

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が、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。

今回検討した各種試験法の中では、試料を水酸化ナトリウムに溶解し、塩酸酸性下での5%塩化亜鉛との反応による沈殿の有無を調べる方法が昨年度報告の塩酸-ホルマリン反応の代替法として利用できることを確認した。

褐色系の着色料においては主成分の特定が不十分であり、今後の課題として、原体の確認試験法及びカラメルとの違いも視野に入れた各色素の定性分析の確立が必要である。

今回検討した品目は次のとおりである。

〔 カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、  
タマリント色素 〕

#### ②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。

アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)及び*n*-ヘキサンの併用で代替可能と判断された。

また、確認試験(3)の試料採取量は0.01gを→0.1gに訂正する必要が認められた。

#### ③クチナシ青色素及びクチナシ赤色素

クチナシ青色素及びクチナシ赤色素については成分が特定できていないため、他の同系色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。

クチナシ青色素についてはスピルリナ色素、タール色素(青色1号、青色2号)と識別できる方法を検討した。

クチナシ赤色素についてはアカキャベツ色素、コチニール色素、ラック色素、ビートルレット、ヘニコウジ色素、ヘニバナ赤色素、アカネ色素及びタール色素(赤色3号、赤色104号、赤色106号)と識別できる方法を検討した。

クチナシ青色素及びクチナシ赤色素ともにアルカリ性や酸性により退色若しくは変色し難いことを利用して、他の同系色の色素と識別できることが確認された。

#### ④ラック色素

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。

市販薄層板(逆相系及びセルロース系の2種)を用いて試験したが、使用する担体のメーカーにより挙動が異なり、規格に入らない(テーリングを起こしスポットが確認できない)場合があるなどの問題があり、薄層クロマトグラフ法を確認試験に採用することは困難であると判断した。

### (3)保存料(2品目)

#### ①フトウ種子抽出物

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。

現在流通している製品品質の実態に照らして、定義に「デキストリン、果糖又はブドウ糖を含むことがある。」を追加し、性状の「灰褐色～褐色」を「淡黄褐～濃褐色」に、「粉末」を「粉末又は液体」に、「わずかに渋み」を「渋み」に変更した。乾燥減量については液体品も考慮に入れ、「8%以下(105°C 2時間)」を「液体試料の場合80 0%以下(110°C 3時間)、粉末試料の場合8 0%以下(105°C 2時間)」に変更した。

これら変更点について市販流通品で検証した結果、性状、確認試験、純度試験、含量(定量法に基づく)は何れも規格を満足しており、規格変更は可能と判断した。

#### ②ε-ポリリシン

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見の見直しを行った。

現在流通している製品品質の実態に照らして、定義に「デキストリンを含むことがある。」を追加し、性状に「淡黄色の液体」を追加した。含量については液体品も考慮に入れ、「87%以上(乾燥物換算)」を「25%以上で、その表示量の95～115%を含む」に変更した。また、試料採取量をε-ポリリシンで示すこととし、純度試験及び強熱残分の試料採取量を「ε-ポリリシンとして」に変更し、定量法の試料採取量を「乾燥物換算」から「ε-ポリリシン0.25g に対応する量」に変更した。

これら変更点について市販流通品で検証した結果、性状、確認試験、純度試験、強熱残分、含量(定量法に基づく)は何れも規格を満足しており、規格変更は可能と判断した。

#### (4)増粘安定剤(2品目)

##### ①アウレオバシシウム培養液

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。

定量法については、本品の主成分である多糖類が側鎖に負の極性を持つことから、カチオン系の界面活性剤である塩化ヘンザルコニウム(塩化アルキルベンシルシメチルアンモニウム,  $C_{22}H_{40}ClN$ )との反応性を利用して多糖類を凝集沈殿させ、全糖量を測定する方法とした。本品の主成分含量は極めて低いが、本品は培養により得られる多糖類を含む溶液そのものであり、残部は大部分が水である。

##### ②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。

確認試験については微結晶セルロース等と識別できる方法を追加した。純度試験については、重金屬規格に代えて鉛規格とした。乾燥減量の規格値を現在流通品の品質に合わせることにした。

これらの変更に関しては、3ロット×3回の繰り返し試験を行い、その妥当性が確認された。

#### (5)酸化防止剤(3品目)

##### ①イノシトール

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。

現行の確認試験(1)及び(2)を削除し、医薬品添加物規格(2003)の確認試験を採用した。定量法についても医薬品添加物規格(2003)の定量法を採用した。含量規格については両規格で値が同しており、改定は行わない。

なお、流通する医薬品添加物「イノシトール」と既存添加物「イノシトール」は同一物質であり、含量規格も同じであることから妥当性の試験は行わなかった。

## ②γ-オリザノール

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。

定量法については紫外可視吸光度測定法によることとし、3ロット×3回の繰り返し試験により試験誤差の小さいことが確認された。

## ③酵素処理ヘスペリジン

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。

定量法については、「ヘスペリジンとモノグルコシルヘスペリジン」及び「グルコアミラーゼ処理により生成する付加糖」を測定し、その合計量により含量を求める方法に改定し、当該定量法によるデータを基に含量規格を改定した。

