

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

分冊 その 1

主任研究者	山崎 壮	国立医薬品食品衛生研究所
分担研究者	多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所
	黒柳 正典	県立広島大学
	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所
	永津 明人	金城学院大学
	尹 永淑	東京薬科大学
	李 貞範	富山大学
	秋山 卓美	国立医薬品食品衛生研究所

平成 18 年 (2006 年) 4 月

目次

分冊 その1

I. 総括研究報告書

- 既存添加物の成分と品質評価に関する研究…………… 1
主任研究者：山崎 壮

II. 分担研究報告書

1. 苦味料等の品質評価法に関する研究

- 1.1. 天然由来苦味料の評価法に関する研究…………… 7
分担研究者：多田 敦子
協力研究者：(株) インテリジェントセンサーテクノロジー

2. 苦味料等の成分・品質に関する研究

- 2.1. ヒキオコシ抽出物およびその基原植物の成分に関する研究…………… 19
分担研究者：黒柳 正典
- 2.2. ヒキオコシ抽出物の成分と基原種に関する研究…………… 27
協力研究者：合田 幸広
- 2.3. レイシ（霊芝）苦味トリテルペン類の単離と同定…………… 33
協力研究者：服部 征雄

3. 酸化防止剤等の品質評価法に関する研究

- 3.1. 天然添加物の抗酸化活性評価法に関する研究…………… 39
分担研究者：杉本直樹
- 3.2. 単一化合物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究…………… 43
協力研究者：受田 浩之
松本 清

4. 酸化防止剤等の成分・品質に関する研究

- 4.1. ブドウ種子抽出物の分析法に関する研究…………… 49
分担研究者：永津 明人
- 4.2. ソバ葉の成分分析…………… 55
分担研究者：尹 永淑
- 4.3. 既存添加物「ユーカリ葉抽出物」の成分に関する研究…………… 59
協力研究者：大槻 崇

5.	増粘多糖類等の成分と品質評価法に関する研究	
5.1.	フクロノリ抽出物の成分に関する研究	71
5.2.	精製カラギナンの成分に関する研究	77
	分担研究者：李 貞範	
6.	ガムベース等の成分・品質に関する研究	
6.1.	テルペノイド系ガムベースの分析	81
	分担研究者：秋山 卓美	
6.2.	天然由来エステル系ガムベースの分析	91
	分担研究者：多田 敦子	
7.	既存添加物の品質規格策定に関する研究	
7.1.	既存添加物の品質規格策定に関する研究（総括）	103
	分担研究者：山崎 壮	
7.2.	既存添加物「ホウセンカ抽出物」の成分に関する研究	111
	協力研究者：合田 幸広	
7.3.	既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究	別冊
	協力研究者：日本食品添加物協会	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	123
IV.	研究成果の刊行物・別刷	125

分冊 その2 (別冊)

平成17年度 既存添加物の成分規格の設定に係る試験・研究及び調査

—既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

日本食品添加物協会

1. 新規自主規格検討品目	
1-1. 酵素	1
・アクチニジン	
・ α -アセトラクタートデカルボキシラーゼ	
・アントシアナーゼ	
・イヌリナーゼ	
・ α -グルコシルトランフェラーゼ	
・ホスホジエステラーゼ	
・ラクトパーオキシダーゼ	
・リポキシゲナーゼ	
1-2. 製造用剤	116
・高級脂肪酸(ステアリン酸)	
2. 既策定規格改定品目	
2.1 着色料	119
・アナトー色素	

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

平成 17 年度 総括研究報告書

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

主任研究者 山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部第二室長

研究要旨

既存添加物（天然添加物）の多くで公的品質規格が未整備なままであるのが現状である。本研究では、特に成分研究が遅れている酸化防止剤、苦味料、増粘多糖類、ガムベースに重点を置き、添加物の有効性（活性）を測定する手法を積極的に利用することによって含有成分を解析し、品質評価の指標となる成分を明らかにする。また、既存添加物製品の品質や機能特性を簡便に評価する方法を開発する。

(1) 苦味料は、味覚センサーによる苦味の質の解析、定量性などの基礎的分析方法を、各種モデル化合物（市販の研究用試薬）及び苦味料添加物を用いて検討した。味覚センサーで苦味が検知可能な化合物群と検知できない化合物群があった。検知できなかった化合物も、溶解性を高めることで検知できる場合がある可能性が示唆された。レイシ抽出物中の苦味成分の単離及びヒキオコシ抽出物の基原植物種の含有成分と DNA 分析を行った。(2) 酸化防止剤は、主要な天然抗酸化化合物を対象にして複数の抗酸化活性測定系における添加物の濃度と活性の関係を調べた。測定系間で活性の高低の傾向はほぼ一致していたので、酸化防止剤評価方法として適していると考えられた。一方、各種食品添加物 22 品目の抗酸化活性を測定すると、抗酸化活性をいずれの方法でも簡便に測定することができたが、測定方法によって活性強度の傾向が異なる品目が一部あることがわかった。ブドウ種子抽出物の HPLC 分析条件の検討、ユーカリ葉抽出物とソバ葉（ルチンの基原植物の一つ）の成分解析を行った。(3) 増粘多糖類は、硫酸化多糖類に分類されるフクロノリ抽出物と精製カラギナンの分子量分布と構成糖の組成比を解析し、特徴を明らかにした。(4) ガムベースは、テルペノイド系ガムベースとエステル系ガムベースに大別し、各品目の含有成分を解析して各品目ごとの特徴を明らかにした。TLC、GC/MS、LC/MS 分析が各品目の確認方法として利用できることが示された。(5) ホウセンカ抽出物の含有成分の解析を行った。既存添加物である酵素 8 品目と製造用剤 1 品目の業界自主規格を新規作成し、着色料 1 品目の業界自主規格を見直し・改訂した。

