

Trigonelline	160
Trigramin	304
Trilobalicin	437
Triumbellatin; 7'-O-D -Apiofuranoside	607
Triumbellatin; 7'-O- α -L-Rhamnopyranoside	607
[U]	
Uhdoside A	586
1-Undecanol (CAS 名)	370,400
1-Undecanol (CAS 名)	370,400
2-Undecanone	811
10-Undecenoic acid (CAS 名)	54
2-Undecyl-4(1H)-quinolinone (CAS 名)	812
2-Undecyl-4(1H)-quinolinone; N-Oxide	813
3-Ursanone	574
20-Ursen-12-ol; 12 β -form	548
12-Ursen-3-ol; 3 α -form	843
12-Ursen-3-ol; 3 β -form	453,843
[V]	
Venoterpine	790
Verbenalol; O- β -D-Glucopyranoside	318
Vicinin 2	821
Viniferal	203
α -Viniferin	203
Viniferol A	205
Viscotoxin	680
Viscumamide	681
Vitexin; 2"-O-(4-Hydroxycinnamoyl)	162
Vitilagin	205
Vitisin B; 3-Epimer	206
Vitispirane	207
[W]	
Wasalexin A	853,854
Wasalexin A; (Z)-Isomer	854
Widdrol	55
Wyeronic acid	536
[X]	
Xanthohumol C	370,371,400,401
Xanthohumol C	370,371,400,401
Xanthohumol E	371,401
Xanthohumol E	371,401
Xanthotoxol; O- β -L-Arabinopyranoside	813
Xanthoxyletin	235
Xenognosin A	501
Xylitol (CAS 名)	243
6-O- β -D-Xylopyranosyl-D-glucose (CAS 名) (旧 CAS 名)	245
[Y]	
Yuccaol A	714,715
Yuccaol A; 3-Epimer	715
[Z]	
Zeaxanthin; Dihexadecanoyl	729

II 分担研究報告書

- 4 天然添加物の規格設定及び
有害試薬使用の排除のための研究

分担研究者 山崎 壮

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

天然添加物の規格設定及び有害試薬使用の排除のための研究

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第2室長

研究要旨

天然添加物の公的規格規格基準設定を推進するために、業界の自社規格・試験法の調査と自主規格案の策定を行った。今年度は酵素やカルニウム類など19品目を新規検討し、第8版食品添加物公定書への新規掲載の検討に向けて28品目を見直し対象とした。また、食品添加物公定書規格試験法から有害試薬を排除するための検討を行い、昨年度からの継続でカロテノイド系着色料4品目及び今年度追加で着色料1品目を検討した。さらに、食品添加物「ルチン（抽出物）」のうち「ソハ全草抽出物」の成分分析法を開発するために、ソハ植物体中のフラボノイドのHPLC分析を行った。

協力研究者

浅野貞男（日本食品添加物協会）

〔業務委託〕

- (1) 既存添加物の規格化に関する調査研究
(天然添加物規格設定のための研究)
- (2) 食品添加物規格試験法の改善に関する試験検査
(有害試薬使用の排除のための研究)

A 研究目的

天然添加物（既存添加物）の公的規格基準設定が未整備である。食品添加物の国際規格であるJECFA規格がある天然添加物については既に第7版食品添加物公定書（食添7）に掲載されたが、天然添加物では我が国独自の品目が多いため、依然として多くの品目の公的規格基準が設定されておらず、食品行政における重要課題になっている。そこで、公的規格基準設定に向けた既存添加物の成分規格設定作業を推進するために、以下の検討を行った。

A-1 天然添加物規格設定のための研究

既存添加物の成分規格設定を目標に、食品添加物業界では日本食品添加物協会（日添協）を中心に既存添加物の自主規格案の策定を進めている。我々（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部）も、業界の自主規格作成を指導・支援してきた。そこで、引き続き業界自主規格案の策定を日添協に依頼した。

業界自主規格かない品目については、我々はこれまでに、含有成分が未解明な各種天然添加物の成分解析や分析法の開発など、成分規格設定に必要な基礎的事項について検討を行ってきた。今回、ソハ由来ルチン抽出物を対象とした。既存添加物「ルチン（抽出物）」はこれまで「エンニュ抽出物」だけが市場に流通していたが、ソハ葉でルチン含量が高いことからソハ葉を使った商品開発が最近進んでいる。一方、業界自主規格は「エンニュ抽出物」の品質規格しかな

い。そこで、食品添加物「ルチン（抽出物）」として「ソハ全草抽出物」が今後市場で広く販売される事を予想し、ソハ由来ルチン抽出物製品の成分分析法開発の予備検討を行った。

A-2 有害試薬使用の排除のための研究

近年、人体や環境に有害な試薬 溶媒を使用しない試験法を作成することか求められている。食添7では、その作成要領において、「人体及び環境に有害な試薬を用いた試験法の廃止など、人及び環境に配慮した試験法となるように努める。」としている。しかし、食添7の改訂作業では、これらの点に関して十分な期間をかけた検討がなされなかったため、食添7には有害試薬を使用している項目が多く残されたままになっている。そこでそれら有害試薬を使用している規格試験法を排除するために、有害試薬を使用しない代替試験法を開発することをめざした。まず我々は、食添7掲載試験法の中で有害試薬を使用している試験項目を調査し、国内外の食品添加物、医薬品等の規格試験法を比較して、食品添加物公定書で適用できる可能性のある代替試験法案の基本方針を平成12年度に提案した。平成13年度からは、それらの代替試験法案の市場流通品への適用可否についての調査研究を日添協に依頼してきた。今年度も引き続き検討を依頼した。結果は、食品添加物公定書の次期改定に活用されると期待される。

B 研究方法

B-1 天然添加物規格設定のための研究

11 既存添加物の規格化に関する調査研究

既存添加物の自社規格・試験法の調査と自主規格案の策定を食品添加物業界に依頼した。作業は日本食品添加物協会（日添協）の技術委員会・自主規格専門委員会が中心となって推進した。既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格 試験法等について調査を

行ない、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進めた。

なお、規格案の策定に当たっては、可能な限り、第7版食品添加物公定書の規格設定の基本的考え方、方法等に準拠した。新規規格策定に当たっては、主成分の確認、定量法の開発検討等を中心に行い、成分規格の設定並びにその妥当性等に関して評価検討を行った。

今年度は酵素やカルニウム類など19品目を新規検討し、第8版食品添加物公定書への新規収載の検討に向けて28品目を見直し対象とした。

1.2 ソバ由来ルチン抽出物の分析法開発のための研究

既存添加物「ソハ全草抽出物」の抽出原料であるソハ植物体のフラボノイド類の成分分析法の検討を行った。ソハ植物体中のルチンを含むフラボノイドのHPLC分析に必要な基礎データである、標準化合物の溶出時間と可視UVスペクトルの収集を行うとともに、ソハ植物体、ソハ葉乾燥粉末を試料にして、それらからのメタノール抽出物中のフラボノイドの分析を行った。既存添加物「エンシュ抽出物」(エンシュ由来ルチン抽出物)との比較も行った。

1) 試薬類

ソハ植物体中に含有か予想されるポリフェノール成分(フラボノイド、カテキン類など)の標準化合物としては、市販試薬を用いた。既存添加物「エンシュ抽出物」は日本食品添加物協会を通して入手した。ソハ葉乾燥粉末は食品素材用ソハ若葉粉末市販品を用いた。

2) ソハ種子

信農1号 長野県中信農業試験場佐藤尚博士より分与していただいた。

北陸4号 中央農業総合研究センター北陸研究センター伊藤誠治博士より分与していただいた。

なお、信農1号は普通ソハの代表的栽培品種であり、北陸4号はダントソバの栽培品種である。

3) HPLC分析条件

カラム TSK gel ODS 80Ts、5 μm、4.6 mm I D × 25 cm (東ソー(株)製)

移動相 1 mM tetrabutylammonium chloride (pH 2.9 adjusted with AcOH)/acetonitrile (19:1→2 3 in 30 min)

流速 0.7 ml/min

カラム温度 40℃

検出 フォトダイオードアレイ検出器(190 nm~600 nm)および紫外可視検出器(280 nm)

4) プランター栽培ソハ植物体(信農1号・北陸4号)の成分分析

プランターに種をまいてから1ヵ月間栽培した植物体を凍結乾燥し、「葉」、「茎の緑色の部分」、「茎の赤色の部分」に分類した。それぞれからMeOH抽出物を調製し、HPLCにより分析を行なった。

5) 液体培地で振とう培養したソハ植物体(信農1号)の成分分析

1-2 MS 固体培地で培養した無菌植物体の先端から1~2節を切り出し、30 ml 1/2 MS 液体培地に植え継ぎ、1ヵ月間ロータリーベンチャー(100 rpm)で振とうしながら培養した。これを凍結乾燥して「葉」、「茎」、「根」に分類した後、それぞれからMeOH抽出物を調製し、HPLCにより分析を行なった。

B-2 有害試薬使用の排除のための研究

これまで、国立医薬品食品衛生研究所において調査研究を行ってきた代替試験法案について、平成13年度から市場流通品への適用可否についての調査研究を日添協に依頼してきた。日添協では、技術委員会の委員が中心となって推進した。技術委員会と各部会が連動し、協会の会員の中から当該食品添加物と関連の深い会員(製造、流通または使用している会員)を選定し、それぞれの添加物について検討を進めた。代替試験法案の市場流通品への適用可否について調査研究するとともに、適用不可能なものについては、改めて代替試験法の開発検討を行った。得られた結果を各部会毎にまとめた。

今年度は、昨年度からの継続でカロテノイド系着色料4品目及び今年度追加で着色料1品目を検討した。

C 研究結果及び考察

C-1 天然添加物規格設定のための研究

1.1 既存添加物の規格化に関する調査研究

【業務委託】

詳細な報告は別添報告書に記載したので、ここでは研究結果の概要と考察を述べる。

平成14年11月には、これまで蓄積してきた189品目の自主規格を収載した「第三版既存添加物自主規格」を刊行した。しかしながら、既存添加物489品目のうち、公定規格および自主規格策定済み品目はおよそ半数にとどまっており、未だ約半数の品目の規格策定が残されている。

今年度も、①新たに19品目の既存添加物について自主規格の策定検討を推進するとともに、②規格内容のレヘルアップを図るために、②-1「第三版既存添加物自主規格」収載品目のうち17品目、および②-2「平成14年度報告品目」のうち11品目について見直しを行なった。②の見直し28品目のうち19品目は第8版食品添加物公定書への新規収載候補品目である。

第8版公定書への収載候補品目に関し、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部との間で既策定規格・試験法の妥当性を検討中であるが、前記19品目については自らの見直し検討を含め、

国立衛研との妥当性評価の過程で提案された規格・試験法について検討したものである。

表1 平成15年度新規自主規格検討品目(19品目)

用途名(検討品目数)	自主規格検討品目
甘味料 (1)	ブランルカンゾウ抽出物
酵素 (9)	アンラーゼ、アルギン酸リアーゼ、エキソマルトテトラオヒトローラーゼ、エステラーゼ、タンナーゼ、テキストラナーゼ、ナリンナーゼ、フルクトシルトランスフェラーゼ、ヘスペリンナーゼ
調味料・苦味料 (1)	ンヤマイカカノノア抽出物
製造用剤 (8)	アスペルギルスステレウス糖たん白質、骨焼成カルシウム、乳清焼成カルシウム、貝殻未焼成カルシウム、サンゴ未焼成カルシウム、卵殻未焼成カルシウム、生石灰、木酢液

表2 平成15年度既策定規格の見直し品目(28品目)

用途名(品目数)	検討品目	見直しの概要
甘味料 (2品目)	N-アセチルグルコサミン	現行定量法は本品に特異性の高い比色方法であるラインノヒ法を採用しているか、オリゴ-N-アセチルグルコサミンがHPLC法であることから、本品についてもHPLC法を検討した。
	L-アラビノース	現行純度試験の一つに「他の糖類」を規格化している。その試験にろ紙クロマトグラフ法を採用しているか、薄層クロマトグラフ法への変更可能性について検討した。
着色料 (11品目)	カカオ色素、カキ色素、クロー色素、コウリヤン色素、シアナト色素、タマネギ色素、タマリント色素	フラボノイド系着色料の確認試験において酢酸鉛が用いられている。昨年度は有害試薬排除の一環としてこれを用いない Steasny 試薬(ホルマリン含有)への代替を報告したか、その後、ホルマリンの発がんリスクなどが報道されたことから、ホルマリンを使用しない方法を検討した。
	トマト色素	現行規格では色価測定法において有害試薬であるクロロホルムを使用しているため、クロロホルムの代替検討を行った。 併せて、確認試験(3)の試料採取量の見直しを行った。
	クチナシ青色素 クチナシ赤色素	左記2品目については成分が特定できていないため、他の着色料と識別できる適切な確認試験法について検討した。

