

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 23KA1012

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

令和5年度(2023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	阿部 裕	国立医薬品食品衛生研究所
	西崎 雄三	国立医薬品食品衛生研究所
	増本 直子	国立医薬品食品衛生研究所
	辻 巖一郎	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
	天倉 吉章	松山大学
	永津 明人	金城学院大学
	井之上 浩一	立命館大学
	大槻 崇	日本大学

令和6(2024)年3月



目次	1
1) 総括研究報告書	
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究	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)	18
業務受託者：背黒 勝也	
研究協力者：藤井 結花	
2. 既存添加物の成分組成に関する研究	
1) カロブ色素の成分解析	38
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：阿部 裕	
研究協力者：西崎 雄三	
2) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究	45
研究分担者：永津 明人	
3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討	61
研究分担者：井之上 浩一	
研究協力者：高山 卓大	
3. 分析法及び試験法の開発に関する研究	
1) 定量 NMR によるアントシアンの純度評価<測定溶媒の最適化>	70
研究分担者：西崎 雄三	
研究協力者：石附 京子	
2) 相対モル感度 (RMS) を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討	
～クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係～	82
研究分担者：増本 直子	
研究協力者：中島 馨	
3) 既存添加物アナトー色素の定量評価の基礎検討	93
研究分担者：井之上 浩一	

	研究協力者：布目 真梨	
4)	既存添加物カシアガム中のアントラキノンの分析法に関する研究	107
	研究分担者：大槻 崇	
5)	PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討	121
	研究分担者：辻 巖一郎	
	研究協力者：出水 庸介	
6)	エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定量法の検討	139
	研究分担者：阿部 裕	
	協力研究者：石附 京子	
7)	菌基原の添加物酵素の基原種同定法の開発及び基原種に関する分類学的情報の収集	152
	研究分担者：渡辺 麻衣子	
	研究協力者：吉成 知也	
	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	
	研究協力者：中西 早苗	
	研究協力者：船江 元子	
	研究協力者：伊藤 紫野	
3)	研究成果の刊行に関する一覧表	164

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5年度総括研究報告書

研究代表者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

## 研究要旨

### 1) 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(公定書案, 自主規格案, 自社規格等)について調査した。2024年2月の第10版食品添加物公定書の公示時点で, 公定書に未収載の既存添加物約100品目の内, 既存添加物自主規格収載の成分規格に基づき第3者検証が実施された30品目, その内製造実績が無いものを除いた20余品目が公定書に収載が可能であり, 優先的にデータ収集が必要であると考えられた。

### 2) 既存添加物の成分組成に関する研究

カロブ色素, カシアガム, 香辛料抽出物(シナモン, バジル, クローブ), スピルリナ色素について検討した。カロブ色素については, 色素成分の同定を行った。カシアガムについては, 不純物であるアントラキノン類の定量に RMS を利用した定量法の適用を検討した。香辛料については,  $^1\text{H-qNMR}$  により, 分離分析を必要とせず指標成分の含量測定が可能であることが確認できた。スピルリナ色素については, ペプチド・タンパク質に特化した分析法の開発が必要であった。

### 3) 分析法及び試験法開発に関する研究

アナトー色素, 生コーヒー豆抽出物, ケイソウ土, 酵素(ガラクトシダーゼ, セルラーゼ, ヘミセルラーゼ, プロテアーゼ)を対象として検討した。アナトー色素については, 主成分が RMS を用いて定量可能であった。生コーヒー豆抽出物の主成分であるクロロゲン酸類については, 発色団の位置に関わらず RMS がほぼ同じであること, 数と比例して RMS が大きくなることが確認され, 一つの化合物について RMS を明らかにすれば他の類縁体の含量は予測可能であると考えられた。また, RMS を用いた定量法の応用範囲の拡張のため, PDA 検出器の校正物質の開発を検討した。ケイソウ土については, XRF が鉛及びヒ素の定量に適用可能であるかどうか検討した。酵素については, MALDI-ToF MS によるペプチドフィンガープリント(PMF)法を検討し, MASCOT サーバー上にカスタムデータセットを構築することにより基原の同定精度を向上することが確認できた。

## 研究分担者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部長

阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部第二室長

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  
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部第二室長  
辻巖一郎 国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学部主任研究官  
渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部第三室長  
天倉吉章 松山大学薬学部  
教授  
永津明人 金城学院大学薬学部  
教授  
井之上浩一 立命館大学薬学部  
教授  
大槻 崇 日本大学生物資源学部  
准教授

#### 研究協力者

背黒勝也 (一社)日本食品添加物協会  
専務理事  
藤井結花 (一社)日本食品添加物協会  
常務理事  
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部研究員  
中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部研究員  
好村守生 松山大学薬学部  
准教授  
内倉 崇 松山大学薬学部  
特任助教  
布目真梨 立命館大学大学院  
助教  
吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部第四室長  
中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所  
短時間非常勤職員  
船江元子 国立医薬品食品衛生研究所  
短時間非常勤職員

伊藤紫野 東京理科大学先進工学部  
大学院生

#### A. 研究目的

2024年2月に第10版食品添加物公定書(以下、第10版公定書)が告示され、成分規格が未設定の既存添加物は全357品目中99品目となった(枝番品目は一部でも設定済のとき、その品目の成分規格は設定済とした場合)。これら成分規格が未設定の品目については、1. 基原・製法・本質、2. 有効成分又は指標成分、3. 分析法、等の調査及び検討を行い、成分規格設定のための基礎情報を引き続き収集する必要がある。

令和5年度は、(1) 既存添加物の成分規格に関する研究：自主規格や自社規格、また検証試験の実施情報の調査及び整理。(2) 既存添加物の成分組成に関する研究：<sup>1</sup>H-qNMRによる同定及び直接定量、RMSを用いた定量法の有効性。(3) 分析法及び試験法の開発に関する研究：RMSを用いた定量分析法の応用範囲の拡張のための基礎情報の収集、XRFを用いた無機物の定量、MALDI-ToF MSによるペプチドフィンガープリント(PMF)法の酵素の基原の同定法、等を検討した。なお、(2)及び(3)については、従来法では試験法が設定できない品目に対して、新たに分析法を開発し、その有効性や実用性を確認することを目的としており、得られた成果は公的な試験法の設定において基礎情報として利用されるものである。

#### 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 10 版公定書に未収載の既存添加物について、成分規格の設定の実現可能性や優先度を総合的に検討するため、本研究では、1. 既存添加物の成分規格(公定書案、自主規格案、自社規格等)、2. 既存添加物の流通・使用実態、3. 既存添加物の国内外の安全性評価情報、について3年間を1サイクルとして調査を行っている。令和5年度は1について、すなわち、第11版公定書成分規格案、第6版自主規格収載予定品目、海外の規格の有無について調査した。

## 2. 既存添加物の成分組成に関する研究

### 1) カロブ色素の成分解析

カロブ色素の成分組成を検討した。カロブ色素製品を水に懸濁し、Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、水、含水メタノールで溶出した。得られた7画分についてHPLC分析を行い、成分の分布について確認した。また、Diaion HP-20の水溶出部をYMC GEL ODS等のカラムクロマトグラフィーを繰り返し、化合物の分離精製を試みた。

### 2) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

<sup>1</sup>H-qNMR法により、チョウジ(生薬)、クローブ末(市販品)、クローブ香料、クローブ抽出物、オールスパイス末(市販品)中のeugenolを直接定量した。また、HPLC法により、eugenol標品を用い絶対検量線を作成して定量した。バジルについては、<sup>1</sup>H-qNMR法及びHPLC法により、rosmarinic acidを同様にして定量した。

### 3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

スピルリナ色素の主成分であるタンパク質フィコシアニンの定量的分析法の開発に向け、各種基礎検討を実施した。すなわち、スピルリナ色素2製品(A及びB)、対照としてクチナシ青色素1製品(C)及びバタフライピー色素1製品(D))を用い、第10版公定書のスピルリナ色素の成分規格の記載に従って、確認試験(1)~(6)に該当する試験を実施した。また、HPLCにより、各製品(A, B, C, D)についてその組成を分析した。

## 3. 分析法及び試験法の開発に関する研究

### 1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価<測定溶媒の最適化>

アントシアニンは溶液の水素イオン濃度(pH)に応じて種々の分子構造をとるため、正確な含量を求めることが困難である。そこで、定量 NMR (qNMR)により正確に定量するための測定溶媒の最適化を検討した。アントシアニンの一種であるシアニジン 3-グルコシド塩酸塩(Cy3G・Cl)を用いて、重溶媒の種類×酸濃度の組み合わせにおける定量値の関係を調べた。<sup>1</sup>H-qNMRには外部標準法(EC)を用いた。すなわち、NMR試料毎に90°パルス幅(pw90)を測定し、この値を反映させて<sup>1</sup>H-qNMR測定を行った。外部標準にはジメチルスルホン(認証純度値:99.9%)を用いた。Cy3Gの定量信号は4位(9 ppm付近)を用いた、重溶媒はD<sub>2</sub>O, methano-*d*<sub>4</sub>, methano-*d*<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O (9:1), DMSO-*d*<sub>6</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O (9:1)を検討した。酸濃度は重溶媒中のTFA-*d*濃度が0~10%となるように添加した。

### 2) 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討~クロロゲン酸類縁体の構造とRMSの関係~

カフェ酸を基準物質とした複数のクロロゲン酸類の定量法を検討した。モノカフェオイルキナ酸(3CQA, 4CQA, 5CQA), 3-*O*-フェルロイルキナ酸(3FQA)及び基準物質に選定したカフェ酸は市販試薬を用いた。モノフェルロイルキナ酸 (4FQA, 5FQA), ジカフェオイルキナ酸(3,5-diCQA, 3,4-diCQA, 4,5-diCQA) 及びフェルロイルカフェオイルキナ酸 (FCQA) 3 種は, 既存添加物「生コーヒー豆抽出物」から単離精製したものをを用いた。HPLC 条件として, 一般的な ODS カラム(4.6 × 250 mm, 粒子径 5 μm)を用い, 移動相に 0.1%ギ酸及び 0.1%ギ酸アセトニトリルの緩やかなグラジエント条件を採用した。各クロロゲン酸類縁体の RMS は, <sup>1</sup>H-qNMR により純度測定した試薬を用い, 横軸に化合物のモル濃度, 縦軸に PDA または UV 検出器のピーク面積をとった回帰直線を作製し, その傾きの比により求めた。

### 3) 既存添加物アナトー色素の定量評価の基礎検討

アナトー色素の主成分であるノルビキシン (norbixin, NBx)及びビキシン(bixin, Bx)の幾何異性体を含めた新たな SR-HPLC 法の開発を検討した。SR 候補化合物は国立医薬品食品衛生研究所有機化学部との共同により検討した。すなわち, 極大吸収波長 450~500 nm で検出できる化合物の合成を検討した。*trans/cis*-NBx, Bx 及び SR の絶対定量は, それぞれ DMSO-*d*<sub>6</sub>に溶解し, DSS-*d*<sub>6</sub>を基準物質として <sup>1</sup>H-qNMR により行った。RMS の算出は, <sup>1</sup>H-qNMR による定量結果を考慮して絶対検量線を作成し, NBx 及び Bx の RMS を, SR に対する NBx 及び Bx の絶対検量線の傾きの比より算出した。なお, 0 μmol/L の

ピーク面積は検量線の原点とした。

### 4) 既存添加物カシアガム中のアントラキノンの分析法に関する研究

<sup>1</sup>H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の適用性の検討として, 測定対象 5 種(エモジン, アロエエモジン, レイン, クリソファン酸, フィシオン)及び基準物質 3 種(ダントロン(1,8-DAQ), カフェイン, メチルパラベン(MHB))の標準溶液(6~8 点濃度)を <sup>1</sup>H-qNMR による純度値または認証値に基づき調製し, 得られた測定対象及び基準物質の検量線の検量線式の傾きの比(測定対象/基準物質)から基準物質に対する測定対象の RMS をそれぞれ算出した。また, JECFA 現行法における前処理法を検証した。JECFA のカシアガムの成分規格で規定されているアントラキノン類分析法の試験溶液の調製手順に従い溶液を調製し, HPLC に供した。また, 前処理法の改良に向け, 加熱時間や抽出効率の検証を実施した。

### 5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

ビスインドリルマレイミド誘導体の効率的な合成として, できる限りカラムクロマトグラフィーによる精製を回避し, 再結晶や洗浄操作のみによる化合物単離を行った。また, *trans*-ビキシン(*trans*-Bx)及び *trans*-ノルビキシン(*trans*-NBx)は, 異性化反応の際の試薬量や温度, 溶媒を検討した。また, リテンションインデックス分子の合成として, 疎水性分子及び水溶性分子のタイプの分子デザインを検討した。

### 6) エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置

## (EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定量法の検討

EDX の公的試験法への導入のため基礎検討をした。試料には主成分が無機物であるケイソウ土及び卵殻焼成カルシウムと主成分が有機物である L-アルギニンを用いた。これらに鉛(Pb)及びヒ素(As)をそれぞれ規格値相当になるように添加したものを添加試料とした。これらの試料及び添加試料中の Pb 及び As 含量を、EDX (EDX-8100, 島津製作所製)を用いて標準添加法により定量した。装置の測定条件は一般的な条件とした。得られた添加試料と試料中の含量から回収率を算出した。

## 7) 菌基原の添加物酵素の基原種同定法の開発及び基原種に関する分類学的情報の収集

より多くの既存添加物製品の基原種を正確に同定するために、「*Bacillus*」, 「*Pycnoporus*」, 「*Sphingomonas*」, 又は「*Trichoderma*」の検索ワードにて抽出したアミノ酸配列を Mascot サーバーにアップロードし、データベースを構築した。過去の研究において取得した各酵素由来のバンドの MALDI-TOF MS スペクトルと構築したデータベースを照合し、タンパク質の同定を行った。また、データベースの有効的な改良を見据えた分類学的情報の収集を行うために、添加物酵素の基原として広く用いられ、かつ分類体系の再構築に伴う菌名の変更の歴史が複雑でありシノニムが多数存在することが知られる *Aspergillus* 属真菌の *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. kawachii* 及び *A. luchuensis* とこれらの近縁種に関する分類学的情報を文献から収集した。

## 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)

令和 6 年(2024 年)2 月に第 10 版食品添加物公定書が公示された時点で、公定書に未収載の既存添加物は、全 357 品目中 99 品目となった(枝番品目は一部でも設定済のとき、その品目の成分規格は設定済とした場合)。その内、第 6 版既存添加物自主規格に収載予定が 65 品目(自主規格 51 品目+暫定規格 11 品目)、また、第 5 版又は第 4 版既存添加物自主規格収載の成分規格に基づいて第 3 者検証を実施した添加物がおよそ 30 品目であった。

### 2. 既存添加物の成分組成に関する研究

#### 1) カロブ色素の成分解析

カロブ色素製品について、HPLC より分析した結果、4つの主ピークが検出された。各ピークの成分を明らかにするため、カラムクロマトグラフィーによる分離精製を試みた結果、ピーク 1 に相当する成分として、4'-dihydrophaseic acid  $\beta$ -D-glucopyranose ester を単離・同定した。また、カロブ色素含有フラボノイドとして入手できた 2 化合物 (schaftoside, isoschaftoside) を用い HPLC 分析した結果、ピーク 4 と schaftoside の保持時間が一致した。また、ピーク 4 の後ろに認められたマイナーピークと isoschaftoside の保持時間が一致した。

#### 2) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

チョウジ(生薬)、クローブ末(市販品)、クロ

ーブ香料, クローブ抽出物, オールスパイス末(市販品)について,  $^1\text{H-qNMR}$  測定により, チョウジ(生薬)中の eugenol 含有率は  $13.01\pm 0.32\%$ , クローブ末(市販品)では  $8.11\sim 14.83\%$ , オールスパイス末(市販品)では  $2.14\sim 2.67\%$  という結果を得た. クローブ末(市販品)の内, 含有率の高いものは生薬と同等であり, 含有率が少ない方は品質が劣るか, あるいは粉末化してから保存時間が長い等の相違があるものと考えられた. クローブ香料の eugenol 含有率は  $81.58\%$  で標品として用いた eugenol 市販試薬ほどではないが高い含有率であった. クローブ抽出物は  $31.93\%$  で, 製品のラベル表示  $38\%$  より低かった. 次に, eugenol 市販試薬について  $^1\text{H-qNMR}$  法により含有率を測定した結果,  $97.34\%$  と見積もられ, この市販試薬の純度表示とほぼ等しかった. この eugenol 市販試薬を標品として HPLC 法により定量分析を行った結果,  $^1\text{H-qNMR}$  法での定量値と極めて近似した値が得られ,  $^1\text{H-qNMR}$  法が HPLC 法の代替法として有効であることが確認できた.

バジル中の rosmarinic acid の  $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量では, 栽培品と市販粉末のうち 1 試料での含有率がそれぞれ  $1.55, 0.31\%$  だったのに対し, 市販粉末 3 試料では rosmarinic acid のシグナルを見つけることができず, 含有率を算出することが出来なかった. HPLC 法により rosmarinic acid の定量を試みたところ,  $^1\text{H-qNMR}$  法で定量された試料ではそれぞれの数値に近似した値が得られた. 一方,  $^1\text{H-qNMR}$  法のスペクトル上に rosmarinic acid のシグナルが認められなかった試料に関しては, 1 試料では rosmarinic acid のピークは全く見られず, 2 試料は rosmarinic acid の保持時間付近に定量下限以下のピー

クが観察された. シソ科の植物であるバジルが rosmarinic acid を殆ど含まないとは考えられないため, 含有量の極端な差は試験に用いたバジルの基原に問題があると考えられた.

### 3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

スピルリナ色素 2 製品(A 及び B), 対照としてクチナシ青色素 1 製品(C)及びバタフライピー色素 1 製品(D))を検討対象として, 第 10 版食品添加物公定書に従って確認試験(1)~(6)を行った. その結果, 確認試験(2)及び(5)の 2 試験においてスピルリナ色素含有製剤製品(A 及び B)を他の色素製品(C 及び D)と判別できたが, 反応は明瞭とは言えず, 定量分析への展開は不可能と考えられた. また, いずれの色素製品においても極大吸収波長は  $620\text{ nm}$  周辺にあることが確認できたため, 次に HPLC によるフィコシアニンの定量的分析法の基礎検討を実施した. 一般的な逆相系カラムを用いた分析時, スピルリナ含有製剤に特徴的なプロファイルが得られたものの, タンパク質に共通して認められる非特異的吸着作用により, 著しいテーリングが認められ, 定量分析に適用することは難しいものと考えられた. タンパク質分析に適切な逆相系カラムを選択し分析を実施した結果, ピーク形状に顕著な改善が認められ, 他製剤由来のピークとも明確に分離することができた.

### 3. 試験法及び分析法の開発に関する研究

#### 1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価<測定溶媒の最適化>

$\text{D}_2\text{O}$  溶媒では TFA-*d* の添加に応じて, 顕著に NMR 試料の pw90 が長くなった.  $\text{D}_2\text{O}$  溶媒中で TFA-*d* が解離し, 水素イオン(正しく

は重水素イオン)濃度が高くなったことが要因と考えられた, このとき Cy3G はフラビリウムイオン型として存在し, 別の構造に由来する NMR 信号は観察されなかった. 一方, methanol- $d_4$  溶媒中ではフラビリウムイオン型とは異なる構造に由来する信号が 6~7 ppm 付近に観察され, 定量値が減少した. これらの信号は, TFA- $d$  の添加量を増やすことにより消失したが, 4 位のやや高磁場側にキノイド型と思われる微小な信号が残った. このときの NMR 試料の pw90 の値は, 無添加の時の pw90 とほとんど変わらなかったことから, methanol- $d_4$  溶媒中で TFA- $d$  が十分に解離していないと考えられた. そこで,  $D_2O$  を 10% になるように添加したところ, TFA- $d$  の解離が促進され, Cy3G はフラビリウムイオン型に収束した. 以上のことから,  $^1H$ -qNMR によりアントシアニンを定量するとき, 添加した酸が十分に解離できる一定量の  $D_2O$  を含む測定溶媒を用いて, フラビリウムイオン型の構造を安定させる必要があるとの知見が得られた.

## 2) 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討~クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係~

モノカフェオイルキナ酸及びジカフェオイルキナ酸では, 構造中で吸収スペクトルへの影響が大きいと思われる発色団のカフェ酸位置や結合数が異なっている. カフェ酸がひとつ結合した 3CQA, 4CQA, 5CQA では, カフェ酸に対する RMS 値はほぼ一致していた. 一方, カフェ酸がふたつ結合した 3,5-diCQA, 3,4-diCQA, 4,5-diCQA では単純に RMS 値が 2 倍になるかと思われたが, 2 倍であったのは 3,5-diCQA のみであり残りの 2

化合物は 1.9 倍程度であった. 3,4-diCQA 及び 4,5-diCQA では, 各化合物のモル吸光係数が結合したふたつのカフェ酸の立体障害等, 何らかの相互作用の影響を受けていると考えられる. 他方, カフェ酸の代わりにフェルラ酸が結合した 4FQA, 5FQA では, モノカフェオイルキナ酸と吸収スペクトル形状は類似していたが RMS 値は 1.1 倍程度であった. さらに, キナ酸にカフェ酸とフェルラ酸が一つずつ結合した FCQA は, diCQA よりも 10% 程大きく, FQA の RMS を 2 倍にした値よりも 4% 程小さかった.

CQA 及び FQA の結果から, ケイ皮酸誘導体のキナ酸への結合数が一つである場合, ケイ皮酸誘導体の化合物種が同じであれば, 同一の RMS を用いても定量値への影響はせいぜい 1% 程度と考えられた. 複数のケイ皮酸誘導体が結合した場合は, 単純にそのケイ皮酸誘導体数の分 RMS が大きくなるとは限らないことが示されたが, 単純に「RMS×ケイ皮酸誘導体数」としても定量値への影響は 10% 程度で収まると考えられた.

## 3) 既存添加物アナトー色素の定量評価の基礎検討

ノルビキシン(NBx)及びビキシン(Bx)標準溶液の HPLC 分析を実施した結果, 純度 91.1%及び 97.0%と分かった. *trans* 体の NBx 及び Bx に関しては, *cis* 体を基に合成を実施した. SR 候補をデザインし, HPLC 分析結果から n-C11 を選択した. それぞれの検量線を作成した結果, 相関係数 0.999 以上となった.  $^1H$ -qNMR を行った結果, 純度は *cis*-NBx は 68.9%, *cis*-Bx は 97.2%, *trans*-NBx は 15.5%, *trans*-Bx は 41.9%, 及び n-C11 は 94.1%であった. また RMS を算出した結果,

*cis*-NBx は 13.7, *cis*-Bx は 11.5, *trans*-NBx は 13.9, *trans*-Bx は 10.2 であった。

#### 4) 既存添加物カシアガム中のアントラキノンの分析法に関する研究

<sup>1</sup>H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の適用性を検討した。各検量線の直線性を評価したところ、測定対象 5 種及び基準物質 3 種の全ての検体の検量線の決定係数は 1.000 と良好であることが確認された。また、化合物ごとに 3 併行の検量線の傾きの平均値の相対標準偏差は 0.6~4.2% であり、検量線の決定係数(直線性)とあわせて評価すると、これらの検量線の傾きの各平均値は RMS の算出に利用可能であることが明らかとなった。また、得られたこれらの検量線の傾きに基づき 3 種の基準物質に対する各測定対象の RMS が明らかとなった。次に、JECFA 現行法における前処理法を検証した。JECFA 現行法について、実試料の分析においても適用可能か否かを検証した結果、すべての試料において、アントラキノン類が溶出する時間帯に広範なブロードなピークが溶出し、現行法では、カシアガム中のアントラキノン類の正確な定量が困難であることが確認された。そこで抽出時の加熱時間に着目し、加熱時間を 1 時間、2 時間、3.5 時間、5 時間としてそれぞれ試験溶液を調製し HPLC に供した結果、加熱時間が短いほど、ブロードなピークは小さくなる傾向が認められた。以上の結果並びに実試料の性状等を考慮し、加熱時間は 1 時間が適切であることが判明した。また、試料の加熱時間を変更(3.5 時間から 1 時間)したことによるカシアガム中のアントラキノン類の抽出効率を検証するため、添加回収試験を行ったところ、回収率が 70%

を下まわる化合物が複数認められた。そこで、抽出回数を 3 回へ変更し検討したところ、n=1 の結果ではあるが、フィシオンの回収率は 78.7%、その他の化合物は 90%以上と回収率が向上することが確認された。従って、測定対象の抽出効率を考慮し、抽出回数の変更の必要性が認められた。

#### 5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

ビスインドリルマレイミド誘導体のスケールアップ合成を行い、再結晶や洗浄操作のみによる化合物単離を行うことで共通中間体を安定した収率にて得ることができた。

また、*trans*-Bx 及び *trans*-NBx への異性化反応においては酸化剤として触媒量(0.1~0.2 当量)のヨウ素の存在下、トルエンやテトラヒドロフランを溶媒とした加熱によって調製できることがわかった。リテンションインデックス分子のデザインとしては、これまでに検討してきた設計方針、すなわち UV 吸収を示す共通化合物ユニットに官能基として直鎖炭化水素基等を導入することで疎水性を変化させ、HPLC クロマトグラム上における溶出位置を制御することが可能であり、疎水性及び親水性分子の両方において適用可能であった。

#### 6) エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定量法の検討

無機物中の元素定量で汎用されるファンダメンタルパラメーター(FP)法では感度が十分ではなかった。また、検量線を用いる方法ではマトリックスを統一することが困難であった。以上の結果をふまえ、標準添加法で

定量することとした。ケイソウ土では、試料及び添加試料のいずれにおいても、関係線の決定係数( $R^2$ )は 0.994 以上となり、良好な直線性を示した。また、回収率(試行回数:3)は Pb で 97.6%, As で 98.1%, 相対標準偏差(RSD)もそれぞれ 2.4 及び 4.6%であり、非常に良好な結果であった。卵殻焼成カルシウムでは、関係線の決定係数( $R^2$ )は 0.90 以上となった。一部の濃度点における繰り返し精度が悪かったが、直線性は認められた。回収率(試行回数:3)は Pb が 84.5%, As が 75.9%, RSD はそれぞれ 17.6%及び 5.9%であった。L-アルギニンでは、関係線の決定係数は 0.992 以上と良好な直線性を示した。また回収率(試行回数:1)は Pb で 88.0%, As は 85.8%と良好であった。以上のように、おおむね良好な結果が得られたが、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの回収率はケイソウ土に比べると低い値であり、特に卵殻焼成カルシウムでは繰り返しの相対標準偏差も大きい値であった。

## 7) 菌基原の添加物酵素の基原種同定法の開発及び基原種に関する分類学的情報の収集

タンパク質のデータベースである UniProt から抽出したアミノ酸配列を用いて独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチの結果、オンラインで実施した場合には同定できなかった *Bacillus circulans* 由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼや *Pycnoporus coccineus* 由来のプロテアーゼの基原を決定することができた。また、複数種の消化酵素を用いた解析では、トリプシンを用いた場合には同定できなかった *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼや *Trichoderma viride* 由来のセルラーゼ

に含まれるタンパク質のバンドを同定することができた。*A. niger* とその近縁種に関する分類学的情報の収集することができた。現在主流の分類体系によれば *A. niger*・*A. tubingensis*・*A. luchuensis* の 3 系統にまとめられるが、過去に分類体系の再構築に伴う菌名変更が繰り返されてきたために、現在でも、これら 3 菌種以外に添加物基原種または SwissProt 等 DB 登録配列の由来種として使用され続けている菌種は多く、*A. awamori*, *A. kawachii*, *A. foetidus* 等がしばしば見られることを把握した。

## E. 結論

### 1. 既存添加物の成分規格に関する研究

#### 1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

第 10 版食品添加物公定書が令和 6 年 2 月に公示された。公定書に未収載の既存添加物 99 品目については、日本食品添加物協会と協力して成分規格(自主規格、検証情報等)、流通実態、安全性情報の収集が必要である。本年度は、成分規格について情報を収集したが、65 品目が第 6 版既存添加物自主規格に今後収載される予定であり、現行の第 5 版又は過去の第 4 版の成分規格に基づいて第 3 者検証が実施されたのはおよそ 30 品目であった。しかし、現在は製造実績が無いこと等が判明しているものもあり、それらを除いた 20 余品目のみが第 11 版公定書改正に向けて成分規格の設定が情報に従って設定可能と考えられ、この内 8 品目については第 11 版公定書の成分規格案として既に検討されている。自主規格や自社規格が未だになく、成分規格に係る情報が得られない品目については、定期的な流通実態の調査結果と合わ

せて消除対象となるような仕組みを今後検討すべきと考えられた。

## 2. 既存添加物の成分組成に関する研究

### 1) カロブ色素の成分解析

カロブ色素製品の HPLC 分析の結果、4 つの主ピークが検出され、そのうち 2 つは同定できた。残り 2 つは schaftoside と同様の UV スペクトルを示しており、関連化合物と考察された。今後、その他のピークに由来する成分を明らかにし、カロブ色素含有成分の解明を目指す予定である。

### 2) qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

チョウジ(生薬)、クローブ末(市販品)、クローブ香料、クローブ抽出物、オールスパイス末中の eugenol について  $^1\text{H}$ -qNMR 法及び HPLC 法で定量分析を行った結果、その定量値は極めて近似しており、 $^1\text{H}$ -qNMR 法がこれらの製品中の eugenol の直接定量法として有効であることが確認できた。また、バジル中の rosmarinic acid の定量分析に  $^1\text{H}$ -qNMR 法が有効であることが確認できた。ただし、製品によって rosmarinic acid の含有量が極端に異なり、市販されているバジルの基原には疑問が残った。

### 3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

フィコシアニンを指標として、スピルリナ色素の HPLC による定量的分析法が構築可能であることが示された。一方で、現行法では凝集等の影響により明瞭なシングルピークは得られていない。今後、直接分析法の更なる条件検討、あるいは必要に応じてトリプシン消化断片の測定検討を実施していく事

で、より正確な定量法の構築を行う予定である。

## 3. 分析法及び試験法の開発に関する研究

### 1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価<測定溶媒の最適化>

Cy3G・Cl を用いて、重溶媒の種類×酸濃度の組み合わせに対する  $^1\text{H}$ -qNMR による定量値の関係を調べた。その結果、 $^1\text{H}$ -qNMR により定量するとき、添加した酸が十分に解離できる一定量の  $\text{D}_2\text{O}$  を含む測定溶媒を用い、フラビリウムイオン型の構造を安定させる必要があるとの知見が得られた。また、EC- $^1\text{H}$ -qNMR でアントシアニンを定量する場合は、EC として用いる標準溶液にもアントシアニン試料と同程度の酸を添加しておくことが望ましいことがわかった。

### 2) 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討～クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係～

本研究で用いた化合物のうち、モノカフェオイルキナ酸以外は市販試薬があるものの非常に高価である。本研究の結果から、同一の発色団をもつ化合物群において、ひとつの化合物の RMS が明らかであれば、発色団の位置や数が異なっても、他の化合物の RMS がある程度予測可能と思われた。

### 3) 既存添加物アナトー色素の定量評価の基礎検討

アナトー色素における NBx 及び Bx の SR-HPLC 定量法を構築した。まず、標品が入手困難である *trans*-NBx 及び *trans*-Bx さらに SR を合成し得ることができた。そして、 $^1\text{H}$ -qNMR により絶対定量を行い、その定量値を

考慮して絶対検量線を作成し、傾きの比から RMS を算出できた。今後、それらの RMS を用いて流通しているアナト一色素製品中の NBx 及び Bx の定量を行い、絶対検量線法で得られる定量値との比較を行う予定である。また同時に、様々な条件下(研究室間、日間、カラム等)における定量値の再現性を確認し、RMS を用いた定量法の適用性を検証する予定である。

#### 4) 既存添加物カシアガム中のアントラキノンの分析手法に関する研究

FAO/WHO 食品添加物専門家会議(JECFA)におけるカシアガムの規格では、安全性の確保の観点から、アントラキノン類(エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸、フィシオン)の含有量は0.5 mg/kg以下と規定されている。これらの定量法としてダントロン(1,8-DAQ)を用いた HPLC による内標準法が規定されている。しかし、測定対象5種の定量用標品について、認証標準物質のような正確な純度が明示された標品の入手はできず、市販試薬をそのまま定量用標品として HPLC 分析に供した場合、定量値の信頼性は保証できない。そこで、<sup>1</sup>H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の適用性並びに JECFA 現行法における前処理法の検証に関する検討を行った。<sup>1</sup>H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の適用性の検討の一環として、本検討において基準物質 3 種に対する測定対象 5 種の各 RMS が判明した。また、JECFA 現行法における前処理法の検証において、加熱時間の変更(3.5 時間から 1 時間)やこれに伴う抽出回数の変更が必要であることが判明した。なお、カシアガム製品(実試料)1 種を用いた検討に

おいて、エモジン及びアロエエモジンのピークの近傍に夾雑成分が観察された。これらは、エモジン及びアロエエモジンの正確な定量を妨害しており、現行の前処理法の改良や HPLC 条件の最適化に向け、他の実試料を同様のピークが観察されるのか否かの検証が必要であると考えられた。さらに、抽出操作(液-液分配)において、エマルジョンが生成し、クロロホルム可溶部(下層)を得るために時間を要することも今回の検討で確認された。また、この抽出操作では有害試薬であるクロロホルムを使用していることから、このような有害試薬の排除も考慮して、前処理法の改良に向けた検討が必要と考えられた。

#### 5) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

カロテノイド類の HPLC 法による定量で利用可能なシングルリファレンス分子として、ビスインドリルマレイミド誘導体の簡便な大量合成経路を確立した。また、アナト一色素である Bx 及び NBx の定量用標品として、幾何異性体である *trans*-Bx 及び *trans*-NBx の異性化反応の条件を検討することで供給した。HPLC におけるリテンションインデックスに利用可能な分子創製の検討として、UV 吸収を示す共通化合物ユニットへの官能基導入により疎水性を変化させ、HPLC クロマトグラム上における溶出位置を制御できた。今後、アイソティック分析条件における適用可否を確認し、化合物構造の最適化等を進める予定である。

#### 6) エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定量法の検討

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

## 7) 菌基原の添加物酵素の基原種同定法の開発及び基原種に関する分類学的情報の収集

独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチ及び複数種の消化酵素を用いた解析は,基原同定の精度を高めることに有用であることが明らかとなった。さらに,データベースに登録する情報を精査すること,並びに酵素製品の付帯情報についても最新の真菌分類学的情報を元に整理する必要があると考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物公定書収載品目における基原生物に使用される学名の考え方とその表記法. 食衛誌, 2023; 64: 77-88.
- 2) Masumoto N., Ohno T., Suzuki T., Togawa T., Sugimoto N: Application of the relative molar sensitivity method using GC-FID to

quantify safranal in saffron (*Crocus sativus* L.). J. Nat. Med., 2023; 77: 829-838.

- 3) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 新井玲子, 杉本直樹, 鈴木梓, 浅野龍二, 五十嵐靖, 三浦亨, 武藤康弘, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 古川茶勲, 嶋田典基, 合田幸広: ブシモノエステルアルカロイドの相対モル感度(RMS)を用いた日本薬局方定量法の検討. 薬学雑誌, 2023; 143: 951-962.
- 4) Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on <sup>1</sup>H-qNMR for khellactone esters from *Peucedanum japonicum* root extract. Food Chem., 2023; 427: 136647.
- 5) Bayrakceken G Z, Saracoglu I, Nagatsu A, Yilmaz M A, Basaran A A: Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from *Prunus mahaleb* L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity. J. Ethnopharmacol., 2023; 310: 116378.
- 6) Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y: Suitability of culture broth and conditions for *Escherichia coli* growth and gas production as a test for food additives in EC broth. Food Hyg. Saf. Sci., 2023; 64: 69-77.
- 7) Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara-Kudo Y, Watanabe M: Determination of the biological origin of enzyme preparations using SDS-

- PAGE and peptide mass fingerprinting. Food Addit. Contam. A, 2023; 40: 711-722.
- 8) 齋藤剛, 杉本直樹: 定量核磁気共鳴(qNMR)法を用いた有機化合物の純度測定に関する国際規格策定. 環境と測定技術, 2023; 50: 13-17.
  - 9) Uchiyama N, Hosoe J, Komatsu T, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Shinozaki T, Kobayashi K, Fujimine Y, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Muto Y, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Quantitative <sup>31</sup>P-NMR for the purity determination of the organophosphorus compound brigatinib and its method validation. Chem. Pharm. Bull., 2024; 72: 36-40.
  - 10) Amakura Y, Uchikura T, Yoshimura M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N: Chromatographic evaluation and characterization of constituents of sunflower seed extract used as food additives. Chem. Pharm. Bull., 2024; 72: 93-97.
- ## 2. 単行本等
- 1) 増本直子, 西崎雄三: 第2章 食品中に含まれる不純物分析の手順, 第6節 RMS法による天然物由来製品の品質評価, 不純物の分析法と化学物質の取り扱い, 技術情報協会(東京), pp.183-192, 2024.
- ## 2. 学会発表等
- ### 2-1. 学会
- 1) 草刈美玖, 西崎雄三, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 谷岡隆, 中室克彦, 中島馨, 石附京子, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: インジゴ法によるオゾン水中のオゾン定量法確立に向けた検討. 日本食品化学学会第29回総会・学術大会(2023.6).
  - 2) 天倉吉章, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹: 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の成分解析(第2報). 日本食品化学学会第29回総会・学術大会(2023.6).
  - 3) 中島馨, 西崎雄三, 草刈美玖, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 谷岡隆, 中室克彦, 石附京子, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 吸光光度法によるオゾン水中のオゾン定量法確立に向けた検討. 日本食品化学学会第29回総会・学術大会(2023.6).
  - 4) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 嶋田典基, 吉田久美, 阿部裕, 杉本直樹: 定量NMRによるアントシアニンの純度測定～測定溶媒の最適化～. 日本食品化学学会第29回総会・学術大会(2023.6).
  - 5) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛: 健康食品中のアントシアニン定量における相対モル感度(RMS)を用いた Single-reference HPLC法の適用について. 日本食品化学学会第29回総会・学術大会(2023.6).
  - 6) 岩崎大剛, 金澤まい, 川本扶佐子, 新穂大介, 村上敏之, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いた single-reference LC法による長命草根由来ケルラクトン類の定量. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第26回総会(2023.7).
  - 7) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 永津明人, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン Single reference-HPLC法によるアナトー色素のビキシシ

- 及びノルビキシンの分析. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回総会(2023.7).
- 8) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛: 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について. 食品科学工学会第 70 回大会(2023.8).
  - 9) 伊藤紫野, 西原秀典, 橋本一浩, 川上裕司, 後藤慶一, 水谷治, 山田修, 清水公德, 伴さやか, 矢口貴志, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指標を用いた型別. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会(2023.10).
  - 10) 阿部 裕, 増本直子, 西崎雄三, 窪崎敦隆, 杉本直樹: 既存添加物に関する国立衛研の最近の取り組み、日本食品衛生学会第 119 回学術講演会(2023.10).
  - 11) 岩崎大剛, 金澤まい, 川本扶佐子, 新穂大介, 村上敏之, 西崎雄三, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いた機能性成分の定量分析例: 長命草根由来ケルラクトン類. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
  - 12) 石附京子, 西崎雄三, 杉本直樹, 山崎太一, 三浦亨, 武藤康弘, 岩本芳明, 吉田浩祐, 澤竜一, 久保田由美子, 加藤毅, 笛木周平, 山本佳奈, 小松功典, 朝倉克夫, 松熊伸也, 吉村弘伸, 末松孝子: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR)共同試験の結果報告. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
  - 13) 加藤千穂, 西崎雄三, 大槻崇, 松藤寛, 阿部裕, 多田敦子, 杉本直樹: qNMR におけるピーク高さ法の検討: naringin の場合. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
  - 14) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, <sup>1</sup>H-定量 NMR に基づいた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニン定量について, 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
  - 15) 建部千絵, 藤原由美子, 久保田浩樹, 多田敦子, 杉本直樹: qNMR を用いた食用タール色素成分規格で使用される不純物定量用試薬の純度測定. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
  - 16) Sensoy M, Kutluay V M, Nagatsu A, Saracoglu I: Isoflavonoids from *Vuralia turcica* (Kit Tan, Vural & Kucukoduk) Uysal & Ertugrul. 日本薬学会第 144 年会(2024.3).
- ## 2-2. 講演等
- 1) Sugimoto N: A new approach to obtain accurate quantitative values by qNMR and chromatography. International Symposium in Okinawa, 2023, on Ciguatera and Related Marine Biotoxins (2023.11).
  - 2) Masumoto N: A new quantitative method of lutein in foods without its analytical standard. International Workshop for “Functional Substances in Agricultural Products” (2023.11).
  - 3) 西崎雄三: <sup>1</sup>H スピン情報にによる化学物質のデジタルリファレンススタンダード(dRS)化: dRS を基準にした qNMR. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
  - 4) 増本直子: 相対モル感度(RMS)を用いた定量法, 室間共同試験をしてみたら. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).

5)

**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)

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5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～

業務受託者 脊黒勝也 一般社団法人日本食品添加物協会 専務理事

**研究要旨** 本研究は、既存添加物の品質確保に資する分析法開発のため、1. 既存添加物の成分規格（公定書案，自主規格案，自社規格等），2. 既存添加物の流通・使用実態，3. 既存添加物の国内外の安全性評価情報，について3年間を1サイクルとして調査を行うものであり，初年度に1，2年目に2，3年目に3について調査し，3年目に総合報告書を作成するものである。本年度は，1. 既存添加物の成分規格（公定書案，自主規格案，自社規格等）について調査を行った。

既存添加物357品目については，第10版食品添加物公定書（案）に，部分規格7を含む45の成分規格が新規収載された。数え方により若干の差はあるが，現段階でおよそ100品目の成分規格が未設定の状況である。一方，令和5（2023）年6月から9月にかけて実施された第5次既存添加物消除に向けた候補78品目の販売等調査では，消除予定添加物となり得る品目の範囲として，品質を保証する成分規格（自社または自主規格）が定められていない品目などが示された。

当協会は，これまで既存添加物について食品添加物公定書新規収載成分規格案を策定するとともに，既存添加物自主規格を運用し見直し等を継続してきた。このたび第10版食品添加物公定書の作成が見込まれることから，令和6年度に第6版既存添加物自主規格を策定することとし，令和5（2023）年12月時点の収載予定品目の自主規格についても整理し，とりまとめた。

研究協力者

藤井結花 （一社）日本食品添加物協会  
常務理事

した品目について，5項目（①担当部会（弊会の担当部会），②用途，③コード番号，④既存添加物番号，④品目名）でまとめた。これらの成分規格案は，第6版既存添加物自主規格に収載する。

## A. 研究方法

(1) 既存添加物成分規格案の整備状況

第9版食品添加物公定書（追補1，追補2を含む）未収載品について，令和5（2023）年12月時点での成分規格設定・検討状況を8項目

①第10版食品添加物公定書（案）収載品目，②第11版成分規格案作成済品目，③第6版既存添加物自主規格収載見込みがある品目，④第5版既存添加物自主規格収載品目，⑤第4版既存添加物収載品目，⑥成分規格案の作成における参考事項，⑦第3者検証を実施した年度及び項目，⑧自社検証を実施した年度及び項目）でまとめた。

(2) 第11版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目

令和5（2023）年12月までに，第11版食品添加物公定書新規収載成分規格案を作成・検討

(3) 第6版既存添加物自主規格収載予定品目  
第5版既存添加物自主規格収載品目のうち，第10版食品添加物公定書収載品目，前項(2)を除く品目につき，第6版既存添加物自主規格に自主規格として収載すべきもの，事業者不在等で暫定規格にすべきものを調査した。また，第4版既存添加物自主規格収載品目のうち意図せず第5版未収載となったオレンジ色素，ブラジルカンゾウ抽出物の第6版での扱い，ならびに，第6版新規収載要望の有無を調査した。

(4) 海外の食品添加物規格の有無について

第10版食品添加物公定書（案）未収載の既存添加物のうち，成分規格策定の参考となる海外の食品添加物規格の有無について調査した。

(5) 調査研究者

これら評価・検討は自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーで実施した。

## B. 研究結果

(1) 既存添加物成分規格案の整備状況

令和5（2023）年12月時点での整備状況について、まとめた結果を表1に記した。

分類した8項目について規格数を以下に示す。

①第10版公定書案収載	：	45
②第11版公定書成分規格案作成済	：	8
③第6版既存添加物自主規格収載予定	：	65
自主規格として収載	：	51
暫定規格として収載(※1)	：	11
※1 第5版自主規格で意図せず欠落した2品を含む規格案を検討中のもの	：	3
④第5版既存添加物自主規格収載	：	99
自主規格として収載	：	93
暫定規格として収載	：	6
(削除したもの(※2))	：	4)
※2 日添協担当部会は消除対象と判断(意図せず欠落したもの	：	2)
⑤第4版既存添加物自主規格収載	：	79
自主規格として収載	：	75
暫定規格として収載	：	4
⑥成分規格案の作成における参考事項	：	60
⑦第3者検証を実施した年度及び項目	：	73
⑧自社検証を実施した年度及び項目	：	41

(2) 第11版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目

令和5（2023）年12月までに、新規収載成分規格案を作成・検討したものは、既存添加物8規格であった。概要を表2にまとめた。

(3) 第6版既存添加物自主規格収載予定品目

令和5（2023）年12月時点で、第6版既存添加物自主規格に収載予定品目は、前項(2)の品目を含め既存添加物64品目、一般飲食物添加物20品目である。それらの品目名を表3にまとめた。

(4) 海外の食品添加物規格の有無について

調査結果を表4に記した。

(5) 調査研究者

既存添加物、一般飲食物添加物の成分規格を検討した自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーを表5に記した。

## C. 考察

第10版食品添加物公定書公表時点で、まだ公定書に成分規格が収載されていない添加物およそ100のうち、過去に、第5版もしくは第4版既存添加物自主規格収載の成分規格に基づいて第3者検証を実施した添加物がおよそ30品目ある。そのうち、現在は製造実績が無いことなどが判明しているものを除いた20余品目が、第11版公定書収載をめざす第一グループと位置付けられる。これらについて、計画的な成分規格案の検討、データ収集が必要となる。

他方、第5版自主規格の設定がなかった品目については、弊会において部会の協力、会員への直接的な呼びかけ等の結果、会員が規格案の検討を開始したのがあり、更なる上乘せが期待される。そのほか、弊会以外では、事業者成分規格を策定する人員や力量が不足しているため検討できないもの、業許可や食品衛生管理者の問題などから公定書収載を希望しないものなどがあり、これらについては、食品衛生上のリスク管理の観点から、多様な施策対応が望まれる。

## 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杉本直樹部長、阿部裕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。



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, △：検討・対応中, 暫：暫定規格, 落：意図せず欠落した規格, 除：削除した暫定規格, -：収載なし又は収載予定なし)								
					食品添加物公定書			自主規格			参考事項	検証項目	
					第11版成分規格案の作成	第10版公定書収載	第6版	第5版	第4版	第3者		自社	
4	増粘安定剤	13	E00013	アマシードガム		○	○	○		規格案再検討	H31 全項目		
4	増粘安定剤	19	E00019	アラビノガラクトタン		○	○	○			H31 全項目		
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	
4	増粘安定剤	52	E00054	カシアガム		○	○	○			H30 全項目		
4	増粘安定剤	60	E00065	ユウケマ藻末		-	-	-		規格情報なし			
4	増粘安定剤	81	E00086	キチン		○	○	○			H30 全項目		
4	増粘安定剤/製造用剤	83	E00088	キトサン		○	○	○			H30 全項目		
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	
4	増粘安定剤	102	E00108	グルコサミン	○		○	○			H27 全項目		
4	増粘安定剤/製造用剤	141	E00149	サバクヨモギシードガム	○		○	○			H30 全項目	H29 全項目	
4	増粘安定剤	224	E00243	トコロアオイ		○	○	○			H30 全項目		
4	増粘安定剤	252	E00271	フアーセラレン		○	○	○			H30 全項目		
4	増粘安定剤	329	E00354	モモ樹脂		○	○	○			H30 全項目		
5	酸化防止剤	57	E00059	カラキン	△		○	○			H29 全項目		
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	
5	酸化防止剤	91	E00097	グアヤク脂		○	○	○					
5	酸化防止剤	93	E00099	クエルセチン	○		○	○			H30 全項目	H31 全項目	
5	酸化防止剤/日持	112	E00119	クローブ抽出物		暫	暫	○					
5	酸化防止剤	126	E00134	酵素分解リンゴ抽出物		-	-	-		規格情報なし			
5	酸化防止剤	132	E00140	ゴマ油不けん化物		○	○	○					
5	酸化防止剤	137	E00145	コメヌカ酵素分解物		-	-	-		規格情報なし			
5	酸化防止剤	169	E00185	精油除去ウイキョウ抽出物	○		-	-			R3 全項目	R3 全項目	
5	酸化防止剤	173	E00189	セージ抽出物		-	-	-		規格情報なし			
5	酸化防止剤	191	E00207	単糖・アミノ酸複合物	○		○	○			R3 全項目	R4-R5 全項目	
5	酸化防止剤	197	E00216	チャ抽出物	○		○	○				H31 全項目	

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, △：検討・対応中, 暫：暫定規格, 落：意図せず欠落した規格, 除：削除した暫定規格, -：収載なし又は収載予定なし)							
					食品添加物公定書			自主規格			検証項目	
					第11版成 分規格案 の作成	第10版公 定書収載	第6版	第5版	第4版	参考事項	第3者	自社
5	酸化防止剤	227	E00246A	生コーヒー豆抽出物 (ペースト品, 液体品)	○			○			H31 全項目	R3 全項目
5	酸化防止剤	227	E00246B	生コーヒー豆抽出物 (粉末品)				-		規格情報なし	H28 全項目	H29.30 全項目
5	酸化防止剤	250	E00269	ヒマワリ種子抽出物	○			○			H28 全項目	H30 全項目
5	酸化防止剤	270	E00290	プロポリス抽出物				-				
5	酸化防止剤	299	E00319	没食子酸	○			○			H28 全項目	H30 全項目
5	酸化防止剤	321	E00346	メラロイカ精油				-		規格情報なし		
5	酸化防止剤	348	E00372	ルチン (抽出物)	○			-				
5	酸化防止剤	357	E00385	ローズマリー抽出物	○			○			H31 全項目	
6	カラムベ-ス/光沢 剤	35	E00036	ウルシロウ	○			○			H30 全項目	H31 (酸化, 融点)
6	カラムベ-ス	41	E00042	オゾケライト				暫				
6	カラムベ-ス	92	E00098	グアヤク樹脂				○				
6	カラムベ-ス	97	E00103	グッタハンカン				○				
6	カラムベ-ス	98	E00104	グッタペルカ				○				
6	カラムベ-ス	134	E00142	ゴム	○			○			H31 全項目	R4 全項目
6	カラムベ-ス	135	E00143	ゴム分解樹脂				-		規格情報なし		
6	カラムベ-ス/光沢 剤	138	E00146	コメヌカロウ				○			H29 全項目	
6	カラムベ-ス/光沢 剤	140	E00148	サトウキビロウ	○			○			H30 全項目	
6	カラムベ-ス/光沢 剤	147	E00158	シェラックロウ	○			○			H31 全項目	
6	カラムベ-ス	149	E00160	ジュエルトシ	○			○			H31 全項目	H29 全項目
6	カラムベ-ス	180	E00196	ソルバ				除		自主規格削除		
6	カラムベ-ス	181	E00197	ソルビンハ				除		自主規格削除		
6	カラムベ-ス	194	E00213	チクル	○			○			H31 全項目	H29 全項目
6	カラムベ-ス	198	E00217	チルテ				-				
6	カラムベ-ス	200	E00219	ツヌー				-		規格情報なし		
6	カラムベ-ス	203	E00222	低分子ゴム				除		自主規格削除		

