

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

令和7年度 総括研究報告書

研究代表者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

研究要旨

1) 既存添加物の成分規格に関する研究

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

2) 既存添加物の成分組成に関する研究

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

3) 分析法及び試験法開発に関する研究

ムラサキヤマイモ色素中のアントシアニン、カシアガム中のアントラキノンの定量法、アントシアニンの $q\text{NMR}$ による純度評価法、PDA 検出器の校正法の検討及び校正用化合物の開発、エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(EDX)を利用した Pb 及び As の定量法への適用、酵素の基原同定法等について検討した。ムラサキヤマイモ色素については、色素成分シアニジンアシルグルコシドの結合様式を明らかとするため、HSCCC による単離精製条件を検討した。カシアガム中のアントラキノンは、前処理法を検討し JECFA 規格の基準値に適用且つクロロホルムを使用したい方法が確立できた。アントシアニンの純度評価に $^1\text{H-qNMR}$ 以外の方法として、イオンクロマトグラフィーを用いた塩化物量に基づく換算法を別法として検討したが、過剰の Cl^- が影響により $^1\text{H-qNMR}$ と同等の精度で純度評価できないことがわかった。PDA 検出器については、装置間差の補正方法について検討すると共に校正用化合物の合成を行った。EDX については、Pb 及び As のスクリーニング法として十分有用であることがわかった。酵素については、二次元電気泳動と MALDI-TOF MS による PMF 法の組合せ、マトリクスの変更や消化酵素の併用により、Coverage が上昇することが確認できた。

研究分担者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部長
阿部 裕 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部第二室長
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部第二室長
辻厳一郎 国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部主任研究官
渡辺麻衣子 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部第三室長
天倉吉章 松山大学薬学部
教授
永津明人 金城学院大学薬学部
教授
井之上浩一 立命館大学薬学部
教授
大槻 崇 日本大学生物資源科学部
准教授
西崎雄三 東洋大学食環境科学部
准教授

研究協力者

松村雅彦 (一社)日本食品添加物協会
専務理事
木戸啓之 (一社)日本食品添加物協会
常務理事
藤井結花 (一社)日本食品添加物協会
常務理事
川末慎葉 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部研究員
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部研究員
中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部研究員

好村守生 松山大学薬学部
准教授
内倉 崇 松山大学薬学部
特任助教
高山卓大 立命館大学薬学部
助教
吉成知也 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部第四室長
中西早苗 国立医薬品食品衛生研究所
短時間非常勤職員
船江元子 国立医薬品食品衛生研究所
短時間非常勤職員

A. 研究目的

令和 6 年(2024 年)2 月に第 10 版食品添加物公定書(以下, 第 10 版公定書)が告示され, 成分規格が未設定の既存添加物は全 357 品目中 99 品目となった(枝番品目は一部でも設定済のとき, その品目の成分規格は設定済とした場合). 更に, 令和 7 年(2025 年)に既存添加物の第 5 次消除が実施され, 全 327 品目中 67 品目の成分規格が未設定となっている.

これら成分規格が未設定の品目については, 1. 基原・製法・本質, 2. 有効成分又は指標成分, 3. 分析法, 等の調査及び検討を行い, 成分規格設定のための基礎情報の収集が急がれている.

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

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

B. 研究方法

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究 (委託調査)

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

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

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

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

2) 既存添加物の基準策定のための ^1H -qNMR を用いた成分定量

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

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

昨年度に引き続き, スピルリナ色素の主色素成分であるタンパク質フィコシアニンの定量的分析法の開発に向け, 各種基礎検討を実施した. スピルリナ色素製品について, 酵素(Tryosib)による消化後の生成物を LC-PDA 及び LC-QToF/MS を用いてその構造を解析した.

3. 分析法及び試験法の開発に関する研究

1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価

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

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

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

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

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

3) ムラサキヤマイモに含まれるアントシアニン化合物の定量的分析法の開発 ムラサキヤマイモ色素の主成分であるアン

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

4) カシアガム中のアントラキノンの分析手法に関する研究

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

5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

昨年度に引き続き、RMS を利用した HPLC 定量法に必要な基準物質(シングルフアレンス分子：SR 分子)の効率的な合成法の確立を検討した。これまでに、1,4-ナフトキノン誘導体の 2 位における置換基導入を検討していた。今年度は 2 位に加えて 5 位に置換基を有する分子について検討した。合成した化合物の UV-Vis スペクトルは DMSO 溶液として測定を行った。SR 分子については、アナトー色素の色素成分ビキシンを定量対象と想定して設計した。具体的にはこれまでの検討で複数合成した分子の中から、ビキシンと類似の UV 吸収帯を示す骨格としてビスイ

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

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

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

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

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

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

C. D. 研究結果及び考察

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究(委託調査)

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

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

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

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

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

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

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

2) 既存添加物の基準策定のための ¹H-qNMR を用いた成分定量

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

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

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

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

3. 試験法及び分析法の開発に関する研究

1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4) カシアガム中のアントラキノンの分析手法に関する研究

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

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

5) PDA 検出器の校正用化合物創出のための基礎検討

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

1. 既存添加物の成分規格に関する研究

1) 既存添加物の成分規格に関する調査研究

(委託調査)

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

2. 既存添加物の成分組成に関する研究

1) カロブ色素の成分解析

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

2) 既存添加物の基準策定のための ^1H -

qNMR を用いた成分定量

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

3) 既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

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

3. 分析法及び試験法の開発に関する研究

1) 定量 NMR によるアントシアニンの純度評価

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

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

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

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

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

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

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

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

4) カシアガム中のアントラキノンの分析手法に関する研究

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

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

5) PDA 検出器の校正化合物創出のための基礎検討

PDA 校正用の標準物質の開発として、1,4-ナフトキノン誘導体の置換基位置の違いがおよぼす UV-Vis スペクトルの変化について検討した。合成した誘導体 **1'** は結果としては図らずしも既存の色素分子である青色 3 号の分子構造に共通した構造を有しており、UV スペクトルの類似性もこの部分に起因することが示唆された。今後はこの化合物構造をベースとし、構造情報を蓄積するとともに、理論的に吸収スペクトルが制御できる設計

指針を立てることが重要と考えられた。

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

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

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

7) 真菌基原の添加物酵素の基原種同定法

の開発及び基原種に関する分類学的情報の収集

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

また、2011 年以降に *A. terreus* と同定された基原菌株は異なる学名に再同定される可能性があり、注意が必要であることを確認した。基原菌種の分類情報は今後も継続的に変遷すると予想されることから、基原微生物の学名について、国際整合を考慮した生物種の最新の分類情報を常に収集し、データベースや酵素製品の付帯情報での登録情報を継続して更新する必要があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表等

1-1. 論文

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

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

1-2. 総説

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

2. 学会発表等

2-1. 学会

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

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

2-2. 講演等

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

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし