

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 7 年度(2025 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 厳一郎	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 8 (2026)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) 既存添加物の国内外の安全性評価情報に関する調査研究(委託調査)	17
業務受託者：松村 雅彦	
研究協力者：木戸 啓之	
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	26
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	32
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	50
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	61
研究分担者：西崎 雄三	
2) 相対モル感度(RMS)を利用した定量法の検討 ―検出器としてフォト ダイオードアレイ(PDA)を用いた際の 測定値ばらつきの原因―	70
研究分担者：増本 直子	
研究協力者：中島 馨	
研究協力者：西崎 雄三	
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	82
	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	92
	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	105
	研究分担者：辻 徹一郎	
6)	食品添加物中の鉛及びヒ素のスクリーニング法へのエネルギー 分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)の適用	120
	研究分担者：阿部 裕	
	研究協力者：石附 京子	
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	135
	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：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：西崎 雄三	
3)	研究成果の刊行に関する一覧表	152

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7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

既存添加物の国内外の安全性評価情報について調査した。「既存添加物 安全性評価検討中品目リスト(消費者庁食品衛生基準審議会添加物部会資料 令和7年2月18日)に収載されている50品目から、「令和6年度既存添加物の安全性評価に関する調査研究」で安全性に問題なしと判断された8品目を除外した計42品目を調査対象とした。この内28品目は、EFSA, JECFA, FDA 及び FSANZA の機関で安全性評価関連情報が報告されていないことがわかった。

2) 既存添加物の成分組成に関する研究

昨年度に引き続き、カロブ色素、スピルリナ色素、香辛料抽出物について検討した。カロブ色素については、 β -グルコシダーゼにより schaftoside 配糖体を加水分解し、schaftoside に収束させた後に rutin を基準物質として RMS 法により定量可能であることが確認できた。スピルリナ色素については、フィコシアノビルリンを発色団とするフィコシアニンが色素成分であることが酵素処理法により確認された。香辛料抽出物(コリアンダーオイル、セロリーシードオイル)については、 $^1\text{H-qNMR}$ により、主成分を直接定量可能であった。

3) 分析法及び試験法開発に関する研究

ムラサキヤマイモ色素中のアントシアニン、カシアガム中のアントラキノンの定量法、アントシアニンの $q\text{NMR}$ による純度評価法、PDA 検出器の校正法の検討及び校正用化合物の開発、エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を利用した Pb 及び As の定量法への適用、酵素の基原同定法等について検討した。ムラサキヤマイモ色素については、色素成分シアニジンアシルグルコシドの結合様式を明らかとするため、HSCCC による単離精製条件を検討した。カシアガム中のアントラキノンは、前処理法を検討し JECFA 規格の基準値に適用且つクロロホルムを使用したい方法が確立できた。アントシアニンの純度評価に $^1\text{H-qNMR}$ 以外の方法として、イオンクロマトグラフィーを用いた塩化物量に基づく換算法を別法として検討したが、過剰の Cl^- が影響により $^1\text{H-qNMR}$ と同等の精度で純度評価できないことがわかった。PDA 検出器については、装置間差の補正方法について検討すると共に校正用化合物の合成を行った。EDX については、Pb 及び As のスクリーニング法として十分有用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 法の組合せ、マトリクスの変更や消化酵素の併用により、Coverage が上昇することが確認できた。

研究分担者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部長
阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部第二室長
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部第二室長
辻厳一郎 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部主任研究官
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
木戸啓之 (一社)日本食品添加物協会
常務理事
藤井結花 (一社)日本食品添加物協会
常務理事
川末慎葉 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部研究員
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
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

A. 研究目的

令和 6 年(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). 更に, 令和 7 年(2025 年)に既存添加物の第 5 次消除が実施され, 全 327 品目中 67 品目の成分規格が未設定となっている.

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の収集が急がれている.

令和 7 年度は, 令和 6 年度に引き続き, (1) 既存添加物の成分規格に関する研究: 国内外の安全性評価情報の調査. (2) 既存添加物の成分組成に関する研究: 色素品目の成分組成の解明及び定量法の検討, ^1H -定量 NMR (^1H -qNMR)による香辛料抽出物の有効成分の同定及び直接定量. (3) 分析法及び試験法の開発に関する研究: ^1H -qNMR によるアントシ

アニンの純度評価, 相対モル感度(RMS)を利用した定量法に用いるフォトダイオードアレイ(PDA)検出器の装置間差の補正法, アントラキノン類の定量法, 校正用化合物の合成, エネルギー分散型蛍光X線分析装置(EDX)のPb及びAs定量法への応用, MALDI-ToF MSによるペプチドフィンガープリント(PMF)法による酵素基原の同定法, 等を検討した. 特に, (2)及び(3)については, 情報に乏しく従来の分析法では試験法が成立しない品目に対して, 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た. いずれにしても本研究で得られた成果は既存添加物の公的な試験法の設定において基礎情報として活用される予定である.

B. 研究方法

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究 (委託調査)

第10版公定書に未収載の既存添加物について, 成分規格の設定の実現可能性や優先度を総合的に検討するため, 本研究では, 1. 既存添加物の成分規格(公定書案, 自主規格案, 自社規格等), 2. 既存添加物の流通・使用実態, 3. 既存添加物の国内外の安全性評価情報, について3年間を1サイクルとして調査を行っている. 令和7年度は国内外の安全性評価状況について調査した.

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

昨年度に引き続き, 定量法について検討した. schaftoside を直接分析する方法と, schaftoside 配糖体を β -グルコシダーゼによる酵素分解で schaftoside に誘導して分析す

る方法を検討した. すなわち, カロブ色素製品中の schaftoside について, グラジエント溶出の HPLC 条件下における rutin 3 水和物を基準物質とした相対モル感度(RMS)を算出し, この RMS を利用した定量法の実用性について検討した.

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, 香辛料抽出物の有効成分の直接定量を検討した. また, HPLC による絶対検量線法と ^1H -qNMR 法による定量値を比較し, ^1H -qNMR 法の有効性を評価した. 具体的には, コリアンダーオイル等の linalol, セロリーシードオイル等の butylphthalide について含有率を検討した.

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色素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. スピルリナ色素製品について, 酵素(Tryosib)による消化後の生成物を LC-PDA 及び LC-QToF/MS を用いてその構造を解析した.

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

昨年度に引き続き, ^1H -qNMR によるアントシアニンの純度評価法について検討した. 市販シアニジン 3-グルコシド塩化物(Cy3G $\cdot$ Cl) 7 試薬を試料として用いた. 5%TFA-*d*を含む重メタノール/重水(9:1, v/v)を測定溶媒として, qNMR を実施した. 外部標準にはジメチルスルホ

ンを用いた。得られた qNMR 純度値の妥当性を評価するため、別途イオンクロマトグラフィーを実施した。具体的には、イオンクロマトグラフィーにより定量した Cl⁻量から算出した Cy3G・Cl 純度値との比較を行った。さらに、HPLC 分析における Cy3G・Cl の絶対検量線の傾きと qNMR 純度値との関連性を検討した。

2) 相対モル感度(RMS)を利用した定量法の検討 -検出器としてフォトダイオードアレイ(PDA)を用いた際の測定値のばらつきの原因-

PDA 検出器の吸収特性調査のため、本研究では、5 社 6 台の PDA 検出器 (HPLC 用、装置 A~F) 及び 1 社 1 台の分光光度計を用いた。PDA 検出器(測定波長：190~900 nm 又は 190~510 nm(装置のスペックによる)、波長記録間隔：0.5 nm)については、HPLC カラムは排除し、HPLC のポンプから直接 PDA 検出器を接続する構成(流速：1.0 mL/min)とし、試料注入のためマニュアルインジェクタ(レオダイン)をポンプと検出器の間に設置したものを用いた。

試験液として、カフェイン溶液(測定波長：273 nm)及び 3 色素混合液(測定波長：418 nm, 522 nm, 及び 629 nm)を調製し用いた。これら試験液は、測定波長での吸光度が約 0.6AU となる濃度を相対濃度 1.0 とし、これに加えて、相対濃度 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 2.0, 及び 3.0 を作製した。これら試験液の測定はすべて同一日に実施した。測定は、1 試験液につき濃度ごとに 2 回ずつ実施した。

3) ムラサキヤマイモ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 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、構造解析及び定量用標品作成に向けて、高速向流クロマトグラフィー(HSCCC)による単離精製条件の最適化を行った。ムラサキヤマイモ色素の原体を試料として用いた。また、分取精製物について、HPLC-HRMS により、組成を確認した。

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ンの分析法について検討した。本年度は、有害試薬の使用低減の観点から、前処理における抽出溶媒として規定されているクロロホルムに代わる抽出溶媒として、ジクロロメタン及び酢酸エチルを選択し、これらの適用性について、各溶媒を単独で使用する場合及びジクロロメタンと酢酸エチルを段階的に使用する場合で検討し、添加回収試験により評価した。

5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

昨年度に引き続き、RMS を利用した HPLC 定量法に必要な基準物質(シングルフアレンス分子：SR 分子)の効率的な合成法の確立を検討した。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ていた。今年度は 2 位に加えて 5 位に置換基を有する分子について検討した。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。SR 分子については、アナトー色素の色素成分ビキシンを定量対象と想定して設計した。具体的にはこれまでの検討で複数合成した分子の中から、ビキシンと類似の UV 吸収帯を示す骨格としてビスイ

ンドリルマレイミドを選択した。この分子の HPLC クロマトグラム上の保持時間の調整は、炭化水素側鎖を種々導入することで行った。

6) 食品添加物中の鉛及びヒ素のスクリーニング法へのエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) の適用

食品添加物中の鉛 (Pb) 及びヒ素 (As) のスクリーニング法として、前処理が不要で測定が簡便なエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いて検討した。既存添加物「カンデリラロウ」、「カルナウバロウ」、「トウガラシ色素」など計 20 種類を試料とした。いずれも Pb 及び As の規格値以下の含量であることが確認されたものを用いた。これらの試料に Pb 及び As を規格値の 0 倍 (無添加)、0.5 倍、1 倍、1.2 倍、2 倍添加した添加試料を調製した。また、対照用標準溶液を規格値の 0 倍 (水)、0.5 倍、1 倍及び 2 倍となるように水で調製した。これらを蛍光 X 線分析装置 (株式会社島津製作所製, EDX-8100) で測定し、その強度又は散乱線内標準補正による強度比を比較した。

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

今年度は、マトリクスの変更や消化酵素の併用により、同定精度の指標となる Coverage を上げることを目的とした検討を行った。また、基原菌種を、遺伝子塩基配列を指標として再同定した際、従来同定され登録されていた基原種と異なる種として同定されるケースがしばしば発生し、問題となっている。その理由として、形態学的または生化学的手法

のみによって同定されていたため分類指標の誤認識等が起こったことによる誤同定や、近年の微生物分類体系の再構築に伴う学名変更などがある。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する必要がある。今年度は、アスペルギルス・テレーウス糖たん白質の基原であるアスペルギルス・テレーウス (*Aspergillus terreus*) について、従来の *A. terreus* (広義の *A. terreus*) の分類情報を整理することを目的とした検討を行った。

C. D. 研究結果及び考察

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

令和 7 年(2025 年)2 月 18 日に開催された令和 6 年度の第 3 回添加物部会において、『既存添加物の安全性については、これまでに確認の必要性が高いと思われるものから、食品安全委員会が定める「添加物に関する食品健康影響評価指針」に従い、国内外の急性毒性試験、90 日反復投与毒性試験、遺伝毒性試験の結果を収集し、順次、確認を行い、また、安全性に関する既存の情報が入手できない場合には、国立医薬品食品衛生研究所に毒性試験を委託し、新規に試験を実施し、それらの評価を進めてきたところであり、これらの取組により、消除予定品目を除いた収載品目 326 品目のうち 276 品目については安全性の確認が完了してきたところであること。さらに、一方で残り 50 品目については、安全性に関する既存の情報もなく、かつ試験試料の入手が困難であること等により、毒性試験の実施が実質的に不可能であると思われる品目も多くある』ことが事務局から報告された。

さらに、令和7年(2025年)11月18日に開催された令和7年度の第2回添加物部会では、「令和6年度既存添加物の安全性評価に関する調査研究」として、8品目(塩水湖水低塩化ナトリウム液、海藻灰抽出物、活性白土、酵素処理ナリンジン、サトウキビロウ、L-ラムノース、単糖・アミノ酸複合物、ツヤプリシン(抽出物))の評価結果ならびに未評価の既存添加物が42品目が報告された。

よって、この42品目について国外の安全性評価状況を調査した。その結果、この内28品目は、EFSA、JECFA、FDA及びFSANZAの機関で安全性評価関連情報が報告されていないことがわかった。

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

カロブ色素中の schaftoside について、HPLC による定量法を検討した。検出波長は、schaftoside の極大吸収を参考に 340 nm に設定した。メタノール(MeOH)、エタノール(EtOH)、50%MeOH、50%EtOH、H₂O の5種類の抽出溶媒を検討した結果、H₂O が最も高い定量値を与えたことから、試料溶液の調製には H₂O が抽出溶媒として適していることがわかった。

次に、schaftoside の市販試薬が非常に高価であり、フラボノイド C 配糖体で回転異性体による立体障害から ¹H-NMR による構造確認も困難であることから、他の安価で入手しやすい化合物を基準物質とした RMS を利用した定量法を検討した。基準物質には、schaftoside と同じフラボノイドで、食品添加物試験用として市販試薬が販売されている rutin 3 水和物を用いることとした。Schaftoside と同じグラジエント溶出条件で

HPLC 分析し、rutin 3 水和物に対する schaftoside の RMS 値を算出したところ、1.1326 であった。この RMS 値を用いて、rutin 3 水和物を基準物質としてカロブ色素中 schaftoside の定量分析を行った結果、4.7 mg/g となり、絶対検量線法による定量値とほぼ近い値を求めることができた。今後、他の化合物を基準物質とし、さらにアイソクラティック溶出における HPLC 分析条件を検討する予定であり、RMS を利用したカロブ色素中 schaftoside の定量法の確立を検討する予定である。

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 を用いて測定した市販試薬 linalol の含有率は 89.47% であった。一方、コリアンダーオイル中の含有率は 69.33%、コリアンダー種子2試料は 0.15 と 0.17% であった。これらの値は、HPLC による定量分析の結果と等しいことから、¹H-qNMR による linalol の直接定量法がコリアンダーオイル等の関連製品の品質管理に有効である可能性が示された。

同様に、セロリシードオイル及びセロリ種子中の butylphthlide の定量分析を ¹H-qNMR により実施した。Butylphthlide の 7-H のシグナルの積分値を用いて各試料の含有率を算出した結果、市販試薬 butylphthlide の含有率は 89.86%、セロリシードオイルは 2.14%、セロリ種子4試料のうち、栽培用が 0.24% と 0.10%、食品用が 0.50% と 0.38% であった。HPLC による定量分析でも同様の値が測定されたが、含有率が1%未満の低含油率のオイル(液体)製品での定量は困難であることがわかった。

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

昨年度までの研究において、主成分であるフィコシアニンに着目し、その発色団の構造を酵素消化法によって解析した。設定した消化法により、スピルリナ色素製品から良好なピークが認められた一方で、その精密質量はフィコシアノビルンとは約 2 Da 異なる分子量であった。この差違が、分析前処理時に生じた構造変換によるものか、試料の特性に起因するものかを検討する目的で、本年度は Trypsin による温和な酵素消化条件を検討した。その結果、フィコシアニンの α 鎖及び β 鎖において、発色団であるフィコシアノビルンの結合ペプチド(それぞれ、CAR 及び MAACLR)が、PDA 検出でも ToF-MS 分析においても良好に検出された。なお、酵素消化効率還元アルキル化の有無によって大きく影響しなかった。さらに、MS/MS 解析により、ペプチドシーケンスは結合位に断定された上、フィコシアノビルンのフラグメントイオンである m/z 587.2851 が、両ペプチドより明確に観測できた。

3. 試験法及び分析法の開発に関する研究

1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価

Cy3G・Cl 試薬 7 製品の純度値は 61.4%~93.7%と製造元により大きく異なっていた。また、試薬ラベルに表示された HPLC 純度と一致するものはなく、いずれも qNMR 純度より高値に見積もられていた。各試薬を用いて HPLC 絶対検量線を作成したところ、検量線傾きのばらつきは RSD 15%であった。一方、qNMR 純度で補正した濃度に基づき再作

成した絶対検量線では、傾きのばらつきは RSD 2%まで収束した。qNMR 法以外の方法として、イオンクロマトグラフィーにより塩化物量を定量し、Cy3G・Cl の純度へ換算する手法についても検討した。しかし、本法は Cy3G⁺と Cl⁻が等量で塩化物化されている場合に限り成立するものであり、塩化物化過程において過剰の Cl⁻が残存する場合には、純度が実際よりも大きく見積もられる結果となった。

2) 相対モル感度(RMS)を利用した定量法の検討 -検出器としてフォトダイオードアレイ(PDA)を用いた際の測定値のばらつきの原因-

本研究では、分光光度計測定により得られる吸収スペクトルが真、すなわち「標準スペクトル」と仮定して、各 PDA 装置における吸収スペクトルと比較した。

まず、検出器によって直線性に特徴があるかを確認するため、各試験液の吸収スペクトルから各測定波長 (273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm) における吸光度を得た。試験液の相対濃度を横軸に、分光光度計または PDA 検出器の吸光度を縦軸にとった検量線を作成した。その結果、分光光度計では、273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm のすべての波長において、濃度 0.10~3.0 の範囲で良好な直線性を、PDA 検出器では、直線性が不良となる装置があった。吸光度は、Lambert-Beer の理論上、溶液中の物質濃度に比例するため、入射光強度が一定である場合、高濃度溶液になるほど光の吸収が大きくなり、透過光強度は低下する。直線性が不良となった装置は、微弱な透過光を強制的に検出するような特殊機能が影響したと考えられた。また、装置

の光源である重水素ランプとタングステンランプの重水素ランプの強度や安定性も影響していると考えられた。

また、分光光度計との吸光度比が、同一装置内において検出波長ごとに比較しどのように異なるか比較したところ、すべての装置において、分光光度計に対する吸光度比の濃度による遷移パターンが、273 nm で測定したときと、418 nm, 522 nm, または 629 nm で測定したときの 2 つのパターンに大別された。分光光度計との吸光度比の差には、光源ランプの違い（消耗度等を含む）が大きく寄与すると考えられ、検量線の傾きの比で求められる RMS 値への影響が大きいことが示唆された。

装置間差を小さくするため、同一試料を両装置で分析した際の吸光度から補正係数を算出し、分析者の装置における補正 RMS を求めるものである。すでに報告されている論文のデータをもとにこの補正方法を実践したところ、装置間差は補正前より小さくなった。

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

市販ムラサキヤマイモ色素原体を試料として、HSCCC を用いて色素成分の単離精製を行った。昨年度の検討から、3 種のシアニンあるいはペオニジンアシルグルコシドが主色素成分であると考えられたため、主にこれらの単離を目標とした。小カラム(75 mL 容)を用いて、本精製の前段階の検討を実施したところ、HPLC 上で主色素成分として確認されたピーク 1 及びその副成分であるピーク 2 がそれぞれ別の溶出時間に溶出した。本精製として注入量を 20 倍に増加させ、大

カラム(350 mL 容)にスケールアップしたところ、小カラムと同様の分離が可能であったが、ピーク 3 の精製には至らなかった。以上のことから、現段階では HPLC 上に観察される主色素成分のピーク 1 及び 2 が HSCCC により単離精製が可能と考えられた。

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

カシアガム製品に JECFA 規格におけるアントラキノン類 6 種添加したものを試料として用い添加回収試験を行った。その結果、JECFA 法で規定されているクロロホルムを用いた場合、概ね 70%以上の回収率が得られた。

一方、ジクロロメタンを用いた場合、すべての化合物で回収率 70%以上を示したものの、アロエエモジンや 1,8-DAQ ではクロロホルムを用いた場合と比較してばらつきが増大する傾向が認められた。次に、酢酸エチルを用いた場合、アロエエモジンのみ良好な回収率と精度が得られなかった。これらの問題を解決するため、ジクロロメタンと酢酸エチルを段階的に使用する抽出法について、同試料を用いた添加回収試験によりその妥当性を評価した。その結果、すべての化合物において良好な回収率と精度が得られることが判明した。

5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

2 位および 5 位にアミノ基を導入した 1,4-ナフトキノン誘導体については、ベースとした分子と比較して顕著な長波長化は観測されなかった。一方で 500-700 nm 付近におけるスペクトル強度の増加が確認された。これ

は 2 位および 5 位にアミノ基を導入したことでアミノ基水素とカルボニル酸素間の分子内水素結合の寄与と推察された。この点は青色 3 号の吸収スペクトル形状との比較からも示唆された。

SR 分子の開発については、ビスインドリルマレイミドを母骨格とし、C5～C12 までの長さの直鎖炭化水素基を導入して疎水性を変化させることで、HPLC クロマトグラム上における保持時間のある程度の範囲内で制御することができた。これらの分子は 1 度の合成で一挙に得ることも可能であるため、HPLC クロマトグラム上で定量対象と重ならない位置に溶出する分子をスクリーニング的に見つけることが可能であった。

6) 食品添加物中の鉛及びヒ素のスクリーニング法へのエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) の適用

分析条件は、散乱線内標準補正の効果が認められたため補正ありとすることとした。試料を測定したところ、無添加試料において As が含有すると判断されたものがあつた。そこでプロファイル(スペクトルのようなもの)を確認したところ、共存元素である Br の影響であることが確認された。隣接ピーク分離処理を行ったが完全に取り除くことはできなかった。また主成分が無機物の場合や平均原子番号が 9.0 を超える場合、感度低下が起きることが確認された。一方、規格値の 1/2 相当濃度の対象標準溶液を基準とすることで、規格値相当濃度を含有する試料を見逃すことなく確実に選抜することができ、また、含有していない試料を含有すると誤って判断することもないことが確認された。

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

今年度は、複数種のマトリクスの変更や消化酵素の併用により、同定精度の指標となる Coverage を上げることができかどうか検討した。これまでにマトリクスとして用いていた 4-クロロ- α -シアノケイ皮酸(CICCA)に加え、9 種のマトリクスを用いることにより検出ペプチド数が増えるかどうかを検討した結果、一部の製品の分析結果において、CICCA では検出されなかったペプチドが 5 種のマトリクスをそれぞれ用いた場合に検出された。また、消化酵素であるトリプシンと Lys-C を併用することにより、検出ペプチド数が増えることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、複数のマトリクスを用い、トリプシンと Lys-C を併用して PMF 法を行うことで、Coverage が上昇するかを調べたところ、3 種の酵素製品の解析において、マトリクスに CICCA のみ、消化酵素にトリプシンのみを用いた過去の結果より Coverage が上昇した。

A. terreus に関する分類の変遷について文献情報を精査したところ、2011 年以降、広義の *A. terreus* は、狭義の *A. terreus*, *A. pseudoterreus*, *A. floccosus*, *A. hortai*, *A. alabamensis*, *A. citrinoterreus* 等に細分化されたため、これ以前に *A. terreus* と同定された基原菌株はこれらの菌種に再同定される可能性があり、注意が必要であることを確認した。

E. 結論

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究

(委託調査)

第 10 版食品添加物公定書に未収載の既存添加物については、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、安全性評価状況について調査した。国内で安全性評価情報が得られていない 42 品目の内、28 品目については、EFSA、JECFA、FDA 及び FSANZA の機関においても報告された情報はなかったため、これらについては流通状況を確認し、入手可能と判断される者場合は評価を進める必要がある。一方、入手困難な品目については、安全性評価が事実上不可能であり、化学的安全性が担保できない以上、消除を含めた対応を検討する必要があると結論した。

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

カロブ色素の色素成分の定量法を検討し、schaftoside を直接分析する方法と、酵素分解により schaftoside 配糖体を加水分解して schaftoside として分析する方法を考案した。しかしながら、schaftoside の市販試薬が非常に高価であることから、これを定量用標品とした定量法の設定は困難であると考えられた。この問題を回避するため、rutin 3 水和物を基準物質とした RMS を利用した定量法を検討した結果、schaftoside の市販試薬を定量用標品とした絶対検量線法とほぼ同じ定量値が得られ、RMS を利用した定量法が十分機能することが確認できた。以上のことから、より定量分析に適した基準物質、HPLC 条件を検討することにより、公的な定量法が設定可能であると結論した。

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

香辛料抽出物コリアンダーオイルをはじめとしたコリアンダー種子由来の製品中の linalol の含有率を、 ^1H -qNMR により、溶媒として acetone- d_6 、linalol の 2-H の積分値を用いて直接定量できることが確認できた。また、香辛料抽出物セロリシードオイルをはじめとしたセロリ種子由来の製品中の butylphthlide の含有率を、 ^1H -qNMR により、溶媒として acetone- d_6 、butylphthlide の 7-H の積分値を用いて直接定量できることが確認できた。

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

本研究により、スピルリナ色素に存在するフィコシアニンがフィコシアノビルリンを発色団にもつものであることが明らかとなった。昨年度の検討で検出された、当該断片における約 2 Da の変化は、過激な酵素消化条件によって生じたものと考えられた。本法はカートリッジ型の MonoSpin Trypsin により簡便かつ迅速に完結でき、 m/z 587 が PCB 特徴的断片として得られるため、定性分析として十分に適用可能である。フィコシアニンは生物性タンパク質であるが、上記特徴的断片を用いることで、種や株の差の判定にも対応可能と考えられた。

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

Cy3G・Cl 市販試薬製品の純度は製造元により大きく異なり、ラベル表示値に基づく定量では試薬間差に起因する誤差が生じることが明らかとなった。また、イオンクロマトグラフィーを用いた塩化物量に基づく換算法は過剰 Cl $^-$ の影響

を受け、純度を過大評価する場合があった。以上より、アントシアニンの正確な純度評価には qNMR による絶対定量が最も信頼性の高い手法であると結論づけられる。さらに、本研究で確立した純度評価法は、アントシアニンを主成分とする食品添加物公定書収載品の HPLC 成分規格試験及び RMS 法の構築に有用な基礎資料となるものである。

2) 相対モル感度(RMS)を利用した定量法の検討 -検出器としてフォトダイオードアレイ(PDA)を用いた際の測定値のばらつきの原因-

本研究では、UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法の課題のひとつである、基準物質と分析対象物質の測定波長が異なる場合における装置間差の原因探索を目的とした。PDA 検出器のスペクトル検出特性を調査するため、同一試料の 273 nm, 418 nm, 522 nm, 629 nm における吸光度を測定し、分光光度計の値を基準として比較した。その結果、装置によって直線性の範囲が異なること、直線性が見られる範囲内であっても分光光度計の値からは最大で 15%ほどズレがある場合があること、分光光度計とのズレ方は波長や装置によって異なっており一定ではないことなどが明らかとなった。とくに、光源としている重水素ランプとタングステンランプが切り替わると、基準とのズレ方に大きな変化が見られる傾向があった。

次に、装置間差を小さくするために、同一試料を両装置で分析した際の吸光度から補正係数を算出し、分析者の装置における補正 RMS を求める感度補正を検討した。本補正の検討結果により、装置間差に PDA 検出器における波長ごとの感度差が大きく寄与し

ていることが裏付けられた。また、RMS 法における基準物質の選定においては、必ずしも分析対象物質の検出波長と同一にする必要はないが、光源ランプの切り替わり付近や離れすぎた波長は避ける方が、装置間差を考慮すると望ましいと考えられた。

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の主色素成分であるアントシアニン類の HPLC 定量法の構築を目指し、各種検討を実施した。主要な 3 つの色素成分の構造推定を実施した結果、既報とは配糖体の数は異なっていたが、類似した構造を持つものであると推定された。一方、LC/MS 分析では、糖の配置やアシル部分の詳細構造に関する情報が得られないため、完全な構造決定のためには NMR 糖を用いた構造解析が必要であった。このため、HSCCC 条件を検討した結果、2 成分の単離精製条件が確立できた。今後、構造決定を行い、定量用標品を供給できるようになる予定である。本研究から得られた結果は、ムラサキヤマイモ色素の規格試験に活用されるものと考えられる。

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類分析法の確立を目的として、JECFA 規格の分析法を基盤とした前処理法の改良を検討した。具体的には、クロロホルムの代替抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを候補溶媒として選定し、添加回収試験に

よりその適用性を評価した。その結果、各溶媒を単独で使用的した場合、測定対象物質の一部において真度または精度の面で問題が認められたため、ジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用する抽出法(段階抽出法)を新たに考案した。JECFA 規格の残留上限値の 10 倍相当(添加濃度 5 mg/kg)及び残留上限値(0.5 mg/kg)相当の添加濃度での検討において、対象とする全化合物について良好な抽出性能が示された。また、本段階抽出法の適用においては、ジクロロメタン層及び酢酸エチル層の抽出液を統合せずにそれぞれ独立して減圧濃縮し、試験溶液を調製することが、アロエエモジンの定量における真度及び精度の確保のために不可欠であることが確認された。以上より、本段階抽出法は、クロロホルムを使用せず、カシアガム中のアントラキノン類を良好な真度及び精度をもって抽出が可能な有効な手法であることが実証できた。本研究結果は、カシアガム中のアントラキノンの試験法の基礎情報として活用され、今後、第三者による検証を行い公的な規格化を目指す予定である。

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。合成した誘導体 **1'** は結果としては図らずしも既存の色素分子である青色 3 号の分子構造に共通した構造を有しており、UV スペクトルの類似性もこの部分に起因することが示唆された。今後はこの化合物構造をベースとし、構造情報を蓄積するとともに、理論的に吸収スペクトルが制御できる設計

指針を立てることが重要と考えられた。

既存添加物の SR 分子の開発については、「1) 比較対象と類似の UV 吸収を示す構造を選択し、2) 導入する炭化水素基で HPLC クロマトグラム上の保持時間を調整する」という方針のもと、複数の誘導体の一斉合成法を確立した。HPLC 法によって定量を行うことを想定した場合のデザインとしては、設計コンセプトの成立がなされたと考えている。今後は定量対象であるアナトー色素類との HPLC クロマトグラム上における保持時間を比較して候補となる誘導体を選定、定量 NMR による候補化合物の純度の値付けを行い、定量への応用に向けた検討を進める予定である。

6) 食品添加物中の鉛及びヒ素のスクリーニング法へのエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) の適用

EDX を公定書における食品添加物中の Pb 及び As のスクリーニング法へ適用できるかどうかを検討した。その結果、散乱線内標準補正を行うことでより正確な判断が可能となることが示され、さらに、規格値の 1/2 の濃度の対照用標準溶液を基準として用いることで、規格値相当濃度含まれる Pb や As を見逃すことなく確実に選抜することができるうえ、これらを含めない試料を誤って判定する可能性も極めて低いことが示された。EDX による分析は試薬を使用しないうえ、前処理は不要でさらに測定時間も短い。つまり環境や試験者への負荷も小さい分析法であるといえ、今後さらなる対象拡大へ向けて引き続き検討を行う予定である。

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、一昨年、昨年に引き続き改良を行った。検出されるペプチドの種類を増やすために、2 種の酵素による消化法と複数種のマトリクスを用いた検出法を組み合わせたことにより、Mascot サーチの結果における Coverage の向上が認められた。この方法を用いることで、より精度高く基原種の同定が可能となることが期待される。

また、2011 年以降に *A. terreus* と同定された基原菌株は異なる学名に再同定される可能性があり、注意が必要であることを確認した。基原菌種の分類情報は今後も継続的に変遷すると予想されることから、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、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と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表等

1-1. 論文

- 1) Masumoto N, Yamazaki T, Miura T, Nakajima K, Yamamoto K, Kato T, Minamoto N, Suematsu T, Sato Y, Nomura A, Akagi M, Ohtsuki T, Koyama K, Mizumoto T, Miyashita T, Kawashima S, Saito T, Sugimoto N: Development of a Standard-Free Analytical Quantitative Method based on Liquid Chromatography Using Relative Molar Sensitivity for Chlorogenic Acid in Apple Juice. Chem. Pharm. Bull., 2025; 73(7): 650-657.

- 2) Miura T, Liu Y, Bzhelyansky A, Ohtsuki T, Matsufuji H: Development of ^1H qNMR analytical procedure for purity determination of Imazosulfuron and 1,4-BTMSB- d_4 for ISO 17034 accreditation. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2025; qsaf099.

1-2. 総説

- 1) 杉本直樹：既存添加物の取扱いに関する今後の方針について。月刊フードケミカル, 2025; 5: 23-27.
- 2) 杉本直樹：定量分析値の SI トレーサビリティの確保：qNMR/Chromatography (Ensuring SI traceability of quantitative analytical values: qNMR/Chromatography). ソフト・ドリンク技術資料, 2025: 207(3); 63-73.

2. 学会発表等

2-1. 学会

- 1) Yuzo Nishizaki: A Case Study on Validation of External Calibration qNMR (EC-qNMR). qNMR summit 2025 (2025.6).
- 2) 梶本りおん, 宮崎真奈, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人：定量 NMR (^1H -qNMR)を用いた生薬バニラ及びバニラ香料中の vanillin, ethylvanillin 及び *p*-hydroxybenzaldehyde の定量. 日本食品化学学会第 31 回総会・学術大会 (2025.6).
- 3) 石附京子, 川末慎葉, 阿部裕, 杉本直樹：キラヤ抽出物の定量法への RMS 導入に向けた検討(第 1 報). 日本食品化学学会第 31 回総会・学術大会 (2025.6).
- 4) 瀬川ひかり, 永津明人, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹：定量 NMR 法を用いたブ

- ラックペッパーオイル中の β -Caryophyllene の定量. 日本生薬学会第 71 回年会 (2025.9).
- 5) 高田翔平, 日置冬子, 丸田知枝, 建部千絵, 久保田浩樹, 多田敦子, 杉本直樹: HPLC における相対モル感度法を応用した食品添加物中のソルビン酸異性体含量の評価. 第 121 回日本食品衛生学会学術講演会(2025.10).
 - 6) 中島馨, 川末慎葉, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度を用いたステビオール配糖体の定量法の検討(第 1 報). 第 121 回日本食品衛生学会学術講演会(2025.10).
 - 7) 西川拓海, 阿部裕, 杉本直樹, 西崎雄三: 卓上 NMR を用いた ^1H スピン情報に基づく qNMR によるカラシ抽出物の定量法の検討. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
 - 8) 藤原由美子, 建部千絵, 高田翔平, 久保田浩樹, 多田敦子, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いた食用緑色 3 号中の未反応原料及び反応中間体の定量法に関する検討. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
 - 9) 山崎太一, Yang Liu, Carlos Amezcua, 大槻崇, 加藤毅, 神山和夫, 高岡信也, 水本俊行, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いた定量分析法の国際規格 (ISO) 化のための国際共同試験. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
 - 10) 石附京子, 川末慎葉, 阿部裕, 杉本直樹: TRAQ-Chrom (Transmission-Referenced Absolute Quantification Chromatography) の検討. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
 - 11) 今岡美史, 高田翔平, 黒原崇, 藤原由美子, 建部千絵, 窪崎敦隆, 大槻崇, 多田敦子, 松藤寛, 杉本直樹: タール色素不純物の NMR スペクトルに与える無機成分の影響. 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11).
 - 12) 梶本りおん, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR)を用いたコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalool の定量. 日本薬学会第 146 年会 (2026.3).
 - 13) 高松さくら, 鬼嶋七海, 内倉崇, 好村守生, 阿部裕, 杉本直樹, 天倉吉章: 食品添加物カロブ色素中に含有する schaftoside の定量分析に関する検討. 日本薬学会第 146 年会(2026.3).
 - 14) 田中誠司, 西崎雄三, 細江潤子, 増本直子, 伊藤美千穂, 内山奈穂子, 石附京子, 杉本直樹, 鈴木梓, 浅野龍二, 三浦亨, 武藤康弘, 朝倉克夫, 末松孝子, 小松功典, 古川茶勲, 合田幸広: ^1H スピン情報に基づいた参照 NMR スペクトルによる「定量用ヘスperiジン」の確認試験について. 日本薬学会第 146 年会(2026.3).

2-2. 講演等

- 1) 阿部裕: 天然由来の食品添加物のリスク管理～これまでとこれから～, 日本薬学会第 146 年会, 日本薬学会・日本食品化学学会ジョイントシンポジウム(2026.3).

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

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7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
～既存添加物の国内外の安全性評価情報に関する調査研究～

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年間を1サイクルとして調査を行うものであり，初年度に1，2年目に2，3年目に3について調査し，3年目に総合報告書を作成するものである。

本年度は，「3. 既存添加物の国内外の安全性評価情報」の調査を実施した。結果を，本研究報告書にまとめて報告する。

安全性評価情報の調査については，「既存添加物 安全性評価検討中品目リスト（消費者庁食品衛生基準審議会添加物部会資料 令和7年2月18日）に収載されている50品目から，「令和6年度既存添加物の安全性評価に関する調査研究」で安全性に問題なしと判断された8品目を除外した計42品目を対象とした。

研究協力者

木戸啓之 （一社）日本食品添加物協会
常務理事
藤井結花 （一社）日本食品添加物協会
常務理事

A. 研究方法

令和7年2月から11月に開催された食品衛生基準審議会添加物部会（以下“添加物部会”という）の報告等に基づき，令和7年12月1日時点で，わが国において安全性確認が完了していない既存添加物を42品目と特定した。

令和7年2月18日に開催された令和6年度の第3回となる添加物部会では，『既存添加物の安全性については，これまでに確認の必要性が高いと思われるものから，食品安全委員会が定める「添加物に関する食品健康影響評価指針」に従い，国内外の急性毒性試験，90日反復投与毒性試験，遺伝毒性試験の結果を収集し，順次，確認を行い，また，安全性に関する既存の情報が入手できない場合に

は，国立医薬品食品衛生研究所に毒性試験を委託し，新規に試験を実施し，それらの評価を進めてきたところであり，これらの取組により，消除予定品目を除いた収載品目326品目のうち276品目については安全性の確認が完了してきたところであること。さらに，一方で残り50品目については，安全性に関する既存の情報もなく，かつ試験試料の入手が困難であること等により，毒性試験の実施が実質的に不可能であると思われる品目も多くある』ことが事務局から報告され，50品目については参考資料2に示された。

さらに，令和7年11月18日に開催された令和7年度の第2回となる添加物部会では，「令和6年度既存添加物の安全性評価に関する調査研究」として，資料4-1「既存添加物の安全性の確認について」に沿って，8品目（塩水湖水低塩化ナトリウム液，海藻灰抽出物，活性白土，酵素処理ナリンジン，サトウキビロウ，L-ラムノース，単糖・アミノ酸複合物，ツヤプリシン（抽出物））の評価結果

ならびに未評価の既存添加物が 42 品目であることが報告された。

これらを踏まえ、本研究では、令和 6 年度第 3 回添加物部会の参考資料 2 収載 50 品目から、令和 7 年度第 2 回添加物部会の資料 4-1 収載の 8 品目を除外した 42 品目を対象として、海外評価機関等における安全性評価状況を調査した。

調査には、消費者庁 Web サイトから遷移する日本食品化学研究振興財団 Web サイト「既存添加物名簿収載品目リスト」に収載されている英名を用い、以下の各サイトで実施した。ヒットしない場合は英名の別名で調査し、英名の別名でもヒットしない場合は、“安全性評価の報告がないもの”とする。

E F S A :

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/search/advanced>

J E C F A :

<https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/>

F D A :

<https://hfppappexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices>

F S A N Z A :

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

<https://www.foodstandards.gov.au/food-standards-code/applications>

<https://www.foodstandards.gov.au/food-standards-code/proposals>

B. 研究結果

調査結果を表 1-1 に、安全性の評価報告の収載先リンクを表 1-2 に記した。ま

た、調査対象外とした 8 品目を表 1-3 に記した。

今回の調査で新たに「酸素」、「パラジウム」の 2 品に安全性評価の報告が加わり、過去に報告済みの「アスコルビン酸オキシダーゼ」を含め、海外の安全性評価報告が有る添加物は 3 品であった。

また、4 つのサイトいずれかにおいて、直接的ではないが安全性評価に関連する報告が、新たに 7 つの添加物について 9 件確認された。

前回報告では、安全性データでなく物理データのみのもので、記載はあるが安全性に言及していないものを報告したが、今回は、それらに該当するものはない。

C. 考察

4 つの評価機関のサイトで安全性評価報告のあった添加物が 3 品目、関連情報の報告があるものが 11 品目あるが、全体の 2/3 にあたる 28 品目は、いずれの機関でも安全性評価関連情報が報告されていない。このことは、添加物部会で報告された「安全性に関する既存の情報が入手できない場合」として、新たに原体を入手し、試験を実施したうえで評価を進める必要のある添加物の割合が多いことを示しており、既存添加物の安全性評価の完遂には、時間、労力、費用面での負担が大きく、また、事業者からの原体提供も重要であることが、改めて確認された。

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部長である杉本直樹先生、第二室長である阿部裕先生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1-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果

通し 番号	既存添加物名簿		添加物名	EFSA	JECFA	FDA	FSANZ	調査日
	R7. 8. 25	R2. 2. 26						
1	2	2	アガラ-ゼ	—	—	△ • GRN No. 1109 (β-agarase preparation produced by Streptomyces coelicolor)	—	2025/12/04
2	3	3	アクチニジン	—	—	—	—	2025/12/04
3	6	6	アスコルビン酸オキシダーゼ	○ 2021年度追加報告済み	—	—	—	2025/12/04
4	23	23	アルギン酸リアーゼ	—	—	—	—	2025/12/04
5	25	25	アントシアナーゼ	—	—	—	—	2025/12/04
6	28	28	イソマルトデキストラーナーゼ	—	—	—	—	2025/12/04
7	30	30	イヌリナーゼ	△ • Safety evaluation of the food enzyme inulinase from the non-genetically modified Aspergillus welwitschiae strain NZYM-KF • Safety evaluation of the food enzyme inulinase from the genetically modified Aspergillus oryzae strain MUCL 44346	—	—	△ • A1171 - Endo-inulinase from GM Aspergillus oryzae as a Processing aid (Enzyme)	2025/12/04
8	33	33	ウエランガム	—	—	—	—	2025/12/04
9	50	51	花こう斑岩	—	—	—	—	2025/12/04
10	79	80	キチナーゼ	△ 2021年度追加報告済み	—	—	—	2025/12/04
11	81	82	キトサナーゼ	—	—	—	—	2025/12/04
12	84	85	キハダ抽出物	—	—	—	—	2025/12/04

表1-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果

通し 番号	既存添加物名簿		添加物名	EFSA	JECFA	FDA	FSANZA	調査日
	R7.8.25	R2.2.26						
13	99	104	β-グルコシダーゼ	〃△ ・Safety evaluation of the food enzyme containing β-fructofuranosidase and β-glucosidase activities from the non-genetically modified Aspergillus tubingensis strain IN 319 ・Safety evaluation of the food enzyme containing endo-polygalacturonase and β-glucosidase from the non-genetically modified Aspergillus tubingensis strain ARO ・Safety evaluation of an extension of use of the food enzyme β-glucosidase from the non-genetically modified Penicillium guanacastense strain AE-GLY ・Safety evaluation of the food enzyme β-glucosidase from the non-genetically modified Penicillium guanacastense strain AE-GLY 〃	—	〃△		—
14	106	111	グレープフルーツ種子抽出物	—	—	—	—	2025/12/04
15	108	113	クロロフィリン	△ 2021 年度追加報告済み	—	—	—	2025/12/04
16	118	123	酵素処理ルチン（抽出物）	—	—	—	—	2025/12/04
17	120	125	酵素分解カンゾウ	—	—	—	—	2025/12/04
18	121	126	酵素分解リンゴ抽出物	—	—	—	—	2025/12/04
19	136	143	酸性ホスファターゼ	—	—	—	—	2025/12/04

表1－1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果

通し 番号	既存添加物名簿		添加物名	EFSA	JECFA	FDA	FSANZ	調査日
	R7.8.25	R2.2.26						
20	137	144	酸素	〇 • Re-evaluation of oxygen (E 948) and hydrogen (E 949) as food additives”	—	—	—	2025/12/04
21	157	165	ステビア末	—	—	—	—	2025/12/04
22	164	172	ゼオライト	△ • Safety of a feed additive consisting of zeolites (≥ 50%) obtained from Neapolitan Yellow Tufa for poultry for fattening or reared for laying/reproduction (Italiana Zeoliti s.r.l.) • Safety and efficacy of a feed additive consisting of zeolites (≥ 50%) obtained from Neapolitan Yellow Tufa for all animal species (Italiana Zeoliti s.r.l.)	—	—	—	2025/12/04
23	179	192	タンナーゼ	△ • Safety evaluation of the food enzyme tannase from the non-genetically modified Aspergillus sp. strain TAN 206	—	”△ • GRN No. 1192 (Tannase enzyme produced by Aspergillus oryzae) ”	—	2025/12/04
24	195	212	動物性ステロール	—	—	—	—	2025/12/04
25	206	223	トレハロースホスホリラーゼ	—	—	—	—	2025/12/04
26	210	228	ナリンジナーゼ	—	—	—	—	2025/12/04
27	217	237	白金	—	—	—	—	2025/12/04
28	221	241	パラジウム	〇 • Scientific Opinion on the safety assessment of the active substances, palladium metal and hydrogen gas, for use in active food contact materials	—	—	—	2025/12/04

表1-1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果

通し 番号	既存添加物名簿		添加物名	EFSA	JECFA	FDA	FSANZ	調査日
	R7.8.25	R2.2.26						
29	226	246	微小繊維状セルロース	—	—	—	—	2025/12/04
30	243	264	ブラジルカンゾウ抽出物	—	—	—	—	2025/12/04
31	244	265	フルクトシルトランスフェラーゼ	△ ・ Safety evaluation of the food enzyme sucrose: sucrose fructosyltransferase from the genetically modified <i>Yarrowia lipolytica</i> strain E4772	—	—	—	2025/12/04
32	257	280	ペクチン分解物	—	—	△ 2022 年度追加報告済	—	2025/12/04
33	282	309	マルトースホスホリラーゼ	—	—	—	—	2025/12/04
34	283	310	マルトリオリオヒドロラーゼ	—	—	—	—	2025/12/04
35	294	321	メラロイカ精油	△ ・ Safety and efficacy of a feed additive consisting of an essential oil derived from leaves and terminal branchlets of <i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel (tea tree oil) for use in all animal species (FEFANA asbl) ・ Safety and efficacy of a feed additive consisting of an essential oil derived from fresh leaves of <i>Melaleuca cajuputi</i> Maton & Sm. ex R. Powell and <i>Melaleuca leucadendra</i> (L.) L. (cajuput oil) for use in all animal species (FEFANA asbl)	—	2021 年度追加報告済 み FEMA GRAS (No. 2225) FEMA GRAS (No. 3902)	—	2025/12/04
36	295	322	モウソウチク乾留物	—	—	—	—	2025/12/04
37	297	324	木材チップ	△ 2021 年度追加報告済み	—	—	—	2025/12/04
38	300	327	木灰	—	—	—	—	2025/12/04
39	301	328	木灰抽出物	—	—	—	—	2025/12/04
40	316	343	リポキシゲナーゼ	—	—	—	—	2025/12/04

表 1－1 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果

通し 番号	既存添加物名簿		添加物名	EFSA	JECFA	FDA	FSANZ	調査日
	R7.8.25	R2.2.26						
41	319	346	リンターセルロース	－		－	－	2025/12/04
42	322	349	ルテニウム	－		－	－	2025/12/04

調査結果による区分		令和7年度調査該当件数			
色	記号	属性	EFSA	JECFA	FDA
【青】	○	: 安全性評価報告のある品目	2	0	2
【黄】	△	: 関連はあり安全性評価の報告はあるが直接的ではない場合	5	0	0
【黄緑】	□	: 安全性データなく物理データのみ	0	0	0
【橙】		: FEMA GRAS	0	0	0
—		: 安全性評価の報告がない品目	0	0	0

表 1－2 既存添加物に関する海外評価機関等における安全性評価の調査結果－安全性報告の掲載先リンク

表 1-1 通し 番号	既存添加物名簿		添加物名	安全性報告の掲載先リンク
	R7. 8. 25	R2. 2. 26		
20	137	144	酸素	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2025.9595
28	221	241	パラジウム	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2014.3558
1	2	2	アガラーゼ	GRAS Notice 1109 with amendment, β -agarase enzyme preparation produced by <i>Streptomyces coelicolor</i>
7	30	30	イヌリナーゼ	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2024.8771
				https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2023.8148
				A1171 – Endo-inulinase from <i>GM Aspergillus oryzae</i> as a Processing aid (Enzyme) Food Standards Australia New Zealand
23	179	192	タンナーゼ	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2025.9338
				https://downloads.regulations.gov/FDA-2025-N-1927-0029/attachment_1.pdf
13	99	104	β -グルコシダーゼ	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2025.9674
				https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2024.9125
				https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2024.9040
				https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2024.8872
31	244	265	フルクトシルトランスフェラーゼ	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2025.9490
22	164	172	ゼオライト	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2025.9787
				https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2023.8456
35	294	321	メラロイカ精油	https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2024.9026
				https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2024.8732

表1－3 今回調査対象外とした品目

令和6年度第3回添加物部会の参考資料2「既存添加物 安全性評価検討中品目リスト」に記載されているが、令和7年度第2回添加物部会で安全性に問題なしと判断された品目

	既存添加物名簿		添加物名
	R7. 8. 25	R2. 2. 26	
1	40	40	塩水湖水低塩化ナトリウム液
2	46	47	海藻灰抽出物
3	54	55	活性白土
4	116	121	酵素処理ナリンゲン
5	133	140	サトウキビロウ
6	178	191	単糖・アミノ酸複合物
7	186	201	ツヤブリンシン（抽出物）
8	311	338	Ｌ-ラムノース

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7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なされる。本研究では、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。これまでの検討で、カロブ色素製品の HPLC 分析から主ピークを検出し、それらが schaftoside 及び schaftoside 配糖体であることを明らかにし、指標成分候補として schaftoside を見出した。また、schaftoside を指標とした TLC 分析による確認試験法について提案した。定量分析としては、schaftoside を直接分析する方法と、schaftoside 配糖体を β -グルコシダーゼによる酵素分解で 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。今年度はその続きとして、カロブ色素製品中の schaftoside の定量分析法について、グラジエント溶出の HPLC による相対モル感度 (RMS) 法について検討し、rutin 標準品によるカロブ色素中 schaftoside の定量分析を行った結果、絶対検量線法による定量データとほぼ近い値となることを示すことができた。

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

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、色調の確認の他、呈色反応による確認試験のみで、品質評価のための指標成分は示されていない。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実施しており、今年度はカロブ色素製品中の schaftoside の定量分析法について、グラジエント溶出における HPLC 分析での検討を行った。

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。イナゴマメの胚乳部は多糖類を豊富に含んでおり、

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。Schaftoside は一般試薬(富士フィルム和光純薬製, MedChemExpress)を用い, rutin は食品添加物試験用ルチン標準品(3水和物, 富士フィルム和光純薬製)を使用した。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用いた。

B-2) 装置及び測定条件

逆相 HPLC は、Shimadzu Prominence システム(島津製作所)を使用した。測定条件を以下に示す。カラム：L-column ODS (2.1 I.D. × 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：340 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(溶媒はいずれもナカライテスク製) [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%)].

