

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 19 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
	大塚	英昭	広島大学大学院
	服部	征雄	富山大学
	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
	天倉	吉章	松山大学
	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 20 年 (2008 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. 酸化防止剤の品質評価法に関する研究……………11

分担研究者：受田 浩之

協力研究者：松本 清

協力研究者：島村 智子

- 1.2. 天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究……………19

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. チャ抽出物の抗酸化成分に関する研究……………25

分担研究者：受田 浩之

協力研究者：島村 智子

- 1.4. 酸化防止剤ローズマリー抽出物に含まれる活性成分の同定……………31

協力研究者：松藤 寛

分担研究者：松本 清

分担研究者：受田 浩之

- 1.5. 酸化防止剤等の品質評価法に関する研究

－天然酸化防止剤 γ -オリザノールのNMRを用いた定量法に関する研究…41

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分析法と評価法に関する研究……………57

分担研究者：永津 明人

- 2.2. カンゾウ油性抽出物の基原植物の同定および成分研究……………63

分担研究者：尹 永淑

- 2.3. 酸化防止剤ユーカリ葉抽出物の成分・品質に関する研究……………69

分担研究者：天倉 吉章

協力研究者：好村 守生

協力研究者：吉田 隆志

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	87
	分担研究者：多田 敦子	
	協力研究者：杉本 直樹	
	協力研究者：小林 義和	
	協力研究者：濱田 ひかり	
	協力研究者：服部 征雄	
	協力研究者：大塚 英昭	
4.	苦味料の成分・品質に関する研究	
4.1.	既存添加物ニガヨモギの成分研究	101
	分担研究者：黒柳 正典	
	協力研究者：杉本 直樹	
	協力研究者：多田 敦子	
	協力研究者：淵野 裕之	
4.2.	靈芝苦味成分に関する研究	109
	分担研究者：服部 征雄	
4.3.	苦味料ヒメマツタケ（アガリクス）抽出物の成分・品質に関する研究	117
	分担研究者：大塚 英昭	
	協力研究者：松浪 勝義	
	協力研究者：末吉 恵津子	
4.4.	既存添加物苦味料ジャマイカカシヤ抽出物中の副成分の分析	123
	分担研究者：多田 敦子	
	協力研究者：杉本 直樹	
	協力研究者：尹 永淑	
5.	増粘多糖類の成分と品質に関する研究	
5.1.	グァーガムの成分に関する研究	133
5.2.	カシアガムの成分に関する研究	139
5.3.	カロブビーンガムの成分に関する研究	145
	分担研究者：李 貞範	
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	151
	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.	既存添加物の規格化に関する調査研究（要旨）	163
	協力研究者：日本食品添加物協会	
7.2.	既存添加物の規格化に関する調査研究（全文）	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	169
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	171

分冊 その2 (別冊)

平成19年度 既存添加物の成分と品質評価に関する研究

— 既存添加物の規格化に関する研究 —

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(銀、シコン色素)	1
1-2. 増粘安定剤(モモ樹脂)	8
1-3. 酵素(フィシン)	12
1-4. 調味料(塩水湖水低塩化ナトリウム液)	18
1-5. 製造用剤・ミネラル(オゾン他 計17品目)	26
2. 既策定規格の見直し品目	
2-1. 着色料(10品目)	38
2-2. 保存料・日持向上剤(4品目)	61
2-3. 増粘安定剤(1品目)	95
2-4. 酸化防止剤(2品目)	100
2-5. 酵素(7品目)	110
2-6. 酸味料(1品目)	152
2-7. 調味料(2品目)	159

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

既存添加物の成分規格の整備が遅れている。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て、品質評価の指標となる成分を明らかにし、既存添加物製品の品質や機能特性を評価する方法を開発することをめざした。

平成 19 年度（3 年計画の 3 年目）は、以下の研究を実施し、含有成分の解明が遅れている既存添加物品目の成分情報を得た。また、品質評価のための新たな分析手法の原型を作成できた。

酸化防止剤

1) 抗酸化力価測定法の開発：

3 種類の抗酸化力価測定法の標準試験操作法を天然酸化防止剤に適用し、検証した。また、2 種類の抗酸化剤を混合したときの併用効果は相加的であると考えられた。

2) 複数成分からなる天然酸化防止剤の成分解析と成分分析法の開発：

チャ抽出物およびローズマリー抽出物に含まれる抗酸化活性を担う成分を明らかにした。ブドウ種子抽出物中のプロアントシアニジン画分の抗酸化活性を測定した。 γ -オリザノールの定量法として定量 NMR 法の有用性を示した。

苦味料

1) 味覚センサーの利用に関する基礎的検討：

味覚センサーの応答が低い苦味化合物は、一部の化合物を除いてはヒトの舌での感度も低いことが分かった。また、味覚センサーの苦味項目値の算出式を再検討し、従来は味覚センサーで測定されなかった物質も、新たな苦味強度予測式を設定することで苦味強度を示せる可能性が得られた。レイシ抽出物、ヒメマツタケ抽出物を用い、レーダーグラフを用いた味パターンの測定により、抽出物（混合物）中で味覚センサーの応答に寄与する成分を判別できることが分かった。