	ラノク色素	現行確認試験の一つにろ紙クロマトグラフ法を採用しているか、薄層クロマトグラフ法への変更可能性について検討した。
保存料 (2品目)	ブトウ種子抽出物	現行規格は粉末のみを対象としているが、デキストリン等を含むもの及び液体品の流通が確認されたため、性状について所要の見直しを行うとともに、液体品の乾燥減量規格の設定について検討した。
	ε-ポリリノン	昨年度は定量法に関し、HPLC法への変更を報告した。本品もブトウ種子抽出物と同様に、デキストリン等を含むもの及び液体品の流通が確認されたため、性状、確認試験等について所要の見直しを行った。
増粘安定剤 (2品目)	アウレオハンシウム培養液	含量規格と定量法及び動粘度規格の追加並びにヒ素規格の改定について検討した。
	微小繊維状セルロース	昨年度に引続き、現在流通している製品品質の実態に照らして規格項目、規格値、試験法など、再度の見直しを行った。
酸化防止剤 (3品目)	イノノトール	現行確認試験において健康衛生上使用しないことか望ましいと思われる硝酸ストロンチウム及び塩基性酢酸鉛が使用されていること並びに定量法において誤差の大きい方法が採用されていること等から、医薬品添加物規格で採り入れられている赤外吸収スペクトル法による確認試験及びHPLC法による定量方法を検討した。
	γ-オリサノール	現行規格では含量規格が設定されていないため含量の規格化を検討した。併せて乾燥減量規格値の見直しを行った。
	酵素処理ヘスペリノン	現行規格策定後の研究で製品成分の実態が明らかになったことから、定量法及び含量規格の見直しを行った。また、確認試験の紫外外部吸収スペクトルについて極大吸収部を明記し、併せて、モノグルコシルヘスペリノンに対する保持時間及びピーク数を示すこととした。

ガムヘース (2品目)	パラフィンワックス マイクロクリスタリンワックス	現行確認試験では、左記2品目とも赤外吸収スペクトル法を採用しているが、原料 製法 成分が極めて近似しており、赤外吸収スペクトル測定では識別が難しいため、確認試験として熔融時(100℃)における動粘度値の規格化を検討した。パラフィンワックスについては純度試験として硫酸呈色物及びイオウ化合物の規格追加を検討した。
調味料 苦味料 (1品目)	ヘタイン	現行確認試験及び定量法でHPLC法を採用しているが、その操作条件の見直しを行い、溶離液流量の変更可能性について検討した。
乳化剤 (1品目)	植物性ステロール	遊離型とエステル型の混在品について両者を確認する方法として、TLC法による方法を検討した。
製造用剤 (4品目)	5-アテニル酸 5-ンチンル酸	左記2品目とも現行確認試験で中和工程を採り入れているが、中和に要する水酸化ナトリウム溶液が若干でも過量になると適切な反応が得られないため、この操作を省略する方法を検討した。また、純度試験における「類縁物質」の試験ではHPLC法を採用しているか、公定書に記載されている類縁物質の試験方法との整合性を考慮し、薄層クロマトグラフ法への変更を検討した。
	粗製海水塩化マグネシウム	現行重金属規格値では妨害イオン等の影響が排除できず、判定に誤差を生ずる懸念があるため、指定添加物「塩化マグネシウム」との整合性を考慮し、同一の規格値とした。
	ヘム鉄	主成分含量が極めて低いことから主成分以外の成分がたんぱく質であることの確認を行った。

12 ソバ由来ルチン抽出物の分析法開発のための研究

まず、HPLC分析により、ソバ植物体中に含有か予想されるポリフェノール成分の標準化合物の溶出時間と紫外可視スペクトルの収集を行った(表3)。

次に、そば植物体として、普通ソハである「信濃1号」およびタノタンソハである「北陸4号」のプランター栽培植物、1/2 MS液体培地中で振とう培養して育てた無菌化植物を調製した。これらの植物体をホモンネートし、メタノール抽出したものを試験溶液としてHPLC分析した結果、以下の結果を得た。

1) いずれの栽培種、生育環境においても主要含

有物はRutinであり、Catechin類やその他Polyphenolsの含量はごく微量であることが確認された。またRutinに次いで含有量が多い未知成分(peak A)の存在が確認された(図1)。この未知成分は既存添加物「エンシュ抽出物」製品(図2)には認められない成分であった。

- 2) プランター栽培植物では、葉中のRutin含量は信濃1号よりも北陸4号の方が多いたことが確認された(表4)。また、信濃1号の場合にはその含量は既報の信濃1号種子中の含量よりも多いたことが確認された。
- 3) いずれの栽培種においてもプランター栽培植物体では、Rutinは「葉」、「茎の緑色の部

分)、「茎の赤色の部分」の順で多く含まれていることが確認された。

また、圃場栽培ソハ植物体の代替として、市販されているソハ葉乾燥粉末製品をメタノール抽出し、HPLC 分析により含有成分を調べた結果、以下の結果を得た。

1) 主要含有物は Rutin であり、その含量は信濃 1 号をプランターで栽培したときの「葉」中の含量と同レベルであった (表 5)。また、プランター栽培植物で確認された未知成分 (peak A) と同じ化合物と思われる成分の存在を確認した (図 3)。

2) プランター栽培植物と比較すると Catechin 類の含量がわずかに多いことが確認された。また Epicatechin と Quercitrin の存在が確認された。

以上の結果から、「ソハ全草抽出物」(ソハ全草由来ルチン抽出物) の HPLC 分析および「エンジュ抽出物」(エンジュ由来ルチン抽出物) との判別のための基礎データが得られた。

表 3 標準化合物の溶出時間と吸収極大波長

標準品	溶出時間 Rt (min)	吸収極大波長 λ max (nm)
Quercetin Dihydrate	27 38	227,255,370
Quercitrin	22 29	230,253,347
Isoquercitrin	20 71	226,255,355
Hyperoside	20 58	226,255,355
Rutin	19 89	222,255,355
Apigenin	29 91	226,266,335
Vitexin	20 37	227,267,335
Isovitexin	20 14	227,269,335
Luteolin	27 13	222,252,267,346
Luteolin-7-Glucoside	20 82	222,253,266,348
Orientin	19 24	226,257,267,347
Homoorientin	18 50	226,255,270,347
Naringenin	29 76	231,286
Naringin	22 02	228,283
Hesperetin	30 97	231,286
Hesperidin	22 37	227,283
(+) Catechin Hydrate	16 38	227,279
(-)-Epicatechin	17 89	226,278
(-)-Epicatechin Gallate	20 95	234,273
Procyanidin B1	14 81	231,278
Protocatechuic Acid	14 03	226,257,293
Gallic Acid	9 90	226,269

標準品	溶出時間 Rt (min)	吸収極大波長 λ max (nm)
Rutin	20 04	222,255,355
Luteolin-3',7-Diglucoside*1	19 03	222,240,270,340

標準品	溶出時間 Rt (min)	吸収極大波長 λ max (nm)
Rutin	19 84	222,255,355
Ellagic Acid*1	20 86	250,365

