

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

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15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	合田 幸広	国立医薬品食品衛生研究所
	黒柳 正典	広島県立大学
	永津 明人	名古屋市立大学
	李 貞範	富山医科薬科大学
	林 真	国立医薬品食品衛生研究所
	中嶋 圓	食品農医薬品安全性評価センター
	浅倉 眞澄	日本バイオアッセイ研究センター
	宮澤 眞紀	神奈川県衛生研究所

平成16年(2004)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 .....	1
佐藤恭子	
II. 分担研究報告	
1. 既存添加物の成分・品質研究の総括 .....	7
ヒメマツタケ抽出物等の成分・品質に関する研究	
佐藤恭子	
(別添) 天然苦味料ヒメマツタケ抽出物の苦味成分について	
天然製造用剤メバロン酸の分析	
天然酸化防止剤没食子酸の分析	
天然着色料ログウッド色素の主成分および安定性に関する研究	
天然増粘安定剤アロエベラ抽出物の低分子量成分の分析	
天然苦味料ニガヨモギ抽出物の主成分に関する研究	
2. 既存添加物「アルカネット色素」の成分に関する研究 .....	53
既存添加物「ユーカリ葉抽出物」の成分に関する研究	
合田幸広	
3. グレープフルーツ種子抽出物の成分に関する研究 .....	71
ヒキオコシ抽出物の成分に関する研究	
サンダラック樹脂の成分に関する研究	
黒柳正典	
4. 「タデ抽出物」および「精油除去ウイキョウ抽出物」の成分探索 .....	97
「コメヌカ油抽出物」の成分探索	
「スフィンゴ脂質」の成分探索	
永津明人	
5. 増粘安定剤マクロホモブシスガムの構成糖に関する研究 .....	107
増粘安定剤アロエベラ抽出物の構成多糖に関する研究	
増粘安定剤キダチアロエ抽出物の構成糖に関する研究	
李 貞範	

6. 変異原性試験の総括ならびにアオイ花抽出物等の変異原性試験 .....	121
林    真	
(別添) ヒキオコシ抽出物の細菌を用いる復帰突然変異試験	
ヒキオコシ抽出物のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	
ヒキオコシ抽出物のげっ歯類を用いる小核試験	
サンダラック樹脂のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	
木酢液の細菌を用いる復帰突然変異試験	
7. ヒメマツタケ抽出物のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 .....	229
メバロン酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	
ログウッド色素の細菌を用いる復帰突然変異試験	
ログウッド色素のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	
ログウッド色素のげっ歯類を用いる小核試験	
グレープフルーツ種子抽出物の細菌を用いる復帰突然変異試験	
中嶋    圓	
8. グレープフルーツ種子抽出物の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 .....	263
浅倉真澄	
9. 没食子酸のげっ歯類を用いた小核試験による遺伝毒性の評価 .....	271
宮澤真紀	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	277
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	278

## 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** 既存添加物の安全性評価の一環として、変異原性試験データの欠けている7品目（ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸、没食子酸、ログウッド色素、グレープフルーツ種子抽出物、ヒキオコシ抽出物、サンダラック樹脂）につき、成分・品質に関する研究と毒性試験（細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞に対する染色体異常試験、げっ歯類を用いる小核試験）を連携して実施し、遺伝毒性について検討した。また、近年毒性試験が行われた品目のうち、6品目（アルカネット色素、ユーカリ葉抽出物、タデ抽出物、精油除去ウイキョウ抽出物、マクロホモプシスガム、アロエベラ抽出物）、昨年度の対象品目のうち、さらに成分研究が必要と考えられた4品目（ニガヨモギ抽出物、コメヌカ油抽出物、スフィンゴ脂質、キダチアロエ抽出物）及び木酢液についての成分・品質に関する研究を実施した。

### 分担研究者

合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部長  
黒柳正典 広島県立大学生物資源学部 教授  
永津明人 名古屋市立大学大学院薬学研究科  
講師  
李 貞範 富山医科薬科大学薬学部 助手  
林 真 国立医薬品食品衛生研究所  
変異遺伝部長  
中嶋 圓 食品農医薬品安全性評価センター  
遺伝毒性グループリーダー  
浅倉眞澄 日本バイオアッセイ研究センター  
変異原性試験部室長  
宮澤眞紀 神奈川県衛生研究所  
理化学部主任研究員

### A. 研究目的

既存添加物は、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、使用を認めたものである。法改正時の国会附帯決議により、その

安全性の見直しが行われてきたが、なお、基本的安全性評価のための毒性データが不十分な品目も残っている。既存添加物は植物等の天然物から抽出して得られたものが多く、それらは多成分を含むものと考えられる。また、成分が未解明なものも存在するため、毒性試験の際には成分含量などの情報が重要であり、毒性試験と成分研究を連携が不可欠と考えられる。さらに、既存添加物については公的な規格がなく、その設定が求められており、成分に関する知見が必要である。このような背景から、本研究では、変異原性試験データの欠けている既存添加物について、成分・品質に関する研究と変異原性試験（細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、及びげっ歯類を用いる小核試験）を連携して行った。さらに、この数年間に毒性試験が行われた品目及び昨年度検討品目の一部について、成分・品質に関する研究を行った。また、くん液（木酢液）については、近年その用途が広がっているが、一部に変異原性の懸念が報告されていることから、

改めて市場製品等の変異原性試験を行い、安全性評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試料

試料は全て、日本食品添加物協会を通じて提供されたものを用いた。

### 2. 既存添加物の成分・品質に関する研究

ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸、没食子酸、ログウッド色素、ニガヨモギ抽出物、アルカナネット色素、ユーカリ葉抽出物、グレープフルーツ種子抽出物、ヒキオコシ抽出物、サンダラック樹脂、タデ抽出物、精油除去ウイキョウ抽出物、コメヌカ油抽出物、スフィンゴ脂質-TLCによる定性、各種クロマトグラフィーによる化合物の単離、核磁気共鳴 (NMR)、質量分析 (MS) 等の分光学的手法による構造解析、LC/MS あるいは HPLC による確認、定量等を行った。

マクロホモブシスガム、アロエベラ抽出物-透析、ゲルろ過等により、分画した後、糖組成分析及びメチル化分析を行った。

キダチアロエ抽出物-ゲルろ過により多糖を単離し、ウロン酸還元多糖を調製し、メチル化後、加水分解、還元、アセチル化を行い、GC 及び GC/MS により分析した。木酢液については GC/MS により成分検索を行った。

### 3. 既存添加物の変異原性試験

原則として、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」(1996、厚生省生活衛生局食品化学課監修)に掲載されている「安全性に関する試験の標準的実施方法」に従い、「細菌を用いる復帰突然変異試験」、「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」、「げっ歯類を用いる小核試験」を行った。

## C. 研究成果及び考察

予定していたアオイ花抽出物及びアマシードガムが入手できず、ヒキオコシ抽出物、マクロホモブシスガムを研究対象とする等の変更があった。報告書の表題は、実際の研究内容を示すものとした。

①成分・品質に関する研究、②変異原性試験の結果は以下の通りである。変異原性試験については、各試験を、復(細菌を用いる復帰突然変異試験)、染(ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)、小(げっ歯類を用いる小核試験)と略し、結果を概説する。

**1. ヒメマツタケ抽出物:** ①低分子量の有機化合物が検出されなかったことから、苦味成分は多糖類またはタンパクに糖が結合している高分子である可能性が示唆された。②染: 陰性。

**2. メバロン酸:** ①メバロン酸製品中のメバロノラクトンは *R(-)* 体であることが確認された。含量は 97.6%であった。②染:  $\pm S_9$  における観察可能な最高用量のみに、染色体の構造異常誘発性が認められた。他の変異原性試験と総合的に評価し、生体にとって特段問題となるものではないと考える。

**3. 没食子酸:** ①HPLC で定量した結果、没食子酸・一水和物として 99.7%であった。また、純度が非常に高いことが確認された。②小: 陰性。生体内では染色体異常誘発性が発現しないことを示しており、生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないものと考えることが出来る。

**4. ログウッド色素:** ①LC/MS を用いて検討した結果、主色素とされるヘマトキシリン(含量 27.3%) 及びその酸化体ヘマテインを検出した。②復: 陰性。染、小: 染色体異常誘発性に関しては *in vitro*, *in vivo* 共に陽性の結果となったが、強いものではなく、生物学的意義は低いものと考えられる。

**5. グレープフルーツ種子抽出物：**①今年度分析を行った2つのサンプルのうち、1製品は2つの不飽和脂肪酸(オレイン酸及びリノール酸)を主成分とし、変異原性試験に供された試料からは、アルキル鎖がC8-C18のベンザルコニウムが検出された。②：復、染：細菌の生育阻害が強く出たため、当該試験の結果は安全性の評価に使用すべきではないと判断した。従って、染色体異常試験の結果は、数的異常の誘発を示唆するものであったが、評価の対象とすべきではないものと判断した。

**6. ヒキオコシ抽出物：**①5つの化合物を分離した。そのうちの1つを、ヒキオコシの苦味成分として知られる oridonin タイプの rabdosianone I と決定した。②検体の入手が遅れ、現時点において予備試験のみが終了した状況にある。復：陰性、染：スライド標本の顕微鏡観察において、現時点で陽性を示す傾向が認められている。小：顕微鏡観察において、現時点で陽性を示す傾向は認められていない。現時点までに得られている本試験の結果から、強い変異原性を示すものではないと考えられる。

**7. サンダラック樹脂：**①主成分はサンダラコピマール酸(含有量11.6%)であることを明らかにした。②染：染色体の構造異常は誘発しなかったが、連続処理法において、数的染色体異常(倍数体)の誘発が観察された。他の変異原性試験と総合的に評価し、生体にとって特段問題となるものではないと考える。

**8. 木酢液：**9種類の異なる試料について試験を実施した。①GC/MS及びヘッドスペースGC/MS分析(NISTライブラリ検索)により、いずれの試料からも酢酸をはじめとする有機酸及び2-methoxyphenol等のフェノール系化合物等が同定された。②復：最大用量を国内外のガイドラインで推奨されている限界用量である

5mg/プレートとした場合、木酢液製品は陰性を示した。陽性を示した菌株から木酢液中に含まれる変異原物質は塩基対置換型の変異を引き起こす物質であることが示唆された。

**9. アルカネット色素：**①主色素成分はヒドロキシナフトキノンのエステル化体であり、それらの立体は shikonin 型 (*R*-configuration)であることを明らかにした。

**10. ユーカリ葉抽出物：**①LC/MSを用いて解析した結果、没食子酸、エラグ酸に加え、6種の macrocarpal 類が含まれることを推定した。

**11. タデ抽出物：**①12種の化合物を単離した。このうち3種はセスキテルペンの isodrimeninol、植物ステロールである  $\beta$ -sitosterol 及び stigmasterol と同定した。

**12. 精油除去ウイキョウ抽出物：**①シリカゲルTLC上で展開されないものが大部分であった。

**13. マクロホモブシスガム：**①糖組成分析やメチル化分析の結果、 $\beta$ -1,3-グルカンとデキストランが含まれている可能性が考えられた。

**14. アロエベラ抽出物：**①機能性多糖として報告されているアセマンナンは確認できなかった。低分子量成分についてTLC及びLC/MSを用いて検討したが、アロエベラ抽出物製品から低分子量成分は検出されなかった。

**15. ニガヨモギ抽出物：**①主成分及びその他のセスキテルペン二量体について、検討した結果、アブシンチン及びアナブシンチンを同定した。また、主成分のアブシンチンを定量した結果、本抽出物製品中に2.0%含有されることを明らかとした。

**16. コメヌカ油抽出物：**①主成分フェルラ酸以外の成分としてフェルラ酸のステロイド及びトリテルペンのエステルが含まれていることがわかった。

**17. スフィンゴ脂質：**①主成分とされているセ

レブロシドが9種単離された。

**18. キダチアロエ抽出物**：①多糖を還元後、メチル化分析に供し、主に1,4-結合したガラクトロン酸で構成されるペクチン性多糖であることが示唆された。

#### D. 結論

本研究事業において変異原性試験に供された試料及び近年、毒性試験に供された試料等18品目の既存添加物について、成分・品質研究を行った結果、その基原に特徴的な成分等を同定する等、多くの知見を得ることができた。また、変異原性試験では、本年度検討した既存添加物の中には弱い遺伝毒性を示すものも認められたが、生体内で強い影響が想定されるものはなく、現時点において現時点において早急に対処が必要と考えられるものはなかった。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一 (2003)天然苦味料ジャマイカカシヤ抽出物の成分分析, 食品衛生学雑誌, 44, 328-331.
- 2) Hamada, S., K. Nakajima, T. Serikawa and M. Hayashi (2003) The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay, *Mutagenesis*, 18, 273-275
- 3) Hamada, S., K. Nakajima, C. Namiki, T. Serikawa, and M. Hayashi (2003) Sex differences in the chemical induction of micronuclei in the rat, *Environ. Mutagen. Res.*, 25, 33-37.