2) 苦味料の成分研究：

ニガヨモギ抽出物、レイシ抽出物、ヒメマツタケ抽出物の成分解析を行った。ジャマイカカシヤ抽出物の国内流通製品は、アメリカニガキから調製した抽出物と成分が類似していた。

増粘多糖類

ガラクトースを含む増粘多糖類としてグァーガム、カシアガム、カロブビーンガムを対象とし、その糖鎖化学構造を解析した。

ガムベース

テルペノイドが主成分とされるマスタック、ダンマル樹脂、ニューコウ、ベンゾインガム、エレミ樹脂、ロシン、コーパル樹脂について、メタノール抽出物の UPLC/MS 分析が確認試験法として有用であることを示した。

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
助教
天倉 吉章 松山大学薬学部 准教授
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
服部 征雄 富山大学和漢医薬学総合研
究所 教授
大塚 英昭 広島大学大学院医歯薬学総
合研究科 教授
李 貞範 富山大学薬学部 助教
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
島村 智子 高知大学農学部 准教授
吉田 隆志 松山大学薬学部 教授
好村 守生 松山大学薬学部 助教
小林 義和 (株) インテリジェントセ
ンサーテクノロジー
濱田 ひかり (株) インテリジェントセ
ンサーテクノロジー
石附 京子 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部
淵野 裕之 (独) 医薬基盤研究所
松波 勝義 広島大学大学院医歯薬学総
合研究科 講師
末吉 恵津子 広島大学大学院医歯薬学総
合研究科 助教
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安全性と品質を確保するために成分規格策定に向けて積極的に取り組んできたが、既存添加物の多くで成分規格が依然として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なまま残されており、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。

そこで、本研究では平成17～19年度の3年間で、既存添加物のうち、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、増粘安定剤、ガムベースに重点を置き、添加物の効果の特徴付ける成分を、添加物の有効性(活性)を測定する手法(活性測定法)を組み合わせながら解析し、品質評価の指標となる成分を明らかにすることをめざした。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の開発をめざした。複数成分の混合物である添加物のプロファイル解析と品目確認に有用なGC/MSやLC/MSによる成分分析法の開発

も行った。さらに、既存添加物の規格設定に向けての検討を行った。

品目群ごとに以下の研究目標を立てた。

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
うえ、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。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。

B. 研究方法

1. 試料

既存添加物製品は、日本食品添加物協会
から提供を受けた。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

2.1. 食品添加物の抗酸化力価測定法の開発

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
測定）に基づく抗酸化力価測定法の標準試
験操作法を複数成分からなる天然酸化防止
剤に適用して、複数機関で適用性を評価・
検証した。また、DPPH ラジカル消去活性
測定法を用いて、2種類の抗酸化剤を混合
したときの抗酸化性の効果（相乗効果、相

加効果、相殺効果）を調べた。

2.2. 複数成分からなる天然酸化防止剤の 成分解析と成分分析法の開発

チャ抽出物およびローズマリー抽出物に
含まれる抗酸化活性成分の同定と成分ごと
の活性測定を行った。γ-オリザノール（主
成分：フェルラ酸エステル）の定量法とし
て定量 NMR 法を検討した。カンゾウ油性
抽出物市場流通製品の含有成分と原料植物
種との関連およびユーカリ葉抽出物の市場
流通製品と原料植物の含有成分解析を行っ
た。

3. 苦味料に関する研究

3.1. 味覚センサーの利用に関する基礎的 検討

各種苦味化合物および既存添加物苦味料
の小規模官能試験を行い、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）による苦味強度との比較を行っ
た。また、既存添加物苦味料レイシ抽出物、
ヒメマツタケ抽出物を用い、単離した主要
含有成分と抽出物全体とを味覚センサーで
解析した。

3.2. 苦味料の成分研究

レイシ抽出物、ヒメマツタケ（アガリク
ス）抽出物、ニガヨモギ抽出物の成分解析
を行った。また、既存添加物苦味料ジャマ
イカカシア抽出物の国内流通製品につい
て、主成分のクアシンおよびネオクアシン
に加え、他の副成分を解析した。製品の基
原を考察するため、本品目の基原として記
載されているジャマイカカシアと同科の
アメリカニガキおよびニガキから抽出物を
調製し、添加物製品で同定した副成分の含
量を比較した。

4. 増粘多糖類に関する研究

ガラクトースを含む増粘多糖類としてグ
アーガム、カロブブーンガム、カシアガム

を対象とし、その糖鎖化学構造を解析した。

5. ガムベースに関する研究

トリテルペノイドが主成分とされているマスチック、ダンマル樹脂、ニューコウ、ベンゾインガム、エレミ樹脂の5品目とジテルペノイドが主成分とされているロシン、コーパル樹脂の2品目について、メタノール抽出物をUPLC/MSで分析し、この手法が確認試験として使用可能であるかどうか検討した。