B-3) 試料溶液の調製

Schaftoside は 4 濃度(1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)で検量線を作成した。また、製品の抽出溶媒を検討するため、メタノール(MeOH), エタノール(EtOH), 50%MeOH, 50%EtOH, H₂O の 5 種類で抽出し、各試料溶液について schaftoside 量を絶対検量線法により算出した。Rutin 3 水和物に対する schaftoside の RMS 値は、それぞれの標準溶液(1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)を調製し、得られた面積値を用いてそれぞれの検量線を作成し、その傾きの比から決定した。

C. 結果及び考察

C-1) 抽出溶媒の検討

カロブ色素製品中の schaftoside 量について、これまで分析してきた条件(グラジエント溶出条件)で予試験的に検討した。検出波長はこれまでの 280 nm から、schaftoside の極大吸収を参考に 340 nm に設定した。Schaftoside は 4 濃度

(1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)で検量線を作成した(図 1)。また、製品の抽出溶媒を検討するため、MeOH, EtOH, 50%MeOH, 50%EtOH, H₂O の 5 種類で抽出し、各試料溶液について schaftoside 量を絶対検量線法により算出した。その結果、H₂O が最も定量値が高い結果(5.0 mg/g)となった(MeOH, EtOH, 50%MeOH, 50%EtOH; それぞれ、2.3, 0.65, 4.8, 4.8 mg/g)(図 2)。昨年度、酵素処理による定量分析法について、アイソクラティック溶出で絶対検量線法による定量値を報告していたが、その値とほぼ同じ結果であった。

C-2) 相対モル感度(RMS)を利用した分析法の検討

Schaftoside は試薬が高価であり、さらにフラボノイド C 配糖体で回転異性体による立体障害から、通常の実験条件では ¹H-NMR 解析が困難なこともあり³⁾、他の化合物を標準品とする相対モル感度(RMS)を利用した分析法について予備検討を実施することとした。標準品は schaftoside と同じフラボノイドで、食品添加物試験用として試薬が販売されているルチン標準品(rutin 3 水和物)を用いることとした。同じグラジエント溶出条件で HPLC 分析し、rutin 3 水和物に対する RMS 値を算出したところ、1.1326 であった(図 3)。この RMS 値を用いて、ルチン標準品によるカロブ色素中 schaftoside の定量分析を行った結果、4.7 mg/g となり、絶対検量線法による定量データ(5.0 mg/g)とほぼ近い値を求めることができた。このように、グラジエント溶出条件の予試験で分析可能であることが示唆されたことから、今後、他の化合物についても標準品としての適用を検討し、さらにアイソクラティック溶出における HPLC 分析条件を検討する予定であり、RMS を利用したカロブ色素中 schaftoside の定量分析の設定を目指す。

D. 結論

食品添加物カロブ色素製品に含有する schaftoside の定量分析に関する検討として、H₂O, 50%MeOH, 50%EtOH, MeOH, EtOH で

それぞれ抽出したものを試料溶液とし、HPLCによる絶対検量線法により **schaftoside** の定量分析を行った結果、抽出溶媒としては H₂O の抽出効率がよく、次いで 50%MeOH, 50%EtOH で、含水の方の抽出量が高い傾向が示唆された。また、RMS 法による分析について、ルチン標準品を使用した方法について検討した結果、絶対検量線法による定量データとほぼ近い値となり、グラジエント溶出条件の試験で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).
- 3) Nørbæk R., Brandt K., Kondo T.: J. Agric. Food Chem., 48, 1703-1707 (2000).

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 高松さくら, 鬼嶋七海, 内倉崇, 好村守生, 阿部裕, 杉本直樹, 天倉吉章: 食品添加物カロブ色素中に含有する **schaftoside** の定量分析に関する検討, 日本薬学会第146年会 (2026.3.36-29).

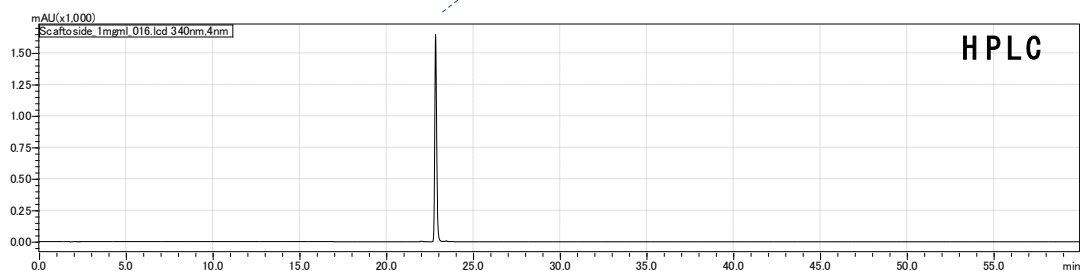
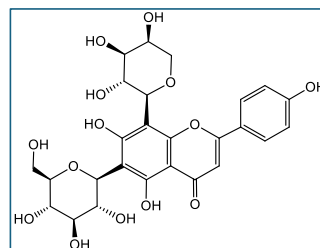
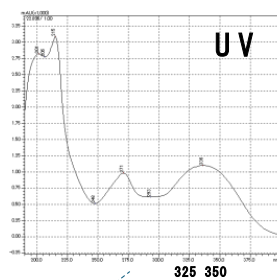
2. 論文発表等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Schaftoside



グラジエントHPLC条件

Shimadzu Prominence システム (島津製作所カラム: L-column ODS (2.1 ID. × 150mm, 5 μm))

(化学物質評価研究機構), カラム温度: 40 °C, 流速: 0.3 mL/min, 検出: UV 340 nm,

移動相: (A) 0.1 % 酢酸 in H₂O, (B) 0.1 % in CH₃CN [濃度勾配条件 (B in A): 0→30 min (0→50 %), 30→35 min (50→85 %), 35→40 min (85 %), 40→50 min (85→100 %)]

検量線 (1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)

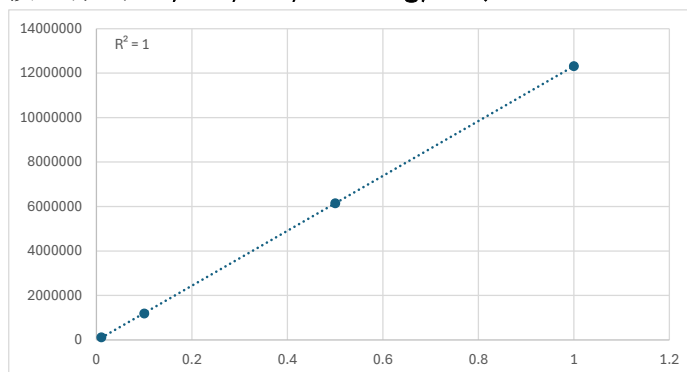
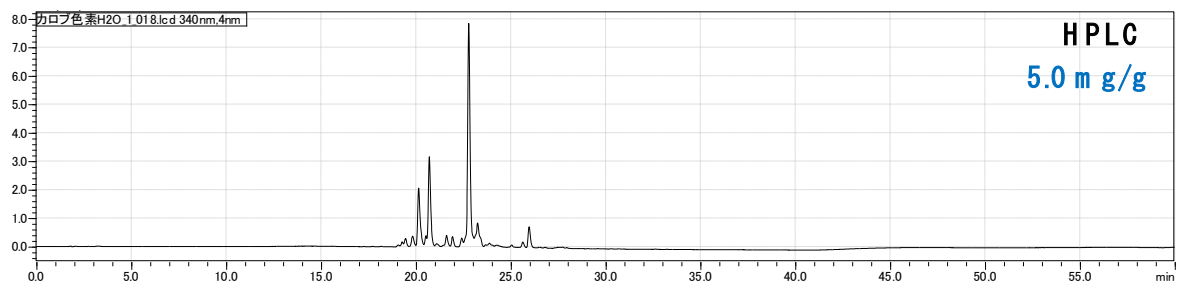


図 1. Schaftoside の HPLC クロマトグラム及び検量線

カロブ色素 (H₂O 抽出物)



カロブ色素製品中のschaftoside定量値 (絶対検量線法)

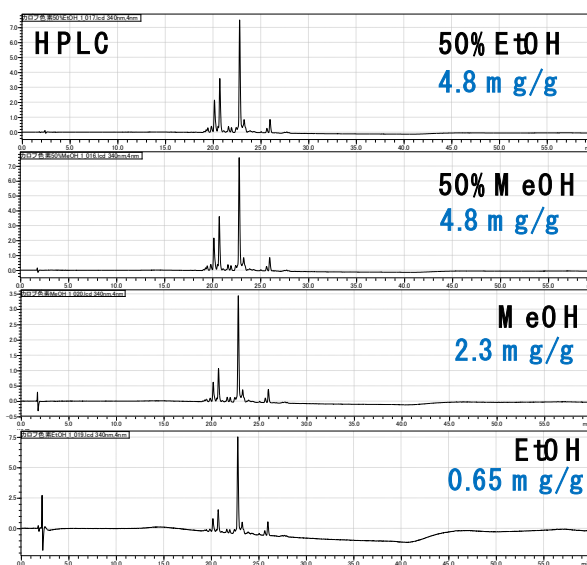
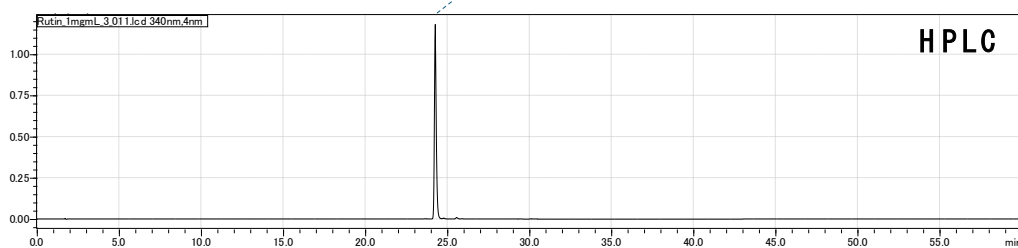
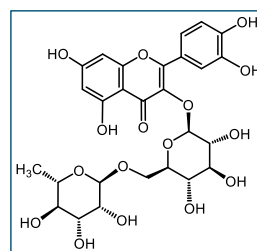
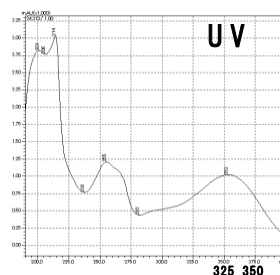


図 2. 抽出溶媒の比較

Rutin



グラジエントHPLC条件

Shimadzu Prominence システム (島津製作所カラム: L-column ODS (2.1 ID. × 150mm, 5 μm))

(化学物質評価研究機構), カラム温度: 40 °C, 流速: 0.3 mL/min, 検出: UV 340 nm,

移動相: (A) 0.1 %ギ酸 in H₂O, (B) 0.1 % in CH₃CN [濃度勾配条件 (B in A): 0→30 min (0→50 %), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85 %), 40→50 min (85→100 %)]

Rutin 3水和物に対するSchaftosideのRMS値 (n=3)

1	1.1106
2	1.1510
3	1.1363
Average	1.1326
% RSD	1.81

図 3. Rutin の HPLC クロマトグラム及び RMS 値

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7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7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した。既存添加物の「コリアンダーオイル」中の linalol の定量をコリアンダー種子、食用の種子の粉末中の定量と併せて行った。また、「香辛料抽出物」由来の既存添加物「セロリーシードオイル」の指標成分として butylphthalide を選択し、原料となるセロリ種子、香粧品用のセロリシードオイルと併せてその含有率の ^1H -qNMR 法での定量を検討した。

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対して、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7年度も引き続き既存添加物

「香辛料抽出物」に着目し、「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討した。

「香辛料抽出物」の一つである「コリアンダーオイル」中の linalol (Fig. 1)の定量を、コリアンダー種子、食用の種子の粉末中の定量と併せて行った。また、同じく「香辛料抽出物」の一つである「セロリーシードオイル」の指標成分として butylphthalide (Fig. 2)を選択し、原料となるセロリ種子、香粧品用のセロリーシードオイルと併せて、 ^1H -qNMR 法を用いてその含有率の定量を検討した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

^1H -qNMR 測定時の内部標準物質として用いる 1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_4 (BTMSB- d_4 , Fig. 3)は富士フィルム和光純薬の Trace Sure®規格のものを用いた。NMR 測定用溶媒の acetone- d_6 は Cambridge Isotope Laboratories

Inc.の 99.9 atom %D を用いた。Linalol と butylphthalide はどちらも東京化成から購入の試薬を用いた。コリアンダーオイル(管理番号 C2300)とセロリシードオイル(管理番号 C2304)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を用いた。コリアンダー種子は食用として市販されている製品 2 種を, セロリ種子はセロリ栽培用として園芸店で市販されているもの 2 種と食用として市販されているもの 2 種を, セロリシードオイルのもう 1 種の試料は香粧品用として市販されているものを, それぞれ 2025 年 4 月に購入し, 用いた。

B-2) 装置等

秤量には島津製作所の精密電子天秤 AUW120D を用いた。試料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-ECZL600 を使用した。HPLC は, ポンプとして JASCO PU-4180, カラムオーブンに Shimadzu CTO-20AC, 検出器はフォトダイオードアレイ検出器 JASCO MD-4010 を用いた。メンブランフィルターは Cosmonice Filter W 0.45 μm ϕ 13 mm を用いた。

B-3) ^1H -qNMR 法を用いたコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalol の定量

まず, linalol 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 linalol の定量を行うことにした。また, HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-3-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

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。

Linalol 標準品とコリアンダーオイルは, 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 qNMR の測定に供した。

市販のコリアンダー種子は粉末化して用いた。粉末化した種子及び粉末を購入した試料は, 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, linalol (Fig. 1) の 2 位のオレフィンプロトンシグナルが 5.66 ppm に現れることを確認した (Fig. 4)。 ^1H -qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから, linalol の 2 位のプロトンシグナルと 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 linalol の濃度を算出した。

$$C_I = (I_I / I_B) \times C_B$$

ただし, C_B , C_I はそれぞれ BTMSB- d_4 及び linalol のモル濃度 (mol/mL), I_B , I_I はそれぞれ BTMSB- d_4 及び linalol の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-3-c) HPLC を用いたコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalol の定量

HPLC は YMC-Triart C18 s-5 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い、40°C で MeCN : 0.1%リン酸-H₂O = 55 : 45, 注入量 10 µL, 流速 1.0 mL/min で溶出, 210 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った. (Fig. 5 a)

¹H-qNMR 法で定量した linalol 標準品の溶液を適宜段階希釈した液を標準液として検量線を作成した. (Fig. 6) 試料溶液として, ¹H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 10 倍に希釈した液を用いた. 試料溶液のクロマトグラムの linalol のピーク面積と検量線の関係から, 試料中の linalol を定量した. (Fig. 5)

B-4) ¹H-qNMR 法を用いたセロリシードオイル及びセロリ種子中の butylphthride の定量

セロリシードオイルに多く含まれる成分として limonen が文献的¹⁾に示されている. しかしながら香辛料抽出物のセロリシードオイル (以下, C2304) の ¹H-NMR スペクトルでは, 特徴的なシグナルがどの化合物に由来するかすぐに予測を立てることが困難であった. C2304 の TLC を展開したところ, 比較的是っきりとした UV 吸収を持つスポットが見られたことから, このスポットを示す化合物の単離同定するところから着手した.

B-4-a) C2304 中の化合物の単離同定

C2304 (約 100 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane-ethylacetate = 4 : 1) で分離した. *n*-Hexane-ethylacetate = 4 : 1 で展開した TLC で *R*_f = 0.4 付近に UV 吸収が見ら

れた画分を集めて濃縮乾固した. 得られた化合物の各種 NMR スペクトルを測定したところ butylphthlide と推定され, 市販試薬の butylphthlide と ¹H-NMR スペクトルが一致したことから, この化合物を butylphthlide と同定した. (Fig. 7) また, butylphthlide の ¹H-NMR スペクトル (CDCl₃ 中) と C2304 のそれを比較したところ, 7.3~7.9 ppm で一致するシグナルが独立して観測されることから, この butylphthlide を指標成分にできる可能性が示された. ところで, ¹H-qNMR の測定の際に CDCl₃ を用いると, 溶媒の密度が大きいため固形試料の抽出時に遠沈して上清を得るという操作が成り立たなくなる. そこで, 溶媒を acetone-*d*₆ として C2304 の ¹H-NMR スペクトルを測定したところ, butylphthlide の芳香族プロトン 4 種類は 7.3~7.6 ppm にそれぞれ独立したシグナルとして観測され, ¹H-qNMR 法での定量が可能と判断された. (Fig. 8 a,b)

B-4-b) 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.

Butylphthlide 試薬は, 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.

C2304 と香粧品用のセロリシードオイル (以下, 香粧品オイル) は約 20 mg を精秤して内部標準溶液に溶かして 2.00 mL とし, この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり ¹H-qNMR の測定に供した. セロリ種子は粉末化して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-c) ¹H-qNMR スペクトルの測定

Butylphthlide 試薬と C2304 とセロリ種子末の抽出液の ¹H-qNMR を測定したところ、芳香族水素のシグナル (4-H: 7.42 ppm, 5-H: 7.52 ppm, 6-H: 7.35 ppm, 7-H: 7.58 ppm) が独立して観測された。(Fig. 8) 積分値は、butylphthlide 試薬とセロリ種子末の抽出液のスペクトルではどのシグナルもほぼ同じ値を示したが、C2304 では 7.35 ppm のシグナル方のシグナルの約 1.3 倍となっており、他のシグナルとの重なりが推定された。一方、香粧品オイル試料の ¹H-qNMR を測定したところ、5-H と 7-H は他のシグナルとオーバーラップしていた。4-H と 6-H は独立したシグナルでほぼ同じ値の積分値を示したが、この濃度において s/n は 7 程度で非常に低く、定量は困難であると判断された。以上を勘案し、積分値が取りやすく、値のばらつきが一番小さかった一番低磁場側の 7-H (7.58 ppm) シグナルを用いて定量することにした。

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、butylphthlide の 7 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 butylphthlide の濃度を算出した。

$$C_P = (I_P / I_B) \times C_B$$

ただし、*C_B*、*C_P* はそれぞれ BTMSB-*d*₄ 及び butylphthlide のモル濃度 (mol/mL)、*I_B*、*I_P* はそれぞれ BTMSB-*d*₄ 及び butylphthlide の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-4-d) HPLC を用いたセロリシードオイル及びセロリ種子中の butylphthlide の定量

HPLC は YMC-Triart C18 s-5 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い、40°C で MeCN : 0.1%リン酸-H₂O = 0 min 50 : 50 → 30 min 70 : 30、注入量 10 μL、流速 1.0 mL/min で溶出、274 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。(Fig. 9)

¹H-qNMR 法で定量した butylphthlide 標準品の溶液を適宜段階希釈した液を標準液として検量線を作成した。(Fig.10) セロリシードオイルの試料溶液は、¹H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 5 倍に希釈、セロリ種子の試料溶液では同様に 10 倍に希釈したものをを用いた。それぞれの試料溶液のクロマトグラムの butylphthlide のピークの面積と検量線の関係から butylphthlide の含量を求めた。(Fig. 9)

C. 結果及び考察

C-1) コリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalol の定量

¹H-qNMR を用いて測定した試薬中の linalol の含有率は 89.47% だった。またコリアンダーオイル中の含有率は 69.33%、種子中の 2 試料は 0.15 と 0.17% であった。(Table 2) HPLC での測定結果でも同様の数値が観測された。いずれの試料でも ¹H-qNMR のスペクトルにおいて 2-H のシグナルが独立して綺麗に観測され、積分値も取りやすい状況であったことから、¹H-qNMR 法による linalol

の定量がコリアンダーオイルなどコリアンダー関連製品の品質管理に有効である可能性が示された。

C-2) セロリシードオイル及びセロリ種子中の butylphthlide の定量

^1H -qNMR 法において, butylphthlide の 7-H のシグナルの積分値を用いて各試料の含有率を算出した。試薬中の含有率は 89.86%だった。セロリシードオイル(C2304)中の含有率は 2.14%, 種子中の 4 試料のうち, 栽培用は 0.24 と 0.10%, 食品用のものは 0.50 と 0.38%であった。(Table 3) いずれのスペクトルでも s/n は 100 程度以上が確保され, 定量に十分なシグナル強度が示された。HPLC での測定結果でも同様の数値が観測された。

香粧品オイル試料では, butylphthlide の 4-H または 6-H のシグナルの積分値を用いて定量することも不可能ではなかったが, 今回の条件では十分な s/n は得られなかった。なお, Table 3 には 6-H のシグナルから仮に算出した含有率を記載した。HPLC から求めた含有率よりも小さな値となった。

以上のように, ^1H -qNMR 法による butylphthlide の定量がセロリシードオイルなどセロリ種子関連製品の品質管理に有効である可能性が示された。一方, 含有率が 1% を切るような低含油率のオイル(液体)製品での定量は困難であることもわかった。

D. 結論

D-1) ^1H -qNMR法をコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalol の定量

香辛料抽出物コリアンダーオイルをはじめとしたコリアンダー種子由来の製品中の linalol の含有率を, ^1H -qNMR 法を利用し, 溶

媒として acetone- d_6 , linalol の 2-H の積分値を用いて定量できることを確認した。

D-2) ^1H -qNMR法を用いたセロリシードオイル及びセロリ種子中の butylphthlide の定量
香辛料抽出物セロリシードオイルをはじめとしたセロリ種子由来製品中の butylphthlide の含有率を, ^1H -qNMR 法を利用し, 溶媒として acetone- d_6 , butylphthlide の 7-H の積分値を用いて定量できることを確認した。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Bacanak H, Dogan Z, Akkol E K, Nagatsu A, Saracoglu I, Bioactive Metabolites from Aerial Parts of *Plantago indica* L.: Structural Elucidation and Integrated In Vitro/In Vivo Assessment of Anti-Inflammatory and Wound-Healing Efficacy, *Plants*, **15**(1), 141 (2026).

2. 学会発表等

2-1. 学会

- 1) 梶本りおん, 宮崎真奈, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部 裕, 杉本直樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR)を用いた生薬バニラ及びバニラ香料中の vanillin, ethylvanillin 及び *p*-hydroxybenzaldehyde の定量, 日本食品化学学会第 31 回総会・学術大会 (2025.6) .
- 2) 瀬川ひかり, 永津明人, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹: 定量 NMR 法を用いたブラックペッパーオイル中の β -Caryophyllene の定量. 日本生薬学会第 71 回年会 (2025.9).
- 3) 梶本りおん, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直

樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR)を用いたコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalool の定量, 日本薬学会第 146 年会 (2026.3).

2-2. 講演等

なし

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

I. 参考文献

- 1) Zorga J, Kunicka-Styczynska A, Gruska R, Smigielski K, Ultrasound-Assisted Hydrodistillation of Essential Oil from Celery Seeds (*Apium graveolens* L.) and Its Biological and Aroma Profiles, *Molecules*, **25**, 5322 (2020)

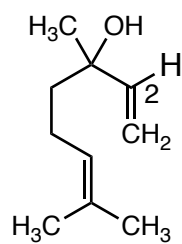


Fig. 1 Linalol の構造

2 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.

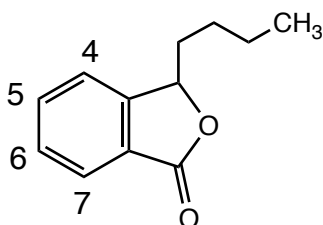


Fig. 2 Butylphthalide の構造

7 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.

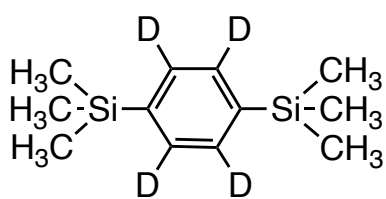


Fig. 3 定量用の認証標準物質 (BTMSB- d_4)

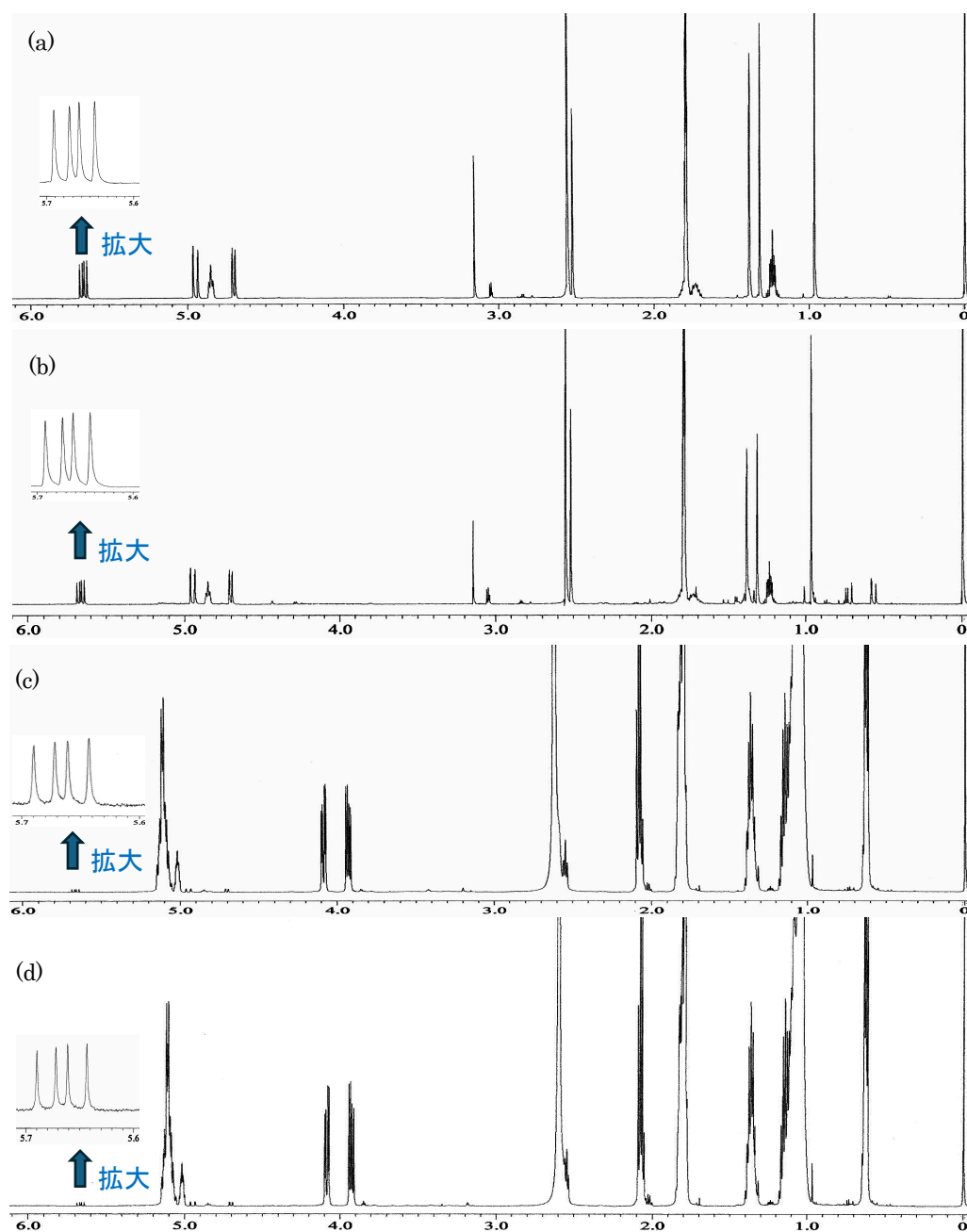


Fig. 4 Linalol 試薬, 既存添加物のコリアンダーオイル (b)と市販コリアンダー種子 A (c), B (d)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 600 MHz)
 拡大図のシグナルが2位のプロトンシグナル.

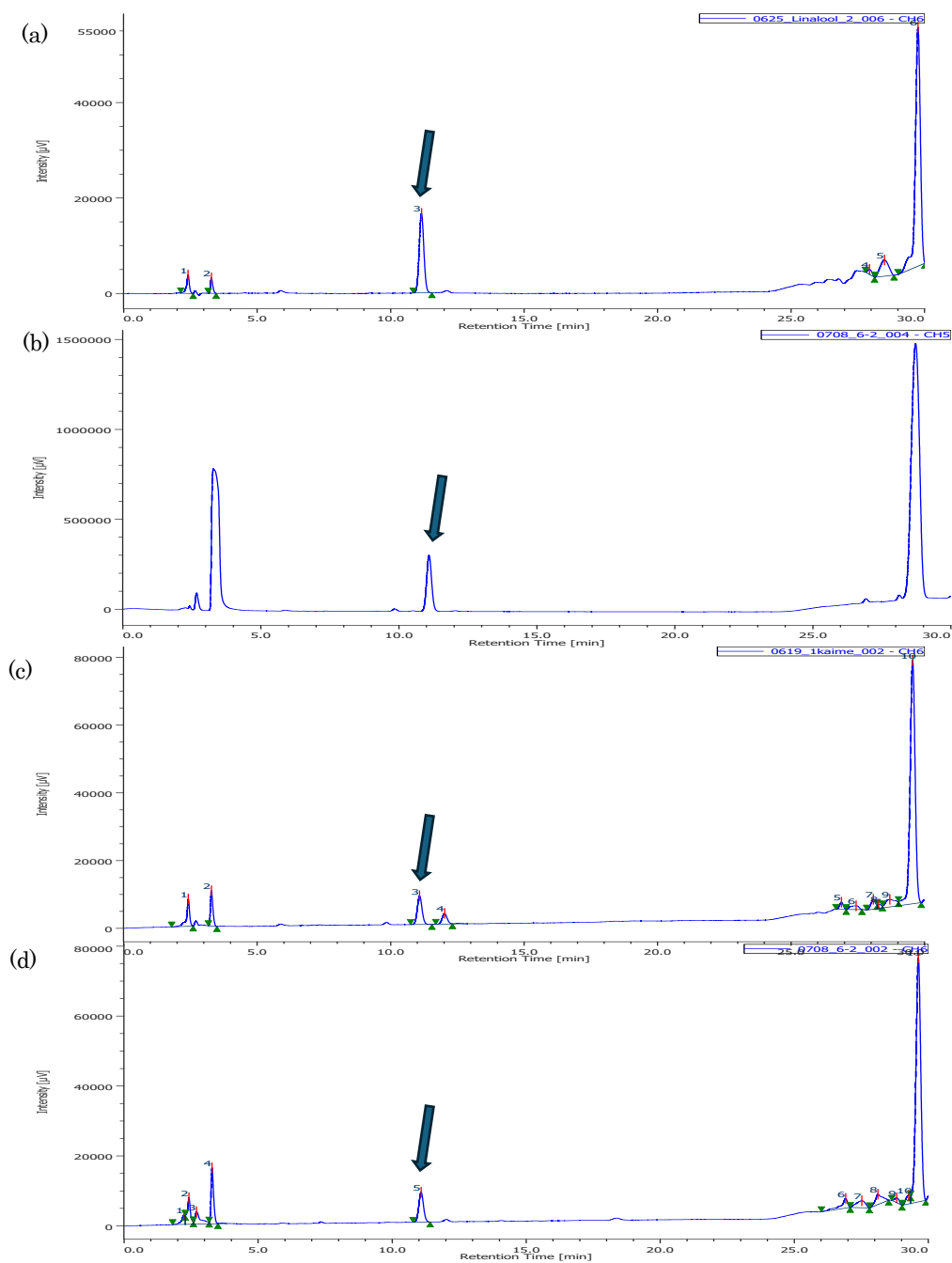


Fig. 5 Linalol 試薬, 既存添加物のコリアンダーオイル (b)と市販コリアンダー種子 A (c), B (d)の各試料の HPLC クロマトグラム

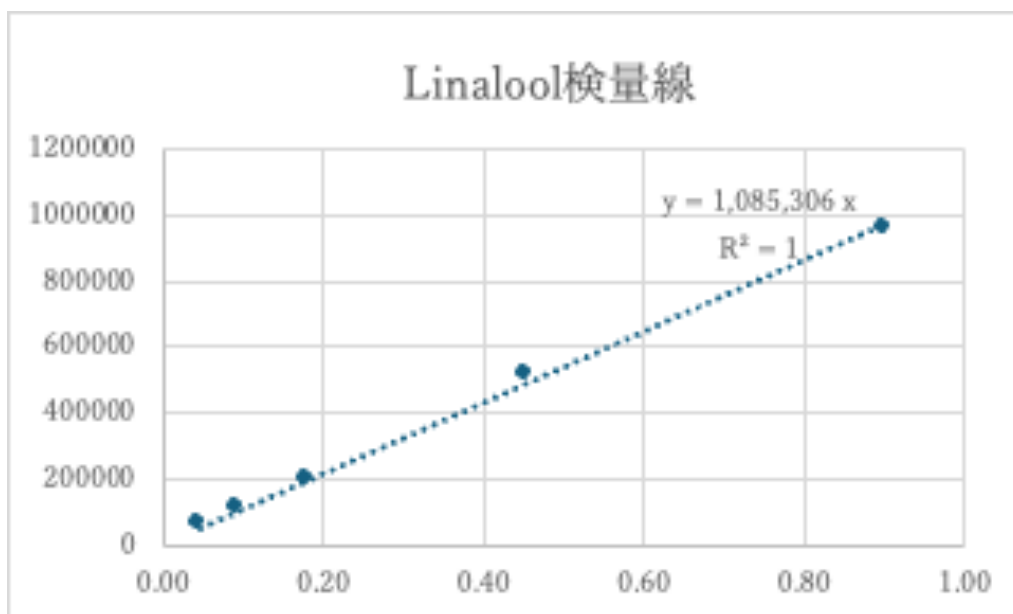


Fig. 6 HPLC における Linalol の検量線

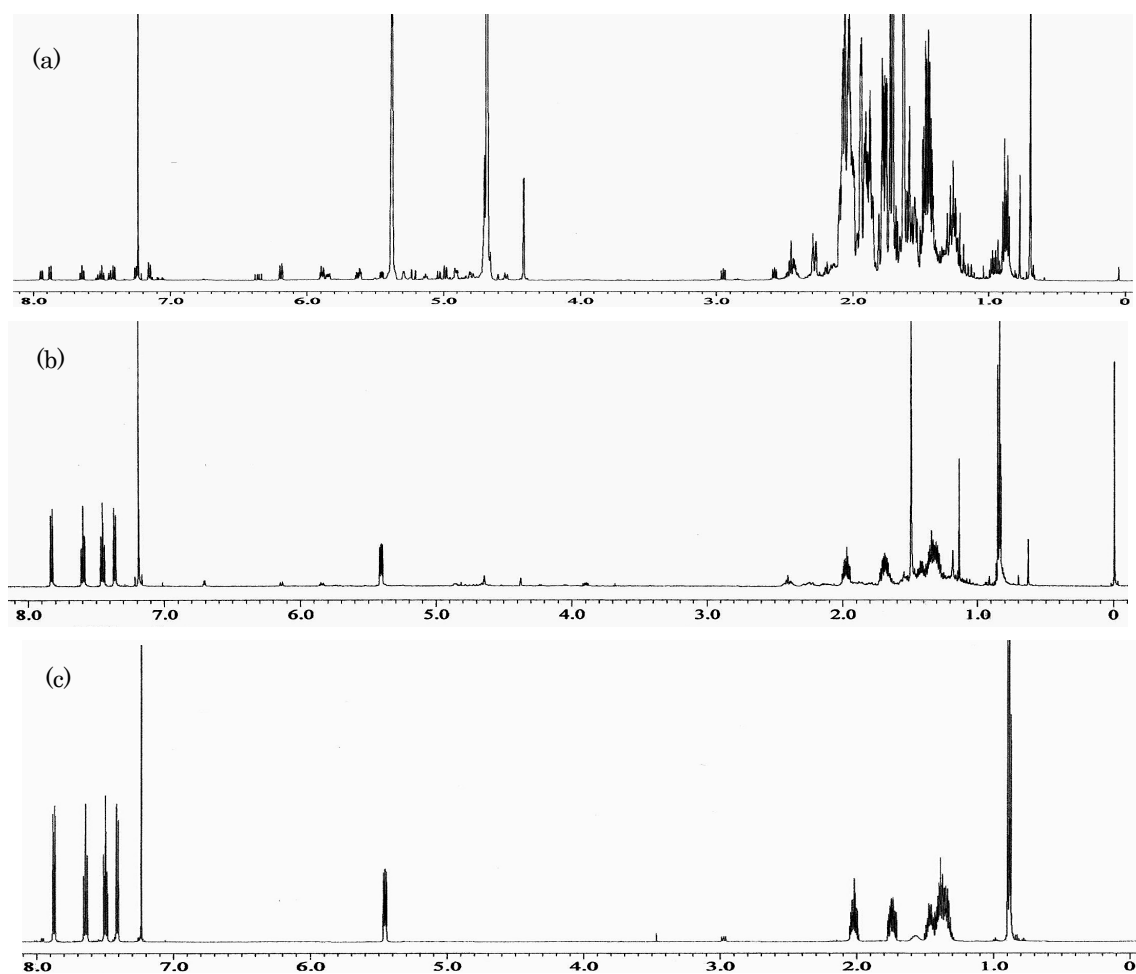


Fig. 8 既存添加物セロリシードオイル (a) , 単離された化合物(b) , Butylphthlide 試薬 (c), の ^1H -qNMR スペクトル (in CDCl_3 , 600 MHz)

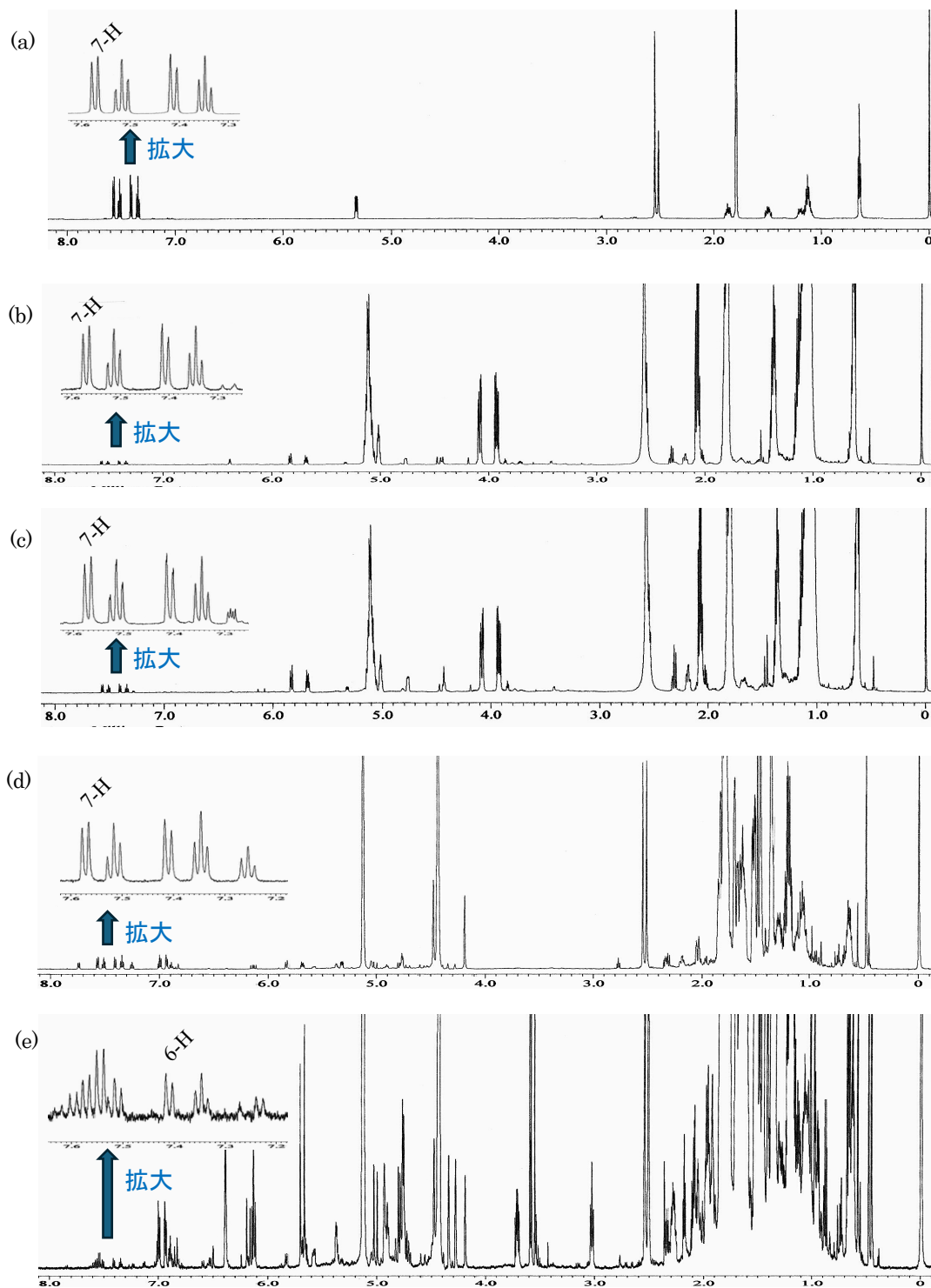


Fig. 8 Butylphthalide 試薬 (a), 既存添加物セロリシードオイル (b), 栽培用セロリ種子試料 (c), 食用セロリ種子試料 (d), 香粧品用セロリシードオイル (e)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 600 MHz)
 拡大図は芳香族のプロトンシグナル.

