

980581

平成10年度厚生科学研究費補助金
生活安全総合研究事業
H10-生活-024
食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究
報告書

平成10年度 厚生科学研究費補助金
生活安全総合研究事業 報告書 目次

食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究

1. 総括研究報告書 国立医薬品食品衛生研究所 山田隆
2. 分担研究報告書 規格試験法、分析法からの有害試薬の除去
国立医薬品食品衛生研究所 山田隆
3. 分担研究報告書 既存添加物の規格設定のための検討
国立医薬品食品衛生研究所 米谷民雄
協力研究報告書 日本食品添加物協会 別添1 後ろへ
協力研究報告書 日本香料工業会 別添2 後ろへ
4. 分担研究報告書 既存添加物の主要成分の構造に関する研究
東亜大学 義平邦利 別添3 後ろへ
5. 分担研究報告書 食品中の食品添加物の定量法の作成とその実態調査
武庫川女子大学 伊藤誉志男
6. 分担研究報告書 食品中の未許可添加物の分析法の開発
国立医薬品食品衛生研究所 川崎洋子
7. 分担研究報告書 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定
神戸学院大学 藤井正美
8. 分担研究報告書 行政検査結果を基にした食品添加物の使用濃度と摂取量の推定
国立医薬品食品衛生研究所 石綿肇
9. 分担研究報告書 ゴム製器具・容器包装中の間接添加物に関する研究
国立医薬品食品衛生研究所 河村葉子
10. 別添1 分担研究報告書 既存添加物の規格設定のための検討
に関する協力研究報告書
既存添加物の規格化に関する調査研究
日本食品添加物協会 小見邦雄
11. 別添2 分担研究報告書 既存添加物の規格設定のための検討
に関する協力研究報告書
JECFA規格と日本で流通している香料化合物の規格との比較研究
日本香料工業会 川村 洋
12. 別添3 分担研究報告書 既存添加物の主要成分の構造に関する研究
東亜大学 義平邦利

総括研究報告書

食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究

主任研究者 山田 隆（国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部長）

研究要旨 第七版食品添加物公定書中の人体又は環境に有害な試薬を使用している品目を検索し、次回の改訂の資とした。

クチナシ青色素について規格設定時に問題となりそうな項目について検討した。また、JECFA規格のない既存添加物に対する業界自主規格の検討、及びJECFA規格のある香料化合物品目における市販製品の適合性の検討を行った。

ベニコウジ色素の市販品より、既知のものと異なる5種類の色素を得、構造を決定した。

食品中のショ糖脂肪酸エステルを、食品より抽出後固相抽出によりショ糖と分離、加水分解後アンペロメトリー検出によるHPLCを行うことで分析出来た。

パラヒドロキシ安息香酸メチルを他のパラベン類と同時分析できた。アリテームを他の合成甘味料と同時分析できた。

食品添加物の製造業者と輸入業者に対するアンケート調査をまとめ、指定添加物348品目の一日平均摂取量の推定が出来た。

1996年度の安息香酸、デヒドロ酢酸、p-ヒドロキシ安息香酸、プロピオン酸、ソルビン酸の摂取量は、1994年度と大きな差はなかった。

シリコーンゴム中にBHT、フタル酸エステル類、ジメチルシロキサン環状オリゴマーが認められた。これらの物質の20%エタノールへの溶出は認められなかった。

分担研究者

米谷 民雄（国立医薬品食品衛生研究所）

義平 邦利（東亜大学）

伊藤 誉志男（武庫川女子大学）

川崎 洋子（国立医薬品食品衛生研究所）

藤井 正美（神戸学院大学）

石綿 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

河村 葉子（国立医薬品食品衛生研究所）

協力研究者

小見 邦雄（日本食品添加物協会）

川村 洋（日本香料工業会）

A. 研究目的

第七版食品添加物公定書が出版され、「食品中の食品添加物分析法」（食品化学課編）も大幅な改正が見込まれている。一方、既存添加物名簿には収載されているが規格がない品目も多い。これらについては、規格案を設定するための調査研究が必要である。そのため、一部既存添加物の組成、主成分の構造を明らかにする。

食品添加物の安全性を確保するためには、その摂取量調査が必要不可欠である。これまで、食品添加物の摂取量調査は、マーケットバスケット方式に

よる調査が行われてきているが、これを補完するための調査も必要である。そのため、生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定、並びに行政検査結果を基にした食品添加物の使用濃度と摂取量の推定を行い、これら3方法による推計結果を比較、検討し、出来るだけ真に近い摂取量を推計する必要がある。

また、現在の「食品中の食品添加物分析法」に記載されている方法をより良くするため、あるいは、それに載っていないものを分析するために、新しい分析法の開発が必要である。その一環として、本年は、ショ糖脂肪酸エステルの分析法の検討を行った。現在の「食品中の食品添加物分析法」には、我が国で使用が許可されている食品添加物の分析法のみが記載されているが、輸入食品が種類、量ともに増加している今日、我が国では許可されていない食品添加物の分析法を確立することも必要である。今年度は、諸外国で使用されている保存料であるパラオキシ安息香酸メチル、及び、近年使用を許可する国が増加してきている甘味料のアリテームの食品中からの分析法を検討した。

また、今後使用される分析法には、環境や人体に対する負荷を減らすため、使用する溶媒等の選択に注意しなければならない。今年度は、新たに発刊された第七版食品添加物公定書中で、人体や環境に有害なおそれのある化合物を使用している試験法を抜き出す作業を行い、次期改訂への資とすることを目的とした。

ゴム製器具・容器包装は、用途が広く、使われる添加剤も多数にのぼるにもかかわらず、これまでの報告は少ないため、シリコーンゴムについて残存化学物質及びそれらの溶出傾向等を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 規格試験法，分析法からの有害試験薬の除去

新たに発刊された「第七版食品添加物公定書」から、有害と考えられる試験薬、すなわち、水銀化合物、シアン化合物、ベンゼン、四塩化炭素、ジオキサン、クロロホルム、ジクロロメタンなどのハロゲン化合物、二硫化炭素を使用している試験法を探し、どの品目のどんな試験法において使用されているかを検索した。

2. 既存添加物の規格設定のための検討

I) ①分子量分布の推定は、高速ゲルろ過クロマトグラフィー及びSDSゲル電気泳動で、②メタノール分析はヘッドスペース-GC/FIDで、③アミノ酸分析は、クチナシ青色素の分子量3000以下の画分を集め、PTCアミノ酸に誘導体化後、HPLCにより行った。④吸収スペクトル及び⑤TLCについては、食用青色1号、2号、パテントブルーバイオレット（アシッドブルー1、3）及びスピルリナ色素との比較を行った。TLC条件は、薄層板：アビセルSF、展開溶媒：インプロパノール-アセトン-水（8:7:6）とした。

II) JECFA規格、EU規格、FCC（及びCFR）規格の規格設定の考え方、方法等を参考にしつつ、妥当な成分規格及びその試験法に関して検討した。対象としては、新規に自主規格を設定するもの11品目、自主規格を見直すもの8品目を選定した。

III) 現在JECFA規格がある香料化合物は285品目であるが、その内73品目は公定書既収載であるため、残り212品目を対象として調査した。分析方法は、公定書と同等の場合は、習熟している公定書法を採用した。

3. 既存添加物の主要成分の構造に関する研究

ベニコウジ色素について、市販品の

色素成分を単離し、機器分析を用いて行った。市販色素の実態調査も行った。類縁菌類の文献調査は、JICST等を用いて行った。

4. 食品中の食品添加物の定量法の作成とその実態調査

食品中のショ糖脂肪酸エステル(SFEA)をメタノールにより抽出し、ショ糖とSFEAをC-18を用いた固相抽出により分離除去する。精製されたSFEAをアルカリ加水分解し、生成したショ糖をパルスドアンペロメトリック検出器付きHPLCにより分離定量する。