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, △：検討・対応中, 暫：暫定規格, 落：意図せず欠落した規格, 除：削除した暫定規格, -：収載なし又は収載予定なし)								
					食品添加物公定書			自主規格			参考事項	検証項目	
					第11版成分規格案の作成	第10版公定書収載	第6版	第5版	第4版	第3者		自社	
6	甘味料等	230	E00249	ニガーグッタ			-	-	-	規格情報なし			
6	甘味料等	275	E00294	粉末モミガラ			-	-	-	規格情報なし			
6	甘味料等	288	E00308	ベネズエラチクル			-	-	-	規格情報なし			
6	甘味料等	300	E00320	ホホバロウ			暫	○	○		R2, R3 全項目		
6	甘味料等	305	E00325	マスチック			暫	○	○		H31 全項目		
6	甘味料等	306	E00326	マッサランドバチョコロート			-	-	-	規格情報なし			
6	甘味料等	307	E00327	マッサランドババラタ			除		暫	自主規格削除			
6	甘味料等	314	E00339	ミルラ		○	○	○	-		H31 全項目	H29 全項目	
6	甘味料等/光沢剤	326	E00351	モクロウ		○	○	○	○		H30 全項目		
6	甘味料等	351	E00378	レッチュデバカ			-	-	-	規格情報なし			
6	甘味料等	355	E00383	ロシデインハ			-	-	-	規格情報なし			
6	甘味料等	356	E00384	ロシン		○	○	○	○		H30 全項目	H29 全項目	
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	
9	苦味料等	84	E00089	キナ抽出物			-	-	-	規格情報なし			
9	苦味料等	85	E00090	キハダ抽出物			-	-	-	規格情報なし			
9	苦味料等	117	E00126	ゲンチアナ抽出物		○	○	○	-		H29 全項目	H29・30 全項目	
9	苦味料等	121	E00130	酵素処理ナリンジン			○	○	○		R2 全項目	R2 全項目	
9	苦味料等	156	E00167	ジャマイカカツシア抽出物		○	○	○	○		H28 全項目	H28 全項目	
9	調味料	177	E00193	粗製海水塩化カリウム		○	○	○	○		R2 全項目	R3 全項目	
9	苦味料等	204	E00223	テオブロミン			-	-	-	規格情報なし			
9	苦味料等	231	E00250	ニガヨモギ抽出物			暫	○	○				
9	苦味料等	350	E00377A	レイシ抽出物(子実体)		○	○	○	○		H30 全項目		
9	苦味料等	350	E00377B	レイシ抽出物(培養液)			-	-	-	規格情報なし			
10	乳化剤	124	E00386	酵素処理レシチン		○	○	○	○		H26 全項目		
10	乳化剤	167	E00183	スフィンゴ脂質	△		○	○	○		R3 全項目	R5 全項目	
10	乳化剤	182	E00198	ダイズサポニン		○	○	○	○				
10	乳化剤	190	E00206	胆汁末			暫	○	○	事業者なし			
13	製造用剤	9	E00009	アスペルギルスステウス糖たん白質		○	○	○	○		H31 全項目		

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, △：検討・対応中, 暫：暫定規格, 落：意図せず欠落した規格, 除：削除した暫定規格, -：収載なし又は収載予定なし)							
					食品添加物公定書			自主規格			検証項目	
					第11版成 分規格案 の作成	第10版公 定書収載	第6版	第5版	第4版	参考事項	第3者	自社
13	製造用剤	29	E00030	イナワラ灰抽出物			-	-	-	規格情報なし		
13	製造用剤	42	E00043	オゾン			○	○	-			
13	製造用剤	43	E00044	オレゴララクチュロン酸			-	-	-	規格情報なし		
13	製造用剤	45	E00047	オレガノ抽出物			-	-	-	規格情報なし		
13	製造用剤	47	E00049	海藻灰抽出物	△		○	○	-		R3全項目	R4全項目
13	製造用剤	51	E00053	花こう斑岩			○	○	○		R4全項目	
13	製造用剤	99	E00105	クリストバル石			-	-	-	規格情報なし		
13	製造用剤	115	E00122	くん液		○		○	○		H31全項目	R3全項目
13	製造用剤	118	E00127H	高級脂肪酸 (カプリル酸, カプリン酸, ステアリン酸, パルミチン酸, ベヘン酸, シスチン酸, テラリン酸以外)			-	-	-			
13	製造用剤	133	E00141	ゴマ柄灰抽出物			-	-	-			
13	製造用剤	144	E00152	酸素			○	○	-			
13	製造用剤	150	E00161D	分岐シクロデキストリン (粉末品)		○		○	○		R2全項目	
13	製造用剤	150	E00161E	分岐シクロデキストリン (粉末品・液体品統合版)	○		○	-	-			R5全項目 (液体品)
13	製造用剤	153	E00164	シソ抽出物			○	○	-			
13	製造用剤/強化剤	158	E00170	うに殻焼成カルシウム		○		-	-	規格情報なし	H27全項目	
13	製造用剤/強化剤	158	E00173	造礁サンゴ焼成カルシウム		○		-	-	規格情報なし	H27全項目	
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
13	製造用剤	163	E00179	水素			-	-	-			
13	製造用剤	171	E00187	ゼイン			△	-	-	規格案再検討	R2全項目	
13	製造用剤	172	E00188	ゼオライト			-	-	-	規格情報なし		
13	製造用剤	174	E00190	セピオライト			-	-	-	規格情報なし		
13	製造用剤	179	E00195	ソバ柄灰抽出物			-	-	-	規格情報なし		
13	製造用剤	193	E00210	柿タンニン			○	○	○			
13	製造用剤	193	E00212	ミモザタンニン			○	○	-		R4全項目	

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, △：検討・対応中, 暫：暫定規格, 落：意図せず欠落した規格, 除：削除した暫定規格, -：収載なし又は収載予定なし)										
					食品添加物公定書			自主規格			参考事項	検証項目			
					第11版成分規格案の作成	第10版公定書収載	第6版	第5版	第4版	第3者		自社			
13	製造用剤	195	E00214	窒素			○	○	-						
13	製造用剤	196	E00215	チャ乾留物			○	○	○						
13	製造用剤/強化剤	207	E00226	鉄			○	○	-						
13	製造用剤	209	E00228	銅			-	-	-						
13	製造用剤	222	E00241	トレハロース		○	○	○	○				H27 全項目		R3 全項目
13	製造用剤	226	E00245	ナフサ			-	-	-						
13	製造用剤	232	E00251	ニッケル			○	○	○						
13	製造用剤	234	E00253	ばい煎コメヌカ抽出物			○	○	-				H30 全項目		H31 全項目
13	製造用剤	235	E00254	ばい煎ダイズ抽出物			暫	○	-				H30 全項目		H31 全項目
13	製造用剤	237	E00256	白金			-	-	-						
13	製造用剤	241	E00260	パラジウム			-	-	-						
13	製造用剤	244	E00263	ヒアルロン酸		○	○	○	○				H28 全項目		
13	製造用剤	251	E00270	ひる石			-	-	-						
13	製造用剤	257	E00276	フィチン (抽出物)		○	○	○	○				H30 全項目		
13	製造用剤	260	E00280	ブタン			○	○	-						
13	製造用剤	269	E00289	プロパン			○	○	-						
13	製造用剤	290	E00310	ヘプタン		○	○	○	○				H26 全項目		
13	製造用剤	295	E00315	ヘリウム			○	○	-						
13	製造用剤/強化剤	311	E00332	貝殻未焼成カルシウム			○	○	○				H27 全項目		
13	製造用剤/強化剤	311	E00333	骨未焼成カルシウム			△	-	-						
13	製造用剤/強化剤	311	E00335	真珠層未焼成カルシウム			-	-	-						
13	製造用剤/強化剤	311	E00336	卵殻未焼成カルシウム			○	○	○				H27 全項目		
13	製造用剤	320	E00345	メバロン酸		○	○	○	○				H28 全項目		
13	製造用剤	324	E00349	木材チップ			○	○	-						
13	製造用剤	325	E00350	木炭			○	○	-						

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, △：検討・対応中, 暫：暫定規格, 落：意図せず欠落した規格, 除：削除した暫定規格, -：収載なし又は収載予定なし)									
					食品添加物公定書			自主規格				参考事項	検証項目	
					第11版成分規格案の作成	第10版公定書収載	第6版	第5版	第4版	第3者	自社			
13	製造用剤	327	E00352	木灰			○	○	-					
13	製造用剤	328	E00353	木灰抽出物			○	○	-					
13	製造用剤	346	E00370	リンターセルロース			-	-	-	規格情報無				
13	製造用剤	349	E00376	ルテニウム			○	○	-					
14	香料抽出物	119	E00128	香料抽出物		○		-	-					

表2 第11版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目

部会	コード番号	既存添加物番号	用途	品目名
2	E00093	087	着色料・製造用剤	金*
2	E00094	088	着色料・製造用剤	銀*
5	E00207	191	酸化防止剤	単糖・アミノ酸複合物
6	E00142	134	ガムベース	ゴム
13	E0161D	150	製造用剤	分岐シクロデキストリン (粉末品・液体品統合版)
13	E00049	47	製造用剤	海藻灰抽出物
5	E00059	57	酸化防止剤	カテキン
10	E00183	167	乳化剤	スフィンゴ脂質

\*第10版食品添加物公定書検討会において、成分規格自体は設定済であり再度審議しない品目。

表3 第6版既存添加物自主規格収載予定品目

【既存添加物】	
アウレオバシジウム培養液	単糖・アミノ酸複合物
アマシードガム	窒素
アラビノガラクトン	チャ乾留物
アルミニウム	鉄
オゾケライト	トロロアオイ
オゾン	ニガヨモギ抽出物
オレンジ色素	ニッケル
貝殻未焼成カルシウム	ばい煎コメヌカ抽出物
海藻灰抽出物	ばい煎ダイズ抽出物
柿タンニン	ヒマワリ種子抽出物
花こう斑岩	ファーセララン
カシアガム	ファフィア色素
カテキン	ブタン
キチン	ブドウ果皮抽出物
キトサン	ブラジルカンゾウ抽出物
金	プロパン
銀	分岐シクロデキストリン（粉末品・液体品統合版）
グアヤク脂	ペカンナッツ色素
グアヤク樹脂	ヘリウム
グッタハンカン	ホホバロウ
グッタペルカ	マスチック
クローブ抽出物	ミモザタンニン
酵素処理ナリンジン	ムラサキヤマイモ色素
骨未焼成カルシウム	モウソウチク乾留物
ゴマ油不けん化物	モウソウチク抽出物
ゴム	木材チップ
酸素	木炭
シソ抽出物	木灰
スフィンゴ脂質	木灰抽出物
ゼイン	モモ樹脂
ダイズサポニン	卵殻未焼成カルシウム
胆汁末	ルテニウム

【一般飲食物添加物】	
アカゴメ色素	ノリ色素
アカジャガイモ色素	ハイビスカス色素
アカダイコン色素	パープルキャロット色素
イカスミ色素	ブドウ果汁色素
エルダーベリー色素	ブラックベリー色素
カンゾウ末	ブルーベリー色素
クランベリー色素	ボイセンベリー色素
サフラン色素	ホワートルベリー色素
シソ色素	ラズベリー色素
チコリ色素	レッドカーラント色素

表 4 第 10 版 食品添加物公定書未収載品目の海外食品添加物規格の有無

部 会	用途分類	既存 添加 物 番号	コード 番号	規格名称	海外の食品添加物規格の有無 「有り」：規格あり, 「なし」：規格なし 規格あり, 規格なしとも付帯条件等がある場合はカッコ書き等で記す 類似物質, 別名, 部分規格などがある場合は, 規格名称 (または添加物名) 記す				
					J E C F A	F C C	E U	備 考	英名 (参考)
1	甘味料	165	E00181	ステビア末	なし	なし	なし		Powdered stevia
1	甘味料	264	E00284	ブラジルカンゾウ抽出物	なし	なし	なし		Brazilian licorice extract
2	着色料	24	E00024	アルミニウム	Aluminium powder	なし	有り		Aluminium
2	着色料	46	E00048	オレンジ色素	なし	なし	なし		Orange colour
2	着色料/製造用剤	87	E00093	金	なし	有り	有り		Gold
2	着色料/製造用剤	88	E00094	銀	なし	有り	有り		Silver
2	着色料	113	E00120	クロロフイリン	なし	なし	有り		Chlorophyllin
2	着色料	253	E00272	ファフイア色素	なし	なし	なし		Phaffia colour
2	着色料	276	E00295	ペカンナッツ色素	なし	なし	なし		Pecan nut colour
2	着色料	317	E00342	ムラサキヤママイモ色素	なし	なし	ANTHOCYANINS		Purple Sweet Potato Color
2	着色料	354	E00382	ログウッド色素	なし	なし	なし		Logwood colour
3	製造用剤/日持	111	E00117	グレープフルーツ種子抽出物	なし	なし	なし		Grapefruit seed extract
3	製造用剤/日持	157	E00168	ショウガ抽出物	なし	Spice Oleoresins (Oleoresin Ginger)	なし		Ginger extract
3	製造用剤/日持	262	E00282	ブドウ果皮抽出物	有り	有り	なし		Grape Skin Color, Grape Skin Extract
3	製造用剤/日持	322	E00347	モウソウチク乾留物	なし	なし	なし		Mousouchiku dry distillate
3	製造用剤/日持	323	E00348	モウソウチク抽出物	なし	なし	なし		Mousouchiku extract
4	増粘安定剤	1	E00001	アウレオバシジウム培養液	なし	なし	なし		Aureobasidium cultured solution
4	増粘安定剤	13	E00013	アマシードガム	なし	なし	なし		Linseed gum
4	増粘安定剤	19	E00019	アラビノガラクトン	なし	有り	なし		Arabino galactan
4	増粘安定剤	52	E00054	カシアガム	有り (暫定)	なし	有り		Cassia gum

部会	用途分類	既存 添加 物 番号	コード 番号	規格名称	海外の食品添加物規格の有無 「有り」：規格あり, 「なし」：規格なし 規格あり, 規格なしとも付帯条件等がある場合はカッコ書き等で記す 類似物質, 別名, 部分規格などがある場合は, 規格名称 (または添加物名) 記す				
					J E C F A	F C C	E U	備考	英名 (参考)
4	増粘安定剤	60	E00065	ユーケマ藻末	Carrageenan	Carrageenan	CARRAGEENAN		Powdered red algae, Carrageenan
4	増粘安定剤	81	E00086	キチン	なし	なし	なし		Chitin
4	増粘安定剤/製 造用剤	83	E00088	キトサン	なし	有り	なし		Chitosan
4	増粘安定剤	224	E00243	トロロアオイ	なし	なし	なし		Tororoaoi, Abelmoschus manihot
4	増粘安定剤	252	E00271	ファーセシラン	Carrageenan	有り	CARRAGEENAN		Furcellaran
4	増粘安定剤	329	E00354	モモ樹脂	なし	なし	なし		Peach gum
5	酸化防止剤	57	E00059	カテキン	なし	なし	なし		Catechin
5	酸化防止剤	91	E00097	グアヤク脂	有り	なし	なし		Guaiac resin, guajac
5	酸化防止剤/日 持	112	E00119	クローブ抽出物	なし	なし	なし		Clove extract
5	酸化防止剤	126	E00134	酵素分解リンゴ抽出物	なし	なし	なし		Enzymatically decomposed apple extract
5	酸化防止剤	132	E00140	ゴマ油不けん化物	なし	なし	なし		Sesame seed oil unsaponified matter
5	酸化防止剤	137	E00145	コメヌカ酵素分解物	なし	なし	なし		Enzymatically decomposed rice bran
5	酸化防止剤	173	E00189	セージ抽出物	なし	なし	なし	FCCに Sage Oil は有り	Sage extract
5	酸化防止剤	191	E00207	単糖・アミノ酸複合物	なし	なし	なし		Amino acid-sugar reaction product, Maillard reaction, amino-carbonyl reaction
5	酸化防止剤	227	E00246B	生コーヒー豆抽出物 (粉末 品)	なし	なし	なし		Coffee bean extract

部会	用途分類	既存 添加 物 番号	コード 番号	規格名称	海外の食品添加物規格の有無 「有り」：規格あり, 「なし」：規格なし 規格あり, 規格なしとも付帯条件等がある場合はカッコ書き等で記す 類似物質, 別名, 部分規格などがある場合は, 規格名称 (または添加物名) 記す				
					JECFA	FCC	EU	備考	英名 (参考)
5	酸化防止剤	250	E00269	ヒマワリ種子抽出物	なし	なし	なし	FCCに Sunflower Oil (Unhydrogenate d)は有り	Sunflower seed extract
5	酸化防止剤	270	E00290	プロポリス抽出物	なし	なし	なし		Propolis extract
5	酸化防止剤	321	E00346	メラロイカ精油	なし	なし	なし		Melaleuca oil
6	カムベ-ス	41	E00042	オゾケライト	なし	なし	なし		Ozokerite
6	カムベ-ス	92	E00098	グアヤク樹脂	なし	なし	なし		Guajac resin (extract)
6	カムベ-ス	97	E00103	グッタハンカン	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Gutta hang kang
6	カムベ-ス	98	E00104	グッタペルカ	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Gutta percha
6	カムベ-ス	134	E00142	ゴム	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Rubber
6	カムベ-ス	135	E00143	ゴム分解樹脂	なし	なし	なし		Resin of depolymerized natural rubber
6	カムベ-ス	180	E00196	ソルバ	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Sorva, Leche caspi
6	カムベ-ス	181	E00197	ソルビンハ	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Sorvinha
6	カムベ-ス	198	E00217	チルテ	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Chilte

部会	用途分類	既存 添加 物 番号	コード 番号	規格名称	海外の食品添加物規格の有無 「有り」：規格あり, 「なし」：規格なし 規格あり, 規格なしとも付帯条件等がある場合はカッコ書き等で記す 類似物質, 別名, 部分規格などがある場合は, 規格名称 (または添加物名) 記す				
					JECFA	FCC	EU	備考	英名 (参考)
6	カクハース	200	E00219	ツヌー	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Tunu
6	カクハース	203	E00222	低分子ゴム	なし	なし	なし		Depolymerized natural rubber
6	カクハース	230	E00249	ニガーグッタ	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Niger gutta
6	カクハース	275	E00294	粉末モミガラ	なし	なし	なし		Powdered rice hulls
6	カクハース	288	E00308	ベネズエラチクル	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Venezuelan chicle
6	カクハース	300	E00320	ホホバロウ	なし	なし	なし		Jojoba wax
6	カクハース	305	E00325	マスチック	なし	なし	なし		Mastic gum
6	カクハース	306	E00326	マッサランドババチョコレート	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Massaranduba chocolate
6	カクハース	307	E00327	マッサランドバババラタ	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Massaranduba balata
6	カクハース	351	E00378	レッチュデバカ	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Leche de vaca
6	カクハース	355	E00383	ロシデインハ	なし	Masticatory Substances, Natural	なし		Rosidinha
9	苦味料等	84	E00089	キノ抽出物	なし	なし	なし	JECFA に Quinine Hydrochloride, Quinine Sulfate は有り.	Redbark cinchona extract

部会	用途分類	既存 添加 物 番号	コード 番号	規格名称	海外の食品添加物規格の有無 「有り」：規格あり, 「なし」：規格なし 規格あり, 規格なしとも付帯条件等がある場合はカッコ書き等で記す 類似物質, 別名, 部分規格などがある場合は, 規格名称 (または添加物名) 記す				
					JECFA	FCC	EU	備考	英名 (参考)
9	苦味料等	85	E00090	キハダ抽出物	なし	なし	なし		Phellodendron bark extract
9	苦味料等	121	E00130	酵素処理ナリンジン	なし	なし	なし		Enzymatically modified naringin
9	苦味料等	204	E00223	テオブロミン	なし	なし	なし		Theobromine
9	苦味料等	231	E00250	ニガヨモギ抽出物	なし	なし	なし		Absinth extract
9	苦味料等	350	E00377B	レイシ抽出物 (培養液)	なし	なし	なし		Mannentake extract
10	乳化剤	167	E00183	スフィンゴ脂質	なし	なし	なし		Sphingolipid
10	乳化剤	182	E00198	ダイズサポニン	なし	なし	なし		Soybean saponin
10	乳化剤	190	E00206	胆汁末	なし	Ox Bile Extract	なし	JECFA に Desoxycholic acid, Cholic acid は有り	Powdered bile
13	製造用剤	29	E00030	イナワラ灰抽出物	なし	なし	なし		Rice straw ash extract
13	製造用剤	42	E00043	オゾン	なし	有り	なし		Ozone
13	製造用剤	43	E00044	オリゴガラクチュロン酸	なし	なし	なし		Oligogalacturonic acid
13	製造用剤	45	E00047	オレガノ抽出物	なし	なし	なし		Oregano extract
13	製造用剤	47	E00049	海藻灰抽出物	なし	なし	なし		Seaweed ash extract
13	製造用剤	51	E00053	花こう斑岩	なし	なし	なし		Granite porphyry
13	製造用剤	99	E00105	クリストバル石	なし	なし	なし		Cristobalite
13	製造用剤	133	E00141	ゴマ柄灰抽出物	なし	なし	なし		Sesame straw ash extract
13	製造用剤	144	E00152	酸素	有り	有り	有り		Oxygen
13	製造用剤	150	E00161E	分岐シクロデキストリン (液体品・粉末品統合版)	なし	なし	なし		Branched Cyclodextrin
13	製造用剤	153	E00164	シソ抽出物	なし	なし	なし		Perilla extract
13	製造用剤	163	E00179	水素	なし	なし	有り		Hydrogen
13	製造用剤	171	E00187	ゼイン	なし	有り	なし		Zein
13	製造用剤	172	E00188	ゼオライト	なし	なし	なし		Zeolite

部会	用途分類	既存 添加 物 番号	コード 番号	規格名称	海外の食品添加物規格の有無 「有り」：規格あり, 「なし」：規格なし 規格あり, 規格なしとも付帯条件等がある場合はカッコ書き等で記す 類似物質, 別名, 部分規格などがある場合は, 規格名称 (または添加物名) 記す				
					JECFA	FCC	EU	備考	英名 (参考)
13	製造用剤	174	E00190	セピオライト	なし	なし	なし		Sepiolite
13	製造用剤	179	E00195	ソバ柄灰抽出物	なし	なし	なし		Buckwheat ash extract
13	製造用剤	193	E00210	柿タンニン	なし (Tannic Acidは基原より該当せず)	なし	なし		Tannin (extract)
13	製造用剤	193	E00212	ミモザタンニン	なし (Tannic Acidは基原より該当せず)	なし	なし		Tannin (extract), Mimosa
13	製造用剤	195	E00214	窒素	有り	有り	有り		Nitrogen
13	製造用剤	196	E00215	チャ乾留物	有り	なし	なし		Tea dry distillate
13	製造用剤/強化剤	207	E00226	鉄	なし	Iron, Electrolytic Iron, Carbonyl Iron, Reduced	なし		Iron
13	製造用剤	209	E00228	銅	なし	なし	なし		Copper
13	製造用剤	226	E00245	ナフサ	なし	なし	なし		Petroleum naphtha
13	製造用剤	232	E00251	ニッケル	なし	有り	なし		Nickel
13	製造用剤	234	E00253	ばい煎コメスカ抽出物	なし	なし	なし		Roasted rice bran extract
13	製造用剤	235	E00254	ばい煎ダイズ抽出物	なし	なし	なし		Roasted soybean extract
13	製造用剤	237	E00256	白金	なし	なし	なし		Platinum
13	製造用剤	241	E00260	パラジウム	なし	なし	なし		Palladium
13	製造用剤	251	E00270	ひる石	なし	なし	なし		Vermiculite
13	製造用剤	260	E00280	ブタン	なし	有り	有り		Butane
13	製造用剤	269	E00289	プロパン	なし	有り	有り		Propane
13	製造用剤	295	E00315	ヘリウム	有り	有り	有り		Helium
13	製造用剤/強化剤	311	E00332	貝殻未焼成カルシウム	なし	なし	なし		Non-calciated shell calcium
13	製造用剤/強化剤	311	E00333	骨未焼成カルシウム	BONE PHOSPHATE	なし	なし		Non-calciated bone calcium

部会	用途分類	既存 添加 物 番号	コード 番号	規格名称	海外の食品添加物規格の有無 「有り」：規格あり, 「なし」：規格なし 規格あり, 規格なしとも付帯条件等がある場合はカッコ書き等で記す 類似物質, 別名, 部分規格などがある場合は, 規格名称 (または添加物名) 記す				
					JECFA	FCC	EU	備考	英名 (参考)
13	製造用剤/強化 剤	311	E00335	真珠層未焼成カルシウム	なし	なし	なし		Non-calcinated mother- of-pearl layer calcium
13	製造用剤/強化 剤	311	E00336	卵殻未焼成カルシウム	なし	なし	なし		Non-calcinated eggshell calcium
13	製造用剤	324	E00349	木材チップ	なし	なし	なし		Wood chip
13	製造用剤	325	E00350	木炭	なし	なし	なし		Charcoal
13	製造用剤	327	E00352	木灰	なし	なし	なし		Timber ash
13	製造用剤	328	E00353	木灰抽出物	なし	なし	なし		Timber ash extract
13	製造用剤	346	E00370	リントナーセルロース	なし	なし	なし		Lintner cellulose
13	製造用剤	349	E00376	ルテニウム	なし	なし	なし		Ruthenium

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	藤井 結花	一般社団法人日本食品添加物協会
規格専門委員会委員長	西宮 隆	株式会社タイショーテクノス
自主規格専門委員会委員長	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	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	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	栗山 義顕	株式会社ウエノフードテクノ
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	岡本 隆広	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	小笠原 正志	三菱商事ライフサイエンス株式会社
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	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	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	義平 邦周	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	今村 一仁	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	酒井 正典	ダイワ化成株式会社
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	廣崎 貴義	MP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	村上 和也	株式会社ガレノス
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	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	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	稲井 隆之	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員, 部会長・部会担当	北川 昭浩	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	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	高井 勲	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	飯塚 正男	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	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	谷 征大	株式会社ロッテ
元自主規格・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
技術委員(自主規格・規格専門委員会オブザーバー)	大橋 篤志	小川香料株式会社
技術委員(自主規格・規格専門委員会オブザーバー)	近藤 直樹	太陽化学株式会社
部会長・部会担当 (自主規格・規格専門委員会オブザーバー)	西山 浩司	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
第11版食品添加物公定書検討会技術委員 (自主規格・規格専門委員会オブザーバー)	竹内 正樹	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
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
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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究  
(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書  
既存添加物の成分組成に関する研究  
カロブ色素の成分解析

研究代表者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

### 研究要旨

カロブ色素は第 10 版食品添加物公定書に記載されている着色料であるが、確認試験は淡黄色～黄色の呈色を確認する定性試験のみであり、本添加物の特徴成分を具体的に確認する試験法の提案がのぞまれる。本研究では、カロブ色素の特徴成分の解明を目的に、カロブ色素製品について、HPLC 分析した結果、4 つの主ピークが検出された。各ピーク由来の成分を明らかにするため、カラムクロマトグラフィーによる分離精製を試みた結果、ピーク 1 に相当する成分として、4'-dihydrophaseic acid  $\beta$ -D-glucopyranose ester を単離、同定した。また、カロブ色素含有フラボノイドとして入手できた 2 化合物 (schafotoside, isoschafotoside) を用い HPLC 分析した結果、ピーク 4 と schafotoside の保持時間が一致した。また、ピーク 4 の後ろに認められるマイナーピークと isoschafotoside の保持時間が一致した。今後、その他のピークに由来する成分を明らかにし、カロブ色素含有の成分解明を目指す。

### 研究協力者

好村守生 松山大学薬学部

内倉 崇 松山大学薬学部

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部

阿部 裕 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

### A. 研究目的

カロブ色素は第 10 版食品添加物公定書<sup>1)</sup>に記載され、「イナゴマメ (*Ceratonia siliqua* L.) の種子の胚芽を粉砕して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある」と定義される着色料である。性状は、「淡黄～淡黄褐色の粉末又は粒で、わずかに特異なにおいがある」とされ、主成分はフラボノイドとされ、かん水を含む弱アルカリ性の麺類に添加すると黄色を呈することが知られている。イナゴマメの胚乳部は多糖類を豊富に含んで

おり、カロブビーンガムとしてガムベースにも利用されている。

食品添加物公定書におけるカロブ色素の確認試験は、色価を換算して調製した試験液の呈色を主とする定性試験であり、具体的な特徴成分の確認は規定されていない。成分はフラボノイドとされており、これまで LC/TOF-MS 分析及び成分の変換反応に基づき、主要成分としてフラボノイド (apigenin) C-配糖体 (isoschafotoside, schafotoside, neoschafotoside) が明らかにされ、qNMR で純度検定した apigenin 標品の絶対検量線を作成して UPLC で定量分析する結果が報告されている。<sup>2)</sup>

本研究では、カロブ色素の HPLC における主検出成分を解明し、確認試験に適用できる含有成分の提案を目的に検討を行った。

### B. 研究方法

#### B-1) 試料及び試薬

カロブ色素製品として、市場に流通しているカロブ色素 (管理番号 C2250) を用いた (図

1). Isoschaftoside は Adooq Bioscience 製, schaftoside は CAYMAN CHEMICAL COMPANY 製を用いた. 分離, 精製にはカラム充填剤として YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシイ製), Chromatorex ODS (富士シリシア製), Diaion HP-20 (三菱化学製) を用いた. 重メタノール (MeOH- $d_4$ ) は Eurisotop 製を用いた. その他の試薬は, 特級または高速液体クロマトグラフ用を用いた.

## 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. 測定条件を以下に示す. カラム: L-column ODS (2.1 I.D.  $\times$  150 mm) (化学物質評価研究機構製), カラム温度: 40°C, 流速: 0.3 mL/min, 測定波長: 200-400 nm, 移動相: (A) 0.1%ギ酸 in 蒸留水及び (B) 0.1%ギ酸 in アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A): 0 $\rightarrow$ 30 min (0 $\rightarrow$ 50%), 30 $\rightarrow$ 35 min (50 $\rightarrow$ 85%), 35 $\rightarrow$ 40 min (85%), 40 $\rightarrow$ 50 min (85 $\rightarrow$ 90%), 50 $\rightarrow$ 55 min (90 $\rightarrow$ 100%), 55 $\rightarrow$ 60 min (100%)]. NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) ( $^1\text{H-NMR}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$ : 126 MHz) を使用した. ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [MeOH- $d_4$  ( $^1\text{H}$ : 3.30 ppm,  $^{13}\text{C}$ : 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, 測定溶媒にはアセトニトリルまたは MeOH を用いた.

## B-3) 分画物の調製

カロブ色素 (10 g) に水を加え, Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し, H<sub>2</sub>O, 10%MeOH $\sim$ MeOH で順次溶出し, 各分画物を得た (① H<sub>2</sub>O 溶出画分 6.3 g, ② 10%MeOH 溶出画分 189 mg, ③ 20%MeOH 溶出画分 37.8 mg, ④ 30%MeOH 溶出画分 56.1 mg, ⑤ 40%MeOH 溶出画分 83.5 mg, ⑥ 50%MeOH 溶出画分 30.4 mg, ⑦ MeOH 溶出画分 65.6 mg).

## B-4) 化合物の単離

カロブ色素について, Diaion HP-20, YMC

GEL ODS-AQ 等による分離・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 HPLC での標品との直接比較, あるいは文献値と NMR データ等の比較によって同定した.

## C. 結果及び考察

### C-1) HPLC 分析

カロブ色素の 80%MeOH 可溶部について, HPLC 分析 (検出波長: 280 nm) を行った結果, 保持時間 20 分周辺に 4 つの主ピーク (ピーク 1 $\sim$ 4) が検出された. 各ピークの UV スペクトルを確認したところ, ピーク 1 以外は同様のスペクトルパターンを示した (図 2). 次に, カロブ色素を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより分画して得た各画分について同様に HPLC 分析した結果, 各ピークが分離して確認された (図 3).

### C-2) 化合物の分離精製

HPLC 分析結果より, ほぼ単一のピークとして確認されたカロブ色素 Diaion HP-20 H<sub>2</sub>O 溶出部 (①) について, YMC GEL ODS-AQ カラムクロマトグラフィーによる分離精製を行った. その結果, ピーク 1 に相当する化合物を単離することができた. 本化合物について NMR 等により構造解析した結果, 4'-dihydrophaseic acid  $\beta$ -D-glucopyranose ester<sup>3)</sup> と同定した. 以下に NMR データを示す.

4'-Dihydrophaseic acid  $\beta$ -D-glucopyranose ester:  
 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  8.02 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-4), 6.59 (1H, d,  $J=16.0$  Hz, H-5), 5.83 (1H, s, H-2), 5.51 (1H, d,  $J=8.5$  Hz, Glc H-1), 4.11 (1H, m, H-4'), 3.65-3.85 (4H, m, Glc H-6, H-8'), 3.33-3.45 (4H, m, Glc H-2 $\sim$ 5), 2.11 (3H, d, H-6), 2.03 (1H, m, H-3'), 1.85 (1H, m, H-5'), 1.72 (1H, dd,  $J=10.5, 14.0$  Hz, H-3'), 1.65 (1H, m, H-5'), 1.14 (3H, s, H-7'), 0.93 (3H, s, H-9').  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  166.0 (C-1), 153.9 (C-3), 136.5 (C-5), 131.7 (C-4), 117.8 (C-2), 95.4 (Glc C-1), 87.8 (C-2'), 83.3 (C-1'), 78.8 (Glc C-3), 78.1 (Glc C-5), 77.3 (C-8'), 74.0 (Glc C-2), 71.1 (Glc C-2), 66.0 (C-4'), 62.4 (Glc C-6), 49.5 (overlapped, C-6'), 46.0 (C-3'), 44.6

(C-5'), 21.3 (C-6), 19.7 (C-7), 16.4 (C-9').

### C-3) フラボノイド標品の HPLC 分析

カロブ色素のフラボノイドとして isoschaftoside, schaftoside, neoschaftoside が報告されている。それらのうち、2 化合物 (isoschaftoside, schaftoside) が入手できたため、HPLC 分析による標品との比較検討を行った。その結果、schaftoside がピーク 4 の保持時間と一致し、isoschaftoside はピーク 4 の後ろにあるマイナーピークの保持時間と一致した (図 4)。

ピーク 2, 3 については未同定のため、今後これらピーク及び周辺のマイナーピークについて分離精製、構造解析を試みる。

### D. 結論

カロブ色素製品について、HPLC より分析した結果、4 つの主ピークが検出された。各ピークの成分を明らかにするため、カラムクロマトグラフィーによる分離精製を試みた結果、ピーク 1 に相当する成分として、4'-dihydrophaseic acid  $\beta$ -D-glucopyranose ester を単離、同定した。また、カロブ色素含有フラボノイドとして入手できた 2 化合物 (schaftoside, isoschaftoside) を用い HPLC 分析した結果、ピーク 4 と schaftoside の保持時間が一致した。また、ピーク 4 の後ろに認められるマイナーピークと isoschaftoside の保持時間が一致した。今後、その他のピークに由来する成分を明らかにし、カロブ色素含有成分の解明を目指す。

### E. 参考文献

- 1) 第 10 版食品添加物公定書, 2024 年.
- 2) 第 105 回日本食品衛生学会学術講演会要旨集, 2013 年 5 月 (東京) .
- 3) Amakura Y., Yoshimura M., Ouchi K., Okuyama S., Furukawa Y., Yoshida T.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 1977-1980 (2013).

### F. 研究業績

1. 学会発表等  
なし

### 2. 論文発表等

- 1) Amakura Y, Uchikura T, Yoshimura M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N: Chromatographic Evaluation and Characterization of Constituents of Sunflower Seed Extract Used as Food Additives. Chem. Pharm. Bull., 2024; 72: 93-97 (<https://doi.org/10.1248/cpb.c23-00670>)

- G. 知的財産権の出願、登録状況  
なし

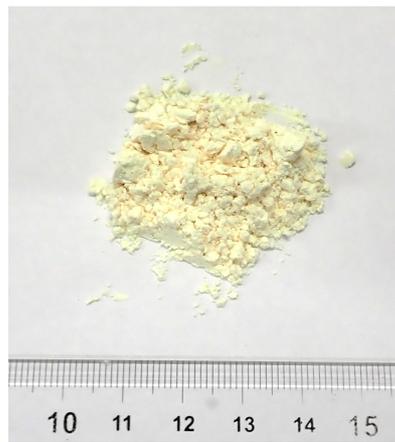


図1. カロブ色素

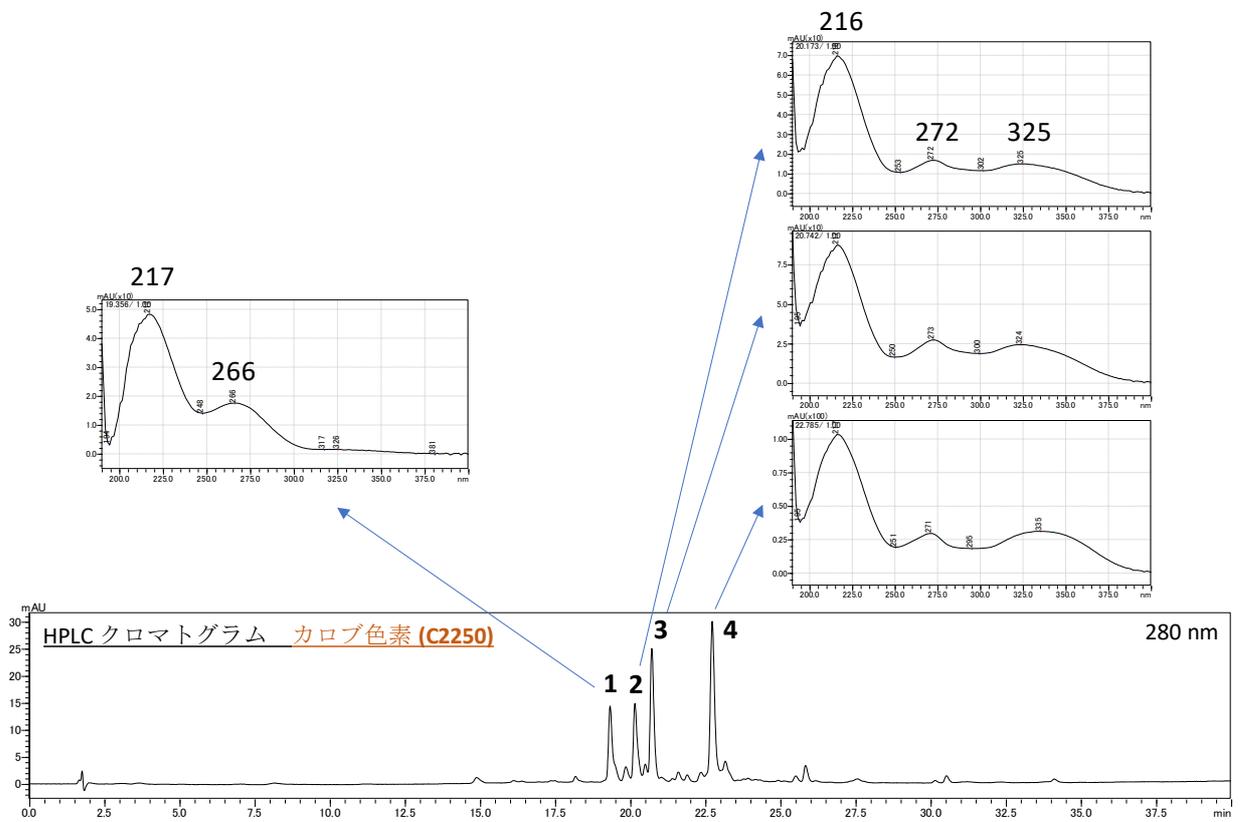


図 2. HPLC クロマトグラムと各ピークの UV スペクトル

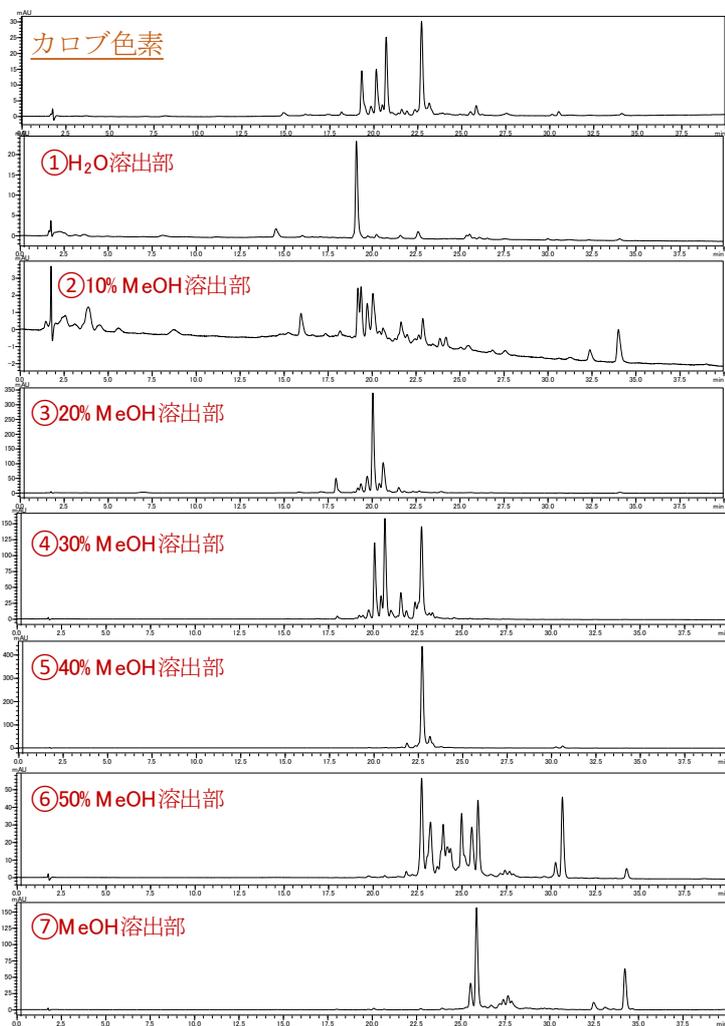


図 3. 各溶出画分の HPLC クロマトグラム

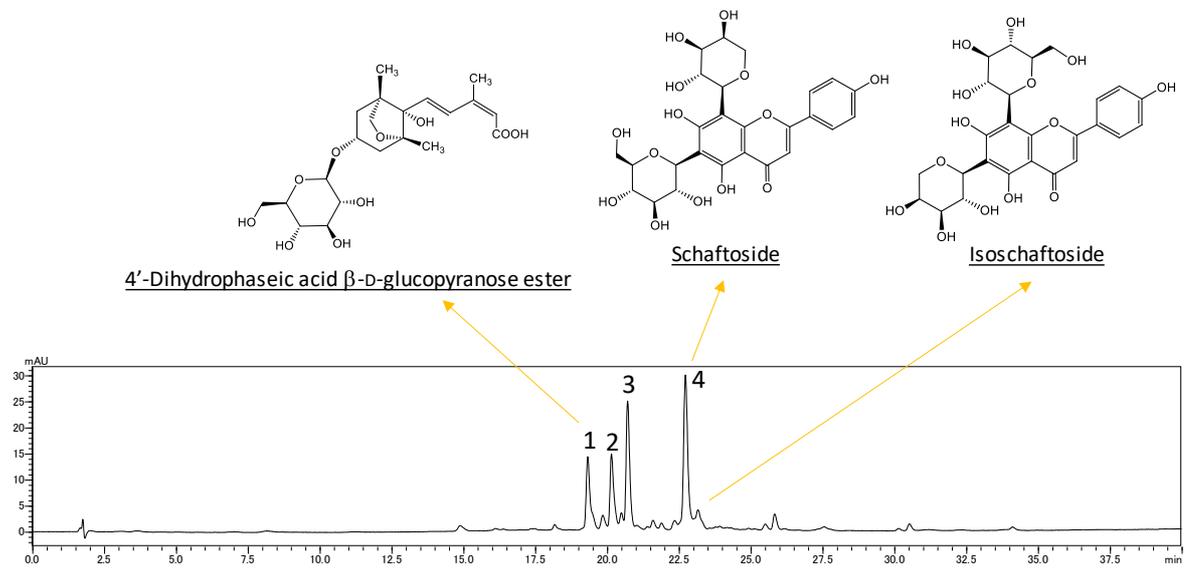


図 4. HPLC クロマトグラムと含有成分

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書

既存添加物の成分組成に関する研究

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、 $^1\text{H-qNMR}$ 法(定量 $^1\text{H-NMR}$ 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。本年度は「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討した。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、その中からクローブ関連製品とバジルの成分含有量評価が $^1\text{H-qNMR}$ 法で可能かどうかを検討した。クローブ関連製品の検討では、指標成分として適切であろう eugenol の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量の検討を行い、クローブの基原となる生薬のチョウジ、クローブ関連の既存添加物製品であるクローブ香料、クローブ抽出物の eugenol の含有率の定量が $^1\text{H-qNMR}$ 法で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。また、クローブと同じく eugenol を主な精油成分とするオールスパイスについても同様に定量が $^1\text{H-qNMR}$ 法で可能である確認できた。バジルについては、当初精油成分の定量を目指したが、rosmarinic acid が指標成分として適切と考え、 $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量の検討を行い、市販の食用バジルにおいて rosmarinic acid の定量が $^1\text{H-qNMR}$ 法で可能であることを示すと同時に、rosmarinic acid がほぼ含有されないものもあることを明らかにした。

## A. 研究目的

$^1\text{H-qNMR}$ 法は、SI トレ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。<sup>1,2)</sup> 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 $^1\text{H-NMR}$ 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5年度は「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、規格基準は定められていない既存添加物である(なお、令和6年2月公示された第10版食品添加物公定書において香辛料抽出物の定義に基原及び使用部位が示された。)。規格基準を決めるには素材ごとに品質評価のための指標成分又は有効成分を定めて基準の策定をしていく必要がある。特に、指標成分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、香辛料抽出物中の正確な含量を得にくいため、その正確な含量を得るには $^1\text{H-qNMR}$ 法が適していると考えられる。本年は、香辛料植物の中からクローブと

オールスパイス，バジルに着目した．クローブとオールスパイスでは，**eugenol** (Fig. 1)が主要成分となると考えて，生薬クローブとクローブ関連の既存添加物製品であるクローブ香料，クローブ抽出物の **eugenol** の定量方法の検討をおこなった．また，クローブ同様に **eugenol** が主な精油成分であるオールスパイス中でも同様に定量可能かの検討をおこなった．バジルでは，当初精油成分の定量を目指したが，<sup>1</sup>H-qNMR 法の実施に適する精油成分のシグナルを見出すことが困難であった代わりに **rosmarinic acid** (Fig. 2)が比較的容易に定量できることがわかったため，**rosmarinic acid** を指標成分とした定量方法の検討を行なった．

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

<sup>1</sup>H-qNMR 測定時の内部標準物質として用いる sodium 3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonate-*d*<sub>6</sub> (DSS-*d*<sub>6</sub>, Fig. 3)は富士フィルム和光純薬の Trace Sure®規格のものを用いた．NMR 測定用溶媒の dimethylsulfoxide (DMSO)-*d*<sub>6</sub>, methanol-*d*<sub>4</sub>, はそれぞれ Isotec Inc.の 99.9, 99.8 atom %D を用いた．**eugenol** は富士フィルム和光純薬から，**rosmarinic acid** は東京化成および富士フィルム和光純薬から購入の試薬を用いた．チョウジは生薬として 2023 年 5 月に購入したもの，チョウジ末，オールスパイス末は，食品として市販されている果実を 2023 年 8 月に購入したものを用いた．クローブ香料は 2023 年 8 月に，クローブ抽出物は 2015 年 8 月にそれぞれ国立医薬品食品衛生研究所より供与を受けたものを用いた．バジルのうち栽培品は 2023 年 4 月に実験者の家庭菜園からえたもの，市販バジル末は 2023 年 4 月にお互いに異なる製造者製を購入し，用いた．

### 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，カラムオープンに 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)<sup>1</sup>H-qNMR 法を用いたチョウジ，クローブ末，クローブ香料，クローブ抽出物，オールスパイス末中の **eugenol** の定量

まず，**eugenol** の <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と，試料中の <sup>1</sup>H-qNMR 法による **eugenol** 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) <sup>1</sup>H-qNMR 法に用いる試料の調製

DSS-*d*<sub>6</sub> 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 DMSO-*d*<sub>6</sub> に溶かして内部標準溶液とした．

**Eugenol** 標準品は，約 10 mg を精秤して 5.00 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 <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した．

**Eugenol** 測定用試料の調製は，次のように行った．生薬のチョウジは粉末化したのち用いた．粉末生薬と市販のクローブ末，オールスパイス末は，デシケータ中で乾燥させたのち約 100 mg を精秤して内部標準溶液 (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，<sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した．クローブ抽出物は約 10 mg を精秤して内部標準溶液 (3.00 mL) に懸濁し，以下同様に遠沈，上清を濾過，濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり，<sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した．クローブ香料は約 10 mg を精秤して内部標準溶液 (3.00 mL) に溶解して 0.600 mL を NMR 試料管にとり，<sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した．

#### B-3-b) <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの測定

Eugenol と各生薬粉末の抽出液の  $^1\text{H-NMR}$  を測定し、eugenol (Fig. 1)の6位のプロトンシグナルが6.5 ppm付近に現れることを確認した。(Fig. 4)  $^1\text{H-qNMR}$  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、eugenolの6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eugenolの濃度を算出した。

$$C_E = (I_E / I_D) \times C_D$$

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

### B-3-c) HPLC を用いたチョウジ、クローブ末、クローブ香料、クローブ抽出物、オールスパイス末中の eugenol の定量

HPLCはCosmosil 5C8-MS-II 250 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い、40°CでMeOH : H<sub>2</sub>O = 75 : 25 (0 min)→90 : 10 (24 min)のグラジエント、流速1.0 mL/minで溶出、275 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)

$^1\text{H-qNMR}$ 法で定量したeugenol標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 6)それぞれの試料は、 $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの測定溶液をHPLCの展開溶媒で20倍に希釈し、その試料溶液を10  $\mu\text{L}$ 注入して得られたクロマトグラム中のeugenolのピークの面積からその定量を行った。

### B-4) $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

まず、rosmarinic acidの $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの実施の条件検討と、試料中の $^1\text{H-qNMR}$ 法による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-4-a) $^1\text{H-qNMR}$ 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溶液とした。

rosmarinic acid標準品は、約10 mgを精秤して5.00 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。

栽培バジルは採集した葉を乾燥後、粉末化した。粉末化したバジルあるいは市販バジル末の測定用試料の調製は、約100mgを精秤して内部標準溶液(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、 $^1\text{H-qNMR}$ の測定に供した。

### B-4-b) $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの測定

各試料から調製した測定試料の $^1\text{H-NMR}$ を測定し、rosmarinic acid (Fig. 2)の7'位のプロトンシグナルがそれぞれ7.54 ppmに現れることを確認した。(Fig. 7)  $^1\text{H-qNMR}$ 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7'位のプロトンシグナルと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の濃度を算出した。

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

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-4-c) HPLC を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

HPLCはYMC-Triart C18 s-5 150 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い、40°CでMeCN : 0.1%リン酸-H<sub>2</sub>O = 20 : 80、流速1.0 mL/minで溶出、275 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. 8)

$^1\text{H}$ -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. 9) それぞれの試料は、 $^1\text{H}$ -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  $\mu\text{L}$  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。

### C. 結果及び考察

#### C-1) $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いたチョウジ、クローブ末、クローブ香料、クローブ抽出物、オールスパイス末中の eugenol の定量

Eugenol 標準品中の eugenol の定量を  $^1\text{H}$ -qNMR 法でおこなった結果、97.34%と見積もられ、試薬の純度表示にほぼ沿ったものだった。

各生薬粉末から調製した試料で  $^1\text{H}$ -NMR を測定したところ、 $\text{DMSO-}d_6$ 中で6位プロトンシグナルが独立して観測されたことから  $\text{DMSO-}d_6$ を溶媒として  $^1\text{H}$ -qNMR の測定をすることにした。 $^1\text{H}$ -qNMR 測定の結果、生薬チョウジ中の eugenol 含有率は  $13.01 \pm 0.32\%$ 、市販クローブ末では 8.11~14.83%、市販オールスパイス末では 2.14~2.67%という結果を得た。(Table 2) 市販クローブ末のうち、含有率の高いものは生薬と同等であったので、少ない方は品質が劣るか粉末化してからの時間が長いかなどの相違があるものと考えられた。既存添加物のクローブ香料の eugenol 含有率は 81.58%で試薬ほどではないが高い eugenol 含有率であった。クローブ抽出物は 31.93%で、製品のラベル表示 38%より低かった。HPLC で eugenol 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。この検量線から各試料中の eugenol の含有率を算出したところ、 $^1\text{H}$ -qNMR 法での数値に極めて近似した値が得られた。お互いにそれぞれの試料の定量値のばらつきも極めて小さく、 $^1\text{H}$ -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。

#### C-2) $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

2 種類の rosmarinic acid 試薬中の化合物の定量を  $^1\text{H}$ -qNMR 法でおこなった結果、それぞれ 90.13%、93.09%と見積もられ、試薬の純度表示よりも小さな値だった。バジル末中の rosmarinic acid の  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた定量では、栽培品と市販粉末のうち 1 試料での含有率がそれぞれ 1.55、0.31%だったのに対し、市販粉末 3 試料では rosmarinic acid のシグナルを見つけないことができなかった。(Fig. 7, Table 3)

次に、HPLC で rosmarinic acid の測定を試みた。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。この検量線から各試料中のそれぞれの含有率を算出したところ、rosmarinic acid は  $^1\text{H}$ -qNMR 法で定量された試料ではそれぞれの数値に近似した値が得られた。一方、 $^1\text{H}$ -qNMR のスペクトルで rosmarinic acid のシグナルがわからなかった試料に関しては、1 試料では rosmarinic acid のピークは全く見られず、2 試料は rosmarinic acid の保持時間付近にピーク面積の測定ができない程度のベースラインからの小さな膨らみが観測される程度だった。極めて濃い抽出液を作れば、これらの試料の場合は HPLC での定量なら可能ということかもしれない。しかしながら、シソ科の植物であるバジルが rosmarinic acid をほぼ含まないということには疑問があり、含有量に極端な差があるということから、市販のバジル末の基原という、定量以外の別の問題が生じている可能性がある。

### D. 結論

1) 生薬チョウジ、クローブ末、クローブ香料、クローブ抽出物、オールスパイス末中の eugenol の  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた定量条件を確立した。

2) バジル末中の rosmarinic acid の  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた定量条件を確立した。また、製品による rosmarinic acid の含有量が極端に異なることから市販のバジル末の基原に疑問が出る結果となった。

### 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*. 2009; 16: 28-33 (2009).
- 2) 厚生労働省, 第 18 改正日本薬局方, pp2623 (2021).

