

図2 脂溶性酸化防止剤のORAC値

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）

既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発

平成 20 年度分担研究報告書

天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

研究分担者 松本 清 九州大学農学研究院 教授

研究協力者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

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て、成分規格試験法（抗酸化活性標準操作法）の有力候補である DPPH ラジカル消去活性測定法の最適化を試みた。基準物質 Trolox の活性値(IC₅₀ 値)を指標として、室間・日間再現性の改善を目的とした測定プロコルの検証を行った結果、DPPH 溶液の調製方法の重要性が示唆されたことから、プロコルの関連箇所を改正した。続いて、酸化防止剤の併用効果を判定するために、薬剤の併用効果判定に汎用されている Median effect analysis の適用性を新たに検討した。「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で単一の成分からなる 7 種類の添加物を用い、10 通りの組み合わせで併用効果を検討した結果、相乗効果 1 組、相殺効果 3 組、相加効果 6 組という判定結果が得られた。この結果は、19 年度厚生科学研究で用いた Fractional product method の結果と一部異なるものであった。

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て、その基礎となる抗酸化活性評価法の検証と酸化防止剤併用効果の検討を行った。平成 17～19 年度厚生科学研究「天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究」の成果により、DPPH ラジカル消去活性測定法は、酸化防止剤評価方法として適していると判断されたが、当大学で測定した基準物質 Trolox の IC₅₀ 値は、他大学の値と比較して高い値を示していた（他大学 63.4, 63.1 μg/mL に対して九大 70.0 μg/mL）。また、Trolox の IC₅₀ 値に関しては、日間変動も大きいことが判明したことから、DPPH 法での活性値に影響を与える因子の解明と測定プロコルの一部見直しが必要であると判断し検討を行った。

一方、酸化防止剤の併用効果に関しては、19 年度の厚生科学研究において検討を行ってきた。すなわち、試料 A と B の混合試料の阻害率の予測値 (I_E) は以下の式で計算できると報告されている^{2, 3)} ことから、予測値 I_E と実測値とを比較することにより、2 成分混合系における酸化防止剤の効果（相乗効果、相加効果、相殺効果）を検討してきた。

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100)$$

本予測式は、Webb⁴⁾ が考案した Fractional product method の式を変形したものと考えられるが、Fractional product method では、個々の化合物が独立して作用し、且つその反応が双曲線型に当てはまる場合にしか適用できないという制限がある。そこで、本年度の研究では、

現在薬剤の併用効果の判定に汎用されている Median effect analysis を適用し、酸化防止剤併用効果判定への適用性を新たに検討した。本法は、Chou ら⁵⁾ が考案した方法であり、実験結果をもとに薬剤の反応型を推定し、反応型に応じた併用効果の解析を行うため、汎用性が極めて高い。さらに、本法により阻害割合に応じた CI (Combination Index) 値を算出することにより、併用効果を詳細に検討することが可能となる。今回は、既存添加物名簿収載品目リスト⁶⁾に記載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる添加物を用い、Median effect analysis による併用効果の検討を行った。

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(As)を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をコントロール(Ac)とした。また、DPPH 溶液の代わりにエタノール、あるいは超純水を添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率(%)を求めた(下式)。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100 \quad \dots\dots (1)$$

(2) Median effect analysis

本法は、以下の式 (Median effect equation)

に基づく解析方法である。

$$fa/fu = (D/Dm)^m$$

ここで、fa は阻害割合、fu は非阻害割合、D は dose (濃度)、Dm は Median effect (本実験では IC₅₀) を生じる濃度、m は Hill 型の係数を示す。式を変形すると以下のようになり、

$$\log(fa/fu) = m \log (D/Dm)$$

$\log (D/Dm)$ (あるいは $\log D$) を横軸に、 $\log(fa/fu)$ を縦軸にプロット (Median effect plot) することにより、傾き m を求めることが出来る。酸化防止剤単独及び併用時の Median effect plot から得られる m 値を基に、CI (Combination Index) 値を算出し併用効果を判定する (CI < 1 相乗効果, CI = 1 相加効果, CI > 1 相殺効果)。

本実験では、各酸化防止剤 (単独使用) について DPPH 法による活性測定を行った後、2 種類の酸化防止剤を各々の IC₅₀ 濃度の比 (モル比) に近い割合で混合して、再度測定を行った。得られた測定結果を基に Median effect plot を行い、CI 値を算出した。なお本実験では、一連の解析 (Median effect plot の作成及び CI 値の算出) に、市販の解析ソフト (Hulinks 社 CalcuSyn ver. 2.0) を用いた。

C. 研究結果及び考察

(1) DPPH ラジカル消去活性測定法の再検証

DPPH 法による Trolox の測定を 3 日間行った結果、IC₅₀ 値はそれぞれ 74.9, 62.5, 64.3 μ g/mL となり、1 日だけ高い値を示した。データを検証した結果、コントロール吸光度(Ac)が阻害率に大きく影響を与えていることが判明した。すなわち、阻害率は(1)式により求めることから、各測定データの Ac 値及び Ac \cdot As 値を検証した結果、Ac \cdot As 値は各測定日間でほとんど差が認められなかったのに対して、

Ac 値に関しては測定日 3 の値が他の測定日より 0.2 程度高いことが判明した。さらに、各測定で得られた阻害率を Ac 値に対してプロットした結果、阻害率と Ac 値の間に明らかな正の相関が確認された ($r=0.974$)。以上の結果、各測定日の IC₅₀ 値の差は、Ac-As 値すなわち Trolox の DPPH ラジカル消去量の差によるものではなく、測定に用いた DPPH 溶液の吸光度の違いが阻害率の差として表れた結果によるものであると考えられた。また、本結果から判断すると Ac 値が 1.00 ± 0.05 となるように DPPH 溶液を調製することが妥当であると考えられた。さらに、DPPH 溶液の調製法を種々検討した結果、調製して 1 時間以内の DPPH 溶液を用いた場合、Ac 値が変化しやすいことも明らかになったことから、測定には調製後 2 時間経過した DPPH 溶液を用いるべきであると判断した。以上の結果を考慮し、DPPH 溶液調製に関する項目を以下の通り改正した。