5. 食品中の未許可添加物の分析法の開発

食品中のパラヒドロキシ安息香酸メチルを、エーテルで溶媒抽出後にSep-Pakアルミナによる固相抽出によってクリーンアップした後、HPLCにより分析した。食品中の甘味料、アリテームを透析後、逆相HPLCすることにより分析した。

6. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

1996, 97年度に開始した食品添加物製造業者・輸入業者からの実需量アンケート調査の回答を精査し、食品添加物の使用量を推定した。

7. 行政検査結果を基にした食品添加物の使用濃度と摂取量の推定

1994年度の全国の地方公共団体の行政検査の結果を集計して、食品中の保存料の平均濃度を求め、これに食品の喫食量に乗じて、摂取量を推計した。食品の喫食量としては、1994年度の厚生科学研究報告書の結果を用いた。本年度は、安息香酸(BA)、デヒドロ酢酸(DA)、*p*-オキシ安息香酸(PB)、プロピオン酸(PA)、及びソルビン酸(SA)について集計を行った。

8. ゴム製器具・容器包装中の間接添加物に関する研究

ほ乳瓶、オシャブリ用乳首、弁当箱、調味料入れ等のパッキング、調理用ゴ

ムベラなど、食品に用いる23検体のシリコーンゴム製品を試料とした。材質試験はシクロヘキサン：2-プロパノール混液で抽出し、GC/MSで同定及び定量を行った。溶出試験は、20%エタノールで60℃30分間及び*n*-ヘプタン25℃60分間溶出の後、濃縮し、GC/MSで測定した。

C 研究結果及び考察

1. 規格試験法、分析法からの有害試験薬の除去

第七版食品添加物公定書中には、水銀化合物を試験に用いている品目4品目、シアン化合物を試験に用いている品目2品目、ベンゼンを試験に用いている品目3品目、四塩化炭素を試験に用いている品目6品目が見いだされた。これらについては、別の試験法を考案する必要がある。クロロホルムを使用している品目はかなりまだ残っているが、これらに対しても、今後慎重に検討する必要がある。

2. 既存添加物の規格設定のための検討

I) ①クチナシ青色素の分子量分布は、検討した3社製品ですべて異なっていた。②メタノール含量は、0.0046~0.0093%であった。また、すべての製品から、エタノールが検出された。③アミノ酸分析では、1製品は主としてProを含んでいたが、他の2製品では、顕著なピークはみられなかった。④クチナシ青色素の極大吸収は、595~598nmであり、スピルリナ色素(616nm)及び合成着色料(612~640nm)とは異なっていた。⑤クチナシ青色素のTLCにおけるRf値は0.17~0.19であり、スピルリナ色素は原点に残り、合成着色料のRf値は0.22~0.59であった。

II) 新規自主規格設定品目においては、主成分の確認方法および定量法に関し総合的に検討した結果、それらの試験法を設定することができた。一方、

自主規格見直し品目にあつては、改定案の妥当性を検討し、各社製品の適合性を確認した。

Ⅲ) 212品目につき日本香料工業会・食品香料委員会の委員会社15社で採用している規格を調査した。そのうち21品目に関しては15社からは規格が集まらなかったが、このことは全ての会社が使用可能な香料原料を一様に使用するのではなく、会社やフレーバーリストの特徴、好みが反映される香料業界の特殊性が現れたと考えられた。

212品目から繁用性と官能基を考慮して29品目を選定し、JECFA規格の項目に従い分析した。分析結果ではほとんどの試料がJECFA規格を満足していたが、一部には純度が低過ぎるもの、酸価が高く経時的変化を示唆するもの等が見られた。一方、JECFA規格において、常温で固体の物質に比重や屈折率を求めていたり、規格幅が異常に広いもの等があり、改正を要望したい点も見られた。

3. 既存添加物の主要成分の構造に関する研究

市販のベニコウジ色素より、5種類の色素成分を新たに単離した。これらは、モナスコルブリン又はルブロパンクタチン系の母核構造を有し、これまで知られているベニコウジ色素とは置換したアミノ酸の種類が異なっていた。JICSTを中心とした文献調査では、*Monascus purpureus* 29件、*Monascus anka* 23件、*Monascus rubia* 21件等を得、成分、安全性、分類、分析法、製法等について調査整理した。

4. 食品中の食品添加物の定量法の作成とその実態調査

SFEAの抽出にはメタノールが最適であった。固相抽出によるショ糖の除去は、C-18を用い、0.5 mol/l リン酸緩衝液20 mlで洗浄した後、メタノール：エーテル(4：1)混液20 mlで溶出する。加水分解を5 mol/Lの水酸化カリウ

ム、25℃で15分間行った後、アンペロメトリー検出器付きHPLCで定量出来た。

5. 食品中の未許可添加物の分析法の開発

パラオキシ安息香酸メチルは、水蒸気蒸留法では他のパラベン類と異なり、回収率が悪かった。エーテルによる直接抽出では、脂肪の含有率が5%以下の試料ではすべてのパラベン類の回収率が良かったが、5%以上の試料では、パラオキシ安息香酸メチル以外のパラベン類の回収率が悪かった。エーテルによる直接抽出の後にSep-Pakアルミナによる精製を行うと、すべてのパラベン類を同時に回収率良く分析できた。甘味料アリテームを、サッカリン、アスパルテーム等他の合成甘味料と同時分析することが出来た。

6. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物348品目について食品向け実使用量及び一日平均摂取量をリスト化する作業を完了した。

7. 行政検査結果を基にした食品添加物の使用濃度と摂取量の推定

総検査件数は112,131検体で、そのうち輸入食品は13,925検体であった。

BAは28,272検体中1,354検体で検出され、平均濃度は基準値の7.8%であった。DAは22,613検体中16検体で検出され、平均濃度は0.00064g/kg、基準値の1.2%であった。PBは18,899検体中6652検体で検出され、平均濃度は基準値の3.2%であった。PAは827検体中59検体で検出され、パンでは検出率(11.5%)、濃度(0.0641g/kg)、基準値に対する比率(2.65)がもっとも高かった。SAは41,520検体中14,588検体で検出され、平均濃度は基準値の14.1%であった。一人1日当たりの摂取量は、BA 11.0 mg、DA 0.047 mg、PB 1.06mg、PA 5.43 mg、SA 26.0mgの結果を得た。1994年度の調査結果と大きな差はなかった。

8. ゴム製器具・容器包装中の間接添

加物に関する研究

材質中に残存する添加剤としては、酸化防止剤のBHT、可塑剤のフタル酸ジブチル(DBP)及びフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP)が検出されたが、検出頻度、検出量ともそれほど高くなかった。そのほかに、すべての試料からジメチルシロキサン環状オリゴマー群が検出された。ジメチルシロキサン環状オリゴマーは、原料の未反応体、及び湿潤剤、充填剤等として添加されたものと推定された。溶出試験の結果は、20%エタノールではいずれの化合物も溶出しなかったが、n-ヘプタンでは、添加剤、ジメチルシロキサン環状オリゴマーともに溶出が認められた。

D 結論

1. 規格試験法、分析法からの有害試薬の除去

第七版食品添加物公定書中のヒト又は環境に有害な試薬を使用している品目を検索し、次回の改訂の資とした。

2. 既存添加物の規格設定のための検討

クチナシ青色素について規格設定時に問題となりそうな項目について検討した。また、JECFA規格のない既存添加物に対する業界自主規格の検討、及びJECFA規格のある香料化合物品目における市販製品の適合性の検討を行った。