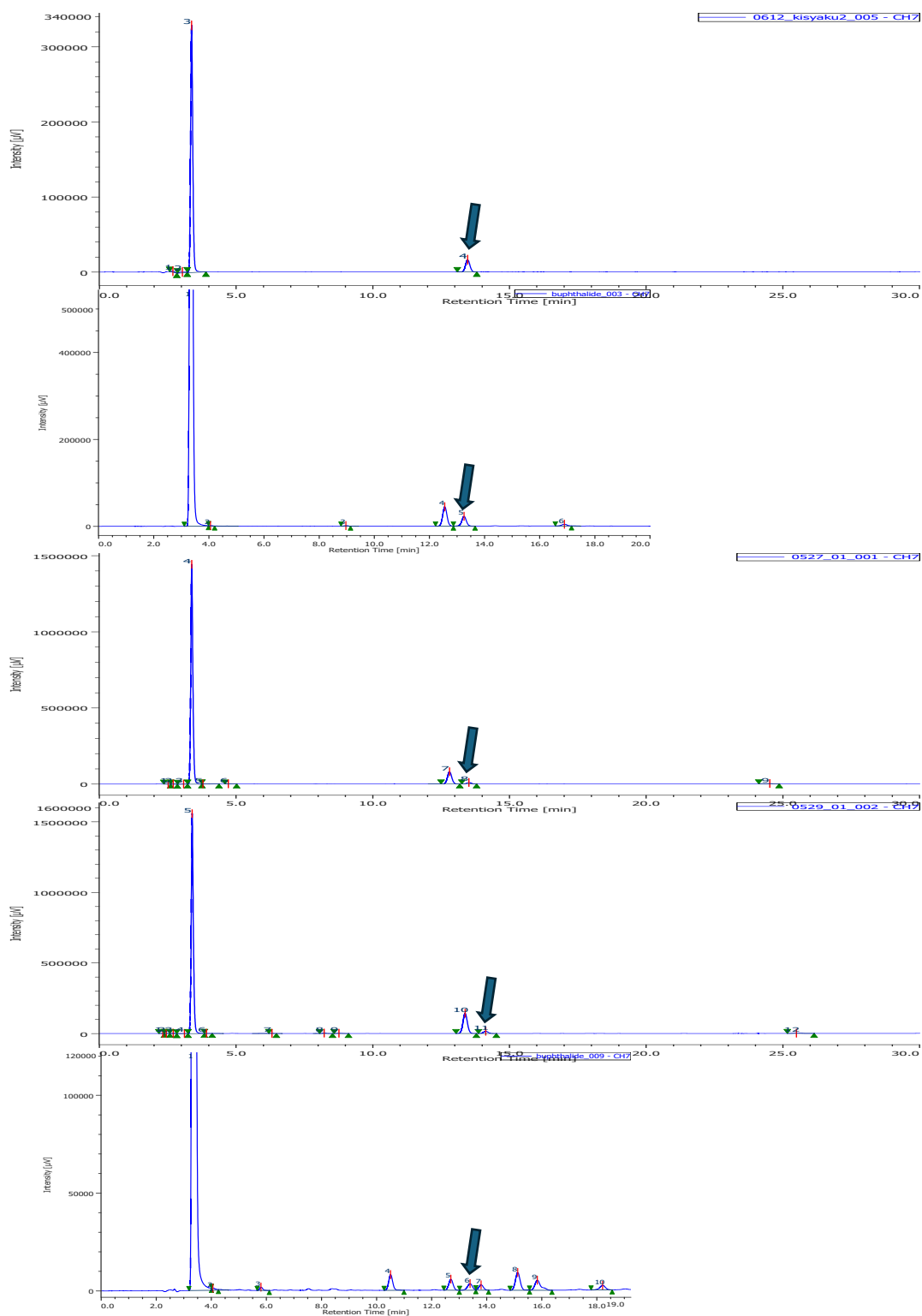


Fig. 9 Butylphthlide 試薬 (a), 既存添加物セロリシードオイル (b), 栽培用セロリ種子試料 (c), 食用セロリ種子試料 (d), 香粧品用セロリシードオイル (e)の各試料の HPLC クロマトグラム

矢印の保持時間 13.3 分付近のピークが butylphthlide のピーク

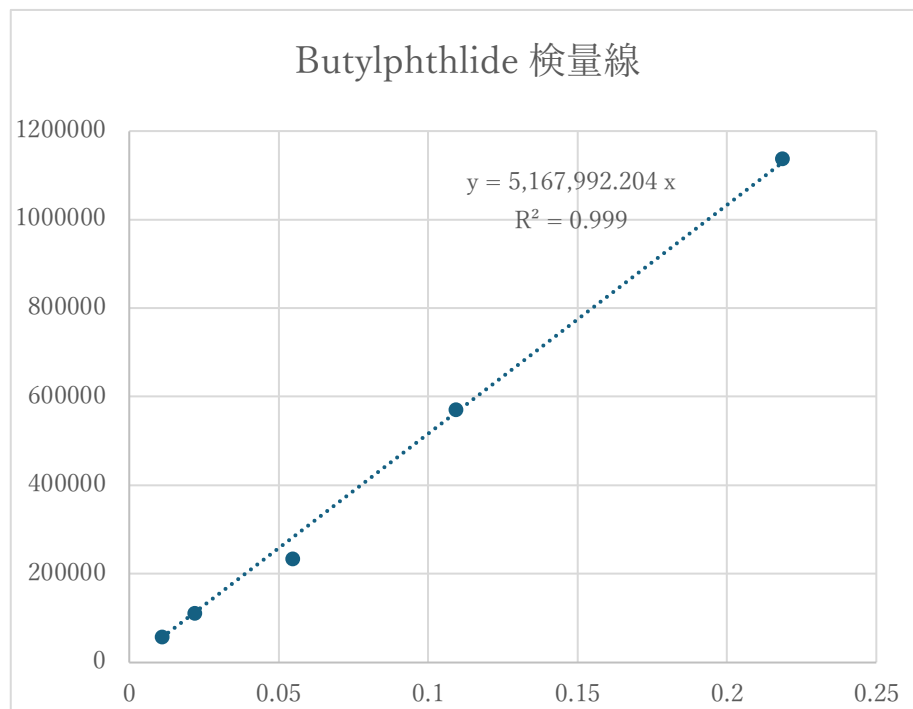


Fig. 10 HPLC における Butylphthlide の検量線

Table 1 ^1H -qNMR スペクトルの測定条件

分光計	日本電子 ECZL600
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 ^1H -qNMR 及び HPLC を用いて測定した linalol の含有率

	含有率(%)	
	^1H -qNMR	HPLC
linalool 試薬	89.47 $\pm$ 1.45	
コリアンダーオイル (C2300)	69.33 $\pm$ 0.29	68.45 $\pm$ 2.78
市販コリアンダー種子(CoS-H)	0.17 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01
市販コリアンダー種子(CoS-Sb)	0.15 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.01

Table 3 ^1H -qNMR 及び HPLC を用いて測定した butylphthalide の含有率

	含有率 (%)	
	^1H -qNMR	HPLC
Butylphthalide 試薬	89.86 $\pm$ 0.63	
セロリシードオイル (既存添加物) (C2304)	2.14 $\pm$ 0.03	2.28 $\pm$ 0.01
セロリ種子 (栽培用) (CeSP-25T)	0.24 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01
セロリ種子 (栽培用) (CeSP-25Sa)	0.10 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.00
セロリ種子 (食品) (CeSF-25Sb)	0.50 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.00
セロリ種子 (食品) (CeSF-25G)	0.38 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.01
セロリシードオイル (香粧品) (CO2504)	(0.28 $\pm$ 0.06)	(0.36 $\pm$ 0.02)

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7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、フィコシアニンを中心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、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、安全性確保のため、より適切な成分規格を策定していく必要がある。公定書には確認試験として、定性手法が定められている。昨年度の研究において、主成分であるフィコシアニンに着目し、その発色団の構造を酵素消化法によって解析した。本消化法により、スピルリナ色素で良好なピークを認めた一方で、その精密質量を計測した場合、フィコシアノビルンとは約2 Da異なる分子量となり、正確な構造同定までには至らなかった。本年度の研究では、この違いが測定処理時に発生したものか、サンプル自体の特性かを解析する目的で、トリプシン消化による消化を試みた。得られた試料は液体クロマトグラフィー-高分解能質量分析装置で測定し、フィコシアノビルン結合シーケンスを確認することができた。

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(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ン(PCB)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。

そこで本研究では、定性・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測定法の開発を目指した。定性・定量の対象物質としては、スピルリナ色素の主成分であるPYCとした。令和6年度の検討において、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))の市販青色素に関して、アミノ酸1残基レベルまで酵素消化を行う手法を検討した。すなわち、PCB結合型Cysレベルまで酵素消化を行い、そのピークの吸収波長と精密質量を計測した。その結果、スピルリナ色素製品1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

ピークが観測され、特に保持時間 6 分付近に高強度なピークを得た。この成分のもののアイソトピックな m/z は 706.2921 $[M+H]^+$ であり、PCB で予測される m/z 708.3066 よりも約 2 Da 小さく検出された。PCB はジヒドロビリベルジンを経て、不飽和炭素が還元されて得られるものとされており、上記の結果からは処理中に酸化が生じた可能性が示唆され、その判別が付けられなかった。そこで今年度の検討としては、PYC 含有製剤について、温和な条件下でトリプシン消化を行い、LC-四重極飛行時間型質量分析計 (QToF/MS) を用いてペプチドシーケンス解析を実施した。PYC の配列情報と照らし合わせ、PCB 結合断片の配列について詳細に解析した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

スピルリナ色素には市場より購入したものをを用いた。

アセトニトリル(HPLC 用), メタノール(HPLC 用), ギ酸(LC/MS 用, 約 99%), トリフルオロ酢酸(TFA, LC/MS 用), 尿素(試薬特級)及び重炭酸アンモニウム(試薬特級), Tris HCl(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。ジチオスレイトール(DTT, 試薬特級)及びヨードアセトアミド(IAA, 試薬特級)はナカラitek社製のものをを用いた。トリプシン消化にはカートリッジ製である MonoSpin Trypsin を採用し、GL Sciences 社から購入した。消化後の脱塩には同社製の MonoSpin C18 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 G2 XS

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

還元的アルキル化に用いる試薬の調製

溶解溶液 1：50 mmol/L 重炭酸アンモニウム-
2 mol/L 尿素溶液を超純水により調製した。

DTT 溶液：溶解溶液 1 を用いて DTT の 50
mmol/L 溶液を調製した。

IAA 溶液：溶解溶液 1 を用いて IAA の 50
mmol/L 溶液を調製した。

還元的アルキル化未実施検体（未還元）：1
mg/mL の PYC 溶液（50 mmol/L 重炭酸アンモニウム-
2 mol/L 尿素にて溶解）を調製し、400 μ L
を消化に供した。

還元的アルキル化実施検体（還元）：4 mg/mL
の PYC 溶液（溶解溶液 1 にて溶解）を調製し、
100 μ L を分取した。そこに DTT 溶液 25 μ L を
加えて、37°C で 30 分間反応させた。その後、
IAA 溶液の 75 μ L を加えて、遮光下で 37°C、30
分間反応させた。得られた溶液を 50 mmol/L の
重炭酸アンモニウム溶液で希釈し、全量を消化
に供した。

酵素消化条件

MonoSpin Trypsin にて下記のプロトコールに
従い実施

平衡化：50 mmol/L の重炭酸アンモニウム溶
液 500 μ L を通液（2000 $\times$ g, 1 分間）

試料ロード：2000 $\times$ g, 1 分間

反応：37°C で 60 分間

溶出：50 mmol/L の重炭酸アンモニウム溶液
500 μ L（サンプル溶液）を通液（2000 $\times$ g, 1 分
間）

MonoSpin C18 にて脱塩

脱塩条件

平衡化：アセトニトリル 200 μ L 及び 0.1%TFA

200 μ L を通液 (各 2300 $\times$ g, 1 分間)
保持: サンプル溶液 200 μ L に 0.1%TFA を 600 μ L 添加して全量をチャージ (2300 $\times$ g, 2 分間)
洗浄: 0.1%TFA の 200 μ L を通液 (2300 $\times$ g, 3 分間)
溶出: 60%アセトニトリル溶液の 200 μ L を通液 (2300 $\times$ g, 2 分間)
溶出液を濃縮乾固し, 5%アセトニトリル溶液の 100 μ L で再溶解し, 測定サンプルとした。

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 μ 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 μ m, YMC 社製)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 0.4 mL/min

還元的脱アルキル化の必要性に係る検討時のグラジエント条件 B% (min): 10(0)-10(0.5)-80(15)-98(15.1)-98(16)-10(16.1)-10(18.5)

本解析時のグラジエント条件 B% (min): 5(0)-5(0.5)-40(45)-98(45.1)-98(46.5)-5(46.6)-5(50)

検出波長: 620 nm

注入量: 5 μ L

C. 結果及び考察

C-1) トリプシン消化断片の LC-MS 解析

スピルリナ色素含有製品 A を用いて, 酵素消化に関する検討を行った。PCB はシステイン(Cys)に結合した状態で PYC 中に保持されていると知られている (図 1)。図 2 に, *Arthrospira platensis* 由来の PYC に関するアミノ酸配列を示した (UniProt より取得)。PYC のアミノ酸配列の中には, PCB 非結合型 Cys が α 鎖で 1 個, β 鎖で 2 個存在することが分かる。これらがジスルフィド結合を形成している可能性が考えら

れたため, 還元的アルキル化の必要性を検討する目的でその有無を比較した。結果, 得られた HPLC-UV 及びトータルイオンクロマトグラムを図 3-(a)及び(b)に示す。また, 図 3-(c)には検出されたペプチド断片に関して, その絶対イオン強度の相関を還元的アルキル化の有無でまとめた。いずれにおいても大きくクロマトグラムのパターンは変わっておらず, 各イオンのイオン強度は $R^2=0.97$ でほぼ相関していた。また, 未消化の PYC はその溶出位置にピークを認めなかった。以上の結果から, 還元的アルキル化の有無は消化効率に大きな影響を及ぼさないと考えられた。従って, サンプル固有の特性を検出することを期待し, 次の解析を実施した。

図 4-(a)及び(b)には, 保持を増加させた系にて LC-PDA 及び LC-QToF/MS 分析を行った結果を示す。検出波長 620 nm において溶出時間 25 分及び 30 分周辺に二つの主ピークを認め, それぞれ対応する位置に MS クロマトグラム上のピークを検出した。この関連イオンの抽出クロマトグラム及びMSスペクトルを図 5-(a)及び(b)に示す。25 分周辺のイオンは $[M+H]^+$ のモノアイソトピック m/z で 935.4476 に検出された。30 分周辺のイオンは $[M+H]^+$ のモノアイソトピック m/z で 1250.6126 に検出された。いずれのイオン種も 3 価までのイオンが良好に検出された。それぞれのピークをデコンボリューションし, MS/MS 解析を行った結果を図 6-(a)及び(b)に示す。これらのペプチドには, 共通して m/z 587.2851 のフラグメントイオンが認められ, これは PCB に由来するフラグメントイオンの m/z に相当すると考えられた。アミノ酸配列の b/y 帰属を行った結果を図 7-(a)及び(b)に示す。

以上の結果から, 昨年度の検討で考えられたジヒドロビリベルジンは, 強酸性を含む過激なタンパク消化条件による前処理において生じた可能性が考えられた。一方で, 本年度開発した温和なトリプシン消化による方法では, 既報にそぐわない結合位置に PCB として検出されることが明らかとなった。

D. 結論

本研究では、市販のスピルリナ色素に含まれる色素タンパク質が PYC であり、その発色団が PCB の構造をとっていることを確認する目的でトリプシン消化による解析を実施した。その結果、LC 分析においては検出波長 620 nm で 2 本の特徴的なピークが観察され、ESI-positive モードで m/z 935.4476 及び m/z 1250.6126 のイオンを与えた。発色団のフラグメントイオンは m/z 587.2851 として認められ、これは PCB の理論値と近似した値をとった。以上から、昨年度認められたジヒドロビリベルジンに由来すると考えられるピークは、強酸性を含む過激なタンパク消化条件による前処理において生じた可能性が考えられた。以上から、これらの断片を指標とすることで、スピルリナ色素含有製品に関する高度な定性分析が可能と考えられる。

一方で、以下の課題は依然として解決する必要がある。

①PYC は生物性タンパク質であるため、その種や株の差によっては PCB 結合領域周辺のアミノ酸配列が異なる可能性がある。現状のターゲット同定では、これらの差に対応することが出来ない。

②市販のスピルリナ含有製品は、ビタミン類をはじめとして他にも多数の成分を含む。これらが混入している状態で、PYC 由来断片を高感度に測定できるか不明である。

以上を検証する目的で、① m/z 587 を識別イオンとしたプロダクトイオンスキャンによるスクリーニング解析法の開発、②市販のスピルリナ含有製品への適用可否及び高感度化に向けた前処理条件最適化を引き続き実施していく予定である。

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
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

フィコシアニン: $\alpha\beta$

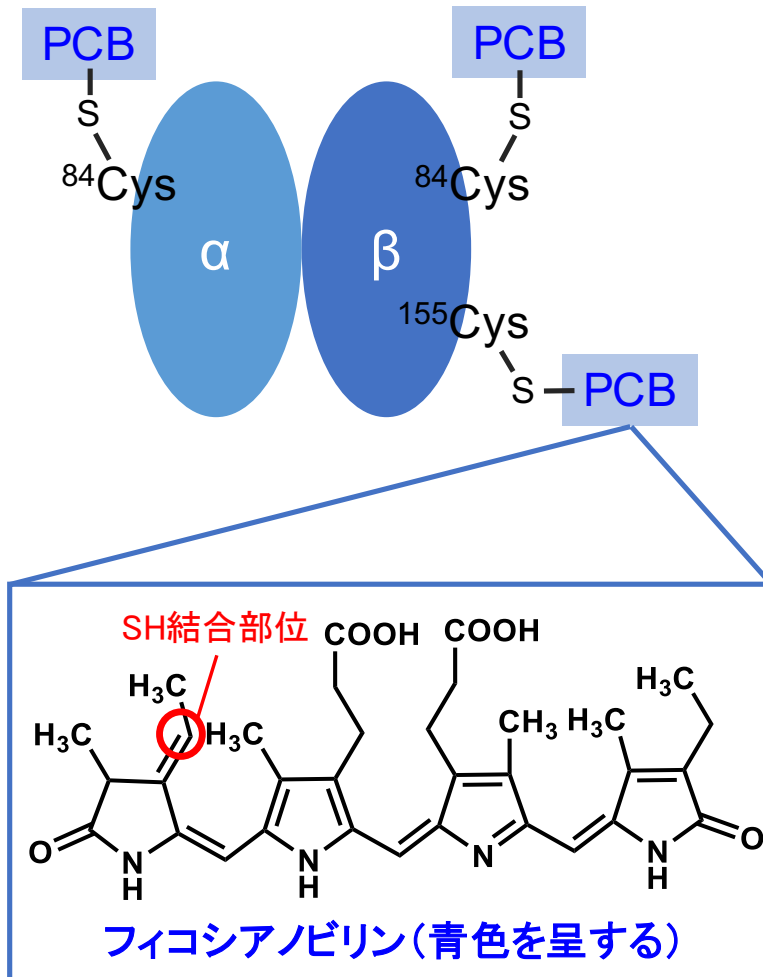


図 1. 分析対象物質 PYC の構造

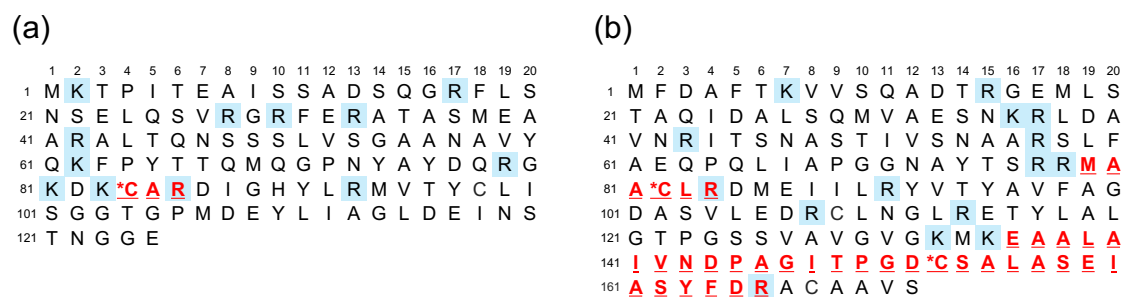


図 2. PYC のアミノ酸配列

(a) α 鎖(Q6RX70), (b) β 鎖(P72508). いずれも *Arthrospira platensis* 由来. *: PCB 結合が知られている Cys 残基, 青ハイライト: トリプシン消化の対象アミノ酸, 赤字: PCB 結合位を含む消化ペプチド

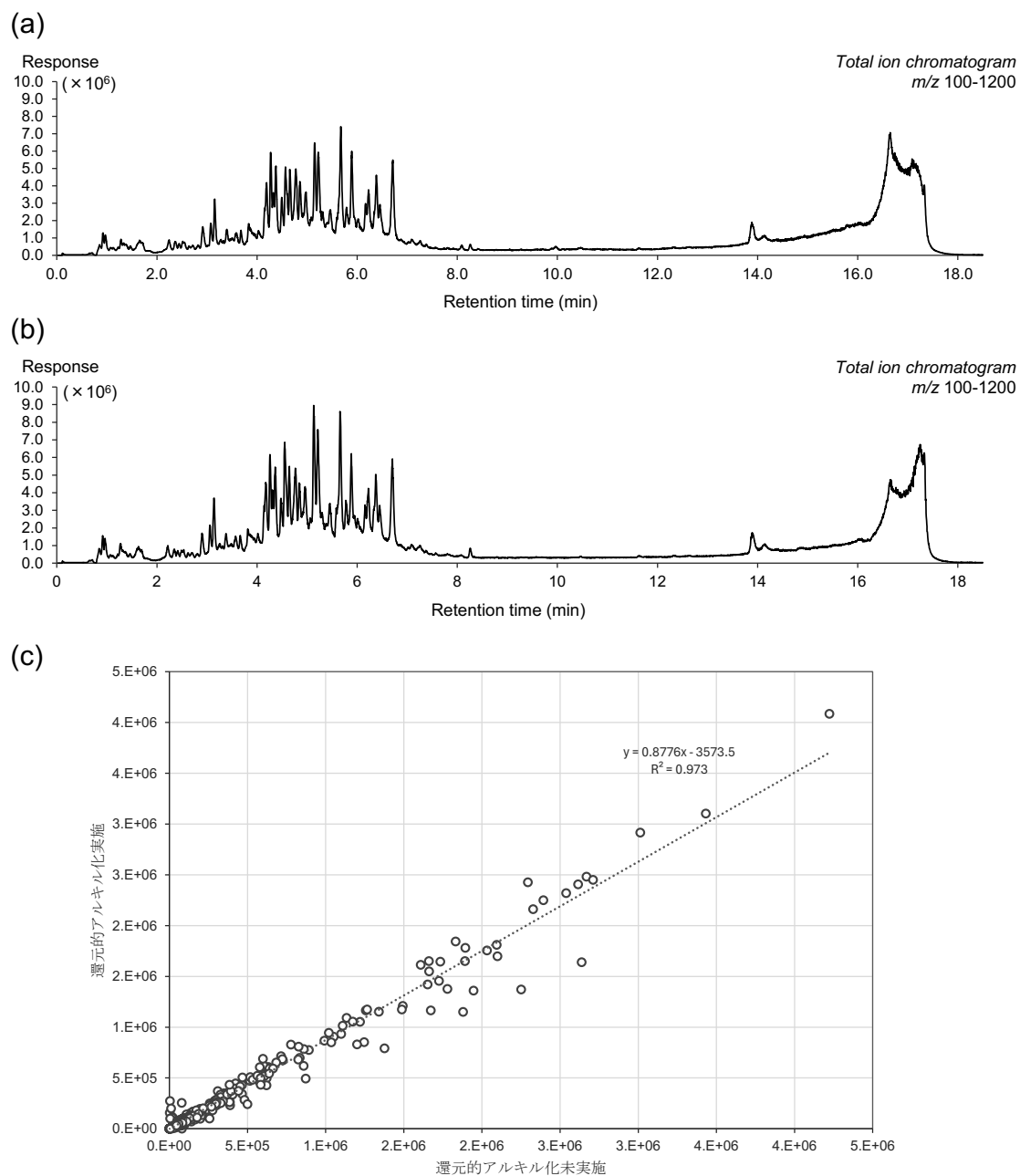


図 3. トリプシン消化断片のトータルイオンクロマトグラム及び MS 解析結果

(a) 還元的アルキル化ありのクロマトグラム

(b) 還元的アルキル化未実施のクロマトグラム

(c) ピーク強度の相関性図

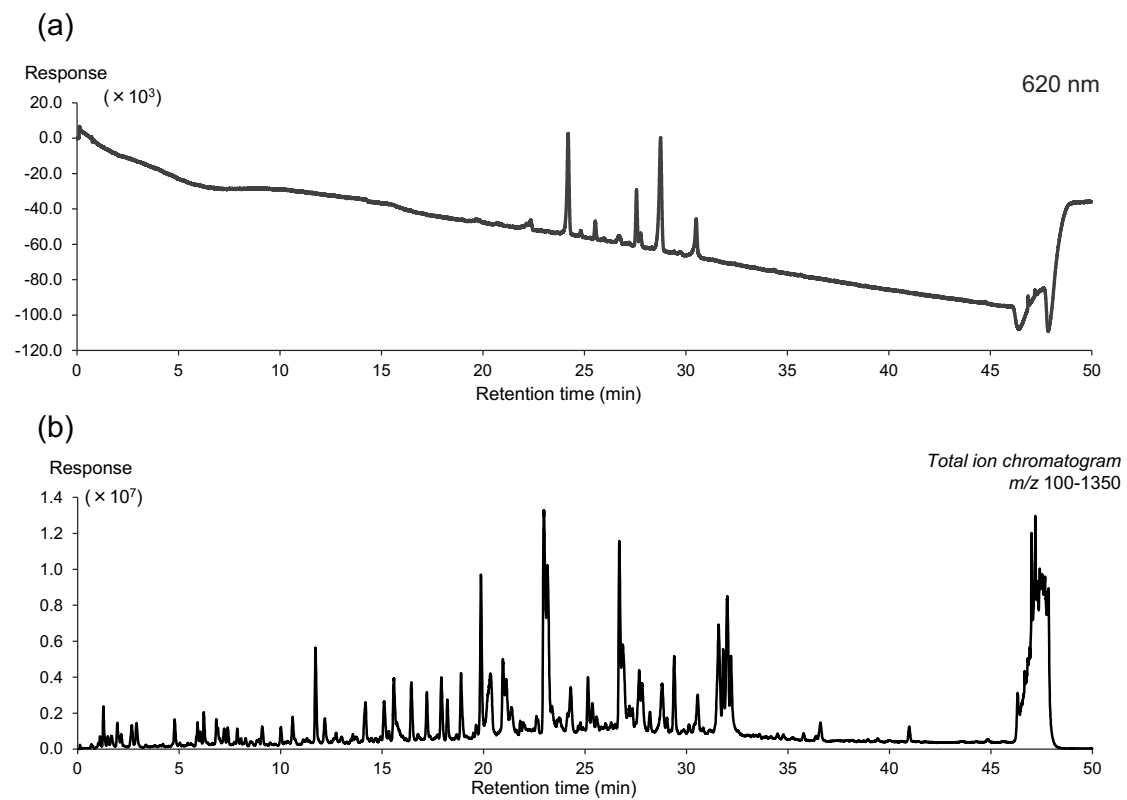


図 4. ペプチドシーケンス解析に供したクロマトグラム

(a) HPLC-UV のクロマトグラム (検出波長 620 nm)

(b) トータルイオンクロマトグラム

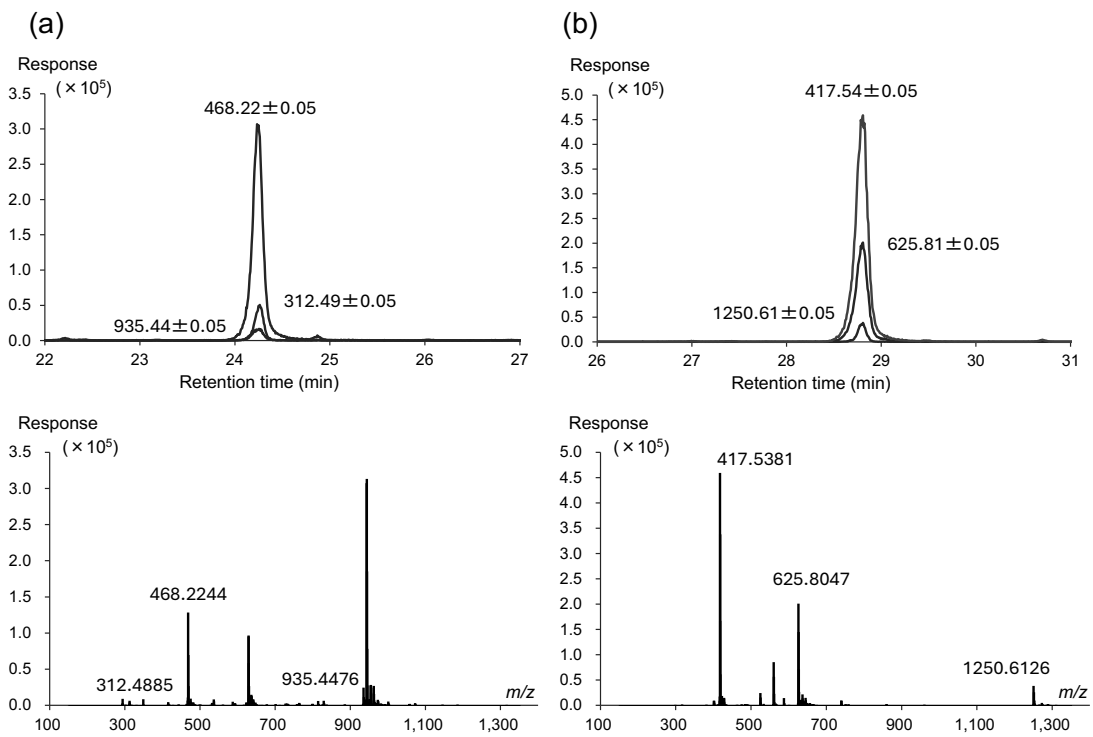


図 5. PCB 結合断片の抽出イオンクロマトグラム及び MS スペクトル

(a) $C_{PCB}LR$ 配列の結果

(b) $MAAC_{PCB}LR$ 配列の結果

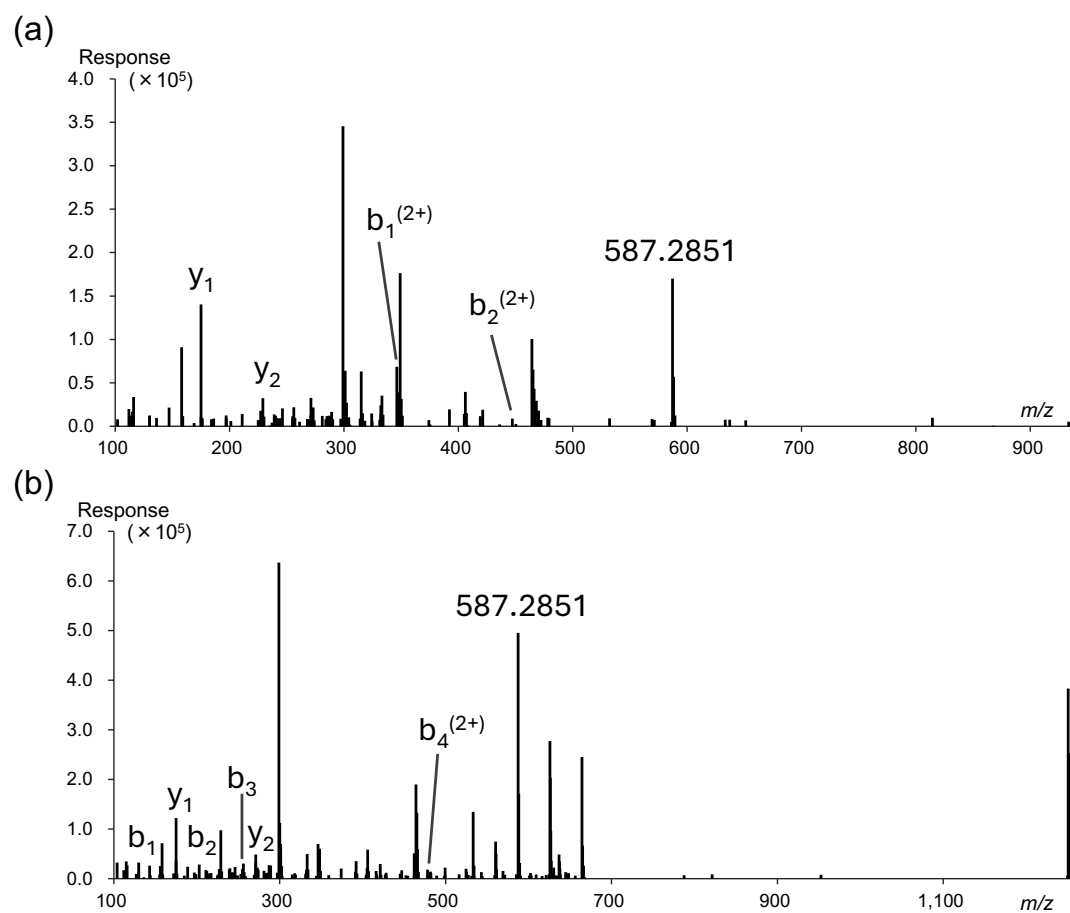


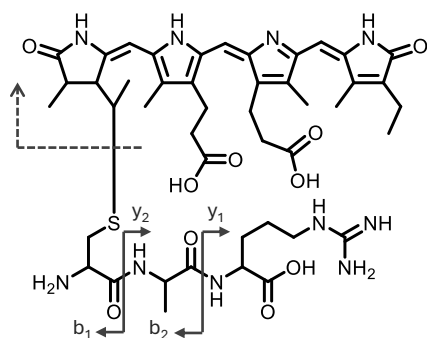
図 6. PCB 結合断片の MS/MS スペクトル

(a) C_{PCBLR} 配列の MS/MS スペクトル

(b) $MAAC_{PCBLR}$ 配列の MS/MS スペクトル

MSDIAL (ver 230923.01)によりデコンボリューションを行い出力

(a)



(b)

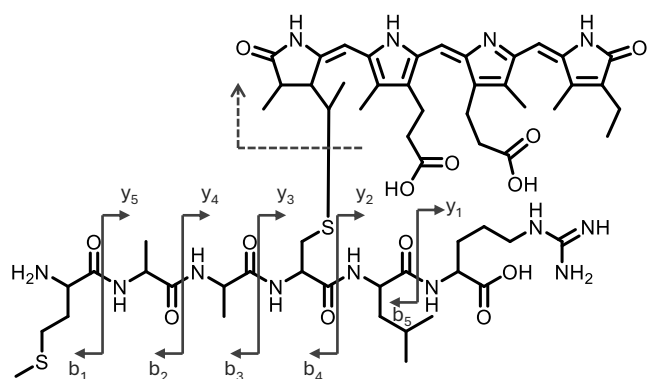


図 7. PCB 結合断片のペプチドシーケンス解析

(a) C_{PCB}LR 配列

(b) MAAC_{PCB}LR 配列

点線は PCB フラグメントに相当し、理論値は 587.2869

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7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 本研究はシアニジン 3-グルコシド塩化物(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ことを目的に3年計画で実施した。昨年度までに検討した推奨測定溶媒を用いて市販 Cy3G・Cl 7 試薬の qNMR 純度を算出したところ、試薬間で純度は 61.4%～93.7%と大きく異なっていた。また、試薬ラベルに表示された HPLC 純度と一致するものではなく、いずれも qNMR 純度より高値に見積もられていた。各試薬を用いて HPLC 絶対検量線を作成したところ、検量線傾きのばらつきは RSD 15%であった。一方、qNMR 純度で補正した濃度に基づき再作成した絶対検量線では、傾きのばらつきは RSD 2%まで収束した。qNMR 法以外の方法として、イオンクロマトグラフィーにより塩化物量を定量し、Cy3G・Cl 純度へ換算する手法についても検討した。しかし、本法は Cy3G⁺と Cl⁻が等量で塩化物化されている場合に限り成立するものであり、塩化物化過程において過剰の Cl⁻が残存する場合には、純度が実際よりも大きく見積もられる結果となった。以上より、qNMR はアントシアニンの純度評価に有用であることが示さ

A. 研究目的

アントシアニンは、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り、フラボノイド系の植物色素に分類される。アントシアニンは橙から赤、紫色の色調を呈し、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」の主成分はいずれも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)に依存して色調が変化する点である。これは、アントシアニジンの分子構造が pH に応じて変化するためである。中性からアルカリ性条件下では徐々に分解して退色するが、酸性条件下ではフラビリウムイオン型構造をとり、最も安定となる。そのため、アントシアニンの市販標準品は、フラビリウムイオン型(カチオン)に対して塩化物

イオン(アニオン)が対イオンとして存在する塩化物の形で販売されている(図 1)。

これらの市販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から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市販標準品は流通していない。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的とした。

アントシアニンは溶液の pH に応じて構造が変化するため、qNMR による純度評価においては、測定溶媒を強酸性とし、アントシアニンを安定なフラビリウムイオン型へ完全にシフトさせることが重要である。

1 年目は、シアニジン 3-グルコシド塩化物(Cy3G・Cl)をモデル化合物として用い、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。2年目は、推奨溶媒に Cy3G・Cl を溶解し、qNMR 測定を実施した。外部標準法(EC-qNMR)及び内部標準法(IC-qNMR)の両手法で得られた Cy3G・Cl の純度値はほぼ同等であった。この結果から、推奨溶媒中において qNMR 用基準物質として用いたジメチルスルホン(DMSO₂)が分解する可能性は低く、qNMR で Cy3G・Cl の正確な純度値を算出できると判断した。

本年度は、これまでに得られた知見を基に、Cy3G・Cl 市販試薬を対象として EC-qNMR による純度評価を実施することとした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

試料として用いた Cy3G・Cl 市販試薬 7 種は、7 社の試薬会社から購入した。

外部標準(EC:External Calibrant)には、CRM であるジメチルスルホン(DMSO₂)(Cat No 048-33271, 99.9%mass fraction, 富士フイルム和光純薬)を用いた。NMR 用重溶媒には、重水(D₂O)(Cat No 047-34243, 富士フイルム和光純薬)、重メタノール(CD₃OD)(Cat No 138-18703, 富士フイルム和光純薬)、重トリフルオロ酢酸(TFA-*d*)(Cat No DLM-46-10×0.75, CIL)を用いた。塩化物イオン標準液は、富士フイルム和光純薬製(Cat No 038-16153(1004mg/L(20°C)))を用いた。

その他の試薬及び溶媒は、特級または高速液体クロマトグラフ用を使用した。

B-2) EC-qNMR 測定

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。

あらかじめ試料、試薬、容器を秤量環境になじませるため、秤量操作の 1 時間前に秤量環境に静置した。5%TFA-*d* 含有 CD₃OD と 5%TFA-*d* 含有 D₂O を 9:1 で混合した液を qNMR 用重溶媒とした。

ウルトラマイクロ天秤を用いて、白金ボートに試料約 5 mg を精密に量り取り、qNMR 用重

溶媒 1.0 mL を加えて溶解させたものを NMR 用試料液とした。別に、白金ボートに DMSO₂ 約 2 mg を精密に量り取り、qNMR 用重溶媒 2.0 mL を加えて溶解させたものを外部標準液(EC1)とした。EC1 1.0mL と qNMR 用重溶媒 1.0mL を混合して EC2 とし、さらに EC2 1.0mL と qNMR 用重溶媒 1.0mL を混合して EC3 とした。

NMR 用試料液及び外部標準液 0.6 mL をそれぞれ 5 mm NMR 試料管に移し、トーチバーナーで封管して qNMR 分析に付した。NMR 試料管をプローブに挿入し、25°Cで10分間平衡化した。シムを自動調整し、¹H 及び ¹³C に対するプローブのチューニングとマッチング(T&M)を行った後、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 試料管ごとに固有の 90PW(¹H)を算出し、この 90PW を以下の qNMR 測定条件に反映させて測定を行った。

レシーバーゲイン: 30, 照射中心: 5ppm, 観測幅: 15ppm, 取り込み時間: 4.5 s, 遅延時間: 60 s, 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(取り込み時間のみ)。

取得した FID に対して窓関数の設定を外し、ゼロフィルによりポイント数を 4 倍に増やした。フーリエ変換後、位相及びベースラインを補正し、¹H qNMR スペクトルとした。このスペクトル上のシグナルを積分し、式 1 及び式 2 を用いて Cy3G 塩化物の絶対純度を算出した。定量には 4 位のシグナルを用いた。

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

$$P_A = molC_A \times MW_A/massC_S \times 100\% \quad \text{式2}$$

ここで、*molC*: モル濃度(mol/L), *I*: シグナル面積, *H*: プロトン数, *P*: 純度(%), *MW*: 分子量(g/mol), *massC*: 濃度(mg/mL), *A*: 分析種(Cy3G・Cl), *B*: DMSO₂ (EC1~EC3), *S*: Cy3G・Clの試料採取量。

B-3) イオンクロマトグラフィー電気伝導度検出(IC-CD)分析

NMR 用試料液の残りから Eppendorf

Multipette を用いて 0.1 mL を正確に量り取り、100 mL メスフラスコに入れ、超純水で定容し、IC-CD 測定用試料液とした。

塩化物イオン標準液(1000 ppm)を Eppendorf Multipette を用いて 1.0 mL 正確に量り取り、500 mL メスフラスコに入れ、超純水で定容し、2000 ng/mL 検量線用標準液とした。順次、超純水を用いて 1:1 希釈を繰り返し、1000, 500, 250, 125 ng/mL 標準液を調製した。試料液及び標準液は定容後速やかにプラスチック製専用バイアルに共液洗いして移し、以下の条件に従って分析を行った。

装置:電気伝導度検出器イオンクロマトグラフ(DionexTM IntegrionTM RFIC, Thermo Scientific 製), トラップカラム: DionexTM IonPacTM ATC-HC 500, 溶離液ジェネレーターカートリッジ: DionexTM EGC 500 KOH Cartridge, カラム: DionexTM IonPacTM AS17-C RFICTM(2 mm×250 mm), サプレッサー: DionexTM DRS 600(2 mm), カラム温度: 35°C, 流速: 0.25 mL/min, 注入量: 25 µL (フルループ注入), サンプラー温度: 10°C, 分離条件: KOH 1 mM (0–3 min)→12 mM (10 min)→35 mM (14–20 min), サプレッサー電流: 22 mA, Cl⁻ 検量線濃度: 125, 250, 500, 1000, 2000 ng/mL。

B-4) 高速液体クロマトグラフィーフォトダイオードアレイ検出(LC-PDA)分析

調製した NMR 用試料液の残液から Eppendorf Multipette を用いて 0.1 mL を正確に量り取り、20 mL メスフラスコに入れ、5%ギ酸/5%ギ酸含有アセトニトリル混液(9:1)で定容した(200 倍希釈)。順次、5%ギ酸/5%ギ酸含有アセトニトリル混液(9:1)を用いて 1:1 希釈を行い、400 倍、800 倍希釈液を調製し、LC/PDA 測定用試料液とした。以下の条件に従って分析を行った。

装置: ACQUITY UPLC-PDA システム(Waters 社製), カラム: ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm×100 mm, 1.7 µm), 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40 °C, 移動相: 5%ギ酸/5%ギ酸含有アセトニトリル, 分離条件: 95:5 (0–1

min)→60:40 (10 min)→20:80 (12 min)→95:5 (12.1–15 min), 注入量: 2 µL, 測定波長: 520 nm。

C. 結果及び考察

C-1) Cy3G・Cl 試薬の qNMR 及び IC-CD 純度

アントシアニンを qNMR 測定するための推奨溶媒として、5%TFA-*d* 含有 CD₃OD/D₂O (9:1)を用い、市販 Cy3G・Cl 7 試薬の純度評価を実施した。その結果、Cy3G・Cl 7 試薬の qNMR 純度値は 61.4%~93.7%と製造元により大きく異なっていた(表 1)。なお、試薬 1, 3, 5, 7 については HPLC 純度値がラベル表示されていたが、いずれの試薬においても qNMR 純度値と HPLC 純度値は一致しなかった。

次に、IC-CD を用いて Cy3G・Cl 中の Cl 含量を定量し(図 2)、この Cl 含量を Cy3G・Cl として換算した含量(以下、IC-CD 純度)を表 1 に示した。その結果、試薬 2~4 及び 7 については qNMR 純度と IC-CD 純度との間に良好な一致が確認できた。一方、試薬 1 及び 6 では、IC-CD 純度値が qNMR 純度値よりもそれぞれ 14.7%, 69.3%高い値を示した。一般に、アントシアニン試薬はフラビリウムイオン型で精製された後に塩化物化されるが、これらの試薬では塩化物化の過程において過剰の Cl⁻が残存した可能性が考えられた。すなわち、Cl⁻含量に基づく換算値が実際の Cy3G 含量を過大評価している可能性がある。また、試薬 5 については IC-CD 純度値が 2.0%と著しく低値であった。本試薬は塩化物として市販されているものの、Cl⁻がほとんど検出されなかったことから、実際には十分に塩化物化されておらず、フラビリウムイオン型のまま、あるいは別形態で存在している可能性が示唆された。

C-2) Cy3G・Cl 試薬の LC-PDA 絶対検量線

LC-PDA における絶対検量線の傾きを求めたところ(図 3)、試薬間の検量線傾きのばらつきは RSD 14.9%であった(表 2)。これらの傾きに対して先に算出した qNMR 純度値で補正を行った結果、試薬間の検量線傾きのばらつ

きは RSD 2.1%と大幅に収束した。以上のことから、qNMR によりアントシアニンの純度値が正確に求められていることが強く支持された。

D. 結論

市販 Cy3G・Cl 試薬の純度は製造元により大きく異なり、ラベル表示値に基づく定量では試薬間差に起因する誤差が生じることが明らかとなった。また、IC-CD を用いた塩化物量に基づく換算法は過剰 Cl⁻の影響を受け、純度を過大評価する場合があった。以上より、アントシアニンの正確な純度評価には qNMR による絶対定量が最も信頼性の高い手法であると結論づけられる。さらに、本研究で確立した純度評価法は、アントシアニンを主成分とする食品添加物公定書収載品の HPLC 成分規格試験及び RMS 法の構築に有用な基礎資料となるものである。

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) Yuzo Nishizaki, A Case Study on Validation of External Calibration qNMR (EC-qNMR), qNMR summit 2025 (2025.6).
- 2) 西川拓海, 阿部裕, 杉本直樹, 西崎雄三: 卓上 NMR を用いた ¹H スピン情報に基づく qNMR によるカラシ抽出物の定量法の検討, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11)

論文発表

なし

G. 知的財産権の出願, 登録状況
なし

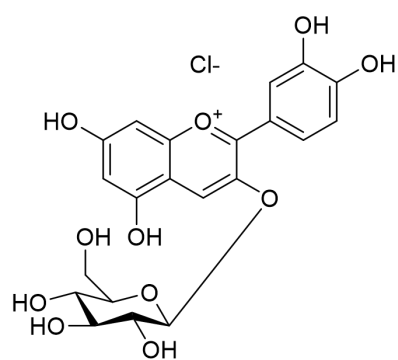


图1 Cy3G·Cl

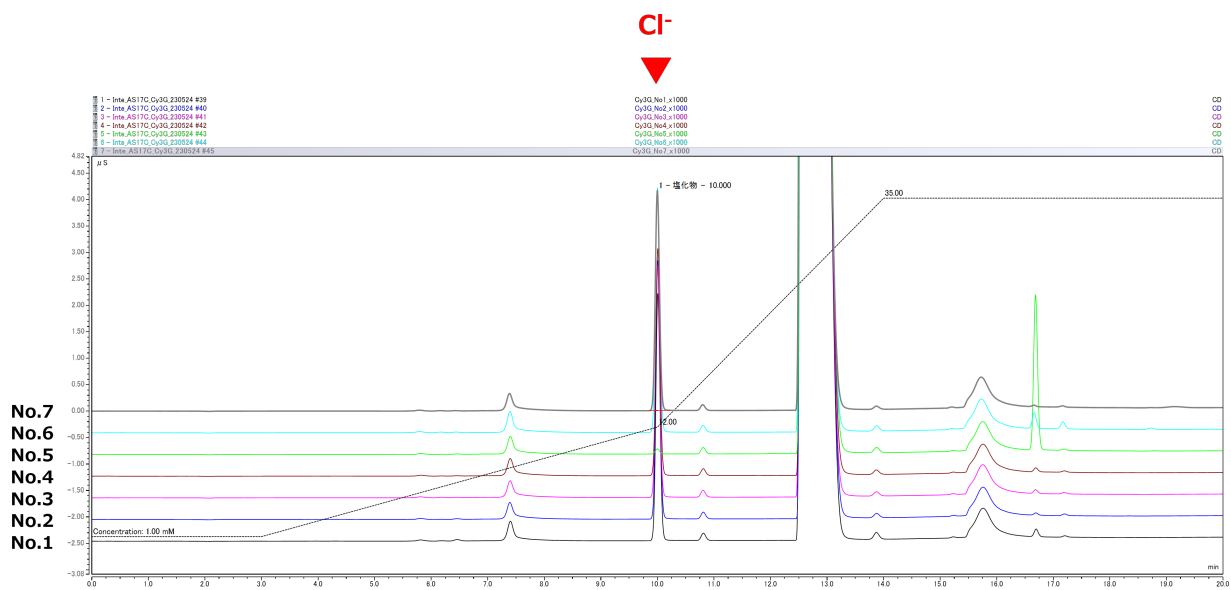
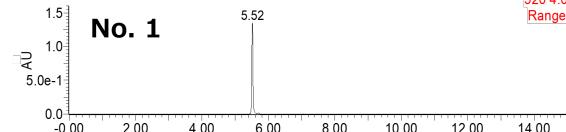


図2 IC-CDクロマトグラム

Cy3G_No6_x200

TofAntC0099

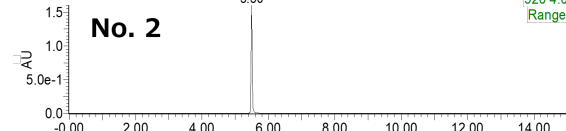
No. 1



2: Diode Array
520 4.0000Da
Range: 1.358

TofAntC0103

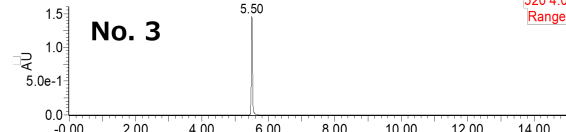
No. 2



2: Diode Array
520 4.0000Da
Range: 1.605

TofAntC0107

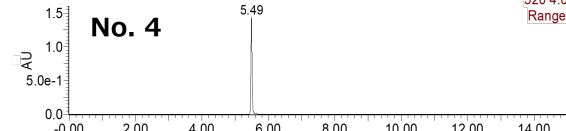
No. 3



2: Diode Array
520 4.0000Da
Range: 1.469

TofAntC0111

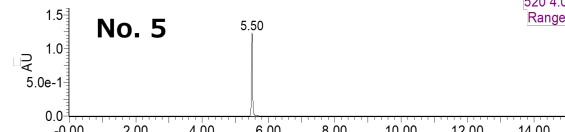
No. 4



2: Diode Array
520 4.0000Da
Range: 1.444

TofAntC0115

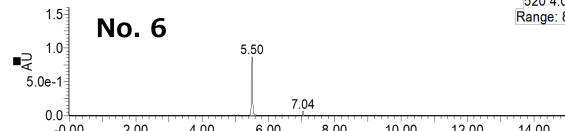
No. 5



2: Diode Array
520 4.0000Da
Range: 1.239

TofAntC0119

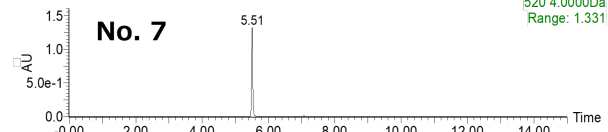
No. 6



2: Diode Array
520 4.0000Da
Range: 8.77e-1

TofAntC0123

No. 7



2: Diode Array
520 4.0000Da
Range: 1.331

図3 LC-PDAクロマトグラム

表 1 EC-qNMR 及び IC-CD から求めた Cy3G・Cl 純度

試薬	ラベル	EC-qNMR		IC-CD	
		純度	RSD	純度※ ¹	RSD
1	≥98% (HPLC)	90.1%	0.8%	103.3%	0.4%
2	-	93.7%	0.9%	92.9%	0.1%
3	≥98% (HPLC)	92.6%	1.4%	92.5%	0.3%
4	-	93.1%	1.3%	93.0%	0.3%
5	>98% (HPLC)	76.7%	1.8%	2.0%	1.9%
6	-	61.4%	0.4%	103.9%	0.1%
7	≥96% (HPLC)	92.4%	0.3%	92.6%	0.7%

試料調製 1 回, 測定 3 回 (非連続) で実施した.