分担研究者	
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
黒柳 正典	県立広島大学生命環境学部 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
永津 明人	金城学院大学薬学部 教授
尹 永淑	東京薬科大学生命科学部 助手
李 貞範	富山大学薬学部 助手
秋山 卓美	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、使用を認めている天然添加物である。これまでに厚生労働省は既存添加物の品質規格策定に向けて積極的に取り組んできたが、依然として既存添加物の多くで公的品質規格が未整備なままであるのが現状である。天然物からの抽出物で多成分からなる既存添加物品目の多くは、規格の対象とする有効成分や不純物等が未解明まま残されており、規格整備を困難にしている。これまでに成分研究が進んだ品目は、成分組成が比較的単純であり、主な有効成分が既知であるものが多く、含有成分の網羅的単離、構造決定による研究手法によって多くの成果を挙げた。しかし、残された品目、特に、酸化防止剤、苦味料、増粘多糖類（増粘安定剤）、ガムベースの中には、有効成分が多くの類似化合物の混合物であると考えられている品目が少なくない。また、有効成分自体が明確でない品目もある。こうした品目については、個々の化合物の化学構造を同定、定量することは膨大な時間と労力を必要とする。これまでのような含有成分の網羅的構造決定は現実的には困難である。そのため、これらの品目の品質規格策定のためには、既存添加物の新たな品質評価手

法を開発し、それらを利用することによって既存添加物の有効成分や不純物を解明していく研究が不可欠である。

そこで、本研究では、含有成分に関する基礎情報が不足している酸化防止剤、苦味料、増粘多糖類、ガムベースに重点を置き、添加物の有効性（活性）を測定する手法を積極的に利用することによって含有成分を解析し、品質評価の指標となる成分を明らかにする。また、活性測定法を利用して、多成分混合物である既存添加物製品の品質や機能特性を簡便に評価する手法を開発する。そのために、以下の項目を検討する。

1) 苦味料

個々の含有成分の正確な構造決定が困難と思われる品目（例：タンニンやテルペノイドを主成分とすると思われる品目）や、苦味成分が解明されていない品目、主成分とされる化合物以外の含有成分が不明確な品目など、含有成分が未解明な品目が少なくない。そこで、味覚センサーを使って、苦味に関与する成分の解析や各含有成分の苦味への寄与率の評価などを行う。それを基に、品質評価の指標となる成分を明らかにする。

2) 酸化防止剤

有効成分と考えられる成分が類似化合物の混合物と思われる品目（例：ポリフェノール類混合物、カテキン混合物などを主成分とすると思われる品目）について、ラジカル捕捉活性測定、脂質過酸化抑制活性測定、SOD 様活性測定、ESR 測定などの抗酸化活性測定系を利用して含有成分を解析し、有効成分の同定と活性の評価を行う。各含有成分の添加物の機能発現への寄与率を評価し、品質評価の指標となる成分を明らかにする。また、各種抗酸化活性測定法を比較して、対象品目に適した活性測定法を選択し、既存添加物の規格試験法への応用を検討する。

3) 増粘多糖類（増粘安定剤）

構成糖の組成比や糖の結合様式などが必ずしも明確でない品目が少なくない。そこで、増粘多糖類の構成糖の組成比や糖の結合様式などを解析して化学構造情報を増やすとともに、増粘多糖類をその構造的特徴から類別するための分画法や品質評価試験法を開発する。

4) ガムベース

ガムベースは、含有主成分によって、テルペノイド系、エステル系、炭化水素系に大別できるが、そのうち前 2 者は、製品中の含有成分が十分に解明されていない、確認試験法の検討が不十分であるなどの問題点がある。そこで、それらの含有成分の解析と確認試験法の開発を行う。

5) 既存添加物の規格策定に向けての検討

上記分類以外の添加物でも、品質規格作成のための、あるいは近年毒性試験が行われた品目の安全性評価のための含有成分に関する情報が不十分な品目について成分研究を行う。また、既存添加物の自主規格作成を業界に依頼する。

本研究により、天然添加物の特性を考慮した品質評価が可能となり、含有成分の解明が遅れている既存添加物品目の成分研究が進む。さらには、これらの研究成果を既存添加物の自主規格作成に反映させることができる。それらを通して、既存添加物の安全性確保の進展が期待できる。

B. 研究方法

1. 試料

既存添加物製品はすべて、日本食品添加物協会から提供を受けたものを使用した。既存添加物と本質成分が同一であると推測される研究用試薬製品（市販品）も試料とした。

2. 苦味料に関する研究

味覚センサー（インテリジェントセンサーテクノロジー社 SA402B）による苦味の質の解析、定量性などの基礎的分析方法を、各種モデル化合物（市販の研究用試薬）および苦味料添加物を用いて検討した。また、含有成分および苦味成分が十分に解明されていない品目として「ヒキオコシ抽出物」

と「レイシ抽出物」の成分研究を行った。

3. 酸化防止剤に関する研究

天然酸化防止剤の中で主要含有成分として明らかになっている単一化合物を市販研究用試薬から購入し、安定ラジカル (DPPH) の消去活性 (DPPH 法)、スーパーオキシドアニオン消去活性 (SOSA) (WST 法)、ABTS ラジカル消去活性 (ABTS 法) の 3 つの抗酸化活性測定系を使って添加物の濃度と活性の関係を調べ、各評価系の特徴を評価した。また、酸化防止剤または抗酸化活性を持つと思われる各種食品添加物 22 品目の抗酸化活性を、 β -カロテン退色法 (リノール酸自動酸化阻害活性)、DPPH 法、WST 法の 3 つの方法で測定した。さらに、ポリフェノール類混合物を主成分とする既存添加物「ブドウ種子抽出物」、含有成分が不明確である既存添加物「ユーカリ葉抽出物」の成分研究を行った。さらに、ルチンの基原のひとつとして既存添加物名簿に記載されているソバ葉の成分研究を行った。

