

量分析法(quantitative NMR (qNMR))の開発を行っている。SIに基づく計量学的な分析法を一次標準測定法といい、一次標準直接法と一次標準比率法に分類される。一次標準直接法は、「物質量の基準となる他の化学物質を用いず、自分自身で目的の化学物質の物質量を測れる方法(絶対測定法)」であり、電量分析法、重量分析法及び凝固点降下法がある。一方、一次標準比率法は、「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」であり、すでに実用化されているものに滴定法及び同位体希釈質量分析法がある。これらの方法は、一般に分析の迅速性に欠け、また分析できる物質の種類に制限がある。一方、我々が開発中のqNMRは、純度値が明らかな他の化合物を基準物質(内標準)としてあらゆる測定対象の有機化合物の純度あるいは含量を迅速に求めることが可能な一次標準比率法の資格を有する方法である。¹H-NMRスペクトル上に観察される異なる化合物のシグナル強度の比は化合物のモル比に対応することから、一方の化合物の純度が明らかであれば、得られたモル比と溶液の調製値の関係から測定対象の化合物の純度(あるいは濃度)を決定できることを原理とし、測定対象化合物の標準品を参照せずに純度値を決定できる点で従来法より優れている。

天然着色料コチニール色素(Cochineal extract)は、「エンジムシ(*Dactylopius coccus* Costa (*Coccus cacti* Linnaeus))から得られた、カルミン酸(carminic acid)を主成分とするものである」と食品添加物公定書に定義されている。色価測定法により測定し、色価(E_{1%}^{1cm})は80%以上で、表示量の95~115%を含むとされている。これは、色価よりコチニール色素の品質規格を設定したものであり、本色素中の主色素carminic acidの実際の含量を求めたものではない。現状の分析法では、carminic acidの定量用標準品が存在しないため、正確な実含量だけでなく、不純物を定量することは不可能である。また、第55回JECFA会議においてコチニール色素およびカルミンにアレルギーが存在する可能性があ

ると報告された。以後の研究結果からアレルギーの原因がエンジムシの特定のタンパク質であることが報告され、これを除去した低アレルゲンコチニール色素も開発されているが、これらの品質評価法あるいは規格基準法については、今後更に検討が必要である。

そこで本年度は、qNMRの品質管理法への応用を目的に、我々が開発中のSIトレーサビリティを確保したqNMRをカルミン酸市販試薬の純度決定および食品添加物コチニール色素市販製品の品質評価に適用した。さらに、qNMRによる分析値の妥当性を検証するとともに、qNMRが従来法に代わる迅速且つ簡便な品質管理法として有効であり、計量学的にも従来法に比べ信頼性の高い結果が得られることを見出したので報告する。

B. 研究方法

1) 試料

カルミン酸市販試薬7製品(CA1-3, 5-8)は各社試薬メーカーより購入したものをを用いた。食品添加物用コチニール色素4製品(CA9-12)は三栄源FFIより分与していただいたものをを用いた。高純度カルミン酸(CA4)は大阪薬科大学薬学部馬場きみ江教授より分与していただいたX線結晶解析用単離精製品を用いた。

高純度フタル酸水素カリウム(認証標準物(CRM 3001a): 純度 100.00±0.027%(PHP))は(独)産業技術総合研究所製を用いた。なお、PHPは、添付の使用法に従い、軽く砕いた後、120℃で約1時間加熱し、デシケーター中で放冷後、用事使用とした。

水溶性qNMR基準物質として高純度DSS-*d*₆(和光純薬特注品)を用いた。

qNMR測定用重溶媒として重水(D₂O)(Isotec製)を用いた。

2) 装置

高速液体クロマトグラフィー(HPLC): Agilent 1100 series

核磁気共鳴装置(NMR): オートサンプラー付き

JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子(株)製). qNMR のケミカルシフト値は, DSS- d_6 を基準シグナル(0 ppm)とし, δ 値を ppm 単位で表した.

3) HPLCによるカルミン酸(CA)の分析

試料(CA1~12)をH₂Oに溶解し, 1.0 mg/mLに調製し, 下記の条件のHPLCに付し, 18.2分に観察されたCAのピーク面積を求めた.

HPLC条件: 注入量, 5 μ L; カラム, XTerra RP18

(2.1 x 150 mm, 5 μ m); 移動相, 0.1% HCOOH:

MeOH = 95 : 5 (0 min) \rightarrow 5 : 95 (25-30 min); 検出波長, 490 nm.

4) qNMR 法による含量測定

4-1) qNMR 標準溶液の調製

DSS- d_6 約 100 mg を精密に量り取り, D₂O 50 mL に定容した. この溶液を D₂O で 5 倍希釈したものを qNMR 用標準液とした. qNMR 用標準液中の DSS- d_6 の濃度 400.5 ± 2.8 μ g/mL ($n = 3$, AV \pm SD) を下記に従い, PHP により校正して求めた. すなわち, CRM の一つである PHP 約 30 mg を精密に量り取り, qNMR 用標準液 1.0 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を NMR 試験管(5 mm ϕ x 200 mm, S-type (和光純薬工業(株)製))に封入したものを DSS- d_6 濃度校正用試料溶液とした. この溶液を qNMR に付し, PHP の PhH $\times 4$ (δ 7.57 ppm, 7.72 ppm)および DSS- d_6 の CH₃ $\times 3$ (δ 0 ppm)に由来するシグナル強度面積, 分子量, 濃度等を式(1)に代入し, qNMR 用標準液中の DSS- d_6 の濃度を校正した.

$$W_{DSS} = \left(\frac{M_{DSS} \times I_{DSS}}{H_{DSS}} / \frac{M_{PHP} \times I_{PHP}}{H_{PHP} \times W_{PHP}} \right) \times \frac{P_{PHP}}{100} \quad (1)$$

ただし, W_{DSS} , W_{PHP} = DSS- d_6 および PHP の濃度 (mg/mL), M_{DSS} , M_{PHP} = DSS- d_6 および PHP の分子量 (MW 224.36 および 204.22), I_{DSS} , I_{PHP} = DSS- d_6 の CH₃ $\times 3$ および PHP の PhH $\times 4$ のシグナル強度面積, P_{PHP} = PHP の純度(100.00%).

