の量、② 酵素処理後の α -グルコシル残基の量及び③ 総ナリンゲニン配糖体含量を算出した。各試験溶液のクロマトグラムを図 4 に示す。その結果、表 3 に示すように、反応時間の違いにより、①、②、③に大きな違いは認められなかった。そこで、グルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼの添加量を規定量の最大量の 2 倍として同様の検討を行った。各試験溶液のクロマトグラムを図 4 に示す。表 4 に示すように、反応時間の違いにより、各種含量に大きな差はなく、また、表 3 に示す定量値とほぼ同等の結果であった。なお、これらのクロマトグラムを確認すると、保持時間が 5~6.5 分付近に、グルコシルナリンジン類と考えられるピークが検出されたが (付録 1)、これらは S/N が 10 またはそれを下まわっており、ナリンゲニン配糖体の定量値に影響は及ぼさないものと考えられた。また、検討したすべての試験溶液では、ナリンゲニン 7-O-グルコシドの量は定量下限 (S/N 10) である 0.1% 以下であった (表 3, 表 4, 付録 1)。

D. 結論

本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、昨年度に引き続き、酵素処理ナリンジンの規格試験法における $^1\text{H-qNMR}$ に基づく RMS を用いたシングルリファレンス HPLC 法の応用に関する検討を行った。その結果、測定対象物質であるナリンゲニン 7-O-グルコシドの MHB 及びカフェインに対する RMS が明らかとなるとともに、昨年度の結果を含めて、成分規格試験法 (案) における測定対象物質 3 種の基準物質に対する RMS が明確となった。また、成分

規格試験法 (案) におけるグルコアミラーゼ及び α -グルコシダーゼによる酵素加水分解反応の最適化に向け、その反応効率を検証した。その結果、反応時間及び添加する酵素量ともに規定値の 2 倍としても、定量値に大きな違いは認められなかった。なお、本研究において使用した酵素処理ナリンジン製品

(C2204) の総ナリンゲニン配糖体含量は、規格値を満たしていない。この原因は不明ではあるが、前処理におけるカラム精製時の洗浄液へのナリンジン配糖体の溶出は認められないこと (図 4) から、この操作での損失はないものといえる。また、酵素処理後の試験溶液に残存するグルコシルナリンジン類の含量は非常に少ないこと (付録 1)、ナリンゲニン 7-O-グルコシドの量は定量下限である 0.1% 以下であること並びに他機関の検証における総ナリンゲニン配糖体含量と本研究で明らかにした各種反応条件における同含量は近似したことを考え合わせると、成分規格試験法 (案) において規定されている酵素加水分解の反応条件について、反応時間、酵素添加量には問題はないものと考えられた。

E. 参考文献

- 1) 食品添加物事典, 日高徹, 湯川宗昭編著. 東京, 食品化学新聞社 (2001)
- 2) 第 4 版 既存添加物自主規格, 日本食品添加物協会 (2008)
- 3) Nishizaki Y, Masumoto N, Yokota A, Mikawa T, Nakashima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Ito Y, Sugimoto N, Sato K.: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Addit. Contam.*, **2018**; 35: 838-847.
- 4) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K.: Single reference quantitative analysis of xanthomonasin A and B in *Monascus yellow colorant* using high-performance liquid chromatography with relative molar sensitivity based on high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **2018**; 1555:

45-52.

- 5) Masumoto N, Nishizaki Y, Maruyama T, Igarashi Y, Nakajima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K: Determination of perillaldehyde in perilla herbs using relative molar sensitivity to single-reference diphenyl sulfone. *J. Nat. Med.*, **2019**; *73*: 566-576.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: Single-reference HPLC 法によるアントシアニンの定量に関する研究、日本食品化学学会 第27回学術大会、2021年6月10日-11日、川崎市産業振興会館 (神奈川)
- 2) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いたアントシアニ

ンの定量に関する研究、日本食品科学工学会 第68回大会、2022年8月24日-26日、東京農業大学 (東京)

- 3) 酒井有希, 大槻崇・松藤寛: 相対モル感度 (RMS) を用いたアントシアニンの定量に関する研究、第3回日本定量 NMR 研究会、2021年12月3, 7日、Web開催

2. 論文発表等

- 1) Ohtsuki T, Friesen JB, Chen SN, McAlpine JB, Pauli GF: Selective Preparation and High Dynamic-Range Analysis of Cannabinoids in "CBD Oil" and Other Cannabis sativa Preparations. *J. Nat. Prod.*, in press. (doi: 10.1021/acs.jnatprod.1c00976.)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

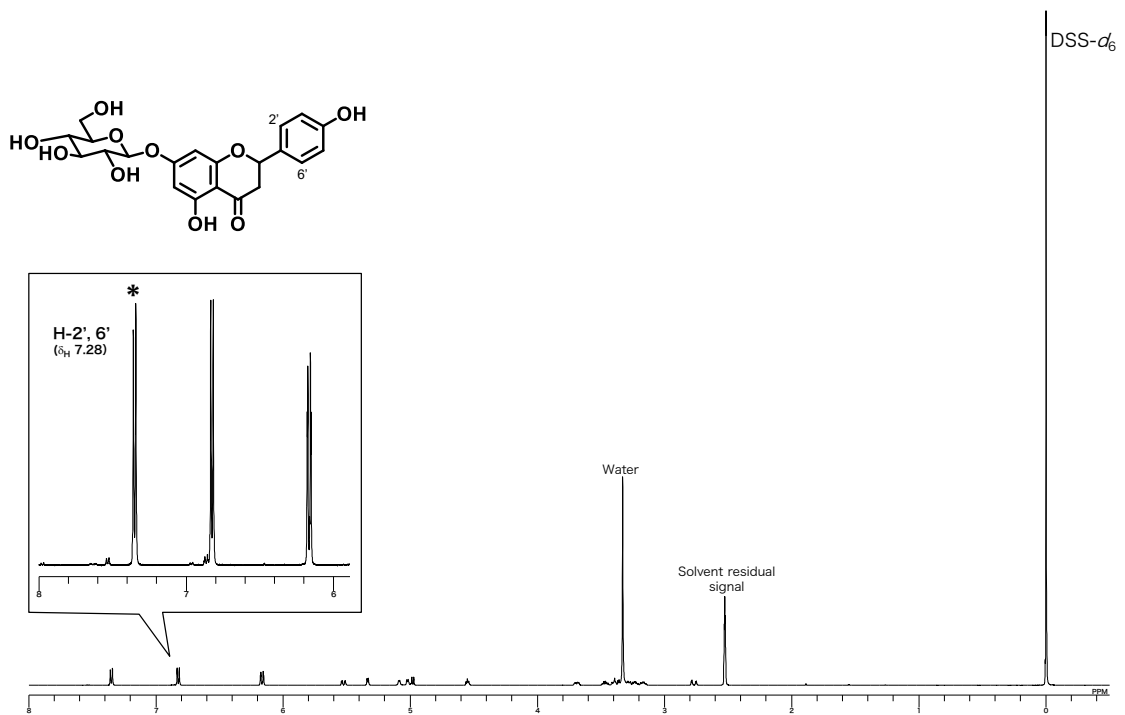


図1 ナリゲニン 7-O-グルコシドの化学構造及び¹H-qNMR スペクトル
 測定溶媒：DMSO-*d*₆, *：定量用シグナル (H-2' and H-6')

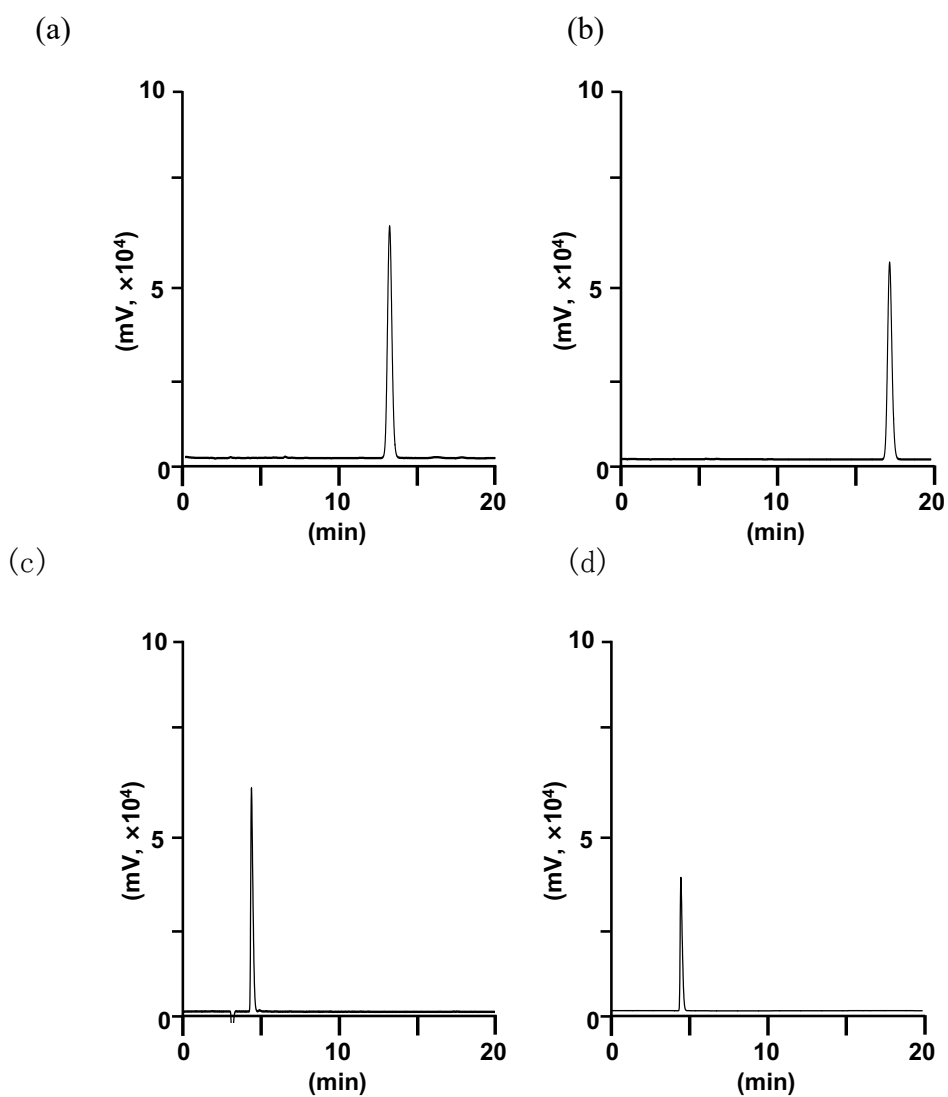


図2 ナリングニン 7-*O*-グルコシド (a), MHB (b), カフェイン (c 及び d) の HPLC クロマトグラム

HPLC 条件

カラム：COSMASIL 5C₁₈-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) (株) ナカライテスク製, カラム温度：40 °C,
 検出波長：283 nm (ナリングニン 7-*O*-グルコシド(a)), 255 nm (MHB (b)), 274 nm (カフェイン (c)), 205 nm (カ
 フェイン (d)), 移動相：水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流速：1.0 mL/min

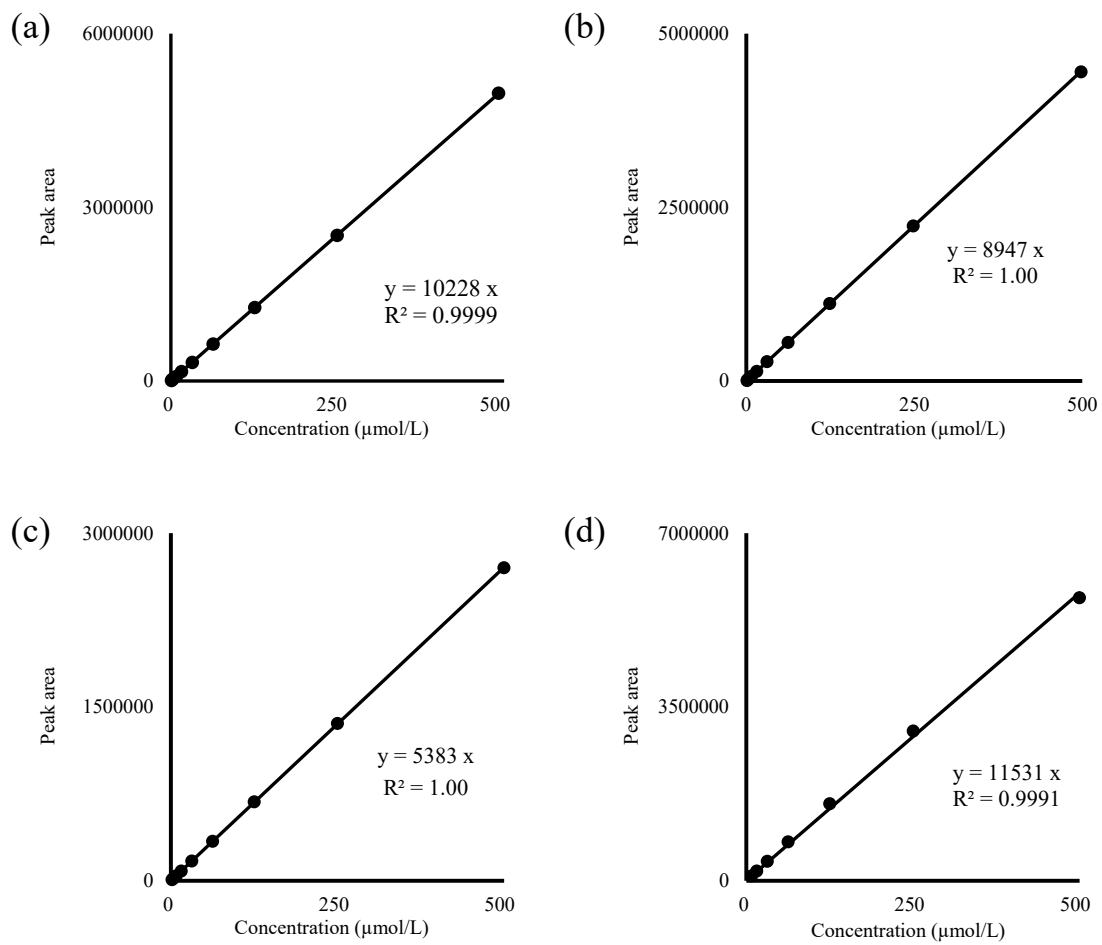


図3 ナリゲニン7-O-グルコシド (a), MHB (b), カフェイン (c及びd) の代表的な検量線

(c) : 274 nm のデータより作成した検量線, (d) : 205 nm のデータより作成した検量線

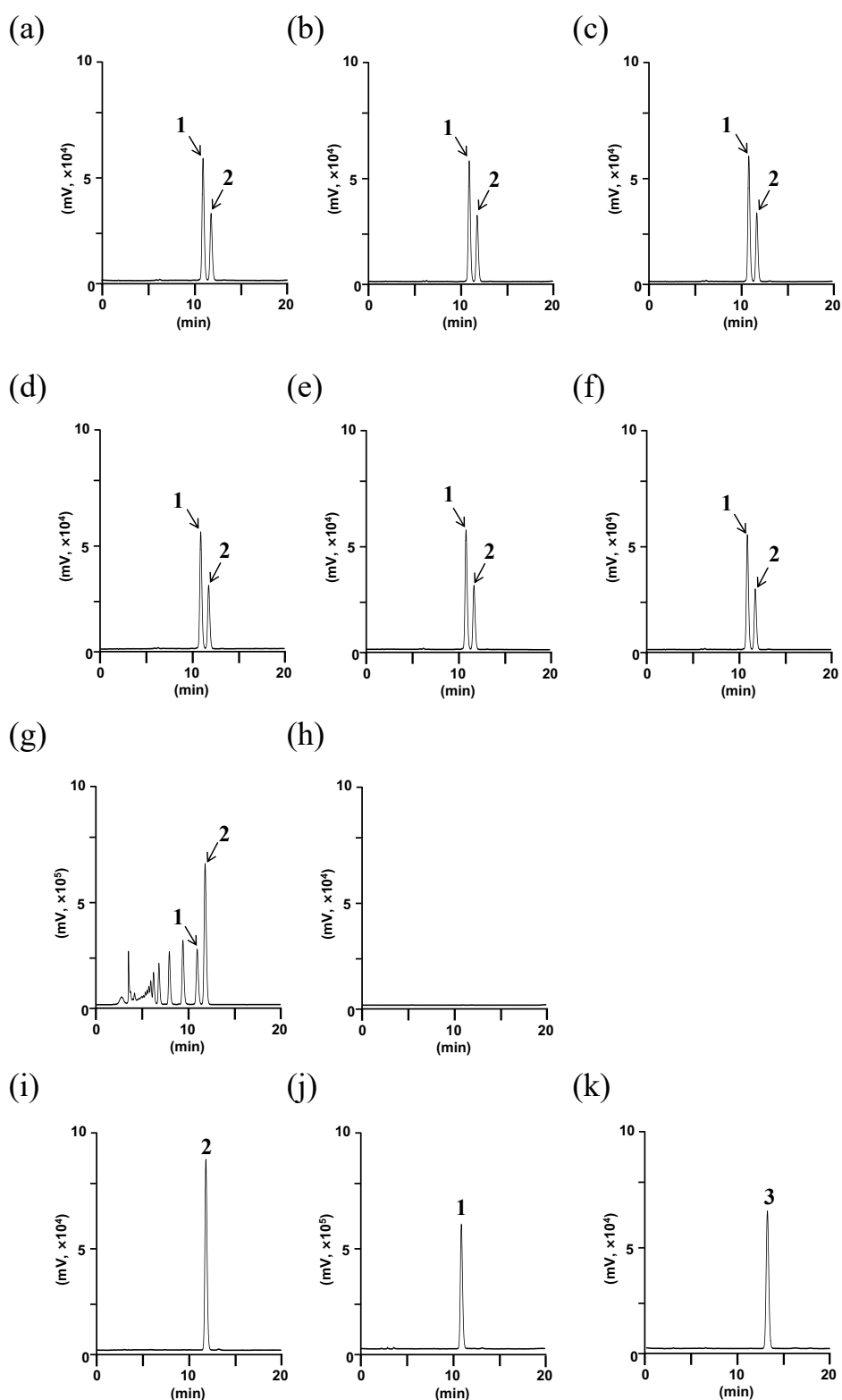


図4 各試験溶液及び標準溶液のHPLCクロマトグラム

1. モノグルコシルナリンジン, 2. ナリンジン, 3. ナリンゲニン7-O-グルコシド

HPLC条件

カラム: COSMASIL 5C₁₈-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) (株)ナカライテスク製, カラム温度: 40 °C,
 検出波長: 283 nm, 移動相: 水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流速: 1.0 mL/min

○ 図 4 のクロマトグラムについて

酵素		
	反応時間	添加量
(a)	60	規定量の最大量
(b)	90	規定量の最大量
(c)	120	規定量の最大量
(d)	60	規定量の最大量の 2 倍
(e)	90	規定量の最大量の 2 倍
(f)	120	規定量の最大量の 2 倍
(g)	溶出液 (酵素未処理)	
(h)	洗浄液 (酵素処理)	
(i)	ナリンジン	
(j)	モノグルコシルナリンジン	
(k)	ナリンゲニン 7-O-グルコシド	

表 1 ナリンジン及び α -モノグルコシルナリンジンの純度測定における
 ^1H -qNMR 条件

装置	JEOL ECA 500 spectrometer
スペクトル幅	15 ppm (-2.5–12.5 ppm)
データポイント数	32768
オートフィルター	on (eight times)
取り込み期間	4.37 秒
フリップ角	90°
取り込み待ち時間	60 秒
スキャン回数	8
スピニング	off
^{13}C デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2 各基準物質に対するナリンゲニン 7-*O*-グルコシドの RMS

	基準物質		
	MHB	カフェイン	
		検出波長 274 nm	検出波長 205 nm
ナリンゲニン 7- <i>O</i> -グルコシド	1.13	1.87	0.87

表 3 酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)
 酵素の添加量：規定値の最大量 (グルコアミラーゼ：2500 単位, α -グルコシダーゼ：30000 単位)

	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.3	0.1	3.3	0.01	3.4	0.03
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	7.1	0.2	7	0.02	7.2	0.1
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	10.5	0.3	10.2	0.02	10.6	0.1
酵素処理により遊離する α -グルコシル残基の量 (%)	14.7	0.5	14.5	0.6	14.0	0.3
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	25.2	0.3	24.7	0.6	24.6	0.4

定量では, $^1\text{H-qNMR}$ の結果に基づいて調製されたナリンジン標準溶液を使用した
 (純度：85.2%)