※¹ Cy3G・Cl (C₂H₂₁O₁₁・Cl) として換算した際の純度

※² qNMR で求めた純度を基準とした場合の差

表2 Cy3G・ClのHPLC検量線の傾き

試薬	絶対検量線の傾き		
	qNMR補正無し	qNMR補正有り	R ²
1	1052	1185	0.99997
2	1103	1188	0.99998
3	1105	1198	0.99998
4	1134	1223	0.99998
5	941	1241	0.99996
6	704	1165	0.99998
7	1079	1191	0.99998
RSD (%)	14.9%	2.1%	

縦軸をAU，横軸をCy3G・Cl濃度 (μg/mL)とし，原点を通る検量線を作成した.

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7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)を利用した定量法の検討

—検出器としてフォトダイオードアレイ(PDA)を用いた際の測定値ばらつきの原因—

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

UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法では、基準物質と分析対象物質の測定波長が異なる場合、装置間差が大きくなるという課題がある。本研究では、PDA 検出器のスペクトル検出特性を調査するため、複数の装置を用いて、同一試料における吸光度を4つの検出波長にて測定し比較した。その結果、装置間の吸光度のズレは最大で15%ほどあり、そのズレ方は波長や装置によって異なっており一定ではないことなどが明らかとなった。また、光源ランプ種の切り替わりも装置間差への寄与が大きいことが示唆された。装置間差を小さくするための補正方法を検討し、装置間差に PDA 検出器における波長ごとの感度差が大きく寄与していることを示した。

研究協力者

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
西崎 雄三 東洋大学食環境科学部 准教授

A. 研究目的

近年、標準物質の入手が困難な物質の定量において、代わりに他の物質を基準として設定(基準物質)し、それに対する分析対象物質の相対モル感度(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、基準物質に対する分析対象の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。

RMS法が採用可能な検出器としては、分析種の量とその応答量とに直線性があることが大前提として挙げられる。現在、最もRMS法

の報告が多いクロマトグラフィー及び検出器は、汎用性が高く、広いダイナミックレンジを有し良好な定量性を示すフォトダイオードアレイ(PDA)検出器及び紫外可視分光計(UV-Vis)の2種である。両検出器はともに Lambert-Beer の法則を基本原理としているが、検出器の光学系が異なっている。PDA 検出器は連続した UV スペクトルを測定可能であるという利点があるが、RMS法を両検出器に適用した際には、UV-Vis 検出器の方がわずかに装置間差が小さいというデータが報告されている(統計学的な有意差はない)¹⁾。

UV-Vis や PDA 検出器を RMS 法に適用する場合、RMS の算出には基準物質及び分析対象物質それぞれの吸収極大波長(λ_{max})における応答量を用いる。これは、とくに PDA 検出器ではスペクトル検出特性の装置間差の影響が無視できないと考えられるためである²⁾。さらに、可能であれば分析対象物質と同一の吸収極大波長(λ_{max})をもつ物質を基準物質とし、その波長における応答量を用いる方が装置間差が小さくなる。しかし、分析対象物質と同一

の $\lambda_{\max}$ をもつ基準物質を探すのは困難である。

本研究では、 $\lambda_{\max}$ が異なる基準物質を用いた精度の高い定量法を確立するため、装置間での RMS 値のばらつき、すなわち応答比のばらつきが大きくなる原因を探索することを目的とし、PDA 検出器の特性を調査した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

「黄色 4 号 (国立衛研食品添加物部内管理番号：Y-4)」, 「赤色 2 号 (国立衛研食品添加物部内管理番号：R-2)」及び「青色 1 号 (国立衛研食品添加物部内管理番号：B-1)」は、日本食品添加物協会から入手した。カフェイン (国立衛研食品添加物部内管理番号：02-53a) は、Alfa Aesar 社のものを用いた。

試薬の溶解溶媒として、超純水を用いた。

B-2) 測定装置

表 1 に示す検出器 (HPLC 用) 及び分光光度計を本研究に用いた。なお、用いた測定装置のメーカーは表の通りだが、項 C で示す PDA 検出器についての結果は、メーカーを伏せて示す。なお、分光光度計に用いた測定用セルの光路長は 10 mm, HPLC 装置用 PDA 検出器のフローセルの光路長は 1 台を除いて 10 mm であった。残りの 1 台は光路長が 7 mm であり、検出器間で比較する際には、10 mm であると仮定した補正を行ったうえで比較した (表 1)。

B-3) 試験液調製

以下 2 種の試験液を調製した。

カフェイン溶液：12.2 mg/L になるよう試薬をとり、超純水に溶解させた。この溶液を相対濃度 1.0 とし、これに加えて、相対濃度 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 2.0, 及び 3.0 となるよう超純水にて希釈または調製した。なお、本研究で用いたカフェイン溶液の吸収極大は 273 nm であった。

3 色素混合液：黄色 4 号、赤色 2 号及び青色 1 号をひとつの容器にはかりとり、超純水にて溶解させ混合液とした。混合液においては、それぞれの化合物濃度が、10.0 mg/L, 15.0 mg/L,

及び 4.1 mg/mL となるように調製し、このものを相対濃度 1.0 とした。この濃度を基準とし、相対濃度 1.0 のほか、相対濃度 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 2.0, 及び 3.0 となるような混合液を、超純水にて希釈または調製した。なお、本研究で用いた 3 色素混合液の吸収極大は 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm であった。

B-4) 測定方法及び条件

本研究は PDA 検出器の装置間差を調査するためのものであるため、HPLC カラムは排除し、HPLC のポンプから直接 PDA 検出器を接続する構成とし、試料注入のためマニュアルインジェクタ (レオダイン) をポンプと検出器の間に設置したものをを用いた (図 1)。レオダインには 2 mL のサンプルループを接続した。

測定条件は以下のとおり

HPLC-PDA

測定波長：190～700nm または 190～510 nm

(装置のスペックによる)

移動相：超純水

流速：1.0 mL/min

セル音調：なし (実験室温度)

分光光度計

測定波長：190～900 nm

波長記録間隔：0.5 nm

B-5) 測定手順

B-3) に示す試料液は測定当日調製し、表 1 に示す装置での測定はすべて同一日に実施した。分光光度計は、測定の 1 時間前に起動させ、安定化させた。各試験液は超純水を対照として用い、各濃度について 2 回ずつ測定しデータを得た。

HPLC-PDA は、最低でも測定の 1 時間前に PDA 検出器のランプを起動させ、超純水を 1.0 mL/min 送液させた。試験液をマニュアルインジェクション用のシリンジに 6～7 mL とり、サンプルループ内を試験液でしっかり満たした。HPLC-PDA の測定は手動により開始し、開始 1 分後に試験液を流路に注入した。これを、1 試験液につき濃度ごとに 2 回ずつ実施した。HPLC-PDA で得られたデータはすべて

CSV 形式に変換し解析した。

C. 結果及び考察

C-1) PDA 検出器における吸収スペクトルの取得と装置間比較の考え方

本研究における試験液の測定は、すべて表 1 に示す分光光度計及び HPLC-PDA にて実施した。なお、分光光度計は表 1 に示す 1 台を、HPLC-PDA は表 1 に示す 6 台（メーカーは 5 社、装置 A～F、ただし装置 D 及び E は、同一メーカーで装置構成もほぼ同一）を用いた。

本研究では、分光光度計測定により得られる吸収スペクトルが真、すなわち「標準スペクトル」と仮定して、各 PDA 装置における吸収スペクトルと比較した。装置間比較に用いる試験液の吸収スペクトルの測定波長は、カフェイン溶液及び 3 色素混合液の吸収極大から選択した。各試験液における「相対濃度 1.0」は、分光光度計で得られた吸収極大波長（273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm）における分光光度計での吸光度が 0.6AU となる濃度と定義した。

HPLC-PDA での測定において、試験液を分析したときに得られるクロマトグラムを図 2 に示す。図 2 に示すように、PDA 検出器のフローセルが完全に試験液で満たされると、クロマトグラム上では飽和したピークが観察される。飽和したピークの中央付近では、移動相の流れはあるものの常に同一濃度の溶液が満ちていると考えられるため、分光光度計のセルによる測定と同等の状態であると見なすことが可能である。各試験液の代表的な吸収スペクトルを図 3 に示す。

C-2) 各検出器の直線性

まず、検出器によって直線性に特徴があるかを確認するため、各試験液の吸収スペクトルから各測定波長（273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm）における吸光度を得た。試験液の相対濃度を横軸に、分光光度計または PDA 検出器の吸光度を縦軸にとった検量線を図 4 に示す。

図 4 に示すように、分光光度計では、273 nm,

418 nm, 522 nm, 及び 629 nm のすべての波長において、濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性を示した。PDA 検出器は、装置 A, B 及び C は、分光光度計同様 4 波長すべてにおいて濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性を示した。装置 D 及び E では、273 nm で測定した場合は濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性を示した。しかし、418 nm, 522 nm, 及び 629 nm の 3 波長における吸光度は、濃度 0.10～2.0 の範囲では直線性が見られたものの、濃度 3.0 で極端に大きな値を示し、濃度 0.10～3.0 の範囲での直線性は不良であった。また、装置 F では、522 nm および 629 nm における濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性が確認されたが、273 nm および 418 nm の吸光度は、装置 D 及び E と同様に低濃度域では直線性が認められたものの、濃度が高くなるにつれて低濃度域で作成した直線の外挿から逸脱し、濃度 0.10～3.0 の範囲における直線性は不良であった。

そこで、想定より極端に大きな吸光度を示した装置 D における濃度 3.0 の 3 色素混合液の吸収スペクトルを、分光光度計のものと重ねた（図 5）。その結果、直線性の確認に用いた測定波長（図 5 における赤矢印）において、装置 D では分光光度計と比較して信号強度（吸光度）が増強されていることが明らかとなった。一方で、信号強度がある一定以下である波長域では、装置 D と分光光度計の吸収スペクトルに大きな違いはなかった。直線性が不良であった装置 E 及び D でも同様の現象が確認された。

吸光度は、Lambert-Beer の理論上、溶液中の物質濃度に比例するため、入射光強度が一定である場合、高濃度溶液になるほど光の吸収が大きくなり、透過光強度は低下する。検出器は、透過光強度を検出することで吸光度を算出しているため、あまりに高濃度の溶液の吸光度は透過光強度が弱くなりすぎ、正確に算出できない。したがって、装置 D～F でみられた高濃度域における吸光度の増強は、微弱な透過光を検出するための何らかの機能が検出器に搭載されていることを示唆している。また、直線性が不良であった領域が、装置 D, E

(同メーカー)では高波長側, 装置 F では低波長側と異なっていた. どの装置も光源に重水素ランプとタングステンランプのふたつを搭載しており, 装置 D, E はタングステンランプ, 装置 F は重水素ランプの影響がある領域でそれぞれ直線性が不良であったと思われる.

C-3) 分光光度計における吸光度を基準としたときの各 PDA 検出器の実測値比較

前項 C-2) にて, 濃度範囲 0.10~1.0 ではいずれの装置 A~F (PDA 検出器) においても良好な直線性があることが示された. そこで, この濃度範囲内の 4 波長 (273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm) における各装置の吸光度が, 分光光度計にて得られた吸光度と比較してどのように異なっているかを調査した. 分光光度計における吸光度を 1 としたときの各装置の吸光度比を算出し, 横軸に相対濃度 (範囲 0.10~1.0) を, 縦軸に各装置の吸光度比をとったグラフを作成した (図 6). グラフでは, 分光光度計を基準としたときの吸光度比 1 を赤線で示しており, この線に近い装置の吸光度ほど分光光度計の吸光度と近いということとなる. PDA 検出器の吸光度を分光光度計と比較したとき, 大きい装置では 15%程度の差がみられた (吸光度比 1.15 付近).

分光光度計や PDA 検出器などの吸光度測定において, 装置の光学系構成にもよるが, 概ね吸光度が 0.3~0.7AU (0.5AU 前後) となる範囲で測定することが, 慣用的に望ましいとされている. 本研究でも, 吸光度 0.3~0.7AU 付近では, 他の吸光度範囲と比較していずれの装置も分光光度計での吸光度に近かった. しかし, 装置によっては 0.5AU 付近でも分光光度計との測定値に 10%程度の差が見られるものもあった (図 6).

また, 図 6 から, 同一装置であっても, 分光光度計との吸光度比の大小パターンは波長ごとに異なっており, 一見して法則性を見いだすことが困難であった. そこで, 同じく濃度範囲 0.10~1.0 を対象とし, 分光光度計における吸光度を 1 としたときの各装置の吸光度を, 同一装置内において検出波長ごとに比較しど

のように異なるか調査した (図 7). その結果, 装置 A~F のすべてにおいて, 分光光度計に対する吸光度比の濃度による遷移パターンが, 273 nm で測定したときと, 418 nm, 522 nm, または 629 nm で測定したときの 2 つのパターンに大別された. 先述の通り, どの装置も光源に重水素ランプとタングステンランプのふたつを搭載しており, 380~400nm 付近でこのふたつのランプを切り替えている. 切り替え手法は, メーカーごとにそれぞれ多少の違いはあると思われるが, 装置 D 及び E は同一メーカーの異なる個体であるため光学系はほぼ同一と見なせるが, 分光光度計に対する吸光度比は装置 D・E 間で大きく異なっている. このため, 分光光度計との吸光度比の差には, 光源ランプの違い (消耗度等を含む) が大きく寄与すると考えられた. しかし, 同一の光源ランプ種である場合でも, 測定波長によって分光光度計に対する吸光度比は一定ではなかった. さらに, 分光光度計に対する吸光度比を装置 B と C とで比較すると, 装置 B では 418 nm > 522 nm > 629 nm の順に吸光度比が小さくなるが, 装置 C では 522 nm > 418 nm > 629 nm の順に小さくなっており, 同一の光源ランプ種内でも装置間で必ずしも同様の強度比とはならなかった. これは, 濃度に対する検出器の応答値をとった検量線の傾きが装置間で逆転することを示しており, 検量線の傾きの比で求められる RMS 値への影響が大きいことが示唆された.

C-4) 異なるふたつの $\lambda_{\max}$ を測定波長として求めた RMS 値の装置間差の補正

RMS 法の定量値における装置間差を小さくするには, 測定波長は基準物質及び分析対象物質の $\lambda_{\max}$ とすることが重要である. このとき, 可能な限り分析対象物質と同一の $\lambda_{\max}$ をもつ物質を基準物質とし, その波長における応答量を用いる方が良いことが報告されている²⁾. この理由としては, 本研究結果からも明らかのように, 同一試料を同様に測定した場合においても, 測定装置及び波長によって, 吸光度が大きく異なることが挙げられる. 基準

物質と分析対象物質を同一波長で測定すれば、このようなズレは相殺されるが、 $\lambda_{\max}$ が異なるとき、とくに紫外領域と可視領域のように使用するランプが異なる場合や波長差が大きい場合には、装置間でのズレの影響が大きくなると考えられる。

このような現象が、ふたつの測定波長により RMS 値を決定する場合にその装置間差に大きく影響していると仮定すると、RMS 値の装置間差をある程度補正可能であると考えられた。そこで、既報の結果²⁾を用いて上記の仮定と補正方法を検証した。既報では、基準物質としてカフェイン (CAF) を設定し、これに対する分析対象物質 4-アミノカルミン酸 (4-ACA) の RMS 値を決定した。このときの検出器は PDA 検出器であり、図 8 に両物質の吸収スペクトルを示す。

既報¹⁾では、2 種の RMS 値を求めており、ひとつは 4-ACA の検出波長をその $\lambda_{\max}$ のひとつである 273 nm としたもの (以下、 $\text{RMS}^{273/273}$)、もうひとつは同じく $\lambda_{\max}$ のひとつである 525 nm としたもの (以下、 $\text{RMS}^{525/273}$) である。基準物質である CAF はどちらの場合もその $\lambda_{\max}$ である 273 nm で測定したため、 $\text{RMS}^{273/273}$ は検出波長がひとつの場合、 $\text{RMS}^{525/273}$ は検出波長がふたつの場合として単純に比較可能である。既報のうち、本研究と全く同一の PDA 検出器を用いて決定した RMS 値を抜粋し、表 2 に示す。表 2 から明らかなように、測定波長が 2 つある $\text{RMS}^{525/273}$ の装置間の RSD (%) は $\text{RMS}^{273/273}$ と比較して大きい。

RMS 法では、通常、どのようなメーカーの検出器でも適用可能な RMS 値を提示するが、その RMS 値は複数装置で算出した RMS の平均値であることが多い。このとき、RSD (%) が大きいほど、RMS 法によって得られる定量値がばらつく要因となる。そこで、RMS 値の装置間差の補正を、ある基準となるような検出器を想定することで試みた。基準となる検出器と分析者の検出器とで、どの程度の“差”が

あるか、すなわち補正係数を求めることができれば、基準となる検出器における提示された RMS 値から、分析者自身の装置で得られるであろう補正 RMS 値を予測することが可能となる。

HPLC/PDA を用いた RMS 法を確立しようとするとき、基準物質に対する分析対象物質の RMS 値を求める際に必要なのは、基準物質及び分析対象物質の検出波長における HPLC クロマトグラムのピーク面積である。同一試料を分析したときのピーク面積値は吸光度に比例するため、2 台の装置におけるピーク面積比は、同一の試料を分析したときに得られる吸光度比にほぼ等しい。例えば、カラムも装着した一般的な HPLC-PDA を用いて、ある検出波長 α における同一試料を分析したときのピークが、基準となる装置 S と装置 X とで、図 9 のようであったとする。

装置 S の吸光度が a である試料では、装置 X の吸光度は b であるとき、装置 S のピーク面積を $A_{S\alpha}$ とすると、装置 X のピーク面積 $A_{X\alpha}$ は以下のように近似される。

$$A_{X\alpha} = A_{S\alpha} \times \frac{b}{a} \quad (1)$$

同様に、ある検出波長 β において、装置 S の吸光度が c である試料では、装置 X の吸光度は d であるとき、装置 X のピーク面積 $A_{X\beta}$ は装置 S のピーク面積を $A_{S\beta}$ を用いて以下のように表される。

$$A_{X\beta} = A_{S\beta} \times \frac{d}{c} \quad (2)$$

ここで、検出波長 α で基準物質を、検出波長 β で分析対象物質を測定するような RMS の値を考える。このときの RMS 値は、検出波長 β で測定した分析対象物質のピーク面積を検出波長 α で測定した基準物質のピーク面積で除したものに比例する。すなわち、装置 S で測定した RMS_S は、

$$\text{RMS}_S = \frac{A_{S\beta}}{A_{S\alpha}} \times R_n \quad (3).$$

ただし、 R_n は基準物質に対する分析対象物質の物質質量比である。以上の式(1)～(3)から、感

度の違いを考慮して得られる装置 X の RMS_X は,

$$RMS_X = RMS_S \times \frac{d}{c} \times \frac{a}{b} \quad (4).$$

以上のように、基準となる検出器と実際に分析者が使用する検出器の吸光度比が、RMS 値の補正係数になる。本検討では、RMS 法にて提示される RMS が装置 A で求めた場合を想定し、装置 A に対する装置 B～D との補正係数を、273 nm と 522 nm のときの各装置の吸光度の実測値を用いて求めた (表 3)。図 7 に示すように、装置間の吸光度比は試料の相対濃度により異なるが、ここでは既報での吸光度にあわせ、相対濃度 0.25 のときの吸光度 (0.15AU 付近) を採用することとした。装置 A を基準の検出器とする場合、 $RMS^{525/273}$ は 0.492 として定量法に示される。仮に、 $RMS^{525/273}$ が 0.516 であった装置 D を用いて、RMS 法 (0.492 が RMS 値として提示されたもの) を実施した場合、得られる定量値に 4.9% の差が生じる可能性がある。各装置の実測値が真の $RMS^{525/273}$ の値であると仮定し、提示値 (装置 A の値) との差 (%) と、補正係数を用いて求めた補正值との差 (%) をそれぞれ比較した (表 3)。その結果、差が広がった装置も縮んだ装置もあったが、最も大きな差が 4.9 から 3.5 へと 1.4 ポイント小さくなった。これは、得られる定量値の装置間のばらつきが小さくなることを示している。

D. 結論

本研究では、UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法の課題のひとつである、基準物質と分析対象物質の測定波長が異なる場合における装置間差の原因探索を目的とした。PDA 検出器のスペクトル検出特性を調査するため、様々なメーカーの複数装置にて、同一試料の 273 nm, 418 nm, 522 nm, 629 nm における吸光度を測定し、分光光度計の値を基準として比較した。その結果、装置によって直線性の範囲が異なること、直線性が見られる範囲内であっても分光光度計の値からは最大で 15% ほどズレがある場合があること、分光光度計と

のズレ方は波長や装置によって異なっており一定ではないことなどが明らかとなった。とくに、光源としている重水素ランプとタングステンランプが切り替わると、基準とのズレ方に大きな変化が見られる傾向があった。

そこで、装置間差を小さくするために、RMS 法にて提示された RMS を求めた装置と分析者との装置との間での感度補正の方法のひとつを提案した。具体的には、同一試料を両装置で分析した際の吸光度から補正係数を算出し、分析者の装置における補正 RMS を求めるものである。この補正方法の実装には複数波長での標準物質を用意し、その際の吸光度をあわせて提示する等のひと手間が必要となる。しかし、本補正の検討結果により、装置間差に PDA 検出器における波長ごとの感度差が大きく寄与していることが裏付けられたといえる。

一方で、RMS 法における測定波長が 2 波長であっても、光源ランプ種の変更がなく、数十 nm の違い程度であれば、それほど装置間差が大きくならないとも思われた。既報²⁾にて $RMS_{525/273}$ が $RMS_{273/273}$ より装置間差が大きかった要因のひとつとしては、検出に用いられる光源ランプ種の切り替わりが寄与していると考えられる。RMS 法における基準物質の選定においては、必ずしも分析対象物質の検出波長と同一にする必要はないが、光源ランプの切り替わり付近や離れすぎた波長は避ける方が、装置間差を考慮すると望ましいといえる。

E. 参考文献

- 1) Masumoto N. *et al*, Chem. Pharm. Bull. 73(7), 650–657 (2025). DOI: 10.1248/cpb.c25-00129
- 2) Nishizaki Y. *et al*, Food Additives & Contaminants: PART A, 35(5), 838–847 (2018).

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masumoto N., Yamazaki T., Miura T., Nakajima K., Yamamoto K., Kato T., Minamoto N., Suematsu T., Sato Y., Nomura A., Akagi M.,

Ohtsuki T., Koyama K., Mizumoto T., Miyashita T., Kawashima S., Saito T., Sugimoto N. Development of a Standard-Free Analytical Quantitative Method based on Liquid Chromatography Using Relative Molar Sensitivity for Chlorogenic Acid in Apple Juice. Chem. Pharm. Bull. 73(7), 650–657 (2025). DOI: 10.1248/cpb.c25-00129

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

表 1 本研究で用いた測定装置

	検出器の型番	メーカー	解析ソフト
分光光度計	V-650	日本分光	スペクトルマネージャー
HPLC-PDA	Series1200 G1315B	Agilent	OpenLab CDS
	Ultimate 3000 DAD ^{a)}	Thermo	Xcalibur
	2996	Waters	MassLynx
	SPD-M20A	島津製作所	LabSolution
	MD-4010	日本分光	ChromNAV

a) 光路長が 7 mm (そのほかはすべて光路長 10 mm)

表 2 CAF に対する 4-ACA の RMS 値²⁾

検出器	RMS ^{525/273}	RMS ^{273/273}
装置 A	0.492	1.29
装置 B	0.475	1.27
装置 C ^{a)}	0.498	1.31
装置 C ^{a)}	0.491	1.30
装置 D ^{a)}	0.499	1.25
装置 D ^{a)}	0.516	1.29
RSD (%)	2.7	1.5

a) カラム構成が異なる

表 3 装置 A の RMS 値を基準としたときの装置 B~C の補正 RMS 値

装置	吸光度 (相対濃度 0.25)		補正係数	RMS ^{525/273}		実測の RMS との差 (%)	
	522 nm	273 nm		実測値	補正值	提示値	補正值
A	0.144	0.149	1.00	0.492	0.492	-	-
B	0.144	0.149	1.00	0.475	0.492	-3.5	-3.5
C	0.147	0.151	1.01	0.498	0.496	1.2	0.5
				0.491	0.496	-0.2	-0.9
D	0.154	0.153	1.04	0.499	0.512	1.4	-2.6
				0.516	0.512	4.9	0.7

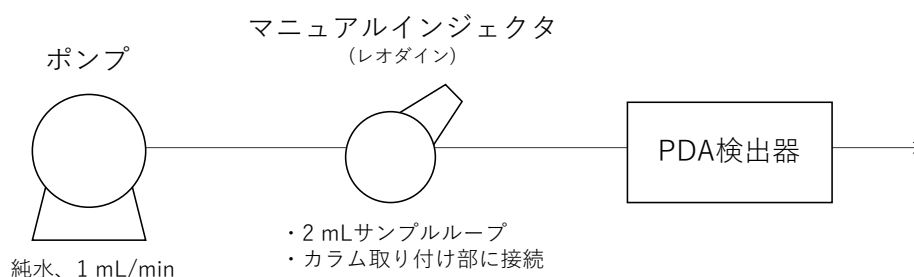


図1 PDA 検出器装置間差調査のための装置構成.

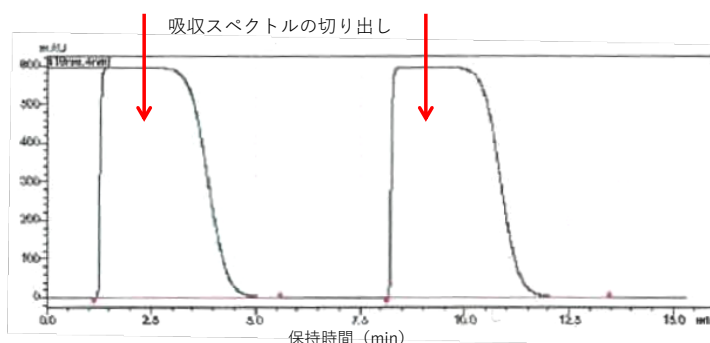


図2 HPLC-PDA クロマトグラム.

ピークが飽和しているあいだは、フローセルが試験液で満たされていると見なし、赤矢印で示す保持時間付近の吸収スペクトルを切り出し、PDA 検出器における各試験液の吸収スペクトルを得た.

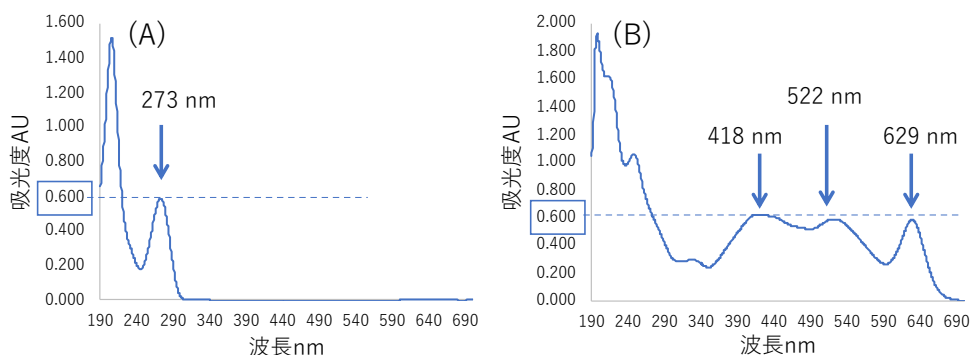


図3 相対濃度 1.0 における(A) カフェイン溶液及び(B) 3 色素混合液の代表的な吸収スペクトル. 吸収極大波長を矢印で、吸光度 0.6AU を点線で、それぞれ示している.

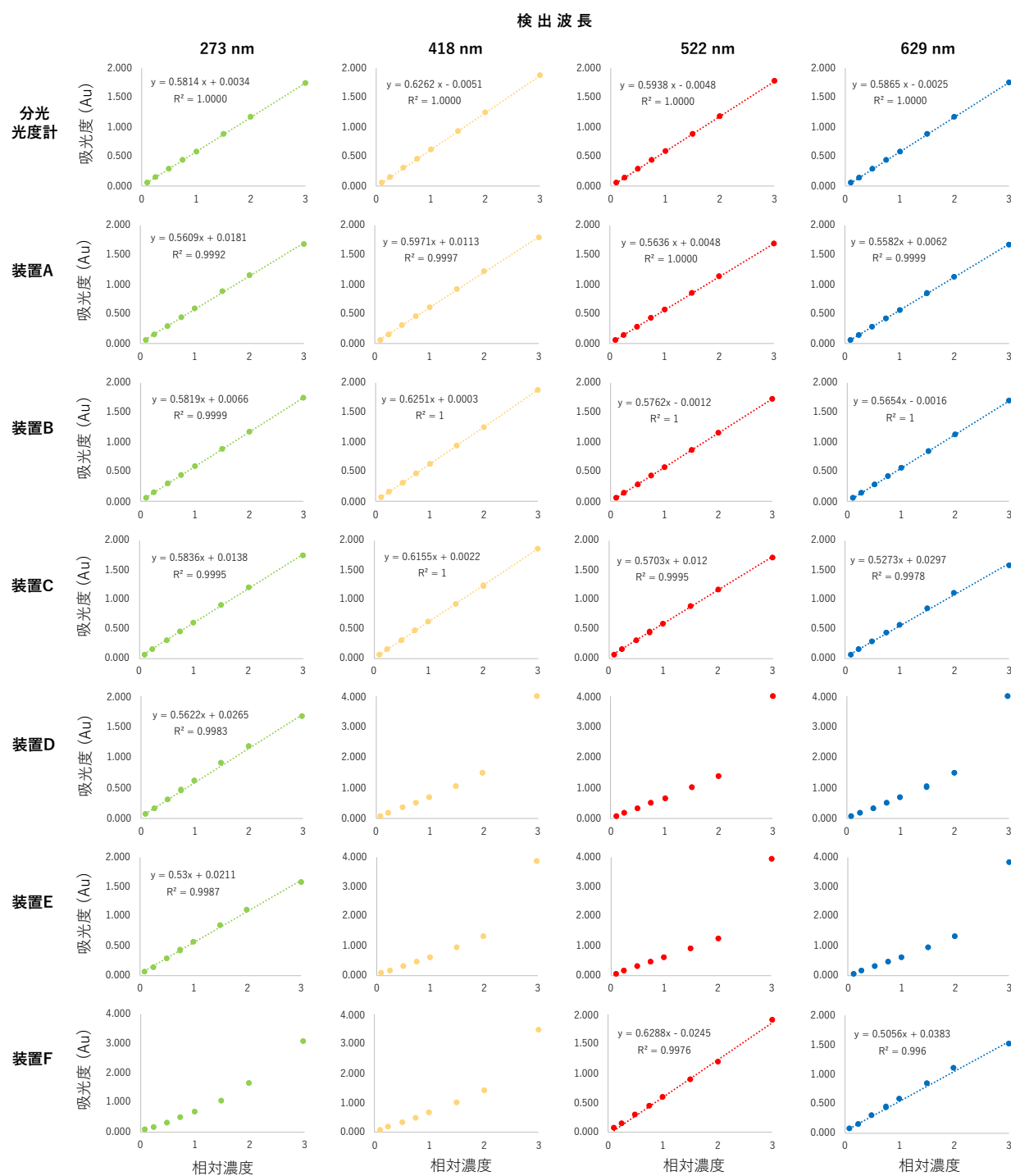


図4 試験液の 273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm における相対濃度に対する吸光度.

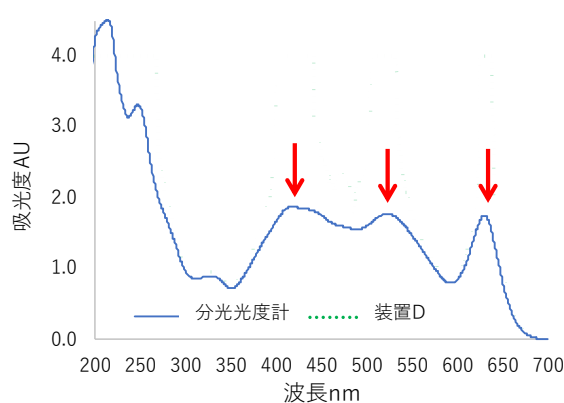


図5 3色素混合液（濃度3.0）の吸光スペクトル。
分光光度計（—）及び装置D（...）で測定したときのものを重ね書きした。赤矢印で示す波長における吸光度を、直線性の確認に用いた。

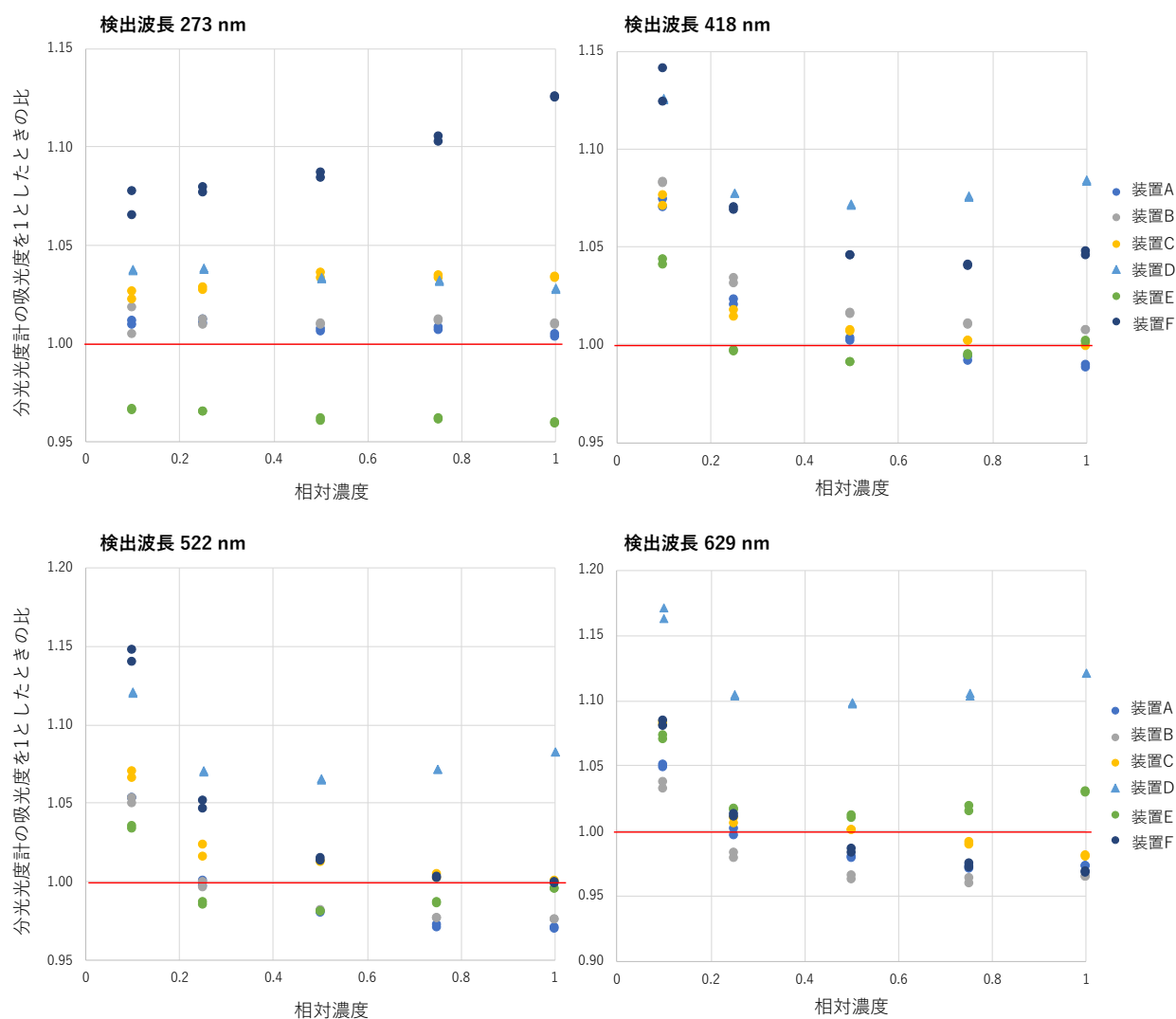


図6 分光光度計の吸光度を1としたときの、装置A～Fで得られた吸光度との比。
グラフ中の赤い線は吸光度比が1を示しており、この線に近いほどPDA検出器の吸光度が分光光度計と近いことを示唆している。

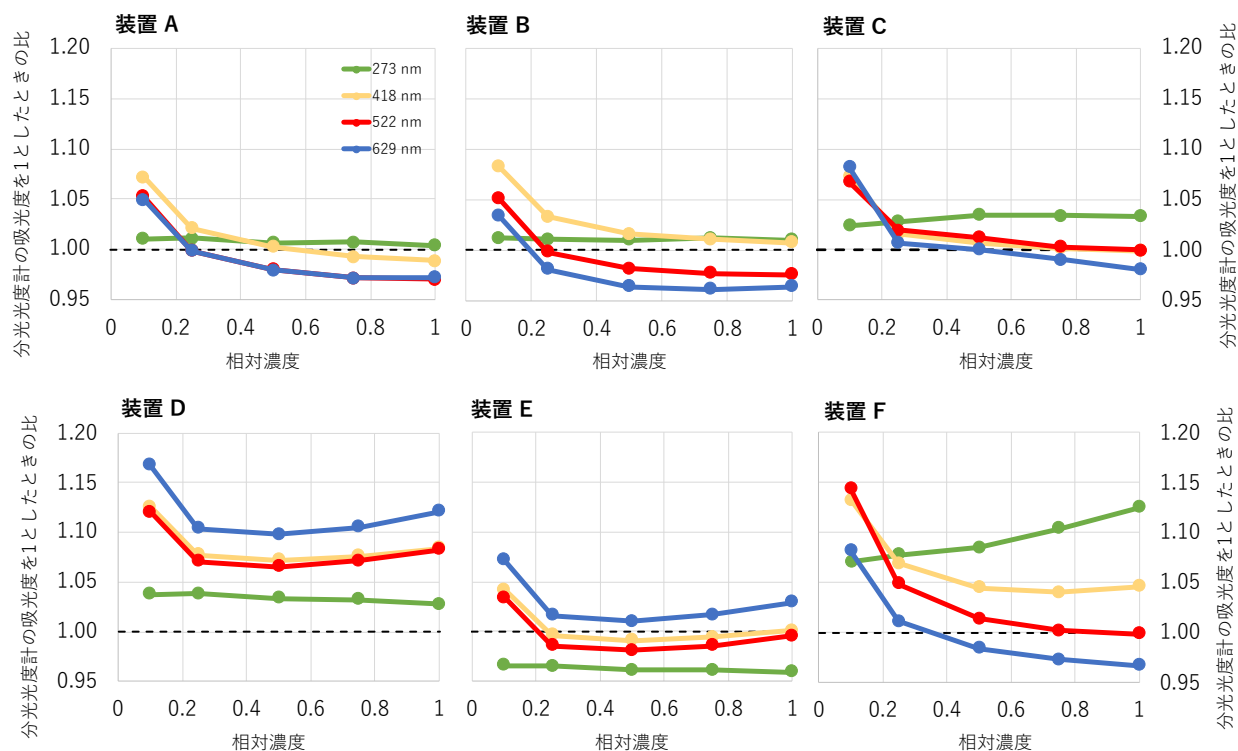


図7 分光光度計の吸光度を1としたときの装置A～Fで得られた吸光度との比を、同一装置内で検出波長をごとに比較した結果。

検出波長は、緑色：273 nm，黄色：418 nm，赤色：522 nm，青色：629 nm. 吸光度比が1（分光光度計と同一吸光度のライン）を黒色点線で示している。

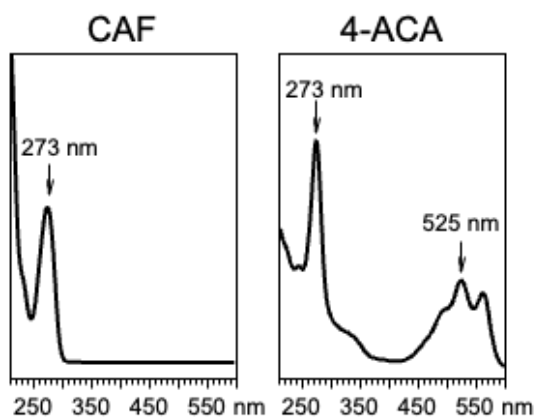


図8 カフェイン（CAF）及び4-アミノカルミン酸（4-ACA）の吸収スペクトル

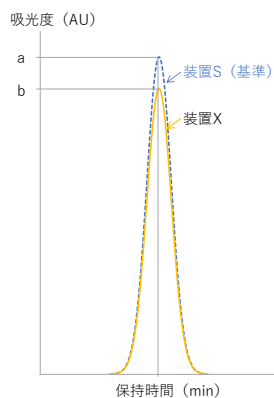


図9 同一試料を分析したときの装置Sと装置Xのクロマトグラムのピークイメージ。

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7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

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、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、現段階での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。昨年度の研究において、ムラサキヤマイモ色素に含まれるアントシアニンのプロファイリングを高速液体クロマトグラフィー-質量分析計を用いて行った。結果、3種の相対的に高強度なピークが認められ、これらのアグリコン及び配糖体を決定できた。一方で、その糖の結合様式に関しては決定するには至らず、定性能の高い測定による追加解析の必要が考えられた。今年度の検討では、この追加解析に向け高純度の成分を獲得するべく、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いて単離精製することを目指した。昨年度に決定した、分配係数が1周辺を得られる溶媒条件において、75 mLカラムでのHSCCCによる単離が確認できた。さらに、350 mLカラムでのHSCCCによる本精製を行った。

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(基原植物が異なる)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、現在、正式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、定性及び定量法について基礎検討を実施する必要がある。

そこで本研究では、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。定量分析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。昨年度の検討では、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、これらはシアニジンあるいはペオニジンをアグリコンとする配糖体であることが明らかとなった。また、これらのピークに対し

て高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いた標準品の獲得を行うべく、分配係数の算出を通じて最適溶媒条件を設定した。

今年度の研究では、設定した最適溶媒条件にて、CAG の単離精製を実施した。まず初めに、HSCCC の成立を確認するために、小カラム (75 mL 容) での小規模な単離を実施した。分離が確認されたため、続いて大カラム (350 mL 容) を用いて本精製を実施した。

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 1 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：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了。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用了。

B-2) 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

遠心分離機：日立工機社製 Himac CF15RN

HPLC 装置：島津製作所社製

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

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-PREP H 型

ポンプ：PU 714M pump (GL Sciences 社製)

コントローラー：SC 762 system controller

(GL Sciences 社製)

UV-vis 検出器：UV 702 (GL Sciences 社製)

フラクションコレクター：PLC 761 fraction collector (GL Sciences 社製)

HPLC-HRMS 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 G2 XS

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) 測定対象の原体あるいは精製後溶液の調製

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。HSCCC の単離精製品については 5 mL を分取し遠心エバポレーターにより濃縮後, 1 mL の移動相初期粗製溶媒にて再溶解し, 測定試料とした。

B-4) 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：TSKgel ODS-100Z column (4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m, 東ソー社製)

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 $\times$ 150 mm, 3 μ m, 東ソー社製)を用いた。

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

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 μ L

B-5) HSCCC による単離精製

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たものをを用いた。溶媒の混合比率は次の通りとした：*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/水/トリフルオロ酢酸 = 2.25/3.25/1.5/4.5/0.01 (V/V/V/V)。合計量で 2 L 分調製し、2 時間静置することで完全に分配させた。回転数 1000 rpm、検出波長 530 nm、流速を 2 mL/min あるいは 4.0 mL/min として、HSCCC を実施した。小カラム (75 mL 容) での検討には 0.1 mg/mL に調製した色素原体の再溶解溶液を用い、4 mL 注入した。大カラム (350 mL 容) での本精製には 2 mg/mL に調製した色素原体の再溶解溶液を用い、4 mL 注入した。

C. 結果及び考察

C-1) 小カラムを用いた単離精製の確認

まず、最適化した溶媒系において、HSCCC による分離が可能なのかを確認する目的で、小カラムを用いた予備検討を実施した。本溶媒系における HSCCC への固定相保持率は 20%であった。図 1 に原体の HPLC 測定結果を示す。また、図 2 には HSCCC クロマトグラムを示す。530 nm の検出波長において、4 つのピークを取得することが出来た。これらを分取し、HPLC により分析した結果を図 3-(a)~(d) に示す。フラクション No. 3 には主成分と考えられるピーク 1 が溶出した。一方でフラクション No. 1 及び 2 にはピーク 1 よりも遅く溶出する成分が認められた。このことは、HSCCC による分離は、必ずしも逆相 HPLC と同様の溶出傾向をとるわけではないことを示唆した。フラクション No. 4 にはピーク 1 よりも HPLC 溶出の遅いピーク 2 と考えられる成分が検出された。一方で、原体に認められた副成分ピーク 3 は、これらのフラクションには含まれておらず、固定相への残存が考

えられた。続いて、獲得量を増加するために大カラムを用いた単離精製に関して検討を行った。

C-2) CAG 標準品の本精製

C-1 の検討結果から本系において、効率的な単離精製が可能と考えられたため、続いて大カラムを用いた単離精製を実施した。本条件における固定相保持率は 67%であった。注入溶液の濃度を 20 倍とし、カラムサイズを変更して同条件で HSCCC を実施した結果、顕著なピークは 1 つのみしか確認できず、固定相に高い濃度の色素が残存した。そこで、カラム容積の増加に対する流速が遅いことを踏まえ、流速を 4 mL/min に増加し再度精製を行った。この時、固定相保持率は 57%であった。結果の HSCCC クロマトグラムを図 4 に示す。小カラムの結果と同様に 4 本のピークを得た。これらを分取して HPLC-HRMS により分析した結果を図 5-(a)~(d) に示す。小カラムの結果と比較した時、同様の傾向となっていることが分かった。流速 4 mL/min においてもピーク 3 の固定相への残存が考えられたため、固定相を濃縮して HPLC-HRMS 分析した。一方で、図 7 に示す様に当該ピーク 3 以外の成分が残存していることが確認された。このことから、ピーク 3 は既に溶出て済みであり、現状の注入量では検出感度が不足している可能性が示唆された。

D. 結論

本研究では、昨年度に決定した HSCCC による単離精製の条件を用いて、実際に CAG 標準品の獲得を試みた。初めに小カラムを用いて検討を行った結果、4 本のピークを認めたが、これらは HPLC の溶出とは別の傾向にあった。続いて、大カラムを用いて大量精製を試みた。流速を 4 mL/min とした時、小カラムと同様の溶出傾向を得て、主成分であるピーク 1 及び 2 については高純度品が獲得できることが示唆された。一方で、ピーク 3 については現状の注入量では検出感度が不足している可能性が考えら

れた． 今後は下記の計画で研究を進めていく．

- ・CAG 純品（ピーク 1, 2）の獲得及び NMR 等による構造決定．
- ・CAG 純品（ピーク 3）の単離精製条件の見直し．

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.

