

平成11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11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
  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
- 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
- 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  
香料化合物のガスクロマトグラフィーによる含量測定法の検討  
日本香料工業会 川村 洋

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** 厚生省から通知された「食品中の食品添加物分析法」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。

既存添加物のクチナシ赤色素につき、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、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。

市販ベニコウジ色素の光学活性、及び食品からの分析法について検討した。

食品中のルチン関連物質の分析法について検討し、食品中の夾雑物と良好に分離する一斉分析を開発した。

食品中の未許可添加物、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン及びパラオキシ安息香酸メチルの分析法を作成した。

生産量統計を基に、食品添加物の摂取量の推定を行うため、食品添加物製造業者・輸入業者に対し、平成10年度実需量アンケート調査を行った。

1996年度の行政検査結果を基に、保存料、防カビ剤、亜硝酸塩、硝酸塩、二酸化硫黄、ブチルヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキシトルエン、プロピレングリコール、サッカリンナトリウムの摂取量のADIに対する比を求めた。

市販の各種ゴム製品61試料を用いて、材質鑑別、規格試験、食品擬似溶媒（4%酢酸、20%エタノール、*n*-ヘプタン）浸出液による蒸発残留物量測定、紫外部吸光度測定、及び材質の元素分析を行った。天然ゴム製器具について、材質中に残存する化学物質の検討を行った。

分担研究者

米谷 民雄（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）

分担研究者

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）

協力研究者

石橋 享（東京顕微鏡院）

中里光男（東京都立衛生研究所）

分担研究者

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

金子令子、船山恵市、渡辺 悠二（東京都立衛生研究）

馬場 二夫、大嶋智子、尾崎麻子  
(大阪市立環境科学研究所)

#### 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)も大幅に改正、通知された。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、新しく発行された「食品中の食品添加物分析法」に収載され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、ルチン、イソクエルシトリン、クエルセチン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、ヨーロッパ諸国で使用されている甘味料であるネオヘスペリジンジヒドロカルコン(NHDC)、及び、アメリカ及びヨーロッパで使用が許可されているパラオキシ安息香酸メチルを含むパラベン類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「食品中の食品添加物分析法」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、その材質鑑別、及び食品疑似溶媒による化学物質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薬の除去

新たに発刊された「食品中の食品添加物分析法」から、有害と考えられる試薬、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

クチナシ赤色素1社2製品について、種々の検討を行った。

メタノールの分析はヘッドスペース-GC/FID法で、イソプロパノールを内部標準物質として行った。アミノ酸分析は、水溶液を限外ろ過膜器具を用いて、遠心器に繰り返しかけ、分子量3,000以下の画分を集め、イソチオシアン酸フェニルと反応させてフェニルチオカルバミルアミノ酸とし、HPLCにより分析した。

分子量の推定は、高速ゲルろ過クロマトグラフィー、SDSゲル電気泳動、及

び遠心式限外ろ過膜器具で行った。

既存添加物の規格化のための調査研究として、JECFA等で規格のない、甘味料4品目、着色料2品目、保存料・日持ち向上剤3品目、増粘安定剤2品目、酸化防止剤・ビタミン3品目、ガムベース2品目、酵素5品目及び酵素一般規格、調味料・苦味料2品目、乳化剤2品目及び製造用剤1品目について新規自主規格の設定に関して検討した。また、甘味料1品目、着色料9品目、保存料・日持ち向上剤4品目、増粘安定剤4品目、調味料・苦味料3品目、乳化剤2品目及び製造用剤1品目（2規格）についてこれまでの自主規格の見直しに関して検討した。

食品衛生法施行規則別表第2に記載されている香料化合物のうち、代表的な12について、ガスクロマトグラフィーで含量の測定を試みた。

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、キャピラリー電気泳動を用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。

食品中からの分析は、高速液体クロマトグラフィー及び質量分析計を用いて行った。

4. 食品中の食品添加物の定量法の作成とその実態調査

試料よりアセトニトリル：エタノール：2-プロパノール（2：1：1）混液を加えてホモジナイズして抽出、脂肪含有量の多い食品は冷凍冷却による脱脂操作を行う。その後、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフ（ECD-HPLC）、又は紫外検出器付き高速液体クロマトグラフ（UV-HPLC）を用い、分離・定量した。

5. 食品中の未許可添加物の分析法の開発

NHDCは、液状食品は、メタノール-水（2：8）混液で希釈して試料溶液とした。固体試料は、メタノールで抽出した後、メタノール-水（2：8）混液で希釈して試料溶液とした。試料溶液をSep-pak C

18カートリッジに負荷し、メタノール-水（3：7）混液10mlで洗浄したのち、メタノール-水（7：3）混液で溶出した。この溶出液10mlを試験溶液とした。試験溶液をHPLCで分離・定量した。HPLC条件は、カラム：ODS、移動相：アセトニトリル-0.02%リン酸（25：75）混液、検出波長：282nm、カラム温度：40℃である。

