

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
松藤寛、佐々怜一郎、 本間友輝、宮島拓臣、 千野誠、山崎壮、島村智子、 受田浩之、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

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

松藤 寛^{*1}, 佐々怜一郎^{*1}, 本間友輝^{*1}, 宮島拓臣^{*1}, 千野 誠^{*1}, 山崎 壮^{*2},
島村智子^{*3}, 受田浩之^{*3}, 松井利郎^{*4}, 松本 清^{*4}, 山形一雄^{*1}

^{*1} 日本大学生物資源学部食品科学工学科

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所

^{*3} 高知大学農学部

^{*4} 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity of Binary Mixtures of Antioxidants

Hiroshi Matsufuji^{*1}, Ryoichiro Sasa^{*1}, Yuki Honma^{*1}, Hiromi Miyajima^{*1}, Makoto Chino^{*1},
Takeshi Yamazaki^{*2}, Tomoko Shimamura^{*3}, Hiroyuki Ukeda^{*3}, Toshiro Matsui^{*4},
Kiyoshi Matsumoto^{*4} and Kazuo Yamagata^{*1}

^{*1} Department of Food Science and Technology, College of Bioresource Sciences,
Nihon University, Kameino 1866 Fujisawa, Kanagawa 252-8510

^{*2} Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences,
Kamiyoga 1-18-1 Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

^{*3} Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe-B 200, Nankoku, Kochi 783-8502

^{*4} Division of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School
Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

The effect of a binary mixture of antioxidants on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was investigated using 11 antioxidants as food additives or 24 natural antioxidants. Among 55 combinations of binary mixtures, including 11 antioxidants, BHA, BHT, catechin, quercetin, sesamol, ferulic acid, gallic acid, morin, ellagic acid, α -tocopherol, and δ -tocopherol, the DPPH radical scavenging activity of 36 combinations were significantly greater than the expected activity of individual antioxidants, resulting in synergistic effects. Also, one combination showed antagonistic effect. Among 276 combinations of 24 natural antioxidants, including 4 benzoic acids, 3 cinnamic acids, 12 flavonoids, 2 vitamins, and 3 terpenes, 74 showed synergistic effects and 61 showed antagonistic effects. However, the ratios of the actual to expected activity of many synergistic and antagonistic combinations were about 1.1-1.2 and 0.8-0.9, respectively.
(Received Aug. 20, 2008; Accepted Dec. 3, 2008)

Keywords: antioxidant, antioxidant activity, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity, synergy, antagonism
キーワード: 酸化防止剤, 抗酸化活性, DPPHラジカル消去活性, 相乗効果, 相殺効果

2008年1月現在、我が国では酸化防止剤として19品目が指定添加物として、42品目が既存添加物として認可されている¹⁾。指定添加物と異なり、既存添加物の多くは天然由来の複雑な混合物であることから、有効成分および成分組成の特定が困難であり、有効成分含量あるいは成分組成を指標とした規格基準の設定が遅れている。網羅的な成分組成の確認、有効成分の同定、および定量法の開発がなさ

¹⁾ 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

²⁾ 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

³⁾ 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

⁴⁾ 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

[†] 連絡先 (Corresponding author), hmatsufu@brs.nihon-u.ac.jp

れているもの²⁾³⁾、現状の機器分析では不可能である場合も多い。このような背景のもと、著者らは抗酸化活性評価により、酸化防止剤の品質評価ができるのではないかと考え、酸化防止剤の抗酸化活性について検討を行ってきた。前報⁴⁾において、抗酸化活性の一つとしてラジカル消去活性を分光学的に測定する1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法および2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 法は、単一の成分からなる酸化防止剤を高い測定精度をもって活性を評価しうること、またその活性は高い直線性をもって濃度依存性を示すことを明らかにした。今後は、単一ではなく、天然由来の複

難な組成を持つ酸化防止剤に対する適用性、すなわち有効成分濃度と活性との相関を調べるのが大きな課題となる。

しかし、有効成分間あるいは含有成分が活性測定時において相互作用を引き起こす場合、活性値から濃度を見積もることは困難となる。すなわち、相乗効果を有する場合、活性値から濃度を見積もると、実際の濃度よりも高く見積もることになり、相殺効果を有する場合は低く見積もることになる。実際、抽出液などの複合系においては、しばしば抗酸化物質の濃度と活性との間に相関がないことが報告され、その詳細は不明であるが、成分間の何らかの相互作用すなわち相乗効果あるいは相殺効果によるものと推察されている⁵⁾⁻⁷⁾。

アスコルビン酸と α -トコフェロールは相乗効果を示す代表的な組み合わせであり、*in vitro*⁸⁾および*in vivo*¹⁰⁾において相乗効果を示すことが確認されている。これはアスコルビン酸と α -トコフェロールがラジカルを消去するだけでなく、 α -トコフェロールがラジカルを消去した反応体をアスコルビン酸が還元し、 α -トコフェロールへと再生することによると考えられている。その他の組み合わせでは、Pekkarinennら¹¹⁾はリノール酸メチルの酸化試験系において、フラボノイドであるミリセチンおよびルチンは α -トコフェロールの存在下で相乗的な抗酸化性を示すが、ケルセチンは相対的な抗酸化性を示すことを報告している。Hiramotoら¹²⁾は、水相とヘキサン相からなる二相系でのDPPHラジカル消去活性測定系において、アスコルビン酸と α -トコフェロールの混合は相乗効果を示すものの、カテキン類やフラノン類などは相乗効果を示さないとしている。一方、Murakamiら¹³⁾は、DPPH-HPLC法とリポソーム酸化の2つの試験系を用いたところ、エピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、ケルセチンは α -トコフェロール存在下においてDPPH-HPLC法では相対的な抗酸化性を示すが、リポソーム酸化系では相乗的な抗酸化性を示すことを明らかにしている。組み合わせは無数であり、詳細な報告はあまり無いが、成分間の相互作用の有無は試料濃度および選択する抗酸化試験法に依存すると考えられている。

そこで、本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単一からなる酸化防止剤11種の2成分混合系(55通り)における抗酸化効果をDPPHラジカル消去活性を用いて2つの濃度レベルで検討した。さらに、構造活性相関およびその他の成分影響の観点から、安息香酸類、桂皮酸類、フラボノイド類、ビタミン類、ジテルペン類の24種の抗酸化成分を用い、その組み合わせ(276通り)での抗酸化効果も併せて検討した。

実験方法

1. 試薬

DPPHは和光純薬工業製を用いた。単一の化合物からな

る酸化防止剤11種:BHA, BHT, (+)-カテキン(CT), ケルセチン(QC), *trans*-フェルラ酸(Fer), 没食子酸(GA), モリン(MO), セサモール(SM)は東京化成製, D- α -トコフェロール(aTOC)はMP Biochemical製, D- α -トコフェロール(dTOC), エラグ酸(EA)はSigma製を用いた。安息香酸類4種;p-ヒドロキシ安息香酸(pHyB), バニリン酸(VA), プロトカテック酸(PA)と没食子酸を、桂皮酸類3種;カフェ酸(Caf), p-クマル酸(pCou)とフェルラ酸を、フラボノイド類12種;アピゲニン(AG), ルテオリン(LT), ケンフェロール(KM), ケルセチン, モリン, ミリセチン(MC), ルチン(RT), フィセチン(FT), タキシフォリン(TX)シアニジン(CY), ベラルゴニジン(PG)とカテキンを、ビタミン類2種;アスコルビン酸(AA)と α -トコフェロールを、ジテルペン類3種;ロスマリン酸(Ros), カルノシン酸(CarA), カルノソール(Car)は和光純薬工業, 東京化成, フナコシあるいはSigma社より購入した。その他の試薬は市販の特級試薬を、水はMilli-Q水を用いた。

2. DPPHラジカル消去活性測定法

前報⁹⁾に準じて行った。すなわち、エタノールに溶解した試料200 μ lに0.1 mol/l Tris-HCl緩衝液(pH 7.4) 800 μ l, 0.2 mmol/l DPPH-エタノール溶液1 mlを順次添加し、10秒間攪はん後、室温暗所下にて30分間放置した。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)として、試料の消去率を以下の式で求めた。また、50%消去率を与える試料溶液の濃度をIC₅₀、25%消去率を与える試料濃度をIC₂₅とした。

$$\text{消去率(\%)} = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100 \quad (1)$$

3. 2成分混合系の評価

終濃度がそれぞれIC₅₀値あるいはIC₂₅値の濃度になるように2成分の混合溶液を作成した。すなわち、IC₅₀値またはIC₂₅値の2倍となる濃度溶液を調製し、等量で混合した。この溶液を用いて、上記方法にてDPPHラジカル消去活性(I_M)を測定した。

一般的にDPPHラジカル消去活性は調製したDPPH濃度や反応時間に影響を受けることから、標準物質としてトロロックスを同時に測定し、トロロックス等量TEACとして規格化されることが多い。しかし、本試験においては2成分間の影響を見ることを目的とするため、トロロックスでの規格化は行わず、代わりに試料A+試料Bの混合物の活性測定と同時に、毎回試料Aと試料B(それぞれ2倍希釈)を測定することとした。

4. 予測値との比較

試料Aと試料Bの混合試料の消去率の予測値(I_E)は、既報¹⁴⁾¹⁵⁾に従い、以下の式で求めた。

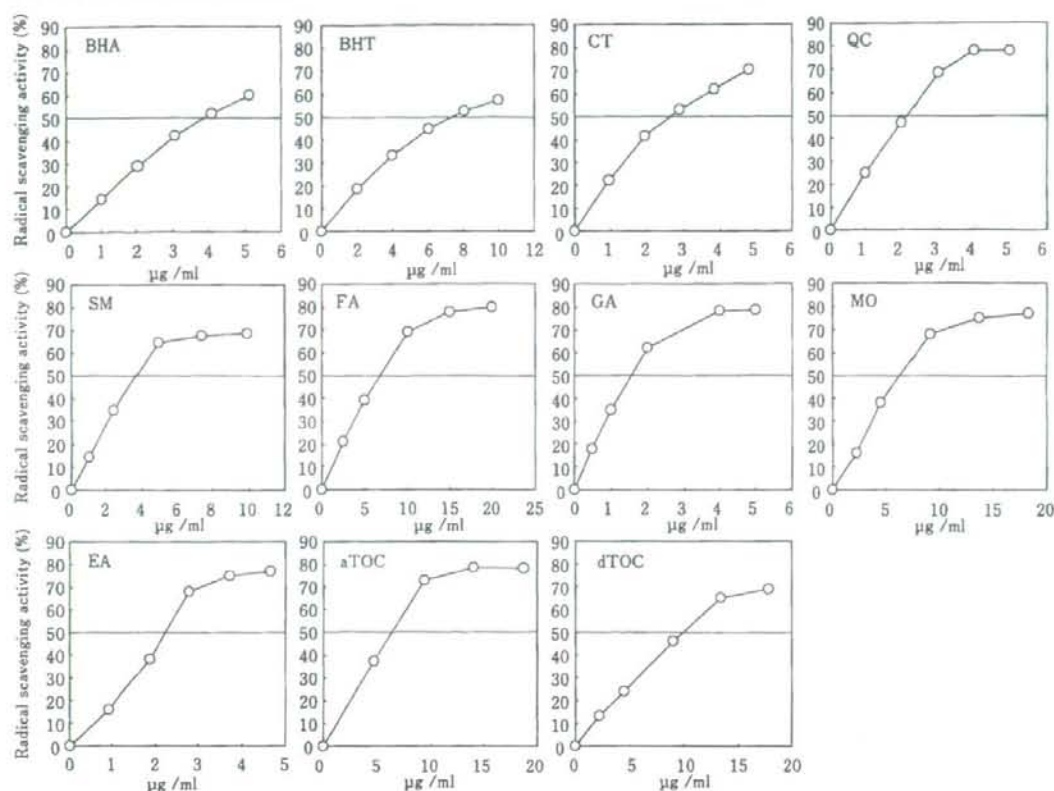


図1 酸化防止剤のDPPH消去活性

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100) \quad (2)$$

ここで I_A は試料 A の消去率, I_B は試料 B の消去率を示す。

したがって, この予測値 I_E と実測値 I_M とを比較し, 混合系の消去率に及ぼす影響を評価した。評価基準は, t 検定により予測値 I_E と実測値 I_M の平均値の差の検定を行い, 危険率 5% で差の有無を判定した。 I_E/I_M 比が 1 以上で有意差ありの場合を相乗効果, 1 以下で有意差ありの場合を相殺効果, それ以外の場合を相加効果と判定した。なお, 本実験は独立した系で最低 3 回繰り返して行い, I_E/I_M 比が大きい (1.2 以上) あるいは小さい場合 (0.8 以下) は計 6 回繰り返して行った。

実験結果

1. 各試料の DPPH ラジカル消去活性

各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性を図 1 に示す。本実験で用いた 11 種類の酸化防止剤の活性は, 濃度依存的に上昇したが, 消去率 60~70% を示す濃度以上から頭打ちを示す傾向が認められた。しかし, 60% の消去率を

示す濃度までは相関係数 0.96 以上の直線性をもって DPPH ラジカルを消去した。そこで, 本試験法を用いて 2 成分の混合系による評価を試みることにした。

2. 50% 阻害濃度における混合系評価

まず, 終濃度がそれぞれ IC_{50} 値の濃度になるように 2 成分の混合溶液を作製し, 11 種のすべての組み合わせ (55 通り) で DPPH ラジカル消去活性を測定した。表 1 に示すように, 各混合系の組み合わせは 64.2% (dTOC と BHA) から 78.8% (aTOC と BHT) の範囲にあった。50% 阻害濃度の組み合わせによることから, 混合物の阻害率は 100% 近い値を出す予想されたが, 結果的には 75% 前後であり, 混合物の阻害率は個々の阻害率の足し算にはならないと考えられた。一方, 式 (2) においては, 消去率 50% を示す 2 成分の混合試料の消去率は 75% を示すと予測される。したがって, 本結果は予測値から大きく外れるものではなく, 成分の混合による活性は, 相加的に上昇すると考えられた。しかし, 図 1 に示すように, DPPH 消去活性測定はいくつかの試料においては消去率 60~70% 以上で濃度依存的ではなく頭打ちを示すことから, 高い消去率を示す濃度

