

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者	佐藤 恭子	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	山崎 壮	国立医薬品食品衛生研究所
	神谷 研二	広島大学原爆放射能医学研究所
	原田 昌興	神奈川県立がんセンター臨床研究所
	三森 国敏	東京農工大学
	関田 清司	国立医薬品食品衛生研究所
	井上 達	国立医薬品食品衛生研究所

平成15年(2003)3月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

- 既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究  
佐藤恭子

### II. 分担研究報告

1. 既存添加物の品質研究の総括及び酸化防止剤等の成分研究  
佐藤恭子
2. 増粘安定剤、ガムベース等の成分研究  
山崎 壮
3. コメヌカ油抽出物、キダチアロエ抽出物の安全性に関する研究  
神谷研二
4. アグロバクテリウムスクシノグリカンの安全性に関する研究  
原田昌興
5. スフィンゴ脂質、ニガヨモギ抽出物の安全性に関する研究  
三森国敏
6. ジャマイカカссия抽出物、グレープフルーツ種子抽出物、  
サンダラック樹脂の安全性に関する研究  
関田清司
7. 毒性試験の総括  
井上 達

## 既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究

主任研究者 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨 既存添加物 489 品目の基本的安全性の評価を進めるために、反復投与毒性試験等の科学的安全性データに欠ける既存添加物のうちから、業界自主規格のない品目を中心に選定し、①成分・品質に関する研究と②ラット 90 日間反復投与毒性試験を連携して行った。毒性試験については、一部の品目は供給が遅れる等の事情で病理組織学的検索等が未了であり、最終結論が出ないが、ジャマイカカссия抽出物およびサンダラック樹脂で肝重量の増加等の所見が認められたことを除いて、他の剤に毒性は認められなかった。

- 1) 酸化防止剤・コメヌカ油抽出物：①有効成分フェルラ酸（約60%）の他、炭素40個程度からなる骨格にフェルラ酸が結合した化合物が確認された。②組織学的に明らかな毒性所見は認められず、今回の亜慢性毒性試験で毒性はないものと判断された（0.06～4%添加固形飼料投与）。
- 2) 増粘安定剤・キダチアロエ抽出物：①多糖体の構成糖および特有低分子成分を明らかにした。②4%投与群では、軽度の白血球増加と体重減少を認めたが、その他の異常を認めず、毒性は極めて低いものと考えられた（0.06～4%添加固形飼料投与）。
- 3) 増粘安定剤・アグロバクテリウムスクシノグリカン：①スクシノグリカンの単糖組成および糖鎖、置換基の結合位置を推定した。②最高用量5%投与でも、72日時点では一般状態、摂餌、体重等に影響なく、一般毒性は乏しいものと推測された（0.5～5%添加粉末飼料投与）。
- 4) 苦味料・ニガヨモギ抽出物：①副作用成分 $\alpha$ -、 $\beta$ -thujoneは微量であった。②病理組織学的検査では被験物質投与に起因した変化は認められず、無毒性量は2%以上と考えられた（0.125～2%混水投与）。
- 5) 乳化剤・スフィンゴ脂質：①主成分と思われる脂質の他に、極性の大きく異なる同類の脂質が多数含まれていることが推定された。由来を判別する確認試験法について文献的検討を行った。②体重増加量、血液学的及び血清生化学的検査、臓器重量測定において被験物質投与に起因した変化は何ら認められなかった（週5日60～1000mg/kg、強制経口投与、病理組織学的検査未了）。
- 6) 苦味料・ジャマイカカссия抽出物：①主有効成分を分析定量した（quassin 21.4%、neoquassin 55.5%）。②雌雄の 0.5%添加飼料投与群で肝臓への影響が示唆された（0.005～0.5%添加粉末飼料投与、病理組織学的検査未了）。
- 7) ガムベース・サンダラック樹脂：①ジテルペンのカルボン酸誘導体が主成分である可能性が示唆された。②雄の 1.0%、雌雄の 5.0%添加飼料投与群で肝臓の相対重量増加との関連性が示唆された（0.2～5.0%添加粉末飼料投与、病理組織学的検査未了）。
- 8) 製造用剤・グレープフルーツ種子抽出物：①成分は多数の脂肪酸誘導体の混合物と推定された。②雌雄ともに 1000mg/kg/日までの投与で影響は認められなかった（40～1000mg/kg/日、強制経口投与、病理組織学的検査未了）。
- 9) 着色料・ログウッド色素：主色素とされるヘマトキシリン及びその酸化体ヘマテインは検出されず、シタン色素の主色素であるサンタリンA、Bが検出され、今回入手した試料はシタン色素である可能性が示唆されたため、毒性試験は保留とした。

分担研究者

山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部室長  
神谷研二 広島大学原爆放射能医学研究所教授  
原田昌興 神奈川県立がんセンター臨床研究所長

三森国敏 東京農工大学農学部獣医学科教授  
関田清司 国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長  
井上 達 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター長

## A. 研究目的

既存添加物 489 品目は、平成 7 年 5 月の食品衛生法の改正に伴い、従来から使用されていた天然添加物に対する経過措置として、使用を認めているものである。法改正時の国会附帯決議で、既存添加物については速やかに安全性の見直しを行い、有害であることが実証された場合には、使用禁止等必要な措置を講じることとされている。既存添加物の基本的安全性を評価するためには、反復投与毒性試験などの実施による安全性の検討が必要である。毒性試験の際には成分含量などの情報が重要であるが、既存添加物の多くは天然抽出物であり、成分が未解明なものも存在する。既存添加物の多くの品目は公的な規格が未設定であり、食品添加物の業界団体である日本食品添加物協会による自主規格の作成が進んでいるものの、規格が不十分と思われる品目もある。本研究では、反復投与毒性試験等の動物実験による科学的安全性データに欠ける既存添加物のうち、自主規格のない品目を中心に選定し、成分、品質に関する研究と 90 日間反復投与毒性試験を行った。

## B. 研究方法

### I. 既存添加物の成分、品質に関する研究

コメヌカ油抽出物、キダチアロエ抽出物、スフィンゴ脂質、ジャマイカカシヤ抽出物、サンダラック樹脂、グレープフルーツ種子抽出物、ログウッド色素については、主成分あるいは微量成分を各種クロマトグラフィーにより単離した。単離した化合物について各種 NMR、MS 等により構造解析を行い、一部、定量分析を行った。また、グレープフルーツ種子抽出物については、LC/MS 等による合成抗菌剤の分析を行った。キダチアロエ抽出物については、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより単離した多糖体について各種定量、定性試験を実施した。アグロバクテリウムスクシノグリカンについては、イオン交換樹脂および塩化セチルピリジンをを用いて得られた酸性多糖体について構成糖、結合様式を検討した。ニガヨモギ抽出物については GC/MS により精油成分の分析を行った。