4. 増粘多糖類に関する研究

増粘多糖類（増粘安定剤）のうち、硫酸化多糖類に分類される既存添加物「フクロノリ抽出物」と既存添加物「精製カラギナン」を対象として、構成糖の組成比や糖の結合様式などを解析した。

5. その他の既存添加物に関する研究

既存添加物「ハウセンカ抽出物」の成分研究を行った。また、今後の既存添加物の国による規格設定に向けて規格試験法を整備することをめざし、既存添加物の自主規格作成を食品添加物業界に依頼した。

6. 倫理面への配慮

本研究においては、実験動物およびヒトの試料を用いることはないので、実験動物およびヒトの倫理面で問題となることはない。

C. 研究結果および考察

1. 苦味料

1) 苦味料の品質評価法に関する研究

味覚センサーによる苦味の質の解析、定量性などの基礎的分析方法を、各種モデル化合物（市販の研究用試薬）および苦味料添加物を用いて検討した。キノリンおよびイソキノリンアルカロイドやベンゼン誘導体は濃度相関性をもって明確に苦味物質として検知できた。プリンアルカロイドでは、カフェイン無水物は値の検知ができなかったが、カフェイン一水和物とテオブロミン（カフェインからメチル基の取れた化合物）では検知可能であった。テルペノイドおよびその配糖体は、溶解性の限界と感度の低さのためか、検知できないものが多かった。また、トリテルペンであるクアシンは検知できなかったが、これを主成分の一つとして含有する食品添加物「ジャマイカカシヤ抽出物」製品は、明瞭に検知することができた。このように、センサーで検知可能な化合物群と検知できない化合物群があったが、反応性の違いを明確に説明できるまでには達しておらず、今後苦味成分に対する味覚センサーの反応特性をさらに解析・検討する予定である。また、検知できなかった化合物も、溶解性を高めたり共存成分を添加することで検知できる場合がある可能性が示唆されたので、反応性の劣る化合物群については反応性を改善する測定条件を検討する予定である。また、味覚センサーを用いて、苦味料中の苦味成分を解析することを試みる予定である。

2) 苦味料の成分・品質に関する研究

ヒキオコシ抽出物の品質評価を目的に、ヒキオコシおよび類縁植物の成分解析とDNA分析を行った。その結果、日本の生薬市場の中では、ヒキオコシ（エンメイソウ）（*Isodon japonicus*）またはクロバナヒキオコシ（*Isodon trrichocarpa*）に代わって、中国産のヒキオコシ同属植物がヒキオ

コシの名称で広く流通していることが示唆された。

ほかに、レイシ抽出物中の苦味成分を味覚センサーで解析することを目的に、レイシに含まれる苦味トリテルペン類の単離と構造決定を行った。

2. 酸化防止剤

1) 酸化防止剤の品質評価法に関する研究

天然酸化防止剤の中で主要含有成分として明らかになっている単一化合物（カテキン、ケルセチン、セサモール、フェルラ酸、ヘスペレチン、没食子酸、モリン、 $d\cdot\alpha$ -トコフェロール、 $d\cdot\delta$ -トコフェロール、エラグ酸）を市販研究用試薬から購入し、複数の方法で抗酸化能の評価を行った。DPPH法、WST法、ABTS法の各評価系において添加物の濃度と活性の関係を調べ、各評価系の特徴を評価した。測定系間で活性の高低の傾向は概して一致していたので、酸化防止剤評価方法として適していると考えられた。唯一の例外はセサモールであり、3つの評価系で活性が大きく異なった。抗酸化活性の反応性がラジカルまたは活性酸素の種類に大きく依存していることが示唆される。

酸化防止剤または抗酸化活性を持つと思われる各種食品添加物 22 品目の抗酸化活性を、 β -カロテン退色法（リノール酸酸化阻害活性）、DPPH法（安定ラジカルの消去活性）、WST法（スーパーオキシドアニオン消去活性（SOSA））の3つの方法で測定した。DPPH法では、 β -カロテン退色法で高い値を示したものでも低い値を示すものがあった。WST法の結果を感度・特異性に優れているとされるESR法で測定したSOSAの結果と比較すると、各種試料の活性相対強度に比較的高い一致がみられた。従って、WST法が食品添加物の迅速なSOSA測定法のひとつとして利用可能であることが示唆された。各食品添加物品目の抗酸化活性をいずれの方法でも簡便に測定することができたが、細かく見ると3つの測定方法によって活性強度の傾向が異なる品目があることがわかった。

2) 酸化防止剤の成分・品質に関する研究

ポリフェノール類混合物を主成分とする既存添加物「ブドウ種子抽出物」製品のHPLC分析条件の検討を行った。ODSカラム製品を選択することで、多様なプロア

ントシアニジン混合物からなると思われるベースラインのふくらみがカテキン類と比較的良好に分離することができた。

また、含有成分が不明確である既存添加物「ユーカリ葉抽出物」の成分研究を行った。すでにエラグ酸が含まれず、主成分がフラボノール配糖体であることを明らかにしているが、今回さらに成分解析を進めた結果、低極性化合物群の中に、セスキテルペン類とトリテルペン類が含まれることを明らかにした。さらに、ルチンの基原のひとつとして既存添加物名簿に記載されているソバ葉の成分研究を行い、主成分ルチン(querletin-3-rutinoside)とクエルシトリン(querletin-3-L-rhamnoside)を同定した。

