

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
既存添加物の成分規格試験法の検討

分担研究者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

要旨 既存添加物等の成分規格試験法を設定あるいは改正するために必要な情報を得る目的で、一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索、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、未指定添加物「耐酸性カルミン」の主色素成分の化学構造の完全帰属、今後流通が懸念される未指定添加物「耐酸性ラック色素」の主色素成分の合成を行った。

研究協力者

多田敦子 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

A. 研究目的

天然添加物は、平成7年（1995年）に食品衛生法が改正されるまでは、有害でない限り一般の食品と同様の扱いであり、添加物としての法的規制を受けていなかった。平成7年の食品衛生法改正によって天然添加物にも指定制度が導入された際、その時点で流通実態（製造、販売、使用、輸入）のあった天然添加物（法的には「化学的合成品以外の添加物」といった。）を既存添加物、天然香料、一般飲食物添加物の3グループに分類した。これらは指定制度の適用除外として引き続き使用が認められた。

このような歴史的経緯から、食品添加物は、法規制上次の4つに分類される。

指定添加物
既存添加物
天然香料
一般飲食物添加物

指定添加物は指定制度に基づく添加物であり、国が有効性と安全性を審査した上で使用を許可しており、公的な成分規格がそれぞれ設定

されている。一方、現在流通している既存添加物は国による事前の有効性・安全性審査を行った上で使用を認めたものではない。このため、既存添加物については、国の責任で安全性情報を収集して安全性を確認して公的な規格基準を設定することとなっている。しかし、指定添加物以外の添加物について公的な規格基準の設定は進んでいない。天然由来の既存添加物及び一般飲食物添加物は、ほとんどが天然物からの抽出物であり多成分からなり製品の成分が未解明なものが多い。また、近年、天然由来の成分の化学構造を化学的に一部改変した、いわゆる未指定添加物の流通も確認されており、これらの化学構造を明らかとすると共に分析法（試験法）の開発が望まれている。したがって、天然由来の添加物の成分規格設定には、不足している化学的データの収集が必要とされている。

このような背景から、本研究では、成分規格試験法を開発を目的に、既存添加物及び未指定添加物等について以下の検討を行ったので報告する。

一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索
INADEQUATEによるカルミン酸 耐酸性カルミン(4-アミノカルミン酸)の¹³C-NMR スペクトルの完全帰属
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

ラック色素のアンモニア処理および構造解析

B. 研究方法

B-1) 一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索

チコリ色素製品を LC/MS に付し、成分組成を確認した。次に、常法に従い分画し、LC/MS 上で主ピークとして確認された化合物 1 及び 2 を分取 HPLC により単離精製した。得られた化合物 1 及び 2 の化学構造について、LC/TOF-MS 及び NMR により解析した。

B-2) INADEQUATE によるカルミン酸、耐酸性カルミン(4-アミノカルミン酸)の ^{13}C -NMR スペクトルの完全帰属

カルミン酸を 28% アンモニア水($^{14}\text{NH}_3$ または $^{15}\text{NH}_3$ 水溶液)中で加熱し、生成した耐酸性カルミン(4-アミノカルミン酸)を単離精製した。精製した化合物について、 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, HMQC, HMBC, INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment)測定を行った。また、アミノ基の置換位置を特定するために $1\text{D-}^{15}\text{N}$ -NMR 測定を行い、得られたスペクトル情報を帰属した。

B-3) 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

クチナシ青色素のモデル合成実験として、ゲニピンとベンジルアミンを反応させた。LC/MS により、反応液中の生成物を経時的に観察し、反応中間体である黄色素 Y1 及び Y2, 最終生成物である青色素 B1 及び B2 を各種クロマトグラフィーにより精製した。得られた化合物について、LC/TOF-MS 及び NMR 測定を行い、その化学構造を解析した。

B-4) ラック色素のアンモニア処理および構造解析

ラック色素(粉末状)を 10% アンモニア水中で加熱し、アンモニア処理ラック色素を得た。こ

れを LC/MS に付し、生成した色素を観察した。また、分取 LC/MS を用いてラック色素より laccaic acid C を単離し、さらに、アンモニア処理し、4-aminolaccaic acid C を得た。精製した化合物について、 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, HMQC, HMBC, INADEQUATE 測定を行い、得られたスペクトル情報よりその構造を確認した。

C. 結果及び考察

C-1) 一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索

一般飲食物添加物は一般に飲食される食品等の抽出物であることから安全性に問題がないと考えられ、早急な成分規格設定は必要ないと考えられている。このため、一般飲食物添加物 106 品目のうち 3 品目について規格設定されているのみであり、規格設定が遅れている。そこで、本研究では一般飲食物添加物のうち、「チコリ色素」について、成分規格を設定するための基礎情報を得るために、指標成分となる特有の成分が含有されているかどうか検討した。

LC/MS により、チコリ色素製品中に観察された化合物 1 及び 2 を単離精製し、NMR によりその化学構造を決定した結果、化合物 1 が 5-(hydroxymethyl) furfural、化合物 2 が 4-hydroxyl-2-(hydroxymethyl)-5-methylfuran-3(2H)-one であり、いずれもチコリ色素製品を製造する際、焙煎の過程において糖類が変性し生じたと考えられる化合物であった(Fig. 1)。これらは、製造過程において焙煎処理を伴う他の添加物においても含有されると予想されることから、チコリ色素の指標成分としては不相当と考えられた。また、チコリ色素に特有な成分であるチコリ酸(chicoric acid)、加水分解後のカフェ酸を定量分析した結果、加水分解後のカフェ酸の有無がチコリ色素の確認に応用可能と考えられた(Fig. 2)。

C-2) INADEQUATE によるカルミン酸、耐酸性カルミン(4-アミノカルミン酸)の ^{13}C -NMR スペクトルの完全帰属

既存添加物「コチニール色素」は「本品は、

エンジムシ (*Dactylopius coccus* Costa (*Coccus cacti* Linnaeus)) から得られた、カルミン酸 (carminic acid ($C_{22}H_{20}O_{13}$)) を主成分とするものである。」と記載されており、わが国では、コチニール色素は食品への使用が許可されているが、コチニール色素の主色素成分カルミン酸を原料として化学的処理により構造を改変した色素はすべて化学的合成品扱いとなり、食品への使用は現在認められていない。

耐酸性カルミン (acid-stable carmine) と呼ばれるカルミン酸をアンモニアと反応させて生成したものと考えられる pH に依存せず、酸・アルカリ性条件下でも赤色を保つ色素が 2000 年頃から流通し始めた。この色素は化学的な構造改変を伴うものであり、世界的にも食品への使用は認められていない。このため、2002 年、我々の研究グループは、耐酸性カルミンの主色素の化学構造について検討し、カルミン酸の 4 位の水酸基がアミノ基に置換した 4-アミノカルミン酸 (4-aminocarminic acid) であると報告した (Sugimoto, N. et al. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **43**, 18-23 (2002))。しかし、この報告では、カルミン酸とカルミン酸のアントラキノンの kermesic acid に類似した構造を持つ purpurin の両者についてアミノ化、次いでメチル化を行い、両者の化学シフトの比較から、耐酸性カルミンの主色素成分が 4-aminocarminic acid であると推定したものであり、完全帰属に至っていない。

そこで本研究では、未指定添加物である耐酸性カルミンの主色素の化学構造が 4-aminocarminic acid であることを完全証明することを目的とした。 ^{13}C - ^{13}C 間の直接結合、すなわち、有機化合物の炭素骨格のつながりを完全に確認することができる INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment) を 4-aminocarminic acid の構造解析に適用した。また、安定同位体 ^{15}N を導入した 4-aminocarminic acid の合成を行い、1D- 1H , ^{13}C , ^{15}N -NMR 及び 2D-HMQC, HMBC, INADEQUATE の解析結果より、 NH_2 基の置換位置を特定し、耐酸性カルミンの主色素の化学構造が 4-aminocarminic acid であることの確証を得ることができた (Fig. 3)。