## (6)ガムベース(2品目)

現行確認試験では、パラフィンワックス、マイクロクリスタリンワックス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両者の識別が難しいため、確認試験として溶融時(100℃)における動粘度値で識別する方法を検討した。

市販流通品で試験を行った結果、十分に識別できることが確認された。

### 【注】

公定書一般試験法の28 粘度測定法・第1法・毛細管粘度計法により、パラフィンワックス及びマイクロクリスタリンワックスの動粘度を測定する場合は、操作法に記述されている「恒温水槽」は「恒温槽」に変更する必要がてくる。

パラフィンワックスについては日本薬局方及び化粧品原料基準法で純度試験として定められている硫酸呈色物及びイオウ化合物の規格追加を検討した。

日本薬局方及び化粧品原料基準法の純度試験を参考に規格案を策定し、市販流通品で試験を行った結果、その妥当性が確認された。

#### (7)調味料 苦味料(1品目)

ヘタインの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を検討した。

現行流量の1ml/分と変更案の0.5ml/分との間には検量線の直線性及び繰り返し試験の安定性において大きな差異は認められなかったか、分析カラムの信頼性から流量を変更するか妥当であると判断した。

#### (8)乳化剤(1品目)

植物性ステロールの現行規格では遊離型のみの規格と、遊離型とエステル型が混在する規格の2つを設定している。今回、規格改定を意図するものではないが、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。

ヘキサン/酢酸エチル混液(95:5)を展開溶媒として試験を行うと、Rf値約0.05及び約0.90にスポットが認められ、遊離型とエステル型を識別できることが確認された。

#### (9)製造用剤(4品目)

##### ①5'-アデニル酸及び5'-シチシル酸

5'-アデニル酸及び5'-シチシル酸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法を採用しているが、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、規格案を策定した。

これらに関し、市販流通品で試験を行った結果、問題なく試験可能であり本規格及び試験方法の妥当性が確認された。

##### ②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」の規格値との整合性をとることとした。

含量については、本品の水分をカールフィッシャー法で測定したところ、本品には60~70%の水分が含まれることを確認した。これに加え、含量規定のマグネシウム(2.5~8.5%)から算出される塩化マグネシウム(約10~35%)を加えると、大半の成分を塩化マグネシウム及び水分で満たすことが明らかとなった。なお、水分の含量については規格化しないこととした。

##### ③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白質であることの確認を行った。

本品のたん白質を窒素定量法のケルダール法で測定したところ、本品にはおおよそ13%の窒素が含まれることを確認した。この値に6.25を乗じてたん白質の量を仮に算出すると約80~85%となる。これに加え、含量規定の鉄(1.0~2.6%)を加えると大半の成分を鉄及びたん白質で満たすことが明らかとなった。

なお、たん白質の含量については規格化しないこととした。

#### 4 自主規格委員会メンバー

別紙のとおり。

#### 5 考察

今年度は19品目の新規自主規格策定検討を行うとともに、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見直しを行った。

規格検討内容の概要は既に述べてきた通りであるが、本年度も、規格案を作成した段階で当協会顧問の山田隆先生に規格案の全面的レビューと問題点の抽出をしていただき、必要に応じて修正するという一連の作業を繰り返し行った。これにより、継続検討を要する品目は別として、本年度新規策定及び改定した規格内容は、よりの確なものになったと考えている。

しかしながら、既存添加物の多くは天然物を基原としていること、収穫時期、産地等で主成分含量が大きく変動すること、或いは主成分がよく分からないまま流通している添加物もあること、比較的小規模の企業が多く十分な研究能力を持たないメーカーが多いこと等、規格策定を進める上で、多くの課題も抱えており、必ずしも満足のものではない。

既存添加物489品目のうち未だ半数近くの品目に規格が定められていない。この中には、使用実態のないもの、ガス・金属・鉱物性物質など規格化困難な品目も含まれており、規格化を要する品目は100品目強と考えられる。

今後とも新規規格策定を継続するとともに、規格内容の一層の充実を図り、よりの確な品質確保が図れるよう努力して行く所存である。

本年度自主規格策定或いは見直し作業に関しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の山崎壮先生を始めとする諸先生方並びに当協会顧問である山田隆先生には多大なるご指導を頂いた。この場をお借りし心より感謝申し上げる次第である。

以上

## 自主規格専門委員会委員名簿

	委員氏名	企業名
技術委員長	浅野 貞 男	日本食品添加物協会
自主規格専門委員長	高橋 仁 一	武田キリン食品株式会社
自主規格専門委員	浅 田 敏	天野エンザイム株式会社
"	植 田 実木生	扶桑化学工業株式会社
"	長 田 裕 次	東和化成工業株式会社
"	唐 沢 昌 彦	味の素株式会社
"	香 田 隆 俊	三栄源エフ エフ・アイ株式会社
	後 藤 康 慶	三栄源エフ エフ・アイ株式会社
"	滝 口 俊 男	株式会社 ロッテ
"	深 尾 正	日本新薬株式会社
"	宮 野 信 雄	株式会社タイショーテクノス
"	村 上 和 也	富田製薬株式会社
"	大和谷 和彦	大日本製薬株式会社
"	夕 田 光 治	理研ビタミン株式会社
"	吉 武 繁 廣	エーザイ株式会社
技術顧問	山 田 隆	日本食品添加物協会