改正プロトコル) 0.2 mM DPPH 溶液 ; DPPH 7.89 mg を 99.5% エタノールで溶解後、メスシリンダーで 100 mL に定容した後、暗所で室温にて 2 時間放置する。放置時間終了後、DPPH 溶液 1 mL に対して 99.5% エタノール 200 μ L 及び 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μ L を順次添加して混合し、517 nm における吸光度を測定する。吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内であれば DPPH 溶液をそのまま測定に用いる。1.05 を超えた場合には 99.5% エタノールで希釈して 1.00 ± 0.05 の範囲に入れて測定に用いる。

(2) 酸化防止剤併用効果の検討

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で単一の成分からなる 7 種類の添加物 (カテキン、ケセルチ

ン、セサモール、フェルラ酸、モリン、エラグ酸、 α -トコフェロール) を用い、10 通りの組み合わせで併用効果を検討した。図 1~3 において、相乗、相殺、相加効果と判定された代表的な組み合わせの Median effect プロット (上図) と CI プロット (下図) を示した。図 1 は、 α -トコフェロールとケルセチンの解析結果を示している。上図の Median effect プロットにおいて、 α -トコフェロール、ケルセチン、両者併用時の m 値は、それぞれ 1.83、1.74、1.93 と算出された。この m 値を基に見積もられた CI プロットでは、いずれの阻害割合においても $CI < 1$ となり両者の併用効果は、相乗効果と判定された。しかしながら、得られた CI 値は 0.83-0.86 の範囲であったことから、相乗効果は小さいものと考えられた。図 2 はフェルラ酸とエラグ酸の解析結果を示している。CI プロットの結果、いずれの阻害割合においても $CI > 1$ となり両者の併用は相殺効果を示すことが判明した。CI が 1.87-2.28 の値を示したことから、両者の相殺効果は大きいものと判断した。図 3 は、モリンと α -トコフェロールの解析結果を示している。CI プロットの結果から、両者の効果はほぼ相加性であると判断したが、その効果は阻害割合 (混合時の濃度レベル) によって異なっていた。すなわち両者の効果は、 $fa < 0.5$ では相殺性を示したものの、 $fa > 0.5$ では逆に相乗性を示すことが判明した。この結果は、混合時の濃度レベルが低い場合、両者は相殺的に作用し、高濃度では相乗的に作用することを示している。Median effect analysis では、併用時の濃度レベルに応じた併用効果の判定が可能であったことから、本法の有用性が確認された。最後に、本実験における Median effect analysis の判定結果を表 1 にまとめて示した。また、比較のために Fractional

product method (19年度厚生科学研究)の判定結果を併せて示した。Median effect analysisでは、相乗効果1組、相加効果6組、相殺効果3組という判定結果が得られた。この結果は、Fractional product methodでの結果と若干異なるものであった。Fractional product methodで相乗効果と判定された4組が本法で相加効果と判定された点に関しては、Fractional product methodでも相加性を僅かに上回る程度の相乗効果しか認められていないことを考慮すると、両法の判定結果は大きく異なるものではないと考えられた。一方、相乗効果と判定されていたセサモールとエラグ酸の組み合わせでは、逆に相殺効果と判定された。Fractional product methodは、限定された条件下での解析法であることを考慮すると、Median effect analysisでの判定結果の信頼性が高いと考えられたが、この点に関しては今後詳しく検討する必要がある。

D. 結論

DPPH測定プロトコルの検証を行った結果、DPPH溶液の調製方法が活性値(IC₅₀値)の室間・日間再現性に大きく影響を及ぼすことが判明したことから、プロトコルの関連箇所を改正した。続いて、酸化防止剤の併用効果を判定するために、薬剤の併用効果判定に汎用されているMedian effect analysisの適用性を新たに検討した。7種類の添加物を用い、10通りの組み合わせで併用効果を検討した結果、Fractional product methodの結果と若干異なる判定結果が得られた。さらに、Median effect analysisでは、酸化防止剤併用時の濃度レベルに応じて併用効果の詳細な判定が可能であることが明示された。

E. 研究発表

(1) 論文発表

松藤寛、佐々怜一郎、本間友輝、宮島拓臣、山崎壮、受田浩之、島村智子、松井利郎、松本清、山形一雄：抗酸化物質の2成分混合系におけるDPPHラジカル消去活性、日本食品科学工学会誌、56(3):129-136(2009)

(2) 学会発表

井邊早春、石川洋哉、受田浩之、山崎壮、松井利郎、松本清：酸化防止剤混合系におけるDPPHラジカル消去活性測定とMedian effect analysisによる併用効果の判定 第46回化学関連支部合同九州大会(2009.7、北九州) [発表予定]

参考文献

- 1) H-S. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4156-4161 (2000).
- 2) M. Doret et al., *Int. J. Obster. and Gynaec.*, **110**, 731-734(2003).
- 3) J. Shi et al., *J. Food Comp. Anal.*, **20**, 603-608 (2007).
- 4) J. L. Webb *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol 1, pp 55-79, Academic press, New York (1963).
- 5) T. C. Chou and P. Talalay *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27-55(1984)