6. 業界自主規格の作成

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

本研究では、「天然由来苦味料の評価法に関する研究」において各種苦味化合物および既存添加物苦味料の小規模官能試験を行ったが、厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従って実施した。それ以外では、実験動物およびヒトの試料を用いる研究はなかったので、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. 酸化防止剤に関する研究

1.1. 食品添加物の抗酸化力価測定法の開発

DPPH ラジカル消去活性測定法、ABTS ラジカル消去活性測定法、スーパーオキシドアニオン消去活性測定法に基づく抗酸化力価測定法の標準試験操作法を複数成分からなる天然酸化防止剤に適用して、複数機関で適用性を評価・検証した。また、DPPH ラジカル消去活性法を用いて、2種類の抗酸化剤を混合したときの抗酸化性の効果（相乗効果、相加効果、相殺効果）を調べた。その結果、一部の化合物間では微弱な相乗効果、相殺効果が認められたものの、全体として、抗酸化剤の併用効果は相加的

であると考えられた。

◎3年間の成果として、DPPH ラジカル消去活性測定法、ABTS ラジカル消去活性測定法、スーパーオキシドアニオン消去活性測定法に基づく食品添加物の抗酸化力価測定法の原型を作ることができた。抗酸化活性標準操作法の室間再現性を確立することが今後の課題である。

1.2. 複数成分からなる天然酸化防止剤の成分解析と成分分析法の開発

チャ抽出物およびローズマリー抽出物に含まれる抗酸化活性成分の同定と成分ごとの活性測定を行った。ブドウ種子抽出物（主成分：プロアントシアニジン）中のプロアントシアニジン画分の抗酸化活性を測定した。γ-オリザノール（主成分：フェルラ酸エステル）の定量法として定量NMR法の有用性を示した。これら4品目については、主要成分の分析法を開発し、品質評価の指標となる抗酸化作用を担う主要成分を明らかにできた。

そのほかに、カンゾウ油性抽出物市場流通製品の含有成分と原料植物種との関連を調べた。*Glycyrrhiza glabra*を原料とした製品と*Glycyrrhiza inflata*を原料とした製品は主成分が異なり、TLC及びHPLCで両者を区別できることを確認した。また、ユーカリ葉抽出物の市場流通製品と原料植物の含有成分解析を行った。既存添加物名簿ではユーカリ葉抽出物の主成分はβ-ジケトンであると記載されているが、ユーカリ（*Eucalyptus globulus*）の葉にはβ-ジケトン類が含まれていたものの、分析対象とした市場流通製品からは検出されなかった。ユーカリ葉からの抽出法により、抽出物中の含有成分も抗酸化活性も著しく異なることが確認された。

◎3年間の成果として、未解明成分の解析、添加物製品に含まれる抗酸化活性成分の同定と活性測定、および抗酸化活性成分のHPLC分析法の開発ができた。今後、成分規格試験法に応用することが期待できる。

また、既存添加物の成分規格項目である「定義」を検討するのに重要な情報を得ることができた。

2. 苦味料に関する研究

2.1. 味覚センサーの利用に関する基礎的検討

各種苦味化合物および既存添加物苦味料の小規模官能試験を行い、味覚センサーによる苦味強度との比較を行った。その結果、味覚センサーの応答が低い化合物のうち、一部は実際のヒトの舌での感度も低いことが分かった。また、味覚センサーの応答値から算出する既存の味覚項目値ではヒトが感じる苦味の強さが検出されにくく、従来は味覚センサーで測定されてこなかった物質も、新たな苦味強度予測式を設定することで苦味強度を示せる可能性が示唆された。

また、既存添加物苦味料レイシ抽出物、ヒメマツタケ抽出物を用い、単離した主要含有成分と抽出物全体とを味覚センサーで解析した。レーダーグラフを用いた味パターンの検出により、味覚センサーの応答に寄与する成分が明らかになった。

◎3年間の成果として、味覚センサーの応答パターンから含有される苦味成分の基本化学構造をある程度推測できることが示唆された。また、既存の味覚項目値では苦味強度が検出されにくい物質も含めて、味覚センサーの応答値から算出する新たな苦味強度予測式を設定することでヒトが感じる苦みの強さを示せる可能性が得られた。

2.2. 苦味料の成分研究

ニガヨモギ抽出物、レイシ抽出物、ヒメマツタケ（アガリクス）抽出物の成分解析を行った。ニガヨモギからは、ニガヨモギに特徴的な成分である数種のセスキテルペン2量体を分離すると共に、新規のセコ型セスキテルペン及びトリテルペンを分離した。レイシからは、新規ラノスタン型トリテルペンを含む複数の化合物を単離した。ヒメマツタケからは、6種類の新規化合物10数種類の化合物を単離した。