- 4) Kirkland, D.J., M. Hayashi, J.T. MacGregor, L. Müller, L.M. Schechtman, and T. Sofuni (2003) Summary of major conclusions—the 3rd International Workshop on Genotoxicity Testing—, *Mutat. Res.*, 540, 123-125.
  - 5) Müller, L., D. Blakey, K.L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. MacGregor, J.M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka, D. Tweats, and H. Yamasaki (2003) Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutat. Res.*, 540, 177-181.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 磯 朝枝, 石橋邦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一:天然増粘安定剤キダチアロエ抽出物の成分分析. 日本食品衛生学会第86回学術講演会, 岩手, 2003.
  - 2) 酒井信夫, 川原信夫, 合田幸広, 佐藤恭子, 棚元憲一:既存添加物「アルカネット色素」の成分に関する研究. 日本食品衛生学会第86回学術講演会, 岩手, 2003.
  - 3) M. Honma, M. Izumi, M. Sakuraba, S. Tadokoro, H. Sakamoto, W. Wang, F. Yatagai, and M. Hayashi: Deletion, rearrangement, and gene conversion; the genetic consequences of chromosomal double strand breaks in human cells. EEMS, Aberdeen, 2003.
  - 4) M. Hayashi: Advantages and limitations of micronucleus assay- validation studies

on in vivo micronucleus assay using  
other than haemopoietic cells: 5th  
International Symposium on  
Chromosomal aberrations, Essen, 2003.

- 5) M. Hayashi: Plenary lecture—In vivo  
micronucleus assay: historical review  
and current improvement. JEMS-KEMS  
Joint Symposium, Seoul, 2003.
- 6) M. Hayashi: Some topics on risk  
assessment of carcinogenic chemicals·  
Mutagenicity testing· 第30回日本トキシ  
コロジー学会, 神奈川, 2003.
- 7) 林 真: 小核試験. 第17回日本動物実験代  
替法学会, 神奈川, 2003.

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし



## 既存添加物の成分・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 本研究事業において変異原性試験に供された試料及び近年、毒性試験に供された試料等 18 品目の既存添加物（ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸、没食子酸、ログウッド色素、グレープフルーツ種子抽出物、ヒキオコシ抽出物、サンダラック樹脂、アルカネット色素、ユーカリ葉抽出物、タデ抽出物、精油除去ウイキョウ抽出物、マクロホモプシスガム、アロエベラ抽出物ニガヨモギ抽出物、コメヌカ油抽出物、スフィンゴ脂質、キダチアロエ抽出物、木酢液）について、成分・品質研究を実施した。

### A. 研究目的

既存添加物には、天然物から抽出により得られたものが多く、それらは通常、多成分からなる。同じ品目名であっても、製法等が異なると、成分組成も異なることが予想される。そのため、既存添加物の中には、既存添加物名簿に（ ）書きで、基原・本質が付記されて、限定されている品目もある。また、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る。したがって、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。さらに、既存添加物の多くは公的な規格がなく、その設定が求められていることから、毒性試験に供せられた試料の成分・品質に関する知見を得るために、本研究を行った。また、くん液（木酢液）については、近年その用途が広がっているが、一部に変異原性の懸念が報告されていることから、改めて市場製品他の復帰突然変異原性試験及び成分研究を行った。

以下に示す 18 品目について、成分・品質に関する研究について総括する。本研究事業において既存添加物の安全性評価の一環として、変異

原性試験を実施した 7 品目（ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸、没食子酸、ログウッド色素、グレープフルーツ種子抽出物、ヒキオコシ抽出物、サンダラック樹脂）。この数年間に毒性試験が行われたが、含有成分の情報が不十分と考えられた 6 品目（アルカネット色素、ユーカリ葉抽出物、タデ抽出物、精油除去ウイキョウ抽出物、マクロホモプシスガム、アロエベラ抽出物）。昨年度の対象品目のうち、さらに成分研究が必要と考えられた 4(5)品目（ニガヨモギ抽出物、（サンダラック樹脂）、コメヌカ油抽出物、スフィンゴ脂質、キダチアロエ抽出物）及び木酢液。なお、詳細は分担研究報告書を参照されたい。

### B. 研究方法

試料は全て、日本食品添加物協会を通じて提供されたものを用いた。なお、予定していたアオイ花抽出物、アマシードガムを入手出来なかったため、ヒキオコシ抽出物、マクロホモプシスガムを研究対象とした。

ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸、没食子酸、ログウッド色素、ニガヨモギ抽出物、アロエベラ抽出物（低分子量成分）、アルカネット色素、

ユーカリ葉抽出物、グレープフルーツ種子抽出物、ヒキオコシ抽出物、サンダラック樹脂、タデ抽出物、精油除去ウイキョウ抽出物、コメヌカ油抽出物、スフィンゴ脂質-TLCによる定性、各種クロマトグラフィーによる化合物の単離、核磁気共鳴 (NMR)、質量分析 (MS) 等の分光学的手法による構造解析、LC/MS あるいは HPLC による確認、定量等を行った。

マクロホモブシスガム、アロエベラ抽出物(多糖体) - 透析、ゲルろ過等により、分画した後、糖組成分析及びメチル化分析を行った。

キダチアロエ抽出物-ゲルろ過により多糖を単離し、ウロン酸還元多糖を調製し、メチル化後、加水分解、還元、アセチル化を行い、GC 及び GC/MS により分析した。木酢液については GC/MS により成分検索を行った。

### C. 研究成果および考察

**1. 苦味料・ヒメマツタケ抽出物:** 低分子量の有機化合物が検出されなかったことから、苦味成分は多糖類またはタンパクに糖が結合している高分子である可能性が示唆された。

**2. 製造用剤・メバロン酸:** 比旋光度測定およびキラルカラムを用いた HPLC 分析より、メバロン酸製品中のメバロノラクトンは *R*(-)体であることが確認された。また LC/MS でメバロノラクトンの定量した結果、97.6%であった。

**3. 酸化防止剤・没食子酸:** HPLC で定量した結果、没食子酸・一水和物として 99.7%であった。また、HPLC の gradient 溶出により分離したところ、没食子酸以外に明らかなピークは認められず、製品中の没食子酸純度が非常に高いことが確認された。

**4. 着色料・ログウッド色素:** ログウッド色素は、昨年度提供された試料がシタン色素であったことから、今年度、新たな試料について、成分分析を行った。LC/MS を用いて検討した結果、主色素とされるヘマトキシリン(含有量 27.3%)

及びその酸化体ヘマテイン(含有量 7.2%)を検出した。また、90 日間反復投与毒性試験に供するために、本色素の安定性について検討した結果、長期保存によってもその成分組成は変化しないことが確認された。

**5. 製造用剤・グレープフルーツ種子抽出物:** 今年度分析を行った 2 つのサンプルのうち、1 製品は 2 つの不飽和脂肪酸(オレイン酸およびリノール酸)を主成分とし、もう一方の製品からは、アルキル鎖が C8-C18 のベンザルコニウムが検出された。

**6. 苦味料・ヒキオコシ抽出物:** 5 つの化合物を分離した。そのうちの 1 つを、ヒキオコシの苦味成分として知られる oridonin タイプの rabsosianone I と決定した。

**7. ガムベース・サンダラック樹脂:** 主成分は既存添加物名簿の記載の通り、サンダラコピマール酸(含有量 11.6%)であることを明らかにした。

**8. 着色料・アルカネット色素:** 主色素成分はヒドロキシナフトキノンのエステル化体であり、それら化合物の立体は shikonin 型 (*R*-configuration)であることを明らかにした。

**9. 酸化防止剤・ユーカリ葉抽出物:** LC/MS を用いて解析した結果、没食子酸、エラグ酸に加え、6 種の macrocarpal 類が含まれることを推定した。

**10. 製造用剤・タデ抽出物:** 12 種の化合物を単離した。このうち 3 種はセスキテルペンの isodrimeninol、植物ステロールである  $\beta$ -sitosterol 及び stigmasterol と同定した。

**11. 酸化防止剤・精油除去ウイキョウ抽出物:** シリカゲル TLC 上で全く展開されないものが大部分であった。

**12. 増粘安定剤・マクロホモブシスガム:** 糖組成分析やメチル化分析の結果、 $\beta$ -1,3-グルカンとデキストランが含まれている可能性が考えられた。

**13. 増粘安定剤・アロエベラ抽出物:** 機能性多

糖として報告されているアセマンナンは確認できなかった。低分子量成分について TLC 及び LC/MS を用いて検討したが、アロエベラ抽出物製品からアロエベラ抽出物に特徴的な低分子量成分は検出されなかった。

**14. 苦味料・ニガヨモギ抽出物**：昨年度は、精油成分について検討し、今年度は主成分及びその他のセスキテルペン二量体について検討した。アブシンチン及びアナブシンチンを同定し、主成分アブシンチンの含有量は 2.0%であることを明らかにした。

**15. 酸化防止剤・コメヌカ油抽出物**：昨年度、主成分はフェルラ酸（含有量 60%）であることを明らかにした。今年度はフェルラ酸以外の成分としてフェルラ酸のステロイドおよびトリテルペンのエステルが含まれていることを明らかにした。

**16. 乳化剤・スフィンゴ脂質**：昨年度より研究を継続し、主成分とされているセレブロシドが 9 種単離された。

**17. 増粘安定剤・キダチアロエ抽出物**：昨年度単離した多糖を還元後、メチル化分析に供し、主に 1,4-結合したガラクトン酸で構成されるヘクテン性多糖であることが示唆された。

**18. 製造用剤・くん液（木酢液）**：木酢液製品、濃縮木酢液、木酢原液及びその蒸留液について、GC/MS 及びヘッドスペース-GC/MS 分析を行い、NIST ライブラリ検索により、酢酸をはじめ

めとする有機酸及び 2-methoxyphenol 等のフェノール系化合物等を同定した。

#### D. 結論

本研究事業において変異原性試験に供された試料及び近年、毒性試験に供された試料等 18 品目の既存添加物について、成分・品質研究を行い、その基原に特徴的な成分等を同定する等、多くの知見を得ることができた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一(2003)  
天然苦味料ジャマイカカシヤ抽出物の成分分析, 食品衛生学雑誌, 44, 328-331.

##### 2. 学会発表

磯 朝枝, 石橋邦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一：天然増粘安定剤キダチアロエ抽出物の成分分析, 日本食品衛生学会第 86 回学術講演会, 岩手, 2003.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ヒメマツタケ抽出物等の成分・品質に関する研究

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 本研究事業あるいは近年行われた毒性試験に供され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、ヒメマツタケ抽出物（苦味料）、メバロン酸（製造用剤）、没食子酸（酸化防止剤）、ログウッド色素（着色料）、ニガヨモギ抽出物（苦味料）、アロエベラ抽出物（増粘安定剤）の低分子成分について成分研究を行った。また、木酢液（製造用剤：くん液）については、近年その用途が広がっているが、一部に変異原性の懸念が報告されていることから、改めて市場製品他の復帰突然変異原性試験及び成分研究を行った。

1. ヒメマツタケ抽出物：低分子量の有機化合物が検出されなかったことから、苦味成分は多糖類またはタンパクに糖が結合している高分子である可能性が示唆された。
2. メバロン酸：主成分は *R(-)*-メバロノラクトン（含量 97.6%）であることが確認された。
3. 没食子酸：没食子酸・一水和物として 99.7%と、純度が非常に高いことが確認された。
4. ログウッド色素：主色素とされるヘマトキシリン（含量 27.3%）及びその酸化体ヘマテインを検出した。
5. アロエベラ抽出物の低分子量成分：特徴的な成分は検出されなかった。
6. ニガヨモギ抽出物：セスキテルペン二量体について検討し、アブシンチン（含量 2.0%）及びアナブシンチンを同定した。
7. 木酢液：木酢液製品、濃縮木酢液、木酢蒸留液及び木酢原液について、NIST ライブラリ検索により、酢酸をはじめとする有機酸及び 2-methoxyphenol 等フェノール系化合物等を同定した。

### 協力研究者

尹 永淑 東京薬科大学 生命科学部助手

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

多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部

八代崇寛 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部

### A. 研究目的

既存添加物の安全性評価の一環として実施された毒性試験の試料についてその成分に関する知見を得るため、成分研究を行った。

ヒメマツタケ抽出物、メバロン酸、没食子酸、ログウッド色素、アロエベラ抽出物の低分子量成分、ニガヨモギ抽出物については、本報告書

の別添を参照されたい。以下、木酢液について述べる。

（木酢液の成分に関する研究）

### B. 研究方法

#### 1. 試料

木酢液製品 1 種類、濃縮木酢液 2 種類、木酢蒸留液 3 種類、木酢原液 3 種類は、日本食品添加物協会を通じて入手した。

#### 2. 分析用試料溶液の調製

ねじ栓付き試験管に、各木酢原液 1 ml を入れ、酢酸エチル 2 ml を加え、栓をして振り混ぜた後、静置し、上澄液を採取した。

#### 3. 装置

GC/MS には、Shimadzu GCMS-5050A system（島津製作所製ガスクロマトグラフ）

GC-17A) 及びデータ解析システムとして GCMS solution ソフトウェア (島津製作所製) を接続したもの、または Agilent5973 / Agilent5973 Mass Selective Detector (Agilent Technologies社製ガスクロマトグラフ) に、ヘッドスペースサンプラーとして Agilent7694 Headspace Sampler (Agilent Technologies社製) 及びデータ解析システムとしてケミステーション (Agilent Technologies社製) を接続したものをを用いた。

#### 4. GC/MS 条件

条件1 カラム: Inert Cap Wax (0.25 mm i.d. x 30 m, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ 、ジーエルサイエンス製)、注入口温度: 200°C、カラム温度: 30°C (10 min)  $\rightarrow$  (4°C/min)  $\rightarrow$  230°C (30 min)、キャリアガス: He、キャリアガス圧力: 92 kPa、カラム流量: 2 ml/min、スプリット比: 15:1、気化室温度: 275°C、インターフェース温度: 230°C、イオン化電圧: 70 eV、加速電圧: 1.2 kV、スキャン範囲:  $m/z$  40-600。

条件2 カラム: DB-1 (0.25 mm i.d. x 30 m, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ 、J&W Scientific 製)、注入口温度: 200°C、カラム温度: 30°C (10 min)  $\rightarrow$  (4°C/min)  $\rightarrow$  260°C (30 min)、その他は、条件1に同じ。

条件3 カラム: DB-5 (0.25 mm i.d. x 30 m, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ 、J&W Scientific 製)、注入口温度: 200°C、カラム温度: 30°C (3 min)  $\rightarrow$  (4°C/min)  $\rightarrow$  300°C、その他は、条件1に同じ。

条件4 カラム: Inert Cap Wax (0.25 mm i.d. x 30 m, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ 、ジーエルサイエンス製)、注入口温度: 200°C、カラム温度: 120°C (10 min)  $\rightarrow$  (4°C/min)  $\rightarrow$  250°C (30 min)、その他は、条件1に同じ。

条件5 ヘッドスペースサンプラー: オープン温度 50°C、ループ温度 100°C、トランスファーライン温度 120°C、バイアル平衡時間、40分間。カラム: Aquatic-2 (0.25 mm i.d. x 60 m, 膜厚 1.4  $\mu\text{m}$ 、ジーエルサイエンス製)、注入口温度: 200°C、

カラム温度: 0°C (5 min), 4°C/min, 110°C, 40°C /min, 240°C (20 min)、キャリアガス: He、インターフェース温度: 250°C、イオン源温度: 230°C、キャリアガス: He、イオン化電圧: 70 eV、注入方法: スプリット比=15:1、スキャン範囲:  $m/z$  15~300 を用いた。

#### C. 結果及び考察

木酢液は、製造用剤 くん液の一種であり、既存添加物収載品目リストにおいて、その基原・製法・本質は「サトウキビ、竹材、トウモロコシ又は木材を、乾留して得られたものである。」とされている。木酢液製品は、粗木酢液 (炭化炉、あるいは乾留炉により木質系原料を炭化する時に生じる排煙を冷却、凝縮させた液体) を蒸留精製した濃縮木酢液を混合して調製される。本研究では、細菌を用いる復帰突然変異試験に供した木酢液 (木酢液製品 1 種類、濃縮木酢液 2 種類に加え、木酢原液 3 種類とそれらの木酢原液を個別に蒸留した木酢蒸留液 3 種類) の成分組成について、GC/MS を用いて検討した。

木酢液製品、濃縮木酢液及び木酢蒸留液について、条件1~3により、GC/MS 分析を行った。その結果、InertCap Wax カラムにより得られた GC/MS クロマトグラムは、いずれも良好な分離を示し、多数のピークが検出された (Fig. 1, 2)。濃度の違いが見られたが、木酢液製品と濃縮木酢液のクロマトグラムは類似していた。木酢蒸留液についても同様の保持時間にピークが観察された。NIST ライブラリを用い、類似度約 85 以上を検索し、化合物を推定した (Table 1)。木酢液製品には、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の有機酸や 2-methoxyphenol、2-methoxy-4-methylphenol 等のフェノール系化合物が検出された。

木酢液製品、木酢原液と他の木酢液とを比較するために、木酢原液の分析用試料溶液 (酢酸エチル抽出物) について GC/MS により分析したところ、条件1では、65分で分析が終了しなかったため、条件4で分析を行った (Fig. 3)。

その結果、25 分以降に多数のピークが観察されたが、同定には至らなかった。

また、揮発性低分子化合物についての知見を得るため、ヘッドスペースーガスクロマトグラフィーを行った。木酢液製品及び濃縮木酢液では、クロマトグラムは類似し、NIST ライブラリを用いて検索したところ、メタノール、アセトン、酢酸メチル及び酢酸等が同定され、特に酢酸のピークが顕著であった。木酢蒸留液 A は、揮発性低分子化合物は少なく、木酢蒸留液 B 及び C では、酢酸メチル及びメタノールが顕著であった。また、木酢蒸留液のクロマトグラムパターンは、木酢原液のものと類似していた。

これまでに、キャピラリーガスクロマトグラフィー (FID) による木酢液の分析では、37 種類の化合物が同定されている (松井ら、宮崎大学工学部紀要、第 27 号 pp51-56 (1998)) が、今回、その主なものについて、GC/MS でのライブラリ検索で同定することができた。

#### **D. 結論**

Ames 試験に供した木酢液製品、濃縮木酢液、木酢蒸留液及び木酢原液について、GC/MS 及びヘッドスペースーGC/MS により分析し、NIST ライブラリ検索により、酢酸をはじめとする有機酸及び 2-methoxyphenol 等フェノール系化合物等を同定した。

#### **E. 健康危機情報**

なし。

#### **F. 研究発表**

##### **1. 論文発表**

杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一(2003)  
天然苦味料ジャマイカカシヤ抽出物の成分分析, 食品衛生学雑誌, 44, 328-331.

#### **G. 知的財産件の登録状況**

なし。

Table 1

Identified Constituents in Wood Vinegar.

Peak	Molecular formula	Identification
1	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	3-hydroxy-2-butanone
2	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	1-hydroxy-2-propanone (acetol)
3	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O	2-cyclopentene-1-one
4	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O	2-methyl-2-cyclopentene-1-one
5	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	1-hydroxy-2-butanone
6	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	acetic acid
7	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	propanoic acid
8	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	butanoic acid
9	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	3-methyl-1,2-cyclopentanedione
10	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2-methoxyphenol ( <i>o</i> -guaiacol)
11	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	2-methoxy-4-methylphenol
12	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	phenol
13	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	4-ethyl-2-methoxyphenol
14	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	4-methylphenol ( <i>p</i> -cresol)
15	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	2 or 3-methylphenol ( <i>o</i> or <i>m</i> -cresol)