パラオキシ安息香酸エステル類は、抽出後、Sep-PakアルミナNカートリッジに負荷し、ジエチルエーテルで洗浄後、メタノールで溶出した。溶出液を濃縮後、アルカリで加水分解してパラオキシ安息香酸とし、HPLCで分離・定量した。

6. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

本調査は、3年を1サイクルとして、継続して調査・研究を行っている。本年度は、第6回調査の初年度であるため、1998年度の食品添加物の製造・輸入実績に関して、食品添加物製造輸入業者462社にアンケート調査表を送付、回収した。

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

1996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、16種類（食品添加物としては33品目に相当）の食品中の平均濃度を求め、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。また、算出された摂取量と、使用基準との比を求め、又、ADIとの比較も行った。

8. ゴム製器具・容器包装中の間接添加物に関する研究

熱分解ガスクロマトグラフを用い、試料を熱分解し、得られた生成物のガスクロマトグラムを同様に操作した標準品と比較して材質を鑑別した。

食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準」に定められたゴム製

(ほ乳器具を除く)の器具又は容器包装の規格試験を行った。

器具又は容器包装一般の試験法に定められている食品擬似溶媒(4%酢酸:pH5以下のもの、20%エタノール:酒類、*n*-ヘプタン:油脂及び脂肪性食品)、浸漬条件(2 ml/cm<sup>2</sup>、60 °C、30分溶出;*n*-ヘプタンのみ25 °C、1時間溶出)を準用し蒸発残留物量を測定した。

天然ゴム製品に関して、材質試験、溶出試験を行い、材質の一部についてはGC/MSにより判定した。

### 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

食品中の食品添加物分析法中には、水銀化合物を試験に用いている品目0品目、シアン化合物を試験に用いている品目3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0品目が見いだされた。このうち、シアン化合物を用いている1品目と、ベンゼンを用いている3品目すべては、参照分析法である。参分析法は、この方法が推奨されるわけではないが、他によい方法もないところから、あくまで参考として収載されているものであり、他によい方法があれば、全く別の方法を採用することが考えられる。シアン化合物をえている2品目は、参照分析法ではないので、別の試験法を考案する必要がある。クロロホルム  
主なアミノ酸は、試料RIではArg、試料RIIではGluであった。ムを使用している品目は9品目(内、参照分析法5品目)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) 両製品から、メタノール28及び13 µg/g、エタノールが、31及び177 µg/g検出された。アセトンと保持時間の

一致するピークが見られたが、確認は出来なかった。

アミノ酸分析を行った結果、分子量3,000以下の画分で主なアミノ酸は、試料RIではArg、試料RIIではGluであった。

クチナシ赤色素の分子量分布は、検討した2製品で異なっており、また、広い範囲に分布していた。

吸収極大は534 nmであり、2製品で収極大は一致するものの、一方が紫外部吸収が強かった。また、ビートレッド及びブドウ果皮色素の吸収極大は529 nm及び534 nmと近く、吸収スペクトルの形状も類似していた。一方、合成着色料とは、形状は異なっていたが、吸収極大近接しているものもあった。

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っては、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) 食品添加物公定書に定められた化学的方法による定量法、内部標準を用いたGC法、内部標準を用いないで、面積百分率によった定量法の値を比較、検討した。面積百分率法の有効性について考察した。

#### 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種類の主色素成分を単離、精製し、O-N置換体のアミノ酸の光学活性を調べたところ、すべてL体であった。いずれの市販品にも、この5種類の色素成分が確認された。

市販の種々の食品中のベニコウジ色素を、高速液体クロマトグラフィー、HPLC/MSで検出できた。

#### 4. 食品中の食品添加物の定量法の

## 作成とその実態調査

食用油、マーガリンに添加したときの回収率は、ルチン、イソクエルシトリン、クエルセチンいずれの化合物も90%以上と良好であったが、生菓子に添加したときの回収率はいずれも80%程度であった。

ECD-HPLCでは、UV-HPLCに比べてルチン関連物質を10~40倍高感度に検出することが出来た。UV-HPLCでは、グラジエントプログラムを使用することにより、3種類の化合物を約15分以内に良好に分離できた。

### 5. 食品中の未許可添加物の分析法の開発

NHDCを種々の食品に $2.0\mu\text{g/g}$ 及び $20\mu\text{g/g}$ となるように添加し、添加回収実験を行ったところ、前者で89.7~134%、後方で75.2~99.4%の回収率が得られた。

検出量が $1\sim 5\mu\text{g/g}$ と微量の場合には、フォトダイオードアレイ検出器を用いて確認する必要があると思われる。

パラオキシ安息香酸メチルは、他のパラオキシ安息香酸エステル類5種と共に5ppm添加したところ、回収率は脂肪5%以下の食品では81.9~90.1%、変動係数1.9~7.5%であった。脂肪5%以上の食品では、回収率が80.7~94.0%、変動係数は0.9~7.5%であった。

