

平成29年度「既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究」

— 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

一般社団法人日本食品添加物協会

# 研究報告書

## 平成29年度「既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究」

### —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 一般社団法人日本食品添加物協会 役職 専務理事  
研究者 樋口 彰 所属 一般社団法人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89品目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。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、今後も着実な成分規格の作成が必要である。

本年度は、平成28年度までに作成した第10版食品添加物公定書に向けた検証用規格案及び第5版自主規格案の一部品目について、見直しあるいは裏付け試験を実施した。また、残された品目の中から情報の集まり、環境の整ったものについて新たに第5版自主規格案として成分規格案を作成した。更に、昨年度に引き続き、既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質に記載されている基原種について、削除、変更又は拡大の必要性の有無を調査した。

## 研究結果の概要と考察

### 1. 研究方法

#### (1) 既存添加物の成分規格の整備状況, 安全性試験実施状況, 国内外規格の有無等の調査

第9版食品添加物公定書未収載品について, 本年度作成する検証用規格および自主規格を含め成分規格の整備状況, 安全性試験実施状況, 国内外規格の有無等を調査した。

#### (2) 第10版食品添加物公定書に向けた検証用規格の見直し及び裏付け試験

既存添加物365品目中, 第8版食品添加物公定書に収載されている128品目, 第9版食品添加物公定書に収載された89品目を除く残りの品目について, 昨年度までに作成した成分規格検証用規格案について, 一部見直しを実施した。

#### (3) 第10版収載既存添加物候補品目定義及び製法・本質の基原生物の調査

第10版収載既存添加物候補品目の基原・製法・本質に記載されている基原種について, 削除, 変更又は拡大の必要性の有無の調査を継続した。

#### (4) 第5版既存添加物自主規格刊行に向けた成分規格収載案の作成

昨年度に引き続き, 前項の検証用とできなかった品目について, 成分規格の収載が可能なものから新規に自主規格案を作成した。

### 2. 調査研究者

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により, 評価・検討を行った。

### 3. 研究結果の概要

#### (1) 既存添加物の成分規格の整備状況, 安全性試験実施状況, 国内外規格の有無等の調査

第9版食品添加物公定書未収載品について次の事項について調査を行い, 部会別および品目順にまとめた。

#### (2) 第10版食品添加物公定書に向けた検証用規格の見直し及び裏付け試験

昨年度までに作成した成分規格検証用規格案について, 一部見直しを行い, 部会別, 品目順に整理した。

表1に対象品目を示す。

表1 第10版既存添加物成分規格案新規作成品目

部会	既存No*	用途	既存添加物名簿名称
2	89	着色料	金

2	51	着色料	カキ色素
2	90	着色料	銀
2	159	着色料	シタン色素
2	165	着色料	植物炭末色素
2	258	着色料	ファフィア色素
2	324	着色料	ムラサキヤマイモ色素
4	40	増粘安定剤	エレミ樹脂
4	145	増粘安定剤	サバクヨモギシードガム
4	359	増粘安定剤	レバン
4	229	増粘安定剤	トロロオアオイ
5	76	酸化防止剤	カンゾウ油性抽出物
5	58	酸化防止剤	ヒマワリ種子抽出物
5	58	酸化防止剤	カテキン
5	202	酸化防止剤	チャ抽出物
5	365	酸化防止剤	ローズマリー抽出物
6	154	ガムベース	ジェルトン
6	199	ガムベース	チクル
6	321	ガムベース	ミルラ
6	364	ガムベース	ロシン
7	148	酵素	イソマルトデキストラナーゼ
9	27	調味料・苦味料	イソアルファー苦味酸
9	120	調味料・苦味料	ゲンチアナ抽出物
9	161	調味料・苦味料	ジャマイカカシミア抽出物

※:既添 No:数字は既存添加物番号

### (3)第10版収載既存添加物候補品目定義及び製法・本質の基原生物の調査

昨年度までに作成した改正要望について、一部削除、変更又は拡大を盛り込んだ。

### (4)第5版既存添加物自主規格刊行に向けた最終取りまとめ

①第10食品添加物公定書の検討に先立ち、今後、第5版既存添加物自主規格の刊行を予定している。収載する規格は、第5版既存添加物自主規格及び第10版食品添加物公定書に向けて作成した成分規格検証用の規格案を反映させた自主規格となる。対象品目を表2に記載した。

新規作成及び見直しを行った自主規格案とその関連資料並びに調査結果については、昨年度までの報告分を含め、部会別に整理した。

②通則、一般試験法、試薬・試液等についてまとめた。

表2 第5版既存添加物自主規格収載予定品目

通し No.	部会	既存 No <sup>※</sup>	用途	既存添加物名簿名称
1	2	024	着色料	アルミニウム <sup>※※</sup>
2	2	047	着色料	オレンジ色素 <sup>※※</sup>
3	2	051	着色料	カキ色素
4	2	087	着色料	魚鱗箔 <sup>※※</sup>
5	2	089	着色料・製造用剤	金
6	2	090	着色料・製造用剤	銀
7	2	114	着色料	クーロー色素 <sup>※※</sup>
8	2	135	着色料	骨炭色素
9	2	149	着色料	シアナット色素 <sup>※※</sup>
10	2	159	着色料	シタン色素
11	2	165	着色料	植物炭末色素
12	2	258	着色料	ファフィア色素
13	2	282	着色料	ペカンナッツ色素 <sup>※※</sup>
14	2	324	着色料	ムラサキヤマイモ色素
15	2	飲食	着色料	アカゴメ色素 <sup>※※</sup>
16	2	飲食	着色料	アカダイコン色素
17	2	飲食	着色料	イカスミ色素
18	2	飲食	着色料	エルダーベリー色素
19	2	飲食	着色料	クランベリー色素 <sup>※※</sup>
20	2	飲食	着色料	サフラン色素
21	2	飲食	着色料	シソ色素
22	2	飲食	着色料	ストロベリー色素 <sup>※※</sup>
23	2	飲食	着色料	チョコリ色素
24	2	飲食	着色料	ノリ色素 <sup>※※</sup>
25	2	飲食	着色料	ハイビスカス色素
26	2	飲食	着色料	ブドウ果汁色素
27	2	飲食	着色料	ブラックベリー色素 <sup>※※</sup>
28	2	飲食	着色料	ブルーベリー色素 <sup>※※</sup>
29	2	飲食	着色料	ボイセンベリー色素 <sup>※※</sup>
30	2	飲食	着色料	ホワートルベリー色素 <sup>※※</sup>
31	2	飲食	着色料	ラズベリー色素 <sup>※※</sup>
32	2	飲食	着色料	レッドカーラント色素 <sup>※※</sup>
33	2	飲食	着色料	パープルキャロット色素
34	2	飲食	着色料	アカジャガイモ色素

35	3	074	保存料	カワラヨモギ抽出物
36	3	175	製造用剤／日持向上剤	セイヨウワサビ抽出物
37	3	216	製造用剤／日持向上剤	トウガラシ水性抽出物
38	3	268	製造用剤／日持向上剤	ブドウ果皮抽出物
39	3	329	製造用剤／日持向上剤	モウソウチク乾留物
40	3	330	製造用剤／日持向上剤	モウソウチク抽出物
41	4	001	増粘安定剤	アウレオバシジウム培養液
42	4	004	増粘安定剤	アグロバクテリウムスクシノグリカン
43	4	013	増粘安定剤	アマシードガム
44	4	019	増粘安定剤	アラビノガラクトン
45	4	040	増粘安定剤/ガムベース	エレミ樹脂
46	4	053	増粘安定剤	カシアガム
47	4	062	増粘安定剤	キチン
48	4	064	増粘安定剤・製造用剤	キトサン
49	4	92	増粘安定剤	グァーガム酵素分解物
50	4	104	増粘安定剤	グルコサミン
51	4	145	増粘安定剤・製造用剤	サバクヨモギシードガム
52	4	229	増粘安定剤	トロロアオイ
53	4	257	増粘安定剤	ファーセララン
54	4	336	増粘安定剤	モモ樹脂
55	4	359	増粘安定剤	レバン
56	5	076	酸化防止剤	カテキン
57	5	091	酸化防止剤/日持	カンゾウ油性抽出物
58	5	093	酸化防止剤	グアヤク脂
59	5	095	酸化防止剤	クエルセチン
60	5	115	酸化防止剤/日持	クローブ抽出物***
61	5	136	酸化防止剤	ゴマ油不けん化物
62	5	196	酸化防止剤	単糖・アミノ酸複合物
63	5	202	酸化防止剤	チャ抽出物
64	5	232	酸化防止剤	生コーヒー豆抽出物
65	5	255	酸化防止剤	ヒマワリ種子抽出物
66	5	306	酸化防止剤	没食子酸
67	5	365	酸化防止剤	ローズマリー抽出物
68	5	036	ガムベース/光沢剤	ウルシロウ
69	6	042	ガムベース	オゾケライト***
70	6	094	ガムベース	グアヤク樹脂

71	6	099	ガムベース	グッタハンカン***
72	6	100	ガムベース	グッタペルカ
73	6	138	ガムベース	ゴム
74	6	142	ガムベース/光沢剤	コメヌカロウ
75	6	144	ガムベース/光沢剤	サトウキビロウ
76	6	152	ガムベース/光沢剤	シェラックロウ
77	6	154	ガムベース	ジェルトン
78	6	199	ガムベース	チクル
79	6	307	ガムベース	ホホバロウ***
80	6	312	ガムベース	マスチック
81	6	321	ガムベース	ミルラ
82	6	333	ガムベース/光沢剤	モクロウ
83	6	364	ガムベース	ロシン
84	8	029	酸味料	イタコン酸***
85	9	027	苦味料	イソアルファー苦味酸
86	9	041	調味料	塩水湖水低塩化ナトリウム液
87	9	120	苦味料	ゲンチアナ抽出物
88	9	124	苦味料	酵素処理ナリンジン***
89	9	161	苦味料	ジャマイカカッシア抽出物
90	9	182	調味料	粗製海水塩化カリウム
91	9	236	苦味料	ニガヨモギ抽出物***
92	9	357	苦味料	レイシ抽出物
93	9	127	乳化剤	酵素処理レシチン
94	10	172	乳化剤	スフィンゴ脂質
95	10	187	乳化剤	ダイズサポニン
96	10	195	乳化剤	胆汁末***
97	10	009	製造用剤	アスペルギルスステレウス糖たん白質
98	13	30	製造用剤	イナワラ灰抽出物
99	13	043	製造用剤	オゾン
100	13	048	製造用剤	海藻灰抽出物
101	13	052	製造用剤	花こう斑岩
102	13	118	製造用剤	くん液
103	13	120	製造用剤	高級脂肪酸(ステアリン酸)
104	13	120	製造用剤	高級脂肪酸(ベヘニン酸)
105	13	120	製造用剤	高級脂肪酸(パルミチン酸)
106	13	120	製造用剤	高級脂肪酸(ラウリン酸)
107	13	120	製造用剤	高級脂肪酸(カプリル酸)

108	13	120	製造用剤	高級脂肪酸(カプリン酸)
109	13	120	製造用剤	高級脂肪酸(ミリスチン酸)
110	13	148	製造用剤	酸素
111	13	137	製造用剤	ゴマ柄灰抽出物
112	13	155	製造用剤	分岐 シクロデキストリン
113	13	158	製造用剤	シソ抽出物
114	13	163	製造用剤	乳清焼成カルシウム
115	13	168	製造用剤	水素
116	13	173	製造用剤	生石灰
117	13	176	製造用剤	ゼイン
118	13	184	製造用剤	ソバ柄灰抽出物
119	13	198	製造用剤	柿タンニン
120	13	198	製造用剤	ミモザタンニン
121	13	200	製造用剤	窒素
122	13	201	製造用剤	チャ乾留物
123	13	212	製造用剤	鉄
124	13	214	製造用剤	銅
125	13	227	製造用剤	トレハロース
126	13	237	製造用剤	ニッケル
127	13	239	製造用剤	ばい煎コメヌカ抽出物
128	13	240	製造用剤	ばい煎ダイズ抽出物
129	13	242	製造用剤	白金
130	13	246	製造用剤	パラジウム
131	13	249	製造用剤	ヒアルロン酸
132	13	262	製造用剤	フィチン(抽出物)
133	13	266	製造用剤	ブタン
134	13	275	製造用剤	プロパン
135	13	297	製造用剤	ヘプタン
136	13	302	製造用剤	ヘリウム
137	13	318	製造用剤	貝殻未焼成カルシウム
138	13	318	製造用剤	卵殻未焼成カルシウム
139	13	327	製造用剤	メバロン酸
140	13	331	製造用剤	木材チップ
141	13	334	製造用剤	木灰
142	13	335	製造用剤	木炭抽出物
143	13	356	製造用剤	ルテニウム

※:既添 No:数字は既存添加物番号



---

※※: 暫定規格

## (5) 添加物酵素の基原種分類, 同定について

酵素の基原としての微生物について, 分類学の発達に伴う呼称の変更等への対応および留意点について調査した結果をまとめた.

### 添加物酵素の基原種の同定, 分類について

平成 30 年 2 月 26 日

東洋大学 食環境科学部 健康栄養学科 教授 林 清  
日本食品添加物協会 第 7 (酵素) 部会長 卯津羅健作

酵素は生体触媒であるゆえ多種多様な生物種に存在している. また, その多様性ゆえ, 様々な分野において事業化されている. 特に, その安全性の高さより食品添加物酵素にも多く利用されている.

自然界に多様に分布する酵素は, 従前「天然添加物」とされていたが, 平成 8 年に「既存添加物名簿」に収載され, ほぼ同時期に「既存添加物名簿収載品目リスト」が通知された. 本リストには, 各添加物酵素について, その「基原・製法・本質」が示された.

また, 食品添加物公定書第 9 版改正においては, 上述の既存添加物名簿収載品目リストに収載された基原に加え, 同リスト発行から本改正に際する検討までの間に事業使用が確認されたものが収載されることとなった.

他方, 酵素の事業化のための発酵生産においては, その生産性の優位性 (※) より, 微生物が酵素の基原として用いられることがほとんどである.

(※) 動植物とは異なり, 微生物による発酵生産は, 季節・天候等の影響を受けず, 短時間に集約かつ計画的な酵素の安定生産が可能となること.

しかし, 微生物においては, 分類学, および同定の技術, 手法の進歩により, 基原の呼称が改正されることが少なからず発生することがある. その際, 事業使用されている基原自体に変更はなくとも, 呼称変更により公定書収載の基原名との齟齬が生じることになる場合もあるが, このことが問題とならないよう, 対応策を検討しておく必要がある.

微生物をはじめ全ての生命体は地球上にある一つの始原細胞 (生命) の誕生に端を発し, 30 数億年の歳月をかけ, 現在のような多種多様な生態系に進化してきている. 逆の見方をすると, 夫々の生物間において, 近い, 遠いの差はあれ, 元来, ひとつの系統で繋がっているものである.

