

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 18 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
	受田 浩之	高知大学
	松本 清	九州大学大学院
	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 19 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. 酸化防止剤の品質評価法に関する研究

- 1.1. 天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究11
分担研究者：受田 浩之
協力研究者：松本 清
- 1.2. 天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究17
分担研究者：松本 清
協力研究者：受田 浩之
協力研究者：松藤 寛

- 1.3. 天然添加物の抗酸化活性評価法に関する研究
ー天然酸化防止剤 γ -オリザノールの定量および有効性の評価法に
関する研究ー25
分担研究者：杉本 直樹

2. 酸化防止剤の成分・品質に関する研究

- 2.1. ブドウ種子抽出物の成分と分析法に関する研究31
分担研究者：永津 明人
- 2.2. カンゾウ油性抽出物の成分分析37
分担研究者：尹 永淑
- 2.3. 既存添加物「ユーカリ葉抽出物」の成分に関する研究43
協力研究者：大槻 崇

3. 苦味料の品質評価法に関する研究

- 3.1. 天然由来苦味料の評価法に関する研究49
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

4. 苦味料の成分・品質に関する研究

- 4.1. ヒキオコシ抽出物の起源植物の成分に関する研究63
分担研究者：黒柳 正典
- 4.2. ヒキオコシ抽出物の成分と基原種に関する研究71
協力研究者：合田 幸広
- 4.3. レイシ（霊芝）苦味成分に関する研究79
協力研究者：服部 征雄

5.	増粘多糖類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	91
5.2.	精製カラギナンの成分に関する研究	95
5.3.	ファーセラランの成分に関する研究	99
	分担研究者：李 貞範	
5.4.	増粘多糖類の品質評価法に関する研究	105
	分担研究者：秋山 卓美	
6.	ガムベースの成分・品質に関する研究	
6.1.	ガムベース等の成分・品質に関する研究	111
	分担研究者：秋山 卓美	
7.	既存添加物の品質規格策定に関する研究	
7.1.	既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究（総括）	123
	分担研究者：山崎 壮	
7.2.	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	127
Ⅳ.	研究成果の刊行物・別刷	129

分冊 その2 (別冊)

平成18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. 着色料 (1品目)	1
1-2. 酵素 (3品目)	5
2. 既策定規格改定品目	
2-1. 甘味料 (1品目)	20
2-2. 着色料 (9品目)	29
2-3. 増粘安定剤 (1品目)	49
2-4. 酵素 (18品目)	56
(1) 成分規格見直し・酵素活性測定法追加品目	
・ α -アミラーゼ	63
・キシラナーゼ	87
・シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	143
・トランスグルコシダーゼ	161
・プルラナーゼ	166
(2) 追加検証データ取得品目	
・ α -アミラーゼ	194
・カタラーゼ	208
・シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	224
・5'-デアミナーゼ	230
・フルクトシルトランスフェラーゼ	233
・リパーゼ	283
(3) 酵素一般規格	311
3. 既存添加物酵素の流通実態に関する調査研究	316
3-1. 別表-1: 酵素流通実態調査リスト	326
3-2. 別表-2: 既存添加物酵素収載品目リストの基原と流通実態の比較	335
3-3. 別表-3: 既存添加物酵素の基原名と各菌株寄託機関における 名称の比較調査—細菌類 (放線菌類)	343
3-4. 別表-4: 既存添加物酵素の基原名と各菌株寄託機関における 名称の比較調査—糸状菌類 (酵母を含む)	345
3.5. Amfep 関連資料	347

研究要旨

これまでに厚生労働省は既存添加物（天然添加物）の成分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国の成分規格が未整備なままであるのが現状である。成分規格の対象とする成分（有効成分及び不純物）が明確でないことが、規格整備を困難にしている。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。

平成 18 年度（3 年計画の 2 年目）は、以下の研究を実施した。

酸化防止剤

食品添加物である酸化防止剤の成分規格の設定を目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の特徴について調べた。3 種類の抗酸化力価測定法（DPPH ラジカル消去活性測定、ABTS ラジカル消去活性測定、スーパーオキシドアニオン消去活性）の標準操作法を作成して、単一成分の天然酸化防止剤 9 種類を複数機関で測定し、測定値の一致度を評価した。抗酸化活性を Trolox 等価活性として表記した場合、各化合物の活性の高低傾向が概して一致することが認められた。また、天然酸化防止剤製品 22～29 製品の抗酸化能を 3 種類の抗酸化力価測定法で評価したが、適用可能であった。以上の結果から、いずれの測定法も酸化防止剤評価方法として適用可能であることが示唆された。ただし、天然酸化防止剤製品によっては、溶媒に不溶あるいは白濁のため測定不能なものがあり、酸化防止剤によっては 3 測定法を使い分ける必要があると考えられた。