レイシとヒメマツタケから抽出単離した主要成分は味覚センサーの解析にも用いた。

既存添加物苦味料ジャマイカカシヤ抽出物の国内流通製品について、主成分のクアシンおよびネオクアシンに加え、他の副成分を解析した。製品の基原を考察するため、本品目の基原として記載されているジャマイカカシヤと同科のアメリカニガキおよびニガキから抽出物を調製し、添加物製品で同定した副成分の含量を比較した。その結果、既存添加物ジャマイカカシヤ抽出物の国内流通製品は、アメリカニガキから調製した抽出物と成分が類似していた。関連情報も考慮すると、国内流通製品の基原植物は、アメリカニガキである可能性が考えられた。

◎3年間の成果として、ヒキオコシ抽出物、ニガヨモギ抽出物、ジャマイカカシヤ抽出物、レイシ抽出物、ヒメマツタケ（アガリクス）抽出物の成分解析と基原の考察を行った。苦味料の品質評価の指標成分となり得る化合物候補を見出すことができた。また、ヒキオコシ抽出物とジャマイカカシヤ抽出物においては、市場流通品の抽出原料が本品目の基原と記載されている植物種とは異なる種であることが示唆された。

3. 増粘多糖類に関する研究

ガラクトースを含む増粘多糖類としてグアーガム、カロブبینガム、カシアガムを対象とし、その糖鎖化学構造を解析した。増粘多糖類の分子量、構成糖組成比、糖の結合様式など、基本的化学構造情報が得られた。

◎3年間の成果として、硫酸化多糖類を含む増粘多糖類としてカラギーナン、ファーセララン、フクロノリ抽出物を、ガラクトースを含む増粘多糖類としてグアーガム、カロブبینガム、カシアガムを対象とし、その糖鎖化学構造を解析した。増粘多糖類の分子量、構成糖組成比、糖の結合様式など、基本的化学構造情報が得られた。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、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。この方法が構成糖の組成分析試験法に利用できることを示した。

4. ガムベースに関する研究

トリテルペノイドが主成分とされているマスチック、ダンマル樹脂、ニューコウ、ベンゾインガム、エレミ樹脂の5品目とジテルペノイドが主成分とされているロシン、コーパル樹脂の2品目について、メタノール抽出物をUPLC/MSで分析し、この手法が確認試験として使用可能であるかどうか検討した。従来のLC/MSと比較してシャープなクロマトグラムピークが得られ、品目間で明らかな違いが認められた。確認試験における指標成分となり得るテルペノイド系化合物を特定できたことで、UPLC/MSが確認試験法として有用であることが示された。

◎3年間の成果として、テルペノイドを主体とする品目とワックスを主体とする品目に分けて、その成分解析と分析法の開発を行った。簡便な確認試験として利用できるTLC分析法、および含有成分確認のためのGC/MS分析法とLC/MS分析法を開発した。

5. 業界自主規格の作成

新たに、着色料2品目、増粘安定剤1品目、酵素1品目、調味料1品目、製造用剤・ミネラル17品目、計22品目の既存添加物について自主規格の策定を行った。また、26品目について見直し改定を行った。なお、流通実態は確認できるものの、製造業者の特定が困難である場合や、当該製造業者の協力が得られない場合が多いことから、「参考規格」の概念を導入した。参考規格は、

関連する公定規格等を基に作成した規格であり、今後製造会社等が自社規格を設定して品質管理を行う際の参考に資するための規格と位置づけた。

◎3年間の成果として、35品目の既存添加物の自主規格を新規に策定し、のべ57品目の自主規格見直しを行った。また、食品用酵素の流通実態調査を行い、既存添加物酵素の名称と基原に関する調査、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、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った。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もめざした。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した。

本研究成果として、含有成分の解明が遅れている既存添加物品目の成分情報と品質評価のための新たな分析手法の原型を提供できたと考える。これらの研究成果が既存添加物の業界自主規格作成・改善を誘導し、それらをさらに国の成分規格原案として整備していくことを期待する。

本研究の個別成果の活用としては、
(1) 酸化防止剤に関する研究では、食品添加物の抗酸化力価測定法の原型を作ることができ、成分規格試験法になり得るめどがついた。そこで、我々はさらに研究を進め、今後3年間で天然酸化防止剤の成分規格試験法に利用できる室間再現性のある抗酸化活性標準操作法を確立する予定である。
(2) 苦味料に関する研究では、様々な苦味化合物に苦味センサーが利用可能であることを示す基礎データを集め、抽出物中の含有苦味成分の解析に味覚センサーが利用で

きることを示すことができた。今後は、味覚センサーとヒトによる官能検査を組み合わせた詳細な解析に基づく、味覚センサーの苦味への応用開発研究が望まれるので、これまで共同研究を行ってきた味覚センサー企業を交えて今後の研究展開を検討したい。また、ヒキオコシ抽出物、ニガヨモギ抽出物、ジャマイカカシア抽出物、レイシ抽出物、ヒメマツタケ（アガリクス）抽出物の成分解析と基原の考察を行ったが、今回の研究成果を苦味料の成分規格を新規作成する際の基礎情報として利用する予定である。