4-2) qNMR による合成赤色素の純度測定

カルミン酸試薬(CA1~3, 5~8), 高純度カルミン酸(CA4)およびコチニール色素製品(CA9~12)をそれぞれ約 20 mg 精密に量り取り, 予め調製した qNMR 用標準液 1.0 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを試料溶液とした. この溶液を qNMR に付し, DSS- d_6 のシグナル強度面積, カルミン酸に由来するそれぞれの特定シグナルの相対強度面積, 分子量, 濃度等を式(2)に代入し, カルミン酸(CA)の純度(含量)(w/w%)を算出した.

$$P_{CA} = \frac{I_{CA}/H_{CA}}{I_{DSS}/H_{DSS}} \times \frac{M_{CA}/W_{CA}}{M_{DSS}/W_{DSS}} \times 100 \quad (2)$$

ただし, W_{DSS} , W_{CA} = DSS- d_6 および CA の濃度 (mg/mL), M_{DSS} , M_{CA} = DSS- d_6 および CA の分子量 (DSS- d_6 = C₆H₉D₆NaO₃SSi (MW 224.36) および carminic acid = C₂₂H₂₀O₁₃ (MW 492.39), carminic acid -H⁺+K⁺+3H₂O (carminic acid potassium salt trihydrate) = C₂₂H₁₉O₁₃⁻K⁺ \cdot 3H₂O (MW 584.53), I_{DSS} , I_{CA} = DSS- d_6 および CA の特定基のシグナル強度面積, H_{DSS} , H_{CA} = DSS- d_6 および CA の特定基のプロトン数 (DSS- d_6 = CH₃ $\times 3$, CA = PhH $\times 1$), P_{CA} = CA の純度(含量)(w/w%).

4-3) qNMR 測定条件および解析処理

qNMR 測定条件の基本情報は Table 1 に示した. qNMR データ解析には, 得られた FID データを定量解析ソフトウェア(日本電子(株)開発中)に導入して自動処理した. すなわち, このソフトウェア上で, qNMR データをフーリエ変換(Window 関数: function = exponential, BF = 0.12 Hz, zero filling = 1, T1 = T2 = 0%, T3 = 90%, T4 = 100%)および自動位相調整を行い, DSS- d_6 および特定シグナルの積分範囲等を設定後, 予め入力した DSS- d_6 およびカルミン酸(CA)の濃度, 分子量, 特定基のプロトン数等の化合物情報から自動解析処理を行い, 純度(含量)(w/w%)を式(2)に従い算出した.

C. 結果及び考察

1) HPLC による carminic acid の分析

カルミン酸市販試薬製品(CA1~3, 5~8), 高純度カルミン酸(CA4)およびコチニール色素製品(CA9~12)をHPLCに付したところ, 検出波長490 nmにおいて, 保持時間18.2分に carminic acid に由来するピークが観察された。Fig. 2には, その代表的なクロマトグラムとして CA1 および CA2 の結果を示した。また, Table 2にはカルミン酸市販試薬製品およびコチニール色素製品の carminic acid のピーク面積を示した。市販試薬製品のカタログ成績値として, CA1はHPLCによるカルミン酸の純度70%以上, CA2は吸光度法により95%以上と記載されているものである。両者の試薬に記載の carminic acid の純度値が正しいとすれば, 下記の関係式(式A)が成り立ち, CA2中の carminic acid 含量比はCA1を1としたとき, 1.4~1と推定される。

$$\frac{\text{Purity}_{\text{CA2}}}{\text{Purity}_{\text{CA1}}} = \frac{95 \sim 100}{70 \sim 100} = 1.4 \sim 1.0 \quad \text{(A)}$$

次に, 同一化合物の同条件におけるHPLCのピーク面積の比はその絶対量の比に等しいことから, CA1およびCA2に観察された carminic acid のピーク面積(実測値)比を求めた(式B)。

$$\frac{\text{Area}_{\text{CA2}}}{\text{Area}_{\text{CA1}}} = \frac{20682647}{6439525} = 3.2 \quad \text{(B)}$$

式Aから求めた理論値が式Bから求めた実測値と一致しないことから, 両者の, 少なくとも一方の純度値は carminic acid の純度を適切に示していないと推定された。純度値が記載されていたCA6およびCA7についても同様に, 理論値と実測値が一致せず, 試薬に記載されている純度値が carminic acid の絶対量を示すものではないことが示唆された。したがって, 市販試薬を定量用標準品の代用品としてコチニール色素製品中の carminic acid 含量をHPLCにより定量することは, 試薬中の carminic acid の絶対量が表示されていないため, 適切ではないことが確認された。この結果は, 天然由来の化合物では, たとえ測定対象の化合物の試薬グレードの製品が入手できたとし

てもその絶対量が保証されているとはいえず, すなわち, 定量用標準品の代用としてはならないという現状の定量分析における解決できない問題の一つを示している。

2) qNMRによる carminic acid の定量

qNMRによる定量分析は, $^1\text{H-NMR}$ で得られる化学シフトの異なる各プロトンシグナル面積比が各置換基に由来する水素原子の数の比を表す特性を利用した方法である。 $^1\text{H-NMR}$ において, シグナル面積比は分子中の個々の置換基上の水素原子数の比に対応する。さらに2つのシグナルが異なる化合物(A, B)に由来する場合には個々のシグナル面積と化合物の濃度は関係式(3)で表すことができる。

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A m_A}{H_B m_B} = \frac{H_A W_A / M_A}{H_B W_B / M_B} \quad \text{(3)}$$

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / W_{\text{std}}} \times P_{\text{std}} \quad \text{(4)}$$

ただし, I = シグナル面積, H = 特定基のプロトン数, m = モル濃度, W = 重量, M = 分子量, P = 純度%, sample = 試料, std = 基準物質。

よって, 2つの化合物の内, 一方の化合物として純度が明らかな基準物質(std)を用いれば, モル比と溶液の調製値の関係から測定対象の化合物の含量(純度)を決定できる関係式(4)が成り立つ。qNMRによる定量分析は, 関係式(4)を利用し, 純度あるいは濃度が既知の基準物質を予め加えた溶液中で測定対象の化合物の $^1\text{H-NMR}$ 測定を行い, 得られたスペクトル上に観察される基準物質と測定対象の化合物に由来するシグナル面積, 水素数および濃度比から定量値を算出する方法である。関係式(4)からわかるように, 測定対象化合物の標準品を必要としないことがqNMRの特徴であり, SIにトレーサブルな一次標準測定法の

うち、一次標準比率法、すなわち「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」の資格を原理的に有する。

qNMRによる定量分析では、各シグナル面積の定量性を厳密に確保することが不可欠であるため、Pauli および Saito らの報告と既報を参考に Table 1 に示すように測定条件を設定した。qNMRによる1測定当たりの所要時間は約20分であり、且つ得られた測定値は高い再現性を示し、不確かさは概ね1.0%以内であった。

また、qNMRによる分析値のSIトレーサビリティの確保のため、計量学的に妥当な手順によって値付けされ、計量学的トレーサビリティが証明されたCRMの一つであるフタル酸水素カリウム(Potassium hydrogen phthalate: PHP)を一次標準として用いた。すなわち、qNMR標準液中のDSS- d_6 の濃度をPHPにより校正した後に、DSS- d_6 を二次標準として測定対象化合物のqNMR測定を行う2段階の方式を用いることとし、測定対象化合物の定量値のSIトレーサビリティは、CRMのPHPを介して完全に実現した(Fig. 1)。

Fig. 3には、カルミン酸市販試薬製品(CA1-3, 5-8)、高純度カルミン酸(CA4)およびコチニール色素製品(CA9-12)のqNMRスペクトルを示した。試料CA2-7では δ 1.90~2.40 ppmの範囲にMe基、 δ 6.50~7.00 ppmの範囲にアントラキノン骨格上のPhH基、 δ 3.50~4.70 ppmの範囲にC-glc基にcarminic acidに由来するシグナルが観察された。また、CA1, 8-11には、賦形剤として用いたと推定されるデキストリンに由来するシグナルが δ 3.30~5.40 ppmに観察され、CA12(液体試料)には、液化に用いたプロピレングリコールに由来するシグナル(δ 1.09, 3.42, 3.50, 3.89 ppm)が観察された。よって、qNMRスペクトルデータから各製品の品質評価も可能であることが示唆された。

次に、これらのcarminic acidの純度および含量を δ 0 ppmに観察されるDSS- d_6 のMe基に由来するシグナル積分値(9H)に対する δ 6.50~7.00 ppmの範囲に観察されるcarminic acidのアントラキノ

ン骨格上のPhHのシグナル積分値(1H)から、式2により算出した。Carminic acid ($C_{22}H_{20}O_{13}$ (MW 492.39))として、カルミン酸市販試薬7製品(CA1-3, 5-8)に21.3~78.3%、高純度カルミン酸(CA4)に81.8%、コチニール色素4製品(CA9-12)に3.9~25.7%含有されることがわかった。また、単離精製して得られた高純度カルミン酸(CA4)は、X線結晶解析よりカルミン酸カリウム塩3水和物の化学構造を有することが報告されていることから、 $C_{22}H_{19}O_{13}K^+ \cdot 3H_2O$ (MW 584.53)として算出したところ、高純度カルミン酸(CA4)に97.1%、カルミン酸市販試薬7製品(CA1-3, 5-8)に25.3~91.6%、コチニール色素4製品(CA9-12)に4.6~30.5%含有されることがわかった。

さらに、得られた含量値をHPLCの結果と比較したところ、qNMRで求めた含量%とcarminic acidのピーク面積の間に良好な正の相関が得られた(Fig. 4, 5)。したがって、今回行ったqNMRが幅広い純度(含量)範囲で絶対定量法として機能し、計量学的に信頼性の高い分析値を導いていることが確認された。今回行ったqNMRは、1測定当たりの所要時間が約10分以内で極めて効率的であり、測定対象の標準品を必要としない絶対定量法である点が優れていた。

D. まとめ

カルミン酸市販試薬製品および食品添加物コチニール色素製品の主色素成分carminic acidの品質評価法および定量法としてqNMRを応用し、従来のHPLC法と結果を比較した。qNMRにより、各製品のcarminic acidの含量を求めたところ、製品毎に含量が異なることを明らかとした。また、qNMRスペクトルデータから各製品中の賦形剤を推定することが可能であり、品質評価法としても有効であることが示唆された。

参考文献

- 1) Pauli G. F., Jaki, B. U., Lankin, D. C.: A routine experimental protocol for qHNMR illustrated with taxol. *J. Natural Prod.*, **70**, 589-595 (2007).
- 2) Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A., Maeda, T.: Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia*, **41**, 213-218 (2004).
- 3) Shao, G., Kautz, R., Peng, S., Cui, G., Giese, R. W.: Calibration by NMR for quantitative analysis: p-Toluenesulfonic acid as a reference substance. *J. Chromatogra. A*, **1138**, 305-308 (2007).
- 4) 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 Add. Contam.*, **24**, 799-806 (2007).
- 5) Wells, R. J., Cheung, J., Hook, J. M.: Dimethylsulfone as a universal standard for analysis of organics by QNMR. *Accred. Qual. Assur.*, **9**, 450-456 (2004).
- 6) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hirai, T.: A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).

F. 研究発表

- 1) 論文発表
なし
- 2) 学会発表
 1. 杉本直樹, 古庄紀子, 建部千絵, 末松孝子, 内海博明, 多田敦子, 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 (2008.5).
 2. 杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 棚元憲一, 末松孝子, 内海博明, 齋藤 剛, 井原俊英, 小島 豊, 伊藤澄夫: qNMRを用いた天然色素カルミン酸の絶対定量. 日本生薬学会第55回年会 (2008.9).
 3. 建部千絵, 杉本直樹, 齋藤 剛, 井原俊英, 末松孝子, 有福和紀, 内海博明, 吉田雄一, 多田敦子, 佐藤恭子, 山崎壮, 棚元憲一, 西村哲治: qNMRに基づく食用合成色素の新規定量法. 日本薬学会第129年会 (2009.3).