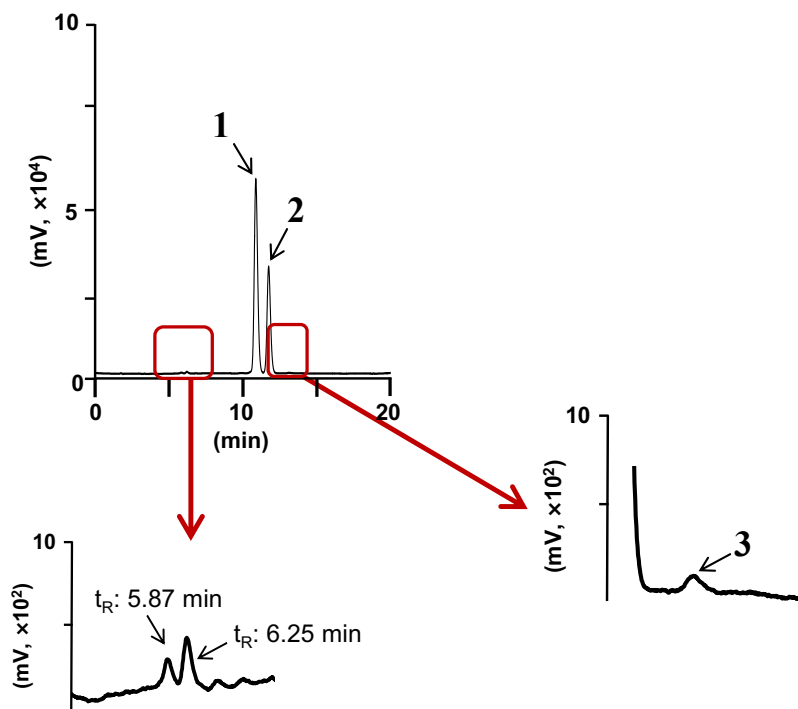
表 4 酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)

酵素の添加量：規定値の最大量の2倍 (グルコアミラーゼ：5000 単位, α -グルコシダーゼ：60000 単位)

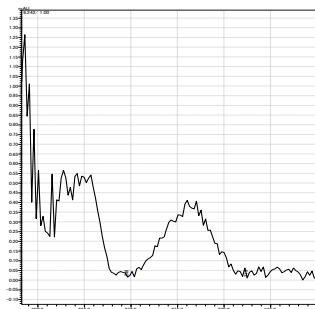
	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.2	0.1	3.1	0.03	3.2	0.2
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	7.0	0.1	6.8	0.1	7.1	0.3
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	10.2	0.2	9.9	0.2	10.3	0.5
酵素処理により遊離する α -グルコシル残基の量 (%)	14.0	0.4	14.5	0.5	14.0	0.9
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	24.1	0.5	24.4	0.7	24.4	0.4

定量では、 $^1\text{H-qNMR}$ の結果に基づいて調製されたナリンジン標準溶液を使用した (純度：85.2%)

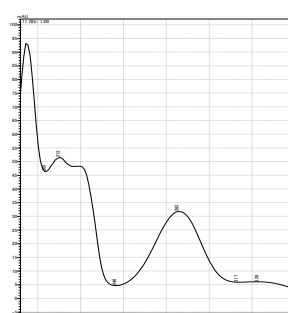
付録 1



t_R : 6.25 minの化合物のUVスペクトル



ナリンジンのUVスペクトル



試験溶液(図 4 (a))の HPLC クロマトグラム, 拡大図等

1. モノグルコシルナリンジン, 2. ナリンジン, 3. ナリンゲニン 7-O-グルコシド

HPLC 条件

カラム : COSMASIL 5C₁₈-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) (株) ナカライテスク製, カラム温度 : 40 °C,
 検出波長 : 283 nm, 移動相 : 水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流速 : 1.0 mL/min

付録 2

酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)

酵素の添加量：規定値の最大量 (グルコアミラーゼ：2500 単位, α -グルコシダーゼ：30000 単位)

(ナリンジン定量用標品の純度を 100%として計算)

	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.9	0.1	3.8	0.01	3.9	0.04
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	8.4	0.2	8.2	0.03	8.5	0.1
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	12.3	0.3	12.0	0.04	12.4	0.1
酵素処理により遊離する α -グルコシル残基の量 (%)	14.7	0.5	14.5	0.6	14.0	0.3
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	27	0.3	26.5	0.6	26.4	0.4

付録 3

酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)

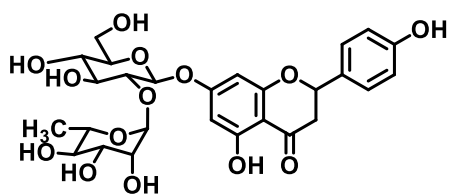
酵素の添加量：規定値の最大量の2倍 (グルコアミラーゼ：5000 単位, α -グルコシダーゼ：60000 単位)

(ナリンジン定量用標品の純度を 100%として計算)

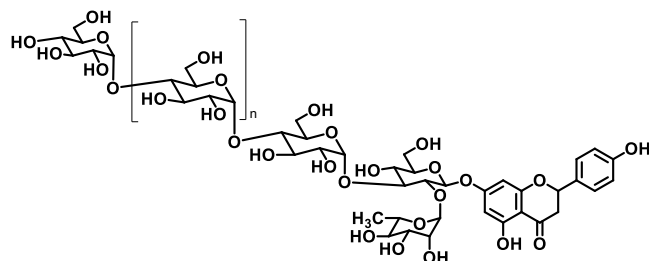
	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.8	0.1	3.7	0.04	3.8	0.2
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	8.2	0.2	8.0	0.1	8.3	0.4
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	12.0	0.3	11.7	0.2	12.1	0.6
酵素処理により遊離する α -グルコシル残基の量 (%)	14.0	0.4	14.5	0.5	14.0	0.9
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	26.6	0.3	26.1	0.8	26.2	0.6

付録 4

(a)



(b)



ナリンジン (a) 及びモノグルコシルナリンジン (b) の化学構造

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

試験法及び分析法の開発

～PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討～

研究分担者 出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 部長

研究要旨 研究分担者らは、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の開発を行っている。フォトダイオードアレイ(PDA)は広範囲の波長域における吸収を検出できるため、HPLCなどの分析機器の検出器として汎用されている。PDAで検出されるシグナルを用いた定量においては装置間、また長波長域における誤差が大きいことが問題点となる。この問題点については、広範囲に吸収をもつ基準物質となる化合物を利用して校正を行うことが望ましいが、現状、PDA校正用として汎用的に使用されている化合物は無い。本研究では、PDA検出器の校正に利用可能な性質、すなわち広範囲における吸収や水溶性といった物理的性質を有する分子の探索を目的とした。本年度は、広波長範囲において吸収を有する分子として複数のビスアリアルマレイミド化合物の効率的な合成と吸収スペクトルの長波長化について検討した。その結果、複数種類のビスアリアルマレイミド誘導体の同時合成が可能であること、また芳香環部位の置換基として電子供与基を導入することで吸収スペクトルが長波長化できることが分かった。

研究協力者

辻厳一郎 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部 主任研究官

A. 研究目的

食品添加物の試験では、HPLCを用いた分析法が設定されているものが多く、異なる装置間での分析における正確さを担保することは重要である。フォトダイオードアレイ(PDA)は広範囲の波長域の吸収を一度に検出できることから、HPLCをはじめとした分析機器の検出器として汎用的に利用されている。PDA検出器を利用したHPLCでの定量分析においては装置間における校正を行う際に基準となる化合物が必要となる。特定波長の吸収における装置間校正は、対象とする波長に対して適切な基準物質(シングルリファレンス)を設定することで対応が可能であるが、PDAのカバーする広範囲の波長域において一種の化合物を使用して校正を実施できることが望ましい。しかしながら、

現状、そのような化合物は設定されていない。本研究では、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について検討した。異なる波長領域に吸収を持つ複数分子を連結する分子設計を考案した。今年度は引き続き吸収を示す化合物の開発として、ビスアリアルマレイミド誘導体の合成について検討した。

B. 研究方法

B-1) 分子設計・合成経路

昨年度は複数分子を連結可能なビルディングブロック部の合成を行い、UV吸収を示す化合物として、ビスアリアルマレイミド化合物を合成した。ビスアリアルマレイミド誘導体は共通の合成前駆体**5**に対して、クロスカップリング反応によって種々の官能基を導入することが可能であるため、様々な構造の誘導体を合成するのに適している。この合成経路によって幅広い波長を示す化合物の探索のための方法につ

いて検討した。

ビスアリールマレイミド誘導体およびその合成に必要なボロン酸エステルは Scheme 1 に示すルートで合成する計画を立てた。以下、本研究において使用した市販試薬等の情報を示す。

B-2) 試料及び試薬

Boc-Amino-PEG3-Amine：東京化成工業，Cat. B6080. 重クロロホルム (CDCl₃), 重アセトン (Acetone-*d*₆): 関東化学. 分光分析用ジメチルスルホキシド: FUJIFILM 和光純薬, Cat. 045-28335. その他, ジクロロメタン, アセトン, 1,4-ジオキササン, エタノール, *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF), トルエン, 酢酸エチル, ヘキサン, アセトン, 塩酸, 水酸化カリウム (KOH), 無水硫酸ナトリウムはすべて市販特級品を用いた。

B-3) 化合物の合成

特に断りがない限り，全ての試薬は試薬会社から購入したものをそのまま使用した。反応の追跡は薄層クロマトグラフィー (TLC)(60 F254, Merck 社)を使用し，スポットの可視化はハンディ UV ランプ (254/365 nm)(UVP 社)による紫外線照射，およびヨウ素蒸気によって行った。化合物精製のためのカラムクロマトグラフィー用のシリカゲルには，関東化学 60N (球状，中性)，もしくは中圧カラムクロマトグラフィー装置 (Smart Flash)(山善)、および中圧カラムクロマトグラフィー用充填カラム (Hi-Flash column / Inject column (山善)を使用した。分取 HPLC のシステムには EXTREMA (日本分光)を使用した。HPLC 分取条件；カラム: COSMOSILAR-II (C18, 20 I.D x 250 mm, 5 μm)(ナカライテスク), 流速: 10 mL/min, 移動相: A = 0.1% TFA in water, B = 0.1% TFA in CH₃CN, 移動相グラジエント (B%): 10 to 100 (30 min), 検出波長: 254 nm. ¹H および ¹³C-NMR スペクトルは NMR 測定用の重水素化溶媒を使用して，ECZ 600 spectrometer (JEOL)にて測定した。化学シフト値 (ppm)はテトラメチルシラン (TMS) (CDCl₃: 0 for ¹H-NMR), もしくは残留溶媒のシグナルを内部標準として補正した (CDCl₃: 77.0 for ¹³C-NMR; Acetone-*d*₆: 2.05 for ¹H-NMR, 29.84 for ¹³C-NMR). シグナルの分

裂様式は以下に示す通りである (singlet (s), doublet (d), triplet (t), double of doublets (dd), multiplet (m), broad (br)). 高分解能質量分析 (HRMS)は Shimadzu IT-TOF MS (島津)にて，エレクトロスプレーイオン化法にて測定した。

B-3) 化合物の紫外可視吸光スペクトル

得られた化合物については UV スペクトルを取得して，吸収波長を確認した。それぞれの化合物はジメチルスルホキシド (分光分析用) に溶解させて 10 mM の溶液としたものをストック溶液とした。これを段階的に希釈することで 50 μM のジメチルスルホキシド溶液とした。スペクトルの測定には，V-730 (日本分光) を使用し，石英セル (1 x 1 cm) を用いて室温にて測定を行った。

C. 結果及び考察

C-1) 化合物の合成

本研究では，幅広い波長領域に吸収をもつ化合物の合成においてマレイミド骨格に2つの芳香環 (Aryl: アリール) を導入した，ビスアリールマレイミド骨格の化合物を用いた (Scheme 1)。ビスアリールマレイミド化合物の合成では，既報¹⁾に従ってジプロモマリアルデヒド酸 (4) から合成した化合物 5 を中間体とした。化合物 5 に対して市販もしくは合成した，種々のアリールボロン酸もしくはボロン酸エステルを鈴木-宮浦クロスカップリング反応によって導入した。²⁾このカップリング反応によって使用したアリールボロン酸に対応する同種の芳香環 (Ar) が2つ導入された化合物 6 が得られる。6 はアルカリ加水分解，続く酸処理により酸無水物へ変換することでビルディングブロックのアミン部位との反応点とした。ビルディングブロック部としては様々な構造が利用可能であるが，合成化合物の HPLC における使用を考慮すると，水溶性や HPLC 移動相への溶解性が良好であることが望ましい。本研究では繰り返しのエチレンジグリコールスパーサーの両末端にアミノ基を有するリンカー 8 を選択した。この構造をビルディングブロックとすることで化合物の水溶性の向上が期待できる。本研究では多種の化

化合物の効率的な合成として、このカップリング反応の際に複数の異なる種類のアリールボロン酸を用いた合成法を実施した。具体例として scheme 1 に示すように、アリールボロン酸としてフェニルボロン酸、6-メトキシ-2-ナフチルボロン酸、またアリールボロン酸エステルとして4'-ジメチルアミノアゾベンゼン-4-ボロン酸のピナコラートエステル **3** を一つのカップリング反応の系中に共存させて反応を行った。化合物 **5** に対して3種のアリールボロン酸を用いたカップリング反応を行うと、それぞれのボロン酸に対応した、同種の Ar が導入されたホモ-ビスカップリング体 ($Ar_1=Ar_2$) と、異なる Ar が導入されたヘテロ-ビスカップリング体 ($Ar_1 \neq Ar_2$) が合計で6種生成する。予想通り、このカップリング反応によって6種の異なるビスアリアルマレイミド誘導体の混合物として **6** が得られたことが TLC およびシリカゲルカラムクロマトグラフィー分析によって確認された。このマレイミド誘導体はこの時点でそれぞれを単離することなくアルカリ加水分解、続く酸処理によって対応する酸無水物とし、ビルディングブロック **8** のアミン部位と反応させることでビスアリアルマレイミド誘導体 **10-15** の混合物を得た。化合物 **10-15** は逆相 HPLC (C18) にてそれぞれを単離することが可能であり、本研究で行った複数の異なる種類のアリールボロン酸を用いたカップリング反応による、多種の分子の同時合成という戦略の有効性が示唆された (Figure 1)。

また、マレイミド部との連結部と逆の末端アミノ基に別の修飾を導入することもできるため、化合物構造の多様性を広げることが可能である。例えば3種のボロン酸と **5** のカップリングで得られた分子6種 (**10-15**) の混合物に対して、さらに異なる3種のボロン酸と **5** のカップリングで調製した分子 (別の6種の化合物) を掛け合わせることで理論上36種類の化合物を同時に合成できる (Figure 2)。

C-1-1) フェニルボロン酸エステル誘導体の合成 化合物 **3** の合成

4-ブロモアニリン (**1**) (1.72 g, 10.0 mmol) の 1M 塩酸溶液 (20 mL) に 0°C にて、亜硝酸ナトリウム (0.73 g, 10.5 mol) の水溶液 (2 mL) を 0°C にて滴下した。反応液をそのままの温度で 15 分間攪拌した後、*N,N*-ジメチルアニリン (1.33 g, 11.0 mmol)、次いで酢酸ナトリウム (1.33 g, 11.0 mmol) の水溶液 (10 mL) およびメタノール (5 mL) を加えた。反応液を室温にて 3 時間攪拌した後、水 (20 mL) およびメタノール (5 mL) を加えた。生じた沈殿をろ取して水 (50 mL)、次いでメタノール (5 mL) で洗浄し真空乾燥することで化合物 **2** を橙色粉末として得た (2.58 g, 85%)。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.08 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, Acetone- d_6) δ 152.7, 152.1, 132.2, 125.3, 123.9, 123.4, 111.6, 40.4.

化合物 **2** (1.22 g, 4.0 mmol) の 1,4-ジオキサン溶液 (40 mL) にビス(ピナコラート)ジボロン (1.42 g, 5.6 mmol)、[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィン)フェロセン]ジクロロパラジウム (II) -ジクロロメタン複合体 (0.33 g, 0.4 mmol)、酢酸カリウム (0.86 g, 8.8 mmol) を加えた後、90°C にて 14 時間攪拌した。室温に冷却後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 ($\Phi = 8.5$ cm, $h = 3$ cm, ヘキサン : 酢酸エチル = 9 : 1 to 4 : 1) することで、化合物 **3** を 89% (1.23 g) の収率で得た。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.81 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.08 (s, 6H), 1.36 (s, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 155.1, 152.7, 143.9, 135.7 (3C), 125.3, 121.5, 111.6, 84.0, 40.4, 25.0.

C-1-2) ビスアリアルマレイミド誘導体の合成 化合物 **10-15** の合成

化合物 **5** (173 mg, 0.5 mmol)、フェニルボロン酸 (46 mg, 0.4 mmol)、6-メトキシナフチル-2-ボロン酸 (81 mg, 0.4 mmol)、化合物 **3** (140 mg,

0.4 mmol), ビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) ジクロリド (18 mg, 0.025 mmol), テトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0) (29 mg, 0.025 mmol), フッ化セシウム (90%, 405 mg, 2.4 mmol) の 1,4-ジオキサン (4.5 mL) /水 (0.5 mL) 溶液を 100°Cにて 15 時間攪拌した。室温に冷却後, 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で順次洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥, 濾過し, 濾液を減圧濃縮した。得られた残渣のエタノール溶液 (4 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (2 mL) を加え, 40°Cにて 4 時間攪拌した。0°Cに冷却後, 反応液に 10%塩酸を加えて酸性とした (pH~2)。生じた沈殿をろ取して, 水で洗浄, 真空乾燥することで暗紫色粉末 (300 mg) を得た。この化合物 (150 mg, as 0.25 mmol) と化合物 8 (73 mg, 0.25 mmol) のトルエン (1.9 mL) /DMF (0.1 mL) 溶液 (1.9 mL) を 100°Cにて 12 時間攪拌した。室温に冷却後, 反応液を酢酸エチルで希釈し, 1M 塩酸, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液飽和食塩水で順次洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥, 濾過し, 濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 9:1 to 0:1) に付すことで, 化合物 9 を得た。この化合物 (70 mg, as 0.125 mmol) を 4M 塩酸-ジオキサン溶液 (2 mL) /メタノール (0.5 mL) に溶解させ, 室温にて 12 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し, 得られた残渣を分取 HPLC にて精製し化合物 10-15 を得た。以下に詳細な合成方法と化合物情報 (Figure 4-19) を記載する。

化合物 10 : 淡黄色固体 (6.5 mg, 6%)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Acetone- d_6) δ 7.48-7.46 (m, 4H), 7.45-7.42 (m, 2H), 7.42-7.39 (m, 4H), 3.94 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.82 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.80 (t, J = 3.6 Hz, 2H), 3.72 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.66-3.61 (m, 3H), 3.57-3.56 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, Acetone- d_6) δ 171.2, 137.2, 130.7, 130.5, 129.9, 129.3, 71.2, 71.1, 71.0, 70.9, 68.4, 68.3, 48.3, 38.5. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 425.2071, found: 425.2068.

化合物 11 : 紫色固体 (13 mg, 8%)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Acetone- d_6) δ 8.13 (s, 1H), 7.83 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.44-7.43 (m, 1H), 7.40 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.35 (dd, J = 8.0, 2.4 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.19 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.90 (t, J = 3.6 Hz, 2H), 3.85 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.78 (t, J = 3.6 Hz, 2H), 3.74 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.67-3.61 (m, 3H), 3.58-3.56 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, Acetone- d_6) δ 171.4, 171.3, 160.0, 137.1, 136.3, 136.1, 131.1, 130.8, 130.5, 130.2, 129.3, 127.8, 127.7, 124.9, 120.3, 106.7, 71.2, 71.0, 71.0, 70.9, 68.4, 68.3, 55.8, 48.1, 38.5. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 572.2867, found: 572.2831.

化合物 12 : 淡橙色固体 (11 mg, 9%)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Acetone- d_6) δ 8.17 (s, 2H), 7.83 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.39 (dd, J = 8.8, 1.6 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.18 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 2H), 3.93 (s, 6H), 3.88-3.86 (m, 4H), 3.77-3.75 (m, 4H), 3.68-3.62 (m, 3H), 3.58-3.56 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, Acetone- d_6) δ 171.5, 160.0, 136.1, 131.1, 131.1, 129.4, 127.9, 127.6, 125.2, 120.2, 106.7, 71.2, 71.1, 71.0, 70.9, 68.4, 68.3, 55.8, 48.1, 38.5. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 505.2333, found: 505.2319.

化合物 13 : 橙色固体 (5.6 mg, 4%)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Acetone- d_6) δ 7.86 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.81 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.52 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 2H), 7.46-7.43 (m, 3H), 6.86 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 3.93 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.84 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.80 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.73 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.65-3.61 (m, 3H), 3.58-3.56 (m, 5H), 3.12 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, Acetone- d_6) δ 171.2, 171.1, 154.3, 154.0, 144.3, 137.3, 136.5, 131.8, 130.8, 130.7, 130.6, 130.0, 129.4, 126.0, 122.8, 112.4, 71.2, 71.1, 71.0, 71.0, 70.9, 68.4, 68.3, 55.8, 48.1, 40.3, 38.5. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 585.2595, found: 585.2574.