— 目 次 —

1 新規自主規格検討品目	
1-1 甘味料	1
・ブラジルカンゾウ抽出物	
1-2 酵素	7
・アシラーゼ	・アルキン酸リアーゼ
・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
・ヘスペリシナーゼ	
1-3 調味料・苦味料	58
・ジャマイカカッシア抽出物	
1-4 製造用剤	61
・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
2 既策定規格改定品目	
2-1 甘味料	81
・N-アセチルグルコサミン	・L-アラビノース
2-2 着色料	91
・カカオ色素	・カキ色素
・クローリー色素	・コウリヤン色素
・シアナット色素	・タマネキ色素
・タマリンド色素	・トマト色素
・クチナシ青色素	・クチナシ赤色素
・ラック色素	

2-3	保存料		214
	・ブドウ種子抽出物	・ε-ポリリシン	
2-4	増粘安定剤		222
	・アウレオバシシウム培養液	・微小繊維状セルロース	
2-5	酸化防止剤		229
	イノシトール	・γ-オリザノール	
	酵素処理ヘスペリシン		
2-6	カムヘース		250
	・パラフィンワックス	・マイクロクリスタリンワックス	
2-7	調味料・苦味料		256
	・ヘタイン		
2-8	乳化剤		262
	植物性ステロール		
2-9	製造用剤等		267
	・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	
			以上



第一部会（甘味料）既存添加物自主規格案検討結果報告書  
（新規自主規格継続検討）

「フラシルカンソウ抽出物」規格案の検討

日本食品添加物協会 第一部会  
研究者所属（株）岐阜セラツク製造所  
東和化成工業株

1 目的

既存添加物「ブラシルカンソウ抽出物」の規格案は、平成14年度の厚生労働科学研究において報告したがまた定量法については見直す必要があった。このため調査研究を継続し、この結果に基づき規格案を策定しその妥当性について確認する。本研究は（株）岐阜セラツク製造所が実施した。

2 検討内容及び方法

(1)平成14年度に提案した規格案の定量法はHPLC法によるものであったが、この方法は混在するタンパク質などの妨害を受ける場合があり、誤差が多いものであった。そこで試料を誘導体化しHPLC分析する方法を検討する。

(2)定量用標準物質の選定

定量用標準物質として設定した高純度ペリアントリンは、測定者が自ら調製するものであった。しかしこの調製には極めて煩雑な操作が必要であり、また市販試薬として入手できる見込みも無い。そこで入手が容易で定量用標準物質として使用可能な物質を検討する。

3 検討結果及び考察

(1)定量法

検討の結果、試料中のペリアントリンを誘導体化した後HPLC分析することにより含量試験が安定的に実施できることを確認した。

その方法は、フラシルカンソウ抽出物の甘味成分であるペリアンドリンが有する3個のカルボン酸残基を4-ニトロベンシル化し、UVラヘル化と低極性化させ、検出感度と分離性能を向上させたHPLC分析を行うものである。

3.9 x 150mmのカラムを用い、流速10 ml/分で分析したときのペリアントリン誘導体のピークは保持時間11~12分に2本のピークとして観察される（HPLC分析例1参照）。1本のピークは、ペリアントリンIとペリアントリンIIからなるもので、もう1本のピークはペリアントリンIIIとペリアントリンIVとからなるものである。

(2)定量用標準物質の選定

ペリアントリンの構造類縁体であるクリチルリチン酸を検討し、定量用標準品として利用可能であることを確認した。クリチルリチン酸は日本薬局方標準品として配布されており容易に入手できる。その構造はペリアントリンと極めて類似していることから誘導体化の反応も同様に進行すると考えられ、標準物質として適当である。

クリチルリチン酸を、試料と同様に処理し4-ニトロベンシル誘導体としHPLC分析すると、その保持

時間は10～11分に観察される（HPLC分析例2参照）。

(3) 確認試験方法の変更

平成14年度の報告では、確認試験は薄層クロマトグラフィーにより試料と定量用ペリアントリンを比較するものであった。しかし今回策定した規格案では定量用ペリアントリンは使用しないため、確認試験も新たに策定した。

策定した確認試験(1)は 薄層クロマトグラフィーにより ペリアントリン及ひクリチルリチン酸標準品のスポットが規定した色と Rf 値で出現することを確認するものであり、確認試験(2)は液体クロマトグラフィーにより、ペリアントリンの4-ニトロヘンシル誘導体ピークとクリチルリチン酸の4-ニトロヘンシル誘導体ピークが規定の保持時間に溶出することを確認するものである。