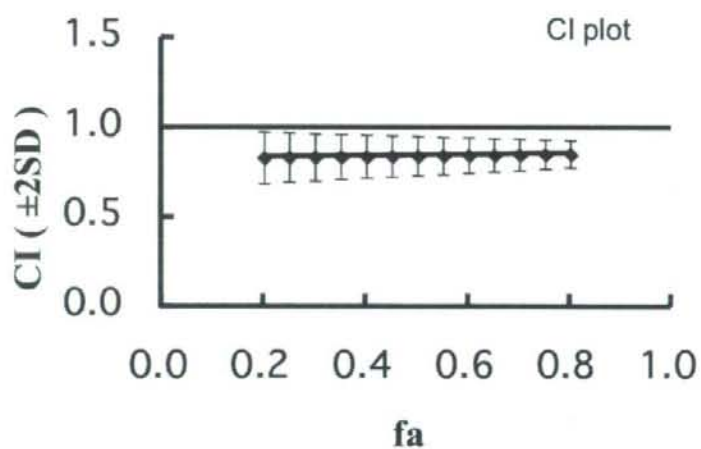
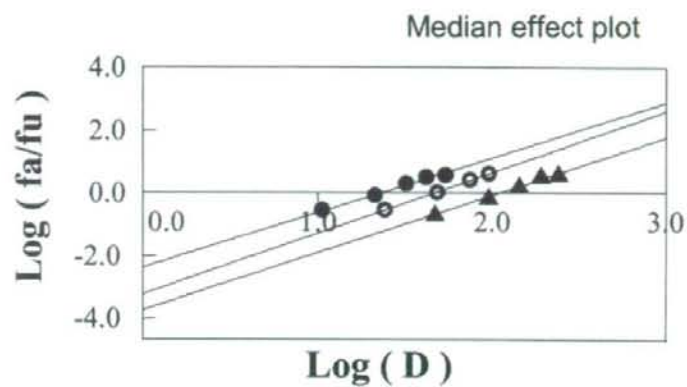


図1 α-トコフェロール-ケルセチン併用効果の解析
 上図: Median effect plot, 下図: CI plot

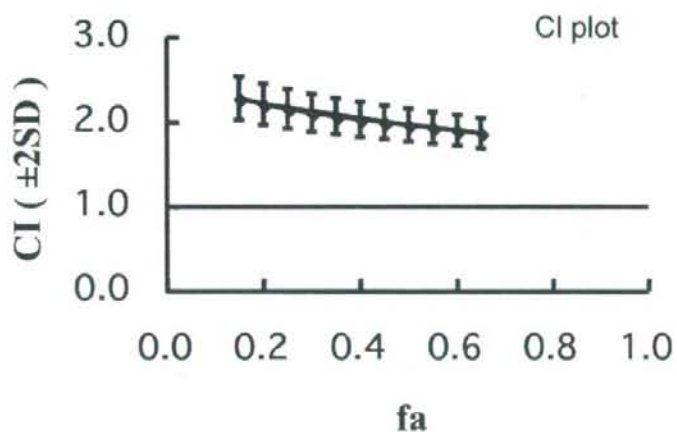
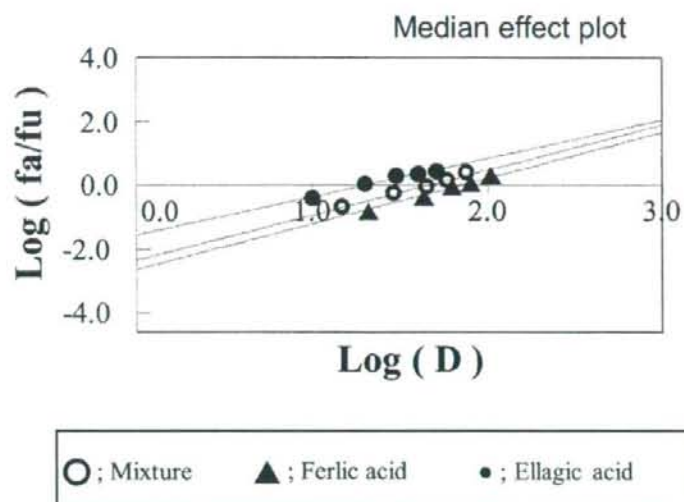


図2 フェルラ酸 - エラグ酸併用効果の解析
 上図: Median effect plot, 下図: CI plot

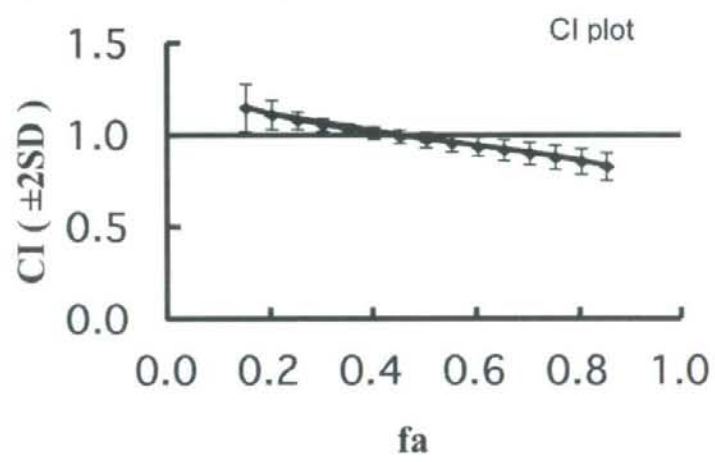
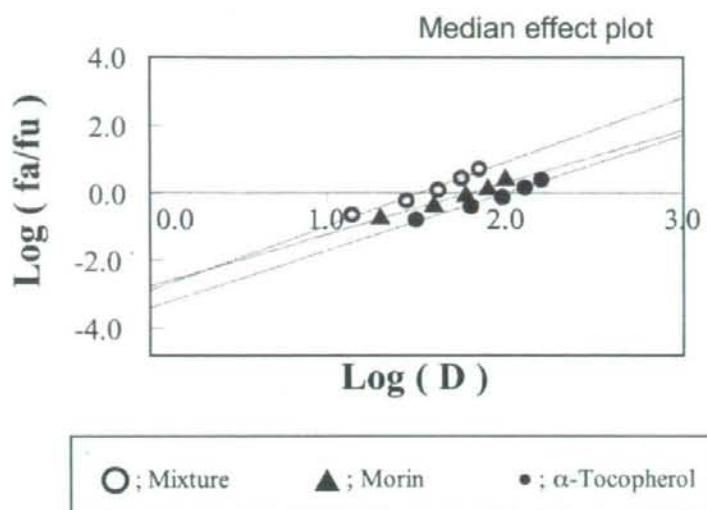


