

**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

平成 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者 天倉 吉章 松山大学
多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所
受田 浩之 高知大学
井之上 浩一 立命館大学
永津 明人 金城学院大学

平成 29(2017)年 3 月

目次

・ 総括研究報告書

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

研究代表者 : 穂山浩 1

・ 分担研究報告書

1. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究 23

研究協力者 : 日本食品添加物協会

2. 既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

2.1. 既存添加物生コーヒー豆抽出物の成分研究 35

研究分担者 : 天倉吉章

研究協力者 : 好村守生

研究協力者 : 杉脇秀美

2.2. 既存添加物カキ色素の成分研究 41

研究分担者 : 天倉吉章

研究協力者 : 好村守生

2.3. 既存添加物モウソウチク抽出物の成分研究 47

研究分担者 : 天倉吉章

研究協力者 : 好村守生

3. 既存添加物の有効成分に関する研究

3.1. 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 51

研究分担者 : 多田敦子

研究協力者 : 西崎雄三

研究協力者 : 杉本直樹

3.2. 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…………… 59

研究分担者 : 多田敦子

研究協力者 : 西崎雄三

研究協力者 : 杉本直樹

研究協力者 : 受田浩之

研究協力者 : 島村智子

4. 既存添加物の成分規格試験法の検討

4.1. 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:青色素の構造の解明…………… 67

研究分担者 : 杉本直樹

研究協力者 : 多田敦子

研究協力者 : 西崎雄三

研究協力者 : 石附京子

4.2. ラック色素のアンモニア処理および構造解析…………… 81

研究分担者 : 杉本直樹

研究協力者 : 多田敦子

研究協力者 : 西崎雄三

研究協力者 : 石附京子

5. 既存添加物の基原の解析に関する検討 ~ DNA を指標にした既存添加物酵素の微生物由来基

原の再同定 - 遺伝子配列情報の調査 - ~…………… 95

研究協力者 : 西崎雄三

研究協力者 : 杉本直樹

研究協力者 : 卯津羅健作

6. 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…………… 117

研究分担者 : 受田浩之

研究協力者 : 杉本直樹

研究協力者：島村智子

7. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

7.1. 既存添加物ベニコウジ色素の成分規格の検討 123

研究分担者：井之上浩一

7.2. 既存添加物ゴマ油不けん化物の成分規格の検討 141

研究分担者：井之上浩一

8. NMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究 155

研究分担者：永津明人

. 研究成果の刊行に関する一覧表 169

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

研究代表者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨

(1) 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

第 9 版食品添加物公定書に未記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。既存添加物の中から第 10 版食品添加物公定書収載をめざし、いままでに作成した検証用規格案、関連資料を見直し、改正した。また、検証用規格案の妥当性検討の為、裏付け試験を実施した。残された既存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。また成分規格案の作成及び裏付け試験を実施した。

(2) 含有成分解析と成分規格試験法の検討

1) 「生コーヒー豆抽出物」: 生コーヒー豆抽出物の製品中から 19 種の化合物が単離・同定された。DPPH ラジカル消去活性を指標に酸化防止効果を検討した結果、カフェー酸誘導体が添加物活性への寄与に大きく影響していることが示唆された。

2) 「モウソウチク抽出物」: 昨年までに含有成分として 11 種の既知化合物を明らかにしている。本年度は他の製品を分析し製品間における成分比較を行った結果、3 製品間で共通の成分が観察され、本研究で明らかにした成分が指標成分の候補となり得ることが考察された。

3) 「カキ色素」: カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として、構造不特定の縮合型タンニン類が豊富に含まれることが示唆されたことから、高分子領域の分子量について GPC により測定したところ、重量平均分子量約 20 万であることが明らかとなった。

4) 「ゴマ油不けん化物」: 既存添加物ゴマ油不けん化物の定量分析用セサミンおよびセサモリンは、HSCCC により簡便かつ安価に単離精製できることが判明した。本標準品は、ゴマ油不けん化物の確認試験のみならず、様々なゴマ油由来の製品に応用可能と考えられる。

5) 「ベニコウジ色素」: ベニコウジ黄色素では、キサントモナシン A および B が主成分として単離精製および同定が可能であった。

6) 「クチナシ青色素」: クチナシ青色素の色素生成メカニズムを明らかとするため、モデル実験下、色調変化の観察と共に青色素 B1 及び B2 を単離し、その構造を推定した。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物であると推定された。

7) 「クローブ抽出物」・「ベニバナ赤色素」: 「クローブ抽出物」では eugenol の定量条件が既存測定条件である HPLC 法と矛盾なく測定できることを確認した。「ベニバナ赤色素」では、定量用標準品が手に入らないことから、まずその単離精製から行い、赤色の化合物である carthamin の単離と ¹H-qNMR 法に応用可能な溶媒の選択、HPLC での測定条件を確立した。「ベニバナ黄色素」も黄色の本体とされる safflor yellow 類の個々の化合物の標準品が手に入らないことから、単離精製を行った。

8)「カンゾウ油性抽出物」: カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性に glabridin だけではなく, licochalcone B, kanzonol X, hispaglabridin A, 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin および glabrene 等多数の化合物が関与していることが示された。

(3) 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

既存添加物に分類される酸化防止剤の抗酸化力価評価に関する一般試験法案を作成し, DPPH 法に基づく一般試験法案が酸化防止剤の力価評価において広い適用性と高い再現性を示すことが明らかとなった。今後は, 各種酸化防止剤に関する個別の手順の作成を目指す。

(4) 日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討カワラヨモギ抽出物の有効成分であるカピリンの定量法を検討した。本研究で算出されたヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF を適用して HPLC/PDA によるカワラヨモギ抽出物中のカピリンの定量を行なった。算出された定量値は, 純度 99.5% のカピリンの量値と殆ど差はなく (0.002% 以下), 検量線から求めた値を真値とすると, RRF を用いた定量法の真度は 91~94% であった。本研究において確立した 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。

(5) 酵素の基原の解析法の確立 第 9 版公定書に記載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について, 16S rDNA または ITS 配列が国際塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。その結果, 「細菌」52/56 基原, 「放線菌」17/19 基原, 「酵母」6/6 基原, 「糸状菌」57/65 基原, 「担子菌」6/6 基原の配列が登録されていた。NCBI Taxonomy から得られる旧名と現行名を確認することで, 基原の使用の是非を判断するなど, 今後, 一定の判断基準を設定しておく必要があると思われる。

研究分担者

天倉 吉章 松山大学薬学部 教授
 多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所
 室長
 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所
 室長
 受田 浩之 高知大学教育研究部自然科学
 系生命環境医学部門 教授
 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授
 永津 明人 金城学院大学薬学部 教授

主任研究官
 西崎 雄三 国立医薬品食品衛生研究所
 研究員
 石附 京子 国立医薬品食品衛生研究所
 好村 守生 松山大学薬学部 講師
 杉脇 秀美 松山大学薬学部 嘱託職員
 島村 智子 高知大学教育研究部総合科学
 系生命環境医学部門 准教授
 細谷 孝博 静岡県立大学食品栄養科学部
 助教

研究協力者

上田 要一 日本食品添加物協会 専務理事
 森 将人 日本食品添加物協会 常務理事
 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所
 部長
 建部 千絵 国立医薬品食品衛生研究所

小出 知己 株式会社テクノスルガ・ラボ
 卯津羅健作 ナガセケムテックス株式会社

A. 研究目的

既存添加物 365 品目のうち 国の成分規格
 設定済は約 130 品目にとどまっている 現在
 検討中の第 9 版公定書には酵素 62 品目を含
 む 87 品目が新規既存添加物として収載され

る予定である。しかし依然として約 140 品目の成分規格が未設定である。また自主規格が定められている品目に関しても規格の内容が不十分で信頼性が低いと考えられ、さらに添加物としての有効性と有効成分自体が明確でない品目や流通実態が不明確な品目がある。これは成分分析や基原等の解析において高度な科学的解析手法が必要な場合がある故に規格設定が困難であると考えられる。

本研究では、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、流通実態や今後の成分規格作成の技術的実現性を調査研究し、今後の成分規格作成の優先順序を判断する。また今後の規格設定が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確認及び成分規格試験法の検討を進める。また規格試験として、酸化防止剤には抗酸化活性測定法の導入を検討し、酸化防止剤の規格試験法素案を作成する。また苦味料や増粘剤等、複雑な混合物の品目に関する特性値を指標とした規格試験法の開発を模索する。また第 9 版公定書に収載予定の酵素の基原に関しては、種の同定に至っていない菌種があることから、種の同定を解析する方法を確立する。

B. 研究方法

1. 成分規格未設定の既存添加物の現状整理：

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及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) 10 版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る予定の 87 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、一部見直しあるいは裏付け試験を実施した。

3) 既存添加物の第 5 版自主規格に向けた成分規格の検討

検証用できなかった品目について、成分規格が設定可能なものから自主規格案を作成するとともに、規格設定の根拠となる関連情報（海外規格を含む各種規格との対比）を調査した。

4) 既存添加物の品目ごとの基原生物の調査

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。

2. 含有成分解析と成分規格試験法の検討：

成分規格未設定の品目（生コーヒー豆抽出物、カキ色素、モウソウチク抽出物、クチナシ青色色素、ムラサキイモ色素、クエルセチン、グルコサミン、ヤマモモ抽出物、生コーヒー豆抽出物、モウソウチク抽出物）について機器分析を用いて含有成分を解析した。

3. 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：

抗酸化活性測定法は、酸化防止剤の抗酸化活性を測定する方法である。DPPH ラジカル消去率を求め、(±)-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸（トロロックス）等価活性（TEAC）で表した。

4. 日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討：

カワラヨモギ抽出物製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した A 社製品 1（暗褐色）、製品 2（黄褐色）及び製品 3（黄褐色）計 3 製品を用いた。既存添加物カワラヨモギ抽出物流通製品 3 種類を用い、乾燥減量試験法の開発、LC/UV

及び LC/MS による定量法の開発を行った。A 社標品（非売品）である ¹H-qNMR 純度 99.5% のカピリン単離・精製品は、日本食品添加物協会を通じて入手し、カピリン標準品として使用した。qNMR を応用し、カピリン単離標品の正確な純度を求め、また添加物製品についても、カピリン標品を使用しない qNMR による直接定量を行った。

5. 酵素の基原の解析法の確立：

第 9 版公定書に記載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、「細菌」、「放線菌」、「酵母」、「糸状菌」、「担子菌」の 5 つの群に分類した。GenBank 上の 16S rDNA または ITS1 塩基配列情報の登録の有無の確認を行った。

倫理面への配慮

特になし

C・D 研究結果及び考察

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 10 版食品添加物公定書収載成分規格（案）及び第 5 版既存添加物自主規格成分規格（案）の整備状況、安全性試験実施状況、国内外の規格の有無について調査を行った。

2) 10 版公定書に向けた検証用成分規格の見直し及び裏付け試験

第 10 版公定書に向けて昨年度までに作成した成分規格検証用の規格案、関連資料を見直し、改正した。また、検証用規格案の妥当性検討の為、セイヨウワサビ抽出物、カンゾウ油性抽出物等について裏付け試験を実施した。

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、第 10 版公定書に向けた検証用規格を作成したものを除き、使用

実態の再調査及び第 5 版自主規格の作成を検討した。

4) 既存添加物の品目ごとの基原生物等の調査

第 9 版食品添加物公定書未収載品目の基原植物、微生物等で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等について、削除、変更又は拡大の必要性の有無について昨年度に引き続きアンケート調査を実施した。

2. 含有成分解析と成分規格試験法の検討：

[生コーヒー豆抽出物]

1. 化合物の単離

生コーヒー豆抽出物の濃縮物について、カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、これまで単離、同定した 14 種の化合物に加え、vanillin (1) (1.0 mg), 3-O-caffeoyl-4-O-feruloylquinic acid (2) (4.5 mg), 4-O-caffeoyl-5-O-feruloylquinic acid (3) (55.3 mg), trans-feruloyl-L-tryptophan (4) (5.1 mg), trans-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester (5) (1.8 mg) の 5 種を新たに単離した。このうち、化合物 4, 5 については LC/MS による分析等に関する報告はあるが、単離報告は見あたらない。

2. 生コーヒー豆抽出物の HPLC 分析

新たに単離した各化合物を標品として HPLC 分析を行い、5 化合物のデータを加えた。

3. DPPH ラジカル消去活性の評価

単離した 5 化合物について、DPPH ラジカル消去活性を評価した。5-O-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) をはじめとするカフェー酸誘導体の活性が強いことを示唆した。

4. SOD 様活性の評価

これまで単離した 19 化合物について、SOD 様活性を評価した。DPPH ラジカル消去活性と同様、カフェー酸誘導体の活性が顕著であった。

既存添加物名簿に生コーヒー抽出物の有効成分は、「クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。これまでの検討で、DPPH ラジカル消去活性を指標に酸化防止能を評価した結果、活性の強かった画分には 5-O-caffeoylquinic acid(クロロゲン酸)、4-O-caffeoylquinic acid、3-O-caffeoylquinic acid が主検出され、これらの添加物活性への寄与が大きいことを考察していた。今回の結果を加え、これまでの考察がさらに支持された。また、単離した 19 化合物について、DPPH ラジカル消去活性及び SOD 様活性を評価した結果、いずれの評価法においてもカフェー酸誘導体が顕著な活性を示した。よって、本添加物の活性への寄与はカフェー酸誘導体であることがあげられ、caffeoyl 基が活性に大きく影響していることが示唆された。

[カキ色素]

1. 化合物の分離精製

カキ色素製品 (47.4 g) に蒸留水 1 L を加えて溶解させた後、酢酸エチル (1 L × 3)、n-ブタノール (1 L × 3) で順次分配を行い、各分画物 [酢酸エチル分画物 (129.4 mg)、n-ブタノール分画物 (773.6 mg)、水分画物 (45.4 g)] を得た。得られた水分画物のうち 20 g を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、8 画分を得た。このうち、Fr. 38-52 (1.0 g) について、さらに MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィーに付し、8 画分を得た。さらにこのうち、Fr. 8 (47.2 mg) について、Chromatorex ODS カラムクロマトグラフィーに付し、6 画分を得た。得られた 1 画分 (Fr. 13-17 (9.7 mg)) について、¹H-NMR を測定したところ、高磁場側に夾雑物由来と思われるシグナルが観察され、さらに精製が必要であることが示唆された。

2. GPC 分析

カキ色素製品中成分の分子量分布について、GPC により検討した結果、重量平均分子量約 20 万であった。今後これらの構造的特徴について検討が必要である。

[モウソウチク抽出物]

1. 添加物製品の分析

モウソウチク抽出物製品について HPLC 分析を行った結果、単離した各化合物を標品として同条件で分析比較を行った。その結果、製品 A と同様のピークが 2 製品 (E, F) から観察されたが、その他の 3 製品はほとんどピークが検出されなかった。また、既存添加物名簿記載の主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は他の製品からもほとんど検出されなかった。

モウソウチク抽出物の 3 製品 (A, E, F) 間で共通の成分が観察されたことから、今回明らかにした成分が指標成分の候補となり得ることが考察される。一方で、今回の条件でピークが検出されない製品もあり、製品間でのばらつきが認められた。また、既存添加物名簿において主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は今回の測定条件ではいずれの製品中にもほとんど検出されておらず、製品の同等性を確保のための明瞭な指標成分の設定と、その分析実施の提案が示唆される。

[ゴマ油不けん化物]

ゴマ油不けん化物中のセサミン、セサモリンおよびセサモールの紫外可視吸光光度における極大吸収波長を調べた。いずれも、290 nm 付近で吸収極大波長 (セサモール $\lambda_{\max} = 296$ nm, セサミン $\lambda_{\max} = 286$ nm, セサモリン $\lambda_{\max} = 289$ nm) が観察され、HSCCC などのモニタリングに用いることとした。それらの条件のもと、LC による分離分析も達成でき、HSCCC 分配係数の算出などに応用した。

LC法を用いて、セサミンおよびセサモリンのHSCCC用2相溶媒の分配係数および分離度の検討を行った。セサミンの分配係数 0.84 ± 0.18 およびセサモリンの分配係数 1.36 ± 0.34 であり、分離度 1.61 ± 0.05 の条件、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)を採用することとした。

本条件を用いて、HSCCCによる単離精製の分析を行った際のクロマトグラムより、Fraction AおよびFraction Bを単離精製することができた。いずれも、絶対検量線法により定量した結果、Fraction Aにおいて、 7.37 mgおよびFraction Bにおいて、 5.17 mgとなった。また、MS/MSスペクトルにより、Fraction AおよびFraction Bは、セサミンおよびセサモリンであると同定できた。本試料をLC-フォトダイオードアレー分析(検出波長200-400 nm)した結果、それぞれの純度が99%以上となり、良好に単離精製できたものと考えられる。

本研究では、ゴマ油不けん化物の新たな確認試験法の基礎的な検討を実施した。昨年度報告した定義や定量法において、安価なセサミンおよびセサモリンの標準品が必要となった。そこで、本年度では、HSCCCによるセサミンおよびセサモリンの効率的な単離精製法の検討を行った。今回、HSCCCを用いて、ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを単離精製するため、2相溶媒系の比較した結果、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)が最適であるとの判断になった。本溶媒系を用いて、HSCCCによる分離を行った結果、主に2つのFractionを得ることができ、LC分析の結果、Fraction Aにおいてセサミン、Fraction Bにおいてセサモリンが高純度(LC評価:99%以上)の標準品を得ることができた。いずれも、セミ分取スケールで1回の操作で、数mgから数十mg程度は同時に単離精製できることが判明した。しかしながら、ゴマ油不

けん化物含有濃度が低いため、今回では、数mg程度の単離精製となった。

本標準試料は、ゴマ油不けん化物の確認試験のみならず、様々なゴマ油由来の製品に関する定量評価へ応用できるものと思われる。また、定量NMR/LC分析法との組み合わせにより、今後は、モル吸光度係数比による定量評価へ応用できるものと考えている。

[ベニコウジ色素]

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、いずれも国内で流通している試料を用いた。そこで、各試料について、第8版食品添加物公定書および4版自主規格の確認試験を実施した。その結果、国内流通品は、いずれも現在の規格基準に従うことが明らかになった。次に、HPLCによる分離分析を実施した。規格における色価では、ベニコウジ色素で波長480~520 nm、ベニコウジ黄色素では、458~468 nmとされている。そこで、各モニタリングをいずれも規格基準内波長である500 nm(ベニコウジ色素)および460 nm(ベニコウジ黄色素)を含むフォトダイオードアレーにて検出した。ベニコウジ色素は、各検体により、全く異なるクロマトグラムパターンを示し、いずれも培養技術やベニコウジカビの種類などが異なり、得られている成分が異なることが疑われた。また、種別によりHPLCによる分離分析は非常に困難であるとも判断された。そのなかでも、試料119において、比較的明確な4つピークが観察された。それぞれの吸光光度スペクトルを測定した結果、いずれも500 nm付近に吸収極大波長をもつため、いずれもベニコウジ色素の成分であることが判明した。一方で、ベニコウジ黄色素は、明確な2つのピークが観察され、いずれも色素成分である可能性が示唆された。それらの吸光光度スペクトルにおいても、吸収極大波長が400 nm付近であり、ベニコウジ黄色の色素成分であることが示唆された。

HPLC 法では、ベニコウジ色素の成分などが固定相カラムに吸着してしまい、良好な分離分析達成できなかつたと推定される。また、ベニコウジ黄色素も同様に吸着成分が存在している可能性も否定できない。そこで、吸着などの影響を受けず、回収率が 100% の分離手法である高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いて、成分解析を実施することとした。HSCCC による分離検討を実施するためには、2 相溶媒系を決定しなければならない。そこで、ベニコウジ色素では、試料 119 のクロマトグラムで示される 4 ピーク (A~D) を用いて、分配係数を算出し、2 相溶媒を検討した。また、ベニコウジ黄色素では、明確に検出されている 2 ピークを用いて実施した。その結果、ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素のいずれも分配係数 0.2~1.5 の間であり、分離度も 1.0 以上のものを選択し、各分離の 2 相溶媒として決定した。

2 相溶媒系の検討条件を用いて、HSCCC の分離分析を実施した。ベニコウジ色素については、主な色素成分 (赤色素) が、ソルベント付近に検出され、色彩より主成分である可能性が示された (色彩成分 X)。また、その後、色彩のある成分が溶出し、それをまとめて獲得した (色彩成分 Y)。色彩成分 X および Y を HPLC で分析した結果、色彩成分 X では、試料 119 のクロマトグラムで観察されたピーク A および B が検出されているが、明らかに大きなブロードの溶出成分が存在し、良好に評価できないことが判明した。また、色彩成分 Y では、試料 119 で観察されたピーク C および D が観察された。一方で、ベニコウジ黄色素は、我々の既報において、良好に各成分を単離精製することができた。各成分を $^1\text{H-NMR}$ および LC-MS/MS (エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモードを採用した) を用いて、解析した結果、フラクション A が、キサントモン

シン A およびフラクション B がキサントモン B であることが判明した。

本研究では、ベニコウジカビ (*Monascus purpureus*) から生成されるベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素について、成分規格に伴う解析を実施した。ベニコウジカビは、育成する培地条件により様々な色彩成分を生成することや抽出条件により成分が異なることなどが報告されているため、国内流通品に関して、成分規格を定める必要がある。そこで、一般的に入手可能なベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の解析することとした。第 8 版食品添加物公定書および 4 版自主規格の確認試験では、主に色彩を評価するものであり、流通品ではすべて規格内であった。それらの製品を用いて、HPLC による色彩成分の評価を実施した。その結果、ベニコウジ色素の製品間において異なるクロマトグラムパターンを示し、色彩成分の違いなどが示唆された。そのうえ、様々な分離条件を検討したが、すべてに対して、良好なピーク分離が得られず、HPLC による評価は難しいことが判明した。一方で、ベニコウジ黄色素では、明確な 2 本のピークが観察された。しかしながら、それ自体が色彩の主成分とは断定することは難しく、色彩成分の回収率が 100% である HSCCC による分離評価が必要であることが分かった。HSCCC では、分配係数を算出しなければならず、ベニコウジ色素 (ピーク A~D) およびベニコウジ黄色素 (ピーク E, F) の HPLC 分析によるピークを基準に 2 相溶媒系を決定した。その結果、HSCCC の評価により、ベニコウジ色素において、色彩成分はフロント付近に大きく検出され、分配係数から想定される色彩ピークは後ろに溶出してきた。しかしながら、それを HPLC により評価した結果、主な色彩成分のピークを定めることができなかった。一方で、ベニコウジ黄色素は、HSCCC により、良好に単離精製することができ、

それぞれをキサントモナシン A およびキサントモナシン B と同定することができた。

[クチナシ青色]

1) LC による Y1 及び Y2 の経時的観察

ゲニピンとベンジルアミンを混合した場合、その溶液中には黄色化合物 Y1 及び Y2 が生成し、次に溶液が青色に変化するに伴い、Y2 が減少することを昨年度報告した。このことから、黄色化合物 Y1 及び Y2 は青色素の前駆体であると考えられた。本年度は引き続き、溶液が青くなつてからの挙動を観察した。

ゲニピン及びベンジルアミン 1:1 の混液では、液色が緑色となったとき、保持時間 16.5 分付近にピークが出現し、液色が青色に変化したときには、保持時間 10~20 分の幅広いピークとともに、15~17 分付近に数本飛び出たピークが生じた。さらに時間経過させると保持時間 10~20 分にわたる幅広いピークになることが確認された。

次に、Si オープンカラムにより精製した黄色化合物 Y1 及び Y2 画分を MeOH に再溶解し、同条件の LC に付し、液色の変化及びピークの出現を経時的に観察した。Y1 の溶液は薄い黄色溶液であったが、時間と共に色調が変化し、薄い水色に変化した。PDA(190-800 nm)により、保持時間 12 分に観察される Y1 のピーク面積の経時的な変化を確認したところ、ほとんど変化しなかった。一方、検出波長 600 nm のクロマトグラムでは保持時間 16 分付近に小さな幅広いピークが時間経過と共に出現した。したがって、黄色化合物 Y1 は青色素の前駆体ではあるが非常に反応速度が遅いと考えられた。一方、Y2 の溶液は橙色の溶液であったが、時間経過と共に青色に変色し、最終的に黒色に近い青色になった。別に PDA(190-800 nm)により、保持時間 14 分に観察される Y2 ピークの経時的な変化を確認したところ、完全に消失した。また、検出波長 600 nm におけるクロマトグラムの経

時的な変化は、ゲニピン及びベンジルアミン 1:1 の混液の挙動と類似していた。したがって、黄色化合物 Y2 は青色素の前駆体であり、生成後、直ちに青色素成分に変化するものと考えられた。

いずれの経時的な観察においても、検出波長 600 nm のクロマトグラム上には青色素成分に由来すると考えられるピークが幅広く観察されたことから、前駆体である Y1 及び Y2 が複雑に重合することによって青色素成分に変化していると考えられた。

2) NMR による Y1 及び Y2 の経時的観察

Y1 及び Y2 は青色素成分の前駆物質であることは明らかである。そこで、その化学構造の変化を追跡するために NMR 測定を行った。予めゲニピンのみを MeOH-d₄ に溶解し、¹H-qNMR 及び ¹³C-NMR 測定した後、当モル量のベンジルアミンを添加し、混合直後からの経時変化を観察した。なお、生成物の濃度変化がわかるように内標(1,4-BTMSB-d₄)を添加し、¹H-qNMR と ¹³C-NMR を 1 セットとして繰り返し測定を行った。その結果、時間の経過と共に NMR 試験液は赤褐色に変化し、ゲニピン由来のシグナルは消失し、Y2 由来のシグナルと考えられるものと共に非常に小さなシグナルが観察されるのみであった。更に 1.8 ヶ月後に測定してもスペクトルパターンに変化はなく、内標(1,4-BTMSB-d₄)に対するシグナル強度が低下しただけであった。この反応液の NMR 試験管を傾けると溶液は赤褐色であるが、ガラス壁面が青色に着色していたことから、沈殿あるいはガラス面への吸着のために、NMR 試験液中に青色素成分はほとんど溶解して存在しておらず、NMR 測定によりシグナルとして観察できなかったと考えられた。この NMR 測定の結果との LC 分析の結果を合わせて考えると、生成する青色素成分は溶解度が非常に低

く、また、分子サイズの大きい複雑な重合物であることが推測された。

3) 青色素 B1 及び B2 の化学構造

ゲニピン及びベンジルアミンを当モル量反応させた溶液を LC 分析したとき、保持時間 10 ~ 20 分付近に青色素成分に由来する幅広いピークが観察される。この幅広いピークには、鋭いピークがいくつか含まれており、更に反応を継続するとこの鋭いピークは徐々に小さくなる。したがって、この鋭いピークはある程度重合したものでそれ以降重合反応が進みにくくなった化合物であると推定した。そこで、このピークに由来する青色素成分の単離を試みた。

ゲニピン及びベンジルアミンの反応液を水で希釈し、HCl 酸性にして酢酸エチルで液-液抽出したところ、酢酸エチル層に溶解する青色素画分が得られた。この画分を Si オープンカラムに付して更に精製した後、prepLC に付し、青色素成分 B1 及び B2 を得た。得られた青色素成分 B1 及び B2 を LC/MS に付し、その精製度を確認した。その結果、青色素成分 B1 は保持時間 16.0 分にシャープなピークを与え、極大吸収波長 604.9 nm、ESI positive モードにおいて m/z 541.2 のイオンを与えるものであった。また、青色素成分 B2 は保持時間 16.4 分にシャープなピークを与え、極大吸収波長 617.9 nm、ESI positive モードにおいて m/z 555.2 のイオンを与えるものであった。更に、青色素成分 B1 及び B2 について、UPLC/TOF-MS により精密質量を測定したところ、ESI positive モードにおいて、B1 が m/z 541.2119、B2 が m/z 555.2299 を与え、B1 に由来する positive イオンの組成式が $C_{35}H_{29}N_2O_4$ (calcd. m/z 541.2127)、B2 に由来する positive イオンの組成式が $C_{36}H_{31}N_2O_4$ (calcd. m/z 555.2284) と推定された。前駆物質 Y2 の組成式 $C_{18}H_{19}NO_3$ と比較すると、B1 が $(Y_2+Y_2)-CH_{10}O_2$ 、B2 が $(Y_2+Y_2)-H_8O_2$ に相当し、いずれも Y2 が 2 分

子脱水結合し、更に共役二重結合を形成した化合物であると推定された。

次に、B1 及び B2 を MeOH- d_4 に溶解し 1H -NMR を測定したところ、ベンジル基に由来するシグナルが 7.4 ppm 及び 5.7 ppm 付近に、メチルエステル基に由来するシグナルが 3.9 ppm 付近に観察されたが、いずれも Y2 の 5, 6 位のシグナルが消失し、更に 1, 3, 7, 10 位のシグナルが 7~9 ppm に低磁場シフトしていると考えられるスペクトルを示した。また、 ^{13}C -NMR では、ベンジル基に由来するシグナルが 128~135 ppm 及び 63 ppm 付近に、メチルエステル基に由来するシグナルが 52 ppm 及び 164 ppm 付近に観察されたが、いずれも Y2 の 5, 6 位のシグナルが消失し、低磁場領域にシフトしていると考えられるスペクトルを示した。次に、B1 について HMQC 及び HMBC 測定を行い、その相関より化学構造を推定したところ、部分構造が推定された。このように B1 は 2 つの Y2 が 6 位と 10 位で脱水縮合後、更に酸化され水素が脱離し、共役二重結合が生成し、共役系が延長された構造をとっていると考えられた。この推定部分構造では 2 位の N 基の電子が化合物全体に非局在化するため、深色化し青色を示す可能性が高く、B1 の部分構造として妥当であると考えられる。また、UPLC/TOF-MS により B1 は m/z 541.2119 を与え、 $C_{35}H_{29}N_2O_4$ の positive イオンの組成式が推定され、この結果は B1 の部分構造のイオンに由来すると考えられる。更に B1 の NMR スペクトルが単純であることから、同じ立体配座の繰り返し構造をとっていると考えられる。一方、B2 は B1 に比べて複雑なスペクトルパターンを示すことから、B1 とは部分的に立体配座が異なる異性体であると推定される。

モデル実験により得られた結果より、青色素成分の生成機構をまとめた。すなわち、前駆体

Y2より中間体モノマーM2及びM3が生成した後、M2とM3が重合を繰り返し、B1やB2のような重合体が形成されると考えられる。重合を繰り返すことによって分子量は大きくなり溶解性は低下すると考えられることから、最終的にはある一定の範囲の重合度で反応が停止すると思われる。

[アンモニア処理ラック色素]

1) アンモニア処理ラック色素のLC/MS分析

ラック色素及びアンモニア処理ラック色素について色調のpH依存性について検討したところ、ラック色素はpHが高くなるにつれて、橙色から紫色に変化した。一方、アンモニア処理ラック色素はpHに依存せず、紫色だった。

次にLC/MS分析を実施したところ、ラック色素及びアンモニア処理ラック色素において、それぞれ5つのピークが確認された(ピーク1~5, ラック色素; ピーク1~5, アンモニア処理ラック色素)。ピーク1~5の吸収スペクトルが490 nm付近に極大吸収波長を示したのに対して、ピーク1~5のそれは、550 nm付近に二つの極大吸収波長を示した。

各ピークに由来するマススペクトルを確認した結果、ピーク1, 2, 4及び5は、それぞれm/z 494, 538, 495及びm/z 536を与える脱プロトン分子[M-H]⁻のピークが強く観測され、それぞれをlaccaic acid E, C, B及びAと同定した。ピーク3に由来するマススペクトルには、m/z 359, 315及びm/z 271を与えるピークが観測された。これは、岡らがラック色素をLC/MS/MS分析した際に観測した、anthraquinonedicarboxylic acid誘導体に由来するm/z 359 [M-H]⁻, 315 [M-H-CO₂]⁻及びm/z 271 [M-H-2CO₂]⁻と一致していることから、ピーク3はanthraquinonedicarboxylic acid誘導体と推定した。

一方、ピーク1~5に由来するm/zは、それぞれピーク1~5に対して1少ない値を示

した。これは、既に杉本らが報告したように、カルミン酸をアンモニア処理した際、アントラキノ骨格の4位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換し、分子量が1Da減少する結果と一致し、すなわち、ピーク1~5は、laccaic acid A, B, C, E及びanthraquinonedicarboxylic acid誘導体の4位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換した色素化合物と推測された。

2) Laccaic acid Cの構造解析

Laccaic acid及びアンモニア処理を施して得られる誘導体の化学構造を明らかにすることにした。しかし、現在はlaccaic acid A, B, C, Eの標準試薬は市販されていない。そこで本研究では、ラック色素からlaccaic acidを単離・精製した後、そのアンモニア処理誘導体をNMR分析に付すことで構造を明らかにする。

ラック色素をODSオープンカラムに付し、メタノールの濃度をステップワイズに上げて溶出した際、laccaic acid Cが他のlaccaic acidと容易に分離した。そこで、laccaic acid Cを含む画分を集めた後、分取LC/MSでさらに精製したところ、1.700 mgのlaccaic acid Cが得られた。500 mgのlaccaic acid Cを600 µLのDMSO-d₆に溶解し、NMR分析に付した。

¹H-NMRスペクトルには、芳香環に由来するH 6.92, 7.04, 7.13及びH 7.56のプロトンシグナルとH 3.11及びH 4.12のプロトンシグナルが観測された。¹³C-NMRスペクトルには、25のカーボンシグナルが観測された。HMQC分析において、H 3.11, 4.12, 6.92, 7.04, 7.13及びH 7.56は、それぞれ、C 35.36, 54.05, 116.48, 132.83, 130.82及びC 115.86との相関が観測された。また、HMBC分析では、H 6.92とC 119.36及びC 125.0, H 7.04とC 35.36, 125.55, 130.82及びC 155.00, H 7.13とC 132.83及びC 155.00,

H 7 . . 56 と C 118 . 32 , 121 . 23 , 168 . 54 , 183 .12 及び C 186 .75 の相関が観測された . いずれのプロトンと相関が得られなかった 10 個のカーボンシグナルについては , 2D-INADEQUATE 分析で 13C-13C の相関を観測し , 帰属することにした . その結果 , 次に示す 13C-13C の相関が観測された .

C121 . 23-140 . 17-(169 . 53)-118 . 32-136 . 53-(115 . 86)-(169 . 65)-186 . 75-118 . 83-(104 . 90)-(183 . 12)-148 . 50-153 . 12-122 . 55-(158 . 93)-(104 . 90)-119 . 36-(155 . 00)- (116 . 48)-132 . 83-125 . 04-130 . 82 及び C 54 . 05 - 170 . 76 .

NMR 分析及び LC/MS 分析の結果から , 化学構造が導かれ , 既に報告されている laccaic acid C の化学構造と矛盾のない結果が得られた

13) .

3) 4-Aminolaccaic acid C の構造解析

C-2 で単離した laccaic acid C 800 mg をアンモニア処理し , LC/MS 分析に付した結果 , その保持時間 , 吸収スペクトル及びマススペクトルは , ピーク 2 のそれと一致した . 次に , アンモニア処理 laccaic acid C を NMR 分析に付した . 1H-NMR スペクトルには , 芳香環に由来する H 6 . 81 , 7 . 05 , 7 . 32 及び H 7 . 57 のプロトンシグナルと H 2 . 99 , 3 . 11 及び

H 3 . 83 のプロトンシグナルが観測された . 13C-NMR スペクトルには , 25 のカーボンシグナルが観測された . HMQC 分析において , H 3 . 83 , 6 . 81 , 7 . 05 , 7 . 32 , 及び H 7 . 57 は , それぞれ , C 54 . 99 , 118 . 12 , 129 . 06 , 133 . 78 及び C 113 . 88 との相関が観測された . また , H 2 . 99 及び H 3 . 11 は C 35 . 78 との相関が観測された . HMBC 分析では ,

H 6 . 81 と C 122 . 59 , 124 . 83 及び C 155 . 85 , H 7 . 05 と C 35 . 78 , 125 . 59 , 133 . 78 及び C 155 . 85 , H 7 . 32 と C 35 . 78 , 116 . 08 , 129 . 06 及び C 155 . 85 , H 7 . 57 と C 119 . 62 , 138 . 33 , 167 . 20 , 169 .

41 , 177 . 15 及び C 180 . 00 の相関が観測された . 2D-INADEQUATE 分析では次に示す 13C-13C の相関が観測された .

C 138 .66-119 .99-167 .20-113 .88-138 .33-119 .62- 138 .66 , C 180 .00-104 .76-(144 .11)-102 .00-177 .15 , C 116 .08-122 .59-133 .78-124 .83 及び C 129 .06-118 .12-155 .85 .

残りの4つのカーボンシグナル(C 162 .84 , 164 .43 , 170 .59 及び C 171 .07)については , laccaic acid C のケミカルシフトから推定して , 帰属した .

Laccaic acid C と同じく , アンモニア処理 laccaic acid C もカーボンと隣接する7つのプロトン及び 25 のカーボンを有していた . このことから , laccaic acid C と比べてアンモニア処理 laccaic acid C が 1Da 少ない分子量を示すことは , アンモニア処理により , laccaic acid C のヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換したためと推測された . そこで , アミノ基(-NH₂)の置換位置を明らかにする目的で , laccaic acid C を 15NH₄OH を用いてアンモニア処理し , NMR に付した . 14N のスピン量子数が 1 なのに対して , 15N のそれは 1/2 であるため , 13C-15N のカップリングが生じる 16) . 実際には , 13C-NMR スペクトルには 25 のカーボンシグナルが観測され , そのうち 4 位のカーボンシグナルは , ダブルレット(JCN = 15 . 41 Hz)のシグナルとして観測された . 以上の結果から laccaic acid C をアンモニア処理して得られる誘導体は , 4-aminolaccaic acid C であることを明らかにした .

Laccaic acid A , B 及び E のアントラキノン骨格に結合したヒドロキシ基の位置は , laccaic acid C のそれと同じである . また , LC/MS 分析から推定された anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体も , アンモニア処理により laccaic acid(A , B , C 及び E)と同様に , 分子量が 1 少なくなること , 極大吸収波長が長波長側にシフ

トすることから, laccaic acid(A, B, C 及び E) と同じアントラキノン骨格を持つと推測される。以上の理由から, 本研究ではピーク 1, 3, 4 及び 5 を, それぞれ, 4-aminolaccaic acid E, 4-aminoanthraquinonedicarboxylic acid 誘導体, 4-aminolaccaic acid B 及び 4-aminolaccaic acid A と結論した。

「カンゾウ油性抽出物」:

1) Licochalcone B の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で yellow であった。LC/MS では, KZ34 frc11-22b と保持時間 (R.T.), UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH₃CN (1.0 mL/min) で R.T.; 20.22 min, UV; λ_{\max} 368 nm, MS; m/z 285 [M+H]⁺, m/z 287 [M-H]⁻ であった。

NMR 測定は, acetone-*d*₆ および methanol-*d*₄ に溶解させて行った。また, 既報¹⁾の文献値(溶媒: methanol-*d*₄)をもとに帰属し licochalcone B と同定した。

2) Glabridin の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で pearl であった。LC/MS では, KZ34 frc37-22b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 50% CH₃CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 23.42 min, UV; λ_{\max} 228, 281 nm, MS; m/z 325 [M+H]⁺, m/z 323 [M-H]⁻ であった。

NMR 測定は, acetone-*d*₆ に溶解させて行った。市販標品のシフト値と比較し帰属した。

3) Kanzonol X の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で brown であった。LC/MS では, KZ34 frc44, 45-29b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 50% CH₃CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 49.52 min, UV; λ_{\max} 207, 283 nm, MS; m/z 395 [M+H]⁺, m/z 393 [M-H]⁻ であった。

NMR 測定は, acetone-*d*₆ に溶解させて行った。また, 既報の文献値(溶媒: acetone-*d*₆)をもとに帰属した。

4) Hispaglabridin A の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で brown であった。LC/MS では, KZ34 frc54-24c と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 55% CH₃CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 56.95 min, UV; λ_{\max} 229, 280, 293 nm, MS; m/z 393 [M+H]⁺, m/z 391 [M-H]⁻ であった。

NMR 測定は, acetone-*d*₆ に溶解させて行った。また, chloroform-*d* に再溶解させて測定した。chloroform-*d* 中では, 難溶であり, C-7, C-9, C-2', C-4' の 4 級炭素が検出されなかったものの, 既報の文献値(溶媒: chloroform-*d*)をもとに帰属し hispaglabridin A と同定した。

5) MW 354 の化合物の同定

LC/MS では, KZ34 frc44, 45-21b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, MS; m/z 355 [M+H]⁺, m/z 353 [M-H]⁻ であった。

NMR 測定は, acetone-*d*₆ および chloroform-*d* にそれぞれ溶解させて行った。また, 既報の文献値(溶媒: chloroform-*d*)をもとに帰属し 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin と同定した。

6) MW 322 の化合物の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で white であった。LC/MS では, KZ34 frc32-33b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 30% CH₃CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 181.13 min, UV; λ_{\max} 214, 248, 284, 295, 324 nm, MS; m/z 323 [M+H]⁺, m/z 321 [M-H]⁻ であった。

Glabrene は, 既報の文献値(溶媒: methanol-*d*₄: chloroform-*d*=1:1)をもとに NMR 測定を行った。その結果, ¹H NMR で -0.07 ppm

の誤差, ^{13}C NMR で 0.8 ppm の誤差で帰属できた。なお, 2次元 NMR による帰属も一致し glabrenec(cas no. 60008-03-9)と同一した。
7) MW 358 の化合物の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で brown であった。LC/MS は, KZ34 frc25-28b と R.T., UV および MS スペクトル が一致した。その分析値は, C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 35% CH_3CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 37.65 min, UV; λ_{max} 230, 290 nm, MS; m/z 359 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 357 $[\text{M}-\text{H}]^-$ であった。

NMR 測定は chloroform- d に不溶であったため, methanol- d_4 および acetone- d_6 に溶解させて行った。その結果, 既知化合物であったため, 既報の文献値(溶媒: acetone- d_6)をもとに帰属し cas no. 938190-35-3 の化合物であると同一した。

8) MW 370 の化合物の同定

物理化学的性状は, 乾燥状態で yellow であった。LC/MS の分析値は, NAP カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH_3CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 114.07 min, UV; λ_{max} 255, 364 nm, MS; m/z 371 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 369 $[\text{M}-\text{H}]^-$ であった。なお, この分析値は, 既報の LC/MS の UV および MS の値と一致した。

NMR 測定は chloroform- d に難溶であったため, methanol- d_4 および acetone- d_6 に溶解させて行った。以上の結果, 既知化合物であった。よって, 既報の文献値(溶媒: acetone- d_6)をもとに帰属し cas no. 905708-40-9 の化合物であると同一した。

9) 単離・精製画分の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)

単離・精製画分の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)測定の結果では, いずれの画分も活性が認められた。

今後, 各画分に含まれる単離成分の純度を ^1H -qNMR 等の手法により確認することで, 各

成分の単位量当たりの活性(比活性)を算出することができると考えられる。

「クローブ抽出物」中の eugenol の定量

昨年度確立した内部標準を DMSO- d_6 溶液として加えて測定する方法で, eugenol の 6 位 H シグナル(6.33 ppm)は独立しており, 「クローブ抽出物」のスペクトルにおいても他の夾雑物のシグナルとの重なりも観測されず, このプロトコールで eugenol が測定できることを改めて確認した。

試料中の eugenol の含有量の測定では, まず, eugenol 標準品の純度を測定したところ 92% 程度であった。「クローブ抽出物」の eugenol の含有率は 26.56%, 28.81% だった。

次に, HPLC での定量では, 今回の条件で eugenol が 280 nm において良好なピークとして検出できることを確認した。 ^1H -qNMR 法を用いて求められた純度をもとに eugenol 溶液を順次希釈し HPLC のピーク面積を求めて検量線を作成した。その検量線も極めて良い直線性を示した。前年度に確立した ^1H -qNMR による eugenol の定量法で, 試料の eugenol を含む試料は acetone- d_6 に溶解し, 認証標準物質の 1,4-BTMSB- d_4 は DMSO- d_6 に 2.5 mg/mL で溶解し, 両者を 5:1 で混合して測定に供するという方法で問題なく簡便に eugenol の 6 位 H のシグナル面積の測定ができた。よって, この測定法が利用できることを改めて確認した。

HPLC においては, ^1H -qNMR で値付けをした eugenol 標準品溶液を用いた定量が可能であることも確認できた。また, 「クローブ抽出物」中の eugenol の定量値が ^1H -qNMR における定量値と HPLC の定量値との比較では, HPLC での値がやや低かったが, ほぼ一致していることから, ^1H -qNMR が既存の定量法に置き換えることのできる簡便な手段であることを確認できた。同時に, 万が一, 測定試料の

¹H-NMR スペクトルで eugenol の 6 位 H にオーバーラップするシグナルがある場合、¹H-qNMR によって標準溶液の純度の値付けを行い、その標準溶液を用いて HPLC 法による定量をすることで、間接的な絶対定量が可能なることも確認できた。

¹H-qNMR 法は、このように揮発性で標準品の純度管理が難しい eugenol の定量を行う「クローブ抽出物」の品質管理でも極めて有効な手段であることを改めて確認した。

「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量
Carthamin の単離では、「ベニバナ赤色素」に相当する製品から TLC 上で 1 spot の状態の carthamin を単離することができた。その NMR スペクトルを先の文献と比較して carthamin であることを確認した。

また、HPLC の条件検討では、酢酸を添加した MeOH-水のグラジエントの条件で、carthamin が良好なピークを与えることを確認した。まだ定量方法の確立には至っていないが、標準試料の単離方法を確立できた。標準試料として正確に秤量できるだけの物質量の確保を行っている。

定量方法の確立に先立って HPLC の条件設定を行ったが、carthamin のピークを良好に検出できる条件を見つけることができたので、少なくとも ¹H-qNMR による標準品溶液の値付け。その標準溶液を基準とした HPLC 分析というプロトコールの実施に目処をつけたと言える。Carthamin 標準溶液の ¹H-qNMR による値付けは先行例があるので、純度が極めて低く ¹H-qNMR では直接定量が困難な試料での定量も目処をつけた。

「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

文献記載の方法で生薬コウカから safflor yellow 類の単離を試みたが、純度が低いと思われる粉末が得られたのみであった。

操作が簡便すぎることから、花卉に含まれる糖類などがまだ多く残っていることが考えられる。現在精製途上で単離には至っていない。Safflor yellow 類には幾つかの化合物があるので、どの化合物を定量の対象とすべきかについても、今後考える必要がある。

3. 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) トロロックスの IC₅₀

酸化防止剤の抗酸化力価評価においてトロロックスの IC₅₀ は TEAC 算出の基礎となる重要な値である。そこで、一般試験法案に基づき、トロロックスの IC₅₀ の算出に関する手順について繰り返し試験 (n = 8) を実施し、その再現性を調べた。その結果、トロロックスの IC₅₀ の平均は 59.3 ± 0.77 μg/mL であり、変動係数は 1.3% となった。この結果より、一般試験法案によるトロロックスの IC₅₀ の算出に関しての再現性は問題ないと判断した。

2) 酸化防止剤チャ抽出物の力価評価

酸化防止剤 19 種類 (サンフェノン EGCg, サンフェノン 90S, サンフェノン BG-3, カメリアエキス 30S, チャ抽出物, 茶抽出物 40, 茶抽出物 70, ポリフェノン PF, ポリフェノン 70S, ポリフェノン G, サンフード 100, テアビゴ, カメリア 50EX, d-δ-トコフェロール, 生コーヒー豆抽出物, ローズマリー抽出物, ヤマモモ抽出物, 酵素処理イソクエルシトリン, 酵素処理ルチン) を試料とし、上記の一般試験法案の手順に従い測定を行った。いずれの試料もエタノール (99.5) に溶解し、希釈もエタノール (99.5) で行った。

測定の結果、19 種類の酸化防止剤全てについて IC₅₀ と TEAC を求めることが可能であった。このことから、一般試験法案の酸化防止剤への適用性は問題ないと判断した。また、TEAC の変動係数は 0.28 ~ 7.1% となった。特に、サンフェノン EGCg を除く 18 試料ではそ

の変動係数が4.3%以下となり非常に高い再現性を示した。

4. 日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討：

1) カピリン定量用内標準物質の選択

HPLC/PDA 分析条件下におけるカピリン定量用内標準物質を選択した。定量用内標準物質としては、安価でコンスタントに入手可能で、試薬メーカーが記載する純度値と¹H-qNMRでの純度値に大きな差がないと予想されるものを考慮して、計13種の市販試薬を候補に挙げた。これらの市販試薬を、HPLC/PDA分析条件に付し、得られたHPLCクロマトグラムを、カワラヨモギ抽出物のそれと比較したところ、ヘプチルパラベンがカワラヨモギ抽出物中のカピリンおよび夾雑物との分離が良好であった。次に、ヘプチルパラベンの市販試薬がカピリンの定量用内標準物質として適しているのか検証を行なった。4社4製品のヘプチルパラベン市販試薬を¹H-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¹H-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、メーカー間純度の差や表示純度との差をあまり気にせずに定量用内標準物質として使用できることが明らかとなった。

2) ヘプチルパラベンに対するカピリンのRRFの算出

ヘプチルパラベンとカピリンを混合したRRF算出用試料液を¹H-qNMRに付したところ、ヘプチルパラベンに由来するH-2+H-6およびH-3+H-5の2つのプロトンシグナルは、カピリンのH-2+H-6、H-4およびH-3+H-5の3つのプロトンシグナルと良好に分離しており、これらのプロトンシグナルから相対積分値を算出した後、各シグナルが由来するプロトン数で

除し、ヘプチルパラベンに対するカピリンのモル比の平均を求め、式1に代入した。各RRF算出用試料液中の平均モル比の値の相対標準偏差(RSD)は0.56%以下であり良好であった。

次にRRF算出用試料液を移動相で希釈しHPLC/PDAに付した。ヘプチルパラベンおよびカピリンの極大吸収波長は、256nmおよび284nmを示したため、ヘプチルパラベンのピーク面積を256nmで求め、カピリンのピーク面積は284nmで求めることにした。ピーク面積は、3社3製品のカラムを用いて求め、式1に代入することでヘプチルパラベンに対するカピリンのRRFを算出した。3社3製品のカラム(各カラム測定n=3)での平均RRFは1.31、RSD1.25%であり、カラムの影響を受けにくい堅牢な値であることが明らかとなった。したがって、RRFを適用したカピリン定量法には、ヘプチルパラベンに対するカピリンのRRF値として1.31を用いることとした。

3) RRFを適用したHPLC/PDAによるカピリンの定量

ヘプチルパラベンと製品1~3を精密に秤量したHPLC/PDA分析用試料液をHPLC/PDAに付し、カワラヨモギ抽出物製品中のカピリンの定量を行なった。秤量値およびピーク面積を求め、式2に代入することでカピリンの含量を算出した。また、算出された含量について、昨年度報告された、カピリン標準品(非売品)の検量線(¹H-qNMR純度で校正)から算出された含量と比較し、本研究で定めたRRFの評価を行なった。両定量法で算出された含量は、概ね一致しており、その差は0.002%以下であったため、本法で用いたRRF値が適切であるものと判断された。

5. 酵素の基原の解析法の確立：

1) 「細菌」及び「放線菌」に属す基原

第9版公定書には、「細菌」由来の既存添加物酵素として86基原が収載されている。基原

別による品目数を見てみると、Bacillus 属 16 品目、次いで Bacillus subtilis が 11 品目で最も多かった。冒頭で述べたように、Bacillus 属で定義されると、セレウス菌 (B. cereus) や炭疽菌 (B. anthracis) など基原として使用可能と解釈されることが懸念されるため、種まで明確にする必要がある。「放線菌」(広義には細菌)由来の既存添加物酵素では、25 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、Streptomyces thermoviolaceus と Streptomyces violaceoruber が共に 19 品目で最も多かった。「細菌」及び「放線菌」は DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が 70% 以上を示す菌株同士を 1 つの菌種と定義している 2)。16S rDNA の全長配列(約 1,500 bp)の相同値が 98.7% 以上の場合には、DNA-DNA 分子交雑試験の相同値が 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。なお薬局方では 16S rDNA の上流約 800 bp または下流 800 bp の配列を指標にして、データベースと照合し、90% 以上合致する上位にランクされた菌種を同一種又は近縁種と判定する。そこで、属及び sp. で定義された基原を除く「細菌」56 基原と「放線菌」19 基原について、16S rDNA 配列が国際塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。「細菌」では、56 基原中 52 基原の 16S rDNA 配列が登録されていた。16S rDNA 配列が登録されていなかった 4 基原のうち、Bacillus coagulans J4 は、株レベルでの定義となっていた。16S rDNA 配列を指標にした同定法では株レベルでの分類には、分解能が低く対応できない。従って、トレサビリティの得られない学名と判断し、「グルコースイソメラーゼ」の基原 Bacillus coagulans と同様に、種レベルまでの定義とするのが望ましい。「放線菌」についても GenBank に 16S rDNA が登録されているのか調査したところ、19 基

原中 17 基原が登録されていた。16S rDNA 配列が登録されていなかった 2 基原のうち、「アスコルビン酸オキシダーゼ」の基原 Eupenicillium brefeldianum は「放線菌」ではなく、「糸状菌」に分類されるため、第 9 版公定書の「アスコルビン酸オキシダーゼ」の定義を一部修正する必要がある。

Thermomonospora viridis はトレサビリティの得られない学名であった。

2) 「酵母」に属す基原

第 9 版公定書には、「酵母」(広義には真菌)由来の既存添加物酵素として 10 基原が収載されている。薬局方では ITS1 配列を指標にして、データベースと照合し、90% 以上合致する上位にランクされた菌種を同一種又は近縁種と判定する。また、日本薬学会協定衛生試験法では、26S rDNA の部分塩基配列 (D1/D2 領域) を指標にして、99% 以上の類似度を示した菌種を同一種と同定する 4)。杉田らは、「酵母」Trichosporon 属 (17 種 5 変種) を用いて、同種の場合、DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が 80% 以上であり、その際に与えられる ITS1 及び ITS2 領域 (5.8S rDNA と 26S rDNA 間のスペーサー領域) の相同値が 99% 以上であることを報告している。衛生試験法では、杉田らの報告を引用し、ITS 領域を指標にしても同等の結果が得られるとしている。そこで、属で定義された基原を除く 6 基原について、ITS 領域の配列 (ITS1 及び ITS2 を含む) が GenBank に登録されているのか調査した。その結果、6 基原の ITS 配列が登録されていることを確認できた。

3) 「糸状菌」及び「担子菌」に属す基原

第 9 版公定書には、「糸状菌」由来の既存添加物酵素として 80 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、Aspergillus niger が 25 品目、次いで Aspergillus oryzae が 16 品目で最も多かった。「担子菌」由来の

既存添加物酵素では，11 基原が収載されている。「糸状菌」及び「担子菌」は，広義には真菌にあたり，同種間における任意の指標遺伝子の相同値についての知見は少ないが，多くの実験データに基づき，「D1/D2 領域又は ITS 領域の相同値が 99%以上のとき，同種とみなす」ことが支持されている．そこで，属及び sp. で定義された基原を除く「糸状菌」65 基原と「担子菌」6 基原について，ITS 配列が GenBank に登録されているのか調査した。「糸状菌」では 65 基原中 57 基原の ITS 配列が登録されていた．ITS 配列が登録されていなかった 8 基原のうち，4 基原は D1/D2 領域の配列も登録されていなかった．また残る 4 基原はトレーサビリティの得られない学名であった．「担子菌」では 6 基原中 6 基原の ITS 配列の登録が確認できた．

4) 16S rDNA，ITS 配列以外の指標遺伝子

16S rDNA または ITS 配列を指標とした場合でも一義的に微生物種を同定することができないことも報告されている．特に「糸状菌」の *Aspergillus* 属，*Penicillium* 属では，異なる種間でも ITS の相同値が 99%以上となることもあることから，ITS 配列は種の絞り込みとして利用し，実際の同定は，別のタンパク質遺伝子を利用する．*Aspergillus* 属，*Penicillium* 属では -チューブリン遺伝子やカルモジュリン遺伝子が有効とされており，データベースも拡充されている．このことから，DNA を用いた種の再同定を実施するにあたり，合理性があれば，16S rDNA，ITS 配列以外の遺伝子も指標とするのが科学的に妥当である．

5) 相同値の目安及び学名変更後の基原の使用是非の判断基準

日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」を参考に，「DNA を指標にした既存添加物酵素の基原同定法（仮称）」を酵素の基原の判断基準の仮案として別紙に示した。「細菌」

「放線菌」については，16S rDNA の全長配列を指標として，データベース上の塩基配列と 98.7%以上の相同値を示したとき，その塩基配列に由来する微生物種と同種と見なす．「酵母」「糸状菌」「担子菌」については，ITS1 配列を指標としてデータベース上の塩基配列と 99%以上の相同値を示したとき，その塩基配列に由来する微生物種と同種と見なす．なお，合理性があれば，16S rDNA 及び ITS1 以外の遺伝子配列も指標にして良いものとする．

既存添加物名簿作成から 20 年が経過しているが，本研究で提示した案，すなわち，DNA を指標にした同定法により，現時点での科学的に妥当と考えられる基原の学名を第 10 版公定書に反映可能であると考えられる．学名の設定根拠は，指標遺伝子配列及び国際塩基配列データベースをよりどころとするため，例えば，第 10 版公定書で学名を A と設定したが，最新の研究により学名が B となった場合でも，国際塩基配列データベースとリンクする NCBI Taxonomy から A と B の関係を確認できれば，トレーサビリティを確保していると判断し，その菌株の使用を認めるということが説明でき，そして，必要に応じて，学名 B は第 11 版公定書に反映することができるように整理した案である．ここで示した案には議論されるべきことが多く残されており，今後も検討が必要である．

E. 結論

2. 含有成分解析と成分規格試験法の検討：

既存添加物名簿収載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物製品中の含有成分について検討した結果，これまで明らかにした 14 化合物に加え，新たに 5 種の化合物〔vanillin，3-O-trans-caffeoyl-4-O-trans-feruloylquinic acid，4-O-trans-caffeoyl-

5-O-trans-feruloylquinic acid ,
trans-feruloyl-L- tryptophan ,
trans-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester)を
単離することができた .今回の結果を加えたこ
れまでの検討から ,本添加物の主成分は
caffeine 及び chlorogenic acid であり ,また
DPPH ラジカル消去活性及び SOD 様活性を指
標とした酸化防止能の結果から ,有効成分は
chlorogenic acid をはじめとするカフェー酸誘
導体であることが示唆された .

カキ色素の品質規格作成に供する化学的検
討として ,製品中の成分精査を行った .HPLC
でほぼ 1 ピークのフラクションを得ることが
できたが ,機器分析による構造解析を行ったと
ころ夾雑物が認められ ,今後さらなる精製を計
画する .一方 ,本製品には構造不特定の縮合型
タンニン類が豊富に含まれることが示唆され
たことから ,高分子領域の分子量について
GPC により測定したところ ,重量平均分子量
約 20 万であることが明らかとなった .今後こ
れらの構造的特徴についても検討が必要であ
る .

モウソウチク抽出物製品について HPLC 分
析を行った結果 ,3 製品間で共通の成分が観察
され ,今回明らかにした成分が指標成分の候補
となり得ることが示唆された .一方で ,今回の
条件でピークが検出されない製品もあり ,製品
間でのばらつきが認められた .また ,既存添加
物名簿において主成分とされる

2,6-dimethoxy-1,4- benzoquinone は今回の測
定条件ではいずれの製品中にもほとんど検出
されなかった .

既存添加物ゴマ油不けん化物の定量分析用
セサミンおよびセサモリンは ,HSCCC により
簡便かつ安価に単離精製できることが判明し
た .本標準品は ,ゴマ油不けん化物の確認試験
のみならず ,様々なゴマ油由来の製品に応用可
能と考えられる .

既存添加物ベニコウジ色素とベニコウジ黄
色素の成分規格案について ,主成分も含めて再
検討する必要性が挙げられた .そのためには ,
今後 ,他の流通品も含めて ,自主規格案との比
較検討を進める必要があると結論付けた .ベ
ニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は ,培地
条件や抽出条件により ,全く色彩成分が異なり ,
明確な主成分を同定し ,それに基づく規格基準
が必要と考えられた .

ベニコウジ色素 : 赤色の主な成分は ,HPLC
による評価は困難であり ,今後 ,HSCCC など
を利用した主成分の同定が必要であり ,それに
基づく ,試験の提案も求められる .ベニコウジ
黄色素 : 主にキサントモナシン A およびキサ
ントモナシン B が主成分と想定される .しか
しながら ,いずれの標準品も入手困難であるた
め ,今後 ,その含量分析に関して ,検討する必
要性がある .

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 .昨年度は ,青色素の前駆体と
考えられる黄色素 Y1 及び Y2 の構造を明らか
とした .本年度は引き続き ,クチナシ青色素の
色素生成メカニズムを明らかとするため ,モデ
ル実験下 ,色調変化の観察と共に青色素 B1 及
び B2 を単離し ,その構造を推定した .その結
果 ,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'が生成した .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 .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。

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ン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 laccaic acid A, B, C, E 等複数の成分から構成される。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。これは、ラック色素中の主色素成分 laccaic acid A, B, C 及び 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 及び E に起因することを明らかにした。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必要と考えられた。また、食品の製造過程において、ラック色素から意図せずに 4-aminolaccaic acid 類が産生される可能性は否定できない。この点については、耐酸性カルミン(4-aminocarminic acid)と同様に注意が必要であり、4-aminolaccaic acid 及び 4-aminocarminic acid が食品または添加物から検出された際、それらが意図せず産生されたものなのかの判断基準を整理しておく必要があると思われる。

「クローブ抽出物」中の eugenol 定量では、認証標準物質の DSS-d₆ を内部標準として用い、この DMSO-d₆ 溶液を測定試料の acetone-d₆ 溶液とを混合して NMR を測定し、eugenol の 6 位 H のシグナル (6.33 ppm) を利用することで測定試料中の eugenol が定量できることがわかった。この数値は、既存の定量法である HPLC 法と良い一致を示した。これらのことから ¹H-qNMR 法が、既存の方法に変わり

うる、簡便で迅速な「クローブ抽出物」の品質管理法になりうることを示すことができた。

「ベニバナ赤色素」の本体である carthamin の HPLC 定量条件の設定ができたため、¹H-qNMR では定量が困難な場合の代替手段として標準溶液の値付け HPLC 法を用いた定量という組み合わせでの絶対定量法の確立の目処をつけた。Carthamin の標準試料の測定に関しては先行例もあることから、引き続き、実際に ¹H-qNMR で「ベニバナ赤色素」が定量可能か、「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量には HPLC との組み合わせが必要かについて検討を行う。

「ベニバナ黄色素」に関しては、個々の safflor yellow 類の単離を引き続き行い、それぞれの ¹H-NMR スペクトルにおいて、独立したシグナルが得られるか、すなわち ¹H-qNMR の実施が可能かの確認をとりあえずの目標とする。

G. glabra 由来のカンゾウ油性抽出物流通製品において抗酸化活性寄与率の高かった 8 成分の単離・精製を行った。これらの単離・精製物は、LC/MS 分析で、各抗酸化活性物質の指標となる分画物試料と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。各単離・精製物構造解析結果から、未同定であった 4 成分の同定を行った。その結果、A 成分 (MW 322, 354, 358, 370) の化合物を同定した。なお、これらの同定成分の内、MW 370 および MW 358 の化合物は、これまでの報告において 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、今回のこれらの単離画分は抗酸化活性を示した。また、既に市販標品や単離標品との比較や LC/MS/MS により同定していた 4 種の抗酸化成分 (glabridin, licochalcone B, kanzonol X および hispaglabridin A) 相当画分についても単離・精製を行い、NMR 測定を行ったところ、同定に問題ないことが確認された。

カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性に glabridin だけではなく, licochalcone B, kanzonol X, hispaglabridin A, 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin および glabrene 等多数の化合物が関与していることが示された。

3. 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

DPPH 法に基づく一般試験法案が酸化防止剤の力価評価において広い適用性と高い再現性を示すことが明らかとなった。今後は, 各種酸化防止剤に関する個別の手順の作成を目指す。

4. 日持ち向上剤や増粘剤等の規格試験法の検討

本研究では, カワラヨモギ抽出物の有効成分であるカピリンの定量法を検討した。本研究で算出されたヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF を適用して HPLC/PDA によるカワラヨモギ抽出物中のカピリンの定量を行なった。算出された定量値は, 純度 99.5% のカピリンの量値と殆ど差はなく (0.002% 以下), 検量線から求めた値を真値とすると, RRF を用いた定量法の真度は 91~94% であった。本研究において確立した 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。

5. 酵素の基原の解析法の確立:

第 9 版公定書に記載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について, 16S rDNA または ITS 配列が国際塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。その結果, 「細菌」52/56 基原, 「放線菌」17/19 基原, 「酵母」6/6 基原, 「糸状菌」57/65 基原, 「担子菌」6/6 基原の配列が登録されていた。配列が登録されていなかった基原の中には, トレーサビリティの得られない学名, すなわち公

定書に記載する基原としてふさわしくない学名であるものが散見された。

微生物などの学名が流動的である基原に対して規格を整備するためには, 統一された方法, 指針に基づいて情報を整理する必要がある。本研究で提示する同定法を実施すると, 第 10 版で基原の大幅な改正が求められ, さらにその後も最新の研究により学名が変更となる基原もでてくることが予想されるが, これについては NCBI Taxonomy から得られる旧名と現行名を確認することで, 基原の使用の是非を判断するなど, 今後, 一定の判断基準を設定しておく必要があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Ueda T., Okumura, T., Tanaka, Y., Shimamura, T., Ukeda, H., Development of a new electrochemical evaluation method for antioxidant activity based on the redox properties of polyoxometalates and its application to the evaluation of antioxidant capacity of beverages, *Analytical Sciences*, **32**, 825-830 (2016).
- 3) 山内良子, 石井佐弥, 草場悠里, 小林弘司, 島村智子, 受田浩之, 穂山浩, 石川洋哉, 酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH ラジカル消去能測定におよぼす反応溶媒の影響, *日本食品保蔵科学会誌*, **42**, 189-196 (2016).

- 4) Enkhtuya, E., Shimamura, T., Kashiwagi, T., Ukeda, H., Antioxidative Constituents in the Leaves of *Paeonia anomala* Grown in Mongolia, *Food Science and Technology Research*, **23**, 63-70 (2017).
- 5) 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,日本食品化学会会誌,印刷中.
- 6) Tanaka, R., Shibata, H., Sugimoto, N., Akiyama, H., Nagatsu, A., Application of a quantitative ¹H-NMR method for the determination of paeonol in Moutan cortex, Hachimijogan and Keishibukuryogan, *Journal of Natural Medicines* (2016), **70**(4), 797-802.
- 8) Tanaka, R., Inagaki, R., Sugimoto, N., Akiyama, H., Nagatsu, A., Application of a quantitative ¹H-NMR (¹H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen, *Journal of Natural Medicines*, **71**, 315-320 (2017).
- 9) Takahashi, M., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Takeuchi, H., Nakagawa, K., Akiyama, H., Sato, K., Inoue, K. Determination and purification of sesamin and sesamol in sesame seed oil unsaponified matter using reversed-phase liquid chromatography coupled with photodiode array and tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.*, **39**, 3898-3905 (2016).
- 10) 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 extracts of *Glycyrrhiza uralensis* roots produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems *J. Nat. Med.*, **71**, 265-271 (2017).
- 11) Amakura, Y., Yoshimura, M., Morimoto, S., Yoshida, T., Tada, A., Ito, Y., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Akiyama, H., Chromatographic evaluation and Characterization of Components of Gentian Root Extract Used as Food Additives, *Chem. Pharm. Bull.* **64**, 78-82 (2016).
- 12) Todoroki, K., Nakamura, M., Sato, Y., Goto, K., Nakano, T., Ishii, Y., Min, J.Z., Inoue, K., Toyooka, T., 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride as an Enantioseparation Enhancer for Chiral Derivatization-LC Analysis of D- and L-Amino acids., *Chromatography*, **37**, 23-28 (2016).
- 13) Inoue, K., Tanada, C., Hosoya, T., Yoshida, S., Akiba, T., Min, J.Z., Todoroki, K., Yamano, Y., Kumazawa, S., Toyooka, T., Principal component analysis of molecularly-based signals from infant formula contaminations using LC-MS and NMR in foodomics., *J. Sci. Food Agric.*, **96**, 3876-3881 (2016).
- 14) Inoue, K., Miyazaki, Y., Unno, K., Min, J.Z., Todoroki, K., Toyooka, T., Stable isotope dilution HILIC-MS/MS method for accurate quantification of glutamic acid, glutamine, pyroglutamic acid, GABA and theanine in mouse brain tissues., *Biomed. Chromatogr.*, **30**, 55-61 (2016).

2. 学会発表

- 1) 好村守生, 越智啓介, 多田敦子, 杉本直樹, 穂山 浩, 天倉吉章, 既存添加物「モウソウ

- チク抽出物」の成分研究，日本生薬学会第 62 回年会，2015 年 9 月 11 日（岐阜）
- 2) 天倉吉章，吉田晴菜，杉脇秀美，好村守生，多田敦子，西崎雄三，杉本直樹，佐藤恭子，穠山 浩，既存添加物「生コーヒー豆抽出物」の成分研究，日本食品化学学会第 22 回総会・学術大会，2016 年 6 月 3 日（高知）
- 3) 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)．
- 4) 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)．
- 5) 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「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)．
- 6) 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)．
- 7) 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)．
- 8) 藤原裕未，田中理恵，杉本直樹，西崎雄三，穠山浩，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)．
- 9) 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，穠山浩，受田浩之，既存添加物チャ抽出物中の成分含量と抗酸化力価の関係，日本食品化学学会 第 22 回総会・学術大会，2016 年 6 月 2-3 日（高知）．
- 10) 草場悠里，山内良子，小林弘司，島村智子，受田浩之，杉本直樹，穠山浩，石川洋哉，既存添加物チャ抽出物の各種抗酸化能評価，第 53 回化学関連支部合同九州大会，2016 年 7 月 2 日（福岡）．
- 11) 永津明人「定量 NMR を用いた生薬の分析」日本生薬学会第 63 年会，1A-SY1-2，2016 年 9 月（富山）
- 12) 藤原裕未，水野舞，永津明人，杉本直樹，西崎雄三，多田敦子，穠山浩「定量 NMR による生薬チョウジ中の eugenol の定量」日本生薬学会第 63 年会，2P-09，2016 年 9 月（富山）
- 13) 永津明人，加藤志保里，山田紗由美，藤原裕未，田中理恵，杉本直樹，西崎雄三，穠山浩
「定量 NMR を用いたグルコサミンの定量法の確立」日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2016，D-34，2016 年 10 月（岐阜）
- 14) 藤原裕未，田中理恵，杉本直樹，西崎雄三，穠山浩，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 年 11 月（大阪）
- 15) 高橋未来，多田敦子，西崎雄三，杉本直樹，竹内弘明，中川一弥，穠山 浩，井之上浩一：高速向流クロマトグラフィーによるゴマ油不けん化物からの高純度セサミンおよびセサモリンの単離精製 日本食品化学学会第 22 回総会・学術大会（高知），2016 年 6 月

I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

平成28年度「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」

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28年度「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」
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 森 将人 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27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る予定の87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5版既存添加物自主規格に向けた成分規格の検討

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、成分規格が設定可能なものから新規に自主規格案を作成するとともに、規格設定の根拠となる関連情報(海外規格を含む各種規格との対比)を調査する。

また、昨年度までに作成した自主規格案について、一部見直しあるいは裏付け試験を実施した。

(4) 既存添加物の品目ごとの基原生物の調査

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。

2. 調査研究者

これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

3. 研究結果の概要

(1) 既存添加物の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目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。

既存添加物の成分規格(案)の整備状況ならびに及び国内外の規格の有無。

本年度を含む過去3年間における第10版食品添加物公定書収載成分規格(案)及び第5版既存添加物自主規格成分規格(案)の整備状況を年度毎に整理し、別紙資料1に収載した。

自社内裏付け試験のデータが取得できている品目については、報告年度及び報告書記載ページに記載した。また、各品目における国内外の規格の有無についても合わせて記載した。

なお、参考までに平成25年度の規格作成状況も記載した。

既存添加物の安全性試験実施状況

各品目に関して実施された安全性試験及び実施年度等を別紙資料2に収載した。

(2) 第10版食品添加物公定書に向けた検証用成分規格の見直し

本年度は、第10版食品添加物公定書に向けて、新たに2品目(表1)について成分規格検証用の規格案を作成した。また、昨年度までに作成した規格案のうち、12品目(表2)について規格案、関連資料を見直し、改正した。新規作成及び改正後の規格案については関連資料とともに部会別に整理して別紙資料3に収載した。

表1 第10版食品添加物公定書第4次検証品目

部会	既存No	用途	既存添加物名簿名称
4	359	増粘安定剤	レバン
6	364	ガムベース	ロシン

表2 第10版食品添加物公定書 検証用成分規格見直し品目

部会	既存No	用途	既存添加物名簿名称
4	040	増粘安定剤/ガムベース	エレミ樹脂
4	145	増粘安定剤・製造用剤	サバクヨモギシードガム
4	229	増粘安定剤	トロロアオイ
5	076	酸化防止剤	カンゾウ油性抽出物
5	091	酸化防止剤	カテキン
5	202	酸化防止剤	チャ抽出物
5	255	酸化防止剤	ヒマワリ種子抽出物
9	027	苦味料	イソアルファー苦味酸
9	120	苦味料	ゲンチアナ抽出物
9	161	苦味料	ジャマイカカシヤ抽出物
10	127	乳化剤	酵素処理レシチン
10	172	乳化剤	スフィンゴ脂質

:既添No:数字は既存添加物番号

本年度を含む3年間における第10版食品添加物公定書に向けた成分規格検証用の新規規格案作成状況について表3にまとめた。増粘安定剤、製造用剤をはじめ3年間の合計で30品目について新たに規格案を作成することができた。

現時点では、平成25年度に作成済みの35品目(うち9品目は一般飲食物添加物)と合わせて合計で65品目について検証用規格案の作成が終了している。

表3 第10版食品添加物公定書 新規規格案作成状況

部会	用途	H26年度	H27年度	H28年度	合計
2	着色料	1	-	-	1
4	増粘安定剤	10	-	1	11
5	酸化防止剤	5	-	-	5
6	ガムベース・光沢剤	1	-	1	2
9	調味料・苦味料	2	-	-	2
10	乳化剤	1	-	-	1
13	製造用剤・ミネラル	8	-	-	8
	合計	28	0	2	30

(3) 第5版既存添加物自主規格案の作成と見直し

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、前述の第10版食品添加物公定書に向けた検証用規格を作成したものを除き、使用実態の再調査及び第5版既存添加物自主規格の作成を検討している。

本年度は成分規格案を作成するために必要な情報が揃った14品目(表4)について規格案を作成するとともに、昨年度までに作成した12品目の自主規格案(表5)について見直しあるいは裏付け試験を実施した。いずれも部会別に整理し別紙資料4に収載した。

表4 第5版既存添加物自主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	159	着色料	シタン色素
6	036	ガムベース / 光沢剤	ウルシロウ
6	094	ガムベース	グアヤク樹脂
6	142	ガムベース / 光沢剤	コメヌカロウ
6	144	ガムベース / 光沢剤	サトウキビロウ
6	333	ガムベース / 光沢剤	モクロウ
13	043	製造用剤	オゾン
13	168	製造用剤	水素
13	176	製造用剤	ゼイン
13	214	製造用剤	銅
13	242	製造用剤	白金
13	246	製造用剤	パラジウム
13	266	製造用剤	ブタン
13	275	製造用剤	プロパン

: 既添 No: 数字は既存添加物番号

表5 第5版既存添加物自主規格案見直し・裏付け試験実施品目

部会	規格見直し	裏付け試験	既存 No	用途	既存添加物名簿名称
4		-	001	増粘安定剤	アウレオバシジウム培養液
5		-	196	酸化防止剤	単糖・アミノ酸複合物
6			042	ガムベース	オゾケライト
6		-	099	ガムベース	グッタハンカン
6	-		100	ガムベース	グッタペルカ
6	-		138	ガムベース	ゴム
6		-	152	ガムベース / 光沢剤	シェラックロウ
6		-	307	ガムベース	ホホバロウ
9		-	041	調味料	塩水湖水低塩化ナトリウム液
9		-	357	苦味料	レイシ抽出物
10		-	187	乳化剤	ダイズサポニン
10		-	195	乳化剤	胆汁末

: 既添 No: 数字は既存添加物番号

: 暫定規格

なお、第14部会においては、昨年度に引き続き基原別の香辛料抽出物について、自主規格設定のために必要な使用実態や関連規格などの調査を実施した。

以上、新規作成及び見直し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、部会別に整理して別紙資料4に収載した。

本年度を含む3年間における第5版既存添加物自主規格の新規規格案の作成状況は、表6にまとめた通りである。最も多い製造用剤25品目を含め3年間の合計で44品目(うち5品目については暫定規格)について新たに規格案を作成することができた。

第5版既存添加物自主規格の刊行に向けた中間取りまとめで後述するように、現時点での自主規

格案は合計で136品目となる。

表6 第5版既存添加物自主規格 新規規格案作成状況

部会	分野	H26年度	H27年度	H28年度	合計
2	着色料	-	1	1	2
4	増粘安定剤	-	-	-	-
5	酸化防止剤	4(2)	-	-	4(2)
6	ガムベース・光沢剤	3	-	5	8
9	調味料・苦味料	3(2)	-	-	3(2)
10	乳化剤	2(1)	-	-	2(1)
13	製造用剤・ミネラル	16	1	8	25
	合計	28(5)	2	14	44(5)

カッコ内は暫定規格数

(4) 既存添加物の品目ごとの基原生物等の調査

第9版食品添加物公定書未収載品目の基原植物、微生物等で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等について、削除、変更又は拡大の必要性の有無について昨年度に引き続きアンケート調査を実施した結果、チャ抽出物について改正要望が寄せられた。詳細資料を別紙資料5に収載した。

本年度を含め3年間では、上記のチャ抽出物に加え、グルコサミン、キチン、キトサン、スフィンゴ脂質、ファフィア色素、トウガラシ水性抽出物、トウガラシ色素、生コーヒー豆抽出物、アグロバクテリウムスクシノグリカン及びローズマリー抽出物の計11品目の改正要望が寄せられた。これらの一覧表も別紙資料5に収載した。

基原生物等の調査については、規格案の完成度の高いものを優先して実施していることから、全ての品目において精査できていない為、今後も引き続き調査する必要があると考える。

(5) 第5版既存添加物自主規格の刊行に向けた中間取りまとめ

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。

今年度は、これまでに作成した自主規格136品目(表7)を取りまとめ、別添資料6に収載した。

なお、参考規格を含め、今後見直しが予定されている品目の規格案については収載しなかった。

また、今回収載した規格についても、新たな情報や裏付け試験の結果により、今後も改正する予定である。

表7 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	用途	既存添加物名簿名称
1	1	270	甘味料	ブラジルカンゾウ抽出物
2	1	飲食	甘味料	カンゾウ末
3	2	024	着色料	アルミニウム
4	2	047	着色料	オレンジ色素
5	2	051	着色料	カキ色素
6	2	087	着色料	魚鱗箔

7	2	089	着色料・製造用剤	金
8	2	090	着色料・製造用剤	銀
9	2	114	着色料	クーロー色素
10	2	135	着色料	骨炭色素
11	2	149	着色料	シアナット色素
12	2	159	着色料	シタン色素
13	2	165	着色料	植物炭末色素
14	2	258	着色料	ファフィア色素
15	2	282	着色料	ペカンナツツ色素
16	2	324	着色料	ムラサキヤマイモ色素
17	2	飲食	着色料	アカゴメ色素
18	2	飲食	着色料	アカダイコン色素
19	2	飲食	着色料	イカスミ色素
20	2	飲食	着色料	エルダーベリー色素
21	2	飲食	着色料	クランベリー色素
22	2	飲食	着色料	サフラン色素
23	2	飲食	着色料	シソ色素
24	2	飲食	着色料	ストロベリー色素
25	2	飲食	着色料	チコリ色素
26	2	飲食	着色料	ハリ色素
27	2	飲食	着色料	ハイビスカス色素
28	2	飲食	着色料	ブドウ果汁色素
29	2	飲食	着色料	ブラックベリー色素
30	2	飲食	着色料	ブルーベリー色素
31	2	飲食	着色料	ボイセンベリー色素
32	2	飲食	着色料	ホワートルベリー色素
33	2	飲食	着色料	ラズベリー色素
34	2	飲食	着色料	レッドカーラント色素
35	2	飲食	着色料	パープルキャロット色素
36	2	飲食	着色料	アカジャガイモ色素
37	3	074	保存料	カワラヨモギ抽出物
38	3	175	製造用剤 / 日持向上剤	セイヨウワサビ抽出物
39	3	216	製造用剤 / 日持向上剤	トウガラシ水性抽出物
40	3	329	製造用剤 / 日持向上剤	モウソウチク乾留物
41	3	330	製造用剤 / 日持向上剤	モウソウチク抽出物
42	4	001	増粘安定剤	アウレオバシジウム培養液
43	4	004	増粘安定剤	アグロバクテリウムスクシノグリカン
44	4	013	増粘安定剤	アマシードガム
45	4	019	増粘安定剤	アラビノガラクトン
46	4	040	増粘安定剤 / ガムベース	エレミ樹脂
47	4	053	増粘安定剤	カシアガム
48	4	062	増粘安定剤	キチン
49	4	064	増粘安定剤・製造用剤	キトサン
50	4	104	増粘安定剤	グルコサミン
51	4	92	増粘安定剤	グァーガム酵素分解物
52	4	145	増粘安定剤・製造用剤	サバクヨモギシードガム
53	4	229	増粘安定剤	トロロアオイ

54	4	257	増粘安定剤	ファーセララン
55	4	336	増粘安定剤	モモ樹脂
56	4	359	増粘安定剤	レバン
57	5	076	酸化防止剤/日持	カンゾウ油性抽出物
58	5	091	酸化防止剤	カテキン
59	5	093	酸化防止剤	グアヤク脂
60	5	095	酸化防止剤	クエルセチン
61	5	115	酸化防止剤/日持	クローブ抽出物
62	5	136	酸化防止剤	ゴマ油不けん化物
63	5	196	酸化防止剤	単糖・アミノ酸複合物
64	5	202	酸化防止剤	チャ抽出物
65	5	232	酸化防止剤	生コーヒー豆抽出物
66	5	255	酸化防止剤	ヒマワリ種子抽出物
67	5	306	酸化防止剤	没食子酸
68	5	365	酸化防止剤	ローズマリー抽出物
69	6	036	ガムベース/光沢剤	ウルシロウ
70	6	042	ガムベース	オゾケライト
71	6	094	ガムベース	グアヤク樹脂
72	6	099	ガムベース	グッタハンカン
73	6	100	ガムベース	グッタペルカ
74	6	138	ガムベース	ゴム
75	6	142	ガムベース/光沢剤	コメヌカロウ
76	6	144	ガムベース/光沢剤	サウキピロウ
77	6	152	ガムベース/光沢剤	セラックロウ
78	6	154	ガムベース	ジェルトン
79	6	199	ガムベース	チクル
80	6	307	ガムベース	ホホバロウ
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	7	028	酵素	イソマルトデキストラナーゼ
85	8	029	酸味料	イタコン酸
86	9	027	苦味料	イソアルファー苦味酸
87	9	041	調味料	塩水湖水低塩化ナトリウム液
88	9	120	苦味料	ゲンチアナ抽出物
89	9	124	苦味料	酵素処理ナリンジン
90	9	161	苦味料	ジャマイカカссия抽出物
91	9	182	調味料	粗製海水塩化カリウム
92	9	236	苦味料	ニガヨモギ抽出物
93	9	357	苦味料	レイシ抽出物
94	10	127	乳化剤	酵素処理レシチン
95	10	172	乳化剤	スフィンゴ脂質
96	10	187	乳化剤	ダイズサポニン
97	10	195	乳化剤	胆汁末
98	13	009	製造用剤	アスペルギルステレウス糖たん白質
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	155	製造用剤	分岐 シクロデキストリン
112	13	158	製造用剤	シソ抽出物
113	13	163	製造用剤	乳清焼成カルシウム
114	13	173	製造用剤	生石灰
115	13	198	製造用剤	柿タンニン
116	13	198	製造用剤	ミモザタンニン
117	13	200	製造用剤	窒素
118	13	201	製造用剤	チャ乾留物
119	13	212	製造用剤	鉄
120	13	214	製造用剤	銅
121	13	227	製造用剤	トレハロース
122	13	237	製造用剤	ニッケル
123	13	239	製造用剤	ばい煎コメヌカ抽出物
124	13	240	製造用剤	ばい煎ダイズ抽出物
125	13	249	製造用剤	ヒアルロン酸
126	13	262	製造用剤	フィチン(抽出物)
127	13	266	製造用剤	ブタン
128	13	275	製造用剤	プロパン
129	13	297	製造用剤	ヘプタン
130	13	302	製造用剤	ヘリウム
131	13	318	製造用剤	貝殻未焼成カルシウム
132	13	318	製造用剤	卵殻未焼成カルシウム
133	13	327	製造用剤	メバロン酸
134	13	331	製造用剤	木材チップ
135	13	332	製造用剤	木炭
136	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

下線: 第 10 版食品添加物公定書の検証用規格あり

(6) 食品添加物公定書既収載品目の見直し
コチニール色素公定規格見直しの検討

海外でコチニール色素を化学反応させた 4-アミノカルミン酸(日本では未指定)が流通しており、日本においても 4-アミノカルミン酸で着色された食品の輸入が確認されている。一方、現状のコチニール色素の公定書規格では 4-アミノカルミン酸 100%品(原体)であれば、確認試験で不適となるが、配合量により適となる可能性がある。

今年度は、上記を改善すべく第2部会において検討したコチニール色素規格の改定案を報告する。

ピロ亜硫酸ナトリウムに関する公定書の別名見直しの検討

食品衛生法施行規則の別表第一において、ピロ亜硫酸ナトリウムの別名として亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム及び酸性亜硫酸ソーダが設定されている。一方、ピロ亜硫酸ナトリウムの公定書規格の別名には亜硫酸水素ナトリウムが含まれていない。現状のままでは公定書規格に適合しない亜硫酸水素ナトリウムであっても指定添加物として使用可能である。

ピロ亜硫酸ナトリウムは指定添加物であり、本研究の対象ではないが、安全性確保の観点から、今年度、ピロ亜硫酸ナトリウムに関する日本薬局方等の他の規格との比較検討を行った。その結果、公定書の別名として亜硫酸水素ナトリウムを加えるだけで規格値を変更する必要はないことが判明した。

以上、 の詳細資料については、別紙資料7に収載した。

4. 考察

本年度は、第10版食品添加物公定書収載に向け、新たに2品目について検証用規格案を作成するとともに、昨年度までに作成した検証用規格のうち12品目について規格案、関連資料を見直し、改正した。

本年度を含む3年間の合計で30品目について新たに検証用規格案を作成することができた。現時点では、平成25年度に作成済みの35品目（うち9品目は一般飲食物添加物）と合わせて合計で、65品目について検証用規格案の作成が終了している。

作成した検証用規格案については、裏付けデータが取得できていない品目もあることから、今後も規格の妥当性を検証する為に、環境の整った品目から裏付け試験を行う等、規格の完成度向上に向け更なる検討が必要と考える。

残された既存添加物についても、昨年度に引き続き第5版既存添加物自主規格の作成を目指して検討を行った。14品目について新たに自主規格を作成し、昨年までに作成した自主規格のうち12品目について成分規格案の見直しあるいは裏付け試験を実施した。

本年度を含む3年間の合計で44品目（うち5品目については暫定規格）について新たに自主規格案を作成することができた。

本年度は、第5版既存添加物自主規格の刊行に向け、現時点で収載予定の136品目の自主規格を取りまとめたが、裏づけ試験等により見直しが必要な品目も含まれている。また、来年度に規格化が予定されている品目も含め、現時点で残された品目については、今後も必要な情報を得るために更なる工夫が必要であるとともに、流通実態の有無についても見極め、規格作成の優先順位を明確にする必要がある。また、残された規格設定が困難な品目に関する今後の取扱いについても検討を開始する必要がある。

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部の穂山部長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上げる次第である。

以上

別紙

調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	森 将人	一般社団法人日本食品添加物協会
自主規格専門委員長,部会長・部会担当	西宮 隆	株式会社タイショーテクノス
規格専門委員長	斎藤知明	MCフードスペシヤリティーズ株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	山本正次	丸善製薬株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	中島光一	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	北村 智	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	義平邦周	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	橋本成久	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	松岡賢一	DSP五協フード&ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	増田哲也	エーザイフード・ケミカル株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	植田実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	尾崎史浩	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	卯津羅健作	ナガセケムテックス株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	香村正徳	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	北川剛司	理研ビタミン株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	小野茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	坂井昭浩	オルガノフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	村上和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	深尾 正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	関谷史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員,部会長・部会担当	稲井隆之	長谷川香料株式会社
技術顧問	山田 隆	一般社団法人日本食品添加物協会
技術顧問	高橋仁一	一般社団法人日本食品添加物協会

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究
研究分担者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

既存添加物 生コーヒー豆抽出物の成分研究

要旨 既存添加物名簿記載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物は、「アカネ科コーヒー（*Coffea arabica* LINNE）の種子より、温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。本研究では、生コーヒー豆抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、製品中の含有成分について検討を行っており、平成26,27年度の検討から、14種の化合物〔3-*O-trans*-caffeoylquinic acid,4-*O-trans*-caffeoylquinic acid,5-*O-trans*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid),3-*O-trans*-feruloylquinic acid,4-*O-trans*-feruloylquinic acid,5-*O-trans*-feruloylquinic acid,caffeine,3,4-di-*O-trans*-caffeoylquinic acid,4,5-di-*O-trans*-caffeoylquinic acid,trans-*p*-coumaroyl-L-tryptophan,3,5-di-*O-trans*-caffeoylquinic acid,ethyl chlorogenate,3-*O-trans*-feruloyl-5-*O-trans*-caffeoylquinic acid,trans-caffeoyl-L-tryptophan〕を単離、同定し報告している。今年度は新たに、5種の化合物〔vanillin,3-*O-trans*-caffeoyl-4-*O-trans*-feruloylquinic acid,4-*O-trans*-caffeoyl-5-*O-trans*-feruloylquinic acid,trans-feruloyl-L-tryptophan,trans-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester〕を単離、同定することができた。これまでの検討から、本添加物の主成分はcaffeine及びchlorogenic acidであり、またDPPHラジカル消去活性を指標とした酸化防止能の結果から、有効成分はchlorogenic acidをはじめとするカフェー酸誘導体であることが示唆された。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 講師
杉脇 秀美 松山大学薬学部 嘱託職員

A. 研究目的

生コーヒー豆抽出物は、酸化防止剤、製造用剤を用途に既存添加物名簿に記載されている。既存添加物名簿に生コーヒー豆抽出物は、「アカネ科コーヒー（*Coffea arabica* LINNE）の種子より、温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。既存添加物の多くは植物抽出物であり、多数の成分が含まれているため、その品質管理には詳細な成分解析に基づいた規格作成

が必要であるが、本添加物については未検討であるため、その精査が求められる。

本研究では、生コーヒー豆抽出物製品中の含有成分を精査し、品質規格作成のための基礎的データの集積を目的とした検討を実施しており、今年度も引き続き製品中の成分精査と、単離成分についてDPPHラジカル消去活性を検討した。また、単離成分については、酸化防止能の別の評価法として、superoxide dismutase (SOD) 様活性についても併せて検討した。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

試料とした生コーヒー豆抽出物は、日本食品添加物協会を通じて入手した。分離、精製には力

ラム充填剤として YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50) (ワイエムシイ), Chromatorex ODS (富士シリシア), MCI-gel CHP-20P (三菱化学) を用いた。1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl はアルドリッチ製を, また trolox は和光純薬製を用いた。SOD 様活性は SOD assay kit-WST (同仁化学研究所) を用いた。その他の試薬はすべて特級又は高速液体クロマトグラフィー用を使用した。

2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は, Shimadzu Prominence システム (島津製作所) を使用した。測定条件を下記に記す。カラム: L-column ODS (2.1 i.d. × 150 mm) (化学物質評価研究機構), カラム温度: 40°C, 流速: 0.3 mL/min, 測定波長: 200 ~ 400 nm, 移動相: (A) 5% 酢酸, 及び (B) アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A): 0→30 min (0→50%), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85→90%), 50→55 min (90→100%), 55→60 min (100%)]. NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) を使用し, 測定溶媒としてメタノール-*d*₄ を用いた。ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [メタノール-*d*₄ (¹H: 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm)] を基準とした。高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用し, 測定溶媒にはアセトニトリルを用いた。分光光度計は Shimadzu UV mini-1240 (島津製作所製) 及び JASCO V-530 (日本分光製) を使用した。旋光計は JASCO P-1020 (日本分光製) を用いた。

3. 分画物の調製及び化合物の単離

生コーヒー豆抽出物 (150 g) を減圧濃縮後, 凍結乾燥し, 濃縮物 (64.1 g) を得た。濃縮物 (1回目: 30 g, 2回目: 21.5 g) をカラムクロマトグラフィー (YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20, Chromatorex ODS, MCI-gel CHP 20P) による分離・精製を繰り返し, 化合物の単離を行った。単離した化合物については標品の分析データとの直接比較, あるいは文献値と比較することにより同定した。

4. DPPH ラジカル消去活性の評価

試料溶液 (200 μL) に 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) (800 μL), 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) エタノール溶液 (1 mL) を加え, 10 秒間振とう後, 暗所で 30 分間放置し, 吸光度 (517 nm) を測定した。試料溶液のかわりにエタノールを添加した時の吸光度をコントロールとし, DPPH 溶液のかわりにエタノールを添加したものをブランクとした。コントロールの吸光度に対する試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を算出した。

5. SOD 様活性の評価

SOD 様活性は, SOD assay kit-WST (同仁化学) を用いて測定した。試料溶液 (20 μL) に WST working solution (200 μL) を加えて攪拌後, さらに Enzyme working solution (20 μL) を加え, 37 にて 20 分間インキュベートし, 450 nm における吸光度 (*A*_s) を測定した。得られた吸光度の数値から阻害率を算出した。

C. 研究結果

1. 化合物の単離

生コーヒー豆抽出物の濃縮物について, カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し, これまで単離, 同定した 14 種の化合物に加え, vanillin (1) (1.0 mg), 3-*O*-caffeoyl-4-*O*-feruloylquinic acid (2) (4.5 mg), 4-*O*-caffeoyl-5-*O*-feruloylquinic acid (3) (55.3 mg), *trans*-feruloyl-L-tryptophan (4) (5.1 mg), *trans*-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester (5) (1.8 mg) の 5 種を新たに単離した。このうち, 化合物 4, 5 については LC/MS による分析等に関する報告¹⁾⁻³⁾ はあるが, 単離報告は見あたらない。化合物の NMR データを以下に記す。

Vanillin (1): HR-ESI-MS: *m/z* 151.0411 [M-H]⁻ (Calcd for C₈H₈O₃-H, 151.0401). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 9.74 (1H, s, H-7), 7.43 (1H, dd, *J*=2, 8 Hz, H-6), 7.41 (1H, d, *J*=8 Hz, H-2), 6.93 (1H, d, *J*=8 Hz, H-5), 3.91 (3H, s, 3-OMe).

3-*O*-*trans*-Caffeoyl-4-*O*-*trans*-feruloylquinic acid (2): HR-ESI-MS: m/z 529.1379 [M-H]⁻ (Calcd for C₂₆H₂₆O₁₂-H, 529.1352). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 7.61 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-7'), 7.53 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-7''), 7.12 (1H, brd, $J=2$ Hz, H-2'), 7.04 (1H, brdd, $J=2, 8.5$ Hz, H-6'), 7.01 (1H, brd, $J=2$ Hz, H-2''), 6.89 (1H, brdd, $J=2, 8$ Hz, H-6''), 6.77 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, $J=8$ Hz, H-5''), 6.37 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8'), 6.26 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8''), 5.63 (1H, m, H-3), 5.11 (1H, m, H-4), 4.21 (1H, brd, $J=12$ Hz, H-5), 3.82 (3H, brs, 3''-OMe), 2.12 (4H, m, H-2, 6). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄): δ 168.4 (C-9'), 168.4 (C-9''), 150.6 (C-4') 149.6 (C-4''), 149.4 (C-3'), 147.2 (C-7') 147.1 (C-7''), 146.8 (C-3'') 127.8 (C-1''), 127.7 (C-1'), 124.1 (C-6') 123.1 (C-6), 116.5 (C-5''), 115.4 and 115.3 (C-8', 8''), 115.1 (C-2'') 111.9 (C-2'), 75.4 (C-4), 70.1 (C-3), 67.0 (C-5), 56.4 (3''-OMe), 37.7 (C-2, 6).

4-*O*-*trans*-Caffeoyl-5-*O*-*trans*-feruloylquinic acid (3): HR-ESI-MS: m/z 529.1351 [M-H]⁻ (Calcd for C₂₆H₂₆O₁₂-H, 529.135). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 7.58 (1H, d, $J=16.5$ Hz, H-7'), 7.52 (1H, d, $J=16.5$ Hz, H-7''), 7.08 (1H, brs, H-2'), 7.00 (1H, brs, H-6''), 6.99 (1H, brs, H-2'), 6.89 (1H, brd, $J=3$ Hz, H-6'), 6.75 (1H, brd, $J=8$ Hz, H-5''), 6.73 (1H, brd, $J=8$ Hz, H-5'), 6.27 (2H, d, H-8', 8''), 5.65 (1H, brs, H-5), 5.11 (1H, brdd, $J=3, 8.5$ Hz, H-4), 4.37 (1H, brs, H-3), 3.81 (3H, brs, 3''-OMe), 2.16 (4H, m, H-2, 6).

trans-Feruloyl-L-tryptophan (4): [α]_D -25 ° ($c=0.1$ MeOH). UVλ_{max} MeOH nm (log ε) : 324.5 (3.82), 290.5 (3.80), 220.5 (4.22). HR-ESI-MS: m/z 379.1296 [M-H]⁻ (Calcd for C₂₁H₂₀O₅N₂-H, 379.1300). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 7.57 (1H, d, $J=8$ Hz, H-4), 7.39 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7'), 7.29 (1H, d, $J=8$ Hz, H-5'), 7.09 (2H, brs, H-2, 2'), 7.04 (1H, dt, $J=1, 6$ Hz, H-5), 6.98 (2H, m, H-6, 6'), 6.77 (1H, d, $J=8$ Hz, H-7), 6.44 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8'), 5.79 (1H, d, $J=16$ Hz, H-11), 3.86 (3H, s, 3'-OMe), 3.37 (2H, m, H-10). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄): δ 175.7 (C-12), 168.9 (C-9'), 149.9

(C-3'), 149.3 (C-4'), 142.2 (C-7'), 138.0 and 138.8 (C-8, 2'), 130.7 (C-6'), 129.0 (C-9), 1247.7 (C-1'), 124.3 (C-2), 122.3 (C-5), 119.7 (C-6), 119.4 (C-4), 118.2 (C-8'), 116.7 (C-5'), 115.9 (C-7), 111.2 (C-3), 56.4 (3'-OMe), 55.1 (C-11), 28.7 (C-10).

trans-Caffeoyl-L-tryptophan methyl ester (5): [α]_D -22 ° ($c=0.1$ MeOH). UVλ_{max} MeOH nm (log ε) : 311 (4.17), 291 (4.23), 222 (4.49). HR-ESI-MS: m/z 379.1297 [M-H]⁻ (Calcd for C₂₁H₂₀O₅N₂-H, 379.1299). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 7.52 (1H, d, $J=8$ Hz, H-4), 7.36 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7'), 7.31 (1H, brdd, $J=2, 8$ Hz, H-7), 7.07 (1H, s, H-2), 7.06 (1H, brt, $J=2$ Hz, H-5), 6.99 (1H, brs, H-6), 6.98 (1H, d, $J=2$ Hz, H-2'), 6.89 (1H, dd, $J=2, 8$ Hz, H-6'), 6.74 (1H, d, $J=8$ Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8'), 4.87 (1H, dd, $J=5, 7.5$ Hz, H-11), 3.40 (1H, dd, $J=5, 14.5$ Hz) and 3.23 (1H, dd, $J=8, 15$ Hz) (H-10). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄): δ 174.1 (C-12), 169.1 (C-9'), 148.9 (C-4'), 146.7 (C-3'), 142.9 (C-7'), 138.1 (C-8), 128.8 (C-1'), 128.2 (C-9), 124.4 (C-2), 122.4 (C-5), 122.2 (C-6'), 119.8 (C-6), 119.1 (C-4), 117.8 (C-8'), 116.4 (C-5'), 115.1 (C-2'), 112.3 (C-7), 110.8 (C-3), 55.1 (C-11), 52.7 (12-OMe), 28.7 (C-10).

2. 生コーヒー豆抽出物の HPLC 分析

新たに単離した各化合物を標品として HPLC 分析を行い、5 化合物のデータを加えた。図 1 に新たな HPLC 成分プロファイリングデータを示す。

3. DPPH ラジカル消去活性の評価

単離した 5 化合物について、DPPH ラジカル消去活性を評価した。これまでの結果とあわせたものを表 1 に示す。5-*O*-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) をはじめとするカフェー酸誘導体の活性が強いことがわかる。

4. SOD 様活性の評価

これまで単離した 19 化合物について、SOD 様活性を評価した。結果を表 2 に示す。DPPH ラジカル消去活性と同様、カフェー酸誘導体の活性が

顕著であった。

D. 考察

既存添加物名簿に生コーヒー抽出物の有効成分は、「クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。これまでの検討で、DPPHラジカル消去活性を指標に酸化防止能を評価した結果、活性の強かった画分には5-*O*-caffeoylquinic acid (クロロゲン酸)、4-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid が主検出され、これらの添加物活性への寄与が大きいことを考察していた。今回の結果を加え、これまでの考察がさらに支持された。また、単離した19化合物について、DPPHラジカル消去活性及びSOD様活性を評価した結果、いずれの評価法においてもカフェー酸誘導体が顕著な活性を示した。よって、本添加物の活性への寄与はカフェー酸誘導体であることがあげられ、caffeoyl基が活性に大きく影響していることが示唆された。

E. 結論

既存添加物名簿収載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物製品中の含有成分について検討した結果、これまで明らかにした14化合物に加え、新たに5種の化合物〔vanillin, 3-*O*-*trans*-caffeoyl-4-*O*-*trans*-feruloylquinic acid, 4-*O*-*trans*-caffeoyl-5-*O*-*trans*-feruloylquinic acid, *trans*-feruloyl-L-tryptophan, *trans*-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester〕を単離することができた。今回の結果を加えたこれまでの検討から、本添加物の主成分はcaffeine及びchlorogenic acidであり、またDPPHラジカル消去活性及びSOD様活性を指標とした酸化防止能の結果から、有効成分はchlorogenic acidをはじめとするカフェー酸誘導体であることが示唆された。

E. 参考文献

1) Podio NS., López-Froilán R., Ramirez-Moreno E., Bertrand L., Baroni MV., Pérez-Rodríguez ML., Sánchez-Mata M., Wunderlin DA.: Matching in vitro

bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of soluble coffee by boosted regression trees, *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 9572-9582 (2015).

2) Alonso-Salces RM., Serra F., Reniero F., Héberger K.: Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea Arabica* and *Coffea canephora*): Chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4224-4235 (2009).

3) Yuanchao X., Bing H., Shi K., Liu F., Wenfang X.: Caffeic acid derivatives: A new type of influenza neuraminidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 3556-3560 (2013).

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 天倉吉章, 吉田晴菜, 杉脇秀美, 好村守生, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 穠山浩, 既存添加物「生コーヒー豆抽出物」の成分研究, 日本食品化学学会第22回総会・学術大会, 2016年6月3日(高知)

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

H. 健康危機情報

なし

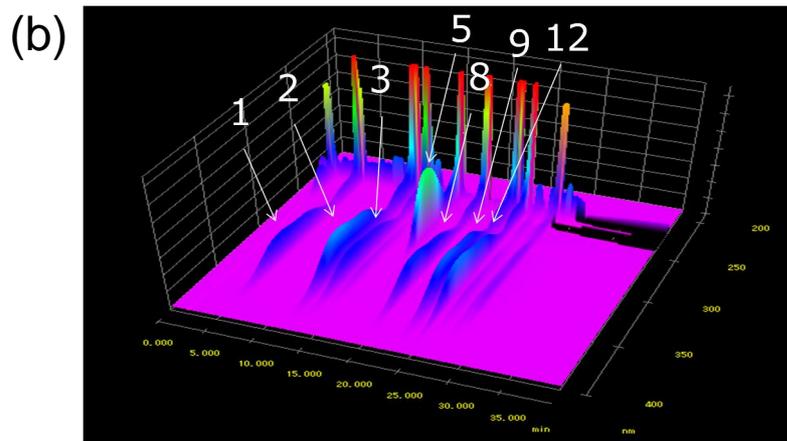
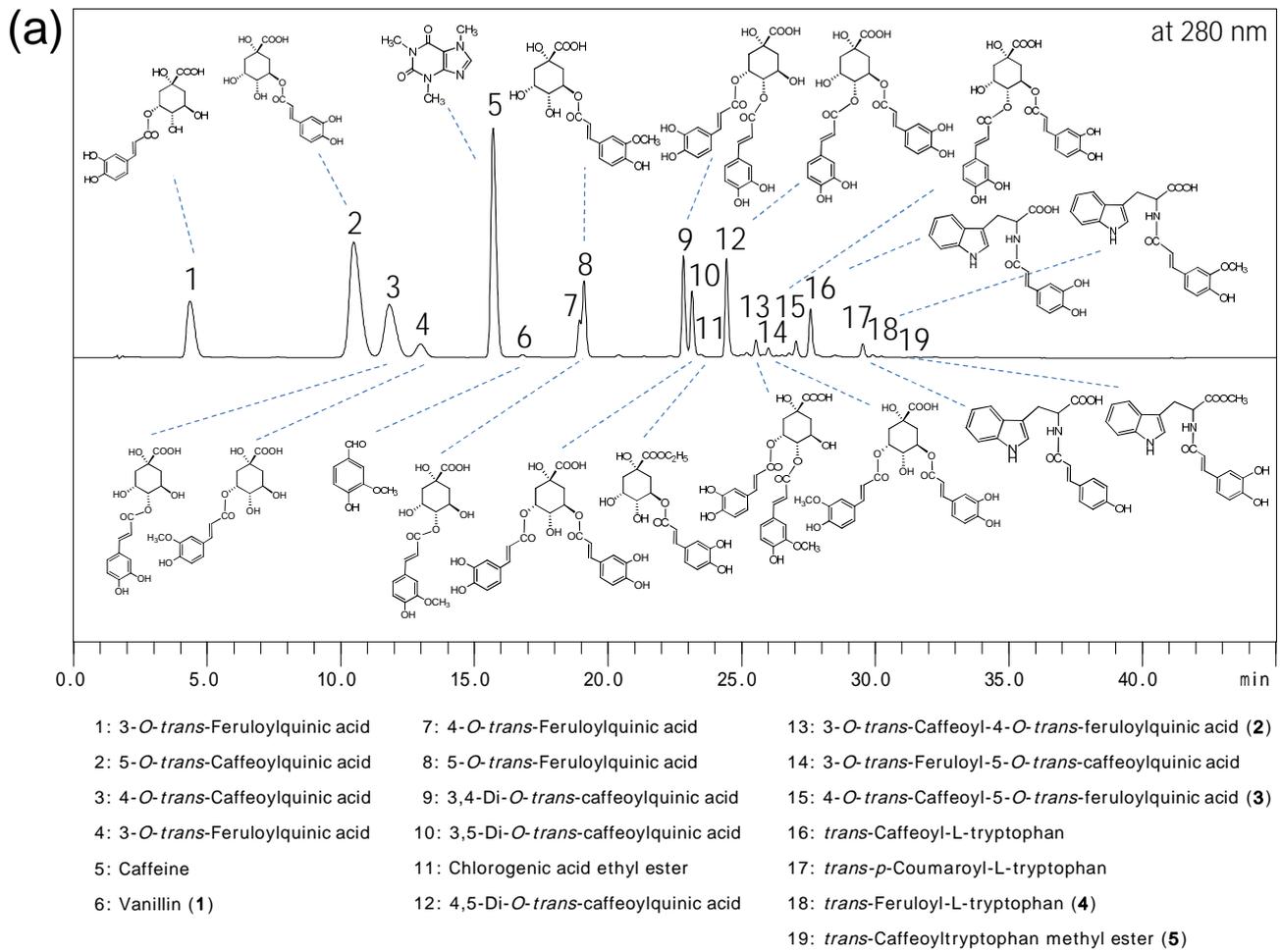


図 1 . 生コーヒー豆抽出物の HPLC 成分プロファイリング

(a)HPLC クロマトグラム (at 280 nm), (b)3D-HPLC クロマトグラム (200 ~ 400 nm)

表 1 . 単離化合物の DPPH ラジカル消去活性

	IC ₅₀ (μM)
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	83.5
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	88.3
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	84.7
3- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	1094.2
Caffeine	>5000
Vanillin (1)	>5000
4- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	1052.1
5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	995.1
3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	69.7
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	54.8
Chlorogenic acid ethyl ester	65.4
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	66.4
3- <i>O</i> -Caffeoyl-4- <i>O</i> -feruloylquinic acid (2)	98.1
3- <i>O</i> -Feruloyl-5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	71.7
4- <i>O</i> -Caffeoyl-5- <i>O</i> -feruloylquinic acid (3)	83.0
Caffeoyltryptophan	83.7
<i>p</i> -Coumaroyltryptophan	1041.4
Feruloyltryptophan (4)	537.1
Caffeoyltryptophan methyl ester (5)	149.6

表 2 . 単離化合物の SOD 様活性

	IC ₅₀ (μM)
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	88.6
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	80.1
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	123.4
3- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	973.6
Caffeine	> 1000
Vanillin (1)	>1000
4- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	788.9
5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	>1000
3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	56.1
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	36.1
Chlorogenic acid ethyl ester	46.3
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	37.9
3- <i>O</i> -Caffeoyl-4- <i>O</i> -feruloylquinic acid (2)	99.0
3- <i>O</i> -Feruloyl-5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	105.1
4- <i>O</i> -Caffeoyl-5- <i>O</i> -feruloylquinic acid (3)	68.1
Caffeoyltryptophan	33.1
<i>p</i> -Coumaroyltryptophan	414.3
Feruloyltryptophan (4)	856.7
Caffeoyltryptophan methyl ester (5)	100.9

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28年度分担研究報告書

分担研究課題：既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究
分担研究者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

既存添加物 カキ色素の成分研究

要旨 既存添加物名簿記載のカキ色素は、「カキノキ科カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) の果実を発酵後、焙焼したものより、温時含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はフラボノイドである。赤褐色を呈する」とされる。本研究では、カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として、本製品の含有成分の解明を行っており、昨年度は予備検討として本製品をHPLC分析し、数ピークの検出について報告している。本年度はそれら成分の詳細を明らかにする目的で、製品エキスの分離精製を繰り返し、HPLCでほぼ1ピークのフラクションを得ることができたが、機器分析により構造解析を試みたところ、夾雑物が認められさらなる精製を計画中である。一方、本製品には構造不特定の縮合型タンニン類が含まれることが示唆されたことから、高分子領域の分子量についてGPCにより測定した。その結果、重量平均分子量約20万であることが明らかとなった。今後これらの構造的特徴についても検討を要する。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 講師

A. 研究目的

既存添加物名簿記載のカキ色素は、「カキの果実から得られた、フラボノイドを主成分とするもの」とされ、着色料として用いられる。また、その基原・製法・本質は、「カキノキ科カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) の果実を発酵後、焙焼したものより、温時含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はフラボノイドである。赤褐色を呈する」とされる。既存添加物の多くは植物抽出物であり、多数の成分が含まれているため、その品質管理には詳細な成分解析に基づいた規格作成が必要である。カキ色素については製品の詳細な分析に関する報告はなく、検討対象の一つとしてあげられる。そこで本研究では、カキ色素

製品中の含有成分を精査することによる品質規格作成のための基礎的な化学データの集積を目的に検討を行い、昨年度はHPLCにおいて複数のピークとともに縮合型タンニンと考えられるブロードピークを確認している。これら結果を踏まえ、今年度はそれらの単離精製を試みた。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

試料となるカキ色素製品は日本食品添加物協会を通じて入手した。分離、精製にはカラム充填剤として Diaion HP-20 (三菱化学)、Sephadex LH-20 (GEヘルスケア・ジャパン)、MCI-gel CHP-20P (三菱化学)、Chromatorex ODS (富士シリシア化学) を用いた。その他試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を使用した。

2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu LC-10Avp システム

(島津製作所)を使用した。測定条件は以下のとおり。カラム: YMC-pack ODS AQ-3C2(2.0 I.D. × 150 mm)(ワイエムシィ)、カラム温度: 40、流速: 0.25 mL/min、測定波長: 280 nm、試料注入量: 3 μL、移動相: (A) 0.01 M H₃PO₄; 0.01 M KH₂PO₄ (1: 1) 及び(B)メタノール[濃度勾配条件: 0→30 min (B: 0→50%)、30→50 min (B: 50→60%)、50→75 min (B: 0%)]。GPCの測定条件は以下のとおり。カラム: TSK-gel Super AW4000 (6.0 I.D.×150 mm)(東ソー)、カラム温度: 35、流速: 0.3 mL/min、測定波長: 280 nm、移動相: *N,N*-dimethylformamide + 3M HCOONH₄ (0.5%)、標品: ポリスチレン(PS)標準試料(Shodex)。

3. 分離精製

カキ色素製品に蒸留水を加えて溶解させた後、酢酸エチル、*n*-ブタノールを順次加えて分配し、各分画物を得た。そのうち水分画物について Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、さらに MCI-gel CHP-20P、Chromatorex ODS を用いて分離精製を試みた。

4. カキ色素の HPLC 及び GPC 分析

カキ色素製品を水に溶解させ、上記条件で HPLC 及び GPC 分析を行った。また、分離した各分画物についても同条件で分析を行った。

C.D 研究結果・考察

1. 化合物の分離精製

カキ色素製品(47.4 g)に蒸留水 1L を加えて溶解させた後、酢酸エチル(1L×3)、*n*-ブタノール(1L×3)で順次分配を行い、各分画物[酢酸エチル分画物(129.4 mg)、*n*-ブタノール分画物(773.6 mg)、水分画物(45.4g)]を得た。得られた水分画物のうち 20 g を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、8 画分を得た(図 1)。このうち、Fr. 38-52 (1.0 g) について、さらに MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィーに付し、8 画分を得た(図 2a)。さらにこのうち、Fr. 8(47.2 mg)について、Chromatorex ODS カラムクロマトグラフィーに付し、6 画分を得た(図 2b)。得られた 1 画分(Fr. 13-17(9.7 mg))について、¹H-NMR を測定したところ、

高磁場側に夾雑物由来と思われるシグナルが観察され(図 3)、さらに精製が必要であることが示唆された。

2. GPC 分析

カキ色素製品中成分の分子量分布について、GPCにより検討した結果、重量平均分子量約20万であった(図4)。今後これらの構造的特徴について検討が必要である。

E. 結論

カキ色素の品質規格作成に供する化学的検討として、製品中の成分精査を行った。HPLC でほぼ1ピークのフラクションを得ることができたが、機器分析による構造解析を行ったところ夾雑物が認められ、今後さらなる精製を計画する。一方、本製品には構造不特定の縮合型タンニン類が豊富に含まれることが示唆されたことから、高分子領域の分子量についてGPCにより測定したところ、重量平均分子量約20万であることが明らかとなった。今後これらの構造的特徴についても検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

H. 健康危機情報

なし

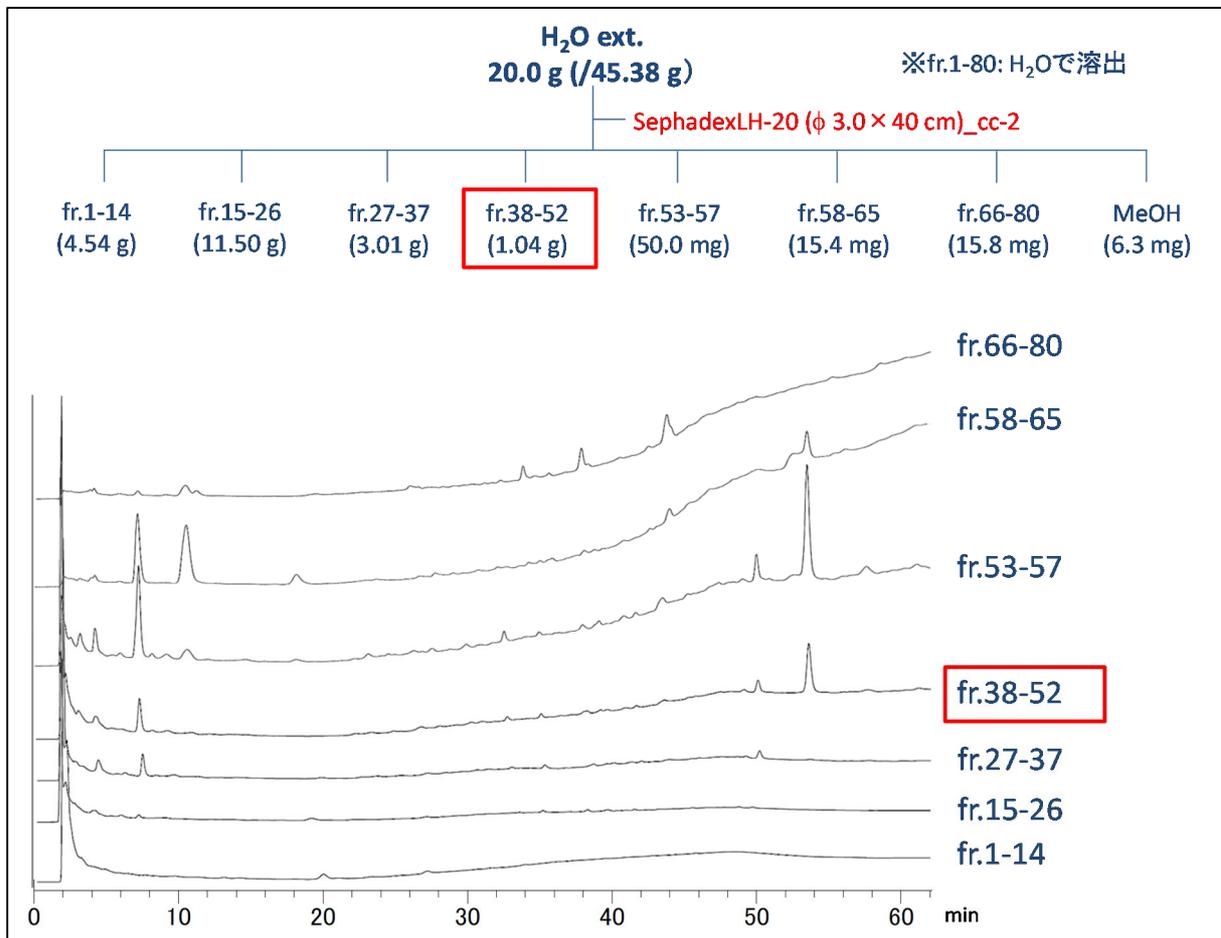


図 1. 水分画物の分離精製 1

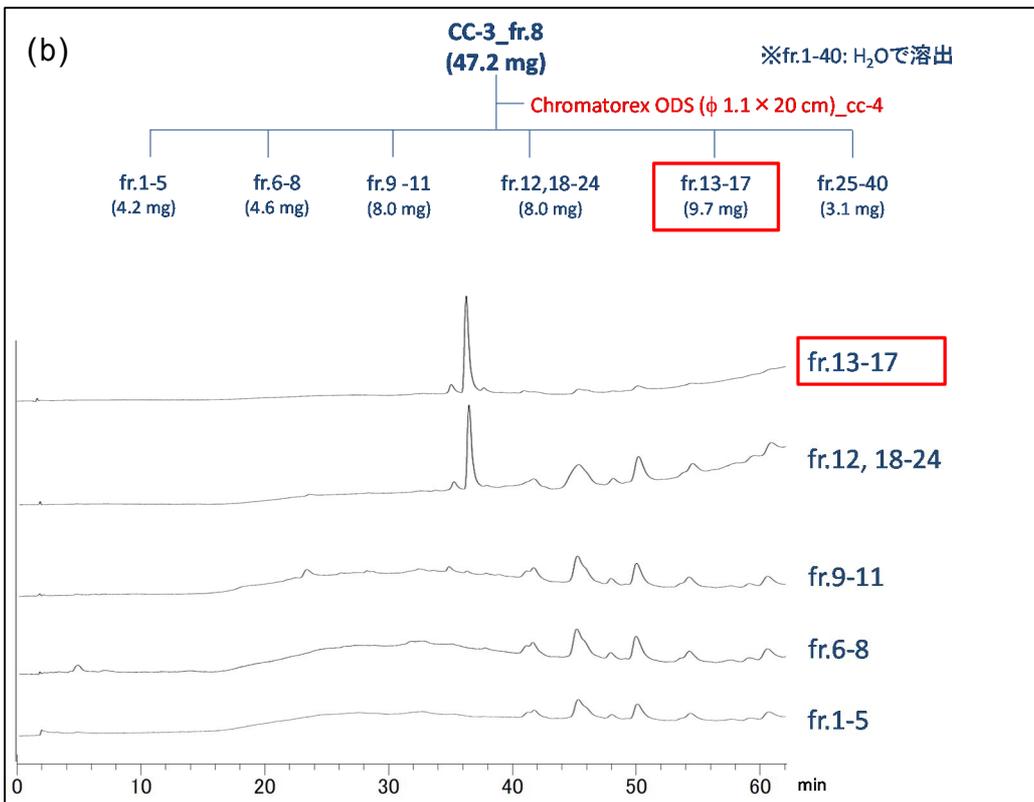
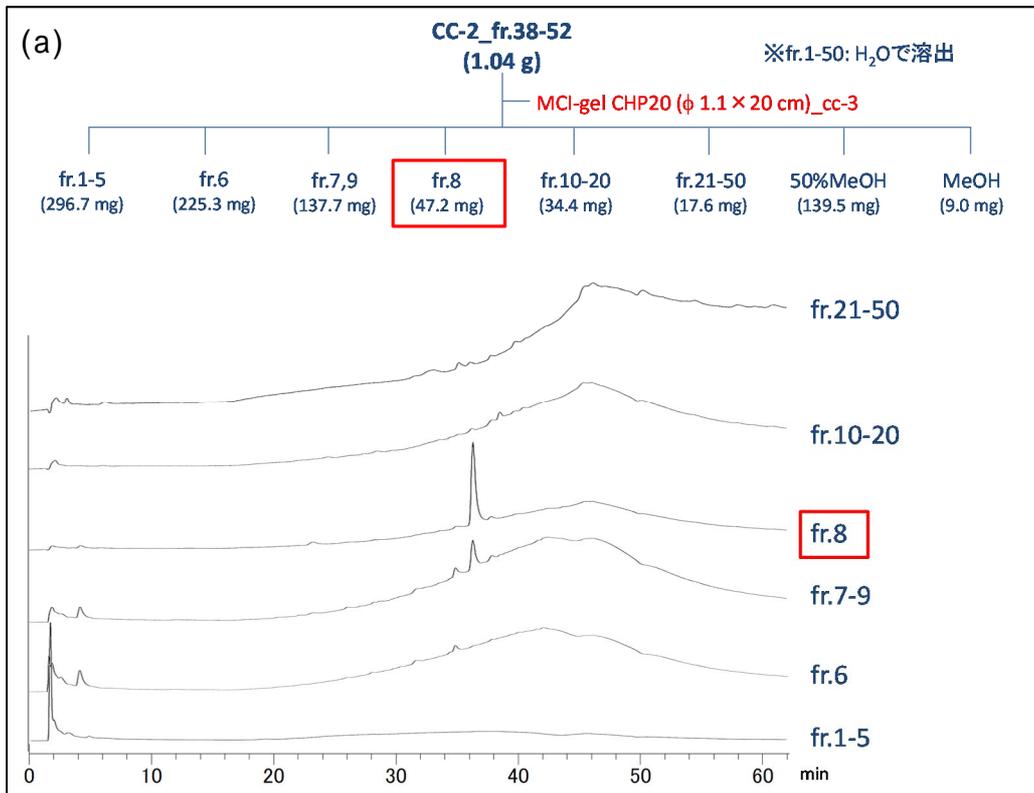


図 2. 水分画物の分離精製 2

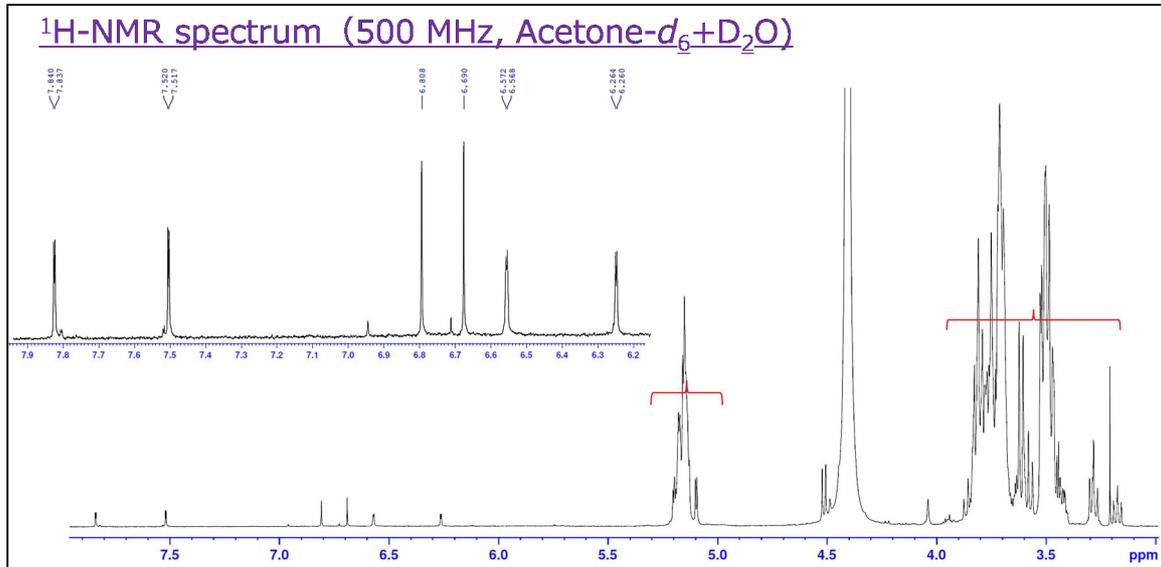


図 3. fr. 13-17 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

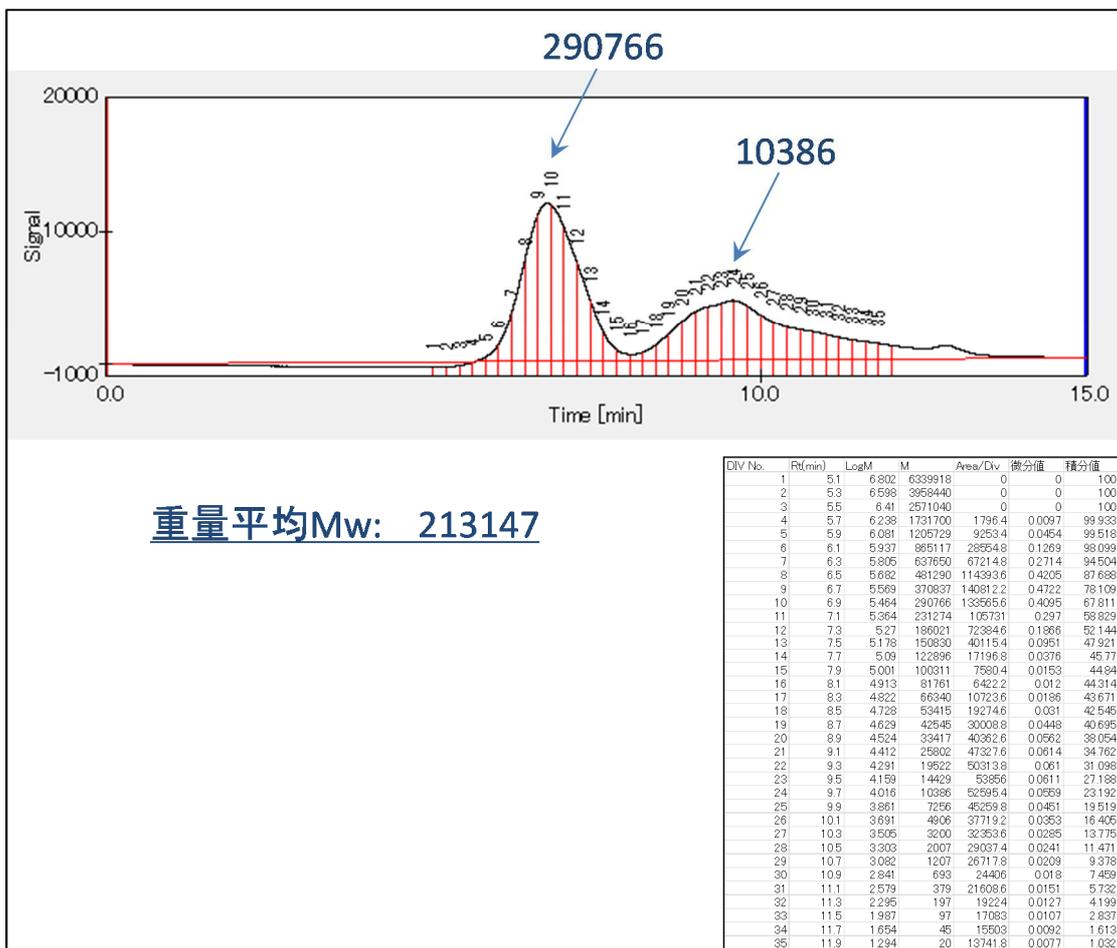


図 4. カキ色素の GPC 分析

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28年度分担研究報告書

分担研究課題：既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究
分担研究者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

既存添加物 モウソウチク抽出物の成分研究

要旨 既存添加物名簿記載のモウソウチク抽出物は「イネ科モウソウチク (*Phyllostachys heterocyclus* MITF.) の茎の表皮を、粉碎したものより、微温時エタノールで抽出して得られたもの」であり、2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンを主成分とするものとされる。本研究では、モウソウチク抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、平成26, 27年度の検討において製品含有成分として11種の既知化合物 [5-hydroxymethyl-2-furfural、4-hydroxybenzoic acid、*p*-coumaric acid、*trans*-ferulic acid、*N,N'*-diferuloylputrescine、arbutin、tachioside、isotachioside、3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside、koaburaside、lyoniresinol 9'-*O*-glucoside] とともに、新規化合物である propiophenone 4'-*O*-primeveroside [propiophenone 4'-*O*-(6-*O*-β-D-xylopyranosyl)-β-D-glucopyranoside] を単離し、その構造を明らかにしている。また、単離した化合物を標準品としてHPLC分析を行った結果、主検出成分として*p*-coumaric acid、3,4'- dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside、lyoniresinol 9'-*O*-glucosideを認めた一方、本製品中の主成分とされる2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinoneはマイナー成分として観察されるのみであったことを報告している。本年度はこれら結果を踏まえ、他の製品を分析し製品間における成分比較を行った結果、3製品間で共通の成分が観察され、本研究で明らかにした成分が指標成分の候補となり得ることが考察された。一方で、今回の条件でピークが検出されない製品もあり、製品間でのばらつきが認められた。また、既存添加物名簿において主成分とされる2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinoneは今回の測定条件ではいずれの製品中にもほとんど検出されておらず、製品の同等性を確保のための明瞭な指標成分の設定と、その分析実施の提案が示唆された。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 講師

A. 研究目的

既存添加物名簿記載のモウソウチク抽出物は「モウソウチクの茎の表皮から得られた、2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンを主成分とするもの」とされ、製造用剤として用いられる。また、その基原・製法・本質は、「イネ科モウソウチク (*Phyllostachys heterocyclus* MITF.) の茎の表皮を、粉碎したものより、微温時エタノールで抽

出して得られたもの」とされる。既存添加物の多くは植物抽出物であり、多数の成分が含まれているため、その品質管理には詳細な成分解析に基づいた規格作成が必要である。本研究では、モウソウチク抽出物製品中の含有成分を精査することによる品質規格作成のための基礎的な化学データの集積を目的として検討を実施し、含有成分として11種も化合物を明らかにするとともに、1種の新規化合物について構造解析を行い報告している。今年度はこれまでの結果を踏まえ、他製品間との成分比較を行った。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

試料となるモウソウチク抽出物は日本食品添加物協会を通じて入手した。試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を使用した。また、2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone の標準品は和光純薬工業社製 (046-27081) を用いた。

2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu LC-10Avp システム (島津製作所) を使用した。測定条件は以下のとおり。カラム: YMC-pack ODS AQ-3C2 (2.0 I.D. × 150 mm) (ワイエムシィ), カラム温度: 40 °C, 流速: 0.25 mL/min, 測定波長: 280 nm, 試料注入量: 3 µL, 移動相: (A) 0.01 M H₃PO₄; 0.01 M KH₂PO₄ (1:1) 及び (B) メタノール [濃度勾配条件: 0→30 min (B: 0→50%), 30→50 min (B: 50→60%), 50→75 min (B: 0%)].

3. HPLC 分析

モウソウチク抽出物製品を上記条件で分析した。また、単離した各化合物についても同条件で分析を行った。

C. 研究結果

1. 添加物製品の分析

モウソウチク抽出物製品について HPLC 分析を行った結果、図 1 に示すチャートが得られた。単離した各化合物 (化学構造は図 2) を標品として同条件で分析比較を行った (成分精査した試料は製品 A)。その結果、製品 A と同様のピークが 2 製品 (E, F) から観察されたが、その他の 3 製品はほとんどピークが検出されなかった。また、既存添加物名簿記載の主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は他の製品からもほとんど検出されなかった。

D. 考察

モウソウチク抽出物の 3 製品 (A, E, F) 間で共通の成分が観察されたことから、今回明らかにした成分が指標成分の候補となり得ることが考察される。一方で、今回の条件でピークが検出されない製品もあり、製品間でのばらつきが認められた。また、既存添加物名簿において主成分

とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は今回の測定条件ではいずれの製品中にもほとんど検出されておらず、製品の同等性を確保のための明瞭な指標成分の設定と、その分析実施の提案が示唆される。

E. 結論

モウソウチク抽出物製品について HPLC 分析を行った結果、3 製品間で共通の成分が観察され、今回明らかにした成分が指標成分の候補となり得ることが示唆された。一方で、今回の条件でピークが検出されない製品もあり、製品間でのばらつきが認められた。また、既存添加物名簿において主成分とされる 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone は今回の測定条件ではいずれの製品中にもほとんど検出されなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

H. 健康危機情報

なし

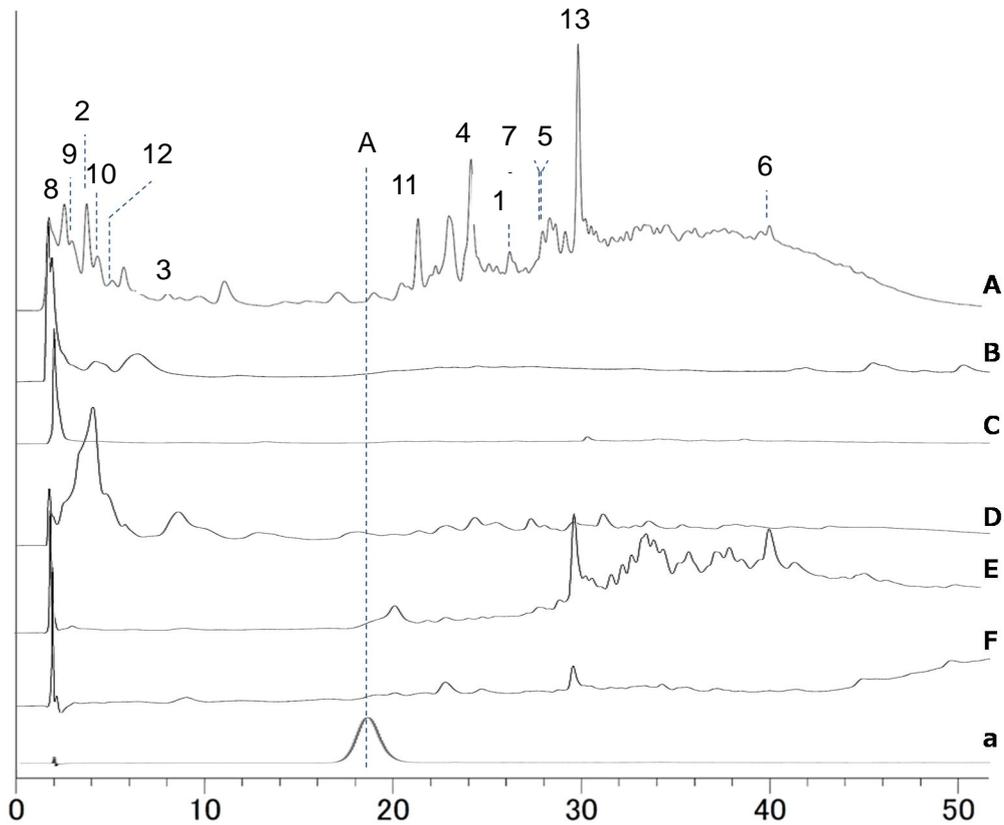


図1．モウソウチク抽出物製品の HPLC クロマトグラム (UV at 280 nm)

(製品 A ~ F , A は本研究で使用したもの . 試料 Lot. A: A289 , B: A420 , C: A422 , D: A425 , E: A427 , F: A442)

1: propiophenone 4'-*O*-primeveroside, **2:** 5-hydroxymethyl-2-furfural, **3:** 4-hydroxybenzoic acid, **4:** *p*-coumaric acid, **5:** *trans*-ferulic acid, **6:** *N,N'*-diferuloylputrescine, **7:** 4'-hydroxypropiophenone, **8:** β-arbutin, **9:** tachioside, **10:** isotachioside, **11:** 3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside, **12:** koaburaside, **13:** lyoniresinol 9'-*O*-glucoside, **a:** 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone

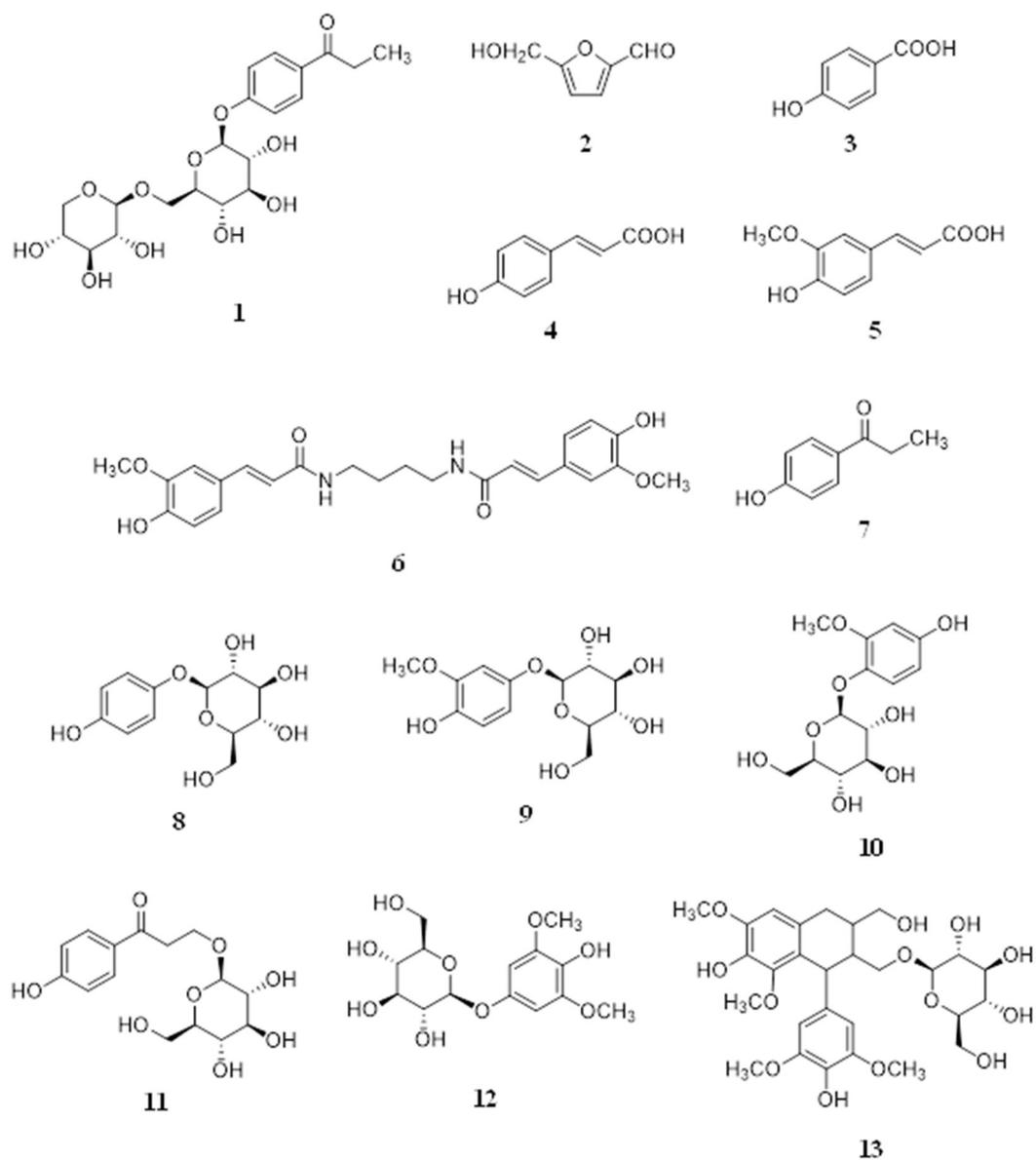


図 2 . 単離した成分の化学構造

1: propiophenone 4'-*O*-primeveroside, 2: 5-hydroxymethyl-2-furfural, 3: 4-hydroxybenzoic acid, 4: *p*-coumaric acid, 5: *trans*-ferulic acid, 6: *N,N'*-diferuloylputrescine, 7: 4'-hydroxypropiophenone, 8: β -arbutin, 9: tachioside, 10: isotachioside, 11: 3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside, 12: koaburaside, 13: lyoniresinol 9'-*O*-glucoside

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28年度研究分担報告書

研究分担課題： 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

研究分担者 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 カワラヨモギ抽出物中の有効成分カピリンの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、HPLC/PDA分析条件下におけるカピリン定量用内標準物質を設定することとした。PDA検出器における感度は化合物ごとに固有であるため、内標準物質に対するカピリンの相対感度係数 (Relative Response Factor: RRF) を求め、定量計算に適用する必要がある。そこで、本研究では定量用内標準物質としてヘプチルパラベンを選択し、¹H-qNMRとHPLC/PDAを組合せて、ヘプチルパラベンに対するカピリンのRRFを算出した。HPLC/PDAにより測定し、ヘプチルパラベンに対するRRFを適用して添加物中のカピリン含量を算出したところ、カピリン標準品の検量線（純度値適用）から算出した含量と殆ど差はなかった（0.002%以下）。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。

研究協力者

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

既存添加物カワラヨモギ抽出物は、既存添加物名簿¹⁾に記載されている保存料の1つで、その定義は、『カワラヨモギの全草から得られた、カピリンを主成分とするものをいう。』と記載されている (Fig. 1)。また、既存添加物名簿収載品目リスト²⁾の基原・製法・本質には、『キク科カワラヨモギ (*Artemisia capillaris* THUNB.) の全草より、室温時エタノール若しくは含水エタノールで抽出して得られたもの、又は水蒸気蒸留して得られたものである。有効成分はカピリン等である。』と記載されている。カワラヨモギ抽出物は、食品添加物公定書³⁾未収載であるため、有効成分カピリンの定量法を規定した成分規格案を作成する必要がある。カピリンの定量法としては、HPLC/PDAによる分析が有用と考えられる。しかし、PDA検出器における感

度は、化合物ごとに固有であるため、純度既知のカピリン標準品を設定する必要があるが、カピリンの標準品は市販されていない。この問題を解決するために、別の化合物の標準品をカピリンの定量用内標準物質として設定し、カピリンの標準品を必要としない定量法を確立することを考案した。そこで本研究では、定量用内標準物質に適した化合物を探索し、HPLC/PDA分析条件下での候補化合物ヘプチルパラベン (Fig. 1) に対するカピリンの正確な相対感度係数 (Relative response factor (RRF)) を、定量 NMR (¹H-qNMR) を応用して算出した。また、得られた RRF を適用し、カピリン標準品を必要としない定量法を検討した。

B. 研究方法

B-1. 試料

カワラヨモギ抽出物製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した A 社製品 1 (暗褐色)、製品 2 (黄褐色) 及び製品 3 (黄褐色) 計 3 製品を用いた (Table 1)。

B - 2 . 試薬

A 社標品 (非売品) である ^1H -qNMR 純度 99.5% のカピリン単離・精製品は, 日本食品添加物協会を通じて入手し, カピリン標準品として使用した.

ヘプチルパラベン試薬は 4 社 (a~d 社) 計 4 製品を購入して用いた.

NMR 測定用重溶媒は重メタノール (MeOH- d_4) (Isotec 社, 型番 151947) を用いた. ^1H -qNMR 基準物質は 1,4-BTMSB- d_4 (1,4-bis(trimethylsilyl) benzene- d_4) (和光純薬工業 (株), 99.8 ± 0.5%, 型番 024-17031) およびフタル酸ジエチル (DEP) (国立研究開発法人 産業技術総合研究所, 99.98 ± 0.01%, 型番 639-10081) を用いた.

上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品あるいは HPLC 用を使用した.

B - 3 . RRF の算出

ヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF は以下の式 (1) から求めた.

式 (1)

$$RRF = \frac{S_{Hep}}{S_{Cap}} \times \frac{H_{Cap}}{H_{Hep}} \times \frac{M_{Hep}}{M_{Cap}} \times \frac{A_{Cap}}{A_{Hep}}$$

S , プロトンシグナルの積分値; H , S に由来するプロトン数; M , 分子量; A , ピーク面積; Cap, カピリン; Hep, ヘプチルパラベン.

カピリンとヘプチルパラベンの秤量比が約 1 : 5, 2 : 7, 2 : 10 (合計約 6 mg, 9 mg, 12 mg) になるように秤量した 3 検体に 1.0 mL の MeOH- d_4 を加えて溶解した. これらの各溶液 0.6 mL をそれぞれ NMR 試験管に封入したものを RRF 算出用試料液とし, Table 2 に示した ^1H -qNMR 条件に付した. カピリンとヘプチルパラベンに由来するプロトンシグナルの積分値 (S) (カピリン: H-2 + H-6, H-3 + H-5, H-4; ヘプチルパラベン: H-2 + H-6, H-3 + H-5) を求め (Fig. 2), 由来するプロトン数 (H) と共に, 式 1 に代入した.

次に ^1H -qNMR に付した RRF 算出用試料液 10 μL を HPLC/PDA 分析条件下の移動相を用いて, 6.5 mL で希釈し, Table 3 に示した HPLC/PDA 分

析条件に付した. クロマトグラム上に観察されたカピリンおよびヘプチルパラベンのピーク面積 (A) を求め, 式 1 に代入した.

B - 4 . RRF を適用した HPLC/PDA による定量

製品 1~3 と B - 5 . ^1H -qNMR による純度測定により値付けされた a~d 社のヘプチルパラベン試薬を, 製品はセミマイクロ天秤 (BM-252, (株) AND 製) を, ヘプチルパラベンはウルトラマイクロ天秤 (XP2U, METTLER TOLEDO 社製) を用いて精密に量りとり, Table 4 に示す量で混合した (調製各 $n=1$). この混合試料を移動相 (水: アセトニトリル: ギ酸 = 500 : 500 : 1) を用いて 100 mL に定容し, HPLC/PDA 分析用試料液とした. HPLC/PDA 分析用試料液は, Table 3 に示した HPLC/PDA 分析条件に付した. なお, カラムは Inertsil ODS-4 (2.1 × 150 mm, 3 μm , GL science) のみを用いた. カピリンの含量は, 以下の式 (2) から求めた.

式 (2)

$$Cont(\text{wt}\%) = \frac{W_{Hep}}{W_{Sample}} \times \frac{A_{Cap}}{A_{Hep}} \times \frac{1}{RRF} \times \frac{P_{Hep}}{100}$$

W , 採取量; A , ピーク面積; RRF , 1.31; P , 純度; Cap, カピリン; Sample, 添加物製品.

B - 5 . ^1H -qNMR による純度測定

B - 5 - 1 . ^1H -qNMR 標準液調製

^1H -qNMR 基準物質 1,4-BTMSB- d_4 約 10 mg を精密に量り, MeOH- d_4 を用いて 50 mL に定容したものを ^1H -qNMR 標準液とした. また, 認証標準物質フタル酸ジエチル (DEP) を用い, 測定用に調製した ^1H -qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB- d_4 濃度を随時確認して使用した.

B - 5 - 2 . ヘプチルパラベンの純度測定

4 社 4 製品 (粉末状) のヘプチルパラベンを, それぞれ約 5.0 mg となるように精密に量りとり, B - 5 - 1 項で調製した ^1H -qNMR 標準液各 1.0 mL を加えて溶解した (調製各 $n=1$). これらの各溶液 0.6 mL をそれぞれ NMR 試験管に封入したものを ^1H -qNMR 用試料溶液とし, Table 2 に示した ^1H -qNMR 条件に付した (測定各 $n=$

3). ^1H -qNMR における 1,4-BTMSB- d_4 のプロトンシグナル積分値とヘプチルパラベンに由来する特定プロトンシグナル積分値の比を基に、各 ^1H -qNMR 用試料溶液中のヘプチルパラベンの純度を算出した。

C. 結果及び考察

C-1. カピリン定量用内標準物質の選択

HPLC/PDA 分析条件下におけるカピリン定量用内標準物質を選択した。定量用内標準物質としては、安価でコンスタントに入手可能で、試薬メーカーが記載する純度値と ^1H -qNMR での純度値に大きな差がないと予想されるものを考慮して、Table 5 に示す計 13 種の市販試薬を候補に挙げた。これらの市販試薬を、Table 3 に示した HPLC/PDA 分析条件に付し、得られた HPLC クロマトグラムを、カワラヨモギ抽出物のそれと比較したところ、ヘプチルパラベンはカワラヨモギ抽出物中のカピリンおよび夾雑物との分離が良好であった (Fig. 3)。

次に、ヘプチルパラベンの市販試薬がカピリンの定量用内標準物質として適しているのか検証を行なった。4 社 4 製品のヘプチルパラベンの市販試薬を ^1H -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 ^1H -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) (Table 6)、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、メーカー間純度の差や表示純度との差をあまり気にせずに定量用内標準物質として使用できることが明らかとなった。

C-2. ヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF の算出

ヘプチルパラベンとカピリンを混合した RRF 算出用試料液を ^1H -qNMR に付したところ、ヘプチルパラベンに由来する H-2 + H-6 および H-3 + H-5 の 2 つのプロトンシグナルは、カピリンの H-2 + H-6、H-4 および H-3 + H-5 の 3 つのプロトンシグナルと良好に分離しており (Fig. 2)、これらのプロトンシグナルから相対積分値を算出した後、各シグナルが由来するプロトン

数で除し、ヘプチルパラベンに対するカピリンのモル比の平均を求め、式 1 に代入した。各 RRF 算出用試料液中の平均モル比の値の相対標準偏差 (RSD) は 0.56% 以下であり良好であった (Table 7)。

次に RRF 算出用試料液を移動相で希釈し HPLC/PDA に付した。ヘプチルパラベンおよびカピリンの極大吸収波長は、256 nm および 284 nm を示したため、ヘプチルパラベンのピーク面積を 256 nm で求め、カピリンのピーク面積は 284 nm で求めることにした (Fig. 4)。ピーク面積は、3 社 3 製品のカラムを用いて求め、式 1 に代入することでヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF を算出した (Table 8)。3 社 3 製品のカラム (各カラム測定 $n=3$) での平均 RRF は 1.31、RSD 1.25% であり、カラムの影響を受けにくい堅牢な値であることが明らかとなった。したがって、RRF を適用したカピリン定量法には、ヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF 値として 1.31 を用いることとした。

C-3. RRF を適用した HPLC/PDA によるカピリンの定量

ヘプチルパラベンと製品 1~3 を精密に秤量 (Table 4) した HPLC/PDA 分析用試料液を HPLC/PDA に付し、カワラヨモギ抽出物製品中のカピリンの定量を行なった。秤量値およびピーク面積を求め、式 2 に代入することでカピリンの含量を算出した。また、算出された含量について、昨年度報告された⁴⁾、カピリン標準品 (非売品) の検量線 (^1H -qNMR 純度で校正) から算出された含量と比較し、本研究で定めた RRF の評価を行なった (Table 9)。両定量法で算出された含量は、概ね一致しており、その差は 0.002% 以下であったため、本法で用いた RRF 値が適切であるものと判断された。

D. 結論

本研究では、カワラヨモギ抽出物の有効成分であるカピリンの定量法を検討した。本研究で算出されたヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF を適用して HPLC/PDA によるカワラ

ヨモギ抽出物中のカピリンの定量を行なった。算出された定量値は、純度 99.5%のカピリンの量値と殆ど差はなく(0.002%以下)、検量線から求めた値を真値とすると、RRFを用いた定量法の真度は91~94%であった。本研究において確立した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。

E. 参考文献

- 1) 厚生省告示第120号(1996)“既存添加物名簿”平成8年4月16日。
- 2) 消費者庁次長通知“食品衛生法に基づく添加物の表示等について、別添1 既存添加物名簿収載品目リスト”平成22年10月20日、消食

単離・精製標品の検量線から直接算出された定

表第377号(2010)

- 3) 厚生労働省“第8版食品添加物公定書”2007。
- 4) 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保促進研究事業)、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、平成27年度分担研究報告書「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」

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

Table 1 カワラヨモギ抽出物試料情報

	製造元	状態	色
製品 1	A 社 Lot. 1	液体	暗褐色
製品 2	A 社 Lot. 2	液体	黄褐色
製品 3	A 社 Lot. 3	液体	黄褐色

Table 2 qNMR 測定条件

Spectrometer	ECZ600 (JEOL Ltd)
Spectral width	- 5 ~ 15 ppm
Data points	48014
Auto filter	on
Flip angle	90°
Pluse delay	60 s
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	25°C
Solvent	MeOH- <i>d</i> ₄
Reference material	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₄

Table 3 HPLC/PDA 分析条件

装置	Alliance 2695 separation module-2996 photodiode array (Waters)
カラム	Inertsil ODS-4 (2.1 × 150 mm , 3 μm , GL science) Atlantis dC18 (2.1 × 150 mm , 3 μm , Waters) TSKgel ODS-80TsQA (2.0 × 150 mm , 5 μm , TOSOH)
移動相	水 : アセトニトリル : ギ酸 = 500 : 500 : 1
カラム温度	40°C
流速	0.15 mL/min
PDA	190-600 nm
検出波長	カピリン : 284 nm ; ヘプチルパラベン : 256 nm
注入量	10 μL

Table 4 HPLC/PDA 分析用試料液中の製品とヘプチルパラベンの採取量 (mg)

製品 1	製品 2	製品 3	ヘプチルパラベン
122.2			0.4919
	1803.3		2.3904
		950.2	1.9311

Table 5 カピリン定量法の検討に用いた内標準物質候補市販試薬

試薬名	保持時間	製造元
4-ヒドロキシ安息香酸	3.2 min	東京化成工業, Cat No.99-96-7, Lot No.44CWL-ST
メチルパラベン	4.7 min	和光純薬工業, Cat No.99-76-3, Lot No. STN0409
エチルパラベン	5.6 min	和光純薬工業, Cat No.120-47-8, Lot No. SDK4955
プロピルパラベン	7.3 min	東京化成工業, Cat No.94-13-3, Lot No.AJ01
ブチルパラベン	9.8 min	和光純薬工業, Cat No.94-26-8, Lot No. SDP7282
アミルパラベン	13.9 min	東京化成工業, Cat No.6521-29-5, Lot No.FIF01
ヘキシルパラベン	20.1 min	東京化成工業, Cat No.1083-27-8, Lot No.PCX01
ヘプチルパラベン	31.5 min	和光純薬工業, Cat No.1085-12-7, Lot No. KPG0950
イソプロピルパラベン	7.0 min	東京化成工業, Cat No.4191-73-5, Lot No.GH01
イソブチルパラベン	10.0 min	東京化成工業, Cat No.4247-02-3, Lot No.AU01
ベンジルパラベン	10.0 min	東京化成工業, Cat No.94-18-8, Lot No.PCX01
4-ピフェニルカルボン酸メチル	26.1 min	和光純薬工業, Cat No.720-75-2, Lot No. KPK0210
安息香酸 2-ナフチル	46.2 min	和光純薬工業, Cat No.93-44-7, Lot No. TLH0334

Table 6 ヘプチルパラベン市販試薬の qNMR 純度値

	a 社	b 社	c 社	d 社
qNMR 純度 (%)	97.0 ± 3.3	96.6 ± 3.5	97.2 ± 3.4	97.4 ± 3.5
メーカー記載純度 (%)	97 (HPLC)	98 (HPLC)	98 (T)	98 (GC)

Table 7 RRF 算出用試料液中のヘプチルパラベンに対するカピリンの平均モル比

	*Average ± SD	RSD (%)
1 : 5	0.28 ± 0.00	0.47
2 : 7	0.41 ± 0.00	0.20
2 : 10	0.30 ± 0.00	0.56

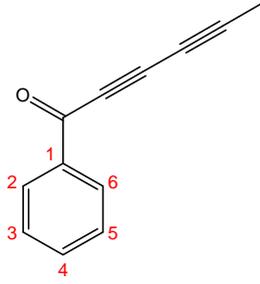
*n = 3 .

Table 8 ヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF

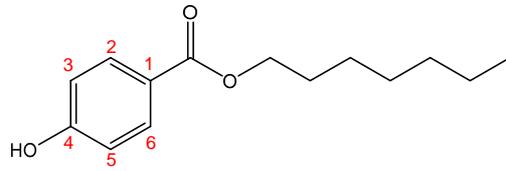
	1 : 5	2 : 7	2 : 10	Average	SD	RSD (%)
Inertsil ODS-4	1.32	1.30	1.32	1.31	0.01	1.11
Atlantis dC18	1.29	1.29	1.29	1.29	0.00	0.24
TSKgel ODS-80TsQA	1.32	1.30	1.32	1.31	0.01	1.11
Average	1.31	1.29	1.31	1.31		
SD	0.02	0.01	0.02		0.02	
RSD (%)	1.43	0.52	1.34			1.25

Table 9 添加物製品中のカピリン含量 (%)

		製品 1	製品 2	製品 3
RRF 法	平均	0.033	0.010	0.015
	SD	0.0008	0.0000	0.0001
	RSD (%)	2.3	0.1	0.5
検量線法	平均	0.035	0.011	0.016
	SD	0.0007	0.0001	0.0007
	RSD (%)	2.0	1.4	4.6



カピリン MW 168.19



ヘプチルパラベン MW 236.31

Fig. 1 カピリンとヘプチルパラベンの化学構造式

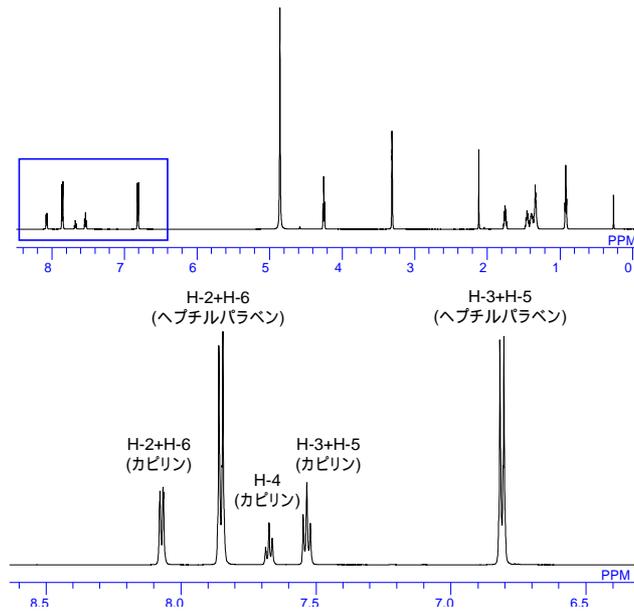


Fig. 2 RRF 算出用試料液のプロトン qNMR スペクトル

下段は、上段の枠を拡大したスペクトル。カピリンとヘプチルパラベンの重量比は約 2 : 7。

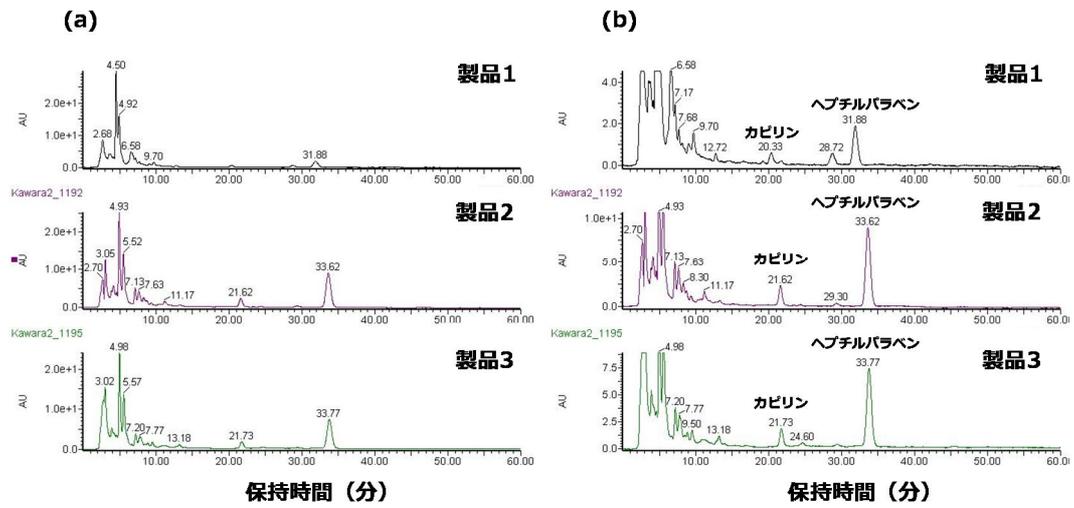


Fig. 3 ヘプチルパラベンとカワラヨモギ抽出物の HPLC/PDA クロマトグラム
 (a) 190-600 nm における PDA クロマトグラム . (b) (a) の拡大図 .

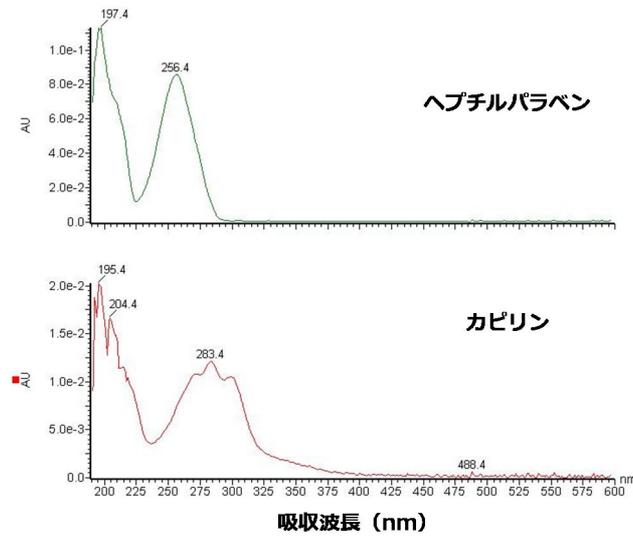


Fig. 4 ヘプチルパラベンとカピリンの UV 吸収スペクトル

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：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

研究分担者 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 前年度までの研究において、*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で同定できたが、残りの4成分については、分子量（MW）322、354、358および370の化合物と推定されたが、化合物の特定はできていなかった。本研究では、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4成分の化合物同定を行った。なお、MW 358およびMW 370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ではDPPHラジカル消去活性を示した。

研究協力者

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹 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

A. 研究目的

カンゾウ油性抽出物は、既存添加物名簿に記載されている酸化防止剤であるが、その成分規格は第8版食品添加物公定書には未だ記載されていない。公的規格を作成する上で、流通製品における主有効成分の把握が必要であり、これまでにDPPHラジカル消去活性測定法により、抗酸化活性画分の探索を行った。その結果、*G. glabra*由来のカンゾウ油性抽出物製品(KZ34)では、主に抗酸化活性を示す8成分が確認された。この内、1成分は市販標品との各種測定結果の比較により glabidin であると同定された。また、2成分は単離標品との各種測定結果の比較およびLC/MS/MSにより licochalcone B および hispaglabridin A と同定され、また他の1成分はLC/MS/MSにより kanzonol X と同定された。しかしながら、残り4成分については分子量(MW) 322、354、358 および 370 の化合物と推定され

たものの、化合物は特定できていなかった。

本研究では、*G. glabra*由来のカンゾウ油性抽出物流通製品において抗酸化活性寄与率の高かった8成分の内、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。また、既に標品との比較やLC/MS/MSにより同定していた4成分についても単離・精製を行い、構造解析結果から化合物の確認を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料

日本食品添加物協会を通じて供与されたカンゾウ油性抽出物KZ34(*G. glabra*由来と記載されている製品、褐色塊)を使用した。

B-2. 試薬およびカラム樹脂

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)は、B-4のTLC-DPPHではWako社製の試薬を、B-14のDPPHラジカル消去活性測定ではSigma社製の試薬を使用した。また、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)はAldrich製の試薬を使用した。

NMR測定用重溶媒は、methanol-*d*₄、acetone-*d*₆、

chloroform-*d* を使用した (Isotec 社製) . 上記以外の試薬・溶媒はすべて市販一級品 , 市販特級品または HPLC 用を使用した .

ゲル濾過樹脂は , Sephadex LH-20 を使用した (GE Healthcare 社製) . ODS 樹脂は , YMC*GEL ODS-A (細孔径 12 nm 粒子径 150 μm , AA12SA5 を使用した (YMC 社製) .

B - 3 . 使用機器

高速液体クロマトグラフ/四重極型質量分析計 (LC/MS) は , alliance Waters 2695 (HPLC) , Waters 2996 (PDA) , Micromass Quattro Micro™ (MS) を使用した (Waters 社製) . 分取 HPLC は , CBM-20A (システムコントローラ) , LC-20AD (ポンプ , 2 台) , DGU-20A_{3R} (デガッサー) , SPD-M20 (PDA) , CTO-20AC (カラムオーブン) , FRC-10A (フラクションコレクター) , LC solution (ソフトウェア) を使用した (SHIMADZU 社製) . NMR は , オートサンプラー付 JNM-ECA600 を使用した (JEOL 社製) . NMR のケミカルシフト値は , 各重溶媒のピークを基準とした .

B - 4 . TLC-DPPH 法による活性画分のスクリーニング

TLC プレートは , UNIPLATES SILICA GEL GF 250 microns を使用した (ANALTECH 社製) . 展開溶媒には , butanol/ acetone/ 5% ammonia water/ water (11/3/3/3) を調製して用いた . DPPH 40 mg を ethanol 100 mL に溶解し , DPPH 溶液を調製した . 分画試料を TLC プレートで展開後 , DPPH 溶液を噴霧し , 分画試料中の成分との反応により DPPH の色が消失あるいは薄くなる画分を DPPH ラジカル消去活性画分と判断した .

B - 5 . LC/MS による活性画分のスクリーニング

HPLC カラムは , Inertsil ODS-3 , 1.5 × 150 mm を使用した (GL science 社製) . または , C30 deversil UG-5 , 4.6 × 250 mm (C30 分析カラム) (野村化学製) を使用した . 移動相溶媒には , 0.1% ギ酸および 0.1% ギ酸を含む CH₃CN の混合溶液を用い , 送液は , liner gradient で行った . 検出は *m/z* 100-1000 , PDA 200-600 nm で行った . 抗酸化活性画分の単離・精製の際に指標として

用いた分画物試料は , 次に示す通りである .

KZ34 の frc11-22b , frc37-22b , frc44, 45-29b , frc44, 45-21b , frc54-24c , frc25-28b , frc25-25c , fr32-33C .

B - 6 . 液々分配

KZ34 (15.07 g) を ethyl acetate (EtOAc) / 40% methanol 溶液 (AqMeOH) (1:1 , 計 1.0 L) で液々分配を行った . 次いで , 40% AqMeOH 層を EtOAc で 3 回抽出した . 得られた EtOAc 層は , 無水硫酸ナトリウムを加え , 一晚脱水した後 , エバポレーターで濃縮した .

EtOAc 層および 40% aqMeOH 層につき TLC-DPPH および LC/MS により確認した . その結果 , EtOAc 層において , DPPH ラジカル消去活性が確認され , かつ LC/MS による解析では , glabridin が顕著に検出された .

B - 7 . Sephadex LH-20 による EtOAc 層の分画

EtOAc 層は , MeOH に溶解させた後 , Sephadex LH-20 によるゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った . 分画は , 1 つの画分 (fr) につき 15 ~ 20 mL で溶出を行い , fr1 ~ fr96 までを得た . なお , 移動相には , methanol (MeOH) を用いた .

得られた画分について TLC-DPPH を行った結果 , fr5 ~ fr6 , fr10 ~ fr45 に強い活性が認められた . 次いで , TLC-DPPH と LC/MS の結果をもとに , fr1 ~ fr10 (**fr 0**) , fr11 ~ fr17 (**fr 1**) , fr18 ~ fr27 (**fr 2**) , fr28 ~ fr37 (**fr 3**) , fr38 ~ fr45 (**fr 4**) , fr46 ~ (**fr 5**) としてそれぞれの画分を合わせ , エバポレーターで濃縮した . さらに LC/MS で再測定した結果 , 目的の活性成分は **fr 2** に含まれていた .

B - 8 . YMC*GEL ODS-A による **fr 2** の分画

fr 2 を MeOH で完全に溶解させ , ODS を加えて , エバポレーターで濃縮し , ODS-**fr2** 粉末とした . ODS-**fr2** 粉末は , 逆相カラムにスラリーとして 1/3 量を負荷し , 逆相カラムクロマトグラフィーを , 計 3 回繰り返した . 30% aqMeOH , 40% aqMeOH , 60% aqMeOH , 80% aqMeOH の順で各 500 mL づつを用いて溶出し , 次いで , MeOH 1000 mL , CH₃CN 500 mL を順に用いて溶

出した .分画は ,1つの画分につき 15~20 mLで行った(1回目を fra2-, 2回目を frb2-, 3回目を frc2-と表記する) .得られた画分は TLC-DPPH および LC/MS で分析した .

1 回目の逆相クロマトグラフィーの結果 , fra2-50 , fra2-65 ~ fra2-70 , fra2-80 ~ fra2-85 付近にラジカル消去活性が認められた . 詳細な成分分布を確認する目的で , TLC-DPPH の結果をもとに fra2-45 ~ fra2-100 までの LC/MS 分析を行った . LC/MS と TLC-DPPH データを合わせて検討すると , 主に fra2-50 付近は , licochalcone B , fra2-65 ~ fra2-70 は , glabridin , fra2-80 ~ fra2-85 は , 推定分子量(MW) 354 の抗酸化活性成分を含有していた . 各画分は , 上記分析データをもとにエバポレーターで濃縮した .

2 回目の分画は , 1回目と同様の方法で行った . ただし , 30% aqMeOH , 40% aqMeOH での溶出は行わず , 60% aqMeOH での溶出から始め , frb2-1 ~ frb2-70 を得た . そのうち , frb2-1 ~ frb2-60 までを LC/MS で分析した . その結果 , 各活性成分の溶出は , 1回目の ODS 画分とほぼ同じ挙動を示した . よって , frb2-10 ~ frb2-16 , frb2-17 ~ frb2-26 , frb2-27 , frb2-28 , frb2-29 , frb2-30 , frb2-31 , frb2-32 , frb2-33 , frb2-34 , frb2-35 , frb2-36 , frb2-37 , frb2-38 , frb2-39 , frb2-40 , frb2-41 , frb2-42 , frb2-43 , frb2-44 , frb2-45 , frb2-46 , frb2-47 , frb2-48 , frb2-49 , frb2-50 ~ frb2-60 となるよう一部の画分は合わせた . 3 回目の分画は 2 回目と同様の方法で行った (frc2-1 ~ frc2-70) .

B - 9 . Licochalcone B の単離・精製

frb2-10 ~ 16 に含まれる licochalcone B を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 deversil UG-5 , 10.0 × 250 mm (C30 カラム) (野村化学) , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は , 156.0 mg であった .

B - 10 . Glabridin および kanzonol X の単離・精製

frb2-38 ~ 42 39 ~ 42 に含まれる glabridin , kanzonol X を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 50%

CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は , glabridin が 1035.7 mg , kanzonol X が 134.0 mg であった .

B - 11 . MW 354 の抗酸化活性成分および hispaglabridin A の単離・精製

frb2-45 に含まれる MW 354 の抗酸化活性成分と hispaglabridin A を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 55% CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は , hispaglabridin A が 231.5 mg であった .

MW 354 の抗酸化活性成分を含む画分は , 別の物質も含んでいたため , 再度精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 42% CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は , 59.5 mg であった .

B - 12 . MW 322 の抗酸化活性成分の単離・精製

frb2-31 に含まれる MW 322 の抗酸化活性成分を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 40% CH₃CN (4.0 mL/min)とした .

MW 322 の抗酸化活性成分を含む画分には別の物質も含まれていたため , 再度 , 分取 HPLC を行った . その条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 30% CH₃CN (4.0 mL/min)とした . 単離収量は 133.3 mg であった .

B - 13 . MW 358 および MW 370 の抗酸化活性成分の単離・精製

frb2-30 に含まれる MW 358 および MW 370 の抗酸化活性成分を単離・精製した . 分取 HPLC 条件は , C30 カラム , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 35% CH₃CN (4.0 mL/min)とした .

C30 カラムでは , MW 358 および MW 370 の抗酸化活性成分は分離しなかったため , COSMOSIL PACKED COLUMN NAP , 4.6 × 250 mm (NAP カラム) (ナカライテスク株式会社製)を用いて単離・精製した . その分取 HPLC 条件は , 移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH₃CN (1.0 mL/min)で行った . 単離収量は , MW 370 の成分は 27.2 mg , MW 358 の成分は 26.0 mg であ

った。

MW358 は夾雑物を含んでいたため、さらに分取 HPLC を行った。その条件は、C30 カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 35% CH₃CN (4.0 mL/min) で精製した。

なお、MW 358, MW 370 は、単離収量が少なかったため、frc2-30 より、上記と同様の方法で単離・精製した。

B - 14 . DPPH ラジカル消去活性測定

試験管、またはサンプリグチューブに試料溶液 200 μL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μL を添加して混合し、そこに DPPH 溶液 1 mL を加え、直ちに試験管ミキサーで 10 秒間撹拌した。その後、室温暗所にて静置した。DPPH 溶液の添加から正確に 30 分後に 517 nm の吸光度を測定した。吸光度測定のパランク溶液には 99.5% エタノール 1.2 mL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μL の混合液を用いた。

試料溶液添加時の吸光度を A_s 、試料溶液の代わりに 99.5% エタノールを添加した際の吸光度を A_c とし、次の計算式から阻害率 (%) を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

C. 結果及び考察

C - 1 . 抗酸化活性成分の単離・精製

図 1 に単離・精製のスキームを示す。

C - 2 . Licochalcone B の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で yellow であった。LC/MS では、KZ34 frc11-22b と保持時間 (R.T.)、UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 20.22 min, UV; λ_{\max} 368 nm, MS; m/z 285 [M+H]⁺, m/z 287 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ および methanol-*d*₄ に溶解させて行った。また、既報¹⁾の文献値(溶媒: methanol-*d*₄)をもとに帰属し licochalcone B と同定した。

C - 3 . Glabridin の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で pearl であった。LC/MS では、KZ34 frc37-22b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 50% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 23.42 min, UV; λ_{\max} 228, 281 nm, MS; m/z 325 [M+H]⁺, m/z 323 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ に溶解させて行った。市販標品のシフト値と比較し帰属した。

C - 4 . Kanzonol X の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で brown であった。LC/MS では、KZ34 frc44, 45-29b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 50% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 49.52 min, UV; λ_{\max} 207, 283 nm, MS; m/z 395 [M+H]⁺, m/z 393 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ に溶解させて行った。また、既報²⁾の文献値(溶媒: acetone-*d*₆)をもとに帰属した。

C - 5 . Hispaglabridin A の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で brown であった。LC/MS では、KZ34 frc54-24c と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム、移動相が 0.1% ギ酸を含む 55% CH₃CN (1.0 mL/min) で、R.T.; 56.95 min, UV; λ_{\max} 229, 280, 293 nm, MS; m/z 393 [M+H]⁺, m/z 391 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ に溶解させて行った。また、chloroform-*d* に再溶解させて測定した。chloroform-*d* 中では難溶であり、C-7, C-9, C-2', C-4' の 4 級炭素が検出されなかったものの、既報³⁾の文献値(溶媒: chloroform-*d*)をもとに帰属し hispaglabridin A と同定した。

C - 6 . MW 354 の化合物の同定

LC/MS では、KZ34 frc44, 45-21b と R.T., UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、MS; m/z 355 [M+H]⁺, m/z 353 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は、acetone-*d*₆ および chloroform-*d*

にそれぞれ溶解させて行った。また、既報³⁾の文献値(溶媒: chloroform-*d*)をもとに帰属し 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin と同定した。

C - 7 . MW 322 の化合物の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で white であった。LC/MS では、KZ34 frc32-33b と R.T. , UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 30% CH₃CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 181.13 min , UV; λ_{\max} 214 , 248 , 284 , 295 , 324 nm , MS; m/z 323 [M+H]⁺ , m/z 321 [M - H]⁻ であった。

Glabrene は、既報⁴⁾の文献値(溶媒: methanol-*d*₄: chloroform-*d*=1:1)をもとに NMR 測定を行った。その結果、¹H NMR で -0.07 ppm の誤差、¹³C NMR で 0.8 ppm の誤差で帰属できた。なお 2次元 NMR による帰属も一致し glabrenec (cas no. 60008-03-9) と同定した。

C - 8 . MW 358 の化合物の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で brown であった。LC/MS は、KZ34 frc25-28b と R.T. , UV および MS スペクトルが一致した。その分析値は、C30 分析カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 35% CH₃CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 37.65 min , UV; λ_{\max} 230 , 290 nm , MS; m/z 359 [M+H]⁺ , m/z 357 [M - H]⁻ であった。

NMR 測定は chloroform-*d* に不溶であったため、methanol-*d*₄ および acetone-*d*₆ に溶解させて行った。その結果、既知化合物であったため、既報⁵⁾の文献値(溶媒: acetone-*d*₆)をもとに帰属し cas no. 938190-35-3 の化合物であると同定した。

C - 9 . MW 370 の化合物の同定

物理化学的性状は、乾燥状態で yellow であった。LC/MS の分析値は、NAP カラム, 移動相が 0.1% ギ酸を含む 25% CH₃CN (1.0 mL/min) で, R.T.; 114.07 min , UV; λ_{\max} 255, 364 nm , MS; m/z 371 [M+H]⁺ , m/z 369 [M - H]⁻ であった。なお、この分析値は、既報⁶⁾の LC/MS の UV および MS の値と一致した。

NMR 測定は chloroform-*d* に難溶であったた

め、methanol-*d*₄ および acetone-*d*₆ に溶解させて行った。以上の結果、既知化合物であった。よって、既報⁵⁾の文献値(溶媒: acetone-*d*₆)をもとに帰属し cas no. 905708-40-9 の化合物であると同定した。

C - 10 . 単離・精製画分の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)

単離・精製画分の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)測定の結果を、表 1 に示す。いずれの画分も活性が認められた。

今後、各画分に含まれる単離成分の純度を ¹H-qNMR 等の手法により確認することで、各成分の単位量当たりの活性(比活性)を算出することができると考えられる。

D . 結論

本研究では、*G. glabra* 由来のカンゾウ油性抽出物流通製品において抗酸化活性寄与率の高かった 8 成分の単離・精製を行った。これらの単離・精製物は、LC/MS 分析で、各抗酸化活性物質の指標となる分画物試料と R.T. , UV および MS スペクトルが一致した。各単離・精製物構造解析結果から、未同定であった 4 成分の同定を行った。その結果 4 成分(MW 322, 354, 358, 370) の化合物を同定した。なお、これらの同定成分の内、MW 370 および MW 358 の化合物は、これまでの報告⁵⁾において 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、今回のこれらの単離画分は抗酸化活性を示した。また、既に市販標品や単離標品との比較や LC/MS/MS により同定していた 4 種の抗酸化成分 (glabridin , licochalcone B , kanzonol X および hispaglabridin A) 相当画分についても単離・精製を行い、NMR 測定を行ったところ、同定に問題ないことが確認された。

本研究より、カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性に glabridin だけではなく、licochalcone B , kanzonol X , hispaglabridin A , 3'-hydroxy-4'-methoxyglabridin および glabrene 等多数の化合物が関与していることが示された。

E. 参考文献

- 1) Kiichiro Kajiyama, Sachio Demizu, Yukio Hiraga, Kaoru Kinoshita, Kiyotaka Koyama, Kunio Takahashi, Yukiyo Tamura, Kenzo Okada, Takeshi Kinoshita. Two prenylated retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, **31**(9), 3229-3232 (1992).
- 2) Toshio Fukai et.al. Isoprenylated flavonoids from underground parts of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry*, **43**(5), 1119-1124 (1996).
- 3) Takeshi Kinoshita et.al. Isoflavan derivatives from *Glycyrrhiza glabra* (Licorice). *Heterocycles*, **43**(3), 581-588 (1996).
- 4) Takeshi Kinoshita, Yukiyo Tamura, Kenji Mizutani. Isolation and synthesis of two new 3-arylcoumarin derivatives from the root of *Glycyrrhiza glabra* (Licorice), and structure revision of an antioxidant isoflavonoid, glabrene. *Natural Product Letters*, **9**, 289-296 (1997).
- 5) Minpei Kuroda, Yoshiro Mimaki, Shinichi Honda, Hozumi Tanaka, Shinichi Yokota. Phenolics from *Glycyrrhiza glabra* roots and PPAR- ligand-binding activity. *Bioorganic and medicinal chemistry*, **18**, 962-970 (2010).
- 6) 多田 敦子, 受田 浩之, 島村 智子, 石附 京子, 杉本 直樹. 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25年度分担研究報告書: 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

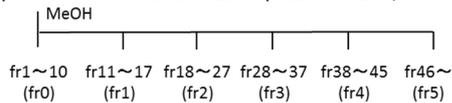
なし

カンゾウ油性抽出物 KZ34 15.07 g

EtOAc層 / 40% aqMeOH層

| EtOAc で40% aqMeOH層を3回抽出

Sephadex LH-20による分画化 (2回繰り返す, 1frあたり~20 mL)



YMC*GEL ODS-AIによる分画化 (3回繰り返す, 1frあたり~20 mL)

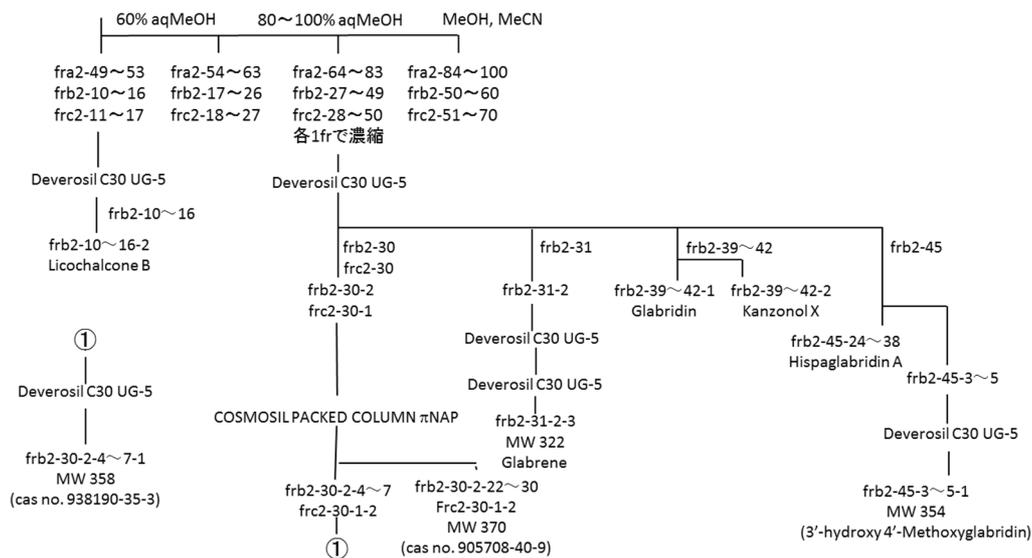


図 1 カンゾウ油性抽出物における単離・精製のスキーム

表 1 単離・精製画分の DPPH ラジカル消去活性測定結果

	サンプル重量 (mg)	原液濃度 (mg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)	TEAC (μg TE/μg sample)
Licochalcone B	3.18	1.590	0.0444	44.36	1.65
Glabridin	2.55	1.275	0.2857	285.71	0.26
Hispaglabridin A	1.91	0.955	0.0937	93.72	0.78
Kanzonol	1.90	0.950	0.1493	149.25	0.49
MW 354	2.20	1.100	0.6320	631.95	0.12
MW 358	1.91	0.955	0.1910	190.99	0.38
MW 370	2.01	1.005	0.1824	182.37	0.40
MW 322	5.52	2.760	0.2214	221.42	0.33
Trolox IC ₅₀ =		72.99 μg/mL			

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28年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法の検討

～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：青色素の構造の解明～
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

研究要旨 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。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。昨年度は、青色素の前駆体と考えられる黄色素Y1及びY2の構造を明らかとした。本年度は引き続き、クチナシ青色素の色素生成メカニズムを明らかとするため、モデル実験下、色調変化の観察と共に青色素B1及びB2を単離し、その構造を推定した。その結果、青色素B1及びB2は、前駆体である黄色素Y1及びY2が繰り返し重合した化合物であると推定された。

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

既存添加物収載品目リストに収載されるクチナシ青色素は、「クチナシの果実から得られたイリドイド配糖体とタンパク質分解物の混合物にβ-グルコシダーゼを添加して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」と定義されている。青色素成分は、イリドイド配糖体のゲニポシド(geniposide)を原料としてアミノ酸が反応して生成するものと考えられているが、その主色素成分の化学構造及び色素生成メカニズムは明らかとされていない。

そこで、我々はクチナシ青色素の主色素成分の生成過程及び反応生成物の化学構造を明らかとするため、反応出発原料となるゲニピン

(genipin)とベンジルアミン(benzylamine)を用いたモデル実験を行った。モデル実験の結果、Fig. 1に示す反応機構が示唆された。

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、黄色化合物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Y1'は、速やかに脱水し黄色化合物Y2となり、その後、青色素成分へ変化または重合していくものと考えられた。また、Y1からY2への脱水反応は遅く、一方、Y2から青色素成分への変化または重合は早いと考えられた(Fig.1)。すなわち、単離した黄色化合物Y1及びY2は、共に青色素成分の前駆体であると考えられた。

本年度は、既存添加物クチナシ青色素の主色素成分の化学構造及び青色素生成メカニズムを明らかとするため、昨年度に引き続き、モデル実験を行い、前駆物質である黄色化合物Y1及びY2より生成する青色素の化学構造を検討すると共にその生成機構について考察したの

で報告する。

B. 研究方法

B-1) 試薬等

本研究では、クチナシ青色素のモデル合成実験のため、以下の市販試薬を用いた。

ゲニピン(Wako, 078-03021, Lot: CTF5047), ベンジルアミン(Wako, 029-05273, Lot: CTP1798), 1,4-BTMSB- d_4 標準物質(Wako, 024-17031, Lot: DCL1923), MeOH- d_4 (ISOTEC, 151947, Lot: IY2101), TLC プレート: Silicagel60 F254 (MERCK, #5715, 20x20cm, 250um, 1x5cm にカットして使用), シリカゲル充填剤: シリカゲル 60 (MERCK, 1.07734.1009, 0.063-0.200mm)

その他溶媒は HPLC グレード, または特級を使用した。

B-2) 装置

モデル実験により得られた生成物の分析には以下の装置を用いた。

LC/MS, UPLC/TOF-MS 及び prepLC 装置・測定条件は Table 1~3 に示した NMR 測定には, JEOL 製 JNM-ECZ600 (JEOL CH UltraCOOL probe) を使用した。スペクトルの化学シフトはすべて native scale のまま δ 値を ppm 単位で表示した。

B-3) ゲニピンとベンジルアミンの反応追跡(LC による追跡)

昨年度の報告において, 出発原料のゲニピンとベンジルアミンはモル比 1:1 で反応することが示された。そこで, 各 0.1 mmol/20 mL (MeOH 溶液) で調製し, 混合直後から青変後まで波長 600 nm における LC/PDA クロマトグラムの変化を観察した(LC 分析条件: Table 1)。別に Y1 及び Y2 画分を昨年度の方法で予め単離し, 減圧乾固後, MeOH に再溶解した溶液についてその経時変化を同 LC 条件により観察した。

B-4) ゲニピンとベンジルアミンの反応追跡(NMR による追跡)

ゲニピン 0.4 mmol を, 0.2 mg/mL の 1,4-BTMSB- d_4 (NMR 基準物質) /MeOH- d_4 溶液

0.6 mL に溶かし, 5 mm ϕ NMR 試料管に封入し, ゲニピンのみのスペクトルを測定した。次に, ゲニピンと当モル量になるようにベンジルアミン (40 μ L) を試料管に直接添加し, 混合直後からの一次元 NMR スペクトルの変化を観察した。NMR スペクトルは, ^1H -qNMR (測定時間 7 分) と ^{13}C -NMR (測定時間 12 分) を 1 セットとし, 次の条件で測定した。 ^1H -qNMR: 測定温度 = 室温, RG = 20, scan = 4 回, プロトンシグナル強度に定量性を持たせるため繰り返し時間を 64 s ($> T_1 \times 5$ 倍) とした。

^{13}C -NMR: 測定温度 = 室温, RG = 56, scan = 256 回, 定性条件下で繰り返し測定した。

B-5) 青色素成分の単離精製

ゲニピン及びベンジルアミン各 0.1 mmol を MeOH 5 mL に溶かし, 封管中, 80 $^\circ\text{C}$ で 5 時間反応させた。反応液に水 (50 mL) を加え, HCl で弱酸性にした後, 酢酸エチル (50 mL) で 3 回液-液抽出し, 酢酸エチル層に溶解する青画分を得た。減圧下, 酢酸エチルを留去後, 少量の展開溶媒に再溶解したものを精製用の試料溶液とし, Si オープンカラム (展開溶媒: クロロホルム: MeOH = 10:1, $\phi 20$ mm \times 140 mm 充填) に付した。得られた青色素成分画分をまとめ, 減圧下, 溶媒を留去し, 70% MeOH 溶液に再溶解し, Table 3 に示す条件の prepLC に付し, 青色素成分 B1 (保持時間 22 分) 及び B2 (保持時間 28 分) を精製した。それぞれ減圧乾固後, 重溶媒に溶かし, NMR (^1H , ^{13}C , COSY, ^1H - ^{13}C -HMQC, ^1H - ^{13}C -HMBC) 及び UPLC/TOF-MS (分析条件, Table 2) 測定を行い, 得られたスペクトルデータより化学構造を推定した。

C. 結果及び考察

C-1) LC による Y1 及び Y2 の経時的観察

ゲニピンとベンジルアミンを混合した場合, その溶液中には黄色化合物 Y1 及び Y2 が生成し, 次に溶液が青色に変化するに伴い, Y2 が減少することを昨年度報告した。このことから, 黄色化合物 Y1 及び Y2 は青色素の前駆体であると考えられた。本年度は引き続き, 溶液が青くなつてからの挙動を観察した。

Fig.2には、Table 1のLC条件下、検出波長 600 nm で青色素成分のピークが時間の経過と共にどのように変化するか観察した結果を示した。なお、このLC分析条件では、黄色化合物 Y1 及び Y2 は保持時間 12 分及び 14 分にそれぞれ観察される。ゲニピン及びベンジルアミン 1:1 の混液では、液色が緑色となったとき、保持時間 16.5 分付近にピークが出現し、液色が青色に変化したときには、保持時間 10~20 分の幅広いピークとともに、15~17 分付近に数本飛び出たピークが生じた。さらに時間経過させると保持時間 10~20 分にわたる幅広いピークになることが確認された(Fig. 2a)。

次に、Si オープンカラムにより精製した黄色化合物 Y1 及び Y2 画分を MeOH に再溶解し、同条件の LC に付し、液色の変化及びピークの出現を経時的に観察した (Fig. 2b, 2c)。Y1 の溶液は薄い黄色溶液であったが、時間と共に色調が変化し、薄い水色に変化した。Fig. 2b には示していないが、PDA(190-800 nm)により、保持時間 12 分に観察される Y1 のピーク面積の経時的な変化を確認したところ、ほとんど変化しなかった。一方、検出波長 600 nm のクロマトグラムでは保持時間 16 分付近に小さな幅広いピークが時間経過と共に出現した。したがって、黄色化合物 Y1 は青色素の前駆体ではあるが非常に反応速度が遅いと考えられた。一方、Y2 の溶液は橙色の溶液であったが、時間経過と共に青色に変色し、最終的に黒色に近い青色になった。別に PDA(190-800 nm)により、保持時間 14 分に観察される Y2 ピークの経時的な変化を確認したところ、完全に消失した。また、検出波長 600 nm におけるクロマトグラムの経時的な変化は、ゲニピン及びベンジルアミン 1:1 の混液の挙動と類似していた。したがって、黄色化合物 Y2 は青色素の前駆体であり、生成後、直ちに青色素成分に変化するものと考えられた。

いずれの経時的な観察においても、検出波長 600 nm のクロマトグラム上には青色素成分に由来すると考えられるピークが幅広く観察されたことから、前駆体である Y1 及び Y2 が複雑に重合することによって青色素成分に変化し

ていると考えられた。

C-2) NMR による Y1 及び Y2 の経時的観察

C-1)で示したとおり、Y1 及び Y2 は青色素成分の前駆物質であることは明らかである。そこで、その化学構造の変化を追跡するために NMR 測定を行った。予めゲニピンのみを MeOH- d_4 に溶解し、 ^1H -qNMR 及び ^{13}C -NMR 測定した後、当モル量のベンジルアミンを添加し、混合直後からの経時変化を観察した。なお、生成物の濃度変化がわかるように内標 (1,4-BTMSB- d_4) を添加し、 ^1H -qNMR と ^{13}C -NMR を 1 セットとして繰り返し測定を行った(Fig. 3, 4)。その結果、時間の経過と共に NMR 試験液は赤褐色に変化し、ゲニピン由来のシグナルは消失し、Y2 由来のシグナルと考えられるものと共に非常に小さなシグナルが観察されるのみであった。Fig. 3, 4 には反応開始後 20 分までの NMR スペクトルを示したが、更に 1.8 ヶ月後に測定してもスペクトルパターンに変化はなく、内標 (1,4-BTMSB- d_4) に対するシグナル強度が低下しただけであった。この反応液の NMR 試験管を傾けると溶液は赤褐色であるが、ガラス壁面が青色に着色していたことから、沈殿あるいはガラス面への吸着のために、NMR 試験液中に青色素成分はほとんど溶解して存在しておらず、NMR 測定によりシグナルとして観察できなかったと考えられた。この NMR 測定の結果と C-1)の LC 分析の結果を合わせて考えると、生成する青色素成分は溶解度が非常に低く、また、分子サイズの大きい複雑な重合物であることが推測された。

C-3) 青色素 B1 及び B2 の化学構造

Fig. 2 に示したとおり、ゲニピン及びベンジルアミンを当モル量反応させた溶液を LC 分析したとき、保持時間 10~20 分付近に青色素成分に由来する幅広いピークが観察される。この幅広いピークには、鋭いピークがいくつか含まれており、更に反応を継続するとこの鋭いピークは徐々に小さくなる。したがって、この鋭いピークはある程度重合したものでそれ以降重合反応が進みにくくなった化合物であると推

定した。そこで、このピークに由来する青色成分の単離を試みた。

ゲニピン及びベンジルアミンの反応液を水で希釈し、HCl 酸性にして酢酸エチルで液-液抽出したところ、酢酸エチル層に溶解する青色成分が得られた。この成分を Si オープンカラムに付して更に精製した後、Table 3 に示す条件の prepLC に付し、青色成分 B1 及び B2 を得た。得られた青色成分 B1 及び B2 を Table 1 に示す条件の LC/MS に付し、その精製度を確認した (Fig. 5)。その結果、青色成分 B1 は保持時間 16.0 分にシャープなピークを与え、極大吸収波長 604.9 nm、ESI positive モードにおいて m/z 541.2 のイオンを与えるものであった。また、青色成分 B2 は保持時間 16.4 分にシャープなピークを与え、極大吸収波長 617.9 nm、ESI positive モードにおいて m/z 555.2 のイオンを与えるものであった。更に、青色成分 B1 及び B2 について、Table 2 に示す条件で UPLC/TOF-MS により精密質量を測定したところ、ESI positive モードにおいて、B1 が m/z 541.2119、B2 が m/z 555.2299 を与え、B1 に由来する positive イオンの組成式が $C_{35}H_{29}N_2O_4$ (calcd. m/z 541.2127)、B2 に由来する positive イオンの組成式が $C_{36}H_{31}N_2O_4$ (calcd. m/z 555.2284) と推定された。前駆物質 Y2 の組成式 $C_{18}H_{19}NO_3$ と比較すると、B1 が $(Y_2+Y_2)-CH_{10}O_2$ 、B2 が $(Y_2+Y_2)-H_8O_2$ に相当し、いずれも Y2 が 2 分子脱水結合し、更に共役二重結合を形成した化合物であると推定された。

次に B1 及び B2 を $MeOH-d_4$ に溶解し 1H -NMR を測定したところ、ベンジル基に由来するシグナルが δ 7.4 ppm 及び δ 5.7 ppm 付近に、メチルエステル基に由来するシグナルが δ 3.9 ppm 付近に観察されたが、いずれも Y2 の 5, 6 位のシグナルが消失し、更に 1, 3, 7, 10 位のシグナルが δ 7~9 ppm に低磁場シフトしていると考えられるスペクトルを示した (Fig. 6, 7, Table 4)。また、 ^{13}C -NMR では、ベンジル基に由来するシグナルが δ 128~135 ppm 及び δ 63 ppm 付近に、メチルエステル基に由来するシグナルが δ 52 ppm 及び 164 ppm 付近に観察されたが、いずれも Y2 の 5, 6 位のシグナルが消失し、低磁場領

域にシフトしていると考えられるスペクトルを示した。次に B1 について HMQC 及び HMBC 測定を行い、その相関より化学構造を推定したところ、Fig. 8 に示すような部分構造が推定された。このように B1 は 2 つの Y2 が 6 位と 10 位で脱水縮合後、更に酸化され水素が脱離し、共役二重結合が生成し、共役系が延長された構造をとっていると考えられた。この推定部分構造では 2 位の N 基の電子が化合物全体に非局在化するため、深色化し青色を示す可能性が高く、B1 の部分構造として妥当であると考えられる。また、UPLC/TOF-MS により B1 は m/z 541.2119 を与え、 $C_{35}H_{29}N_2O_4$ の positive イオンの組成式が推定され、この結果は B1 の部分構造のイオンに由来すると考えられる。更に B1 の NMR スペクトルが単純であることから、同じ立体配座の繰り返し構造をとっていると考えられる。一方、B2 は B1 に比べて複雑なスペクトルパターンを示すことから、B1 とは部分的に立体配座が異なる異性体であると推定される。

Fig. 9 にモデル実験により得られた結果より、青色成分の生成機構をまとめた。すなわち、前駆体 Y2 より中間体モノマー M2 及び M3 が生成した後、M2 と M3 が重合を繰り返し、B1 や B2 のような重合体が形成されると考えられる。重合を繰り返すことによって分子量は大きくなり溶解性は低下すると考えられることから、最終的にはある一定の範囲の重合度で反応が停止すると思われる。

D. 結論

既存添加物クチナシ青色は、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。昨年度は、青色の前駆体と考えられる黄色素 Y1 及び Y2 の構造を明らかとした。本年度は引き続き、クチナシ青色の色素生成メカニズムを明らかとするため、モデル実験下、色調変化の観察と共に青色成分 B1 及び B2 を単離し、その構造を推定した。その結果、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' が生成し．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．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物であると推定された．

E. 参考文献

なし

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，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：前駆体の構造決定．食品化学学会(2016.6)．
- 2) 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)．
- 3) 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)．
- 4) 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)．
- 5) 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)．
- 6) 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)．

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

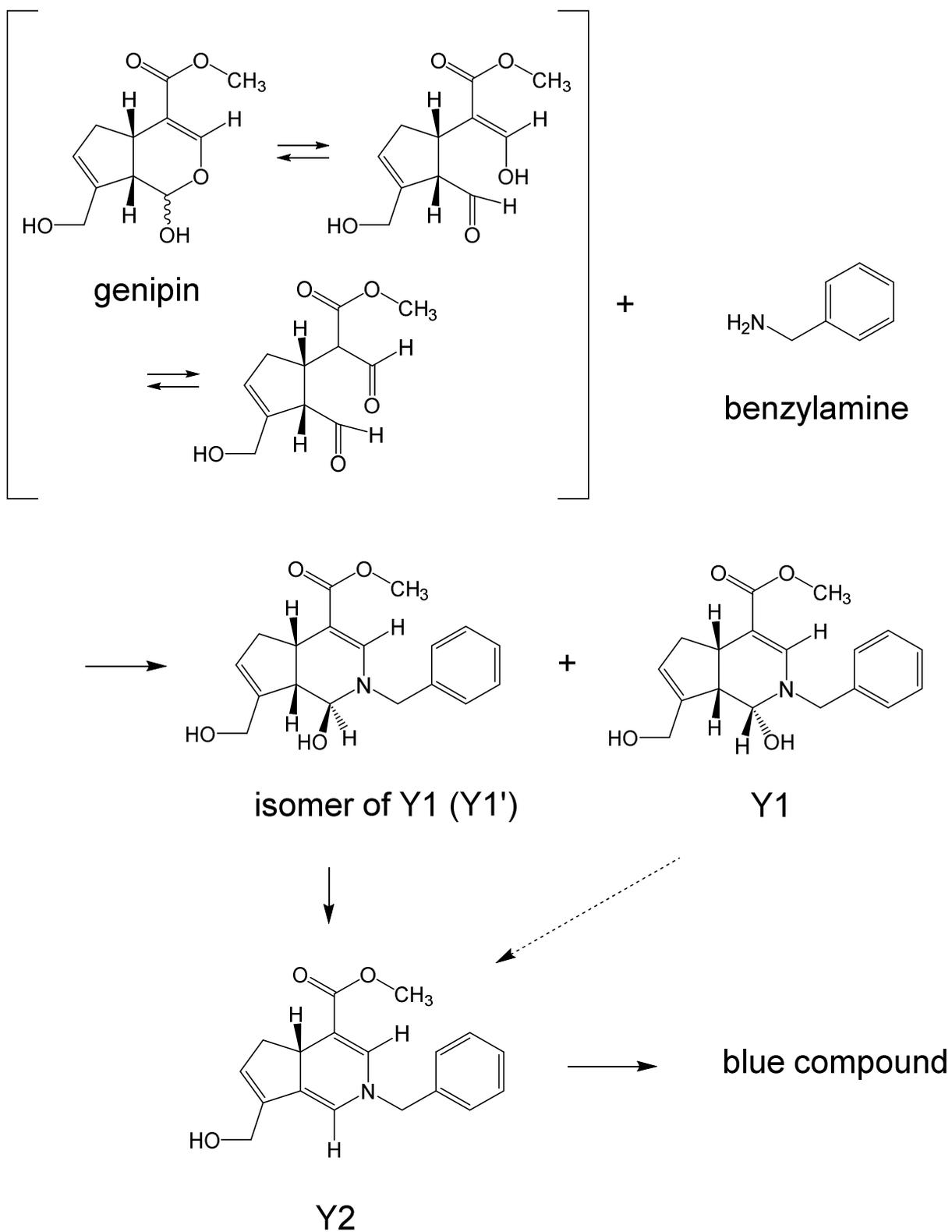


Fig. 1 Estimated reaction pathway of blue compound generation from genipin and benzylamine

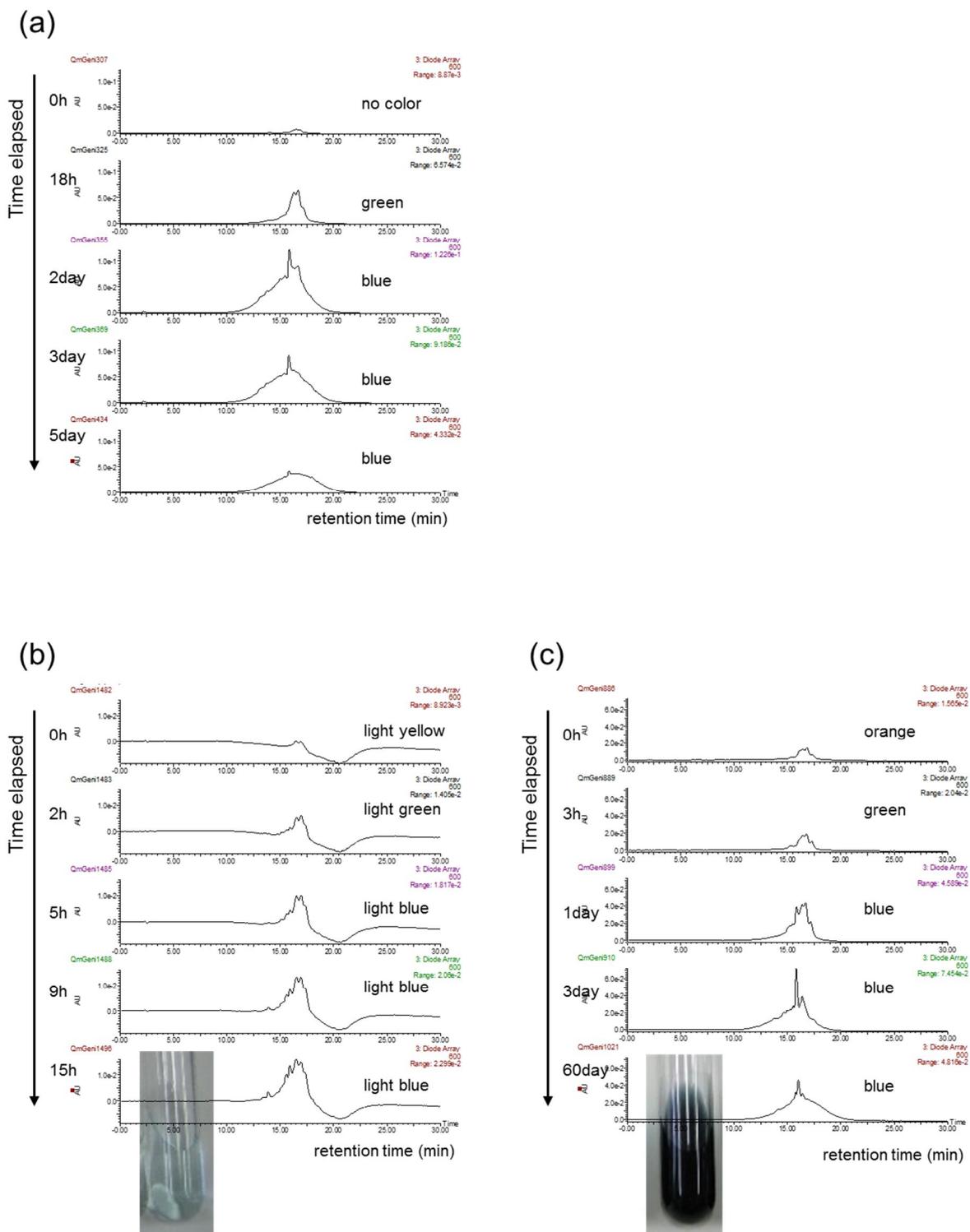


Fig. 2 Changes of LC profiles of reaction mixture (genipin : benzylamine = 1 : 1) and fractionated solutions of compound Y1 and Y2

The LC profiles were recorded on LC conditions shown in Table 1. a) Reaction mixture (genipin : benzylamine = 1 : 1). b) Fractionated solution of Y1. c) Fractionated solution of Y2.

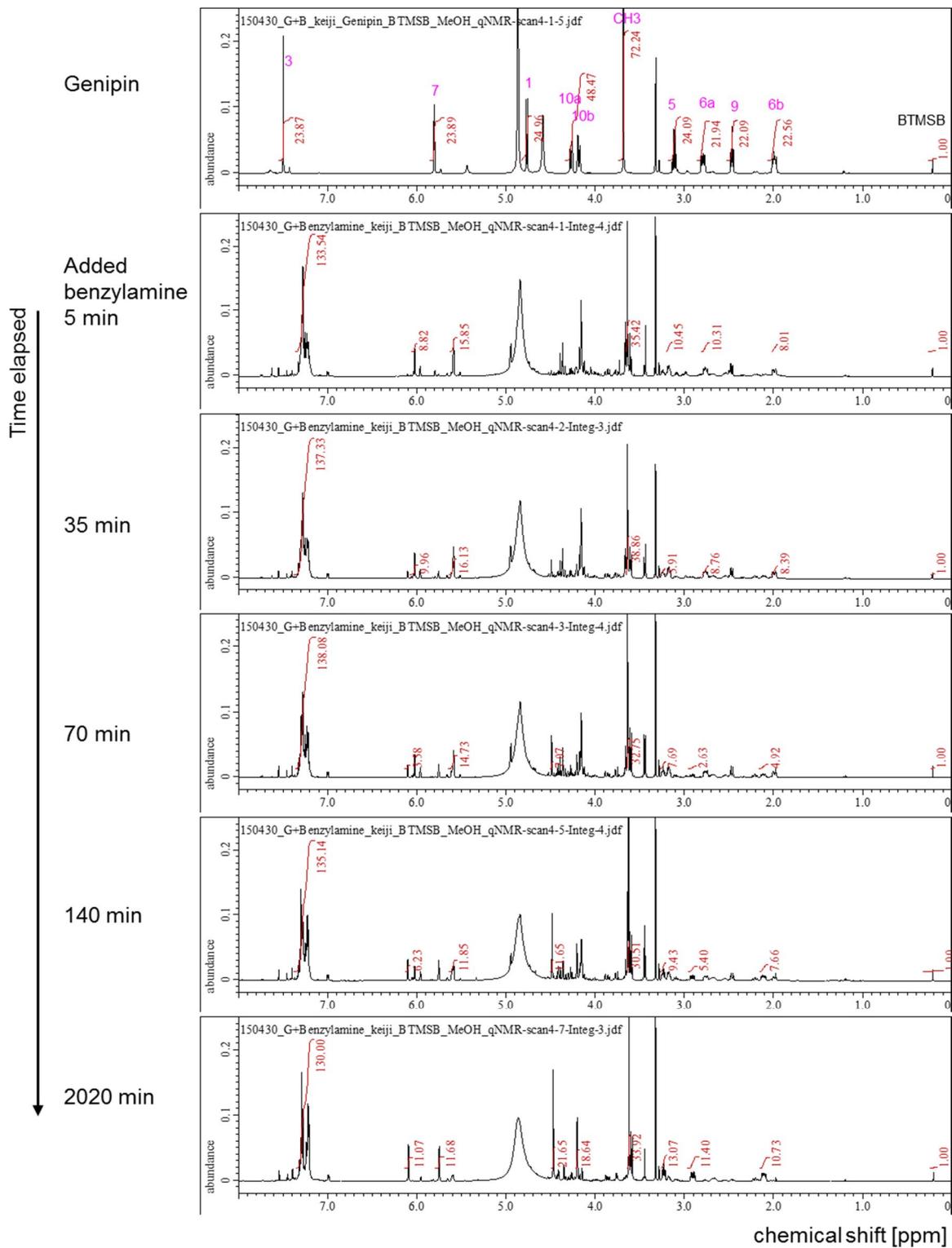


Fig. 3 Changes of ^1H -NMR profiles of reaction mixture (genipin : benzylamine = 1 : 1)

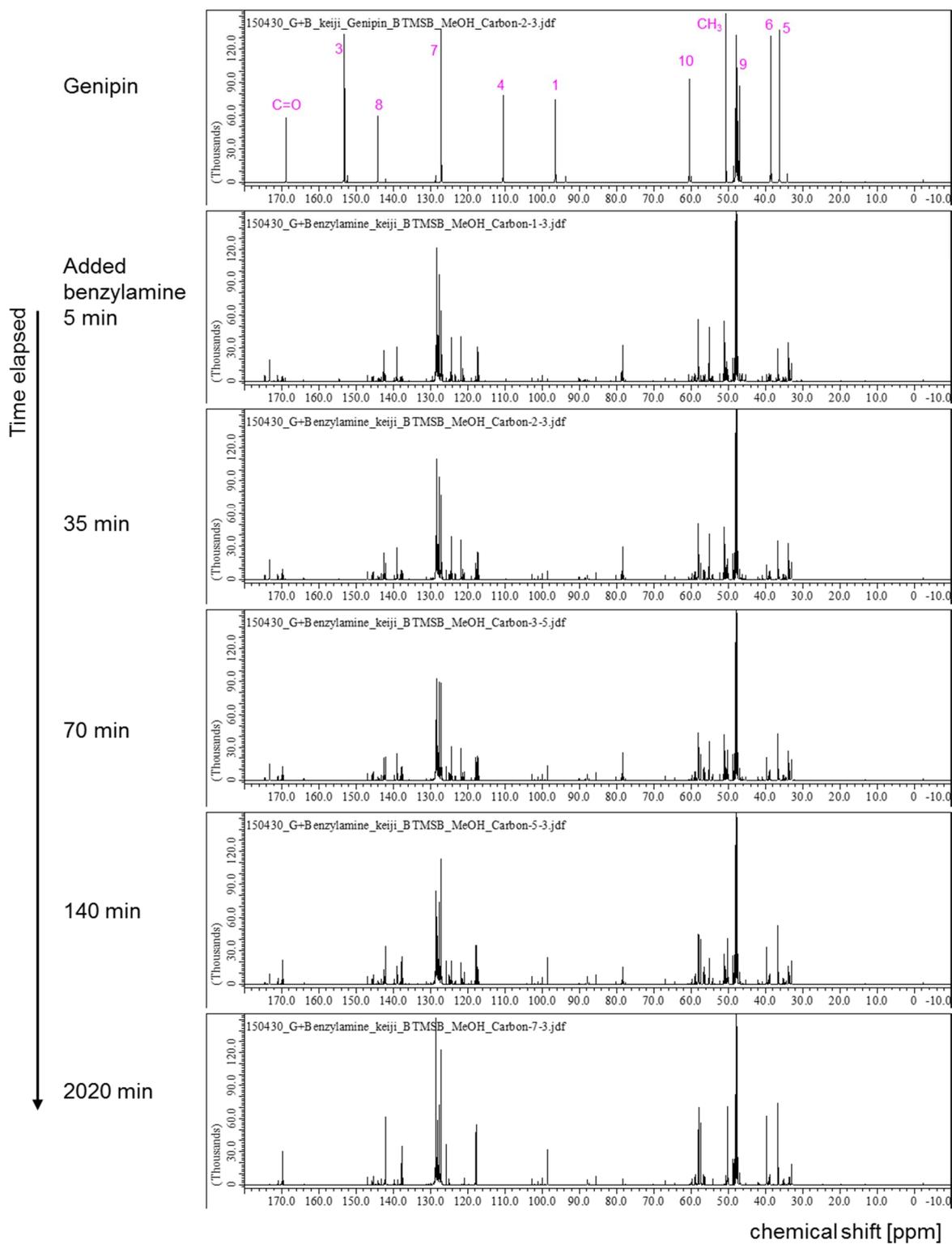


Fig. 4 Changes of ^{13}C -NMR profiles of reaction mixture (genipin : benzylamine = 1 : 1)

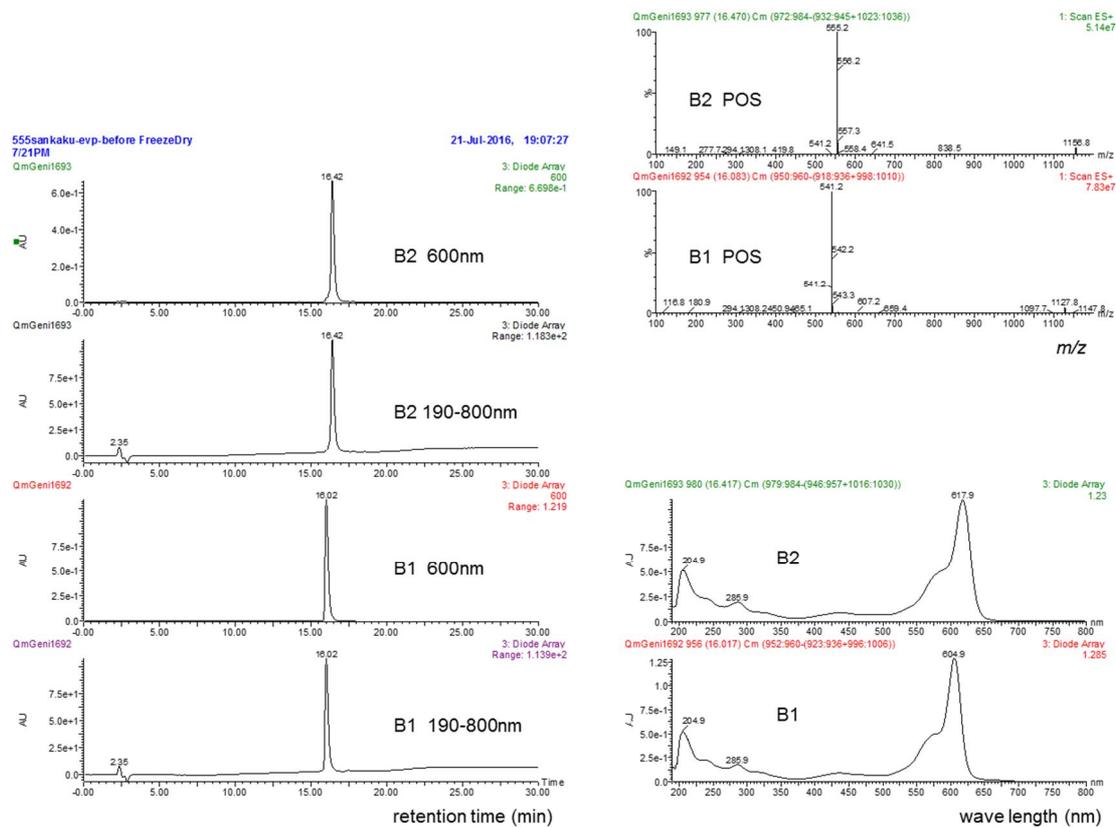


Fig. 5 HPLC profiles of purified fractions, and mass and UV spectra of peak B1 and B2

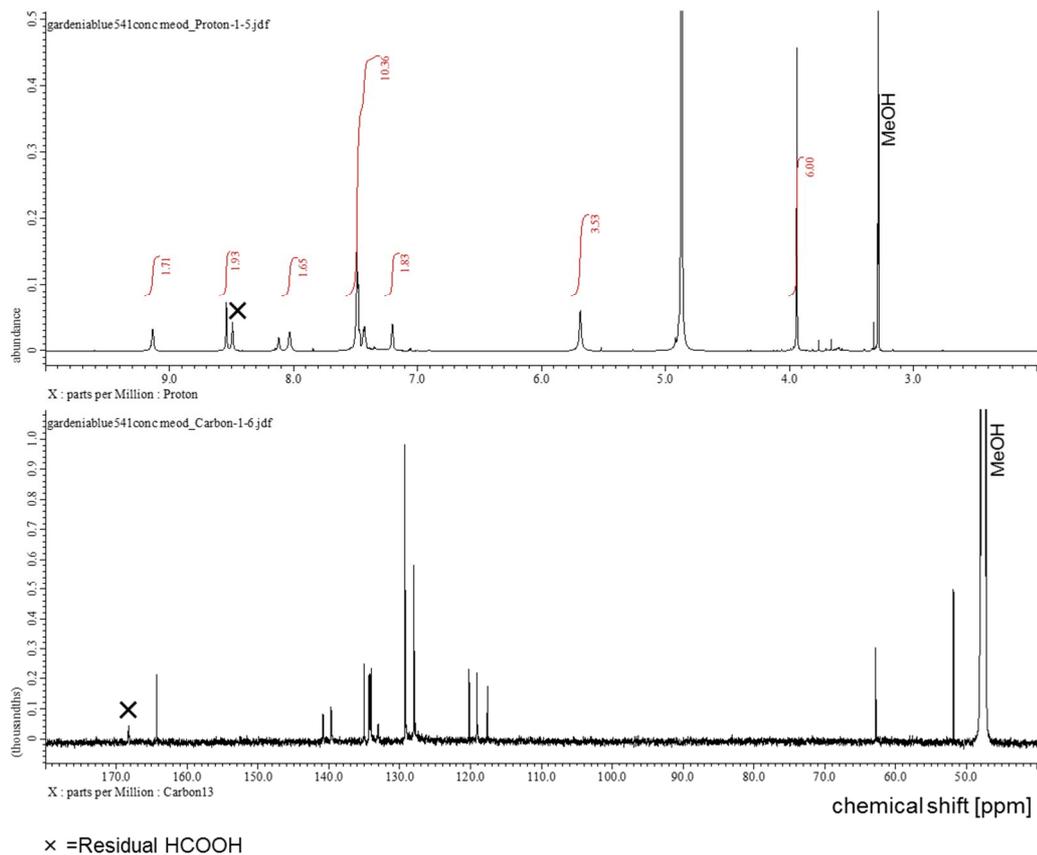


Fig. 6 NMR spectra of B1 in MeOH- d_4

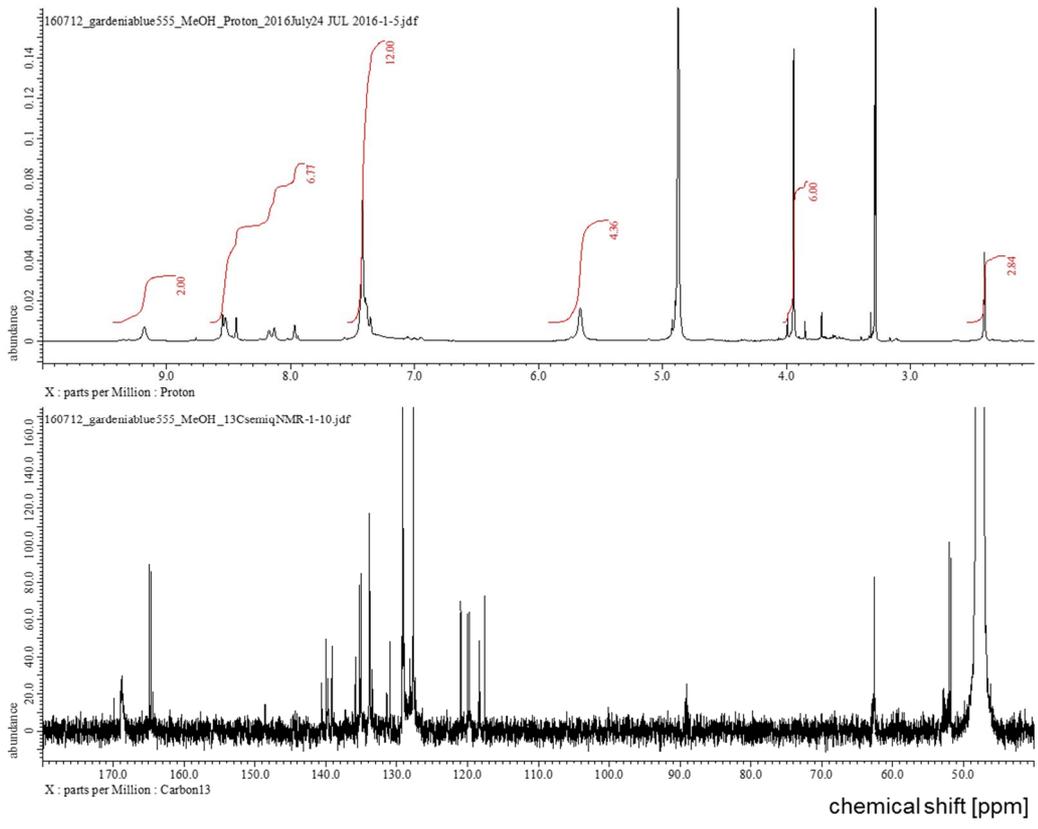


Fig. 7 NMR spectra of B2 in MeOH-*d*₄

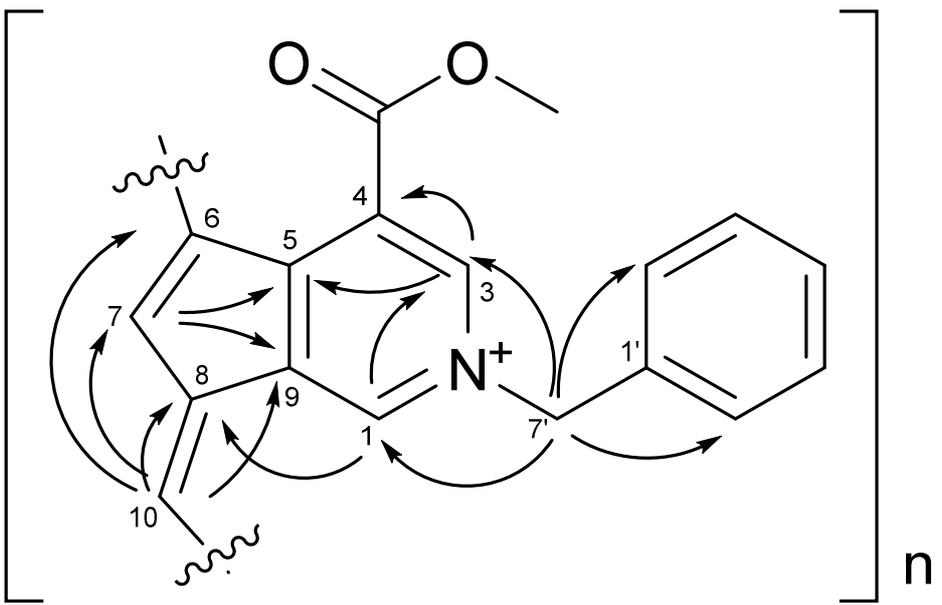


Fig. 8 Estimated segment structure of B1

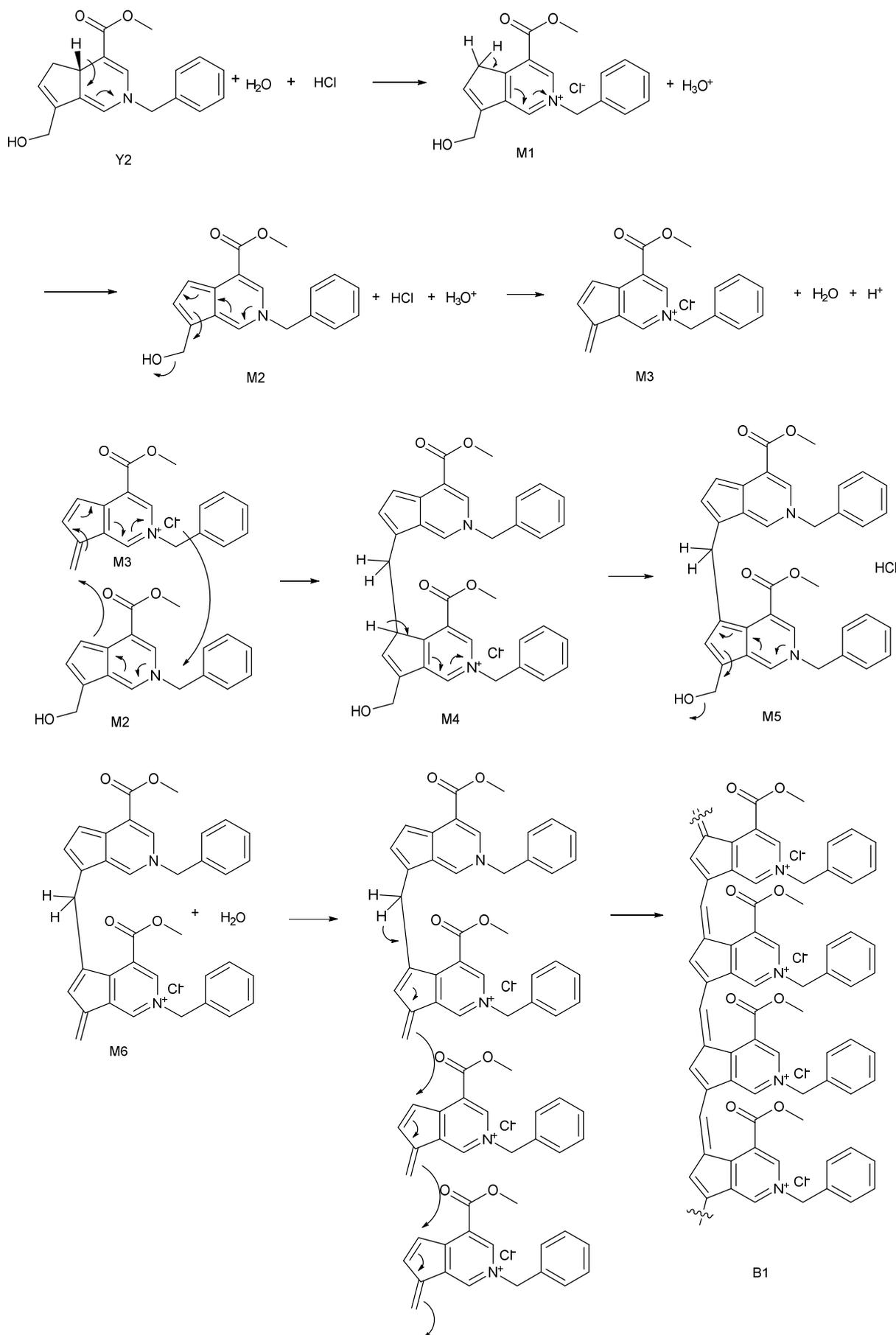


Fig. 9 Estimated reaction pathway of blue compound generation from Y2

Table 1 LC/MS conditions

LC/MS system	Waters LC : Alliance 2695 , PDA : 2996 photodiode array detector, MS : Quattro micro™
Column	Atlantis T3 (2.1 × 150 mm , 3 μm , Waters)
Column temp.	40
Solvent	A : 0.1% HCOOH/H ₂ O B : 0.1% HCOOH/MeOH gradient: B 50% (0-3 min) 95% (15-25 min)
Flow rate	0.2 mL/min
PDA scan	190-800 nm
Capillary voltage	3.0 kV (Pos.), 2.5 kV (Neg.)
Cone voltage	20 V (Pos.), 30 V (Neg.)
Source temp.	120
Desolvation temp.	350
Desolvation gas flow	400 L/hr
Cone gas flow	50 L/hr
Ion mode	ESI
MS scan	m/z 100-1000

Table 2 UPLC/TOF-MS conditions

LC/MS system	Waters UPLC : ACQUITY H-CLASS , PDA : ACQUITY e , TOF-MS : Xevo-G2 QToF
Column	ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 50 mm , 1.7 μm , Waters)
Column temp.	40
Solvent	A : 0.1% HCOOH/H ₂ O B : 0.1% HCOOH/MeOH gradient: B 50% (0 min) 95% (9-11 min)
Flow rate	0.2 mL/min
PDA scan	210-800 nm
Capillary voltage	0.5 ~ 4.0 kV
Cone voltage	10 ~ 100 V
Source temp.	120
Desolvation temp.	450
Desolvation gas flow	800 L/hr
Cone gas flow	50 L/hr
Ion mode	ESI (Resolution mode)
MS scan	m/z 100-4000

Table 3 Prep LC conditions for compound B1 and B2

LC system	SHIMADZU : prominence LC (LC -20AT , SIL-20AC , CTO -20AC) , PDA (SPD -M 20A) , FRACTION COLLECTOR (FRC -10A)
Column	Atlantis Prep T3 (10 × 250 mm , 5 μm , Waters)
Column temp.	40
Solvent	A : 0.1% HCOOH / H ₂ O B : 0.1% HCOOH / MeOH isocratic : B 66%
Flow rate	2.5 mL / min
PDA scan	190-800 nm (detect : 600 nm)
Injection volume	200 ~ 800 uL

Table 4 ¹H- and ¹³C-NMR assignments of B1

Position	¹³ C	¹ H		HMBC (H→C)
		DEPT135		
1	134.1 *	CH	9.14 brs	3, 5, 8, 7'
3	134.3	CH	8.54 brs	1, 4, 5, 7', C=O
4	117.6	C		
5	140.8	C		
6	120.2	C		
7	139.7	CH	8.03 brs	5, 6, 8, 9, 10
8	134.1 *	C		
9	134.2	C		
10	119.1	CH	7.2 brs	6, 7, 9
C=O	164.3	C		
MeO	51.8	CH ₃	3.94 s	C=O
1'	135.0	C		
2', 6'	128.0	CH	7.43-7.49 m	1', 2', 3', 4', 5', 6', 7'
4'	129.2	CH		
3', 5'	129.3	CH		
7'	62.8	CH ₂	5.69 brs	1, 3, 2'

* overlapped signal

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28年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格試験法の検討

～ラック色素のアンモニア処理および構造解析～

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

研究要旨 ラック色素の主成分ラッカイン酸類とコチニール色素の主成分カルミン酸は、アントラキノン骨格を持った水溶性の色素化合物で、その色調は酸性溶液では橙色、中性溶液で赤色、アルカリ性溶液で紫色を示す。一方、耐酸性カルミンと呼ばれる未指定添加物は、カルミン酸をアンモニア処理して得られる4-アミノカルミン酸を主色素成分とし、酸性条件下でも赤紫色を示すことが知られており、食品に添加される違反事例が報告されている。本研究はこの報告を元に、ラック色素をアンモニア処理し、酸性条件下での色調の確認とその主色素成分の構造解析を行なった。主色素成分として、4-アミノラッカイン酸Cを同定すると共に、LC/MS分析の結果、アンモニア処理ラック色素は4位のヒドロキシ基にアミノ基が置換した4-アミノラッカイン酸類を主色素成分とすることが確認された。現時点では、耐酸性カルミンと同様ないわゆる耐酸性ラック色素の報告はないが、容易に合成可能であることが確認されたことから、今後、未指定添加物として監視する必要があると考えられた。

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

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ン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¹⁾、ラック色素は、laccaic acid A, B, C, E等複数の成分から構成される(Fig. 1)^{2), 3)}。また、コチニール色素の主色素成分の carminic acid のレーキ化合物はカルミンと呼ばれ、我が国を除いた多くの国で食品に着色料として使用されている。さらに、その名称から混同されやすいが、carminic acid をアンモニアと反応させて得られる耐酸性カルミンと呼ばれる世界的にも使用が許可されていない着色料が2000年頃から流通し始めた⁴⁾。これらカルミン及び

耐酸性カルミンは carminic acid に対して化学的構造改変を伴うものであることから、我が国では既存添加物とは見なせず、食品への使用は共に認められていない。

耐酸性カルミンの特徴として、carminic acid が酸性溶液では橙色、中性溶液で赤色、アルカリ性溶液で赤紫色を示すのに対して、pHに依存せず、酸・アルカリ条件下でも赤色を示すことが挙げられる。2002年、我々の研究グループは、carminic acid と carminic acid のアントラキノン部の kermesic acid に類似した構造を持つ purprin 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の化学構造が carminic acid 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(Fig. 1)⁵⁾。この報告以降、欧州を中心に、実際に4-aminocarminic acid が食品に添加されたことを示す分析結果が報告されている^{6), 7), 8), 9)}。4-Aminocarminic acid は、carminic acid をアン

モニア処理することで, carminic acid の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に容易に置換し合成される. 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, ラック色素の主要成分である laccaic acid に対しても同様に起こりうると予想される. 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.

本研究では, 既報に従い^{4), 5)}, ラック色素をアンモニア処理し, LC/MS 及び NMR を用いて生成する色素成分の構造解析を行ったので報告する.

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ラック色素(粉末状)は, 日本シエラック工業(株)から購入した. ¹⁴N アンモニア水(¹⁴NH₄OH, Cat. No 016-03146)は, 和光純薬工業(株), ¹⁵N アンモニア水(¹⁵NH₄OH, Cat. No 609390)は, シグマアルドリッチ社より購入した. NMR 用溶媒 dimethyl sulfoxide-*d*₆ (DMSO-*d*₆)は, ISOTEC 社より購入した.

B-2) ラック色素のアンモニア処理

ラック色素 300 mg を, 100 mL の 10% アンモニア水を加えて溶解した後, スクリューキャップ付きのテストチューブに移し, ブロックヒーターで 120°C・2h 加熱した. ブロックヒーターのスイッチを切り, 一晚静置した後, 溶媒を減圧留去して得られた残渣をアンモニア処理ラック色素とした.

アンモニア処理ラック色素の色調は, 残渣約 300 mg に 200 mL の 0.05% 炭酸ナトリウム水溶液を加えて溶解した後, 0.1% ギ酸水溶液(pH 2), 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液(pH 6)または 0.05% 炭酸ナトリウム水溶液(pH 10)を加えて 100 倍希釈し, 各々を白色蛍光灯で確認した.

アンモニア処理ラック色素中の成分は, 上述の残渣 300 mg に 200 mL の 0.05% 炭酸ナトリウム水溶液を加えて溶解した後, 0.1% ギ酸含有

20% メタノールを加えて 10 倍希釈し, この溶液を 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過したものを LC/MS 用試料液とした.

LC 条件: 装置, ACQUITY UPLC/SQD system (Waters 社製); カラム, XTerra MS C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm, Waters 社製); カラム温度, 40°C; 移動相 A, 1% ギ酸含有水; 移動相 B, 1% ギ酸含有メタノール; 溶出, A : B = 80 : 20 (0-10 min)→75 : 25 (10-35 min); 注入量, 10 μL; 流速, 0.3 mL/min; PDA 検出器, 200 ~ 500 nm; 検出波長, 280 nm.

MS 条件: キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 30 V; ソース温度, 120°C; 脱溶媒温度, 350°C; 脱溶媒ガス流量, 600 L/hr; コーンガス, 50 L/hr; スキャン範囲, *m/z* = 200 ~ 700 (ESI neg.).

B-3) Laccaic acid C 及び 4-aminolaccaic acid C の単離

ラック色素 2.5 g を 0.05% 炭酸ナトリウム溶液 500 mL に溶解させ, ろ紙ろ過(FILTER PAPER QUALITATIVE ADVANTEC No.2, 直径 15 cm, 東洋濾紙(株)製)した. このろ液を, あらかじめ 0.1% ギ酸含有 30% メタノールで平衡化しておいた ODS オープンカラム(Chromatorex ODS, 富士シリシア化学(株)製, Cat. No DM1020T, 4.0 mm i.d.×400 mm)に負荷し, 200 mL の 0.1% ギ酸含有 30% メタノールと 200 mL の 0.1% ギ酸含有 40% メタノールで段階的に溶出させた. 得られた 20 画分(それぞれ 20 mL)を上述の LC/MS に付し, laccaic acid C を含む画分をまとめて, 溶媒を減圧留去した. この操作を 20 回行い, ラック色素合計 50 g から laccaic acid C 粗分離画分とした. 次に得られた粗分離画分を再度 300 mL の 0.05% 炭酸ナトリウム水溶液に溶解し, 下述の LC/MS 条件で分取を繰り返し, 1,700 mg の laccaic acid C を得た.

次に単離精製した laccaic acid C に対して, B-2 項に示したように ¹⁴NH₄OH または ¹⁵NH₄OH を加えて反応させて, 下述の LC/MS 条件で分取を繰り返し, 600 mg の ¹⁴N-4-aminolaccaic acid C 及び 50 mg の ¹⁵N-4-aminolaccaic acid C を得た. 分取 LC/MS: カラム, XTerra Prep RP18 (19 mm i.d.×100 mm, 5 μm, Waters 社製); カラム温度,

40°C；移動相 A，0.1%ギ酸含有水；移動相 B，0.1%ギ酸含有メタノール；溶出(laccaic acid C)，A : B = 75 : 25 (0-15 min)；溶出(4-aminolaccaic acid C)，A : B = 75 : 25→40 : 60 (0-10 min)；注入量，700 μ L；流速，8 mL/min；分取トリガー， m/z 538 [M-H]⁻ (laccaic acid C 及び ¹⁵N-4-aminolaccaic acid C)；分取トリガー(¹⁴N-4-aminolaccaic acid C)， m/z 537 [M-H]⁻。

B-4) NMR 分析

NMR スペクトルは、重溶媒に DMSO-*d*₆を用いて、JEOL 製 JNM-ECA800 を使用して測定した。プローブに JEOL CH UltraCOOL probe を用いて、¹H-、¹³C-NMR スペクトル及び COrelation Spectroscopy (COSY)，¹H-detected Multiple Quantum Coherence (HMQC)，¹H-detected Multi-Bond heteronuclear quantum Coherence (HMBC)，Incredible Natural Abundance Double QUANTum Transfer Experiment (INADEQUATE)測定した。

INADEQUATE 測定条件：probe temperature，50°C；relaxation delay，1 s；*J* constant，70 Hz；X points，8192；Y points，128；scan times，320000(laccaic acid C (4 days))及び 486400(aminolaccaic acid C (6 days))。

¹⁵N-NMR 測定条件：probe temperature，50°C；relaxation delay，2 s；Spectral width，-50 ~ 650；X points，32768；scan times，880；NOE，false。

C. 結果及び考察

C-1) アンモニア処理ラック色素の LC/MS 分析

ラック色素及びアンモニア処理ラック色素について色調の pH 依存性について検討したところ、ラック色素は pH が高くなるにつれて、橙色から紫色に変化した。一方、アンモニア処理ラック色素は pH に依存せず、紫色だった(Table 1)。

次に LC/MS 分析を実施したところ、ラック色素及びアンモニア処理ラック色素において、それぞれ5つのピークが確認された(ピーク 1~5，ラック色素；ピーク 1'~5'，アンモニア処理ラック色素)(Fig. 2)。ピーク 1~5 の吸収スペクトルが 490 nm 付近に極大吸収波長を示したの

に対して、ピーク 1'~5'のそれは、550 nm 付近に二つの極大吸収波長を示した。

各ピークに由来するマススペクトルを確認した結果、ピーク 1，2，4 及び 5 は、それぞれ m/z 494，538，495 及び m/z 536 を与える脱プロトン分子 [M-H]⁻ のピークが強く観測され、それぞれを laccaic acid E，C，B 及び A と同定した(Table 2)^{2), 3), 10), 11), 12), 13), 14)}。ピーク 3 に由来するマススペクトルには、 m/z 359，315 及び m/z 271 を与えるピークが観測された。これは、岡らがラック色素を LC/MS/MS 分析した際に観測した、anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体由来する m/z 359 [M-H]⁻，315 [M-H-CO₂]⁻ 及び m/z 271 [M-H-2CO₂]⁻ と一致していることから、ピーク 3 は anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体と推定した¹⁵⁾。

一方、ピーク 1'~5'に由来する m/z は、それぞれピーク 1~5 に対して 1 少ない値を示した(Table 2)。これは、既に杉本らが報告したように⁵⁾、カルミン酸をアンモニア処理した際、アントラキノン骨格の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換し、分子量が 1Da 減少する結果と一致し、すなわち、ピーク 1'~5'は、laccaic acid A，B，C，E 及び anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体の 4 位ヒドロキシ基(-OH)がアミノ基(-NH₂)に置換した色素化合物と推測された。

C-2) Laccaic acid C の構造解析

Laccaic acid 及びアンモニア処理を施して得られる誘導体の化学構造を明らかにすることにした。しかし、現在は laccaic acid A，B，C，E の標準試薬は市販されていない。そこで本研究では、ラック色素から laccaic acid を単離・精製した後、そのアンモニア処理誘導体を NMR 分析に付すことで構造を明らかにする。

ラック色素を ODS オープンカラムに付し、メタノールの濃度をステップワイズに上げて溶出した際、laccaic acid C が他の laccaic acid と容易に分離した。そこで、laccaic acid C を含む画分を集めた後、分取 LC/MS でさらに精製したところ、1,700 mg の laccaic acid C が得られた。500 mg の laccaic acid C を 600 μ L の DMSO-*d*₆ に

溶解し, NMR 分析に付した. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルには, 芳香環に由来する δ_{H} 6.92, 7.04, 7.13 及び δ_{H} 7.56 のプロトンシグナルと δ_{H} 3.11 及び δ_{H} 4.12 のプロトンシグナルが観測された (Table 3). $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルには, 25 のカーボンシグナルが観測された (Fig. 3) (Table 3). HMQC 分析において, δ_{H} 3.11, 4.12, 6.92, 7.04, 7.13 及び δ_{H} 7.56 は, それぞれ δ_{C} 35.36, 54.05, 116.48, 132.83, 130.82 及び δ_{C} 115.86 との相関が観測された. また HMBC 分析では δ_{H} 6.92 と δ_{C} 119.36 及び δ_{C} 125.0, δ_{H} 7.04 と δ_{C} 35.36, 125.55, 130.82 及び δ_{C} 155.00, δ_{H} 7.13 と δ_{C} 132.83 及び δ_{C} 155.00, δ_{H} 7.56 と δ_{C} 118.32, 121.23, 168.54, 183.12 及び δ_{C} 186.75 の相関が観測された. いずれのプロトンと相関が得られなかった 10 個のカーボンシグナルについては, 2D-INADEQUATE 分析で $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$ の相関を観測し, 帰属することにした. その結果, 次に示す $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$ の相関が観測された. δ_{C} 121.23-140.17-(169.53)-118.32-136.53-(115.86)-(169.65)-186.75-118.83-(104.90)-(183.12)-148.50-153.12-122.55-(158.93)-(104.90)-119.36-(155.00)-(116.48)-132.83-125.04-130.82 及び δ_{C} 54.05 - 170.76 (Fig. 4).

NMR 分析及び LC/MS 分析の結果から, Fig. 4 に示した化学構造が導かれ, 既に報告されている laccaic acid C の化学構造と矛盾のない結果が得られた¹³⁾.

C-3) 4-Aminolaccaic acid C の構造解析

C-2 で単離した laccaic acid C 800 mg をアンモニア処理し, LC/MS 分析に付した結果, その保持時間, 吸収スペクトル及びマススペクトルは, ピーク 2' のそれと一致した. 次に, アンモニア処理 laccaic acid C を NMR 分析に付した. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルには, 芳香環に由来する δ_{H} 6.81, 7.05, 7.32 及び δ_{H} 7.57 のプロトンシグナルと δ_{H} 2.99, 3.11 及び δ_{H} 3.83 のプロトンシグナルが観測された (Table 3). $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルには, 25 のカーボンシグナルが観測された (Fig. 3) (Table 3). HMQC 分析において, δ_{H} 3.83, 6.81, 7.05, 7.32, 及び δ_{H} 7.57 は, それぞれ, δ_{C} 54.99, 118.12, 129.06, 133.78 及び δ_{C} 113.88 との相関が観測された. また, δ_{H} 2.99 及び δ_{H} 3.11

は δ_{C} 35.78 との相関が観測された. HMBC 分析では δ_{H} 6.81 と δ_{C} 122.59, 124.83 及び δ_{C} 155.85, δ_{H} 7.05 と δ_{C} 35.78, 125.59, 133.78 及び δ_{C} 155.85, δ_{H} 7.32 と δ_{C} 35.78, 116.08, 129.06 及び δ_{C} 155.85, δ_{H} 7.57 と δ_{C} 119.62, 138.33, 167.20, 169.41, 177.15 及び δ_{C} 180.00 の相関が観測された. 2D-INADEQUATE 分析では次に示す $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$ の相関が観測された.

δ_{C} 138.66-119.99-167.20-113.88-138.33-119.62-138.66, δ_{C} 180.00-104.76-(144.11)-102.00-177.15, δ_{C} 116.08-122.59-133.78-124.83 及び δ_{C} 129.06-118.12-155.85 (Fig. 5).

残りの 4 つのカーボンシグナル (δ_{C} 162.84, 164.43, 170.59 及び δ_{C} 171.07) については, laccaic acid C のケミカルシフトから推定して, 帰属した (Table 3).

Laccaic acid C と同じく, アンモニア処理 laccaic acid C もカーボンと隣接する 7 つのプロトン及び 25 のカーボンを有していた. このことから, laccaic acid C と比べてアンモニア処理 laccaic acid C が 1Da 少ない分子量を示すことは, アンモニア処理により, laccaic acid C のヒドロキシ基 (-OH) がアミノ基 (-NH₂) に置換したためと推測された. そこで, アミノ基 (-NH₂) の置換位置を明らかにする目的で, laccaic acid C を $^{15}\text{NH}_4\text{OH}$ を用いてアンモニア処理し, NMR に付した. ^{14}N のスピン量子数が 1 なのに対して, ^{15}N のそれは 1/2 であるため, $^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$ のカップリングが生じる¹⁶⁾. 実際には, $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルには 25 のカーボンシグナルが観測され, そのうち 4 位のカーボンシグナルは, ダブルレット ($J_{\text{CN}} = 15.41$ Hz) のシグナルとして観測された (Fig. 6). 以上の結果から laccaic acid C をアンモニア処理して得られる誘導体は, 4-aminolaccaic acid C であることを明らかにした.

Laccaic acid A, B 及び E のアントラキノン骨格に結合したヒドロキシ基の位置は, laccaic acid C のそれと同じである. また, LC/MS 分析から推定された anthraquinonedicarboxylic acid 誘導体も, アンモニア処理により laccaic acid (A, B, C 及び E) と同様に, 分子量が 1 少なくなること, 極大吸収波長が長波長側にシフトすることから, laccaic acid (A, B, C 及び E) と同じア

ントラキノ骨格を持つと推測される。以上の理由から、本研究ではピーク 1', 3', 4'及び 5'を、それぞれ、4-aminolaccaic acid E, 4-aminoanthraquinonedicarboxylic acid 誘導体、4-aminolaccaic acid B 及び 4-aminolaccaic acid A と結論した(Table 2)。

D. 結論

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、laccaic acid A, B, C, E 等複数の成分から構成される。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。これは、ラック色素中の主色素成分 laccaic acid A, B, C 及び 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 及び E に起因することを明らかにした。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必要と考えられた。また、食品の製造過程において、ラック色素から意図せず 4-aminolaccaic acid 類が産生される可能性は否定できない。この点については、耐酸性カルミン(4-aminocarminic acid)と同様に注意が必要であり、4-aminolaccaic acid 及び 4-aminocarminic acid が食品または添加物から検出された際、それらが意図せず産生されたものなのかの判断基準を整理しておく必要があると思われる。

E. 参考文献

- 1) Schmitt, P., Günther, H., Hägele, G., Stilke, R., A ¹H and ¹³C NMR study of carminic acid. *Org. Magn. Reson.*, **22**, 446-449 (1984).
- 2) Oka, H., Ito, Y., Yamada, S., Kagami, T., Hayakawa, J., Harada, K., Atsumi, E., Suzuki, M., Suzuki, M., Odani, H., Akahori, S., Maeda, K.,

Tanaka, T., Mizuno, M., Identification of lac dye components by electrospray high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Mass Spec. Soc. Jpn.*, **46**, 63-68 (1998).

- 3) Hirata, K., Uematsu, Y., Suzuki, K., Iida, K., Yasuda, K., Saito, K., Analysis of main pigments and other ingredients in lac color product. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **42**, 109-113 (2001).

- 4) Schul, J., U.S. Patent 5147673 (Sep. 15, 1992).

- 5) Sugimoto, N., Kawasaki, Y., Sato, K., Aoki, H., Ichi, T., Koda, T., Yamazaki, T., Maitani, T., Structure of acid-stable carmine. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **43**, 18-23 (2002).

- 6) Kawasaki, Y., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Ishiwata, H., Maitani, T., Identification of acid-stable carmine in imported apple syrup product. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **43**, 191-195 (2002).

- 7) Sabatino, L., Scordino, M., Gargano, M., Lazzaro, F., Borzi, M. A., Traulo, P., Gagliano, G., Aminocarminic acid in E120-labelled food additives and beverages. *Food additives & Contaminants: Part B*, **5**, 295-300 (2012).

- 8) Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mastroianni, R., Mazzucco, E., Manfredi, M., Marengo, E., Retrospective analysis for the identification of 4-aminocarminic acid photo-degradation products in beverages. *Food additives & Contaminants: Part A*, **32**, 285-292 (2015).

- 9) Miller, A., Lassek, E., Pfister, J., Klinger, R., Höbel, W., Knapp, H., Gaßmann, F., Wollein, U., Schramek, N., Detection of 4-aminocarminic acid in beverages and cake glaze from the German market: a food additive not approved in the EU. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, **11**, 127-135 (2016).

- 10) Pandhare, E. D., Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N., Lac pigments: part III-isolation of laccaic acid A & B & the constitution of laccaic acid A. *Indian J. Chem.*, **7**, 977-986 (1969).

- 11) Pandhare, E. D., Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N.,

Venkataraman, K., The constitution of laccaic acid B. *Tetrahedron Lett.*, **26**, 2437-2440 (1967).

12) Bhide, N. S., Pandhare, E. D., Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N., Srinivasan, R., Lac pigments: part IV—constitution of laccaic acid B. *Indian J. Chem.*, **7**, 987-995 (1969).

13) Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N., Venkataraman, K., Laccaic acid C, the first natural anthraquinone with an amino acid side chain. *Indian J. Chem.*, **7**, 188-189 (1969).

14) Mehandale, A. R., Rama Rao, A. V., Shaikh, I. N., Venkataraman, K., Desoxyerythrolaccin and laccaic acid D. *Tetrahedron Lett.*, **18**, 2231-2234 (1968).

15) Oka, H., Ito, Y., Yamada, S., Kagami, T., Hayakawa, J., Harada, K., Atsumi, E., Suzuki, M., Suzuki, M., Odani, H., Akahori, S., Maeda, K., Nakazawa, H., Ito, Y., Separation of lac dye components by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A*, **813**, 71-77 (1998).

16) Nieto, R., Cruz, F., Tejedor, J.M., Barroso, G., Cerdán, S., Origin of the ammonia used for mitochondrial citrulline synthesis as revealed by ^{13}C - ^{15}N spin coupling patterns observed by ^{13}C NMR. *Biochimie*, **74**, 903-911 (1992).

F. 研究業績

1. 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

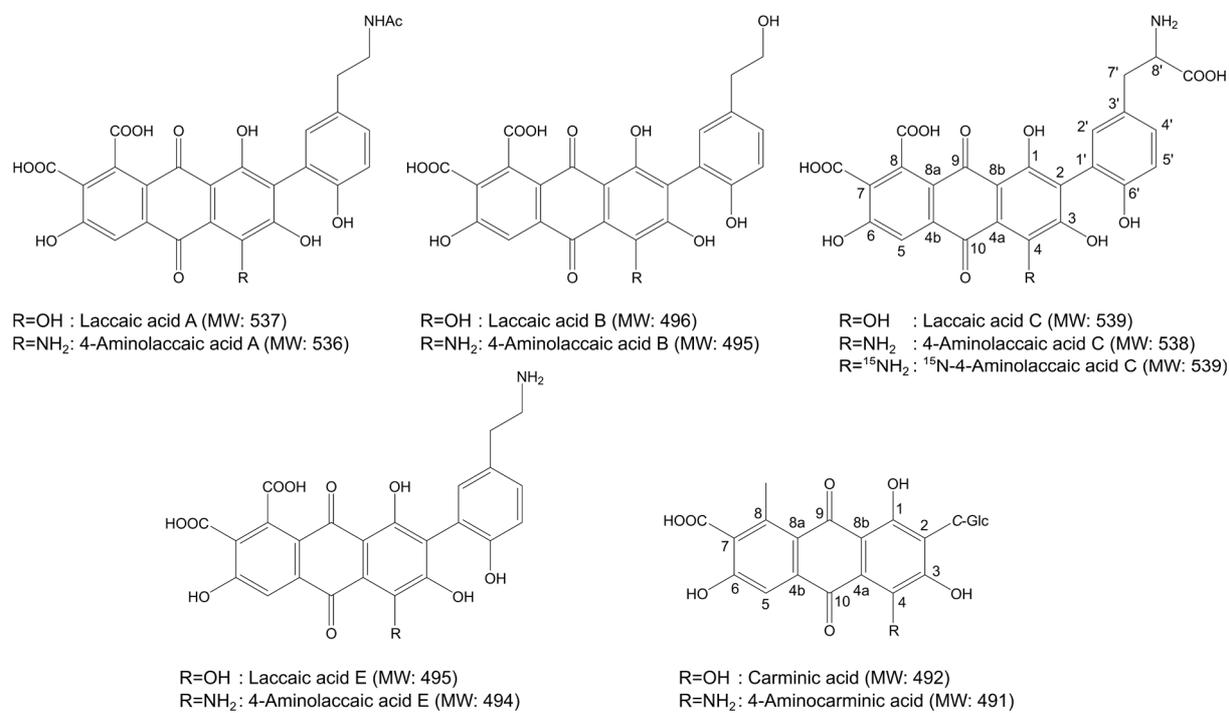


Fig. 1 Structures of anthraquinone derivatives in this study.

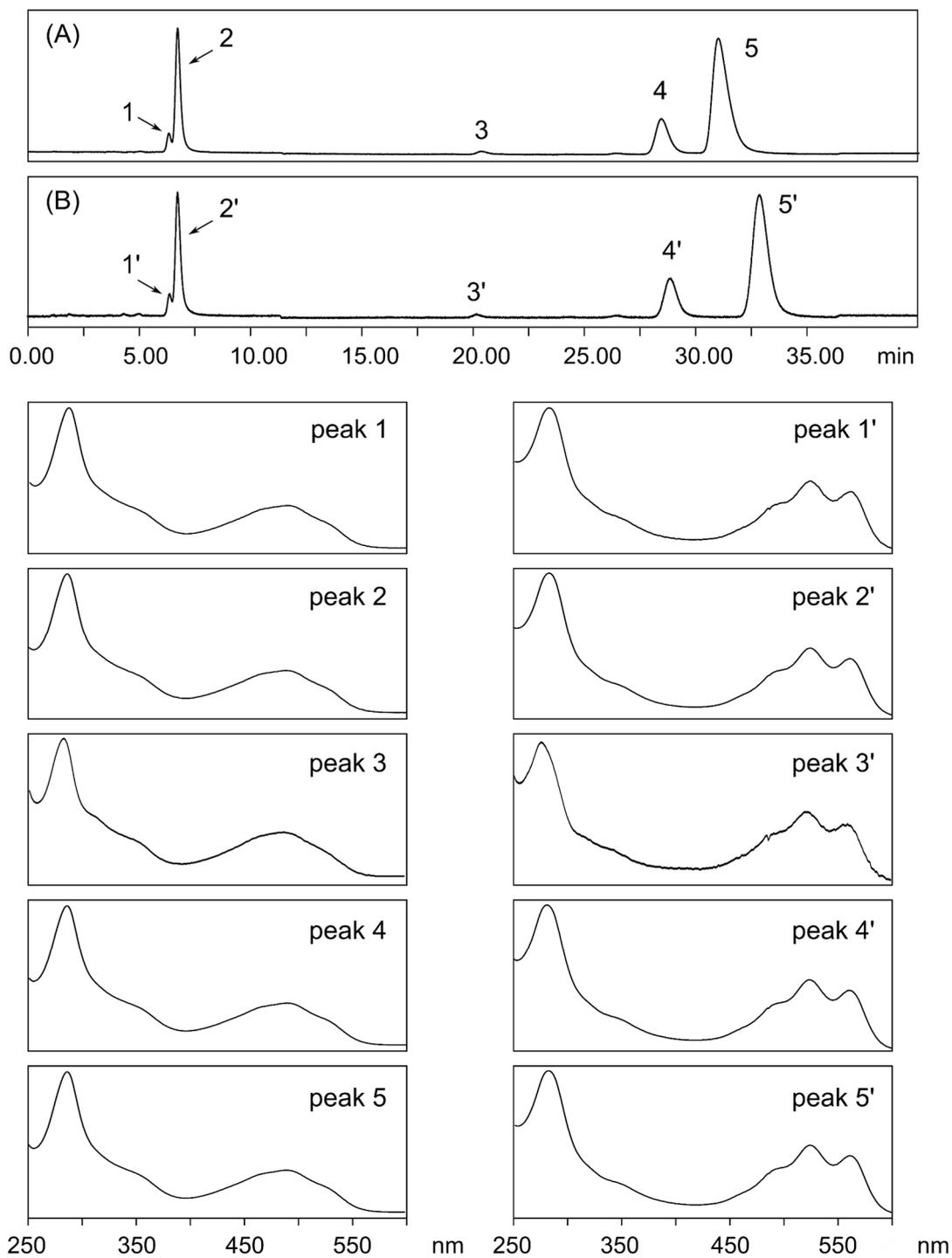


Fig. 2. LC/MS analysis of lac dye and ammonia-treated lac dye.

(A) Lac dye; (B) Ammonia-treated lac dye. HPLC chromatograms were recorded at 480 nm. PDA spectra of peaks 1 to 5 and 1' to 5' are shown below. MS analyses of peaks a to e and 1' to 5' are summarized in Table 2.

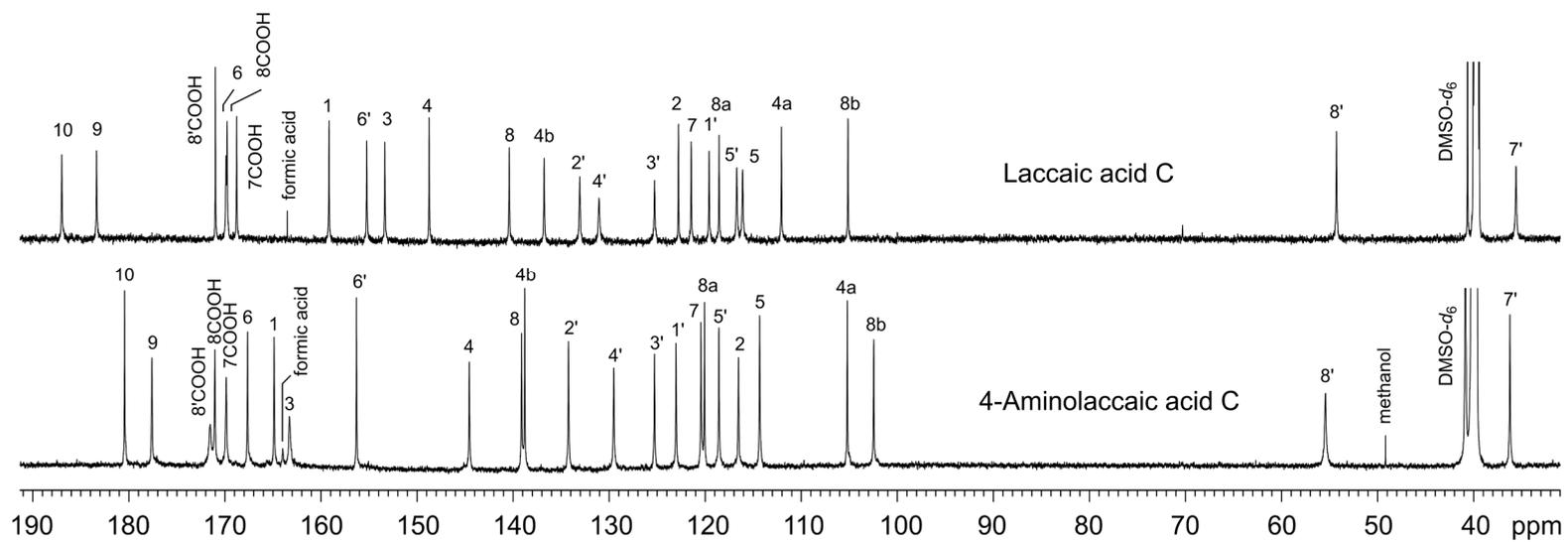


Fig. 3. ^{13}C -NMR spectra of laccic acid C and 4-aminolaccic acid C.

^{13}C - ^{15}N spin coupling of ^{15}N -4-aminolaccic acid C was observed at δ_{C} 141.44 (15.41 Hz) (Fig. 6).

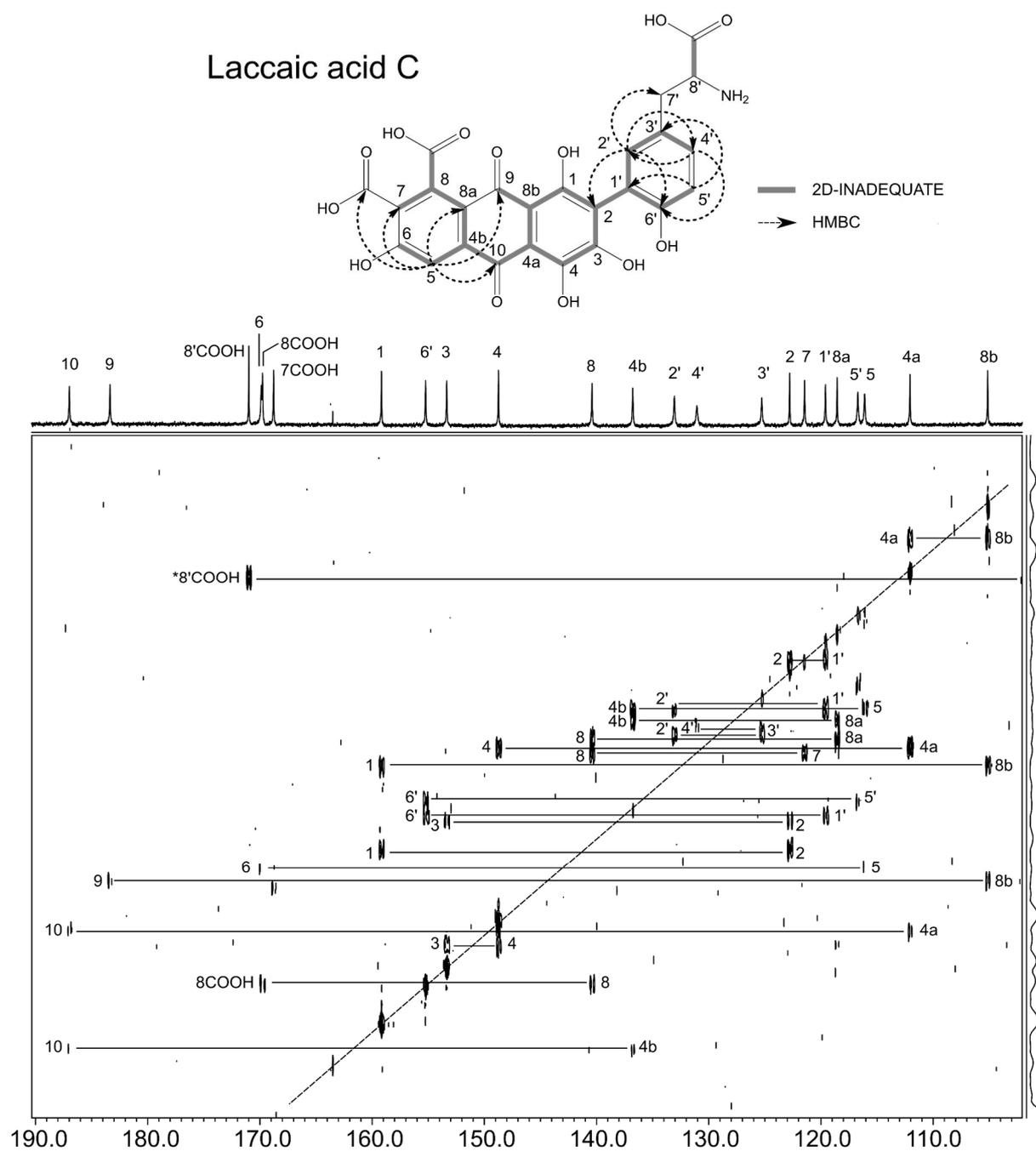


Fig. 4. 2D-INADEQUATE spectrum of laccaic acid C.

* indicate carbon skeletons as follows: δ_C 54.05-170.76 (8'-8'COOH).

4-aminolaccaic acid C

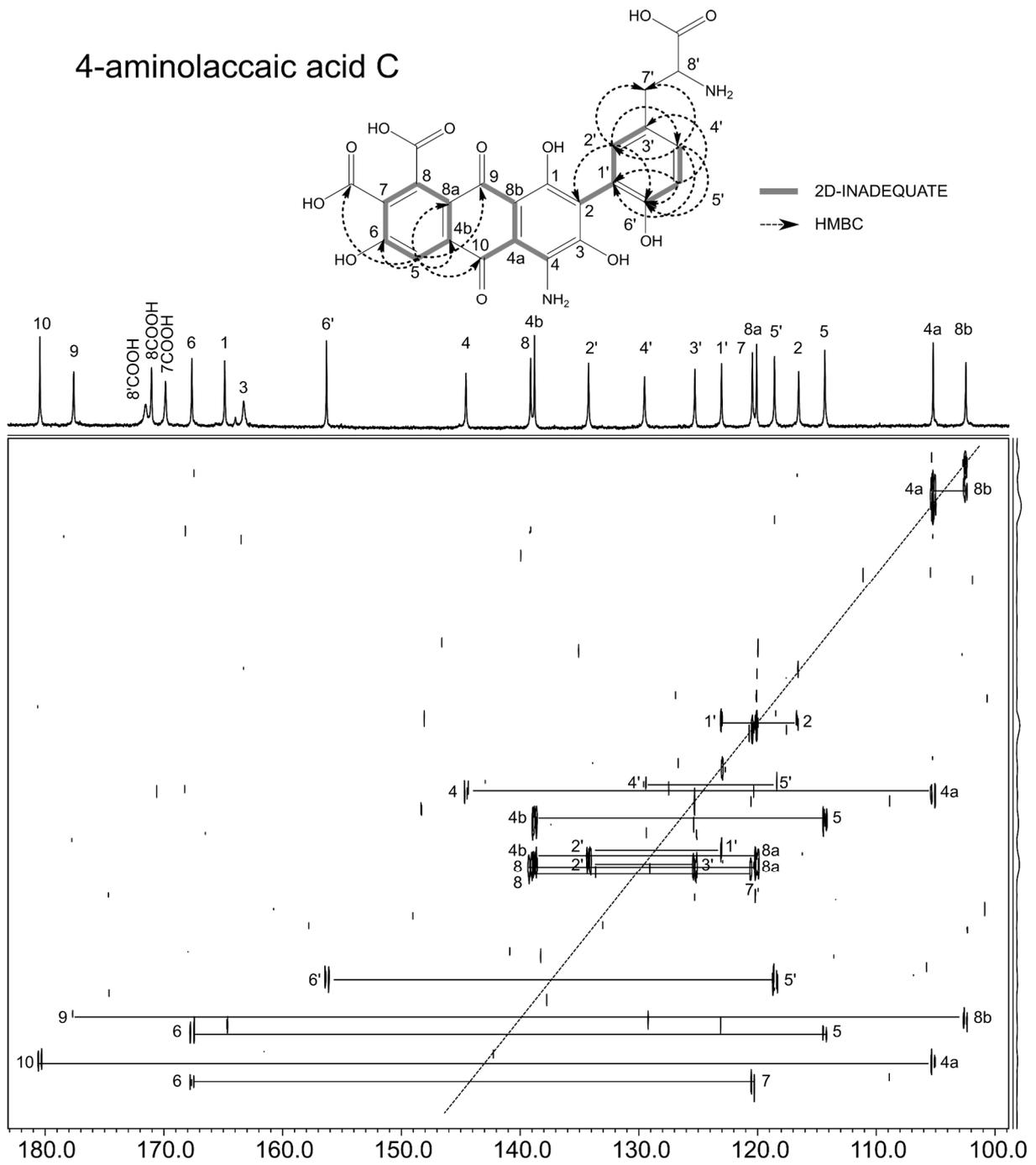


Fig. 5. 2D-INADEQUATE spectrum of 4-aminolaccaic acid C.

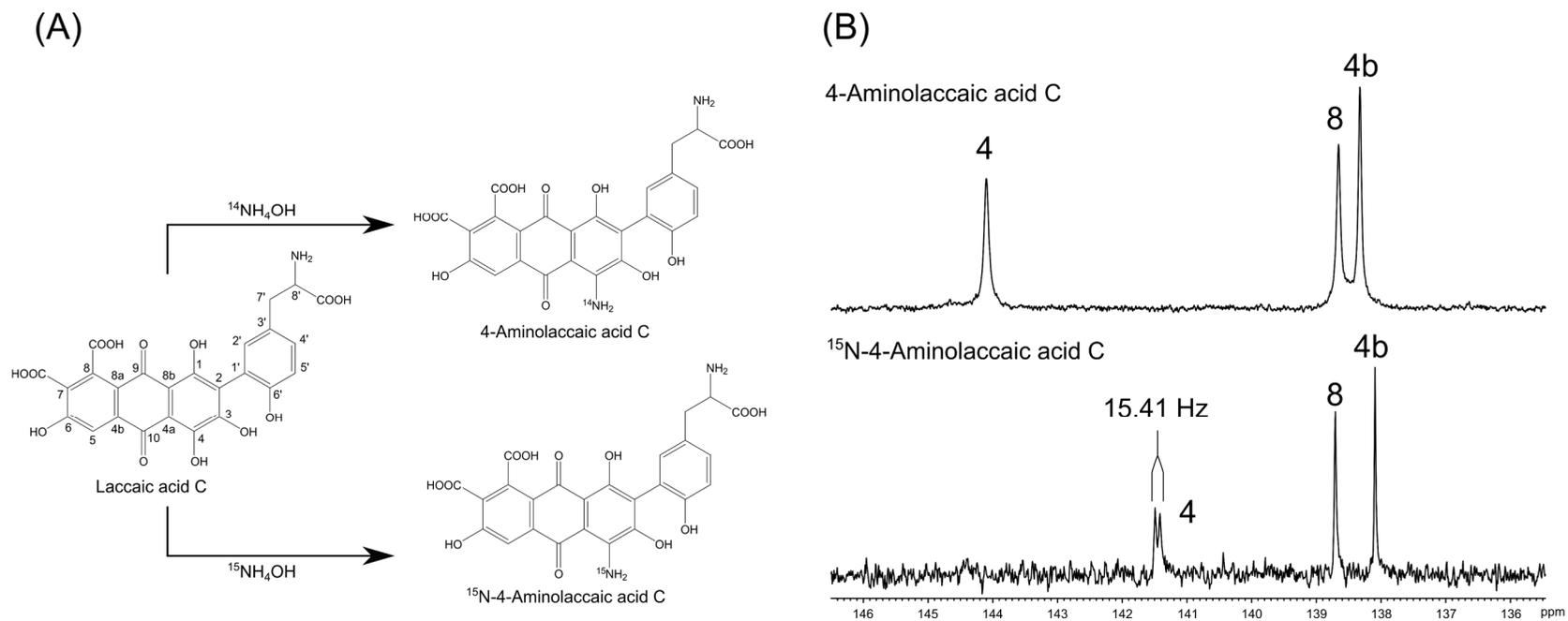


Fig. 6. Synthesis of ^{14}N - and ^{15}N -4-aminolaccaic acid C (A) and ^{13}C -NMR spectra of ^{14}N - and ^{15}N -4-aminolaccaic acid C (B).

Table 1. The color of lac dye and ammonia-treated lac dye at different pH conditions.

Lac dye			Ammonia-treated lac dye		
pH 2	pH 6	pH 10	pH 2	pH 6	pH 10
orange	red	purple	purple	purple	purple

The pH solutions consisted of 0.1% formic acid (pH 2), 10 mM ammonium formate (pH 6), and 0.05% sodium carbonate solution (pH 10).

Table 2. The observed m/z of peaks 1–5 and 1'–5' in lac dye and ammonia-treated lac dye, respectively, as determined by LC/MS analysis.

Lac dye			Ammonia-treated lac dye		
peak	m/z	Compound	peak	m/z	Compound
1	494	laccaic acid E	1'	493	4-aminolaccaic acid E
2	538	laccaic acid C	2'	537	4-aminolaccaic acid C
3	359	anthraquinonedicarboxylic acid derivative	3'	358	4-aminoanthraquinonedicarboxylic acid derivative
4	495	laccaic acid B	4'	494	4-aminolaccaic acid B
5	536	lacciac acid A	5'	535	4-aminolaccaic acid A

Peaks 1–5 and 1'–5' are shown in Fig. 2.

Table 3. ^1H - and ^{13}C -NMR chemical shifts of laccaic acid C and 4-aminolaccaic acid C

No.	Laccaic acid C		4-Aminolaccaic acid C	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	-	158.93	-	164.43*
2	-	122.55	-	116.08
3	-	153.12	-	162.84*
4	-	148.50	-	144.11
4a	-	118.83	-	104.76
4b	-	136.53	-	138.33
5	7.56 (1H, s)	115.86	7.57 (1H, s)	113.88
6	-	169.65	-	167.20
7	-	121.23	-	119.99
8	-	140.17	-	138.66
8a	-	118.32	-	119.62
8b	-	104.90	-	102.00
9	-	183.12	-	177.15
10	-	186.75	-	180.00
1'	-	119.36	-	122.59
2'	7.04 (1H, s)	132.83	7.32 (1H, s)	133.78
3'	-	125.04	-	124.83
4'	7.13 (1H, d, $J=5.50$)	130.82	7.05 (1H, d, $J=5.50$)	129.06
5'	6.92 (1H, d, $J=7.34$)	116.48	6.81 (1H, d, $J=7.34$)	118.12
6'	-	155.00	-	155.85
7-COOH	-	168.54	-	169.41
8-COOH	-	169.53	-	170.59**
7'	3.11 (2H, brs)	35.36	2.99 (1H, s)	35.78
			3.11 (1H, s)	
8'	4.12 (1H, s)	54.05	3.83 (1H, s)	54.99
8'-COOH	-	170.76	-	171.07**

Solvent, DMSO- d_6 . brs, broad singlet; d, doublet; s, singlet. Sets of * and ** indicate interchangeable.

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物の基原の解析に関する検討
～ DNA を指標にした既存添加物酵素の微生物由来基原の再同定-遺伝子配列情報の調査～

研究代表者 穠山 浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

要旨 第9版公定書に収載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、DNAを指標にした種の再同定を実施するに先立ち、指標とする遺伝子16S rDNA及びITS配列が国際塩基配列データベースGenBankに登録されているかどうか調査した。また種々の公定法や文献を参考にして、塩化配列データベースとの相同性検索を行った際、同種とみなす目安、学名が変更となった際の基原の使用是非についての判断基準について示した。本研究で示した仮案をもとに、既存添加物酵素の基原について、今後さらに検討していく必要がある。

研究協力者

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所
卯津羅健作 ナガセケムテックス株式会社

A. 研究目的

既存添加物酵素の品目名は、その添加物の酵素活性に基づいた名前が付けられており、基原に関しては、ひとつの生物種に指定されていない。例えば、異なる生物種に由来する製品でも、酵素活性が同じであれば、同一の品目と見なされる。既存添加物酵素は、細菌、放線菌、酵母、糸状菌、担子菌などの微生物を基原とするものが殆どである。微生物の中には、ヒトに対して病原性をもつものも存在するため、既存添加物酵素の基原が「何者」であるかを同定することは、食の安全を保障する上で、非常に重要である。極端な例ではあるが、*Bacillus* 属等の定義となれば、セレウス菌 (*B. cereus*) や炭疽菌 (*B. anthracis*) なども基原として使用可能と解釈されてしまう危険性がある。微生物は、動植物とは異なり、人の目では確認できず、さらに種の数が増加の一途であることから、公的な同定法に基づいて、一義的に微生物種を特定する必要がある。

現在までに、既存添加物酵素 68 品目のうち、5 品目が第 8 版食品添加物公定書（以下、公定書）に収載され、第 9 版公定書には、62 品目の既存添加物酵素が収載予定である。これによりイソマルトデキストラナーゼ 1 品目を除く全ての酵素 67 品目が公定書に収載される運びとなったが、基原については、属までしか明らかにされていない品目も数多く見受けられる。この理由として、平成 8 年に作成した既存添加物名簿に収載された酵素品目の基原の多くが、従来の形態観察及び生理・生化学性状試験により同定され、それらの特徴が乏しい場合は、種まで特定することが難しかったことが挙げられる。一方、これらの指標は現在でも一部の微生物種に対しては、同定の際の重要な項目となっている。そのため、種まで特定された基原もあるものの、上述の表現形質のみに基づいた同定は、実験者の習熟度、菌株の継代条件等の人為的、生物学的要因の影響を受けやすく、例えば、試験機関での同定結果の比較は困難であり、高い再現性が得られる同定法とは言い難い。さらに、特に微生物の学名は、専門家による最新の研究によって見解が変わることも多く、流動的であるため、法的拘束力をもつ公定書を運用する上では、学名の変更履歴をたどれるようなトレー

サビリティを有した情報に基づいて、同定を行うことが望ましい。

既存添加物名簿が平成 8 年に作成されて 20 年が経過したが、その当時は従来の形態観察および生理・生化学性状試験が同定法として用いられていたのに対して、近年では、DNA 塩基配列を指標にした同定法が一般的で、学術分野に留まらず企業の品質管理の現場でも頻繁に用いられている。当該同定法は、以下の利点を有している； 表現形質のみでは判別できない種の同定が可能、 同定結果（塩基配列）の情報共有が容易（トレーサビリティの確保）、 人為的、生物学的要因の影響を受けず、データが客観的、 再現性に優れる。DNA を用いた微生物種の同定法は、既に日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」として記載されており¹⁾、ひろく認知された同定法といえる。微生物の進化の歴史は rDNA に記録されているとされており、第十七改正日本薬局方（以下、薬局方、参考情報、G4. 微生物関連、遺伝子解析による微生物の迅速同定法）では、細菌で 16S rDNA、真菌については 18S rDNA と 5.8S rDNA 間のスペーサー領域（ITS1）を指標としている（Fig. 1）。両遺伝子とも、すべての微生物種に有効なユニバーサルプライマーが設計可能で、薬局方には、それぞれのプライマー配列セットが記載されている¹⁾。ユニバーサルプライマーを用いて、任意の微生物種由来の 16S rDNA または ITS1 を PCR 増幅し、シークエンスにより塩基配列を決定し、この配列情報を国際塩基配列データベースと照合することで、種または属レベルで同定できる。現在では、データベース上に様々な微生物種由来の 16S rDNA 及び ITS1 配列情報が登録されており、本法は表現形質を指標にした従来法の代替法として大いに期待できる。また、NCBI が提供する Taxonomy データベースでは、国際塩基配列データベースに登録されている塩基配列に由来する生物種名の管理をしており、学名変更後の現行名を確認することができる。DNA を指標にした種の同定法を利用し、現在流通している既存添加物酵素の微生物由来の基原を再同定すれば、トレーサビリティを確保した同定結果が得られるため、そ

の同定結果を、公定書成分規格中の定義（基原）に反映すれば、既存添加物酵素の透明性が今まで以上に確保される。法的拘束力をもつ公定書を運用する際、微生物由来の基原の学名が変更となった際、学名の齟齬が生じ、既存添加物酵素の基原として使用可能かの是非が問われるが、DNA を指標にした再同定後は、NCBI Taxonomy を判断基準とすることが可能であり、上述の問い合わせに対する行政対応の迅速化を図る上でも望ましい。

そこで、本研究では、日本薬局方に準じた DNA を用いた種の再同定の手法を応用するに先立ち、既存添加物酵素の微生物由来の基原を対象に、第 9 版公定書に記載される微生物由来の基原の 16S rDNA 及び ITS 配列情報について NCBI が提供する塩基配列データベース GenBank に登録されているかどうかを確認し、その情報を整理した。また、DNA を用いた種の再同定を実施した後、流動的な微生物の学名によって生じる基原の齟齬の問題に対して、使用の是非の判断基準について考察したので報告する。

B. 研究方法

B-1. 既存添加物酵素の微生物由来の基原の分類

第 9 版公定書に記載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、「細菌」、「放線菌」、「酵母」、「糸状菌」、「担子菌」の 5 つの群に分類し、それぞれ Table 1～5 に示した。

B-2. GenBank 上の 16S rDNA または ITS1 塩基配列情報の登録の有無の確認

以下の手順により、確認した。

1. 米国生物学情報センター（NCBI; National Center for Biotechnology Information）が提供している塩基配列データベース GenBank（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>）に学名を入力し、その学名に由来する 16S rDNA または ITS1 塩基配列の登録の有無を確認し、確認できた場合は「○」として Table に記入した。
2. 1 で、入力した学名に由来する遺伝子が何もヒットしない場合は、NCBI Taxonomy（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>）で

現行名を確認した。NCBI Taxonomy で現行名が確認できない場合は、Mycobank Database (<http://www.mycobank.org/>), LPSN (<http://www.bacterio.net/>) で現行名を確認した。現行名を GenBank に入力し再度検索を行い、入力した学名に由来する 16S rDNA または ITS1 塩基配列の有無を確認し、確認できた場合は「 」として Table に記入し、備考欄に現行名を記入した。16S rDNA または ITS1 塩基配列が確認できない場合は「 × 」とした。

3. 現行名が確認できなかった場合は、「 」として、トレーサビリティが得られない学名と判断した。

C. 研究結果及び考察

C-1. 「細菌」及び「放線菌」に属す基原

第 9 版公定書には、「細菌」由来の既存添加物酵素として 86 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、*Bacillus* 属 16 品目、次いで *Bacillus subtilis* が 11 品目で最も多かった (Table 1)。冒頭で述べたように、*Bacillus* 属で定義されると、セレウス菌 (*B. cereus*) や炭疽菌 (*B. anthracis*) など基原として使用可能と解釈されることが懸念されるため、種まで明確にする必要がある。「放線菌」(広義には細菌)由来の既存添加物酵素では、25 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、*Streptomyces thermoviolaceus* と *Streptomyces violaceoruber* が共に 19 品目で最も多かった (Table 2)。「細菌」及び「放線菌」は DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が 70% 以上を示す菌株同士を 1 つの菌種と定義している²⁾。16S rDNA の全長配列(約 1,500 bp)の相同値が 98.7% 以上の場合には、DNA-DNA 分子交雑試験の相同値が 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³⁾。なお薬局方では 16S rDNA の上流約 800 bp または下流 800 bp の配列を指標にして、データベースと照合し、90% 以上合致する上位にランクされた菌種を同一種又は近縁種と判定する¹⁾。そこで、属及び sp. で定義された基原を除く「細菌」56 基原と「放線菌」19 基原について、16S rDNA 配列が国際

塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。「細菌」では、56 基原中 52 基原の 16S rDNA 配列が登録されていた (Table 1)。16S rDNA 配列が登録されていなかった 4 基原のうち、*Bacillus coagulans* J4 は、株レベルでの定義となっていた。16S rDNA 配列を指標にした同定法では株レベルでの分類には、分解能が低く対応できない。従って、トレーサビリティの得られない学名と判断し、「グルコースイソメラーゼ」の基原 *Bacillus coagulans* と同様に、種レベルまでの定義とするのが望ましい。「放線菌」についても GenBank に 16S rDNA が登録されているのか調査したところ、19 基原中 17 基原が登録されていた (Table 2)。16S rDNA 配列が登録されていなかった 2 基原のうち、「アスコルビン酸オキシダーゼ」の基原 *Eupenicillium brefeldianum* は「放線菌」ではなく、「糸状菌」に分類されるため、第 9 版公定書の「アスコルビン酸オキシダーゼ」の定義を一部修正する必要がある。*Thermomonospora viridis* はトレーサビリティの得られない学名であった。

C-2. 「酵母」に属す基原

第 9 版公定書には、「酵母」(広義には真菌)由来の既存添加物酵素として 10 基原が収載されている。薬局方では ITS1 配列を指標にして、データベースと照合し、90% 以上合致する上位にランクされた菌種を同一種又は近縁種と判定する¹⁾。また、日本薬学会協定衛生試験法では、26S rDNA の部分塩基配列 (D1/D2 領域) を指標にして、99% 以上の類似度を示した菌種を同一種と同定する⁴⁾。杉田らは、「酵母」*Trichosporon* 属 (17 種 5 変種) を用いて、同種の場合、DNA-DNA 分子交雑試験による相同値が 80% 以上であり、その際に与えられる ITS1 及び ITS2 領域 (5.8S rDNA と 26S rDNA 間のスペーサー領域) の相同値が 99% 以上であることを報告している⁵⁾。衛生試験法では、杉田らの報告を引用し、ITS 領域を指標にしても同等の結果が得られるとしている。そこで、属で定義された基原を除く 6 基原について、ITS 領域の配列 (ITS1 及び ITS2 を含む) が GenBank に登録

されているのか調査した。その結果、6 基原の ITS 配列が登録されていることを確認できた (Table 3)

C-3. 「糸状菌」及び「担子菌」に属す基原
第 9 版公定書には、「糸状菌」由来の既存添加物酵素として 80 基原が収載されている。基原別による品目数を見てみると、*Aspergillus niger* が 25 品目、次いで *Aspergillus oryzae* が 16 品目で最も多かった (Table 4)。「担子菌」由来の既存添加物酵素では、11 基原が収載されている (Table 5)。「糸状菌」及び「担子菌」は、広義には真菌にあたり、同種間における任意の指標遺伝子の相同値についての知見は少ないが、多くの実験データに基づき、「D1/D2 領域又は ITS 領域の相同値が 99% 以上のとき、同種とみなす」ことが支持されている^{1),4),6)}。そこで、属及び sp. で定義された基原を除く「糸状菌」65 基原と「担子菌」6 基原について、ITS 配列が GenBank に登録されているのか調査した。「糸状菌」では 65 基原中 57 基原の ITS 配列が登録されていた。ITS 配列が登録されていなかった 8 基原のうち、4 基原は D1/D2 領域の配列も登録されていなかった。また残る 4 基原はトレーサビリティの得られない学名であった。「担子菌」では 6 基原中 6 基原の ITS 配列の登録が確認できた。

C-4. 16S rDNA, ITS 配列以外の指標遺伝子
16S rDNA または ITS 配列を指標とした場合でも一義的に微生物種を同定することができないことも報告されている。特に「糸状菌」の *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属では、異なる種間でも ITS の相同値が 99% 以上となることもあることから、ITS 配列は種の絞り込みとして利用し、実際の同定は、別のタンパク質遺伝子を利用する。*Aspergillus* 属⁷⁾、*Penicillium* 属⁸⁾では - チュープリン遺伝子やカルモジュリン遺伝子が有効とされており、データベースも拡充されている。このことから、DNA を用いた種の再同定を実施するにあたり、合理性があれば、16S rDNA, ITS 配列以外の遺伝子も指標とするのが科学的に妥当である。

C-5. 相同値の目安及び学名変更後の基原の使用是非の判断基準

日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」を参考に、「DNA を指標にした既存添加物酵素の基原同定法 (仮称)」を酵素の基原の判断基準の仮案として別紙に示した。「細菌」「放線菌」については、16S rDNA の全長配列を指標として、データベース上の塩基配列と 98.7% 以上の相同値を示したとき、その塩基配列に由来する微生物種と同種と見なす。「酵母」「糸状菌」「担子菌」については、ITS1 配列を指標としてデータベース上の塩基配列と 99% 以上の相同値を示したとき、その塩基配列に由来する微生物種と同種と見なす。なお、合理性があれば、16S rDNA 及び ITS1 以外の遺伝子配列も指標にして良いものとする。

Fig. 2 には、「DNA を指標にした既存添加物酵素の基原同定法 (仮称)」を第 9 版公定書に収載される既存添加物酵素の微生物由来の基原に対して実施後、種名を管理する体制の案を示した。既存添加物名簿作成から 20 年が経過しているが、本研究で提示した案、すなわち DNA を指標にした同定法により、現時点での科学的に妥当と考えられる基原の学名を第 10 版公定書に反映可能であると考えられる。学名の設定根拠は、指標遺伝子配列及び国際塩基配列データベースをよりどころとするため、例えば、第 10 版公定書で学名を A と設定したが、最新の研究により学名が B となった場合でも、国際塩基配列データベースとリンクする NCBI Taxonomy から A と B の関係を確認できれば、トレーサビリティを確保していると判断し、その菌株の使用を認めるということが説明でき、そして、必要に応じて、学名 B は第 11 版公定書に反映することができるように整理した案である。ここで示した案には議論されるべきことが多く残されており、今後も検討が必要である。

D. 結論

第 9 版公定書に収載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、16S rDNA または

ITS 配列が国際塩基配列データベース GenBank に登録されているのか調査した。その結果、「細菌」52/56 基原、「放線菌」17/19 基原、「酵母」6/6 基原、「糸状菌」57/65 基原、「担子菌」6/6 基原の配列が登録されていた。配列が登録されていなかった基原の中には、トレーサビリティの得られない学名、すなわち公定書に記載する基原としてふさわしくない学名であるものが散見された。

微生物などの学名が流動的である基原に対して規格を整備するためには、統一された方法、指針に基づいて情報を整理する必要がある。本研究で提示する同定法を実施すると、第 10 版で基原の大幅な改正が求められ、さらにその後も最新の研究により学名が変更となる基原もでてくることが予想されるが、これについては NCBI Taxonomy から得られる旧名と現行名を確認することで、基原の使用の是非を判断するなど、今後、一定の判断基準を設定しておく必要があると思われる。

E. 参考文献

- 1) 第十六改正日本薬局方，厚生労働省：参考情報 G4．微生物関連 (2011)
- 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) 日本薬学会編，“1.2.2.2 真菌の分離・同定法 -7) 真菌の DNA 塩基配列による同定法”。衛生試験法・注解 2010，P. 117-118。

- 5) Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R., and Shinoda, T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1985-199 (1999).
- 6) 後藤慶一，“DNA 塩基配列を用いたカビ・酵母の同定”。モダンメディア，第 55 巻 P.237-242 (2009).
- 7) Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., and Samson, R.A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.*, 69, 1-17 (2011).
- 8) Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., and Samson, R.A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.*, 78, 343-371 (2014).

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表
特になし

G. 知的財産権の出願，登録状況

特になし

H. 健康危機情報

特になし

Table 1. 細菌群における既存添加物酵素の基原種 (77 基原)				
学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Aeromonas caviae</i>	アミノペプチダーゼ	1		
<i>Aeromonas</i> 属	キチナーゼ、キトサナーゼ	2	-	
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1		
<i>Alcaligenes latus</i>	-アミラーゼ	1		
<i>Alcaligenes</i> 属	リパーゼ	1	-	
<i>Alteromonas macleodii</i>	アルギン酸リアーゼ	1		
<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i>	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1		
<i>Arthrobacter</i> 属	-アミラーゼ、 -グルコシルトランスフェラーゼ、インベルターゼ、ウレアーゼ、グルカナーゼ、フルクトシルトランスフェラーゼ、リパーゼ	7	-	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-アミラーゼ、 -アミラーゼ、グルカナーゼ、グルタミナーゼ、プロテアーゼ	5		
<i>Bacillus cereus</i>	レンネット	1		
<i>Bacillus circulans</i>	-アミラーゼ、 -ガラクトシダーゼ、グルタミナーゼ、セルラーゼ	4		
<i>Bacillus clausii</i>	プロテアーゼ	1		
<i>Bacillus coagulans</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Bacillus coagulans</i> J4	プロテアーゼ	1		
<i>Bacillus flexus</i>	-アミラーゼ	1		
<i>Bacillus halodurans</i>	プロテアーゼ、ヘミセルラーゼ	2		
<i>Bacillus lentus</i>	プロテアーゼ	1		
<i>Bacillus licheniformis</i>	-アセトラクタートデカルボキシラーゼ、 -アミラーゼ、アミノペプチダーゼ、プロテアーゼ	4		
<i>Bacillus mannanilyticus</i>	ヘミセルラーゼ	1		
<i>Bacillus polymyxa</i>	-アミラーゼ、プロテアーゼ	2		<i>Paenibacillus polymyxa</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	-アミラーゼ、 -ガラクトシダーゼ、プロテアーゼ	3		<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Bacillus subtilis</i>	-アセトラクタートデカルボキシラーゼ、 -アミラーゼ、 -アミラーゼ、グルカナーゼ、グルタミナーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ	11		

Table 1. 細菌群における既存添加物酵素の基原種 (77 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	プロテアーゼ	1	×	
<i>Bacillus</i> 属	アガラーゼ、-グルコシダーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、-グルコシダーゼ、イソアミラーゼ、インベルターゼ、キトサナーゼ、グルコアミラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、トランスグルタミナーゼ、パーオキシダーゼ、フルクトシルトランスフェラーゼ、プルラナーゼ、ペプチダーゼ、ホスホリパーゼ、ムラミダーゼ	16	-	
<i>Brevibacterium</i> 属	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Burkholderia ginsengisoli</i>	-グルコシダーゼ	1	○	
<i>Burkholderia plantarii</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Burkholderia ubonensis</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	-アミラーゼ、グルカナーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	3	○	
<i>Chromobacterium viscosum</i>	リパーゼ	1	×	
<i>Corynebacterium</i> 属	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Erwinia</i> 属	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Escherichia coli</i>	レンネット	1	○	
<i>Flavobacterium multivorum</i>	アルギン酸リアーゼ	1		<i>Sphingobacterium multivorum</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Flavobacterium odoratum</i>	イソアミラーゼ	1		<i>Myroides odoratus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Flavobacterium sp.</i>	アルギン酸リアーゼ	1	-	
<i>Geobacillus caldoproteolyticus</i>	プロテアーゼ	1	○	
<i>Geobacillus pallidus</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1		<i>Aeribacillus pallidus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、プロテアーゼ	3		
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	リパーゼ	1		
<i>Gluconobacter oxydans</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1		
<i>Halomonas aquamarina</i>	-グルコシダーゼ	1		

Table 1. 細菌群における既存添加物酵素の基原種 (77 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Klebsiella</i> 属	プルナーゼ	1	-	
<i>Lactobacillus casei</i>	アミノペプチダーゼ	1		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ウレアーゼ	1		
<i>Lactococcus lactis</i>	アミノペプチダーゼ、ペプチダーゼ	2		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1		
<i>Lysobacter enzymogenesis</i>	グルカナナーゼ、プロテアーゼ	2		
<i>Microbacterium imperiale</i>	-アミラーゼ	1		
<i>Microbacterium saccharophilum</i>	フルクトシルトランスフェラーゼ	1		
<i>Microbacterium</i> 属	マルトトリオヒドロラーゼ	1	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	カタラーゼ	1		
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	カタラーゼ	1		<i>Micrococcus luteus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Naxibacter sp.</i>	イソアミラーゼ	1	-	
<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	-アミラーゼ、 -グルコシルトランスフェラーゼ	2		
<i>Paenibacillus campinasensis</i>	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1		
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	グルカナナーゼ	1		
<i>Paenibacillus macerans</i>	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	1		
<i>Paenibacillus sp.</i>	トレハロースホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ	2	-	
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	キチナーゼ	1		
<i>Pimelobacter</i> 属	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Plesiomonas</i> 属	トレハロースホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ	2	-	
<i>Protaminobacter</i> 属	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	-	
<i>Pseudomonas amyloclavata</i>	イソアミラーゼ	1	x	
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	グルカナナーゼ、プロテアーゼ	2		<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	エキソマルトテトラオヒドロラーゼ	1		

Table 1. 細菌群における既存添加物酵素の基原種 (77 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
----	------	-----	---------	----

<i>Pseudomonas</i> 属	アガラーゼ、 -グルコシダーゼ、 -グルコシルトランスフェラーゼ、 アルギン酸リアーゼ、 エステラーゼ、 グルコアミラーゼ、 リパーゼ	7	-
<i>Pullulanibacillus naganoensis</i>	プルラナーゼ	1	
<i>Serratia marcescens</i>	リパーゼ	1	
<i>Serratia</i> 属	-アセトラクタートデカルボキシラーゼ、 -グルコシルトランスフェラーゼ	2	-
<i>Sporosarcina globispora</i>	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	
<i>Streptococcus</i> 属	-ガラクトシダーゼ	1	-
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	-アミラーゼ、 トランスグルコシダーゼ、 プルラナーゼ	3	
<i>Thermus</i> 属	-グルコシルトランスフェラーゼ	1	-
<i>Xanthomonas</i> 属	アルギン酸リアーゼ	1	-
<i>Zymomonas mobilis</i>	フルクトシルトランスフェラーゼ	1	

○, GeneBank 上に 16S rDNA 配列が登録されている; , GeneBank 上に 16S rDNA 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; x, GenBank 上に 16S rDNA 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレサビリティの得られない学名であり, 16S rDNA 配列の登録の有無が確認できない.

Table 2. 放線菌群における既存添加物酵素の基原種 (25 基原)

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Actinomadura</i> 属	ホスホリパーゼ	1	-	
<i>Actinomyces</i> 属	セルラーゼ、ムラミダーゼ	2	-	
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	キチナーゼ	1		
<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	アスコルビン酸オキシダーゼ	1	-	糸状菌
<i>Kitasatospora sp.</i>	ホスホリパーゼ	1	-	
<i>Nocardioopsis</i> 属	ホスホリパーゼ	1	-	
<i>Saccharomonospora viridis</i>	-アミラーゼ	1		
<i>Streptomyces aureus</i>	5'-デアミナーゼ、ホスホジエステラーゼ	2		
<i>Streptomyces avermitilis</i>	5'-デアミナーゼ、-アミラーゼ、-グルコシダーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、-グルコシダーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キシラナーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	16		
<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	マルトトリオヒドロラーゼ	1		
<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	5'-デアミナーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キトサナーゼ、ペプチダーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ	9		
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Streptomyces griseus</i>	5'-デアミナーゼ、-アミラーゼ、-グルコシダーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、-グルコシダーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、グルコースイソメラーゼ、ペプチダーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	14		
<i>Streptomyces lividans</i>	ホスホリパーゼ	1		
<i>Streptomyces murinus</i>	5'-デアミナーゼ、グルコースイソメラーゼ	2		
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Streptomyces polychromogenes</i>	ホスホリパーゼ	1		
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	グルコースイソメラーゼ	1		
<i>Streptomyces sp.</i>	グルコースイソメラーゼ	1	-	

Table 2. 放線菌群における既存添加物酵素の基原種 (25 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	5'-デアミナーゼ、-アミラーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、-グルコシダーゼ、アミノペプチダーゼ、エキソマルトテトラオヒドロラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キシラナーゼ、キトサナーゼ、グルカナナーゼ、グルコースイソメラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、パーオキシダーゼ、ペクチナーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	19		
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	5'-デアミナーゼ、-アミラーゼ、-グルコシダーゼ、-グルコシルトランスフェラーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アミノペプチダーゼ、エキソマルトテトラオヒドロラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キシラナーゼ、キトサナーゼ、グルカナナーゼ、グルコースイソメラーゼ、パーオキシダーゼ、ペクチナーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	19		
<i>Streptomyces</i> 属	-アミラーゼ、キチナーゼ、セルラーゼ、トランスグルタミナーゼ、プロテアーゼ、ムラミダーゼ、リパーゼ	7	-	
<i>Streptoverticillium mobaraense</i>	トランスグルタミナーゼ	1		
<i>Thermomonospora viridis</i>	-アミラーゼ	1		

○, GeneBank 上に 16S rDNA 配列が登録されている; , GeneBank 上に 16S rDNA 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; ×, GenBank 上に 16S rDNA 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレースビリティの得られない学名であり, 16S rDNA 配列の登録の有無が確認できない.

Table 3. 酵母群における既存添加物酵素の基原種 (10 基原)

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Candida</i> 属	エステラーゼ、グルタミナーゼ、リパーゼ	3	-	
<i>Geotrichum klebahnii</i>	ペクチナーゼ	1		
<i>Kluyveromyces fragillus</i>	-ガラクトシダーゼ	1		<i>Kluyveromyces marxianus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	インベルターゼ、-ガラクトシダーゼ、レンネット	3		
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ	2		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	インベルターゼ、カルボキシペプチダーゼ	2	○	
<i>Saccharomyces</i> 属	カタラーゼ、-ガラクトシダーゼ、グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、-グルコシダーゼ、プロテアーゼ	6	-	
<i>Sporobolomyces singularis</i>	-ガラクトシダーゼ	1		
<i>Torulopsis</i> 属	エステラーゼ	1	-	
<i>Trichosporon</i> 属	ペクチナーゼ	1	-	

○, GeneBank 上に ITS 配列が登録されている; , GeneBank 上に ITS 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; ×, GenBank 上に ITS 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレーサビリティの得られない学名であり, ITS 配列の登録の有無が確認できない.

Table 4. 糸状菌群における既存添加物酵素の基原種 (78 基原)

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Absidia</i> 属	-グルコシダーゼ	1	-	
<i>Acremonium cellulolyticus</i>	セルラーゼ	1	○	
<i>Acremonium chrysogenum</i>	グルコースオキシダーゼ	1	○	
<i>Acremonium</i> 属	-グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ	2	-	
<i>Alternaria</i> 属	パーオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ	2	-	
<i>Aspergillus aculeatus</i>	-ガラクトシダーゼ、 -グルコシダーゼ、 イヌリナーゼ、 インベルターゼ、 カタラーゼ、 キシラナーゼ、 グルカナナーゼ、 グルコースオキシダーゼ、 セルラーゼ、 ペクチナーゼ、 ヘミセルラーゼ	11		
<i>Aspergillus alliaceus</i>	ペクチナーゼ	1		
<i>Aspergillus aureus</i>	-アミラーゼ	1	x	
<i>Aspergillus awamori</i>	-ガラクトシダーゼ、 インベルターゼ、 カタラーゼ、 キシラナーゼ、 セルラーゼ、 ペクチナーゼ、 ヘミセルラーゼ、 リパーゼ	8		
<i>Aspergillus carbonarius</i>	ペクチナーゼ	1		
<i>Aspergillus foetidus</i>	-アミラーゼ、 カタラーゼ	2		
<i>Aspergillus japonicus</i>	インベルターゼ、 ペクチナーゼ、 リパーゼ	3		
<i>Aspergillus melleus</i>	5'-デアミナーゼ、 アシラーゼ、 プロテアーゼ	3		
<i>Aspergillus niger</i>	-アミラーゼ、 -ガラクトシダーゼ、 -ガラクトシダーゼ、 -グルコシダーゼ、 アントシアナーゼ、 イヌリナーゼ、 インベルターゼ、 カタラーゼ、 キシラナーゼ、 キチナーゼ、 キトサナーゼ、 グルカナナーゼ、 グルコースオキシダーゼ、 酸性ホスファターゼ、 セルラーゼ、 トランスグルコシダーゼ、 フィターゼ、 プロテアーゼ、 ペクチナーゼ、 ペプチダーゼ、 ヘミセルラーゼ、 ホスホジエステラーゼ、 ホスホリパーゼ、 ポリフェノールオキシダーゼ、 リパーゼ	25		
<i>Aspergillus niger var. awamori</i>	タンナーゼ	1		
<i>Aspergillus ochraceus</i>	アシラーゼ	1		
<i>Aspergillus oryzae</i>	5'-デアミナーゼ、 -アミラーゼ、 -アミラーゼ、 -ガラクトシダーゼ、 -グルコシダーゼ、 アミノペプチダーゼ、 アントシアナーゼ、 キチナーゼ、 酸性ホスファターゼ、 タンナーゼ、 パーオキシダーゼ、 プロテアーゼ、 ペプチダーゼ、 ヘミセルラーゼ、 ホスホリパーゼ、 リパーゼ	16		
<i>Aspergillus phoenicis</i>	-ガラクトシダーゼ、 イヌリナーゼ、 カタラーゼ、 プロテアーゼ、 リパーゼ	5		
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	-グルコシダーゼ、 ペクチナーゼ	2		
<i>Aspergillus saitoi</i>	プロテアーゼ	1		

Table 4. 糸状菌群における既存添加物酵素の基原種 (78 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Aspergillus sojae</i>	プロテアーゼ、ペプチダーゼ	2		
<i>Aspergillus usamii</i>	トランスグルコシダーゼ、ナリンジナーゼ、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ、リパーゼ	5	○	
<i>Aspergillus</i> 属	-グルコシダーゼ、エステラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、グルコアミラーゼ、グルコースイソメラーゼ、グルタミナーゼ、フルクトシルトランスフェラーゼ、ヘスペリジナーゼ	8	-	
<i>Chaetomium erraticum</i>	デキストラナーゼ	1	×	
<i>Chaetomium gracile</i>	デキストラナーゼ	1	○	
<i>Coriolus</i> 属	ポリフェノールオキシダーゼ	1	-	
<i>Cryphonectria parasitica</i>	レンネット	1	○	
<i>Disporotrichum dimorphosporum</i>	キシラナーゼ	1		
<i>Geosmithia emersonii</i>	グルカナナーゼ	1		<i>Rasamsonia emersonii</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Geotrichum candidum</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Humicola grisea</i>	グルコアミラーゼ	1	○	
<i>Humicola insolens</i>	キシラナーゼ、グルカナナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	4	○	
<i>Humicola</i> 属	リパーゼ	1	-	
<i>Leptographium procerum</i>	ホスホジエステラーゼ	1	○	
<i>Monascus pilosus</i>	プロテアーゼ	1	○	
<i>Monascus purpureus</i>	プロテアーゼ	1	○	
<i>Mortierella</i> 属	-ガラクトシダーゼ	1	-	
<i>Mucor circinelloides</i>	プロテアーゼ	1	○	
<i>Mucor circinelloides f. circinelloides</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Mucor javanicus</i>	プロテアーゼ、リパーゼ	2	×	
<i>Mucor miehei</i>	プロテアーゼ、リパーゼ、レンネット	3	○	
<i>Mucor pusillus</i> Lindt	レンネット	1		<i>Rhizomucor pusillus</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Mucor rouxii</i>	プロテアーゼ	1	○	

Table 4. 糸状菌群における既存添加物酵素の基原種 (78 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
----	------	-----	---------	----

<i>Mucor spp.</i>	レンネット	1	-	
<i>Myrothecium verrucaria</i>	ポリフェノールオキシダーゼ	1	○	
<i>Oidiodendron</i> 属	パーオキシダーゼ	1	-	
<i>Penicillium amagasakiense</i>	カタラーゼ	1	×	
<i>Penicillium camembertii</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Penicillium citrinum</i>	プロテアーゼ、ホスホジエステラーゼ	2	○	
<i>Penicillium decumbens</i>	-グルコシダーゼ、アントシアナーゼ、ナリンジナーゼ、ヘスペリジナーゼ	4	○	
<i>Penicillium duponti</i>	プロテアーゼ	1		
<i>Penicillium funiculosum</i>	グルカナーゼ、セルラーゼ	2	○	
<i>Penicillium lilacinum</i>	デキストラナーゼ	1	○	
<i>Penicillium multicolor</i>	-ガラクトシダーゼ、 -グルコシダーゼ、ヘミセルラーゼ	3	○	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	イヌリナーゼ	1	○	
<i>Penicillium roqueforti</i>	フルクトシルトランスフェラーゼ、リパーゼ	2	○	
<i>Penicillium</i> 属	グルコースオキシダーゼ、マルトトリオヒドロラーゼ	2	-	
<i>Rasamsonia emersonii</i>	キシラナーゼ、グルカナーゼ	2	○	
<i>Rhizomucor miehei</i>	プロテアーゼ、リパーゼ、レンネット	3	○	
<i>Rhizomucor pusillus</i>	レンネット	1	○	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Rhizopus chinensis</i>	プロテアーゼ	1		<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Rhizopus delemar</i>	グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ	4	○	
<i>Rhizopus japonicus</i>	リパーゼ	1	○	
<i>Rhizopus miehei</i>	リパーゼ	1		
<i>Rhizopus niveus</i>	グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ	3	○	
<i>Rhizopus oryzae</i>	-ガラクトシダーゼ、アミノペプチダーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ペプチダーゼ、 リパーゼ	7	○	

Table 4. 糸状菌群における既存添加物酵素の基原種 (78 基原) -続き-

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Rhizopus</i> 属	リボキシゲナーゼ	1	-	

<i>Trichoderma harzianum</i>	-グルコシダーゼ、キチナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	5	○	
<i>Trichoderma insolens</i>	セルラーゼ	1		
<i>Trichoderma koningii</i>	キシラナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	3	○	
<i>Trichoderma lignorum</i>	アスコルビン酸オキシダーゼ	1		<i>Trichoderma viride</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-グルコシダーゼ、キシラナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	5	○	
<i>Trichoderma reesei</i>	-グルコシダーゼ、キシラナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	7	○	
<i>Trichoderma viride</i>	キシラナーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ	5	○	
<i>Trichoderma</i> 属	イヌリナーゼ、ペクチナーゼ	2	-	
<i>Verticillium</i> 属	キトサナーゼ	1	-	

○, GeneBank 上に ITS 配列が登録されている; , GeneBank 上に ITS 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; x, GenBank 上に ITS 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレーサビリティの得られない学名であり, ITS 配列の登録の有無が確認できない.

Table 5. 担子菌群における既存添加物酵素の基原種 (11 基原)

学名	酵素品目	品目数	GenBank	備考
<i>Coliolum</i> 属	アガラーゼ	1	-	
<i>Coprinus cinereus</i>	パーオキシダーゼ	1	○	
<i>Corticium rolfsii</i>	グルコアミラーゼ	1		<i>Athelia rolfsiit</i> (NCBI Taxonomy)
<i>Corticium</i> 属	セルラーゼ、ペクチナーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホリパーゼ	4	-	
<i>Cyathus</i> 属	ポリフェノールオキシダーゼ	1	-	
<i>Irpex lacteus</i>	レンネット	1	○	
<i>Irpex</i> 属	セルラーゼ	1	-	
<i>Polyporus cinereus</i>	ポリフェノールオキシダーゼ	1		<i>Trametes hirsuta</i> (Mycobank NCBI Taxonomy)
<i>Polyporus versicolor</i>	ポリフェノールオキシダーゼ	1		<i>Trametes versicolor</i> (Mycobank NCBI Taxonomy)
<i>Pycnoporus coccineus</i>	グルカナーゼ、セルラーゼ、プロテアーゼ、ヘミセルラーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ	5	○	
<i>Trametes</i> 属	ポリフェノールオキシダーゼ	1	-	

○, GeneBank 上に ITS 配列が登録されている; , GeneBank 上に ITS 配列が登録されているが, 基原の学名が現行名と異なる; ×, GenBank 上に ITS 配列が登録されていない; , 基原の学名がトレーサビリティの得られない学名であり, ITS 配列の登録の有無が確認できない.

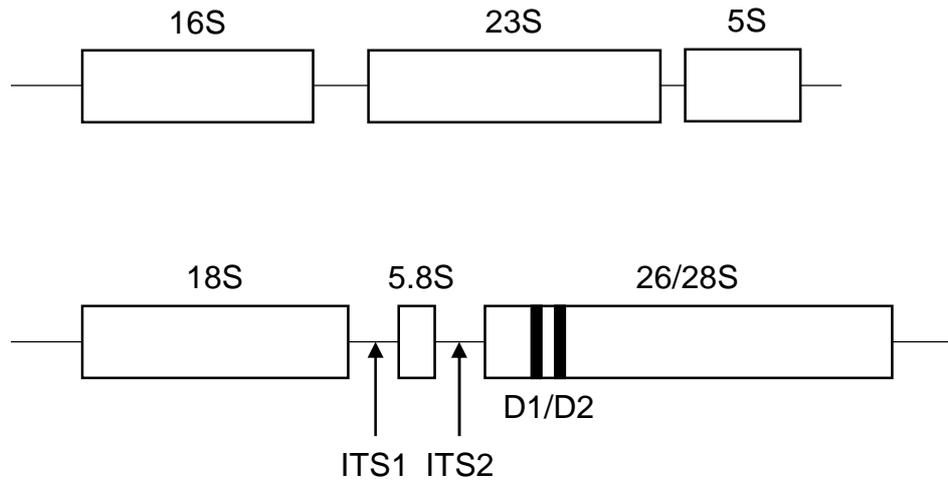


Fig. 1 . 日本薬局方における細菌及び真菌の指標遺伝子

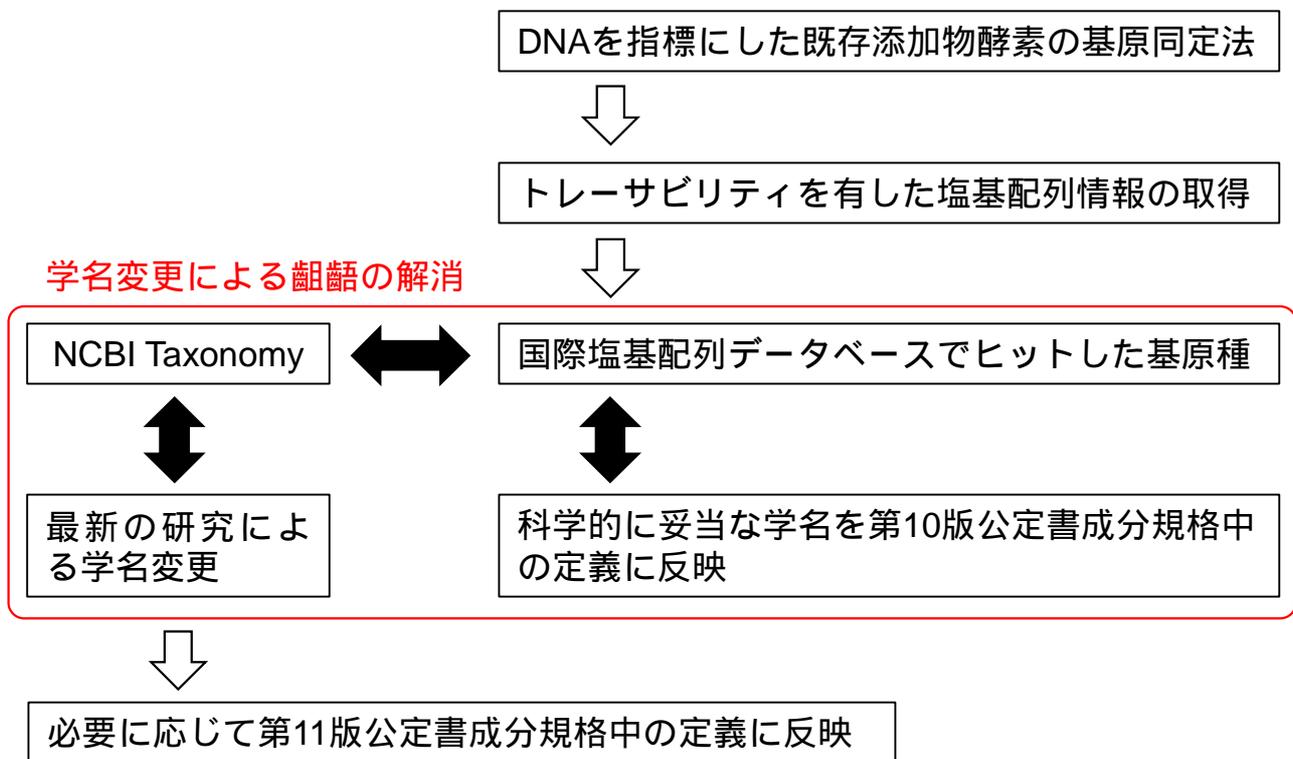


Fig. 2 . DNA を指標にした既存添加物酵素の基原の再同定実施後の種名管理体制（案）

別紙

ここに記載された内容は、日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」を参考にして作成したものであり、今後さらに検討していくものである。

DNA を指標にした既存添加物酵素の基原同定法（仮称）

本法は、既存添加物酵素の微生物由来の基原を遺伝子解析法によって種又は属レベルで同定又は推定する手法を示す。微生物の同定法は、微生物固有の形態や生理・生化学性状、菌体成分の解析等を組み合わせて、分類階級の上位から下位に進めていく表現形質解析法が広く用いられてきた。表現形質による微生物同定用キットも数多く市販されているが、既存添加物酵素の微生物の中には、同定できないものも多い。また、表現形質による同定法は、一般に専門知識が必要な上、結果の判定が客観性に欠ける恐れがある。

微生物の進化の歴史はリボソームRNA（rRNA）に記録されているとされており、近年の微生物分類学ではこの記録をもとに、系統発生的に区分する手法が採用されている。本法は、「細菌」「放線菌」については、16S rRNAの高度可変領域の一部、「糸状菌」「酵母」「担子菌」については18S rRNAと5.8S rRNA間のスペーサー領域（ITS1）の遺伝子配列を自動解析し、データベースと照合することによって微生物を迅速に同定又は推定する手法を示す。なお、本法は他の同定法にとって代わるものではない。また、本法に示した方法は、用いる装置や材料、実施者の経験などによって変更可能である。また、本法に示した以外の遺伝子領域も合理性があれば使用可能である。

装置

（1） DNA 自動解析装置

DNA の塩基配列を読み取る（シーケンスする）装置で、ゲル板法やキャピラリー法など、種々の機種がある。

（2） DNA 増幅装置

被検菌の標的 DNA の増幅（PCR）に用いる。また、PCR 産物をシーケンシング試薬で標識するためにも用いる。

操作法

以下、操作法の一例を示す。

1. 鋳型 DNA の調製

同定対象とする微生物は純培養されていることが重要である。被検菌が集落の場合は、1.5 mL 遠心チューブに被検菌処理液を 0.3 mL 入れ、これに滅菌竹串などで集落の一部（カビの場合は、ごく少量）を取り懸濁させる。被検菌が液体培養物の場合は、1.5 mL 遠心チューブに培養物を 0.5 mL とり、10000 rpm で 10 分間遠心後、上清を除去し、残留物に被検菌処理液を 0.3 mL 入れ

て懸濁させる。ヒーターを用いて懸濁液を 100 ℃ で 10 分間加熱する。細菌、酵母類は一般に、加熱処理物でも PCR はかかるが、カビの中には集落を用いると PCR 反応を阻害するものもある。その場合には、液体培養物から DNA 抽出を行った方が良い。

2. PCR

PCR 反応液に加熱処理した菌液の上清又は DNA 抽出物を 2mL 加え、「細菌」「放線菌」の場合は 10F/1500R プライマーセット、「糸状菌」「酵母」「担子菌」の場合は ITS1F/ITS1R プライマーセットを添加して以下の条件で PCR を行う。94 ℃ , 30 秒 55 ℃ , 60 秒 72 ℃ , 60 秒の反応を 30 サイクル。「細菌」「放線菌」の場合は約 1500 bp, 「糸状菌」「酵母」「担子菌」の場合は菌種により約 150 ~ 470 bp の DNA 断片が増幅生成する。PCR を行う際には、陰性対照（菌液の代わりに水）を置くこと。

3. PCR 産物の検出

反応終了後の PCR 液 5 μL を 1 μL のローディング緩衝液と混合し、1.5 w/v% アガロースゲルのウェルに添加し、1 倍 TAE 緩衝液を用いて電気泳動する。この際、適当な DNA サイズマーカーも並行して泳動する。泳動後、トランスイルミネーター（主波長：312 nm）で観察し、鮮明な 1 本の標的サイズバンドが得られていることを確認する。複数のバンドが確認された場合には、標的バンドを切り出し、適当な市販 DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出を行う。

4. PCR 産物の精製

未反応物（dNTP やプライマーなど）を除去するための方法としてはいろいろある。採用する方法のプロトコルに従って精製する。

5. 精製 DNA の定量

精製 DNA 量を分光光度計で測定する場合には、OD_{260 nm} = 50 mg/mL で換算する。

6. 精製 PCR 産物の標識

DNA 解析装置又はそのプログラムに合った蛍光標識シーケンシング試薬を用い、PCR 産物を標識する。

7. シーケンシング反応物の精製

1.5 mL 遠心チューブに薄めたエタノール（7 ~ 10）を 75 μL 入れ、反応終了物を移す。氷中に 20 分間放置後、15000 rpm で 20 分間遠心する。遠心終了後、上清を除去し、薄めたエタノール（7 ~ 10）250 μL を加え、15000 rpm で 5 分間遠心する。上清を除去し、乾燥させる。

8. 塩基配列の解析

DNA 解析装置やシーケンス試薬に合った方法で処理した試料を DNA 解析装置にセットし、塩基配列を読み取る。得られた塩基配列を BLAST 検索によりデータベースと照合する。

判定

「細菌」「放線菌」の場合、得られた塩基配列とデータベースとが 98.7% 以上合致した場合、「糸状菌」「酵母」「担子菌」の場合、99% 以上合致した場合、以下のように判定できる。

1. 「細菌」「放線菌」の場合は、10F プライマー及び 1500R プライマーで読み取った塩基を BLAST を用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。
2. 真菌の場合は、ITS1F プライマーで読み取った領域を BLAST を用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。

試薬・試液

(1) エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液, 0.5 mol/L

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 18.6 g を水に溶かし, 100 mL とする。

(2) トリス緩衝液, 1 mol/L, pH 8.0

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 24.2 g を水に溶かし, 0.2 mol/L 塩酸試液を加えて pH8.0 に調整した後, 水を加えて 200 mL とする。

(3) TE 緩衝液

pH 8.0 の 1 mol/L トリス緩衝液 1.0 mL に 0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 0.2 mL を加えた後, 水を加えて 100 mL とする。

(4) 被検菌処理液

ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルを 1 vol% 含む TE 緩衝液を小分けし, 使用時まで凍結保存する。

その後, 水を加えて 100 mL とする。

(5) PCR 反応液

10 倍緩衝液*	5 μ L
dNTP 溶液** (各 2.5 mmol/L)	4 μ L
10 mmol/L センスプライマー	1 μ L
10 mmol/L アンチセンスプライマー	1 μ L
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (1 U/mL)	1 μ L
水	36 μ L

*10 倍緩衝液

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-

プロパンジオール・塩酸 (pH 8.4) 100 mmol/L

塩化カリウム 500 mmol/L

塩化マグネシウム 20 mmol/L

ゼラチン 0.1 g/L

**dNTP 溶液 (dGTP, dATP, dCTP, dTTP の等モル混合液)

dGTP (2'-デオキシグアノシン 5'-トリフォス

フェート, ナトリウム塩) 2.5 mmol/L

dATP (2'-デオキシアデノシン 5'-トリフォス

フェート, ナトリウム塩) 2.5 mmol/L

dCTP (2'-デオキシシチジン 5'-トリフォス
フェート, ナトリウム塩) 2.5 mmol/L

dTTP (2'-デオキシチミジン 5'-トリフォス
フェート, ナトリウム塩) 2.5 mmol/L

なお, これらの成分を有する適当な製品を記載に従って用いてもよい.

(6) シークエンシング試薬

シークエンシング方式には, プライマーを標識するダイプライマー (dye-primer) 法, dNTP ターミネーターを標識するダイターミネーター (dye-terminator) 法など, 種々の方法がある. DNA 自動解析装置やプログラムに合った適切な試薬キットを使用する.

(7) TAE 緩衝液, 50 倍濃縮

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 242 g に酢酸 (100) 57.1 mL, 0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 100 mL 及び水を加えて溶かし, 1000 mL とする.

(8) 1 倍 TAE 緩衝液

使用時, 50 倍濃縮 TAE 緩衝液を水で 50 倍に希釈したものを 1 倍 TAE 緩衝液という.

(9) アガロースゲル

アガロース 1.5 g に 50 倍濃縮 TAE 緩衝液 2.0 mL, 臭化エチジウム (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromide) 溶液 (1 100) 10 mL, 及び水 100 mL を加えて加熱して溶かした後, 60 に冷却し, アガロースゲルを調製する.

(10) ローディング緩衝液, 6 倍濃縮

プロモフェノールブルー 0.25g, キシレンシアノール FF0.25 g 及びエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 1.63 g を水 50 mL に溶かし, グリセリン 30 mL を加え, 水を加えて 100 mL とする.

(11) PCR 用プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌, 放線菌	10F	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	1500R	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'
糸状菌, 酵母, 担子菌	ITS1F	5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3'
	ITS1R	5'-CGTTCCTTCATCGATG-3'

(12) ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル

本品は微黄色の粘性の液体である.

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：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

研究分担者 受田浩之 高知大学教育研究部総合科学系 教授

要旨 既存添加物に分類される酸化防止剤の抗酸化力価に基づく基準値の設定を目的とし、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法による一般試験法案を作成した。本研究では、作成した一般試験法案に基づき、実際にトロロックス、及び酸化防止剤19種類の抗酸化力価評価を行い、適用性、及び再現性の確認を行った。その結果、試験に用いた酸化防止剤19種類全てについて抗酸化力価の指標であるトロロックス等価活性 (TEAC) を求めることが可能であったことから、一般試験法案の適用性については問題ないと判断した。また、トロロックスの IC₅₀、及び酸化防止剤のTEACを求めた際の変動係数は概ね5.0%以下であり、一般試験法案の手順に従うことにより、再現性の高い抗酸化力価評価が可能であることが判明した。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部第二室 室長
島村智子 高知大学教育研究部総合科学系 准教授

A. 研究目的

既存添加物は 1995 年の食品衛生法の改正に伴い、経過措置的にその使用が認められている主に天然由来の添加物である。既存添加物については規格基準設定を目的として、成分組成の分析、有効成分の同定、及び定量法の開発が行われている。しかし、酸化防止用途の一部の既存添加物は多種類の成分が抗酸化力価に関与しており、すべての抗酸化物質の分析・同定を行うことが困難である。このような既存添加物では、成分組成に基づく規格が設定できないことから、品質確保のためには主要な成分組成と抗酸化力価の確認の組み合わせにより、規格設定することが望まれている。そのため、抗酸化力価の標準法の確立が必要と考えられる。このような状況のもと、これまでに各種抗酸化活性測定法の既存添加物の抗酸化力価評価への適用性を検討し、1,1-diphenyl-2-

picrylhydrazyl (DPPH) 法に関する複数機関での評価研究を行い、最終的に DPPH 法を標準法の候補として選出し、DPPH 法に基づく一般試験法案を作成した。

今年度は作成した一般試験法案に基づき、実際にトロロックス、及び酸化防止剤 19 種類の抗酸化力価評価を行い、適用性、及び再現性の確認を行った。

B. 一般試験法案

抗酸化活性測定法は、酸化防止剤の抗酸化活性を測定する方法である。DPPH ラジカル消去率を求め、(±)-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (トロロックス) 等価活性 (TEAC) で表す。

1. 操作法

(1) トロロックスの DPPH ラジカル消去率の測定

トロロックス 100 mg を精密に量りとり、エタノール (99.5) を加えて 100 mL とする。この液 50 mL を正確に量りとり、エタノール (99.5) を加え 500 mL とし、トロロックス標準原液とする。標準原液をエタノール (99.5) を加えて希釈

し, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL のトロロックス標準液を調製する¹. 試験管にトロロックス標準液 200 µL を量りとり, 抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加えて混合する. この液に DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 1000 µL を加え, 直ちに 10 秒間攪拌後, 室温暗所で 30 分間静置し, 検液とする. 別に標準液の代わりにエタノール (99.5) を用いて検液の調製と同様に操作し, 比較液とする. エタノール(99.5) 1200 µL に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加え, 混合したものを対照液とし, 波長 517 nm における検液の吸光度 A_R 及び比較液 A_C を測定し, 次式により DPPH ラジカルの消去率 (%) を求める.

$$\text{トロロックスの DPPH の消去率 (\%)} = \frac{(A_C - A_R)}{A_C} \times 100$$

¹ トロロックス試薬の純度は 97%であるため, 実際の試験に用いるトロロックス標準液の濃度については純度を考慮した補正を行う.

(2) トロロックスの 50%阻害濃度 (IC_{50}) の算出

横軸に消去率 50%を挟む 2 点のトロロックス標準液の濃度 (40 µg/mL と 60 µg/mL, あるいは 60 µg/mL と 80 µg/mL), 縦軸に DPPH の消去率 (%) をとり, グラフにそれぞれの値をプロットする². この 2 点を通る回帰線から, トロロックスの 50%阻害濃度 (IC_{50}) を求める. ただし, 3 回の繰り返し測定を行い, その平均値をトロロックスの 50%阻害濃度 (IC_{50}) とする.

² 2 点の間に消去率 50%があることを確認する. いずれの濃度でも消去率 50%を挟まない場合は標準液の調製からやり直す.

(3) 試料の DPPH ラジカル消去率の測定

別に規定する量の試料を試験管に量りとり, 別に規定する量の希釈溶媒を加えて希釈し, 5 種以上の異なる濃度の試料液を調製する. 試験管に試料液 200 µL を量りとり, 抗酸化活性測

定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加えて混合する. この液に DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 1000 µL を加え, 直ちに 10 秒間攪拌後, 室温暗所で 30 分間静置し, 検液とする. 別に試験液の代わりに希釈溶媒を用いて検液の調製と同様に操作し, 比較液とする. エタノール (99.5) 1200 µL に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 µL を加え, 混合したものを対照液とし, 波長 517 nm における検液の吸光度 A_S 及び比較液 A_C を測定し, 次式により DPPH ラジカルの消去率 (%) を求める.

$$\text{DPPH の消去率 (\%)} = \frac{(A_C - A_S)}{A_C} \times 100$$

(4) 酸化防止剤試料の 50%阻害濃度 (IC_{50}) の算出

横軸に酸化防止剤試料液の濃度, 縦軸に DPPH の消去率 (%) をとり, グラフにそれぞれの値をプロットする. DPPH の消去率 50%を挟む酸化防止剤試料液の濃度 2 点を通る回帰線から, トロロックスの 50%阻害濃度 (IC_{50}) を求める. ただし, 3 回の繰り返し測定を行い, その平均値をトロロックスの 50%阻害濃度 (IC_{50}) とする.

(5) トロロックス等価活性 (TEAC) の算出

酸化防止剤試料液とのトロロックス標準液の IC_{50} が同一の活性を有しているとみなし, 酸化防止剤の抗酸化活性をトロロックス等価活性 (TEAC) で表す. 酸化防止剤のトロロックス等価活性は次式により求める.

酸化防止剤のトロロックス等価活性 (TEAC: µg/µg)³ = トロロックスの IC_{50} (µg/mL) / 酸化防止剤試料液の IC_{50} (µg/mL)

³ 同一日に測定した酸化防止剤試験溶液の IC_{50} とトロロックスの IC_{50} の値を用いて TEAC を求めることが望ましい.

2. 試薬, 試液, 標準品

(1) トロロックス標準溶液

(±)-6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチル

クロマン-2-カルボン酸, Aldrich 製, 233813, 純度 97%

(2) トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4), 抗酸化活性測定法用

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール⁴ 12.1 g を量り, 水を加えて溶かし, 塩酸試液 (1 mol/L) で pH 7.4 に調整し, 水を加えて 1000 mL とする.

⁴ 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール, 和光純薬工業 特級, 207-06275, 純度 99.0%

(3) DPPH 試液 (0.2 mmol/L)

DPPH⁵ 17 mg を精密に量りとり, エタノール (99.5) を加えて溶かし, 200 mL とし, 遮光して吸光度が定常状態に達するまで 2 時間放置する⁶. この液 1000 μ L を試験管に正確に量りとり, エタノール (99.5) 200 μ L と抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 μ L を正確に加えて混合し検液とする. エタノール (99.5) 1200 μ L に抗酸化活性測定法用トリス緩衝液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 800 μ L を加え, 混合したものを対照液とする. 検液につき 517 nm における吸光度を測定し, 検液の吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内であることを確認する. 検液の吸光度が 1.05 を超える場合はエタノール (99.5) を加えて希釈し, 検液の吸光度が 1.00 ± 0.05 の範囲内に入るように調整する. 用事調製とする.

⁵ DPPH, Aldrich 製, D9132

⁶ DPPH 溶液は, 調製直後から 1 時間程度まで時間と共に吸光度が低下する. 2 時間放置することで吸光度が定常状態に達する.

C. 研究結果と考察

(1) トロロックスの IC₅₀

酸化防止剤の抗酸化力価評価においてトロロックスの IC₅₀ は TEAC 算出の基礎となる重要

な値である. そこで, 一般試験法案に基づき, トロロックスの IC₅₀ の算出に関する手順について繰り返し試験 (n = 8) を実施し, その再現性を調べた. その結果, トロロックスの IC₅₀ の平均は 59.3 ± 0.77 μ g/mL であり, 変動係数は 1.30% となった. この結果より, 一般試験法案によるトロロックスの IC₅₀ の算出に関しての再現性は問題ないと判断した.

(2) 酸化防止剤チャ抽出物の力価評価

酸化防止剤 19 種類 (サンフェノン EGCg, サンフェノン 90S, サンフェノン BG-3, カメリアエキス 30S, チャ抽出物, 茶抽出物 40, 茶抽出物 70, ポリフェノン PF, ポリフェノン 70S, ポリフェノン G, サンフード 100, テアピゴ, カメリア 50EX, d- δ -トコフェロール, 生コーヒー豆抽出物, ローズマリー抽出物, ヤマモモ抽出物, 酵素処理イソクエルシトリン, 酵素処理ルチン) を試料とし, 上記の一般試験法案の手順に従い測定を行った. いずれの試料もエタノール (99.5) に溶解し, 希釈もエタノール (99.5) で行った. 各酸化防止剤の IC₅₀ 濃度, TEAC, TEAC の標準偏差 (SD), TEAC の変動係数 (CV) を表 1 に示した.

測定の結果, 19 種類の酸化防止剤全てについて IC₅₀ と TEAC を求めることが可能であった. このことから, 一般試験法案の酸化防止剤への適用性は問題ないと判断した. また, TEAC の変動係数は 0.28 ~ 7.1% となった. 特に, サンフェノン EGCg を除く 18 試料ではその変動係数が 4.3% 以下となり非常に高い再現性を示した.

E. 結論

本試験の結果より, DPPH 法に基づく一般試験法案が酸化防止剤の力価評価において広い適用性と高い再現性を示すことが明らかとなった. 今後は, 各種酸化防止剤に関する個別の手順の作成を目指す.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tadaharu Ueda, Takashi Okumura, Yukino Tanaka, Tomoko Shimamura, Hiroyuki Ueda,

Development of a new electrochemical evaluation method for antioxidant activity based on the redox properties of polyoxometalates and its application to the evaluation of antioxidant capacity of beverages, *Analytical Sciences*, **32**, 825-830 (2016).

2) 山内良子,石井佐弥,草場悠里,小林弘司,島村智子,受田浩之,穠山浩,石川洋哉,酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH ラジカル消去能測定におよぼす反応溶媒の影響,日本食品保蔵科学会誌,**42**,189-196 (2016).

3) Enkhtsetseg Enkhtuya, Tomoko Shimamura, Takehiro Kashiwagi, Hiroyuki Ukeda, Antioxidative Constituents in the Leaves of *Paeonia anomala* Grown in Mongolia, *Food Science and Technology Research*, **23**, 63-70 (2017).

4) 島村智子,伊藤裕才,久保勇人,柏木丈拵,石川洋哉,松井利郎,山崎壮,多田敦子,杉本直樹,穠山浩,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,日本食品化学会会誌,印刷中.

2. 学会発表

1) 島村智子,伊藤裕才,久保勇人,柏木丈拵,石川洋哉,松井利郎,山崎壮,多田敦子,杉本直樹,穠山浩,受田浩之,既存添加物チャ抽出物の成分含量と抗酸化力価の関係,日本食品化学学会 第 22 回総会・学術大会,2016 年 6 月 2-3 日(高知).

2) 草場悠里,山内良子,小林弘司,島村智子,受田浩之,杉本直樹,穠山浩,石川洋哉,既存添加物チャ抽出物の各種抗酸化能評価,第 53 回化学関連支部合同九州大会,2016 年 7 月 2 日(福岡).

G. 知的財産権の出願,登録状況
なし

H. 健康危機情報
なし

表 1 一般試験法案に基づく酸化防止剤の抗酸化力価評価 (n=3)

製品名	IC ₅₀ (μg/mL)	TEAC (μg/μg)	TEAC SD	TEAC CV(%)
サンフェノンEGC g	26.5	2.21	0.16	7.1
サンフェノン90S	28.6	2.05	0.03	1.6
サンフェノンBG-3	24.3	2.51	0.14	5.6
カメラアエキス30S	62.3	0.94	0.04	4.3
チャ抽出物	29.3	2.03	0.04	2.2
茶抽出物 - 40	55.9	1.06	0.01	1.0
茶抽出物 - 70	33.9	1.73	0.07	4.0
ポリフェノンPF	127	0.47	0.01	2.6
ポリフェノン70S	24.5	2.39	0.08	3.3
ポリフェノンG	64.5	0.91	0.02	1.7
サンフード100	49.9	1.18	0.003	0.28
テアピゴ	22.0	2.68	0.02	0.87
カメラア50EX	88.6	0.67	0.01	1.8
d- -トコフェノール	113	0.53	0.01	2.0
生コーヒー豆抽出物	180	0.33	0.01	3.6
ローズマリー抽出物	175	0.34	0.006	1.7
ヤマモモ抽出物	50.4	1.18	0.04	3.2
酵素処理イソクエルシトリン	89.2	0.67	0.006	0.92
酵素処理ルチン	85.6	0.69	0.02	2.5

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物ベニコウジ色素の成分規格の検討

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

要旨 第8版食品添加物公定書には、ベニコウジ色素（Monascus Color）が収載されている。また、日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第4版）」においては、ベニコウジ黄色素（Monascus Yellow）が収載されている。いずれも、主成分は、アンカフラビン類、モナスコルブリン類、キサントモナシン類とされているが、確認試験などでは、色彩の評価のみである。そこで、本研究では、それぞれの主成分を明確にし、それに基づく成分規格を検討することとした。ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素において、HPLC分析を実施した。その結果、ベニコウジ黄色素では、明確な2つのピークが検出されたが、ベニコウジ色素は、製品間により、明確なピークが検出されなかった。その後、HSCCCによる評価を行った結果、ベニコウジ黄色素では、キサントモナシンAおよびBが主成分として単離精製および同定が可能であった。一方で、ベニコウジ色素は、主な成分がフロント付近に溶出し、それらはHPLCによる評価も達成できなかった。そのため、今後は、ベニコウジ色素の明確な成分解析を進めることとする。

A. 研究目的

ベニコウジカビ（*Monascus purpureus*）は糸状菌であり、昔から沖縄などで、紅酒や豆腐のような発酵食品として利用されてきた。この菌が生産する赤色素は、既存添加物としても利用されており、主にかまぼこなどの練り製品に用いられている。ベニコウジ色素は、培養した紅麹カビをプロピレングリコールやエタノールなど水溶性の溶剤で抽出し、一般的にはアンカフラビン、モナスコルブリン（図1）を色素の主成分としている。一方で、近縁種のカビはシトリニンという哺乳類に対し毒性を示す物質を生産するため、その含有量の検討が必須として挙げられる。一方で、同様のベニコウジカビを微温時弱塩酸性エタノールで抽出し、中和して得られたものをベニコウジ黄色素としている。主色素はキサントモナシン類（図1：キサントモナシンAおよびキサントモナシンB）とされ、黄色を呈する。

第8版食品添加物公定書には、ベニコウジ色素（Monascus Color）が収載されている。確認試験では、主に色彩の評価のみであり、明確に主成分を定性し、分析するものとなっていない。また、純度試験では、シトリニンを0.2 μg/g以下と定め、HPLC法が規格化されている。主成分の定義は、アンカフラビン類およびモナスコルブリン類が記載されている。ベニコウジ黄色素（Monascus Yellow）は、日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」（以下、4版自主規格）に規格されているが、確認試験では色彩の評価のみである。シトリニンの純度評価に関しては、示されていない。主成分では、キサントモナシン類と示されている。以上より、いずれも同じベニコウジカビから生成される色素成分であるが、培地条件や抽出方法により、異なる成分が含有することが考えられ、早急に主成分の規格などを示す必要がある。

ベニコウジ色素を対象とした成分規格の評価法については、殆ど報告がない。Shiらは、

pH-sensitive UV-Vis absorption 法により，色彩を簡便に評価する方法を示している¹⁾。また，分離技術による評価では，Watanabe らが，ミセル動電クロマトグラフィーにより，ベニコウジ色素の分解物である 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2(NHOH))を分析している²⁾。一方で，培地に添加するアミノ酸の種類により，ベニコウジカビから生産される色素成分が異なることを示す研究報告もある³⁾。さらに，近年では，新たなベニコウジカビから生成される色素成分も報告され，明確な成分解析が求められるようになってきた⁴⁾。そこで，本研究では，国内流通品であるベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素に関する色彩の成分規格および主成分の確定を検討することとした。

B. 研究方法

ベニコウジ色素は，ヤエガキ発酵技研社製，グリコ栄養食品社製，三栄源エフエフアイ社製を用いた。ベニコウジ黄色素は，三栄源エフエフアイ社製を用いた。

電子天秤：メトラ製 METTLER ML303/52

LC 装置：島津製作所社製 LC-20AD/SIL-20AC/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10A S システム

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge)，GLサイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761 システム

ベニコウジ色素の LC 分離分析：対象試料はアセトニトリル/メタノール混液 (50/50, V/V) により調製した。移動相には，0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1% ギ酸メタノール (B) を使用し，A/B : 45/55 を 1.5 分間維持し，その後，15 分にて A/B : 2/98 のグラジエント分析を行った。カラム：TSKgel ODS-100V column (4.6 × 150 mm, 3 μm, 東ソー社製) カラム温度：40 流速：1.0 mL/min 検出波長：200-550 nm (定量：500 nm) 注入量：10 μL

ベニコウジ黄色素の LC 分離分析：対象試料は水/メタノール混液 (30/70, V/V) により調製した。移動相には，0.1% ギ酸水溶液 (A) /0.1% ギ酸メタノール (B) を使用し，A/B : 70/30 をアイソクラティックにより，10 分間の分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100V column (4.6 × 150 mm, 3 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-500 nm (定量：460 nm)

注入量：10 μL

ベニコウジ色素の HSCCC の分離分析：対象試料を上層および下層混合溶液 (50/50, V/V) に溶解した。二相溶媒系は，ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1% ギ酸水溶液 (4/5/4/5, V/V/V) を用いた。分離部は，Type-J コイルを用い，遠心スピードを 1000 rpm とした。また，コイル容量は，350 mL であり，固定相には，上層を充填した。移動相には下層を用い，流速 2.0 mL/min で送液した。

ベニコウジ黄色素の HSCCC の分離分析：対象試料を上層および下層混合溶液 (50/50, V/V) に溶解した。二相溶媒系は，酢酸エチル/n-ブタノール/水 (V/V/V) を用いた。分離部は，Type-J コイルを用い，遠心スピードを 1000 rpm とした。また，コイル容量は，350 mL であり，固定相には，上層を充填した。移動相には下層を用い，流速 2.0 mL/min で送液した。

C. 研究結果

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は，いずれも国内で流通している試料を用いた。そこで，各試料について，第 8 版食品添加物公定書および 4 版自主規格の確認試験を実施した。その結果，国内流通品は，いずれも現在の規格基準に従うことが分かった (図 2：ベニコウジ色素の確認試験 (1) のみ示す，図 3：ベニコウジ黄色素の確認試験 (1) のみ示す)。

次に，HPLC による分離分析を実施した。規格

における色価では、ベニコウジ色素で波長 480 ~ 520 nm、ベニコウジ黄色素では、458 ~ 468 nm とされている。そこで、各モニタリングをいずれも規格基準内波長である 500 nm (ベニコウジ色素) および 460 nm (ベニコウジ黄色素) を含むフォトダイオードアレーにて検出した。その結果の HPLC クロマトグラムを図 4 (ベニコウジ色素) および図 5 (ベニコウジ黄色素) に示す。ベニコウジ色素は、各検体により、全く異なるクロマトグラムパターン (図 4) を示し、いずれも培養技術やベニコウジカビの種類などが異なり、得られている成分が異なることが疑われた。また、種別により HPLC による分離分析は非常に困難であるとも判断された。そのなかでも、試料 119 において、比較的明確な 4 つピークが観察された。それぞれの吸光光度スペクトルを測定した結果、いずれも 500 nm 付近に吸収極大波長をもつため、いずれもベニコウジ色素の成分であることが判明した (図 6)。一方で、ベニコウジ黄色素は、明確な 2 つのピークが観察され、いずれも色素成分である可能性が示唆された (図 5)。それらの吸光光度スペクトルにおいても、吸収極大波長が 400 nm 付近であり、ベニコウジ黄色の色素成分であることが示唆された (図 7)。

HPLC 法では、ベニコウジ色素の成分などが固定相カラムに吸着してしまい、良好な分離分析達成できなかったと推定される。また、ベニコウジ黄色素も同様に吸着成分が存在している可能性も否定できない。そこで、吸着などの影響を受けず、回収率が 100% の分離手法である高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いて、成分解析を実施することとした。HSCCC による分離検討を実施するためには、2 相溶媒系を決定しなければならない。そこで、ベニコウジ色素では、試料 119 のクロマトグラムで示される 4 ピーク (A ~ D) を用いて、分配係数を算出し、2 相溶媒を検討した。また、ベニコウジ黄色素では、明確に検出されている 2 ピークを用いて実施した。その結果、表 1 ではベニコウジ色素および表 2 ではベニコウジ黄色素の分配係数と分離度を示す。いずれも、分配係数 0.2 ~ 1.5 の間であり、分離度も 1.0 以上のものを選択し、

各分離の 2 相溶媒として決定した。

2 相溶媒系の検討条件を用いて、HSCCC の分離分析を実施した。その結果、図 8 (ベニコウジ色素) および図 9 (ベニコウジ黄色素) にそれぞれのクロマトグラムを示す。ベニコウジ色素については、主な色素成分 (赤色素) が、ソルベント付近に検出され、色彩より主成分である可能性が示された (図 8: 色彩成分 X)。また、その後、色彩のある成分が溶出し、それをまとめて獲得した (図 8: 色彩成分 Y)。色彩成分 X および Y を HPLC で分析した結果、色彩成分 X では、試料 119 のクロマトグラムで観察されたピーク A および B が検出されているが、明らかに大きなブロードの溶出成分が存在し、良好に評価できないことが判明した (図 10)。また、色彩成分 Y では、試料 119 で観察されたピーク C および D が観察された (図 10)。一方で、ベニコウジ黄色素は、我々の既報⁵⁾において、良好に各成分を単離精製することができた (図 11)。各成分を ¹H-NMR および LC-MS/MS (エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモードを採用した) を用いて、解析した結果、フラクション A が、キサントモナシン A およびフラクション B がキサントモナシン B であることが判明した (図 12)。

D. 考察

本研究では、ベニコウジカビ (*Monascus purpureus*) から生成されるベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素について、成分規格に伴う解析を実施した。ベニコウジカビは、育成する培地条件により様々な色彩成分を生成することや抽出条件により成分が異なることなどが報告されているため、国内流通品に関して、成分規格を定める必要がある。そこで、一般的に入手可能なベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の解析することとした。第 8 版食品添加物公定書および 4 版自主規格の確認試験では、主に色彩を評価するものであり、流通品ではすべて規格内であった。それらの製品を用いて、HPLC による色彩成分の評価を実施した。その結果、ベニコウジ色素の製品間において異なるクロマトグラムパターンを示し、色彩成分の

違いなどが示唆された。そのうえ、様々な分離条件を検討したが、すべてに対して、良好なピーク分離が得られず、HPLCによる評価は難しいことが判明した。一方で、ベニコウジ黄色素では、明確な2本のピークが観察された。しかしながら、それ自体が色彩の主成分とは断定することは難しく、色彩成分の回収率が100%であるHSCCCによる分離評価が必要であることが分かった。HSCCCでは、分配係数を算出しなければならず、ベニコウジ色素(ピークA~D)およびベニコウジ黄色素(ピークE,F)のHPLC分析によるピークを基準に2相溶媒系を決定した。その結果、HSCCCの評価により、ベニコウジ色素において、色彩成分はフロント付近に大きく検出され、分配係数から想定される色彩ピークは後ろに溶出してきた。しかしながら、それをHPLCにより評価した結果、主な色彩成分のピークを定めることができなかった。一方で、ベニコウジ黄色素は、HSCCCにより、良好に単離精製することでき、それぞれをキサントモナシンAおよびキサントモナシンBと同定することができた。

E. 結論

本結果より、既存添加物ベニコウジ色素とベニコウジ黄色素の成分規格案について、主成分も含めて再検討する必要性が挙げられた。そのためには、今後、他の流通品も含めて、自主規格案との比較検討を進める必要があると結論付けた。本研究からの結論は下記に示す。

ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素は、培地条件や抽出条件により、全く色彩成分が異なり、明確な主成分を同定し、それに基づく規格基準が必要と考えられた。

ベニコウジ色素：赤色の主な成分は、HPLCによる評価は困難であり、今後、HSCCCなどを利用した主成分の同定が必要であり、それに基づく、試験の提案も求められる。

ベニコウジ黄色素：主にキサントモナシンAおよびキサントモナシンBが主成分と想定される。

しかしながら、いずれの標準品も入手困難であるため、今後、その含量分析に関して、検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし

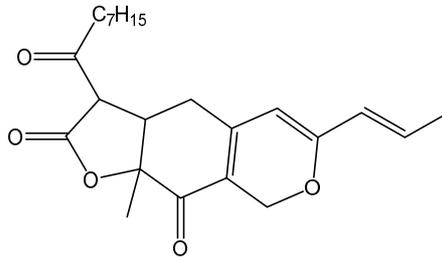
2. 学会発表
特になし

G. 知的財産権の出願、登録状況
特になし

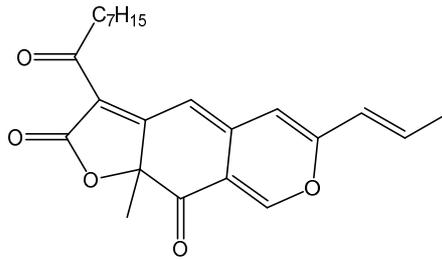
H. 健康危機情報
特になし

I. 参考文献

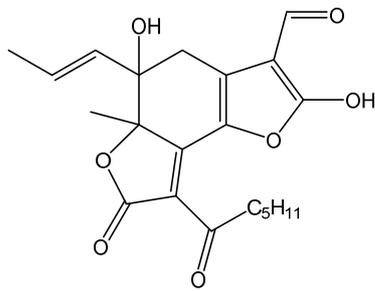
- 1) Shi K, Chen G, Pistolozzi M, Xia F, Wu Z.; *Food Addit. Contam. Part A* 33, 1396-1401. (2016)
- 2) Watanabe T, Mazumder TK, Yamamoto A, Nagai S, Arimoto-Kobayashi S, Hayatsu H, Terabe S.; *Mutat Res.* 444, 75-83. (1999)
- 3) Jung H, Kim C, Kim K, Shin CS.; *J. Agric. Food Chem.* 51, 1302-1306. (2003)
- 4) Kongruang S.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 93-99. (2011)
- 5) Inoue K, Ito Y, Hattori Y, Tsutsumiuchi K, Ito S, Hino T, Oka H; *Jpn. J. Food Chem. Safety* 17, 185-191. (2010)
- 6) Yamaguchi K, Kurata S; *Bunseki Kagaku* 54, 1091-1100. (2005).
- 7) Górnas P, Siger A, Pugajeva I, Segliņa D; *Food Addit. Contam. Part A* 31, 567-573. (2014).



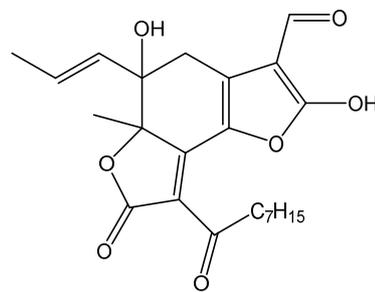
Ankaflavin



Monascorubin

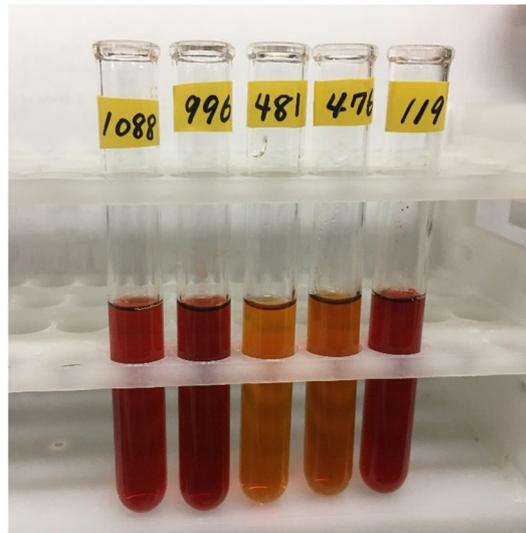


Xanthomonascin A



Xanthomonascin B

図1 ベニコウジ色素およびベニコウジ黄色素の主成分と定義される化合物



- 1088 ベニコウジ色素アンカレッド Alc300ヤエガキ発酵技研(株)
996 ベニコウジ色素 グリコ栄養食品(株)
481 ベニコウジ色素 ヤエガキ発酵技研(株)
476 ベニコウジ色素モナスカラー300LND グリコ栄養食品(株)
119 ベニコウジ色素(粉末タイプ) 三栄源FFI(株)

確認試験(1)

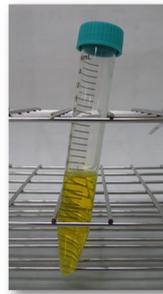
図2 ベニコウジ色素の確認試験



黄色



蛍光の緑色



黄色

NaOH



赤褐色

確認試験(1)

確認試験(2)

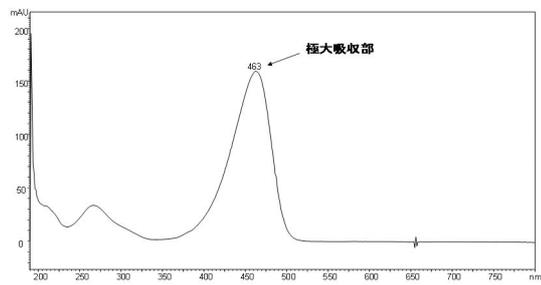


硫酸



黄色の濁り

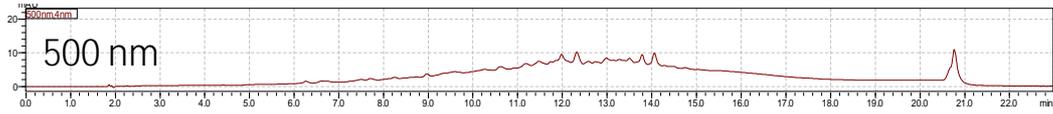
確認試験(3)



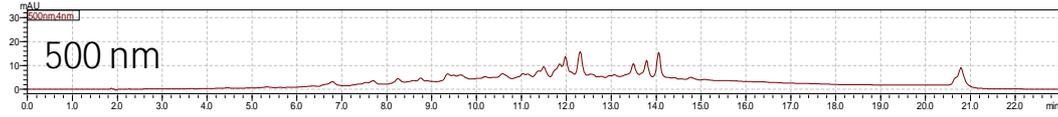
確認試験(4)

図3 ベニコウジ黄色素の確認試験

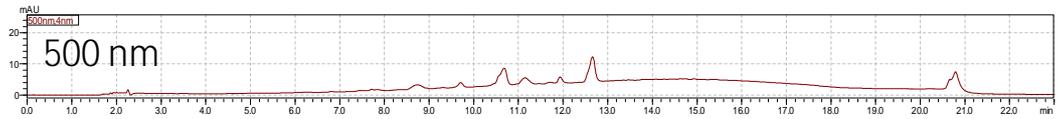
1088 ベニコウジ色素アンカレッド Alc300ヤエガキ発酵技研(株)



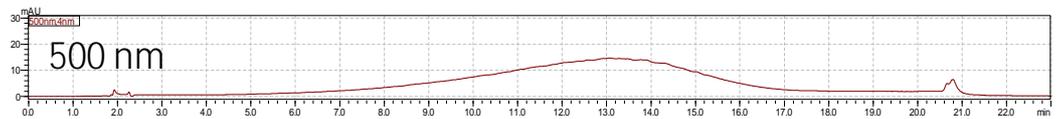
996 ベニコウジ色素 グリコ栄養食品(株)



481 ベニコウジ色素 ヤエガキ発酵技研(株)



476 ベニコウジ色素モナスカラー300LND グリコ栄養食品(株)



119 ベニコウジ色素(粉末タイプ) 三栄源FFI(株)

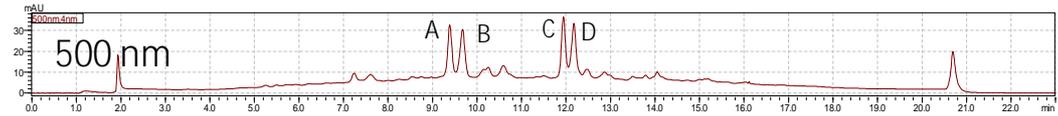


図4 ベニコウジ色素の HPLC クロマトグラム

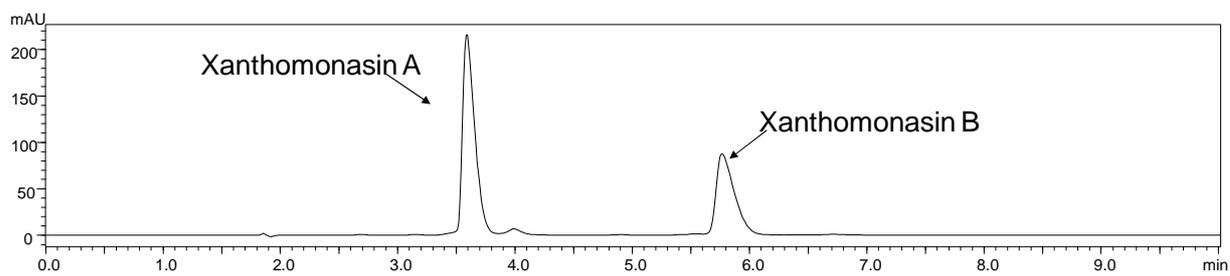


図5 ベニコウジ黄色素の HPLC クロマトグラム

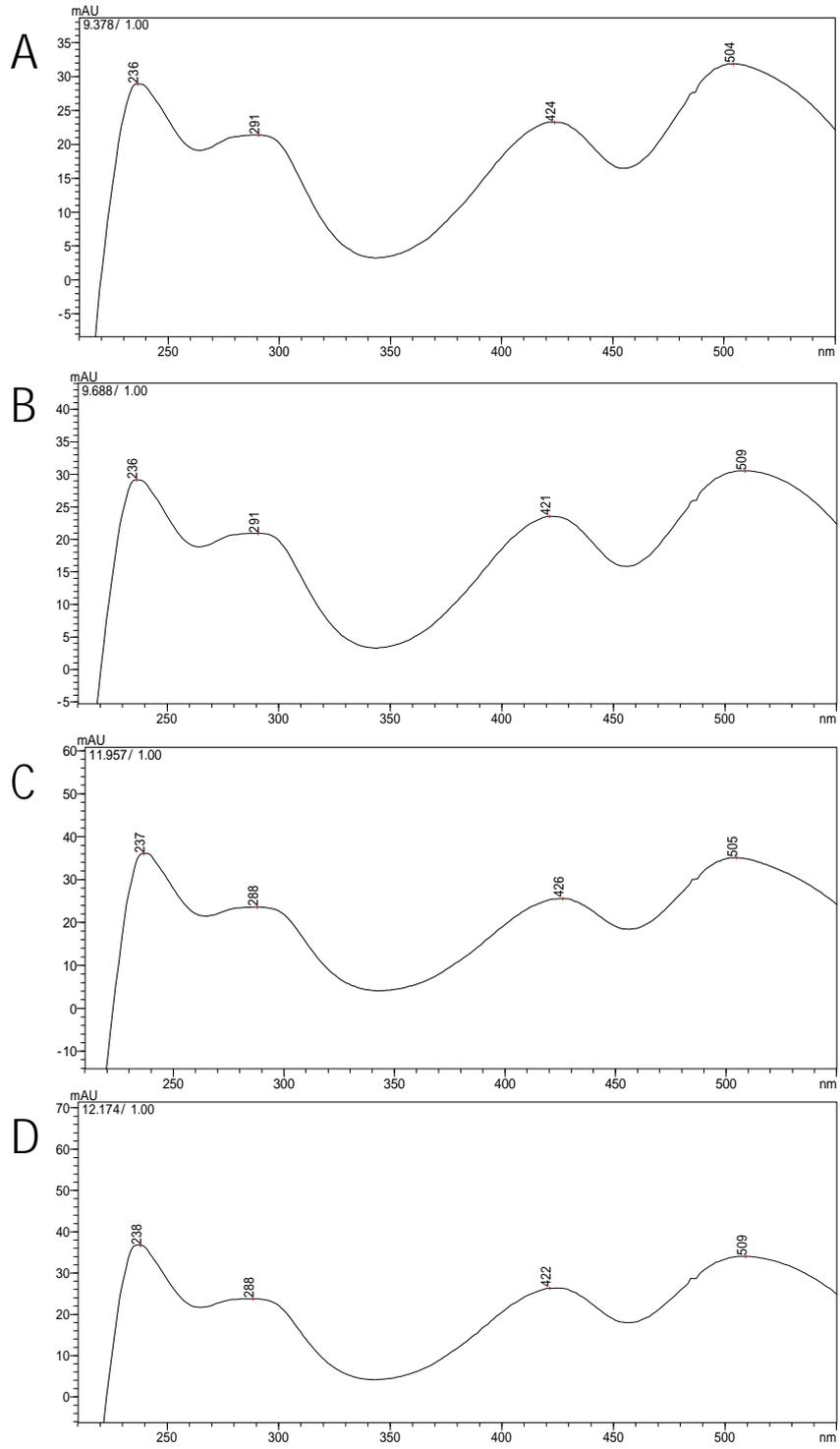


図6 ベニコウジ色素(試料119)の検出ピークA~Dの紫外可視スペクトル

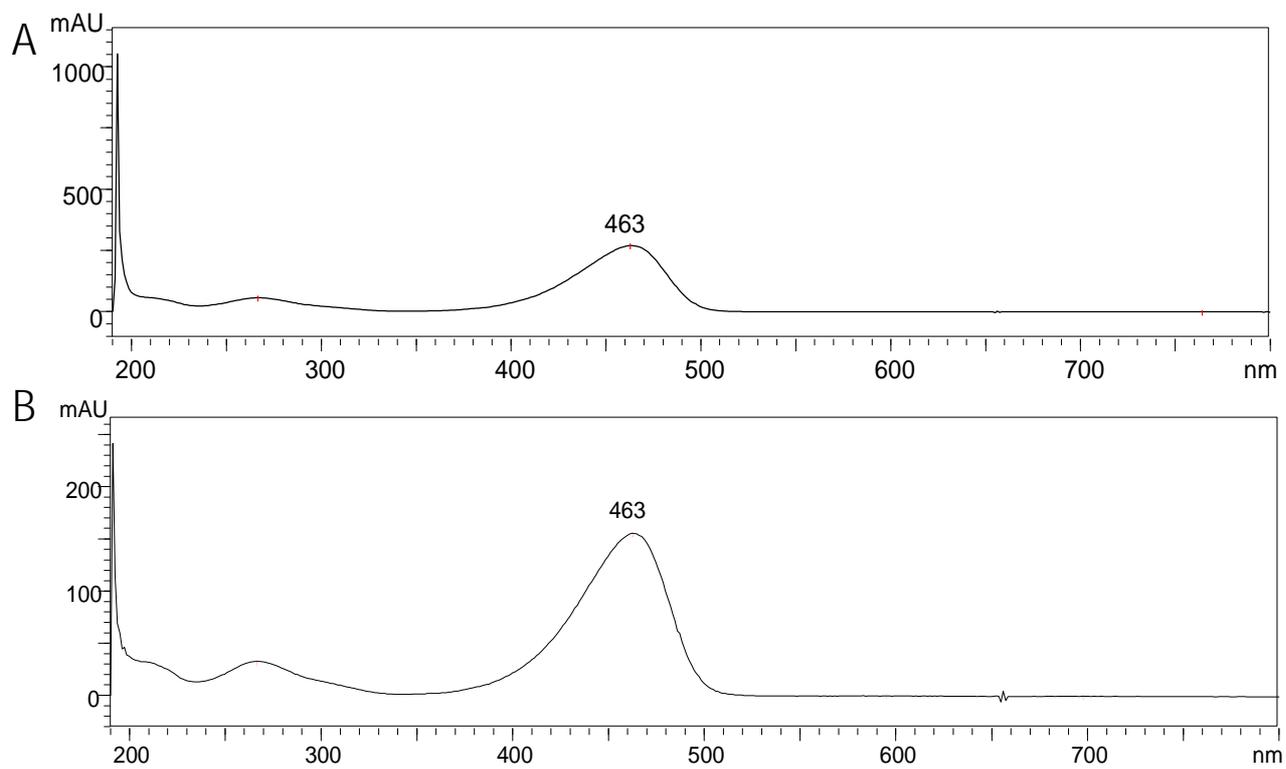


図7 ベニコウジ黄色素の検出ピークの紫外可視スペクトル

A: キサントモナシン A

B: キサントモナシン B

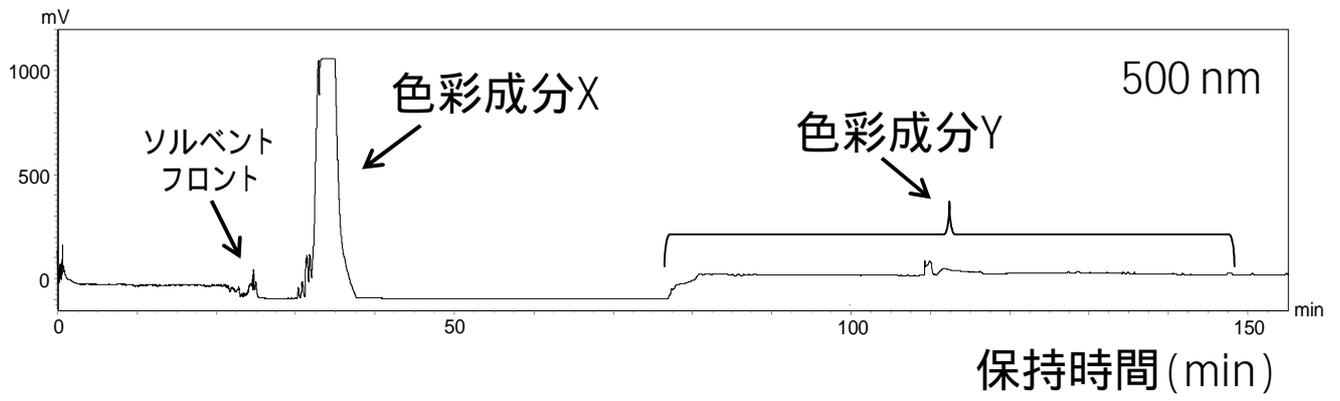


図8 ベニコウジ色素(試料119)のHSCCCクロマトグラム

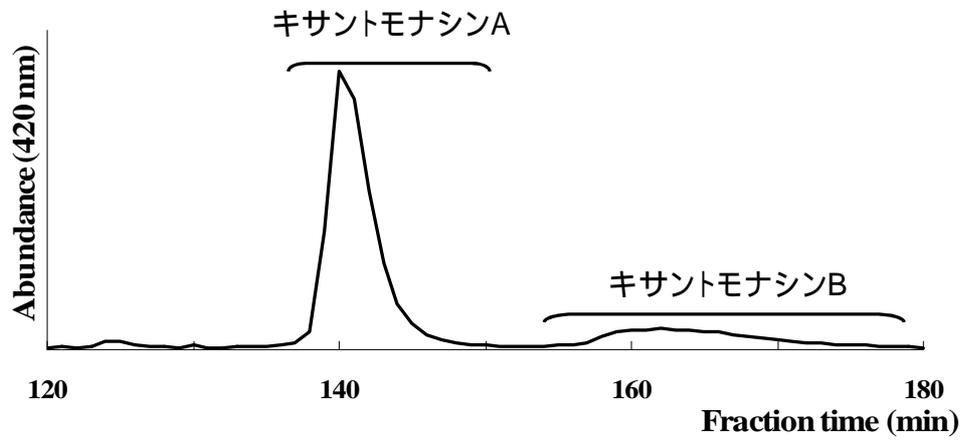


図9 ベニコウジ黄色素の HSCCC クロマトグラム

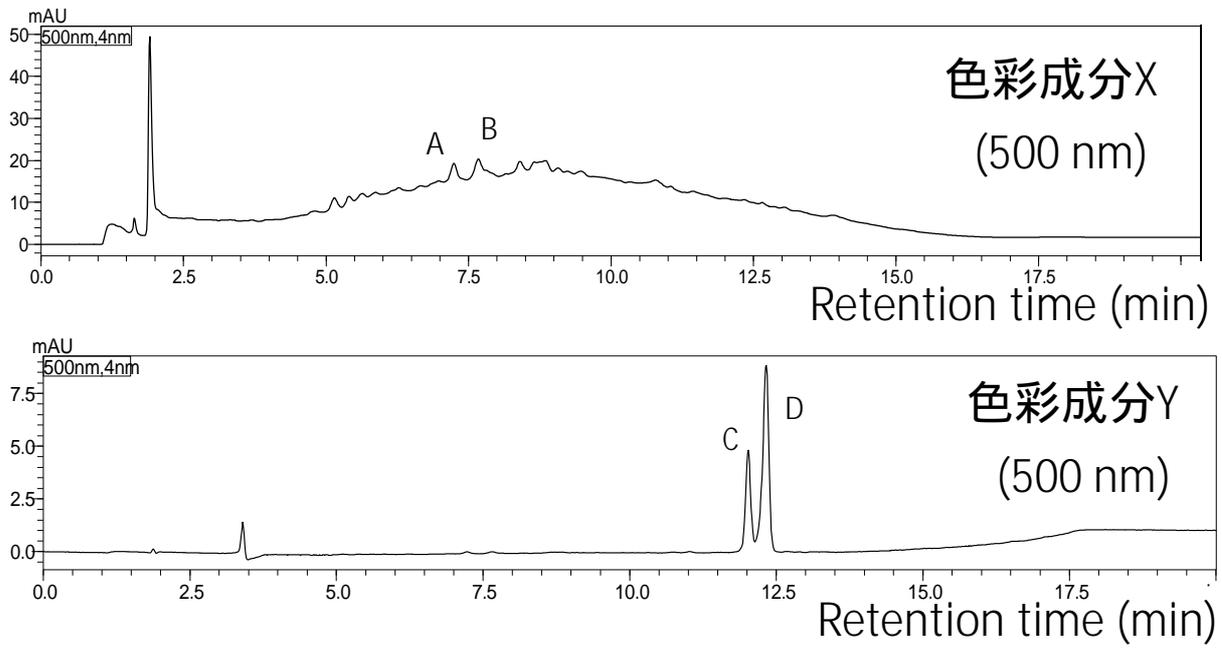


図 10 ベニコウジ色素 (試料 119) から分取した色彩 X および Y の HPLC クロマトグラム

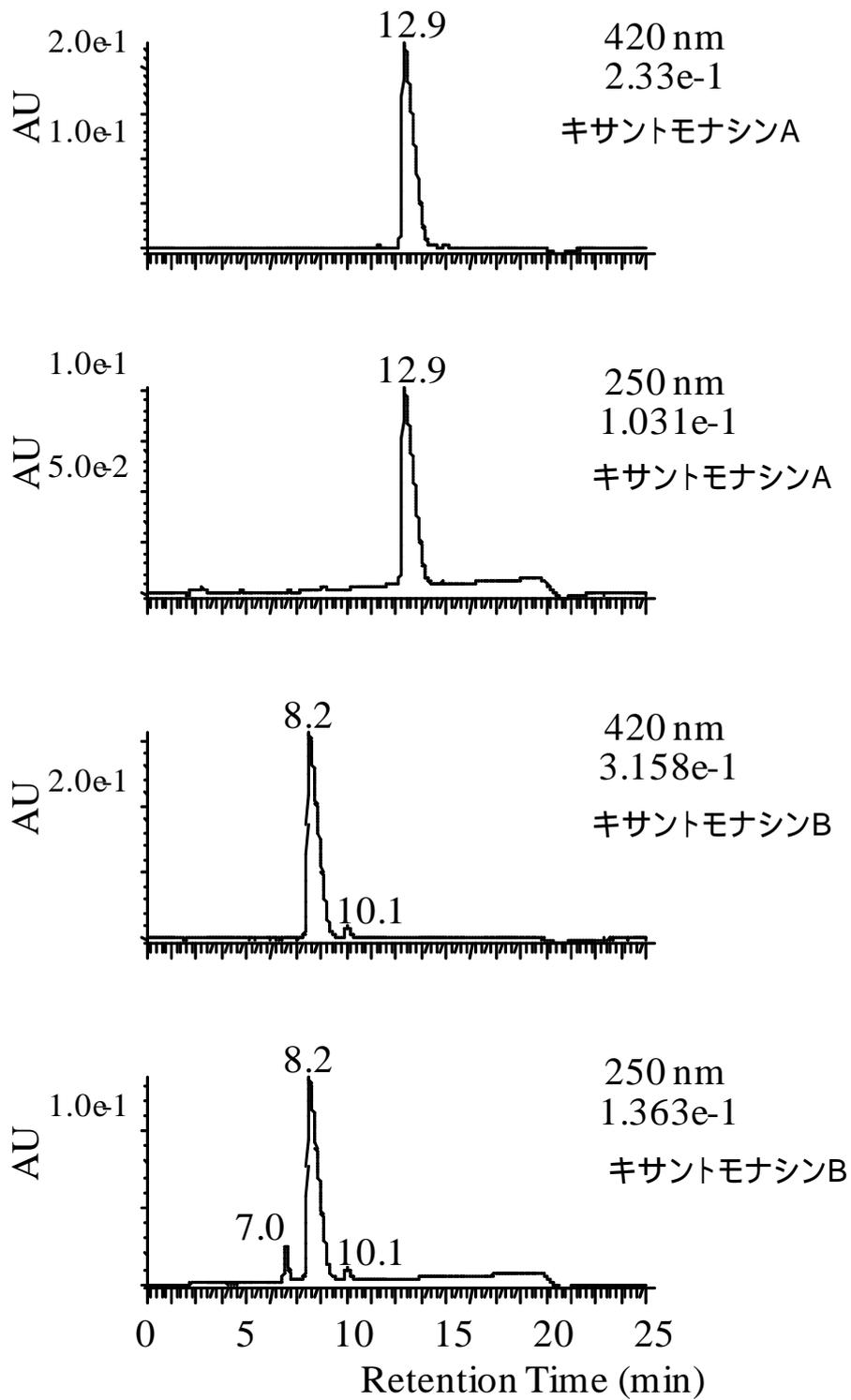


図 11 ベニコウジ黄色素のキサントモナシン A および B の HPLC クロマトグラム⁵⁾

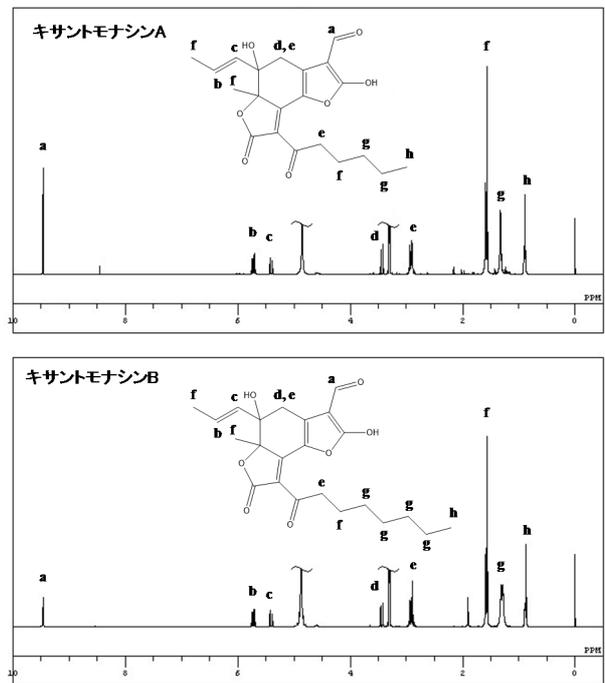
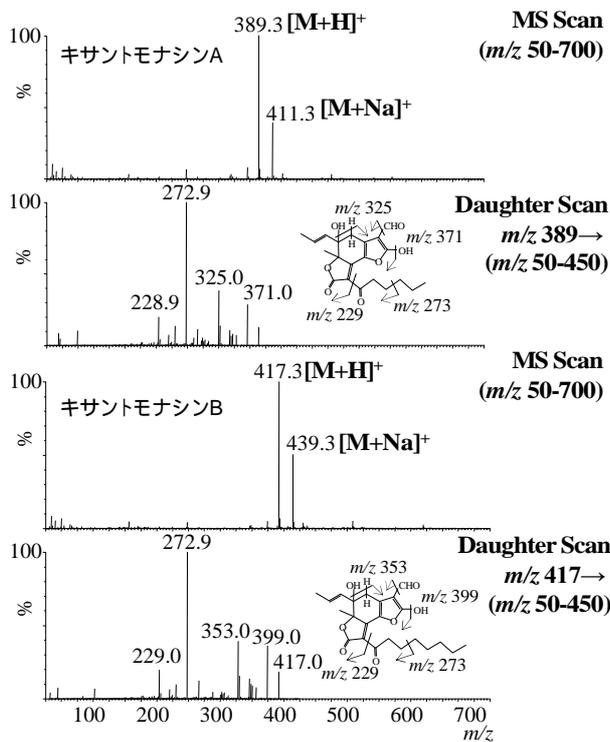


図 12 キサントモナシン A および B の同定データ (MS/MS および NMR) ⁵⁾

表1 ベニコウジ色素の各成分 (A~B) における分配係数と分離度

Hexane	Ethyl Acetate	Butanol	Two-solvent system			K _a ± SD				Separation factor	
			Methanol	Water	0.1% FA in water	A	B	C	D	A/C	B/D
0	5	0	0	5	0	0.21±0.01	0.18±0.01	1.56±0.27	1.38±0.22	7.43	7.67
0	4	1	0	5	0	0.36±0.01	0.32±0.01	2.59±0.08	2.16±0.04	7.19	6.75
0	3	2	0	5	0	0.80±0.01	0.83±0.01	4.64±0.12	3.98±0.11	5.80	4.80
5	5	0	5	0	5	0.06±0.02	0.06±0.02	0.19±0.05	0.18±0.04	3.17	3.00
4	5	0	4	0	5	0.29±0.03	0.26±0.03	0.77±0.10	0.72±0.09	2.66	2.77
3.5	5	0	3.5	0	5	0.44±0.02	0.40±0.01	1.41±0.07	1.32±0.06	2.59	3.30
3	5	0	3	0	5	1.11±0.04	1.07±0.07	4.34±0.25	4.27±0.21	3.91	3.99

表2 ベニコウジ黄色素のキサントモナシン A および B の分配係数と分離度

酢酸エチル/n-ブタノール/水	Xanthomonasin A	Xanthomonasin B	分離度(α)
	分配係数(K)	分配係数(K)	
5/0/5	0.01(±0.00)	0.10(±0.01)	6.71(±0.11)
4/1/5	0.30(±0.03)	1.62(±0.15)	5.45(±0.06)
3/2/5	2.03(±0.24)	8.94(±1.38)	4.40(±0.17)
2/3/5	5.11(±0.61)	18.92(±1.61)	3.72(±0.14)
1/4/5	8.95(±0.47)	27.13(±0.40)	3.02(±0.40)
5/0/5	11.33(±0.77)	34.21(±2.17)	0.27(±0.10)

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物ゴマ油不けん化物の成分規格の検討

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

要旨 昨年度に引き続き，日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第4版）」に収載されているゴマ油不けん化物の成分規格作成の検討を実施した．定義において，本品は，ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた，セサミンおよびセサモリンを主成分とすることを提案した．それに伴い，セサミンおよびセサモリンの定量評価を実施しなければならず，いずれの標準品が必要となった．そこで，高速向流クロマトグラフィーを用いて，ゴマ油不けん化物から，セサミンおよびセサモリンの高純度単離精製を試みた．2相溶媒系には，ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)を用いたとき，保持率は85%であり，セサミンおよびセサモリンを純度99%以上で単離精製できた．その際の重量は，セサミンで，7.37 mgおよびセサモリンで5.17 mg（注入量：0.5 g）であった．本手法により，高純度のセサミンおよびセサモリンが単離精製できたため，今後，LC用分析などの定量に用いることができると思われる．

セサモリンを主成分とするものである．

A. 研究目的

日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」（以下，4版自主規格）に規格されているゴマ油不けん化物（Sesame Seed Oil Unsaponified Matter）は，ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた，セサモリンを主成分とするものである¹⁾．現在までの確認試験では，本品を直接順相系液体クロマトグラフィー（LC）により測定するものであったが，昨年度の報告において，順相系 LC においても分析が可能であった．また，定義においても，主成分がセサミンおよびセサモリンが有用と考えられ，下記のような変更点を提案した．

定義（原案）：本品は，ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた，セサモリンを主成分とするものである．

定義（改善案）：本品は，ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた，セサミンおよび

確認試験（原案）：順相系 LC によるピーク面積からの算出方法（試料は 10 μL を量り，直接注入する）

確認試験（改善案）：逆相系 LC によるセサモール，セサミンおよびセサモリンの同時定量法（試料は適時，アセトニトリル/メタノール混合液（50/50, V/V）にて希釈して注入する）

規格基準（原案）：保持時間 8～23 分間の 5 本以上のピーク面積において，最も大きなピーク面積よりも 30%大きい 4 本のピークを認める．

規格基準（改善案）：セサミンおよびセサモリンの含有率を提示する．さらに，セサモールは含まれない（もしくは規定の含有率以下とする）．

本規格基準において，LC 法による成分規格の設定では，高純度の標準品が必要となってくる．

つまり、セサミンおよびセサモリンの標準品が必要である。しかしながら、いずれの標準品も入手困難であり、簡便かつ安価な規格基準とは言い難い。そこで、本研究では、ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを高純度に単離精製する簡便な方法として、高速向流クロマトグラフィー（HSCCC）を用いた手法を検討することとした。

現在までに、セサミンもしくはセサモリンを安価に単離精製する場合、ゴマ油などの製品からアルミナカラム、macroporous 樹脂、逆相系クロマトグラフ、saponification/crystallization 混合法などが利用されてきた²⁻⁴⁾。また、簡便な技術としては、向流遠心クロマトグラフィーもしくは、HSCCC が挙げられる^{5, 6)}。そこで、本研究では、HSCCC を用いて、ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを同時に単離精製する方法を開発した。

B. 研究方法

ゴマ油不けん化物は長岡香料社製（B478）を用いた。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

LC 装置：Waters 社製 Acquity H Class/PDAe

MS 装置：Waters 社製 Xevo TQD

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge), GL サイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761 システム

LC による分離分析：対象試料はアセトニトリル/メタノール混液（50/50, V/V）により調製した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液（A）/アセトニトリル（B）を使用し、A/B：80/20 を 1 分間維持し、その後、15 分にて A/B：2/98 のグラジエント分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100V column (2.0 × 150 mm, 3 μm, 東ソー社製)

カラム温度：40

流速：0.2 mL/min

検出波長：200-400 nm (定量：290 nm)

注入量：5 μL

MS 装置：測定条件は、エレクトロスプレーイオン化法（ESI：ポジティブモード）で行った。

Capillary voltage: 2.0 kV

Extractor voltage: 3 V

RF lens voltage: 2.5 V

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone/desolvation gas flows: 50/800 L/hr

MS/daughter scan ranges: m/z 50 to 400

Cone voltage: 15-20 V

Collision energy: 15-25 eV

HSCCC の分離条件：対象試料は、0.5 g を 2 相溶媒それぞれ 1 mL に溶解し、0.8 μm の LC 用フィルターを通し、試料溶液とした。2 相溶媒には、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水（7:3:7:3, V/V/V/V）を利用し、上層を固定相として、テフロンチューブ内（350 mL）に充填し、その後、遠心回転（1000 rpm）を行った。下層は、流速 2.0 mL/min において送液し、安定後、試料溶液を注入した。モニタリングには、290 nm を用いて、セサミンおよびセサモリンと想定されるピークをフラクションコレクターにより単離精製した。その後、エバポレータにより、濃縮乾固したものを、秤量した。秤量後、LC による分離分析に準じて、純度評価を行った。

C. 研究結果

ゴマ油不けん化物中のセサミン、セサモリンおよびセサモールの紫外可視吸光光度における極大吸収波長を調べた（Fig. 1）。いずれも、290 nm 付近で吸収極大波長（セサモール $\lambda_{max} = 296$ nm, セサミン $\lambda_{max} = 286$ nm, セサモリン $\lambda_{max} = 289$ nm）が観察され、HSCCC などのモニタリングに用いることとした（Fig. 1）。それらの条件のもと、LC による分離分析も達成でき、HSCCC 分配係数の算出などに応用した（Fig. 1 および Table 1）。

LC 法を用いて、セサミンおよびセサモリンの HSCCC 用 2 相溶媒の分配係数および分離度の検討を行った。その結果、Table 2 に示す。Table 2 の条件から、セサミンの分配係数 0.84 ± 0.18

およびセサモリンの分配係数 1.36 ± 0.34 であり、分離度 1.61 ± 0.05 の条件、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)を採用することとした。

本条件を用いて、HSCCC による単離精製の分析を行った際のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。HSCCC クロマトグラムより、Fraction A および Fraction B を単離精製することができた。いずれも、絶対検量線法により定量した結果、Fraction A において、7.37 mg および Fraction B において、5.17 mg となった (Fig. 3, 4)。また、MS/MS スペクトルにより、Fraction A および Fraction B は、セサミンおよびセサモリンであると同定できた (Fig. 5, 6)。本試料を LC-フォトダイオードアレー分析 (検出波長 200-400 nm) した結果、それぞれの純度が 99% 以上となり、良好に単離精製できたものと考えられる (Fig. 7)。

D. 考察

本研究では、ゴマ油不けん化物の新たな確認試験法の基礎的な検討を実施した。昨年度報告した定義や定量法において、安価なセサミンおよびセサモリンの標準品が必要となった。そこで、本年度では、HSCCC によるセサミンおよびセサモリンの効率的な単離精製法の検討を行った。今回、HSCCC を用いて、ゴマ油不けん化物からセサミンおよびセサモリンを単離精製するため、2 相溶媒系の比較した結果、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)が最適であるとの判断になった。本溶媒系を用いて、HSCCC による分離を行った結果 (Fig. 2)、主に 2 つの Fraction を得ることができ、LC 分析の結果、Fraction A においてセサミン、Fraction B においてセサモリンが高純度 (LC 評価: 99%以上, Fig. 3) の標準品を得ることができた。いずれも、セミ分取スケールで 1 回の操作で、数 mg から数十 mg 程度は同時に単離精製できることが判明した。しかしながら、ゴマ油不けん化物含有濃度が低いため、今回では、数 mg 程度の単離精製となった。

本標準試料は、ゴマ油不けん化物の確認試験のみならず、様々なゴマ油由来の製品に関する

定量評価へ応用できるものと思われる。また、定量 NMR/LC 分析法との組み合わせにより、今後は、モル吸光度係数比による定量評価へ応用できるものと考えている。

E. 結論

本結果より、既存添加物ゴマ油不けん化物の定量分析用セサミンおよびセサモリンは、HSCCC により簡便かつ安価に単離精製できることが判明した。下記のその条件を示す。本標準品は、ゴマ油不けん化物の確認試験のみならず、様々なゴマ油由来の製品に応用可能と考えられる。

HSCCC 条件

2 相溶媒系:ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水(7:3:7:3, V/V/V/V)

固定相:上層

移動相:下層

流速:2.0 mL/min

保持容量:85%程度

Fraction A:セサミン(純度 99%以上)

Fraction B:セサモリン(純度 99%以上)

F. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi, M., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Takeuchi, H., Nakagawa, K., Akiyama, H., Sato, K., Inoue, K. Determination and purification of sesamin and sesamol in sesame seed oil unsaponified matter using reversed-phase liquid chromatography coupled with photodiode array and tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* 39, 3898-3905 (2016)

2. 学会発表

高橋未来, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 竹内弘明, 中川一弥, 穠山 浩, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによるゴマ油不けん化物からの高純度セサミンおよびセサモリンの単離精製 日本食品化学学会第 22 回総会・

学術大会 (高知), 2016 年 6 月

G. 知的財産権の出願, 登録状況

特になし

H. 健康危機情報

特になし

I. 参考文献

- 1) 日本食品添加物協会; 第 4 版 既存添加物
自主規格 平成 20 年 10 月 13 日発行
- 2) Amarowicz R, Shahidi F, Pegg RB; *J. Food
Lipids* 8, 85-94. (2001)
- 3) Zhou JC, Feng DW, Zheng GS; *J. Food Eng.*
100, 289-293. (2010)
- 4) Reshma MV, Balachandran C, Arumughan C,
Sunderasan A, Sukumaran D, Thomas S, Saritha
SS; *Food Chem.* 120, 1041-1046. (2010)
- 5) Wang X, Lin Y, Geng Y, Li F, Wang D; *Cereal
Chem.* 86, 23-25. (2009)
- 6) Jeon JS, Park CL, Syed AS, Kim YM, Cho IJ,
Kim CY; *J. Chromatogr. B* 1011, 108-113.
(2016)

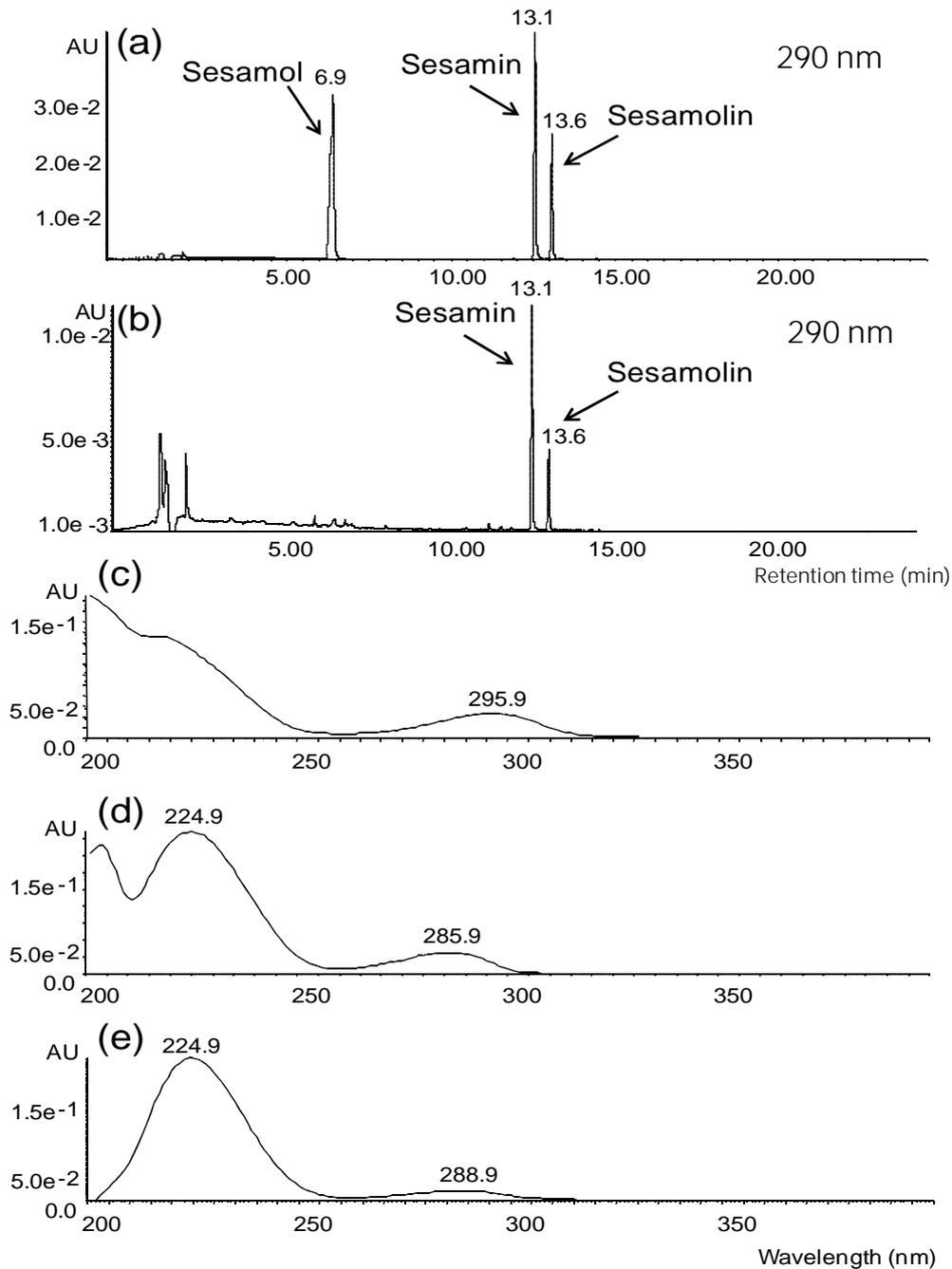


Fig. 1 ゴマ油不けん化物におけるセサモール、セサミンとセサモリンの RPLC クロマトグラムおよび紫外可視吸収スペクトル

(a) 標準溶液 (5 µg/mL) の RPLC クロマトグラム (290 nm)

(b) ゴマ油不けん化物の RPLC クロマトグラム (290 nm)

(c) クロマトグラム(a)におけるセサモール(保持時間 6.9 min) の紫外可視吸収スペクトル

(d) クロマトグラム(a)におけるセサミン(保持時間 13.1 min) の紫外可視吸収スペクトル

(e) クロマトグラム(a)におけるセサモリン(保持時間 13.6 min) の紫外可視吸収スペクトル

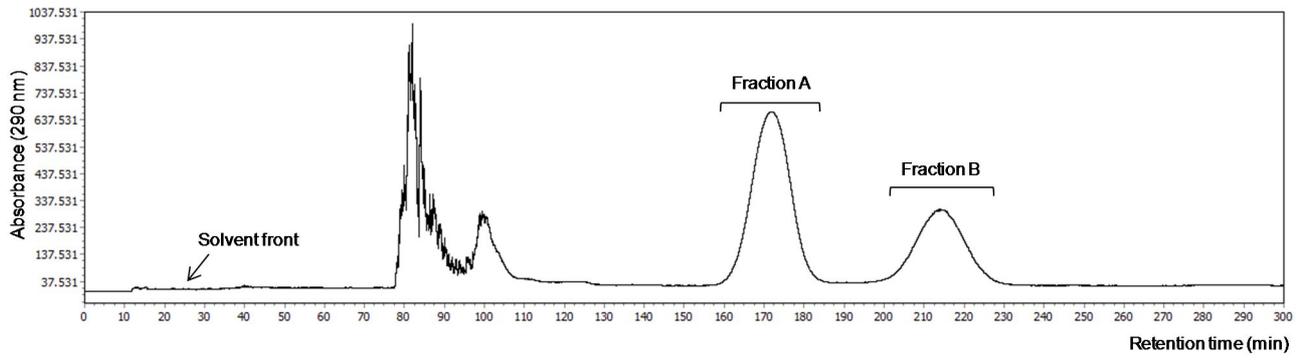


Fig. 2 ゴマ油不けん化物における HSCCC クロマトグラム
Fraction A (40-90 min) および Fraction B (400-450 min)

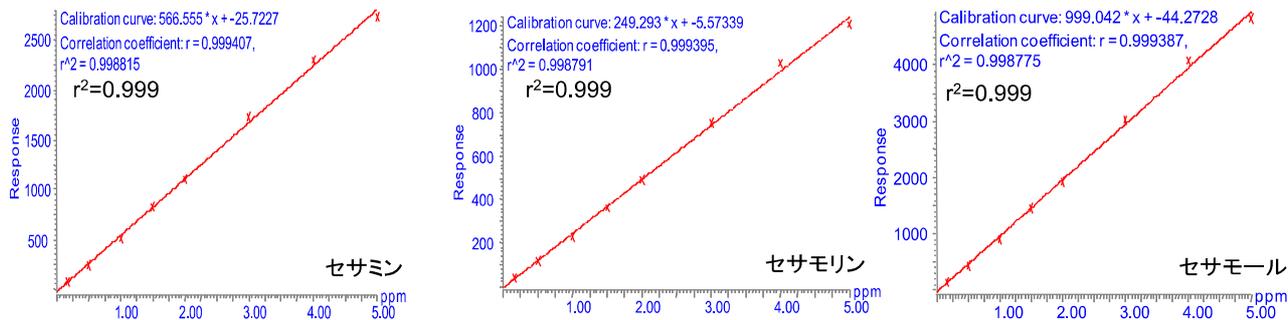


Fig. 4 セサミン，セサモリン，セサモールの絶対検量線

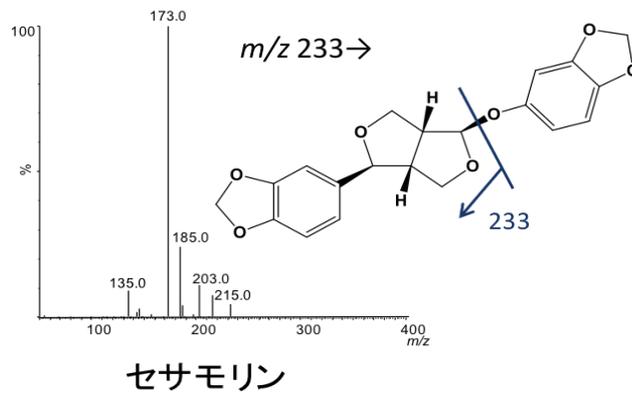
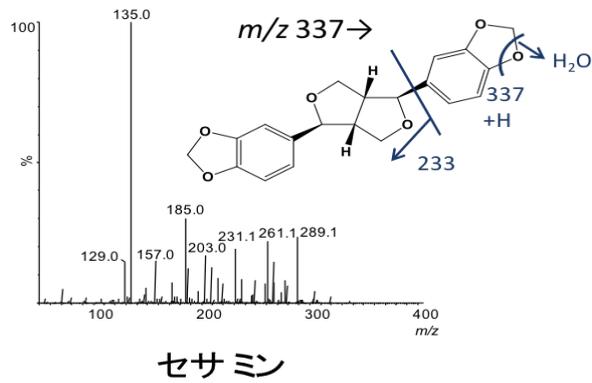
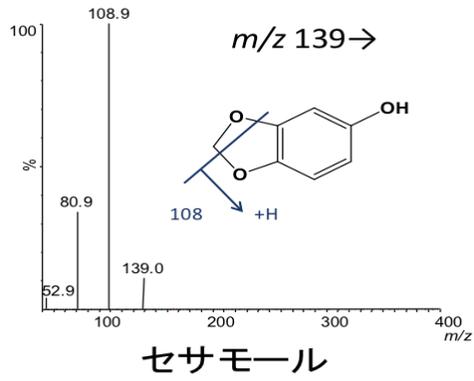


Fig. 5 セサモール，セサミン，セサモリンのMS スペクトル
(ESI：ポジティブモード)

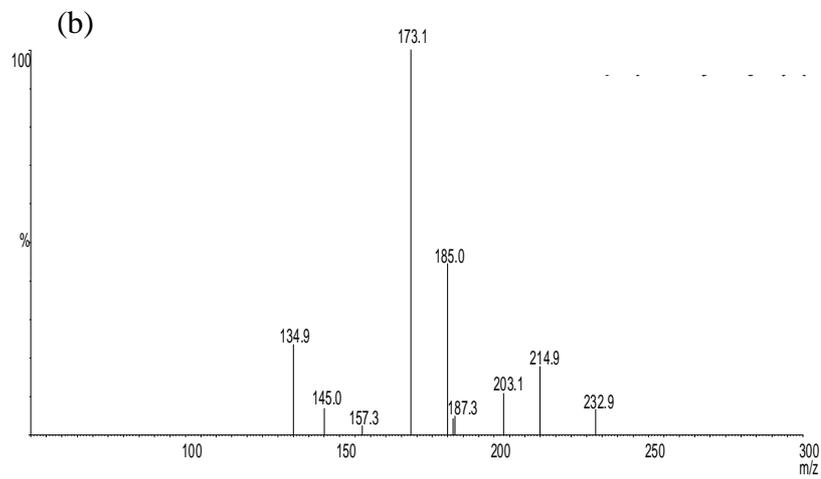
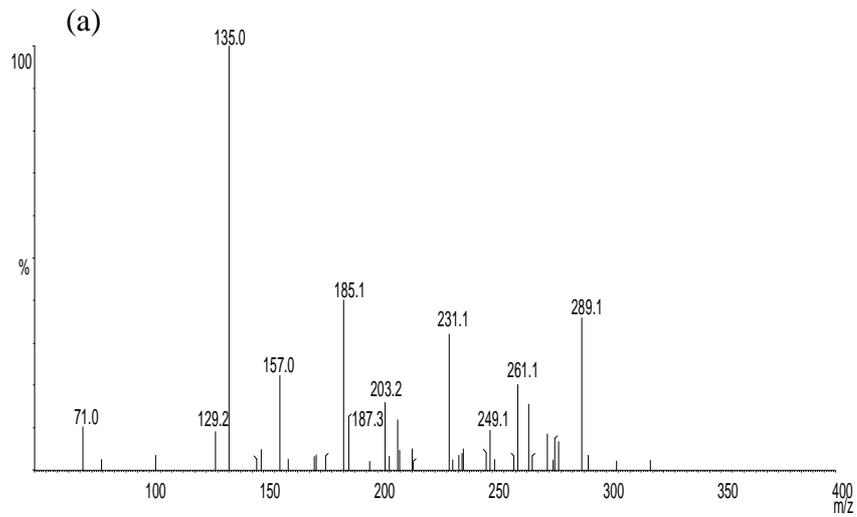


Fig. 6 HSCCC を用いて精製した Fractions A と Fractions B の MS スペクトル
(a) Fraction A はセサミン , (b) Fraction B はセサモリン

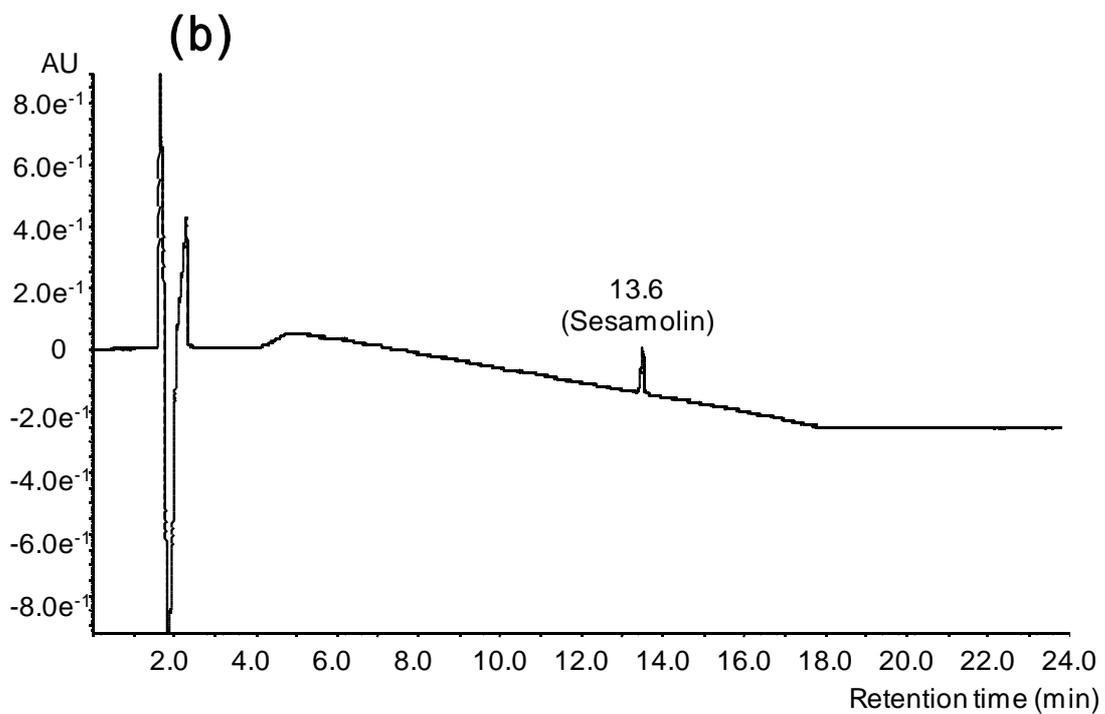
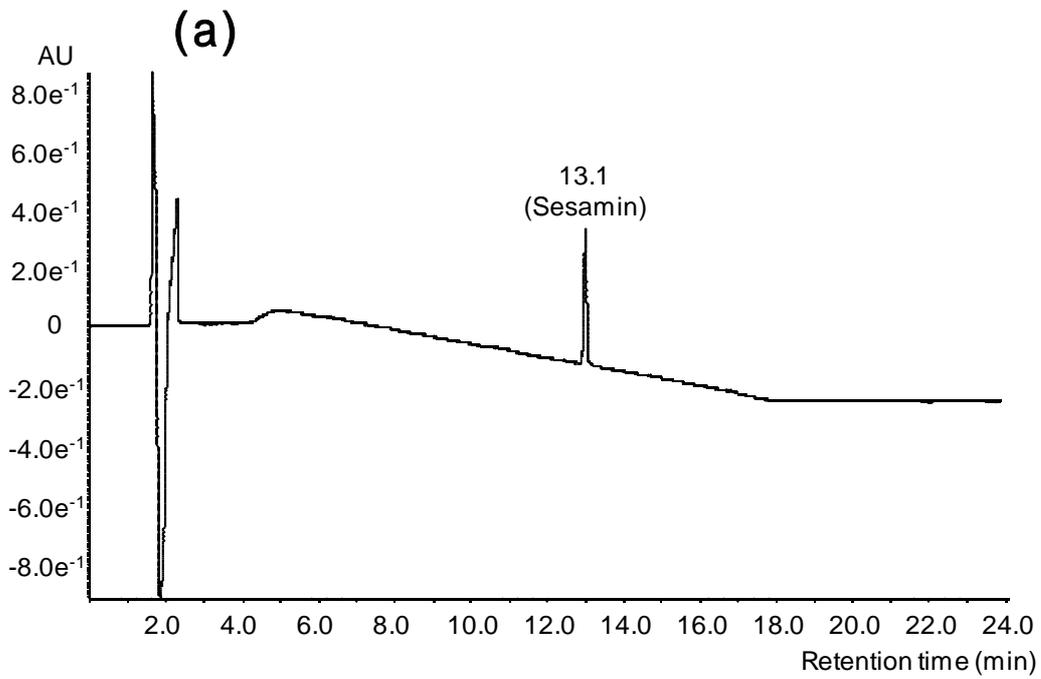


Fig. 7 HSCCC を用いて精製した Fractions A と Fractions B の RPLC クロマトグラム
Fraction A はセサミン , Fraction B はセサモリン (200-400 nm)

Table 1 セサミン，セサミン，セサモリンの RPLC による分析パラメーター（PDA 検出）

Mobile Phase	Concentration of FA (%)	S1	S2	S3	Rs	N
Water/Acetonitrile	0	0.63±0.02	1.08±0.06	1.03±0.06	4.38±0.21	270585.61±3244
	0.1	0.72±0.04	1.01±0.01	1.01±0.02	4.64±0.14	278057.79±143
	0.5	0.77±0.02	0.98±0.06	1.05±0.02	4.14±0.23	267973.57±281
Water/Methanol	0	0.62±0.01	1.07±0.05	1.06±0.07	3.63±0.01	272869.45±284
	0.1	0.63±0.01	1.20±0.01	1.24±0.05	3.84±0.05	286477.72±436
	0.5	0.69±0.01	1.30±0.09	1.14±0.05	3.74±0.04	276324.12±1429

S1：セサモールのシンメトリー係数，S2：セサミンのシンメトリー係数，S3：セサモリンのシンメトリー係数，Rs：セサミンおよびセサモリンの分離度，N：セサモリンの理論段数

Table 2 各 2 相溶媒系における分配係数 (K)および分離係数(α)

Two-phase solvent system Hexane/ethyl acetate/methanol/ water Ratio (v/v/v/v)	Partition Coefficient(K) \pm SD (n=3)		Separation factor(α) \pm SD (n=3)
	Sesamin	Sesamolin	
9:1:9:1	0.15 \pm 0.02	0.22 \pm 0.02	1.39 \pm 0.02
8:2:8:2	0.33 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02	1.55 \pm 0.01
7:3:7:3	0.84 \pm 0.18	1.36 \pm 0.34	1.61 \pm 0.05
7:3:6:4	2.22 \pm 0.19	3.90 \pm 0.57	1.75 \pm 0.12
6:4:6:4	2.27 \pm 0.76	4.04 \pm 1.60	4.04 \pm 0.23
7:3:5:5	7.21 \pm 1.90	14.51 \pm 4.46	2.00 \pm 0.10
6:4:5:5	9.69 \pm 2.13	15.80 \pm 1.34	1.67 \pm 0.28

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28年度研究分担報告書

研究分担課題：NMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

研究分担者 永津明人 金城学院大学薬学部

要旨 規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、 ^1H -qNMR法(定量 ^1H -NMR法)が試験法として適用可能であるか明らかにする目的で研究を行った。すなわち、適用の可能性の有無の判断と、可能性があるものに関しては実際に適用する場合の測定条件の確立を目的とした。28年度は「クローブ抽出物」の適用条件の確認と、「ベニバナ赤色素」、「ベニバナ黄色素」の規格試験法への適用の可能性の検討を行った。「クローブ抽出物」ではeugenolの定量条件が既存測定条件であるHPLC法と矛盾なく測定できることを確認した。「ベニバナ赤色素」では、定量用標準品が手に入らないことから、まずその単離精製から行い、赤色の化合物であるcarthaminの単離と ^1H -qNMR法に応用可能な溶媒の選択、HPLCでの測定条件を確立した。「ベニバナ黄色素」も黄色の本体とされるsafflor yellow類の個々の化合物の標準品が手に入らないことから、単離精製を行った。

A. 研究目的

^1H -qNMR法は、SIトレーサブルな認証標準物質を内部標準としてNMRスペクトルの測定することで、測定対象サンプルの絶対定量ができる方法である。対象化合物の標準品がなくても絶対定量が可能であることから、標準品が手に入りにくい天然物の定量に好適な測定法である。すなわち、対象物質の ^1H -NMRスペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となりうる。

28年度の研究では既存添加物である「クローブ抽出物」の品質評価方法としてeugenol (Fig. 1)の定量が ^1H -qNMR法で可能で、既存測定条件であるHPLC法と矛盾なく測定できることを確認した。また、「ベニバナ赤色素」「ベニバナ黄色素」も成分定量的方法が確立されておらず、規格基準が決められていないことから、それぞれの色素本体の化

合物であるcarthamin (Fig. 2)とsafflor yellow類 (Fig. 3)を直接 ^1H -qNMR法で、あるいは標準品溶液を ^1H -qNMR法で定量したのちHPLC法で既存添加物の定量を行う方法で管理法が確立できるかの検討を行った。

B. 研究方法

1) ^1H -qNMR法を用いた「クローブ抽出物」中のeugenol定量

既存添加物の「クローブ抽出物」は、「フトモモ科チョウジ (*Syzygium aromaticum* MERRILL et PERRY)のつぼみ、葉又は花より、エタノール又はアセトンで抽出して得られたもの、又は水蒸気蒸留により得られたものである。主成分はオイゲノール等である。」とされるもので、酸化防止剤として用いられる。今回用いた「クローブ抽出物」は、前年度の研究時に入手・使用したもので、水蒸気蒸留をした際の水とオレオレジンなどの炭化水素の乳濁液にeugenolが含まれているというものであった。

Eugenol の ^1H -qNMR の測定は,前年度の研究成果より acetone- d_6 中での測定,内部標準として用いる認証標準物質としては 0 ppm 付近にシグナルが現れ acetone など脂溶性の溶媒に可溶な 1,4-(bistrimethylsilyl)benzene- d_4 (1,4-BTMSB- d_4 , Fig. 4)を DMSO- d_6 溶液として用いる方法を確認している.今年度もこの方法を用いて定量を行った.

1-1) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

測定に利用した 1,4-BTMSB- d_4 は和光純薬の Trace Sure®規格のもの,acetone- d_6 と DMSO- d_6 はいずれも Isotec Inc. の 99.9 atom %D を用いた.NMR 測定管は和光純薬 HG タイプ (5 mm) を用いた.秤量には精密電子天秤 AUW120D (島津製作所) を用いた.

1,4-BTMSB- d_4 はデシケーター中で overnight 乾燥させた.約 5 mg を精秤して 2.00 ml の DMSO- d_6 に溶かし内部標準用溶液とした.Eugenol は揮発性成分でもあるので,減圧下での乾燥などは行わず,この eugenol 標準品の製品を開封してそのまま用いた.これらの溶液 0.50 mL と,先に調製した 1,4-BTMSB- d_4 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり,混和して ^1H -qNMR の測定に供した.各試料とも 3 検体ずつ調製して測定を行った.

「クローブ抽出物」はもともと水を含むものであることから,乾燥などの特段の操作は行わず,そのままを試験に供した.約 10 mg を精秤して acetone- d_6 (1.00 mL)を加え,10 分間超音波下においたのち 3 分間遠沈し,わずかに存在する固形物を除去した.この上清 0.50 mL と,先に調製した 1,4-BTMSB- d_4 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり,混和して ^1H -qNMR の測定に供した.各試料とも 5 検体ずつ調製して測定を行った.

1-2) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Eugenol と「クローブ抽出物」の ^1H -NMR を測定し,eugenol の 6 位 H のシグナルが 6.33 ppm に現れることを確認した.Fig. 5, 6 にそれぞれのスペクトルを示した.測定条件は Table 1 に示した条件で測定した.積算回

数は 8 回とした.測定によって得られたスペクトルから,eugenol の 6 位 H のシグナルと 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB- d_4 のシグナルの面積を比較して,式 2 に従って eugenol の濃度を算出した.

$$C_{\text{EU}} = \frac{I_{\text{EU}}}{I_{\text{B}}} \times C_{\text{B}} \quad (2)$$

ただし, C_{B} , C_{EU} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び eugenol のモル濃度 (mol/ml), I_{B} , I_{EU} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び eugenol の水素 1 個あたりのシグナル面積.

1-3) HPLC を用いた「クローブ抽出物」中の eugenol の定量

HPLC はポンプとして JASCO JASCO PU-2089 を用い,YMC-Pack ODS-AL s-5 250 mm x 4.6 mm i.d.のカラムをカラムオープン Shimadzu CT0-20AC 中で 37 とし, H_2O : MeCN : MeOH = 50 : 40 : 10 の溶媒を流速 1.0 mL/min で溶出,JASCO MD-2010 を用いて 280 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った.

^1H -qNMR 法で定量した eugenol 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した.「クローブ抽出物」は,HPLC の展開溶媒で希釈し,その試料溶液を 10 μL 注入して定量を行った.

2) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

既存添加物の「ベニバナ赤色素」は「ベニバナの花から得られた,カルタミンを主成分とするものをいう.」と定義され,その本質は「ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linne) の花から得られた,カルタミンを主成分とするものである.デキストリン又は乳糖を含むことがある.」とされるもので,赤色の着色料として用いられる.市販の carthamin が主成分として市販されている試薬の NMR スペクトルを測定した場合,糖類に由来する巨大なシグナルが観測され,carthamin に由来する sp^2 領域のシグナルは極めて小さく,既存添加物同様で大部分がデキストリンなどの添

加物と考えられた。(Fig. 7) 純度の高い carthamin は市販されていないため、まず、ある程度の純度とした標準品用の carthamin を単離して得るということから行い、得られた上で HPLC と ¹H-NMR による確認を行うことにした。

2-1) Carthamin の単離

水上らの方法 (*Chem, Pharm. Bull.*, **61**(12), 1264-1268(2013)) に従い、市販既存添加物からの carthamin の単離を行った。すなわち、「ベニバナ赤色素」を MeOH 中で攪拌、濾過後、濾液の溶媒を留去、得られた残渣を ODS を担体としたオープンカラム (MeOH-水 = 60:40) で分離をし、TLC 上で 1 spot の状態の carthamin を単離した。

2-2) Carthamin の HPLC 分析法の確立

市販添加物中の carthamin 含有量が極めて少ないことが推定されることから、carthamin の絶対定量では標準品溶液の値付け 標準品溶液を使った HPLC 分析という手順を念頭に、carthamin の HPLC 分析の条件の確立をおこなった。

HPLC はポンプとして JASCO PU-2089 を用い、YMC-Pack ODS-AL s-5 250 mm x 4.6 mm i. d. のカラムをカラムオープン Shimadzu CTO-20AC 中で 37 とし、0.5%酢酸-MeOH 溶液 : 0.5%酢酸水溶液 1.0 ml/min のグラジエント (0 min: 50:50 20 min 80:20) で溶出、JASCO MD-2010 を用いて 520 nm における吸光度で化合物の検出を行うという分析条件を作った。

3) 「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

既存添加物の「ベニバナ黄色素」は「ベニバナの花から得られた、サフライエロー類を主成分とするものをいう。」と定義され、その本質は「ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linne) の花から得られた、サフライエロー類を主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」とされるもので、黄色の着色料として用いられる。「ベニバナ黄色素」も「ベニバナ赤色

素」と同様で、実際に購入できた製品は、NMR スペクトルは糖類に由来する巨大なシグナルが観測され、safflor yellow に由来する sp²領域のシグナルは極めて小さい。(Fig. 8) 純度の高い safflor yellow 類も販売されていない。極めて簡便に純度の高い safflor yellow を得ることができるとされる方法 (Indian Patent, IN 183773 A1 20000408, (2000)) が文献上にあったことから、ある程度の純度の標準品用の safflor yellow 類を得るべく、生薬コウカからの分離精製を行うことにした。

3-1) Safflor yellow 類の分離精製

生薬コウカ (35 g) を MeOH で 2 回抽出したのち乾燥させた。その乾燥物を水 300 mL で 2 回抽出、得られた水溶液を凍結乾燥し、凍結乾燥物を MeOH に懸濁、不溶物 (5.06 g) を濾取した。文献上ではこれが高純度の safflor yellow と記されていたが、TLC 上ではスミアーな状態に近い多くのスポットが確認された。さらに、ODS カラムクロマトグラフィーなどを用いて精製を進めている。

C. 研究結果

1) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量

昨年度確立した内部標準を DMSO-*d*₆ 溶液として加えて測定する方法で、eugenol の 6 位 H シグナル (6.33 ppm) は独立しており、「クローブ抽出物」のスペクトルにおいても他の夾雑物のシグナルとの重なりも観測されず、このプロトコールで eugenol が測定できることを改めて確認した。(Fig. 5,6)

試料中の eugenol の含有量の測定では、まず、eugenol 標準品の純度を測定したところ 92% 程度であった。「クローブ抽出物」の eugenol の含有率は 26.56%、28.81% だった。

次に、HPLC での定量では、今回の条件で eugenol が 280 nm において良好なピークとして検出できることを確認した。(Fig. 9) ¹H-qNMR 法を用いて求められた純度をもとに eugenol 溶液を順次希釈し HPLC のピーク面積を求めて検量線を作成した。その検量線も

極めて良い直線性を示した。(Fig. 10)
この検量線から算出した HPLC 法での「クローブ抽出物」中の eugenol の定量値を Table 2 に示した。

2) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

Carthamin の単離では, 研究方法の操作で「ベニバナ赤色素」に相当する製品から TLC 上で 1 spot の状態の carthamin を単離することができた。その NMR スペクトル (Fig. 11) を先の文献と比較して carthamin であることを確認した。

また, HPLC の条件検討では, 酢酸を添加した MeOH- 水のグラジエントの条件で, carthamin が良好なピークを与えることを確認した。(Fig. 12)

3) 「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

文献記載の方法で生薬コウカから safflor yellow 類の単離を試みたが, 純度が低いと思われる粉末が得られたのみであった。

D. 考察

1) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量

前年度に確立した ^1H -qNMR による eugenol の定量法で, 試料の eugenol を含む試料は acetone- d_6 に溶解し, 認証標準物質の 1,4-BTMSB- d_4 は DMSO- d_6 に 2.5 mg/mL で溶解し, 両者を 5 : 1 で混合して測定に供するという方法で問題なく簡便に eugenol の 6 位 H のシグナル面積の測定ができた。よって, この測定法が利用できることを改めて確認した。

HPLC においては, ^1H -qNMR で値付けをした eugenol 標準品溶液を用いた定量が可能であることも確認できた。また, 「クローブ抽出物」中の eugenol の定量値が ^1H -qNMR における定量値と HPLC の定量値との比較では, HPLC の値がやや低かったが, ほぼ一致していることから, ^1H -qNMR が既存の定量法に置き換えることのできる簡便な手段であることを確

認できた。同時に, 万が一, 測定試料の ^1H -NMR スペクトルで eugenol の 6 位 H にオーバーラップするシグナルがある場合, ^1H -qNMR によって標準溶液の純度の値付けを行い, その標準溶液を用いて HPLC 法による定量をすることで, 間接的な絶対定量が可能なることも確認できた。

^1H -qNMR 法は, このように揮発性で標準品の純度管理が難しい eugenol の定量を行う「クローブ抽出物」の品質管理でも極めて有効な手段であることを改めて確認した。

2) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

まだ定量方法の確立には至っていないが, 標準試料の単離方法を確立できた。標準試料として正確に秤量できるだけの物質の確保を行っている。

定量方法の確立に先立って HPLC の条件設定を行ったが, carthamin のピークを良好に検出できる条件を見つけることができたので, 少なくとも ^1H -qNMR による標準品溶液の値付け その標準溶液を基準とした HPLC 分析というプロトコールの実施に目処をつけたと言える。Carthamin 標準溶液の ^1H -qNMR による値付けは先行例があるので, 純度が極めて低く ^1H -qNMR では直接定量が困難な試料での定量も目処をつけた。

3) 「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

操作が簡便すぎることから, 花卉に含まれる糖類などがまだ多く残っていることが考えられる。現在精製途上で単離には至っていない。Safflor yellow 類には Fig.3 に示したように幾つかの化合物があるので, どの化合物を定量の対象とすべきかについても, 今後考える必要がある。

E. 結論

1) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量では, 認証標準物質の 1,4-BTMSB- d_4 を内部標準として用い, この DMSO- d_6 溶液を測定試料の acetone- d_6 溶液とを混合して NMR を測定

し, eugenol の6位Hのシグナル(6.33 ppm) を利用することで測定試料中の eugenol が定量できることがわかった. この数値は, 既存の定量法である HPLC 法と良い一致を示した. これらのことから ¹H-qNMR 法が, 既存の方法に変わりうる, 簡便で迅速な「クローブ抽出物」の品質管理法になりうることを示すことができた.

2) 「ベニバナ赤色素」の本体である carthamin の HPLC 定量条件の設定ができたため, ¹H-qNMR では定量が困難な場合の代替手段として標準溶液の値付け HPLC 法を用いた定量という組み合わせでの絶対定量法の確立の目処をつけた. Carthamin の標準試料の測定に関しては先行例もあることから, 引き続き, 実際に ¹H-qNMR で「ベニバナ赤色素」が定量可能か, 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量には HPLC との組み合わせが必要かについて検討を行う.

3) 「ベニバナ黄色素」に関しては, 個々の safflor yellow 類の単離を引き続き行い, それぞれの ¹H-NMR スペクトルにおいて, 独立したシグナルが得られるか, すなわち, ¹H-qNMR の実施が可能かの確認をとりあえずの目標とする.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka, Rie; Shibata, Hikari; Sugimoto, Naoki; Akiyama, Hiroshi; Nagatsu, Akito
Application of a quantitative ¹H-NMR method for the determination of paeonol in Moutan cortex, Hachimijiogan and Keishibukuryogan
Journal of Natural Medicines (2016), **70**(4), 797-802.

2) Tanaka, Rie; Inagaki, Risa; Sugimoto, Naoki; Akiyama, Hiroshi; Nagatsu, Akito
Application of a quantitative ¹H-NMR (¹H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen, *Journal of Natural Medicines* (2017), **71**(1), 315-320.

2. 学会発表

1) 永津明人「定量 NMR を用いた生薬の分析」
日本生薬学会第 63 年会, 1A-SY1-2, 2016 年 9 月 (富山)

2) 藤原裕未, 水野舞, 永津明人, 杉本直樹, 西崎雄三, 多田敦子, 穠山浩「定量 NMR による生薬チヨウジ中の eugenol の定量」
日本生薬学会第 63 年会, 2P-09, 2016 年 9 月 (富山)

3) 永津明人, 加藤志保里, 山田紗由美, 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穠山浩
「定量 NMR を用いたグルコサミンの定量法の確立」
日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, D-34, 2016 年 10 月 (岐阜)

4) 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穠山浩, 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 年 11 月 (大阪)

G. 知的財産権の出願, 登録状況
現在のところなし

H. 健康危機情報
特になし

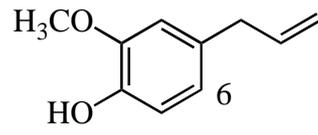


Fig. 1 Eugenolの構造

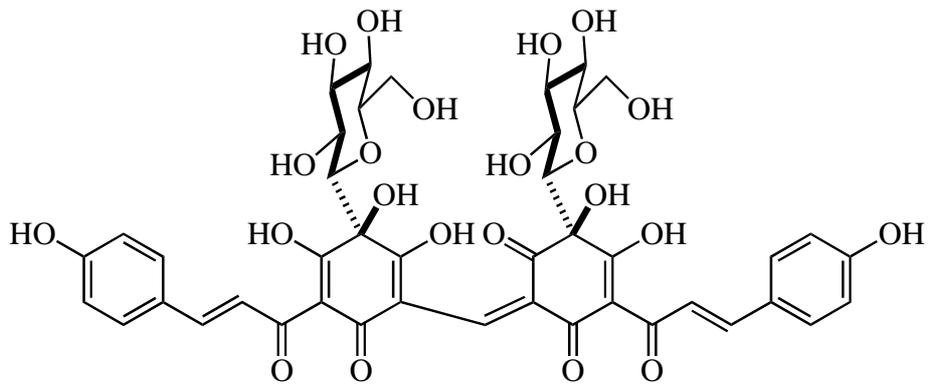


Fig. 2 Carthaminの構造

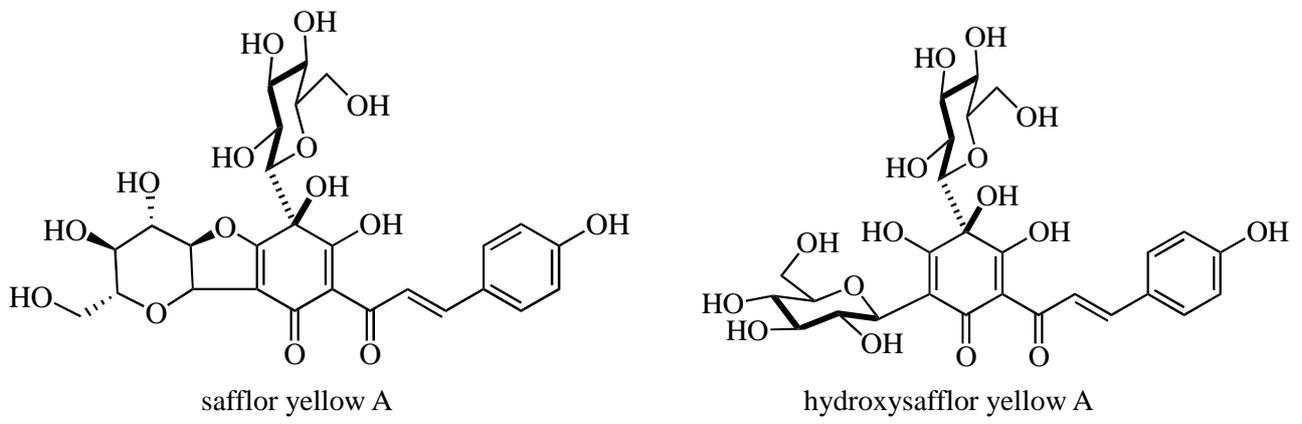


Fig. 3 Safflor yellow 類の構造

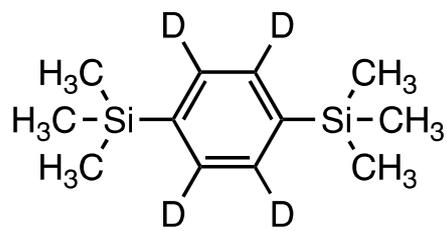


Fig. 4 1,4-(Bis(trimethylsilyl)benzene-d₄) (1,4-BTMSB-d₄)の構造

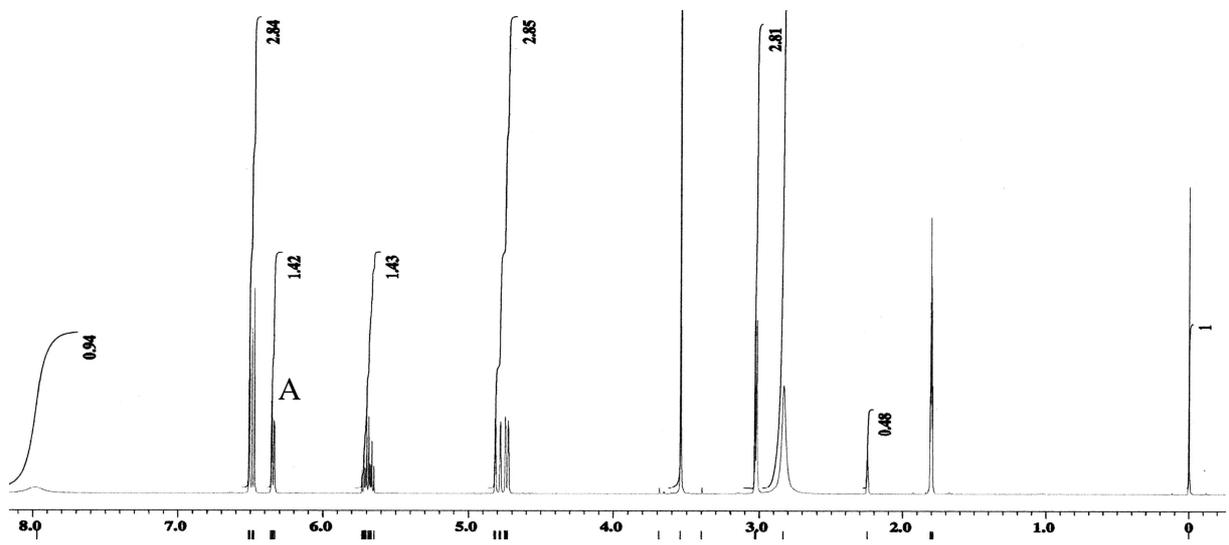


Fig. 5 Eugenol の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (acetone- d_6 , 500 MHz)

A: eugenol の 6 位 H のシグナル

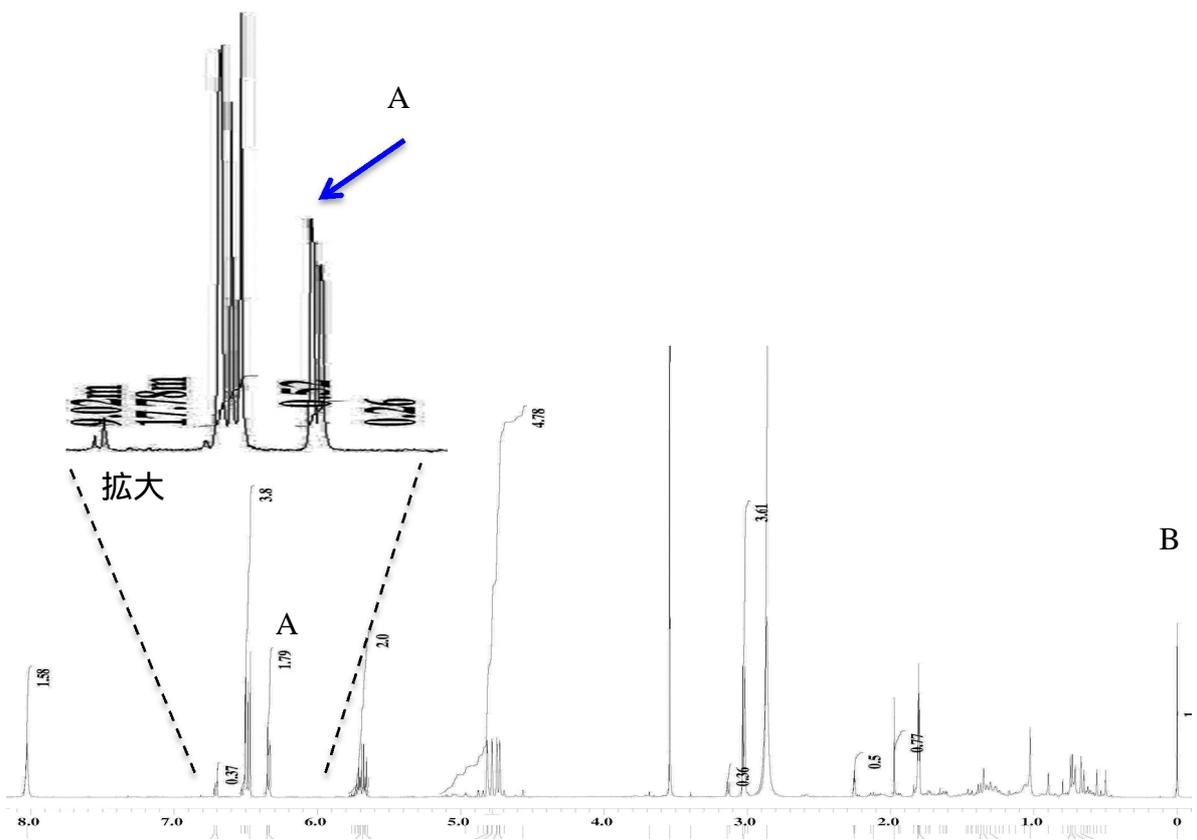


Fig. 6 「クローブ抽出物」の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (acetone- d_6 , 500 MHz)

A: eugenol の 6 位 H のシグナル, B: 1,4-BTMSB- d_6 のメチル基のシグナル

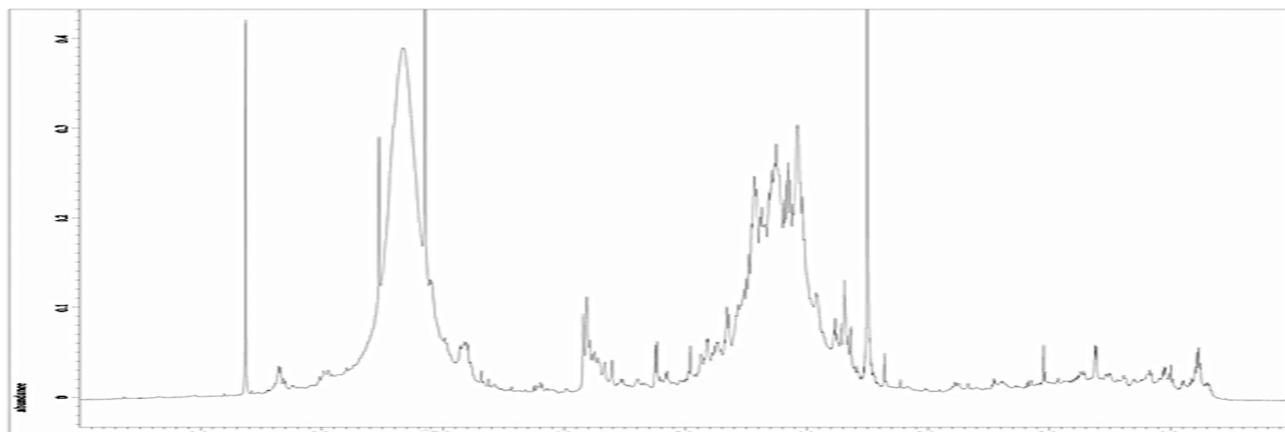


Fig. 7 主成分 carthamin として市販の色素の ^1H -NMR スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

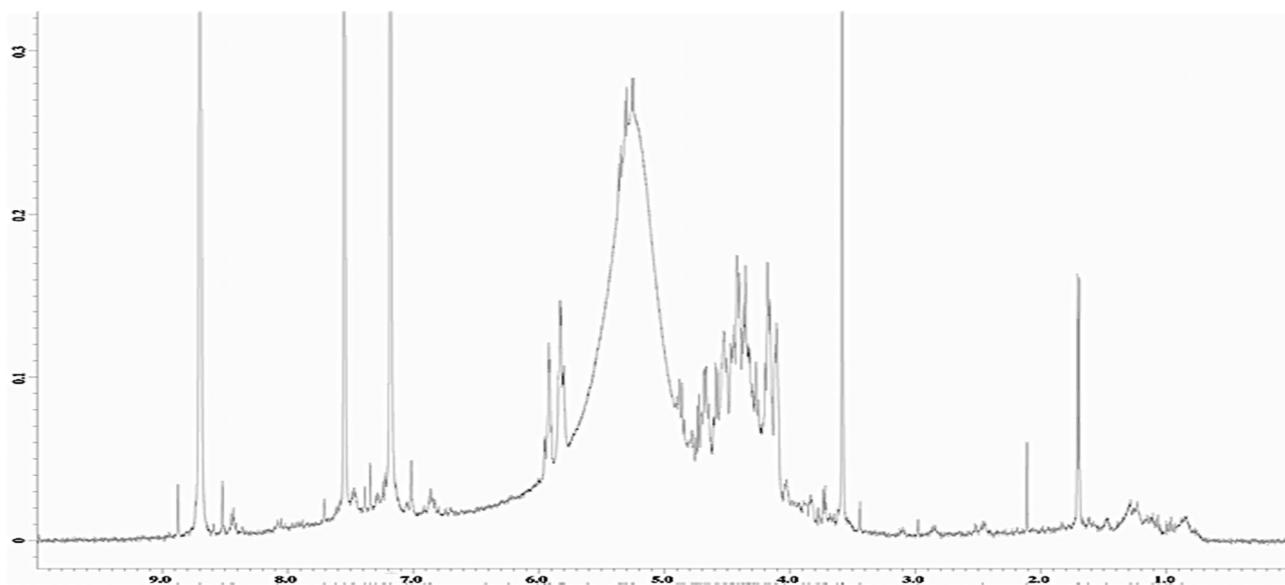


Fig. 8 「ベニバナ黄色素」の ^1H -NMR スペクトル(pyridine- d_5 , 500 MHz)

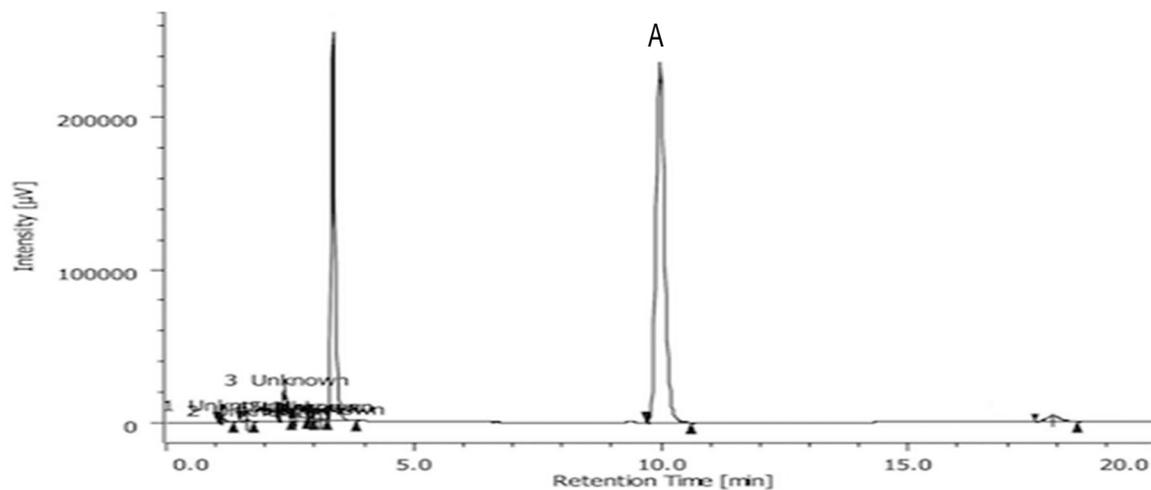


Fig. 9 Eugenol 標準品の HPLC クロマトグラム
A: eugenol のピーク

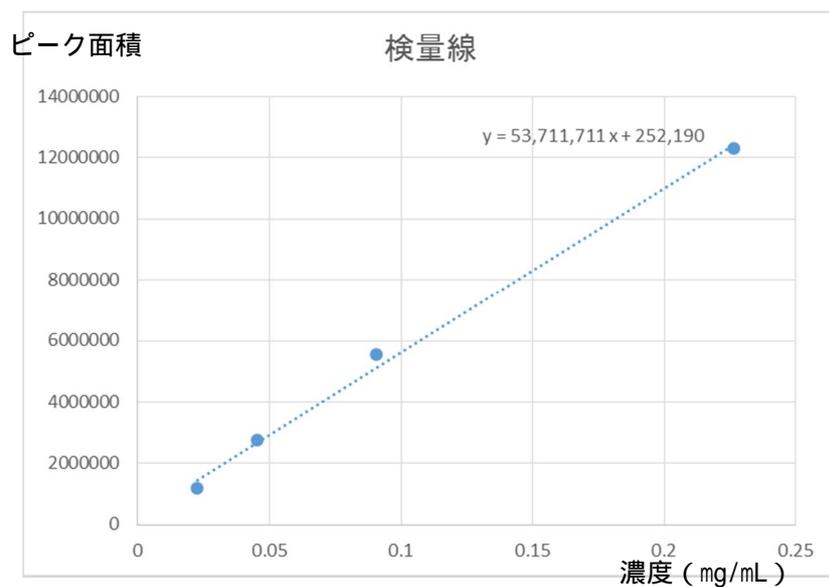


Fig. 10 Eugenol 標準品の HPLC におけるピーク面積から作成した検量線 ($r = 0.998$)

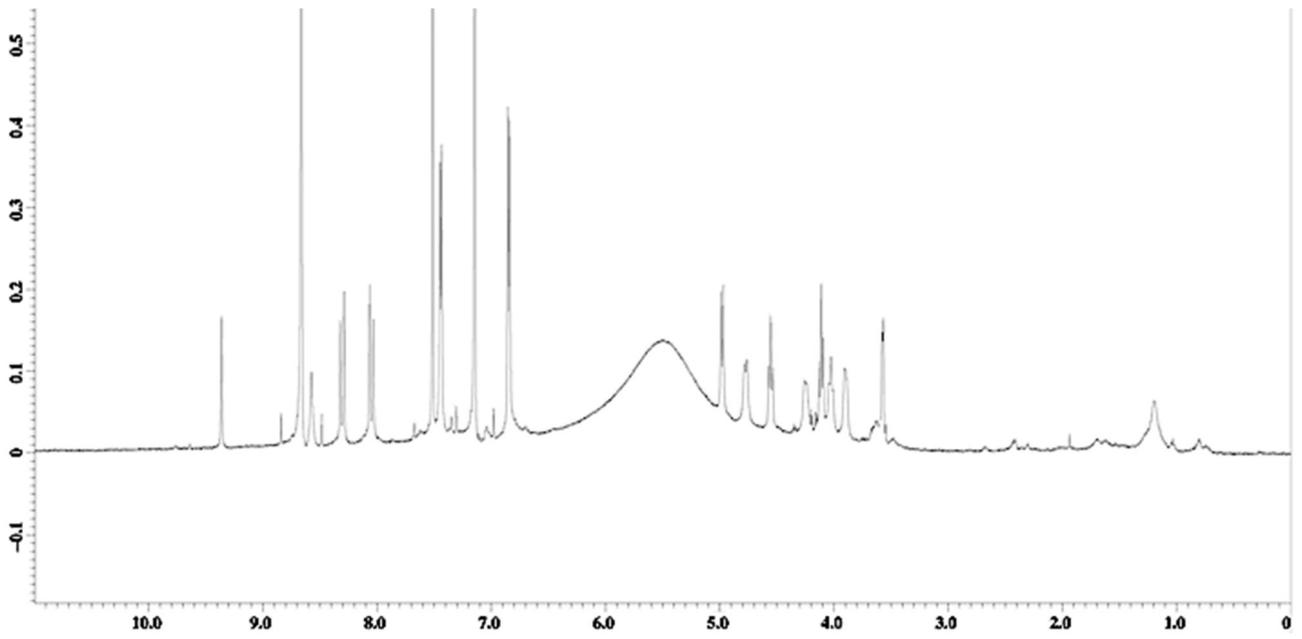


Fig. 11 単離した carthamin の ^1H -NMR スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

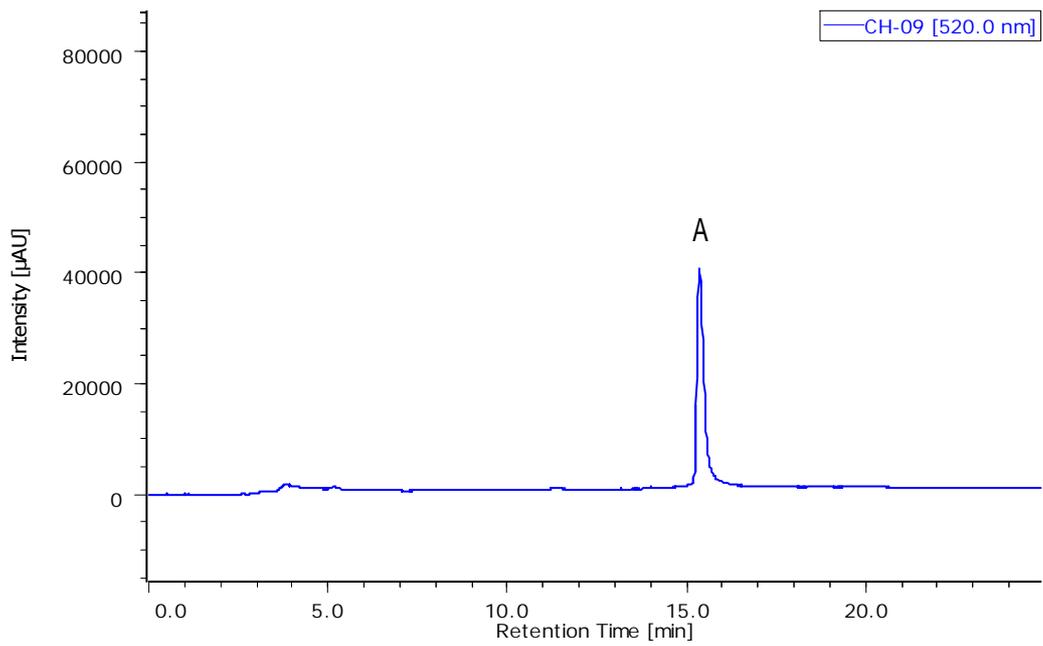


Fig.12 単離した carthamin の HPLC クロマトグラム
A: 検出波長 520 nm における carthamin のピーク

Table 1 ¹H-qNMR スペクトルの測定条件

分光計	日本電子 ECA500
観測範囲	-5 ~ 15 ppm
データポイント数	32000
フリップアングル	90°
パルス待ち時間	60 秒
積算回数	8 回
スピン	なし
プローブ温度	25

Table 2 ¹H-qNMR 法と HPLC 法で定量された eugenol の含有率

samples	含有率(%)	
	¹ H-qNMR	HPLC ^a
eugenol 標準品		
A	92.47	
クローブ抽出物		
B	26.56	24.94
C	28.81	26.20

^a ¹H-qNMR 法から得られた eugenol 標準品の含有率をもとに算出

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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,穠山浩,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	日本食品化学 会誌			印刷中
Akiyama H, Nose M, Oh tsuki N, Hisaka S, Takig uchi H, Tada A, Sugimoto o N, Fuchino H, Inui T, Kawano N, Hayashi S, Ho ishida A, Kudo T, Sugiya ma K, Abe Y, Mutsuga M, Kawahara N, Yoshim atsu K,	Evaluation of the safety an d efficacy of extracts of <i>Gl cyrrhiza uralensis</i> roots pr oduced using artificial hydr oponic and artificial hydrop onic-field hybrid cultivation system,	<i>J. Nat. Med.</i> ,	71	265-271	2017
Enkhtsetseg Enkhtuya, T omoko Shimamura, Take hiro Kashiwagi, Hiroyuki Ukeda	Antioxidative Constituents in the Leaves of <i>Paeonia anomala</i> Grown in Mongo lia	<i>Food Science and Technology Research</i>	23	63-70	2017
Tanaka, Rie; Inagaki, Risa; Sugimoto, Naoki; Akiyama, Hiroshi; Nagatsu, Akito	Application of a quantitative ¹ H-NMR (¹ H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in <i>Plantaginis</i> semen	<i>Journal of Natural Medicines</i>	71(1)	315-320	2017
山内良子, 石井佐弥, 草 場悠里, 小林弘司, 島村 智子, 受田浩之, 穠山浩 石井洋哉	酸化防止剤力価評価を目的 とした DPPH ラジカル消去 能測定におよぼす反応溶媒 の影響	日本食品保 蔵学会誌	42(5)	189-196	2016
Nishizaki Y., Ishizuki, K., Akiyama, H., Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K.	Preparation of a ammonia-t reated lac dye and structure elucidation of its main co mponent	Journal of th e Food Hygie nic Society o f Japan (Sho kuhin Eiseiga ku Zasshi)	57 (6)	193-200	2016

Amakura, Y., Yoshimura, M., Morimoto, S., Yoshida, T., Tada, A., Ito, Y., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Akiyama, H.,	Chromatographic evaluation and Characterization of Components of Gentian Root Extract Used as Food Additives	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	64(1)	78-82	2016
Tanaka, R., Shibata, H., Sugimoto, N., Akiyama, H., Nagatsu, A.,	Application of a quantitative ¹ H-NMR method for the determination of paeonol in Moutan cortex, Hachimijiogan and Keishibukuryogan	<i>Journal of Natural Medicines</i>	70(4)	797-802	2016
Ueda T., Okumura, T., Tanaka, Y., Shimamura, T., Ukeda, H.	Development of a new electrochemical evaluation method for antioxidant activity based on the redox properties of polyoxometalates and its application to the evaluation of antioxidant capacity of beverages	<i>Analytical Sciences</i>	32	825-830	2016
Takahashi, M., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Takeuchi, H., Nakagawa, K., Akiyama, H., Sato, K., Inoue, K.	Determination and purification of sesamin and sesamol in sesame seed oil unsaponified matter using reversed-phase liquid chromatography coupled with photodiode array and tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography.	<i>J. Sep. Sci.</i>	39	3898-3905	2016
Todoroki, K., Nakamura, M., Sato, Y., Goto, K., Nakano, T., Ishii, Y., Min, J.Z., Inoue, K., Toyo'oka, T.	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride as an Enantioseparation Enhancer for Chiral Derivatization-LC Analysis of D- and L-Amino acids.	<i>Chromatography</i>	37	23-28	2016
Inoue, K., Tanada, C., Hosoya, T., Yoshida, S., Akiba, T., Min, J.Z., Todoroki, K., Yamano, Y., Kumazawa, S., Toyo'oka, T.	Principal component analysis of molecularly-based signals from infant formula contaminations using LC-MS and NMR in foodomics.	<i>J. Sci. Food Agric.</i>	96	3876-3881	2016

Inoue, K., Miyazaki, Y., Unno, K., Min, J.Z., Todoroki, K., Toyo'oka, T.	Stable isotope dilution HILIC-MS/MS method for accurate quantification of glutamic acid, glutamine, pyroglutamic acid, GABA and theanine in mouse brain tissues.	Biomed. Chromatogr.	30	55-61	2016
--	--	------------------------	----	-------	------