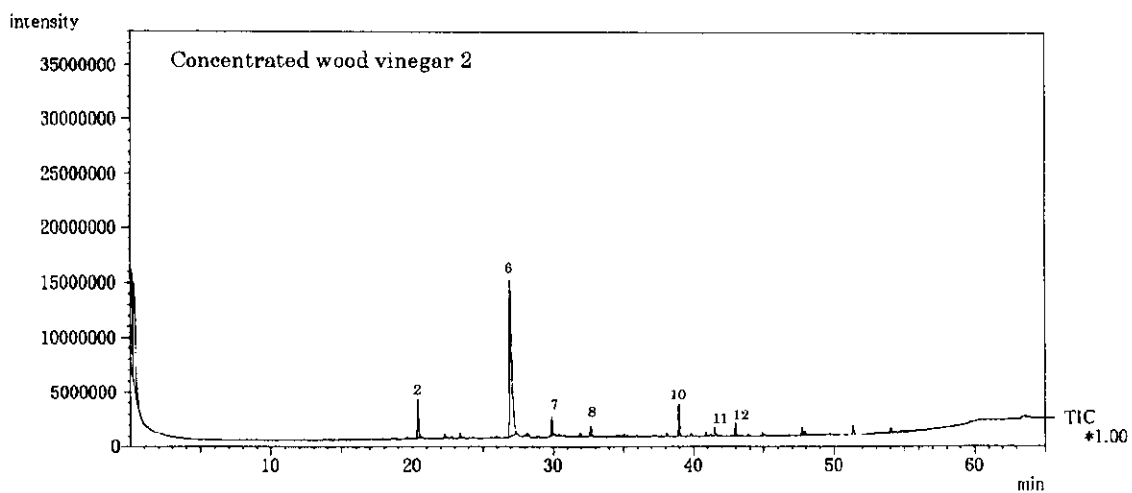
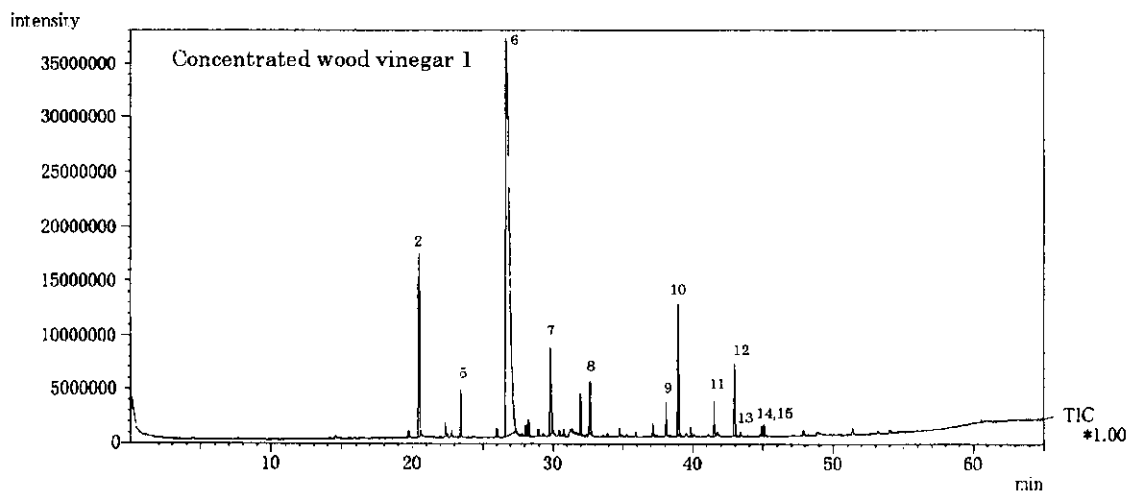
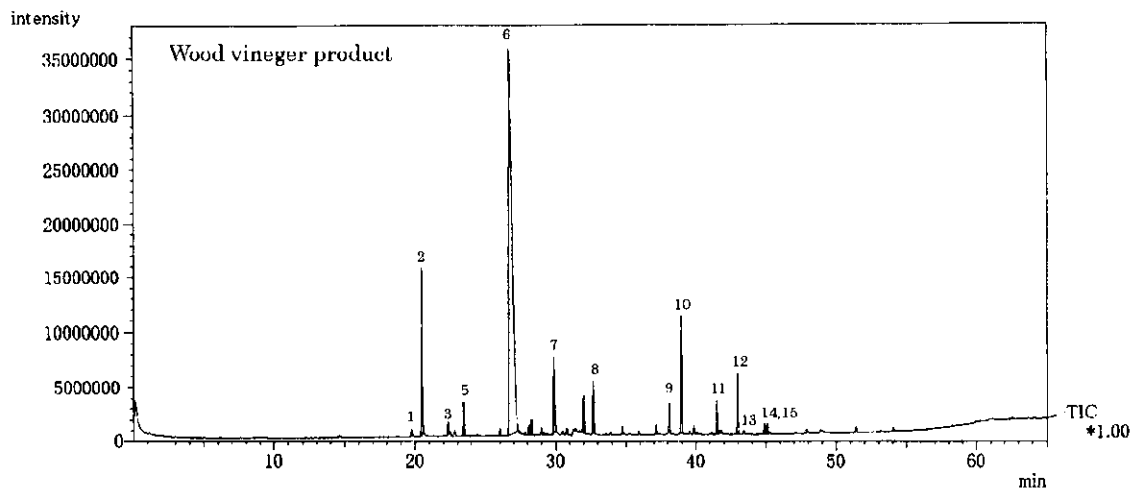


Fig. 1 GC profiles of wood vinegar product and concentrated wood vinegar



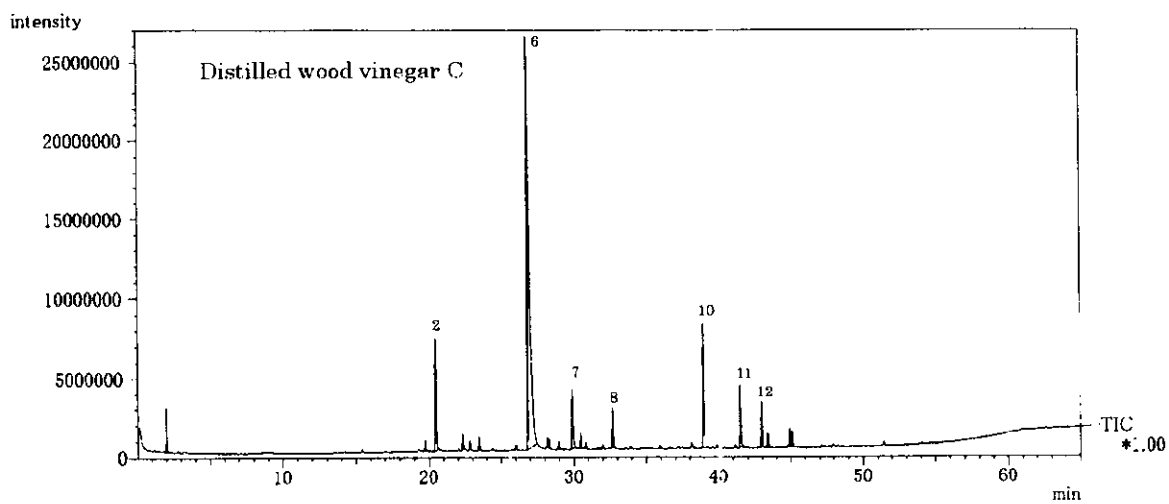
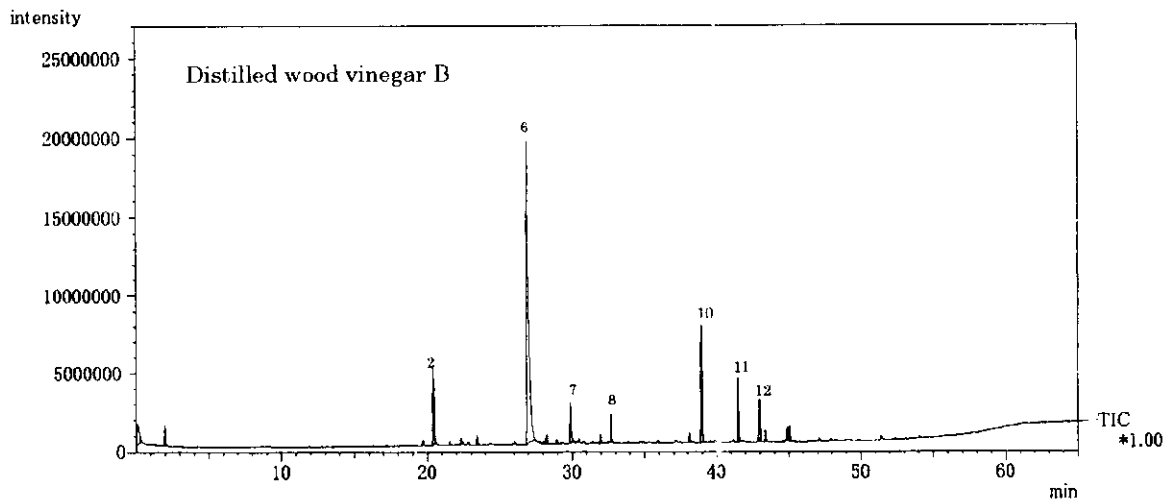
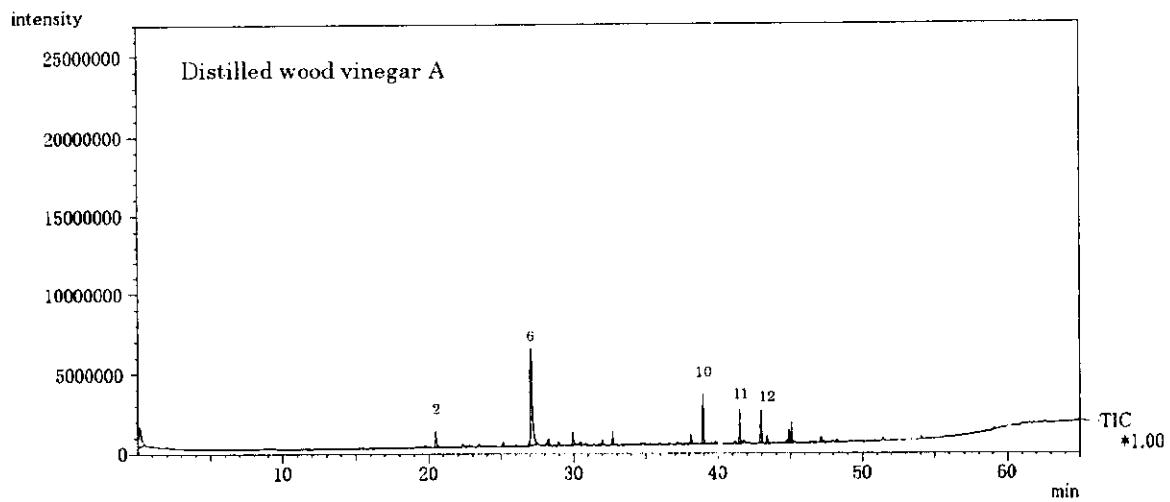


Fig. 2 GC profiles of distilled wood vinegar

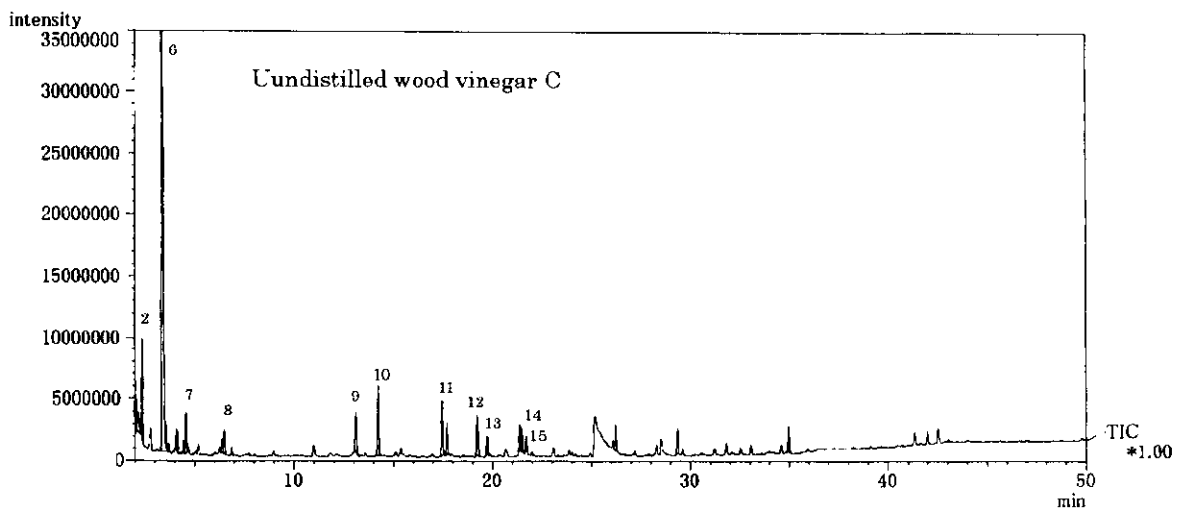
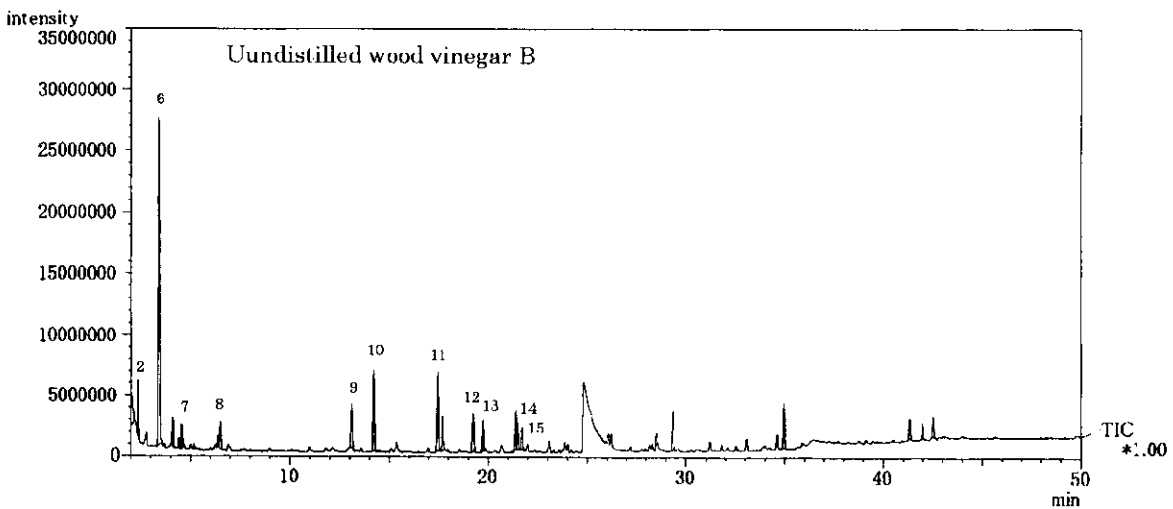
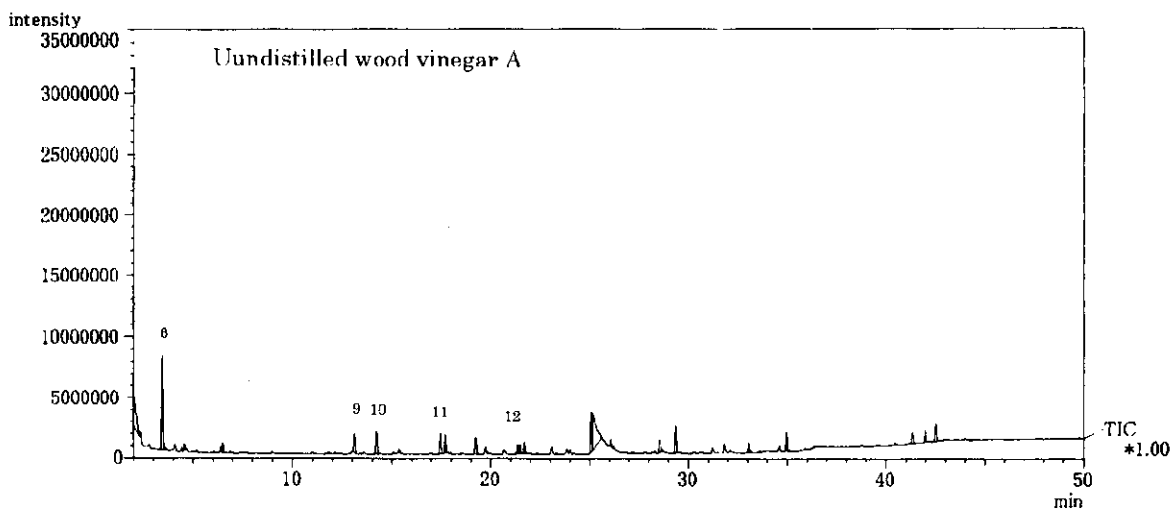