方法の詳細は添付の規格案に示す。

4 添付資料

- ・「ブラシルカンゾウ抽出物」規格案
- ・規格案に従い試験したロット分析結果
- ・HPLC分析例

## ブラジルカンソウ抽出物 (案)

Brazilian licorice extract

ペリアントリン

**定義** 本品は、ブラジルカンソウの根から得られた、ペリアントリンを主成分とするものをいう。

**含量** 本品を乾燥したものは、ペリアントリンとして2.0%以上を含む。

**性状** 本品は、黄～黒褐色の粉末、薄片、粒、又は塊である。

**確認試験** (1) 本品の10～100 mgを量り、20%エタノール5 mlに溶かし、試料溶液とする。別にグリチルリチン酸標準品5mgを20%エタノール5 mlに溶かし、標準溶液とする。試料溶液および標準溶液の2 μlにつき、クロロホルム/メタノール/水/酢酸混液(15 : 7 : 1 : 1)を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行うとき、試料溶液は、Rf値0.07付近および0.13付近に赤紫～青紫色のスポットを認める。また標準溶液は、Rf値0.05付近に赤紫～青紫色のスポットを認める。ただし、薄層板は、薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調整したものを105℃で2時間乾燥した後用いる。展開溶媒の先端が原線より10cmの高さに上昇したとき展開を止め、風乾した後、呈色液を噴霧し80℃以上で乾燥した後、自然光下で観察する。呈色液は、エタノール/硫酸混液(19 : 1)にハニリン1gを溶かし調整する。

(2) 本品につき定量法の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、保持時間約12分にペリアントリンⅠ誘導体およびペリアントリンⅡ誘導体に由来する1本のピークと、ペリアントリンⅢ誘導体およびペリアントリンⅣ誘導体に由来するもう1本のピークが隣接して溶出する。このとき、グリチルリチン酸標準品誘導体のピークは保持時間約11分に溶出する。

**純度試験** (1) 不溶物 本品を乾燥したものを5.0gに20%エタノール100 mlを加えて攪拌し、質量既知のろ紙を用いてろ過し、20%エタノールで洗った後、残留物を105℃で2時間乾燥するとき、その量は1.0g以下である。

(2) 液性 pH 3.5～6.5 (1.0 g, 20%エタノール100 ml)

(3) 重金属 Pbとして10 μg/g以下 (2.0 g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0 ml)

(4) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として2.0 μg/g以下 (1.0 g, 第3法, 装置B)

**乾燥減量** 8.0%以下 (1.0g, 105℃, 2時間)

**強熱残分** 2.0%以下 (2.0g)

**定量法** 本品を乾燥し、その約250 mgを精密に量り、シメチルホルムアミドに溶かし正確に50 mlとし、その10 mlを正確に取り、4-ニトロベンシルフロミトシメチルホルムアミド溶液(1→20)0.4 mlおよびトリエチルアミン0.01 mlを加え、50℃で2時間加熱し、4-ニトロベンシル誘導体とし、冷後、試料溶液とする。別に、グリチルリチン酸標準品を乾燥し、その約25mgを精密に量り、試料溶液の場合と同様に操作し、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液の1.0 μlを量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。それぞれの液のグリチルリチン酸誘導体及びペリアントリン誘導体のピーク面積を測定し、次式により含量を求める。

$$\text{ペリアントリンの含量} = \frac{TP}{SP} \times \frac{Ws}{W} \times 1.60 \times 100 (\%)$$

TP グリチルリチン酸標準品誘導体のピーク面積

SP 4種のペリアントリン誘導体のピーク面積の和

Ws グリチルリチン酸標準品の採取量

W 試料の採取量

1.60 定量係数(ペリアントリン誘導体に対するグリチルリチン酸誘導体のピーク面積比)

操作条件

検出器 紫外外部吸収検出器(測定波長 254 nm)

カラム充填剤 3~7  $\mu\text{m}$  の液体クロマトグラフィー用オクタデシル基結合シリカゲル

カラム管 内径 2~5 mm, 長さ 10~30 cm のステンレス管

カラム温度 40°C

移動層 A 水/トリフルオロ酢酸混液 (999 1)

B アセトニトリル/トリフルオロ酢酸混液 (999 1)

濃度勾配 A B (50 50) から A B (0 100) まで直線濃度勾配を 20 分間行う。

流量 クリチルリチン酸誘導体の保持時間が約 11 分になるように調整する (約 1.0 ml/分)

---

試薬 試液への追加収載

- ・トリエチルアミン ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>N 本品は、強アンモニア臭を有する液体である。

含量 99%以上

比重  $d_4^{20}$  0.724~0.730

沸点 89.4°C

- ・4-ニトロベンシルブロミド  $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Br}$  本品は、黄~黄褐色の針状結晶で、エタノール、エーテル、酢酸に溶けやすく、水に溶けにくい。