また、パラベン類が入っているか否かのスクリーニング法として利用できる方法も提案した。

### 6. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

各食品添加物の出荷量及び食品向け出荷量に関する調査報告を受け、前回調査と比較した。それらの内、記載間違いと思われるものや、不備な回答を選び出した。データのコンピュータ入力を行い、集計表を作成した。

### 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162,497検体で、前回に比べ1.32倍であった。

使用を許可された食品中の濃度と使用基準の比は、安息香酸7.8%、デヒドロ酢酸0.4%、*p*-オキシ安息香酸3.2%、プロピオン酸1.7%、ソルビン酸14.1%、ジフェニル0.007%、イマザリル8.0%、オルトフェニルフェノール3.0%、チアベンダゾール3.2%、亜硝酸塩17.2%、硝酸塩30.9%、二酸化硫黄14.4%、ブチルヒドロキシアニソール3.9%、ジブチルヒドロキシトルエン0.7%、プロピレングリコール16.8%、サッカリンナトリウム5.7%であった。

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

材質鑑別ではシリコーンゴムが約半数を占め、次いでジエン構造をもつイソプレンゴム、スチレンブタジエンゴムが多かった。規格試験では食品用ゴム製品は全試料適合であった。食品擬似溶媒浸出液による蒸発残留物量は、平均で水4.8 ppm、4%酢酸68.2 ppm、20%エタノール20.2 ppm、*n*-ヘプタン1,654 ppmと揮発性化学物質の溶出が認められた。食品用ゴム製品は規格に適合しているが、使用条件によっては添加剤が溶出し、摂取される可能性があることが推測された。

天然ゴム製乳首では、酸化防止剤や滑剤が使用されていたが、加硫促進剤は検出されず、いずれの製品も加硫していない天然ゴムが使用されたものと推定された。天然ゴム製手袋では、加硫促進剤が高頻度に使用され、残存量も高く、さらにそれらに関連する未知化合物も多数検出された。天然ゴム製パッキングでは、酸化防止剤のBHTが全検体で使用されていた。また加硫促進剤が3検体から検出されたが、天然ゴム製手袋とは異なる種類であり、残存量も手袋より低かった。

## D 結論

1. 規格試験法、分析法からの有害

## 試薬の除去

食品中の食品添加物分析法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

クチナシ赤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、及び香料化合物12品目のGCによる定量について検討を行った。

### 3. 既存添加物の主要成分の構造に関する研究

ベニコウジ色素の食品中からの分析法を検討した。

### 4. 食品中の食品添加物の定量法の作成とその実態調査

食品中のルチン、イソクエルシトリン、クエルセチンを、食品より抽出後、ECD-HPLC、又はUV-HPLCを用いることにより、回収率、感度ともによく、分離・定量出来た。

### 5. 食品中の未許可添加物の分析法の開発

食品中のNHDCを、回収率よく分離・定量する方法、及び、パラオキシ安息香酸メチルを、他のパラオキシ安息香酸エステル類と共にパラオキシ安息香酸として定量する方法を考案した。

### 6. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

1998年度の食品添加物製造。輸入実績について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行った。

### 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16種類(33品目)の食品添加物の摂取量は、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

市販の各種ゴム製品を用いて、材質

鑑別、規格試験、食品擬似溶媒浸出液による蒸発残留物量測定、紫外部吸光度測定、天然ゴム製器具について、材質中に残存する化学物質の検討を行った。

## E 研究発表

### 1. 論文発表

美甘江利子、岡田安代、扇間昌規、伊藤誉志男、日食化誌、6、38-42 (1999)

Hajimu Ishiwata, Takiko Sugita, Yoko Kawasaki, Yuiko Takeda, Takashi Yamada, Motohiro Nishijima, and Yoshinobu Fukasawa: 食衛誌、40, 246-258 (1999)

Hajimu Ishiwata, Takiko Sugita, Yoko Kawasaki, Yuiko Takeda, Takashi Yamada, Motohiro Nishijima, and Yoshinobu Fukasawa: 食衛誌、40, 407-416 (1999)

Hajimu Ishiwata, Takiko Sugita, Yoko Kawasaki, Yuiko Takeda, Takashi Yamada, Motohiro Nishijima, and Yoshinobu Fukasawa: 食衛誌、40, 79-85 (2000)

Hajimu Ishiwata, Ayako Fukushima, Yoko Kawasaki, Yuiko Takeda, Takashi Yamada, Motohiro Nishijima, and Yoshinobu Fukasawa: 食衛誌、40, 86-93 (2000)

### 2. 学会発表

松野伸広、加藤文秋、石橋亨、伊藤武、坂井千三、川崎洋子、石綿肇、山田隆：日本食品衛生学会第78回学術講演会(10月)長野、

石綿肇、杉田たき子、川崎洋子、武田由比子、山田隆、西島基弘、深沢喜延：日本食品衛生学会第77回学術講演会(5月)東京、



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 平成12年に出された「食品中の食品添加物分析法」中に、水銀化合物、四塩化炭素、ジオキサン、二硫化炭素を使用している試験法は収載されていない。しかし、シアン化合物を使用するものが分析法各条に2品目、参照分析法中に1品目有る。ベンゼンを使用している品目は、分析法各条中にはないが、参照分析法中に3品目有る。一方、その使用については、慎重に検討することとされたクロロホルムに関しては、分析法各条中に4品目、参照分析法中に5品目有る。また、参照分析法中に1,2-ジクロロエタン（二塩化エチレン）を使用している試験法がある。

以上の品目の試験法について、今後の改訂の見直しについても考察した。

### A. 研究目的

近年、人体や環境に有害な試薬・溶媒を使用しない規格や試験法を作成することが求められるようになってきている。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。

昨年度の調査研究で、我々は、「第7版食品添加物公定書」中で前記の試薬を使用している試験法を洗い出し、次期の改訂に備えた。

一方、食品添加物の試験法に関しては、平成元年に出された「食品中の食品添加物分析法」が、今年度に改訂された。その改訂に当たっては、新たに採用された試験法については、上記の人体及び環境に有害な試薬を使用していないことは言うまでもない。

しかし、今回、新たな試験法が提示されなかった添加物の分析法に関しては、旧版の試験法をそのまま収載している。これらの中に

は、作成当時、上記の試薬を使用しないようにするというコンセンサスがなかったこともあり、いくつかの物が使用されている。特に、参照分析法の中には多く見られる。

### B. 研究方法

新たな「食品中の食品添加物分析法」の中から、前記の試薬を使用している項目を拾い出した。

### C. 研究結果

#### (a)水銀化合物を用いている試験法

水銀化合物を使用している試験法は、収載されていない。

#### (b)シアン化合物を用いている試験法

シアン化合物を用いている試験法は、食品添加物分析法各条の中に2品目、参照分析法の中には1品目有る。

##### ① 85. チアミン塩類

##### ② 86. チアミン誘導体

上記2品目とも、測定液の調製に、臭化シアンを用いる方法が収載されている。

##### ③参照分析法 6. 次亜塩素酸及びその塩類

試料ガスの調製において、試料とシアン化

カリウムを反応させてクロルシアンを得ている。

#### (c)ベンゼンを用いている試験法

ベンゼンを用いている試験法は、食品添加物分析法各条の中にはないが、参照分析法の中には3品目有る。

##### ①参照分析法3. ガムベース

試験法A（ガスクロマトグラフィー法）の(3)定性試験の中で、薄層クロマトグラフィーの移動相として使用している。

##### ②参照分析法9. 水溶性アナトー

の測定法 a 吸収スペクトル法において、試料液からの抽出に、ベンゼンを用いている。

また、定量においても、検量線用標準溶液の作成に使用している。

##### ③参照分析法19. 流動パラフィン

試料液の調製の際、アルミナカラムから、石油エーテル・ベンゼン混液（9：1）で溶出させている。

#### (d)四塩化炭素を用いている試験法

四塩化炭素を使用している試験法は、収載されていない。

#### (e)ジオキサンの用いている試験法

ジオキサンを使用している試験法は、収載されていない。

#### (f)クロロホルムを使用している試験法

クロロホルムの使用に関しては、第7版食品添加物公定書の作成要領において「慎重に検討する」としていることもあり、かなりの品目において、なお、使用されている。

食品添加物分析法各条中では4品目、参照分析法中では5品目に使用されている。

##### ①23. カゼイン及びカゼインナトリウム

試料液の調製の際、エタノール・クロロホルム混液で洗浄している。

##### ②27. $\beta$ -カロテン

検量線用標準液の調製の際、少量のクロロホルムに溶かしている。

また、液体クロマトグラフィーの移動相としても使用している。

##### ③41. 銅クロロフィル及び銅クロロフィリンナトリウム

液体クロマトグラフィーの移動相として、メタノール・クロロホルム・ヘキサン混液を使用している。

##### ④92. リボフラビン及びその誘導体

試料液の調製の際、盲蛍光物質を抽出除去するのに用いている。

また、測定液には、クロロホルム溶液を使用している。

##### ⑤参照分析法4. グリセリン脂肪酸エステル

試料液の調製に用いている。

また、標準液の調製も、クロロホルムを用いて行っている。

##### ⑥参照分析法8. ショ糖脂肪酸エステル

試料液の調製に用いている。

また、薄層クロマトグラフィーを行う際の展開溶媒として用いている。

##### ⑦参照分析法9. 水溶性アナトー

薄層クロマトグラフィーを行う際の展開溶媒として用いている。

##### ⑧参照分析法10. ステアロイル乳酸カルシウム

試料液の調製の際の抽出溶媒として用いている。

##### ⑨参照分析法12. ソルビタン脂肪酸エステル

試料液の還流・抽出に用いている。

#### (g)1,2-ジクロルエタンを使用している試験法

1,2-ジクロルエタンを用いている試験法は、食品添加物分析法各条の中にはないが、参照分析法の中には1品目有る。

##### ①参照分析法3. ガムベース

ソックスレー抽出器で抽出する際の溶媒として使用されている。

#### (h)二硫化炭素を用いている試験法

二硫化炭素を使用している試験法は、収載されていない。

#### (i)その他、人体、環境に有害なおそれのある試薬

① 17. 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の試験法において、試料を蒸留する際のフラスコに、アジ化ナトリウム溶液を加えている。