3. 既存添加物の主要成分の構造に関する研究

ベニコウジ色素の市販品より、既知のものと異なる5種類の色素を得、構造を決定した。

4. 食品中の食品添加物の定量法の作成とその実態調査

食品より抽出後固相抽出によりショ糖nと分離、加水分解後アンペロメトリ検出によるHPLCを行うことで、食

品中のショ糖脂肪酸エステルが定量出来た。

5. 食品中の未許可添加物の分析法の開発

パラオキシ安息香酸メチルを他のパラベン類と同時分析できた。アリテームを他の合成甘味料と同時分析できた。

6. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

食品添加物の製造業者と輸入業者に対するアンケート調査をまとめ、指定添加物348品目の一日平均摂取量の推定が出来た。

7. 行政検査結果を基にした食品添加物の使用濃度と摂取量の推定

1996年度のBA, DA, PB, PA, SAの摂取量は、1994年度と大きな差はなかった。

8. ゴム製器具・容器包装中の間接添加物に関する研究

シリコーンゴム中にBHT、フタル酸エステル類、ジメチルシロキサン環状オリゴマーが認められた。これらの物質の20%エタノールへの溶出は認められなかった。

E 研究発表

論文発表

高智美, 矢田朋子, 扇間昌規, 伊藤誉志男 他, 日食化誌, 4, 93-98 (1997)

川崎洋子, 加藤千晶, 石綿 肇, 山田隆: 食衛誌 39, 297~302 (1998)

学会発表

平澤適子, 岡田安代, 扇間昌規, 伊藤誉志男, 第48回日本薬学会近畿支部大会

F 知的所有権の取得状況

無し

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

規格試験法，分析法からの有害試薬の除去

分担研究者 山田 隆（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨 第七版食品添加物公定書に，水銀化合物を使用した試薬が未だ多数「試薬・試液」に残っているが，現在使われていないものもある。各条で，水銀化合物を使用する試験を採用しているものが4品目，シアン化合物を使用する試験を採用しているものが2品目，ベンゼンを使用する試験を採用しているものが3品目，四塩化炭素を使用する必要があるものが6品目ある。今後，これらの試薬を使用しない試験法を考案する必要がある。クロロホルムを使用している品目は，かなりあるが，これらに対しても，今後慎重に検討する必要がある。

A. 研究目的

近年，人体や環境に有害な試薬・溶媒を使用しない試験法を作成することが求められるようになってきた。第七版食品添加物公定書では，その作成要領において，「人体及び環境に有害な試薬を用いた試験法の廃止など，人及び環境への影響に配慮した試験法となるよう努める。特に，水銀化合物，シアン化合物，ベンゼン及び四塩化炭素は，原則として，用いない。ジオキサンなどは極力用いない。また，クロロホルム，1,2-ジクロロエタン，ジクロロメタンなどのハロゲン化合物や二硫化炭素の使用については慎重に検討する」としている。しかし，今回の改訂では，変更すべき試験法が，時間的な制約のため作成できなかった項目も多い。どのような試験法に，未だ前記の試薬類が使われているかを調査することは，次回の改訂までに，新たな代替試験法を作成するために必要不可欠である。

B. 研究方法

第七版食品添加物公定書は，本年度末，あるいは来年度はじめに出版される見込みであるが，そのための原稿は作成されている。その中から，前記の試薬を使用している項目を検索した。

C. 研究結果

(a)水銀化合物を用いている 試薬・試液，一般試験法，各条

1. エタノール製臭化第二水銀試液

本項目には，“臭化第二水銀試液，エタノール製を見よ。”と記載されているが，“臭化第二水銀試液，エタノール製”という項目は，試薬・試液には出てこない。

2. 塩化第二水銀 HgCl_2 （特級）

本品は，第七版では，試薬“メタノール，水分測定用”の調製に用いられている。

3. 黄色酸化第二水銀 「酸化第二水銀，黄色を見よ。」と記載されている。

4. 酢酸第二水銀 $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ “（酢酸水銀(II)，特級）”と記載されており，次項で使われている。

5. 酢酸第二水銀試液，非水滴定用 “酢酸第二水銀6gを量り，非水滴定用酢酸を加えて溶かし，100mlとする。”と記載されている。

6. 酸化第二水銀，黄色 HgO “（酸化第二水銀（黄色），特級）”と記載されている。

7. 臭化第二水銀 HgBr_2 “（臭化水銀(II)，特級）”と記載されており，次項で使用している。

8. 臭化第二水銀紙

以上のものは，第七版では“ヒ素試験法”の装置Aを使用する場合に用いることとなっ

ている。しかし、第七版に、各条で装置Aを用いる品目はない。

9. 硝酸第二水銀試液

本品は、第七版では、「1,8-シネオール」の純度試験(6) レゾルシン の項で使用している。

10. ネスラー試液

本品は、第六版では、試薬、「精製水」の純度試験に用いられていた。しかし、第七版では、この項目が無くなったため、使用されていない。

11. 非水滴定用酢酸第二水銀試液

本品は、第七版では、「チアベンダゾール」の定量に用いられている。

12. メタノール、水分測定用

前述のように、塩化第二水銀を用いて調製している。

13. ヨウ化水銀カリウム試液

本品は、第六版では、「コリンリン酸塩」の確認試験に用いられていた。しかし、第七版では、この試験法が変更されたため、使用されていない。

14. 硫酸第二水銀試液

本品は、第七版だが、「クエン酸イソロピル」の確認試験(2)に用いられている。

15. 水銀標準液

本品は、第七版中に、「水酸化カリウム」、「水酸化カリウム液」、「水酸化ナトリウム」、及び「水酸化ナトリウム液」の純度試験において、水銀を定量する際に用いられている。

16. 「アルギン酸ナトリウム」

定量で、無機水銀を用いている。

17. 「クエン酸イソプロピル」

確認試験(2)で硫酸第二水銀試液を用いている。

18. 「1,8-シネオール」

純度試験(6) レゾルシン の項で、硝酸第二水銀試液を使用している。

19. 「ポリイソブチレン」の純度試験(5) 総不飽和物 の項で、酢酸第二水銀を用いている。

(b)シアン化合物を用いている試薬・試液、標

準液、一般試験法、各条

1. 標準液”シアン標準液”及び”シアン標準原液”は「エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム」の純度試験(4)シアン化物 の試験に用いられる。

2. 「エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム」の純度試験(4)シアン化物の試験に用いている。

3. 「グルコン酸亜鉛」の純度試験(1) 重金属 の項で、シアン化カリウム溶液が用いられる。

4. 「硫酸亜鉛」の純度試験(2) 重金属 の項で、シアン化カリウム溶液を用いている。

(c)ベンゼンを用いている試薬・試液、一般試験法、各条

1. 試薬”アルミナ” の吸着度を測定する際に用いられている。しかし、”アルミナ”は第六版では、「水溶性アナトー」の確認試験で用いられていたが、第七版では、この確認試験法が変更になったため、”アルミナ”を用いる試験はない。

2. 試薬”4,4'-テトラメチルジアミノジフェニルメタン”の溶状の試験に用いられている。本品は、”テトラベース・クエン酸試液”の調製に用いられる。”テトラベース・クエン酸試液”は、第六版では、「グルコン酸」の純度試験(6)ペンタクロロフェノールの試験に用いられていた。しかし、第七版では、この項目が削除されたため、この試薬を用いる試験はない。