### II. 既存添加物の安全性に関する研究

90 日間反復投与毒性試験：コメヌカ抽出物、キダチアロエ抽出物、アグロバクテリウムスクシノグリカン、ニガヨモギ抽出物、スフィンゴ

脂質、ジャマイカカシヤ抽出物、サンダラック樹脂、グレープフルーツ種子抽出物の 8 品目についてラットに数段階の用量の被験物質を 90 日間反復投与した。試験では、一般状態の観察（毎日）、体重測定（週 1 回）、摂餌量測定（週 1 回）を投与期間中に実施する他、投与終了後には、血液学的検査（赤血球数、白血球など 10 数項目）、血液生化学的検査（GOT、GPT など 20 数項目）、臓器重量測定（肝臓、腎臓など 10 項目近く）、及び組織学的検査を含む病理学的検査（全臓器）を実施する。また平均被験物質投与量（mg/kg・day）と無毒性量（NOAEL）による被験物質の安全性の評価を行う。

## C. 研究成果および考察

### II. 既存添加物の成分、品質に関する研究

- 1. コメヌカ油抽出物**：約 60% がフェルラ酸であることを確認した。その他に炭素 40 個程度からなる骨格にフェルラ酸が結合した化合物数種が確認された。
- 2. キダチアロエ抽出物**：収率 9.1% で、ガラクトロン酸、アラビノース、ラムノース、ガラクトース、およびグルコースで構成される多糖体を単離した。低分子化合物として aloenin (1.9%)、barbaloin (0.7%)、isobarbaloin (0.7%) を含有していた。また、これらの低分子化合物を指標とした局方アロエおよびアロインとの判別法として、TLC および LC/MS が有用であることを明らかにした。
- 3. アグロバクテリウムスクシノグリカン**：スクシノグリカンを 77.6% の収率で得た。構成糖はグルコース、ガラクトース、マンノースであり、Glc:Gal:Man = 10:1:0.8 であった。また、非還元末端位にピルビン酸が結合していることが示唆された。さらに、糖鎖の結合様式を明らかにした。
- 4. ニガヨモギ抽出物**：精油成分としては chrysanthenol、sabinol の含量が高く、副作用成分とされる  $\alpha$ -,  $\beta$ -thujone の含有量はごく微量であった。
- 5. スフィンゴ脂質**：シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いた分離を行った結果、主成分と思われる脂質の他に、極性の大きく異なる化合物が多種単離された。NMR により同類の脂質が多く含まれていると推定された。スフィンゴ脂質の由来判別法についての文献的検討より、

米または小麦のぬか由来製品とウシ脳由来製品の区別は原理的には可能と判断された。

**6. ジャマイカカシヤ抽出物**：主有効成分 quassin を単離し、MS、NMR により同定した。得られた quassin を標品として定量した結果、quassin 21.4%、neoquassin 55.5%であった。

**7. サンダラック樹脂**：シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび分取薄層クロマトグラフィーにより得られた化合物は、ジテルペンのカルボン酸誘導体の可能性が示唆された。

**8. グレープフルーツ種子抽出物**：TLC において非常に多くのスポットがラダー状に観察された。単離した成分の NMR の結果から、多数の脂肪酸誘導体が含まれていることが推測された。また、TLC 挙動からは、脂肪酸誘導体以外と考えられる化合物が存在する情報が全く見られなかった。なお、過去に合成抗菌剤等が検出された報告があったため、今回の試料について分析を行ったが、検出されなかった。

**9. ログウッド色素**：主色素成分とされるヘマトキシリンおよびその酸化体ヘマテインは検出されず、シタン色素の主色素成分であるサンタリン A、B が検出された。今回のログウッド色素製品は、シタン色素である可能性が高いことが示唆されたため、毒性試験は保留した。

## II. 既存添加物の安全性に関する研究

**1. コメヌカ油抽出物**：血液学的検査および血清生化学的検査においては、散発的な検査項目で対照群に比べ有意の差を認めしたが、これらの値の変動範囲はごく軽度であり、その範囲も生物学的に正常範囲で、用量相関性も認められなかったことから毒性学的意義に乏しい変化と考えられた。投与群に特異的な組織学的変化は認められなかった(0.06、0.25、1、4%添加固形飼料投与)。

**2. キダチアロエ抽出物**：4%投与群で軽度の白血球増加と体重減少が認められたが、組織学的に明らかな毒性所見は認められず、その他の異常所見も認められなかったことから毒性は極めて低いものと考えられる。(0.06、0.25、1、4%添加固形飼料投与)。

**3. アグロバクテリウムスクシノグリカン**：5%投与群でも72日目までは、一般状態、体重、摂餌量、肉眼的病理所見、一般血液検査、血液生化学検査等に異常を認めず、スクシノグリカン

の一般毒性は極めて乏しいものと推察される(0.5、1.5、5%添加粉末飼料投与)。

**4. ニガヨモギ抽出物**：血液学的検査及び血清生化学的検査においては、散発的な検査項目で対照群に比べ有意の差を認めしたが、変動幅がわずかであることなどから、毒性学的意義はないものと判断した。雌雄に肝臓相対重量の変化が認められたが、病理組織学的変化は認められず、毒性学的意義はないものと判断した。病理組織学的検査では雌雄ともに顎下腺漿液腺細胞の空胞化が認められ、投与群の数例で若干変化が強かったが、発生頻度は対照群と差はなく、変化の強い個体数もわずかであることから、毒性学的意義は低いものと考えられた(0、0.125、0.5、2%混水投与)。

**5. スフィンゴ脂質**：血液学的検査で雌1000mg/kg投与群に好酸球(EOS)の増加が認められたが、同群における1匹の動物の高値によるものであることから、毒性学的意義は低いものと考えられた。血清生化学的検査で雄250mg/kg投与群に血中尿素窒素(BUN)値の有意な増加が認められたが、投与量に相関しないことから偶発的な変化と考えられた。また雄1000mg/kg投与群にアルブミン/グロブリン(A/G)比の低下が認められたが、変動幅がわずかであり、その他の関連項目に変化がみられないことから毒性学的意義はないものと判断した。臓器重量測定において雌250mg/kg以上の投与群で子宮及び卵巣の相対重量の減少が認められた(週5日0、60、250、1000mg/kg、強制経口投与、病理組織学的検査未了)。

**6. ジャマイカカシヤ抽出物**：0.5%群では、肝臓の絶対重量および相対重量増加が雌雄で認められ、雌ではγ-グルタミルトランスペプチターゼ(γ-GTP)や総コレステロール(T-Cho)の増加も観察され、被験物質の肝臓への影響を示唆した変化と考えられた。0.005%群からアルカリホスファターゼ(AIP)の減少が認められたが毒性変化としての意義はないと考えられており、現時点ではその意義について考察し得ないが、変化の程度から、少なくとも0.005および0.05%群の変化は毒性変化とは考えなかった(0、0.005、0.05、0.5%添加粉末飼料投与、病理組織学的検査未了)。