酸化防止剤の成分解析と成分分析法の開発としては、ブドウ種子抽出物のカテキン類とプロアントシアニン類の HPLC 分析条件を検討し、カテキン類とそれ以外の含有成分の分離を可能にした。 γ -オリザノールの定量法として HPLC 法と比色法を比較検討した。また、 γ -オリザノールの抗酸化活性（DPPH 法）とフェルラ酸エステル含量には直線関係が成立することが明らかになり、抗酸化活性値からフェルラ酸エステル含量を算出可能であることが示唆された。カンゾウ油性抽出物中の主要成分を同定した。ユーカリ葉抽出物中の含有成分を解析した。

苦味料

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方法を見出すため、種々の苦味モデル化合物及び苦味料添加物を用い、味覚センサー（味認識装置）による苦味の質の解析、定量性などの基礎的分析方法を検討した。化合物純品を試料として味覚センサーによる味の質の解析を行った結果、苦味化合物の化学構造により味覚センサーの応答パターンが特徴的であることが分かった。既存添加物製品でも味覚センサー応答を解析した。また、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成分の単

離と構造決定を行った。

ヒキオコシ抽出物の品質評価を目的に、ヒキオコシ及び類縁植物の成分解析と DNA 分析を連携して行った。その結果、ヒキオコシ抽出物の基原植物は定義に記載されているヒキオコシではなく、中国産の同属植物を原料としていると推測された。また、ヒキオコシ（日本産）と中国産の同属植物とは、主成分としてウルソール酸（ursolic acid）を共通成分とするが、ヒキオコシに特徴的な主要成分であるジテルペン誘導体に関して両者に共通成分は認められなかった。

増粘多糖類

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について、昨年度は分子量分布と構成糖組成比を解析したが、今年度は糖鎖化学構造をさらに詳細に解析し、糖鎖の結合様式と硫酸基の置換位置を明らかにした。さらに、硫酸化多糖類であるファーセラランについても同様に詳細な解析を行った。

ウロン酸と中性糖を含む増粘多糖類の構成糖組成分析法を検討した。ジエチルジチオアセタール誘導体化して GC 分析することで、糖組成の違いにより品目間の区別を行うことができた。

ガムベース

テルペノイド系ガムベースであるエレミ樹脂、ニュウコウ、ベンゾインガムの成分解析を行った。

既存添加物の規格設定に向けての検討

既存添加物の自主規格作成を業界に依頼した。新規に 4 品目の成分規格を作成し、30 品目の既設定規格を見直した。また、食品用酵素の流通実態調査を行った。

分担研究者

受田 浩之 高知大学農学部 教授
松本 清 九州大学大学院農学研究院
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
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
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

協力研究者

松藤 寛 日本大学生物資源学部
講師
大槻 崇 千葉大学大学院薬学研究院
助手
合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部 部長
服部 征雄 富山大学和漢医薬学総合研
究所 教授
(株) インテリジェントセンサーテクノロ
ジー
日本食品添加物協会

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成分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国の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てきた。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、これらの品目の成分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。

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、研究班の下で既存添加物の自主規格作成を業界に依頼することで、これらの研究成果を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。

1) 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、複数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。

2) 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。

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な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、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つは、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を開発を行う。今年度はテルペノイド系ガムベースの成分研究を行う。

5) 既存添加物の規格策定に向けての検討

今後の既存添加物の国による成分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。

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。既存添加物と類似の品目名をもつ（本質成分が同一であると推測される）市販研究用試薬も試料とした。

2. 酸化防止剤に関する研究

3種類の抗酸化力価測定法（DPPH ラジカル消去活性測定、ABTS ラジカル消去活性測定、スーパーオキシドアニオン消去活性）の標準操作法を作成して、単一成分の天然

酸化防止剤9種類を複数機関で測定し、測定値の一致度を評価した。また、天然酸化防止剤製品22～29製品の抗酸化能を3種類の抗酸化力価測定法で評価した。ブドウ種子抽出物、 γ -オリザノールの成分分析法の開発とカンゾウ油性抽出物、ユーカリ葉抽出物の成分解析を行った。

3. 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。

各種モデル化合物（市販の研究用試薬、化合物純品）を試料として用いて味覚センサー（インテリジェントセンサーテクノロジー社 SA402B）による味の質の解析を行い、苦味化合物の化学構造と味覚センサーの応答パターンとの関連を調べた。苦味料添加物（既存添加物製品）でも味覚センサー応答を解析した。また、ヒキオコシ抽出物、レイシ抽出物の成分解析を行った。

4. 増粘多糖類に関する研究

硫酸化多糖類を含む増粘多糖類としてフクロノリ抽出物、精製カラギナン、ファーセラランの糖鎖化学構造を詳細に解析した。また、ウロン酸と中性糖を含む増粘多糖類の構成糖組成分析法を検討した。

5. ガムベースに関する研究

テルペノイド系ガムベースであるエレミ樹脂、ニューコウ、ベンゾインガムの成分解析を行った。

6. その他の既存添加物に関する研究

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。

7. 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. 酸化防止剤

1) 酸化防止剤の品質評価法に関する研究

酸化防止剤の成分規格の設定を目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の検証を行った。昨年度の研究で、単一化合物天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価試験では DPPH ラジカル消去活性測定 (DPPH 法)、ABTS ラジカル消去活性測定、スーパーオキシドアニオン消去活性測定 (WST-1 法) のいずれもが酸化防止剤評価方法として適していると判断された。今年度は、「既存添加物名簿収載品目リスト」に収載されている天然物酸化防止剤の中から単一の成分からなる添加物 (カテキン、ケセルチン、セサモール、フェルラ酸、没食子酸、モリン、エラグ酸、 $d\alpha$ -トコフェロール、 $d\delta$ -トコフェロール) を選び出し、その DPPH ラジカル消去活性測定、ABTS ラジカル消去活性測定、スーパーオキシドアニオン消去活性 (SOSA) 測定を行い、各評価系の特徴について調べるとともに、3 研究室による共同試験を行い、測定値の一致性を評価した。その結果、抗酸化活性を Trolox 等価活性として表記した場合、3 つの評価系における各化合物の活性の高低傾向は、概して一致しており、3 研究室間でほぼ同じ傾向であることが明らかとなった。

次に、複数成分からなる天然物酸化防止剤 29 製品について、上記 3 評価系を適用しその抗酸化性を評価した。その結果、これらの測定法はいずれも酸化防止剤評価方法として適しているものと考えられた。さらに、天然物酸化防止剤製品への DPPH 法の適用性については 2 研究室による共同研究を行い、測定値の一致性を評価した。天

然物酸化防止剤 26 製品の抗酸化活性を DPPH 法により測定し、2 つの研究室で求められた値を比較したところ、その抗酸化活性 (Trolox 等価活性) に顕著な相違は認められず、両者の間には有意な直線性が認められた。また、その回帰直線の傾きは 1 に近似していた。以上のことから、複数成分からなる天然物酸化防止剤に対しても、DPPH 法が適用可能であることが明らかとなった。

2) 酸化防止剤の成分・品質に関する研究

γ -オリザノールの定量法と抗酸化活性について検討した。本品の含量を HPLC 法および吸光度法で測定したところ、求められた定量値は、吸光度法 > 真値 > HPLC 法であると考えられ、いずれかを規格試験法として採用する場合には、このことを考慮して規格値を設定する必要があると思われる。また、DPPH 法を用いて γ -オリザノールの抗酸化活性を評価したところ、アルコール部分の異なる複数種のフェルラ酸エステル類がほぼ等しい活性を持つことが確認され、抗酸化活性値からフェルラ酸エステル含量を算出可能であることが示唆された。したがって、本品目について、含量値以外にも「抗酸化価」という規格項目が新たに設定可能であると考えられた。

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 分析条件の改善と未知ピークの化合物同定、異なるロットの試料でのクロマトグラムの相違について、昨年度に引き続き検討した。Cosmosil Chorester カラムのカラム長を延長することで、バックグラウンドの化合物とカテキン類との分離においてさらに良好な結果が得られた。未知ピークのうち 2 つは procyanidin B1 と (-)-epicatechin であることが確認された。また、異なる 4 ロットの試料でクロマトグラムを比較し、ロット間で含有成分に大き

な相違がみられないことがわかった。

カンゾウ油性抽出物の含有成分を解析した。カンゾウ油性抽出物をカラムクロマトグラフィーで分画し、単離した成分の構造を調べた。主成分として glabridin が単離された。そのほかの成分として hispaglabridin A と kanzonol U を単離した。hispaglabridin A と kanzonol U はすでにヨウカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* L.)からの単離が報告されている。

