

食品衛生基準科学研究費補助金
食品安全科学研究事業
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 6 年度(2024 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
	増本 直子	国立医薬品食品衛生研究所
	辻 徹一郎	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
	西崎 雄三	東洋大学

令和 7 (2025)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) 既存添加物の流通・使用実態及び成分規格整備状況	
に関する調査研究(委託調査)	18
業務受託者：松村 雅彦	
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	48
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	
2) 既存添加物の基準策定のための ^1H -qNMR を用いた成分定量	58
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	71
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	80
研究分担者：西崎 雄三	
2) 相対モル感度(RMS)を利用したメナキノン及びフィトナジオンの	
定量法の検討	88
研究分担者：増本 直子	
研究協力者：岡田 真子	
3) ムラサキヤマイモ色素に含まれるアントシアニン化合物の	
定量的分析法の開発	100
研究分担者：井之上 浩一	

	研究協力者：高山 卓大	
4)	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	110
	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	128
	研究分担者：辻 巖一郎	
	研究協力者：出水 庸介	
6)	窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較	143
	研究分担者：阿部 裕	
	協力研究者：川末 慎葉	
	研究協力者：石附 京子	
	研究協力者：中島 馨	
	研究協力者：御所窪 誠	
	研究協力者：渡辺 実薫	
	研究協力者：座間 俊輔	
	研究協力者：伊藤 朱美	
	研究協力者：藤松 芽生	
7)	真菌基原の添加物酵素の基原種同定法の開発及び基原種に関する 分類学的情報の収集	157
	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：清水 公德	
	研究協力者：伊藤 紫野	
3)	研究成果の刊行に関する一覧表	172

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

令和6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

既存添加物の流通・使用実態及び成分規格について調査した。流通・使用実態については、既存添加物357品目(成分規格数として402)の生産量流通調査3回で報告がなく流通情報が得られなかった成分規格数は102品目、使用状況が確認できなかった成分規格数は160品目であった。第10版食品添加物公定書の公示時点で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三者検証が実施された30品目で昨年度と変わりなく、第11版食品添加物公定書には多く見積もって20余品目の収載が見込まれる。

2) 既存添加物の成分組成に関する研究

カロブ色素、スピルリナ色素、香辛料抽出物(バジル、ブラックペッパーオイル、コショウ)について検討した。カロブ色素については、昨年度に引き続き色素成分の同定を行った結果、 β -グルコシダーゼにより shaftoside 配糖体を加水分解することによって、主成分の shaftoside に収束させることができた。スピルリナ色素については、酵素消化によりフィコシアノビリンの前駆物質であるジヒドロビルベルジンと考えられる物質が生成され、この物質が確認試験の指標となると考えられた。香辛料抽出物については、 $^1\text{H-qNMR}$ により、主成分を直接定量することが可能であった。

3) 分析法及び試験法開発に関する研究

アントシアニン、メナキノン、フィトナジオン及びアントラキノンの分析法、RMS を利用した定量法とその校正物質の開発、元素分析法を利用した窒素定量法の優位性、真菌基原の酵素の分析法について検討した。その結果、アントシアニンについては、 $^1\text{H-qNMR}$ による定量条件(測定条件及び溶媒条件)を $\text{Cy3G}\cdot\text{Cl}$ をモデル化合物として確立した。メナキノン及びフィトナジオンについては、RMS 法が有効であることを明らかとした。アントラキノンは、JECFA 法を参考に RMS を利用した方法に改良可能であることがわかった。また、RMS 法に必要な校正物質の候補を合成した結果、1,4-ナフトキノン骨格の5位にニトロ基を持つものが吸収波長の長波長化がみられたことから、更に置換基を検討することにより校正物質として適したものを開発可能と考えられた。窒素定量法については、ケルダール法等の一般的な方法と元素分析法を比較したところ、元素分析法が試験者や環境への負荷低減のため有効であることがわかった。酵素については、二次元電気泳動と MALDI-TOF MS による PMF 法を組合せることによって、同定結果の正確性を向上させることができた。

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

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 日本大学生物資源科学部
准教授

西崎雄三 東洋大学食環境科学部
准教授

研究協力者

松村雅彦 (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

高山卓大 立命館大学薬学部
助教

岡田真子 日本大学生物資源科学部
実習生

出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部長

御所窪誠 (一財)日本食品分析センター

渡辺実薫 (一財)日本食品分析センター

座間俊輔 (一財)日本食品分析センター

伊藤朱美 (一財)日本食品分析センター

藤松芽生 (一財)日本食品分析センター

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

清水公徳 東京理科大学先進工学部
教授

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 6 年度は、令和 5 年度に引き続き、(1)

既存添加物の成分規格に関する研究：流通・使用実態及び成分規格整備状況の調査。(2) 既存添加物の成分組成に関する研究：¹H-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年間で1サイクルとして調査を行っている。令和6年度は2について，すなわち，流通／使用実態について調査すると共に，令和5年度に引き続き，成分規格の策定状況について整理した。

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

昨年度に引き続き，カロブ色素の成分組成

を明らかとすると共に，確認試験及び定量法について検討した。Diaion HP-20 の他，各種カラムクロマトグラフィーによる分離，精製を繰り返し，化合物を単離した。単離した化合物については HPLC における標品との直接比較，あるいは文献値と NMR データ等の比較によって同定した。また，食品添加物公定書に記載されている確認試験をルチンを比較対象として行った。HPLC による定量分析は，β-グルコシダーゼにより shaftoside 配糖体を加水分解し，主成分の shaftoside に収束させたものについて検討した。さらに，TLC による確認試験を検討した。

2) 既存添加物の基準策定のための ¹H-qNMR を用いた成分定量

¹H-qNMR 法により，バジル粉末及び栽培品中の rosmarinic acid，ブラックペッパーオイル，コショウ末中の β-caryophyllene を直接定量した。また，HPLC 法により，rosmarinic acid 標品を用い絶対検量線を作成して定量した。

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

昨年度に引き続き，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。発色団の同定のため，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))について，酵素による消化後の生成物を LC-QToF/MS を用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

定量 NMR (qNMR)によるアントシアニンの絶対量算出方法について検討した。シアニン 3-グルコシド塩化物(Cy3G・Cl)をモデル試料として、強酸性測定溶媒中での qNMR 用基準物質:DMSO₂ と DSS-*d*₆の安定性, Cy3G・Cl の濃度依存性, 及び内部標準法 qNMR (IC-qNMR)と外部標準法 qNMR (EC-qNMR)の比較を行った。具体的には以下の方法で測定を行い、得られた結果より評価した。qNMR は EC-qNMR 及び IC-qNMR を用いて実施した。外部標準には DMSO₂(認証純度: 99.9%), 内部標準には DSS-*d*₆(認証純度: 92.3%)を使用した。Cy3G・Cl の定量には、4 位のシグナル(約 9 ppm 付近)を利用した。測定溶媒として、5% TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)を用いた。この溶媒は、5% TFA-*d* 含有重メタノールと 5% TFA-*d* 含有重水を事前に調製し、それらを 9:1 の比率で混合することで調製した。

2) 相対モル感度(RMS)を利用したメナキノ ン及びフィトナジオンの定量法の検討

「メナキノ(抽出物)」は、既存添加物として第 10 版食品添加物公定書に収載されており、成分規格に有効成分の定量法として定量用のメナキノ-4 (MK-4)試薬を標品とし高速液体クロマトグラフィー (HPLC)が設定されている。しかし、標品として用いる市販の MK-4 試薬の正確な純度は不明であることから、標品を用いない定量法を検討した。分析条件は、「メナキノ(抽出物)」の定量法に準じた。ナフトキノ骨格に由来する $\lambda_{\max}$ を既報の文献から調査し、実際に測定した分析種 (MK-4、メナキノ-7 (MK-7)、フィトナジオン(K₁)) の UV 吸収スペクトルから、

RMS 法での検出波長を決定した。次に、基準物質 4-ヒドロキシ安息香酸ドデシル (D4HB)に対する分析種の RMS を決定した。すなわち、各化合物の標準溶液を調製し 2 台の HPLC/PDA にて測定し、各化合物のピーク面積(応答値)を得、検量線の傾きから 3 種の分析種の RMS を算出した。更に、この RMS を用いて「メナキノ(抽出物)」の定量を行い、検量線法の定量値と比較した。

3) ムラサキヤマイモに含まれる案とシア ニン化合物の定量的分析法の開発

ムラサキヤマイモ色素の主成分であるアントシアニン類の定量分析法の開発のため、LC-QToF/MS により、色素製品に含まれる成分のプロファイリングを実施した。また、各アントシアニン類の単離精製に向けて高速向流クロマトグラフィーの条件最適化を行った。

4) 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

昨年度に引き続き、カシアガム中のアントラキノ(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)の分析法について検討した。JECFA 規格における前処理法の検証では、昨年度の検討において未解決であった液-液抽出時のエマルジョン形成という課題に着目し検討を実施した。また、規定の HPLC 条件の適用性について検討した。さらに、¹H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノ分析法の適用性の検討として、測定対象 5 種及び基準物質 3 種(ダントロン(1,8-DAQ), カフェイン, メチルパラベン)の標準溶液(6~8 点濃度)を ¹H-qNMR による純度値または認証値に基づき調製した。

得られた測定対象及び基準物質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。併せて、モデル溶液を用いた検証により、算出された RMS の正確性を評価した。

5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

これまでに、1,4-ナフトキノン誘導体の 2 位における置換基導入を検討し、UV-Vis スペクトルを取得している。今年度は他の置換位置として 5 位についても検討した。入手容易な市販試薬から、置換基位置の異なる誘導体合成に必要な中間体を合成した。これらを組み合わせることで短工程にて複数の誘導体を合成できる経路を計画し、化合物を調製した。合成した化合物の UV-Vis スペクトルは DMSO 溶液として測定を行った。

6) 窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較

食品添加物公定書の収載された窒素定量法の違いによる定量値、操作性、設備点での課題等を比較した。試料には、試験実施ができない可能性がある「L-シスチン(Cys)」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム(CSNa)」を用いた。窒素定量法は、① 公定法(ケルダール法)、② 公定法改法(ケルダール法)、③ セミマイクロケルダール法、④ 元素分析法(改良デュマ法)及び ⑤ 元素分析法(CHN コーダー法)とした。

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

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。今回、ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) の代わりに二次元電気泳動法を用いることにより、タンパク質をより高い分解能で分離し、同定の精度の向上が可能となるかを検討した。電気泳動法と PMF 法を組み合わせた基原同定については、日本食品添加物協会から分与された製品の、*Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼ (B651)、*Trichoderma longibrachiatum* 由来のヘミセルラーゼ、*Niallia circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼ及び *Triticum aestivum*(パンコムギ)由来の b-アミラーゼを供試した。試料を標準細胞溶解バッファーに溶解し、タンパク質 10 µg 相当を Immobiline DryStrip pH 3-10 NL に添加し、Ettan IPGphor II を用いて 1 次元目の等電点電気泳動を行った。電気泳動後の Immobiline Drystrip を 10%アクリルアミドゲルの上部に乗せ、二次元目の電気泳動を行った。主要なスポットを切り出し、脱染、システイン残基の還元、カルバミドメチル化反応を行った後、トリプシンでペプチド化し、MALDI-TOF MS を用いて質量分析を行った。得られたペプチドの質量を指標として、Matrix Science のウェブ上のプログラム Peptide Mass Fingerprint search、または Mascot データベースを用いてタンパク質の同定を行った。

基原真菌種の最新の分類情報を把握については、添加物基原としての使用頻度が高い *Trichoderma* 属菌について、PubMed から分類体系に関する論文を検索し、入手した。

C. D. 研究結果及び考察

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

既存添加物 357 品目(成分規格数 402)の内、生産量流通調査 3 回(平成 26 年, 平成 29 年及び令和 2 年)で報告がなく, 流通情報が取得できなかった成分規格数は 102 品目であった。使用状況が確認できた成分規格は 245 品目, 確認できなかった成分規格は 160 品目であった。また, 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 品目中約 100 品目(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)となっているが, この内, 67 品目(自主規格 67 品目+暫定規格 6 品目)が第 6 版既存添加物自主規格に収載された。第 6 版又は第 5 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 30 品目であった。第 11 版食品添加物公定書作成検討会へ成分規格を提出した添加物は 8 品目, 第 5 回作業部会へ提出予定の添加物は 10 品目程度であった。

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

食品添加物公定書におけるカロブ色素の確認試験について, フラボノイドのルチンを比較試料として改めて試験を実施した。確認試験 1~5 の項目について試験した結果, いずれも同様の呈色, 波長を示し, 呈色による確認は曖昧さが否定できなかった。よって, カロブ色素に特徴的な指標成分候補を明らかにし, それに基づいた試験法の改良の必要性が示唆された。

Schaftoside の他, その配糖体である 2 種の

schaftoside glucoside を単離同定されたことから, 成分規格の指標成分は schaftoside が適していると考えられた。β-グルコシダーゼにより, 本色素を酵素分解したところ, HPLC 分析において観察された配糖体のピークが schaftoside のピークのみ収束することが確認された。Schaftoside の含量について, HPLC による定量分析を行ったところ, 酵素分解前が 5.0 mg/g, 酵素分解後が 8.6 mg/g と算出された。HPLC による定量分析が容易になることから, β-グルコシダーゼによる酵素分解後の schaftoside の含量測定がカロブ色素の品質管理として適当であると考えられた。また, TLC により schaftoside が明瞭に観察できたことから, 確認試験として機能すると考えられた。

2) 既存添加物の基準策定のための ¹H-qNMR を用いた成分定量

¹H-qNMR により, 市販バジル末中の rosmarinic acid の含有率は 4 製品中, 2 製品ではそれぞれ 1.51%と 0.70%であったが, 残りの 2 製品ではシグナルが観測されず測定不能だった。また, 栽培した 5 品種では, 葉における含有率が 0.83~1.90%であったのに対して, 茎では 4 品種でシグナルが観測できず, 1 品種でわずかに含有されている程度であった。HPLC による測定結果が ¹H-qNMR とほぼ等しいことから, バジル由来の製品の rosmarinic acid の定量が ¹H-qNMR を用いて容易に行えるとともに, rosmarinic acid の有無がバジルのどの用部かの判断材料になることがわかった。

ブラックペッパーオイル中の β-caryophyllene を ¹H-qNMR を用いて測定できることがわかった。ただし, 試料の ¹H-

qNMR スペクトルには、定量用のシグナルの近傍に別のシグナルが観察されることから、精度の高い定量値が算出できるものではないと考えられた。また、原料のコショウ中には β -caryophyllene が観察できなかった。ブラックペッパーオイル製品の管理の手段としては活用できるものの、原料の品質の管理指標として β -caryophyllene を用いることは困難と考えられた。

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

4 種類の市販青色素製品(バタフライピー色素 1 製品, クチナシ青色素 1 製品, 及びスピルリナ色素 2 製品)を対象として、昨年度の研究結果より課題となった構成成分に由来するピークの複雑性を解決すべく検討を行った。タンパク質の酵素消化法を用いて得られた消化断片を LC-QToF/MS により分析した結果、スピルリナ色素製品においてのみ、フィコシアニンの発色団であるフィコシアノビリンのシステイン結合体に類似した精密質量の化合物がピークとして検出された。本ピークに由来する化合物は 620 nm 周辺に吸収極大を有することも明らかとなった。

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

qNMR 用基準物質の安定性確認のため、5% TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)中における DMSO₂ 及び DSS-*d*₆ のシグナル強度の変化を EC-qNMR で確認した。3 日間にわたって両物質の 1 プロトン当たりの感度係数を記録した結果、分解物のシグナルは観察されず、感度係数は 1%以内の範囲で安定し

ていた。このことから、DMSO₂ 及び DSS-*d*₆ は酸性条件下でも安定で qNMR 用基準物質として利用可能であることが確認された。次に Cy3G・Cl の濃度依存性を確認するため、5, 10, 20, 40 mg/mL となるように、5% TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)に溶解し、それぞれ EC-qNMR で純度を測定した。その結果、20 mg/mL を超える濃度では Cy3G・Cl が完全に溶解していない可能性が示唆された。特に、アントシアニンのような色素化合物の場合、完全に溶解しているかを目視で確認することが困難であるため、定量分析において試料濃度には十分な注意が必要であることがわかった。更に、IC-qNMR と EC-qNMR の精度を検証した。EC-qNMR で得られた Cy3G の純度は $92.7 \pm 0.9\%$ 、IC-qNMR では $93.5 \pm 0.4\%$ であった。IC-qNMR の方がより安定した結果が得られたものの、EC-qNMR の結果も標準偏差(SD)の範囲内で IC-qNMR と一致していたことからほぼ同等の精度であると結論した。

2) 相対モル感度(RMS)を利用したメナキノン及びフィトナジオンの定量法の検討

ビタミン K の共通構造 (ナフトキノン骨格) に由来し、かつ側鎖に存在する二重結合の吸収波長の影響を受けない $\lambda_{\max}$ を検出波長とすれば、この骨格をもつ他のビタミン K 類でも同一の RMS を用いた定量が可能であると仮説を立て検証した。すなわち、分析種 3 種(K₁, MK-4 及び MK-7)の UV 吸収スペクトルを確認したところ、 $\lambda_{\max}$ をはじめとしたスペクトル形状が一致したため、これら 3 種の分析種は同じ検出波長での定量が可能であると考えられた。次に、基準物質 D4HB の検出波長を 256 nm、3 種の分析種(K₁, MK-4

及びMK-7)の検出波長を 247 nm として RMS を求めたところ、いずれも 1.06 であった。次に、得られた RMS 値を用いて「メナキノン(抽出物)」中に含まれる MK-4 を測定し、従来の検量線法と比較したところ、ほぼ同等の定量値が得られた。

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

2 種類のロットの異なるムラサキヤマイモ色素原体(C2352 及び C2375)を検討対象として、成分解析に向けて吸光光度計により吸光スペクトルを取得した。その結果、いずれの色素製剤においても極大吸収波長は 520 nm 周辺にあることが分かった。LC-QToF/MS による成分プロファイリングを、最適化した汎用的な逆相系カラムを用いて実施したところ、533 nm 付近に極大吸収を有する 3 つの主要ピークが検出された。これらは両ロットにおいて検出されていたため、色素主要な成分であると判断し、構造推定を実施した結果、シアニジンあるいはペオニジンのアシル化2配糖体化合物である可能性が示された。また、高速向流クロマトグラフィーの条件最適化として、分配係数の検討を実施し、最適溶媒系を決定できた。

4) 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

まず、JECFA 規格における前処理法の検証を行った。抽出操作における上層と下層(クロロホルム層)の分離を著しく遅延させ、分析効率を低下させる要因となっていた液-液抽出時のエマルジョン形成について、新たに供与された 3 種のカシアガム試料において

昨年度と同様に安定なエマルジョンが生成し、24 時間の静置後も層分離は達成されなかった。この問題を解決するため、遠心分離操作(400×g, 5 分, 20℃)を適用したところ、上層と下層(クロロホルム層)の完全な二層分離が達成され、その有効性が実証された。HPLC 条件の検証では、規定されている条件では測定対象の一部のピークの近傍に試料由来の内在性成分(夾雑成分)のピークが検出され、十分なベースライン分離が得られないことが判明した。この分離不良を改善するため、①カラムを粒子径が 3 µm である Unison UK-C18 (4.6 mm×250 mm)への変更、②グラジエント条件の変更など測定条件の最適化を行い、測定対象 5 種と夾雑成分との間で良好なベースライン分離が達成された。次に、¹H-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 種の全ての検量線の決定係数は 0.999~1.000 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 0.1~2.4%であり、検量線の決定係数(直線性)と併せて評価すると、これらの検量線の傾きの各平均値は RMS の算出に適していることが明らかとなった。得られた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 を決定した。さらに、濃度の異なるモデル溶液 2 種を用いた検証において、RMS 法及び従来定量法の一つである絶対検量線法により得られる定量値を比較したところ、両法の定量値はほぼ同等であった。また、RSD は最大で 5.5%と精度も良好であった。以上の結果より、基準物質及びこれに対応する RMS は正確であり、RMS 法によるアント

ラキノン類 5 種の精確な定量が可能であることが実証された。

5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

中間体化合物及び 1,4-ナフトキノン誘導体の合成は計画通り実施できたものの、設計した誘導体の置換基位置によっては、望みの構造からさらに反応(複数の置換もしくは分子内環化)が進行することで異なる構造へと変換されてしまうことが明らかとなった。これは導入した置換基の電子的もしくは立体的な効果が反応性に影響したものであると考えられた。得られた誘導体の UV-Vis スペクトル測定の結果、1,4-ナフトキノン骨格の 5 位にニトロ基をもつ誘導体では吸収波長の長波長化が観測され、800 nm 以上にも吸収を示すことが分かった。この結果から、5 位への置換基導入が吸収波長に影響を与えることが示唆されたため、この位置におけるさらなる置換基の検討(種類及び個数)が必要と考えられる。

6) 窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較

Cys の定量値の平均値($n=3$)は 98.7~99.4% であり、公定法とその他の定量法の定量値の比(その他の定量法/公定法)は 0.99~1.00 であった。また、相対標準偏差は 0.07~0.55% であった。CSNa では、定量値の平均値($n=3$)は 3.08~3.19%, 公定法とその他の定量法の定量値の比(その他の定量法/公定法)は 0.98~1.02, 相対標準偏差は 0.21~2.27% であった。このように、いずれの定量法においてもほぼ同程度の定量値が得られること、かついずれの定量法においても精度よく測定可能

であることが確認された。ただし、CSNa は吸湿性があったため、⑤ CHN コーダー法における採取量 2 mg は極めて微量なため正確な秤量が困難であった。そのため本検討からは除外した。

操作性の特徴として、ケルダール法は分析に長時間を要し、また試験者や環境への負荷が大きいことが改めて示された。一方元素分析法においては、装置が高価であり初期投資が大きいというデメリットがあったが、測定時間や操作性は明らかに迅速で簡便であり、試験者や環境負担の小さい分析法であると考えられた。

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

それぞれの試料を二次元電気泳動で展開して得られた主要なスポットを PMF 法で解析した結果、*A. niger* 由来のヘミセルラーゼ及び *N. circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼについては、通常の SDS-PAGE による解析で同定不能であったタンパク質が同定された。また、本手法では等電点の情報も得られることから、同定結果の正確性を向上させることができた。しかし、タンパク質同定の際データベースサーチ時、決定配列の登録配列に対するカバー率は通常の SDS-PAGE とほぼ同等で、Mascot サーチでヒットする生物種を限定するには至らなかった。以上の結果より、二次元電気泳動法による解析はタンパク質の同定率を向上させるために有用であることが明らかとなったが、本手法による基原同定の精度を高めるためには、手法の更なる改良や他の手法との組み合わせが必要であると考えられた。

Trichoderma 属を基原にもつ既存添加物 10 品目の基原菌種 7 菌種のゲノムにおいて、特定の遺伝子アミノ酸配列での異種間配列一致率は、近縁菌種間では最高で 99.5% が一致することが判明した。このことから、アミノ酸配列を指標として、基原菌種をその近縁種と区別して識別するためには、0.5% 程度の差違を認識できる精度で分析する必要があることが示唆された。加えて *Trichoderma* 属はその有性世代は *Hypocrea* 属であることから、塩基配列やアミノ酸配列を決定し公共データベースで検索した際には *Hypocrea* spp. としてヒットする場合は有り、このことに注意が必要である。

E. 結論

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

第 10 版食品添加物公定書に未収載の既存添加物約 100 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、流通・使用実態及び成分規格について情報を収集した。流通又は仕様情報が得られない品目が多く見られ、これらについては削除も含めた対応を今後検討すべきと考えられた。また、67 品目が第 6 版既存添加物自主規格に収載されたが、未だ成分規格が設定されていないものもあった。第 3 者検証が実施され、その結果に基づき公的な成分規格が設定できると考えられるものは 20 余品目であり、昨年度の調査と変化はなかった。これらの品目については、引き続き成分規格の設定を進めるが、使用基準や製

造基準を設定することによって安全性が確保する方法も今後検討する予定である。いずれの方法によっても、品質或いは安全性が確保できないと判断される品目については消除対象としての再調査の必要性を検討する。

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

カロブ色素の成分精査を行った結果、5 つの化合物(dihydrophaseic acid β -D-glucoside, 2 種の schaftoside 配糖体, schaftoside, isoschaftoside)を単離同定した。HPLC 分析により、主成分の schaftoside 以外に複数の schaftoside 配糖体の含有が認められた。これら配糖体は天然物である原料によって含有量にばらつきが生じることも考察されたため、定量分析として、schaftoside を直接分析する方法と、酵素分解により schaftoside に誘導して分析する方法を検討し、いずれにおいても定量値を算出することができた。指標成分候補とした schaftoside について、TLC 分析を検討した結果、明瞭なスポットを確認することができ、確認試験として応用可能であると考えられた。

2) 既存添加物の基準策定のための ^1H -qNMR を用いた成分定量

バジル中の rosmarinic acid について ^1H -qNMR 法及び HPLC 法による定量分析を検討した結果、 ^1H -qNMR を用いた定量条件を確立することができた。さらに本法により、バジル由来の製品中の rosmarinic acid の有無によって、その原料にバジルの葉と茎のどちらを用いたかを明らかとできることがわかった。また、ブラックペッパーオイル中の β -caryophyllene を ^1H -qNMR を用いて測定できることがわかった。

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 LC による定量的分析法が構築可能であることが示された。特に、今年度の解析によって、測定対象としたタンパク質成分がフィコシアノビリンの類似構造を有することが実験的に示された。また、酵素消化を組み合わせた LC 分析により、ピークの形状が改善されると共に構成成分が単純化され、本法は定性確認の手法として有効と考えられた。一方で、感度に直結する消化の効率や前処理時間に課題が残り、更なる検討が必要であった。また、ジヒドロビリベルジンの完全構造解析は、MS のみでは不可能であるため、NMR や X 線構造解析法等による手法の応用も検討する予定である。加えて、引き続き、スピルリナ色素の直接分析法についても検討を重ねていく予定である。

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

Cy3G・Cl をモデル化合物として、アントシアニンの qNMR 純度測定法を確立するための検討を行った。強酸性条件のアントシアニン測定溶媒(5% TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1))中で、qNMR 用基準物質である DMSO₂ 及び DSS-*d*₆ の安定性を確認した結果、両物質は分解せず、感度係数も安定していた。これにより、酸性条件下でも qNMR 用基準物質として使用可能であることが示された。Cy3G・Cl の濃度依存性については、20 mg/mL を超える場合には完全に溶解していない可能性が示唆されたため、5 mg/mL が最適な濃度であると判断された。IC-qNMR 及び EC-qNMR による Cy3G・Cl の

純度測定結果は、標準偏差の範囲内で一致していた。以上の結果から、酸性条件下でも DMSO₂ 及び DSS-*d*₆ を IC または EC として使用し、アントシアニンを適切な濃度で qNMR 測定することで、正確な純度が求められることを明らかにした。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重要な知見である。

2) 相対モル感度(RMS)を利用したメナキノン及びフィトナジオンの定量法の検討

本研究では、既存添加物「メナキノン(抽出物)」の有効成分である MK-4 の定量法について、RMS 法が代替法として実用可能か検討した。さらに、同一の発色団を持つ K₁ や MK-4 同様に栄養上重要視される MK-7 をはじめとしたほかのビタミン K でも、同一の RMS 値で定量可能か検証した。その結果、基準物質として D4HB を用いた系では、ビタミン K 類の RMS は一律 1.06 であった。RMS を用いた定量法と標品を用いた絶対検量線法の定量結果と比較したところ、数%のばらつきはみられるものの、品質モニタリング等に用いる程度の精度であれば十分運用可能であることが示された。他方、食品中のビタミン K 含量の定量を、ポストカラムとして還元カラムを用いて実施した。還元カラムの有無により検出されたピーク面積は変化するが、その比は一定となるため、還元カラムを用いない場合の RMS から予測可能であることが示唆された。これは、標品が入手困難な化合物であっても、還元カラム等で変化させて得られる場合、RMS を推定することが可能であると考えられた。

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

本研究では、ムラサキヤマイモ色素におけるアントシアニン類を指標とした LC 定量法の構築を目指して各種検討を実施し、入手した原体 2 ロットにおける共通主要成分 3 成分の構造推定を実施した。結果として、既報とは配糖体の数は異なっていたが、類似した構造として推定するに至った。一方で、糖の配置やアシル部分の詳細構造に関しては質量分析計では情報が得られないため、完全な構造決定のためには NMR による構造解析が必要であると考えられた。また、定量的評価法のためには定量用標品を用いた定量が不可欠である。そのため、高純度品を色素原体から獲得を目指して高速向流クロマトグラフィーによる単離精製の初期検討を実施した。今後は、設定した条件を用いて実際に単離精製を実施し、qNMR 等を用いて純度決定を行う予定である。

4) 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

本研究では、カシアガム中のアントラキノン分析法の確立を目的に、JECFA で規定される分析法を基に、前処理法の改良、HPLC 条件の最適化及び ^1H -qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン類分析法の確立について検討した。

前処理法の改良においては、液-液抽出における二層分離の遅延という課題に着目した。特に、エマルジョン形成による分離効率の低下に関する問題に対し、遠心分離操作の導入が有効であることを実証した。また、JECFA 規格の HPLC 条件では測定対象と夾雑成分

の分離が不十分であることが判明したため、粒子径 $3\ \mu\text{m}$ のカラムを採用し、グラジエント条件を最適化することで、高分離能を有する分析条件を確立した。

^1H -qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン類分析法の確立では、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 を明らかにした。これらの RMS の正確性はモデル溶液を用いた検証により実証され、本手法が測定対象 5 種の効率的かつ高精度な定量を可能とすることが示された。なお、前処理におけるクロロホルムの使用は、環境負荷及び作業者の安全性の観点から重要な課題として残されている。今後は、環境負荷が少なく、かつ分析担当者の安全性に配慮した代替溶媒の探索を含めた前処理法の改良が必要である。このような検討を進めることで、本研究で確立した分析法は、カシアガムの規格試験における実用的な手法として活用が可能となることが期待される。

5) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

PDA 校正用の標準物質の開発として、1,4-ナフトキノン誘導体の置換基位置の違いがおよぼす UV-Vis スペクトルの変化について検討した。複数の誘導体の合成経路を確立したが、置換基の位置と種類によっては別の化合物構造が得られて、望みの構造を得ることが極めて困難となることが分かった。また、今回検討したうち、1,4-ナフトキノン誘導体の 5 位にニトロ基を導入した化合物で UV-Vis スペクトルの長波長化が観測された。この化合物構造をベースとし、導入する置換基

の個数や位置を検討することで、さらなる吸収波長の長波長化が可能と考えられる。合成予定の化合物として、今回検討した5位に加えて8位にアミノ基等の置換基を有する化合物を設計しており、今後はこれら誘導体の合成も行い、UV-Vis スペクトルの長波長化に有用な情報の蓄積を進めていく。

6) 窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較

窒素定量に課題がある「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を試料に用いて、公定法を含む複数の窒素定量法の定量値及び操作性等を比較した。

定量値はいずれの定量法でもほぼ同程度の値が得られた。またいずれの精度も同等であった。ケルダール法は試験者や環境への負荷が大きい分析法であること、一方元素分析法は迅速かつ簡便ではあるが初期投資の負担が大きいことが改めて示された。以上の結果を踏まえると、「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」に対しては、公定法の試料量を少なくした公定法改法を導入することが最も簡単であると考えられた。一方、元素分析法は複数の元素を測定可能な装置も有ることから、複数部署で共有して使用できると考えられる。したがって、将来的には試験者や環境への負荷低減のため元素分析法へシフトしていくべきであると考えられた。

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

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、タ

ンパク質の分解能を向上させるために、一般的な SDS-PAGE に代わり二次元電気泳動法を用いて添加物酵素を解析した。その結果、一部の試料において SDS-PAGE による解析結果と比較して同定可能なタンパク質数が上昇したことを確認できた。さらに、分析手法の開発だけに留まらず、データベース登録情報の菌種に関するアノテーションや、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していく必要があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表等

1-1. 論文

- 1) Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen S-P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G. F: Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR Sustainability. *Analytical Chemistry*, 2024; 96(24): 9790-9798.
- 2) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 燃烧法による食品添加物中の窒素定量分析. *日本食品化学学会誌*, 2024; 31(1): 31-34.
- 3) Ohtsuki T, Huang Y, Kamiya A, Nakayama Y, Matsushita M, Morikawa S, Matsufuji H: Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of blood concentrations of nine pharmaceutical compounds. *J. Pharm. Health Care Sci.*, 2024; 10: 35.
- 4) 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 ^{31}P -NMR for the purity determination of the organophosphorus compound brigatinib and its method validation. Chem. Pharm. Bull., 2024; 72: 36-40.

1-2. 総説

- 1) 杉本直樹：定量 NMR の標準化と実用化. 薬学雑誌, 2024; 144: 353-357.
- 2) 杉本直樹：我が国の食品添加物の指定及び改正. Pharm Tech Japan, 2024; 40(8): 95-96.

2. 学会発表等

2-1. 学会

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹： ^1H スピン情報に基づいたクロロゲン酸類のデジタルリファレンススタンダード(dRS)の作成. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会(2024.5).
- 2) 大槻崇, 馬場萌加, 二見櫻子, 黄奕, 遠藤悠平, 金子剣伸, 松藤寛： ^1H -qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いた大豆イソフラボン類分析法の確立. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会(2024.5).
- 3) 伊藤紫野, 渡辺麻衣子, 西原秀典, 橋本一浩, 川上裕司, 小林直樹, 後藤慶一, 水谷治, 清水公德, 伴さやか, 矢口貴志, 工藤由起子, 大西貴弘：発酵食品由来の黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指

標を用いた分類学的検討. 第 45 回日本食品微生物学会学術総会(2024.9).

- 4) 森本深麗, 永津明人, 西崎雄三, 阿部裕, 増本直子, 杉本直樹： ^1H -qNMR 法を用いたクローブ由来既存添加物及びチョウジ末、オールスパイス末中の eugenol の定量. 日本生薬学会第 70 回年会(2024.9).
- 5) 鬼嶋七海, 内倉崇, 好村守生, 阿部裕, 杉本直樹：食品添加物カロブ色素の成分研究. 第 63 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(2024.11).
- 6) 石附京子, 阿部裕, 杉本直樹：エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定呈法の検討. 第 61 回全国衛生化学技術協議会年会(2024.11).
- 7) 中島馨, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹：相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討～クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係～. 第 120 回日本食品衛生学会学術講演会(2024.11).
- 8) 大槻崇, 神谷彩音, 中山優希, 黄奕, 松下美由紀, 森川悟, 松藤寛：TDM 対象薬など医薬品 6 種の血中濃度測定における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用. 第 6 回日本定量 NMR 研究会年会(2024.12).
- 9) 渡辺実薫：食品添加物公定書における窒素定量法の代替試験法の検証. 第 7 回(公社)日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会(2025.2).
- 10) 瀬川ひかり, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人：定量 NMR (^1H -qNMR)を用いたバジル(*Ocimum basilicum*

L.)中の rosmarinic acid の定量. 日本薬学会第 145 年会(2025.3).

- 11) 内山奈穂子, 細江潤子, 清田浩平, 石附京子, 杉本直樹, 小出達夫, 田中誠司, 増本直子, 伊藤美千穂, 村林美香, 篠崎妙子, 藤峰慶徳, 大藤克也, 清水仁, 藤田和弘, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 牧野吉伸, 武藤康弘, 高岡真也, 中山貴寛, 朝倉克夫, 末松孝子, 阿部仁美, 小浜亜以, 五島隆志, 安田万寿, 諏訪博昭, 渡邊玲, 岡田ひとみ, 合田幸広: ^{19}F -qNMR を用いた医薬品中の残留溶媒としてのトリフルオロ酢酸(TFA)の定量に関する研究. 日本薬学会第 145 年会(2025.3).

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)
なし

2-2. 講演等

- 1) 杉本直樹: 食品添加物の化学的安全性の確保. ifia JAPAN20224, 食の安全・科学セッション(2024.5).
- 2) 杉本直樹: 食品化学における定量分析の役割. 日本食品化学学会第 30 回総会学術大会(2024.5).
- 3) 杉本直樹: 第 10 版食品添加物公定書における主要な改正ポイント. 日本食品添加物協会拡大情報連絡会(2024.6).
- 4) 杉本直樹: 食品添加物の品質確保. 創立 150 周年記念特別衛研シンポジウム(2024.8).
- 5) 永津明人: 生薬等の品質管理での定量 NMR 法 (^1H -qNMR) の利用. 2024 年度分子研異分野技術交流セミナー(第 3 回), (2024.7).
- 6) 永津明人: 生薬の品質評価について. 令和 6 年度日本アロマセラピー学会中部北陸地方会・清水薬剤師会(2024.9).

食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和6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

～既存添加物の流通・使用実態及び成分規格整備状況に関する調査研究～

業務受託者 松村雅彦 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年間で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、「2. 既存添加物の流通・使用実態について」の調査ならびに、「1. 既存添加物の成分規格整備状況」の確認を行った。

流通実態については、第6～8回生産量統計調査の結果により、流通情報が取得できた添加物は275品目であった。

使用実態については、(一社)日本食品添加物協会(以下「当協会」という)の第1～14部会を通じて267社に対して、既存添加物原体の製品名と用途及び事業者名を問うた結果、使用実態が確認できた添加物は245品目であった。

なお、既存添加物357品目については、第10版食品添加物公定書に、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6(2024)年9月5日に作成された第5次の消除予定添加物名簿には消除候補32品目が掲載され、令和7(2025)年3月4日まで訂正の申し出手続きが実施されている。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を受けて、第6版既存添加物自主規格を策定した。

研究協力者

藤井結花 (一社)日本食品添加物協会
常務理事

者検証を実施した年度及び項目、⑦自社検証を実施した年度及び項目)でまとめた。

(2) 流通実態

流通実態については、第6～8回生産量統計調査(平成26年、平成29年及び令和2年度対象)で報告のあった品目について、成分規格の制定状況とともにまとめた。

(3) 使用実態

既存添加物原体の使用実態を調査し結果をまとめた。

(4) 調査研究者

(1)～(3)の検討・調査は、当協会の規格専門委

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2への未収載品、すなわち第10版食品添加物公定書新規収載品ならびに未収載品について、令和6(2024)年12月時点での成分規格設定・検討状況を7項目(①第10版食品添加物公定書収載品目、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品目、④第5版既存添加物自主規格収載品目、⑤成分規格案の作成における参考事項、⑥第3

員会・自主規格専門委員会合同会議、技術委員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6（2024）年12月時点での整備状況についてまとめ結果を表1に記した。

分類した7項目について規格数を以下に示す。

①第10版公定書収載：	45
②第11版公定書成分規格案作成済：	12
③第6版既存添加物自主規格収載：	67
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（※1）：4）	

※1 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成分規格案の作成における参考事項：59

⑥第3者検証実施年度及び項目：75

⑦自社検証実施年度及び項目：44

(2) 流通実態

既存添加物357品目（成分規格数として402）の流通状況について、第6～8回生産量統計調査で報告のあった品目を、令和6年度消除予定添加物名簿収載品目ならびに令和6年度販売実態調査対象品目情報とともに、表2（その1～10）にまとめた。

流通状況について、今回の調査により流通情報が取得できた成分規格数（A）は281品目であった。ただし、「カラギナン」、「ルチン（抽出物）」、「シェラック」、「焼成カルシウム」、「タンニン（抽出物）」および「未焼成カルシウム」の6品目は、小分類の添加物により流通実態が確認できた。

一方、生産量流通調査3回で報告がなく、流通情報が取得できなかった成分規格数（B）は102品目であった。

また、成分規格の制定状況と照合してみたところ、規格がなく、流通の報告がない品目

は37品目であった。

(3) 使用実態

既存添加物原体の使用実態が確認できた品目（成分規格）、確認できなかった品目（成分規格）について表3（その1～12）に記した。

使用状況が確認できた成分規格は245品目、確認できなかった成分規格は160品目であった。

(4) 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、規格専門委員及び部会担当のメンバーを表4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3者検証を実施した添加物30余品あり、そのうち、これまでに第11版食品添加物公定書作成検討会へ成分規格を提出した添加物は8品目、第5回作業部会へ提出予定の添加物がおおよそ10品目程度あるが、第11版食品添加物公定書新規収載成分規格は多く見積みつつ約20品目となる見込みである。その他の品目は、事業者が確認できないか、又は確認できていても諸事情により成分規格策定が困難なものである。

流通実態調査ならびに使用実態調査については、一部には情報開示を忌避する例が見られた。今後の調査のあり方を工夫する必要があると考えられる。

D. 謝辞

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

表1 既存添加物成分規格案の整備状況（その1）

部 会	用途分類	既存 添加物 番号	コード番 号	規格名称	成分規格の整備状況						検証項目	
					食品添加物公定書		自主規格		参考事項			
					第10版 公定書収 載	第11版 成分規格 案の作成	第6版	第5版		第3者	自社	
1	甘味料	165	E00181	ステビア末			－	－	食品流通			
1	甘味料	264	E00284	ブラジルカンゾウ抽出物			○	落				
2	着色料	24	E00024	アルミニウム			○	暫				
2	着色料	46	E00048	オレンジ色素			○	落				
2	着色料/製造用剤	87	E00093	金		○	○	○	H28 全項目	H29 全項目		
2	着色料/製造用剤	88	E00094	銀		○	○	○	H28 全項目	H29 全項目		
2	着色料	113	E00120	クロフリン			○	－	規格情報なし			
2	着色料	154	E00165	シタン色素	○			○	H30 全項目	H29 全項目		
2	着色料	160	E00177	植物炭末色素	○			○	H31 全項目	H29 全項目		
2	着色料	253	E00272	ファフィア色素			○	○	製造実績なし	H29 全項目	H29.30 全項目	
2	着色料	276	E00295	ペカンナッツ色素			○	暫				
2	着色料	317	E00342	ムラサキヤマイモ色素			○	○	事業者なし			
2	着色料	354	E00382	ログウッド色素			－	－	規格情報なし			
3	保存料	73	E00078	カワラヨモギ抽出物	○			○	H29 全項目	H31 全項目		
3	製造用剤/日持	111	E00117	グレープフルーツ種子抽出物			－	－	合成抗菌剤			
3	製造用剤/日持	157	E00168	ショウガ抽出物			－	－	規格情報なし			
3	製造用剤/日持	170	E00186	セイヨウワサビ抽出物	○			○	H28 全項目	H27 全項目		
3	製造用剤/日持	211	E00230	トウガラシ水性抽出物	○			○	H30 全項目	H31 全項目		
3	製造用剤/日持	262	E00282	ブドウ果皮抽出物			○	○	R6 全項目(予定)			
3	製造用剤/日持	322	E00347	モウソウチク乾留物			○	○	H31 全項目			
3	製造用剤/日持	323	E00348	モウソウチク抽出物			○	○	規格案再検討			
4	増粘安定剤	1	E00001A	アウレオバシジウム培養液(液体品)			○	○	H31 全項目			
4	増粘安定剤	1	E00001B	アウレオバシジウム培養液(粉末品)			○	－	H31 全項目			
4	増粘安定剤	4	E00004	アグロバクテリウムスクシノグリカン	○			○	H31 全項目	R2 全項目		
4	増粘安定剤	13	E00013	アマニードガム			○	○	H31 全項目			
4	増粘安定剤	19	E00019	アラビノガラクトン			○	○	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	E00062	カラギナン			－	－				
4	増粘安定剤	60	E00065	ユーケマ薬末			－	－	規格情報なし			

表1 既存添加物成分規格案の整備状況（その2）

部 会	用途分類	既存 添加物 番号	コード番 号	規格名称	成分規格の整備状況						
					食品添加物公定書		自主規格		参考事項	検証項目	
					第10版 公定書収 載	第11版 成分規格 案の作成	第6版	第5版		第3者	自社
4	増粘安定剤	81	E00086	キチン		△	○	○		H30 全項目	R6 全項目
4	増粘安定剤/製造 用剤	83	E00088	キトサン		△	○	○		H30 全項目	R6 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	トロロアオイ			○	○	事業者取扱い終了	H30 全項目	
4	増粘安定剤	252	E00271	フアーセララン			○	○	事業者は取扱い終了	H30 全項目	
4	増粘安定剤	329	E00354	モモ樹脂		△	○	○		H30 全項目	R6 全項目
5	酸化防止剤	57	E00059	カデキン		○	○	○		H29 全項目	R6 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			
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
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)			－	○			
5	酸化防止剤	250	E00269	ヒマワリ種子抽出物			○	○	事業者製造終了	H28 全項目	H29.30 全項目
5	酸化防止剤	270	E00290	プロポリス抽出物			－	－	終売予定		
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	ガムベース/光沢剤	35	E00036	ウルシロウ	○			○		H30 全項目	H31(酸化,融 点)
6	ガムベース	41	E00042	オゾケライト			○	暫			

表1 既存添加物成分規格案の整備状況（その3）

部 会	用途分類	既存 添加物 番号	コード番 号	規格名称	成分規格の整備状況						検証項目	
					食品添加物公定書		自主規格		参考事項			
					第10版 公定書収 載	第11版 成分規格 案の作成	第6版	第5版				
6	ガムベース	92	E00098	グアヤク樹脂			○	○				
6	ガムベース	97	E00103	グッタハンカン			○	○				
6	ガムベース	98	E00104	グッタペレカ			○	○				
6	ガムベース	134	E00142	ゴム		○	○	○		H31 全項目	R4 全項目	
6	ガムベース	135	E00143	ゴム分解樹脂				—	—	規格情報なし		
6	ガムベース/光沢剤	138	E00146	コメヌカロウ	○			○		H29 全項目		
6	ガムベース/光沢剤	140	E00148	サトウキビロウ	○			○		H30 全項目		
6	ガムベース/光沢剤	147	E00158	シェラックロウ	○			○		H31 全項目		
6	ガムベース	149	E00160	ジェルボン	○			○		H31 全項目	H29 全項目	
6	ガムベース	180	E00196	ソルバ			—	除	自主規格削除			
6	ガムベース	181	E00197	ソルビンハ			—	除	自主規格削除			
6	ガムベース	194	E00213	チクル	○			○		H31 全項目	H29 全項目	
6	ガムベース	198	E00217	チルデ			—	—				
6	ガムベース	200	E00219	ソーズ			—	—	規格情報なし			
6	ガムベース	203	E00222	低分子ゴム			—	除	自主規格削除			
6	ガムベース	230	E00249	ニカーグッタ			—	—	規格情報なし			
6	ガムベース	275	E00294	粉末モミガラ			—	—	規格情報なし			
6	ガムベース	288	E00308	ベネズエラチクル			—	—	規格情報なし			
6	ガムベース	300	E00320	ホホバロウ			○	○	食添用途なし	R2 全項目, R3 全項目		
6	ガムベース	305	E00325	マスチック			○	暫	事業者取扱い終了	H31 全項目		
6	ガムベース	306	E00326	マッサランドバチョコレート			—	—	規格情報なし			
6	ガムベース	307	E00327	マッサランドババラタ			—	除	自主規格削除			
6	ガムベース	314	E00339	ミルラ	○			○		H31 全項目	H29 全項目	
6	ガムベース/光沢剤	326	E00351	モクロウ	○			○		H30 全項目		
6	ガムベース	351	E00378	レッチュデバカ			—	—	規格情報なし			
6	ガムベース	355	E00383	ロシデインハ			—	—	規格情報なし			
6	ガムベース	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	キノ抽出物			—	—	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			

表1 既存添加物成分規格案の整備状況（その4）

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号	規格名称	成分規格の整備状況						
					食品添加物公定書 第10版 公定書収載	第11版 成分規格 案の作成	自主規格		参考事項	検証項目	
							第6版	第5版		第3者	自社
9	苦味料等	117	E00126	ゲンチアナ抽出物	○			○		H29 全項目 R2 全項目 はグレープフルーツのみ	H29・30 全項目 R2 全項目 はグレープフルーツのみ
9	苦味料等	121	E00130	酵素処理ナリンジン			○	○			
9	苦味料等	156	E00167	ジャマイカカッシア抽出物	○			○		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	デオブロミン			—	—	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(菌糸体, 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			○	○	事業者なし		
13	製造用剤	9	E00009	アスペルギルスステレウス糖たん白質	○			○		H31 全項目	
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			○	○		実施しない	
13	製造用剤	42	E00043B	オゾン水			○	○		実施しない	
13	製造用剤	43	E00044	オリゴガラクチュロン酸				—	規格情報なし		
13	製造用剤	45	E00047	オレガラ抽出物			—	—	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	クリストパル石			—	—	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	E00127	高級脂肪酸			—	—			
13	製造用剤	118	E00127H	高級脂肪酸(C8・C10 混合品)			—	—			
13	製造用剤	118	E00127I	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, ペヘニン酸, ミリスチン酸, ラウリン酸, C8・C10 混合品以外)			—	—			
13	製造用剤	133	E00141	ゴマ柄灰灰抽出物			—	—			
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(液体品)→純合版		○	○	—			R5 全項目(液体品)
13	製造用剤	153	E00164	シソ抽出物			○	○			

表 1 既存添加物成分規格案の整備状況（その 5）

部 会	用途分類	既存 添加物 番号	コード番 号	規格名称	成分規格の整備状況						検証項目	
					食品添加物公定書		自主規格		参考事項			
					第10版 公定書収 載	第11版 成分規格 案の作成	第6版	第5版		第3者	自社	
13	製造用剤	158	E00169	焼成カルシウム				－				
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	E00209	タンニン(抽出物)				－				
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		
13	製造用剤	195	E00214	窒素				○	○			
13	製造用剤	196	E00215	チャ乾留物				○	○	R5 以降候補		
13	製造用剤/強化剤	207	E00226	鉄				○	○			
13	製造用剤	209	E00228	銅				－	規格情報なし			
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				－	規格情報なし			
13	製造用剤	232	E00251	ニッケル				○	○	第三者検証困難	実施しない	
13	製造用剤	234	E00253	ばい煎コメヌカ抽出物				○	○	規格案再検討	H30 全項目	H31 全項目
13	製造用剤	235	E00254	ばい煎ダイズ抽出物				○	○	R5 事業者取扱い終了	H30 全項目	H31 全項目
13	製造用剤	237	E00256	白金				－	規格情報なし			
13	製造用剤	241	E00260	パラジウム				－	規格情報なし			
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				－	規格情報なし			
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				○	○			

表1 既存添加物成分規格案の整備状況（その6）

部 会	用途分類	既存 添加物 番号	コード番 号	規格名称	成分規格の整備状況						検証項目	
					食品添加物公定書		自主規格		参考事項	第3者	自社	
					第10版 公定書収 載	第11版 成分規格 案の作成	第6版	第5版				
13	製造用剤	311	E00331	未焼成カルシウム			－	－				
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		△	○	－		R6 全項目		R6 全項目
13	製造用剤/強化剤	311	E00335	真珠層未焼成カルシウム			－	－	規格情報なし			
13	製造用剤/強化剤	311	E00336	卵殻未焼成カルシウム			○	○		H27 全項目, R6 全項目(予定)		
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			○	○	規格情報無			
13	製造用剤	325	E00350	木炭			○	○				
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	リンターセルローズ			－	－	規格情報無			
13	製造用剤	349	E00376	ルテニウム			○	○	第三者検証困難	第三者検証困難		
14	香辛料抽出物	119	E00128	香辛料抽出物	○			－				

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 1）

部会	用途分類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制 定状況		流通の 状況		規格がなく、流通 の報告が ない品目
			全体コ ード	既存コード							
1	甘味料	20	FA004800	E00020	Ｌーアラビノース		1		A		－
1	甘味料	74	FA015600	E00079	カンゾウ抽出物	カンゾウ抽出物(粗製物)	1		A		－
1	甘味料	74	FA015600	E00079	カンゾウ抽出物	カンゾウ抽出物(精製物)	1				
1	甘味料	79	FA016600	E00084	D－キシロース		1		A		－
1	甘味料	106	FA019400	E00112	α－グルコシルトランス スフェラーゼ処理ステ ビア	α－グルコシルトランスフ ェラーゼ処理ステビア	1		A		－
1	甘味料	106	FA019400	E00112	α－グルコシルトランス スフェラーゼ処理ステ ビア	α－グルコシルトランスフ ェラーゼ処理ステビオー ール配糖体	1				
1	甘味料	125	FA023000	E00133	酵素分解カンゾウ		1		B		－
1	甘味料	164	FA035200	E00180	ステビア抽出物	ステビア抽出物	1		A		－
1	甘味料	164	FA035200	E00180	ステビア抽出物	ステビオール配糖体	1				－
1	甘味料	165		E00181	ステビア末		5		A		－
1	甘味料	183	FA036500	E00199	タウマチン		1		A		－
1	甘味料	264		E00284	ブラジルカンゾウ抽 出物		4		B		－
1	甘味料	332	FA062200	E00357	ラカンカ抽出物		1		A		－
1	甘味料	338	FA063300	E00363	Ｌーラムノース		1		A		－
1	甘味料	344	FA064400	E00368	D－リボース		1		A		－
2	着色料	12	FA003400	E00012	アナトー色素	アナトー色素(ノルビキシ ン)	1		A		－
2	着色料	12	FA003400	E00012	アナトー色素	アナトー色素(ビキシ ン)	1				－
2	着色料	24		E00024	アルミニウム		4		B		－
2	着色料	34	FA008900	E00035	ウコン色素		1		A		－
2	着色料	46		E00048	オレンジ色素		4		B		－
2	着色料	49	FA012600	E00051	カカオ色素		1		A		－
2	着色料	50	FA012650	E00052	カキ色素		1		A		－
2	着色料	64	FA014000	E00069	カラメルⅠ		1		A		－
2	着色料	65	FA014100	E00070	カラメルⅡ		1		A		－
2	着色料	66	FA014200	E00071	カラメルⅢ		1		A		－
2	着色料	67	FA014300	E00072	カラメルⅣ		1		A		－
2	着色料	71	FA015100	E00076	カロブ色素		1		A		－
2	着色料/製 造用剤	87		E00093	金		3		A		－
2	着色料/製 造用剤	88		E00094	銀		3		A		－
2	着色料	94	FA018100	E00100	クチナシ青色素		1		A		－
2	着色料	95	FA018200	E00101	クチナシ赤色素		1		A		－
2	着色料	96	FA018300	E00102	クチナシ黄色素		1		A		－
2	着色料	113		E00120	クロロフィル		5		A		－
2	着色料	114	FA021500	E00121	クロロフィル		1		A		－
2	着色料	129	FA023400	E00136	コウリヤン色素		1		A		－
2	着色料	130	FA023500	E00137	コチニール色素		1		A		－
2	着色料	154	FA028750	E00165	シタン色素		3		B		－
2	着色料	160		E00177	植物炭末色素		3		A		－
2	着色料	166	FA035400	E00182	スピルリナ色素		1		A		－
2	着色料	185	FA036700	E00201	タマネギ色素		1		A		－
2	着色料	186	FA036800	E00202	タマリンド色素		1		A		－
2	着色料	208	FA040100	E00227	デュナリエラカロテン		1		A		－
2	着色料	210	FA040400	E00229	トウガラシ色素		1		A		－
2	着色料	217	FA041500	E00236	トマト色素		1		A		－
2	着色料	233	FA044300	E00252	ニンジンカロテン		1		A		－
2	着色料	239	FA044900	E00258	パーム油カロテン		1		A		－
2	着色料	248	FA047100	E00267	ビートレッド		1		A		－
2	着色料	208	FA040100	E00227	デュナリエラカロテン		1		A		－
2	着色料	210	FA040400	E00229	トウガラシ色素		1		A		－
2	着色料	217	FA041500	E00236	トマト色素		1		A		－
2	着色料	233	FA044300	E00252	ニンジンカロテン		1		A		－

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 2）

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制定状況		流通の状況		規格がなく、流通の報告がない品目
			全体コード	既存コード							
2	着色料	239	FA044900	E00258	パーム油カロテン		1		A		—
2	着色料	248	FA047100	E00267	ビートレッド		1		A		—
2	着色料	253		E00272	ファファイ色素		3		A		—
2	着色料	261	FA051600	E00281	ブドウ果皮色素		1		A		—
2	着色料	276		E00295	ペカンナッツ色素		4		B		—
2	着色料	284	FA055100	E00304	ベニコウジ黄色素		1		A		—
2	着色料	285	FA055200	E00305	ベニコウジ色素		1		A		—
2	着色料	286	FA055300	E00306	ベニバナ赤色素		1		A		—
2	着色料	287	FA055400	E00307	ベニバナ黄色素		1		A		—
2	着色料	292	FA055800	E00312	ヘマトコッカス藻色素		1		A		—
2	着色料	308	FA058700	E00328	マリーゴールド色素		1		A		—
2	着色料	315	FA059400	E00340	ムラサキイモ色素		1		A		—
2	着色料	316	FA059500	E00341	ムラサキトウモロコシ色素		1		A		—
2	着色料	317		E00342	ムラサキヤマイモ色素		4		A		—
2	着色料	335	FA063000	E00360	ラック色素		1		A		—
2	着色料	354		E00382	ログウッド色素		5		B		○
3	製造用剤/日持	63	FA013900	E00068	カラシ抽出物		1		A		—
3	保存料	73	FA015250	E00078	カワラヨモギ抽出物		3		B		—
3	製造用剤/日持	111		E00117	グレープフルーツ種子抽出物		5		A		—
3	製造用剤/日持	157		E00168	シヨウガ抽出物		5		A		—
3	製造用剤/日持	162	FA033600	E00178	しらこたん白抽出物		1		A		—
3	製造用剤/日持	170		E00186	セイヨウワサビ抽出物		3		A		—
3	保存料	201	FA038900	E00220	ツヤブリシン（抽出物）		1		B		—
3	製造用剤/日持	211		E00230	トウガラシ水性抽出物		3		A		—
3	製造用剤/日持	262		E00282	ブドウ果皮抽出物		4		A		—
3	製造用剤/日持	263	FA051700	E00283	ブドウ種子抽出物		1		A		—
3	製造用剤/日持	280	FA054700	E00299	ペクチン分解物		1		A		—
3	製造用剤/日持	302	FA058100	E00322	ε-ポリリシン		1		A		—
3	製造用剤/日持	322		E00347	モウソウチク乾留物		4	—	A		—
3	製造用剤/日持	323		E00348	モウソウチク抽出物		4		A		—
4	増粘安定剤	1		E00001A	アウレオバシジウム培養液（液体品）		4		B		—
4	増粘安定剤	1		E00001B	アウレオバシジウム培養液（粉末品）		5		B		—
4	増粘安定剤	4	FA000650	E00004	アグロバクテリウムスクシノグリカン		3		A		—
4	増粘安定剤	13		E00013	アマシードガム		4		A		—
4	増粘安定剤	18	FA004700	E00018	アラビアガム		1		A		—
4	増粘安定剤	19		E00019	アラビノガラクトン		4		B		—
4	増粘安定剤	22	FA005400	E00022	アルギン酸		1		A		—

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 3）

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制定状況		流通の状況		規格がなく、流通の報告がない品目
			全体コード	既存コード							
4	増粘安定剤	33	FA008800	E00034	ウェランガム		1		A		—
4	増粘安定剤/ガムベース	39	FA010850	E00040	エレミ樹脂		3		A		—
4	増粘安定剤	52		E00054	カシアガム		4		A		—
4	増粘安定剤	56	FA013400	E00058	ガティガム		1		A		—
4	増粘安定剤	58	FA013500	E00060	カードラン		1		A		—
4	増粘安定剤	60		E00062	カラギナン		5	◇	A	☆	—
4	増粘安定剤	60	FA012700	E00063	加工ユーケマ藻類		1		A		—
4	増粘安定剤	60	FA035500	E00064	精製カラギナン		1		A		—
4	増粘安定剤	60		E00065	ユーケマ藻末		5		A		—
4	増粘安定剤	68	FA014400	E00073	カラヤガム		1		A		—
4	増粘安定剤	72	FA015200	E00077	カロブビーンガム		1		A		—
4	増粘安定剤	77	FA016200	E00082	キサンタンガム		1		A		—
4	増粘安定剤	81		E00086	キチン		4		A		—
4	増粘安定剤/製造用剤	83		E00088	キトサン		4		A		—
4	増粘安定剤	89	FA017000	E00095	グァーガム		1		A		—
4	増粘安定剤	90	FA017050	E00096	グァーガム酵素分解物		3		A		—
4	増粘安定剤	102	FA019050	E00108	グルコサミン		3		A		—
4	増粘安定剤	128	FA023300	E00135	酵母細胞壁		1		A		—
4	増粘安定剤	139	FA024400	E00147	サイリウムシードガム		1		A		—
4	増粘安定剤/製造用剤	141	FA026450	E00149	サバクヨモギシードガム		3		A		—
4	増粘安定剤	148	FA028000	E00159	ジェランガム		1		A		—
4	増粘安定剤	187	FA036900	E00203	タマリンドシードガム		1		A		—
4	増粘安定剤	188	FA037000	E00204	タラガム		1		A		—
4	増粘安定剤	206	FA039600	E00225	デキストラン		1		A		—
4	増粘安定剤	218	FA041600	E00237	トラガントガム		1		A		—
4	増粘安定剤	224		E00243	トロロアオイ		4		A		—
4	増粘安定剤	225	FA042900	E00244	納豆菌ガム		1		A		—
4	増粘安定剤	246	FA046500	E00265	微小繊維状セルロース		1		A		—
4	増粘安定剤	252		E00271	ファースレラン		4		A		—

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 4）

部会	用途分類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制 定状況		流通の 状況		規格がなく、流通 の報告が ない品目
			全体コ ード	既存コー ド							
4	増粘安定 剤	259	FA051100	E00279	フクロノリ抽出物		1		A		—
4	増粘安定 剤	267	FA052400	E00287	プルラン		1		A		—
4	増粘安定 剤	279	FA054600	E00298	ペクチン		1		A		—
4	増粘安定 剤	304	FA058600	E00324	マクロホモブシスガム		1		B		—
4	増粘安定 剤	329		E00354	モモ樹脂		4		A		—
4	増粘安定 剤	337	FA063200	E00362	ラムザンガム		1		B		—
5	酸化防止 剤	31	FA008400	E00032	イノシトール		1		A		—
5	酸化防止 剤	44	FA012000	E00045	γ-オリザノール		1		B		—
5	酸化防止 剤	57		E00059	カテキン		4		A		—
5	酸化防止 剤/日持	75	FA015720	E00080	カンヅウ油性抽出物		3		A		—
5	酸化防止 剤	91	FA017150	E00097	グアヤク脂		4		B		—
5	酸化防止 剤	93		E00099	クエルセチン		3		A		—
5	酸化防止 剤/日持	112		E00119	クローブ抽出物		4		A		—
5	酸化防止 剤	120	FA022700	E00129	酵素処理イソクエル シトリン		1		A		—
5	酸化防止 剤	122	FA022800	E00131	酵素処理ヘスペリジ ン		1		A		—
5	酸化防止 剤	123	FA022900	E00132	酵素処理ルチン（抽 出物）		1		A		—
5	酸化防止 剤	126		E00134	酵素分解リンゴ抽出 物		5		B		○
5	酸化防止 剤	132		E00140	ゴマ油不けん化物		4		B		—
5	酸化防止 剤	136	FA024100	E00144	コメヌカ油抽出物		1		B		—
5	酸化防止 剤	137		E00145	コメヌカ酵素分解物		5		B		○
5	酸化防止 剤	145	FA027500	E00154	シアノコバラミン		1		A		—
5	酸化防止 剤	169		E00185	精油除去ウイキョウ抽 出物		2		B		—
5	酸化防止 剤	173		E00189	セージ抽出物		5		B		○
5	酸化防止 剤	191		E00207	単糖・アミノ酸複合物		4		A		—
5	酸化防止 剤	197		E00216	チャ抽出物		3		A		—
5	酸化防止 剤	213	FA040800	E00232	トコリエノール		1		A		—
5	酸化防止 剤	214	FA040900	E00233	d-α-トコフェロー ル		1		A		—
5	酸化防止 剤	215	FA041000	E00234	d-γ-トコフェロー ル		1		A		—
5	酸化防止 剤	216	FA041100	E00235	d-δ-トコフェロー ル		1		A		—
5	酸化防止 剤	227		E00246	生コーヒー豆抽出物		3		A		—

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 5）

部会	用途分類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制 定状況		流通の 状況		規格がなく、流通 の報告が ない品目
			全体コ ード	既存コード							
5	酸化防止 剤	250		E00269	ヒマワリ種子抽出物		3		A		—
5	酸化防止 剤	258	FA050700	E00278	フェルラ酸		1		A		—
5	酸化防止 剤	270		E00290	プロポリス抽出物		5		A		—
5	酸化防止 剤	282	FA054900	E00302	ヘスペリジン		1		A		—
5	酸化防止 剤	299		E00319	没食子酸		3		A		—
5	酸化防止 剤	312	FA059200	E00337	ミックスコフェロール		1		A		—
5	酸化防止 剤	319	FA061500	E00344	メナキノン(抽出物)		1		A		—
5	酸化防止 剤	321		E00346	メラロイカ精油		5		B		○
5	酸化防止 剤	330	FA061900	E00355	ヤマモモ抽出物		1		A		—
5	酸化防止 剤	347	FA068100	E00371	ルチン酵素分解物		1		A		—
5	酸化防止 剤	348		E00372	ルチン(抽出物)		5	◇	A	☆	—
5	酸化防止 剤	348	FA011500	E00373	エンジュ抽出物		1		A		—
5	酸化防止 剤	348		E00374	アズキ全草抽出物		5		B		○
5	酸化防止 剤	348		E00375	ソバ全草抽出物		5		B		○
5	酸化防止 剤	357		E00385	ローズマリー抽出物		3		A		—
6	ガムベース/ 光沢剤	35	FA009050	E00036	ウルシロウ		3		A		—
6	ガムベース	41		E00042	オブケライト		4		B		—
6	ガムベース/ 光沢剤	69	FA014600	E00074	カルナウバロウ		1		A		—
6	ガムベース/ 光沢剤	76	FA015800	E00081	カンデリラロウ		1		A		—
6	ガムベース	92		E00098	グアヤク樹脂		4		B		—
6	ガムベース	97		E00103	グッタハンカン		4		B		—
6	ガムベース	98		E00104	グッタペルカ		4		B		—
6	ガムベース	134		E00142	ゴム		4		B		—
6	ガムベース	135		E00143	ゴム分解樹脂		5		B		○
6	ガムベース/ 光沢剤	138	FA024150	E00146	コメヌカロウ		3		A		—
6	ガムベース/ 光沢剤	140	FA026420	E00148	サトウキビロウ		3		A		—
6	ガムベース/ 光沢剤	146		E00155	シェラック		5	◇	A	☆	—
6	ガムベース/ 光沢剤	146	FA027800	E00156	白シェラック		1		A		—
6	ガムベース/ 光沢剤	146	FA027900	E00157	精製シェラック		1		A		—
6	ガムベース/ 光沢剤	147	FA027950	E00158	シェラックロウ		3		A		—
6	ガムベース	149	FA028050	E00160	ジェルトン		3		A		—
6	ガムベース	180		E00196	ソルバ		5		B		○
6	ガムベース	181		E00197	ソルビンハ		5		B		○
6	ガムベース/ 光沢剤	189	FA037100	E00205	タルク		1		A		—

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 6）

部会	用途分類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制 定状況		流通の 状況		規格がなく、流通 の報告が ない品目
			全体コ ード	既存コード							
6	ガムベース	194		E00213	チクル		3		A		—
6	ガムベース	198		E00217	チルテ		5		B		○
6	ガムベース	200		E00219	ツヌー		5		B		○
6	ガムベース	203		E00222	低分子ゴム		5		B		○
6	ガムベース	230		E00249	ニガーグッタ		5		B		○
6	ガムベース/ 光沢剤	242	FA045600	E00261	パラフィンワックス		1		B		—
6	ガムベース	275		E00294	粉末モミガラ		5		B		—
6	ガムベース	288		E00308	ベネズエラチクル		5		B		○
6	ガムベース	300		E00320	ホホバロウ		4		B		—
6	ガムベース/ 光沢剤	303	FA058500	E00323	マイクロクリスタリンワ ックス		1		A		—
6	ガムベース	305		E00325	マスチック		4		B		—
6	ガムベース	306		E00326	マッサランドバチョコ レート		5		B		○
6	ガムベース	307		E00327	マッサランドババラタ		5		B		○
6	ガムベース/ 光沢剤	313	FA059300	E00338	ミツロウ		1		A		—
6	ガムベース	314		E00339	ミルラ		3		B		—
6	ガムベース/ 光沢剤	326		E00351	モクロウ		3		A		—
6	ガムベース/ 光沢剤	336	FA063100	E00361	ラノリン		1		B		—
6	ガムベース	351		E00378	レッチュデバカ		5		B		○
6	ガムベース	355		E00383	ロシディンハ		5		B		○
6	ガムベース	356		E00384	ロシン		3		A		—
7	酵素	2	FA000500	E00002	アガラーゼ		1		A		—
7	酵素	3	FA000600	E00003	アクチニジン		1		B		—
7	酵素	5	FA001000	E00005	アシラーゼ		1		A		—
7	酵素	6	FA001200	E00006	アスコルビン酸オキシ ダーゼ		1		A		—
7	酵素	10	FA002900	E00010	α -アセトラクタート デカルボキシラーゼ		1		A		—
7	酵素	14	FA003900	E00014	アミノペプチダーゼ		1		A		—
7	酵素	15	FA004000	E00015	α -アミラーゼ		1		A		—
7	酵素	16	FA004100	E00016	β -アミラーゼ		1		A		—
7	酵素	23	FA006000	E00023	アルギン酸リアーゼ		1		A		—
7	酵素	25	FA006300	E00025	アントシアナーゼ		1		B		—
7	酵素	26	FA007000	E00026	イソアミラーゼ		1		A		—
7	酵素	28	FA008150	E00028	イソマルトデキストラ ナーゼ		1		B		—
7	酵素	30	FA008300	E00031	イヌリナーゼ		1		A		—
7	酵素	32	FA008700	E00033	インベルターゼ		1		A		—
7	酵素	36	FA009100	E00037	ウレアーゼ		1		A		—
7	酵素	37	FA009300	E00038	エキソマルトテトラオヒ ドロラーゼ		1		A		—
7	酵素	38	FA009400	E00039	エステラーゼ		1		A		—
7	酵素	53	FA013100	E00055	カタラーゼ		1		A		—
7	酵素	61	FA013700	E00066	α -ガラクトシダーゼ		1		A		—
7	酵素	62	FA013800	E00067	β -ガラクトシダーゼ		1		A		—
7	酵素	70	FA014700	E00075	カルボキシペプチダ ーゼ		1		A		—
7	酵素	78	FA016400	E00083	キシラナーゼ		1		A		—
7	酵素	80	FA016700	E00085	キチナーゼ		1		A		—
7	酵素	82	FA016800	E00087	キトサナーゼ		1		A		—
7	酵素	100	FA018900	E00106	グルカナーゼ		1		A		—
7	酵素	101	FA019000	E00107	グルコアミラーゼ		1		A		—
7	酵素	103	FA019100	E00109	α -グルコシダーゼ		1		A		—
7	酵素	104	FA019200	E00110	β -グルコシダーゼ		1		A		—

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 7）

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制定状況		流通の状況		規格がなく、流通の報告がない品目
			全体コード	既存コード							
7	酵素	105	FA019300	E00111	α -グルコシルトランスフェラーゼ		1		A		—
7	酵素	107	FA019600	E00113	グルコースイソメラーゼ		1		A		—
7	酵素	108	FA019700	E00114	グルコースオキシダーゼ		1		A		—
7	酵素	109	FA020600	E00115	グルタミナーゼ		1		A		—
7	酵素	143	FA027100	E00151	酸性ホスファターゼ		1		A		—
7	酵素	151	FA028400	E00162	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ		1		A		—
7	酵素	176	FA035700	E00192	セルラーゼ		1		A		—
7	酵素	192	FA038000	E00208	タンナーゼ		1		A		—
7	酵素	202	FA039100	E00221	5'-デアミナーゼ		1		A		—
7	酵素	205	FA039500	E00224	デキストラナーゼ		1		A		—
7	酵素	219	FA041700	E00238	トランスグルコンダーゼ		1		A		—
7	酵素	220	FA041800	E00239	トランスグルタミナーゼ		1		A		—
7	酵素	221	FA041900	E00240	トリプシン		1		A		—
7	酵素	223	FA042600	E00242	トレハロースホスホリラーゼ		1		B		—
7	酵素	228	FA043100	E00247	ナリンジナーゼ		1		A		—
7	酵素	236	FA044600	E00255	パーオキシダーゼ		1		A		—
7	酵素	238	FA044800	E00257	パパイン		1		A		—
7	酵素	243	FA046000	E00262	パンクレアチン		1		A		—
7	酵素	255	FA049800	E00274	フィターゼ		1		A		—
7	酵素	254	FA049700	E00273	フィシン		1		A		—
7	酵素	265	FA052100	E00285	フルクトシルトランスフェラーゼ		1		A		—
7	酵素	266	FA052300	E00286	プルラナーゼ		1		A		—
7	酵素	268	FA052500	E00288	プロテアーゼ		1		A		—
7	酵素	271	FA053600	E00291	プロメライン		1		A		—
7	酵素	278	FA054500	E00297	ペクチナーゼ		1		A		—
7	酵素	281	FA054800	E00301	ヘスベリジナーゼ		1		A		—
7	酵素	289	FA055500	E00309	ペプシン		1		A		—
7	酵素	291	FA055700	E00311	ペプチダーゼ		1		A		—
7	酵素	293	FA055900	E00313	ヘミセルラーゼ		1		A		—
7	酵素	297	FA056800	E00317	ホスホジエステラーゼ		1		A		—
7	酵素	298	FA056900	E00318	ホスホリパーゼ		1		A		—
7	酵素	301	FA057900	E00321	ポリフェノールオキシダーゼ		1		A		—
7	酵素	309	FA058800	E00329	マルトースホスホリラーゼ		1		B		—
7	酵素	310	FA058900	E00330	マルトトリオヒドロラーゼ		1		A		—
7	酵素	318	FA059600	E00343	ムラミダーゼ		1		B		—
7	酵素	333	FA062800	E00358	ラクトパーオキシダーゼ		1		A		—
7	酵素	341	FA064000	E00365	リゾチーム		1		A		—
7	酵素	342	FA064200	E00366	リパーゼ		1		A		—
7	酵素	343	FA064300	E00367	リボキシゲナーゼ		1		B		—
7	酵素	352	FA068300	E00380	レンネット		1		A		—
8	酸味料	256	FA049900	E00275	フィチン酸	フィチン酸(液体)	1		A		—
8	酸味料	256	FA049900	E00275	フィチン酸	フィチン酸(粉末)	1				—
9	調味料/強化剤	7	FA001800	E00007	L-アスパラギン		1		B		—
9	調味料/強化剤	8	FA001900	E00008	L-アスパラギン酸		1		B		—

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 8）

部会	用途分類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制 定状況		流通の 状況		規格がなく、流通 の報告が ない品目
			全体コ ード	既存コード							
9	調味料/強化剤	17	FA004500	E00017	L-アラニン		1		A		—
9	調味料/強化剤	17	FA004500	E00017	L-アラニン	L-アラニン液	1				—
9	調味料/強化剤	21	FA005200	E00021	L-アルギニン		1		A		—
9	苦味料等	27	FA007150	E00027	イソアルファー 苦味酸		1		A		—
9	調味料	40	FA011550	E00041	塩水湖水低塩化ナトリウム液		3		A		—
9	苦味料等	59	FA013600	E00061	カフェイン(抽出物)		1		A		—
9	苦味料等	84		E00089	キナ抽出物		5		B		○
9	苦味料等	85		E00090	キハダ抽出物		5		B		○
9	調味料/強化剤	110	FA020800	E00116	L-グルタミン		1		A		—
9	苦味料等	117	FA022300	E00126	ゲンチアナ抽出物		3		A		—
9	苦味料等	121		E00130	酵素処理ナリンジン		4		A		—
9	調味料/強化剤	152	FA028600	E00163	L-シスチン		1		A		—
9	苦味料等	156	FA030150	E00167	ジャマイカカссия抽出物		3		A		—
9	調味料/強化剤	175	FA035600	E00191	L-セリン		1		A		—
9	調味料	177		E00193	粗製海水塩化カリウム		3		A		—
9	調味料/強化剤	184	FA036600	E00200	タウリン(抽出物)		1		A		—
9	調味料/強化剤	199	FA038800	E00218	L-チロシン		1		A		—
9	苦味料等	204		E00223	テオブロミン		5		B		○
9	調味料/苦味料	229	FA043200	E00248	ナリンジン		1		A		—
9	苦味料等	231		E00250	ニガヨモギ抽出物		4		B		—
9	調味料/強化剤	247	FA046600	E00266	L-ヒスチジン		1		A		—
9	調味料/強化剤	249	FA047800	E00268	L-ヒドロキシプロリン		1		B		—
9	調味料/強化剤	272	FA053700	E00292	L-プロリン	L-プロリン	1		A		—
9	調味料/強化剤	272	FA053700	E00292	L-プロリン	L-プロリン液	1				—
9	調味料	283	FA055000	E00303	ベタイン		1		A		—
9	調味料/強化剤	340	FA063500	E00364	L-リシン	L-リシン	1		A		—
9	調味料/強化剤	340	FA063500	E00364	L-リシン	L-リシン液	1				—
9	苦味料等	350		E00377	レイシ抽出物	2020 年 8 月意見募集	3		A		—
9	調味料/強化剤	353	FA068400	E00381	L-ロイシン		1		A		—
10	乳化剤	86	FA016900	E00092	キラヤ抽出物		1		A		—
10	乳化剤	124	FA022950	E00386	酵素処理レシチン		3		B		—
10	乳化剤	127	FA023100	E00387	酵素分解レシチン		1		A		—
10	乳化剤	159	FA031200	E00176	植物性ステロール	植物性ステロール(遊離体高濃度品)	1		A		—
10	乳化剤	159	FA031200	E00176	植物性ステロール	植物性ステロール(遊離体低濃度品)	1				—
10	乳化剤	161	FA068200	E00388	植物レシチン		1		A		—
10	乳化剤	167		E00183	スフィンゴ脂質		4		B		—
10	乳化剤	182		E00198	ダイズサポニン		4		A		—
10	乳化剤	190		E00206	胆汁末		4		B		—

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 9）

部会	用途分類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制 定状況		流通の 状況		規格がなく、流通 の報告がない品目
			全体コ ード	既存コード							
10	乳化剤	212	FA040700	E00231	動物性ステロール		1		B		—
10	乳化剤	273	FA068200	E00389	分別レシチン		1		A		—
10	乳化剤	331	FA062000	E00356	ユッカフオーム抽出物		1		A		—
10	乳化剤	339	FA068200	E00390	卵黄レシチン		1		B		—
13	製造用剤	9	FA002150	E00009	アスペルギルスステレウス糖たん白質		3		A		—
13	製造用剤	11	FA003200	E00011	5'-アデニル酸		1		A		—
13	製造用剤	29		E00030	イナワラ灰抽出物		5		B		○
13	製造用剤	42		E00043	オゾン		4		B		—
13	製造用剤	42		E00043B	オゾン水		4		B		—
13	製造用剤	43		E00044	オリゴガラクチュロン酸		5		B		○
13	製造用剤	45		E00047	オレガノ抽出物		5		A		—
13	製造用剤	47		E00049	海藻灰抽出物		4		A		—
13	製造用剤	48	FA012500	E00050	カオリン		1		B		—
13	製造用剤	51		E00053	花こう斑岩		4		B		—
13	製造用剤	54	FA013200	E00056	活性炭		1		A		—
13	製造用剤	55	FA013300	E00057	活性白土		1		A		—
13	製造用剤	99		E00105	クリストバル石		5		B		○
13	製造用剤	115	FA021550	E00122	くん液		3		A		—
13	製造用剤	115		E00123	木酢液		2		B		—
13	製造用剤	115		E00124	リキッドスモーク		2		B		—
13	製造用剤	116	FA021800	E00125	ケイソウ土		1		A		—
13	製造用剤	118		E00127	高級脂肪酸		5	◇	A	☆	—
13	製造用剤	118		E00127	高級脂肪酸	高級脂肪酸(カプリル酸)	1				—
13	製造用剤	118		E00127	高級脂肪酸	高級脂肪酸(カプリン酸)	1				—
13	製造用剤	118		E00127	高級脂肪酸	高級脂肪酸(ステアリン酸)	1				—
13	製造用剤	118		E00127	高級脂肪酸	高級脂肪酸(パルミチン酸)	1				—
13	製造用剤	118		E00127	高級脂肪酸	高級脂肪酸(ベヘニン酸)	1				—
13	製造用剤	118		E00127	高級脂肪酸	高級脂肪酸(ミリスチン酸)	1				—
13	製造用剤	118		E00127	高級脂肪酸	高級脂肪酸(ラウリル酸)	1				—
13	製造用剤	131	FA023700	E00138	骨炭		1		A		—
13	製造用剤	133		E00141	ゴマ柄灰抽出物		5		B		○
13	製造用剤	142	FA027000	E00150	酸性白土		1		A		—
13	製造用剤	144		E00152	酸素		4		A		—
13	製造用剤	150	FA028100	E00161	シクロデキストリン	α-シクロデキストリン	1		A		—
13	製造用剤	150	FA028100	E00161	シクロデキストリン	β-シクロデキストリン	1				—
13	製造用剤	150	FA028100	E00161	シクロデキストリン	γ-シクロデキストリン	1				—
13	製造用剤	150	FA028100	E00161	シクロデキストリン	分岐シクロデキストリン	3				—
13	製造用剤	153		E00164	シソ抽出物		4		A		—
13	製造用剤	155	FA028800	E00166	5'-シチジル酸		1		A		—
13	製造用剤	158		E00169	焼成カルシウム		5	◇	A	☆	—
13	製造用剤/ 強化剤	158	FA008950	E00170	うに殻焼成カルシウム		2		B		—
13	製造用剤/ 強化剤	158	FA012400	E00171	貝殻焼成カルシウム		1		A		—
13	製造用剤/ 強化剤	158	FA023600	E00172	骨焼成カルシウム		1		A		—
13	製造用剤/ 強化剤	158	FA035750	E00173	造礁サンゴ焼成カルシウム		2		A		—
13	製造用剤/ 強化剤	158	FA044250	E00174	乳清焼成カルシウム		3		A		—
13	製造用剤	158	FA063400	E00175	卵殻焼成カルシウム		1		A		—
13	製造用剤	163		E00179	水素		5		A		—

表 2 既存添加物の流通実態の調査結果（その 10）

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	規格の制定状況		流通の状況		規格がなく、流通の報告がない品目
			全体コード	既存コード							
13	製造用剤	168	FA035550	E00184	生石灰		1		A		—
13	製造用剤	171		E00187	ゼイン		5		A		—
13	製造用剤	172		E00188	ゼオライト		5		B		○
13	製造用剤	174		E00190	セピオライト		5		B		○
13	製造用剤	178	FA035800	E00194	粗製海水塩化マグネシウム		1		A		—
13	製造用剤	179		E00195	ソバ柄灰抽出物		5		B		○
13	製造用剤	193		E00209	タンニン(抽出物)		5	◇	A	☆	—
13	製造用剤	193		E00210	柿タンニン		4		A		—
13	製造用剤	193	FA031400	E00211	植物タンニン		1		A		—
13	製造用剤	193		E00212	ミモザタンニン		4		B		—
13	製造用剤	195		E00214	窒素		4		A		—
13	製造用剤	196		E00215	チャ乾留物		4		A		—
13	製造用剤/強化剤	207		E00226	鉄		4		B		—
13	製造用剤	209		E00228	銅		5		B		○
13	製造用剤	222		E00241	トレハロース		3		A		—
13	製造用剤	226		E00245	ナフサ		5		B		○
13	製造用剤	232		E00251	ニッケル		4		A		—
13	製造用剤	234		E00253	ばい煎コメヌカ抽出物		4		B		—
13	製造用剤	235		E00254	ばい煎ダイズ抽出物		4		B		—
13	製造用剤	237		E00256	白金		5		B		○
13	製造用剤	240	FA045000	E00259	パーライト		1		A		—
13	製造用剤	241		E00260	パラジウム		5		B		○
13	製造用剤	244		E00263	ヒアルロン酸		3		A		—
13	製造用剤	245	FA046400	E00264	微結晶セルロース		1		A		—
13	製造用剤	251		E00270	ひる石		5		B		○
13	製造用剤	257		E00276	フィチン(抽出物)		3		A		—
13	製造用剤	260		E00280	ブタン		4		B		—
13	製造用剤	269		E00289	プロパン		4		B		—
13	製造用剤	274	FA053900	E00293	粉末セルロース		1		A		—
13	製造用剤	277	FA054100	E00296	ヘキサン		1		A		—
13	製造用剤	290		E00310	ヘプタン		3		A		—
13	製造用剤	294	FA056000	E00314	ヘム鉄		1		A		—
13	製造用剤	295		E00315	ヘリウム		4		B		—
13	製造用剤	296	FA056700	E00316	ベントナイト		1		A		—
13	製造用剤	311		E00331	未焼成カルシウム		5	◇	A	☆	—
13	製造用剤/強化剤	311		E00332	貝殻未焼成カルシウム		4		A		—
13	製造用剤/強化剤	311		E00333	骨未焼成カルシウム		5		B		○
13	製造用剤/強化剤	311	FA026900	E00334	サンゴ未焼成カルシウム		1		A		—
13	製造用剤/強化剤	311		E00335	真珠層未焼成カルシウム		5		B		○
13	製造用剤/強化剤	311		E00336	卵殻未焼成カルシウム		4		A		—
13	製造用剤	320		E00345	メバロン酸		3		B		—
13	製造用剤	324		E00349	木材チップ		4		B		—
13	製造用剤	325		E00350	木炭		4		A		—
13	製造用剤	327		E00352	木灰		4		B		—
13	製造用剤	328		E00353	木灰抽出物		4		B		—
13	製造用剤	334	FA062900	E00359	ラクトフェリン濃縮物		1		A		—
13	製造用剤	345	FA066100	E00369	流動パラフィン		1		B		—
13	製造用剤	346		E00370	リンターセルロース		5		B		○
13	製造用剤	349		E00376	ルテニウム		4		B		—
14	香辛料抽出物	119	FA022350	E00128	香辛料抽出物		2		A		—

表 2 の集計

集計項目	項目数
流通実態が確認できた品目（規格名称数）	281
流通実態が確認できなかった品目（規格名称数）	102
部分規格などで、当該成分規格名では流通実態が確	

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 1）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認で きた品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
1	甘味料	20	FA004800	E00020	L-アラビノース	L-アラビノース		1	
1	甘味料	74	FA015600	E00079	カンゾウ抽出物	カンゾウ抽出物（粗製物）	1		
1	甘味料	74	FA015700	E00079B	カンゾウ抽出物	カンゾウ抽出物（精製物）	1		
1	甘味料	79	FA016600	E00084	D-キシロース	D-キシロース	1		
1	甘味料	106	FA019400	E00112	α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア	α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア	1		
1	甘味料	106	FA019500	E00112B	α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア	α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビアオール配糖体	1		
1	甘味料	125	FA023000	E00133	酵素分解カンゾウ	酵素分解カンゾウ	1		
1	甘味料	164	FA035200	E00180	ステビア抽出物	ステビア抽出物	1		
1	甘味料	164	FA035300	E00180B	ステビア抽出物	ステビアオール配糖体	1		
1	甘味料	165		E00181	ステビア末			1	
1	甘味料	183	FA036500	E00199	タウマチン	タウマチン	1		
1	甘味料	264		E00284	ブラジルカンゾウ抽出物			1	
1	甘味料	332	FA062200	E00357	ラカンカ抽出物	ラカンカ抽出物	1		
1	甘味料	338	FA063300	E00363	L-ラムノース	L-ラムノース	1		
1	甘味料	344	FA064400	E00368	D-リボース	D-リボース		1	
2	着色料	12	FA003400	E00012	アナトー色素	アナトー色素（ノルビキシン）	1		
2	着色料	12	FA003500	E00012B	アナトー色素	アナトー色素（ビキシン）	1		
2	着色料	24		E00024	アルミニウム			1	
2	着色料	34	FA008900	E00035	ウコン色素	ウコン色素	1		
2	着色料	46		E00048	オレンジ色素			1	
2	着色料	49	FA012600	E00051	カカオ色素	カカオ色素	1		
2	着色料	50	FA012650	E00052	カキ色素	カキ色素	1		
2	着色料	64	FA014000	E00069	カラメルⅠ	カラメルⅠ	1		
2	着色料	65	FA014100	E00070	カラメルⅡ	カラメルⅡ	1		
2	着色料	66	FA014200	E00071	カラメルⅢ	カラメルⅢ	1		
2	着色料	67	FA014300	E00072	カラメルⅣ	カラメルⅣ	1		
2	着色料	71	FA015100	E00076	カロブ色素	カロブ色素		1	
2	着色料・ 製造用剤	87		E00093	金		1		
2	着色料・ 製造用剤	88		E00094	銀		1		
2	着色料	94	FA018100	E00100	クチナシ青色素	クチナシ青色素	1		
2	着色料	95	FA018200	E00101	クチナシ赤色素	クチナシ赤色素	1		
2	着色料	96	FA018300	E00102	クチナシ黄色素	クチナシ黄色素	1		
2	着色料	113		E00120	クロロフィリン			1	
2	着色料	114	FA021500	E00121	クロロフィル	クロロフィル	1		
2	着色料	129	FA023400	E00136	コウリヤン色素	コウリヤン色素	1		
2	着色料	130	FA023500	E00137	コチニール色素	コチニール色素	1		
2	着色料	154	FA028750	E00165	シタン色素	シタン色素		1	
2	着色料	160	FA031450	E00177	植物炭末色素	植物炭末色素	1		
2	着色料	166	FA035400	E00182	スピルリナ色素	スピルリナ色素	1		
2	着色料	185	FA036700	E00201	タマネギ色素	タマネギ色素	1		
2	着色料	186	FA036800	E00202	タマリンド色素	タマリンド色素	1		
2	着色料	208	FA040100	E00227	デュナリエラカロテン	デュナリエラカロテン	1		
2	着色料	210	FA040400	E00229	トウガラシ色素	トウガラシ色素	1		
2	着色料	217	FA041500	E00236	トマト色素	トマト色素	1		
2	着色料	233	FA044300	E00252	ニンジンカロテン	ニンジンカロテン	1		
2	着色料	239	FA044900	E00258	パーム油カロテン	パーム油カロテン	1		
2	着色料	248	FA047100	E00267	ビートレッド	ビートレッド	1		

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 2）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認で きた品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
2	着色料	253		E00272	ファフィア色素			1	B
2	着色料	261	FA051600	E00281	ブドウ果皮色素	ブドウ果皮色素	1		
2	着色料	276		E00295	ベカンナツツ色素			1	A
2	着色料	284	FA055100	E00304	ベニコウジ黄色素	ベニコウジ黄色素	1		
2	着色料	285	FA055200	E00305	ベニコウジ色素	ベニコウジ色素	1		
2	着色料	286	FA055300	E00306	ベニバナ赤色素	ベニバナ赤色素	1		
2	着色料	287	FA055400	E00307	ベニバナ黄色素	ベニバナ黄色素	1		
2	着色料	292	FA055800	E00312	ヘマトコッカス藻 色素	ヘマトコッカス藻色素	1		
2	着色料	308	FA058700	E00328	マリーゴールド色 素	マリーゴールド色素	1		
2	着色料	315	FA059400	E00340	ムラサキイモ色素	ムラサキイモ色素	1		
2	着色料	316	FA059500	E00341	ムラサキトウモロコ シ色素	ムラサキトウモロコシ色素	1		
2	着色料	317		E00342	ムラサキヤマイモ 色素			1	
2	着色料	335	FA063000	E00360	ラック色素	ラック色素	1		
2	着色料	354		E00382	ログウッド色素			1	A
3	製造用剤 /日持	63	FA013900	E00068	カラシ抽出物	カラシ抽出物	1		
3	保存料	73	FA015250	E00078	カワラヨモギ抽出 物	カワラヨモギ抽出物		1	
3	製造用剤 /日持	111		E00117	グレープフルーツ 種子抽出物		1		
3	製造用剤 /日持	157		E00168	ショウガ抽出物			1	
3	製造用剤 /日持	162	FA033600	E00178	しらこたん白抽出 物	しらこたん白抽出物	1		
3	製造用剤 /日持	170	FA035580	E00186	セイヨウワサビ抽出 物	セイヨウワサビ抽出物		1	
3	保存料	201	FA038900	E00220	ツヤプリシン（抽出 物）	ツヤプリシン（抽出物）		1	
3	製造用剤 /日持	211	FA040450	E00230	トウガラシ水性抽出 物	トウガラシ水性抽出物	1		
3	製造用剤 /日持	262		E00282	ブドウ果皮抽出物			1	
3	製造用剤 /日持	263	FA051700	E00283	ブドウ種子抽出物	ブドウ種子抽出物		1	
3	製造用剤 /日持	280	FA054700	E00299	ペクチン分解物	ペクチン分解物	1		
3	製造用剤 /日持	302	FA058100	E00322	εーポリリン	εーポリリン	1		
3	製造用剤 /日持	322		E00347	モウソウチク乾留 物		1		
3	製造用剤 /日持	323		E00348	モウソウチク抽出 物			1	
4	増粘安定 剤	1		E00001	アウレオバシジウ ム培養液（液体 品）			1	
4	増粘安定 剤	4	FA000650	E00004	アグロバクテリウム スクシノグリカン	アグロバクテリウムスクシ ノグリカン	1		
4	増粘安定 剤	13		E00013	アマシードガム			1	
4	増粘安定 剤	18	FA004700	E00018	アラビアガム	アラビアガム	1		
4	増粘安定 剤	19		E00019	アラビノガラクトン			1	

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 3）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認で きた品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
4	増粘安定 剤	22	FA005400	E00022	アルギン酸	アルギン酸	1		
4	増粘安定 剤	33	FA008800	E00034	ウエランガム	ウエランガム		1	B
4	増粘安定 剤 / ガム ベース	39	FA010850	E00040	エレミ樹脂	エレミ樹脂		1	
4	増粘安定 剤	52		E00054	カシアガム		1		
4	増粘安定 剤	56	FA013400	E00058	ガティガム	ガティガム	1		
4	増粘安定 剤	58	FA013500	E00060	カードラン	カードラン	1		
4	増粘安定 剤	60		E00062	カラギナン		1		
4	増粘安定 剤	60	FA012700	E00063	加工ユーケマ藻 類	加工ユーケマ藻類	1		
4	増粘安定 剤	60	FA035500	E00064	精製カラギナン	精製カラギナン	1		
4	増粘安定 剤	60		E00065	ユーケマ藻末			1	
4	増粘安定 剤	68	FA014400	E00073	カラヤガム	カラヤガム	1		
4	増粘安定 剤	72	FA015200	E00077	カロブピーンガム	カロブピーンガム	1		
4	増粘安定 剤	77	FA016200	E00082	キサンタンガム	キサンタンガム	1		
4	増粘安定 剤	81		E00086	キチン		1		
4	増粘安定 剤・製 造 用剤	83		E00088	キトサン		1		
4	増粘安定 剤	89	FA017000	E00095	グァーガム	グァーガム	1		
4	増粘安定 剤	90	FA017050	E00096	グァーガム酵素分 解物	グァーガム酵素分解物	1		
4	増粘安定 剤	102	FA019050	E00108	グルコサミン	グルコサミン	1		
4	増粘安定 剤	128	FA023300	E00135	酵母細胞壁	酵母細胞壁		1	
4	増粘安定 剤	139	FA024400	E00147	サイリウムシードガ ム	サイリウムシードガム	1		
4	増粘安定 剤・製 造 用剤	141	FA026450	E00149	サバクヨモギシード ガム	サバクヨモギシードガム		1	
4	増粘安定 剤	148	FA028000	E00159	ジェランガム	ジェランガム	1		
4	増粘安定 剤	187	FA036900	E00203	タマリンドシードガ ム	タマリンドシードガム	1		
4	増粘安定 剤	188	FA037000	E00204	タラガム	タラガム	1		
4	増粘安定 剤	206	FA039600	E00225	デキストラン	デキストラン		1	
4	増粘安定 剤	218	FA041600	E00237	トラガントガム	トラガントガム	1		
4	増粘安定 剤	224		E00243	トロロアオイ			1	

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 4）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認で きた品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
4	増粘安定 剤・製 造 用剤	225	FA042900	E00244	納豆菌ガム	納豆菌ガム	1		
4	増粘安定 剤	246	FA046500	E00265	微小繊維状セル ロース	微小繊維状セルロース		1	
4	増粘安定 剤	252		E00271	ファーセラレン			1	
4	増粘安定 剤	259	FA051100	E00279	フクロノリ抽出物	フクロノリ抽出物		1	
4	増粘安定 剤	267	FA052400	E00287	ブルラン	ブルラン	1		
4	増粘安定 剤	279	FA054600	E00298	ペクチン	ペクチン	1		
4	増粘安定 剤	304	FA058600	E00324	マクロホモブシス ガム	マクロホモブシスガム		1	
4	増粘安定 剤	329		E00354	モモ樹脂			1	
4	増粘安定 剤	337	FA063200	E00362	ラムザンガム	ラムザンガム		1	
5	酸化防止 剤	31	FA008400	E00032	イノシトール	myo-イノシトール	1		
5	酸化防止 剤	44	FA012000	E00045	γ-オリザノール	γ-オリザノール		1	
5	酸化防止 剤	57		E00059	カテキン		1		
5	酸化防止 剤/日持	75	FA015720	E00080	カンゾウ油性抽出 物	カンゾウ油性抽出物	1		
5	酸化防止 剤	91		E00097	グアヤク脂			1	A
5	酸化防止 剤	93	FA017150	E00099	クエルセチン	クエルセチン		1	
5	酸化防止 剤/日持	112		E00119	クローブ抽出物		1		
5	酸化防止 剤	120	FA022700	E00129	酵素処理イソクエ ルシトリン	酵素処理イソクエルシトリ ン	1		
5	酸化防止 剤	122	FA022800	E00131	酵素処理ヘスペリ ジン	酵素処理ヘスペリジン	1		
5	酸化防止 剤	123	FA022900	E00132	酵素処理ルチン (抽出物)	酵素処理ルチン(抽出 物)	1		
5	酸化防止 剤	126		E00134	酵素分解リンゴ抽 出物			1	
5	酸化防止 剤	132		E00140	ゴマ油不けん化 物			1	
5	酸化防止 剤	136	FA024100	E00144	コメヌカ油抽出物	コメヌカ油抽出物		1	
5	酸化防止 剤	137		E00145	コメヌカ酵素分解 物			1	
5	酸化防止 剤	145	FA027500	E00154	シアノコバラミン	シアノコバラミン	1		
5	酸化防止 剤	169	FA035560	E00185	精油除去ウイキョ ウ抽出物	精油除去ウイキョウ抽出 物		1	
5	酸化防止 剤	173		E00189	セージ抽出物			1	
5	酸化防止 剤	191		E00207	単糖・アミノ酸複 合物		1		
5	酸化防止 剤	197	FA038750	E00216	チャ抽出物	チャ抽出物	1		
5	酸化防止 剤	213	FA040800	E00232	トコリエノール	トコリエノール	1		

表3 既存添加物の使用実態の調査結果（その5）

部会	用途分類	既存添加物番号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実態が確認できた品目 =1	使用実態が確認できなかった品目 =1	消除予定添加物 A：令和6年度 消除予定添加物名簿記載 B：令和6年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コード	既存コード					
5	酸化防止剤	214	FA040900	E00233	d- α -トコフェロール	d- α -トコフェロール	1		
5	酸化防止剤	215	FA041000	E00234	d- γ -トコフェロール	d- γ -トコフェロール	1		
5	酸化防止剤	216	FA041100	E00235	d- δ -トコフェロール	d- δ -トコフェロール	1		
5	酸化防止剤	227		E00246	生コーヒー豆抽出物	生コーヒー豆抽出物（ペースト品、液体品）	1		
5	酸化防止剤	250		E00269	ヒマワリ種子抽出物			1	
5	酸化防止剤	258	FA050700	E00278	フェルラ酸	フェルラ酸	1		
5	酸化防止剤	270		E00290	プロポリス抽出物			1	A
5	酸化防止剤	282	FA054900	E00302	ヘスペリジン	ヘスペリジン	1		
5	酸化防止剤	299	FA056950	E00319	没食子酸	没食子酸		1	
5	酸化防止剤	312	FA059200	E00337	ミックストコフェロール	ミックストコフェロール	1		
5	酸化防止剤	319	FA061500	E00344	メナキノン（抽出物）	メナキノン（抽出物）		1	
5	酸化防止剤	321		E00346	メラロイカ精油			1	
5	酸化防止剤	330	FA061900	E00355	ヤマモモ抽出物	ヤマモモ抽出物	1		
5	酸化防止剤	347	FA068100	E00371	ルチン酵素分解物	ルチン酵素分解物		1	
5	酸化防止剤	348		E00372	ルチン（抽出物）	ルチン（抽出物）	1		
5	酸化防止剤	348	FA011500	E00373	エンジュ抽出物	ルチン（抽出物）	1		
5	酸化防止剤	348	FA068120	E00374	アズキ全草抽出物	ルチン（抽出物）		1	
5	酸化防止剤	348	FA068120	E00375	ソバ全草抽出物	ルチン（抽出物）		1	
5	酸化防止剤	357		E00385	ローズマリー抽出物		1		
6	ガムベース・光沢剤	35	FA009050	E00036	ウルシロウ	ウルシロウ	1		
6	ガムベース	41		E00042	オゾケライト			1	A
6	ガムベース・光沢剤	69	FA014600	E00074	カルナウバロウ	カルナウバロウ	1		
6	ガムベース・光沢剤	76	FA015800	E00081	カンデリラロウ	カンデリラロウ	1		
6	ガムベース	92		E00098	グアヤク樹脂			1	A
6	ガムベース	97		E00103	グッタハンカン			1	A
6	ガムベース	98		E00104	グッタペルカ			1	A
6	ガムベース	134		E00142	ゴム		1		
6	ガムベース	135		E00143	ゴム分解樹脂			1	A
6	ガムベース・光沢剤	138	FA024150	E00146	コメヌカロウ	コメヌカロウ	1		
6	ガムベース・光沢剤	140	FA026420	E00148	サトウキビロウ	サトウキビロウ	1		
6	ガムベース・光沢剤	146		E00155	シェラック		1		
6	ガムベース・光沢剤	146	FA027800	E00156	白シェラック	シェラック（白シェラック）	1		
6	ガムベース・光沢剤	146	FA027900	E00157	精製シェラック	シェラック（精製シェラック）	1		

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 6）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認で きた品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
6	ガムベース・ 光沢剤	147	FA027950	E00158	シェラックロウ	シェラックロウ	1		
6	ガムベース	149	FA028050	E00160	ジェルトン	ジェルトン	1		
6	ガムベース	180		E00196	ソルバ			1	A
6	ガムベース	181		E00197	ソルビンハ			1	A
6	ガムベース・ 光沢剤	189	FA037100	E00205	タルク	タルク	1		
6	ガムベース	194	FA038720	E00213	チクル	チクル	1		
6	ガムベース	198		E00217	チルテ			1	A
6	ガムベース	200		E00219	ツヌー			1	A
6	ガムベース	203		E00222	低分子ゴム			1	A
6	ガムベース	230		E00249	ニガーグッタ			1	A
6	ガムベース・ 光沢剤	242	FA045600	E00261	パラフィンワックス	パラフィンワックス		1	
6	ガムベース	275		E00294	粉末モミガラ			1	
6	ガムベース	288		E00308	ベネズエラチクル			1	A
6	ガムベース	300		E00320	ホホバロウ			1	A
6	ガムベース・ 光沢剤	303	FA058500	E00323	マイクロクリスタリ ンワックス	マイクロクリスタリンワッ クス	1		
6	ガムベース	305		E00325	マスチック			1	
6	ガムベース	306		E00326	マッサランドバチョ コレート			1	A
6	ガムベース	307		E00327	マッサランドババ ラタ			1	A
6	ガムベース・ 光沢剤	313	FA059300	E00338	ミツロウ	ミツロウ	1		
6	ガムベース	314	FA059350	E00339	ミルラ	ミルラ		1	
6	ガムベース・ 光沢剤	326	FA061750	E00351	モクロウ	モクロウ	1		
6	ガムベース・ 光沢剤	336	FA063100	E00361	ラノリン	ラノリン		1	
6	ガムベース	351		E00378	レッチュデバカ			1	A
6	ガムベース	355		E00383	ロシディンハ			1	A
6	ガムベース	356	FA068450	E00384	ロシン	ロシン	1		
7	酵素	2	FA000500	E00002	アガラーゼ	アガラーゼ	1		
7	酵素	3	FA000600	E00003	アクチニジン	アクチニジン	1		B
7	酵素	5	FA001000	E00005	アシラーゼ	アシラーゼ	1		
7	酵素	6	FA001200	E00006	アスコルビン酸オ キシダーゼ	アスコルビン酸オキシダ ーゼ	1		
7	酵素	10	FA002900	E00010	α －アセトラクタ ートデカルボキシ ラーゼ	α －アセトラクタートデカ ルボキシラーゼ		1	
6	ガムベース・ 光沢剤	336	FA063100	E00361	ラノリン	ラノリン		1	
6	ガムベース	351		E00378	レッチュデバカ			1	A
6	ガムベース	355		E00383	ロシディンハ			1	A
6	ガムベース	356	FA068450	E00384	ロシン	ロシン	1		
7	酵素	2	FA000500	E00002	アガラーゼ	アガラーゼ	1		
7	酵素	3	FA000600	E00003	アクチニジン	アクチニジン	1		B
7	酵素	5	FA001000	E00005	アシラーゼ	アシラーゼ	1		
7	酵素	6	FA001200	E00006	アスコルビン酸オ キシダーゼ	アスコルビン酸オキシダ ーゼ	1		
7	酵素	10	FA002900	E00010	α －アセトラクタ ートデカルボキシ ラーゼ	α －アセトラクタートデカ ルボキシラーゼ		1	
6	ガムベース・ 光沢剤	336	FA063100	E00361	ラノリン	ラノリン		1	
6	ガムベース	351		E00378	レッチュデバカ			1	A

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 7）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認でき た品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
6	ガムベース	355		E00383	ロシディンハ			1	A
6	ガムベース	356	FA068450	E00384	ロシン	ロシン	1		
7	酵素	2	FA000500	E00002	アガラーゼ	アガラーゼ	1		
7	酵素	3	FA000600	E00003	アクチニジン	アクチニジン	1		B
7	酵素	5	FA001000	E00005	アシラーゼ	アシラーゼ	1		
7	酵素	6	FA001200	E00006	アスコルビン酸オ キシダーゼ	アスコルビン酸オキシダ ーゼ	1		
7	酵素	10	FA002900	E00010	α - アセトラクタ ートデカルボキシ ラーゼ	α - アセトラクタートデカ ルボキシラーゼ		1	
7	酵素	14	FA003900	E00014	アミノペプチダー ゼ	アミノペプチダーゼ	1		
7	酵素	15	FA004000	E00015	α - アミラーゼ	α - アミラーゼ	1		
7	酵素	16	FA004100	E00016	β - アミラーゼ	β - アミラーゼ	1		
7	酵素	23	FA006000	E00023	アルギン酸リアー ゼ	アルギン酸リアーゼ	1		
7	酵素	25	FA006300	E00025	アントシアナーゼ	アントシアナーゼ	1		B
7	酵素	26	FA007000	E00026	イソアミラーゼ	イソアミラーゼ	1		
7	酵素	28	FA008150	E00028	イソマルトデキスト ラナーゼ	イソマルトデキストラナー ゼ	1		B
7	酵素	30	FA008300	E00031	イヌリナーゼ	イヌリナーゼ	1		
7	酵素	32	FA008700	E00033	インベルターゼ	インベルターゼ	1		
7	酵素	36	FA009100	E00037	ウレアーゼ	ウレアーゼ	1		
7	酵素	37	FA009300	E00038	エキソマルトテトラ オヒドロラーゼ	エキソマルトテトラオヒド ロラーゼ	1		
7	酵素	38	FA009400	E00039	エステラーゼ	エステラーゼ	1		
7	酵素	53	FA013100	E00055	カタラーゼ	カタラーゼ	1		
7	酵素	61	FA013700	E00066	α - ガラクトシダ ーゼ	α - ガラクトシダーゼ	1		
7	酵素	62	FA013800	E00067	β - ガラクトシダ ーゼ	β - ガラクトシダーゼ	1		
7	酵素	70	FA014700	E00075	カルボキシペプチ ダーゼ	カルボキシペプチダー ゼ	1		
7	酵素	78	FA016400	E00083	キシラナーゼ	キシラナーゼ	1		
7	酵素	80	FA016700	E00085	キチナーゼ	キチナーゼ	1		
7	酵素	82	FA016800	E00087	キトサナーゼ	キトサナーゼ	1		
7	酵素	100	FA018900	E00106	グルカナナーゼ	グルカナナーゼ	1		
7	酵素	101	FA019000	E00107	グルコアミラーゼ	グルコアミラーゼ	1		
7	酵素	103	FA019100	E00109	α - グルコシダー ゼ	α - グルコシダーゼ	1		
7	酵素	104	FA019200	E00110	β - グルコシダー ゼ	β - グルコシダーゼ	1		
7	酵素	105	FA019300	E00111	α - グルコシルト ランスフェラーゼ	α - グルコシルトランス フェラーゼ	1		
7	酵素	107	FA019600	E00113	グルコースイソメラ ーゼ	グルコースイソメラーゼ	1		
7	酵素	108	FA019700	E00114	グルコースオキシ ダーゼ	グルコースオキシダーゼ	1		
7	酵素	109	FA020600	E00115	グルタミナーゼ	グルタミナーゼ	1		
7	酵素	143	FA027100	E00151	酸性ホスファター ゼ	酸性ホスファターゼ	1		
7	酵素	151	FA028400	E00162	シクロデキストリン グルカノトランスフ ェラーゼ	シクロデキストリングルカ ノトランスフェラーゼ	1		
7	酵素	176	FA035700	E00192	セルラーゼ	セルラーゼ	1		
7	酵素	192	FA038000	E00208	タンナーゼ	タンナーゼ	1		