**7. サンダラック樹脂**：雄1.0および雌雄5.0%投与群で肝臓の相対重量の有意な増加が認めら

れ、被験物質投与との関連性が示唆された。その他の変化については、毒性学的に意義の無い変化と考察した(0、0.2、1.0、5.0%添加粉末飼料投与、病理組織学的検査未了)。

**8. グレープフルーツ種子抽出物**：雌の1000mg/kg投与で、脾臓の相対重量増加が認められたが、統計学的に有意差を示すものの、差は極めて小さく、他に変化が全く認められないことなどの理由から、毒性学的意義のない変化と考察した(0、40、200、1000mg/kg/日、強制経口投与、病理組織学的検査未了)。

#### D. 結論

1. 既存添加物の成分、品質に関する研究

- 1) コメヌカ油抽出物：有効成分フェルラ酸(約60%)の他、炭素40個程度からなる骨格にフェルラ酸が結合した化合物が確認された。
- 2) キダチアロエ抽出物：多糖体の構成糖および特有低分子成分を明らかにした。
- 3) アグロバクテリウムスクシノグリカン：スクシノグリカンの単糖組成および糖鎖、置換基の結合位置を推定した。
- 4) ニガヨモギ抽出物：副作用成分 $\alpha$ -、 $\beta$ -thujoneは微量であった。
- 5) スフィンゴ脂質：主成分と思われる脂質の他に、極性の大きく異なる同類の脂質が多数含まれていると推定された。由来を判別する確認試験法について文献的検討を行った。
- 6) ジャマイカカussia抽出物：主有効成分を同定し、定量した(quassin 21.4%、neoquassin 55.5%)。
- 7) サンダラック樹脂：ジテルペンのカルボン酸誘導体が主成分である可能性が示唆された。
- 8) グレープフルーツ種子抽出物：成分は多数の脂肪酸誘導体の混合物と推定された。
- 9) ログウッド色素：主色素とされるヘマトキシリン及びその酸化体ヘマテインは検出されず、シタン色素の主色素であるサンタリンA、Bが検出され、今回入手した試料はシタン色素である可能性が示唆されたため、毒性試験は保留とした。

2. 既存添加物の安全性に関する研究

ラット90日間反復投与試験については、一部の品目は供給が遅れる等の事情で病理組織学的検索等が未了であり、最終結論が出ないが、

ジャマイカカussia抽出物およびサンダラック樹脂で肝臓の相対重量の増加等の所見が認められたことを除いて、他の品目に毒性は認められなかった。

- 1) コメヌカ油抽出物：組織学的に明らかな毒性所見は認められず、今回の亜慢性毒性試験で毒性はないものと判断された(0.06~4%添加固形飼料投与)。
- 2) キダチアロエ抽出物：最高用量4%投与群で、軽度の白血球増加と体重減少を認めたが、その他の異常を認めず、毒性は極めて低いものと考えられた(0.06~4%添加固形飼料投与)。
- 3) アグロバクテリウムスクシノグリカン：最高用量5%投与でも、72日時点では一般状態、摂餌、体重等に影響なく、一般毒性は乏しいものと推測される(0.5~5%添加粉末飼料投与)。
- 4) ニガヨモギ抽出物：病理組織学的検査では被験物質投与に起因した変化は認められず、無毒性量は2%以上と考えられた(0.125~2%混水投与)。
- 5) スフィンゴ脂質：体重増加量、血液学的及び血清生化学的検査、臓器重量測定において被験物質投与に起因した変化は何ら認められなかった(週5日60~1000mg/kg、強制経口投与、病理組織学的検査未了)。
- 6) ジャマイカカussia抽出物：雌雄の0.5%添加飼料投与群で肝臓への影響が示唆された(0.005~0.5%添加粉末飼料投与、病理組織学的検査未了)。
- 7) サンダラック樹脂：雄の1.0%、雌雄の5.0%添加飼料投与群で肝臓の相対重量増加との関連性が示唆された(0.2~5.0%添加粉末飼料投与、病理組織学的検査未了)。
- 8) グレープフルーツ種子抽出物：雌雄ともに1000mg/kg/日までの投与で影響は認められなかった(40~1000mg/kg/日、強制経口投与、病理組織学的検査未了)。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 既存添加物の品質研究の総括

分担研究者 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨 90日間反復投与毒性試験の対象とした9品目の既存添加物の成分、品質研究について総括を行った。今回対象とした既存添加物9品目はいずれも混合物であり、主成分の純度の確認や他の既存添加物との区別のために、薄層クロマトグラフィー（TLC）、あるいは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC/MS）、ガスクロマトグラフィー（GC）、GC/MSによる確認試験が有用であると考えられた。また、定量法としてもHPLC等の導入が望ましいと考えられた。

分担研究者

山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 室長

協力研究者

永津明人 名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師

垣内信子 金沢大学薬学部 助教授

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

黒柳正典 広島県立大学生物資源学部 教授

李 貞範 富山医科薬科大学薬学部 助手

櫛 泰典 帯広畜産大学畜産科学科 教授

### A. 研究目的

既存添加物の多くは天然抽出物であり、通常、多成分からなる。同じ品目名であっても、製法等の違いにより、成分組成は異なる場合がある。さらに、既存添加物の場合、添加物原体にも安定化のために、デキストリンあるいは食用油脂等を含む場合があり、毒性試験に用いられる試料の主成分含量を明らかにしておくことは、安全性評価のために重要であると考えられる。同濃度の既存添加物について試験をしたつもりでも、基原動植物由来物質の含量が異なれば、結果が異なることも予想される。一方、既存添加物の多くの品目は公的な規格が未設定であり、日本食品添加物協会による自主規格の作成が進んでいるものの、規格が不十分と思われる品目もある。今年度、本研究班では、90日間反復投与毒性試験等の動物実験による科学的安全性データに欠

ける既存添加物のうちから、自主規格のない品目、あるいは不十分と考えられた品目を選定し、成分、品質に関する研究と90日間反復投与毒性試験を行った。そこで、公的な成分規格作成を考慮し、今回対象とした9品目（Table 1）の成分、品質研究について総括した。

### B. 研究方法

コメヌカ油抽出物、キダチアロエ抽出物、スフィンゴ脂質、ジャマイカカシア抽出物、サンダラック樹脂、グレープフルーツ種子抽出物、ログウッド色素については、主成分あるいは微量成分を各種クロマトグラフィーにより単離した。単離した化合物について各種核磁気共鳴（NMR）、MS等により構造解析を行い、一部、定量分析を行った。また、グレープフルーツ種子抽出物については、合成抗菌剤の分析を行った。キダチアロエ抽出物については、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより単離した多糖体について各種定量、定性試験を実施した。アグロバクテリウムスクシノグリカンについては、イオン交換樹脂等を用いて得られた酸性多糖体について構成糖、結合様式を検討した。ニガヨモギ抽出物についてはGC/MSにより精油成分の分析を行った。

また、学名の確認、使用目的等の調査のためWeb検索等を行った。

### C. 研究成果および考察

#### 1. コメヌカ油抽出物

コメヌカ油抽出物は約 60%がフェルラ酸であり、残り約 40%はフェルラ酸誘導体等の混合物であることを確認した。

コメヌカ油抽出物については、今年度、日本食品添加物協会により自主規格案が提案されたが、主成分がフェルラ酸であることから、既存添加物フェルラ酸の確認試験が準用されている。また、社内規格として、フェルラ酸の確認試験、純度試験(重金属、ヒ素)等の記載があり、一定の品質が保たれているものと考えられた。しかし、既存添加物のフェルラ酸と異なり、不純物を含むため、規格には、確認試験として薄層クロマトグラフィー(TLC)等が望ましいと考えられた。また、フェルラ酸の定量法は水酸化ナトリウムによる中和滴定であるが、同じ理由から、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等が望ましいと考えられた。

## 2. キダチアロエ抽出物

キダチアロエ抽出物粉末より収率 9.1%で、ガラクトロン酸、アラビノース、ラムノース、ガラクトース、およびグルコースで構成される多糖体を単離した。一方、アロエベラに含まれている多糖体(アロエマンナン)は含まれていないと推測された。

キダチアロエ抽出物製品中には低分子化合物として aloenin が 1.9%、barbaloin が 0.7%、isobarbaloin が 0.7%含まれており、低分子化合物を指標としたキダチアロエ抽出物と局方アロエおよびアロインとの判別法として、TLC および LC/MS が有用であることを明らかにした。

今年度、キダチアロエ抽出物の自主規格案が提案され、確認試験としてアロエベラ抽出物の方法に準拠した方法が採用されているが、基原を明らかにするために、TLC および LC/MS を用いた確認試験の導入が有用であると考えられた。しかし、キダチアロエは既存添加物(増粘安定剤)原料ではあるが、むしろ低分子成分の薬効を期待し健康食品素材として多用されている。このように既存添加物名簿収載品目リストの用途とは異なる目的で使用される品目の場合、規格作成は慎重に行う必要があると考える。

## 3. アグロバクテリウムスクシノグリカン

本研究で検体としたアグロバクテリウムスクシノグリカンは *Agrobacterium* 由来であり、文献で報告されている *Sinorhizobium melitoli* 由来スクシノグリカン等と単糖組成が異なること

が明らかとなった。すなわち、文献で報告されているスクシノグリカンの単糖組成は Glc:Gal = 7:1 であるのに対し、本試料に含まれる多糖体の構成糖はグルコース、ガラクトース、マンノースであり、Glc:Gal:Man = 10:1:0.8 であった。また、非還元末端位にピルビン酸が結合していることが示唆された。

今年度、アグロバクテリウムスクシノグリカンの自主規格案が提案されたが、含有成分の確認試験は含まれていない。また、社内規格では、粒度、粘度等の規格はあるものの、確認試験としては不十分と考えられた。確認試験には、構成糖およびピルビン酸の確認が有用と考えられた。

## 4. ニガヨモギ抽出物

ニガヨモギ抽出物中の副作用成分  $\alpha$ - $\beta$ -thujone を GC-MS により分析したところ、極めて微量であった。

ニガヨモギは、芳香性苦味健胃、強壯、解熱、胆汁分泌促進剤として薬用に供される。ニガヨモギ抽出物は、日本食品添加物協会の第三版自主規格(自主規格)に記載されており、thujone の限度値も設定されている。苦味成分は、absinthin、artabsin、anabsinthin、artabin 等複数のセスキテルペンラクトンからなり、LC/MS を用いた定量法の検討が必要と考えられた。

## 5. スフィンゴ脂質

スフィンゴ脂質からは、主成分の他に極性の大きく異なる、脂質と考えられる化合物が多種単離された。

スフィンゴ脂質の判別確認試験法について文献的検討を行い、米または小麦のぬか由来製品とウシ脳由来製品とを区別することは原理的には可能と判断された。しかし、ぬか由来製品中にウシ脳由来の物を混在させた場合には混入を検出することは機器分析法では困難と思われる。ELISA など免疫化学的手法が必要と思われる。

日本食品添加物協会の調査によると、市場に流通しているスフィンゴ脂質製品は健康食品素材用途である。今回提供を受けた製品の社内規格では、製品中のスフィンゴ糖脂質含量が約 90%であり、不純物としてのステロール配糖体は 5%以下としている。精製スフィンゴ糖脂質の分析法は生化学研究法としてほぼ確立しているので、今回試料とした製品のような純度であ

れば、主成分であるスフィンゴ糖脂質の確認試験および定量法は TLC および GC あるいは GC-MS を採用することで比較的容易に策定できると思われる。

## 6. ジャマイカカシア抽出物

ジャマイカカシア抽出物の含有成分は quassin(1)と neoquassin(2) (2種類の立体異性体) であり、試料中に 1 が 21%、2 が 56%含まれることを明らかとした。

既存添加物名簿収載品目リストでは、ジャマイカカシア抽出物の基原植物の学名は、*Quassia excelsa* SW.であるが、試料の添付資料では *Picraena excelsa* となっていた。また、Web サイトの検索では、ほとんどの場合ジャマイカカシアの学名は *Picraena excelsa* Lindl. となっていたが、1つの Web サイトにおいて *Quassia excelsa* Sw., *Picrasma excelsa* Planch., *Simaruba excelsa* D.C.が同義語という記載が見られたことから、既存添加物名簿収載品目リストの学名は誤りではないが、*Picraena excelsa* Lindl.が一般的と考えられた。

ジャマイカカシア抽出物の自主規格は策定されていないが、社内規格があり、quassin および neoquassin 含量が求められていることから、一定の品質が保たれているものと考えられた。規格での確認試験、定量法としては、quassin および neoquassin の含量が比較的高いことから、標準品の検討が必要であるが、TLC (確認試験) や HPLC (確認試験および定量法) の導入が有用であると考えられた。

## 7. サンダラック樹脂

サンダラック樹脂の主構成成分は、既存添加物名簿収載品目リストではサンダラコピマル (sandarakopimar) 酸であると記載されており、今回の研究でもジテルペンのカルボン酸誘導体の可能性が示唆された。

サンダラック樹脂は、既存添加物名簿収載品目リストでは、ガムベースに分類されているが、日本食品添加物協会の調査では香料成分として利用されているという。サンダラック樹脂の主な用途は、油性塗料ワニス原料または接着剤といわれている。

サンダラック樹脂についての成分研究はこれまでほとんど報告がなく、本研究の継続により、毒性試験結果と成分との関連を考察する上での

有用な知見が得られるものと考えられる。

## 8. グレープフルーツ種子抽出物

分離の過程における状況と一部化合物の NMR の結果から、グレープフルーツ種子抽出物中には多数の脂肪酸誘導体が含まれていることが推測された。なお、TLC 挙動から、脂肪酸誘導体以外と考えられる化合物が存在する情報が全く見られないことは、これまでほとんど例が無く、非常に興味を持たれる。また、過去にグレープフルーツ種子抽出物から合成抗菌剤等が検出された報告があったため、今回の試料について分析を行ったが、検出されなかった。

グレープフルーツ種子抽出物を含む製品は、日本では食品衛生製剤、野菜や魚の鮮度保持剤として販売されているが、海外では、Dietary supplement 等として販売されている。いずれも、抗菌作用を目的としているが、製品により抗菌活性に差があるとの報告がある。日本の製品では、「グレープフルーツの種子から抽出した植物油、脂肪酸が主成分」と記されているものがあるのに対し、海外の製品には成分として diphenol hydroxybenzene complex と記されているものがある。これらのことから、製品により成分、品質が異なる可能性が考えられる。規格作成の際には、確認試験法等について慎重に検討する必要があると考えられた。

## 9. ログウッド色素

今回成分分析を行ったログウッド色素製品は、シタン色素である可能性が高いことが判明した。今回のログウッド色素の由来については、製造企業に問い合わせ中である。ログウッド色素の安全性評価の前に、本物のログウッド色素が食品添加物として流通しているのかどうか確認が必要であろう。なお、ログウッド色素の確認には、HPLC あるいは LC/MS が有用であると考えられた。

## D. 結論

今回対象とした既存添加物 9 品目はいずれも混合物であり、主成分の純度の確認、他の既存添加物との区別のために多くの場合、簡便な TLC あるいは HPLC、LC/MS、GC、GC/MS による確認試験が有用であると考えられた。また、定量法としても HPLC や GC 等の導入が望ましいと考えられた。

**E. 健康危険情報**

なし

**F. 研究発表**

なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

Table 1 90日間反復投与毒性試験検討品目

品名	基原・製法・本質	用途	備考
アグロバクテリウム スクシノグリカン	細菌 ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ) の培養液より、分離して得られた多糖類である。主成分はスクシノグリカンである。	増粘安定剤	Agrobacterium Succinoglycan
キダチアロエ抽出物	ユリ科キダチアロエ ( <i>Aloe arborescens</i> MILL.) の葉より、搾汁して得られたものである。主成分は多糖類である。	増粘安定剤	Aloe extract
グレープフルーツ 種子抽出物	ミカン科グレープフルーツ ( <i>Citrus paradisi</i> MACF.) の種子より、水又はエタノールで抽出して得られたものである。主成分は脂肪酸及びフラボノイドである。	製造用剤	Grapefruit seed extract
コメヌカ油抽出物	イネ科イネ ( <i>Oryza sativa</i> LINNE) の種子より得られる米ぬか油の不けん化物より、エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はフェルラ酸である。	酸化防止剤	Rice bran oil extract
サンダラック樹脂	ヒノキ科サンダラック ( <i>Tetraclinis articulata</i> (VAHL.) MAST.) の分泌液より、室温時エタノールで抽出し、ろ液からエタノールを留去して得られたオレオレンジから得られたものである。主構成成分はサンダラコピマル酸である。	ガムベース	Sandarac resin
ジャマイカカッシア 抽出物	ニガキ科ジャマイカカッシア ( <i>Quassia excelsa</i> SW.) の幹枝又は樹皮より、水で抽出して得られたものである。有効成分はクアシン及びネオクアシンである。	苦味料等	Jamaica quassia Extract
スフィンゴ脂質	ウシ科ウシ ( <i>Bos taurus</i> LINNE) の脳、イネ科イネ ( <i>Oryza sativa</i> LINNE) の種子又は小麦 ( <i>Triticum aestivum</i> LINNE) の胚芽から得られた米ぬかより、室温時? 温時エタノール、含水エタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、ヘキサン又は酢酸エチルで抽出したものより得られたものである。主成分はスフィンゴシン誘導体である。	乳化剤	Sphingolipid
ニガヨモギ抽出物	ニガヨモギ科ニガヨモギ ( <i>Artemisia absinthium</i> LINNE) の全草より、水又は室温時エタノールで抽出して得られたものである。主成分はセスキテルペン (アブシンチン等) である。	苦味料等	Absinth extract
ログウッド色素	マメ科ログウッド ( <i>Haematoxylon campechianum</i> ) の心材より、熱時水で抽出して得られたものである。主色素はヘマトキシリンである。黒褐色を呈する。	着色料	Logwood colour

## 酸化防止剤等の成分研究

分担研究者 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨 90日間反復投与毒性試験の対象とした既存添加物について、成分を明らかにするとともに研究成果を成分規格へ反映させることを目的に、試験品目のうち、コメヌカ油抽出物（酸化防止剤）、ニガヨモギ抽出物（苦味料）、ジャマイカカussia抽出物（苦味料）、グレープフルーツ種子抽出物（製造用剤）、ログウッド色素（着色料）について成分研究を行い、主成分の構造解析および定量、副成分の構造解析等を行った。

1. コメヌカ抽出物：含量の約60%が有効成分フェルラ酸であり、残り約40%が各種化合物の混合物であること、およびその中の主な化合物は炭素40個程度からなる骨格にフェルラ酸が結合したものであることが確認された。
2. ニガヨモギ抽出物：精油成分の分析定量を行ったが、副作用成分 $\alpha$ -、 $\beta$ -thujoneは極めて微量であった。抽出物の抗菌活性を検討したが、活性はわずかであった。
3. ジャマイカカussia抽出物：主有効成分quassinおよびneoquassinを同定、定量した（21.4%および55.5%）。
4. グレープフルーツ種子抽出物：多数の脂肪酸誘導体が含まれていることが推測された。
5. ログウッド色素：主色素とされるヘマトキシリンは検出されず、シタン色素の主色素であるサンタリンA、Bが検出された。今回入手した試料はシタン色素である可能性が示唆され、毒性試験は保留とした。

### 協力研究者

永津明人 名古屋市立大学大学院薬学研究科  
講師

垣内信子 金沢大学薬学部助教授

黒柳正典 広島県立大学生物資源学部教授

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

### A. 研究目的

既存添加物の多くは天然抽出物であり、通常、多成分からなり、成分が明らかでないものも存在する。また、基原や製法により、成分組成が変化することも考えられることから、毒性試験結果の評価には成分情報が重要である。しかし、既存添加物の多くの品目は公的な規格が未設定であり、日本食品添加物協会による自主規格の作成が進んでいるものの、規格が不十分と思われる品目もある。本研究では、そのような品目の中から90日間反復投与毒性試験検討品目として選定した9品目のうち、酸化防止剤等5品目の成分、品質に関する研究を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 試料

試料はすべて日本食品添加物協会を通じて入手した。

#### 2. コメヌカ油抽出物（酸化防止剤）の成分研究

コメヌカ油抽出物の微量成分を、ODSなど各種担体とHPLCなどを駆使した各種クロマトグラフィーを用いて分離し、単離された化合物の各種NMR、MSなどのスペクトル測定を行った。構造の確認のため必要に応じて誘導化なども行った。