#### F. 研究業績

##### 1. 学会発表等

###### 1-1. 学会

- 1) Sensoy M, Kutluay V M, Nagatsu A, Saracoglu I: Isoflavonoids from *Vuralia turcica* (Kit Tan, Vural & Kucukoduk) Uysal & Ertugrul, *日本薬学会第144年会* (2024年3月, 横浜)

##### 2. 論文発表等

###### 2-1. 論文

- 1) Bayrakceken G Z, Saracoglu I, Nagatsu A, Yilmaz M A, Basaran A A: Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from *Prunus mahaleb* L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 2023; 310: 116378.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

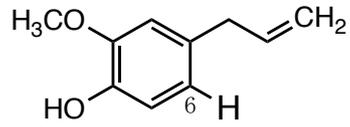


Fig. 1 Eugenol の構造

6位のプロトンが <sup>1</sup>H-qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

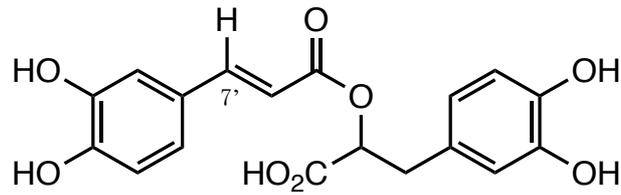


Fig. 2 rosmarinic acid の構造

7'位のプロトンが <sup>1</sup>H-qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

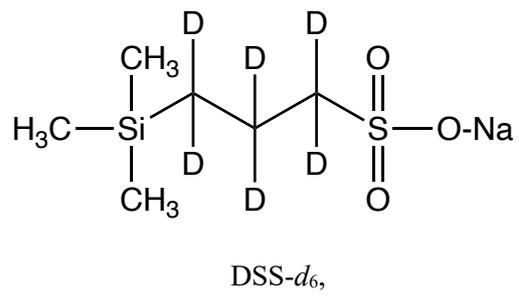


Fig. 3 定量用の認証標準物質

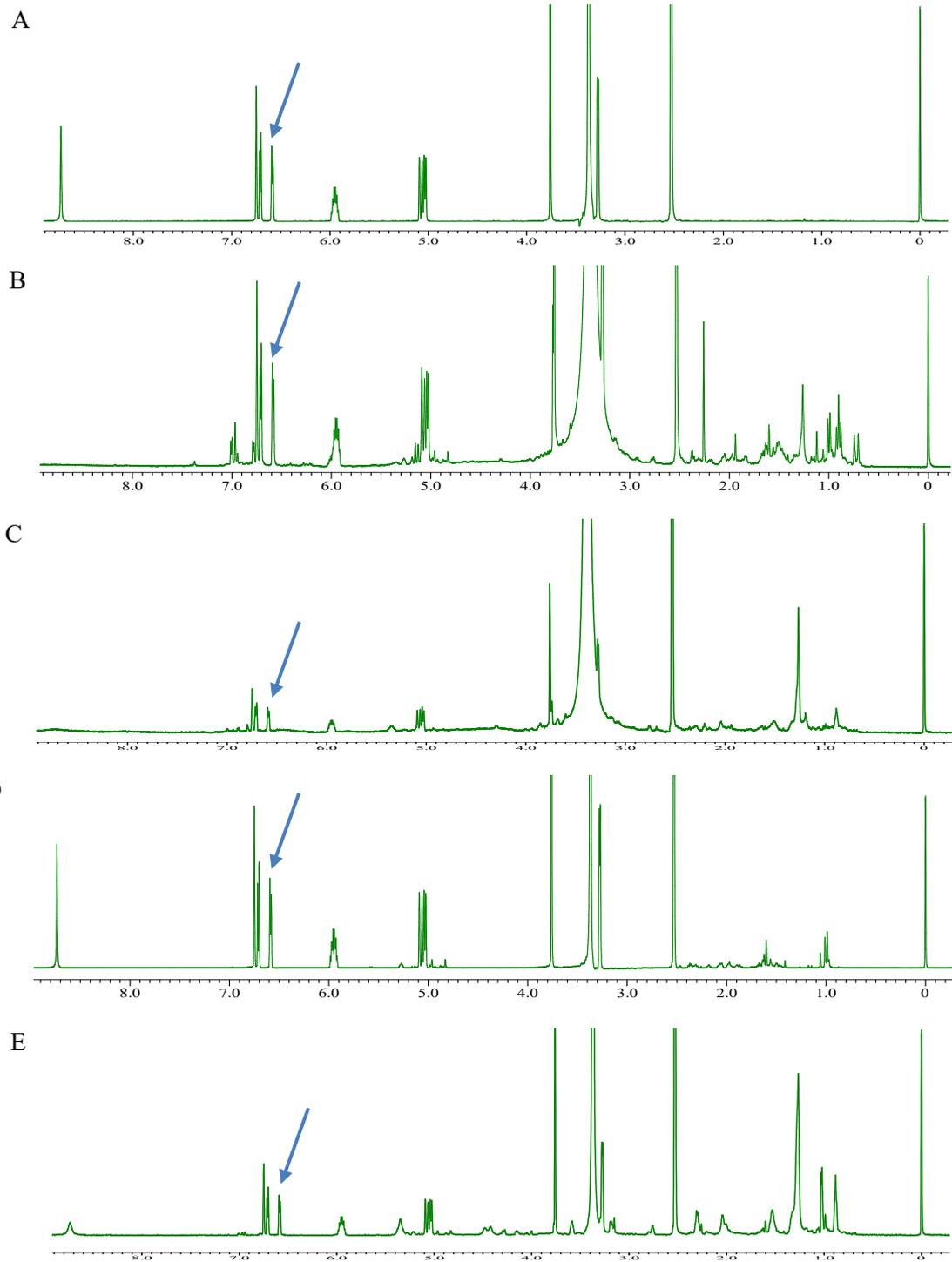


Fig. 4 Eugenol 試薬(A), 市販クローブ粉末(B), 市販オールスパイス粉末(C), クローブ香料及びクローブ抽出物(D)の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in  $\text{DMSO-}d_6$ , 600 MHz)  
 矢印は 6 位の水素のシグナル

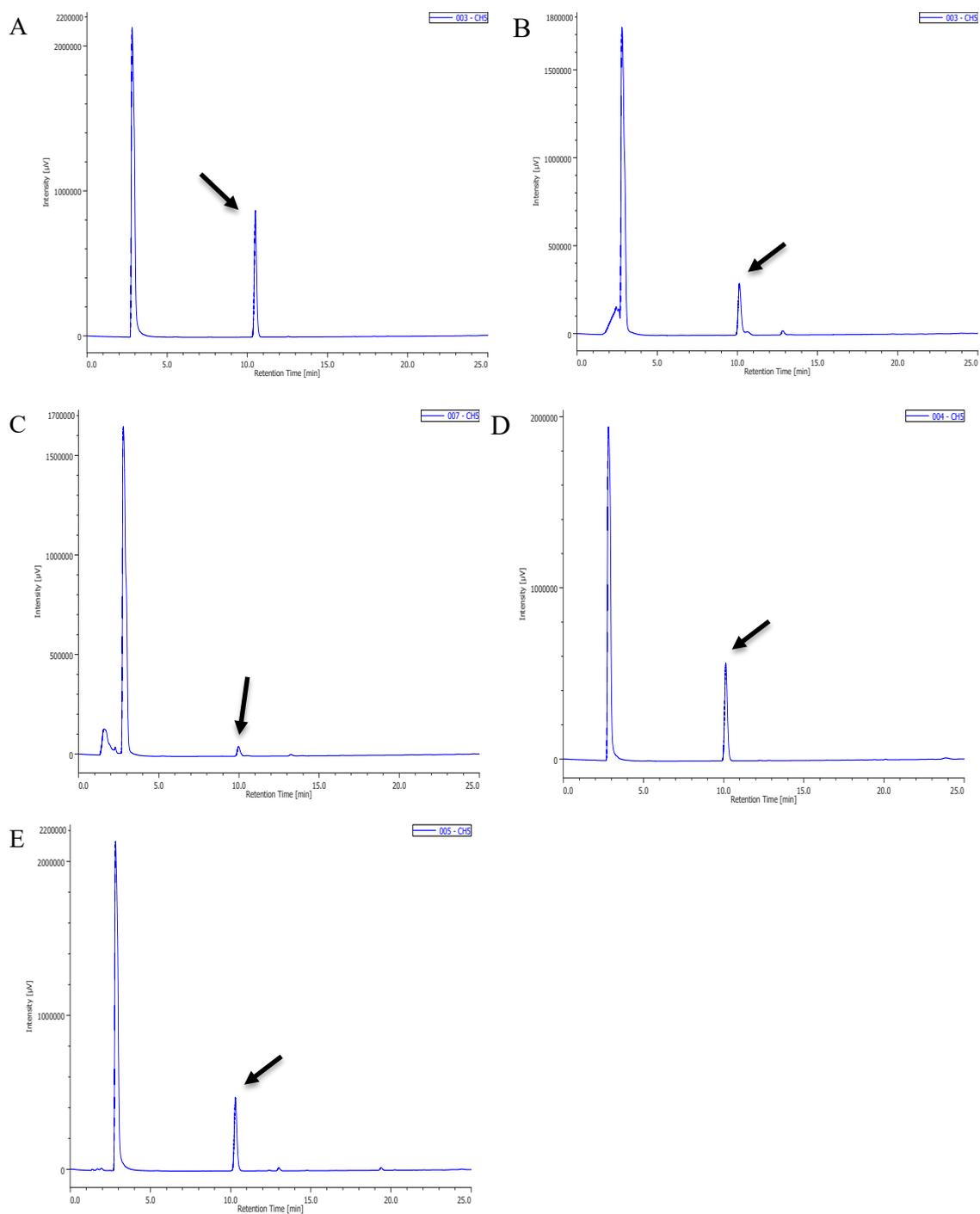


Fig. 5 Eugenol 試薬(A)，市販クローブ粉末(B)，市販オールスパイス粉末(C)，クローブ香料(D)及びクローブ抽出物(E)の HPLC クロマトグラム  
縦軸はピーク強度，横軸は保持時間 (min) ，矢印は eugenol のピーク．

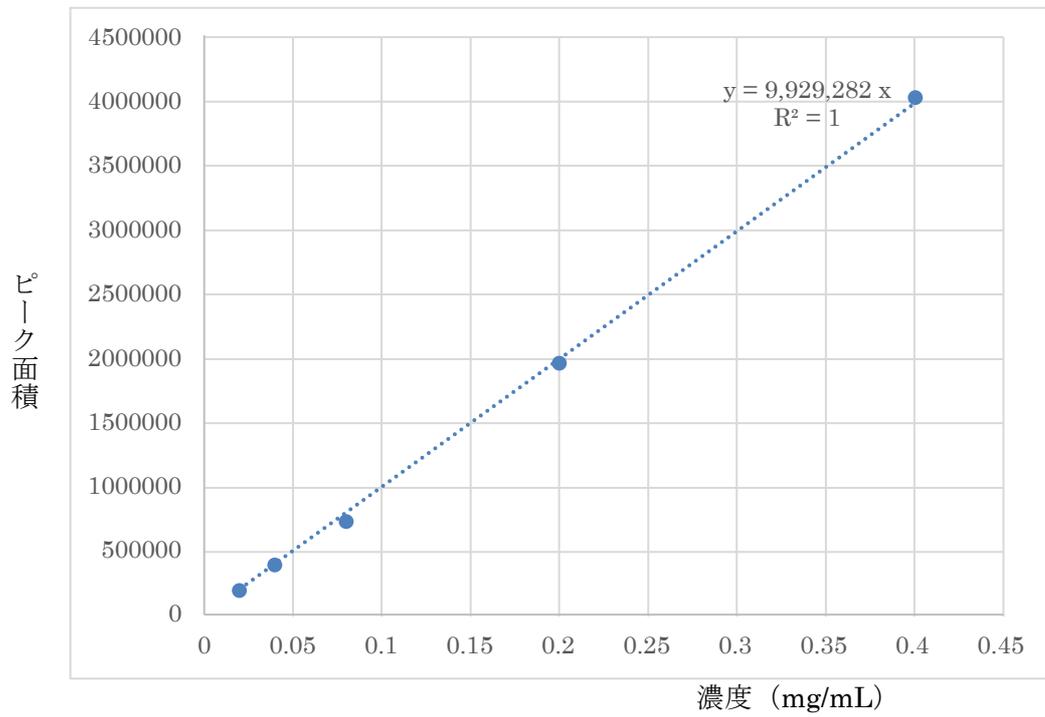


Fig. 6 HPLCにおける eugenol の検量線

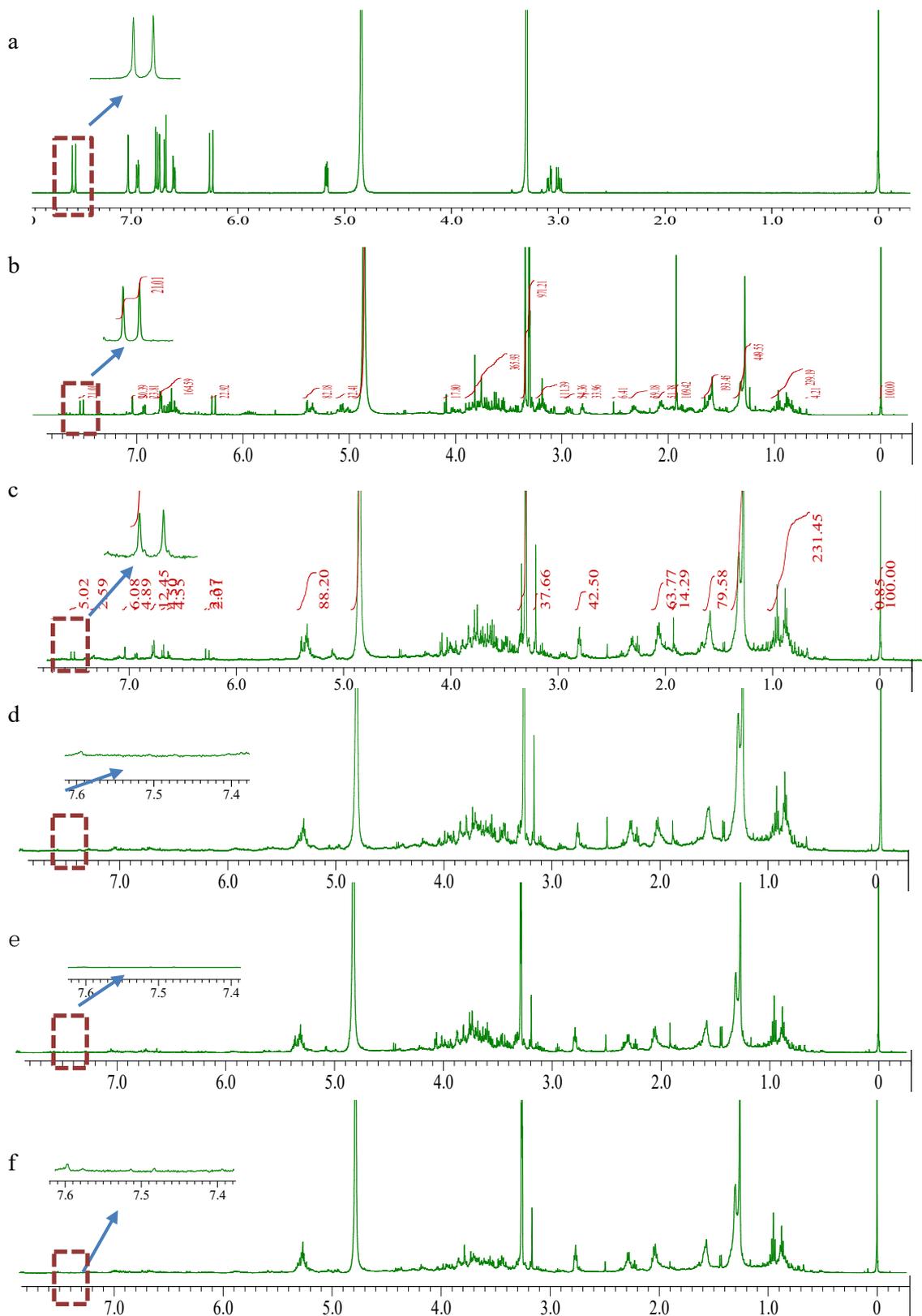


Fig. 7 Rosemarinic acid 試薬(a), 採集のバジル葉(b)と市販バジル末 A (c), B (d), C (e), D (f)の各試料の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in methanol- $d_4$ , 500 MHz) 拡大図のシグナルが 7' 位のプロトンシグナル

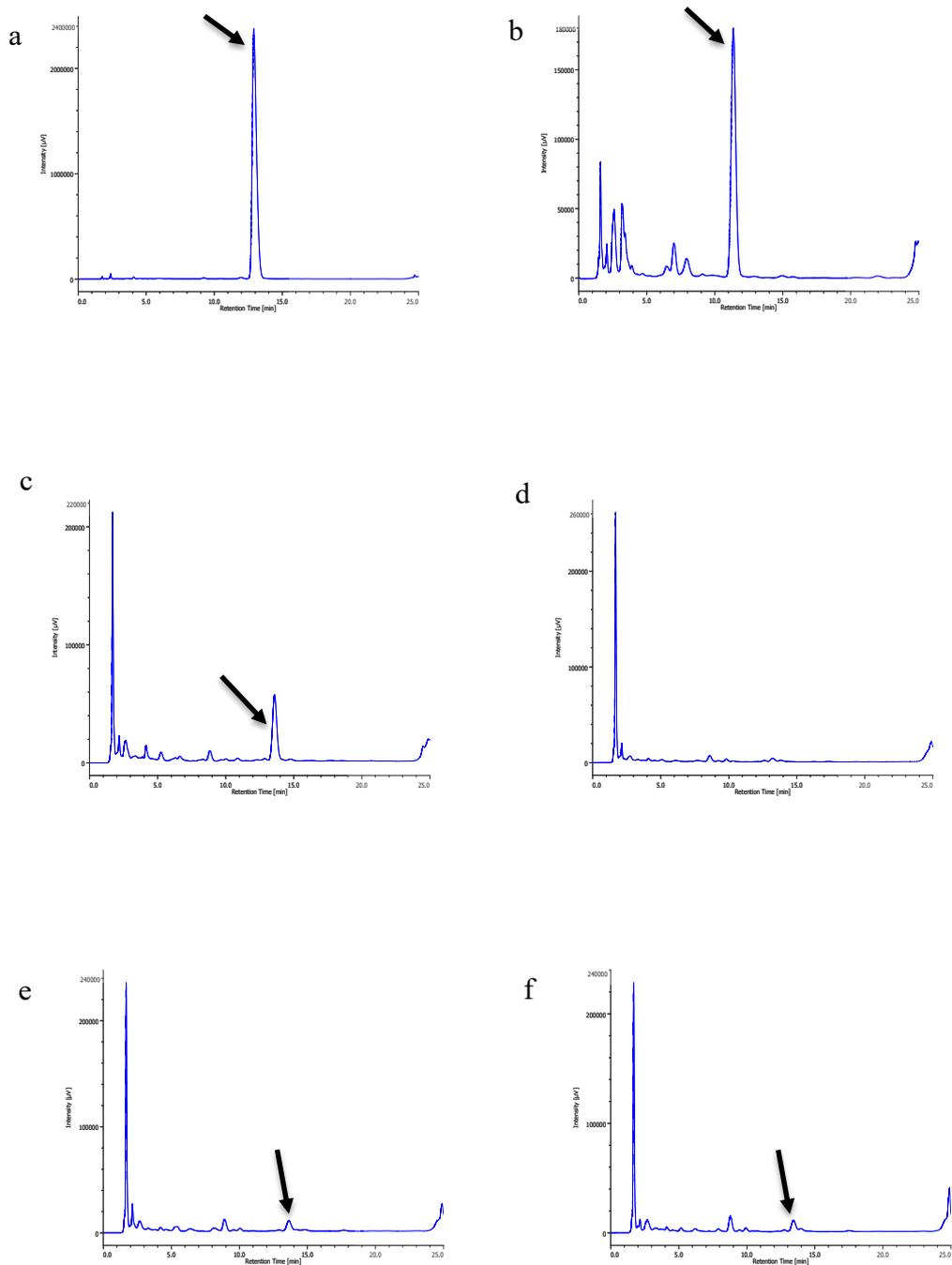


Fig. 8 Rosemarinic acid 試薬(a), 採集のバジル葉(b)と市販バジル末 A (c), B (d), C (e), D (f)の各試料の HPLC クロマトグラム.

縦軸はピーク強度, 横軸は保持時間 (min), 矢印が rosmarinic acid のピーク

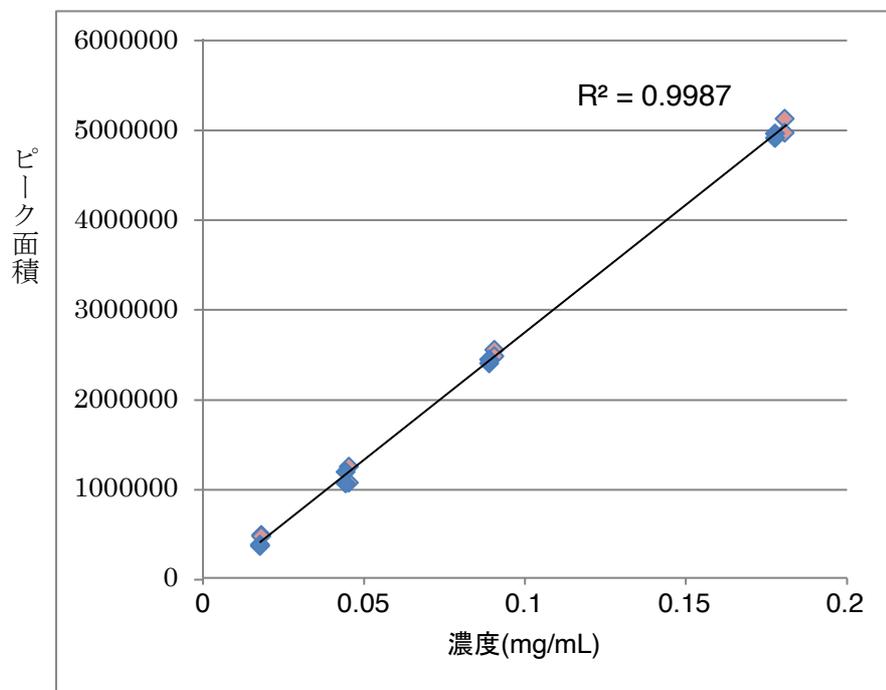


Fig.9 HPLCにおける rosmarinic acid の検量線

Table 1 <sup>1</sup>H-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 Eugenol の含有率

	含有率 (%)			
	<sup>1</sup> H-qNMR		HPLC	
eugenol 試薬	97.34	±0.29		
クローブ香料	84.55	±0.51	82.78	±0.01
クローブ抽出物	32.16	±0.49	31.67	±0.00
生薬チョウジ粉末	13.01	±0.26	12.58	±0.12
市販クローブ末 A	8.11	±0.14	7.56	±0.33
市販クローブ末 B	14.83	±0.35	14.20	±0.68
市販オールスパイス末 A	2.35	±0.36	2.28	±0.51
市販オールスパイス末 B	2.67	±0.10	2.40	±0.06

# 試薬の純度表示は&gt;95%

Table 3 Rosmarinic acid の含有率

	含有率 (%)			
	<sup>1</sup> H-qNMR		HPLC	
rosmarinic acid 試薬 A	90.13	±0.14		
rosmarinic acid 試薬 B	93.09	±0.11		
栽培バジル葉粉末	1.55	±0.047	1.48	±0.077
市販バジル粉末 A	0.31	±0.033	0.24	±0.051
市販バジル粉末 B	ND		ND	
市販バジル粉末 C	ND		unmeasurable	
市販バジル粉末 D	ND		unmeasurable	

# 試薬の純度表示は>96% ND: not detected

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書

既存添加物の成分組成に関する研究

既存添加物スピルリナ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** スピルリナ色素は、第9版食品添加物公定書においてスピルリナ (*Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*)) の全藻から得られた、フィコシアニンを主成分とするものと定義されている。フィコシアニンは青色の発色団を分子内に有するタンパク質で、食用色素として用いられる他、その抗酸化活性や神経保護作用からスーパーフードとしても近年着目されており、今後適切な成分規格を策定していく必要があると考えられる。公定書には確認試験として、定性手法が定められている。本年度の研究において、まず本確認試験によりスピルリナ色素を定性可能か、市販の青色素製品（スピルリナ色素2製品、クチナシ青色素製品及びバタフライピー色素製品）を用いて確かめた。確認試験では蛍光あるいは試液を添加した際の発色を確認するが、2試験においてスピルリナ含有試料のみが反応を示した。一方で、定量手法は定められていないため、続いて高速液体クロマトグラフィーによる分析を試みた。検討にあたり、一般的な逆相オクタデシルシリルカラムと、細孔径の大きいカラムを比較した。

研究協力者

高山卓大 立命館大学薬学部 助教

## A. 研究目的

スピルリナ色素 (*Spirulina color*) は、第10版食品添加物公定書（以降、公定書）においてスピルリナ (*Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*)) の全藻から得られた、フィコシアニン（以降、PYC）を主成分とするものと定義されている<sup>1)</sup>。PYCは青色の発色団を分子内に有するタンパク質（分子量 30 kDa）で、発色団は分子量 600 Da 程度の低分子フィコシアノビルリンである<sup>2)</sup>。スピルリナ色素は食用色素として用いられる他、近年、PYCが抗酸化作用、神経保護作用さらには抗がん作用を有することが報告され<sup>3,4)</sup>、スピルリナ色素を含有する製品がスーパーフードとしても商業的に注目されている。公定書にはスピルリナ色素の確認試験として、定性試験法に規格が存在する。一方で、その含有量評価は色価測定に留まっており、よ

り正確な定量評価法が求められる。

そこで本研究課題では、汎用される定性及び定量分析可能な理化学機器である高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に基づくスピルリナ色素の定性および定量法の開発を目指した。定量の対象物質としては、スピルリナ色素の主成分はPYCとした。まず初めに、市販の青色素製品を含めて4種類（スピルリナ色素2製品、クチナシ青色素1製品及びバタフライピー色素1製品）を、公定書記載の確認試験により定性した。その結果から、各色素を識別することが可能か、極大吸収波長の確認を行った。次に、PYCの極大吸収波長と考えられる 620 nm を検出波長として、HPLC 分析に用いる分析カラムの検討を行った。検討には、汎用されているオクタデシルシリル基 (ODS) が修飾された逆相クロマトグラフィー系カラムを用いた。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

検討に用いた青色素製剤、スピルリナ色素 2 製品(A 及び B)、クチナシ青色素 1 製品(C)及び バタフライピー色素 1 製品(D) は、それぞれ DIC ライフテック株式会社、ジャパンアルジェ株式会社、共立食品株式会社及び日本アドバンスストアグリ株式会社から購入した。なお バタフライピー色素は、チョウマメ抽出液の濃縮物であり、アントシアニンを主成分とする。

アセトニトリル (HPLC 用)、メタノール (HPLC 用)、ギ酸 (LC/MS 用、約 99%)、クエン酸一水和物、硫酸アンモニウム、40%塩化鉄 (III) 溶液及び次亜塩素酸ナトリウムは富士フイルム和光純薬社製のものをを用いた。超純水は Milli-Q EQ7000 system (Merck 社製) にて生成したものを採取し、試験に用いた。

## 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：

Waters 社製 ACQUITY UPLC H-Class plus

ポンプ：Quaternary Solvent Manager

オートサンプラー：Sample Manager FTN-H

検出器：PDA eλ Detector

## B-3) 公定書確認試験

第 10 版公定書 C 項「試薬・試液等」に従って、クエン酸緩衝液 (pH 6.0)、塩化鉄(III)試液、次亜塩素酸ナトリウム試液を調製した。第 10 版公定書のスピルリナ色素の成分規格の記載に従って、確認試験(1)～(6)に該当する試験を実施した<sup>1)</sup>。なお、色価が不明の製品もあったため、公定書記載の色価 25 換算は行わず各製剤 0.4 g を試験に供した。確認試験(6)における極大吸収波長の確認には、装置に示した分光光度計を用い、210 nm～800 nm の波長帯における吸光スペクトルを取得した。その他の確認試験においては蛍光や発色を目視により判断した。

## B-4) HPLC 分離分析

粉末の対象試料は超純水により溶解し、400 µg/mL までアセトニトリル/超純水(10/90, V/V) にて希釈した。移動相には、A 液：0.1 vol%ギ酸水溶液/B 液：0.1 vol% ギ酸アセトニトリルを使用し、以下に示すグラジエント条件にて、18.5 分の分析を行った。

カラム：Shim-Pack Scepter C18-120 (4.6×150 mm, 5 µm, 島津社製) 及び Accura Triart Bio C18 (2.1×100 mm, 1.9 µm, YMC 社製)

カラム温度：40℃

流速：0.4 mL/min

グラジエント条件 B% (min)：10(0)-10(0.5)-80(15)-98(15.1)-98(16)-10(16.1)-10(18.5)

検出波長：620 nm

注入量：5 µL

## C. 結果及び考察

### C-1) 公定書確認試験

国内で市販される 4 つの青色素製剤を用い、スピルリナ色素の成分規格の記載の確認試験により定性が可能かを検討した。図 1-(a)～(f)に確認試験(1)～(6)の結果を示した。確認試験(1)において、薄層クロマトグラフィー用シリカシート (TLC) にスポットした全ての製品(A, B, C, D)で 365 nm の励起波長において赤色の蛍光が確認された。確認試験(2)において、各溶液を 90℃で 30 分間加熱後、得られた溶液の上清を (1)と同様に TLC にスポットし、蛍光を確認したところ、スピルリナ色素 2 製品(A 及び B)において赤色蛍光の消失が認められた。確認試験(3)において、各溶液に硫酸アンモニウムを規定量加えたところ、全ての製品(A, B, C, D)で青色沈殿が認められた。確認試験(4)において、塩化鉄(III)試液を規定量加え、20 分間放置したところ、全製品で明確な色調の変化は認められず、スピルリナ色素 2 製品(A 及び B)はこの確認試験で判別することは困難であった。確認試験(5)において、次亜塩素酸ナトリウム試液を規定量加えたところ、スピルリナ色素 2 製品(A 及び B)で淡黄色への色調変化が認められた。確認試験(6)において、400 µg/mL 溶液の吸収波長を確認したところ、全ての製剤において波長 620 nm 周

辺に極大吸収部が認められた。スピルリナ色素含有製剤 2 製品(A 及び B)では、クチナシ青色素製品(C)やバタフライピー色素製品(D)と比べ、極大吸収部が僅かに長波長側ではあったが、完全分離は不可能と考えられた。以上の結果を表 1 に要約した。確認試験(2)及び(5)によりスピルリナ色素の判別は可能であったが、いずれも明確な反応とは言い難く、定量的測定に応用できるとは考えられなかった。そこで、620 nm を検出波長とした HPLC 測定法の検討を実施した。

### C-2) HPLC 分離分析の検討

C-1 の確認試験(6)から、代表的な青色素 4 製剤(A, B, C, D)はいずれも 620 nm 周辺に極大吸収部を有することが示された。従って、この波長を検出波長として、HPLC に基づく分離分析を検討した。図 2-(a)~(d)には分析カラムとして Shim-Pak Scepter C18-120 を用いた際のクロマトグラムを示した。検討した全色素製剤製品において、何本かのピークが認められた一方で、分離は不十分であり、特にスピルリナ色素製剤 2 製品(A 及び B)においては著しいテーリングが認められた。バタフライピー色素製品(D)の色素成分はアントシアニン的一种であるテルナチン、クチナシ青の色素成分はゲニピンとタンパク質加水分解物の反応物として知られている。PYC は分子量 30 kDa 程度のタンパク質であり、他の色素製剤とは異なる物理化学的特性を有するため、次に非特異的吸着抑制と広い細孔径を有することから、タンパク質測定に適切なカラムでの分析検討を実施した。今回、YMC 社製の Accura Triart Bio C18 にて HPLC 分析を行った結果を図 3-(a)~(d)に示す。いずれもピークが良好な形状で認められ、スピルリナ色素含有製剤製品のみ共通して、溶出時間 9-11 分ほどにピークが認められた。これらのピークは PYC 由来であると考えられるが、複数本認められたことから凝集体や同等の発色団を有した異性体の存在が考えられる。今後、溶出条件を最適化し、定量ピークを選定していくことで、スピルリナ色素の適切な定量分析法を構築可能と考えられた。

### D. 結論

本研究では、まず市販の青色素製剤を検討対象として、第 10 版公定書のスピルリナ色素の成分規格の確認試験により定性が可能か確かめた。確認試験(2)及び(5)の 2 試験においてスピルリナ色素製剤製品を識別可能であったが、変化は明確ではなく、定量的評価は不可能であると考えられたため、HPLC による分析を試みることにした。一般的な ODS 系カラムでは、ピークは観察できたものの、各色素製剤で分離は不十分であり、かつ目的ピークがテーリングする傾向が認められた。一方で、タンパク質分析に適切なカラムを用いたところ、良好なピークパフォーマンスを認めた。今後は下記について、検討を進めていく。

- ・タンパク質直接分析法の更なる検討（分離分析条件と定量ピークの選定）
- ・トリプシン消化断片の分析検討

以上を検討していくことで、正確かつ信頼性のあるスピルリナ色素の分離分析法が構築できると考える。

### E. 参考文献

- 1) 第 10 版食品添加物公定書，厚生労働省 (2017).
- 2) Schram BL, Kroes HH. Structure of phycocyanobilin. *Eur J Biochem.*, 1971; 30: 581-594.
- 3) Ashaolu TJ, Samborska K, Lee CC, Tomas M, Capanoglu E, Tarhan Ö, Taze B, Jafari SM. Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties, purification characterization, and applications. *Int J Biol Macromol.*, 2021; 193: 2320-2331.
- 4) Park WS, Kim HJ, Li M, Lim DH, Kim J, Kwak SS, Kang CM, Ferruzzi MG, Ahn MJ. Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin, in Spirulina Powder and Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 2018; 23:

2065.

**F. 研究業績**

1. 学会発表等

なし

2-1. 論文発表等

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

フィコシアニン:  $\alpha\beta$

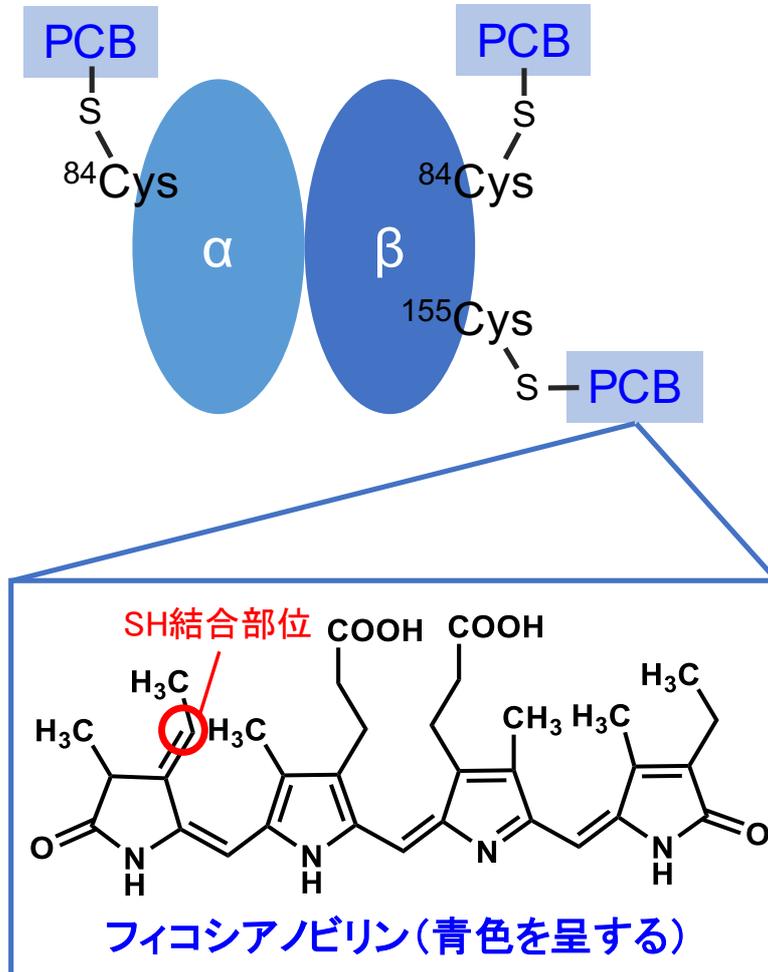


図 1. 分析対象物質 PYC の構造

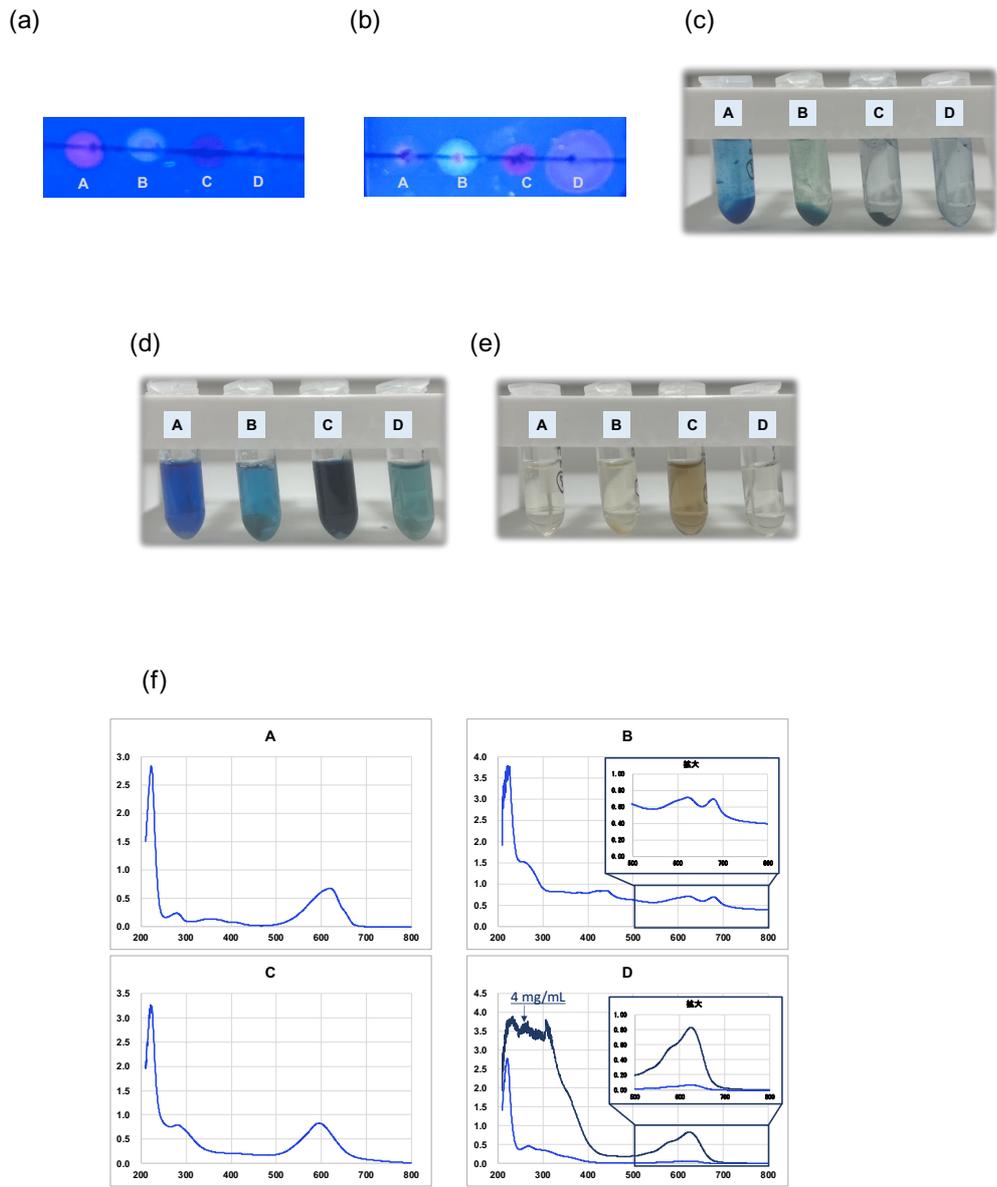


図 2. 第 10 版公定書のスピルリナ色素の確認試験の結果

- (a) 確認試験(1)
- (b) 確認試験(2)
- (c) 確認試験(3)
- (d) 確認試験(4)
- (e) 確認試験(5)
- (f) 確認試験(6)

※各図表中 A : スピルリナ色素 1, B : スピルリナ色素 2,  
C : クチナシ青色素, D : バタフライピー色素

表 1. 第 10 版公定書のスピルリナ色素の確認試験の結果の要約

確認試験	スピルリナ色素 1	スピルリナ色素 2	クチナシ青色素	バタフライピー 色素
(1)	○	○	○	○
(2)	○	○	×	×
(3)	○	○	○	×
(4)	×	×	×	×
(5)	○	○	×	×
(6)	○	○	○	○

○：公定書の基準反応が認められたもの，×：基準反応が認められなかったもの

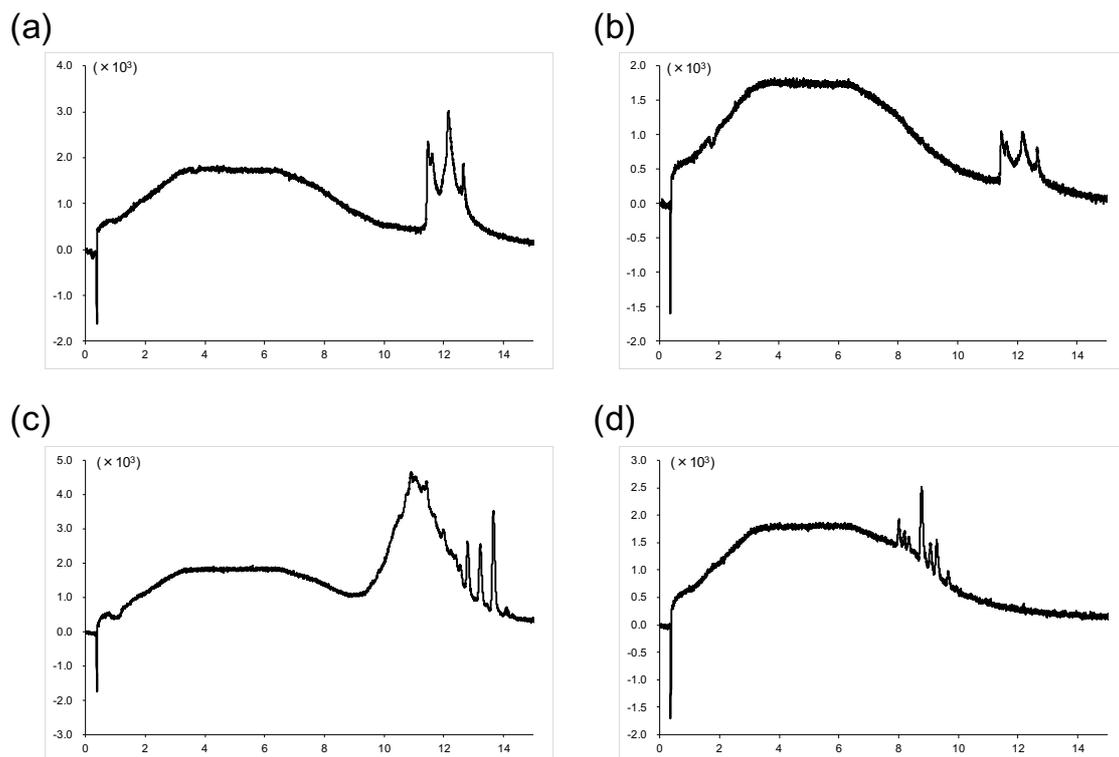


図 3. 分析カラム Shim-pack Scepter C18-120 を用いた際の HPLC クロマトグラム

- (a)スピルリナ色素 1, A
- (b)スピルリナ色素 2, B
- (c) クチナシ青色素, C
- (d)バタフライピー色素, D

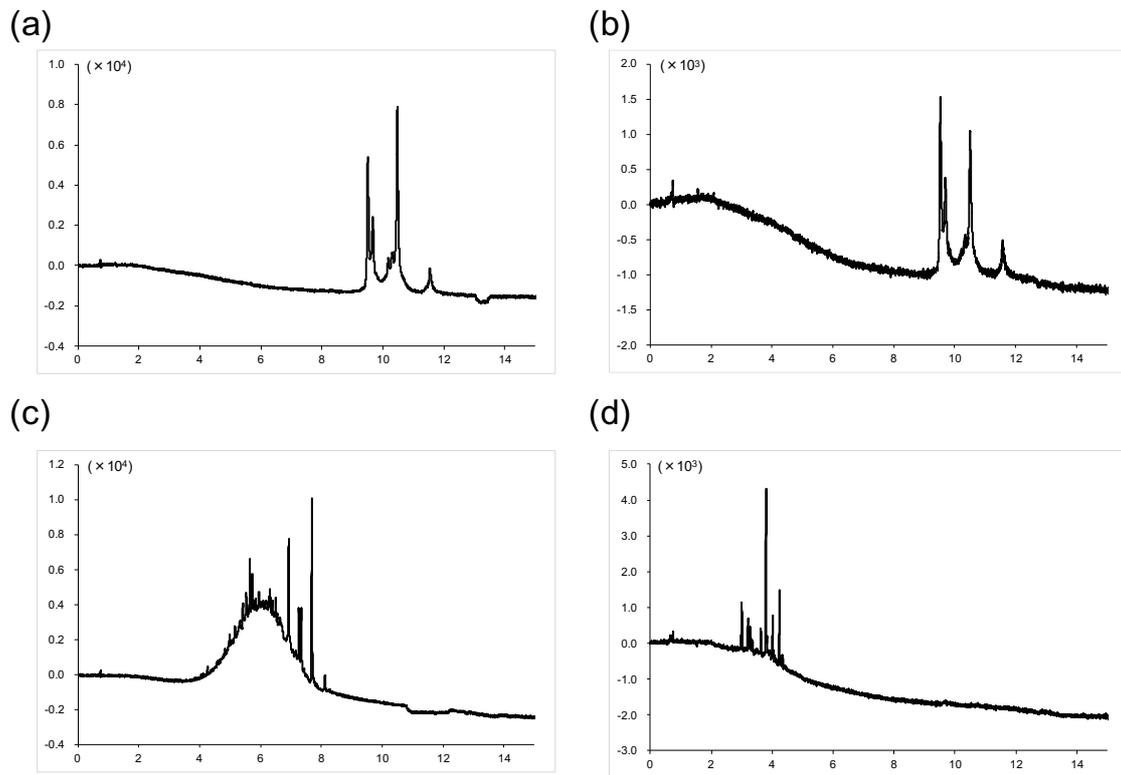


図 4. 分析カラム Accura Triart Bio C18 を用いた際の HPLC クロマトグラム

- (a)スピルリナ色素 1, A
- (b)スピルリナ色素 2, B
- (c)クチナシ青色素, C
- (d)バタフライピー色素, D

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

～定量 NMR によるアントシアニンの純度評価＜測定溶媒の最適化＞～

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** 定量 NMR (qNMR) によるアントシアニンの絶対純度算出法について検討した。試薬会社から販売されているシアニジン 3-グルコシド塩化物 (Cy3G・Cl) をモデル試料として、測定溶媒の最適化を行った。qNMR でアントシアニンを正確に定量するためには、測定溶媒中でアントシアニンをフラビリウムイオン型にシフトさせることが重要である。このためには、測定溶媒に酸を添加することに加えて、添加した酸が溶媒中で解離できる一定量の重水の添加も重要であることが明らかとなった。また、外部標準法 qNMR で値付けする際は、外部標準溶液側にもアントシアニン試料溶液と同程度の酸を添加することで、安定した定量結果が得られることを明らかにした。本研究は、アントシアニンをはじめとする天然由来色素の絶対定量法を確立する上での重要な知見といえる。

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

## A. 研究目的

アントシアニンは、フラボノイド系の植物色素である。アグリコン（母核）であるアントシアニジンに糖や有機酸が修飾されたものを総称して、アントシアニンと呼び、一般に橙から赤、紫色の色彩を呈する。食品添加物としても使用され、食品添加物公定書に記載されている「ブドウ果皮色素」、「ムラサキイモ色素」、「ムラサキトウモロコシ色素」、「赤キャベツ色素」の主成分はアントシアニンである。アントシアニンの特徴としては、溶液中の水素イオン濃度 (pH) に依存して色が変化することである。これは、アントシアニジンの構造が pH に応じて変化するためである。中性からアルカリ性では徐々に分解して退色していくが、酸性ではフラビリウムイオン型の構造をとり、最も安定となる。そのため、アントシアニンの標準品は、フラビリウムイオン型（カチオン）に対して、塩素イオン（アニオン）を反応させた塩化物として販売

されている（図 1）。これら標準品のラベルに記載された純度は、クロマトグラフ法のピーク面積百分率で算出された相対純度であることが一般的である。定量 NMR (qNMR) を用いた絶対純度評価法が標準化されているにもかかわらず、依然として絶対純度が表示されたアントシアニン標準品が流通していない理由として、アントシアニンに qNMR を適用した例が少なく、また分析結果の妥当性が評価されたことがないことが挙げられる。