3. 増粘多糖類

1) 増粘多糖類の成分と品質評価法に関する研究

構成糖により、グルカン系多糖類、ウロン酸含有多糖類、硫酸化多糖類、その他に類別して、そのうち、硫酸化多糖類に分類されるフクロノリ抽出物と精製カラギナンを対象として、分子量分布と構成糖の組成比を解析した。「フクロノリ抽出物」製品には、ガラクトースと3,6-アンハイドログラクトースを1:0.26の比で含む多糖を主に含んでいた。「精製カラギナン」製品には、主に高分子量のκ-カラゲーナンなどを含むが、比較的分子量のカラゲーナンも存在した。

4. ガムベース

1) ガムベースの成分・品質に関する研究

テルペノイド系ガムベースとエステル系ガムベースに大別し、各品目の含有成分をTLC、LC/MS、GC/MSで解析し、各品目ごとの特徴を明らかにした。

テルペノイド系ガムベース製品については、製品をTLCにより分析した結果、異なる品目は互いに異なるパターンを示し、同一品目はほぼ同じパターンを示した。LC/MSによる分析では、いずれの品目についても主要構成成分を検出することができ、品目に特異的で指標成分になり得る化合物が検出された。誘導体化した試料のGC/MSによる分析では、いずれの品目においても主要構成成分を検出でき、特異的で指標成分になり得る化合物が検出された。

エステル系ガムベース製品については、

TLC分析の結果、各品目間で含有脂質成分組成に違いが見られ、TLCは確認試験法の一つとして有用であると考えられた。また、GC/MSにより構成脂肪酸・アルコールを分析した結果、種類や相対比率が各品目毎に特徴的であり、また、IRスペクトルが似ている品目同士も、脂肪酸組成分析に加えアルコール組成分析を組み合わせることで、品目同士を区別できることが分かった。

以上のように、ガムベースでは、TLC、GC/MS、LC/MS分析が各品目の確認方法として利用できることが示された。

5. 既存添加物の規格設定に向けての検討

1) その他の既存添加物の成分・品質に関する研究

「ホウセンカ抽出物」の品質規格作成のための基礎情報を得ることを目的に、「ホウセンカ抽出物」製品の含有成分を解析した。その結果、新規ナフトキノ誘導体を含む19種の化合物単離し、それらの構造を明らかにした。

2) 既存添加物の成分規格設定に関する調査研究

今後の既存添加物の国による規格設定に向けて規格試験法を整備することをめざし、既存添加物の自主規格作成を食品添加物業界に依頼した。酵素8品目(アクチニジン、α-アセトラクタートデカルボキシラーゼ、アントシアナーゼ、イヌリナーゼ、α-グルコシルトランフェラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ラクトパーオキシダーゼ、リポキシゲナーゼ)と製造用剤1品目(高級脂肪酸(ステアリン酸))の業界自主規格を新規作成し、着色料1品目(アナトー色素)の業界自主規格を見直し・改訂した。

D. 結論

本研究の目的は、特に成分研究が遅れている酸化防止剤、苦味料、増粘多糖類、ガムベースに重点を置き、添加物の有効性(活性)を測定する手法を積極的に利用することによって含有成分を解析し、品質評価の指標となる成分を明らかにすることである。また、既存添加物製品の品質や機能特性を簡便に評価する方法を開発することをめざ

すことである。

初年度の研究成果として、味覚センサーによる苦味成分の検出及び各種抗酸化活性測定法による天然酸化防止剤の抗酸化活性能の評価については、方法論として有用であると判断された。次年度も検討を継続する。また、含有成分の解明が遅れていた既存添加物品目の成分解析を進めることができた。さらには、既存添加物の業界自主規格作成を進めることができた。それらを通して、既存添加物の安全性確保および既存添加物の第9版食品添加物公定書への新規収載に向けた進展が期待できる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada,A., Jin, Z.L., 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, 46, 198-204 (2005).

2. 学会発表

- 1) 鄒大鵬、川原信夫、合田幸広：既存添加物「ホウセンカ抽出物」の成分に関する研究。日本生薬学会第52回年会(2005.9)
- 2) 多田敦子、秋山卓美、杉本直樹、山崎壮、棚元憲一、増田愛乃、山形一雄：エステル系ガムベースの成分と試験法の検討。日本食品衛生学会第90回学術講演会(2005.10)

- 3) 秋山卓美、多田敦子、杉本直樹、山崎壮、棚元憲一、林歩美、尹永淑、功刀彰：テルペノイド系ガムベースの成分と試験法の検討。日本食品衛生学会第90回学術講演会(2005.10)

- 4) Atsuko TADA, Naoki SUGIMOTO, Kyoko SATO, Takeshi YAMAZAKI, Ken-ichi TANAMOTO: Quantification of Wax Esters in Jojoba Wax Used as a Food Additive in Japan by LC/MS/MS. PACIFICHEM 2005 (International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), Honolulu, Hawaii (2005.12)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

1. 苦味料等の品質評価法に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 17 年度分担研究報告書

天然由来苦味料の評価法に関する研究

分担研究者 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
協力研究者 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
協力研究者 小林義和 株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー
協力研究者 濱田ひかり 株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー

研究要旨 天然由来の苦味料中の苦味関与成分の検索に有効な評価法を見出すため、種々の苦味モデル化合物及び既存添加物苦味料を用い、味認識装置（味覚センサー）による苦味の質の解析・濃度依存性などについて検討した。各種試薬を測定した結果、キノリン及びイソキノリンアルカロイドやベンゼン誘導体は濃度相関性をもって明確に苦味物質として検知できた。プリンアルカロイドでは、カフェインは値の検知ができなかったものの、その一水和物、メチル基の取れたテオブロミンでは検知可能であった。テルペン及びその配糖体は、溶解性の限界と感度の低さのためか、検知できないものが多かった。また、トリテルペンであるクアシンは検知できなかったものの、これを主成分の一つとして含有する食品添加物ジャマイカカッシアは、味認識装置により明瞭に検知することができた。この点については、今後さらに検討を行う予定である。