含量 97%以上

融点 99~100°C

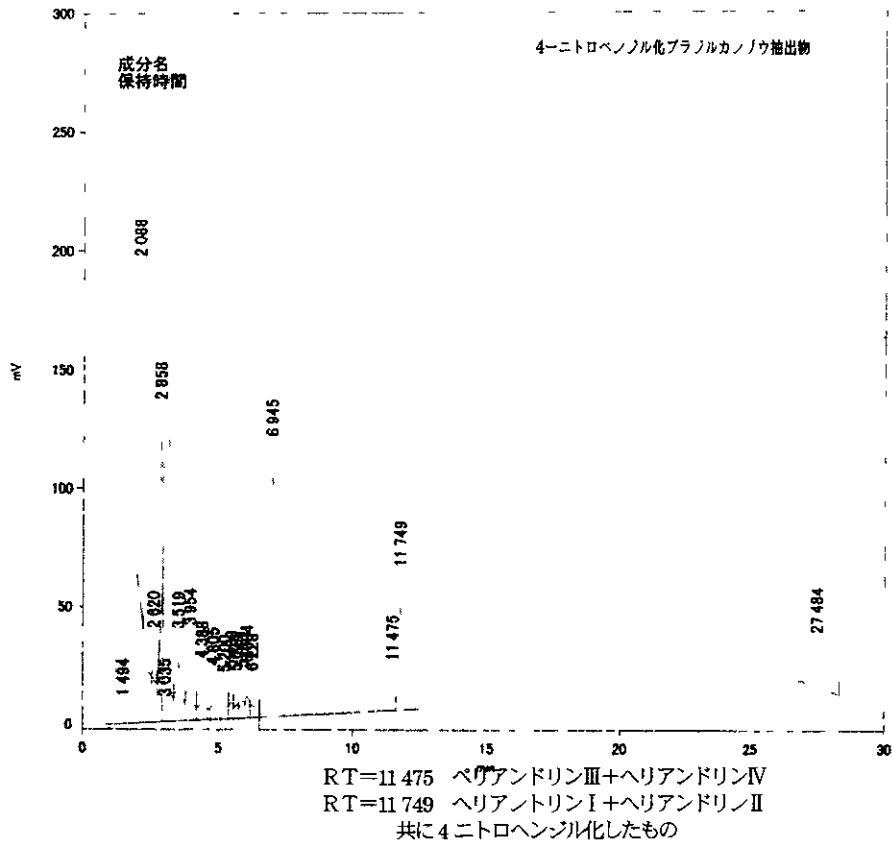
ロット分析結果

項目			ロット		
			191221	201204	211212
確認試験	(1) TLC	1	適	適	適
	(2) HPLC	1	適	適	適
純度試験	(1) 不溶分	1	0.42g	0.38g	0.33g
		2	0.46g	0.31g	0.36g
		3	0.39g	0.40g	0.42g
	(2) 液性	1	pH 4.4	pH 4.8	pH 5.1
		2	pH 4.5	pH 4.7	pH 5.1
		3	pH 4.5	pH 4.8	pH 5.0
	(3) 重金属	1	10 µg/g以下	10 µg/g以下	10 µg/g以下
		2	10 µg/g以下	10 µg/g以下	10 µg/g以下
		3	10 µg/g以下	10 µg/g以下	10 µg/g以下
	(4) ビ素	1	2 µg/g以下	2 µg/g以下	2 µg/g以下
		2	2 µg/g以下	2 µg/g以下	2 µg/g以下
		3	2 µg/g以下	2 µg/g以下	2 µg/g以下
乾燥減量	1	4.6%	4.2%	3.9%	
	2	4.4%	4.0%	3.9%	
	3	4.4%	4.2%	4.0%	
強熱残分	1	0.31%	0.53%	0.43%	
	2	0.30%	0.58%	0.39%	
	3	0.33%	0.56%	0.42%	
含量	1	4.10%	3.95%	2.82%	
	2	4.42%	3.88%	2.47%	
	3	4.79%	3.96%	2.93%	

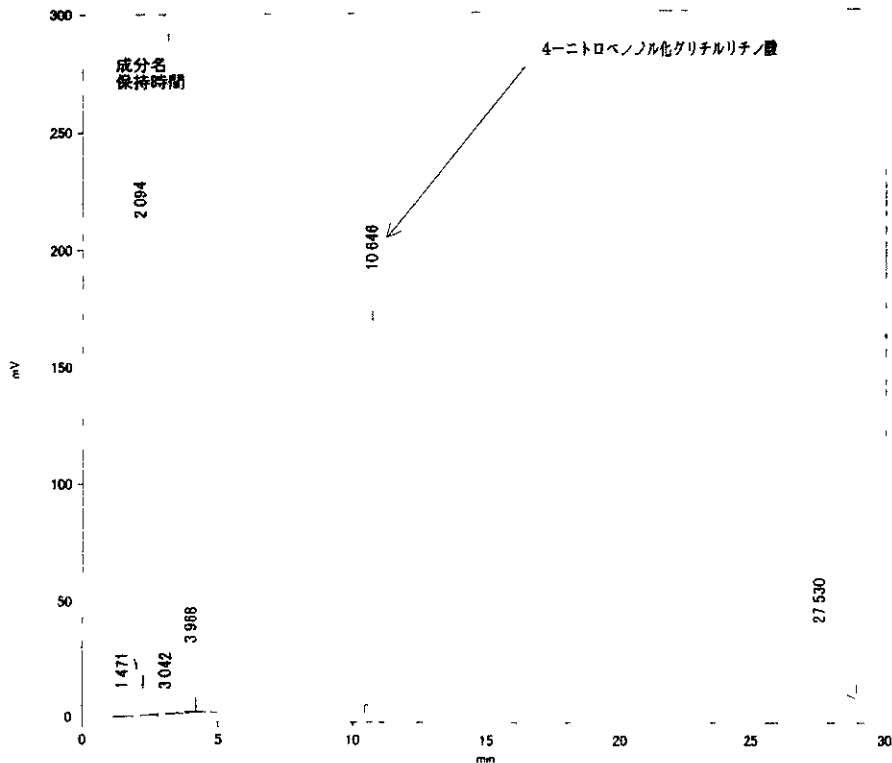
「フラシルカンゾウ抽出物」(案)の試験法による試験結果

# HPLC分析例

分析例1 ブラジルカンゾウ抽出物のクロマトグラム



分析例2 グリチルリチン酸標準品 (定量用標準物質) のクロマトグラム



## 酵素 9 品目の新規自主規格（案）作成の調査研究

研究者名	所属	中森 董	キノコーマン(株)
		全井 晴彦	合同酒精(株)
		内田 典芳	三共ライフテック(株)
		北原 昇吾	新日本化学工業(株)
		大脇 純	ナカセケムテック(株)
		和泉 昇	(株)林原
		半谷 守弘	天野エンサイム(株)
		浅田 敏	天野エンサイム(株)