アントシアニンは溶液の pH に応じてさまざまな分子構造をとる。そのため、qNMR による純度評価では、測定溶媒を強酸性にし、アントシアニンを安定なフラビリウムイオン型に完全シフトさせることが重要である。そこで本研究では、モデル化合物としてアントシアニンの一種であるシアニジン 3-グルコシド (Cy3G) を用いて、重溶媒の種類と酸濃度の組み合わせにおける定量値の関係性を調べることにした。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

アントシアニンは、長良サイエンス（株）

製の Cy3G・Chloride (Cy3G・Cl) を用いた。

ジメチルスルホン (DMSO<sub>2</sub>; Cat. No. 048-33271, 質量分率 99.9%)、重水 (D<sub>2</sub>O; Cat. No. 047-34243, D 99.8%)、重メタノール (methanol-*d*<sub>4</sub>; Cat. No. 138-18703, D 99.8%)、重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*<sub>6</sub>; Cat. No. 048-34251, D 99.9%) は、富士フイルム和光純薬工業 (株) 製のものを使用した。重トリフルオロ酢酸 (TFA-*d*; Cat. No. DLM-46-10×0.75, D 99.5%) は CIL 社から購入した。その他の試薬は、特級または高速液体クロマトグラフ用を使用した。

### B-2) 検討する重溶媒×酸濃度

表 1 に示す重溶媒×酸濃度を検討した。

### B-3) 装置

NMR 装置は日本電子製 JNM-ECZ600R/S1 (<sup>1</sup>H 共鳴周波数 600.1723 MHz) を用いた。

### B-4) NMR 試料の調製

qNMR 測定に使用する Cy3G は以下の手順で調製した。まず、Cy3G・Cl を約 200 mg 精密に量り取り、0.1%TFA 水溶液に溶解した。次に、この試料液を固相カラム (C18 Sep-Pac Vac 20cc, Cat. No. WAT036925, Waters 社製) に負荷し、0.1%TFA 水溶液で洗浄した後、0.1%TFA 含有アセトニトリルで Cy3G を溶出した。着色部分のみを 50 mL メスフラスコに回収し、0.1%TFA 水溶液を加えて 50 mL に定容した。その後、Cy3G・Cl が 5 mg となる液量を 15 mL 遠沈管 (Cat. No. 2325-015, AGC テクノガラス (株) 製) に分注し、遠心濃縮機で溶媒を留去し、使用するまで冷凍庫で保管した。使用する際は、室温に戻した後、重溶媒 1.0 mL を加えて溶解し、0.6 mL を NMR 試料管に移し、qNMR 測定に付した。

qNMR 用の外部標準 (EC; 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL) は以下の手順で調製した。まず、DMSO<sub>2</sub> を約 2.0 mg 精密に量り取り、重溶媒 2.0 mL に溶解し、1 mg/mL の EC を調製した。次に、1 mg/mL の EC 1.0 mL を精密に量り取り、重溶媒 1.0 mL を加えて、0.5 mg/mL の EC とした。同様に、0.5 mg/mL の EC を希釈して、0.25 mg/mL の EC を調製した。3 濃度の外部標準 0.6 mL をそれぞれ NMR 試料管に移し、

qNMR 測定に付した。

### B-5) qNMR 測定

外部標準法 qNMR (EC-qNMR) で qNMR 測定を実施することとした。すなわち、NMR 試料毎に 90°パルス幅 (pw90) を測定し、この値を反映させて qNMR 測定を実施した。<sup>1)</sup> 外部標準には DMSO<sub>2</sub> を用いた。

EC-qNMR 測定は以下の手順で実施した。NMR 試料、すなわち Cy3G・Cl 及び 3 濃度の外部標準をプローブに挿入し、25°C で 5 分間平衡化させた。シムを自動調整し、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C に対するプローブのチューニング&マッチング (T&M) を取った後、パルス幅を変化させるアレイ測定を行った。アレイ測定データに対して、非線形最小二乗法によるカーブフィッティングを行い、NMR 試料毎に 90°パルス幅 (pw90) を校正し、この pw90 を、以下の qNMR 測定条件に反映させた。

- 照射中心 : 5 ppm
- 観測幅 : 15 ppm
- 取込み時間 : 4.5 秒
- 遅延時間 : 60 秒
- 積算回数 : 8 回
- ダミースキャン : 2 回
- サンプル回転 : なし
- <sup>13</sup>C デカップリング : MPF8 (取込み時間のみ)

取得した FID に対して、窓関数の設定を外し、ゼロフィルでポイント数を 4 倍に増やした。フーリエ変換を行った後、位相とベースラインを補正し、定量用の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルとした。このスペクトル上のシグナルに対して自動積分を行い、式 1 を用いて Cy3G・Cl の絶対純度を算出した。定量対象シグナルには、Cy3G・Cl は 4 位、DMSO<sub>2</sub> はメチル基のシグナルを用いた。

$Molar\ Conc._A =$

$Molar\ Conc._C \times S_A/S_C \times H_C/H_A \times PW90_A/PW90_C$

式 1

下付き A : 分析種 (Cy3G・Cl)、下付き C : 外部標準 (EC, DMSO<sub>2</sub>)

### C. 結果及び考察

表 1 に示す条件で EC-qNMR を実施し、Cy3G・Cl としての絶対純度をプロットした。また、測定データから各 NMR 試料の pw90 の値と T&M の際の <sup>1</sup>H 核側の反射値をあわせてプロットした。

#### 条件 1~4 (D<sub>2</sub>O)

D<sub>2</sub>O 溶媒では、TFA-*d* の添加に応じて顕著に pw90 が長くなった (図 2)。このことは、D<sub>2</sub>O 溶媒中で TFA-*d* が解離し、水素イオン (正しくは重水素イオン) 濃度が高くなったことが要因と考えられる。このとき、Cy3G はフラビリウムイオン型として存在し、別の構造に由来する NMR 信号は観察されなかった (図 3)。しかしながら、TFA-*d* 濃度が濃くなるにつれて、Cy3G・Cl の絶対純度は低くなる傾向にあった。この原因として、NMR 試料中の水素イオンが過剰に存在することで、NMR 試料の導電性が上昇し、T&M の精度が低下したと考えられた。実際、TFA-*d* を 10% 含む Cy3G・Cl 試料では、T&M の反射地が約 300 であるのに対して、TFA-*d* を含まない外部標準 (DMSO<sub>2</sub>) の T&M は約 10 である。すなわち、pw90 校正しているにも関わらず、Cy3G・Cl 試料側と外部標準側の NMR 試料側の環境差を十分に相殺できていないと考えられた。

#### 条件 1'~4' (D<sub>2</sub>O)

条件 1~4 の結果を受けて、外部標準側にも Cy3G・Cl と同程度の TFA-*d* を加えて、EC-qNMR を実施することとした。その結果、すべての条件で Cy3G・Cl 試料の純度が約 91~93% と算出された (図 2)。

#### 条件 5~8 (methanol-*d*<sub>4</sub>)

methanol-*d*<sub>4</sub> 溶媒では、TFA-*d* を添加しても、D<sub>2</sub>O ほど pw90 は長くならなかった (図 4)。TFA-*d* 無添加の場合、6~7ppm 付近にフラビリウムイオン型とは異なる異性体由来の信号が観察された (図 5)。しかし、酸添加によりこれらの信号は消失したが、すべての Cy3G・Cl 試料において、4 位付近に小さなシグナル (\*) が残ったままであった。この小さなシグナルを積分範囲から除外して Cy3G・Cl の純度を算出した結果、約 84~92% であった。

#### 条件 9~12 (methanol-*d*<sub>4</sub> / D<sub>2</sub>O (9 : 1, v/v))

Methanol-*d*<sub>4</sub> と D<sub>2</sub>O を 9 : 1 の比率で混合した溶媒を検討した。測定溶媒中の D<sub>2</sub>O の存在により、添加した TFA-*d* の解離が促進されると考えた。その結果、先の条件 5~8 で観察された小さなシグナルは観察されなかった (図 5)。このことは、Cy3G・Cl 試料中の Cy3G が、フラビリウムイオン型に完全シフトしたと考えられた。Cy3G・Cl の純度も全体的に約 1% 程度向上した (図 4)。

#### 条件 13~16 (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Methanol-*d*<sub>4</sub> のときと同様に、TFA-*d* を添加しても、D<sub>2</sub>O ほど pw90 は長くならなかった (図 6)。TFA-*d* 無添加の場合、明らかに複雑なスペクトルであったが、TFA-*d* を添加することにより、少しずつ Cy3G はフラビリウムイオン型に収束した (図 7)。しかし、TFA-*d* を 10% 添加しても、完全に収束することはなかった。したがって、全体的に Cy3G・Cl の純度は低く算出された。

#### 条件 17~20 (DMSO-*d*<sub>6</sub> / D<sub>2</sub>O (9 : 1, v/v))

DMSO-*d*<sub>6</sub> に water-*d* を添加することで、Cy3G をフラビリウムイオン型に完全シフトできるか検討した。しかしながら、DMSO-*d*<sub>6</sub> / D<sub>2</sub>O (9 : 1, v/v) に対して TFA-*d* を 10% 添加しても、フラビリウムイオン型に完全シフトすることはなかった (図 7)、条件 13~16 よりも約 5%~10% 程度、Cy3G・Cl の純度は向上した (図 6)。

以上のことから、qNMR によりアントシアニンを定量するときには、添加した酸が十分に解離できる一定量の D<sub>2</sub>O を含む測定溶媒を用い、フラビリウムイオン型の構造を安定させる必要があるとの知見が得られた。

### D. 結論

Cy3G・Cl を用いて、重溶媒の種類×酸濃度の組み合わせにおける qNMR 定量値の関係を調べた。qNMR によりアントシアニンを定量するときには、添加した酸が十分に解離できる一定量の D<sub>2</sub>O を含む測定溶媒を用い、フラビリウムイオン型の構造を安定させる必要があるとの知見が得られた。EC-qNMR でアントシア

ニンを定量する場合は、EC 側にもアントシアニン試料と同程度の酸を添加しておくことが望ましい。本研究成果は、アントシアニンをはじめとする天然由来色素の絶対定量法を確立する上での重要な知見といえる。

## E. 文献

- 1) Nishizaki Y, Lankin D.C, Chen S, and Pauli G.F, Analytical Chemistry 2021; 93 (5): 2733-2741.

## F. 研究発表

### 学会発表

- 1) 石附京子、西崎雄三、増本直子、嶋田典基、吉田久美、阿部裕、杉本直樹：定量 NMR によるアントシアニンの純度測定～測定溶媒の最適化～、第 29 回日本食品化学学会(2023.6.8-9, 富山)。

### 論文発表

なし

## G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

表1. 検討する重溶媒×酸濃度		TFA- <i>d</i> 濃度	
		DMSO <sub>2</sub> (EC)	Cy3G·Cl (Analyte)
条件 1	D <sub>2</sub> O	0%	0%
条件 2		0%	1%
条件 3		0%	5%
条件 4		0%	10%
条件 1'	D <sub>2</sub> O	0%	0%
条件 2'		1%	1%
条件 3'		5%	5%
条件 4'		10%	10%
条件 5	methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>	0%	0%
条件 6		0%	1%
条件 7		0%	5%
条件 8		0%	10%
条件 9	methanol- <i>d</i> <sub>4</sub> /D <sub>2</sub> O (9:1, v/v)	0%	0%
条件 10		0%	1%
条件 11		0%	5%
条件 12		0%	10%
条件 13	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	0%	0%
条件 14		0%	1%
条件 15		0%	5%
条件 16		0%	10%
条件 17	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> O (9:1, v/v)	0%	0%
条件 18		0%	1%
条件 19		0%	5%
条件 20		0%	10%

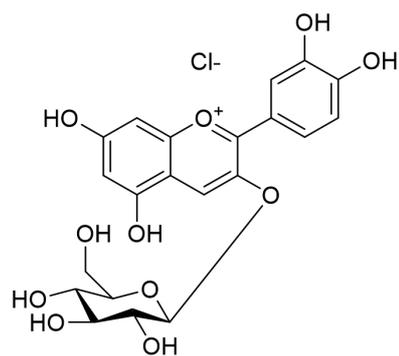


图1 Cy3G-Cl

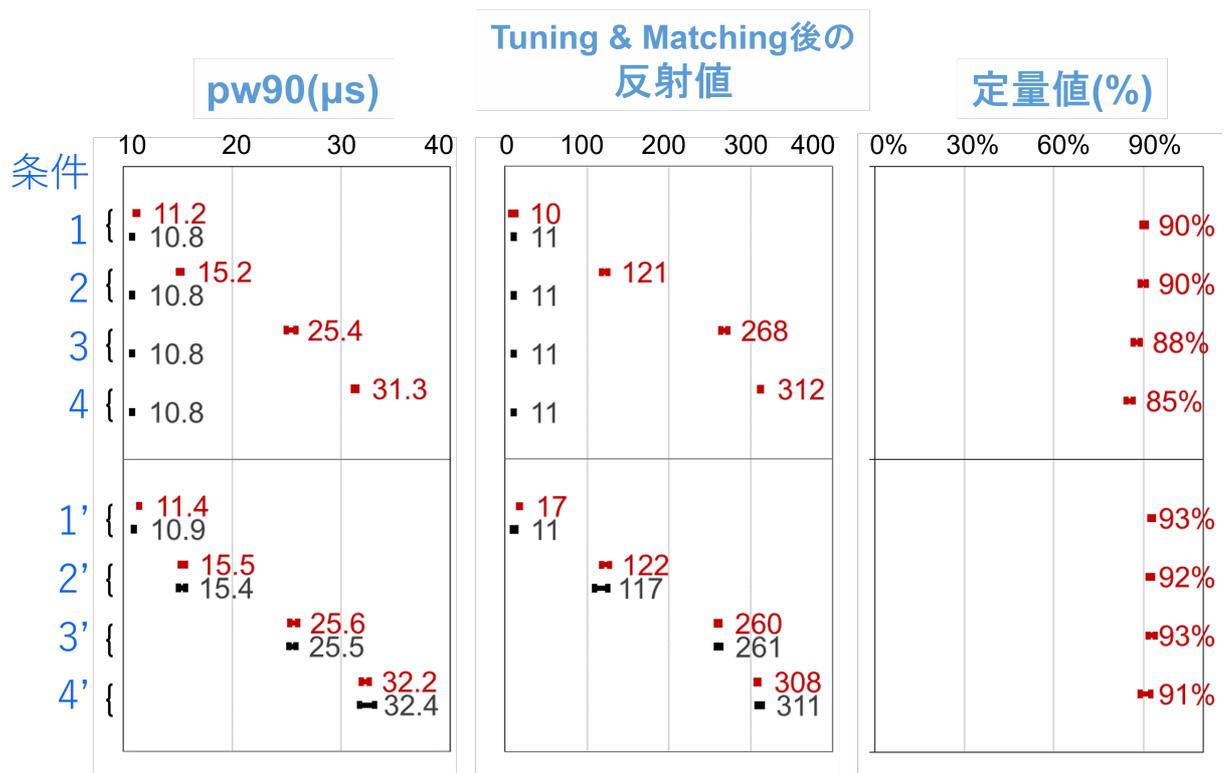


図2 EC-qNMRを条件1~4および1~4' で実施した際のpw90、T&Mの反射値およびCy3G・C1の絶対純度  
 黒のプロットは外部標準のデータ.

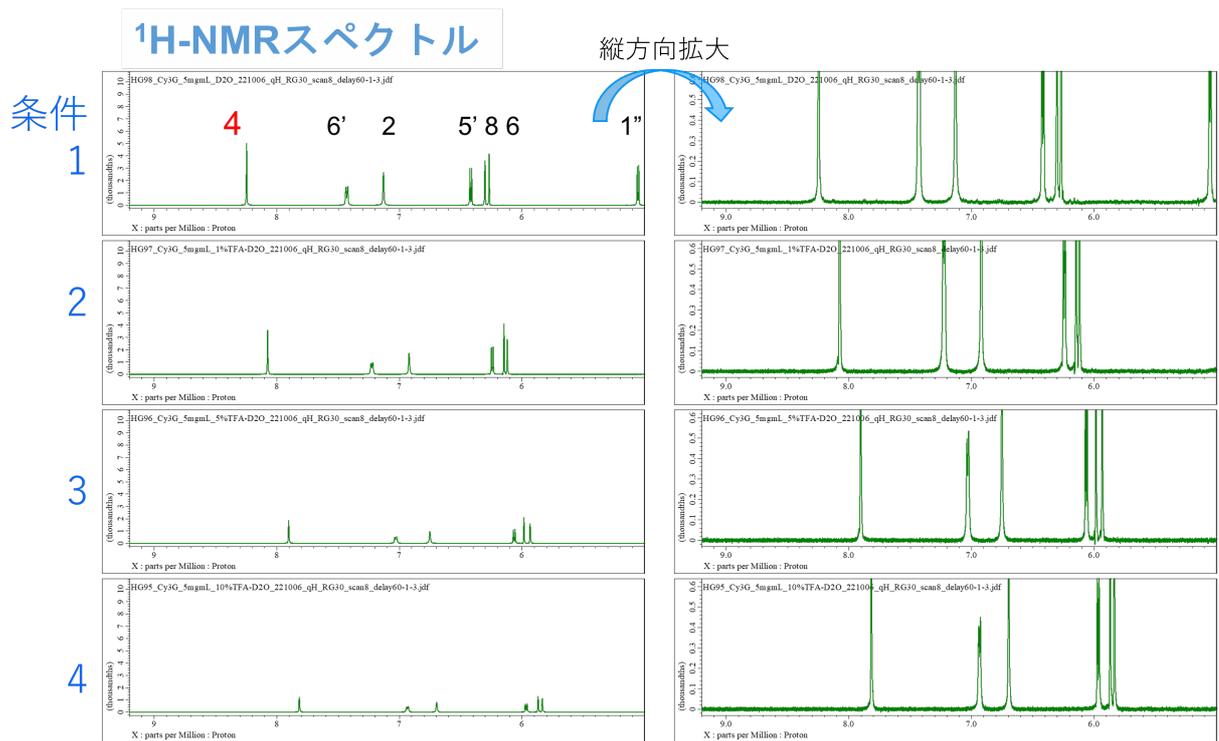


図 3 EC-qNMRを条件1~4で実施した際のCy3G・C1の $^1\text{H-qNMR}$ スペクトル

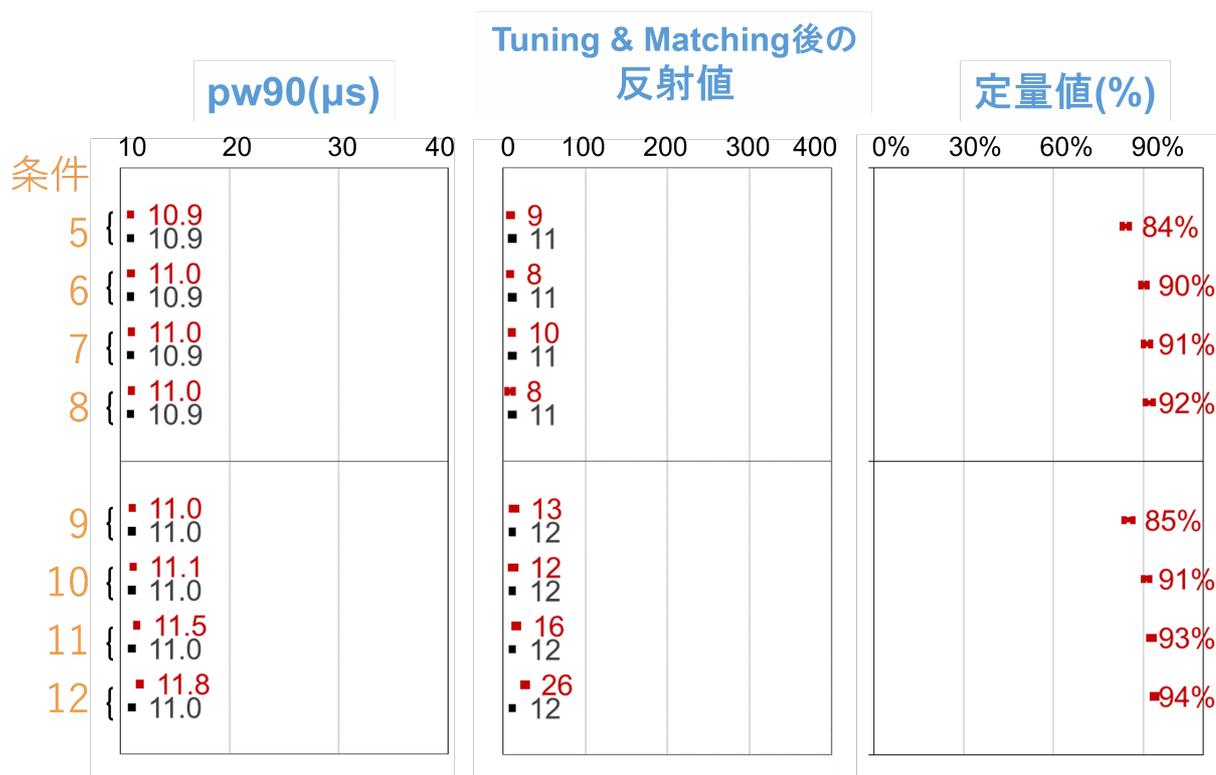


図 4 EC-qNMRを条件5~12で実施した際のpw90、T&Mの反射値およびCy3G・Clの絶対純度黒のプロットは外部標準のデータ。

# 1H-NMRスペクトル

縦方向拡大

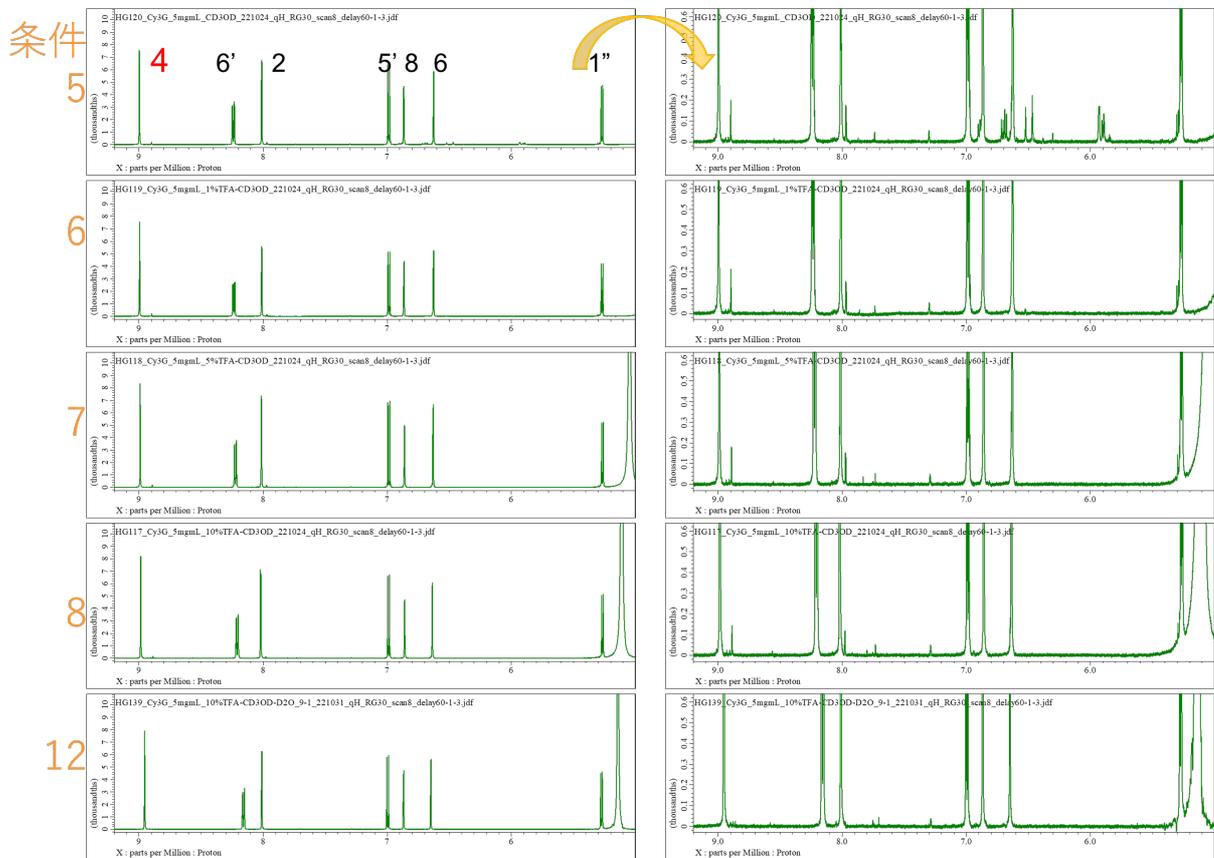


図 5 EC-qNMRを条件5~12で実施した際のCy3G・C1の<sup>1</sup>H-qNMRスペクトル

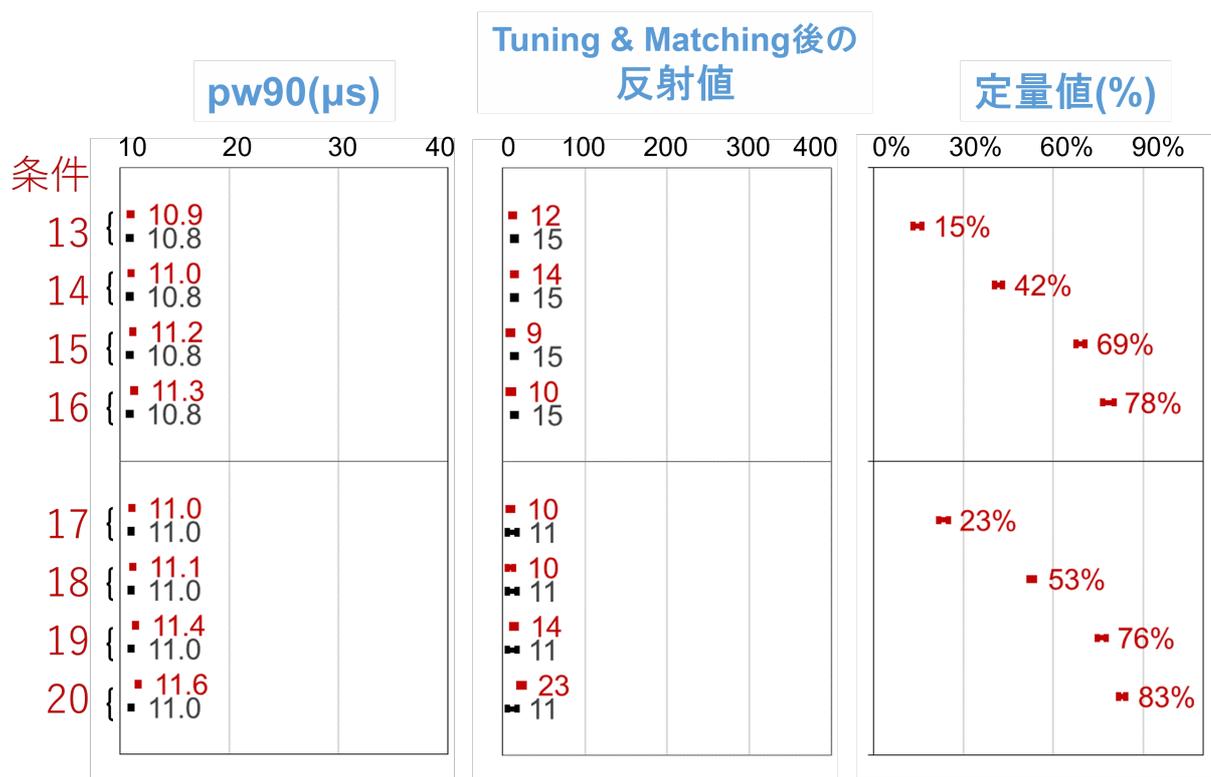


図 6 EC-qNMRを条件13~20で実施した際のpw90、T&Mの反射値およびCy3G・Clの絶対純度黒のプロットは外部標準のデータ。

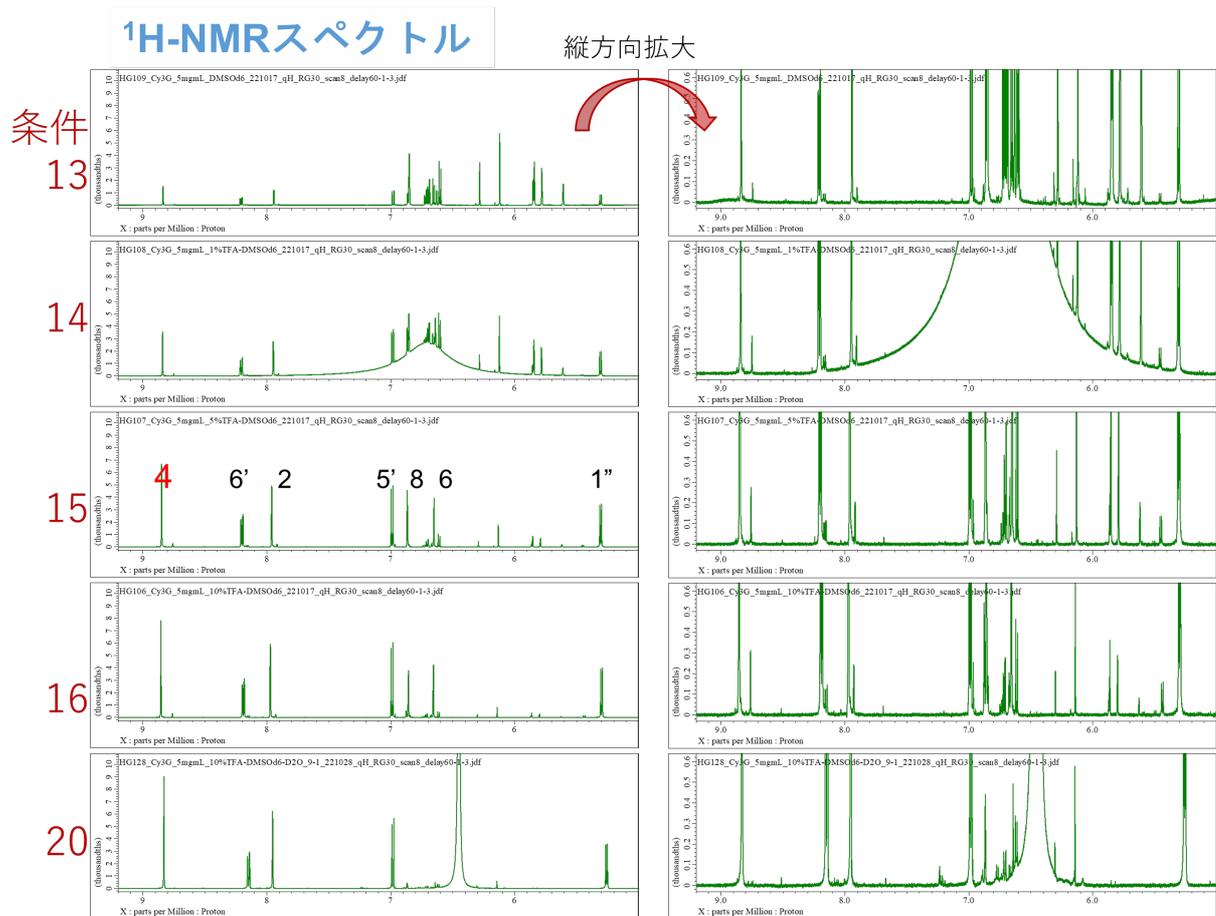


図 7 EC-qNMRを条件13~20で実施した際のCy3G・C1の $^1\text{H-qNMR}$ スペクトル

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究  
(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

相対モル感度（RMS）を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討

～クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係～

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官

### 研究要旨

既存添加物名簿収載品目のひとつである「生コーヒー豆抽出物」は、第10版食品添加物公定書に収載予定の品目であり、主成分であるクロロゲン酸の定量法が設定されている。一方、これまでの研究によりクロロゲン酸以外の様々なクロロゲン酸類(キナ酸に様々なケイ皮酸誘導体が結合した)が含まれていることが知られているが、すべてのクロロゲン酸類を絶対検量線法により定量することは現実的ではない。本研究では、既存添加物規格の改正を見据え、相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉定量法を検討した。さらに、クロロゲン酸類の構造の違いが同一化合物を基準物質としたときのRMSにどのような影響を及ぼすか検討した。

研究協力者

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部研究員

### A. 研究目的

近年、標準物質の入手が困難な化合物の定量において、代わりに他の物質を基準として設定(基準物質)し、それに対する定量対象化合物の相対モル感度(relative molar sensitivity, RMS)を利用する定量法(以下, RMS法)が注目されている。我々はこれまでに食品添加物をはじめ、天然物由来製品に含まれる有効成分や機能性成分の RMS法を報告している。

RMS法での定量には、基準物質に対する定量対象の RMS値が必要である。通常、RMS値は定量 NMR ( $^1\text{H-qNMR}$ )と HPLC などのクロマトグラフィーを用い、分析対象物質と基準物質の正確な純度や応答値を求めたうえで算出する。そのため、RMS算出時には、試薬グレードは問わないものの分析対象物質そのものが必要である。しかし、類似構造の化合物はあっても分析対象物質の市販がなかった

り単離精製が必要であったりする場合も少なくない。

本研究では、市販試薬の入手が困難な化合物について、その類似化合物から RMS値をある程度予測できないかと仮定した。そこで、構造異性体が多く存在する様々なクロロゲン酸類(キナ酸にカフェ酸やフェルラ酸が結合したもの)について、RMS値を算出し比較、考察した。

### B. 研究方法

#### B-1) 試薬

本研究に使用した試薬を表1に示す。また、市販品の入手が困難だったクロロゲン酸類については、長谷川香料(株)製の「生コーヒー豆抽出物」(部内管理番号 C2049)から B-3)に示すとおり単離精製した。その他の試薬は、特級品または液体クロマトグラフィー用を用いた。

#### B-2) 装置

以下の装置を本研究に用いた。  
NMR装置: JNM-ECA600, JNM-ECZ600 および JNM-ECZL800 (日本電子(株)製)

HPLC-UV-PDA-MS 装置 (LC 装置 1) : Alliance-UV-PDA-XevoTQ システム(Waters 社製)

HPLC-UV 装置(LC 装置 2) : TS1000(日立製作所製)

紫外可視分光光度計: V-650(日本分光(株)製)

フラッシュ精製装置 : Biotage Isolera One

リサイクル分取装置 : LaboACE LC-5060 および LaboACE LC-5060 Plus (日本分析工業(株)製)

ウルトラマイクロ天秤 : XP2U (METTLER TOLEDO(株)製)

### B-3) クロロゲン酸類の単離精製

ジカフェオイルキナ酸(diCQA), モノフェルロイルキナ酸(FQA)およびフェルロイルカフェオイルキナ酸(FCQA)は, 「生コーヒー豆抽出物」から図 1 に示すように単離精製した. なお, 「生コーヒー豆抽出物」から Fr.1-3 への分画工程は 5 回繰り返し, HPLC/UV/PDA/MS 分析にて含有成分を確認したのち, Fr.1-3 へそれぞれ合わせた. リサイクル分取により得られた画分はエバポレーターにより有機溶媒留去後, 凍結乾燥した. 分取装置条件および分析条件を以下に示す.

B-3-1) フラッシュ精製装置による分画条件  
カラム : Sfar C18 D (Duo 100 Å 30 µm 30 g, Biotage 社製), 移動相 A : 0.1%ギ酸水溶液, 移動相 B : 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件: 平衡化(90:10)→1-4CV (90:10)→5-7CV (85:15)→8-12CV (85:15→50:50)→13-14CV (0:100), 流速 : 25 mL/min, 検出波長 : 325 nm, フラクション量 : 11 mL.

B-3-2) リサイクル分取装置による分画条件  
カラム : JAIGEL-ODS-AP-L (20.0 × 500 mm, 日本分析工業(株)製), 移動相 : 0.5%ギ酸水溶液/アセトニトリル溶液(80:20), 流速 : 10 mL/min, 検出波長 : 325 nm.

### B-3-3) HPLC/UV/PDA/MS 分析条件

HPLC 条件 カラム : Wakopak Ultra C18-5 (4.6 × 250 mm, 5 µm, 富士フイルム和光純薬(株)製), カラム温度 : 40 °C, 移動相 A : 0.1%ギ酸水溶液, 移動相 B : 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件①: 0-10 min (85:

15)→10-25 min (85:15→50:50)→25-30 min (0:100)→30-45 min (85:15), グラジエント条件②: 移動相 A と B の混液(80:20 または 85:15), 流速 : 1.0 mL/min, PDA 検出器 : 190 nm-800 nm, UV 検出波長 : 325 nm  
MS 条件 キャピラリー電圧 : 2 kV, コーン電圧 : 30 V, ソース温度 : 150 °C, 脱溶媒温度 : 350 °C, 脱溶媒ガス流量 : 1000 L/hr, コーンガス流量 : 50 L/hr, イオン化モード : ESI (pos., neg.), 走査範囲 : *m/z* 100-1200.

### B-4) NMR による単離精製物の同定

B-3)にて精製した画分を重メタノールに溶解して NMR スペクトル(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, COSY, HMQC, HMBC (Long Range J : 4 Hz または 6 Hz), NOE)を測定し, 文献値<sup>1-4)</sup>と比較して化合物を同定した.

### B-5)クロロゲン酸(5CQA)のUV吸収スペクトル測定

リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.39 g を秤量し, リン酸 0.17 mL とともに 500 mL メスフラスコに入れ, 水で定容し, 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液(pH=2.6)とした.

酢酸ナトリウム 8.3g を秤量し, 1 L のメスフラスコに入れ, 水で定容し, 0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液とした. 酢酸 2.86 mL を 500 mL メスフラスコに入れ, 水で定容し, 0.1 M 酢酸水溶液とした. 0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液 600 mL と 0.1 M 酢酸水溶液 400 mL を混合し, 0.1 M 酢酸ナトリウム : 0.1 M 酢酸(60/40)溶液(pH=4.8)とした.

リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.39 g およびリン酸水素二ナトリウム 12 水和物 0.895 g を秤量し, 500 mL メスフラスコに入れ, 水で定容し, 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液(pH=6.9)とした.

セミマイクロ天秤を用いて, 5CQA 約 20 mg を量り取り, 20 mL メスフラスコに入れ 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液(pH=2.6)でメスアップした. この液を同じ溶媒で 100 倍希釈し, UV 吸収スペクトルを測定した. 同様の操作を, 0.1 M 酢酸ナトリウム : 0.1 M 酢酸(60/40)溶液(pH=4.8)および 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液(pH=6.9)で行った.

## B-6)クロロゲン酸類の RMS 算出

### B-6-1) 試料液調製

**NMR 用試料液:** ウルトラマイクロ天秤を用いて、5CQA (試料)約 10 mg および DSS-*d*<sub>6</sub>約 1 mg をそれぞれ精密に量りとり、重メタノール 2.0 mL を加えて溶解させたものを NMR 用試料液とした。NMR 用試料液 0.6 mL を 5 mm NMR 試料管に移し、トーチバーナーで封管して NMR 分析に付した。試料として 3CQA, 4CQA および CA を用いた際も同様の操作を行った。一方、diCQA, FQA および FCQA の RMS を求める際は、これら試料の秤量値を約 5 mg とした。

**HPLC 用試料液:** NMR 用試料液(5000 µg/mL または 2500 µg/mL)を、水：メタノール(9/1)溶液を用いて精密に希釈し、6 濃度の検量線用標準液(1, 5, 10, 20, 40, 50 µg/mL)を調製し HPLC 用試料液とした。

### B-6-2) 定量 NMR による純度測定

NMR 測定条件は以下のとおり。

レシーバーゲイン, 30 ; 照射中心, 5 ppm ; 観測幅, 20 ppm ; データポイント数, 60018 ; 遅延時間, 60 秒 ; 積算回数, 8 回 ; ダミースキップ, 2 回 ; サンプル回転, なし ; <sup>13</sup>C デカップリング, MPF8 (取込み時間のみ)。

取得した FID に対して窓関数の設定を外し、ゼロフィルでポイント数を 2 倍に増やした後、フーリエ変換を行った。次に、位相およびベースラインを補正し、定量用の <sup>1</sup>H NMR スペクトルとした。このスペクトル上のシグナルに対して自動積分を行い、式(1)および式(2)を用いて試料の純度を算出した。複数のシグナルを使用した場合は、それらの純度を平均して、試料の純度(%)とした。定量に用いたシグナルを表 2 に示す。

$$molC_A = molC_B \times I_A/I_B \times H_B/H_A \quad \text{式(1)}$$

$$P_A = molC_A \times MW_A/C_S \times 92.4\% \quad \text{式(2)}$$

ここで、*molC*: モル濃度(mol/L), *I*: シグナル面積, *H*: プロトン数, *P*: 純度(%), *MW*: 分子量(g/mol), *C*: 濃度(mg/mL), *A*: 分析対象化合物, *B*: DSS-*d*<sub>6</sub>(標準), *S*: 試料。

### B-6-3) HPLC 分析

HPLC 測定条件は以下の通り。

カラム: Wakopak Ultra C18-5 (4.6 × 250 mm, 5 µm), カラム温度: 40 °C, 移動相 A: 0.1% 酢酸水溶液, 移動相 B: 0.1% 酢酸アセトニトリル溶液, 移動相条件: 0-15 min (90:10) → 15-30 min (90:10→50:50) → 30-45 min (90:10), 流速: 1.0 mL/min, 注入量: 10 µL, PDA 検出器: 190 nm-800 nm (定量用検出波長 325 nm)。

### B-6-4) RMS の決定

各クロロゲン酸類について、B-6-2)にて得られた純度を用いて検量線用標準液濃度(µmol/mL)を補正した。これらの濃度を横軸に、B-6-3)で得られたピーク面積を縦軸にとった絶対検量線を各クロロゲン酸類について作成した。各クロロゲン酸類の絶対検量線の傾きを CA の絶対検量線の傾きでそれぞれ除し、RMS を求めた。

## C. 結果および考察

### C-1) HPLC 条件検討および基準物質の選定

クロロゲン酸類の RMS 決定に先立ち、溶解溶媒の pH を変えて 5CQA の UV 吸収スペクトルを測定した(図 2)。溶解溶媒の pH を pH 2.6, 4.8, および 6.9 としたところ、吸収極大波長(λ max)や吸収極小波長(λ min)に変化はなく、HPLC 分析時の試料の溶解溶媒や移動相の pH が変化しても λ max 等のずれは考慮しなくてよいと考えられた。

次に、移動相条件を検討した。通常、RMS 法を検討する際は、装置間のポンプ性能の差による溶媒比率の差が RMS に及ぼす影響を小さくするため、アイソクラティック条件を採用する。しかし、本研究では分析対象とするクロロゲン酸類が多く、分析効率等も考慮し、B-5-3)に示すようなグラジエント条件を採用した。なお、検討には「生コーヒー豆抽出物」を用い、対象とするクロロゲン酸類が良好に分離する条件を模索した(図 3)。

さらに、検出波長を考慮しながら、基準物質を選定した。基準物質は、化学的に安定かつ安価で高純度の市販試薬が入手可能なものが望ましい。また、検出器に UV や PDA を用いる場合は、分析対象物質と近い λ max をもつも

のが望ましい。これらの条件を満たす化合物として、CQA の部分構造であり発色団であるカフェ酸(CA)を選択した。

### C-2) クロロゲン酸類の単離・精製

B-3)に示すように「生コーヒー豆抽出物」の分画を実施した。フラッシュ精製により FQA を含む画分(Fr.1), diCQA を含む画分(Fr.2)および FCQA を含む画分(Fr.3)を得た(図 1)。各画分には複数の化合物が含まれており、さらにリサイクル分取装置によりそれぞれを精製した。各化合物は NMR を測定し、文献値<sup>1-4)</sup>と比較して化合物を同定した。

Fr.1 に含まれていた 2 つの化合物は、それぞれ<sup>1</sup>H-NMR スペクトルのケミカルシフトおよび積分値を文献<sup>4)</sup>と比較し、4FQA (26 mg) および 5FQA (45 mg)と同定した。Fr.2 に含まれていた 3 つの化合物も、それぞれ<sup>1</sup>H-NMR スペクトルのケミカルシフトおよび積分値を文献<sup>2)</sup>と比較し、3,4-diCQA (19.4 mg), 3,5-diCQA (36.4 mg)および 4,5-diCQA (37.3 mg)と同定した。Fr.3 には複数の化合物が含まれており、このなかから FCQA\_F2, FCQA\_F5 および FCQA\_F7 をそれぞれ 7.7 mg, 8.0 mg および 19.7 mg を精製した。これらの化合物について、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルのシグナルのケミカルシフトおよび積分値から、カフェ酸とフェルラ酸をひとつずつ有する化合物であることが推察された。キナ酸の水酸基とカフェ酸およびフェルラ酸の結合位置は、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを diCQA のものと比較して、FCQA\_F2 は 3,4-diCQA と、FCQA\_F5 は 3,5-diCQA と、FCQA\_F7 は 4,5-diCQA と同じ結合位置であると予測した。また、HMBC より、F\_CQA F2 においてキナ酸の 3 位にカフェ酸の、4 位にフェルラ酸の相関が見られ、3-caffeoyl-4-feruloylquinic acid と同定した。同様に FCQA\_F5 ではキナ酸の 3 位にフェルラ酸の、5 位にカフェ酸の相関が見られ、3-feruloyl-5-caffeoylquinic acid, FCQA\_F7 においてキナ酸の 4 位にカフェ酸の、5 位にフェルラ酸の相関が見られ、4-caffeoyl-5-feruloylquinic acid と、それぞれ同定した。さらに、これら FCQA の<sup>1</sup>H-NMR ス

ペクトルも文献<sup>2,3)</sup>と合致していることを確認した。

なお、3FQA は試薬を購入したが、夾雑物が多かったため精製を行い、3.9 mg の生成物を得た。

精製したものも含め、本研究で RMS を決定したクロロゲン酸類の構造式を図 4 に示す。

### C-3) クロロゲン酸類の RMS 決定

クロロゲン酸類の HPLC 測定用溶液には、単離精製品などもあり異性体等が含まれている可能性があるため、得られる HPLC クロマトグラム上で目的成分ピークと近接した位置に夾雑物由来のピークが検出する可能性がある。夾雑物等の影響を最小限にするため、各 HPLC 測定用溶液は化合物毎に調製し測定した。得られたクロマトグラムから、B-6-4)に記載の通り各クロロゲン酸類のカフェ酸に対する RMS を決定した。得られた RMS を表 3 に示す。

キナ酸にひとつカフェ酸が結合したモノカフェオイルキナ酸(CQA)のうち、結合位置だけが異なる 3CQA, 4CQA および 5CQA の RMS はそれぞれ 1.123, 1.115 および 1.115 であり、ほぼ同じであった。キナ酸にひとつフェルラ酸が結合し FQA のうち、結合位置だけが異なる 3FQA, 4FQA および 5FQA の RMS はそれぞれ 1.246, 1.262 および 1.502 であった。4FQA および 5FQA はモノカフェオイルキナ酸同様、ほぼ同じ RMS であったが、3FQA のみ大きな値となった。3FQA のみ大きな値である理由は不明であるが、ケイ皮酸誘導体のキナ酸への結合数が一つである場合、ケイ皮酸誘導体の化合物種が同じであれば、同一の RMS を用いても定量値への影響はせいぜい 1%程度と考えられた。

一方、5CQA の RMS に対する CQA および FQA (3FQA を除く)の RMS の比を算出したところ、FQA は CQA よりも 10%程度大きな値であった。フェルラ酸はカフェ酸の 3 位の水酸基がメトキシル基となった構造である。基準物質と 4FQA および 5FQA は溶出時の移動相条件が異なるため、CQA と 4FQA および 5FQA の RMS の違いは構造もしくは溶媒に

よる深色効果／淡色効果によるものと推測された。クロマトグラフィーの分析条件にもよるが、ケイ皮酸誘導体の種類が異なる場合、この構造が発色団であることから、同一の RMS と見なす前に一考が必要であることが示唆された。

キナ酸にカフェ酸が二つ結合した diCQA のうち、3,4-diCQA, 3,5-diCQA および 4,5-diCQA の RMS はそれぞれ 2.175, 2.268 および 2.151 であった。5CQA の RMS に対するこれらの RMS の比はそれぞれ 1.95, 2.03 および 1.93 であった。発色団のカフェ酸の数が単純に 2 倍に増えると RMS も 2 倍になると予想していたが、3,4-diCQA および 4,5-diCQA では 1.9 倍程度とわずかに小さな値となった。分子内に立体障害があると  $\epsilon$  は低下することが知られている<sup>5)</sup>。3,4-diCQA および 4,5-diCQA の二つのカフェ酸はキナ酸の隣り合った炭素に結合しており、二つのカフェ酸が隣り合っていない 3,5-diCQA と比較して立体障害の影響があるのではと考えられた。溶媒系は異なるが 5CQA と 4,5-diCQA のモル吸光係数を比較した報告があり、4,5-diCQA は 5CQA の 1.9 倍程度という結果とも矛盾がなかった<sup>6)</sup>。

キナ酸にカフェ酸とフェルラ酸がひとつずつ結合した FCQA のうち、本研究で単離精製した F\_CQA F2, F\_CQA F5 および F\_CQA F7 の RMS はそれぞれ 2.274, 2.429 および 2.398 であった。diCQA 同様、立体障害がもっとも小さいと思われる 3 位および 5 位にケイ皮酸誘導体が結合した F\_CQA F5 が最も大きい値を示したが、その RMS は diCQA よりも 10% 程大きく、FQA の RMS を 2 倍にした値(仮に 4FQA の 2 倍の 2.26)よりも 4% 程小さかった。これは、CQA の RMS が FQA の RMS より小さいことが影響していると考えられた。

以上の結果から、クロロゲン酸類の場合、立体障害等の影響もあり、発色団であるケイ皮酸誘導体の数が増えたからといって、その RMS が単純に 2 倍などになるとは限らないことが示された。しかし、キナ酸にケイ皮酸誘

導体が一つであれば、その位置異性体は同一の RMS が使用できそうであること、ケイ皮酸誘導体が 2 つだから RMS も 2 倍にして計算したとしても定量値への影響は 10% 程度で収まることが示唆された。

#### D. 結論

CA を基準物質としてクロロゲン酸類 12 化合物の RMS を求めた。CA を基準物質とした場合 CQA の RMS は概ね 1.12 であった。その他のクロロゲン酸類の RMS は、diCQA は CQA の約 2 倍、FQA は 1.1 倍、F+CQA は 2.1 倍程度であった。

本研究で用いた化合物のうち、CQA 以外は単離精製が必要であったり、市販試薬があっても非常に高価であったりするものがほとんどである。本研究の結果から、同一の発色団をもつ化合物群において、ひとつの化合物の RMS が明らかであれば、発色団の位置や数が異なっても、他の化合物の RMS がある程度予測可能と考えられた。

#### E. 参考文献

- 1) Chunpeng Wan *et. al.* “Caffeoylquinic Acids from the Aerial Parts of *Chrysanthemum coronarium* L.,” plants, 2017.
- 2) 天倉吉章, “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) 既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究\_平成 27 年度研究分担報告書,” 2015.
- 3) 天倉吉章, “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) 既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究\_平成 28 年度研究分担報告書,” 2016.
- 4) 天倉吉章, “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) 既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究\_平成 26 年度研究分担報告書,” 2014.
- 5) 脇田久伸, 増田勲, 藤原学, “可視・紫外線吸収スペクトル法および蛍光スペクトル法,” 著: 第二版 機器分析のてびき①, 化学同人, 1996, p. 131.
- 6) Kaeswurm J A H, Scharinger A, Teipel J,

Buchweitz M: Absorption Coefficients of Phenolic Structures in Different Solvents Routinely Used for Experiments. *molecules*, 2021; 26: 4656. (doi: 10.3390/molecules26154656)

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物公定書収載品目における基原生物に使用される学名の考え方とその表記法. *食衛誌*, 2023; 64: 78-88.
- 2) Masumoto N, Ohno T, Suzuki T, Togawa T, Sugimoto N. Application of the relative molar

sensitivity method using GC-FID to quantify safranal in saffron (*Crocus sativus* L.). *J Nat Med* 2023; 77: 829–838. (<https://doi.org/10.1007/s11418-023-01724-8>)