化合物 14 : 赤色固体 (14.4 mg, 9%)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, Acetone- d_6) δ 8.18 (s, 1H),

7.86-7.85 (m, 5H), 7.81 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.41 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 3.98 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.87 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.81 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.76 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.78-3.62 (m, 3H), 3.60-3.59 (m, 5H), 3.12 (s, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, Acetone- d_6) δ 171.4, 171.3, 160.1, 154.4, 154.0, 144.3, 137.1, 136.2, 135.6, 131.8, 131.2, 131.2, 131.0, 129.4, 127.9, 127.8, 126.0, 124.9, 122.8, 120.3, 112.4, 106.8, 71.2, 71.1, 71.0, 70.9, 68.4, 68.1, 55.8, 48.5, 40.3, 38.6. ESI-HRMS calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 652.3130, found: 652.3118.

化合物 **15**: 濃紫色固体 (4.2 mg, 2%)

^1H NMR (600 MHz, Acetone- d_6) δ 7.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 6.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 3.98 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.86 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.82 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.75 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.78-3.62 (m, 3H), 3.60-3.59 (m, 5H), 3.13 (s, 12H); ^{13}C NMR (151 MHz, Acetone- d_6) δ 171.1, 154.4, 154.0, 144.3, 136.5, 131.8, 130.7, 126.0, 122.9, 112.4, 71.2, 71.1, 71.0, 70.9, 68.4, 68.2, 48.5, 40.3, 38.6. HRMS calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 719.3664, found: 652.3118.

C-2) 化合物の紫外可視吸光スペクトル測定

合成したビスアリアルマレイミドのジメチルスルホキシド中の紫外可視吸光スペクトルを取得したところ、化合物に導入した芳香環上の置換基によってスペクトルが異なることが分かった (Figure 3). 6-メトキシ-2-ナフチル基を有する化合物 **11** や **12** ではビスフェニル置換体 **10** やと比較してより長波長側においても吸収を示した。これはメトキシ基が電子供与基であり、マレイミド部のカルボニル基が電子吸引基として働く、いわゆる push-pull 型の電子配置となるためと考えられた。特にジメチルアミノ基が導入されたアゾベンゼンが導入されたマレイミド誘導体 **13-15** では 550 nm 付近まで吸収帯が延長していることが分かった。このことからビスアリアルマレイミド誘導体においては

電子供与基を芳香環に導入することで吸収波長の長波長化が可能であった。

D. 結論

本年度は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。本研究の化合物分子設計では、幅広い領域に UV 吸収を有する化合物の合成法として、ビルディングブロックとなる構造に、複数の化合物を連結するという手法を検討している。

まず広範囲に吸収を示す化合物として、誘導体化の容易さや置換基効果による吸収スペクトル変化などからビスアリアルマレイミド誘導体を選択した。この分子においては、複数種類の芳香環ユニットをカップリング反応により一度に導入することで多種のビスアリアルマレイミド化合物を効率的に合成することができた。また、合成したビスアリアルマレイミド分子の UV-Vis スペクトルを測定した結果、芳香環に電子供与基を導入することで紫外可視吸光スペクトルにおける吸収の長波長化でできることが分かった。今回検討した合成法によって同時に多種類調製することで、広範囲の波長域に吸収を示す色素分子の効率的な探索ができると考えられる。今後は見出した分子を複数個、ビルディングブロックに導入し、より幅広い波長域をカバーできるような分子の合成について引き続き検討を行う。化合物を連結するビルディングブロック部としては、一例として合成の簡便さ、溶解性などの物性を考慮して、繰り返しのポリエチレングリコール構造を含むものを採用した。これにより複数の色素分子を連結させた場合でも化合物の水中での凝集等を抑制できることが期待される。

本研究で開発する分子は PDA の装置間校正に利用可能な化合物であるが、RMS による HPLC を用いた定量法などにも利用できる。RMS を用いた定量法に利用するためには、高純度、安定供給可能である他、①測定対象と物理的な特性 (極性、極大吸収波長) が類似していること、②HPLC クロマトグラム上で試料中の

夾雑物や測定対象の化合物と分離すること，等
が要件となる．本研究で開発を検討する化合物
においては導入する官能基やビルディングブ
ロックの変更によって物理的特性の調整が可
能であるため，①および②の条件を満たすこと
が可能であると考えられる．

E. 参考文献

- 1) Doi I, Tsuji G, Kawakami K, Nakagawa O, Taniguchi Y, Sasaki S: The spermine-bisaryl conjugate as a potent inducer of B- to Z-DNA transition. *Chem. Eur. J.*, 16, 11993-11999 (2010).
- 2) Shorunov SV, Krayushkin MM, Stoyanovich FM,

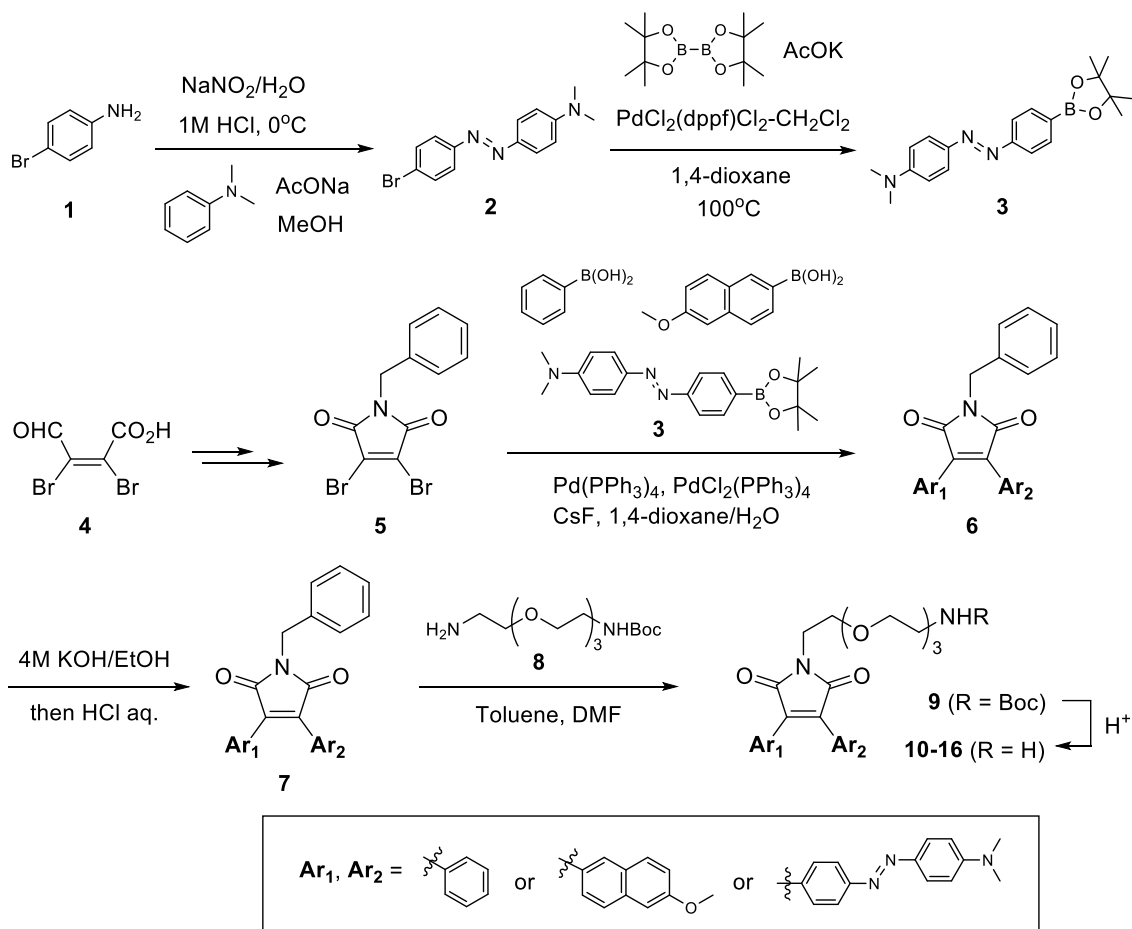
Irie M: A Convenient Synthesis of 3,4-Diaryl(hetaryl)-Substituted Maleimides and Maleic Anhydrides. *Russ. J. Org. Chem.*, 42, 1490-1497 (2006).

F. 研究業績

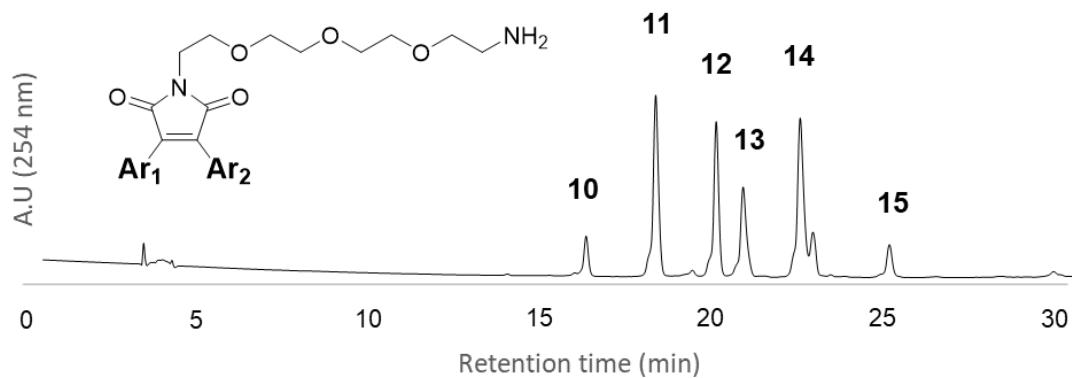
1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
なし

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし



Scheme. 1 複数のアリアルボロン酸のカップリング反応によるビスアリアルマレイミド誘導体の合成



(HPLC conditions)

Column : CAPCEL PAK MG-II (C18, 4.6I.Dx250 mm, 5 μ m)(Osaka soda), flow rate : 1.0 mL/min, column temp. : 40 $^{\circ}$ C
 Mobile phase; A : 0.1% Formic acid in H₂O, B : 0.1% Formic acid in CH₃CN Gradient B% : 10-100% (30 min)

10 (Ar₁ = Ar₂ = Phenyl), **11** (Ar₁ = Phenyl, Ar₂ = 6-MeO-2-naphthyl), **12** (Ar₁ = Ar₂ = 6-MeO-2-naphthyl), **13** (Ar₁ = Phenyl, Ar₂ = 4'-Dimethylaminoazobenzene-4-yl), **14** (Ar₁ = 6-MeO-2-naphthyl, Ar₂ = 4'-Dimethylaminoazobenzene-4-yl), **15** (Ar₁ = Ar₂ = 4'-Dimethylaminoazobenzene-4-yl).

Fig. 1 本研究の合成法で合成したビスアリアルマレイミド誘導体の HPLC 痕跡

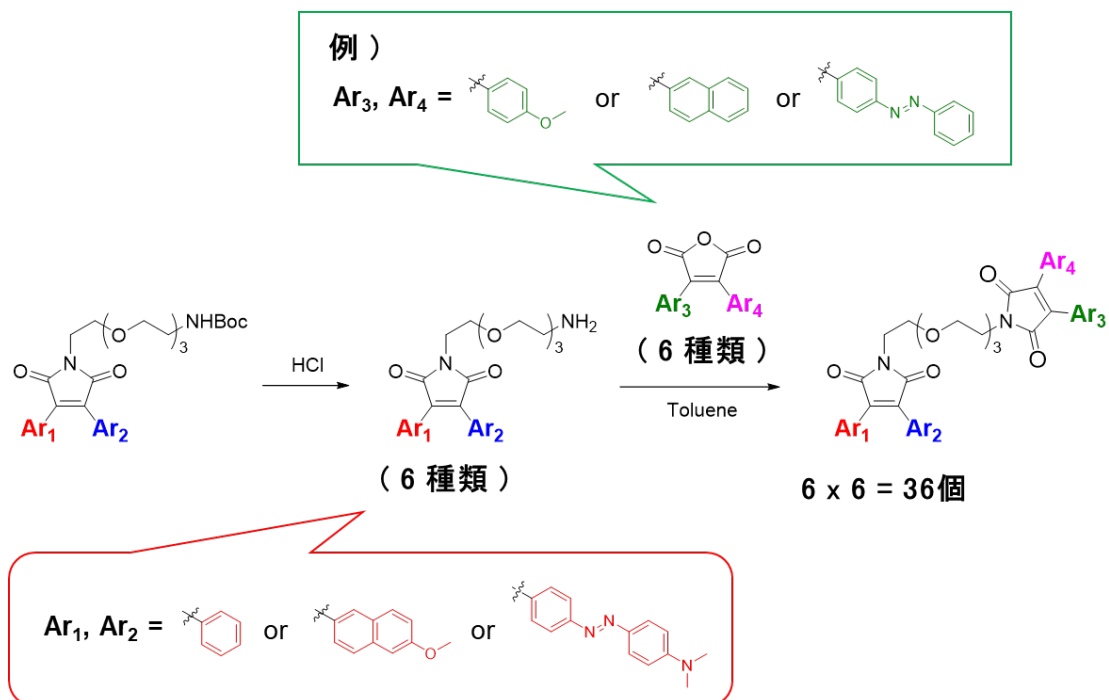


Fig. 2 多種のビスアリアルマレイミド誘導体の同時合成

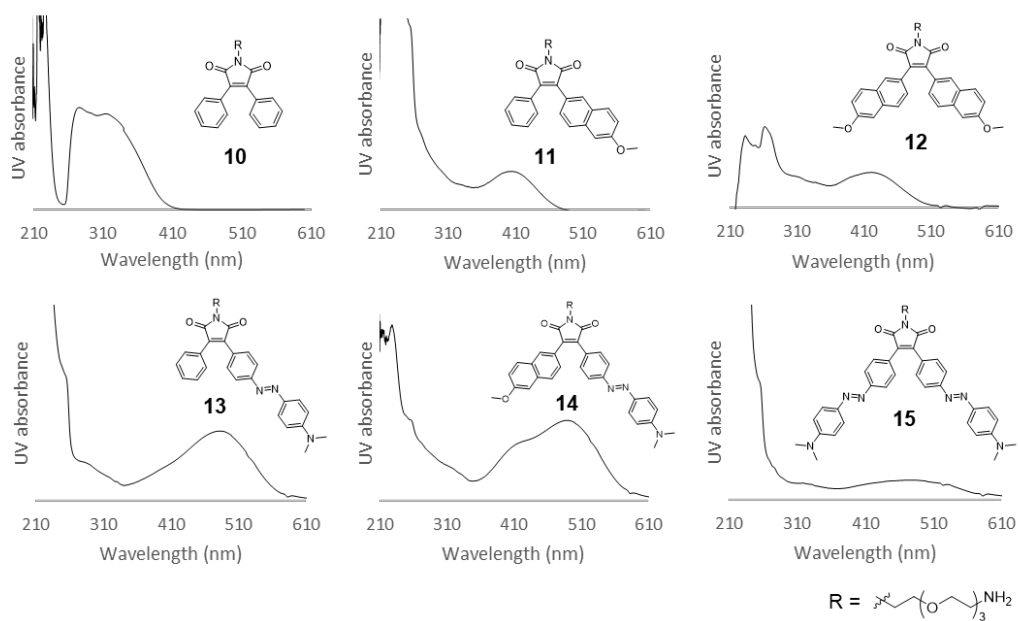


Fig. 3 ビスアリアルマレイミド誘導体の UV-Vis 測定 (DMSO 中)

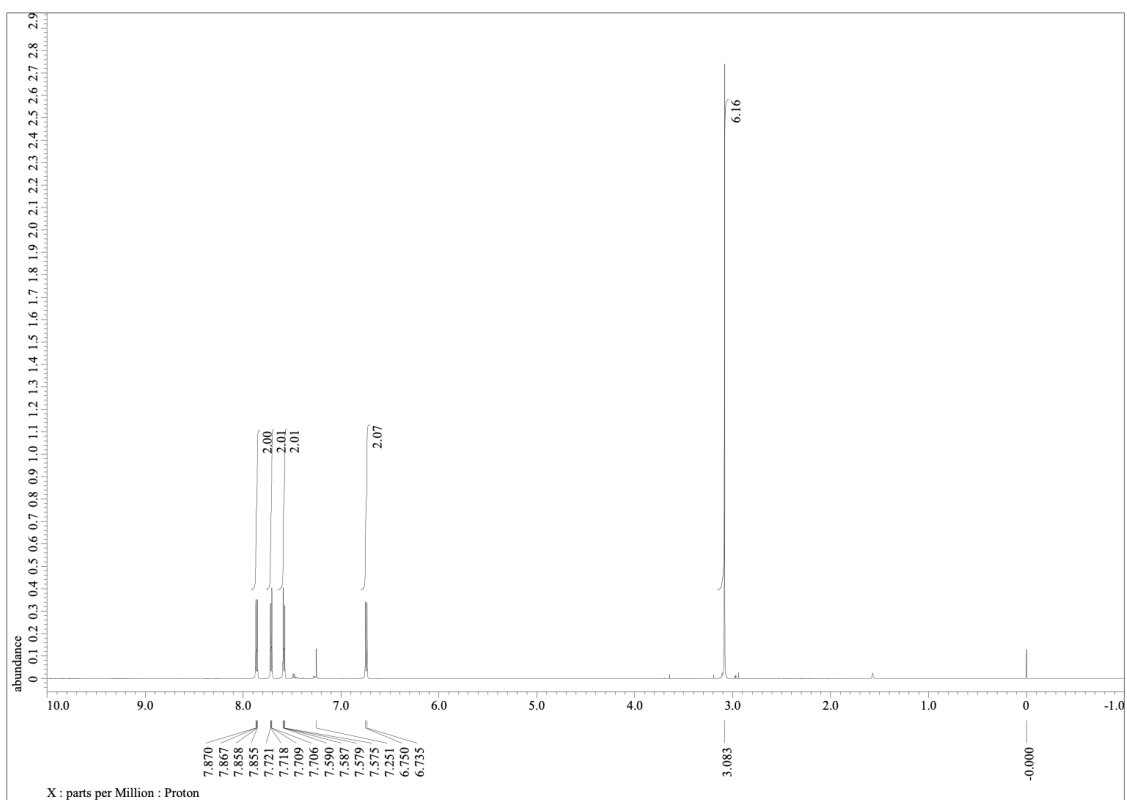


Fig. 4 化合物 2 の ¹H NMR (CDCl₃)

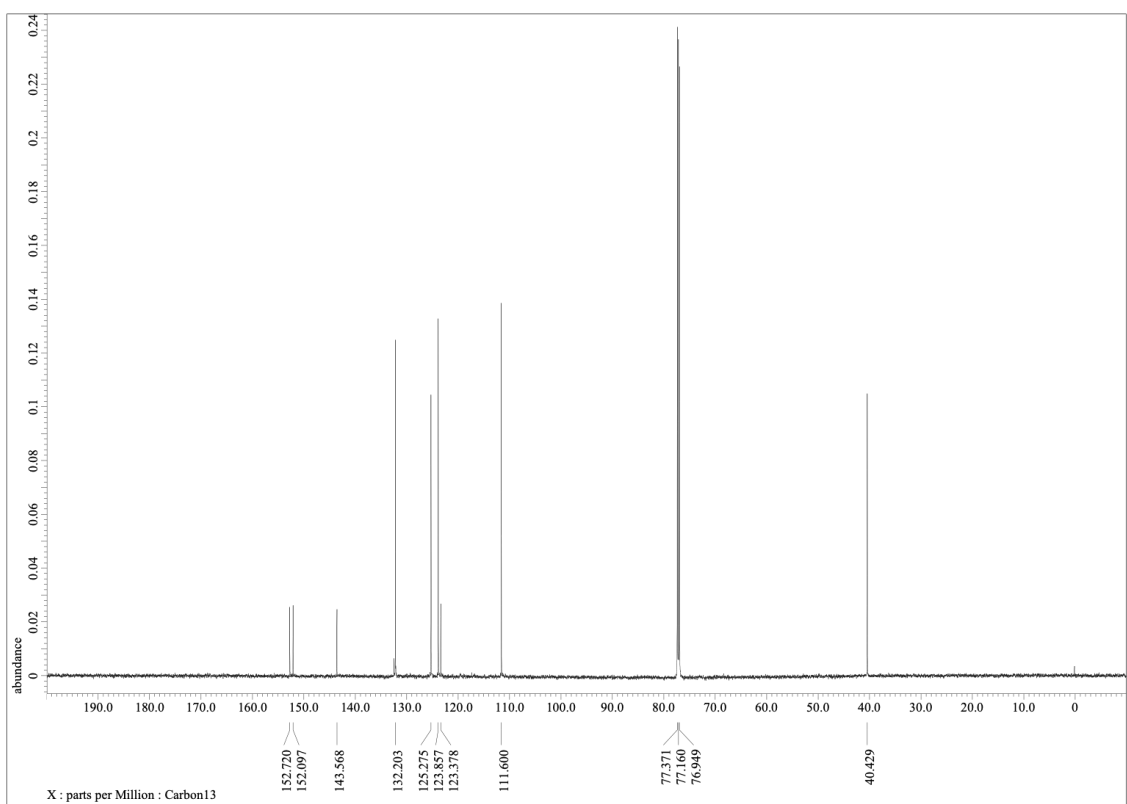


Fig. 5 化合物 2 の ¹³C NMR (CDCl₃)

