

201234019A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	天倉 吉章	松山大学
	水上 元	名古屋市立大学大学院
	受田 浩之	高知大学
	松井 利郎	九州大学大学院
	石川 洋哉	福岡女子大学

平成25(2013)年3月

目次

I. 総括研究報告書

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究	-----	1
研究代表者: 穂山 浩		

II. 分担研究報告書

1. 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査		
1.1. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究	-----	12
研究協力者: 日本食品添加物協会		
2. 既存添加物の含有成分解析に関する研究		
1.2 タマネギ色素の色素構造に関する研究	-----	25
黄色タマネギ外皮由来の赤橙色色素の構造決定		
研究協力者: 伊藤 裕才		
2.2. 既存添加物クチナシ青色素の色素生成メカニズムの解明: ゲニピンと各種アミノ酸から生じる青色素の色調の差異に関する研究	-----	38
研究協力者: 伊藤 裕才		
2.3. 既存添加物ブドウ果皮抽出物の品質評価法の検討	-----	56
研究分担者: 天倉 吉章		
2.4. 既存添加物ゲンチアナ抽出物の成分研究	-----	63
研究分担者: 天倉 吉章		
2.5. 既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分解析と基原の確認	-----	71
研究協力者: 多田 敦子		
研究協力者: 石附 京子		
研究協力者: 杉本 直樹		
3. 既存添加物の成分規格試験法の検討		
3.1 定量NMR法の既存添加物と天然抽出物への適用に関する研究	-----	82
研究分担者: 水上 元		
3.2. カラメルⅢ中の2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールのHPLC及び LC/MSによる分析法	-----	88
研究協力者: 秋山 卓美		

4. 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

4.1. 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明 ----- 98

研究分担者: 受田 浩之

研究協力者: 島村 智子

研究協力者: 多田 敦子

研究分担者: 石附 京子

研究協力者: 柏木 丈弘

研究分担者: 松井 利郎

研究分担者: 石川 洋哉

4.2. 酸化防止剤力価評価におけるDPPH法と各種測定法との相関性の検討と酸化防止剤の

併用効果の解析に関する研究 ----- 104

研究分担者: 石川 洋哉

研究分担者: 松井 利郎

研究協力者: 受田 浩之

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 111

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

研究代表者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部長

研究要旨 既存添加物 365 品目のうち、国の成分規格設定済は第 8 版食品添加物公定書までで約 130 品目にとどまっている。第 9 版公定書に新規収載が期待される約 90 品目（約 60 品目の酵素を含む）を除くと、まだ約 140 品目の成分規格が未設定である。規格設定が困難な品目が残ったと言える。これまでに我々は厚生労働科学研究において、成分規格設定に必要な基礎情報を得るために、有効性と基原の確認を行いながら有効成分の解明と有効性評価試験法の開発に取り組んできた。そこで、次の研究計画を立てた。1. 国の成分規格が設定されていない既存添加物約 140 品目について、今後の成分規格作成の技術的実現性を調査研究する。それにより、既存添加物の今後の成分規格作成の優先順序を判断する。2. 今後規格設定する価値があり、かつ技術的に可能と考えられる品目については、含有成分の解析と基原（製造原料）確認及び成分規格試験法の検討を進める。3. 規格試験として抗酸化活性測定法の導入が必要なものは、含有成分の分離分析ができない酸化防止剤製品である。それらの品目を対象にして、DPPH 法、WST-1 法などの抗酸化活性測定法を用いた酸化防止剤の規格試験法素案を作成する。本年度は、以下の研究を行った。

(1) 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に調査を依頼した（事業委託）。第 9 版食品添加物公定書に未収載の既存添加物の中から、第 10 版公定書の作成に備え製品情報の収集を実施した。また、第 9 版では重金属規格は鉛規格に変更されるため、第 10 版に備え自主規格品目においても鉛規格への変更が必要となる。このため、公定書未収載の既存添加物及び一般飲食物に関し、参考となる鉛規格の情報収集を行った。

(2) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

- 1) 既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計 20 検体以上の分析結果から 7 種の指標成分を選択し、カンゾウ油性抽出物流通製品の LC/MS による定量を行った。また既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計 20 検体以上の NMR 測定データを用いて多変量解析を行い、添加物製品の基原を推定した。
- 2) タマネギの乾燥外皮から、赤橙色の新規色素 2 を単離精製し構造決定した。精密質量解析および重水素置換体の NMR 分析の結果、新規色素は cepaic acid の 4 位にケトカルボン酸が置換した構造であると決定された。
- 3) 既存添加物「クチナシ青色素」において、ゲニピンとアミノ酸の反応による青色色素の生成において、アミノ酸の側鎖が発色に大きく影響することを確認した。特に Gly や β Ala のような側鎖のないアミノ酸類は色素形成が高かった。ゲニピンと Gly から得られる青色色素は、逆相 LC/MS 上で複数の色素ピークを示し、分子量からゲニピン/Gly 複合体の 3 量体までが推測された。一方で、ゲニピン/Cys の発色は弱く、LC/MS 分析の結果、Cys のチオールがゲニピンの一位の結合したチオエーテル化合物が得られた。これは側鎖のチオール基

が電子密度の低い1位に求核攻撃したためと推測された。同様のエーテル結合をもつ反応物がゲニピンと Ser の反応物からも得られた。

- 4) 既存添加物名簿に記載されている製造用剤「ブドウ果皮抽出物」の品質規格作成のための化学的検討として、ブドウ果皮抽出物製品中の縮合型タンニンオリゴマー画分について平均分子量を求めた。数平均分子量は 5999.6、重量平均分子量は 21287.7 であった。また、プロシアニジン系タンニンが多く含まれることから、ブドウ果皮抽出物製品中のプロアントシアニジンの簡便測定法について検討したところ、バニリン、硫酸を加えて呈色させ、吸光度測定することで測定可能であることが明らかとなった。

(3) 既存添加物の成分規格試験法の検討

- 1) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin 含量の qHNMR 法による定量について検討を行い、昨年度の研究で使用した 16 位のプロトンに加えて、8,8'位および 9,9'位のプロトンを用いても定量可能であり、測定値は非常によく一致することを示した。
- 2) カラメルⅢの純度試験 2-アセチルテトラヒドロキシブチルイミダゾールの HPLC の移動相の条件を検討した。8版公定書の方法と定量値を比較し、さらに LC/MS で定量した場合と定量値との比較を行った。その結果、移動相条件を変更した改良法で得られた定量値は第8版公定書の方法で得られた定量値より高い値を与えた。

(4) 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

- 1) DPPH, ABTS, FRAP 法での活性値の比較により、DPPH 法がラジカル消去活性だけでなく、鉄イオンに対する還元能も同時に評価できる可能性が高いことを示し、酸化防止剤の規格試験法として妥当であることを示した。
- 2) DPPH 法と ABTS 法での解析結果に基づき、Median effect analysis を用いた併用効果の解析を試みた結果、一部で解析結果の異なる組合せが存在することを明らかにし、抗酸化評価法の選定の重要性を明示した。
- 3) カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明に取り組んだ。その結果、測定に用いた 8 種類すべてのカンゾウ油性抽出物に抗酸化活性を確認することができた。しかし、既知物質の抗酸化力価に対する寄与率は低かった。カンゾウ油性抽出物の HPLC による分離・分画後、各 Fraction の活性測定を行った結果からも未知の抗酸化成分の存在が強く示唆された。

研究分担者

天倉 吉章	松山大学薬学部 教授
水上 元	名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授
受田 浩之	高知大学教育研究部自然科学系 教 授
松井 利郎	九州大学大学院農学研究院 教授
石川 洋哉	福岡女子大学国際文理学部 准教授

研究協力者

上田 要一	日本食品添加物協会 専務理事
村田 義文	日本食品添加物協会 常務理事
杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所 室長
伊藤 裕才	国立医薬品食品衛生研究所 主任研 究官
多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 主任研 究官
石附 京子	国立医薬品食品衛生研究所
秋山 卓美	国立医薬品食品衛生研究所 室長
好村 守生	松山大学薬学部 助教
山上 沙織	松山大学薬学部 助手
島村 智子	高知大学教育研究部自然科学系 准 教授
柏木 丈広	高知大学教育研究部自然科学系 准 教授

A. 研究目的

既存添加物 365 品目のうち、国の成分規格設定済は第 8 版食品添加物公定書までで約 130 品目にとどまっている。第 9 版公定書に新規収載が期待される約 90 品目（約 60 品目の酵素を含む）を除くと、まだ約 140 品目の成分規格が未設定である。規格設定が困難な品目が残ったと言える。これまでに我々は厚生労働科学研究において、成分規格設定に必要な基礎情報を得るために、有効性と基原の確認を行いながら有効成分の解明と有効性評価試験法の開発に取り組んできた。

これまでの厚生労働科学研究成果を踏まえて、(1) 国の成分規格が設定されていない既存添加物約 140 品目について、今後の成分規格作成の技術的実現性を調査研究する。それにより、既存添加物の今後の成分規格作成の優先順序を判断する。(2) 今後規格設定する価値があり、かつ技術的に可能と考えられる品目については、含有成分の解析と基原（製造原料）確認及び成分規格試験法の検討を進める。(3) 規格試験として抗酸化活性測定法の導入が必要なのは、含有成分の分離分析ができない酸化防止剤製品である。それらの品目を対象にして、DPPH 法、WST-1 法などの抗酸化活性測定法を用いた酸化防止剤の規格試験法素案を作成する。

B. 研究方法

(1) 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究

1-1 既存添加物の国際規格、国内規格と事業者の持つ製品情報収集

平成 24 年度は、既存添加物の自主規格の整備と改良に関する検討を継続するとともに、国の成分規格が未設定である既存添加物を対象にして、今後の成分規格作成の技術的実現性を検討するための基礎情報を得るこ

とを目的として、成分規格未設定の既存添加物の現状を調査した。

1-2 既存添加物の鉛及び有害重金属についての国際規格、国内規格と類似品目情報の収集

調査対象とする添加物は、成分規格未設定の既存添加物及び一般飲食物添加物とした。調査対象とする情報は、鉛及びカドミウムに関する国際・国内規格、類似と見なされる品目の鉛規格とした。

(2) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

以下の条件に該当する品目を検討対象候補として、含有成分の解析、品質評価に有効な指標成分の検討を行う。国の成分規格が設定されている品目についても、成分規格の改善が必要と考えられる場合には検討対象候補とする。研究成果を規格試験法開発と成分本質の定義設定などに反映させる。

1. 品質確保の指標となる成分や有効性を担う成分が未解明である。
2. 正しい基原と部位の原材料が使用されていることが確認されていない、または基原を確認する必要があるのに適当な分析方法がない。

- 1.の品目として、タマネギ色素、クチナシ青色素、ブドウ果皮抽出物の成分解析を行った。
- 2.の品目として、カンゾウ油性抽出物の成分解析を行い、基原確認試験法を検討した。

(3) 既存添加物の成分規格試験法の検討

国の成分規格が未設定な品目のうちで成分規格を設定する価値があると考えられる品目であり、かつ品質確保の指標となる成分（主有効成分、不純物など）が明らかになっている品目については、有効成分の規格試験法を検討する。

1. 定量 NMR 法の適用例を増やす。個別品目と試薬の具体的な定量分析方法を開発する。

2. 個別品目の成分規格試験法を検討する。

今年度は

- 1.の品目として、ベニバナ赤色素（主成分はカルタミン）、定量用標準品として使用するカンゾウ抽出物中の甘味成分である glycyrrhizic acid 市販試薬の純度測定を行った。
- 2.の品目として、カラメルⅢの純度試験 2-アセチル-4-(テトラヒドロキシブチル)イミダゾール (THI) の HPLC 操作条件が不適切であると指摘されているので、HPLC 操作条件を再検討した。

(4) 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

成分規格試験法に利用できる抗酸化活性標準操作法を確立することをめざして、以下の2項目の検討を行う。

1. DPPH 法による酸化防止剤評価方法の確立

室間再現性の妥当性評価がされた抗酸化活性測定標準試験操作法を確立しているため、それに基づいた規格試験法素案を作成する。

2. 抗酸化活性メカニズムの解析

複数の抗酸化活性測定法から測定対象品目に適した方法を選択するための判断情報を得るために、酸化防止剤の相加・相殺現象および複数の抗酸化活性測定法による反応性の違いを検討し、抗酸化活性メカニズムの解析を行う。

今年度は

- 1.として、含有成分の分離分析ができる品目の製品を使って、抗酸化活性成分の含量と抗酸化活性値との間に高い関連性があることを実験データで示すことを目的として、カン

ゾウ油性抽出物の抗酸化力価と主要成分含量の関係を調べると共に、抗酸化成分の詳細な解明を検討した。

2.として、DPPH法とABTS法の反応性の違いを解析した。トコフェロールと他の酸化防止剤との併用効果を解析した。

倫理面への配慮

本研究においては、実験動物、ヒトを対象とした研究およびヒトから採取した臓器・組織などの試料を用いる研究は実施しなかった。分担研究課題の一つでヒト由来細胞株としてヒトリンパ芽球培養細胞株 TK6 を使用したが、ATCC からの分譲では biosafety level 1 とされており、研究倫理および安全性上の国の指針の対象に該当しない。その取り扱いに関しても、研究分担者の所属機関での培養細胞の取り扱い規程に従った。

C. 研究結果及び考察

(1) 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に依頼して（事業委託）、既存添加物の国際規格、国内規格と事業者の持つ製品情報収集状況、成分規格未設定品目における自主規格設定状況、成分規格未設定品目に対する調査回答状況、既存添加物の鉛及び有害重金属についての国際規格、国内規格と類似品目情報の収集状況を調査した。一覧表にまとめた。

本年度は、既存添加物の国際規格、国内規格と事業者の持つ製品情報の収集・整理及び、既存添加物の鉛及び有害重金属についての国際規格、国内規格と類似品目情報の収集・整理を行った。対象となる規格の内、回答の得られたものは70品目で今後さらなる情報の収集が必要である。また、何らかの自主規格に係る情報のない規格については、回答は3件しかなく、今後必要な情報を得るためにさらなる工夫が必要

である。また、鉛及び有害重金属については国際規格、国内規格とも参考になるものはほとんどなく、第9版と同様に $2\mu\text{g}/\text{g}$ を原則としつつ、実態の調査を行い、妥当な規格値を設定する必要がある。

(2) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) 既存添加物タマネギ色素の成分解析を行った。既存添加物「タマネギ色素」は、黄色タマネギの乾燥外皮から得られる橙色～褐色の色素である。これまでに乾燥外皮からは、xanthylum 構造をもつ cepaic acid だけが報告されているが、黄色の cepaic acid だけでは外皮の色調を説明できない。昨年、外皮から単離精製した赤橙色の新規色素は、cepaic acid のケトカルボン酸置換体であったが、最終的な構造決定には至らなかった。UPLC/Tof-MS を用いて新規色素の精密質量解析を行い、さらに置換基の重水素置換を試み、各種 NMR 分析を用いて構造決定を達成した。新規色素の構造は 4-ketocarboxylcepaic acid と判明した。