A. 研究目的

既存添加物名簿収載品目リスト¹⁾に記載されている天然由来の苦味料（表1）の中には、有効成分が多くの類似化合物の混合物であるため、個々の含有成分の正確な構造決定が困難と思われる品目が少なくない。そのため、現時点で食品添加物公定書²⁾に記載されている苦味料は無く、一部が日本食品添加物協会の第三版自主規格³⁾に記載されているに過ぎない。また、苦味成分が解明されていない品目や、主成分以外の成分が不明確な品目など、含有成分が未解明な品目もある。こうした品目について、個々の化合物の化学構造を同定・定量すること

は、膨大な時間と労力を必要とするため、含有成分の網羅的構造決定は現実的には困難である。従って、これらの品目の品質規格策定のためには、苦味を担う主成分を効率よく検索し、その化学的特性を把握することが必要であり、そのためには、苦味物質を検索できるような新たな品質評価手法の利用が不可欠である。

本研究では、苦味の新たな評価手法として、近年様々な分野で利用されている味認識装置（味覚センサー）を用い、苦味関与成分の解析や各含有成分の苦味への寄与率の評価などを行い、それを基に、品質評価の指標となる成分を明らかにすることを目

的とする。

今年度は、種々の苦味モデル化合物及び既存添加物苦味料を用い、味覚センサーによる苦味の質の解析、濃度依存性などの基礎的分析方法を検討した。

B. 研究方法

1. 試料

表2に、測定に用いた呈味物質を示した。今回の測定では、既存添加物苦味料の構成成分として推定されている苦味物質を主に用いた。また、甘味物質の中には苦味を呈するものがあることや、渋味との違いや構造の違いによるセンサーの応答性を確認するために、一部の渋味物質、甘味物質も測定試料として用いた。また、日本食品添加物協会を通じ、既存添加物苦味料4製品(イソ α 苦味酸、カフェイン、ジャマイカカッシア、ナリンジン)を入手した。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2. 装置

味覚センサー：味認識装置 SA402B (株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー(Insent))

この装置は、マルチチャネル型脂質膜センサーにより、味を認識する。各センサーの応答特性は表3に示した。

3. 測定用試料液の調製

各試料は10 mM 塩化カリウムを用い、表4に示す濃度に調製した。また、コントロール用標準液として、10 mM 塩化カリウムを用いた。ただし、テルペノイド系苦味料(B15~B21)は、10 mM 塩化カリウムには溶けにくかったため、0.1mMでの1点測定とし、さらに、エタノール30vol%を含む10 mM 塩化カリウム溶液を用い、表4に示す濃度で調製し、コントロールとしてエタノール

30vol%を含む10 mM 塩化カリウム標準液を用いて測定した。

4. 測定値の算出方法

試料を測定する前に標準液について測定し、その測定値を V_r (mV) で表す。次に、試料溶液に脂質膜センサープローブを浸した時の測定値を V_s 、試料測定後、再び測定した標準液の測定値を V_r' とする。結果として、標準液と試料溶液の測定値の差($V_s - V_r$)が脂質膜センサーの出力となり、これを「相対値」として算出した。また、試料測定の前と後での標準液の測定値の変化($V_r' - V_r$)は脂質膜に呈味物質が吸着したことに由来するいわゆる「後味」と考えられ、この値は「CPA (Change of membrane Potential caused by Adsorption) 値」と定義されており、この値も評価に用いた^{4,5)}。濃度依存的に「相対値」や「CPA 値」が変化するか否かにより、味認識装置による検知の可能性を判断した。

5. 主成分分析

主成分分析とは、多次元のデータを、情報の損失をできるだけ少なくして数次元のデータに圧縮する多変量解析の一種である。今回の分析では、6本のセンサーから得られる各相対値と各CPA値、計12種類の情報、即ち12次元のデータを説明変数として、主成分分析を行った。元の情報を最も多く有している合成変数が「第1主成分PC1」であり、1つの主成分が元の全変数の情報の何割を説明できるかということを表す指標が「寄与率」である。また、第1主成分から第 m 主成分までの寄与率の合計を「累積寄与率」と言い、100%から累積寄与率を引くことで、情報の損失の程度を知ることが出来る。

C. 結果及び考察

1. 測定に際しての課題

今回用いた味認識装置は、これまで苦味、渋味測定対象物としてキノリンアルカロイド、イソ α 酸、タンニン等を用いており、テルペノイド系の苦味物質については、測定経験が無かった。天然由来の苦味料には、苦味成分としてテルペノイド系化合物を含むことが予想されるものが種々存在する。そのため、今回テルペノイド類が測定できるかどうかは課題の一つであった。味認識装置のセンサーには、各種味物質に特異的な脂質膜を用いているため、測定試料溶液中の無極性溶媒濃度を上げてしまうと、センサーが劣化すると共に、正確な測定の保証が無くなる。テルペノイド系苦味料は、10mM 塩化カリウムのみでは溶け難く、0.1mM の濃度では溶けないもの (B17) や、懸濁状のまま測定せざるを得ないもの (B19 及び B20) があった。そこで、これまでに味認識装置での測定経験があり、センサーの劣化を起ささないことが分かっている有機溶媒濃度、即ち 30vol% エタノールを含むようコントロール標準液及び試料溶解溶媒を調整し、テルペノイド系苦味料 (B15~B21) を再度測定した。