該当無し

### 2. 学会発表

- 1) 増本直子: 相対モル感度(RMS)を用いた定量法、室間共同試験をしてみたら. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

表 1 本研究に用いた試薬

試薬名	略称	メーカー	製造番号	Lot. No.	管理番号
カフェ酸	CA	Cayman Chemical Co.	70602	0452227-5	08-52a
クロロゲン酸	5CQA	Sigma-Aldrich Co.	C3878	025K1096	04-74b
クリプトクロロゲン酸	4CQA	Sigma-Aldrich Co.	65969-10MG2	BCCB9338	22100146
ネオクロロゲン酸	3CQA	東京化成工業(株)	N11552	7PD5G-HK	22100096
3- <i>O</i> -フェルロイルキナ酸	3FQA	フナコシ (株) ChemFaces Biochemical Co., Ltd.	NS430401 CFN923932	0002 CFS202101	22100013 22200009
2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸ナトリウム	DSS- <i>d</i> <sub>6</sub>	富士フィルム和光純薬(株)	044-31671	APL6177	23-40c , 23-95c
重メタノール		MERCK(株)	1.06028.0025 2	S5831128 116	2210008 9,221000 90,22100 165,2220 0011

表 2 各化合物の定量 NMR 測定時に定量に用いたシグナル

化合物名	定量対象シグナル
5CQA	H-7' (1H, d, 7.54 ppm), H-2' (1H, d, 7.04 ppm), H-6' (1H, dd, 6.93 ppm), H-5' (1H, d, 6.76 ppm), H-8' (1H, d, 6.25 ppm), H-5 (1H, td, 5.32 ppm), H-3 (1H, m, 4.15 ppm), H-4 (1H, dd, 3.71 ppm);
3CQA	H-7' (1H, d, 7.56 ppm), H-2' (1H, d, 7.03 ppm), H-6' (1H, dd, 6.93 ppm), H-5' (1H, d, 6.76 ppm), H-8' (1H, d, 6.30 ppm), H-5 (1H, q, 5.34 ppm), H-3 (1H, td, 4.15 ppm), H-4 (1H, dd, 3.66 ppm)
4CQA	H-7' (1H, d, 7.63 ppm), H-2' (1H, d, 7.05 ppm), H-6' (1H, dd, 6.95 ppm), H-5' (1H, d, 6.78 ppm), H-8' (1H, d, 6.36 ppm), H-3+H-5 (2H, m, 4.28 ppm);
3,4-diCQA	H-5 (1H, q, 5.65 ppm), H-4 (1H, td, 4.36 ppm);
3,5-diCQA	H-7'+H-7'' (2H, dd, 7.56 ppm), H-6'+H-6'' (2H, t, 7.06 ppm), H-2'+H-2'' (2H, td, 6.93 ppm), H-5'+H-5'' (2H, dd, 6.76 ppm), H-8'+H-8'' (2H, dd, 6.31 ppm), H-3+H-5 (2H, m, 5.40 ppm), H-4 (1H, dd, 3.95 ppm)
4,5-diCQA	H-7'+H-7'' (2H, dd, 7.56 ppm), H-6'+H-6'' (2H, dd, 7.01 ppm), H-2'+H-2'' (2H, td, 6.89 ppm), H-5'+H-5'' (2H, dd, 6.74 ppm), H-8'+H-8'' (2H, dd, 6.23 ppm), H-5 (1H, m, 5.63 ppm), H-3 (1H, dd, 5.10 ppm), H-4 (1H, m, 4.36 ppm)
5FQA	H-7' (1H, d, 7.61 ppm), H-6' (1H, s, 7.19 ppm), H-2' (1H, d, 7.06 ppm), H-5' (1H, d, 6.80 ppm), H-8' (1H, d, 6.34 ppm), H-5 (1H, m, 5.32 ppm), H-3 (1H, s, 4.15 ppm), H-4 (1H, d, 3.72 ppm)
4FQA	H-7' (1H, d, 7.70 ppm), H-6' (1H, s, 7.20 ppm), H-2' (1H, d, 7.06 ppm), H-5' (1H, d, 6.80 ppm), H-8' (1H, d, 6.44 ppm), H-3+H-5 (2H, m, 4.28 ppm)
3FQA	H-5 (1H, m, 5.36 ppm), H-4 (1H, d, 3.66 ppm)
F+CQA_F2	H-2'' +H-2'+H-6' (3H, m, 7.06 ppm), H-6'' (1H, m, 6.89 ppm), H-5'+H-5'' (2H, m, 6.75 ppm), H-5 (1H, m, 5.63 ppm), H-3 (1H, m, 4.36 ppm)
F+CQA_F5	H-2' (1H, s, 7.19 ppm), H-5'+H-2'' (2H, m, 7.06 ppm), H-5'' (1H, m, 6.94 ppm), H-5+H-3 (2H, m, 5.41 ppm)
F+CQA_F7	H-2'' +H-2'+H-6'' (3H, m, 7.06 ppm), H-3 (1H, m, 5.63 ppm)

表3 クロロゲン酸類のカフェ酸に対する相対モル感度 (RMS)

	CA に対する RMS			平均値 (SD)	5CQA の RMS に 対する 各クロロゲン酸類の RMS の比
	LC 装置 1		LC 装置 2		
	PDA 検出器	UV 検出器	UV 検出器		
5CQA	1.116	1.112	1.116	1.115 (0.002)	1.00
4CQA	1.117	1.113	1.115	1.115 (0.002)	1.00
3CQA	1.126	1.124	1.120	1.123 (0.003)	1.01
3,4-diCQA	2.175	2.171	2.179	2.175 (0.004)	1.95
3,5-diCQA	2.264	2.250	2.291	2.268 (0.021)	2.03
4,5-diCQA	2.140	2.132	2.180	2.151 (0.026)	1.93
5FQA	1.232	1.245	1.261	1.246 (0.015)	1.12
4FQA	1.252	1.264	1.269	1.262 (0.009)	1.13
3FQA	1.481	1.500	1.524	1.502 (0.022)	1.34
FCQA_F2	2.269	2.275	2.278	2.274 (0.005)	2.04
FCQA_F5	2.411	2.422	2.453	2.429 (0.022)	2.17
FCQA_F7	2.400	2.405	2.389	2.398 (0.008)	2.15

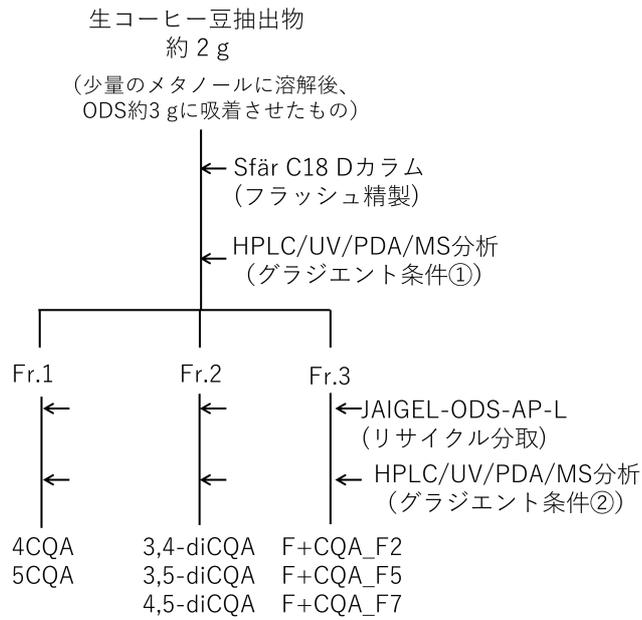


図 1 「生コーヒー豆抽出物」からクロロゲン酸類単離のスキーム

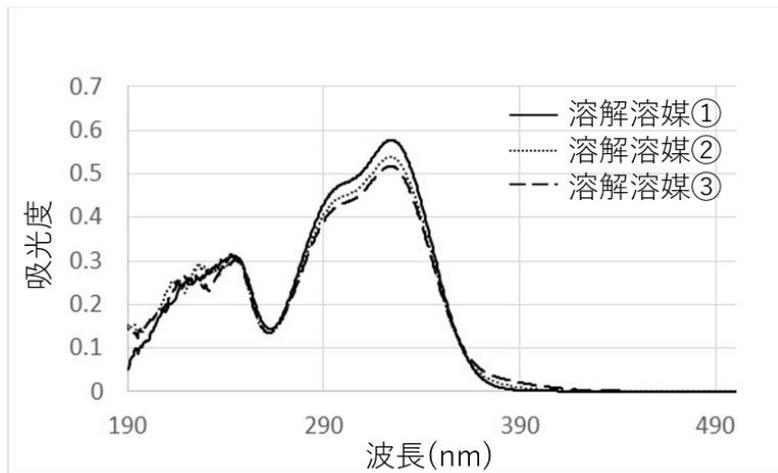


図 2 pH を変化させたときの 5CQA 溶液の UV 吸収スペクトル  
溶解溶媒① : 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液 pH=2.6,  
溶解溶媒② : 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa : 0.1M CH<sub>3</sub>COOH = 60 : 40 pH=4.8,  
溶解溶媒③ : 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液 pH=6.9

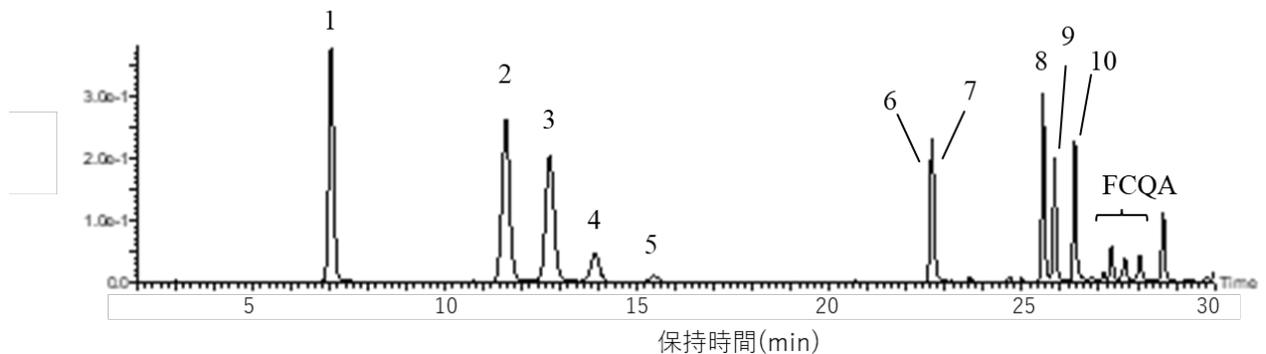


図 3 「生コーヒー豆抽出物」の HPLC クロマトグラム  
ピーク 1: 3CQA, ピーク 2: 5CQA, ピーク 3: 4CQA, ピーク 4: 3FQA, ピーク 5: CA,  
ピーク 6: 4FQA, ピーク 7: 5FQA, ピーク 8: 3,4-diCQA, ピーク 9: 3,5-diCQA,  
ピーク 10: 4,5-diCQA. HPLC 条件は B-6-3)に記載

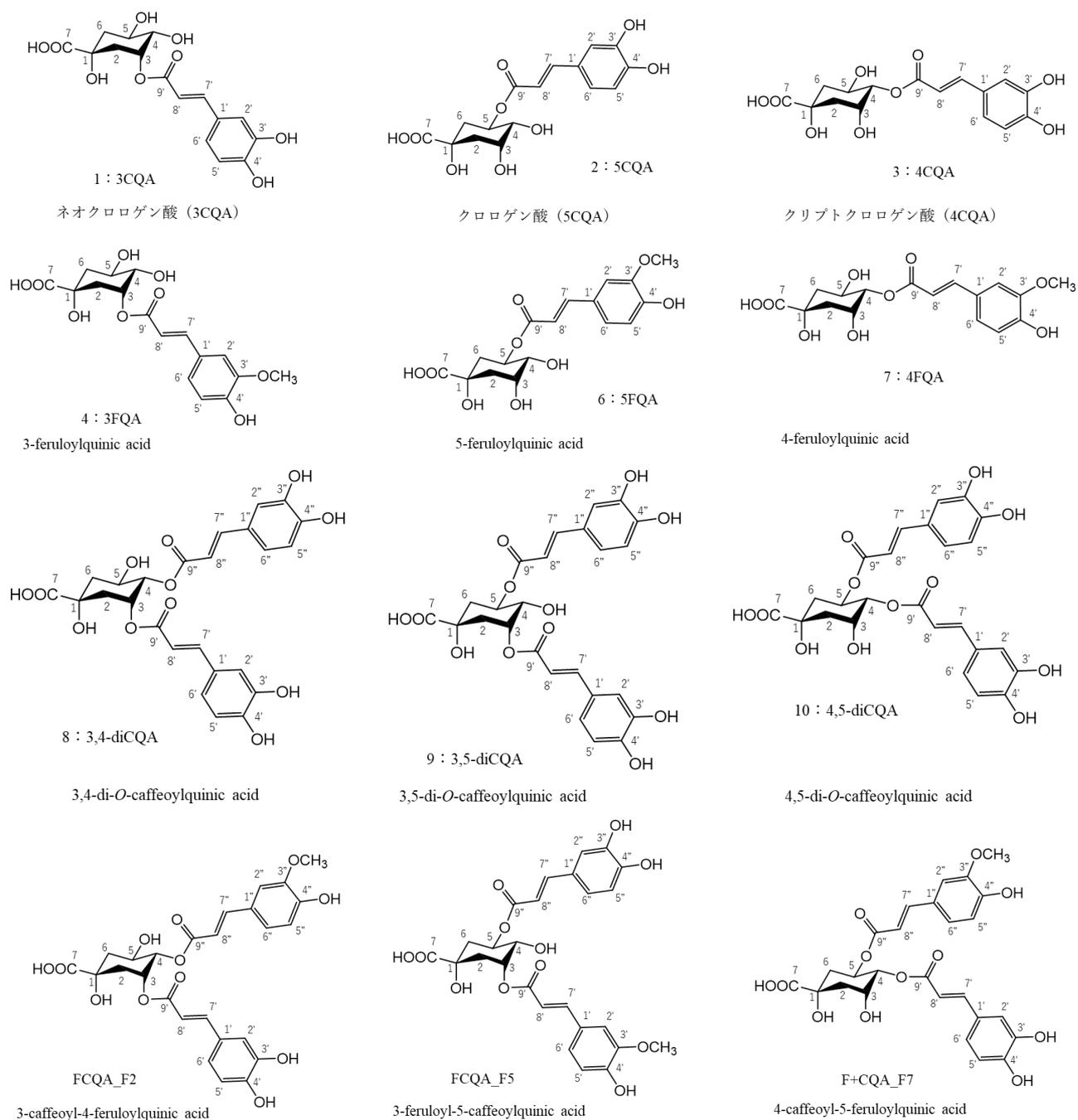


図4 本研究でカフェ酸に対する RMS を決定したクロロゲン酸類の構造

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）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

既存添加物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、ノルビキシン (NBx) を主成分とするもの及びビキシン (Bx) を主成分とするもの」と定義されている。第10版食品添加物公定書の改定において、アナトー色素（ノルビキシン）及びアナトー色素（ビキシン）に成分規格が二つに分離され、括弧内の成分を主に含むものとされたが、成分規格に本質的な変更はない。主成分の定量分析にはHPLCの絶対検量線法が有効と考えられるが、幾何異性体の存在等の問題より、信頼ある分析法は困難である。定量用標品は*cis*体が主であり、*trans*体がわずかに混在していることが確認された。*trans*体の精製は非常に煩雑かつ一度の精製で得られる量が少ないことが課題となった。そこで、本年度は、*trans*体を合成することとし、これまでに合成したSRと合わせて、SR-HPLC法を目指した検討を実施した。HPLCによる分離分析を検討し、得られたNBx及びBxを混合した溶液とデザインしたSRの保持時間などを確認した結果、SR候補物質としてn-C<sub>9</sub>及びn-C<sub>11</sub>が有効と考えられた。つぎに、NBx、Bx、SR候補物質の検量線を作成した結果、相関係数0.997以上と良好な結果を得ることができた。

研究協力者

布目真梨 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NBx及びBxと定義されている<sup>1)</sup>。また、第10版食品添加物公定書の改定において、アナトー色素（ノルビキシン）及びアナトー色素（ビキシン）に成分規格が二つに分離され、括弧内の成分を主に含むものとされたが、成分規格に本質的な変更はない<sup>2)</sup>。我々はこれまで公定書による規格試験、高速液体クロマト

グラフィー (HPLC) 分析、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 定性を実施した。その中で、NBx 及び Bx の安定性や異性化などの問題点が挙げられた。つまり、これらを指標とする絶対検量線法による定量分析は、信頼性に欠けるため、新たな分析法の開発が必要であると判断した。Scotter らの報告では、アナトーの主成分である NBx 及び Bx はそれぞれ *trans*-/*cis*-体が存在しており、それぞれを測り分ける必要性がある (図1)<sup>3)</sup>。幾何異性体は、一般的に逆相系 ODS で分離可能である。そのため、図2に示す HPLC 分析で検出された未知ピークは幾何異性体と推定される。一方で、これら NBx 及び Bx 幾何異性体の定量要標品は入手できない。そこで、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いた NBx 及び Bx 幾何異性体の単離精製をこれまで検討したが、HSCCCにより不純物質の



除去は可能であったが、幾何異性体の分離は非常に困難であった。そこで本年度は、*trans*-NBx 及び *trans*-Bx を合成することとした。また、それらの状況を考慮して、相対モル感度係数 (RMS) を用いた Single Reference (SR) HPLC の開発へ繋げることとした。SR-HPLC を開発するにあたり、これまで本研究班での検討の結果、類似した最大吸収波長をもつものをデザインすることが望まれる<sup>4,5)</sup>。そこで、本研究では、新たな赤色領域に特化した SR をデザインした。今回提案する SR は、アナトーを含めて、天然キストカロテノイド色素に拡大できるものと思われる。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

NBx 及び Bx 試薬製品は、富士フィルム和光純薬社製を用いた。アナトー色素製剤は、ノルビキシシ (三栄源エフ・エフ・アイ社製；粉末) を用いた。

アセトニトリル (HPLC 用)、アセトン (特級)、メタノール (HPLC 用)、DSS-*d*<sub>6</sub> 標準品、ギ酸 (LC/MS 用、約 99%) 及び酢酸 (LC/MS 用、約 99%) は富士フィルム和光純薬社製を用いた。超純水は PURELAB flex5 system (ELGA 社製) を用いて得た。ジメチルスルフォキシド-*d*<sub>6</sub> (DMSO-*d*<sub>6</sub>) はシグマアルドリッチ社製を用いた。

### B-2) 装置

電子天秤：メトラ製 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  
マイクロ天秤：島津製作所社製 AUW120D  
NMR 装置：JEOL 社製 ECZL-600

### 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% 酢酸水溶液/0.1 vol% 酢酸メタノールを使用し、10/90 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 μm, 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 μL

### B-4) SR デザイン

国立医薬品食品衛生研究所有機化学部との共同により、SR 候補化合物を検討した。すなわち、極大吸収波長 450~500 nm で検出できる化合物の合成を検討した (図 3)。

### B-5) <sup>1</sup>H-qNMR による *trans/cis*-NBx, Bx 及び SR の絶対定量

DSS-*d*<sub>6</sub> 標準品を 10 mg を DMSO-*d*<sub>6</sub> に溶解し、これを希釈溶媒とした。測定対象化合物 10 mg を希釈溶媒にて 2 mL または 3 mL に溶解し、そのうちの 0.5 mL を NMR 試験管に移し、<sup>1</sup>H-qNMR で内標準法により定量した。

Data points : 60,000  
Flip angle : 90°  
Pulse delay : 60 s  
Scans : 8 times  
Probe : 25°C  
Software : JEOL 社製 Purity Pro qNMR ANALYSIS Software

### B-6) RMS 算出

<sup>1</sup>H-qNMR の定量結果を用いて、絶対検量線の範囲は 0~100 mg/L と設定し、RMS を求めた。

RMS を算出するとき、ランベルト・ベールの法則の式を下記のように式変形した。なお、吸光度 (*R*) は、吸光係数 ( $\epsilon$ )、濃度 (*C*) 及び層長 (*l*) で表される。

$$R = \epsilon \times C \times l$$

$$\frac{R_{\text{analyte}}}{(\varepsilon_{\text{analyte}} \times C_{\text{analyte}})} = \frac{R_{\text{SR}}}{(\varepsilon_{\text{SR}} \times C_{\text{SR}})}$$

$$\left(\frac{\varepsilon_{\text{analyte}}}{\varepsilon_{\text{SR}}}\right) \times C_{\text{analyte}} = \left(\frac{R_{\text{analyte}}}{R_{\text{SR}}}\right) \times C_{\text{SR}}$$

$$\frac{\varepsilon_{\text{analyte}}}{\varepsilon_{\text{SR}}} = \left(\frac{R_{\text{analyte}}}{R_{\text{SR}}}\right) \times \left(\frac{C_{\text{SR}}}{C_{\text{analyte}}}\right) = \text{RMS}$$

上記より、NBx 及び Bx の RMS を、SR に対する NBx 及び Bx の絶対検量線の傾きの比より算出した。なお、0 μmol/L のピーク面積は検量線の原点とした。

## C. 結果及び考察

### C-1) HPLC 分離分析の検討

国内で市販される NBx 及び Bx の HPLC 分離分析を令和 3 年度の報告に従い、測定を実施した。その結果、図 4 の HPLC クロマトグラムが得られた。ピーク面積からその純度は、NBx で 91.1% 及び Bx で 97.0% となった。また、既報<sup>3)</sup> の HPLC クロマトグラムと比較して、いずれも *cis* 体と考えられた。また、今回の HPLC 分離分析から、NBx/Bx 混合溶液を調製し、HPLC 定量分析を行ってしまうと、NBx 標品に混入する Bx により過剰評価してしまう恐れが考えられた。さらに、本標品は、100 mg が 3~4 万円と高額であり、汎用性に欠ける。さらに、今後、既存添加物の状態（温度、pH など）により、幾何異性化の可能性も否定できない。つまり、従来の標準品を用いた絶対検量線法では正確な定量評価が困難であることが分かった。

### C-2) SR デザイン

NBx/Bx 混合溶液を用いて、デザインした SR の評価を行うこととした。HPLC（検出波長：460 nm）により、デザインした 6 種類の SR 及び NBx/Bx 混合溶液を用いて比較を行った結果、NBx と Bx の不純物を考慮して、n-C<sub>11</sub> を用いることとした（図 5）。次に、NBx、Bx、n-C<sub>11</sub> の

検量線を作成した結果、相関係数 0.999 以上となった（図 6）。<sup>1</sup>H-qNMR で純度を算出し、RMS を求めることが可能となった。

### C-3) <sup>1</sup>H-qNMR による合成した *trans*-NBx、Bx 及び SR の絶対定量

本研究では、<sup>1</sup>H-qNMR 用標準物質として、DSS-*d*<sub>6</sub> を用いた。DSS-*d*<sub>6</sub> の純度（92.4%）に基づいて、NBx、Bx 及び n-C<sub>11</sub> を <sup>1</sup>H-qNMR により定量し、純度を計算した。それらの <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルを図 7 に示した。その結果、*cis*-NBx は 68.9%、*cis*-Bx は 97.2%、*trans*-NBx は 15.5%、*trans*-Bx は 41.9%、n-C<sub>11</sub> は 94.1% であった。

### C-4) RMS 算出

NBx 及び Bx と n-C<sub>11</sub> の NMR 試験管の試料溶液を用いて、HPLC 用標準溶液を調製し、絶対検量線を作成し（原点通過、0~100 mg/L）、図 8 に示した。さらに、本検量線より n-C<sub>11</sub> に対する各分析対象物質の RMS を算出した結果、*cis*-NBx は 13.7、*cis*-Bx は 11.5、*trans*-NBx は 13.9、*trans*-Bx は 10.2 であった。

## D. 結論

本研究では、アナトー色素における NBx 及び Bx の SR-HPLC 定量法を構築した。まず、標準品が入手困難である *trans*-NBx 及び *trans*-Bx さらに SR を合成し得ることができた。そして、qNMR により絶対定量を行い、その定量値に基づいて検量線を作成した結果、RMS を算出できた。今後はそれらの RMS を用いて流通しているアナトー色素中の NBx 及び Bx を定量を行い、絶対検量線法とほぼ同じ定量値との比較を行う。また、様々な条件下（研究室間、日間、カラムなど）における定量値の再現性を確認することが必要であると考えられる。

## E. 参考文献

- 1) 第 9 版食品添加物公定書，厚生労働省（2017）。

- 2) 第 10 版食品添加物公定書, 厚生労働省 (2024).
- 3) Scotter MJ, Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Food Addit. Contam.* 11, 301-315. (1994)
- 4) 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, 25-31. (2022)
- 5) Takahashi, M., Nishizaki, Y., Morimoto, K., Sugimoto, N., Sato, K., Inoue, K. Design of synthetic single reference standards for the simultaneous determination of sesamin, sesamol, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity. *Sep. Sci. Plus* 1, 498-505 (2018)

G. 知的財産権の出願. 登録状況  
なし

## F. 研究業績

### 1. 学会発表等

- (1) 中森洋紀、布目真梨、辻巖一郎、出水庸介、増本直子、永津明人、杉本直樹、井之上浩一: デザイン Single reference-HPLC 法によるアナトー色素のビキシシ及びノルビキシシの分析. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会(2023.7.14) [東京].

### 2-1. 論文発表等

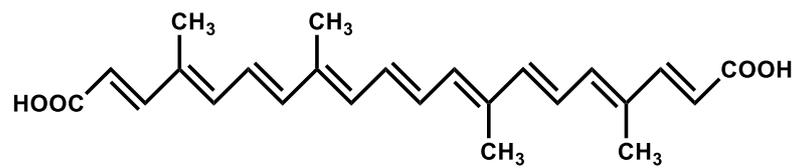
なし

### 2-2. 総説

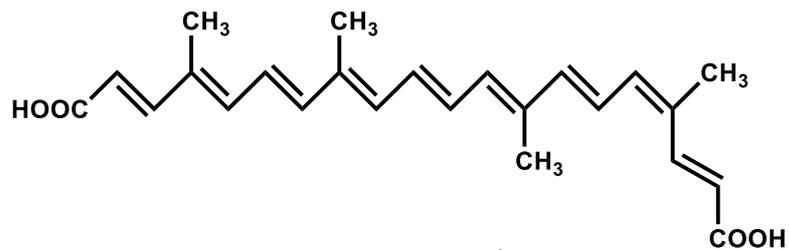
なし

### 2-3. 単行本

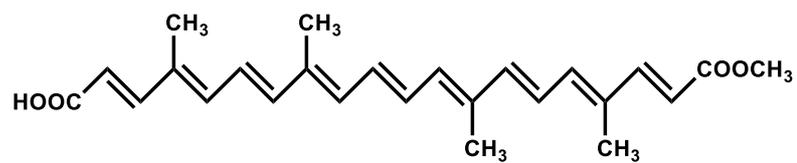
なし



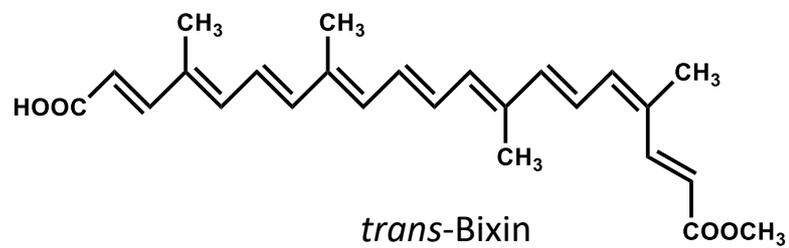
*cis*-Norbixin



*trans*-Norbixin



*cis*-Bixin



*trans*-Bixin

図 1. 分析対象物質の構造式 (幾何異性体)

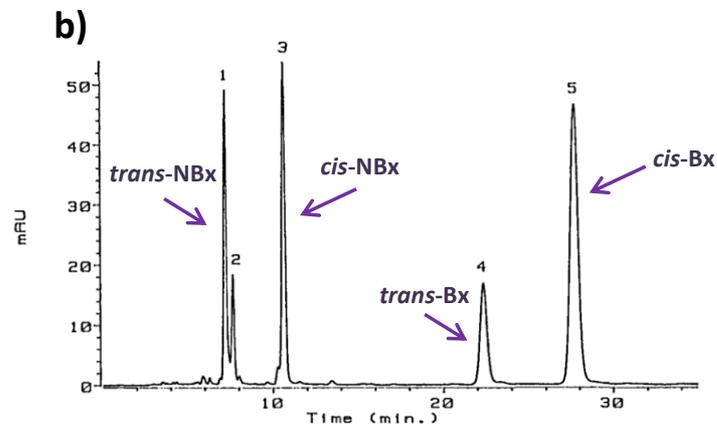
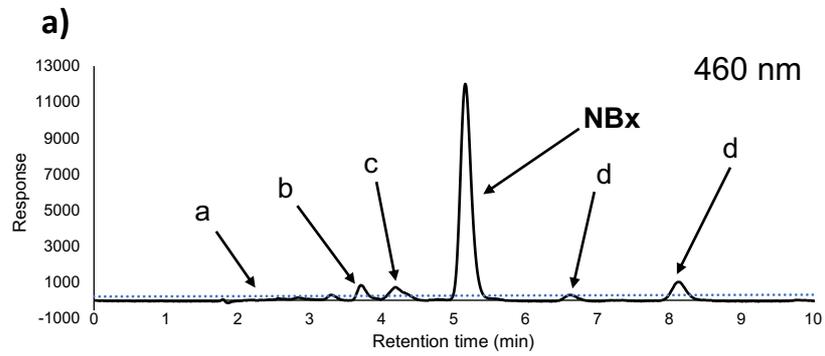


図 2. 幾何異性体 NBx 及び Bx の HPLC クロマトグラム

a) 令和 3 年度報告

b) 既報<sup>3)</sup>の報告

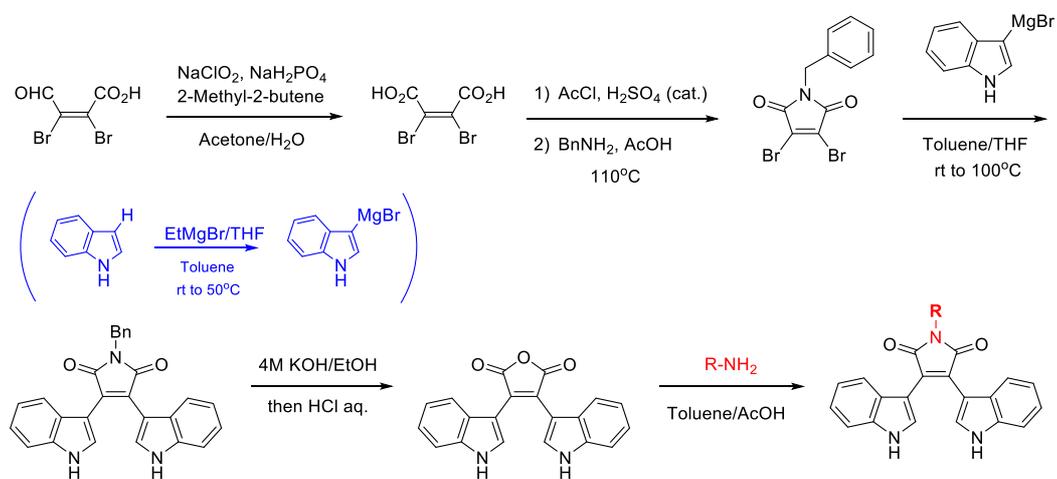


図 3. SR デザインの合成経路

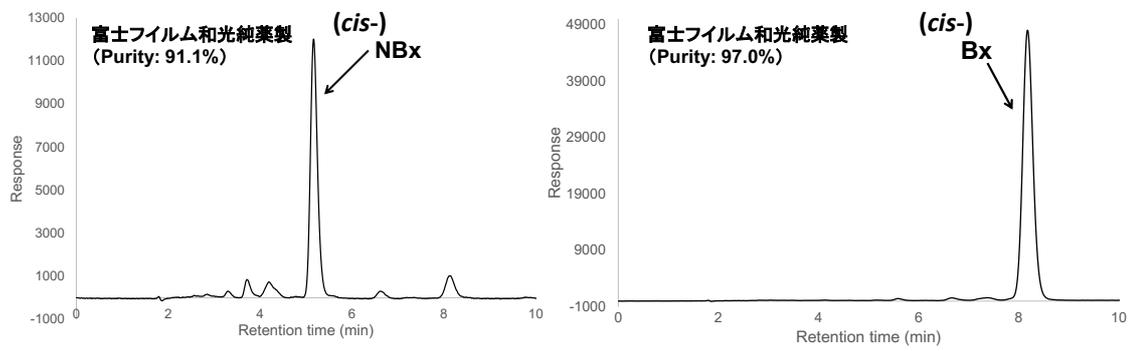


図 4. NBx 及び Bx 標準溶液の HPLC クロマトグラム

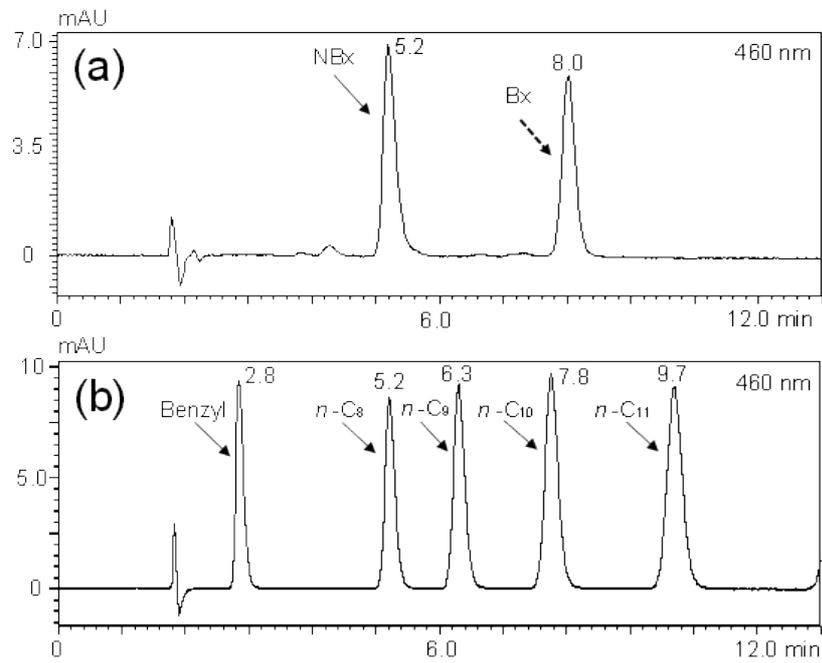


図 5. NBx/Bx 混合溶液及び SR 候補の HPLC クロマトグラム

(a) NBx/Bx 混合溶液

(b) SR 候補の混合溶液

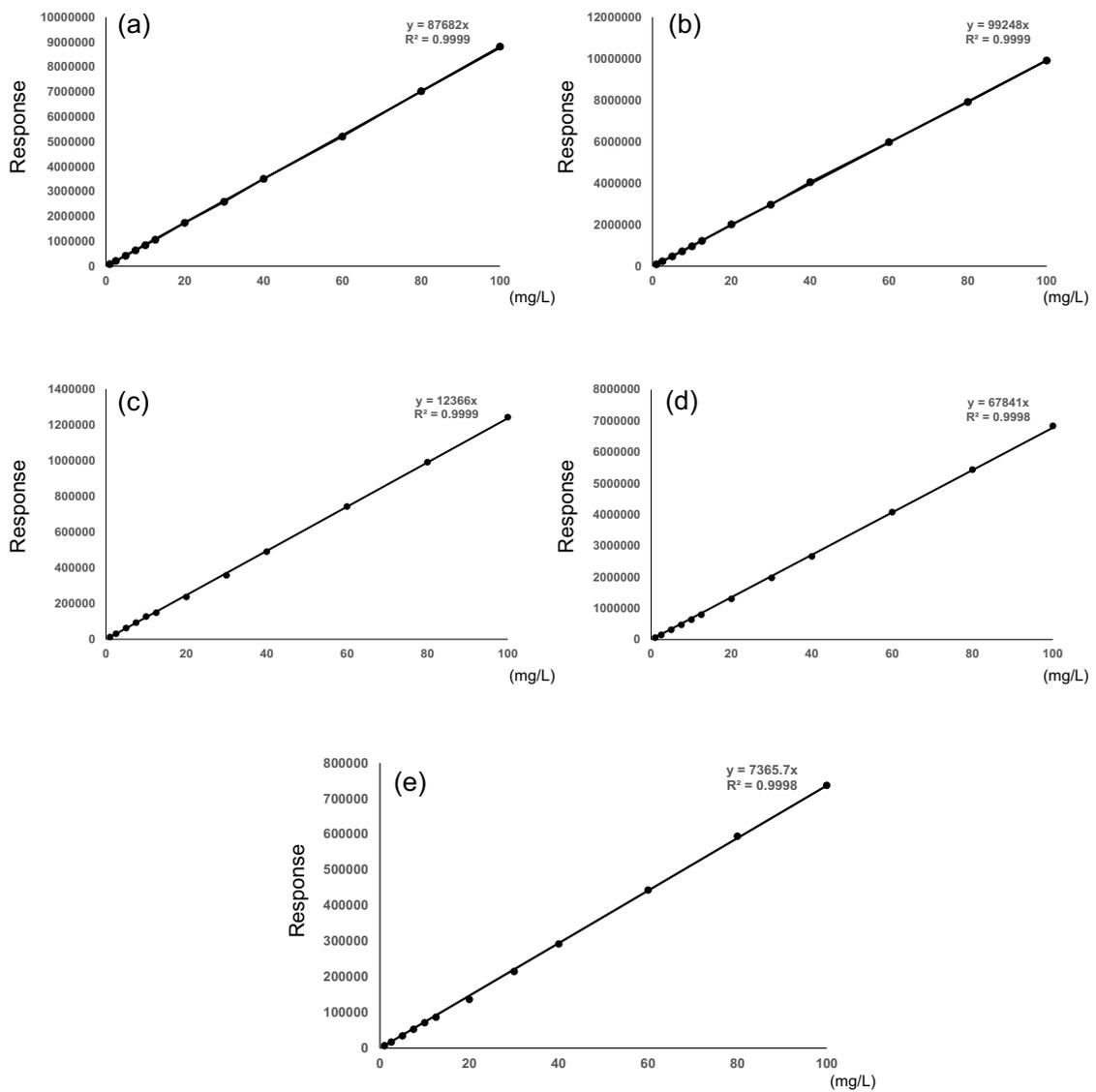


図 6. NBx, Bx,及び n-C<sub>11</sub> の検量線  
 (a) *cis*-NBx ( $y = 87682x$ , 相関係数 0.999)  
 (b) *cis*-Bx ( $y = 99248x$ , 相関係数 0.999)  
 (c) *trans*-NBx ( $y = 12366x$ , 相関係数 0.999)  
 (d) *trans*-Bx ( $y = 67841x$ , 相関係数 0.999)  
 (e) n-C<sub>11</sub> ( $y = 7365.7x$ , 相関係数 0.999)

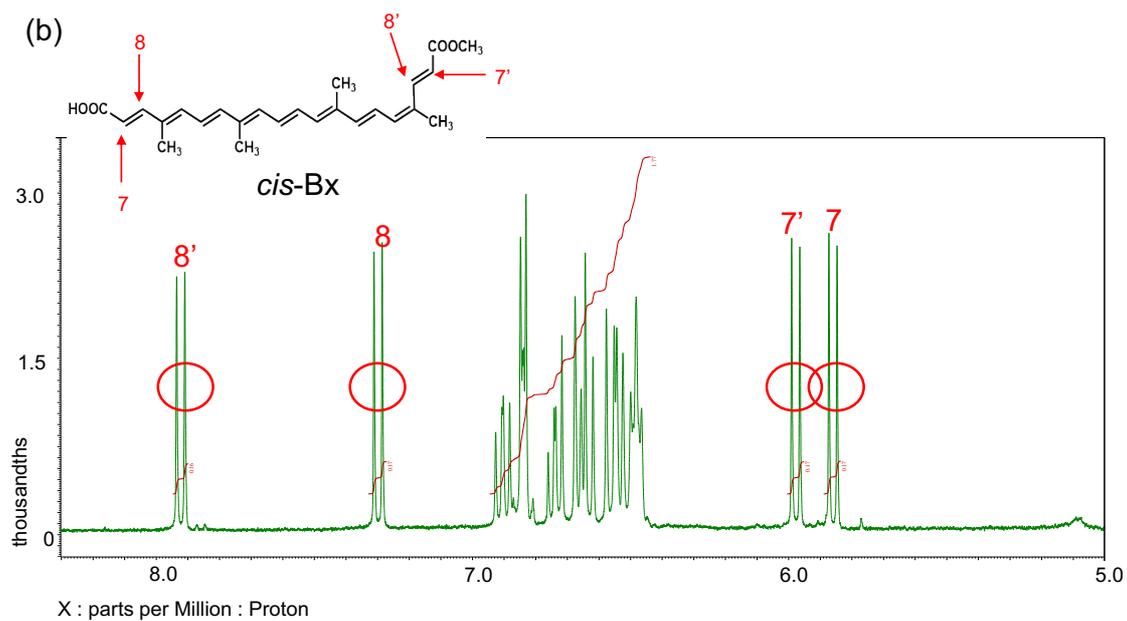
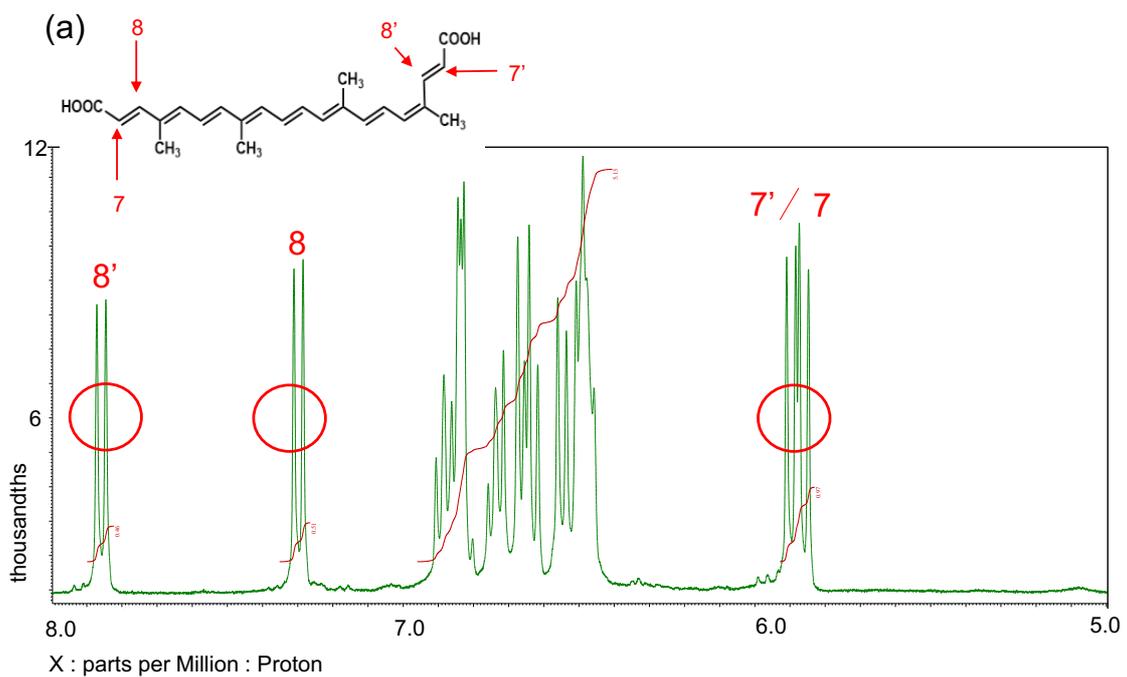


図 7. *cis/trans-Bx/NBx* 及び *n-C<sub>11</sub>* の qNMR スペクトル (その 1)

(a) *cis-NBx* (b) *cis-Bx*

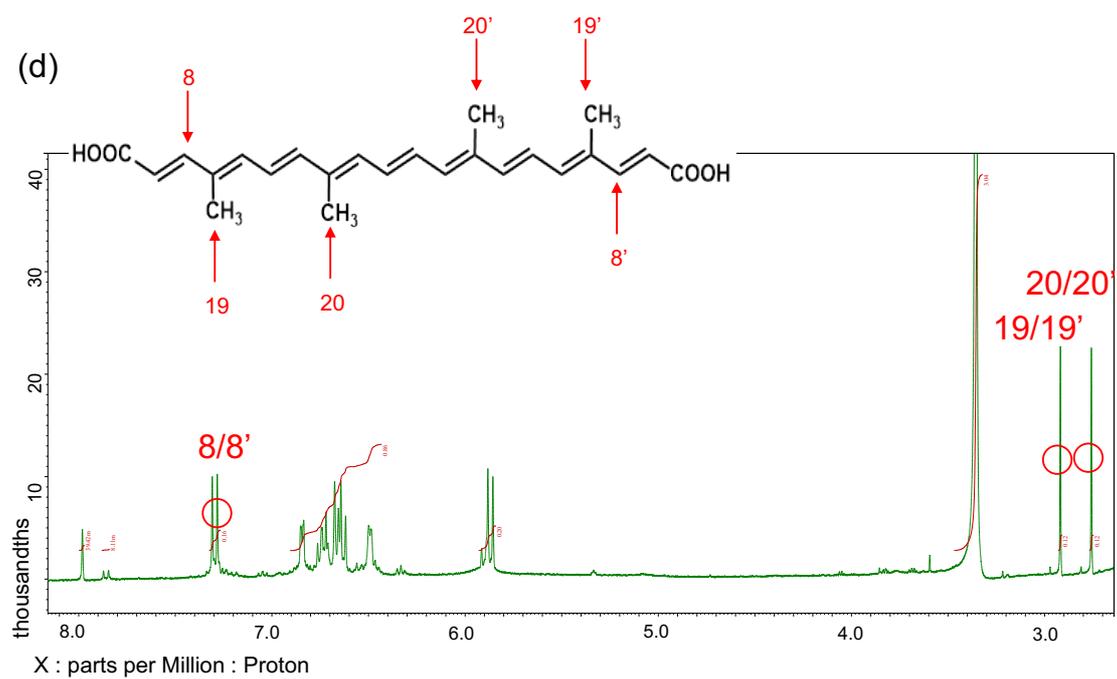
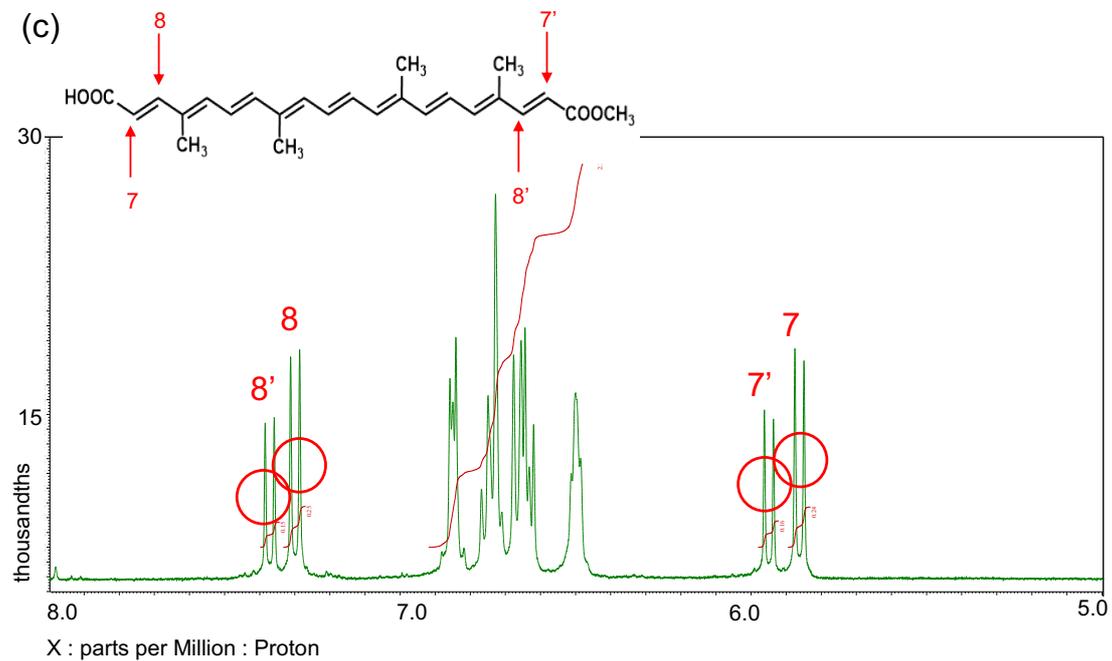


図 7. *cis/trans*-Bx/NBx 及び *n*-C<sub>11</sub> の qNMR スペクトル (その 2)

(c) *trans*-NBx (d) *trans*-Bx

(e)

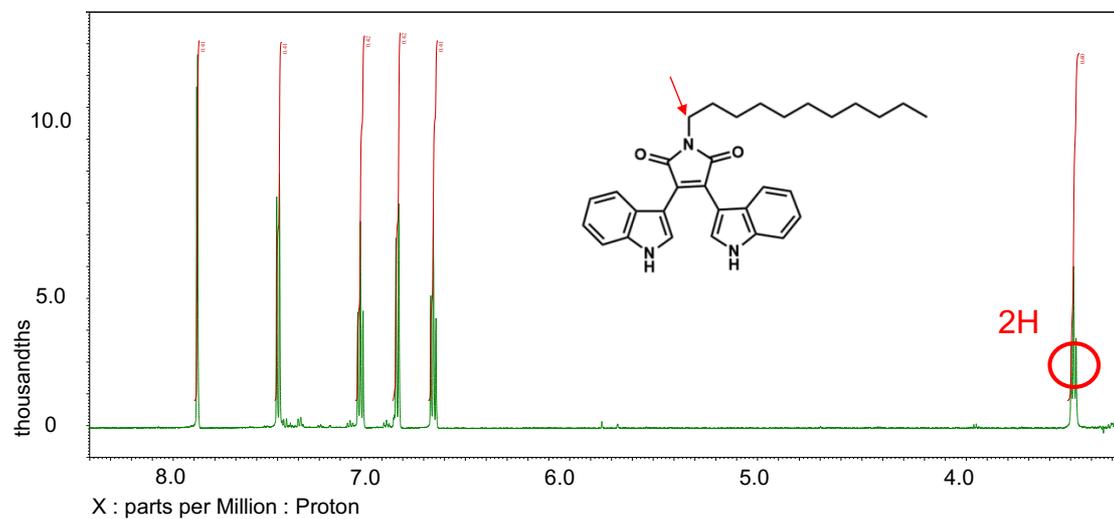


図 7. *cis/trans*-Bx/NBx 及び n-C<sub>11</sub> の qNMR スペクトル (その 3)