我々は, 多様な生物種を系統的に取り扱いができるよう, このような多様な系統を類縁の近い, 遠いで模式的に表現した分類体系を作り上げてきた. 例えば, Haeckel による生物の系統樹などがある<sup>1)</sup>.

微生物においても, その分類体系において「種」の概念が共有化できるよう科学的根拠に基づく境界線を設け, 個々の識別ができるようにされてきた. そのために各微生物群の科学的特徴を見出し, 各系統の範囲・定義を定め, 各々の系統毎に学術名を与える分類学が発達してきた.

また、分類学の発達にともない、系統をより明確に表示するために分類階級が定められた（表1は、*Bacillus subtilis* の分類階級の事例）。分類の最小単位が「種 (species)」, 「種」の集合が「属 (genes)」, 「属」の集合が「科 (family)」というように、進化・系統を反映させ、それぞれの集合毎の階級にまとめられている。ただ、ここで重要なことは、「種」や「属」は概念的なものであるのに対し、実存する微生物は個体（株：strain）であることである。

表1 分類階級の事例

階級	Rank	<i>Bacillus subtilis</i>
ドメイン	Domain	Bacteria
界	Kingdom	Bacteria
門	Division	Fermicutes
綱	Class	Bacilli
目	Order	Bacillales
科	Family	Bacillaceae
属	Genus	<i>Bacillus</i>
種	Species	<i>Bacillus subtilis</i>

微生物の分類については、微生物の形態的特徴（コロニーの形状や細胞の形など）、生理・生化学的性状（糖の資化性・発酵性、生育する温度や pH の範囲・至適条件など）、化学分類学的性状（菌体の脂肪酸組成、キノン組成など）等の違いの比較（同定）により行われてきた。

ただ、これらの同定法においては、微生物の多様性ゆえ、同定結果による分類の判定が明確に行えないこともある。例えば、表2（*B.subtilis* の生理・生化学的性質の一部）に示されるように分類の最小単位である「種」の中に分布する「株 (Strain)」により多様な性状を示すことがあるからである。

表2 *Bacillus subtilis* の生理・生化学的性状 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> Edition Volume 3, p79 Table 4 から抜粋)

Characteristic	<i>Bacillus subtilis</i>
Oxidase	d
β-Galactosidase	+
Lysine decarboxylase	—
Acid from N-Acetyl-D-glucosamine	d
Acid from Cellobiose	+
Acid from Fructose	+
Acid from Galactose	d
Acid from Sorbose	—
Acid from L-Xylose	—

＋：85%以上の株 (Strain) が陽性

d：株 (Strain) により多様 (16～84%の株が陽性)

－：0～15%の株が陽性

一方、近年の分子生物学や遺伝学的分析法の進歩、および分析結果を解析するコンピュータ（ハード、ソフト両面）の発達により、種々の遺伝子情報がより精密に解析され、かつ豊富で良質な情報が蓄積されてきた。これらの知見に基づき、微生物の系統解析を効率的に行うための適切な遺伝子領域も見出されている。現在、系統解析に、一般的に用いられる遺伝子として、細菌では16S rDNA 遺伝子、真菌では18S rDNA 遺伝子、28S rDNA 遺伝子のD1/D2 領域、および両遺伝子の間に存在するITS 領域などがある。

これらの遺伝子情報を指標にして、従来の形態的特徴や生理・生化学的性状などに基づいて系統解析（分類）された微生物について、再解析（分類）が活発に行われており、系統解析の情報がデータベースに蓄積されてきている。

遺伝子領域による微生物の系統解析においては、被検菌株の遺伝子情報（例 細菌の場合は16S rDNA 遺伝子の塩基配列）と蓄積された遺伝子情報との客観性のある相同値をもって判定を行うため、試験者の主観が入らず、より客観的な結果が得られる。例えば、細菌の「種」はDNA-DNA 分子交雑試験による相同値が70%以上を示す菌株（Strain）同士を1菌種と定義している<sup>2)</sup>。また、16S rDNA の全塩基配列（約1,500 塩基）の相同値が98.7%以上の場合は、DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が70%以上を示す可能性、つまり同種の可能性がある、とされている<sup>3)</sup>。本法による細菌の同定の事例として、「16S rDNA を指標としたアルギン酸リアーゼ生産菌の種の同定」<sup>4)</sup>がある。

このような背景から、近年、微生物の系統解析は、遺伝子領域による手法が主流となってきている。しかしながら、従来の形態的特徴や生理・生化学的性状などに基づく系統解析（分類）と近年の遺伝子領域の情報の基づく系統解析とは、必ずしも一致しない場合もあり菌株の分類学上の呼称変更に至る場合がある（後述の事例1、事例2）。

また、過去において、命名された学名に混乱がみられていたものがあり、学術的見地からの確認をもって当該学名が整備され、呼称変更に至ったケースもある（後述の事例3）。

これらの事例の詳細を後述するが（事例1～3）、このようなことより、食品添加物公定書の酵素の各条に記載されている基原においても同様に呼称変更が生じることもありえる。ただ、その呼称変更の背景等は下記の事例に限定されるものではなく、また予め想定できるものでもない。

他方、食品添加物として使用される添加物酵素の安全性の確保においては、当該酵素の基原の病原性、および毒素産生性の有無が判断材料となる。当該基原の呼称変更については分類学上の改正であり、当該基原微生物自体が他の基原微生物に変わることはないので、その安全性を左右するものではない。

このような背景から、分類学上の改正、または同定技術の進歩により、当該基原の呼称変更が生じた場合であっても、それらの科学的な背景、および当該基原微生物自体が他の基原微生物に変わっていないことが確認できれば、その安全性に問題が生じることもないので、新呼称への読替えを施し、公定規格上何ら問題なく添加物酵素製造に使用できるとする措置が妥当である。なお、新呼称の公定書規格への収載は、公定書改正の際の検討課題とすることでよいと考える。

#### 【分類学上の呼称変更の事例】

(事例1) *Lactobacillus fermentum*

Bergey's Manual of Systematic Bacteriologyによると、「生理学的検査のみでは、類縁の *Lactobacillus reuteri* と区別ができない。両者の区別には遺伝子型の検査が必要である。」とあるため、生理学的検査において *Lactobacillus fermentum* と同定・分類されたものが、遺伝子情報の解析により *Lactobacillus reuteri* と同定されることもある。

以下は、上記のことを示す記述を Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> Edition Volume 3 *Lactobacillus* の章より抜粋したものである。

**30. *Lactobacillus fermentum***

Additional remarks : *Lactobacillus fermentum* cannot be distinguished from *Lactobacillus reuteri* by simple physiological tests. The genotypical methods used provide clear results (Dellaglio et.al. 2004)

**77. *Lactobacillus reuteri***

Additional remarks : *Lactobacillus reuteri* cannot be distinguished from *Lactobacillus fermentum* by simple physiological tests. Determination of Diamino acid of peptidoglycan or preferentially, genotypical methods clearly Separate the two species.

(事例2) *Bacillus amyloliquefaciens*

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> Edition Volume 3 *Bacillus* の章の 1a. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* の項に、"Strains formerly designated "*Bacillus amyloliquefaciens*" or "*Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*" are now accommodated within *Bacillus amyloliquefaciens*"と記されており、*Bacillus amyloliquefaciens* が *Bacillus subtilis* から明確に分けられた。これにより、従前 *Bacillus subtilis* と分類されていた一部の株は、*Bacillus amyloliquefaciens* に分類された。

なお、上述は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> Edition Volume 3 *Bacillus* の章より抜粋したものである。

(事例3) 黒麹菌

黒麹菌は、泡盛麹から分離された当初は、*Aspergillus luchuensis* とされたが、後に黒麹菌として *Aspergillus awamoris* を提唱されるなどその学名に混乱が見られた。近年の確認により、*Aspergillus awamoris* と分類されている株には、*Aspergillus luchuensis* のみならず *Aspergillus niger* も混在していることが示され、結局、*Aspergillus awamoris* の学名は「doubtable (疑問)」であり、分類学上の混乱を避けるため廃止された。このことにより、黒麹菌の学名は、*Aspergillus luchuensis* とされ、*Aspergillus niger* などのクロカビとは別種として分類されることとなった<sup>5)</sup>。

参考文献

- 1) E. Haeckel : "Generelle Morphologie der Organismen" Vol.2 Reimer, Berlin, 1866

- 2) Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, L., Moore, L.H., Moore, W.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., and Trüper, H.G: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 463-464 (1987)
- 3) Stackebrandt, E. and Ebers, J.: Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today*, 33, 152-155 (2006)
- 4) 穂山浩:「研究分担課題:16S rDNA を指標にしたアルギン酸リアーゼ生産菌種の同定」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)
- 5) 山田修:「黒麹菌の学名が *Aspergillus luchuensis* になりました」日本醸造協会誌 第 110 卷 第 2 号 P64-67 (2015)

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法に関する研究

～トマト色素中のリコピン分析法～

研究分担者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

**研究要旨** 既存添加物「トマト色素」の定量法として色価測定法が適用されているが、HPLCによる分析法を今後導入していくには、主色素成分であるリコペンの定量用標準品を必要としない定量法が望ましい。HPLC及びqNMRにより、リコペンのスタンIに対する相対モル感度(RMS: relative molar sensitivity)を正確に求めることによって、安価なスタンIを内標準物質とし、HPLCクロマトグラム上に観察される試料中のリコピンとスタンIのピーク面積、RMSの関係からリコペンの定量用標準品を必要としない定量法を構築した。その結果、絶対検量線法とほぼ同等の精度が得られたことから、本法が色価測定法に代わる定量法として有効であると考えられた。

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 研究員  
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 研究員  
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 研究員

#### A. 研究目的

食品添加物公定書<sup>1)</sup>において、既存添加物「トマト色素」は、『トマト(*Lycopersicon esculentum* Miller)の果実から得られた、リコピン(lycopene)を主成分とするものである。食用油脂を含むことがある。』と定義され、また、既存添加物名簿収載品目リスト注解書<sup>2)</sup>には、その基原・製法・本質として『ナス科トマト(*Lycopersicon esculentum* Mill.)の果実より、油脂で抽出したもの、果実を脱水し、室温時若しくは熱時、ヘキササン、酢酸エチル若しくはアセトンで抽出し、溶媒を留去したもの、又はトマトの果実の搾汁より分離して得られる。』と記載されている。トマト色素は、黄色～橙色系が主体のカロテノ

イド系色素の中で例外的に赤～ピンクの色調を呈すること、原料の身近さなどから、天然由来の着色料として需要が高い。トマト色素の主色素成分はリコペン(ドイツ語読みでリコピンと呼ばれていたが、現在、英語読みが奨励されているため、以下リコペンとする。)であり、トマトに多く含まれるほか、スイカ、ニンジン、パパイヤなどの赤色の野菜・果物に all-trans 体として存在するが、加工、調理、保存、露光により容易に異性化することが知られている。また、主色素成分のリコペンについては、抗酸化機能、がん抑制効果、コレステロール低下作用など様々な健康機能効果についても研究が進み、健康食品分野で急激に注目を集めている。

米国では着色料は食品添加物とは別扱いになっており、既存添加物「トマト色素」に相当する「tomato lycopene extract」と「tomato lycopene concentrate」が、アナトーエキスやβ-カロテンとともに検定不要(exempt from certification)の食用色素として21 CFR 73.585<sup>3)</sup>に収載されている。「tomato lycopene extract」はトマトより酢酸エチルで抽出され、オレオレジン 5.5%以上、

「tomato lycopene concentrate」はオレオレジン60%以上のリコペンと規定されている。また、FDAはGRAS通知(GRAS notice)<sup>4)</sup>において、2003年に「synthetic lycopene」、2005年に「tomato lycopene extract 6 percent, tomato lycopene extract 1.5 percent, and crystallized tomato lycopene extract」及び「lycopene from *Blakeslea trispora*」、2006年に「concentrated tomato lycopene extract」について、当該品がGRAS物質であるという見解に疑問はない(no questions)というコメントを出している。すなわち、米国では、天然、合成に関わらず、リコペンは規定された条件下で食品加工及び食品用途にその使用が認められている。一方、EUでは、着色料E160d LYCOPENEとして(i) SYNTHETIC LYCOPENE, (ii) LYCOPENE FROM RED TOMATOES, (iii) LYCOPENE FROM *BLAKESLEA TRISPORA*, が登録されている<sup>5)</sup>。更に、JECFAには、LYCOPENE (SYNTHETIC)(用途：着色料・栄養補助食品), LYCOPENE EXTRACT FROM TOMATO (着色料), LYCOPENE FROM *BLAKESLEA TRISPORA*(着色料)があり<sup>6)</sup>、いずれもHPLCを用いた定量法を規定している。2009年にグループADIを特定しない(not specified)と定められている。

我が国では、前述したとおり、既存添加物「トマト色素」のみが使用できるとされており、海外で使用が許可されているトマト由来以外の合成および発酵法によって製造されるリコペンは現在わが国では食品添加物として使用できないが、輸入食品に入っている可能性は否定できない状況にある。

トマト色素の成分規格試験法を比較すると、海外ではリコペンの定量法としてHPLCを用いた方法を採用しているが、我が国(食品添加物公定書<sup>1)</sup>)では、定量法の代わりに色価測定法を採用している。色価は同一の着色料において、色素濃度を相対的に評価する値であり、すなわち、同じ色価であっても、副色素成分と主色素成分を合算して相対値として求められるため、主色素成分の濃度が求められるものではない。したがって、品質と安全性をより確保するためには、主色素成分を特異的に検出でき、その濃度を正確に求めることができる方法への改正が必要

と考えられる。しかし、一般的なHPLCを用いた定量法では、主色素成分の定量用標準品が必要であるが、リコペンは安定性が悪いため純度既知の定量用標準品が流通しておらず、正確な濃度の検量線を作ることが困難である。

このため、本研究では、相対モル感度係数(RMS: relative molar sensitivity), または重量ベースに換算した相対感度係数(RRF: relative response factor)を利用したリコペンの定量法を検討することとした。本法は、定量用標準品を用いて絶対検量線を作成せずに、測定対象物質とは別の安価な標準物質と測定対象物質のRMSまたはRRFを利用することによって、すなわち、測定対象物質と同一の定量用標準品を必要とせずに正確な定量値を簡便且つ迅速に求める方法である。トマト色素に本法が適用可能かどうか、また、その定量精度が吸光度法や絶対検量線法と比較して妥当かどうか検証したので報告する。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

リコペン、スダンI (Fig. 1)は、現時点では共に純度既知の標準品の流通が確認できなかったため、該当する試薬を<sup>1</sup>H qNMRで値付けして用いた。なお、試薬リコペンは分解しやすいため、吸光度測定やLC絶対検量線作成に必要な標準液を調製する際には、<sup>1</sup>H qNMRによりリコペンの絶対純度をその都度確認して用いた。本研究で使用した試薬を以下に示す。

・リコペン(lycopene): Wako, 生化学用, 125-04341, Lot.SAN4711 と LKP4227, -80°C保管。

なお、*trans/cis* の記載はないが、CAS No.が[502-65-8]と記載されていることから、*all-trans* 体と推定されるものを用いた。

・スダンI(sudan I, 1-Phenylazo-2-naphthol): TCI, P0585, Lot.GM01, 室温保管。LC定量用内標準物質として用いた。

・1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>(1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-*d*<sub>4</sub>): Wako, TraceSure(R), 024-17031, Lot.ECG4815, 99.9%。 <sup>1</sup>H qNMR用基準物質として用いた。

・4-ヒドロキシ-3-*tert*-ブチルアニソール(4-hydroxy-3-*tert*-butylanisole, BHA): TCI, EP,

B0723, Lot.7GRAI-GQ. リコペンの分解を抑えるために酸化防止剤として用いた.