また、味認識装置はカフェインの応答性が悪いことが予め分かっていたため、今回はカフェインの水和物を用いて測定の可能性について試すと共に、同類のテオブロミンについても調べることにした。

2. 測定結果

味覚センサーで苦味物質を測定した結果を表5に示す。大きく3つのグループ、味認識装置で1) 検知できる物質 (相対値, CPA 値で検知), 2) 検知できる物質 (相対値のみ検知), 3) 検知できない物質に分類

した。苦味物質は一般にセンサー脂質膜へ吸着する傾向にあるため、CPA 値がより明確に検知される物質は、苦味の一種と考えられる。

試薬の結果を見てみると、1) 検知できる物質 (相対値, CPA 値で検知) グループとして、キノリン及びイソキノリンアルカロイド類、フラバノン配糖体のナリンギン水和物、イソ α 酸、ベンゼン誘導体、タンニン、没食子酸、またトリテルペンでも塩になっているものは、検出可能であった。苦味物質のテルペン及びテルペン配糖体の多くは、3) 検知できない物質のグループに入った。30vol% エタノールを含む溶媒に溶解することで、10mM 塩化カリウムのみの場合より高濃度まで溶解させることができたが、今回試験した濃度では、ゲンチオピクロシド及びアンドログラフォリド以外のテルペノイド系苦味物質は、センサーがその苦味情報を検知出来ないようであった。ゲンチオピクロシド (B15) 及びアンドログラフォリド (B17) は、30vol% エタノールを含む溶媒に溶解させた場合、相対値のみではあるが、2) 検知できる物質に分類された。また、テルペノイド系甘味物質については、今回 30vol% エタノール溶媒を用いての試験を行わなかったが、グリチルリチン (S1) 及び、ステビオシド (S2) は 2) 検知できる物質 (相対値のみ検知) に分類され、3) 検知できない物質に分類されたレバウジオシド A (S5) も試験した最高濃度で値が若干上がってきており、さらに高濃度を試験することで、検知可能となることも示唆された。カフェインは、予想された通り、3) 検知できない物質に入ったが、一水和物 (B10) 及び同じプリンアルカロイドのテオブロミンは 2) 検知できる物質 (相対値のみ検知)

に入ったことから、溶解性を上げる事で検出しやすくなり、また同類の化合物でも側鎖の微妙な違いで検出のされ方も変わる事が分かった。

食品添加物では、今回入手可能であった4品目の内、イソ α 苦味酸、ジャマイカカシヤ抽出物、ナリンジンは、1) 検知できる物質(相対値, CPA 値で検知)に分類され、カフェインは3) 検知できない物質に分類された。これらの内、イソ α 苦味酸、ナリンジン及びカフェインの分類結果は、それぞれ試薬品 B14, B13 及び B9 と結果が一致し、イソ α 苦味酸及びナリンジンでは、各センサーの応答パターンも一致していた。また、食品添加物ジャマイカカシヤ抽出物の主成分がクアシン及びネオクアシンであることは、既に当研究部において報告⁹⁾しており、今回用いた添加物試料も、成績書記載のデータによるとクアシン及びネオクアシンをそれぞれ約 12%及び約 42%含有している。試薬としてのクアシン(B21)は3) 検知できない物質に分類されたにも関わらず、クアシンを主成分の一つとする食品添加物ジャマイカカシヤ抽出物は明らかに検知できたことから、一つの可能性として、単独では味認識装置に検知され難いテルペン系苦味物質も、副成分の存在等により十分に溶解することができれば、検知可能となることが考えられた。或いは、ジャマイカカシヤ中のクアシン以外の成分が、味センサーに応答した可能性も否定はできないため、今後さらに詳しく調べたいと考えている。

3. 主成分分析

表4に示す各種試薬(0.1mM)及び食品添加物のナリンジン(0.006w/v%), カフェイン(0.002w/v%), ジャマイカカシヤ

(0.005w/v%)の測定値を用い、主成分分析を行った。ただし、タンニン及びイソ α 酸は、明確なモル数が得られないため、計算から除外した。図1に第1主成分 PC1 と第2主成分 PC2 による分析結果を示した。PC2 までの累積寄与率は 62.8%であり、図1により元のデータの 60%以上の情報を反映できた。得られた結果から、大きく分けて、甘味料、キノリンアルカロイドおよびイソキノリンアルカロイドと、それ以外の化合物とで、味のバランスが異なることが確認され、味認識装置によりこれら物質の分類が可能であることが分かった。味センサーへの応答性の低いテルペノイド系やプリンアルカロイド系苦味物質は、今回の主成分分析では同じグループにまとまった。今後、これらの物質については、より高濃度の測定値を用いて再度主成分分析を行う予定である。また今回得られたデータについて、さらに様々な角度から解析を加え、苦味を担う化合物の種類を推定できる方法を検討する予定である。

D. 結論

天然由来の苦味料中の苦味関与成分の検索に有効な評価法を見出すため、種々の苦味モデル化合物及び既存添加物苦味料を用い、味認識装置(味覚センサー)による苦味の質の解析・濃度依存性などについて検討した。各種試薬を測定した結果、キノリン及びイソキノリンアルカロイドやベンゼン誘導体は濃度相関性をもって明確に苦味物質として検知できた。プリンアルカロイドでは、カフェインは値の検知ができなかったものの、その一水和物、メチル基の取れたテオブロミンでは検知可能であった。テルペン及びその配糖体は、溶解性の限界

と感度の低さのためか、検知できないものが多かった。また、トリテルペンであるクアシンは検知できなかったものの、これを主成分の一つとして含有する食品添加物ジャマイカカシアは、味認識装置により明瞭に検知することができた。この点については、今後さらに検討を行う予定である。