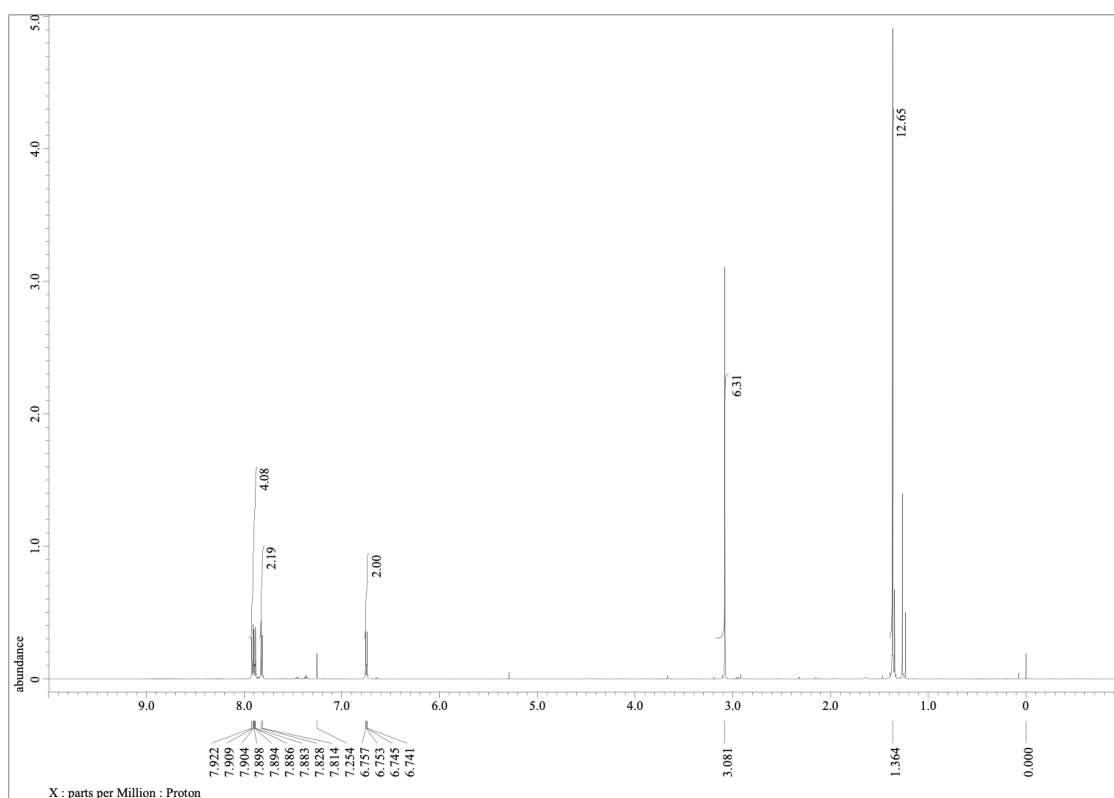


Fig. 6 化合物 3 の ¹H NMR (CDCl₃)

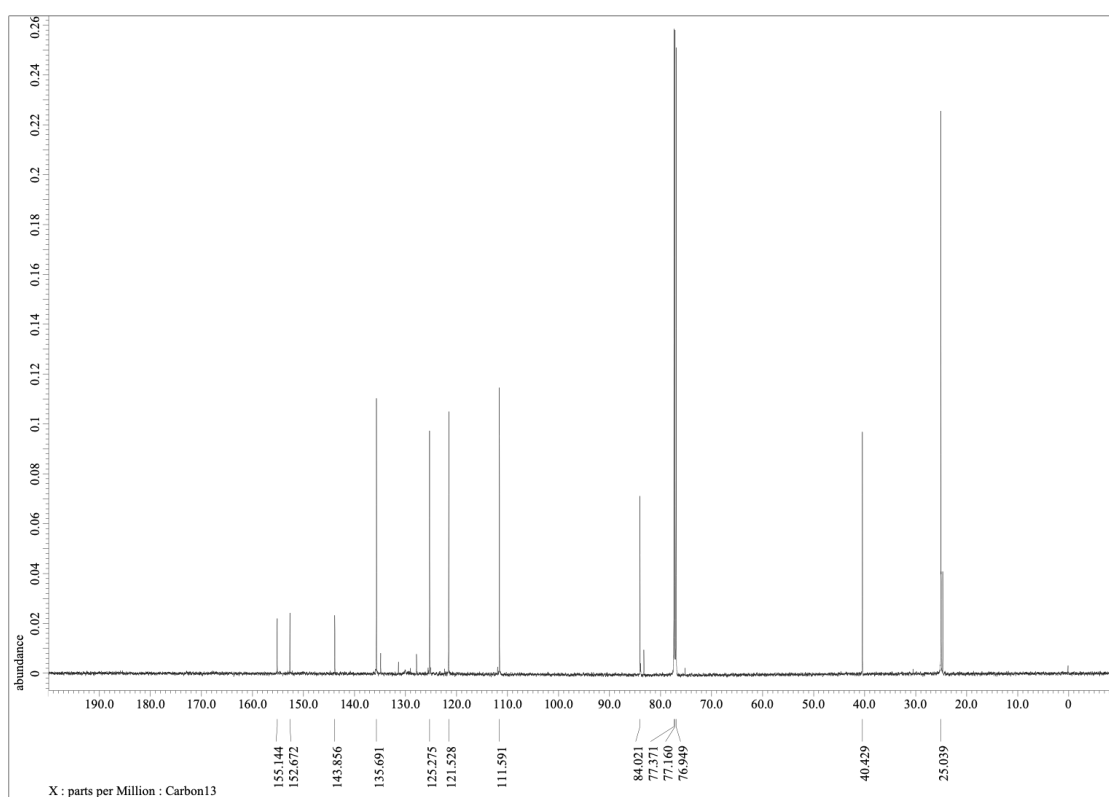


Fig. 7 化合物 3 の ¹³C NMR (CDCl₃)

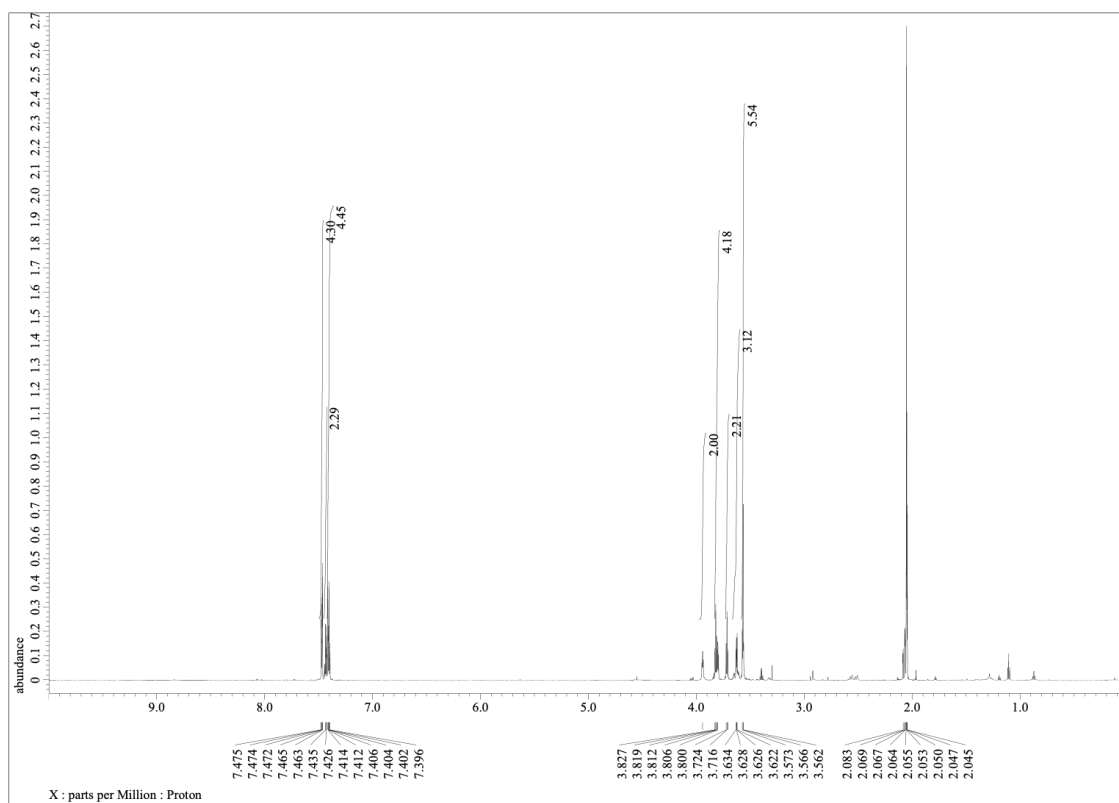


Fig. 8 化合物 10 の ^1H NMR (Acetone- d_6)

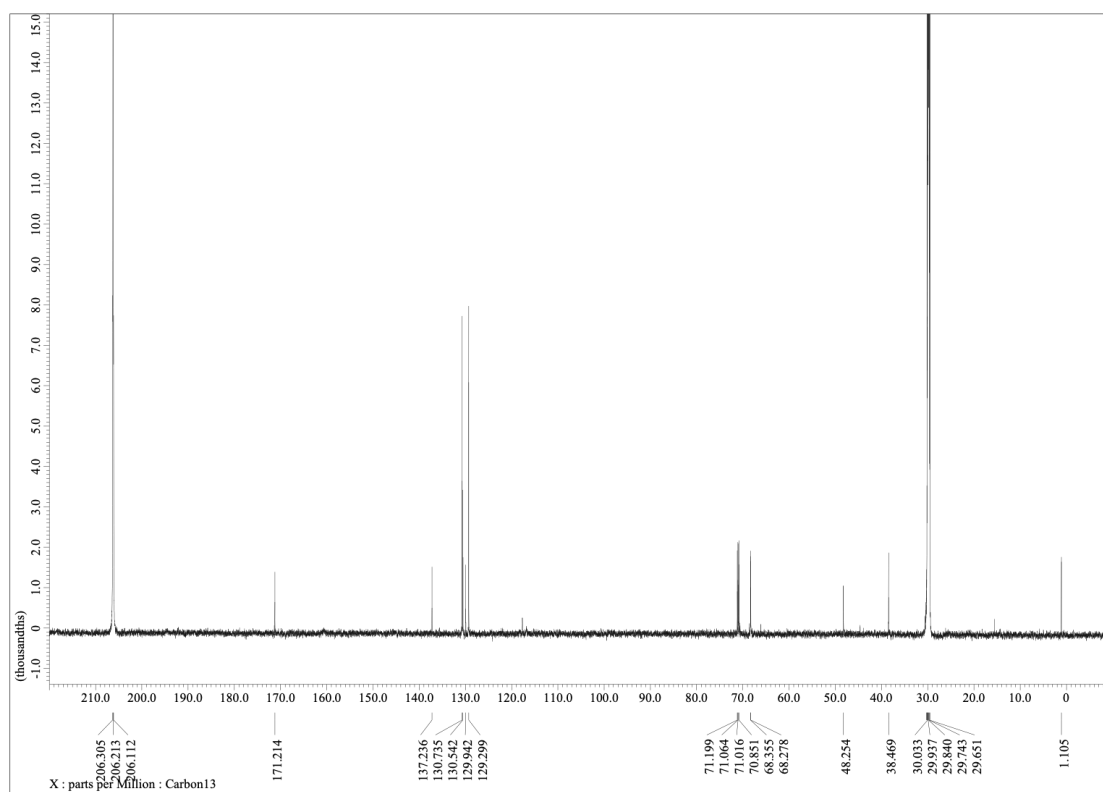


Fig. 9 化合物 10 の ^{13}C NMR (Acetone- d_6)

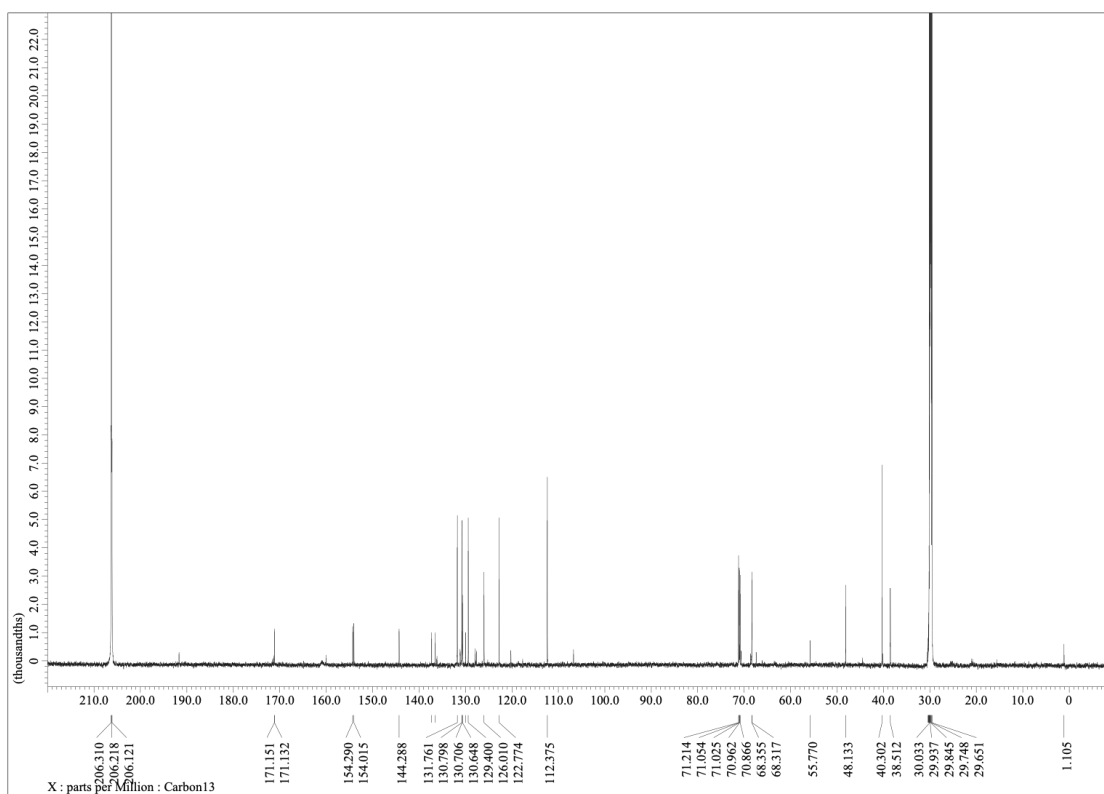


Fig. 10 化合物 11 の ^{13}C NMR (Acetone- d_6)

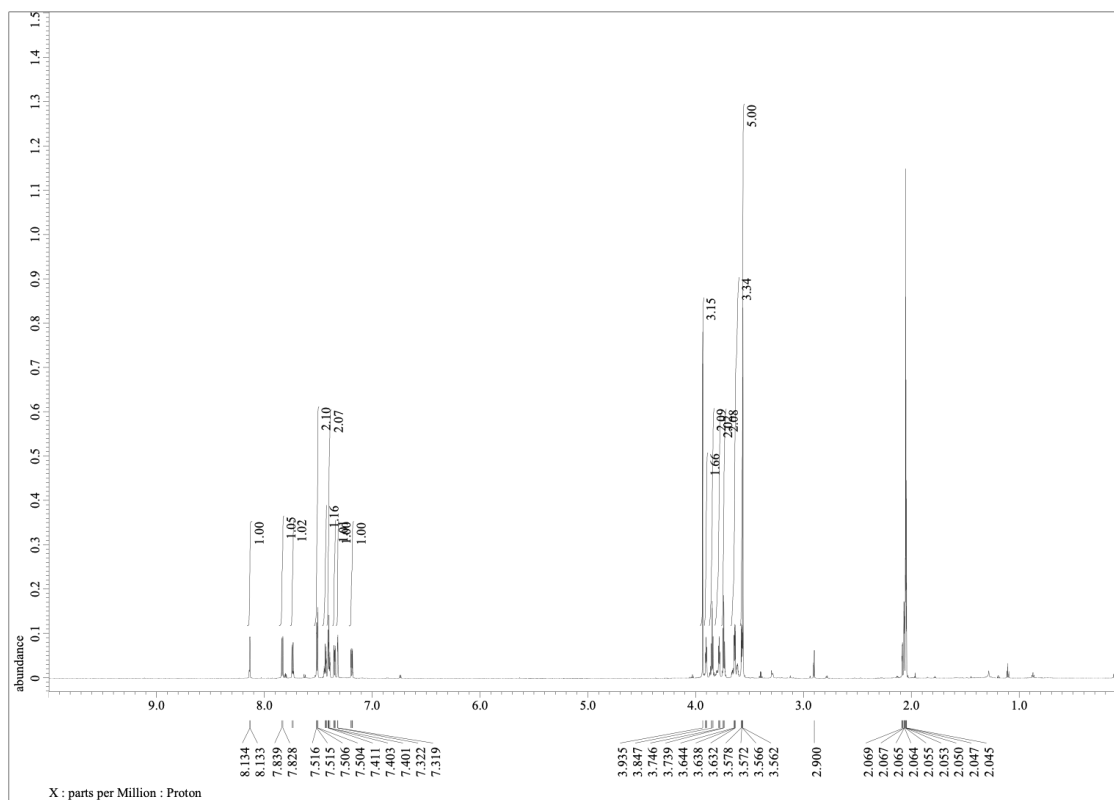


Fig. 11 化合物 11 の ^1H NMR (Acetone- d_6)

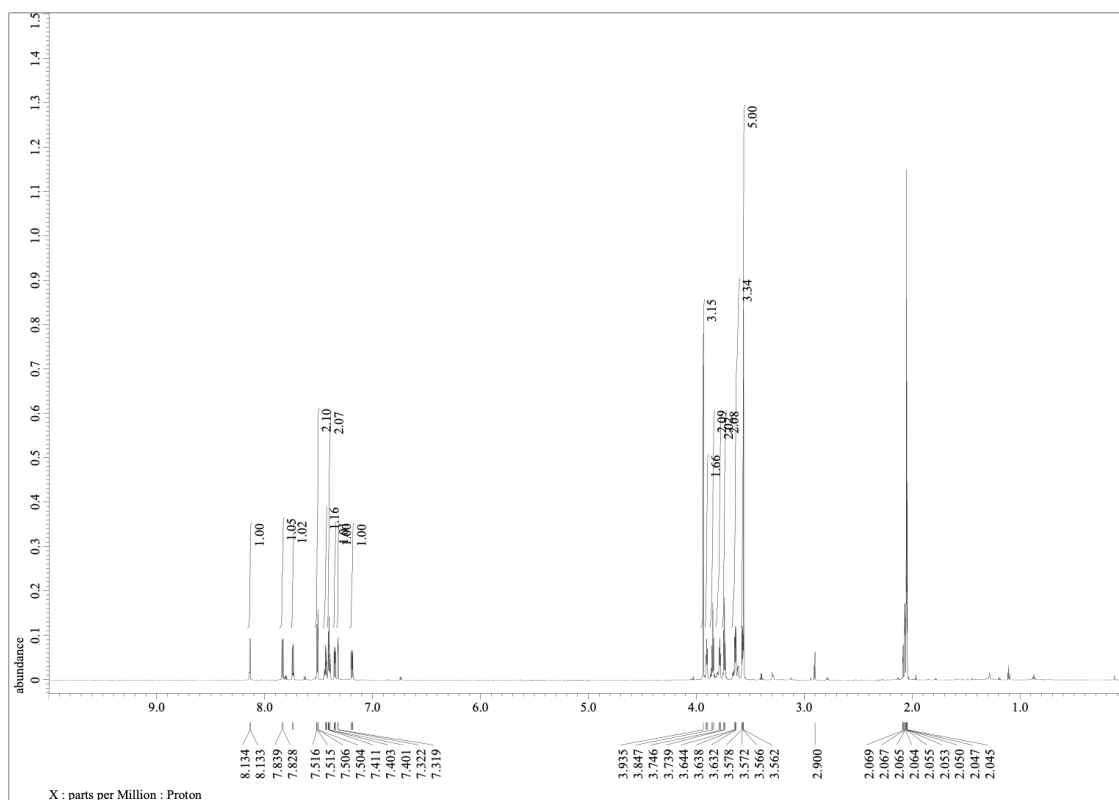


Fig. 12 化合物 12 の ^1H NMR (Acetone- d_6)