・重ベンゼン(C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): ISOTEC, 151815, Lot.MKBF9301.

・アセトニトリル(CH<sub>3</sub>CN): Sigma-Aldrich, HPLC用, 34888.

・エタノール(99.5)(エタノール, EtOH): Wako, HPLC用, 056-03341.

・*n*-ヘキサン(ヘキサン): Wako, 特級, 085-00416. その他の試薬はすべて市販特級品を用いた.

国内流通の既存添加物トマト色素製品 6 試料を Table 1 に示す. 日本添加物協会を通じて入手し, 当部において試料保管しているものを用いた.

## B-2) 装置及び測定条件

吸光度, <sup>1</sup>H qNMR, LC 定量分析データの取得に用いた装置・条件を Table 2~4 に示す.

## B-3) トマト色素製品の色価測定とリコペンの吸光係数測定

第 8 版食品添加物公定書<sup>1)</sup>のトマト色素の色価測定法の記載「試料をアセトン/シクロヘキサン混液に溶解したのちヘキサンで 200 倍以上に希釈して吸光度(0.3~0.7 の範囲内)を測定する」に準じたが一部操作手順を変更した.

トマト色素製品試料 W mg を精密に量りとり, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)を加え, 超音波処理(2 分以内)を行い溶解させた後, 25 mL (V)に定容した. その 1.0 mL を量りとり, ヘキサンで 20 mL に定容した. さらにこの液 1.0 mL を分注し, ヘキサンで 10 mL に定容し(F = 20×10), 色価測定用検液とした(調製 n = 3). Table 2 の条件下, ヘキサンを対照液として波長 465 ~ 475 nm の極大吸収部(λ<sub>max</sub>)における吸光度(Abs)を測定し, 以下の式により, 色価(E<sup>10%</sup><sub>1cm</sub>)を求めた. ただし, トマト色素製品試料 A1207 のみ, アセトン/シクロヘキサン混液に液滴となってほとんど溶解しなかったため, 調製法を変更せずに, 元の公定書記載の通りにした. すなわち, 試料を 100 mL メスフラスコに量りとり, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)を 25 mL 加えたのち, ヘキサンで 100 mL (V)に定容

し, 更にヘキサンで 50 倍希釈(F = 50)したものを色価測定用検液とした.

$$\text{色価}(E_{1\text{cm}}^{10\%}) = \frac{\text{Abs} \times V \times F \times 100}{W}$$

Abs: 検液の吸光度, V: 定容量(mL), F: 希釈率, W: トマト色素採取量(mg)

リコペンの吸光係数(E<sup>1%</sup><sub>1cm,ヘキサン</sub>)測定も同様に, 第 8 版食品添加物公定書<sup>1)</sup>のトマト色素の色価測定法の記載に準じた. 200 mL メスフラスコに, 試薬リコペン 2 mg (W<sub>L</sub>)を精密に量りとり, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)10 mL に溶解したのち, ヘキサンで 200 mL (V)に定容した. この液 1.0 mL を分注し, ヘキサンで 10 mL に定容(F = 10)したものを吸光係数測定用検液とした(調製 n = 3). Table 2 の条件下, ヘキサンを対照液として波長 465 ~ 475 nm の極大吸収部(λ<sub>max</sub>)における吸光度(Abs)を測定し, 以下の式により, 吸光係数(E<sup>1%</sup><sub>1cm</sub>)を求めた. なお, 試薬リコペン採取量は, II. 5) の操作で求める調製時の試薬の絶対純度(P<sub>L</sub>)を用いて絶対量に換算し(リコペン以外の成分は λ<sub>max</sub> に吸収がないと仮定して), リコペンの吸光係数を計算した.

$$\text{吸光係数}(E_{1\text{cm}}^{1\%}) = \frac{\text{Abs} \times V \times F \times 10}{W_L \times \frac{P_L}{100}}$$

Abs, 検液の吸光度; V, 定容量(mL); F, 希釈率; W<sub>L</sub>, 試薬リコペン採取量(mg); P<sub>L</sub>, <sup>1</sup>H qNMR により求めた調製時のリコペン純度(%).

色価とリコペンの吸光係数から, 製品試料中のリコペン含有量を求めた.

リコペン含有量(%) =

$$\frac{\text{色価}(E^{10\%})}{10 \times \text{リコペンの吸光係数}(E^{1\%})} \times 100$$

## B-3) リコペン及びスダン I の純度算出

リコペン 2 mg, スダン I 4 mg, BHA 5 mg, 1,4-BTMSB-d<sub>4</sub> 1 mg を精密に量りとり, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> 2.0



mLに溶解したものをqNMR用試料液とした(調製 n=3). この溶液 0.6 mL を 5 mm φ NMR 試料管に移し, Table 3 の条件の  $^1\text{H}$  qNMR に付した. なお, 残りの qNMR 用試料液は, B-4) に示す操作で希釈し, LC 定量用標準液とした.

qNMR 用解析ソフト Alice を用い,  $^1\text{H}$  qNMR 用基準物質 1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナル(18H, 0 ppm)を基準とし, リコペンの 2 位(2H, 4.99 ppm), スダン I の 8 位(1H, 8.45 ppm)シグナルの積分比から純度を算出した.

#### B-4) リコペン及びスダン I の絶対検量線の作成, 並びに相対モル感度係数(RMS)の確認

B-3) で調製した qNMR 用試料液のうち,  $^1\text{H}$  qNMR 測定に用いなかった残液 0.5 mL を量りとり, 0.5w/v% BHA 含有  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{EtOH}$  (1:1) 溶液 (以下, BHA 含有希釈液と略す) で 50 mL に定容し, リコペン 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液とした. この液 2.5 mL をとり, BHA 含有希釈液で 10 mL に定容し, リコペン 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  標準液とした. この液 3.0 mL に BHA 含有希釈液 3.0 mL 加え, リコペン 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  標準液とした. 以下, 順次 2 倍希釈を行い, リコペン 0.625, 0.313, 0.156, 0.078  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の標準液を調製した. 0.078~2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 6 濃度の標準液を Table 4 の条件の HPLC に付し, 波長 475 nm ( $\pm 4$  nm), smoothing ( $\pm 3$  scans  $\times 2$  回) のクロマトグラムを積分し, リコペンとスダン I のピーク面積を求めた.  $^1\text{H}$  qNMR により得られた調製時の純度からリコペンとスダン I の正確なモル濃度を算出し, 原点を通る絶対検量線(x 軸=モル濃度, y 軸=ピーク面積)をそれぞれ作成した. なお, 絶対検量線の作成は, 異なる日に 3 回(各調製 n=3) 行い, 絶対検量線の(リコペンの傾き) $\div$ (スダン I の傾き)から相対モル感度係数(RMS)を求めた.

#### B-5) トマト色素製品中のリコペンの定量

スダン I 2 mg を精密に量り取り( $W_s$ ), BHA 含有希釈液を加え 50 mL に定容した. この液 4.33 mL を分注し, BHA 含有希釈液で 100 mL に定容し, 定量用内標準液とした. なお, 定量用内標準液中のスダン I の絶対濃度は,  $^1\text{H}$  qNMR により得られた絶対純度で調製濃度を補

正して求めた(スダン I 調製濃度 1.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 絶対濃度 1.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (純度補正後の値)).

トマト色素製品 W mg を精秤し, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)で 25 mL (V) に定容した(B-3) 色価測定用に調製したものを使用). この液 0.4 mL を正確に量り, BHA 含有希釈液で 20 mL に定容し, 試料液とした. 試料液 1.0 mL と, 定量用内標準液 4.0 mL を混合し( $F = 20/0.4 \times 5$ ), LC 定量用検液とした. Table 4 の条件下, LC 定量用検液を HPLC に付し, 波長 475 nm ( $\pm 4$  nm), smoothing ( $\pm 3$  scans  $\times 2$  回) のクロマトグラムを積分し, リコペンとスダン I のピーク面積を求めた. 以下の式により, 検液中のスダン I のモル濃度からリコペンのモル濃度を求め, さらに, 採取量・希釈率・分子量からトマト色素中のリコペン含有量(%)を計算した.

ただし, トマト色素製品試料 A1207 のみ, アセトン/シクロヘキサン混液に液滴となつてほとんど溶解しなかったため, 調製法を変更した. 試料を 100 mL メスフラスコに採取し, アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)を 25 mL 加えたのち, BHA 含有希釈液で 100 mL (V) に定容し, この液 1.6 mL をとり BHA 含有希釈液で 20 mL に定容したものを試料液とした. 試料液 1.0 mL と, 定量用内標準液 4.0 mL を混合し( $F = 20/1.6 \times 5$ ), LC 定量用検液とした.

検液中のスダン I ( $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ ) のモル濃度

$$C_s(\text{m\_mol}/\text{mL}) = \frac{W_s}{50} \times \frac{P_s}{100} \times \frac{1}{M_s} \times \frac{4.33}{100} \times \frac{4}{5}$$

$W_s$ , スダン I 採取量(mg);  $P_s$ ,  $^1\text{H}$  qNMR により求めたスダン I 純度(%);  $M_s$ , スダン I 分子量 (248.285).

検液中のリコペン ( $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ ) のモル濃度

$$C_L(\text{m\_mol}/\text{mL}) = \frac{\frac{A_L}{A_s} \times C_s}{\text{RMS}}$$

$A_L$ , リコペンのピーク面積;  $A_s$ , スダン I のピーク面積;  $C_s$ , 検液中のスダン I のモル濃度 ( $\text{m\_mol}/\text{mL}$ ); RMS, 相対モル感度係数.

試料中のリコペン(C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>)の含有量(%) =

$$\frac{C_L \times M_L \times V \times F \times 100}{W}$$

C<sub>L</sub>, 検液中のリコペンのモル濃度(m mol/mL);  
M<sub>L</sub>, リコペン分子量(536.888); V, 定容量(mL); F,  
希釈率; W, トマト色素採取量(mg).

## C. 結果及び考察

### C-1) トマト色素製品の色価測定とリコペンの吸光係数測定

第8版食品添加物公定書<sup>1)</sup>記載のトマト色素の色価測定法では、『本品を精密に量り、アセトン/シクロヘキサン混液(1:1) 25 mLを加えて溶かし、ヘキサンを加えて正確に100 mLとする。その2 mLを正確に量り、ヘキサンを加えて正確に100 mLとし、必要があれば遠心分離し、その上澄液を検液とする。色価測定法により次の操作条件で試験を行う。操作条件: 測定溶媒 ヘキサン, 測定波長 波長 465~475 nmの極大吸収部』と規定されており、また、その吸光度が0.3~0.7の範囲になるよう調製する必要がある。すなわち、色価30000の試料の場合、5 mg採取して調製するとその吸光度が0.3、11.7mg採取で吸光度が0.7ということになる。さらに、記載の通りの溶媒組成で測定するためには(検液中のアセトン/シクロヘキサン混液の割合を測定溶媒であるヘキサンの1/200以下)、試料を5~11.7 mg採取して、アセトン/シクロヘキサン混液25 mLに完全に溶解させなくてはならない。しかしながら、トマト色素はアセトン/シクロヘキサン混液にはあまり溶解性が高くないという問題がある。

このことから、予試験として吸光度測定用の検液の調製を記載に従って行った。その結果、アセトン/シクロヘキサン混液25 mLで溶解したように見え、ヘキサンで100 mLに定容した液も透明で均一に溶けているように見えたが、一晚放置すると赤褐色の細かい沈殿が生じることが確認された。したがって、試料が完全に溶けているわけではなく、測定溶媒中で細かい粒子となって分散しているだけと考えられた。実際に、この液を50倍希釈して吸光度を測定したとき、想定される吸光度よりも低い値を示し、

そのばらつきも大きく生じたことから、均一に溶解しておらず、分散した液であることが示唆された。すなわち、記載の操作通りに、アセトン/シクロヘキサン混液で溶解した後、ヘキサンで4倍希釈した場合、試料が析出するかしないかの上限の濃度になっている可能性が高いと考えられた。この予試験の結果より、本試験では25 mLのアセトン/シクロヘキサン混液で定容した後、ヘキサンで20倍に希釈することとした。この調製法では、一日放置後でも沈殿は生じないが、多めの採取量の場合(吸光度が0.4くらい)、色価が想定よりやや低下する傾向にあった。吸光度測定用の検液の調製において、試料を最初に溶解させるアセトン/シクロヘキサン混液は溶解力が弱く、クロロホルム、ベンゼン、ジクロロメタン等の溶解力が強いものが望ましいが、これらは有害溶媒であることから、公定法に採用するには抵抗があると考えられた。

そこで、今回は、吸光度の下限0.3付近になるように検液を調製することにした(リコペン含量として1 µg/mL程度)。但し、実験の項で示したとおり、今回試料として用いた製品の内、A1207は揮発性が高く、ひょう量が困難であったため、他の試料とは異なりバイアル瓶に密封してセミマイクロ天秤でその重量を測定した。さらに、A1207は、アセトン/シクロヘキサン混液、クロロホルムにも溶けず、水に分散する水分散型リコペンと考えられる製品であり、ヘキサンで100 mLに定容すると、分離は解消されて懸濁したため、公定書の通りに検液を調製した。

トマト色素製品のUV/VisスペクトルをFig. 2に、λ<sub>max</sub>と吸光度、求められた色価をTable 5-1に示す。260 nm付近のブロードな吸収は、アセトン/シクロヘキサン由来であり、製品の極大吸収部(λ<sub>max</sub>)は470.6~470.9 nmであった。トマト色素の成分規格に記載の色価測定条件「測定溶媒 ヘキサン, 測定波長 波長 465~475 nmの極大吸収部(λ<sub>max</sub>)」に従い、それぞれのλ<sub>max</sub>において色価を求めたところ、粉末製品試料(A1201, A1205, A1208)の色価は22000~27000、液状製品試料(A1155, A1206, A1207)の色価は

700~2400 であった。食品添加物公定書<sup>1)</sup>のトマト色素の成分規格には、「本品の色価( $E^{10\%}_{1cm}$ )は300以上で、その表示量の95~115%を含む。」と記載されている。今回使用した6製品試料は、色価300以上であり、色価表示された製品はA1205とA1206の2製品だけであったが、いずれも95~115%を満たしていた。