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

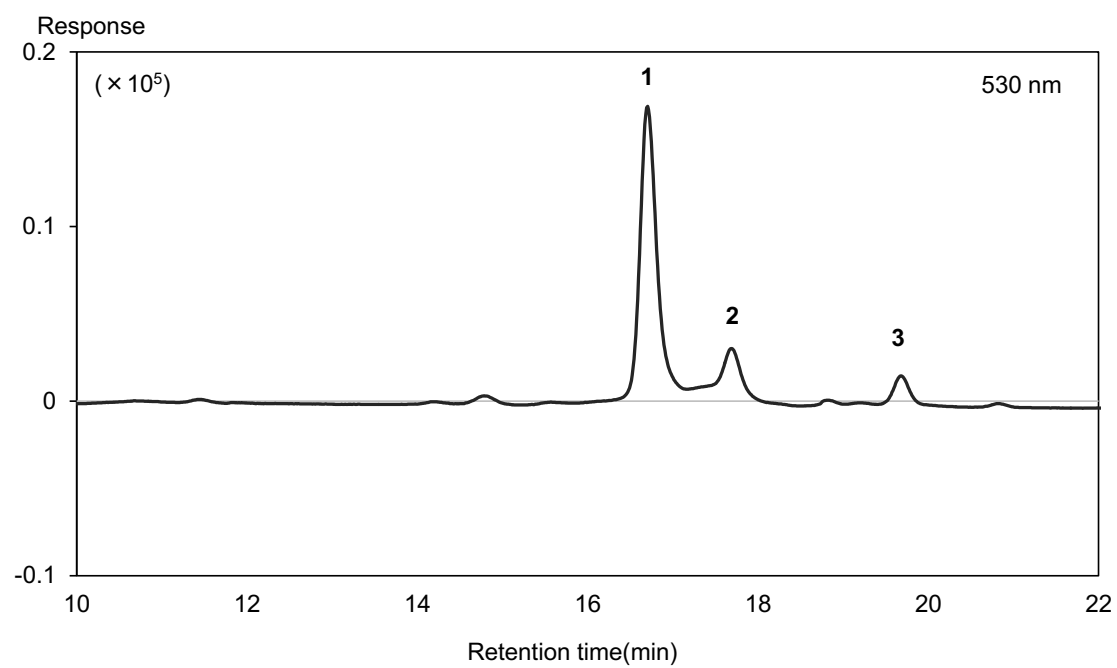


図 1. 色素原体の HPLC 測定クロマトグラム
検出波長は 530 nm

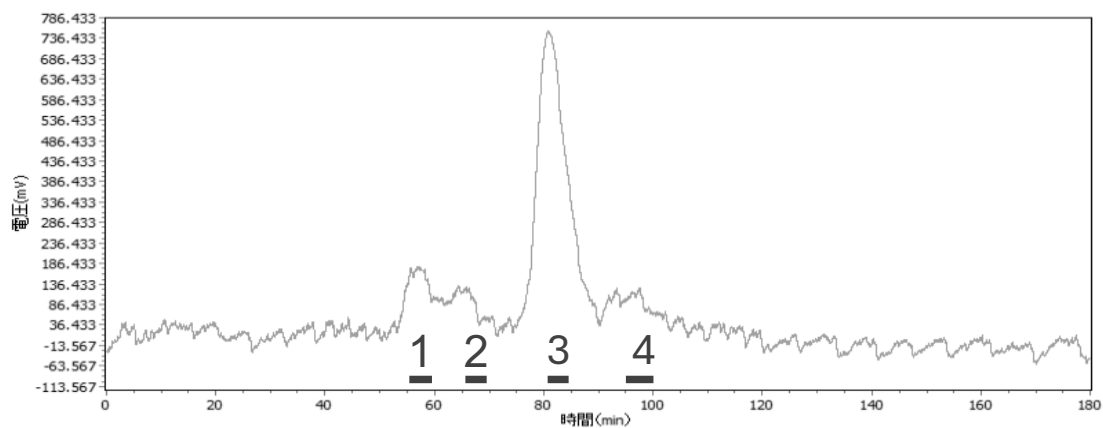


図 2. HSCCC による分離の予備検討結果

使用したカラムは 75 mL 容，回転速度は 1000 rpm，流速は 2 mL/min。この時の固定相保持率は 20%。検出波長は 530 nm とし，吸光が認められた区間（No. 1, 2, 3, 4）を分取した。

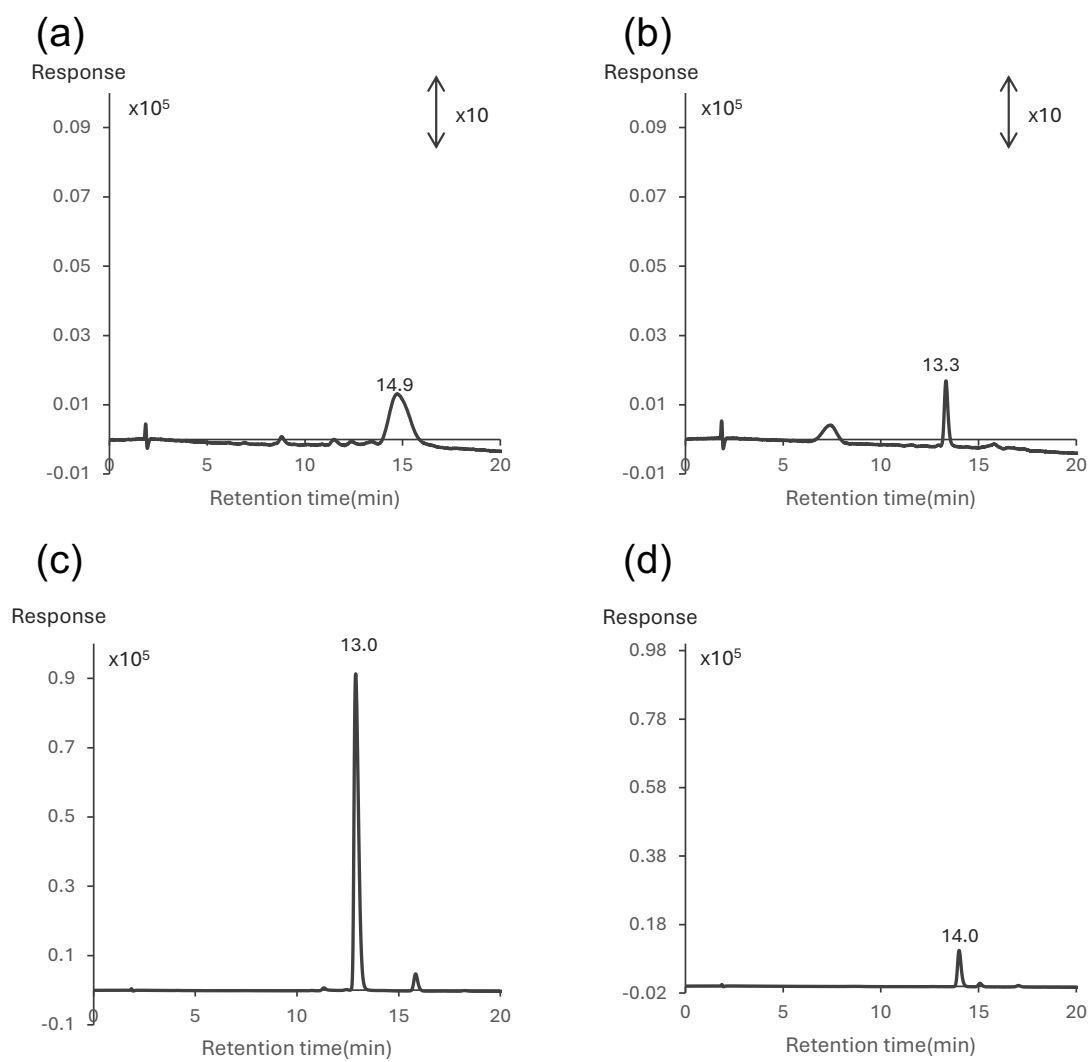


図 3. 単離精製のフラクションの HPLC 分析結果
(a) No. 1, (b) No. 2, (c) No. 3, (d) No. 4. 検出波長は 530 nm.

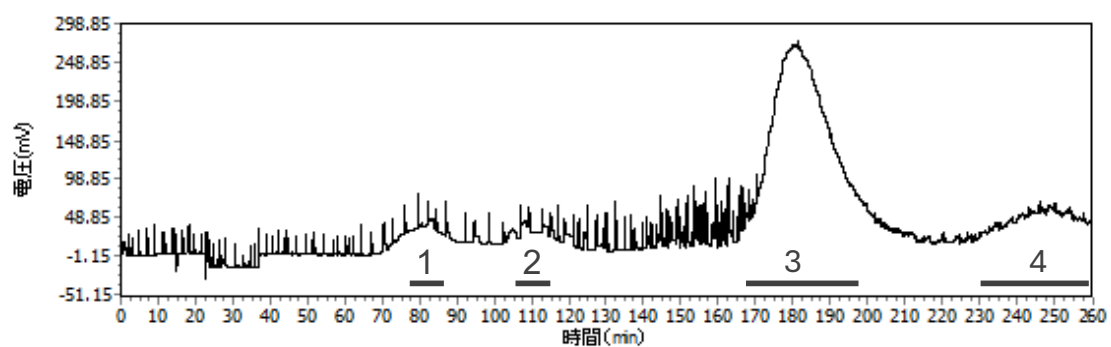


図 4. HSCCC によるムラサキヤマイモ色素の本精製

使用したカラムは 350 mL 容，回転速度は 1000 rpm，流速は 4 mL/min。この時の固定相保持率は 57%。検出波長は 530 nm とし，吸光が認められた区間（No. 1, 2, 3, 4）を分取した。

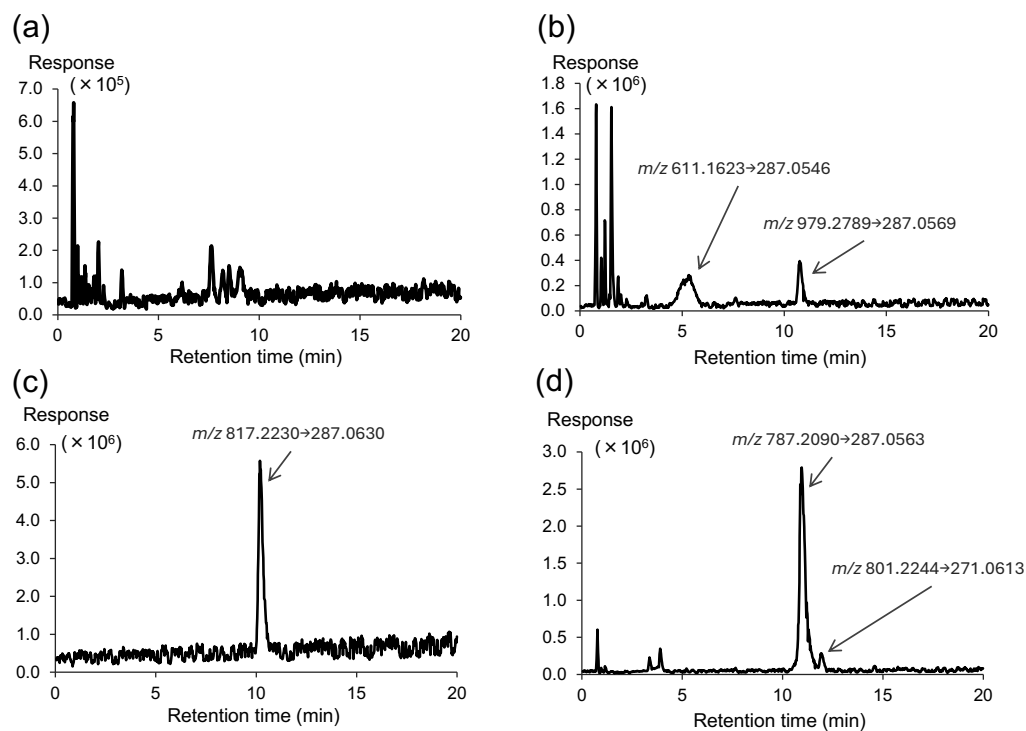


図 5. 分取したフラクションの HPLC-HRMS クロマトグラム

(a) No. 1, (b) No. 2, (c) No. 3, (d) No. 4. ノイズの影響を排除するためベースピークイオンクロマトグラムにて表示.

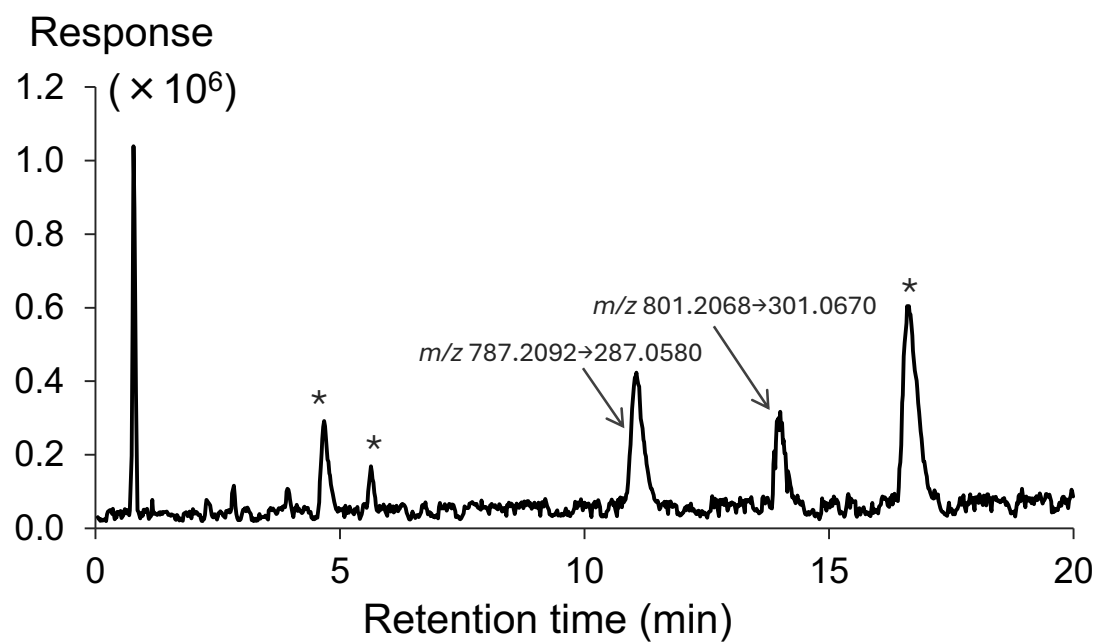


図 6. HSCCC 分取後の固定相濃縮物の HPLC-HRMS クロマトグラム
ノイズの影響を排除するためベースピークイオンクロマトグラムにて表示. *: 530 nm
に吸収無しであり, CAG 類ではないと考えられる.

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7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的とし、成分規格が未制定であるカシアガムを対象に、成分規格におけるアントラキノン分析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、特に、有害試薬の使用低減の観点から、抽出溶媒として規定されているクロロホルムに代わる抽出溶媒(ジクロロメタン、酢酸エチル)の適用性を添加回収試験により評価した。その結果、各溶媒を単独で用いた場合、酢酸エチルではアロエエモジンの回収率が著しく低く、ジクロロメタンではフィシオンの回収率が相対的に低値を示すとともに、一部の測定対象物質でRSDが増大することが確認された。そこでジクロロメタンで抽出後、酢酸エチルで抽出し、各有機層を統合せずに個別に濃縮して試験溶液を調製する段階抽出法を考案した。本抽出法により、カシアガム中のアントラキノン類を良好な真度及び精度をもって抽出可能であることが実証され、JECFA規格の基準値(0.5 mg/kg)に適用可能かつクロロホルムを使用しない前処理法が確立された。

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、増粘安定剤として食品産業において広く使用されている¹。一方、本添加物は食品衛生法第13条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、現状で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に準拠して製造された製品が流通している²。近年、既存添加物の品質確保及び食の安全性向上を目的として、個々の既存添加物に関する成分規格の設定並びに食品添加物公定書への収載が進められており、カシアガムについても規格基準の策定及び食品添加物公定書への収載に向けた検討が行われている。

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には「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。しかし、基原植物の種子由来不純物としてアントラキノン類が含まれ得ることが知られており、製造工程によっては製品中にアントラキノン類が微量残留する可能性がある。実際、JECFAの化学・技術評価(Chemical and Technical Assessment; CTA)では、カシア種子中のアントラキノン類が主要な懸念不純物であること及び精製工程によりアントラキノン類が低減されることが示されている³。このような毒性が懸念される化合物を含有し得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とそれを担保し得る分析法の整備が不可欠である。

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では、アントラキノン類(エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸、フィシオン)の総含有量を 0.5 mg/kg 以下と規定している⁴(図 1)。同規格の試験法では、アントラキノン類をクロロホルムで抽出し、

内標準物質としてダントロン(1,8-dihydroxyanthraquinone; 1,8-DAQ)を用いる HPLC 法により定量し、フォトダイオードアレイ検出器を用いて 435 nm で検出することとされている⁴。したがって、国内規格の策定に向けては、当該基準値(0.5 mg/kg)を確実に評価可能な分析法の確立が重要な課題となる。

一方、国内規格の策定に向けた過年度の検討において、JECFA 法は前処理及び HPLC 条件に課題を有することが明らかとなり、既報^{5,6}も参考に改良に向けた検討を進めてきた。未検討の課題としては、前処理で用いられるクロロホルムの使用が挙げられる。クロロホルムは、作業者の安全性及び環境負荷の観点から、代替溶媒への変更を検討することが重要である。そこで本研究では、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、JECFA 規格の分析法を基盤とした前処理工程の改良を検討した。具体的には、有害試薬の使用低減の観点から代替抽出溶媒(ジクロロメタン、酢酸エチル等)の適用性を評価し、JECFA 規格の基準値(0.5 mg/kg)に適用可能な前処理法の確立について検討した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

カシアガム(管理番号:C2395)は国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部よりご供与いただいた。エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸、フィシオンは、東京化成工業(株)製を用いた。ダントロン(1,8-DAQ)は、富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。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), オートサンプラ: 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)

セミマイクロ天秤: 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)

オープン: DR-22(ヤマト科学(株)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(1)(抽出溶媒としてクロロホルムまたはジクロロメタンを単独で使用する場合)

過年度の検討に基づき、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)を一部改変して用いた。すなわち、試料 4.0 g を正確に量りとり、2 mol/L 硫酸 100 mL を加えて軽く振り混ぜた後、103℃で 1 時間加熱した。室温まで冷却後、内容物を分液ろう斗に移し、クロロホルム 100 mL を加えて液液分配を行った。静置後、生じたエマルションを低減するため、全量を 50 mL 容遠沈管に分注して遠心分離(400×g, 5 分, 20℃)を行い、下層(クロロホルム層)を採取した。上層に再度クロロホルムを加え、同様の抽出操作をさらに二回繰り返した後、得られたすべての下層(クロロホルム層)を合わせて減圧下で溶媒を留去した。残留物に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℃)により除去した後、上清をメタノールで 2 mL に定容したものを試験溶液とした。なお、ジクロロメタンを抽出溶媒として使用する場合は、上記の記述のクロロホルムをジクロロメタンに置き換え、同様の抽出操作を行った(図 3)。

B-3-2) 試験溶液の調製(2)(抽出溶媒として酢酸エチルを単独で使用する場合)

試験溶液の調製は、前項 B-3-1 の操作手順に準じて行った。ただし、抽出溶媒をクロロホルム(比重約 1.48 g/mL, 20℃)から酢酸エチル(比重約 0.90, 20℃)に変更したことに伴い、有機層が下層から上層となるため、抽出操作を以下のとおり変更した。すなわち、試料 4.0 g を正確に量りとり、2 mol/L 硫酸 100 mL を加えて軽く振り

混ぜた後、103℃で1時間加熱した。室温まで冷却後、内容物を分液ろう斗に移し、酢酸エチル 100 mL を加えて液液分配を行った。静置後、生じたエマルジョンを低減するため、全量を 50 mL 容遠沈管に分注して遠心分離(400×g, 5分, 20℃)を行い、上層(酢酸エチル層)を採取した。下層に再度酢酸エチルを加え、同様の抽出操作をさらに二回繰り返した後、得られたすべての上層(酢酸エチル層)を合わせて減圧下で溶媒を留去した。残留物に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℃)により除去した後、上清をメタノールで 2 mL に定容したものを試験溶液とした(図 4)。

B-3-3) 試験溶液の調製(3)(抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用する場合)

抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを併用する場合、ジクロロメタン、次いで酢酸エチルの順で段階的に液液分配を行い、各溶媒による抽出液は統合せず、それぞれ独立した試験溶液として調製した。すなわち、試料 4.0 g を正確に量りとり、2 mol/L 硫酸 100 mL を加えて軽く振り混ぜた後、103℃で1時間加熱した。室温まで冷却後、内容物を分液ろう斗に移し、ジクロロメタン 100 mL を加えて液液分配を行った。静置後、生じたエマルジョンを解消するため、全量を 50 mL 容遠沈管に分注して遠心分離(400×g, 5分, 20℃)を行い、下層(ジクロロメタン層)を採取した。上層に再度ジクロロメタンを加え、同様の抽出操作をさらに1回繰り返し、得られたすべての下層(ジクロロメタン層)を合わせて減圧下で溶媒を濃縮した。残留物に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℃)により除去した後、上清をメタノールで 2 mL に定容し、これを試験溶液 1 とした。

次に、ジクロロメタンによる液液分配後の上層について、酢酸エチル 100 mL を加えて液液分配を行った。静置後、生じたエマルジョンを解消するため、全量を 50 mL 容遠沈管に分注して遠心分離(400×g, 5分, 20℃)を行い、上層(酢酸エチル層)を採取した。下層に再度酢酸エチル

を加え、同様の抽出操作をさらに1回繰り返し、得られたすべての上層(酢酸エチル層)を合わせて減圧下で溶媒を濃縮した。残留物に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℃)により除去した後、上清をメタノールで 2 mL に定容し、これを試験溶液 2 とした(図 5)。

B-3-4) 試験溶液の HPLC 分析

調製した試験溶液について、次の測定条件を用い HPLC 分析を行った。

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℃、検出波長：435 nm、流速：1.0 mL/min、移動相 A：0.1 % トリフルオロ酢酸水溶液、移動相 B：アセトニトリル、グラジエント条件：0 min(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

C. 結果及び考察

昨年度までの検討において、JECFA 法で規定されている前処理では、加熱時間の短縮(3.5 時間から1時間)、抽出回数の増加(1回から3回)、遠心分離操作の追加(エマルジョンの解消)の必要性が明らかとなった(図 6)。今年度は、有害試験薬の使用低減の観点から、JECFA 法で規定されている抽出溶媒クロロホルムの代替溶媒を検討することを目的とし、ジクロロメタン及び酢酸エチルを候補溶媒として、その性能を添加回収試験より評価した。

C-1)各抽出溶媒を単独で使した場合の抽出効率の検討

B-3-1 及び B-3-2 の操作手順に準じ、測定対象物質 5 種(アロエエモジン、レイン、エモジン、クリソファン酸、フィシオン)及び JECFA 法では内標準物質として規定されている 1,8-DAQ を、カシアガム製品に添加し、添加回収試験(n=3)を行った。添加濃度は、JECFA 規格におけるアントラキノン類の残留上限値(0.5 mg/kg)の 10 倍に相当する濃度(5 mg/kg)で検討した。なお、

回収率及び相対標準偏差(RSD)は $n=3$ の測定結果に基づき算出した。その結果を表 1 に示す。

クロロホルムを用いた場合、アロエエモジンの回収率は 87.4%(RSD : 1.1%), レインは 84.1%(RSD : 3.2%), エモジンは 83.7%(RSD : 2.9%), 1,8-DAQ は 82.8%(RSD : 0.7%), クリソファン酸は 76.8%(RSD : 0.7%)であり、これら 5 化合物はいずれも回収率が 70%以上を満たした。一方、フィシオンは 67.4%(RSD : 2.8%)にとどまり、回収率が 70%を下回った。したがって、JECFA 法で規定されているクロロホルムを用いる条件ではフィシオンの回収率が他の化合物に比べ低下することが示された。

ジクロロメタンを用いた場合、すべての化合物で回収率 70%以上を示したものの、フィシオンは 73.1%と他の化合物と比較して低値であった。また、アロエエモジンや 1,8-DAQ では RSD が 6%を超え、クロロホルムを用いた場合と比較してばらつきが増大する傾向が認められた。

酢酸エチルを用いた場合、アロエエモジンを除く 5 種の化合物は良好な回収率及び併行精度を示した。一方、アロエエモジンは回収率が 41.7%, RSD が 22.3%と著しく低く、真度及び精度の観点から問題が認められた。以上より、代替溶媒の選定にあたっては、(i) 酢酸エチルを用いた条件にて、低回収かつ高い RSD を示したアロエエモジンについて回収率の向上と精度の改善を図ること、(ii) ジクロロメタンを用いた条件にて、相対的に低回収であったフィシオンの回収率を改善すること、(iii) ジクロロメタンを用いた条件にて、ジクロロメタンを抽出溶媒とした場合に一部測定対象物質で認められたばらつき(RSD)の低減をすべて満たすよう、操作条件のさらなる最適化が必要であることが示唆された。

C-2) ジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用した場合の抽出効率の検討

前項での検討により、抽出溶媒として酢酸エチルを単独で使用した場合にはアロエエモジンの回収率が著しく低く、ジクロロメタンを単独で使用した場合にはフィシオンの回収率が相対的に低値を示すとともに、一部の測定対象

物質で RSD が増大することが問題として確認された。これらの問題を解決するため、ジクロロメタンと酢酸エチルを段階的に使用する抽出法について、添加回収試験によりその妥当性を評価した。なお、カシアガム製品へのアントラキノン類の添加濃度は、前項と同様に 5 mg/kg とし、B-3-3 の操作手順に従い各試験溶液を調製した。試験溶液 1 及び試験溶液 2 のクロマトグラムを図 7 に示す。また、表 2 に示すように、各化合物の回収率及び RSD は、アロエエモジンは 92.2%(RSD : 2.2%), レインは 90.2%(RSD : 2.1%), エモジンは 94.3%(RSD : 1.8%), 1,8-DAQ は 96.4%(RSD : 2.4%), クリソファン酸は 95.1%(RSD : 3.6%), フィシオンは 90.0%(RSD : 4.8%)であり、検討したすべての化合物において回収率は 90%以上、RSD が 4.8%以下と真度、精度ともに良好であることが判明した。

本段階抽出法は、測定対象物質の物性差(極性など)により、有機相への分配挙動が化合物ごとに異なる点に着目した操作である。すなわち、まずジクロロメタンによって比較的疎水性が高くジクロロメタン層へ移行しやすい化合物を優先的に回収し、その後、ジクロロメタン抽出後も水層に残存する化合物を、酢酸エチルによる再抽出で回収することにより、単独溶媒では回収が不十分となりやすい化合物を補完的に抽出できる点が本法の特徴である。以上より、ジクロロメタン及び酢酸エチルの段階的な抽出は、酢酸エチルの単独使用で問題となったアロエエモジンの低回収率及び精度の低下並びにジクロロメタンの単独使用で問題となったフィシオンの相対的な回収率の低下及び一部化合物におけるばらつき増大を同時に改善できることが示された。

次に、各アントラキノン類を JECFA 規格における残留上限値(0.5 mg/kg)で添加したカシアガム製品を用い、本段階抽出法の妥当性をさらに評価した。試験溶液 1 及び試験溶液 2 のクロマトグラムを図 8、添加回収試験の結果を表 2 に示す。アロエエモジンの回収率は 78.0%(RSD:2.9%), レインは 85.6%(RSD:3.2%), エモジンは 84.1%(RSD : 2.1%), 1,8-DAQ は 88.5%(RSD : 2.5%), クリソファン酸は

88.6%(RSD : 0.6%), フィシオンは 81.5%(RSD : 3.2%)であり, 検討したすべての化合物において回収率 78%以上, RSD 3.2%以下と, 真度及び併行精度ともに良好であることが判明した. 以上の結果から, 本段階抽出法は JECFA 規格における残留上限値相当の濃度を含む試料においても, アントラキノン類を良好な精度で抽出可能であることが明らかとなった.

なお, 本段階抽出法では, ジクロロメタン層及び酢酸エチル層から得られた抽出溶液は統合せずに減圧濃縮し, 試験溶液を調製した後, HPLC 分析に供した. この操作の根拠として, 両溶媒の抽出液を統合して減圧濃縮し試験溶液を調製した場合, 表 3 に示すようにアロエエモジンの回収率が 43.2%に大幅に低下し, また, RSD も 27.8%と著しく増大することが確認されたことが挙げられる. この回収率の低下及び RSD の増大は, 抽出溶液の統合や濃縮過程における何らかの影響により損失を受けることに起因するものと推察される. したがって, 本段階抽出法の適用にあたっては, 各有機層からそれぞれ独立した試験溶液を調製することが, 分析精度の確保の点で, 不可欠であることが確認された.

D. 結論

本研究では, 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 規格の分析法を基盤とした前処理法の改良を検討した. 具体的には, クロロホルムの代替抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを候補溶媒として選定し, 添加回収試験によりその適用性を評価した. その結果, 各溶媒を単独で使用した場合, 測定対象物質の一部において真度または精度の面で問題が認められた. これらの問題を解決するため, ジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用する抽出法(段階抽出法)を新たに考案し, 添加回収試験によってその妥当性を評価した. 添加濃度 5 mg/kg(JECFA 残留上限値の 10 倍相当)での検討において, 本段階抽出法により調製した試験溶液では, 検討した全 6 化合物(測定対象物質 5 種及び内標準物質 1 種)の回収率が 90%以上, RSD が 4.8%以下となり,

真度及び精度ともに良好であることが明らかとなった. さらに, JECFA 規格の残留上限値(0.5 mg/kg)相当の添加濃度での検討においても, 全化合物の回収率は 78%以上, RSD は 3.2%以下であり, 当該濃度域における良好な抽出性能が示された. また, 本段階抽出法の適用においては, ジクロロメタン層及び酢酸エチル層の抽出液を統合せずにそれぞれ独立して減圧濃縮し, 試験溶液を調製することが, アロエエモジンの定量における真度及び精度の確保のために不可欠であることが確認された. 以上より, 本段階抽出法は, クロロホルムを使用せず, カシアガム中のアントラキノン類を良好な真度及び精度をもって抽出が可能な有効な手法であることが実証された.

E. 文献

- 1) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書, 日本食品添加物協会技術委員会編. 東京, 日本食品添加物協会(1999)
- 2) 第 5 版 既存添加物自主規格, 日本食品添加物協会技術委員会編. 東京, 日本食品添加物協会(2021)
- 3) Mahungu S M, Meyland I: CASSIA GUM Chemical and Technical Assessment (CTA). Submitted to JECFA (dossier dated 4 Dec 2008). 2008.
- 4) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA): Combined Compendium of Food Additive Specifications. FAO JECFA Monographs, 2018; 22: 15-21.
- 5) Genovese S, Tammara F, Menghini L, Carlucci G, Epifano F, Marcotullio M C: Comparison of three different extraction methods and HPLC determination of the anthraquinones aloemodine, emodine, rheine, chrysophanol and physcione in the bark of *Rhamnus alpinus* L. (Rhamnaceae). *Phytochemical Analysis*, 2010; 21: 261-267.
- 6) Locatelli M, Tammara F, Menghini L, Carlucci G, Epifano F, Genovese S: Anthraquinone profile and chemical fingerprint of *Rhamnus saxatilis* L. from Italy. *Phytochemistry Letters*,

2009; 2: 223-226.

F. 研究発表

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 大槻崇, ^1H -qNMR に基づく相対モル感度を用いた食品関連成分分析法の確立, 日本農芸化学会中部支部第 203 回例会シンポジウム, 2025 年 11 月(長野)
- 2) 岩崎大剛, 川本広明, 村上敏之, 大槻崇, 松藤寛, ブラックジンジャー由来 PMF の定量: 相対モル感度(RMS 法)の検討, ノビレチン・PMF 研究会第 8 回学術研究会, 2025 年 11 月(神奈川)
- 3) 多田敦子, 内山陽介, 栗田史子, 羽石奈穂子, 林真輝, 杉浦潤, 大槻崇, 河野敏己, 池野恵美, 建部千絵, 高田翔平, 黒原崇, 日置冬子, 久保田浩樹, 佐藤恭子, 杉本直樹, 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(令和 6 年度), 第 62 回全国衛生化学技術協議会年会, 2025 年 11 月(群馬)
- 4) 山崎太一, Yang Liu, Carlos Amezcua, 大槻崇, 加藤毅, 神山和夫, 高岡信也, 水本俊行, 杉本直樹, 相対モル感度(RMS)を用いた定量分析法の国際規格(ISO)化のための国際共同試験, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会, 2025 年 11 月(埼玉)
- 5) 今岡美史, 高田翔平, 黒原崇, 藤原由美子, 建部千絵, 窪崎敦隆, 大槻崇, 多田敦子, 松藤寛, 杉本直樹, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会, 2025 年 11 月(埼玉)
- 6) 岩崎大剛, 川本広明, 村上敏之, 大槻崇, 松藤寛, ^1H -qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いたブラックジンジャー由来ポリメトキシフラボンの新規 LC 定量法, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会, 2025 年 11 月(埼玉)
- 7) 白男川晃成, 佐藤ななみ, 浪川幸己, 森山のん, 藤佑志郎, 山本将之, 大槻崇, 松藤寛, アクテオシドを高生産するゴマ品種及び栽培条件の探索, 第 40 回日本ゴマ科学大会, 2025 年 10 月(香川)
- 8) 大槻崇, 相対モル感度を用いたシングルリ

ファレンス LC 法による食品関連成分分析法の確立, 日本食品分析学会 令和 7 年度学術集会, 2025 年 09 月(東京)

- 9) 今岡美史, 高田翔平, 黒原崇, 藤原由美子, 建部千絵, 窪崎敦隆, 大槻崇, 多田敦子, 松藤寛, 杉本直樹, 食用タール色素不純物の合成と組成分析による品質評価, 日本食品分析学会 令和 7 年度学術集会, 2025 年 09 月(東京)
- 10) 黒原崇, 長谷川千紘, 今岡美史, 藤原由美子, 建部千絵, 高田翔平, 窪崎敦隆, 大槻崇, 松藤寛, 多田敦子, 杉本直樹, タール色素不純物 ESBSA 異性体の同定に向けた合成と分析, 第 11 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム, 2025 年 09 月(埼玉)
- 11) 白男川晃成, 佐藤ななみ, 浪川幸己, 森山のん, 藤佑志郎, 山本将之, 大槻崇, 松藤寛, 品種の異なるゴマの葉中ポリフェノールおよびイリドイドの分析, 日本食品化学学会 第 31 回学術大会, 2025 年 06 月(滋賀)

F-2) 論文発表

F-2-1) 論文等

- 1) Miura T, Liu Y, Bzhelyansky A, Ohtsuki T, Matsufuji H: Development of ^1H qNMR analytical procedure for purity determination of Imazosulfuron and 1,4-BTMSB- d_4 for ISO 17034 accreditation. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2024; qsaf099.
- 2) Masumoto N, Yamazaki T, Miura T, Nakajima K, Yamamoto K, Kato T, Minamoto N, Suematsu T, Sato Y, Nomura A, Akagi M, Ohtsuki T, Koyama K, Mizumoto T, Miyashita T, Kawashima S, Saito T, Sugimoto N: Development of a standard-free analytical quantitative method based on liquid chromatography using relative molar sensitivity for chlorogenic acid in apple juice. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2025; 73: 650-657.

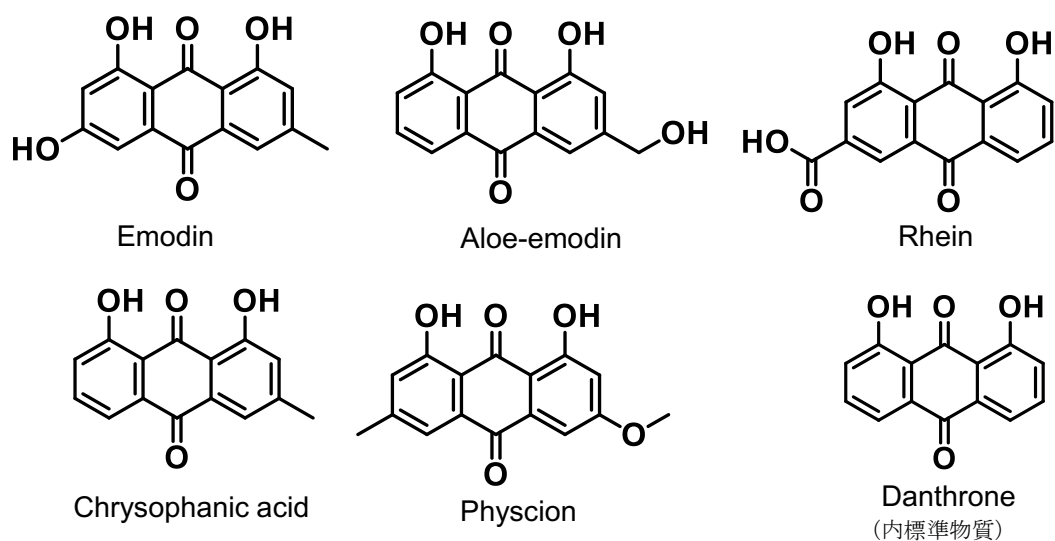


図1 JECFA 規格で規定されている分析法の測定対象物質(5 種)及び内標準物質の化学構造

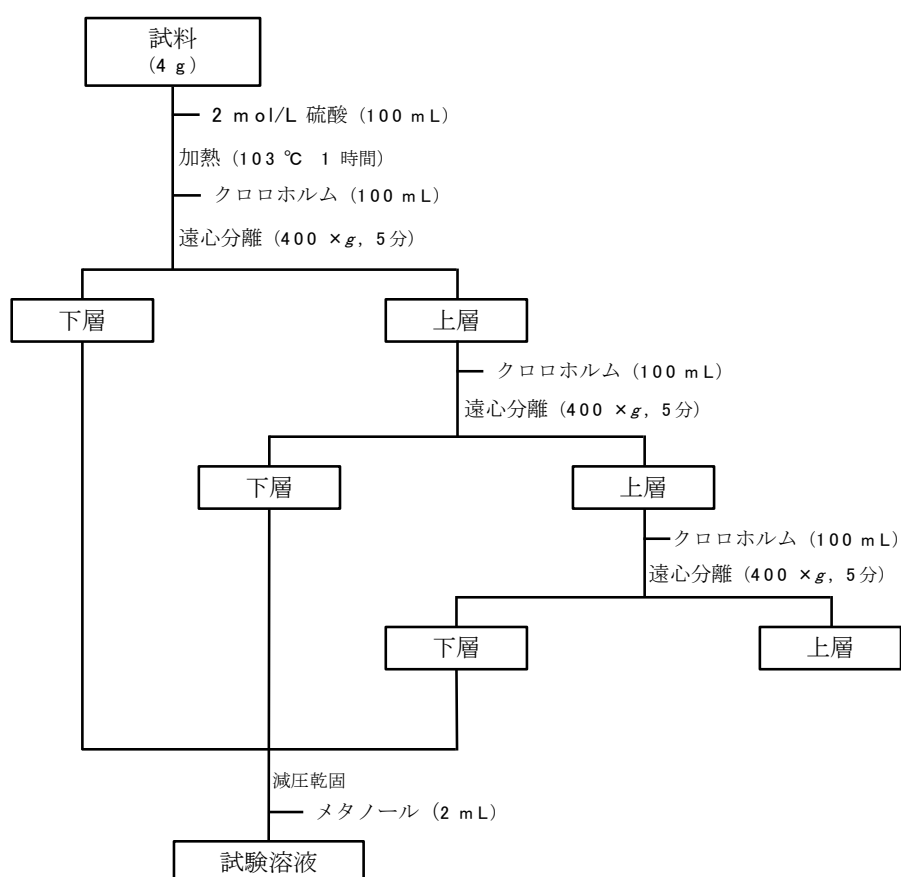


図2 試験溶液の調製法(抽出溶媒としてクロロホルムを単独で使用する場合)

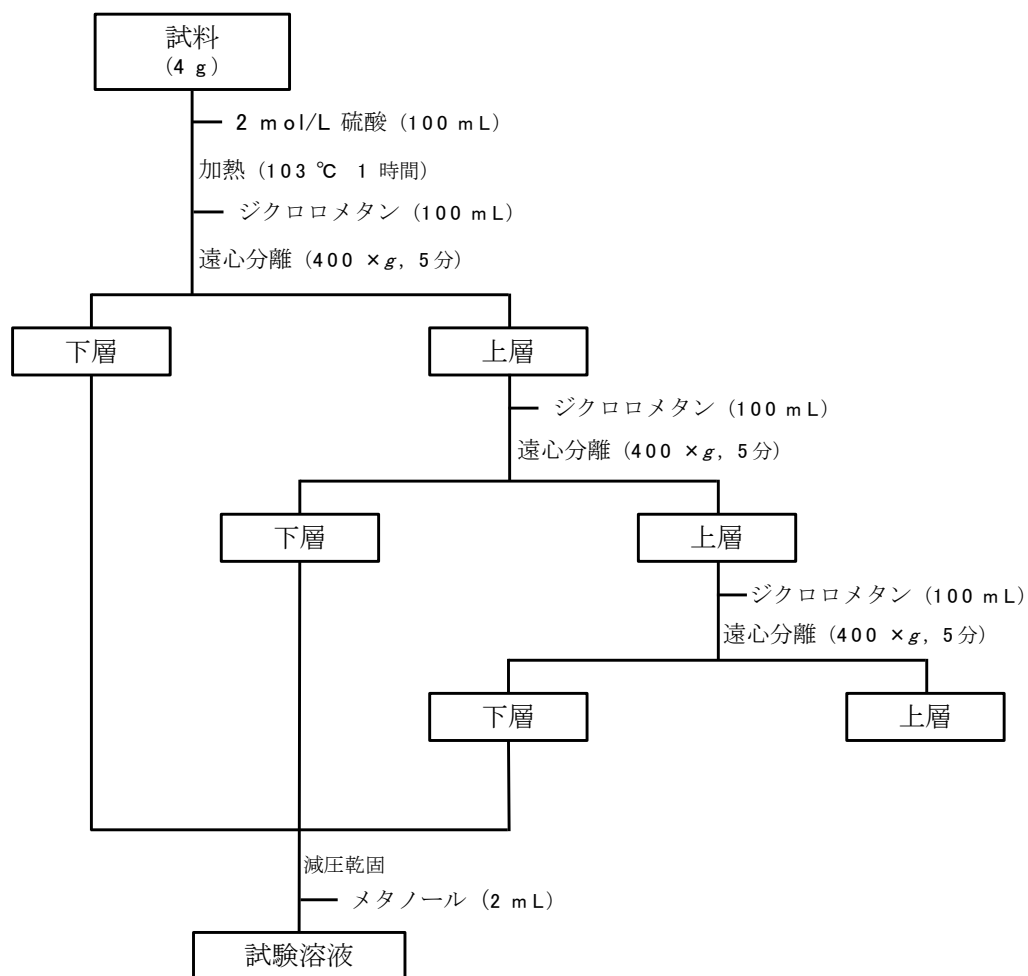


図3 試験溶液の調製法(抽出溶媒としてジクロロメタンを単独で使用する場合)

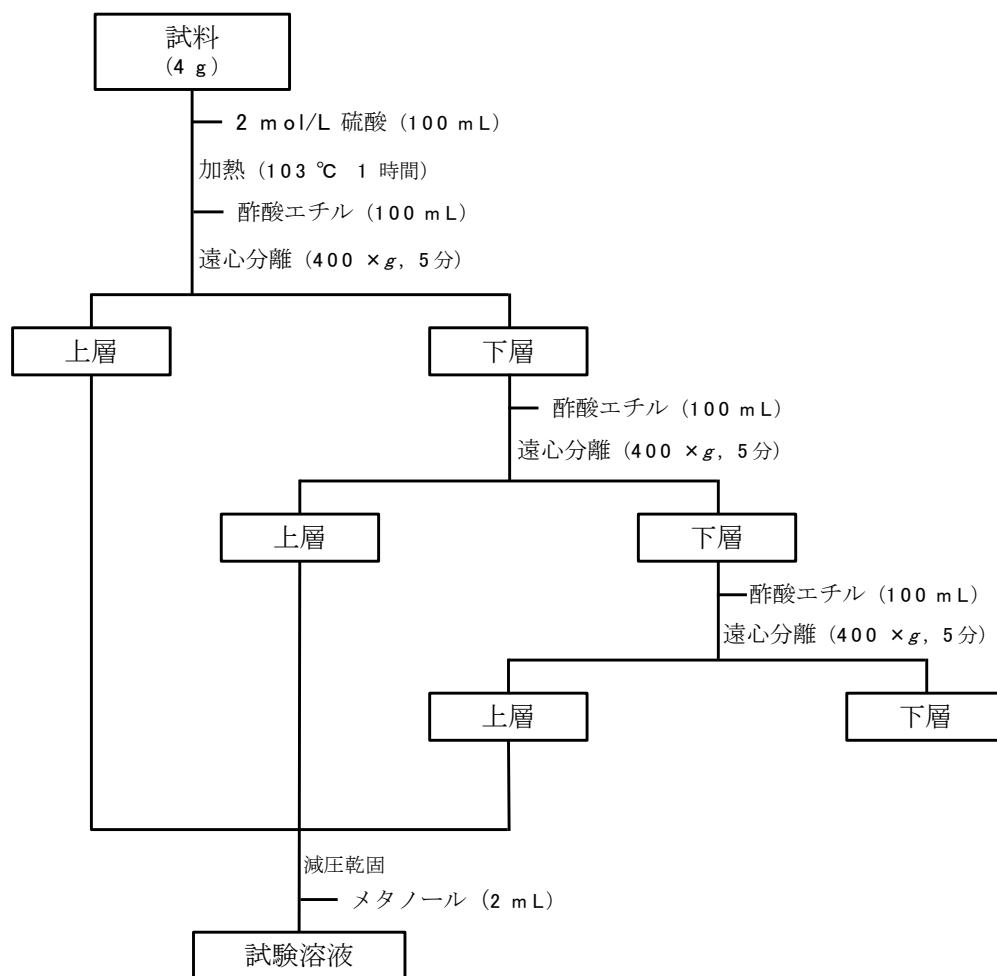


図 4 試験溶液の調製法 (抽出溶媒として酢酸エチルを単独で使用する場合)

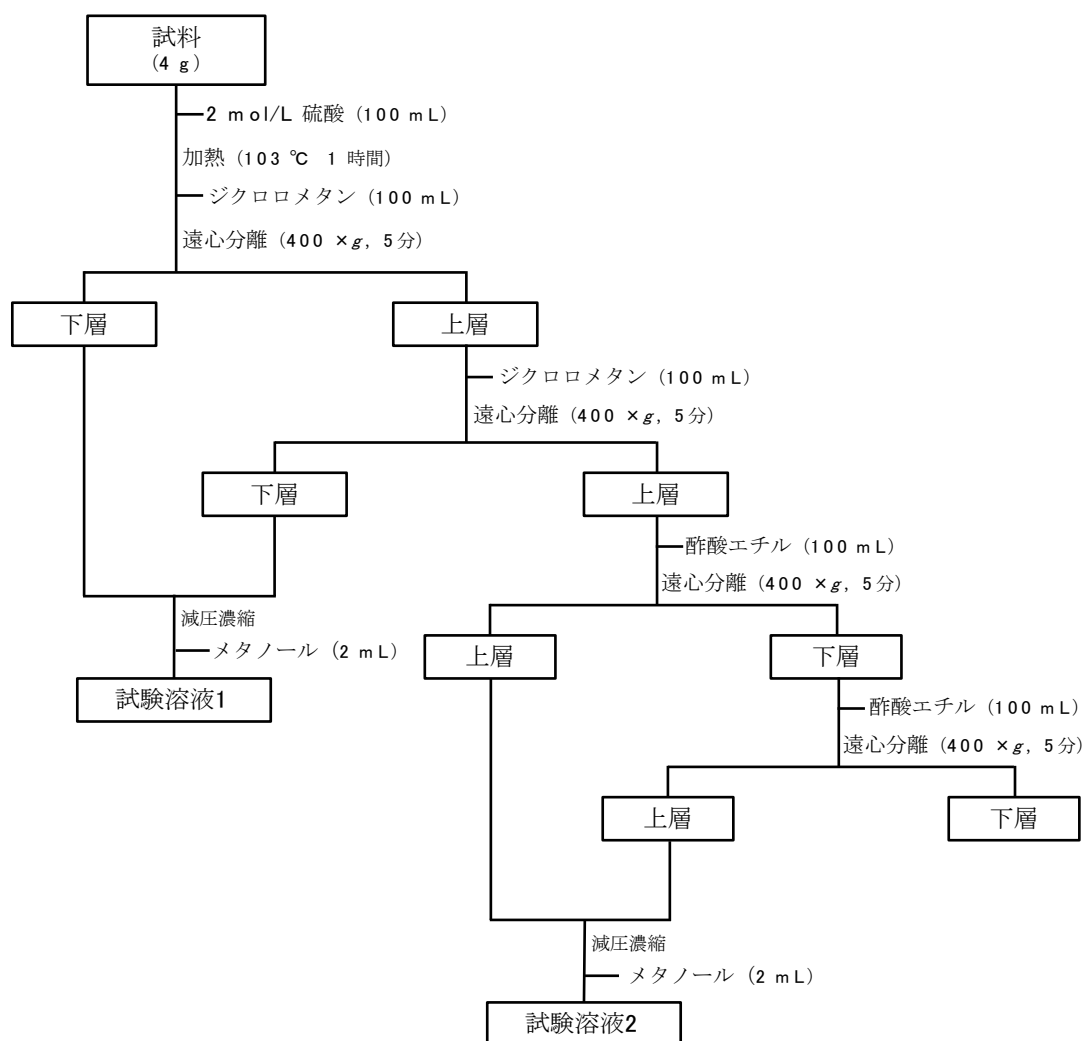


図5 試験溶液の調製法

(抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用する場合)

