

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 5 年度～令和 7 年度

総合研究報告書

研究代表者	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
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. 総合研究報告書(総括)	
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. 総合分担研究報告書	
1. 既存添加物の成分規格に関する調査研究	20
業務受託者：松村 雅彦	
研究協力者：藤井 結花	
研究協力者：木戸 啓之	
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	21
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	35
研究分担者：永津 明人	
(3) 天然色素に含まれる色素成分の定量的分析法の開発	69
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 によるアントシアニンの純度評価	98
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	113
研究分担者：増本 直子	
(3) 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	127
研究分担者：大槻 崇	

(4) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討 158

研究分担者：辻 厳一郎

(5) 環境負荷及び試験者負担の軽減を目指した分析法の検討 176

研究分担者：阿部 裕

研究協力者：川末 慎葉

研究協力者：石附 京子

研究協力者：中島 馨

研究協力者：御所窪 誠

研究協力者：渡辺 実薫

研究協力者：座間 俊輔

研究協力者：伊藤 朱美

研究協力者：藤松 芽生

(6) 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 210

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

研究協力者：清水 公德

研究協力者：伊藤 紫野

3. 研究成果の刊行に関する一覧表(令和 5～7 年度) 242

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5年度～令和7年度 総合研究報告書

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 既存添加物の品質確保を目的に、流通実態、自主規格、安全性評価状況の調査を行うと共に、入手できた品目について成分組成の調査、有効成分又は指標成分の同定、更に必要に応じて分析法の開発を行った。本研究で得られた成果は、各品目について公的な成分規格設定を行う際にその科学的な根拠情報として活用される予定である。具体的には、既存添加物の内、「カロブ色素」、「カシアガム」、「香辛料抽出物(シナモン、バジル、クローブ、コショウ、コリアンダー、セロリ)」、「アナトー色素」、「スピルリナ色素」、「ムラサキヤマイモ色素」、「メナキノン(抽出物)」、「酵素(ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ等)」等を対象品目とし、各品目に適した分析法の開発を行い、公的な試験法への実用化を検討した。

「カロブ色素」については、主色素成分の同定し、確認試験法及び RMS を利用した定量法(RMS 法)の規格試験への導入を検討した。「カシアガム」については、不純物であるアントラキノン類の抽出法及び定量法を検討し、JECFA 法よりも正確な純度試験法が設定可能であることを見出した。「香辛料抽出物」については、流通製品及び基原植物中の有効成分を $^1\text{H-qNMR}$ により直接定量でき、品質管理に応用可能であることを確認した。また、 $^1\text{H-qNMR}$ は、アントシアニン類の正確な純度評価において、最も信頼性の高い手法であり、アントシアニンを主色素成分とする既存添加物について RMS 法を導入する際に活用できることがわかった。「ムラサキヤマイモ色素」については、主色素成分がアントシアニン類であることを明らかにし、HSCCC による精製条件を決定した。「スペルリナ色素」については、HPLC 定量法及び HPLC-HRMS による定性法を確立した。「アナトー色素」及び「メナキノン(抽出物)」については、RMS 法が規格試験の定量法に導入可能であることを確認した。「酵素」については、基原微生物の同定法を検討し、マトリクスの変更や消化酵素の併用が検出ペプチド数を増加させ、Coverage を上昇できることを明らかにした。また、基原微生物の同定精度の向上には、国際整合を考慮した最新の分類情報を常に収集し、データベースの登録情報の更新が重要であることを明らかにした。

また、公的な試験法への導入のために、分析法の開発を行った。既に基盤技術となっている RMS 法の定量値の装置間差の要因を調べ、補正法を導入することにより精度向上が可能であることを明らかにした。更に、RMS 法に利用可能な校正物質の合成及びスペクトルデータの比較により、ユニバーサルな校正物質の創出に資する知見を得ることができた。

食品添加物中のPb及びAsの定量法としてEDXが利用可能であるか検討を行い、品質管理において十分な精度を有することを明らかとした。また、食品添加物中の窒素含量の定量に元素分析法が適用可能であることを確認した。EDX及び元素分析法には、専用の装置が必要という欠点があるが、試験者や環境への負荷を大幅に低減できるという大きな利点がある。従来法との比較により、各品目の公的な試験法への導入の推進に資する従来法と同等以上の性能を有することが確認できた。

研究分担者

	吉成知也	国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部第四室長
	食品添加物部長	中西早苗
阿部 裕	国立医薬品食品衛生研究所	短時間非常勤職員
	食品添加物部第二室長	船江元子
増本直子	国立医薬品食品衛生研究所	短時間非常勤職員
	生薬部第二室長	好村守生
辻巖一郎	国立医薬品食品衛生研究所	准教授
	有機化学部主任研究官	内倉 崇
渡辺麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所	特任助教
	衛生微生物部第三室長	高山卓大
西崎雄三	東洋大学食環境科学部	助教
	准教授	清水公德
天倉吉章	松山大学薬学部	教授
	教授	伊藤紫野
井之上浩一	立命館大学薬学部	大学院生
	教授	松村雅彦
永津明人	金城学院大学薬学部	(一社)日本食品添加物協会
	教授	専務理事
大槻 崇	日本大学生物資源科学部	藤井結花
	准教授	(一社)日本食品添加物協会
		常務理事
		木戸啓之
		(一社)日本食品添加物協会
		常務理事

研究協力者

川末慎葉	国立医薬品食品衛生研究所	御所窪誠	(一社)日本食品分析センター
	食品添加物部研究員	渡辺実薫	(一社)日本食品分析センター
石附京子	国立医薬品食品衛生研究所	座間俊輔	(一社)日本食品分析センター
	食品添加物部研究員	伊藤朱美	(一社)日本食品分析センター
中島 馨	国立医薬品食品衛生研究所	藤松芽生	(一社)日本食品分析センター
	食品添加物部研究員		

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務となっている。

本研究では、このような要求に対し、(1) 既存添加物の成分規格に関する研究：流通実態及び基原・製法・本質の調査、海外規格及び自主規格、安全性評価状況等の調査を行う、(2) 既存添加物の有効成分の解明：最新の技術により詳細な成分解析を行い、成分規格の設定に必要な情報として、有効成分あるいは指標成分を明らかにする、(3) 試験法及び分析法の開発：定量用標品の代替物質の合成・供給、定量用標品を必要としない相対モル感度(RMS)を用いたSIへのトレーサビリティを確保した定量法、分子生物学的手法を応用した試験法等、新規分析法を開発、次いで実用化を行う。について検討した。すなわち、本研究では、既存添加物の公的な成分規格の設定及び改正に繋がる基礎情報の収集と同時に科学技術発展に資する新規分析法の開発・実用化、公的試験法への導入を検討した。

B. 研究方法

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

既存添加物の公的な成分規格設定のための基礎情報を得ることを目的に、主に第10版公定

書に未収載品について、自主規格又は自社規格の整備状況、公的な規格案の作成状況、流通実態、国内外の安全性評価状況等について調査した。

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

成分規格の設定又は改正が望まれる品目の内、流通が確認され試料が入手できた品目について成分組成を分析し、有効成分又は指標成分を探索した。また、必要に応じて次項「3. 分析法及び試験法に関する研究」で検討した手法を応用した。具体的には「カロブ色素」、「カシアガム」、「香辛料抽出物(シナモン、バジル、クローブ、コショウ、コリアンダー、セロリ)」、「アナトー色素」、「スピルリナ色素」、「ムラサキヤマイモ色素」、「メナキノン(抽出物)」、「酵素(ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ等)」について検討した。

3. 分析法及び試験法に関する研究

2に示した品目の内、「アナトー色素」、「スピルリナ色素」、「ムラサキヤマイモ色素」、「メナキノン(抽出物)」、「酵素(ガラクトシダーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、プロテアーゼ等)」に対して、各品目に適した分析法及び試験法を検討した。適した分析法がない場合は、分析法を開発し、それを適用した。本研究で用いた手法は、qNMR、各種NMR測定、HPLC、分取HPLC、相対モル感度(RMS)を用いた定量法、LC/MS、GC/MS、TLC、HSCCC、元素分析、XRF、MALDI-ToF-MS、ペプチドマスフィンガープリント法(PMF)等である。

C. 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

第 10 版公定書未収載品について、①自主規格(案)及び第 11 版食品添加物公定書成分規格案の作成状況、②試験法に関する第 3 者及び自社検証実施状況、③国内食品市場における流通実態、④国内外の安全性評価の実施状況、等について調査結果をまとめた。また、第 10 版公定書既収載品目の内、改正が必要とされた品目については、その成分規格案をまとめた。

具体的には、令和 5 年度は、成分規格が未設定である既存添加物について、日本食品添加物協会の協力を得て、自主規格、自社規格、又は業界団体が提案する成分規格案を、令和 6 年度は国内市場における流通・使用実態調査を、令和 7 年度は既存添加物全品目の安全性評価状況を調査し、これらをまとめた。計 3 年間の調査、本研究班で得られた知見から、別に成分規格案を修正、あるいは新規作成し、業界団体にフィードバックし試験データの提供を依頼する予定である。更に得られた情報から成分規格設定が実現可能な品目を選出し、別に第 3 者検証を行い、第 11 版公定書作成検討会(間に合わない場合は第 12 版公定書作成検討会)に成分規格案を提出する予定である。

自主規格、流通実態及び安全性評価状況の調査において、第 10 版公定書未収載品の内、情報に乏しく、製造又は輸入に携わる国内事業者が見つからず、試験に供する原体の入手が困難であり、成分規格案の策定や安全性評価が実質的に不可能と判断できる品目があった。これらの品目については、引き続き調査が必要であるが、消除手続きを進める、あるいは別の方策を講じる必要がある。令和 7 年 2 月 18 日の食品衛生基準審議会添加物部会において「既存添加物の取扱いにかかる今後の方針について」が示され通り、安全性評価が完了していないもの及び成

分規格が設定されていないものについて、製造や使用実態に関する情報を収集し、毒性試験や成分規格の設定が不要な場合、使用基準又は製造基準を設定し、製品としての安全性及び品質を確保する方針で今後検討する予定である。

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分研究

食品添加物カロブ色素は、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望まれる。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。

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

分析検討の過程で、含有成分として複数の schaftoside 配糖体の含有が認められた。これら配糖体は天然物である原料によって含有量にばらつきが生じることも考察されたため、定量分析として、schaftoside を直接分析する方法と、酵素分解により schaftoside に誘導して分析する方法を検討し、いずれにおいても定量値を算出することができた。指標成分候補とした schaftoside について、TLC 分析による確認試験を検討した結果、H₂O または 50%MeOH を抽出溶媒として調製した試料溶液をシリカゲル板にスポットし、*n*-ブタノール/酢酸/水系溶媒で展開し、UV (254 nm)照射することで、*R_f* 0.4 付近に schaftoside の明瞭なスポットを確認すること

ができ、分析可能であることが示唆された。

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、rutin 3 水和物を基準物質した定量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においても定量分析可能であることが示唆された。

2) 既存添加物の基準策定のための ¹H-qNMR を用いた成分定量

既存添加物「香辛料抽出物」の規格試験法への ¹H-qNMR の適用のため、「クローブ抽出物」「クローブ香料」等、クローブ関連製品中の eugenol の含有率の定量、バジル関連製品中の rosmarinic acid の定量、「コリアンダーオイル」とコリアンダー種子関連製品の linalol の定量、さらに、「セロリーシードオイル」とセロリー種子関連製品中の butylphthalide の定量について検討した。

2-1) チョウジ、クローブ末、「クローブ香料」、 「クローブ抽出物」、オールスパイス末中の eugenol の定量

Eugenol 標準品中の eugenol の含有率は 97.34% と見積もられた。生薬チョウジ中の eugenol 含有率は 13.01±0.32%、市販クローブ末では 8.11～14.83%、市販オールスパイス末では 2.14～2.67% という結果を得た。「クローブ香料」の eugenol 含有率は 81.58%、「クローブ抽出物」は 31.93% であった。HPLC から得られた各試料中

の eugenol の含有率は ¹H-qNMR での定量値に極めて近似した値であった。ゆえに、¹H-qNMR が HPLC の代わりになり得る方法であることが確認できた。

2-2) バジル中の rosmarinic acid の定量

市販バジル末中の rosmarinic acid の含有率は、2 製品ではそれぞれ 1.51% と 0.70%、他の 2 製品ではシグナルが観測されず、測定不能だった。栽培した 5 品種では、葉における含有率が 0.83～1.90% であったのに対して、茎ではシグナルを観測できない(4 品種)か測定可能でもわずか(1 品種、0.14%) であった。このようにバジル由来の製品の rosmarinic acid の定量が ¹H-qNMR を用いて可能であることが確認できたと同時に、rosmarinic acid の有無によって用部がバジルの植物体のどの部分かの判断材料になることもわかった。

2-3) 「ブラックペッパーオイル」及びコショウ 末中の β-caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイル中の β-caryophyllene を ¹H-qNMR では 1.55% で測定が可能ながわかった。ただし、スペクトル中でシグナルが混んでいる領域であることから、精密な測定という観点ではあまり精度の高いものではないと考えられた。また、原料となるコショウの試料では ¹H-qNMR で測定ができず、β-caryophyllene を原料の管理の指標とすることはできないと考えられた。

2-4) 「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 では、試薬中の linalol の含有率は 89.47% だった。一方、「コリアンダーオイル」中

の含有率は 69.33%, 種子試料 2 種中では 0.15 と 0.17%であった。この結果は、HPLC による定量結果とほぼ等しいことから、¹H-qNMR による linalol の定量が「コリアンダーオイル」等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。

2-5) 「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」中の含有率は 2.14%, 種子 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。この結果は、HPLC による定量結果とほぼ等しいことから、¹H-qNMR による butylphthlide の定量が「セロリシードオイル」等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。

3) 天然色素に含まれる色素成分の定量的分析法の開発

天然由来の色素品目の多くは、成分規格に「色価」が規定されているのみで、主色素成分の含量及び定量法が規定されていない。これらの色素品目は国内流通において問題はないが、国際的な評価に耐えられるものではないと考えられる。このような背景から、天然色素に含まれる色素成分の定量的分析法の開発を行った。

3-1) アナトー色素ノルビキシン及びビキシンを指標とする新たな SR-HPLC 法の開発

アナトー色素におけるノルビキシン(NBx)及びビキシン(Bx)の SR-HPLC 定量法を構築した。まず、標準品が入手困難である *trans*-NBx 及び

trans-Bx さらに SR を合成し得ることができた。そして、¹H-qNMR により絶対定量を行い、その定量値に基づいて検量線を作成した結果、RMS が算出できた。今後、RMS を用いてアナトー色素製品中の NBx 及び Bx の定量を行い、絶対検量線法とほぼ同じ定量値との比較を行う予定である。公的な規格試験法として成立させるためには、様々な条件下(室間、日間、カラム等)における定量値の再現性を確認することが更に必要である。

3-2) 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

ムラサキヤマイモ色素におけるアントシアニン類を指標とした HPLC 定量法の構築を目指し、各種検討を実施し、入手した 2 ロットにおける共通主要成分 3 成分の構造推定を実施した。結果として、既報とは配糖体の数は異なっていたが、類似した構造として推定するに至った。これらの構造決定及び定量用標準品の獲得に向け、HSCCC による単離精製を検討した。大容量のカラムにおいて高濃度の濃縮溶液を注入可能な条件を確立し、主成分及び副成分の 1 つを単離精製可能な手法を構築した。

3-3) スピルリナ色素の発色成分であるフィコシアニンを指標とする新たな定量的分析法の開発

スピルリナ色素の HPLC 定量法及び HPLC-HRMS による定性法を構築した。まず、バイオカラムによる測定によりフィコシアニン由来の明瞭なピークを得ることができることが明らかとなった。次に、定性分析法としてトリプシン修飾カートリッジを用いた温和且つ迅速な条件で、フィコシアノビルリン結合断片のペプ

チドシーケンス解析が可能となった。また MS/MS のフラグメンテーションでは、 m/z 587 が PCB 特徴的断片として得られた。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、種や株の差にも対応可能と考えられる。

3. 分析法及び試験法に関する研究

1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価
 ^1H -qNMR によるアントシアニンの絶対純度算出法について検討した。モデル試料として市販のシアニジン 3-グルコシド塩化物($\text{Cy3G}\cdot\text{Cl}$)を用い、まず測定溶媒の最適化を行った。

まず、 $\text{Cy3G}\cdot\text{Cl}$ を用い、重溶媒の種類と酸濃度の組み合わせが ^1H -qNMR 定量値に及ぼす影響を検討した。その結果、アントシアニンを ^1H -qNMR により定量するには、添加した酸が十分に解離可能な一定量の D_2O を含む測定溶媒を用い、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必要があることが明らかとなった。推奨測定溶媒としては、アントシアニンのアグリコンも溶解可能な 5 %TFA- d 含有重メタノール/重水(9:1)が適切であると判断した。なお、本測定溶媒における ^1H -qNMR 用基準物質 DMSO_2 及び $\text{DSS-}d_6$ の安定性を検討したところ、分解物由来のシグナルは観察されず、両物質とも安定であることが確認された。

また、市販 $\text{Cy3G}\cdot\text{Cl}$ 7 試薬の実態調査では、純度は 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ではなく、いずれも ^1H -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、 ^1H -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。さらに、 ^1H -qNMR 以外の手法として、イオンクロマトグラフィーにより塩化物量を定量し $\text{Cy3G}\cdot\text{Cl}$ 純度へ換算する方法も検討した。しかし、本法は Cy3G^+ と Cl^- が等量で存在する場合にのみ成立し、塩化物化過程で過剰の Cl^- が残存すると純度を過大評価することが明らかとなった。

以上より、アントシアニンの正確な純度評価には ^1H -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の HPLC 成分規格試験及び RMS 法を開発する際の重要な知見となる。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

分析対象物質とは異なる物質を基準とし、その相対モル感度 (RMS) を利用する定量法 (RMS 法) が、様々な天然物中の成分測定に用いられている。UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法では、1) RMS 決定時に必要な定量対象と同一の物質の入手も困難な場合がある、2) 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、といった課題がある。そこで、この二つの課題の解決策について検討した。

2-1) RMS 法における類似構造間での法則性の調査

1) ナフトキノン骨格を持つフェナキノン類やメナキノン類を分析対象とした RMS 値及び 2) クロロゲン酸類を分析対象とした RMS 値を算出し、類似構造間で RMS 値にどのような変化があるか調査した。

1) の分析対象物質では、ナフトキノン骨格に由来する UV 吸収帯とナフトキノンに結合した側鎖の二重結合に由来する UV 吸収帯が存在すると考えられる。メナキノン-4(MK-4), メナキノン-7(MK-7)及びフィトナジオン(K₁)において、側鎖の構造は様々であるが、ナフトキノン骨格は共通しているため、この骨格のみに由来する UV 吸収帯を測定波長として設定すれば、同一の基準物質に対する RMS は同一になることが予想された。2 台の HPLC-PDA にて、基準物質 D4HB に対する MK-4, MK-7 及び K₁ の RMS を求めたところ、いずれも 1.06 であった。このとき、分析対象物質の測定波長は、ナフトキノン骨格に由来する 247 nm とした。ナフトキノン骨格をもつビタミン K 類は、本研究で対象とした化合物以外にも側鎖の異なる十数種類存在する。本研究により、側鎖が異なってもナフトキノン骨格由来の UV 吸収帯に影響する発色団がほかに存在しなければ、すべて同一の RMS で定量可能であることが示唆された。

次に、発色団の数と RMS の関係を調べるため、2) のクロロゲン酸類を対象とした実験を行った。クロロゲン酸類は、キナ酸にカフェ酸等のケイ皮酸誘導体が結合した化合物群である。

キナ酸に一つカフェ酸が結合したモノカフェオイルキナ酸(CQA)のうち、結合位置だけが異なる 3CQA, 4CQA 及び 5CQA の RMS はほぼ同一であった。キナ酸に一つフェルラ酸が結合し FQA のうち、結合位置だけが異なる 3FQA, 4FQA 及び 5FQA の RMS は、4FQA 及び 5FQA はほぼ同一の RMS であったが、3FQA のみ大きな値となった。この理由は不明であるが、ケイ皮酸誘導体のキナ酸への結合数が一つである場合、ケイ皮酸誘導体の化合物種が同じであれば、同一の RMS を用いても定量値への影響はせいぜい 1%程度と考えられた。

一方、5CQA の RMS に対する CQA 及び FQA (3FQA を除く)の RMS の比を算出したところ、FQA は CQA よりも 10%程度大きな値であった。フェルラ酸はカフェ酸の 3 位の水酸基がメトキシル基となった構造である。基準物質と 4FQA 及び 5FQA は溶出時の移動相条件が異なるため、CQA と 4FQA 及び 5FQA の RMS の違いは構造もしくは溶媒による深色効果／淡色効果によるものと推測された。クロマトグラフィーの分析条件にもよるが、ケイ皮酸誘導体の種類が異なる場合、この構造が発色団であることから、同一の RMS と見なす前に一考が必要である。

キナ酸にカフェ酸が二つ結合した diCQA のうち、3,4-diCQA, 3,5-diCQA 及び 4,5-diCQA の RMS はそれぞれ 2.175, 2.268 及び 2.151 であった。5CQA の RMS に対するこれらの RMS の比はそれぞれ 1.95, 2.03 及び 1.93 であった。発色団のカフェ酸の数が単純に 2 倍に増えると RMS も 2 倍になると予想していたが、3,4-diCQA 及び 4,5-diCQA では 1.9 倍程度とわずかに小さな値となった。3,4-diCQA 及び 4,5-diCQA の二つのカフェ酸はキナ酸の隣り合った炭素に結合しており、二つのカフェ酸が隣り合っていない 3,5-diCQA と比較して立体障害の影響があるのではと考えられた。

以上の結果から、クロロゲン酸類の場合、立体障害等の影響もあり、発色団であるケイ皮酸誘導体の数が増えたからといって、その RMS が単純に 2 倍等になるとは限らないことが示された。しかし、キナ酸にケイ皮酸誘導体があれば、その位置異性体はほぼ同一の RMS であること、ケイ皮酸誘導体が 2 つだから RMS も 2 倍にしたとしても定量値への影響は 10%程度であることが示唆された。

2-2) PDA 検出器の吸収スペクトル特性調査

2-2-1) 各検出器の直線性

試験液の測定は、分光光度計(1 台)及び HPLC-PDA(6 台、装置 A～F)にて実施した。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。分光光度計では、すべての測定波長において、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。装置 F でも、装置 D 及び E と同様に直線性が不良な波長があった。

2-2-2) 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

次に、いずれの装置 A～F においても良好な直線性があった濃度範囲 0.1～1.0 での 4 波長における各装置の吸光度が、分光光度計における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たところ、差が大きい装置で 15%程度であった。同一装置内において検出波長ごとに比較したところ、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、それ以外の 3 波長で測定したときの 2 つのパターンに大別された。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二つを搭載しており、380～400nm 付近でこの二つのランプ

を切り替えている。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。

2-2-3) 異なる二つの $\lambda_{\max}$ を測定波長として求めた RMS 値の装置間差の補正

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一つを提案した。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。既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。

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りえないとも思われた。これまでの研究で測定波長が 1 波長より 2 波長の方が装置間差が大きかった要因の一つとしては、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。

3) 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

既存添加物の成分規格試験の効率化及び精度向上を目的として、成分規格が未制定であるカシアガムを対象に、アントラキノン類分析法の確立について検討した。

JECFA 法の検証では、前処理工程において加熱時間の短縮並びに抽出回数の変更が必要であることが明らかとなった。また、液液抽出におけるエマルジョンの形成に起因する二層分離の遅延が確認され、遠心分離操作の導入が分離効率の改善に有効であることが実証された。さらに、実試料においては測定対象物質のピーク近傍に夾雑成分が観察される場合があり、JECFA 法の HPLC 条件では測定対象物質と夾雑成分の分離が不十分となり得ることが示唆された。この点については、粒子径 3 μm のカラムを採用し、グラジエント条件を最適化することにより、高分離能を有する分析条件が確立された。

また、前処理における有害試薬の使用低減の観点からクロロホルムの代替溶媒を検討した結果、ジクロロメタン及び酢酸エチルの単独使用では、化合物によって回収率の低下等が認められた。そこで、ジクロロメタンによる抽出後に酢酸エチルで再抽出し、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。本法により、JECFA 規格の残留基準値(0.5 mg/kg)付近におけるアントラキノン類の抽出に適用可能かつクロロホルムを使用しない前処理法を確立した。

$^1\text{H-qNMR}$ に基づく RMS を用いた定量法の適用性については、正確な標準溶液濃度に基づいて作成した各検量線式の傾きの比(測定対象の傾き/

基準物質の傾き)より、基準物質 3 種に対する測定対象物質 5 種の各 RMS が算出された。これらの RMS の正確性は、モデル溶液を用いた検証により実証され、本手法が測定対象物質 5 種の効率的かつ信頼性の高い定量に資することが示された。

以上より、本研究で確立した前処理(エマルジョン対策を含む JECFA 法の改良)及び HPLC 条件(測定条件の最適化)を組み合わせた方法は、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分析可能であり、成分規格の策定に資する分析法として有用であることが明らかとなった。また、クロロホルムを使用しない段階抽出法や RMS に基づく定量法を活用することにより、作業者の安全性及び環境負荷の低減を図りつつ、分析の効率化及び信頼性向上に貢献できると考えられた。

4) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

本研究では、1) HPLC の汎用的な検出器としての 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った。検討した分子としては、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、2) 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開発の検討を行った。

まず、1,4-ナフトキノン誘導体に対して様々な置換基を導入した誘導体の合成経路においては、基本的に置換基としてアミノ基を導入した中間体化合物を調製し、1,4-ナフトキノン骨格へと導入することで化合物の合成を行うことができた。しかしながら、導入する置換基の電

子的な効果によって反応が進行しない、また望みのものとは別の構造が得られる場合もあった。合成した化合物の UV-Vis スペクトルを測定した結果、5 位にニトロ基を有する誘導体においてピークトップの長波長化が観測され、800 nm 以上の部分にも UV 吸収を示した。また 5 位及び 8 位にアミノ基を有する誘導体では、500–700 nm 付近における吸収において青色 3 号と類似性のあるスペクトルが得られた。これは分子内水素結合が形成可能な共通構造が、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。合成した誘導体については固体ではあるものの、分析の際の秤量操作や精製しやすさなどを考慮すると、今後は結晶性を高めるための構造変換等も検討すべき事項である。

次に、シングルフアレンス(SR)分子の開発については、ビスアリールマレイミド分子に導入する芳香環の種類によって吸収波長域が変化するという性質を利用して吸収波長域の調整を行った。今回はビスインドリルマレイミドを母骨格とすることで、ビキシンと同様の吸収帯を付与することができた。この骨格に対して 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を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 度の合成で一挙に複数の候補化合物を得ることが可能であり、逆相 HPLC によってそれぞれを分離することができるため、HPLC クロマトグラム上で定量対象であるビキシンやノルビキシン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探索・調製することが可能であった。また、親水性の高い官能基を有する炭化水素基を利用することで、分子としての親水性

の向上及び HPLC クロマトグラム上の保持時間の短縮もできることが分かった。この SR 分子デザインを利用することによって、既存添加物含め、標準品そのものの入手が困難な定量対象に対しても分析法を設定できるものと期待された。

5) 環境負荷及び試験者負担の軽減を目指した分析法の検討

食品添加物公定書の収載された分析法及び試験法の開発に関する研究として、主に環境負荷、試験者負担を軽減することを目的とし、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 Pb 及び As の定量法の検討、窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較、EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討を行った。

5-1) EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討

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

5-2) 窒素定量法の比較

窒素定量に課題がある「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を試料に用いて、公定法を含む複数の窒素定量法(①公定法(ケル

ダール法), ②公定法改法(公定法における試料採取量を減らしたもの), ③セミマイクロケルダール法, ④元素分析法(改良デュマ法), ⑤元素分析法(CHN コーダー法))の定量値及び操作性等を比較した。

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

以上の結果を踏まえると、「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」に対しては、公定法の試料量を少なくした公定法改法を導入することが最も簡単であると考えられた。一方、元素分析法は複数の元素を測定可能な装置も有ることから、複数部署で共有して使用できると考えられる。したがって、将来的には試験者や環境への負荷低減のため元素分析法へシフトしていくべきであると考えられた。

5-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討

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、これらを含む し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。

6) 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

既存添加物酵素は、細菌、放線菌、真菌などの微生物を基原とするものが多い。微生物の中には二次代謝産物としてヒトへ危害性を有する物質を産生するものがあることから、基原菌種の正確な同定法の確立が望まれている。また、データベースの改良を見据えた、基原となる真菌種の分類学的情報の収集が必要とされている。本研究では、これらの課題について検討した。

6-1) 添加物酵素の基原種同定法の開発

タンパク質のデータベースである UniProt から抽出したアミノ酸配列を用いて独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチを実施した結果、オンラインで検索した場合には同定できなかった β -ガラクトシダーゼやプロテアーゼの基原菌種を同定することができた。複数種の消化酵素を用いた解析を実施した結果、トリプシンを用いた場合には同定できなかったヘミセルラーゼやセルラーゼに含まれるタンパク質のバンドの基原菌種を同定することができた。また計 4 種の添加物酵素を二次元電気泳動法により解析した結果、一部の酵素については通常の SDS-PAGE による解析で同定不能であったタンパク質が同定され同定結果の正確性を向上させることができた。マトリクスの変更や消化酵素の併用による検出ペプチド数の増加程度を確認したところ、これまで用いていたマトリクスの CICCA では検出されなかった

ペプチドが複数種のマトリクスをそれぞれ用いた場合に検出され、また消化酵素の併用により検出ペプチド数が増えることが明らかとなった。さらに、複数のマトリクスとトリプシン/Lys-C 併用を組み合わせ Coverage 上昇程度を確認した結果、マトリクスに CICC 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。

これらの改良を加えたことによって、解析するタンパク質によっては、検出されるペプチドの種類が増え、Mascot サーチの結果における Coverage の向上が認められ、基原同定の精度を高めることに有用であることが明らかとなった。これらの方法を組み合わせることで、より精度高く酵素の基原種の同定が可能となると期待される。

6-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

データベース有効的な改良を見据えた分類学的情報の収集を行った。酵素の基原として使用される *A. niger* とその近縁種について、現在主流の分類体系では *A. niger*・*A. tubingensis*・*A. luchuensis* の 3 菌種にまとめられるが、これら以外に添加物基原種または SwissProt 等 DB 登録配列の由来種として使用され続けている学名は多く存在し、*A. awamori*, *A. kawachii*, *A. foetidus* などがしばしば見られることを把握した。データベースに登録する情報を精査すること、並びに酵素製品の付帯情報についても最新の真菌分類学的情報を元に整理する必要があると考えられた。添加物酵素の基原として用いられる *Trichoderma* 属 7 菌種のゲノムにおける特定の遺伝子アミノ酸配列における異種間での配列一致率を確認したところ、近縁菌種間では最高で 99.5% が一致することが判明した。こ

のことから、アミノ酸配列を指標として基原菌種をその近縁種と区別して識別するためには、0.5% 程度の差違を認識できる精度で分析する必要があることが示唆された。*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* を含む 12 菌種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。

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。真菌分類学的情報を元に、継続して整理し使用する必要があると考えられた。

D. 健康危機情報

なし

E. 研究発表

E-1) 学会発表

E-1-1) 学会

- 1) 草刈美玖, 西崎雄三, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 谷岡隆, 中室克彦, 中島馨, 石附京子, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: インジゴ法によるオゾン水中のオゾン定量法確立に向けた検討. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).
- 2) 天倉吉章, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹: 既存添加物ヒマワリ種子抽出物の成分解析(第 2 報). 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).

- 3) 中島馨, 西崎雄三, 草刈美玖, 鈴木俊宏, 兎川忠靖, 谷岡隆, 中室克彦, 石附京子, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 吸光光度法によるオゾン水中のオゾン定量法確立に向けた検討. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).
- 4) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 嶋田典基, 吉田久美, 阿部裕, 杉本直樹: 定量 NMR によるアントシアニンの純度測定～測定溶媒の最適化～. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).
- 5) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛: 健康食品中のアントシアニン定量における相対モル感度(RMS)を用いた Single-reference HPLC 法の適用について. 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会(2023.6).
- 6) 岩崎大剛, 金澤まい, 川本扶佐子, 新穂大介, 村上敏之, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いた single-reference LC 法による長命草根由来ケルラクトン類の定量. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回総会(2023.7).
- 7) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 永津明人, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン Single reference-HPLC 法によるアナトー色素のビキシシン及びノルビキシシンの分析. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回総会(2023.7).
- 8) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛: 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について. 食品科学工学会第 70 回大会(2023.8).
- 9) 伊藤紫野, 西原秀典, 橋本一浩, 川上裕司, 後藤慶一, 水谷治, 山田修, 清水公德, 伴さやか, 矢口貴志, 工藤由起子, 渡辺麻衣子. 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指標を用いた型別. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会(2023.10).
- 10) 阿部 裕, 増本直子, 西崎雄三, 窪崎敦隆, 杉本直樹: 既存添加物に関する国立衛研の最近の取り組み, 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会(2023.10).
- 11) 岩崎大剛, 金澤まい, 川本扶佐子, 新穂大介, 村上敏之, 西崎雄三, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いた機能性成分の定量分析例: 長命草根由来ケルラクトン類. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 12) 石附京子, 西崎雄三, 杉本直樹, 山崎太一, 三浦亨, 武藤康弘, 岩本芳明, 吉田浩祐, 澤竜一, 久保田由美子, 加藤毅, 笛木周平, 山本佳奈, 小松功典, 朝倉克夫, 松熊伸也, 吉村弘伸, 末松孝子: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) 共同試験の結果報告. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 13) 加藤千穂, 西崎雄三, 大槻崇, 松藤寛, 阿部裕, 多田敦子, 杉本直樹: qNMR におけるピーク高さ法の検討: naringin の場合. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 14) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, ¹H-定量 NMR に基づいた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニン定量について, 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会 (2023.12).
- 15) 建部千絵, 藤原由美子, 久保田浩樹, 多田敦子, 杉本直樹: qNMR を用いた食用タール色素成分規格で使用される不純物定量用試薬の純度測定. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).

- 16) Sensoy M, Kutluay V M, Nagatsu A, Saracoglu I: Isoflavonoids from *Vuralia turcica* (Kit Tan, Vural & Kucukoduk) Uysal & Ertugrul. 日本薬学会第 144 年会(2024.3).
- 17) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹: ^1H スピン情報に基づいたクロロゲン酸類のデジタルリファレンススタンダード(dRS)の作成. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会(2024.5).
- 18) 大槻崇, 馬場萌加, 二見櫻子, 黄奕, 遠藤悠平, 金子剣伸, 松藤寛: ^1H -qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いた大豆イソフラボン類分析法の確立. 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会(2024.5).
- 19) 伊藤紫野, 渡辺麻衣子, 西原秀典, 橋本一浩, 川上裕司, 小林直樹, 後藤慶一, 水谷治, 清水公德, 伴さやか, 矢口貴志, 工藤由起子, 大西貴弘: 発酵食品由来の黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指標を用いた分類学的検討. 第 45 回日本食品微生物学会学術総会(2024.9).
- 20) 森本深麗, 永津明人, 西崎雄三, 阿部裕, 増本直子, 杉本直樹: ^1H -qNMR 法を用いたクロブ由来既存添加物及びチョウジ末, オールスパイス末中の eugenol の定量. 日本生薬学会第 70 回年会(2024.9).
- 21) 鬼嶋七海, 内倉崇, 好村守生, 阿部裕, 杉本直樹: 食品添加物カロブ色素の成分研究. 第 63 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(2024.11).
- 22) 石附京子, 阿部裕, 杉本直樹: エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定呈法の検討, 第 61 回全国衛生化学技術協議会年会(2024.11).
- 23) 中島馨, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討〜クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係〜. 第 120 回日本食品衛生学会学術講演会(2024.11).
- 24) 大槻崇, 神谷彩音, 中山優希, 黄奕, 松下美由紀, 森川悟, 松藤寛: TDM 対象薬等医薬品 6 種の血中濃度測定における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用. 第 6 回日本定量 NMR 研究会年会(2024.12).
- 25) 渡辺実薫: 食品添加物公定書における窒素定量法の代替試験法の検証. 第 7 回(公社)日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会(2025.2).
- 26) 瀬川ひかり, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR) を用いたバジル(*Ocimum basilicum* L.)中の rosmarinic acid の定量. 日本薬学会第 145 年会(2025.3).
- 27) 内山奈穂子, 細江潤子, 清田浩平, 石附京子, 杉本直樹, 小出達夫, 田中誠司, 増本直子, 伊藤美千穂, 村林美香, 篠崎妙子, 藤峰慶徳, 大藤克也, 清水仁, 藤田和弘, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 牧野吉伸, 武藤康弘, 高岡真也, 中山貴寛, 朝倉克夫, 末松孝子, 阿部仁美, 小浜亜以, 五島隆志, 安田万寿, 諏訪博昭, 渡邊玲, 岡田ひとみ, 合田幸広: ^{19}F -qNMR を用いた医薬品中の残留溶媒としてのトリフルオロ酢酸(TFA)の定量に関する研究. 日本薬学会第 145 年会(2025.3).
- 28) Yuzo Nishizaki: A Case Study on Validation of

- External Calibration qNMR (EC-qNMR).
qNMR summit 2025 (2025.6).
- 29) 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).
- 30) 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).
- 31) 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).
- 32) 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).
- 33) 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).
- 34) 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).
- 35) 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).
- 36) 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).
- 37) 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).
- 38) 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).
- 39) 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).
- 40) 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).
- 41) 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「定量用ヘスペリジン」の確認試験について. 日本薬学会第 146 年会(2026.3).

E-1-2) 講演等

- 1) Sugimoto N: A new approach to obtain accurate quantitative values by qNMR and chromatography. International Symposium in Okinawa, 2023, on Ciguatera and Related Marine Biotoxins (2023.11).
- 2) Masumoto N: A new quantitative method of lutein in foods without its analytical standard. International Workshop for “Functional Substances in Agricultural Products” (2023.11).
- 3) 西崎雄三: ^1H スピン情報による化学物質のデジタルリファレンススタンダード (dRS) 化: dRS を基準にした qNMR. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 4) 増本直子: 相対モル感度(RMS)を用いた定量法, 室間共同試験をしてみたら. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会(2023.12).
- 5) 杉本直樹: 食品添加物の化学的安全性の確保. ifia JAPAN20224, 食の安全・科学セッション(2024.5).
- 6) 杉本直樹: 食品化学における定量分析の役割. 日本食品化学学会第 30 回総会学術大会(2024.5).
- 7) 杉本直樹: 第 10 版食品添加物公定書における主要な改正ポイント. 日本食品添加物協会拡大情報連絡会(2024.6).
- 8) 杉本直樹: 食品添加物の品質確保. 創立 150 周年記念特別衛研シンポジウム(2024.8).
- 9) 永津明人: 生薬等の品質管理での定量 NMR 法 (^1H -qNMR) の利用. 2024 年度分子研異分野技術交流セミナー(第 3 回), (2024.7).

- 10) 永津明人: 生薬の品質評価について. 令和 6 年度日本アロマセラピー学会中部北陸地方会・清水薬剤師会(2024.9).
- 11) 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).

E-2) 論文発表等

E-2-1) 論文等

- 1) Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y: Suitability of culture broth and conditions for *Escherichia coli* growth and gas production as a test of food additives in EC Broth. Food Hyg. Safety Sci., 2023; 64: 69-77.
- 2) Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara-Kudo Y, Watanabe M: Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. Food Addit. Contam. Part A, 2023; 40: 711-722.
- 3) Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on ^1H -qNMR for khellactone esters from *Peucedanum japonicum* root extract. Food Chem., 2023; 427: 136647.
- 4) 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物公定書収載品目における基原生物に使用される学名の考え方とその表記法. 食衛誌, 2023; 64: 77-88.

- 5) Masumoto N, Ohno T, Suzuki T, Togawa T, Sugimoto N: Application of the relative molar sensitivity method using GC-FID to quantify safranal in saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Nat. Med.*, 2023; 77: 829-838.
- 6) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 新井玲子, 杉本直樹, 鈴木梓, 浅野龍二, 五十嵐靖, 三浦亨, 武藤康弘, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 古川茶勲, 嶋田典基, 合田幸広: プシモノエステルアルカロイドの相対モル感度(RMS)を用いた日本薬局方定量法の検討. *薬学雑誌*, 2023; 143: 951-962.
- 7) Bayrakceken G Z, Saracoglu I, Nagatsu A, Yilmaz M A, Basaran A A: Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from *Prunus mahaleb* L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 2023; 310: 116378.
- 8) 齋藤剛, 杉本直樹: 定量核磁気共鳴(qNMR)法を用いた有機化合物の純度測定に関する国際規格策定. *環境と測定技術*, 2023; 50: 13-17.
- 9) Uchiyama N, Hosoe J, Komatsu T, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Shinozaki T, Kobayashi K, Fujimine Y, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Muto Y, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Quantitative ³¹P-NMR for the purity determination of the organophosphorus compound brigatinib and its method validation. *Chem. Pharm. Bull.*, 2024; 72: 36-40.
- 10) Amakura Y, Uchikura T, Yoshimura M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N: Chromatographic evaluation and characterization of constituents of sunflower seed extract used as food additives. *Chem. Pharm. Bull.*, 2024; 72: 93-97.
- 11) Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen S-P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G. F: Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR Sustainability. *Analytical Chemistry*, 2024; 96(24): 9790-9798.
- 12) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 燃焼法による食品添加物中の窒素定量分析. *日本食品化学学会誌*, 2024; 31(1): 31-34.
- 13) Ohtsuki T, Huang Y, Kamiya A, Nakayama Y, Matsushita M, Morikawa S, Matsufuji H: Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of blood concentrations of nine pharmaceutical compounds. *J. Pharm. Health Care Sci.*, 2024; 10: 35.
- 14) 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.

- 15) 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.

E-2-2) 総説等

- 1) 杉本直樹：定量 NMR の標準化と実用化. 薬学雑誌, 2024; 144: 353-357.
- 2) 杉本直樹：我が国の食品添加物の指定及び改正. Pharm Tech Japan, 2024; 40(8): 95-96.
- 3) 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.
- 4) 杉本直樹：定量分析値の SI トレーサビリテイの確保：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.

E-2-3) 単行本等

- 1) 増本直子, 西崎雄三：第 2 章 食品中に含まれる不純物分析の手順, 第 6 節 RMS 法による天然物由来製品の品質評価, 不純物の分析法と化学物質の取り扱い, 技術情報協会(東京), pp.183-192, 2024.

E. 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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

既存添加物の成分規格に関する研究

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 令和5年度から令和7年度にかけて、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として、既存添加物の成分規格に関する各種調査に取り組んだ。各年度の実施内容を以下に示す。

令和5年度

- ・既存添加物成分規格案の整備状況
- ・第11版食品添加物公定書成分規格案を検討した品目
- ・第6版既存添加物自主規格収載予定品目
- ・海外の食品添加物規格の有無

令和6年度

- ・既存添加物成分規格案の整備状況
- ・流通実態
- ・使用実態

令和7年度

- ・既存添加物の国内外の安全性評価情報について
- これらの活動について報告する。

研究協力者

藤井結花 (一社)日本食品添加物協会
常務理事

木戸啓之 (一社)日本食品添加物協会
常務理事

A. 研究方法

既存添加物の成分規格の作成状況、流通実態、安全性評価状況を調査した。調査内容は、各年度の報告書に記載したとおりである。

B. 研究結果

各年度の報告書に詳細を示したので参照していただきたい。

C. 考察

第11版食品添加物公定書作成検討会において、既存添加物の新たな成分規格設定案は、審議予定を含めて20品目程度となる。この値は、令和5年度の本調査研究報告において、第11版公定書をめざす第一グルー

プと位置付けられる品目数として示した数字と同じであり、背景事情の差異等を考慮しても、「20品目程度」という数字は実態を表していると考えられる。

添加物の安全性評価については、令和7年度の分担研究報告で考察したように、評価未了42品目のうち、海外の評価機関のサイトで安全性評価報告があるものは僅かで、全体としては、新たに試験を実施する必要があるものが大多数を占める。本取り組み完遂のためにも、事業者に対し継続して原体提供を呼び掛けていく必要があると考えられる。

D. 謝辞

各年度の調査研究に際して、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の部長杉本直樹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。

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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書
既存添加物の成分組成に関する研究
～カロブ色素の成分解析～
研究代表者 天倉吉章 松山大学薬学部 教授

研究要旨

カロブ色素は第 10 版食品添加物公定書に記載されている着色料であるが、確認試験は呈色を確認する定性試験のみであり、本添加物の特徴成分を具体的に確認する試験法の提案がのぞまれる。本研究では、カロブ色素の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。さらに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⁾に記載され、「イナゴマメ(*Ceratonia siliqua* L.)の種子の胚芽を粉砕して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある」と定義される着色料である。性状は、「淡黄～淡黄褐色の粉末又は粒で、わずかに特異なおいがある」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。IsoschaftosideはAdooq Bioscience製、schaftosideはCAYMAN CHEMICAL COMPANY製を用いた。分離、精製にはカラム充填剤として YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50)(ワイエムシィ製)、Chromatorex ODS(富士シリシア製)、Diaion HP-20(三菱化学製)を用いた。β-グルコシダーゼ(from almond, 4 U/mg)は、シグマアルドリッチジャパンより入手した。TLCはTLC Silica gel 60 F₂₅₄(Merck)を用いた。NMR溶媒(Methanol-*d*₄, DMSO-*d*₆)はEurisotop製を用いた。定量分析において、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。(条件1)カラム：L-column ODS(2.1 I.D. × 150 mm)(化学物質評価研究機構製)、カラム温度：40℃、流速：0.3 mL/min、測定波長：200-400 nm、移動相：(A)0.1%ギ酸 in 蒸留水及び(B)0.1%ギ酸 in アセトニトリル〔濃度勾配条件(B in A)：0→30 min(0→50%)、30→35 min(50→85%)、35→40 min(85%)、40→50 min(85→90%)、50→55 min(90→100%)、55→60 min(100%)〕。(条件2)カラム：L-column ODS (2.1 I.D. × 150 mm, 5 μm)(化学物質評価研究機構)、カラム温度：40℃、流速：0.2 mL/min、測定波長：UV 280 nm、移動相：0.01 mol/L リン酸：0.01 mol/L リン酸二水素カリウム：アセトニトリル(42.5:42.5:15)。NMRはBruker AVANCE500(ブルカー・バイオスピン社製)(¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz)を使用した。ケミカルシフトは各溶媒由来ピーク〔Methanol-*d*₄(¹H: 3.31 ppm, ¹³C: 49.0 ppm), DMSO-*d*₆(¹H: 2.50 ppm, ¹³C: 39.52 ppm)〕を基準とした。高分解能(HR)ESI-MSはmicrOTOF-Q(ブルカー・ダルトニクス社製)を使用し、測定溶媒にはアセトニ

トリルまたはメタノール(MeOH)を用いた。

B-3) 分画物の調製

カロブ色素(10 g)に水を加え、Diaion HP-20カラムクロマトグラフィーに付し、H₂O, 10%MeOH～MeOHで順次溶出し、7分画物を得た(① H₂O 溶出画分 6.3 g, ② 10%MeOH 溶出画分 189 mg, ③ 20%MeOH 溶出画分 37.8 mg, ④ 30%MeOH 溶出画分 56.1 mg, ⑤ 40%MeOH 溶出画分 83.5 mg, ⑥ 50%MeOH 溶出画分 30.4 mg, ⑦ MeOH 溶出画分 65.6 mg)。

B-4) 化合物の単離

カロブ色素について、Diaion HP-20カラムクロマトグラフィーにより得られた画分について、YMC GEL ODS-AQ等による分離、精製を繰り返し、化合物の単離を試みた。単離した化合物についてはHPLCにおける標品との直接比較、あるいは文献値とNMRデータ等の比較によって同定した。

B-5) 確認試験の追試

カロブ色素製品について、食品添加物公定書に記載されている確認試験(1. 本品の表示量から、色価30に換算して0.5gに相当する量を取り70%MeOH 50 mLを加えて振った時に液の色が淡黄～黄色になる。2. 1の上澄み液に水酸化ナトリウム溶液(1→20)を加えてアルカリ性にするとき、液の色は濃黄色になる。3. 1の上澄み液に塩酸(1→3)を加えて酸性にするとき、液の色はほとんど消える。4. 1の上澄み液5 mLに塩化鉄(III)六水和物溶液(1→10)1 mLを加えるとき、液の色は黄褐色に変わる。5. 本品の表示量から色価30に換算して0.1 gに相当する量を量り、水酸化ナトリウム溶液(1→1250)100 mL加えた後、定量分析用ろ紙(5種C)でろ過した液は、波長385～400 nmに吸収極大がある)を行った。比較試料として、フラボノイド配糖体のルチンを用いた。

B-6) 酵素処理

カロブ色素製品(100 mg)に0.1 mol/L酢酸緩衝液(pH 5.0)(10 mL)を加え、20分間超音波処理を

行った。遠心分離後、残渣に 0.1 mol/L 酢酸緩衝液(pH 5.0)(10 mL)を加え、20 分間超音波処理を行い、遠心分離を行った。得られた上澄液を酢酸緩衝液で 20 mL に定容し、さらに酢酸緩衝液(1 mL)を加え、試料溶液(酵素処理なし)とした。同様の操作により得られた上澄液について、37℃で 5 分間加温した後、 β -グルコシダーゼ/酢酸緩衝液(160 U)(1 mL)を加え、さらに 37℃で 30 分間加温したものを試料溶液(酵素処理あり)とした。

B-7) TLC 分析

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

B-8) 定量分析における試料溶液の調製

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、MeOH, エタノール(EtOH), 50%MeOH, 50%EtOH, H_2O 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) HPLC 分析及び化合物の同定

カロブ色素の 80%MeOH 可溶部について、HPLC 分析(検出波長: 280 nm)を行った結果、保持時間 20 分周辺に 4 つの主ピーク(ピーク 1 $\sim$ 4)が検出された。各ピークの UV スペクトルを確認したところ、ピーク 1 以外は同様のスペクトルパターンを示した。カラムクロマトグラフィーによる分離精製を行い、5 つの化合物〔dihydrophaseic acid β -D-glucoside, 2 種の schaftoside 配糖体, schaftoside, isoschaftoside〕

を単離し、ピーク 1 が 4'-dihydrophaseic acid β -D-glucopyranose ester, ピーク 2, 3 を schaftoside glucoside として、ピーク 4 として schaftoside として同定した(図 1)。主検出成分として schaftoside 及びその配糖体であることが確認され、指標成分候補として schaftoside が考察された。

C-2) 公定書における確認試験の追試

食品添加物公定書におけるカロブ色素の確認試験について、フラボノイドのルチンを比較試料として用い、改めて試験を実施した。確認試験 1 $\sim$ 5 の項目について試験した結果、いずれも同様の呈色、波長を示し(図 2)、呈色による確認は曖昧さがあり、カロブ色素に特徴的な指標成分候補を明らかにし、それに基づく試験法の提案の必要性が示唆された。

C-3) 酵素分解

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

C-4) 定量分析

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

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

C-5) TLC 分析

指標成分候補とした schaftoside について、TLC 分析による確認試験法を検討した。まず、schaftoside の検出について検討した結果、*n*-ブタノール/酢酸/水系溶媒で展開し、UV(254 nm) 照射することで、 R_f 0.4 付近に schaftoside の明瞭なスポットを確認することができた。次に抽出溶媒を検討する目的で、 H_2O 及び含水 MeOH(10%~90%)、MeOH で抽出した試料溶液について、注入量を一定にして HPLC 分析を行い、schaftoside のピーク面積を比較した。その結果、90%MeOH 及び MeOH で調製した試料溶液はピーク面積が小さく、それ以外(H_2O ~80%MeOH)については、ピーク面積はほぼ同等であった。そこで、 H_2O 、50%MeOH を抽出溶媒として調製した試料溶液について、TLC 分析した結果、いずれも schaftoside のスポットを確認することができた(図 4)。

C-6) 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。また、製品の抽出溶媒を検討するため、MeOH, EtOH, 50%MeOH, 50%EtOH, H_2O 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、 H_2O 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 4)。

C-7) 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、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、RMS 値を算出したところ、1.1489 であった(図 5)。この RMS 値を用いて、rutin 3 水和物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、他の化合物による標準品の検討、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の成分精査を行った結果、5 つの化合物〔dihydrophaseic acid β -D-glucoside, 2 種の schaftoside 配糖体, schaftoside, isoschaftoside〕を単離し、HPLC 分析における指標成分候補として schaftoside が確認された。

分析検討の過程で、含有成分として複数の schaftoside 配糖体の含有が認められた。これら配糖体は天然物である原料によって含有量にばらつきが生じることも考察されたため、定量分析として、schaftoside を直接分析する方法と、酵素分解により schaftoside に誘導して分析する方法を検討し、いずれにおいても定量値を算出することができた。指標成分候補とした schaftoside について、TLC 分析による確認試験を検討した結果、 H_2O または 50%MeOH を抽出溶媒として調製した試料溶液をシリカゲル板にスポットし、*n*-ブタノール/酢酸/水系溶媒で展開し、UV(254 nm)照射することで、 R_f 0.4 付近に schaftoside の明瞭なスポットを確認するこ

とができ、分析可能であることが示

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、rutin 3 水和物を標準品として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).

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 鬼嶋七海, 内倉 崇, 好村守生, 阿部 裕, 杉本直樹, 天倉吉章: 食品添加物カロブ色素の成分研究, 第63回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(2024.11).
- 2) 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).