C-4) 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

既存添加物クチナシ青色素は、ゲニピンと一級アミンの反応生成物が主色素成分とされるがその構造は未だ不明である。この主色素成分の生成過程および構造についての知見を得るため、ゲニピンとベンジルアミンを用いたモデル実験を行った。LC/MS により経時的に反応液中の生成物を観察したところ、青色素が生成するまでに前駆体と考えられる黄色の化合物 Y1 及び Y2 が生成することが確認された。化合物 Y1 及び Y2 を分取 HPLC により単離し、NMR 等により構造解析したところ、化合物 Y1 及び Y2 は、ゲニピンが反応液中でジアルデヒド構造に開裂し、ベンジルアミンのアミノ基とカルボニル-アミノ反応を起こした後に閉環したものであった。また、単離した化合物 Y1 及び Y2 を再溶解した溶液を観察したところ、青色に経時的に変化することから、青色素の前駆体であることが確認された。したがって、ゲニピンは、ベンジルアミンの 1 級アミンと反応し閉環した後、黄色素 Y1 とその異性体 Y1' を生成する。次に、1 位の OH 基と 9 位のプロトンが *cis* 配置した異性体 Y1' は、速やかに脱水し黄色素 Y2 となった後、青色素成分へ変化または重合していくと考えられた (Fig. 4)。次に、生成した青色素成分の混合物より青色素 B1 及び B2 を精製し、その化学構造を LC/TOF-MS 及び NMR により解析した結果、Y2 の 6 位と 10 位が脱水結合して共役二重結合を形成し、更に繰り返し結合した重合体であると推定された。以上のことから、既存添加物クチナシ青色素の青色素成分は、ゲニピンと一級アミンが重合的に反応して生成した化合物であると推定された。

C-4) ラック色素のアンモニア処理および構造解析

既存添加物「ラック色素」は、天然由来の着色料であり、コチニール色素と同様にアントラキノ骨格を有する色素を主成分とするが、コチニール色素が carminic acid の 1 成分からなるのに対し、ラック色素は、laccic acid A, B, C,

E 等複数の成分から構成される。C-2)で述べたように、carminic acid をアンモニア処理することで、4位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に容易に置換され、4-aminocarminic acid が合成される。このような置換反応は、アントラキノン骨格を持つ化合物、laccaic acid に対して普遍的に起こりうると想像できる。現時点では、ラック色素をアンモニア処理して合成された、いわゆる耐酸性ラック色素の報告例はないが、今後、流通が確認されたとき、これについても、耐酸性カルミンと同様に未指定添加物となることから、その分析法の確立が望まれる。

そこで本研究では、ラック色素をアンモニア処理し、その色素成分について LC/MS および NMR を用いて解析を行った。ラック色素をアンモニア処理することで、pH に依存しない色調が確認された。LC/MS 分析により、アンモニア処理後のラック色素には、ラック色素の主色素成分 laccaic acid A, B, C および E の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換した 4-aminolaccaic acid A, B, C および E が主色素成分として含まれることが示唆された。また、単離精製した laccaic acid C をアンモニア処理して得られた化合物について NMR 解析を行ったところ、4-aminolaccaic acid C であることが確認された。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 原田晋, 小川有子, 杉本直樹, 穠山浩: フランス製菓子赤色マカロン摂取後に生じた, コチニール色素によるアナフィラキシーの 2 症例. 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌, 8, 180-186 (2014).
- 2) 山崎太一, 大槻崇, 三浦亨, 末松孝子, 堀之内高暁, 村上雅代, 齋藤剛, 井原俊英, 多田敦子, 田原麻衣子, 合田幸広, 穠山浩, 中尾慎治, 山田裕子, 小池亮, 杉本直樹: ¹H NMR による正確な定量分析のための内標準液を用いる試料調製法の検討. 分析化学, 63, 323-329 (2014).
- 3) Kawasaki, H., Akiyama, T., Tada, A., Sekiguchi, W., Nishizaki, Y., Ito, Y., Sugimoto, N., Akiyama,

H.: Development of HILIC-LC/MS method for direct quantitation of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole in caramel III with the qNMR certified standard. Jpn. J. Food Chem. Safety, 22(2), 115-122 (2015).

- 4) Nishizaki, Y., Ishizuki, K., Akiyama, H., Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K.: Preparation of ammonia-treated lac dye and structure elucidation of its main component. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.), 57, 193-200 (2016).

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) 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)
- 3) Sugimoto, N., Takada, M., Ishizuki, K., Ohtsuki, T., Tada, A., Nishizaki, Y., Suematsu, T., Miura, T., Yamada, Y., Horinouchi, T., Koike, R., Kato, T., Togawa, T., Akiyama, H.: "AQARI" vs. "PULCON", a comparison of qNMR: internal and external reference methods. Pacificchem2015 (2015.12).
- 4) Miura, T., Suematsu, T., Sugimoto, N., Nakao, S., Takaoka, S., Yamada, Y.: Development of quantity analytical standard by using qNMR. 3rd Annual Practical Applications of NMR in Industry Conference (PANIC)(2015.2).
- 5) 石附京子, 西崎雄三, 多田敦子, 箕川剛, 中島光一, 穠山浩, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物クチナシ青色色素の色素生成メカニズムの解明: 前駆体の構造決定. 食品化学学会 (2016.6).
- 6) 杉本直樹: qNMR による相対感度係数の算出