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。昨年度までの研究で、エラグ酸は含まれず、主成分がフラボノール配糖体であること、および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。今年度は「ユーカリ葉抽出物」からメタノール抽出物を調製し、HPLC 分析した結果、Gallic acid、Quercetin 3-*O*- β -D-glucuronide、Kaempferol 3-*O*- β -D-glucuronide が主成分であった。「ユーカリ葉抽出物」の有効成分とされる β -ジクエトン類は、少量存在することは否定できないものの、その含有量は極めて低いことが示唆されたの存在量は小さいことが判明した。

2. 苦味料

1) 苦味料の品質評価法に関する研究

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)による味の数値化・質の解析の可能性について検討した。今年度は、味の質の解析の可能性について検討した。その結果、苦味化合物の化学構造により、味センサーの応答パターンが異なることが分かった。従って、成分が未解明な苦味料の味パターンを調べることで、含有される苦味成分の化学構造をある程度推測できるものと考えられた。食品添

加物苦味料ナリンジン、イソアルファー苦味酸は、特徴的な味パターンを示した。カフェインは応答強度が低かったものの、市販試薬と既存添加物製品とで同一の味パターンを示した。食品添加物ジャマイカカシヤ抽出物の味パターンはキノリンアルカロイド系苦味化合物のパターンに類似しており、主成分であるクアシン(トリテルペン)以外にもキノリンアルカロイド系苦味物質を含有することが示唆された。

2) 苦味料の成分・品質に関する研究

昨年度の研究で、ヒキオコシ抽出物が中国産エンメイソウを基原とする可能性が示された。また、日本の生薬市場の中では、ヒキオコシ(エンメイソウ、延命草) (*Isodon japonicus*) またはクロバナヒキオコシ (*Isodon trichocarpus*) 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。そこで今年度は、既存添加物ヒキオコシ抽出物の基原植物シソ科ヒキオコシ (*Isodon japonicus* HARA)を含む日本産 *Isodon* 属植物、日本及び中国の市場でエンメイソウ(延命草)として流通する生薬について、DNA 配列解析と成分の分離・構造決定を行い、両者の成分の差異を比較検討した。その結果、市販のヒキオコシ抽出物製品は、定義に記載されているヒキオコシ (*I. japonicus*) 以外の中国産の *Isodon* 属植物を原料に製造されたと推定された。日本産ヒキオコシと中国産の同属植物とでは、主成分としてウルソール酸を共通成分とするが、ヒキオコシに特徴的な主要成分であるジテルペン誘導体に関して両者に共通成分は認められなかった。したがって、ヒキオコシ抽出物の原料として多種多様な *Isodon* 属植物が用いられる可能性が考えられ、その品質に充分注意する必要があると考えられた。

レイシ（靈芝）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、靈芝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。紫芝に含まれる苦味成分の探索を行い、炭素数 27 の lucidenic acid 型の新化合物 4 種の単離、構造決定を行なった。紫芝と赤芝の HPLC による成分分析を行い、紫芝に含まれるトリテルペンは赤芝のものとは比べ、著しい差異が認められた。これらの化合物は苦味試験の標準物質とする予定である。

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

増粘多糖類を、構成糖により(1)グルカン系多糖類、(2)ウロン酸含有多糖類、(3)硫酸化多糖類、(4)その他に類別した。昨年度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について、分子量分布と構成糖組成比を解析した。今年度はフクロノリ抽出物と精製カラギナンの糖鎖化学構造をさらに詳細に解析し、糖鎖の結合様式と硫酸基の置換位置を明らかにした。また、硫酸化多糖類であるファーセラランについても同様に詳細な解析を行った。フクロノリ抽出物は $[\rightarrow 3)\text{-}6\text{-SO}_3\text{-Gal}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}3,6\text{-AnGal}\text{-}(1\rightarrow)]$ と $[\rightarrow 3)\text{-}6\text{-SO}_3\text{-Gal}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}6\text{-SO}_3\text{-Gal}\text{-}(1\rightarrow)]$ の繰り返し構造をもつ多糖であることが明らかとなった。精製カラギナンは κ -カラギナンと κ/β -ハイブリッド型カラギナンが含まれていることが明らかとなった。ファーセラランは、KCl に対する溶解度の差を用いて可溶画分及び不溶画分に分画した。可溶画分中には多くの結合様式を持つ数種の多糖分子種が含まれていると推測された。不溶画分は κ -カラギナンもしくは類似した構造を持つ多糖であることが分かった。