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 8）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認でき た品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
7	酵素	202	FA039100	E00221	5'-デアミナーゼ	5'-デアミナーゼ	1		
7	酵素	205	FA039500	E00224	デキストラナーゼ	デキストラナーゼ	1		
7	酵素	219	FA041700	E00238	トランスグルコシダーゼ	トランスグルコシダーゼ	1		
7	酵素	220	FA041800	E00239	トランスグルタミナーゼ	トランスグルタミナーゼ	1		
7	酵素	221	FA041900	E00240	トリプシン	トリプシン	1		
7	酵素	223	FA042600	E00242	トレハロースホスホリラーゼ	トレハロースホスホリラーゼ	1		B
7	酵素	228	FA043100	E00247	ナリンジナーゼ	ナリンジナーゼ	1		
7	酵素	236	FA044600	E00255	パーオキシダーゼ	パーオキシダーゼ	1		
7	酵素	238	FA044800	E00257	パパイン	パパイン	1		
7	酵素	243	FA046000	E00262	バンクレアチン	バンクレアチン	1		
7	酵素	254	FA049700	E00273	フィシン	フィシン	1		
7	酵素	255	FA049800	E00274	フィターゼ	フィターゼ	1		
7	酵素	265	FA052100	E00285	フルクトシルトランスフェラーゼ	フルクトシルトランスフェラーゼ	1		
7	酵素	266	FA052300	E00286	ブルナーゼ	ブルナーゼ	1		
7	酵素	268	FA052500	E00288	プロテアーゼ	プロテアーゼ	1		
7	酵素	271	FA053600	E00291	プロメライン	プロメライン	1		
7	酵素	278	FA054500	E00297	ペクチナーゼ	ペクチナーゼ	1		
7	酵素	281	FA054800	E00301	ヘスペリジナーゼ	ヘスペリジナーゼ	1		
7	酵素	289	FA055500	E00309	ペプシン	ペプシン	1		
7	酵素	291	FA055700	E00311	ペプチダーゼ	ペプチダーゼ	1		
7	酵素	293	FA055900	E00313	ヘミセルラーゼ	ヘミセルラーゼ	1		
7	酵素	297	FA056800	E00317	ホスホジエステラーゼ	ホスホジエステラーゼ	1		
7	酵素	298	FA056900	E00318	ホスホリパーゼ	ホスホリパーゼ	1		
7	酵素	301	FA057900	E00321	ポリフェノールオキシダーゼ	ポリフェノールオキシダーゼ	1		
7	酵素	309	FA058800	E00329	マルトースホスホリラーゼ	マルトースホスホリラーゼ	1		B
7	酵素	310	FA058900	E00330	マルトトリオヒドローラーゼ	マルトトリオヒドローラーゼ	1		
7	酵素	318	FA059600	E00343	ムラミダーゼ	ムラミダーゼ	1		
7	酵素	333	FA062800	E00358	ラクトパーオキシダーゼ	ラクトパーオキシダーゼ	1		
7	酵素	341	FA064000	E00365	リゾチーム	リゾチーム	1		
7	酵素	342	FA064200	E00366	リパーゼ	リパーゼ	1		
7	酵素	343	FA064300	E00367	リボキシゲナーゼ	リボキシゲナーゼ	1		B
7	酵素	352	FA068300	E00380	レンネット	レンネット	1		
8	酸味料	256	FA049900	E00275	フィチン酸	フィチン酸(液体)	1		
9	調味料, 強化剤	7	FA001800	E00007	L-アスパラギン	L-アスパラギン		1	
9	調味料, 強化剤	8	FA001900	E00008	L-アスパラギン酸	L-アスパラギン酸	1		
9	調味料, 強化剤	17	FA004500	E00017	L-アラニン	L-アラニン	1		
9	調味料, 強化剤	17	FA004600	E00017B	L-アラニン	L-アラニン液		1	
9	調味料, 強化剤	21	FA005200	E00021	L-アルギニン	L-アルギニン	1		
9	苦味料等	27	FA007150	E00027	イソアルファー 苦味酸	イソアルファー 苦味酸	1		
9	調味料	40	FA011550	E00041	塩水湖水低塩化ナトリウム液	塩水湖水低塩化ナトリウム液		1	
9	苦味料等	59	FA013600	E00061	カフェイン(抽出物)	カフェイン(抽出物)	1		

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 9）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認で きた品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
9	苦味料等	84		E00089	キナ抽出物			1	
9	苦味料等	85		E00090	キハダ抽出物			1	
9	調味料， 強化剤	110	FA020800	E00116	L-グルタミン	L-グルタミン	1		
9	苦味料等	117	FA022300	E00126	ゲンチアナ抽出物	ゲンチアナ抽出物	1		
9	苦味料等	121		E00130	酵素処理ナリンジン		1		
9	調味料， 強化剤	152	FA028600	E00163	L-シスチン	L-シスチン	1		
9	苦味料等	156	FA030150	E00167	ジャマイカカシア抽出物	ジャマイカカシア抽出物		1	
9	調味料， 強化剤	175	FA035600	E00191	L-セリン	L-セリン	1		
9	調味料	177	FA035780	E00193	粗製海水塩化カリウム	粗製海水塩化カリウム		1	
9	調味料， 強化剤	184	FA036600	E00200	タウリン(抽出物)	タウリン(抽出物)		1	
9	調味料， 強化剤	199	FA038800	E00218	L-チロシン	L-チロシン		1	
9	苦味料等	204		E00223	テオプロミン			1	A
9	調味料・ 苦味料	229	FA043200	E00248	ナリンジン	ナリンジン	1		
9	苦味料等	231		E00250	ニガヨモギ抽出物			1	
9	調味料， 強化剤	247	FA046600	E00266	L-ヒスチジン	L-ヒスチジン	1		
9	調味料・ 強化剤	249	FA047800	E00268	L-ヒドロキシプロリン	L-ヒドロキシプロリン		1	
9	調味料， 強化剤	272	FA053700	E00292	L-プロリン	L-プロリン	1		
9	調味料， 強化剤	272	FA053800	E00292B	L-プロリン	L-プロリン液		1	
9	調味料	283	FA055000	E00303	ベタイン	ベタイン		1	
9	調味料， 強化剤	340	FA063500	E00364	L-リシン	L-リシン	1		
9	調味料， 強化剤	340	FA063600	E00364B	L-リシン	L-リシン液		1	
9	苦味料等	350	FA068150	E00377	レイシ抽出物	レイシ抽出物(子実体)		1	A(子実体以外が対象)
9	調味料， 強化剤	353	FA068400	E00381	L-ロイシン	L-ロイシン	1		
10	乳化剤	86	FA016900	E00092	キラヤ抽出物	キラヤ抽出物	1		
10	乳化剤	124	FA022950	E00386	酵素処理レシチン	酵素処理レシチン	1		
10	乳化剤	127	FA023100	E00387	酵素分解レシチン	酵素分解レシチン	1		
10	乳化剤	159	FA031200	E00176	植物性ステロール	植物性ステロール(遊離体高濃度品)	1		
10	乳化剤	159	FA031300	E00176B	植物性ステロール	植物性ステロール(遊離体低濃度品)	1		
10	乳化剤	161	FA068200	E00388	植物レシチン	レシチン	1		
10	乳化剤	167		E00183	スフィンゴ脂質		1		
10	乳化剤	182		E00198	ダイズサポニン			1	
10	乳化剤	190		E00206	胆汁末			1	A
10	乳化剤	212	FA040700	E00231	動物性ステロール	動物性ステロール		1	
10	乳化剤	273	FA068200	E00389	分別レシチン	レシチン	1		
10	乳化剤	331	FA062000	E00356	ユッカフォーム抽出物	ユッカフォーム抽出物		1	

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 10）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認でき た品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
10	乳化剤	339	FA068200	E00390	卵黄レシチン	レシチン		1	
13	製造用剤	9	FA002150	E00009	アスペルギルスステ レウス糖たん白質	アスペルギルスステ レウス糖たん白質		1	
13	製造用剤	11	FA003200	E00011	5'-アデニル酸	5'-アデニル酸		1	
13	製造用剤	29		E00030	イナワラ灰抽出物			1	A
13	製造用剤	42		E00043	オゾン			1	
13	製造用剤	43		E00044	オリゴガラクチュロ ン酸			1	
13	製造用剤	45		E00047	オレガノ抽出物			1	
13	製造用剤	47		E00049	海藻灰抽出物			1	
13	製造用剤	48	FA012500	E00050	カオリン	カオリン		1	
13	製造用剤	51		E00053	花こう斑岩			1	
13	製造用剤	54	FA013200	E00056	活性炭	活性炭	1		
13	製造用剤	55	FA013300	E00057	活性白土	活性白土	1		
13	製造用剤	99		E00105	クリストバル石			1	
13	製造用剤	115	FA021550	E00122	くん液	くん液	1		
13	製造用剤	115	FA021550	E00123	木酢液	くん液		1	
13	製造用剤	115	FA021550	E00124	リキッドスモーク	くん液	1		
13	製造用剤	116	FA021800	E00125	ケイソウ土	ケイソウ土	1		
13	製造用剤	118		E00127	高級脂肪酸			1	
13	製造用剤	118	FA022310	E00127A	高級脂肪酸	高級脂肪酸(カプリル 酸)		1	
13	製造用剤	118	FA022320	E00127B	高級脂肪酸	高級脂肪酸(カプリン酸)		1	
13	製造用剤	118	FA022330	E00127C	高級脂肪酸	高級脂肪酸(ステアリン 酸)		1	
13	製造用剤	118	FA022340	E00127D	高級脂肪酸	高級脂肪酸(パルミチン 酸)		1	
13	製造用剤	118	FA022350	E00127E	高級脂肪酸	高級脂肪酸(ベヘニン 酸)		1	
13	製造用剤	118	FA022360	E00127F	高級脂肪酸	高級脂肪酸(ミリスチン 酸)		1	
13	製造用剤	118	FA022370	E00127G	高級脂肪酸	高級脂肪酸(ラウリル酸)		1	
13	製造用剤	131	FA023700	E00138	骨炭	骨炭	1		
13	製造用剤	133		E00141	ゴマ柄灰抽出物			1	A
13	製造用剤	142	FA027000	E00150	酸性白土	酸性白土		1	
13	製造用剤	144		E00152	酸素		1		
13	製造用剤	150	FA028100	E00161	シクロデキストリン	α-シクロデキストリン	1		
13	製造用剤	150	FA028200	E00161B	シクロデキストリン	β-シクロデキストリン	1		
13	製造用剤	150	FA028300	E00161C	シクロデキストリン	γ-シクロデキストリン	1		
13	製造用剤	150		E00161D	シクロデキストリン	分岐シクロデキストリン	1		
13	製造用剤	153		E00164	シソ抽出物			1	A
13	製造用剤	155	FA028800	E00166	5'-シチジル酸	5'-シチジル酸		1	
13	製造用剤	158		E00169	焼成カルシウム			1	
13	製造用剤 /強化剤	158	FA008950	E00170	うに殻焼成カルシ ウム	うに殻焼成カルシウム		1	
13	製造用剤 /強化剤	158	FA012400	E00171	貝殻焼成カルシウ ム	貝殻焼成カルシウム	1		
13	製造用剤 /強化剤	158	FA023600	E00172	骨焼成カルシウム	骨焼成カルシウム	1		
13	製造用剤 /強化剤	158	FA035750	E00173	造礁サンゴ焼成カ ルシウム	造礁サンゴ焼成カルシ ウム		1	
13	製造用剤 /強化剤	158	FA044250	E00174	乳清焼成カルシウ ム	乳清焼成カルシウム	1		
13	製造用剤	158	FA063400	E00175	卵殻焼成カルシウ ム	卵殻焼成カルシウム	1		
13	製造用剤	163		E00179	水素		1		
13	製造用剤	168	FA035550	E00184	生石灰	生石灰		1	
13	製造用剤	171		E00187	ゼイン			1	

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 11）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認で きた品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加 物 A：令和 6 年度 消除予定添加 物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
13	製造用剤	172		E00188	ゼオライト			1	
13	製造用剤	174		E00190	セピオライト			1	A
13	製造用剤	178	FA035800	E00194	粗製海水塩化マグネシウム	粗製海水塩化マグネシウム	1		
13	製造用剤	179		E00195	ソバ柄灰抽出物			1	A
13	製造用剤	193		E00209	タンニン(抽出物)			1	
13	製造用剤	193		E00210	柿タンニン			1	
13	製造用剤	193	FA031400	E00211	植物タンニン	植物タンニン		1	
13	製造用剤	193		E00212	ミモザタンニン			1	
13	製造用剤	195		E00214	窒素		1		
13	製造用剤	196		E00215	チャ乾留物		1		
13	製造用剤 /強化剤	207		E00226	鉄			1	
13	製造用剤	209		E00228	銅			1	
13	製造用剤	222	FA042550	E00241	トレハロース	トレハロース	1		
13	製造用剤	226		E00245	ナフサ			1	A
13	製造用剤	232		E00251	ニッケル		1		
13	製造用剤	234		E00253	ばい煎コメヌカ抽出物			1	
13	製造用剤	235		E00254	ばい煎ダイズ抽出物			1	A
13	製造用剤	237		E00256	白金			1	
13	製造用剤	240	FA045000	E00259	パーライト	パーライト	1		
13	製造用剤	241		E00260	パラジウム			1	
13	製造用剤	244	FA046250	E00263	ヒアルロン酸	ヒアルロン酸	1		
13	製造用剤	245	FA046400	E00264	微結晶セルロース	微結晶セルロース	1		
13	製造用剤	251		E00270	ひる石			1	A
13	製造用剤	257	FA050050	E00276	フィチン(抽出物)	フィチン(抽出物)		1	
13	製造用剤	260		E00280	ブタン			1	
13	製造用剤	269		E00289	プロパン			1	
13	製造用剤	172		E00188	ゼオライト			1	
13	製造用剤	274	FA053900	E00293	粉末セルロース	粉末セルロース	1		
13	製造用剤	277	FA054100	E00296	ヘキサシ	ヘキサシ		1	
13	製造用剤	290	FA055550	E00310	ヘプタン	ヘプタン		1	
13	製造用剤	294	FA056000	E00314	ヘム鉄	ヘム鉄		1	
13	製造用剤	295		E00315	ヘリウム			1	
13	製造用剤	296	FA056700	E00316	ベントナイト	ベントナイト	1		
13	製造用剤	311		E00331	未焼成カルシウム			1	
13	製造用剤 /強化剤	311		E00332	貝殻未焼成カルシウム			1	
13	製造用剤 /強化剤	311		E00333	骨未焼成カルシウム			1	
13	製造用剤 /強化剤	311	FA026900	E00334	サンゴ未焼成カルシウム	サンゴ未焼成カルシウム		1	
13	製造用剤 /強化剤	311		E00335	真珠層未焼成カルシウム			1	
13	製造用剤 /強化剤	311		E00336	卵殻未焼成カルシウム		1		
13	製造用剤	320	FA061550	E00345	メバロン酸	メバロン酸		1	
13	製造用剤	324		E00349	木材チップ			1	
13	製造用剤	325		E00350	木炭			1	
13	製造用剤	327		E00352	木灰			1	
13	製造用剤	328		E00353	木灰抽出物			1	
13	製造用剤	334	FA062900	E00359	ラクトフェリン濃縮物	ラクトフェリン濃縮物	1		
13	製造用剤	345	FA066100	E00369	流動パラフィン	流動パラフィン		1	

表 3 既存添加物の使用実態の調査結果（その 12）

部 会	用途分 類	既存 添加 物番 号	コード番号		品目名称	規格名称	使用実 態が確 認で きた品目 =1	使用実態 が確認で きなかつ た品目 =1	消除予定添加物 A：令和 6 年度 消除予定添加物名簿記載 B：令和 6 年度 販売実態調査 対象添加物
			全体コ ード	既存コ ード					
13	製造用剤	346		E00370	リンターセルロー ス			1	
13	製造用剤	349		E00376	ルテニウム		1		
14	香辛料抽 出物	119	FA022380	E00128	香辛料抽出物	香辛料抽出物	1		

表 3 の集計

集計項目	項目数
使用実態が確認できた品目（規格名称数）	245
使用実態が確認できなかった品目（規格名称数）	160

表 4 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
前自主規格・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
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

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

令和6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収載されている着色料であるが、確認試験は呈色を確認する定性試験のみであり、本添加物の特徴成分を具体的に確認する試験法の提案がのぞまれる。本研究はカロブ色素の主要成分を解明することで、高度な品質保証のための試験法の提案につなげることを目的に検討を行った。昨年度はカロブ色素製品の HPLC 分析から 4 つの主ピークを検出し、そのうち 2 ピークが 4'-dihydrophaseic acid β -D-glucopyranose ester, schaftoside によることを明らかにしている。今年度はさらに精査を行い、残り 2 ピークが schaftoside 配糖体であることを明らかにした。4 ピークのうち、3 ピークが schaftoside 類であることから、HPLC 分析における指標成分候補として schaftoside が考察された。そこで定量分析として schaftoside を直接分析する方法と、schaftoside 配糖体を酵素分解により schaftoside に誘導して分析する方法を検討し、いずれにおいても定量値を算出することができた。一方で、schaftoside について TLC 分析による確認試験を検討した結果、水または 50%メタノールを抽出溶媒として調製した試料溶液をシリカゲル板にスポットし、*n*-ブタノール/酢酸/水系溶媒で展開し、UV (254 nm)照射することで、 R_f 0.4 付近に schaftoside の明瞭なスポットを確認することができ、分析可能であることが示唆された。

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

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(isoschaftoside, schaftoside, neoschaftoside)が明らかにされ、 ^1H -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。²⁾

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。

A. 研究目的

カロブ色素は第 10 版食品添加物公定書¹⁾に収載され、「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で、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

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。IsoschaftosideはAdooq Bioscience製, schaftosideはCAYMAN CHEMICAL COMPANY製を用いた。Rutinは東京化成製を使用した。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。 β -グルコシダーゼ(from almond, 4 U/mg)は、シグマアルドリッチジャパンより入手した。TLCはTLC Silica gel 60 F₂₅₄(Merck)を用いた。NMR 溶媒(MeOH-*d*₄, DMSO-*d*₆)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。(条件 1)カラム：L-column ODS(2.1 I.D. × 150 mm)(化学物質評価研究機構製), カラム温度：40℃, 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→30 min (0→50%), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85→90%), 50→55 min (90→100%), 55→60 min (100%)〕。(条件 2)カラム：L-column ODS (2.1 I.D. × 150mm, 5 μ m)(化学物質評価研究機構), カラム温度：40℃, 流速：0.2 mL/min, 測定波長：UV 280 nm, 移動相：0.01 mol/L リン酸：0.01 mol/L リン酸二水素カリウム：アセトニトリル(42.5:42.5:15)。NMRはBruker AVANCE500(ブルカー・バイオスピン社製)(¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz)を使用した。ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [MeOH-*d*₄ (¹H: 3.31 ppm, ¹³C: 49.0 ppm), DMSO-*d*₆ (¹H: 2.50 ppm, ¹³C: 39.52 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メタノール (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、H₂O, 10%MeOH～MeOH で順次溶出し、7 分画物を得た(① H₂O 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 における標品との直接比較、あるいは文献値と NMR データ等の比較によって同定した。

B-5) 確認試験の追試

カロブ色素製品について、食品添加物公定書に記載されている確認試験(1. 本品の表示量から、色価 30 に換算して 0.5g に相当する量を取り 70%MeOH 50 mL を加えて振った時に液の色が淡黄～黄色になる。2. 1 の上澄み液に水酸化ナトリウム溶液 (1→20) を加えてアルカリ性にするとき、液の色は濃黄色になる。3. 1 の上澄み液に塩酸 (1→3) を加えて酸性にするとき、液の色はほとんど消える。1 の上澄み液 5 mL に塩化鉄(III)六水和物溶液 (1→10) 1 mL を加えるとき、液の色は黄褐色に変わる。5. 本品の表示量から色価 30 に換算して 0.1 g に相当する量を量り、水酸化ナトリウム溶液(1→1250)100 mL 加えた後、定量分析用ろ紙(5 種 C)でろ過した液は、波長 385～400 nm に吸収極大がある)を行った。比較試料として、フラボノイド配糖体のルチンを用いた。

B-6) 定量分析

カロブ色素製品(100 mg)に 0.1 mol/L 酢酸緩衝液(pH 5.0)(10 mL)を加え、20 分間超音波処理を行った。遠心分離後、残渣に 0.1 mol/L 酢酸緩衝液(pH 5.0)(10 mL)を加え、20 分間超音波処理

を行い、遠心分離を行った。得られた上澄液を酢酸緩衝液で 20 mL に定容し、さらに酢酸緩衝液(1 mL)を加え、試料溶液(酵素処理なし)とした。同様の操作により得られた上澄液について、37℃で 5 分間加温した後、 β -グルコシダーゼ/酢酸緩衝液(160 U)(1 mL)を加え、さらに 37℃で 30 分間加温したものを試料溶液(酵素処理あり)とした。

B-7) TLC 分析

カロブ色素製品(100 mg)を各種溶媒(H_2O , 10%MeOH $\sim$ MeOH)(10 mL)中で 20 分間超音波処理し、遠心分離後、上澄液を試料溶液とした。展開溶媒は *n*-ブタノール/酢酸/水(4: 1: 2)を用い、スポット量を 3 μ L、検出は UV 照射(254 nm)で行った。

C. 結果及び考察

C-1) 公定書における確認試験の追試

食品添加物公定書におけるカロブ色素の確認試験について、フラボノイドのルチンを比較試料として用い、改めて試験を実施した。確認試験 1 $\sim$ 5 の項目について試験した結果、いずれも同様の呈色、波長を示し(図 1)、呈色による確認は曖昧さがあり、カロブ色素に特徴的な指標成分候補を明らかにし、それに基づく試験法の提案の必要性が示唆された。

C-2) 化合物の分離精製

HPLC 分析結果より、ほぼ単一なピークとして確認されたカロブ色素 Diaion HP-20 H_2O 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い、これまでピーク 1 が 4'-dihydrophaseic acid β -D-glucopyranose ester であることを同定している。また、HPLC 分析による標品との比較検討で、ピーク 4 が schaftoside、ピーク 4 の後ろにあるマイナーピークが isoschaftoside であると同定している。今年度はピーク 2 $\sim$ 4 を含む Diaion HP-20 20%MeOH 溶出部(③)及び 40%MeOH 溶出部(⑤)について、さらに ODS カラム(YMC GEL ODS-AQ, CHROMATOREX ODS)による分離精製を行い、ピーク 2, 3 を schaftoside glucoside

として、ピーク 4 として schaftoside として単離した。Schaftoside glucoside の glucose の結合位置は、現在検討中である。このように、主検出成分として schaftoside 及びその配糖体であることが確認され、指標成分候補として schaftoside が考察された(図 2)。

C-3) 酵素分解

HPLC 分析結果より、主検出成分として schaftoside とその配糖体が同定された。そこで、本添加物について β -グルコシダーゼによる酵素分解を試みた。その結果、酵素処理により schaftoside に分解することが確認され、HPLC 分析(条件 1)においては、ピーク 2 及び 3 が消失し、ピーク 4 に収束することが観察された(図 3)。

C-4) 定量分析

カロブ色素製品中の指標成分候補として schaftoside が示された。そこで、本添加物中の schaftoside 量について、HPLC による定量分析法について検討した。カロブ色素製品 100 mg を正確にはかり、0.1 mol/L 酢酸緩衝液で抽出して遠心分離後、その上澄液を試料溶液とした。HPLC 分析は、ODS カラムを用い、リン酸緩衝液/アセトニトリル系溶媒を移動相に用い、アイソクラティック溶出による分析条件(条件 2)を設定した。その結果、保持時間 7 分付近に schaftoside のピークを検出することができ、分析可能であることが示された。本方法を適用し、絶対検量線法により定量分析した結果、schaftoside 量を 5.0 mg/g と定量値を算出することができた。

本添加物には schaftoside glucoside の含有も認められ、 β -グルコシダーゼにより酵素分解され schaftoside に収束することを確認している。そこで、 β -グルコシダーゼにより酵素処理して schaftoside に収束させ、定量分析する方法も検討した。その結果、schaftoside の定量値 8.6 mg/g を算出することができ、酵素処理による方法も分析可能であることが示唆された(図 4)。

C-5) TLC 分析

指標成分候補とした schaftoside について、TLC 分析による確認試験法を検討した。まず、schaftoside の検出について検討した結果、*n*-ブタノール/酢酸/水系溶媒で展開し、UV(254 nm) 照射することで、 R_f 0.4 付近に schaftoside の明瞭なスポットを確認することができた。次に抽出溶媒を検討する目的で、 H_2O 及び含水 MeOH(10%~90%)、MeOH で抽出した試料溶液について、注入量を一定にして HPLC 分析を行い、schaftoside のピーク面積を比較した。その結果、90%MeOH 及び MeOH で調製した試料溶液はピーク面積が小さく、それ以外(H_2O ~80%MeOH)については、ピーク面積はほぼ同等であった。そこで、 H_2O 、50%MeOH を抽出溶媒として調製した試料溶液について、TLC 分析した結果、いずれも schaftoside のスポットを確認することができた(図 5)。

D. 結論

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

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

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)。

F. 研究業績

1. 学会発表等

1) 鬼嶋七海，内倉崇，好村守生，阿部裕，杉本直樹：食品添加物カロブ色素の成分研究，第63回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (2024.11)。

2. 論文発表等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

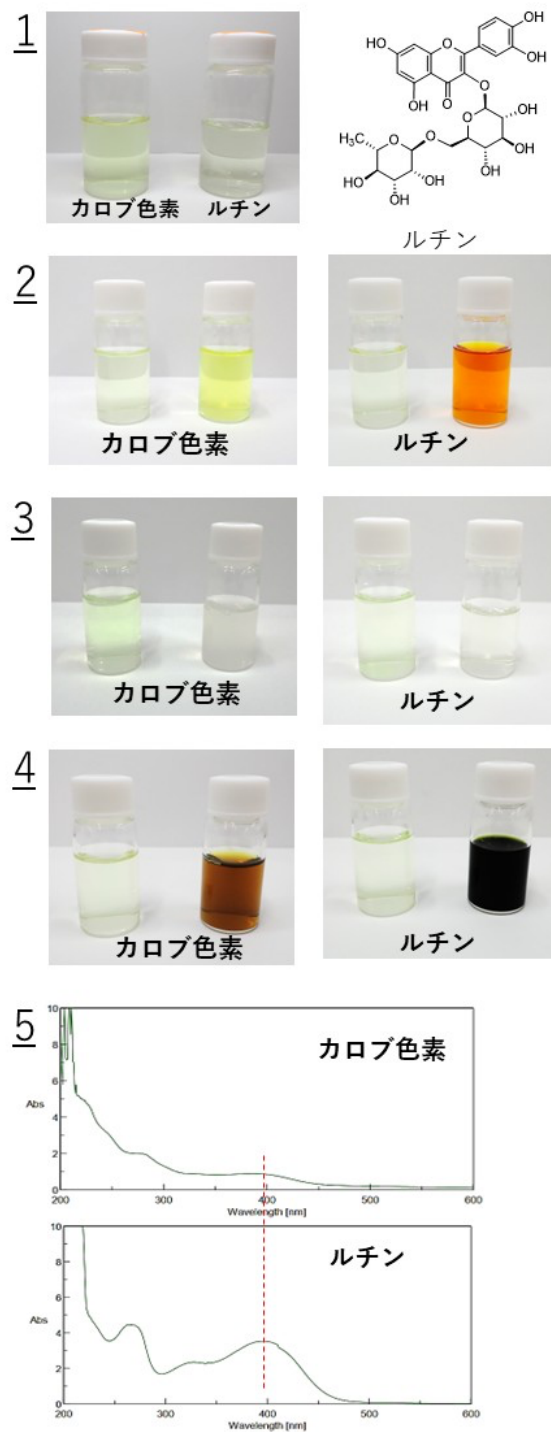


図 1. 公定法における確認試験 1～5

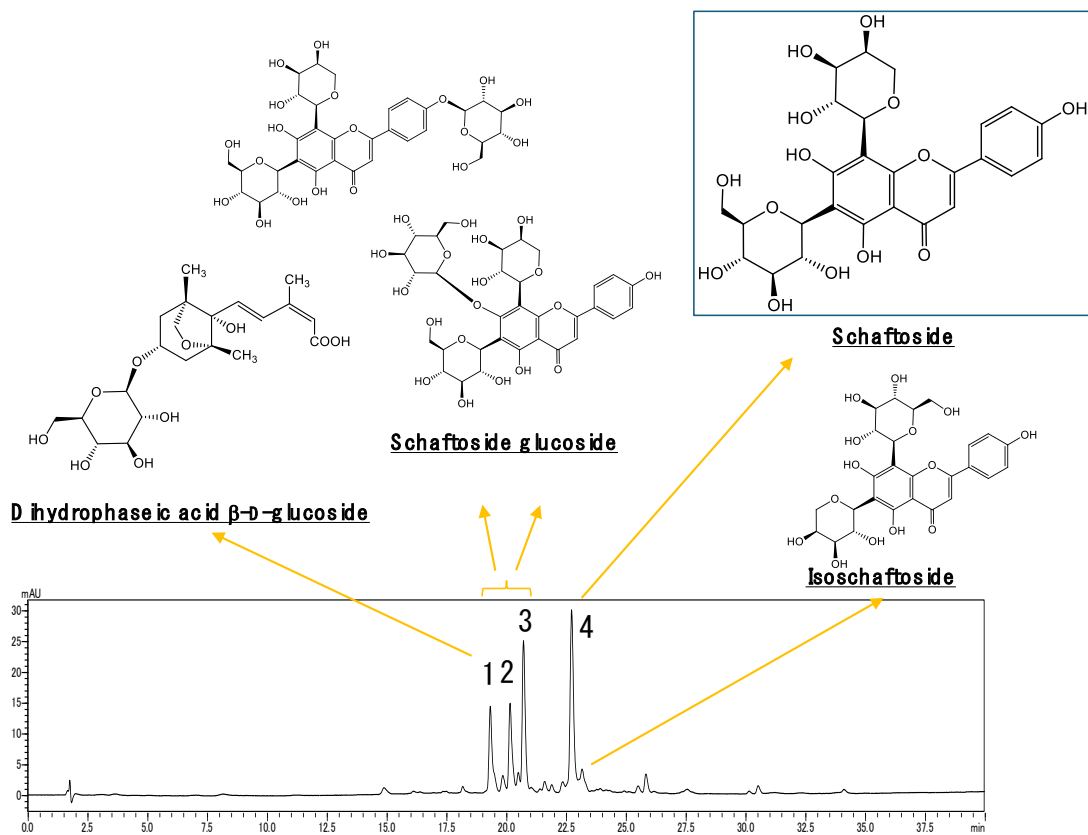
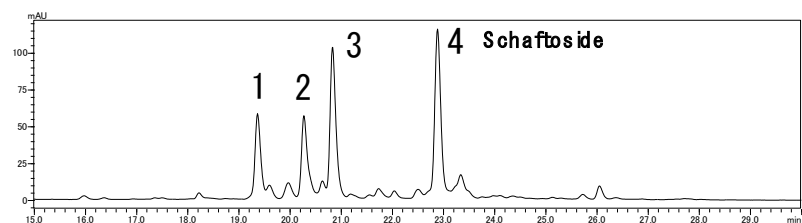
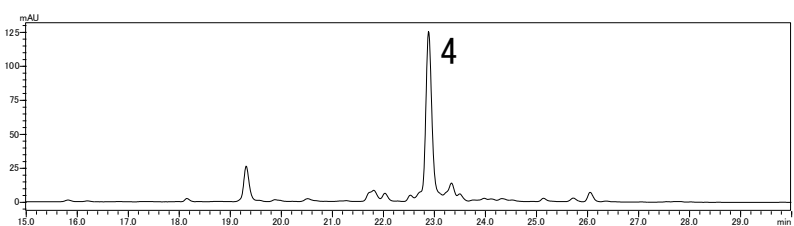


図 2. カロブ色素の HPLC クロマトグラム (条件 1)

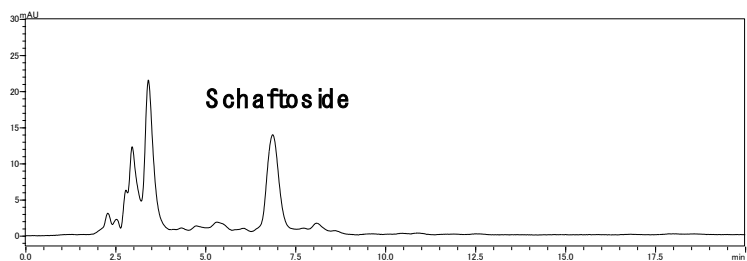
(条件1)



↓ β -glucosidase



(条件2)



↓ β -glucosidase

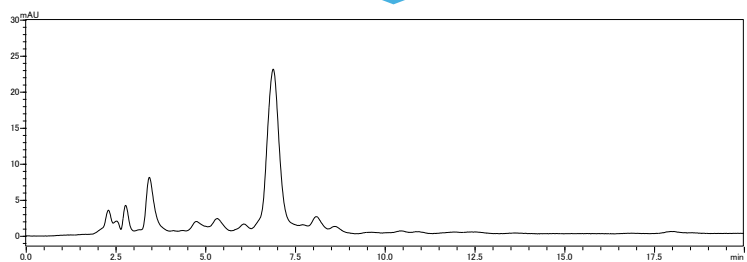
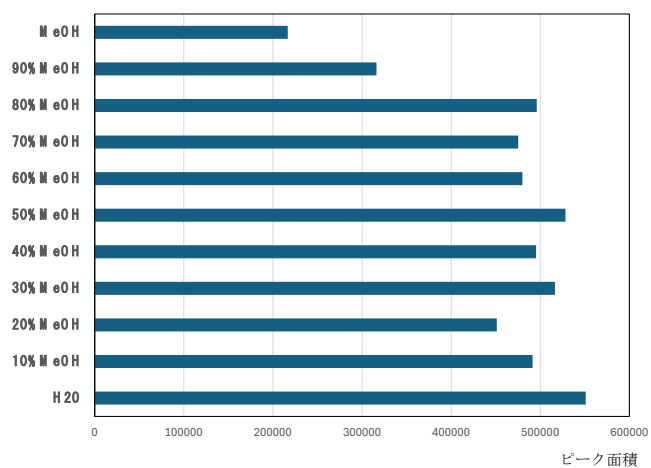
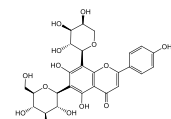


図 3. 酵素分解の HPLC クロマトグラム

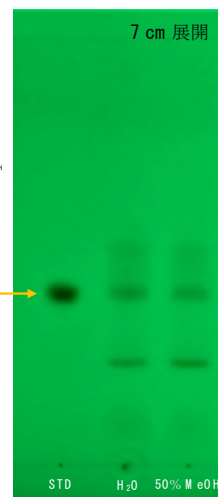
抽出溶媒の検討



TLC 分析



Schaftoside



担体 : TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)
 展開溶媒 *n*-BuOH:CH₃COOH:H₂O (4:1:2)
 スポット量 3 μ L
 検出 UV 照射 254 nm)

図 4. TLC 分析

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

令和6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

～既存添加物の基準策定のための ^1H -qNMR を用いた成分定量～

研究分担者 永津明人 金城学院大学薬学部 教授

研究要旨 規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、 ^1H -qNMR 法(定量 ^1H -NMR 法)が試験法として適用可能であるか可能性を検討した上で、適用の可能性のあるものに関して、実際に適用する場合の測定条件の確立、あるいはそれを応用した正確な定量法の検討を目的として研究を行なった。令和6年度も引き続き「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討とした。まず、令和5年度の研究においてバジル中の *rosmarinic acid* の定量を行った際、市販の食用バジルにおいて *rosmarinic acid* がほぼ含有されないものもあることを明らかとした。*rosmarinic acid* の有無の差異が何に起因するかも確認が必要であるため、令和6年度は品種の異なるバジルを栽培し、それぞれを茎と葉に分け、それぞれの *rosmarinic acid* の定量を行った。また、「香辛料抽出物」由来の既存添加物「ブラックペッパーオイル」の指標成分として β -caryophyllene を選択し、その含有率の定量が ^1H -qNMR 法で可能であることを確認した。

A. 研究目的

^1H -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。対象化合物の標準品の存在が HPLC 法などの従来法では必須であるのにたいして、それらがなくても絶対定量が可能であることから、標準品が手に入りにくい天然物の定量に好適な測定法である。すなわち、対象物質の ^1H -NMR スペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となりうる。それゆえ、既存添加物「香辛料抽出物」の原料生薬成分の規格試験法として、定量 NMR (^1H -qNMR)法が

適切あるいは適用可能なものがあるかの検討を行っている。令和6年度も引き続き既存添加物である「香辛料抽出物」に着目して研究を行った。

令和5年度の研究において、バジル中の *rosmarinic acid* (Fig. 1)の定量を行った際、市販の食用バジルにおいて *rosmarinic acid* がほぼ含有されないものもあることを明らかとした。既存添加物「香辛料抽出物」の基原の一つであるバジルでの *rosmarinic acid* の有無の差異が何に起因するかも確認が必要であるため、令和6年度は品種の異なるバジルを栽培、収穫し、それぞれを茎と葉に分け、それぞれの *rosmarinic acid* の定量を行った。

さらに、コショウ由来の食品添加物の一つであるブラックペッパーオイルについて、規格基準策定の基礎研究として、指標成分とし

て β -caryophyllene (Fig. 2)を選択し、その定量が可能か否かの検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

^1H -qNMR 測定時の内部標準物質として用いる sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonate- d_6 (DSS- d_6 , Fig. 3)及び 1,4-bis(trimethylsilyl)-benzene- d_4 (BTMSB- d_4 , Fig. 3)はいずれも富士フィルム和光純薬の Trace Sure®規格のものをを用いた。NMR 測定用溶媒の methanol- d_4 , acetone- d_6 , はそれぞれ Isotec Inc. の 99.8, 99.9 atom %D をを用いた。Rosmarinic acid と β -caryophyllene はどちらも東京化成及び富士フィルム和光純薬から購入の試薬を用いた。スイートバジル, スイートタイバジル, ブッシュバジル, イタリアンラージリーフバジル, ジェノババジル(Fig. 4)の各品種は種子を日野春ハーブガーデンより 2024 年 4 月に購入し金城学院大学薬用植物園に 4 月中旬に播種, 6 月 20 日ごろに収穫して乾燥後, 葉と茎に分け粉末化した。市販バジル末は 2024 年 4 月にお互いに異なる製品を購入し, 用いた。ブラックペッパーオイルは 2023 年 8 月に国立医薬品食品衛生研究所より供与を受けたもの(管理番号 C2302)を用いた。コショウ粉末は 2024 年 4 月に市販のものを購入した。

B-2) 装置等

秤量には島津製作所の精密電子天秤 AUW120D をを用いた。生薬の粉末化には大阪ケミカル WB-1, 分注操作の電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x, 超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S, 遠沈操作は遠心器 AS One Mini Centrifuge をそれぞれ用

いた。NMR 装置は 日本電子 JNM-ECA500 を使用した。HPLC は, ポンプとして JASCO PU-4180, カラムオーブンに Shimadzu CTO-20AC, 検出器はフォトダイオードアレイ検出器 JASCO MD-4010 を用いた。メンブランフィルターは Cosmonice Filter W 0.45 μm ϕ 13 mm をを用いた。

B-3) ^1H -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

まず, rosmarinic acid の ^1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と, 試料中の ^1H -qNMR 法による rosmarinic acid の定量を行うことにした。また, HPLC をを用いた定量との比較も行うことにした。

B-3-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- d_6 はデシケーター中で保管乾燥させたものをを用いた。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。

粉末化した栽培バジルの葉, 茎あるいは市販バジル末の測定用試料の調製は, 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, ^1H -qNMR の測定に供した。

B-3-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

各試料から調製した測定試料の ^1H -NMR を測定し, rosmarinic acid (Fig. 1)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. 5). ^1H -qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した. 積算回数は 8 回とした. 測定によって得られたスペクトルから, rosmarinic acid の 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-3-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_2O = 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.

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

B-4) ^1H -qNMR 法を用いたブラックペッパーオイル及びコショウ末中の β -caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイルにある程度含まれ

る成分として, α -pinene, limonene, β -caryophyllene (Fig. 2)が文献的に示されている. これらのスペクトルとブラックペッパーオイルのスペクトルを比較したところ, acetone- d_6 溶液の測定において β -caryophyllene のシグナルが独立して観測されたことから, 試料中の ^1H -qNMR 法による β -caryophyllene の定量を同重溶媒で実施した.

B-4-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

BTMSB- d_4 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 acetone- d_6 に溶かして内部標準溶液とした.

β -caryophyllene 試薬とブラックペッパーオイルは, 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 ^1H -qNMR の測定に供した.

コショウ末は, デシケーター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, ^1H -qNMR の測定に供した.

B-4-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

β -caryophyllene 試薬とブラックペッパーオイルとコショウ末の抽出液の ^1H -NMR を測定し, 試薬とブラックペッパーオイルでは β -caryophyllene (Fig. 2)の 5 位のプロトンシグナルが 5.04 ppm 付近に現れることを確認した (Fig. 6). コショウ末の抽出液ではこのシグナルは観測できなかった. ^1H -qNMR スペクトル

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、 β -caryophyllene の 5 位のシグナルと 0.00 ppm とした BTMSB- d_4 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 β -caryophyllene の濃度を算出した。

$$C_C = (I_C / I_B) \times C_B$$

ただし、 C_B 、 C_C はそれぞれ BTMSB- d_4 及び β -caryophyllene のモル濃度 (mol/mL)、 I_D 、 I_E はそれぞれ BTMSB- d_4 及び β -caryophyllene の水素 1 個あたりのシグナル面積。

C. 結果及び考察

C-1) ^1H -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

改めて ^1H -qNMR を用いて測定した市販バジル末中の rosmarinic acid の含有率は 2 製品ではそれぞれ 1.51% と 0.70% であったが、2 製品ではシグナルが観測されず、測定不能だった。栽培した 5 品種では、葉における含有率が 0.83~1.90% であったのに対して、茎では 4 品種でシグナルを観測できず、比較的葉での含有率が大きかった 1 品種でわずかに含有されている程度であった HPLC での測定結果でも同様のことが確認された。バジル由来の製品の rosmarinic acid の定量が ^1H -qNMR を用いても容易に行えることは昨年にも実証済みであるが、rosmarinic acid の有無がバジル各品種のどの部分を用いているかの判断材料になることがわかった (Fig. 5, Table 2)。

C-2) ^1H -qNMR 法を用いたブラックペッパ

ーオイル及びコショウ末中の β -caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイル中の β -caryophyllene を ^1H -qNMR を用いて測定できることがわかった (Fig. 6, Table 3)。ただし、スペクトル中でシグナルが混んでいる領域であることから、精密な測定という観点ではあまり精度の高いものではないと考えられた。原料となるコショウ中の β -caryophyllene は測定ができず、製品の管理の手段としては活用の余地があるものの原料の管理として β -caryophyllene を指標とすることはできないと考えられた。

D. 結論

D-1) ^1H -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

- 1) 令和 6 年度の結果と合わせて、バジル由来の製品中の rosmarinic acid の ^1H -qNMR を用いた定量条件を確立することができた。
- 2) バジル由来の製品中の rosmarinic acid の有無によって、バジルの葉を用いた茎を用いたかが明らかとできることがわかった。

D-2) ^1H -qNMR 法を用いたブラックペッパーオイル及びコショウ末中の β -caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイル中の β -caryophyllene を ^1H -qNMR を用いて測定できることがわかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表等

2-1. 学会

- 1) 森本深麗, 永津明人, 西崎雄三, 阿部裕, 増本直子, 杉本直樹: ^1H -qNMR 法を用いたクローブ由来既存添加物及びチョウジ末、オールスパイス末中の eugenol の定量. 日本生薬学会第 70 回年会(2024.9).
- 2) 瀬川ひかり, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人, 「定量 NMR (^1H -qNMR) を用いたバジル (*Ocimum basilicum* L.) 中の rosmarinic acid の定量」, 日本薬学会第 145 年会(2025.3).

- 1) 永津明人: 生薬等の品質管理での定量 NMR 法 (^1H -qNMR) の利用. 2024 年度分子研異分野技術交流セミナー(第 3 回)(2024.7).
- 2) 永津明人: 生薬の品質評価について. 令和 6 年度日本アロマセラピー学会中部北陸地方会・清水薬剤師会(2024.9).

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)
なし

2-2. 講演等

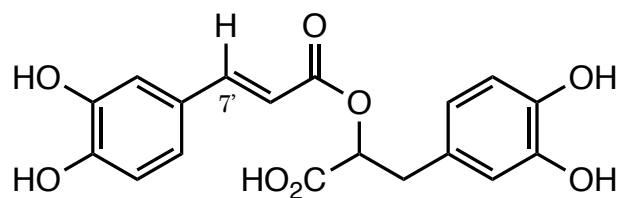


Fig. 1 Rosmarinic acid の構造

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

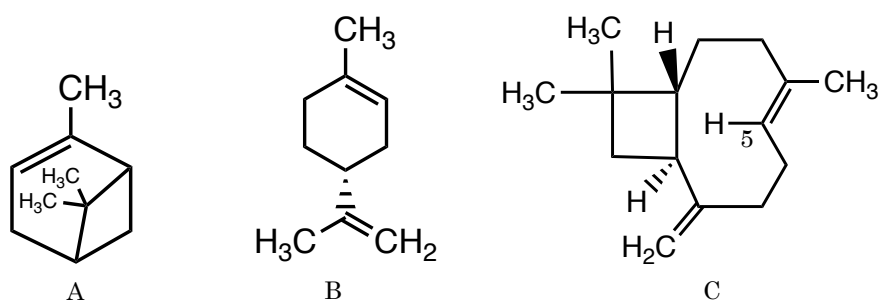


Fig. 2 α -Pinene (A), limonene (B), β -caryophyllene (C)の構造

β -Caryophyllene (C) の5位のプロトンが ^1H -qNMR 法において積分値を測定したプロトン.

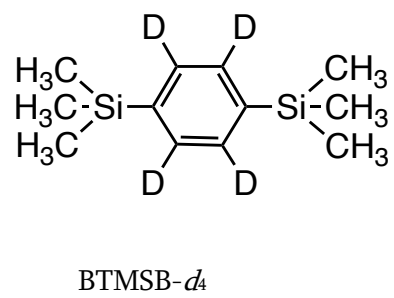
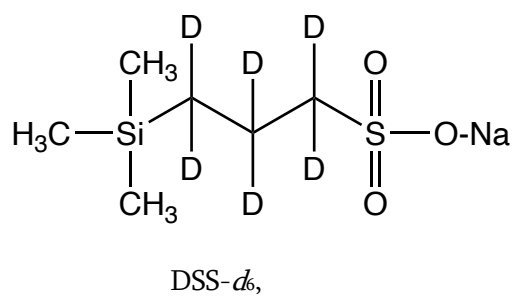


Fig. 3 定量用の認証標準物質

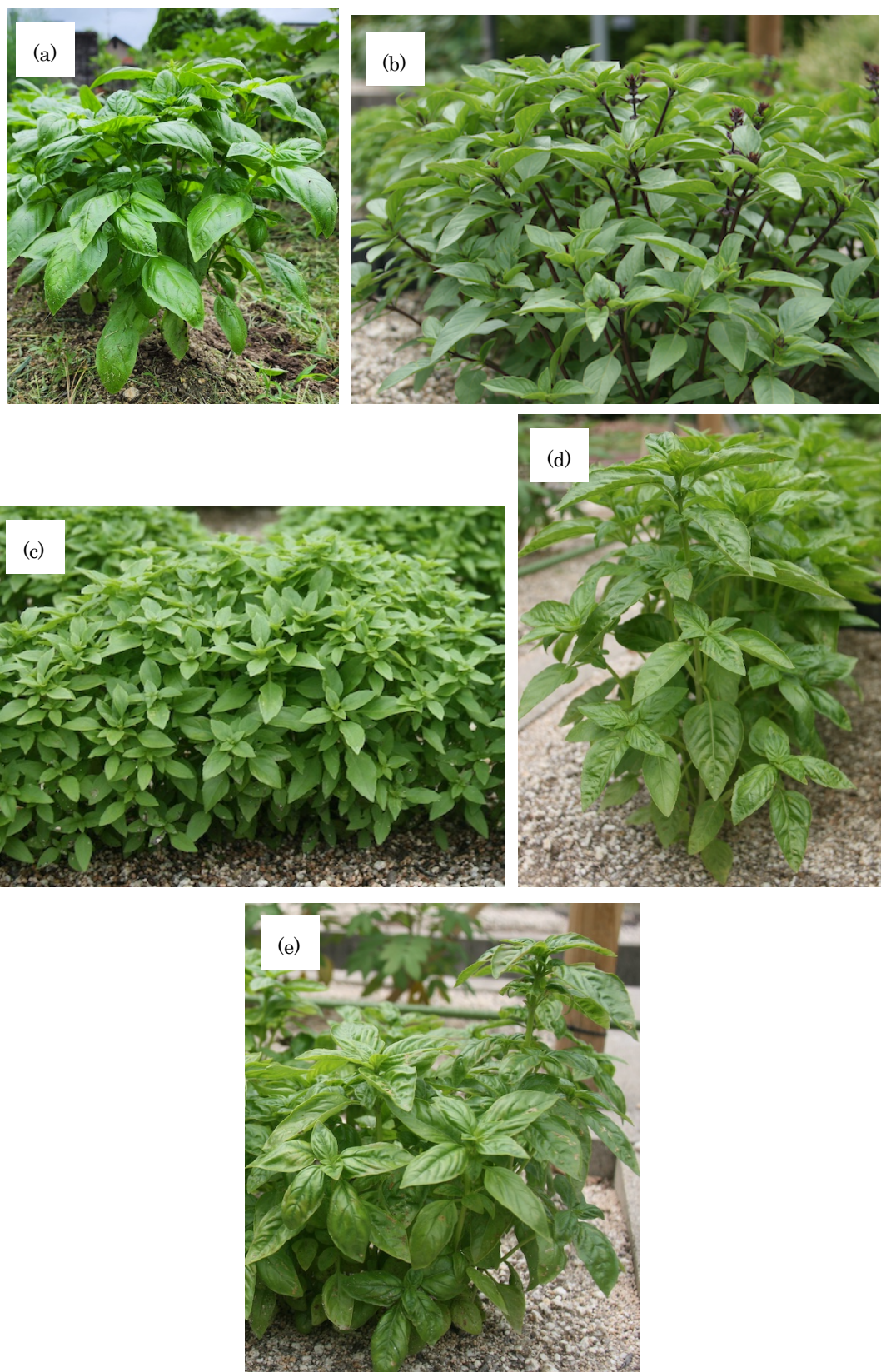


Fig. 4 栽培して試料とした各品種のバジル

それぞれスイートバジル (a), スイートタイバジル (b), ブッシュバジル (c), イタリアンラージリーフバジル (d), ジェノババジル (e) .

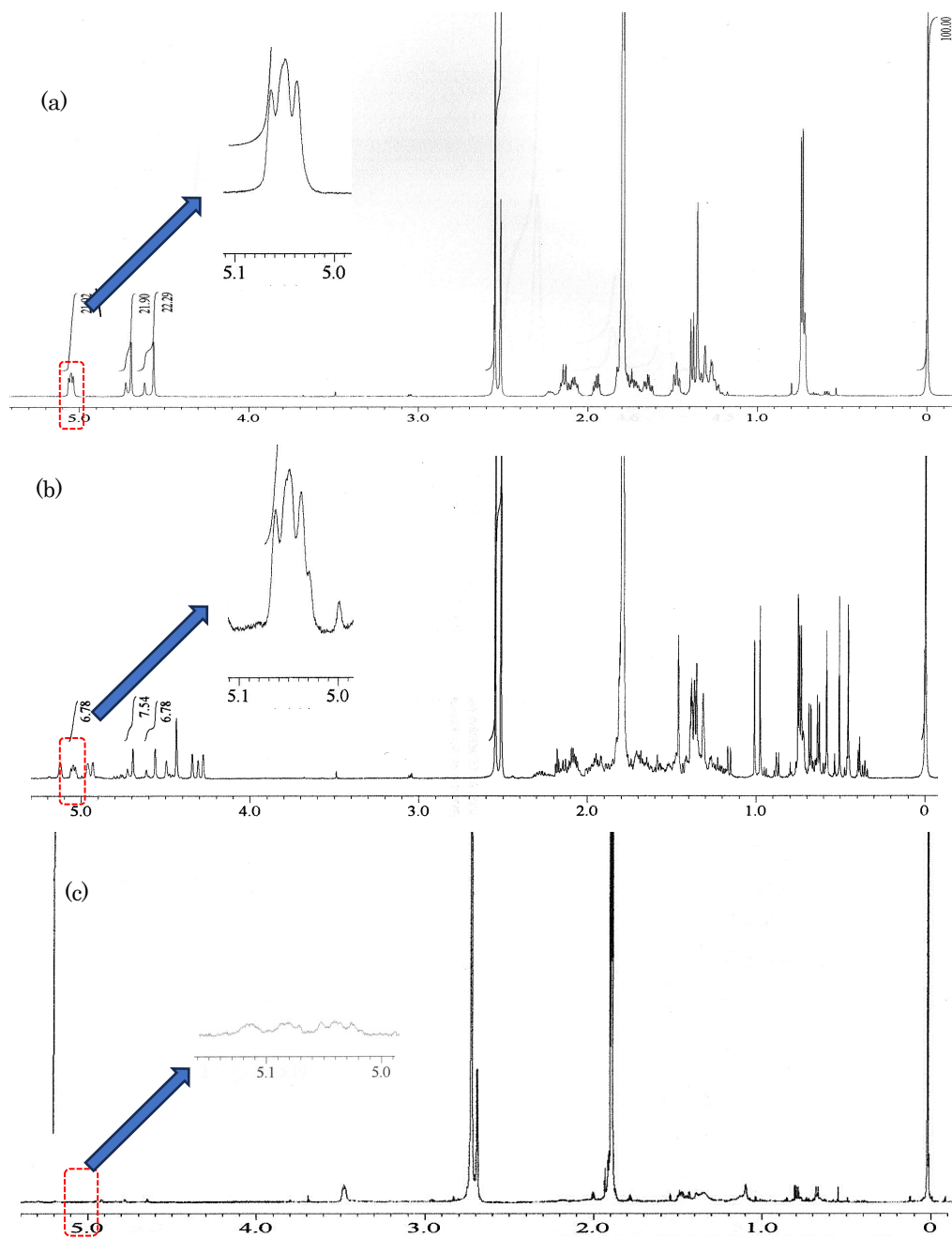


Fig. 6 β -Caryophyllene 試薬 A (a), ブラックペッパーオイル (b)とコショウ末の各試料 (c) の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 500 MHz)
 拡大図のシグナルが 5 位のプロトンシグナル.

