

201327004B

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23～25年度 総合研究報告書

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26(2014)年3月

目次

I. 総合研究報告書

1. 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

2. 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
既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究 ----- 13
研究協力者: 日本食品添加物協会

3. 既存添加物の含有成分解析に関する研究
 - 3.1. タマネギ色素の色素構造に関する研究
黄色タマネギ外皮由来の赤橙色色素の構造決定 ----- 19
研究協力者: 伊藤裕才
研究分担者: 穂山浩
研究協力者: 山崎壮
研究協力者: 杉本直樹
研究協力者: 多田敦子

 - 3.2. 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 ----- 31
研究協力者: 伊藤裕才
研究分担者: 穂山浩
研究協力者: 山崎壮
研究協力者: 杉本直樹
研究協力者: 多田敦子

3.3. 既存添加物の含有成分解析に関する研究	49
研究分担者: 天倉吉章	
研究協力者: 好村守生	
4. 既存添加物の成分規格試験法の検討	
4.1. 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	51
研究分担者: 水上元	
4.2. 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	61
研究協力者: 秋山卓美	
研究分担者: 穂山浩	
研究協力者: 山崎壮	
研究協力者: 杉本直樹	
研究協力者: 多田敦子	
研究協力者: 伊藤裕才	
5. 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	
5.1. 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	71
研究分担者: 受田浩之	
研究協力者: 松井利郎	
研究協力者: 石川洋哉	
研究協力者: 島村智子	
研究協力者: 柏木丈拡	
研究協力者: 多田敦子	
研究協力者: 伊藤裕才	
研究協力者: 石附京子	

5.2. 酸化防止剤の併用効果の解析に関する研究 ----- 77

研究分担者：松井利郎

研究分担者：石川洋哉

研究協力者：受田浩之

5.3. 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に関する研究 ----- 81

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 87

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

(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。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検証規格の作成を実施した。

(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。抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 5 活性画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 6 活性画分につき、さらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。この内、3 種の抗酸化活性画分につき、UPLC/TOF-MS を用いて、活性に重なるピークとカンゾウからの単離標品との詳細な比較検討を行い、それぞれ licochalcone B、licochalcone D、hispaglabridin A であることを明らかにした。

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) 既存添加物名簿に収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。

5)ゲンチアナ抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、本抽出物製品中の含有成分についての検討を行っている。今年度、新たに7種の既知化合物 [vanillic acid, gentisin, isogentisin, 6'-O-glucosylgentiopicroside, gentisin 7-O-primeveroside, isogentisin 3-O-primeveroside, swertiajaposide D] とともに1種の新規化合物 (GL-1 と仮称) を単離し、その構造を明らかにした。また、本製品の詳細な成分精査の結果、既報で有効成分として知られている amarogentin は HPLC 分析においてマイナー成分として検出されるのみであった。

(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 法によって評価するとともに、カンゾウ抽出物中の含量測定を試みた。

3)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。DPPH 法でアセトニトリル系の活性測定を試み、カテコール化合物の活性値の低下が著しいことが判明し、水/エタノール系でのカテコール構造の再生が DPPH 法での活性値の増加の直接的原因であることが示唆された。また DPPH 法と WST-1 法の活性値を比較検証し、両者の活性値に高い相関は得られなかったが活性傾向は類似していることが判明した。キサントキシダーゼの阻害効果が WST-1 法の活性値に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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した結果、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。カテコール・ピロガロール構造がいずれも相乗効果の発現に重要な因子となっており、相乗効果の程度はカテコール類の方がピロガロール類より高くなることが示された。

3)既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価標準法としての DPPH 法の適用性を検討するために、4種類の既存添加物と Trolox を分析試料として用い、14か所の試験機関による評価研究を行った。DPPH 法の改良プロトコルを用いた複数機関による評価研究では、同一試験機関内での再現性が極めて高いことが判明した。カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明を検討したところ、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。

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
山崎 壮	実践女子大学生生活科学部食生活科学 科 教授
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 講師
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 丈拵	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) 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

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。

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った。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した。

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。

対象品目としては、タマネギ色素、クチナシ青色素、ブドウ果皮抽出物、ゲンチアナ抽出物、カンゾウ油性抽出物の成分解析を行った。

(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した。

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。

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3項目の検討を行った。

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検討した。

2. 脂質過酸化抑制能評価法として、ロダン鉄法の原理に基づいた SIA (Sequential Injection Analysis) 法の開発と各種酸化防止剤での適合性確認を行った。

3. 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った。

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。既存添加物365品目中、第8版食品添加物公定書に記載されている128品目と第9版食品添加物公定書に記載される予定の87品目を除いた150品目から168規格及び一般飲食物添加物23品目について第10版公定書に向けて成分規格の検証用規格の作成検討を行った。更に、第5版自主規格への掲載を目指して自主規格の検討を行った。