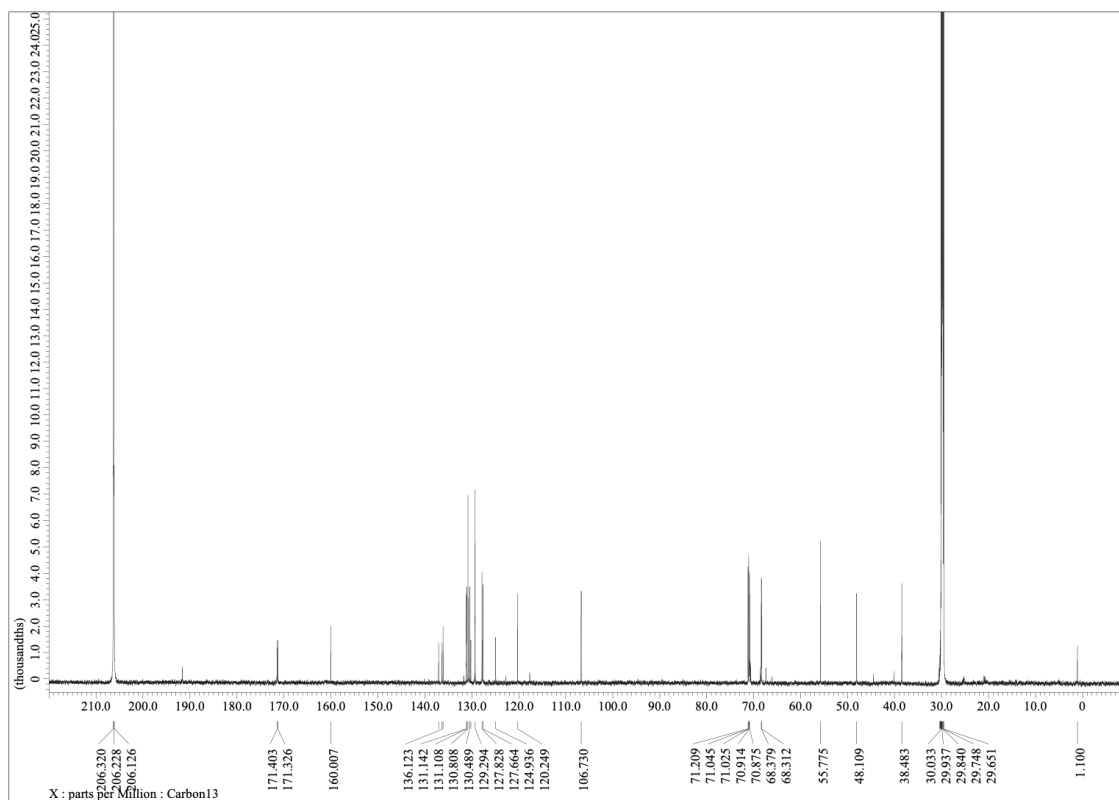


Fig. 13 化合物 12 の ^{13}C NMR (Acetone- d_6)

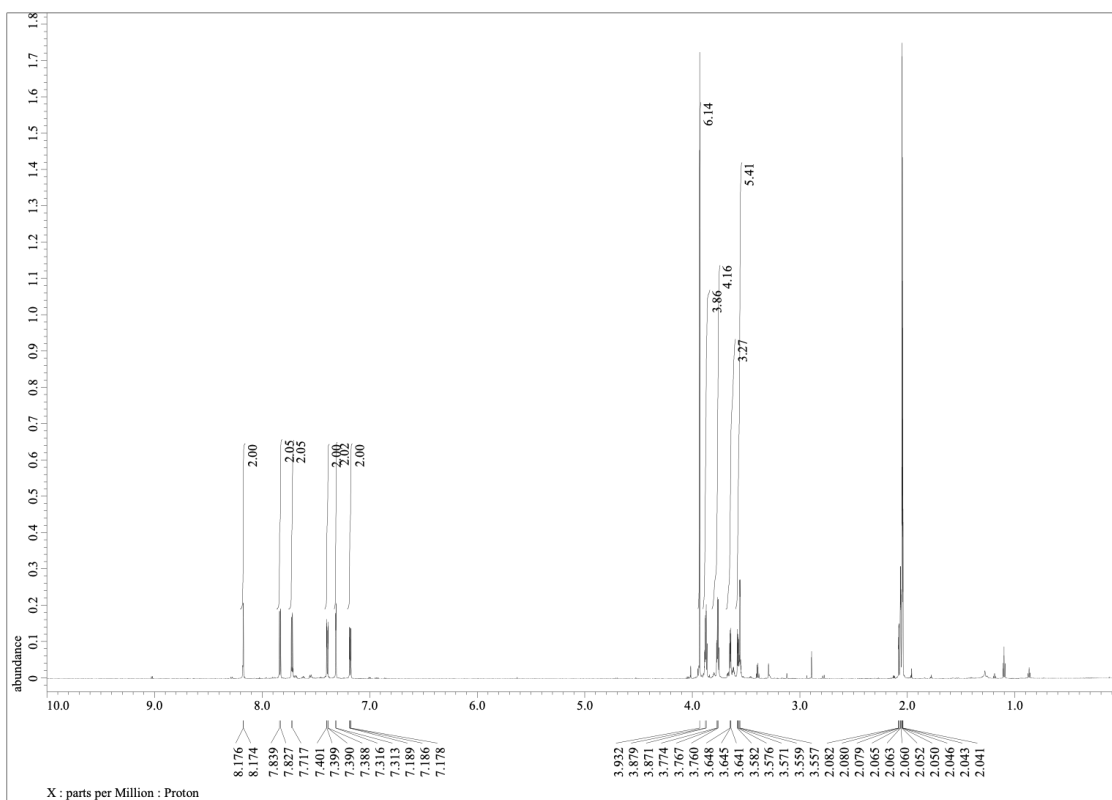


Fig. 14 化合物 13 の ^1H NMR (Acetone- d_6)

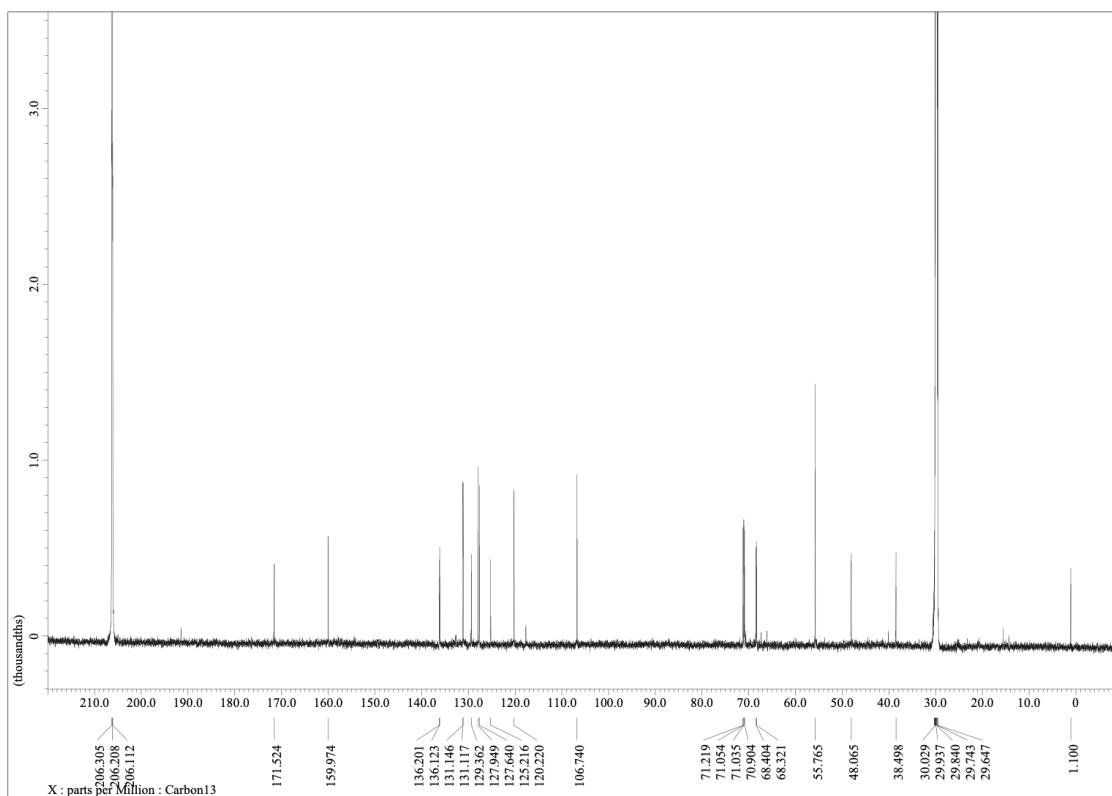


Fig. 15 化合物 13 の ^{13}C NMR (Acetone- d_6)

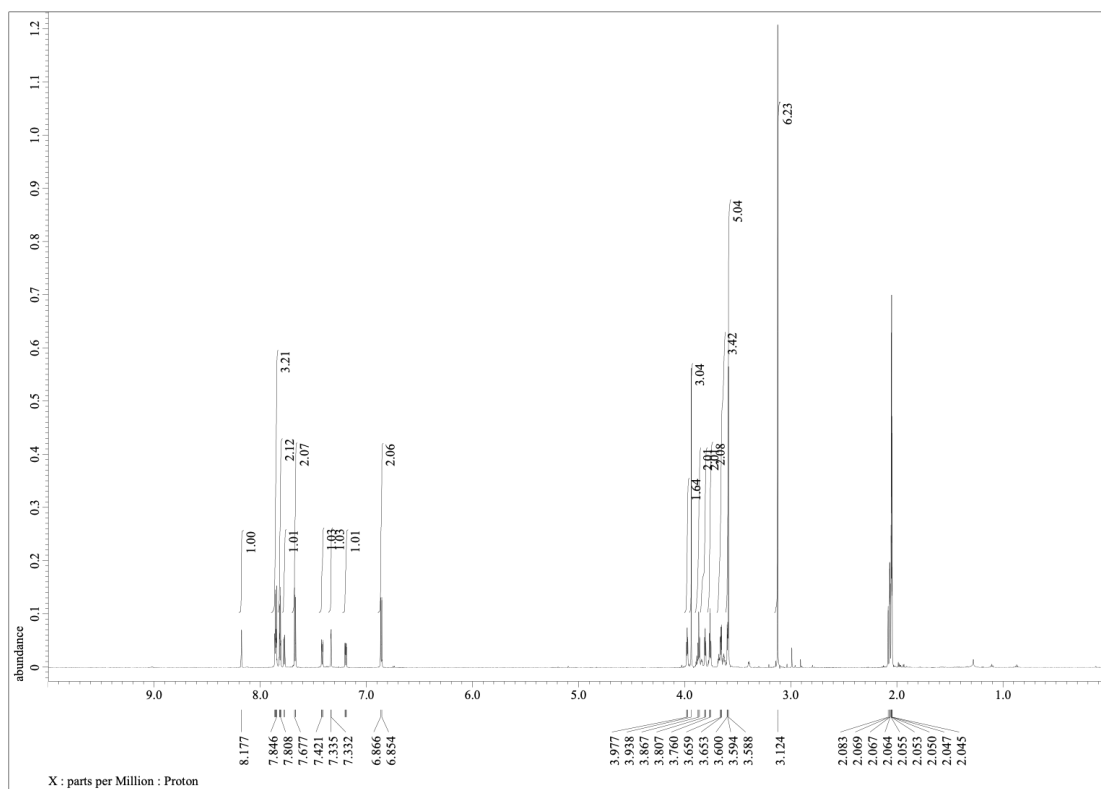


Fig. 16 化合物 14 の ^1H NMR (Acetone- d_6)

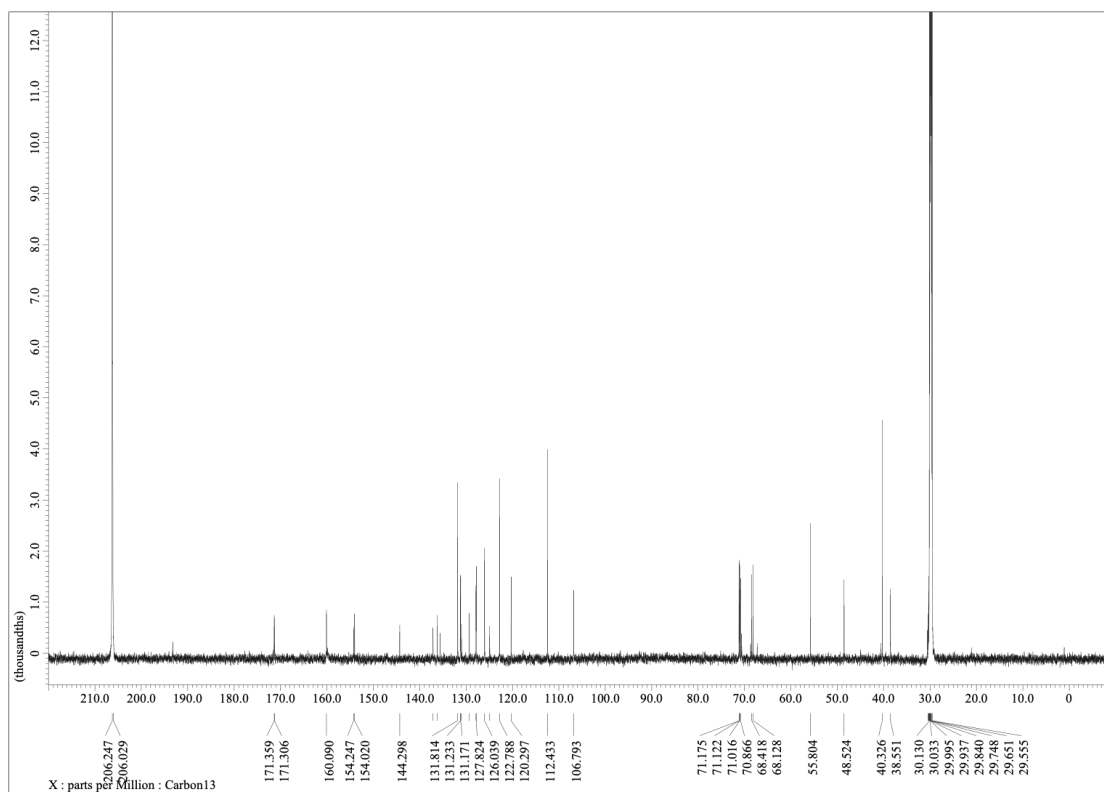


Fig. 17 化合物 14 の ^{13}C NMR (Acetone- d_6)

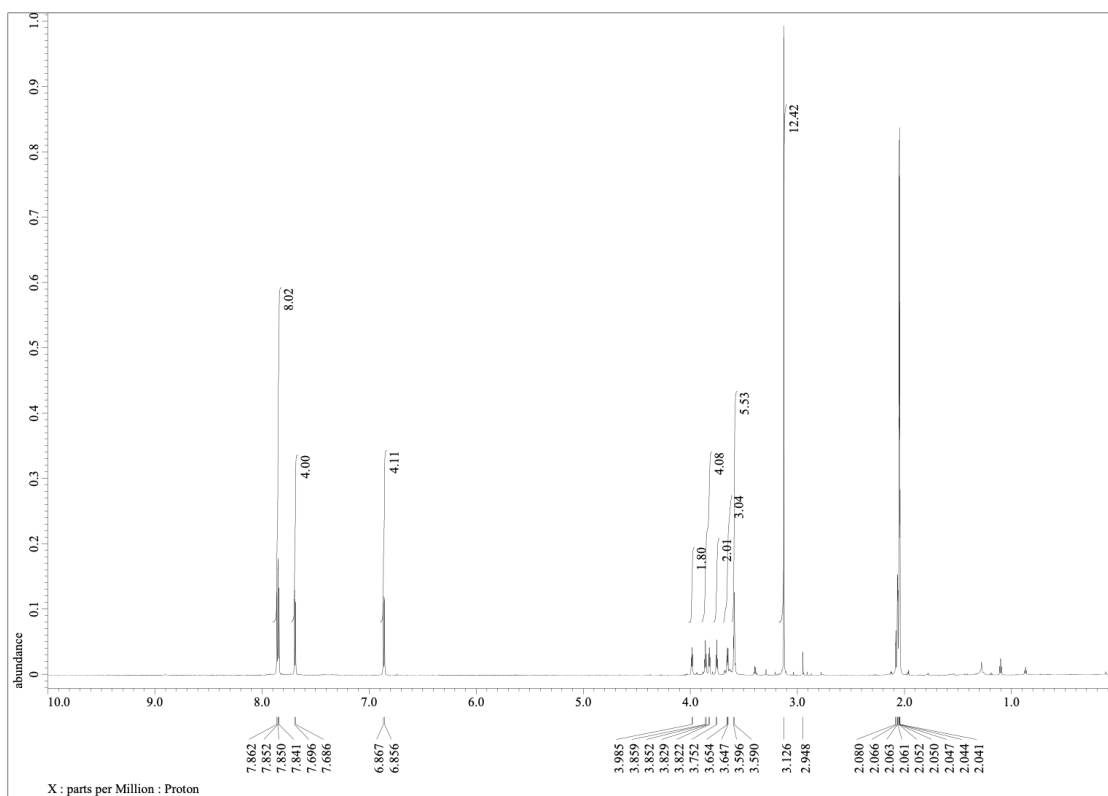


Fig. 18 化合物 15 の ¹H NMR (Acetone-d₆)

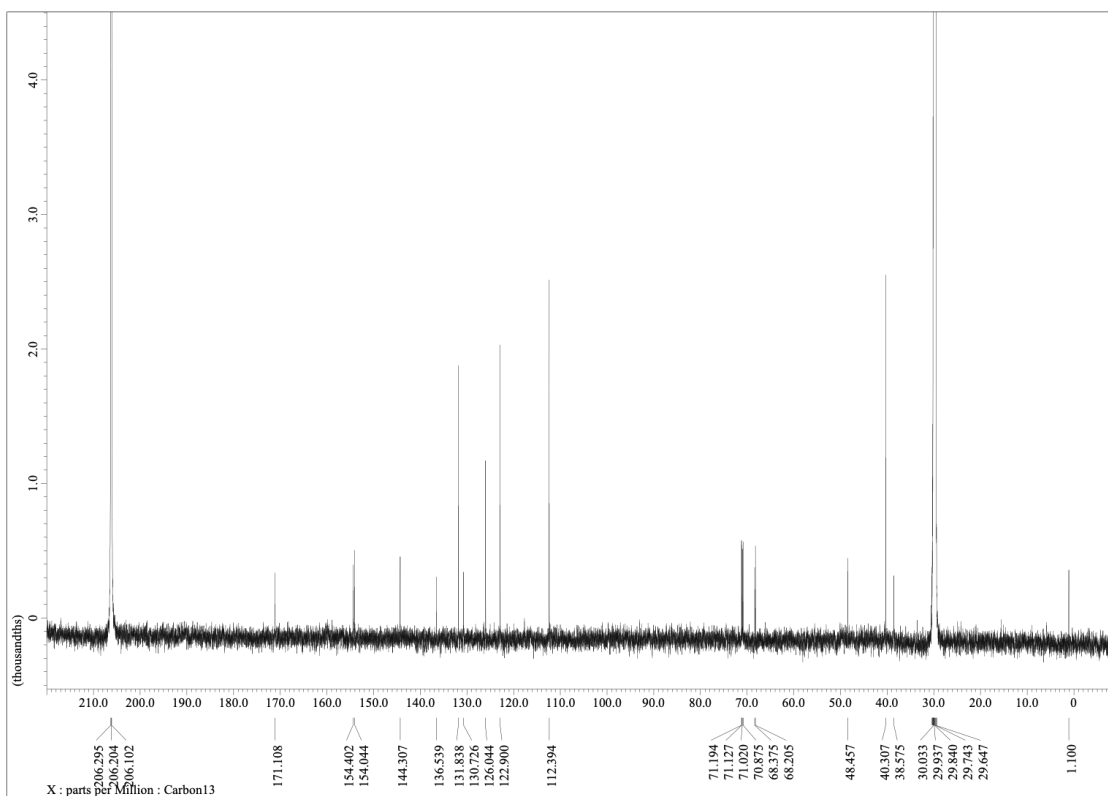


Fig. 19 化合物 15 の ¹³C NMR (Acetone-d₆)

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

試験法及び分析法の開発

～真菌基原の添加物の分析法の開発～

研究分担者 渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

研究要旨 2020年度に開発を行った SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS による分析を組み合わせた微生物由来酵素添加物の基原の解析法について、その適用範囲や問題点を明らかにするために真菌由来の9種の製品の解析を行った。5種の製品が Mascot サーチを用いた検索により、1種が NCBI のデータベースから取得したアミノ酸配列と MALDI-TOF-MS スペクトルを比較することにより同定できた。その他の3種については、基原の菌種のタンパク質情報がデータベースに含まれていないため同定できなかった。検討した解析法は、簡便に精度高く多様な添加物酵素の同定に対して適用可能であることが明らかになった。その一方で、同定の可否は検索に用いるデータベースの情報量に依存するという限界も明らかになった。今後は、菌種の同定マーカーの候補となったタンパク質アミノ酸配列の種内多型の有無を確認すること、及び細菌を基原とした酵素を含めてさらに多くの酵素製品で同様の作業や分析を行い、本解析法の適用範囲を調べるとともに、問題点を明らかにし、改善点の検証を継続する。

研究協力者

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 室長

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 主任研究官

中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 短時間非常勤職員

船江元子 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部 短時間非常勤職員

A. 研究目的

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。既存添加物酵素の基原は一つの微生物種に規定されておらず、異なる種に由来する製品であっても、酵素活性が同じであれば同一の品目とみなされる。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、基原菌種の同定は重要である。その一方で、既存添加物の流通製品を分析すると、基

原菌種の同定が難しい品目は多いことが知られている。そこで、微生物由来基原の品目の同定法の構築を目的とし、タンパク質アミノ配列を指標とした分子生物学的手法を応用した試験法に関する検討を行う。