Fig. 3 GC profiles of ethyl acetate extracts from undistilled wood vinegar

## 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

## 天然苦味料ヒメマツタケ抽出物の苦味成分について

協力研究者 尹 永淑 東京薬科大学 生命科学部 助手

研究要旨 天然苦味料として用いられるヒメマツタケ抽出物の苦味成分を明らかにするため、各種溶媒による分配やカラムクロマトグラフィーにより確認を行った結果、低分子量の有機化合物が検出されなかったことから、苦味成分は多糖類またはタンパクに糖が結合している高分子である可能性が示唆された。

## A. 研究目的

天然苦味料ヒメマツタケ抽出物は既存添加物名簿収載品目リストにその起源・製法・本質としてヒメマツタケ (*Agaricus blazei* MURR.) の菌糸体若しくは子実体又はその培養液より水で抽出して得られたものであると記載されているが、その苦味成分本体についての情報は無い。そこで、苦味成分を同定し、添加物としての安全性を図るため、成分分析を行った。

## B. 研究方法

## 1) 試料

日本添加物協会を通じてヒメマツタケ水抽出物製品 (S) を粉末として 100 g を入手した。また、ブラジル産 (B) および中国産 (C) のヒメマツタケは (株) ウチダ和漢薬から購入し、粉碎器で粉碎した。

S を水 2 L に懸濁し、 $\text{CHCl}_3$  および *n*-BuOH で分配を行った後、 $\text{CHCl}_3$  抽出物 (SC, 109.8 mg) および *n*-BuOH 抽出物 (SB, 960.6 mg)、水可溶部を得た。SC をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH—gradient solvent system) に付し、SB を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (80% MeOH) に付した。また、50 g の B および C を 250 mL の MeOH または水で抽出し、その抽出物をさらに水に懸濁して  $\text{CHCl}_3$  と分配を行い、ブラジル産ヒメマツタケ水抽出物 (BH, 30.09 g)、ブラジル産ヒメマツタケ MeOH 抽出物 (BM, 2.38 g)、ブラジル産ヒメマツタケ  $\text{CHCl}_3$  抽出物 (BC, 493.0 mg)、中国産ヒメマツタケ水抽出物 (CH, 14.96 g)、中国産ヒメマツタケ MeOH 抽出物 (CM, 2.28 g)、および中国産ヒメマツタケ  $\text{CHCl}_3$  抽出物 (CC, 289.8 mg) を得た。これらの抽出物を

用い、検討を行った。

## 2) ergosterol の精製・単離

ブラジル産ヒメマツタケ  $\text{CHCl}_3$  抽出物 (BC, 493.0 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH—gradient solvent system) にかけて、ergosterol を単離した。

## 3) 機器およびその他

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは Bruker-DPX-400 型を用い、測定溶媒は重クロロホルムを使用した。シリカゲルの TLC は Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plates (Art. 5715; Merck) を用いた。

## C. 研究結果

ヒメマツタケ抽出物製品の  $\text{CHCl}_3$  抽出物 (109.8 mg) と *n*-BuOH 抽出物 (960.6 mg) からフタル酸エステル類が単離されたが、その他の化合物は TLC ( $\text{SiO}_2$ , ODS) 上で分離されない状態であり、そのほとんどが水溶性であるため、糖類の混合物であると推定された。一方、中国産およびブラジル産のヒメマツタケより調整した MeOH 抽出物からは ergosterol [ $\text{SiO}_2$  TLC ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH=9.5:0.5) *rf*=0.56] が単離され、NMR により確認された。これを標準品として、中国産およびブラジル産のヒメマツタケより調製した MeOH 抽出物、水抽出物、およびヒメマツタケ抽出物製品の MeOH 抽出物および  $\text{CHCl}_3$  抽出物について  $\text{SiO}_2$ -TLC により、比較した結果、ergosterol は中国産およびブラジル産のヒメマツタケより調製した MeOH 抽出物だけに含まれ、

水抽出物やヒメマツタケ抽出物中には含まれていないことが判明した (Fig.1)。このことより、ergosterol のような化合物は水抽出物には含有されないことがわかった。

#### D. 考察

ヒメマツタケ抽出物製品 100 g により  $\text{CHCl}_3$  抽出物 および *n*-BuOH 抽出物がそれぞれ 109.8 mg と 960.6 mg しか得られなかつたことから、本抽出物製品には、多量の糖類 (実際、デキストリンが 70% 含まれている) が含まれるが、低分子量の有機化合物が殆ど含まれていないと考えられた。また、苦味成分の一つとされる ergosterol が水抽出物には含有されなかつたことより、ヒメマツタケの水抽出物の苦味成分があると仮定すれば、それは多糖類またはタンパクに糖が結合している高分子である可能性が示唆された。

#### E. 結論

以上の結果よりヒメマツタケ抽出物製品には苦味成分として、ergosterol のような低分子量の有機化合物が含有されていないことが示唆された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし