

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

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 16 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
	中澤 裕之	星薬科大学
	永津 明人	名古屋市立大学
	李 貞範	富山医科薬科大学
	尹 永淑	東京薬科大学
	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
	荒木 明宏	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 17 年 (2005) 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	9
ウルシロウの成分分析	
天然ガムベース オゾケライトの分析	
天然着色料 魚鱗箔の構成成分	
酵素分解ハトムギ抽出物の主構成成分の分析	
ばい煎ダイズ抽出物の成分分析	
天然ガムベース ホホバロウの成分分析	
天然苦味料 レイシ抽出物中の苦味成分の分析	
チャ種子サボニンの成分に関する研究	
パフィア抽出物の成分に関する研究	
ヒキオコシ抽出物の成分に関する研究	
佐藤 恭子	
2. エラグ酸の成分・品質に関する研究	83
既存添加物「アルカネット色素」の成分と基原種に関する研究	
既存添加物「ホウセンカ抽出物」の成分に関する研究	
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. ゴマ油不ケン化物の成分・品質に関する研究	113
中澤 裕之	
4. コメヌカ酵素分解物の品質に関する研究	121
精油除去ウイキョウに含有される成分に関する研究	
永津 明人	
5. 既存添加物「アマシードガム」に含まれる多糖体に関する研究	129
既存添加物スクレロガムに関する研究	
李 貞範	

6. エレミ樹脂の成分研究	139
ニガキ抽出物の苦味成分の分析	
尹 永淑	
7. 変異原性試験の総括ならびにホウセンカ抽出物等の変異原性試験	147
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	
ホウセンカ抽出物のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	
ホウセンカ抽出物のげっ歯類を用いる小核試験	
エラグ酸およびホウセンカ抽出物の細菌を用いる復帰突然変異試験	
林 真	
8. ヒスチジン等の変異原性試験に及ぼす影響に関する研究	207
エラグ酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	
エラグ酸のげっ歯類を用いる小核試験	
中嶋 圓	
9. 復帰突然変異原性試験に影響を与える諸要因の研究	281
荒木 明宏	
10. エレミ樹脂のげっ歯類を用いた小核試験による遺伝毒性の評価	299
宮澤 真紀	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	305
IV. 研究成果の刊行物・別刷	307

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
平成 16 年度総括研究報告書

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

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4品目（ヒキオコシ抽出物、ホウセンカ抽出物、エラグ酸、エレミ樹脂）につき、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、17品目（チャ種子サポニン、パフィア抽出物、魚鱗箔、酵素分解ハトムギ抽出物、レイシ抽出物、オゾケライト、ホホバロウ、ウルシロウ、ばい煎ダイズ抽出物、アルカネット色素、ユーカリ葉抽出物、ゴマ油不ケン化物、コメヌカ酵素分解物、精油除去ウイキョウ抽出物、アマシードガム、スクレロガム、ニガキ抽出物）についての成分・品質に関する研究を実施した。さらに、本研究事業では既存添加物の復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因についての検討も行った。

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
中澤裕之 星薬科大学 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
尹 永淑 東京薬科大学 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
荒木明宏 日本バイオアッセイ研究センター
変異原性試験部室長
宮澤真紀 神奈川県衛生研究所
理化学部主任研究員

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欠ける品目も残っている。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、多成分からなるものが多い。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、90 日間反復投与毒性試験あるい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毒性研究を連携して行ってきた。本年度も成分・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）を連携して行うとともに、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

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

を行った。また、既存添加物の復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因として、アルカロイド、アゾ色素、配糖体化合物等の試験での試験手法、試験菌株、代謝活性化系の選択が不適切であるための陰性結果や、検体のヒスチジン含有または混入による復帰変異コロニー数の増加等が挙げられる。

そこで、復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因のうち、試験菌株、代謝活性化系の選択の重要性を確認するために、芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性の検出に高感度である試験菌株 YG1041、YG1042 とリボフラビン添加ハムスター肝 S9 との組み合わせによるアゾ色素の高感度な変異原性検出法についての検討を行った。

また、既存添加物の細菌を用いる復帰突然変異試験に対するヒスチジンの影響について検討するため、ヒスチジン及びヒスチジンを配列構造に持つ合成ジ・トリペプチドのサルモネラ試験系への添加による復帰変異コロニー数の増加と、ヒスチジン要求性菌（バックグラウンドローン）への影響等を調べた。さらに、プロテアーゼ活性を持つ酵素を用い、透析によるヒスチジン除去の効果とプロテアーゼ活性を不活化した場合の効果等についても検討し、復帰突然変異試験の限界について考察した。

B. 研究方法

1. 試料

既存添加物は全て、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

チャ種子サポニン、パフィア抽出物、ヒキオコシ抽出物一分取薄層クロマトグラフィー（TLC）及び高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で精製し、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を行った。

魚鱗箔、酵素分解ハトムギ抽出物、レイシ抽出物－高速液体クロマトグラフ（LC/MS）あるいは HPLC により、構成成分の確認あるいは定量を行った。

オゾケライト－GC/MS により同定を行った。

ホホバロー分取 LC/MS により分画し、メタノリシス、アルコールの TMS 化を行い、GC/MS により構成脂肪酸及びアルコールを同定した。予想されたエステルを合成し、LC/MS/MS により定量を行った。

ウルシローメタノリシス後、GC/MS により構成脂肪酸を分析し、LC/MS により、トリグリセリドの同定、定量を行った。

ばい煎ダイズ抽出物－LC/MS により化合物の同定、定量を行った。

ホウセンカ抽出物－溶媒分配後、分取 HPLC 等で精製し、MS、NMR 等により同定を行った。

エラグ酸－NMR 等により同定を行い、HPLC により定量を行った。

アルカネット色素－アグリコンの立体を明らかにするため、加水分解後、分取 HPLC により shikonin/alkannin 画分を精製し、キラルカラムを用いた HPLC を行った。また、原植物の特定を目的として、DNA 分析を行った。

ユーカリ葉抽出物－溶媒抽出により得られた画分を分取 HPLC 等で分画し、MS、NMR により化学構造を明らかにした。

ゴマ油不ケン化物－アセトニトリルで抽出し、LC/MS によりゴマリグナン類の定量を行った。

コメヌカ酵素分解物－³¹P-NMR を用い、フィチン酸の定量を行った。

精油除去ウイキョウ抽出物－カラムクロマトグラフィー（CC）により精製し、MS、NMR

により同定を行った。

アマシードガムー塩化セチルピリジウムを加えて中性多糖と酸性多糖に分画し、酸性多糖はさらにゲルろ過 (GFC) により分画を行った。得られた画分について、GFC による見かけの分子量の算出、構成糖の分析、メチル化分析による構成残基の結合様式について検討した。

スクレロガムー透析により分画した後、高分子量画分について酸加水分解後、アルジトールアセテート誘導体を調製し、GC により構成糖をメチル化分析により構成糖の結合様式を検討した。

エレミ樹脂-CC 及び分取 TLC により精製し、NMR により構造解析を行った。ニガキ抽出物-CC、HPLC により単離し、MS、NMR、X 線解析等により同定を行い、主成分の定量を行った。また、GC/MS 分析を行った。

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。復帰突然変異原性試験に影響を与える諸要因の研究では、アゾ色素[アマランス (赤色 2 号) 及び陽性物質としてボンソー3R]をモデル化合物として、芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性の検出に高感度である試験菌株 YG1041、YG1042 とリボフラビン添加ハムスター肝 S9 との組み合わせによるアゾ色素の高感度な変異原性検出法について検討した。また、ヒスチジン等の変異原性試験に及ぼす影響に関する研究では、ヒスチジン及びヒスチジンを配列構造に持つ合成ジ・トリペプチドのサルモネラ試験系への添加による復

帰変異コロニー数の増加と、ヒスチジン要求性菌 (バックグラウンドローン) への影響等を調べた。また、プロテアーゼ活性を持つ酵素を用い、透析によるヒスチジン除去の効果とプロテアーゼ活性を不活化した場合の効果等についても検討し、復帰突然変異試験の限界について考察した。

C. 研究成果及び考察

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。

1. ヒキオコシ抽出物：①ヒキオコシの同属植物に特徴的な 3 種のジテルペン(rabdosianone I、maocrystal A 及び rabdosianone I の 2 つのメチル基のうちの 1 つがヒドロキシメチル基となったもの)の他、ulsolic acid、4',5'-dihydroxy-7,8-dimethoxy-flavone の存在を明らかにしたが、ヒキオコシ抽出物の主成分といわれるエンメインは確認されなかった。また、基原植物である生薬エンメイソウのメタノール溶液は、ヒキオコシ抽出物のメタノール溶液と全く同じ TLC パターンを示し、エンメインは確認されなかった。②復帰突然変異試験において陰性、染色体異常試験において一部陽性の結果が得られたが、高用量まで試験した小核試験において陰性の結果であった。従って、*in vitro*で観察された染色体異常誘発性は生体内では発現することはないものと考えられた。

2. ホウセンカ抽出物：①既存添加物名簿収載品目リスト (以下、リストと略す) の基原・製法・本質に、有効成分の記載はないが、ホウセンカの二次代謝産物として、ナフトキノン誘導体、トリテルペノイド配糖体類の存在が報告されている。成分研究の結果、既に本植物より報告されている化合物群とは若干異なる比較的単純な低分子化合物群並びに基本骨格の異なるト

リテルペノイド (vanillin, scopoletin, 4-hydroxybenzaldehyde, echinocystic acid 及び新規ナフトキノン誘導体) を同定した。既存添加物としての用途は、酸化防止剤であるが、植物体に含有される抗酸化活性を示す二次代謝物は多岐に渡る。本研究で同定された化合物の抗酸化能の解明も今後の検討課題であると考えられる。

②標準的な変異原性試験の組み合わせ (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) において、全て陰性の結果であったことから、生体内において遺伝毒性を示す可能性はないものと考えられた。

3. エラグ酸: ①エラグ酸純度は、 $99.6 \pm 2.0\%$ (乾燥時) と、非常に高いことが確認された。

②ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の一部で非常に弱い異常細胞の増加が観察されたが、他の条件下での増加はなく、さらに高用量まで試験されたげっ歯類を用いる小核試験において陰性の結果であったことから、エラグ酸における変異原性試験は問題ないものと考えられた。

4. エレミ樹脂: ①リストの主成分は β -アミリンとされているが、 ^{13}C -NMR スペクトルにより、エレミの樹脂の主成分は β -アミリンではなく α -アミリンであることが示唆された。GC/MS 分析では、 α -アミリン及び β -アミリンのピークのみが検出された (α -アミリン 78.6%、 β -アミリン 21.4%) ②げっ歯類を用いる小核試験において変異原性は認められなかった。なお、エレミ樹脂に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験とほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では陰性結果がすでに報告されており、問題となるような遺伝毒性は無いものとする。

5. チャ種子サポニン: ①既存添加物名簿 (以下、名簿と略す) の主成分はサポニンとされており、分取 TLC により、2つのフラボン含有

フラクションと、複数のサポニンが混在するフラクションを得た。フラボン配糖体は、サポニンチャ種子成分として知られる *camelliaside B* 及びさらに1つの糖の結合したものと考えられた。

6. パフィア抽出物: ①名簿において主成分はエクジステロイド及びサポニンとされており、本研究で、 β -ecdysone 及びトリテルペンサポニンが得られた。なお、既存添加物名簿収載品目リストにおいて、パフィア抽出物の学名は、*Paffia iresunoides* となっているが、文献上は、*Phaffia iresinosides* となっており、学名の修正が必要と考えられた。

7. 魚鱗箔: ①リストでは、グアニンを含むとされており、今回、魚鱗箔分の主構成成分がグアニン、ヒポキサンチン及びキサンチンであることを明らかにした。箔分中のそれぞれの含有量は、79.38%、1.64%、2.01%であった

8. 酵素分解ハトムギ抽出物: ①リストに有効成分の記載はないが、今回、1~7個のグルコースが α -(1 \rightarrow 4)結合したオリゴ糖の混合物 (glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose) であることを確認した。

9. レイシ抽出物: ①リストに有効成分の記載はないが、マンネンタケ(霊芝、レイシ)の苦味成分に関しては、現在までに合計 80 種以上が単離・同定されている。苦味成分の成分研究の結果、ganoderic acid 類を主苦味成分とするラノスタン型トリテルペノイドの複雑な混合物であることがわかった。

10. オソケライト: ①リストでは、C29~C53の炭化水素とされているが、今回の試料の主成分はC21からC39の飽和炭化水素であり、炭素数の範囲が異なっていた。なお、飽和炭化水素濃度の合計は、75.1%であった。

11. ホホバロウ：①名簿の主成分はイコセン酸イコセニル (eicosenyl eicosenoate) であり、本研究においても、ホホバロウの主構成成分は高級脂肪酸と高級アルコールのエステル (eicosenyl octadesenoate (C20:1, C18:1)、eicosenyl eicosenoate (C20:1, C20:1)、docosenyl eicosenoate (C22:1, C20:1)、eicosenyl docosenoate (C20:1, C22:1)、tetracosenyl eicosenoate (C24:1, C20:1)) であることが明らかとなった。このうち主成分を LC/MS/MS により定量したところ、docosenyl eicosenoate 37.8%、eicosenyl eicosenoate 21.4%であった。

12. ウルシロウ：①名簿の主成分は、グリセリンバルミタートとされ、本研究において、主成分は、Glyceryl-1,2,3-tripalmitate (30.7%) であり、その他に glyceryl-1,2-dipalmitate-3-oleate と glyceryl-1,3-dipalmitate-2-oleate の混合物 (21.2%)、glyceryl-1,2-dioleate-3-palmitate (2.1%)、glyceryl-1-palmitate-2-oleate-3-stearate (2.6%)、glyceryl-1,2-dipalmitate-2-stearate (5.6%)、glyceryl-1,2-distearate-3-palmitate (1.4%) であることを明らかにした。

13. ばい煎ダイズ抽出物：①名簿には、成分としてマルトールを含むと記載されているが、maltol と共にダイズイソフラボン類である daidzin、genistin、daidzein、genistein、6'-O-acetyldaizin、6'-O-acetylglucitin、6'-O-acetylgenistin 等が観察された。主なイソフラボン類の含量は daidzin 0.40%、genistin 0.48% であり、他方、maltol 含量は 0.014% であった。

14. アルカネット色素：①名簿において主色素成分はアルカニン (alkannin) とされている。本色素には、alkannin 及びその各種エス

テル体も含まれるが、本色素の本体は、shikonin 及びその各種エステル化体であることを確認した。また、原料植物が、*Anchusa officinalis* L. ではなく、別のムラサキ科植物であることを示す結果を得た。

15. ユーカリ葉抽出物：①主化合物として、没食子酸、Quercetin 3-O-β-D-glucuronide、Kaempferol 3-O-β-D-glucuronide、grandinol 類縁新規配糖体及び macrocarpal I を含むことを明らかにした。これまでの同植物中の二次代謝物の研究においては、没食子酸、エラグ酸、macrocarpal 類の存在が報告されているが、本研究に用いた「ユーカリ葉抽出物」からは、エラグ酸は単離されなかった。植物体に含有される抗酸化活性を示す二次代謝物は多岐に渡る。酸化防止剤としての食品添加物の用途を踏まえると、本研究で同定された化合物群の抗酸化能を測定し、同食品添加物中の活性本体を解明することが、今後の検討課題であると考えられた。

16. ゴマ油不ケン化物：①名簿において主成分はセサモリンとされている。ゴマリグナン類のうち、セサミン及びセサモールの定量を行ったところ、それぞれ 1.8%、0.27% であった。また、セサモリンの含有量を文献値より推定した。セサモール換算値としてのセサモリン含量は 1.1% 程度であると推定された。

17. コメヌカ酵素分解物：①主活性成分とされているフィチン酸の定量を、大量に共存するとされているペプチドを排除しフィチン酸のみを検出・定量する方法として ³¹P-NMR 測定により行った結果、11.1% と算出された。

18. 精油除去ウイキョウ抽出物：①主活性成分として既存添加物名簿記載のα体ではなく 4-O-β-D-glucoosylsynapylalcohol が 0.25% 存在すること及び adenosine が含有されることがわかった。

19. アマシードガム：①中性多糖及び分子量の異なる数種の酸性多糖が含まれていた。それらの構成糖及び結合様式を検討したところ、中性多糖はキシランタイプの多糖、酸性多糖はラムノガラクトンタイプの多糖であることが明らかになった。

20. スクレロガム：①スクレロガム中の多糖は、1,3-グルカンで約3残基当たり1残基のペンダントとして主鎖の6位にグルコースが結合している構造であることが推定された。

21. ニガキ抽出物：①名簿にクアシンを主成分とするとされている。クアシン、ネオクアシン および 2 種のアルカロイドが単離された。今回分析したニガキ抽出物製品の HPLC クロマトグラムは、ジャマイカカシヤ抽出物製品のものと同様であった。

今回、変異原性試験と成分研究を同時に実施した品目については、いずれも生体内において遺伝毒性を示す可能性はないものと考えられた。

一方、成分研究により、既存添加物名簿あるいはリストの記載については、既存添加物名簿収載品目リストの記載事項（成分、学名等）に合致しない試料も多かったため、規格化のためには、より幅広く詳細な検討が必要と考えられた。

また、既存添加物の復帰突然変異原性試験の結果に影響を与える諸要因として、試験菌株、代謝活性化系の選択の重要性を確認するため、芳香族アミノ・ニトロ化合物の変異原性の検出に高感度である YG1041、YG1042 とリボフラビン添加ハムスター肝 S9 との組み合わせによるアゾ色素の高感度な変異原性検出法を検討し、高感度な試験菌株の選択と、被験物質に対応した適切な試験手法と代謝活性化系の選択が、復帰突然変異試験において重要であることを示した。既存添加物の細菌を用いる復帰突然変異試験に対するヒスチジンの影響について検討し、

試験系がアミノ酸の要求性から非要求性を指標にしていることと、試験菌株がペプチド中のアミノ酸も利用するため、ヒスチジン（サルモネラの場合）またはトリプトファン（大腸菌の場合）を配列構造に持つ短鎖のペプチドを含有する試料、または試験実施中にアミノ酸、ペプチドを生成する試料を試験するには限界があり、この場合は、アミノ酸の影響を受けない他の試験系の選択が必要であると考えられた。

D. 結論

ヒキオコシ抽出物、ホウセンカ抽出物、エラグ酸、及びエレミ樹脂に関して標準的な変異原性試験を実施し、遺伝毒性について検討した結果、今回検討した既存添加物には問題となるような遺伝毒性は無いものと考えられた。

本研究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 21 品目の既存添加物について、成分・品質研究を行った。今回分析した試料の中には、定義に主成分の記載がない品目等もあったが、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。その一方、既存添加物名簿収載品目リストの記載事項（成分、学名等）に合致しない試料もあり、規格化のためには、より幅広く詳細な検討が必要と考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yashiro, T., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of Absinthin in Absinth Extract Bittering

Agent, Jpn. J. Food Chem., 11, 86-90
(2004).

- 2) 金 哲龍, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子,
山崎 壯, 棚元憲一, 天然着色料魚鱗箔の構
成成分, 食化誌, 投稿中(2004).
- 3) Tada, A., Z-L. Jin, Sugimoto, N., Sato, K.,
Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of
the Constituents in Jojoba Wax used as a
Food Additive by LC/MS/MS, J. Food Hyg.
Soc. Japan, submitted.
- 4) Sakai S., Maruyama T., Kawahara N.,

Goda Y., Studies on Main Pigments in
Alkanet Color, a Natural Food Color. Jpn.
J. Food Chem., 12 (1), in press.

2. 学会発表

丸山卓郎、酒井信夫、川原信夫、佐藤恭子、棚
元憲一、合田幸広：既存添加物「アルカネット
色素」の成分と基原種について。日本食品化学
学会第10回学術大会，大阪，2004。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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16年度分担研究報告書

既存添加物の成分・品質研究の総括ならびにウルシロウ等の成分・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 本研究事業において変異原性試験を実施した4品目（ヒキオコシ抽出物、ホウセンカ抽出物、エラグ酸、エレミ樹脂）及び近年、毒性試験の行われ、同じロットあるいは同じ製法で調製された試料が入手可能であった17品目の既存添加物（チャ種子サポニン、パフィア抽出物、魚鱗箔、酵素分解ハトムギ抽出物、レイシ抽出物、オゾケライト、ホホバロウ、ウルシロウ、ばい煎ダイズ抽出物、アルカネット色素、ユーカリ葉抽出物、ゴマ油不ケン化物、コメヌカ酵素分解物、精油除去ウイキョウ抽出物、アマシードガム、スクレロガム、ニガキ抽出物）について、成分・品質研究を実施した。

研究協力者

黒柳正典 広島県立大学 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

多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部主任研究官

金 哲龍 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、既存添加物名簿の定義に（ ）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。なお、定義の「主成分」は、必ずしも、最も多い成分ではなく、多くの場合、主有効成分を示している。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及びその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。

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4品目（ヒキオコシ抽出物、ホウセンカ抽出物、エラグ酸、エレミ樹脂）。この数年間に毒性試験が行われた14品目（チャ種子サポニン、パフィア抽出物、魚鱗箔、酵素分解ハトムギ抽出物、レイシ抽出物、オゾケライト、ホホバロウ、ウルシロウ、ばい煎ダイズ抽出物、ゴマ油不ケン化物、コメヌカ酵素分解物、アマシードガム、スクレロガム、ニガキ抽出物）。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3品目（アルカネット色素、ユーカリ葉抽出物、精油除去ウイキョウ抽出物）。なお、チャ種子サポニン、パフィア抽出物、ヒキオコシ抽

出物、魚鱗箔、酵素分解ハトムギ抽出物、レイシ抽出物、オゾケライト、ホホバロウ、ウルシロウ、ばい煎ダイズ抽出物に関しては、本報告書の添付資料（協力研究報告書）を、また、ゴマ油不ケン化物、エラグ酸、ホウセンカ抽出物、アルカネット色素、ユーカリ葉抽出物、コメヌカ酵素分解物、精油除去ウイキョウ抽出物、アマシードガム、スクレロガム、エレミ樹脂、ニガキ抽出物に関しては、他の分担研究者によって実施されたので、それぞれの分担研究者の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。

チャ種子サポニン、パフィア抽出物、ヒキオコシ抽出物—分取薄層クロマトグラフィー（TLC）及び高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で精製し、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を行った。魚鱗箔、酵素分解ハトムギ抽出物、レイシ抽出物—高速液体クロマトグラフ（LC/MS）あるいは HPLC により、構成成分の確認あるいは定量を行った。オゾケライト—GC/MS により同定を行った。ホホバロウ—分取 LC/MS により分画し、メタノリシス、アルコールの TMS 化を行い、GC/MS により構成脂肪酸及びアルコールを同定した。予想されたエステルを合成し、LC/MS/MS により定量を行った。ウルシロウ—メタノリシス後、GC/MS により構成脂肪酸を分析し、LC/MS により、トリグリセリドの同定、定量を行った。ばい煎ダイズ抽出物—LC/MS により化合物の同定、定量を行った。ホウセンカ抽出物—溶媒分配後、分取 HPLC 等で精製し、MS、NMR 等により同定を行った。エラグ酸—NMR 等により同定を行い、HPLC により定量を行った。アルカネット色素—アグリコンの立体を明らかにするため、加水分解後、

分取 HPLC により shikonin/alkannin 画分を精製し、キラルカラムを用いた HPLC を行った。また、原植物の特定を目的として、DNA 分析を行った。ユーカリ葉抽出物—溶媒抽出により得られた画分を分取 HPLC 等で分画し、MS、NMR により化学構造を明らかにした。ゴマ油不ケン化物—アセトニトリルで抽出し、LC/MS によりゴマリグナン類の定量を行った。コメヌカ酵素分解物— ^{31}P -NMR を使い、フィチン酸の定量を行った。精油除去ウイキョウ抽出物—カラムクロマトグラフィー（CC）により精製し、MS、NMR により同定を行った。アマシードガム—塩化セチルピリジウムを加えて中性多糖と酸性多糖に分画し、酸性多糖はさらにゲルろ過（GFC）により分画を行った。得られた画分について、GFC による見かけの分子量の算出、構成糖の分析、メチル化分析による構成残基の結合様式について検討した。スクレロガム—透析により分画した後、高分子量画分について酸加水分解後、アルジトールアセテート誘導体を調製し、GC により構成糖をメチル化分析により構成糖の結合様式を検討した。エレミ樹脂—CC 及び分取 TLC により精製し、NMR により構造解析を行った。また、GC/MS 分析を行った。ニガキ抽出物—CC、HPLC により単離し、MS、NMR、X 線解析等により同定を行い、主成分の定量を行った。

C. 研究成果および考察

1. ヒキオコシ抽出物：ヒキオコシの同属植物に特徴的な 3 種のジテルペン(rabdosianone I、maoecrystal A 及び rabdosianone I の 2 つのメチル基のうちの一つがヒドロキシメチル基となったもの)の他、ulsolic acid、4,5-dihydroxy-7,8-dimethoxyflavone の存在を明らかにしたが、ヒキオコシ抽出物の主成分といわれるエンメインは確認されなかった。また、基原植物である生薬エンメイソウのメタノール溶液は、ヒキオ

コシ抽出物のメタノール溶液と全く同じ TLC パターンを示し、エンメインは確認されなかった。

2. ホウセンカ抽出物: 既存添加物名簿収載品目リスト (以下、リストと略す) の基原・製法・本質に、有効成分の記載はないが、ホウセンカの二次代謝産物として、ナフトキノ誘導体、トリテルペノイド配糖体類の存在が報告されている。成分研究の結果、既に本植物より報告されている化合物群とは若干異なる比較的単純な低分子化合物群並びに基本骨格の異なるトリテルペノイド (vanillin, scopoletin, 4-hydroxybenzaldehyde, echinocystic acid 及び新規ナフトキノ誘導体) を同定した。既存添加物としての用途は、酸化防止剤であるが、植物体に含有される抗酸化活性を示す二次代謝物は多岐に渡る。本研究で同定された化合物の抗酸化能の解明も今後の検討課題であると考えられる

2. エラグ酸: エラグ酸純度は、 $99.6 \pm 2.0\%$ (乾燥時) と、非常に高いことが確認された。

3. エレミ樹脂: リストの主成分は β -アミリンとされているが、 ^{13}C -NMR スペクトルにより、エレミの樹脂の主成分は β -アミリンではなく α -アミリンであることが示唆された。GC/MS 分析では、 α -アミリン及び β -アミリンのピークのみが検出された (α -アミリン 78.6%、 β -アミリン 21.4%)

4. チャ種子サポニン: 既存添加物名簿 (以下、名簿と略す) の主成分はサポニンとされており、分取 TLC により、2つのフラボン含有フラクションと、複数のサポニンが混在するフラクションを得た。フラボン配糖体は、サポニンチャ種子成分として知られる camelliaside B 及びさらに1つの糖の結合したものと考えられた。

5. パフィア抽出物: 名簿において主成分はエクジステロイド及びサポニンとされており、本研究で、 β -ecdysone 及びトリテルペンサポニンが得られた。なお、既存添加物名簿収載品目リ

ストにおいて、パフィア抽出物の学名は、*Paffia iresunoides* となっているが、文献上は、*Phaffia iresinosides* となっており、学名の修正が必要と考えられた。

7. 魚鱗箔: リストでは、グアニンを含むとされており、今回、魚鱗箔分の主構成成分がグアニン、ヒポキサンチン及びキサンチンであることを明らかにした。箔分中のそれぞれの含有量は、79.38%、1.64%、2.01%であった

8. 酵素分解ハトムギ抽出物: リストに有効成分の記載はないが、今回、1~7個のグルコースが α -(1 \rightarrow 4)結合したオリゴ糖の混合物 (glucose, maltose, maltotriose, malto-tetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose) であることを確認した。

9. レイシ抽出物: リストに有効成分の記載はないが、マンネンタケ(霊芝、レイシ)の苦味成分に関しては、現在までに合計 80 種以上が単離・同定されている。苦味成分の成分研究の結果、ganoderic acid 類を主苦味成分とするラノスタン型トリテルペノイドの複雑な混合物であることがわかった。

10. オゾケライト: リストでは、C29~C53の炭化水素とされているが、今回の試料の主成分はC21 から C39 の飽和炭化水素であり、炭素数の範囲が異なっていた。なお、飽和炭化水素濃度の合計は、75.1%であった。

11. ホホバロウ: 名簿の主成分はイコセン酸イコセニル (eicosenyl eicosenoate) であり、本研究においても、ホホバロウの主構成成分は高級脂肪酸と高級アルコールのエステル (eicosenyl octadesenoate (C20:1, C18:1)、eicosenyl eicosenoate (C20:1, C20:1)、docosenyl eicosenoate (C22:1, C20:1)、eicosenyl docosenoate (C20:1, C22:1)、tetracosenyl eicosenoate (C24:1, C20:1)) であることが明らかとなった。このうち主成分を LC/MS/MS により定量したところ、docosenyl

eicosenoate 37.8%、eicosenyl eicosenoate 21.4%であった。

12. ウルシロウ：名簿の主成分は、グリセリンパルミタートとされ、本研究において、主成分は、Glyceryl-1,2,3-tripalmitate (30.7%)であり、その他に glyceryl-1,2-dipalmitate-3-oleateと glyceryl-1,3-dipalmitate-2-oleateの混合物 (21.2%)、glyceryl-1,2-dioleate-3-palmitate (2.1%)、glyceryl-1-palmitate-2-oleate-3-stearate (2.6%)、glyceryl-1,2-dipalmitate-2-stearate (5.6%)、glyceryl-1,2-distearate-3-palmitate (1.4%) であることを明らかにした。

13. ばい煎ダイズ抽出物：名簿には、成分としてマルトールを含むと記載されているが、maltol と共にダイズイソフラボン類である daidzin、genistin、daidzein、genistein、6'-*O*-acetyldaizin、6'-*O*-acetylglycitin、6'-*O*-acetylgenistin 等が観察された。主なイソフラボン類の含量は daidzin 0.40%、genistin 0.48%であり、他方、maltol 含量は 0.014%であった。

14. アルカネット色素：名簿において主色素成分はアルカニン (alkannin) とされている。本色素には、alkannin 及びその各種エステル体も含まれるが、本色素の本体は、shikonin 及びその各種エステル化体であることを確認した。また、原料植物が、*Anchusa officinalis* L. ではなく、別のムラサキ科植物であることを示す結果を得た。

15. ユーカリ葉抽出物：主化合物として、没食子酸、Quercetin 3-*O*- β -D-glucuronide、Kaempferol 3-*O*- β -D-glucuronide、grandinol 類縁新規配糖体及び macrocarpal I を含むことを明らかにした。これまでの同植物中の二次代謝物の研究においては、没食子酸、エラグ酸、macrocarpal 類の存在が報告されているが、本研究に用いた「ユーカリ葉抽出物」からは、エラグ酸は単離されなかった。植物体に含有される

抗酸化活性を示す二次代謝物は多岐に渡る。酸化防止剤としての食品添加物の用途を踏まえると、本研究で同定された化合物群の抗酸化能を測定し、同食品添加物中の活性本体を解明することが、今後の検討課題であると考えられた。

16. ゴマ油不ケン化物：名簿において主成分はセサモリンとされている。ゴマリグナン類のうち、セサミン及びセサモールの定量を行ったところ、それぞれ 1.8%、0.27%であった。また、セサモリンの含有量を文献値より推定した。セサモール換算値としてのセサモリン含量は 1.1%程度であると推定された。

17. コメヌカ酵素分解物：主活性成分とされているフィチン酸の定量を、大量に共存するとされているペプチドを排除しフィチン酸のみを検出・定量する ^{31}P -NMR 測定により行った結果、11.1%と算出された。

18. 精油除去ウイキョウ抽出物：主活性成分として既存添加物名簿記載の α 体ではなく β 体 (4-*O*- β -D-galucosylsynapylalcohol) が 0.25%存在すること及び adenosine が含有されることがわかった。