ウロン酸と中性糖を含む増粘多糖類の構成糖組成分析法を検討した。増粘多糖類を

酸水解後ジエチルジチオアセタール誘導体化して GC 分析することで、構成糖の同定と定量を行い、糖組成を明らかにすることができた。また、この分析法を用いて、基原植物の異なるアラビアガム 2 製品の糖組成の違いとロットの異なるモモ樹脂 2 製品の糖組成の違いを明らかにした。この方法によって品目を互いに区別することが可能であることが示され、製品の品質評価に応用できる可能性が示唆された。

4. ガムベース

1) ガムベースの成分・品質に関する研究

昨年度は、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 TLC、LC/MS、GC/MS で解析し、各品目ごとの特徴を明らかにした。今年度は、テルペノイド系ガムベースの品目を変えて検討した。テルペノイド系ガムベースであるエレミ樹脂、ニューコウ、ベンゾインガムについて含有成分と確認試験法を検討した。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。GC/MS を用いた場合、誘導体化した試料の分析により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。以上のように、LC/MS、GC/MS ともテルペノイド系ガムベースの確認試験法として有用であることが示された。

5. 既存添加物の規格設定に向けての検討

1) 既存添加物の成分規格設定に関する調査研究

既存添加物（天然添加物）には国の規格基準設定が未設定である品目が多く残されている。国の成分規格が作成される場合、業界自主規格が国の成分規格素案になることが多い。そこで、国の成分規格を新規に設定するためには、業界自主規格の新規作

成と見直しを支援することが求められる。今後の国による既存添加物成分規格案の新規作成をめざし、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。

着色料・製造用剤 1 品目（金）、酵素 3 品目（アガラーゼ、アミノペプチダーゼ、ムラミダーゼ）の計 4 品目の成分規格を新規に作成した。30 品目の既設定規格（甘味料 1 品目、着色料 9 品目、増粘安定剤 2 品目、酵素 18 品目）を見直した。

また、食品用酵素の流通実態調査を行った。調査項目は、次の事項である。

(1) 既存添加物酵素の名称、基原に関する調査

1996 年制定の既存添加物酵素 76 品目のうち、報告のあったのは 66 品目、約 200 種類（品名と基原の組合せ）であった。流通報告のなかった 10 品目の内訳は、消除済又は消除予定の品目が 7 品目、自主規格作成予定のない品目が 3 品目であった。既存添加物酵素に関する問題点として、品名と基原についての問題点を整理した。JECFA 及び FCC はじめ海外規格の品名、基原等の実態調査を行った。

(2) 酵素活性規格の設定及び酵素活性測定法の統一に関する調査

食品添加物はその成分規格において「含量規格」とそれを定義する「定量法」の設定が要求されているが、食品添加物公定書既収載酵素では、含量規格、定量法に代わるものとしてそれぞれ「酵素活性」規格、「酵素活性測定法」が設定されている。酵素の成分規格設定で問題となる酵素活性規格と酵素活性測定法について日本食品添加物協会酵素部会の意見をまとめた結果、酵素活性規格を品目毎に設定すること、及び酵素活性測定法を一品目、一測定法に統一することは困難であるとの結論に至った。なお、欧州の酵素事業者団体である Amfep (The Association of Manufacturers and

Formulators of Enzyme Products) と日本食品添加物協会酵素部会とは共通の見解である。

(3) 微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての提案の検討

将来微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての構成、酵素の品名・基原名称の設定、及び酵素活性規格・酵素活性測定法の設定に関して、日本食品添加物協会酵素部会の基本的考え方をまとめた。

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。

3 年計画の 2 年目として、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性能の評価および味覚センサーによる苦味成分の検出については、方法論の検討に進展があった。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の規格案整備に向けて有用な基礎的知見を得られた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugimoto, N., Kuroyanagi, M., Kato, T., Sato, K., Tada, A., Yamazaki, T., Tanamoto, K.: Identification of the main constituents in sandarac resin, a natural gum base. J. Food Hyg. Soc. Japan, 47, 76-79 (2006)
- 2) 金 哲龍、多田敦子、杉本直樹、佐藤恭子、増田愛乃、山形一雄、山崎 壮、棚元憲一: 既存添加物ウルシロウの成分分析. 食品衛生学雑誌、47、167-172 (2006)
- 3) Maruyama, T., Sugimoto, N., Kuroyanagi, M., Kim, I.K., Kamakura, H., Kawasaki, T., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Tada, A., Yamazaki, T., Goda, Y., Authentication and chemical study of Isodonis Herba and Isodonis extract. J. Agric. Food Chem., submitted (2007).