(3) 増粘安定剤に関する研究では、硫酸化多糖類を含む増粘多糖類とガラクトースを含む増粘多糖類に関する基本的化学構造情報が得られた。ウロン酸を含む増粘多糖類の解析が残る課題であるが、別途研究を進めたい。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結果、糖組成の違いにより品目間の区別ができ、この構成糖組成分析試験法が成分規格試験法に利用できることを確認した。これらの成果を、増粘多糖類の成分規格の確認試験法や本質記載情報の作成・改善に反映させたい。

(4) ガムベースに関する研究では、テルペノイドを主体とする品目とワックスを主体とする品目に分けて成分解析と分析法の開発を行い、簡便な確認試験として利用できるTLC分析法、および含有成分確認のためのGC/MS分析法とLC/MS分析法を開発した。これらは成分規格試験法の原型となり得ると期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugimoto N, Koike R, Furusho N, Tanno M, Yomota C, Sato K, Yamazaki T, Tanamoto K. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. Food Additives and Contaminants 24: 799-806 (2007).
- 2) Maruyama T, Sugimoto N, Kuroyanagi M, Kim IK, Kamakura H, Kawasaki T, Fujita M, Shimada H, Yamamoto Y, Tada A, Goda Y. Authentication and chemical study of Isodonis Herba and Isodonis extracts. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 55: 1626-1630 (2007).
- 3) Uekusa Y, Sugimoto N, Yun YS, Sato K, Kunugi A, Yamazaki T, Tanamoto K. Neocrocin A: a novel crocetin glycoside with a unique system for binding sugars isolated from gardenia yellow. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 55: 1643-1646 (2007).
- 4) 杉本直樹, 多田敦子, 山崎壮, 棚元憲一. 天然保存料カラワヨモギ抽出物の有効成分の確認. 食品衛生学雑誌 48: 106-111 (2007).
- 5) 杉本直樹, 多田敦子, 黒柳正典, 米田祐子, 尹永淑, 功刀彰, 佐藤恭子, 山崎壮, 棚元憲一. グレープフルーツ種子抽出物および配合製品中の合成殺菌剤の調査. 食品衛生学雑誌 49: 56-62 (2008).
- 6) 多田敦子, 増田愛乃, 杉本直樹, 山形一雄, 山崎壮, 棚元憲一: 既存添加物エステル系ガムベースの成分分析. 食

- 品衛生学雑誌, 48, 179-185 (2007)
- 7) 島村智子、松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、松藤寛、松井利郎、松本清、受田浩之：酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験、日本食品科学工学会誌、54 (11), 482-487 (2007)
 - 8) El-Dine R. S., El-Halawany A. M., Nakamura N., Ma C., Hattori M.: New lanostane triterpene lactones from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum* (Fr.) C. F. Baker. Chem. Pharm. Bull., 56: 642-646 (2008).
 - 9) El-Dine R. S., El-Halawany A. M., Ma C., Hattori M.: Anti-HIV protease active triterpenes from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*. J. Nat. Prod., in press (2008).
2. 学会発表
- 1) 多田敦子、杉本直樹、秋山卓美、山崎壮、棚元憲一、尹永淑、麻野間正晴：既存添加物ジャマイカカシア抽出物中の副成分の分析、日本食品衛生学会第94回学術講演会、静岡 (2007.10)
 - 2) 秋山卓美、山崎壮、棚元憲一、ジエチルジチオアセタール化法による増粘多糖類構成糖の分析、日本食品衛生学会第94回学術講演会、静岡 (2007.10)
 - 3) 石附京子、多田敦子、山崎壮、棚元憲一：GC/MSによるエステル系ガムベース確認分析法の検討、日本食品衛生学会第94回学術講演会、静岡 (2007.10)
 - 4) 秋山卓美、山崎壮、棚元憲一：既存添加物名簿収載の樹脂由来ガムベースの成分・品質に関する研究。第44回全国衛生化学技術協議会年会、津 (2007.11)
 - 5) 多田敦子、古庄紀子、杉本直樹、佐藤恭子、山崎壮、棚元憲一：炭化水素系ワックスの成分比較。第44回全国衛生化学技術協議会年会、津 (2007.11)
 - 6) 松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、松藤寛、松井利郎、松本清、島村智子、受田浩之：酸化防止剤の力価に対する各種抗酸化活性測定法の適用について、日本食品科学工学会第54回大会、福岡 (2007.9)
 - 7) 黒柳正典、佐藤さゆり、杉本直樹、佐藤恭子、山崎壮；苦味料ヒキオコシ抽出物および中国産ヒキオコシの成分、第51回香料・テルペンおよび精油に関する討論会、長浜、2007年
 - 8) Salah El Dine R., El-Halawany A. M., Ma C. M., and Hattori M.: Anti-HIV lanostane triterpenes from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum* (Fr.) C. F. Baker. 日本生薬学会第54回年会、名古屋 (2007.9)
 - 9) 上口有美、松浪勝義、大塚英昭：アガリクス (*Agaricus blazei* Murril) の成分研究 (第2報) 日本薬学会年会第128年会、横浜 (2008.3)
 - 10) 好村守生、天倉吉章、徳原美恵、吉田隆志：Eucalyptus globulus のポリフェノール成分。日本薬学会第128年会、横浜 (2008.3)
 - 11) 杉本直樹、古庄紀子、建部千絵、多田敦子、末松孝子、内海博明、佐藤恭子、山崎 壮、棚元憲一：核磁気共鳴に基づく食品添加物の新規定量法の開発、日本食品化学学会第14回学術大会、西宮 (2008.5) [発表予定]
 - 12) 多田敦子、杉本直樹、山崎壮、棚元憲一、濱田ひかり、小林義和、服部征雄、大塚英昭、味認識装置による既存添加物苦味料および関連化合物評価法の検討、日本食品化学学会第14回学術大会、西宮 (2008.5) [発表予定]