(e) n-C<sub>11</sub>

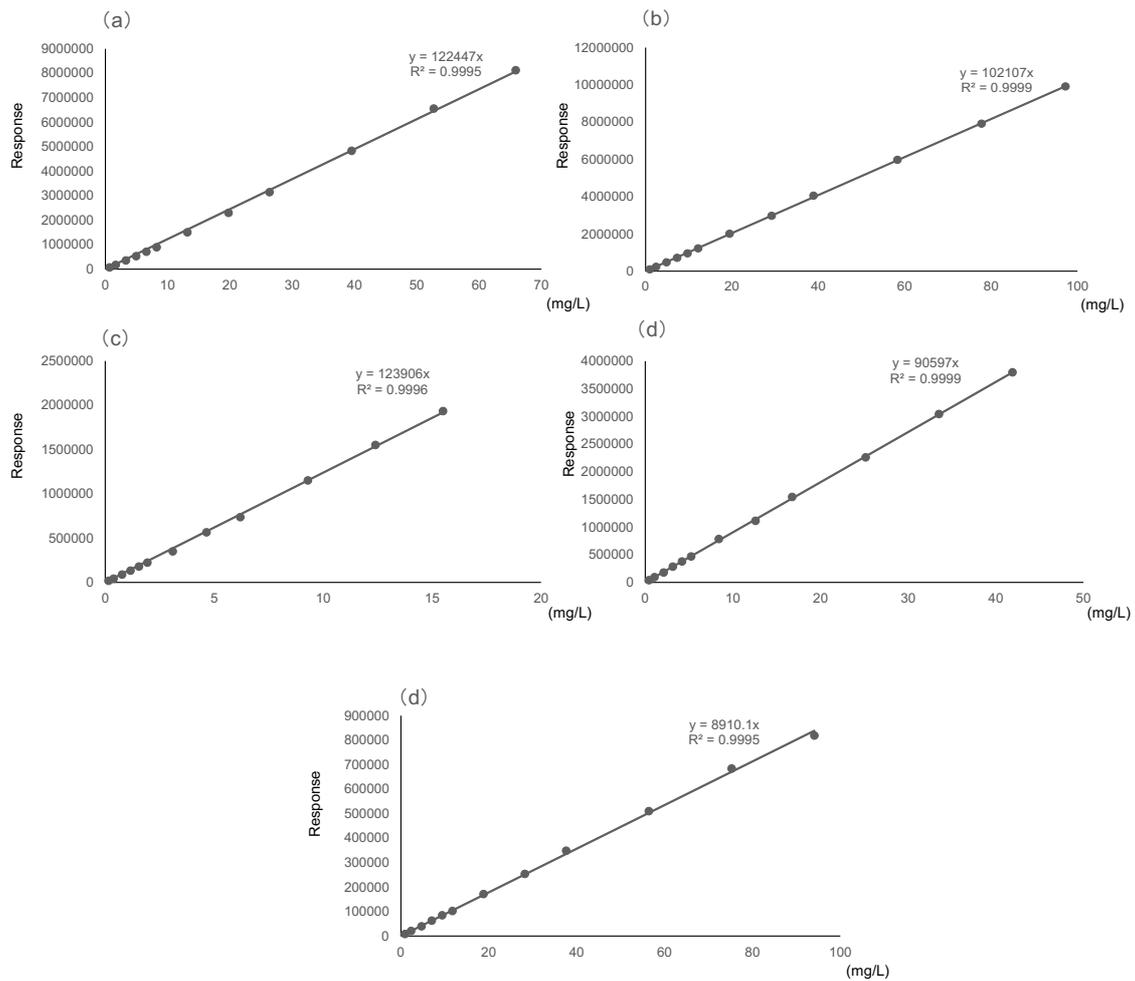


図 8. 純度補正後の NBx, Bx, 及び n-C<sub>11</sub> の検量線

(a) *cis*-NBx ( $y = 122447x$ , 相関係数 0.999)

(b) *cis*-Bx ( $y = 102107x$ , 相関係数 0.999)

(c) *trans*-NBx ( $y = 123906x$ , 相関係数 0.999)

(d) *trans*-Bx ( $y = 90597x$ , 相関係数 0.999)

(e) n-C<sub>11</sub> ( $y = 8910.1x$ , 相関係数 0.999)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

既存添加物カシアガム中のアントラキノンの分析手法に関する研究

分担研究者 大槻 崇 日本大学 生物資源科学部 食品開発学科 准教授

**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、現在、成分規格が未設定であるカシアガムを対象にその成分規格における定量法の確立に関する検討を行った。今年度は、相対モル感度（RMS）を用いたカシアガム中のアントラキノン分析法の確立に向けた検討を実施した。その結果、正確な標準溶液の濃度に基づいて作成した各検量線式の傾きの比より、基準物質3種に対する測定対象5種の各RMSが判明した。また、試験溶液の調製において、参考とするJECFA規格におけるカシアガム中のアントラキノン分析法（現行法）の性能を検証したところ、加熱時間の変更（3.5時間から1時間）やこれに伴う抽出回数の変更が必要であることが判明した。なお、製品（実試料）1種を用いた測定において、測定対象2種に対する夾雑成分の妨害や抽出操作（液々分配）時のエマルジョンの生成など、現行法の前処理法やHPLC条件について、改良、最適化が必要であることが明らかとなった。

## A. 研究目的

カシアガム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一つであり、増粘安定剤として使用される<sup>1</sup>。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5版既存添加物自主規格<sup>2</sup>に基づいて製造されたものが使用、流通していると考えられる。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、このカシアガムも「食品、添加物等の規格基準」の策定および次期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。

カシアガムの基原・製法・本質について、既存添加物名簿収載品目リストでは「マメ科

エビスグサモドキ(*Cassia tora* LINNE)の種子の胚乳部を粉砕して得られたものである。主成分は多糖類である。」と記載されている<sup>1</sup>。一方、エビスグサモドキの胚外皮には発がん性の懸念のあるアントラキノン類が含まれる。従って、カシアガムにもアントラキノン類が一部残留することが予想され、このような発がんなどの毒性のある化合物が含有されるものを食品添加物として使用する場合は、安全性を考慮した残留量の設定が必要である。FAO/WHO 食品添加物専門家会議（JECFA）におけるカシアガムの規格<sup>3</sup>では、安全性の確保の観点から、アントラキノン類の含有量は0.5 mg/kg以下と規定されている。また、この基準値における測定対象はエモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸、フィシオン（図1）の5種であり、これらの定量法としてダントロン（1,8-DAQ）を用いたHPLCによる内標準法が規定されている。しかし、測定対象5種の定量用標品について、認証標準物質

のような正確な純度が明示された標品の入手はできず、市販試薬をそのまま定量用標品として HPLC 分析に供した場合、定量値の信頼性は保証できない。

このような定量用標品の入手および定量値の正確性の問題を解決する方法の 1 つとして、近年、 $^1\text{H}$ -qNMR に基づく相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity: RMS) を用いた HPLC 法が注目を集めている<sup>4,7</sup>。これは、測定対象および測定対象とは異なる基準物質 (代替定量用標品) との正確な RMS を明らかにすることにより、「基準物質」、「RMS」および「測定対象と基準物質の分子量比」から測定対象の定量を可能とする方法である。また、RMS は、計量学的に正確な定量が可能である定量  $^1\text{H}$ -NMR ( $^1\text{H}$ -qNMR) に基づき算出されているため、この方法により得られる定量値の信頼性も高いと言える。

そこで、本研究では、既存添加物の成分規格試験法の確立を目指した研究の一環として、JECFA で規定されている分析法を参考に① $^1\text{H}$ -qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の適用性並びに②JECFA 現行法における前処理法の検証に関する検討を実施した。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

カシアガム (①A105, ②A951, ③A952 および④C2052), 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。エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸、フィシオンは、東京化成工業 (株) 製を用いた。ダントロン (1,8-DAQ) は、富士フィルム和光純薬 (株) 製を用いた。カフェイン (Product. No. 56396, 認証値: 99.9%, 拡張不確かさ: 0.4%) およびメチルパラベン (MHB) (Product. No. 79721, 認証値: 99.8%, 拡張不確かさ: 0.3%) はシグマアルドリッチ (株) 製の認証標準物質を使用した。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

分析用 HPLC ポンプ: LC-20AD (低圧グラジエントユニット内蔵), オートサンプラ: SIL-20A, カラム恒温槽: CTO-10AS<sub>VP</sub>, 紫外可視分光検出器: SPD-10A, システムコントローラ: CBM-20A, 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 および AP125WD ((株) 島津製作所製)

### B-3) $^1\text{H}$ -qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の適用性

#### B-3-1) 基準物質 (カフェイン, MHB および 1,8-DAQ) に対する測定対象 5 種の RMS の算出

エモジン, アロエエモジン, クリソファン酸, レイン, フィシオン, 1-8 DAQ では, 溶液濃度が約 1000  $\mu\text{mol/L}$  となるように, あらかじめ調製した各  $^1\text{H}$ -qNMR 用試験溶液の必要量を 10 mL 容メスフラスコへ入れ, メタノールを加え調製し, 標準原液とした (濃度: 1000  $\mu\text{mol/L}$ )。その後メタノールを用いて適宜希釈を行い, 各測定対象の標準溶液を調製した。各標準溶液の濃度範囲は 0.5~15.6  $\mu\text{mol/L}$  (6 点濃度, 公比 2) である。

カフェインでは, カフェイン標準物質 (認証標準物質) を認証値に基づき精密に秤量し, 10%アセトニトリルを用いて溶解し, 濃度 1000  $\mu\text{mol/L}$  の溶液を標準原液とした。この原液について 10%アセトニトリルを用いて適宜希釈を行い, カフェインの標準溶液を調製した。各標準溶液の濃度範囲は 0.125~15.6  $\mu\text{mol/L}$  (8 点濃度, 公比 2) である。

MHB では, MHB 標準物質 (認証標準物質) を認証値に基づき精密に秤量し, メタノールを用いて溶解し, 濃度 1000  $\mu\text{mol/L}$  の溶液を標準原液とした。この原液についてメタノールを用いて適宜希釈を行い, MHB の標準溶液を調製した。各標準溶液の濃度範囲は 0.25

～15.6 μmol/L (7点濃度, 公比2) である。

作製された各試験溶液のうち, エモジン, アロエエモジン, クリソファン酸, レイン, フィシオン, 1-8 DAQ では HPLC 条件 1, カフェインでは測定条件 2, MHB では測定条件 3 でそれぞれ分析した。

#### ■ 測定条件 1

カラム: Develosil ODS-UG-5 (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm, 野村化学), カラム温度: 40°C, 検出波長: 435 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液, 移動相 B: アセトニトリル, グラジエント条件: 0 min (14%B) → 10 min (14%B) → 15 min (20%B) → 25 min (20%B) → 55 min (80%B) → 60 min (100%B) → 65 min (100%B) → 65.01 min (14%B) → 75 min (14%B) 【60 min 以降はカラム洗浄および平衡化】, 注入量: 20 μL

#### ■ 測定条件 2

カラム: Develosil ODS-UG-5 (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm, 野村化学), カラム温度: 40°C, 検出波長: 435 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液, 移動相 B: アセトニトリル, グラジエント条件: 0 min (14%B) → 10 min (14%B), 注入量: 20 μL

#### ■ 測定条件 3

カラム: Develosil ODS-UG-5 (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm, 野村化学), カラム温度: 40°C, 検出波長: 272 nm (カフェイン), 255 nm (MHB), 流速: 1.0 mL/min, 移動相 A: 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液, 移動相 B: アセトニトリル, グラジエント条件: 0 min (14%B) → 10 min (14%B) → 15 min (20%B) → 25 min (20%B) → 30 min (30%B) → 30.01 min (100%B) → 35 min (100%B) → 35.01 min (14%B) → 45 min (14%B) 【30 min 以降はカラム洗浄および平衡化】, 注入量: 20 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。

得られた測定対象および基準物質の検量線の検量線式の傾きの比 (測定対象/基準物質) から基準物質に対する測定対象の RMS を算出した。

### B-4) JECFA 現行法における前処理法の検証

#### B-4-1) 試験溶液の調製

JECFA Monographs におけるカシアガム規格で規定されているアントラキノン類分析法の試験溶液の調製手順 (Sample preparation) に従った (図 2)。

#### B-4-2) 試験溶液の HPLC 分析

実試料より調製した試験溶液について, B-3-1 で示した測定条件 1 を用い分析を行った。

### C. 結果及び考察

#### C-1) <sup>1</sup>H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の適用性～基準物質 (カフェイン, MHB および 1,8-DAQ) に対する測定対象 5 種の RMS の算出～

正確な RMS の算出にあたり, 測定対象の市販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, これらの純度を明らかにするため, <sup>1</sup>H-qNMR を用いることとした。<sup>1</sup>H-qNMR の測定は ECA500 (プロトン共鳴周波数 500 MHz) (日本電子 (株) 製) により既報<sup>7</sup> の測定条件を参考に実施した。なお, エモジン, アロエエモジン, クリソファン酸, レイン, 1-8 DAQ では, 3 種の外部標準を用いた外部標準法, フィシオンでは, 1,4-BTMSB-d<sub>4</sub> を用いた内標準法により, 各試薬の純度をそれぞれ算出した。その結果, エモジン, アロエエモジン, クリソファン酸, レイン, 1-8 DAQ の純度は, それぞれ, 99.9%, 97.2%, 98.2%, 85.8%, 95.5% と判明した。また, フィシオンは 98.1% であることが明らかとなった。

次に、基準物質に対する測定対象 5 種の RMS を算出するため、各検体の  $^1\text{H-qNMR}$  による純度に基づいて調製された測定対象 5 種および 1,8-DAQ 並びに認証書に記載の認証値(純度値)に基づき調製されたカフェインおよび MHB 標準溶液を用いて、B-3-1 に示す HPLC 条件より紫外可視分光検出器が接続された HPLC で分析した(図 3-6)。その後、得られたデータに基づき原点を通る各検量線を作成し、その検量線式の傾きの比(測定対象/基準物質)から基準物質に対する測定対象の RMS を算出した。まず、各検量線の直線性を評価したところ、測定対象 5 種および基準物質 3 種の全ての検体の検量線の決定係数は 1.000 と良好であることが確認された。各測定対象および基準物質の代表的な検量線を図 7 および図 8 に示す。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、エモジンは 11411 (検出波長: 435 nm)、アロエエモジンは 11933 (検出波長: 435 nm)、レインは 13160 (検出波長: 435 nm)、クリソファン酸は 12083 (検出波長: 435 nm)、フィシオンは 14303 (検出波長: 435 nm)、カフェインは 11048 (検出波長: 272 nm)、MHB は 18002 (検出波長: 255 nm)、1,8-DAQ は 10862 (検出波長: 435 nm) であることが判明した。これらの検量線の傾きの相対標準偏差は 0.6~4.2% であり、検量線の決定係数(直線性)とあわせて評価すると、これらの検量線の傾きは RMS の算出に利用可能であることが明らかとなった。そこで、得られたこれらのデータより、基準物質に対する測定対象の RMS を算出したところ、表 1 に示す値であることが明らかとなった。

## C-2) JECFA 現行法における前処理法の検証

### C-2-1) 現行法による実試料の分析

前項でも使用した JECFA で規定されている HPLC 条件について、実試料の分析においても適用可能か否かを検証した。まず、図 1 の調製法のうち試料採取量を 800 mg として試験溶液を調製し、HPLC に供した。その結果、図 9 に示すように、すべての試料において、アントラキノン類が溶出する 40~50 分に広範なブロードなピークが観察された。従って、現行法では、

カシアガム中のアントラキノン類の正確な定量が困難であることが確認された。なお、多波長検出器が接続された HPLC で別途分析し、検出波長の変更による定量の可能性を検討したが、200~600 nm の波長範囲では、このブロードなピークに由来する夾雑成分の影響により、測定対象の定量が可能な検出波長は見いだすことはできなかった。

### C-2-2) 加熱時間の検証

広範なブロードなピークが観察された要因として、前処理における加熱(103°C, 3.5 時間)が挙げられた。加熱前と加熱後の試料溶液の色を比較すると、加熱後では褐色に変化していた。この色やクロマトグラムの形状を考慮すると、加熱によりカシアガム中の成分を由来とするメイラード反応によるポリマーの生成が予想された。そこで、加熱時間と広範なブロードなピークの関連性を評価するため、前処理における加熱時間の検証を行った。すなわち、加熱時間を 1 時間、2 時間、3.5 時間、5 時間としてそれぞれ試験溶液を調製し HPLC に供した。なお、本検討では、試料として C2052 を用い、試料採取量は規定どおり 4 g とした。その結果、図 10 に示すように、加熱時間が短いほど、ブロードなピークは小さくなる傾向が認められた。なお、加熱時間を 0 時間とすることも考えたが、増粘安定剤であるカシアガムは水分を含むとゼリー状なり、これを液体化するには最低でも 1 時間の加熱が必要であった。このように、HPLC 分析における広範なブロードなピークの低減並びに実試料の性状等を考慮し、加熱時間は 1 時間が適切であることが判明した。

### C-2-3) カシアガム中のアントラキノン類の抽出効率の検証

次に試料の加熱時間を変更(3.5 時間から 1 時間)したことによるカシアガム中のアントラキノン類の抽出効率を検証するため、添加回収試験を行った。なお、試料として A105 (試料採取量 4 g) を用い、添加濃度は JECFA 規格における含有上限値(0.5 mg/kg)の 10 倍(5 mg/kg)で検討した。その結果、表 2 に示すように、回収率が 70%を下まわる化合物が複数認められ

た。そこで、抽出回数を3回へ変更し、試料としてA951（試料採取量4g）を用いて検討したところ（図11）、表3に示すように、n=1の結果ではあるが、すべての化合物において、回収率が向上することが確認された。従って、測定対象の抽出効率を考慮し、抽出回数の変更の必要性が認められた。

#### 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、JECFAで規定されている分析法を参考に①<sup>1</sup>H-qNMRに基づくRMSを用いたアントラキノン分析法の適用性並びに②JECFA現行法における前処理法の検証を実施した。

①については、正確な標準溶液の濃度に基づいて作成した各検量線式の傾きの比（測定対象の傾き/基準物質の傾き）より、基準物質3種に対する測定対象5種の各RMSが判明した。

また、②についてはJECFA現行法について、加熱時間の変更（3.5時間から1時間）やこれに伴う抽出回数の変更が必要であることが判明した。なお、図12に示すように、A105の試料において、エモジンおよびアロエエモジンのピークの近傍に夾雑成分が観察された。これらは、エモジンおよびアロエエモジンの正確な定量を妨害しており、現行の前処理法の改良やHPLC条件の最適化に向け、他の実試料を同様のピークが観察されるのか否かの検証が必要である。さらに、抽出操作（液々分配）において、エマルジョンが生成し、クロロホルム可溶部（下層）を得るために時間を要することも今回の検討で確認された。また、この抽出操作では有害試薬であるクロロホルムを使用していることから、このような有害試薬の排除も考慮して、前処理法の改良に向けた検討が必要と考えられた。

#### E. 文献

1) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書，日本食品添加物協会技術委員会編．東京，日本食品添加物協会（1999）

- 2) 第5版 既存添加物自主規格，日本食品添加物協会技術委員会編．東京，日本食品添加物協会（2021）
- 3) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), “Combined Compendium of Food Additive Specifications”, FAO JECFA Monographs 22, 15-21 (2018).
- 4) Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N. A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on <sup>1</sup>H-qNMR for khellactone esters from *Peucedanum japonicum* root extract. *Food Chem.*, 427, 136647 (2023)
- 5) Takahashi M, Morimoto K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K. Study on the Synthesis of methylated reference and their application in the quantity of curcuminoids using single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *Chem. Pharm. Bull.*, 70, 25-31 (2022)
- 6) Koyama K, Hiroshi Sasako, Higashi Y, Ichikawa H, Nagoya A, Hirao T. Quantitative analysis of bisacurone in turmeric by HPLC using relative molar sensitivity. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 63, 202-209 (2022).
- 7) Masumoto N, Ishizuki K, Nishizaki Y, Ohtsuki T, Kuroe M, Yamazaki T, Numata M, Matsufuji H, Sugimoto N, Sato K. Determination of mogrosin V in luohanguo extract for daily quality control operation using relative molar sensitivity to single-reference caffeine. *Chem. Pharm. Bull.*, 2021;69:18-25.

#### F. 研究発表

##### F-1) 学会発表

##### F-1-1) 学会等

- 1) 加藤菜帆，大槻崇，松藤寛，<sup>1</sup>H-定量NMRに基づいたSingle-reference HPLC法による健康食品中のアントシアニン定量について

て、第5回日本定量 NMR 研究会年会, 2023 年 12 月

- 2) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について, 食品科学工学会第 70 回大会, 2023 年 08 月
- 3) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 相対モル感度 (RMS) を用いた Single-reference HPLC による健康食品中のアントシアニン定量法の開発, AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会, 2023 年 7 月
- 4) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 健康食品中のアントシアニン定量における相対モル感度 (RMS) を用いた Single-reference HPLC 法の適用について, 日本食品化学学会 第 29 回学術大会, 2023 年 6 月

## F-2) 論文発表

### F-2-1) 論文等

- 1) Fuji Y, Uchida K, Akashi T, Ohtsuki T, Matsufuji H, Hirai Y M, Molecular Identification of UDP-Sugar-Dependent Glycosyltransferase and Acyltransferase Involved in the Phenylethanoid Glycoside Biosynthesis Induced by Methyl Jasmonate in *Sesamum indicum* L. *Plant and Cell Physiology*, 2023; 64: 716-728.

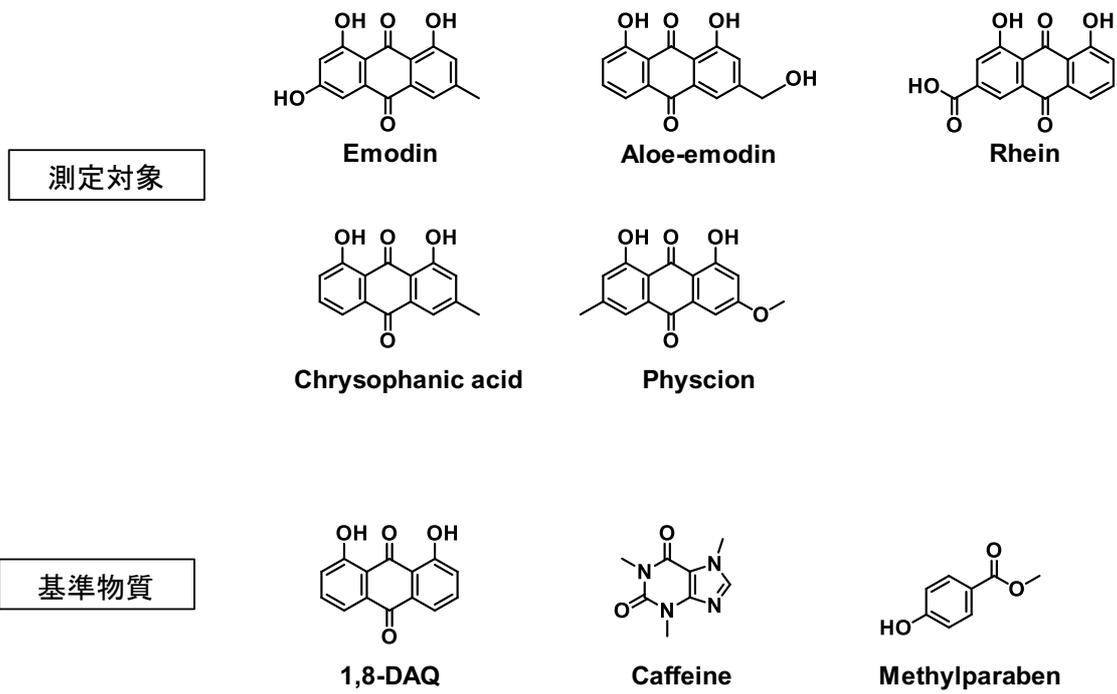


図1 測定対象および基準物質の化学構造

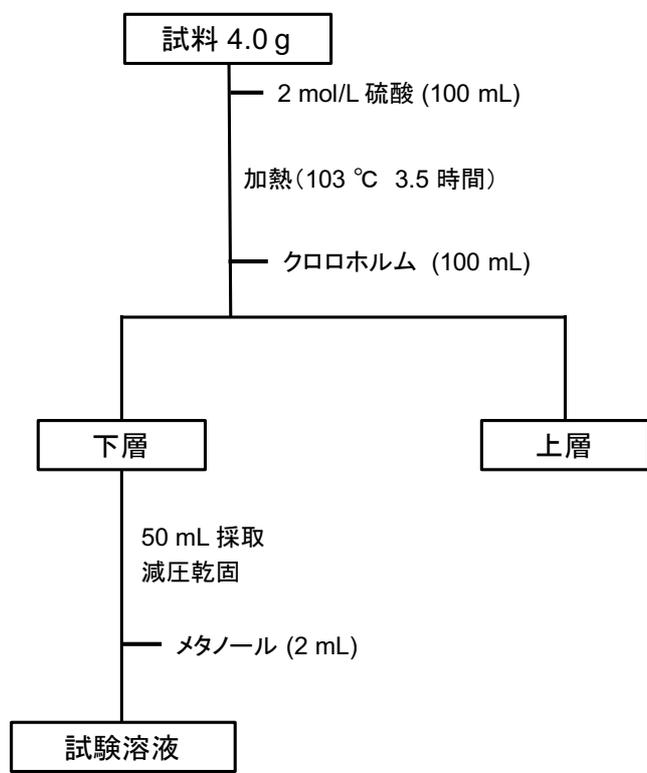


図2 JECFA Monographs におけるカシアガム規格で規定されているアントラキノン類分析法の試験溶液の調製手順

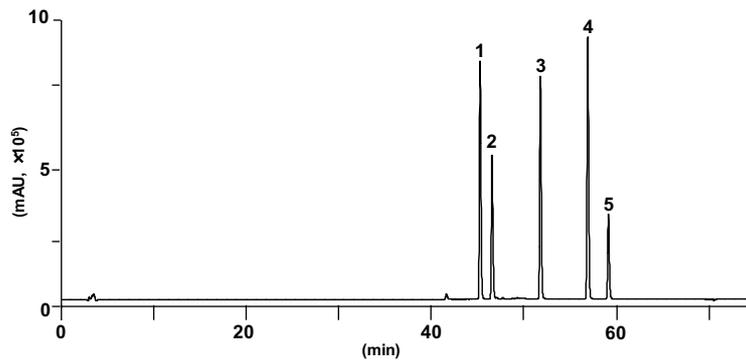


図3 測定対象5種のクロマトグラム

1. Aloe-emodin, 2. Rhein, 3. Emodin, 4. Chrysophanic acid, 5. Physcion

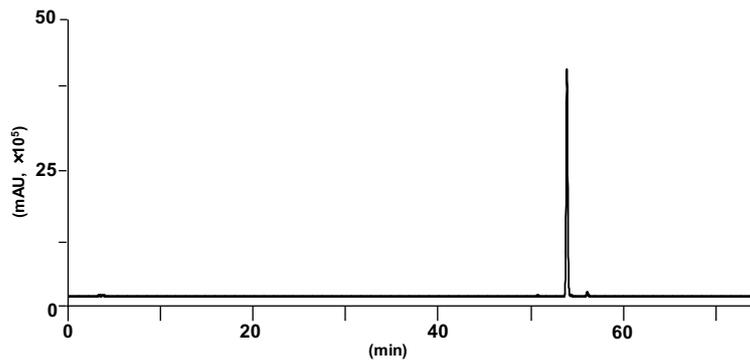


図4 ダントロン (1,8-DAQ) のクロマトグラム

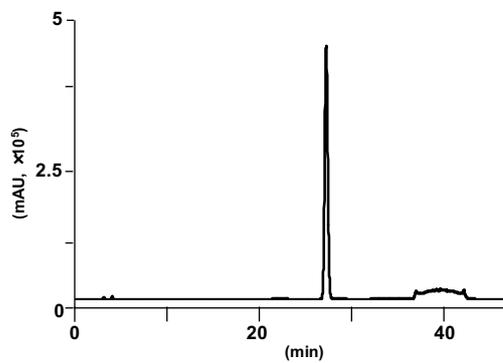


図5 メチルパラベン (MHB) のクロマトグラム

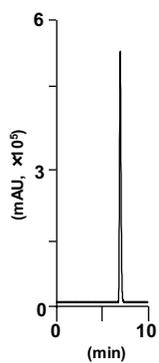


図6 カフェインのクロマトグラム

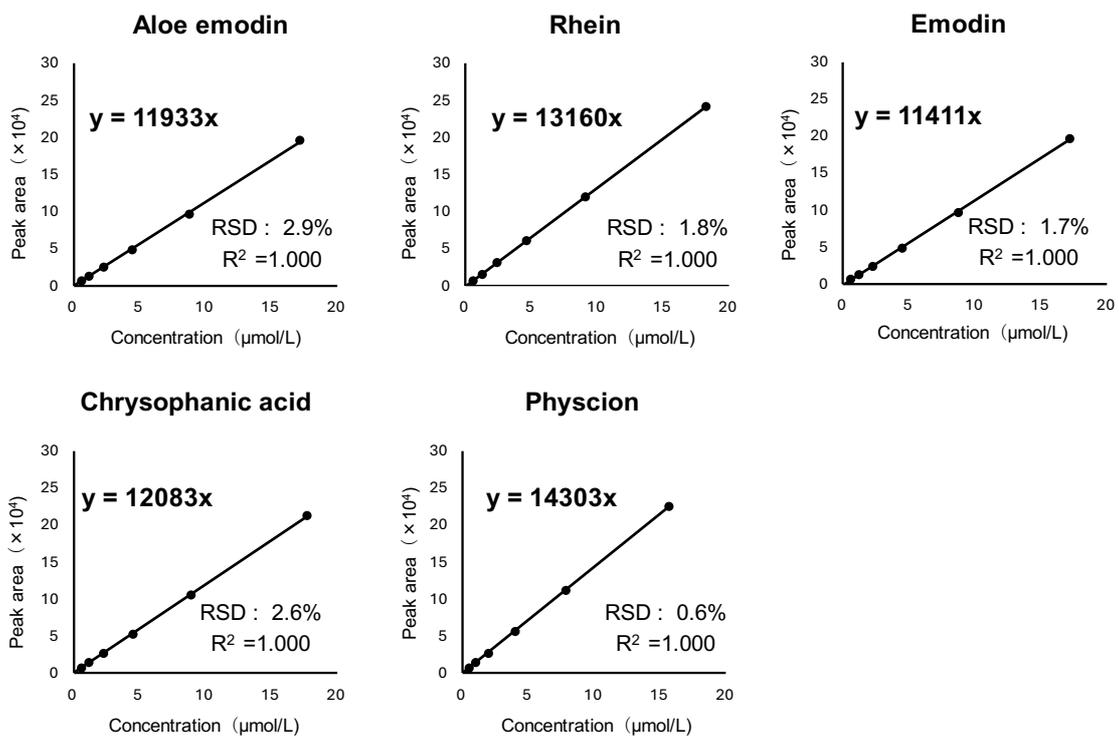


図7 測定対象5種の検量線

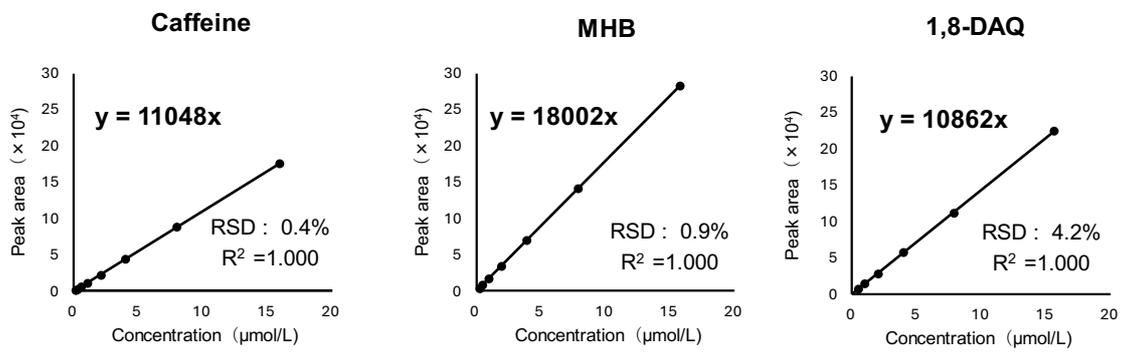


図 8 基準物質 3 種の検量線

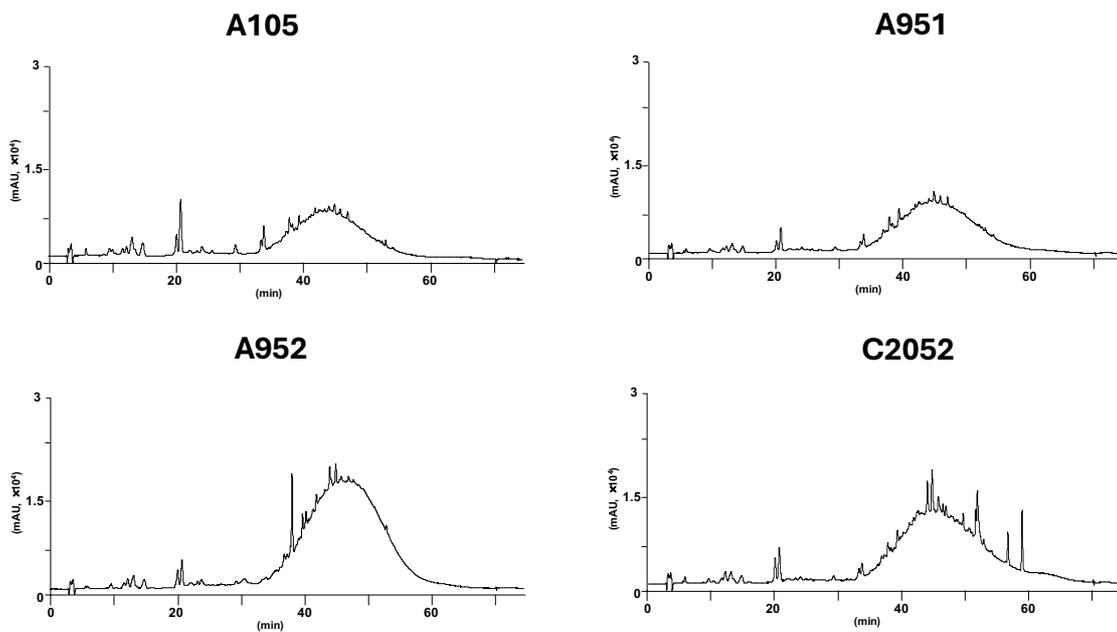


図 9 カシアガム製品 4 種のクロマトグラム

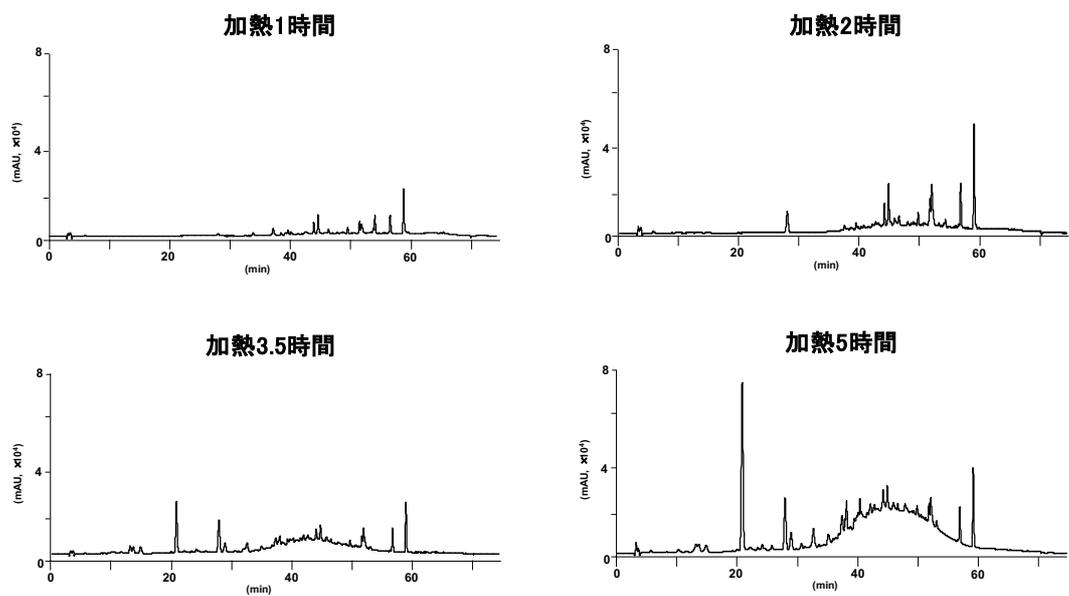


図 10 加熱時間の異なる各試験溶液のクロマトグラム

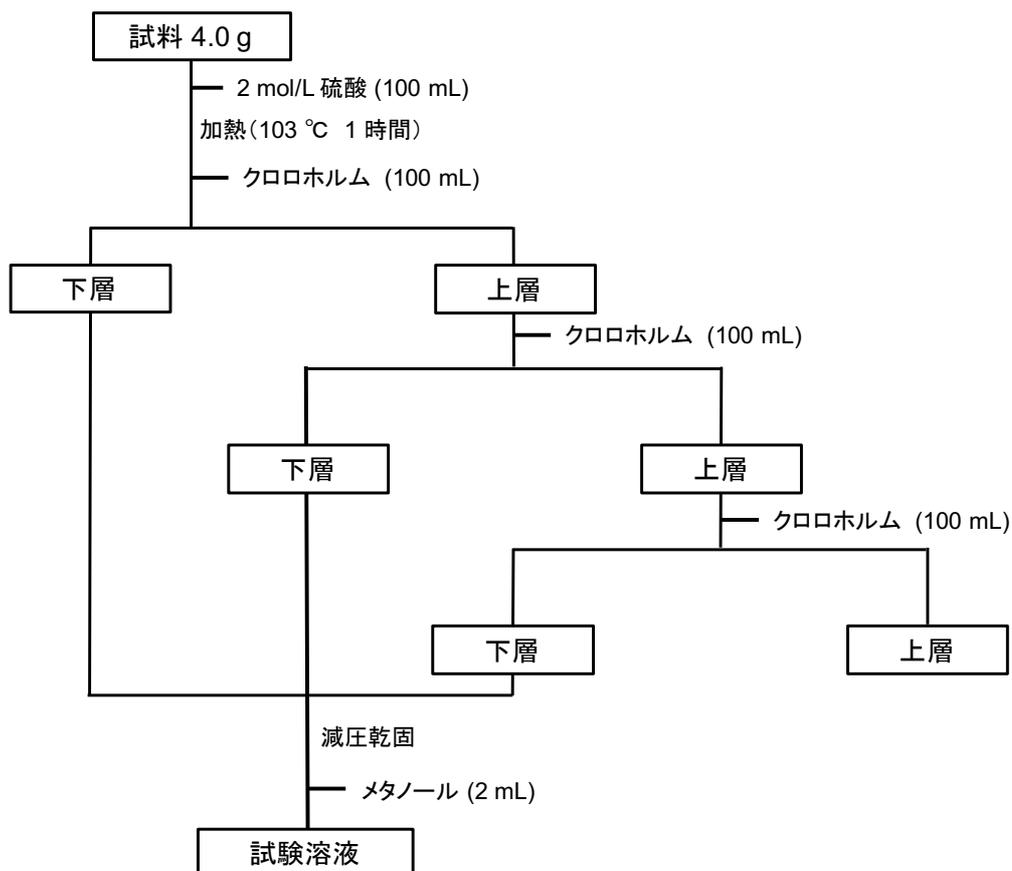


図 11 抽出回数を変更したアントラキノン類分析法の試験溶液の調製手順

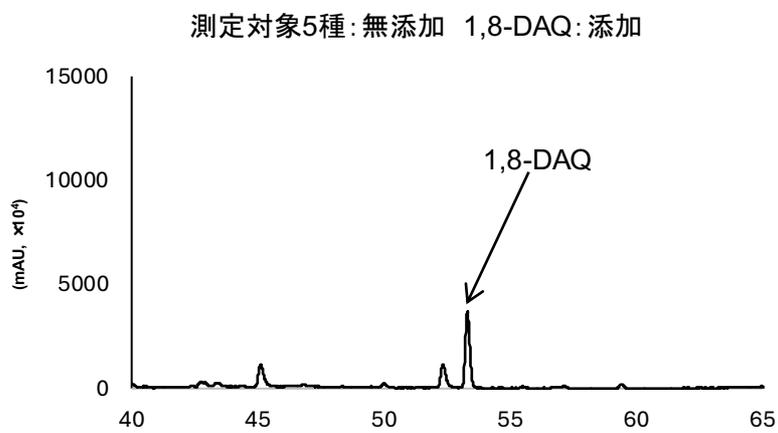
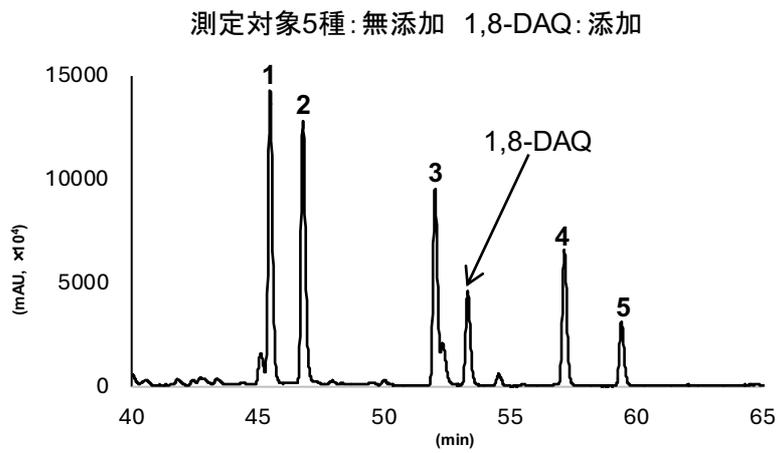


図 12 測定対象 5 種および 1,8-DAQ 添加試料ならびに 1,8-DAQ のみ添加した試料のクロマトグラム

表 1 各基準物質に対する測定対象の相対モル感度 (RMS)

		基準物質		
		<b>Caffeine</b> y=11048x	<b>MHB</b> y=18002x	<b>1,8-DAQ</b> y=10862x
測定対象	<b>Aloe-emodin</b> y=11933x	<b>1.08</b>	<b>0.66</b>	<b>1.10</b>
	<b>Rhein</b> y=13160x	<b>1.19</b>	<b>0.73</b>	<b>1.21</b>
	<b>Emodin</b> y=11411x	<b>1.03</b>	<b>0.63</b>	<b>1.05</b>
	<b>Chrysophanic acid</b> y=12083x	<b>1.09</b>	<b>0.67</b>	<b>1.11</b>
	<b>Physcion</b> y=14303x	<b>1.29</b>	<b>0.79</b>	<b>1.32</b>

表 2 測定対象 5 種および 1,8-DAQ の回収率 (n=4)

	Recovery (%)
Aloe-emodin	72.0
Rhein	70.9
Emodin	48.8
1,8-DAQ	59.9
Chrysophanic acid	29.1
Physcion	12.2

表 3 抽出回数を変更した場合の測定対象 5 種および 1,8-DAQ の回収率 (n=1)

	Recovery (%)
Aloe-emodin	90.2
Rhein	94.1
Emodin	102.2
1,8-DAQ	100.1
Chrysophanic acid	92.6
Physcion	78.7

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究  
(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究  
PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

研究分担者 辻巖一郎 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 主任研究官

### 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。本年度は、カロテノイド類であるビキシンおよびノルビキシンの HPLC を用いた定量に利用可能なシングルリファレンス化合物の大量供給のための合成、また、定量用標品として利用するためのビキシンおよびノルビキシンの *trans* 異性体の合成を行った。また、HPLC のリテンションインデックス (RI) 化合物として利用可能な分子のデザインについても検討し、疎水性および親水性構造の RI 化合物の合成を行った。

研究協力者  
出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学物部

### A. 研究目的

食品添加物の成分規格に設定される試験には、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。HPLC を利用した化合物の定量においては、対象とする分子に対して適切な基準物質（シングルリファレンス）を個別に設定することで対応が可能であるが、HPLC クロマトグラム上における定量対象物質との溶出位置が重なってしまうと分析ができず、極端に離れていることも好ましくない。これまでの検討から、定量対象と類似の吸収スペクトルを示す化合物を母骨格とし、官能基導入によってその疎水性を制御することによりクロマトグラム上におけるピーク位置を調整するという分子デザイン手法が利用できることが分かった。

本研究では、上記のデザイン分子のうち、カロテノイド類の HPLC を用いた定量法に利用

可能なシングルリファレンス物質として利用可能な、ビスインドリルマレイミド誘導体の大量スケール合成について検討した。また、カロテノイド類であるビキシンおよびノルビキシンの異性体として *trans*-ビキシンおよび *trans*-ノルビキシンについて、HPLC での定量法検討のための合成を試みた。さらに、HPLC クロマトグラム上における溶出位置の基準物質、すなわちリテンションインデックスとして利用可能な分子のデザインについても疎水性および親水性分子を基にした分子の設計・合成を検討した。

### B. 研究方法

#### B-1) 試料及び試薬

「ビキシン」および「ノルビキシン」は三栄源エフ・エフ・アイ社製の製品を用いた。直鎖第一級アルキルアミン（それぞれ、C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12）は FUJIFILM 和光純薬社製の試薬を用いた。直鎖第一級ヨウ化アルキル（それぞれ、C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10, C12）は東京化成工業社の試薬を用いた。分光分析用ジメチルスルホキシド：

FUJIFILM 和光純薬, Cat. 045-28335. 重クロロホルム ( $\text{CDCl}_3$ ): 関東化学, Cat. 07663-23, 重アセトン ( $\text{Acetone-}d_6$ ): 関東化学, Cat. 01053-43, 重ジメチルスルホキシド ( $\text{DMSO-}d_6$ ): 関東化学, Cat. 11560-96. その他, ジクロロメタン, 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-2) 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, 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.  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$ -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  $\delta$  (ppm) はテトラメチルシラン (TMS) ( $\text{CDCl}_3$ : 0 for  $^1\text{H}$ -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 ( $\text{CDCl}_3$ : 77.0 for  $^{13}\text{C}$ -NMR;  $\text{Acetone-}d_6$ : 2.05 for  $^1\text{H}$ -NMR, 29.84 for  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $\text{DMSO-}d_6$ : 2.50 for  $^1\text{H}$ -NMR, 39.52 for  $^{13}\text{C}$ -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), doublet of doublets of doublets (ddd), multiplet (m), broad (br)). 合成した化合物の NMR データは Figure 6-13 に示した.

## B-3) 装置

HPLC のシステムには EXTREMA (日本分光) もしくは Prominence (島津) を使用した.

## B-3) 測定条件

### B-3-1) HPLC 測定条件

ビキシン, ノルビキシンおよびそれぞれの異性化反応追跡における分析条件;

カラム: TSKgel ODS-100Z (C18, 4.6 I.D x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (東ソー), 流速: 1.0 mL/min, column temp.: 40  $^\circ\text{C}$ , 検出波長: 460 nm, 移動相; A: 0.1 vol% AcOH in  $\text{H}_2\text{O}$ , B: 0.1 vol% AcOH in MeOH, 移動相グラジエント (B%): 90% (isocratic)

RI-1 における分析条件;

カラム: TSKgel ODS-100Z (C18, 4.6 I.D x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (東ソー), 流速: 1.0 mL/min, column temp.: 40  $^\circ\text{C}$ , 検出波長: 254 nm, 移動相; A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 移動相グラジエント (B%): 80-100% (20 min), linear gradient.

RI-2 における分析条件;

カラム: TSKgel ODS-100Z (C18, 4.6 I.D x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (東ソー), 流速: 1.0 mL/min, column temp.: 40  $^\circ\text{C}$ , 検出波長: 254 nm, 移動相; A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 移動相グラジエント (B%): 10-100% (30 min), linear gradient.

RI-3 における分析条件;

カラム: CAPCEL PAK MG-II (2.0 I.D x 35 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (大阪ソーダ), 流速: 0.4 mL/min, column temp.: 40  $^\circ\text{C}$ , 検出波長: 254 nm, 移動相; A: 0.1 vol%  $\text{HCO}_2\text{H}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ , B: 0.1 vol%  $\text{HCO}_2\text{H}$  in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 移動相グラジエント (B%): 30-100% (1 min), linear gradient.

## C. 結果及び考察

### C-1) *trans*-ビキシンおよび *trans*-ノルビキシンの調製

ビキシン (bixin) やノルビキシン (norbixin) はベニノキの種子から抽出されるアナトー色素であり, 黄色~赤色の着色料として食品添加物として用いられる. ビキシンは化合物構造としてはカロテノイドに類するもので構造の二重結合の一つが *Z* 配座 (*cis* 体) をとるモノエステルである. ノルビキシンはビキシンのエステルが加水分解されて生じる水溶性カロテノイドである (Figure 1). ビキシンやノルビキシンは徐々に 9' 位の二重結合において異性化を起し, それぞれ対応する *E* 体構造である *trans*-ビキシンと *trans*-ノルビキシンへと変化する. 本研究では, カロテノイド類である

ビキシンやノルビキシンの HPLC を用いた定量法確立の検討で使用するサンプルとして、*trans*-ビキシンと *trans*-ノルビキシンの調製を実施した。文献情報として触媒量のヨウ素の存在下、加熱によって *cis* 体から *trans* 体へのビキシンおよびノルビキシンの異性化が起こるという記載<sup>1)</sup>がある。具体的な異性体の調製方法は参照できなかったため、化合物を溶解し、一定温度以上での加熱が可能かつヨウ素と反応しない溶媒を使用して反応条件を検討した。その結果、トルエンもしくはテトラヒドロフランが適用できることが分かった (Scheme 1)。ビキシンにおいてはトルエン単独を溶媒として使用し、0.1~0.2 モル当量のヨウ素存在下、110°C で加熱攪拌することで大部分の *cis*-ビキシンを *trans*-ビキシンへと異性化できた (Figure 2A))。一方、ノルビキシンにおいては加熱時においてもトルエン単独への溶解性が低かったため、共溶媒としてテトラヒドロフランを使用することで溶解性を向上させることができ、*trans*-ノルビキシンへの変換率を向上させることができた (Figure 2B)。C-1-1 および C-1-2 の項に実施例を示している。また、反応で使用するヨウ素量については、触媒量を逸脱して使用すると原料および目的物であるビキシンの回収量が顕著に減少することが分かった。この時、溶解性の極めて悪い沈殿物が反応系中において生じており、分析の結果からこの沈殿物は原料のビキシンや異性体での *trans*-ビキシンではないことが分かったため、何かしら重合体のようなものが生じた可能性が考えられた。

#### C-1-1) ビキシンの異性化による *trans*-ビキシンへの変換

ビキシン (167 mg, 0.36 mmol) のトルエン溶液 (100 mL) にヨウ素 (18 mg, 0.073 mmol) を加え、100°C にて 12 時間加熱攪拌した。反応液を室温に冷却後、反応液を酢酸エチル (50 mL) で希釈し、15%チオ硫酸ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄後、得られた有機層を減圧濃縮することで *trans*-ビキシンの粗精製物を暗赤色固体として得た (165 mg)。

#### C-1-2) ノルビキシンの異性化による *trans*-ノルビキシンへの変換

ノルビキシン (205 mg, 0.54 mmol) のトルエン/THF (1:1) 溶液 (125 mL) にヨウ素 (27 mg, 0.108 mmol) を加え、90°C にて 12 時間加熱攪拌した。反応液を室温に冷却後、反応液を減圧して THF の半分量程度を留去してから酢酸エチル (50 mL) で希釈し、15%チオ硫酸ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄後、得られた有機層を減圧濃縮することで *trans*-ノルビキシンの粗精製物を暗赤色固体として得た (220 mg)。

#### C-2) ビスインドリルマレイミド誘導体 6 の合成

カロテノイド類のシングルリファレンスとしてのビスインドリルマレイミド誘導体は Scheme 2 に示す経路によって合成した。大量に安価に合成するためには化合物の変換率が高く、精製法も簡便なものが望ましい。本経路では極力シリカゲルカラムクロマトグラフィーを使用せずに工程を進めることで、迅速かつ簡便に目的とする中間体 5 を得ることができ、複数種類のシングルリファレンス化合物 (6-1~6-3) の合成に利用できた。C-2-1 の項に実施例を示す。

##### C-2-1) 化合物の合成

###### 化合物 2 の合成<sup>2)</sup>

ムコブロム酸 (1) (10.0 g, 38.8 mmol)、2-メチル-2-ブテン (20.5 mL, 194.0 mmol) のアセトン溶液 (160 mL) を 0°C に冷却し、攪拌しながら亜塩素酸ナトリウム (80%) (12.3 g, 136.3 mol) のリン酸水素二ナトリウム (29.1 g, 186.5 mol) の水溶液 (160 mL) を滴下して加えた。反応液を 6 時間攪拌した後、1M 塩酸 (160 mL) を加えて pH2.0 以下とし、酢酸エチル (160 mL) で 3 回抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、濾過し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣 (化合物 2) はそのまま次の反応に使用した (16.8 g)。

###### 化合物 3 の合成

化合物 2 (22 g, 80.3 mmol) に室温にて塩化アセチル (57 mL, 803 mmol) を加え、触媒量の

硫酸（パスツールピペットにて 15 滴）を加えて反応を開始させた。反応液を 1.5 時間攪拌した後、真空下にて減圧濃縮して液体成分を留去した。得られた残渣（化合物 **2'**）に対して真空下、トルエンによる共沸操作を行った後、酢酸（160 mL）に溶解させ、室温にてベンジルアミン（10.5 mL, 96.4 mmol）を加えた後、110°Cにて 14 時間攪拌した。反応液を室温に冷却後、反応液を減圧濃縮して酢酸を除去した。残渣を酢酸エチルに溶解させ、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、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（ヘキサン：酢酸エチル = 9 : 1 to 3 : 1）することで、化合物 **3** を無色粉末として得た（4.9 g, 18%）。

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.38-7.30 (m, 5H), 4.76 (s, 2H), 0.88 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.7, 135.3, 129.6, 129.0, 128.9, 128.5, 43.4.