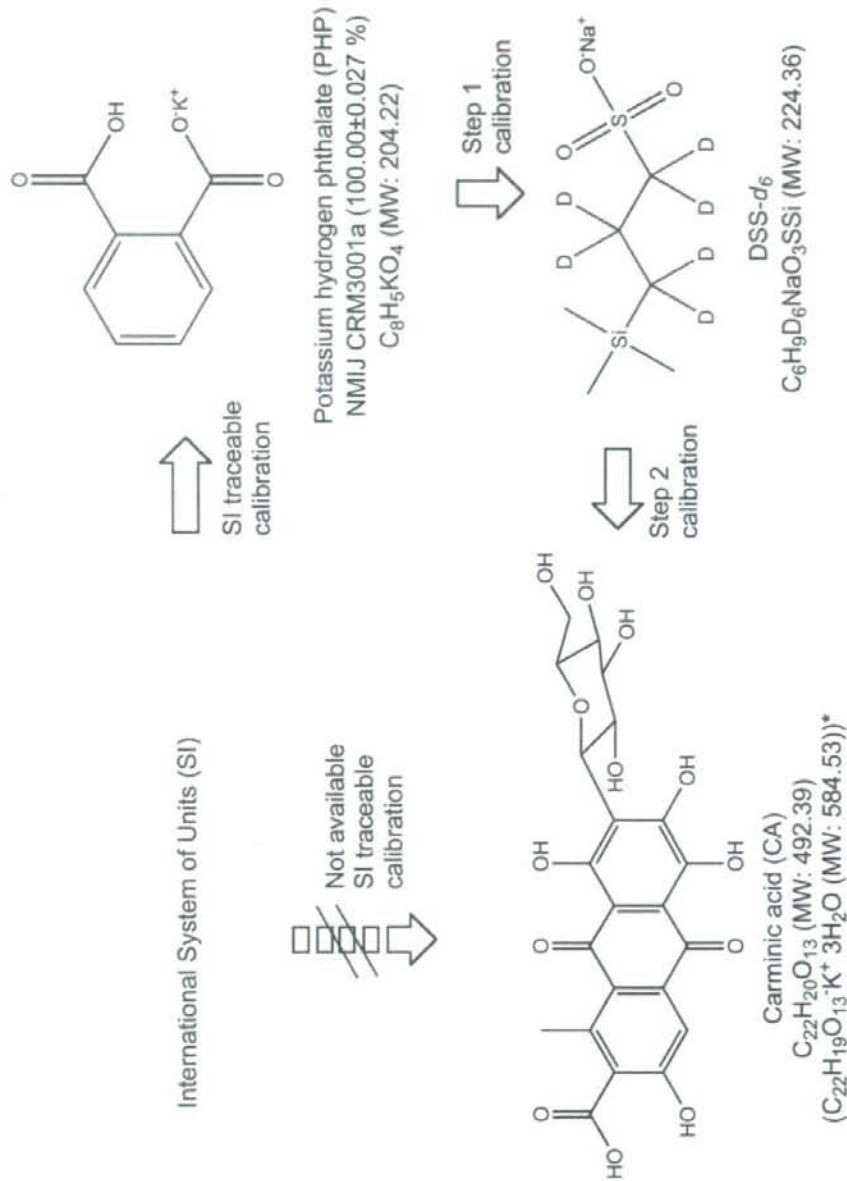


Fig. 1 Strategy of SI-traceable quantification based on qNMR.
* The formula is derived from X ray analysis.