本研究課題におけるこれまでの研究成果から、既存食品添加物酵素の LC-TOF-MS または MALDI-TOF-MS を用いた分析でアミノ酸配列を推定し Mascot サーチで基原菌種を検索すると、①確からしい検索結果が得られたが製品付帯情報による基原菌種と一致しなかった、②いずれの菌種もヒットせず同定できなかった、③SDS-PAGE でのバンドパターンが複雑となり Mascot サーチの結果の解釈が難しかった、といった結果となった添加物が存在したことを確認した。①については、昨年度、製品情報では *Aspergillus foetidus* 由来とされた α -アミラーゼについて、Mascot サーチによって *Aspergillus shirousami* と同定された。これらはシノニム同士であるため、本研究の分析方法によって正しく同定できたこと、及びシノニムであることが認識できなかった場合には正確に同定できな

かったものと認識される可能性があるが、*A. foetidus* の複数のシノニムを整理することによって同一であることが明確となり正しく同定できたことが示した。②については、データベースに登録された配列の不足と考へ、同定精度は使用するデータベースに大きく依存するため、データベースを整備し登録情報の学術的な正確性を向上させ、登録情報を厚くする必要があると考へた。そこで本年度は、Mascotサーチに搭載されているアミノ酸配列データベースである SwissProt 以外から収集した配列データを比較に使用することによって、同定が可能となるかを確認した。③については、分析した添加物に、分解や化学的変性や、製造工程に含まれる別タンパク質の添加、コンタミネーションなどにより複数種類のタンパク質が含まれた状態であったためと考へた。昨年度は、一昨年度に同定できなかった酵素添加物を用いて SDS-PAGE でタンパク質を分離し、個別のタンパク質を分析し同定する方法の構築を行った。SDS-PAGE で検出されたバンドを個別に酵素消化し、得られたペプチドを MALDI-TOF-MS で解析し、Mascot サーチで同定を行ったところ、*Aspergillus* 属真菌を基原とするアミラーゼやガラクトシダーゼの同定に成功した。そこで本年度は、引き続きこれまでに同定できなかった添加物を用いて、SDS-PAGE でのタンパク質単離及び MALDI-TOF-MS 分析を組み合わせた方法で、真菌基原のセルラーゼ、ヘミセルラーゼ及びプロテアーゼの同定が可能かどうか検証を行った。

B. 研究方法

B-1) 分析機器

既存添加物の質量分析には、MALDI-TOF-MS (Spiral TOF-plus JMS-S3000 ; 日本電子株式会社) を使用した。

B-2) 試料

研究対象とした既存添加物試料には、過去の研究¹⁾において分析した添加物酵素 9 種 (セルラーゼ No.52<B576>, ヘミセルラーゼ 3 試料 No.101<B652>, 102<B653> 及び 103<B575

>, プロテアーゼ 5 試料 No.61<B675>, No.62<B676>, No.63<B677>, No.64<B678> 及び No.65<B679> を用いた。なお、< >内は国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号を示す。

B-3) 質量分析用検体の調製

各試料は、いずれも 20 mg/mL の濃度となるよう精製水に溶解した。それぞれ等量の 2×laemmli sample buffer (Bio-Rad 社) と混合後、SDS-PAGE に供した。ゲルからバンドを切り出し、約 1 mm 立方に細かく切り刻み、1.5 mL 容のマイクロチューブに入れた。チューブに脱色液 (50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 150 µL を加え、10 分間振盪 (1000 rpm) 後、溶液を除去した。同じ操作をもう 1 回繰り返した。アセトニトリル 100 µL を加え、10 分間インキュベートした。アセトニトリルを除去後、減圧容器を用いて乾燥させた。還元用バッファー (10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 100 µL を加え、56°C で 45 分振盪 (1000 rpm) した。溶液を除去後、アルキル化用バッファー (55 mM ヨードアセトアミドを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 100 µL を加え、暗所下で 30 分間振盪 (1000 rpm) した。溶液を除去後、チューブに脱色液 (50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 150 µL を加え、10 分間振盪 (1000 rpm) 後、溶液を除去した。同じ操作をもう 1 回繰り返した。アセトニトリル 100 µL を加え、10 分間インキュベートした。アセトニトリルを除去後、減圧容器を用いて乾燥させた。トリプシン (Trypsin Sequencing Grade, modified; Roche Diagnostics 社) 10 µg/mL を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) 20 µL を加え、37°C 一晩インキュベートした。0.1% TFA を 100 µL 加え、15 分間インキュベート後に上清を回収した。同様の操作を合計 3 回行い、全ての上清をまとめて、窒素気流で 20 µL 程度まで濃縮した。0.1% トリフロオロ酢酸を含む 50% アセトニトリル水溶液、続いて 0.1% トリフロオロ酢酸水溶液で平衡化した ZipTip 0.2 µL-C18 (ミリポア社製) にトリプシン消化産物を吸着させ、

0.1%トリフロオロ酢酸水溶液で洗浄後、0.1%トリフロオロ酢酸と 10 mg/mL のマトリクス (4-クロロ- α -シアノケイ皮酸; シグマアルドリッチ社) を含む 50% アセトニトリル水溶液で MALDI-TOF-MS のサンプルプレート上に直接溶出した。完全に乾燥させた後、MALDI-TOF-MS を用いてスパイラルモードでマススペクトルを測定した。キャリブレーションには、トリプシン由来の 2 種の自己消化ペプチド (m/z 805.4163 及び 2163.0564) を用いた。

B-4) ペプチド質量を指標としたタンパク質の同定

マススペクトルから得られたペプチド質量を指標としたタンパク質の同定は、Matrix Science のウェブ上のプログラム Mascot Search Peptide Mass Fingerprint を用いて行った。主要なペプチドの質量を入力し、検索条件は以下のように設定した; Database: SwissProt, Taxonomy: Other Fungi, Enzyme: Trypsin, Allow up to: 1, Fixed modification: Carbamidomethyl(C), Peptide tolerance: ± 0.5 Da, Mass values: MH⁺。これによって確からしい菌種とタンパク質が同定できなかった場合、National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) データベースの検索により該当する菌種のタンパク質のアミノ酸配列を得て、酵素消化後のペプチド配列の予測ソフトウェア expasy (https://web.expasy.org/peptide_mass/) によりトリプシン消化後のペプチドの質量を算出し、これと TOF-MS 分析によって得られたマススペクトルと目視により照合することによって、同定を行った。

C. 結果及び考察

C-1) MALDI-TOF-MS による予測アミノ酸配列を指標とした基原同定

Figure 1-3 に各試料の SDS-PAGE 像と泳動量、Figure 4-14 に、各試料由来のペプチドの MALDI-TOF-MS スペクトル(タンパク質が同定できたもののみ)、Table 1 に各試料の由来、SDS-PAGE 像から推定した分子量、及び MALDI-TOF-MS による同定結果 (タンパク質名、生物

種、質量、Coverage) を示した。

試料 52; 本試料の基原菌種は、製品の付帯情報によるとヒイロタケ (*Pycnoporus coccineus*) の α -アミラーゼである。SDS-PAGE 像において、35kDa 付近のメインのバンドの他、複数のバンドが検出された。3 本のバンドを切り出して解析した結果、いずれも Mascot サーチにおいてタンパク質が同定されなかった。そこで NCBI のデータベースから *P. coccineus* のシノニムである *Trametes coccinea* のセルラーゼ様タンパク質のアミノ酸配列 172 種を得て、全てのアミノ酸配列のトリプシン消化後のペプチドの質量を expasy によりそれぞれ算出した。その結果と MALDI-TOF-MS 解析で得られたスペクトルを比較した結果、バンド 52-1 がセルラーゼの 1 種である glycoside hydrolase family 79 protein [*Trametes coccinea* BRFM310] OSD01894.1 由来のタンパク質と同定された。Mascot サーチで同定できなかった原因は、SwissProt のデータベースにヒイロタケのタンパク質が登録されていないためと推定された。NCBI のデータベースには *T. coccinea* のタンパク質の情報があるため、今後 SwissProt にも登録されれば、Mascot サーチで同定可能になると考えられた。

試料 101-103; 101 と 102 の基原菌種は、*Trichoderma longibrachiatum*、103 の基原菌種は、*Trichoderma viride* である。いずれの酵素も SDS-PAGE 像において複数のバンドが検出されたため、それぞれを切り出して解析を行った。101 については、5 種のバンドを解析した結果、2 種が Mascot サーチによって同定され、それぞれ *Trichoderma harzianum* 及び *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei* の有性世代) のヘミセルラーゼであった。酵素種は製品の付帯情報と一致したが、菌種が一致しなかったため、同定されたタンパク質の *T. longibrachiatum* における相同タンパク質のアミノ酸配列を NCBI からアミノ酸配列 1 種を得て、これらの全てのアミノ酸配列のトリプシン消化後のペプチドの質量を expasy によりそれぞれ算出した。これらと MALDI-TOF-MS スペクトルを比較した結果、*T. longibrachiatum* の相同タンパク質からは生成されず、*T. harzianum* のヘミセルラーゼからのみ生

成されるペプチドがバンド 2 から、*H. jecorina* のヘミセルラーゼからのみ生成されるペプチドがバンド 4 から検出されていた。この結果から、試料 101 の基原の菌種は少なくとも現在得られているデータからは *T. longibrachiatum* とは同定できず、*T. harzianum* または *H. jecorina* の可能性もあると考えられた。

102 については、7 種のバンドを解析した結果、5 種が Mascot サーチによって同定され、いずれも *H. jecorina* 由来のヘミセルラーゼであった。101 の解析結果と同様に、酵素種は製品の付帯情報と一致したが、菌種が一致しなかった。そこで、同定されたタンパク質の *T. longibrachiatum* における相同タンパク質のアミノ酸配列を NCBI からアミノ酸配列 1 種を得て、これらのアミノ酸配列のトリプシン消化後のペプチドの質量を expasy によりそれぞれ算出した。その情報と MALDI-TOF-MS スペクトルを比較した結果、*T. longibrachiatum* の相同タンパク質からは生成されず、*T. harzianum* のヘミセルラーゼからのみ生成されるペプチドがバンド 2 とバンド 4 から検出されていた。この結果から、試料 102 の基原の菌種は少なくとも現在得られているデータからは *T. longibrachiatum* とは同定できず、*T. harzianum* の可能性もあると考えられた。

101 及び 102 で確認された現象は、製品の付帯情報による菌種と、実際の製品で使用された菌種が異なっていた可能性の他に、*T. longibrachiatum*、*T. harzianum* 及び *T. reesei* が極近縁である²⁾ことと関連してヘミセルラーゼのアミノ酸配列に種内多型が生じている可能性も考えられる。様々な生物種で、近縁な菌種間では、同一の菌種の異なる菌株間で相同なタンパク質のアミノ酸配列が異なると同時に、異なる菌種間でそのタンパク質のアミノ酸配列が一致している、つまり一部のアミノ酸配列が菌種内で固定されていない種内多型が生じていることが報告されている³⁾。その場合、ヘミセルラーゼのアミノ酸配列が菌種特異的でない可能性がある。添加物酵素の分析から得たアミノ酸配列が、基原菌種の同定にどの程度有効かを評価するためには、今後、タンパク質の種類

ごとに、同種の複数菌株から得た配列間の一致率を複数の近縁種にまたがって確認し、菌種特異的であるかを評価する必要があることも確認された。この作業を行うことによって、そのタンパク質のアミノ酸配列を菌種同定のマーカーとすることが可能となる。

103 については、5 種のバンドを解析した結果、いずれも Mascot サーチにより同定することができなかった。101 と 102 の解析結果から、SwissProt のデータベースには 103 の基原の菌種である *T. viride* のプロテアーゼタンパクの情報は登録されていると考えられる。しかし 103 でだけ 5 種のバンドが同定されなかった原因は、この製品の基原菌種は *T. viride* ではなく、真の基原菌種の情報が SwissProt のデータベースに登録されていない、または今回単離できたバンドのタンパク質は製造過程で培地などから混入した夾雑物であり、そのアミノ酸配列がデータベースに含まれていない、といった理由により同定できないことなどが考えられた。2019 年度に LC-TOF-MS を用いて行われた解析結果においては、小麦由来の 15kDa 前後のアミラーゼインヒビターが同定されていた¹⁾。しかし今回の MALDI-TOF-MS を用いた解析では小麦由来のタンパク質は検出されなかった。

試料 61-65 ; 61 と 62 の基原菌種は *Aspergillus melleus*、63-65 の基原菌種は *Aspergillus niger* である。SDS-PAGE による解析の結果、いずれも主要なバンドが 1 種ずつ検出されたため、それらを解析した。その結果、61 と 62 のバンドはいずれも Mascot search で同定できなかった。SwissProt のデータベース中に *A. melleus* の情報が含まれていないためと考えられた。63、64 及び 65 のバンドについては、*A. niger* のプロテアーゼと同定され、これは製品付帯情報の基原菌種と一致したことから、正確に同定できたことが確認された。

今後は、これまでの検討において同定が不可能であったような菌種で示されたように、真菌を含む多くの添加物の基原となっている微生物種のタンパクアミノ酸配列を決定し、SwissProt またはローカルで検索可能なデータベースに収録する作業を進めることが必要で

あることが確認された。また、分析対象とする酵素について、菌種の同定マーカーの候補となったタンパク質のアミノ酸配列において種内多型の有無を確認し、菌種特異的であるかを評価する必要があることも示された。加えて、細菌を基原とした酵素を含めて、さらに多くの酵素製品で同様の作業や分析を行い、添加物の基原菌種やタンパク質の種類と同定が困難なケースの原因についての情報を蓄積していく必要があると考えられた。これらを行うことで、今後、TOF-MS分析で得られたスペクトルパターンから、多くの既存添加物酵素基原を正確に同定することが可能となると考えられた。基原菌種の解析法の適用範囲を調べるとともに、問題点を明らかにし、改善点の検証を継続していく。

D. 結論

昨年度に開発した SDS-PAGE によって添加物に含まれる個々のタンパク質を単離した後に、それぞれのタンパク質について MALDI-TOF-MS による分析を行う手法を用い、真菌を基原としたセルラーゼ及びプロテアーゼ製品の基原菌種の特定を行った。その結果、いくつかの酵素製品について基原菌種の特定に成功した。また、付帯する基原菌種と解析結果が異なる可能性のある製品が認められた。*A. melleus* 及び *P. coccineus* では、昨年度構築した SDS-PAGE でのタンパク質単離及び MALDI-TOF-MS での分析を組み合わせた手法でも、Mascot search で用いる SwissProt のデータベースに情報が一切含まれていないため、登録情報がまったくヒットせず基原菌種もタンパク質の種類と同定も不可能であった。しかしその場合には、さらに NCBI データベースから収集したアミノ酸配列との照合を行うことによって、正確に菌種を同定することが可能となった。SDS-PAGE で分離したシングルバンド由来のペプチドを MALDI-TOF-MS で解析する基原菌種の解析法は、簡便に精度高く多様な添加物酵素に対して適用可能であることが明らかになった。その一方で、検索に用いるデータベースの情報量に依存するという限界も明らかになった。今後は、菌種

の同定マーカーの候補となったタンパク質のアミノ酸配列の種内多型の有無を確認すること、及び細菌を基原とした酵素を含めて、さらに多くの酵素製品で同様の作業や分析を行い、基原菌種の解析法の適用範囲を調べるとともに、問題点を明らかにし、改善点の検証を継続する。

E. 参考文献

- 1) 増本直子, 杉本直樹, 西崎雄三: 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〜. 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 H29-食品-一般-007), 既存添加物の品質向上に資する研究 平成 29〜31 年度総合分担報告, 2020.
- 2) Asis A, Shahriar S, Naher L, et al. Identification patterns of *Trichoderma* strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular Biology Reports*. 48:3285–3301, 2021.
- 3) Hadami K, Ameziane E, Hassani R, et al. Association between GPX1 Pro189Leu polymorphism and the occurrence of bladder cancer in Morocco. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2(14):38-43, 2016.

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
2-1. 論文
なし
2-2. 総説
なし
2-3. 単行本
なし

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

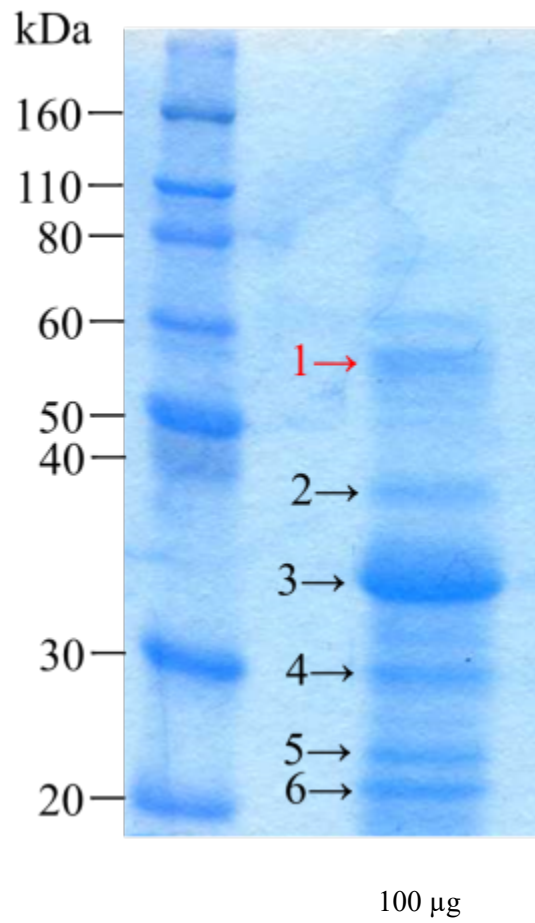


Figure 1. 試料 52 の SDS-PAGE 像
同定できたバンドは赤色の矢印で示した.

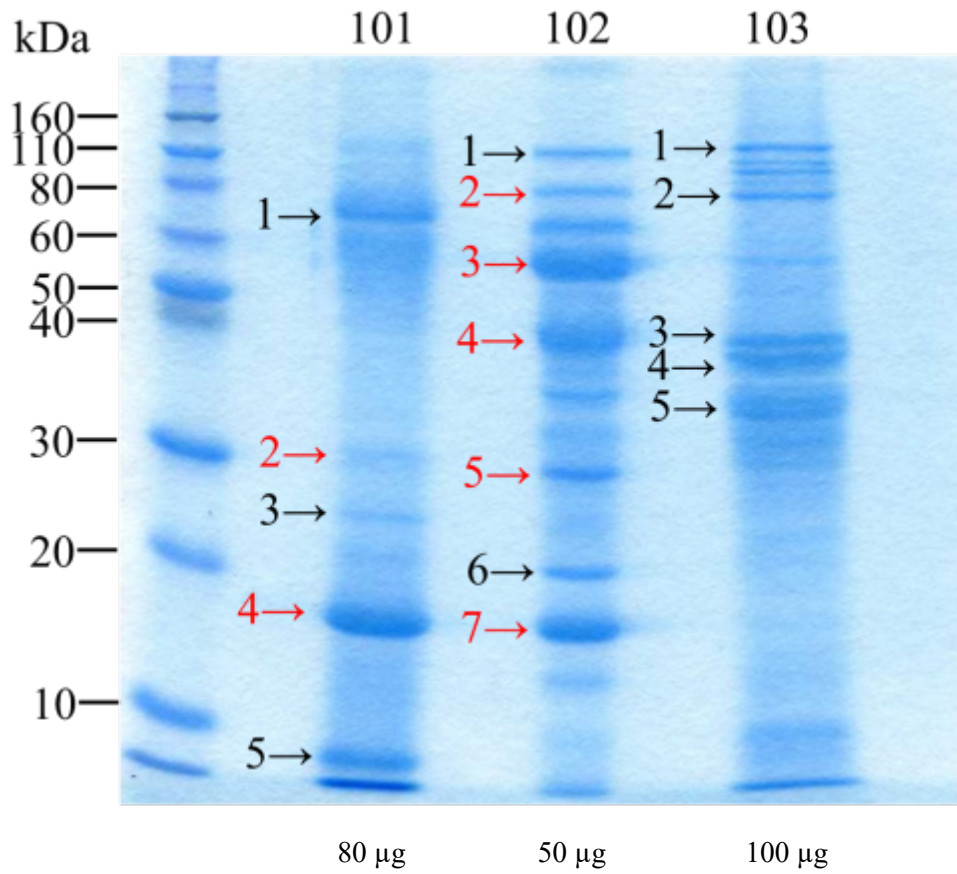


Figure 2. 試料 101,102 及び 103 の SDS-PAGE 像
 同定できたバンドは赤色の矢印で示した.

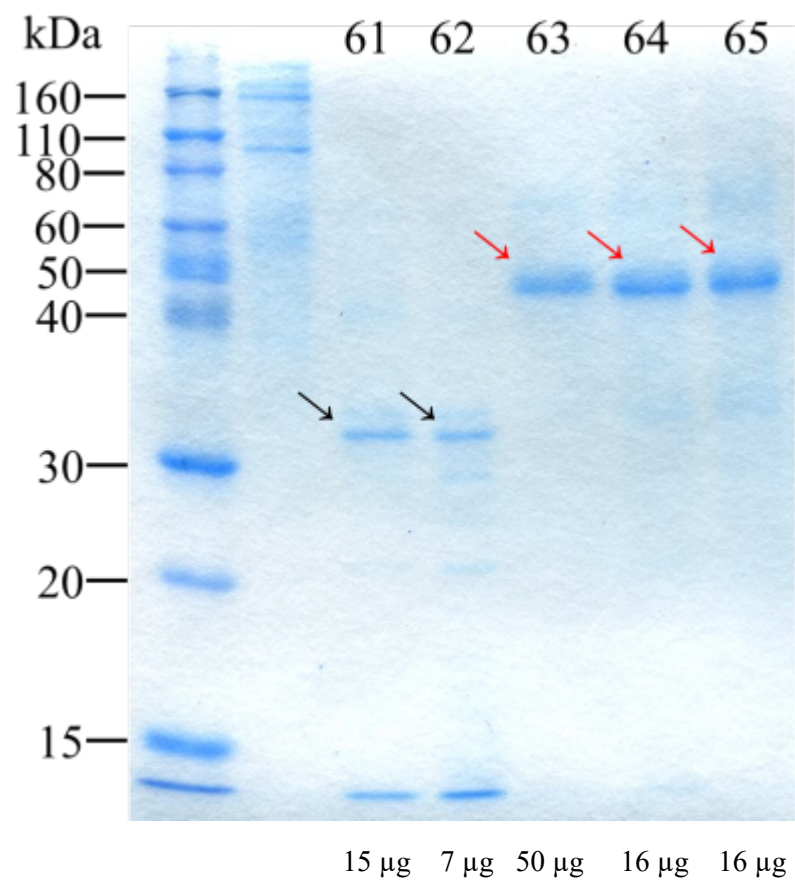


Figure 3. 試料 No.61-65 の SDS-PAGE 像
同定できたバンドは赤色の矢印で示した.

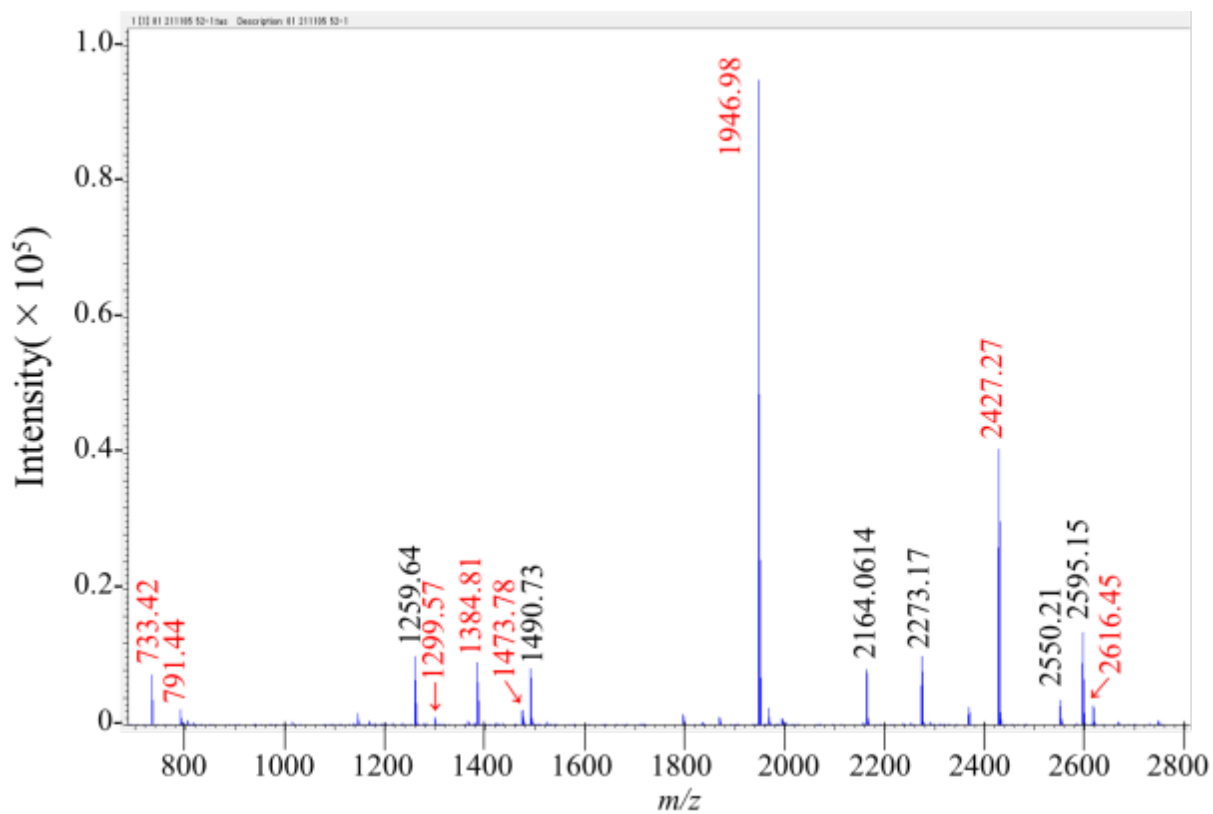


Figure 4. 試料 52 バンド 1 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

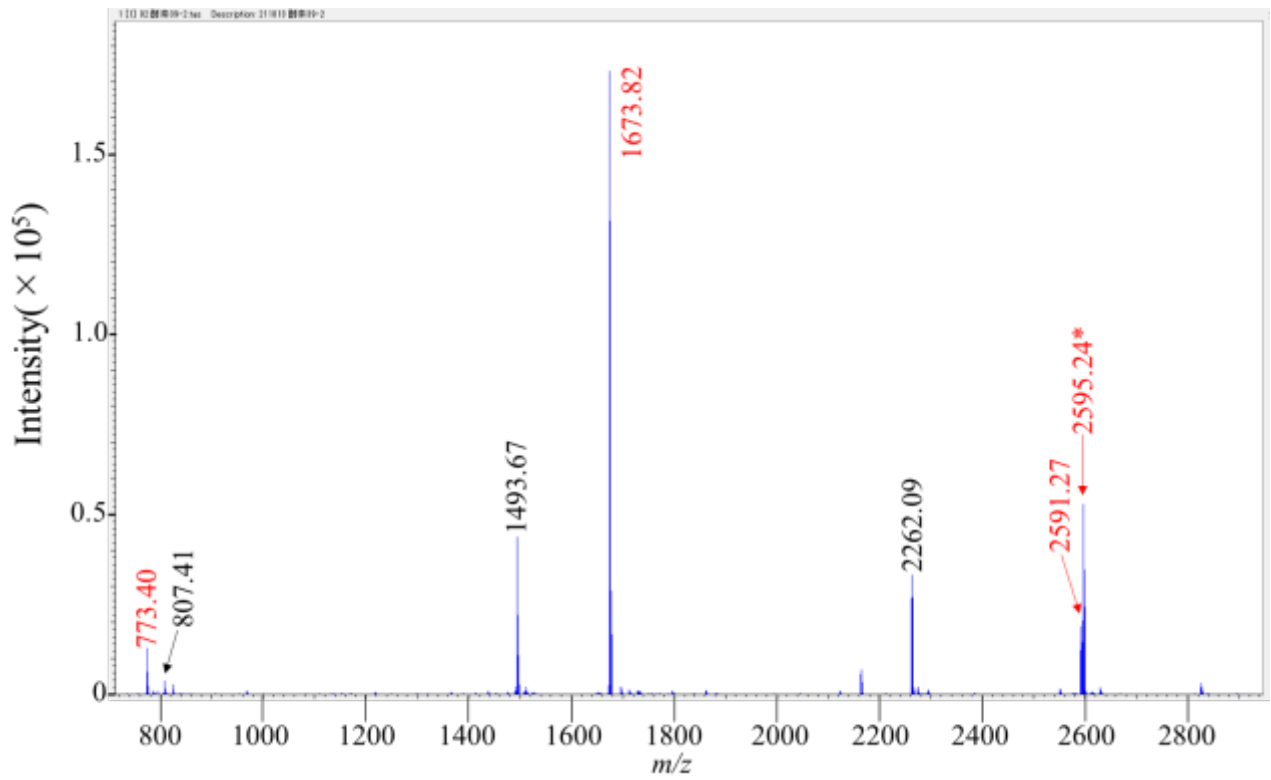


Figure 5. 試料 No.101 のバンド 2 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチドを示し, *は *T. lognibrachiatum* の相同タンパク質からは検出されないペプチドを示している.)

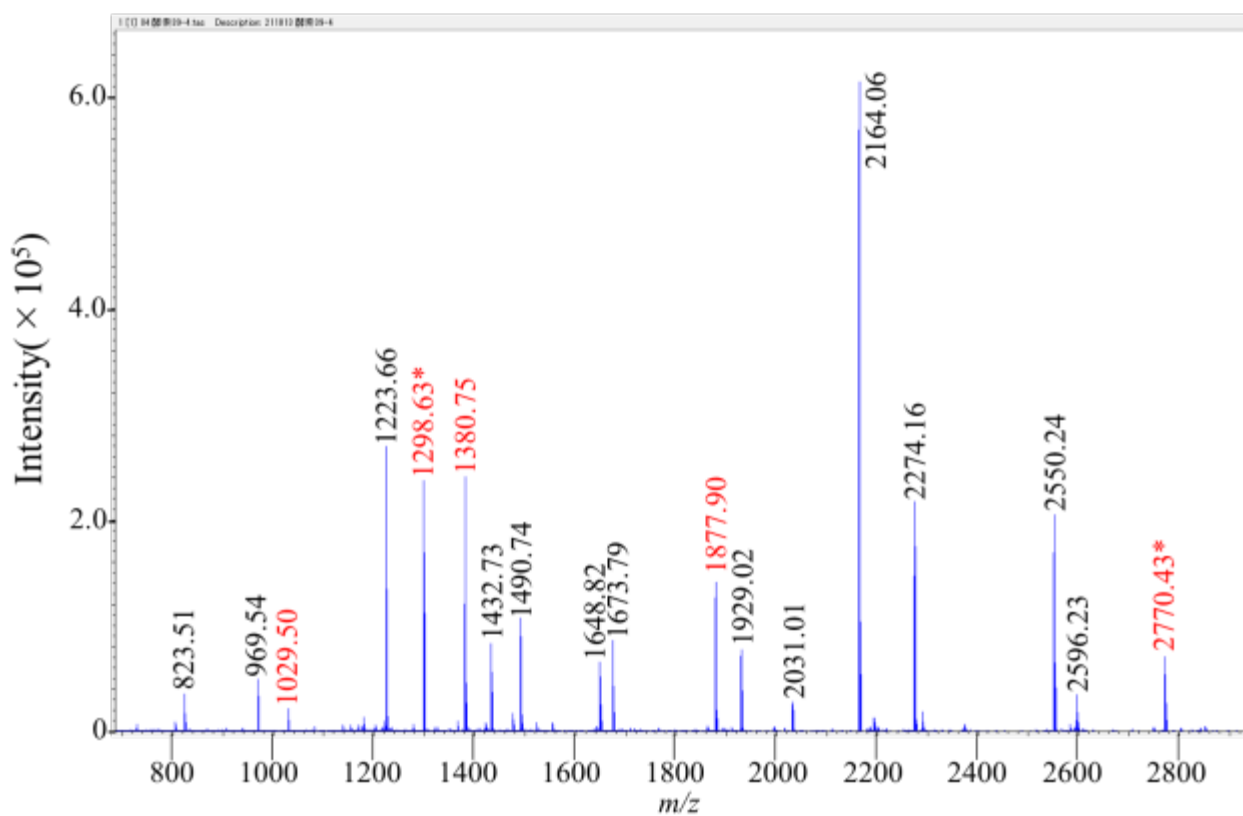


Figure 6. 試料 No.101 のバンド 4 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチドを示し, *は *T. lognibrachiatum* の相同タンパク質からは検出されないペプチドを示している.)

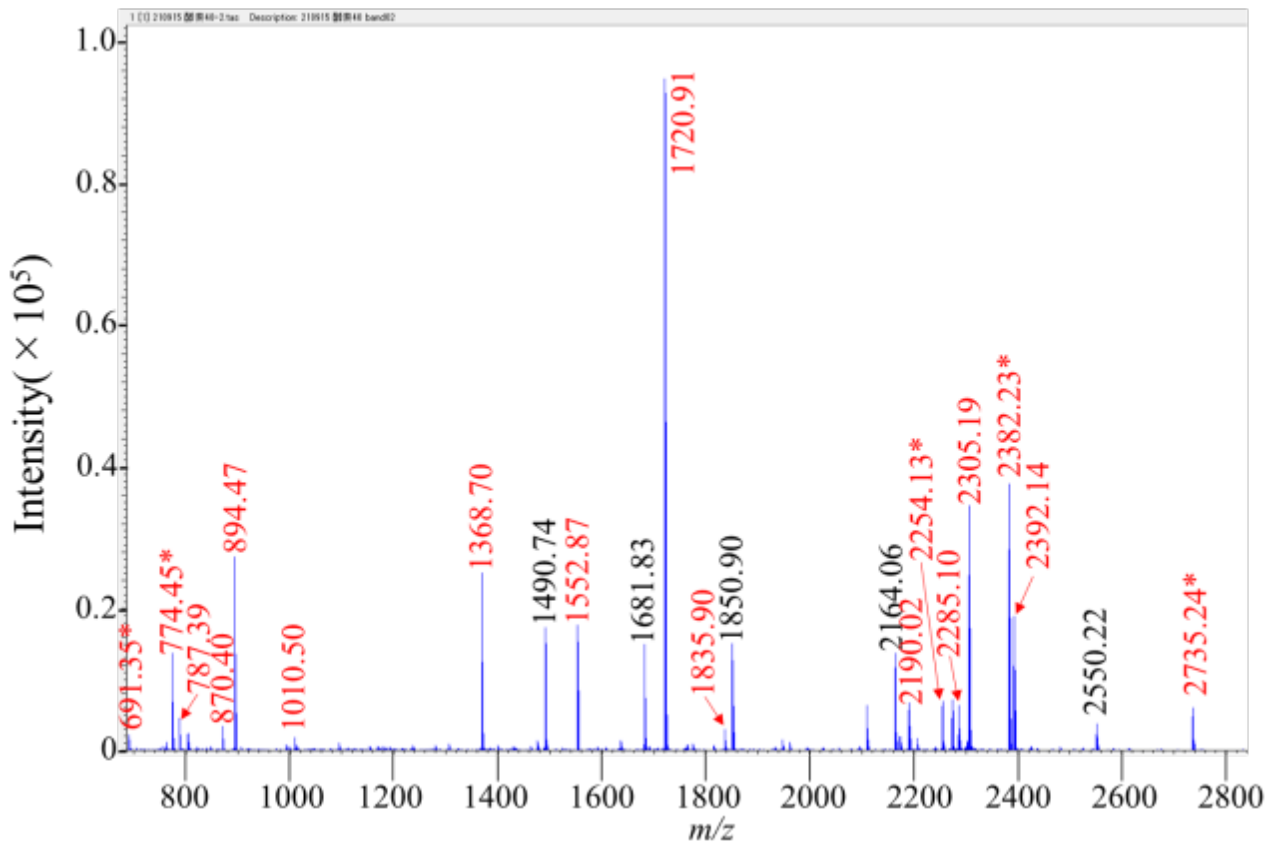


Figure 7. 試料 No.102 のバンド 2 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチドを示し、*は *T. lognbranchiatum* の相同タンパク質からは検出されないペプチドを示している.)

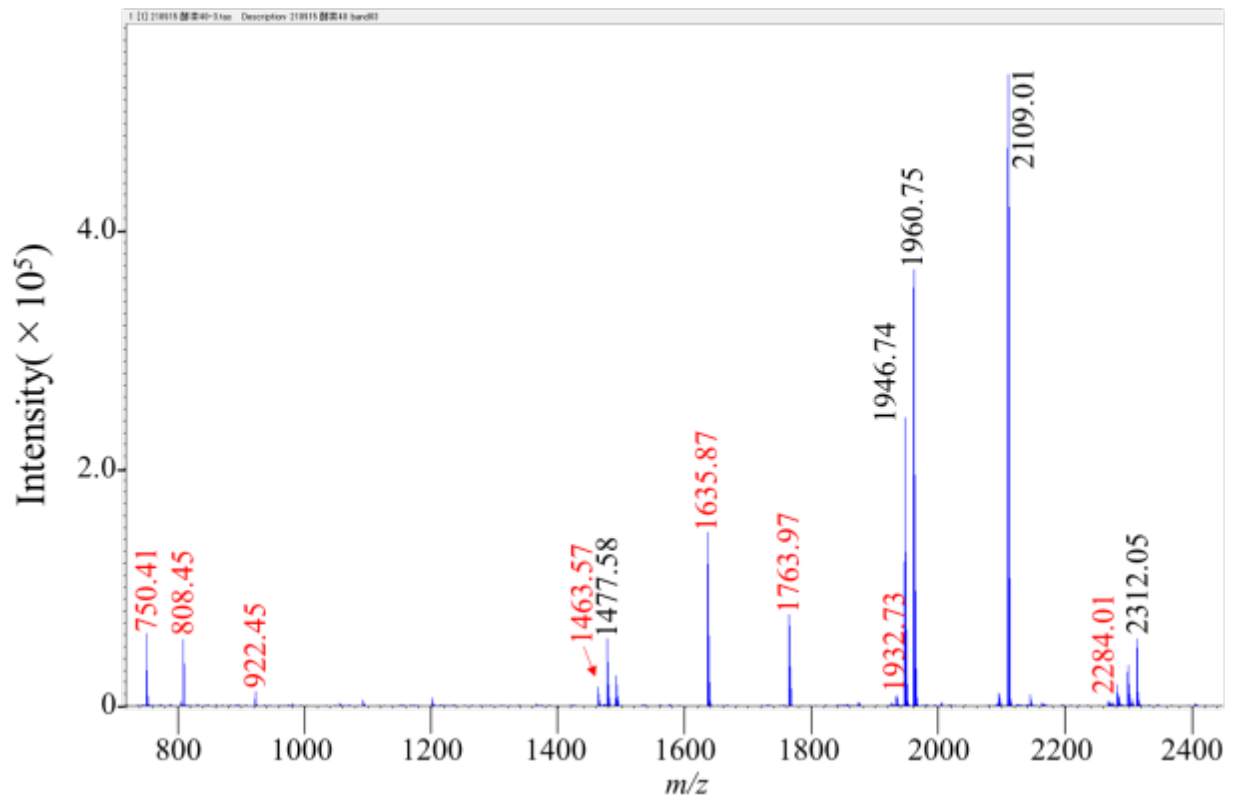


Figure 8. 試料 No.102 のバンド 3 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

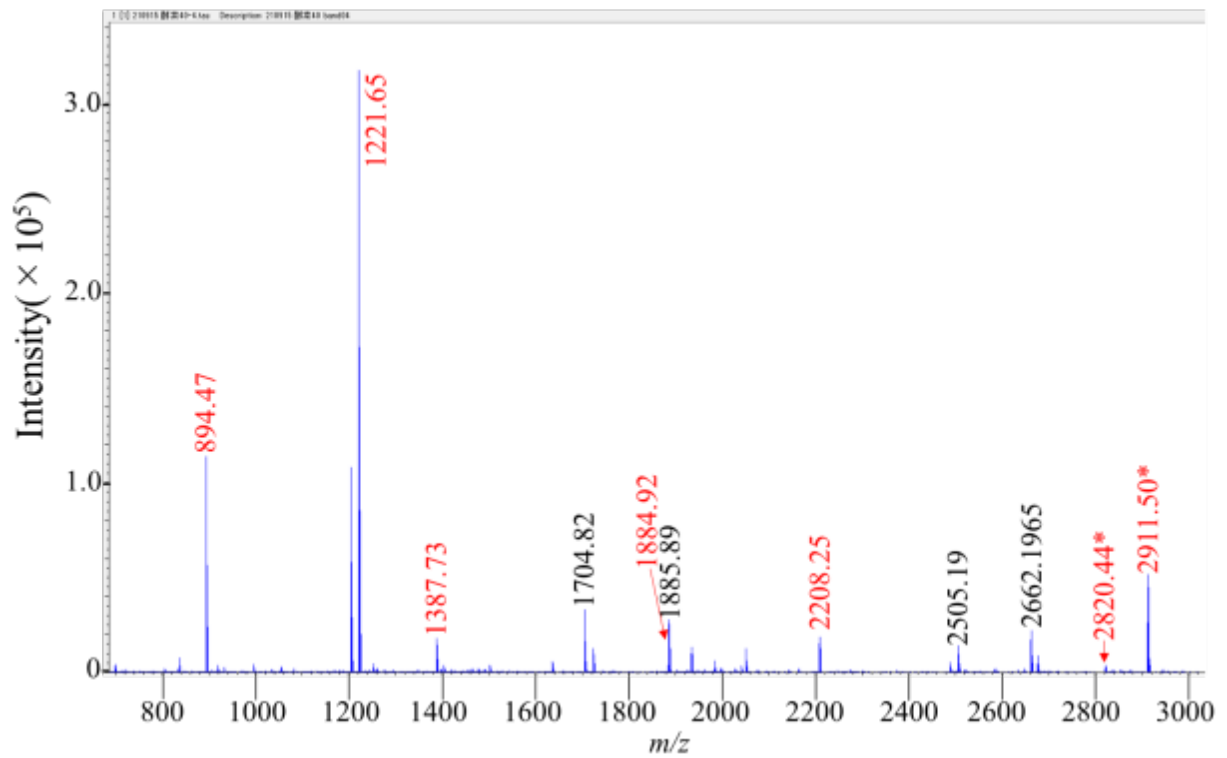


Figure 9. 試料 No.102 のバンド 4 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
 (赤字は同定されたタンパク質由来のペプチドを示し、*は *T. lognibrachiatum* の相同タンパク質からは検出されないペプチドを示している.)