#### 3. ニガヨモギ抽出物（苦味料）の成分研究

ニガヨモギ抽出物（50%エタノールチンキ）を水蒸気蒸留し、精油画分を得た。ニガヨモギ抽出物および精油画分をGC/MS分析定量した。

ニガヨモギ抽出物の大腸菌K-12株への抗菌活性の分析をディスク法により行った。

#### 4. ジャマイカカussia抽出物（苦味料）の成分研究

液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC/MS）によりジャマイカカussia抽出物の

含有成分の構造を推定した。また、本抽出物を silica gel を担体とするオープンカラムに付し、有効成分の単離・精製を試みた。更に HPLC 法により各成分の定量を試みた。

### 5. グレープフルーツ種子抽出物（製造用剤）の成分研究

シリカゲルカラムクロマトグラフィー (SCC) で分離を行い、得られたフラクションを更に逆相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、分取薄層クロマトグラフィー (PLC) を繰り返し行うことによりそれぞれの成分を分離した。得られた化合物を核磁気共鳴 (NMR) 法、MS 法を中心とした分光学的手法で化学構造を決定した。

また、HPLC により塩化ベンザルコニウムの分析を、LC/MS により塩化ベンゼトニウム、2,4,4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシジフェニルエーテル (トリクロサン) およびパラヒドロキシ安息香酸エステル (メチル、エチル、プロピル、*n*-ブチル) の分析を行った。

### 6. ログウッド色素（着色料）の成分研究

分取 LC/MS によりログウッド色素製品の含有主成分を単離、精製し、その構造について NMR、MS スペクトルにより検討した。また、LC/MS によりシタン色素製品との比較を行った。さらに、毒性試験(反復投与 90 日)と同条件下にログウッド色素製品及びメタノールに溶解したものを放置し、1 週間後、1 ヶ月後の成分組成を LC/MS により測定し、ログウッド色素製品の安定性を確認した。

## C. 研究成果および考察

各品目の既存添加物名簿収載品目リスト記載事項を Table 1 に示した。記載された主成分の確認および副成分の成分研究を行った。

### 1. コメヌカ油抽出物

コメヌカ油抽出物は文献通り約 60% がフェルラ酸であり、残り約 40% が各種化合物の混合物であることを確認した。さらに、混合物の中の主な化合物 2 種は炭素 40 個程度からなる骨格にフェルラ酸が結合した化合物であることが確認された。炭素 40 個程度からなる骨格部分はジテルペン 2 量体又はステロイドの可能性があり、その両方を念頭に構造を解析中である。

### 2. ニガヨモギ抽出物

ニガヨモギ抽出物の精油成分の  $\alpha$ -、 $\beta$ -thujone は過多の摂取で嘔吐、下痢、意識混濁を伴う中毒を引き起こすとされる。ニガヨモギ抽出物およびその精油画分の GC/MS 分析の結果、ニガヨモギ抽出物の精油成分含量は 0.85%、含量の多い精油成分は、chrysanthenol (精油画分中 9.8%) sabinol (精油画分中 2.2%) であった。 $\alpha$ -、 $\beta$ -thujone は存在しているが精油画分中 0.1% 以下の含量で極めて微量であった。苦味成分 absinthin 等の定量分析については、LC/MS 分析が有効である。さらに、50% エタノールチンキの *E.coli* を用いた抗菌活性の分析では、わずかな抗菌活性が検出されるのみであった。これは精油成分の含量が少ないためと思われた。

### 3. ジャマイカカussia抽出物

LC/MS により、ジャマイカカussia抽出物の含有成分の構造について検討した結果、3 つのピークが検出され、quassin(1) と neoquassin(2) の立体異性体の混合物によるものと推定された。更に、単離・精製し、NMR により構造を確認した 1 を標品として、1 及び 2 の含量を測定したところ、製品中に 1 が 21%、2 が 56% 含まれることを明らかとした。また、ニガキ抽出物を調製し、ジャマイカカussia抽出物製品と比較した結果、成分組成が異なることを明らかとした。

### 4. グレープフルーツ種子抽出物

グレープフルーツ種子抽出物の濃縮したエキスより SCC および C-4 の逆相系カラムを用いた HPLC により 10 種余りの化合物を得た。これらの化合物の NMR の測定を行い、このうち 4 種の化合物については脂肪酸のグリセライド或いは不飽和脂肪酸と推定された。さらにその他の成分分離および NMR 測定を行っている。なお、グレープフルーツ種子抽出物の TLC 挙動からは、脂肪酸誘導体以外と考えられる化合物が存在する情報が全く見られなかった。また、過去にグレープフルーツ種子抽出物から合成抗菌剤等が検出された報告があったため、今回の試料について分析を行ったが、検出されなかった (各化合物の検出限界 10  $\mu$ g/g)。

### 5. ログウッド色素

ログウッド色素製品を LC/MS に付し、含有

成分について検討した結果、ヘマトキシリン及びその酸化体ヘマテインのピークは検出されず、3つのピークが検出された。各ピークを分取LC/MSにより単離・精製し、その構造についてNMR、MSスペクトルより検討した結果、pterostilbene及びシタン色素の主色素とされるsantalin A、Bであった。また、ログウッド色素製品のLC/MSクロマトグラムはシタン色素製品のそれとよく似ていた。従って、今回成分分析を行ったログウッド色素製品は、シタン色素である可能性が高い。また、ログウッド色素製品は、放置後1週間後および1ヶ月後に、いずれも放置前の色素製品と完全に等しいクロマトグラムを与え、今回入手した色素製品は、毒性試験条件下において安定であった。

本質が異なるため、本色素製品についての毒性試験は保留とした。

#### D. 結論

1. コメヌカ油抽出物：有効成分フェルラ酸を確認し（含量約60%）、その他に炭素40個程度からなる骨格にフェルラ酸が結合した化合物が含まれることを確認した。

2. ニガヨモギ抽出物：副作用成分 $\alpha$ -, $\beta$ -thujoneは極めて微量であった。また、抽出物の抗菌活性はわずかであった。
3. ジャマイカカシア抽出物：主有効成分quassinおよびneoquassinを同定、定量した（21.4%および55.5%）。
4. グレープフルーツ種子抽出物：多数の脂肪酸誘導体の混合物と推定された。
5. ログウッド色素：主色素とされるヘマトキシリンは検出されず、シタン色素の主色素であるサンタリン A、B が検出された。今回入手した試料はシタン色素である可能性が示唆され、毒性試験は保留とした。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Table 1 成分研究分担品目