② 参照分析法 18. メチルセルロースの試験法において、分解反応に赤リンを使用している。

#### D. 考察

##### (a) 水銀化合物を使用している試験法

水銀化合物を使用している試験法は、記載されていないので、特に問題はない。

##### (b) シアン化合物を使用している試験法

食品添加物分析法各条の中に

① 85. チアミン塩類

② 86. チアミン誘導体

の2品目で、測定液の調製に、臭化シアンを用いる方法が記載されている。しかし、測定液の調製の方法には、

a. フェリシアン化カリウムを用いる方法とb. 臭化シアン溶液を用いる方法の2法が記載されており、どのような場合にどちらの方法を用いるべきかの記載はない。

臭化シアンを用いる方法は、削除しても差し支えないと考えられる。

また、参照分析法 6. 次亜塩素酸及びその塩類において、試料ガスの調製の際、試料とシアン化カリウムを反応させてクロルシアンを得ている。この使用方法に関しては、他の試薬での代替は、困難であり、方法自体の変更を行わなくてはならない。

##### (c) ベンゼンを使用している試験法

参照分析法の中で3品目に使用されている。

① 参照分析法 3. ガムベースの試験法 A

(ガスクロマトグラフィー法) の(3)定性試験の中で、薄層クロマトグラフィーの移動相として使用している。この移動相は、混液ではなく、ベンゼンのみを使用していることから、他の移動相への転換は比較的容易と考えられる。しかし、分析対象がガムベースという、かなり特殊な物であることを考えると、実際に実験を行うのは、メーカーの場合が多いと考えられ、今後、どのように、方法の転

換が行われるかは、未知である。

② 参照分析法 9. 水溶性アナーの測定法

a 吸収スペクトル法において、試料液から抽出するのに、ベンゼンを用いている。また、定量においても、検量線用標準溶液の作成に使用している。

この方法は、ビキシン、あるいはノルビキシンの定量法として、よりよい方法が存在すると考えられるので、廃止が可能と思われる。

③ 参照分析法 19. 流動パラフィンにおいて、試料液の調製の際、アルミナカラムから、石油エーテル・ベンゼン混液(9:1)で溶出させている。極性の近い混合溶媒を考案することはさほど困難でなく、代替は可能と思われる。

##### (d) 四塩化炭素を使用している試験法

四塩化炭素を使用している試験法は、記載されていないので、特に問題はない

##### (e) ジオキサンを使用している試験法

ジオキサンを使用している試験法は、記載されていないので、特に問題はない。

##### (f) クロロホルムを使用している試験法

① 23. カゼイン及びカゼインナトリウムにおいて、試料液の調製の際、エタノール・クロロホルム混液で洗浄している。洗浄の目的は、脂質等の除去であるので、他の有機溶媒で代替可能と考えられる。

② 27.  $\beta$ -カロテンにおいて、検量線用標準液の調製の際、少量のクロロホルムに溶かしている。これは、他の有機溶媒で代替可能と思われる。

また、液体クロマトグラフィーの移動相としても使用している。本品は、ビタミンとして、栄養学の方面でも多数の実験が行われているので、クロロホルムを使用しない液体クロマトグラフィーの系も開発されていると思われる。

③ 41. 銅クロロフィル及び銅クロロフィルナトリウムにおいて、液体クロマトグラフィーの移動相として、メタノール・クロロホルム・ヘキサン混液を使用している。銅ク

ロロフィリンナトリウムは、複雑で分解しやすい混合物であるので、良い移動相の開発も困難が予想される。

#### ④ 9 2. リボフラビン及びその誘導体

試料液の調製の際、盲蛍光物質を抽出除去するのに用いている。他の有機溶媒で代替は可能と思われるが、実験をしてみなければ、分からない。

また、測定液には、クロロホルム溶液を使用している。これも、他の溶媒で代替できると考えられる。

本品は、ビタミンとして、栄養学の方面でも多数の実験が行われているので、クロロホルムを使用しない、全く別の試験法が存在すると考えられる。

#### (g) 1, 2-ジクロルエタンを使用している試験法

①参照分析法 3. ガムベースにおいて、ソックスレー抽出器で抽出する際の溶媒として使用されている。

前項(c)で述べたように、ガムベースは、かなり特殊な添加物であり、実際に分析を行うのは、メーカーの場合が多いと考えられ、今後、どのように、方法の転換が行われるかは、未知である。

#### (h) 二硫化炭素を使用している試験法

二硫化炭素を使用している試験法は、記載されていないので、特に問題はない。

#### (i) その他、人体、環境に有害なおそれのある試薬

① 1 7. 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類において、試料を蒸留する際のフラスコに、アジ化ナトリウム溶液を加えている。しかし、アジ化ナトリウムは、特に毒性の強い試薬ではなく、近年、犯罪に使用されたことから、異常に注目を集めたに過ぎない。劇物としての通常の取り扱いをすれば、特に、試験法から排除する必要はないと考えられる。

②参照分析法 1 8. メチルセルロースの試験法において、分解反応に赤リンを使用しているが、この方法は、かなり特殊であり、特異性の点などからも、今後、どの程度実際に使用されるか、はつきりしない。従って、本法の改良を試みるよりは、より、特異性の高

い、異なった原理の方法の開発を待つべきだと考える。

#### D-2 その他

有害試薬の除去という本題からは外れるが、「食品中の食品添加物分析法」について、その他、改善すべき点を以下に記載する。

本版は、新たに既存添加物の分析法も加えたので、既存添加物が、一つの章を構成している。しかし、旧版の「食品中の食品添加物分析法」にも、既存添加物である「ヘキサミン」が記載されている。今後は、既存添加物という分類は設けずに、用途別の分類の中に既存添加物も入れる方がよいと考えられる。但し、その際には、本版で既存添加物 1 0 7 に記載されている「ナリンジン及びヘスペリジン」は、ナリンジンが苦味料、ヘスペリジンが強化剤に入ることになるので、2項目に分ける方がよいと考えられる。また、今回は記載されなかった、「L-アスパラギン」、「L-アスパラギン酸」、「L-アラニン」、「L-アルギニン」、「L-オキシプロリン」、「L-グルタミン」、「L-シスチン」、「L-セリン」、「L-チロシン」、「L-ヒスチジン」、「L-プロリン」、「L-リシン」、「L-ロイシン」については、化学的合成品であるアミノ酸類と分析法が同じ物が多いので、現試験法を準用することができると思われる。

#### E. 結論

今回の「食品中の食品添加物分析法」中、ヒトや、環境に有害な影響を及ぼすおそれのある試薬の使用状況は、以下の表のようであった。今後、これらの試薬の使用を改めるような試験法の作成を検討する必要がある。

有害試薬の使用状況

試薬名	分析法各条	参照分析法	
水銀化合物	0	0	F. 研究発表
シアン化合物	2	1	無し.
ベンゼン	0	3	
ジオキサン	0	0	G. 知的所有権の取得状況
四塩化炭素	0	0	無し.
クロロホルム	4	5	
1,2-ジクロルエタン	0	1	
二硫化炭素	0	0	

## 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赤色素につき、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

本分担研究においては、既存添加物の規格設定のための研究として、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関する実験的研究を行っている。平成10年度はクチナシ青色素を対象に検討を行った。平成11年度はクチナシ赤色素を対象とし、①クチナシ赤色素で原料イリドイド配糖体のエステル加水分解の際に精製するとされるメタノールについて検討した。また、②原料のアミノ酸組成を知るために、色素中のアミノ酸の分析を行い、③色素成分の分子量を推定した。さらに、市販クチナシ赤色素の確認試験として、④吸収スペクトルあるいは色彩及び⑤薄層クロマトグラフィーが

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。JECFA規格がある既存添加物品目については、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。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し、III) JECFA規格のある香料化合物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赤色素に関する実験的研究

## B. 研究方法

### 1. 試料及び試薬

市販クチナシ赤色素 1 社 2 製品 (RI、RII と略す)、ビートレッド 1 製品、ブドウ果皮色素 1 製品、デキストリン 1 製品は日本食品添加物協会を通じて入手した。食用赤色 3 号、同 104 号、同 105 号、同 106 号は食品添加物規格のものを用いた。アセトニトリル及びアセトンは片山化学工業 (株) 製高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用を、イソプロパノールは和光純薬工業 (株) 製 HPLC 用を、エタノールは片山化学工業 (株) 製残留農薬分析用を用いた。アンモニア水は国産化学 (株) 製のアンモニア含量 28 % のものを、イソチオシアン酸フェニル (PITC) は和光純薬工業 (株) 製アミノ酸配列分析用を用いた。L-アミノ酸標準品 (15 種、L-アラニン (Ala)、L-アルギニン塩酸塩 (Arg)、L-アスパラギン酸 (Asp)、L-グルタミン酸 (Glu)、グリシン (Gly)、L-ヒスチジン塩酸塩 (His)、L-ロイシン (Leu)、L-リシン塩酸塩 (Lys)、L-メチオニン (Met)、L-フェニルアラニン (Phe)、L-プロリン (Pro)、L-セリン (Ser)、L-スレオニン (Thr)、L-チロシン (Tyr)、L-バリン (Val)) はシグマ製を用いた。プルランは、昭和電工 (株) 製 STANDARD P-82 (p-100: MW=10.0×10<sup>4</sup>、p-50: MW=4.80×10<sup>4</sup>、p-20: MW=2.37×10<sup>4</sup>、p-10: MW=1.22×10<sup>4</sup>、p-5: MW=0.58×10<sup>4</sup>)

を用いた。Tris[hydroxymethyl]aminomethane (トリス) はシグマ製 TRIZMA BASE を、Tris[hydroxymethyl]aminomethane hydrochloride (トリス塩酸) はシグマ製 TRIZMA Hydrochloride を、N-tris (hydroxymethyl)methylglycine (トリシン) は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) 製電気泳動用純度試薬を用いた。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) はナカライテスク (株) 製難溶性蛋白質研究用特製試薬を、2-メルカプトエタノールは和光純薬工業 (株) 製生化学用を、分子量スタンダードタンパク質はバイオラッド製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、soybean trypsin inhibitor 分子量 28,700、carbonic anhydrase 分子量 37,600 の混合物) を用いた。セルロース薄層板はフナコシ製アビセル SF (10×20 cm)、ポリアミド薄層板はメルク製 DC-Fertigplatten Polyamid 11F 254 Art.5557 (20×20 cm 0.15 mm) を用いた。電気泳動用ゲルはバイオラッド製レディゲル J 10-20% 12well を用いた。水は日本ミリポア製ミリ-Q SP で処理して得られた、比抵抗値 18 MΩ·cm 以上の超純水を用いた。他の試薬はすべて試薬特級品を用いた。

### 2. 装置及び器具

メタノール分析にはヒューレットパッカー製ガスクロマトグラフ HP-5890 シリーズ II (FID 付) 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プタム及びアルミキャップ付を使用した。ガスタイトシリンジは Precision Sampling 製プレッシャーロックシリンジ(2 mL)を使用した。

アミノ酸分析には(株)島津製作所製高速液体クロマトグラフ LC-6A システム(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 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)を用いた。

エバポレーターは中村製作所製 GP-150- II を使用した。

真空凍結乾燥機は東西通商製 FREEZVAC-IC 型を使用した。

限外ろ過膜器具はアミコン製セントリプレップ-3 (C-3、分画分子量 3,000)、セントリプレップ-10 (C-10、分画分子量 10,000) 及びセントリプレップ-30 (C-30、分画分子量 30,000) をを用いた。

高速ゲルろ過クロマトグラフィー (HPGFC)には(株)島津製作所製ポンプ 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、示差屈折計検出器 RID-6A、日本分光(株)製カラムオープン 865-CO に、データ処理装置として(株)島津製作所製 C-R4AX を接続したものをを用いた。

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

吸収スペクトルの測定には(株)島津製作所製自記分光光度計 UV-1600 をを用いた。色素溶液の加熱には、アドバンテック東洋(株)製のホットブロックバス TPB-32 をを用いた。

### 3. メタノール分析

#### 1) GC 条件

カラムは J&W Scientific 社製キャピラリーカラム DB-1 (内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.32  $\mu$ m) をを用いた。注入方法はスプリット注入法とし、スプリット比 3.4 とした。カラム温度 50 $^{\circ}$ C (6 min) - (10 $^{\circ}$ C/min) - 150 $^{\circ}$ C (8 min)、注入口温度 100 $^{\circ}$ C、検出器温度 150 $^{\circ}$ C、キャリアーガスはヘリウムとし、注入量 1 mL で分析を行った。

#### 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  $\mu$ 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。

#### 4. アミノ酸分析

##### 1) 試料及び試薬の調製

試料 RI、RII 各々 50 mg を水 50 mL に溶解した。それらを分画分子量 3,000 の限外ろ過膜器具を用いて遠心機 (回転数: 3500 r.p.m.、温度: 25  $^{\circ}$ C、時間: 60 分) に繰り返しかけ、分子量 3,000 以下の画分を集め、凍結乾燥した。得られた試料 RI の分子量 3,000 以下の画分 28 mg 及び試料 RII の分子量 3,000 以下の画分 28 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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、東ソー (株) 製 TSK-gel ODS 80T<sub>M</sub> (内径 4.6 mm 長さ 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  $\mu$ 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

#### 5. HPGFC による分子量の推定

##### 1) 試料の調製

試料 RI 及び RII は、各々 10 mg をはかりとり、0.5 mL の移動相に溶解し、プルラン 5 種は、各々 0.5 mg をはかりとり、200  $\mu$ L の水に溶解した。

##### 2) HPGFC 条件

カラムは SB-803 HQ (8.0 mm i.d. x 300 mm、Shodex 製) を用いた。移動相は 10 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) を用い、カラム温度は 30  $^{\circ}$ C、流速は 0.6 mL/min、注入量は 10  $\mu$ L とし、示差屈折計検出器及び紫外可視検出器で検出した。