2) 既存添加物「クチナシ青色素」は、クチナシ果実中のイリドイド配糖体ゲニポシドを β -グルコシダーゼでゲニピンとした後、タンパク質分解物のアミノ基と反応させることで得られる色素である。今回、通常アミノ酸 19 種および異常アミノ酸 8 種をゲニピンとモル比 1:1 で反応させ、生成した青色素について紫外可視部吸収スペクトルを測定し、さらに LC/MS で成分確認を行った。その結果、アミノ酸間で色素の形成に大きな差異がみられた。グリシンや β -アラニン等の側鎖を持たないアミノ酸は高い色素形成を示した。一方、システインはほとんど色素形成を示さなかった。システインの反応液中には色素ではない反応物が LC/MS 確認された。反応物を単離精製し、NMR で構造解析した結果、システインのチオール基がゲニピンの 1 位に結合したチオエーテル構造であることが

判明した。セリンについてもゲニピンの1位との間でエーテル構造をもつ反応物が単離・構造決定された。

3) 既存添加物名簿に記載されている製造用剤「ブドウ果皮抽出物」の品質規格作成のための検討として、昨年度の結果から明らかとなっている縮合型タンニン(プロアントシアニジン)オリゴマー画分について、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)による平均分子量を求めた。その結果、数平均分子量は5999.6、重量平均分子量は21287.7であった。また、プロシアニジン系タンニンが多く含まれることから、ブドウ果皮抽出物製品中のプロアントシアニジンの簡便測定法について検討したところ、バニリン、硫酸を加えて呈色させ、吸光度測定することで測定可能であることが明らかとなった。この方法を適用し、catechin換算で2製品を定量分析した結果、約60%の含有率が算出され、測定可能であることが示唆された。

4) 既存添加物カンゾウ油性抽出物は、天然由来の酸化防止剤であり、その基原はウラルカンゾウ、チョウカカンゾウ又はヨウカンゾウの根又は根茎と記載されている。本研究では、既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計20検体以上の分析結果から7種の指標成分を選択し、カンゾウ油性抽出物流通製品のLC/MSによる定量を行った。また既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計20検体以上のNMR測定データを用いて多変量解析を行い、添加物製品の基原を推定した。

(3) 既存添加物の成分規格試験法の検討

1) 既存添加物中の指標成分の定量分析への定量NMR法(qNMR)の適用について検討した。既存添加物中の指標成分の定量分析への定量NMR法の適用について検討した。昨

年度に報告したベニバナ赤色素中の主要色素成分であるcarthaminのqNMRによる定量について、定量法のvalidationを実施した。次に、カンゾウ抽出物中の甘味成分であるglycyrrhizic acidについて、市販標準品の純度をqNMR法によって評価した。

2) カラメルIII(アンモニウム化合物添加)に含まれる2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール(THI)を、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)と反応させてヒドラゾン(THI-DNPH)とした後にHPLCで分離して定量する純度試験において、第8版食品添加物公定書の方法では夾雑物との分離が不十分であるため、カラム温度を30℃に固定してHPLCの移動相の条件を検討した。また、8版公定書の方法と定量値を比較し、さらにLC/MSで定量した場合と定量値との比較を行った。その結果、移動相条件を変更した改良法で得られた定量値は第8版公定書の方法で得られた定量値より高い値を与えた。別にLC/MS法により定量分析を行った結果、第8版公定書の方法で得られた定量値より高い値が得られたが、この値は改良法により得られた定量値と同等であった。この結果から本改良法は、規格法より正確に定量できることが示唆された。

(4) 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

1) 既存添加物カンゾウ油性抽出物は、天然由来の酸化防止剤であり、その基原はウラルカンゾウ、チョウカカンゾウ又はヨウカンゾウの根又は根茎と記載されている。しかし、そこに含まれる成分や成分組成は不明であったため、昨年度の研究において成分組成の解明に取り組んだ結果、glabridinが顕著に検出されることが明らかとされている。今年度は、カンゾウ油性抽出物の抗酸化力価と主要成分含量の関係を調べると共に、抗酸化成分の詳細な解明にも取り組んだ。その結果、測

定に用いた 8 種類すべてのカンゾウ油性抽出物に抗酸化活性を確認することができた。しかし、既知物質の抗酸化力価に対する寄与率は低かった。カンゾウ油性抽出物の HPLC による分離・分画後、各 Fraction の活性測定を行った結果からも未知の抗酸化成分の存在が強く示唆された。[4.1]

2) 公定法の有力候補である DPPH 法について、各種抗酸化物の反応特性を明らかにするために、その他測定法における活性値との相関性を詳細に検討した。昨年度の研究では、DPPH 法と ABTS 法の比較を行ったが、本年度はさらに鉄イオンに対する還元能を評価する FRAP 法を新たに加え、3 者の活性相関を検討した。21 種の抗酸化物を評価し TEAC 値を比較した結果、DPPH 法と FRAP 法では比較的類似した活性傾向を示した。両者ともカテコール構造に対する反応性が高く、ABTS 法とは異なる傾向を示すことが確認された。また、この結果から DPPH 法では、抗酸化物のラジカル消去能力だけでなく金属イオンに対する還元性も評価し得ること、すなわち酸化防止剤の公定法として妥当な能力を有することも示唆された。[4.3]