品名	基原・製法・本質	用途	備考
コメヌカ油抽出物	イネ科イネ ( <i>Oryza sativa</i> LINNE) の種子より得られる米ぬか油の不けん化物より、エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はフェルラ酸である。	酸化防止剤	Rice bran oil extract
グレープフルーツ種子抽出物	ミカン科グレープフルーツ ( <i>Citrus paradisi</i> MACF.) の種子より、水又はエタノールで抽出して得られたものである。主成分は脂肪酸及びフラボノイドである。	製造用剤	Grapefruit seed extract
ジャマイカカссия抽出物	ニガキ科ジャマイカカссия ( <i>Quassia excelsa</i> SW.) の幹枝又は樹皮より、水で抽出して得られたものである。有効成分はクアシン及びネオクアシンである。	苦味料等	Jamaica quassia Extract
ニガヨモギ抽出物	ニガヨモギキク科ニガヨモギ ( <i>Artemisia absinthium</i> LINNE) の全草より、水又は室温時エタノールで抽出して得られたものである。主成分はセスキテルペン (アブシンチン等) である。	苦味料等	Absinth extract
ログウッド色素	マメ科ログウッド ( <i>Haematoxylon campechianum</i> ) の心材より、熱時水で抽出して得られたものである。主色素はヘマトキシリンである。黒褐色を呈する。	着色料	Logwood colour

## 天然酸化防止剤コメヌカ油抽出物の成分研究

協力研究者 永津 明人 名古屋市立大学大学院薬学研究科講師

研究要旨 コメヌカ抽出物は、約 60%がフェルラ酸で、残り約 40%が各種化合物の混合物であることを確認した。主成分フェルラ酸以外に炭素 40 個程度からなる骨格にフェルラ酸が結合した化合物数種が確認された。

### A. 研究目的

天然食品添加物はもともと食用だったものの一部あるいは一部を濃縮したものを多く用いることが多いことから、安全性が確立されていると多くの場合考えられている。しかしながら、その効果を期待する主成分が明らかになっても微量成分に関しては多くの場合解明されていない。そこで今回、我々は、抗酸化剤として利用されている天然食品添加物コメヌカ油抽出物について主成分以外の微量成分を明らかとすることを目的に、研究を行った。

### B. 研究方法

コメヌカ油抽出物の微量成分を、シリカゲル、ODS など各種担体と HPLC などを駆使した各種クロマトグラフィーを用いて分離し、単離された化合物の各種 NMR、MS などのスペクトル測定を行ってその構造を明らかとする。構造の確認のため必要に応じて誘導化なども行った。

### C. 研究結果

まず、主成分であるフェルラ酸とその他のものにシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt = 4:1) を用いて分離した。文献記載のとおり、約 60%がフェルラ酸で、残り約 40%が各種化合物の混合物であることを確認した。混合物のうち TLC (hexane: AcOEt = 4:1 または CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 20:1) 上特に目立つスポットを示す化合物 2 種の分離を行った。最終的に HPLC を用いて両者を分離したが、それぞれの NMR スペクトルを測定するとどちらの画分も両化合物の混合物となっていた。この両者が互変異性体と考えられ

たことから、その速度を低下させる目的でアセチル化後の分離を行い、2 種の化合物を単離した。それぞれの NMR スペクトルなど各種スペクトルを現在解析中であるが、いずれの化合物も (1)C40 個の骨格にフェルラ酸が結合した分子であること、(2) 水酸基はフェルラ酸上の 1 個だけであることがわかっている。また、片方の化合物の解析でこれまでに骨格分子はステロイドの AB 環様の構造を持ち、ステロイド 3 位に相当する位置にフェルラ酸がエステル結合しているであろうということが推定された。現在、分子式の決定ははじめ更なるスペクトル解析を行っている。

### D. 考察

コメヌカ油抽出物中の炭素 40 個程度からなる骨格部分を持つ化合物の構造は炭素数から勘案するとジテルペンの 2 量体の可能性がある一方、これまでに解明できている部分構造がステロイド AB 環部分に似ていることからステロイドの可能性もある。現在、その両方を念頭に構造を解析中である。

### E. 結論

コメヌカ油抽出物は、その約 60%がフェルラ酸で、残り約 40%が各種化合物の混合物であることを確認した。主成分フェルラ酸以外に C40 程度の骨格にフェルラ酸が結合した化合物数種が確認された。

### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
協力研究報告書

天然苦味料ニガヨモギ抽出物の成分研究

協力研究者 垣内信子 金沢大学薬学部 助教授

研究要旨 ニガヨモギ抽出物の精油成分のGC/MS分析を行った。さらに抗菌活性を検討した。精油成分の含量は低く、強い抗菌活性は検出されないことが明らかとなった。

A. 研究目的

ニガヨモギ抽出物の有効成分は主として、苦味成分と精油成分とされている。苦味成分は主としてセスキテルペンラクトンであり、又精油成分はモノ及びセスキテルペンである。このうち精油成分の一つ $\alpha$ -, $\beta$ -thujone は過多の摂取で嘔吐、下痢、意識混濁を伴う中毒を引き起こす事が分かっている。これら、有効成分および副作用成分の同定を行い、あわせて腸内細菌への作用を検討した。

B. 研究方法

ニガヨモギ抽出物（50%エタノールチンキ）を水蒸気蒸留し、精油画分を得た。50%エタノールチンキおよび精油画分をGC/MSでキャピラリーカラムを用い、65°Cから240°Cまで昇温し、分析定量した。大腸菌 K-12 株への抗菌活性はディスク法を用い行った。50%エタノールチンキ 50 $\mu$ l を含んだろ紙による、寒天培地への細菌の増殖阻止による阻止円形成を、コントロールの抗生物質、アンピシリン 0.1 mg/ml と比較し、行った。

C. 研究結果

50%エタノールチンキおよび精油画分のGC/MS分析の結果、50%エタノールチンキ中に精油成分含量が0.85%であり、少量しか含まれていないことがわかった。含量の多い精油成分は、chrysanthenol（精油画分中9.8%）sabinol（精油画分中2.2%）であった。 $\alpha$ -, $\beta$ -thujone

は存在しているが精油画分中0.1%以下の含量で極めて微量であった。（Table 1）

50%エタノールチンキの *E.coli* を用いた抗菌活性の分析では、50%エタノールチンキおよび、その10倍希釈液の阻止円形成は、コントロールの0.9 cm に対し0.1 cm 以下であり、わずかな抗菌活性が検出されるのみであった。（Table 2）

D. 考察

今回入手した50%エタノールチンキは精油含量が微量で、特に副作用成分である $\alpha$ -, $\beta$ -thujone はトレース量程度含まれるのみであった。今回精油成分について定量分析、抗菌試験を行ったが、精油成分以外の成分、苦味成分 absinthin 等の定量分析については、HPLC/MS を用いた分析が有効である。さらに、50%エタノールチンキに強い抗菌作用を検出できなかったが、これは精油成分の含量が少ないためと思われる。

E. 結論

今回入手した50%エタノールチンキは精油含量が微量で、特に強い生理作用を与えないと考えられることから、添加物として副作用の心配は少ないものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