図3 モリン - α-トコフェロール併用効果の解析
 上図: Median effect plot, 下図: CI plot

表1 酸化防止剤併用効果の判定結果

化合物	Fractional product method	Median effect analysis
α -トコフェロール - ケルセチン	相乗	相乗
セサモール - カテキン	相乗	相加
セサモール - エラグ酸	相乗	相加
カテキン - ケルセチン	相乗	相加
α -トコフェロール - モリン	相乗	相加
セサモール - エラグ酸	相乗	相殺
モリン - カテキン	相加	相加
モリン - フェルラ酸	相加	相加
α -トコフェロール - カテキン	相加	相殺
フェルラ酸 - エラグ酸	相殺	相殺

2. 天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究

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）
既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発
平成 20 年度分担研究報告書

天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究
研究分担者 松藤 寛 日本大学生物資源科学部 准教授

研究要旨

天然酸化防止剤の一つであるローズマリー抽出物が酸化劣化した際の、抗酸化活性の変化を調べるとともに、有害物質生成の可能性をヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた遺伝毒性試験により評価した。光照射並びに熱処理により主要成分であるカルノソール、カルノシン酸は減少し、多くの分解物が検出された。中でも熱処理においては顕著な生成物ピークが観察された。処理時間の異なる試料を用いて DPPH ラジカル消去活性を調べたところ、処理時間の増加により活性は顕著に低下した。一方、未処理ローズマリー抽出物は細胞毒性を示すものの、遺伝毒性は示さなかった。光分解物は若干細胞毒性を強めるものの、遺伝毒性は示さなかったのに対し、熱分解物は小核誘発を示したことから、熱処理によって何らかの染色体異常を引き起こす物質を生成する可能性が示された。

A. 研究目的

近年、健康志向とあいまって、天然物由来の抗酸化物質は様々な疾病予防効果の観点から健康食品を中心として注目を集めている。一方、天然物であるので安全である、食品添加物として使用されているので安全であるという発想に基づく健康食品もあり、過剰摂取やプロオキシダント作用などの安全性が指摘、懸念されている。このことは、食品中でも天然酸化防止剤の劣化や過剰使用により酸化防止剤のプロオキシダント作用による有害物質生成の可能性があり得る。

そこで、本研究では天然酸化防止剤の過剰使用や劣化による有害物質生成の可能性を調べると共に、有害物質生成を防ぐための成分規格、使用基準、適正使用に資する基礎的情報を得ることを目的とし、天然酸化防止剤そのものの *in vitro* 遺伝毒性並び

に酸化劣化させた際の遺伝毒性を調べることとした。

今年度においては、健康食品素材としても注目されているローズマリー抽出物を対象とし検討を行った。

B. 実験方法

(1) 試料

ローズマリー抽出物（粉末試料）は遺伝毒性試験または抗酸化試験に要する最大濃度となるように、DMSO に溶解し（15 mg/mL）、使用するまで -20℃ で保存した。

(2) 光および熱分解

スクリーキャップ付きの試験管に 15 mg/mL の試料（5 mL）を入れ、グローブチャンバー内（5000 lx、25℃）で継続的に光を当て、光分解させた。同様に、ヒートプロ

ック (95°C) で加熱し、熱分解させた。これらを経時的に HPLC(UPLC™)に供し

(10 倍希釈後)、ローズマリー抽出物の主要成分であるカルノソールとカルノシン酸のピーク面積がほぼ半分、あるいはほぼ消失した分解物試料を作成し、以後の実験に用いることとした。なお、処理試料は複数本調製し、HPLC 前に混合し、分析終了後に再び試験管に戻すことにより、光照射並びに熱処理のばらつきを抑えることとした。HPLC 条件：カラム：ACUITY UPLC™ BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 μm, Waters)、溶媒：5% アセトニトリル (0.1%ギ酸含有) (0 分) →80% アセトニトリル (0.1%ギ酸含有) (4.63 分) →80% アセトニトリル (0.1%ギ酸含有) (8 分)、流速：0.3 mL/min、検出波長：210–400 nm (モニター波長 285 nm)、温度：40°C、注入量：2 μL。

(3) DPPH ラジカル消去活性

DPPH ラジカル消去活性測定は既報²⁾にしたがい行った。試験管に試料溶液 200 μL、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800 μL、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 DMSO を添加した場合の吸光度をコントロール、また DPPH 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率(%)を求めた。

試料の DPPH ラジカル消去活性は 6-hydroxy-5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid 等価活性、すなわち、Trolox

等価活性 (TEAC) で示した。TEAC とは IC₅₀ を示す Trolox 濃度 (μg/mL) と IC₅₀ を示す試料濃度 (μg/mL) が等しい活性を有するものとみなし、試料 1 μg あたりの活性を Trolox 当量に換算したものである。

(4) TK 遺伝毒性試験

TK 遺伝毒性試験は既報^{2,3)}にしたがい行った。すなわち、ヒトリンパ芽球細胞 TK6 に種々の濃度の試料を加えて 37°C で 4 時間処理した。新鮮な培地 (RPMI1640) で洗浄後、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。処理直後から 3 日間の生細胞数をカウントし、無添加区と比較することにより細胞増殖率を求めた (細胞毒性として評価)。また処理直後から 48 時間後に小核が出現した細胞数を蛍光顕微鏡下でカウントすることにより小核誘発頻度を、処理直後から 72 時間後にトリフルオロチミジンを添加し薬剤耐性を獲得した tk 遺伝子変異体を検出することにより tk 遺伝子突然変異頻度を評価した。なお、濃度依存性があり、試料無添加区に対して 2 倍以上の小核誘発頻度あるいは遺伝子突然変異頻度を示したとき、遺伝毒性有り と判定した。

C. 研究結果及び考察

(1) ローズマリー抽出物の光及び熱分解

15 mg/mL のローズマリー抽出物に光及び熱を与えた際のクロマトグラムをそれぞれ図 1 に示す。光および熱を与えることにより、主要成分であるカルノソール (Car) とカルノシン酸 (CarA) のピーク強度は低下し、それに伴いいくつかの新しいピークが検出された。中でも熱処理においては 6 分前後に複数の大きなピークが検出され、