*1 Luteolin-3',7-Diglucoside および Ellagic Acid は、他の化合物と別に分析を行なったので基準物質となる Rutin の Rt とともに Rt、 λ max を示した。

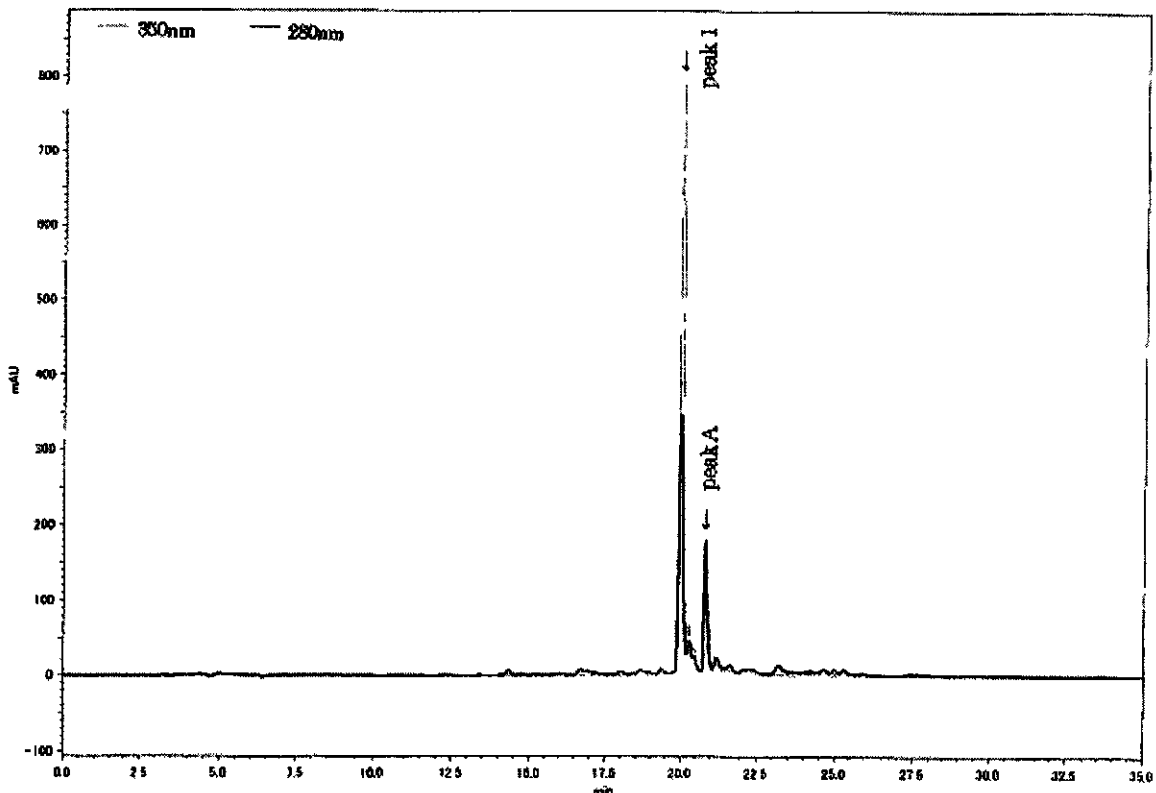


図1 プランター栽培ソハ植物体（信濃1号）の葉からのメタノール抽出物のHPLCクロマトグラム
peak 1 Rutin、 peak A 未知化合物 A

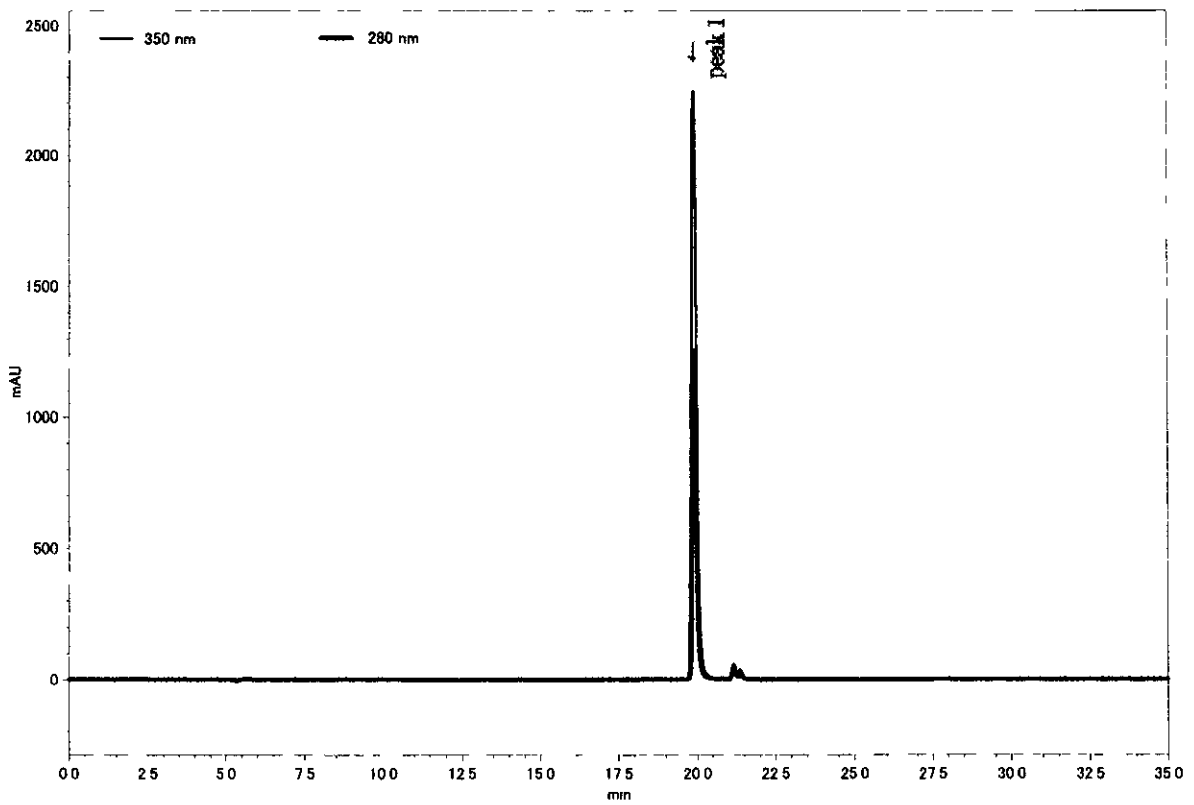


図2 既存添加物「エンシュ抽出物」製品からのメタノール抽出物のHPLCクロマトグラム
peak 1 Rutin

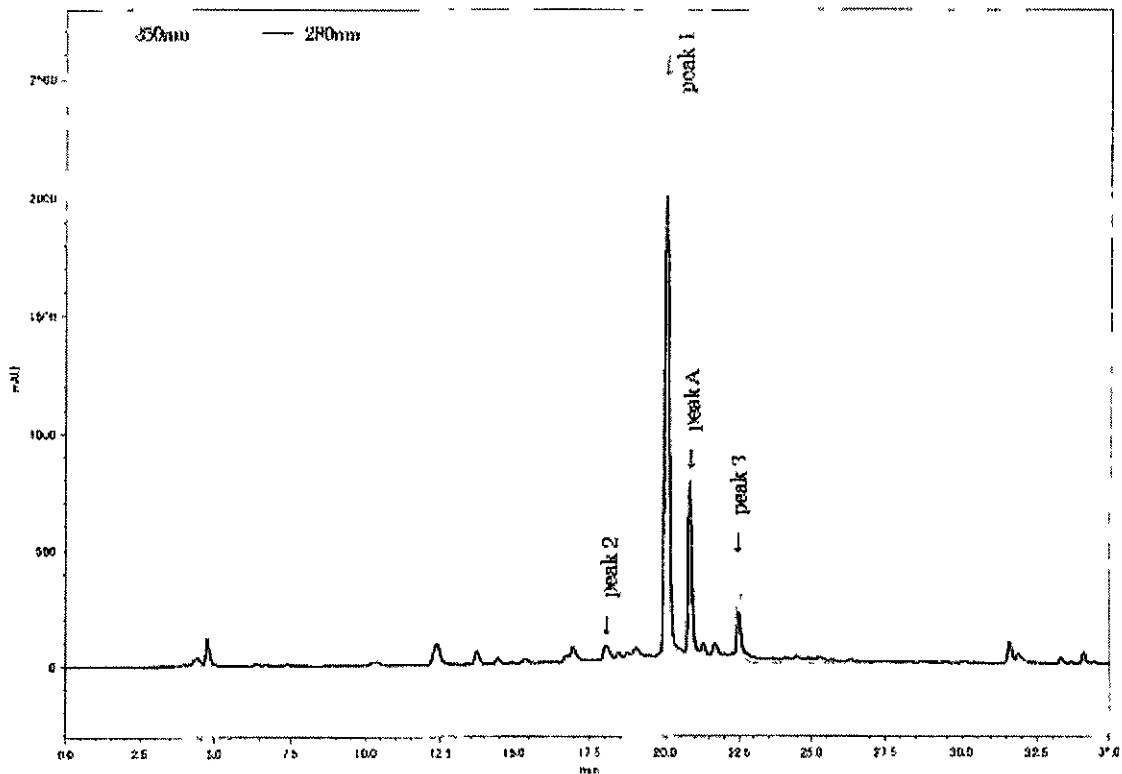


図3 そば葉乾燥粉末製品からのメタノール抽出物のHPLCクロマトグラム
peak 1 Rutin、 peak 2 Epicatechin、 peak 3 Quercitrin、 peak A 未知化合物A

表4 プランター栽培ソハ植物中のRutin含量

	Rutin 含量 (μ mol/g)	Rutin 含量 (mg/100g)
信濃1号 葉	260	1588.8
信濃1号 茎(緑)	12.9	787.9
信濃1号 茎(赤)	2.4	143.8
北陸4号 葉	54.2	3308.8
北陸4号 茎(緑)	7.5	460.0
北陸4号 茎(赤)	6.2	380.0

表5 ソハ葉乾燥粉末製品中のRutin含量

	Rutin 含量 (μ mol/g)	Rutin 含量 (mg/100g)
ソハ若葉粉末製品	22.7	1386.1

C-2 有害試薬使用の排除のための、研究

[業務委託]

詳細な報告は別添報告書に記載したので、ここでは研究結果の概要と考察を述べる。

1 検討品目と試験法の概要

本年度調査研究を行なった品目、試験法は次の通りである。

食添7に記載のカロテノイド系着色料の確認試験において、有害試薬であるクロロホルムと三塩化アンチモンが使用されている。その代替法の開発をめざして、次の研究を行った。

