

# 既存添加物の規格設定

国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 第2室

杉本 直樹

# 1. 既存添加物とは？

## 2. 既存添加物の規格設定の基本的な流れ

### 1. 既存添加物の規格設定の例

ステビア抽出物 （規格改正）

ブドウ種子抽出物 （新規収載）

### 4. まとめ・今後の規格設定の方針

# 合成添加物と既存(天然)添加物の違い

製造方法による区別

**合成添加物** = 化学的合成品である添加物

化学的手段により分解反応以外の  
化学的反応で得られた物質

**既存(天然)添加物**

= 天然原材料から得られ、化学的合成品以外の添加物

天然に存在しない物質 = 合成添加物  
天然に存在する物質 = 天然添加物 } ではない

自然界に通常存在する成分と同一の物質であっても、製法が「化学的合成」に該当する場合には、行政上は「化学的合成品」とみなされる。

# 食品添加物とは？

保存料，甘味料，着色料，香料など，食品の製造過程または食品の加工・保存の目的で使用されるもの。

指定添加物

445品目

H26. 11. 17改正まで

合成添加物

及び

天然添加物

平成7年

食品衛生法改正で

範囲を天然添加物

にも拡大された

有効性，安全性の評価

成分規格の事前審査

指定添加物以外

平成7年食品衛生法改正以前に使用されていた

天然添加物

既存添加物

当初489品目

124品目が消除

現在365品目

(382品目枝番込み)

(H23. 5. 6改正)

既存添加物名簿に収載

引続き，使用可

★品目追加は

認められない

タンニン，クチナシ色素

天然香料 約600品目

カニ香料，バニラ香料

一般飲食物添加物

約100品目

一般に食品として

飲食に供される

物であって

添加物として

使用されるもの

寒天，イチゴジュース

## 既存添加物収載品目リストとは？

指定添加物のほか、わが国において広く使用されており長い食経験があるものは、「既存添加物名簿」に収載され、例外的に使用、販売等が認められている。

この類型は、平成7年の食品衛生法改正により、指定の対象が化学的合成品から、天然物を含む全ての添加物に拡大された際に設けられた。

既存添加物総数  
当初  
489品目

削除 124品目  
安全性の問題  
流通無し

現時点  
365品目  
(枝番込み382品目)

### 既存添加物収載品目リストの抜粋

番号	名称
1	アウレオバシジウム培養液
・	・
355	ルチン(抽出物)
-1	エンジュ抽出物
-2	アズキ抽出物
-3	ソバ抽出物
・	・
365	ローズマリー抽出物

枝番品目

規格化

1. 既存添加物とは？

2. 既存添加物の規格設定の基本的な流れ

1. 既存添加物の規格設定の例

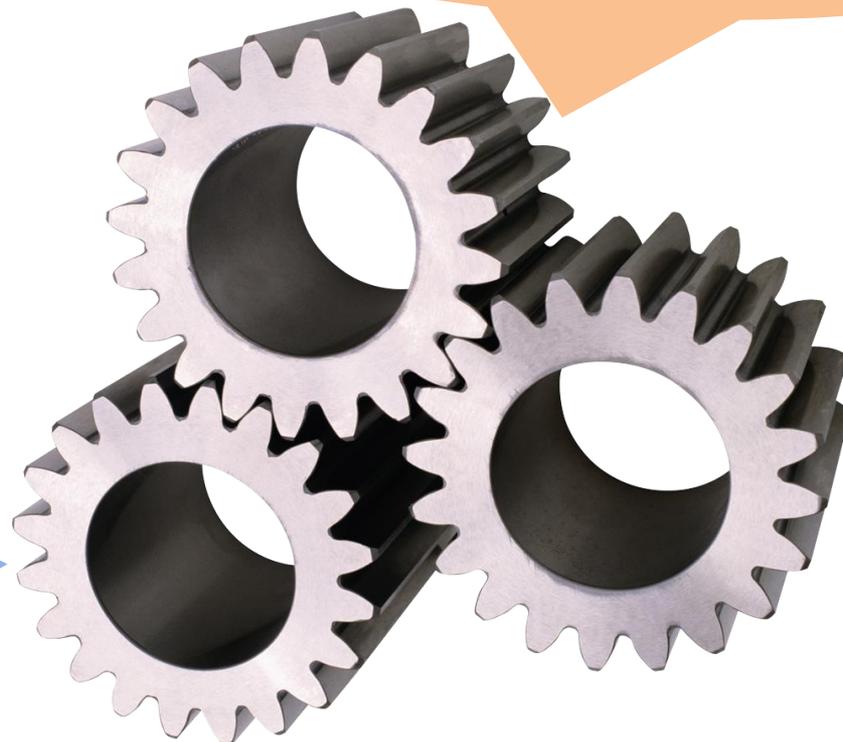
ステビア抽出物 （規格改正）

ブドウ種子抽出物 （新規収載）

4. まとめ・今後の規格設定の方針

# 既存添加物の規格設定を行うための3つの要素

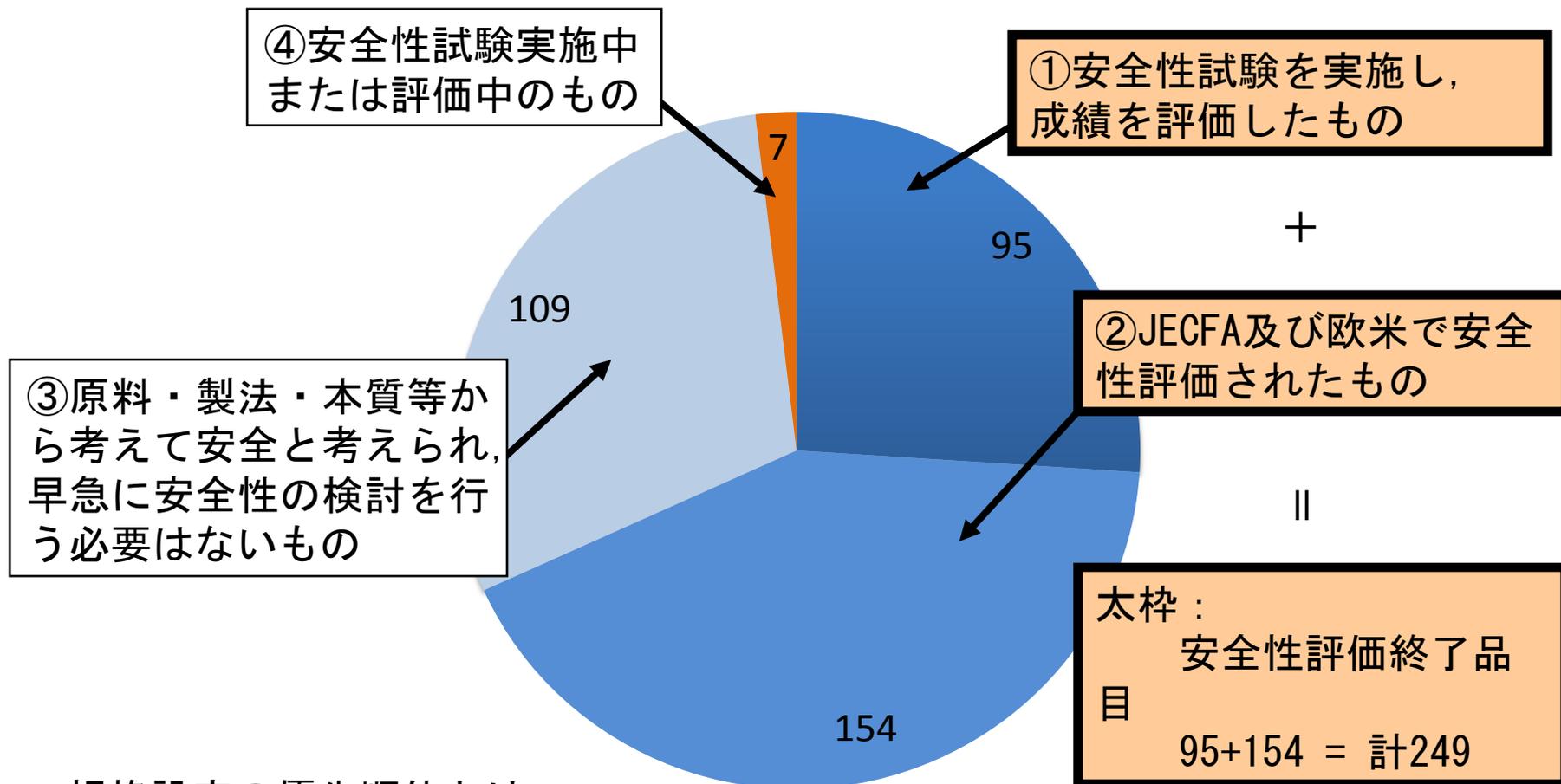
- 規格化の実現可能性
- 定義(基原・本質)の設定
  - 学名の調査
- 既存添加物の規格試験法の設定
  - 分析法開発, 成分組成解明, 標準品設定



流通実態の調査  
多いものから!

安全性評価  
安全なものから!

## 既存添加物365品目の安全性評価の状況 (H26. 4. 23の時点)



規格設定の優先順位とは？

1. 流通量 大 > 流通量 小
2. 安全性評価終了①+② > 原料・製法・本質等から安全③ > 安全性評価中④
3. 規格化の実現可能性 (通常の機器分析法が適用できるかどうか) 大 > 小

# 既存添加物の規格の例

## ステビア抽出物（改正案）

**定義** 本品は、**ステビア** (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) の葉から抽出して得られた、ステビオール配糖体を主成分とするものである。

**含量** 本品を乾燥物換算したものは、**ステビオール配糖体4種** (ステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドC及びズルコシドA) の合計量として**80.0%以上**を含む。

**性状** 本品は、白～淡黄色の粉末、薄片又は粒で、においがいいか又はわずかに特異なにおいがあり、強い甘味がある。

**確認試験** 定量法の検液及び標準液につき、定量法の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、検液の主ピークの保持時間は、標準液のステビオシド及びレバウジオシドAのいずれかのピークの保持時間と一致する。

**純度試験** (1) 鉛 Pbとして1.0 $\mu$ g/g以下

(2) ヒ素 Asとして1.0 $\mu$ g/g以下

**定量法** 本品50mgを精密に量り、(中略)・・・各ステビオール配糖体の定量用の係数 $f_x$ は、1.00(ステビオシド)、1.18(レバウジオシドC)及び0.98(ズルコシドA)とする。

**各ステビオール配糖体(レバウジオシドAを除く)の含量(%) = 計算式**

## 設定根拠の厳格化

基原の確認(天然由来)  
定義の設定

含量、性状の確認

製品情報の収集

規格試験法の設定  
(無理のない試験法の設定)  
LC/UV, 滴定, 比色 etc.

自主規格や文献情報

分析法開発(成分解析)  
LC/MS, NMR etc.

定量用標準品の設定

検証データの収集

# <定義> 既存添加物の基原生物の学名と標準和名

## 定義に基原種の学名を記載することの目的

- 想定外の原料が使用されることを防ぐ.
- 微生物や国内に自生・栽培がない植物等は基原を限定する必要がある.

基原の学名根拠とは？  
植物学者によって見解が異なる

トレーサビリティーの確保

- 高等植物：
  - ✓ 学名および英語慣用名：Tropicos (<http://www.tropicos.org/>)
  - ✓ 和名：BG Plants 和名-学名インデックス ([http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist\\_main.html](http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html))
- 魚類：「日本産魚類検索 全種の同定 第二版」（中坊徹次（京都大学総合博物館教授））
- 藻類：大型藻類：「新日本海藻誌—日本産海藻類総覧」（吉田忠生）
- 緑藻類：米国National Center for Biotechnology Information (NCBI)のTaxonomy database.
  - ✓ 補助的に各国のカルチャーコレクション(UTEX The culture collection of Algae, NIES collection (国立環境研究所・微生物系統保存施設))の保存株リストを参照.
- 藍藻類：NCBIのTaxonomy database. 補助的にPCC (Pasteur culture collection of cyanobacteria (フランス)) およびUTEX, NIES collectionの保存株リストを参照.
- 菌類・細菌類
  - ✓ 存在および学名の確認：NCBIのTaxonomy database
  - ✓ 学名（補助）および群の確認：農業資源生物研究所のジーンバンク (NIAS Genebank) .
  - ✓ 菌類の和名：「日本産菌類集覧」（勝本謙著，2010）

既存添加物全品目についてほぼ調査終了！

# <確認試験, 純度試験, 定量法> 既存添加物の成分規格設定の問題点

## 規格化の実現可能性 大 = 簡単

- 成分組成が単純, 単一成分
- 有効成分が既知
- 従来の分析法が適用可能



## 規格化の実現可能性 小 = 困難

- 成分組成が複雑, 多成分
- 有効成分が未知
- 従来の分析法が適用不可能

既存添加物365品目(枝番込み382品目)のうち,

第8版公定書: 130品目について規格設定済

酵素62品目 + 酵素以外25品目 = 87品目

第9版公定書: 217品目について規格設定済

165品目(枝番込み)について規格未設定

第10版公定書: ???品目について規格設定済

成分規格・試験法への要求  
確認試験や定量法の厳密化!

不確かな有効成分

分析法の確立

既存添加物  
成分規格設定

成分組成が未知

標準品の供給

新技術の開発・応用  
より高精度に!  
LC/MS, NMR etc.

既存技術への落とし込み

# 第9版食品添加物公定書への既存添加物規格の収載状況

既存添加物総数  
365品目  
(枝番込み382品目)

規格未設定  
枝番込み165品目

新規収載  
酵素62品目  
酵素以外25品目

9版公定書  
217品目

8版公定書  
130品目

## ●新規収載既存添加物25品目(酵素を除く)

着色料	アナトー色素, カカオ色素, カロブ色素, コウリヤン色素, タマネギ色素, タマリンド色素, ベニコウジ黄色素
酸化防止剤	γ-オリザノール, コメヌカ抽出物, フェルラ酸, 酵素処理ルチン
製造用剤等	ブドウ種子抽出物, ラクトフェリン濃縮物, カラシ抽出物
強化剤等	ヘスペリジン, 骨焼成カルシウム, サンゴ未焼成カルシウム
乳化剤	植物性ステロール, 動物性ステロール
甘味料	酵素分解カンゾウ, L-ラムノース
増粘安定剤	ウェランガム
酸味料等	フィチン酸
苦味料	カフェイン(抽出物)
保存料	ペクチン分解物

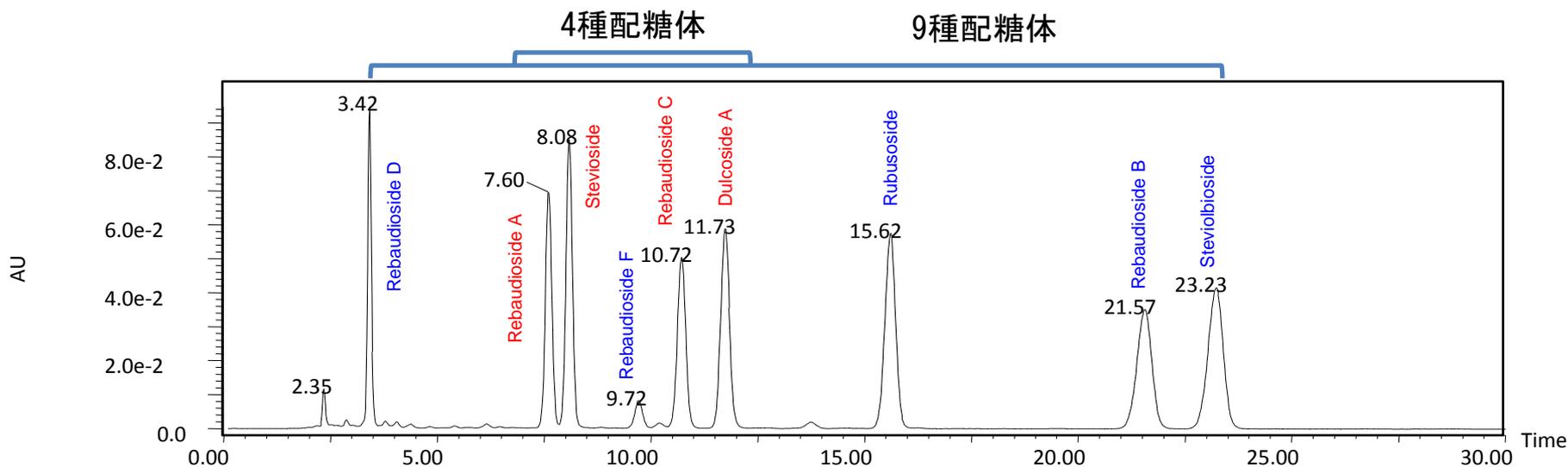
## ●既収載既存添加物規格改正13品目: ステビア抽出物など

第9版公定書に既存添加物(酵素62品目+酵素以外25品目)87品目が収載される予定。

1. 既存添加物とは？
2. 既存添加物の規格設定の基本的な流れ
1. 既存添加物の規格設定の例
  - ステビア抽出物（規格改正）
  - ブドウ種子抽出物（新規収載）
4. まとめ・今後の規格設定の方針

# 規格改正の例：ステビア抽出物の分離2規格（国際整合性）

- ステビア抽出物 = 現行品
  - 4種配糖体合計 = 含量80%以上
  - 4種配糖体 = ステビオシド, レバウジオシドA, レバウジオシドC及びズルコシドA
  - 定量法のHPLC条件などを高純度品に準拠.
- ステビオール配糖体 = 高純度品
  - 4種配糖体合計 = 含量80%以上, 且つ, 9種配糖体合計 = 含量95%以上
  - JECFA規格(2010年改正) に合わせた高純度品の規格を追加
  - HPLC条件: NH<sub>2</sub>カラムをODSカラムに変更,
  - ステビオシド及びレバウジオシドAは標準品で定量, それ以外の配糖体は標準品でピーク位置を決めるが定量はステビオシドで行い換算する.





## 試薬・試液の項の新規格の例

レバウジオシドC, 同定用  $C_{44}H_{70}O_{22}$

本品は、白～淡褐色の結晶又は粉末である。

**確認試験** (1)本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき、 $2920\text{cm}^{-1}$ ,  $1730\text{cm}^{-1}$ ,  $1640\text{cm}^{-1}$ ,  $1450\text{cm}^{-1}$ ,  $1370\text{cm}^{-1}$ ,  $1230\text{cm}^{-1}$ ,  $1210\text{cm}^{-1}$ ,  $1080\text{cm}^{-1}$ ,  $900\text{cm}^{-1}$ 及び $580\text{cm}^{-1}$ のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

(2)本品5 mgに水/アセトニトリル混液(7:3)を加えて5 mLとし、検液とする。検液1  $\mu\text{L}$ につき、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、**主ピークのマスマスペクトルに、脱プロトン分子[M-H]<sup>-</sup>のシグナル( $m/z$  949)を認める。**

### 操作条件

**検出器** 質量分析計(エレクトロスプレーイオン化法)

ただし、電圧値等のパラメータを調整しあらかじめ最適化しておく。

**走査質量範囲**  $m/z$  100~1200 (負イオン)

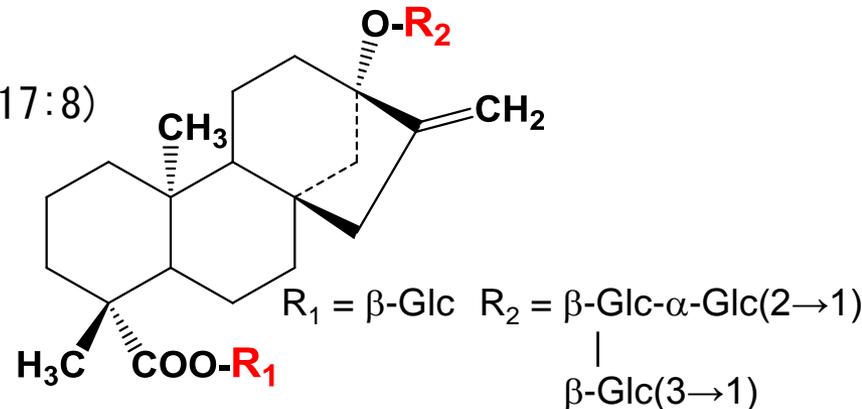
**カラム充填剤** 5  $\mu\text{m}$ の液体クロマトグラフィー用のオクタデシルシリル化シリカゲル

**カラム管** 内径4.6 mm, 長さ25 cmのステンレス管

**カラム温度** 40°C

**移動相** ギ酸溶液(20 mmol/L)/アセトニトリル混液(17:8)

**流量** 0.5 mL/分



LC/MSによる同定(確認：異性体等との判別)を必要とする規格の採用

# 天然物の定量分析法とは？

## 1. クロマトグラフ法

- 相対定量法（分析対象成分の標準品との比較）
- ピークにならない成分を評価できない  
例：水分，カラムから溶出しない成分



有効成分が明らかな品目  
(標準品有り)

## 2. 比色法，色価測定法

- 相対定量法
- 分離分析法ではない



色素類

## 3. 滴定法

- 絶対定量法（一次標準測定法（一次比率法））
- 分離分析法ではない。
- 類似化合物の混合物は適用対象外

既存添加物の規格設定の問題点  
(天然物の分析に共通の問題点)



有効成分の同定，絶対含量測定  
分析用標準品の供給



新しい概念の分析法の開発が必要



新しい分析法の開発 2006頃～

共同研究

国立医薬品食品衛生研究所  
産業技術総合研究所



定量NMR法 (quantitative NMR: qNMR)

絶対定量法（一次標準測定法（一次比率法））  
混合物にも適用可能

局方16-2 生薬標準品の純度決定  
指定添加物フルジオキソニル等の標準品の純度決定  
残農試験用標準品の純度決定  
(その他の分野へ応用が行われている)

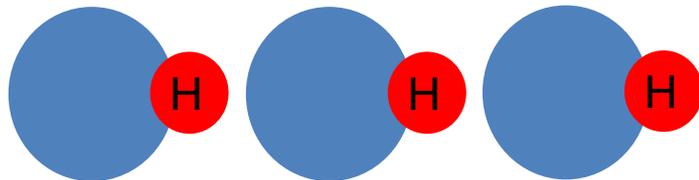
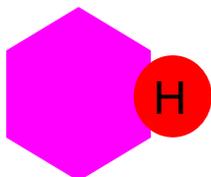
# 物質質量 (mol) の測定法とは？

定量分析法の分類	説明	操作性	問題点
一次標準測定法	国際単位系 (SI) に <b>トレーサブル</b> な測定 (絶対量の測定)		試料によっては正確な定量が困難。不純物の影響評価が困難、操作が煩雑。
	一次直接法 物質質量の基準となる他の化学物質を用いずに、自分自身で目的の化学物質の物質質量を測れる方法 (絶対測定法) 電量分析法, 重量分析法, 凝固点降下法	×	
	一次比率法 物質質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質質量を測れる方法 <b>滴定法</b> , 同位体希釈質量分析法	×	
	定量NMR (quantitative NMR: qNMR)法	◎	
相対測定法 (二次測定法)	一次標準測定法で値付けした目的の化学物質の標準品を用いて相対値として目的の物質質量を測る。 <b>クロマトグラフ法</b>	◎	計量学的に妥当な手順によって純度が算出された標準品に乏しい。

# NMRとクロマトグラフ法の定量分析の違い

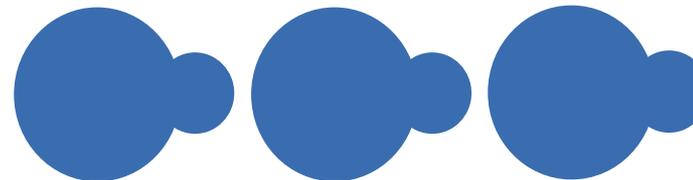
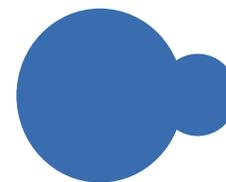
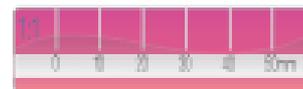
## 定量NMR (quantitative NMR)

原子核 (nucleus) の「ものさし」  
 $^1\text{H}$  Nuclear Resonance



## クロマトグラフ法

分子 (molecule) の「ものさし」  
UV/Vis, MS etc.



### 一次標準測定法(一次比率法):

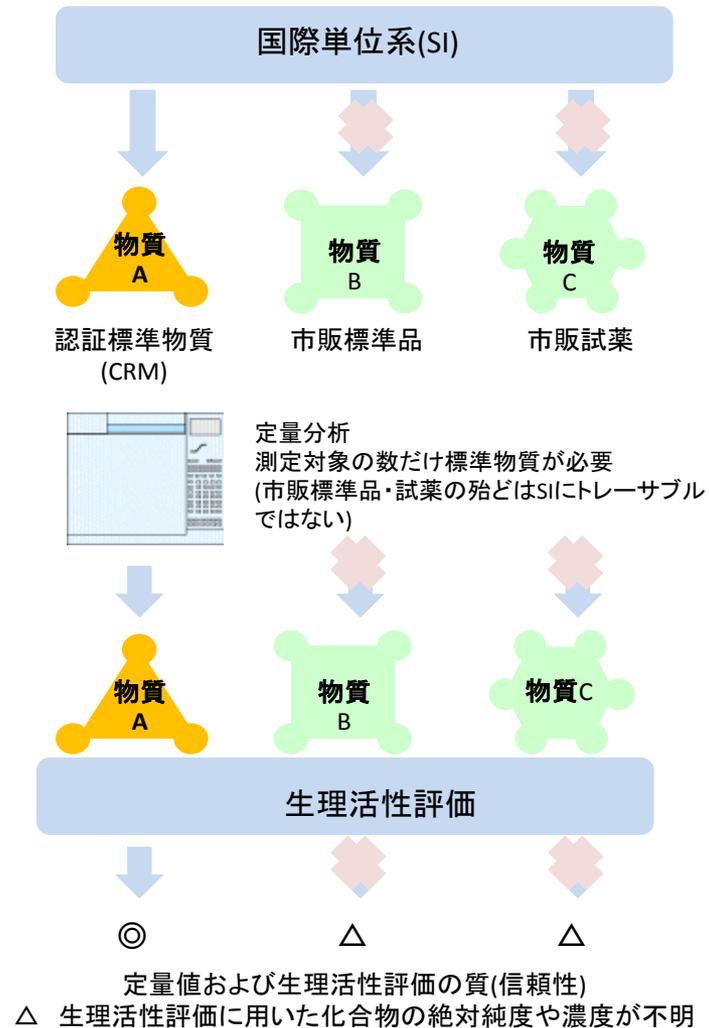
物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法

### 相対分析法:

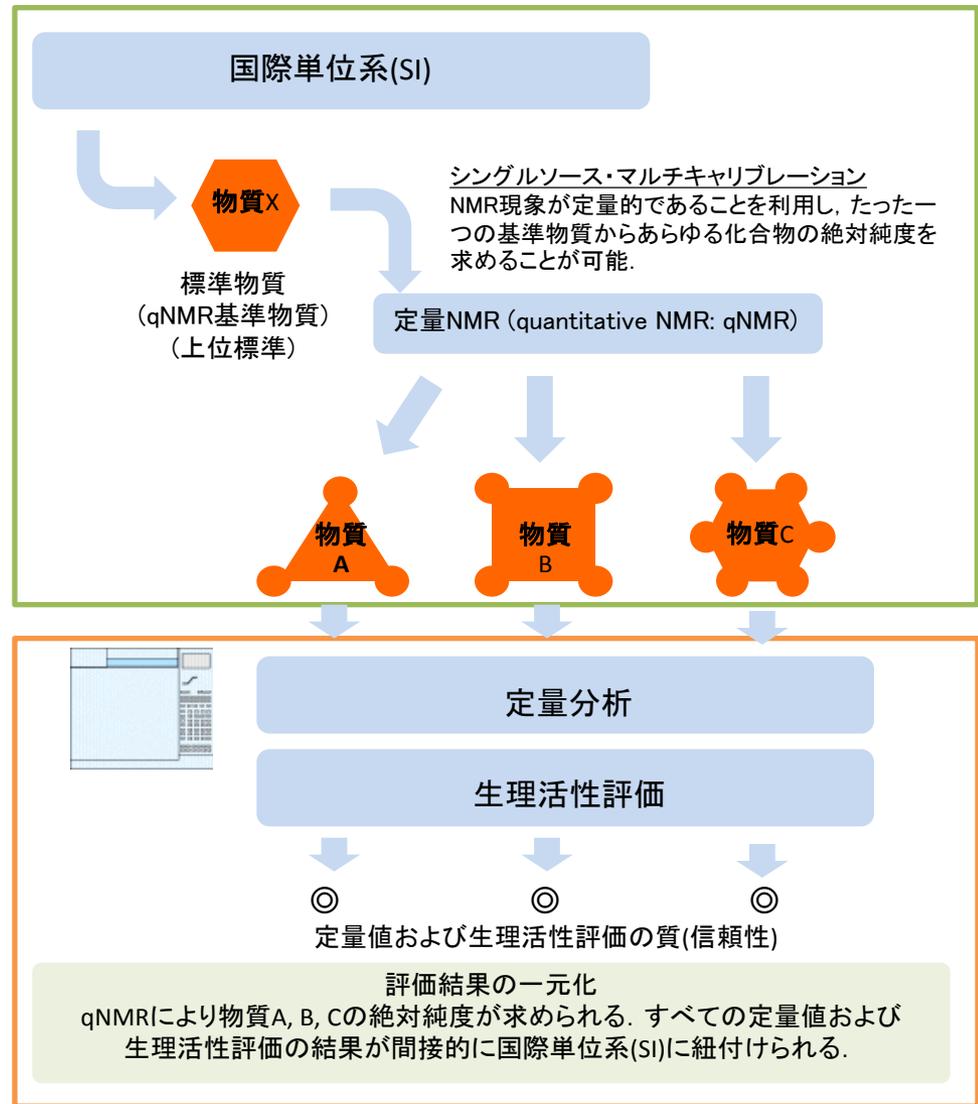
目的の化学物質と同一の化学物質を基準として物質量を測れる方法

# qNMRによる有機化合物の定量分析値のトレーサビリティの制御

## 従来の分析法の概念

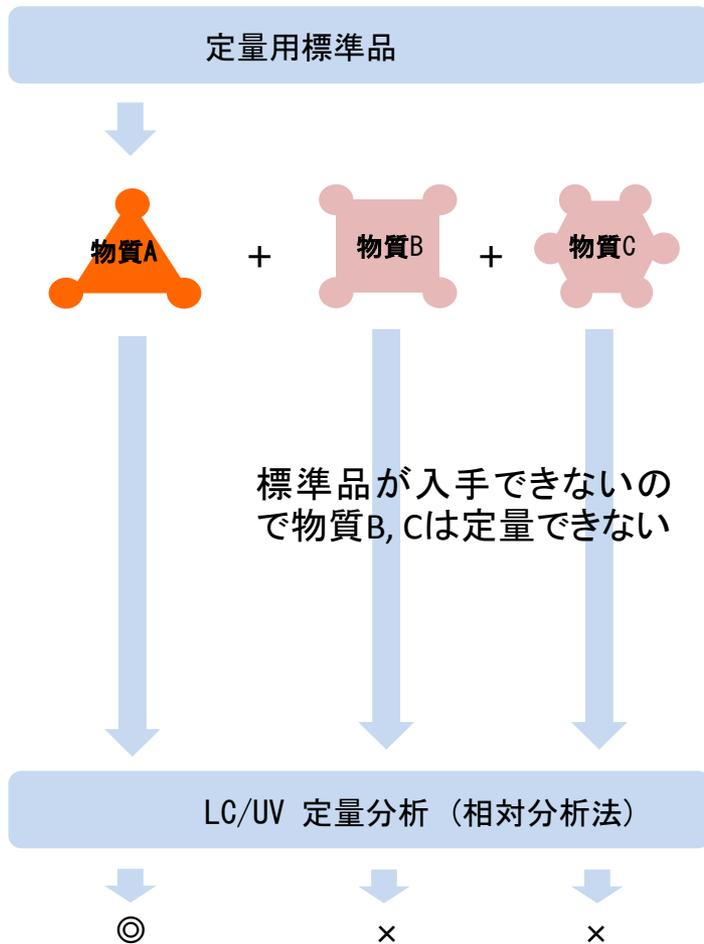


## 新しい分析法の概念



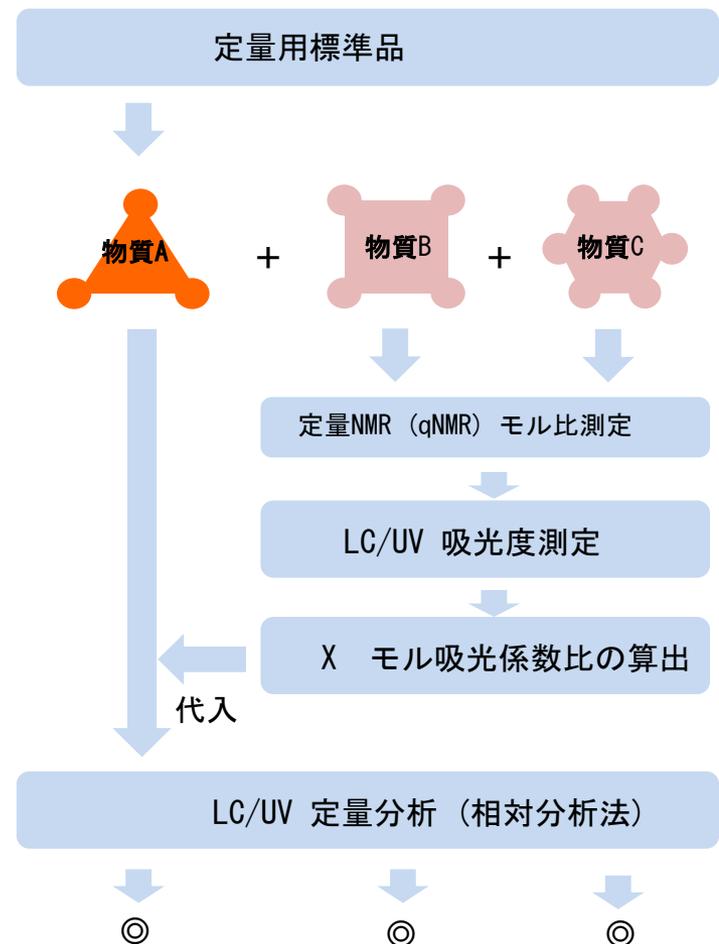
# 天然物化学の分野における定量分析の問題の解決 計量計測トレーサビリティの制御

## 従来の分析法



分析対象成分全てについて標準品が必要

## 新しい分析法



モル吸光係数比が算出できると純度既知の標準品が一つあれば良い

# 既存添加物「ブドウ種子抽出物」の成分規格設定への応用

「ブドウ種子抽出物」プロアントシアニジン（カテキン類の重合体）を主成分とする酸化防止剤（製造用剤）。

## 定義

本品は、アメリカブドウ (*Vitis labrusca* L.) 又はブドウ (*Vitis vinifera* L.) の種子から得られた、プロアントシアニジンを主成分とするものである。デキストリン、果糖又はブドウ糖を含むことがある。

## 含量

本品を乾燥物換算したものは、プロアントシアニジン25%以上を含む。

## 確認試験

ブタノール塩酸法：プロアントシアニジンの確認試験

## 定量法

プロアントシアニジンの含量 (%) =  
総フラバノール量 (%) - 総カテキン類量 (%)

- 1) 総フラバノールの定量  
バニリン塩酸法

総フラバノール

- 2) 総カテキン類の定量

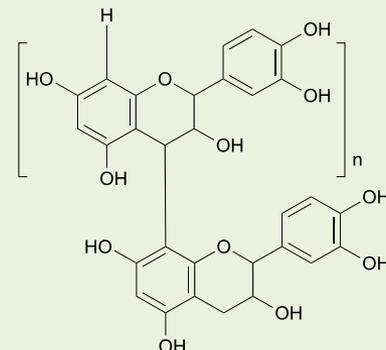
CTの検量線から総カテキン類の含量を算出  
(青字はモル吸光係数比)

総カテキン類の含量 (%) =

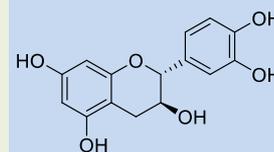
$$A_{TCT} + \left\{ \frac{A_{TEC}}{0.99} + \frac{442.37}{290.27} \left( \frac{A_{TCG}}{4.03} + \frac{A_{TECG}}{3.58} \right) \right\} \times S_C \times 2$$

$$\frac{\quad}{A_{SC} \times \text{乾燥物換算した試料の採取量(mg)}} \times 100$$

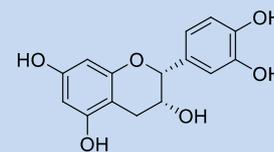
$A_T =$  ピーク面積,  $S_C =$  (+)-カテキン 無水物換算



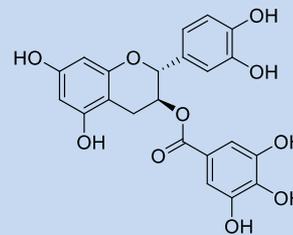
プロアントシアニジン



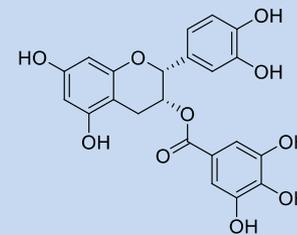
(+)-catechin (CT)



(-)-epicatechin (EC)



(-)-catechin gallate (Cg)



(-)-epicatechin gallate (ECg)

カテキン類

# 既存添加物「ブドウ種子抽出物」中のカテキン類の定量分析への応用

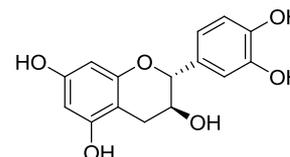
「ブドウ種子抽出物」はプロアントシアニジン（カテキン類の重合体）を主成分とする酸化防止剤。  
成分規格は、4種のカテキン類（カテキン(CT)，エピカテキン(EC)，カテキンガレート(Cg)，エピカテキンガレート(ECg))をHPLCで定量分析する。

## HPLC定量分析の問題点

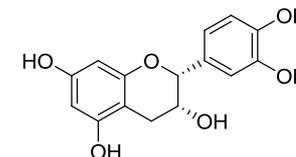
CT標準品は安価だが、EC, ECg, Cgは高価.

EC, ECg, Cgは入手できても純度未知

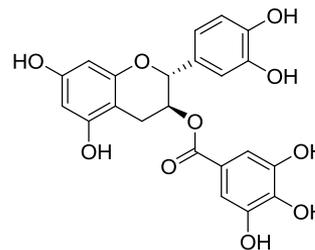
(+)-CT hydrate	5 g	¥9,400
(-)-EC	10 mg	¥8,000
(-)-ECg	10 mg	¥12,000
(-)-Cg	10 mg	¥34,000



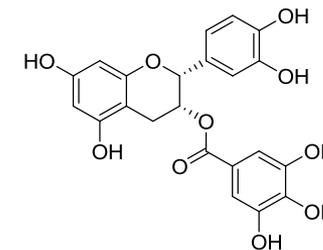
(+)-catechin (CT)



(-)-epicatechin (EC)

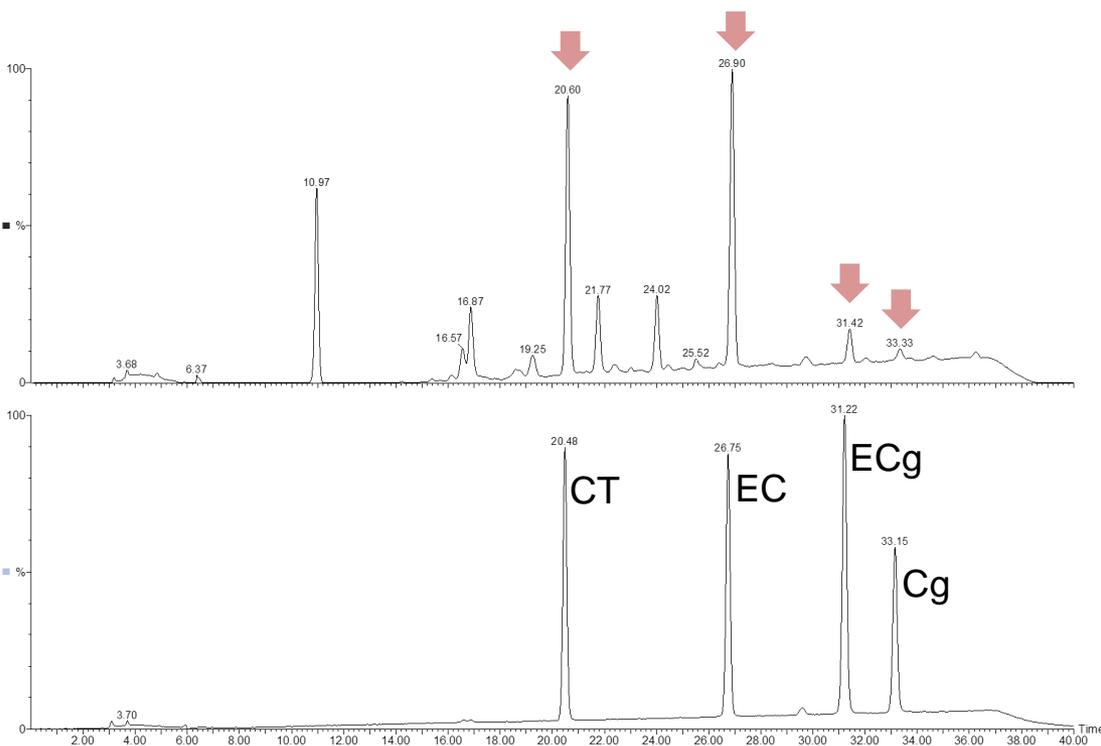


(-)-catechin gallate (Cg)



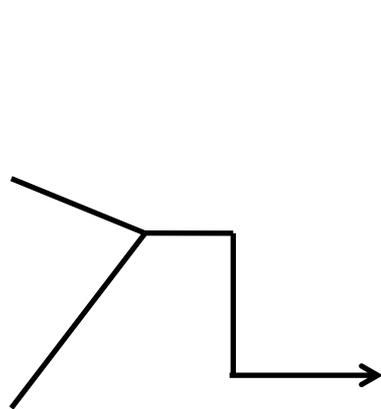
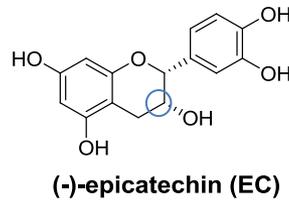
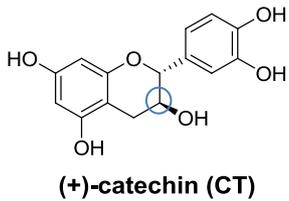
(-)-epicatechin gallate (ECg)

カラム: Cosmosil 5-C18-MSII (4.6 i. d. x 250 mm)  
移動相: A) 0.1%ギ酸, B) 0.1% ギ酸メタノール,  
グラジエント: B = 10% to 40% over 30 min  
流量: 0.5 mL/min, 温度: 40°C, 検出波長: 280 nm



# qNMRによる溶液中のモル比の測定

## ①<sup>1</sup>H-NMR分析



40 mm



FT-NMR

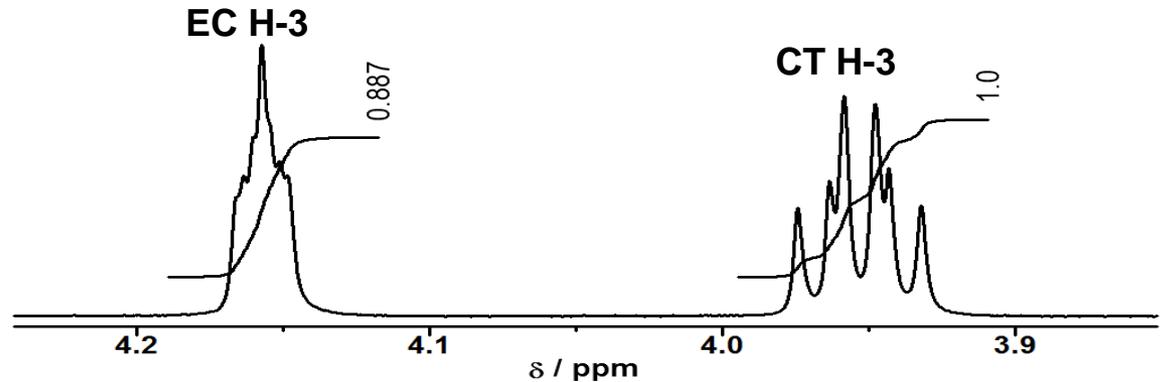
<sup>1</sup>H-NMR (ECA500)  
solvent : CD<sub>3</sub>OD  
flip angle : 90°  
delay: 60s  
point: 32000  
scan:16

CTとECを混合し封入  
(秤量の必要はない)

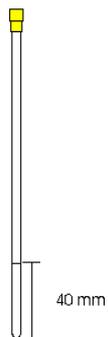
## ②モル比 (M) 計算

3位の水素シグナル(H-3) の積分値  
から、ECとCTのモル比 (M) を算出

$$EC/CT = 0.89 = M$$



## ③HPLC分析



10倍希釈  
(with DMSO)

迅速に分析



HPLC分析条件

カラム: ODS (4.6 x 250 mm, 粒子径5 μm)

移動相: A) 0.1% ギ酸溶液

B) 0.1% ギ酸メタノール,

グラジエント: 10~40 % over 30 min

流量: 0.5~0.7 mL/min, 温度: 40°C

試料注入量: 10 mL

検出: 280 nm

Waters Alliance 使用

## ④吸光度比 (S) 計算

ECとCTのピーク面積から,  
吸光度比 (S) を算出

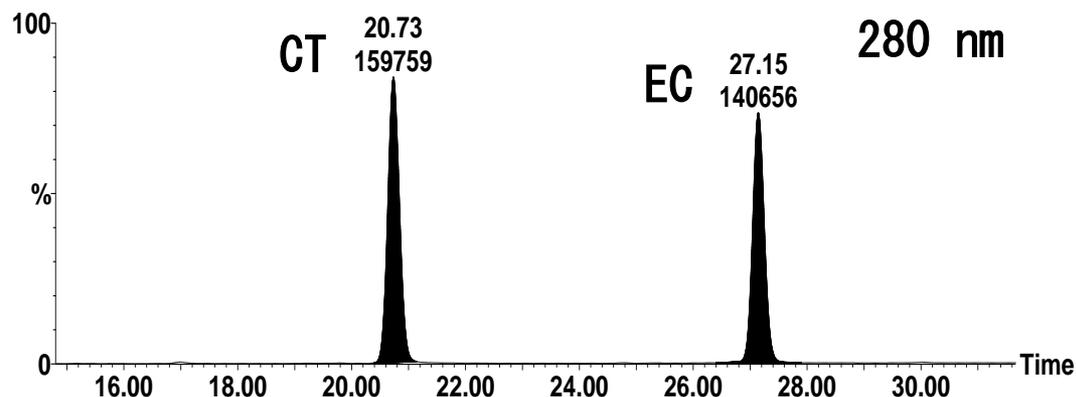
$$EC/CT = 14065/159759 = 0.88 = S$$

## ⑤モル吸光係数比の算出 (S/M)

吸光度比 (S) / モル比 (M) から  
モル吸光係数比を算出

$$S/M = 0.88/0.89 = 0.99$$

ECのCTに対するモル吸光係数比 = 0.99



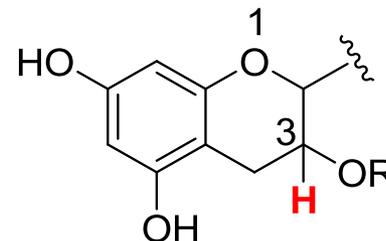
# LCとqNMRの併用：モル吸光係数比を用いた定量分析

## ⑤モル吸光係数比の算出 (S/M)

EC, Ecg, CgのCTに対するLCピーク面積を求める

EC, Ecg, CgのCTに対するモル吸光係数比は？

**0.99, 3.58, 4.03**



R = H or gallate

## ⑥モル吸光係数比を用いたLC定量分析

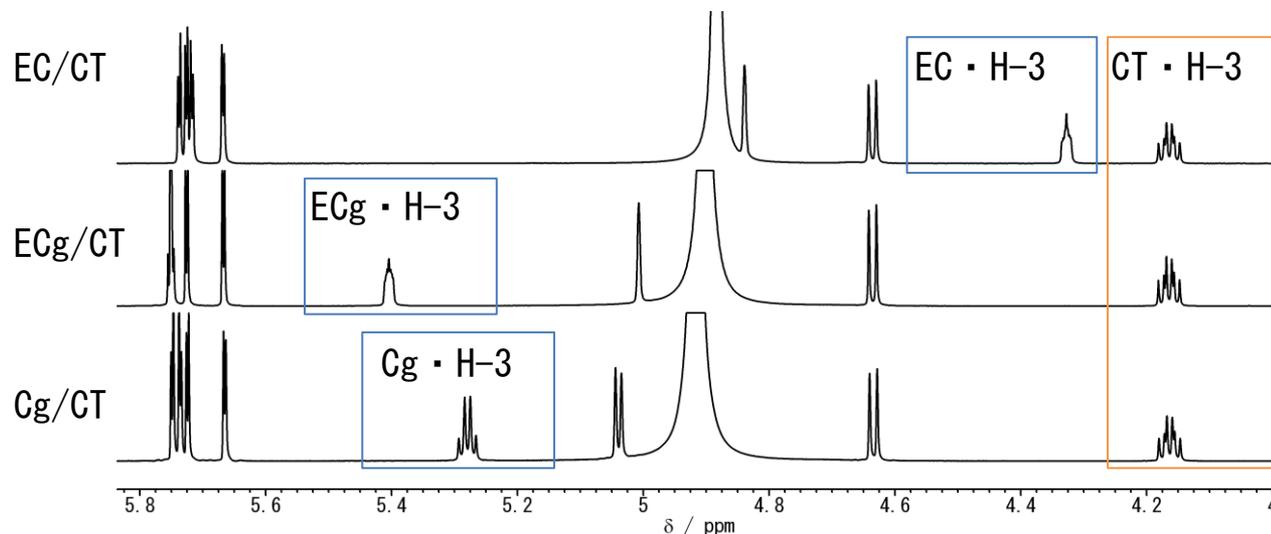
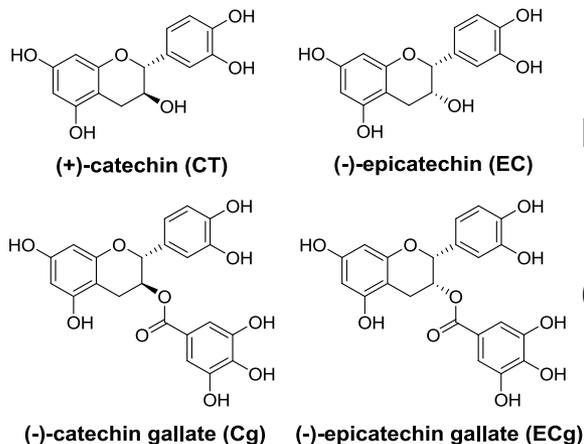
CTの検量線からEC, Ecg, Cgを定量できる

総カテキン類の含量 (%) =

$$\frac{A_{TCT} + \left\{ \frac{A_{TEC}}{0.99} + \frac{442.37}{290.27} \left( \frac{A_{TCG}}{4.03} + \frac{A_{TECG}}{3.58} \right) \right\} \times S_C \times 2}{A_{SC} \times \text{乾燥物換算した試料の採取量(mg)}} \times 100$$

$A_T$  = ピーク面積,  $S_C$  = (+)-カテキン 無水物換算

H-3同士は十分に分離している



エピカテキン (EC), エピカテキンガレート (Ecg), カテキンガレート (Cg) とカテキン (CT) の各混合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

1. 既存添加物とは？
  
2. 既存添加物の規格設定の基本的な流れ
  
1. 既存添加物の規格設定の例
  - ステビア抽出物 （規格改正）
  - ブドウ種子抽出物 （新規収載）
  
4. まとめ・今後の規格設定の方針

# 第9版食品添加物公定書への既存添加物規格の収載状況

既存添加物総数  
365品目  
(枝番込み382品目)