Table 1 ^1H -qNMR スペクトルの測定条件

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

Table 2 Rosmarinic acid の含有率

	含有率(%)			
	¹ H-qNMR		HPLC	
rosmarinic acid 試薬 A (23TK-RA)	90.13	±0.14		
rosmarinic acid 試薬 B (24FW-RA)	93.09	±0.11		
スイートバジル葉 (24Oc-SB-L)	1.90	±0.03	1.80	±0.05
スイートバジル茎 (24Oc-SB-S)	0.14	±0.00	0.12	±0.00
スイートタイバジル葉 (24Oc-STB-L)	1.40	±0.05	1.15	±0.03
スイートタイバジル茎 (24Oc-STB-S)	ND		ND	
ブッシュバジル葉 (24Oc-BB-L)	1.08	±0.03	0.98	±0.03
ブッシュバジル茎 (24Oc-BB-S)	ND		ND	
イタリアンラージリーフバジル葉 (24Oc-ILB-L)	1.39	±0.03	1.29	±0.03
イタリアンラージリーフバジル茎 (24Oc-ILB-S)	ND		ND	
ジェノババジル葉 (24Oc-JB-L)	0.83	±0.01	0.69	±0.02
ジェノババジル茎 (24Oc-JB-S)	ND		ND	
市販バジル粉末 A (24ca-SB-SBp)	1.51	±0.01	1.39	±0.05
市販バジル粉末 B (24ca-SB-OBp)	0.70	±0.04	0.57	±0.02
市販バジル粉末 C (24ca-H-Bp)	ND		ND	
市販バジル粉末 D (24ca-G-Bp)	ND		ND	

Table 3 ^1H -qNMR を用いて測定した β -caryophyllene の含有率

	含有率(%)
β -caryophyllene 試薬 A (24TK-bca)	90.13 $\pm$ 0.14
β -caryophyllene 試薬 B (24FW-bca)	93.09 $\pm$ 0.11
ブラックペッパーオイル (C2302)	1.55 $\pm$ 0.047
コショウ末(24ca-BPp)	ND

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

令和6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10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)を比較対照として確認した。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「本品は、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。」と定義されている¹⁾。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²⁾。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^{3,4)}、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。令和5年度の検討において、既存の確認試験において、4種(スピルリナ色素2種、クチナシ青色素及びバタフライピー色素(チョウマメ色素))の市販青色素製品を識別可能であるが、定量的評価への適用は困難と考えられた。そこで、全長PYCの検出が可能となるか検討する目的で、バイオカラムを用いたHPLC法を検討した。その結果、スピルリナ色素製品2種において検出波長 620 nm (PYCの極大吸収領域)で選択的に検出されるピークが複数本観測された。今年度の検討としては、PYC

含有製剤の1残基タンパク質消化断片において発色団フィコシアノビリンの定性分析を、LC-四重極飛行時間型質量分析計(QToF/MS)を用いて実施した。これにより、定量の対象としているタンパク質が PYC 由来であることを検証した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

青色素 4 製品, スピルリナ色素 2 製品(製品 1=A 及び製品 2=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, それぞれ市場より購入したものをを用いた。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%), 1 mol/L 塩酸(容量分析用)及び水酸化カリウム(試薬特級)は富士フイルム和光純薬社製のものをを用いた。Leucine Aminopeptidase (microsomal from porcine kidney), Prolidase from porcine kidney 及び Pepsin from porcine gastric mucosa lyophilized powder ($\geq 3,200$ units/mg protein)は Sigma Aldrich 社製のものをを用いた。Pronase E (Activity ≥ 4000 U/mg)は MedChemExpress 社製のものをを用いた。Thymol は東京化成工業社製のものをを用いた。りん酸二水素カリウム(試薬特級)及びりん酸水素二カリウム(試薬特級)はナカライテクス社製のものをを用いた。本研究に用いた超純水は, 全て Milli-Q EQ7000 system (Merck 社製)にて精製したものをを用いた。

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

フォトダイオードアレイ検出器: PDA eλ
Detector

QToF/MS 装置:

Waters 社製 Xevo G2XS

イオン化条件: エレクトロスプレーイオン化
ポジティブモード

測定モード: MSE モード

B-3) 酵素消化法

酵素分解に用いる試薬の調製

Pepsine: 超純水にて希釈した 20 mmol/L 塩酸を用いて 900 U/mL になるよう溶解した。

Thymol: 超純水にて希釈した 20 mmol/L 塩酸に 2 mg/mL になるよう溶解した。

Pronase E: 10 U/mL に 10 mmol/L リン酸緩衝溶液(pH 7.4)で溶解した。

Leucine Aminopeptidase: 超純水にて調製した 10 mmol/L リン酸緩衝溶液(pH 7.4)を用いて 20 U/mL になるよう溶解した。

Prolidase: 超純水にて調製した 10 mmol/L リン酸緩衝溶液(pH 7.4)を用いて 200 U/mL になるよう溶解した。

酵素消化条件

本条件は既報を参考にして設定した⁵⁾。40 mg/mL に調製した各色素製剤の 5 μ L に対して 10 μ L の Pepsine 及び 10 μ L の Thymol を添加し 37°C で 3 時間反応させた。その後, 20 μ L の 10 mmol/L リン酸緩衝溶液(pH 7.4), 10 μ L の 260 mmol/L 水酸化カリウム溶液及び 10 μ L の Pronase E を添加し, 37°C で 3 時間反応させた。終了後, Leucine Aminopeptidase 及び Prolidase をそれぞれ 10 μ L 加え, 37°C で 24 時間反応させた。最終溶液に対して 15 μ L の超純水を加え, 合計で 100 μ L の溶液とした。この溶液の 10 μ L を分注し, 40 μ L のメタノールを加え, LC-MS 測定に適切となる様に除タンパク質を行った(遠心分離: 3000 $\times$ g, 4°C, 5 min)。得られた上清の 40 μ L と超純水の 40 μ L を攪拌し, 測定溶液(色素製剤として 200 μ g/mL)とした。

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 $\mu\text{g/mL}$ 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：Accura Triart Bio C18(2.1 $\times$ 100 mm, 1.9 μm , YMC 社製)

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

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) 酵素消化法による各色素製剤の結果

国内で市販される青色素製品(A~D)を用い、期待される酵素消化断片がスピルリナ色素含有2製品(A, B)のみで検出されるか検討した。分析対象とするPYCの構造を図1に示した。図2-(a)~(d)には検出波長域 200-800 nmでのクロマトグラムの結果を示した。いずれのクロマトグラムにおいてもいくつかのピークが認められた。特にスピルリナ色素含有2製品では、0.95分及び1.25分に共通してピークが認められた。分析モードが逆相系であることを考慮すると、これらは高極性な物質でありタンパク質の消化断片であると考えられる。また、8.68分及び8.93分に全製品共通のピークが認められているが、これらは消化に用いた酵素のチモール由来のピークである。図3-(a)~(d)には検出波長 620 nmでのクロマトグラムの結果を示した。(a)スピルリナ色素、(c)クチナシ青色素、(d)バタフライピー色素の製品に明瞭なピークが観察された。特に(a)スピルリナ色素に関しては6.26分に大きなピークが検出されていたため、このピークの同定を試みた。図4-(a)及び(b)にはMSクロマトグラム(トータルイオンクロマトグラム)及び6.26分のピークのMSスペクトルを示した。基準ピークとして m/z 353.6497が、関連ピ

ークとして m/z 706.2921が検出された。前者は m/z 706.2921の2価イオンであると考えられる。既報によると、フィコシアノビリンの構造は図5-(a)とされている。仮にこの構造でプロトン化されたイオンの精密質量を算出すると m/z 708.3066となり、検出された値は2.0145分小さいことになる。これは水素2原子分の質量に相当するため、今回検出されたイオンはフィコシアノビリンの前駆物質であるジヒドロビリベルジンである可能性が高い(図5-(b))。ジヒドロビリベルジンが酵素的に還元されるとフィコシアノビリンになると知られ両者とも青色を示すため、スピルリナ色素に含まれている可能性はある。一方で、酵素消化の過程で変化している可能性も否定はできないため、この構造が正確にジヒドロビリベルジンであることは、より定性性能が高い機器分析で確認していく必要がある。また、断片の標準品が入手不可能であるため、酵素消化の効率率は理論的に算出することは困難であること、さらにスピルリナパウダーからは、目的の断片が検出されなかったことから感度の面で限界があり、定量的な評価方法としては不向きである。従って、構造が明確になった後、その断片を含む全長タンパク質として定量法を設定することが望ましい。今後、定性的評価と定量法の確立を並行して実施していく予定である。

D. 結論

本研究では、市販の青色素製品を検討対象とし、スピルリナ色素に含まれる色素タンパク質がPYCであることを確認する目的で酵素消化を実施した。その結果、市販のスピルリナ色素には、LC分析において検出波長 620 nmで特徴的なピークが観察され、ESI pos.モードで m/z 706.2921のイオンを与えた。フィコシアノビリンが発色団だと仮定して、そのプロトン付加した精密質量は理論上 m/z 708.3066となるため、PYCとは異なる形態(例えばジヒドロビリベルジン)で存在している可能性が示唆された。今後は下記の方針で研究を進めていく予定である。

なし

・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)

・酵素消化断片の構造決定(X線構造解析法や核磁気共鳴法を予定)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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9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.
- 5) Zhang G, Huang G, Xiao L, Mitchell AE. Determination of advanced glycation endproducts by LC-MS/MS in raw and roasted almonds (*Prunus dulcis*). *J Agric Food Chem.*, 2011; 59: 12037-46.

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

フィコシアニン: $\alpha\beta$

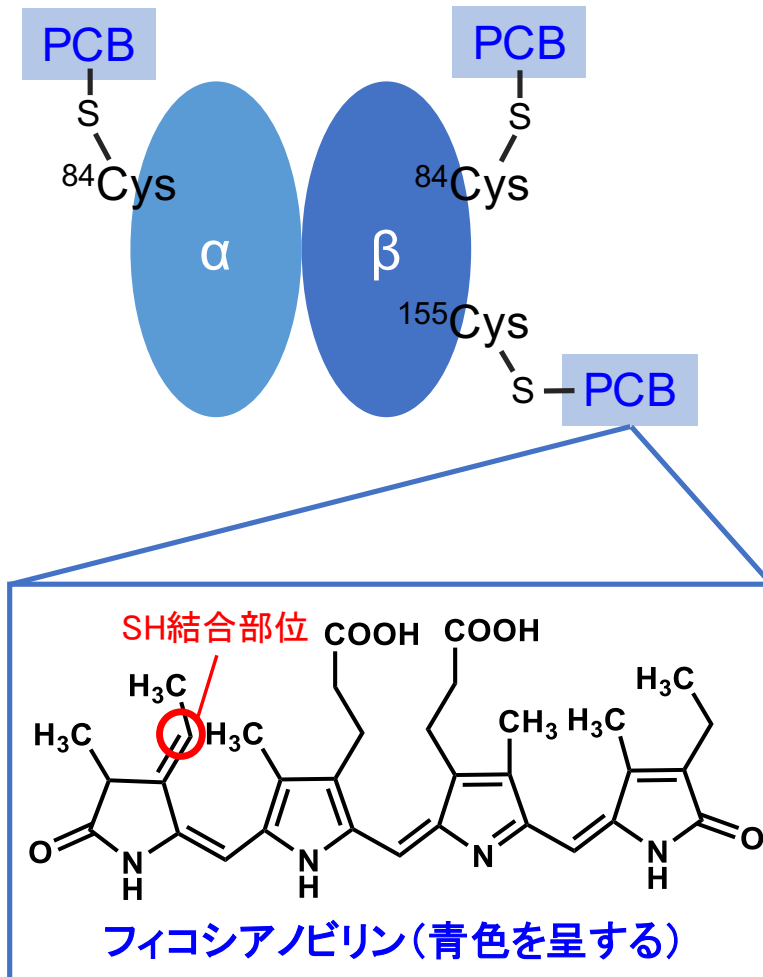


図 1. 分析対象物質 PYC の構造

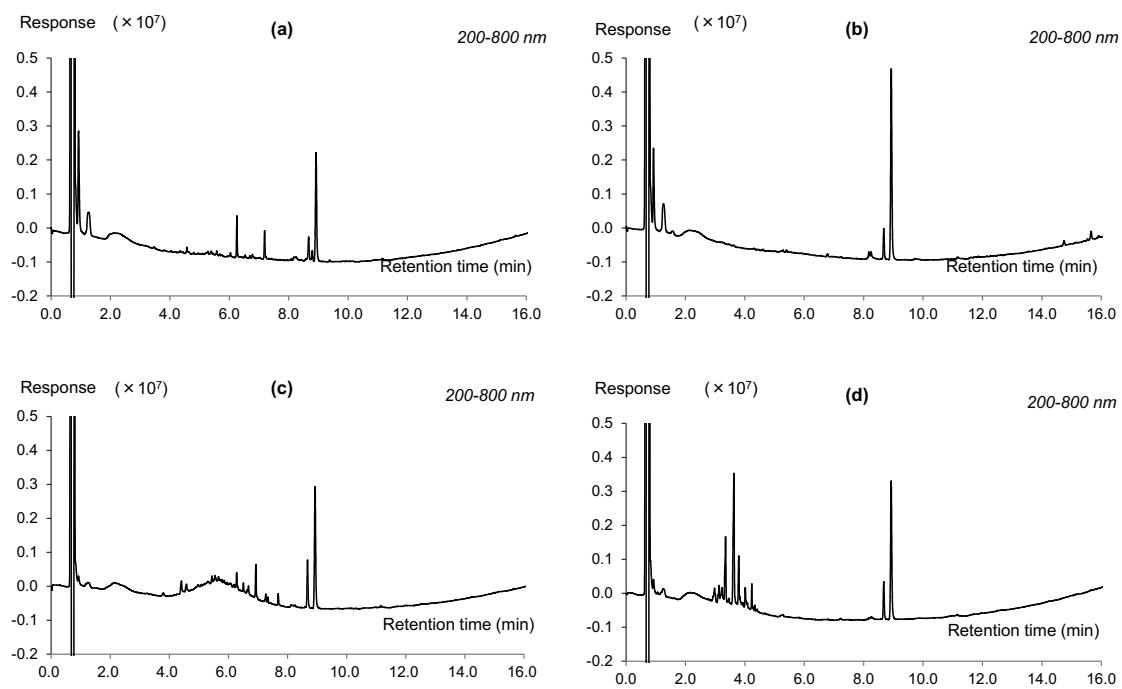


図 2. 酵素消化後の断片のクロマトグラム(200-800 nm)

(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

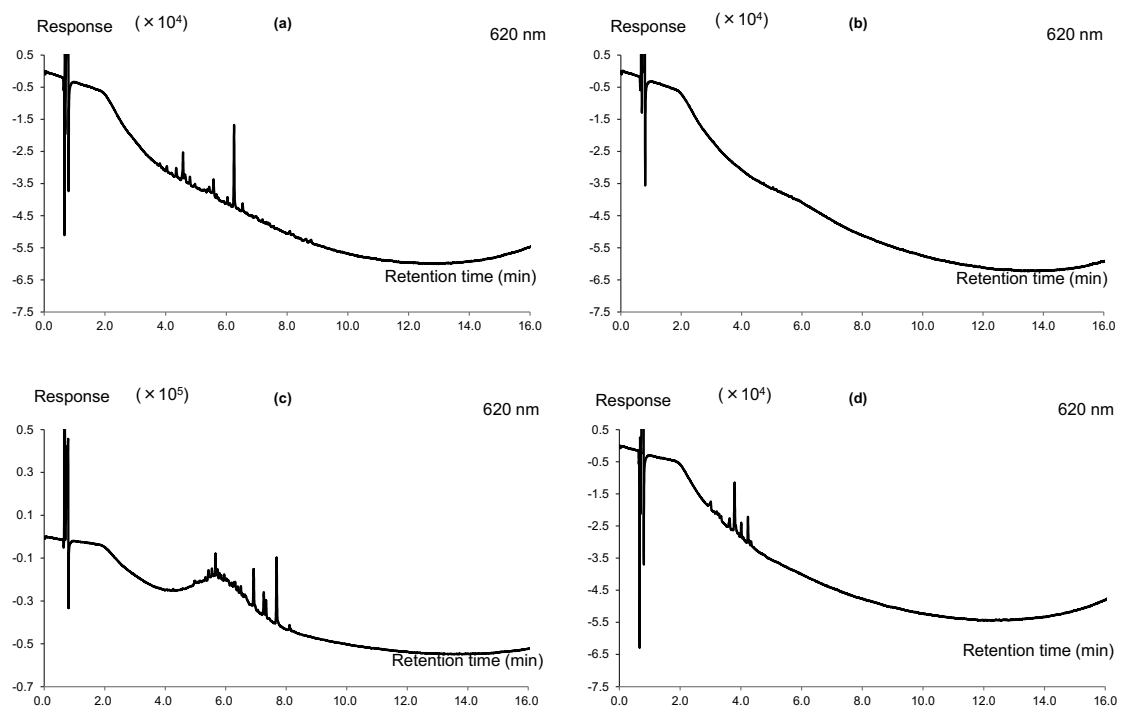


図 3. 酵素消化後の断片のクロマトグラム(620 nm)

- (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

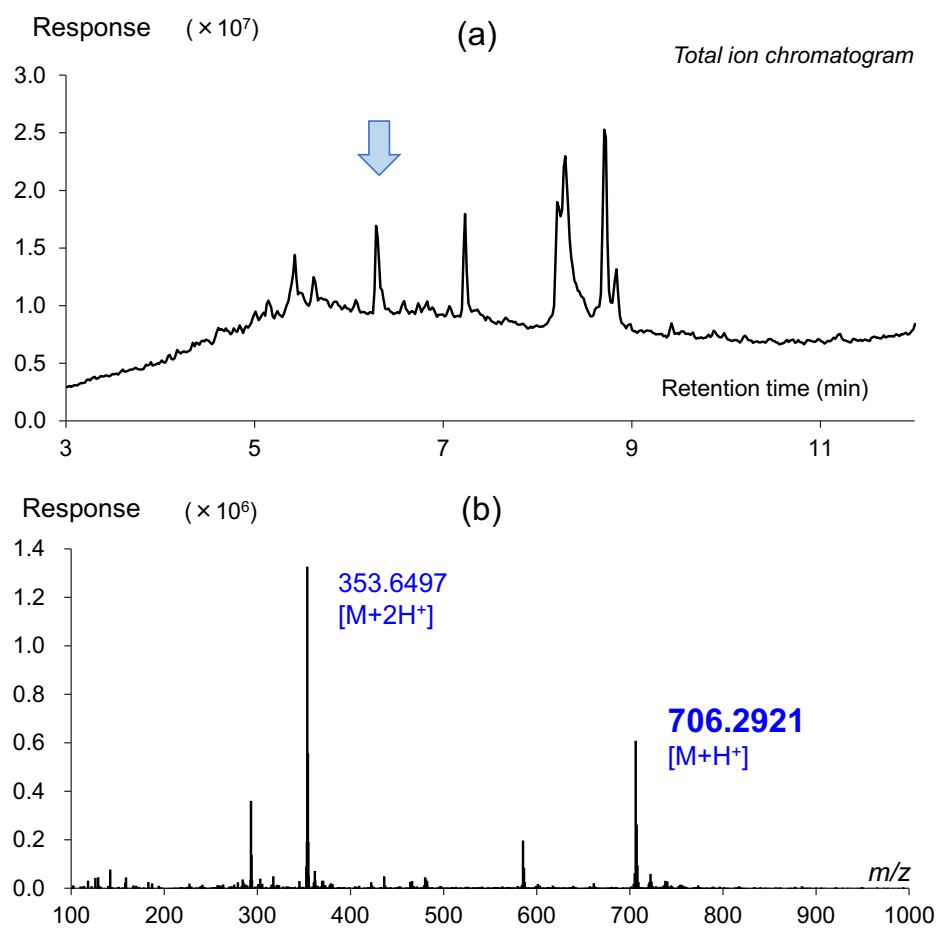


図 4. スピルリナ色素 LC-MS の測定結果

(a) LC-MS のクロマトグラム

(b) 6.29 分の MS スペクトル

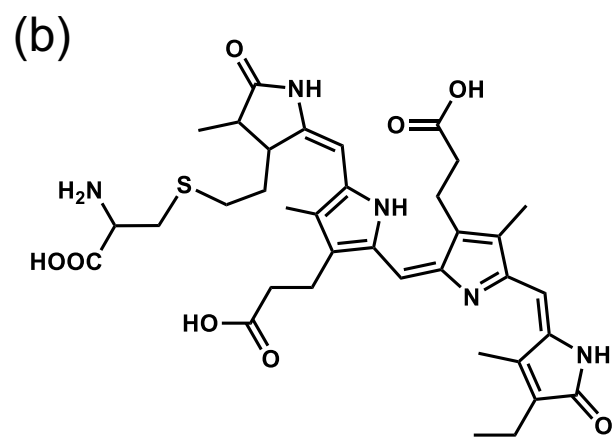
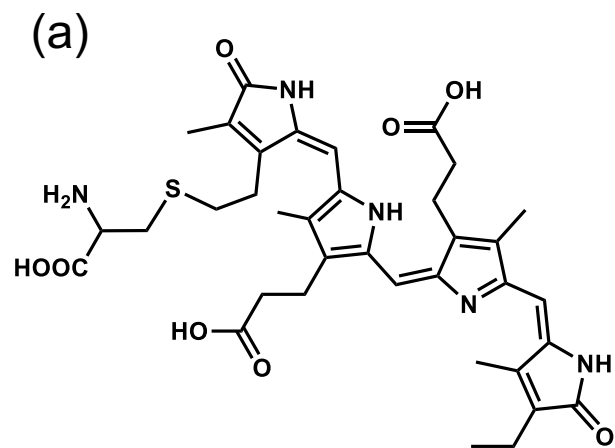


図 5. スピルリナ色素の発色団の構造

(a) ジヒドロビリベルジン

(b) フィコシアノビルン

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

令和6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～

研究分担者 西崎雄三 東洋大学 食環境科学部 食環境科学科 准教授

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、強酸性測定溶媒中での qNMR 用基準物質：DMSO₂と DSS-*d*₆の安定性、Cy3G・Clの濃度依存性、および内部標準法 qNMR (IC-qNMR)と外部標準法 qNMR (EC-qNMR)の比較を行った。DMSO₂と DSS-*d*₆は、検討した強酸性測定溶媒中で安定であり、qNMR における基準物質として使用できることを確認できた。Cy3G・Clの濃度依存性については、20 mg/mLを超える場合において完全に溶解していない可能性が示唆された。強酸性条件下での安定性が確認された DMSO₂と DSS-*d*₆を基準物質に用いて、適切なアントシアニン濃度で IC-qNMR と EC-qNMR を実施した結果、両手法から得られた結果は標準偏差の範囲内で一致していた。以上の結果から、本研究では Cy3G・Clの正確な絶対純度を算出できたことが示された。

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り、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化合物の総称である。一般に、橙から赤、紫色の色彩を呈し、食品添加物としても利用されている。食品添加物公定書に収載されている「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の一つは、溶液中の水素イオン濃度(pH)に依存して色が変わることである。これは、アントシアニジンの分子構造が pH によって変化するためである。中性からアルカリ性にかけては徐々に分解して退色するが、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の形で販売されている(図1)。

これらの標準品のラベルに記載されている

純度は、クロマトグラフ法によるピーク面積百分率で算出された相対純度であることが多く、絶対純度が付与された標準品は市販されていない。そこで、本研究では、定量 NMR (qNMR)を用いたアントシアニンの絶対純度測定法の確立を目指すこととした。

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ため、qNMR による純度評価を行う際には、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にシフトさせることが重要である。昨年度は、モデル化合物としてアントシアニン的一种であるシアニジン 3-グルコシド塩化物(Cy3G・Cl)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を調査した。その結果、測定溶媒に酸を添加するだけでなく、添加した酸が溶媒中で解離するための一定量の重水の添加も重要であることが明らかになった。そして、5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)が、Cy3G・Cl にとって最適な測定溶媒であることを見出した。

今年度は、5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)を用いた場合の qNMR 用基準物質の安

定性, および qNMR 測定における Cy3G・Cl の濃度依存性について検討した. さらに, 内部標準法 qNMR (IC-qNMR) と外部標準法 qNMR (EC-qNMR) を用いた場合に, Cy3G・Cl の純度測定結果に差が生じるかを評価したので, ここに報告する.

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.

DSS- d_6 (Cat. No. 044-31671, 質量分率 92.3%) ジメチルスルホン(DMSO₂; Cat. No. 048-33271, 質量分率 99.9%), 重水(D₂O; Cat. No. 047-34243, D 99.8%), 重メタノール(methanol- d_4 ; Cat. No. 138-18703, D 99.8%)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) NMR 装置

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

B-3) qNMR 測定

qNMR 測定では, NMR 試料ごとに 90°パルス幅(pw90)を校正し, この校正值を測定条件に反映させた. 具体的な測定手順は以下の通りである: NMR 試料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, ¹H および ¹³C 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 pw90 を校正した. 校正した pw90 を, 以下の qNMR 測定条件に反映させた.¹⁾

- 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
- ¹³C デカップリング: MPF8 (取込み時間のみ)

得られた 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 倍に増やした後, フーリエ変換を行った. 次に, 位相とベースラインを補正して定量用の ¹H-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.

$$\text{Molar Conc.}_A =$$

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

式 1

下付き A: 分析種(Cy3G・Cl), 下付き C: qNMR 基準物質(DMSO₂ と DSS- d_6).

Cy3G・Cl は 4 位, DMSO₂ および DSS- d_6 はメチル基のシグナルを定量対象とした.

B-4) DMSO₂ と DSS- d_6 の安定性

DMSO₂ (または DSS- d_6) 1 mg を精密に量り取り, 5% TFA- d 含有重メタノール/重水(9:1) 1 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を取り, NMR 試料管に移して qNMR 測定を行った. 得られた DMSO₂ (または DSS- d_6) のシグナル積分値を以下の式 2 に代入して, 1 プロトンあたりの感度係数を算出した. qNMR 測定は 3 回繰り返し, 3 日間にわたって実施した.

$$\text{Response Factor} = S_A \times PW90_A/H_A/\text{Conc.}_A$$

式 2

B-5) Cy3G・Cl の濃度依存性

Cy3G・Cl を 5, 10, 20, 40 mg それぞれ精密に量り取り, 5% TFA- d 含有重メタノール/重水(9:1) 1 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を取り, NMR 試料管に移して qNMR 測定を行った. 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, DMSO₂ を約 2.0 mg 精密に量り取り, 5% TFA- d 含有重メタノール/重水(9:1) 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, 5%

TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1) 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 測定を行った。

B-6) IC-qNMR と EC-qNMR の比較

Cy3G・Cl を 5 mg, DSS-*d*₆ を 1 mg 精密に量り取り、5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1) 1 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を取り、NMR 試料管に移して qNMR 測定を行い、Cy3G・Cl の純度を算出した(IC-qNMR)。また、「B-5) Cy3G・Cl の濃度依存性」に記載した手順に従い、別途、外部標準(EC : 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL)を調製して qNMR 測定を行い、Cy3G・Cl の純度を算出した(EC-qNMR)。

C. 結果および考察

C-1) 酸性条件下における qNMR 用基準物質 : DMSO₂ と DSS-*d*₆ の安定性

現在、試薬会社からさまざまな qNMR 用基準物質が販売されており、それぞれの基準物質について、重溶媒に対する溶解性や安定性が公開されている。しかし、酸性条件下での安定性については明らかではない。本研究ではアントシアニン測定溶媒として、酸性に傾けた 5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1) を使用するため、この測定溶媒中における qNMR 用基準物質の安定性について調査する必要がある。重メタノールおよび重水に溶解可能な qNMR 用基準物質として、DMSO₂ と DSS-*d*₆ が適していることから、これらの 5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1)における安定性を調査した。

DMSO₂ および DSS-*d*₆ の安定性は、qNMR によって確認した。具体的には、両物質の 1 プロトン当たりの感度係数を 3 日間にわたり記録した。その結果、DMSO₂ および DSS-*d*₆ のいずれにおいても、分解物のシグナルはスペクトル上に観察されず、感度係数は 1%以内の範囲で安定していることが確認された(図 2)。以上の結果から、DMSO₂ および DSS-*d*₆ は、酸性に傾

けたアントシアニン測定溶媒中でも安定であると結論付けた。

C-2) アントシアニン qNMR の濃度依存性

アントシアニンは色素化合物であるため、NMR 試料を調製する際に、アントシアニンが測定溶媒に完全に溶解しているかどうかを目視で確認することが難しい。そこで、Cy3G・Cl を 5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9:1, v/v)に溶解し、5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL の濃度となるように調製して、それぞれ EC-qNMR で純度を測定した。その結果、20 mg/mL を超える濃度では Cy3G・Cl が完全に溶解していない可能性が示唆された(表 1)。本研究では、Cy3G・Cl のみを対象としているが、アントシアニンの分子種によっては、NMR 測定溶媒への溶解性が大きく異なることが予想される。したがって、アントシアニンをはじめとする色素化合物について qNMR 測定を行う際には、試料の濃度を複数調製して純度を測定し、それらの純度測定結果の一致を確認することで、アントシアニンが完全に溶解していることを確認することが重要であると考えられる。

C-3) IC-qNMR と EC-qNMR の純度測定結果の比較

最後に、IC-qNMR と EC-qNMR によるアントシアニンの純度測定結果を比較した。今回使用した 5%TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1) の測定溶媒では、DMSO₂ および DSS-*d*₆ が安定であることが確認されているため、外部標準には DMSO₂ を、内部標準には DSS-*d*₆ を用いた。また、アントシアニンである Cy3G・Cl の調製濃度は、「C-2) アントシアニン qNMR の濃度依存性」の結果に従い、5 mg/mL とした。EC-qNMR で得られた Cy3G・Cl の純度は $92.7 \pm 0.9\%$ 、IC-qNMR では $93.5 \pm 0.4\%$ であった(表 2)。EC-qNMR の結果は標準偏差(SD)の範囲内で IC-qNMR の結果と一致していたため、IC-qNMR と EC-qNMR で得られる純度測定結果は一致していると結論付けた。

D. 結論

本研究は Cy3G・Cl をモデル化合物として、アントシアニンの qNMR 純度測定法を確立するための検討を行った。強酸性条件のアントシアニン測定溶媒(5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1))中で、qNMR 基準物質である DMSO₂ および DSS-*d*₆ の安定性を確認した結果、両物質は分解せず、感度係数も安定していた。これにより、酸性条件下でも基準物質として使用可能であることが示された。Cy3G・Cl の濃度依存性については、20 mg/mL を超える場合には完全に溶解していない可能性が示唆されたため、5 mg/mL が最適な濃度であると判断された。IC-qNMR および EC-qNMR による Cy3G・Cl の純度測定結果は、標準偏差の範囲内で一致していた。以上の結果から、酸性条件下でも DMSO₂ および DSS-*d*₆ を IC または EC として使用し、適切なアントシアニン濃度で qNMR 測定を行うことで、正確なアントシアニン純度を求められることを明らかにした。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、重要な知見となる。

E. 文献

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

F. 研究発表

学会発表

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹 : ¹H スピン情報に基づいたクロロゲン酸類のデジタルリファレンススタンダード(dRS)の作成, 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会 (2024.5).

論文発表

- 1) Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen S-P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G. F: Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR

Sustainability. Analytical Chemistry, 2024; 96(24): 9790-9798.

- 2) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子 : 燃焼法による食品添加物中の窒素定量分析. 日本食品化学学会誌, 2024; 31(1) 31-34.

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

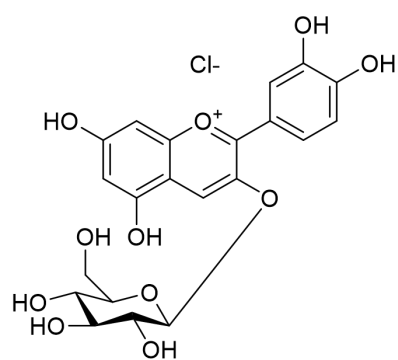


图1 Cy3G-Cl

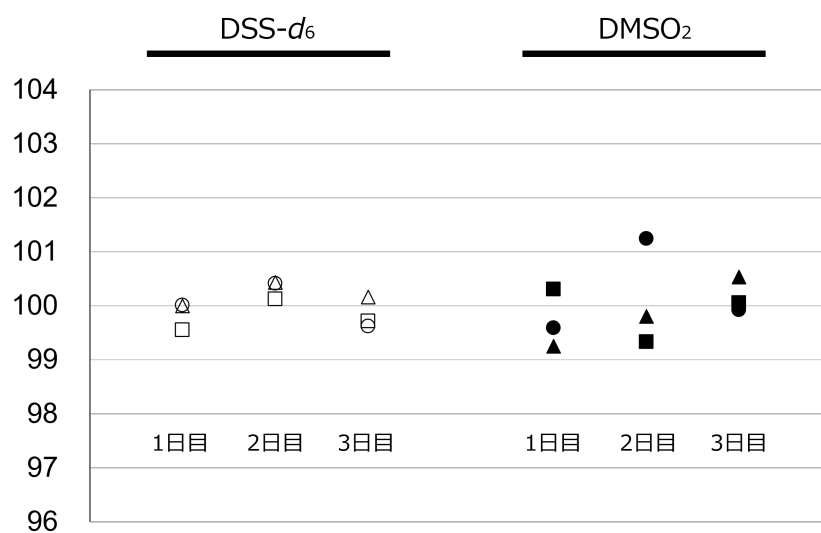


図2 5%TFA- d 含有重メタノール／重水(9 : 1, v/v)におけるDSS- d_6 とDMSO $_2$ の安定性

表1 アントシアニンqNMRの濃度依存性

5 mg/mL Cy3G・Cl	10 mg/mL Cy3G・Cl	20 mg/mL Cy3G・Cl	40 mg/mL Cy3G・Cl
93.5 ± 0.8%	93.6 ± 1.3%	91.0 ± 1.3%	86.4 ± 0.6%

表2 EC-qNMRとIC-qNMRから算出したCy3G・Clの絶対純度

	EC-qNMR	IC-qNMR
Day1	93.5 ± 0.4%	93.4 ± 0.2%
Day2	92.2 ± 0.8%	93.8 ± 0.2%
Day3	92.4 ± 0.8%	93.4 ± 0.5%
AVE	92.7 ± 0.9%	93.5 ± 0.4%

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

令和6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)を利用したメナキノン及びフィトナジオンの定量法の検討

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 第二室長

研究要旨

既存添加物名簿収載品目のひとつである「メナキノン(抽出物)」の成分規格では、主成分であるメナキノン(MK-4)の定量法が設定されている。しかし、MK-4は光に弱く分解しやすいため、より安定かつ安価な別の物質を基準物質とする相対モル感度(RMS)法を検討した。MK-4はビタミンKの一種であり、ナフトキノン骨格を持つ側鎖の異なる類縁体が多く存在する。この中には、医薬品として用いられるフィトナジオン(K₁)(栄養上重要とされるMK-7も含まれている。本研究では、これらも同一の基準物質及びRMSで定量する手法を検討した。

研究協力者

岡田 真子 日本大学生物資源科学部実習生

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(¹H-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がある。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、発色団が同一の類似化合物であればRMS値をある程度予測できないかと仮定し、ナフトキノン骨格を持つフェナキノン類やメナキノン類を対象としたRMS値を算出し比較した。また、実際に食品添加物や食品に含まれる対象化合物の定量が可能か評価した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

「メナキノン(抽出物)」(国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部内管理番号:A77)は日本食品添加物協会から入手した。ビタミンK含有食品として、ひきわり納豆(1社1製品)をスーパーマーケットにて購入し用いた。

定量NMR用基準物質として、1,4-BTMSB-d₄標準物質(以下、1,4-BTMSB-d₄, 純度100.0%±0.2%, k=2, lot. No. KCL2411)を用いた。また、本研究に使用した試薬を表1に示す。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) 装置及び器具

以下の装置を本研究に用いた。

NMR 装置: JNM-ECZ600R/S1 (日本電子(株)製)
高速液体クロマトグラフィー:
装置 A) 島津製作所(京都, 日本)製 Prominence series (オートサンプラー: SIL-20AC, 送液ポンプ: LC20AT, カラムオーブン: CTO-20AC, 多波長検出器: SPD-M20A, 紫外可視吸光度検出器: SPD-20A, データ処理ソフト: LabSolutions)
装置 B) WatersTM (MA, USA)製 Alliance series (HPLC システム: e2695, 多波長検出器: 2998 PDA Detector, 紫外可視吸光度検出器: 2489 UV/Vis Detector, データ処理ソフト: MassLynx V4.1)
ウルトラマイクロ天秤: XP2U (METTLER TOLEDO(株)製)
セミマイクロ天秤: BM-252 ((株)エー・アンド・デイ)
電動ピペット: Multipette E3X(Eppendorf)
ソニケーター: ブランソニック 卓上型超音波洗浄器 2510 (日本エマソン(株))

B-3) メナキノン及びフィトナジオンの RMS 算出

B-3-1) 試料溶液調製

NMR 用試料液: ウルトラマイクロ天秤を用いて, 4-ヒドロキシ安息香酸ドデシル(D4HB)約 10 mg 及び 1,4-BTMSB-*d*₄約 1 mg をそれぞれ精密にひとつの褐色スクリュールバイアルに量りとり, MeOH-*d*₄ 2.0 mL を加えて溶解させたものを NMR 用試料液とした. NMR 用試料溶液 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. 他方, 試料として日本薬局方フィトナジオン標準品(K₁ 試薬), メナキノン-4 標準品(MK-4 試薬)及びメナキノン-7(MK-7 試薬)を用いた際も, 同様に操作した. ただし, これら 3 種の化合物については酸化防止剤として 3-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシアニソール(BHA) 20 mg も精秤し加えたほか, 溶解溶媒として THF-*d*₈を用いた.
HPLC 用試料液: NMR 用試料溶液(5000 µg/mL)を, メタノールを用いて精密に希釈し, 6 濃度の検量線用標準液(9.6-250 µg/mL)を調製し HPLC 用試料溶液とした.

B-3-2) 定量 NMR による純度測定

NMR 測定条件は以下のとおり.
照射中心: 5 ppm, 観測幅: 20 ppm, デジタル分解能: 0.25 Hz, 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, ¹³C デカップリング: MPF8 (取込み時間のみのみ), 測定温度: 25°C.

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, 位相及びベースラインを補正し, 定量用の ¹H 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)及び式(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. なお, D4HB の定量には, 4.0, 6.5, 及び 7.6 ppm 付近のシグナルを, K₁, MK-4 及び MK-7 の定量には 3.1 ppm 付近のシグナルをそれぞれ用いた. これらの化学シフトは 1,4-BTMSB-*d*₄ のシグナルを 0 ppm としたときの値で示している.

$$molC_A = molC_B \times I_A/I_B \times H_B/H_A \quad (1)$$

$$P_A = molC_A \times MW_A/C_S \times 92.4\% \quad (2)$$

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*: 1,4-BTMSB-*d*₄ (標準), *S*: 試料.

B-3-3) HPLC 分析

HPLC 測定条件は以下の通り.
カラム: Wakopak Ultra C18-5 (4.6 × 150 mm, 5 µm), カラム温度: 40°C, オートサンプラー温度: 室温, 移動相: メタノール, 流速: 1.0 mL/min, 注入量: 10 µL, 検出波長: 256 nm (D4HB), 247 nm (K₁, MK-4 及び MK-7).

B-3-4) RMS の決定

各試薬(化合物)について, B-3-2)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-3-3)で得られたピーク面積を縦軸にとった絶対検量線を各化合物について作成した. K₁, MK-4 及び MK-7 (分析種)の絶対検量線の傾き

を, D4HB (基準物質)の絶対検量線の傾きでそれぞれ除し, RMS を求めた.

B-4) 「メナキノン(抽出物)」中の MK-4 定量

B-4-1) HPLC 用検液調製

「メナキノン(抽出物)」5 mg 及び BHA 10mg を精秤し, 褐色バイアルに入れ, MeOH 1 mL を正確に加えて溶解させた. 別に, D4HB 5 mg を精密に量りとり, 同様に MeOH 1 mL に溶解させた. これらの溶液について, 各溶液につき 5 点(約 0.0105~0.25 mg/mL)の濃度となるよう MeOH にて希釈し, HPLC 用検液とした.

B-4-2) 検量線用標準溶液調製

MK-4 試薬 5mg 及び BHA 10mg を精秤し, 褐色バイアルに入れ, MeOH 1 mL を正確に加えて溶解させた. この溶液について, 各溶液につき 5 点(約 0.0105~0.25 mg/mL)の濃度となるよう MeOH にて希釈し, 検量線用標準溶液とした.

B-4-3) RMS 法による定量

D4HB に対する MK-4 の RMS を用い, 以下の式に従い, 「メナキノン(抽出物)」の HPLC 用検液中に含まれる MK-4 のモル濃度(mol/L)を算出した. このとき, D4HB の純度として, B-3-2)で $^1\text{H-qNMR}$ によって算出した値を用いた.

$$C_{\text{ana}}[\text{mol/L}] = \frac{A_{\text{ana}}}{A_{\text{ref}}} \times \frac{1}{\text{RMS}} \times C_{\text{ref}} \quad (3)$$

ここから, 次式により「メナキノン(抽出物)」中に含まれる MK-4 の含量を求めた.

$$\text{Cont.}_{\text{ana}} [\%] = C_{\text{ana}} \times DF \times \frac{M_{\text{ana}}}{W_{\text{ext}}} \times 100 \quad (4)$$

ここで, Cont.は含量(%), DF は希釈倍率, M はモル質量(g/mol), W は秤取量(mg), ext は「メナキノン(抽出物)」.

B-4-4) 絶対検量線法による定量

B-4-2)で調製した MK-4 試薬の検量線用標準溶液のクロマトグラムから MK-4 のピーク面積を求め, 横軸に MK-4 のモル濃度(mol/L), 縦軸にピーク面積をとった検量線を作成した.

このとき, 検量線用標準溶液のモル濃度は, MK-4 試薬の純度を 100%とみなした場合と, $^1\text{H-qNMR}$ にて測定した純度を用いて補正を行った場合の2種を想定し, 検量線を作成した. 一方, 「メナキノン(抽出物)」の HPLC 用検液のクロマトグラムから, MK-4 のピークを同定し, そのピーク面積を求めた. 先述の 2 種の検量線を用いて「メナキノン(抽出物)」の HPLC 用検液中に含まれる MK-4 のモル濃度(mol/L)を算出した.

B-5) 還元カラムの使用による RMS 値の推定

B-5-1) 標準溶液調製

K₁ 試薬 2 mg, BHA 4 mg をそれぞれ正確に秤量し, MeOH 2 mL を正確に加えて溶解させた. この溶液 1.5 mL をとり, MeOH を用いて 10 mL に定容し, K₁ 標準液とした. また, D4HB 2 mg を正確に秤量し, MeOH 2 mL を正確に加えて溶解させた. この溶液 1.5 mL について K₁ 標準液と同様に操作し, D4HB 標準液とした.

B-5-2) HPLC 分析

HPLC 測定条件は B-3-3) で示した通り. ただし, 還元カラムである大阪ソーダ製 RC-10 (4.0 mm I.D. × 15 mm, 粒子径 5 μm) をポストカラムとして接続した. B-5-1) で調製した溶液について, まず還元カラムを接続して実施し還元カラムを用いたデータを取得した後, 還元カラムを外し移動相により約 1 時間平衡化させ, ベースラインの安定を確認して還元カラムなしのデータを測定した.

B-5-3) RMS 値の推定

還元カラムを用いた場合の RMS は以下式(5)により推定した. 還元カラムの有無により変化するのは K₁ 標準液中の K₁ のピーク面積のみであったため, 還元カラムを用いなかった場合に対する還元カラムを用いた場合の K₁ のピーク面積比を算出し, B-3-4) で求めた RMS を式(5)により補正した.

$$\text{RMS}^{\text{RC}} \cong \text{RMS} \times \frac{A_{\text{ana}}^{\text{RC}}/A_{\text{ana}}}{A_{\text{ref}}^{\text{RC}}/A_{\text{ref}}} \quad (5)$$

ここで, RC は還元カラム.

B-6) ひきわり納豆中のビタミン K 定量

B-6-1) 前処理

試料 4.1322 g を乳鉢に量りとり、超純水 2 mL、海砂適量、MeOH 10 mL を加え、乳棒で磨砕し、吸引ろ過によりろ液を得た。残留物を乳鉢に戻し、MeOH を 10 mL 加え、磨砕し吸引ろ過によりろ液を得た。この操作をさらに 2 回以上繰り返してろ液を得た。得られたろ液を合わせ、10 g/L クエン酸水和物溶液 10 mL、ヘキサン-酢酸エチル溶液 (9:1 v/v) 15 mL を加えた。この液を 5 分間振り混ぜ、3000 rpm にて 5 分間遠心分離し、有機溶媒層を褐色ナスフラスコに分取した。水層にヘキサン-酢酸エチル混液 (9:1 v/v) 15 mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返した。全有機溶媒層を合わせ、溶媒を減圧留去し、残留物^{H1}を得た。これに、ヘキサン 10 mL を加えて溶解させ、シリカゲルカラム(ガラス製クロマトグラフ管(上部φ25×100 mm, 下部φ10×200 mm(コック下部 50mm))にカラムクロマトグラム用シリカゲル 60 (球状)(中性), φ75 μm を充填したもの)に添加した。さらにヘキサン 10 mL を加えた後、ヘキサン-ジエチルエーテル混液(85:15 v/v) 90 mL を加え、溶出液を採集し、減圧留去ののち残留物^{H2}を得た。残留物^{H2}を MeOH にて溶解させ 1 mL に定容し、試料溶液^{HN}とした。

B-6-2) 標準溶液の調製

MK-7 試薬 2 mg 及び BHA 4mg をそれぞれ正確に秤量し、MeOH 2 mL を精確に加え、溶解させた。この溶液 1.5 mL をとり、MeOH を用いて 10 mL に定容し、MK-7 標準液とした。別に、D4HB 2mg を精密に量りとり、MeOH 2 mL を正確に加え、溶解させた。この溶液 1.5 mL をとり、MeOH を用いて 10 mL に定容し、D4HB 標準液とした。

B-6-3) MK-7 含量の算出

試料溶液^{HN}及び MK-7 標準液を B-5-2) に示す HPLC 条件でそれぞれ測定した。得られた両者のクロマトグラムから、試料溶液^{HN}及び MK-7 標準液中の MK-7 のピーク面積を求め

た。

C. 結果及び考察

C-1) RMS 決定のための条件検討

C-1-1) HPLC 条件検討及び基準物質の選定

食品添加物公定書収載の「メナキノン(抽出物)」の成分規格を参考に、分析条件を検討した。成分規格では試料調製に用いる溶媒はエタノール(99.5)、移動相はメタノールが用いられている。各分析種の試薬から調製した溶液を測定したところ、分析種の溶解性が確認されたメタノールを、試料調製溶媒及び HPLC 測定における移動相として採用した。

次に検出波長を検討した。本研究の目的のひとつとして、ビタミン K の共通構造(ナフトキノン骨格)に由来し、かつ側鎖に存在する二重結合の吸収波長の影響を受けない $\lambda_{\max}$ を検出波長とすれば、この骨格をもつ他のビタミン K 類でも同一の RMS を用いた定量が可能ではないか、という仮説の検証がある。分析種 3 種の UV 吸収スペクトルを確認したところ、 $\lambda_{\max}$ をはじめとしたスペクトル形状が一致したため、分析種の K₁、MK-4 及び MK-7 は同じ検出波長での定量が可能であると推察された。勝井ら¹⁾の報告によると、3 位の側鎖を持たないビタミン K₃ は、アセトニトリル/水混液(1:1)中で 242.0~246.0, 251.0~255.0, 261.0~265.0 及び 327.0~331.0 nm に $\lambda_{\max}$ が観察されている。このことから、図 1 に示すスペクトル中の $\lambda_{\max}$ のうち、報告¹⁾に近似する 246~247, 266~267 及び 329~331 nm はビタミン K のナフトキノン骨格に由来する波長であると考えられた。そのため、以上 3 カ所のいずれかを検出波長とすることとし、基準物質の選定結果により本 RMS 法の検出波長を決定することとした。

基準物質には、先述の $\lambda_{\max}$ と近い $\lambda_{\max}$ をもつ等、基準物質に求められる条件²⁾を満たすものを探索した。その結果、移動相をメタノールとしたときでも十分にカラムに保持され、256 nm に $\lambda_{\max}$ をもつ D4HB が基準物質として適切であると判断した。D4HB は市販試薬でも高純度であり安価かつ安定な化合物である。以上より、RMS の決定及び RMS 法においては基

準物質に D4HB を選択し、基準物質の検出波長は 256 nm、分析種の検出波長はこれに近い 247 nm とすることとした。

なお、分析種は溶媒中で経時変化の懸念があることから、安定性を保持するために BHA を酸化防止剤として添加することとした。

C-1-2) HPLC 検量線の濃度範囲の検討

基準物質である D4HB 及び各分析種の、RMS 決定時の濃度範囲を検討した。クロマトグラムにおける各ピークが S/N 比 50 以上³⁾となり、 $R^2=0.999$ 以上と良好な直線性を示した 9.6~250 µg/mL の範囲で、RMS 決定用の検量線を作成することとした。

C-1-3) ¹H-qNMR 条件の検討

NMR 測定に用いる重溶媒を決定するため、その溶解性を様々な溶媒を用いて検討した結果、基準物質は MeOH-*d*₄、分析種は THF-*d*₈ に溶解させることとした。

定量用シグナルは、他のピークと重ならず、安定した純度を算出可能なものを探索した。以下、本研究で定量に用いたシグナルを、1,4-BTMSB-*d*₄ 標準物質の ¹H シグナルを基準シグナル(δ 0ppm)とした化学シフトで表記する。
D4HB: H-12' (δ 4.0ppm, 2H), H-3, 5 (δ 6.5ppm, 2H), H-2, 6 (δ 7.6ppm, 2H). (図 2)
K₁, MK-4 及び MK-7: (δ 3.1ppm, 2H)(K₁, MK-4 では H-16', MK-7 では H-28') (図 3)

C-2) 基準物質に対する分析種の RMS 決定

各試薬について ¹H-qNMR により純度を測定したところ、基準物質である D4HB の純度は 98.08±0.36%, K₁ 試薬は 98.34±0.21%, MK-4 試薬は 98.26±0.16%, MK-7 試薬は 98.35±0.43%であった。得られた純度を用いて、B-3-1)で調製した HPLC 用試料溶液の純度を補正し、B-3-3) に示す条件で 2 台の HPLC を用いて分析に供した。得られたクロマトグラムから、横軸に各物質のモル濃度、縦軸にピーク面積値をとった検量線を作成した。得られた検量線の傾きの比から求めた RMS を表 2 に示す。各分析種の RMS は装置 A ではすべて 1.08,

装置 B ではすべて 1.05 であった。K₁, MK-4, MK-7 で同装置内では同一の RMS が得られたため、ナフトキノン骨格を持つビタミン K では、側鎖長が変わっても同一の RMS での定量が可能だと考えられた。以降の定量では、両装置の平均である 1.06 をビタミン K の RMS とした。

C-3) 「メナキノン(抽出物)」中の MK-4 定量

既存添加物の市場流通品である「メナキノン(抽出物)」中の MK-4 定量を、絶対検量線法と本研究で確立した RMS 法により行った(表 3)。絶対検量線法の定量値は、検量線作成時に MK-4 試薬の純度を 100%と仮定した場合と、¹H-qNMR により決定した試薬純度で補正した場合の 2 パターンで算出した。補正なしの前者では 99.4~99.7%であり、補正ありの後者の場合は MK-4 含量が 1.7%小さくなった。後者の方が試薬純度を考慮しているため真の MK-4 含量に近いと考えられるが、MK-4 試薬が高純度であったため大きな差はなかった。

次に RMS 法により「メナキノン(抽出物)」中の MK-4 含量を定量した。基準物質である D4HB の純度を ¹H-qNMR で決定した 98.08%とし、RMS 値を 1.06 として定量しところ、装置 A では 99.9%, 装置 B では 97.7%であった。装置間差は 2.2%程度と、絶対検量線法と比較して大きな値となった。

一方、両手法の RSD%を比較したところ、絶対検量線法では MK-4 試薬の純度補正の有無に関わらず 1.2~1.3%であったのに対し、RMS 法では 0.1~0.2 と小さかった。これは、絶対検量線法の標品である MK-4 試薬は光に弱く不安定な試薬であるため、標準液を工事調製する必要があるため調製差が大きくなったことが可能性のひとつとして挙げられる。RMS 法の基準物質である D4HB は安定性が高く、高濃度のストック溶液を作製して定量に用いても分解等が見られず定量値に影響を与えなかった。

以上より、「メナキノン(抽出物)」に関しては RMS 法の方が絶対検量線法と比較して定量値の装置間差が大きかったが、不安定な

MK-4 試薬を標品とする必要がないため併行精度に優れていた。MK-4 試薬の価格や扱いづらさを考慮すると、本研究で確立した RMS 法は定量の正確性を大きく損なうほどではなく、品質管理という目的で厳密な精度を求めないのであれば、絶対検量線法の代替法として十分運用可能であると考えられた。

C-4) 還元カラムの使用による RMS 値の推定

食品中のビタミン K 等、少量のものを定量する場合、還元カラムを用いた検量線法が一般的である⁴⁾。ここでいう還元カラムは、触媒還元方式でキノン体をハイドロキノン体に高収率で変換するキノン誘導体化カラムである⁵⁾。そのため、還元カラムを使用すると、ピーク面積の比が変化し、本研究で求めた RMS は適用不可である。そこで、還元カラムの有無により、RMS 値にどのような影響を与えるか検討した。

K₁ 標準液を B-5-2) に示す条件で HPLC 測定を行ったところ、ポストカラムとして還元カラムを用いることにより、保持時間が 13.98 min から 14.19 min へと 0.21 min 遅くなった(図 4)。また、ピーク面積は大きくなり、UV 吸収スペクトルは変化した。ナフトキノン骨格由来と考えられる $\lambda_{\max}$ は 244 nm のみとなった(図 5)。

還元カラムの使用により化合物が変化するものの、キノン体をもつ分析対象成分がすべてハイドロキノン体に変換されると想定すると、還元カラムの使用前後のピーク面積の比は理論上一定であることが予想される。そこで、本研究で求めた RMS に一定の係数をかけることで、還元カラムを接続した場合に求められる RMS と一致することが考えられた。K₁ 標準液中の K₁ の還元カラムの有無による比の平均は 2.15 であったため、式(5)に従いこれと RMS(1.06)を用い、還元カラムを用いた場合の RMS と予想される値である RMS^{RC} は 2.28 であった。他方、K₁ 標準液及び D4HB 標準液を、還元カラムを接続した状態で測定し、原点をとる一点検量線の傾きの比から RMS を算出したところ、2.32 であり、1.7%のズレであ

った。これは、化合物の変化により $\lambda_{\max}$ が 3 nm ズレたことや、RMS^{RC} の算出に 2 台の装置の平均値を使用したことが考えられる。しかし、装置間差や定量値の精度を考慮すると、推定値は十分使用可能と判断された。

C-5) 還元カラムを用いたひきわり納豆中の MK-7 定量

B-6-1)及び B-6-2)に記載の方法で調製した MK-7 標準液と試料溶液^{HN}を B-5-2) に示す条件で HPLC にて分析したところ、保持時間 35.11 min 付近に MK-7 と思われるピークが検出された(図 6)。このピークの UV 吸収スペクトルは、K₁ 標準液で検討したときと同様であった(図 7)。試料溶液^{HN}のクロマトグラムでは、K₁ 標準液分析時と同様、還元カラムの使用により、ピーク面積が大きくなるピークが複数見られた。

MK-7 について、ポストカラムとして還元カラムを用いたときの RMS は、本研究の結果と構造を考慮すると、K₁ の RMS^{RC} と同一であると考えられる。そこで、ひきわり納豆中の MK-7 含量を、還元カラムを用い、絶対検量線法と推定 RMS である RMS^{RC} を用いた RMS 法で実施した。その結果、絶対検量線法では 60 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、RMS^{RC} を用いた RMS 法では 53 $\mu\text{g}/100\text{g}$ であった。定量値として 10%の差があるが、本測定は調製回数が 1 であり、より詳細な検討が必要であると思われる。

D. 結論

本研究では、既存添加物「メナキノン(抽出物)」の有効成分である MK-4 の定量法について、光に弱く分解しやすい標品を用いない RMS 法の確立を試み、代替法として実用可能か検討した。さらに、同一の発色団を持つ K₁ (医薬品名「フィトナジオン」)や、MK-4 同様に栄養上重要視される MK-7 をはじめとしたほかのビタミン K でも、同一の RMS 値で定量可能か検証した。基準物質として D4HB を用いた系を確立した結果、このものに対するビタミン K 類の RMS は一律 1.06 であった。標品を用いた絶対検量線法とも比較したところ、

数%のばらつきはみられるものの、品質モニタリング等に用いる程度の精度であれば十分運用可能であることが示された。

他方、食品中のビタミン K 含量の定量を、ポストカラムとして還元カラムを用いて実施した。還元カラムの有無により検出されたピーク面積は変化するが、その比は一定となるため、還元カラムを用いない場合の RMS から予測可能であることが示唆された。これは、標品が入手困難な化合物であっても、還元カラム等で変化させて得られる場合、RMS を推定することが可能であることを示唆している。

E. 参考文献

- 1) 勝井五一郎, 府川秀明, 木島静正, 松本晃, 富山忠, 平内三政, 藤本恭子, 末木一夫, 山本大介, 小高要, 富田仁, 木村真一, 美濃真: フィロキノノンオキシド, メナキノノン-4 オキシド及びメナジオンの高速液体クロマトグラフィー用標準品の作製: 脂溶性ビタミン総合研究委員会生体試料中のビタミン K 類の HPLC による標準的定量法の作製小委員会. ビタミン, 1991; 65 (10): 481-488.
- b) 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 食品分析の信頼性確保における定量 NMR に基づく相対モル感度の役割—分析種の定量用標品不要なクロマトグラフィーの開発. FFI ジャーナル, 2019; 224 (2): 123-130.
- c) 酒井有希, 増本直子, 西崎雄三, 大槻崇, 松

藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた single-reference HPLC 法が定量値に影響を及ぼす 要因の検討と機能性表示食品中のルテイン定量への応用. 日本食品化学学会誌, 2020; 27 (3): 123-134.