- 13) 松藤 寛、千野 誠、受田浩之、松本清、山形一雄：天然酸化防止剤ローズマリー抽出物中の活性成分について
第 14 回日本食品化学学会学術大会、西宮 (2008.5) [発表予定]
- 14) 島村智子、平山大剛、杉本直樹、山崎壯、松井利郎、松本清、受田浩之：酸化防止剤の力価評価に対する各種抗酸化活性評価法の適用性 -天然物由来酸化防止剤について-、日本食品科学工学会第 55 回大会、京都 (2008.9) [発表予定]

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評価に関する研究

平成19年度分担研究報告書

酸化防止剤の品質評価法に関する研究

分担研究者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

協力研究者 松本 清 九州大学農学研究院 教授

協力研究者 島村 智子 高知大学農学部 准教授

研究要旨

既存添加物に分類される酸化防止剤の抗酸化活性に基づく品質規格策定を目的とし、汎用性の高い抗酸化活性評価法である DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法の酸化防止剤評価に対する適用性を検討した。26 種類の酸化防止剤を試料とし、DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法により 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求めた。2 研究室における共同試験では、試薬秤取量、溶液調製操作に用いる器具の種類、データ解析方法を全て指定し、同一プロトコルに従って行った。測定の結果、DPPH 法では 21 種類、ABTS 法では 21 種類、WST-1 法では 17 種類の酸化防止剤の IC_{50} を求めることが可能であった。共同試験結果の回帰分析を行ったところ、全測定法において 2 研究室で得られた結果の間に有意な相関が認められた ($r = 0.990-0.992$)。また、回帰式の傾きは DPPH 法で 1.00、ABTS 法で 1.11、WST-1 法で 1.03 であった。このことから、DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法は共同試験においてはほぼ同一の結果を与えることが判明した。以上の結果より、今回測定に用いた 3 種類の方法は酸化防止剤の力価評価に適用可能であると判断した。

A. 研究目的

現在、日本国内で使用されている酸化防止剤は、合成添加物と既存添加物に大別される。合成添加物は、成分含量または組成に基づく規格基準が設定されており、その有効性が確認されている。一方、既存添加物は、従来から使用されている天然添加物が経過措置的に使用を認可されているもので、天然由来の複雑な混合物である品目も多いことから、有効成分の特定が困難であり、成分含量・組成を指標とした規格基準の設定が遅れている。これらについては、将来、規格基準を設定することを目的として、成分組成の確認、有効成分の同定、及び定量法の開発を行っているが、現状の機器分析では不

可能である場合も多い。従って、成分組成に基づいた規格が未だ設定できていない既存添加物に対しては、一定の品質を確保するために、新たな評価法を規格基準法として適用する必要がある。

本研究では、既存添加物の抗酸化活性評価の公定法の候補として (1) 過去の研究において使用されてきた実績がある、(2) 短時間での測定が可能である、(3) 特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法であることを条件とし、ラジカル消去活性測定法の中から DPPH 法と ABTS 法を、活性酸素種消去活性測定法の中から WST-1 法を選出した。これまで、

平成17年度と18年度の本事業の研究において、上記の3種類の測定法が単一化合物からなる酸化防止剤の抗酸化活性評価に適用可能であることを明らかとしてきた。

今年度は、複数成分からなる天然酸化防止剤(26種類)；チャ抽出物(4種類)、緑茶エキス、ミックストコフェロール、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、トコトリエノール、カンゾウ油性抽出物、ブドウ種子抽出物、単糖・アミノ酸複合物、生コーヒー豆抽出物、ローズマリー抽出物(2種類)、コメヌカ酵素分解物、コメヌカ油抽出物、 γ -オリザノール、フェルラ酸、ヤマモモ抽出物、エンジュ抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、ルチン酵素分解物、ルチン、酵素処理ルチンの抗酸化活性をDPPH法、ABTS法、WST-1法で測定し、2研究室における共同試験で得られた結果をもとに公定法としての利用に対する適用性を検討した。