表 1 酸化防止剤の 50% 消去濃度での 2 成分混合系における消去率 (%)

	IC ₅₀ (μ g/ml)	BHA	BHT	CT	QC	SM	Fer	GA	MO	EA	aTOC	dTOC
BHA	3.89 \pm 0.07	—	73.4 \pm 0.4	69.5 \pm 0.7	69.0 \pm 0.9	66.1 \pm 0.5	76.0 \pm 0.7	68.9 \pm 1.3	73.0 \pm 0.7	76.3 \pm 1.4	73.3 \pm 0.7	64.2 \pm 1.6
BHT	7.32 \pm 0.13	—	—	75.9 \pm 0.3	74.1 \pm 1.6	70.3 \pm 0.2	77.6 \pm 0.4	73.9 \pm 0.9	76.5 \pm 1.2	76.9 \pm 0.6	78.8 \pm 0.2	72.3 \pm 1.4
CT	2.63 \pm 0.03	—	—	—	72.0 \pm 2.5	70.8 \pm 0.5	73.4 \pm 0.9	66.4 \pm 2.5	75.0 \pm 1.8	78.4 \pm 0.2	69.9 \pm 1.4	65.6 \pm 2.0
QC	2.13 \pm 0.06	—	—	—	—	72.2 \pm 0.2	76.0 \pm 0.5	78.5 \pm 1.6	78.7 \pm 0.1	77.2 \pm 1.5	66.8 \pm 1.4	74.2 \pm 0.4
SM	3.73 \pm 0.01	—	—	—	—	—	74.1 \pm 0.3	70.8 \pm 0.4	74.1 \pm 0.2	75.6 \pm 0.4	63.7 \pm 0.2	69.4 \pm 1.3
Fer	6.80 \pm 0.06	—	—	—	—	—	—	72.8 \pm 1.0	76.6 \pm 0.5	67.5 \pm 1.4	67.3 \pm 0.3	72.4 \pm 1.4
GA	1.55 \pm 0.04	—	—	—	—	—	—	—	76.5 \pm 1.1	78.6 \pm 0.3	70.7 \pm 1.2	69.5 \pm 1.6
MO	6.41 \pm 0.41	—	—	—	—	—	—	—	—	78.5 \pm 0.2	74.5 \pm 1.7	77.2 \pm 1.2
EA	2.24 \pm 0.08	—	—	—	—	—	—	—	—	—	74.3 \pm 0.2	76.9 \pm 0.1
aTOC	6.37 \pm 0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	67.1 \pm 2.5
dTOC	9.89 \pm 0.17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

値は 3 回の繰り返し測定での平均値 \pm 標準偏差で表示。

表 2 酸化防止剤の 25% 消去濃度での 2 成分混合系における消去率 (I_M) と予測値 (I_E)

	BHA		BHT		CT		QC		SM		Fer		GA		MO		EA		aTOC		dTOC	
	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E
BHA	—	—	58.0	55.3	51.6	51.1	53.2	49.7	58.2	56.1	58.3	54.2	56.4	53.7	56.9	53.5	53.6	50.0	51.8	48.2	56.2	53.1
BHT	—	—	—	—	51.0	51.2	51.3	49.8	51.0	48.2	48.7	46.9	48.5	47.3	48.2	46.8	49.0	47.8	49.9	45.9	54.9	51.0
CT	—	—	—	—	—	—	46.9	45.1	50.7	51.7	37.8	39.0	45.3	46.6	48.7	48.8	45.0	42.2	43.5	43.2	48.0	46.3
QC	—	—	—	—	—	—	—	—	57.4	50.8	52.5	48.6	44.9	41.1	52.3	47.9	44.9	41.4	46.4	38.4	52.5	45.6
SM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	52.0	43.5	46.5	44.0	49.0	43.4	52.8	45.1	51.3	44.1	57.6	49.0
Fer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	48.5	43.9	47.5	40.4	38.4	42.5	45.9	41.5	51.6	46.6
GA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	37.5	36.8	43.0	40.7	42.7	37.5	47.1	44.6
MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	44.4	39.8	49.7	41.4	48.5	43.7
EA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43.3	38.8	50.6	44.6
aTOC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49.1	42.5
dTOC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

値は 3 回あるいは 6 回の繰り返し測定での平均値で表示。

での混合系評価だけでは、2 成分間の影響を十分に反映しないと考えられた。そこで次に直線性の範囲内に入る IC₂₅ を示す濃度での混合系の評価を行った。

3. 25% 消去濃度における混合系評価

IC₂₅ 値を示す濃度の試料を調製後、これを等量で混合した 2 成分の混合溶液を作製し、11 種のすべての組み合わせ (55 通り) での活性を測定した。また、測定時の誤差を軽減するために、各試料の阻害率を混合試料と同時に毎回測定し、各試料の消去率 (式 (2) における I_A および I_B) を求めた。表 2 にすべての組み合わせの実測消去率 (I_M) と予測消去率 (I_E) を示す。概ね I_M と I_E は一致する傾向を示した。各組み合わせにおける平均値の差の有意差を判定した組み合わせを図 2 に示す。比の値が 1 以上で有意差ありの組み合わせは相乗効果、比の値が 1 以下で有意差ありの組み合わせは相殺効果と判定したところ、55 通りの組み合わせのうち、36 通りで相乗効果、1 通り (フェルラ酸とエラグ酸) で相殺効果が観察された。しかし、どちらの効果においてもその比は最大で 1.2 程度、最小で 0.9 程度であり、わずかに相加効果を上回る、あるいは下回る程度であった。

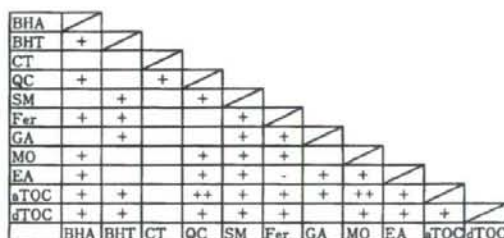


図 2 酸化防止剤の組み合わせによる DPPH ラジカル消去活性予測値に対する効果

- + : I_M/I_E の比が 1.0 以上 1.2 未満で有意差あり。
- ++ : I_M/I_E の比が 1.2 以上で有意差あり。
- : I_M/I_E の比が 0.8 以上 1.0 未満で有意差あり。

4. 他成分における混合系評価

検討した 11 種類の酸化防止剤の混合系における抗酸化効果が、わずかに相加効果を上回る、あるいは下回る程度であったことから、いくつかの他成分を用いて同様に検討した。すなわち、安息香酸類 4 種、桂皮酸類 3 種、フラボ

ノイド類12種、ビタミン類2種、ジテルペン類3種を用いて、計276通りの組み合わせにおけるDPPHラジカル消去活性を検討した。表3に各試料の IC_{50} 値を示す。活性の強弱を安息香酸類、桂皮酸類、フラボノイド類でみると、フェノール性水酸基の数に依存しており、これらについては明らかにされている構造活性相関⁽⁴⁾と一致する。次に得られた値を参考に、これらの組み合わせの活性に及ぼす影響について検討した。なお、pHyBとAGは本条件ではほとんど活性を示さなかった(pHyBの消去率%：50 μ g/ml, 2.0%；100 μ g/ml, 3.0%；200 μ g/ml, 3.8%；300 μ g/ml, 4.7%；500 μ g/ml, 5.7%。AGの消去率%：20 μ g/ml, 2.6%；40

μ g/ml, 5.4%；60 μ g/ml, 7.3%；80 μ g/ml, 8.9%；100 μ g/ml, 12.1%)が、それぞれ100 μ g/mlおよび10 μ g/mlとなるように調製し、混合試験に供することとした。また、図2と一部重なる組み合わせ(GA, Fer, QC, MO, CT, aTOCの15通り)については、新たに測定することとした。全組み合わせによる実測消去率と予測消去率を表4に、また混合による活性予測値に対する効果を図3に示す。276通りの組み合わせのうち、74通りで相乗効果、61通りで相殺効果が観察され、半数は相加的であった。しかし、表3と同様、相乗および相殺効果は弱く、 I_M/I_E 比が1.2以上を示した組み合わせは14通り、 I_M/I_E 比が0.8以下を示した組み合わせは33通りであった。1.2以上の組み合わせのうち、6通りはaTOCとの組み合わせ、4通りはPAとの組み合わせであり、0.8以下の組み合わせのうち、17通りはVAとの組み合わせ、12通りはpCouとの組み合わせであった。

表3 使用した抗酸化物質の IC_{50} 値

	IC_{50} (μ g/ml)		IC_{50} (μ g/ml)
pHyB	>500	MC	2.58 \pm 0.08
VA	12.8 \pm 0.28	RT	7.10 \pm 0.07
PA	2.14 \pm 0.01	FT	2.42 \pm 0.04
GA	1.63 \pm 0.04	TX	4.04 \pm 0.04
pCou	125 \pm 6.5	CY	2.88 \pm 0.07
Fer	6.58 \pm 0.14	PG	8.17 \pm 0.40
Caf	2.96 \pm 0.06	CT	2.57 \pm 0.02
AP	>500	AA	4.84 \pm 0.05
LT	3.60 \pm 0.07	aTOC	10.4 \pm 0.02
KM	9.09 \pm 0.03	Ros	2.84 \pm 0.01
QC	2.36 \pm 0.01	CarA	4.77 \pm 0.05
MO	6.18 \pm 0.02	Car	6.81 \pm 0.11

値は3回の繰り返し測定での平均値 \pm 標準偏差で表示。

考 察

全組み合わせのうち、 α -トコフェロール(aTOC)との組み合わせだけをみると、多くの化合物と相乗効果を示し、アスコルビン酸(AA)との組み合わせでは活性は約1.24倍に増強した。一方、aTOCとフラボノイドとの組み合わせをみると、相乗効果が認められたものはルテオリン(LT)、ケンフェロール(KM)、ケルセチン(QC)、モリン(MO)、フィセチン(FT)との組み合わせであり、その他(アピゲニン(AP)、ミリセチン(MC)、ルチン(RT)、タキシフェリン(TX)、シアニジン(CY)、ベラルゴニジン(PG)、カ

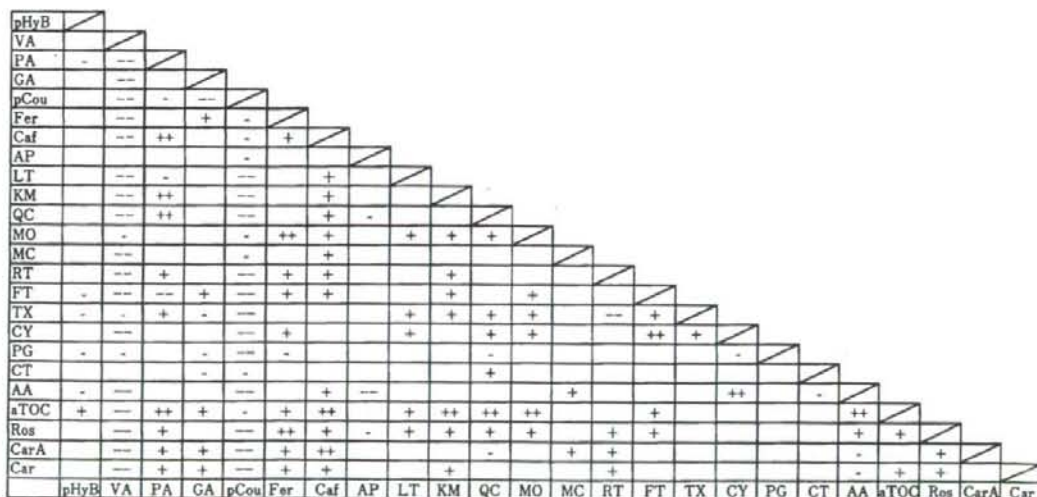


図3 24種の抗酸化物質の組み合わせによるDPPHラジカル消去活性予測値に対する効果

- + : I_M/I_E の比が1.0以上1.2未満で有意差あり。
- ++ : I_M/I_E の比が1.2以上で有意差あり。
- : I_M/I_E の比が0.8以上1.0未満で有意差あり。
- : I_M/I_E の比が0.8未満で有意差あり。

表 4 抗酸化物質の 25% 消去濃度での 2 成分混合系における消去率 (I_M) と予測値 (I_E)

	pHyB		VA		PA		GA		pCou		Fer		Caf		AP		LT		KM		QC		MO		
	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	
pHyB	—	—	33.5	35.4	18.7	20.6	27.2	25.1	30.2	29.3	21.8	21.9	26.8	23.9	0.0	0.0	18.0	17.2	29.5	28.4	26.2	27.6	23.0	21.2	
VA	—	—	—	—	30.8	50.7	34.0	53.0	40.1	54.9	34.3	49.6	30.7	52.4	36.7	32.8	35.0	45.3	33.4	52.5	36.4	47.8	37.5	46.5	
PA	—	—	—	—	—	—	41.8	38.8	35.2	43.9	46.5	42.2	50.7	40.7	23.6	24.9	37.0	39.3	53.0	42.8	46.4	36.4	45.4	41.6	
GA	—	—	—	—	—	—	—	—	34.9	45.5	48.5	43.9	44.5	41.6	23.2	24.0	36.0	36.2	46.0	45.3	44.9	41.1	37.5	39.2	
pCou	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.7	44.0	38.2	45.0	29.8	31.8	31.3	41.5	35.9	51.2	39.8	51.2	35.5	44.3	
Fer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45.7	39.6	21.5	19.8	41.8	39.7	46.8	43.5	40.1	38.5	49.2	40.4	
Caf	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29.8	32.5	38.8	35.0	57.7	51.2	59.5	51.4	48.6	41.0	
AP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	31.9	34.7	30.5	28.7	17.9	21.2	33.5	35.0	
LT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43.0	41.9	50.1	48.5	67.6	57.6	
KM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	44.9	44.3	49.1	43.6	
QC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	54.1	48.8
MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

	MC		RT		FT		TX		CY		PG		CT		AA		aTOC		Ros		CarA		Car	
	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E
pHyB	20.6	20.2	21.7	21.5	24.1	29.0	25.0	27.9	24.8	24.2	17.4	21.7	20.2	21.9	21.7	24.7	22.0	19.3	27.3	25.8	24.1	24.4	31.0	30.8
VA	32.9	45.5	31.7	47.4	36.8	46.6	40.5	45.0	35.0	49.1	39.4	44.9	41.3	44.1	33.1	47.4	33.5	43.6	34.3	52.1	33.7	50.7	27.3	49.2
PA	40.7	37.7	45.3	40.1	20.3	39.6	61.3	55.3	46.3	45.1	40.7	41.5	42.5	40.4	48.8	44.5	51.7	40.6	59.7	51.2	60.1	50.3	59.1	49.6
GA	39.7	36.1	40.8	42.9	45.6	39.6	41.1	46.3	42.4	43.2	36.6	39.4	37.0	43.2	40.4	41.6	42.7	37.4	45.5	43.4	47.5	42.3	56.3	48.4
pCou	36.4	43.5	35.4	45.2	38.5	52.4	38.6	50.6	34.6	49.4	33.8	44.2	36.7	45.5	16.9	47.5	35.0	43.7	39.3	49.4	38.4	48.4	40.4	51.8
Fer	36.2	35.3	42.8	38.7	46.0	41.8	40.6	42.5	44.1	38.5	36.0	40.0	37.8	39.0	49.3	47.6	52.2	43.9	57.5	41.5	46.2	40.3	52.1	46.5
Caf	45.1	40.0	49.1	42.2	46.8	43.0	45.1	40.6	49.7	49.3	40.6	42.4	42.9	42.5	47.1	41.5	46.5	37.5	57.5	49.4	58.5	48.4	58.6	49.4
AP	17.4	14.7	21.2	20.7	24.1	25.5	28.8	27.8	15.6	15.6	20.8	22.0	32.0	31.7	12.5	20.6	20.1	20.7	26.2	27.9	22.1	25.7	31.1	32.6
LT	31.3	30.8	37.4	35.0	47.2	46.5	61.3	52.8	48.6	44.9	35.5	35.9	55.0	55.4	33.1	36.5	39.9	36.4	43.7	41.3	40.8	39.5	39.5	39.1
KM	36.5	35.9	45.0	41.9	50.3	43.0	46.1	41.7	51.1	49.4	43.6	41.8	44.5	48.0	44.9	45.0	51.5	41.1	53.2	46.7	49.6	45.7	59.6	50.8
QC	36.3	33.7	40.1	38.3	38.4	35.5	50.9	43.1	38.3	33.5	34.0	38.1	51.3	46.2	43.5	42.6	45.4	38.4	51.0	44.0	36.4	42.2	42.5	41.1
MO	35.4	32.9	49.6	45.3	52.5	46.8	59.9	53.1	48.8	45.1	38.0	38.5	56.7	55.6	48.2	45.3	49.7	41.4	50.1	42.5	43.0	40.8	43.3	43.8

	MC		RT		FT		TX		CY		PG		CT		AA		aTOC		Ros		CarA		Car		
	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	I _M	I _E	
MC	—	—	35.8	33.0	34.9	32.5	37.7	35.6	28.5	30.0	33.0	35.2	37.4	36.6	43.0	38.2	38.4	34.7	33.2	31.1	39.9	34.7	36.8	40.4	
RT	—	—	—	—	38.4	36.9	17.2	34.3	41.7	38.2	37.2	38.0	36.6	36.1	36.9	39.7	43.7	39.8	47.5	41.0	45.5	39.9	48.5	44.7	
FT	—	—	—	—	—	—	46.6	40.9	39.1	30.9	36.0	36.5	45.7	44.1	35.6	39.0	45.6	39.1	46.7	42.6	43.2	40.9	45.1	42.3	
TX	—	—	—	—	—	—	—	45.5	39.1	38.0	38.5	41.1	40.7	38.8	42.7	49.2	42.8	44.3	41.0	40.7	39.1	44.9	43.0	—	
CY	—	—	—	—	—	—	—	—	—	37.6	41.4	44.5	42.4	49.4	39.8	35.2	34.6	39.2	37.1	43.4	40.6	50.1	48.1	—	
PG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	36.4	37.0	39.7	42.1	38.6	37.8	48.7	46.1	39.7	38.1	38.7	42.4	
CT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.0	43.1	43.5	43.2	42.4	42.7	38.5	40.9	38.1	40.3	
AA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43.1	34.6	56.4	47.1	36.7	40.1	42.5	47.0	—	
aTOC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49.0	43.1	44.4	41.3	49.8	45.0	
Ros	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	48.4	43.8	59.2	53.4	
CarA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	44.4	44.1

値は 3 回あるいは 6 回の繰り返し測定での平均値で表示。なお、IC₅₀ 値が得られなかった pHyB は 100 μg/ml, AP は 10 μg/ml の濃度で使用した。

テキン (CT)) とは相加的であった。また、AA とフラボノイドとの組み合わせをみると、相乗効果が認められたものは MC と CY, 相殺効果が認められたものは AP と CT であり、その他はすべて相加的であった。Murakami ら¹³⁾ は DPPH-HPLC 法を用いて aTOC あるいは AA と 15 種のフラボノイドをそれぞれ 10 μM で混合し、各活性値の和

と混合物の活性値を比較して、aTOC とフラボノイド間、AA とフラボノイド間では相加的であったことを明らかにしている。Murakami らの結果と比較しうるフラボノイド 5 種 (QC, KM, RT, CY, CT) 10 通りを比較すると、aTOC vs QC, aTOC vs KM, AA vs CY, AA vs CT の 4 つの組み合わせで結果が異なっていた。しかし、Murakami ら

の方法とは①同一の濃度での検討と同一の活性値(IC₂₅)での検討, ②予測活性値の算出の違いの点で大きく異なる。著者らは, 50%の消去率同士を混ぜ合わせても100%にはならない点, 高濃度では活性値に頭打ちが認められる点, 活性が大きく異なる試料同士では濃度を統一することができない点から, 混合系の評価の判定に式(2)を用いた。ただ, 混合系での効果の判定は, 他にも解析方法がいくつか報告^{17)~19)}されており, 今後他の解析方法による判断が必要であろう。

SaitoとKawabata²⁰⁾はプロトカテック酸およびその類縁体とチオール類またはアミン類との相乗効果を明らかにし, プロトカテック酸のカテコール構造の再生が関与していることを報告している。本研究では, チオール類およびアミン類は使用していない。カテコール構造の有無から判断すると, 安息香酸類, 桂皮酸類, KM, QC, MOおよびCY, PGなどの比較は何らかの情報を与えてくれると考えられるが, カテコール構造の有無による影響を述べるには更なる検討が必要であろう。すなわち, 単一の化合物の活性評価においては, 理に合った構造活性相関が観察されているにも関わらず, 2成分間の混合効果を比較するとあまり構造には基づいておらず, この点からも, 複数の解析による判断が必要であることが推察される。