- d) 食品成分データベース(日本食品標準成分表 2020 年版(八訂)対応), 文部科学省
<<https://fooddb.mext.go.jp/search.html>>
閲覧日: 2025 年 2 月 27 日
- e) HPLC カラム 還元カラム CQ-R, HPLC provided by OSAKA SODA
<https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/column/cq_manual.html>
閲覧日: 2023 年 1 月 4 日

F. 研究発表

1. 論文発表
該当無し
2. 学会発表
1) 中島馨, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討〜クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係〜. 第 120 回日本食品衛生学会 学術講演会(2024.11).

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.
メナキノン-4 標準品	MK-4 試薬	富士フイルム和光 純薬(株)	136-16641	AWP5790, ESM2660
メナキノン-7 標準品	MK-7 試薬	富士フイルム和光 純薬(株)	133-14331	DLL3967
日本薬局方フィトナジ オン標準品	K _I 試薬	(一財) 医薬品医療 機器レギュラトリ ーサイエンス財団	1127000021	PHY02A
4-ヒドロキシ安息香酸 ドデシル	D4HB	東京化成工業(株)	H0352	NQIKJ-PS
3- <i>tert</i> -ブチル-4-ヒドロ キシアニソール	BHA	東京化成工業(株)	B0723	W28ME-NG
メタノール- <i>d</i> ₄	MeOH- <i>d</i> ₄	MERCK(株)	1.06028.00252	S5831128 116
テトラヒドロフラン- <i>d</i> ₈	THF- <i>d</i> ₈	関東化学(株)	40064-43	
クエン酸一水和物	—	関東化学(株)	07380-01	602H1916
海砂 425~850 μm(20~35 mesh)	—	富士フイルム和光 純薬(株)	196-08175	—

表2 フィトナジオンまたはメナキノン類の基準物質に対する相対モル感度(RMS)

	装置A			装置B		
	K1	MK-4	MK-7	K1	MK-4	MK-7
RMS平均(n=3)	1.08	1.08	1.08	1.05	1.05	1.05
RSD%	0.98	1.78	0.69	1.25	1.86	0.51
同装置内RMS平均	1.08			1.05		

表3 「メナキノン(抽出物)」中 MK-4 含量

装置A

	絶対検量線法		RMS法	
	純度補正(○)	純度補正(×)	RMS1.08	RMS1.06(平均)
含量平均%(n=3)	97.9	99.7	98.0	99.9
RSD%	1.2	1.2	0.2	0.2

装置B

	絶対検量線法		RMS法	
	純度補正(○)	純度補正(×)	RMS1.05	RMS1.06(平均)
含量平均%(n=3)	97.7	99.4	98.6	97.7
RSD%	1.3	1.3	0.1	0.1

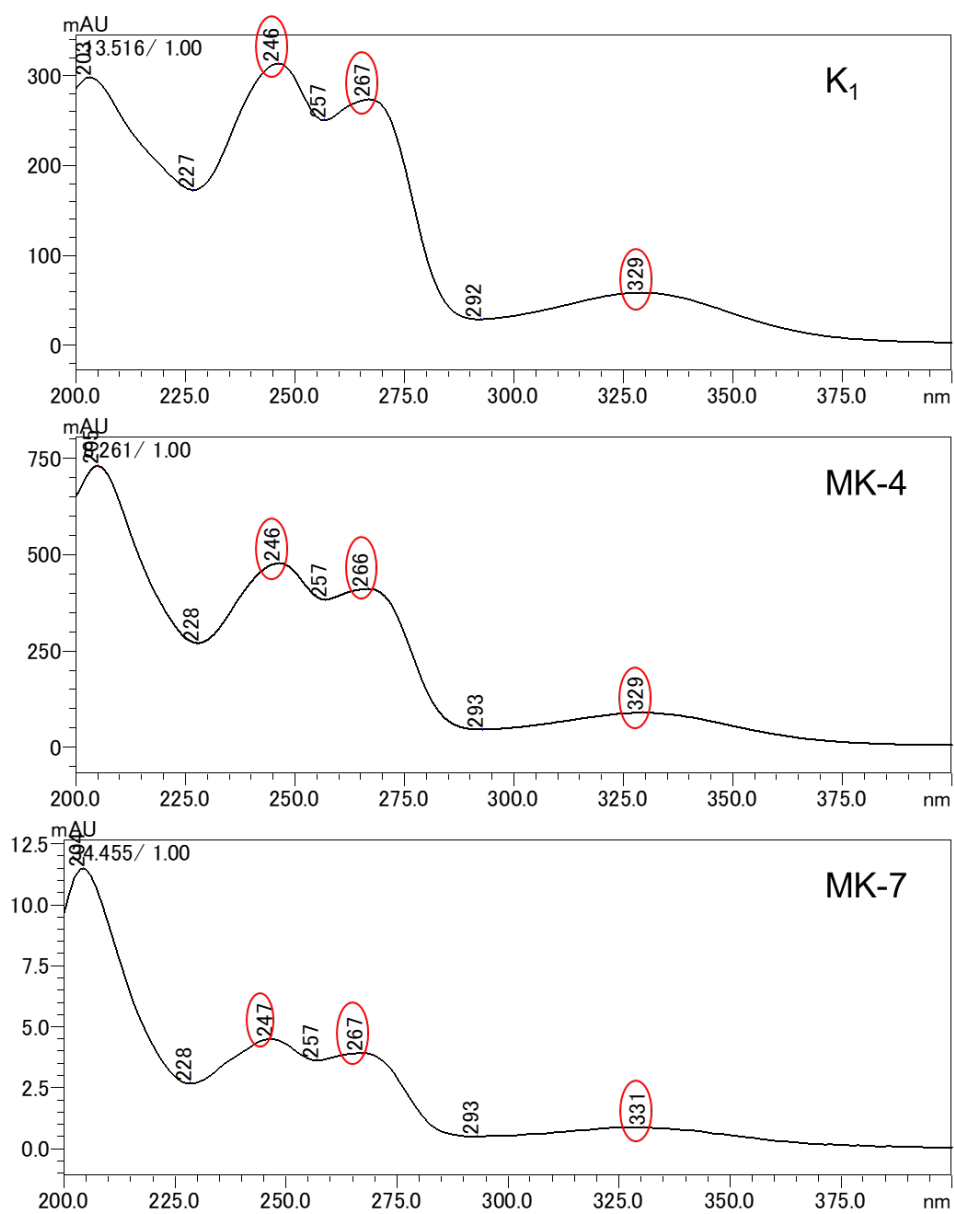


図1 「K₁, MK-4, MK-7のUV吸収スペクトル
赤丸は3つの分析種で共通かつナフトキノン骨格に由来すると考えられる $\lambda_{\max}$

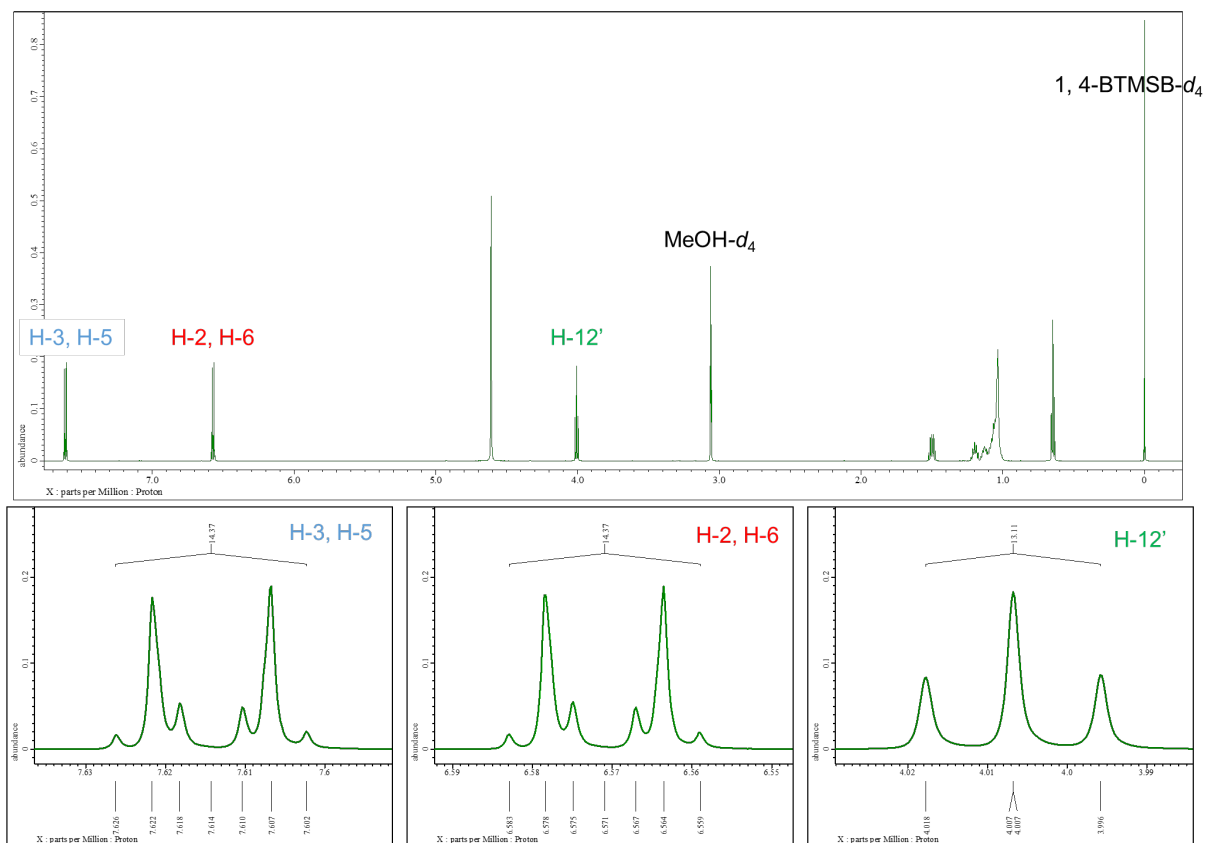
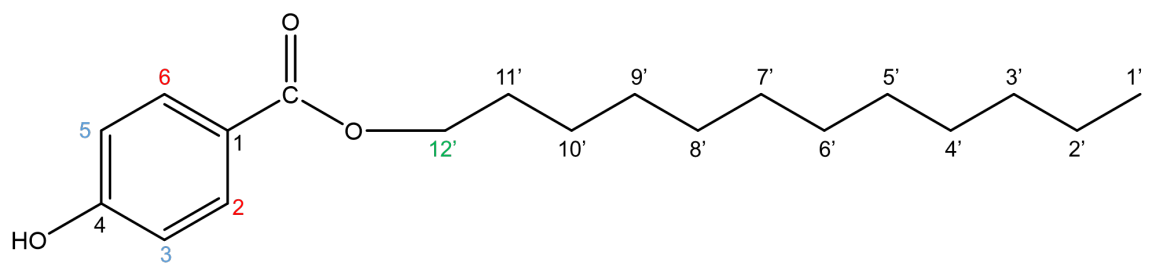


図 2 D4HB の化学構造, ^1H -qNMR スペクトル及び定量用シグナル

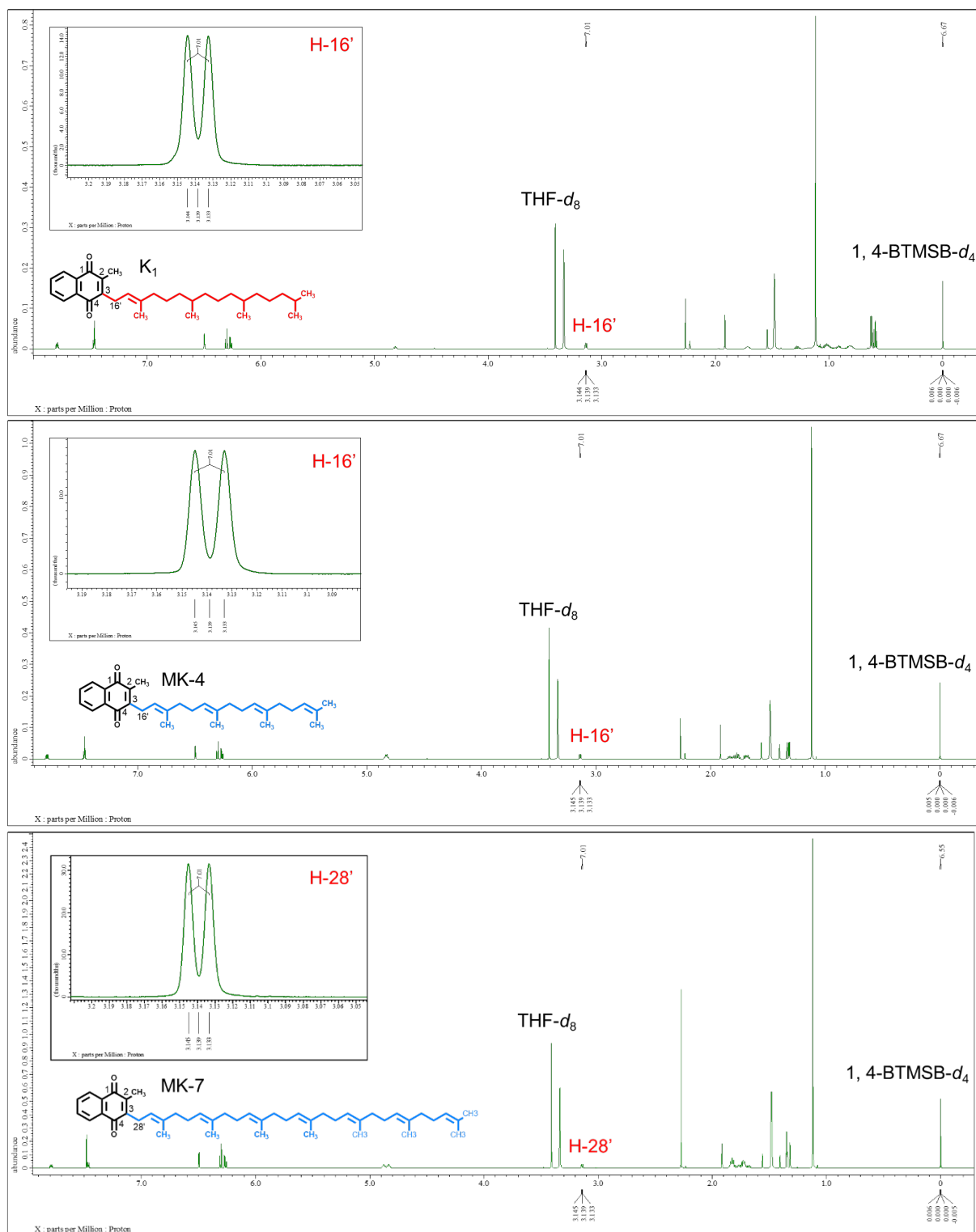


図3 分析種(K_1 , MK-4, MK7)の化学構造, ^1H -qNMR スペクトル及び定量用シグナル

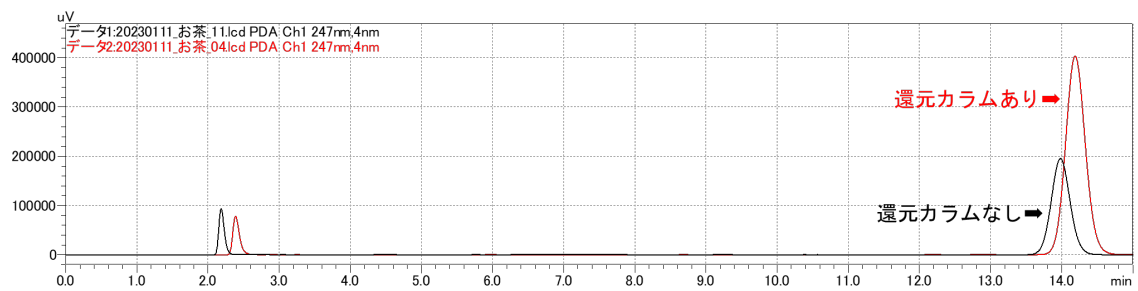


図4 還元カラムの有無による K₁ 標準液のクロマトグラム

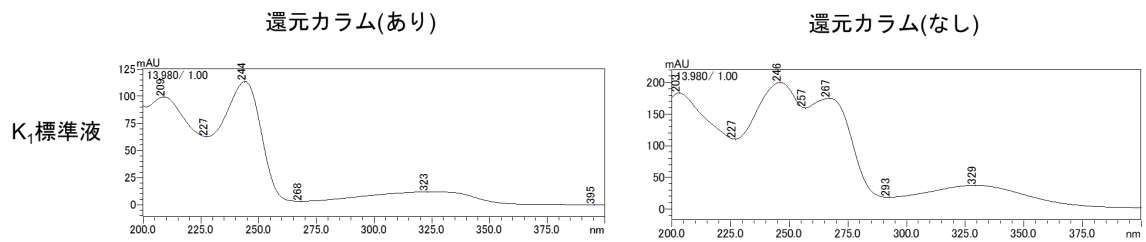


図5 K₁ 標準液中における K₁ スペクトルの還元カラムによる影響

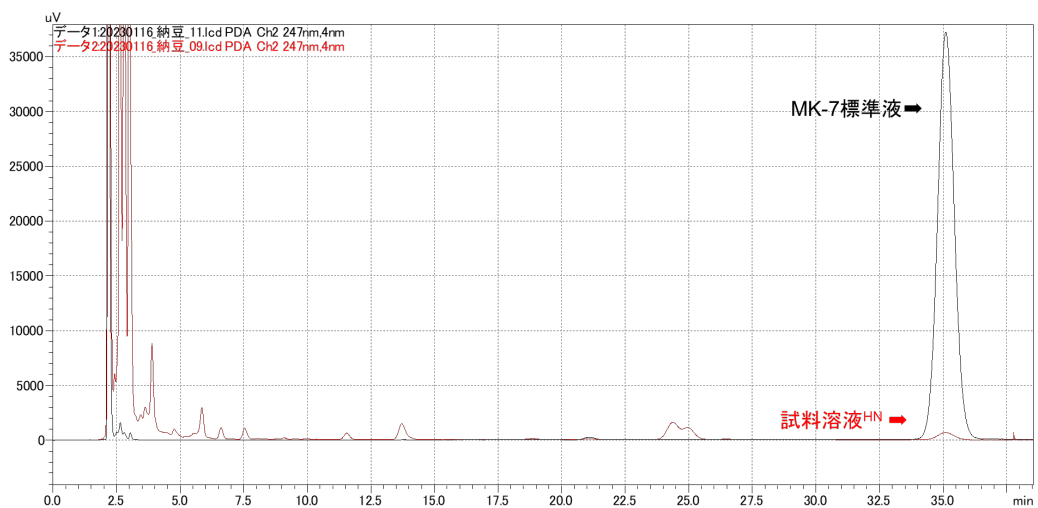


図6 MK-7 標準液及び試料溶液^{HN}のクロマトグラム

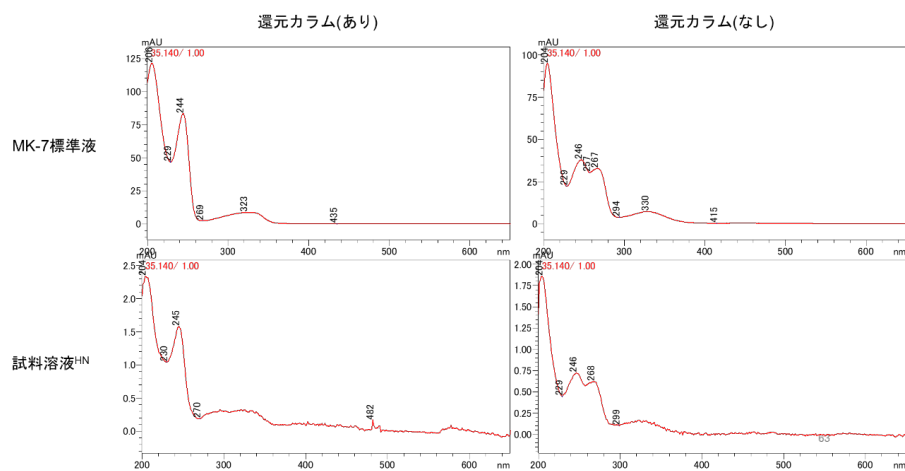


図7 MK-7 標準液及び試料溶液^{HN}の吸収スペクトル

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

令和6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

ムラサキヤマイモ色素に含まれるアントシアニン化合物の定量的分析法の開発

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 ムラサキヤマイモ色素(Purple yam color)は、ヤマイモ(*Dioscorea alata* L.)の塊根から得られた、シアニジンアシルグルコシド等を主成分とするものである。ジャム、ジュースやアイスクリーム等の食品の着色の他、化粧品や医薬品にも使用されることがある。一方で、いまだ適切な規格基準が設定されていない(第6版自主規格のみ)ため、定性及び定量のための基礎検討を実施する必要がある。シアニジンアシルグルコシドはアントシアニン配糖体の一種であり、糖の形態やアシル基の種類に応じて様々な種類がある。本年度の研究において、まず分析対象とするアントシアニン類のプロファイリングを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-質量分析計(MS)を用いて行った。HPLCの条件を決定する目的で、5本の分析カラムを検討した結果、TSKgel ODS-100Zカラムにおいて複数本のピーク(波長550 nm程度)が観察された。本系を用いて、LC-MSにより高含量なアントシアニン類の同定を試みた。その結果、3種の相対的に高強度なピークに関して、アグリコンと配糖体のタイプを推定することができた。また、これらの成分の標準品を獲得するために高速向流クロマトグラフィーを用いた精製を検討しており、その初期検討として分配係数の算出を行った。

研究協力者

高山卓大 立命館大学薬学部 助教

A. 研究目的

ムラサキヤマイモ色素(Purple yam color)は、「本品は、ヤマイモ(*Dioscorea alata* L.)の塊根から得られた、シアニジンアシルグルコシド(CAG)を主成分とするものである。」と定義されている¹⁾。ジャム、ジュースやアイスクリーム等の食品の着色の他、化粧品や医薬品にも使用されることがある。類似品にムラサキイモ色素があるが、ムラサキヤマイモ色素の方がやや紫味が少ない。耐光性はほぼ同等であるが、耐熱性に優れており、80℃で2時間加熱してもほとんど退色や色調の変化がない。そのため加熱工程を含む食品の着色に適している。また、アントシアニン成分に基づく抗酸化活性も期待さ

れており、市場流通する可能性は十分に考えられる²⁾。一方で、本邦においては現在、適切な規格基準が設定されていない(第6版自主規格のみ)ため、定性及び定量のための基礎検討を実施する必要がある。

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)に基づくムラサキヤマイモ色素の定性および定量法の開発を目指した。定量の対象物質は主成分であるCAGとするのが適切であると考えた。一方で、CAGは糖部分の構造やアシル基の種類に応じて種類が存在する。既報では、これらをHPLC-高分解能質量分析計(HRMS)にてプロファイリングしているケースが多いため³⁾、今年度はLC-四重極飛行時間型質量分析計(QToF/MS)を用いて、定量の対象とするCAGの設定を実施すること

とした。また、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC)を用いた標準品獲得に向けた基礎検討を併せて実施した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ムラサキヤマイモ色素の原体 2 ロット(国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部保存番号：C2352 及び C2375)を試験に用いた。

メタノール(HPLC 用), ギ酸(LC/MS 用, 約 99%), *tert*-ブトキシメチルエーテル(試薬特級), 1-ブタノール(試薬特級), アセトニトリル(HPLC 用), クエン酸一水和物及びトリフルオロ酢酸(試薬特級)は富士フイルム和光純薬社製のものを用いた。本研究に用いた超純水は, 全て Milli-Q EQ7000 system (Merck 社製)にて精製したものをを用いた。

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：測定条件検討及び分配係数の算出
島津製作所社製

ポンプ：LC-20AD

オートサンプラー：SIL-20AC

コントローラー：CBM-20A

フォトダイオードアレイ検出器：SPD-M20A

カラムオーブン：CTO-10A

LC-MS 装置：

HPLC 装置部：

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

フォトダイオードアレイ検出器：PDA eλ

Detector

QToF/MS 装置部：

Waters 社製 Xevo G2XS

イオン化条件：エレクトロスプレーイオン化
ポジティブモード

測定モード：MSE モード

B-3) 測定対象の原体の調製

測定対象の原体の 1 mL を取り, 9 mL メタノールを加えて 10 倍希釈物を調製した。この 100 μ L を取り, 400 μ L の水/メタノール=1/1 混合溶液により希釈して, 合計で 50 倍希釈物として測定に供した。

B-4) 分配係数の算出

有機系溶媒としては, *tert*-ブトキシメチルエーテル, 1-ブタノール, アセトニトリルを水系溶媒として水を選択し, トリフルオロ酢酸を添加して検討した。溶媒の混合比率は次の通りとした：3.5/2.0/1.5/4.5/0.01, 3.0/2.5/1.5/4.5/0.01, 2.5/3.0/1.5/4.5/0.01, 2.0/3.5/1.5/4.5/0.01 及び 1.5/4.0/1.5/4.5/0.01 (V/V/V/V)。これらの溶液をそれぞれ 5 mL 調製し, 5 分間静置した後, 100 μ L の色素原体をそれぞれ添加して十分に攪拌した。その後, 5 分間静置し, 分配した上相及び下相を 100 μ L 分取して溶媒留去した。乾固した残差を水/メタノール=8/2 (V/V)溶液の 100 μ L に溶解し, HPLC 測定に供した。分配係数は上相のピーク面積/下相のピーク面積として算出した。

B-5) HPLC 分離分析

移動相には, A 液：0.1 vol% ギ酸水溶液/B 液：0.1 vol% ギ酸含有メタノールを使用し, 以下に示すグラジエント条件にて, 30 分の分析を行った。

カラム：以下のカラムを検討した。

①TSKgel ODS-100Z column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, 東ソー社製)

②TSKgel ODS-100V column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, 東ソー社製)

③Xbridge C18 column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, Waters 社製)

④YMC-PackPrp C18 RS column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, YMC 社製)

⑤Inertsil ODS-2 column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, GL Sciences 社製)

LC-MS 測定においては, MS 分析に適切な流速

に設定できるように TSKgel ODS-100Z column (2.0×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)を用いた.

カラム温度: 40℃

流速: HPLC 測定時; 1.0 mL/min, LC-MS 測定時; 0.3 mL/min

グラジエント条件 B% (min): 20(0)-40(20)-95(20.1)-95(25.1)-20(25.2)-20(30)

検出波長: 200-800 nm

注入量: 10 μL

C. 結果及び考察

C-1) 色素原体の分析及び成分同定

まず, ムラサキヤマイモ色素原体について, 既存の食品添加物であるムラサキイモ色素と同等の試験を行い, 極大波長を確かめた. 図 1-(a)及び(b)に希釈液の外観(pH3.0)と吸光スペクトルを示した. 結果として赤〜暗赤色を示し, 極大吸収波長は 520 nm 周辺に認められていたため, 報告通りムラサキイモ色素と同等であることが検証できた. 図 2-(a)〜(e)には検出波長域 200-800 nm での 2 次元クロマトグラムの結果を示した. いずれのクロマトグラムにおいてもいくつかのピークが認められた. これらは極大吸収が 500 nm 周辺にあったため, 既報通り CAG の関連物質であることが示唆された. 特に TSKgel ODS-100Z カラムにおいてピーク形状が優れており, 複数本のピーク(検出波長 520 nm)が観察された. 従って, 本カラムを LC-MS 測定に適切となる様に内径及び粒子径を変更し, HPLC-HRMS を用いて, これらのピークの同定を試みた. 入手したロットごとのトータルイオンクロマトグラム及び 522 nm でのクロマトグラムを図 3-(a)〜(d)に示す. いずれも分析カラムの最適化時と同様の分離を得ることができ, 内 3 本は特に MS の検出強度が高かった. そこでこれらについて, MS 及び MS/MS スペクトルからの同定を試みた. その結果, 図 4-(a)〜(f)に示す通り, m/z 817.2230(9.76 分), m/z 787.2090(10.53 分)及び m/z 831.2368(12.42 分)の精密質量でイオンが検出された. これらはムラサキヤマイモの

抽出物に含まれるアントシアニン類として知られており, 本研究においても原体に含まれることが実証された. 一方で, m/z 831.2368 については報告がなく, 産地の違いや抽出工程の識別に使用できる可能性が考えられる. これらのアントシアニン類の MS/MS スペクトルを考えると, アグリコンがシアニジン骨格のものでプロダクトイオンの m/z 287.06 周辺, ペオニジン骨格のものでプロダクトイオンの m/z 301.07 周辺が検出されるという報告⁴⁾を踏まえると, それぞれのピークは図-5(a)〜(c)の構造を有することが考えられた.

C-2) CAG 標準品の獲得に向けた初期検討: HSCCC 条件検討のための分配係数算出

C-1 の検討結果から定量対象とする成分を設定できたため, 続いて HSCCC を用いた精製品の獲得に向けて分配係数の算出を行った. 結果は表 1 に示した通り, 3 本のピークが分配係数 1 周辺をとる溶媒系(*tert*-butyl methyl ether / 1-butanol / acetonitrile / water / trifluoroacetic acid=2.5/3.0/1.5/4.5/0.01, *V/V/V/V*)を設定することができた. 本条件を用いて HSCCC による単離精製を行うことで, 1 度に大量の純品を入手することが可能となると考えられる.

D. 結論

本研究では, 入手した色素原体の HPLC 測定条件を検討し, 3 本のピークが明確に観測可能な条件を設定した. また HPLC-HRMS 測定を通じて, 既報の事実と類似した結果を得ることができ, 明確に検出された成分については, CAG の構造を推定することが可能であった. また, 設定した分析条件を用いて, HSCCC による単離精製のための初期検討として分配係数の設定を行い. 今後は下記の計画で研究を進めていく.

- HSCCC を用いた色素原体からの CAG 類純品の獲得.
- 獲得した CAG 純品の構造決定.

以上を検討していくことで、正確かつ信頼性のあるムラサキヤマイモ色素の定性及び定量的評価法が構築できると考える。

E. 参考文献

- 1) 第 6 版既存添加物自主規格, 日本食品添加物協会 (2025).
- 2) Qiu P, Chen J, Wu J, Wang Q, Hu Y, Li X, Shi H, Wang X. The effect of anthocyanin from *Dioscorea alata* L. after purification, identification on antioxidant capacity in mice. *Food Sci Nutr.*, 2023; 11: 6106-6115.
- 3) Vishnu VR, Jyothi AN, Sheela MN, Sreekumar J, Identification of anthocyanins in a purple yam (*Dioscorea alata*) accession and their in vitro antiproliferative activity. *J Plant Biochem and Biotech.*, 2023; 32: 467-477.
- 4) Ivanova V, Dörnyei A, Stefova M, Stafilov T, Vojnoski B, Kilár F, Márk L, Rapid MALDI-TOF-MS Detection of Anthocyanins in Wine and Grape Using Different Matrices. *Food Anal. Method*, 2011; 4: 108-115.

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

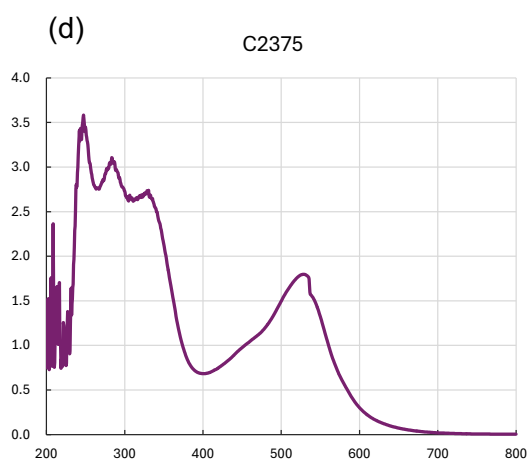
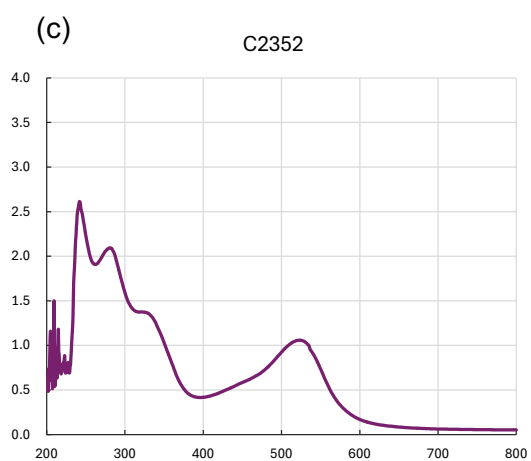
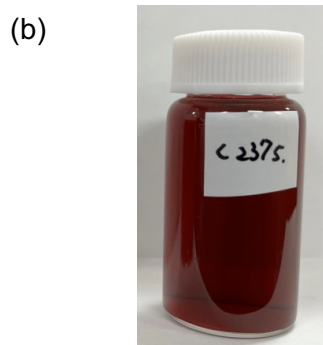


図 1. 色素原体の外観と検出波長の検討

(a)ロット 1 の外観, (b)ロット 2 の外観, (c)ロット 1 の吸光スペクトル, (d)ロット 2 の吸光スペクトル

いずれも pH 3.0 のクエン酸緩衝液中で観測

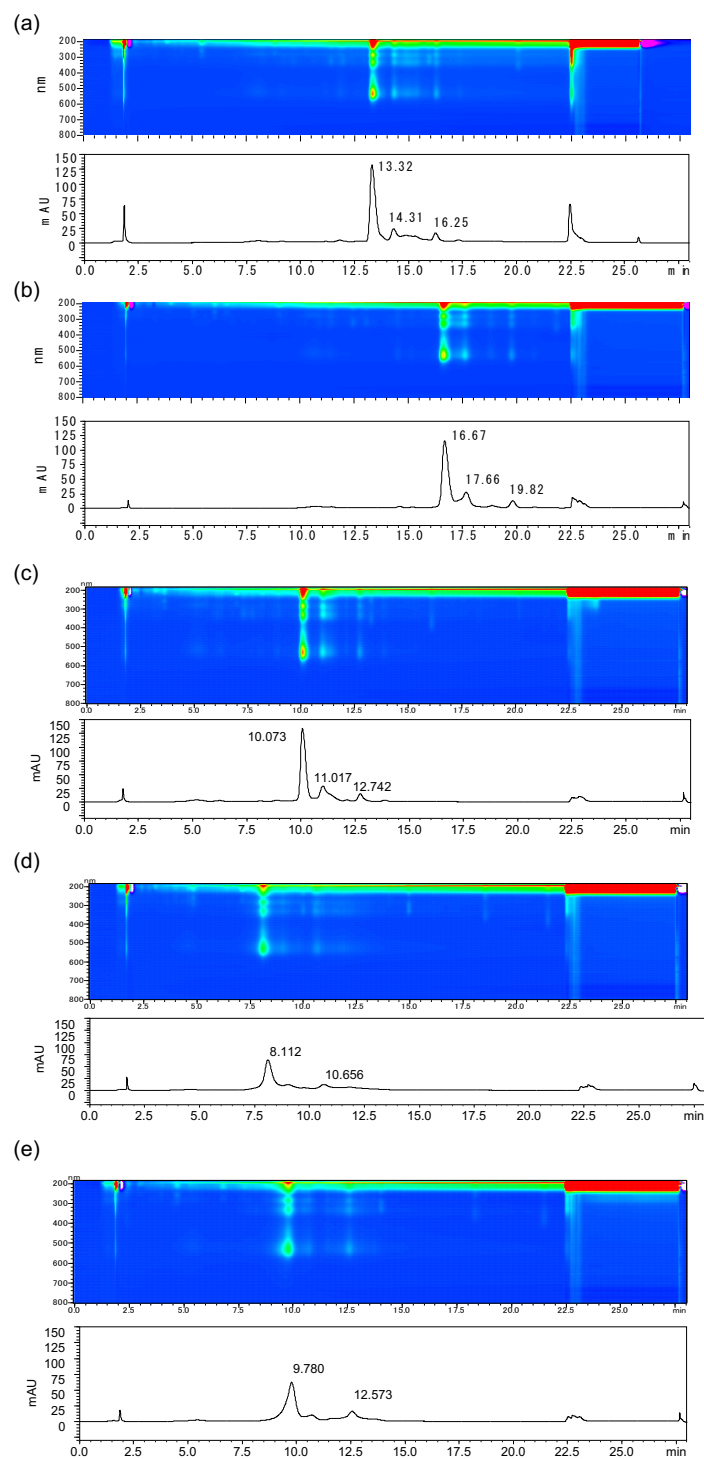


図 1. 分析カラムのスクリーニング結果

(a)TSKgel ODS-100Z column (4.6 × 150 mm, 5 μm, 東ソー社製), (b)TSKgel ODS-100V column (4.6 × 150 mm, 5 μm, 東ソー社製), (c)Xbridge C18 column (4.6 × 150 mm, 5 μm, Waters 社製), (d)YMC-PackPrp C18 RS column (4.6 × 150 mm, 5 μm, YMC 社製), (e)Inertsil ODS-2 column (4.6 × 150 mm, 5 μm, GL Sciences 社製)

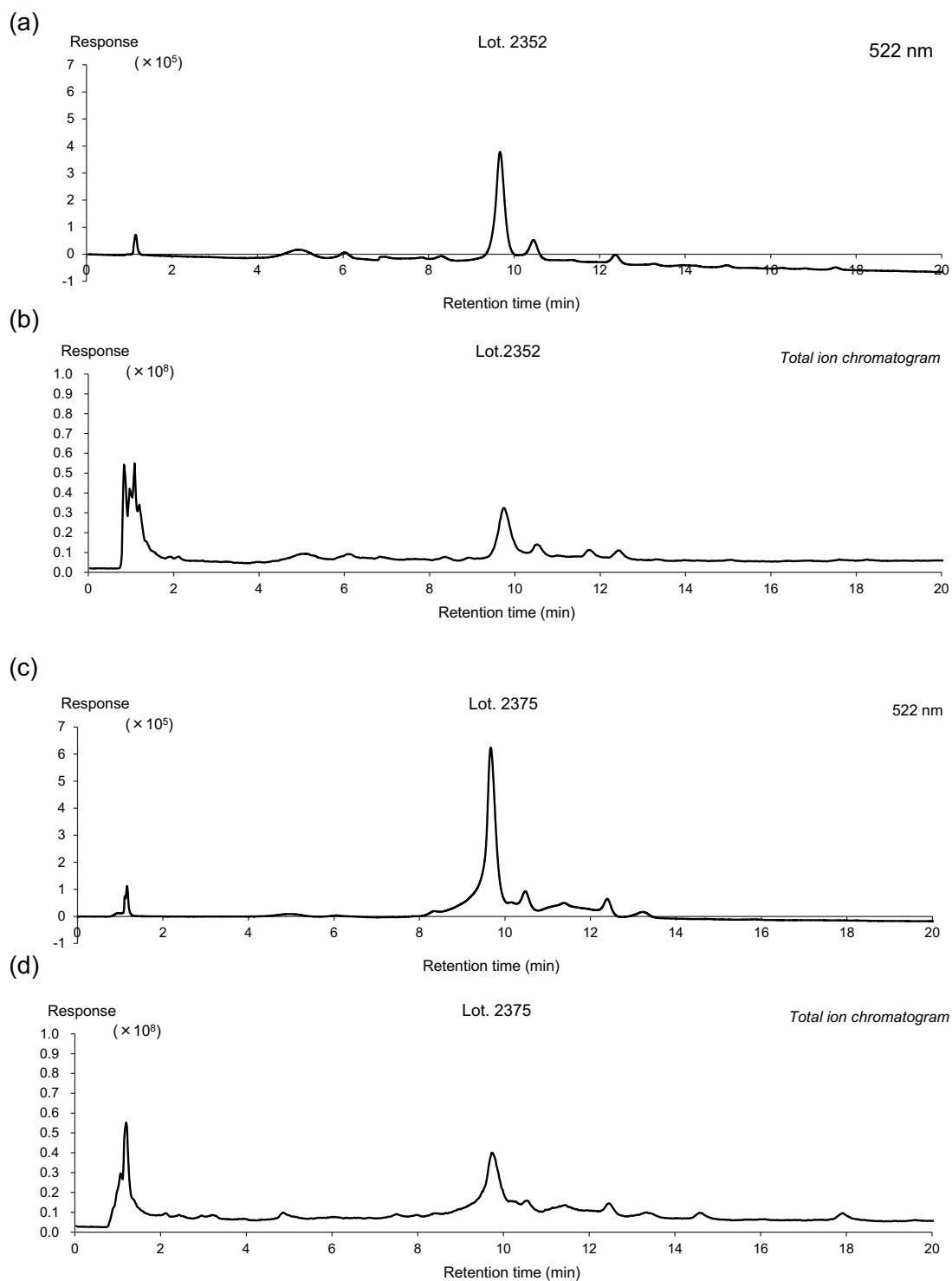


図 3. HPLC 及び LC-MS のクロマトグラム

(a)ロット 1 の HPLC クロマトグラム, (a)ロット 1 のトータルイオンクロマトグラム,
(a)ロット 2 の HPLC クロマトグラム, (a)ロット 2 のトータルイオンクロマトグラム

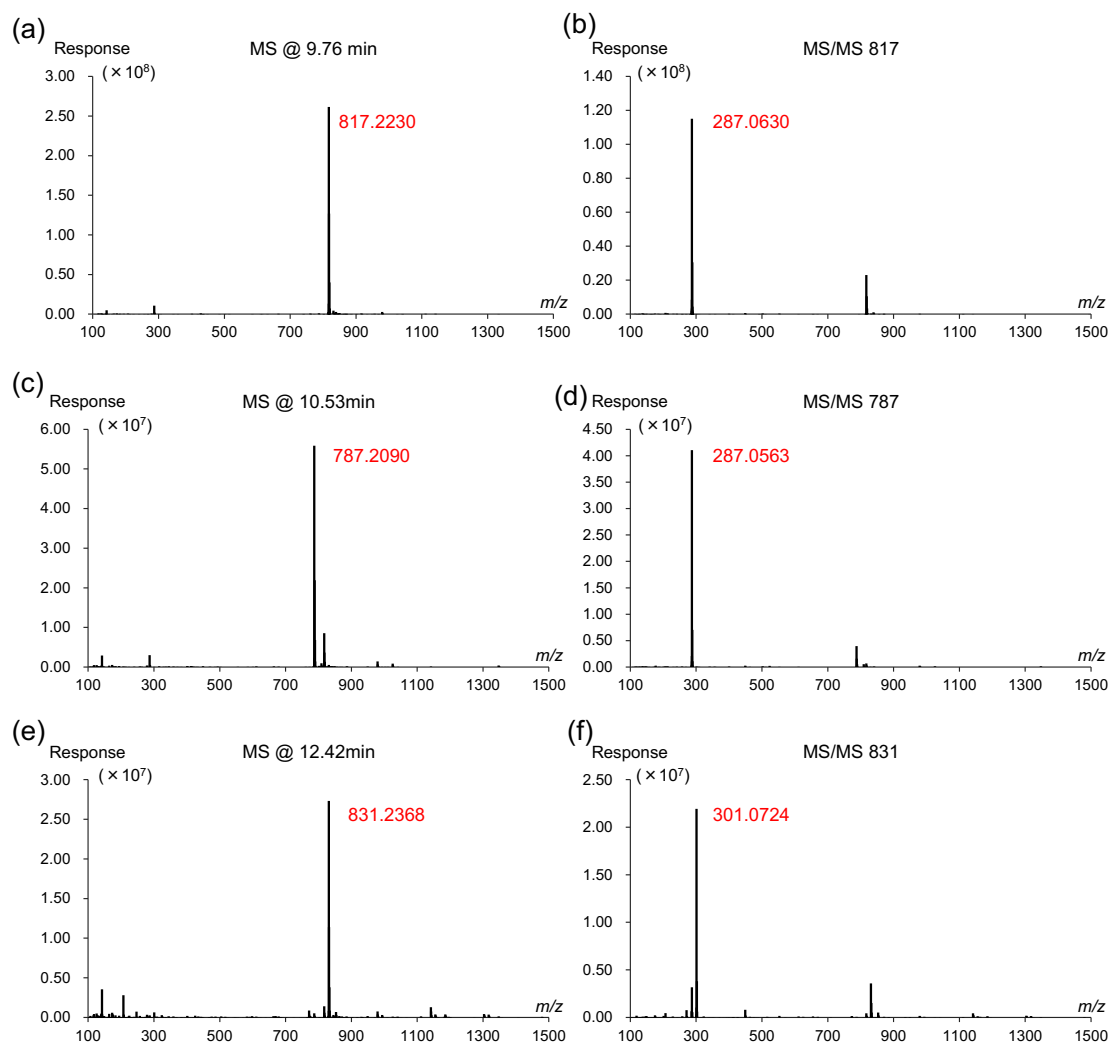


図 4. 各ピークの MS 及び MS/MS スペクトル

(a)9.76 分に検出されたピークの MS スペクトル, (b) m/z 817.2230 の MS/MS スペクトル, (c)10.53 分に検出されたピークの MS スペクトル, (d) m/z 787.2090 の MS/MS スペクトル, (e)12.42 分に検出されたピークの MS スペクトル, (f) m/z 831.2368 の MS/MS スペクトル

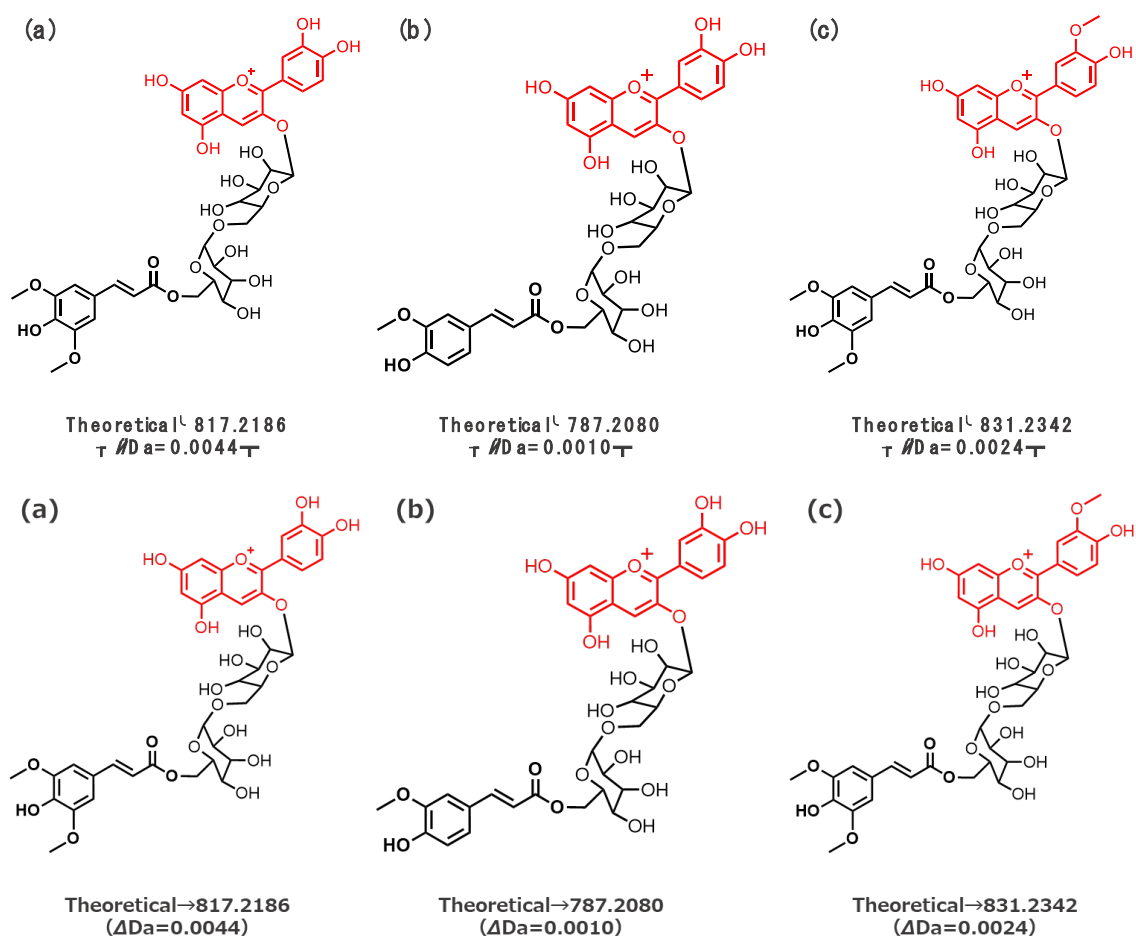


図 5. 推定される構造

(a) 9.76 分に検出されたピーク

(b) 10.53 分に検出されたピーク

(b) 12.42 分に検出されたピーク

表 1. 分配係数の検討結果

Two-phase solvents	Ratio	Partition coefficient(Ka)		
		Peak 1	Peak 2	Peak 3
	3.5/2.0/1.5/4.5/0.01	0.39±0.01	0.62±0.09	0.41±0.02
<i>tert</i> -Butyl methyl ether / <i>n</i> -Butanol / Acetonitrile / Water / Trifluoroacetic acid	3.0/2.5/1.5/4.5/0.01	0.62±0.03	0.75±0.03	0.64±0.04
	2.5/3.0/1.5/4.5/0.01	0.85±0.04	1.25±0.13	0.88±0.03
	2.0/3.5/1.5/4.5/0.01	1.24±0.01	2.09±0.10	1.36±0.06
	1.5/4.0/1.5/4.5/0.01	1.50±0.03	2.66±0.35	1.62±0.08

N=3 で実施，平均値±標準誤差で表記.

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

令和6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
カシアガム中のアントラキノン類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向上を目指し、現在成分規格が未設定であるカシアガムを対象として、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、昨年度に引きつづき、前処理法の改良、HPLC条件の最適化及び¹H-qNMRに基づくRMSを用いたアントラキノン類分析法の確立について検討を実施した。JECFA規格の前処理法における課題であった液-液抽出時のエマルジョン形成による分離効率の低下については、遠心分離操作の導入が有効であることを明らかにした。また、HPLC条件においては、粒子径3 μmのカラムを採用し、グラジエント条件を最適化することで、高分離能を有する分析条件を確立した。さらに、改良したHPLC条件に基づき、基準物質3種に対するアントラキノン類5種の各RMSが明らかとなった。これらのRMSの正確性は、モデル溶液を用いた検討により実証され、¹H-qNMRに基づくRMSを用いたアントラキノン5種の効率的かつ信頼性の高い分析法が確立した。

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収載されている既存添加物の一つであり、増粘安定剤として広く食品産業で使用されている¹。本添加物は、食品衛生法第11条第1項の規定により告示される「食品、添加物等の規格基準」における成分規格が未制定であり、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²に準拠して製造された製品が流通している。一方で、平成7年以降、既存添加物の安全性確保に関する国会の附帯決議も踏まえ、品質確保と食の安全性向上を目的として、個々の既存添加物の成分規格の設定及び食品添加物公定書への収載が進められている。カシアガムについても、現在、「食品、添加物等の規格基準」の策定及び次期食品添加物公定書への収載に向けた検討が行われている。

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¹。一方、エビスグサモドキの胚外皮には発がん性が懸念されるアントラキノン類が含まれており、カシアガム中にもアントラキノン類の残留が予想される。このような発がんなどの毒性を有する化合物を含有する食品添加物については、安全性確保の観点から適切な残留基準値の設定が不可欠である。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³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を0.5 mg/kg以下と規定している。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、これらの定量にはダントロン(1,8-DAQ)内標準物質として用いるHPLC法が採用されている。しかし、これら5種の測定対象について、認証標準物質のような正確な純度が保証された定量用標品の入手は困難であり、市販試薬を定量用標品として使用した場合、定量値の信頼性は担保できない。

このような定量用標品の入手及び定量値の正

確性の問題を解決する方法の1つとして、近年、¹H-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^{4,7}。本手法は、測定対象及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」及び「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¹H-NMR(¹H-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。

そこで、本研究では、昨年度の検討に続き、カシアガム中のアントラキノン類分析法の確立を目的として、JECFA で規定される分析法を基に、¹H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン類分析法の確立、JECFA 法の前処理法及び HPLC 条件の改良について検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

カシアガム(①C2393, ② C2394, ③C2395), 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, 富士フイルム和光純薬(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%)及びメチルパラベン(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 (高压グラジエント), オートサンブラ: SIL-20A, カラム恒温槽: CTO-20AC, 多波長検出器: SPD-M20A, 脱気装置: DGU-20A3R, システムコントローラ: CBM-20A, 分析データ処理システム: LabSolutions ((株)島津製作所製)。

マイクロ天秤: BM-20 ((株)エー・アンド・デイ製)

セミクロ天秤: AUW220D 及び AP125WD ((株)島津製作所製)

遠心分離機: 5220(久保田商事(株)製)及び MiniSpin (エッペンドルフ製)

B-3) JECFA 法における前処理法の改良

B-3-1) 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)(図 2)の一部を変更した。すなわち、試料 4 g を正確に量りとり、2 mol/L 硫酸 100 mL を加え軽く振り混ぜた後、103℃で1時間加熱した。冷却後、分液漏斗へ入れ、クロロホルム 100 mL を加え液-液抽出を行った。静置後、エマルジョンを低減するため、これら全量を 50 mL 容遠沈管に小分けし遠心分離(400×g, 5 分, 20℃)し下層(クロロホルム層)を採取した。上層にクロロホルムを加え、同様の抽出操作をさらに三回繰り返した後、採取したすべての下層(クロロホルム層)は減圧乾固した。メタノールを加え超音波処理し、不溶物を遠心分離(10000×g, 2 分, 20℃)により取り除いた後、2 mL に定容したものを試験溶液とした。

B-3-2) 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、次の測定条件 1 または 2 を用い分析を行った。

■ 測定条件 1(JECFA 規定の条件)

カラム: Develosil ODS-UG-5 (4.6 × 250 mm, 粒子径 5 μm, 野村化学(株)), カラム温度: 40℃, 検出波長: 435 nm (アントラキノン類), 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 以降はカラム洗浄及び平衡化】, 注入量: 20 μL

■ 測定条件 2

カラム: Unison UK-C18 (4.6 × 250 mm, 粒子径 3

μm, インタクト(株)), カラム温度: 40°C, 検出波長: 272 nm (カフェイン), 255 nm (MHB), 435 nm (アントラキノン類), 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 (10%B) → 60 min (100%B) → 65 min (100%B) → 65.01 min (10%B) → 75 min (10%B)

【60 min 以降はカラム洗浄及び平衡化】, 注入量: 20 μL

B-4) ¹H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の確立

B-4-1) 基準物質(カフェイン, MHB 及び 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, ¹H-qNMR により算出された純度値に基づき正確に量りとり, メタノールを加え調製したものを標準原液とした(濃度: 156 μmol/L). その後 1%DMSO 含有メタノールを用いて適宜希釈し, 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 μmol/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)を認証値に基づき正確に量りとりし, 10%アセトニトリルを用いて溶解し, 濃度 156 μmol/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 μmol/L (8 点濃度, 公比 2) である.

メチルパラベンでは, メチルパラベン標準物質(認証標準物質)を認証値に基づき精密に秤量し, メタノールを用いて溶解し, 濃度 156 μmol/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.

これら各種濃度の標準溶液については, 各化合物 3 セットずつ調製し, B-3-2 に示した測定条件 2 によりそれぞれ分析した. 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. その後, 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 を算出した.

B-4-2) RMS の正確性の評価

フィシオン以外の各アントラキノン類の標準原液(濃度: 156 μmol/L)及び別途調製したフィシオン溶液(濃度: 31.2 μmol/L)を用い, これらを適宜採取し, メタノールを用いて希釈したモデル溶液 A (各測定対象の濃度: 約 8~9 μmol/L)及びモデル溶液 B (各測定対象の濃度: 1.0 μmol/L)を調製し, RMS の正確性の評価に使用した.