2. 論文発表等

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

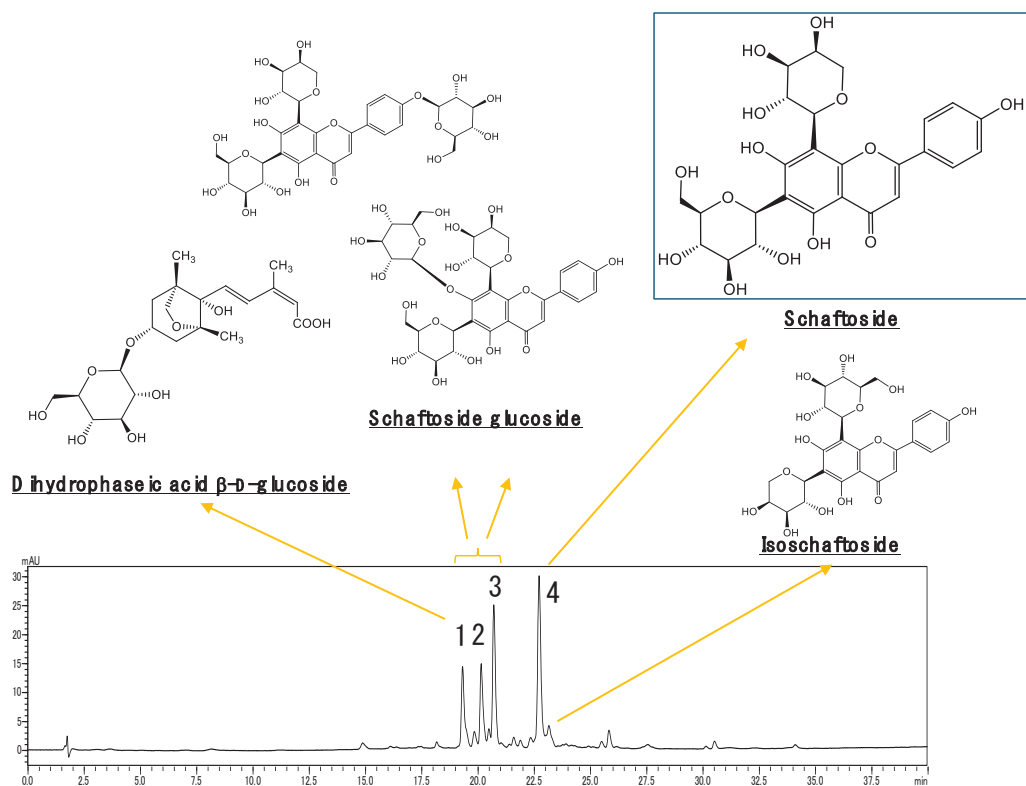


図 1. カロブ色素の HPLC クロマトグラム (条件 1)

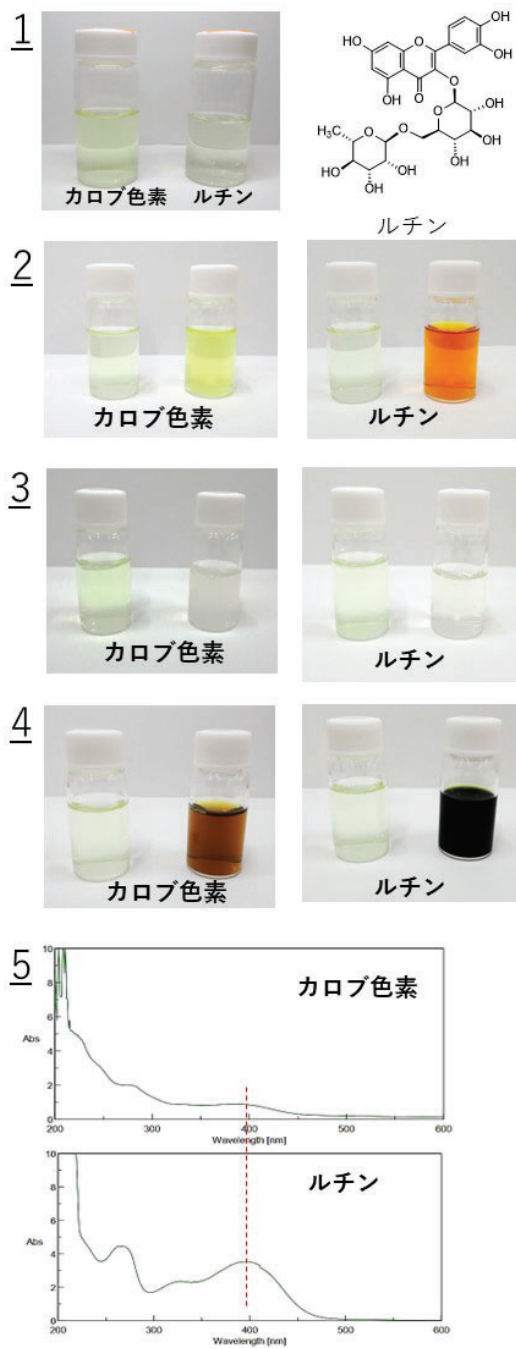
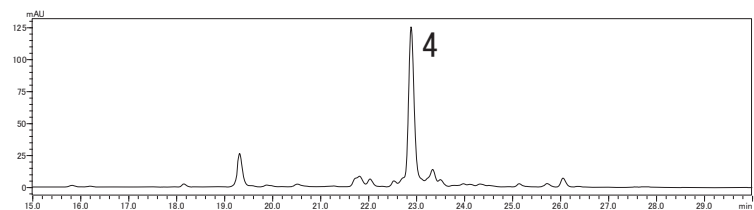
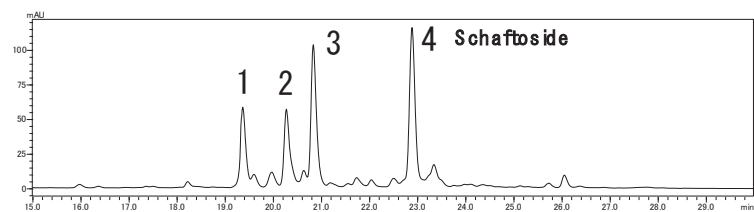


図 2. 公定法における確認試験 1～5

(条件1)



(条件2)

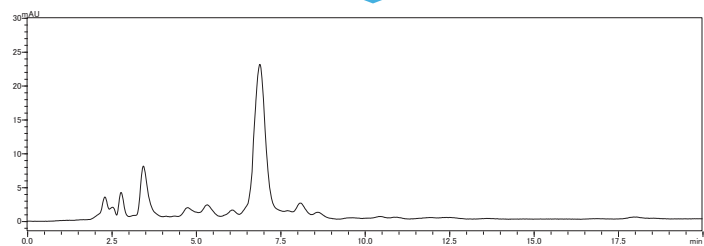
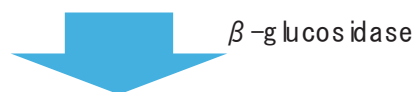
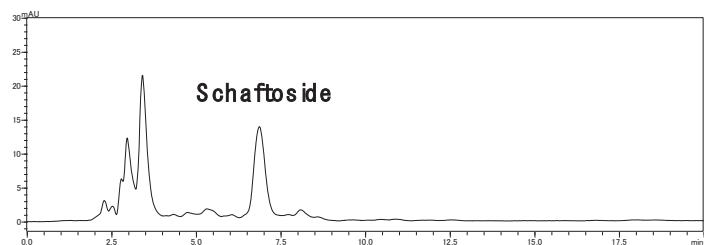
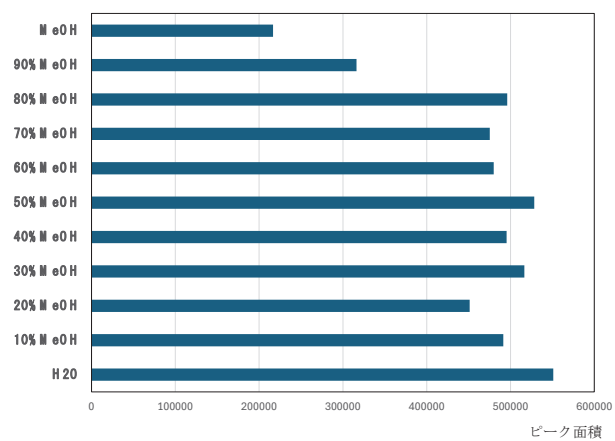
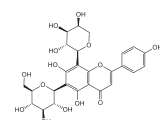


図 3. 酵素分解の HPLC クロマトグラム

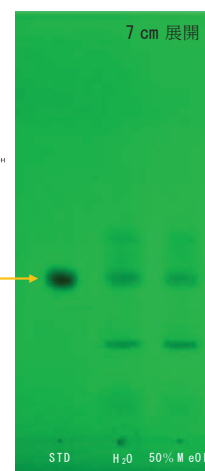
抽出溶媒の検討



TLC 分析



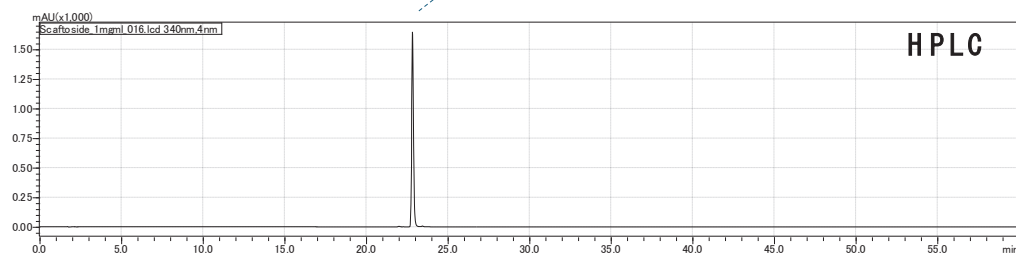
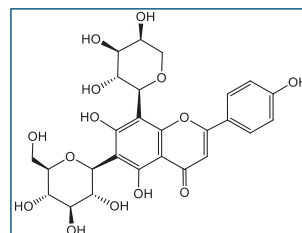
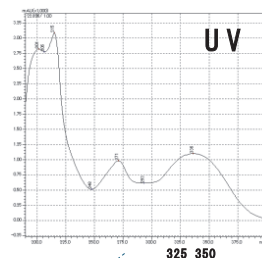
Schaftoside



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

図 4. TLC 分析

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 %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 %)]

検量線 (1.0, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL)

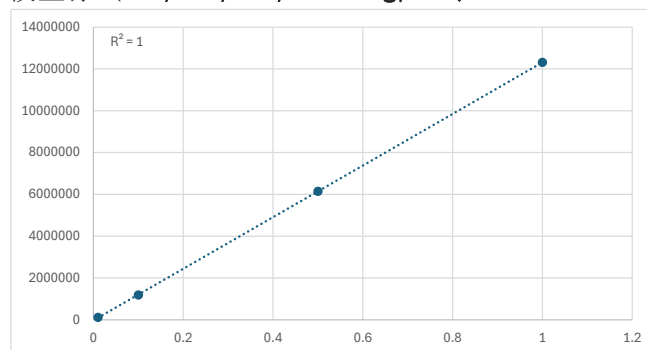
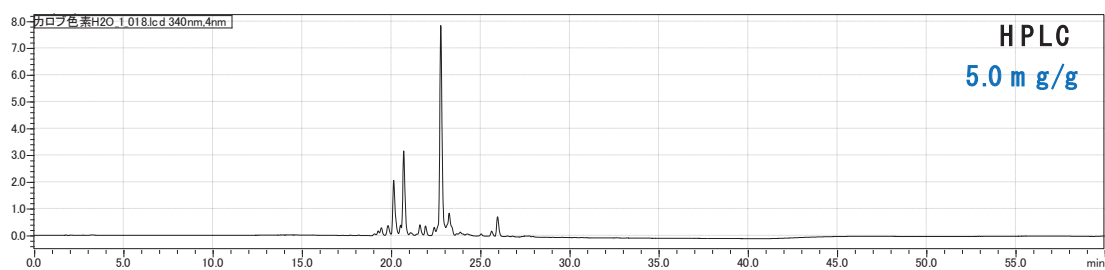


図 5. Schaftoside の HPLC クロマトグラム及び検量線

カロブ色素 (H₂O 抽出物)



カロブ色素製品中のschafoside 定量値 (絶対検量線法)

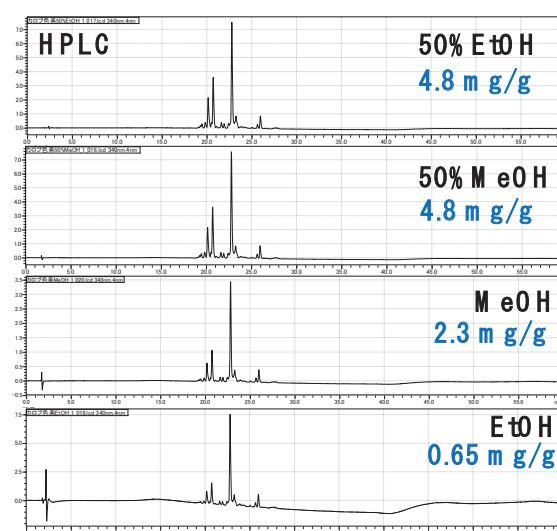
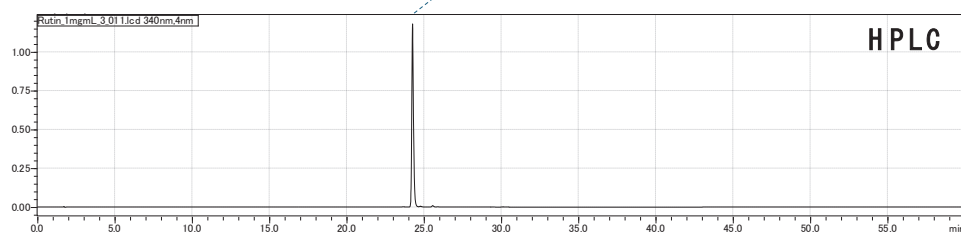
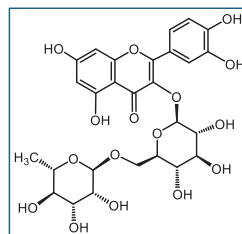
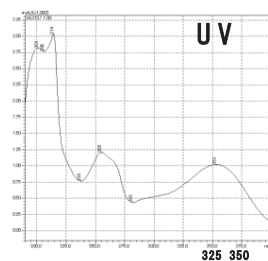


図 6. 抽出溶媒の比較

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 % 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 %)]

Rutinに対するSchaftosideのRMS値 (n=3)

1	1.1265
2	1.1676
3	1.1526
Average	1.1489
% RSD	1.81

図 7. 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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

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する一環として、「香辛料抽出物」に着目して検討した。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、令和5～7年度はそこからクローブ関連製品、バジル関連製品、「ブラックペッパーオイル」およびコショウ関連製品、「コリアンダーオイル」とコリアンダー種子関連製品、「セロリーシードオイル」とセロリ種子関連製品の成分含有量評価を ^1H -qNMR 法で可能かの検討を行った。クローブ関連製品の検討では、指標成分として適切と考えられる *eugenol* の定量を行い、クローブの基原となる生薬のチョウジ、クローブ関連の既存添加物製品である「クローブ香料」、「クローブ抽出物」の *eugenol* の含有率の定量が ^1H -qNMR 法で可能であることを示し、既存の HPLC 法との同等性を確認できた。また、クローブと同じく *eugenol* を主な精油成分とするオールスパイスについても同様に ^1H -qNMR 法での定量が可能であることを確認した。バジル関連製品について、当初精油成分の定量を目指したが、*rosmarinic acid* が指標成分として適切と考え、市販の食用バジルにおいて *rosmarinic acid* の定量が ^1H -qNMR 法を用いて可能であることを示すと同時に、品種の異なるバジルの茎と葉のそれぞれの *rosmarinic acid* の含有率も確認し、製品中の *rosmarinic acid* の含有率の差異が用部の由来に依る可能性についても確認した。既存添加物の「コリアンダーオイル」とコリアンダー種子関連製品に関しては、その主な含有成分の *linalol* の定量 ^1H -qNMR 法で可能であることを確認した。さらに、既存添加物「セロリーシードオイル」とセロリ種子関連製品での検討では、指標成分として *butylphthalide* を選択し、原料となるセロリ種子と併せてその含有率の ^1H -qNMR 法での定量が可能であることを確認した。

A. 研究目的

^1H -qNMR 法は、SI トレーサブルな認証標準物質を内部標準として NMR スペクトルの測定することで、測定対象サンプルの絶対定量ができる方法である。^{1,2)} 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。そこで、既存添加物「香辛料抽出物」の基原の成分の規格試験法として、定量 NMR (^1H -

qNMR)法が適切あるいは適用可能なものがあるかの検討を行った。

その「香辛料抽出物」中から、令和5年度はクローブとオールスパイスに着目した。クローブとオールスパイスでは、eugenol (Fig. 1)が主要成分となると考えて、生薬クローブとクローブ関連の既存添加物製品である「クローブ香料」、「クローブ抽出物」の eugenol の定量方法の検討をおこなった。また、クローブ同様に eugenol が主な精油成分であるオールスパイス中でも同様に定量可能かの検討をおこなった。また、令和5～6年度にかけてバジルについて検討をした。当初、精油成分の定量を目指したが、¹H-qNMR法の実施に適する精油成分のシグナルを見出すことが困難であった代わりに rosmarinic acid (Fig. 2)が比較的容易に定量できることがわかったため、rosmarinic acid を指標成分とした定量方法の検討を行なった。この際に、市販の食用バジルで rosmarinic acid の含有率に大きな差異があることがわかり、その差異が何に起因するか の解明を目的に吸う品種のバジルを栽培し、茎と葉に用部を分けてそれぞれにおける rosmarinic acid の含有率の検討を行った。さらに、令和6年度にはコショウ由来の食品添加物の一つである「ブラックペッパーオイル」について、指標成分として β-caryophyllene (Fig. 3)を選択し、その定量が可能か否かの検討を行った。令和7年度には「コリアンダーオイル」中の linalol (Fig. 4)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」の既存添加物の一つである「セロリシードオイル」の指標成分として butylphthalide (Fig. 5)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、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) 試薬及び試料

¹H-qNMR 測定時の内部標準物質として用いる sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonate-*d*₆ (DSS-*d*₆, Fig. 6) 及び 1,4-bis(trimethylsilyl)-benzene-*d*₄ (BTMSB-*d*₄, Fig. 6)はいずれも富士フィルム和光純薬の Trace Sure®規格のものをを用いた。NMR 測定用溶媒の dimethylsulfoxide (DMSO)-*d*₆, methanol-*d*₄はそれぞれ Isotec Inc.の 99.9, 99.8 atom %D を acetone-*d*₆ は Isotec Inc. (令和6年度) または Cambridge Isotope Laboratories Inc. (令和7年度) の 99.9 atom %D をを用いた。Eugenol は富士フィルム和光純薬から、β-caryophyllene は東京化成および富士フィルム和光純薬の2社から、linalol と butylphthalide は東京化成から、それぞれ購入した。

既存添加物の「クローブ抽出物」(管理番号 A1083)は2015年8月に、「クローブ香料」(管理番号 C2301), 「ブラックペッパーオイル」(管理番号 C2302), 「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、それぞれ国立医薬品食品衛生研究所より供与を受けたものをを用いた。

チョウジは生薬として2023年5月に購入したもの、チョウジ末、オールスパイス末は、食品として市販されている果実を2023年8月に購入したものをを用いた。バジルについては、スイートバジル、スイートタイバジル、ブッシュバジル、イタリアンラージリーフバジル、ジェノババジル (Fig. 7)の各品種の種子を日野春ハーブガーデンより2024年4月に購入し金城学院大学薬用植物園に4月中旬に播種、6月20日ごろに収穫して乾燥後、葉と茎に分け粉末化した。

市販バジル末は 2024 年 4 月にお互いに異なる製品を購入し、用いた。コショウ粉末は 2024 年 4 月に市販のものを購入した。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、市販のセロリーシードオイルとして香粧品用オイルを、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。生薬の粉末化には大阪ケミカル WB-1、分注操作の電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x、超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S、遠沈操作は遠心器 AS One Mini Centrifuge をそれぞれ用いた。NMR 装置は日本電子 ECZL600（令和 7 年度）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 μ m ϕ 13 mm を用いた。

B-3) ^1H -qNMR 法に用いる内部標準液の調製と ^1H -qNMR の測定条件

内部標準として用いる BTMSB- d_4 または DSS- d_6 はデシケータ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 の重溶媒に溶かして内部標準溶液とした。

^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、測定対象化合物の対象となるシグナルと 0.00 ppm とした内部標準物質のメチル基プロトンのシ

グナルの面積を比較して次式に従って eugenol の濃度を算出した。

$$C_S = (I_S / I_R) \times C_R$$

ただし、 C_R 、 C_S はそれぞれ内部標準物質及び測定対象化合物のモル濃度(mol/mL)、 I_R 、 I_S はそれぞれ内部標準物質及び測定対象化合物の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-4) ^1H -qNMR 法を用いたチョウジ、クローブ末、「クローブ香料」、「クローブ抽出物」、オールスパイス末中の eugenol の定量

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

B-4-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として DSS- d_6 の DMSO- d_6 溶液を用いた。Eugenol 標準品は、約 10 mg を精秤して 5.00 mL の内部標準溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり ^1H -qNMR の測定に供した。

Eugenol 測定用試料の調製は、次のように行った。生薬のチョウジは粉末化したのち用いた。粉末生薬と市販のクローブ末、オールスパイス末は、デシケータ中で乾燥させたのち約 100 mg を精秤して内部標準溶液(1.00 mL)に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清をメンブランフィルターを用いてろ過し、ろ液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。クローブ抽出物は約 10 mg を精秤して内部標準溶液(3.00 mL)に懸濁し、以下同様に遠沈、上清をろ過、ろ液から 0.600 mL を

NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。
「クローブ香料」は約 10 mg を精秤して内部標準溶液(3.00 mL)に溶解して 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。

B-4-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Eugenol と各生薬粉末の抽出液の ^1H -NMR を測定し、eugenol (Fig. 1)の 6 位のプロトンシグナルが 6.5 ppm 付近に現れることを確認した。(Fig. 8) 測定によって得られたスペクトルから、eugenol の 6 位のシグナルと 0.00 ppm とした DSS- d_6 のメチル基プロトンのシグナルの面積を比較して次式に従って eugenol の濃度を算出した。

B-4-c) HPLC を用いたチョウジ、クローブ末、「クローブ香料」、「クローブ抽出物」、オールスパイス末中の eugenol の定量

HPLC は Cosmosil 5C8-MS-II 250 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い、40°Cで MeOH : H₂O = 75 : 25 (0 min)→90 : 10 (24 min)のグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、275 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。(Fig. 9)

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

B-5) ^1H -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

まず、rosmarinic acid の ^1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と、試料中の ^1H -qNMR 法に

よる rosmarinic acid の定量を行うことにした。また、HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-5-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として DSS- d_6 の methanol- d_4 溶液を用いた。

Rosmarinic acid 標準品は、約 10 mg を精秤して 5.00 mL の内部標準溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

粉末化した栽培バジルの葉、茎あるいは市販バジル末の測定用試料の調製は、約 100 mg を精秤して内部標準溶液 (1.00 mL)に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清をメンブランフィルターを用いてろ過し、ろ液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。

B-5-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

各試料から調製した測定試料の ^1H -NMR を測定し、rosmarinic acid (Fig. 2)の 7'位のプロトンシグナルがそれぞれ 7.54 ppm に現れることを確認した。(Fig. 11) 測定によって得られたスペクトルから、rosmarinic acid の 7'位のプロトンシグナルと 0.00 ppm とした DSS- d_6 のメチル基プロトンのシグナルの面積を比較して次式に従って rosmarinic acid の濃度を算出した。

B-5-c) HPLC を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

HPLC は YMC-Triart C18 s-5 150 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い、40°Cで MeCN : 0.1%リン酸水溶液 = 20 : 80、流速 1.0 mL/min で溶出、275 nm における吸光度で検出するという条件

で測定を行った。(Fig. 12)

^1H -qNMR 法で定量した rosmarinic acid 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 13) それぞれの試料は、 ^1H -qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 10 倍に希釈し、その試料溶液を 10 μL 注入して得られたクロマトグラムの rosmarinic acid のピークの面積からその定量を行った。

B-6) ^1H -qNMR 法を用いた「ブラックペッパーオイル」およびコショウ末中の β -caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイルにある程度含まれる成分として、 α -pinene, limonene, β -caryophyllene (Fig. 3)が文献的に示されている。これらのスペクトルと「ブラックペッパーオイル」のスペクトルを比較したところ、acetone- d_6 中での測定で β -caryophyllene のシグナルが厳しい条件ながらも独立して観測されたことから、試料中の ^1H -qNMR 法による β -caryophyllene の定量を行うことにした。

B-6-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として BTMSB- d_4 の acetone- d_6 溶液を用いた。

β -caryophyllene 試薬と「ブラックペッパーオイル」は約 10 mg を精秤して 5.00 mL の内部標準溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり ^1H -qNMR の測定に供した。

コショウ末は、デシケーター中で乾燥させたのち約 100 mg を精秤して内部標準溶液 (1.00 mL) に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清をメンブランフィルターを用いてろ過し、ろ液か 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。

B-6-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

β -caryophyllene 試薬と「ブラックペッパーオイル」とコショウ末の抽出液の ^1H -NMR を測定し、試薬とブラックペッパーオイルでは β -caryophyllene (Fig. 3)の 5 位のプロトンシグナルが 5.04 ppm 付近に現れることを確認した。(Fig. 14) 測定によって得られたスペクトルから、 β -caryophyllene の 5 位のシグナルと 0.00 ppm とした BTMSB- d_4 のメチル基プロトンのシグナルの面積を比較して次式に従って β -caryophyllene の濃度を算出した。コショウ末の抽出液ではこのシグナルは観測できず、定量はできなかった。

B-7) ^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-7-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として BTMSB- d_4 の acetone- d_6 溶液を用いた。

Linalol 標準品と既存添加物の「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 ^1H -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ろ過し、ろ液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。

B-7-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. 4)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. 15). 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.

B-7-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%リン酸水溶液=55:45, 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. 16)

¹H-qNMR 法で定量した linalol 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した. (Fig. 6)それぞれの試料は, ¹H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 10 倍に希釈し, その試料溶液を 10 µL を inject して得られたクロマトグラムの linalol のピークの面積から, その定量を行った. (Fig. 17)

B-8) 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

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³⁾に示されている. しかしながら既存添加物の「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-8-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. 18) 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. 19a,b)

B-8-b) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として BTMSB-*d*₄の acetone-*d*₆溶液を用いた.

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ろ過し, ろ液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり, ^1H -qNMR の測定に供した.

B-8-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. 19) 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 6-H のシグナルの積分値が, 4-H, 5-H, 7-H 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, 香粧品のオイル試料の ^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芳香族プロトンである 7-H シグナル (7.58 ppm) を用いて定量することにした.

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 butylphthlide の濃度を算出した.

B-8-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% リン酸水溶液 = 0 min 50 : 50 $\rightarrow$ 30 min 70 : 30, 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. 20)

^1H -qNMR 法で定量した butylphthlide 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した. (Fig. 21) それぞれの試料は, ^1H -qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒でセロリシードオイルの試料では 5 倍に希釈, セロリ種子の試料では 10 倍に希釈, その試料溶液を 10 μL 注入して得られたクロマトグラムの butylphthlide のピークの面積からその定量を行った. (Fig. 20)

C. 結果及び考察

C-1) ^1H -qNMR 法を用いたチョウジ, クローブ末, 「クローブ香料」, 「クローブ抽出物」, オールスパイス末中の eugenol の定量

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

各生薬粉末から調製した試料で ^1H -NMR を測定したところ, DMSO- d_6 中で 6 位プロトンシグナルが独立して観測されたことから DMSO- d_6 を溶媒として ^1H -qNMR の測定をすることにした. ^1H -qNMR 測定の結果, 生薬チョウジ中の eugenol 含有率は $13.01 \pm 0.32\%$, 市販クローブ末では 8.11~14.83%, 市販オールスパイス末では

2.14～2.67%という結果を得た。(Table 2) 市販クローブ末のうち、含有率の高いものは生薬と同等であったので、少ない方は品質が劣るか粉末化してからの時間が長いかなどの相違があるものと考えられた。既存添加物の「クローブ香料」の eugenol 含有率は 81.58%で試薬ほどではないが高い eugenol 含有率であった。「クローブ抽出物」は 31.93%で、製品のラベル表示 38%より低かった。HPLC で eugenol の検量線を作成したところ、良好な相関の検量線を得ることができた。この検量線から各試料中の eugenol の含有率を算出したところ、¹H-qNMR 法での数値に極めて近似した値が得られた。お互いにそれぞれの試料の定量値のばらつきも極めて小さく、¹H-qNMR 法が HPLC の代わりにとり得る方法であることが確認できた。

C-2) ¹H-qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

¹H-qNMR を用いて測定した市販バジル末中の rosmarinic acid の含有率は 2 製品ではそれぞれ 1.51%と 0.70%であったが、2 製品ではシグナルが観測されず、測定不能だった。栽培した 5 品種では、葉における含有率が 0.83～1.90%であったのに対して、茎では 4 品種でシグナルを観測できず、比較的葉での含有率が大きかった 1 品種でわずかに(0.14%)含有されている程度であった。HPLC での測定結果でも同様のことが確認された。このようにバジル由来の製品の rosmarinic acid の定量が ¹H-qNMR を用いても容易に行えることがわかった。また、rosmarinic acid の有無からバジル製品が植物体のどの部分を用いているかを判別する手段になりうることもわかった。(Fig. 11, Table 3)

C-3) ¹H-qNMR 法を用いた「ブラックペッパーオイル」およびコショウ末中の β-caryophyllene の定量

「ブラックペッパーオイル」中の β-caryophyllene を ¹H-qNMR を用いて 1.55%で測定が可能ながわかった。(Fig. 14, Table 4) ただし、スペクトル中でシグナルが混んでいる領域であることから、精密な測定という観点ではあまり精度の高いものではないと考えられた。原料となるコショウ中の β-caryophyllene は測定ができず、製品の管理的手段としては活用の余地があるものの原料の管理として β-caryophyllene を指標とすることはできないと考えられた。

C-4) 「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。また既存添加物の「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 5) 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-5) 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。既存添加物の「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 6) 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.

香粧品のセロリシードオイルでは, 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 6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

1) 生薬チョウジ, クローブ末, 既存添加物の「クローブ香料」, 「クローブ抽出物」, オールスパイス末中のeugenolの¹H-qNMR法を用いた定量条件を確立した.

2) バジル由来の製品中のrosmarinic acidの¹H-qNMRを用いた定量条件を確立することができた. また, バジル由来の製品中のrosmarinic acidの有無によって, バジルの葉を用いた茎を用いたかが明らかとできることがわかった.

3) 既存添加物「ブラックペッパーオイル」中のβ-caryophylleneを¹H-qNMRを用いて測定できることがわかった.

4) 既存添加物「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.

5) 既存添加物「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) Bayrakceken G Z, Saracoglu I, Nagatsu A, Yilmaz M A, Basaran A A: Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from *Prunus mahaleb* L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 2023; **310**: 116378.
- 2) 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*, 2026; **15**(1): 141.

2. 学会発表等

2-1. 学会

- 1) Merve Sensoy, Vahap Murat Kutluay, Akito Nagatsu, Iclal Saracoglu: Isoflavonoids from *Vuralia turcica* (Kit Tan, Vural & Kucukoduk) Uysal & Ertugrul. 日本薬学会第144年会(2024.3).
- 2) Merve Sensoy, Yasin Genc, Hilal Erdem, Iclal Saracoglu, Akito Nagatsu: Comparative quantitative determination studies of acteoside in

Plantago subulata L. with ^1H -qNMR technique.

第70回日本薬学会東海支部総会・大会
(2024.7).

- 3) 永津明人, 森本深麗, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹: ^1H -qNMR法を用いたクローブ由来既存添加物およびチョウジ末, オールスパイス末中のeugenolの定量. 日本生薬学会第70回年会(2024.9).
- 4) 瀬川ひかり, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR) を用いたバジル(*Ocimum basilicum* L.)中のrosmarinic acid の定量. 日本薬学会第145年会(2025.3).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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

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

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

I. 参考文献

- 1) Tahara M, Sugimoto N, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara, T, Yoshida Y, Tada A, Kubota R, Shimizu K, Yamazaki T, Tanamoto K, Nakazawa H, Nishimura T: Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Jpn J Food Chem. Safety* 2009; 16: 28-33.
- 2) 厚生労働省, 第18改正日本薬局方, pp2623 (2021).
- 3) 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*, 2020; 25: 5322.

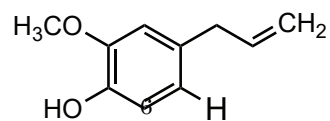


Fig. 1 Eugenol の構造

6 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

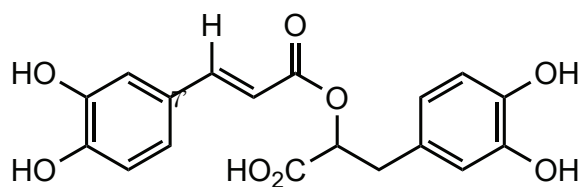


Fig. 2 rosmarinic acid の構造

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

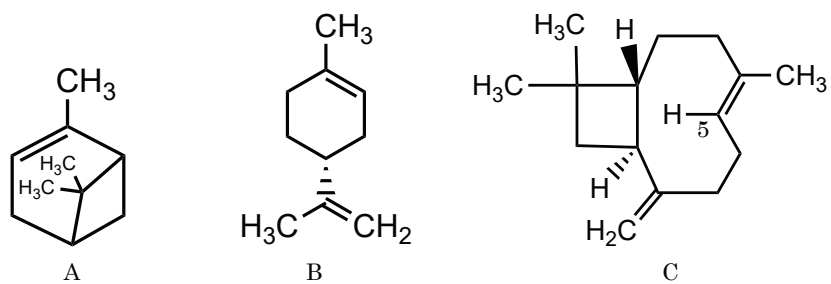


Fig. 3 α -Pinene (A), limonene (B), β -caryophyllene (C) の構造

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

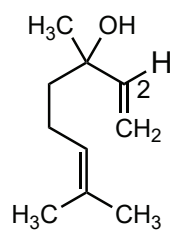


Fig. 4 Linalol の構造

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.

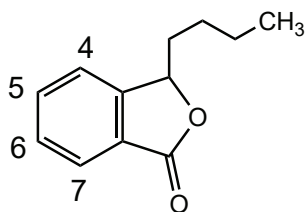
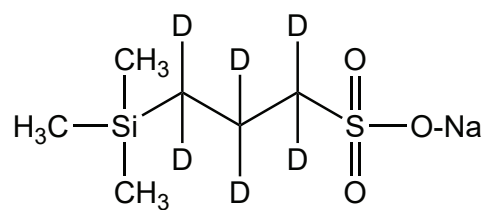
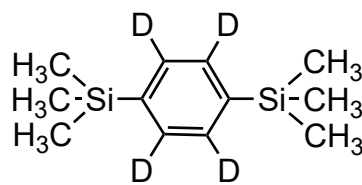


Fig. 5 Butylphthalide の構造

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.



DSS- d_6 ,



BTMSB- d_4

Fig. 6 定量用の認証標準物質



(e)



Fig. 7 栽培して試料とした各品種のバジル

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

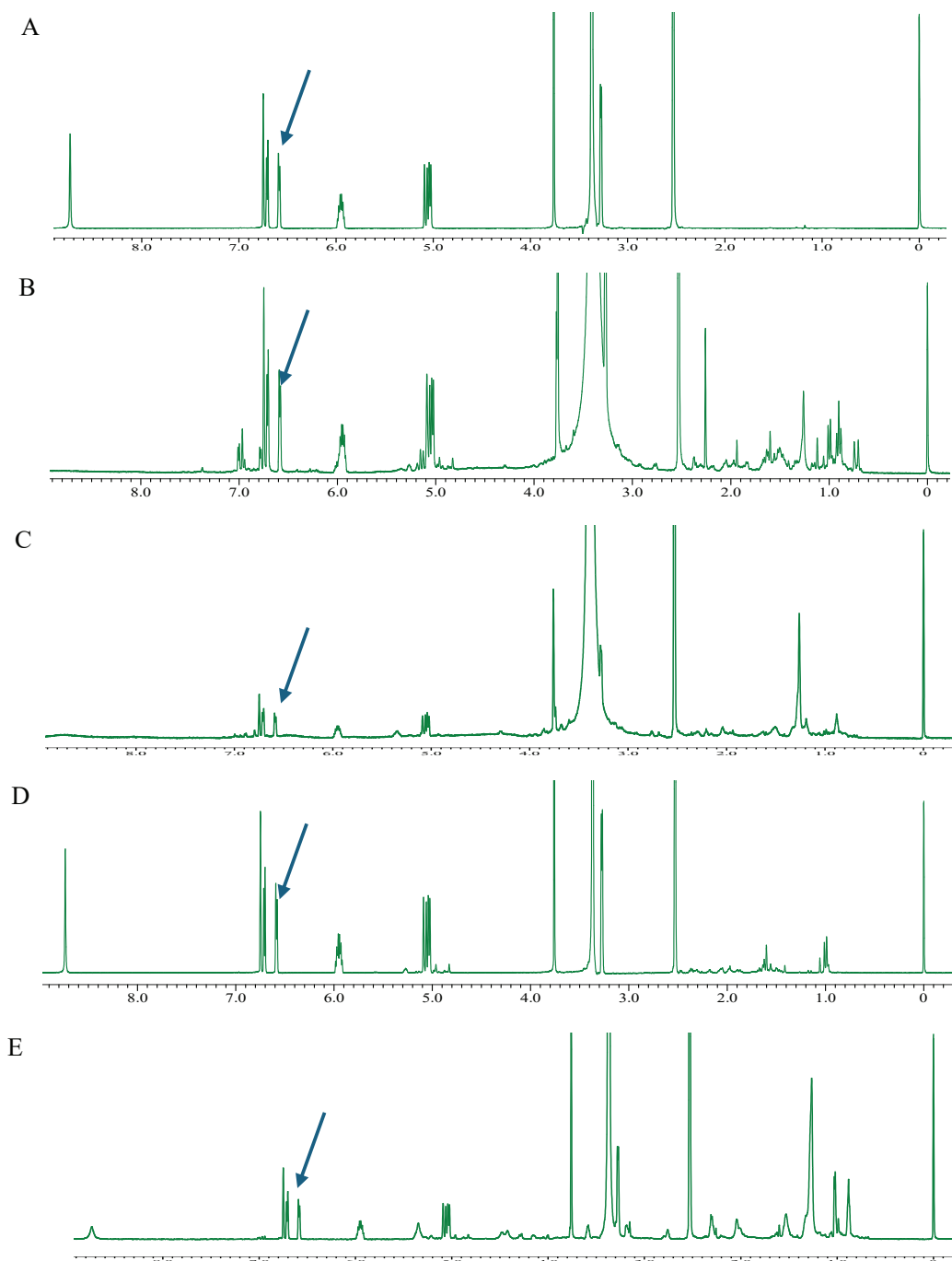


Fig. 8 Eugenol 試薬(A), 市販クローブ粉末(B), 市販オールスパイス粉末(C) , 「クローブ香料」及び「クローブ抽出物」(D)の ^1H -qNMR スペクトル (in $\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz)
矢印は 6 位の水素のシグナル

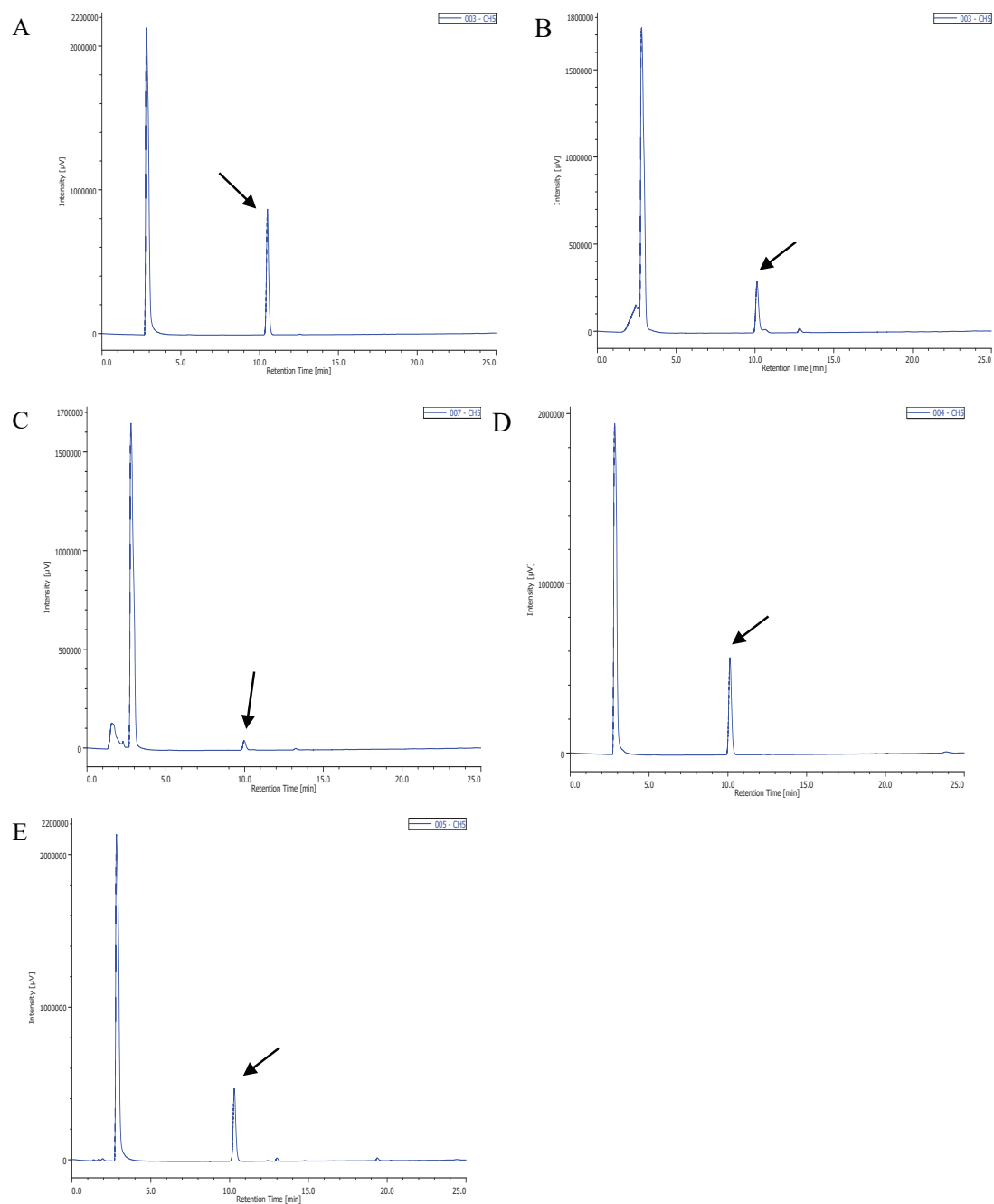


Fig. 9 Eugenol 試薬(A), 市販クローブ粉末(B), 市販オールスパイス粉末(C), 「クローブ香料」(D)及び「クローブ抽出物」(E)の縦軸はピーク強度, 横軸は保持時間 (min), 矢印は eugenol のピーク.

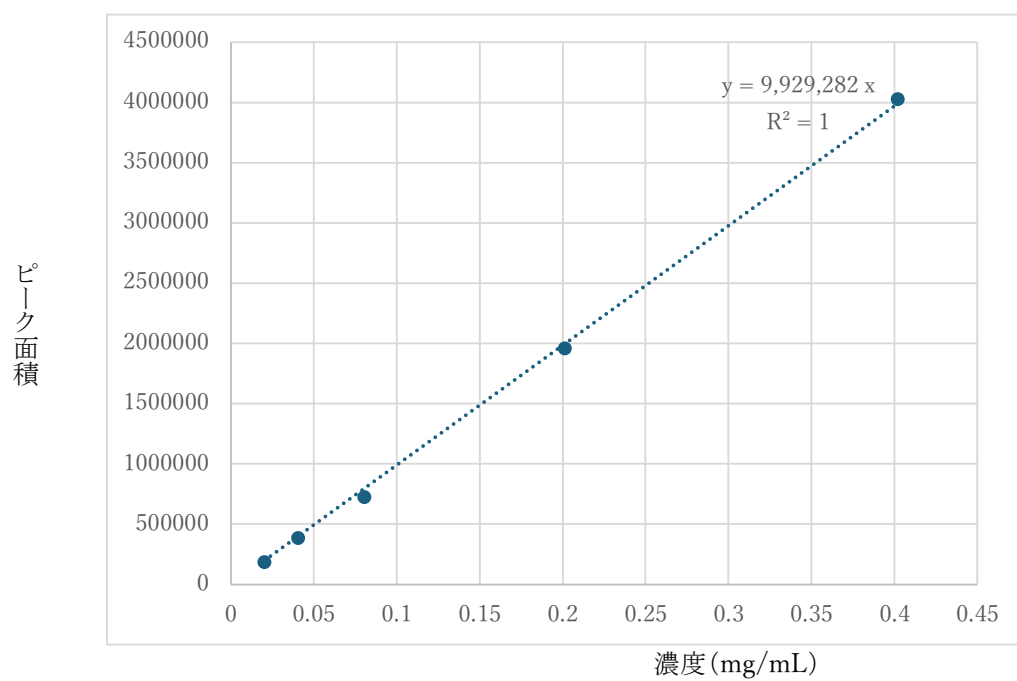


Fig. 10 HPLC における eugenol の検量線

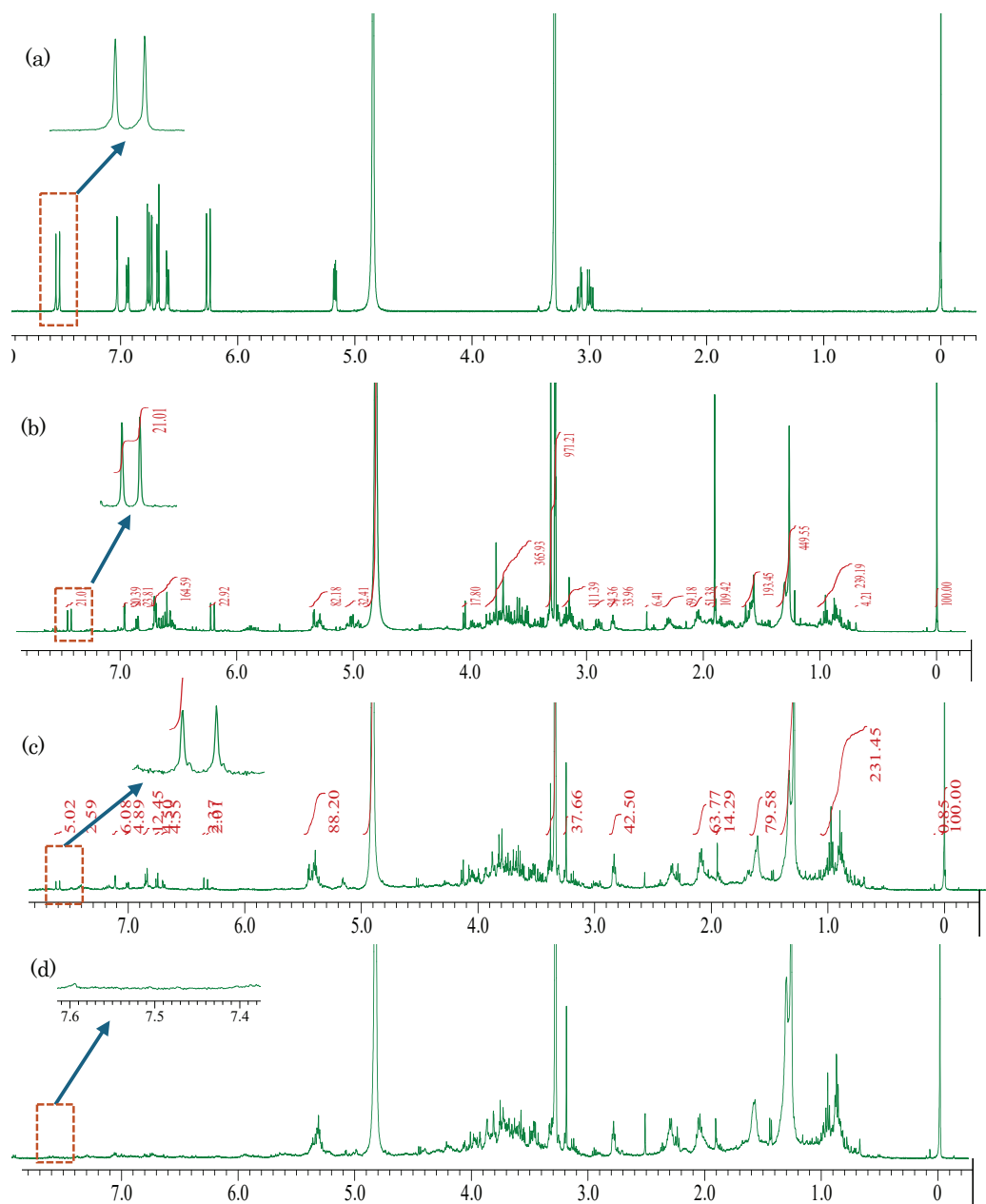


Fig. 11 Rosemarinic acid 試薬 A (a), スイートバジル葉 (b)と市販バジル末 A (c), C (d)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4 , 500 MHz)

拡大図のシグナルが 7' 位のプロトンシグナル.

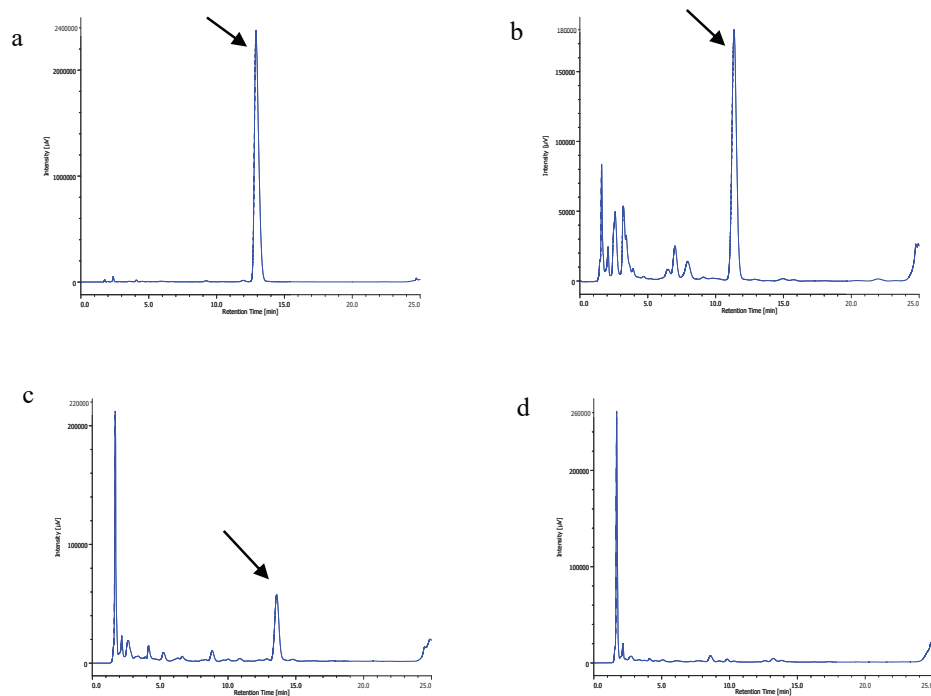


Fig. 12 Rosemarinic acid 試薬(a), スイートバジル葉(b)と市販バジル末 A (c), C (d)の各試料の HPLC クロマトグラム.

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

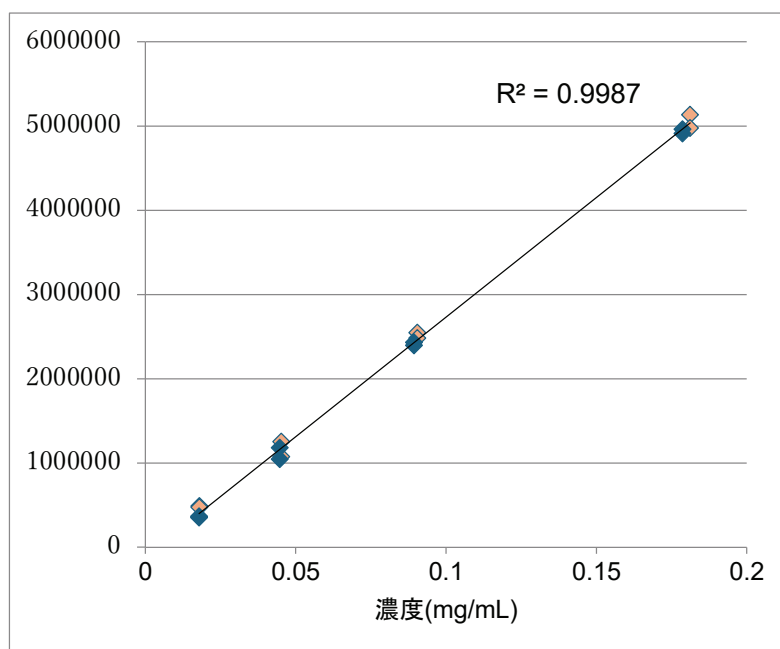


Fig. 13 HPLC における rosmarinic acid の検量線

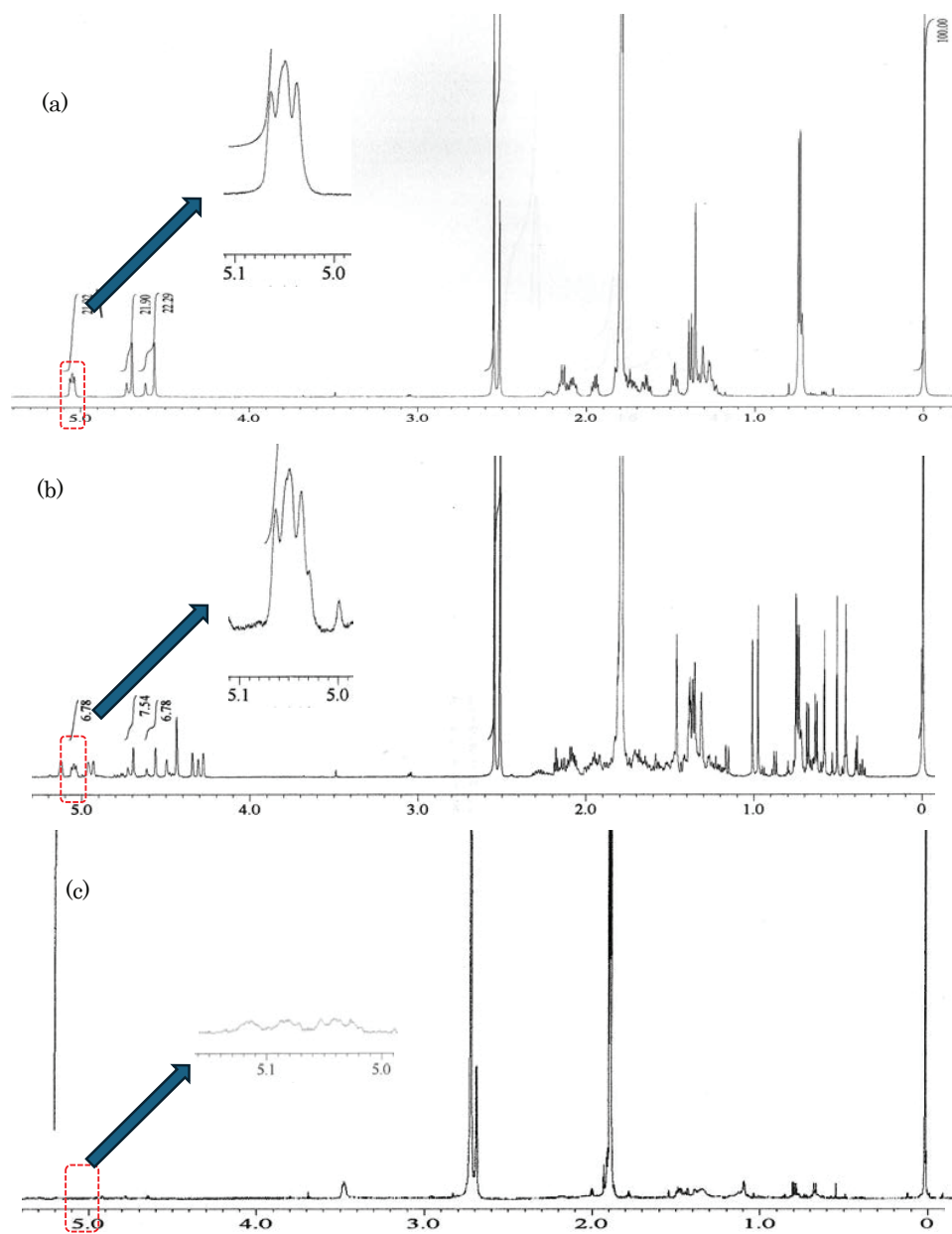


Fig. 14 β -Caryophyllene 試薬 A (a), 「ブラックペッパーオイル」 (b)とコショウ末の各試料 (c)の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 500 MHz)

拡大図のシグナルが 5 位のプロトンシグナル.

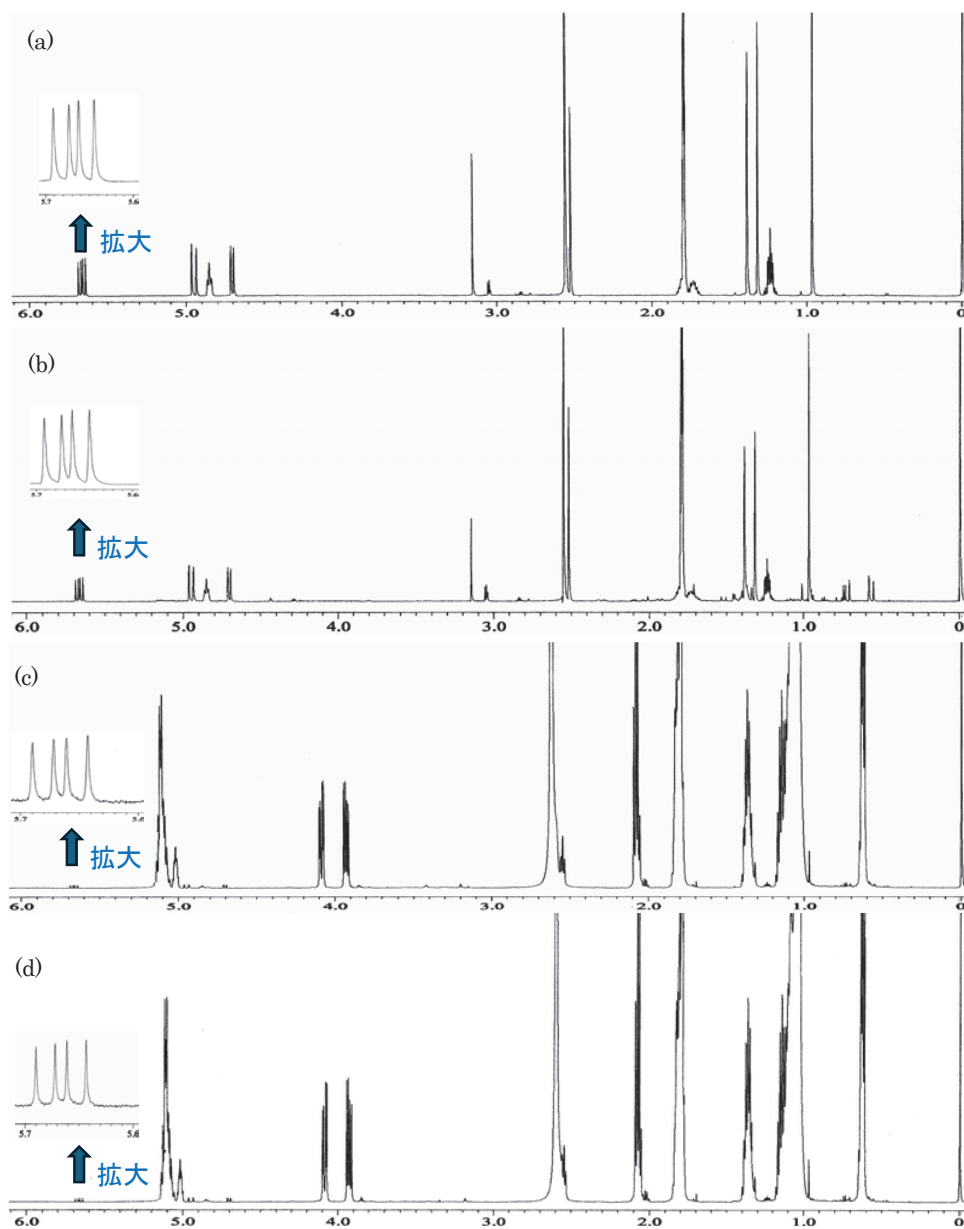


Fig. 15 Linalol 試薬, 既存添加物の「コリアンダーオイル」 (b)と市販コリアンダー種子 A (c), B (d)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 600 MHz)

拡大図のシグナルが 2 位のプロトンシグナル.