本結果から組み合わせの約半数は相加的であり, また相乗効果および相殺効果が認められた組み合わせにおいても, その多くは相乗効果をわずかに上回る, あるいは下回る程度であることが明らかとなった。須田ら²¹⁾は66種類の果実・野菜の抽出液のDPPHラジカル消去活性とポリフェノール含量を測定し, 可食部あるいは未利用部のアセトンと80%エタノール抽出液の活性総和と含量の間に, 相関係数としてそれぞれ0.947あるいは0.964と高い相関を有していることを明らかにしている。活性と含量の間における高い相関は, 抗酸化物質間にかかる効果の打ち消し, あるいは効果を検知しないことを示唆する。Murakamiら¹⁹⁾はリポソーム酸化系では相乗効果を示した組み合わせもDPPH-HPLC法では相加的な抗酸化性を示すことを報告している。今回の我々の結果やこれらの報告を考慮すると, DPPHラジカル消去活性測定法は抗酸化物質間にかかる効果を検知しにくいかもしれない。今後, 濃度依存性も含めて更なる検討が必要であろう。

要 約

DPPHラジカル消去活性測定法を用いて, 2成分間の活性に及ぼす効果(相乗効果, 相乗効果, 相殺効果)について検討した。11種の酸化防止剤55通りの組み合わせでは, 36通りにおいて統計上相乗効果, 1通りで相殺効果と判定される結果が得られた。一方, 24種の化合物276通りの組み合わせ(うち15通りは重複)では, 74通りにおいて相乗効果, 61通りで相殺効果が得られた。しかし, これらの多

くの組み合わせによる効果は弱く, 相乗効果をわずかに上回る, あるいは下回る程度であり, 2割以上の活性増強が認められた組み合わせは14通り, 2割以下の活性低下が認められた組み合わせは33通りであった。一方, α -トコフェロールとの組み合わせのうち6通りで, *p*-クマル酸との組み合わせのうち4通りで2割以上の活性増強が観察され, バニリン酸との組み合わせのうち17通りで, *p*-クマル酸との組み合わせのうち12通りで2割以下の活性低下が観察された。

本研究の一部は, 平成18年度, 平成19年度厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)により行われた。

文 献

- 1) 食品・食品添加物等規格基準(抄), 食衛誌, 49, J119-J156 (2008).
- 2) Tada, A., Jin, Z.-L., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T. and 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).
- 3) Sugimoto, N., Noike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T. and Tanamoto, K., Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add. Contam.*, 24, 799-806 (2007).
- 4) 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, 酸化防止剤評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験, 食科工, 54, 482-487 (2007).
- 5) Plumb, G.W., Lambert, N., Chambers, S.J., Wanigatunga, S., Heaney, R.K., Plumb, J.A., Aruoma, O.I., Halliwell, B., Miller, N.J. and Williamson, G., Are the extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetable antioxidants? *Free Rad. Res.*, 25, 75-86 (1996).
- 6) Hassimotto, N.M.A., Genovesi, M.J. and Lajolo, F.M., Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2928-2935 (2005).
- 7) Dasgupta, N. and De, B., Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chem.*, 101, 471-474 (2007).
- 8) Packer, J.E., Slater, T.F. and Willson, R.L., Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278, 737-738 (1979).
- 9) Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. and Gotoh, N., Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.*, 6, 1322S-1326S (1995).
- 10) Hamilton, I.M.J., Gilmore, W.S., Benzie, I.F.F., Mulholland, C.W. and Strain, J.J., Interactions between vitamins C and E in human subjects. *Br. J. Nutr.*, 84, 261-267 (2000).
- 11) Pekkarinen, S.S., Heinonen, I.M. and Hopia, A.L., Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *J. Sci. Food. Agric.*, 79, 499-506 (1999).
- 12) Hiramoto, K., Miura, Y., Ohnuki, G., Kato, T. and Kikugawa, K., Are water-soluble natural antioxidants syn-

- ergistic in combination with α -tocopherol? *J. Oleo. Sci.*, 51, 569-576 (2002).
- 13) Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H. and Matoba, T., Effects of ascorbic acid and α -tocopherol on antioxidant activity of polyphenolic compounds. *J. Food Sci.*, 68, 1622-1625 (2003).
- 14) Webb, J.L., Effect of more than one inhibitor. In "Enzyme and metabolic Inhibitors," Vol. 1, (Academic press, New York), pp. 66-79, 488-512 (1963).
- 15) Shi, J., Qu, Q., Kakuda, Y., Xue, S. J., Jiang, Y., Koide, S. and Shim, Y. -Y., Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *J. Food Comp. Anal.*, 20, 603-608 (2007).
- 16) Rice-Evans, C., Miller, N.J. and Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biol. Med.*, 20, 933-956 (1996).
- 17) Chou, T.C. and Talalay, P., Quantitative analysis of dose-effect relationships : the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.*, 22, 27-55 (1984).
- 18) Berenbaum M.C. (1985) The expected effect of a combination of agents : The general solution. *J. Theor. Biol.*, 114, 413-431 (1985).
- 19) Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M. and Perry, E.K., Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol. Biochem. Behavior*, 75, 661-668 (2003).
- 20) Saito, S. and Kawabata, J., Synergistic effects of thiols and amines on antiradical efficiency of protocatechuic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 8163-8168 (2004).
- 21) 須田郁夫, 沖 智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一, 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, *食料工*, 52, 462-471 (2005).
- (平成 20 年 8 月 20 日受付, 平成 20 年 12 月 3 日受理)

200837046A (2/2)

平成20年度 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

総括・分担研究報告書 分冊その2

— 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

研究報告書

平成20年度 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

—既存添加物の規格化に関する調査研究—

研究者 高橋 仁一

所属 日本食品添加物協会

役職 常務理事

[はじめに]

当協会は、これまでも既存添加物の成分規格設定を目標に、行政並びに学識経験者のご指導のもと、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。

平成14年11月には、これまで蓄積してきた189品目の自主規格を収載した「第三版既存添加物自主規格」を刊行した。しかしながら、既存添加物418品目のうち、公定規格及び自主規格の策定済み品目は凡そ半数に留まっていたため、新規規格策定を継続し、平成15年度に19品目の自主規格の策定を行ってきた。

平成16年度には、第8版食品添加物公定書への収載候補品目を中心に、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部との間でその規格・試験法の妥当性を検討し、38品目について見直し改定を行った。平成17年度には、新たに9品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、1品目について見直し改定を行った。平成18年度には、新たに4品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、30品目について見直し改定を行った。平成19年度には、新たに22品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、26品目について見直し改定を行った。

平成20年度には、第8版食品添加物公定書の公表を機に、既存添加物等の自主規格案の策定・蓄積結果の集大成及び既収載規格の見直しを実施し、「第4版既存添加物自主規格」を刊行し、既収載の142品目(既存添加物123品目及び一般飲食物添加物19品目)に加えて78品目を新規収載した。また、新たに18品目の既存添加物について自主規格の策定を行い、11品目について「第4版既存添加物自主規格」の見直し改定を行った。なお、自主規格未策定品目には、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等も多いことから、平成19年度に導入した「参考規格」の概念を継続適用することにより策定品目の拡大を推進した。

これらの作業は、これまでと同様に当協会技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。具体的には、既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。なお、必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、自主規格(案)を改定するとともに、その妥当性評価を行った。

また、「第4版既存添加物自主規格」の試験法について妥当性を確認するため、検証作業を実施した。

研究結果の概要と考察

1. 研究方法

1-1. 自主規格の策定及び見直し

本研究は、当協会技術委員会の自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当が中心となって推進した。これまでと同様に既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行い、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進め、適切な安全性確保が図れるよう、自主規格(案)を策定し、その妥当性を評価した。