今回の結果のみでは、味覚センサーが、苦味物質のどの程度の範囲を網羅できているか完全に把握できてはいないため、さらに条件を変えて検討を行うと共に、別の角度からのデータ解析を行いたい。また、各種物質の味覚センサーでの検出値の強さが、実際のヒトでの味の強さと相関するか否かを今後検討し、既存添加物苦味料の研究における味覚センサーの有用性について確認し、更には成分分析へと生かしたいと考えている。

E. 参考文献

1. 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)
2. 第7版食品添加物公定書, 日本食品添加物協会, 1999.
3. 第三版既存添加物自主規格, 日本食品添加物協会, 2002.
4. 内田 弘, 第2回医薬品添加剤セミナー, 2003.
5. 安食菜穂子, 川原信夫, 合田幸広, 味認識装置による漢方書報の味の評価に関する研究(第1報), *Natural Medicines*, 59, 164-170, 2005.
6. 杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎壮, 棚元憲一, 天然苦味料ジャマイカカシア抽出物の成分分析, *食衛誌(J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 44, 2003.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 既存添加物 苦味料

	名称	英名	公定書又は 日添協自主規格	含有成分
37	イソアルファー苦味酸	Iso- α -bitter acid		イソフムロン, イソルブロン
94	カフェイン(抽出物)	Caffeine(extract)	第三版自主規格	カフェイン
108	カワラタケ抽出物	Kawaratake extract		カワラタケ菌糸体若しくは子実体又はその培養液の水抽出物
121	キナ抽出物	Redbark cinchona extract		キニジン, キニーネ, シンコニン, 他にタンニン
122	キハダ抽出物	Phellodendron bark extract		ベルベリン
164	ゲンチアナ抽出物	Gentian root extract		アマロゲチン, ゲンチオピクロシド(ゲンチオピクリン)
167	香辛料抽出物	Spice extracts		種類多数で成分化合物名について記述なし
172	酵素処理ナリンジン	Enzymatically modified naringin	第三版自主規格	α -グルコシルナリンギン
216	ジャマイカカссия抽出物	Jamaica quassia extract		クアシン, ネオクアシン
277	テオブロミン	Theobromine		テオブロミン(カフェインの脱メチル体)
313	ナリンジン (注)	Naringin	第8版公定書収載予定	ナリンギン(ラムノース-グルコース-ナリンゲニン)
314	ニガキ抽出物	Quassia extract	第三版自主規格	クアシン
316	ニガヨモギ抽出物	Absinth extract	第三版自主規格	アブシンチン, アブソルピン等のセスキテルペン
339	ヒキオコシ抽出物	Isodonis extract		ジテルペノイド(エンメイン等)
348	ヒメマツタケ抽出物	Himematsutake extract	第三版自主規格	ヒメマツタケ菌糸体若しくは子実体又はその培養液の水抽出物
438	メチルチオアデノシン	Methylthioadenosine	第三版自主規格	5'-デヒドロキシ-5'-メチルチオアデノシン
478	レイシ抽出物	Mannentake extract	第三版自主規格	マンネンタケ菌糸体若しくは子実体又はその培養液の水, エタノール又は二酸化炭素抽出物, ganoderic acid 類

注: 本報告書では, 既存添加物の品目名としては「ナリンジン(Naringin)」, 化合物名及び試薬名としては「ナリンギン(Naringin)」を採用した。

表 2 測定に用いた呈味物質(試薬)

No.	試薬	化合物分類
苦味物質		
B 1	キニジン (Quinidine)	キノリンアルカロイド
B 2	キニジン塩酸塩一水和物 (Quinidine hydrochloride monohydrate)	キノリンアルカロイド
B 3	キニジン硫酸塩二水和物 (Quinidinesulfate dihydrate)	キノリンアルカロイド
B 4	キニン (Quinine, anhydrous, 99%)	キノリンアルカロイド
B 5	キニーネ塩酸塩二水和物 (Quinine hydrochloride dihydrate, 一級)	キノリンアルカロイド
B 6	シンコニン (Cinchonine)	キノリンアルカロイド
B 7	シンコニン硫酸塩二水和物 (Cinchonine sulfate dihydrate)	キノリンアルカロイド
B 8	ベルベリン塩酸塩二水和物 (Berberine chloride dihydrate, 99%)	イソキノリンアルカロイド
B 9	カフェイン (Caffeine, 99.7%)	プリンアルカロイド
B10	カフェイン一水和物 (Caffeine monohydrate)	プリンアルカロイド
B11	テオブロミン (Theobromine, 特級)	プリンアルカロイド
B12	5'-デオキシ-5'-メチルチオアデノシン (5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine, HPLC100%)	プリン配糖体
B13	ナリンギン水和物 (Naringin hydrate, 98%以上)	フラバノン配糖体
B14	イソ α 苦味酸 (Iso- α -bitter acid)	フロログルシン誘導体
B15	ゲンチオピクロシド標準品 (Gentiopicroside standard, 生薬試験用)	モノテルペン配糖体
B16	スウェルチアマリン標準品 (Swertiamarin standard, HPLC 99.0%以上)	モノテルペン配糖体, センブリ中の苦味成分
B17	アンドログラフォリド (Andrographolide, センシンレン <i>Andrographis paniculata</i> から単離)	ジテルペン
B18	エンメイン (Enmein, 99%以上)	ジテルペン
B19	リモニン (Limonin, グレープフルーツ由来生化学用, HPLC 98.0%以上)	トリテルペン
B20	ノミリン (Nomilin)	トリテルペン
B21	クアシン (Quassin)	トリテルペン
B22	安息香酸ナトリウム (Sodium benzoate, 98.0%以上)	ベンゼン誘導体
B23	N-フェニルチオ尿素 (N-Phenylthiourea, フェニルチオカルバミド)	ベンゼン誘導体
渋味物質		
A 1	タンニン	タンニン
A 2	エラグ酸二水和物 (生化学用, 99.0+%)	タンニン中ポリフェノール酸
A 3	没食子酸 (Gallic acid, 98%)	タンニン中ポリフェノール酸
甘味物質		
S 1	グリチルリチン (Glycyrrhizin, 生薬試験用, HPLC 98.0%以上)	トリテルペン配糖体, カンゾウ中の甘味成分
S 2	グリチルリチン酸アンモニウム塩 (Glycyrrhizic acid ammonium salt, HPLC Aprox75%)	トリテルペン
S 3	グリチルリチン酸二カリウム (Glycyrrhizic acid dipotassium salt, 生化学用)	トリテルペン
S 4	ステビオシド標準品 (Stevioside standard)	ジテルペン配糖体, ステビア中の甘味成分, 苦味ももつ
S 5	レバウジオシド A 標準品 (Rebaudioside A Standard, ステビオシド定量用, 乾燥後 99.0%以上)	ジテルペン配糖体, ステビア中の甘味成分, 苦味ももつ
S 6	サッカリン (Saccharin, o-スルホベンズイミド)	ベンズイミド, 人工甘味料, 苦味ももつ