(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) ゲンチアナ抽出物製品をメタノールに溶解させて HPLC 分析を行った結果、また、液-液分配による分画物を調製し、得られた各エキス (n-ヘキサン、酢酸エチル、n-ブタノール、水分画物) についての HPLC 分析を行った。さらに、今回の成分精査で得られた各化合物を標品として同条件で分析比較を行った結果、本添加物製品中の主成分は gentiopicroside (7)、loganic acid (8)、sweroside (9) の 3 成分であることが明らかとなった。一方、既報で有効成分として知られる amarogentin はマイナー成分として検出された。

5) 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。

HPLC 分画面分の内、抗酸化活性が強く認められた画分について、活性に重なる主ピークの UPLC/TOF-MS 測定を行った。2 段階目の HPLC 分画で抗酸化活性が強かった画分について、活性に重なる主ピークを UPLC/TOF-MS で分析し、分子式を推定した。文献で報告のあるカンゾウ成分を調べ、カン

ゾウからの単離標品を入手した。入手した単離標品と活性画分の主ピークにつき、保持時間、精密質量、UV スペクトルを比較した。

KZ01-frc11-⑦と KZ34-frc11-⑦の各主ピーク化合物は、UPLC/TOF-MS により、いずれも m/z 287.0926 (pos.)、285.0782 (neg.) であると判明し、 $C_{16}H_{14}O_5$ のプロトン付加分子イオンの理論値 m/z 287.0919 [$C_{16}H_{14}O_5+H$]⁺ および脱プロトン分子イオンの理論値 m/z 285.0763 [$C_{16}H_{14}O_5-H$] とミリマスオーダーで一致し、これら化合物の組成式を $C_{16}H_{14}O_5$ と推定した。次に、この分子式を持つカンゾウ由来の単離標品として licochalcone B を入手し、UPLC/TOF-MS で測定した。その結果、UV、MS スペクトル、精密質量、保持時間がいずれも一致したため、KZ01 及び KZ34 の各 frc11-⑦の主ピーク化合物は licochalcone B と判明した。

同様に、KZ01-frc28-⑥の主ピーク化合物は、UPLC/TOF-MS により $C_{21}H_{22}O_5$ と推定され、さらにカンゾウからの licochalcone D 単離標品との UV、MS スペクトル、精密質量、保持時間の比較を行い、licochalcone D と判明した。KZ01-frc31-④の主ピーク化合物は、同じ分子式と推定されたが、UV スペクトルが異なり、licochalcone D とは異なる物質であった。また、KZ34-frc52-④の主ピーク化合物は UPLC/TOF-MS により $C_{25}H_{28}O_4$ と推定され、さらにカンゾウからの hispaglabridin A 単離標品との UV、MS スペクトル、精密質量、保持時間の比較を行い、hispaglabridin A と判明した。

(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。

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。純度評価を行った glycyrrhizic acid 試薬について、0.200 mg/ml 溶液を作成し、その 10 ml を用いて HPLC で分析した時の glycyrrhizic acid に相当するピークの面積と qHNMR 法によって求めた純度の相関性を検討した。その結果、両者は高い相関性を示していた。カンゾウ抽出物中の glycyrrhizic acid 含量を qHNMR 法を用いて直接測定することを試みた。医薬品製造原料として用いられるカンゾウ抽出物では glycyrrhizic acid の H12 由来のシグナルが明瞭に分離したピークとして観察され、これを利用した定量が可能であった。

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) チャ抽出物、ブドウ種子抽出物、エンジュ抽出物、d- α -トコフェロールの IC₅₀ に関する検証では、エンジュ抽出物の結果のうち、1 つの試験機関 L が外れ値と判断された。これは当該試験機関の IC₅₀ の平均値が他と比較して大きいことが原因であった。4 つの酸化防止剤に関する室内再現相対標準偏差 (RSD_I) は 2.2-2.9%、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 3.1-11% となった。TEAC に関する室内再現相対標準偏差 (RSD_I) は 2.1-2.5%、室間再現相対標準偏差 (RSD_R) は 3.7-9.3% となった。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検討した。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。

2) 抗酸化評価法として最適な 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。DPPH 法と ABTS 法、FRAP 法の 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評価法として妥当な能力を有することも示唆された。DPPH 法での溶媒効果を明らかにするために、アセトニトリル系での活性測定を試み、水/エタノール系での活性値と比較した。その結果、アセトニトリル系では、カテコール化合物の活性値の低下が著しい

ことが判明し、水／エタノール系でのカテコール構造の再生がDPPH法での活性値の増加の直接的原因である可能性が強く示唆された。続いて、DPPH法とWST-1法の活性値を比較検証したところ、両者の活性値に高い相関は得られなかったが活性傾向は類似していることが判明した。さらに、キサントキシンダーゼの阻害効果がWST-1法の活性値に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

3) Median effect analysisによる酸化防止剤の併用効果の解析を試みた。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。チオール化合物（グルタチオン、システイン）と各種抗酸化物（15種）の併用効果の解析を行ったところ、グルタチオン・システインいずれとの併用時も、フェルラ酸、ケンフェロール以外の13種の抗酸化物との組合せで高い相乗効果が確認された。また、供試した濃度範囲によって効果が異なり、より高濃度域においてCI値が小さくなる傾向、すなわち高濃度域で大きな相乗効果を発現することが確認された。相乗効果を示した化合物群は、いずれも分子内にカテコールあるいはピロガロール構造を有していることが明らかになった。

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品目が削除されたのを機に、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。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かと期待される。

(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。抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の5活性画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の6活性画分につき、さらにHPLCによる分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。この内、3種の抗酸化活性画分につき、それぞれ *licochalcone B*、*licochalcone D*、*hispaglabridin A*であることを明らかにした。

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βAla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。

5) ゲンチアナ抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、本抽出物製品中の含有成分についての検討を行っている。今年度、新たに 7 種の既知化合物とともに 1 種の新規化合物を単離し、その構造を明らかにした。また、本製品の詳細な成分精査の結果、既報で有効成分として知られている amarogentin は HPLC 分析においてマイナー成分として検出

されるのみであった。

(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 法による定量の検討を行い、16 位のプロトン及び 8,8'位および 9,9'位のプロトンを用いて定量可能であり、測定値はすべて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。

2) 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 法によって評価するとともに、カンゾウ抽出物中の含量測定を試みた。lycyrrhizic acid の 12 位のシグナルを用いて市販の glycyrrhizic acid 試薬の純度を評価した。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。

3) 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ところ、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した結果、抗酸化評価法の選定の重要性を明示した。

3) 既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価標準法としての DPPH 法の適用性を検討するために、4 種類の既存添加物と Trolox を分析試料として用い、14 か所の試験機関に

よる評価研究を行った。DPPH 法の改良プロトコルを用いた複数機関による評価研究では、同一試験機関内での再現性が極めて高いことが判明した。

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) 伊藤 裕才. ぶんせき「フラボノイドの分離と検出」, 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, 穂山浩, 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, 穂山浩, 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, 穂山浩. 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, 穂山浩, 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).
- 23) A. Tada, K. Ishizuki, J. Iwamura, H. Mikami, Y. Hirao, I. Fujita, T. Yamazaki, H. Akiyama and Y. Kawamura Improvement of the Assay Method for Steviol Glycosides in the JECFA Specifications, *American Journal of Analytical Chemistry*, 4, 190-196 (2013)
- 24) T. Akiyama, W. Sekiguchi, N. Sugimoto, A. Tada, Y. Ito, T. Yamazaki, H. Akiyama, Revised method for analyzing, 2-acetyl-4-tetrahydroxy butylimidazole in caramel III, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 20, 190-195 (2013).
- 25) Bang, T. H., Suhara, H., Doi, K., Ishikawa, H., Fukami, K., Parajuli, G. P., Katakura, Y., Yamashita, S., Watanabe, K., Adhikari, M. K., Manandhar, H. K., Kondo, R., Shimizu, K., Wild Mushroom in Nepal: Some potential Candidates as Antioxidant and ACE Inhibition Sources, *Evidence-Based Complementary and*

Alternative Medicine, in press (2014)

- 26) 山内良子, 深木さやか, 小浜友紀子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穂山 浩, 松井利郎, 石川洋哉. 酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH および ABTS ラジカル消去能評価法の特長比較. 日本食品保蔵科学会誌, 2014 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 伊藤裕才, 坂本祐実, 杉本直樹, 穂山浩. 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, 穂山浩. 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, 穂山 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) 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. 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. 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) 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. 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. 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) 山元涼子, 藤田睦, 山内良子, 島村智子,

柏木 丈拵, 受田 浩之, 穂山浩, 松井利郎, 石川 洋哉, 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. 日本農芸化学 2012 年度大会 (仙台) 2013 年 3 月