新規規格策定に当たっては、主成分の確認、定量法の開発検討等を中心に行い、規格・試験法の

設定並びにその妥当性等に関して評価・検討を行った。

1-2. 「第4版既存添加物自主規格」試験法の検証

「第4版既存添加物自主規格」について、次の方法により試験法の検証調査を行った。

- (1) 検証調査対象品目
「第4版既存添加物自主規格」収載全品目
- (2) 検証調査方法
資料1の検証依頼書及び検証結果報告書様式により実施
- (3) 調査期間
平成20年10月～平成21年2月
- (4) 調査対象者
当協会の関連部会加入会社

2. 調査研究者

これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

3. 研究結果の概要

3-1. 自主規格の策定及び見直し

本年度は以下の品目について、「新規規格設定のための調査研究と規格案の策定」及び「当協会第三版既存添加物自主規格として定められている規格・試験法及びこれまでに策定した自主規格案の内容についての見直し」を行った。なお、必要に応じ新たな試験方法の導入を検討し、それらの妥当性に関しても評価・検討した。

(1) 平成20年度 新規規格作成検討18品目

本年度新規作成検討品目は次のとおりである。

用途分類(検討品目数)	自主規格作成検討品目
増粘安定剤(1品目)	レバン
酸化防止剤(8品目)	酵素分解リンゴ抽出物(参考規格)、コメヌカ酵素分解物(参考規格)、セサモリン(参考規格)、セージ抽出物(参考規格)、単糖・アミノ酸複合物(参考規格)、ヘゴ・イチョウ抽出物(参考規格)、ペパー抽出物(参考規格)、メラロイカ精油(参考規格)
ガムベース・光沢剤(1品目)	ミルラ
製造用剤・ミネラル(8品目)	酸素(参考規格)、水素(参考規格)、ゼイン、鉄(参考規格)、ナフサ(参考規格)、ニストース(参考規格)、木材チップ(参考規格)、木炭

(2) 既設定規格の見直し(11品目)

本年度は、「第4版 既存添加物 自主規格」(平成20年10月刊行)収載品目及び自主規格案策定済品目について見直しを行った。見直しの結果、改定が必要とされた品目について、その妥当性を評価・検討した。

本年度見直しを行った品目及び見直しの概要は次表のとおりである。

用途分類(品目数)	検討項目	見直しの概要
着色料 (8品目)	カロブ色素、金、クーロー色素、タマネギ色素、赤ダイコン色素、エルダーベリー色素、ブドウ果汁色素、褐色系色素(カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素、チコリ色素、ペカンナッツ色素)	・カロブ色素の確認試験及び色価試験法の改訂検討を行った。 ・金の純度試験(2)銅の改訂検討を行った。 ・クーロー色素、赤ダイコン色素及びブドウ果汁色素の確認試験の改訂検討を行った。 ・タマネギ色素の色価試験法の改訂検討を行った。 ・エルダーベリー色素の色価規格及び確認試験の改訂検討を行った。 ・褐色系色素9品目の差別化のための確認試験の改訂検討を行った。
増粘安定剤 (1品目)	グァーガム酵素分解物	・確認試験について見直しを行った。
酵素(1品目)	フルクトシルトランスフェラーゼ	・フルクトシルトランスフェラーゼ活性測定法に、第2法を追加・挿入した。
乳化剤(1品目)	動物性ステロール	・含量の規格及び定量法を追加した。

3-2 「第4版既存添加物自主規格」試験法の検証

検証結果の回収結果は、次のとおりであった。

	有効 回答 数	延 品 目 数	問 題 無 品 目 数	問 題 有 品 目 数	問題有品目の分類							備考	
					色 価	性 状	確 認 試 験	純 度 試 験	乾 燥 減 量	強 熱 残 分	定 量 法		
第1部会(甘味料)	6	6	5	1		1				1			
第2部会(着色料)	22	78	60	18	2		6	10					
第3部会(保存料・日持向上剤)	8	8	8	0									
第4部会(増粘安定剤)	4	4	4	0									
第5部会(酸化防止剤・ビタミン)	2	2	0	2			2					2	
第6部会(ガムベース・光沢剤)	1	13	13	0									部会で一括報告
第7部会(酵素)	1	62	62	0									部会で一括報告
第8部会(酸味料)	1	1	1	0									
第9部会(調味料・苦味料)	2	2	1	1		1							
第10部会(乳化剤)	2	2	2	0									
第13部会(製造用剤・ミネラル類)	5	7	6	1							1		
小 計	72	185	162	23	2	2	8	10	1	1	2		

4. 研究結果の概要

4-1. 自主規格の策定及び見直し

(1) 新規規格作成検討

① 増粘安定剤(1品目)

本年度は、レバンについて検討した。定義、含量、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、灰分及び微生物限度について調査研究を行い、その結果に基づいて規格案

を策定し、その妥当性について検討した。

②酸化防止剤(8品目)

酵素分解リンゴ抽出物、コメヌカ酵素分解物、セサモリン、セージ抽出物、単糖・アミノ酸複合物、ヘゴ・イチョウ抽出物、ペパー抽出物及びメラロイカ精油について自主規格案を作成すべく種々検討を行った。輸入品が多く自主規格設定のための検討作業が難しいこと及び国内販売品目については製造量が少ないこと等により、今回はいずれの品目についても参考規格(メーカー規格又は医薬部外品原料規格)となった。

なお、「参考規格」の既存添加物自主規格における扱いは、次の通りである。

参考規格の扱い:参考規格とは、製造会社等が自社規格を設定し品質管理を行う際の参考に資するための規格であり、関連する公定規格等を基に作成した規格である。
参考規格については、適否判定及び試験実施対象とするものではない。

また、「ペパー抽出物」の定量法のピペリン含量については、吸光係数等を使用した計算式への改訂検討が必要であり、「メラロイカ精油」については、定量法の追加検討が必要と考えられる。

③ ガムベース・光沢剤(1品目)

ミルラについて、自主規格案を作成し、項目及び試験法について確認を行い、妥当性を検証した。

④ 製造用剤・ミネラル(8品目)

製造用剤等8品目につき、規格及び試験方法を策定した。

ゼインについては、医薬品添加物規格に記載のゼインを参考として規格化した。

木炭については、「活性炭」の規格及び試験方法に準拠して作成した。ただし、その製法的特性に基づき、確認試験における吸着試験並びに純度試験における亜鉛の項目を削除した。

酸素、水素、鉄、ナフサ、ニストース及び木材チップについては、公定規格に基づく参考規格を作成した。

(2) 既策定規格の見直し

①着色料(8品目)

第4版既存添加物自主規格の検証結果に基づき、規格改訂検討を行い、改訂案を作成した。

- ・カロブ色素については、確認試験及び色価試験法の改訂検討を行った。
- ・金については、純度試験(2)銅の改訂検討を行った。
- ・クーロー色素、赤ダイコン色素及びブドウ果汁色素については、確認試験の改訂検討を行った。
- ・エルダーベリー色素については、色価規格及び確認試験の改訂検討を行った。