Table 1 ニガヨモギエキス中の成分含量

Compounds	Area	area %	mg/100g
$\alpha$ -Pinene	tr	tr	tr
Hexanal	341	0.0510	0.1459
$\beta$ -Pinene	tr	tr	tr
Sabinene	119	0.0178	0.0509
Myrcene	775	0.1158	0.3317
$\alpha$ -Terpinene	85	0.0127	0.0364
Limonene	65	0.0097	0.0278
1,8-Cineole	191	0.0285	0.0817
$\gamma$ -Terpinene	195	0.0291	0.0835
<i>p</i> -Cymene	91	0.0136	0.0389
Methyl heptenone	tr	tr	tr
Hexanol	tr	tr	tr
6-Methyl-5-methylideneheptan-2-one	327	0.0489	0.1399
<i>cis</i> -3-Hexenol	82	0.0123	0.0351
$\alpha$ -Thujone	153	0.0229	0.0655
<i>cis</i> -Linalool oxide (Furanoid)	672	0.1004	0.2876
$\beta$ -Thujone	580	0.0867	0.2482
Acetic acid	4586	0.6853	1.9626
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1642	0.2454	0.7027
<i>trans</i> -Linalool oxide (Furanoid)	392	0.0586	0.1678
Camphor	98	0.0146	0.0419
Linalool	4208	0.6288	1.8009
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	2074	0.3099	0.8876
Pinocarvone	3400	0.5080	1.4551
<i>iso</i> -Butyric acid	243	0.0363	0.1040
3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexenone	tr	tr	tr
Terpinen-4-ol	1726	0.2579	0.7387
Hotrienol	tr	tr	tr
Sabinaketone	549	0.0820	0.2350
Sabinyl acetate	1887	0.2820	0.8076
Thujyl alcohol	1273	0.1902	0.5448
2-Methylbutyric acid	3109	0.4646	1.3305
3-Methylbutyric acid	3110	0.4647	1.3310
Lavandulol	2488	0.3718	1.0648
Verbenol	937	0.1400	0.4010
$\alpha$ -Terpineol	2451	0.3662	1.0489
3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione	377	0.0563	0.1613

Sabinol	14891	2.2251	6.3728
Verbenone	854	0.1276	0.3655
<i>cis</i> -Linalool oxide (Pyranoid)	264	0.0394	0.1130
Chrysanthenol	65571	9.7979	28.0621
<i>trans</i> -Linalool oxide (Pyranoid)	399	0.0596	0.1708
Citronellol	398	0.0595	0.1703
Cumin aldehyde	455	0.0680	0.1947
Perilla aldehyde	185	0.0276	0.0792
Nerol	7059	1.0548	3.0210
Geraniol	2245	0.3355	0.9608
2-Hydroxycineole	657	0.0982	0.2812
Benzyl alcohol	1642	0.2454	0.7027
$\beta$ -Phenylethyl alcohol	2426	0.3625	1.0382
2,6-Dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol	5067	0.7571	2.1685
Limonen-10-ol	536	0.0801	0.2294
Perilla alcohol	602	0.0900	0.2576
Anis aldehyde	2564	0.3831	1.0973
Cuminy alcohol	687	0.1027	0.2940
MW : 186	51530	7.6999	22.0530
MW : 186	71454	10.6770	30.5798
Eugenol	2950	0.4408	1.2625
Thymol	247	0.0369	0.1057
Dihydroactinodiolide	2415	0.3609	1.0335
Chamazulene	17339	2.5909	7.4205
3,4,5-Trimethoxybenzaldehyde	2146	0.3207	0.9184
Hexadecanoic acid	20379	3.0451	8.7215
Linoleic acid	14095	2.1061	6.0322
Loliolide	3493	0.5219	1.4949
Others	338456	50.5738	144.8474
Total	669232	100	286.4077
Ethyl hexanoate (内部標準)	5539		2.494

Table 2 阻止円形成 (cm) n = 3

control (ampicillin 50 mg/ml)	50% ethanol extract	10-fold dilution
1.93 + 0.06	1.08 + 0.12	1.10 + 0.02
1.93 + 0.06	1.08 + 0.12	1.10 + 0.02

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
協力研究報告書

天然製造用剤グレープフルーツ種子抽出物の成分研究

協力研究者 黒柳正典 広島県立大学 生物資源学部教授

研究要旨 天然添加物として用いられているグレープフルーツ種子抽出物の主成分を各種分離法を用い抽出分離を行い、その構造を分光学的手法を中心に決定し確認する。

A. 研究目的

天然添加物の安全性評価および規格基準を設定するためには天然添加物中の主要成分を明らかにし、生理活性や毒性等を評価し、分析法の確立が必要である。そこで、既に用いられているにもかかわらずその成分の詳細な情報のない天然添加物のうち、グレープフルーツ種子抽出物の主要成分の分離および化学構造決定の研究を行う。その結果、安全性評価および規格基準設定のための基礎資料を提供する。

B. 研究方法

提供されたグレープフルーツ種子抽出物（水に溶かした状態と考えられる）を減圧下 50°C で濃縮し、得られたエキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶媒として CHCl<sub>3</sub>-MeOH 系溶媒を用いて）で分離を行った。得られた多数のフラクションを薄層クロマトグラフィー（TLC）で検討し最終的に 9 つのフラクションに纏めた。これらのフラクションについて TLC を行った結果、それぞれのフラクションが非常に多数の化合物の混合物であり、しかも TLC で発色がほとんど同じであることから、アルキル基の長さの異なる、二重結合の数、幾何異性、酸素官能基の有無等による脂肪酸誘導体の混合物ではないかと推測された。主要成分を含むと考えられる 3 フラクション（Fr. 3, Fr. 4 および Fr. 5）について ODS 系および C8 系の逆相系カラムを用いて HPLC 分析を行ったが、成分の脂溶性が高すぎ良好な結果が得られなかった。そこで、C-4 カラムを用い分析を

行った結果、Fig 1 に示す様に良好な分析結果が得られ、非常に多数の成分からなることが明らかになった。そこで、Fr. 4 および Fr. 5 について C4 カラムを用いて、溶媒として 85% のアセトニトリル系溶媒を用いて HPLC による分離を行った。Fr. 4 を HPLC で分離した一つのピークが TLC では複数のスポットを示すことから HPLC のみによる純粋な化合物の分取は不可能であるため、HPLC で分取されたフラクションは更に分取薄層クロマトグラフィー（PLC）による精製を行った。Fr. 4 を例に分取した各フラクションが多数の化合物の混じりである例を Fig. 2 に示す。HPLC および PLC を繰り返すことにより 5 種の化合物を得た。Fr. 5 についても C4 カラムによる分離を行い 15 のフラクションを得、さらに精製する。その他のフラクションからもいくつかの化合物を分離し、合計 10 種の成分を分離した。得られた化合物を核磁気共鳴（NMR）法、MS 法を中心とした分光学的手法で化学構造を決定する。分離のスキームを Fig. 3 に示す。

C. 研究結果

グレープフルーツ種子抽出物の濃縮したエキスを SCC で 13 のフラクションに分離し、それぞれのフラクションから更に C-4 の逆相系カラムを用いた HPLC を繰り返すことにより 10 種余りの化合物を得た。これらの化合物の NMR の測定を行い、このうち GF-3, GF-4, GF-5, GF-6 については脂肪酸のグリセライド或いは不飽和脂肪酸であることが分かった。し