1) 三塩化アンチモンを使用しない代替法

三塩化アンチモンを使用しない代替法の開発については、平成13年度に報告した。今年度、新規に水溶性アナトーについて検討した。その結果、水溶性アナトーについては、5%亜硝酸ナトリウム、硫酸による脱色を確認する方法で、三塩化アンチモンを用いた試験法を代替できることが確認された。

2) クロロホルムを使用しない代替法

クロロホルムを使用しない代替法については、昨年度の研究において、色素を溶解する有機溶媒クロロホルムの代替としてテトラヒドロフランの可能性を報告した。しかし、テトラヒドロ

フランは ICH Q3C ガイトラインでクラス 2 (遺伝子障害性を示さない発がん性物質) に分類されていることから、今年度はテトラヒドロフランの代替溶媒として有機溶媒混液を検討した。品目としては、β-カロテン、デュナリエラカロテン、ニンニンカロテン、パーム油カロテンを対象にした。その結果、テトラヒドロフランをアセトン/クロヘキサン混液 (1 : 1) で代替し、①アセトンで希釈した後 5% 亜硝酸ナトリウム、次いで、硫酸を加えることにより脱色するのを確認する (β-カロテン、デュナリエラカロテン、ニンニンカロテン、パーム油カロテン) か、または②クロヘキサンの希釈したときの極大吸収部で確認する (β-カロテン) ことと代替可能と判断した。

2 第 8 版公定書への規格試験法改定案

過去 3 年間にわたり、本調査研究を実施しその結果を報告してきた。本調査研究が今年度をもって終了することから、これまでの調査結果に基づき、第 8 版公定書への規格試験法改定案を報告することとした。

規格試験法改定案を提案する品目は次のとおりである。【 】内は報告年度である。

(1) 着色料

1-1 β-カロテン、デュナリエラカロテン、ニンニンカロテン及びパーム油カロテン (確認試験 (1) 又は (2) における三塩化アンチモンの代替) 【H13】

(確認試験 (1) 及び (2) におけるクロロホルムの代替) 【H15】

1-2 水溶性アナトー 【H15】、トウカラノ色素及びマリールト色素 【H13】

(確認試験における三塩化アンチモンの代替)