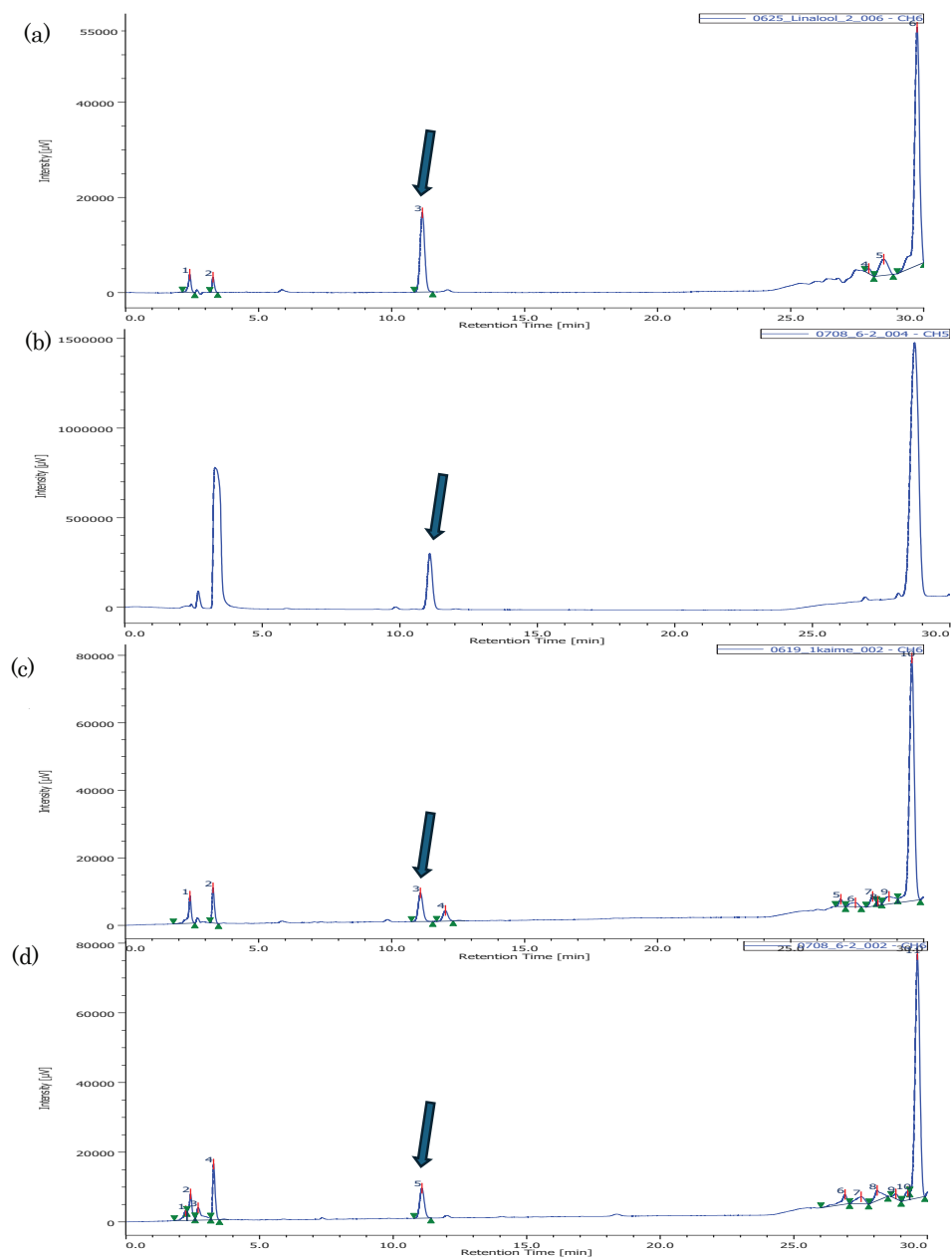


Fig. 16 Linalol 試薬, 既存添加物の「コリアンダーオイル」 (b)と市販コリアンダー種子 A (c), B (d)の各試料の HPLC クロマトグラム

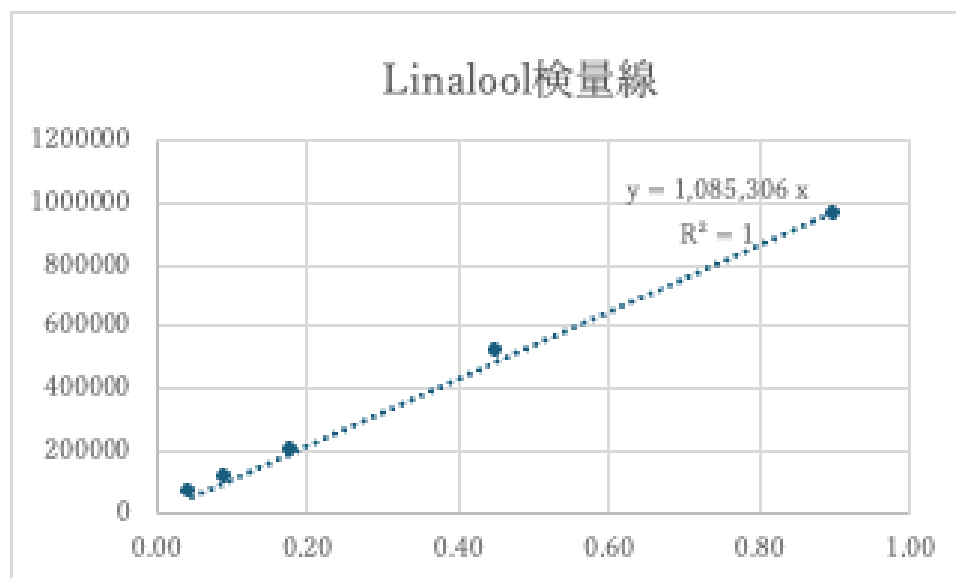


Fig. 17 HPLC における Linalol の検量線

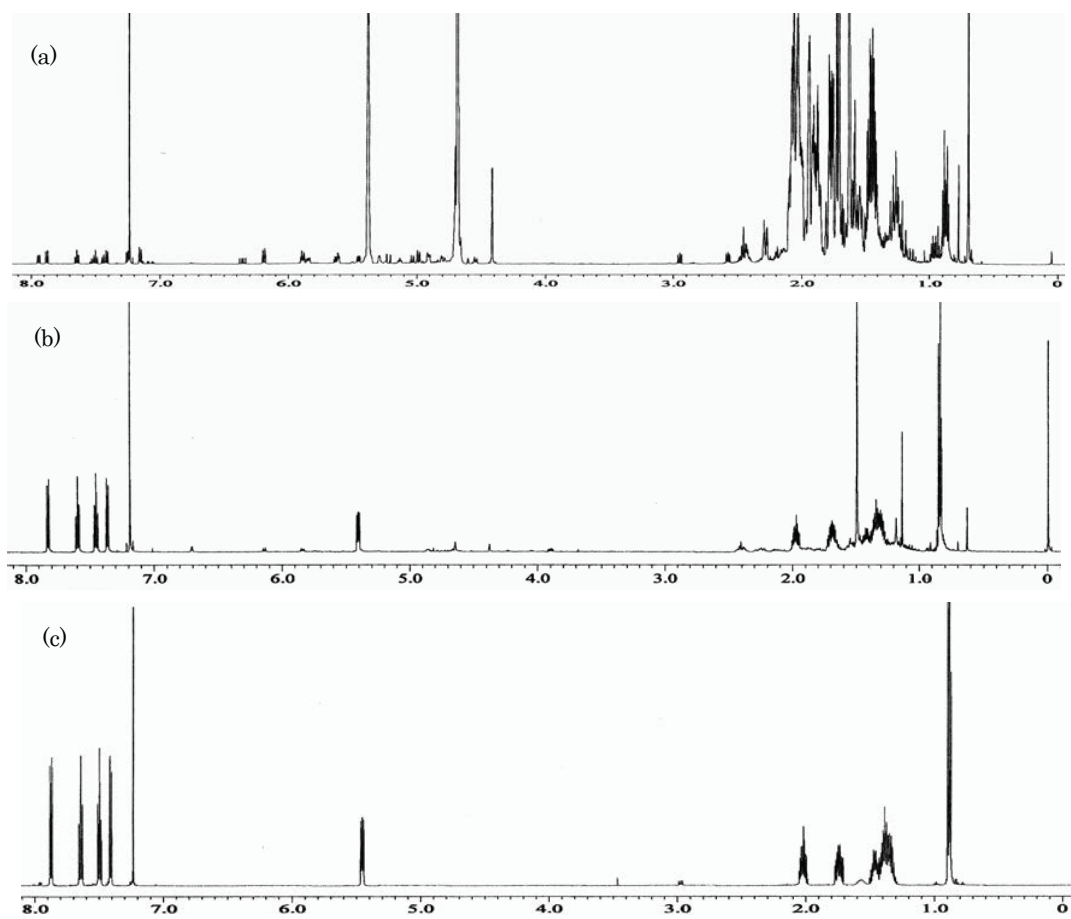


Fig. 18 既存添加物「セロリシードオイル」 (a) , 単離された化合物(b) , Butylphthlide 試薬 (c), の ^1H -qNMR スペクトル (in CDCl_3 , 600 MHz)

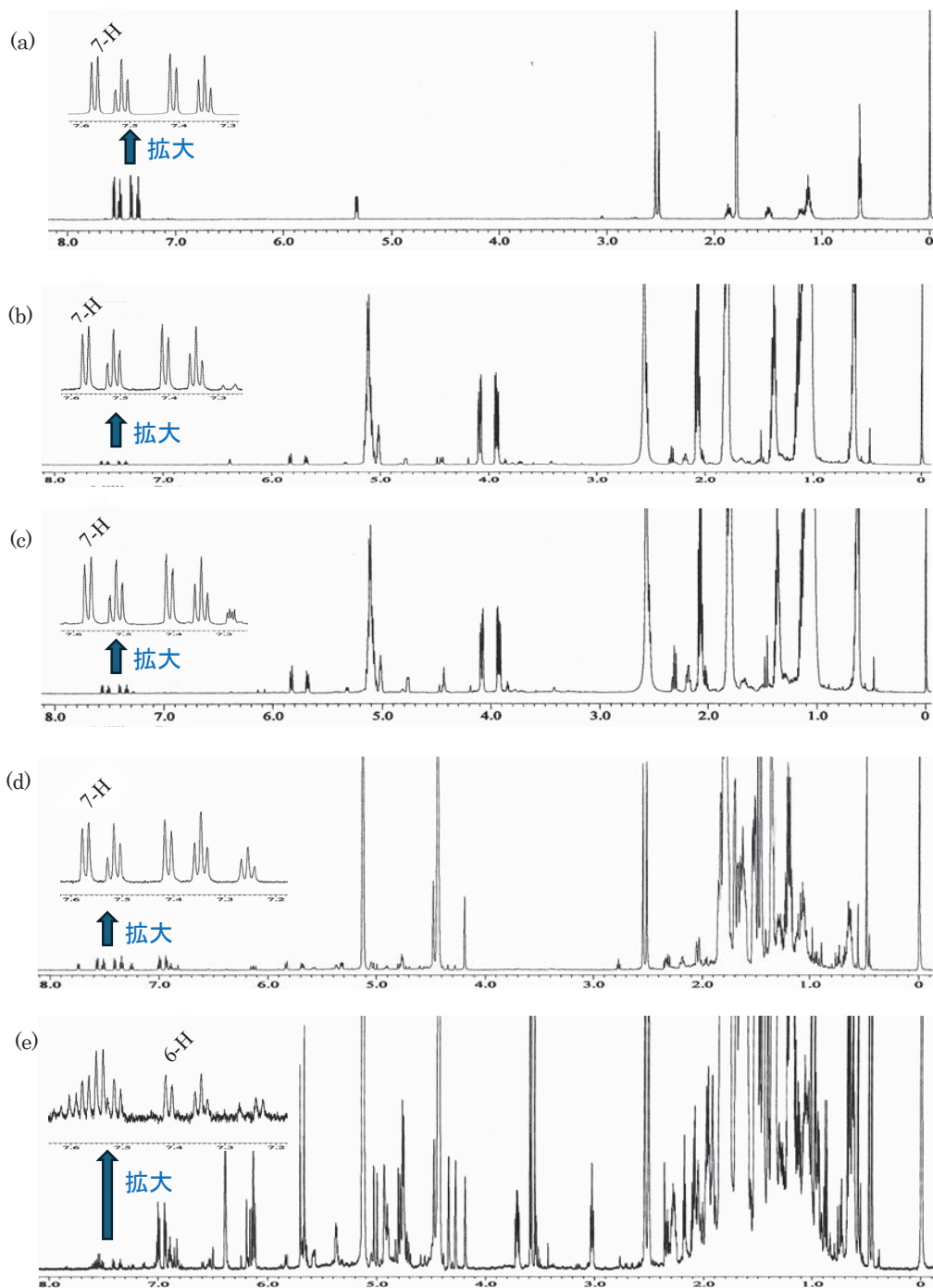


Fig. 19 Butylphthlide 試薬 (a), 既存添加物「セロリシードオイル」 (b), 栽培用セロリ種子試料 (c), 食用セロリ種子試料 (d), 香粧品用セロリシードオイル (e)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 600 MHz)
 拡大図は芳香族のプロトンシグナル.

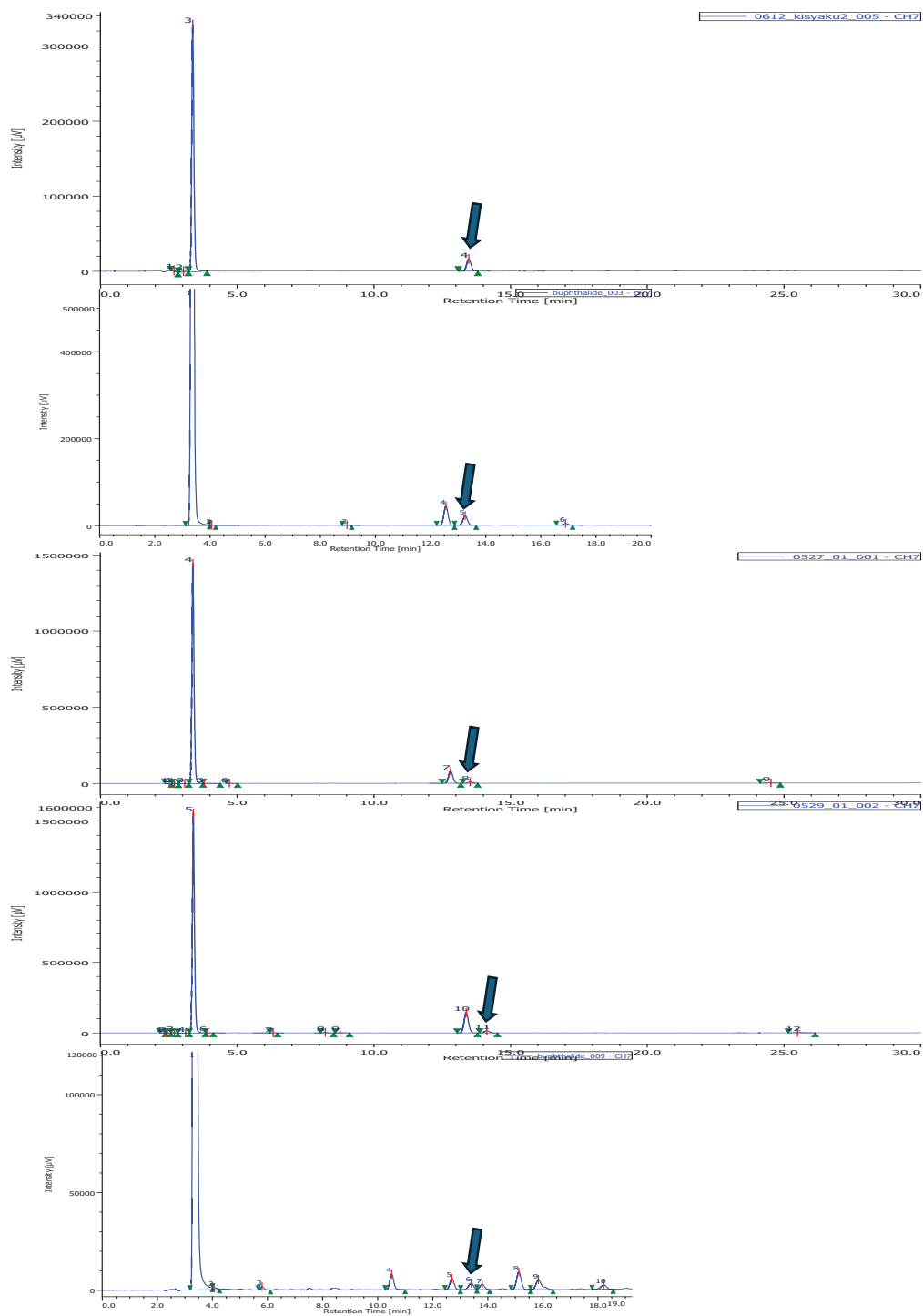


Fig. 20 Butylphthalide 試薬 (a), 既存添加物「セロリシードオイル」 (b), 栽培用セロリ種子試料 (c), 食用セロリ種子試料 (d), 香粧品用セロリシードオイル (e)の各試料の HPLC クロマトグラム
矢印の保持時間 13.3 分付近のピークが butylphthalide のピーク

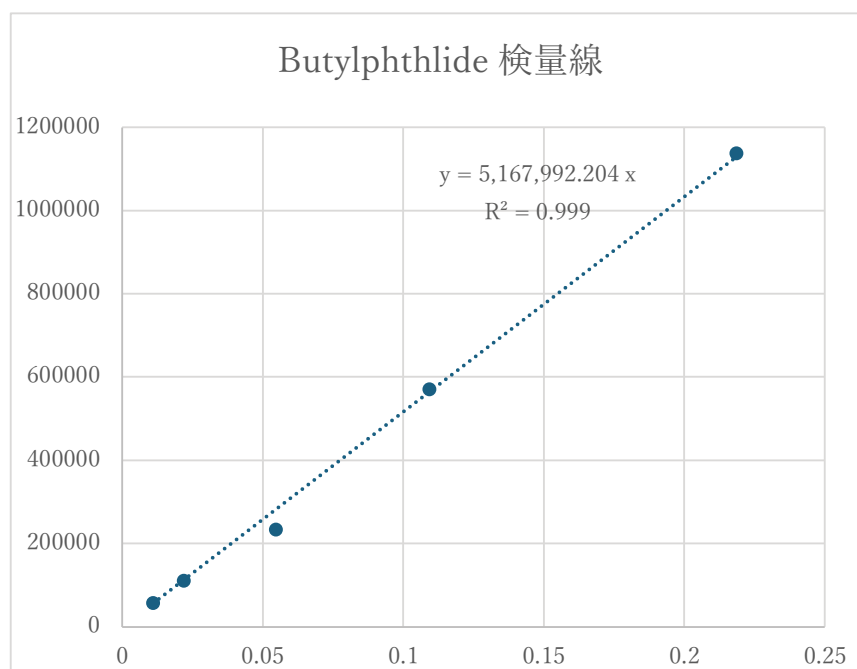


Fig. 21 HPLC における Butylphthlide の検量線

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 Eugenol の含有率

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

試薬の純度表示は>95%

Table 3 Rosmarinic acid の含有率

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

Table 4 ^1H -qNMR を用いて測定した β -caryophyllene の含有率

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

Table 5 ^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 6 ^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 ±0.63	
「セロリシードオイル」 (既存添加物) (C2304)	2.14 ±0.03	2.28 ±0.01
セロリ種子 (栽培用) (CeSP-25T)	0.24 ±0.01	0.25 ±0.01
セロリ種子 (栽培用) (CeSP-25Sa)	0.10 ±0.00	0.11 ±0.00
セロリ種子 (食品) (CeSF-25Sb)	0.50 ±0.01	0.51 ±0.00
セロリ種子 (食品) (CeSF-25G)	0.38 ±0.02	0.39 ±0.01
セロリシードオイル (香粧品) (CO2504)	(0.28 ±0.06)	(0.36 ±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5～7年度 総合分担研究報告書

既存添加物の成分組成に関する研究

天然色素に含まれる色素成分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 「第10版食品添加物公定書」または日本食品添加物協会「既存添加物自主規格(第6版)」に記載されている既存添加物について、成分規格に関する一次データを取得した。対象の既存添加物はアナトー色素、ムラサキヤマイモ色素、スピルリナ色素である。

アナトー色素についてはシングルリファレンスHPLC定量法の構築を目指した。アナトー色素の主成分である、ビキシン、ノルビキシン及びこれらの幾何異性体に対し、シングルリファレンスのデザイン及び合成、相対モル感度を算出した。ムラサキヤマイモ色素については、HPLC定量法の確立に向け、LC-MSを用いた内容成分の構造同定及び色素製剤からの標準品の獲得を行った。その結果、主に3種のシアニジンあるいはペオニジンアシルグルコシドが検出され、これらの高速向流クロマトグラフィーによる単離精製検討を完了した。スピルリナ色素については、その主成分がタンパク質であるフィコシアニンのため、これの定性的分析法の確立を目指した。

研究協力者

高山卓大 立命館大学薬学部 助教

A. 研究目的

本研究では、既存添加物のうち、天然色素の含有成分解析に関する分析およびその化学物質の評価を実施した。具体的には、アナトー色素、ムラサキヤマイモ色素、スピルリナ色素についてである。これらは第10版食品添加物公定書または日本食品添加物協会 既存添加物自主規格(第6版)に規定されている。その確認試験は色価、薄層クロマトグラフィーや吸光度法などであり、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が用いられていなかった。そこで、本研究では、既存添加物の主成分の成分規格を検討し、簡便かつ高精度な HPLC 分析法を構築することとした。

アナトー色素

アナトー色素(Annatto Extract)は第10版食品

添加物公定書(以下、公定書)において、ベニノキ(*Bixa orellana* L.)の種子の被覆物から得られたものである。なお、ノルビキシン(Norbixin, NBx)を主成分とするもの及びビキシン(Bixin, Bx)を主成分とするものがあり、それぞれを NBx 及び Bx と定義されている。Scotter らの報告では、アナトーの主成分である NBx 及び Bx はそれぞれ *trans*-/*cis*-体が存在しており、それぞれを測り分ける必要がある。幾何異性体は、一般的に逆相系 ODS で分離可能であるが、これらの単一標準品は入手困難である。加えて、これらの異性体は光や熱によって互いに変換する可能性が示唆されている。そのため、標準品自体の安定性を担保する必要がある。標準品を用いた一般的な高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法では常にその懸念が生じる。そこで、入手不可能な *trans*-NBx および *trans*-Bx を合成、並びに相対モル感度(RMS)を用いた Single Reference(SR) HPLC の開発へ繋げることとした。SR-HPLC を開発するにあたり、本件研究班では

新たに赤色領域に特化した SR をデザインした。今回提案する SR は、アナトーを含めて、天然カロテノイド色素の定量分析に広く適用できるものと考えられる。

ムラサキヤマイモ色素

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。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。一方で、本邦においては現在、適切な規格基準が設定されていない(第6版自主規格のみ)ため、定性及び定量のための基礎検討を実施する必要がある。

そこで本研究課題では、HPLCに基づくムラサキヤマイモ色素の定性および定量法の開発を目指した。定量の対象物質は主成分であるCAGとするのが適切であると考えた。一方で、CAGは糖部分の構造やアシル基の種類に応じて種類が存在する。そこでまず、HPLC-高分解能質量分析計(HRMS)にてプロファイリングし、定量の対象とするCAGを設定した。これらのピーク由来の市販標準品は入手不可能であったため、高速向流クロマトグラフィー(HSCCC)による単離精製を目指した。

スピルリナ色素

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。PYCは青色の発色団を分子内に有するタンパク質(分子量30 kDa)で、発色団は分子量600 Da程度の低分子フィコシアノビルリン(PCB)であ

る。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、スピルリナ色素を含有する製品がスーパーフードとしても商業的に注目されている。公定書にはスピルリナ色素の確認試験として、定性試験法に規格が存在する。一方で、その含有量評価は色価測定に留まっており、より正確な定量評価法が求められる。

そこで本研究課題では、HPLCあるいはHPLC-MSに基づくスピルリナ色素の定性および定量法の開発を目指した。定性・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。4つの市販青色色素(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))を対象として、まず初めに公定書記載の確認試験により判別可能か確かめた。また、適切なHPLC分離及び検出条件を検討した。さらに、酵素消化法を用いた発色団の構造に関する定性分析を実施した。

B. 研究方法

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

コントローター：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)

コントローター：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 G2XS
 イオン化条件：エレクトロスプレーイオン化
 ポジティブモード
 測定モード：MSE モード
 NMR 装置：JEOL 社製 ECZL-600

アナトー色素

NBx 及び Bx 試薬製品は、富士フイルム和光純薬社製を用いた。アナトー色素製剤は、ノルビキシシ(保存番号 NBx0001)を用いた。

HPLC 分離分析

粉末の対象試料は DMSO により溶解し、メタノール/水(90/10, V/V)混液を用いて希釈した。移動相には、0.1 vol%酢酸水溶液/0.1 vol% 酢酸メタノールを使用し、10/90 をアイソクラティック条件により、10 分の分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100Z column (4.6×150 mm, 5 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40℃

流速：1.0 mL/min

検出波長：460 nm

注入量：10 μL

SR デザイン

国立医薬品食品衛生研究所有機化学部との共同により、SR 候補化合物を検討した。すなわち、極大吸収波長 450～500 nm で検出できる化合物の合成を検討した(図 2)。

¹H-qNMR による *trans/cis*-NBx, Bx および SR の絶対定量

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

Data points：60,000

Flip angle：90°

Pulse delay：60 s

Scans：8 times

Probe：25℃

Software: JEOL 社製 Purity Pro qNMR ANALYSIS Software

RMS 算出

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

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

$$R = \varepsilon \times C \times l$$

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

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

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

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

ムラサキヤマイモ色素

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

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 μL を取り、400 μL のメタノール/水(50/50, V/V)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。

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：スクリーニングを実施し、最適であった TSKgel ODS-100Z column (4.6×150 mm, 5 μm, 東ソー社製)を用いた。

LC-MS 測定においては、MS 分析に適切な流速に設定できるように TSKgel ODS-100Z column (2.0×150 mm, 3 μm, 東ソー社製)を用いた。カラム温度：40℃

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

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

検出波長：200-800 nm

注入量：10 μL

HSCCC による単離精製

分配係数の条件検討

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。溶媒条件の最適化に供する溶媒の混合比率は次の通りとした：

3.5/2.0/1.5/4.5/0.01, 3.0/2.5/1.5/4.5/0.01, 2.5/3.0/1.5/4.5/0.01, 2.0/3.5/1.5/4.5/0.01 及び 1.5/4.0/1.5/4.5/0.01(V/V/V/V)。

これらの溶液をそれぞれ 5 mL 調製し、5 分間静置した後、100 μL の色素原体をそれぞれ添加して十分に攪拌した。その後、5 分間静置し、分配した上相及び下相を 100 μL 分取して溶媒留去した。乾固した残差を水/メタノール=8/2(V/V)溶液の 100 μL に溶解し、HPLC 測定に供した。分配係数は上相のピーク面積/下相のピーク面積として算出した。

HSCCC の分取条件

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。

スピリリナ色素

青色素 4 製品(スピリリナ色素 2 製品(製品 1=A 及び製品 2=B), クチナシ青色素 1 製品(C) 及びバタフライピー色素 1 製品(D))は、それぞれ市場より購入したものをを用いた。なおバタフライピー色素は、チョウマメ抽出液の濃縮物であり、アントシアニンを主成分とする。

公定書確認試験

公定書 C 項「試薬・試液等」に従って、クエン酸緩衝液(pH 6.0), 塩化鉄(III)試液, 次亜塩素酸ナトリウム試液を調製した。公定書の記載に従って、確認試験(1)～(6)に該当する試験を実施した¹⁾。確認試験(6)における極大吸収波長の確認には、装置に示した分光光度計を用い、210 nm～800 nm の波長帯における吸光スペクトルを取得した。その他の確認試験においては蛍光や発色を目視により判断した。

HPLC 分離分析

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

カラム：Accura Triart Bio C18(2.1×100 mm, 1.9 μm, YMC 社製)

カラム温度：40℃

流速：0.4 mL/min

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

検出波長：620 nm

注入量：5 μ L

酵素消化法による発色団の検出検討

アミノ酸 I 残基レベルへの消化方法

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

トリプシンによるペプチドマッピングに基づく消化方法

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(50 mmol/L 重炭酸アンモニウム-2 mol/L 尿素溶液にて溶解)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。

C. 結果及び考察

アナト一色素

図 1 には標準品溶液の HPLC クロマトグラムを示す。ピーク面積百分率からその純度は、NBx で 91.1%及び Bx で 97.0%となった。また、既報の HPLC クロマトグラムと比較して、いずれも *cis* 体と考えられた。一方で、大小さまざまなピークが検出されており、保管中の劣化等による分解の可能性が示唆された。従って、一般的な絶対検量線を用いた HPLC 法では、応答を過小評価してしまう可能性が考えられ、安定に存在する別の定量指標を確立する必要があると考えられた。そこで、同様の極大吸収波長を示し、類似した溶出挙動をとる SR の開発に取り組むこととした。HPLC(検出波長：460 nm)により、デザインした 6 種類の SR 及び NBx/Bx 混合溶液を用いて比較を行った結果、NBx と Bx の不純物を考慮して、n-C₁₁ がもっとも適切であると考えられた(図 2)。続いて、¹H-qNMR を実施し、各成分の純度を算出した。¹H-qNMR 用標準物質として、DSS-*d*₆(純度 92.4%)を用いた。各対象物質の ¹H-qNMR スペクトルを図 3 に示した。その結果、*cis*-NBx は 68.9%, *cis*-Bx は 97.2%, *trans*-NBx は 15.5%, *trans*-Bx は 41.9%, n-C₁₁ は 94.1%であった。各対象物質の NMR 試験管の試料溶液を用いて、HPLC 用標準溶液を調製し、純度

補正後の絶対検量線を作成した(原点通過, 0~100 mg/L, 図 4). 本検量線より $n\text{-C}_{11}$ に対する各分析対象物質の RMS を算出した結果, *cis*-NBx は 13.7, *cis*-Bx は 11.5, *trans*-NBx は 13.9, *trans*-Bx は 10.2 であった. 以上の結果から, 開発した SR-HPLC 法により, アナトー色素 Bx/NBx の安定的測定が可能なものと考えられた.

ムラサキヤマイモ色素

まず, ムラサキヤマイモ色素原体について, 既存の食品添加物であるムラサキイモ色素と同等の試験を行い, 極大波長を確かめた. 図 5-(a)及び(b)に希釈液の外観(pH3.0)と吸光スペクトルを示した. 結果として赤~暗赤色を示し, 極大吸収波長は 520 nm 周辺に認められていたため, 報告通りムラサキイモ色素と同等であることが検証できた. 次に, 図 6-(a)~(e)には検出波長域 200-800 nm での 2 次元クロマトグラムを 5 本のカラムにて比較した結果を示す. 特に TSKgel ODS-100Z カラムにおいてピーク形状が優れており, 複数本のピーク(検出波長 520 nm)が観察された. 従って, 本カラムを LC-MS 測定に適切となる様に内径及び粒子径を変更し, HPLC-HRMS を用いて, これらのピークの同定を試みた. 入手したロットごとのトータルイオンクロマトグラム及び 522 nm でのクロマトグラムを図 7-(a)~(d)に示す. いずれも分析カラムの最適化時と同様の分離を得ることができ, 内 3 本は特に MS の検出強度が高かった. 図 8-(a)~(f)に示す通り, ピーク 1 m/z 817.2230(9.76 分), ピーク 2 m/z 787.2090(10.53 分)及びピーク 3 m/z 831.2368(12.42 分)の精密質量でイオンが検出された. これらのアントシアニン類の MS/MS スペクトルを考えると, m/z 287.06 周辺, m/z 301.07 周辺のフラグメントイオンが検出されていた. 既報ではアグリコンがシアニジン骨格のもので前者, ペオニジン骨格のもので後者が生じると知られている. これを踏まえると, それぞれのピークは図-9(a)~(c)の構造を有することが推定された.

標準品獲得に向けた HSCCC の最適溶媒検討

の結果を表 1 に示す. 3 本のピークが分配係数 1 周辺をとる溶媒系(*tert*-butyl methyl ether / 1-butanol / acetonitrile / water / trifluoroacetic acid=2.5/3.0/1.5/4.5/0.01, *V/V/V/V*)を設定することができた. この溶媒系において効率的な単離精製が可能と考えられたため, 大カラム(350 mL 容)を用いた単離精製を実施した. 本条件に固定相保持率は 57%であった. 結果の HSCCC クロマトグラムを図 10-(a)に示す. 4 本のピークの溶出が認められた. これらを分取して HPLC-HRMS により分析した結果を図 10-(b)~(e)に示す. 固定相には依然として赤色を呈していたため, 固定相を濃縮して HPLC-HRMS 分析した. その結果, 図 11 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 は既に溶出で済みであり, 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.

以上の結果から, 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 の獲得には継続の検討が必要なことが示唆された.

スピルリナ色素

国内で市販される 4 つの青色素製剤を指標として, 公定書記載の確認試験により定性が可能かを検討した. 結果を表 2 に要約した. 確認試験(1)において, 薄層クロマトグラフィー用シリカシート(TLC)にスポットした全ての製剤で 365 nm の励起波長において赤色の蛍光が確認された. 確認試験(2)において, 各溶液を 90℃で 30 分間加熱後, 得られた溶液の上清を(1)と同様に TLC にスポットし, 蛍光を確認したところ, リナブルーとスピルリナパウダーにおいて赤色蛍光の消失が認められた. 確認試験(3)において, 各溶液に硫酸アンモニウムを規定量加えたところ, 全ての製剤で青色沈殿が認められた. 確認試験(4)において, 塩化鉄(III)試液を規定量加え, 20 分間放置したところ, 全種で明確な色調の変化は認められなかった. 確認試験(5)において, 次亜塩素酸ナトリウム試液を規定量加え

たところ、リナブルーとスピルリナパウダーで淡黄色への色調変化が認められた。確認試験(6)において、400 µg/mL 溶液の吸収波長を確認したところ、全ての製剤において波長 620 nm 周辺に極大吸収部が認められた。スピルリナ色素含有製剤 2 種では、クチナシ青やバタフライピーと比べ、極大吸収部が僅かに長波長側ではあったが、完全分離は不可能と考えられた。確認試験(2)及び(5)によりスピルリナ色素の識別は可能であったが、いずれも明確な反応とは言い難く、定量的測定に応用できるとは考えられなかった。従って、続いて HPLC 測定法の検討を実施した。低分子向けの HPLC 用カラムである、Shim-Pak Scepter C18-120 を用いた結果、いずれの製剤についてもピーク形状が不良であり、定量には不向きであった。そこで、非特異的吸着抑制と広い細孔径を有することから、タンパク質測定に適切なカラムでの分析検討を実施した。今回、YMC 社製の Accura Triart Bio C18 にて HPLC 分析を行った結果を図 12-(a)～(d)に示す。いずれもピークが良好な形状で認められ、スピルリナ色素含有製剤のみに共通して、溶出時間 9-11 分ほどにピークが認められた。これらのピークは PYC 由来であると考えられる。これらの内、再現性に優れた適切なモニタリングイオンを選定することで、詳細な解析が可能となると考えられる。一方で、上記では PYC の定性面での情報量に欠けるため、続いて HPLC-HRMS を用いた発色団構造の定性的分析について検討した。アミノ酸 1 残基レベルまでへの消化方法を検討した消化後の溶液について、Accura Triart Bio C18 により分析した結果を図 13-(a)～(d)に示す。スピルリナ色素 1 において、6 分周辺に明確なピークを認め、スピルリナ色素 1 及び 2 において図 12 と比較して明確に異なる傾向を得た。当該ピークを HPLC-HRMS に供した結果、 $[M+H]^+$ のイオンとして、 m/z 706.2921 が検出された。発色団の構造を PYC としてその断片の m/z を推定すると、 m/z 708.3066 で検出されると考えられ、その差は水素二つ分に相当した。この結果から、検出された原子団

がジヒドロビリベルジンである可能性が考えられたが、測定前処理時に生じたものかを明確にするため、トリプシン消化により発色団を有するペプチドが検出できるか検討した。前処理として還元的アルキル化の有無が与える影響を検討した結果、いずれにおいても結果に大きな変化を与えなかったことから、必要以上の前処理を避けるため還元的アルキル化は未実施の検体をペプチド解析に用いた(図 14-(a)～(c))。図 15-(a)及び(b)には、保持を増加させた系にて HPLC 及び HPLC-HRMS 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することが出来た。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 16-(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 16-(c)及び(d)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 に相当した。アミノ酸配列の b/y 帰属を行った結果を図 17-(a)及び(b)に示す。これらの配列は、それぞれ PYC の α 鎖及び β 鎖の構造を支持しており、発色団は PYC 上に PCB の構造として存在していることが考えられた。

D. 結論

アナトー色素

市販標準品 NBx および Bx は、HPLC クロマトグラム上で多数の分解由来ピークを示し、純度は NBx 91.1%、Bx 97.0% と限定的であった。また *cis/trans* 異性化が確認され、既存標準品による絶対検量線法では応答の過小評価が懸念された。そこで、安定な他の定量的指標として同等の吸収特性と溶出挙動を示す 6 種類の SR

を設定し、溶出時間を比較した。その結果、*n*-C₁₁ が最適 SR として選定された。¹H-qNMR により各化合物の純度補正を行い、*n*-C₁₁ を用いた純度補正済みの絶対検量線を構築したところ、*cis*-NBx, *cis*-Bx, *trans*-NBx, *trans*-Bx の RMS が確立された。以上より、*n*-C₁₁ を用いた SR-HPLC 法により、アナトー色素 Bx/NBx を安定かつ高精度に定量する手法を確立できた。

ムラサキヤマイモ色素

ムラサキヤマイモ色素は既知のムラサキイモ色素と同様に 520 nm 付近に極大吸収を示し、アントシアニンを主成分とすることが確認された。5 種類のカラム比較から TSKgel ODS-100Z が最良のピーク形状を示し、HPLC-HRMS により主要ピークとして *m/z* 817.2230, 787.2090, 831.2368 をそれぞれ検出した。MS/MS 解析からは、いずれもシアニジンあるいはペオニジン骨格を持つアントシアニン誘導体であることが示された。HSCCC による最適溶媒系を確立し、大型カラムで分取を行った結果、主要成分であるピーク 1 およびピーク 2 については高純度で単離可能であることが示唆された。一方ピーク 3 は保持後の固定相に残存が確認され、さらなる精製条件最適化が必要であることが明らかとなった。

スピルリナ色素

市販青色素製剤を用いた公定書法による識別試験では、蛍光消失・次亜塩素酸反応などでスピルリナ色素の識別が可能であったが、反応は明確でなく、定量法としての応用は困難であった。そこで HPLC 法を検討した結果、低分子用 C18 カラムでは適切なピークが得られなかったが、タンパク質分析向けの Accura Triart Bio C18 にて良好なピーク形状が得られ、特にスピルリナ色素含有製剤に共通する 9-11 分付近のピークは PYC 由来成分であると示唆された。さらに消化液を用いた HPLC-HRMS 解析では、*m/z* 706.2921 などの発色団を検出し、トリプシン消化物からは *m/z* 935.4476 および 1250.6126

の PYC α 鎖および β 鎖由来ペプチドが確認された。MS/MS における *m/z* 587.2851 の共通フラグメントは PCB 発色団の存在を支持し、発色団構造が PYC 上に保持されていることを明確にした。

E. 研究業績

1. 学会発表等

- (1) 中森洋紀, 布目真梨, 辻徹一郎, 出水庸介, 増本直子, 永津明人, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン Single reference-HPLC 法によるアナトー色素のビキシシ及びノルビキシシの分析. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第26回年次大会(2023.7).

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

表 1. 分配係数の検討結果

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

N=3 で実施， 平均値±標準誤差で表記.

表 2. スピルリナ色素の確認試験の結果要約

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

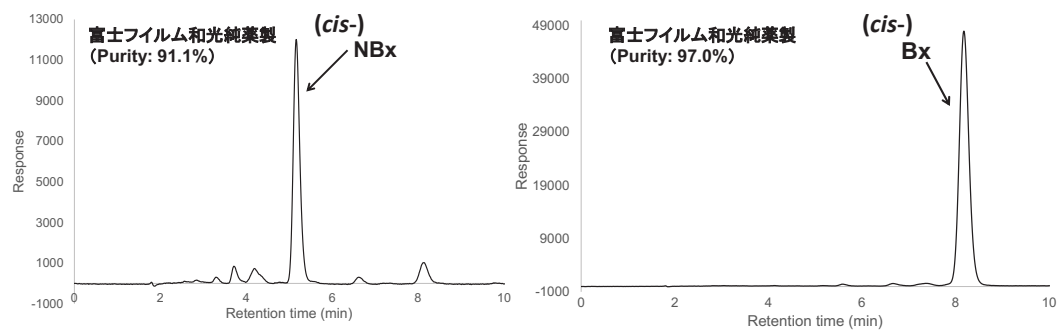


図 1. NBx 及び Bx 標準溶液の HPLC クロマトグラム

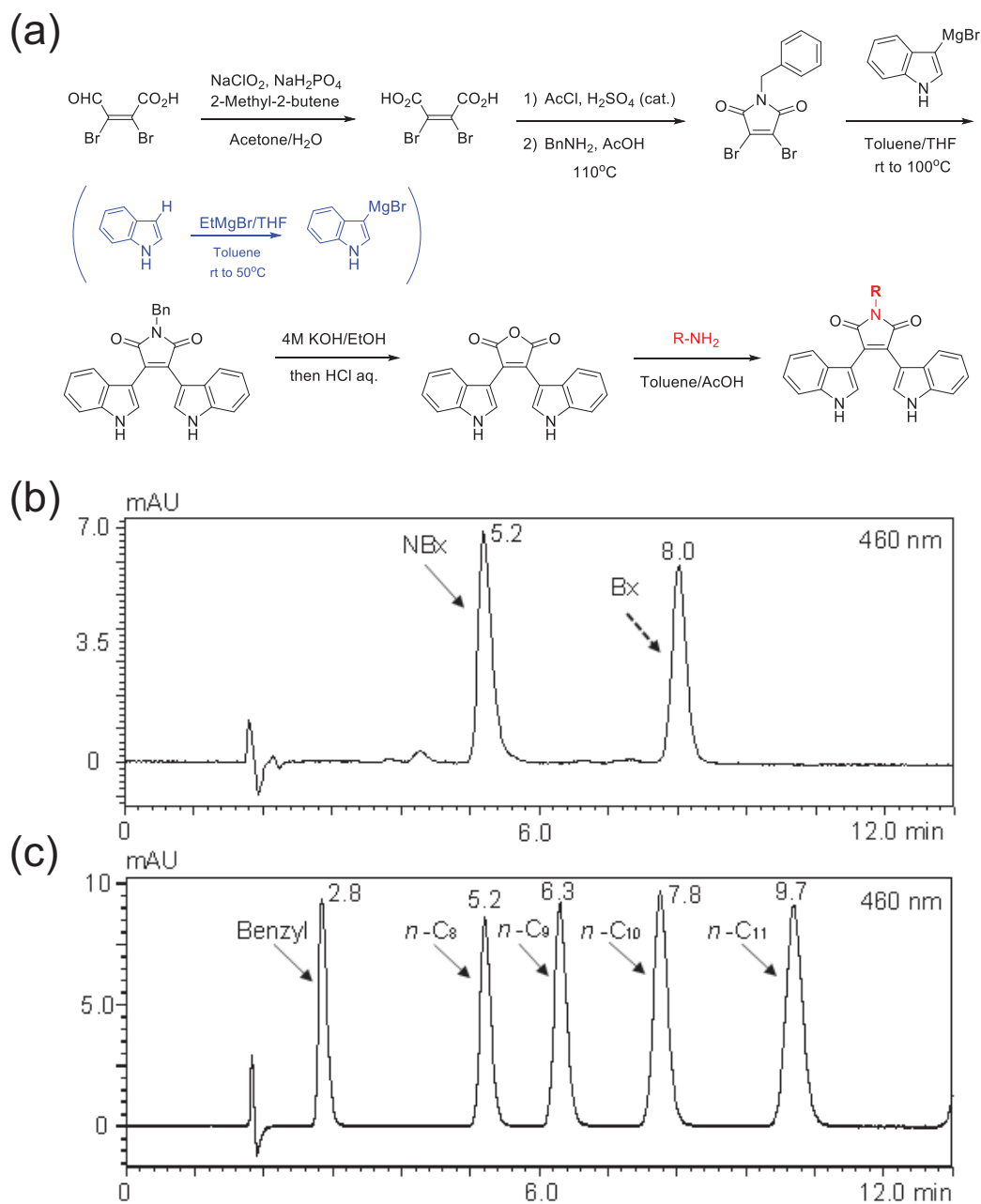


図 2. SR-HPLC 法による Bx/NBx の分析法基礎検討

(a) SR の合成経路. R には Benzyl 及び n -C₈~C₁₁ のものを合成した. (b) Bx/NBx 混合標準品の測定結果. (c) SR の測定結果. いずれも 2 μ g/mL の溶液を測定.

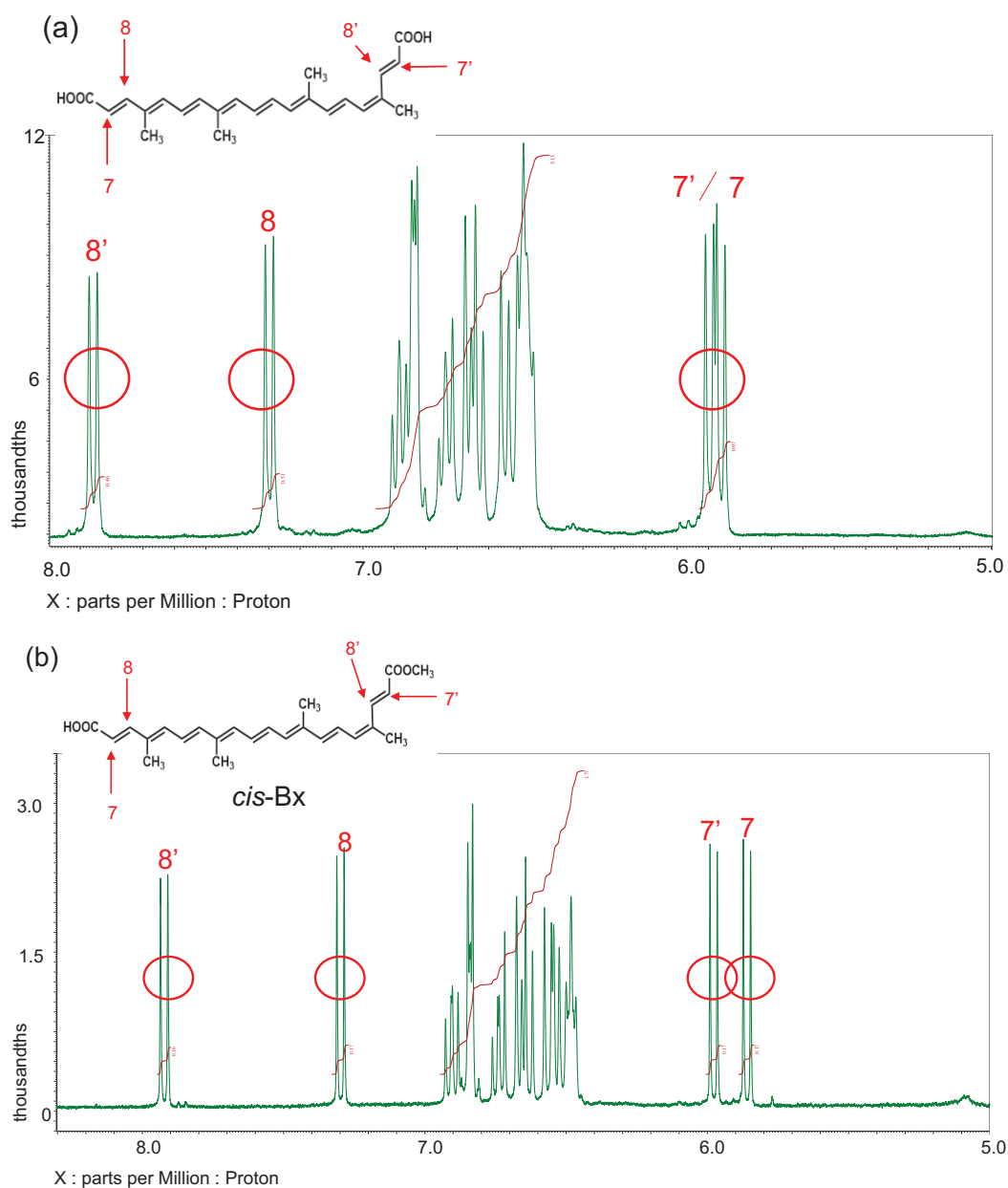


図 3. *cis/trans*-Bx/NBx および *n*-C₁₁ の qNMR スペクトル(その 1)

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

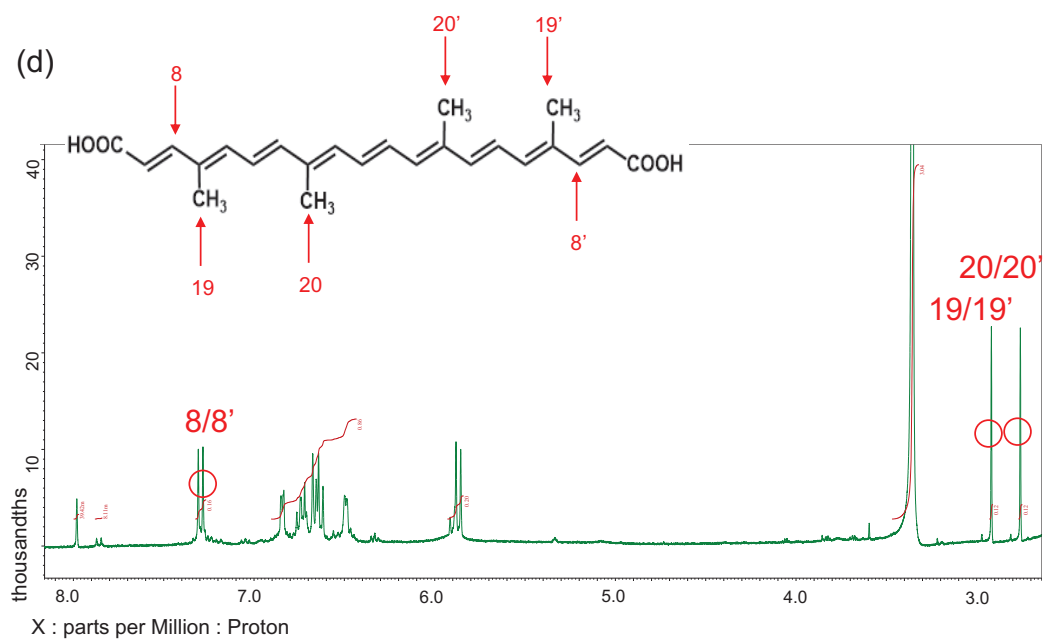
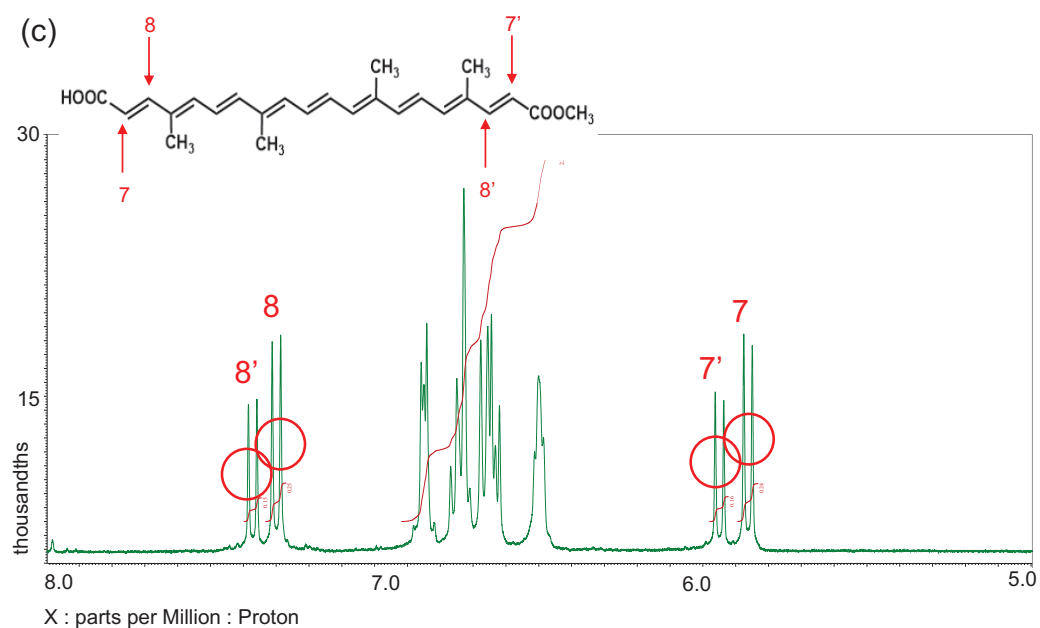


図 3. *cis/trans*-Bx/NBx および *n*-C₁₁ の qNMR スペクトル(その 2)

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

(e)

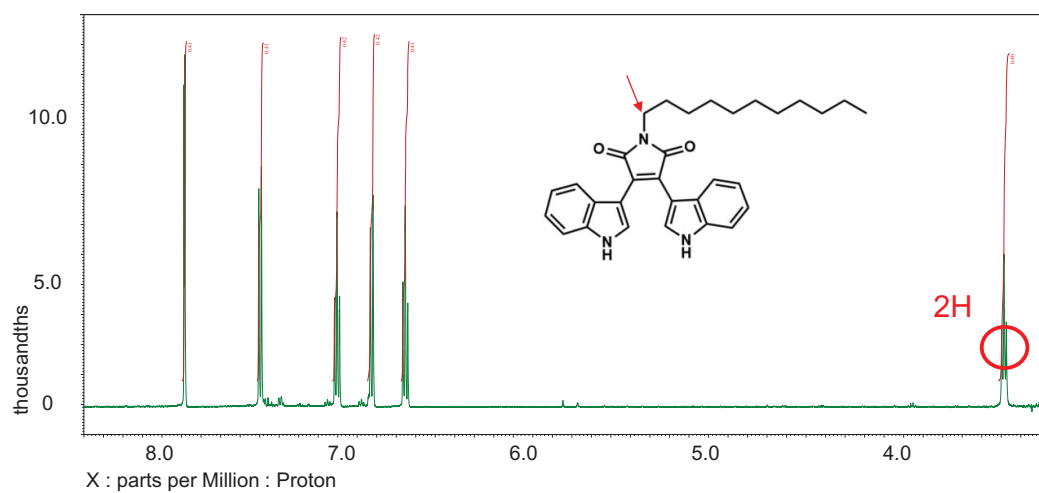


図 3. *cis/trans*-Bx/NBx および n-C₁₁ の qNMR スペクトル(その 3)

(e)n-C₁₁

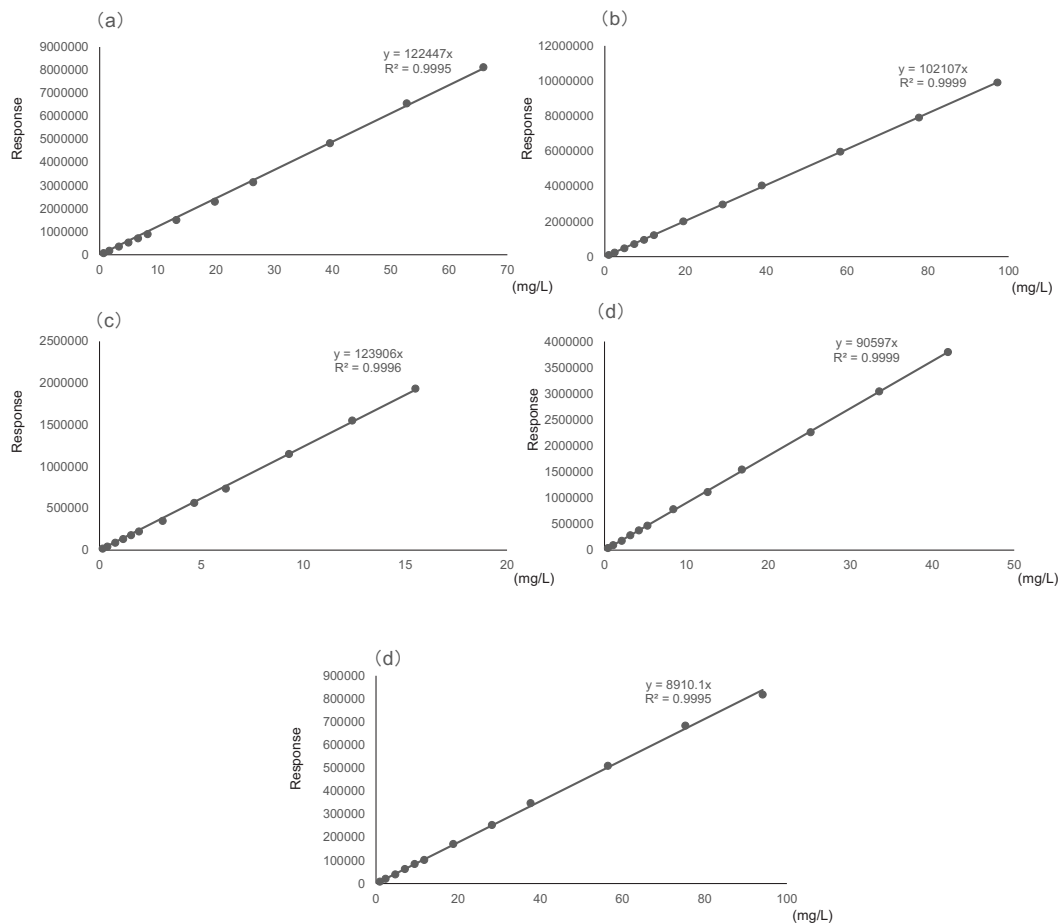


図 8. 純度補正後の NBx, Bx, 及び n-C₁₁ の検量線

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

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

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

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

(e) n-C₁₁($y = 8910.1x$, 相関係数 0.999)