3. 試薬”モルホリン”の溶状の試験に用いられている。”モルホリン”は、第七版では、「グリセロール」の純度試験(4)塩素化合物 のみで用いられている。

4. 「ヘキサン」の純度試験(5)にベンゼンの規格がある。従って、この項で、ベンゼンを用いるのはやむを得ない。

5. 「ポリイソブチレン」の純度試験(6)低重合物の項で、ベンゼンを用いている。

6. 「リン脂肪酸塩」の確認試験(1)の項で、ベンゼンを用いている。

(d)四塩化炭素を用いる試薬・試液、一般試験

法、各条

1. 試薬”オスミウム酸”の規格の定量の項で用いられている。本品は、”0.1ml/1硫酸第二セリウム溶液”標定の際に用いられている。“0.1ml/1硫酸第二セリウム溶液”は「グルコン酸第一鉄」及び「dl- α -トコフェロール」の定量に用いられている。
2. 試薬”モルホリン”の溶状の試験に用いられている。“モルホリン”は、第七版では、「グリセロール」の純度試験(4)塩素化合物のみで用いられている。
3. 試薬”ヨウ素・四塩化炭素試液”に用いられ、”ヨウ素・四塩化炭素試液”は「ポリイソブチレン」の純度試験(5)総不飽和物の試験にのみ用いられている。
4. 「シリコーン樹脂」の純度試験(1)で用いられている。
5. 「ポリイソブチレン」の純度試験(5)総不飽和物の項で用いられている。

(e) ジオキサンをを用いている試薬・試液，一般試験法，各条

1. 試薬”ヒドリンダンチン”の溶状の試験に用いられている。試薬”ヒドリンダンチン”は、第六版では、「アスパルテーム」の確認試験にのみ用いられていたが、第七版では、この試験法が変更となった。
この他に、第七版中でジオキサンをを用いている試薬・試液，一般試験法，各条は無い。

(f) クロロホルムを使用している試薬・試液，一般試験法，各条

1. 試薬” α -L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル”の純度試験として、薄層クロマトグラフィーを行う際の移動相として使用している。
2. ”三塩化アンチモン試液”の溶媒として使用している。
3. ”ジチゾン試液，亜鉛用”の溶媒として用いている。本試液は、第六版では、「活性炭」の純度試験で亜鉛を測定する際に用いられていたが、第七版では、この試験法が変更されて、本試液を使用しなくなった。
4. 試薬”パラフェニルフェノール”の溶状を

試験するのに用いられている。本試薬は、「オルトフェニルフェノール」の純度試験に用いられている。

5. 試薬”5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸”の純度試験の薄層クロマトグラフィーの移動相として用いられている。
6. 「塩化カリウム」の純度試験(2)臭化物の試験に用いられている。
7. 「カラメルI」の純度試験(7)4-メチルイミダゾールの試験で、薄層クロマトグラフィーの移動相として用いられている。
8. 「 β -カロテン」の確認試験(1)及び(2)に用いられている。
また、純度試験(2)溶状及び(5)吸光比にも用いられている。
9. 「希釈過酸化ベンゾイル」の確認試験及び定量法に用いられている。
10. 「グリセリン脂肪酸エステル」の純度試験(4)ポリオキシエチレンの試験に用いられている。
11. 「シェラック」の中の「白シェラック」の純度試験(4)ロシン及び(5)ロウの試験に用いられている。
12. 「ジフェニル」の純度試験(3)ナフタレン及びその誘導体の試験に用いられている。
13. 「ショ糖脂肪酸エステル」の純度試験(2)ジメチルホルムアミドの試験に用いられている。
14. 「ソルビタン脂肪酸エステル」の純度試験(4)ポリオキシエチレンの試験に用いられている。
15. 「ダンマル樹脂」の確認試験(2)及び純度試験(3)ヨウ素価の試験に用いられている。
16. 「デュナリエラカロテン」の確認試験に用いられている。
17. 「ニンジンカロテン」の確認試験(1)及び(2)の試験に用いられている。
18. 「パーム油カロテン」の確認試験(1)及び(2)の試験に用いられている。
19. 「ビタミンA脂肪酸エステル」の確認試験(1)及び純度試験(2)クロロホルム不溶物の試験の用いられている。

20. 「ビタミンA油」の確認試験（1）及び純度試験（2）クロロホルム不溶物の試験の用いられている。

21. 「プロピレングリコール脂肪酸エステル」の確認試験（2）の試験において、薄層クロマトグラフィーの移動相として使用している。

22. 「粉末ビタミンA」の確認試験で用いられている。

23. 「ミツロウ」の純度試験（3）過酸化物質の試験に用いられている。

24. 「リボフラビン」の純度試験（2）ルミフラビンの試験で用いられている。

25. 「リボフラビン酪酸エステル」の純度試験（1）溶状の試験で用いられている。

26. 「レシチン」の純度試験（4）過酸化物質の試験に用いられている。また、水分の試験に用いられている。

(g)二硫化炭素を用いている 試薬・試液、一般試験法、各条

1. 「ショ糖脂肪酸エステル」の純度試験（2）ジメチルホルムアミドの項で使用されている。

第七版で、二硫化炭素を用いているのは、この項目のみである。

D. 考察

(a)水銀化合物 今回の調査結果では、第七版食品添加物公定書の「試薬・試液」では、まだ、かなりの種類の水銀化合物が存在している。しかし、この中には、公定書の一般試験法や各条では使用されていないものもかなりある。そのような試薬は、第八版以降は削除して差し支えないと考えられる。その試薬は、

1. エタノール製臭化第二水銀試液
2. 黄色酸化第二水銀 「酸化第二水銀、黄色
3. 酢酸第二水銀
4. 酢酸第二水銀試液、非水滴定用 「酢酸第
5. 酸化第二水銀、黄色
6. 臭化第二水銀
7. 臭化第二水銀紙
8. ネスラー試液
9. ヨウ化水銀カリウム試液

また、規格において、水銀の残存が一定以下であることを確認するために、用いるのはやむを得ないと考えられる試薬・試液がある。それは、水銀標準液で、本品は、第七版中で、「水酸化カリウム」、「水酸化カリウム液」、「水酸化ナトリウム」、及び「水酸化ナトリウム液」の純度試験で用いられる。

以下に、各条の試験で水銀化合物が用いられており、次回の改訂の際には、検討した方がよいと思われるものを挙げる。

1. 「アルギン酸ナトリウム」
2. 「クエン酸イソプロピル」
3. 「1,8-シネオール」
4. 「ポリイソブチレン」

(b)シアン化合物

標準液”シアン標準液”及び”シアン標準原液”は「エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム」の純度試験（4）シアン化合物の試験に用いられるが、これは、やむを得ないものと考えられる。

以下に、各条の試験でシアン化合物が用いられており、次回の改訂の際には、検討した方がよいと思われるものを挙げる。

1. グルコン酸亜鉛
2. 「硫酸亜鉛」

(c)ベンゼン

1. 試薬”アルミナ”
2. 試薬”4,4'-テトラメチルジアミノジフェニルメタン”

の試験の中でベンゼンが用いられているが、これらの試薬は第七版食品添加物公定書では用いられていないので、第八版からは削除して差し支えないと考えられる。

また、「ヘキサン」の純度試験で用いているが、この場合は、ベンゼンの残留規格であるため、この項で、ベンゼンを用いるのはやむを得ないと考えられる。

以下に、各条の試験でシアン化合物が用いられており、次回の改訂の際には、検討した方がよいと思われるものを挙げる。

1. 試薬”モルホリン”の溶状の試験に用いられ、”モルホリン”は、第七版では、「グリセロール」の純度試験で用いられている。
2. 「ポリイソブチレン」

3. 「リン脂肪酸塩」

(d) 四塩化炭素

以下の試験で四塩化炭素が用いられており、次回の改訂の際には、検討した方がよいと思われる。

1. 試薬”オスミウム酸”の規格で用いられ、本品は、”0.1mol/l硫酸第二セリウム溶液”標定の際に用いられている。”0.1mol/l硫酸第二セリウム溶液”は「グルコン酸第一鉄」及び「dl- α -トコフェロール」の定量に用いられている。
2. 試薬”モルホリン”の試験に用いられ、本品は「グリセロール」のみで用いられている。
3. 試薬”ヨウ素・四塩化炭素試液”に用いられ、本品は「ポリイソブチレン」の試験にのみ用いられている。
4. 「シリコーン樹脂」
5. 「ポリイソブチレン」

(e) ジオキサン

ジオキサンは、試薬”ヒドリダグンチン”の試験に用いられ、本品は、第七版食品添加物公定書では用いられていないので、第八版からは削除して差し支えないと考えられる。

(f) クロロホルム

第七版食品添加物公定書では、未だ多くの箇所でクロロホルムが用いられている。クロロホルムは、以上で述べた5種類の化合物と異なり、「使用を慎重に検討する」となっており、必ずしも、方法の変更を考える必要はない。

クロロホルムを使用している試薬のうち、第七版食品添加物公定書では用いられなくなったので、削除して良いと思われるものは、”ジチゾン試液，亜鉛用”である。

(g) 二硫化炭素

「ショ糖脂肪酸エステル」の試験でのみ使用

されている。

E. 結論

水銀化合物を使用した試薬が多数「試薬・試液」にあるが、現在使われていないものも多い。しかし、各条で、水銀化合物を使用する試験を採用しているものが4品目有り、これらは、今後、改訂していかなければならない。

各条でシアン化合物を使用する試験を採用しているものが2品目有り、これらは、今後、改訂していかなければならない。

各条でベンゼンを使用する試験を採用しているものが3品目有り（ベンゼンを使用する試験を用いる規格を採用している試薬を用いている品目を含む）、これらは、今後、改訂していかなければならない。

四塩化炭素を使用する試験を用いる規格を採用している試薬を用いて試験を行う品目が各条中に3品目有り、四塩化炭素を用いる試験法を採用しているものが3品目有る。これらは、今後、改訂していかなければならない。

ジオキサンを用いている試験法は、第七版食品添加物公定書にはない。

クロロホルムを使用している試験法を採用している品目は、未だ多数ある。

二硫化炭素を使用している品目は、1品目のみである。

クロロホルムと二硫化炭素を使用している品目については、慎重に検討する必要がある。

F. 研究発表

無し。

G. 知的所有権の取得状況

無し。

厚生科学研究費補助金（食品衛生調査研究事業）
分担研究報告書

既存添加物の規格設定のための検討

分担研究者：米谷 民雄（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部室長）
協力研究者：佐藤 恭子（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官）
小見 邦雄（日本食品添加物協会常務理事）
川村 洋（日本香料工業会食品香料委員会副委員長）

研究要旨 既存添加物の規格設定のための検討として、I) 既存添加物のクチナシ青色素につき、規格設定時に問題となりそうな試験項目につき検討を加えるとともに、II) JECFA 規格のない既存添加物品目に対する業界自主規格の検討、及びIII) JECFA 規格のある香料化合物品目における市販製品の適合性の検討を行った。

A. 研究目的

化学的合成品以外の食品添加物リストに記載されていた天然添加物は、平成8年の食品衛生法の改正により、既存添加物、天然香料、一般飲食物添加物（一般に食品として飲食に供されている物であって添加物として使用されるもの）に分類された。特に、既存添加物は従来の天然添加物と異なり、公的に認知されたものと認識されている。そのため、安全性についての調査とともに、その規格基準設定が急務となっている。

そこで、本研究においては、既存添加物の規格設定のための研究として、まずI) 酵素反応を用いて製造される着色料品目につき、規格設定時に問題となると考えられる項目につき、実験的研究を行うことにした。平成10年度はクチナシ青色素を対象とし、①分子量分布の推定、②クチナシ赤色素で原料イリド配糖体のエステル加水分解の際に生成するとされるメタノール、について検討した。また、③原料のタンパク質分解物の組成を知るために、色素中のアミノ酸の分析を行った。

さらに、市販クチナシ青色素の確認試験として、④吸収スペクトル及び⑤薄層クロマトグラフィー（TLC）が応用できないかについて検討した。

一方、我が国で規格を設定する際には、国際的規格（JECFA 規格）と整合性をとる必要がある。天然添加物には JECFA 規格がある品目とない品目があるが、JECFA 規格がある既存添加物品目については、今回作成された第7版食品添加物公定書において、多くの品目につき成分規格が設定されたところである。そこで、II) JECFA 規格のない既存添加物品目に対して、日本食品添加物協会に自主規格の検討を依頼するとともに、III) JECFA 規格のある香料化合物品目について日本香料工業会に市販製品の JECFA 規格適合性について検討を依頼した。

以下に I の検討結果を詳しく報告する。なお、II 及び III の検討結果については、それぞれ別添 1 及び別添 2 として提出するので、それらを参照されたい。

I) 既存添加物クチナシ青色素に関する実験的研究

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

市販クチナシ青色素 3 社 3 製品 (BI、BII、BIII と略す)、市販スピルリナ色素 1 製品、乳糖 1 製品及びデキストリン 2 社 2 製品：日本食品添加物協会を通じて入手

食用青色 1 号

食用青色 2 号

アシッドブルー 1 : Patent Blue Violet (C.I. 42045; Acid Blue 1)、色素含量約 65%、シグマ製

アシッドブルー 3 : Patent Blue Violet (C.I. 42051; Acid Blue 3) カルシウム塩、色素含量約 50%、シグマ製

プルラン : STANDARD P-82 (p-100: MW=10.0×10⁴、p-50: MW=4.80×10⁴、p-20: MW=2.37×10⁴、p-10: MW=1.22×10⁴、p-5: MW=0.58×10⁴)、昭和電工製

Tris[hydroxymethyl]aminomethane (トリス) : TRIZMA BASE、シグマ製

Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride (トリス塩酸) : TRIZMA Hydrochloride、シグマ製

N-tris(hydroxymethyl)methylglycine (トリシン) : 電気泳動用純度試薬、日本バイオラッドラボラトリーズ (以下バイオラッドと略す) 製

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) : 難溶性蛋白質研究用特製試薬、ナカライテスク製

2-メルカプトエタノール : 生化学用、和光純薬製

分子量スタンダードタンパク質 : カレイドスコープポリペプチドスタンダード (着色済み、insulin 分子量 3,500、aprotinin 分子量 8,200、lysozyme 分子量 15,600、soybeantrypsin inhibitor 分子量 28,700、carbonicanhydrase 分子量 37,600 の混合物)、バイオラッド製

電気泳動用ゲル : レディーゲル J10-20% 12well、バイオラッド製

アセトニトリル及びアセトン : HPLC 用、片山化学工業製

イソプロパノール : HPLC 用、和光純薬工業製

エタノール : 残留農薬分析用、片山化学工業製

アンモニア水 : アンモニア含量 28%、国産化学製

イソチオシアン酸フェニル (PITC) : アミノ酸配列分析用、和光純薬工業製

アミノ酸標準品 (15 種) : L-アミノ酸 (アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、セリン (Ser)、グリシン (Gly)、アラニン (Ala)、プロリン (Pro)、アルギニン (Arg)、チロシン (Tyr)、バリン (Val)、メチオニン (Met)、ロイシン (Leu)、フェニルアラニン (Phe)、リシン (Lys)、スレオニン (Thr)、ヒスチジン (His))、シグマ製

薄層板 : アビセル SF (10×20cm、フナコシ薬品製)、DC-Fertigplatten Kieselgel 60 Art.5721 (20×20cm 0.25mm、Merck 製)、DC-Fertigplatten Polyamid 11 F 254 Art. 5557 (20×20cm 0.15mm、Merck 製)、DC-Fertigplatten RP-8 F 254S Art.15424 (10×20cm 0.25mm、Merck 製)

他の試薬はすべて試薬特級品を用いた。

水は、ミリ Q SP Standard (日本ミリポア製) により精製して得られた超純水 (比抵抗値 18 M Ω · cm 以上) を用いた。

2. 装置及び器具

高速ゲルろ過クロマトグラフィー (HPGFC) には、ポンプ : LC-9A 2 台、システムコントローラー : SCL-6B、紫外可視検出器 : SPD-6AV、示差屈折率検出器 : RID-6A (以上、島津製作所製)、カラムオーブン : 865-CO (日本分光製) に、データ

処理装置として、C-R4AX（島津製作所製）を接続したものをを用いた。

SDS ゲル電気泳動には、電気泳動装置：ミニプロティアンII 1-D セル（バイオラッド製）に、パワーサプライとして Model 3500（TEFCO 製）を接続したものをを用いた。

メタノール分析には、FID 付ガスクロマトグラフ：HP-5890 シリーズ II（Hewlett Packard 社製）を使用した。

バイアル瓶は、ガラス製、容量 25 mL、テフロンコーティングシリコンラバーセパタム及びアルミキャップ付を使用した。

シリンジは、プレッシャーロックシリンジ（2 mL、Precision Sampling 製）を使用した。

アミノ酸分析には、高速液体クロマトグラフ：Shimadzu 6A system（ポンプ：LC-6A 2 台、システムコントローラー：SCL-6A、紫外可視検出器：SPD-6AV、カラムオープン：CTO-6A）に、フォトダイオードアレイ検出器：SPD-M10A、及びデータ処理装置として、C-R4A（以上、島津製作所製）を接続したものをを用いた。

遠心分離器は、H-103RS（コクサン製）を使用した。

真空凍結乾燥機は、FREEZVAC-IC 型（東西通商製）を使用した。

限外ろ過膜器具は、セントリプレッサー 3（分画分子量 3000、Amicon 製）を使用した。

エバポレーターは、GP-150-II（中村製作所製）を使用した。

吸収スペクトルの測定には、自記分光光度計 UV-1600（島津製作所製）を用いた。

3. 高速ゲルろ過クロマトグラフィー（HPGFC）による分子量の推定

1) 試料の調製

市販クチナシ青色素 3 製品、乳糖及びデキストリン 2 製品は、各々 10 mg をはかりとり、0.5 mL の移動相に溶解した。

ブルラン 5 種は、各々 0.5 mg をはかりと

り、200 μ L の水に溶解した。

2) HPGFC の条件

カラムとして、① SB-803 HQ（8.0 mm i.d. \times 300 mm、Shodex 製）または、② TSK-GEL G3000SW（7.5 mm i.d. \times 60 cm、東ソー製）を用いた。いずれのカラムの場合も、注入量 10 μ L、移動相として 10 mmol/L Tris-HCl 緩衝液（pH7.4）、10 mmol/L Tris-HCl 緩衝液（pH7.4）+0.2 mol/L 塩化リチウム、0.1 mol/L 硫酸ナトリウムあるいは 0.1 mol/L 硫酸ナトリウム - アセトニトリル（9 : 1）を用い、紫外可視検出器の検出波長 598 nm で検出した。カラム温度は、カラム①は 30 $^{\circ}$ C、カラム②は室温とした。また、流速は、カラム①は 0.6 mL/min、カラム②は 1.0 mL/min とした。

なお、10 mmol/L Tris-HCl 緩衝液（pH 7.4）は、トリス塩酸 13.2 g 及びトリス 1.95 g を水に溶解し 1 L とし、さらに 10 倍希釈して用いた。

4. SDS ゲル電気泳動による分子量の推定

1) バッファアの調製

サンプルバッファ A は、水 2.0 mL、0.5 mol/L トリス - 塩酸水溶液（トリスを塩酸で pH6.8 に調整）3.2 mL、グリセリン（80 W/V%）1.0 mL、10% SDS 水溶液 1.6 mL を混和して調製した。サンプルバッファ B は、サンプルバッファ A 1.56 mL に、2-メルカプトエタノール 40 μ L を混和して調製した。

泳動バッファア（トリス - トリシン系）は、トリス 12.1 g（最終濃度 100 mmol/L）、トリシン 17.9 g（最終濃度 100 mmol/L）、SDS 1 g（最終濃度 0.1 %）を精製水を用いて 1L に定容して調製した。

2) 試料溶液の調製

試料 BI、BII、BIII を、各々 40 mg はかりとり、200 μ L の水に溶解した。そのうち、各々 50 μ L ずつをエッペンドルフチュ

ープ2本にはかり取り、一方には、200 μ Lのサンプルバッファ A を加え試料溶液とした。もう一方には、200 μ Lのサンプルバッファ B を加え、ふたをして 95 $^{\circ}$ C、4分間加熱した後、放冷し、還元型試料溶液とした。

3) サンプルのアプライ及び電気泳動

電気泳動槽にセットしたゲルのウェルに各試料溶液 (15 μ L) あるいは分子量スタンダードタンパク質をアプライし、200 V で 23 分間電気泳動を行った。

5. メタノール分析

1) GC 条件

カラム：キャピラリーカラム DB-1、0.32 mm i.d. \times 30 m、膜厚 0.32 μ m、J&W Scientific 社製、注入方法：split 注入法、split 比 3.4、カラム温度：50 $^{\circ}$ C (6 min) \rightarrow (10 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 150 $^{\circ}$ C (8 min)、注入口温度：100 $^{\circ}$ C、検出器温度：150 $^{\circ}$ C、キャリアーガス：He、注入量：1 mL

2) 標準溶液の調製

標準原液：メタノール、エタノール、アセトン及びイソプロパノールは、約 1 g をそれぞれ精密に量り、水を用いて 100 mL にしたものを標準原液とした。

定量用標準溶液：標準原液を適宜希釈して、種々の濃度の標準物質を含む水溶液を調製した。

3) 分析方法

試料 1 g (または 0.1 g) をあらかじめ攪拌子を入れたバイアル瓶にはかり取り、水 2 mL、及び標準溶液または水 0.2 mL を添加し、さらにイソプロパノール溶液 (2 mg/ml) 20 μ L を加えて、クリンパーを用いてキャップを密封した。スターラーで 5 分間攪拌し、直ちに気相 1 mL をガスタイトシリンジで採取後、ガスクロマトグラフに注入し、内部標準法により定量した。

6. アミノ酸分析

1) 試料及び試薬の調製

BI、BII、BIII、それぞれ 50 mg を水 50 mL に溶解した。それらを限外ろ過膜器具を用いて遠心分離器 (回転数：3500 r.p.m.、温度：25 $^{\circ}$ C、時間：60 分間) にかけて、分子量 3000 以下の画分を集め、凍結乾燥した。得られた分子量 3000 以下の画分 (BI 28.8 mg、BII 30.5 mg、BIII 32.2 mg) を試料とした。

試料を、エタノール-水-トリエチルアミン-PITC (7:1:1:1) の溶液 100 μ L に溶かし、15 分放置した後、エバポレーターを用いて減圧乾燥させた。残留物に、50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) -アセトニトリル (97:3) の溶液 100 μ L を加え、よく溶かして試料液とした。

2) HPLC 条件

カラムとして、ODS 80T_M (4.6 mm i.d. \times 150 mm) を用い、紫外可視検出器の検出波長 254 nm、フォトダイオードアレイ検出器の検出波長 200 ~ 600 nm、流速 1 mL/min、注入量 10 μ L、カラム温度 40 $^{\circ}$ C で、A 液 = アセトニトリル - 0.1 mol/L 過塩素酸ナトリウム含有 50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) (3:97)、B 液 = アセトニトリル - 50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) (50:50) を用いた以下のグラジエント条件で分析した。

0 ~ 20 分、0 ~ 75% B (直線グラジエント) ; 20 ~ 21 分、75 ~ 100% B (直線グラジエント) ; 21 ~ 26 分、100% B

7. 吸収スペクトル

試料 BI、BII、BIII、RI、RII は、各々 1 mg/mL となるよう水に溶解した。

スピルリナ色素は、0.4 mg/mL、食用青色 1 号、食用青色 2 号、アシッドブルー 1 及びアシッドブルー 3 は、2 μ g/mL、となるよう水に溶解した。それぞれ、200 nm ~

800 nm で測定した。

8. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

1) 試料溶液の調製

BI、BII、BIII 及びスピルリナ色素は 10 mg/100 μ L、食用青色 1 号、食用青色 2 号、アシッドブルー 1 及びアシッドブルー 3 は 1 mg/mL となるよう水に溶解した。

2) TLC 条件

薄層板としてアピセル SF、展開溶媒としてイソアミルアルコール-アセトン-水 (8:7:6) を用い、それぞれの試料溶液 0.5 μ L をスポットし、展開させた。

C. 研究結果

1. 分子量の推定

クチナシ青色素は、アカネ科クチナシ (*Gardenia augusta* MERR.var. *gardiflora* HORT.) の果実の抽出液に含まれる geniposide (イリドイド配糖体の 70 % を占めている、構造式を Fig. 1 に示す) をはじめとする各種のイリドイド配糖体 (これまでに 9 種類が単離されている)¹⁾ が、食用酵素 β -グルコシダーゼにより genipin (構造式を Fig. 2 に示す) をはじめとする種々のアグリコンとなり、さらにこれらのアグリコンが、タンパク質分解物中の一級アミノ基と、空气中で酸化的に重合してできたものである。クチナシ青色素の生成過程を Fig. 3 に示す。その反応過程において、アミノ基の窒素による、アグリコンの酸素への置換等が起こり、重合が進むものと考えられる²⁾。クチナシ青色素は、高分子構造を持つものであると推定されることから、高速ゲルろ過クロマトグラフィー (HPGFC) によるクチナシ青色素の分子量の推定を試みた。

はじめに、市販クチナシ青色素について、カラムとしてポリマー系カラム (ポリヒドロキシメタクリレート) を担体とする Shodex SB-803HQ) を、移動相として、ペプチドの

HPGFC に用いられる Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) を用いて、HPGFC を行った。クチナシ青色素 3 製品のクロマトグラムを Fig. 4 に示す。クチナシ青色素 3 製品は、いずれも、紫外可視検出器 (VIS、測定波長 598 nm) と示差屈折率検出器 (RI) で得られたクロマトグラムのパターンが異なっていた。天然着色料の中には、安定化、標準化のために、乳糖あるいはデキストリンが加えられているものがある³⁾ ことから、これらの色素には、乳糖等が添加されているものと考えられた。そこで、乳糖及びデキストリンについて、クチナシ青色素と同濃度の試料溶液を調製し、クチナシ青色素の場合と同条件で、HPGFC を行った。示差屈折率検出のクロマトグラムを Fig. 5 に示す (乳糖のピークが大きかったため乳糖の部分のみ縮小率を大きくした)。同じデキストリンでも、製造業者により、分子量分布が異なることが明らかとなった (Fig. 5)。また、すべてのクチナシ青色素の示差屈折率検出のクロマトグラムが、デキストリン B のクロマトグラムと同様であったことから、市販クチナシ青色素中には、デキストリンが添加されているものと考えられた。さらに、クチナシ青色素とデキストリンは、同濃度の試料溶液で同程度のピーク面積を示すことから、市販クチナシ青色素には、かなりのデキストリンが含まれていると考えられた。

クチナシ青色素は、イリドイド化合物とアミノ基の反応後、酸化的に重合したものであることから、クチナシ青色素には、genipin に存在するカルボキシル基が保持され、イオン性を帯びているものと考えられる。イオン性のポリマーの場合、イオンを含まない水溶液中ではポリマーチェーンが伸び、見かけ上、分子が長大化するが、移動相に強電解質を添加することにより、長大化を防ぐことができる。そこで、強電解質を含む移動相で HPGFC を行った。試料 BI、BII 及び BIII

の結果をそれぞれ Fig. 6、7 及び 8 に示す。

Tris-HCl 緩衝液に、強電解質である塩化リチウムを加えた移動相を用いて HPGFC を行った場合、いずれのクチナシ青色素でも、示差屈折率検出のクロマトグラムパターンはほとんど変わらなかった (Fig. 6 B、Fig. 7 B、Fig. 8 B) が、VIS のクロマトグラムにみられるピークの保持時間は Tris-HCl 緩衝液のみに比べ、長くなった。しかし、ピークは小さくなり、テーリングを起こしていたため、色素成分がカラムに吸着されたものと考えられた。0.1 mol/L 硫酸ナトリウムを移動相とした場合には、さらにピークは小さくなり (Fig. 6 C、Fig. 7 C、Fig. 8 C)、これにアセトニトリルを添加したところ、Tris-HCl 緩衝液に塩化リチウムを加えた場合と同様のクロマトグラムとなった (Fig. 6 D、Fig. 7 D、Fig. 8 D)。

カラムへの吸着は、genipin 由来の芳香族性による hydrophobic interaction のためと考えられた。そこで、芳香族化合物の吸着が少ないシリカ系カラム (TSKgel G3000SW) を用いて、ポリマー系カラムの場合と同様の移動相により、HPGFC を行った。試料 BI、BII 及び BIII の結果を Fig. 9、10 及び 11 に示す。示差屈折率検出のクロマトグラムパターンはカラムの違いにより変化した。また、塩化リチウムを移動相に添加した場合に、ピーク面積が大きくなった。Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) を移動相とした場合、試料 BI では、色素はカラムに保持されなかった (Fig. 9 A)。また、試料 BII 及び BIII ではカラムに保持されたものの、ピークの裾が波打っていた (Fig. 10 A、Fig. 11 A)。しかし、この原因については分からなかった。他の移動相を用いた場合、試料 BI では、ポリマー系カラムに比べ、テーリングは小さいものの、ピーク面積も小さかった (Fig. 9 B ~ D)。試料 BII 及び BIII については、ほとんどの場合、テーリングは小さく、ピーク面積は大

きかったが、試料 BIII では、0.1 mol/L 硫酸ナトリウムを移動相とした場合にテーリングが観察された (Fig. 10 B ~ D、Fig. 11 B ~ D)。また、保持時間に対するアセトニトリルの影響はみられなかった (Fig. 9 D、Fig. 10 D、Fig. 11 D)。

以上の各条件における各ピーク頂点に対して、プルランによる較正曲線を用いて分子量の推定を行った。結果を Table 1 と 2 に示す。

Table 1 に示したように、ポリマー系カラムを用い Tris-HCl 緩衝液を移動相とした場合、試料 BI の推定分子量が最も大きく、75,500 であり、次いで BII は 36,400、BIII が最も小さく 23,300 であった。推定分子量の大小関係は、移動相を変えても、変わらなかった。試料 BI についてみると、移動相の変化により、推定分子量は、75,500 から 2,400 に変化し、31 倍の差があった。また、試料 BII については、推定分子量は 36,400 から 1,500 と 24 倍の差がみられた。BIII については、Tris-HCl 緩衝液以外の移動相ではピークは観察されなかった。