2. 学会発表

- 1) 松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、島村智子、受田浩之: 各種抗酸化活性評価法による酸化防止剤の力価評価 日本農芸化学会 2007 年度大会 (2007.3)
- 2) 多田敦子、杉本直樹、濱田ひかり、小林義和、山崎 壮、棚元憲一: 味認識装置による食品添加物苦味料および関連苦味化合物の測定. 日本薬学会第 127 年会 (2007.3)
- 3) 佐藤直人、高江静、馬 超美、服部征雄: 紫芝 *Ganoderma chinense* の新規トリテルペノイド成分. 日本薬学会第 127 年会 (2007.3)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

1. 酸化防止剤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規格に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究

分担研究者 松本 清 九州大学農学研究院 教授

分担研究者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

協力研究者 島村 智子 高知大学農学部 助教授

研究要旨

酸化防止剤の品質規格の設定を目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の検証を行った。先に行った単一化合物天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価試験より、DPPH ラジカル消去活性測定 (DPPH 法)、ABTS ラジカル消去活性測定、WST-1 法によるスーパーオキシドアニオン消去活性測定がいずれも酸化防止剤評価方法として適していると判断されたことを受け、本研究では複数成分からなる天然物酸化防止剤の抗酸化能評価に対する DPPH 法の適用性を検討した。26 種類の天然物酸化防止剤の抗酸化活性を DPPH 法により測定し、2 つの研究室で求められた値を比較したところ、その TEAC に顕著な相違は認められず、両者の間には有意な直線性が認められた。また、その回帰直線の傾きは 1 に近似していた。以上のことから、複数成分からなる天然物酸化防止剤に対しても、DPPH 法が適用可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

酸化防止剤の品質規格の設定を目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の検証を行った。先に行った単一化合物天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価試験より、DPPH ラジカル消去活性測定 (DPPH 法)、ABTS ラジカル消去活性測定、WST-1 法によるスーパーオキシドアニオン消去活性測定がいずれも酸化防止剤評価方法として適していると判断されたことを受け、本研究では複数成分からなる天然物酸化防止剤の抗酸化能評価に対する DPPH 法の適用性を検討した。今回の研究では、「既存添加物名簿収載品目リスト」に収載されている天然物酸化防止剤のうち 26 種類： γ -オリザノール、コメヌカ油抽出物、フェルラ酸、カンゾウ油性抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、ルチン酵素分解物、ヤマモモ抽出物、エンジュ抽

出物、酵素処理ルチン、コメヌカ酵素分解物、単糖・アミノ酸複合物、生コーヒー豆抽出物、チャ抽出物 (4 種類)、トコトリエノール、d- α -トコフェロール、d- γ -トコフェロール、d- δ -トコフェロール、ミックストコフェロール、緑茶エキス、ブドウ種子抽出物、ルチン(抽出物)、ローズマリー抽出物(粉末状 1 種類、液状 1 種類)を用い、DPPH 法による抗酸化活性測定を行った。また、2 研究室による共同試験を行い、測定値の一致性を評価した。

B. 研究方法

(1) DPPH ラジカル消去活性測定

Choi らの方法¹⁾、および 17 年度の研究結果を参考に設定したプロトコールに基づき測定を行った。具体的な方法は以下の通りである。試料溶液

200 μ l に 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μ l、99.5%エタノールで調製した 0.2 mM DPPH 溶液 1 ml を順次添加し、室温で暗所にて正確に 30 分間反応させた。その後、517 nm の吸光度 (As) を測定した。試料溶液の代わりに水もしくは、99.5%エタノールを添加した際の吸光度をコントロール (Ac) とし、試料の阻害率 (%) を以下の式から求めた。

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Ac} - \text{As}}{\text{Ac}} \times 100$$

50%阻害を与える試料の濃度を IC₅₀ (mg/ml) とした。同様の手順で、標準物質である Trolox の IC₅₀ (mg/ml) を求めた。Trolox の IC₅₀ と試料の IC₅₀ が等価であるとみなして、各試料の DPPH ラジカル消去活性を Trolox 等価活性 (TEAC) として表した。

(2) 試料の調製

各酸化防止剤は 99.5%エタノールに溶解した。エタノール不溶性の場合は、水に溶解した。試料は 5.0 mg 以上秤量することとし、各溶媒に溶解した後、メスフラスコにて定容した。これを原液として、ピペッターにて希釈を行い、測定に供した。また、液状の酸化防止剤の希釈には 99.5%エタノールを使用した。