1-3 カラメル I、III 及び IV

(純度試験 (4-メチルイミダゾール) におけるクロロホルムの代替) 【H14】

(2) 増粘安定剤

2-1 ダンマル樹脂

(確認試験 (2) 及び純度試験 (3) におけるクロロホルムの代替) 【H13】

(3) 酸化防止剤・ヒタミン

3-1 ヒタミン A 脂肪酸エステル

3-2 ヒタミン A 油

(確認試験 (1) におけるクロロホルム、三塩化アンチモンの代替) 【H13】

— 薄層クロマトグラフ法に変更 —

(純度試験 (2) におけるクロロホルムの代替) 【H14】

3-3 粉末ヒタミン A

(確認試験におけるクロロホルム、三塩化アンチモンの代替) 【H13】

(4) ガムヘース・光沢剤

4-1 シェラック

(純度試験 (4)、(5) におけるクロロホルムの代替) 【H13】

4-2 ポリイソブチレン

(純度試験 (5) における四塩化炭素、酢酸第二水銀の代替) 【H14】

(純度試験 (6) におけるヘンセンの代替)

【H13】

(5) 乳化剤

5-1 ノニ糖脂肪酸エステル

(純度試験 (2) におけるクロロホルムの代替) 【H14】

5-2 ソルヒタン脂肪酸エステル

(純度試験 (4) におけるクロロホルムの代替) 【H13】

5-3 プロピレングリコール脂肪酸エステル

(確認試験 (2) におけるクロロホルムの代替) 【H14】

(純度試験 (4) におけるクロロホルムの代替)

【H13】

5-4 レンチン

(水分試験におけるクロロホルムの代替)

【H14】

— 水分規格を乾燥減量規格に変更 —

(6) 強化剤

6-1 グルコン酸亜鉛

6-2 硫酸亜鉛

(純度試験 (1) におけるシアン化カリウムの代替) 【H13】

— 重金属規格を鉛規格に変更 —

(7) 調味料

7-1 塩化カリウム

(純度試験 (2) におけるクロロホルムの代替) 【H13】

(8) 製造用剤

8-1 ニリコーン樹脂

(純度試験 (1)、(2)、(4) における四塩化炭素の代替) 【H14】

8-2 モルホリン脂肪酸塩

(確認試験 (1) におけるヘンセンの代替) 【H13】

(9) 香料

9-1 1,8-シネオール

(純度試験 (6) における硝酸第二水銀の代替) 【H13】

3 今後の課題

本年度は、着色料 5 品目の有害試験 試液の代替調査研究を行った。今回は、昨年度報告の継続検討および一昨年度の研究で取り残した品目について研究を行った。3 年間全体で考えると、ほぼ当初の目標を達し得たものと考えている。

やむを得ず規格項目を変更したものもあった。

レシチンにおける水分規格の乾燥減量規格への変更、グルコン酸亜鉛・硫酸亜鉛における重金属規格の鉛規格への変更等である。

また、ヒタミンA脂肪酸エステルにおける純度試験（2）のクロロホルム不溶物のように、現在流通している製品実態に即さない規格については、当該規格の削除を提案したものもある。

個別にはいくつかの未解決事項を残した。特にクロロホルムは多数の品目に使用されており、代替法を見出せない品目もあった。今後、更に検討すべき課題も多い。例えば、グリセリン脂肪酸エステルにおける純度試験（4）のポリオキソエチレン試験で使用するクロロホルムの代替、レシチンにおける純度試験（4）の過酸化物質試験等は試験法全体の見直しが必要となる。これらの代替試験法については、今後、更に時間をかけた検討を必要とするか、現時点では、これら代替試験法の開発は極めて難しいと判断している。

D 結論

- 1 天然添加物（既存添加物）の成分規格設定を目標に、既存添加物の業界自社規格・試験法の調査と自主規格案の策定を行った。今年度は酵素やカルシウム類など 19 品目を新規検討し、第 8 版食品添加物公定書への新規収載の検討に向けて 28 品目を見直し対象とした。
- 2 食品添加物「ルチン（抽出物）」のうち「ソハ全草抽出物」（ソハ由来ルチン抽出物）の成分分析法を検討するために、ソバ植物体中のルチンを含むフラボノイドの HPLC 分析を行った。
- 3 食品添加物公定書の規格試験法から有害試薬を排除するための代替試験法の検討を行い、昨年度からの継続でカロテノイド系着色料 4 品目及び今年度追加で着色料 1 品目を検討した。

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

平成15年度厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業
「食品用香料及び天然添加物の化学的安全性確保に関する研究」

天然添加物の規格設定及び有害試薬使用の排除のための研究

— 既存添加物の規格化に関する調査研究 —

平成16年3月

日本食品添加物協会

研究報告書
既存添加物の規格化に関する調査研究

——規格策定のための含量 定量法及び
確認試験法等に関する調査研究と自主規格(案)の策定——

研究者 浅野貞男

所属 日本食品添加物協会

役職 常務理事

【研究要旨】

当協会は、これまでも既存添加物の成分規格設定を目標に、行政並びに学識経験者のご指導のもと、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。

平成14年11月には、これまで蓄積してきた189品目の自主規格を収載した「第三版既存添加物自主規格」を刊行した。しかしながら、既存添加物489品目のうち、公定規格および自主規格策定済み品目は凡そ半数に止まっており、未だ約半数の品目の規格策定が残されている。

本年度も、①新たに19品目の既存添加物について自主規格の策定検討を推進するとともに、②規格内容のレヘルアップを図るべく、②-1「第三版既存添加物自主規格」収載品目のうち17品目、及び②-2「平成14年度報告品目」のうち11品目について見直しを行なった。

②の見直し28品目のうち19品目は第8版食品添加物公定書への新規収載候補品目である。

第8版公定書への収載候補品目に関し、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部との間で既策定規格・試験法の妥当性を検討中であるが、前記19品目については自らの見直し検討を含め、国立衛研との妥当性評価の過程で提案された規格・試験法について検討したものである。

これらの作業は、これまでと同様に当協会技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、自主規格(案)を策定するとともに、その妥当性評価を行なった。

研究結果の概要と考察

1 研究方法

本研究は、当協会技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。これまでと同様に既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、適切な安全性確保が図れるよう、自主規格(案)を策定し、その妥当性を評価した。

新規規格策定に当たっては、主成分の確認、定量法の開発検討等を中心に行い、規格・試験法の設定並びにその妥当性等に関して評価・検討を行った。

一方、平成15年8月に第8版食品添加物公定書の作成検討会が発足し、「既存添加物の規格を積極的に収載すること」が作成方針の一つとされ、公定書収載候補品目の選定作業が進められている。第8版公定書への収載候補品目の規格・試験法に関しては、関係企業自らが再確認を行うとともに、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部との妥当性評価の過程で提案された規格・試験法について当該関係企業での検討を行い、その妥当性を評価、確認した。