- 7) 多田敦子, 石附京子, 末松孝子, 有福利紀, 伊藤裕才, 大槻 崇, 大月典子, 吉松嘉代, 川原信夫, 山崎 壮, 杉本直樹, 穂山 浩. カンゾウ油性抽出物の成分組成に基づく解析. 食品化学学会第 19 回総会・学術大会 (2013.8)
- 8) 多田 敦子, 石附 京子, 島村 智子, 受田浩之, 深井 俊夫, 山崎 壮, 杉本 直樹, 穂山 浩. 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性要因と寄与率. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)
- 9) 好村 守生, 天倉 吉章, 吉田 隆志, 多田敦子, 伊藤 裕才, 杉本 直樹, 山崎 壮, 穂山 浩. 既存添加物「ゲンチアナ抽出物」の成分研究. 日本生薬学会第 60 回年会 (2013.9)
- 10) 山元涼子, 藤田睦, 山内良子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穂山浩, 松井利郎, 石川洋哉. Median effect analysis によるチオール化合物と各種抗酸化物の相互作用解析. 第 50 回化学関連支部合同大会 (2013.7)
- 11) 山内良子, 小浜友紀子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穂山 浩, 松井利郎, 石川洋哉. 酸化防止剤評価における各種抗酸化測定法の相関. 第 62 回日本食品保蔵科学会大会 (2013.6)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

平成23－25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23－25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、128品目(130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、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。今後も上述の約150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が着実な成分規格の作成が必要である。一方、今後の第10版食品添加物公定書の作成に向けて、現在の自主規格から規格の検証作業を進める必要がある。そこで、第10版公定書に向けた検証作業のための規格作成および第5版自主規格に向けた成分規格作成の調査研究を行うこととした。

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検証規格の作成を実施した。また、第5版自主規格案の作成を進めた。

研究結果の概要と考察

1. 研究方法

(1) 既存添加物の第10版公定書に向けた検証用規格の作成

これまでの検討により規格として整備が進み、国の成分規格に移行が可能と思われる既存添加物を対象に検証用の規格を作成し、併せて検証のための試料収集を行った。

① 調査対象とする添加物

表1に示した35品目について調査を行った。

② 調査内容

検証用の成分規格の作成、および検証用資料の収集。

(2) 既存添加物の第5版自主規格に向けた成分規格の検討

成分規格が設定可能なものから、前項の検証用とできなかった品目について自主規格案を作成した。

① 調査対象とする添加物

表2に示した、第4版自主規格成分規格未設定のもの又は再整備をしたものを合わせて27品目について成分規格案を作成した

② 調査内容

成分規格案、規格設定の根拠(海外規格を含む各種規格との対比)

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) 成分規格の検討

既存添加物365品目中、第8版食品添加物公定書に記載されている128品目と第9版食品添加物公定書に記載される予定の87品目を除いた150品目から168規格及び一般飲食物添加物23品目について第10版公定書に向けて成分規格の検証用規格の作成検討を行った。更に、第5版自主規格への掲載を目指して自主規格の検討を行った。

検討の状況を部会別及び品目別の表にまとめた。

(2) 検証用成分規格の作成と試料の収集

① 成分規格検証用規格案作成品目

前記既存添加物150品目168規格及び一般飲食物添加物23品目から既存添加物27規格と一般飲食物添加物8規格の合計35規格について成分規格検証用の規格案を作成した。作成した規格の部会別規格数を表にまとめた。

部会	分野	規格数(一般飲食物添加物)
第1部会	甘味料	1
第2部会	着色料	11(8)
第3部会	保存料・日持向上剤	5
第4部会	増粘安定剤	3
第5部会	酸化防止剤・ビタミン	1
第6部会	ガムベース・光沢剤	2
第7部会	酵素	1
第9部会	調味料・苦味料	2
第10部会	乳化剤	1
第13部会	製造用剤・ミネラル	8

② 成分規格案(部会別)

各品目の成分規格案は第9版食品添加物公定書に準ずる形で作成し、部会別に整理して掲載した。

(3) 第5版自主規格案の作成

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から、更に検証用規格を作成したものを除き、第5版自主規格の作成を検討した。

成分規格案を作成するために必要な情報がある程度集まった27規格を作成した。また、第4版自主規格にあったものの中で、今回の見直しに際し情報が得られず、見直しが出来なかった25規格については暫定規格とした。

作成した規格及び暫定規格を部会毎に収載した。

4. 考察

既存添加物及び一般飲食物添加物の中から第10版食品添加物公定書収載をめざし35規格の検証用規格を作成した。この35規格については検証のための試料の収集も併せて行った。今後、検証結果を踏まえ、更に規格の完成に向けて検討を進める。また、更に検証を実施する品目を増やすための検討を進める。

残された既存添加物及び一般飲食物添加物については第5版自主規格の作成を目指して検討を行った。このうち27品目は成分規格案の作成ができたが、第4版自主規格に収載したものの中から25品目については見直しに対し、全く情報の収集ができなかった。このためこれらの規格は暫定規格とした。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と共に、流通実態の有無についても見極める必要がある。

現段階において、未だ104品目について必要な情報の収集が出来ていない。平成26年度では、第10版食品添加物公定書収載を目指して更に検証用の規格を作成し試料の収集を進めると共に、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。

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