(3) 共同試験

2 研究室共同試験では、酸化防止剤のロット、試薬秤取の基準量、用いる計容器具の基準、ならびにデータ解析法の検討をあわせて行った。

C. 研究結果及び考察

26 種類の天然物酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性を測定した。そのうち、22 種類の天然物酸化防止剤の抗酸化活性 (TEAC) を表 1 (左欄) に示した。コメヌカ酵素分解物、単糖・アミノ酸複

合物は飽和濃度でも阻害率が 50%に達さず、その IC₅₀ を求めることができなかった。また、 γ -オリザノール、ローズマリー抽出物 (液状) は反応溶液に白濁を生じた。従って、これらの場合は例外的に 99.5%エタノールに試料を添加する系を設定した。この系の吸光度、すなわち白濁の程度を示す吸光度を差し引くことによって IC₅₀ を求めることが可能となった。表 1 (左欄) に示したように、複数成分からなる天然物酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性はチャ抽出物 (サンフェノン 90S) が最も強く、以下ブドウ種子抽出物、チャ抽出物 (茶抽出物-70)、チャ抽出物 (サンフード 100: lot 05091)、チャ抽出物 (サンフー100: lot 05041)、ヤマモモ抽出物、緑茶エキス、ルチン酵素分解物、エンジュ抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、ルチン (抽出物)、酵素処理ルチン抽出物、フェルラ酸、トコリエノール、d- γ -トコフェロール、d- δ -トコフェロール、生コーヒー豆抽出物、コメヌカ油抽出物、d- α -トコフェロール、ミックストコフェロール、ローズマリー抽出物 (粉末状)、 γ -オリザノールの順であった。また、表 1 には示していないが、液状の酸化防止剤であるローズマリー抽出物は 980 倍希釈試料に、カンゾウ油性抽出物は 423 倍希釈試料に 50%阻害が認められた。

続いて、2 研究室 (K 大学、Q 大学) の測定結果の比較を行った。K 大学で求められた TEAC を表 1 (右欄) に示した。その結果、両大学で求めた TEAC に大きな相違はなく、活性の高低の傾向はほぼ同じであった。しかし、液状試料に関しては活性の求め方が違っていたことから、比較を行うことができなかった。今後、より厳密なプロトコールを作成して評価方法を統一する必要があると考えられた。図 1 に両研究室で求めた TEAC の相関を示した。両者の間の相関係数は 0.980 (n=20) となり、有意な直線性が認められた。また、その回帰式は $y = 1.1443x + 0.0291$ であり、回帰直線の

傾きは 1.0 に近似していた。以上のことから、DPPH 法は複数成分からなる天然物酸化防止剤の抗酸化活性にも適用可能であり、複数研究室での測定においても再現性に優れた結果を得ることが可能であった。今後、単一化合物からなる天然物酸化防止剤の場合と同様に、各々の酸化防止剤について厳密な試料調製手順を定めることにより、より測定の精度を上げることが可能であると推察された。

D. 結論

本研究では、単一化合物酸化防止剤の抗酸化活性評価に対して有用であると判断された DPPH 法を複数成分からなる天然物酸化防止剤 (26 種類) の抗酸化活性評価に適用し、その有用性を検討した。測定の結果より、26 種類中 24 種類の酸化防止剤において、 IC_{50} を求めることが可能で

あった。また、2 研究室で求められた TEAC の間に有意な相関が認められた。従って、DPPH 法は複数成分からなる天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に対しても適用可能であると判断した。

E. 研究発表

(1) 論文発表

なし

(2) 学会発表

松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、島村智子、受田浩之：各種抗酸化活性評価法による酸化防止剤の力価評価

日本農芸化学会 2007 年度大会 (2007.3)

参考文献

- 1) H-S. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4156-4161 (2000).

表1 天然物酸化防止剤の示す DPPH 消去活性

酸化防止剤	TEAC	
	K大学	Q大学
チャ抽出物 (サンフェノン90S)	2.27	2.85
ブドウ種子抽出物	1.93	2.09
チャ抽出物 (茶抽出物-70)	1.92	2.44
チャ抽出物 (lot 05091)	1.54	1.60
チャ抽出物 (lot 05041)	1.38	1.69
ヤマモモ抽出物	1.32	1.37
緑茶エキス	1.09	1.02
ルチン酵素分解物	1.03	-
エンジュ抽出物	0.965	0.903
酵素処理イソクエルシトリン	0.826	0.950
ルチン (抽出物)	0.813	0.979
酵素処理ルチン (抽出物)	0.800	1.090
フェルラ酸	0.734	0.901
トコリエロール	0.552	0.734
d- γ -トコフェロール	0.521	0.694
d- δ -トコフェロール	0.466	0.549
生コーヒー豆抽出物	0.465	0.528
コメヌカ油抽出物	0.458	0.597
d- α -トコフェロール	0.438	0.609
ミックストコフェロール	0.356	0.475
ローズマリー抽出物 (粉末状)	0.329	0.452
γ -オリザノール	0.159	-