C. 結果及び考察

C-1) JECFA 法における前処理法の改良

加熱時間の短縮(3.5 時間から 1 時間)及び抽出回数の増加(1 回から 3 回)の必要性が明らかとなった(図 2). 今年度は, 昨年度の検討において未解決であった液-液抽出時のエマルジョン形成という課題に着目した. このエマルジョン形成は, 上層と下層(クロロホルム層)の分離を著しく遅延させ, 分析効率を低下させる要因となっていた. 本検討を進めるにあたり, 試料に関して, 昨年度使用した 4 種(①A105, ②A951, ③A952, ④C2052)については, 本検討に必要な十分量が残存していなかったため, 新たに市場流通している 3 種の試料(①C2393, ②C2394, ③C2395)の供与を受け, 前処理法の改良に関する検討を実施することとした. これらの試料を用いて液-液抽出を行ったところ, 昨年度と同様に安定なエマルジョンが生成し, 24 時間の静置後も層分離は達成されなかった(図 3). この問題を解決するため, 遠心分離操作(400×g, 5 分, 20°C)を適用したところ, 上層と下層(クロロホルム層)の完全な二層分離が達成され, その有効性が実証された(図 3). 以上の結果から, JECFA 法における前処理法では, 昨年度明らかとなった改善点(加熱時間の短縮及び抽出回数の増加)に加え, 液-液抽出後の遠心分離操作の追加が必

要であることが判明した。これらの知見に基づき改良した前処理法の詳細を図 4 に示す。

C-2) JECFA 法による実試料の分析

今年度新たに供与を受けたカシアガム 3 種(①C2393, ②C2394, ③C2395)を用いて, JECFA で規定されている HPLC 条件(B-3-2 項, 測定条件 1)の実試料の分析に実試料分析における適用性を検証した。検証実験では, 図 4 に示す改良した前処理法により調製した各試料溶液に, 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)を終濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加し, HPLC 分析を行った。その結果, 図 5 に示すように, すべての試料において, 測定対象の一部のピークの近傍に試料由来の内在性成分(夾雑成分)のピークが検出され, 十分なベースライン分離が得られないことが判明した。この分離不良を改善するため, ① カラムを粒子径が 3 μm である Unison UK-C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm)へ変更, ②グラジエント条件の変更など溶離条件の最適化を行った。最適化した条件下で, カシアガム 3 種(①C2393, ②C2394, ③C2395)の試験溶液及び測定対象 5 種の混合標準溶液を分析した。その結果, 図 6 に示すように, すべての試料において, 測定対象 5 種と夾雑成分との間のベースライン分離に問題がないことが確認された。以上より, 実試料における測定対象 5 種の分析において, JECFA 規格の HPLC 条件からの変更が必要であることが明らかとなった。

C-3) ^1H -qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の確立

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

昨年度確立した ^1H -qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法について, 前項で示したとおり JECFA 規格の HPLC 条件の変更が必要となったことを受け, 改良条件下での分析法の確立について検討した。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, 表 1 に

示す測定条件による ^1H -qNMR 測定を実施した。なお, エモジン, アロエエモジン, レイン及び 1-8 DAQ では, 3 種の外部標準を用いた外部標準法, クリソファン酸及びフィシオンでは, 1,4-BTMSB- d_4 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%, 98.3%, 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 ^1H -qNMR による純度に基づいて調製された測定対象 5 種及び 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及び MHB 標準溶液を用いて, 改良した HPLC 条件(B-3-2 項, 測定条件 2)より多波長検出器が接続された HPLC で分析した(図 6-9)。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 種及び基準物質 3 種の全ての検体の検量線の決定係数は 0.999~1.000 と良好であることが確認された。各測定対象及び基準物質の代表的な検量線を図 10 及び図 11 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 13026 (検出波長: 435 nm), アロエエモジンは 13521 (検出波長: 435 nm), レインは 15669 (検出波長: 435 nm), クリソファン酸は 13260 (検出波長: 435 nm), フィシオンは 14254 (検出波長: 435 nm), カフェインは 11808 (検出波長: 272 nm), メチルパラベン は 18511 (検出波長: 255 nm), 1,8-DAQ は 12296 (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 0.1~2.4%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 の算出に適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 2 に示す値であることが明らかとなった。

C-3-2)RMS の正確性の評価

得られた RMS の正確性を評価するため、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)をそれぞれ約 8~9 $\mu\text{mol/L}$ を含むモデル溶液 A 及びそれぞれ約 1 $\mu\text{mol/L}$ を含むモデル溶液 B を各 3 セットずつ調製し, HPLC に供し(図 12), RMS 法及び従来定量法の 1 つである絶対検量線法により得られる定量値と比較した。その結果, 表 3 及び表 4 に示すように, 基準物質の異なる RMS 法と絶対検量線法にて得られた定量値はほぼ同等であった。また RSD は最大で 5.5%と精度も良好であった。以上の結果より, 基準物質及びそれに対応する RMS は正確であり, RMS 法から測定対象 5 種の精確な定量が可能であることが明らかとなった。

D. 結論

本研究では, カシアガム中のアントラキノン分析法の確立を目的に, JECFA で規定される分析法を基に, 前処理法の改良, HPLC 条件の最適化及び $^1\text{H-qNMR}$ に基づく RMS を用いたアントラキノン類分析法に確立について検討した。

前処理法の改良においては, 液-液抽出における二層分離の遅延という課題に着目した。特に, エマルジョン形成による分離効率の低下に関する問題に対し, 遠心分離操作の導入が有効であることを実証した。また, JECFA 規格の HPLC 条件では測定対象と夾雑成分の分離が不十分であることが判明したため, 粒子径 3 μm のカラムを採用し, グラジエント条件を最適化することで, 高分離能を有する分析条件を確立した。

$^1\text{H-qNMR}$ に基づく RMS を用いたアントラキノン類分析法に確立では, 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 を明らかにした。これらの RMS の正確性はモデル溶液を用いた検証により実証され, 本手法が測定対象 5 種の効率的かつ高精度な定量を可能とすることが示された。

一方で, 前処理におけるクロロホルムの使用は, 環境負荷及び作業者の安全性の観点か

ら重要な課題として残されている。今後は, より安全な代替溶媒の探索を含めた前処理法の改良が必要である。この課題に対応するため, 今後は環境負荷が少なく, かつ分析担当者の安全性に配慮した代替溶媒の探索を含めた前処理法の改良が必要である。このような検討を進めることで, 本研究で確立した分析法は, カシアガムの規格試験における実用的な手法として活用が可能となることが期待される。

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 $^1\text{H-qNMR}$ 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 mogroside V in luohanguo extract for daily quality control operation using relative molar sensitivity to single-reference caffeine. *Chem. Pharm. Bull.*, 69, 18-25 (2021).

F. 研究発表

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 大槻崇, 神谷彩音, 中山優希, 黄奕, 松下美由紀, 森川悟, 松藤寛: TDM 対象薬など医薬品 6 種の血中濃度測定における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用. 第 6 回日本定量 NMR 研究会年会(2024.12).
- 2) 大槻崇, 馬場萌加, 二見櫻子, 黄奕, 遠藤悠平, 金子剣伸, 松藤寛: ^1H -qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いた大豆イソフラボン類分析法の確立. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会(2024.5).

F-2) 論文発表

F-2-1) 論文等

- 1) Ohtsuki T, Huang Y, Kamiya A, Nakayama Y, Matsushita M, Morikawa S, Matsufuji H: Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of blood concentrations of nine pharmaceutical compounds. *J. Pharm. Health Care Sci.*, 2024; 10: 35.

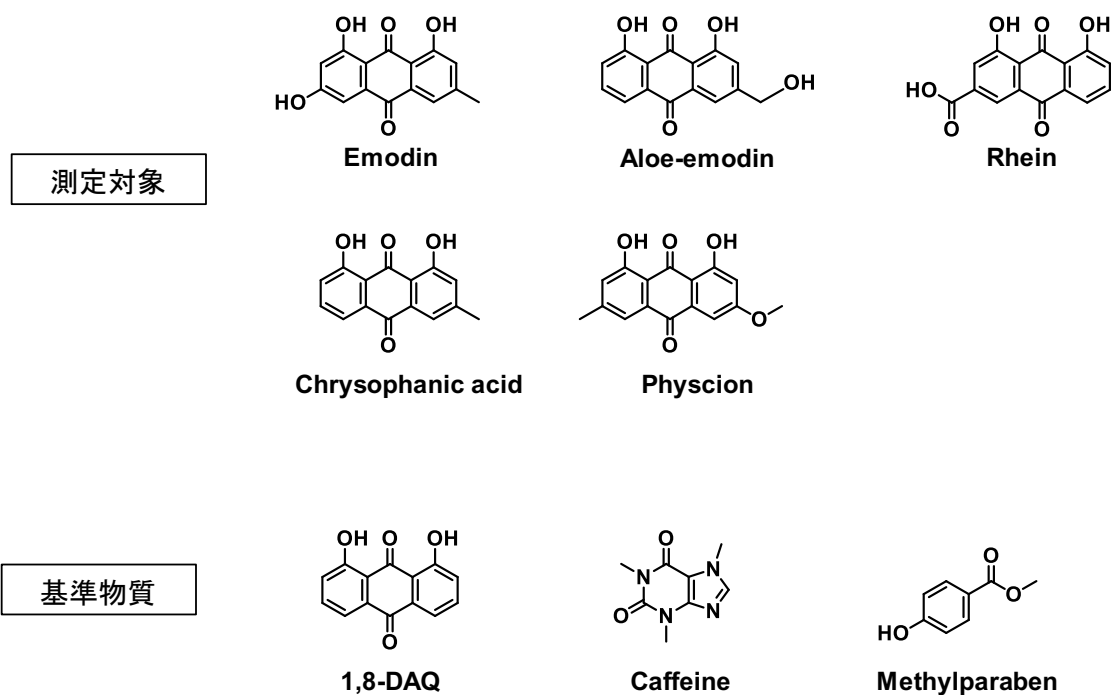


図1 測定対象及び基準物質の化学構造

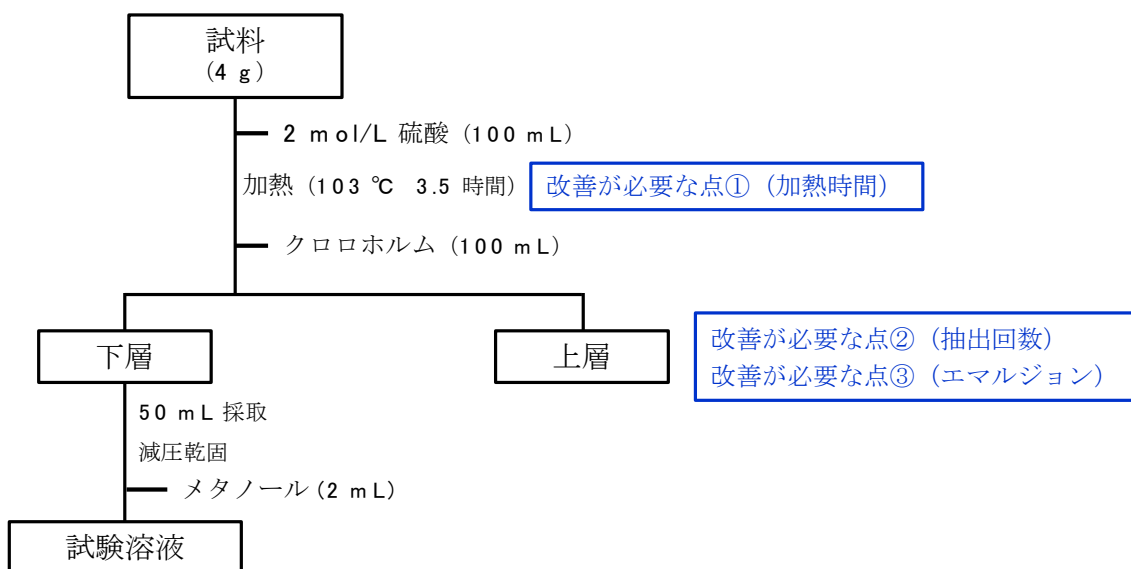


図2 JECFA Monographs におけるカシアガム規格で規定されているアントラキノン類分析法の試験溶液の調製法並びに改善が必要な点

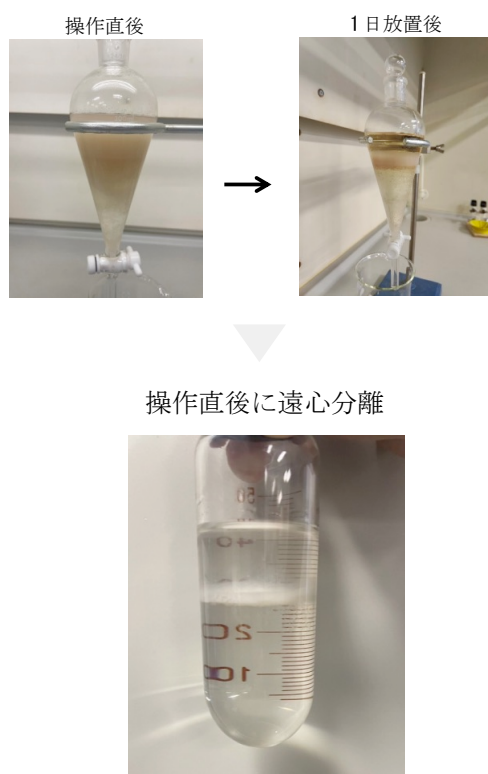


図3 液-液抽出によるエマルジョンの生成並びに遠心分離の効果

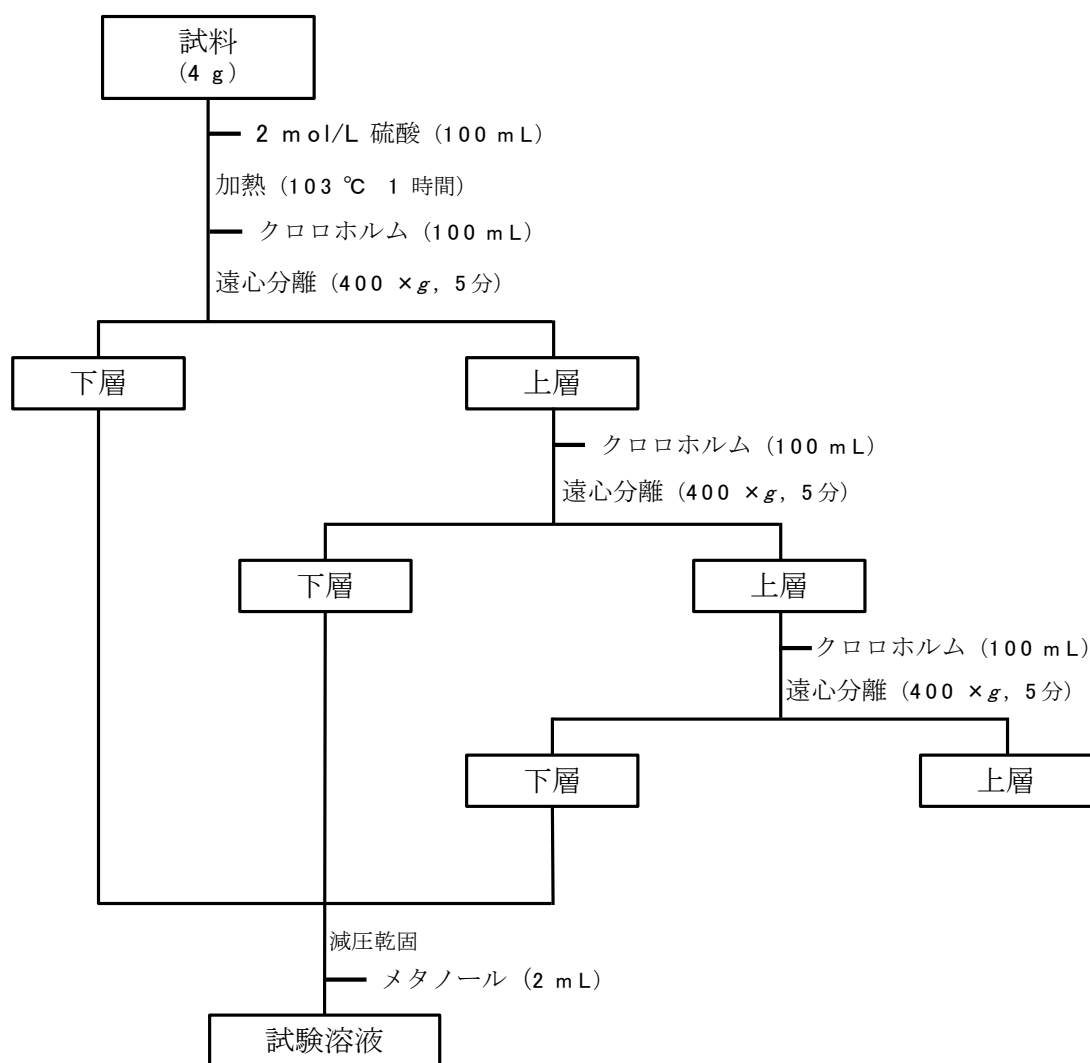


図 4 改良した試験溶液の調製法

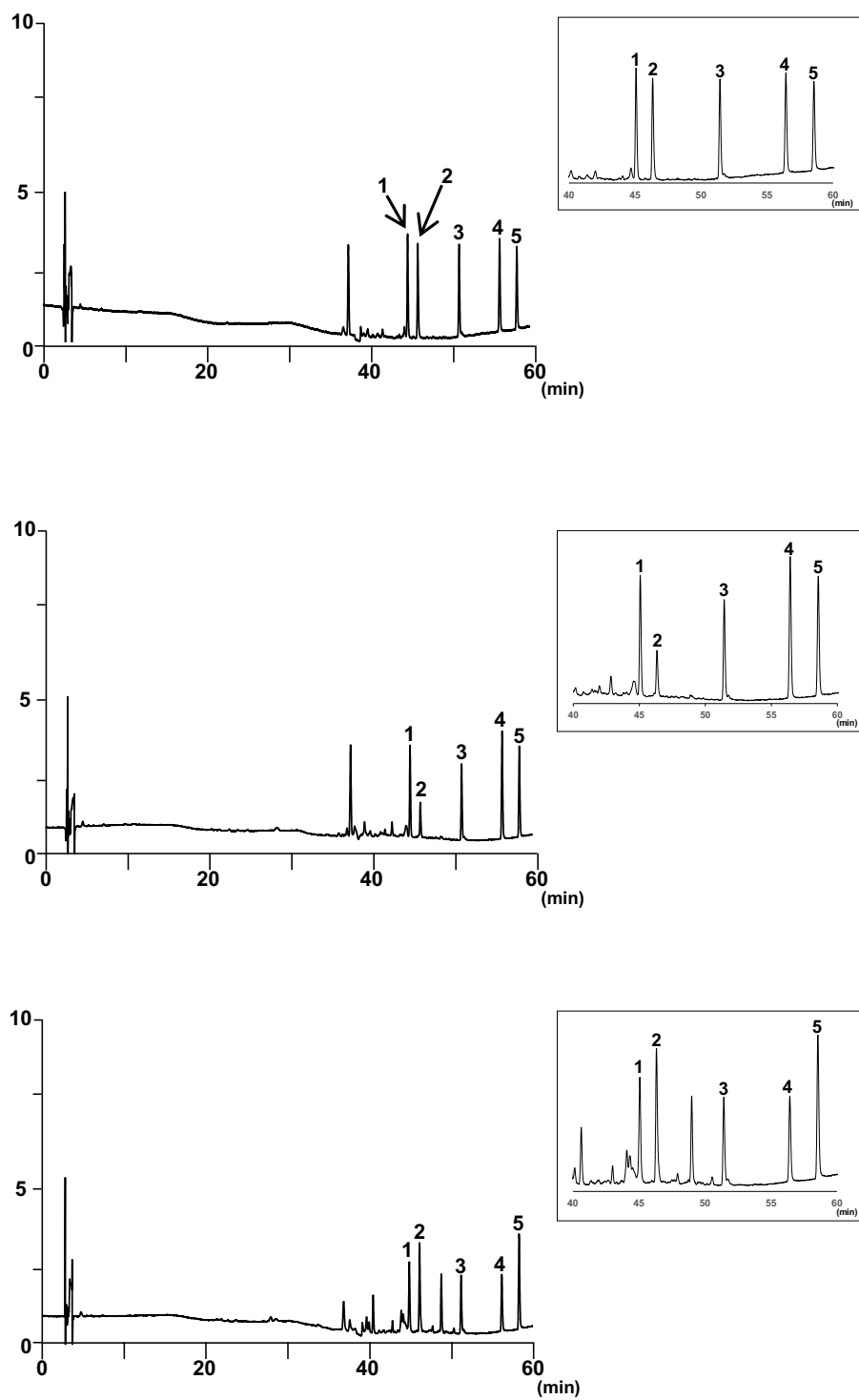


図5 測定対象5種を添加した各カシアガム試験溶液のクロマトグラム(測定条件1)

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

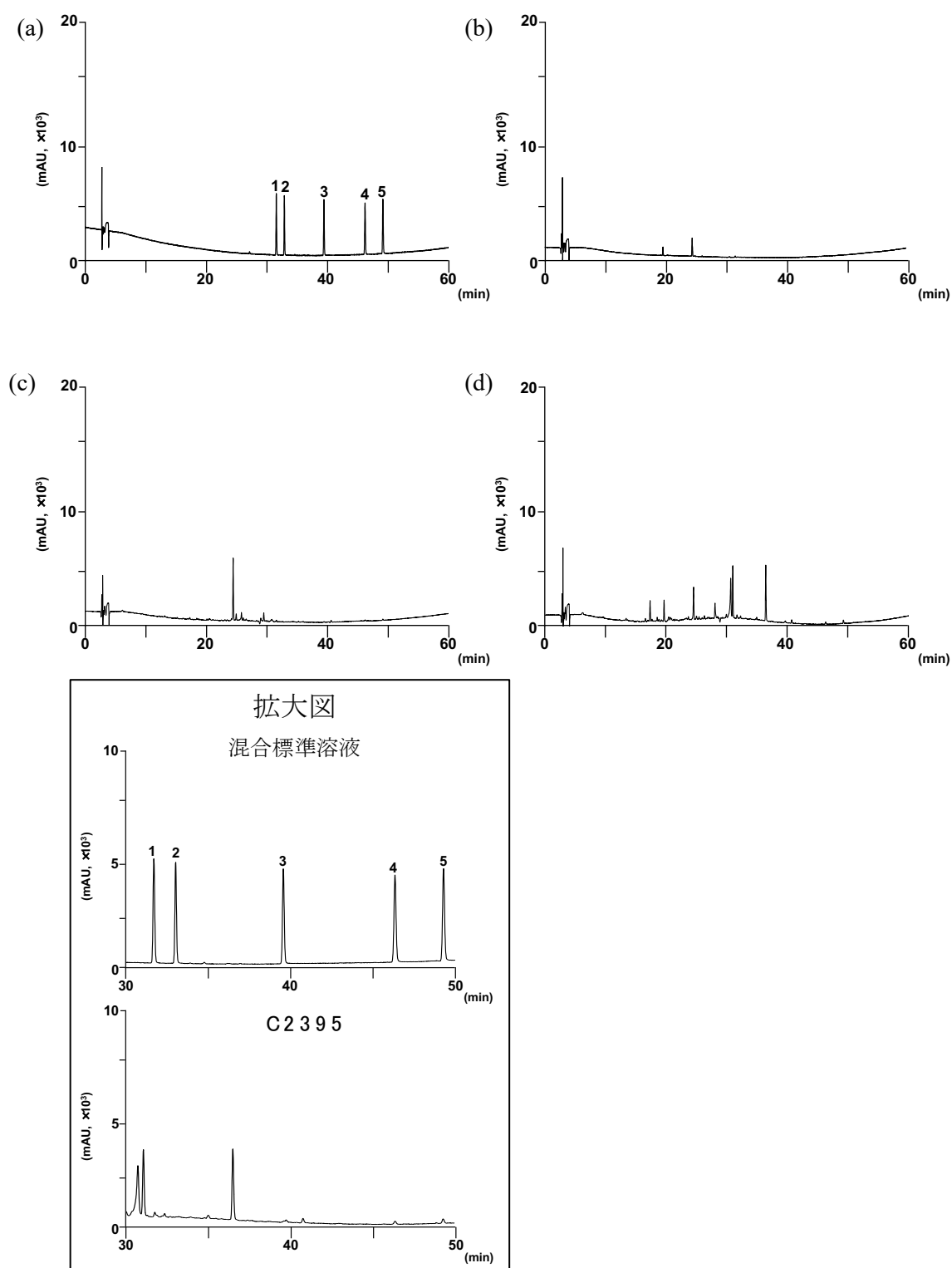


図 6 測定対象 5 種の混合標準溶液，各カシアガム試験溶液及び測定対象 5 種を添加したカシアガム(C2395)試験溶液のクロマトグラム(測定条件 2)

(a) 混合標準溶液，(b) カシアガム(C2393)，(c) カシアガム(C2394)，(d) カシアガム(C2395)，

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

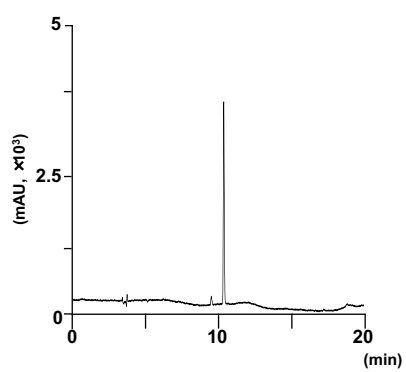


図 7 カフェインのクロマトグラム

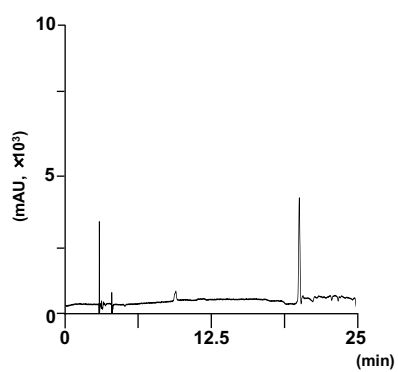


図 8 メチルパラベン(MHB)のクロマトグラム

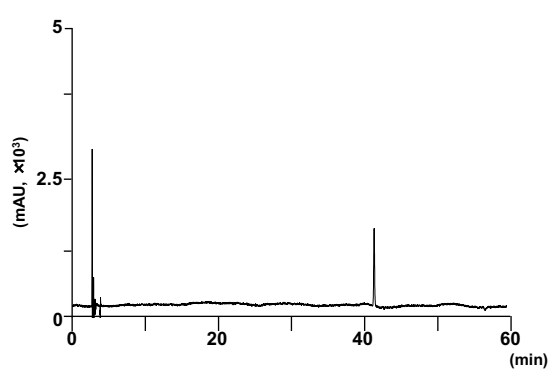


図 9 ダントロン(1,8-DAQ)のクロマトグラム

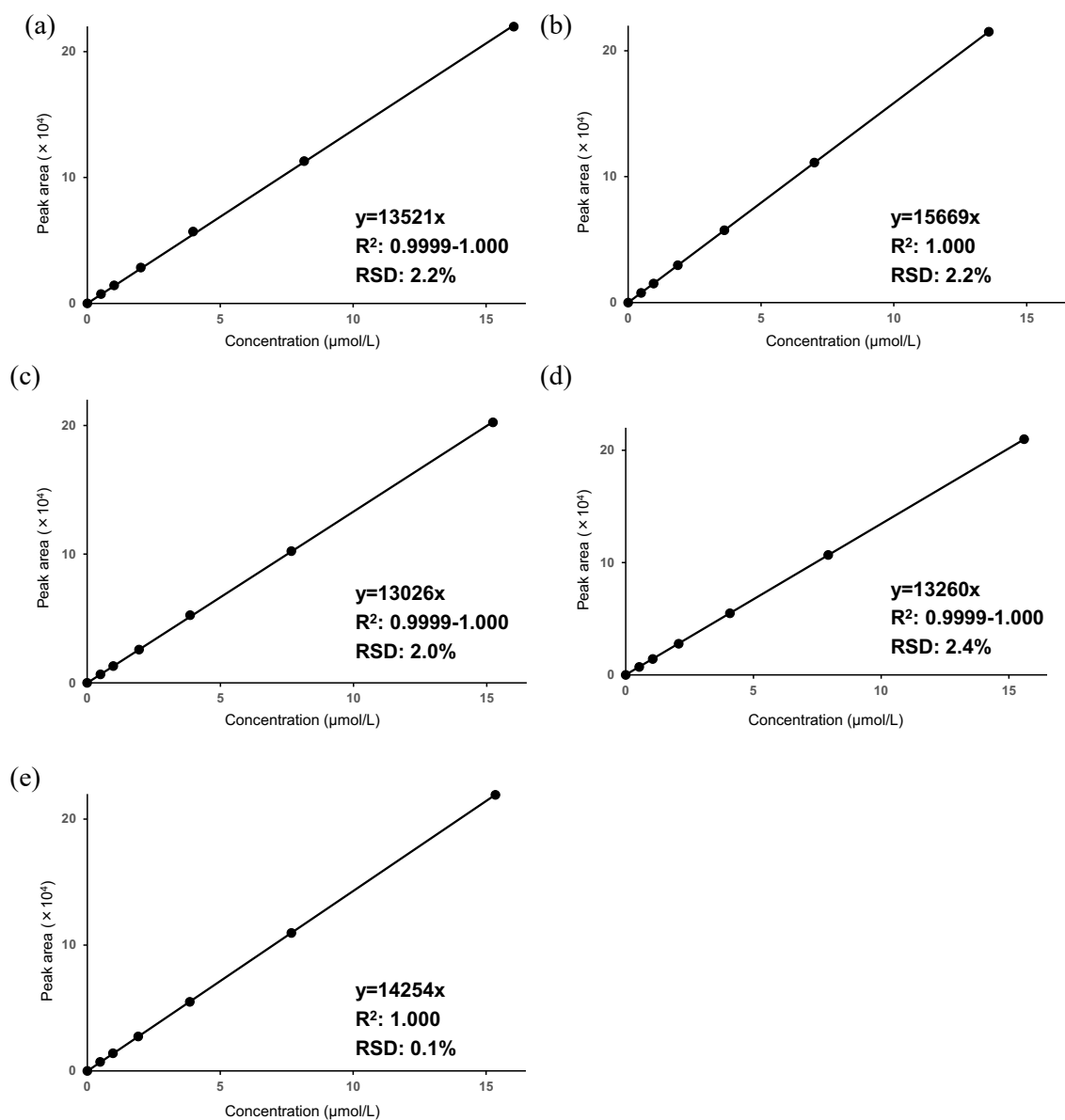


図 10 測定対象 5 種の検量線

(a) Aloe-emodin, (b) Rhein, (c) Emodin, (d) Chrysophanic acid, (e) Physcion

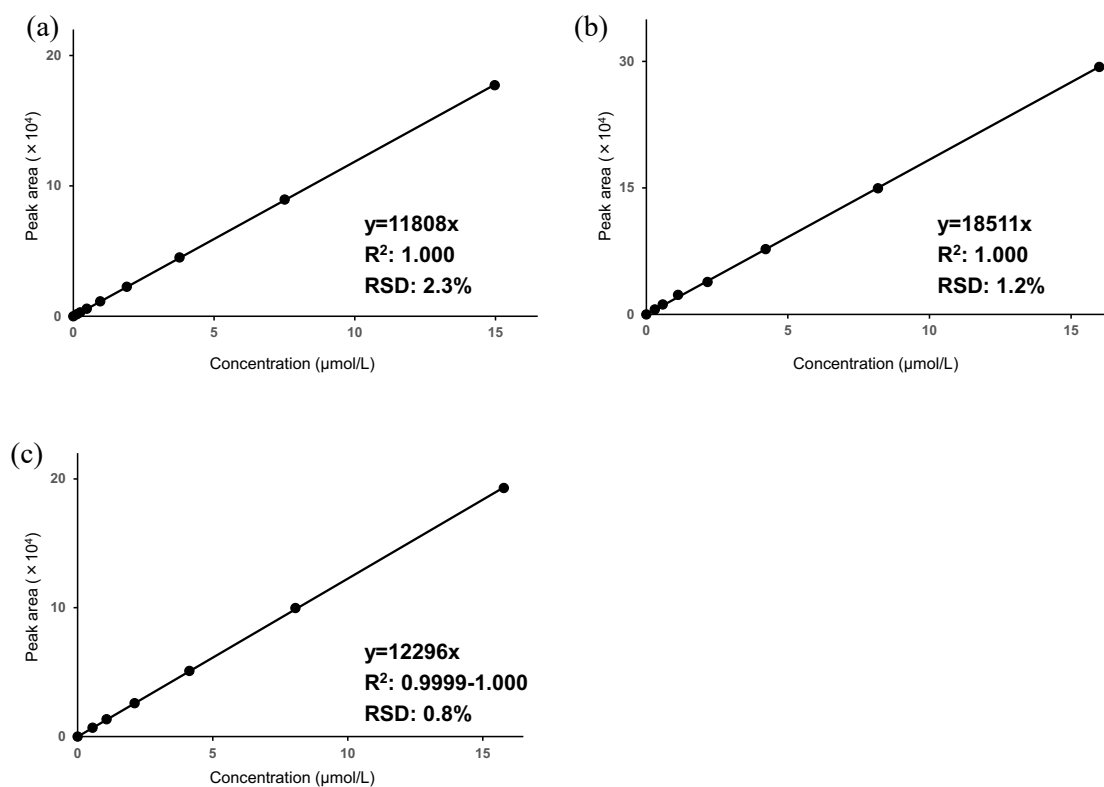


図 11 基準物質 3 種の検量線

(a) Caffeine, (b) Methylparaben, (c) 1,8-DAQ

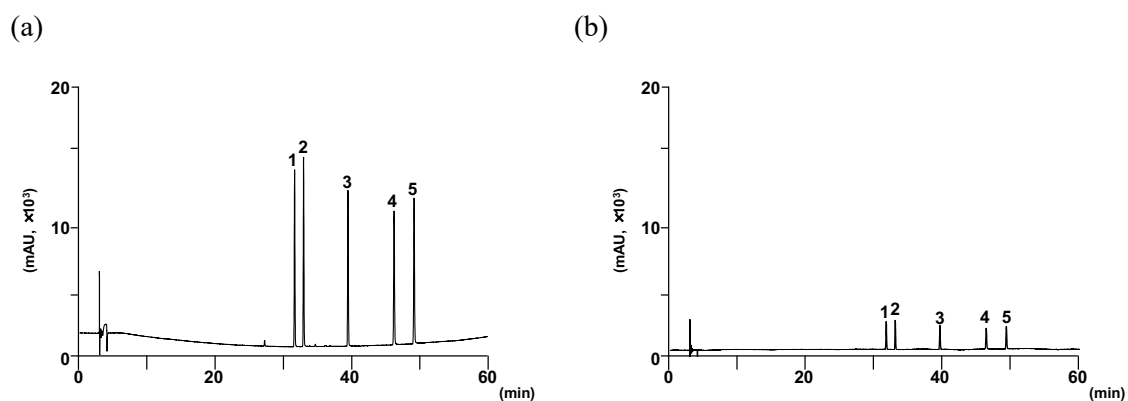


図 12 モデル溶液のクロマトグラム

(a) モデル溶液 A, (b) モデル溶液 B

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

表 1 ^1H -qNMR 測定条件

装置	JEOL ECA 500 spectrometer
スペクトル幅	20 ppm(-5 – 15 ppm)
データポイント数	65536
オートフィルター	on(eight times)
取り込み期間	6.55 秒
フリップ角	90°
取り込み待ち時間	60 秒
スキャン回数	8
スピニング	off
^{13}C デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching(MPF-8)

表 2 各基準物質に対する測定対象の相対モル感度(RMS)

		Calibrant		
		Caffeine (y=11808x)	Methylparaben (y=18511x)	1,8-DAQ (y=12296x)
Analyte	Emojin (y=13026x)	1.10	0.70	1.06
	Aloe-emojin (y=13521x)	1.15	0.73	1.10
	Rein (y=15669x)	1.33	0.85	1.27
	Chrysophanic acid (y=13260x)	1.12	0.72	1.08
	Physcion (y=14254x)	1.21	0.77	1.16

表 3 RMS 法と従来法(絶対検量線法)によるモデル溶液 A の各測定対象の
含量の比較(n=3)

	RMS method						Conventional method	
	Calibrant (Caffeine)		Calibrant (Methylparaben)		Calibrant (1,8-DAQ)			
	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)
Emodin	8.7	2.2	8.6	2.2	8.4	2.2	8.5	2.2
Aloe-emodin	8.6	5.0	8.5	5.0	8.4	5.0	8.4	5.0
Rein	7.7	5.5	7.6	5.5	7.5	5.5	7.7	5.5
Chrysophanic acid	8.7	2.4	8.6	2.4	8.5	2.4	8.8	2.4
Physcion	8.5	1.0	8.3	1.0	8.2	1.0	8.3	1.0

表 4 RMS 法と従来法(絶対検量線法)によるモデル溶液 B の各測定対象の
含量の比較(n=3)

	RMS method						Conventional method	
	Calibrant (Caffeine)		Calibrant (Methylparaben)		Calibrant (1,8-DAQ)			
	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)
Emodin	1.2	2.0	1.1	2.0	1.1	2.0	1.1	2.0
Aloe-emodin	1.1	3.4	1.1	3.4	1.1	3.4	1.1	3.4
Rein	1.0	2.6	1.0	2.7	1.0	2.6	1.0	2.7
Chrysophanic acid	1.2	2.1	1.1	2.1	1.1	2.1	1.2	2.1
Physcion	1.1	2.5	1.1	2.5	1.1	2.5	1.1	2.5

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

令和6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

本研究において研究分担者は、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。具体的には、HPLC の検出器として汎用される PDA の校正用化合物として利用可能な化合物の探索を行い、有望な化合物を見出すことを目的とする。本年度は、広範囲の波長域に UV スペクトル吸収を有する化合物の合成として、1,4-ナフトキノン誘導体の置換基導入による吸収波長の変化について検討した。その結果、特定の位置へのニトロ基の導入によって吸収波長を長波長化できることが分かった。

研究協力者
出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学物部長

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 を利用した分析法が設定されているものが多く、異なる装置間での分析における正確さを担保することは重要である。フォトダイオードアレイ(PDA)検出器は広範囲の波長域の吸収を一度の分析で検出できることから、HPLC をはじめとした分析機器の検出器として汎用的に利用されている。先述したように、PDA 検出器を利用した HPLC での定量分析において正確さを担保するためには、検出器の装置間校正ができることが重要となる。特定波長の吸収における装置間校正は、対象とする波長に対して適切な基準物質(シングルフアレンス)を個別に設定することで対応が可能であるが、PDA のカバーする広範囲の波長域において一種の化合物を使用して校正を実施できることがより望ましい。しかしながら、そのような化合物は現状設定されていない。本

研究では、PDA の校正用化合物として利用可能な分子創出を目的とし、広範囲の波長域において UV 吸収を示す化合物の開発を行う。本年度は広範囲の波長域に UV 吸収を示す化合物の開発として、既報の 1,4-ナフトキノン誘導体 **1** (Fig. 1)についてその置換基位置について検討し、その UV 吸収波長の変化を確認した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (製品コード：D0384)及び2,3-ジクロロ-5-ニトロ-1,4-ナフトキノン (製品コード：D2428)は東京化成工業社の製品を用いた。5-フルオロ-2-ニトロアニリン (製品コード：356-17761)及び 5-クロロ-2-ニトロアニリン (製品コード：323-56772)はFUJIFILM 和光純薬社の製品を用いた。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 (CDCl₃)：関東化学, Cat. 07663-23, 重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆)：関東化学, Cat. 11560-96. その他、ジクロロメタン, *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF), テトラヒドロフラン (THF), 酢

酸エチル，ヘキサン，アセトン，塩酸，水酸化ナトリウム，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，または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)，及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． ^1H 及び ^{13}C -NMR スペクトルは NMR 測定用の重水素化溶媒を使用して，ECZ600R spectrometer (JEOL)にて測定した．化学シフト値 δ (ppm)はテトラメチルシラン (TMS) (CDCl_3 : 0 for ^1H -NMR)，もしくは残留溶媒のシグナルを内部標準として補正した (CDCl_3 : 77.16 for ^{13}C -NMR; $\text{DMSO}-d_6$: 2.50 for ^1H -NMR, 39.52 for ^{13}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), double of doublets (dd), doublet of doublets of doublets (ddd), multiplet (m), broad (br)). 合成した化合物の NMR スペクトルを Fig. 3-15 に示した．

B-3) 装置・測定条件

UV-Vis スペクトル測定のための紫外可視吸光光度計には V-730 (日本分光)を使用した．化合物の濃度は 50 μM の DMSO 溶液とし，光路長 10 mm の石英セルを用いて測定した．

C. 結果及び考察

C-1) 1,4-ナフトキノ誘導体の合成

本研究ではこれまでに既報¹の 1,4-ナフトキノ誘導体 **1** の構造中の 2 位の置換基を変更した誘導体の合成及び UV スペクトルの比較を行っており，様々な構造の導入が容易に行えること，構造の変更によりスペクトルの波長域が変化することを確認している (Fig.1). 今年度

はこの 1,4-ナフトキノ誘導体 **1** を基とし，UV-Vis スペクトルの長波長化を目的として，各種置換基の導入や置換位置の違いによる吸収波長域の変化を確認することとした．

この検討においては各構成ユニットにおいて置換位置の異なる化合物を準備し，それらを組み合わせることで多種の誘導体を効率的に合成することを計画した (Scheme 1-3). 置換基を導入した誘導体の合成経路においては，基本的に置換基としてアミノ基を導入した中間体化合物 **4-3** や **5-3** を調製し，1,4-ナフトキノ骨格へと導入することで化合物の合成を行うことができた．しかしながら，本来では **4-3** が 1 つ導入された誘導体 **4** が得られると想定していたが，実際には 2 つ導入された化合物 **4'** が得られた (Scheme 2). これはおそらく置換基としてのアミノ基の電子的効果によって反応性 (求核性) が上がったためと考えられた．また，誘導体 **5** の合成では化合物 **5'** のみが生成していることが分かった (Scheme 3). これは化合物の構造上，分子内での環化が進行してしまい望みの構造 **5** が得られないものと考えられた．各化合物の調製について，詳細な手順と NMR データを以下に記載した (C-1-1 ~ C-1-5).

C-1-1) 化合物 **2** の合成

2,3-ジクロロ-5-ニトロ-1,4-ナフトキノ (200 mg, 0.74 mmol) の濃塩酸溶液 (12M, 6 mL) に塩化スズ二水和物 (829 mg, 3.68 mmol) を加え，80°C にて 1 時間加熱攪拌した．反応液を室温に冷却後，反応液を 2M 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 10 付近に調整し，ジクロロメタンで抽出後，得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し，無水硫酸ナトリウム上で乾燥後，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 = 90 : 10 to 66 : 34) することで，化合物 **2-1**² を暗紫色固体として得た (43 mg, 24%).

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.50 (dd, J = 8.4, 7.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H).

化合物 **2-1** (10 mg, 0.04 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (160 μL) に N,N -ジメチル-1,4-フェニレ

ンジアミン(6.2 mg, 0.045 mmol), 炭酸ナトリウム(9.6 mg, 0.091 mmol)を加え, 室温にて12時間加熱攪拌した. 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥後, 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 = 90 : 10 to 66 : 34)することで, 化合物 **2** を暗紫色固体として得た(10 mg, 73%). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.00 (s, 1H), 7.45 (dd, *J* = 8.4, 8.4 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 2.90 (s, 6H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.9, 176.2, 152.0, 148.1, 143.6, 135.2, 133.0, 127.6, 125.8, 122.2, 115.6, 111.5, 109.5, 108.5, 40.3.

C-1-2) 化合物 **3** の合成

2,3-ジクロロ-5-ニトロ-1,4-ナフトキノン(68 mg, 0.25 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(1.0 mL)に *N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミン(37.5 mg, 0.275 mmol), 炭酸ナトリウム(58 mg, 0.55 mmol)を加え, 室温にて12時間加熱攪拌した. 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥後, 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 = 90 : 10 to 34 : 66)することで, 化合物 **3** を暗紫色固体として得た(58 mg, 62%).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.39 (s, 1H), 8.22 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.4, 7.8 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 2.90 (s, 6H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.6, 174.4, 148.2, 147.8, 143.6, 135.8, 133.3, 128.4, 127.5, 126.4, 125.6, 121.4, 111.5, 111.2, 79.2, 40.3.

C-1-3) 化合物 **4** の合成

2-フルオロ-5-ニトロアニリン(2.26 g, 14.5 mmol)のDMF溶液(20 mL)に50%ジメチルアミン水溶液(3.7 mL, 41.0 mmol), 炭酸カリウム(3.6 g, 26.0 mmol)を加え, 130°Cで15時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 攪拌しながら氷冷水(40 mL)を加えた. 生じた固体をろ取して, 蒸

留水で洗浄後, 真空下で乾燥することで化合物 **4-1** を橙色粉末固体として得た(2.53 g, 96%). 化合物 **4-1**(906 mg, 5.0 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(10 mL)に二炭酸ジ-*tert*-ブチル(2.4 g, 11.0 mmol), トリエチルアミン(1.53 mL, 11.0 mmol)及び4-ジメチルアミノピリジン(30 mg, 0.25 mmol)を加えて室温にて12時間攪拌した. 反応液をジエチルエーテル(20 mL)で希釈し, 沈殿物をろ取してジエチルエーテルで洗浄後, 真空下で乾燥することで化合物 **4-2** を淡黄色固体として得た(290 mg, 21%).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.07 (br. s, 1H), 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.08 (s, 6H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 163.7, 135.3, 129.6, 129.0, 128.9, 128.5, 43.4.

化合物 **4-2** (140 mg, 0.5 mmol)のテトラヒドロフラン/DMF (1:1)(5 mL)溶液にパラジウム炭素(10%, 25 mg)を加え, 水素雰囲気下にて40°Cで16時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 酢酸エチルで希釈してセライトろ過し, 濾液を減圧濃縮した. 得られた残渣(化合物 **4-3**)はそのまま次の反応に使用した(150 mg).

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン(23 mg, 0.10 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(1.0 mL)に化合物 **4-3**(38 mg, 0.15 mmol), 炭酸ナトリウム(32 mg, 0.3 mmol)を加え, 室温にて12時間攪拌した. 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥後, 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 = 80 : 20 to 25 : 75)することで, 化合物 **4-4** を赤紫色非晶質固体として得た(16 mg, 24%). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.39 (br.s, 0.7H), 8.07 (br. s, 1H), 8.06 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 2H), 7.89 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.83 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.12–7.04 (m, 2H), 6.91–6.89 (m, 2H), 6.52–6.51 (m, 2H), 4.97 (br. s, 1.3H), 2.77 (s, 6H), 2.51 (s, 6H), 1.38–1.33 (m, 18H).

化合物 **4-4** (12 mg, 0.018 mmol)に4M塩酸・ジオキサン溶液(1.8 mL)を加え, 室温にて12時間攪拌した. 反応液を真空下で減圧濃縮することで, 化合物 **4** を赤茶色非晶質固体として得た(10 mg, quant.).

C-1-5) 化合物 5 の合成

5-クロロ-2-ニトロアニリン(2.50 g, 14.5 mmol)の DMF 溶液 (20 mL)に 50%ジメチルアミン水溶液(3.7 mL, 41.0 mmol), 炭酸カリウム(3.6 g, 26.0 mmol)を加え, 130°Cで 15 時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 攪拌しながら氷冷水(40 mL)を加えた. 生じた固体をろ取して, 蒸留水(30 mL), 次いでジエチルエーテル(30 mL)で洗浄後, 真空下で乾燥することで化合物 **5-1**を黄色粉末固体として得た(1.91 g, 73%). 化合物 **5-1**(906 mg, 5.0 mmol)のテトラヒドロフラン懸濁液(10 mL)に二炭酸ジ-*tert*-ブチル(2.18 g, 10.0 mmol), トリエチルアミン(1.4 mL, 10.0 mmol)を加えて室温にて 18 時間攪拌した. 反応液を真空下で減圧濃縮した後, 残渣をジエチルエーテルに再懸濁させて沈殿物をろ取して真空下で乾燥することで, 化合物 **5-2**を黄色粉末固体として得た(500 mg, 36%).

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.07 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 6.74 (dd, $J=9.0, 3.0$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 3.07 (s, 6H), 1.33 (s, 18H).

化合物 **5-2** (191 mg, 0.5 mmol)の THF/DMF (1:1)(5 mL)溶液にパラジウム炭素 (10%, 25 mg)を加え, 水素雰囲気下にて 40°Cで 16 時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 酢酸エチルで希釈してセライトろ過し, 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 = 80:20 to 20:80)することで, 化合物 **5-3**を暗紫色固体として得た(88 mg, 70%).

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノンの(23 mg, 0.10 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(1.0 mL)に化合物 **5-3**(38 mg, 0.15 mmol), 炭酸ナトリウム(32 mg, 0.3 mmol)を加え, 室温にて 12 時間攪拌した. 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥後, 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 = 90:10 to 34:66)することで, 化合物 **5-4**を赤紫色非晶質固体として得た(28 mg, 63%). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.86 (br.s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.03–7.80 (m, 2H), 7.85 (ddd, $J=7.2,$

7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.78 (ddd, $J=7.2, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 6.46 (dd, $J=8.7, 3.0$ Hz, 1H), 2.90 (s, 6H), 1.44 (s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 180.0, 176.3, 153.5, 148.9, 143.8, 134.9, 133.7, 132.9, 132.2, 130.0, 127.9, 126.5, 126.0, 19.9, 111.0, 107.5, 106.1, 79.5, 79.2, 40.2, 28.1.

化合物 **5-4** (28 mg, 0.063 mmol)に 4M 塩酸・ジオキサン溶液(1.2 mL)を加え, 室温にて 12 時間攪拌した. 反応液を真空下で減圧濃縮することで, 化合物 **5**を茶色粉末固体として得た(20 mg, quant.).

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.18 (dd, $J=7.2, 1.2$ Hz, 1H), 8.33 (dd, $J=7.2, 1.2$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.88–7.82 (m, 2H), 7.71 (dd, $J=9.6, 3.0$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 3.16 (s, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 150.1, 141.2, 138.9, 137.2, 136.7, 130.1, 129.1, 128.5, 128.4, 124.8, 123.0, 122.2, 109.4, 103.9.

C-2) 1,4-ナフトキノ誘導体の合成の UV-Vis スペクトル

合成した誘導体の UV-Vis スペクトルを測定した結果, 特定の位置への置換基の導入によって UV-Vis スペクトルの一定の長波長化が観測された. *N,N*-ジメチルアミノ-1,4-フェニレンジアミン構造の導入前の分子においては, 5 位の置換基をアミノ基とすることで 532 nm 付近に吸収をもつようになることがわかった(Fig. 2a). これはおそらく 5 位アミノ基の水素と 1 位のアルボニル酸素との間に形成される分子内水素結合の寄与のためと予想される. 一方, *N,N*-ジメチルアミノ-1,4-フェニレンジアミン構造の導入後の分子においては, 5 位にニトロ基を有する誘導体 **3**においてピークトップの長波長化が観測され, 800 nm 以上の部分にも UV 吸収をもつことが分かった(Fig. 2b). Figure 2c のスペクトルから, *N,N*-ジメチルアミノ-1,4-フェニレンジアミンの 2 位へのアミノ基の導入はおそらく長波長化には寄与しないものと考えられた. **5'**のように環化した構造においてはピークトップの短波長側へのシフトが観測された(Fig. 2d). これはおそらく環化した構造とな

ったことで、1,4-ナフトキノン誘導体 **1** でみられるような電荷分離状態をとらなくなったことによるものと考えられた。

D. 結論

PDA 校正用の標準物質の開発として、1,4-ナフトキノン誘導体の置換基位置の違いがおよぼす UV-Vis スペクトルの変化について検討した。本検討により、複数の誘導体の合成経路を確立し、また置換基の位置と種類によっては別の化合物構造が得られて、望みの構造を得ることが極めて困難となることが分かった。今回検討したうち、1,4-ナフトキノン誘導体の5位にニトロ基を導入した化合物で UV-Vis スペクトルの長波長化が観測された。この化合物構造をベースとし、導入する置換基の個数や位置を検討することで、さらなる吸収波長の長波長化が可能と考えられる。合成予定の化合物として、今回検討した5位に加えて8位にアミノ基等の置換基を有する化合物を設計しており、今後はこれら誘導体の合成も行い、UV-Vis スペクトルの長波長化に有用な情報の蓄積を進めていく。

E. 文献

- 1) Terayama K, Sumita M, Tamura R, Payne DT, Chahal MK, Ishihara S, Tsuda K: Pushing property limits in materials discovery via boundless objective-free exploration. Chem. Sci. 2020; 11(23): 5959-5968.

- 2) Aaron WT, Susan R-H, Christopher W: Probe for selectively characterizing enzymes involved in xenobiotic metabolism and method of making and using the same. US Patent. US20190100792A1 (Apr. 4, 2019).