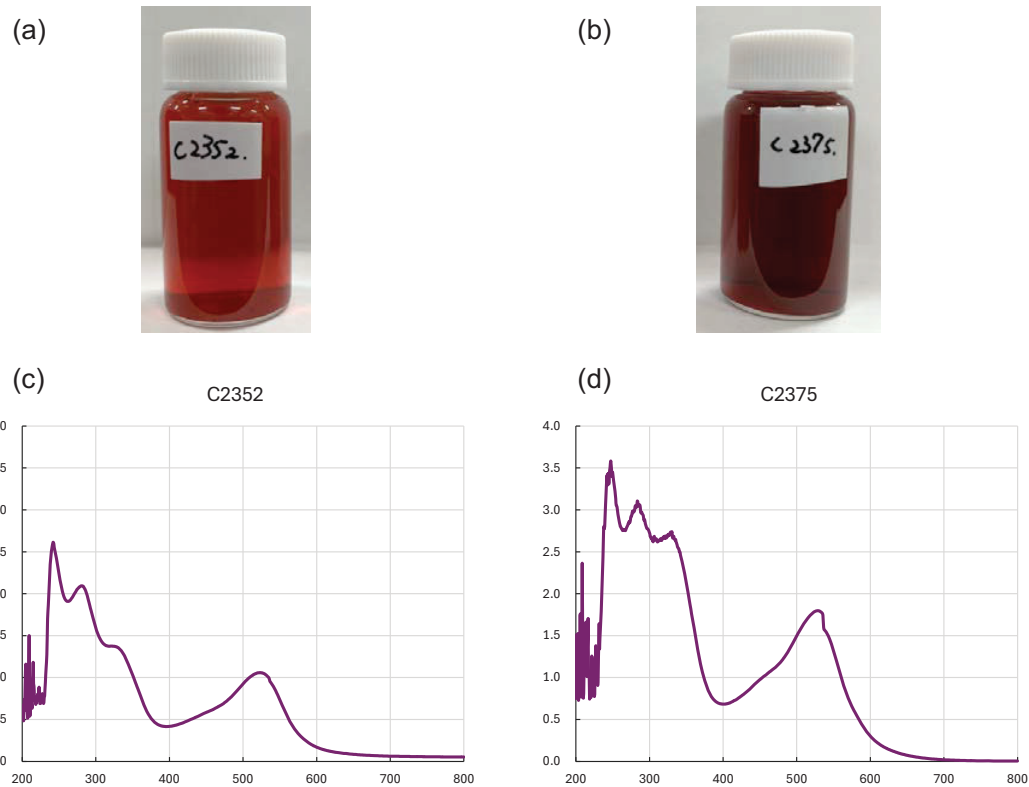


図 5. 色素原体の外観と検出波長の検討

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

いずれも pH3.0 のクエン酸緩衝液中で観測

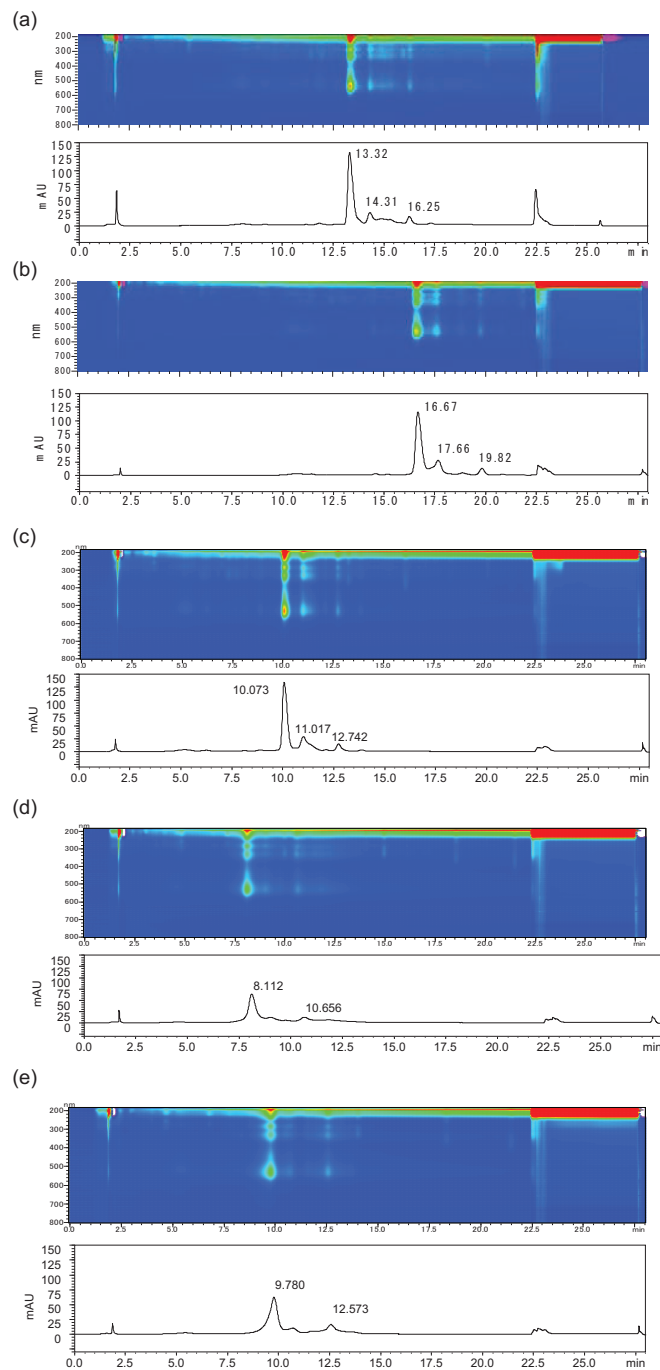


図 6. 分析カラムのスクリーニング結果

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

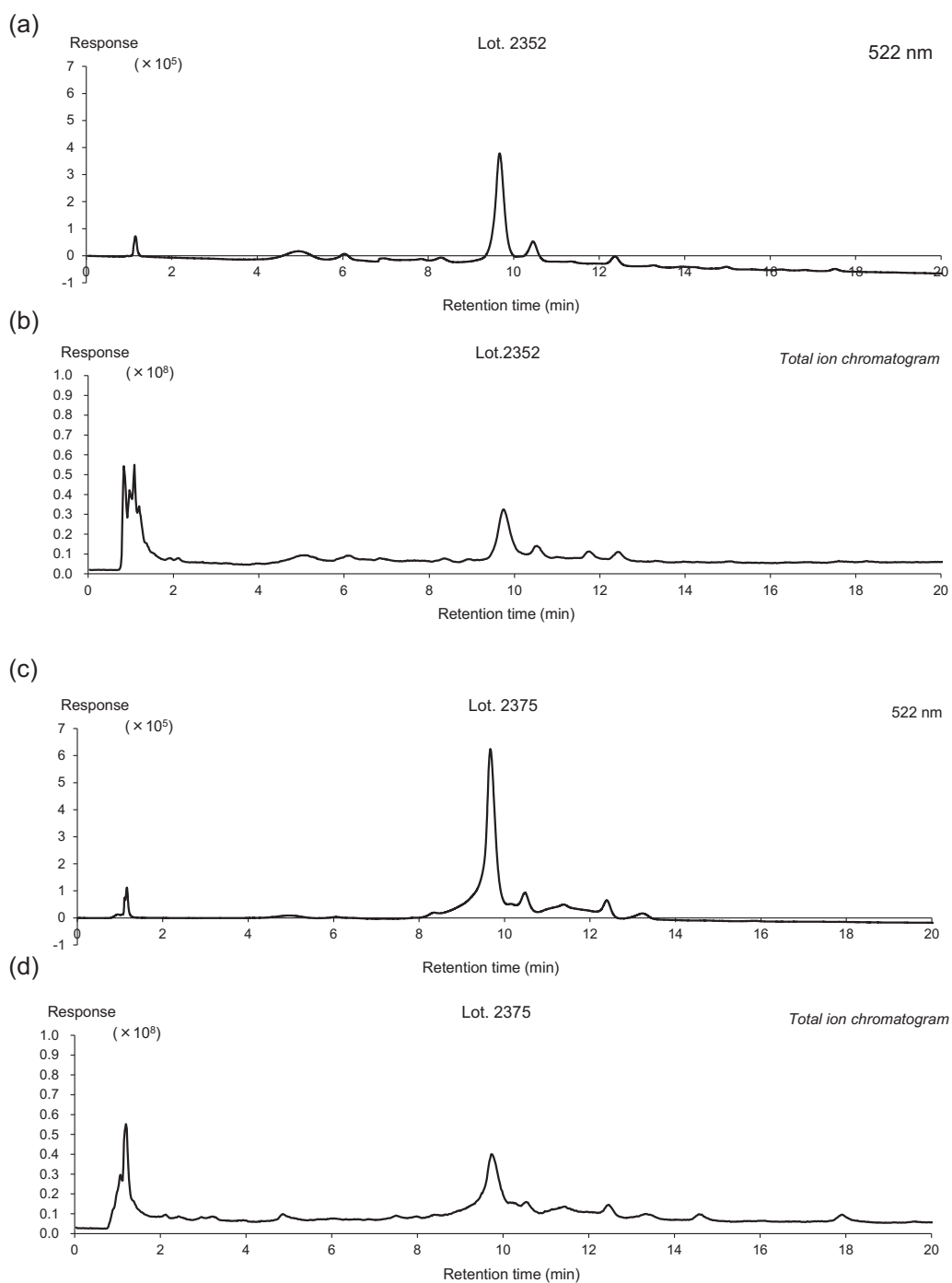


図 7. HPLC 及び LC-MS のクロマトグラム

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

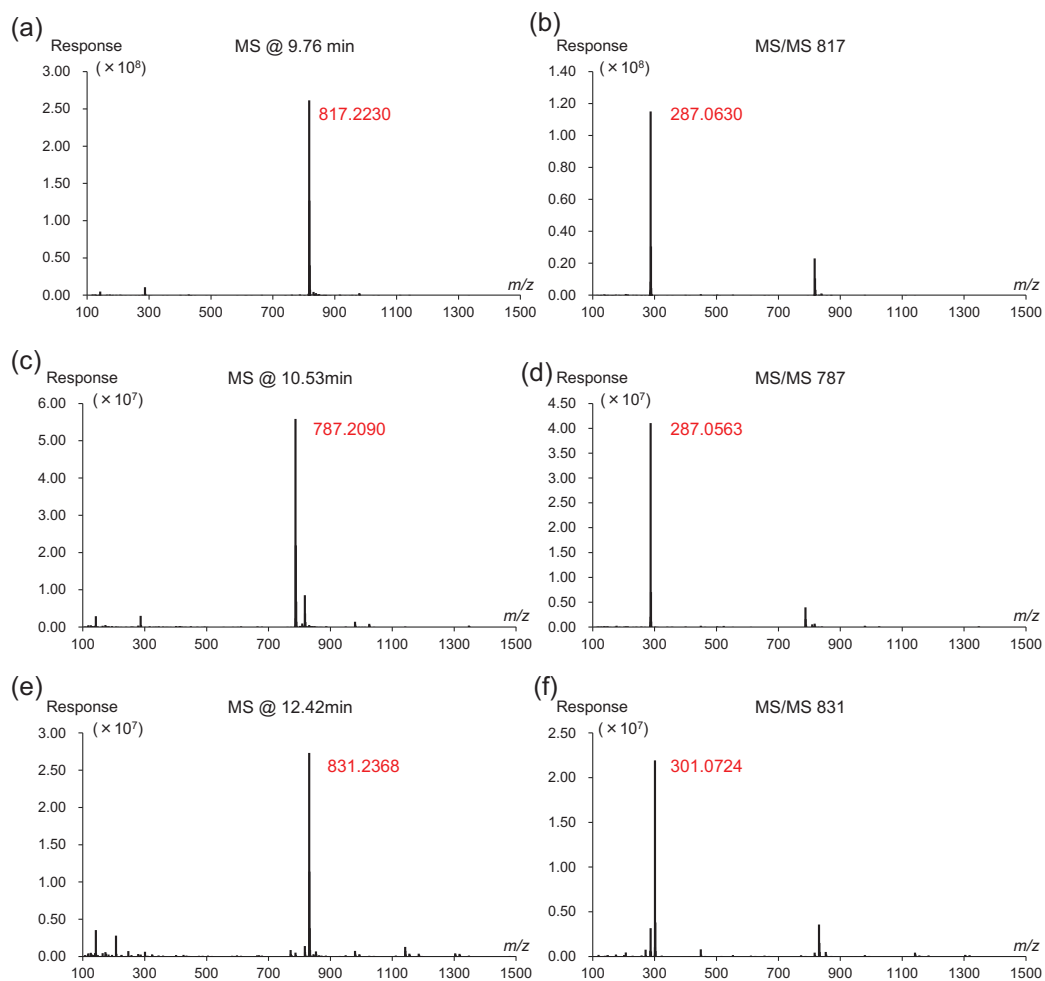


図 8. 各ピークの MS 及び MS/MS スペクトル

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

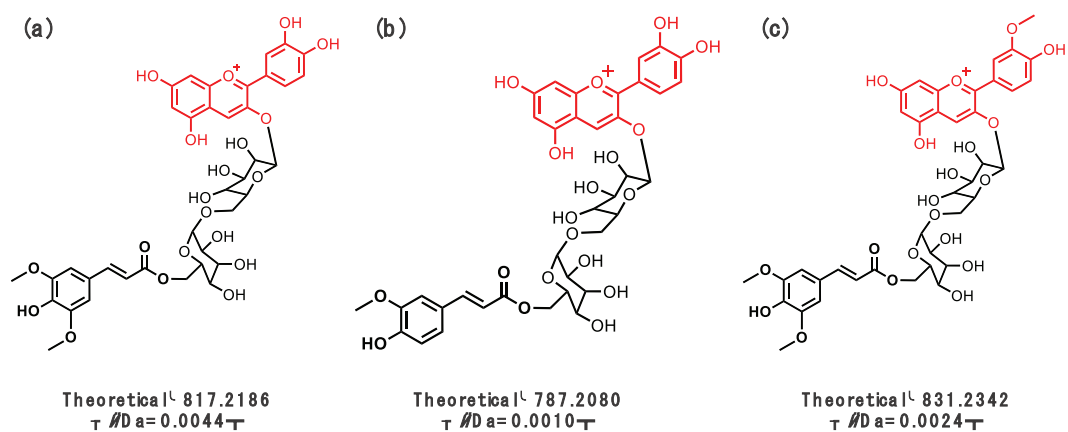


図 9. 推定される構造

- (a) 9.76 分に検出されたピーク
- (b) 10.53 分に検出されたピーク
- (b) 12.42 分に検出されたピーク

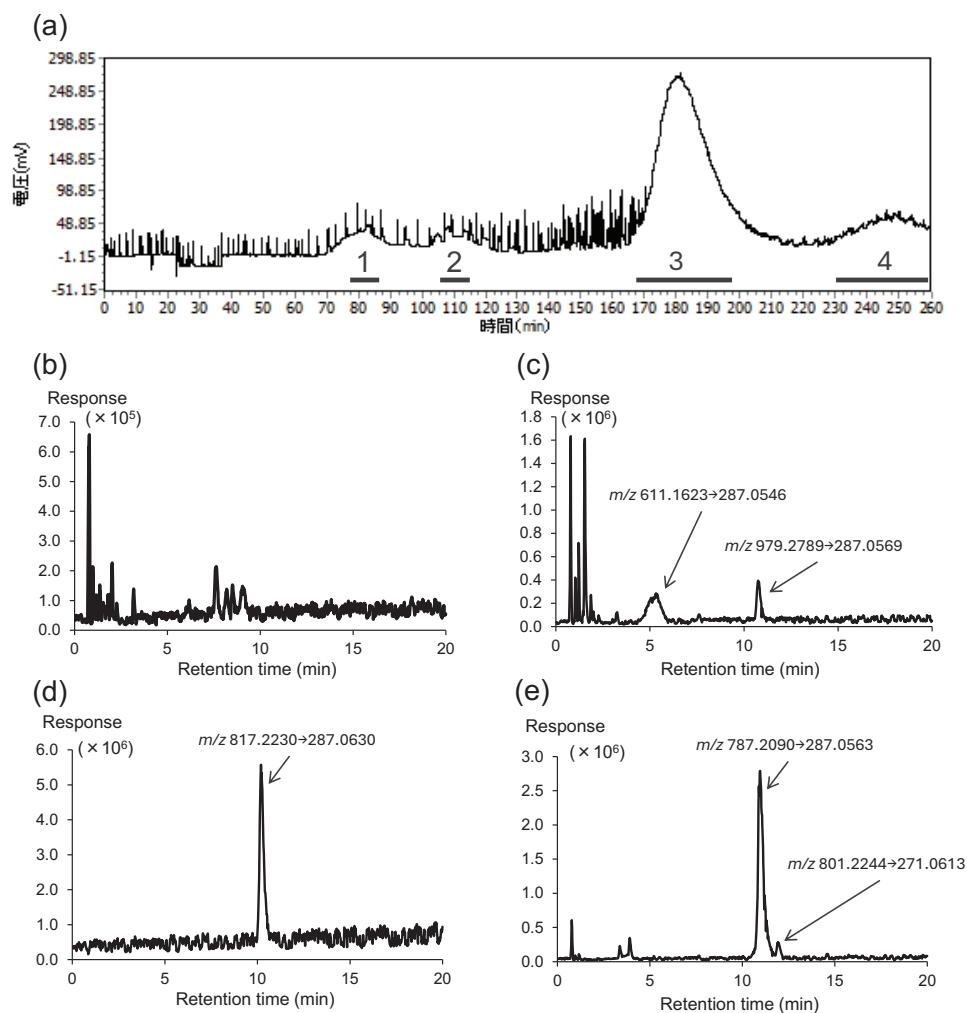


図 10. HSCCC による単離精製の結果

(a) HSCCC クロマトグラム：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. HPLC-HRMS クロマトグラム：(b) No. 1, (c) No. 2, (d) No. 3, (e) 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.

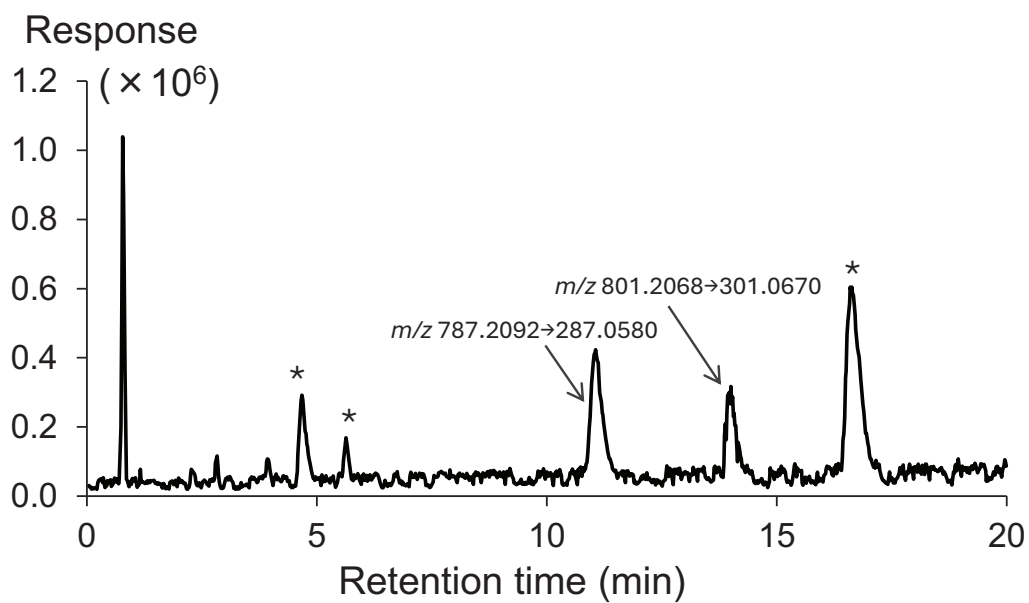


図 11. HSCCC 分取後の固定相濃縮物の HPLC-HRMS クロマトグラム
ノイズの影響を排除するためベースピークイオンクロマトグラムにて表示. * : 530 nm
に吸収無しであり, CAG 類ではないと考えられる.

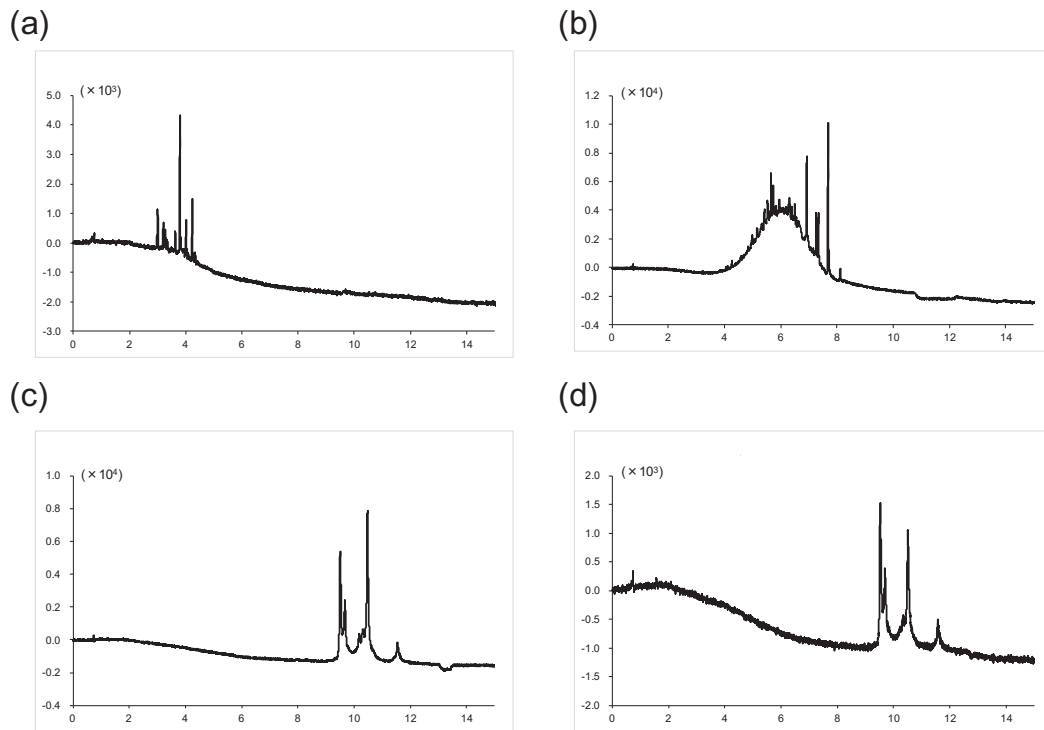


図 12. 分析カラム Accura Triart Bio C18 を用いた際の HPLC クロマトグラム

(a)バタフライピー色素, (b)クチナシ青色素,

(c)スピルリナ色素 1, (d)スピルリナ色素 2.

検出波長は 620 nm で検出.

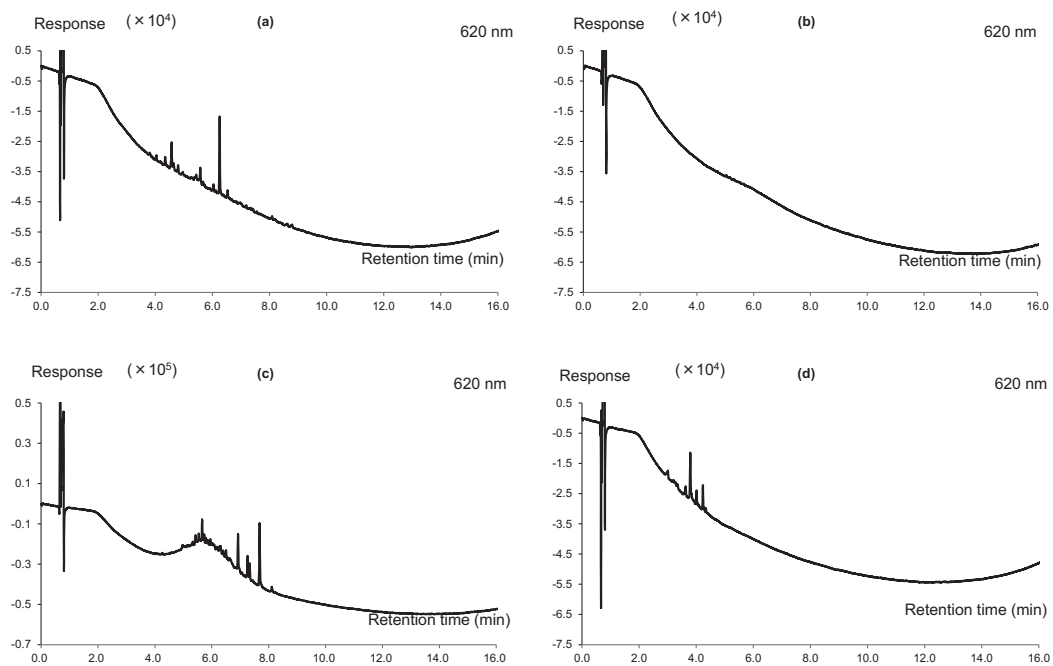


図 13. 酵素消化法により得られた溶液の HPLC クロマトグラム

(a)スピルリナ色素 1, (b)スピルリナ色素 2,
(c)クチナン青色素, (d)バタフライピー色素
検出波長は 620 nm で検出.

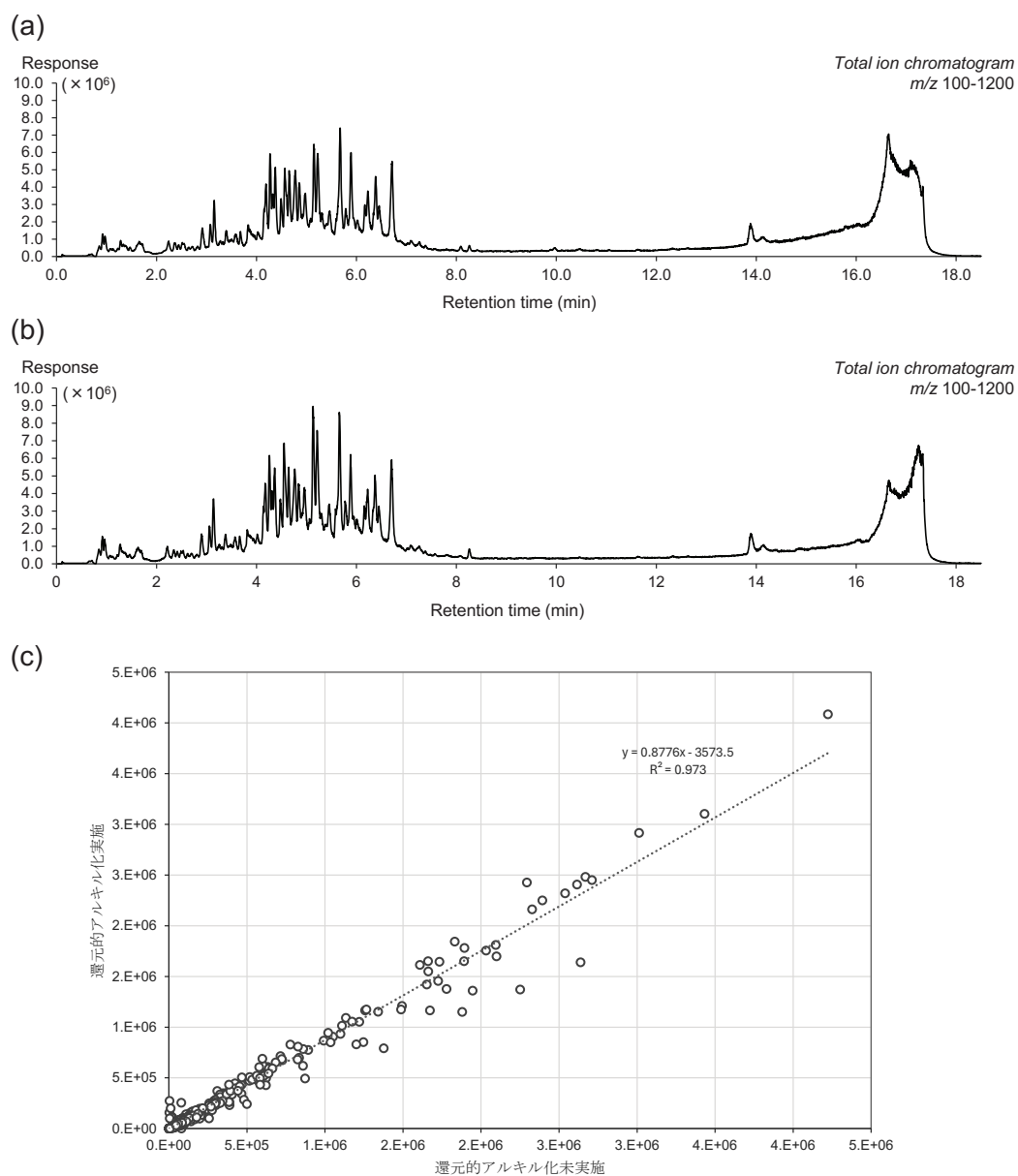


図 14. トリプシン消化断片のトータルイオンクロマトグラム及び MS 解析結果

- (a) 還元的方法あり
- (b) 還元的方法未実施
- (c) 各手法から得られたペプチド強度の相関

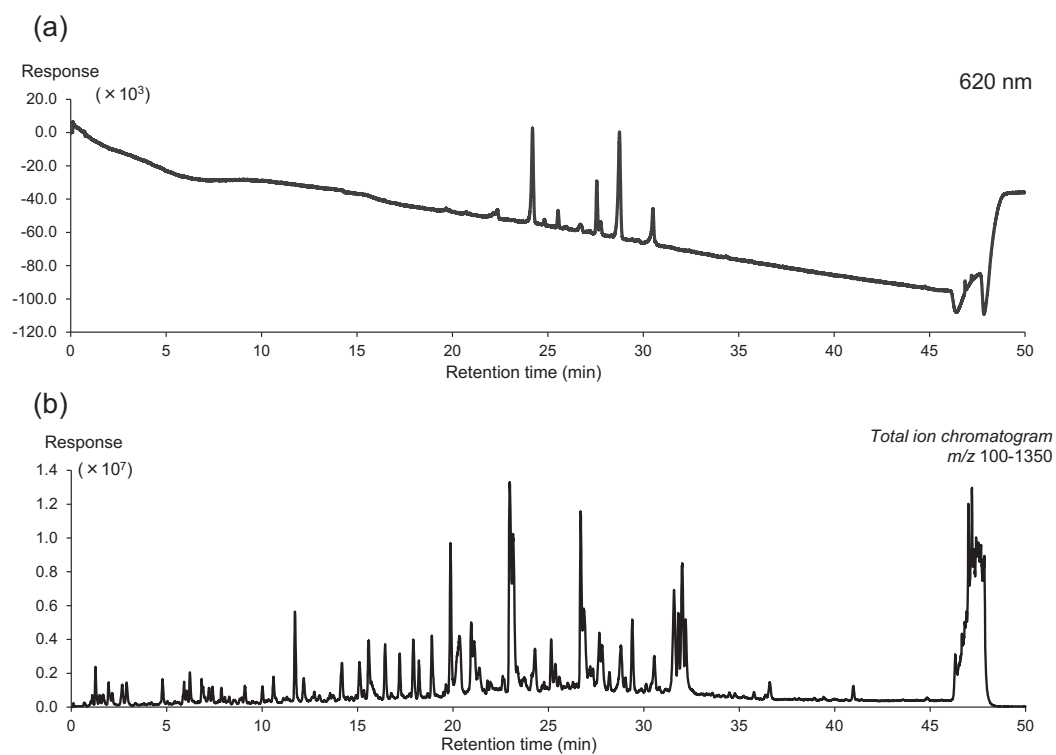


図 15. ペプチドシーケンス解析に供したクロマトグラム

(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

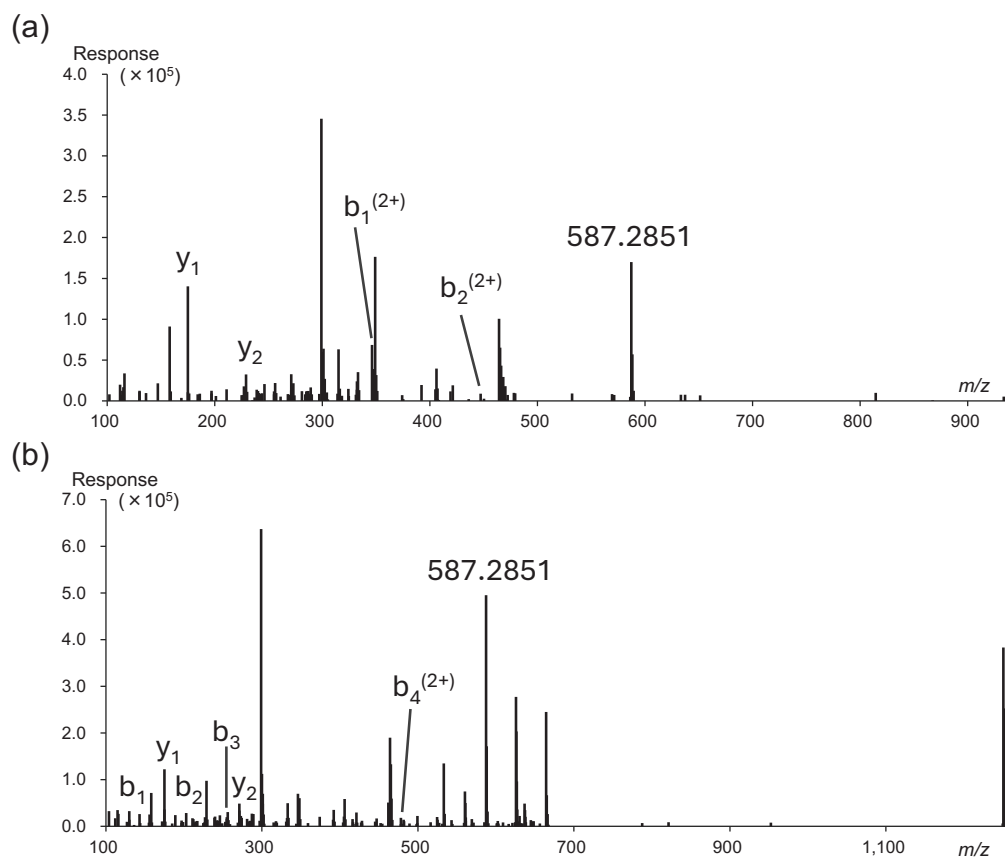


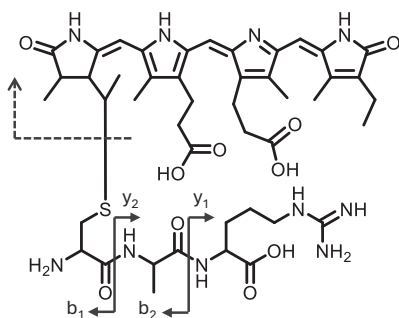
図 16. PCB 結合断片の MS/MS スペクトル

(a) $C_{PCB}LR$ 配列の MS/MS スペクトル

(b) $MAAC_{PCB}LR$ 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)

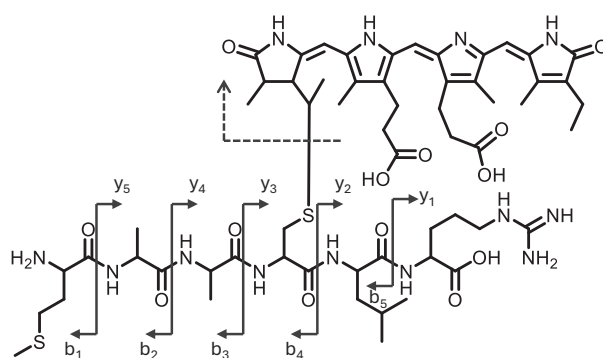


図 17. PCB 結合断片のペプチドシーケンス解析

(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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

～定量 NMR によるアントシアニンの純度評価～

研究分担者 西崎雄三 東洋大学 食環境科学部 食環境科学科 准教授

研究要旨 定量 NMR(qNMR)によるアントシアニンの絶対純度算出法について検討した。モデル試料として市販のシアニジン 3-グルコシド塩化物(Cy3G・Cl)を用い、まず測定溶媒の最適化を行った。最適化した条件下で市販 Cy3G・Cl 7 試薬の純度を qNMR により評価したところ、純度は 61.4%～93.7%と試薬間で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。さらに、qNMR 以外の手法として、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 純度へ換算する方法も検討した。しかし、本法は Cy3G⁺と Cl⁻が等量で存在する場合にのみ成立し、塩化物化過程で過剰の Cl⁻が残存すると純度を過大評価することが明らかとなった。以上より、qNMR はアントシアニンの正確な純度評価に有用な手法であることが示された。

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。橙から赤、紫色の色調を呈し、食品添加物として広く利用されている。食品添加物公定書に記載されている「ブドウ果皮色素」、「ムラサキイモ色素」、「ムラサキトウモロコシ色素」、「赤キャベツ色素」の主成分はいずれもアントシアニンである。

アントシアニンの特徴は、溶液中の水素イオン濃度(pH)に依存して分子構造が変化し、それに伴い色調が変化する点にある。中性からアルカリ性条件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取り、最も安定となる。そのため、市販標準品はフラビリウムイオン型(カチオン)に塩化物イオン(アニオン)が対イオンとして存在する塩化物として販売されている(図 1)。

しかしながら、これら市販標準品のラベルに記載されている純度は、クロマトグラフ法のピーク面積百分率に基づく相対純度であることが一般的であり、絶対純度が付与された標準品は流通していない。定量 NMR(qNMR)を用いた絶対純度評価法は確立された分析概念であるにもかかわらず、アントシアニンに適用された例は少なく、その測定条件や分析結果の妥当性について体系的な検証が行われていないことが一因と考えられる。

アントシアニンは pH に応じて多様な分子構造をとるため、qNMR による純度評価においては、測定溶媒を強酸性に調整し、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不可欠である。そこで本研究では、モデル化合物としてシアニジン 3-グルコシド塩化物(Cy3G・Cl)を用い、アントシアニンの qNMR による絶対純度測定法の確立を目的とした。

B. 研究方法

B-1) 試薬

ジメチルスルホン(DMSO₂; Cat. No. 048-33271, 質量分率 99.9%), 重水(D₂O; Cat. No. 047-34243, D 99.8%), 重メタノール(methanol-d₄; Cat. No. 138-18703, D 99.8%), 重ジメチルスルホキシド(DMSO-d₆; Cat. No. 048-34251, D 99.9 %)は, 富士フイルム和光純薬工業(株)製を使用した. 重トリフルオロ酢酸(TFA-d; Cat. No. DLM-46-10×0.75, D 99.5%)はCIL 社製を使用した. その他の試薬は, 特級または高速液体クロマトグラフ用試薬を用いた.

B-2) NMR 測定溶媒の最適化

Cy3G・Cl(長良サイエンス(株))約 200 mg を精密に量り取り, 0.1% TFA 水溶液に溶解した. この試料液を固相カラム(C18 Sep-Pac Vac 20 cc, Cat. No. WAT036925, Waters 社製)に負荷し, 0.1% TFA 水溶液で洗浄後, 0.1% TFA 含有アセトニトリルで Cy3G を溶出した. 着色画分を 50 mL メスフラスコに回収し, 0.1% TFA 水溶液で定容した. 得られた溶液から Cy3G・Cl 5 mg に相当する液量を分取し, 遠心濃縮機により溶媒を留去した後, 使用時まで冷凍保存した.

測定時には室温に戻し, 各種重溶媒 1.0 mL に溶解し, そのうち 0.6 mL を NMR 試料管に充填した. 得られた qNMR スペクトルの外観及び算出純度値を比較し, 最適測定溶媒を選定した. 検討した溶媒は表 1 の通りである.

B-3) qNMR 測定

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

測定は外部標準法 qNMR(EC-qNMR)により実施した. 外部標準には DMSO₂ を用い, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL の 3 濃度を調製した. DMSO₂ 約 2.0 mg を重溶媒 2.0 mL に溶解して 1.0 mg/mL 溶液を調製し, 段階希釈により他の濃度を得た. 各外部標準溶液 0.6 mL を NMR 試料管に充填した.

Cy3G・Cl 試料及び外部標準溶液を 25°C で 5

分間平衡化した後, シム調整及び ¹H/¹³C チューニング&マッチング(T&M)を行った. 続いてパルス幅アレイ測定を実施し, 非線形最小二乗フィッティングにより各試料の 90°パルス幅(pw90)を校正した. 校正 pw90 を反映させた条件下で qNMR 測定を行った. 測定条件は以下のとおりである.

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

FID は窓関数を適用せず, ゼロフィルによりデータポイント数を 4 倍に拡張した. フーリエ変換後, 位相及びベースライン補正を行い, ¹H NMR スペクトルを得た. シグナルを自動積分し, Cy3G・Cl の 4 位プロトン及び DMSO₂ のメチル基シグナルを用いて絶対純度を算出した.

$Molar\ Conc._A =$

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

式 1

下付き A: 分析種(Cy3G・Cl), 下付き C: 外部標準(EC, DMSO₂)

B-4) qNMR 用基準物質の安定性確認

DMSO₂(または DSS-d₆) 1 mg を精密に量り取り, 5%TFA-d 含有重メタノール/重水(9:1) 1 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を取り, NMR 試料管に移して qNMR 測定を行った. 得られた DMSO₂ (または DSS-d₆) のシグナル積分値を以下の式 2 に代入して, 1 プロトンあたりの感度係数を算出した. qNMR 測定は 3 回繰り返し, 3 日間にわたって実施した.

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

式 2

B-5) Cy3G・Cl 市販試薬の純度測定

5%TFA-d 含有重メタノール/重水(9:1)を用

いて EC-qNMR で純度測定することとした。

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。試料約 5 mg を精密に量り取り、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。

B-8) 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(Dionex™ Integriion™ RFIC, Thermo Scientific 製), トラップカラム: Dionex™ IonPac™ ATC-HC 500, 溶離液ジェネレーターカートリッジ: Dionex™ EGC 500 KOH Cartridge, カラム: Dionex™ IonPac™ AS17-C RFIC™(2 mm×250 mm), サプレッサー: Dionex™ 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-9) 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

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、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) 測定溶媒の最適化

表 1 に示す条件で EC-qNMR を実施し、Cy3G・Cl の絶対純度を算出した。あわせて、各 NMR 試料の pw90 及び T&M 時の ¹H 核反射値をプロットした。

条件 1~4 (D₂O)

D₂O 溶媒では、TFA-*d* 濃度の増加に伴い pw90 が顕著に延長した (図 2)。これは、D₂O 中で TFA-*d* が解離し、重水素イオン濃度が増加したことによる影響と考えられる。この条件下では、Cy3G はフラビリウムイオン型として存在し、他の構造に由来するシグナルは観察されなかった。

しかしながら、TFA-*d* 濃度の増加に伴い Cy3G・Cl の絶対純度は低下する傾向を示した。その要因として、試料中のイオン濃度上昇により導電性が増加し、T&M の精度が低下した可能性が考えられる。実際に、TFA-*d* 10%添加試料では T&M 反射値が約 300 であったのに対し、TFA-*d* を含まない外部標準(DMSO₂)では約 10 であった。すなわち、pw90 を校正しても、試料と外部標準間の環境差を十分に補正できていないと考えられた。

条件 1' ~4' (D₂O)

以上の結果を踏まえ、外部標準側にも Cy3G・Cl 試料と同濃度の TFA-*d* を添加して EC-qNMR を実施した。その結果、すべての条件において Cy3G・Cl 純度は約 91~93%と安定して算出された (図 2)。

条件 5~8 (methanol-*d*₄)

methanol-*d*₄ 溶媒では、TFA-*d* 添加による

pw90 の延長は D₂O ほど顕著ではなかった (図 3). TFA-*d* 無添加条件では, 6~7 ppm 付近にフラビリウムイオン型とは異なる構造由来のシグナルが観察された. 酸添加によりこれらのシグナルは消失したものの, 4 位近傍に微小シグナルが残存した. このシグナルを除外して純度を算出すると, Cy3G・Cl 純度は約 84~92%であった.

条件 9~12 (methanol-*d*₄ / D₂O (9 : 1, v/v))

methanol-*d*₄ に D₂O を 9 : 1 で混合した溶媒を検討した. D₂O の存在により TFA-*d* の解離が促進されると考えられる. その結果, 条件 5~8 で観察された 4 位近傍の微小シグナルは消失し, Cy3G はフラビリウムイオン型へ完全にシフトしたと判断された. 純度も全体として約 1%向上した (図 3).

条件 13~16 (DMSO-*d*₆)

DMSO-*d*₆ では, TFA-*d* 添加による pw90 延長は D₂O ほど顕著ではなかった (図 4). TFA-*d* 無添加条件では複雑なスペクトルを示したが, 酸添加により徐々にフラビリウムイオン型へ収束した. しかし, TFA-*d* 10%添加条件でも完全な収束は得られず, 純度は低値を示した.

条件 17~20 (DMSO-*d*₆ / D₂O (9 : 1, v/v))

DMSO-*d*₆ に D₂O を添加した条件を検討したが, TFA-*d* 10%添加でも完全なフラビリウムイオン型へのシフトは達成されなかった. ただし, 条件 13~16 と比較すると純度は約 5~10%向上した (図 4).

以上の結果より, アントシアニンの正確な定量には, 測定溶媒中の酸が十分に解離するための一定量の D₂O を含んでいることが重要であった. 推奨測定溶媒としては, アントシアニンのアグリコンも溶解可能な 5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)が挙げられた.

なお, 5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)における, qNMR 用基準物質 : DMSO₂ と DSS-*d*₆ の安定性について検討したが, いずれも分解物のシグナルはスペクトル上に観察されず, また感度係数は 1%以内の範囲で安定であった (図 5).

C-2) 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* 含有重メタノール/重水(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 2). 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 6), 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 2 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-3) 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 7), 試薬間の検量線傾きのばらつきは RSD 14.9%であった(表 3). 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

qNMR によるアントシアニンの純度測定法の

確立を目的として、アントシアニン測定溶媒を最適化し、続いて市販の Cy3G・Cl 試薬を対象に qNMR を実施した。Cy3G・Cl 試薬は試薬間で純度に明確な差が認められ、その純度差は LC/PDA における絶対検量線傾きの差と良好な相関を示した。すなわち、qNMR により算出した絶対純度を用いることで、アントシアニン試薬間に存在する品質差を補正可能であることが示された。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添加物製品の 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) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 嶋田典基, 吉田久美, 阿部裕, 杉本直樹: 定量 NMR によるアントシアニンの純度測定～測定溶媒の最適化～, 第 29 回日本食品化学学会 (2023.6).
- 2) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹: ¹H スピン

情報に基づいたクロロゲン酸類のデジタルリファレンススタンダード(dRS)の作成, 第 30 回日本食品化学学会 (2024.5).

- 3) Yuzo Nishizaki, A Case Study on Validation of External Calibration qNMR (EC-qNMR), qNMR summit 2025 (2025.6).
- 4) 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

- 1) Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen S-P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G. F: Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR Sustainability. Analytical Chemistry, 2024; 96(24): 9790-9798.
- 2) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 燃焼法による食品添加物中の窒素定量分析. 日本食品化学学会誌, 2024; 31(1) 31-34.

G. 知的財産権の出願, 登録状況 なし

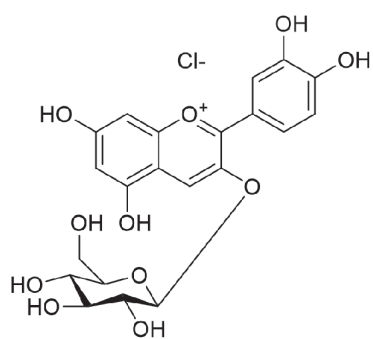


图1 Cy3G·Cl.

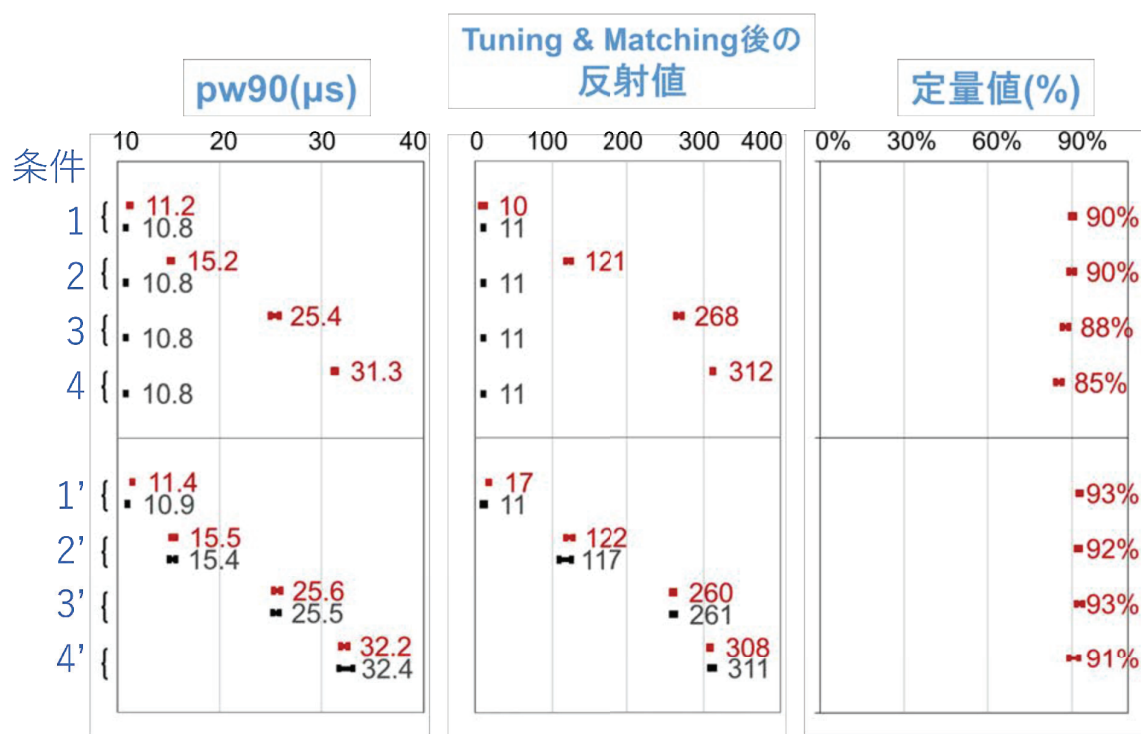


図2 EC-qNMRを条件1～4及び1～4'で実施した際のpw90, T&Mの反射値及びCy3G・Clの絶対純度.
黒のプロットは外部標準のデータ.

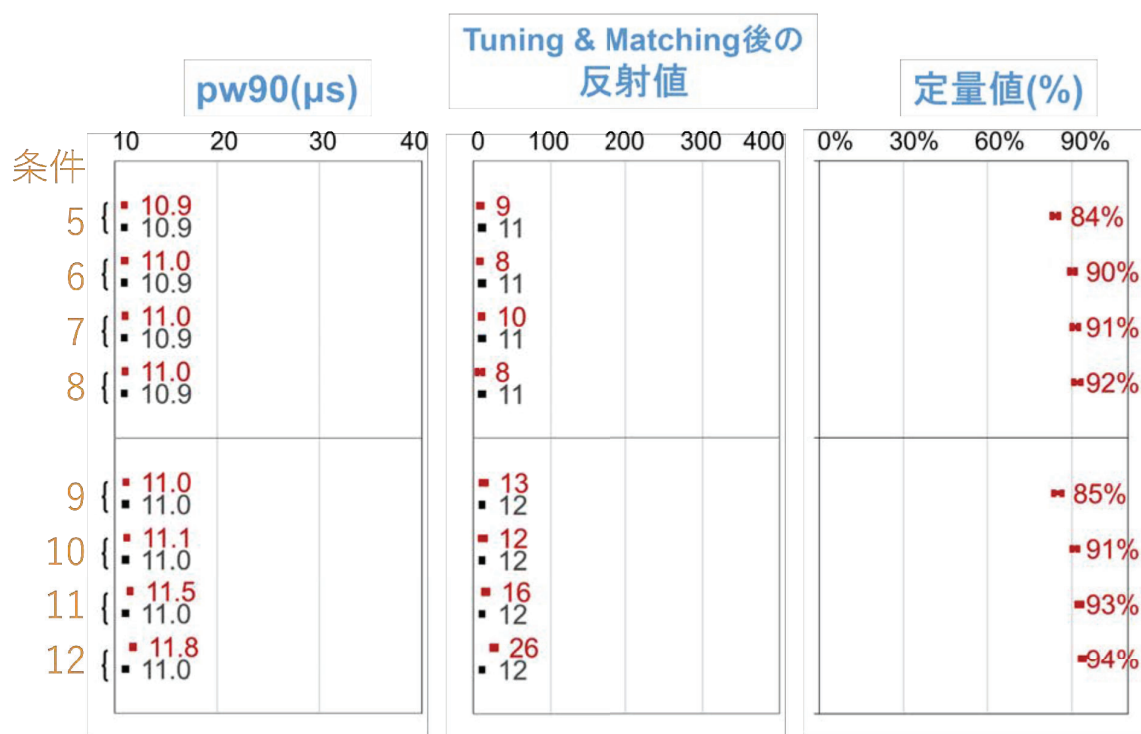


図3 EC-qNMRを条件5～12で実施した際のpw90，T&Mの反射値及びCy3G・Clの絶対純度．
黒のプロットは外部標準のデータ．

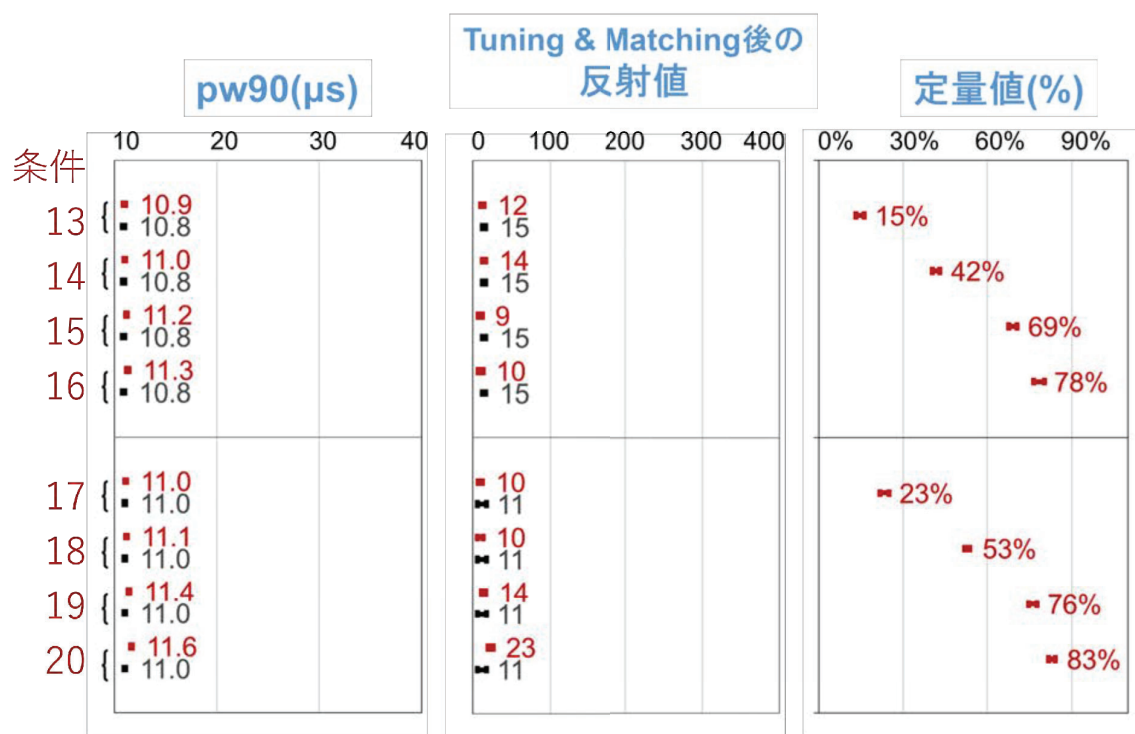


図4 EC-qNMRを条件13～20で実施した際のpw90，T&Mの反射値及びCy3G・Clの絶対純度．
黒のプロットは外部標準のデータ．

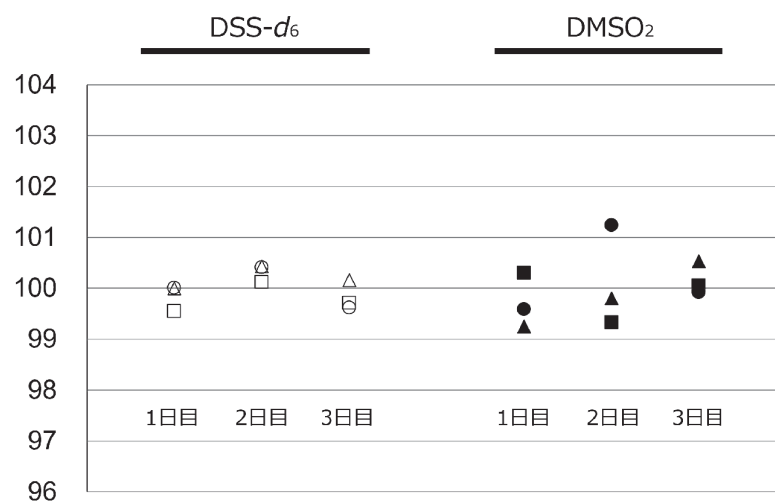


図5 5%TFA- d 含有重メタノール／重水(9 : 1, v/v)におけるDSS- d_6 とDMSO $_2$ の安定性
両物質の1プロトン当たりの感度係数を3日間にわたり記録した.

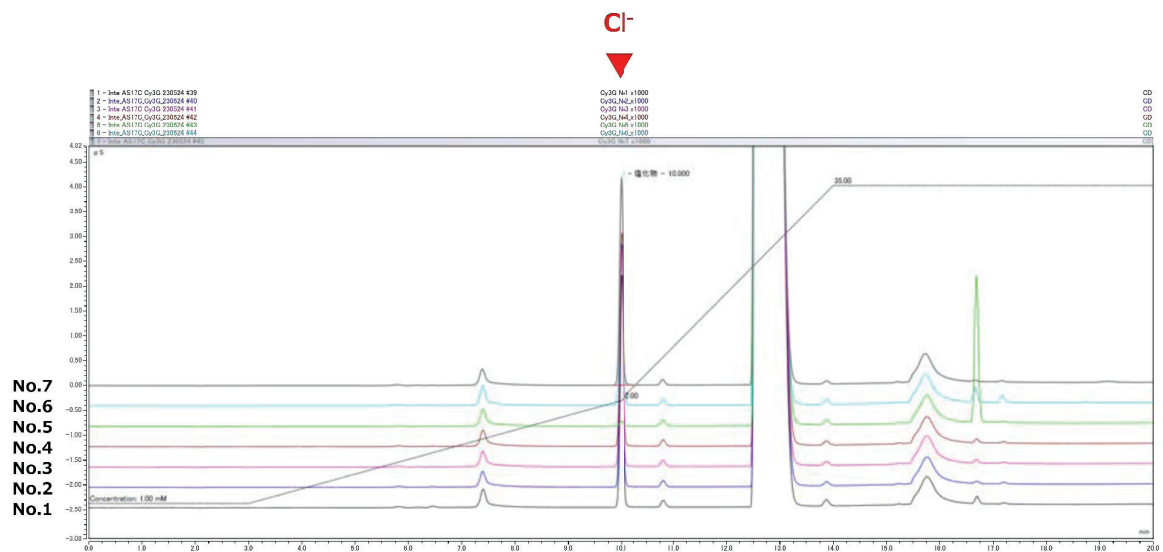


図6 IC-CDクロマトグラム

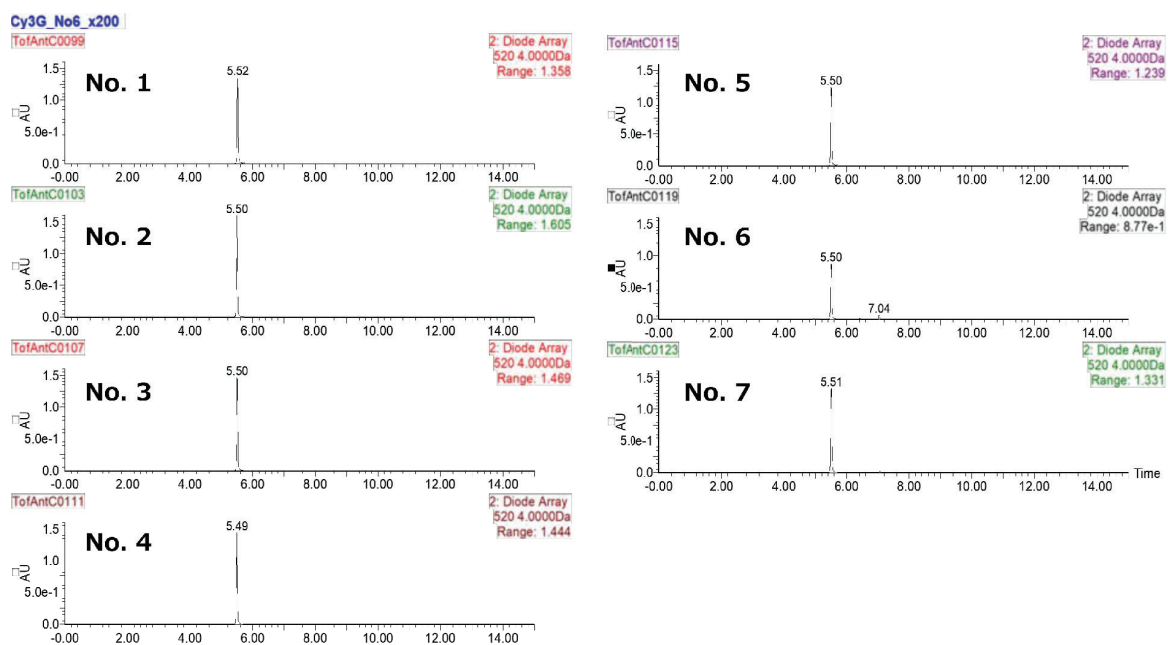


図7 LC-PDAクロマトグラム

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

表 2 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	差※2
1	≥98% (HPLC)	90.1%	0.8%	103.3%	0.4%	14.7%
2	-	93.7%	0.9%	92.9%	0.1%	-0.8%
3	≥98% (HPLC)	92.6%	1.4%	92.5%	0.3%	-0.1%
4	-	93.1%	1.3%	93.0%	0.3%	-0.1%
5	>98% (HPLC)	76.7%	1.8%	2.0%	1.9%	-97.5%
6	-	61.4%	0.4%	103.9%	0.1%	69.3%
7	≥96% (HPLC)	92.4%	0.3%	92.6%	0.7%	0.2%

試料調製 1 回, 測定 3 回 (非連続) で実施した.

