

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

令和6年度総括研究報告書

研究代表者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

研究要旨

1) 既存添加物の成分規格に関する研究

既存添加物の流通・使用実態及び成分規格について調査した。流通・使用実態については、既存添加物357品目(成分規格数として402)の生産量流通調査3回で報告がなく流通情報が得られなかった成分規格数は102品目、使用状況が確認できなかった成分規格数は160品目であった。第10版食品添加物公定書の公示時点で未収載の既存添加物約100品目の内、既存添加物自主規格収載の成分規格に基づき第三者検証が実施された30品目で昨年度と変わりなく、第11版食品添加物公定書には多く見積もって20余品目の収載が見込まれる。

2) 既存添加物の成分組成に関する研究

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

3) 分析法及び試験法開発に関する研究

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

研究分担者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部長
阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部第二室長
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部第二室長
辻巖一郎 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部主任研究官
渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部第三室長
天倉吉章 松山大学薬学部
教授
永津明人 金城学院大学薬学部
教授
井之上浩一 立命館大学薬学部
教授
大槻 崇 日本大学生物資源科学部
准教授
西崎雄三 東洋大学食環境科学部
准教授

研究協力者

松村雅彦 (一社)日本食品添加物協会
専務理事
藤井結花 (一社)日本食品添加物協会
常務理事
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部研究員
中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部研究員
好村守生 松山大学薬学部
准教授
内倉 崇 松山大学薬学部

特任助教

高山卓大 立命館大学薬学部
助教
岡田真子 日本大学生物資源科学部
実習生
出水庸介 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部長
御所窪誠 (一財)日本食品分析センター
渡辺実薫 (一財)日本食品分析センター
座間俊輔 (一財)日本食品分析センター
伊藤朱美 (一財)日本食品分析センター
藤松芽生 (一財)日本食品分析センター
吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部第四室長
中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所
短時間非常勤職員
船江元子 国立医薬品食品衛生研究所
短時間非常勤職員
清水公徳 東京理科大学先進工学部
教授
伊藤紫野 東京理科大学先進工学部
大学院生

A. 研究目的

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

令和 6 年度は、令和 5 年度に引き続き、(1)

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

B. 研究方法

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

第 10 版公定書に未収載の既存添加物について，成分規格の設定の実現可能性や優先度を総合的に検討するため，本研究では，1. 既存添加物の成分規格(公定書案，自主規格案，自社規格等)，2. 既存添加物の流通・使用実態，3. 既存添加物の国内外の安全性評価情報，について3年間で1サイクルとして調査を行っている。令和6年度は2について，すなわち，流通／使用実態について調査すると共に，令和5年度に引き続き，成分規格の策定状況について整理した。

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

昨年度に引き続き，カロブ色素の成分組成

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

2) 既存添加物の基準策定のための ¹H-qNMR を用いた成分定量

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

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

昨年度に引き続き，スピルリナ色素の主成分であるタンパク質フィコシアニンの定量的分析法の開発に向け，各種基礎検討を実施した。発色団の同定のため，スピルリナ色素2製品(A及びB)，対照としてクチナシ青色素1製品(C)及びバタフライピー色素1製品(D))について，酵素による消化後の生成物を LC-QToF/MS を用いてその組成を分析した。

3. 分析法及び試験法の開発に関する研究

1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度

評価

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

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

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

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

3) ムラサキヤマイモに含まれる案とシア ニン化合物の定量的分析法の開発

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

4) カシアガム中のアントラキノンの分析 手法に関する研究

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

得られた測定対象及び基準物質の検量線式の傾きの比(測定対象/基準物質)から基準物質に対する測定対象の RMS をそれぞれ算出した。併せて、モデル溶液を用いた検証により、算出された RMS の正確性を評価した。

5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

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

6) 窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較

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

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

食品添加物のうち微生物を基原とする酵素

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

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

C. D. 研究結果及び考察

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

既存添加物 357 品目(成分規格数 402)の内、生産量流通調査 3 回(平成 26 年, 平成 29 年及び令和 2 年)で報告がなく, 流通情報が取得できなかった成分規格数は 102 品目であった。使用状況が確認できた成分規格は 245 品目, 確認できなかった成分規格は 160 品目であった。また, 令和 6 年(2024 年)2 月に第 10 版食品添加物公定書が公示された時点で, 公定書に未収載の既存添加物は, 全 357 品目中約 100 品目(枝番品目は一部でも設定済のとき, その品目の成分規格は設定済とした場合)となっているが, この内, 67 品目(自主規格 67 品目+暫定規格 6 品目)が第 6 版既存添加物自主規格に収載された。第 6 版又は第 5 版既存添加物自主規格収載の成分規格に基づいて第 3 者検証を実施した添加物が 30 品目であった。第 11 版食品添加物公定書作成検討会へ成分規格を提出した添加物は 8 品目, 第 5 回作業部会へ提出予定の添加物は 10 品目程度であった。

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

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

Schaftoside の他, その配糖体である 2 種の

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

2) 既存添加物の基準策定のための ¹H-qNMR を用いた成分定量

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

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

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

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

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

3. 試験法及び分析法の開発に関する研究

1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価

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

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

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

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

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

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

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

4) カシアガム中のアントラキノンの分析手法に関する研究

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

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

ラキノン類 5 種の精確な定量が可能であることが実証された。

5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

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

6) 窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較

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

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

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

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

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

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

E. 結論

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

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

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

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

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

2) 既存添加物の基準策定のための ^1H -qNMR を用いた成分定量

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

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

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

3. 分析法及び試験法の開発に関する研究

1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価

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

純度測定結果は、標準偏差の範囲内で一致していた。以上の結果から、酸性条件下でも DMSO₂ 及び DSS-*d*₆ を IC または EC として使用し、アントシアニンを適切な濃度で qNMR 測定することで、正確な純度が求められることを明らかにした。本研究成果は、アントシアニンをはじめとする天然由来色素の絶対定量法を確立する上で重要な知見である。

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

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

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

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

4) カシアガム中のアントラキノンの分析手法に関する研究

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

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

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

^1H -qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン類分析法の確立では、正確な標準溶液の濃度に基づいて作成した各検量線式の傾きの比(測定対象の傾き/基準物質の傾き)より、基準物質 3 種に対する測定対象 5 種の各 RMS を明らかにした。これらの RMS の正確性はモデル溶液を用いた検証により実証され、本手法が測定対象 5 種の効率的かつ高精度な定量を可能とすることが示された。なお、前処理におけるクロロホルムの使用は、環境負荷及び作業者の安全性の観点から重要な課題として残されている。今後は、環境負荷が少なく、かつ分析担当者の安全性に配慮した代替溶媒の探索を含めた前処理法の改良が必要である。このような検討を進めることで、本研究で確立した分析法は、カシアガムの規格試験における実用的な手法として活用が可能となることが期待される。

5) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

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

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

6) 窒素定量法の違いによる定量値及び操作性等の比較

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

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

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

電気泳動法とMALDI-TOF MSを組み合わせた添加物酵素の基原の解析法について、タ

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

G. 研究発表

1. 論文発表等

1-1. 論文

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

Shinozaki T, Kobayashi K, Fujimine Y, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Muto Y, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Quantitative ^{31}P -NMR for the purity determination of the organophosphorus compound brigatinib and its method validation. Chem. Pharm. Bull., 2024; 72: 36-40.

1-2. 総説

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

2. 学会発表等

2-1. 学会

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

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

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

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

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

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)
なし

2-2. 講演等

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