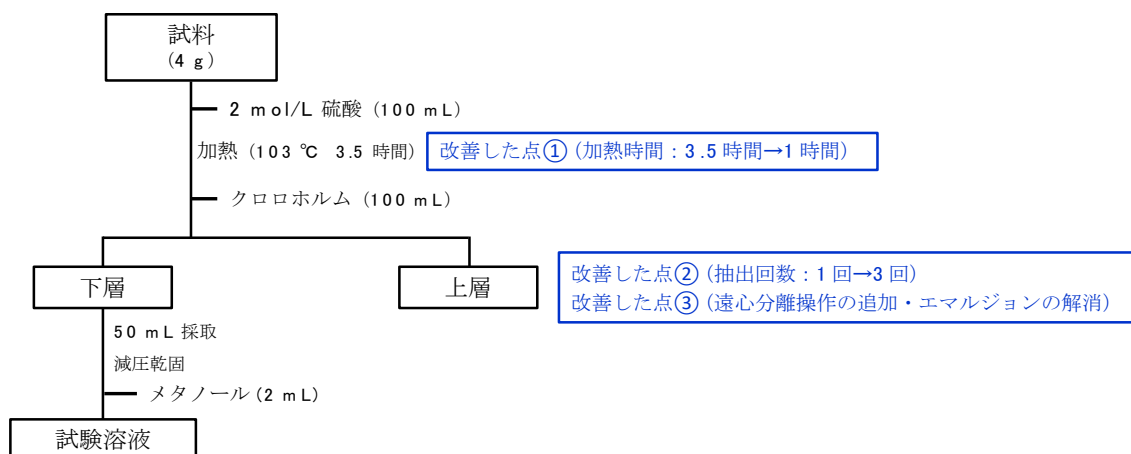


図 6 JECFA Monographs におけるカシアガム規格で規定されているアントラキノン類分析法の試験溶液の調製法並びに昨年度までの検討において改善した点

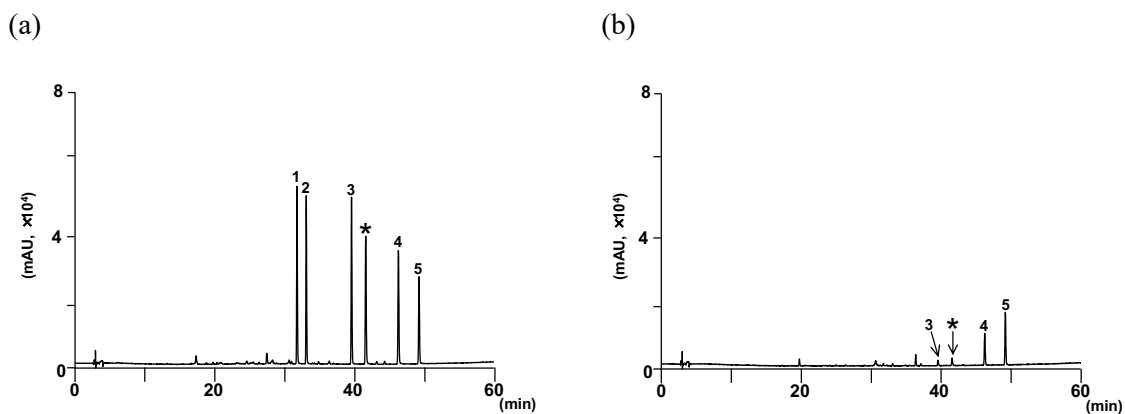


図 7 アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度 : 5.0 mg/kg)より段階抽出法により調製した試験溶液のクロマトグラム

(a) : 試験溶液 1(ジクロロメタン層由来), (b) : 試験溶液 2(酢酸エチル層由来)

1. Aloe-emodin, 2. Rhein, 3. Emodin, 4. Chrysophanic acid, 5. Physcion, * 1,8-DAQ

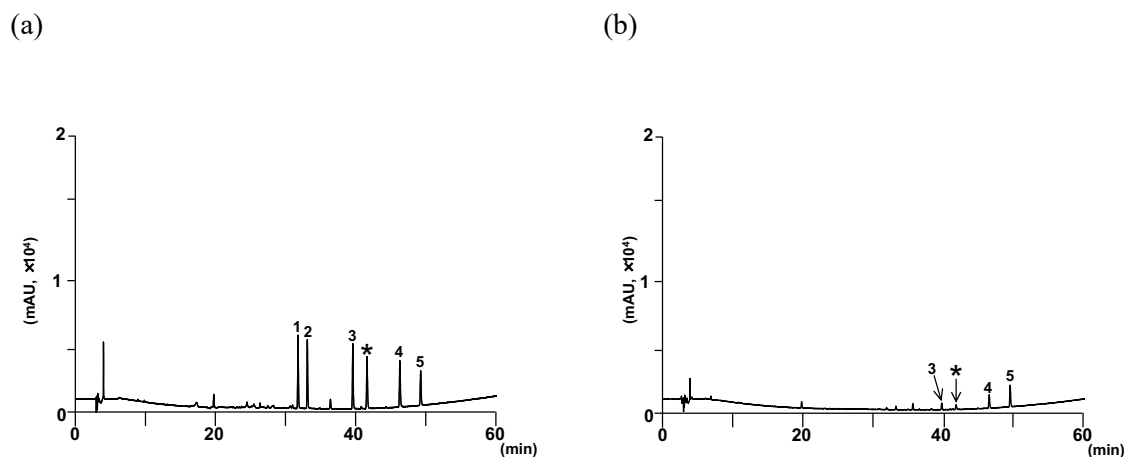


図 8 アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：0.5 mg/kg)より
段階抽出法により調製した試験溶液のクロマトグラム

(a)：試験溶液 1(ジクロロメタン層由来)，(b)：試験溶液 2(酢酸エチル層由来)

1. Aloe-emodin, 2. Rhein, 3. Emodin, 4. Chrysophanic acid, 5. Physcion, * 1,8-DAQ

表 1 各抽出溶媒を単独で使した場合のアントラキノン類の添加回収試験の
結果(n=3)

	Extraction solvent					
	Chloroform		Dichloromethane		Ethyl acetate	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Aloe-emodin	87.4	1.1	83.2	6.6	41.7	22.3
Rein	84.1	3.2	84.9	6.0	95.9	0.9
Emodin	83.7	2.9	88.2	3.4	96.5	1.6
1,8-DAQ	82.8	0.7	94.4	7.8	99.6	0.4
Chrysophanic acid	76.8	0.7	85.1	2.8	98.1	0.7
Physcion	67.4	2.8	73.1	5.6	94.6	1.9

試料：アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：5.0 mg/kg)

表2 ジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用した場合のアントラキノン類の添加回収試験の結果(n=3)

	0.5 mg/kg spiked		5.0 mg/kg spiked	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Aloe-emodin	78.0	2.9	92.2	2.2
Rein	85.6	3.2	90.2	2.1
Emodin	84.1	2.1	94.3	1.8
1,8-DAQ	88.5	2.5	96.4	2.4
Chrysophanic acid	88.6	0.6	95.1	3.6
Physcion	81.5	3.2	90.0	4.8

表3 ジクロロメタン層及び酢酸エチル層を統合して試験溶液を調製した場合のアントラキノン類の添加回収試験の結果(n=3)

	Recovery (%)	RSD (%)
Aloe-emodin	43.2	27.8
Rein	91.5	2.4
Emodin	93.2	2.1
1,8-DAQ	92.1	3.0
Chrysophanic acid	91.8	1.8
Physcion	85.6	3.9

試料：アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：0.5 mg/kg)

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7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 の校正用化合物や既存添加物の定量法に利用可能なシングルフアレンス (SR) 用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を確認した。また、アナトー色素の定量用 SR 候補化合物の誘導体の設計・合成を行った。

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 (SR)) 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** (図 1) についてその誘導体の UV 吸収の波長変化を確認した。また、アナトー色素の一種であるビキシンの SR 化合物について、HPLC クロマトグラム上における溶出位置を制御するための誘導体を合成した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

化合物の合成や分析には下記のものを使用した。2,3-ジクロロ-5-ニトロ-1,4-ナフトキノン (TCI, D2428), *N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミン (TCI, D0779), アミルアミン (TCI, A0445), ヘキシルアミン (TCI, H0134), ヘプチルアミン (Sigma-Aldrich, 126802), (TCI, O0045), *n*-オクチルアミン (TCI, O0045), ノニルアミン (TCI, N0297), 1-アミノデカン (TCI, D0033), 1-アミノウンデカン (TCI, A0761), ドデシルアミン (FUJIFILM 和光純薬, 129-00243), 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. その他, 溶媒類, 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、およびヨウ素蒸気によって行った。化合物精製のためのカラムクロマトグラフィー用のシリカゲルには、中圧カラムクロマトグラフィー装置 (Smart Flash) (山善)、および中圧カラムクロマトグラフィー用充填カラム (Hi-Flash column / Inject column (山善)を使用した。¹Hおよび¹³C-NMR スペクトルはNMR 測定用の重水素化溶媒を使用して、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) (CDCl₃: 0 for ¹H-NMR), もしくは残留溶媒のシグナルを内部標準として補正した (CDCl₃: 77.16 for ¹³C-NMR; DMSO-*d*₆: 2.50 for ¹H-NMR, 39.52 for ¹³C-NMR)。シグナルの分裂様式は以下に示す通りである (singlet (s), doublet (d), double of doublets (dd), doublet of doublets of doublets (ddd), multiplet (m), broad (br))。質量分析は LCMS-9050 (Shimadzu) を使用し、エレクトロスプレーイオン化法にて測定した。合成した化合物の NMR スペクトルを図 4-19 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度計には V-730 (日本分光)を使用した。化合物は 50 μ M の DMSO 溶液とし、光路長 10 mm の石英セルを用いて測定した。青色 3 号 (Disperse Blue 3)は Aldrich 社製 (21,565-1, Dye content ~20%)を使用した。

C. 結果及び考察

C-1) 1,4-ナフトキノ誘導体の UV スペクトル

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および 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。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した。本研究においては、これまで 1,4-ナフトキノ誘導体の UV 吸収の長波長に寄与していると考えられた構造を組み合わせた構造として **1'** の分子 (Scheme 1) について UV スペクトルを測定した。図 1 に基となる化合物 **1** と比較した UV スペクトルを示している。**1'** においては **1** と比較して顕著な UV 吸収の長波長化は観察されなかったが、長波長域における吸収強度は増加しており、特に 500–700 nm 付近における吸収強度が増加していることが分かった。この点について、参照物質として青色 3 号 (DB3) の UV スペクトルを比較として測定したところ、500–700 nm 付近におけるスペクトルの形状に類似性がみられた。これらの化合物の分子構造の共通点として、5 位および 8 位にアミノ基を有している。この位置のアミノ基上の水素原子は 1,4-ナフトキノンの 2 つのカルボニル酸素と分子内で水素結合を形成できるため、おそらくこの構造が両化合物の UV スペクトルの類似性に寄与しているものと考えられた。

C-2) アナトー色素用 SR 化合物の合成

本研究にて、これまでにビスアリアルマレイミド分子の芳香環置換誘導体を合成している中で、2 つのインドールを芳香環として導入したビスインドリルマレイミド誘導体の吸収波長がビキシシンに対する SR 化合物として有望であることが示唆された。図 2 にビスインドリルマレイミド誘導体 (赤色化合物) の UV-Vis スペクトルとビキシシンの UV-Vis スペクトルを重ね合わせたものを示している。吸光度の強度に差はあるが、吸収波長域は類似しており、ビキシシンに対する SR 化合物として適した性質を有することが示唆された。また、この誘導体については、インドール環の窒素原子をアルキル基で置換しても吸収波長の変化が軽微であるため、さらなる分子修飾による構造展開や高機能化が可能であると期待される。このビ

スインドリルマレイミド骨格の分子について、HPLC クロマトグラム上における保持時間を変化させるための官能基として、直鎖炭化水素アミンを導入した誘導体 (**C5**–**C12**) を合成した。化合物の合成については各鎖長に対応するアミンを個別に反応させて調製することが可能である (例: C-1-1 の項; 化合物 **C11**)。一方で、各鎖長に対応するアミンの混合物と化合物 **3** を反応させることで複数種類の化合物を一挙に合成することも可能である (例: C-1-2 の項)。この混合物は順相シリカゲル上における極性はそれほど差がないためにそれぞれを分離することは困難であるが、逆相の充填剤 (**C18**) においては、その疎水性の違いによって容易に分離できる (図 3)。そのため、複数化合物の混合物として調製し、逆相 HPLC によって分離するという方法によって、多種の分子を一挙に合成することが可能である。この方法によってスクリーニング的に SR 候補分子を合成し、その HPLC クロマトグラム上における溶出位置を確認・比較することが可能であった。

C-1-1) SR 候補分子の個別合成例

化合物 **3** の合成

化合物 **2** (**Bn**) (417 mg, 1.0 mmol) のエタノール懸濁液 (4 mL) に 4M 水酸化カリウム水溶液 (2 mL) を加えて、60°C にて 3 時間攪拌した。反応液を 0°C に冷却し、10% 塩酸 (8 mL) を加えて液性を酸性 (pH 1~2) とした後、ジクロロメタン (20 mL x 2) で抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮することで化合物 **3** を暗赤色固体として得た (275 mg)。この化合物はこれ以上精製せずに次の反応に使用した。

化合物 **C11** の合成

化合物 **3** (200 mg, 0.609 mmol) のトルエン (5.5 mL) / 酢酸溶液 (0.6 mL) に、室温にて 1-アミノウンデカン (156 μ L, 0.73 mmol) を加え、反応液を 110°C にて 14 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、酢酸エチル (40 mL) で希釈し、1M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、

濾過し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 9 : 1 to 4 : 6) することで、化合物 **C11** を赤色無定形固体として得た (115 mg, 60%)。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.60 (s, 2H), 7.67 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.06 (dd, J = 8.1, 7.8 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.74 (dd, J = 8.1, 7.8 Hz, 2H), 3.68 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.74–1.70 (m, 2H), 1.40–1.32 (m, 4H), 1.29–1.24 (m, 12H), 0.86 (t, J = 7.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.5, 135.8, 128.3, 127.5, 125.4, 122.6, 121.9, 120.3, 111.2, 107.2, 38.4, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 28.8, 27.0, 22.7, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_2$ 482.2802, found 482.2807 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 **C5**–**C12** (**C11** を除く) の一斉合成

化合物 **3** (120 mg, 0.365 mmol) のトルエン (3.3 mL) / 酢酸溶液 (0.34 mL) に、室温にてアミルアミン、ヘキシルアミン、ヘプチルアミン、*n*-オクチルアミン、ノニルアミン、1-アミノデカンおよびドデシルアミン (それぞれ 0.052 mmol) を加え、反応液を 110°C にて 12 時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、酢酸エチル (40 mL) で希釈し、1M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、濾過し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムパッド (Φ = 2 cm, h = 2 cm, ヘキサン: 酢酸エチル = 9 : 1 to 2 : 1) に付し、ろ液を濃縮して回収した。得られた残渣を逆相 HPLC (Column: XBridge BEH C18 OBD™ (19 I.D x 250 mm, 5 μ m) (Waters), Flow rate : 10 mL/min, Detection : UV254 nm, Column temp. : rt, Mobile phase : 90% MeOH aq. (isocratic)) で分離精製することで、目的化合物をそれぞれ赤色無定形固体として得た (**C5**: 7 mg, 4.8%; **C6**: 6.8 mg, 4.5%; **C7**: 6 mg, 3.9%; **C8**: 9 mg, 5.6%; **C9**: 7.5 mg, 4.5%; **C10**: 7 mg, 4.2%; **C12**: 7.5 mg, 4.1%)。

化合物 **C5**

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (s, 2H), 7.72 (d, J = 3.0 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.08 (dd, J

= 8.4, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.75 (dd, J = 8.4, 7.8 Hz, 2H), 3.69 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.72 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.39–1.38 (m, 4H), 0.91 (t, J = 6.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.3, 29.1, 28.5, 22.3, 14.0. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$ 398.1863, found 398.1859 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C6

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.55 (s, 2H), 7.73 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.08 (dd, J = 8.4, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.76 (dd, J = 8.4, 7.8 Hz, 2H), 3.69 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.41–1.31 (m, 6H), 0.89 (t, J = 7.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.4, 28.8, 26.6, 22.5, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2$ 412.2020, found 412.2017 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C7

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.54 (s, 2H), 7.74 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.08 (dd, J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.76 (dd, J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 3.68 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.40–1.33 (m, 4H), 1.32–1.27 (m, 4H), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 122.0, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.7, 28.9, 28.8, 26.9, 22.6, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$ 426.2176, found 426.2179 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C8

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (s, 2H), 7.72 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 7.07 (dd, J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.76 (dd, J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 3.69 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.37–1.31 (m, 4H), 1.32–1.27 (m, 6H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.5, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.8, 29.2, 29.2, 28.8, 27.0, 22.6, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd.

for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_2$ 440.2333, found 440.2329 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C9

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.55 (s, 2H), 7.73 (d, J = 3.0 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.07 (dd, J = 8.1, 7.8 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.75 (dd, J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 3.68 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.41–1.33 (m, 4H), 1.30–1.22 (m, 8H), 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.8, 29.5, 29.3, 29.3, 28.8, 27.0, 22.6, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_2$ 454.2489, found 454.2482 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C10

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.55 (s, 2H), 7.74 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.07 (dd, J = 8.1, 7.2 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.76 (dd, J = 8.1, 7.2 Hz, 2H), 3.68 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.41–1.32 (m, 4H), 1.30–1.22 (m, 10H), 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 28.8, 27.0, 22.7, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2$ 468.2646, found 468.2650 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

化合物 C12

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.55 (s, 2H), 7.73 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.07 (ddd, J = 8.4, 7.8, 1.2 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.76 (ddd, J = 8.4, 7.8, 1.2 Hz, 2H), 3.68 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.74–1.69 (m, 2H), 1.40–1.32 (m, 4H), 1.30–1.25 (m, 14H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 135.8, 128.2, 127.4, 125.5, 122.6, 121.9, 120.3, 111.1, 107.3, 38.4, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 28.8, 27.0, 22.7, 14.1. HRMS (ESI): m/z calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_2$ 496.2959, found 496.2954 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

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。今回の検討では複数の置換基を組み合わせた誘導体 **1'**について UV-Vis スペクトルを測定した。誘導体 **1'**は基の分子である **1**と比較して顕著な長波長化は観測されなかった。誘導体 **1'**は結果としては図らずしも既存の色素分子である青色 3 号の分子構造に共通した構造を有しており、UV スペクトルの類似性もこの部分に起因することが示唆された。今後はこの化合物構造をベースとし、構造情報を蓄積するとともに偶然や経験に頼るだけでなく、理論的に吸収スペクトルの制御できる設計指針を立てることが重要と考えられる。

既存添加物の SR 候補化合物の開発については、「1) 比較対象と類似の UV 吸収を示す構造を選択し、2) 導入する炭化水素基で HPLC クロマトグラム上の保持時間を調整する」という方針のもと、複数の誘導体の一斉合成法を確立した。HPLC 法によって定量を行うことを想定した場合のデザインとしては、設計コンセプトの成立がなされたと考えている。今後は定量対象であるアナトー色素類との HPLC クロマトグラム上における保持時間を比較して候補となる誘導体を選定、定量 NMR による候補化合物の純度の値付けを行い、定量への応用に向けた検討を進める予定である。

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. 11(23), 5959-5968 (2020).

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

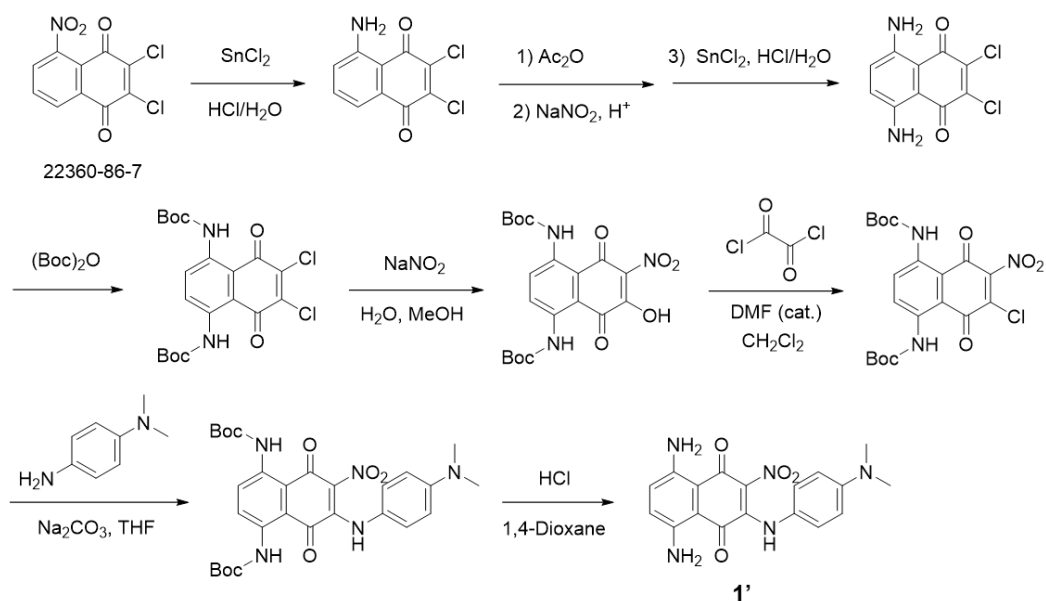
F-2) 論文発表

F-2-1) 論文等

なし

F-2-2) 総説等

なし



Scheme 1. 1,4-ナフトキノン誘導体 1' の合成

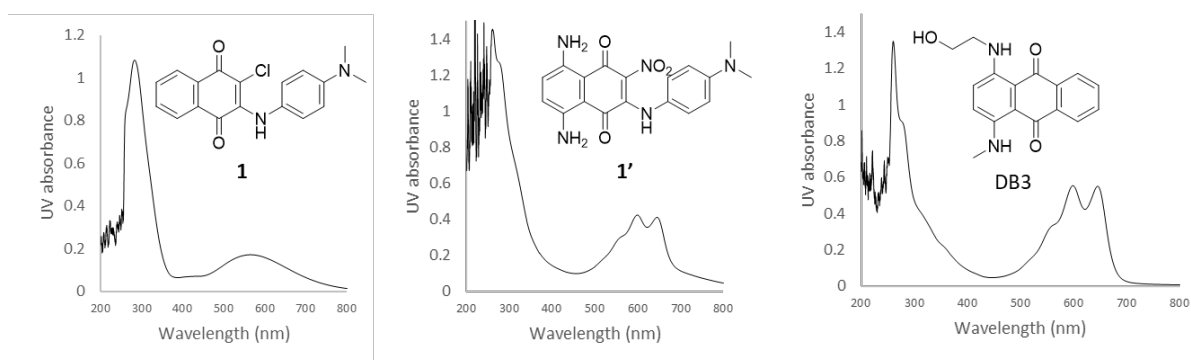


図 1. 1,4-ナフトキノン誘導体および青色 3 号 (DB3) の UV-Vis スペクトル

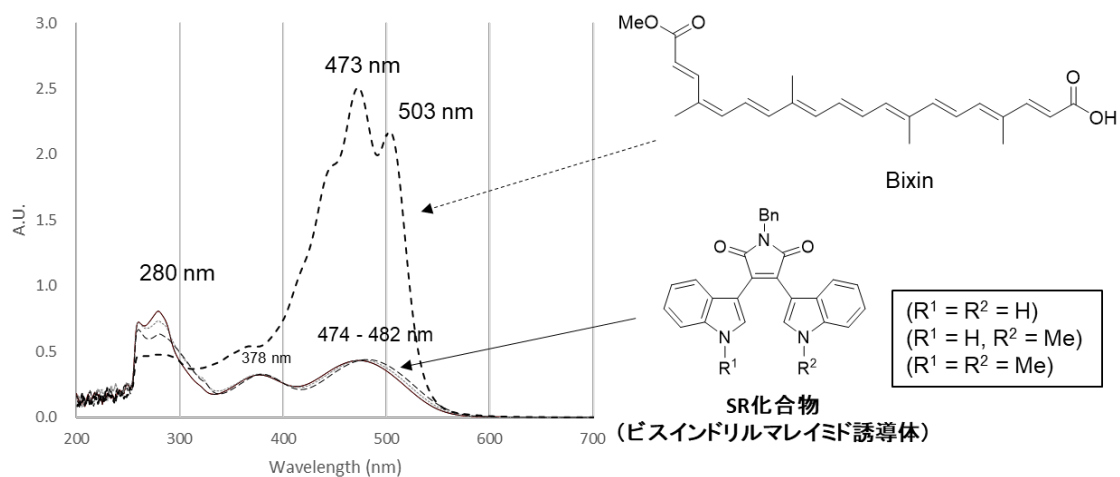
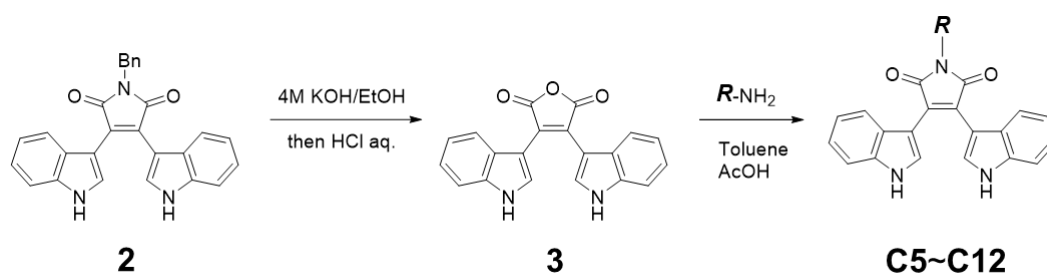