日本食品添加物協会 第七部会長

日本食品添加物協会 第七部会 酵素自主規格検討会は、既存添加物酵素 9 品目について新規に自主規格設定のための研究を行ったので、その概要を報告する。

既存添加物酵素は、「既存添加物名簿」に 76 品目が記載されている。規格の設定は、第七版食品添加物公定書には 4 品目、平成 14 年発行の第三版自主規格には 17 品目及び酵素一般規格が記載されている。平成 13 年度調査研究、平成 14 年度調査研究として新規に検討された各々 9 品目、10 品目、及び今年度、平成 15 年度に新規に検討した 9 品目を含む状況は次の通りである。

第 7 版食品添加物公定書収載	パパイン、フロメライン、ペプシン、トリプシン
第 3 版自主規格収載	酵素一般規格、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、カタラーゼ、クルコアミラーゼ、クルタミナーゼ、シクロデキストリンクルカノトランスフェラーゼ、セルラーゼ、トランスクルタミナーゼ、パンクレアチン、プルラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ、リノチーム、リパーゼ、レンネノト
平成 13 年度新規検討品目	インヘルターゼ、 $\alpha$ -カラクトシターゼ、 $\beta$ -カラクトシターゼ、クルカナナーゼ、 $\beta$ -クルコシターゼ、クルコースイノメラーゼ、クルコースオキシターゼ、フィターゼ、ホスホリパーゼ
平成 14 年度新規検討品目	アスコルヒン酸オキシターゼ、ウレアーゼ、キンラーゼ、キトサナーゼ、 $\alpha$ -クルコシターゼ、酸性ホスファターゼ、5' テアミナーゼ、トランスグルコシターゼ、ペプチターゼ、ポリフェノールオキシターゼ
平成 15 年度新規検討品目	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、ナリンナーゼ、フルクトンルトランスフェラーゼ、ヘスペリンナーゼ

## 酵素 9 品目の成分規格（案）

## (1) 目的

第七版食品添加物公定書及び第三版自主規格に記載されていない既存添加物酵素 55 品目のうち、自主規格未設定の 36 品目から流通品 9 品目を選び、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、この結果に基づき規格(案)を策定し、その妥当性について研究を行った。なお、本年度に検討した酵素 9 品目は、FCCIV 及び JECFA 規格には記載されていない品目である。

## (2) 検討方法

第七部会 自王規格検討会(7社参加)は、9品目の成分規格について品目毎に作成担当会社を決めた。作成担当会社は、下記の通りである。

- |                     |              |
|---------------------|--------------|
| ① アンラーゼ             | 天野エンサイム(株)   |
| ② アルギン酸リアーゼ         | ナカセケムテノクス(株) |
| ③ エキソマルトテトラオヒトローラーゼ | (株)林原        |
| ④ エステラーゼ            | キノコーマン(株)    |
| ⑤ タンナーゼ             | 三共ライフテック(株)  |
| ⑥ テキストラナーゼ          | 三共ライフテック(株)  |
| ⑦ ナリンナーゼ            | 天野エンサイム(株)   |
| ⑧ フルクトシルトランスフェラーゼ   | 天野エンサイム(株)   |
| ⑨ ヘスペリシナーゼ          | 天野エンサイム(株)   |

## (3) 成分規格 酵素活性測定法検討結果並びに考察

検討結果は、下記の通りである。

- ① 規格の記載方法は、公定書に準拠させた。
- ② 第三版自主規格の「酵素一般規格」に従い、定義(基原 本質, 賦形剤 希釈剤等), 酵素特性を記載し、性状, 純度試験, 微生物限度の規定, 及び確認試験, 酵素活性測定法を設定した。
- ③ 定義については、「既存添加物名簿収載品目リスト」の基原 本質に準拠した。ただし、リストには糸状菌, 細菌等の「培養液より得られた」と記載されているか, 市販酵素剤には 液体培養品と固体培養品があり、「培養液より」では 固体培養品は該当しなくなるので, 自王規格では「培養物より」に統一して記載した。なお, 製法は、「基原 製法 本質」欄に記載されているが, 自王規格では省略した。
- ④ 酵素特性には, 機能 本質を記載し, 参考としてECナンバーを記載した。なお, 既存添加物名簿に記載される酵素の名称は, 特定の酵素を除き機能を表す名称であり, 一般的に酵素は基原により基質特異性が異なるため, 品目によっては 複数のECナンバーを記載した。なお, エステラーゼについては, 範囲が広く EC3 1 (Acting on Ester Bonds) とすることも考えられたが, 流通する酵素剤を考慮し, EC3 1 1 (Carboxylic Ester Hydrolases) に限定し, 酵素特性は, カルボン酸エステルを加水分解してカルボン酸とアルコールに分解すると記載した。なお, EC3 1 1 には, リパーゼ (EC3 1 1 3 Triacylglycerol Lipase) やホスホリパーゼ (EC3 1 1 32 Phospholipase A1, EC3 1 1 4 Phospholipase A2, EC3 1 1 5 Phospholipase B) も含まれる。
- ⑤ 性状は、「酵素一般規格」の規格に準じ記載した。
- ⑥ 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。
- ⑦ 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, 酵素活性を示すこととした。ただし, エキソマルトテトラオヒトローラーゼは, 酵素活性測定法で酵素活性を示す方法(還元糖の生成)では特定できないので, 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方法とした。
- ⑧ 酵素活性測定法は, 酵素の基原, 性質により特性が異なるため, 品目により複数の測定法を設定した。更に測定条件(反応pH, 緩衝液の種類, 試料希釈液等)を選択できることとし, 種々性質の異なる酵素にも対応できるようにした。
- ⑨ 酵素活性の規格値(含量規定)は, 市販酵素剤が種々の活性値に調製されているため, 定めないこととした。
- ⑩ 性状, 確認試験, 純度試験, 微生物限度, 酵素活性測定法につき, 各品目, 3ロットの繰り返し試験を行った結果, 測定値の全てが規格(案)に適合し, 妥当性が検証された。



各品目の規格案につき、確認試験、酵素活性測定法等の検討概要を次に示す。

1) アンラーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、第1法、第2法として、異なる基質を用いるか、同じ原理、操作手順による2種類の方法を設定した。

第1法はN-アセチル DL メチオニン、第2法はN-アセチル DL-トリプトファンをそれぞれ基質として用いる方法で、それぞれ生成するL メチオニン、L トリプトファンかニニヒトリンと定量的に発色する性質を利用して吸光度を測定し定量する方法である。

2) アルキノ酸リアーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素を基質であるアルキノ酸 (D マンニユロン酸と、そのC-5 異性体 L-クルロノ酸からなる鎖状の複合多糖又は D マンニユロン酸のみの鎖状重合体) に作用させた時、アルキノ酸が分解され、その分解個所の糖に二重結合が生成される。この二重結合が紫外部に吸収を持つことを利用して、酵素反応停止液の波長 235nm における吸光度の増加量を測定して定量する方法である。

3) エキソマルトテトラオヒトラーゼ

確認試験は、液体クロマトグラフ法により 反応生成物と標準物質マルトテトラオースの保持時間が一致することによって確認する方法とした。

酵素活性測定法は、酵素を基質であるテンブンに作用させ、生成した還元糖の還元力をソモギーネルソン変法により定量する方法である。

4) エステラーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素作用により基質であるクロロケノ酸のエステル結合が加水分解されたときに紫外部の吸収が変化することを利用し、波長 350nm における吸光度を測定し定量する方法である。

5) タンナーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素を基質タンニン酸に作用させ、タンニン酸のデブシト結合の分解に伴う波長 310nm における吸光度の減少を測定し定量する方法で、1960 年代後半に確立された方法である。

6) テキストラナーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素作用で生成する還元糖の定量法により2種類の測定法を設定した。第1法、第2法ともに、酵素を基質テキストランに作用させ、 $\alpha$ -1,6-グルコシト結合を分解し、生成した還元糖を第1法は Somogyi 法、第2法は Hanes 法により定量する方法である。Somogyi 法は 各種の変法があるか、第1法は グルコースとマルトースの 等モルか 殆ど同一の滴定値を示す 1945 年法を採用した。

7) ナリノナーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素を基質であるナリノニンに作用させ、生成した還元糖 (ラムノース及びグルコース) をノモギー試液と加熱し、定量的に亜酸化銅を沈殿させ、過剰の硫酸銅を硫酸酸性下でヨウ化カリウムと反応させ、生成したヨウ素をチオ硫酸ナトリウムで滴定し 定量する方法である。

8) フルクトンルトランスフェラーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素を基質とするキシロース及びノヨ糖に作用させ、糖転移反応を起こさせる。

これによって遊離したグルコースをFキント（グルコース/フルクトース）により、波長 340nm における吸光度で測定し定量する方法である。

9) ヘスペリナーゼ

確認試験は、酵素活性を確認する方法を設定した。

酵素活性測定法は、酵素を基質であるヘスペリンンに作用させ、生成した還元糖（ラムノース及びグルコース）をノモギー試液と加熱し、定量的に亜酸化銅を沈殿させ、過剰の硫酸銅を硫酸酸性下でヨウ化カリウムと反応させ、生成したヨウ素をチオ硫酸ナトリウムで滴定し 定量する方法である。

以上、新規に酵素 9 品目の成分規格（案）、酵素活性測定法（案）を策定し、酵素剤試料を用い測定、検討した結果、各品目とも規格、試験方法の妥当性が検証された。なお、各品目とも酵素の基原、性質により測定方法、測定条件が異なるため、公定書への収載の際には、単位定義も含め国際整合性を踏まえて、更なる調査研究が必要であると考ええる。