#### 化合物 **4** の合成<sup>3)</sup>

インドール（1.03 g, 63.8 mmol）のトルエン溶液（112 mL）に、攪拌下、室温にてエチルマグネシウムブロミド（3M in  $\text{Et}_2\text{O}$ , 21.3 mL, 63.8 mmol）を 5 分間かけて滴下した後、50°Cにて 1 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、化合物 **3**（5.0 g, 14.5 mmol）のトルエン溶液（70 mL）を滴下し、反応液を 100°Cにて 14 時間攪拌した。反応液を 0°Cに冷却し、2M 塩酸（140 mL）を加えて反応を停止させ、酢酸エチル（280 mL）で抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、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。得られた残渣をジクロロメタン/メタノール混液（19 : 1, v/v）に懸濁させ、沈殿物を濾取して真空乾燥することで化合物 **4** を赤色固体として得た（6.05 g, 70%）。

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11.71 (brs, 2H), 7.79 (d,  $J = 3.0$  Hz, 2H), 7.38-7.34 (m, 6H), 7.29-7.28 (m, 1H), 6.97 (ddd,  $J = 7.5, 7.5, 1.2$  Hz, 2H), 6.80 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 6.62 (ddd,  $J = 7.5, 7.5, 1.2$  Hz, 2H), 4.77 (s, 2H).

#### 化合物 **5** の合成

化合物 **4**（1.25 g, 3.0 mmol）のエタノール懸濁液（12 mL）に 4M 水酸化カリウム水溶液（6 mL）を加えて、60°Cにて 3 時間攪拌した。反応液を 0°Cに冷却し、10%塩酸（24 mL）を加えて液性を酸性（pH1~2）とした後、ジクロロメタン（60 mL x 2）で抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮しすることで化合物 **5** を暗赤色固体として得た（1.1 g）。この化合物はこれ以上精製せずに次の反応（化合物 **6-1**~**6-3** の合成）に使用した。

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{Acetone}-d_6$ )  $\delta$  10.84 (s, 2H), 7.89 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 7.44 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.40 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.35 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.28 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 6.99 (ddd,  $J = 7.2, 7.2, 0.6$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 6.63 (ddd,  $J = 7.5, 7.2, 0.6$  Hz, 2H), 4.84 (s, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{Acetone}-d_6$ )  $\delta$  172.5, 138.7, 137.3, 130.0, 129.4, 128.8, 128.3, 128.2, 126.8, 122.8, 122.3, 120.4, 112.4, 107.5, 42.1.

#### 化合物 **6-1** の合成

化合物 **6**（328 mg, 1.0 mmol）のトルエン（9 mL）/酢酸溶液（1 mL）に、室温にてノニルアミン（218  $\mu\text{L}$ , 1.2 mmol）を加え、反応液を 110°Cにて 14 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、酢酸エチル（40 mL）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上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製（ヘキサン：酢酸エチル = 9 : 1 to 5 : 5）することで、化合物 **6-1** を赤色無定形固体として得た（170 mg, 38%）。

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.58 (s, 2H), 7.73 (d,  $J = 3.0$  Hz, 2H), 7.32 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.07 (dd,  $J = 7.8, 7.8$  Hz, 2H), 6.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.76 (dd,  $J = 8.4, 7.8$  Hz, 2H), 3.68 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.71 (tt,  $J = 7.8, 7.2$  Hz, 2H), 1.40-1.33 (m, 4H), 1.30-1.24 (m, 8H), 0.87 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

#### 化合物 **6-2** の合成

1-アミノウンデカンを使用し化合物 **6-1** と同様の手順にて合成することで、化合物 **6-2** を赤色無定形固体として得た（190 mg, 39%）。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ 10.82 (s, 2H), 7.87 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (ddd, *J* = 7.2, 6.6, 1.2 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.64 (ddd, *J* = 7.2, 6.6, 1.2 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.70 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.40-1.35 (m, 4H), 1.30-1.24 (m, 14H), 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).  
化合物 **6-3** の合成

1-アミノヘキサデカンを使用し化合物 **6-1** と同様の手順にて合成（シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製（ヘキサン：酢酸エチル = 9 : 1 to 7 : 3））することで、化合物 **6-3** を赤色無定形固体として得た（10 mg, 36%）。

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.55 (s, 2H), 7.73 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J* = 8.4, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.75 (dd, *J* = 8.4, 7.8 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.71 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.39-1.33 (m, 4H), 1.30-1.24 (m, 24H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.6, 135.9, 128.4, 127.6, 125.6, 122.8, 122.1, 120.5, 111.3, 107.5, 38.5, 32.1, 29.8, 29.8, 29.7, 29.5, 29.5, 29.0, 27.1., 22.8, 14.3.

### C-2-3) RI インデックス用化合物の合成

RI インデックス候補分子の合成では、本研究におけるシングルリファレンス分子の設計方針、すなわち UV 吸収を示す共通化合物ユニットに官能基として直鎖炭化水素基などを導入することで疎水性を変化させ、HPLC クロマトグラム上における溶出位置を制御することとした。Figure 3 には黄色色素の骨格に対して、長さの異なる直鎖アルキルアミンを導入した化合物 **RI-1** の HPLC クロマトグラム上における溶出位置を示している。この化合物においては C3~C12 までのアルキル基に応じて溶出位置が異なっており、設計通り、溶出位置を制御することができたと考えられる。しかしながら、**RI-1** においては全体的に疎水性が非常に高く、溶出も遅いことから、親水性型の分子の合成を試みた。Figure 4 には第 3 級アミン構造を導入した類似の化合物を中間体として、各鎖長のアルキル化試薬を反応させて第 4 級アンモニウム塩とすることで極性や親水性の向上を狙った分子 **RI-2** の結果を示してい

る。第 4 級アンモニウム塩としたことで、HPLC クロマトグラム上における溶出位置は **RI-1** と比較して明らかに早くなることが分かった。また、詳細なデータは得られていないものの、一定の水溶性を獲得していることも分かった。一方で、HPLC チャート上において各鎖長に対応するマイナーなピーク（矢印で示している）が確認された。質量分析の結果から、これらは芳香環部分が酸化されて閉環構造となった分子であることが示唆された。これはおそらくアルキル化試薬由来のヨウ化物イオンからヨウ素が生成したことにより酸化的な閉環反応が促進されたものと予想される。この副反応については、反応系の遮光やヨウ素の補足剤の使用、またアルキル化剤の脱離基を臭素など他の元素のものを使用することで抑制できると考えられる。最後に、Figure 5 にはよりシンプルなコンセプトとして、水溶性分子である赤色 106 号をベースに、長さの異なるアルキルアミンを導入した例 (**RI-3**) を示している。この結果からも、本分子設計による極性や親水性を高めた RI 分子の創出が可能であることが示唆された。C-2-4 の項に各分子の合成について示している。

### C-2-4) 化合物の合成

#### RI-1 の合成

2,3-ジフェニルマレイン酸無水物（125 mg, 0.5 mmol）のトルエン（1.8 mL）/酢酸溶液（0.2 mL）に、室温にて直鎖アルキルアミン（C3~C12; それぞれ 0.05 mmol）を加え、反応液を 110°C にて 14 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、酢酸エチル（20 mL）で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、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上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃した

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（ヘキサン：酢酸エチル = 9 : 1 to 7 : 3）することで、**RI-1** を黄色油状物質として得た（170 mg）。

#### 化合物 7 の合成

2,3-ジフェニルマレイン酸無水物（125 mg, 0.5

mmol) のトルエン (1.8 mL) /酢酸溶液 (0.2 mL) に, 室温にて 2-(ジメチルアミノ)エチルアミン (54  $\mu$ L, 0.5 mmol) を加え, 反応液を 100°Cにて 15 時間攪拌した. 反応液を室温まで冷却し, 酢酸エチル (20 mL) で希釈し, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 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上で乾燥, 濾過し, 濾液を減圧濃縮することで, 化合物 **7** を黄色固体として得た (165 mg, quant.).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.48-7.47 (m, 4H), 7.37-7.33 (m, 6H), 3.77 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 2.61 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.9, 136.3, 130.0, 129.9, 128.8, 128.6, 57.3, 45.7, 36.5.

#### RI-2 の合成

ヨウ化アルキル試薬 (ヨウ化メチル, ヨウ化エチル, 1-ヨードプロパン, 1-ヨードブタン, 1-ヨードペンタン, 1-ヨードヘキサン, 1-ヨードオクタン, 1-ヨードデカンおよび 1-ヨードドデカン; それぞれ 0.022 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL) に, **7** (32 mg, 0.1 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL) および炭酸カリウム (30 mg, 0.22 mmol) を室温にて加えた後, 80°Cにて 12 時間攪拌した. 反応液を室温まで冷却し, セライト濾過してメタノールで洗浄, 濾液を減圧濃縮して得られた残渣をサンプルとし, HPLC に導入して分析した.

#### 化合物 **8** の合成

赤色 106 号 (1.5 g, 2.58 mmol) のジクロロメタン懸濁液 (40 mL) に, 室温にて塩化オキサリル (1.11 mL, 12.9 mmol), 次いで *N,N*-ジメチルホルムアミド (50  $\mu$ L) を加えた. 室温にて 14 時間攪拌した後, 反応液を真空下にて減圧濃縮し, 得られた残渣をジエチルエーテル (50 mL) に懸濁させ, 生じた沈殿物を濾取して真空乾燥することで化合物 **8** を茶色固体として得た (1.48 g, quant.).

#### RI-3 の合成

化合物 **8** (mg, 0.2 mmol), トリエチルアミン (56  $\mu$ L, 0.4 mmol) のジクロロメタン溶液 (1 mL) に直鎖第一級アルキルアミン (C3, C5, C7, C9 および C12; それぞれ 0.04 mmol) を室温に

て加えて, 12 時間攪拌した. 反応液をメタノールで 1000 倍希釈して HPLC に導入して反応生成物 (**RI-3**) の分析を行った.

#### D. 結論

カロテノイド類の HPLC 法による定量で利用可能なシングルリファレンス分子として, ビスインドリルマレイミド誘導体の簡便な大量合成経路を確立した. アナトー色素であるビキシンおよびノルビキシンの定量用サンプルとして, 異性体である *trans*-ビキシンおよび *trans*-ノルビキシンの合成における反応条件を検討することで供給した. 今後はこれらのシングルリファレンス分子および標品を利用してビキシンおよびノルビキシンの HPLC による定量法の確立を行う. また, HPLC におけるリテンションインデックスとして利用可能な分子のデザインを検討した結果, これまでの研究で用いていた, UV 吸収を示す共通化合物ユニットへの官能基導入により, HPLC クロマトグラム上における溶出位置を制御する, という戦略が利用可能であることが示唆され, 疎水性および親水性分子についても適用できることが分かった. ただし, 現状の HPLC 分析では移動相のグラジエントを適用した条件であるため, 今後はアイソクラティックな移動相条件にて検討を行い, 化合物構造のさらなる最適化を行う必要があると考えられた.

#### E. 文献

- 1) Scotter MJ, S. A. Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR, Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. Food Addit. Contam. 11, 301-315 (1994).
- 2) 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).
- 3) Lin Z, Chen HC, Sun S-S, Hsu C-P, Chow TJ: Bifunctional maleimide dyes as selective anion

sensors. Tetrahedron, 65, 5216-5221 (2009).

## **F. 研究発表**

### **F-1) 学会発表**

#### **F-1-1) 学会等**

- 1) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 永津明人, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン Single reference-HPLC 法によるアナトー色素のビキシシ及びノルビキシシの分析. 2023 AOAC Japan Section Meeting (2023.7).

#### **F-1-2) シンポジウム等**

なし

### **F-2) 論文発表**

#### **F-2-1) 論文等**

なし

#### **F-2-2) 総説等**

なし

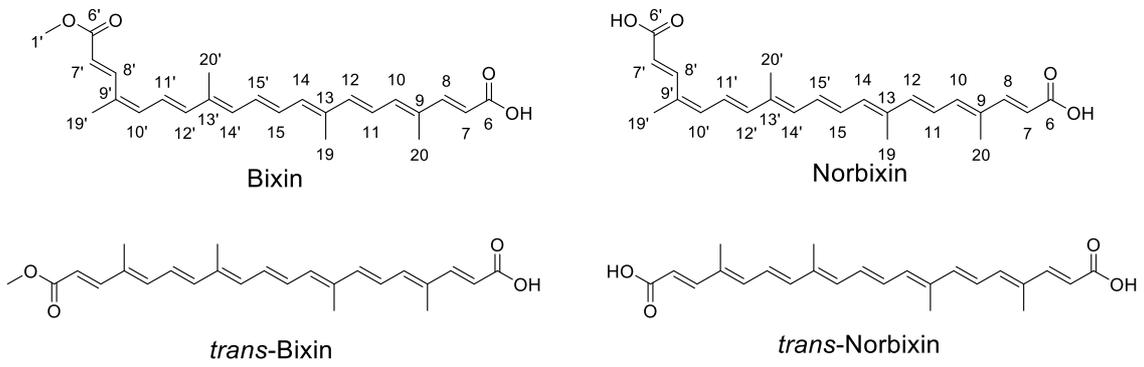
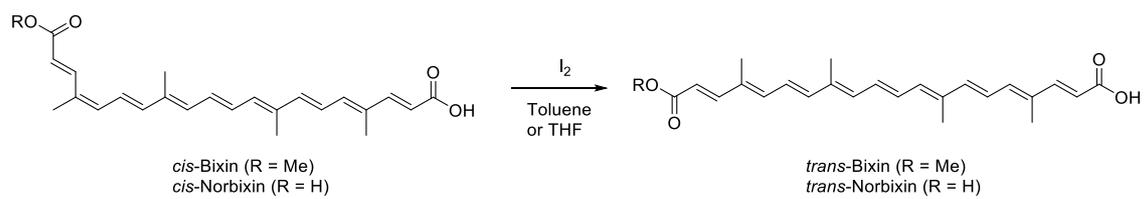


Fig. 1. Bixin, norbixin とその *trans* 異性体の化学構造



Scheme 1. Bixin および norbixin の異性化反応

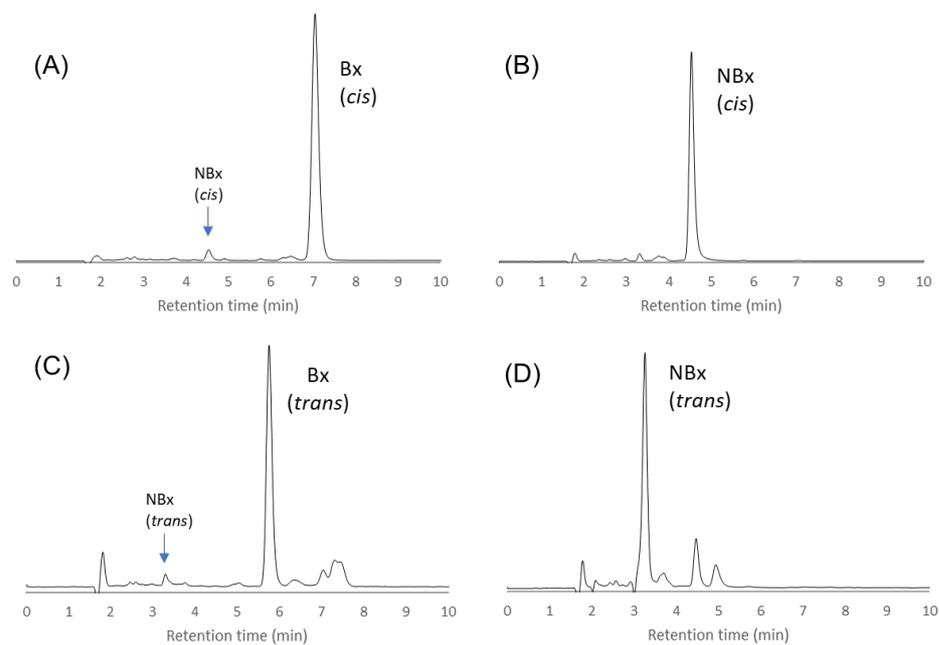
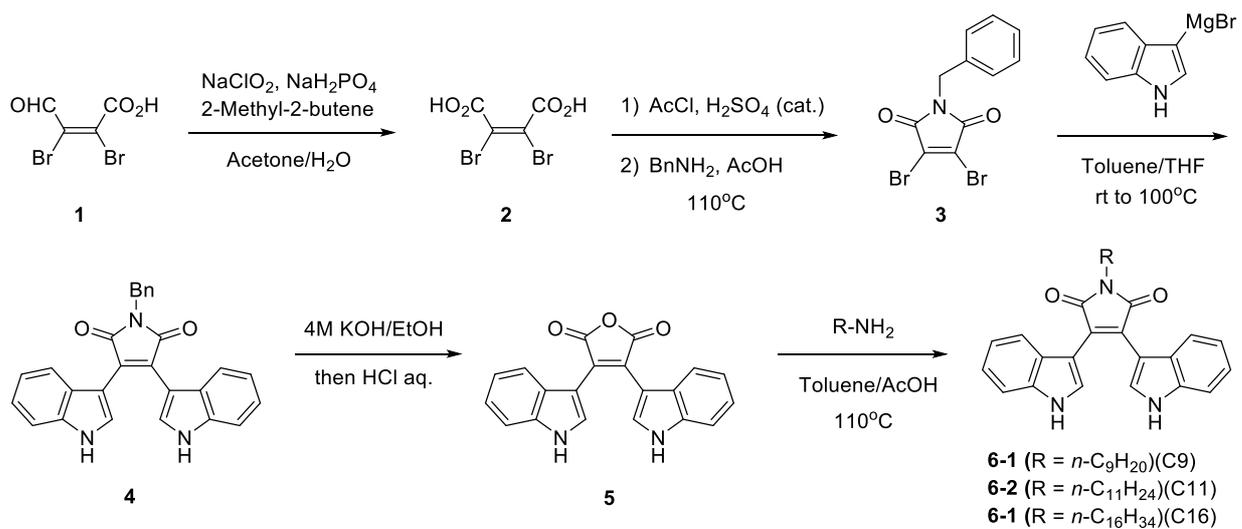


Fig. 2. ビキシシ (Bx)およびノルビキシシ (NBx)の異性化の HPLC 痕跡  
 (A) *cis*-Bx 単独, (B) *cis*-NBx 単独, (C) Bx の異性化反応物, (D) NBx の異性化反応物



Scheme 2. ビスインドリルマレイミド誘導体 **6** の合成

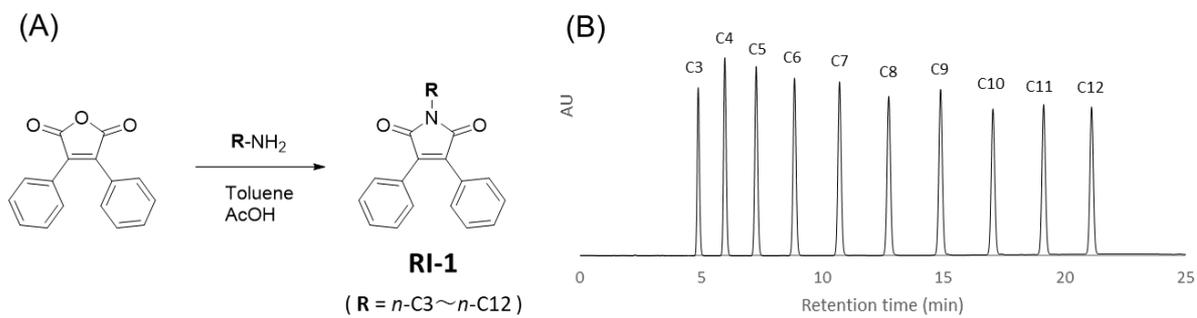


Fig. 3. ビスフェニルマレイミド誘導体 RI-1 (C3-C12 の混合物) の合成(A)とその HPLC 痕跡(B)

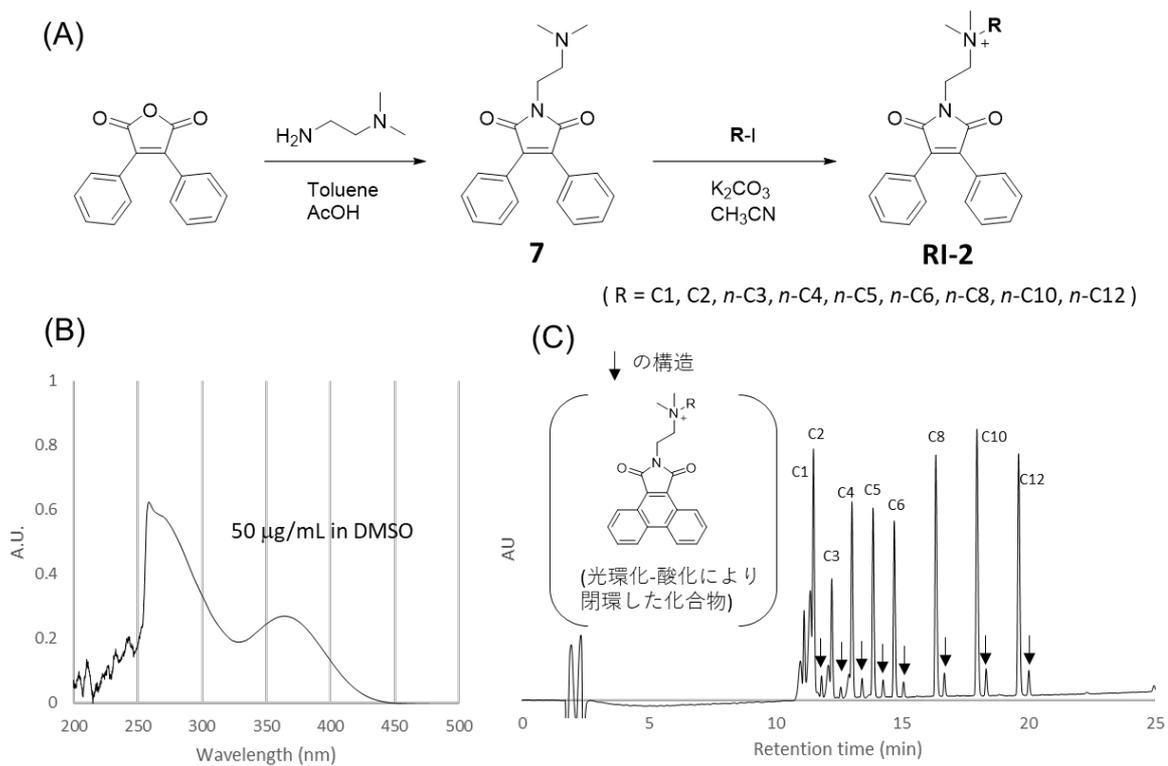


Fig. 4. ビスフェニルマレイミド誘導体 RI-2 (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10 および C12 の混合物) の合成(A)とその吸収スペクトル(B)、HPLC 痕跡(C)

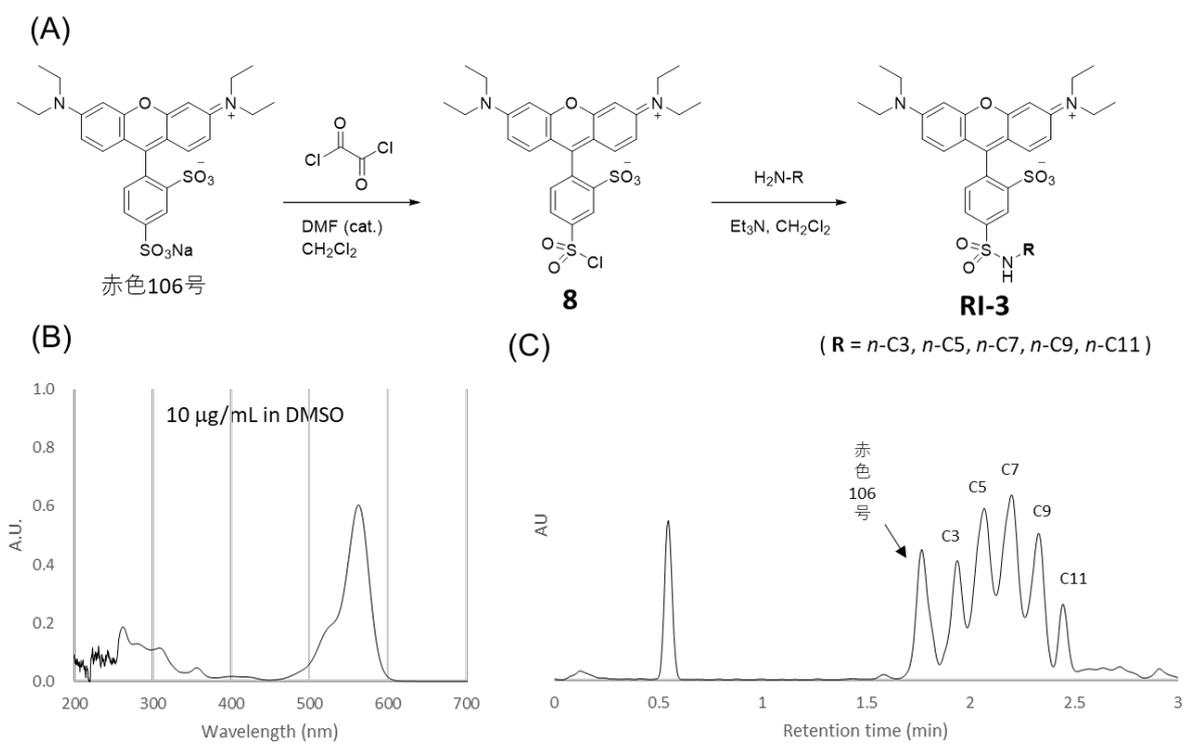


Fig. 5. 赤色 106 号誘導体 RI-3(C3, C5, C7, C9 および C11 の混合物)の合成(A)とその吸収スペクトル(B)、HPLC 痕跡(C)

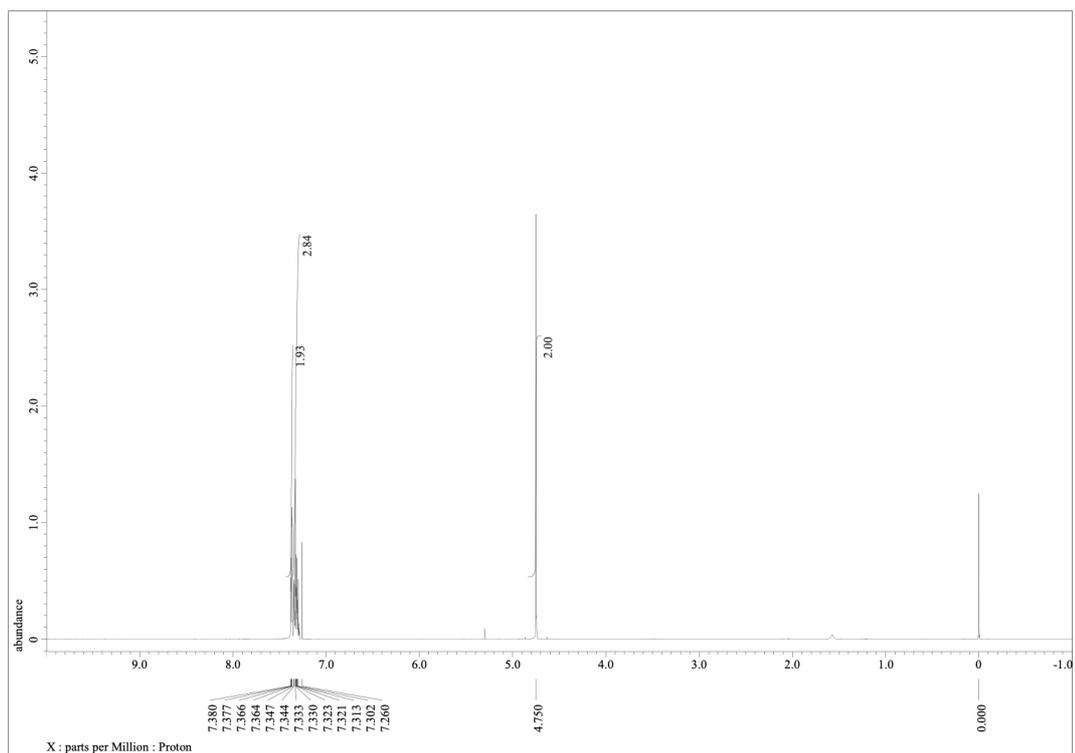


Fig. 6. 化合物4の<sup>1</sup>H NMRスペクトル (CDCl<sub>3</sub>)

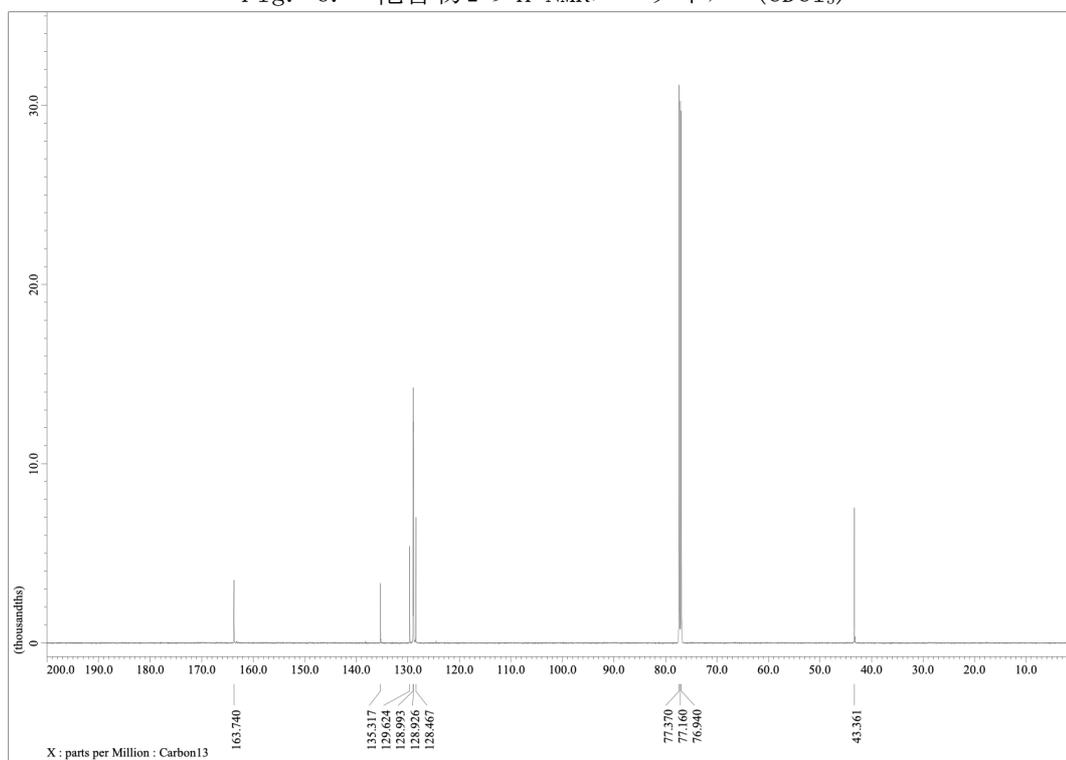


Fig. 7. 化合物4の<sup>13</sup>C NMRスペクトル (CDCl<sub>3</sub>)

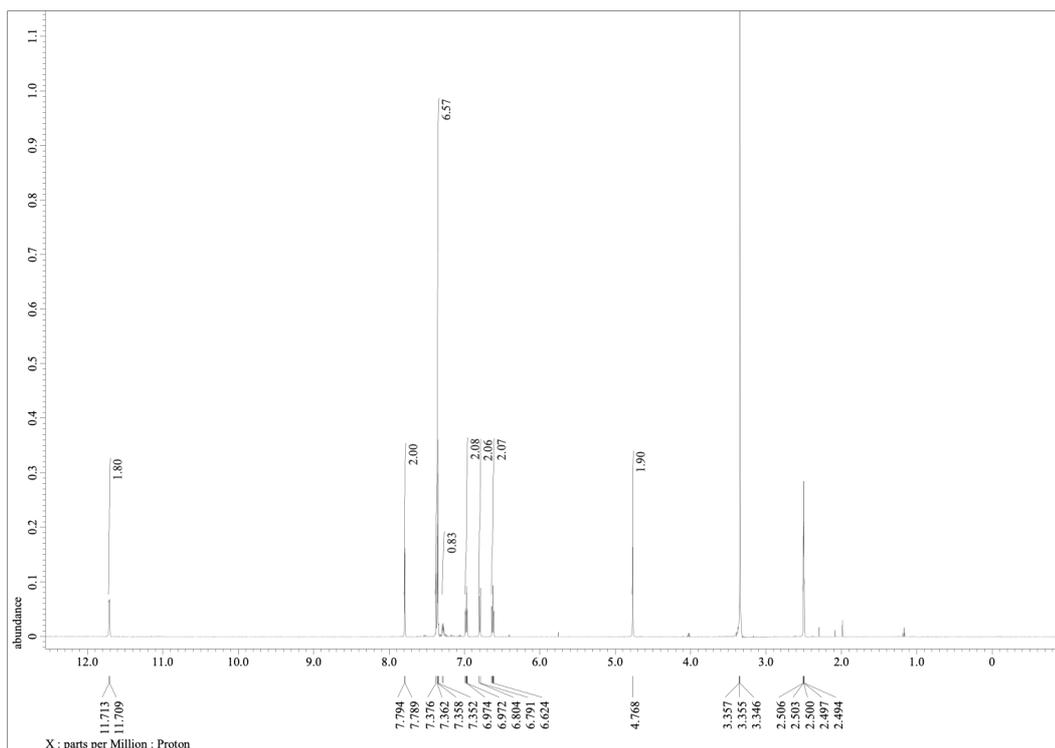


Fig. 8. 化合物5の<sup>1</sup>H NMRスペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

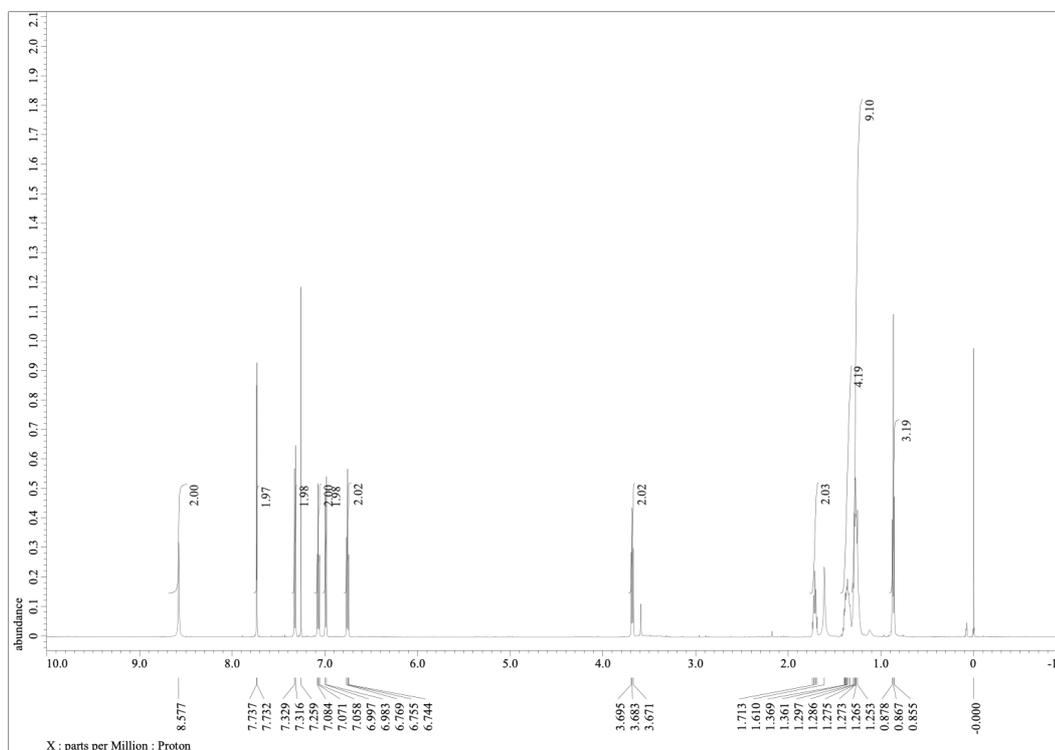


Fig. 9. 化合物6-1の<sup>1</sup>H NMRスペクトル (CDCl<sub>3</sub>)

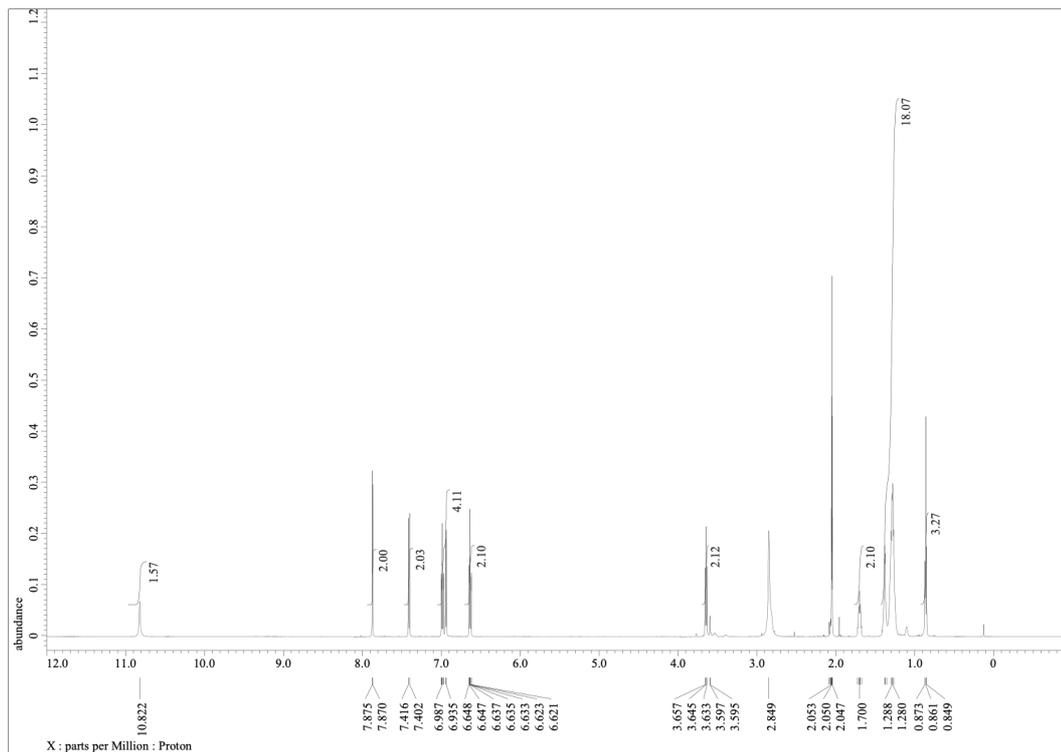


Fig. 10. 化合物6-2の<sup>1</sup>H NMRスペクトル (Acetone-*d*<sub>6</sub>)

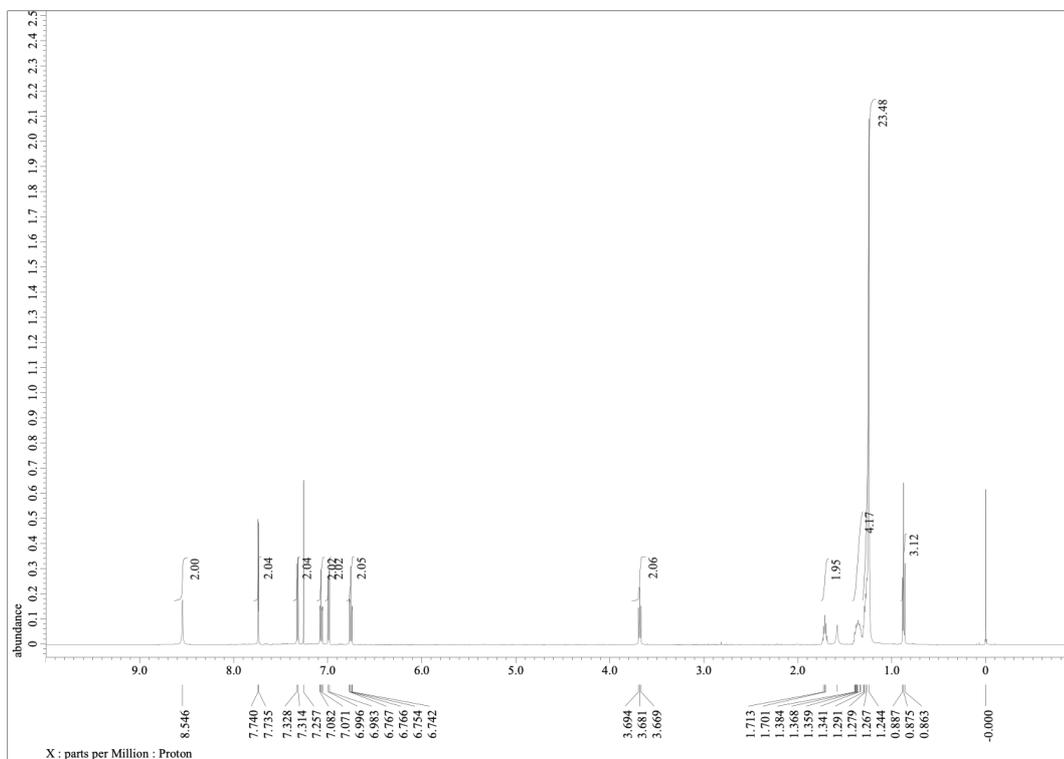


Fig. 11. 化合物6-3の<sup>1</sup>H NMRスペクトル (CDCl<sub>3</sub>)

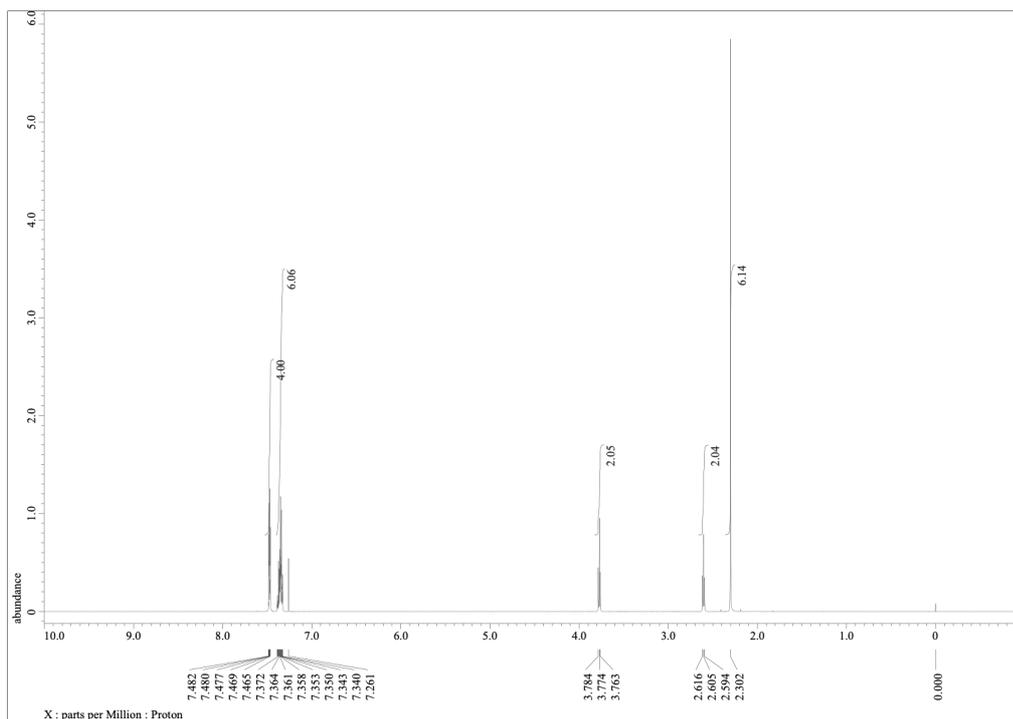


Fig. 12. 化合物7の $^1\text{H}$  NMRスペクトル ( $\text{CDCl}_3$ )

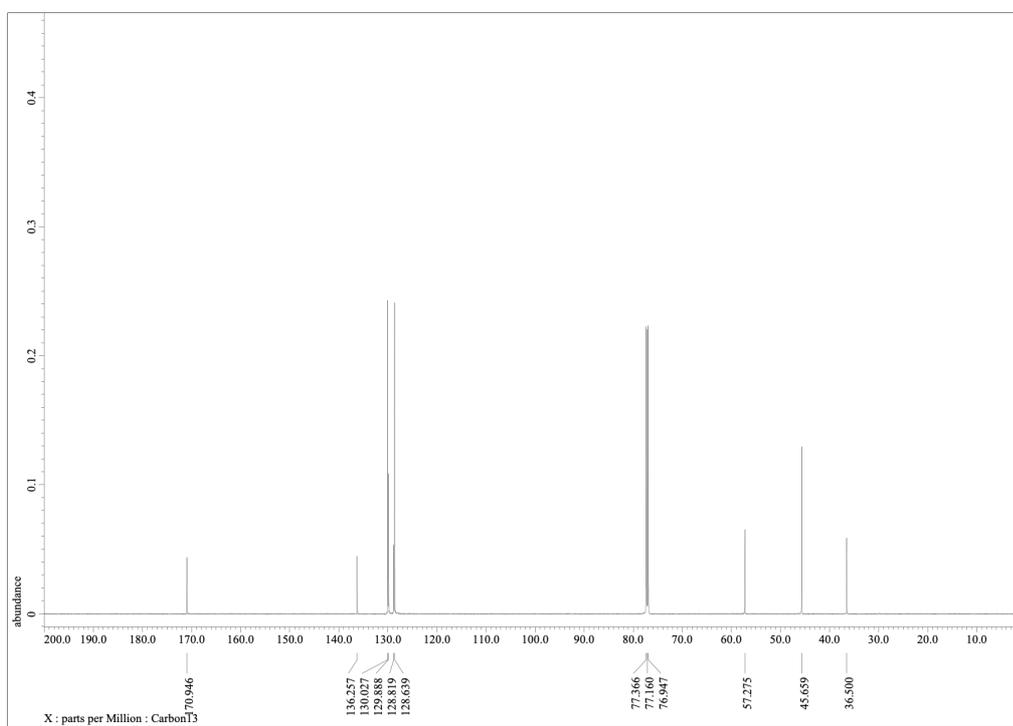


Fig. 13. 化合物7の $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル ( $\text{CDCl}_3$ )

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置（EDX）を用いた食品添加物中の

鉛及びヒ素の定量法の検討

研究分担者 阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

### 研究要旨

食品添加物中の鉛（Pb）及びヒ素（As）の定量法として、前処理が不要で測定が簡便なエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置（EDX）を用いた定量法の検討を行った。試料には性状が粉末で、主成分が無機物のケイソウ土及び卵殻焼成カルシウム及び主成分が有機物の L-アルギニンを用いた。定量法はファンダメンタルパラメーター（FP）法では感度が十分ではなかったことから、標準添加法を用いることとした。規格値相当濃度を添加した試料について、標準添加法を用いて回収率を求めたところ、回収率は 75-100%程度、一部の試料において相対標準偏差は 5%未満、関係線の決定係数（ $R^2$ ）は 0.95 以上と良好な結果が得られた。卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンにおいてわずかに回収率が低く、卵殻焼成カルシウムでは相対標準偏差も大きくなる場合があったため、今後、改善策の検討を進める予定である。

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

### A. 研究目的

我が国では、原則として厚生労働大臣が使用を認めた食品添加物しか使用できないこととされ、また、その安全性及び品質を確保するため成分規格や保存基準等の規格基準が設定され<sup>1)</sup>、表示基準と合わせて食品添加物公定書（公定書）<sup>2)</sup>に収載される。

現在、公定書は第 10 版まで発出されてお

り、この中の D 成分規格・保存基準各条には約 720 品目の食品添加物が収載されている。成分規格には、各食品添加物に応じて、定義、含量、性状、確認試験、純度試験等の項目が定められている。このうち純度試験は食品添加物中の混在物の試験であり、その混在物の限度値やその試験法が規定されている。純度試験の項目には、酸価、塩化物、鉛（Pb）、ヒ素（As）、残留溶媒等がある。これらの項目のうち、Pb 及び As については、非常に多くの食品添加物に設定されている。

Pb 及び As の試験法は、試料を灰化等によって分解して検液を調製したのち、Pb は原子吸光光度計を用いて測定し、規格値相当の比較液の吸光度と比較して判定する。As の場合は、検液を調製した後、亜ヒ酸をヒ化水素として揮発させ、ヒ化水素吸収液に吸収させて発色した色を、同様に反応させた標準液の色と比較して判定する。いずれも、古くから用いられてきた方法であるが、灰化等に長時間を要する場合があったり、As の場合には有害試薬であるピリジンを用いたり、試験者や環境への負担が大きい試験法である。

試料中の原子に X 線を照射すると、原子から固有の X 線が発生し試料外に放出される (図 1)。この放出された X 線は蛍光 X 線と呼ばれ、各元素固有の波長 (エネルギー) をもつため、蛍光 X 線分析装置 (XRF) を用いて蛍光 X 線のエネルギーを測定することで、含有されている元素が同定でき、また、その強度から物質中の各元素の量を計算することができる。多元素同時分析・非破壊分析が可能ならぬ、様々な形態の試料の測定も可能であり、検量線を用いた定量及びファンダメンタルパラメーター (FP) 法による定量が可能である。

そこで本研究では、装置が小型かつ安価で操作が簡便なエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いて、灰化等の前処理をせずに食品添加物中の Pb 及び As の定量が可能かどうか検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1) 試料

ケイソウ土 (当部管理番号 : C2308), 卵殻焼成カルシウム (当部管理番号 : C2342), L-アルギニン (当部管理番号 : C2256) : 一般社団法人日本食品添加物協会 (日添協) を通じて入手した市場流通品を用いた。それぞれ Pb 及び As の規格値とともに表 1 に示した。

### B-2) 標準原液及び試薬

Pb 標準原液 : Lead Standard for ICP, 濃度 : 1000 mg/L  $\pm$  3 mg/L, SIGMA-ALDRICH 社製 (CN : 41318, Lot : BCCD0986)

As 標準原液 : Arsenic Standard for ICP, 濃度 : 1000 mg/L  $\pm$  2 mg/L, SIGMA-ALDRICH 社製 (CN : 01969, Lot : BCCC2631)

水 : ピューリック Ω (オルガノ株式会社製) で製造した超純水

### B-3) 添加用標準液の調製

① ケイソウ土用 Pb 標準原液 0.8 mL 及び As 標準原液 0.6 mL に水を加え 2 mL とした (Pb : 400  $\mu$ g/mL, As : 300  $\mu$ g/mL)。

② 卵殻焼成カルシウム用 Pb 標準原液 0.32 mL 及び As 標準原液 0.48 mL に水を加え 2 mL とした (Pb : 160  $\mu$ g/mL, As : 240  $\mu$ g/mL)。

③ L-アルギニン用 Pb 標準原液 0.12 mL 及び As 標準原液 0.18 mL に水を加え 1 mL とした (Pb : 120  $\mu$ g/mL, As : 180  $\mu$ g/mL)。

#### B-4) 添加試料の調製

##### ① ケイソウ土

ケイソウ土 32.0 g を 250 mL 容ポリプロピレン (PP) 製容器にとり, Pb 標準原液 0.32 mL 及び As 標準原液 0.24 mL を加え, 均一になるように良く振り混ぜた. 水分をのぞくため, ドラフト内で蓋を開けた状態で 40°C で 4 時間乾燥し添加試料とした. 添加試料中の Pb 及び As 濃度はそれぞれ 10 及び 7.5 µg/g となる.