なお、これら評価・検討を行った自主規格専門委員会のメンバーは別紙に記したとおりである。

2 研究結果の概要

2-1 検討対象品目

本年度は以下の品目について、(1)新規規格設定のための調査研究と規格案の策定、及び、(2)平成14年度報告品目を含め当協会自主規格(第三版既存添加物自主規格)として定めている規格・試験法の内容についての見直しを行なった。

必要に応じ新たな試験方法の導入を検討し、それらの妥当性についても評価・検討した。

(1) 平成15年度 新規自主規格検討品目(19品目)

本年度新規規格検討品目は次のとおりである。

用途名(検討品目数)	自主規格検討品目
甘味料 (1)	ブラジルカンゾウ抽出物
酵素 (9)	アシラーゼ、アルギン酸リアーゼ、エキソマルトテトラオヒトローラーゼ、 エステラーゼ、タンナーゼ、デキストラナーゼ、ナリンジナーゼ、 フルクトシルトランスフェラーゼ、ヘスペリジナーゼ
調味料・苦味料 (1)	ジャマイカカツシア抽出物
製造用剤 (8)	アスペルギルステレウス糖たん白質、骨焼成カルシウム、 乳清焼成カルシウム、貝殻未焼成カルシウム、 サンゴ未焼成カルシウム、卵殻未焼成カルシウム、生石灰、木酢液

上記品目のうち、ブラジルカンゾウ抽出物は昨年度からの継続検討品目であるが、今年度研究によりほぼ規格案の妥当性が確認された。木酢液に関しては純度試験において有害試薬であるジクロロメタンを使用しており、この試薬排除のための更なる研究が必要である。その他品目については、100%満足のいくものではないか、ほぼ規格案の妥当性が確認された。

(2) 既策定規格の見直し品目(28品目)

平成14年11月、当協会の自主規格として「第三版 既存添加物 自主規格」を刊行した。

本年度は「第三版既存添加物自主規格」収載品目のうち17品目及び平成14年度報告品目のうち11品目について、規格内容のレヘルアップ及び第8版公定書収載のための見直しを行った。

見直しに当たっては、国際動向への対応、有害試薬・試液の代替、類似物質間の識別及び第7版食品添加物公定書準拠を中心とした。

見直しの結果、改定の必要とされた規格項目に関しては、その妥当性を評価 検討した。

本年度見直しを行った品目及び見直しの概要は次のとおりである。

平成15年度 既策定規格の見直し品目(28品目)

用途名(品目数)	検討品目	見直しの概要
<p>甘味料 (2品目)</p>	<p>N-アセチルグルコサミン</p> <p>L-アラヒノース</p>	<p>現行定量法は本品に特異性の高い比色方法であるライシッヒ法を採用しているか、オリゴ-N-アセチルグルコサミンかHPLC法であることから、本品についてもHPLC法を検討した。</p> <p>現行純度試験の一つに「他の糖類」を規格化している。その試験にろ紙クロマトグラフ法を採用しているが、薄層クロマトグラフ法への変更可能性について検討した。</p>
<p>着色料 (11品目)</p>	<p>カカオ色素、カキ色素、クロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素</p> <p>トマト色素</p> <p>クチナシ青色素 クチナシ赤色素</p> <p>ラック色素</p>	<p>フラボノイド系着色料の確認試験において酢酸鉛が用いられている。昨年度は有害試薬排除の一環としてこれを用いない Steasny 試薬(ホルマリン含有)への代替を報告したか、その後、ホルマリンの発ガンリスクなどが報道されたことから、ホルマリンを使用しない方法を検討した。</p> <p>現行規格では色価測定法において有害試薬であるクロロホルムを使用しているため、クロロホルムの代替検討を行った。</p> <p>併せて、確認試験(3)の試料採取量の見直しを行った。</p> <p>左記2品目については成分が特定できていないため、他の着色料と識別できる適切な確認試験法について検討した。</p> <p>現行確認試験の一つにろ紙クロマトグラフ法を採用しているが、薄層クロマトグラフ法への変更可能性について検討した。</p>
<p>保存料 (2品目)</p>	<p>ブドウ種子抽出物</p> <p>ε-ポリリシン</p>	<p>現行規格は粉末品のみを対象としているか、デキストリン等を含むもの及び液体品の流通が確認されたため、性状について所要の見直しを行うとともに、液体品の乾燥減量規格の設定について検討した。</p> <p>昨年度は定量法に関し、HPLC法への変更を報告した。本品も</p>

<p>保存料 (2品目)</p>	<p>ε-ポリリシン</p>	<p>ブドウ種子抽出物と同様に、デキストリン等を含むもの及び液体品の流通が確認されたため、性状、確認試験等について所要の見直しを行った。</p>
<p>増粘安定剤 (2品目)</p>	<p>アウレオバシジウム培養液 微小繊維状セルロース</p>	<p>含量規格と定量法及び動粘度規格の追加並びにヒ素規格の改定について検討した。昨年度に引き続き、現在流通している製品品質の実態に照らして規格項目、規格値、試験法など、再度の見直しを行った。</p>
<p>酸化防止剤 (3品目)</p>	<p>イノシトール γ-オリザノール 酵素処理ヘスペリジン</p>	<p>現行確認試験において健康衛生上使用しないことが望ましいと思われる硝酸ストロンチウム及び塩基性酢酸鉛が使用されていること並びに定量法において誤差の大きい方法が採用されていること等から、医薬品添加物規格で採り入れられている赤外吸収スペクトル法による確認試験及びHPLC法による定量方法を検討した。 現行規格では含量規格が設定されていないため含量の規格化を検討した。併せて乾燥減量規格値の見直しを行った。 現行規格策定後の研究で製品成分の実態が明らかになったことから、定量法及び含量規格の見直しを行った。また、確認試験の紫外部吸収スペクトルについて極大吸収部を明記し、併せて、モノグルコシルヘスペリジンに対する保持時間及びピーク数を示すこととした。</p>
<p>ガムヘース (2品目)</p>	<p>パラフィンワックス マイクロクリスタリンワックス</p>	<p>現行確認試験では、左記2品目とも赤外吸収スペクトル法を採用しているか、原料・製法・成分が極めて近似しており、赤外吸収スペクトル測定では識別が難しいため、確認試験として熔融時(100℃)における動粘度値の規格化を検討した。パラフィンワックスについては純度試験として硫酸呈色物及びイオウ化合物の規格追加を検討した。</p>