F. 研究発表

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

なし

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

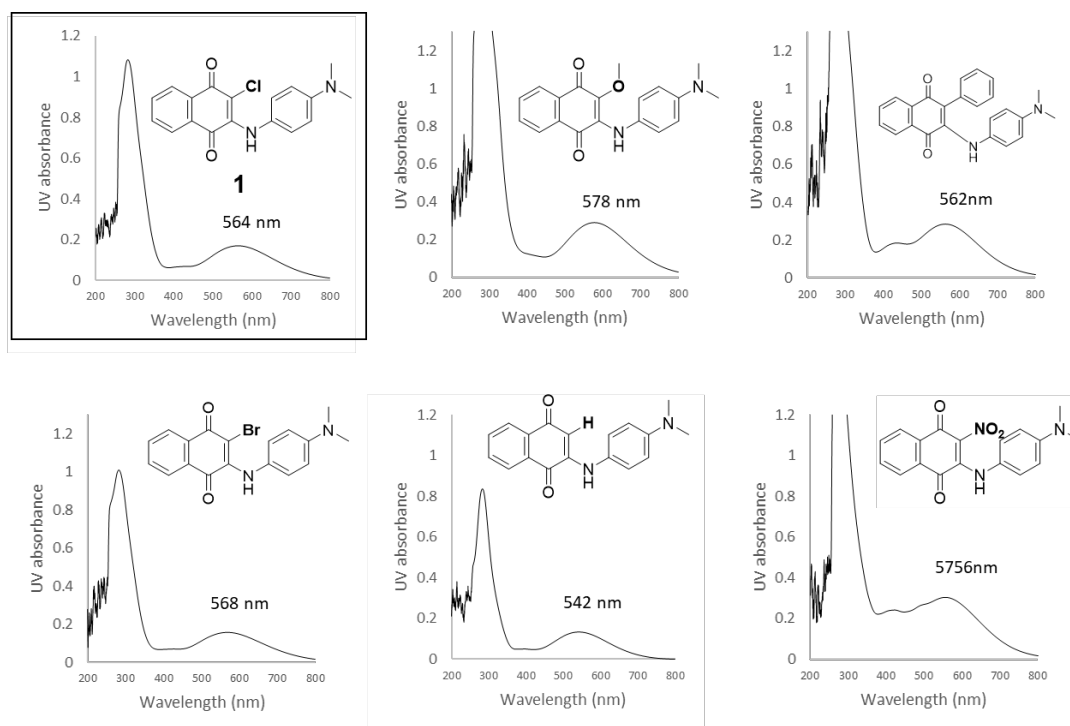
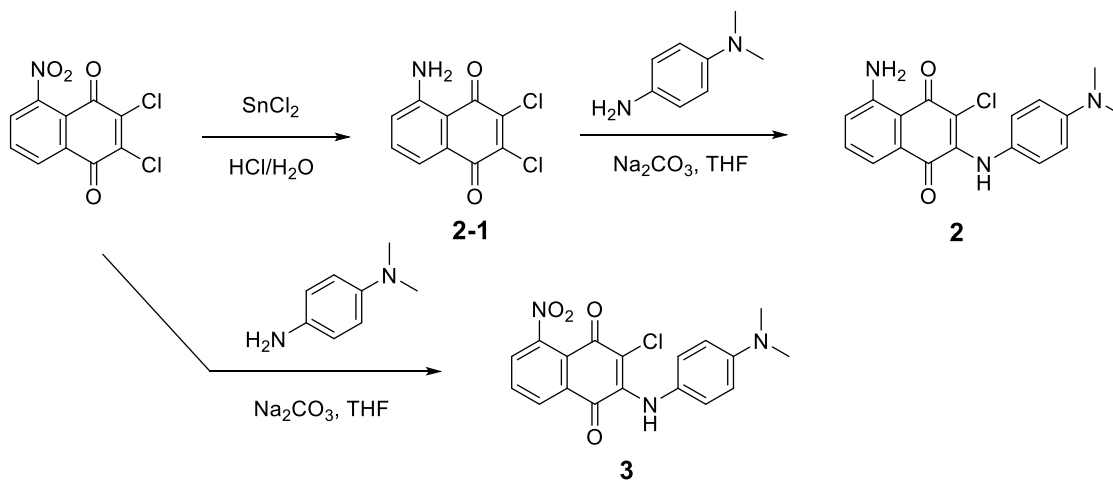
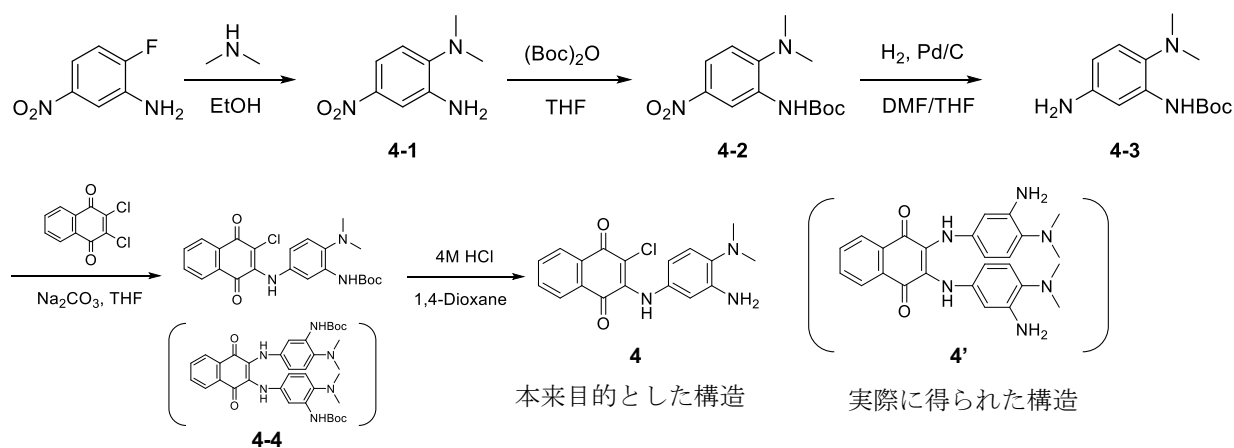


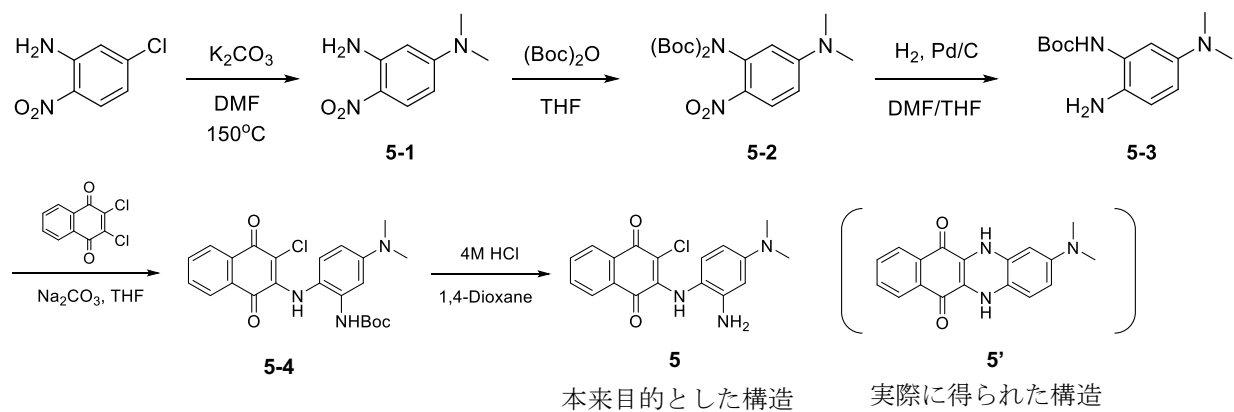
Fig. 1. 1,4-ナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル (1)



Scheme 1. 1,4-ナフトキノン誘導体 2 及び 3 の合成



Scheme 2. 1,4-ナフトキノ誘導体 **4** の合成



Scheme 3. 1,4-ナフトキノ誘導体 **5** の合成

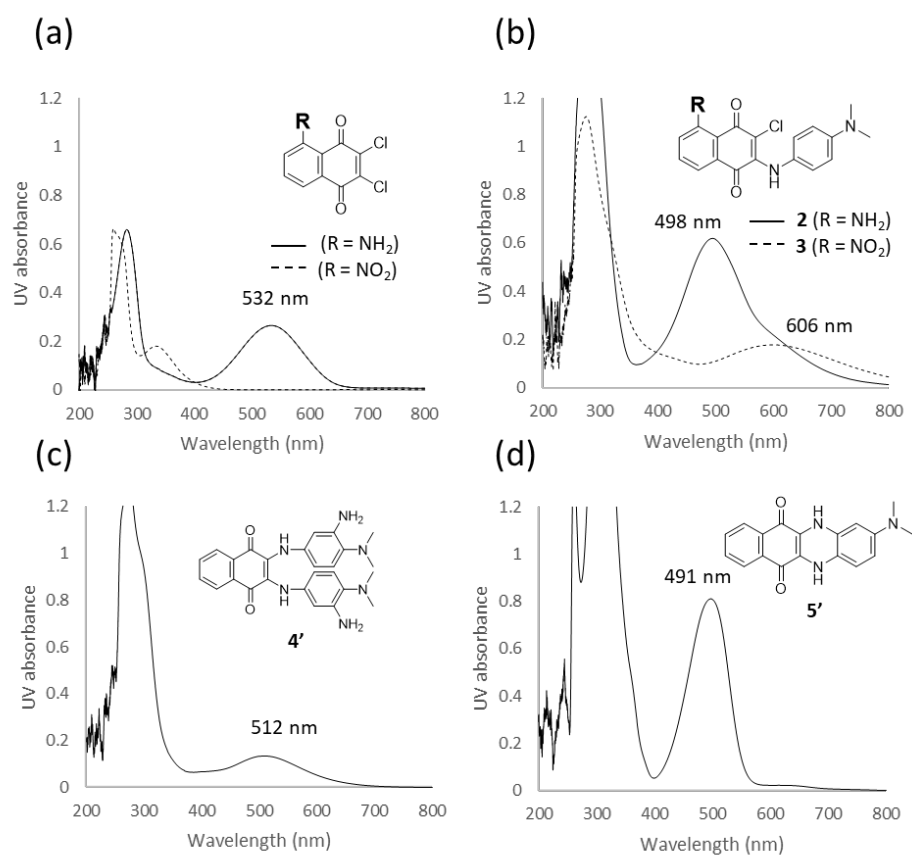


Fig. 2. 1,4-ナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル (2)

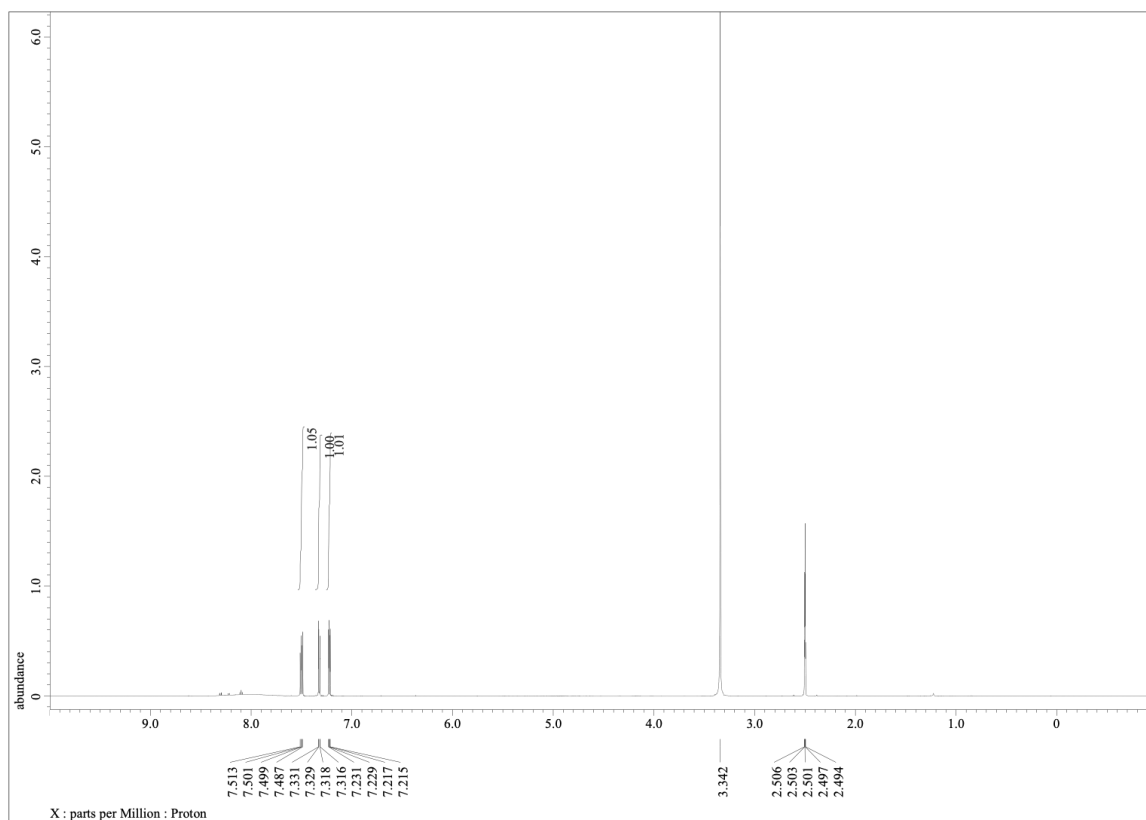


Fig. 3. 化合物2-1の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

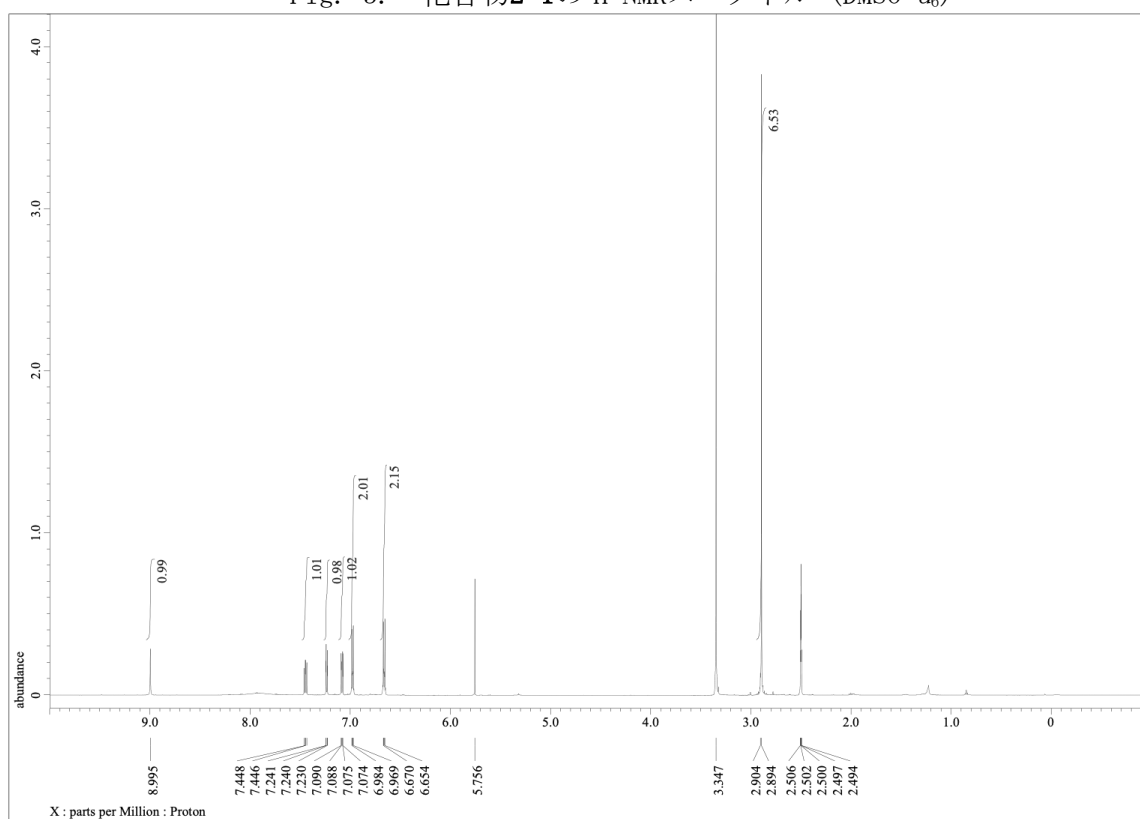


Fig. 4. 化合物2の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

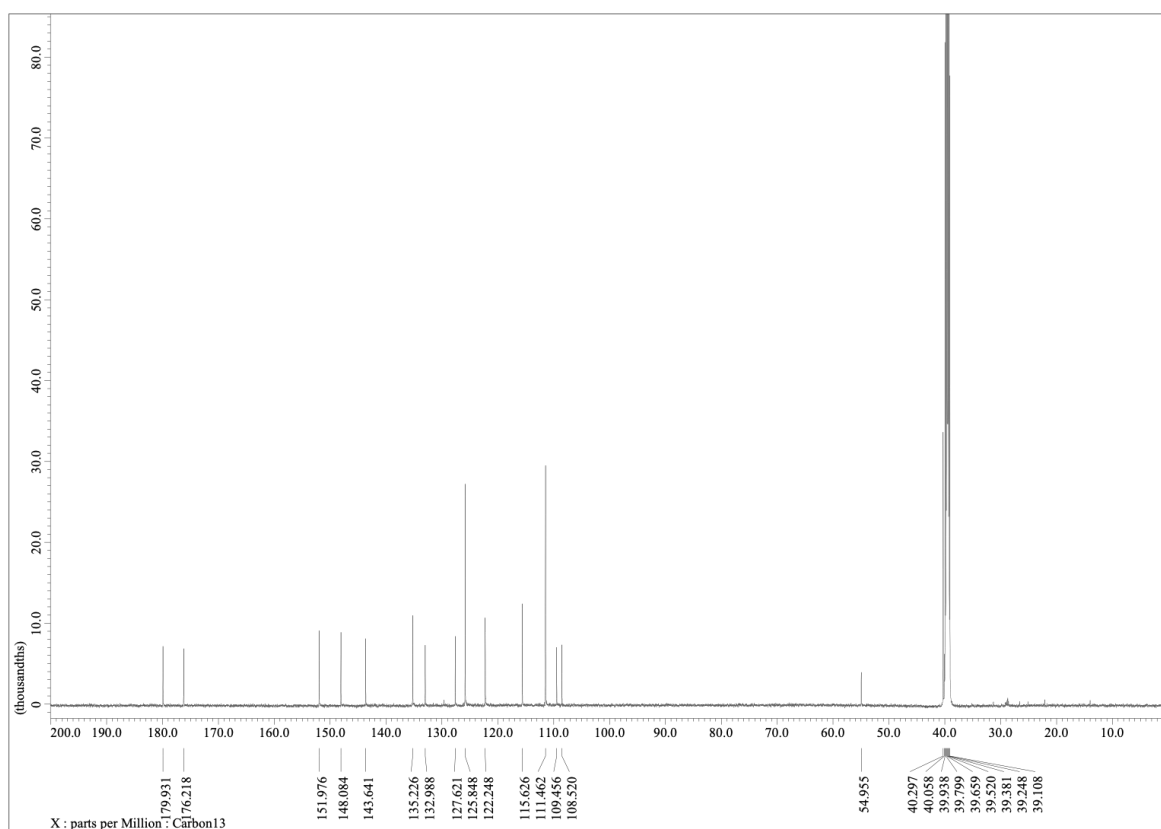


Fig. 5. 化合物2の ^{13}C NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

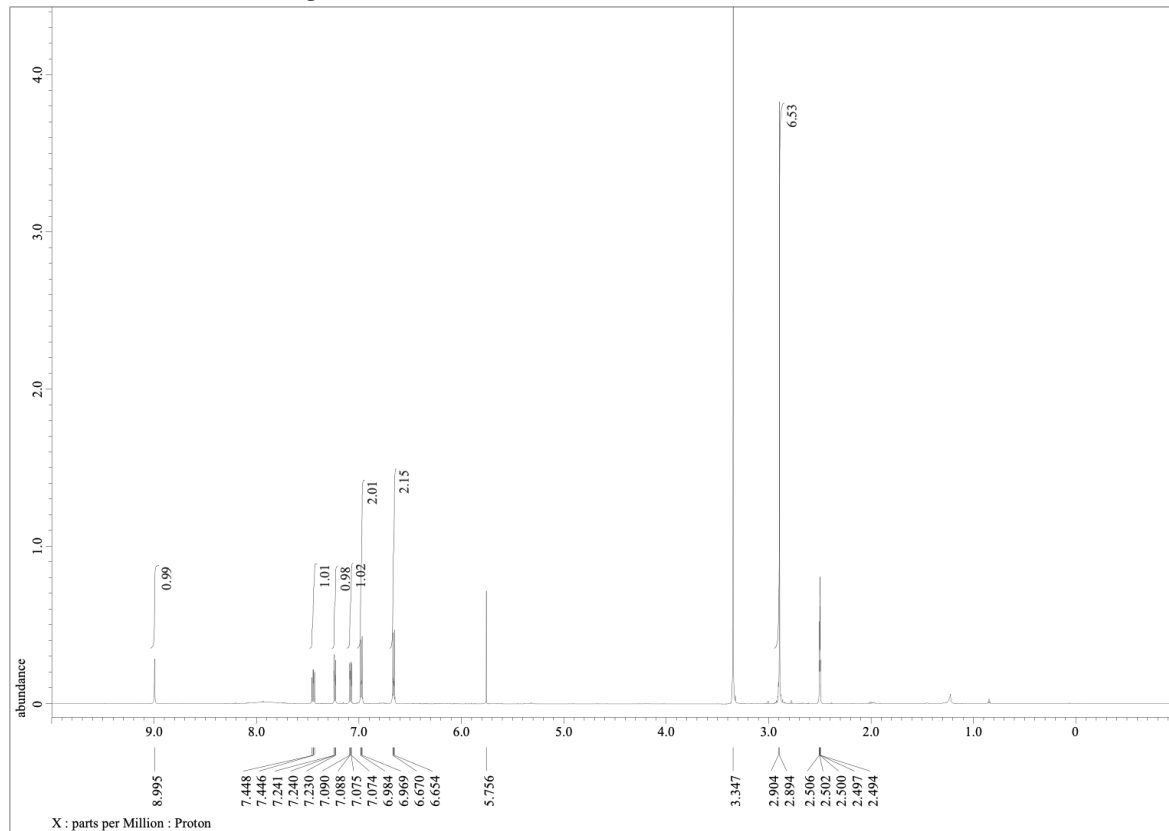


Fig. 6. 化合物3の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

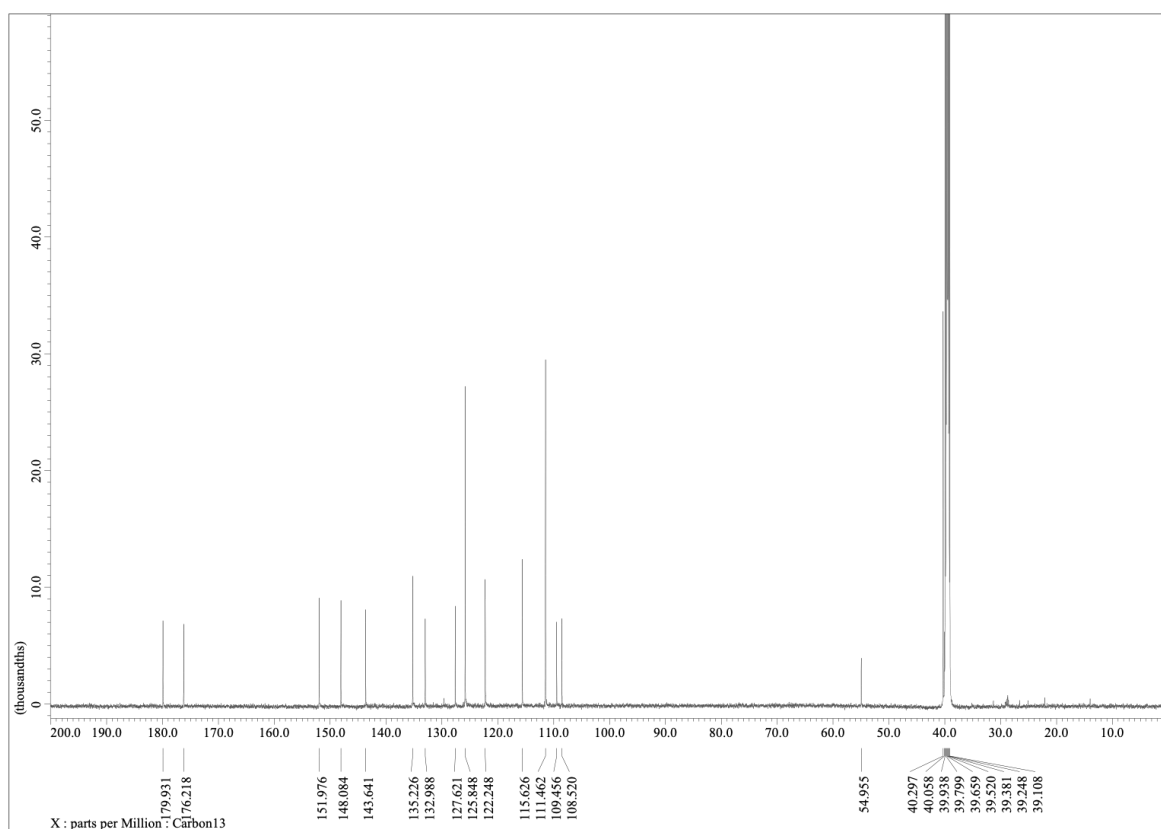


Fig. 7. 化合物3の ^{13}C NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

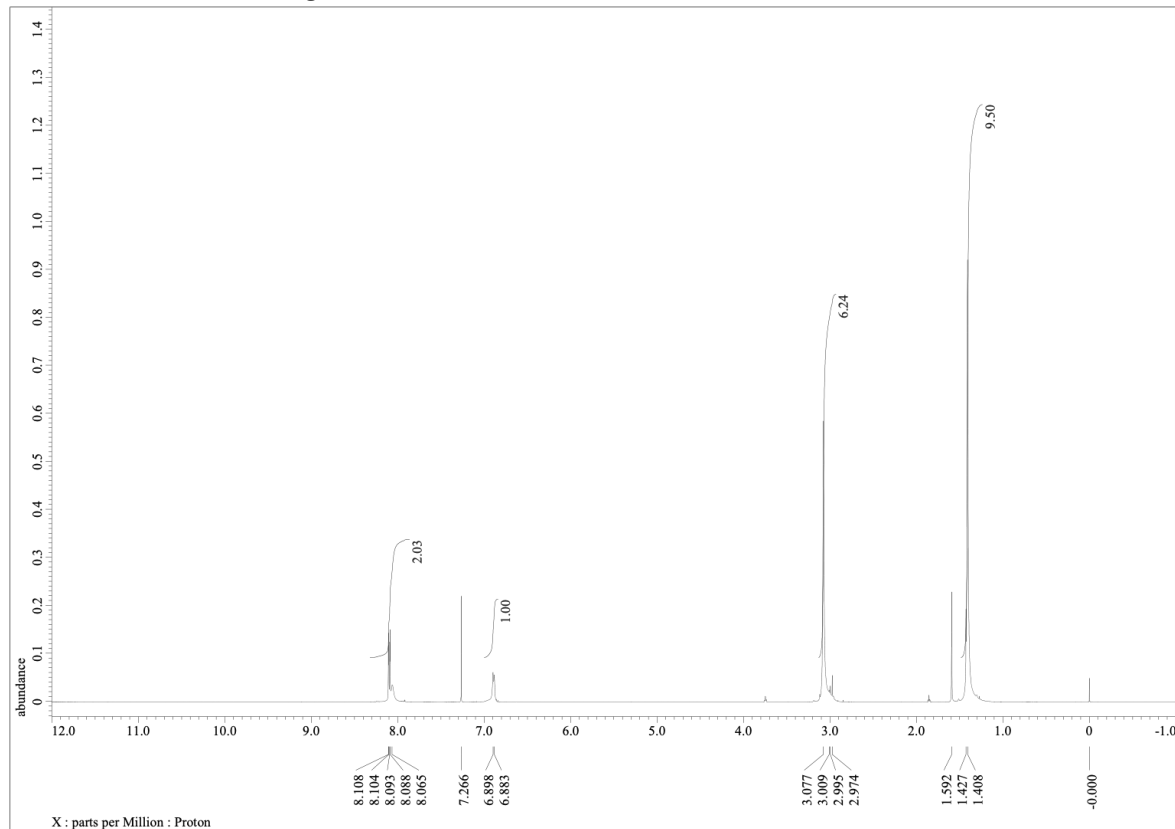


Fig. 8. 化合物4-2の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

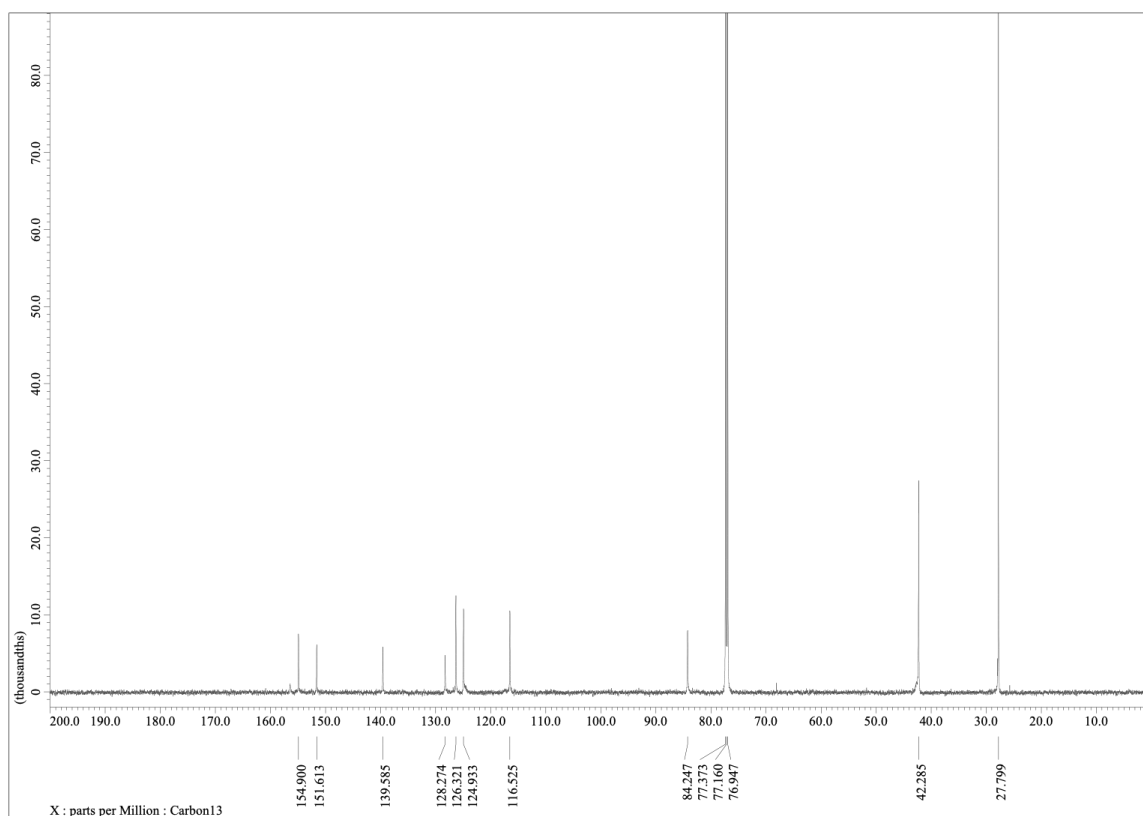


Fig. 9. 化合物4-2の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

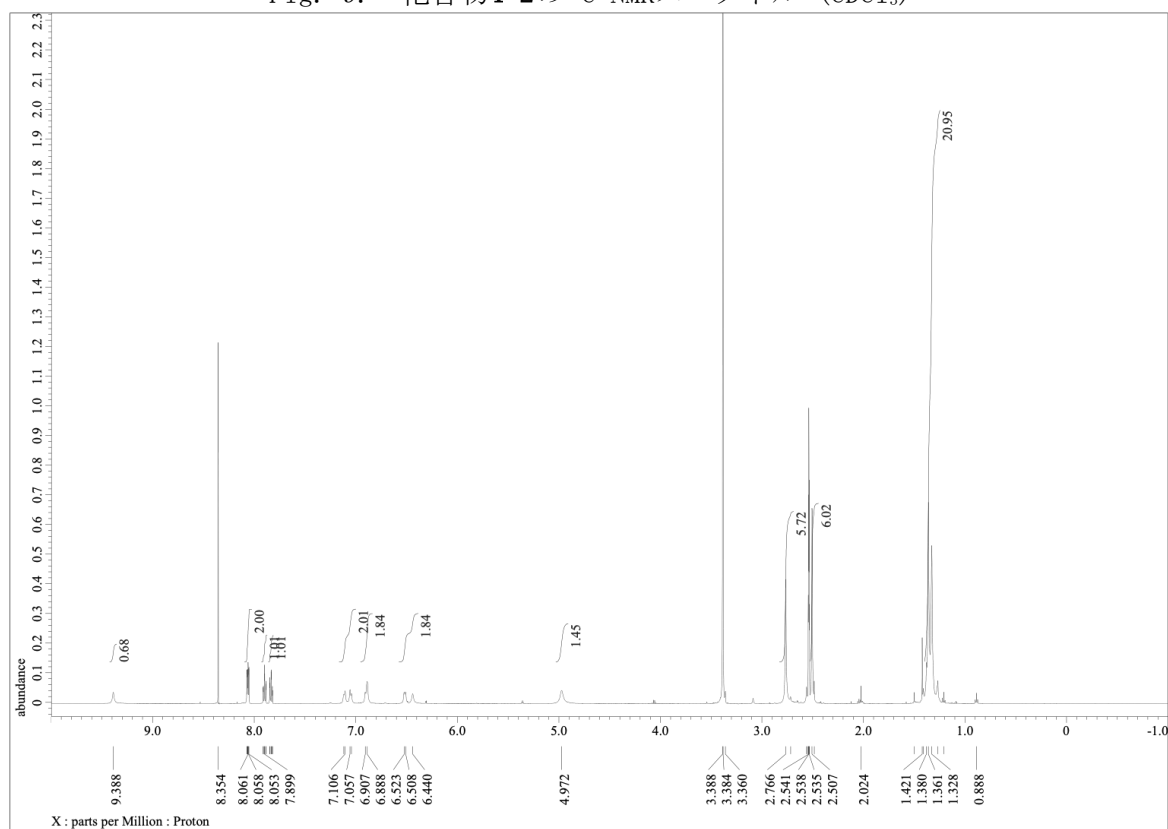


Fig. 10. 化合物4-4の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

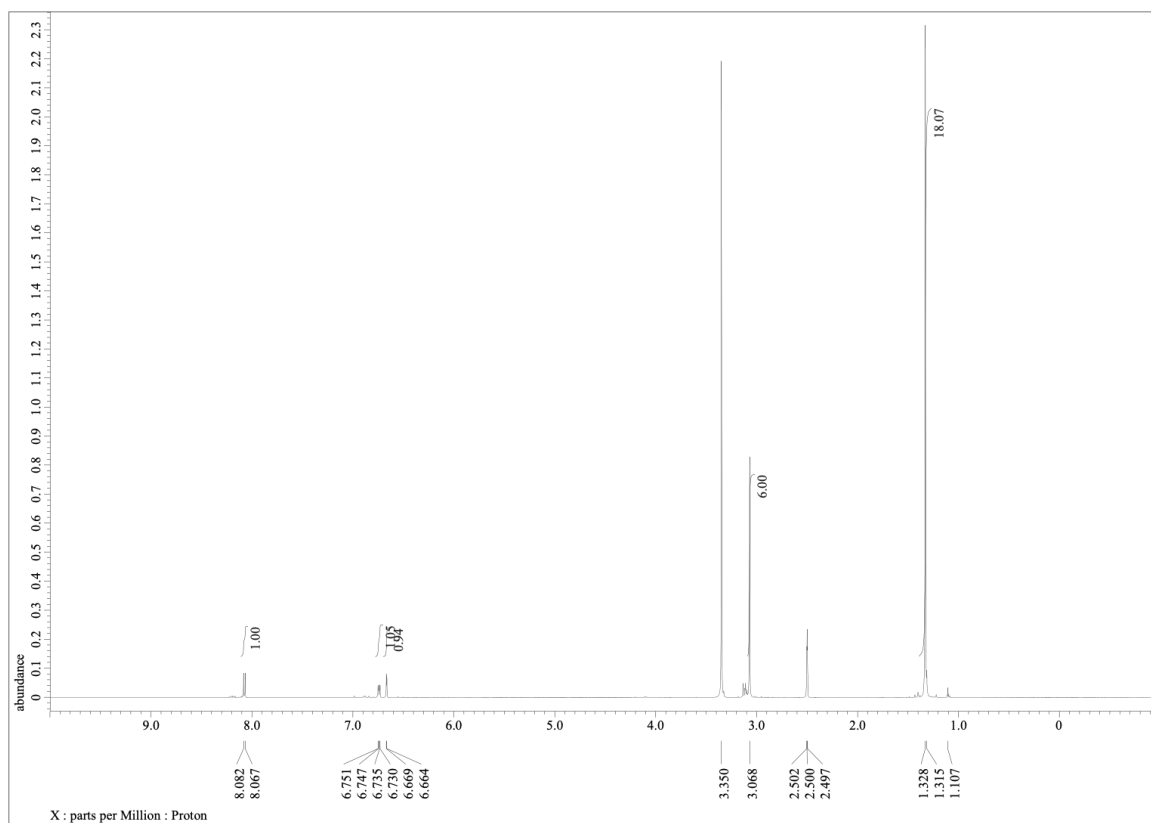


Fig. 11. 化合物5-2の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

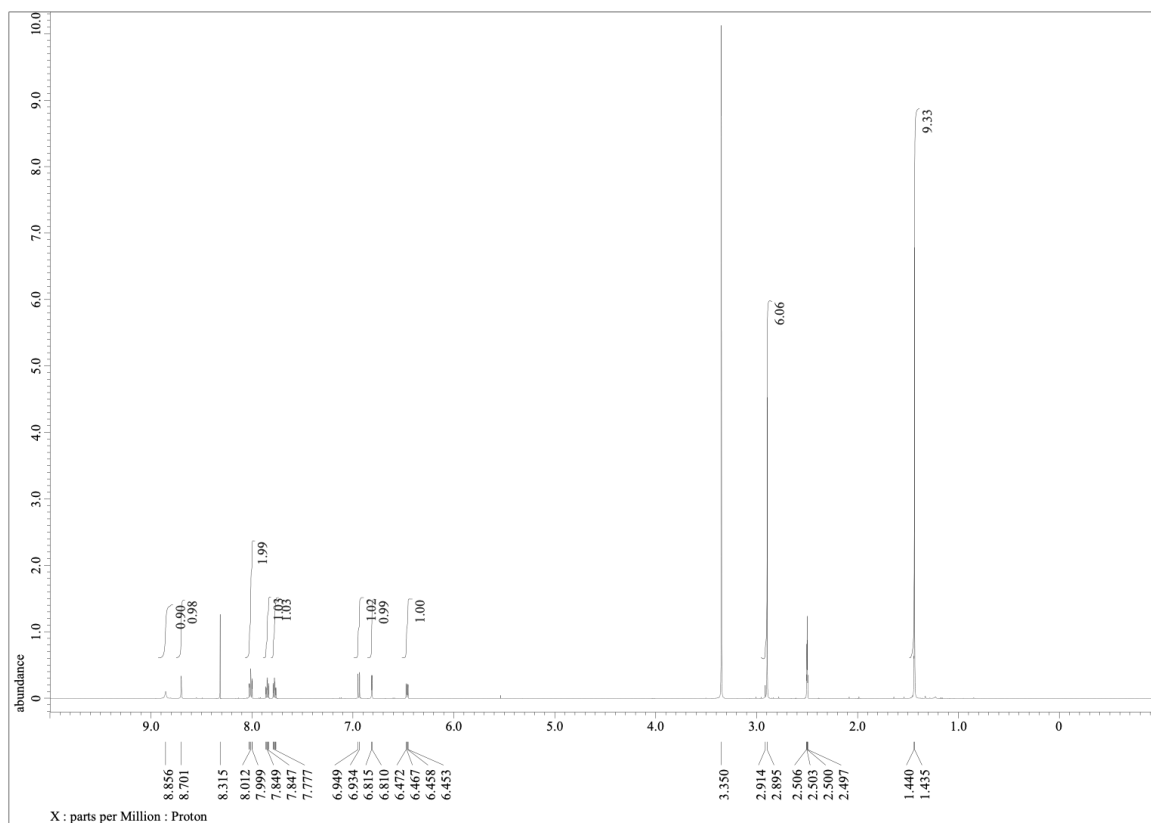


Fig. 12. 化合物5-4の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

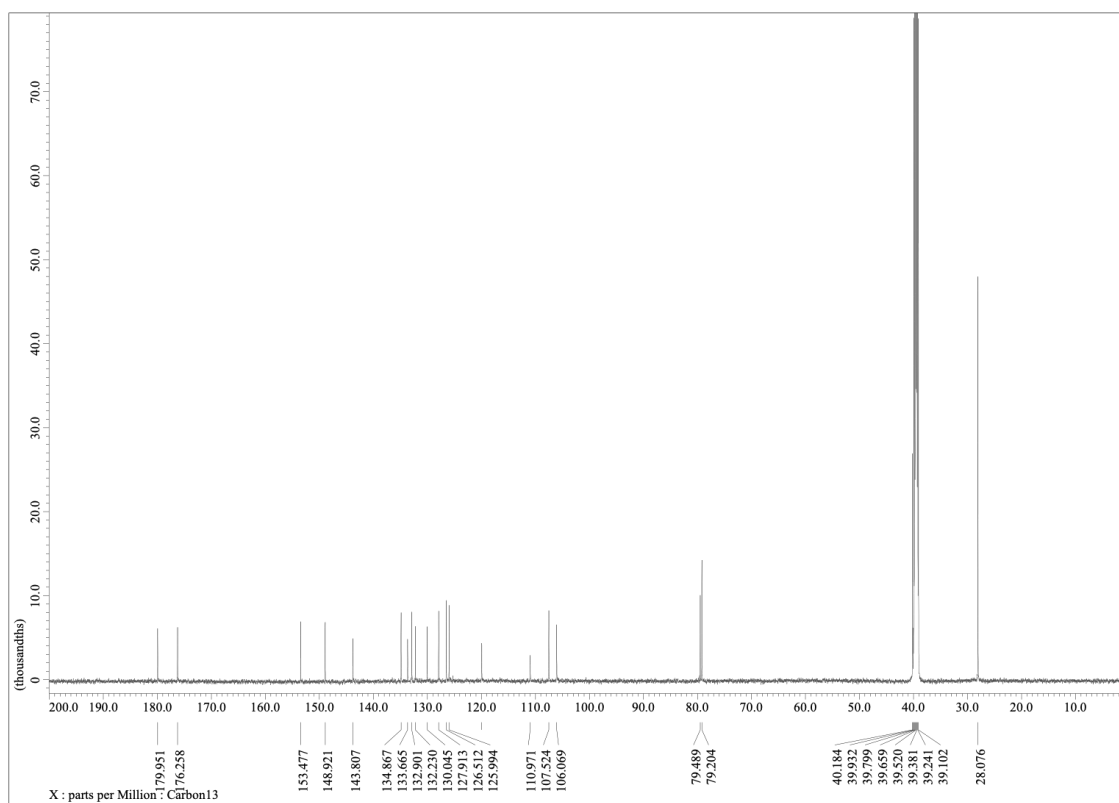


Fig. 13. 化合物5-4の ^{13}C NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

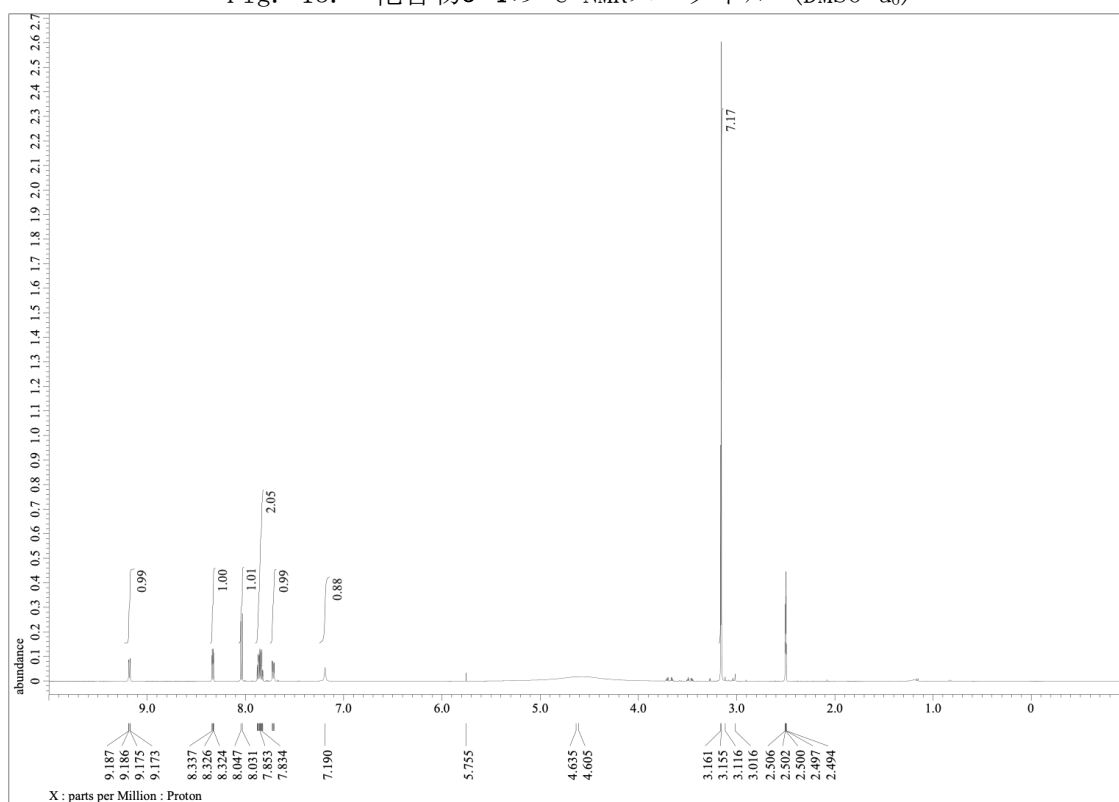


Fig. 14. 化合物5の ^1H NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

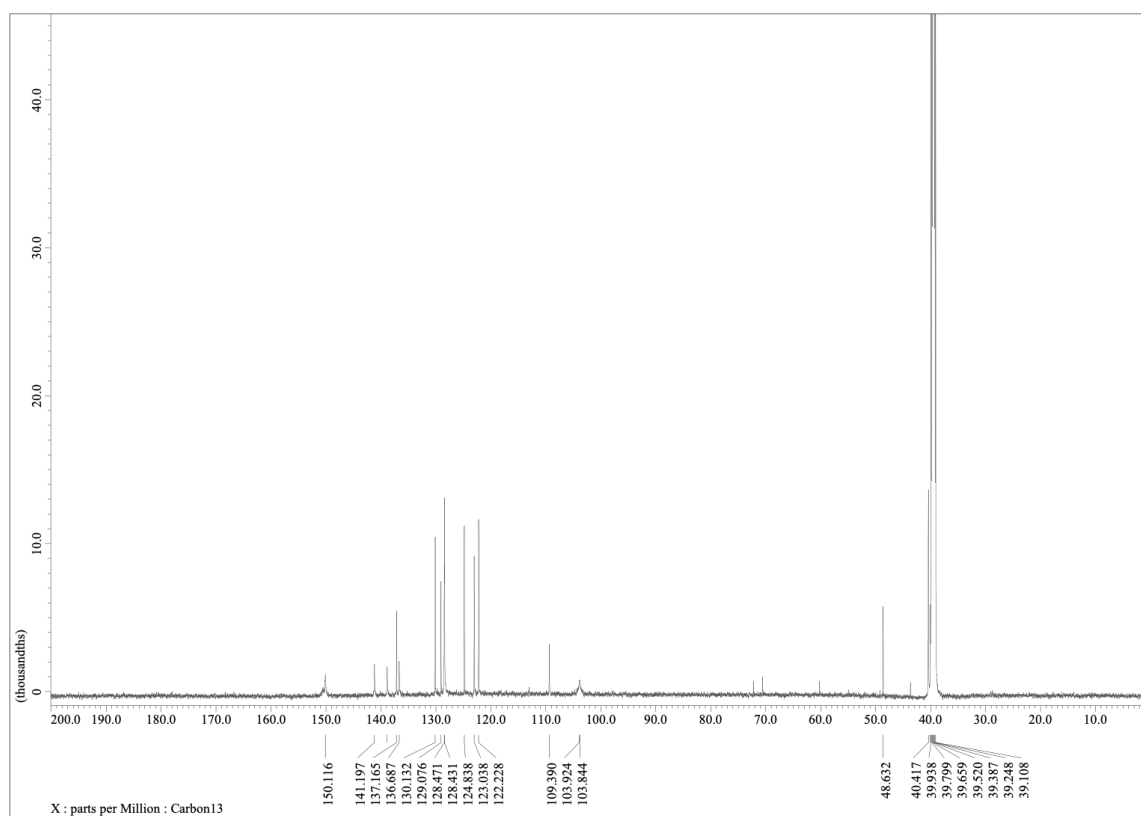


Fig. 15. 化合物5の ^{13}C NMRスペクトル ($\text{DMSO}-d_6$)

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

令和6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
窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較

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

食品添加物公定書の収載された窒素定量法の違いによる定量値，操作性，設備点での課題等を比較した．試料には，試験実施ができない可能性がある「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を用いた．窒素定量法は，① 公定法(ケルダール法)，② 公定法改法(ケルダール法)，③ セミマイクロケルダール法，④ 元素分析法(改良デュマ法)及び⑤ 元素分析法(CHN コーダー法)とした．いずれの定量法でもほぼ同等の定量法が得られることが示された．またいずれの精度も良好であった．ケルダール法及びセミマイクロケルダール法は操作が煩雑で時間を要し，有害・有毒試薬を用いる点，大量の硫酸廃液が出る点，亜硫酸ガスが発生する点等から試験者や環境への負担が非常に大きいことが改めて示された．一方元素分析法では，装置が高額でありキャリアガスや助燃ガスが必要ではあるが，操作は簡便で試験時間も 10 分以内で完結する点で優れていた．なお「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」の公定法は試料量を減らした② 公定法改法へ改正することが最も簡単であったが，将来的には元素分析法へ移行していくべきだと考えられた．

研究協力者

川末慎葉 国立医薬品食品衛生研究所
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
御所窪誠 (一財)日本食品分析センター
渡辺実薫 (一財)日本食品分析センター
座間俊輔 (一財)日本食品分析センター
伊藤朱美 (一財)日本食品分析センター
藤松芽生 (一財)日本食品分析センター

A. 研究目的

我が国では，原則として内閣総理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¹⁾，表示基準と合わせて食品添加物公定書(公定書)²⁾に収載されている．

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、主成分がたん白質である食品添加物には含量として窒素の含量を規定しているものがある。また、一部の食品添加物には、純度試験として総窒素の含量が規定されているものがある。

窒素の定量法は、B 項の一般試験法の『29.窒素定量法』に記載されているケルダール法、セミマイクロケルダール法又は元素分析法のいずれかで実施することとされている。例えば、「L-シスチン」(FA028600, E00163)(以降、Cys)や「コンドロイチン硫酸ナトリウム」(FA024300, T01400)(CSNa)等ではケルダール法を、「サイリウムシードガム」(FA024400, E00147)や「パントテン酸カルシウム」(FA046100, T02950)等ではセミマイクロケルダール法を用いることとされている。なお、第 10 版公定書において、元素分析法を用いて窒素を定量することとされている品目はない。

窒素定量法としてケルダール法が規定されている品目のうち、Cys では、各条において規定された試料量 0.3 g の上限の試料を採取した場合 0.33 g となるが、これは窒素 38.5 mg に相当し、0.05 mol/L 硫酸で滴定すると 27.4 mL を要する計算となる。試験で規定されている 0.05 mol/L 硫酸は 25 mL であるため、試料によっては過量の硫酸が存在しない。つまり、滴定する前から滴定終点を超えていることとなる。また、CSNa についても、窒素の規格上限(3.8%)である試料を既定の採

取量 1 g 採って試験を実施した場合、これは窒素として 38 mg に相当し、0.05 mol/L 硫酸で滴定すると 27.1 mL を要する計算となる。つまり、Cys と同様に滴定前から滴定終点を超えていることとなる。このように Cys 及び CSNa においては、窒素定量が確実に実施できない場合がある。

そこで本研究では、Cys 及び CSNa の窒素定量法の改正に向けた基礎的検討として、複数の窒素定量法による測定値の比較を行うとともに、各定量法の操作性、設備面での課題、初期コスト等について比較した。

B. 研究方法

B-1) 試料

Cys は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。また、CSNa については日添協を通じても入手できなかったため、市販の試薬(特級、関東化学(株)製)を用いた。

B-2) 試薬及び標準品

① 試薬

硫酸：特級

二酸化セレン：和光特級

水酸化ナトリウム：特級

0.05mol/L 硫酸：容量分析用

以上、富士フイルム和光純薬(株)製

② 標準品

エチレンジアミン四酢酸(EDTA)：認証標準物質、LECO ジャパン合同会社製

アセトアニリド：有機元素分析用、キシ

ダ化学(株)製

B-3) 定量

① 公定法(ケルダール法)

操作は公定書にしたがった。すなわち、Cysは乾燥せず、CSNaは105℃で4時間乾燥したもの試料とし、既定の量(Cys : 0.3 g, CSNa : 1 g)を精密にケルダールフラスコに量り採り、硫酸カリウム 5 g, 硫酸銅(II)五水和物 0.5gを加えた。ただし、Cysの場合はさらに二酸化セレン 0.2 gを加えた。これに硫酸 20 mLを加え、泡立ちがほとんど止むまで穏やかに加熱し、更に温度を上げて沸騰させ、内容物が青色の透明な液となった後、更に 1～2時間加熱した(Cysの場合は4時間)。冷後、水 150mLを徐々に加え、冷却した。冷後、沸騰石又は粒状の亜鉛 1～3粒を加え、ケルダール分解装置を組み立てた(図1)。Hに0.05 mol/L 硫酸 25 mLを正確に量って入れ、更に水約 50 mLを加え、Gの下端をこの液中に浸し、次に、Cから水酸化ナトリウム溶液(1→5)85 mLを徐々に加え、更に少量の水で洗い込み、Dの部分のピンチコックを閉じ、Aを軽く揺り動かして内容物を混和した後、穏やかに加熱し、沸騰し始めたならば加熱を強めて、内容物の約 2/3 容量が留出するまで蒸留した。次に、Gの下端をHの液面から離し、更にしばらく蒸留を続けた後、Gの下端を少量の水で洗い込み、Hの液中の過量の硫酸を 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。終点の確認には、電位差計又は指示薬(ブロモクレゾールグリーン・メチルレッド混合試液 3 滴)を用いた。別に空試験を

行い、補正した。なお、全ての操作を3回繰り返した(n=3)。

② 公定法改法(ケルダール法)

公定法から試料量を減らした方法を公定法改法とした。試料量は、Cys は 0.2 g, CSNa は 0.8 g とした。その他は全て① ケルダール法と同様に操作した。

③ セミマイクロケルダール法

1)装置

加熱分解装置 : DigiPREP HT250-20(株式会社 SCP SCIENCE 製)(図2)

自動蒸留滴定装置 : VAPODEST 500(ゲルハルトジャパン株式会社製)(図3)

2)測定条件

水添加量 : 50 mL

30%水酸化ナトリウム溶液量 : 30 mL

2%ほう酸溶液量 : 80 mL

蒸留時間 : 5 min

3)定量

第18改正日本薬局方³⁾又は医薬部外品原料規格 2021⁴⁾にしたがった。すなわち、Cys は 105℃3 時間、CSNa は 105℃で 4 時間乾燥したもの試料とし、既定の量(Cys : 30 mg, CSNa : 0.1 g)を精密に分解容器に量り採り、分解促進剤 1 gを加えた。これに硫酸 7 mLを加えた後、過酸化水素(30) 1 mLを分解容器を揺り動かしながら徐々に加えたのち、加熱分解装置で分解した。なお分解温度は 380℃、分解時間は4時間とした。冷後、水 20mLを注意しながら加えて冷却し、自動蒸留滴定装置で蒸留滴定を行った(滴定液 :

0.005 mol/L 硫酸). 別に空試験を行い, 補正した. なお, 全ての操作を 3 回繰り返した (n=3).

④ 元素分析法(改良デュマ法)

1)装置

元素分析装置 : SUMIGRAPH NC-TRINITY(株式会社住友分析センター製)(図 4)

2)測定条件

燃焼管温度 : 900 °C

還元管温度 : 600 °C

熱伝導度検出器温度 : 100 °C

カラム温度 : 70 °C

キャリアガス : 高純度ヘリウムガス(純度 99.995 %以上)

キャリアガス流量 : 80 mL±5 mL/min

助燃ガス : 高純度酸素ガス(純度 99.99 %以上)

3)定量

試料(Cys : 0.5 及び 0.25 g, CSNa : 0.5 g)及び EDTA 標準品をそれぞれ石英ボードに精密に量りとり装置に導入し測定した. 検量線範囲は想定される範囲として窒素量が 10~64 mg に相当する濃度とした. 得られた EDTA 標準品のピーク面積から検量線を作成し, 各試料のピーク面積値から窒素量を求めた. なお, 全ての操作を 3 回繰り返した (n=3).

⑤ 元素分析法(CHN コーダー法)

1)装置

有機微量元素分析装置 : vario EL cube(エレ

メンター・ジャパン株式会社製)(図 5)

2)測定条件

燃焼管温度 : 950°C

還元管温度 : 550°C

キャリアガス : ヘリウム

キャリアガス流量 : 230 mL/min

助燃ガス : 酸素

3)定量

試料(Cys 及び CSNa : 2 mg)及びアセトアニリド標準品をそれぞれアルミボードに精密に量りとり装置に導入し測定した. 検量線範囲は想定される範囲として窒素量が約 0.1~0.3 mg に相当する濃度とした. 得られたアセトアニリド標準品のピーク面積から検量線を作成し, 各試料のピーク面積値から窒素量を求めた. なお, 全ての操作を 3 回繰り返した(n=3).