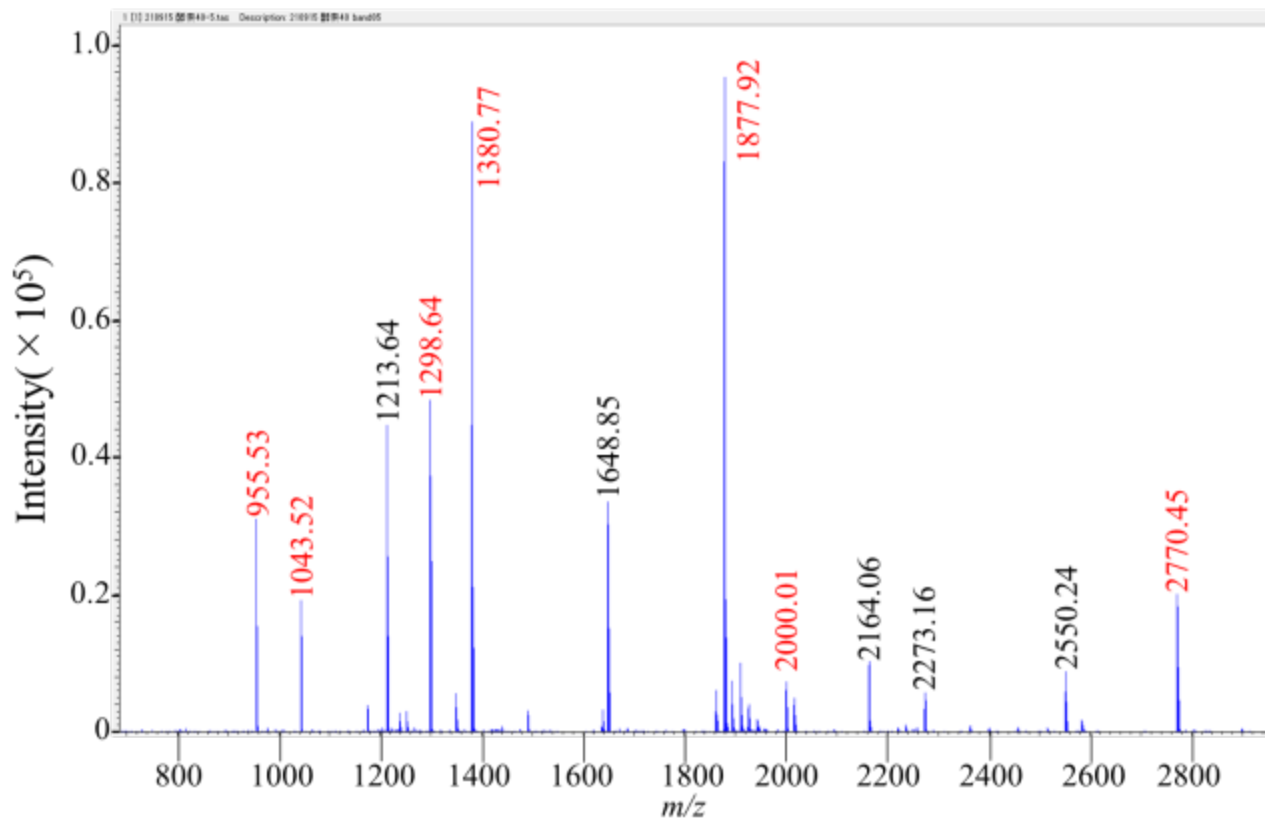


Figure 10. 試料 No.102 のバンド 5 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

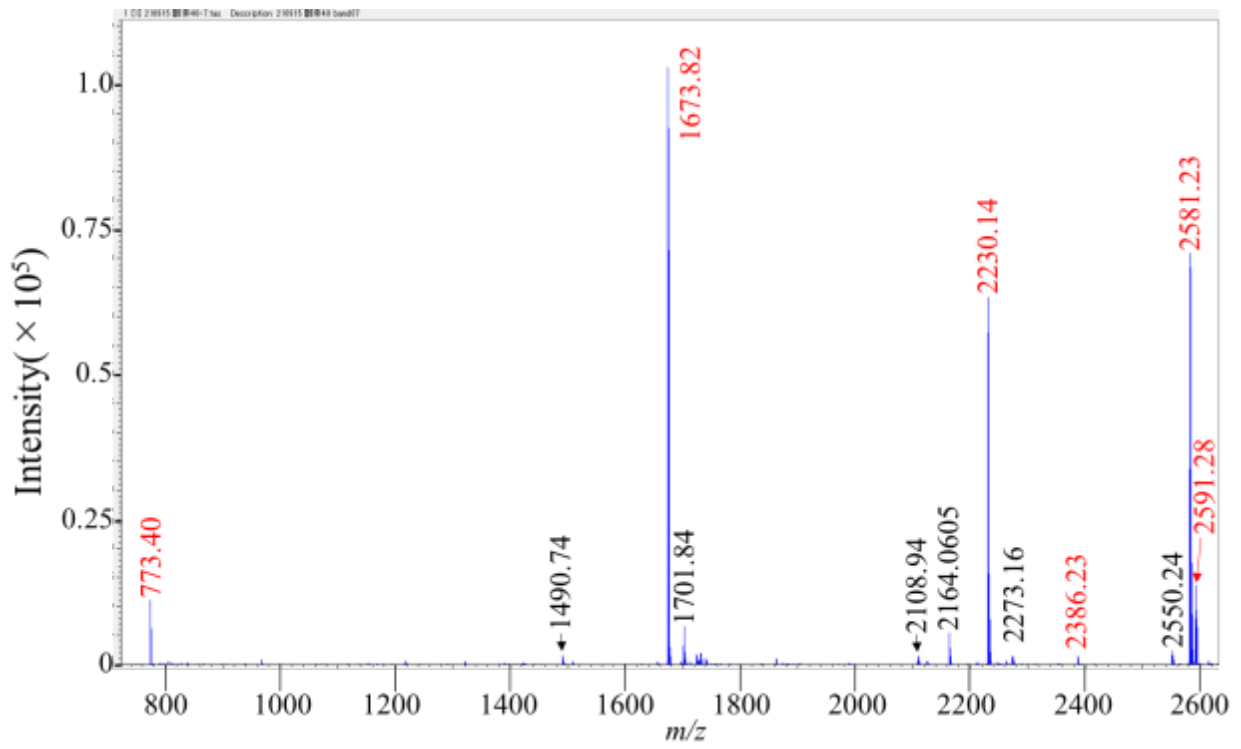


Figure 11. 試料 No.102 のバンド7の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

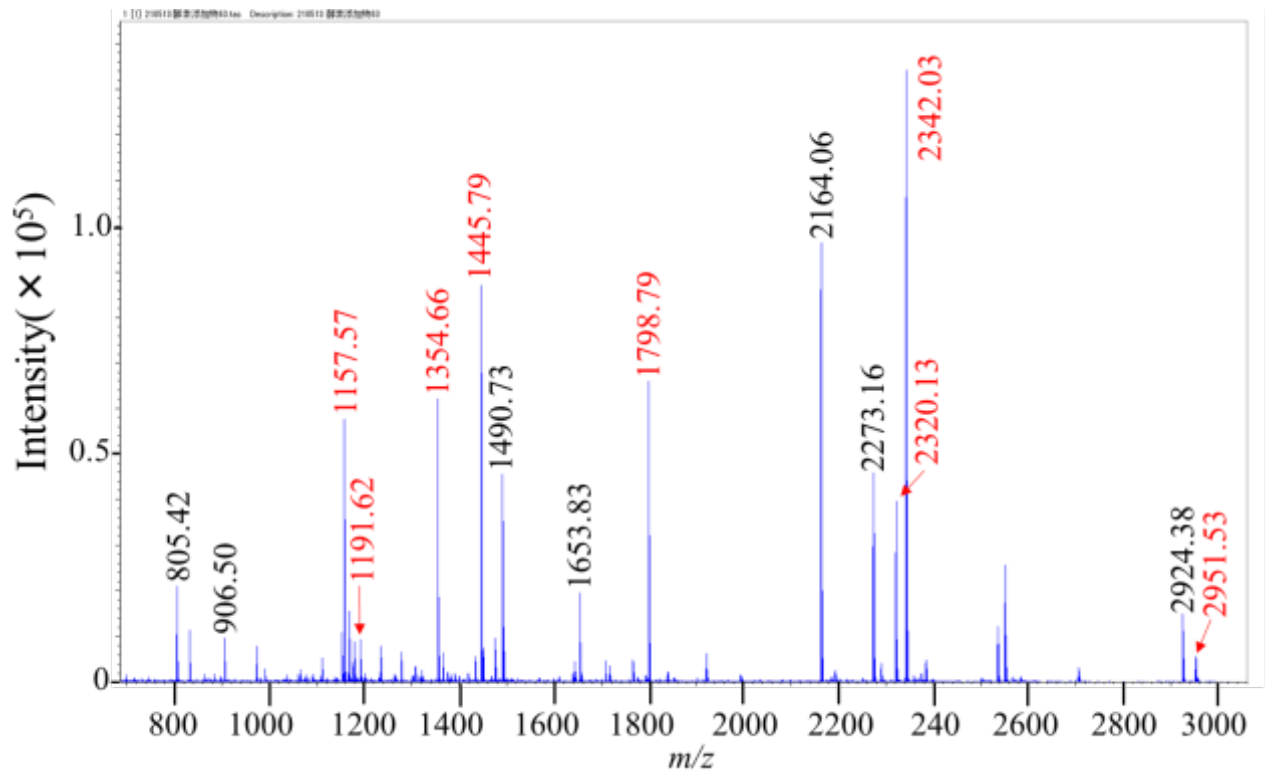


Figure 12. 試料 No.63 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

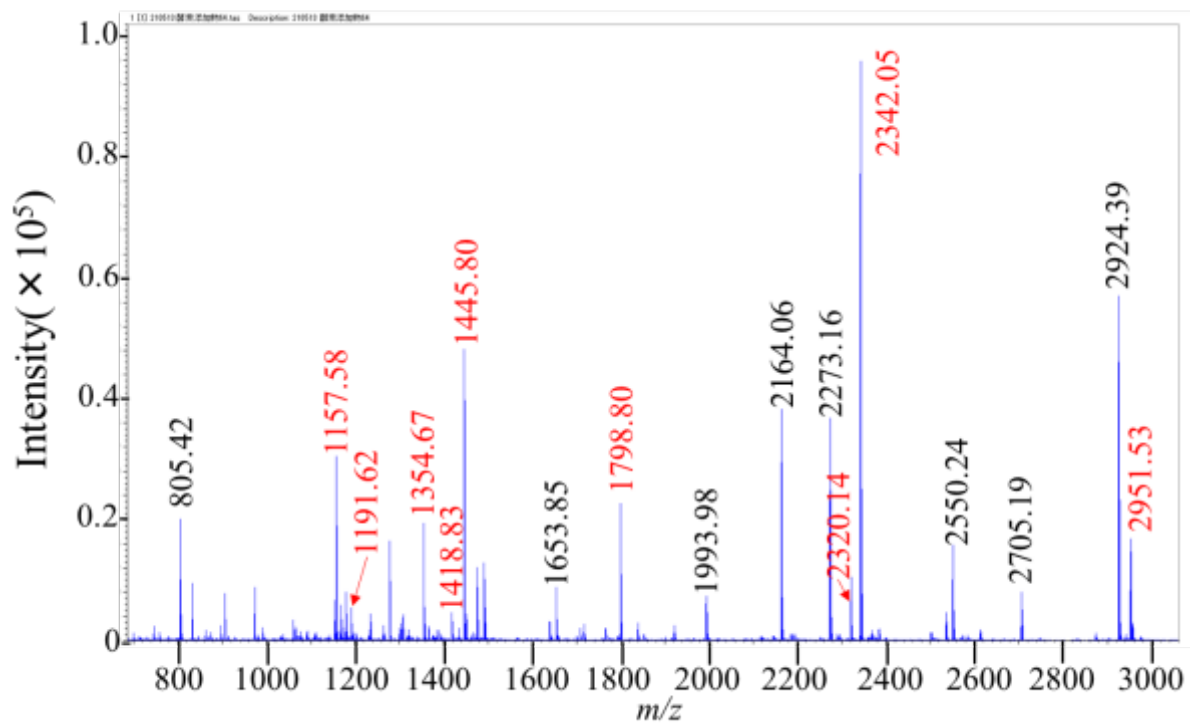


Figure 13. 試料 No.64 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

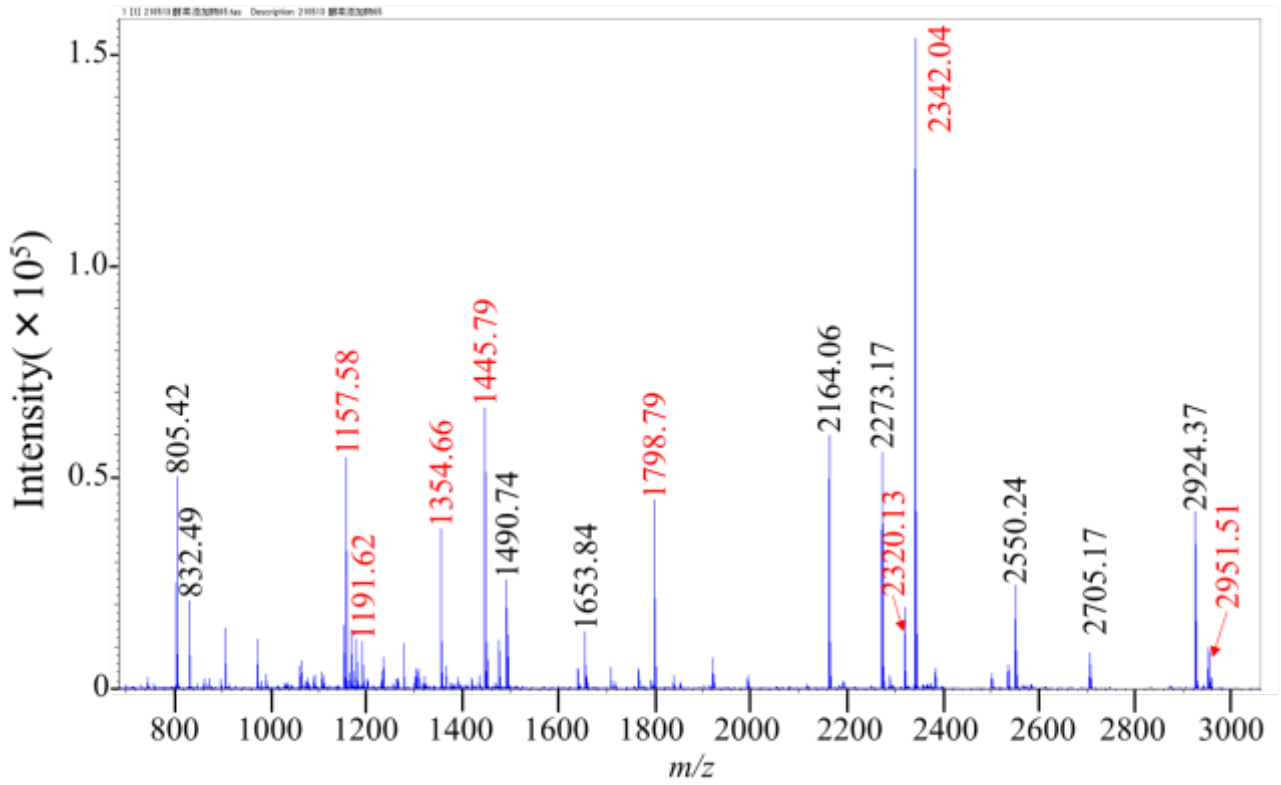


Figure 14. 試料 No.65 の MALDI-TOF-MS クロマトグラム
(赤字は同定されたタンパク質由来のペプチド)

Table 1 Mascot サーチによる試料由来のタンパク質の同定結果

製品 No.	バンド No.	基原情報		SDS-PAGE上の 推定分子量 (kDa)	酵素名	生物名	酵素名	生物名	分子量 (kDa)	Coverage (%)
		酵素名	生物名							
	1			55	Glycoside hydrolase	<i>Trametes coccinea</i>			57	-
	2			38		同定不可				
52	3	セルラーゼ		35		同定不可				
	4		<i>Pycnoporus coccineus</i>	30		同定不可				
	5			24		同定不可				
	6			21		同定不可				
61		プロテアーゼ	<i>Aspergillus melleus</i>	32		同定不可				
62		プロテアーゼ	<i>Aspergillus melleus</i>	32		同定不可				
63		プロテアーゼ	<i>Aspergillus niger</i>	50	Asperillopepsin	<i>Aspergillus niger</i>			41.3	34
64		プロテアーゼ	<i>Aspergillus niger</i>	50	Asperillopepsin	<i>Aspergillus niger</i>			41.3	37
65		プロテアーゼ	<i>Aspergillus niger</i>	50	Asperillopepsin	<i>Aspergillus niger</i>			41.3	34
	1			70		同定不可				
101	2			30	Endo-1,4-beta-xylanase	<i>Trichoderma harzianum</i>			20.7	35
	3	ヘミセルラーゼ	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	25		同定不可				
	4			18	Endo-1,4-beta-xylanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			38.2	25
	5			5		同定不可				
	1			130		同定不可				
	2			80	Xyloglucanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			87.3	27
	3			58	Exoglucanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			55.4	17
102	4	ヘミセルラーゼ	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	40	Exoglucanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			50.3	22
	5			30	Endo-1,4-beta-xylanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			38.2	33
	6			20		同定不可				
	7			18	Endo-1,4-beta-xylanase	<i>Hypocrea jecorina</i>			24.1	39
	1			130		同定不可				
	2			80		同定不可				
103	3	ヘミセルラーゼ	<i>Trichoderma viride</i>	40		同定不可				
	4			38		同定不可				
	5			35		同定不可				

研究成果の刊行に関する一覧表(令和3年度)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsutumiuchi K, Toyoshima T, Hasegawa F, Terasawa R, Honda W, Sakakibara M, Ishida Y, Ikai Y, Ishibashi R, Furuya K, Morimoto T, Ishizuki K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Oka H	Molecular Structure of Gardenia Blue Pigments by Reaction of Genipin with Benzylamine and Amino Acids	J. Agric. Food Chem.	69	3904-3911	2021
増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐 藤恭子 :	相対モル感度に基づ くシングルリファレ ンス GC 法及び HPLC 法によるカラシ抽出 物及びセイヨウワサ ビ抽出物中のイソチ オシアン酸アリルの 定量	食衛誌	62	73-78	2021
Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Yasobu N, Iwamoto Y, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T,	Purity Determination of Cyclophosphamide Hydrate by Quantitative ³¹ P-NMR and Method Validation	Chem. Pharm. Bull.	69 (7)	630-638	2021

Goda Y					
Fujiwara Y, Miwa M, Nagatsu A, Honma A	: Identification of Maple Anthocyanin and its Antiproliferative Activity against LLC, T47D and C3H10T1/2 Cells	Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry	21	894-901	2021
Takahashi M, 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.	70	25-31	2022
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.	in press (doi: 10.1021/acs.jnatprod.1c00976.)		2022

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究 (20KA1008)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品添加物部 第二室長
(氏名・フリガナ) 杉本 直樹 (スギモト ナオキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究 (20KA1008)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品添加物部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 西崎 雄三 (ニシザキ ユウゾウ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 有機化学部・部長

(氏名・フリガナ) 出水庸介

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究 (20KA1008)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 衛生微生物部 第三室長
(氏名・フリガナ) 渡辺 麻衣子 (ワタナベ マイコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 立命館大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 仲谷 善雄

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究 (20KA1008)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬学部 薬学科・教授
(氏名・フリガナ) 井之上 浩一 ・ イノウエ コウイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 松山大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 新井 英夫

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究 (20KA1008)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 松山大学薬学部 教授
(氏名・フリガナ) 天倉 吉章 (アマクラ ヨシアキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和4年 3月 24日

厚生労働大臣 殿

機関名 日本大学 生物資源科学部

所属研究機関長 職 名 学部長

氏 名 丸山 総一

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究

3. 研究者名 (所属部局・職名) 生物資源科学部・専任講師

(氏名・フリガナ) 大槻 崇 (オオツキ タカシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 金城学院大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 小室 尚子

次の職員の令和3年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 既存添加物の品質向上に資する研究 (20KA1008)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬学部 教授
(氏名・フリガナ) 永津 明人 (ナガツ アキト)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。