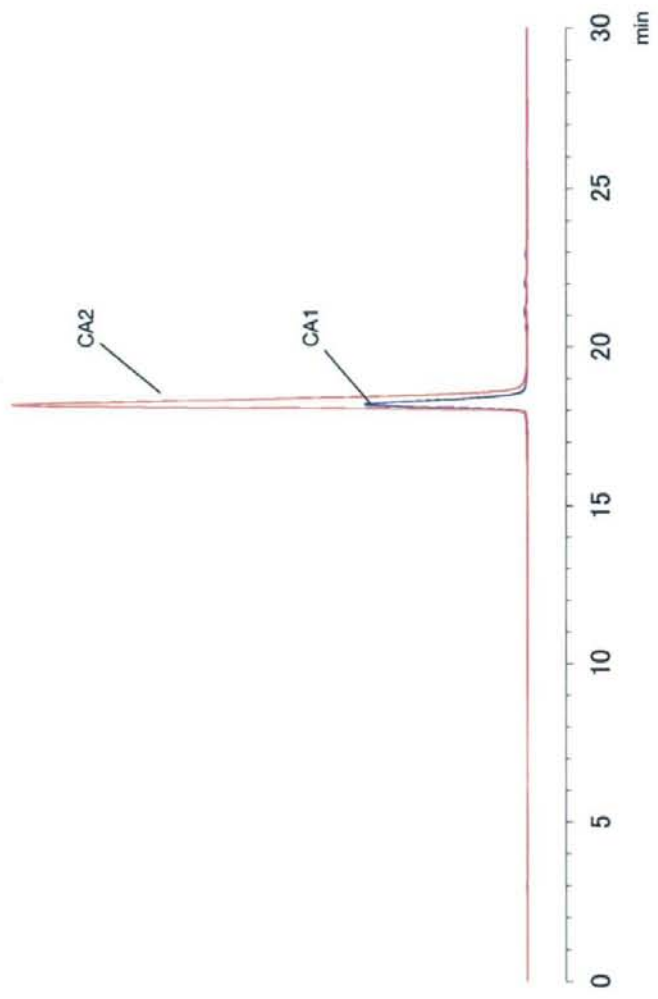


Fig. 2 HPLC profiles of carminic acid reagents CA1 and CA2

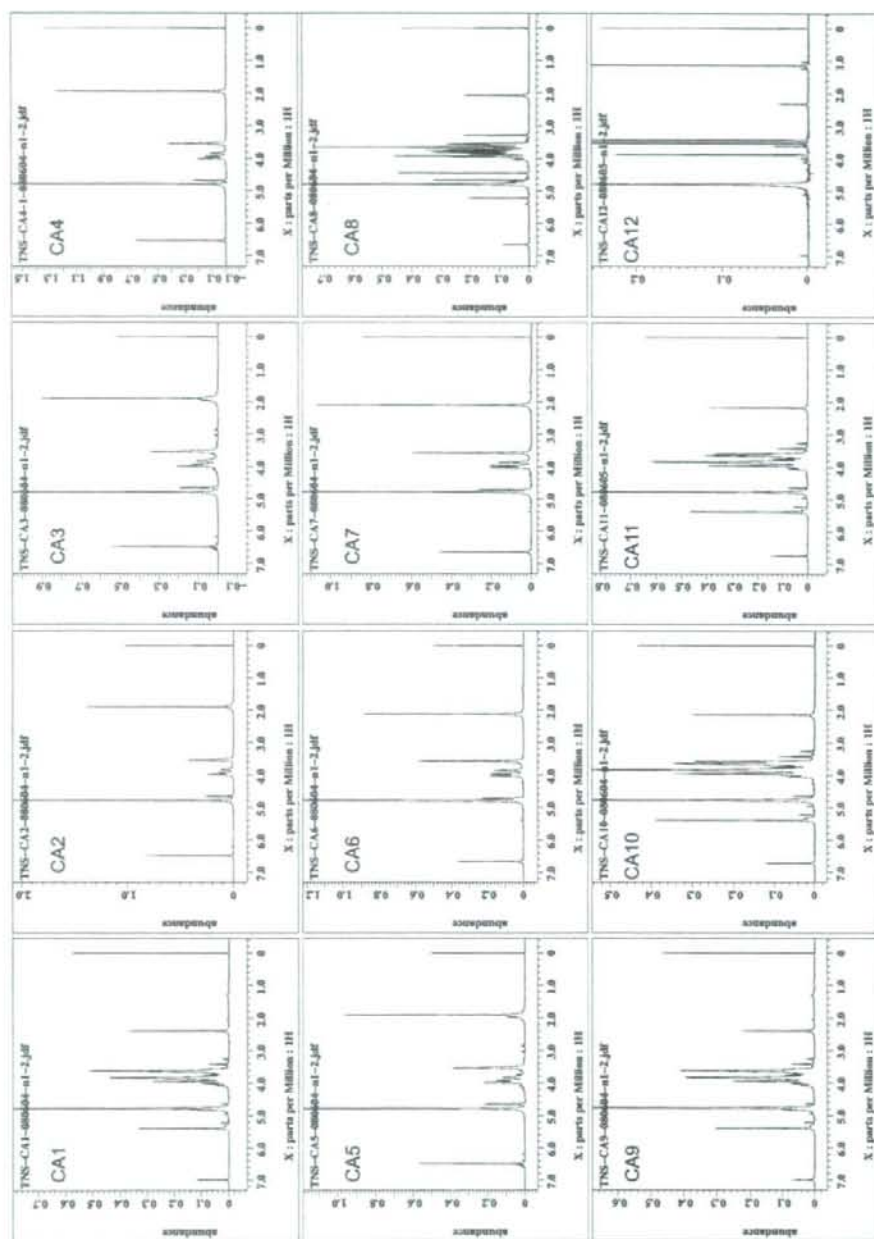


Fig. 3 ¹H NMR spectra of carminic acid reagents and cochineal pigments CA1-3, 5-8 = reagent grade, CA4 = isolated sample for X-ray analysis, CA9-12 = food color grade.

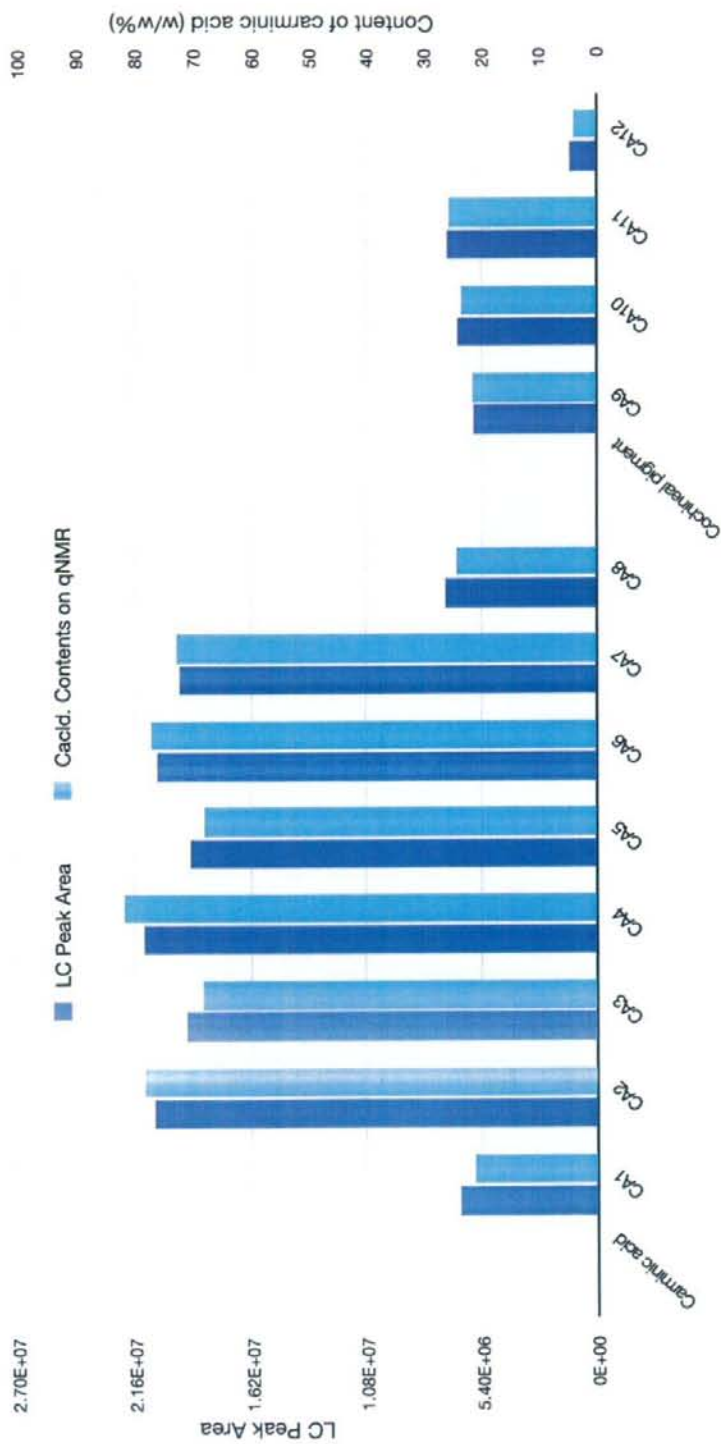


Fig. 4 Comparison between LC peak area and content of carminic acid in the reagents and food colors CA1-3, 5-8 = reagent grade. CA4 = isolated sample for X-ray analysis. CA9-12 = food color grade.