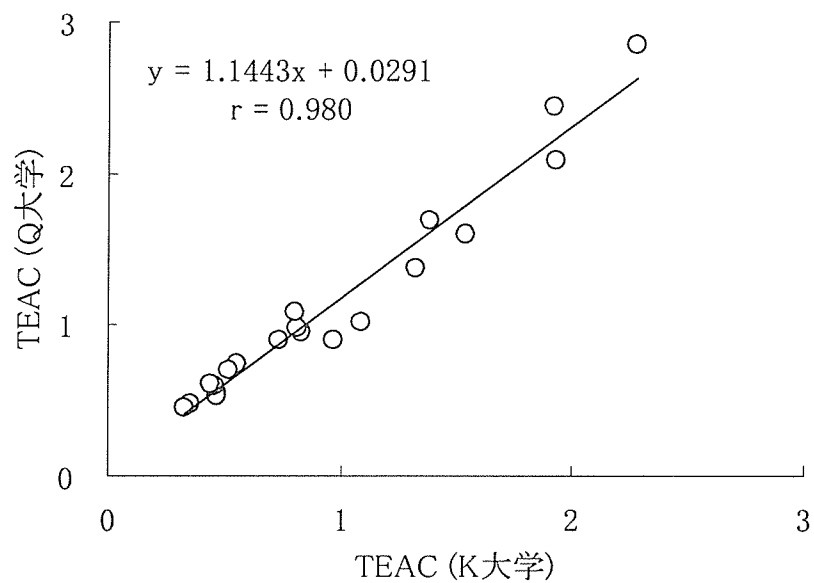


図 1 2 研究室において DPPH 法により求めた各酸化防止剤の TEAC の相関

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規格に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究

分担研究者 松本 清 九州大学農学研究院 教授

協力研究者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

協力研究者 松藤 寛 日本大学生物資源学部 講師

研究要旨

食品添加物である酸化防止剤の品質規格の設定を目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の検証を行った。「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中から単一の成分からなる添加物（カテキン、ケセルチン、セサモール、フェルラ酸、没食子酸、モリン、エラグ酸、*d*・ α -トコフェロール、*d*・ δ -トコフェロール）を選び出し、その DPPH ラジカル消去活性測定、ABTS ラジカル消去活性測定、スーパーオキシドアニオン消去活性（SOSA）測定を行い、各評価系の特徴について調べるとともに、3 研究室による共同試験を行い、測定値の一致性を評価した。その結果、3 つの評価系における各化合物の活性の高低の傾向は、概して一致しており、3 研究室間でほぼ同じ傾向であることが明らかとなった。また、天然物酸化防止剤 29 種について、上記 3 評価系を適用しその抗酸化性を評価した。その結果、これらの測定法はいずれも酸化防止剤評価方法として適しているものと考えられた。

A. 研究目的

食品への用途が認められている酸化防止剤の品質規格の設定を目的とし、その基礎となる抗酸化活性評価法の検証を行った。今回の研究では、「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中で平成 17 年度の結果から比較的抗酸化活性が高く、複数の測定法で一致性が高いと思われる単一化合物からなる添加物（カテキン、ケルセチン、セサモール、フェルラ酸、没食子酸、モリン、エラグ酸、*d*・ α -トコフェロール、*d*・ δ -トコフェロール）を選び出し、その DPPH ラジカル消去活性測定、ABTS ラジカル消去活性及びスーパーオキシドアニオン消去活性（SOSA）測定を行い、各評価系の

特徴について調べるとともに、3 研究室による共同試験を行い、測定値の一致性を評価した。さらに、天然物酸化防止剤について、上記 3 測定法による評価を行った。

B. 研究方法

(1) DPPH ラジカル消去活性測定

Choi らの方法を一部変更して行った¹⁾。試験管に試料溶液 200 μ l, 100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800 μ l, 0.20 mM DPPH エタノール溶液 1 ml を添加し、10 秒間激しく攪拌した後、暗所で常温にて 30 分間静置した。30 分後、反応溶液の 517 nm における吸光度を測定した。試料溶液の代わりにエタノ