19. アマシードガム：中性多糖及び分子量の異なる数種の酸性多糖が含まれていた。その構成糖及びそれらの結合様式を検討したところ、中性多糖はキシランタイプ多糖、酸性多糖はラムノガラクトンタイプ多糖であることが明らかになった。

20. スクレロガム：スクレロガム中の多糖は、1,3-グルカンで約 3 残基当たり 1 残基のペンダントとして主鎖の 6 位にグルコースが結合している構造であることが推定された。

21. ニガキ抽出物：名簿にクアシンを主成分とするとされている。クアシン、ネオクアシン および 2 種のアルカロイドが単離された。今回分析したニガキ抽出物製品の HPLC クロマトグラムは、ジャマイカカシヤ抽出物製品のものと同様であった。

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 21 品目の既存添加物について、成分・品質研究を行った。今回分析した試料の中には、定義に主成分の記載がない品目等もあったが、その基原に特徴的な成分を同定する等、多くの知見を得ることができた。その一方、既存添加物名簿収載品目リストの記載事項（成分、学名等）に合致しない試料も多かったため、規格化のためには、より幅広く詳細な検討が必要と考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yashiro, T., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of Absinthin in Absinth Extract Bittering Agent, *Jpn. J. Food Chem.*, 11, 86-90 (2004).
- 2) 金 哲龍, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子,

山崎 壮, 棚元憲一, 天然着色料魚鱗箔の構成成分, 食化誌, 投稿中(2004).

- 3) Tada, A., Z-L. Jin, Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of the Constituents in Jojoba Wax used as a Food Additive by LC/MS/MS, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, submitted.
- 4) Sakai S., Maruyama T., Kawahara N., Goda Y., Studies on Main Pigments in Alkanet Color, a Natural Food Color. *Jpn. J. Food Chem.*, 12 (1), in press.

2. 学会発表

丸山卓郎、酒井信夫、川原信夫、佐藤恭子、棚元憲一、合田幸広：既存添加物「アルカネット色素」の成分と基原種について。日本食品化学学会第10回学術大会，大阪，2004。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)
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 16 年度協力研究報告書

ウルシロウの成分分析

研究協力者 金 哲龍 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第2室

研究要旨

食品添加物としてのウルシロウの品質を明らかにするため、GC/MS 及び LC/MS を用いて分析した。その結果、ウルシロウの構成脂肪酸は主に、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸であることがわかった。また、ウルシロウの主成分は、Glyceryl-1,2,3-tripalmitate (30.7 %) であり、その他に、glyceryl-1,2-dipalmitate-3-oleate と glyceryl-1,3-dipalmitate-2-oleate の混合物 (21.2 %), glyceryl-1,2-dioleate-3-palmitate (2.1 %), glyceryl-1-palmitate-2-oleate-3-stearate (2.6 %), glyceryl-1,2-dipalmitate-2-stearate (5.6 %), glyceryl-1,2-distearate-3-palmitate (1.4 %) であることを明らかにした。

A. 研究目的

天然食品添加物として用いられるウルシロウは、既存添加物名簿¹⁾に収載され、「ウルシの果実から得られた、グリセリンパルミタートを主成分とするものをいう。」と定義されている。また、その基原・製法・本質として、「ウルシ科ウルシ (*Rhus verniciflua* LINNE) の果実より、融解、さらして得られたものである。主成分はグリセリンパルミタートである。」と記載されている²⁾。しかし、食品添加物としてのウルシロウの成分組成についての報告はなく、公的な成分規格もない。そこで、我々はウルシロウ中のトリグリセリド(Fig.1)の組成を明らかにするために GC/MS による構成脂肪酸の分析および LC/MS による定量法について検討した。

B. 研究方法

1) 試料

ウルシロウ (urushi wax) は(財)日本食品添加物協会を通じて入手したものをを用いた。Glyceryl-1,2,3-tripalmitate (PPP) は DOOSAN SERDARY RESEARCH LABORATORIES 社製, glyceryl-1,2-dipalmitate-3-oleate (PPO), glyceryl-1,3-dipalmitate-2-oleate (POP), glyceryl-1,2-dipalmitate-2-

stearate (PPS), glyceryl-1,2-distearate-3-palmitate (PSS), glyceryl-1,2-dioleate-3-palmitate (POO), glyceryl-1-palmitate-2-oleate-3-stearate (POS) は LARODAN FINE CHEMICALS AB 社製, パルミチン酸メチルエステル, ステアリン酸メチルエステル, オレイン酸メチルエステル, 5% 塩化水素メタノール溶液は和光純薬工業(株), その他の溶媒はすべて市販特級品あるいは HPLC 用を使用した。

2) 装置

ガスクロマトグラフ/質量分析計: 島津製作所製 GC/MS system (GCMS-QP5050)

高速液体クロマトグラフ/質量分析計: Waters 社製 LC/MS system (LC: Alliance 2695; PDA: 2996 photodiode array detector; MS: Quatro micro API)

3) 構成脂肪酸の GC/MS 分析

ウルシロウ 6.75 mg を精密に量りとり, 5% 塩化水素メタノール溶液 1.0 mL, ベンゼン 3 滴をスクリー栓付き試験管内で混合し, 沸騰水溶液中で 3 時間反応させた。冷却後, ヘキサン (3 mL×2 回) で抽出し, 濃縮した。1.5 mL のヘキサンに再溶解し, 10 倍希釈したものを GC/MS 分析試料とした。各脂肪酸メチルエステル標品 (パルミチン酸メチルエステル, ステアリン酸メチ

ルエステル, オレイン酸メチルエステル) の 1 mg/mL ヘキサン溶液を調製した。これを希釈し, 標準溶液 (250, 125, 62.5, 31.2 ng/ μ L) を調製した。GC/MS 測定条件: カラム, DB-1 (0.25 mm \times 30m, 膜厚, 0.25 μ m, J&W Scientific); カラム入口圧, 100 kPa; カラム流量, 1.0 mL/min; 注入口温度, 300 $^{\circ}$ C; カラム温度, 180 $^{\circ}$ C \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C (8 min); イオン源温度, 250 $^{\circ}$ C; イオン化電圧, 70 eV; 注入量, 1.0 μ L; 試料注入方式, スプリット (4:1); 測定モード, EI スキャン法 (m/z 50~800)