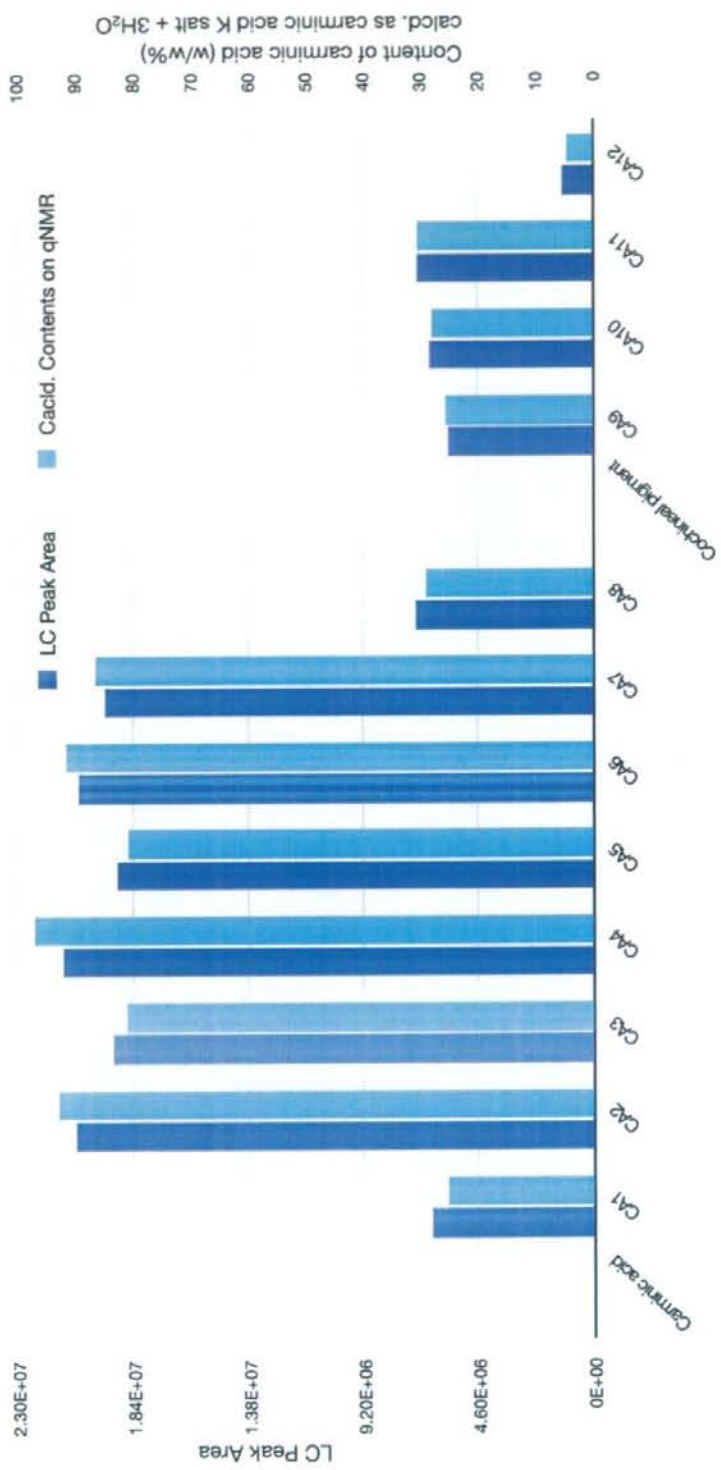


Fig. 5 Comparison between LC peak area and content of carminic acid in the reagents and food colors CA1-3, 5-8 = reagent grade. CA4 = isolated sample for X-ray analysis. CA9-12 = food color grade. The contents were calcd. as carminic acid potassium salt trihydrate.

Table 1 Instruments and acquisition parameters

Spectrometer	ECA600 (JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	- 5 - 15 ppm
Data points	32000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	45°
Pulse delay	30 s ($>5 \cdot T_1$)
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	25°C
Solvent	D ₂ O
qNMR reference material	DSS-d ₆
Primary standard material	Potassium hydrogen phthalate (PHP) (NMIJ CRM3001a)

Table 2 Quantitation of the content of carminic acid in the different reagents and cochineal pigments, calculated from the content of carminic acid in the samples with qNMR.

Sample No.	Sample Type	Catalog spec.	LC		qNMR	
			Area	Target signal Ph-H	(% as carminic acid)	(% as carminic acid potassium salt trihydrate)
Carminic acid						
CA1	Reagent (Wako)	>70% (HPLC)	6439525	21.3		25.3
CA2	Reagent (Merck)	>95% (Spectrophotometric)	20682647	78.3		92.9
CA3	Reagent (Sigma-Aldrich)	-	19189340	68.3		81.1
CA4	Isolated sample (for X-ray analysis)	-	21172301	81.8		97.1
CA5	Reagent (Extrasynthese S.A.)	-	19028131	68.1		80.8
CA6	Reagent (MP Biomedicals, LLC)	95.0%	20561664	77.2		91.6
CA7	Reagent (Acros)	70-90%	19521465	72.9		86.5
CA8	Reagent (Wako, for analysis of food additive)	-	7079698	24.4		29.0
Cochineal pigment						
CA9	Food color (San-Ei Gen F.F.I., powder)	-	5785440	21.6		25.6
CA10	Food color (San-Ei Gen F.F.I., powder, low allergen)	-	6519563	23.5		27.9
CA11	Food color (San-Ei Gen F.F.I., powder)	-	7006552	25.7		30.5
CA12	Food color (San-Ei Gen F.F.I., liquid)	-	1232696	3.9		4.6

4. 保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究

平成 20 年度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

分担研究報告書

保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究

— 既存添加物検討対象候補品目の選定 —

研究分担者 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

研究協力者 伊藤 裕才 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

既存添加物の保存料・日持ち向上剤は、抗菌もしくは静菌作用があるとされているが、市販製品の抗菌力と抗菌活性成分が不明確である上、有効性を担保する成分規格も設定されていない。そこで、本研究では、有効性を担保するための成分試験法を開発することを目的に、活性成分を解析し、抗菌活性評価の指標成分を明らかにすることをめざす。初年度は保存料・日持ち向上剤の抗菌・抗かび活性スクリーニングを行うこととし、検討対象候補とする既存添加物品目の選択作業を分担した。

A. 研究目的

既存添加物は、平成 7 年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、国による事前の安全性・有効性の評価、成分規格設定がないまま使用が認められたものである。厚生労働省はその後既存添加物の安全性確認と成分規格作成に向けて積極的に取り組んできたが、安全性確認と比べて、成分規格の整備が大幅に遅れている。残された品目には、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や、有効性と有効成分自体が明確でない品目が多い。今後の成分規格案作成には一層の困難が予想されるので、業界自力での自主規格作成に頼るだけでは成分規格作成は進展しない。我々の研究班では、平成 17～19 年度厚生労働科学研究において、酸化防止剤、苦味料、増粘安定剤、ガムベースに重点を置き、有効性（活性）を測定する手法も導入して品質評価の指標となる成分を明らかにしてきた。本研究では、これまで我々が取り上げなかった保存料・日持ち向上剤の成分解析を取りあげる。

既存添加物の保存料・日持ち向上剤は、抗菌も

しくは静菌作用があるとされているが、市販製品の抗菌力と抗菌活性成分が不明確である上、有効性を担保する成分規格も設定されていない。そこで、有効性を担保するための成分試験法を開発することを目的に、活性成分を解析し、抗菌活性評価の指標成分を明らかにする。