B. 研究方法

(1) DPPH法

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。試料溶液のかわりに 99.5%エタノール、あるいは水を添加した際の吸光度をコントロール (Ac) として、試料の阻害率 (%) を以下の式で求めた。また、50%阻害を与える試料溶液の濃度を IC₅₀ とした。標準物質として用いた Trolox も同様の方法で IC₅₀ を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

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) で評価した。

(2) ABTS法

7 mM ABTS 溶液 5 ml に 140 mM ペルオキシ二硫酸カリウム 88 μ l を加えた後、室温暗所で 12-16 時間反応させた。その後、734 nm における吸光度が 0.7 \pm 0.02 になるように 99.5%エタノールで希釈し、これを ABTS^{•+} working solution とした。この ABTS^{•+} working solution 1 ml に対して、10 μ l の試料溶液を添加し、10 秒間攪拌した。その後、30°C でインキュベーションを行い、試料溶液の添加から正確に 4 分後に 734 nm における吸光度 (As) を測定した。試料溶液のかわりに、99.5%エタノール、あるいは水を添加した際の吸光度をコントロール (Ac) として、試料の阻害率 (%) を以下の式で求めた。また、50%阻害を与える試料溶液の濃度を IC₅₀ とした。標準物質として用いた Trolox も同様の方法で IC₅₀ を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

Trolox の IC₅₀ と試料の IC₅₀ が等価であるとみなして、各試料の ABTS ラジカル消去活性を Trolox 等価活性 (TEAC) で評価した。

(3) WST-1法

市販の SOD Assay-Kit WST (同仁化学研究所製) を使用し、添付マニュアルを一部改変して測定を行った。96 穴マイクロプレートに試料溶液 20 μ l、WST working solution 200 μ l、Enzyme working solution 20 μ l を順次添加し、マイクロプレートシェーカー (800 rpm) で室温にて 10 分間攪拌した。その後、マイクロ

レートリーダーで450 nmの吸光度を測定した。試料添加時の吸光度を A_{sample} 、試料溶液のかわりに水、あるいは99.5%エタノールを添加した際の吸光度を A_{blank1} 、Enzyme working solutionのかわりにDilution bufferを用いた際の吸光度を A_{blank2} 、Enzyme working solutionのかわりにDilution bufferを加え、かつ試料溶液のかわりに水、あるいは99.5%エタノールを添加した際の吸光度を A_{blank3} とし、以下の式から各試料の阻害率 (%) を求めた。また、50%阻害を与える試料溶液の濃度を IC_{50} とした。同様の手順でSODの IC_{50} も求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

本研究では、WST-1法において50%阻害を与える試料濃度 (IC_{50}) がSOD 1 unitに相当すると定義し、各酸化防止剤のSOD等価活性 (units/mg) を算出した。

(4) 共同試験

研究室AとBにおける共同試験は、試薬秤取量、溶液調製操作に用いる器具の種類、データ解析方法を全て指定し、同一プロトコルに従って行った。

C. 研究結果と考察

(1) DPPH法

既存添加物に分類される26種類の酸化防止剤のDPPHラジカル消去活性を測定した。そのうち、ルチン酵素分解物とコメヌカ酵素分解物は、溶解性が低く、測定に用いることができなかった。これは後のABTS法、WST-1法における測定でも同様であった。また、単糖・アミノ酸複合物は活性が低く、50%阻害に達しなかったことから、 IC_{50} を求めることができなかった。

γ -オリザノール、ローズマリー抽出物 (1種類) は反応溶液に白濁を生じたことから、これらの試料の活性測定では例外的に99.5%エタノールに試料を添加する系を設定し、この系の吸光度、すなわち白濁に起因する吸光度を差し引くことによって活性を求めることが可能となった。ただし、この操作はプロトコル外の操作であったため、共同試験結果は得られなかった。

研究室AとBの両方において IC_{50} を求めることができた酸化防止剤21種類の抗酸化活性 (TEAC) の相関について調べた (図1)。その結果、両研究室の測定結果の間に有意な直線性が認められた ($r = 0.990$, $n = 21$)。また、回帰式の傾きは1.00であった。この値は両研究室で求めたTEACの値が一致していることを示すものであった。以上の結果より、DPPH法は複数成分からなる天然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ことが明らかとなった。

(2) ABTS法

ABTS法による測定においても26種類の酸化防止剤を試料とし、そのABTSラジカル消去活性の評価を試みた。前述のように、ルチン酵素分解物とコメヌカ酵素分解物はその溶解性の低さから測定に供することができなかった。その他24種類の酸化防止剤については、研究室AとBの両方において IC_{50} を求めることが可能であったため、共同試験結果の回帰分析を行ったところ、両者の間の相関係数は0.638 ($n = 24$)、回帰式の傾きは0.918であった。直線性が低くなった原因について調べたところ、両者の間の回帰直線からイソクエルシトリン、フェルラ酸、コメヌカ油性抽出物が大きく外れていることが判明した。これら3種類の酸化防止剤のABTSラジカル消去活性は、研究室AとBの