※1 Cy3G・Cl ($C_{21}H_{21}O_{11} \cdot Cl$)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3 Cy3G・ClのHPLC検量線の傾き			
試薬	絶対検量線の傾き		R ²
	qNMR補正無し	qNMR補正有り	
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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

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

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

分析対象分析対象物質分析対象物質とは異なる物質を基準とし、その相対モル感度 (relative molar sensitivity, RMS) を利用する定量法 (RMS 法) が、様々な天然物中の成分の測定に用いられている。UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法では、1) RMS 決定時に必要な分析対象と同一の物質の入手も困難な場合がある、2) 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、といった課題がある。本研究では、これら二つの課題について、1) クロロゲン酸類など同一の発色団を持つ化合物群の RMS を求め、法則性はないか、2) PDA 検出器のスペクトル検出特性を調査することで、測定波長の違いによる装置間差の要因の手がかりはないか、を調査した。

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物質の 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。ひとたび一定の分析条件下での RMS 値が決定すれば、分析者は同一分析条件にて分析する限りは、この RMS 値を適用可能であるため、分析対象物質と同一の物質の定量用標品を用意する必要はない。

RMS 法の発展は、標準物質の入手が困難な天然物を取り扱う分野における成分の定量に大きく貢献している。その一方で、いくつかの課題もあり、例えば以下のようなものが挙げられ

る。

1) RMS 算出時には、試薬グレード、純度は問わないものの分析対象物質そのものが必要である。しかし、類似構造の物質は容易に入手可能でも分析対象物質の市販試薬が存在しなかったり単離精製が必要であったりする場合も少なくないこと。

2) 現在、最も RMS 法の報告が多い検出器の一つであるフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器において、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}) が一致しない場合は、一致する場合と比較して装置間差が大きいこと (装置間差低減のため、RMS は二つの物質の λ_{max} で測定することが多い)。

本研究では、これらの課題解決のため、令和5～6年度の2年間で、類似構造をもつ物質において、基準物質を同一にした際の RMS 値にどのような法則性があるかを調べた。また、令和7年度には、PDA 検出器を用いた場合に、分析対象物質と λ_{max} が異なる基準物質を用いた定量法で装置間差に影響する要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。

液を調製し HPLC 用試料溶液とした。

B-3-2) 定量 NMR による純度測定条件

NMR 測定条件は以下のとおり。

照射中心：5 ppm，観測幅：20 ppm，デジタル分解能：0.25 Hz，遅延時間：60 秒，積算回数：8 回，ダミースキップ：2 回，サンプル回転：なし，¹³C デカップリング：MPF8 (取込み時間のみ)，測定温度：25°C。

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

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

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

ここで，*molC*：モル濃度(mol/L)，*I*：シグナル面積，*H*：プロトン数，*P*：純度(%)，*MW*：分子量(g/mol)，*C*：濃度(mg/mL)，*A*：分析対象化合物，*B*：1,4-BTMSB-*d*₄ (標準)，*S*：試料。

B-3-3) HPLC 分析

条件 1) MK-4, MK-7 及び K₁

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

条件 2) クロロゲン酸類

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

B-3-4) RMS の決定

各試薬(物質)について，B-3-2)にて得られた純度を用いて検量線用標準液濃度(μmol/mL)を補正した。これらの濃度を横軸に，B-3-3)で得られたピーク面積を縦軸にとった絶対検量線を各物質について作成した。分析対象物質の絶対検量線の傾きを，基準物質の絶対検量線の傾きで除し，RMS を求めた。なお，MK-4, MK-7 及び K₁の基準物質は D4HB，クロロゲン酸類の基準物質は CA である。

B-4) PDA 検出器の吸収スペクトル特性調査

B-4-1) 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 号を一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-4-2) 測定方法及び条件

図 1 に示す装置構成で測定を実施した。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-4-3) 測定手順

B-4-1) 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、サンプリング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) RMS 法における類似構造間での法則性の調査

本研究では、1) ナフトキノン骨格を持つフェナキノン類やメナキノン類を分析対象とした RMS 値及び 2) クロロゲン酸類を分析対象とした RMS 値を算出し、類似構造間で RMS 値にどのような変化があるか調査した。本研究で対象とした物質の構造式を図 2 及び図 3 に示す。1) の分析対象物質では、ナフトキノン骨格に由来する UV 吸収帯とナフトキノンに結合した側鎖の二重結合に由来する UV 吸収帯が存在すると考えられる。MK-4、MK-7 及び K₁ において、側鎖の構造は様々であるが、ナフトキノン骨格は共通しているため、この骨格のみに由来する UV 吸収帯を測定波長として設定すれば、同一の基準物質に対する RMS は同一になることが予想された。2 台の HPLC-PDA にて、基準物質 D4HB に対する MK-4、MK-7 及び K₁ の RMS を求めたところ、いずれも 1.06 であった。このと

き、分析対象物質の測定波長は、ナフトキノン骨格に由来する 247 nm とした。ナフトキノン骨格をもつビタミン K 類は、本研究で対象とした化合物以外にも側鎖の異なる十数種類存在する。本研究により、側鎖が異なってもナフトキノン骨格由来の UV 吸収帯に影響する発色団がほかに存在しなければ、すべて同一の RMS で定量可能であることが示唆された。

では、同一の発色団の数が増えたら、単純に RMS は 2 倍になるのか？これを調べるために、2) のクロロゲン酸類を対象とした実験を行った。クロロゲン酸類は、キナ酸にカフェ酸などのケイ皮酸誘導体が結合した化合物群である。カフェ酸を基準物質として得られた RMS を表 2 に示す。

キナ酸に一つカフェ酸が結合したモノカフェオイルキナ酸(CQA)のうち、結合位置だけが異なる 3CQA、4CQA 及び 5CQA の RMS はそれぞれ 1.123、1.115 及び 1.115 であり、ほぼ同じであった。キナ酸に一つフェルラ酸が結合し FQA のうち、結合位置だけが異なる 3FQA、4FQA 及び 5FQA の RMS はそれぞれ 1.246、1.262 及び 1.502 であった。4FQA 及び 5FQA はモノカフェオイルキナ酸同様、ほぼ同じ RMS であったが、3FQA のみ大きな値となった。3FQA のみ大きな値である理由は不明であるが、ケイ皮酸誘導体のキナ酸への結合数が一つである場合、ケイ皮酸誘導体の化合物種が同じであれば、同一の RMS を用いても定量値への影響はせいぜい 1%程度と考えられた。

一方、5CQA の RMS に対する CQA 及び FQA (3FQA を除く) の RMS の比を算出したところ、FQA は CQA よりも 10%程度大きな値であった。フェルラ酸はカフェ酸の 3 位の水酸基がメトキシル基となった構造である。基準物質と 4FQA 及び 5FQA は溶出時の移動相条件が異なるため、CQA と 4FQA 及び 5FQA の RMS の違いは構造もしくは溶媒による深色効果／淡色効果によるものと推測された。クロマトグラフィーの分析条件にもよるが、ケイ皮酸誘導体の種類が異なる場合、この構造が発色団であることから、同一の RMS と見なす前に一考が必

要である。

キナ酸にカフェ酸が二つ結合した diCQA のうち、3,4-diCQA、3,5-diCQA 及び 4,5-diCQA の RMS はそれぞれ 2.175、2.268 及び 2.151 であった。5CQA の RMS に対するこれらの RMS の比はそれぞれ 1.95、2.03 及び 1.93 であった。発色団のカフェ酸の数が単純に 2 倍に増えると RMS も 2 倍になると予想していたが、3,4-diCQA および 4,5-diCQA では 1.9 倍程度とわずかに小さな値となった。分子内に立体障害があると ϵ は低下することが知られている¹⁾。3,4-diCQA および 4,5-diCQA の二つのカフェ酸はキナ酸の隣り合った炭素に結合しており、二つのカフェ酸が隣り合っていない 3,5-diCQA と比較して立体障害の影響があるのではと考えられた。溶媒系は異なるが 5CQA と 4,5-diCQA のモル吸光係数を比較した報告があり、4,5-diCQA は 5CQA の 1.9 倍程度という結果とも矛盾がなかった²⁾。

キナ酸にカフェ酸とフェルラ酸が一つずつ結合した FCQA のうち、本研究で単離精製した F_CQAF2、F_CQAF5 及び F_CQAF7 の RMS はそれぞれ 2.274、2.429 及び 2.398 であった。diCQA 同様、立体障害がもっとも小さいと思われる 3 位及び 5 位にケイ皮酸誘導体が結合した F_CQAF5 が最も大きい値を示したが、その RMS は diCQA よりも 10% 程大きく、FQA の RMS を 2 倍にした値(仮に 4FQA の 2 倍の 2.26)よりも 4% 程小さかった。これは、CQA の RMS が FQA の RMS より小さいことが影響していると考えられた。

以上の結果から、クロロゲン酸類の場合、立体障害等の影響もあり、発色団であるケイ皮酸誘導体の数が増えたからといって、その RMS が単純に 2 倍などになるとは限らないことが示された。しかし、キナ酸にケイ皮酸誘導体の一つであれば、その位置異性体はほぼ同一の RMS であること、ケイ皮酸誘導体が 2 つだから RMS も 2 倍にしたとしても定量値への影響は 10% 程度であることが示唆された。

C-2) PDA 検出器の吸収スペクトル特性調査

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波長は、各試験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 4 (A) に示す。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 4 (B)(C)に示す。

C-2-1) 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 5 に示す。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。装置 F でも、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。

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ところ(図 6)、直線性の確認に用いた測定波長において、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。

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。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が示唆された。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二つを搭載しており、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-2-2) 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

次に、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った濃度範囲 0.1～1.0 での 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たところ、差が大きい装置で 15%程度であった。また、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

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二つを搭載しており、380～400nm 付近でこの二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-2-3) 異なる二つの $\lambda_{\max}$ 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³⁾。こ

の理由としては、本研究結果からも明らかなように、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。

測定波長が同一であり同一試料を分析したとしても、そもそも複数の装置間で吸光度がばらつく、ということが、RMS 値の決定に測定波長が二つ必要であ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³⁾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、2 種の RMS 値を求めており、一つは 4-ACA の検出波長をその $\lambda_{\max}$ の一つである 273 nm としたもの(以下、 $\text{RMS}^{273/273}$)、もう一つは同じく $\lambda_{\max}$ の一つである 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、 $\text{RMS}^{273/273}$ は検出波長が一つの場合、 $\text{RMS}^{525/273}$ は検出波長が二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 3 に示す。表 3 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。

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、PDA 検出器から得られるデータは、基準物質及び分析対象物質の検出波長における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。そのため、RMS を求めた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 値の補正係数となる。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 4)。装置 A を基準の検出器とする場合、 $\text{RMS}^{525/273}$ は 0.492 として定量法に示される。仮に、 $\text{RMS}^{525/273}$ 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 $\text{RMS}^{525/273}$ 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 4)。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 法の課題のうち、2 つに注目して実験を行った。

一つ目は、類似構造をもつ物質において、基準物質を同一にした際の RMS 値にどのような法則性があるかを検証した。

まず、同一の発色団を持つ K_1 (医薬品名「フィトナジオン」)や、MK-4 同様に栄養上重要視

される MK-7 をはじめとしたほかのビタミン K でも、同一の RMS 値で定量可能か検証した。基準物質として D4HB を用いた系を確立した結果、このものに対するビタミン K 類の RMS は一律 1.06 であった。

次に、CA を基準物質としてクロロゲン酸類 12 化合物の RMS を求めた。CA を基準物質とした場合 CQA の RMS は概ね 1.12 であった。その他のクロロゲン酸類の RMS は、diCQA は CQA の約 2 倍、FQA は 1.1 倍、F+CQA は 2.1 倍程度であった。CQA 以外は単離精製が必要であったり、市販試薬があっても非常に高価であったりするものがほとんどである。本研究の結果から、同一の発色団をもつ化合物群において、一つの化合物の RMS が明らかであれば、発色団の位置や数が異なっても、他の化合物の RMS がある程度予測可能と考えられた。

二つ目の課題として、PDA 検出器を用いた場合に、分析対象物質と $\lambda_{\max}$ が異なる基準物質を用いた定量法で装置間差に影響する要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。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一つを提案した。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。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。

E. 参考文献

- 1) 脇田久伸, 増田勲, 藤原学, “可視・紫外線吸収スペクトル法および蛍光スペクトル法,” 著: 第二版 機器分析のてびき①, 化学同人, 1996, p. 131.
- 2) Kaeswurm J A H, Scharinger A, Teipel J, Buchweitz M: Absorption Coefficients of Phenolic Structures in Different Solvents Routinely Used for Experiments. *molecules*, 2021; 26: 4656. (doi: 10.3390/molecules26154656)
- 3) 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, Ohno T, Suzuki T, Togawa T, Sugimoto N: Application of the relative molar sensitivity method using GC-FID to quantify safranal in saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Nat. Med.*, 2023; 77: 829-838.
- 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. *Chem. Pharm. Bull.*, 2025; 73(7): 650–657. DOI: 10.1248/cpb.c25-00129
- 3) 増本直子: 既存添加物の品質確保のための基礎研究. *食品衛生学雑誌*, 2025; 66: J-73-J-75.

2. 学会発表

- 1) 増本直子: 相対モル感度(RMS)を用いた定量法, 室間共同試験をしてみたら. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会 (2023.12).
- 2) 中島馨, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討〜クロロゲン酸類縁体の構造と

RMS の関係～. 第 120 回日本食品衛生学会学
術講演会(2024.11).

- 3) 増本直子：既存添加物の品質確保のための基礎
研究. 第 120 回日本食品衛生学会 学術講演会
(2024.11).

表 1 PDA 検出器の吸収スペクトル特性調査で用いた装置

	検出器の型番	メーカー
分光光度計	V-650	日本分光
HPLC-PDA	Series1200 G1315B	Agilent
	Ultimate3000 DAD	Thermo
	2996	Waters
	SPD-M20A	島津製作所
	MD-4010	日本分光

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 クロロゲン酸類のカフェ酸に対する相対モル感度(RMS)

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

表 4 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

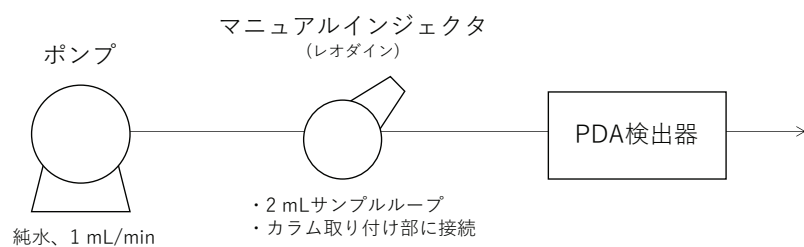


図1 PDA 検出器装置間差調査のための装置構成.

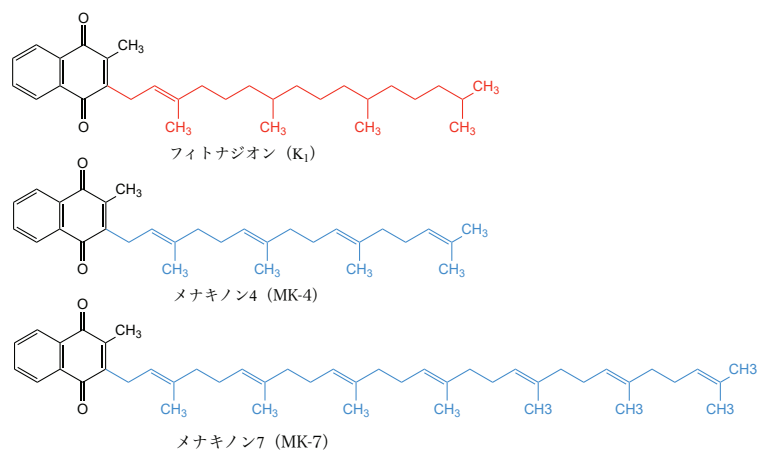


図2 本研究で D4HB に対する RMS を決定したメナキノン類及びフィトナジオン類の構造

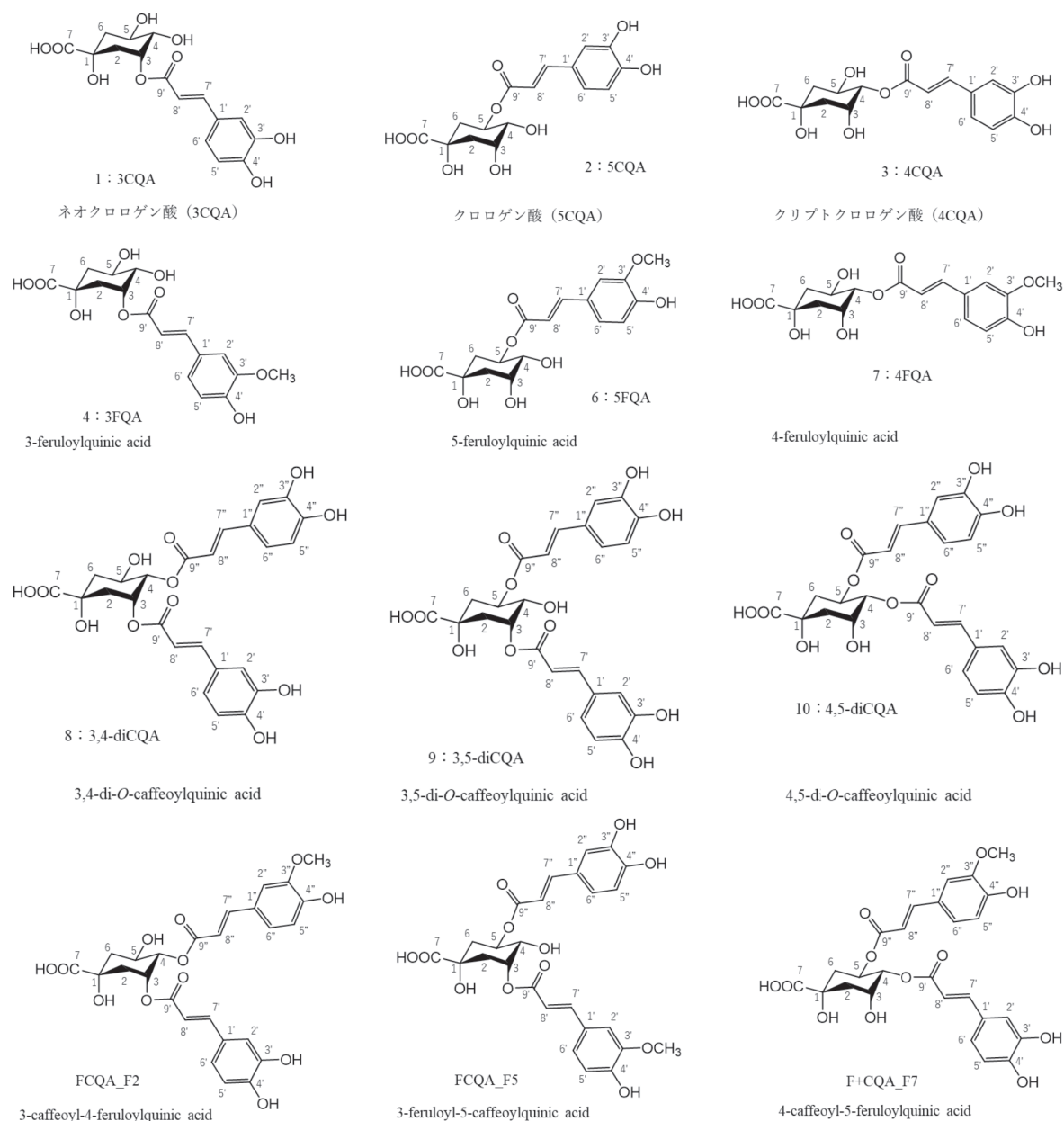


図 3 本研究でカフェ酸に対する RMS を決定したクロロゲン酸類の構造

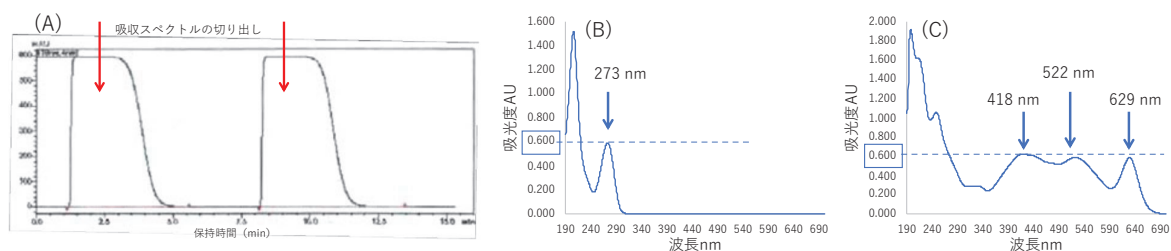


図 4 (A) HPLC-PDA クロマトグラム. ピークが飽和しているあいだは、フローセルが試験液で満たされていると見なし、赤矢印で示す保持時間付近の吸収スペクトルを切り出し、PDA 検出器における各試験液の吸収スペクトルを得た。

(B) 相対濃度 1.0 におけるカフェイン溶液及び(C) 相対濃度 1.0 における 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。

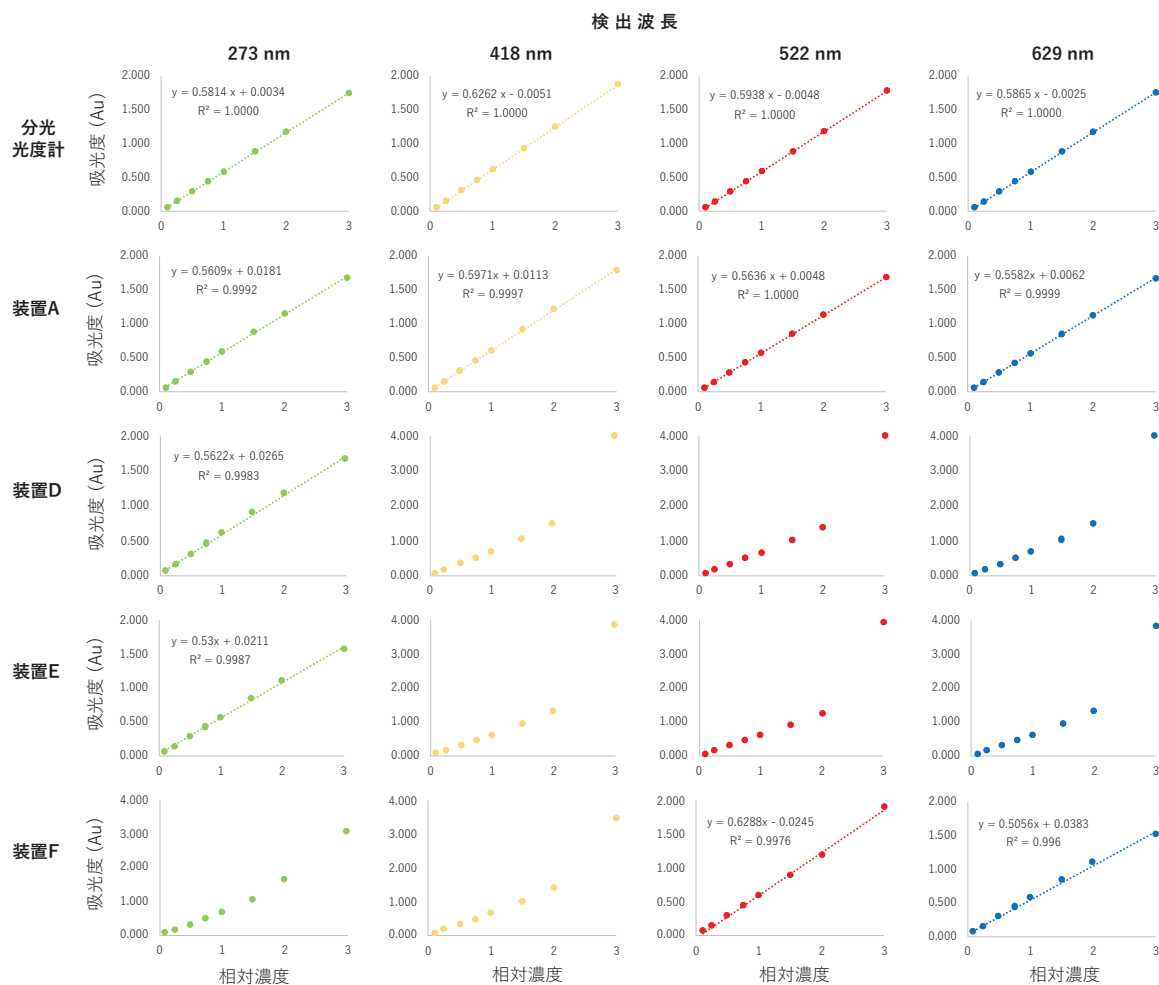


図 5 試験液の 273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm における相対濃度に対する吸光度. 装置 B, C は装置 A と同様の直線性を示したので割愛した。

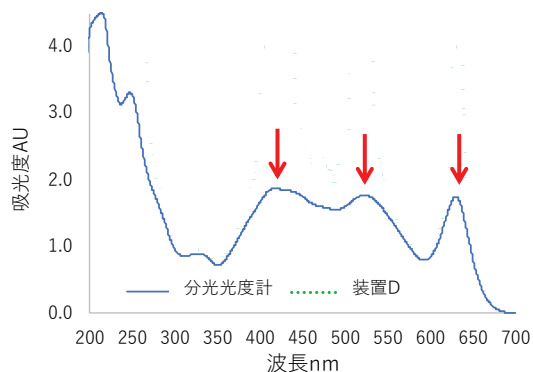


図 6 3 色素混合液(濃度 3.0)の吸光スペクトル. 分光光度計(—)及び装置 D(···)で測定したときのものを重ね書きした. 赤矢印で示す波長における吸光度を, 直線性の確認に用いた.

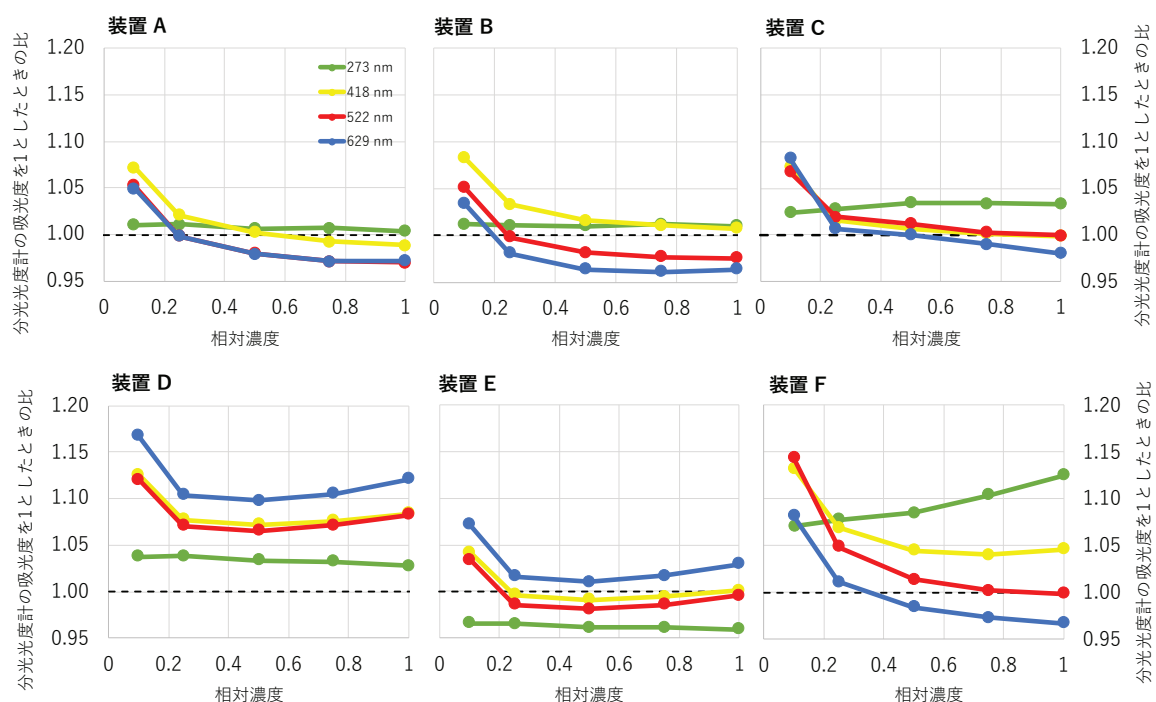


図 7 分光光度計の吸光度を 1 としたときの装置 A~F で得られた吸光度との比を, 同一装置内で検出波長をごとに比較した結果. 検出波長は, 緑色: 273 nm, 黄色: 418 nm, 赤色: 522 nm, 青色: 629 nm. 吸光度比が 1 (分光光度計と同一吸光度のライン) を黒色点線で示している.

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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

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

研究分担者 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の効率化及び精度向上を目的として、成分規格が未制定であるカシアガムを対象に、アントラキノン類分析法の確立について検討した。まず、参考とするJECFA規格におけるカシアガム中のアントラキノン類分析法の性能の検証により、加熱時間の短縮並びに抽出回数の見直しが必要であること、さらに液-液分配時のエマルジョンの生成や夾雑成分による妨害等に起因して、前処理法及びHPLC条件の改良・最適化が必要であることが明らかとなった。また、前処理における有害試薬の使用低減の観点からクロロホルムの代替となる溶媒を検討した結果、ジクロロメタン及び酢酸エチルの単独使用では化合物により回収率の低下等が認められた。そこで、ジクロロメタンによる抽出後に酢酸エチルで再抽出し、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。本法により、JECFA規格の残留基準値(0.5 mg/kg)付近のアントラキノン類の抽出に適用可能かつクロロホルムを使用しない前処理法を確立した。さらに、分析面では、¹H-qNMRに基づく相対モル感度(RMS)を用いる定量法として、正確な標準溶液濃度に基づく検量線の傾きの比から基準物質3種に対する測定対象物質5種のRMSを算出し、モデル溶液による検証に基づき、その正確性(妥当性)が判明した。以上より、JECFA規格におけるカシアガム中のアントラキノン類分析法の課題を改良した前処理法及びHPLC条件によるカシアガムの成分規格の策定に資する分析法を確立した。また、測定対象物質の定量用標品を必要としないRMSを用いたアントラキノン類分析法の有用性を実証した。

A. 研究目的

カシアガムは既存添加物名簿収載品目リストに収載されている既存添加物の一つであり、増粘安定剤として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制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碎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)。同規格の分析法(JECFA 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。しかし、JECFA 法を国内規格の試験法として適用するに当たっては、実試料への適用可能性等の検証が必要である。また、前処理で用い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、代替溶媒への転換を検討する必要がある。さらに、測定対象物質 5 種の定量用標品については、認証標準物質のような正確な純度が明示された標品の入手はできず、市販試薬をそのまま定量用標品として HPLC 分析に供した場合、定量値の信頼性を十分に担保できない。

定量用標品の入手及び定量値の正確性の問題を解決する方法の 1 つとして、近年、¹H-qNMR に基づく相対モル感度(Relative Molar Sensitivity : RMS)を用いた HPLC 法が注目を集めている⁵⁻⁸。本法は、測定対象物質及び測定対象物質とは異なる基準物質(代替定量用標品)との正確な RMS を明らかにすることにより、「基準物質」、「RMS」から測定対象物質の定量を可能とする方法である。また、RMS は、計量学的に正確な定量が可能である定量 ¹H-NMR(¹H-qNMR)に基づき算出されているため、本法により得られる定量値の信頼性も高いと考えられる。

以上の背景を踏まえ、本研究では、既存添加物の成分規格試験の効率化及び精度向上を

目的として、成分規格が未制定であるカシアガムを対象に、JECFA 法を基盤としたカシアガム中のアントラキノン類分析法の確立に関して検討した。具体的には、① JECFA 法の前処理及び HPLC 条件に関する課題の確認並びに改良、② クロロホルムを使用しない抽出法の確立を目指した代替溶媒の適用性評価、③ ¹H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の適用性の 3 点について検証した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

カシアガム(管理番号 : A105, A951, A952, C2052, C2393, C2394, 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ものを用いた。エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸及び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-dihydroxyanthraquinone ; 1,8-DAQ)は富士フイルム和光純薬(株)製を用いた。カフェイン(Product No. 56396, 認証値 : 99.9%, 拡張不確かさ : 0.4%)及びメチルパラベン(Product No. 79721, 認証値 : 99.8%, 拡張不確かさ : 0.3%)はシグマアルドリッチ(株)製の認証標準物質を使用した。その他の溶媒は高速液体クロマトグラフィー用または特級を用いた。

B-2) 装置

分析用 HPLC ポンプ : LC-20AD(低圧グラジエントユニット内蔵型/高圧グラジエント), オートサンプラ : SIL-20A, カラム恒温槽 : CTO-10ASVP または CTO-20AC, 検出器 : 紫外可視分光検出器 SPD-10A または多波長検出器 SPD-M20A, システムコントローラ : CBM-20A, 分析データ処理システム : LabSolutions(以上(株)島津製作所製), 脱気装置 : AG-34((株)フロム製)または DGU-20A3R((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検証

B-3-1) 試験溶液の調製(1)

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

B-3-2) 試験溶液の調製(2)(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)

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 3)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、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 4)。

B-3-3) 試験溶液の調製(3)(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-液抽出を行った。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 5)。

B-3-4) 試験溶液の調製(4)(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 回繰り返す、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($10000\times g$, 2分, 20°C)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6)。

B-4) 試験溶液の HPLC 分析

実試料より調製した試験溶液について、次の測定条件1または2を用い分析を行った。

■ 測定条件1(JECFA法の条件)

カラム：Develosil ODS-UG-5 ($4.6\times 250\text{ mm}$, 粒子径 $5\text{ }\mu\text{m}$, 野村化学(株)), カラム温度： 40°C , 検出波長： 435 nm (アントラキノン類), 流速： 1.0 mL/min , 移動相 A： 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液, 移動相 B：アセトニトリル, グラジエント条件： 0 min ($14\%\text{B}$) $\rightarrow 10\text{ min}$ ($14\%\text{B}$) $\rightarrow 15\text{ min}$ ($20\%\text{B}$) $\rightarrow 25\text{ min}$ ($20\%\text{B}$) $\rightarrow 55\text{ min}$ ($80\%\text{B}$) $\rightarrow 60\text{ min}$ ($100\%\text{B}$) $\rightarrow 65\text{ min}$ ($100\%\text{B}$) $\rightarrow 65.01\text{ min}$ ($14\%\text{B}$) $\rightarrow 75\text{ min}$ ($14\%\text{B}$) 【 60 min 以降はカラム洗浄及び平衡化】, 注入量： $20\text{ }\mu\text{L}$

■ 測定条件2(改良法の条件)

カラム：Unison UK-C18 ($4.6\times 250\text{ mm}$, 粒子径 $3\text{ }\mu\text{m}$, インタクト(株)), カラム温度： 40°C , 検出波長： 272 nm (カフェイン), 255 nm (MHB), 435 nm (アントラキノン類), 流速： 1.0 mL/min , 移動相 A： 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液, 移動相 B：アセトニトリル, グラジエント条件： 0 min ($10\%\text{B}$) $\rightarrow 60\text{ min}$ ($100\%\text{B}$) $\rightarrow 65\text{ min}$ ($100\%\text{B}$) $\rightarrow 65.01\text{ min}$ ($10\%\text{B}$) $\rightarrow 75\text{ min}$ ($10\%\text{B}$) 【 60 min 以降はカラム洗浄及び平衡化】, 注入量： $20\text{ }\mu\text{L}$

B-5) $^1\text{H-qNMR}$ に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の確立

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

エモジン, アロエエモジン, クリソファン酸,

レイン, フィシオン, 1,8-DAQ では, $^1\text{H-qNMR}$ により算出された純度値に基づき正確に量りとり, メタノールを加え調製したものを標準原液とした(濃度： $156\text{ }\mu\text{mol/L}$)。その後 $1\%\text{DMSO}$ 含有メタノールを用いて適宜希釈し, 各測定対象物質の標準溶液を調製した。各標準溶液の濃度範囲は $0.5\sim 15.6\text{ }\mu\text{mol/L}$ (6点濃度, 公比 2)である。

カフェインでは, カフェイン標準物質(認証標準物質)を認証値に基づき正確に量りとりし, $10\%\text{アセトニトリル}$ を用いて溶解し, 濃度 $156\text{ }\mu\text{mol/L}$ の溶液を標準原液とした。この原液について $10\%\text{アセトニトリル}$ を用いて適宜希釈を行い, カフェインの標準溶液を調製した。各標準溶液の濃度範囲は $0.125\sim 15.6\text{ }\mu\text{mol/L}$ (8点濃度, 公比 2)である。

メチルパラベンでは, メチルパラベン標準物質(認証標準物質)を認証値に基づき精密に秤量し, メタノールを用いて溶解し, 濃度 $156\text{ }\mu\text{mol/L}$ の溶液を標準原液とした。この原液についてメタノールを用いて適宜希釈を行い, MHB の標準溶液を調製した。各標準溶液の濃度範囲は $0.25\sim 15.6\text{ }\mu\text{mol/L}$ (7点濃度, 公比 2)である。

これら各種濃度の標準溶液については, 各化合物3セットずつ調製し, B-4に示した測定条件2によりそれぞれ分析した。各溶液のモル濃度を X 軸に, 検出器の応答値(ピーク面積値)を Y 軸にプロットし, Excel を用いて原点を通る($X:0, Y:0$)回帰直線を作成し, これを検量線とした。なお, 各溶液におけるクロマトグラム上のピークの S/N が 10 以上となる濃度範囲で検量線を作成した。その後, 得られた測定対象物質及び基準物質の検量線の検量線式の傾きの比(測定対象物質/基準物質)から各基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出した。

B-5-2) RMS の正確性の評価

フィシオン以外の各アントラキノン類の標準原液(濃度： $156\text{ }\mu\text{mol/L}$)及び別途調製したフィシオン溶液(濃度： $31.2\text{ }\mu\text{mol/L}$)を用い, これらを適宜採取し, メタノールを用いて希釈し

たモデル溶液 A (各測定対象物質の濃度：約 8 ～9 $\mu\text{mol/L}$) 及びモデル溶液 B (各測定対象物質の濃度：1.0 $\mu\text{mol/L}$) を調製し、RMS の正確性の評価に使用した。

C. 結果及び考察

C-1) JECFA 法における前処理法の検証

C-1-1) 現行法による実試料の分析

JECFA 法で規定されている HPLC 条件(B-4 の項、測定条件 1)について、実試料の分析において適用可能かについて検証した。まず、図 2 の調製法のうち試料採取量を 800 mg として試験溶液を調製し、HPLC に供した。その結果、図 7 に示すように、すべての試料において、アントラキノン類が溶出する 40～50 分に広範なブロードなピークが観察された。従って、現行法では、カシアガム中のアントラキノン類の正確な定量が困難であることが確認された。なお、多波長検出器が接続された HPLC で別途分析し、検出波長の変更による定量の可能性を検討したが、200～600 nm の波長範囲では、このブロードなピークに由来する夾雑成分の影響により、測定対象物質の定量が可能な検出波長を見いだすことはできなかった。

C-1-2) 加熱時間の検証

広範なブロードなピークが観察された要因として、前処理における加熱(103℃, 3.5 時間)が挙げられた。加熱前と加熱後の試料溶液の色を比較すると、加熱後では褐色に変化していた。この色やクロマトグラムの形状を考慮すると、加熱によりカシアガム中の成分を由来とするメイラード反応によるポリマーの生成が予想された。そこで、加熱時間と広範なブロードなピークの関連性を評価するため、前処理における加熱時間の検証を行った。すなわち、加熱時間を 1 時間、2 時間、3.5 時間、5 時間としてそれぞれ試験溶液を調製し HPLC に供した。なお、本検討では、試料として C2052 を用い、試料採取量は規定どおり 4 g とした。その結果、図 8 に示すように、加熱時間が短いほど、ブロードなピークは小さくなる傾向が認められた。なお、加熱時間を 0 時間とすることも考えたが、増粘

安定剤であるカシアガムは水分を含むとゼリー状なり、これを液体化するには最低でも 1 時間の加熱が必要であった。このように、HPLC 分析における広範なブロードなピークの低減並びに実試料の性状等を考慮し、加熱時間は 1 時間が適切であることが判明した。

C-1-3) カシアガム中のアントラキノン類の抽出効率の検証

次に試料の加熱時間を変更(3.5 時間から 1 時間)したことによるカシアガム中のアントラキノン類の抽出効率を検証するため、添加回収試験を行った。なお、試料として A105(試料採取量 4 g)を用い、添加濃度は JECFA 規格における含有上限値(0.5 mg/kg)の 10 倍(5 mg/kg)で検討した。その結果、表 1 に示すように、回収率が 70% を下回る化合物が複数認められた。そこで、抽出回数を 3 回へ変更し、試料として A951(試料採取量 4 g)を用いて検討したところ(図 9)、表 2 に示すように、n=1 の結果ではあるが、すべての化合物において、回収率が向上することが確認された。従って、測定対象物質の抽出効率を考慮し、抽出回数の変更の必要性が認められた。

C-1-2) エマルジョンの低減に向けた検証

上記の検証において、抽出操作(液-液分配)にて、エマルジョンが生成し、上層と下層(クロロホルム層)の分離を著しく遅延させ、分析効率を低下させることも明らかとなった。そこで、上記の検証にて使用した試料とは異なる 3 種の試料(①C2393, ②C2394, ③C2395)の試料を用いて液-液分配を行ったところ、同様に安定なエマルジョンが生成し、24 時間の静置後も層分離は達成されなかった(図 10)。この問題を解決するため、遠心分離操作(400×g, 5 分, 20℃)を適用したところ、上層と下層(クロロホルム層)の完全な二層分離が達成され、その有効性が実証された(図 10)。

C-2) HPLC 条件の検証

カシアガム 3 種(①C2393, ②C2394, ③C2395)を用いて、JECFA 法で規定されている HPLC 条件(B-4 の項、測定条件 1)の実試料の分析におけ

る適用性を検証した。検証実験では、図 3 に示す前処理法により調製した各試料溶液に、測定対象物質 5 種(エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸、フィシオン)を終濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加し、HPLC 分析を行った。その結果、図 11 に示すように、すべての試料において、測定対象物質の一部のピークの近傍に試料由来の内在性成分(夾雑成分)のピークが検出され、十分なベースライン分離が得られないことが判明した。この分離不良を改善するため、① カラムを粒子径が 3 μm である Unison UK-C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm)へ変更、② グラジエント条件の変更など溶離条件の最適化を行った(B-4 の項、測定条件 2)。最適化した条件下で、カシアガム 3 種(① C2393, ② C2394, ③ C2395)の試験溶液及び測定対象物質 5 種の混合標準溶液を分析した。その結果、図 12 に示すように、すべての試料において、測定対象物質 5 種と夾雑成分との間のベースライン分離に問題がないことが確認された。以上より、実試料における測定対象物質 5 種の分析において、JECFA 法の HPLC 条件からの変更が必要であることが明らかとなった。

C-3) 前処理におけるクロロホルムに代わる抽出溶媒の検討

C-3-1) 各抽出溶媒を単独で使用情况の抽出効率の検討

B-3-2 及び B-3-3 の項に示した操作手順に準じ、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 3 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 成分はいずれも回収率 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-3-2) 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情况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情况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-3-4 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 13 に示す。また、表 4 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 14、添加回収試験の結果を表 5 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 6 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。

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

C-4-1) 基準物質(カフェイン、MHB 及び 1,8-DAQ)に対する測定対象物質 5 種の RMS の算出

¹H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の確立について検討した。正確な RMS の算出にあたり、測定対象物質の市販試薬の正確な純度を明らかにすることは非常に重要である。そこで、これらの純度を明らかにするため、表 7 に示す測定条件による ¹H-qNMR 測定を実施した。なお、エモジン、アロエエモジン、レイン及び 1-8 DAQ では、3 種の外部標準を用いた外部標準法、クリソファン酸及びフィシオンでは、1,4-BTMSB-*d*₄を用いた内標準法により、各試薬の純度をそれぞれ算出した。その結果、エモジン、アロエエモジン、クリソファン酸、レイン、1-8 DAQ の純度は、それぞれ、99.9%、97.2%、98.3%、85.8%、95.5%と判明した。また、フィシオンは 98.1%であることが明らかとなった。

次に、基準物質に対する測定対象物質 5 種の

RMS を算出するため、各検体の $^1\text{H-qNMR}$ による純度に基づいて調製された測定対象物質 5 種及び 1,8-DAQ 並びに認証書に記載の認証値(純度値)に基づき調製されたカフェイン及び MHB 標準溶液を用いて、改良した HPLC 条件(B-4 の項, 測定条件 2)より多波長検出器が接続された HPLC で分析した(図 12, 15-17). その後、得られたデータに基づき原点を通る各検量線を作成し、その検量線式の傾きの比(測定対象物質/基準物質)から基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出した. まず、各検量線の直線性を評価したところ、測定対象物質 5 種及び基準物質 3 種の全ての検体の検量線の決定係数は 0.999 ~1.000 と良好であることが確認された. 各測定対象物質及び基準物質の代表的な検量線を図 18 及び図 19 に示す. 化合物ごとに 3 併行の検量線の傾きの平均値を算出したところ、エモジンは 13026 (検出波長: 435 nm), アロエエモジンは 13521 (検出波長: 435 nm), レインは 15669 (検出波長: 435 nm), クリソファン酸は 13260 (検出波長: 435 nm), フィシオンは 14254 (検出波長: 435 nm), カフェインは 11808 (検出波長: 272 nm), メチルパラベン は 18511 (検出波長: 255 nm), 1,8-DAQ は 12296 (検出波長: 435 nm) であることが判明した. これらの検量線の傾きの相対標準偏差は 0.1~2.4% であり、検量線の決定係数(直線性)とあわせて評価すると、これらの検量線の傾きは RMS の算出に適用可能であることが明らかとなった. そこで、得られたこれらのデータより、基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出したところ、表 8 に示す値であることが明らかとなった.

C-4-2) RMS の正確性の評価

得られた RMS の正確性を評価するため、測定対象物質 5 種(エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸、フィシオン)をそれぞれ約 8~9 $\mu\text{mol/L}$ を含むモデル溶液 A 及びそれぞれ約 1 $\mu\text{mol/L}$ を含むモデル溶液 B を各 3 セットずつ調製し、HPLC に供し(図 20)、RMS 法及び従来定量法の 1 つである絶対検量線法により得られる定量値と比較した. その結果、表 9 及び表 10 に示すように、基準物質の異なる RMS 法

と絶対検量線法にて得られた定量値はほぼ同等であった. また RSD は最大で 5.5% と精度も良好であった. 以上の結果より、基準物質及びそれに対応する RMS は正確であり、RMS 法から測定対象物質 5 種の正確な定量が可能であることが明らかとなった.

D. 結論

本研究では、成分規格が未制定であるカシアガムについて、国内規格の策定及び食品添加物公定書への収載に資することを目的に、JECFA 規格の分析法(JECFA 法)を基盤とした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、①JECFA 法の前処理及び HPLC 条件に関する課題の確認並びに改良、②クロロホルムを使用しない抽出法の確立を目指した代替溶媒の適用性評価、③ $^1\text{H-qNMR}$ に基づく相対モル感度(RMS)を用いた定量法の適用性について検討した.

まず、① JECFA 法の前処理及び HPLC 条件に関する課題の確認並びに改良に関しては、JECFA 法の性能評価により、前処理工程において加熱時間の短縮並びに抽出回数の変更が必要であることが明らかとなった. また、液-液分配におけるエマルジョン形成に起因する二層分離の遅延が確認され、遠心分離操作の導入が分離効率の改善に有効であることが実証された. さらに、実試料においては測定対象物質のピーク近傍に夾雑成分が観察される場合があり、JECFA 法の HPLC 条件では測定対象物質と夾雑成分の分離が不十分となり得ることが示唆された. この点については、粒子径 3 μm のカラムを採用し、グラジエント条件を最適化することにより、高分離能を有する分析条件が確立された.

②クロロホルムを使用しない抽出法の確立を目指した代替溶媒の適用性評価については、代替抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを検討した. その結果、両溶媒の単独使用では化合物により回収率の低下や RSD の増大が認められたため、ジクロロメタン抽出後に酢酸エチルで再抽出する段階抽出法を考案した. 本段階抽出法では、各有機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操作が、特にアロエエモジンの定量における真度及び精度の確保に不可欠であることが確認された。本法は、添加濃度 5 mg/kg において回収率 90%以上、RSD 4.8%以下を示し、JECFA 規格の残留上限値(0.5 mg/kg)相当の添加濃度においても回収率 78%以上、RSD 3.2%以下であり、当該濃度域に適用可能なクロロホルム不使用の前処理法として有効性が実証された。

③ ¹H-qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いた定量法の適用性については、正確な標準溶液の濃度に基づいて作成した各検量線式の傾きの比(測定対象物質の傾き/基準物質の傾き)より、基準物質 3 種に対する測定対象物質 5 種の各 RMS が明らかとなった。これらの RMS の正確性は、モデル溶液を用いた検証により実証され、本手法が測定対象物質 5 種の効率的かつ信頼性の高い定量に資することが示された。

以上より、本研究で確立した前処理(エマルジョン対策を含む JECFA 法の改良)及び HPLC 条件(測定条件の最適化)を組み合わせた方法は、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分析可能であり、成分規格の策定に資する分析法として有用であることが明らかとなった。また、クロロホルムを使用しない段階抽出法や RMS に基づく定量法を活用することにより、作業者の安全性及び環境負荷の低減を図りつつ、分析の効率化及び信頼性向上に貢献できると考えられた。

E. 文献

- 1) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書，日本食品添加物協会技術委員会編．東京，日本食品添加物協会(1999)
- 2) 第 5 版 既存添加物自主規格，日本食品添加物協会技術委員会編．東京，日本食品添加物協会(2021)
- 3) 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) Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Arahata D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on ¹H-qNMR for khellactone esters from *Peucedanum japonicum* root extract. Food Chemistry, 2023; 427: 136647.
- 6) Takahashi M, Morimoto K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Study on the synthesis of methylated reference and their application in the quantity of curcuminoids using single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2022; 70: 25-31.
- 7) Koyama K, Sasako H, Higashi Y, Ichikawa H, Nagoya A, Hirao T: Quantitative analysis of bisacurone in turmeric by HPLC using relative molar sensitivity. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2022; 63: 202-209.
- 8) Masumoto N, Ishizuki K, Nishizaki Y, Ohtsuki T, Kuroe M, Yamazaki T, Numata M, Matsufuji H, Sugimoto N, Sato K: Determination of mogroside V in luohanguo extract for daily quality control operation using relative molar sensitivity to single-reference caffeine. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2021; 69: 18-25.

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 回日本ゴマ科学学会大会, 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)
 - 12) 大槻崇, 神谷彩音, 中山優希, 黄奕, 松下美由紀, 森川悟, 松藤寛, TDM 対象薬など医薬品 6 種の血中濃度測定における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用, 第 6 回日本定量 NMR 研究会年会, 2024 年 11 月 (東京)
 - 13) 大槻崇, 馬場萌加, 二見櫻子, 黄奕, 遠藤悠平, 金子剣伸, 松藤寛, ¹H-qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いた大豆イソフラボン類分析法の確立, 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会, 2024 年 5 月 (東京)
 - 14) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, ¹H-定量 NMR に基づいた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニン定量について, 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会, 2023 年 12 月 (神奈川)
 - 15) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について, 食品科学工学会第 70 回大会, 2023 年 8 月 (京都)
 - 16) 3) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 相対モル感度(RMS)を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニン定量法の開発, AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会, 2023 年 7 月 (東京)
 - 17) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 健康食品中のアントシアニン定量における相対モル感度(RMS)を用いた Single-reference HPLC 法の適用について, 日本食品化学学会 第 29 回学術大会, 2023 年 6 月 (富山)

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.
- 3) Ohtsuki T, Huang Y, Kamiya A, Nakayama Y, Matsushita M, Morikawa S, Matsufuji H: Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of blood concentrations of nine pharmaceutical compounds. Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences, 2024; 10: 35.
- 4) Fuji Y, Uchida K, Akashi T, Ohtsuki T, Matsufuji H, Hirai Y M: Molecular identification of UDP-sugar-dependent glycosyltransferase and acyltransferase involved in the phenylethanoid glycoside biosynthesis induced by methyl jasmonate in *Sesamum indicum* L. Plant and Cell Physiology, 2023; 64: 716-728.

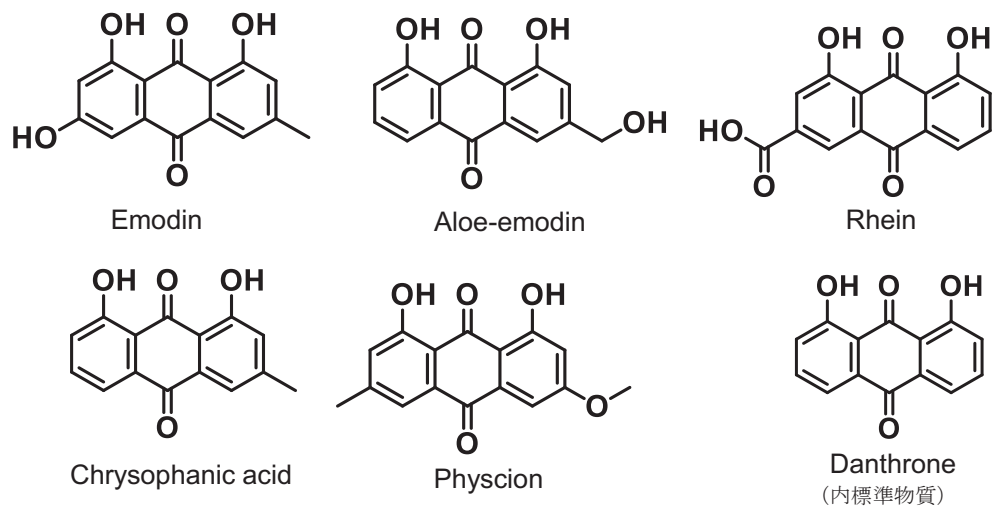


図1 JECFA 規格で規定されている分析法の測定対象物質(5種)及び内標準物質の化学構造

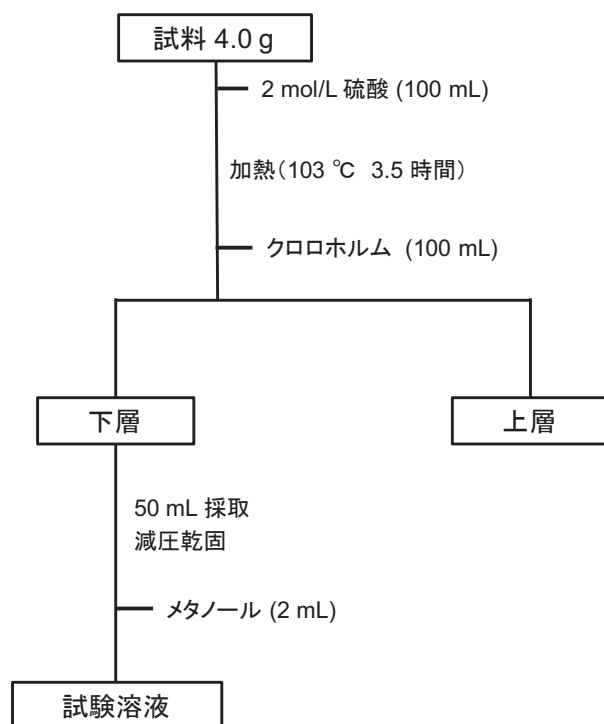


図2 JECFA Monographs におけるカシアガム規格で規定されているアントラキノン類分析法の試験溶液の調製法

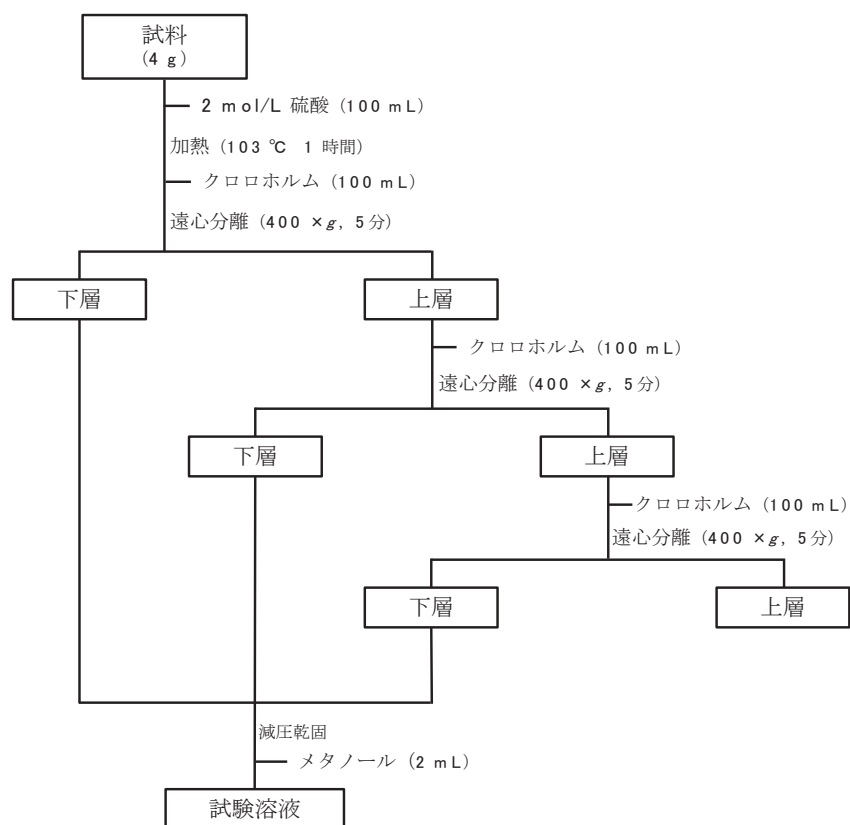


図 3 試験溶液の調製法(抽出溶媒としてクロロホルムを単独で使用する場合)

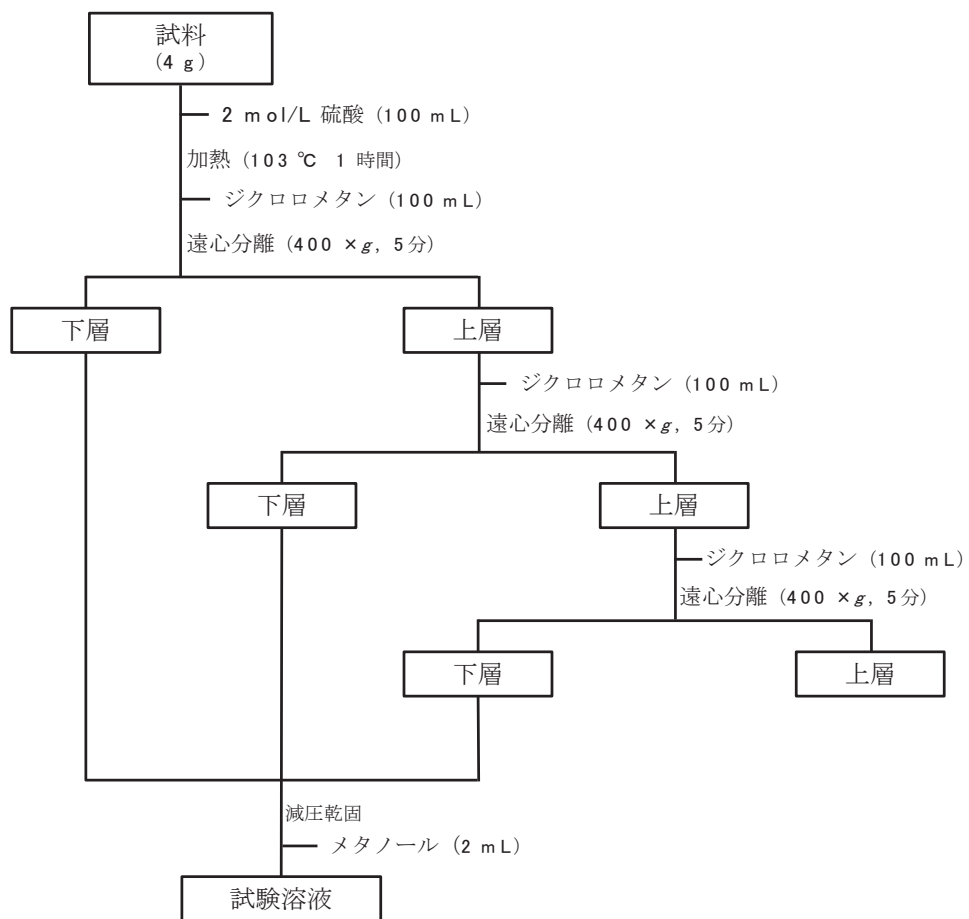


図 4 試験溶液の調製法(抽出溶媒としてジクロロメタンを単独で使用する場合)

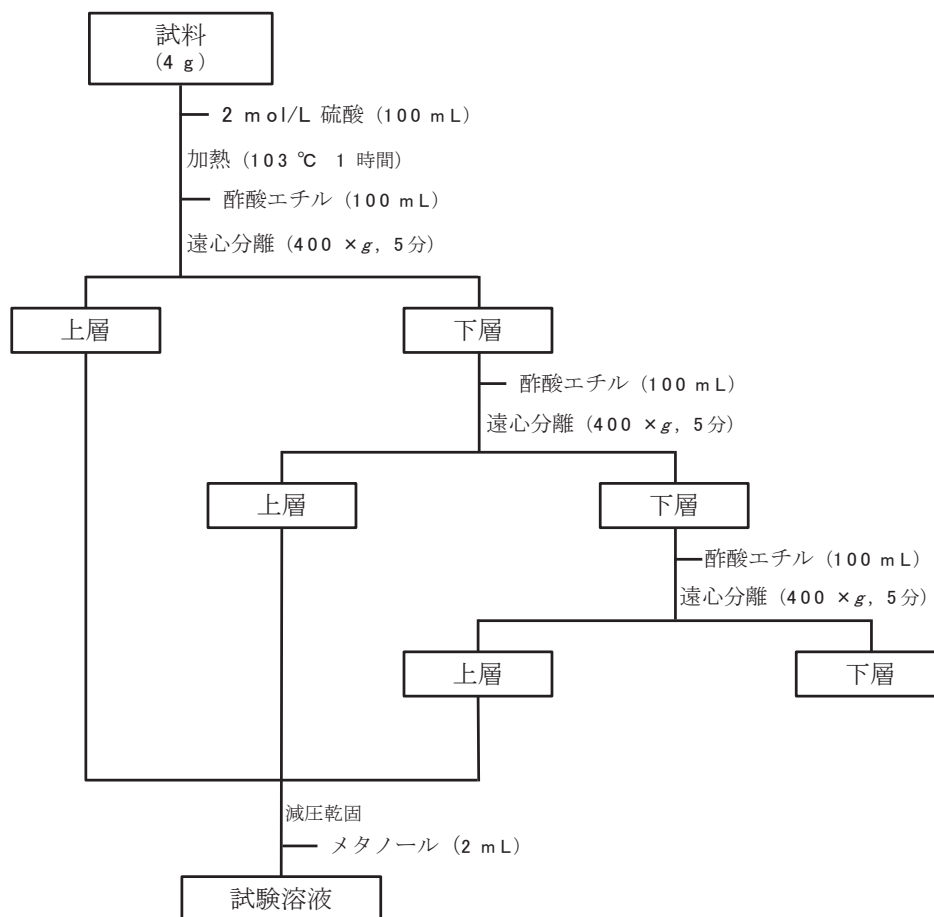


図5 試験溶液の調製法(抽出溶媒として酢酸エチルを単独で使用する場合)

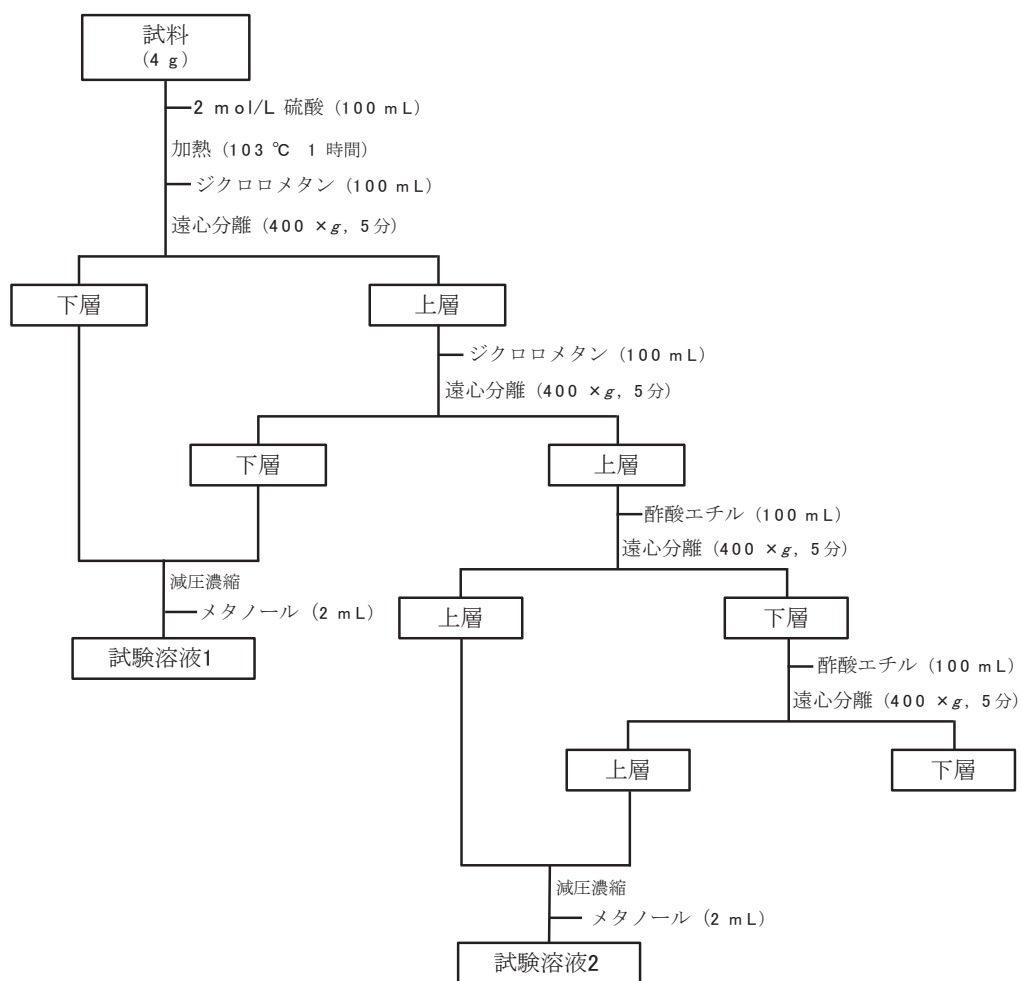


図 6 試験溶液の調製法

(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)

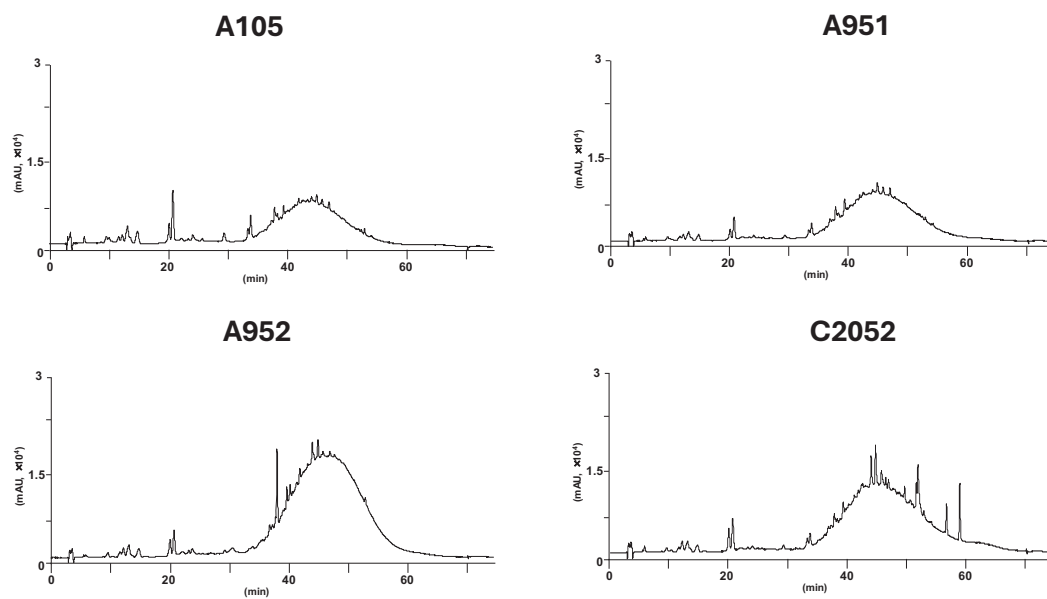


図 7 カシアガム製品 4 種のクロマトグラム

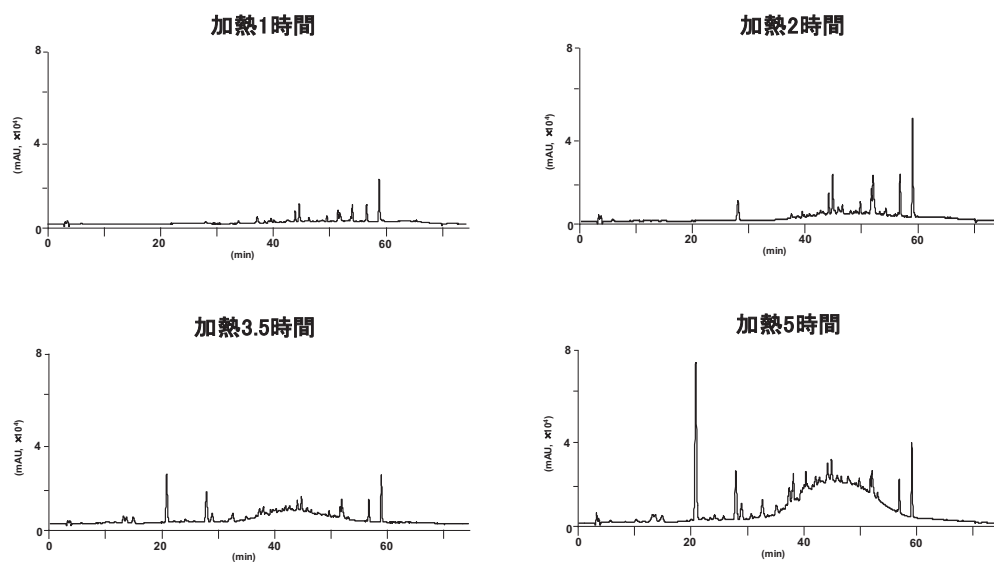


図 8 加熱時間の異なる各試験溶液のクロマトグラム

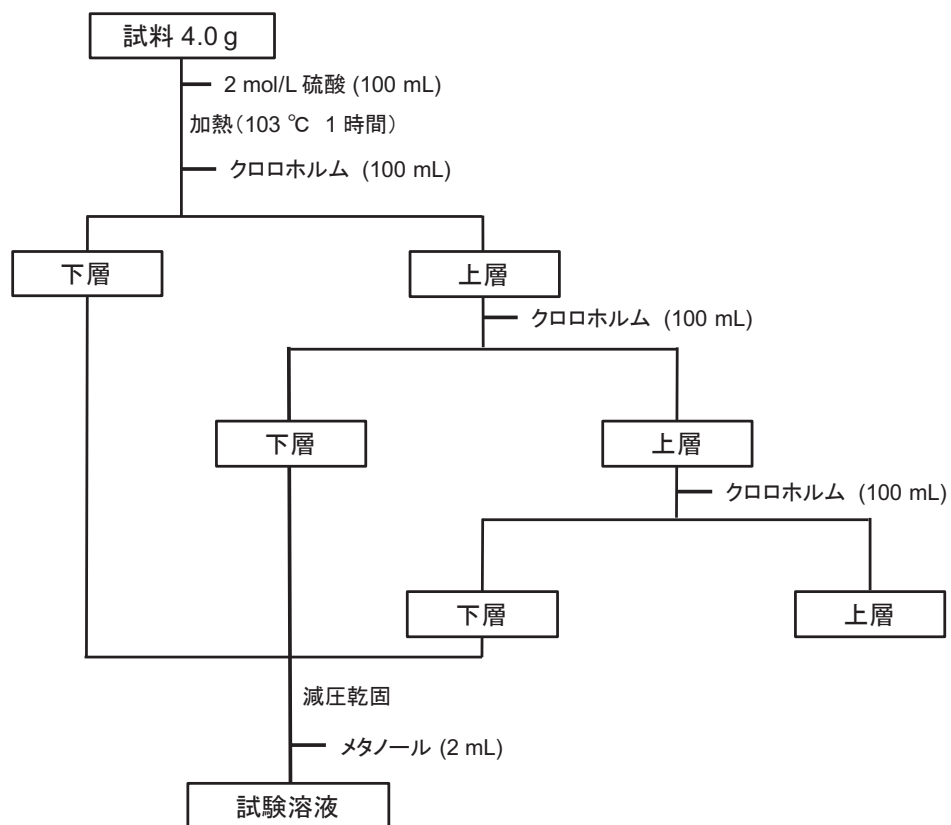
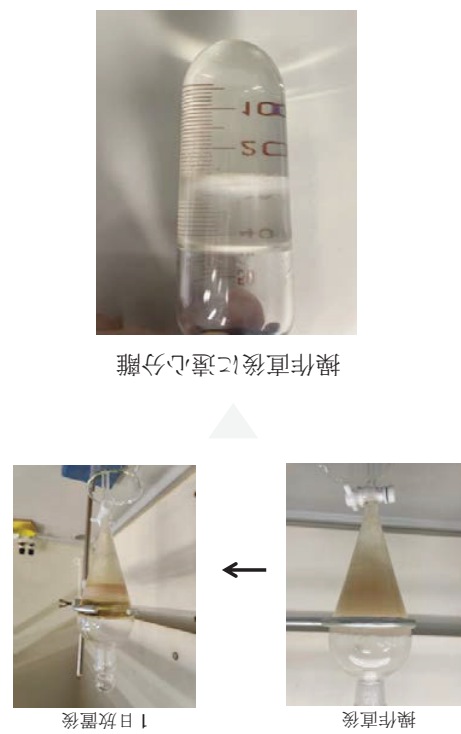


図 9 抽出回数を変更した試験溶液の調製法

図 10 液-液分配によるエマルジョンの生成並びに遠心分離の効果



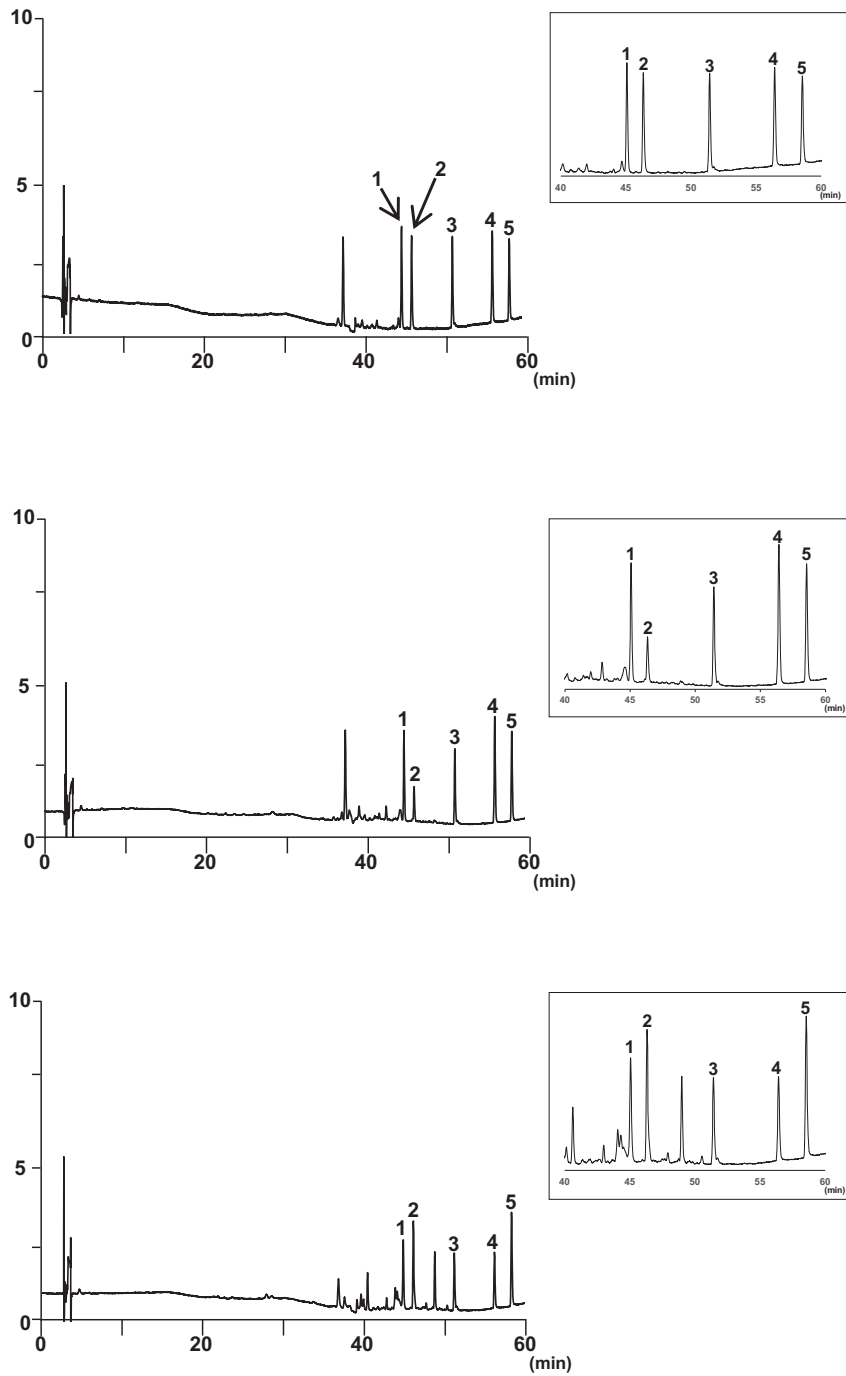


図 11 測定対象物質 5 種を添加した各カシアガム試験溶液のクロマトグラム
(測定条件 1)

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

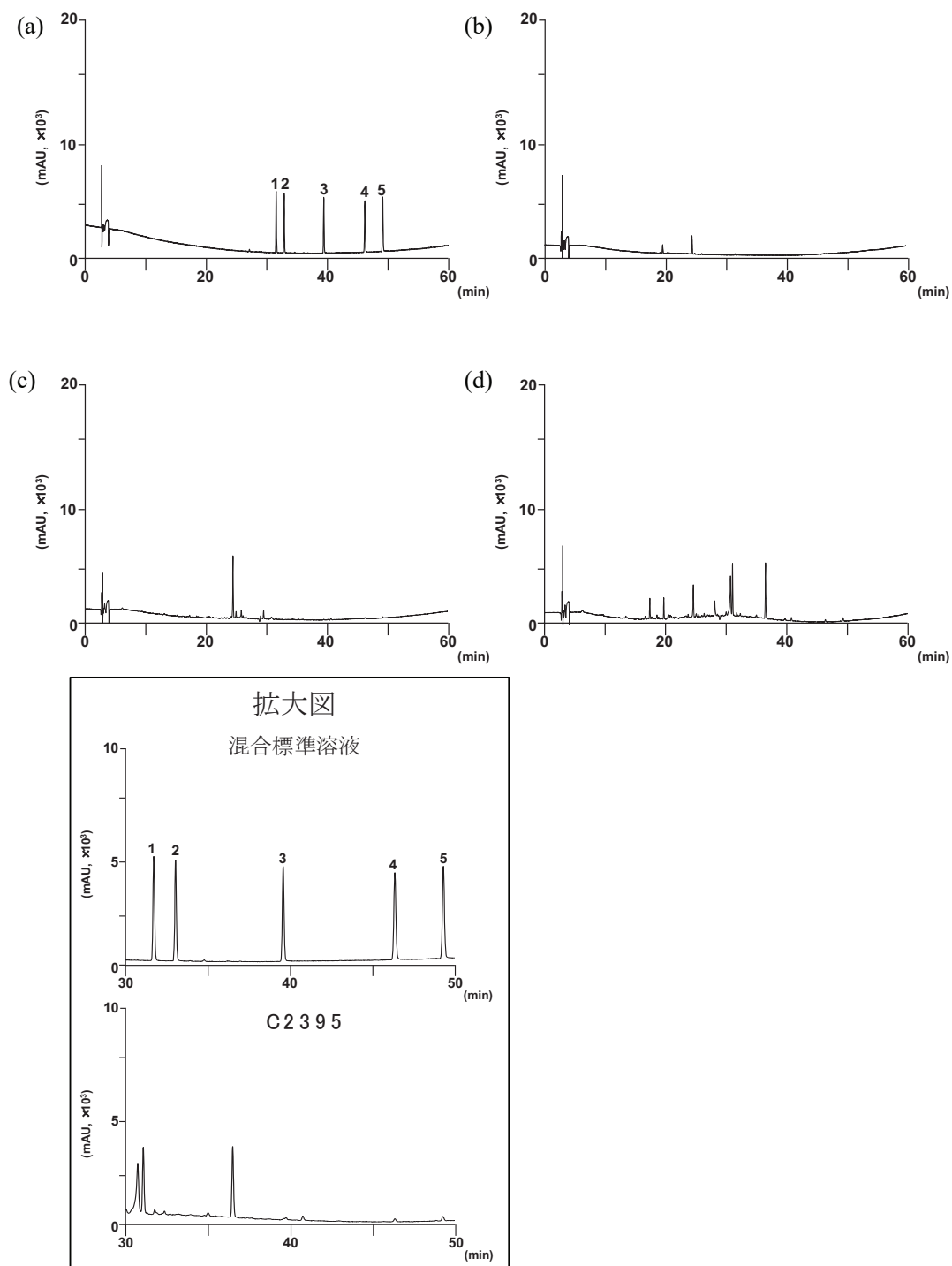


図 12 測定対象物質 5 種の混合標準溶液, 各カシアガム試験溶液及び測定対象物質

5 種を添加したカシアガム(C2395)試験溶液のクロマトグラム(測定条件 2)

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

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

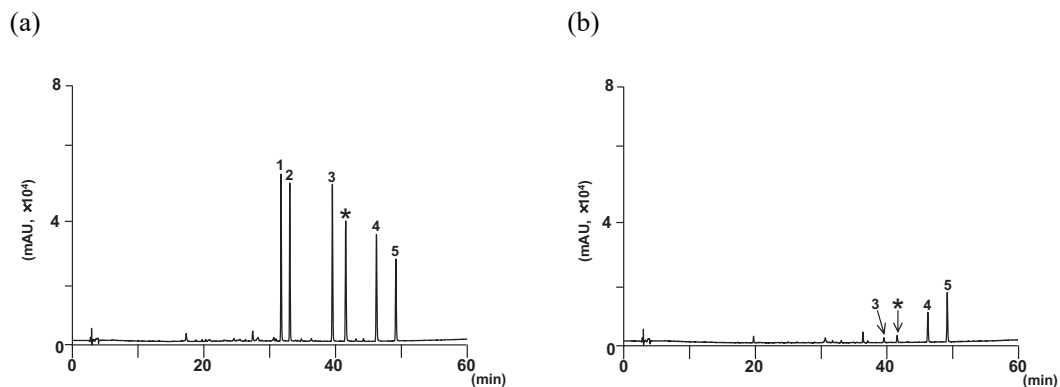


図 13 アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：5.0 mg/kg)より
段階抽出法により調製した試験溶液のクロマトグラム

(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

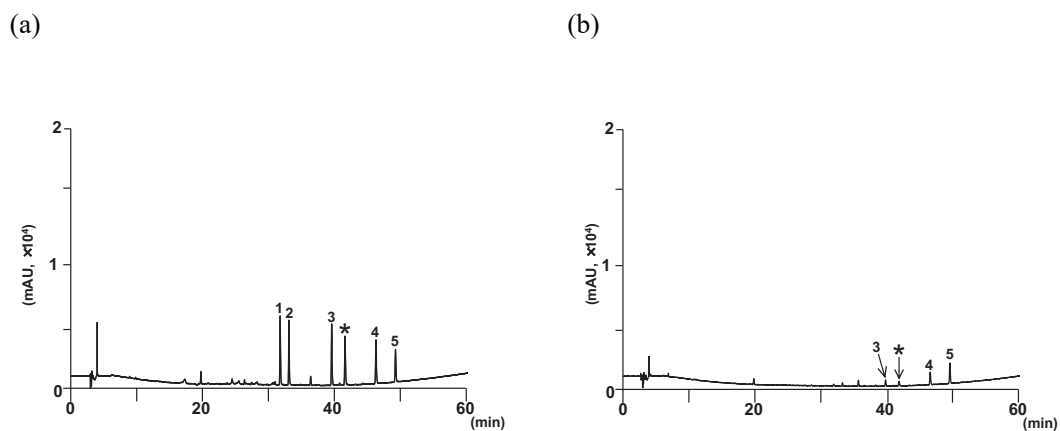


図 14 アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：0.5 mg/kg)より
段階抽出法により調製した試験溶液のクロマトグラム

(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

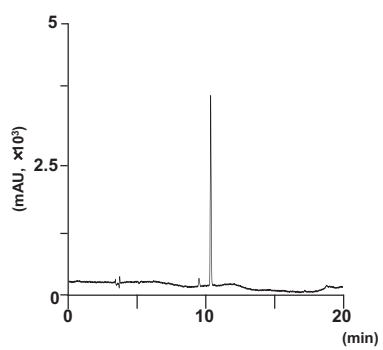


図 15 カフェインのクロマトグラム

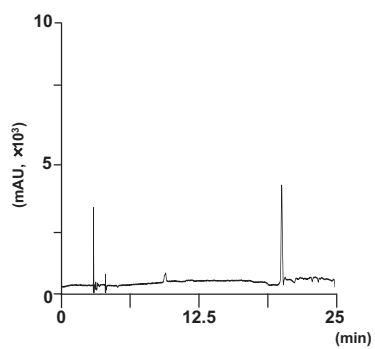


図 16 メチルパラベン(MHB)のクロマトグラム

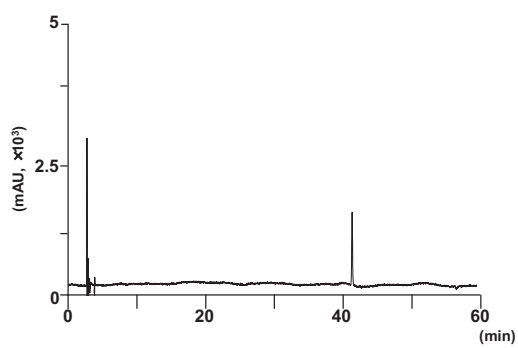


図 17 ダントロン(1,8-DAQ)のクロマトグラム

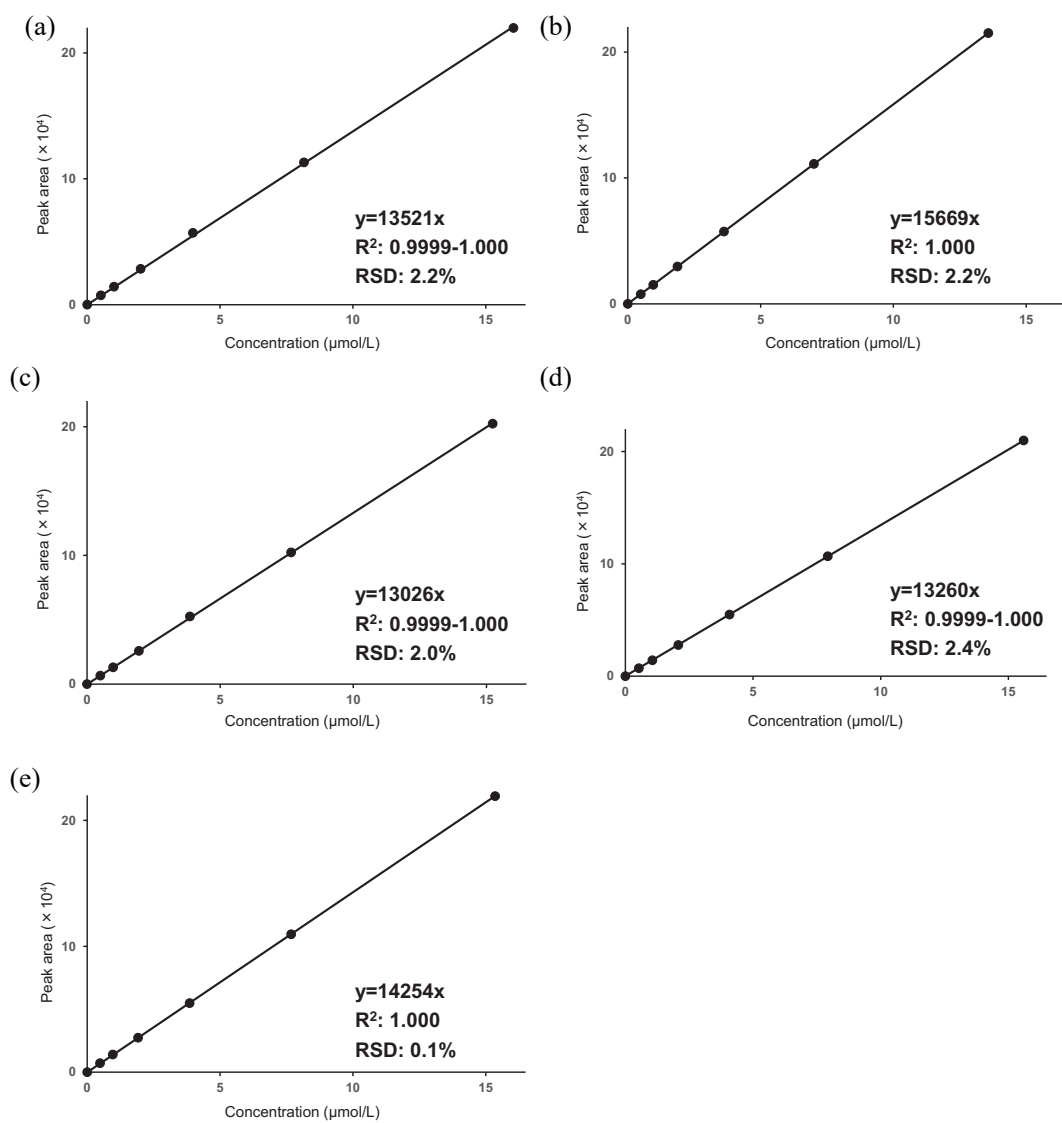


図 18 測定対象物質 5 種の検量線

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

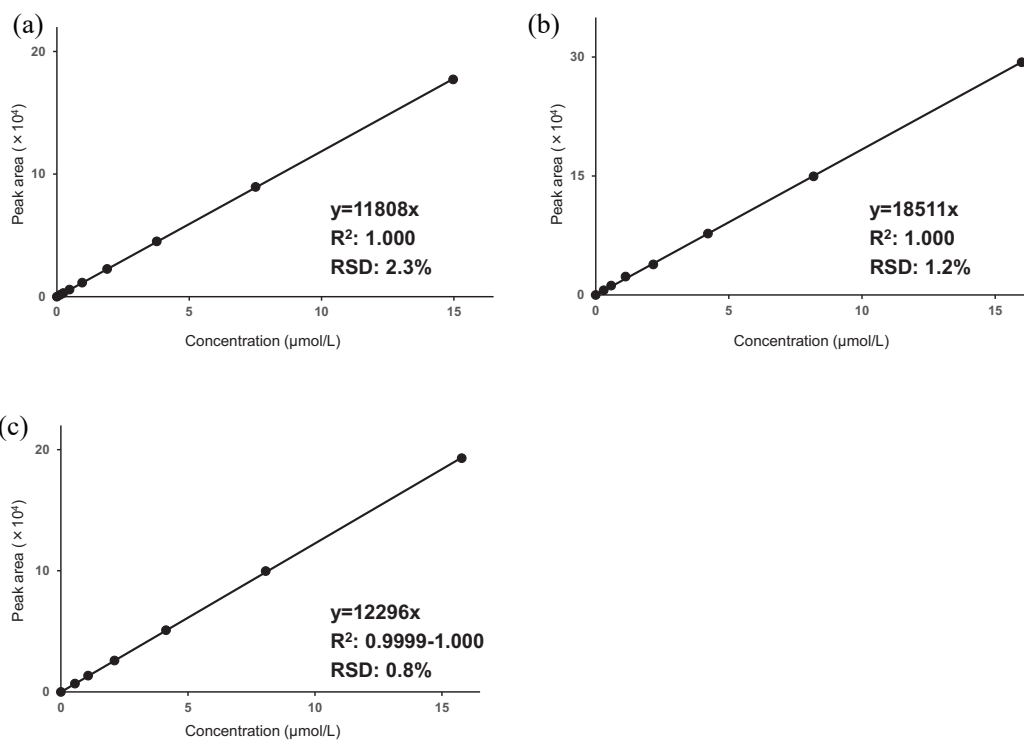


図 19 基準物質 3 種の検量線

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

表 1 測定対象物質 5 種及び 1,8-DAQ の回収率(n=4)

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

表 2 抽出回数を変更した場合の測定対象物質 5 種及び 1,8-DAQ の回収率
(n=1)

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

表 3 各抽出溶媒を単独で使した時のアントラキノン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：アントラキノンの添加されたカシアガム(添加濃度：5.0 mg/kg)

表 4 ジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使した時のアントラキノン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 5 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 6 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)

表 7 ^1H -qNMR 測定条件

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

表 8 各基準物質に対する測定対象物質の相対モル感度(RMS)

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

表 9 RMS 法と従来法(絶対検量線法)によるモデル溶液 A の各測定対象物質の
含量の比較(n=3)

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

表 10 RMS 法と従来法(絶対検量線法)によるモデル溶液 B の各測定対象物質の
含量の比較(n=3)

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

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5～7年度 総合分担研究報告書

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

研究要旨

本研究では、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た。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した。検討した分子としては、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、既存添加物であるアナトー色素の定量用SR候補化合物の誘導体として、ビスアリールマレイミド化合物の設計および効率的な合成法の確立を行った。

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を利用した定量法が設定されているものが多く、異なる装置間での定量分析における正確さを担保することは重要である。フォトダイオードアレイ(PDA)検出器は広範囲の波長域の吸収を一度の分析で検出できることから、HPLCをはじめとした分析機器の検出器として汎用的に利用されている。先述したように、PDA検出器を利用したHPLCでの定量分析において正確さを担保するためには、検出器の装置間校正ができることが重要となる。特定波長の吸収における装置間校正は、対象とする波長に対して適切な基準物質(シングルフアレンス)を個別に設定することで対応が可能であるが、PDAのカバーする広範囲の波長域において一種の化合物を使用して校正を実施できることがより望ましい。しかしながら、そのような化合物は現状規定されていない。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。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、また、アナトー色素の一種であるビキシンのシングルフアレンス化合物について、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

試薬類についてはSigma-Aldrich、東京化成工業、富士フイルム和光純薬、関東化学、ナカライテスク、Ambeed社製を使用した。「ビキシン」および「ノルビキシン」は三栄源エフ・エフ・アイ社製の製品を用いた。

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 ^{13}C -NMR スペクトルはNMR 測定用の重水素化溶媒を使用して、ECZ600R spectrometer (JEOL)にて測定した。化学シフト値 δ (ppm)はテトラメチルシラン (TMS), もしくは残留溶媒シグナルを内部標準として補正した。質量分析は LCMS-9050 (島津)にて行った。

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 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合成

本研究では、既報¹⁾の 1,4-ナフトキノ誘導体 **1** に対して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 (図 1)ことから、UV-Vis スペクトルの長波長化を目的として本分子の吸収スペクトルについての構造活性相関を行った。各構成ユニットにおいて置換位置の異なる化合物を準備し、それらを組み合わせることで多種の誘導体を効率的に合成する経路を計画した (Scheme 1-3)。置換基を導入した誘導体の合成経路においては、基本的に置換基としてアミノ基を導入した中間体化合物 **4-3** や **5-3** を調製し、1,4-ナフトキノ骨格へと導入することで化合物の合成を行うことができた。しかしながら、想定していたように反応が進行しない場合もあり、誘導体 **4** が得られると想定していた経路では、実際には化合物 **4'** が得られた (Scheme 2)。これはおそらく置換基としてのアミノ基の電子的効果によって反応性 (求核性)が上がったためと考えられる。また、誘導体 **5** の

合成では化合物 **5'** が主生成物として得られた (Scheme 3)。これは化合物の構造上、分子内環化が進行してしまうため、望みの構造 **5** が得られないものと考えられた。**1** の構造中の 2 位および 5 位にアミノ基を導入した誘導体 **1'** の合成については Scheme 4 に示す経路にて行った。

C-1-1) 化合物 **2** の合成 (各化合物の NMR データは R6 報告書に記載)

2,3-ジクロロ-5-ニトロ-1,4-ナフトキノン (200 mg, 0.74 mmol) の濃塩酸溶液 (12M, 6 mL) に塩化スズ二水合物 (829 mg, 3.68 mmol) を加え、80°C にて 1 時間加熱攪拌した。反応液を室温に冷却後、反応液を 2M 水酸化ナトリウム水溶液で pH を 10 付近に調整し、ジクロロメタンで抽出後、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン : 酢酸エチル = 90 : 10 to 66 : 34) することで、化合物 **2-1**² を暗紫色固体として得た (43 mg, 24%)。

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.50 (dd, J = 8.4, 7.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H)。

化合物 **2-1** (10 mg, 0.04 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (160 μL) に *N,N*-ジメチル-1,4-フェニレンジアミン (6.2 mg, 0.045 mmol), 炭酸ナトリウム (9.6 mg, 0.091 mmol) を加え、室温にて 12 時間加熱攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン : 酢酸エチル = 90 : 10 to 66 : 34) することで、化合物 **2** を暗紫色固体として得た (10 mg, 73%)。

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.00 (s, 1H), 7.45 (dd, J = 8.4, 8.4 Hz, 1H), 7.23 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 6.66 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 2.90 (s, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 179.9, 176.2, 152.0, 148.1, 143.6, 135.2, 133.0, 127.6, 125.8, 122.2, 115.6, 111.5, 109.5, 108.5, 40.3。

C-1-2) 化合物 3 の合成

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

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

C-1-3) 化合物 4 の合成

2-フルオロ-5-ニトロアニリン (2.26 g, 14.5 mmol) の DMF 溶液 (20 mL) に 50%ジメチルアミン水溶液 (3.7 mL, 41.0 mmol), 炭酸カリウム (3.6 g, 26.0 mmol) を加え, 130°C で 15 時間攪拌した. 反応液を室温に冷却後, 攪拌しながら氷冷水 (40 mL) を加えた. 生じた固体をろ取して, 蒸留水で洗浄後, 真空下で乾燥することで化合物 4-1 を橙色粉末固体として得た (2.53 g, 96%). 化合物 4-1 (906 mg, 5.0 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (10 mL) に二炭酸ジ-*tert*-ブチル (2.4 g, 11.0 mmol), トリエチルアミン (1.53 mL, 11.0 mmol) および 4-ジメチルアミノピリジン (30 mg, 0.25 mmol) を加えて室温にて 12 時間攪拌した. 反応液をジエチルエーテル (20 mL) で希釈し, 沈殿物をろ取してジエチルエーテルで洗浄後, 真空下で乾燥することで化合物 4-2 を淡黄色固体として得た (290 mg, 21%).

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

化合物 4-2 (140 mg, 0.5 mmol) のテトラヒドロ

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

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (23 mg, 0.10 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (1.0 mL) に化合物 4-3 (38 mg, 0.15 mmol), 炭酸ナトリウム (32 mg, 0.3 mmol) を加え, 室温にて 12 時間攪拌した. 反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウム上で乾燥後, 減圧濃縮した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン: 酢酸エチル = 80 : 20 to 25 : 75) することで, 化合物 4-4 を赤紫色非晶質固体として得た (16 mg, 24%).

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.39 (br. s, 0.7H), 8.07 (br. s, 1H), 8.06 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 2H), 7.89 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.83 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.12–7.04 (m, 2H), 6.91–6.89 (m, 2H), 6.52–6.51 (m, 2H), 4.97 (br. s, 1.3H), 2.77 (s, 6H), 2.51 (s, 6H), 1.38–1.33 (m, 18H).

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

C-1-5) 化合物 5 の合成

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

た．反応液を真空下で減圧濃縮した後，残渣をジエチルエーテルに再懸濁させて沈殿物をろ取して真空下で乾燥することで，化合物 **5-2** を黄色粉末固体として得た (500 mg, 36%).

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

化合物 **5-2** (191 mg, 0.5 mmol) の THF/DMF (1:1)(5 mL) 溶液にパラジウム炭素 (10%, 25 mg) を加え，水素雰囲気下にて 40°C で 16 時間撹拌した．反応液を室温に冷却後，酢酸エチルで希釈してセライトろ過し，濾液を減圧濃縮した．得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン：酢酸エチル = 80 : 20 to 20 : 80) することで，化合物 **5-3** を暗紫色固体として得た (88 mg, 70%).

2,3-ジクロロ-1,4-ナフトキノン (23 mg, 0.10 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (1.0 mL) に化合物 **5-3** (38 mg, 0.15 mmol)，炭酸ナトリウム (32 mg, 0.3 mmol) を加え，室温にて 12 時間撹拌した．反応液を酢酸エチルで希釈し，水，飽和食塩水で洗浄後，無水硫酸ナトリウム上で乾燥後，減圧濃縮した．残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (ヘキサン：酢酸エチル = 90 : 10 to 34 : 66) することで，化合物 **5-4** を赤紫色非晶質固体として得た (28 mg, 63%).

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.86 (br.s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.03–7.80 (m, 2H), 7.85 (ddd, J = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.78 (ddd, J = 7.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 6.46 (dd, J = 8.7, 3.0 Hz, 1H), 2.90 (s, 6H), 1.44 (s, 9H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 180.0, 176.3, 153.5, 148.9, 143.8, 134.9, 133.7, 132.9, 132.2, 130.0, 127.9, 126.5, 126.0, 19.9, 111.0, 107.5, 106.1, 79.5, 79.2, 40.2, 28.1.

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

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.18 (dd, J = 7.2, 1.2 Hz, 1H), 8.33 (dd, J = 7.2, 1.2 Hz, 1H), 8.04 (d,

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

C-2) 1,4-ナフトキノン誘導体の UV スペクトル

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

これまで 1,4-ナフトキノン誘導体の 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である **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-3) アナトー色素定量用シングルフアレンス (SR)候補化合物の探索

立命館大学薬学部 井之上博士らとの共同により、HPLC 法で使用可能な SR 候補化合物を検討した。すなわち、図 4 に示すようなコンセプトのもと、極大吸収波長 450~500 nm で検出でき、HPLC クロマトグラム上における保持時間を制御可能な化合物の設計・合成を検討した (Scheme 5)。

C-3-1) シングルフアレンス (SR)候補化合物の探索

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 **6** の吸収波長がビキシンに対する SR 化合物として有望であることが示唆された。図 5 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ンの UV-Vis スペクトルの重ね合わせを示した。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。

C-3-2) HPLC クロマトグラム保持時間の制御

本研究におけるシングルフアレンス分子の設計方針においては、UV 吸収を示す共通化合物ユニットに官能基として直鎖炭化水素基などを導入することで疎水性を変化させ、HPLC クロマトグラム上における溶出位置を制御することとした。この方針に従い、いくつかの化合物を設計・合成した。図 6 には黄色色素の骨格に対して、長さの異なる直鎖アルキ

ルアミンを導入した化合物 **RI-1** の HPLC クロマトグラム上における溶出位置を示している。この化合物においては C3~C12 までのアルキル基に応じて溶出位置が異なっており、設計通り、溶出位置を制御することができたと考えられる。しかしながら、**RI-1** においては全体的に疎水性が非常に高く、溶出も遅いことから、親水性型の分子の合成も試みた。図 7 には第 3 級アミン構造を導入した類似の化合物を中間体として、各鎖長のアルキル化試薬を反応させて第四級アンモニウム塩とすることで極性や親水性の向上を狙った分子 **RI-2** の結果を示している。第 4 級アンモニウム塩としたことで、HPLC クロマトグラム上における溶出位置は **RI-1** と比較して明らかに早くなることが分かった。一方で、HPLC チャート上において各鎖長に対応するマイナーなピーク (矢印で示している) が確認された。質量分析の結果から、これらは芳香環部分が酸化されて閉環構造となった分子であることが示唆された。これはおそらくアルキル化試薬由来のヨウ化物イオンからヨウ素が生成したことにより酸化的な閉環反応が促進されたものと予想される。この副反応については、反応系の遮光やヨウ素の補足剤の使用、またアルキル化剤の脱離基を臭素など他の元素のものを使用することで抑制できると考えられる。図 8 にはよりシンプルなコンセプトとして、水溶性分子である赤色 106 号をベースに、長さの異なるアルキルアミンを導入した例 (**RI-3**) を示している。この結果からも、本分子設計による極性や親水性を高めた RI 分子の創出も可能であることが示唆された。C-3-2-1 の項に各分子の合成について示した。

C-3-2-1) 化合物の合成

化合物 **RI-1** の合成

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

トリウム水溶液，飽和炭酸水素ナトリウム水溶液，飽和食塩水で順次洗浄後，無水硫酸ナトリウム上で乾燥，濾過し，濾液を減圧濃して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製（ヘキサン：酢酸エチル＝9：1 to 7：3）することで，**RI-1**を黄色油状物質として得た（170 mg）。

化合物 **7** の合成

2,3-ジフェニルマレイン酸無水物（125 mg, 0.5 mmol）のトルエン（1.8 mL）/酢酸溶液（0.2 mL）に，室温にて 2-（ジメチルアミノ）エチルアミン（54 μ L, 0.5 mmol）を加え，反応液を 100℃にて 15 時間攪拌した．反応液を室温まで冷却し，酢酸エチル（20 mL）で希釈し，飽和炭酸水素ナトリウム水溶液，飽和炭酸水素ナトリウム水溶液，飽和食塩水で順次洗浄後，無水硫酸ナトリウム上で乾燥，濾過し，濾液を減圧濃縮することで，化合物 **7** を黄色固体として得た（165 mg, quant.）。

化合物 **RI-2** の合成

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

化合物 **8** の合成

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

化合物 **RI-3** の合成

化合物 **8**（mg, 0.2 mmol），トリエチルアミン（56 μ L, 0.4 mmol）のジクロロメタン溶液（1 mL）に直鎖第一級アルキルアミン（C3, C5, C7, C9 および C12；それぞれ 0.04 mmol）を室温にて加えて，12 時間攪拌した．反応液をメタノールで 1000 倍希釈して HPLC に導入して反応生成物（**RI-3**）の分析を行った．

C-3-3) アナトー色素用 SR 化合物の一斉合成

本研究で検討したアナトー色素用 SR 化合物としては，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（Scheme 6）．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．一方で，各鎖長に対応するアミンの混合物と化合物 **6** 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った．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．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（図 9）。

C-3-3-1) SR 候補分子の個別合成例

化合物 **10** の合成

化合物 **9**（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℃にて 3 時間攪拌した．反応液を 0℃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 **10** 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 **10** (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 **10** (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 ($\phi = 2$ 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 OBDTM (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 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

C-3-4) アナトー色素の調製

本研究において定量対象とした既存添加物のアナトー色素であるビキシシ (*cis*-Bx)およびノルビキシシ (*cis*-NBx)にはそれぞれ *trans* 異性体が存在する。これらを測定対象とするため、*cis* 体の Bx および NBx それぞれを異性化させることで *trans* 体を調製することを試みた。得られた化合物は共同研究者に提供した。以下に方法を記載した。

C-3-4-1) ビキシシの異性化による *trans*-ビキシシへの変換

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

C-3-4-2) ノルビキシシの異性化による *trans*-ノルビキシシへの変換

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

HPLC 分析条件 (図 10)

(HPLC conditions)

Column : TSKgel ODS-100Z (C18, 4.6 x 150 mm, 5 μm)(Tosoh), flow rate : 1 mL/min, Detection :

UV460 nm, column temp. : 40°C, Mobile phase; 0.1vol% AcOH in H₂O/ 0.1vol% AcOH in MeOH = 10 / 90, v/v.

D. 結論

PDA 校正用の標準物質の開発においては、長波長域に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。基の分子である **1** の 2 位にニトロ基を有する誘導体において UV スペクトルの長波長化がみられた。また、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が、500–700 nm 付近の吸収強度が増加した。この誘導体 **1'** は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がみられたことから、500–700 nm 付近の吸収強度の増加は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., 2020; 11(23): 5959-5968 .

F. 研究発表

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 永津明人, 杉本直樹, 井之上浩一: デザイン Single reference-HPLC 法によるアナトー色素のビキシシ及びノルビキシシの分析. AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会 (2023.7).

F-1-2) シンポジウム等

なし

F-2) 論文発表

F-2-1) 論文等

なし

F-2-2) 総説等

なし

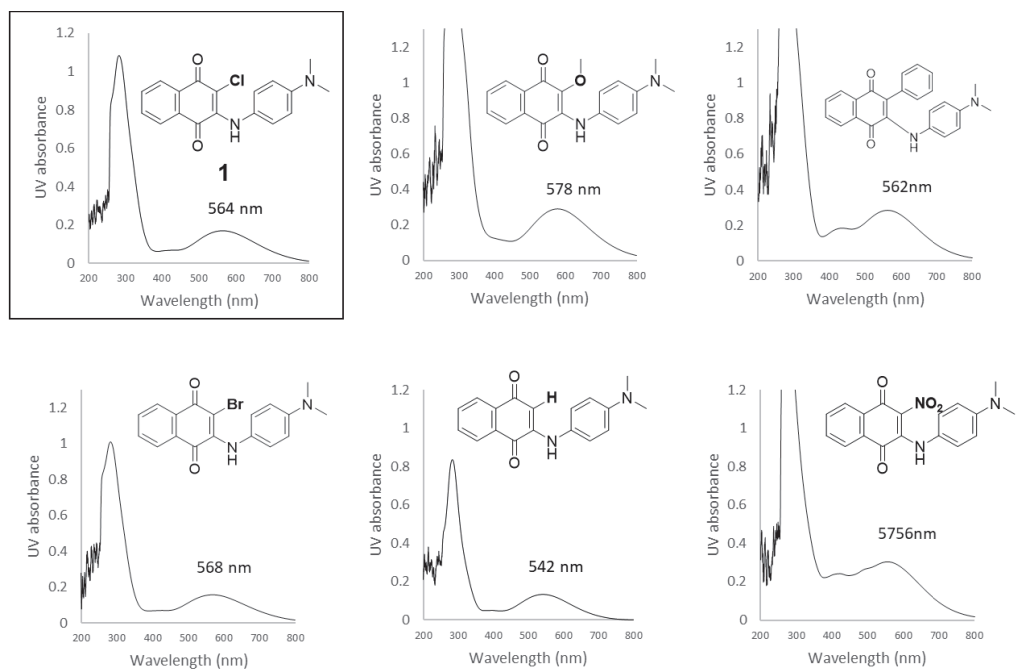
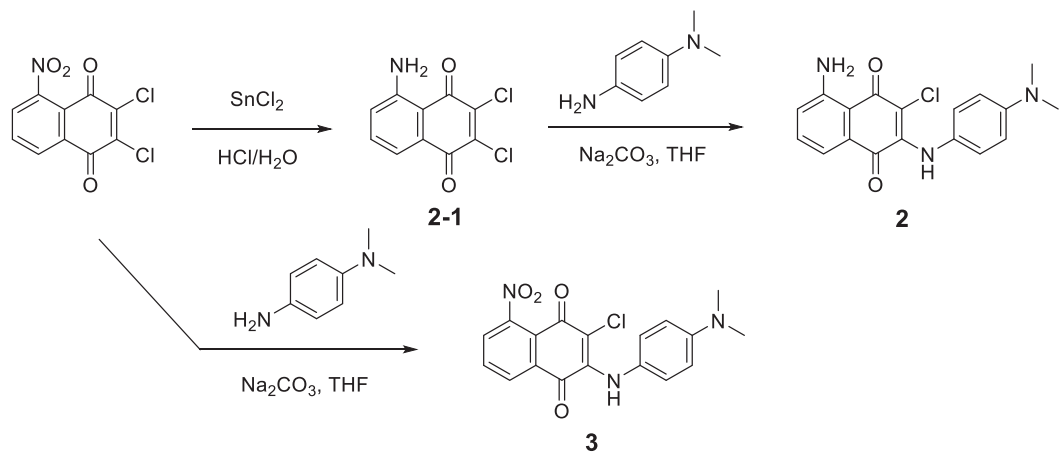
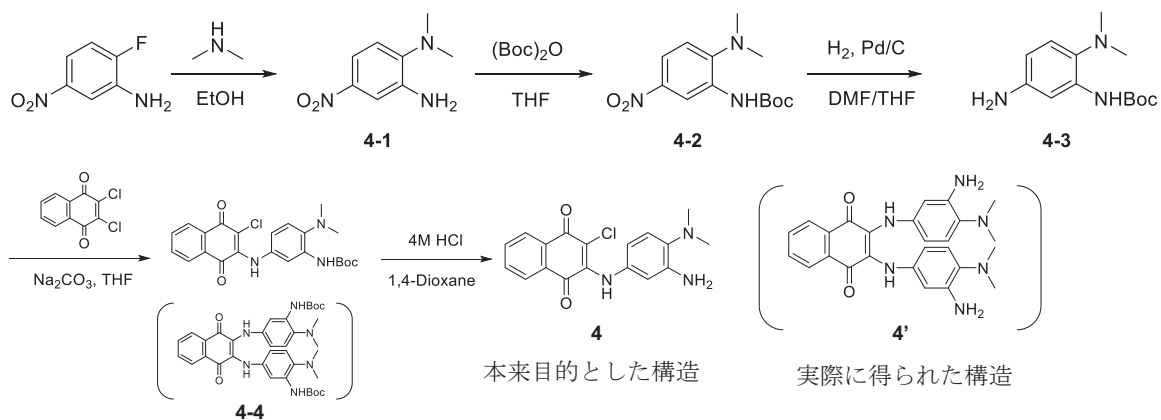


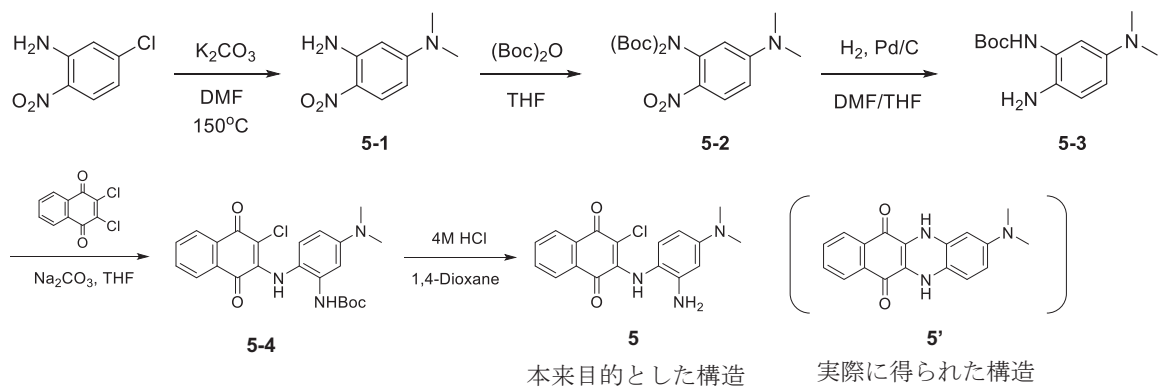
図 1. 1,4-ナフトキノ誘導体の UV-Vis スペクトル (1)



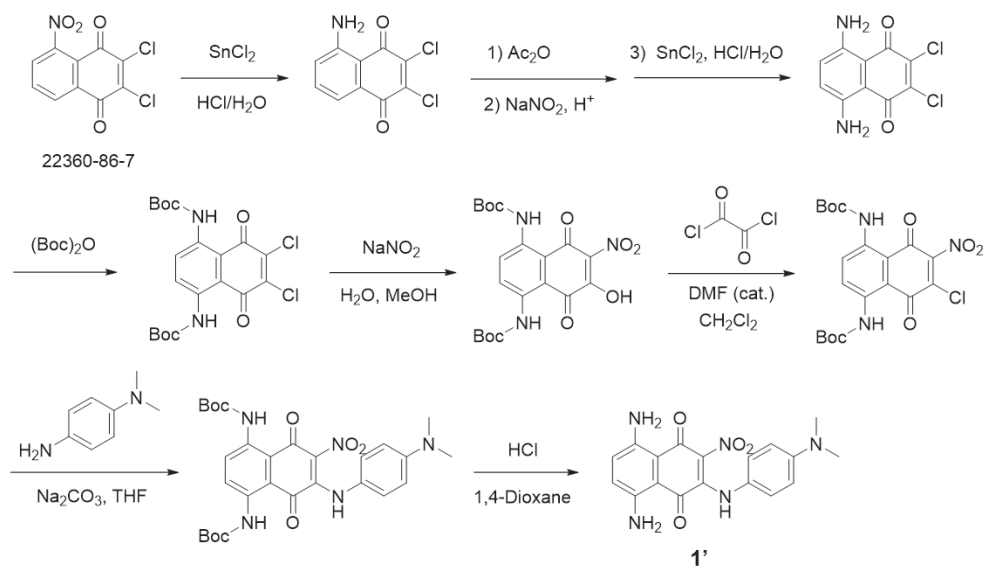
Scheme 1. 1,4-ナフトキノ誘導体 **2** 及び **3** の合成



Scheme 2. 1,4-ナフトキノン誘導体 **4** の合成



Scheme 3. 1,4-ナフトキノン誘導体 **5** の合成



Scheme 4. 1,4-ナフトキノン誘導体 1' の合成

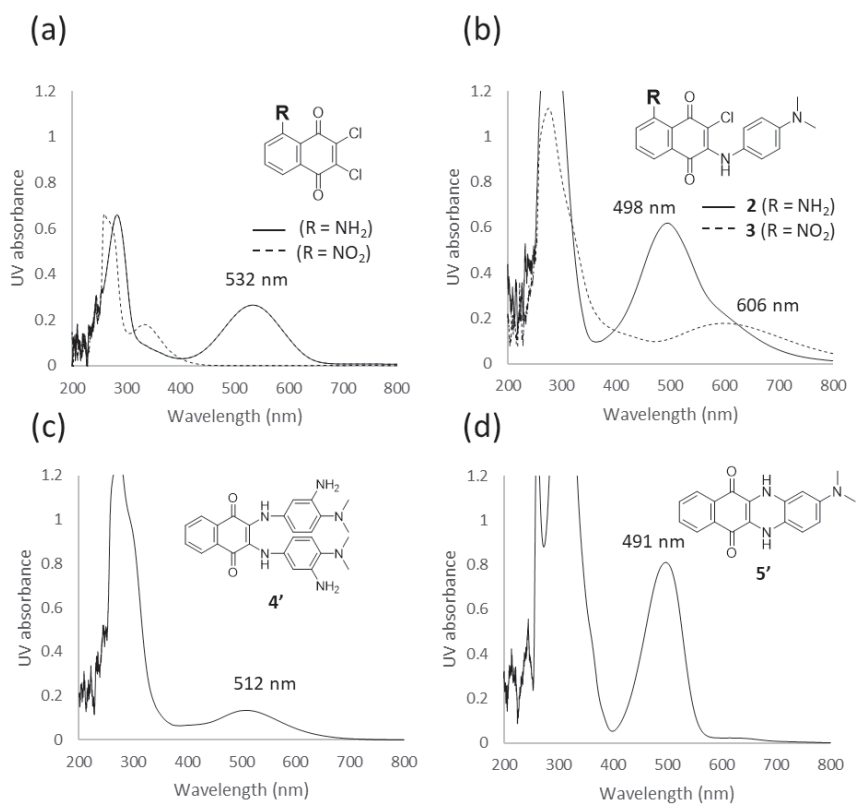


図 2. 1,4-ナフトキノン誘導体の UV-Vis スペクトル (2)