研究班として、初年度は保存料・日持ち向上剤の抗菌・抗かび活性のスクリーニングを行うとした。筆者らは検討対象とする既存添加物の選択作業を分担した。

B. 研究方法

既存添加物 418 品目のうちで、既存添加物名簿収載品目リスト注解書（1999 年、日本食品添加物協会）〔以下、リスト注解書〕において、用途が保存料に区分されている既存添加物およびリスト注解書の「基原・製法・本質」、「概要」または「品質特性」に抗菌作用があると記載されている品目を選んだ。さらに、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進事業）「国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究」（主任

研究者：佐藤恭子、国立医薬品食品衛生研究所）の分担研究「生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定」報告書その2既存添加物品目の生産量統計：最終報告（日本食品添加物協会、平成20年3月）に3回の調査対象年（平成11年度、平成14年度、平成17年度）における流通実態（国内製造量または輸入量の報告）が記載されているので、その記載を流通実態とした。

C. 結果及び考察

1. 抗菌もしくは静菌作用があるとされている既存添加物
 - ・用途が保存料と記載されている既存添加物
 - ・既存添加物名簿収載品目リスト注解書に抗菌作用があると記載されている既存添加物を表1にリストした。

なお、(1) 流通量が極端に少ない既存添加物では日本食品添加物協会の生産量統計調査では調査対象年度にちょうど輸入・製造・出荷実績がなかった場合がありえること、(2) 日本食品添加物協会に非加盟の企業が調査漏れになっている場合がありえること、(3) 生産量統計調査では流通実態が確認されなかったにも関わらず過去に厚生労働省が実施した既存添加物の安全性確認試験のためには試料が提供された品目もあること、(4) 従来は流通実態が確認されていなかったが、厚生労働省が実施した消除予定添加物名簿の公示に対して、流通実態があるとして訂正の申し出があった既存添加物があることなどから、生産量統計調査結果から既存添加物の流通実態を確定することまではできないことに留意する必要がある。

表1にリストした品目から「本研究の検討対象候補を選択して、日本食品添加物協会に研究試料として提供を依頼することとした。本研究の趣旨にご協力いただける企業に製品を研究用試料としてご提供いただいた。各品目につき、2

～3ロット（同一製造企業の同一商品名の製品については1ロットずつでよい）、同一製造企業に基原または製造方法が異なる製品がある場合には、基原または製造方法ごとに1ロットを目安に、製品の提供を依頼した。

入手できた試料について抗菌・抗かび活性スクリーニングを行った。その結果に基づき、次年度以降に、成分分画と抗菌・抗かび活性測定を連携して行い、抗菌・抗かび活性を担う成分の分画と構造決定を進める予定である。

D. 結論

既存添加物名簿収載品目リスト注解書と「生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定」報告書をもとに、抗菌もしくは静菌作用があるとされている既存添加物のうちで流通実態があると思われる品目をリストアップした。日本食品添加物協会に依頼して、本研究の趣旨にご協力いただける企業に製品を研究用試料としてご提供いただいた。

E. 研究発表

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 既存添加物名簿収載品目リストにおいて抗菌もしくは静菌作用があるとされている既存添加物

品目名	用途	抗菌もしくは静菌作用に関する記載概要	主成分記載	流通実態(注1)				入手 試料
				平11	平14	平17	なし	
エゴノキ抽出物	保存料	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌作用 ・細菌・酵母などに対して比較的濃度で増殖抑制 ・かびへの効力は弱い 	安息香酸	なし	なし	なし		
オゾン	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・食品工場内及び水等の殺菌に利用 ・強い酸化力、殺菌力があるが、不安定 	オゾン	なし	なし	なし		
オレガノ抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌作用 ・日持向上剤としても利用 	カルバクロー ル、チモール	なし	なし	なし		
カラシ抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌作用 ・抗菌作用は、真菌(かび、酵母)、グラム陰性菌、グラム陽性菌の順に強く、乳酸菌には弱い 	イソチアノ酸ア リル	あり	あり	あり	1製品	
カワラヨモギ抽出物	保存料	<ul style="list-style-type: none"> ・かびの生育を抑制する効果 ・グラム陽性菌、酵母にも有効 ・グラム陰性菌には効果なし 	カピリンなど	あり	なし	なし	1製品	
カンゾウ油性抽出物	酸化防止剤	<ul style="list-style-type: none"> ・一部の細菌に対して抗菌作用 	フラボノイド	あり	あり	あり	2製品	
グレープフルーツ種子抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌作用 ・日持向上剤として利用 	脂肪酸およびフ ラボノイド	あり	あり	あり		
クローブ抽出物	酸化防止剤	<ul style="list-style-type: none"> ・一部の菌に対して抗菌作用 	オイゲノール	あり	あり	あり		
クワ抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・グラム陽性菌に抗菌作用 ・日持向上剤としても利用 	フラボノイドお よびスチルベン 誘導体など	なし	なし	なし	1製品	
香辛料抽出物		<ul style="list-style-type: none"> ・日持向上の効果をもつものもある 	74種類の起源 物質が定められ ているので、主 成分は様々	あり	あり	あり		
酵素処理チャ抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌作用 ・日持向上効果 	カテキン類のグ ルコース付加物	なし	なし	なし		

品目名	用途	抗菌もしくは静菌作用に関する記載概要	主成分記載	流通実態(注1)			入手 試料
				平11	平14	平17	
酵素分解ハトムギ抽出物	保存料	・抗菌作用	ハトムギ種子からの熱水抽出物を α -アミラーゼ処理した後、エタノール処理したもの	あり	あり	なし	
コメスカ油抽出物 シソ抽出物	酸化防止剤 製造用剤	・防菌、防ばい性をもつ ・微生物に対して抗菌作用 ・日持向上剤として利用	フェルラ酸 テルペノイド。 フラボノイドも 含む	あり	なし	あり	
シヨウガ抽出物	製造用剤	・静菌作用	ジンゲロール類 及びシヨウガオール類	なし	あり	なし	
しらこたん白抽出物	保存料	・中性〜アルカリ域でグラム陽性菌、グラム陰性菌、特に耐熱性芽胞菌に対して有効	塩基性タンパク質(プロタミンヒスチン)	あり	あり	あり	2製品
セイヨウワサビ抽出物	酸化防止剤、 製造用剤	・細菌、かびに対して抗菌作用 ・日持向上剤としても利用	イソチオシアナート(アリルイソチオシアナート)	あり	あり	あり	
セージ抽出物	酸化防止剤	・抗菌作用 ・日持向上剤としても期待される	フェノール性ジテルペノイド(ジテルペン)及びカルノシン酸	あり	あり	なし	
チャ乾留物	製造用剤	・抗菌性の記載はない	特定できないアミノ酸、カフェイン、タンニン、カテキン類を含む	あり	あり	あり	