光照射と熱処理により分解挙動が異なると考えられた。ローズマリー抽出物中の全ての成分が同時に消失する時間は認められなかったことから、主要成分である Car や CarA が半分程度となった時の試料(光照射 196 h、熱処理 23 h)と、CarA がほぼ消失した時の試料(光照射 410 h、熱処理 46 h)をそれぞれの分解試料として用い、以後の実験に使用することとした。

ローズマリー抽出物の光分解物や熱分解物中に数多くのピークが検出されたことから、その由来の特定化を行うために、主要成分の市販標準品 (RosA; ロスマリン酸、Car、CarA) を用い、同様に光照射及び熱処理を施した (図 2)。単一成分においても複数のピークが検出され、様々な化合物へと分解していることが示唆された。一方、標準品から検出されたピークは、ローズマリー抽出物の分解物中のピークと概ね一致していた。他方、ローズマリー抽出物の熱分解物に認められた 6 分前後のピークは Car 及び CarA の熱分解においても認められたことから、これらの共通の構造を有する分解物と考えられた。

(2) DPPH ラジカル消去活性の変化

図 3 にローズマリー抽出物並びにその光及び熱分解物の DPPH ラジカル消去活性を示す。未処理ローズマリー抽出物は $IC_{50} = 21.2 \mu\text{g/mL}$ 、 $TEAC = 0.295 \mu\text{g}$ トロロックス当量を示した。未処理と比較すると、光分解物及び熱分解物ともに、主要成分が減少することにより活性は顕著に低下した。光照射 410 h の試料並びに熱処理 46 h の試料中には、まだローズマリー抽出物中の主要成分である RosA や Car が残存している

ために、一概には言えないが、これらの分解物が未処理の約 4 割から 5 割の活性を有していることから判断すると光照射または熱処理によって生成される分解物もまた抗酸化活性を有することが推察された。言い換えると、主要成分が光や熱によって減少しても、弱いながらも酸化防止能力は維持されると考えられた。

(3) ローズマリー抽出物及び分解物の遺伝毒性

図 4 に未処理ローズマリー抽出物が TK6 細胞の細胞増殖、小核誘発、遺伝子突然変異に及ぼす影響を示す。ローズマリー抽出物は $50 \mu\text{g/mL}$ から濃度依存的に細胞増殖率を低下させ、 $150 \mu\text{g/mL}$ でほとんどの細胞は死滅した。一方、小核誘発頻度並びに tk 遺伝子突然変異頻度の上昇は認められなかった。ローズマリー抽出物そのものの遺伝毒性に関する報告は見当たらないが、抽出物やロスマリン酸の抗変異原に関する研究のコントロールとして使用されている範囲内で遺伝毒性は認められていない^{4,5)}。従って、ローズマリー抽出物は細胞毒性作用は有するが、遺伝毒性は有さないと考えられた。

光分解物と熱分解物の遺伝毒性を図 5 に示す。光分解の促進により、細胞増殖率はわずかに低下し、細胞毒性を有する成分が生成している可能性が示された。しかし、小核誘発並びに tk 遺伝子突然変異は観察されなかった。一方、熱分解により強い細胞毒性が観察され、 $30 \mu\text{g/mL}$ の低濃度で細胞はほぼ死滅した (未処理では $150 \mu\text{g/mL}$)。0~ $30 \mu\text{g/mL}$ の濃度範囲内で tk 遺伝子突然変異頻度の上昇は認められなかったが、小

核誘発頻度は濃度依存的に上昇したことから、染色体異常を引き起こす成分が熱処理によって生成することが示唆された。

今後は遺伝毒性成分を同定するとともに、食品中に添加したローズマリー抽出物の熱処理による生成の有無、またその生成抑制について検討する必要があると考えられた。

D. 結論

ローズマリー抽出物に光照射及び熱処理を施すことにより、複数の分解物が生成した。光照射時間並びに熱処理時間を変化させ、抗酸化活性を調べたところ、抗酸化活性は光及び熱分解が進むにつれ顕著に低下した。しかし、主要成分の多くが消失しても約半分程度の活性を保持しており、分解生成物も抗酸化活性を有することが示唆された。一方、未処理及び各分解物の遺伝毒性を調べたところ、ローズマリー抽出物は細胞毒性は示すものの、小核誘発並びに遺伝子突然変異は示さず、遺伝毒性は示さないと考えられた。他方、光分解物は未処理よりも若干強い細胞毒性を示したが、遺伝毒性は示さなかった。しかし、熱分解物は強い細胞毒性を示すとともに、濃度依存的に小核を誘発し、染色体異常を引き起こす物質を生成している可能性が示された。

E. 研究発表

(1) 発表論文

1) 松藤寛、佐々怜一郎、本間友輝、宮島拓臣、山崎壮、受田浩之、島村智子、松井利郎、松本清、山形一雄：抗酸化物質の2成分混合系における DPPH ラジカル消去活性、日本食品科学工学会誌、56 (3): 129-136 (2009).

(2) 学会発表

なし

参考文献

- 1) 島村ら、日本食品科学工学会誌、54, 482-487 (2007).
- 2) H. Liber et al., *Mutat. Res.*, 94, 467-485 (1982).
- 3) 本間ら、*Environ. Mutagen. Res.*, 18, 107-111 (1996).
- 4) E. A. Offord et al., *Carcinogenesis*, 16, 2057-2062 (1995).
- 5) M. A. Furtado et al., *Mutat. Res.*, 657, 150-154 (2008).