規格未設定  
枝番込み165品目

新規収載  
酵素62品目  
酵素以外25品目

9版公定書  
217品目

8版公定書  
130品目

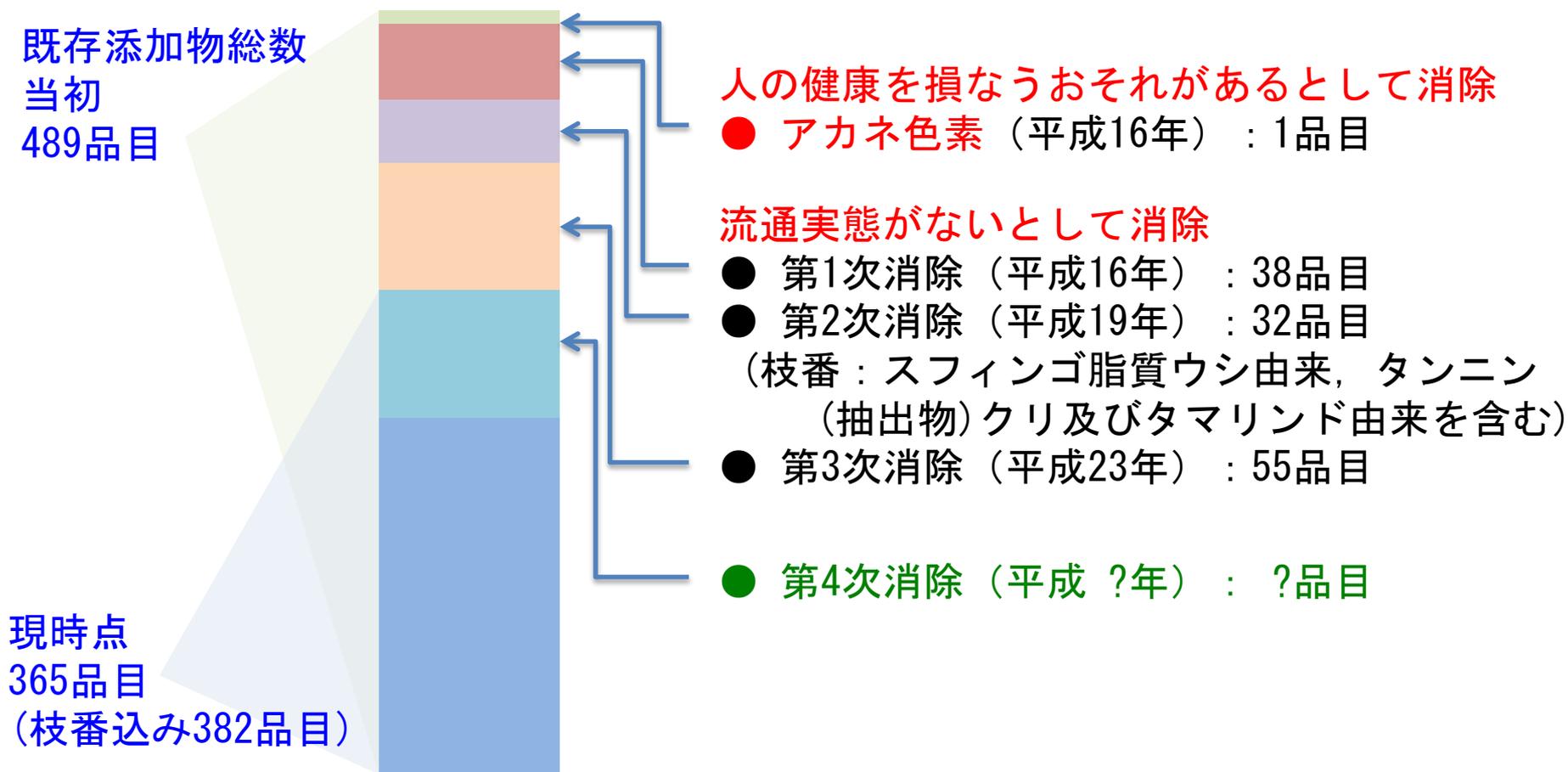
## ●新規収載既存添加物25品目(酵素を除く)

着色料	アナトー色素, カカオ色素, カロブ色素, コウリヤン色素, タマネギ色素, タマリンド色素, ベニコウジ黄色素
酸化防止剤	γ-オリザノール, コメヌカ抽出物, フェルラ酸, 酵素処理ルチン
製造用剤等	<b>ブドウ種子抽出物</b> , ラクトフェリン濃縮物, カラシ抽出物
強化剤等	ヘスペリジン, 骨焼成カルシウム, サンゴ未焼成カルシウム
乳化剤	植物性ステロール, 動物性ステロール
甘味料	酵素分解カンゾウ, L-ラムノース
増粘安定剤	ウェランガム
酸味料等	フィチン酸
苦味料	カフェイン(抽出物)
保存料	ペクチン分解物

## ●既収載既存添加物規格改正13品目: **ステビア抽出物**など

第9版公定書に既存添加物(酵素62品目+酵素以外25品目)87品目が収載される予定。

# 既存添加物の消除(=使用不可)



流通実態がないもの, 安全性に問題があると認められるものを定期的に消除していく.

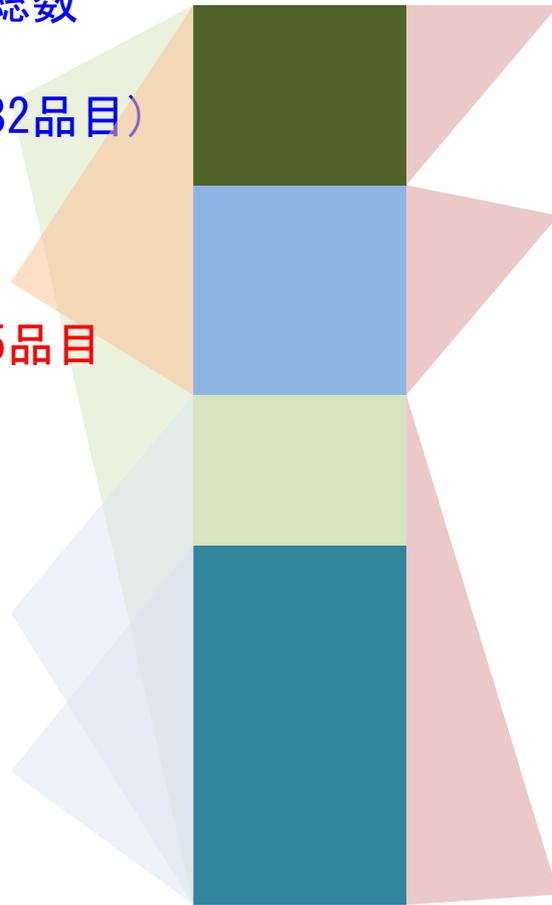
# 既存添加物の規格設定の課題と対応

既存添加物総数  
365品目  
(枝番込み382品目)

規格未設定  
枝番込み165品目

9版公定書  
217品目

8版公定書  
130品目



● 第4次消除対象（平成 ?年）： ?品目  
流通実態がない，自主規格がない  
安全性・有効性に問題のあり

● 規格設定推進品目  
業界

- 自主規格の作成・質の向上
- 規格値・試験データの蓄積・検証

国・研究機関

- 規格化の実現可能性がある品目を中心に公的な規格設定を推進
- 試験・研究：新分析法の開発 MS, NMR
- 分析用標準品の供給体制

● 国際整合性・改正品目

規格未設定165品目(枝番込み)について、  
消除，または，規格化を推進

# 既存添加物の規格設定

## ご清聴ありがとうございました.

第12回 食品安全フォーラム  
日本薬学会長井記念ホール  
2014年11月28日(金)

国立医薬品食品衛生研究所  
食品添加物部 第2室 杉本 直樹