図 2. ビキシンの SR 化合物との UV スペクトルの重ね合わせ



Scheme 2. ビスインドリルマレイミド誘導体の合成

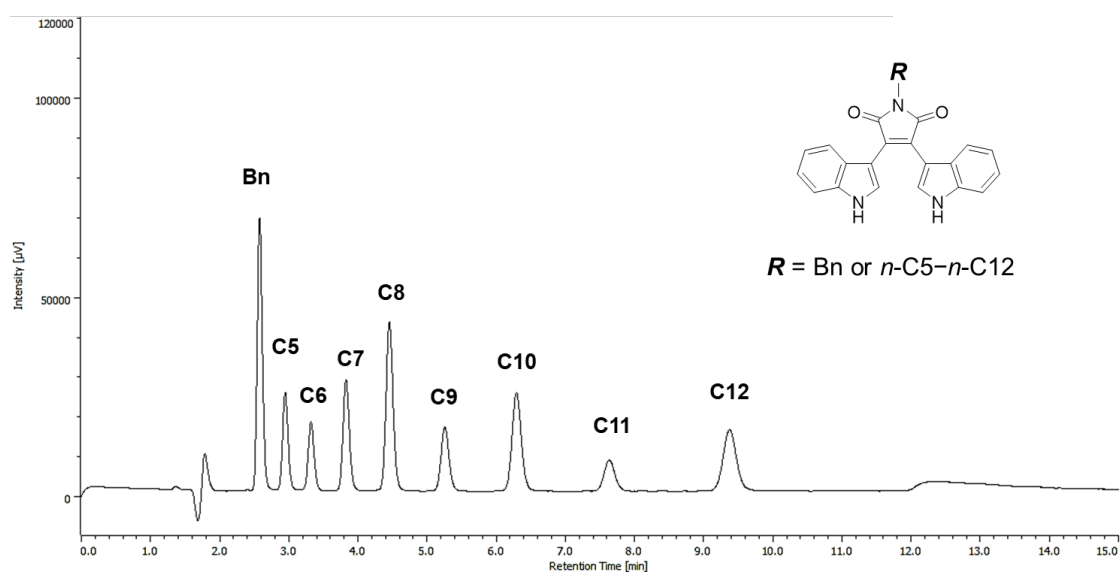


図 3. SR 化合物(Bn, C5~C12)の HPLC による一斉分析

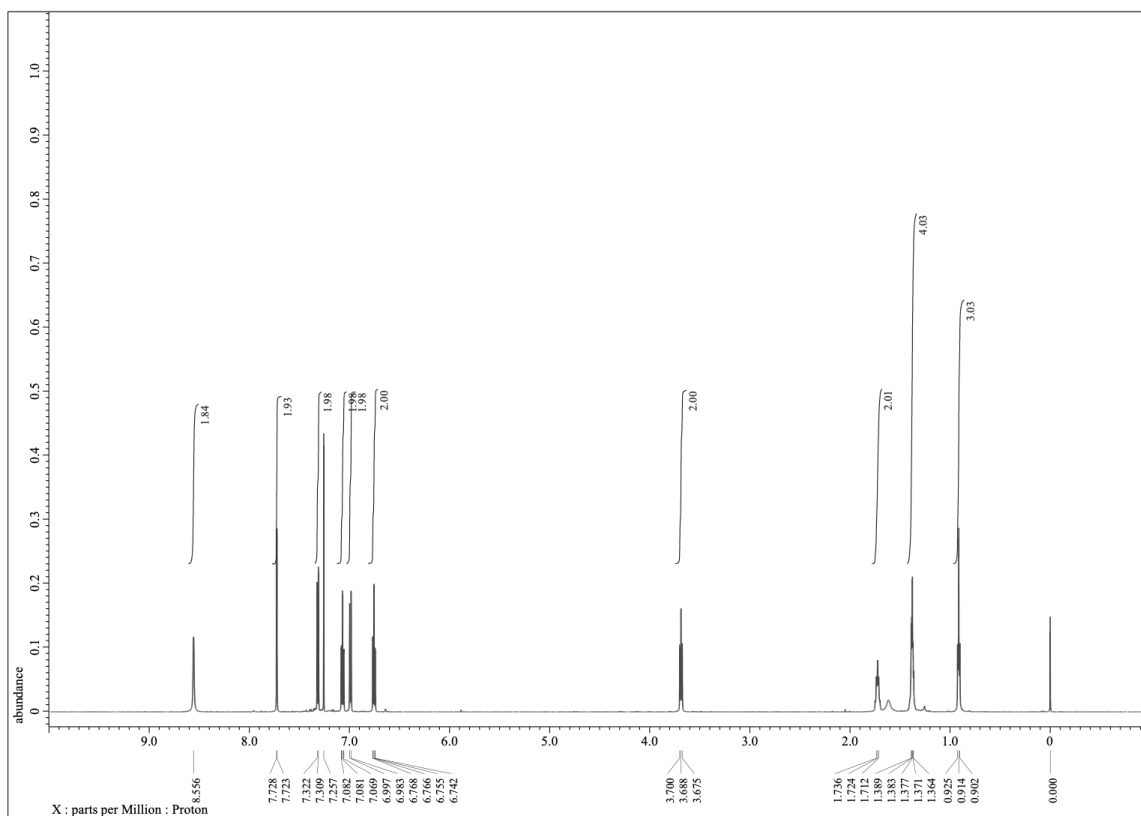


図4. 化合物C5の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

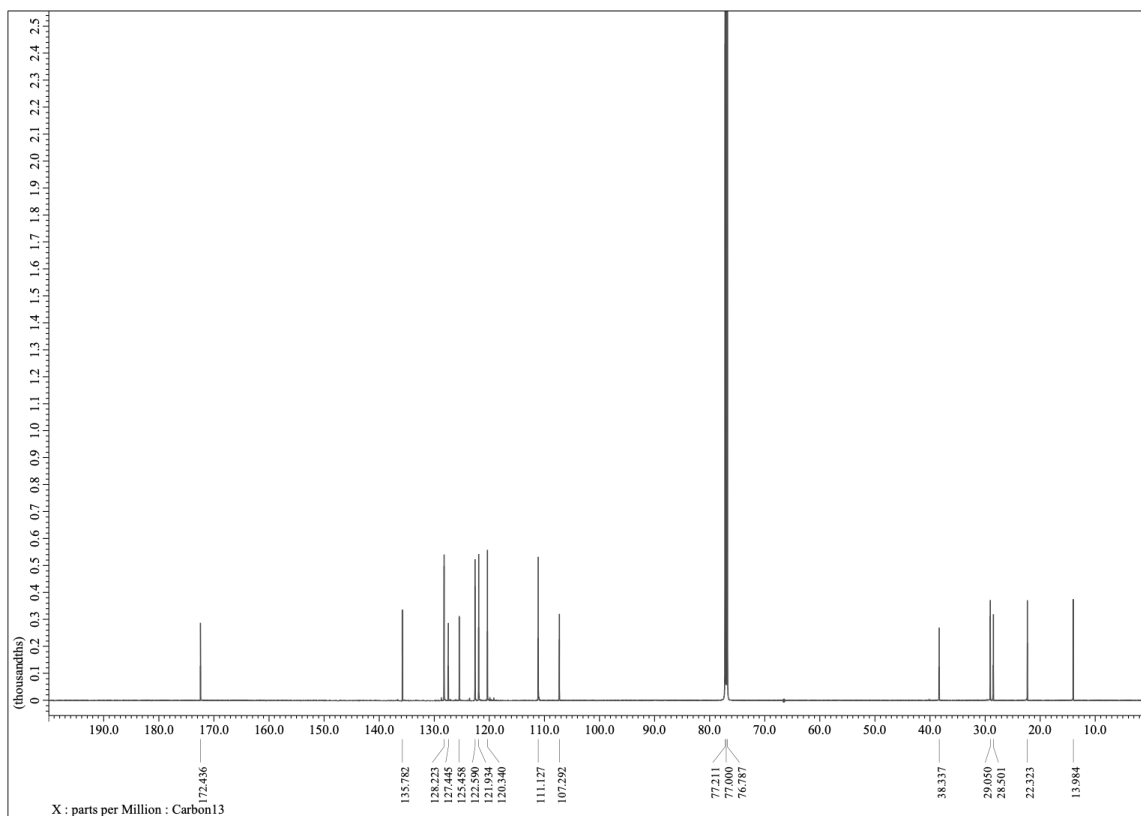


図5. 化合物C5の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

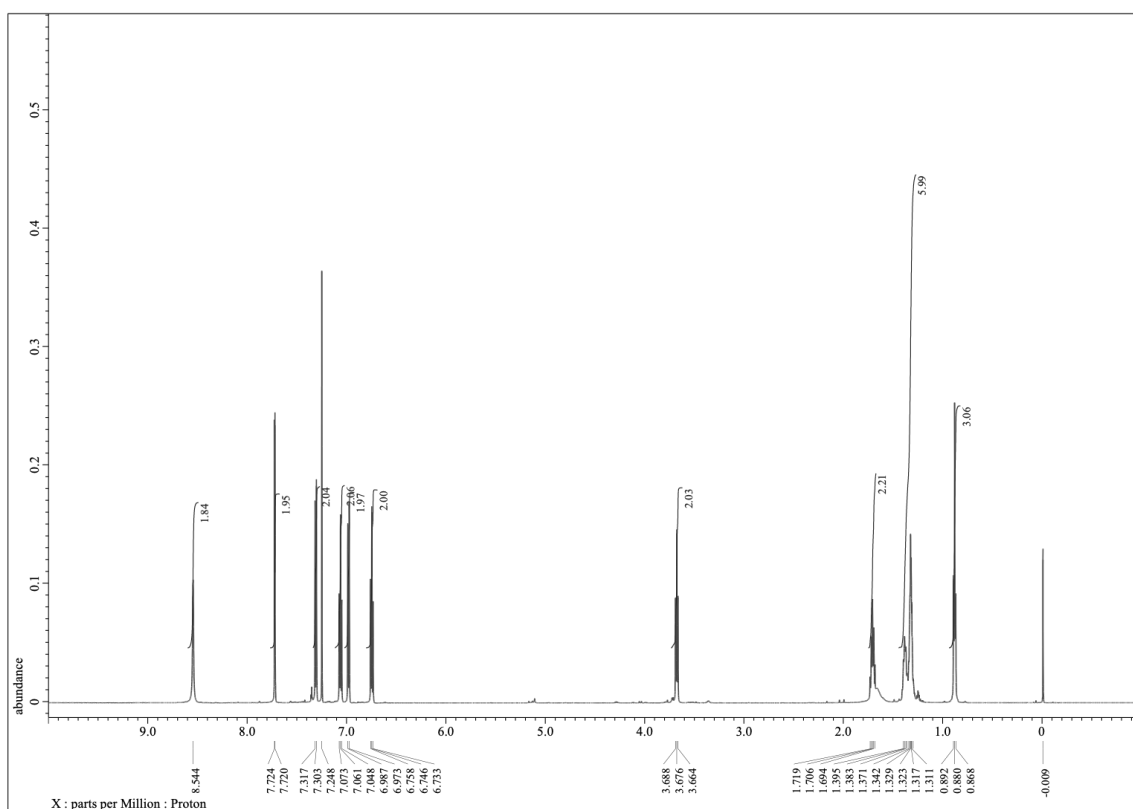


図6. 化合物C6の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

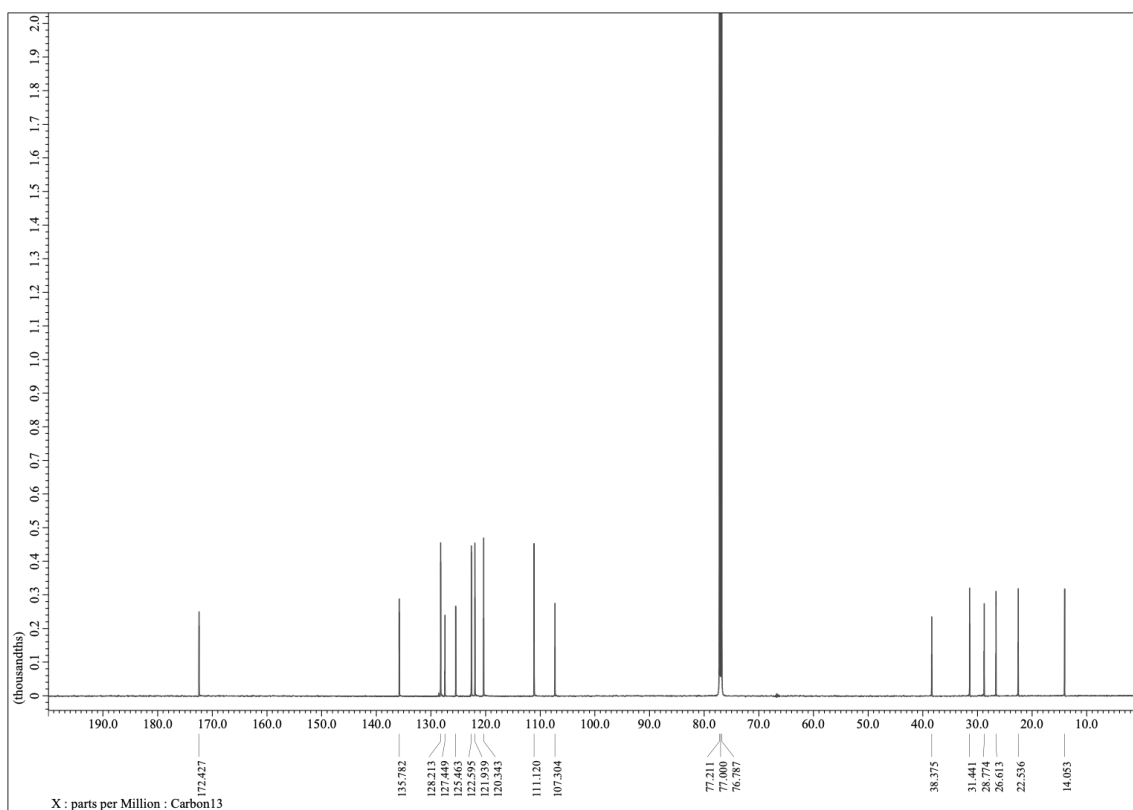


図7. 化合物C6の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

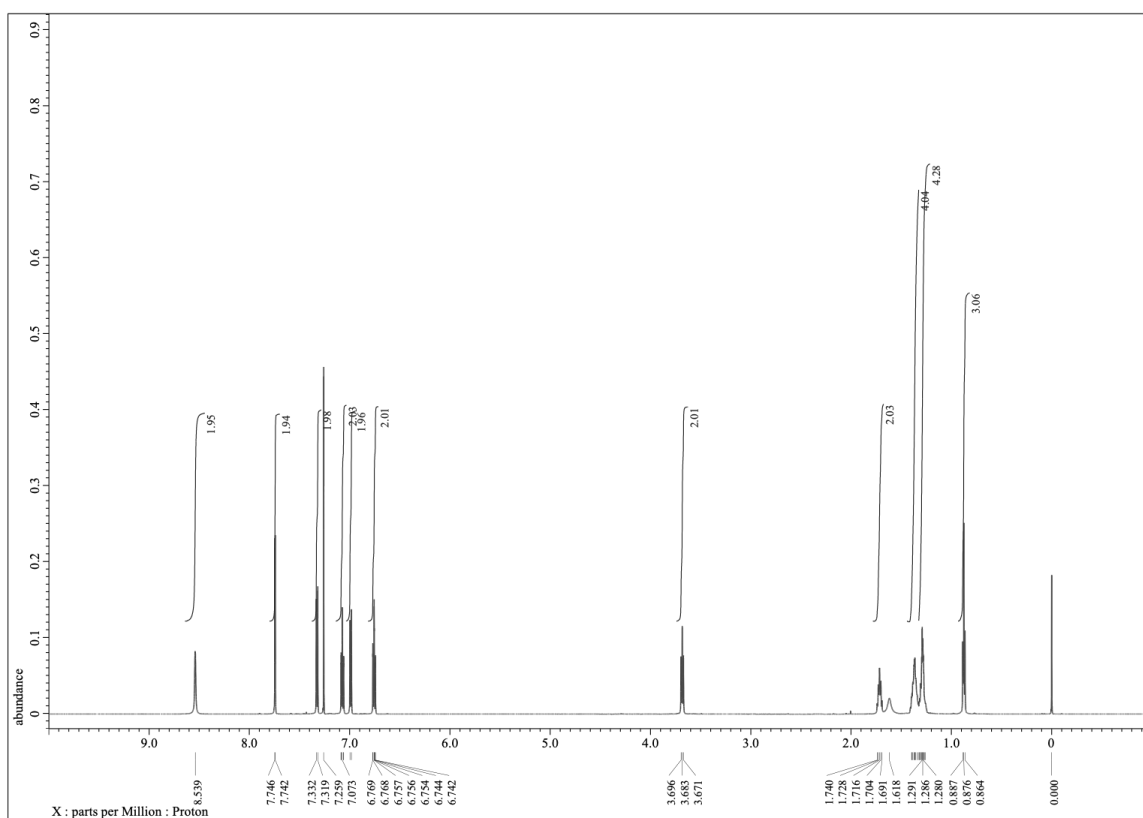


図8. 化合物C7の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

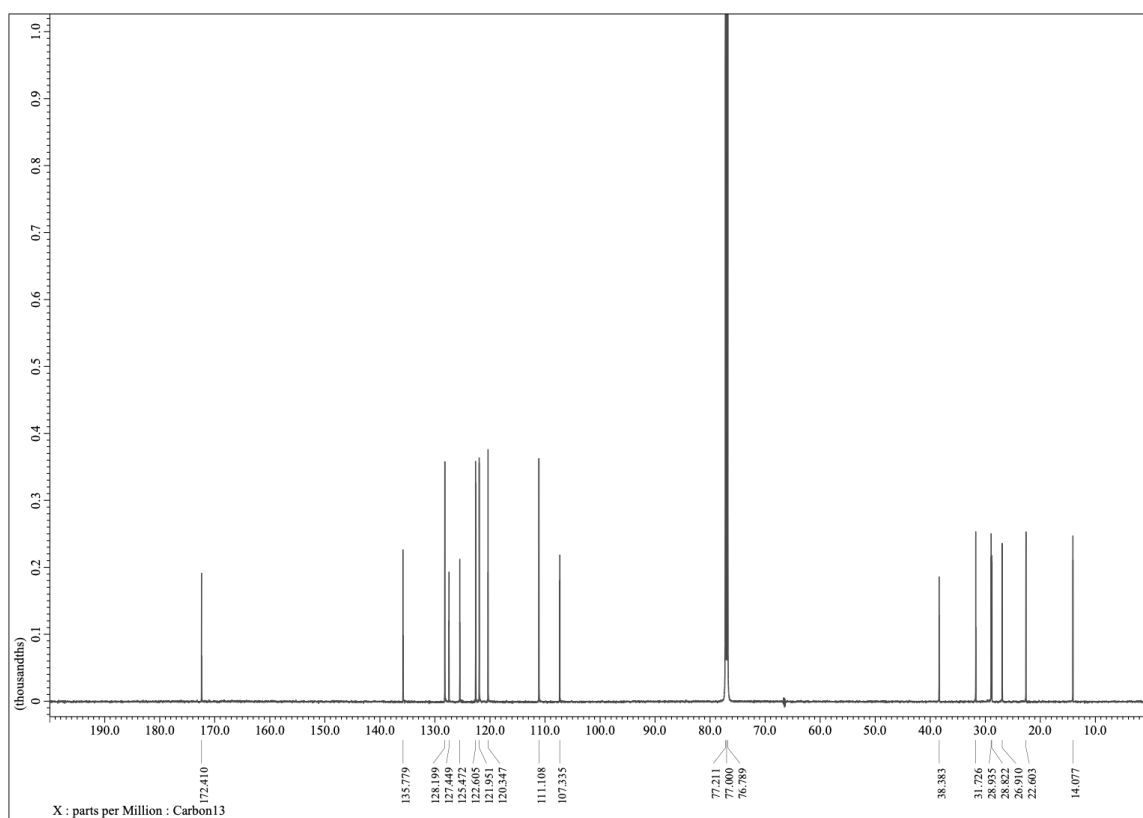


図9. 化合物C7の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

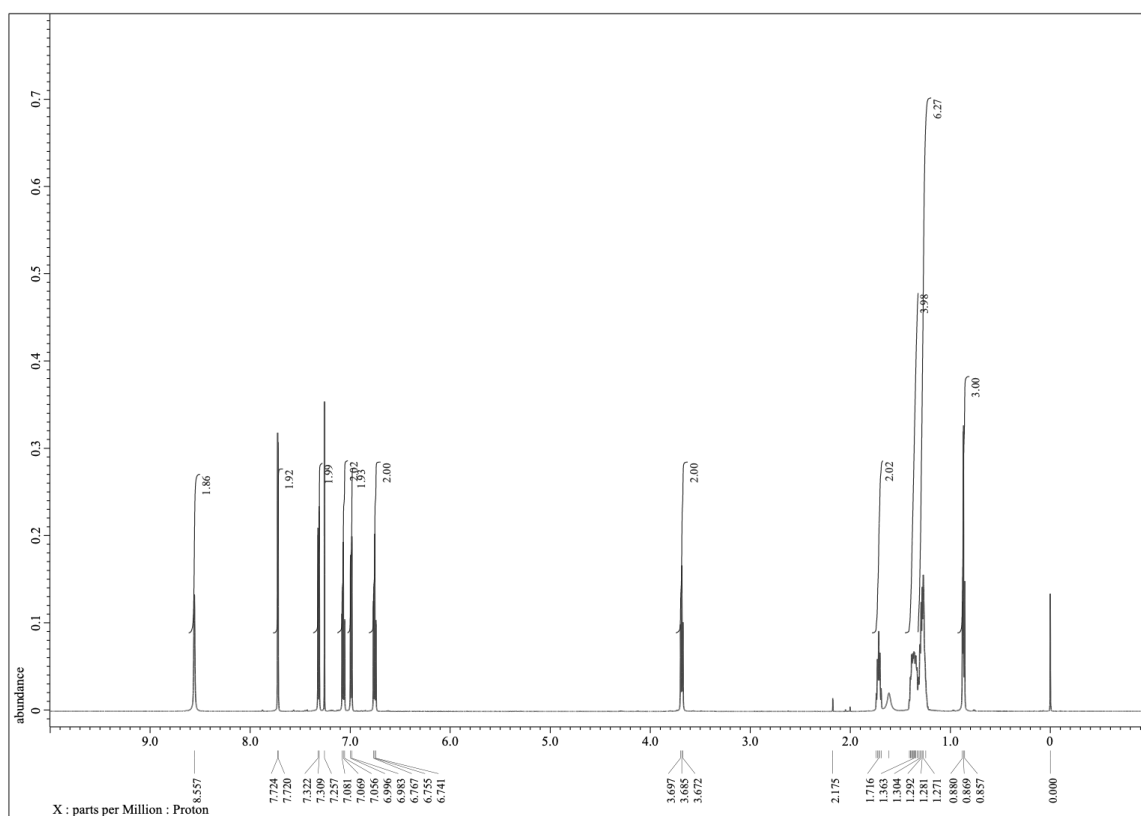


図10. 化合物C8の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

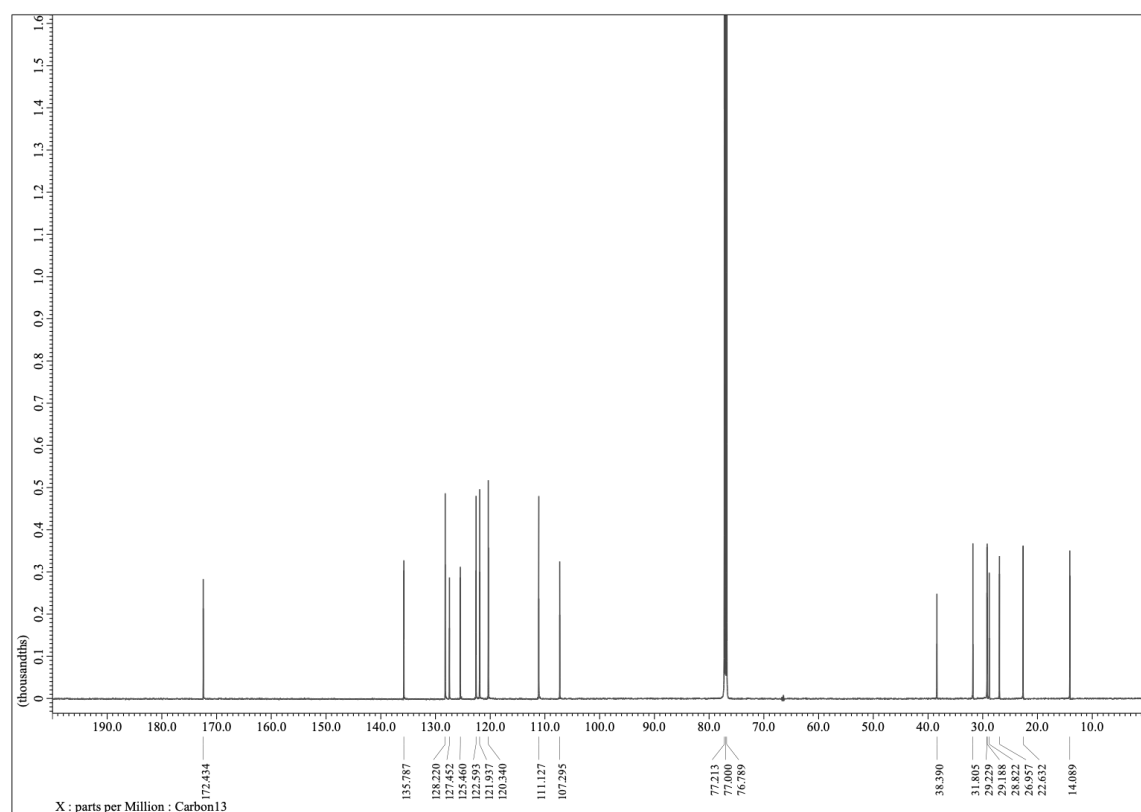


図11. 化合物C8の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

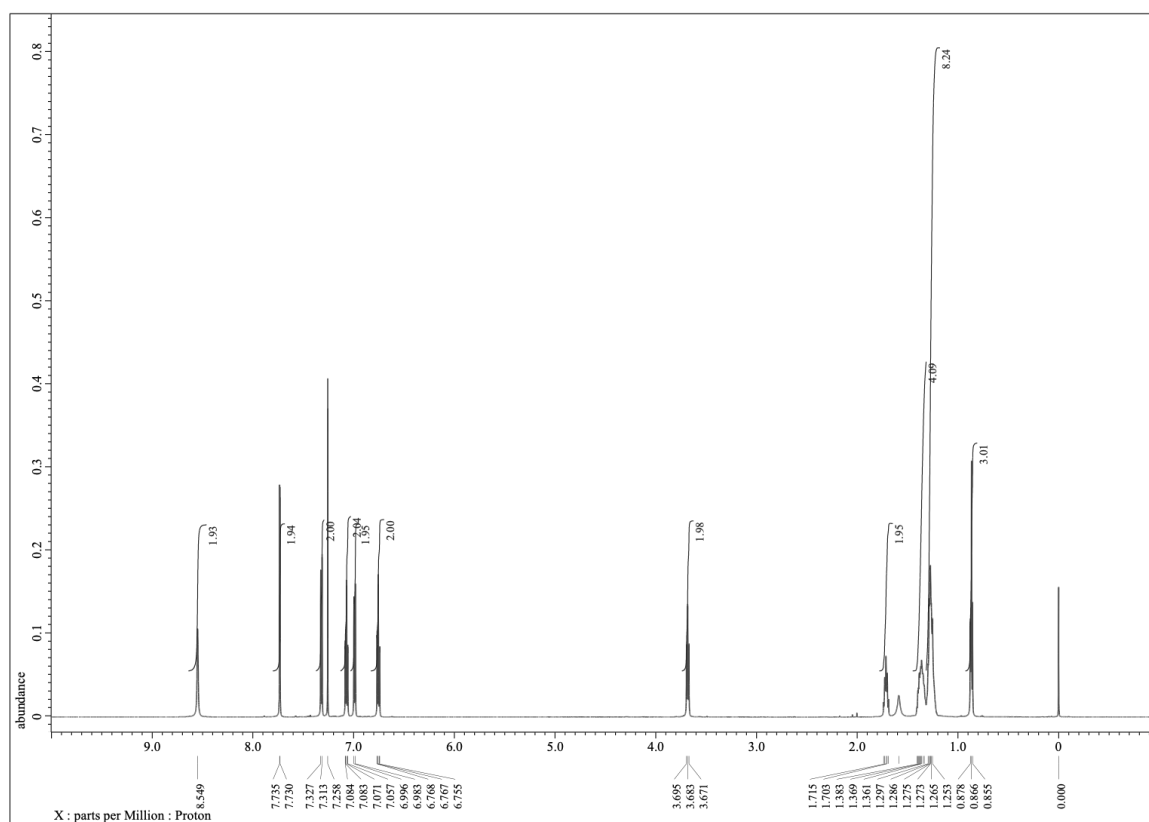


図12. 化合物C9の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

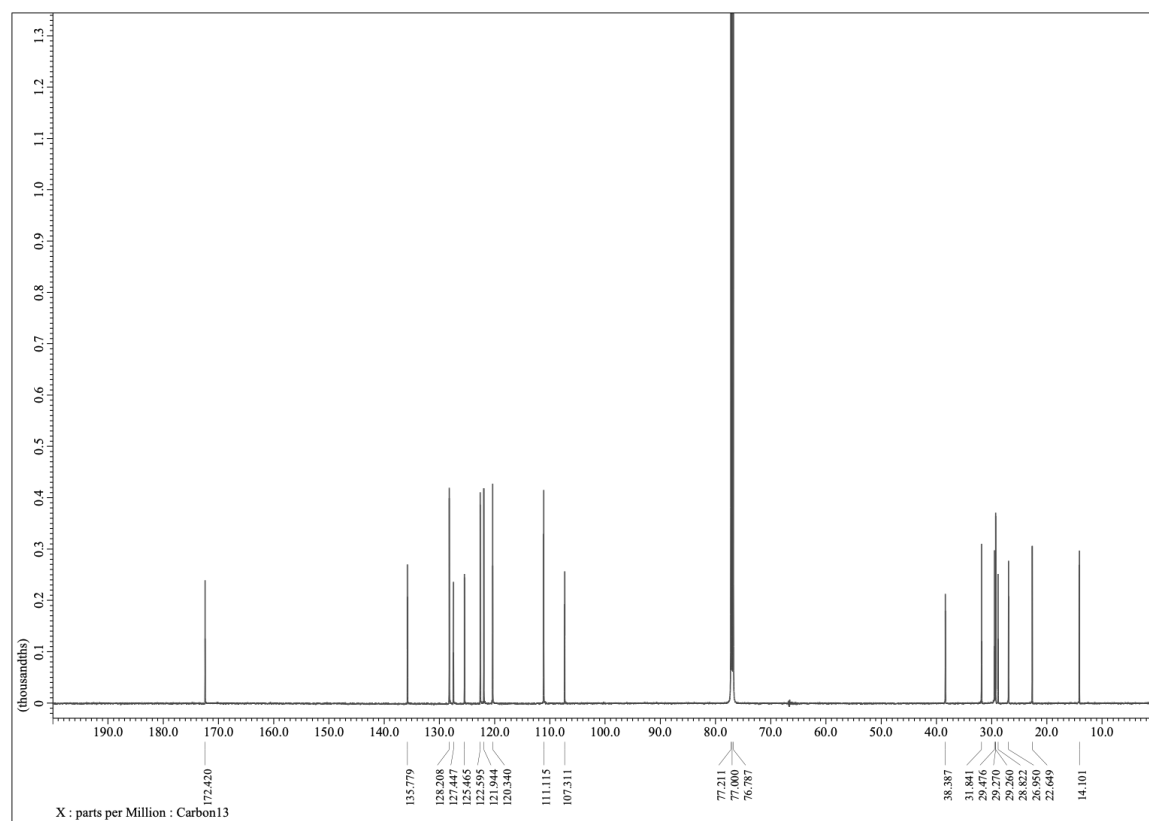


図13. 化合物C9の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

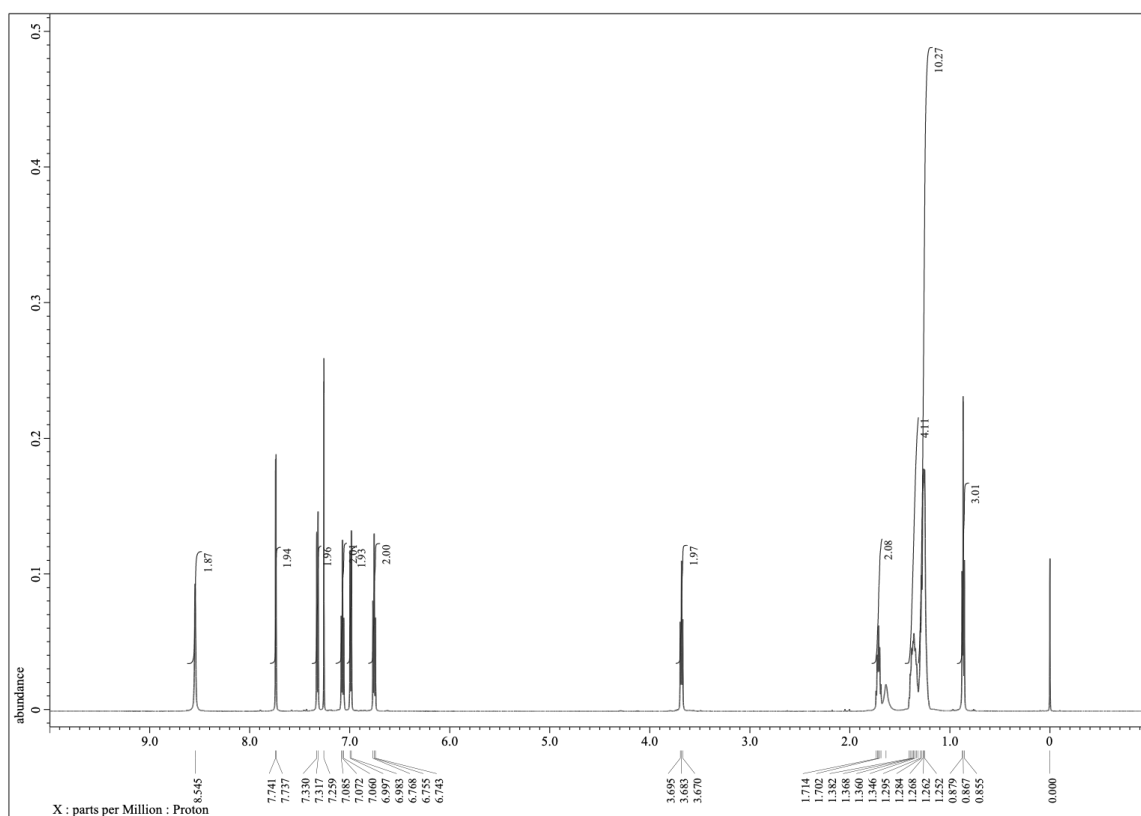


図14. 化合物C10の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

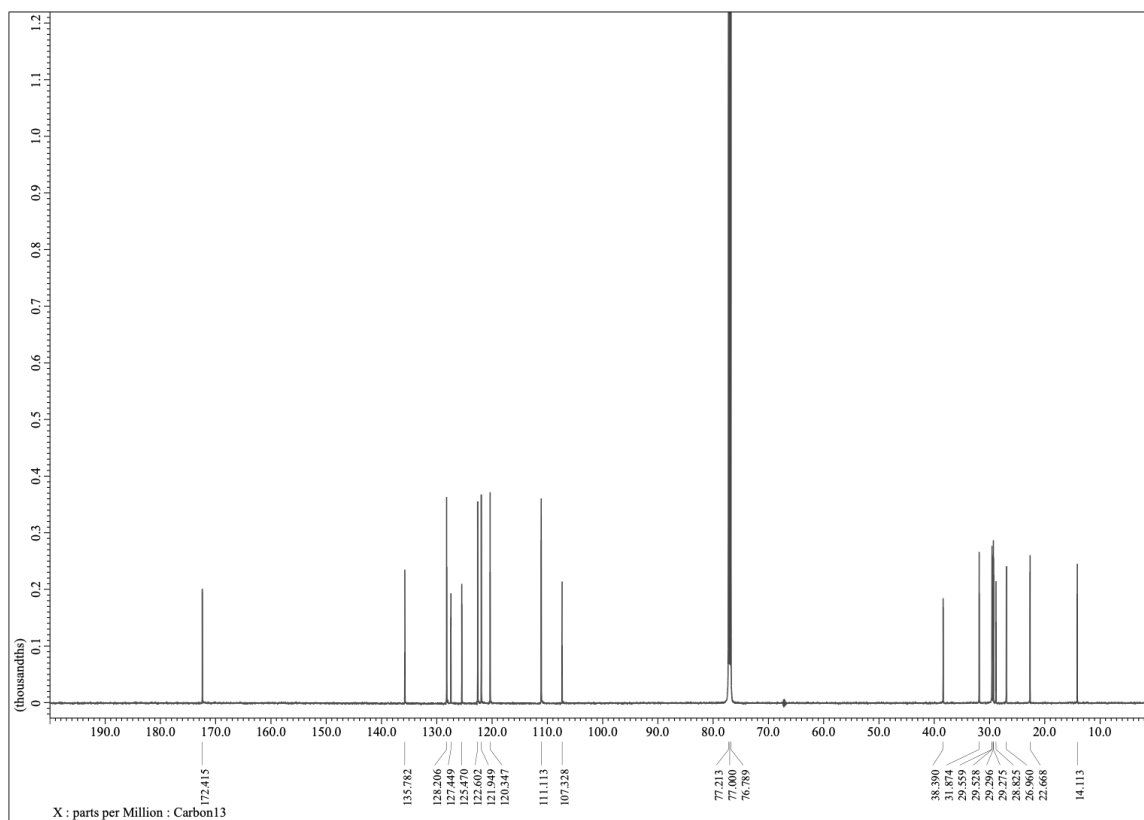


図15. 化合物C10の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

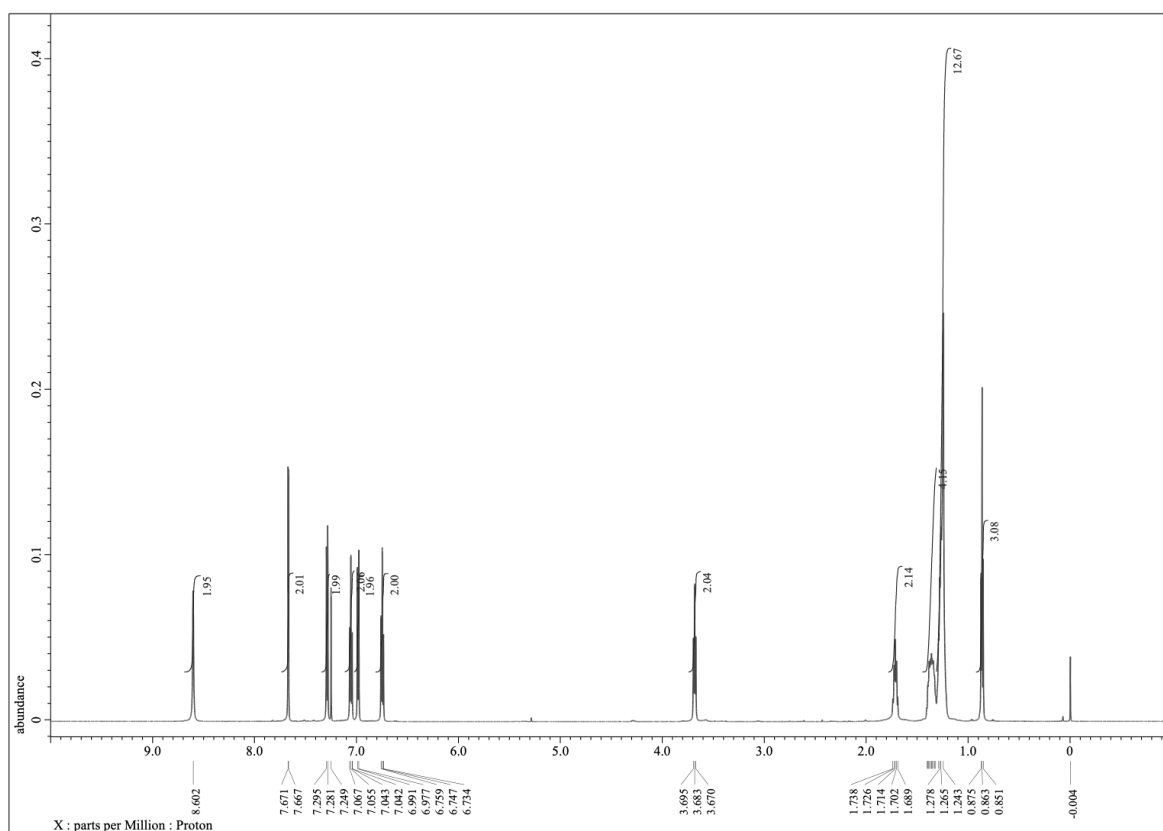


図16. 化合物C11の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

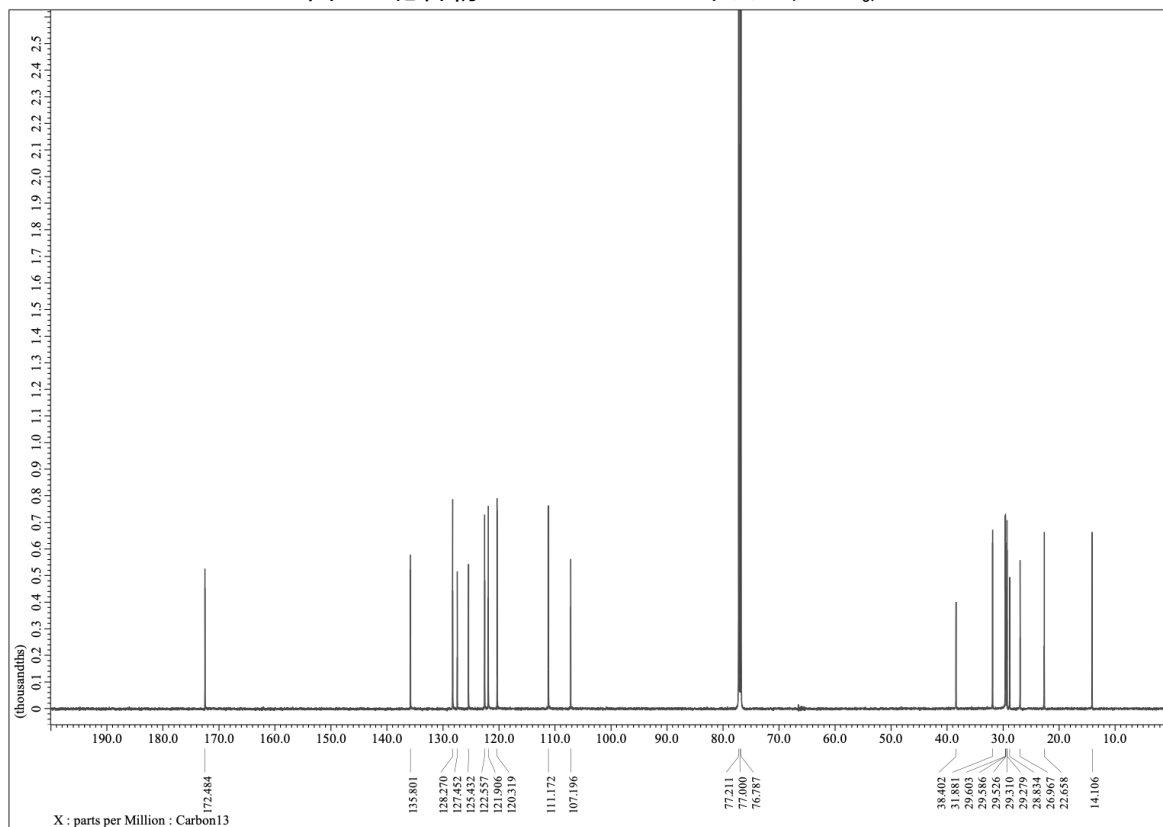


図17. 化合物C11の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

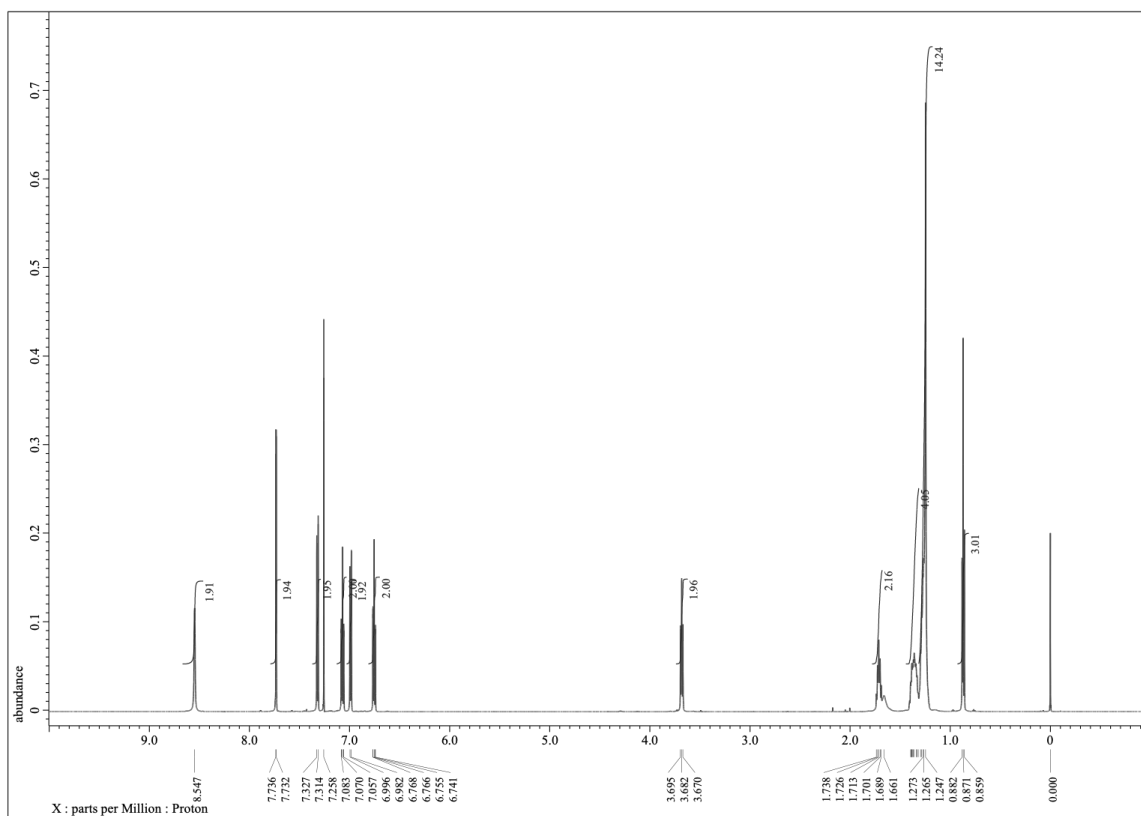


図18. 化合物C12の ^1H NMRスペクトル (CDCl_3)

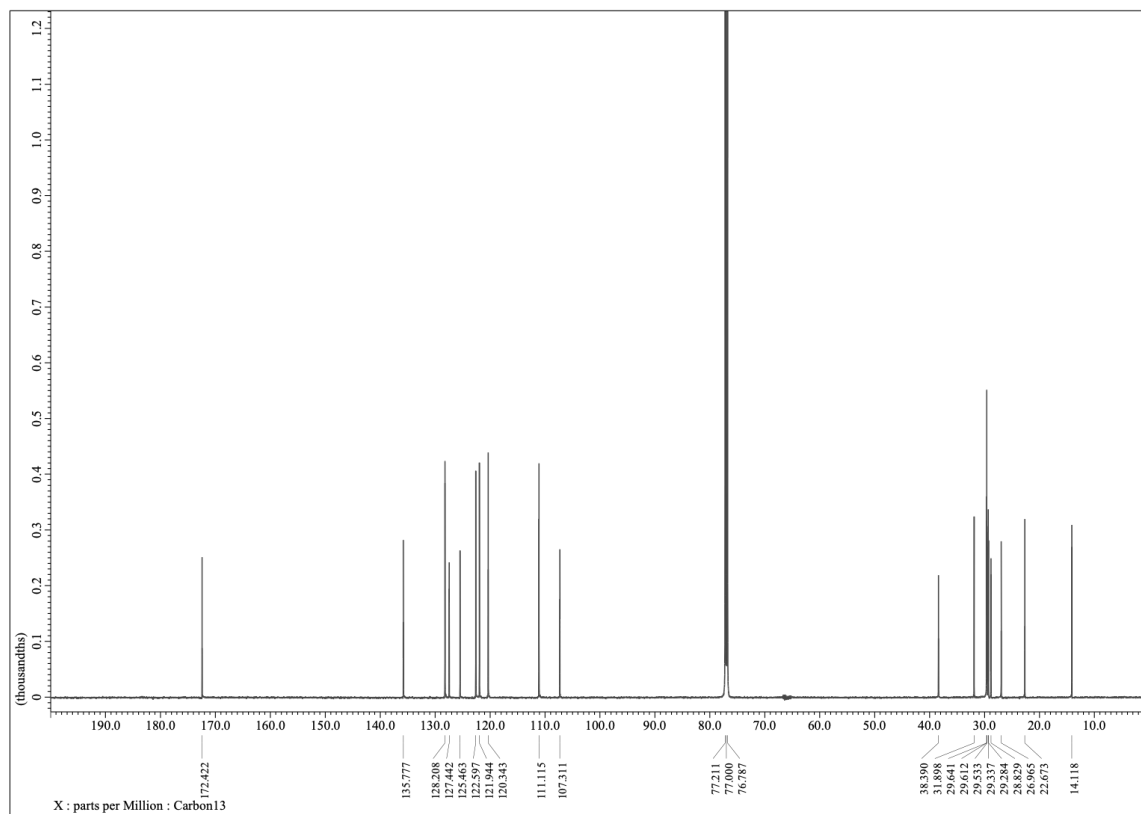


図19. 化合物C12の ^{13}C NMRスペクトル (CDCl_3)

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7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
食品添加物中の鉛及びヒ素のスクリーニング法への
エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) の適用
研究分担者 阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

研究要旨

食品添加物中の鉛 (Pb) 及びヒ素 (As) のスクリーニング法について、前処理が不要で測定が簡便なエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いて検討した。対照用標準溶液との比較により、試料に添加した量が検出可能かどうか調べた。添加試料の調製は溶液又はあらかじめ Pb 及び As を含むように調製したセルロース粉末を添加した。測定後のデータは散乱線内標準補正によって精度が向上することを確認した。一方、臭素 (Br) を含む試料においては、Br の分析線と As の分析線の一部が重複してしまい、誤判定 (False Positive) となるケースがあったが、プロファイルを確認することで改善されることを確認した。また、平均原子番号が大きい試料では含量が多いものを少ないと判断してしまう場合があった。しかしいずれの場合においても、規格値の 1/2 濃度の対照用標準溶液と比較することで、Pb 及び As を規格値相当濃度含まれる試料を確実に選抜することができ、また、これらを含まない試料は全て正しく判定することができた。スクリーニング法において最も重要なことは、含有しているものを確実に選抜することと、迅速かつ簡便に行えることである。したがって、本法は Pb 及び As のスクリーニング法として非常に有用であると期待された。

研究協力者
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

我が国では、原則として厚生労働大臣が使用を認めた食品添加物しか使用できないこととされている。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⁾に収載される。

現在、公定書は第 10 版まで発出されており、この中の D 成分規格・保存基準各条には約 720 品目の食品添加物が収載されている。成分規格には、各食品添加物に応じて、定義、含量、性状、確認試験、純度試験等の項目が定められている。このうち純度試験は食品添加物中の不純物の試験であり、その不純物の限度値

やその試験法が規定されている。純度試験の項目には、酸価、塩化物、鉛 (Pb)、ヒ素 (As)、残留溶媒等がある。これらの項目のうち、Pb 及び As については、非常に多くの食品添加物に設定されている。

Pb 及び As の試験法は B 一般試験法に規定されている。Pb の場合は、試料を灰化等によって分解して検液を調製したのち、原子吸光光度計を用いて測定し、規格値相当の比較液の吸光度と比較して判定される。As の場合は、検液を調製した後、亜ヒ酸をヒ化水素として揮発させ、ヒ化水素吸収液に吸収させて発色した色を、同様に反応させた標準液の色と比較して判定される。いずれも、古くから用いられてきた方法であるが、灰化等に長時間を要する場合があったり、As の場合には有害試薬であるピリジンを用いたり、試験者や環境

への負担が大きい試験法である。

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

我々は令和 5 年度の本研究において、装置が小型かつ安価で操作が簡便なエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置（EDX）を用いて、標準添加法により添加物を試料として用いた、Pb 及び As の定量法を検討した³⁾。その結果、試料調製が煩雑であること、また試料によっては適用できないことなどが示唆された。そこで本年度は、食品添加物中の Pb 及び As のスクリーニング法への適用が可能かどうか検証した。

B. 研究方法

B-1) 試薬及び標準原液

① 試薬

水：ピューリック Ω（オルガノ株式会社製）で製造した超純水

セルロース粉末：MP Biomedicals 社製（CN：191499, Lot：YD01017）<22400031>

L-アルギニン：Caca（CN：58050-17, 食品添加物グレード, Lot：602K1408）<22400037>

② 標準原液

Pb 標準原液：Lead Standard for ICP, 1000 mg/L, SIGMA-ALDRICH 製（CN：41318, Lot：BCCD0986）<32200739>

As 標準原液：Arsenic Standard for ICP, 1000

mg/L, SIGMA-ALDRICH 製（CN：01969, Lot：BCCC2631）<32100283>

ただし、<>は当部管理番号を示す。

B-2) 試料

本研究に用いた添加物試料を Pb 及び As の規格値、添加試料調製法、平均原子番号、主成分とともに表 1 に示した。なお、試料は平均原子番号順とした。これらは一般社団法人日本食品添加物協会（日添協）を通じて市場流通品を入手した。なお、「卵殻焼成カルシウム」以外は Pb 及び As の含量が規格値以下であることが確認されたものを用いた。

B-3) 装置・器具

① 装置

EDX 装置 EDX-8100（ターレット付き）
（（株）島津製作所製）

② 器具

EDX 試料容器、一般用フタなし P/N 219-85000-55（島津製作所製）、容量 10mL

ポリプロピレン（PP）フィルム P/N 219-82019-05（島津製作所製）、厚さ 5μm

マイクロポラスフィルム CAT.No.325（Chemplex 社製）、気孔率 55%

メノウ乳鉢・乳棒 SBU-110（外径 110×内径 90×深さ 40）（野中理化）

B-4) 対照用標準溶液

Pb 標準原液及び As 標準原液を混合し、以下の濃度になるように水で希釈した。

① Pb・As：1.0 μg/mL・1.5 μg/mL

② 2.0 μg/mL・3.0 μg/mL

③ 3.0 μg/mL・4.5 μg/mL

④ 4.0 μg/mL・6.0 μg/mL

B-5) 添加試料の調製

(1) 溶液を添加する場合

試料を PP 製遠沈管に量りとり、目標濃度と

なるようできるだけ少量の PbAs 混合標準液を加えた。本研究で用いた試料の Pb と As の規格値はほぼ全てがそれぞれ 2 及び 3 $\mu\text{g/g}$ であったことから、目標濃度は Pb・As が 1・1.5 $\mu\text{g/g}$ (0.5 倍), 2・3 (1 倍), 2.4・3.6 $\mu\text{g/g}$ (1.2 倍) 又は 3・4.5 $\mu\text{g/g}$ (1.5 倍) とした。ただし、L-アルギニンと「卵殻焼成カルシウム」は、Pb・As が 1・1.5 $\mu\text{g/g}$ (0.5 倍), 2・3 (1 倍), 3・4.5 $\mu\text{g/g}$ (1.5 倍) 又は 4・6 $\mu\text{g/g}$ (2.0 倍) とした。例えば、試料量が 6g 必要な場合は、試料 6g に PbAs 混合標準液 (Pb:100 $\mu\text{g/mL}$ ・As : 150 $\mu\text{g/mL}$) を 0.06, 0.144, 0.18 μL を加えた。その後、ドラフト内で蓋を開けた状態で 40 $^{\circ}\text{C}$ (As が揮散する可能性を考慮し 40 $^{\circ}\text{C}$ とした) で約 4 時間乾燥して水分を除いたのち、メノウ製乳鉢を用いてすり潰しながら混ぜ、均一化した。

(2) 標準粉末を添加する場合 (カロブبینガム及びグァーガム)

標準粉末は、セルロース粉末 3g を PP 製遠沈管に量りとり、Pb 及び As 標準原液 (各 1000 $\mu\text{g/mL}$) を Pb 0.18mL, As 0.27mL 添加したのち、40 $^{\circ}\text{C}$ で約 4 時間加温し水分を飛ばした。メノウ乳鉢で搗り混ぜて均一化し、標準粉末 (Pb : 60, As : 90 $\mu\text{g/g}$) を調製した。

添加試料の調製は、対象とする試料を PP 製遠沈管に量りとり、その量を 95%相当とし、それに対して標準粉末とセルロース粉末を合わせて 5%相当になるように加えて、メノウ乳鉢で均一化した。例えば、試料量が 6g 必要な場合は、試料 5.7g に PbAs 標準粉末 (Pb : 60, As : 90 $\mu\text{g/g}$) とセルロース粉末を、(0.1g+0.2g), (0.24g+0.06g), (0.3g+0g) 加え、0.5 倍, 1.2 倍, 1.5 倍の添加試料を調製した。

B-6) 測定サンプルの調製

(1) 溶液の試料を測定する場合

PP フィルムを張った EDX 試料容器に試料を 8mL いれ、蒸発防止のため上部も PP フィルム

を張った。

(2) 粉末の試料を測定する場合

EDX 試料容器の底部に PP フィルムを張り、その上に試料を入れ、タッピングにより表面を押し詰め、厚さ 1cm 程度に詰めた。上部には飛散防止のためマイクロポラスフィルムを張った。

B-7) EDX 測定条件

測定条件は表 2 にまとめた。なお、散乱線内標準補正をするかしないかは、解析時に選択した。

C. 結果及び考察

C-1) 添加試料の調製法の検討

添加試料の調製は操作が簡便な溶液を添加する方法検討した。

試料に少量の混合標準液を添加し、40 $^{\circ}\text{C}$ で約 4 時間乾燥させた。その結果、ほとんどの試料は図 1 の「5.L-ロイシン」のようになり、標準液を滴下した部分は乳鉢で触れるだけで簡単に崩れるような状態であり、その後の操作も容易であった。一方、多糖類である「14.グァーガム」、「16.カロブبینガム」、「1.キサンタンガム」及び「17.カラヤガム」は強固に固まってしまい (図 1), メノウ乳鉢ですりつぶせなかったり、跳ねて飛びだしてしまったりした。また、メノウ乳鉢ですり混ぜたあとは、大部分は図 2 の「19.卵殻焼成カルシウム」のように乳鉢からきれいに回収することができたが、L-アルギニン、「18.L-シスチン」、「6.ウコン色素」などは乳鉢に固着しまい、物理的に剥離できないものもあった。

また、予備的な測定結果において多糖類についてはデータに不備が見られたため、「14.グァーガム」及び「16.カロブبینガム」の 2 製品のみは代表として標準粉末を用いて添加試料を調製した。

一方「2.カルナウバロウ」及び「1.カンデリ

ラウ」はロウであるためその性質から溶液やセルロース粉末を添加しても均一化は不可能であると考えられたため無添加試料のみを対象とした。また、「4.マリーゴールド色素」及び「3.トウガラシ色素」はロウほどではなかったが粘土のように固く、また疎水性であったことから、これらも無添加試料のみとした。

C-2) Pb 及び As のプロファイルの確認

Pb と As のプロファイルを図 3 に示した。Pb 及び As の XRF 分析においては、Pb の $L\alpha$ 線と As の $K\alpha$ 線が重複するが、Pb は $L\beta$ 線及び As は $K\beta$ 線を測定することで分別測定可能であることが確認できた。

C-3) 散乱線内標準補正の有無の比較

EDX における測定においては、主成分の違い、X 線源の強度変動、表面の凹凸等の影響を補正する内標準補正が効果的であることが知られている。一般的な内標準補正は試料に内標準物質を添加する方法があるが、EDX の場合、X 線管球から照射された X 線が試料に当たって発生する散乱線（バックグラウンド）を用いた補正が可能である。そこで、散乱線内標準補正（以降、BG 補正とする）の効果を検証するため、対照用標準溶液及び試薬の L-アルギニンを用いて添加試料を調製し、BG 補正の有無での強度（ただし BG 補正の場合は強度比）を比較した。なお、標準溶液は 5 回繰り返し測定し、添加試料は 3 ロット調製し各 3 回繰り返し測定した。

その結果を図 4 に示した。BG 補正がない場合、特に規格値相当（Pb : 2, As : $3\mu\text{g/g}$ ）以上の濃度において Pb 及び As の両元素とも対照用標準溶液に比べ強度が大きくなる場合が多かった。一方 BG 補正有の場合、両元素とも対照用標準溶液とほぼ同等の数字が得られた。

以上の結果から、本研究においては BG 補正を行うこととした。

C-4) 試料の測定

BG 補正ありで測定した結果を図 5 に示した。ただし、L-アルギニンは C-3) の結果を再掲した。

Pb では、規格値相当である三角・緑色（▲, Pb : $2\mu\text{g/g}$ ）のラインを丸・黄緑色（●, Pb : $2.4\mu\text{g/g}$ ）及び丸・赤色（●, Pb : $3\mu\text{g/g}$ ）が「卵殻焼成カルシウム」を除いて全て上回り、かつ、丸・紫色（●, Pb : 無添加）が全て下回っていることが確認された。さらに、丸・薄オレンジ色（●, Pb : $1\mu\text{g/g}$ ）も全て下回っていた。つまり、標準溶液を基準として、Pb の含有量がそれを上回るか下回るか概ね判断可能であることが示された。

As においても、ほとんどの試料において規格値相当である三角・緑色（▲, As : $3\mu\text{g/g}$ ）のラインを丸・黄緑色（●, As : $3.6\mu\text{g/g}$ ）、丸・赤色（●, As : $4.5\mu\text{g/g}$ ）が上回り、かつ、丸・紫色（●, As : 無添加）が全て下回っていることが確認され、さらに、丸・薄オレンジ色（●, As : $1.5\mu\text{g/g}$ ）も全て下回っていた。以上の結果から、As の含有量についても標準溶液を基準としてそれを上回るか下回るか概ね判断可能であることが示された。一方、「ブドウ果皮色素」及び「グァーガム」においては、無添加の丸・紫色（●）においても三角・赤色（▲, As : $4.5\mu\text{g/mL}$ ）を大きく超えた。反対に、「卵殻焼成カルシウム」については、As だけではなく Pb においても規格値の 1.5 倍添加の丸・赤色（●, Pb : $3\mu\text{g/g}$ & As : $4.5\mu\text{g/g}$ ）において三角・緑色（▲, As : $3\mu\text{g/g}$ ）のラインを下回ることがあった。また、Pb においては、2 倍添加の丸・青（●, Pb : $4\mu\text{g/g}$ & As : $6\mu\text{g/g}$ ）の一部も下回っていた。

そこで、これらの原因を次項において考察した。

C-5) プロファイルの確認

C-4) の As において「10.ブドウ果皮色素」及び「14.グァーガム」の無添加試料が規格値のラインを超えたことから、全ての無添加試料の 9.5~15keV のプロファイルを確認した(図 6-1~4)。

無添加試料が規格値のラインを超えた「10.ブドウ果皮色素」及び「14.グァーガム」のうち、「14.グァーガム」については、Br の $K\alpha$ 線(約 11.9keV)と $K\beta$ 線(約 13.3keV)の位置におよそ 5:1 のピークが確認された。 $K\alpha$ 線と $K\beta$ 線の強度比はおよそ 5:1 であることが知られていること、Pb $L\beta$ 線及び As $K\alpha$ +Pb $L\alpha$ 線の位置にピークが検出されていないことから、これらは As ではなく Br に由来するピークであると考えられた。つまり、本研究で用いた「14.グァーガム」は Br を含んでおり、この Br の $K\alpha$ 線を As の $K\beta$ 線として誤って検出された可能性が考えられた。一方、「10.ブドウ果皮色素」においても Br の影響によると考えられた。Pb の $L\beta$ 線及び As $K\alpha$ +Pb $L\alpha$ 線の位置にピークが検出されていないことから、As 由来ではないと考えられる。しかし、Br の $K\beta$ 線と $K\alpha$ 線のピーク強度は約 1:1 で検出されたことから、Br の $K\beta$ 線の位置に検出されているピークには他の元素に由来するピークが重なっており、本来はもう少し小さいと考えられた。ルビジウム(Rb)の $K\alpha$ 線が約 13.4keV に検出されるため、本研究で用いた「ブドウ果皮色素」は Rb を含む可能性もあった。

また、無添加試料における As の強度比がわずかに原点付近を超えた「1.カンデリラロウ」、「2.カルナウバロウ」及び「3.トウガラシ色素」についても、わずかではあったが Br の $K\alpha$ 線付近(約 11.9keV)においてピークが検出されていたため、これらについても Br の影響で As と誤判定されたと考えられた。「4.マリーゴールド色素」については、As $K\alpha$ +Pb $L\alpha$ の位置にピークがあり、As の $K\beta$ 線にわずかにピークが見られた。一方、Pb の $L\beta$ 線及び Br の K

β 線にピークが検出されなかったことから、規格値未満で As が含有されている可能性が示唆された。

さらに Pb の強度比が原点付近を超えた「18.L-シスチン」については、Se の $K\alpha$ 線(約 11.2keV)の位置にわずかにピークが検出された。Se の $K\beta$ 線と Pb の $L\beta$ 線(約 12.6keV)は近接して検出されることから、これは Se の影響であると考えられた。

このように、プロファイルを確認することで、他の元素の影響を受けているかどうかをある程度判断可能であることが示唆され、判定精度を高めることができると考えられた。

また、他に As や Pb のプロファイルを妨害する可能性がある元素として、Ga ($K\beta$: 約 10.3keV), Cr ($K\alpha+K\alpha$ (SUM) : 約 10.8keV), Bi ($L\alpha$: 約 10.8keV), Mn ($K\alpha+K\alpha$ (SUM) : 11.8keV) などが考えられたため、これらが共存する可能性がある場合はプロファイルによる確認が必要である。

C-6) 隣接ピーク分離

EDX 分析においては解析ソフトが自動的にカーブフィッティングを行い、重複しているピークを分離してそれぞれ別々のピークとして認識する。いわゆるデコンボリューションのような処理が行われている。今回用いた装置でも自動でピーク分離する機能があり、「10.ブドウ果皮色素」(無添加試料)における自動フィッティングによるピーク分離例を図 7-1) に示した。As の $K\beta$ 線(約 11.7keV)と Br の $K\alpha$ 線(約 11.9keV)を分離し、As の $K\beta$ 線として認識していることが分かる。しかし、本来「10.ブドウ果皮色素」には As が含有されていないが、その強度比から推定される含量は 6 μ g/g 相当と高い値であった(図 8)。これは機械的に処理しただけであり As と Br を特に認識したものではなく、そこまで正確に分離ができていなかったためと考えられた。そこで、

As と Br をそれぞれ認識して分離するような設定を加えて改めて隣接ピーク分離を行ったところ、図 7 2)のようになり、またピーク強度比は機械的な処理に比べて 1/3 以下まで低減した（図 8）。しかしそれでも強度比はゼロにはならなかった。これは、As と Br を無理やり認識してしまったためと考えられた。このように、カーブフィッティングによってピーク認識の精度を高めることができる可能性が示唆されたが、それだけでは十分ではなく、前項で示したようにプロファイルの確認結果と合わせて本当に含有されているかされていないかを判断すべきだと考えられた。

C-7)「卵殻焼成カルシウム」における強度低減の要因の推定

続いて、「19.卵殻焼成カルシウム」において、Pb と As のいずれにおいても規格値の 1.5 倍又は 2 倍の含量のものが規格値の対照用標準溶液の強度比よりも小さい値になった理由を考察した。

マトリックスが無機物の場合、試料中の Pb・As から発生した蛍光 X 線はマトリックス（無機物）に一部吸収される。一方、本研究では対照用標準溶液は水を用いて調製しており、この場合蛍光 X 線はマトリックスにほとんど吸収されない。つまり、「19.卵殻焼成カルシウム」における Pb と As の強度比が対照用標準溶液よりも小さい値となっていたのはマトリックスの影響であったと考えられた。坂本らによれば、平均原子番号*が 9.0 を下回る有機物であれば、水溶液検量線の適用が可能であるとしている⁴⁾。「19.卵殻焼成カルシウム」は酸化カルシウム（CaO）であり、その平均原子

番号は 16.58 となり、9.0 を大きく上回った。

また、本研究で対象とした添加物の平均原子番号を表 1 に示した。ただし、既存添加物は混合物であるため平均原子番号の計算は主成分を用いた。平均原子番号が 9.0 を超えたのは「18.L-シスチン」のみであり、9.07 であった。図 5 の「18.L-シスチン」の添加試料の測定結果を改めて確認すると、As の K β 線の結果において、対象用標準溶液の強度を下回る傾向が確認された。なお、Pb の L β 線の結果は対照用標準溶液よりも高めに出来ていたが、これは C-5) で述べたとおり Se の影響によるものであった。