4) トリグリセリドの LC/MS 分析

ウルシロウをヘキサンに溶解し, 濃度 5 μ g/mL に調製したものを分析試料とし, 下記の条件の LC/MS に付した。LC/MS 条件⁴⁾: LC 条件: カラム, SHISEIDO CAPCELL PAK C18 (4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μ m); 流速, 0.4 mL/min; カラム温度, 40 $^{\circ}$ C; 移動相, アセトニトリル:ヘキサン:2-プロパノール=60:0:40 (0 min) \rightarrow 40:20:40 (50 min) \rightarrow 40:20:40 (60 min); PDA, 192-600 nm; 検出波長, 220 nm。MS 条件: ソース温度, 130 $^{\circ}$ C; 脱溶媒温度, 400 $^{\circ}$ C; 脱溶媒ガス流量, 300 L/hr; コーンガス, 50 L/hr; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 60 V (APCI pos.); スキャン範囲, m/z 100-1000; SIR (Selected Ion Recording) [M+Na]⁺。MS/MS 条件: コーン電圧, 25 V (APCI pos.); コリジョンガス, アルゴン; コリジョン電圧, 40 V

5) トリグリセリドの定量

PPP (1 ng/ μ L), PPO (1 ng/ μ L), POO (0.1 ng/ μ L), POS (0.1 ng/ μ L), PPS (0.2 ng/ μ L) および PSS (0.1 ng/ μ L) を含む標準混合溶液を, ヘキサンを用いて調製し, 4, 8, 12, 16, 20 μ L を LC/MS に注入した。検出には選択イオン検出 (Selected Ion Recording: SIR) 法を採用した。モニターイオン m/z 829.6 [M_{PPP}+Na]⁺; m/z 855.6 [M_{PPO}+Na]⁺; m/z 881.6 [M_{POO}+Na]⁺; m/z 883.6 [M_{POS}+Na]⁺; m/z 857.6 [M_{PPS}+Na]⁺; m/z 885.6 [M_{PSS}+Na]⁺ より得られたクロマトグラムピーク面積を求め, 絶対検量線を作成した。

6) 異性体比の推定

MS/MS によるプロダクトイオンの [PP]⁺, [PO]⁺, [PS]⁺, [OO]⁺, [SS]⁺, [OS]⁺ を用いて MRM (Multiple Reaction Monitoring) 測定を行い, 各ピークの面積比を求め, 標品と比較することにより, 異性体の存在及び割合を推定した。

$$\text{計算式: } AX+BY=C(X+Y)$$

* A, B: 異性体の標品マスプロダクトイオン面積比; C: ウルシロウ中のトリグリセリドのマスプロダクトイオン面積比; X, Y: 含有割合

C. 結果及び考察

1) ウルシロウの脂肪酸組成及び相対含量

ウルシロウをメタノリシスし, 得られた脂肪酸メチルエステルおよび標品を GC/MS で分析した。トータルイオン (TIC) クロマトグラムを Fig. 2 に示す。主に保持時間 4.6 分 (ピーク①), 5.9 分 (ピーク②), 6.1 分 (ピーク③) の3つのピークが観察された。ピーク①は M⁺ (m/z 270), ピーク②は M⁺ (m/z 296), ピーク③は M⁺ (m/z 298) を与え, マスフラグメントを NIST ライブラリー検索したところ, パルミチン酸メチルエステル, オレイン酸メチルエステル及びステアリン酸メチルエステルであると推定された。そこでこれら脂肪酸メチルエステル標品と比較したところ, ピーク①, ②, ③は, 保持時間およびマススペクトルがパルミチン酸メチルエステル, オレイン酸メチルエステル及びステアリン酸メチルエステルと完全に一致した。他に, 保持時間 7.6 分 (m/z 326), 保持時間 10.1 分 (m/z 272), 保持時間 11.9 分 (m/z 398) に小さなピークが観察された。これらは, NIST ライブラリー検索を行った結果, C₂₁H₄₂O₂, C₁₅H₂₈O₄, C₂₄H₄₆O₄ と推定されるものであったが, これらの含量は非常に少なかった。クロマトグラム上に観察された総ピーク面積を 1 として各成分の相対的な割合を示すと, ①, ②, ③は, それぞれ 73.2 %, 16.9 %, 9.3 % であり, パルミチン酸の占める割合が非常に高かった。したがって, 今回入手したウルシロウは, パルミチン酸を主とするが, 他の脂肪酸とのグリセリンエステルを含むと考えられる⁵⁾。

2) ウルシロウの成分構成および定量

GC/MS による脂肪酸分析の結果から, パルミチン酸を主とするが, 他の脂肪酸とのグリセリンエ

ステルを含むと予想されたことから、脂肪酸グリセリンエステルの種類を明らかとするために、ウルシロウを LC/MS で分析した。TIC クロマトグラムを Fig. 3 に示す。保持時間 44.55 分 (P-1), 45.48 分 (P-2), 46.43 分 (P-3), 49.27 分 (P-4), 50.22 分 (P-5), 53.87 分 (P-6) の 6 つのピークが観察された。各ピークの APCI-MS(pos) におけるマススペクトルを Fig. 4 に示す。P-3 は m/z 829.6[M+Na]⁺ を与え、ウルシロウの主成分とされる PPP であると推定された。P-(1, 2, 4, 5, 6) もそれぞれ m/z 881.6 [M+Na]⁺, m/z 855.6[M+Na]⁺, m/z 883.6[M+Na]⁺, m/z 857.6[M+Na]⁺, m/z 885.6 [M+Na]⁺ を与えた。GC/MS による分析の結果から、トリグリセリドの構成脂肪酸種類は主として P, O, S と限られていることから、それぞれのピークは Table. 1 のように推定される。分子量関連イオンを与えると考えられるトリグリセリドと比較したところ、P-(1~6) は、保持時間およびマススペクトルがそれぞれ標品 POO, PPO, PPP, POS, PPS, PSS と一致した。しかし、PPO と POP は分離せず、混合物である可能性が考えられた。P.Laakso らは、トリグリセリド分子のマススペクトルのフラグメントパターンには特異性があると指摘している^{6,7)}。そこで標品 PPO, POP を MS/MS で分析した結果 (Fig 5.), 正イオンモードにおいてフラグメントイオン [M-RCOO]⁺ の相対比に注目すると PPO と POP では明らかにパターンが異なっていた。PPO では [PP]/[PO] が 0.82 であるのに対して、POP では 0.41 であった。ウルシロウの P-2 では [PP]/[PO]=0.78 となっていることから、P-2 は PPO と POP の混合物であり、PPO が主成分 (計算値:90.2 %) として含まれることが予想される。実際、標品 PPO/POP=9.1/0.9 の混合物を分析した結果、ウルシロウの P-2 と類似したマススペクトルを与えた。同方法で他の P-(1, 4, 5, 6) も分析した結果、フラグメントイオンの相対比 (Table. 3) が標品 POO, POS, PPS, PSS (Table. 2) と一致しないことから、それぞれ対応する異性体及び異性体の混合物であることが予想される。しかしながら、今回の LC/MS 条