調味料 苦味料 (1品目)	ヘタイン	現行確認試験及び定量法でHPLC法を採用しているか、その操作条件の見直しを行い、溶離液流量の変更可能性について検討した。
乳化剤 (1品目)	植物性ステロール	遊離型とエステル型の混在品について両者を確認する方法として、TLC法による方法を検討した。
製造用剤 (4品目)	5'-アデニル酸 5'-シチシル酸 粗製海水塩化マグネシウム ヘム鉄	左記2品目とも現行確認試験で中和工程を採り入れているが、中和に要する水酸化ナトリウム溶液が若干でも過量になると適切な反応が得られないため、この操作を省略する方法を検討した。また、純度試験における「類縁物質」の試験ではHPLC法を採用しているか、公定書に記載されている類縁物質の試験方法との整合性を考慮し、薄層クロマトグラフ法への変更を検討した。 現行重金属規格値では妨害イオン等の影響が排除できず、判定に誤差を生ずる懸念があるため、指定添加物「塩化マグネシウム」との整合性を考慮し、同一の規格値とした。 主成分含量が極めて低いことから主成分以外の成分がたん白質であることの確認を行った。

3 研究結果の概要

3-1 新規作成検討品目

(1) 甘味料(1品目)

昨年度からの継続検討品目としてブラシルカンゾウ抽出物について調査研究を行い、この結果を踏まえて規格案を策定し、その妥当性について評価した。

定量法に関し、昨年度は本品を直接HPLCにて分析する方法を検討したが、他の成分の妨害により含量が低めの値になるため適切な前処理を必要とする課題が残った。

今年度は主成分であるペリアントリンを誘導体化した後、HPLC法で測定する方法を検討した。標準品についてはペリアントリンの構造類縁体であるグリチルリチン酸の利用可能性を検討した。また、確認試験として薄層クロマトグラフ法によるペリアントリン及びグリチルリチン酸の確認、及びHPLC法によりペリアントリン誘導体及びグリチルリチン酸誘導体を確認する方法を検討した。

定量法、確認試験とも市場流通品で検証した結果、良好な結果が得られ、規格案の妥当性が確認された。

(2) 酵素(9品目)

本年度検討品目は、次の9品目を選定した。なお、これら品目はFCCIV及びJECFA規格には収載されていない。

アシラーゼ、アルギン酸リアーゼ、エキソマルトテトラオヒドロラーゼ、エステラーゼ、
タンナーゼ、デキストラナーゼ、ナリンジナーゼ、フルクトシルトランスフェラーゼ、
ヘスペリジナーゼ

夫々の品目について、性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法及び測定結果について調査研究を行い、この結果に基づいて規格案を策定し、その妥当性について検討した。各品目とも規格、試験方法の妥当性が検証された。

規格の記載方法は公定書に準拠したが、第三版既存添加物自主規格の「酵素一般規格」に従って定義及び酵素特性を記載し、参考としてECナンバーを記載した。純度試験及び微生物限度試験は「酵素一般規格」の規格と同一とした。確認試験は「それぞれの活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す」とこととしたが、エキソマルトテトラオヒドロラーゼはこの方法では特定できないため、液体クロマトグラフ法により反応生成物と標準物質の保持時間が一致することによって確認することとした。酵素活性測定法は、酵素の基原、性質により異なってくるため、品目によっては複数の測定法を設定した。

(3) 調味料・苦味料(1品目)

本年度はジャマイカカシヤ抽出物について新規規格設定を行ない、その妥当性について検討した。確認試験、純度試験、水分、強熱残分の調査研究結果に基づき、本品の規格案を策定し、3ロットについての繰り返し試験を行った結果、規格案の妥当性が確認された。

(4) 製造用剤(8品目)

本年度はアスペルギルステレウス糖たん白質、焼成カルシウム(骨焼成カルシウム、乳清焼成カルシウム)、未焼成カルシウム(貝殻未焼成カルシウム、サンゴ未焼成カルシウム、卵殻未焼成カルシウム)、生石灰及び木酢液の8品目について調査研究を行い、この結果を踏まえて規格案を策定し、その妥当性について市場流通品を用いて検証した。

上記8品目全ての市場流通品が問題なく試験可能であり、規格にも適合することから、規格案の妥当性が確認された。

①アスペルギルステレウス糖たん白質

主成分が糖たん白質であることを考慮し、定量法として窒素定量法中のケルダール法を採用し、含量を窒素として規定した。

②焼成カルシウム及び未焼成カルシウム

(骨焼成カルシウム、乳清焼成カルシウム、貝殻未焼成カルシウム、サンゴ未焼成カルシウム、卵殻未焼成カルシウム)

「炭酸カルシウム」及び既策定の貝殻焼成カルシウム、卵殻焼成カルシウム等の自主規格等を参考に検討した。

③生石灰

「水酸化カルシウム」の規格及び試験方法を参考に検討した。

④木酢液

JECFA規格を参考にしたが、国際的に流通しているものと我が国で流通しているものの品質の違い(製法の違い等に起因)を考慮し、含量規格についてはJECFA規格より低値に設定した。なお、純度試験のベンゾ[a]ピレンの試験において、有害試薬であるシクロロメタンを使用しており、この試薬排除のための更なる研究が必要である。

3-2 既策定規格の見直し品目

(1) 甘味料(2品目)

①N-アセチルグルコサミン

現行定量法は本品に特異性の高い比色方法であるライシッヒ法を採用しているが、本品の類似品であるオリゴ-N-アセチルグルコサミンがHPLC法であることから、本品についてもHPLC法を検討した。

現行比色定量法とHPLC法の相関性と再現性を確認したが、両者の相関性もありHPLC法の再現性も十分であった。

HPLC法は本品の定量法として適していることが確認された。

②L-アラビノース

現行純度試験の一つに「他の糖類」を規格化している。その試験にろ紙クロマトグラフ法を採用しているが、薄層クロマトグラフ法への変更可能性について検討した。

L-アラビノース、D-キシロースを検体とし、ろ紙クロマトグラフ法と薄層クロマトグラフ法を比較した。ただし、薄層板は市販品を使用した。

薄層クロマトグラフ法もろ紙クロマトグラフ法と同様にその他の糖を分離することができ、試験方法として採用することは可能と思われた。しかし、薄層板のメーカーの違いにより各糖のRf値が変化するため、Rf値を指標とする試験には注意が必要である。なお、第7版公定書では薄層板は自作することとされているが、その場合にはさらにバラツキが大きくなることが予想される。市販薄層板を利用できるよう一般試験法の改定が期待される。

一方、本品の定量法としてHPLC法を採用しており、HPLCによれば更に精度よく試験できることが確認された。

薄層クロマトグラフ法もろ紙クロマトグラフ法と同様に「他の糖類」の純度試験に利用できると思われたが、HPLCによる含量試験で十分代替できると考えられ、現行規格から「他の糖類」の試験は削除することとした。

(2) 着色料(11品目)

①フラボノイド系着色料(7品目)

フラボノイド系着色料の確認試験において酢酸鉛が用いられている。昨年度は有害試薬排除