品目名	用途	抗菌もしくは静菌作用に関する記載概要	主成分記載	流通実態 (注1)			入手 試料
				平11	平14	平17	
チャ抽出物	酸化防止剤、 製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> 微生物の増殖抑制 日持ち向上に有効 	カテキン類	あり	あり	あり	3 製品
ツヤブリン (抽出物)	保存料	<ul style="list-style-type: none"> 比較的強い抗菌力 抗菌スペクトルが広い 細菌、かび、酵母に対する最小発育阻止濃度は25~100ppm 	ツヤブリン類	なし	なし	なし	
トウガラシ水性抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> 酵母に対する抗菌作用 日持向上剤として利用 	トウガラシの果 実から抽出して 得られた水溶性 物質	あり	あり	あり	1 製品
ニンニク抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> かび・酵母・細菌に対して抗菌作用 日持向上剤として利用 広範囲の細菌、真菌類に作用し、50~1000ppm程の濃度で生育阻止 抗菌作用はpHによって影響を受けない 	アリルスルフィ ド	あり	あり	なし	
ブドウ果皮抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> グラム陽性菌に対して抗菌作用 日持向上剤として利用 	ポリフェノール	なし	あり	なし	1 製品
ブドウ種子抽出物	酸化防止剤、 製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> 抗菌作用 日持向上剤としても利用できる 	プロアントシア ニジン	あり	あり	あり	1 製品
プロポリス抽出物	酸化防止剤	<ul style="list-style-type: none"> 抗菌作用 	フラボノイド	あり	あり	なし	
ペクチン分解物	保存料	<ul style="list-style-type: none"> 保存料として使用 抗微生物作用は、ガラクトクロン酸とオリゴガラクトクロン酸に基づく 酸性域 (pH5.5 以下) でグラム陽性菌、グラム陰性菌、特に乳酸菌に対して有効 	ガラクトクロン 酸	あり	あり	あり	1 製品
ヘゴ・イチョウ抽出物	酸化防止剤	<ul style="list-style-type: none"> 公開特許公報で、抗菌作用があると記載されている 	公開特許公報で は、アミノ酸と ミネラル類	なし	なし	なし	1 製品
ハスペレチン	酸化防止剤、 強化剤	<ul style="list-style-type: none"> 抗微生物作用、抗ウイルス作用 	ハスペレチン	なし	なし	なし	
ペパー抽出物	酸化防止剤	<ul style="list-style-type: none"> 抗菌作用 	フェルペリン類	あり	あり	あり	

品目名	用途	抗菌もしくは静菌作用に関する記載概要	主成分記載	流通実態(注1)			入手 試料
				平11	平14	平17	
ホコッシン抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・バクチオールに抗菌作用 ・日持向上剤として利用 ・細菌、特にグラム陽性菌の増殖を阻害 ・芽胞形成細菌や乳酸菌に対しては 50ppm 以下で増殖を阻害し、添加量を多くすると殺菌作用が現れる 	バクチオール	なし	なし	なし	1 製品
ε-ポリリシン	保存料	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌作用 ・ほとんどの細菌の生育を抑制 ・大腸菌、枯草菌、乳酸菌、黄色ブドウ球菌などの繁殖防止に有効 ・酵母に対しても有効 ・カビに対しては効果はやや低い 	ε-ポリリシン	あり	あり	あり	2 製品
モウソウチク乾留物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌作用(微生物の増殖抑制効果) ・日持向上剤として利用 	有機酸やフェノール系化合物など多数の成分	あり	あり	あり	
モウソウチク炭抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・酢酸を含み、静菌作用がある ・日持向上剤として利用 	糖類、酢酸	なし	なし	なし	
モウソウチク抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・種々の微生物に対する発育阻止効果 ・抗菌作用は、グラム陽性菌、酵母に対して強く、その他の菌に対しても有効 ・日持向上剤として利用 	2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノ	なし	あり	あり	4 製品
ユッカフォーム抽出物	乳化剤、製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・抗真菌作用 ・抗菌作用は細菌、かびには弱い、酵母には強く作用し、ほとんどの酵母に対して 50~100ppm 程度の濃度で発育を阻止 ・抗菌作用は pH によって影響を受けない ・日持向上剤としても利用 	サポニン(サルササポニンなど)	あり	あり	あり	1 製品
ラクトフェリン濃縮物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> ・大腸菌、ブドウ球菌などに対する静菌作用 	ラクトフェリン	あり	あり	あり	

品目名	用途	抗菌もしくは静菌作用に関する記載概要	主成分記載	流通実態 (注1)			入手 試料
				平11	平14	平17	
リゾチーム	酵素	<ul style="list-style-type: none"> 細菌の細胞壁を構成するムコ多糖類を加水分解して溶菌作用を示す 日持向上剤および食品製造工程の微生物制御の目的で使用されることが多い 主成分であるシトラール及びびゲラニオールに抗菌、抗かび作用 日持向上剤として使用 	リゾチーム	あり	あり	あり	
レモン果皮抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> 抽出溶剤及び抽出温度によって溶解性が異なり、水溶性及び非水溶性の2種類がある 水溶性抽出物は日持向上剤としても利用 	モノテルペノイド (シトラール及びびゲラニオール等)	なし	なし	あり	
ローズマリー抽出物	酸化防止剤	<ul style="list-style-type: none"> 抽出溶剤及び抽出温度によって溶解性が異なり、水溶性及び非水溶性の2種類がある 水溶性抽出物は日持向上剤としても利用 	フェノール性ジテルペノイド (ロスマノール、カルノソール及びカルノシン酸等)	あり	あり	あり	
ワサビ抽出物	製造用剤	<ul style="list-style-type: none"> 主成分のイソチオシアナート (イソチオシアン酸アリル) は抗菌作用がある 日持向上剤として使用 抗微生物活性を示す 食品に直接添加するよりも、蒸気状態でより強い効力を発揮 効力は真菌 (カビ、酵母)、グラム陰性菌、グラム陽性菌の順に強く、乳酸菌には弱い。 	イソチオシアナート (イソチオシアン酸アリル)	なし	あり	あり	

注1: 既存添加物品目の生産量統計:最終報告 (日本食品添加物協会、平成20年3月) において、3回の調査対象年 (平成11年度、平成14年度、平成17年度) における流通実態 (国内製造量または輸入量の報告)