C. 結果及び考察

C-1) 各定量法の定量値の比較

C-1-1) Cys

各定量法における結果を表 1 及び図 6 に示した. また, ④ 改良デュマ法及び ⑤ CHN コーダー法の検量線を図 7 に示した. いずれの検量線も測定した範囲において良好な直線性($r>0.9999$)であった. ただし, Cysにおいては, ④ 改良デュマ法において試料中の窒素量が今回設計した検量線範囲の上限値付近となったことから試料量を半分の 0.25 g とした結果も④'として示した.

定量値の平均値(n=3)は 98.7~99.4%であった. 公定法とその他の定量法の定量値の比(その他の定量法/公定法)は 0.99~1.00 であ

った。また、相対標準偏差は 0.07~0.55%であった。以上の結果から、いずれの定量法においてもほぼ同程度の定量値が得られること、かついずれの定量法においても精度よく測定可能であることが確認された。

C-1-2) CSNa

CSNaは吸湿性があり、⑤ CHN コーダー法における採取量 2 mg は極めて微量なため正確な秤量が困難であった。そのため、CSNaでは⑤ CHN コーダー法は検討から除外した。⑤ CHN コーダー法以外の定量法における結果を表 2 及び図 8 に示した。

定量値の平均値(n=3)は 3.08~3.19%、公定法とその他の定量法の定量値の比(その他の定量法/公定法)は0.98~1.02、相対標準偏差は 0.21~2.27%であった。以上の結果から、CSNaにおいても、いずれの定量法でも得られる定量値はほぼ同じであること、かついずれの定量法においても精度よく測定可能であることが確認された。

C-2) 各定量法の特徴

C-2-1) ケルダール法及びセミマイクロケルダール法

ケルダール法の操作は以下の通りである。また、公定書に示されているケルダール法及びセミマイクロケルダール法で用いる装置をそれぞれ図 1~図 3 に示した。

- ① 試料に硫酸を加え分解促進剤存在下で加熱分解して窒素を硫酸アンモニウムに変換する。
- ② 水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性と

したのち、水蒸気蒸留によってアンモニアを遊離させ硫酸に捕集し、再び硫酸アンモニウムとする。

- ③ 過量の硫酸を水酸化ナトリウムで滴定し、②において消費された硫酸の量を求める。(逆滴定)
- ④ 消費された硫酸の量から計算式により窒素の量を求める。

なお、セミマイクロケルダール法の操作もケルダール法とほぼ同様であるが、公定書においては、試料量はケルダール法の 1/10 とされ、遊離したアンモニアの捕集はホウ酸溶液を用い、ホウ酸溶液中に遊離したアンモニアを硫酸で滴定する点で異なる。なお、一部の操作は自動化された装置を用いることもできる。

試薬として劇物である硫酸や水酸化ナトリウムを使用するうえ、「L-シスチン」では分解促進剤に毒物である二酸化セレンを使用する。

分析時間は、ケルダール法及びセミマイクロケルダール法ともに試料の分解に約 4 時間、蒸留から測定までの操作にケルダール法は約 45 分間、セミマイクロケルダール法は約 7 分間程度かかる。また、自動化されていない装置を用いる場合は、大部分の操作において試験者が現場に立ち会う必要があるため、試験者への負担が大きい。

基本的に特別な機器は不要であり、試験に用いる装置はいずれもガラス器具で構成されそれぞれはそれほど高価なものではない。しかし、複数試料を同時に加熱できるような装置もあり(図 9)、十数万円程度かか

る。また、セミマイクロケルダール法では加熱分解装置(図2)や自動蒸留滴定装置(図3)を使用することができるが、それぞれ数十万～百数十万円程度かかる。

また試料の分解時に亜硫酸ガスが発生するためドラフト設備が必須となり、大量の硫酸廃液に加え、硫酸銅を使用するため重金属廃液の処理が必要となる。したがって、環境負荷が大きい試験法であるとも言える。

C-2-2) 元素分析法

元素分析法は、いわゆる燃焼法と呼ばれ、元素分析計を用いる。窒素の場合、採取した試料を高温で完全燃焼し窒素酸化物(NO_x)を発生させ、還元管を通過して窒素に還元したのち、水分と二酸化炭素を除去し熱伝導度検出器(Thermal Conductivity Detector, TCD)や非分散赤外線吸収法(Non-Dispersive Infrared Absorption, NDIA)等によって検出する。適切な標準品を用いて検量線を作成し定量することができる。大部分の操作は自動化されているため、煩雑な操作はない。装置としては、窒素以外にも炭素、水素、硫黄、酸素等の定量も可能なものなど、様々なメーカーから多種の装置が市販されているが、いずれも数百万～一千数百万円程度と非常に高価である(図4及び図5)。

分析時間は操作全体では10分以内で完了するため非常に迅速である。特別な試薬は使用しないが、キャリアガスとしてヘリウム又はアルゴン、助燃ガスとして酸素を必要とする。そのためこれらのガスを供給可能な設備又はガスボンベの設置が必要とな

る。

得られた結果は滴定のように目視での判定を行わないため試験者による差が生じない。

C-2-3) 各定量法の特徴の比較

各定量法の特徴を表3にまとめた。ケルダール法は分析に長時間を要し、また試験者や環境への負荷が大きいことが改めて示された。一方元素分析法においては、装置が高価であり初期投資が大きいというデメリットがあったが、測定時間や操作性は明らかに迅速で簡便であり、試験者や環境負担の小さい分析法であると考えられた。

D. 結論

窒素定量に課題がある「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を試料に用いて、公定法を含む複数の窒素定量法の定量値及び操作性等を比較した。

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

以上の結果を踏まえると、「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」に対しては、公定法の試料量を少なくした公定法改法を導入することが最も簡単であると考えられた。一方、元素分析法は複数の元素を測定可能な装置も有ることから、複数部署で共有して使用できると考えられる。

したがって、将来的には試験者や環境への負荷低減のため元素分析法へシフトしていくべきであると考えられた。

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18改正日本薬局方，厚生労働省告示第220号(2021)。
- 4) 医薬部外品原料規格，厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課(2021)。

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 渡辺実薫，御所窪誠，伊藤朱美，藤松芽生，座間俊輔，阿部 裕，建部千絵，多田敦子，杉本直樹：食品添加物公定書における窒素定量法の検証，日本食品衛生学会第120回学術講演会(2024.11)。
- 2) 中島 馨，増本直子，阿部 裕，杉本直樹：相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討 ～クロロゲ

ン酸類縁体の構造と RMS の関係～，日本食品衛生学会第120回学術講演会(2024.11)。

- 3) 石附京子，阿部裕，杉本直樹：エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定呈法の検討，第61回全国衛生化学技術協議会年会(2024.11)。
- 4) 渡辺実薫：食品添加物公定書における窒素定量法の代替試験法の検証．第7回(公社)日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会(2025.2)。

2. 論文発表等

なし

3. 総説, 解説等

- 1) 阿部 裕，多田敦子：第10版食品添加物公定書における改正のポイント．月刊フードケミカル，2024; 5: 20-24.

G. 知的財産権の出願，登録状況

なし

装置

概略は、図1による。ただし、接続部は、すり合わせにしてもよい。

A：ケルダールフラスコ（硬質ガラス製 容量約300mL）

B：ガラス管

C：アルカリ溶液注入用漏斗

D：ゴム管（BとCを連結する。途中にピンチコックが付けてある。）

E：しぶき止め

F：蒸留管

G：冷却器

H：吸収用フラスコ（容量約300mL）

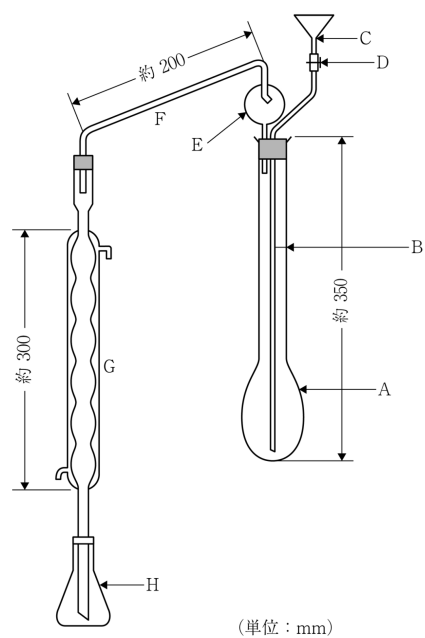


図1 ケルダール法の装置²⁾



図 2 加熱分解装置((DigiPREP HT250-20, 株式会社 SCP SCIENCE 製)



図 3 自動蒸留滴定装置 (VAPODEST 500, ゲルハルトジャパン株式会社製)



図4 改良デュマ法で用いた装置
((SUMIGRAPH NC-TRINITY, 株式会社住友分析センター製)

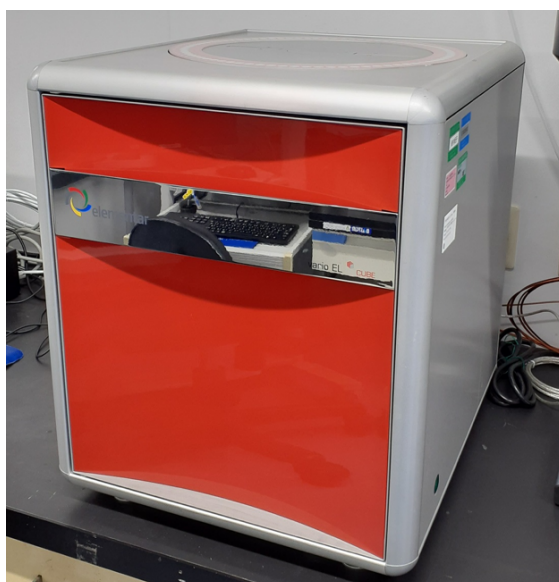


図5 CHN コーダー法で用いた装置
((vario EL cube, エレメンター・ジャパン株式会社製)

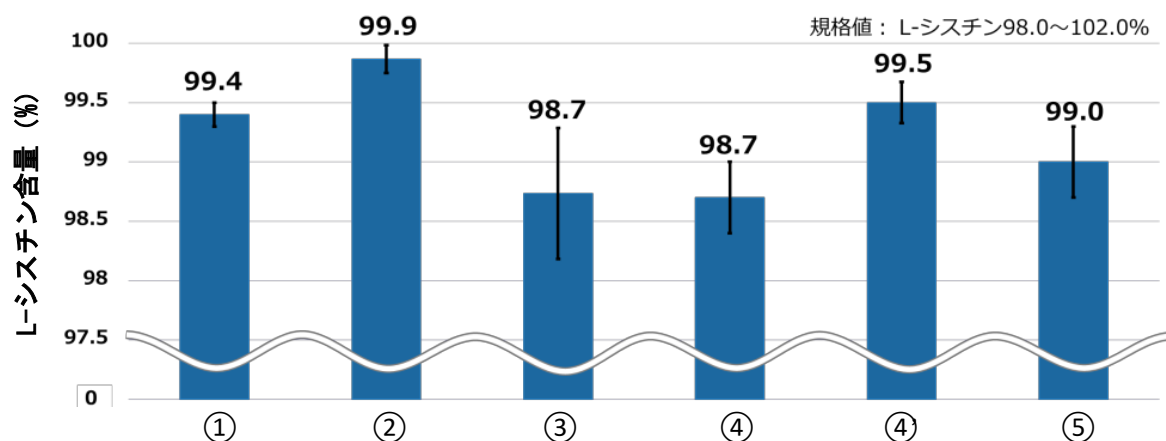


図6 L-シスチン含量(%, n=3)

- ① 公定法((ケルダール法), ② 公定法改法((ケルダール法),
- ③ セミマイクロケルダール法,
- ④ 元素分析法((改良デュマ法)・試料量 0.5g,
- ④' 元素分析法((改良デュマ法)・試料量 0.25 g,
- ⑤ 元素分析法((CHN コーダー法))

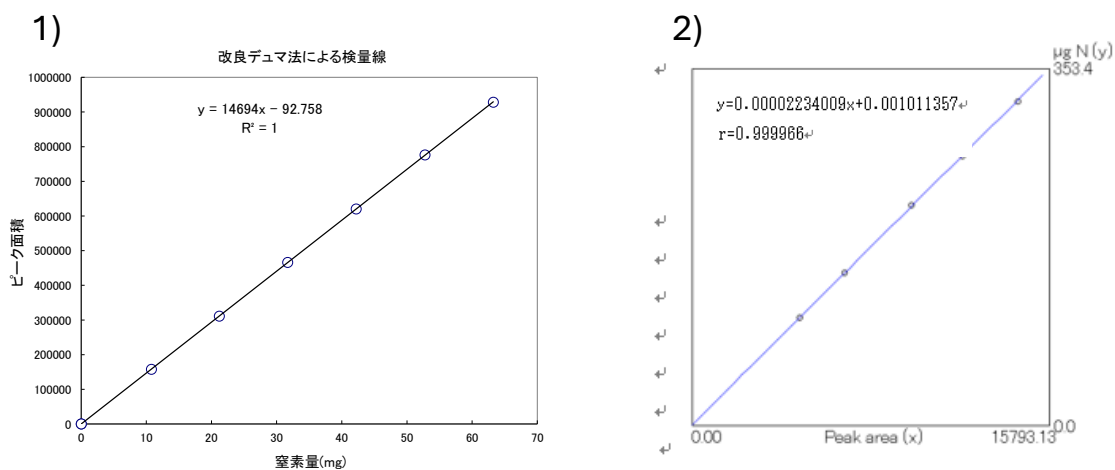


図7 元素分析法による検量線

- 1)改良デュマ法((標準品：EDTA, 検量線範囲：窒素量として 10~64 mg)
- 2)CHN コーダー法((標準品：アセトアニリド, 検量線範囲：窒素量として約 0.1~0.3 mg)

なお、CHN コーダー法の検量線は装置からとりだされたものであるため縦軸の記載がない。

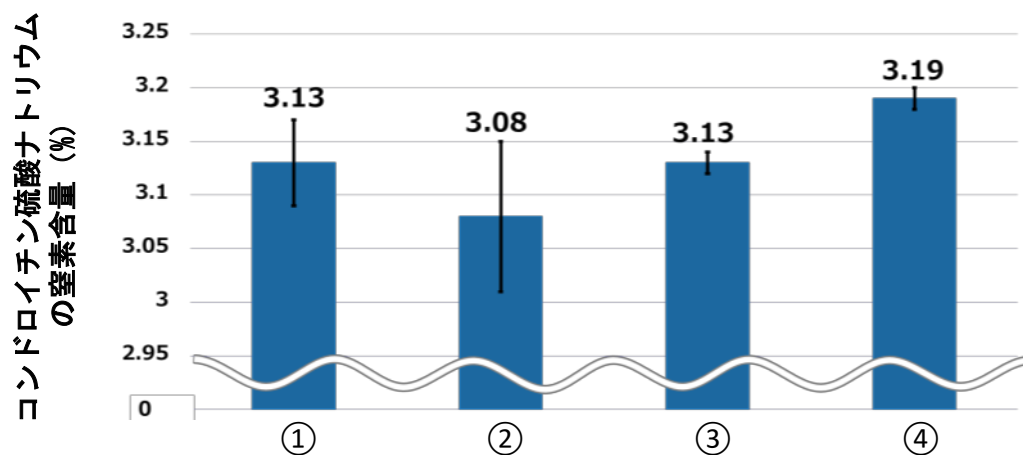


図8 コンドロイチン硫酸ナトリウムの窒素含量 ((%, n=3)

- ① 公定法 ((ケルダール法))、② 公定法改法 ((ケルダール法))、
③ セミマイクロケルダール法、④ 元素分析法 ((改良デュマ法))



図9 ケルダール分解装置 ((同時加熱式))

表 1 L-シスチンの試験結果

No	試験方法	試行数	空試験滴定量 (mL)	滴定量 (mL)	空試験差引後 滴定量 (mL)	試料採取量 (g)	滴定液 フタガー	Nとして			L-シスチンとして		
								計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)	計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)
①	公定法 (ケルダール法)	1回目	25.01	0.05	24.96	0.3024	1.001	11.58			99.3		
		2回目	25.01	0.07	24.94	0.3020	1.001	11.58	11.58	0.07	99.4	99.4	
		3回目	25.01	0.08	24.93	0.3016	1.001	11.59			99.5		
②	公定法改法 (ケルダール法)	1回目	25.01	8.27	16.74	0.2019	1.001	11.63			99.8		
		2回目	25.01	8.39	16.62	0.2004	1.001	11.63	11.64	0.11	99.8	99.9	
		3回目	25.01	8.37	16.64	0.2003	1.001	11.65			100.0		
③	セミクロ ケルダール法	1回目	1.129	25.924	24.795	0.0304	1.000	11.44			98.2		
		2回目	1.129	26.059	24.930	0.0302	1.000	11.57	11.51	0.55	99.3	98.7	
		3回目	1.129	26.129	25.000	0.0304	1.000	11.51			98.7		
④	元素分析法 (改良デュマ法) 試料量：0.5 g	1回目	-	-	-	0.5063	-	11.47			98.4		
		2回目	-	-	-	0.5051	-	11.54	11.50	0.31	99.0	98.7	
		3回目	-	-	-	0.5007	-	11.50			98.7		
④'	元素分析法 (改良デュマ法) 試料量：0.25 g	1回目	-	-	-	0.2508	-	11.58			99.3		
		2回目	-	-	-	0.2501	-	11.51	11.54	0.35	98.7	99.0	
		3回目	-	-	-	0.2505	-	11.54			99.0		
⑤	元素分析法 (CHN コーダー法)	1回目	-	-	-	0.0020362	-	11.58			99.4		
		2回目	-	-	-	0.0019561	-	11.63	11.60	0.22	99.7	99.5	
		3回目	-	-	-	0.0019009	-	11.58			99.4		

表 2 コンドロイチン硫酸ナトリウムの試験結果

No	試験方法	試行数	空試験滴定量 (mL)	滴定量 (mL)	空試験差引後 滴定量 (mL)	試料採取量 (g)	滴定液 777ター	Nとして		
								計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)
①	公定法 (ケルダール法)	1回目	25.02	2.50	22.52	1.0014	1.001	3.15		
		2回目	25.02	2.91	22.11	1.0027	1.001	3.09	3.13	1.20
		3回目	25.02	2.37	22.65	1.0051	1.001	3.16		
②	公定法改法 (ケルダール法)	1回目	25.02	6.98	18.04	0.8016	1.001	3.16		
		2回目	25.02	7.62	17.40	0.8035	1.001	3.04	3.08	2.27
		3回目	25.02	7.66	17.36	0.8025	1.001	3.03		
③	セミミクロ ケルダール法	1回目	1.129	23.880	22.751	0.10185	1.000	3.13		
		2回目	1.129	23.555	22.426	0.10028	1.000	3.13	3.13	0.29
		3回目	1.129	23.449	22.320	0.10036	1.000	3.12		
④	元素分析法 (改良デュマ法)	1回目	-	-	-	0.5022	-	3.19		
		2回目	-	-	-	0.5061	-	3.19	3.19	0.21
		3回目	-	-	-	0.5041	-	3.18		

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

令和6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及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。これまでに検討した構成成分の少ない添加物酵素製品については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、及び微生物学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。今年度は分析法の改良として、二次元電気泳動法を用いたタンパク質の分解能の改善による同定精度の向上を試みた。計 4 種の添加物酵素を二次元電気泳動法により解析した結果、*Niallia circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼと *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼについては、通常の SDS-PAGE による解析で同定不能であったタンパク質が同定された。また、等電点の情報も二次元電気泳動法による解析により得られることから、同定結果の正確性を向上させることができた。しかし、タンパク質同定のカバー率は通常の SDS-PAGE とほぼ同等で、Mascot サーチでヒットする生物種を限定するには至らなかった。以上の結果より、二次元電気泳動法による解析はタンパク質の同定率を向上させるために有用であることが明らかとなったが、基原同定の精度を高めるためには他の手法を組み合わせる必要があると考えられた。さらに、既存添加物酵素の基原としての使用頻度が高い真菌である *Trichoderma* 属菌を例として、データベースにおける微生物学名の情報量の不足や読み取りにおける問題を解消するためには、基原微生物の学名について、国際整合を考慮した生物種の最新の分類情報を常に収集し、データベースや酵素製品の付帯情報での登録情報を継続して更新する必要があることを示した。

研究協力者

吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部
杉本直樹 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
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部
中西早苗 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

衛生微生物部

清水公徳 東京理科大学
先進工学部
伊藤紫野 東京理科大学
先進工学部

A. 研究目的

既存添加物酵素は、微生物を基原とするものが多く、基原として用いられる微生物種は細菌、真菌、放線菌など多分類にわたり、菌種も多様である。既存添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いない。

微生物の中には二次代謝産物としてヒトへ危害性を有する物質を産生するものがあることから、基原菌種の同定は重要である。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。本研究では、これまで質量分析器を用いたペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)法に着目し、基原種同定法を検討してきた。これまでにアミラーゼ、ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ及びプロテアーゼの複数製品を対象に、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、構成成分の少ない添加物酵素成分については、基原の情報を得ることができ、一定の成果を上げた¹⁾。さらに、より多くの製品の基原種を正確に同定するために、独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチを実施した。その結果、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に成功した。加えて複数種の消化酵素を用いる改良を分析法に加えたところ、1種の酵素(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可能となった。これらの2通りの改良法は、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。

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、昨年度はデータベースの改良や消化酵素を伴う解析法の検討を実施した。今年度は、二次元電気泳動法を用いてタンパク質の分離能を上げることにより、タンパク質同定の精度が向上するかを検討した。なお、以降は分子量の違いのみで分離を行う通常の電気泳動法を SDS-PAGE と称する。

また、これまでの検討結果から、より良い分析手法によって基原微生物の同定指標における特徴を効果的に認識できたとしても、同定するにあたりその指標の特徴を照合するデータベースにおける菌種名の読み取りに問題

があった場合、正しく同定することができないことや、微生物の分類情報は新種の記載や再編が頻繁になされていることから、基原微生物の学名について、国際整合を考慮した生物種の最新の分類情報を常に収集しておく必要があるという問題点を把握していた。そこで、今年度は、昨年度に引き続き、基原真菌種の最新の分類情報を把握することを目的として、既存添加物酵素の基原として使用される頻度の高い真菌種の分類学的情報を収集した。

B. 研究方法

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

B-1-1) 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-1-2) 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。β-ガラクトシダーゼは DFA No. B572, ヘミセルラーゼは B651 及び B653, β-アミラーゼは B659 を用いた。

B-1-3) 質量分析用検体の調製

各試料は、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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ g/mL を含む 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 20 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L-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- α -シアノケイ皮酸; シグマアルドリッチ社)を含む 50%アセトニトリル水溶液で MALDI-TOF MS のサンプルプレート上に直接溶出した。完全に乾燥させた後、MALDI-TOF MS を用いてスパイラルモードでマスペクトルを測定した。

等電点電気泳動は、以下の様に実施した。各試料をタンパク質含有量が 1.5 mg/mL の濃度となるよう標準細胞溶解バッファーに溶解した。

標準細胞溶解バッファーの組成

Tris(1 M 溶液)	3.0 mL
チオウレア	15.2 g
ウレア	42 g
CHAPS	4.0 g

以上の試薬を精製水に溶解し、希塩酸によって pH を 8.5 に調製後、100 mL にメスアップした。

タンパク質溶液 62.5 μ L (7 cm の DryStrip 使用時)又は 125 μ L (13 cm の DryStrip 使用時)に等量の 2×サンプルバッファーを加え、氷上で 10 分間インキュベートした。ストリップホルダー

に添加後、Immobiline DryStrip pH 3-10 NL (Cytiva 社) を上から置き、カバー液を添加した後、Ettan IPGphor II を用いて 1 次元目の等電点電気泳動を行った。

2×サンプルバッファーの組成

ウレア	10.5 g
チオウレア	3.8 g
CHAPS	1 g

以上の試薬を精製水で 25 mL にメスアップした。2×サンプルバッファーは使用直前に DTT を 2 mg/ml, Pharmalyte broad range pH 3-10 (Cytiva)を 1%となるよう添加した。

一次元電気泳動後の Immobiline Drystrip を SDS 平衡化バッファーA 2 mL に浸し、室温で穏やかに 15 分間振盪した。バッファーを捨て、SDS 平衡化バッファーB 2 mL に浸し、再び 15 分間振盪した。平衡化終了後の Drystrip を電気泳動バッファーでリンスした後、10% アクリルアミドゲルの上部に乗せ、0.5% アガロース溶液で封入した。SDS-PAGE は上述の方法で実施した。

SDS 平衡化バッファーA/B

Tris(1.5 M pH 8.8)	20 mL
ウレア	72 g
グリセロール	69 mL
SDS	4 g

以上の試薬を精製水で 200 mL にメスアップした。使用直前にバッファーA は DTT を 5 mg/mL, バッファーB はヨードアセトアミドを 45 mg/mL となるよう加えた。

B-1-4) ペプチドの質量を指標としたタンパク質の同定

マ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, または昨年度構築した Mascot データベースを用いて行った。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 : トリプシン, Allow up to : 1, Fixed modification : Carbamidomethyl(C), Peptide tolerance : ± 15 ppm, Mass values: MH⁺.

B-2) 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の使用頻度が高く、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 *Trichoderma* 属菌について、PubMed から分類体系に関する論文を検索し、入手した²⁻⁴⁾。

C. 結果及び考察

C-1) 二次元電気泳動法を用いた添加物酵素の基原の解析

Triticum aestivum(パンコムギ)由来のβ-アミラーゼ(B659)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 1A と 1B に示す。SDS-PAGE 像においては、55 kDa 付近に単一のバンド a が認められ、PMF 法による解析の結果、*Hordeum vulgare*(大麦)のβ-アミラーゼと同定された(表 1A)。二次元電気泳動像においては、55 kDa・pI 6 付近に 4 つのスポット I, II, III 及び IV が認められ、PMF 法による解析の結果、いずれも *H. vulgare* のβ-アミラーゼと同定された(表 1B)。

Niallia circulans 由来のβ-ガラクトシダーゼ(B572)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 2A と 2B に示す。SDS-PAGE 像においては、180, 140 及び 80 kDa 付近に 3 つのバンド a, b 及び c が認められ、PMF 法による解析の結果、いずれも *N. circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼと同定された(表 2A)。二次元電気泳動像においては、多数のブロードなスポットが認められた。180 kDa・pI 5 付近のスポット I, 140 kDa・pI 5 付近のスポット II 及び 80 kDa・pI 6 付近のスポット III は、いずれも *N. circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼと同定された。50 kDa・pI 4 付近のスポット V は、グルタミン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼと同定された。スポット IV と VI は同定されなかった(表 2B)。

Aspergillus niger 由来のヘミセルラーゼ(B651)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 3A と

3B に示す。SDS-PAGE 像においては、20~70 kDa の間に多数のバンドが認められた。そのうち、切り出しが可能であった 5 種を PMF 法で解析した結果、28 kDa 付近のバンド d は複数の *Aspergillus* 属由来のエンドグルカナーゼ、22 kDa 付近のバンド e は複数の *Aspergillus* 属由来のキシラナーゼと同定された。バンド a, b 及び c は同定されなかった(表 3A)。二次元電気泳動像においては、7 種の主要なスポットが認められた。50 kDa・pI 4 付近のスポット II は、5 種の *Aspergillus* 属由来のα-アミラーゼ、34 kDa・pI 6 付近のスポット V は、6 種の *Aspergillus* 属由来のβ-キシラナーゼ、20 kDa・pI 5 付近のスポット VI は、3 種の *Aspergillus* 属のキシラナーゼ、30 kDa・pI 4 付近のスポット VII は、2 種の *Aspergillus* 属の多糖分解酵素と同定された。スポット I, III と IV は同定されなかった(表 3B)。

Trichoderma longibrachiatum 由来のヘミセルラーゼ(B653)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 4A と 4B に示す。SDS-PAGE 像においては、20~120 kDa の間に多数のバンドが認められた。そのうち、切り出しが可能であった 6 種を PMF 法で解析した結果、120 kDa 付近のバンド a は 4 種の *Trichoderma* 属由来のキシラン 1,4-β-キシロシダーゼ、80 kDa 付近のバンド c は 2 種の *Trichoderma* 属由来のエキシソグルカナーゼ、30 kDa 付近のバンド e は 2 種の *Trichoderma* 属由来のβ-キシラナーゼ、20 kDa 付近のバンド f は 5 種の *Trichoderma* 属由来のβ-キシラナーゼと同定された。バンド b と d は同定されなかった(表 4A)。二次元電気泳動像においては、20~80 kDa の間に多数のスポットが認められた。そのうち、9 種の主要なスポットを PMF 法で解析した結果、80 kDa・pI 5 付近のスポット I は複数の *Trichoderma* 属由来のキシログルカナーゼ、60 kDa・pI 4 付近のスポット II は 3 種の *Trichoderma* 属由来のエキシソグルカナーゼ、30 kDa・pI 8 付近のスポット VIII は 2 種の *Trichoderma* 由来のβ-キシラナーゼと同定された。スポット III~VII は同定されなかった(表 4B)。

本年度は、計 4 種の添加物酵素を対象に二次

元電気泳動法による解析を実施した。B659 は、SDS-PAGE 像ではシングルバンドとして検出されたが、二次元電気泳動像では複数のスポットとして検出された。ただ、いずれも同じタンパク質であったことから、何らかの修飾の有無の違いによるものと考えられる。それぞれのスポットを分離して解析を行ったが、検索時のペプチドの決定アミノ酸配列のデータベース登録配列に対するカバー率は SDS-PAGE でバンドを切り出して解析した結果とほぼ同様であった。このようなタンパク質数の少ない酵素では、二次元電気泳動法の長所は活かせないと考えられる。B572 は、二次元電気泳動像において横に伸びたスポットとなった。B659 と同様に何らかの修飾による影響と考えられる。スポットの同定結果は SDS-PAGE のバンドを切り出した時と同様であったが、検索時の配列カバー率はわずかに低下した。ただ、SDS-PAGE による解析ではバンドとして切り出しが困難であったタンパク質 1 種が、二次元電気泳動法による解析では同定できた。B651 と B653 においては、SDS-PAGE 像では多数のバンドが認められ、切り出しが困難であったが、二次元電気泳動像ではスポットに分離され、解析が容易となった。その結果、B651 においては同定できたタンパク質数が増加した。ただ、B653 においては同定できたタンパク質数は 1 種減少した。二次元電気泳動法は、SDS-PAGE に比べてアプライ可能なタンパク質量が少ない。そのため、解析に十分なシグナルが質量分析による解析で得られなかったことが原因と推定される。

以上の結果より、二次元電気泳動法で添加物試料を解析することにより、タンパク質数の多い試料において SDS-PAGE では同定不可能であったタンパク質が同定可能となること、pI(等電点)の情報も得られることから同定の精度が上がる利点があることが明らかとなった。しかし、データベースサーチ時の配列カバー率は SDS-PAGE による解析時とほとんど変わらず、複数の菌種由来のタンパク質がデータベースサーチの結果ヒットするという問題点の解決には至らなかった。今後はデータベース

サーチ時の決定配列カバー率を上げるために、イオン化に用いるマトリクスの種類や組成を検討し、検出可能なペプチド種を増やす試みを行う。二次元電気泳動法は操作が複雑で泳動像が得られるまでに時間がかかる、多検体を同時に処理できない等といった欠点もあることから、SDS-PAGE では十分な解析結果が得られない試料のみに用いることが適切と考えられる。

C-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

既存添加物名簿収載品目リストから *Trichoderma* 属を基原にもつ既存添加物 10 品目とその基原菌種を抽出したところ、7 菌種が記載されていた。これらのゲノムにおける特定の遺伝子アミノ酸配列における異種間での配列一致率を確認したところ、近縁菌種間では最高で 99.5% が一致することが判明した(図 5)。一例として、キシラナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、 β -グルコシダーゼ及びセルラーゼの基原として記載される *T. reesei* では、その近縁菌種 *T. parareesei* と平均で 99.5% 一致した^{2,3)}。このことから、アミノ酸配列を指標として、基原菌種をその近縁種と区別して識別するためには、0.5% 程度の差違を認識できる精度で分析する必要があることが示唆された。加えて *Trichoderma* 属はその有性世代は *Hypocrea* 属である⁴⁾ことから、塩基配列やアミノ酸配列を決定し公共データベースで検索した際には *Hypocrea* spp. としてヒットする場合があり、このことに注意が必要である。この問題を解決する方法の 1 つとして、登録配列の菌種に関するアノテーションを精査し、独自に構築したカスタムデータベースを使用しての 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、

昨年度に引き続き改良を行った。タンパク質の分解能を向上させるために、二次元電気泳動法を用いて添加物酵素を解析した結果、一部の試料において SDS-PAGE による解析結果と比較して同定可能なタンパク質数が増え、本手法はタンパク質の同定率を向上させるために有用であることが明らかとなった。今後、基原同定の精度をさらに高めるためには、手法の更なる改良や他の手法との組み合わせが必要であると考えられた。さらに、手法の開発だけに留まらず、同定の際の検索に用いるデータベース登録情報の菌種に関するアノテーションや、酵素製品の付帯情報について、真菌分類学的情報を元に、継続して整理し使用する必要があると考えられた。

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) C. P. Kubicek et al. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. BMC Genomics. 20:485 (2019)
- 3) F. Cai, I. and S. Druzhinina. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. Fungal Divers. 107:1–69 (2021).
- 4) G. J. Samuels. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96:195–206 (2006)

F. 研究業績

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 伊藤紫野，渡辺麻衣子，西原秀典，橋本一浩，川上裕司，小林直樹，後藤慶一，水谷治，清水公德，伴さやか，矢口貴志，工藤由起子，大西貴弘：発酵食品由来の黒麹菌

Aspergillus luchuensis の遺伝子指標を用いた分類学的検討. 第 45 回日本食品微生物学会学術総会(2024.9).

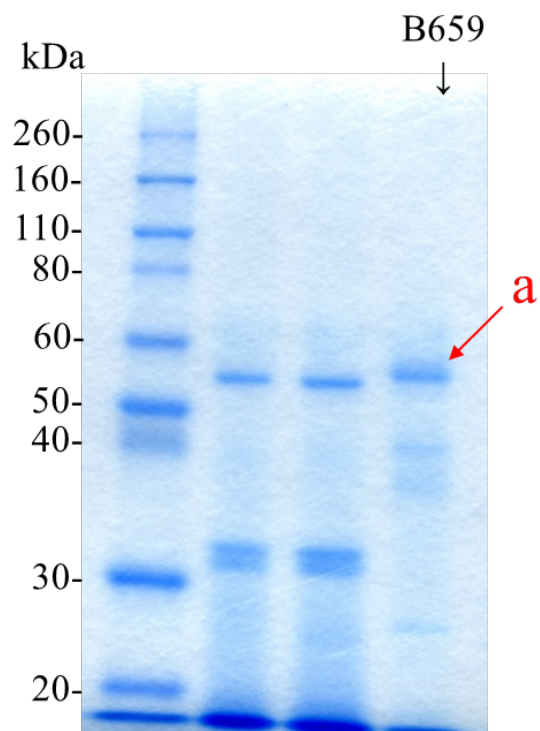
F-1-2) シンポジウム等

無し

F-2) 論文発表

無し

(A)



(B)

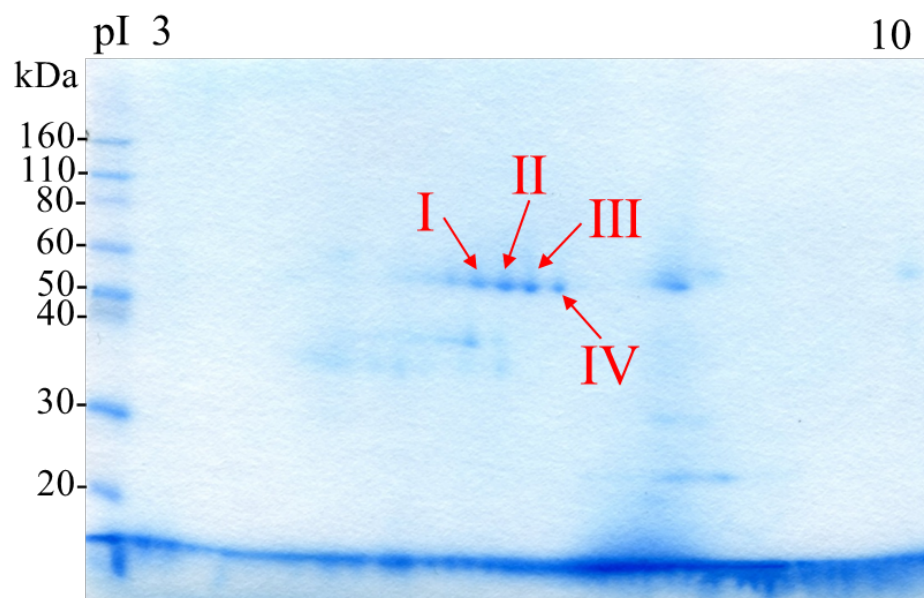
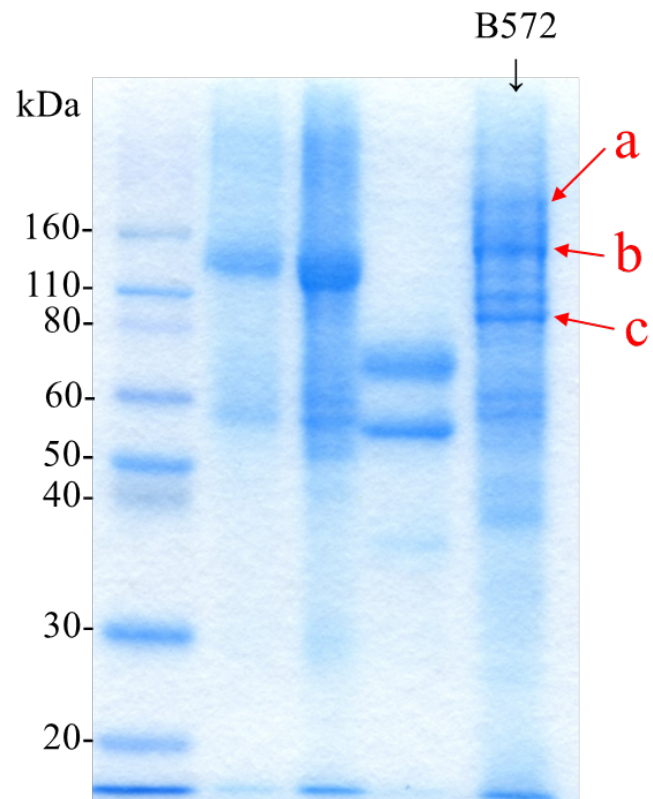


図 1. *Triticum aestivum* 由来の β -アミラーゼ(B659)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

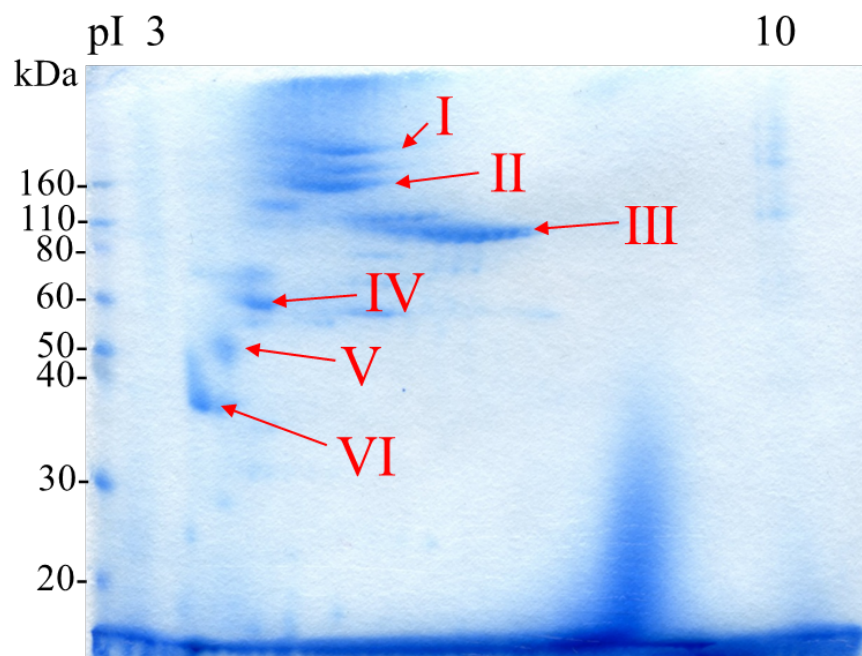
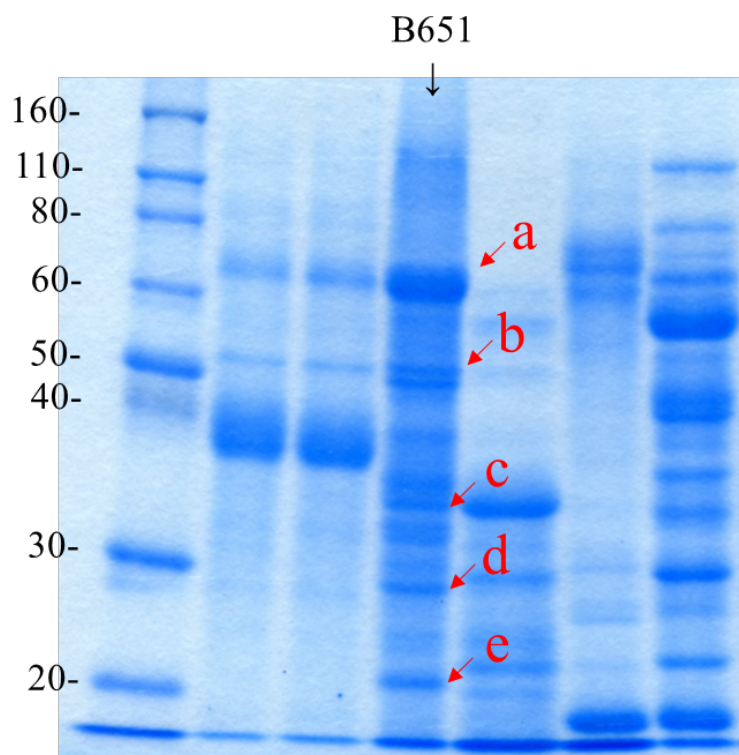


図 2. *Niallia circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼ(B572)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

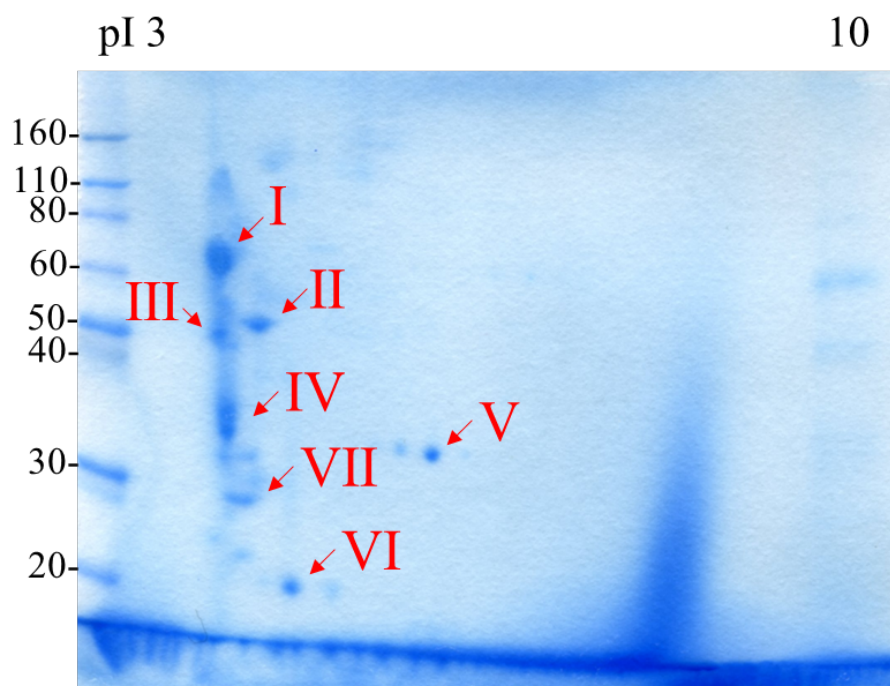
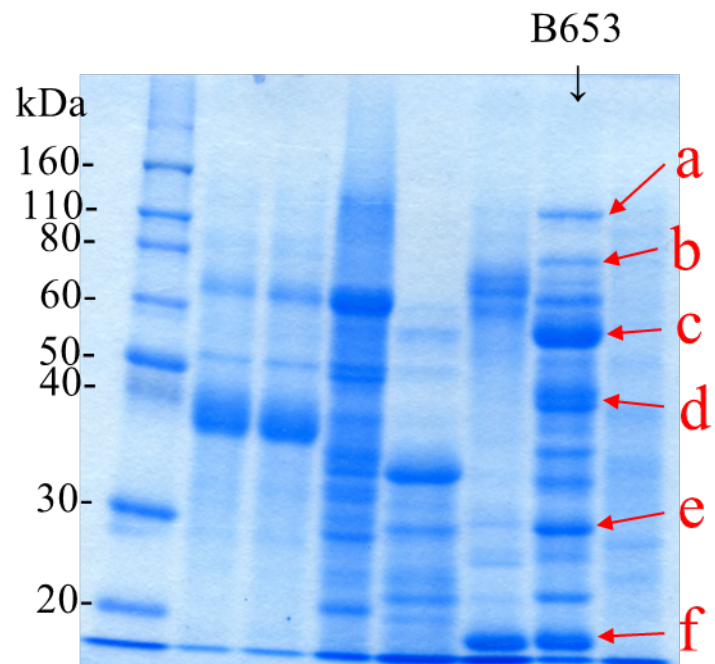


図 3. *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼ(B651)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

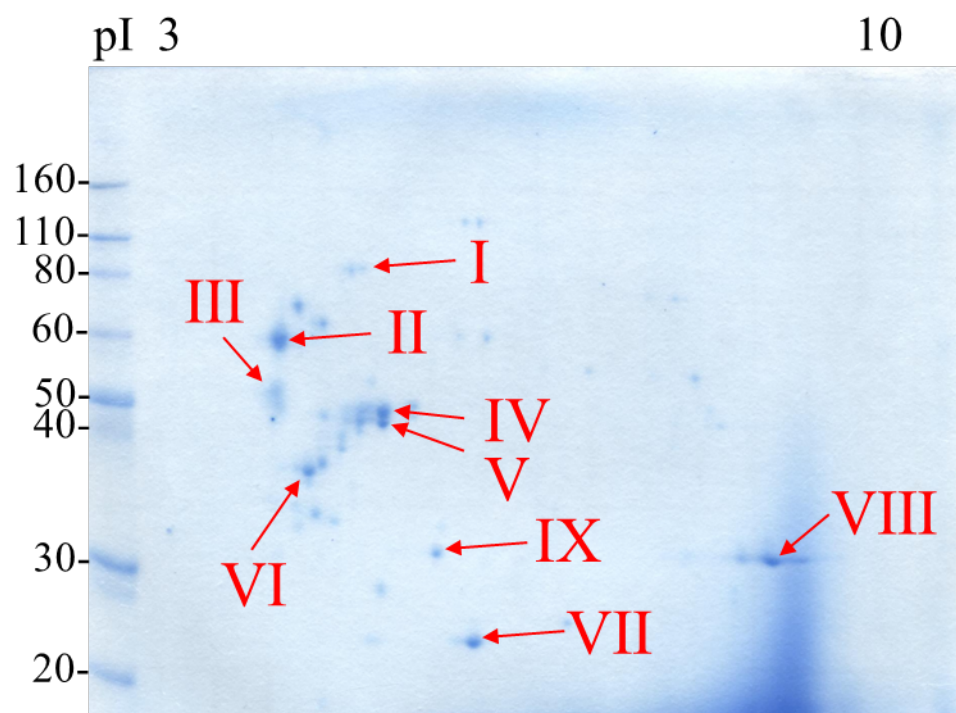


図 4. *Trichoderma longibrachiatum* 由来のヘミセルラーゼ(B653)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

<i>Trichoderma</i> 属の節		Longibranchiatum				Harzianum /Virens			
Species		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>T. reesei</i> ●	1		0.021	0.027	0.005	0.071	0.071	0.072	0.068
<i>T. longibranchiatum</i> ●	2			0.03	0.021	0.074	0.075	0.075	0.072
<i>T. citrinoviride</i>	3				0.027	0.071	0.071	0.071	0.068
<i>T. parareesei</i>	4					0.071	0.071	0.072	0.068
<i>T. horzianum</i> ●	5						0.007	0.009	0.033
<i>T. guizhouense</i>	6							0.009	0.034
<i>T. afroharzianum</i>	7								0.034
<i>T. virens</i>	8								

図 5. 添加物酵素の基原として使用される頻度高い *Trichoderma* spp.における全ゲノムの遺伝子アミノ酸配列の異種間での配列一致率

C. P. Kubicek et al. (2019)²⁾を改変。●：既存添加物名簿収載品目リストに掲載された添加物に基原として使用される *Trichoderma* 属菌。各菌株のゲノムにおける相同遺伝子のアミノ酸配列の配列一致率を、異種間で算出した。

表1. *Triticum aestivum*由来の β -アミラーゼ(B659)の同定結果

(A) SDS-PAGE

バンド	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
a	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	32	5.58

(B) 二次元電気泳動法

スポット	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
I	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	30	5.58
II	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	26	5.58
III	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	35	5.58
IV	β -amylase	<i>Hordeum vulgare</i>	59,895	26	5.58

表 2. *Niallia circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼ(B572)の同定結果

(A) SDS-PAGE

バンド	同定された タンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
a	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	25	5.51
b	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	30	5.51
c	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	29	5.51

(B) 二次元電気泳動法

スポット	同定された タンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
I	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	19	5.51
II	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	13	5.51
III	β -galactosidase	<i>Niallia circulans</i>	192,297	15	5.51
IV	同定不可				
V	L-glutamate γ -semialdehyde dehydrogenase	<i>Niallia circulans</i>	57,445	14	5.35
VI	同定不可				

表3. *Aspergillus niger*由来のヘミセルラーゼ(B651)の同定結果

(A) SDS-PAGE

バンド	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
a	同定不可				
b	同定不可				
c	同定不可				
d	Endoglucanase A	<i>Aspergillus kawachii</i>	25,911	24	4.63
	Glycoside hydrolase family 12 protein	<i>Aspergillus luchuensis</i>	25,911	24	4.63
	Endoglucanase A	<i>Aspergillus eucalypticola</i>	25,834	24	4.57
	Endoglucanase A	<i>Aspergillus piperis</i>	25,888	24	4.63
e	Endo-1,4- β -xylanase B	<i>Aspergillus kawachii</i>	24,225	27	5.74
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Aspergillus luchuensis</i>	24,225	27	5.74
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Aspergillus piperis</i>	24,225	27	5.74

(B) 二次元電気泳動法

スポット	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
I	同定不可				
II	α -Amylase	<i>Aspergillus niger</i>	55,157	25	4.48
	α -Amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	55,152	25	4.52
	α -Amylase	<i>Aspergillus sojae</i>	55,141	25	4.54
	α -Amylase	<i>Aspergillus kawachii</i>	55,157	25	4.48
	α -Amylase	<i>Aspergillus parasiticus</i>	55,171	25	4.5
III	同定不可				
IV	同定不可				
V	β -Xylanase	<i>Aspergillus tubingensis</i>	34,197	34	5.89
	β -Xylanase	<i>Aspergillus niger</i>	34,240	34	6.08
	β -Xylanase	<i>Aspergillus neoniger</i>	34,197	34	5.89
	β -Xylanase	<i>Aspergillus vadensis</i>	34,207	34	5.66
	β -Xylanase	<i>Aspergillus phoenicis</i>	34,240	34	6.08
	β -Xylanase	<i>Aspergillus awamori</i>	34,240	34	6.08
VI	Endo-1,4- β -xylanase B	<i>Aspergillus kawachii</i>	24,225	26	5.74
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Aspergillus luchuensis</i>	24,225	26	5.74
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Aspergillus piperis</i>	24,225	26	5.74
VII	Endoglucanase A	<i>Aspergillus kawachii</i>	25,911	32	4.63
	Glycoside hydrolase family 12 protein	<i>Aspergillus luchuensis</i>	25,911	32	4.63

表4. *Trichoderma longibrachiatum*由来のヘミセルラーゼ(B653)の同定結果

(A) SDS-PAGE

バンド	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
a	Xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Trichoderma reesei</i>	87,479	14	5.52
	Xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Trichoderma parareesei</i>	87,477	14	5.52
	Xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	87,590	14	5.54
	Xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Trichoderma orientale</i>	87,610	14	5.49
b	同定不可				
c	Exoglucanase 1	<i>Trichoderma reesei</i>	55,407	17	4.65
	Glucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	55,445	17	4.6
d	同定不可				
e	Endo-1,4- β -xylanase 3	<i>Trichoderma reesei</i>	38,224	20	6.97
	β -Xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	38,224	20	6.97
f	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	20,931	45	8.15
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	21,512	44	9.01
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	22,447	42	9.00
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	24,112	38	7.88
	Endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	24,112	38	7.88

(B) 二次元電気泳動法

スポット	同定されたタンパク質	種名	分子量	Coverage (%)	Calculated pI
I	Xyloglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>	87,307	10	5.42
	Xyloglucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	87,322	10	5.42
II	Exoglucanase 1	<i>Trichoderma reesei</i>	55,407	21	4.65
	Exoglucanase 1	<i>Trichoderma koningii</i>	55,407	21	4.65
	Glucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	55,445	21	4.60
III	同定不可				
IV	同定不可				
V	同定不可				
VI	同定不可				
VII	同定不可				
VIII	Endo-1,4- β -xylanase 3	<i>Trichoderma reesei</i>	38,224	20	6.97
	β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	38,224	20	6.97
IX	同定不可				

3) 研究成果の刊行に関する一覧表(令和 6 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
Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen S-P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G. F	Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR Sustainability	Analytical Chemistry	96(24)	9790-9798	2024
西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子	燃焼法による食品添加物中の窒素定量分析	日本食品化学学会誌	31(1)	31-34	2024
Ohtsuki T, Huang Y, Kamiya A, Nakayama Y, Matsushita M, Morikawa S, Matsufuji H	Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of blood concentrations of nine pharmaceutical compounds	<i>J. Pharm. Health Care Sci.</i>	10	35	2024
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 ^{31}P -NMR for the purity determination of the organophosphorus compound brigatinib and its method validation.	Chem. Pharm. Bull.	72	36-40	2024

杉本直樹	定量 NMR の標準化 と実用化	薬学雑誌	144	353-357	2024
杉本直樹	我が国の食品添加物 の指定及び改正	Pharm Tech Japan	40(8)	95-96	2024
阿部 裕, 多田敦子	第 10 版食品添加物公 定書における改正の ポイント	月刊フー ドケミカ ル	5	20-24	2024

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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： ）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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・第二室長
- （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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		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）	☐ ☒	☐		☐
	☐ ☐	☐		☐
	☐ ☐	☐		☐
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： ）	☐ ☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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：）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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 厳一郎・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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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：）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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：）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 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6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		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）	☐ ☒	☐		☐
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：）	☐ ☒	☐		☐

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

その他（特記事項）

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

5. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 殿

機関名 松山大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 池上 真人

次の職員の令和6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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）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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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：）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 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 関 泰一郎

次の職員の令和6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
		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）	☐ ☒	☐		☐
	☐ ☐	☐		☐
	☐ ☐	☐		☐
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： ）	☐ ☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。

消費者庁長官 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 直子

次の職員の令和6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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：）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容：）

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

令和 7 年 3 月 31 日

消費者庁長官 殿

機関名 東洋大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 矢口 悦子

次の職員の令和6年度食品衛生基準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 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

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）食環境科学部・准教授

（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）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
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： ）	☐	☒	☐		☐

（※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. 消費者庁の行う食品安全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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☒ 無 ☐ （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 ☐ 無 ☒ （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。