次に、Table 5-2 に色価の測定波長を470 nmに固定し、色価を求めた結果を示したが、 $\lambda_{max}$ で求めた色価と殆ど同じ結果となったことから、465~475nmの極大吸収部( $\lambda_{max}$ )を指定しなくても、470 nm固定で再現良く色価が求められると考えられた。

Table 6 に報告されているリコペンの $\lambda_{max}$ 、吸光係数、測定溶媒を示したが、リコペンは測定溶媒が異なると吸光係数が若干異なり、さらに *cis* 体の $\lambda_{max}$ は *all-trans* 体に比べ短波長へシフトし、吸光係数も小さくなる傾向がみられる。また、リコペンの吸光係数( $E^{1\%}$ )は、測定溶媒及び報告によって異なるが *all-trans* 体で3000~3500と推定される。そこで、リコペンの吸光係数( $E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}$ )測定は、8版公定書<sup>1)</sup>のトマト色素の色価測定法に準じるとし、リコペンの吸光係数が3000、採取量が2 mgと仮定すると、検液中のアセトン/シクロヘキサン混液(1:1)の割合を1/200以下にするためには、アセトン/シクロヘキサン混液(1:1) 10 mLに溶かし、その後ヘキサンで200倍希釈しないと吸光度が0.3を越えない計算となる。アセトン/シクロヘキサン混液10 mLで洗い込んでの定容は少量のため困難であること、ヘキサンでの低倍率の希釈の際に不溶化する可能性もあることから、B-3)に示したように、200 mLメスフラスコに精秤した試薬リコペン(2 mg)を、アセトン/シクロヘキサン混液(1:1) 10 mLで洗い込んで溶解した後、さらにヘキサンで洗い込んで200 mLに定容し、この液を10倍希釈して検液とすることにした。

試薬リコペン採取量を調製時のqNMR純度90.60%で補正した後にリコペンの吸光係数( $E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}$ )を求めたところ、 $\lambda_{max}$ は471 nm、吸光係数は $3369 \pm 31$ (調製  $n=3$ , 各2回測定, AV  $\pm$ SD)となった(Table 7-1)。また、測定波長470

nmで求めた吸光係数は、 $3359 \pm 31$ (調製  $n=3$ , 各2回測定, AV  $\pm$ SD)となった(Table 7-2)。今回実測した吸光係数 $E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}=3369$ と、JECFAで採用されている3450の値から、製品中のリコペン含有量(%)を求めた結果をTable 5-1に示したが、製品によってその含量は異なり2~80%であった。なお、Table 5-2には測定波長470 nmで求めた吸光係数の実測値 $E^{1\%}_{1cm,ヘキサン}=3359$ から求めた製品中のリコペン含有量(%)の結果も示したが、 $\lambda_{max}$ における計算結果とほとんど変わらず、2~80%であった。

JECFAにおいてリコペンのChemical namesには、*all-trans*-lycopeneと書かれており、*all-trans*とtotal lycopeneの含量を規定している<sup>6)</sup>。一方、米国21 CFR 73.585の定量法には、「Qualitative Analysis of Lycopene, Its Isomers・・・」と記載があり<sup>3)</sup>、異性体を区別して定量すると思われる。化学合成由来のリコペンは*all-trans*体>70%、5-*cis*体(20%以内)の組成であるためであると考えられるが、我が国で使用が認められているものは天然のトマト由来のトマト色素のみであることから、現在の色価による含量規定で概ね問題ないと考えられた。

## C-2) リコペン及びスダン I の純度算出

相対モル感度係数(RMS)または相対感度係数(RRF)に利用する定量用内標準物質の条件として、安価、高純度、純度既知、安定、入手しやすい、測定対象と物理的特性、極性、極大吸収波長が近く、また、試料そのものに含まれず、LCで夾雑物及び測定対象と分離する、などが挙げられる。スダン I~IVは親油性アゾ化合物であり、発がん性が疑われるため、ほとんどの国で食品への使用は認められていないが、プラスチックや合成材料の着色に使用する工業用染料として広く使用されている。このうち、スダン Iは測定対象であるリコペンの物理的特性に類似しており、前述の条件にほぼ合致する化合物であったため、これをRMSによる定量用内標準物質として用いることとした。

RMSまたはRRFを決定するためには、両物質の精確な濃度が既知である必要がある。安定で純度既知の標準品が存在するなら、両物質の

調製時の濃度で LC 絶対検量線を作成し、その傾きから RMS または RRF を求めることが可能であるが、現段階ではスタン I、リコペンともに純度既知の標準品は販売されていない。さらにリコペンは非常に不安定であるため、調製中の分解や保存中の濃度低下が懸念される。このため、両物質を混合した液を調製し、<sup>1</sup>H qNMR により混合液中の精確なモル濃度を直ちに求め、その後混合液を希釈して LC に付し、両物質の絶対検量線を作成して RMS を決定する手順をとった。なお、混合液に BHA(酸化防止剤)を添加することで、qNMR 試料液及び LC 定量用標準液中のリコペンの濃度は約 24 h 安定であった。

試薬リコペン、スタン I、BHA、1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> (<sup>1</sup>H qNMR 用基準物質)を C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>に溶解し、Table 3 の条件で qNMR を測定した。リコペンの 2 位 (4.99 ppm, 2H, t, *J* = 6.9 Hz)、スタン I の 8 位 (8.45 ppm, 1H, d, *J* = 8.1 Hz)が他シグナルとの分離が良好なため定量シグナルとした(Fig. 3)。また、予実験において、<sup>1</sup>H qNMR 測定に 600 MHz NMR (UltraCOOL probe)を用いていたが、シグナルを比較すると Fig. 4 に示す通り、1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>、リコペン 2 位シグナルは問題ないが、800 MHz NMR では、スタン I の 8 位シグナルの左裾に不純物が観察された。計 5 回の調製日(各調製 *n* = 3)で、スタン I の純度はほとんど変化しなかったが、リコペンの純度は試薬のロット、開封/未開封により異なった(90~94%)(Table 8)。スタン I は室温保管においても安定であるため、平均値を純度として用いても問題ないと判断され、不純物を差し引いてスタン I の純度を求めた場合は、93.17 ± 0.31%、不純物込みの場合は 94.39 ± 0.63%となり、本実験における試薬スタン I の純度には平均値の 93.17%を用いた。一方、リコペンは -80°C で保管しているが、室温にして開封する度に異性化や酸化が起こり、純度が低下すると考えられ、リコペン濃度は、用事測定した(*n* = 3 平均)値を絶対純度とすることにした。

### C-3) 相対モル感度係数(RMS)の算出

Response factor (RF, 感度係数, 応答係数)と

は、分析物の濃度とその物質に対する検出器の応答との間の比として定義される。クロマトグラム上には検出器からの応答がピークとして表示されるので、そのピークを定量化する方法のひとつが積分(面積)であり、

$$RF = \text{ピーク面積} / \text{濃度}$$

で表される。次に、それぞれの物質について計算された RF を使用して、2 つの物質(A と B)間の relative response factor (RRF, 相対感度係数)を求める。

$$RRF = RF(A) / RF(B)$$

ここで、濃度を mol の単位で表示したものが relative molar sensitivity (RMS, 相対モル感度係数)であり、 $RMS = RRF \times \text{分子量}(A) / \text{分子量}(B)$ と換算される。RMS は、以下の式を使用して既知濃度(mol)の分析物 B の存在下で、分析物 A の未知の濃度(mol)を計算するために使用することができる。

$$\text{濃度 A (mol)} = \text{ピーク面積 A} / \text{ピーク面積 B} / RMS \times \text{濃度 B (mol)}$$

分析物の標準品が入手困難、高価、分解しやすいなどの場合は、RMS を用いた定量が有効である。

qNMR 用に調製した試料液を希釈して作成したリコペン 0.078~2.5 µg/mL の 6 濃度(薄い濃度から LV1~LV6)の標準液を、Table 4 の条件で HPLC 測定を行った。スタン I は保持時間 4.7 分、リコペンは 13.2 分に観察され、LC クロマトグラム上での 2 成分の分離は良好であった(Fig. 5)。極大吸収波長は、リコペンが 473 nm、スタン I が 476 nm 付近にブロードな吸収を示したため、本測定における検出波長を 475 nm とした。

それぞれのピークを積分するにあたり、クロマトグラムの抽出幅(475 ± 〇 nm)、スムージングあり/なしの影響を確認した。LC の測定条件は Table 4 と同じ条件を用い、標準液(調製 No :

std4, Table 8 参照)のデータについて、抽出幅とスムージングを変えて、リコペン/スダン I の面積比を計算した(Fig. 6). 散布図は、調製 n=3 回分のそれぞれの面積比をプロットしたものである(ただし、調製時のリコペンとスダン I の秤量値が異なるので、面積比は変わる). この結果、高濃度標準液(LV3~6)では波長抽出幅やスムージングによる影響は小さく、一方、低濃度標準液(LV1~2)では、波長抽出幅やスムージングによる面積比のばらつきが大きくなることが確認された.

次に、クロマトグラムの描画を波長 475 nm ( $\pm 4$  nm), smoothing ( $\pm 3$  scans  $\times 2$  回)とし、リコペンとスダン I のピーク面積を求め、それぞれ絶対検量線(x 軸=モル濃度, y 軸=ピーク面積)を作成した. 検量線の作成は日を変えて計 3 回(調製 No: std3~std5, 各調製 n=3)行った. 絶対検量線の作成に用いた標準液中の濃度は、別に  $^1\text{H}$  qNMR により求めた調製時の化合物の純度により補正し、リコペンとスダン I の正確なモル濃度( $m_{\text{mol/mL}}$ )を用いた. 検量線は、原点を通す/通さない、計算に使用する濃度範囲を LV0~LV6/LV0~LV5 (blank =LV0)の 4 パターンで作成し(Fig. 7), RMS を求めた(Table 9). 参考として波長 475 nm ( $\pm 0.6$  nm)スムージングなしのクロマトグラムから同様に計算した値を示した.

得られた RMS 及びリコペンの絶対検量線から、それぞれ残差%=(定量値-調製値)/調製値 $\times 100$ )を求め、横軸にリコペン絶対濃度、縦軸に残差%をプロットした(Fig. 8). その結果、RMS の計算に用いたデータがばらついているためか、RMS 及び絶対検量線から算出された残差%に大きな差はなく、また、濃度 LV6 でも LV5 までの絶対検量線でもほとんど同じであった. 残差が 10%以内の濃度を範囲を直線性があるのみなし、RMS 及び検量線の適用範囲としたとき、その適用濃度範囲は LV3~LV5 または LV4~LV6 が適当と考えられた.

最終的に、波長 475 nm( $\pm 4$  nm), smoothing ( $\pm 3$  scans $\times 2$  回)のクロマトグラムを積分し、LV0~LV5 までの原点を通る直線の傾きから、相対モル感度係数  $\text{RMS} = 9.857$  [mol/mol] と決定し、

その適用範囲は LV3~LV5, すなわちリコペンの絶対濃度  $0.31 \sim 1.2 \mu\text{g/mL}$ ( $0.57 \times 10^{-6} \sim 2.3 \times 10^{-6}$  mmol/mL), スダン I 絶対濃度  $0.57 \sim 2.3 \mu\text{g/mL}$ ( $2.3 \times 10^{-6} \sim 9.3 \times 10^{-6}$  mmol/mL)とした.

なお、参考 4 に波長 475 nm( $\pm 4$  nm), smoothing ( $\pm 3$  scans $\times 2$  回)のクロマトグラムを積分して求めた  $\text{RMS} = 9.857$  に、475 nm( $\pm 0.6$  nm), スムージングなしで処理した面積を使って定量した場合の残差%のグラフを示したが、低濃度ではばらつきが大きいものの、適用濃度範囲 (LV3~LV5) ではほとんど影響ないことが確認され、仮に解析ソフトによるクロマトグラム処理に違いがあったとしても大きな影響はでないと考えられる.

#### C-4) トマト色素製品中のリコペンの定量

試料からのリコペンの抽出、溶解にはクロロホルムが適しているが、公的な試験法として今後採用することを考えたとき、有害溶媒であるクロロホルムの使用は極力避けたい. そこで、トマト色素の色価測定法にならいうアセトン/シクロヘキサン混液(1:1)で溶解することとした. すなわち、II. 7) の調製法に記した通り、トマト色素製品をアセトン/シクロヘキサン混液(1:1)で 25 mL (V)に定容し(色価測定用に調製したものを使用)、この液 0.4 mL を正確に量り、BHA 含有希釈液で 20 mL に定容し、試料液とした. この試料液 1.0 mL とスダン I の定量用内標準液 4.0 mL を混合し LC 定量用検液とし、LC 測定した(Fig. 9, Fig. 10). Table 4 の条件下、LC 定量用検液を HPLC に付したところ、試薬リコペンと同一の保持時間及び UV/Vis スペクトルをもつピークが観察され、また、測定時間の範囲内にはリコペン以外の目立ったピークはないことが確認された.

リコペンとスダン I のピーク面積を求め、C-3) で得た相対モル感度係数( $\text{RMS} = 9.857$ ), 及び添加したスダン I の絶対濃度を用いて、製品中のリコペン含有量を計算した(Table 10). 粉末試料では 69~81%, 液状試料で 2~7%だった. リコペンの絶対検量線( $Y = 2.1190\text{E}+10 * X$ , LV0~LV5, 原点通す)から求めた含有量と比較したところ、ほぼ同等の値が得られ、RMS と絶対検量

線の定量値の残差% $(= (\text{RMS 定量値} - \text{検量線定量値}) / \text{検量線定量値} \times 100)$ は 4%以内であることが確認された。

以上のことから、RMS を利用した HPLC によるリコペンの定量法が色価測定法に代わる分析法として機能すると判断できる結果となった。

#### D. 結論

現在、食品添加物公定書には、既存添加物「トマト色素」の定量法として色価測定法が適用されているが、HPLC を今後導入していくにあたり、主色素成分であるリコペンの定量用標準品を必要としない方法を検討した。比較のためトマト色素製品の色価とリコペンの吸光係数を測定し、製品中のリコペン含有量を求めた。

色価測定法では、副色素成分及び不純物を分離せずに測定するため、後述する HPLC による主色素成分の定量値より大きくなるはずであるが、今回検体として使用したトマト色素製品では、含有量の小さい液体製品でのみ、若干高めの定量値が算出されただけで、高含有量の粉末製品では、ほとんど同じ値を示した。

次に、スタンI に対するリコペンの RMS を検証し、RMS による方法と絶対検量線法でリコペンを定量し、得られた値を比較した。その結果、RMS 法による定量値と絶対検量線法による定量値はほぼ等しい値が得られたことから、色価測定法に代わる定量法として RMS による方法は有効であると考えられた。

現在、リコペンとスタンI の SI トレサブルな標準品は市販されていない。スタンI は安価で安定な物質であるため、 $^1\text{H}$  qNMR を応用することによって、定量用標準品として供給可能であると考えられる。一方、リコペンは市販試薬として入手可能であるが、安定性が低く非常に高価であり、酸化・光分解により純度が低下するため、純度既知の定量用標準品を供給することは今後も不可能であると考えられる。したがって、今後、安価なスタンI の定量用標準品が供給されれば、RMS による方法がトマト色素の定量法に適用でき、高価で不安定なリコペンについては定性用標準品の供給のみで純度既知の定量用

標準品の供給は必要ないこととなる。

ただし、今後、海外からの輸入品との成分規格の整合性を視野に入れると、トマト色素の色素成分として *all-trans*-リコペンのみを測定対象とするのか、*cis*-リコペンも合算して測定対象として成分規格を設定するのか、実態調査を行い継続して検討する必要がある。

#### E. 参考文献

- 1) 第 8 版食品添加物公定書，厚生労働省 (2007).
- 2) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書，日本添加物協会 (1999).
- 3) [http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=873a0cbdfb349e30b8bfc587638219af&mc=true&node=se21.1.73\\_1585&rgn=div8](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=873a0cbdfb349e30b8bfc587638219af&mc=true&node=se21.1.73_1585&rgn=div8)
- 4) [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=lycopene](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=lycopene)
- 5) <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2012:083:FULL&from=EN>
- 6) [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/jecfa\\_additives/docs/monograph7/additive-496-m7.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph7/additive-496-m7.pdf)
- 7) [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/jecfa\\_additives/docs/monograph7/additive-517-m7.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph7/additive-517-m7.pdf)
- 8) [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/jecfa\\_additives/docs/monograph7/additive-497-m7.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph7/additive-497-m7.pdf)

#### F. 研究業績

##### 1. 学会発表

- 1) 石附京子，西崎雄三，多田敦子，箕川剛，中島光一，大槻崇，穂山浩，杉本直樹，佐藤恭子：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：青色素の推定構造。食品化学学会 (2017.6).
- 2) 杉本直樹，西崎雄三，佐藤(増本)直子，村島健司，北牧祐子，沼田雅彦，井原俊英，佐藤恭子：カワラヨモギ抽出物の成分規格試験法の検討：抗菌成分カピリンの定量法。食品化学学会 (2017.6).

- 3) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMRおよびHPLCによる機能性関与成分ルテインの定量. 食品化学学会(2017.6).
- 4) 箕川剛, 中島光一, 武川泰哲, 西崎雄三, 杉本直樹: オービトラップLC/MSのAIF測定による既存添加物スピルリナ青色素中の総ミクロシスチン定量法の検討. 食品化学学会(2017.6).
- 5) 北牧祐子, 斎藤直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英: ガスクロマトグラフィーの新たな展開 -定量NMRから求めたモル比を用いる一対多型の定量法の紹介-. 日本分析化学会シンポジウム(2017.9).
- 6) 杉本直樹: 定量NMRの公的な分析法への適用とその応用, NMRによる新しい定量技術~その基礎と食品, 化学品分析への応用, 第64回日本食品科学工学会シンポジウムB3 (2017.8).
- 7) 杉本直樹: qNMR/Chromatographyの開発と規格試験への応用. 日本分析化学会第66年会シンポジウム2 (2017.9).
- 8) Kuroe M, Yamazaki T, Saito N, Numata M, Ihara T, Nishizaki Y, Sugimoto N: Determination of a non-ionic surfactant without its own calibration standard by qNMR/chromatography. Asian Conference on Oleo Science 2017 (ACOS2017) (2017.9).
- 9) Sugimoto N, Nishizaki Y, Ishizuki K, Suematsu T, Miura T, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sato K: Determination of relative molar sensitivity (RMS) by combination of qNMR and chromatography: Application of RMS for quantification of lycopene in tomato colorant. 131st AOAC Annual Meeting (2017.9).
- 10) Sugimoto, N: qNMR in Japan's Specification and standards for food additives. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
- 11) Sugimoto, N: Overview of the Introductory Meeting on qNMR. International qNMR forum in qNMR summit 2018 (2018.1).
- 12) 森美保菜, 寺倉理央奈, 間瀬貴巳, 藤原裕未, 永津 明人, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量NMR(<sup>1</sup>H-qNMR)を応用した生薬コウカ中のcarthaminの定量. 日本薬学会第138回年会(2018.3).
- 13) 合田幸広, 小出達夫, 細江潤子, 内山奈穂子, 杉本直樹, 近藤加奈子, 村林美香, 藤谷敏彦, 小野誠, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 岡本寿美子, 大藤克也, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 小幡泰子, 山田裕子, 鈴木裕樹, 三浦亨, 水井浩司, 末松孝子, 朝倉克夫: 日本薬局方化学薬品を対象としたqNMRとマスバランス法の比較とqNMRの経済的利点. 日本薬学会第138回年会(2018.3).
- 14) 杉本直樹: 天然由来の食品添加物の利用と規制. 一般シンポジウムS26 食品にかかわる天然成分の安全性とその活用. 日本薬学会第138回年会(2018.3).

## 2. 論文発表

- 1) Zaima K, Fukamachi A, Yagi R, Ito Y, Sugimoto N, Akiyama H, Shinomiya K, Harikai N: Kinetic Study of the Equilibration between Carminic Acid and Its Two Isomers Isolated from Cochineal Dye. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*, 306-310.
- 2) 島村智子, 伊藤裕才, 久保勇人, 柏木丈弘, 石川洋哉, 松井利郎, 山崎壮, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山浩, 受田浩之: 既存添加物チャ抽出物中のカテキン類含量と抗酸化力価の関係. *日食化誌*, **2017**; *24*, 10-15.
- 3) Yoshimura M, Ochi K, Sekiya H, Tamai E, Maki J, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Amakura Y: Identification of Characteristic Phenolic Constituents in Mousouchiku Extract Used as Food Additives. *Chem Pharm Bull.*, **2017**; *65*, 878-882 (2017).
- 4) Ito Y, Harikai N, Ishizuki K, Shinomiya K, Sugimoto N, Akiyama H: Spiroketalcarminic Acid, a Novel Minor Anthraquinone Pigment in Cochineal Extract Used in Food Additives. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**; *65*, 883-887.
- 5) Kitamaki Y, Saito N, Yamazaki T, Otsuka S, Nakamura S, Nishizaki Y, Sugimoto N, Numata M, Ihara T. Determination of PAHs in

Solution with a Single Reference Standard by a Combination of  $^1\text{H}$  Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography. *Anal. Chem.*, **2017**; *89* (13), 6963–6968

- 6) 佐藤(増本)直子, 西崎雄三, 斎藤直樹, 山崎太一, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: qNMR および HPLC による機能性表示食品中の機能性関与成分ルテインの定量. *日食化誌*, **2017**; *24*(2), 75-81.
- 7) 西崎雄三, 佐藤(増本)直子, 中西章仁, 橋爪雄志, タンジャマハマドゥ, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子: 定量 NMR に基づく相対モル感度を利用した加工食品中のヘスペリジンおよびモノグルコシルヘスペリジンの定量. *食衛誌*, **2018**; *59*(1), 1-10 (2018).
- 8) Akiyama H, Nose M, Ohtsuki N, Hisaka S, Takiguchi H, Tada A, Sugimoto N, Fuchino H,

Inui T, Kawano N, Hayashi S, Hishida A, Kudo T, Sugiyama K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshimatsu K: Evaluation of the safety and efficacy of Glycyrrhiza uralensis root extracts produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems. *J. Nat. Med.*, **2017**; *71*, 265-271.

- 9) Tatebe C, Ohtsuki T, Fujita T, Nishiyama K, Itoh S, Sugimoto N, Kubota H, Tada A, Sato K, Akiyama, H: Determination of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in the Color Additive Food Red No. 106 (Sulforhodamine B) using High-Performance Liquid Chromatography. *Food Chem.* **2017**; *237*: 733-742.

**G. 知的財産権の出願. 登録状況**  
なし



Table 1 トマト色素製品試料

試料番号	外観	色価表示値
A1155	溶けたチョコレート状の粘性のある流体	記載なし
A1201	褐色粉末	記載なし
A1205	湿り気のある褐色粉末	20.125
A1206	溶けたチョコレート状の粘性のある流体	2.466
A1207	赤色液体	記載なし
A1208	湿り気のある褐色粉末	記載なし

\* なお、試料番号は当部における管理番号と共通である。

Table 2 吸光度測定条件

spectrophotometer	V-650 (JASCO)
wavelength range	200 ~ 700 nm, 1 nm interval
wavelength	maximum absorption wavelength of 465-475 nm
data scan	0.1 nm
cell	1-cm quartz cell
reference solvent	<i>n</i> -hexane

Table 3 <sup>1</sup>H qNMR 測定条件

NMR	ECA800 (JEOL), (H : 800 MHz)
probe	HCN
spectral width	-5 ~ 15 ppm
data points	80,000 (resolution 0.25 Hz)
digital filter	on (×13)
flip angle	90 deg
repetition time	64 s (▷ T <sub>1</sub> × 5)
sample spin	off
probe temp	room temp.
scan times	64

Table 4 LC 測定条件

HPLC	Waters LC : Alliance 2695, PDA : 2996 photodiode array detector
column	SunFire C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm, Waters)
column temp.	40°C
solvent	isocratic CH <sub>3</sub> CN/EtOH (7:3), 30 min
flow rate	0.5 mL/min
PDA scan	200-700 nm (resolution 1.2 nm), detect 475 nm
sample temp.	4°C
injection volume	10 μL

Table 5-1 トマト色素製品の465~475nmの極大吸収波長( $\lambda_{max}$ )における色価( $E^{10\%}_{1cm}$ , ヘキサン)とリコペン含有量(%)

☆☆☆ 色価@ $\lambda_{max}$												リコペンの吸光係数から計算した含有量(%)	
	$\lambda_{max}$ [nm]	Abs	採取量 W(mg)	定容 V(mL)	希釈率 F	単位換算 mg→g	色価 $E^{10\%}$	AVR	STDEV	CV%	JECFA $E^{1\%}=3450$	実測@ $\lambda_{max}$ $E^{1\%}=3369$	
A1155-n1	470.6	0.330690	78.5650	25	200	1000	2105	2087	25	1.19	6.10	6.25	
A1155-n2	470.7	0.342348	83.1612	25	200	1000	2058				5.97	6.11	
A1155-n3	470.7	0.328226	78.2514	25	200	1000	2097				6.08	6.23	
A1201-n1	470.9	0.341956	6.3519	25	200	1000	26918	27026	128	0.47	78.02	79.90	
A1201-n2	470.9	0.301897	5.5922	25	200	1000	26993				78.24	80.12	
A1201-n3	470.9	0.348213	6.4088	25	200	1000	27167				78.74	80.64	
A1205-n1	470.9	0.493012	10.8550	25	200	1000	22709	22930	253	1.10	65.82	67.41	
A1205-n2	470.9	0.404907	8.7242	25	200	1000	23206				67.26	68.88	
A1205-n3	470.9	0.431267	9.4262	25	200	1000	22876				66.31	67.90	
A1206-n1	470.6	0.363574	76.0766	25	200	1000	2390	2380	9	0.36	6.93	7.09	
A1206-n2	470.6	0.347376	73.1241	25	200	1000	2375				6.88	7.05	
A1206-n3	470.6	0.358286	75.4481	25	200	1000	2374				6.88	7.05	
A1207-n2	470.9	0.430973	342.62	100	50	1000	629	699	61	8.69	1.82	1.87	
A1207-n3	470.9	0.344117	234.16	100	50	1000	735				2.13	2.18	
A1207-n4	470.9	0.350232	238.70	100	50	1000	734				2.13	2.18	
A1207-n5	470.8	0.298468	198.37	100	50	1000	752				2.18	2.23	
A1208-n1	470.9	0.382174	6.9338	25	200	1000	27559	27117	626	2.31	79.88	81.80	
A1208-n2	470.9	0.373756	7.0516	25	200	1000	26502				76.82	78.66	
A1208-n3	470.9	0.441900	8.4429	25	200	1000	26170				75.85	77.68	
A1208-n4	470.9	0.337592	6.1065	25	200	1000	27642				80.12	82.05	
A1208-n5	470.9	0.348742	6.3314	25	200	1000	27541				79.83	81.75	
A1208-n6	470.9	0.333958	6.1185	25	200	1000	27291				79.10	81.01	

Table 5-2 トマト色素製品の 470nm における色価( $E^{10\%}_{1\text{cm,ヘキサ}}$ )とリコペン含有量(%)

☆☆☆ 色価@470nm											リコペンの吸光係数から計算した含有量(%)	
	$\lambda$ [nm]	Abs	採取量 W(mg)	定容 V(mL)	希釈率 F	単位換算 mg→g	色価 $E^{10\%}$	AVR	STDEV	CV%	JECFA $E^{1\%}_{1\text{cm}}=3450$	実測@ $\lambda_{\text{max}}$ $E^{1\%}_{1\text{cm}}=3359$
A1155-n1	470.0	0.330204	78.5650	25	200	1000	2101	2084	25	1.19	6.09	6.26
A1155-n2	470.0	0.341851	83.1612	25	200	1000	2055				5.96	6.12
A1155-n3	470.0	0.327693	78.2514	25	200	1000	2094				6.07	6.23
A1201-n1	470.0	0.341033	6.3519	25	200	1000	26845	26956	128	0.47	77.81	79.92
A1201-n2	470.0	0.301158	5.5922	25	200	1000	26927				78.05	80.16
A1201-n3	470.0	0.347303	6.4088	25	200	1000	27096				78.54	80.67
A1205-n1	470.0	0.491724	10.8550	25	200	1000	22650	22870	253	1.11	65.65	67.43
A1205-n2	470.0	0.403875	8.7242	25	200	1000	23147				67.09	68.91
A1205-n3	470.0	0.430094	9.4262	25	200	1000	22814				66.13	67.92
A1206-n1	470.0	0.363178	76.0766	25	200	1000	2387	2377	9	0.37	6.92	7.11
A1206-n2	470.0	0.346966	73.1241	25	200	1000	2372				6.88	7.06
A1206-n3	470.0	0.357832	75.4481	25	200	1000	2371				6.87	7.06
A1207-n2	470.0	0.429888	342.62	100	50	1000	627	697	61	8.70	1.82	1.87
A1207-n3	470.0	0.343246	234.16	100	50	1000	733				2.12	2.18
A1207-n4	470.0	0.349445	238.70	100	50	1000	732				2.12	2.18
A1207-n5	470.0	0.297807	198.37	100	50	1000	751				2.18	2.23
A1208-n1	470.0	0.381051	6.9338	25	200	1000	27478	27040	630	2.33	79.65	81.80
A1208-n2	470.0	0.372570	7.0516	25	200	1000	26417				76.57	78.65
A1208-n3	470.0	0.440462	8.4429	25	200	1000	26085				75.61	77.66
A1208-n4	470.0	0.336694	6.1065	25	200	1000	27568				79.91	82.07
A1208-n5	470.0	0.347823	6.3314	25	200	1000	27468				79.62	81.77
A1208-n6	470.0	0.333111	6.1185	25	200	1000	27222				78.90	81.04

Table 6 リコペンの極大吸収波長と吸光係数( $E^{1\%}$ )の報告例

lycopene isomer	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	solvent	$\epsilon$	$E^{1\%}$	reference
all- <i>trans</i>	470	hexane/ $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2$ (98:2)	1.87E+05	3483	
5- <i>cis</i>	470	hexane/ $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2$ (98:2)	1.84E+05	3427	Helvetica Chimica Acta,
7- <i>cis</i>	469	hexane/ $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2$ (98:2)	1.54E+05	2868	75 (6), 1848-1865 (1992)
15- <i>cis</i>	468	hexane/ $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2$ (98:2)	1.10E+05	2049	
all- <i>trans</i>	471	hexane	1.82E+05	3390	J. Agric. Food Chem.,
all- <i>trans</i>	470	hexane/ $\text{CHCl}_3$ (98:2)	1.87E+05	3483	62 (1), 264-269 (2014)
all- <i>trans</i>	471	hexane	1.82E+05	3390	
9- <i>cis</i>	465	hexane	1.64E+05	3055	Food Chem., 171, 323-329
13- <i>cis</i>	464	hexane	1.37E+05	2552	(2015)
all- <i>trans</i>	471	hexane		3450	J. AOAC International,
					93 (2), 499-509 (2010)
all- <i>trans</i>	472	petroleum ether		3450	The Merck index, 13th ed.
15,15'- <i>cis</i>	470	petroleum ether		1660	(2001)

Table 7-1 465～475 nm の極大吸収波長( $\lambda_{\max}$ )におけるリコペンの吸光係数( $E^{1\%}_{1\text{cm,ヘキサン}}$ )実測値

☆☆☆ リコペン吸光係数 $E^{1\%}$ ,ヘキサン@ $\lambda_{\max}$												
	$\lambda_{\max}$ [nm]	Abs	採取量 $W_L$ (mg)	試薬純度 $P_L$ (%)	定容 V(mL)	希釈率 F	単位換算 mg→g	吸光係数 $E^{1\%}$	AVR	STDEV	CV%	
lycopene-n1	470.9	0.284164	1.8688	90.60	200	10	1000	3357	3369	31	0.93	
lycopene-n1	471.0	0.427926	1.8688	90.60	200	6.67	1000	3370				
lycopene-n2	470.9	0.312187	2.0169	90.60	200	10	1000	3417				
lycopene-n2	470.9	0.465071	2.0169	90.60	200	6.67	1000	3393				
lycopene-n3	470.8	0.319455	2.1070	90.60	200	10	1000	3347				
lycopene-n3	470.9	0.477003	2.1070	90.60	200	6.67	1000	3332				

Table 7-2 470 nm におけるリコペンの吸光係数( $E^{1\%}_{1\text{cm,ヘキサン}}$ )実測値

☆☆☆ リコペン吸光係数 $E^{1\%}$ ,ヘキサン@470nm												
	$\lambda$ [nm]	Abs	採取量 $W_L$ (mg)	試薬純度 $P_L$ (%)	定容 V(mL)	希釈率 F	単位換算 mg→g	吸光係数 $E^{1\%}$	AVR	STDEV	CV%	
lycopene-n1	470.0	0.283380	1.8688	90.60	200	10	1000	3347	3359	31	0.92	
lycopene-n1	470.0	0.426564	1.8688	90.60	200	6.67	1000	3359				
lycopene-n2	470.0	0.311288	2.0169	90.60	200	10	1000	3407				
lycopene-n2	470.0	0.463590	2.0169	90.60	200	6.67	1000	3383				
lycopene-n3	470.0	0.318614	2.1070	90.60	200	10	1000	3338				
lycopene-n3	470.0	0.475590	2.1070	90.60	200	6.67	1000	3322				

Table 8 リコペン, スダン I の  $^1\text{H}$  qNMR 純度測定結果

H 数	18	2	1	1				
Int. start [ppm]	0.100	5.092	8.539	8.539				
Int. end [ppm]	-0.100	4.880	8.351 (不純物除外)	8.351 (不純物込み)				
No.	Lot.	1, 4-BTMSB- $d_4$ (%)	Lycopene 2 位 AV (%)	SD (%)	Sudan I 9 位 AV (%)	SD (%)	Sudan I 9 位 AV (%)	SD (%)
Std1	SAN4711		99.33	1.42	92.98	0.07	94.28	0.07
Std2	SAN4711		90.74	0.86	93.13	0.70	94.71	0.39
Std3	SAN4711	99.9	94.27	0.58	93.56	0.06	94.75	0.23
Std4	LKP4227		90.60	0.84	93.39	0.40	94.88	0.07
Std5	SAN4711		93.28	1.73	92.80	0.57	93.34	0.66
				AV (%)	93.17		94.39	
				SD (%)	0.306		0.630	
				CV (%)	0.33		0.67	

Table 9 絶対検量線の傾き, 相対モル感度係数(原点を通す/通さない, 計算に使用する濃度範囲を LV0~LV6/LV0~LV5)

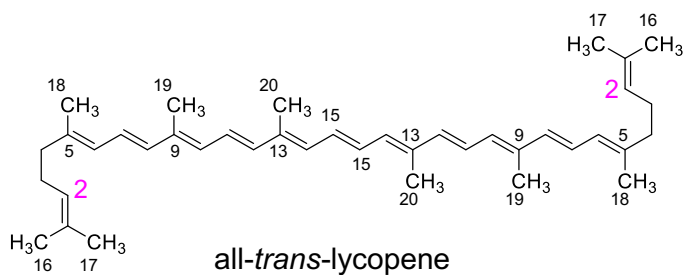
クロマトグラム処理	lycopen					sudan-I			RMS [mol/mol]
	傾き	切片	r2	傾き	切片	r2			
8Da_Mn, LV0~LV6	std3	原点通す	2.104E+10	0	0.9978	2.193E+09	0	0.9998	9.594
		通さない	2.092E+10	368.69	0.9962	2.198E+09	-60.70	0.9997	9.520
	std4	原点通す	2.118E+10	0	0.9999	2.158E+09	0	1.0000	9.813
		通さない	2.123E+10	-144.44	0.9999	2.158E+09	-2.76	0.9999	9.835
	std5	原点通す	2.141E+10	0	0.9991	2.142E+09	0	0.9999	9.995
		通さない	2.144E+10	-119.22	0.9984	2.147E+09	-66.90	0.9999	9.987
	std3-5	原点通す	2.121E+10	0	0.9988	2.164E+09	0	0.9998	9.799
		通さない	2.120E+10	35.23	0.9980	2.168E+09	-43.35	0.9997	9.778
8Da_Mn, LV0~LV5	std3	原点通す	2.128E+10	0	0.9985	2.177E+09	0	0.9998	9.773
		通さない	2.119E+10	145.78	0.9972	2.181E+09	-21.34	0.9997	9.717
	std4	原点通す	2.096E+10	0	0.9998	2.158E+09	0	1.0000	9.716
		通さない	2.096E+10	-2.91	0.9997	2.157E+09	0.74	0.9999	9.717
	std5	原点通す	2.130E+10	0	0.9990	2.115E+09	0	0.9999	10.073
		通さない	2.136E+10	-88.65	0.9982	2.113E+09	13.38	0.9999	10.109
	std3-5	原点通す	2.119E+10	0	0.9990	2.150E+09	0	0.9998	9.857
		通さない	2.118E+10	11.67	0.9982	2.150E+09	-2.07	0.9995	9.852
1.2Da_No, LV0~LV6	std3	原点通す	2.667E+09	0	0.9975	2.784E+08	0	0.9997	9.581
		通さない	2.655E+09	39.09	0.9958	2.787E+08	-4.28	0.9994	9.526
	std4	原点通す	2.655E+09	0	0.9999	2.736E+08	0	0.9999	9.701
		通さない	2.655E+09	-0.54	0.9998	2.739E+08	-2.69	0.9999	9.694
	std5	原点通す	2.683E+09	0	0.9991	2.674E+08	0	0.9999	10.036
		通さない	2.689E+09	-16.82	0.9985	2.673E+08	1.52	0.9999	10.060
	std3-5	原点通す	2.669E+09	0	0.9988	2.731E+08	0	0.9996	9.772
		通さない	2.667E+09	6.66	0.9979	2.732E+08	-1.74	0.9993	9.759
1.2Da_No, LV0~LV5	std3	原点通す	2.699E+09	0	0.9981	2.765E+08	0	0.9997	9.761
		通さない	2.694E+09	7.05	0.9965	2.763E+08	1.04	0.9994	9.751
	std4	原点通す	2.654E+09	0	0.9996	2.737E+08	0	0.9999	9.694
		通さない	2.654E+09	0.18	0.9993	2.743E+08	-3.42	0.9998	9.675
	std5	原点通す	2.679E+09	0	0.9993	2.676E+08	0	0.9999	10.013
		通さない	2.692E+09	-20.76	0.9987	2.674E+08	1.14	0.9998	10.068
	std3-5	原点通す	2.678E+09	0	0.9989	2.726E+08	0	0.9996	9.826
		通さない	2.682E+09	-5.26	0.9980	2.726E+08	-0.37	0.9993	9.836

8Da\_Mn = 475 nm(±4 nm), smoothing(±3 scans×2回)

1.2Da\_No = 475nm(±0.6 nm), no smoothing

Table 10 RMS (= 9.857) 法, およびリコペン絶対検量線(Y = 2.1190E+10 \* X)法により求めたトマト色素製品中のリコペン含有量(%)

	lycopen area A <sub>s</sub>	sudan I area A <sub>s</sub>	採取量 W(mg)	定容量 V(mL)	希釈率 F	単位補正	RMS (std3~5, LV0~LV5, 原点通す) = 9.857			リコペン絶対検量線 (std3~5, LV0~LV5, 原点通す)			残差%= RMS-検 量線/検 量線×100				
							検液中の sudan I C <sub>s</sub> (m_mol/mL)	検液中の lycopen C <sub>L</sub> (m_mol/mL)	含有量 (%)	検液中の lycopen濃度 (m_mol/mL)	含有量 (%)	含有量 (%)					
A1155-n1	31634	11565	78.5650	25	250	100	5.40.E-06	1.500.E-06	6.40	AVR	6.35	1.49E-06	6.38	AVR	6.28	0.45	
A1155-n2-2	30427	11535	83.1612	25	250	100	5.40.E-06	1.446.E-06	5.83	STDEV	0.48	1.44E-06	5.79	STDEV	0.45	0.71	
A1155-n3	33008	11416	78.2514	25	250	100	5.40.E-06	1.585.E-06	6.80	CV%	7.63	1.56E-06	6.68	CV%	7.16	1.76	
A1201-n1	33488	11459	6.3519	25	250	100	5.40.E-06	1.602.E-06	84.64	AVR	81.3	1.58E-06	83.49	AVR	81.2	1.38	
A1201-n2	28473	11579	5.5922	25	250	100	5.40.E-06	1.348.E-06	80.90	STDEV	3.10	1.34E-06	80.63	STDEV	2.08	0.33	
A1201-n3	32149	11758	6.4088	25	250	100	5.40.E-06	1.499.E-06	78.49	CV%	3.81	1.52E-06	79.44	CV%	2.56	-1.20	
A1205-n1	43902	11740	10.8550	25	250	100	5.40.E-06	2.050.E-06	63.37	AVR	68.9	2.07E-06	64.05	AVR	68.3	-1.05	
A1205-n2	38281	11489	8.7242	25	250	100	5.40.E-06	1.827.E-06	70.26	STDEV	4.96	1.81E-06	69.48	STDEV	3.75	1.11	
A1205-n3	42404	11337	9.4262	25	250	100	5.40.E-06	2.050.E-06	72.99	CV%	7.20	2.00E-06	71.24	CV%	5.49	2.46	
A1206-n1	30136	11771	76.0766	25	250	100	5.40.E-06	1.404.E-06	6.19	AVR	6.56	1.42E-06	6.27	AVR	6.58	-1.31	
A1206-n2	30524	11592	73.1241	25	250	100	5.40.E-06	1.444.E-06	6.62	STDEV	0.34	1.44E-06	6.61	STDEV	0.29	0.22	
A1206-n3	32610	11581	75.4481	25	250	100	5.40.E-06	1.544.E-06	6.87	CV%	5.21	1.54E-06	6.84	CV%	4.37	0.31	
A1207-n11	18842	11685	161.99	100	62.5	100	5.40.E-06	8.841.E-07	1.83	AVR	1.82	8.89E-07	1.84	AVR	1.82	-0.58	
A1207-n12	29448	11544	262.52	100	62.5	100	5.40.E-06	1.399.E-06	1.79	STDEV	0.02	1.39E-06	1.78	STDEV	0.04	0.63	
A1207-n13	26705	11633	230.76	100	62.5	100	5.40.E-06	1.258.E-06	1.83	CV%	1.37	1.26E-06	1.83	CV%	1.95	-0.14	
A1208-n1	30052	12094	6.9338	25	250	100	5.40.E-06	1.362.E-06	65.93	AVR	79.1	1.42E-06	68.63	AVR	79.4	-3.95	
A1208-n2	36374	11740	7.0516	25	250	100	5.40.E-06	1.699.E-06	80.83	STDEV	7.10	1.72E-06	81.68	STDEV	5.76	-1.05	
A1208-n3	41766	11687	8.4429	25	250	100	5.40.E-06	1.959.E-06	77.86	CV%	8.97 (n3)	1.97E-06	78.34	CV%	7.25 (n3)	-0.60	
A1208-n4	31327	11616	6.1065	25	250	100	5.40.E-06	1.478.E-06	81.24			83.4	1.48E-06	81.24		82.5	0.01
A1208-n5	34225	11440	6.3314	25	250	100	5.40.E-06	1.640.E-06	86.93			3.10	1.62E-06	85.60		2.71	1.55
A1208-n6	31158	11431	6.1185	25	250	100	5.40.E-06	1.494.E-06	81.95			3.71	1.47E-06	80.64		3.28	1.63