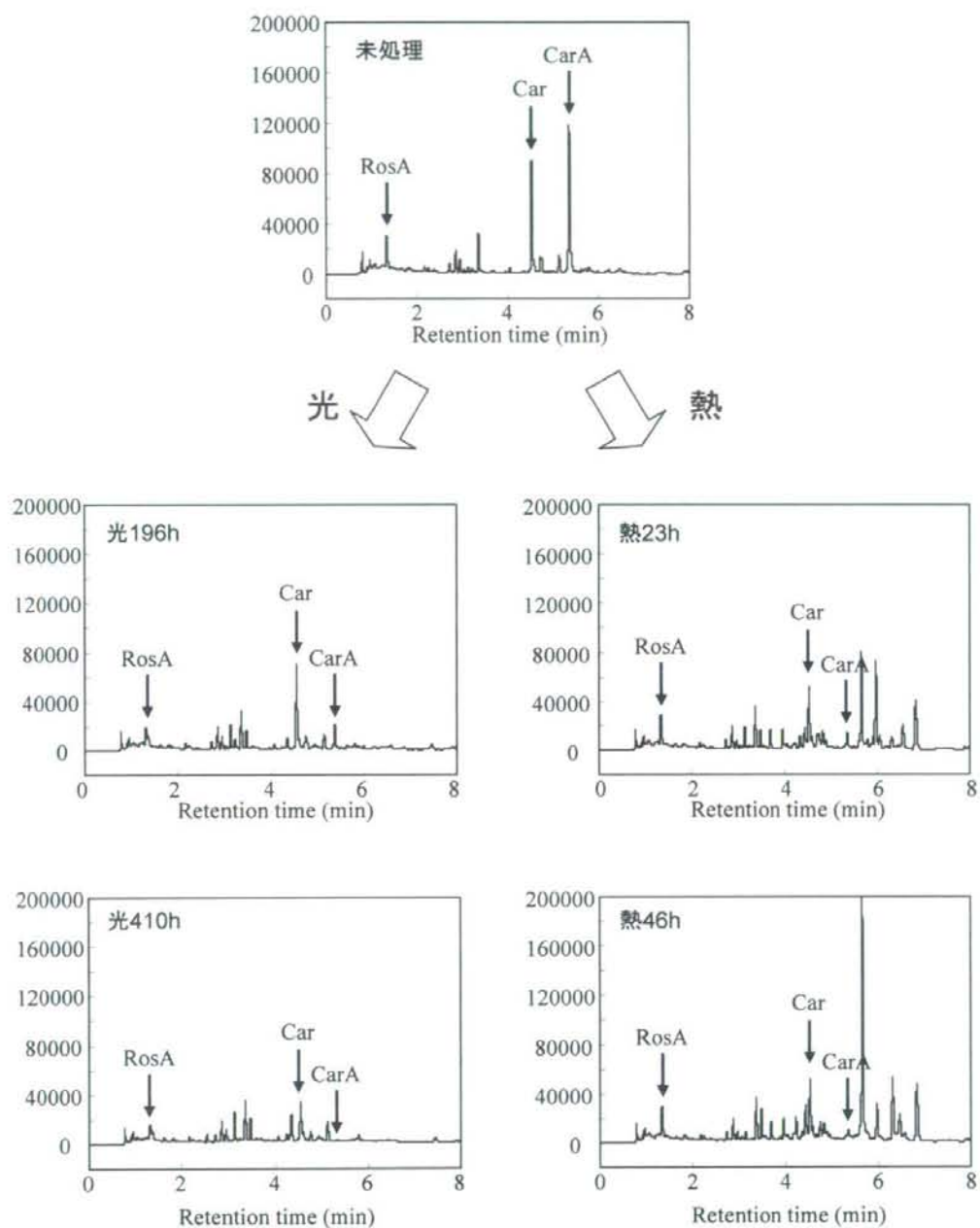


図1 ローズマリー抽出物の光分解と熱分解

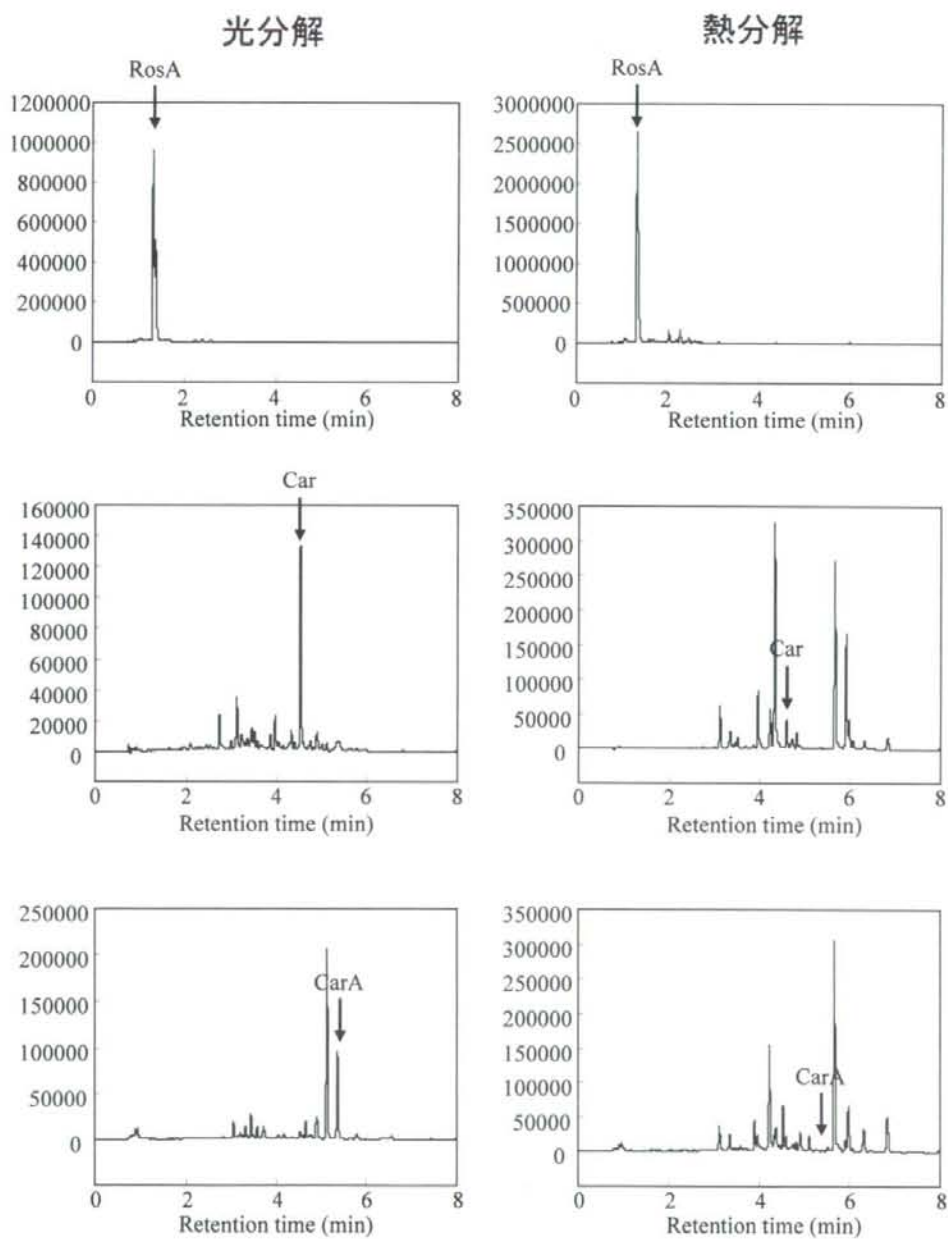


図2 標準品(ロスマリン酸、カルノソール、カルノシン酸)の光分解と熱分解

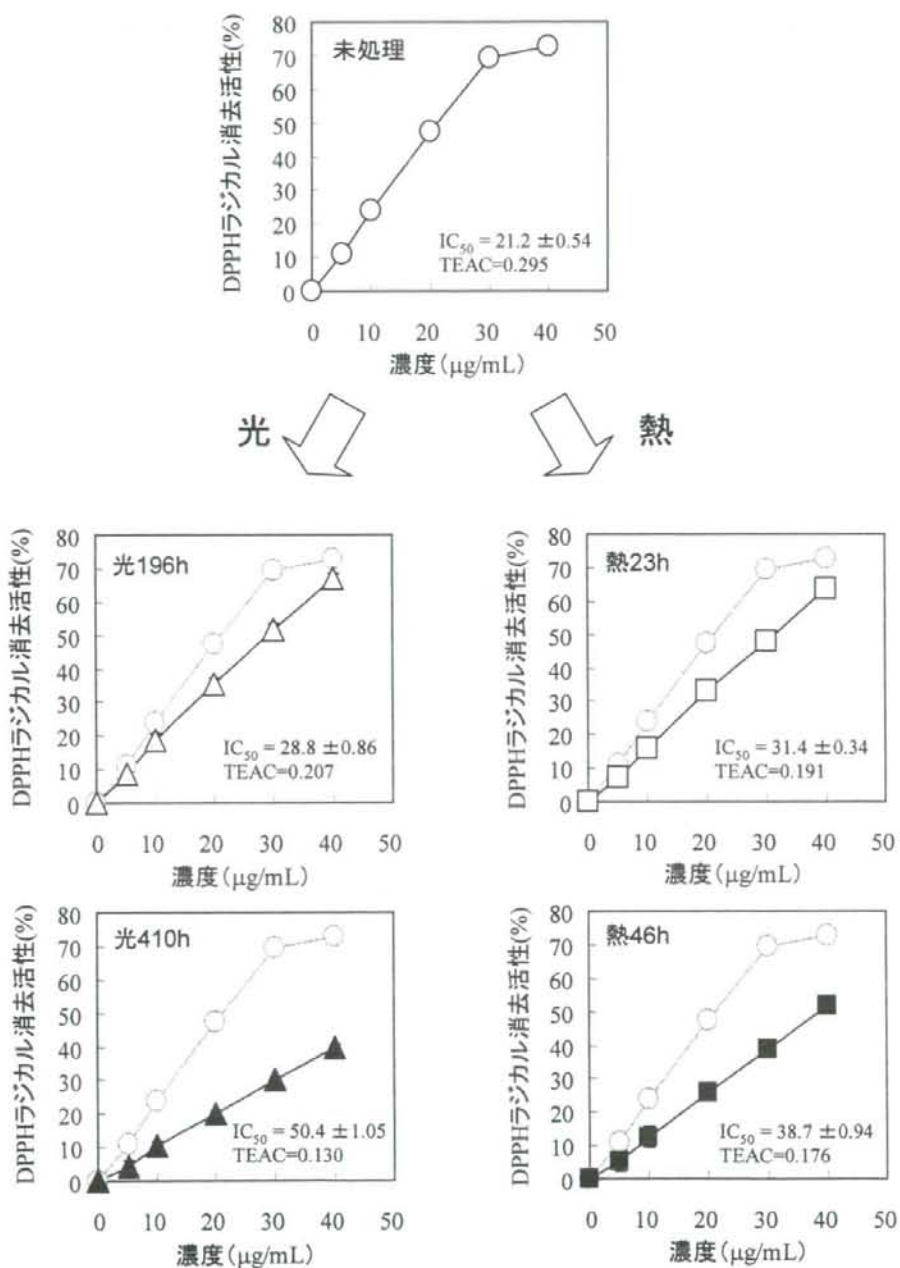


図3 光分解と熱分解によるDPPHラジカル消去活性の変化

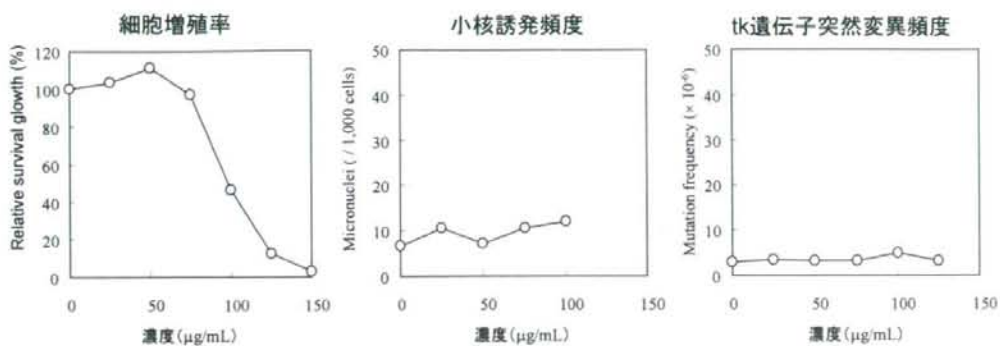


図4 ローズマリー抽出物がTK6細胞の細胞増殖、小核誘発、tk遺伝子突然変異に及ぼす影響

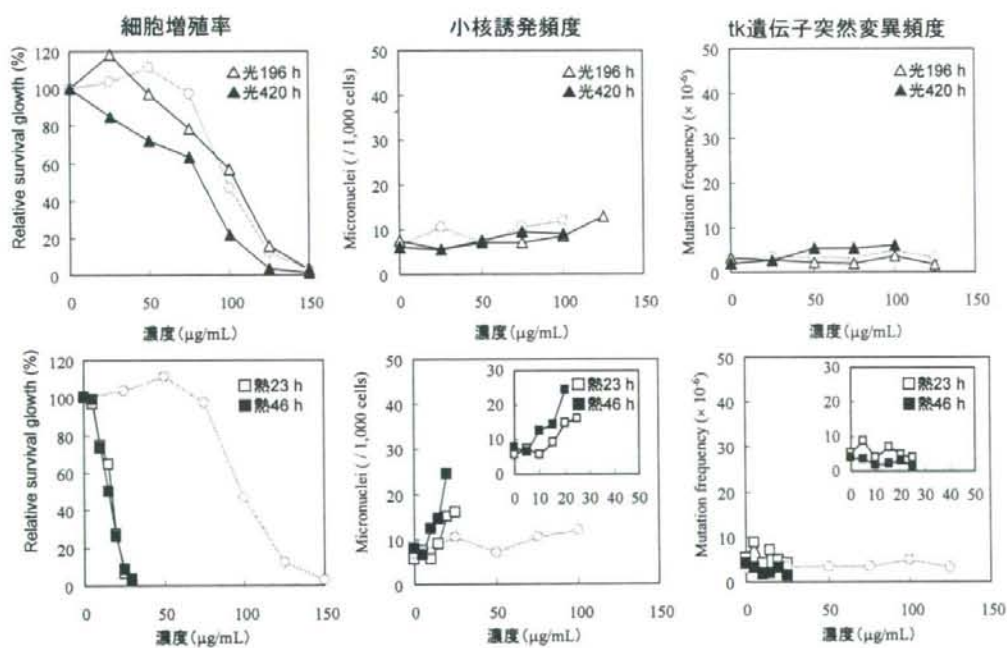


図5 ローズマリー抽出物の光分解と熱分解による遺伝毒性の変化

3. NMRを用いた既存添加物の新規分析法の開発に関する研究

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）
既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発
平成 20 年度分担研究報告書

NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発に関する研究
-qNMR を用いたコチニール色素(カルミン酸)の絶対定量-