3) Median effect analysis による酸化防止剤の併用効果の解析を試みた。本年度は、特に測定法として DPPH 法・ABTS 法での測定結果を基に解析を行い、両者の解析結果の違いを検討した。その結果、トコフェロールとフラボノール類・カテキン類との併用効果の解析において、測定法の違いにより解析結果が一部異なることが判明した。[4.3]

D. 結論

(1) 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究

現在国の成分規格が設定も検討もされていない既存添加物約 140 品目については、規

格設定が困難な品目が残ったと言えるので、国が業界自主規格を技術的に検証した上で国の成分規格として整備してきた従来の方針では成分規格作成が進まないと考える。また、添加物としての有効性が不明確な品目を成分規格がないまま既存添加物として国が使用を認め続けることは、品質と安全性の確保に懸念が残る。平成 23 年度に 55 品目が消除されたのを機に、成分規格未設定品目の状況を再整理することが望ましいと考える。本研究の成分規格設定に関する調査研究は、そのための有用な資料になると期待される。また、国立研究機関が規格試験法の研究を主導的に進めて業界と調整することで、規格設定が困難な品目の国の成分規格作成を進めることができると期待される。

(2) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) 既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計 20 検体以上の分析結果から 7 種の指標成分を選択し、カンゾウ油性抽出物流通製品の LC/MS による定量を行った。また既存添加物カンゾウ油性抽出物及びその基原植物と類縁植物の乾燥試料、計 20 検体以上の NMR 測定データを用いて多変量解析を行い、添加物製品の基原を推定した。2) タマネギの乾燥外皮から、赤橙色の新規色素 2 を単離精製し構造決定した。精密質量解析および重水素置換体の NMR 分析の結果、新規色素は cepaic acid の 4 位にケトカルボン酸が置換した構造であると決定された。3) ゲニピンとアミノ酸の反応による青色色素の生成において、アミノ酸の側鎖が発色に大きく影響することを確認した。特に Gly や β Ala のような側鎖のないアミノ酸類は色素形成が高かった。ゲニピンと Gly から得られる青色色素は、逆相 LC/MS 上で複数の色素ピークを示し、分子量からゲニピン/Gly 複合体の 3 量体までが推測された。一方で、ゲ

ニピン/Cys の発色は弱く, LC/MS 分析の結果, Cys のチオールがゲニピンの一位の結合したチオエーテル化合物が得られた。これは側鎖のチオール基が電子密度の低い 1 位に求核攻撃したためと推測された。同様のエーテル結合をもつ反応物がゲニピンと Ser の反応物からも得られた。今回の研究によって, 求核性の高い官能基は, ゲニピンとアミノ酸の色素形成を阻害することが示された。色素濃度の高い青色色素を得るためには, 求核性の低い 1 級アミノ基源を用いる必要があると考える。今後はこの求核反応をさらに検証し, 色素形成における連鎖反応のメカニズムを明らかにしたい。4) 既存添加物名簿に記載されている製造用剤「ブドウ果皮抽出物」の品質規格作成のための化学的検討として、ブドウ果皮抽出物製品中の縮合型タンニンオリゴマー画分について、GPC による平均分子量を求めた。その結果、数平均分子量は 5999.6、重量平均分子量は 21287.7 であった。また、プロシアニジン系タンニンが多く含まれることから、ブドウ果皮抽出物製品中のプロアントシアニジンの簡便測定法について検討したところ、バニリン、硫酸を加えて呈色させ、吸光度測定することで測定可能であることが明らかとなった。この方法を適用し、catechin 換算で 2 製品を定量分析した結果、約 60% の含有率が算出され、測定可能であることが示唆された。

(3) 既存添加物の成分規格試験法の検討

昨年度報告した「ベニバナ赤色素」中の carthamin 含量の qHNMR 法による定量について補足的な検討を行い、昨年度の研究で使用した 16 位のプロトンに加えて、8,8'位および 9,9'位のプロトンを用いても定量可能であり、測定値は非常によく一致することを示した。qHNMR 法によって得た定量値は、文献上に報告されている吸光係数を用いる方法に比

較して低くなった。Glycyrrhizic acid の 12 位のシグナルを用いて市販の glycyrrhizic acid 試薬の純度を評価できた。このようにして純度を評価した標準品を用いて HPLC の定量が可能になるものと考えられる。

(4) 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

本年度の研究では、DPPH, ABTS, FRAP 法での活性値の比較により、DPPH 法がラジカル消去活性だけでなく、鉄イオンに対する還元能も同時に評価できる可能性が高いことを示し、酸化防止剤の規格試験法として妥当であることを示した。また、DPPH 法と ABTS 法での解析結果に基づき、Median effect analysis を用いた併用効果の解析を試みた結果、一部で解析結果の異なる組合せが存在することを明らかにし、抗酸化評価法の選定の重要性を明示した。

DPPH 法を公定法として採用するためには、さらに他の試験法との相違点を明らかにする必要がある。また、抗酸化物の併用効果についてはそのメカニズムも含めて不明な点も多い。以上の点に重点を置き、次年度以降の研究を進めていきたい。

カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明に取り組んだ。その結果、測定に用いた 8 種類すべてのカンゾウ油性抽出物に抗酸化活性を確認することができた。しかし、既知物質の抗酸化力値に対する寄与率は低かった。カンゾウ油性抽出物の HPLC による分離・分画後、各 Fraction の活性測定を行った結果からも未知の抗酸化成分の存在が強く示唆された。従って、現在、構造解析を進めているところである。今後、物質の詳細が明らかになることで、抗酸化成分の全容解明に近づくものと期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada A., Takahashi K., Ishizuki K., Sugimoto N., Suematsu T., Arifuku K., Tahara M., Akiyama T., Ito Y., Yamazaki T., Akiyama H. and Kawamura Y., Absolute Quantitation of Stevioside and Rebaudioside A in Commercial Standards by Quantitative NMR, *Chem. Pharm. Bull.*, 61, 33-38 (2012).
- 2) Ito Y., Ishizuki K., Sekiguchi W., Tada A., Akiyama T., Sato K., Yamazaki T., Akiyama H. The analysis of residual solvents in annatto extracts using a static headspace gas chromatography method. *Am. J. Anal. Chem.* 3, 638-645 (2012).
- 3) ぶんせき「フラボノイドの分離と検出」伊藤裕才、1, 18-24 (2013)
- 4) 田原麻衣子, 末松孝子, 早川昌子, 合田幸広, 小西良子, 杉本直樹: 定量 NMR によるトリコテセン系マイコトキシン類市販試薬の純度決定. *Micotoxins*, 62, 111-119 (2012).
- 5) 杉本直樹, 田原麻衣, 末松孝子, 三浦亨: NMR による有機化合物の絶対定量の可能性. *食衛誌*, 53, J228-J233 (2012).
- 6) Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H., Kawamura, Y.: Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 734, 54-61 (2012)
- 7) Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H., Kawamura, Y.: Absolute quantification for benzoic acid in processed foods using quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Talanta*, 99, 342-348 (2012).
- 8) Watanabe-Ishizuka A., Akiyama H., Kondo K., Obitsu S., Kawahara N., Teshima R., Goda Y. Determination of Cyanogenic Glycoside Linamarin in Cassava Flour using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 19, 38-43 (2012).
- 9) 田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻崇, 多田敦子, 穂山浩, 合田幸広, 西村哲治, 定量分析値の信頼性確保のための qNMR を用いた市販試薬の純度決定, *環境化学*, 22, 33-41(2012).
- 10) Watanabe S., Taguchi H., Temmei Y., Hirao T., Akiyama H., Sakai S., Adachi R., Urisu A., Teshima R., Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction, *J. Agric. Food Chem.*, 60, 2108-2115 (2012).
- 11) Ishizaki S, Sakai Y, Yano T, Nakano S, Yamada T, Nagashima Y, Shiomi K, Nakao Y, Akiyama H. Specific Detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) of Potentially Allergenic Salmonid Fish Residues in Processed Food, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 980-985 (2012).
- 12) Tsuruda S., Akaki K., Hiwaki H., Akiyama H., Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Omphalotus guelpiniformis* and *Lentinula edodes*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 1343-1349 (2012).
- 13) Akiyama H., Minegishi Y., Makiyama D., Mano J., Sakata K., Nakamura K., Noguchi A., Takabatake R., Futo S., Kondo K., Kitta K., Kato Y., Teshima R., Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* 53, 157-165 (2012).
- 14) Tatebe C., Ohtsuki T., Kubota H., Sato K.,