両方において阻害率 50%付近で頭打ちとなり、正確な IC_{50} を求めることが困難な状態にあった。従って、イソクエルシトリン、フェルラ酸、コメヌカ油性抽出物の正確な抗酸化活性評価は ABTS 法では困難であると判断した。そこで、上記 3 種類の酸化防止剤を除く 21 種類の酸化防止剤の TEAC について、共同試験結果の相関を再度調べた (図 2)。その結果、両者の間の相関係数は 0.990 ($n = 21$) となり、有意な相関が認められた。また、回帰式の傾きは 1.11 であったことから、2ヶ所の共同試験においてほぼ同一の値が得られたことが判明した。以上のことから、ABTS 法は複数成分からなる天然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。

(3) WST-1 法

先の 2 法と同様、WST-1 法によるスーパーオキシドアニオン消去活性測定についても 26 種類の酸化防止剤を試料として用いた。その結果、DPPH 法、ならびに ABTS 法と同様に、ルチン酵素分解物とコメヌカ酵素分解物はその溶解性の低さから測定に供することができなかった。ミックストコフェロール、 $d-\alpha$ -トコフェロール、 $d-\gamma$ -トコフェロール、 $d-\delta$ -トコフェロール、トコトリエノール、コメヌカ油抽出物の 6 試料は、試料溶液を反応系に添加した際に白濁を生じたため、測定を続行することができなかった。これは、WST-1 法の反応溶媒のエタノール濃度が DPPH 法、および ABTS 法と比較して低く、脂溶性のトコフェロール、ならびにコメヌカ油抽出物が反応溶媒に溶解しなかったことが原因であった。また、 γ -オリザノールは活性が低く、50%阻害に達しなかったことから、 IC_{50} を求めることができなかった。その他 17 種類の酸化防止剤については研究室 A と B の両

方において IC_{50} を求めることが可能であったため、共同試験結果の回帰分析を行った。その結果、両者の間の相関係数は 0.992 ($n = 17$) となり、有意な直線性が認められた。しかし、回帰直線の傾きは 1.25 であり、2 研究室の測定結果の間に 25%の差が認められた。この値は、DPPH 法、ならびに ABTS 法と比較して高いものであった。この差の原因について考察したところ、標準物質として使用した SOD の IC_{50} が両研究室で異なっていることが原因であると考えられた。本研究で用いたウシ赤血球由来 SOD (Sigma 社製) の酵素単位はシトクロム *c* 法により決定されている。シトクロム *c* 法で決定された酵素単位を WST-1 法に適用したことが不一致を招いた原因ではないかと推察した。そこで、「WST-1 法において 50%阻害を与える試料濃度が SOD 1 unit に相当する」と定義し、新たに SOD 等価活性を算出した後、両研究室の結果の相関を調べた (図 3)。その結果、両者の間に有意な直線性 (0.992, $n = 17$) が認められたのに加えて、その回帰式の傾きは 1.03 となり、両研究室間の差異は解消された。このことから、WST-1 法における測定についても、2ヶ所の共同試験において同一の値を得ることが可能であることが判明した。以上の結果より、WST-1 法が複数成分からなる天然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ことが示唆された。

D. 結論

既存添加物に分類される 26 種類の酸化防止剤を試料とし、2ヶ所の研究室において同一プロトコルに従った DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法による抗酸化活性測定の共同試験を行った。その結果、DPPH 法では 21 種類、ABTS 法では 21 種類、WST-1 法では 17 種類の酸化防止剤の抗

酸化活性を求めることができた。共同試験結果の回帰分析を行ったところ、全測定法において 2 研究室で得られた結果の間に有意な相関が認められた ($r = 0.990-0.992$)。また、回帰式の傾きは DPPH 法で 1.00、ABTS 法で 1.11、WST-1 法で 1.03 であった。このことから、DPPH 法、ABTS 法、WST-1 法は共同試験においてほぼ同一の結果を与えることが判明した。以上の結果は、今回測定に用いた 3 種類の方法が酸化防止剤の抗酸化活性評価方法として適用可能であることを示唆するものであった。

E. 研究発表

(1) 論文発表

島村智子、松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、松藤寛、松井利郎、松本清、受田浩之：酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験、日本食品科学工学会誌、54 (11)、482-487 (2007)

(2) 学会発表

松浦理太郎、徳田貴志、杉本直樹、山崎壮、松藤寛、松井利郎、松本清、島村智子、受田浩之：酸化防止剤の力価に対する各種抗酸化活性測定法の適用について、日本食品科学工学会第 54 回大会、2007 年 9 月 (福岡)

松藤 寛、千野 誠、受田浩之、松本 清、山形一雄：天然酸化防止剤ローズマリー抽出物中の活性成分について 第14回日本食品化学学会学術大会、2008年5月、西宮 [発表予定]

島村智子、平山大剛、杉本直樹、山崎壮、松井利郎、松本清、受田浩之：酸化防止剤の力価評価に対する各種抗酸化活性評価法の適用性 —天然物由来酸化防止剤について—、日本食品科学工学会第55回大会、2008年9月、京都 [発表予定]