研究分担者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 室長 (平成 20 年 8 月-)
(前職: 食品添加物部 主任研究官)

研究要旨

現在、化合物の定量にはクロマトグラフ法が主として利用されるが、測定対象の定量用標準品が存在しない場合には原理的に適用不能である。また、測定対象の化合物を入手、有機合成あるいは単離精製できたとしてもその純度値が正確に求められているものでなければ、得られた定量値に信頼性はない。これは、既存添加物、健康食品及び生薬等の天然由来の化合物の品質や有効性について議論するとき最も基本的な問題であるが未だ解決策が見いだされていない。そこでこの問題を抜本的に解消するために、NMRを用いた定量法(quantitative NMR: 以下qNMR)の開発を行った。今回、qNMR法の応用例として、食品添加物コチニール色素(エンジムシから得られる赤色素)の主色素成分であるカルミン酸(carminic acid)を絶対定量した。qNMR法は測定対象の標準品が入手できない場合においても計量学的に信頼性の高い定量値を求めることが可能な方法であり、且つ、得られたqNMRスペクトルデータは定量性を持つ参照スペクトルとしても有用であると考えられた。したがって、従来法では定量が困難であると思われる他の既存添加物中の規格基準法としてもqNMR法が有効であると考えられた。

A. 研究目的