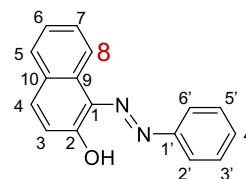


**all-*trans*-lycopene**

Chemical Formula:  $C_{40}H_{56}$

Exact Mass: 536.438

Molecular Weight: 536.888



**sudan I**

Chemical Formula:  $C_{16}H_{12}N_2O$

Exact Mass: 248.095

Molecular Weight: 248.285

Fig. 1 リコペンとスダンIの構造

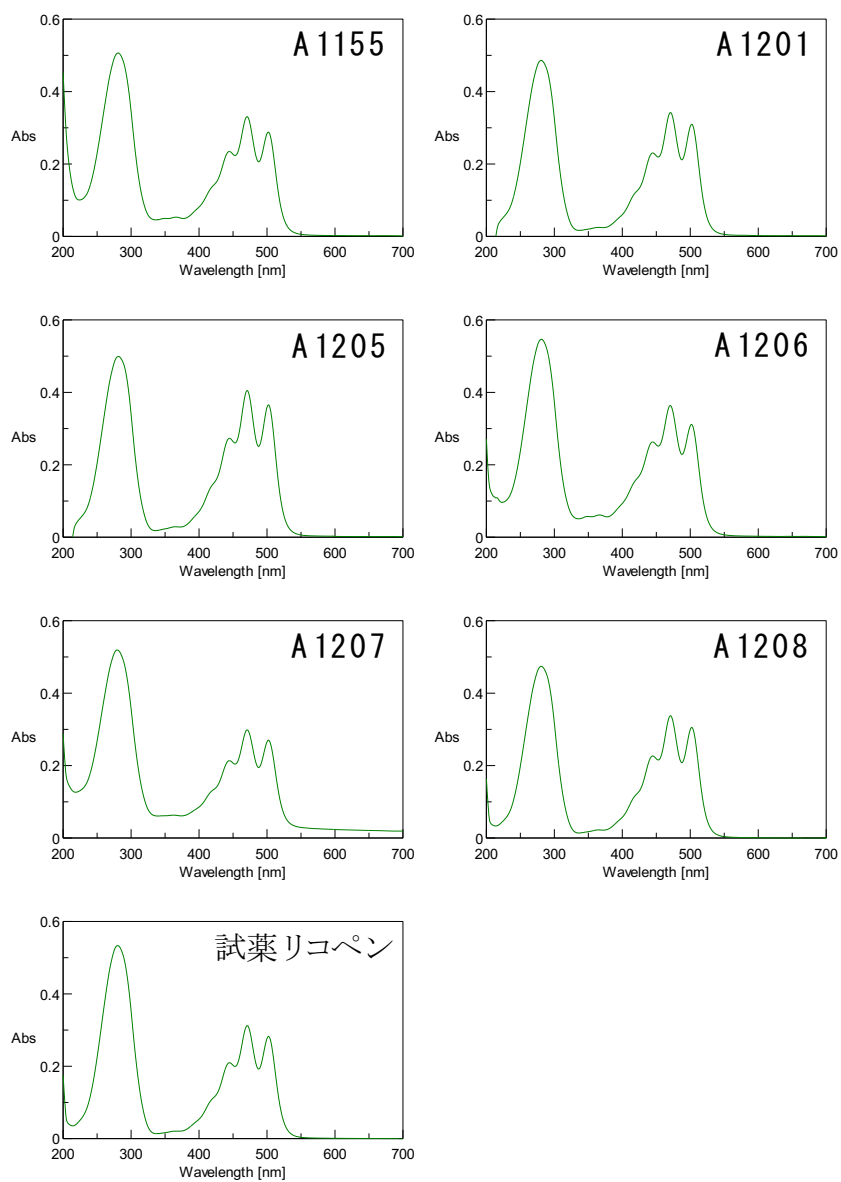


Fig. 2 トマト色素製品，試薬リコペンのUV/Vis吸収スペクトル

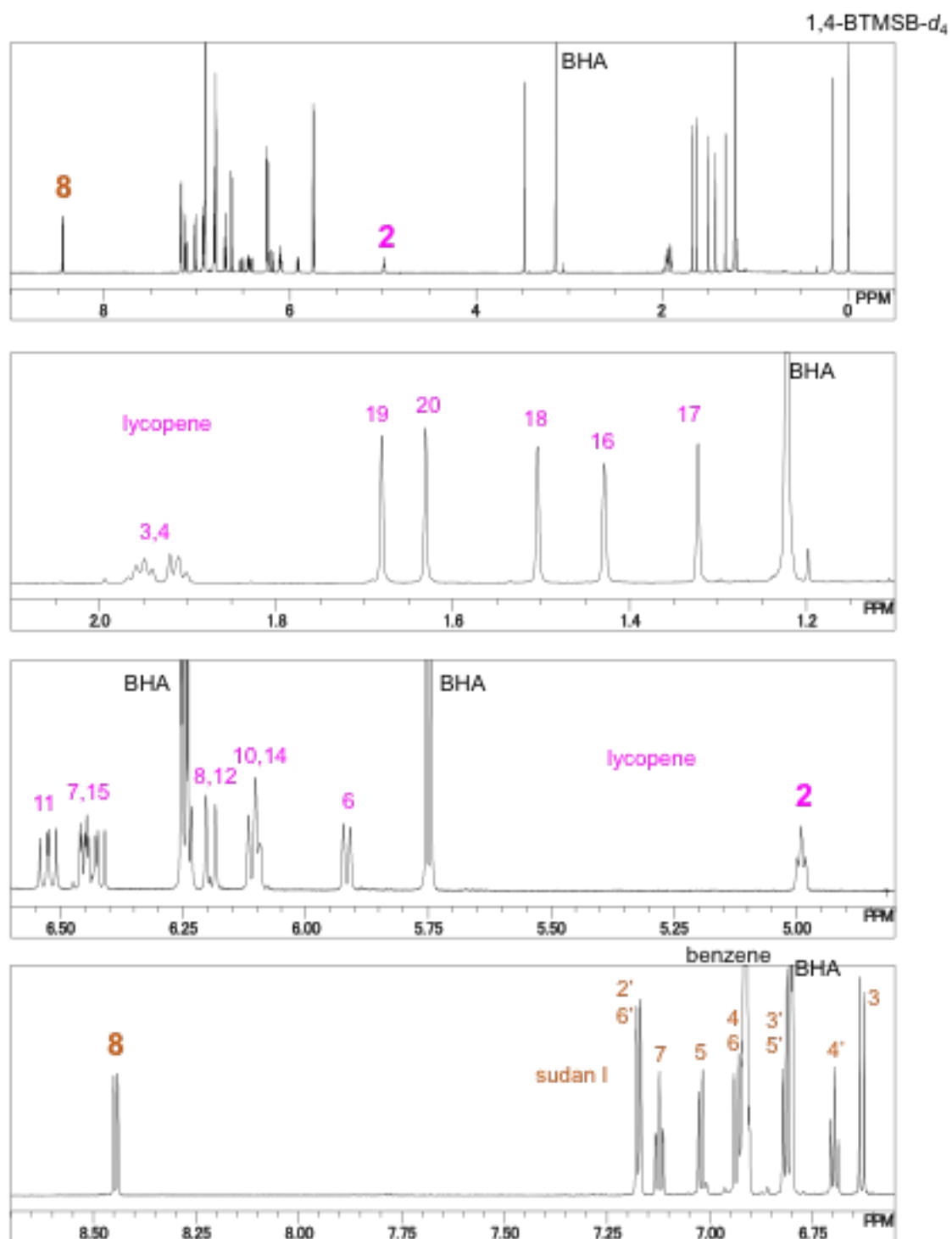


Fig. 3 リコペン, スダン I, BHA, 1,4-BTMSB- $d_4$ ( $C_6D_6$  溶液)の  $^1H$  qNMR スペクトル(800 MHz)

なお, リコペンのシグナル帰属は J. Agric. Food Chem., **62** (1), 264–269 (2014)を, スダン I は Food Chemistry, **217**, 418-424 (2017)を参考にした.



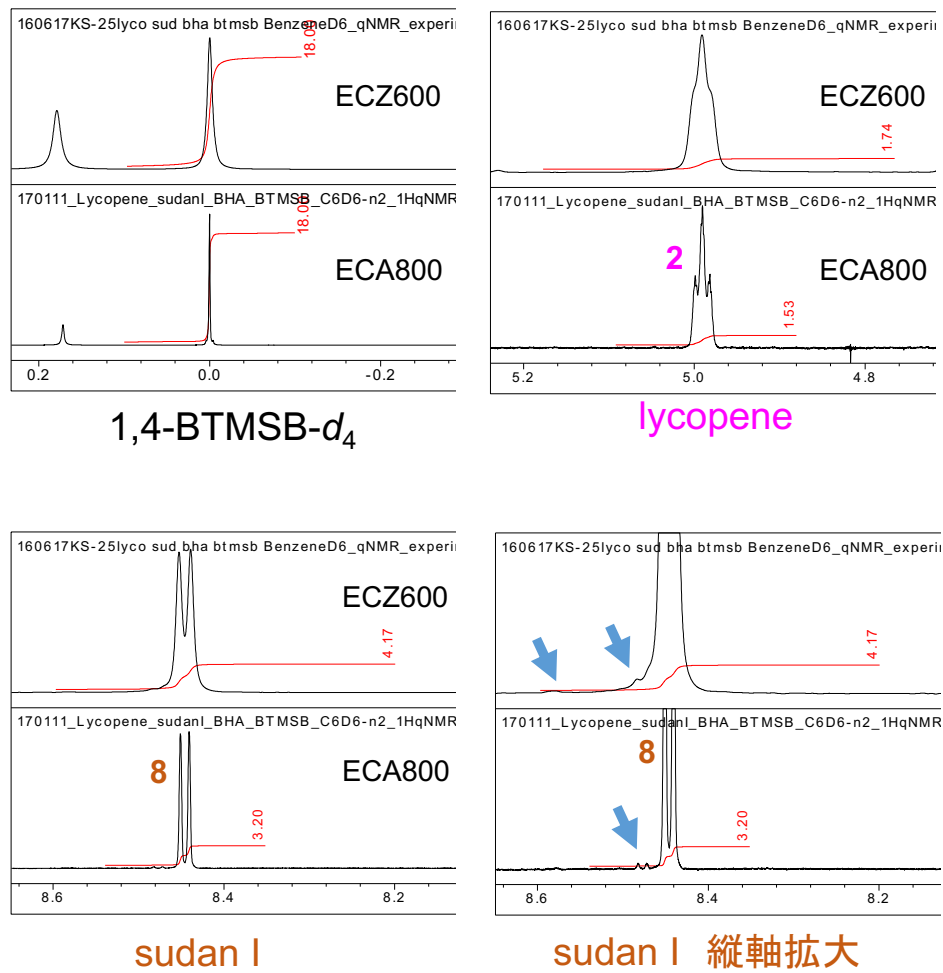


Fig. 4 測定した NMR 装置による 1,4-BTMSB- $d_4$ , リコペン(2 位), スダン I(8 位)シグナルの比較

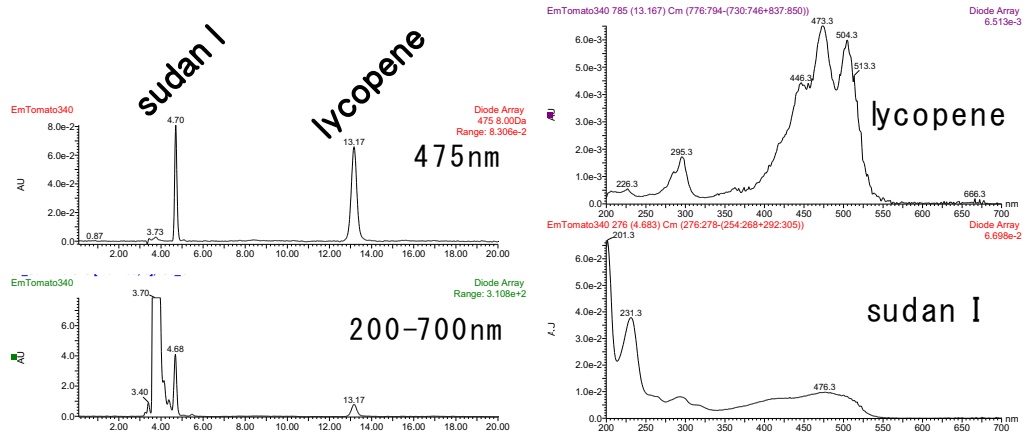


Fig. 5 リコペン(0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )とスダン I (1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )混合標準液(LV4)の LCクロマトグラムと UV スペクトル

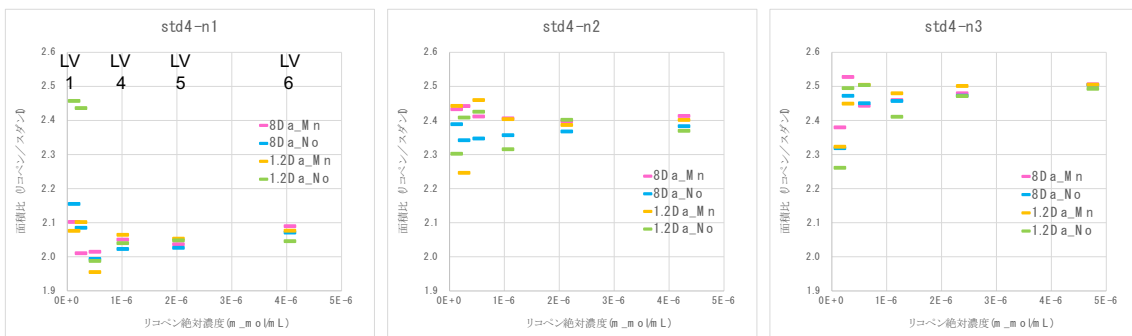
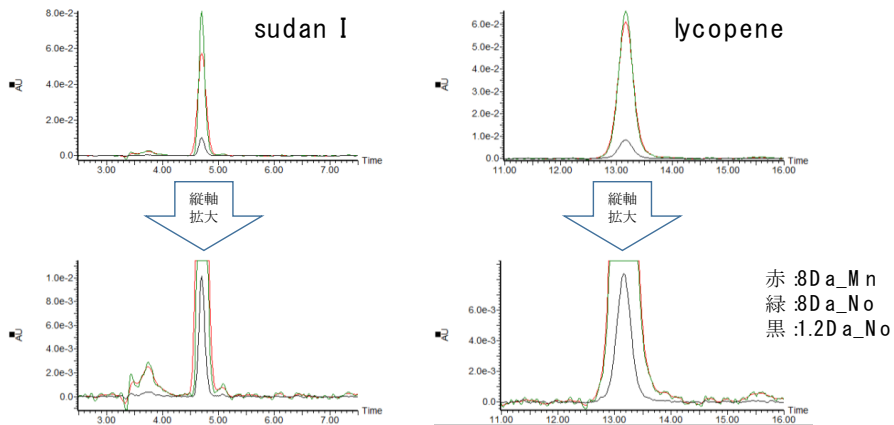


Fig. 6 クロマトグラムの抽出処理によるピーク形状の変化と、希釈濃度による面積比の比較

8Da\_Mn : 抽出波長 475 nm ( $\pm 4$  nm), smoothing ( $\pm 3$  scans  $\times 2$  回)

8Da\_No : 抽出波長 475 nm ( $\pm 4$  nm), スムージングなし

1.2Da\_Mn : 抽出波長 475 nm ( $\pm 0.6$  nm), smoothing ( $\pm 3$  scans  $\times 2$  回)