（4）規格案

別紙に示す 9 品目の成分規格（案）、各酵素活性測定法（案）のとおり。

以上

# アシラーゼ

Acylase

**定義** 本品は、糸状菌 (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus melleus*) の培養物より得られた、ラセミ体アシル-DL アミノ酸のアシル-L-アミノ酸から L-アミノ酸を生成する酵素である。乳糖、デキストリン、ブドウ糖又はショ糖を含むことがある。

**酵素特性** 本品は、ラセミ体アシル DL アミノ酸のアシル-L-アミノ酸のアミト基の C-N 結合を加水分解し脱アシル化して、L-アミノ酸を生成する。

EC ナンバー (参考) EC 3.5.1.14 (Aminoacylase)

**性状** 本品は、白～濃褐色の粉末若しくは粒状又はペースト状、又は無色～濃褐色の液状である。においはないか又は特異なにおいがある。

**確認試験** 酵素活性測定法のアシラーゼ活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す。

**純度試験** (1) 重金属 Pb として  $40 \mu\text{g/g}$  以下 (0.50g, 第2法, 比較液 鉛標準液 2.0ml)

(2) 鉛 Pb として  $50 \mu\text{g/g}$  以下 (2.0g, 第1法)

(3) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$  として  $40 \mu\text{g/g}$  以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

**微生物限度** 微生物限度試験法により試験を行うとき、本品 1g につき、細菌数は 50,000 以下である。また、大腸菌は認めない。

**酵素活性測定法** 酵素活性測定法のアシラーゼ活性測定法により試験を行う。但し、測定条件 (反応 pH, 緩衝液の種類, 試料希釈液等) は、アシラーゼの基原, 性質に応じて適切なものを選択する。

## アシラーゼ活性測定法

### 第1法

酵素を基質 N-アセチル-DL-メチオニンに作用させ、L-メチオニンを生成する。L-メチオニンはニンヒトリンと定量的に発色する。この性質を利用して吸光度を測定し定量する方法である。

#### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、生成した L-メチオニンの増加が試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、本品に適量の水（又は適切な緩衝液、塩類溶液）を加えて溶かし試料溶液とする。その濃度は通例 0.3～1.5 単位/ml である。

#### (2) 基質溶液

N アセチル-DL-メチオニン 0.956g を正確に量り、水 20ml 及び水酸化ナトリウム試液 5 ml を正確に加え溶かした後、最初 0.1mol/L 塩酸試液で、次いで 0.1mol/L 塩酸試液を適当に水で薄めた液を加えて pH8.00 に調整し、水を加えて 50ml とする。

#### (3) 操作法

0.1mol/L ハルヒタールナトリウム 塩酸緩衝液 (pH8.0) 2 ml, 0.0005mol/L 塩化コハルト試液 1 ml 及び試料溶液 1 ml をそれぞれ正確に量り、共栓付試験管に入れ振り混ぜ、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 5 分間放置した後、基質溶液 1 ml を正確に加え振り混ぜる。直ちにこの液 1 ml を正確に採り、別の共栓付試験管に入れ、直ちに沸騰水浴中で正確に 3 分間加熱した後、流水中で冷却する。(フランク液,  $A_2$ )

一方、上記フランク液を採取した後の反応液は、引き続き  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で正確に 30 分間放置した後、この液 1 ml を正確に採り、別の共栓付試験管に入れ、直ちに沸騰水浴中で正確に 3 分間加熱した後、流水中で冷却する。(A<sub>1</sub>)

冷後、ニンヒトリン溶液 2 ml 及び塩化スス (II) 溶液 0.1ml を加え振り混ぜ、沸騰水浴中で正確に 20 分間加熱した後、流水中で冷却し、冷後、1-プロパノール/水混液 (1 : 1) 10ml を加え振り混ぜる。この液につき、水を対照として波長 570nm における吸光度 (A<sub>1</sub> 及び A<sub>2</sub>) を測定する。

その酵素活性の単位は、操作法の条件で 30 分間に 1 μモルの L-メチオニンを生成するとき 1 単位とし、次式により算出される。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = (A_1 - A_2) \times 89.76 \times \frac{1}{149} \times 5 \times \frac{1}{W}$$

但し、A <sub>1</sub>	反応液の吸光度
A <sub>2</sub>	フランク液の吸光度
89.76	吸光度 1 のときの L-メチオニン量 (μg) (L-メチオニン検量線から)
1/149	L-メチオニン 1 μモルの μg
5	反応系液量 (ml)
W	試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

#### (4) 試薬 試液

##### 1) N-アセチル-DL-メチオニン

例えば和光純薬工業製 (製品番号 015-00632) 又は同等品が使用できる。

##### 2) ニンヒトリン (アミノ酸自動分析用)

例えば和光純薬工業製 (製品番号 207-02772) 又は同等品が使用できる。

##### 3) 0.1mol/L 塩酸試液

塩酸 9.0ml に水を加えて 1,000ml とする。

##### 4) 0.1mol/L ハルヒタールナトリウム試液

ハルヒタールナトリウム 20.62g を水に溶かして 1,000ml とする。

##### 5) 0.1mol/L ハルヒタールナトリウム 塩酸緩衝液 (pH8.0)