件で、異性体である PPO と POP は同じ保持時間と分子イオン強度を示すことから、異性体の混合物でも、1 つの標品で定量可能と考えられた。

そこで標品を用い、選択イオン検出 (Selected Ion Recording: SIR) 法で絶対検量線 (PPP:y=8540x+2868, $r^2=0.996$; PPO:y=9563x-2454, $r^2=0.991$; POO:y=8237x+2576, $r^2=0.956$; POS:y=19075x+1428, $r^2=0.997$; PPS:y=16723x+13394, $r^2=0.992$; PSS:y=8795x+1006, $r^2=0.995$) を作成し、定量を行った。今回使用したウルシロウを 100 % として求めた相対含量は、PPP が 30.7±5.0 %, PPO が 21.2±2.4 %, POO が 2.1±0.6 %, POS が 2.6±0.3 %, PPS が 5.6±0.9 %, PSS が 1.4±0.3 % (mean±SD, n=4) であり、PPP と PPO が主成分であることが分かった。

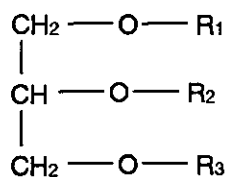
今回分析したウルシロウについて、既存添加物名簿記載品目リスト³⁾ のとおり、グリセリンパルミタートが主成分として確認されたと同時に、他にもオレイン酸、ステアリン酸を含むトリグリセリドが含まれていることが分かった。

D. 結論

我々は、既存添加物の規格及び品質評価法設定のための基礎的知見を得るため、ウルシロウの分析及び構成成分の定量を行った。ウルシロウの構成成分であるトリグリセリドの分析には、LC/MS が有効であった。また LC/MS/MS 分析により、トリグリセリドの構造異性体の存在比を推定することが可能と考えられた。ウルシロウのトリグリセリドについて、選択イオン検出 (Selected Ion Monitoring, SIM) 法によって作成した絶対検量線により、定量した結果、主成分として PPP が 30.7±5.0 %, PPO と POP 混合物が 21.2±2.4 % 含まれていた。他にもオレイン酸、ステアリン酸を含むトリグリセリドが数多く含まれていることを明らかにした。本研究結果は、ウルシロウの品質評価及び規格設定のための基礎となると考えられる。

E. 参考文献

1. 厚生省告示第 210 号“既存添加物名簿”
平成 8 年 4 月 16 日(1996).
2. 厚生省生活衛生局長通知“別添1既存添加物名簿収載品目リスト”(平成 8 年 5 月 23 日).
衛化第 56 号(1996).
3. 既存添加物名簿収載品目リスト注解書,
日本食品添加物協会, 1999.
4. Kusaka, T. Composition analysis of
normal plant triacylglycerols and
hydroperoxidized *rac*-1-stearoyl-2-oleoyl
-3-linoleoyl-*sn*-glycerols by liquid
chromatography-atmospheric pressure
chemical ionization mass spectrometry ,
Journal of Chromatography A, 730
(1996) 1-7
5. 橘 燦郎, 桜木 学 (1989) : ウルシロウの
天日さらしについて. 木材学会誌, 35,
356-361.
6. P. Laakso, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74,
1291 (1997).
7. W. E. Neff, W. C. Bydwell, *J.*
Chromatogr., A818, 169 (1998).



Palmitic acid(P), Oleic acid(O), Stearic acid(S)
 PPP(C₅₁H₉₈O₆ MW:807.3): R₁=R₂=R₃= P
 PPO(C₅₃H₁₀₀O₆ MW:833.3): R₁=R₂= P, R₃=O
 POP(C₅₃H₁₀₀O₆ MW:833.3): R₁=R₃= P, R₂=O
 POO(C₅₅H₁₀₂O₆ MW:859.3): R₁= P, R₂=R₃=O
 PPS(C₅₃H₁₀₂O₆ MW:835.3): R₁=R₂= P, R₃=S
 PSS(C₅₅H₁₀₆O₆ MW:863.4): R₁= P, R₂=R₃= S
 POS(C₅₅H₁₀₄O₆ MW:861.4): R₁= P, R₂=O, R₃= S

Fig 1. Structures of Triglycerids.

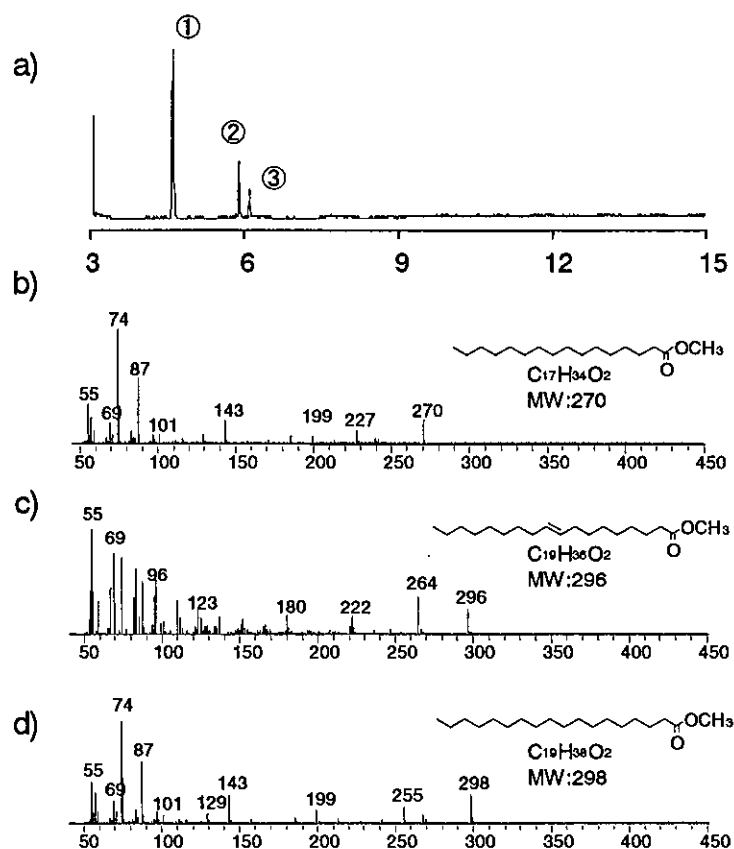


Fig 2. GC/MS analysis of a reaction mixture of furushi wax methanolysis. (A) Gas chromatograms (B) mass spectra