一方、規格値の 1/2 相当（丸・薄オレンジ色（●））の試料は「19.卵殻焼成カルシウム」及び「18.L-シスチン」のいずれにおいても原点を超えて検出されており、入っているかいないか、という確認は可能であると考えられた。

C-8) 最適なスクリーニング条件の検討

スクリーニングにおいて最も重要なことは、対象物質を含む試料を見逃さないことである。つまり、偽陰性（False negative、実際には含有しているのに含有していないと判定されること）と判断してはならない。一方で、その判断基準を厳しくし過ぎると、偽陽性（False positive、実際には含有していないのに含有していると判定されること）と判断される試料が増えることとなり、スクリーニングをする意味がなくなってしまう。そこでこれまでの結果を踏まえ、適切なスクリーニング条件を検討した。

図 5 に示した無添加試料（●）を対象に、対照用標準溶液の Pb 及び As : 0 μ g/mL（▲）を基準とした場合、偽陽性と判定されたのは Pb

*平均原子番号とは 2 種類以上の元素からなる化合物の平均的な原子番号であり、 Z_{av} はそれぞれの元素の原子番号を Z_i 、質量濃度を C_i ($0 < C_i < 1$) とすると、 $Z_{av} = \sum C_i Z_i$ で表される。例えば H_2O の場合は、次式によって表される。

H_2O の分子量 = 18.015

H_2O のうち H の重量比 = $1.0080 \times 2 / 18.015 = 0.11191$

H_2O のうち O の重量比 = $15.999 \times 1 / 18.015 = 0.88809$

H_2O の平均原子番号 = {H の原子番号 (1) $\times$ 0.11191} + {O の原子番号 (12) $\times$ 0.88809} = 7.2166 となる。

及び As で約 20 検体あった。つまりおよそ半分は含有されていると誤って判断されてしまい、スクリーニング効果は得られなかった。続いて、対照用標準溶液の Pb : 1, As : 1.5 μ g/mL (▲) を基準とした場合、Pb においては全て含有していないと正しく判定された (いわゆる True negative)。一方、As においては Br の影響があった「10.ブドウ果皮色素」及び「14.グァーガム」を除き含有していないと正しく判定された (True negative)。ただし、「10.ブドウ果皮色素」及び「グァーガム」についてもプロファイルを確認すれば As を含有していないと正しく判断できた。

次に規格値相当含有している試料 (●又は●) を対象とした。Pb 及び As : 0 μ g/mL (▲) と Pb : 1, As : 1.5 μ g/mL (▲) の強度比が一番高い値を基準とした場合、Pb 及び As のいずれも含有している試料であると正しく判定された (いわゆる True positive)。しかし、規格値相当の対照用標準溶液 Pb : 2, As : 3 μ g/mL (▲) を基準とした場合、特に平均原子番号が高い試料において偽陽性と判定される場合があった。

以上の結果から、規格値の 1/2 相当 (▲, Pb : 1 及び As : 1.5 μ g/mL) の対照用標準溶液を基準とすることで、Pb 及び As を規格値相当濃度含有する試料を確実に選抜することができ、また Pb 及び As を含有しない試料を含有すると判断することもほとんどないと考えられ、スクリーニング法として適用可能であると期待された。

D. 結論

EDX を公定書における食品添加物中の鉛 (Pb) 及びヒ素 (As) のスクリーニング法へ適用できるかどうかを検討した。

初めに散乱線内標準補正の有無による効果を検証した。その結果、散乱線内標準補正を行うことで対照液の強度との比較判定をより

正確に行うことができ、ある程度含量の予想も可能であることが示された。また、臭素 (Br) などの共存元素の影響によって、含量を多く見積もってしまう場合があったが、プロファイルを確認したり、ピーク分離処理を行うことで実際に含有しているのか含有していないのか正しく判断が可能であった。一方、平均原子番号が 9.0 を超える試料や主成分が無機物である試料においては蛍光 X 線の感度が低下するため、水で調製した対象用標準溶液の強度比よりも低く見積もられる可能性があった。しかし、規格値の 1/2 の濃度の対照用標準溶液を基準として用いることで、規格値相当濃度含まれる Pb や As を見逃すことなく確実に選抜することができるうえ、これらを含有しない試料を誤って判定する可能性を低減できることがわかった。

以上のように EDX を用いて Pb 及び As を規格値相当含有するかどうかのスクリーニングは可能であることが示された。EDX による分析は試薬を使用しないうえ、前処理は不要でさらに測定時間も短い。つまり環境や試験者への負荷も小さい分析法である。今後さらなる対象拡大へ向けて引き続き検討を行う予定である。

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) 阿部 裕, 令和 5 年度 厚生労働科学研究費補助金 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 研究分担報告書 分析法及び試験法の開発に関する研究 エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定量法の検討 (2024)
- 4) 坂本 知昭, 寺下 衛作, 鈴木 桂次郎, 正田

卓司, 大田 昌弘: 令和 5 年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告 EDXRF による ICH-Q3D 元素不純物分析 (第 3 報) —ICH-Q3D に基づく日本薬局方医薬品の元素不純物管理の効率化を目指した蛍光 X 線分析法を用いた元素不純物スクリーニング手法の標準化に関する研究—, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, OMDRS, 56, 251-265 (2025)

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
なし

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

表1 試料情報

番号	添加物	規格値(μg/g)		添加試料調製法*	平均原子番号	主成分	食添部 管理番 号
		Pb	As				
1	「カンデリラロウ」	2	3	添加なし	5.26	ヘントリアコンタンとして	C2351
2	「カルナウバロウ」	2	3	添加なし	5.39	セロチン酸ミリスルとして	C2350
3	「トウガラシ色素」	2	3	添加なし	5.68	カプサンチンとして	C2292
4	「マリーゴールド色素」	3	3	添加なし	5.78	アスタキサンチンとして	C2288
5	「L-ロイシン」	2	3	溶液	6.10	L-ロイシン	C2358
6	「ウコン色素」	2	3	溶液	6.25	クルクミンとして	C2291
7	「L-プロリン」	2	3	溶液	6.28	L-プロリン	C2259
8	「L-チロシン」	2	3	溶液	6.30	L-チロシン	C2260
9	「L-ヒスチジン」	2	3	溶液	6.39	L-ヒスチジン	C2255
10	「ブドウ果皮色素」	2	3	溶液	6.48	シアニジンとして	C2374
11	「L-グルタミン」	2	3	溶液	6.50	L-グルタミン	C2257
12	「微結晶セルロース」	2	3	溶液	6.68	セルロース	C2345
13	「L-セリン」	2	3	溶液	6.71	L-セリン	C2258
14	「グァーガム」	2	3	粉末	6.73	グルコースとして	C23881
15	「キサンタンガム」	2	3	溶液	6.73	グルコースとして	C2387
16	「カロブベーンガム」	2	3	粉末	6.73	グルコースとして	C2389
17	「カラヤガム」	2	3	溶液	6.73	グルコースとして	C2312
18	「L-シスチン」	2	3	溶液	9.07	L-シスチン	C2390
19	「卵殻焼成カルシウム」	2	3	溶液	16.58	酸化カルシウム	C2346

*添加なしは試料との相性が悪いため添加しなかったもの、溶液は標準溶液、粉末は標準粉末を添加したことを示す。

表2 EDX 測定条件

X 線管球	Rh ターゲット
管電圧	50 [kV]
管電流	最大 100 [μ A]、自動
デッドタイム	30 [%]
コリメータ	10 [mm ϕ]
スピン	なし
雰囲気	大気
検出器	SSD
測定元素	Pb、As
処理	定量
1 次フィルタ	#4
積分時間	1800 [秒]
エネルギー範囲	PbLb1 12.38-12.88keV AsKa+PbLa 10.30-10.80keV AsKb 11.48-11.98 keV
測定元素	BG
処理	補正
1 次フィルタ	なし
積分時間	100 [秒]
エネルギー範囲	13-14 keV



図1 標準液滴下、乾燥後の試料の様子



図2 乳鉢ですり混ぜた後の様子

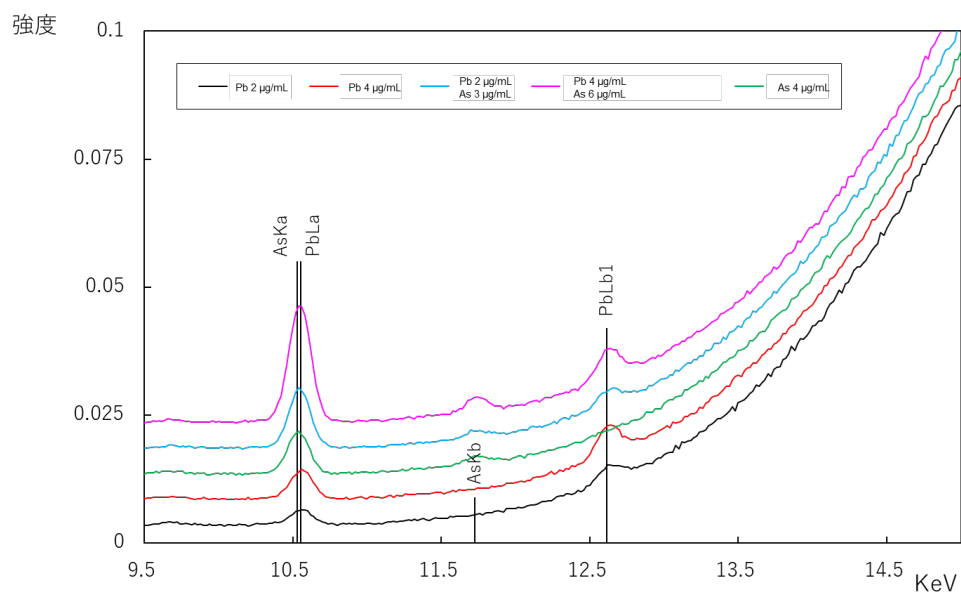


図3 Pb 及び As 標準溶液の EDX プロファイル

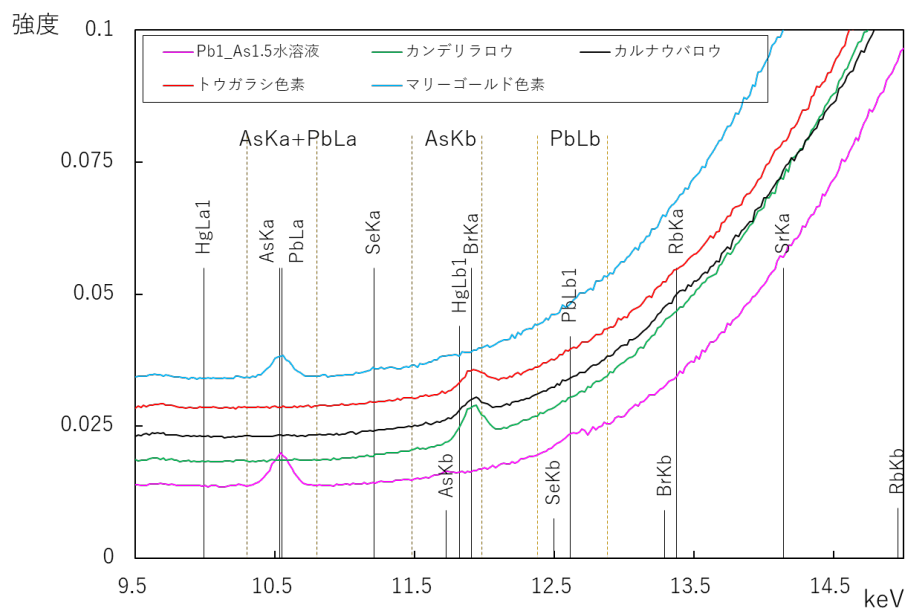


図6-1 各試料のプロファイル (9.5~15.0keV)

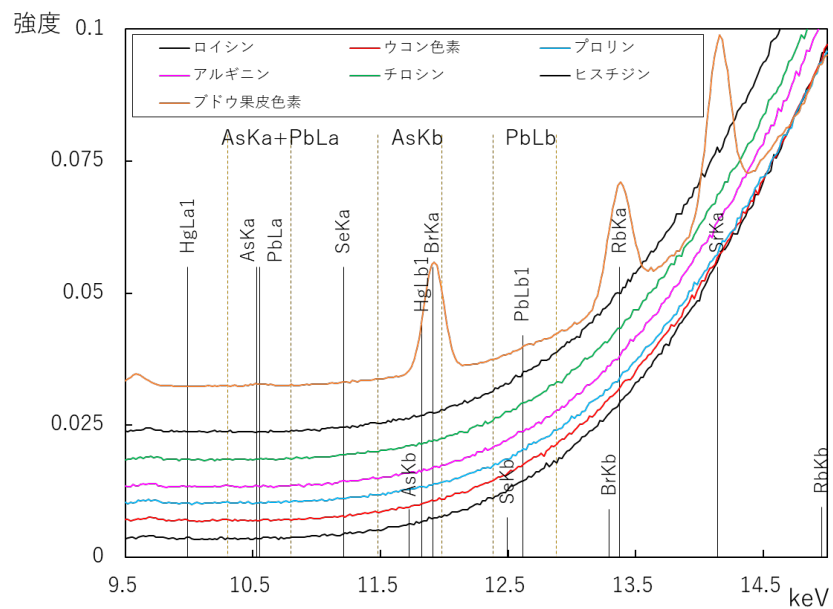


図6-2 各試料のプロファイル (9.5~15.0keV)

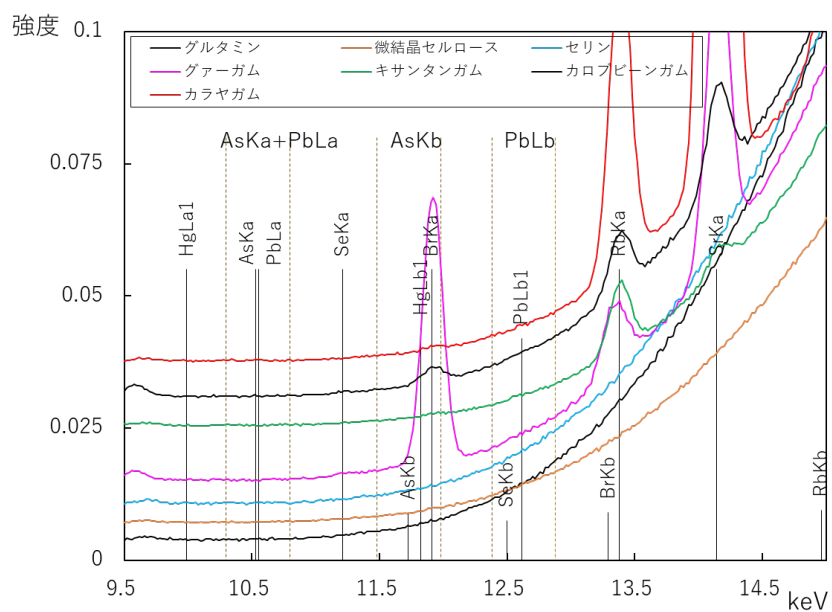


図6-3 各試料のプロファイル (9.5~15.0keV)

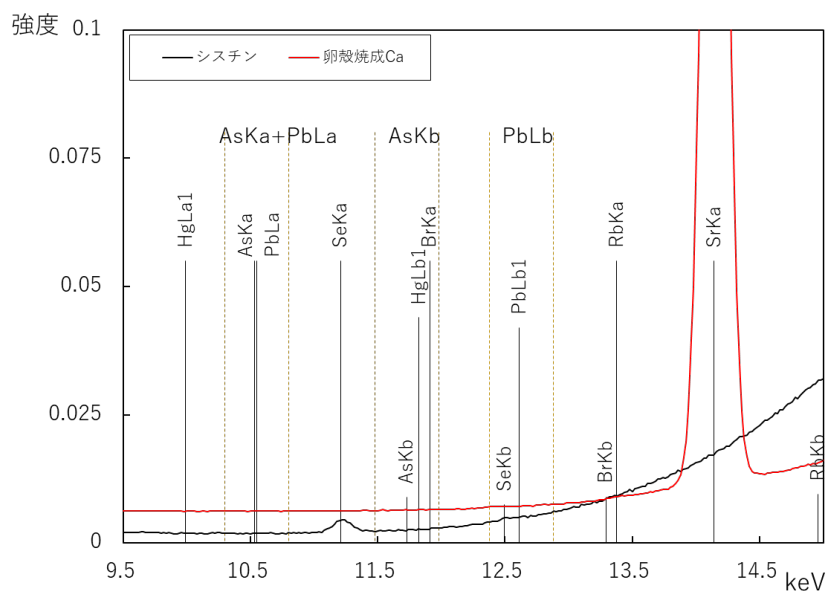


図6-4 各試料のプロファイル (9.5~15.0keV)

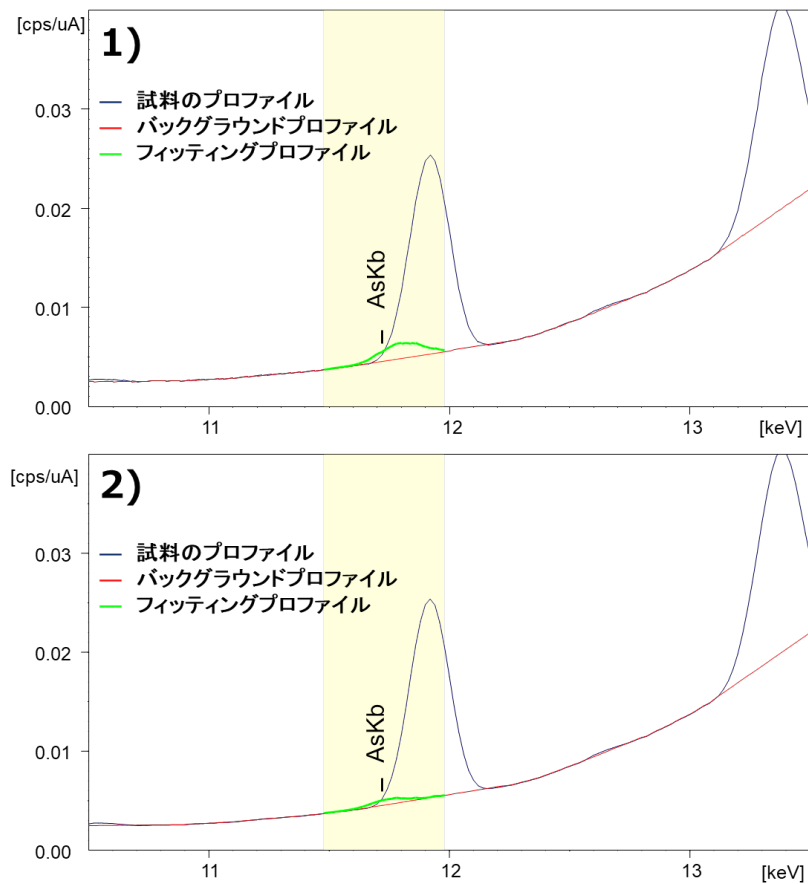


図7 「ブドウ果皮色素」を用いたカーブフィッティングの例

- 1) 自動カーブフィッティングの例
- 2) AsとBrを認識して分離するように設定したカーブフィッティングの例

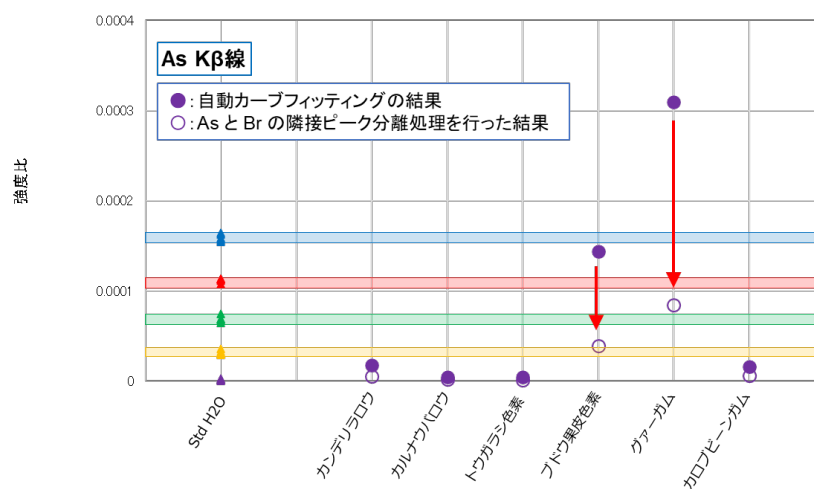


図8 隣接ピーク分離による補正効果

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7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 既存添加物酵素の微生物由来品目の同定法として、質量分析を用いたアミノ酸解析による基原菌種の同定法の開発を行ってきた。これまで、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)法を組み合わせることで基原同定法の検討を行った。その結果、独自データベースの作成や二次元電気泳動法を用いて、一部の酵素の基原同定が可能であることを示したが、さらなる同定精度の向上が望まれる。それらの課題を解決するため、これまでデータベースの改良や二次元電気泳動法を用いた検討、国際整合を考慮した最新の基原微生物種の分類情報の収集を行ってきた。今年度は、複数種のマトリクスの変更や消化酵素の併用により、同定精度の指標となる Coverage を上げることができかどうかを検討した。予備検討の結果、これまでにマトリクスとして用いていた 4-クロロ- α -シアノケイ皮酸(CICCA)に加え、9種のマトリクスを用いることにより検出ペプチド数が増えるかどうかを検討した。その結果、一部の製品の分析結果において、CICCA では検出されなかったペプチドが 5種のマトリクスをそれぞれ用いた場合に検出された。また、これまで用いていた消化酵素であるトリプシンと Lys-C を併用することにより、検出ペプチド数が増えることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、複数のマトリクスを用い、トリプシンと Lys-C を併用して PMF 法を行うことで、Coverage が上昇するかを調べたところ、3種の酵素製品の解析において、マトリクスに CICCA のみ、消化酵素にトリプシンのみを用いた過去の結果より Coverage が上昇した。本年度検討した手法を用いることで、より精度高く基原種の同定が可能となることが期待される。さらに、アスペルギルス・テレーウス糖たん白質の基原である *Aspergillus terreus* の最新の分類体系について文献調査を行った。その結果、2011 年以降に *A. terreus* と同定された基原菌株は異なる学名に再同定される可能性があり、注意が必要であることを確認した。基原菌種の分類情報は今後も継続的に変遷すると予想されることから、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、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と考えられた。

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

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

西崎雄三 東洋大学

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、用いられる微生物種は細菌、真菌、放線菌など多分類群かつ他菌種にわたる。微生物の中には二次代謝産物としてヒトへ有害性を有する物質を産生するものがあることから、酵素の品質確保のため、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、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、タンパク質アミノ酸配列を指標とする質量分析法に基づくペプチドマスマインガープリンティング (PMF) 法に着目し、基原種同定法の検討を行ってきた。これまでに、複数の酵素製品を対象として SDS-PAGE と PMF を組み合わせた解析を実施し、構成成分の少ない添加物酵素については基原情報を取得できることを示した¹⁾。さらに、より正確な同定を目的として独自構築データベースによる Mascot サーチを行い、オンライン検索では同定困難であったタンパク質の同定に成功した。また、複数種の消化酵素を用いる手法を導入することで、トリプシン単独では同定できなかったタンパク質の同定も可能となった。これらの改良は基原同定精度の向上に有効であったが、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、2023 年度にはデータベースの改良や用いる消化酵素の検討を、2024 年度には二次元電気泳動法により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。本年度は、①マトリクスの検討、②2 種の消化酵素の同時使用の検討、③複数のマトリクスの使用と 2 種の消化酵素の同時使用の検討を実施した。精度の目安として、タンパク質全体のアミノ酸数に対する検出されたペプチドに含まれるアミノ酸の割合である Coverage を用いた。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微生物菌株の特徴を照合するデータベースにおける学名に問題があった場合、誤同定が発生したり、再同定した際に従来登録されていた基原種と異なる種とし

て同定されるケースがしばしばあることを把握していた。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継続的に収集する必要がある、文献調査を続けている。

今年度は、アスペルギルス・テレーウス糖たん白質に着目した調査を実施した。本酵素は、公定書の成分規格・保存基準各条で、アスペルギルス・テレーウス (*Aspergillus terreus*) の培養液から得ると定義されている。*A. terreus* は分子系統分類学的手法によって 2011 年以降に再分類が頻繁に行われたことから、本菌種から新種が独立的に定義され、真菌分類学分野では現在、12 菌種以上がここに内包されると認識されている。このことから、従来 “*A. terreus*” と扱われていた菌株を再同定した場合に、異なる種として同定される可能性が十分にある。そこで、従来の *A. terreus* (広義の *A. terreus*) に関する分類情報を整理することを目的とした調査を行った。

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。 α -アミラーゼは B583, B641 及び B643, ヘミセルラーゼは B653, プロテアーゼは B590 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。今回用いた試料の電気泳動像を図 1 に示す。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 μ L 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 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。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 μ L 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 又はリシルエンドペプチダーゼ(質量分析グレード, Lys-C)10 μ g/mL を併用し、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 のマトリクスを含む 50%アセトニトリル水溶液で MALDI-TOF MS のサンプルプレート上に直接溶出した。完全に乾燥させた後、MALDI-TOF MS を用いてスパイラルモードでマススペクトルを測定した。

マトリクスは以下の化合物を用いた。4-クロロ- α -シアノケイ皮酸(CICCA : シグマアルドリッチ), 6-アザ-2-チオチミン(ATT : サーモフィッシャーサイエンティフィック), カフェイン酸(CA : 東京化成工業), α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸(CHCA : 富士フイルム和光純薬), 2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHBA : 東京化成工

業), *trans*-フェルラ酸(FA : 東京化成工業), 2-ヒドロキシ-5-メトキシ安息香酸(MSA, 東京化成工業), nor-harman(東京化成工業), シナピン酸(SA : 富士フイルム和光純薬), 2',4',6'-トリヒドロキシアセトフェノン-水和物(THAP : 東京化成工業)をそれぞれ終濃度 10 mg/mL となるよう 0.1%TFA を含む 50% アセトニトリル水溶液に溶解して用いた。各マトリクスの化学構造を図 2 に示す。

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 2024 年度に構築した 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 : 15~50 ppm, Mass values: MH⁺。

B-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

アスペルギルス・テレーウス糖たん白質の基原として使用されており、かつ頻繁に分類体系の再構築に伴う菌名の変更が繰り返され学名の細分化が進むことが知られる *A. terreus* について、広義の *A. terreus* に内包する複数の近縁種に関する文献を PubMed および Google Scholar を用いて検索し、主に遺伝子塩基配列の解析手法を取り入れた分類体系に関する論文を入手した²⁻⁴⁾。これらの文献の内容を調査し、整理した。

C. 結果及び考察

C-1-1) マトリクスによる Coverage への影響の解析

これまでに実施した PMF 解析においては、マトリクスとして CICCA を用いた。CICCA 以外のマトリクスを用いることにより、検出可能なペプチドが増える可能性が考えられたため、9 種のマトリクスを入手し、 α -アミラーゼ

(DFA B643)とヘミセルラーゼ(DFA B653)の SDS-PAGE 上の主要バンドの PMF 解析に用いた。B643 の結果では、CICCA を用いた際に最も多くペプチド(14 種)が検出された。ATT, CA, FA, MSA 及び THAP を用いた際に CICCA では検出されなかったペプチドが計 3 種検出された。それらをまとめて Mascot データベースサーチを行った結果、Coverage が CICCA のみの 29%から 31%に向上した(表 1)。一方で B653 の結果では、CICCA を用いた際に 9 種のペプチドが検出され、他のマトリクスを用いても新たなペプチドは検出されなかった(表 2)。以上の結果より、解析するタンパク質によってはマトリクスを複数種用いることにより検出されるペプチドの種類が増え、Coverage を上げることも明らかとなった。

C-1-2) 2 種の消化酵素の同時使用による Coverage への影響の解析

これまでに実施した PMF 解析においては、消化酵素としてトリプシンを用いた。トリプシンはリジンとアルギニンの C 末端側を切断するが、切れ残りが生じることが知られている。そこでリジンの C 末端側を切断する LysC を併用することで切れ残りが減り、Coverage の向上が期待された。 α -アミラーゼ 2 種(DFA B583 と B643)、 β -アミラーゼ(DFA B659)及びヘミセルラーゼ(DFA B653)の SDS-PAGE 上の主要バンドを PMF 解析に用いた。それぞれトリプシンのみ又はトリプシンと LysC を併用して得られた結果を表 3~6 に示した。B583, B643 及び B659 においては、LysC を併用することにより検出されるペプチドのパターンが変化し、Coverage がそれぞれ 2%, 8%及び 1%上昇した。B653 については、検出されるペプチドのパターンに変化はなかった。以上の結果より、解析するタンパク質によっては LysC をトリプシンと併用することにより、Coverage が上がることも明らかとなった。

C-1-3) 複数のマトリクスの使用と 2 種の酵素を用いた同時消化による Coverage への影響の解析

上述の解析結果より、CICCA 以外のマトリクスも使用すること、又はトリプシンと LysC を併用することにより、Coverage が上昇することが明らかとなった。そこでその両手法を併用することにより、さらに Coverage が上がるかを検討した。 α -アミラーゼ(DFA B641)、プロテアーゼ(DFA B590)とヘミセルラーゼ(DFA B653)の SDS-PAGE 上の主要バンドを切り出し、トリプシンと LysC で同時消化後、CICCA, ATT, FA 及び THAP それぞれをマトリクスとして用い、ペプチドを検出した。得られたペプチドの質量数を統合して Mascot データベースサーチを行い、Coverage を求めた。過去の文献⁹⁾を参照し、トリプシンと CICCA を用いて解析を行った結果と比較したところ、Coverage が B641 では 28%から 33%に、B590 では 27%から 32%に、B653 では 17%から 19%に向上した(表 7~9)。以上の結果より、トリプシンと LysC を併用し、マトリクスを複数用いる方法は PMF 解析の結果の精度を向上させることに有効であると示された。

C-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

広義の *A. terreus* の分類について、Samson ら (2011) は、 β -tubulin (β -*tub*) およびカルモジュリン (*CaM*) 遺伝子などを指標とした multilocus の分子系統解析と形態学的特徴、二次代謝産物プロファイルを統合することによって再評価を行い、広義の *A. terreus* には複数の明確な系統群が内包されることを明らかにした。各系統群は新種として記載または既存種として再定義された。これが起こった主な理由は、広義の *A. terreus* 内部にはゲノムレベルでは明確に独立した系統群が存在するが、これらの群間の形態学的差異は軽微であったため、従来の形態観察中心の同定では識別困難であったことによるものである。それらの系統が隠ぺい種として認識された。その後、Houbraken ら (2020) および Visagie ら (2024) は、*Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* 属菌などの分類においては、従来多用されてきた rDNA-ITS 領域単独での系統解析では分解能が不十分であることを強調し、 β -*tub*, *CaM*,

RPB2などを組み合わせた multilocus の分子系統解析による分類を推奨した。また、近年再定義された *A. terreus* (狭義の *A. terreus*) とそれと近縁な隠ぺい種を含むグループ「*Aspergillus* section Terrei における series Terrei」内の種境界を一層厳密に定義した。さらに近年でも、series Terrei の種多様性は継続的に評価されており、今後さらに学術的に許容された菌種は増加すると考えられた。

以上の現行の分類体系 (Houbraken et al. 2020 ; Visagie et al. 2024) に基づくと、広義の *A. terreus* は、狭義の *A. terreus*, *Aspergillus pseudoterreus*, *Aspergillus aureoterreus*, *Aspergillus floccosus*, *Aspergillus neoaffricanus*, *A. alabamensis*, *Aspergillus citrinoterreus*, *Aspergillus heldtiae*, *Aspergillus jilinensis*, *Aspergillus montensis*, *Aspergillus neoterreus* および *Aspergillus pseudoalabamensis* の 12 種に細分化される (表 10)。したがって、2011 年以前に「*A. terreus*」と同定された添加物酵素の基原菌株は、series Terrei 内の別種として再同定される可能性あり、狭義の *A. terreus* とその近縁種を網羅した参照配列と比較したうえでの multilocus の分子系統解析に基づく再同定が必要である。

A. terreus の例と同様に、基原菌種の分類情報は今後も継続的に変遷すると予想されることから、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、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と考えられた。

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、一昨年、昨年に引き続き改良を行った。検出されるペプチドの種類を増やすために、2 種の酵素による消化法と複数種のマトリクスを用いた検出法を組み合わせたことにより、Mascot サーチの結果における Coverage の向上が認められた。この方法を用いることで、よ

り精度高く基原種の同定が可能となることが期待される。また、2011 年以降に *A. terreus* と同定された基原菌株は異なる学名に再同定される可能性があり、注意が必要であることを確認した。基原菌種の分類情報は今後も継続的に変遷すると予想されることから、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、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と考えられた。

E. 参考文献

- 1) T. Yoshinari, A. Sekine, N. Kobayashi, et al. 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) R.A. Samson, S.W. Peterson, J.C. Frisvad, J. Varga. New species in *Aspergillus* section Terrei. Studies in Mycology. 2011;69:39-55.
- 3) J. Houbraken, S. Kocsubé, C.M. Visagie, et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Studies in Mycology. 2020;95:1-169.
- 4) C.M. Visagie, N. Yilmaz, S. Kocsube, et al. A review of recently introduced *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and other Eurotiales species. Studies in Mycology. 2024; 107: 1-66.

F. 研究業績

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

無し

F-1-2) シンポジウム等

無し

F-2) 論文発表

無し

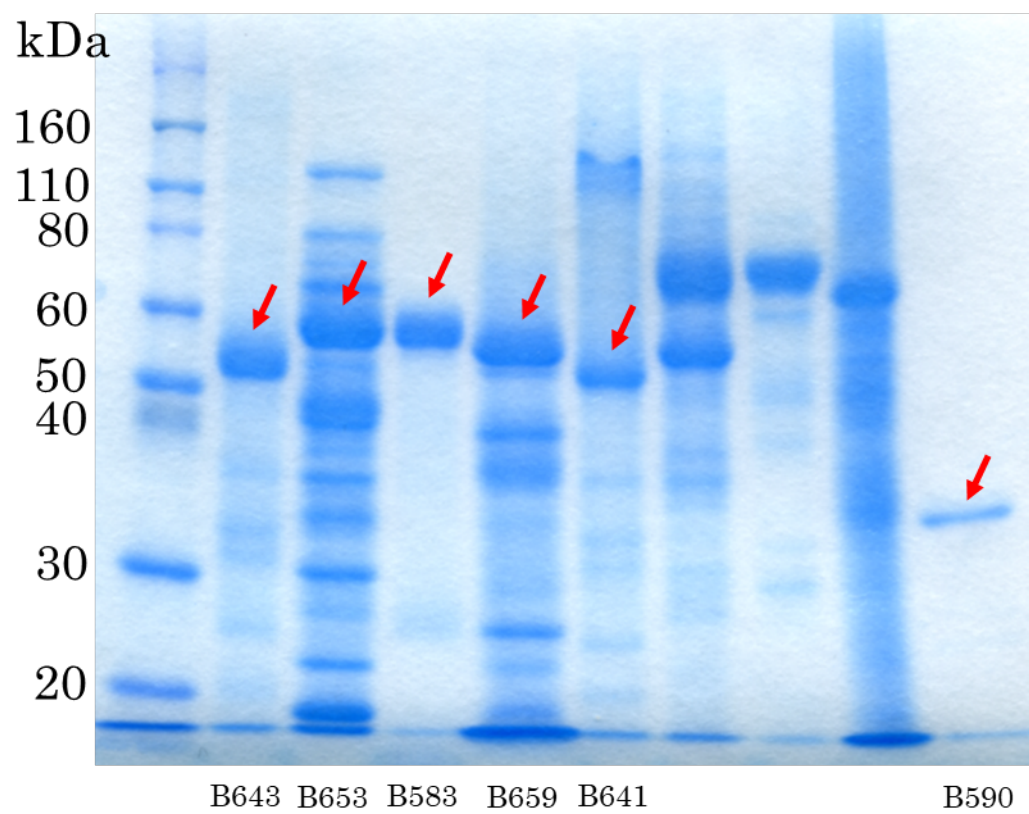


図1 PMF解析に用いた添加物酵素のSDS-PAGE像
赤色の矢印のバンドを切り出して解析に用いた.

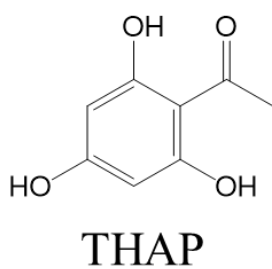
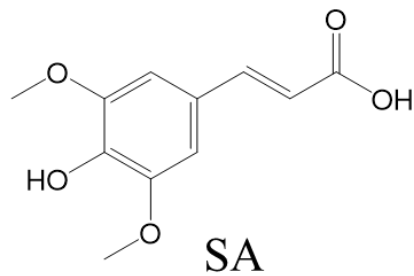
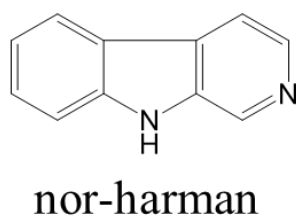
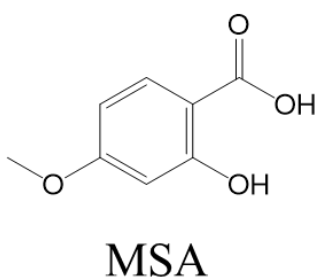
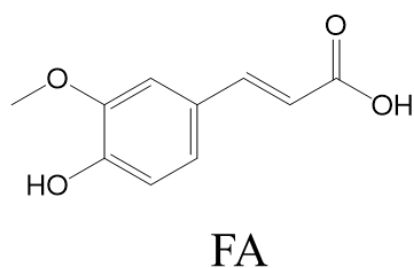
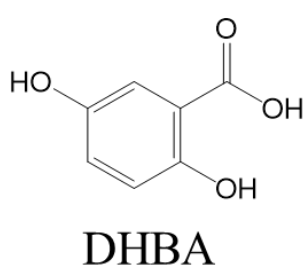
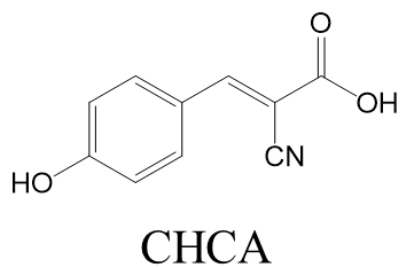
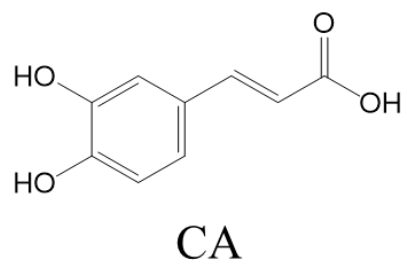
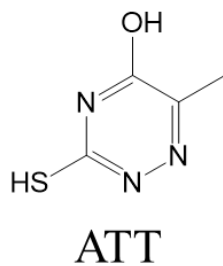
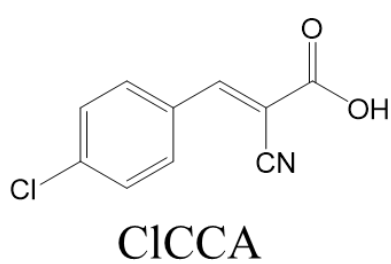


図2 本研究で使用したマトリクスの化学構造

表1 α -アミラーゼ(DFA B643)のトリプシン消化物を各マトリクスを用いてMALDI-TOF MSにより検出した際の
ペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

マトリクス	CICCA	ATT	CA	CHCA	DHBA	FA	MSA	nor-harman	SA	THAP	合算*
検出ペプチド数	14	11	8	7	9	14	11	6	11	10	17
Coverage (%)	29	27	13	16	21	30	22	13	27	22	31
m/z	2274	2274		2274	2274	2274	2274	2274	2274	2274	2274
	1876	1876				1876			1876		1876
	1860	1860			1860	1860	1860		1860		1860
	1724	1724	1724	1724	1724	1724	1724		1724	1724	1724
										1607	1607
	1561	1561				1561			1561	1561	1561
		1519				1519					1519
	1433	1433				1433				1433	1433
	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343	1343
	1314	1314		1314	1314	1314	1314		1314	1314	1314
	1026		1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026	1026
	984	984	984	984	984	984	984	984	984	984	984
	930		930	930	930	930	930	930			930
	929	929	929	929	929	929	929	929	929	929	929
	922										922
	849		849			849	849		849		849
			820				820				820

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascotサーチを行った結果

表2 ヘミセラーゼ(DFA B653)のトリプシン消化物を各マトリクスを用いてMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

マトリクス	CICCA	ATT	CA	CHCA	DHBA	FA	MSA	nor-harman	SA	THAP	合算*
検出ペプチド数	9	6	7	6	8	6	6	7	6	7	9
Coverage (%)	21	14	11	14	17	11	11	13	11	13	21
m/z	2284	2284		2284	2284						2284
	2078										2078
	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933	1933
	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764	1764
	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636	1636
	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464	1464
	922		922	922	922	922	922	922	922	922	922
	879		879		878			879		879	879
	808	809	808	808	808	808	808	808	808	808	808

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascot サーチを行った結果

表3 α -アミラーゼ(DFA B583)のトリプシン又はトリプシンとLysC併用による消化物をMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	消化酵素	
	トリプシンのみ	トリプシン+Lys-C
検出ペプチド数	14	17
Coverage (%)	35	37
m/z	2660	
	2594	2594
		2532
		2027
	2007	2007
	1900	1900
	1842	1842
		1524
	1500	
	1497	1497
	1485	1485
		1451
	1413	1413
	1344	1344
		1116
	960	960
		942
	931	931
	873	873
	795	

表4 α -アミラーゼ(DFA B643)のトリプシン又はトリプシンとLysC併用による消化物をMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	消化酵素	
	トリプシンのみ	トリプシン+Lys-C
検出ペプチド数	11	13
Coverage (%)	20	28
m/z	2274	2274
	1860	1860
	1724	
	1561	
	1433	1433
		1398
	1343	1343
		1314
	1051	
		1026
	984	984
	930	930
	929	929
	922	922
		849
		820

表5 β -アミラーゼ(DFA B659)のトリプシン又はトリプシンとLysC併用による消化物をMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	消化酵素	
	トリプシンのみ	トリプシン+Lys-C
検出ペプチド数	11	12
Coverage (%)	23	24
m/z	2086	2086
	1753	1753
	1739	1739
	1670	1670
	1371	1371
	1327	1327
	1017	1017
	1003	1003
	993	
		884
	838	838
		832
	802	802

表6 ヘミセルラーゼ(DFA B653)のトリプシン又はトリプシンとLysC併用による消化物をMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	消化酵素	
	トリプシンのみ	トリプシン+Lys-C
検出ペプチド数	6	6
Coverage (%)	11	11
m/z	1933	1933
	1764	1764
	1636	1636
	1464	1464
	922	922
	808	808

表7 α -アミラーゼ(DFA B641)のトリプシンとLysC併用による消化物を4種のマトリクスをそれぞれ用いてMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	マトリクス				合算*
	CICCA	ATT	FA	THAP	
検出ペプチド数	16	11	16	7	17
Coverage (%)	32	25	31	17	33
m/z	2274	2274	2274	2274	2274
	1876	1876	1876		1876
	1860	1860	1860	1860	1860
	1561	1561	1561		1561
			1519		1519
	1433	1433	1433		1433
	1398	1398			1398
	1343	1343	1343	1343	1343
	1314	1314	1314	1314	1314
	1026	1026	1026		1026
	984		984	984	984
	930		930		930
	929		929	929	929
	922	922	922	922	922
	849		849		849
	820	820	820		820
	695		695		695

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascotサーチを行った結果

表8 プロテアーゼ(DFA B590)のトリプシンとLysC併用による消化物を4種のマトリクスをそれぞれ用いてMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	マトリクス				合算*
	CICCA	ATT	FA	THAP	
検出ペプチド数	10	11	11	13	13
Coverage (%)	27	28	28	32	32
m/z	2348	2348	2348	2348	2348
	2320	2320	2320	2320	2320
	2183	2183	2183	2183	2183
	2144	2144	2144	2144	2144
	2130	2130	2130	2130	2130
	2105	2105	2105	2105	2105
	1840	1840	1840	1840	1840
				1403	1403
	1194	1194	1194	1194	1194
		1086	1086	1086	1086
	1081	1081	1081	1081	1081
	934	934	934	934	934
				831	831

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascotサーチを行った結果

表9 ヘミセルラーゼ(DFA B653)のトリプシンとLysC併用による消化物を4種のマトリクスをそれぞれ用いてMALDI-TOF MSにより検出した際のペプチドの数, Coverage及び質量電荷比(m/z)

	マトリクス				合算*
	CICCA	ATT	FA	THAP	
検出ペプチド数	8	3	7	5	8
Coverage (%)	19	5	15	8	19
m/z	2284		2284		2284
	2078				2078
	1933		1933		1933
	1764	1764	1764	1764	1764
	1636	1636	1636	1636	1636
	1464	1464	1464	1464	1464
	922		922	922	922
	808		808	808	808

* 各マトリクスを用いて検出されたペプチドの質量電荷比をまとめて Mascotサーチを行った結果

表10 最新の分類体系において*Aspergillus* section Terrei series Terreiに含まれる菌種の一覧

学名	新種記載 された年	新種記載時の分類指標	主に分子系統解析での 再定義時の分類体系
<i>A. terreus</i>	1918	形態学（コロニー形態、分生子頭、分生子形状）	Sam son et al 2011
<i>A. alabamensis</i>	2009	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；温度成長；抗真菌薬感受性試験	Sam son et al 2011
<i>A. pseudoterreus</i>	2011	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性；二次代謝プロファイル	Sam son et al 2011
<i>A. aureoterreus</i>	2011	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性；二次代謝プロファイル	Sam son et al 2011
<i>A. fibricosus</i>	2011	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性；二次代謝プロファイル	Sam son et al 2011
<i>A. neoafRICanus</i>	2011	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性；二次代謝プロファイル	Sam son et al 2011
<i>A. citrinoterreus</i>	2015	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性	Houbraken et al 2020
<i>A. hildiae</i>	2020	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM + RPB2）； 形態学的指標；二次代謝プロファイル	Houbraken et al 2020
<i>A. jilnensis</i>	2020	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM + RPB2）； 形態学的指標	Houbraken et al 2020
<i>A. montensis</i>	2021	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM）； 形態学的指標；生育温度特性	Houbraken et al 2020
<i>A. neoterreus</i>	2022	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM + RPB2）； 形態学的指標	Houbraken et al 2020
<i>A. pseudalabamensis</i>	2023	multilocusの分子系統解析（ITS + β -tub + CaM + RPB2）； 形態学的指標；抗真菌薬感受性試験	Houbraken et al 2020

3) 研究成果の刊行に関する一覧表(令和7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
Masumoto N, Yamazaki T, Miura T, Nakajima K, Yamamoto K, Kato T, Minamoto N, Suematsu T, Sato Y, Nomura A, Akagi M, Ohtsuki T, Koyama K, Mizumoto T, Miyashita T, Kawashima S, Saito T, Sugimoto N	Development of a Standard-Free Analytical Quantitative Method based on Liquid Chromatography Using Relative Molar Sensitivity for Chlorogenic Acid in Apple Juice	Chem. Pharm. Bull.	73(7)	650-657	2025
Miura T, Liu Y, Bzhelyansky A, Ohtsuki T, Matsufuji H:	Development of ¹ H qNMR analytical procedure for purity determination of Imazosulfuron and 1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄ for ISO 17034 accreditation.	Journal of AOAC INTERNATIONAL	31(1)	qsaf099	2025
杉本直樹	既存添加物の取扱いに関する今後の方針について.	月刊フー ドケミカ ル	5	23-27	2025
杉本直樹	定量分析値の SI トレーサビリティの確保: qNMR/Chromatography (Ensuring SI traceability of quantitative analytical values: qNMR/Chromatography)	ソフト・ド リンク 技 術資料	207(3)	63-73	2025

令和8年3月30日

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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 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. 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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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. 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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 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. 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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 巖一郎・ツジ ゲンイチロウ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 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. 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 齋藤 嘉朗

次の職員の令和7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 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. 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7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		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. 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8年3月31日

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7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）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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： ）	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

（※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. 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 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7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. 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7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 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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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. 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 8年 3月 31日

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 尚子

次の職員の令和7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 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)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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. 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。