また、褐色系色素9品目については差別化のための確認試験の改訂検討を行った。カカオ色素において他の色素との差別化試験が確認できたことから、改訂案を作成した。

②増粘安定剤(1品目)

グァーガム酵素分解物の確認試験見直しを行い、改訂案を作成した。

③酵素(1品目)

フルクトシルトランスフェラーゼ活性測定法に、第2法を追加・挿入した。

④乳化剤(1品目)

「動物性ステロール」に「含量」の規格を追加するため、定量法の検討を行った。

4-2「第4版既存添加物自主規格」試験法の検証

(1) 全般的問題点

提出された検証試験成績書から、第4版既存添加物自主規格どおり100%忠実に試験を実施しているかどうか疑わしい点が散見された。例をあげると次のとおりである。

- ・第4版既存添加物自主規格に設定されていない項目についての試験結果記載があり、適判定の記載もされていた。
- ・限度試験項目について、実測値の記載がされていた。
- ・実測値の記載桁数が規格値と合致しないものが認められた。
- ・明らかに規格不適と思われる項目について試験省略がなされていた。
- ・実測値の得られるはずの規格項目に対して規格限度値のみの記載がされていた。
- ・第4版既存添加物自主規格以外の公定試験法及び社内試験法で試験が行われていた。
- ・濁度の定義の解釈ミスにより、澄明の結果が不適判定とされていた。

(2) 検証結果の概要

①第1部会(甘味料)

カンゾウ油性抽出物の液体品について性状及び乾燥減量規格不適合を示唆する報告があったが、問題点の有無を確認の必要があるものと考えられる。

②第2部会(着色料)

金については、純度試験(2)銅について試験法上の問題が確認された。アナトー色素(ノルビキシン粉末品)については、純度試験(4)アセトン等の試験において溶け残りが認められた。また、アナトー色素(ノルビキシン粉末品)の確認試験の引用ミスが確認された。更にクーロー色素、アカダイコン色素、エルダベリー色素及びブドウ果汁色素の確認試験に不具合が認められた。エルダベリー色素については色価規格が実態と合わないことが確認された。酵素処理ルチンにおいては、確認試験及び定量法に問題が確認された。

③第5部会(酸化防止剤・ビタミン)

酵素処理ナリンジンの定量法に問題が確認された。

④第9部会(調味料・苦味料)

カフェイン(抽出物)の性状(規格値)に問題が確認された。

⑤第13部会(製造用剤・ミネラル類)

チャ乾留物の強熱残分(規格値)に問題が確認された。

5. 研究結果の詳細

(1) 自主規格の策定及び見直し

研究結果の詳細は、別紙資料1のとおりである。

(2) 「第4版既存添加物自主規格」試験法の検証

検証結果の詳細は、別紙資料2のとおりである。

6. 考察

本年度は17品目の新規自主規格策定検討及び11品目の既設定規格・規格案の見直しを行った。

規格検討内容の概要は既に述べてきた通りであるが、本年度も、規格案を作成した段階で当協会顧問の山田隆先生に規格案の全面的レビューと問題点の抽出をしていただき、必要に応じて修正するという一連の作業を繰り返し行った。これにより、本年度新規策定及び改定した規格内容は、よりの確なものになったと考えている。また、第4版既存添加物自主規格発行に伴い収載品目の試験法について検証調査を実施し、結果に基づく規格見直し検討及び正誤表の作成検討を行った。

今後は、新規規格策定を継続するとともに、規格策定の可否についても早急に結論を出していく所存である。

また、第9版食品添加物公定書への新規収載を目指した第4版既存添加物自主規格の改訂作業を進めて行く所存である。

本年度自主規格策定あるいは見直し作業に関しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の山崎壮先生をはじめとする諸先生方並びに当協会顧問である山田隆先生には多大なるご指導をいただいた。この場をお借りし心より感謝申し上げる次第である。

以上

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	高橋 仁一	日本食品添加物協会
自主規格・規格専門委員長	大倉 裕二	キリンフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	相田 忠	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	浅田 敏	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	伊藤 秀行	理研ビタミン株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田 実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	長田 裕次	三菱商事フードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野 茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	皆藤 光雅	三菱化学フーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島 敏貴	上野製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	唐澤 昌彦	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	北村 智	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	香田 隆俊	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	坂井 昭浩	オルガノ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	滝口 俊男	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	武智 壽夫	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	田中正剛	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	関谷 史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾 正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	宮野 信雄	株式会社タイショーテクノス
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上 和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村椿 康隆	第一工業製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	大和谷 和彦	大日本住友製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本 隆志	小川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	吉武 繁廣	エーザイフード・ケミカル株式会社
技術顧問	山田 隆	日本食品添加物協会

平成20年10月17日

部会担当 各位

技 術 委 員 長
自 主 規 格 専 門 委 員 長

第4版既存添加物自主規格の試験法に関する検証依頼の件

首題の件、本年10月13日をもって『第4版既存添加物自主規格』を発行し、10月16日に発売いたしました。自主規格の作成に際しましては、多大のご協力を賜り、厚く御礼申し上げます。

発行に際しましては、可能な限りの内容確認等を実施いたしました。第8版公定書と同様の記載ミス等が残っている可能性があり、試験法について検証作業を行う必要が生じております。

つきましては、ご多忙中誠にお手数で恐縮には存じますが、下記にて至急ご検証いただきたく、格別のご協力を賜りますようお願い申し上げます。

記

1. 検証依頼対象品目

- ・『第4版既存添加物自主規格』に記載されている品目（暫定規格の品目を除く）

2. 検証実施要領

(1) 品目数・ロット数・n数

- ・1成分規格について1品目・1ロット・n=1を原則としてください。特性等の異なる製品で、試験法に影響する可能性の考えられる製品があれば、追加してください。

(2) 検証実施項目

- ・性状、確認試験等も含めた成分規格全項目としてください。

(3) 検証方法

- ・『第4版既存添加物自主規格』に100%忠実に試験（自家試験）を実施してください。（他の公定規格の試験法、社内の詳細試験法、別途に作成した詳細試験法等に基づく試験は、検証の意味がなくなりますので避けてください。）
- ・試験試料は、製品試料をご使用ください。製品試料がない場合は、証拠品（ロット保存サンプル）等をご使用ください。
- ・『第4版既存添加物自主規格』に100%忠実にロット試験（自家試験）を実施した試験記録等がある場合は、代替いただいて結構です。（必ず、原資データ等により、『第4版既存添加物自主規格』に100%忠実に実施された試験記録等であることを確認してください。）
- ・外部機関に依頼いただいた試験結果により代替いただいても結構です。（『第4版既存添加物自主規格』に100%忠実な試験結果に限定してください。）

・試験(自家試験)困難な項目等で試験法に問題がないと判断できる項目については、適宜、試験(自家試験)を省略いただいて結構です(別添検証試験成績書の記入例をご参照ください。なお、ヒ素、強熱残分に限定するものではありません。)

3. 検証結果報告書の様式
別添のとおりとしてください。

4. 検証結果報告書の扱い
提出いただいた検証結果報告書については、非開示扱いといたしますので、会社名等がそのままの形で開示されることはありません。

5. 検証結果報告書の提出期限
平成21年1月13日(火)

以上