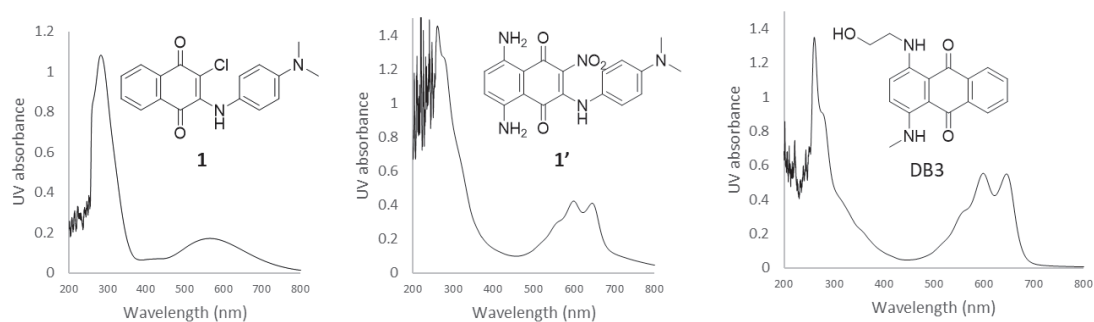


図 3. 1,4-ナフトキノン誘導体および青色 3 号(DB3)の UV-Vis スペクトル

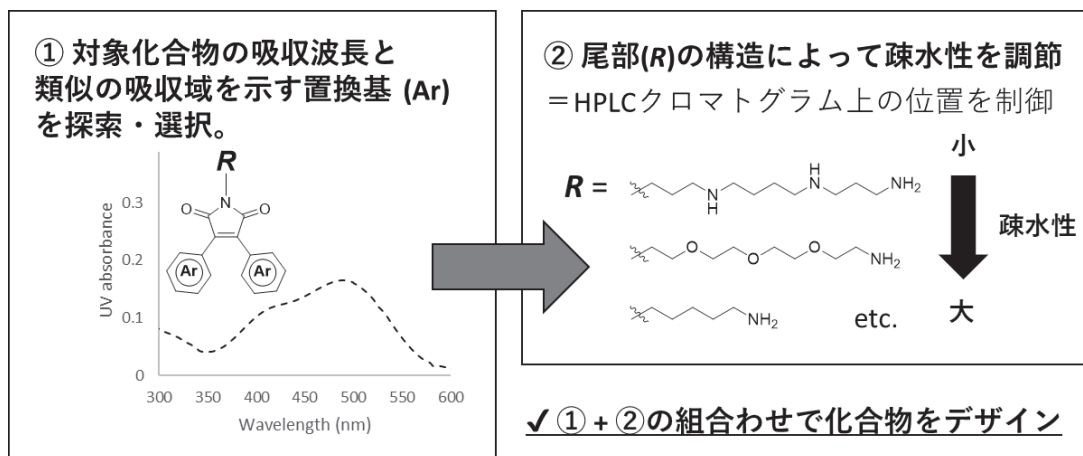
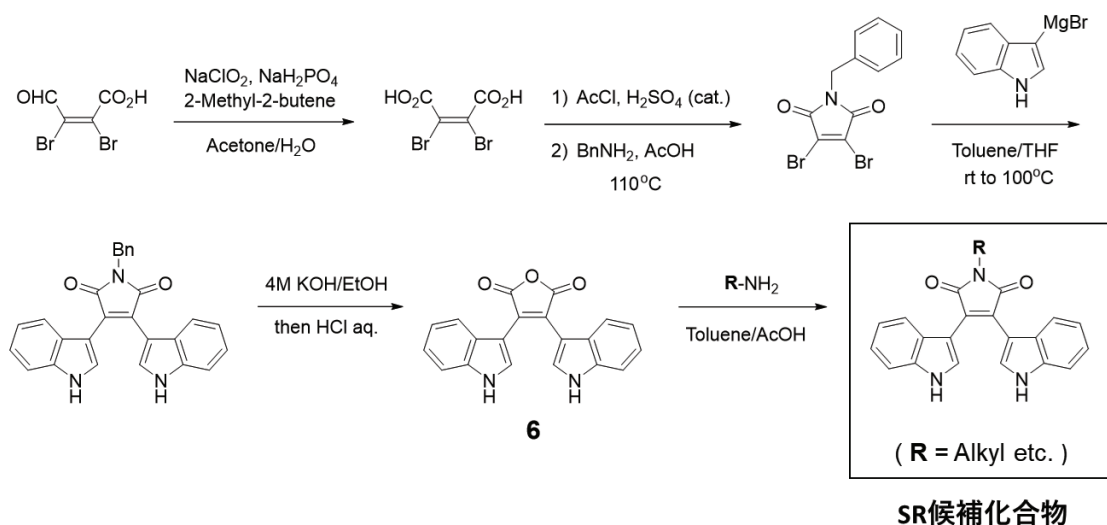


図 4. 本研究における SR 化合物のデザイン



Scheme 5. SR 候補化合物(ビスインドリルマレイミド誘導体)の合成

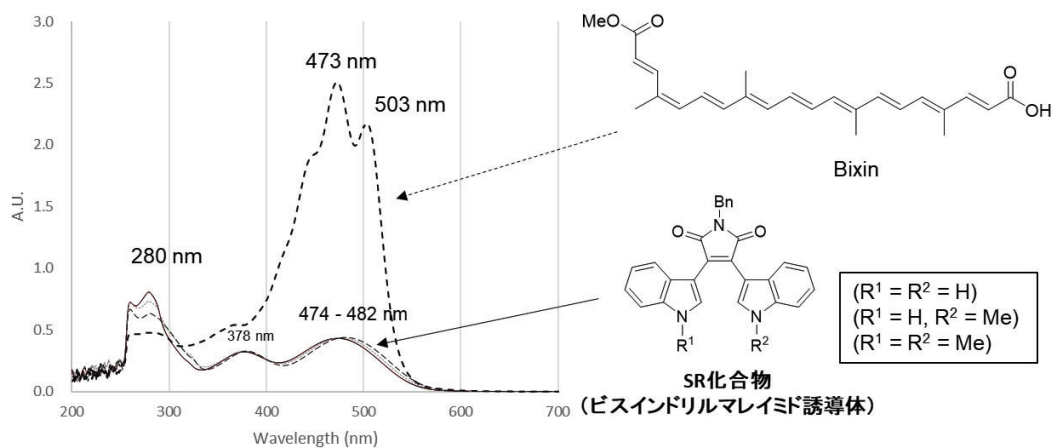


図 4. ビキシシと SR 化合物との UV スペクトルの重ね合わせ

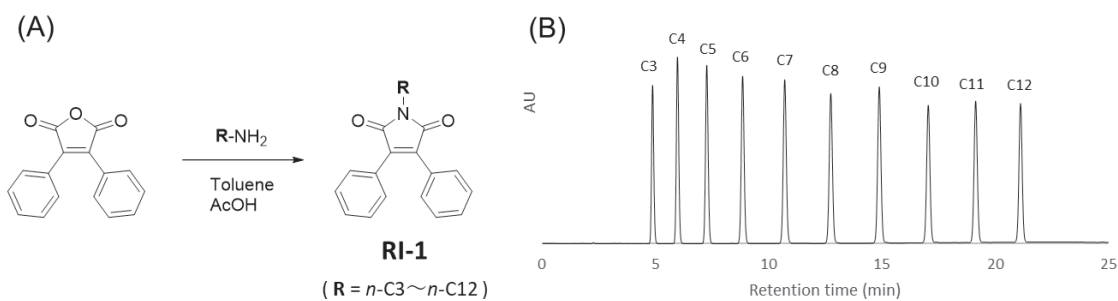


図 5. ビスフェニルマレイミド誘導体 **RI-1**(C3-C12 の混合物)の合成(A)とその HPLC 痕跡(B)

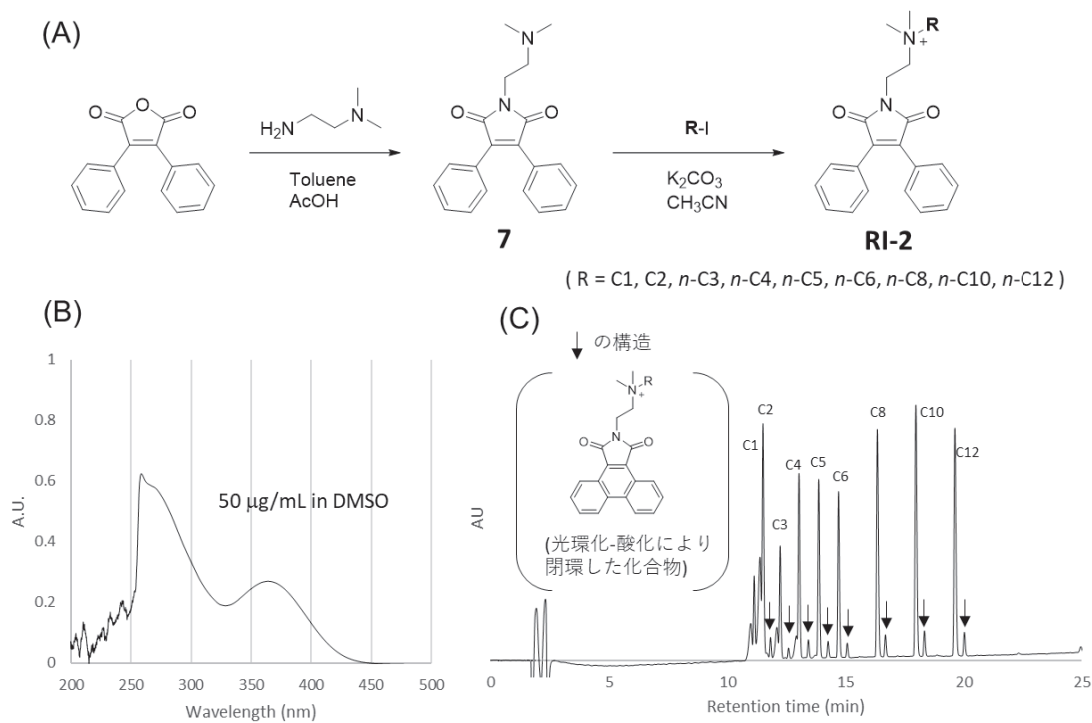


図 6. ビスフェニルマレイミド誘導体 **RI-2**(C1, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10 および C12 の混合物)の合成(A)とその吸収スペクトル(B), HPLC 痕跡(C)

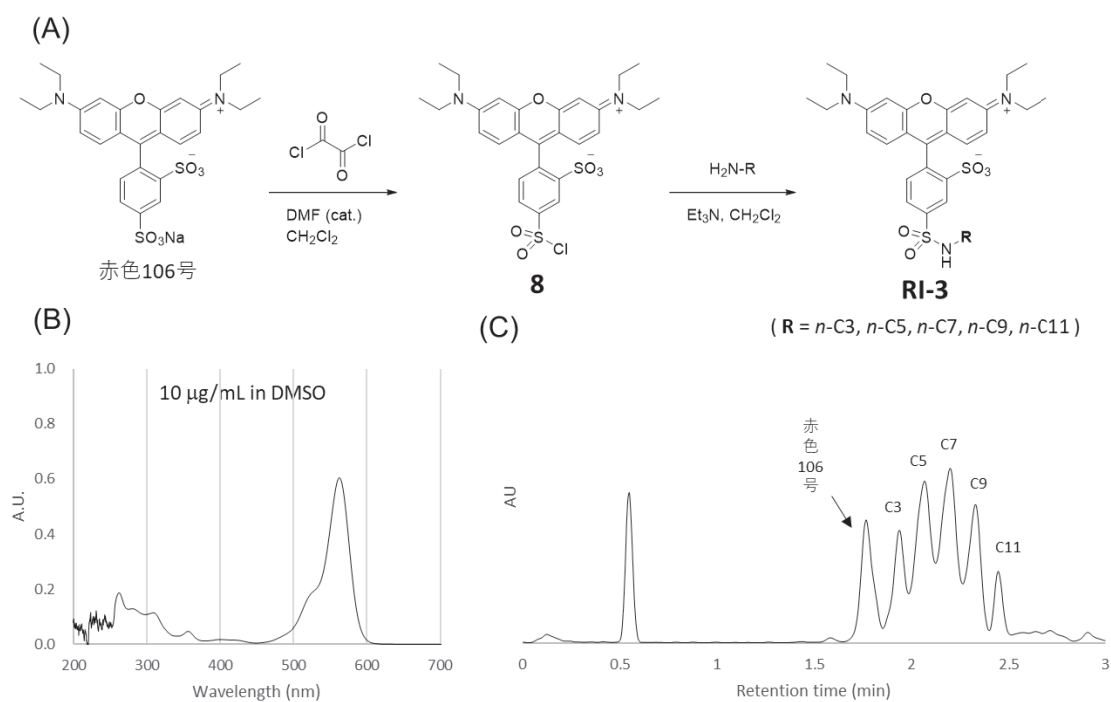
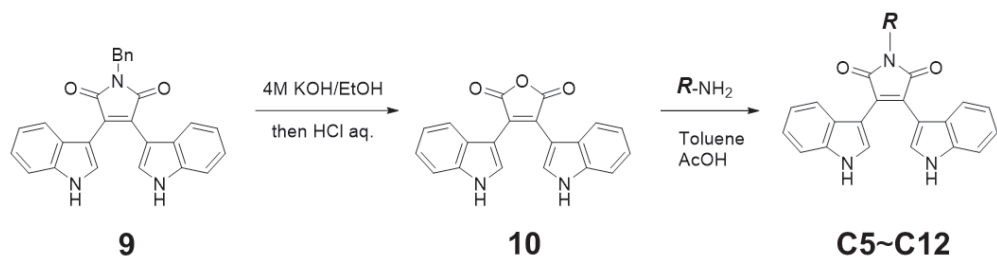


図 7. 赤色 106 号誘導体 RI-3(C3, C5, C7, C9 および C11 の混合物)の合成(A)とその吸収スペクトル(B), HPLC 痕跡(C)



Scheme 6. ビスインドリルマレイミド誘導体の一斉合成

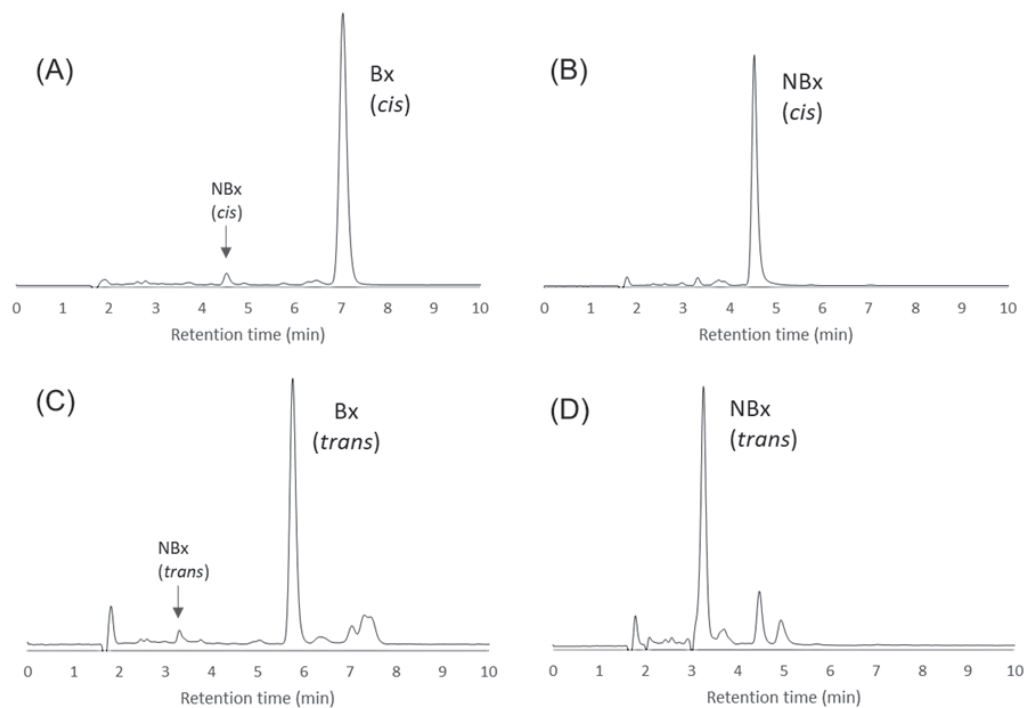


図9. ビキシシ (Bx)およびノルビキシシ (NBx)の異性化のHPLC痕跡
 (A) *cis*-Bx単独, (B) *cis*-NBx単独, (C) Bxの異性化反応物, (D) NBxの異性化反応物

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5~7年度 総合分担研究報告書
分析法及び試験法の開発に関する研究

環境負荷及び試験者負担の軽減を目指した分析法の検討

研究分担者 阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 第二室長

研究要旨

食品添加物公定書の収載された分析法及び試験法の開発に関する研究として、主に環境負荷、試験者負担を軽減することを目的とし、「エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定量法の検討 (EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討) (R5)」,「窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較 (窒素定量法の比較) (R6)」及び「(EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討) (R7)」の検討を行った。

EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討 (R5) では、ファンダメンタルパラメーター (FP) 法では感度が十分ではなかったことから、標準添加法を用いることとした。規格値相当濃度を添加した試料について、標準添加法を用いて回収率を求めたところ良好な結果が得られた。卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンにおいてわずかに回収率が低く、卵殻焼成カルシウムでは相対標準偏差も大きくなる場合があり特に試料調製において課題があることを明らかとした。

窒素定量法の比較 (R6) では、公定書に収載されている複数の窒素定量法の定量値、操作性、設備点での課題等を比較した。「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を試料とし、定量値はいずれの分析法でも同等の結果が得られることを示した。元素分析法では、装置が高額でありキャリアガスや助燃ガスが必要ではあるが、操作は簡便で試験時間も 10 分以内で完結する点でケルダール法及びセミマイクロケルダール法より優れており、元素分析法への移行は合理的であると考えられた。

EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討 (R7) では、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検討した。その結果、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、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、スクリーニング法として十分な精度を持つことが確認できた。

研究協力者

川末慎葉 国立医薬品食品衛生研究所

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所

御所窪誠 (一財)日本食品分析センター

渡辺実薫 (一財)日本食品分析センター

座間俊輔 (一財)日本食品分析センター

伊藤朱美 (一財)日本食品分析センター

藤松芽生 (一財)日本食品分析センター

A. 研究目的

A-1) EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討

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

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

試料中の原子に X 線を照射すると、原子から固有の X 線が発生し試料外に放出される (図 A1)。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る。また、その強度から物質中の各元素の量を計算することができる。多元素同時分析・非破壊分析が可能なので、様々な形態の試料の測定も可能であり、検量線を用いた定量及びファンダメンタルパラメーター (FP) 法による定量が可能である。

そこで本研究では、装置が小型かつ安価で操作が簡便なエネルギー分散型蛍光 X 線分析装

置 (EDX) を用いて、灰化等の前処理をせずに食品添加物中の Pb 及び As の定量が可能かどうか検討を行った。

A-2) 窒素定量法の比較

窒素の定量法は、B 項の一般試験法の『29. 窒素定量法』に記載されているケルダール法、セミクロケルダール法又は元素分析法のいずれかで実施することとされている。ただし、第 10 版公定書において、元素分析法を用いて窒素を定量することとされている品目はない。

窒素定量法としてケルダール法が規定されている品目のうち、Cys では、各条において規定された試料量 0.3 g の上限の試料を採取した場合 0.33 g となるが、これは窒素 38.5 mg に相当し、0.05 mol/L 硫酸で滴定すると 27.4 mL を要する計算となる。試験で規定されている 0.05 mol/L 硫酸は 25 mL であるため、試料によっては過量の硫酸が存在しない。つまり、滴定する前から滴定終点を超えていることとなる。また、CSNa についても、窒素の規格上限 (3.8%) である試料を既定の採取量 1 g 採って試験を実施した場合、これは窒素として 38 mg に相当し、0.05 mol/L 硫酸で滴定すると 27.1 mL を要する計算となる。つまり、Cys と同様に滴定前から滴定終点を超えていることとなる。このように Cys 及び CSNa においては、窒素定量が確実に実施できない場合がある。

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

A-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討

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) EDXを用いたPb及びAs定量法の検討

B-1-1) 試料

ケイソウ土（当部管理番号：C2308）、卵殻焼成カルシウム（当部管理番号：C2342）、L-アルギニン（当部管理番号：C2256）：一般社団法人日本食品添加物協会（日添協）を通じて入手した市場流通品を用いた。それぞれPb及びAsの規格値とともに表A1に示した。

B-1-2) 標準原液及び試薬

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

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

水：ピューリックΩ（オルガノ株式会社製）で製造した超純水

B-1-3) 添加用標準液の調製

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

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

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

B-1-4) 添加試料の調製

① ケイソウ土

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

② 卵殻焼成カルシウム

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

③ L-アルギニン

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

B-1-5) 測定試料及び測定添加試料の調製

試料（ケイソウ土は 2.0 g，卵殻焼成カルシウムは 4.0 g，L-アルギニンは 3.0 g）を 50 mL 容 PP 製容器にとり，それぞれ添加用標準溶液 0，0.025，0.05，0.075 及び 0.10 mL を加え，ケイソウ土はそのまま振り混ぜ，卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンはメノウ乳鉢ですり混ぜたのち容器に戻しよく振り混ぜた。水分を除くため，ドラフト内で蓋を開けた状態で 40℃で 4 時間乾燥したものを測定試料とした。また，添加試料について同様の操作を行ったものを，測定添加試料とした。

B-1-6) 装置

EDX：EDX-8100（ターレット付き）（島津製作所製）

B-1-7) 測定試料及び測定添加試料の測定

サンプルカップ（P/N 219-85000-55，島津製作所製）の底部に PP 製フィルム（P/N 219-82019-05，島津製作所製）を張り，その上に測定試料又は測定添加試料を厚さ 0.5 cm 以上（ケイソウ土は 2.0 g，卵殻焼成カルシウムは 4.0 g，L-アルギニンは 3.0 g）入れ，サンプル瓶など

を使って強く表面を押し詰め、上部には真空測定用 PP フィルム (CAT.No.325, Chemplex 製) を張った。測定試料、測定添加試料ともに各濃度 3 個ずつ調製し、次に示す測定条件で測定した。ただし、L-アルギニンについては、検討途中で試料が不足したため、測定試料、測定添加試料とも各濃度 1 個ずつ調製した。

B-1-8) 測定条件

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

分析グループ：定量

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

X 線管球：Rh ターゲット

管電圧：50 [kV]

管電流：100 [μ A]

コリメータ：10 [mm ϕ]

スピン：しない

1 次フィルタ^{脚注 1}：#4

雰囲気：大気

積分時間：1800 [秒]

デッドタイム：最大 30 [%]

B-1-9) 回収率の算出

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

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

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

B-2) 窒素定量法の比較

B-2-1) 試料

Cys は一般社団法人日本食品添加物協会(日添協)を通じて入手した市場流通品を用いた。また、CSNa については日添協を通じても入手

できなかったため、市販の試薬(特級、関東化学(株)製)を用いた。

B-2-2) 試薬及び標準品

① 試薬

硫酸：特級

二酸化セレン：和光特級

水酸化ナトリウム：特級

0.05mol/L 硫酸：容量分析用

以上、富士フィルム和光純薬(株)製

② 標準品

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

アセトアニリド：有機元素分析用、キシダ化学(株)製

B-2-3) 定量

① 公定法(ケルダール法)

操作は公定書にしたがった。すなわち、Cys は乾燥せず、CSNa は 105℃で 4 時間乾燥したもの試料とし、既定の量(Cys : 0.3 g, CSNa : 1 g)を精密にケルダールフラスコに量り採り、硫酸カリウム 5 g, 硫酸銅(II)五水和物 0.5g を加えた。ただし、Cys の場合はさらに二酸化セレン 0.2 g を加えた。これに硫酸 20 mL を加え、泡立ちがほとんど止むまで穏やかに加熱し、更に温度を上げて沸騰させ、内容物が青色の透明な液となった後、更に 1~2 時間加熱した(Cys の場合は 4 時間)。冷後、水 150mL を徐々に加え、冷却した。冷後、沸騰石又は粒状の亜鉛 1~3 粒を加え、ケルダール分解装置を組み立てた(図 B1)。H に 0.05 mol/L 硫酸 25 mL を正確に量って入れ、更に水約 50 mL を加え、G の下端をこの液中に浸し、次に、C から水酸化ナトリウム溶液(1 $\rightarrow$ 5)85 mL を徐々に加え、更に少量の水で洗い込み、D の部分のピンチコックを閉じ、A を軽く揺り動かして内容物を混和した後、穏やかに加熱し、沸騰し始めたならば加熱を強めて、内容物の約 2/3 容量が留出するまで蒸留した。次に、G の下端を H の液面から離し、更にしばらく蒸留を続けた後、G の下端を少量の水で洗い込み、H の液中の過量の

硫酸を 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。終点の確認には、電位差計又は指示薬(ブロモクレゾールグリーン・メチルレッド混合試液 3 滴)を用いた。別に空試験を行い、補正した。なお、全ての操作を 3 回繰り返した(n=3)。

② 公定法改法(ケルダール法)

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

③ セミマイクロケルダール法

1)装置

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

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

2)測定条件

水添加量：50 mL

30%水酸化ナトリウム溶液量：30 mL

2%ほう酸溶液量：80 mL

蒸留時間：5 min

3)定量

第 18 改正日本薬局方³⁾又は医薬部外品原料規格 2021⁴⁾にしたがった。すなわち、Cys は 105℃3 時間、CSNa は 105℃で 4 時間乾燥したもの試料とし、既定の量(Cys : 30 mg, CSNa : 0.1 g)を精密に分解容器に量り採り、分解促進剤 1 g を加えた。これに硫酸 7 mL を加えた後、過酸化水素(30) 1 mL を分解容器を揺り動かしながら徐々に加えたのち、加熱分解装置で分解した。なお分解温度は 380℃、分解時間は 4 時間とした。冷後、水 20 mL を注意しながら加えて冷却し、自動蒸留滴定装置で蒸留滴定を行った(滴定液：0.005 mol/L 硫酸)。別に空試験を行い、補正した。なお、全ての操作を 3 回繰り返した(n=3)。

④ 元素分析法(改良デュマ法)

1)装置

元素分析装置：SUMIGRAPH NC-

TRINITY(株式会社住友分析センター製)(図 B 4)

2)測定条件

燃焼管温度：900℃

還元管温度：600℃

熱伝導度検出器温度：100℃

カラム温度：70℃

キャリアガス：高純度ヘリウムガス(純度 99.995 %以上)

キャリアガス流量：80 mL±5 mL/min

助燃ガス：高純度酸素ガス(純度 99.99 %以上)

3)定量

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

⑤ 元素分析法(CHN コーダー法)

1)装置

有機微量元素分析装置：vario EL cube(エレメント・ジャパン株式会社製)(図 B 5)

2)測定条件

燃焼管温度：950℃

還元管温度：550℃

キャリアガス：ヘリウム

キャリアガス流量：230 mL/min

助燃ガス：酸素

3)定量

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

B-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング

法の検討

B-3-1) 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-3-2) 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 C1 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-3-3) 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 5 %

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

B-3-4) 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-3-5) 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 μg/g であったことから、目標濃度は Pb・As が 1・1.5 μg/g（0.5 倍）、2・3（1 倍）、2.4・3.6 μg/g（1.2 倍）又は 3・4.5 μg/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 μg/g（0.5 倍）、2・3（1 倍）、3・4.5 μg/g（1.5 倍）又は 4・6 μg/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 μg/mL・As：150 μg/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℃（As が揮散する可能性を考慮し 40℃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（カロブベーン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 μg/mL）を Pb 0.18 mL, As 0.27 mL 添加したのち、40℃で約 4 時間加温し水分を飛ばした。メノウ乳鉢ですり混ぜて均一化し、標準粉末（Pb：60, As：90 μg/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 μg/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-3-6) 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-3-7) EDX 測定条件

測定条件は表 C 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) EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討

C-1-1) 定量方法の選択

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

そこで、検量線を用いる方法を検討した。XRF で検量線を用いて定量するには、未知試料と主成分、および定量対象元素の含有範囲を合わせた濃度既知の標準試料を用意する必要がある。適切な標準試料が得られない場合は、標準試料（例えば水溶液）と未知試料（例えば固体）の主成分の違いを補正する内標準法、あるいは標準添加法による関係線から定量することができるが、本研究では標準添加法による定量法を検討した。

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

C-1-2) 試料の選択

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

C-1-3) 添加回収試験

① 添加試料の調製

添加試料における Pb 及び As の濃度は各品目の規格値相当濃度とした。本研究では、試料は粉末のものを対象としたが、溶液を添加することで溶解又は吸湿して硬化する可能性があったため、添加量は極力少なくした。また、試料中の水分の影響を抑えるため、添加後の試料は良く攪はんして混ぜ合わせたのち乾燥させることとした。ただし、高温で乾燥すると As が揮散する可能性があったため、40℃で 4 時間穏やかに加温することで乾燥した。

② 測定試料及び測定添加試料の調製

標準添加法における測定試料や測定添加試料の調製では、試料に濃度が異なる標準溶液を一定量添加するか、一つの濃度の標準溶液

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

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

③ 回収率

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

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

卵殻焼成カルシウムでは、関係線の決定係数は 0.90 以上となった。一部の濃度点における繰り返し精度が悪かったが、直線性は認められた (図 A 2-2)。回収率は、Pb が 84.5%、As が 75.9%、RSD はそれぞれ 17.6% 及び 5.9% であった (表 A 2)。

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

以上のように、おおむね良好な結果が得られたが、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの回収率はケイソウ土に比べると低い値であり、特に卵殻焼成カルシウムでは繰り返しの相対標準偏差も大きい値であった。これは、卵殻焼成カルシウム及び L-アルギニンの規格値がケイソウ土に比べ低いことが原因の一つと考えられた。また、L-アルギニンは水に溶けるため、添加試料及び測定試料を調製する際に溶解したために均一に混ぜ合わせること

が出来なかった可能性もあった。卵殻焼成カルシウムの主成分は酸化カルシウム (CaO) であるが、CaO は水と反応し発熱して水酸化カルシウムになり固まるため、それも均一に混ぜ合わせることができなかった原因の一つと推定された。

④ ケイソウ土の Pb 及び As 純度試験との比較

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

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

C-2) 窒素定量法の比較

C-2-1) 各定量法の定量値の比較

C-2-1-1) Cys

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

定量値の平均値 (n=3) は 98.7～99.4% であった。公定法とその他の定量法の定量値の比 (その他の定量法/公定法) は 0.99～1.00 であった。また、相対標準偏差は 0.07～0.55% であった。以上の結果から、いずれの定量法においてもほぼ同程度の定量値が得られること、かついずれの定量法においても精度よく測定可能であることが確認された。

C-1-2) CSNa

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

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

C-2-2) 各定量法の特徴

C-2-2-1) ケルダール法及びセミマイクロケルダール法

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

- ① 試料に硫酸を加え分解促進剤存在下で加熱分解して窒素を硫酸アンモニウムに変換する。
- ② 水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性としたのち、水蒸気蒸留によってアンモニアを遊離させ硫酸に捕集し、再び硫酸アンモニウムとする。
- ③ 過量の硫酸を水酸化ナトリウムで滴定し、②において消費された硫酸の量を求める。(逆滴定)
- ④ 消費された硫酸の量から計算式により窒素の量を求める。

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

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

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

基本的に特別な機器は不要であり、試験に用いる装置はいずれもガラス器具で構成されそれぞれはそれほど高価なものではない。しかし、複数試料を同時に加熱できるような装置もあり(図 B 9)、十数万円程度かかる。また、セミマイクロケルダール法では加熱分解装置(図 B 2)や自動蒸留滴定装置(図 B 3)を使用することができるが、それぞれ数十万～百数十万円程度かかる。

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

C-2-2-2) 元素分析法

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

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

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

C-2-2-3) 各定量法の特徴の比較

各定量法の特徴を表 B3 にまとめた。ケルダール法は分析に長時間を要し、また試験者や環境への負荷が大きいことが改めて示された。一方元素分析法においては、装置が高価であり初期投資が大きいというデメリットがあったが、測定時間や操作性は明らかに迅速で簡便であり、試験者や環境負担の小さい分析法であると考えられた。

C-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討

C-3-1) 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℃で約 4 時間乾燥させた。その結果、ほとんどの試料は図 C1 の「L-ロイシン」のようになり、標準液を滴下した部分は乳棒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「グァーガム」、「カロブブーンガム」、「キサントガム」及び「カラヤガム」はカチカチに固まってしまい（図 C1）、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 C2 の「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」、「L-シスチン」、「ウコン色素」などは乳鉢に張り付いてしまい、薬さじですすっても落としきれない物もあった。

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、「グァーガム」及び「カロブブーンガム」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「カルナウバロウ」及び「カンデリラロウ」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、「マリーゴールド色素」及び「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-3-2) 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 C3 に示した。Pb 及び As の XRF 分析においては、Pb の L α 線と As の K α 線が重複するが、Pb は L β 線及び As は K β 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-3-3) 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 C4 に示した。BG 補正がない場合、特に規格値相当（Pb : 2, As : 3 μ 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-3-4) 試料の測定

BG 補正ありで測定した結果を図 C 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 : 2μg/g) のラインを丸・黄緑色 (●, Pb : 2.4μg/g) 及び丸・赤色 (●, Pb : 3μg/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 : 1μg/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 : 3μg/g) のラインを丸・黄緑色 (●, As : 3.6μg/g)、丸・赤色 (●, As : 4.5μg/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 : 1.5μg/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 : 4.5μg/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 : 3μg/g & As : 4.5μg/g) において三角・緑色 (▲, As : 3μg/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 : 4μg/g & As : 6μg/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-3-5) プロファイルの確認

C-4) の As において「ブドウ果皮色素」及び「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 C 6 - 1 ~ 4)。

無添加試料が規格値のラインを超えた「ブドウ果皮色素」及び「グァーガム」のうち、「グァーガム」については、Br の Kα 線 (約 11.9keV) と Kβ 線 (約 13.3keV) の位置におよそ 5 : 1 のピークが確認された。Kα 線と Kβ 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、PbLβ 線及び AsKα+PbLα 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「グァーガム」は Br を含んでおり、この Br の Kα 線を As の Kβ 線として誤って検出された可能性が考えられた。一方「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 Lβ 線及び AsKα+PbLα 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 Kβ 線と Kα 線のピーク強度は約 1:1 で検出されたことから、Br の Kβ 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 Kα 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「カンデリラロウ」、「カルナウバロウ」及び「トウガラシ色素」についても、わずかではあったが Br の Kα 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。「マリーゴールド色素」については、AsKα+PbLα の位置にピークがあり、As の Kβ 線にわずかにピークが見られた。一方、Pb の Lβ 線及び Br の Kβ 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「L-シスチン」については、Se の Kα 線 (約 11.2keV) の位置にわずかにピークが検出された。Se の Kβ 線と Pb の Lβ 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-3-6) 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、「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 C 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「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 $6\mu\text{g/g}$ 相当と高い値であった (図 C 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 C 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

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-3-7) 「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、「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、「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。「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 C 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「L-シスチン」のみであり、9.07 であった。図 C 5 の「L-シスチン」の添加試料の測定結

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

H_2O のうちの 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。

(図 C 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

果を改めて確認すると、As の $K\beta$ 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 $L\beta$ 線の結果は対照

用標準溶液よりも高めにしていたが、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「卵殻焼成カルシウム」及び「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-3-8) 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 C 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 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「ブドウ果皮色素」及び「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、「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

D-1) EDX を用いた Pb 及び As 定量法の検討

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

また、本研究において、ケイソウ土中に Pb 及び As が約 10 μ g/g 含有されていることが確認されたが、これらはほとんど食品へ移行しないことが示され、健康影響はほとんどないと考えられた。

D-2) 窒素定量法の比較

窒素定量に課題がある「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」を試料に

用いて、公定法を含む複数の窒素定量法の定量値及び操作性等を比較した。

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

以上の結果を踏まえると、「L-シスチン」及び「コンドロイチン硫酸ナトリウム」に対しては、公定法の試料量を少なくした公定法改法を導入することが最も簡単であると考えられた。一方、元素分析法は複数の元素を測定可能な装置も有ることから、複数部署で共有して使用できると考えられる。したがって、将来的には試験者や環境への負荷低減のため元素分析法へシフトしていくべきであると考えられた。

D-3) EDX を用いた Pb 及び As スクリーニング法の検討

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が、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かつ

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しない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. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 渡辺実薫, 御所窪誠, 伊藤朱美, 藤松芽生, 座間俊輔, 阿部 裕, 建部千絵, 多田敦子, 杉本直樹: 食品添加物公定書における窒素定量法の検証, 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会(2024.11).
- 2) 中島 馨, 増本直子, 阿部 裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討 ~クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係~, 日本食品衛生学会第 120 回学術講演会(2024.11).
- 3) 石附京子, 阿部裕, 杉本直樹: エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を用いた食品添加物中の鉛及びヒ素の定呈法の検討、第 61 回全国衛生化学技術協議会年会 (2024.11).
- 4) 渡辺実薫: 食品添加物公定書における窒素定量法の代替試験法の検証. 第 7 回(公社)日本食品衛生学会近畿ブロック勉強会 (2025.2).

2. 論文発表等

なし

3. 総説, 解説等

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

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

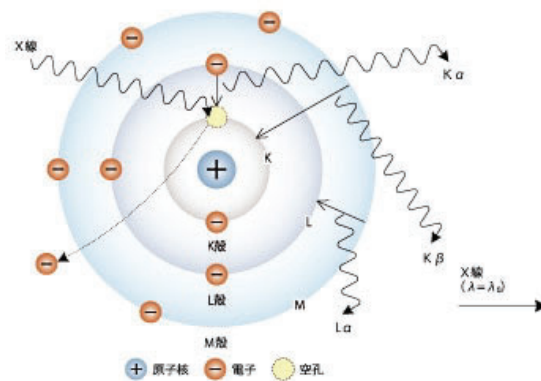


図 A 1 蛍光 X 線の原理・特徴

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

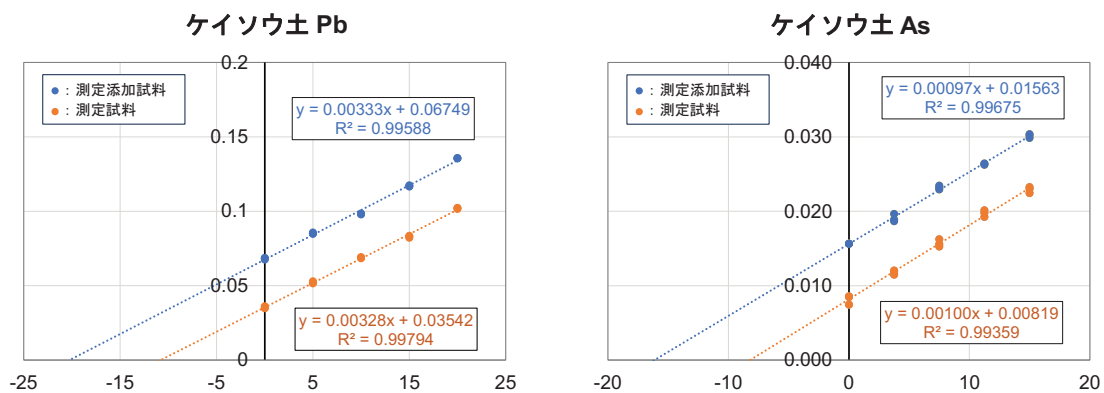


図 A 2 - 1 ケイソウ土の Pb 及び As の関係線（一例）

（縦軸：強度，横軸：添加濃度（ $\mu\text{g/g}$ ））

決定係数が最も小さい値だった関係線を一例として示した．

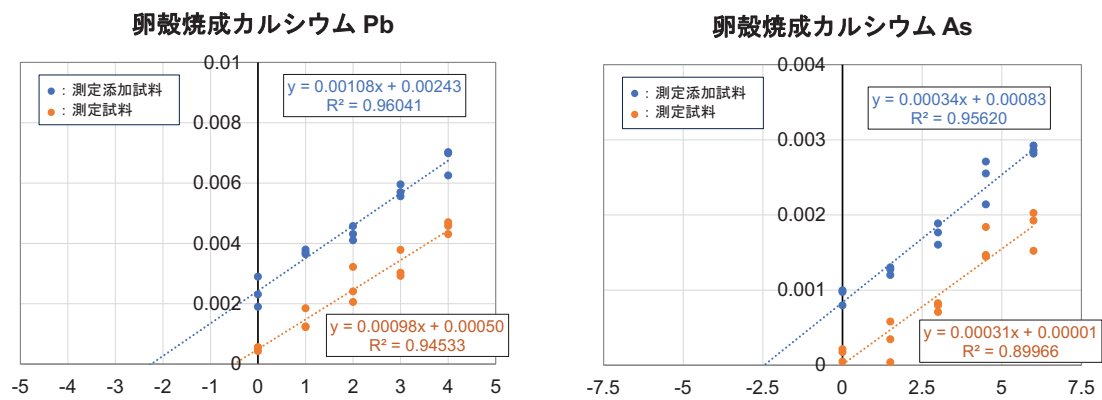


図 A 2 - 2 卵殻焼成カルシウムの Pb 及び As の関係線 (一例)

(縦軸：強度，横軸：添加濃度 (μg/g))

決定係数が最も小さい値だった関係線を一例として示した.

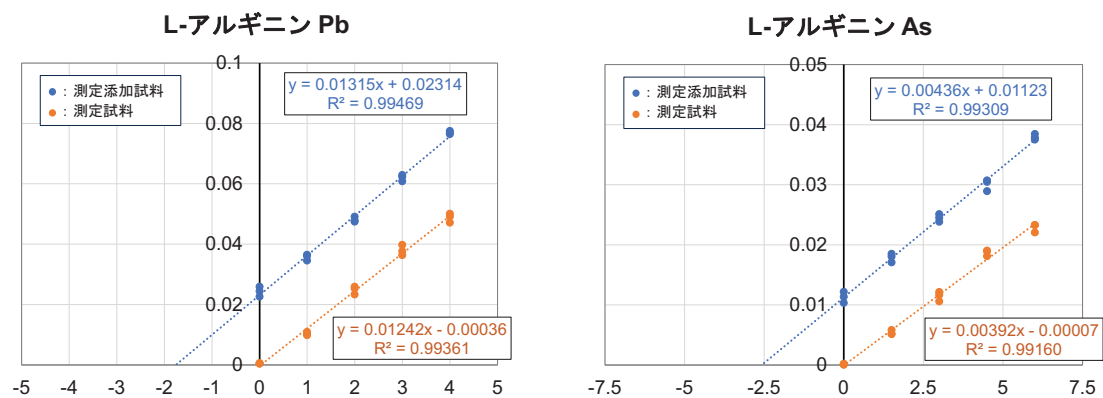


図 A 2-3 L-アルギニンの Pb 及び As の関係線（縦軸：強度，横軸：添加濃度（ $\mu\text{g/g}$ ））

表 A 1 本研究で用いた試料

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

*食品添加物への移行を考慮した規格値

表 A 2 試料及び添加試料中の Pb 及び As 含量並びに回収率

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

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

装置

概略は、図 1 による。ただし、接続部は、すり合わせにしてもよい。

A：ケルダールフラスコ（硬質ガラス製 容量約300mL）

B：ガラス管

C：アルカリ溶液注入用漏斗

D：ゴム管（BとCを連結する。途中にピンチコックが付けてある。）

E：しぶき止め

F：蒸留管

G：冷却器

H：吸収用フラスコ（容量約300mL）

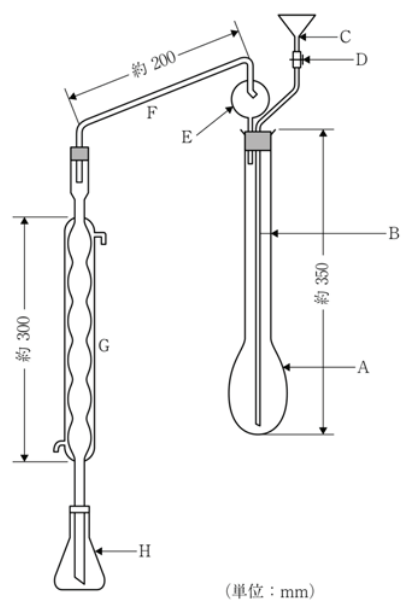


図 B 1 ケルダール法の装置²⁾



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



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



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

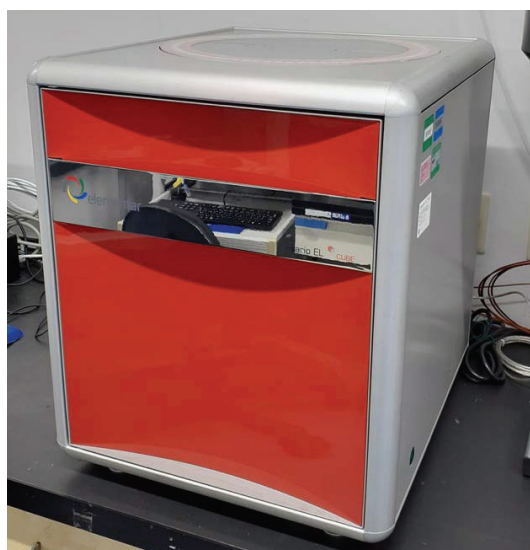


図 B 5 CHN コーダー法で用いた装置
((vario EL cube, エレメンター・ジャパン株式会社製)

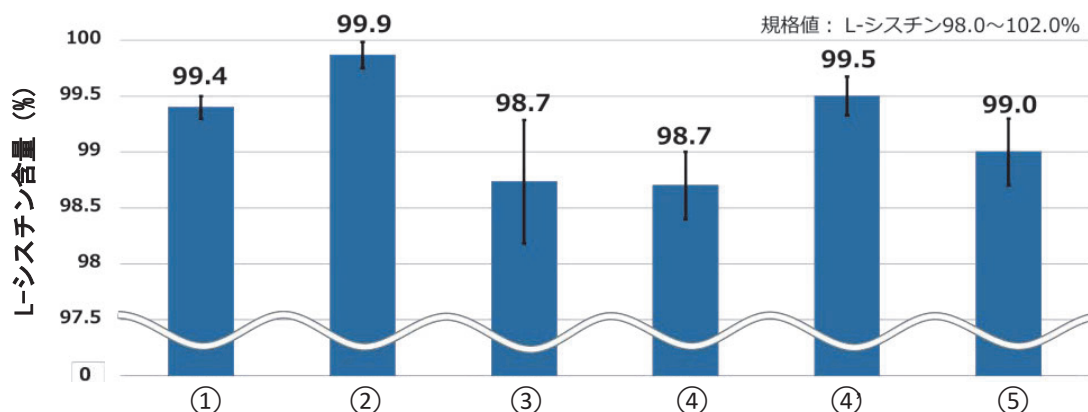


図 B 6 L-シスチン含量(%, n=3)

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

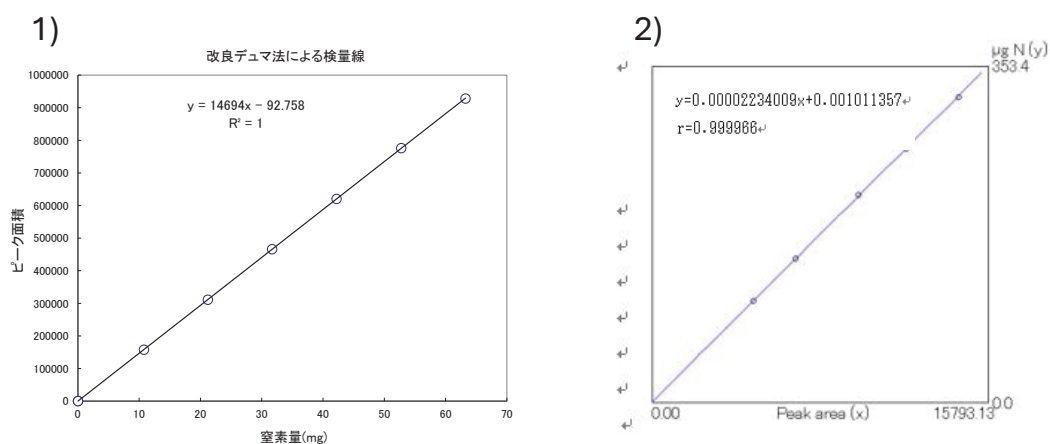


図 B 7 元素分析法による検量線

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

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

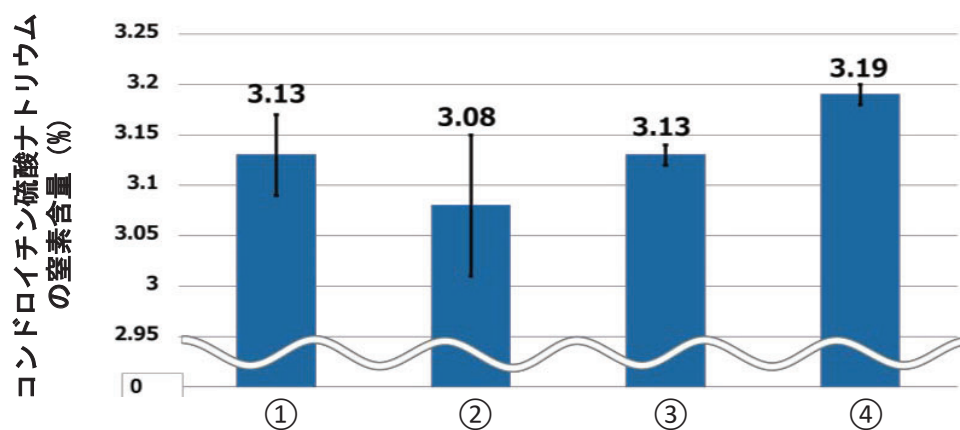


図 B8 コンドロイチン硫酸ナトリウムの窒素含量 ((%, n=3)

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



図 B9 ケルダール分解装置((同時加熱式)

表 B 1 L-シスチンの試験結果

No	試験方法	試行数	空試験滴定量 (mL)	滴定量 (mL)	空試験差引後 滴定量 (mL)	試料採取量 (g)	滴定液 7.4%	Nとして			L-シスチンとして		
								計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)	計算値 (%)	平均値 (%)	相対 標準偏差 (RSD, %)
①	公定法 (ケルダール法)	1回目	25.01	0.05	24.96	0.3024	1.001	11.58			99.3		
		2回目	25.01	0.07	24.94	0.3020	1.001	11.58	11.58	0.07	99.4	99.4	
		3回目	25.01	0.08	24.93	0.3016	1.001	11.59			99.5		
②	公定法改法 (ケルダール法)	1回目	25.01	8.27	16.74	0.2019	1.001	11.63			99.8		
		2回目	25.01	8.39	16.62	0.2004	1.001	11.63	11.64	0.11	99.8	99.9	
		3回目	25.01	8.37	16.64	0.2003	1.001	11.65			100.0		
③	セミクロ ケルダール法	1回目	1.129	25.924	24.795	0.0304	1.000	11.44			98.2		
		2回目	1.129	26.059	24.930	0.0302	1.000	11.57	11.51	0.55	99.3	98.7	
		3回目	1.129	26.129	25.000	0.0304	1.000	11.51			98.7		
④	元素分析法 (改良デュマ法) 試料量：0.5 g	1回目	-	-	-	0.5063	-	11.47			98.4		
		2回目	-	-	-	0.5051	-	11.54	11.50	0.31	99.0	98.7	
		3回目	-	-	-	0.5007	-	11.50			98.7		
④'	元素分析法 (改良デュマ法) 試料量：0.25 g	1回目	-	-	-	0.2508	-	11.58			99.3		
		2回目	-	-	-	0.2501	-	11.51	11.54	0.35	98.7	99.0	
		3回目	-	-	-	0.2505	-	11.54			99.0		
⑤	元素分析法 (CHN コーダー法)	1回目	-	-	-	0.0020362	-	11.58			99.4		
		2回目	-	-	-	0.0019561	-	11.63	11.60	0.22	99.7	99.5	
		3回目	-	-	-	0.0019009	-	11.58			99.4		

表 B 2 コンドロイチン硫酸ナトリウムの試験結果

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

表 C1 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
		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
2	「カルナウバロウ」	2	3	添加なし	5.39	セロチン酸ミリシルとして
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
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
5	「L-ロイシン」	2	3	溶液	6.10	L-ロイシン
6	「ウコン色素」	2	3	溶液	6.25	クルクミンとして
7	「L-プロリン」	2	3	溶液	6.28	L-プロリン
8	「L-チロシン」	2	3	溶液	6.30	L-チロシン
9	「L-ヒスチジン」	2	3	溶液	6.39	L-ヒスチジン
10	「ブドウ果皮色素」	2	3	溶液	6.48	シアニジンとして
11	「L-グルタミン」	2	3	溶液	6.50	L-グルタミン
12	「微結晶セルロース」	2	3	溶液	6.68	セルロース
13	「L-セリン」	2	3	溶液	6.71	L-セリン
14	「グァーガム」	2	3	粉末	6.73	グルコースとして
15	「キサンタンガム」	2	3	溶液	6.73	グルコースとして
16	「カロブビーンガム」	2	3	粉末	6.73	グルコースとして
17	「カラヤガム」	2	3	溶液	6.73	グルコースとして
18	「L-シスチン」	2	3	溶液	9.07	L-シスチン
19	「卵殻焼成カルシウム」	2	3	溶液	16.58	酸化カルシウム

*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 C2 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 C1 標準液滴下、乾燥後の試料の様子



図 C2 乳鉢ですり混ぜた後の様子

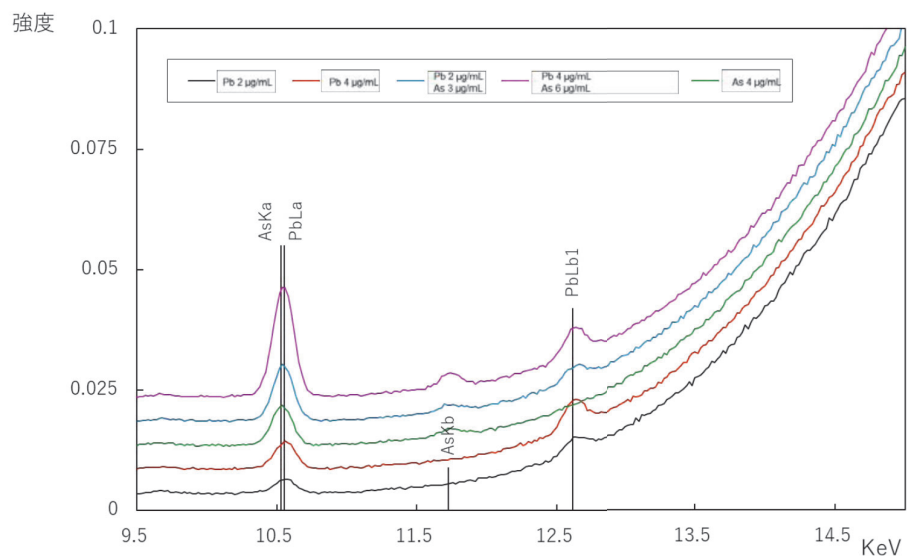


図 C3 Pb 及び As 標準溶液の EDX プロファイル

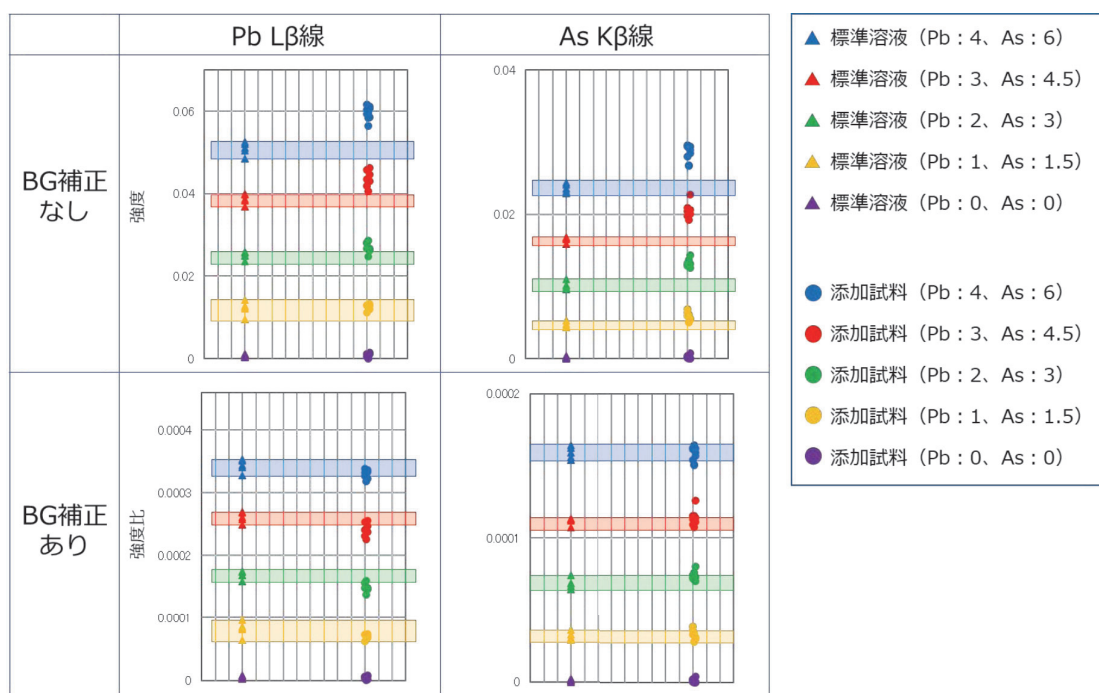


図 C4 BG補正有無における強度（強度比）の比較

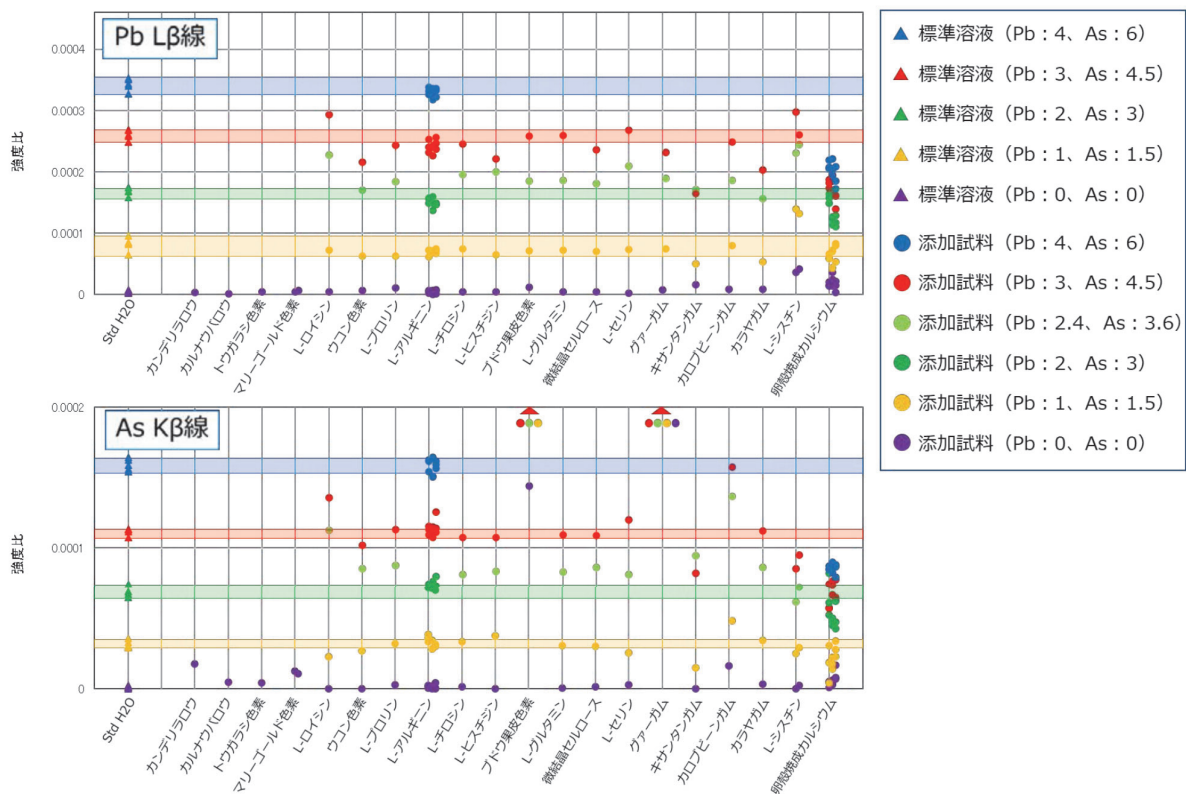


図 C5 試料の測定結果(BG 補正あり)

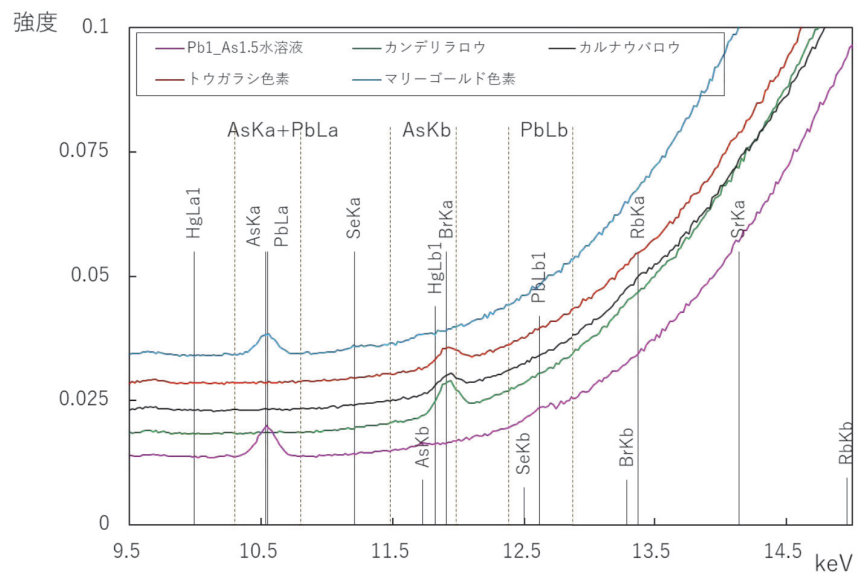


図 C6-1 各試料のプロファイル(9.5~15.0keV)