なお、10 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) 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。

#### 6. SDS ゲル電気泳動による分子量の推定

##### 1) バッファーの調製

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。サンプルバッファー B はサンプルバッファー A 1.56 mL に、2-メルカプトエタノール 0.40  $\mu$  L を混和して調製した。

泳動バッファー (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 %) を水に溶かし、1 L に定容して調製した。

## 2) 試料溶液の調製

試料 RI 及び RII 各々 40 mg を量り取り、200  $\mu$  L の水に溶解した。各々 2 本のエッペンドルフチューブに 50  $\mu$  L ずつ分注し、一方には 200  $\mu$  L のサンプルバッファー A を加え、試料溶液とした。もう一方には、200  $\mu$  L のサンプルバッファー B を加え、ふたをして 95 °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  $\mu$  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。

## 7. 限外ろ過膜による分子量の推定

試料 RI 及び RII 50 mg を水 50 mL に溶解し、試料溶液とした。試料溶液 10 mL を分画分子量 30,000 の限外ろ過膜器具 (C-30) に移し、遠心機 (回転数

: 3500 r.p.m.、温度: 25 °C、時間 20 分間) に装着し、遠心分離を行った。ろ液は分画分子量 10,000 の限外ろ過膜器具 (C-10) に移し、さらに限外ろ過膜器具 (C-30) について、濃縮された試料溶液 (分子量 30,000 以上の画分) が約 0.7 mL となるまで遠心分離を繰り返した。濃縮された試料溶液は水で 10 mL に定容した。限外ろ過膜器具 (C-10) に移したろ液についても同様に遠心分離を行い、ろ液は分画分子量 3,000 の限外ろ過膜器具 (C-3) に移し、濃縮試料溶液は、水を用いて 10 mL に定容した。限外ろ過膜器具 (C-3) に移したろ液についても遠心分離を行い、ろ液及び濃縮試料溶液を 10 mL にそれぞれ定容した。試料溶液及び定容した、限外ろ過後の濃縮試料溶液及びろ液について 534 nm における吸光度を測定した。

## 8. 吸収スペクトル

試料 RI、RII、ビートレッド及びブドウ果皮色素についてはそれぞれ 50、50、70 及び 30 mg/mL の水溶液を調製した。さらに各水溶液をそれぞれ水、クエン酸緩衝液 (pH3.0) 及びリン酸緩衝液 (pH8.0) を用いて 50 倍 (ブドウ果皮色素については 100 倍) に希釈し、200 ~ 800 nm の吸収スペクトルを測定した。また、試料 RI、RII 及びビートレッドのリン酸緩衝液溶液については、90 °C、5 分間加熱した。

食用赤色 3 号、同 104 号、同 105 号、同 106 号については、0.6 mg/mL の水溶

液を調製し、さらに、水、クエン酸緩衝液あるいはリン酸緩衝液を用いて100倍（食用赤色106号については200倍）に希釈し、同様に吸収スペクトルを測定した。

## 9. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

### 1) 試料溶液の調製

試料 RI、RII は 40 mg、ビートレッドは 50 mg、ブドウ果皮色素は 20 mg をそれぞれ 100  $\mu$ L の水に溶解した。

### 2) TLC 条件

ポリアミド薄層用には展開溶媒として、イソプロパノール-水-ギ酸 (7:3:1) を用いた。セルロース薄層用には展開溶媒として、アセトン-イソアミルアルコール-水 (6:5:5)、水-酢酸-塩酸 (82:15:3)、酢酸-水-塩酸 (6:5:5) 及び 0.5 mol/L 塩酸-アセトン (3:1) を用いた。また、それぞれの試料溶液 0.5 あるいは 0.2  $\mu$ L をスポットし、展開させた。

## C. 研究結果

### 1. メタノールの分析結果

#### 1) 分析条件

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<sup>1)</sup>。また、クチナシ赤色素は、水への溶解性が高いことから、クチナシ青色素と同様、試料は水に溶解することにした。試料 1 g を、溶解するために必要な最小量である 2 mL に溶解し試料溶液とした。

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が、攪拌のみでも検出が可能であったため、試料に水等を添加した後密栓し、5分間攪拌後、直ちにガスクロマトグラフに注入した。

内部標準物質として、エタノール、アセトン、イソプロパノール等が考えられたが、色素の中にエタノールあるいはアセトン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メタノール濃度から検量線を作成し、0 から 100  $\mu$ g/mL の範囲で直線性が得られた ( $r^2=0.998$ )。

#### 2) メタノールの添加回収率

試料 RI 及び RII 各々 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  $\mu$ g) 及びイソプロパノール溶液 20  $\mu$ L 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。

#### 3) 市販品への応用

内部標準物質としてイソプロパノールを用いて、試料 RI 及び RII 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. 1 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