

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）  
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究  
（H26-食品-一般-001）

平成26～28年度分担総合研究報告書  
既存添加物の有効成分に関する研究

分担研究者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

要旨 既存添加物の有効成分に関する研究として、「ジャマイカカussia抽出物」の有効成分の新規定量分析法の検討、「クエルセチン」の定量法確立のための検討、粘度測定法に関する検討、「カンゾウ油性抽出物」の抗酸化成分の分離、解析及び単離・同定に関する研究、「カワラヨモギ抽出物」の有効成分である抗菌活性成分の定量法の開発に関する研究を行った。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所  
受田浩之 高知大学  
島村智子 高知大学  
田邊思帆里 国立医薬品食品衛生研究所  
佐藤恭子 国立医薬品食品衛生研究所  
建部千絵 国立医薬品食品衛生研究所  
河崎裕美 国立医薬品食品衛生研究所  
加藤智久 国立医薬品食品衛生研究所  
松田 諭 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

第8版公定書以降、既存添加物品目では、添加物としての有効性や正しい基原の原材料が使用されていること、有効成分の確認及びその含量が正しく測定できることが特に重要と考え、規格設定が行われてきた。しかしながら、既存添加物品目によっては、有効成分やその寄与率が明確でないものや、有効成分が明らかであっても、それを正確に定量する方法が確立されていないものが多数残されている。また、HPLC等による分析手法では、化合物により検出感度が固有であり異なることから、測定対象と同一の化合物の標準品を用い、これを基準に定量計算を行う方法が一般的である。しかしながら、既存添加物の有効成分に関しては、市販試薬の入手が困難かつ高価な場合があり、一般

的なクロマトグラフィーによる定量法の適用が困難であり、検討が必要とされている。本研究では、既存添加物の有効成分に関するこれらの課題を解決すべく、様々な手法を用いた研究を行うことを目的とした。

B. 研究方法

各既存添加物品目およびその有効成分の標準品について、国際単位系（SI）にトレーサブルな内標準物質を用いて定量 NMR を実施し、含有成分の正確な純度を求め、各研究に応用した。LC/MS(/MS)を活用し、各成分の定性に用いた。また、有効成分そのものの標準品の入手が困難な場合は、別に汎用性の高い分析用の内標準物質を定量用標準として立て、検出感度の正確な比を別に求め、両者を適用することで、相対感度係数を用いた定量を新たに検討した。

C. 結果及び考察

C-1) 既存添加物ジャマイカカussia抽出物と天然香料クワッシャ中におけるクアシン、ネオクアシンの新規定量分析法の検討

「ジャマイカカussia抽出物」は天然由来の苦味料、「クワッシャ」は天然由来の香料として使用され、それぞれ既存添加物と天然香料に分類される食品添加物である。両品目の有効成分はいずれもクアシン及びネオクアシンとされているが、これら有効成分の定量用標準品は市販されていない。そこで、安価で入手しやすく、

純度も高いと予想される 4-ヒドロキシ安息香酸 (4HBA) を両有効成分の定量用内標準物質として選定し、クアシン及びネオクアシンそのものの定量用標準品を必要としない

HPLC/PDA による定量法を確立することを目的とした  $^1\text{H}$ -qNMR から求めた 4HBA 市販試薬の純度は、試薬に記載された純度値と殆ど差異はなく 100.43%であった。このことから、市販の 4HBA を購入して用いれば、表示純度との差を気にせずに定量用内標準として使用できると考えられた。そこで、4HBA とクアシン及びネオクアシンの混合液を用い、 $^1\text{H}$ -qNMR により正確なモル比を求め、HPLC/PDA により吸光度比を求め、これら得られた値を元に 4HBA に対するクアシン及びネオクアシンのモル吸光係数比を算出したところ、0.84 及び 0.85 であることが明らかとなった。純度既知の 4HBA を内標準として、モル吸光係数比を適用した HPLC/PDA により添加物製品中のクアシン及びネオクアシンを定量したところ、国際単位系 (SI) にトレサブルな 1,4-BTMSB- $d_4$  を内標準とした  $^1\text{H}$ -qNMR により求めたクアシン及びネオクアシンの定量値と殆ど差異はなかった (1.2%以下)。モル吸光係数比を適用した定量法は、クアシン及びネオクアシンそのものの定量用標準品を必要とせず、これらの製品中の含量を求められる試験法として有用であることが明らかとなった。

#### C-2) 既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を応用した検討

天然由来の酸化防止剤である既存添加物クエルセチンは、食品添加物公定書未収載であり、成分規格案の作成を行う上で定量法の確立が必要である。そこで本研究では、 $^1\text{H}$ -NMR による定量 NMR (quantitative NMR: qNMR) を適用し、試薬や添加物の正確な quercetin 含量を求めることにより、既存添加物クエルセチンの定量法確立のための基礎的検討を行った。本研究により、既存添加物クエルセチンの成分規格作成に有用な基礎データを得ることができた。また、これらの結果より、標準試薬 (qNMR 純度適用) を用いた LC/UV による quercetin の定量が最も

適切であることが示唆された。

#### C-3) 粘度測定法に関する検討

物質の粘度を測定する手法として、様々な粘度計が存在する。食品添加物公定書において粘度測定法は、毛細管粘度計法 (第 1 法) と回転粘度計法 (第 2 法) が規定されている。一方、日本工業規格 (JIS) における粘度測定法としては、細管粘度計、落球粘度計、共軸二重円筒形回転粘度計、単一円筒形回転粘度計、円すい - 平板形回転粘度計の他、近年、振動粘度計が追加されている。本報告では、食品添加物公定書、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JIS、JCSS 等における粘度測定法を調査し、比較整理したので報告する。また、JIS における振動粘度計の原理と各測定計との相違について調べ、考察した。

#### C-4) 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の分離

カンゾウ油性抽出物製品には、主要成分以外にも抗酸化活性寄与率が比較的高い成分が存在することが強く示唆され、ODS カラムを用いた分取 HPLC による 2 段階の分離及び分離画分の抗酸化活性測定を行い、活性画分の探索研究を行ってきた。今年度は、これまでの分離により抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 7 画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 8 画分につき、ODS とは異なる分離特性を有するカラムを用いてさらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。本研究により、各カンゾウ油性抽出物製品の活性ピークを分離・特定することができた。

#### C-5) 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の LC/TOF-MS による解析

カンゾウ油性抽出物製品の主要成分による全体の抗酸化力価への寄与率は高くないことが明らかとなり、HPLC による分離・分画後、各画分の活性測定を行い、他の抗酸化成分を分離・特定した。さらに研究を進め、*Glycyrrhiza inflata* 由来製品及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品より単離した活性成分につき、

LC/TOF-MS(MS)を用いて分析し、精密質量による組成解析から含有成分の推定を行い、市販試薬及び供与された単離標品との解析結果と比較した。その結果、カンゾウ油性抽出物製品中の6種の抗酸化活性成分及び2種の非活性成分を同定した。

#### C-6) 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の単離・同定

*G. glabra* 由来のカンゾウ油性抽出物製品では、主に抗酸化活性を示す8成分が確認された。この内、4成分については、市販標品や単離標品との比較やLC/MS/MSで同定したが、残りの4成分については、分子量(MW)370, 358, 322および354の化合物と推定されたが、同定はできていなかった。未同定の4成分の構造を明らかにする目的で、これら成分の単離・精製を行い、構造解析結果から化合物の同定を行った。その結果、4成分は *glabrene*, 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin 等の化合物であると同定した。なお、MW 370およびMW 358の化合物は、これまでDPPHラジカル消去活性を有することは報告されていないが、本研究におけるこれらの単離画分はDPPHラジカル消去活性を示した。

#### C-7) 既存添加物カワラヨモギ抽出物の乾燥減量試験法とqNMRを応用した定量法の開発

既存添加物製品の規格の設定は、品質や安全性確保の上から極めて重要である。既存添加物カワラヨモギ抽出物は、天然由来の保存料であり、抗菌作用があるとされている。本研究では、既存添加物カワラヨモギ抽出物の公的規格作成のため、本品目に適した乾燥減量試験法及び定量NMRを応用したLC定量法の開発を行った。その結果、溶液状態のカワラヨモギ抽出物製品に適した乾燥減量試験法を確立することができた。また、LC/UV及びLC/MSによるカピリン定量条件を最適化し、qNMRを応用してカピリン標品の正確な純度値を付けて定量に用いることで、信頼性の高いLC定量法を開発できた。さらに、カピリン標品を必要としないqNMRでの直接定量法が、比較的カピリン含量の高いカワラヨモギ抽出物製品では、有用

な定量法の1つとして選択可能であることを示した。

#### C-4) Relative response factorを用いたHPLC/PDAによるカワラヨモギ抽出物中のカピリン定量法の開発解析

既存添加物名簿に記載されている保存料「カワラヨモギ抽出物」中の抗菌成分カピリンのHPLC/PDA定量法について検討した。カピリンの定量用標準品は市販されていないため、別の化合物をカピリンの基準物質として選定し、カピリンの定量用標準品を必要としないHPLC/PDA定量法を確立することを目的とした。<sup>1</sup>H-qNMRを利用してモル吸光係数比を算出し、定量法に用いた。このように内標準物質と定量対象化合物の検出感度の違いを係数として求めて定量法に応用する手法は、吸光度に限らず、他の検出方法でも適用可能であると考え、本項では、相対感度係数(Relative response factor; RRF)という語を用いて報告した。カピリンの定量用内標準物質として、<sup>1</sup>H-qNMRスペクトル及びHPLCクロマトグラム上で、カピリンと良好に分離したヘプチルパラベンを選定した。4社4製品のヘプチルパラベ入市販試薬を<sup>1</sup>H-qNMRに付し、得られた純度値を各試薬のラベルに記載されている純度値と比較したところ、4製品全てにおいて<sup>1</sup>H-qNMRでの純度値とラベル記載の純度値に大きな差がなく(1.4%未満)、このことから、市販のヘプチルパラベンを購入して用いれば、メーカー間の純度差や表示純度との差を気にせずに定量用内標準として使用できると考えられた。ヘプチルパラベン及びカピリンの混合液を調製し、ヘプチルパラベンに対するカピリンのRRFを算出したところ1.31であった。この値を適用してHPLC/PDAによる添加物製品中のカピリン含量を算出したところ、カピリン標準品を用いて作成した検量線(<sup>1</sup>H-qNMRによる純度値を適用)から求めた含量と殆ど差はなかったため、RRFを適用した定量法は、カピリンの定量用標準品を必要とせず、カワラヨモギ抽出物の規格試験法として有用であることが明らかとなった。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tada, A., Ishizuki, K., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Akiyama, H., Method for the Determination of Natural Ester-Type Gum Bases Used as Food Additives via Direct Analysis of their Constituent Wax Esters Using High-Temperature GC/MS, *Food Science & Nutrition*, 2, 417-425 (2014)
- 2) 多田敦子, 石附京子, 杉本直樹, 吉松嘉代, 川原信夫, 末松孝子, 有福和紀, 深井俊夫, 田村幸吉, 大槻崇, 田原麻衣子, 山崎壮, 穠山浩, 既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分組成の多変量解析に基づく基原植物種の検討, *日本食品衛生学雑誌*, 56, 217-227 (2015)
- 3) 多田敦子, 杉本直樹, 小林義和, 濱田ひかり, 石附京子, 秋山卓美, 伊藤裕才, 川原信夫, 山崎壮, 穠山浩, 味認識装置による既存添加物苦味料及び関連苦味化合物の品質評価, *日本食品化学学会誌*, 22, 25-31 (2015)
- 4) 西崎雄三, 多田敦子, 石附京子, 伊藤裕才, 小野田絢, 杉本直樹, 穠山浩, モル吸光係数比を利用したジャマイカカシヤ抽出物中のクアシンおよびネオクアシンの新規定量法の開発 *食品衛生学雑誌*, 56(5), 185-193 (2015)

### 2. 学会発表

- 1) 田邊思帆里, 多田敦子, 古庄紀子, 建部千絵, 西川真寿美, 荒井なぎさ, 西崎雄三, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩: 食品添加物公定書における一般試験法の国際整合性に関する研究: 粘度測定法, *日本食品化学学会第 21 回総*

会・学術大会(2014.5)

- 2) 松田 諭, 多田敦子, 大槻 崇, 石附京子, 河崎裕美, 田原麻衣子, 杉本直樹, 穠山 浩: 既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を用いた基礎的検討, 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014.12)
- 3) 河崎裕美, 関口若菜, 多田敦子, 秋山卓美, 杉本直樹, 穠山浩: HILIC カラムを用いた LC/MS によるカラメル 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 (THI) の直接定量, 日本食品衛生学会第 108 回学術講演会(2014.12)
- 4) 西崎雄三, 多田敦子, 伊藤裕才, 大槻崇, 杉本直樹, 穠山浩: qNMR と HPLC を利用した天然苦味料ジャマイカカシヤ抽出物中のクアシン及びネオクアシンの新規定量法の開発, *日本薬学会第 135 年会* (2015.3)
- 5) 加藤智久, 多田敦子, 河崎裕美, 西崎雄三, 石附京子, 建部千絵, 古庄紀子, 佐藤恭子, 杉本直樹, 穠山浩: NMR を用いた既存添加物カワラヨモギ抽出物の定量法の開発, *日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会* (2015.5)
- 6) Tada A., Sugimoto N., Nishizaki Y., Matsuda S., Kawasaki H., Ishizuki K., Ohtsuki T., Tahara M., Suematsu T., Yamada Y., Akiyama H.: Examination of quantification methods of quercetin in food additives and reagents using <sup>1</sup>H quantitative NMR, *Pacificchem 2015* (2015.12)