1.2Da\_No : 抽出波長 475 nm ( $\pm 0.6$  nm), スムージングなし

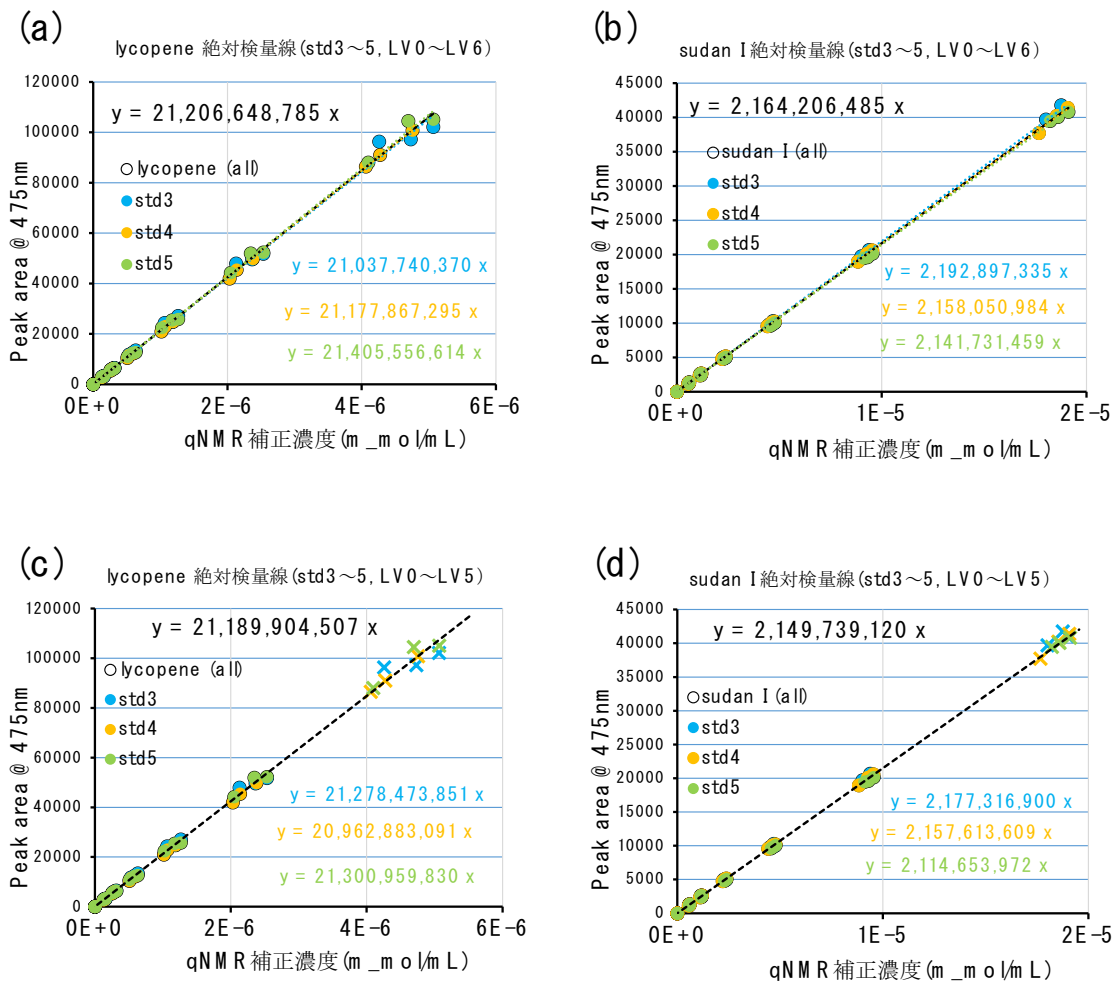


Fig. 7 リコペン及びスダン I の絶対検量線(原点を通す)

(a) リコペン(LV0~LV6), (b) スダン I(LV0~LV6), (c) リコペン(LV0~LV5), (d) スダン I(LV0~LV5)のデータを使用して計算

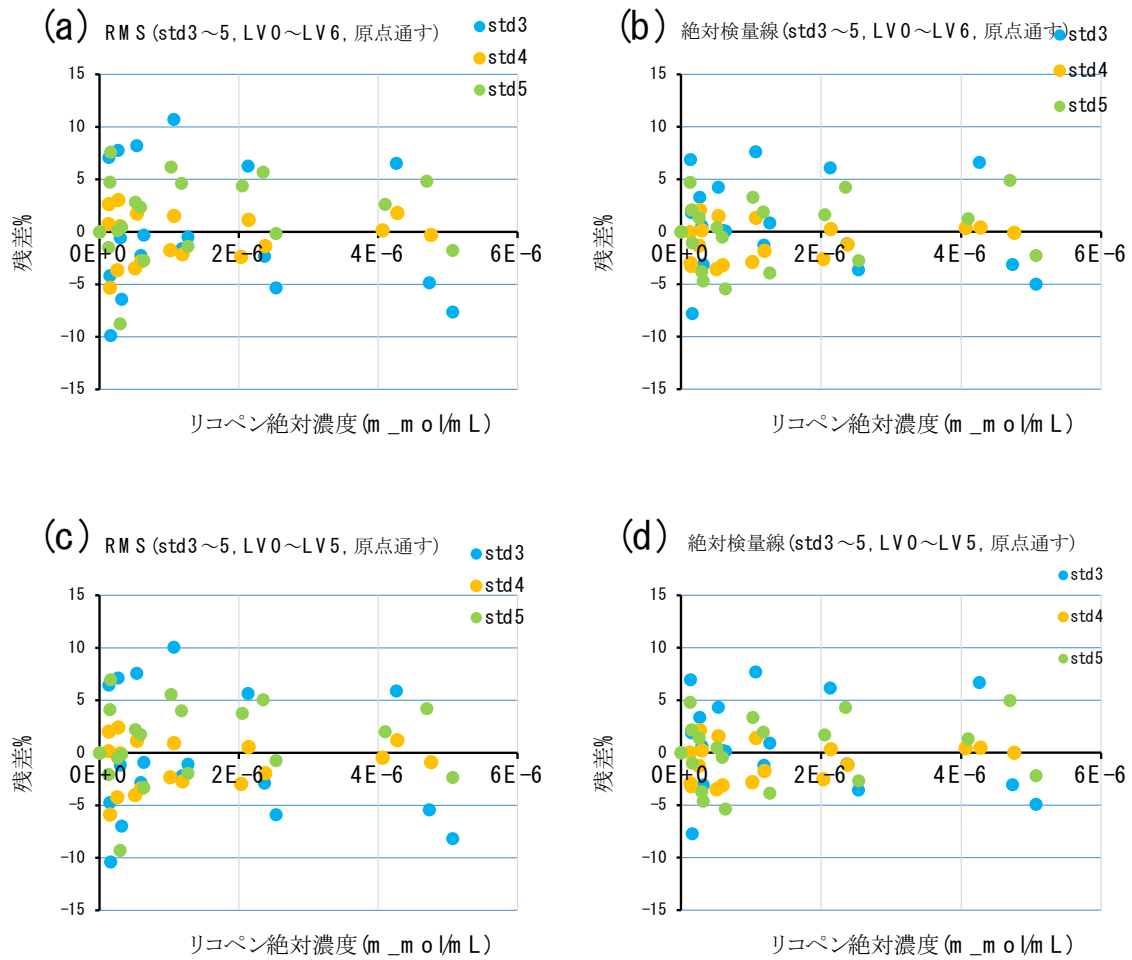
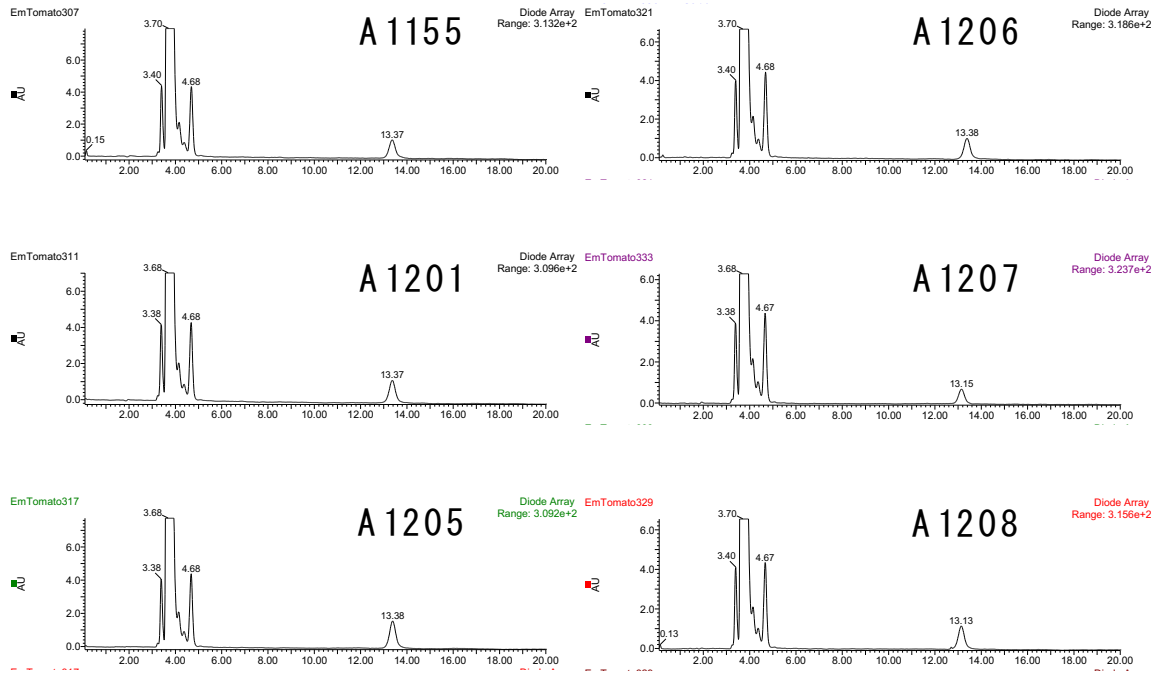


Fig. 8 標準液の戻し定量値の残差プロット (a)RMS(LV0~LV6), (b)絶対検量線(LV0~LV6), (c)RMS(LV0~LV5), (d)絶対検量線(LV0~LV5)

(a)



(b)

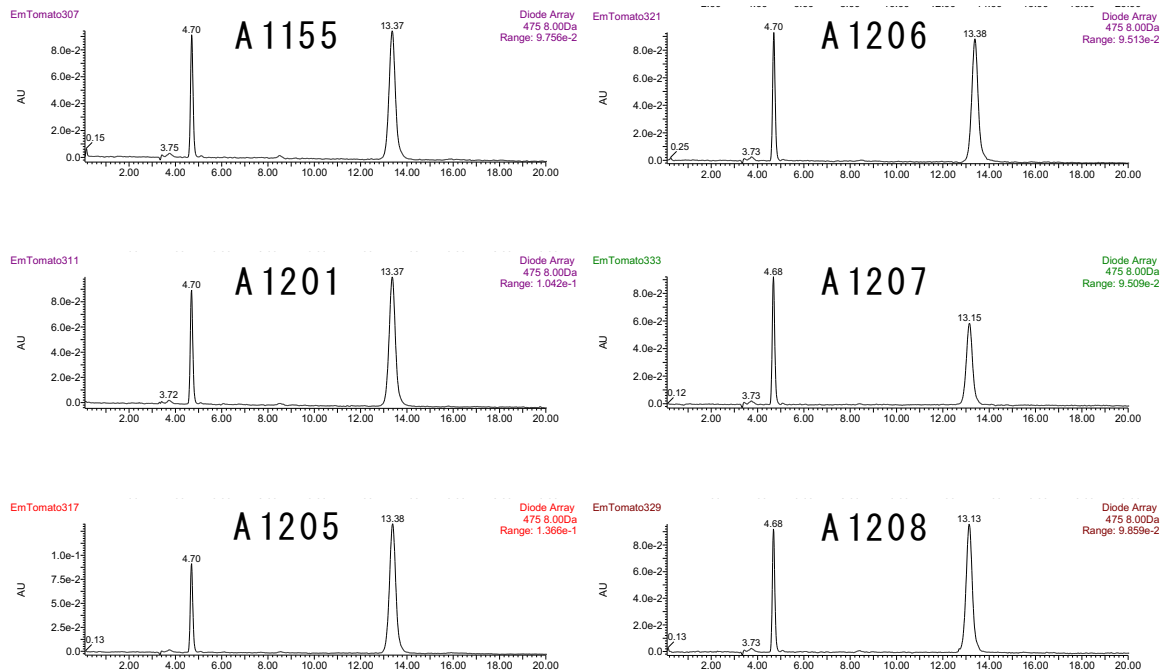


Fig. 9 トマト色素製品の LC クロマトグラム(スタン I 添加) (a)200-700 nm, (b)475 nm

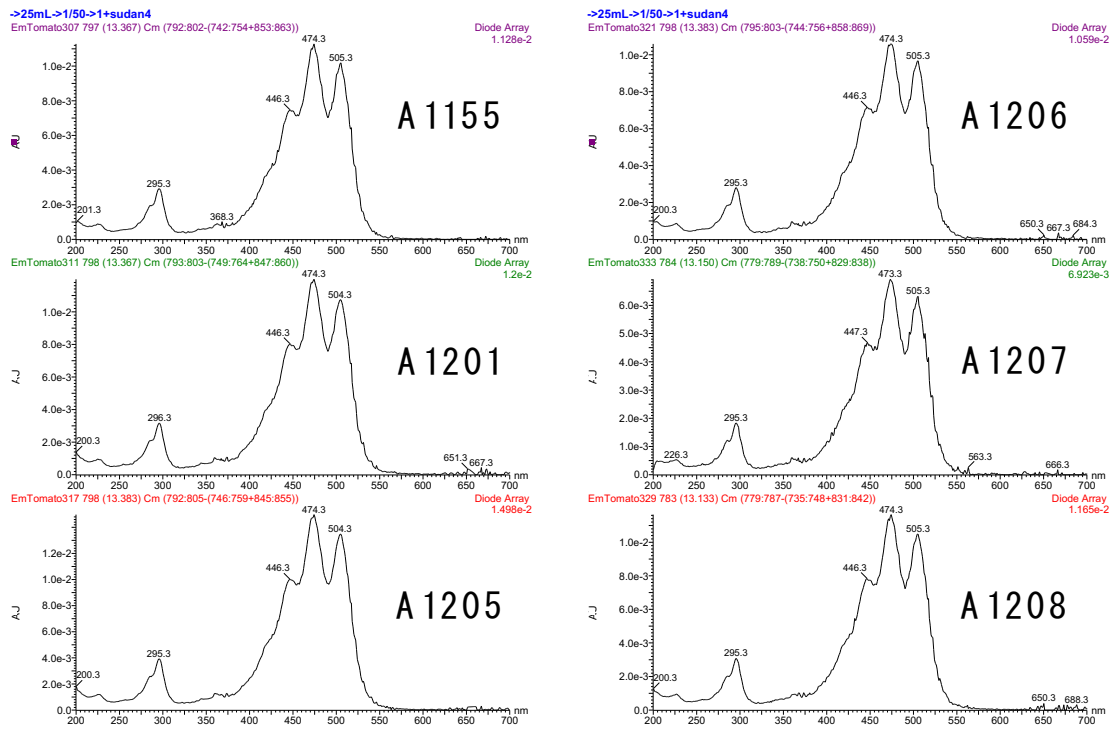


Fig. 10 トマト色素製品中のリコペンの HPLC ピークの UV/Vis スペクトル