##### ② 卵殻焼成カルシウム

卵殻焼成カルシウム 65.0 g をメノウ乳鉢にとり, Pb 標準原液 0.195 mL 及び As 標準原液 0.13 mL を加え, 均一になるようにすり混ぜたのち, 250 mL 容 PP 製容器に移し, さらに良く振り混ぜた. 水分をのぞくため, ドラフト内で蓋を開けた状態で 40°C で 4 時間乾燥したものを添加試料とした. 添加試料中の Pb 及び As 濃度はそれぞれ 2 及び 3 µg/g となる.

##### ③ L-アルギニン

L-アルギニン 18.0 g をメノウ乳鉢にとり, Pb 標準原液 0.036 mL 及び As 標準原液 0.054 mL を加え, 均一になるようにすり混ぜたのち, 100 mL 容 PP 製容器に移し, さらに良く振り混ぜた. 水分をのぞくため, ドラフト内で蓋を開けた状態で 40°C で 4 時間乾燥したものを添加試料とした. 添加試料中の Pb 及び As 濃度はそれぞれ 2 及び 3 µg/g となる.

#### B-5) 測定試料及び測定添加試料の調製

試料 (ケイソウ土は 2.0 g, 卵殻焼成カルシウムは 4.0 g, L-アルギニンは 3.0 g) を 50

mL 容 PP 製容器にとり, それぞれ添加用標準溶液 0, 0.025, 0.05, 0.075 及び 0.10 mL を加え, ケイソウ土はそのまま振り混ぜ, 卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンはメノウ乳鉢ですり混ぜたのち容器に戻しよく振り混ぜた. 水分を除くため, ドラフト内で蓋を開けた状態で 40°C で 4 時間乾燥したものを測定試料とした. また, 添加試料について同様の操作を行ったものを, 測定添加試料とした.

#### B-6) 装置

EDX : EDX-8100 (ターレット付き) (島津製作所製)

#### B-7) 測定試料及び測定添加試料の測定

サンプルカップ (P/N 219-85000-55, 島津製作所製) の底部に PP 製フィルム (P/N 219-82019-05, 島津製作所製) を張り, その上に測定試料又は測定添加試料を厚さ 0.5 cm 以上 (ケイソウ土は 2.0 g, 卵殻焼成カルシウムは 4.0 g, L-アルギニンは 3.0 g) 入れ, サンプル瓶などを使って強く表面を押し詰め, 上部には真空測定用 PP フィルム (CAT.No.325, Chemplex 製) を張った. 測定試料, 測定添加試料ともに各濃度 3 個ずつ調製し, 次に示す測定条件で測定した. ただし, L-アルギニンについては, 検討途中で試料が不足したため, 測定試料, 測定添加試料とも各濃度 1 個ずつ調製した.

#### B-8) 測定条件

測定元素 : As ( $K_{\beta}$ 線), Pb ( $L_{\beta 1}$ 線)

分析グループ：定量

検出器：シリコンドリフト検出器 (Silicon-drift detector, SDD)

X線管球：Rh ターゲット

管電圧：50 [kV]

管電流：100 [μA]

コリメータ：10 [mm φ]

スピン：しない

1次フィルタ<sup>脚注1</sup>：#4

雰囲気：大気

積分時間：1800 [秒]

デッドタイム：最大 30 [%]

## B-9) 回収率の算出

測定試料及び測定添加試料におけるそれぞれの添加濃度と面積値から関係線を作成し、試料及び添加試料中の Pb 及び As 濃度を求めたのち、回収率を算出した。

なお、装置付属のソフトウェアでの計算結果では計算過程が不透明であったため、測定により得られた面積値を Microsoft Excel を用いて関係線を作成して計算し、以下の式から回収率を求めた。

回収率 (%) = {(測定添加試料の濃度) - 測定試料の濃度 (ただし試行回数が3の場合は平均値)} ÷ 添加濃度 × 100

## C. 結果及び考察

### C-1) 定量方法の選択

XRF を用いて鉱物や合金等、無機物で構成されている試料中の構成元素の定量には、物理定数 (ファンダメンタルパラメーター, FP) を用いた FP 法が汎用される。FP 法は、標準試料を必要としない XRF 独自の定量法で、試料の蛍光 X 線強度から試料組成を理論的に推定し、検出された全ての元素の合計量が 100% となるように計算することで試料中の各元素の含量を算出する。いずれの装置メーカーの XRF にも標準的に備わっている定量法である。そこで予備検討として、ケイソウ土に規格値相当の Pb (10 μg/g) と As (7.5 μg/g) を添加した添加試料を調製し、FP 法で定量した<sup>脚注2</sup>。測定は大気条件と真空条件で、それぞれ3試行で行った。その結果、Pb は PbO としていずれの測定条件においても 0.002% (=20 μg/g) 検出され、As は大気条件で 0.002%、真空条件では不検出となった。Pb も As も FP 法では感度が不十分で正確な定量値が得られなかったと考えられた。

そこで、検量線を用いる方法を検討した。XRF で検量線を用いて定量するには、未知試料と主成分、および定量対象元素の含有範囲を合わせた濃度既知の標準試料を用意する必要がある。適切な標準試料が得られない場合は、標準試料 (例えば水溶液) と

### 脚注

- 1: 目的の測定線に対する特性 X 線などの妨害を除去することでバックグラウンドを下げ、シグナルノイズ比を向上させるためのフィルター。測定対象の元素ごとに適切なフィルターを選択するのが一般的である。本研究では Pb 及び As 測定に適したフィルター (#4) を選択した。
- 2: 予備検討における測定条件 (B-8 に示した条件と異なる部分のみ)  
測定元素: Na-U; 分析グループ: 定性定量; 管電圧: 15 [kV] ([Na-P], [S-Ca]), 50 [kV] ([Mo-Xe], [Al-U], [Cr-Fe], [Ni-Nb, As, Pb])  
管電流: Auto [μA]; 1次フィルタ: #1 ([Mo-Xe]), #2 ([S-Ca]), #3 ([Cr-Fe]), #4 ([Ni-Nb, As, Pb]), Non ([Na-P], [Al-U]);  
雰囲気: 大気及び真空; 積分時間: 60 [秒]×5Ch ([Na-P], [S-Ca], [Mo-Xe], [Cr-Fe], [Ni-Nb, As, Pb]), 30 [秒]×1Ch ([Al-U])

未知試料（例えば固体）の主成分の違いを補正する内標準法，あるいは標準添加法による関係線から定量することができるが，本研究では標準添加法による定量法を検討した。

また，EDX の測定条件として大気条件と真空条件があるが，特別な試料調製や装置機能が不要な大気条件で行うこととした。

## C-2) 試料の選択

食品添加物の性状は，液体，ペースト，固体，粉末等様々であるが，本年度は装置感度及び試料調製のし易さの観点から，固体，特に粉末の試料を対象とすることとした。なお，粉末の試料には，主成分が無機物か有機物かの違いがあり，また Pb 及び As の規格値にも幅が見られた。そこで，Pb 及び As の規格値も考慮し，主成分が無機物のものでケイソウ土及び卵殻焼成カルシウム，主成分が有機物のもので L-アルギニンを試料として用いた（表 1）。

## C-3) 添加回収試験

### ① 添加試料の調製

添加試料における Pb 及び As の濃度は各品目の規格値相当濃度とした。本研究では，試料は粉末のものを対象としたが，溶液を添加することで溶解又は吸湿して硬化する可能性があったため，添加量は極力少なくした。また，試料中の水分の影響を抑えるため，添加後の試料は良く攪はんして混ぜ合わせたのち乾燥させることとした。ただし，高温で乾燥すると As が揮散する可能性

があったため，40℃で4時間穏やかに加温することで乾燥した。

### ② 測定試料及び測定添加試料の調製

標準添加法における測定試料や測定添加試料の調製では，試料に濃度が異なる標準溶液を一定量添加するか，一つの濃度の標準溶液を設定された濃度になるように量を変えて添加する方法があるが，標準溶液調製の手間を考慮し，本研究では一つの濃度の標準溶液を量を変えて添加することとした。また，① 添加試料の調製と同様に，標準溶液の添加量は極力少なくし，添加して良く攪はんした後，40℃で4時間穏やかに乾燥したものを測定試料又は測定添加試料とした。

測定試料及び測定添加試料に添加する Pb 及び As 濃度は，規格値相当濃度の 1/2～2 倍の範囲とした。

### ③ 回収率

ケイソウ土，卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンのそれぞれについて，測定試料及び測定添加試料の関係線の一例を図 2-1～3 に，含有量及び回収率を表 2 に示した。

ケイソウ土では，測定試料及び測定添加試料のいずれにおいても，関係線の決定係数 ( $R^2$ ) は 0.994 以上となり，良好な直線性を示した（図 2-1）。また，回収率は Pb で 97.6%，As で 98.1%，相対標準偏差（RSD）もそれぞれ 2.4 及び 4.6% であり，非常に良好な結果であった（表 2）。

卵殻焼成カルシウムでは，関係線の決定係数は 0.90 以上となった。一部の濃度点における繰り返し精度が悪かったが，直線性

は認められた (図 2-2)。回収率は、Pb が 84.5%、As が 75.9%、RSD はそれぞれ 17.6% 及び 5.9%であった (表 2)。

L-アルギニンでは、関係線の決定係数は 0.992 以上と良好な直線性を示した (図 2-3)。また回収率は Pb で 88.0%、As は 85.8% と良好であった (表 2)。

以上のように、おおむね良好な結果が得られたが、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの回収率はケイソウ土に比べると低い値であり、特に卵殻焼成カルシウムでは繰返しの相対標準偏差も大きい値であった。これは、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの規格値がケイソウ土に比べ低いことが原因の一つと考えられた。また、L-アルギニンは水に溶けるため、添加試料及び測定試料を調製する際に溶解したために均一に混ぜ合わせることが出来なかった可能性もあった。卵殻焼成カルシウムの主成分は酸化カルシウム (CaO) であるが、CaO は水と反応し発熱して水酸化カルシウムになり固まるため、それも均一に混ぜ合わせることができなかった原因の一つと推定された。

#### ④ ケイソウ土の Pb 及び As 純度試験との比較

ケイソウ土の測定試料の定量結果において、Pb が 10.6  $\mu\text{g/g}$ 、As が 8.4  $\mu\text{g/g}$  と公定書における規格値 (Pb : 10  $\mu\text{g/g}$ 、As : 7.5  $\mu\text{g/g}$ ) をわずかに上回った。そこで、公定書に準じて Pb 及び As の純度試験を行ったところ、Pb は 0.4  $\mu\text{g/g}$ 、As は 1.2  $\mu\text{g/g}$  (いずれも  $n=3$ ) となり、Pb は規格値の 1/20 未満、As は 1/5 未満であり、規格基準に適合していること

が確認された。

公定書におけるケイソウ土の Pb 及び As の試験法は、塩酸酸性下及び高温下で抽出されたものを測定している。これは、食品製造中に食品に移行する可能性があることを考慮して、過剰な試験条件が設定されたものであるが<sup>3)</sup>、実際の含量は適切に定量できないことが示唆された。

#### D. 結論

EDX を用いて公定書における食品添加物中の鉛 (Pb) 及びヒ素 (As) の定量法を検討した。粉末の試料を対象に標準添加法での定量法を検討した。試料としてケイソウ土、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンをを用いた。規格値相当濃度で添加回収試験を実施した結果、回収率はいずれも 80%以上、特にケイソウ土では 100%に近い結果が得られた。卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンで回収率がケイソウ土に比べ低い値になった要因は、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの Pb 及び As の規格値がケイソウ土に比べ低いいため装置の感度の問題があったと考えられた。また、これらの試料には若干の溶解性があり、添加試料や測定添加試料調製時に一部溶解し、そのため均一な試料調製が出来なかった可能性も考えられた。そこで来年度以降は、水溶液を添加しない標準添加法や内標準法による定量法の検討を進める予定である。

また、本研究において、ケイソウ土中に Pb 及び As が約 10  $\mu\text{g/g}$  含有されていることが確認されたが、これらはほとんど食品へ

移行しないことが示され、健康影響はほとんどないと考えられた。

#### **E. 参考文献**

- 1) 食品，添加物等の規格基準 第2 添加物，厚生省告示第370号（昭和34年）
- 2) 第10版食品添加物公定書，厚生労働省，消費者庁（2024）
- 3) 第9版食品添加物公定書解説書，廣川書店（2019）

#### **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

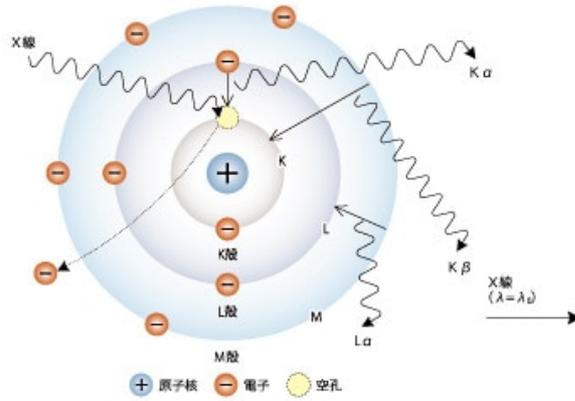


図1 蛍光 X 線の原理・特徴

(<https://www.an.shimadzu.co.jp/products/elemental-analysis/edx-fs/edx-700080008100/index.html>)

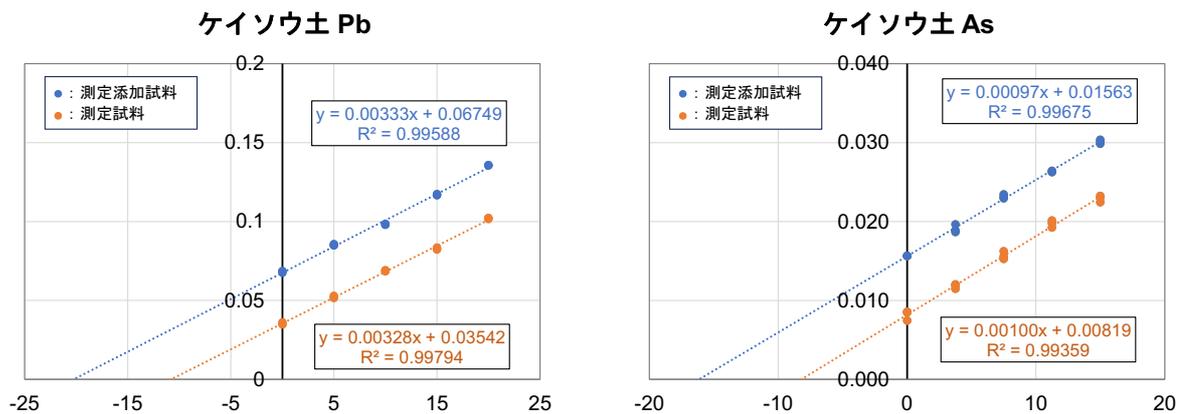


図 2 - 1 ケイソウ土の Pb 及び As の関係線 (一例)

(縦軸：強度，横軸：添加濃度 (μg/g))

決定係数が最も小さい値だった関係線を一例として示した.

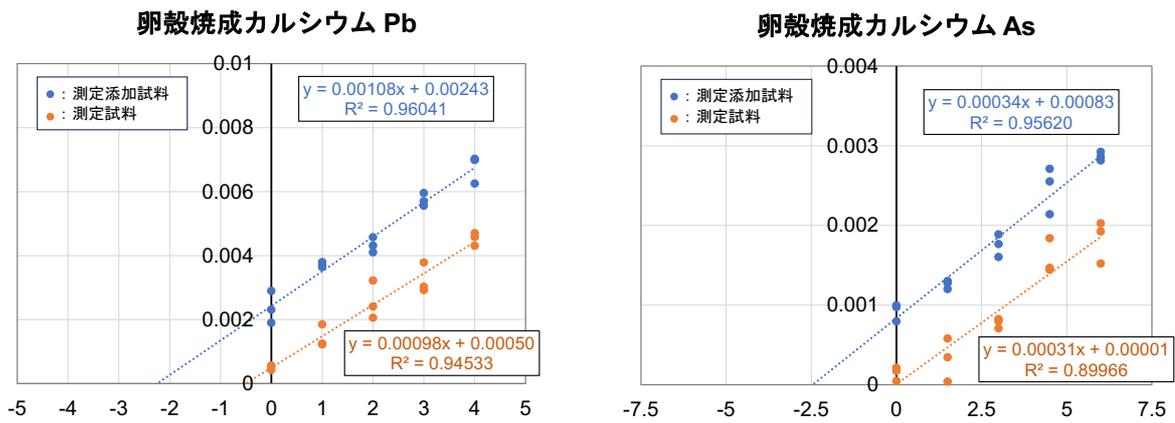


図 2-2 卵殻焼成カルシウムの Pb 及び As の関係線 (一例)

(縦軸：強度，横軸：添加濃度 (μg/g))

決定係数が最も小さい値だった関係線を一例として示した.

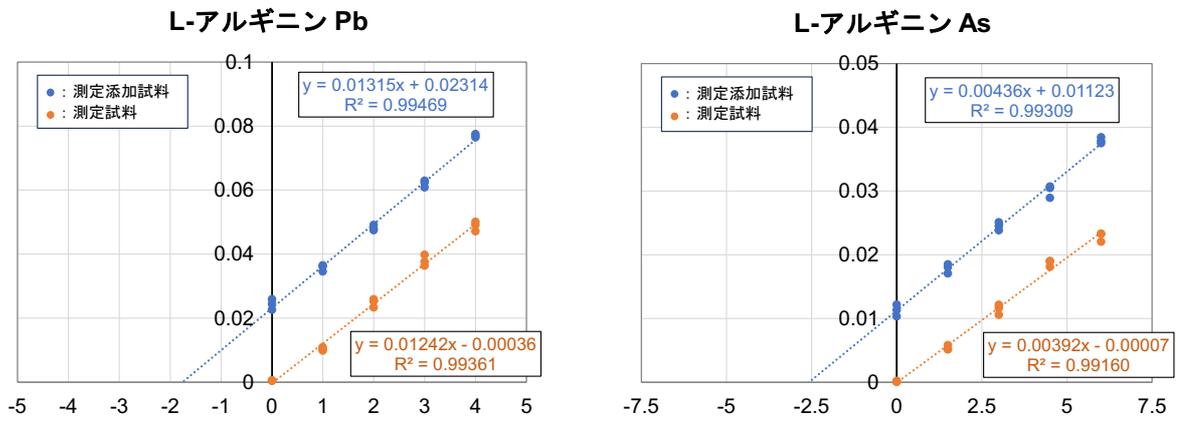


図 2-3 L-アルギニンの Pb 及び As の関係線 (縦軸：強度, 横軸：添加濃度 (μg/g))

表 1 本研究で用いた試料

試料	当部 管理番号	公定書における規格値	
		Pb	As
ケイソウ土	C2308	10 µg/g 以下*	7.5 µg/g 以下*
卵殻焼成 カルシウム	C2342	2 µg/g 以下	3 µg/g 以下
L-アルギニン	C2256	2 µg/g 以下	3 µg/g 以下

\*食品添加物への移行を考慮した規格値

表 2 試料及び添加試料中の Pb 及び As 含量並びに回収率

試料	Trial	試料 (µg/g)		添加試料 (µg/g)		回収率 (%)	
		Pb	As	Pb	As	Pb	As
ケイソウ土	1	10.5	8.2	20.3	15.6	96.3	95.3
	2	10.6	8.2	20.7	16.2	100.3	103.3
	3	10.8	8.8	20.3	15.6	96.1	95.8
	Ave	10.6	8.4	20.4	15.8	97.6	98.1
	RSD (%)	1.4	4.3	1.2	2.1	2.4	4.6
卵殻焼成 カルシウム	1	0.2	0.0	2.2	2.5	97.8	77.2
	2	0.2	0.3	1.7	2.5	68.5	79.6
	3	0.5	0.1	2.0	2.3	87.2	70.9
	Ave	0.3	0.1	2.0	2.4	84.5	75.9
	RSD (%)	64.4	93.7	15.0	5.6	17.6	5.9
L-アルギニン	1	0.0*	0.0*	1.8	2.6	88.0	85.8

\*関係線における定量値がマイナスの値となったため、定量値は0（ゼロ）とみなした。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

～真菌基原の添加物酵素の基原種同定法の開発および基原種に関する分類学的情報の収集～

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 第三室長

### 研究要旨

食品添加物のうち微生物を基原とする酵素について、電気泳動法と MALDI-TOF MS によるペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) を組み合わせた基原同定法の開発を実施した。検討した添加物酵素の多くについて基原の情報を得ることができたが、一部の製品については製造者が公表している基原種と解析結果が一致せず、また、基原種の情報が全く得られなかった製品も存在した。その理由として、分析手法による問題のほか、検索に用いるデータベースの配列登録情報の不足、および微生物菌名の変更に伴うシノニム情報の不足もあると考えられた。そこで、より多くの製品の基原種を正確に同定するために、本年度の検討では、データベースの改良を伴う解析法の検討、およびデータベース有効的な改良を見据えた分類学的情報の収集を行った。タンパク質のデータベースである UniProt から抽出したアミノ酸配列を用いて独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチの結果、オンラインで実施した場合には同定できなかった *Bacillus circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼや *Pycnoporus coccineus* 由来のプロテアーゼの基原を決定することができた。また、複数種の消化酵素を用いた解析では、トリプシンを用いた場合には同定できなかった *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼや *Trichoderma viride* 由来のセルラーゼに含まれるタンパク質のバンドを同定することができた。さらに、添加物酵素の基原として広く用いられる *A. niger* とその近縁種に関する分類学的情報の収集することができた。以上の結果より、独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチおよび複数種の消化酵素を用いた解析は、基原同定の精度を高めるために有用であることが明らかとなった。さらに、データベースに登録する情報を精査すること、並びに酵素製品の付帯情報についても最新の真菌分類学的情報を元に整理する必要があると言える。

研究協力者

衛生微生物部

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部

船江元子 国立医薬品食品衛生研究所

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部

衛生微生物部

伊藤紫野 東京理科大学

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部

先進工学部

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部

### 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

中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所

加物酵素の定義には、基原が一つの微生物種に規定されておらず、すなわち、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酵素品目とみなされる。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が多いことが知られている。微生物由来基原の品目の同定法として、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の開発が望まれる。添加物酵素は、分子量の大きいタンパク質であることから、HPLC や質量分析器による解析に適していない。また、微生物の分泌物から製造されていることから、核酸情報を基にしたアプローチも難しい。この問題を解決できる手法として、質量分析器を用いたペプチドマスマスフィンガープリンティング (PMF) 法に着目した。本手法はタンパク質の構造解析法の一つとして頻繁に用いられている。PMF 法は、まずポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法 (SDS-PAGE) によってタンパク質を分離した後、バンドを切り出してトリプシンなどのタンパク質分解酵素による消化を行う。得られたペプチドをマトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析器 (MALDI-TOF MS) により網羅的に分析する。複数のペプチドの質量情報からデータベース検索 (Mascot サーチ) により、元のタンパク質を同定する。

我々は、これまでに 36 種 (アミラーゼ 10 種、ガラクトシダーゼ 3 種、セルラーゼ 5 種、ヘミセルラーゼ 5 種及びプロテアーゼ 13 種) の既存添加物酵素を対象に、SDS-PAGE と PMF を組み合わせた方法によりそれぞれの基原種の同定を試みた。その結果、30 製品について基原の情報が得られ、そのうち 24 製品において、製品に付帯する基原情報と解析から得られた結果が一致した。残りの 6 製品については、製品付帯の基原情報と一致した結果のみならず、近縁種の基原情報も同時に得られた。これらの結果より、電気泳動法と MALDI-TOF MS を

組み合わせた解析法は、酵素の基原の特定に有効であり、製品の安全性の確保に貢献できると考えられたり。

しかし、一部の製品については製造者が公表している基原種と解析結果が一致しなかった。また、基原種の情報が全く得られなかった製品も存在した。その理由として、上述の試験法の問題の他にも、検索に用いるデータベースの配列登録情報の不足、及び微生物菌名の変更に伴うシノニム情報の不足、という問題もあると考えられた。

そこで、より多くの製品の基原種を正確に同定するために、本年度の検討では、データベースの改良を伴う解析法の検討、及びデータベース有効的な改良を見据えた分類学的情報の収集を行うこととした。

## B. 研究方法

### B-1) Mascot データベースの作成

タンパク質のアミノ酸配列データベース UniProt (<https://www.uniprot.org>) から、「*Bacillus*」, 「*Pycnoporus*」, 「*Sphingomonas*」, 又は「*Trichoderma*」の検索ワードにて抽出したアミノ酸配列を Mascot サーバーにアップロードし、データベースを構築した。過去の研究において取得した各酵素由来のバンドの MALDI-TOF MS スペクトルと構築したデータベースを照合し、タンパク質の同定を行った。

### B-2) MALDI-TOF MS による予測アミノ酸配列を指標とした基原同定

#### B-2-1) 分析機器

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-2-2) 試料

既存添加物試料は、日本食品添加物協会から分与された製品を用いた。各試料は国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号 (DFA No.) で、 $\beta$ -ガラクトシダーゼは B572、セルラーゼは B576 及び B674、ヘミセルラーゼは B651、B653 及び B577、プロテアーゼは

B591 及び B698 を用いた。

### B-2-3) 質量分析用検体の調製

各試料は、検体のタンパク質含有量に応じて 5~100 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 (1,000 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 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 20 µL, Arg-C (Sequence Grade; Roche Diagnostics 社) 5 µg/mL を含む 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 水溶液 20 µL (10×Activation solution を 2 µL 含む), Asp-N (Sequence Grade;富士フィルム和光純薬 (株)) 2 µg/mL を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 20 µL, キモトリプシン (CHTR, Sequence Grade; Roche Diagnostics 社) 10 µg/mL を含む 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 水溶液 20 µL, 又は Lys-C (Sequence Grade;富士フィルム和光純薬 (株)) 10 µg/mL を含む 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液を加え、37°C

一晩インキュベートした。0.1% トリフロオロ酢酸 (TFA) を含む 50%アセトニトリル水溶液 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%TFA 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) に酵素消化産物を吸着させ、0.1%TFA 水溶液で洗浄後、0.1%TFA と 10 mg/mL のマトリクス (4-クロロ- $\alpha$ -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。

### B-2-4) ペプチドの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の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 Peptide Mass Fingerprint search 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, Enzyme: 各消化酵素, Allow up to: 1, Fixed modification: Carbamylmethyl(C), Peptide tolerance: 15 ppm, Mass values: MH<sup>+</sup>。

### B-3) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

添加物酵素の基原として広く用いられ、かつ分類体系の再構築に伴う菌名の変更の歴史が複雑でありシノニムが多数存在することが知られる *Aspergillus* 属真菌の *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. kawachii* 及び *A. luchuensis* とこれらの近縁種に関する分類学的情報を文献から収集した。

## C. 結果及び考察

### C-1) 構築した Mascot データベースを用いた PMF

*Bacillus circulans* 由来  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (B572, 図 1a) については、SwissProt のデー

データベースを用いた Mascot サーチでは同定できなかった。そこで、UniProt において「*Bacillus*」と検索して得られたアミノ酸配列を用いて構築したデータベースを用いて Mascot サーチを行った (表 1)。その結果、2 種のバンドについていずれも *B. circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼが最も高いスコアで同定された。

*Pycnoporus coccineus* 由来のセルラーゼ (B576, 図 1b), ヘミセルラーゼ (B577, 図 1c) 及びプロテアーゼ (B591, 図 1d) については、SwissProt のデータベースを用いた Mascot サーチでは同定できなかった。そこで UniProt において「*Pycnoporus*」と検索して得られたアミノ酸配列を用いて構築したデータベースを用いて Mascot サーチを行った (表 1)。その結果、B576 の主要バンドは *P. coccineus* 由来の酸性プロテアーゼと同定された。B577 のバンド I は同定できなかったが、バンド II は *P. coccineus* の酸性プロテアーゼと同定された。B591 の主要バンドは、*P. coccineus* の酸性プロテアーゼと同定された。

*Trichoderma longibrachiatum* 由来のヘミセルラーゼ (B653, 図 1e) は、SwissProt のデータベースを用いた Mascot サーチでは *Trichoderma reesei* 又は *Trichoderma koningii* 由来のセルラーゼ様タンパク質がヒットし、*T. longibrachiatum* のタンパク質はヒットしなかった。そこで UniProt において「*Trichoderma*」と検索して得られたアミノ酸配列を用いて構築したデータベースを用いて Mascot サーチを行った結果、バンド II は *T. reesei* 及び *Trichoderma parareesei* 由来のキシログルカナーゼが、バンド III は *Trichoderma viride*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum* 及び *Trichoderma orientale* のグルカナーゼが、バンド IV は *Trichoderma ghanense*, *T. reesei*, *Trichoderma parareesei*, *T. viride* 及び *T. jecorina* 由来のグルカナーゼが、バンド V は *T. reesei*, *T. parareesei*, *T. jecorina*, *T. orientale* 及び *T. longibrachiatum* のキシラナーゼが、バンド VII は *T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. parareesei*, *T. pseudokoningii* 及び *T. orientale* のキシラナーゼが高スコアでヒットした (表 1)。

*Sphingomonas paucimobillii* 由来のプロテアー

ゼ (B698, 図 1f) は、SwissProt のデータベースを用いた Mascot サーチでは同定できなかった。そこで UniProt において「*Sphingomonas*」と検索して得られたアミノ酸配列を用いて構築したデータベースを用いて Mascot サーチを行ったが、3 種のバンドいずれも同定することができなかった (表 1)。

4 種の微生物由来の添加物酵素について、データベースを構築して Mascot サーチを行った結果、*B. circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼについては付帯情報と同一の微生物のβ-ガラクトシダーゼが高スコアでヒットした。*P. coccineus* 由来の酵素については、付帯情報と同一の微生物由来のタンパク質が高スコアでヒットしたが、セルラーゼとヘミセルラーゼについては他のタンパク質であった。UniProt からアミノ酸配列情報を取得し、構築したデータベースを用いることにより、オンラインの SwissProt を用いる Mascot サーチよりも検索対象を広げることができ、基原の特定に有用であることが明らかとなった。しかし、*T. longibrachiatum* 由来のヘミセルラーゼについては、一部のバンドで付帯情報と同一の微生物由来のヘミセルラーゼ様タンパク質が高スコアでヒットしたが、他の種由来のタンパク質も多くヒットした。また、*S. paucimobillii* 由来のプロテアーゼについては、構築したデータベースを用いてもいずれのバンドも同定することができなかった。UniProt には、*S. paucimobillii* 由来のプロテアーゼのアミノ酸配列が 100 種以上登録されていることから、データベースの情報量は十分と考えられる。今後、まだ解析していないバンドの同定を試みる。

## C-2) 複数種の酵素消化を用いた解析

トリプシンを用いた PMF の結果、複数種の菌種のタンパク質がヒットした添加物酵素について、トリプシン以外の酵素を用いた解析を実施し、菌種を限定することが可能か検討した。*Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼ (B651, 図 1g) については、トリプシンを用いた場合はバンド I, III 及び V を同定できた。Arg-C を用いた場合にはバンド I のみが、Asp-

N を用いた場合はバンド I, II 及び III が, CHTR を用いた場合はバンド I, IV 及び V が, Lys-C を用いた場合はバンド I, III 及び IV が同定できた (表 2). トリプシン以外の消化酵素を用いることにより, トリプシンでは同定できなかったバンドが同定できた. 特にキモトリプシンを用いた場合, トリプシンよりもヒットタンパク質の由来菌種が少なく, 基原を限定することができた. *T. viride* 由来のセルラーゼ (B674, 図 1h) については, トリプシンを用いた場合は 3 種の主要バンドはいずれも同定できた (表 2). Arg-C を用いた場合はいずれのバンドも同定できず, Asp-N を用いた場合はバンド II のみが, CHTR と Lys-C を用いた場合は 3 種いずれのバンドも同定できた. バンド I と III の同定結果については, トリプシンを用いた場合が最も coverage が高く, 他の酵素を用いる利点は見出せなかった. バンド II については, トリプシンを用いた際はバンド I と同じタンパク質が同定されたが, Asp-N と CHTR を用いた場合は異なるタンパク質が同定された. バンド I と II は非常に近接していることから, SDS-PAGE のゲルから切り出す際に, バンド II に I が混入した可能性が考えられた.

### C-3) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

添加物酵素の基原として広く用いられる *A. niger* とその近縁種は, *Aspergillus* 属 Nigri 節と総称され, 黒褐色の胞子を形成する胞子や分生子頭等の形態が非常に酷似した麹菌のグループである. それらの分類法をめぐり多くの研究と改名が繰り返され, 菌種の定義や名前が混乱していたが<sup>2,3)</sup>, 近年では遺伝子を用いた再分類が進んだが<sup>3,4)</sup>, シノニムが多く, 現在でも, 古い分類体系が一掃され完全に整理されたとは言い難い. 分類体系の再構築に伴う菌名の変更の歴史として, *A. niger*・*A. tubingensis*・*A. luchuensis* の 3 系統の変遷を図 2 に示した. 真菌の分類学分野では 3 菌種にまとめる分類体系をとることが主流であるが, 現在でも, これら 3 菌種以外に, 添加物基原種または SwissProt 等 DB 登録配列の由来種として現在使用され続けている菌種は多く, *A.*

*awamori*, *A. kawachii*, *A. foetidus* などがしばしば見られる. つまり, 公的データベースであっても登録種名が最新でない可能性があり, ヒット配列の由来または製品の付帯情報が「*A. awamori*」であっても, 生物としては *A. luchuensis* または *A. niger* のどちらの可能性も有りうる. この問題を解決する方法の 1 つとして, 登録する情報を精査し, 独自に構築したカスタムデータベースを使用する Mascot サーチを行うことが有効であると考えられた. さらに, データベースの整備とともに, 酵素製品の付帯情報についても, 最新の真菌分類学的情報を元に整理する必要があると言える.

### D. 結論

電気泳動法と MALDI-TOF MS を組み合わせた添加物酵素の基原の解析法について, より多くの製品の基原種を正確に同定するために, 改良を行った. 独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチの結果, オンラインで実施した場合には同定できなかったタンパク質を同定することができた. 複数種の消化酵素を用いた解析では, トリプシンを用いた場合には同定できなかったタンパク質を同定することができた. これらの 2 種の方法は, 基原同定の精度を高めることに有用であることが明らかとなったが, その効果は一部の添加物酵素に限られていた. 今後, より同定の精度を高めるために, 電気泳動法の工夫を行う. さらに, 手法の開発だけに留まらず, データベース構築に使用する真菌データの分類情報や, 酵素製品の付帯情報を, 真菌分類学的情報を元に整理して使用する必要があると考えられた.

### E. 参考文献

- 1) T. Yoshinari, A. Sekine, N. Kobayashi, Y. Nishizaki, N. Sugimoto, Y. Hara-Kudo, M. Watanabe. Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. *Food Addit. Contam. A.* 2023;40(6):711-722.
- 2) 伴さやか. “微生物あれこれ (25) 泡盛麹菌

*Aspergillus luchuensis* の学名の変遷” . NBRC ニュース. 2014. No.28.

- 3) Koji Yamada. “Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section *Nigri* inferred from mitochondrial cytochrome b gene” . FEMS Microbiology Letters. 2001, p241-246.
- 4) H. Seung-Beom et al. Taxonomic re-evaluation of black koji molds. Appl Microbiol Biotechnol. 98:555–561 (2014)

peptide mass fingerprinting. Food addit. contam. A, 2023; 40(6): 711-722.

## F. 研究業績

### F-1) 学会発表

#### F-1-1) 学会等

- 1) 伊藤紫野, 西原秀典, 橋本一浩, 川上裕司, 後藤慶一, 水谷治, 山田修, 清水公德, 伴さやか, 矢口貴志, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指標を用いた型別. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会 (2023.10).

#### F-1-2) シンポジウム等

無し

### F-2) 論文発表

- 1) Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y. Suitability of culture broth and conditions for *Escherichia coli* growth and gas production as a test for food additives in EC groth. Food Hyg. Saf. Sci. 2023; 64: 69-77.
- 2) Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara-Kudo Y, Watanabe M: Determination of the biological origin of enzyme preparations using SDS-PAGE and

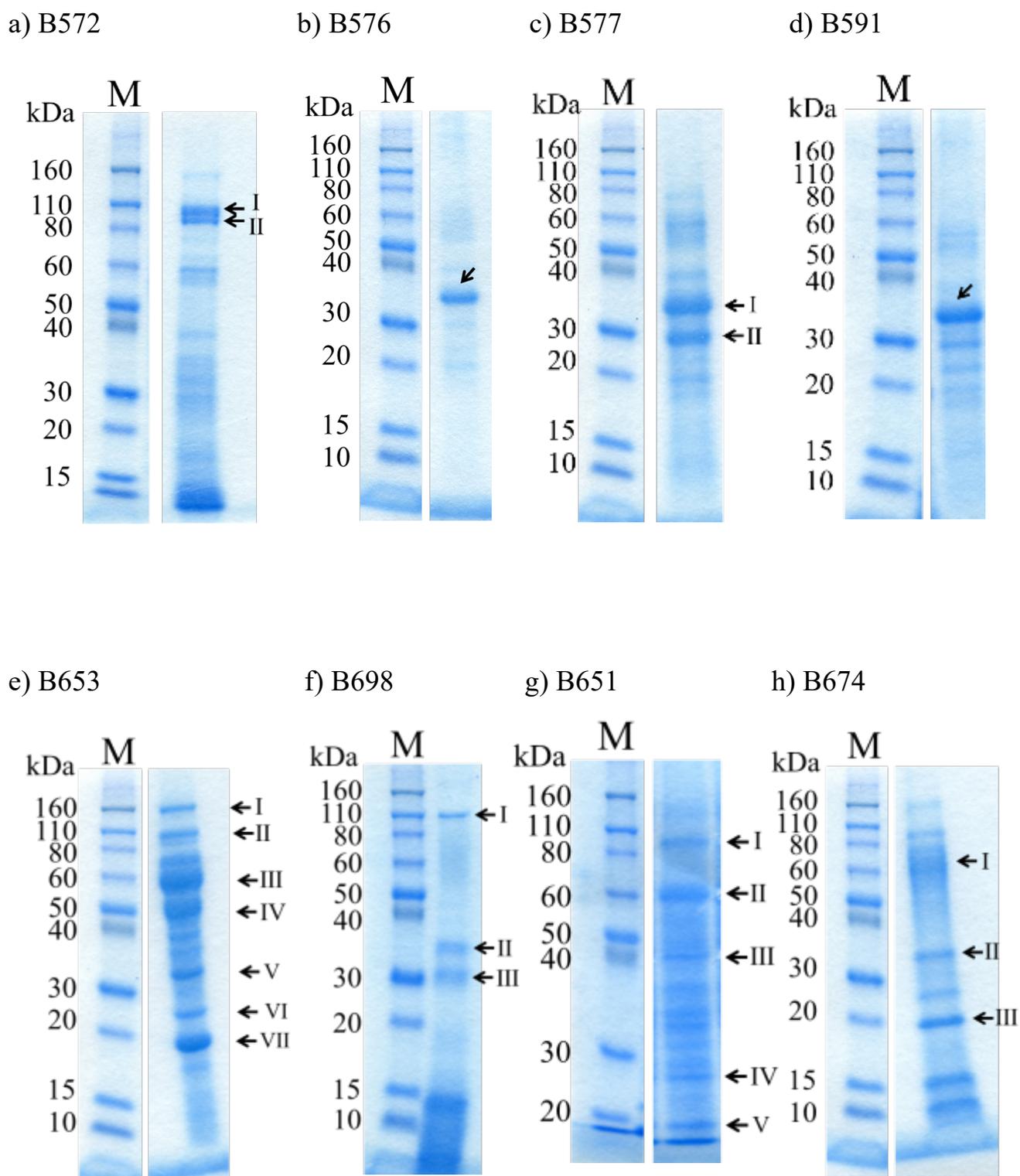


図 1. 解析を行った添加物酵素の SDS-PAGE 像

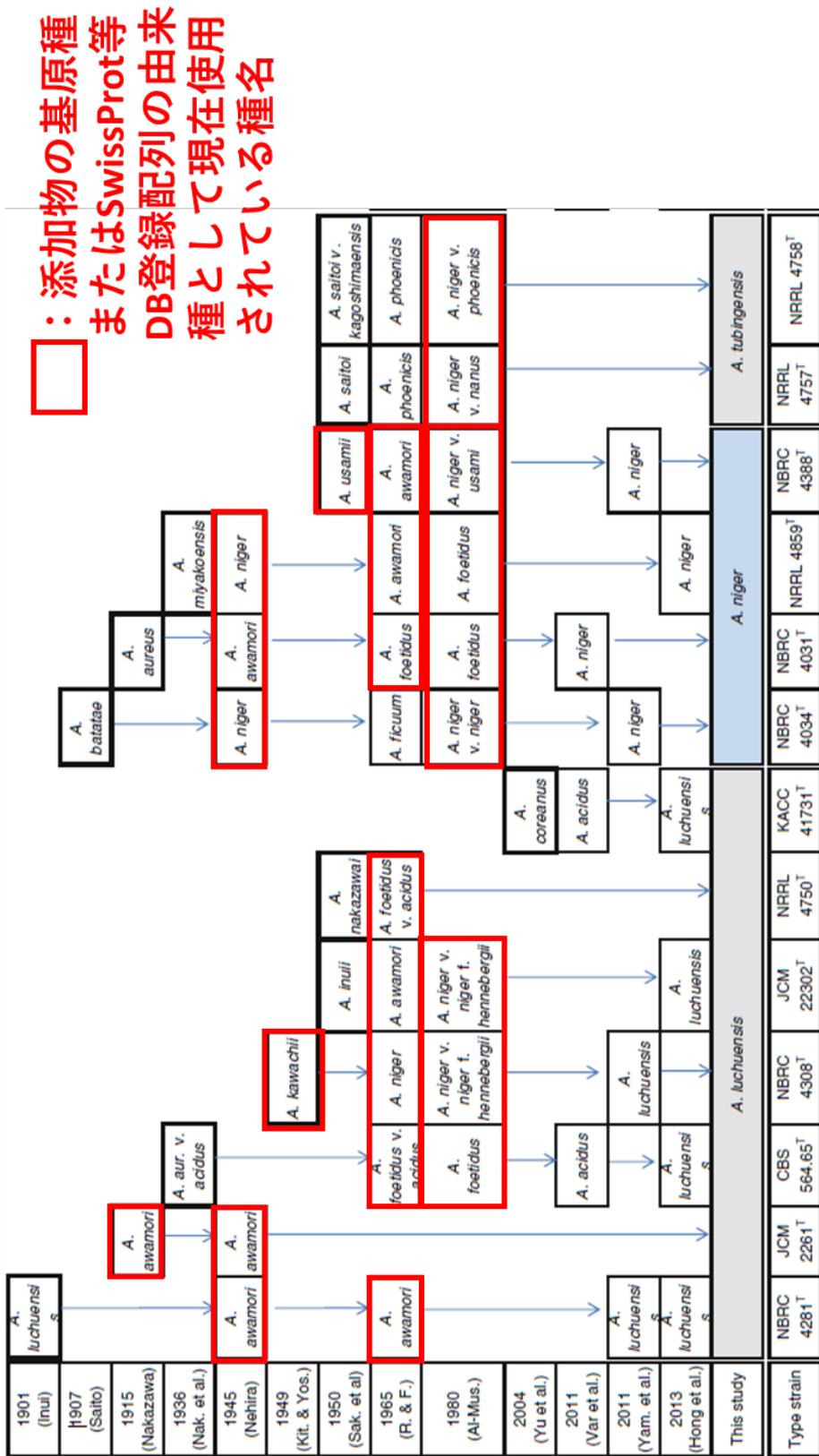


図 2. *Aspergillus niger* およびその近縁菌の分類体系の変遷とシノニムの整理

H. Seung-Beom et al. Appl Microbiol Biotechnol. 98:555–561 (2014) からの引用。

表 1. 構築した Mascot データベースを用いた PMF 解析の結果

DFA No.	製造者による付帯情報		バンド No.	ゲル上の構築したデータベースを用いた Mascot サーチによりヒットしたタンパク質		分子量 (kDa)	一致したペプチド数	
	酵素名	由来		タンパク質名	生物種			
B572	$\beta$ -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	I	105	$\beta$ -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	192	27
B576	cellulase	<i>Pycnoporus coccineus</i>	-	33	$\beta$ -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	192	28
B577	hemicellulase	<i>Pycnoporus coccineus</i>	I	34	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	44.8	4
B653	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	I	164	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	44.8	4
			II	104	xyloglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	87.3	18
			III	59	xyloglucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	87.3	18
			IV	48	glucanase	<i>Trichoderma viride</i>	53.7	8
					glucanase	<i>Trichoderma koningii</i>	53.7	8
					glucanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	55.5	8
					glucanase	<i>Trichoderma orientale</i>	55.6	8
					glucanase	<i>Trichoderma ghanense</i>	50.1	6
					exoglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	50.3	6
					glucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	50.4	6
					glucanase	<i>Trichoderma viride</i>	50.3	6
					glucanase	<i>Trichoderma jecorina</i>	50.3	6

次ページへ

表 1. 構築した Mascot データベースを用いた PMF 解析の結果 (続き)

DFA No.	製造者による付帯情報		バンド No.	ゲル上の構築したデータベースを用いた Mascot サーチによりヒットしたタンパク質		分子量 (kDa)	一致したペプチド数
	酵素名	由来		タンパク質名	生物種		
B653	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	V	33	endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	8
					$\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	8
					$\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma jecorina</i>	8
					$\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	7
					$\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	7
			VI	25	unidentified		
			VII	20	endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6
					endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	6
					endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	6
					endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	6
					endo-1,4- $\beta$ -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	6
B591	protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	-	34	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	5
B698	protease	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	I	110	unidentified		
			II	36	unidentified		
			III	30	unidentified		

表 2. 複数種の酵素消化を用いた PMF 解析の結果 (B651)

バンド I							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
glucoamylase	<i>A. kawachii</i>	68,743	20	11	9	10	9
	<i>A. usamii</i>	68,659	18	11	7	10	7
	<i>A. awamori</i>	68,837	14	11	9	-	9
	<i>A. niger</i>	68,837	14	11	9	-	9
バンド II							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
glucoamylase	<i>A. kawachii</i>	68,743	-	-	13	-	-
	<i>A. usamii</i>	68,659	-	-	13	-	-
	<i>A. awamori</i>	68,837	-	-	8	-	-
	<i>A. niger</i>	68,837	-	-	8	-	-
バンド III							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
aspergillopepsin-1	<i>A. niger</i>	41,319	24	-	27	-	20
	<i>A. phoenicis</i>	41,387	24	-	27	-	20
	<i>A. awamori</i>	41,266	18	-	20	-	20
バンド IV							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
endoglucanase A	<i>A. kawachii</i>	25,911	-	-	-	20	32
バンド V							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
1,4- $\beta$ -xylanase B	<i>A. kawachii</i>	24,225	27	-	-	26	-
	<i>A. niger</i>	24,099	15	-	-	-	-

表 3. 複数種の酵素消化を用いた PMF 解析の結果 (B674)

バンド I							
同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
exoglucanase 1	<i>T. viride</i>	55,336	21	-	-	19	7
	<i>T. reesei</i>	55,407	19	-	-	13	6
	<i>T. koningii</i>	55,407	19	-	-	13	6
	<i>T. reesei</i>	55,445	19	-	-	13	6
バンド II							
タイプ	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
exoglucanase 1	<i>T. viride</i>	55,336	21	-	-	-	4
	<i>T. reesei</i>	55,407	19	-	-	-	3
	<i>T. koningii</i>	55,407	19	-	-	-	-
	<i>T. reesei</i>	55,445	19	-	-	-	-
exoglucanase 2	<i>T. reesei</i>	50,306	-	-	19	19	-
バンド III							
タイプ	種名	分子量	Coverage (%)				
			トリプシン	Arg-C	Asp-N	CHTR	Lys-C
1,4- $\beta$ -xylanase	<i>T. harzianum</i>	20,691	23	-	-	20	3
1,4- $\beta$ -xylanase II	<i>T. harzianum</i>	23,809	20	-	-	17	-
	<i>T. reesei</i>	24,055	20	-	-	21	-

3) 研究成果の刊行に関する一覧表(令和5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
増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子	食品添加物公定書収載 品目における基原生物 に使用される学名の考 え方とその表記法	食品衛生学 雑誌	64	77-88	2023
Masumoto N, Ohno T, Suzuki T, Togawa T, Sugimoto N	Application of the relative molar sensitivity method using GC-FID to quantify safranal in saffron ( <i>Crocus sativus</i> L.)	J. Nat. Med.	77	829-838	2023
内山奈穂子, 細江潤 子, 石附京子, 新井玲 子, 杉本直樹, 鈴木梓, 浅 野龍二, 五十嵐靖, 三浦 亨, 武藤康弘, 末松孝 子, 小松功典, 日向野太 郎, 古川茶勲, 嶋田典 基, 合田幸広	ブシモノエステルアル カロイドの相対モル感 度 (RMS) を用いた 日本薬局方定量法の検 討.	薬学雑誌	143	951-962	2023
Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N	A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on <sup>1</sup> H-qNMR for khellactone esters from <i>Peucedanum japonicum</i> root extract	Food Chem.	427	136647	2023
Bayrakceken G Z, Saracoglu I, Nagatsu A, Yilmaz M A, Basaran A A	Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from <i>Prunus mahaleb</i> L.: Phenolic composition,	J. Ethnophar macol.	310	116378	2023

	isolation, identification and inhibitory activity				
Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y	Suitability of culture broth and conditions for <i>Escherichia coli</i> growth and gas production as a test for food additives in EC broth	Food Hyg. Saf. Sci.	64	69-77	2023
Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara-Kudo Y, Watanabe M	Determination of the biological origin of enzyme preparations using SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting	Food Addit. Contam. A	40	711-722	2023
齋藤剛, 杉本直樹	定量核磁気共鳴 (qNMR)法を用いた有機化合物の純度測定に関する国際規格策定	環境と測定技術	50	13-17	2023
Uchiyama N, Hosoe J, Komatsu T, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Shinozaki T, Kobayashi K, Fujimine Y, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Muto Y, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y	Quantitative <sup>31</sup> P-NMR for the purity determination of the organophosphorus compound brigatinib and its method validation	Chem. Pharm. Bull.	72	36-40	2024
Amakura Y, Uchikura T, Yoshimura M, Masumoto	Chromatographic evaluation and	Chem. Pharm.	72	93-97	2024

N, Nishizaki Y, Sugimoto N	characterization of constituents of sunflower seed extract used as food additives	Bull.			
増本直子, 西崎雄三	第2章 食品中に含ま れる不純物分析の手 順, 第6節 RMS法 による天然物由来製品 の品質評価	不純物の分 析法と化学 物質の取り 扱い(単行 本)		183-192	2024

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 本間 正充

次の職員の令和5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品添加物部・部長

(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 本間 正充

次の職員の令和5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品添加物部・第三室長

(氏名・フリガナ) 阿部 裕・アベ ユタカ

## 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 本間 正充

次の職員の令和5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・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 本間 正充

次の職員の令和5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生薬部・第二室長

(氏名・フリガナ) 増本 直子・マスモト ナオコ

## 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 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5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・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。

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5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・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。

2024年3月29日

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5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

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)
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 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5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 生物資源科学部・准教授

(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)
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 本間 正充

次の職員の令和5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 有機化学部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 辻 巖一郎・ツジ ゲンイチロウ

#### 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 本間 正充

次の職員の令和5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 既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

3. 研究者名 (所属部署・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。