食品添加物の定量分析には、クロマトグラフィーを利用する方法、化学的な反応を利用する方法(滴定法等)、化合物固有の吸光度を利用した方法(吸光度法)等が主に利用されている。しかしながら、分析対象とする品目が複雑な混合物であり、且つ分析対象の化合物の定量用標準品が入手不可能な多くの天然添加物では、上記のいずれの方法によっても信頼性の高い定量値を求めることは実質的に不可能であり、実際にこれらの品質規格基準設定が遅れており、その解決策も現状の分析化学の分野におけるあらゆる方法論の中からも見いだせていない。したがって、今後の天然添加物の品質規格基準設定を推進するためにも、この問題を抜本的に解決する新たな方法論の構築が急務である。

また、食品添加物公定書において天然色素類では、各色素成分の含量を規定せず、「色価」という色の強度値を規格値として採用している。これは、天然色素の有効性が色調やその強度であることから、「色価」を評価し、その値が基準値以上であればその天然色素の品質がある一定以上に確保されているという考え方に基づいている。このように定量分析が困難で規格基準設定が遅れている天然添加物(既存添加物)については、有効性から評価する方法をさらに導入すると同時に、信頼性の高い規格値を付加する分析法あるいは品質評価法を順次設定し、食品添加物の品質確保がすることが必要であると考えている。

このような背景から、我々は、国際単位系(SI)に基づく計量トレーサビリティが確保された新たな分析法の一つとして、核磁気共鳴に基づく定