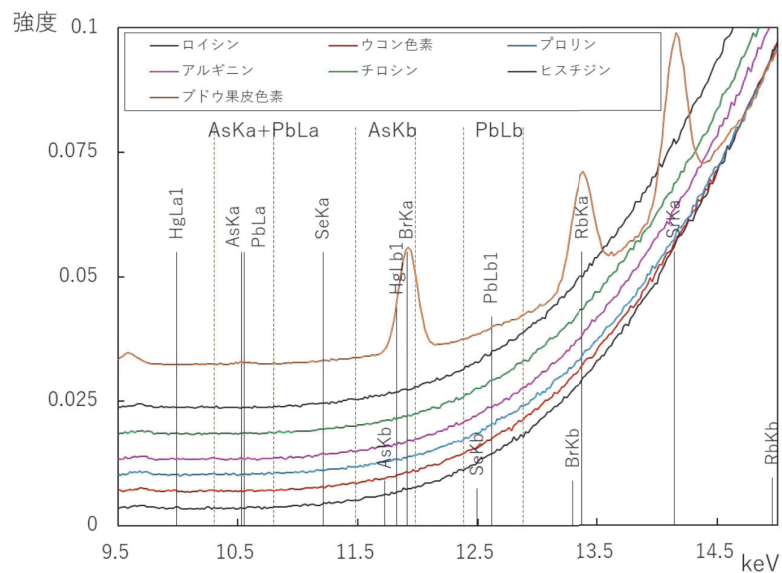


図 C6-2 各試料のプロファイル(9.5~15.0keV)

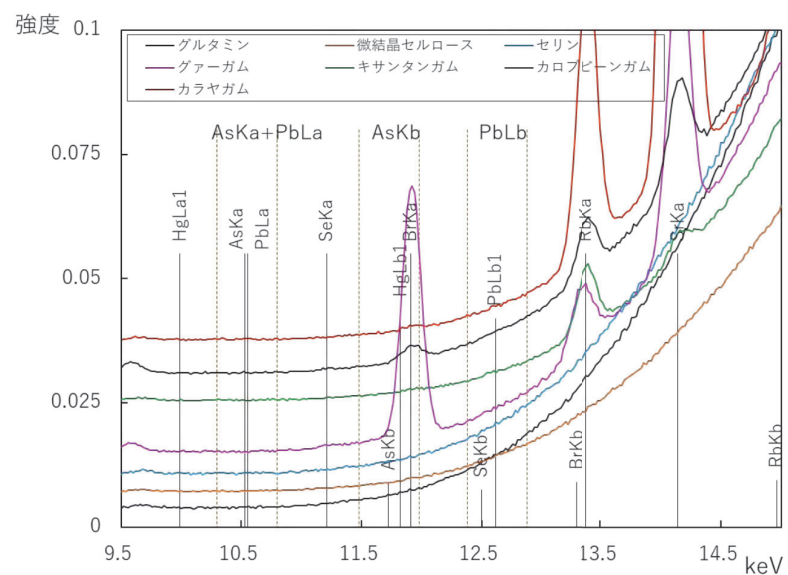


図 C6-3 各試料のプロファイル(9.5~15.0keV)

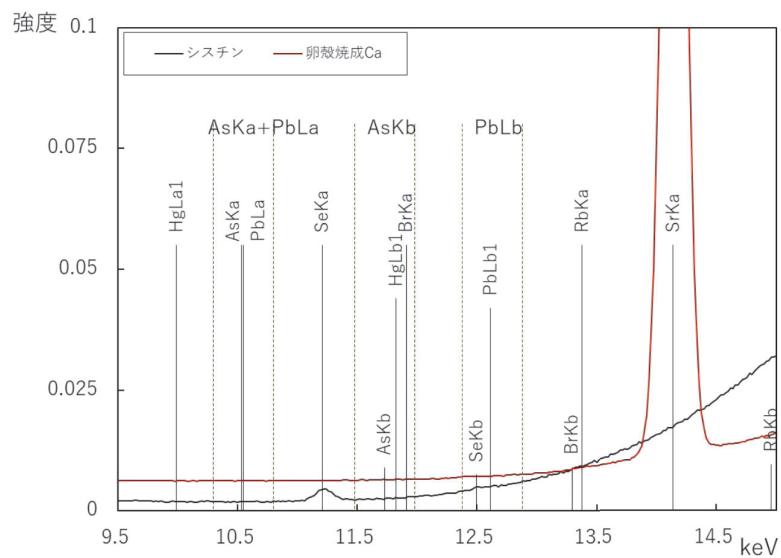


図 C6-4 各試料のプロファイル(9.5~15.0keV)

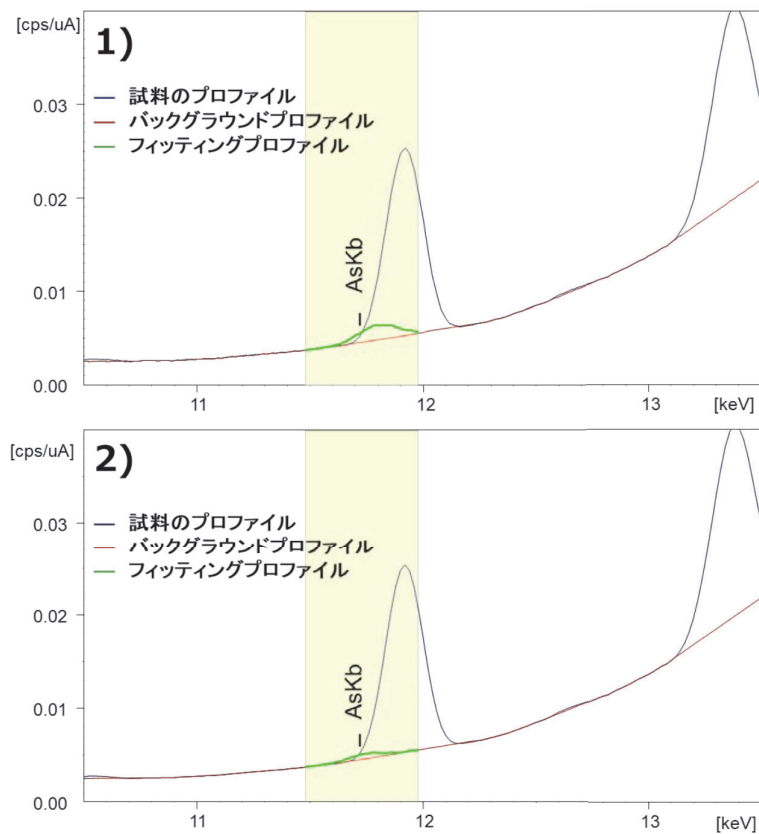


図 C7 「ブドウ果皮色素」を用いたカーブフィッティングの例

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

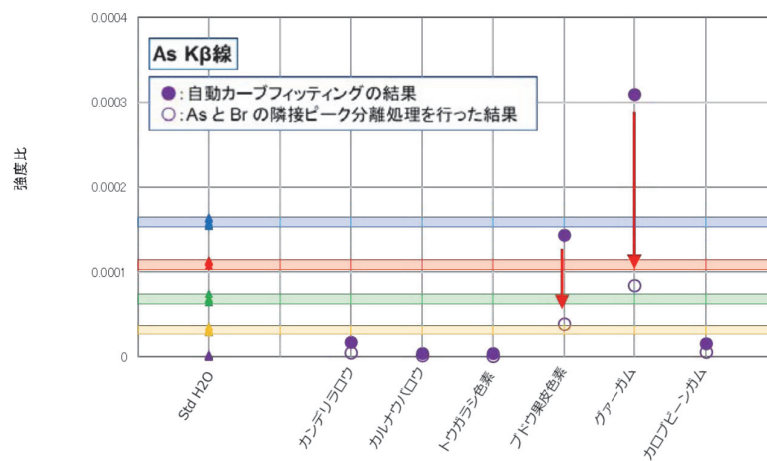


図 C8 隣接ピーク分離による補正効果

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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

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

研究分担者 渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 第三室長

研究要旨 食品添加物のうち微生物を基原とする酵素について、質量分析を用いたアミノ酸解析法として、電気泳動法と MALDI-TOF MS によるペプチドマスフィンガープリンティング (PMF)法を組み合わせることで基原同定法の開発を実施した。検討した添加物酵素の多くについて基原の情報を得ることができたが、一部の製品については製造者が公表している基原種と解析結果が一致せず、また、基原種の情報全く得られなかった製品も存在した。その理由として、試験法における技術的な課題、検索に用いるデータベースの配列登録情報の不足、微生物学名の変更に伴うシノニム情報の不足等の問題があると考えられた。これらの問題を解決するため分析法の改良を実施し、さらなる同定精度の向上を試みた。具体的には、複数種の消化酵素の使用、独自に構築した改良データベースの使用、二次元電気泳動法を用いたタンパク質の分解能の改善、マトリクスの変更や複数消化酵素の併用を実施し、同定精度の指標となる Coverage を上げることができるかの検討を行った。タンパク質のデータベースである UniProt から抽出したアミノ酸配列を用いて独自に構築したデータベースを用いた Mascot サーチを実施した結果、オンラインで検索した場合には同定できなかったβ-ガラクトシダーゼやプロテアーゼの基原菌種を同定することができた。複数種の消化酵素を用いた解析を実施した結果、トリプシンを用いた場合には同定できなかったヘミセルラーゼやセルラーゼに含まれるタンパク質のバンドの基原菌種を同定することができた。また計 4 種の添加物酵素を二次元電気泳動法により解析した結果、一部の酵素については通常の SDS-PAGE による解析で同定不能であったタンパク質が同定され同定結果の正確性を向上させることができた。マトリクスの変更や消化酵素の併用による検出ペプチド数の増加程度を確認したところ、これまで用いていたマトリクスの C1CCA では検出されなかったペプチドが複数種のマトリクスをそれぞれ用いた場合に検出され、また消化酵素の併用により検出ペプチド数が増えることが明らかとなった。さらに、複数のマトリクスとトリプシン/Lys-C 併用を組み合わせ Coverage 上昇程度を確認した結果、マトリクスに C1CCA 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。本研究で検討した分析手法を用いることで、従来の PMF 法と比較してより高精度の基原種の同定が可能となると期待される。基原種同定法の開発と並行して、データベースの有効的な改良を見据えた基原種に関する分類学的情報の収集を行った。添加物酵素の基原として広く用いられる *A. niger* とその近縁種、*Trichoderma* 属菌およびアスペルギルス・ステレウス糖たん白質の基原である *Aspergillus terreus* について、それぞれの最新の分類体系に関する文献収集を実施した。その結果、伝統的な古い指標で同定された菌株は、再同定した際に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
食環境科学部

清水公徳 東京理科大学
先進工学部

伊藤紫野 東京理科大学
先進工学部

A. 研究目的

既存添加物酵素は、細菌、放線菌、真菌などの微生物を基原とするものが多い。既存添加物酵素の定義には、基原が一つの微生物種に規定されておらず、異なる種に由来する製品であっても、酵素活性が同じであれば同一の酵素品目とみなされる。微生物の中には二次代謝産物としてヒトへ危害性を有する物質を産生するものがあることから、基原菌種の同定は重要である。その一方で、既存添加物の流通製品を分析すると、基原菌種の同定が難しい品目が多いことが知られている。微生物由来基原の品目の同定法として、タンパク質アミノ配列を指標とした分子生物学的手法を応用した試験法の開発が望まれる。

添加物酵素は、分子量の大きいタンパク質であることから、HPLC や質量分析器による解析に適していない。また、微生物の分泌物から製造されていることから、核酸情報を基にしたアプローチも難しい。この問題を解決できる手法として、質量分析器を用いたペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)法に着目した。本手法はタンパク質の構造解析法の一つとして頻繁に用いられている。PMF 法を

混合タンパク質試料に対して適用する際には、SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後、バンドを切り出してトリプシンなどのタンパク質分解酵素による消化を行う。得られたペプチドを MALDI-TOF MS により網羅的に分析する。複数のペプチドの質量情報からデータベース検索(Mascot サーチ)により、元のタンパク質を同定する。

我々は、過去に複数の既存添加物酵素を対象に、SDS-PAGE と PMF 法を組み合わせた方法によりそれぞれの基原種の同定を試みた。その結果、構成成分の少ない添加物酵素成分については、大多数の製品で基原の情報が得られ、製品に付帯する基原情報と解析から得られた結果が一致し、一定の成果を上げた¹⁾。しかし、一部の製品については製造者が公表している基原種と解析結果が一致しなかった。また、基原種の情報が全く得られなかった製品も存在した。その理由として、試験法における技術的な課題、検索に用いるデータベースの配列登録情報の不足、微生物菌名の変更に伴うシノニム情報の不足等の問題が考えられた。

また、過去の検討から、より良い分析手法によって基原微生物の同定指標における特徴を効果的に認識できたとしても、同定するにあたりその指標の特徴を照合するデータベースにおける菌種名の読み取りに問題があった場合、正しく同定することができないことや、微生物の分類情報は新種の記載や再編が頻繁になされていることから、基原微生物の学名について、国際整合を考慮した生物種の最新の分類情報を常に収集しておく必要があるという問題点を把握していた。

そこで、これらの問題を解決し同定精度を向上させることで、より多くの製品の基原種を正確に同定するために、試験法の改良を行った。さらに、基原種同定法の開発と並行して、データベース有効的な改良を見据えた基原となる真菌種の分類学的情報の収集を行った。

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) Mascot データベースの作成

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

B-1-2) 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-1-3) 試料

既存添加物試料は、日本食品添加物協会から分与された製品を用いた。各試料は国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号 (DFA No.) で示す。1 年目の検討では、 β -ガラクトシダーゼは B572, セルラーゼは B576 及び B674, ヘミセルラーゼは B651, B653 及び B577, プロテアーゼは B591 及び B698 を用いた。2 年目の検討では、 β -ガラクトシダーゼは DFA No. B572, ヘミセルラーゼは B651 及び B653, β -アミラーゼは B659 を用いた。3 年目の検討では、 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

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。各試料は、タンパク質含有量に応じて 5~100 mg/mL の濃度となるよう精製水に溶解した。それぞれ等量の 2×laemmli sample buffer (Bio-Rad 社) と混合後、SDS-PAGE に供した。ゲルからバンドを切り出し、約 1 mm 立方に細かく切り刻み、1.5 mL 容のマイクロチューブに入れた。チューブに脱色液(50%アセトニトリルを含む 25 mM 重

炭酸アンモニウム水溶液) 150 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 または 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。37°C 一晩インキュベートした。0.1%トリフロオロ酢酸(TFA)を含む 50%アセトニトリル水溶液 100 μ L 加え、15 分間インキュベート後に上清を回収した。同様の操作を合計 3 回行い、全ての上清をまとめて、窒素気流で 20 μ L 程度まで濃縮した。0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液、続いて 0.1%トリフロオロ酢酸水溶液で平衡化した ZipTip 0.2 μ L-C18(ミリポア社)に酵素消化産物を吸着させ、0.1%TFA 水溶液で洗浄後、0.1%TFA と 10 mg/mL のマトリクス(4-クロロ- α -シアノケイ皮酸 ; シグマアルドリッチ社)を含む 50%アセトニトリル水溶液で MALDI-TOF MS のサンプルプレート上に直接溶出した。完全に乾燥させた後、MALDI-TOF MS を用いてスパイラルモードでマスマスペクトルを測定した。

マトリクスには以下の化合物のいずれかを用いた。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-水和水物(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.

B-1-4) 等電点電気泳動

各試料をタンパク質含有量が 1.5 mg/mL の濃度となるよう標準細胞溶解バッファーに溶解した.

標準細胞溶解バッファーの組成

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

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

タンパク質溶液 62.5 μ L (7 cm の DryStrip 使用時)又は 125 μ L (13 cm の DryStrip 使用時)に等量の 2 $\times$ サンプルバッファーを加え、氷上で 10 分間インキュベートした. ストリップホルダーに添加後、Immobiline DryStrip pH 3-10 NL (Cytiva 社) を上から置き、カバー液を添加した後、Ettan IPGphor II を用いて 1 次元目の等電点電気泳動を行った.

2 $\times$ サンプルバッファーの組成

ウレア	10.5 g
チオウレア	3.8 g
CHAPS	1 g

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

一次元電気泳動後の Immobiline Drystrip を SDS 平衡化バッファーA 2 mL に浸し、室温で

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

SDS 平衡化バッファーA/B

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

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

B-1-5) ペプチドの質量を指標としたタンパク質の同定

マスマスプロトから得られたペプチドの質量を指標としたタンパク質の同定は、Matrix Science のウェブ上のプログラム Peptide Mass Fingerprint search, または昨年度構築した Mascot データベースを用いて行った. 主要なペプチドの質量を入力し、検索条件は以下のよう設定した ; Database : SwissProt, Enzyme : トリプシン, Allow up to : 1, Fixed modification : Carbamidomethyl(C), Peptide tolerance : 15 ppm, Mass values: MH⁺.

B-2) 真菌基原種に関する分類学的情報の収集

添加物酵素の基原としての使用頻度が高く、かつ分類体系の再構築に伴う菌名の変更の歴史が複雑でありシノニムが多数存在することが知られる 3 分類群, ①*Aspergillus* 属真菌の *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. kawachii* 及び *A. luchuensis* とこれらの近縁種, ②*Trichoderma* 属菌, ③アスペルギルスステレウス糖たん白質の基原 *A. terreus* について、PubMed から分類体系に関する論文を検索し、入手した. 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) 構築した Mascot データベースを用いた PMF

Bacillus circulans 由来β-ガラクトシダーゼ (B572, 図 1a)については, SwissProt のデータベースを用いた Mascot サーチでは同定できなかった. そこで, UniProt において「*Bacillus*」と検索して得られたアミノ酸配列を用いて構築したデータベースを用いて Mascot サーチを行った(表 1). その結果, 2種のバンドについていずれも *B. circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼが最も高いスコアで同定された.

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

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

orientale 及び *T. longibrachiatum* のキシラナーゼが, バンド VII は *T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. parareesei*, *T. pseudokoningii* 及び *T. orientale* のキシラーゼが高スコアでヒットした(表 1).

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

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

C-1-2) 複数種の酵素消化を用いた解析

トリプシンを用いた PMF の結果, 複数種の菌種のタンパク質がヒットした添加物酵素について, トリプシン以外の酵素を用いた解析を実施し, 菌種を限定することが可能か検討

した. *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼ (B651, 図 1g)については, トリプシンを用いた場合はバンド I, III及びVを同定できた. Arg-C を用いた場合にはバンド I のみが, Asp-N を用いた場合はバンド I, II 及びIIIが, CHTR を用いた場合はバンド I, IV及びVが, Lys-C を用いた場合はバンド I, III及びIVが同定できた(表 2). トリプシン以外の消化酵素を用いることにより, トリプシンでは同定できなかったバンドが同定できた. 特にキモトリプシンを用いた場合, トリプシンよりもヒットタンパク質の由来菌種が少なく, 基原を限定することができた. *T. viride* 由来のセルラーゼ(B674, 図 1h)については, トリプシンを用いた場合は3種の主要バンドはいずれも同定できた(表3). Arg-Cを用いた場合はいずれのバンドも同定できず, Asp-Nを用いた場合はバンド IIのみが, CHTR と Lys-Cを用いた場合は3種いずれのバンドも同定できた. バンド I とIIIの同定結果については, トリプシンを用いた場合が最も coverageが高く, 他の酵素を用いる利点は見出せなかった. バンド IIについては, トリプシンを用いた際はバンド I と同じタンパク質が同定されたが, Asp-N と CHTRを用いた場合は異なるタンパク質が同定された. バンド I と II は非常に近接していることから, SDS-PAGE のゲルから切り出す際に, バンド II に I が混入した可能性が考えられた.

C-1-3) 二次元電気泳動法を用いた添加物酵素の基原の解析

Triticum aestivum (パンコムギ)由来のβ-アミラーゼ(B659)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 2A と 2B に示す. SDS-PAGE 像においては, 55 kDa 付近に単一のバンド a が認められ, PMF 法による解析の結果, *Hordeum vulgare* (大麦)のβ-アミラーゼと同定された(表 4A). 二次元電気泳動像においては, 55 kDa・pI 6 付近に4つのスポット I, II, III 及び IV が認められ, PMF 法による解析の結果, いずれも *H. vulgare* のβ-アミラーゼと同定された(表 4B). B659 は, SDS-PAGE 像ではシングルバンドとして検出されたが, 二次元電気泳動像では複数のスポッ

トとして検出された. ただ, いずれも同じタンパク質であったことから, 何らかの修飾の有無の違いによるものと考えられる. それぞれのスポットを分離して解析を行ったが, 検索時のペプチドの決定アミノ酸配列のデータベース登録配列に対するカバー率は SDS-PAGE でバンドを切り出して解析した結果とほぼ同様であった. このようなタンパク質数の少ない酵素では, 二次元電気泳動法の長所は活かせないと考えられる.

Niallia circulans 由来のβ-ガラクトシダーゼ (B572)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 3A と 3B に示す. SDS-PAGE 像においては, 180, 140 及び 80 kDa 付近に3つのバンド a, b 及び c が認められ, PMF 法による解析の結果, いずれも *N. circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼと同定された(表 5A). 二次元電気泳動像においては, 多数のブロードなスポットが認められた. 180 kDa・pI 5 付近のスポット I, 140 kDa・pI 5 付近のスポット II 及び 80 kDa・pI 6 付近のスポット III は, いずれも *N. circulans* 由来のβ-ガラクトシダーゼと同定された. 50 kDa・pI 4 付近のスポット V は, グルタミン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼと同定された. スポット IV と VI は同定されなかった(表 5B). B572 は, 二次元電気泳動像において横に伸びたスポットとなった. B659 と同様に何らかの修飾による影響と考えられる. スポットの同定結果は SDS-PAGE のバンドを切り出した時と同様であったが, 検索時の配列カバー率はわずかに低下した. ただ, SDS-PAGE による解析ではバンドとして切り出しが困難であったタンパク質1種が, 二次元電気泳動法による解析では同定できた.

Aspergillus niger 由来のヘミセルラーゼ(B651)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 4A と 4B に示す. SDS-PAGE 像においては, 20~70 kDa の間に多数のバンドが認められた. そのうち, 切り出しが可能であった5種を PMF 法で解析した結果, 28 kDa 付近のバンド d は複数の *Aspergillus* 属由来のエンドグルカナーゼ, 22 kDa 付近のバンド e は複数の *Aspergillus* 属由来のキシラナーゼと同定された. バンド a, b 及

びcは同定されなかった(表 6A). 二次元電気泳動像においては, 7 種の主要なスポットが認められた. 50 kDa・pI 4 付近のスポット II は, 5 種の *Aspergillus* 属由来の α -アミラーゼ, 34 kDa・pI 6 付近のスポット V は, 6 種の *Aspergillus* 属由来の β -キシラナーゼ, 20 kDa・pI 5 付近のスポット VI は, 3 種の *Aspergillus* 属のキシラナーゼ, 30 kDa・pI 4 付近のスポット VII は, 2 種の *Aspergillus* 属の多糖分解酵素と同定された. スポット I, III と IV は同定されなかった(表 6B).

Trichoderma longibrachiatum 由来のヘミセルラーゼ(B653)の SDS-PAGE 像と二次元電気泳動像を図 5A と 5B に示す. SDS-PAGE 像においては, 20~120 kDa の間に多数のバンドが認められた. そのうち, 切り出しが可能であった 6 種を PMF 法で解析した結果, 120 kDa 付近のバンド a は 4 種の *Trichoderma* 属由来のキシラン 1,4- β -キシロシダーゼ, 80 kDa 付近のバンド c は 2 種の *Trichoderma* 属由来のエキソグルカナーゼ, 30 kDa 付近のバンド e は 2 種の *Trichoderma* 属由来の β -キシラナーゼ, 20 kDa 付近のバンド f は 5 種の *Trichoderma* 属由来の β -キシラナーゼと同定された. バンド b と d は同定されなかった(表 7A). 二次元電気泳動像においては, 20~80 kDa の間に多数のスポットが認められた. そのうち, 9 種の主要なスポットを PMF 法で解析した結果, 80 kDa・pI 5 付近のスポット I は複数の *Trichoderma* 属由来のキシログルカナーゼ, 60 kDa・pI 4 付近のスポット II は 3 種の *Trichoderma* 属由来のエキソグルカナーゼ, 30 kDa・pI 8 付近のスポット VIII は 2 種の *Trichoderma* 由来の β -キシラナーゼと同定された. スポット III~VII は同定されなかった(表 7B). B651 と B653 においては, SDS-PAGE 像では多数のバンドが認められ, 切り出しが困難であったが, 二次元電気泳動像ではスポットに分離され, 解析が容易となった. その結果, B651 においては同定できたタンパク質数が増加した. ただ, B653 においては同定できたタンパク質数は 1 種減少した. 二次元電気泳動法は, SDS-PAGE に比べてアプライ可能なタンパク質量が少ない. そのため, 解析に十分

なシグナルが質量分析による解析で得られなかったことが原因と推定される.

以上の結果より, 二次元電気泳動法で添加物試料を解析することにより, タンパク質数の多い試料において SDS-PAGE では同定不可能であったタンパク質が同定可能となること, pI(等電点)の情報も得られることから同定の精度が上がる利点があることが明らかとなった. しかし, データベースサーチ時の配列カバー率は SDS-PAGE による解析時とほとんど変わらず, 複数の菌種由来のタンパク質がデータベースサーチの結果ヒットするという問題点の解決には至らなかった. 二次元電気泳動法は操作が複雑で泳動像が得られるまでに時間がかかる, 多検体を同時に処理できない等といった欠点もあることから, SDS-PAGE では十分な解析結果が得られない試料のみに用いることが適切と考えられた.

C-1-4)マトリクスの種類変更と 2 種の消化酵素併用による Coverage への影響の解析

本研究での PMF 解析においては, マトリクスとして CICCA を用いることを基本としたが, 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 8). 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 9). 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 を上げることが明らかとなった.

本研究での PMF 解析においては, 消化酵素

としてトリプシンを用いることを基本としたが、本消化酵素はリジンとアルギニンのC末端側の切断部位に切れ残りが生じることが知られている。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 10~13 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。

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¹⁾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 14~16)。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-2-1) *A. niger* とその近縁種に関する分類学的情報の収集

A. niger とその近縁種は、*Aspergillus* 属 Nigri 節と総称され、黒褐色の胞子を形成する胞子や分生子頭等の形態が非常に酷似した麹菌のグループである。それらの分類法をめぐり多くの研究と改名が繰り返され、菌種の定義や名前が混乱していたが^{2,3)}、近年では遺伝子を用いた再分類が進んだが^{3,4)}、シノニムが多く、現在でも、古い分類体系が一掃され完全に整理されたとは言い難い。分類体系の再構築に伴う菌名の変更の歴史として、*A. niger*・*A. tubingensis*・*A. luchuensis* の 3 系統の変遷を図 6 に示した。真菌の分類学分野では 3 菌種にまとめる分類体系をとることが主流であるが、現在でも、これら 3 菌種以外に、添加物基原種または SwissProt 等 DB 登録配列の由来種として現在使用され続けている菌種は多く、*A. awamori*、*A. kawachii*、*A. foetidus* などがしばしば見られる。つまり、公的データベースであっても登録種名が最新でない可能性があり、ヒット配列の由来または製品の付帯情報が「*A. awamori*」であっても、生物としては *A. luchuensis* または *A. niger* のどちらの可能性もありうる。この問題を解決する方法の 1 つとして、登録する情報を精査し、独自に構築したカスタムデータベースを使用しての Mascot サーチを行うことが有効であると考えられた。さらに、データベースの整備とともに、酵素製品の付帯情報についても、最新の真菌分類学的情報を元に整理する必要があると言える。

C-2-2) *Trichoderma* 属菌に関する分類学的情報の収集

既存添加物名簿収載品目リストから *Trichoderma* 属を基原にもつ既存添加物 10 品目とその基原菌種を抽出したところ、7 菌種が記載されていた。これらのゲノムにおける特定の遺伝子アミノ酸配列における異種間での配列一致率を確認したところ、近縁菌種間では最高で 99.5%が一致することが判明した(図 7)。一例として、キシラナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、β-グルコシダーゼ及びセルラーゼの基原として記載される *T. reesei* では、その近縁菌種 *T. parareesei* と平均で 99.5%一致した^{5,6)}。

このことから、アミノ酸配列を指標として、基原菌種をその近縁種と区別して識別するためには、0.5%程度の差違を認識できる精度で分析する必要があることが示唆された。加えて *Trichoderma* 属はその有性世代は *Hypocrea* 属である⁷⁾ことから、塩基配列やアミノ酸配列を決定し公共データベースで検索した際には *Hypocrea* spp.としてヒットする場合が有り、このことに注意が必要である。この問題を解決する方法の1つとして、登録配列の菌種に関するアノテーションを精査し、独自に構築したカスタムデータベースを使用する *Mascot* サーチを行うことが有効であると考えられた。さらに、データベースの整備とともに、酵素製品の付帯情報についても、最新の真菌分類学的情報を元に整理する必要があると言える。

C-2-3) *A. terreus* 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⁸⁾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⁹⁾および Visagie ら¹⁰⁾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* などを用いた 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に基づく、広義の *A. terreus* は 12 種に細分化される(表 17)。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、試験法の改良を行った。独自に構築したデータベースを用いた *Mascot* サーチ、複数種の消化酵素の併用、タンパク質の分解能を向上させるための SDS-PAGE から二次元電気泳動法への変更、検出されるペプチドの種類を増やすための 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、これらの改良を加えたことによって、解析するタンパク質によっては、検出されるペプチドの種類が増え、*Mascot* サーチの結果における Coverage の向上が認められ、基原同定の精度を高めることに有用であることが明らかとなった。これらの方法を組み合わせて用いることで、より精度高く酵素の基原種の同定が可能となると期待される。また、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．真菌分類学的情報を元に，継続して整理し使用する必要があると考えられた．

E. 参考文献

- 1) T. Yoshinari, A. Sekine, N. Kobayashi, Y. Nishizaki, N. Sugimoto, Y. Hara-Kudo, M. Watanabe. Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. Food Addit. Contam. A. 2023;40(6):711-722.
- 2) 伴さやか. “微生物あれこれ(25)泡盛麹菌 *Aspergillus luchuensis* の学名の変遷”. NBRC ニュース. 2014. No.28.
- 3) Koji Yamada. “Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section Nigri inferred from mitochondrial cytochrome b gene”. FEMS Microbiology Letters. 2001, p241-246.
- 4) H. Seung-Beom et al. Taxonomic re-evaluation of black koji molds. Appl Microbiol Biotechnol. 98:555–561 (2014)
- 5) C. P. Kubicek et al. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. BMC Genomics. 20:485 (2019)
- 6) F. Cai, I. and S. Druzhinina. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. Fungal Divers. 107:1–69 (2021).
- 7) G. J. Samuels. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology 96:195–206 (2006)
- 8) R.A. Samson, S.W. Peterson, J.C. Frisvad, J. Varga. New species in *Aspergillus* section Terrei. Studies in Mycology. 2011;69:39–55.
- 9) 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.
- 10) 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

- 1) 伊藤紫野，西原秀典，橋本一浩，川上裕司，後藤慶一，水谷治，山田修，清水公德，伴さやか，矢口貴志，工藤由起子，渡辺麻衣子. 黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指標を用いた型別. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会(2023.10).
- 2) 伊藤紫野，渡辺麻衣子，西原秀典，橋本一浩，川上裕司，小林直樹，後藤慶一，水谷治，清水公德，伴さやか，矢口貴志，工藤由起子，大西貴弘：発酵食品由来の黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の遺伝子指標を用いた分類学的検討. 第 45 回日本食品微生物学会学術総会(2024.9).

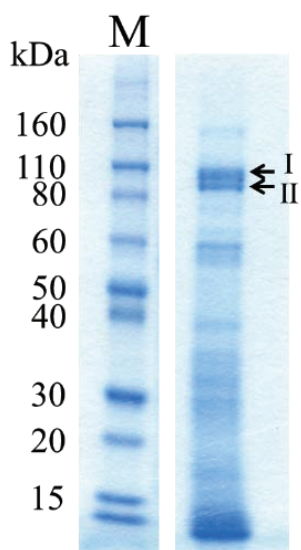
F-1-2) シンポジウム等

無し

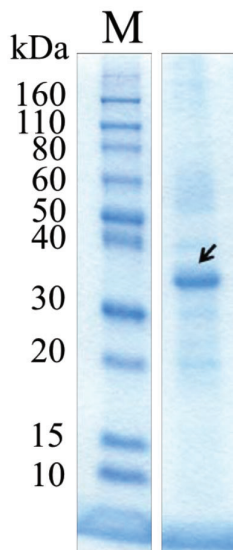
F-2) 論文発表

- 1) Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y. Suitability of culture broth and conditions for *Escherichia coli* growth and gas production as a test for food additives in EC groth. Food Hyg. Saf. Sci. 2023; 64: 69-77.
- 2) Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara-Kudo Y, Watanabe M: Determination of the biological origin of enzyme preparations using SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting. Food addit. contam. A, 2023; 40(6): 711-722.

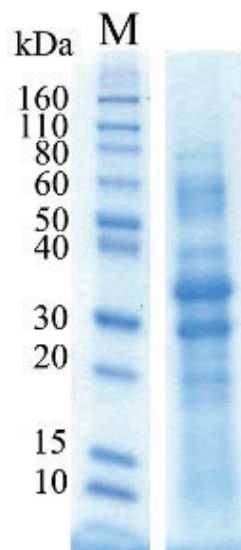
a) B572



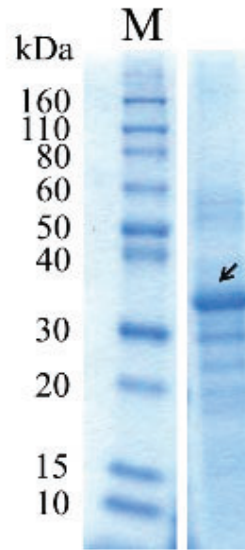
b) B576



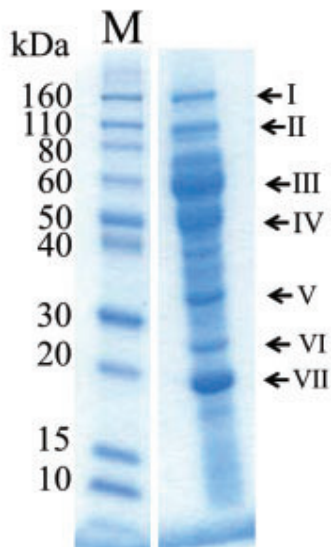
c) B577



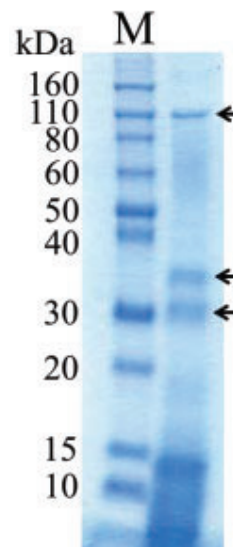
d) B591



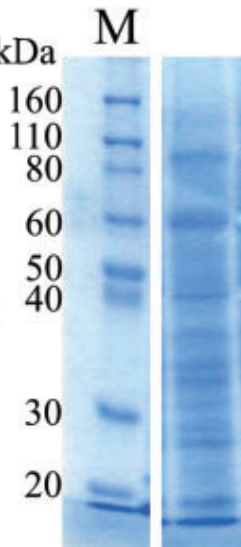
e) B653



f) B698



g) B651



h) B674

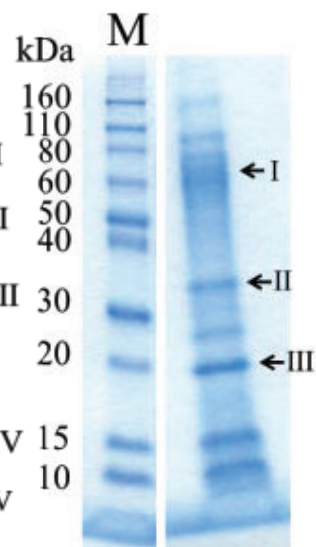
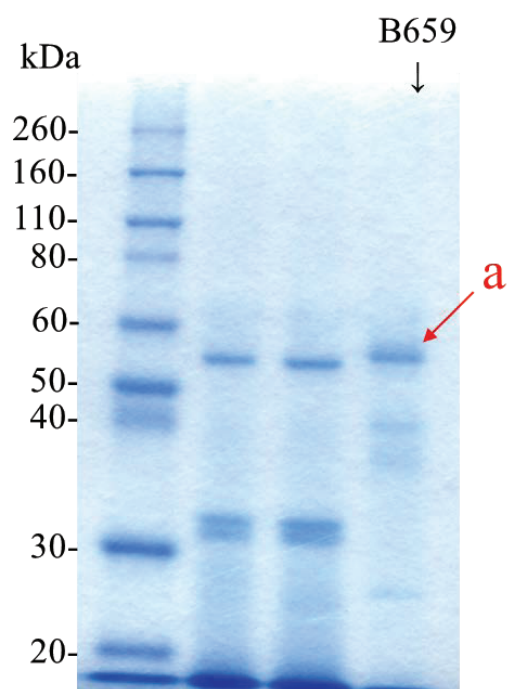


図 1. 解析を行った添加物酵素の SDS-PAGE 像

(A)



(B)

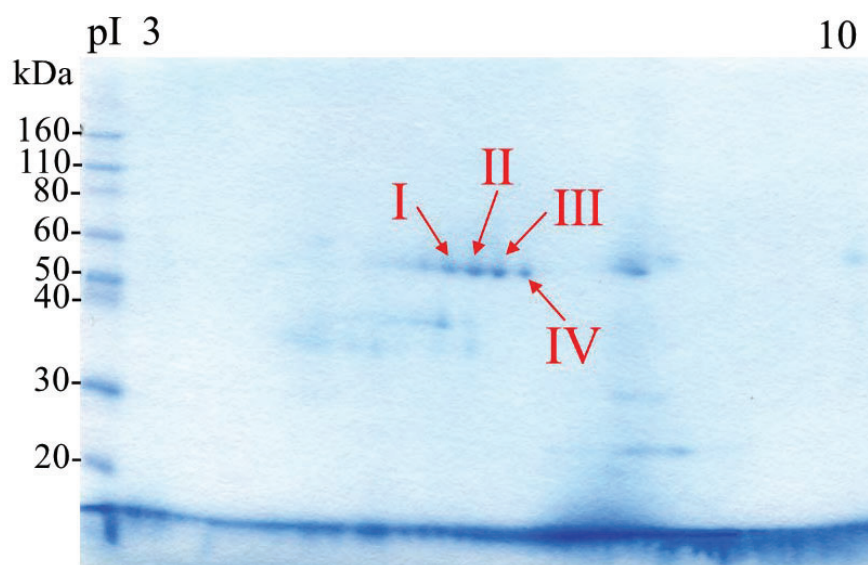
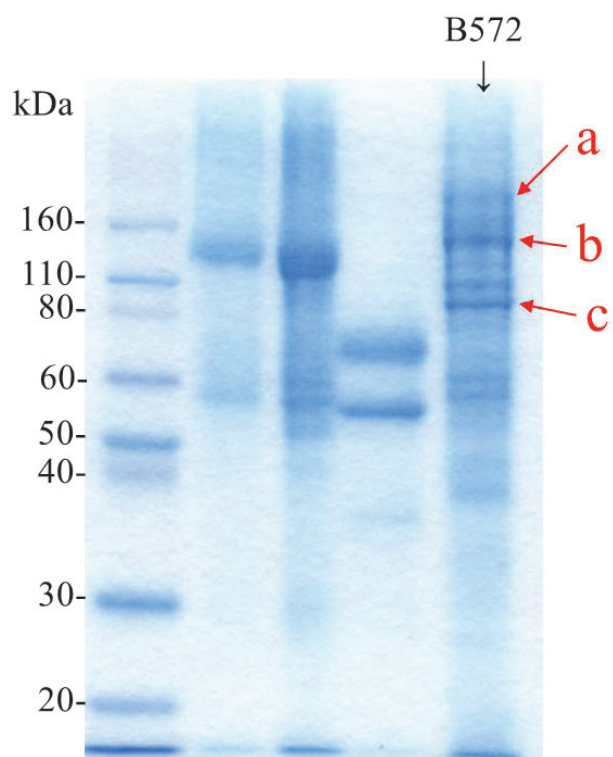


図 2. *Triticum aestivum* 由来の β -アミラーゼ(B659)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

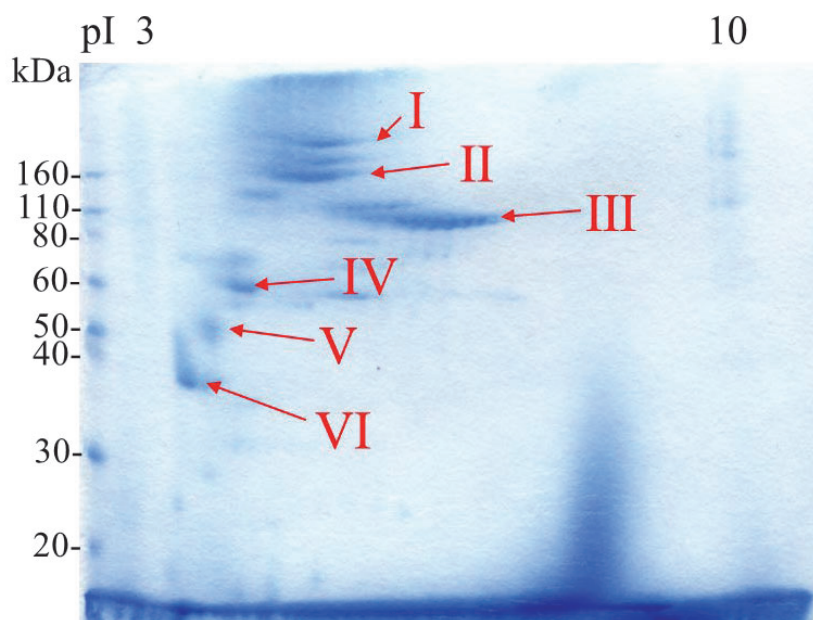
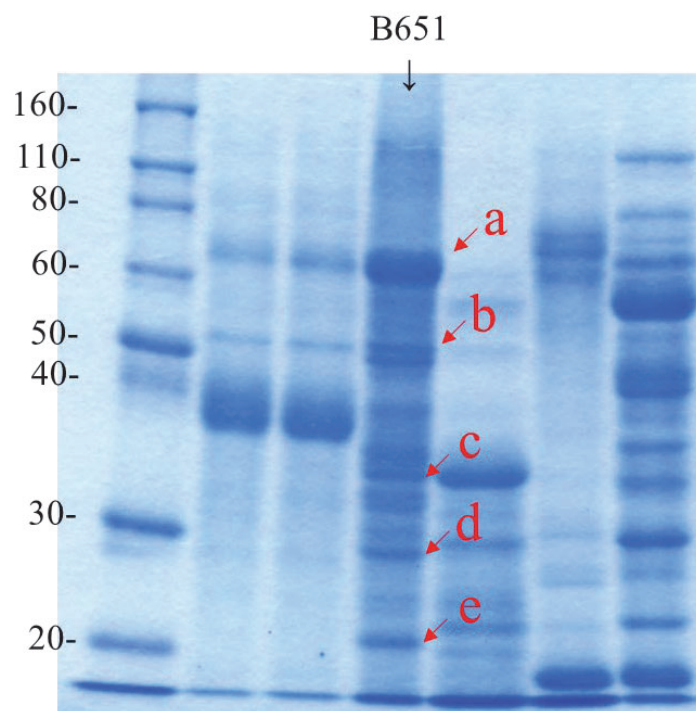


図 3. *Niallia circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼ(B572)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

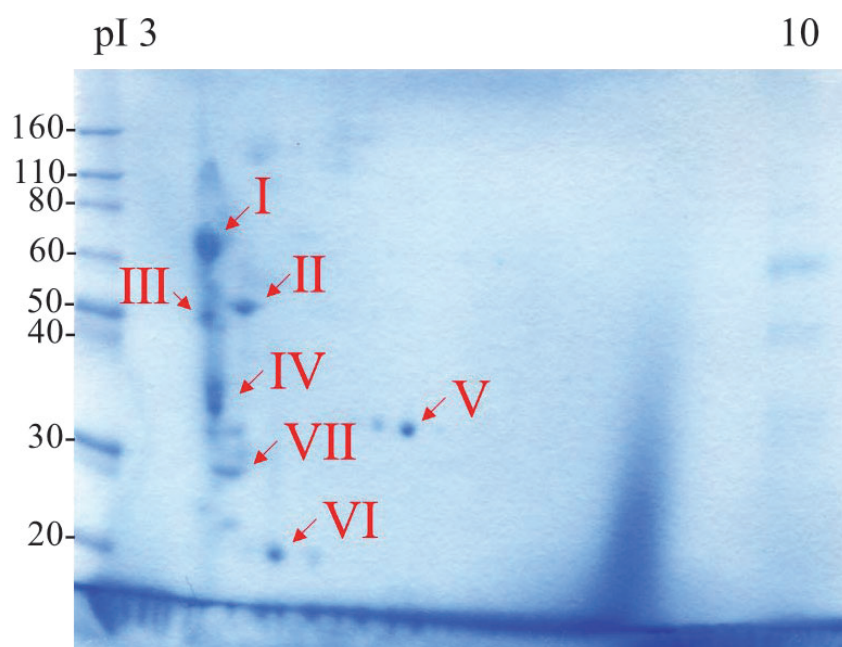
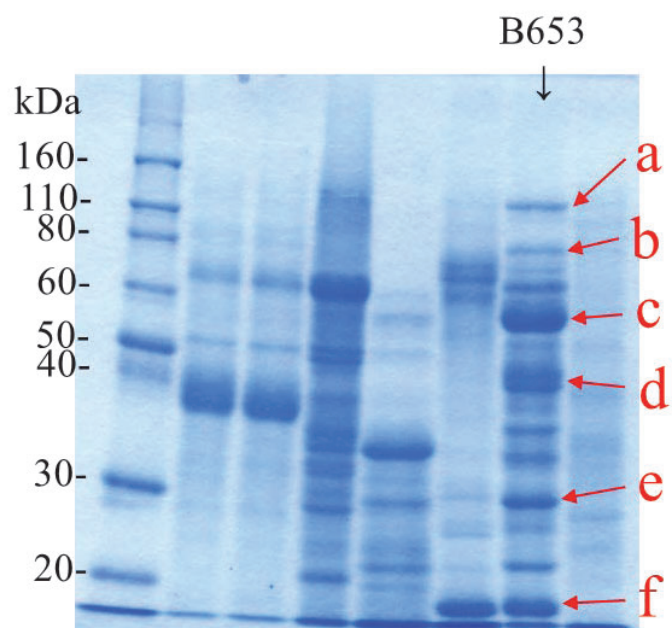


図 4. *Aspergillus niger* 由来のヘミセルラーゼ(B651)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

(A)



(B)

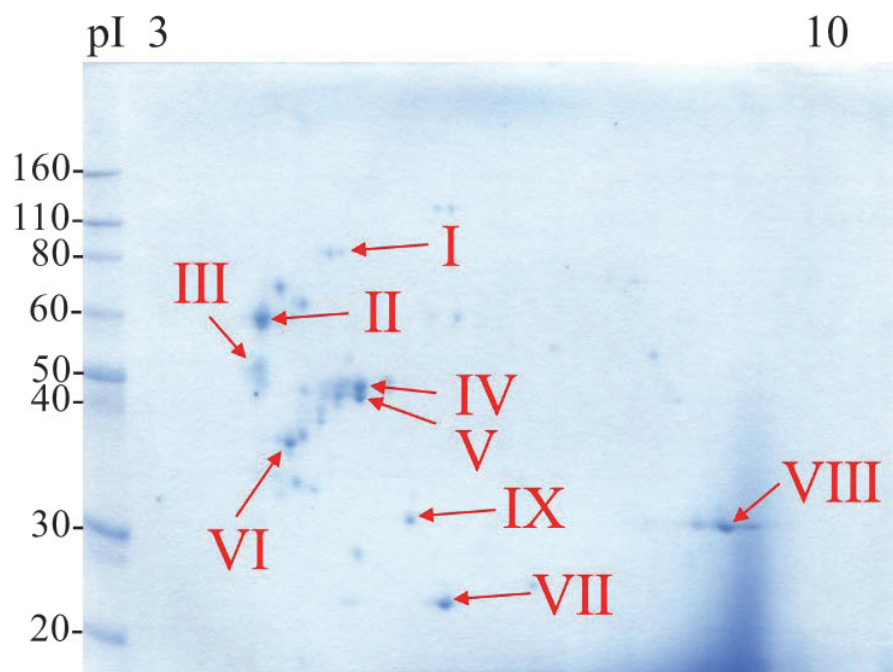


図 5. *Trichoderma longibrachiatum* 由来のヘミセルラーゼ(B653)の
(A)SDS-PAGE 及び(B)二次元電気泳動像

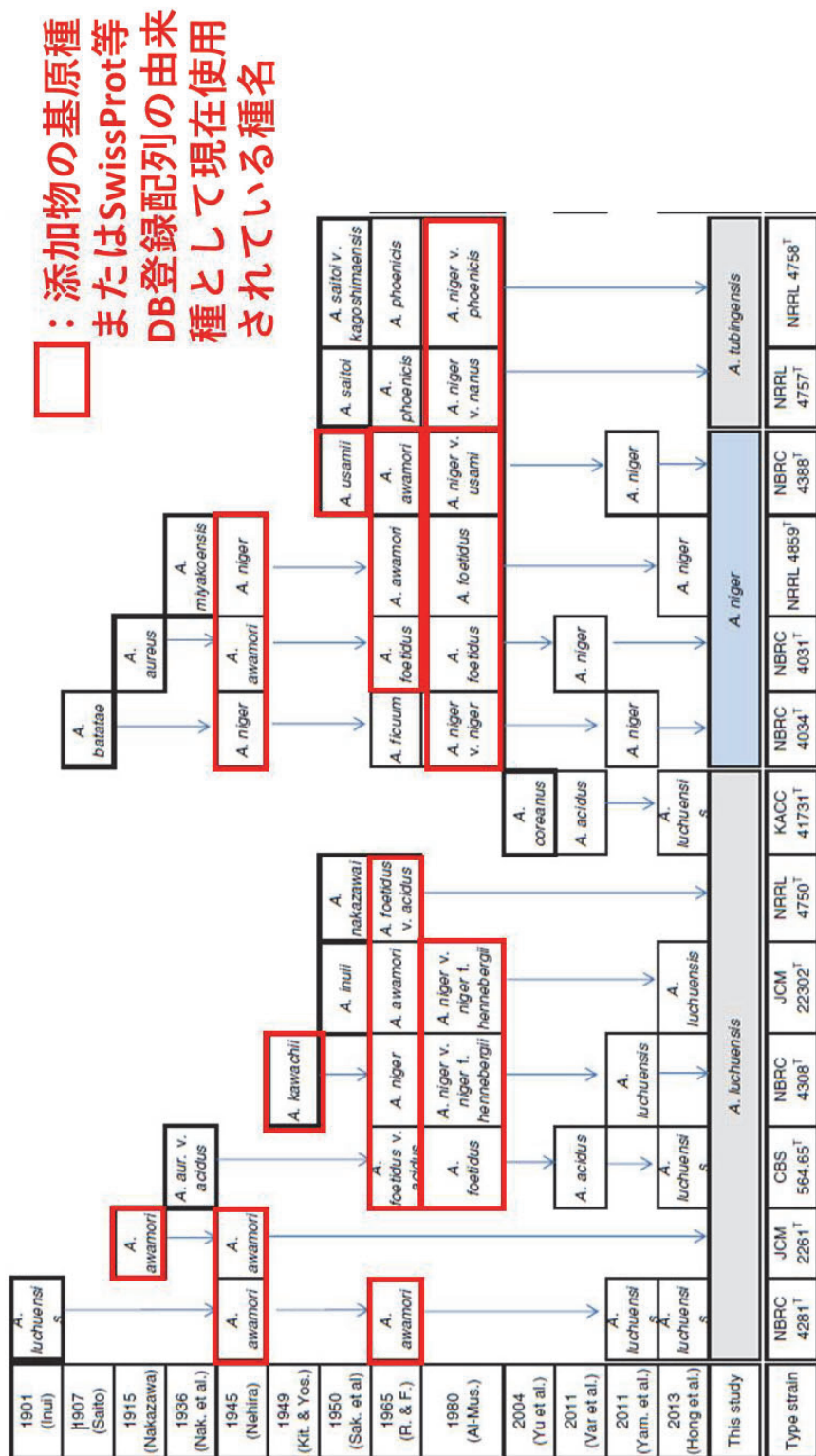


図6. *Aspergillus niger* およびその近縁菌の分類体系の変遷とシノニムの整理

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

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

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

表 1. 構築した Mascot データベースを用いた PMF 解析の結果

製造者による付帯情報			バンド	ゲル上の		構築したデータベースを用いたMascotサーチによりヒットしたタンパク質			
DFA No.	酵素名	由来		No.	分子量 (kDa)	タンパク質名	生物種	分子量 (kDa)	一致した ペプチド数
B572	β -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>	I	105	β -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>		192	27
			II	98	β -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i>		192	28
B576	cellulase	<i>Pycnoporus coccineus</i>	-	33	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>		44.8	4
B577	hemicellulase	<i>Pycnoporus coccineus</i>	I	34	unidentified				
			II	28	acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>		44.8	4
B653	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	I	164	unidentified				
			II	104	xyloglucanase	<i>Trichoderma reesei</i>		87.3	18
					xyloglucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>		87.3	18
			III	59	glucanase	<i>Trichoderma viride</i>		53.7	8
					glucanase	<i>Trichoderma koningii</i>		53.7	8
					glucanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>		55.5	8
					glucanase	<i>Trichoderma orientale</i>		55.6	8
			IV	48	glucanase	<i>Trichoderma ghanense</i>		50.1	6
					exo glucanase	<i>Trichoderma reesei</i>		50.3	6
					glucanase	<i>Trichoderma parareesei</i>		50.4	6
					glucanase	<i>Trichoderma viride</i>		50.3	6
					glucanase	<i>Trichoderma jecorina</i>		50.3	6

次ページへ

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

DFA No.	製造者による付帯情報		バンド No.	ゲル上の 分子量 (kDa)		構築したデータベースを用いた Mascot サーチによりヒットしたタンパク質		分子量 (kDa)	一致した ペプチド数
	酵素名	由来				タンパク質名	生物種		
B653	hemicellulase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	V	33		endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	38.2	8
						β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	38.2	8
						β -xylanase	<i>Trichoderma jecorina</i>	38.2	8
						β -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	38.3	7
						β -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	38.3	7
						unidentified			
			VI	25		endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	20.8	6
						endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	21.5	6
						endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma parareesei</i>	22.4	6
						endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	24.1	6
						endo-1,4- β -xylanase	<i>Trichoderma orientale</i>	24.1	6
						acid protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	44.8	5
B591	protease	<i>Pycnoporus coccineus</i>	-	34		unidentified			
B698	protease	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	I	110		unidentified			
			II	36		unidentified			
			III	30		unidentified			

表 2. 複数種の酵素消化を用いた PMF 解析の結果(B651)

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

表 3. 複数種の酵素消化を用いた PMF 解析の結果(B674)

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

表4. *Triticum aestivum*由来の β -アミラーゼ(B659)の同定結果

(A) SDS-PAGE

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

(B) 二次元電気泳動法

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

表 5. *Niallia circulans* 由来の β -ガラクトシダーゼ(B572)の同定結果

(A) SDS-PAGE

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

(B) 二次元電気泳動法

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

表6. *Aspergillus niger*由来のヘミセルラーゼ(B651)の同定結果

(A) SDS-PAGE

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

(B) 二次元電気泳動法

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

表7. *Trichoderma longibrachiatum*由来のヘミセルラーゼ(B653)の同定結果

(A) SDS-PAGE

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

(B) 二次元電気泳動法

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

表8. 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	ClCCA	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
	1561	1561				1561			1561	1607	1607
		1519				1519				1561	1561
	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9. ヘミセルラーゼ(DFA B653)のトリブ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	CICA	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
	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10. 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11. 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12. 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13. 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14. 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15. 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16. 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17. 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. floccosus</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. haktiae</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. jilInensis</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. m ontoensis</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. pseudoalabamensis</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 5～7 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
Hirose S, Watanabe M, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Hara-Kudo Y	Suitability of culture broth and conditions for <i>Escherichia coli</i> growth and gas production as a test of food additives in EC Broth	Food Hyg. Safety Sci.	64	69-77	2023
Yoshinari T, Sekine A, Kobayashi N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Hara- Kudo Y, Watanabe M	Determination of the biological origin of enzyme preparation by SDS-PAGE and peptide mass fingerprinting	Food Addit. Contam. A	40	711-722	2023
Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N	A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on ¹ H- qNMR for khellactone esters from <i>Peucedanum</i> <i>japonicum</i> root extract	Food Chem.	427	136647	2023
増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子	食品添加物公定書収 載品目における基原 生物に使用される学 名の考え方とその表 記法	食衛誌	64	77-88	2023
Masumoto N, Ohno T, Suzuki T, Togawa T, Sugimoto N	Application of the relative molar sensitivity method using GC-FID to quantify safranal in	J. Nat. Med.	77	829-838	2023

	saffron (<i>Crocus sativus</i> L.)				
内山奈穂子 , 細江潤子, 石附京子, 新井玲子, 杉本直樹, 鈴木梓, 浅野龍二, 五十嵐靖, 三浦亨, 武藤康弘, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 古川茶勲, 嶋田典基, 合田幸広	ブシモノエステルアルカロイドの相対モル感度(RMS)を用いた日本薬局方定量法の検討	薬学雑誌	27	951-962	2023
Bayrakceken G Z, Saracoglu I, Nagatsu A, Yilmaz M A, Basaran A A	Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from <i>Prunus mahaleb</i> L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity	J. Ethnopharmacol.	310	116378	2023
齋藤剛, 杉本直樹	定量核磁気共鳴 (qNMR)法を用いた有機化合物の純度測定に関する国際規格策定	環境と測定技術	69	13-17	2023
Uchiyama N, Hosoe J, Komatsu T, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Shinozaki T, Kobayashi K, Fujimine Y, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Muto Y, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A,	Quantitative ³¹ P-NMR for the purity determination of the organophosphorus compound brigatinib and its method validation	Chem. Pharm. Bull.	72	36-40	2024

Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y					
Amakura Y, Uchikura T, Yoshimura M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N	Chromatographic evaluation and characterization of constituents of sunflower seed extract used as food additives	Chem. Pharm. Bull.	72	93-97	2024
Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen S-P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G. F	Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR Sustainability	Anal. Chem.	96(24)	9790-9798	2024
西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子	燃焼法による食品添加物中の窒素定量分析	日食化誌	31(1)	31-34	2024
Ohtsuki T, Huang Y, Kamiya A, Nakayama Y, Matsushita M, Morikawa S, Matsufuji H	Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of blood concentrations of nine pharmaceutical compounds.	<i>J. Pharm. Health Care Sci.</i>	10	35	2024
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,	Development of a Standard-Free Analytical Quantitative Method based on Liquid Chromatography Using Relative Molar Sensitivity for	Chem. Pharm. Bull.	73 (7)	650-657	2025

Miyashita T, Kawashima S, Saito T, Sugimoto N	Chlorogenic Acid in Apple Juice				
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		qsaf099	2025