とその有効利用について．JAIAN (2016.8) ．

7) 杉本直樹：定量 NMR/LC を用いた天然有機化合物の定量分析法の開発(シンポジウム I 「定量 NMR から見えてくる世界」) ．日本生薬学会第 63 回年会 (2016.9) ．

8) 黒江美穂，山崎太一，斎藤直樹，中村哲枝，沼田雅彦，西崎雄三，杉本直樹，井原俊英：新規定量法である qNMR/LC 法による非イオン界面活性剤標準液の濃度評価．日本分析化学会第 65 回年会(2016.9) ．

9) 斎藤直樹，北牧祐子，大塚聡子，西崎雄三，杉本直樹，井原俊英：定量 NMR における不純

物の重なる信号に対するクロマトグラフィーを併用した新規評価法の確立．NMR 討論会 (2016.11).

10) 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穂山浩, 永津明人：定量 NMR を利用した生薬成分の定量．第 45 回生薬分析シンポジウム (2016.11).

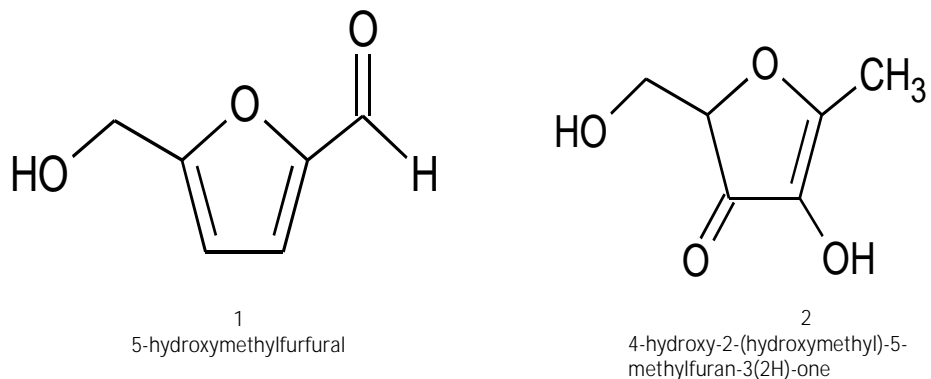


Fig. 1 Structures of compound 1 and 2 isolated from Chicori color product

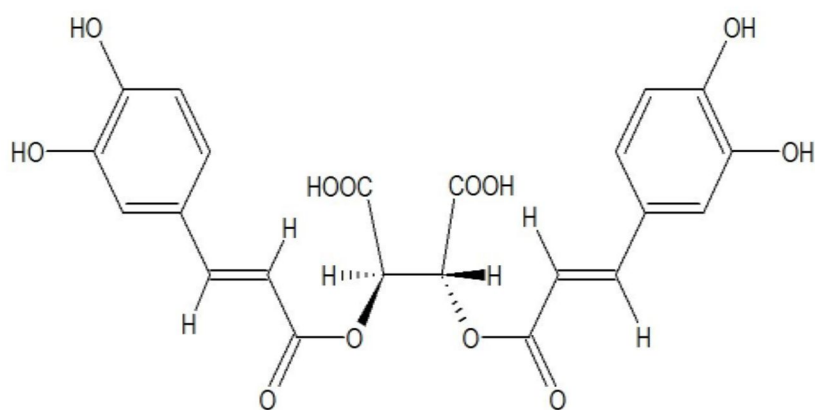


Fig. 2 Structure of chicoric acid

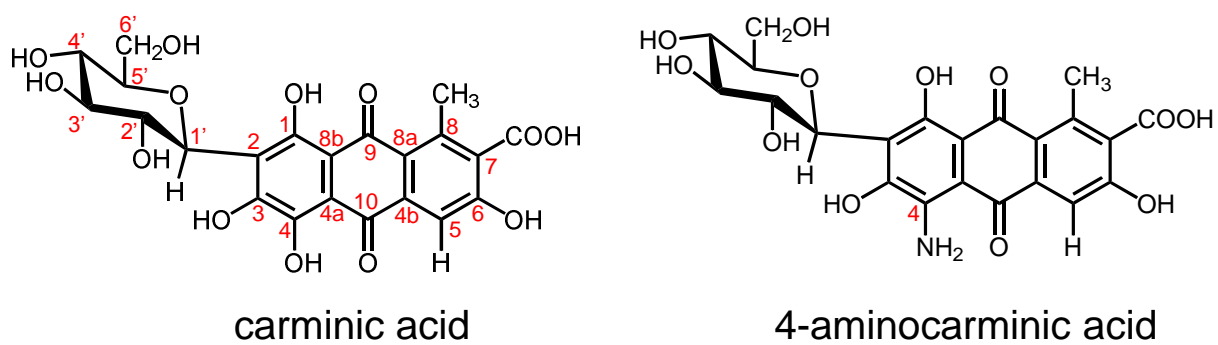


Fig. 3 Structure of carminic acid and 4-aminocarminic acid

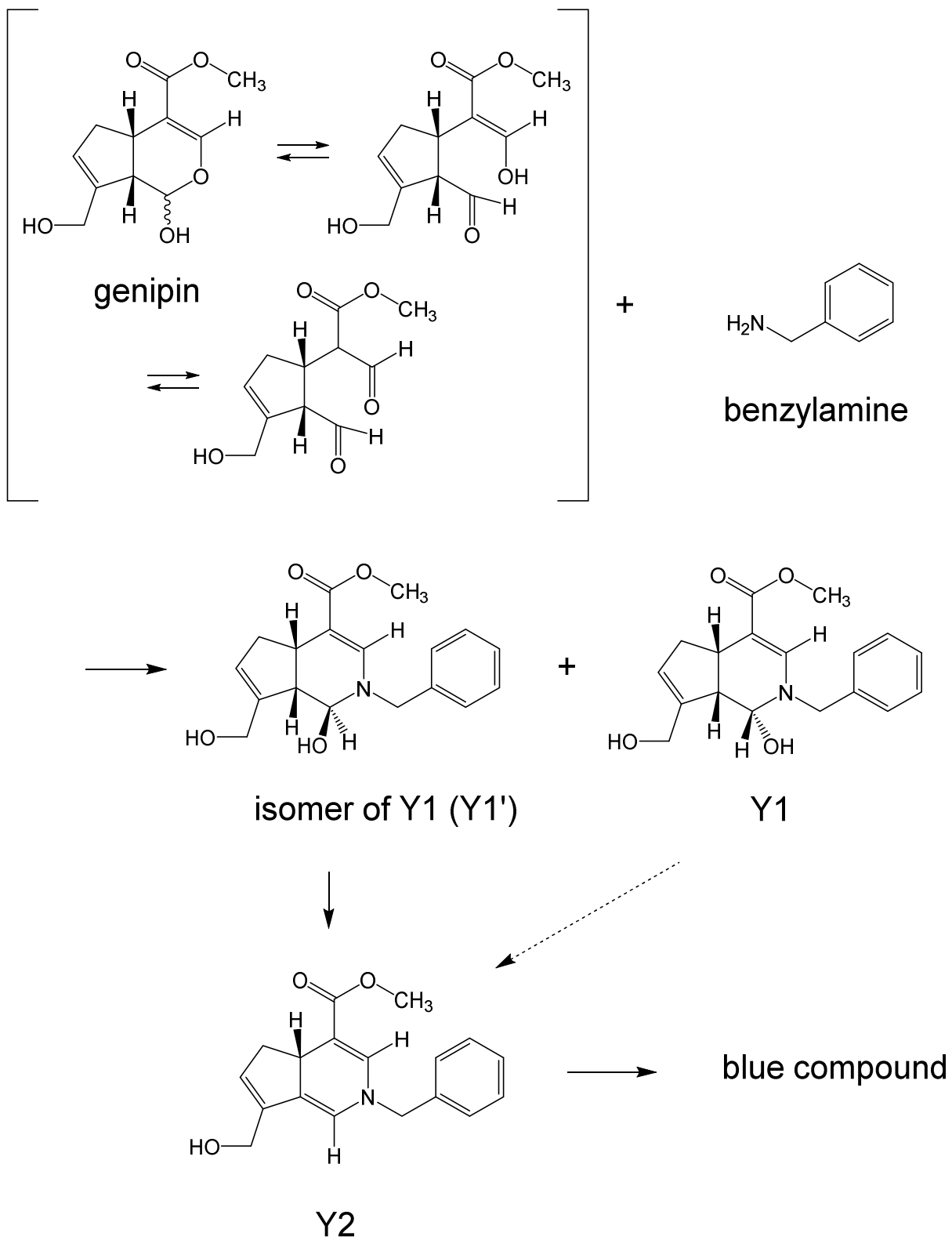


Fig. 4 Estimated reaction pathway of blue compound generation from genipin and benzylamine