シリカ系カラムでは、Table 2 に示すように、Tris-HCl 緩衝液を移動相とした場合、試料 BI の推定分子量が最も大きく、98,800 であった。試料 BII では、57,300、試料 BIII では、45,800 であった。推定分子量の大小関係は、どの移動相においても変わらなかった。試料 BI についてみると、移動相の変化により、推定分子量は、98,800 から 4,800 に変化し、約 20 倍の差があった。また、試料 BII については、推定分子量は 57,300 から 3,600 と 16 倍の差がみられた。BIII については、推定分子量 45,800 から 1,800 と 25 倍の差があった。

次に、SDS ゲル電気泳動法による分子量の推定を試みた。2-メルカプトエタノールによる還元を行った、あるいは行わなかった、クチナシ青色素について、分子量スタンダードタンパク質 (分子量 3,500、8,200、15,600、

28,700、37,600 の混合物) とともに、電気泳動を行った。結果を Fig. 12 に示す。いずれの色素においても、還元の影響はみられなかった。クチナシ青色素の試料 BI では分子量 3,500 から 15,600 を中心として分子量 3,500 以下から 37,600 以上と推定された。試料 BII の泳動が最も速く、緩衝液フロント⁴⁾ を越えて泳動し、分子量は 8,200 までと予想された。試料 BIII でも、緩衝液フロントを越えて泳動し、分子量は、3,500 以下から 15,600 以上と予想された。SDS ゲル電気泳動法では、試料 BI の分子量が最も大きいという点では、HPGFC の結果と矛盾しないものであったが、BII の方が BIII より泳動が速かった。

2. メタノール

クチナシ赤色素は、イリドイド配糖体のエステル加水分解物とアミノ酸との反応によって得られる。従って、クチナシ赤色素については、エステル加水分解の際にメタノールが生成し、製品に残留する可能性が考えられる。そこで、クチナシ青色素の場合にはメタノールが存在しないのかを調べるため、ガスクロマトグラフィー (GC) によるメタノールの定量を行った。

1) 添加溶媒

ヘッドスペース法によるメタノールの分析では、試料のマトリックスが水の場合、無水エタノールや 5%エタノール溶液の場合に比べ、感度が良いことが報告されている⁵⁾。また、クチナシ青色素は、水への溶解性が高いことから、試料は水に溶解することにした。水の添加量は、試料 1 g を溶解する最少量の 2 mL とした。

2) GC カラムの検討

カラムとしては、キャピラリーカラムを用いることとし、一般的に用いられている DB-1 について検討を行った。

膜厚 0.25 μm のカラム (DB-1、内径 0.25

mm i.d. \times 30 m) を用いて、試料 BII を分析したところ、メタノールのピークが妨害を受けることが明らかとなった。そこで、膜厚 0.32 μm のキャピラリーカラムを用いたところ、メタノールと妨害ピークが分離したため、以後、膜厚 0.32 μm のキャピラリーカラムを用いて GC 分析を行った。

3) 分析条件の検討

ヘッドスペース GC では、バイアル瓶の加熱により、感度が上がると考えられる。しかし、クチナシ青色素の場合、分子内にエステル結合を持つため、水溶液の場合、加熱による加水分解が起こる可能性が考えられた。そこで、色素に水を加え、5 分間かく拌後、直ちにガスクロマトグラフに注入することにした。

4) 内部標準物質の検討と検量線の作成

内部標準物質として、エタノール、アセトン、イソプロパノールについて検討した。色素の中には、エタノールの保持時間にピークが検出されるものがあったため、イソプロパノールを内部標準物質とした。イソプロパノールに対するピーク面積比と濃度から検量線を作成した結果、メタノール 25 ppm から 100 ppm の範囲で直線性が得られた ($R^2 = 0.998$)。

5) メタノールの添加回収率

色素 2 製品各 1.0 g をバイアル瓶にはかり取り、メタノール標準溶液 0.2 mL (メタノール 50 μg) 及びイソプロパノール溶液 20 μL を加えて、ヘッドスペース法により操作したときの回収率は、91%及び 99%といずれも良好であった。この結果から、以下、内部標準法により、製品中のメタノールの分析を行った。

6) 市販品への応用

市販のクチナシ青色素 3 製品について、本法を適用し、メタノールの分析を行った。各色素のクロマトグラムを Fig. 13 に示す。いずれの色素においても、複数のピークが検出さ

れた。

FDA や FAO/WHO では、天然着色料のうち、製造過程で有機溶剤による抽出の工程があるものについて、抽出に使用できる有機溶剤の種類及び製品への残留の許容限度を定めている。FDA ではアナトー、パプリカ色素などの天然着色料について、メタノール、アセトン、イソプロパノール、ヘキサン、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、トリクロロエチレンの許容限度を定めている⁵⁾。クチナシ青色素の製造過程では、これらの有機溶剤は使われていないはずであるが、ピークの同定のために、これらの有機溶剤の保持時間を調べた。その結果、各有機溶剤の保持時間は、メタノール— 3.0分、アセトン— 5.1分、イソプロパノール— 5.4分、ヘキサン— 9.7分、ジクロロメタン— 6.7分、1,2-ジクロロエタン— 10.6分、トリクロロエチレン— 12.3分であった。Fig. 13から、メタノールを除く有機溶剤は、各色素に存在していないと考えられた。なお、内部標準物質として検討したエタノールの保持時間は、4.2分であった。さらに、各試料溶液で検出された保持時間 4.2分のピークについては、標準溶液を加えた試料溶液について GC を行い、エタノールのピークと同定した。

メタノール及びエタノールの定量結果を Table 3 に示す。メタノール含量は、クチナシ青色素では BIII で最も多く 0.0093%、BII は 0.0069%、BI は 0.0046%であった。エタノール含量は、メタノールと同様 BIII が最も多かった。

3. アミノ酸分析

クチナシ青色素 BI、BII、BIII について、限外ろ過膜を用いて得られた分子量 3,000 以下の画分のアミノ酸分析を行った。同様に、アミノ酸標準品 (Asp、Glu、Ser、Gly、Ala、Pro、Arg、Tyr、Val、Met、Leu、Phe、Lys、Thr、His の 15 種) 混合溶液について

も分析を行い、保持時間及びフォトダイオードアレイ検出器における吸収スペクトルによりピークの同定を行った。結果を Fig. 14 に示す。

試料 BI 及び BIII については、目立ったピークはみられなかったが、ピーク保持時間より試料 BI には Ser、Gly、Ala、Pro、Arg、Tyr、Val、Leu、試料 BIII には Asp、Ser、Gly、Ala、Pro、Arg、Tyr、Val、Leu が存在していると予想された (Fig. 14 A, C)。

試料 BII については、12.2 分に大きなピークがみられ、Pro が主に存在していると予想された (Fig. 14 B)。Pro 及びその他予想されたアミノ酸の誘導体を BII の試料溶液に添加し、HPLC を行ったところ、Glu、Ala、Pro、Arg、Val、Leu の存在が確認された。

また、どの試料においても 19.30 分近くに大きなピークが観察された。そこで、Phe (保持時間 19.54 分) の誘導体を添加して HPLC を行ったところ、Phe のピークとは一致せず、フォトダイオードアレイ検出器における吸収スペクトルも一致しなかった。また、このピークがもともと試料中に存在するもののピークかどうかを調べるために、PTC 誘導体化していない試料 BII の分子量 3000 以下の画分を同条件で分析したところ、19.3 分付近にはピークがみられなかった。したがって 19.3 分近くのピークはアミノ酸由来ではないが、PITC との反応により生成したピークと考えられた。

各試料に存在していると確認あるいは予想されたアミノ酸及び残留量を Table 4 に示す。色素中に存在していると確認あるいは予想されたアミノ酸の割合は、試料 BI が 0.011%、試料 BII が 0.024%、試料 BIII が 0.017%、試料 BII では、主なアミノ酸は Pro あった。

4. 吸収スペクトル

クチナシ青色素の確認試験として吸収スペ