表3 各センサーの応答特性

センサー	相対値	CPA 値
AC0	酒石酸, クエン酸等の有機酸 その他に苦味物質に応答	Ca, Mg 系の苦味
AN0	酒石酸, クエン酸等の有機酸 その他に苦味物質に応答	塩酸キニーネ等の塩基性苦味 その他に Ca, Mg 等のイオンに応答
C00	クロロゲン酸, イソ α 酸等の苦味物質 その他に塩味に応答	イソ α 酸, クロロゲン酸等の苦味物質
AE1	カテキン, タンニン等の渋味物質 その他に塩味に応答	カテキン, タンニン等の渋味物質
AAE	MSG, IMP 等の旨味物質 その他に酸味に応答	MIP 等の旨味物質
CT0	塩味に応答	なし

表4 各試料の測定濃度

No.	サンプル名	測定濃度	備考
試薬			
B 1	キニン	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	
B 2	キニン塩酸塩一水和物	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	
B 3	キニン硫酸塩二水和物	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	
B 4	キニン	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	
B 5	キニーネ塩酸塩二水和物	0.003mM~1 mM の 6 点	
B 6	シニコニン	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	0.3 mM は全量溶解せず、懸濁液の状態にて測定
B 7	シニコニン硫酸塩二水和物	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	
B 8	ヘルペリン塩酸塩二水和物	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	
B 9	カフェイン	0.01 mM~10 mM の 7 点	
B10	カフェイン一水和物	0.01 mM~10 mM の 7 点	
B11	テオブロミン	0.01 mM~10 mM の 7 点	10 mM は全量溶解せず、懸濁液の状態にて測定
B12	5'-デオキシ-5'-メチルチオアデニン	0.01 mM~10 mM の 7 点	
B13	ナリンキン水和物	0.01 mM~3 mM の 6 点	3 mM は全量溶解せず、懸濁液の状態にて測定
B14	イソα酸	0.003vol%~3vol%の 7 点	
B15	ゲンチオピクロイド	0.1 mM	10 mM 塩化カリウムで調製
		0.01 mM~3 mM の 6 点	10 mM 塩化カリウム+30vol%エタノールで調製
B16	スウェルチアミン	0.1 mM	10 mM 塩化カリウムで調製
		0.01 mM~3 mM の 6 点	10 mM 塩化カリウム+30vol%エタノールで調製
B17	アントログラフォイト	0.01 mM~3 mM の 6 点	10 mM 塩化カリウム+30vol%エタノールで調製、 1, 3 mM は全量溶解せず、懸濁液の状態にて測定
B18	エンメイン	0.1 mM	10 mM 塩化カリウムで調製
		0.01 mM~3 mM の 6 点	10 mM 塩化カリウム+30vol%エタノールで調製
B19	リモニン	0.1 mM	10 mM 塩化カリウムで調製、懸濁液の状態にて測定
		0.01 mM~3 mM の 6 点	10 mM 塩化カリウム+30vol%エタノールで調製、 0.3, 1, 3 mM は全量溶解せず、懸濁液の状態にて測定
B20	マリリン	0.1 mM	10 mM 塩化カリウムで調製、懸濁液の状態にて測定
		0.01 mM~3 mM の 6 点	10 mM 塩化カリウム+30vol%エタノールで調製、 1, 3 mM は全量溶解せず、懸濁液の状態にて測定
B21	クアシン	0.01 mM~3 mM の 6 点	10 mM 塩化カリウム+30vol%エタノールで調製、 3 mM は全量溶解せず、懸濁液の状態にて測定
B22	安息香酸ナトリウム	0.01 mM~10 mM の 7 点	
B23	N-フェニルチオ尿素	0.01 mM~10 mM の 7 点	
A 1	タンニン	0.001%~1.6%の 7 点	
A 2	エラグ酸二水和物	0.01 mM~10 mM の 7 点	0.1 mM~10 mM は全量溶解せず、懸濁液の状態にて測定
A 3	没食子酸	0.01 mM~10 mM の 7 点	
S 1	グリチルリチン	0.1 mM の 1 点	
S 2	グリチルリチン酸アンモニウム塩	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	
S 3	グリチルリチン酸二カルシウム	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	
S 4	ステピオイド	0.01 mM~10 mM の 7 点	
S 5	レバウジオイド A	0.01 mM~0.3 mM の 4 点	
S 6	サッカリン	0.01 mM~10 mM の 7 点	