- Akiyama H., Kawamura Y. Extraction Method and Determination of Sudan I from Sunset Yellow FCF by Isocratic High-Performance Liquid Chromatography. *Am. J. Anal. Chem.* 3, 570-575 (2012).
- 15) Ito A., Taguchi T., Mogi T., Wake H., Tanaami T., Akiyama H., Teshima R., Sasaki N., Yamada A., Ozeki Y. Comparison of signal amplification methods using DNA microarrays for screening GM crops. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 19, 141-148 (2012).
- 16) Kubota H., Sato K., Sasaki N., Ozeki Y., Akiyama H., Formation of volatile halogenated compounds in fresh-cut vegetables treated with sodium hypochlorite. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 19, 94-103 (2012).
- 17) Mikawa T., Kubota H., Ozeki Y., Yoshida M., Nakanishi T., Sato K., Akiyama H., Determination of sodium stearoyl lactylates in foods using HPLC after derivatization with 2-nitrophenyl hydrazine. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 19, 178-184 (2012).
- 18) Yokota A., Kubota H., Komiya S., Sato K., Akiyama H., Koshiishi I., Sensitive and simple determination of bromate in foods disinfected with hypochlorite reagents using high performance liquid chromatography with post-column derivatization J. *Chromatogr. A* 1262, 219-222 (2012).
- 19) 佐藤恭子, 大月典子, 大迫勉, 大堀昭男, 珍田充, 古庄紀子, 穠山浩, 河村葉子, 食品添加物シリコーン樹脂の純度試験に関する検討, 国立衛研報告, 130, 71-74 (2012).
- 20) 古庄紀子, 大月典子, 大槻崇, 建部千絵, 佐藤恭子, 穠山浩, 河村葉子, 有害試薬不使用のチアベンダゾール定量法の改良, 国立衛研報告, 130 46-49 (2012).
- 21) 久保田浩樹, 箕川剛, 小関良宏, 佐藤恭子, 穠山浩, 食品添加物ステアロイル乳酸ナトリウムの LC-MS による組成分析, 食品衛生学雑誌, 53, 14-18 (2012).
- 22) 笠間菊子, 井上雪乃, 穠山浩, 鈴木達也, 坂田こずえ, 中村公亮, 大島赴夫, 小島幸一, 近藤一成, 手島玲子, プラスミド DNA を用いた中国産安全性未承認遺伝子組換えコメ検査に関する外部精度管理調査 日本食品化学学会誌, 19, 215-222 (2012).
2. 学会発表
- 1) 伊藤裕才, 坂本祐実, 杉本直樹, 穠山浩 「赤タマネギ外皮に黄色色素は含まれているのか？」日本農芸化学 2013 大会 (仙台), 2013 年 3 月, 口頭発表
- 2) 秋山卓美, 関口若菜, 山崎壮, 穠山浩, カラメルⅢ中 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールの HPLC 分析法. 日本食品衛生学会第 103 回学術講演会 (2012 年 5 月, 東京).
- 3) 好村守生, 天倉吉章, 山上沙織, 吉田隆志, 杉本直樹, 山崎 壮, 穠山 浩, 既存添加物「ブドウ果皮抽出物」の成分研究, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 (横浜)
- 4) Median effect analysis によるラジカル消去反応系における酸化防止剤併用効果の解析 山元涼子・石川洋哉・于銀萍・島村智子・柏木丈拵・受田浩之・山崎壮・松井利郎, 第 49 回化学関連支部合同大会 (北九州) 6 月 30 日第 49 回化学関連支部合同大会日本農芸化学会西日本支部ポスター賞受賞
- 5) ラジカル消去反応系における酸化防止剤の相乗・相殺効果の解析、山元涼子, 石川洋哉, 山内良子, 島村智子, 柏木丈拵,

受田浩之, 穂山 浩, 松井利郎, 日本食品
科学工学会第59回大会 8月29-31日
(札幌、藤女子大学)

- 6) ラジカル消去反応におけるチオール化合物と各種抗酸化物の併用効果、山元涼子, 藤田 睦, 山内 良子, 島村 智子¹, 柏木 丈 弘¹, 受田 浩之, 穂山浩, 松井利郎, 石川 洋哉, 日本農芸化学会 2012 年度大会 (仙台) 2013年 3月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

平成24年度 既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

— 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24年度 既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究 —既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

業務受託者	上田 要一	所属	日本食品添加物協会	役職	専務理事
研究者	村田 義文	所属	日本食品添加物協会	役職	常務理事

[はじめに]

既存添加物365品目中成分規格の定められているものは、127品目(132規格)にすぎず、約240品目(約250規格)については、未設定の状況にある。第9版食品添加物公定書は87品目(87規格)が収載される予定であるが、なお、約150品目(約160規格)が未設定の状況で残る。

当協会は、これまでも既存添加物の食品添加物公定書への新規収載を目標に、当協会としての自主規格の策定を進めてきた。

平成20年度は、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、既存添加物について自主規格案の策定検討及び見直し検討を推進してきた。

しかしながら、国の成分規格が設定されていない既存添加物については、

- ・業界自主規格がない、またはあっても質が不十分
- ・添加物としての有効性と有効成分自体が不明確
- ・食品添加物としての流通実態が不明確
- ・正しい基原の原材料が使用されていることの確認が不十分

といった品目が多いことが指摘されている。これまでは、国が業界自主規格を技術的に検証した上で国の成分規格として整備してきたが、上述の約140品目については、規格設定が困難な品目が残ったと言えるので、従来の方針では成分規格作成が進まないと考える。そこで、今後の成分規格作成の技術的実現性を調査研究し、今後の成分規格作成の優先順序の判断資するための調査研究を行うこととした。

本年度は、第9版食品添加物公定書に未収載の既存添加物の中から、第10版公定書の作成に備え製品情報の収集を実施した。また、第9版では重金属規格は鉛規格に変更されるため、第10版に備え自主規格品目においても鉛規格への変更が必要となる。このため、公定書未収載の既存添加物及び一般飲食物に関し、参考となる鉛規格の情報収集を行った。

研究結果の概要と考察

1. 研究方法

(1) 既存添加物の国際規格、国内規格と事業者の持つ製品情報収集

平成24年度は、既存添加物の自主規格の整備と改良に関する検討を継続するとともに、国の成分規格が未設定である既存添加物を対象にして、今後の成分規格作成の技術的実現性を検討するための基礎情報を得ることを目的として、成分規格未設定の既存添加物の現状を調査した。

① 調査対象とする添加物

成分規格未設定の既存添加物及び一般飲食物添加物

② 調査対象とする情報

1)調査対象とする既存添加物:

既に国の成分規格が設定されている品目及び第9版食品添加物公定書新規収載規格案を検討中の品目を除く、国の成分規格が未設定である既存添加物

2)調査対象企業

調査対象とする既存添加物を取り扱っている、日本食品添加物協会加盟企業

3)調査項目

既存添加物品目ごとに、次の事項を調査する。各調査事項の収集状況をまとめた一覧表を作成する。

①製品名と製品取扱い企業名

②用途

③当該添加物または当該添加物を含む製剤の販売実績または食品への使用実績の説明

④製品及び原料の生産国

⑤原料生物種(栽培品種についても分かる範囲で)

⑥製造工程概要

⑦一定の品質(成分)が常に保証されていることの根拠資料(自社製造規格、製品成績書等)

⑧食品添加物としての有効性を示す根拠資料

⑨その他当該添加物に関する有用と思われる情報

(2) 既存添加物の鉛及び有害重金属についての国際規格、国内規格と類似品目情報の収集

① 調査対象とする添加物

成分規格未設定の既存添加物及び一般飲食物添加物

② 調査対象とする情報

鉛及びカドミウムに関する国際・国内規格、類似と見なされる品目の鉛規格

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

(1) 既存添加物の国際規格、国内規格と事業者の持つ製品情報収集状況

① 既存添加物の国際規格、国内規格と事業者の持つ製品情報収集状況(品目別)

第9版食品添加物公定書後に残ると考えられる成分規格未設定の173品目数(183規格数)についての品目別調査結果を一覧表にまとめた。

調査研究結果の詳細は、別紙資料1のとおりである。

② 既存添加物の国際規格、国内規格と事業者の持つ製品情報収集状況(部会別)

第9版食品添加物公定書後に残ると考えられる成分規格未設定品目についての部会別の規格数は次のとおりである。

	規格数
全規格数	183
既存添加物	164
一般飲食物添加物	19

部会	分野	規格数
第1部会	甘味料	3
第2部会	着色料	34
第3部会	保存料・日持向上剤	7
第4部会	増粘安定剤	16
第5部会	酸化防止剤・ビタミン	23
第6部会	ガムベース・光沢剤	28
第9部会	調味料・苦味料	11
第10部会	乳化剤	4
第13部会	製造用剤・ミネラル	57

③ 成分規格未設定品目における自主規格設定状況

成分未設定品目のうち自主規格の作成状況は以下のとおりであった。

自主規格有	◎	103
自主規格作成済み	○	10
参考規格	参	25
暫定規格	暫	5
規格作成なし	×	40

④ 成分規格未設定品目に対する調査回答状況

調査の結果得られた回答及び、それぞれの自主規格毎の内訳は以下のとおりであった。

	会員	非会員	合計
回答企業数	112	19	131
回答規格数	56	14	70

回答規格数	◎	46	13	59
	○	5	0	5
	参	2	1	3
	暫	0	0	0
	×	3	0	3

(2) 既存添加物の鉛及び有害重金属についての国際規格、国内規格と類似品目情報の収集状況

第9版食品添加物公定書後に残ると考えられる既存添加物について自主規格のあるもの、ないものを含めて鉛及び有害重金属に関する情報を収集し一覧表にまとめた。

調査研究結果の詳細は、別紙資料2のとおりである。

4. 考察

本年度は、既存添加物の国際規格、国内規格と事業者の持つ製品情報の収集・整理及び、既存添加物の鉛及び有害重金属についての国際規格、国内規格と類似品目情報の収集・整理を行った。

対象となる規格の内回答の得られたものは70品目で今後さらなる情報の収集が必要である。

また、何らかの自主規格に係る情報のない規格については、回答は3件しかなく、今後必要な情報を得るためにさらなる工夫が必要である。

また、鉛及び有害重金属については国際規格、国内規格とも参考になるものはほとんどなく、第9版と同様に2 μ g/gを原則としつつ、実態の調査を行い、妥当な規格値を設定する必要がある。

平成25年度は、既存添加物の自主規格の整備と改良に関する検討を継続するとともに、次の調査研究を行う予定である。

- 1) 当協会内部情報として保有する情報と、厚労科研研究の成果として公表してよい情報とに分けて、公開用の厚労科研報告書と非公開の当協会内部資料の2つを作成する。
- 2) 国衛研(必要に応じて外部の専門家にも参加していただく)と当協会とでWGを作り、公表する情報だけでなく、非公開にする情報も含めて参考情報にしながら、第10版公定書に向けて、既存添加物の今後の成分規格作成の優先順序を決める。

本年度の調査研究に際しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の穂山先生をはじめとする諸先生方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あげる次第である。

以上

別紙

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	村田義文	日本食品添加物協会
自主規格専門委員長、部会長・部会担当	伊藤秀行	理研ビタミン株式会社
規格専門委員長	斎藤知明	キリン協和フーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本正次	丸善製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	西山浩司	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	西宮隆	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	大本俊郎	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	橋本成久	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山田裕之	DSP五協フード&ケミカル株式会社
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	増田哲也	エーザイフード・ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	尾崎史浩	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	卯津羅健作	ナガセケムテックス株式会社
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	岩間保憲	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	香村正徳	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	廣田佳卓	花王株式会社
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	坂井昭浩	オルガノ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	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	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	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	稲井隆之	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	阿部貴宏	三菱化学株式会社
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	中島敏貴	上野製薬株式会社
技術顧問	山田隆	日本食品添加物協会
技術顧問	高橋仁一	日本食品添加物協会