

公定書法（化学的測定方法）との関連についても検討を行った。

なお、本研究は、日本香料工業会・食品香料委員会所属の 12 社より試料提供を受け、日本香料工業会・食品香料委員会、および同委員会所属の技術専門委員会 6 社が行った。

1. 試料の選定

本研究では、食品添加物公定書第 7 版収載の各条香料化合物 78 品目から以下の手順により選抜した 12 品目を対象に研究を行った。

即ち、78 品目の香料化合物から「面積百分率法」による含量測定が妥当と思われる 51 品目を選択した。この 51 品目の官能基別内訳はエステル類が 33 品目、アルコール類 6 品目、アルデヒド類 4 品目、ラクトン類 2 品目、フェノール類 2 品目、酸類 2 品目、ケトン類 1 品目、エーテル類 1 品目である。この官能基別内訳に配慮して以下の 12 化合物を選定した。

- 1) α -アミルシンナムアルデヒド (α -Amylcinnamaldehyde)
- 2) オイゲノール (Eugenol)
- 3) デカノール (Decanol)
- 4) 酢酸フェネチル (Phenylethyl acetate)
- 5) シトロネロール (Citronellol)
- 6) 1,8-シネオール (1,8-Cineole)
- 7) デカナール (Decanal)
- 8) γ -ノナラクトン (γ -Nonalactone)
- 9) フェニル酢酸エチル (Ethyl phenylacetate)
- 10) ヘキサン酸アリル (Allyl hexanoate)
- 11) ベンジルアルコール (Benzyl alcohol)
- 12) 酪酸エチル (Ethyl butyrate)

2. 測定条件

1) GC 測定条件

資料-1 の JECFA 試験法「GAS CHROMATOGRAPHIC (GC) ASSAY OF FLAVOUR CHEMICALS」(以下、「JECFA 試験法」)記載の GC 法分析条件を満たす範囲内で、各社独自の条件を用いて測定を行った。各社の GC 測定条件は表-1 に示した。

本研究には、食品香料委員会所属会社が保有する市場流通品で、かつ食品添加

物規格品のものを各品目につきロットの異なる 2 試料（試料-1、試料-2）、計 24 試料を使用した。

「JECFA 試験法」の GC 分析条件

カラム： 長さ30m×内径0.25mm～0.53mmのフューズドシリカ（熔融シリカ）または不活性ガラスのキャピラリーカラム

固定相：

1. 非極性カラム：methyl silicone gumまたは同等品（望ましくは架橋、交差結合した dimethylpolysiloxane）
2. 極性カラム：polyethylene glycolまたは同等品（望ましくは架橋、交差結合した polyethylene glycol）
3. 固定相の膜厚は1～3 μ m

キャリアーガス： 線速度 20～40ml/secのヘリウム

サンプル量： 0.1～1.0 μ l

スプリット比： （内径が0.25mm～0.35mmカラムの場合）50:1～200:1、組成物の一つでもカラムの許容範囲を超えないように設定する。

注入口温度： 225～275℃

検出器温度： 250～300℃

検出器： メーカーが推奨する使用条件で熱伝導度検出器または水素炎イオン化検出器のいずれかを使用する。

オーブンプログラム： 50～240℃、5℃/min昇温、240℃で5min保持

測定は上記方法によるか、またはそれ以上のGC分離条件であること。

2) GC 装置の適性試験

GC 装置の適性試験は「JECFA 試験法」に記載の GC 装置の適性試験法をそのまま踏襲した。

装置の適性試験には下記の表に記載の 5 成分の等重量混合物として調製した適性試験用サンプルを用意し、各社の GC 測定条件で定期的あるいは分析前に測定し、ピークの溶出が表の順序であり、面積百分率は下記表に示された値との差が 10%以内である事を各社で予め確認した。適性試験用サンプルはいずれも食品添加物規格品を用いて調製し、共用のものを使用した。

結果は表-2 および表-3 に示した。ピークの溶出は 6 社とも JECFA で示された順であった。面積百分率の JECFA 標準値との差は、測定条件 1 の 15m 非極性カラムを使用した場合でも最大で 8%であった。一方、測定条件 2～6 ではカラムの長さが 30m 以上だったため、その差は最大で 6%であった。

GC 装置の適性試験結果より、6 社の各装置および表-1 に示された GC 測定

条件に違いはあるものの、5成分の面積%のCV値は4%以内であった。従って、本研究に使用した全ての装置が香料化合物のGCによる含量測定法に適用できることを確認した。

JECFA=GC装置の適性試験サンプル

適性試験用サンプル中の成分	溶出順序		標準化された面積百分率(%) [FIDによる]	
	非極性カラム	極性カラム	非極性カラム	極性カラム
Benzyl Alcohol	1	4	22.0	21.3
Acetophenone	2	2	21.1	21.4
Linalool	3	1	20.8	21.0
Benzyl Acetate	4	3	18.6	19.1
Hydroxycitronellal	5	5	16.7	16.7

3. 測定方法

1) GC法による含量測定法の種類

①「第七版食品添加物公定書」一般試験法

一般試験法に記載のGC法による含量測定法には下記の2方法が記載されているが、香料化合物の含量測定法にはいずれのGC法も適用されていない。

I) 内標準法：別に規定する内標準物質の一定量に対して標準被検成分を段階的に加えた標準液を数種類調製する。この一定量ずつを注入して得られたクロマトグラムから、標準被検成分のピーク高さ又はピーク面積と内標準物質のピーク高さ又はピーク面積との比を求める。この比を縦軸に、標準被検成分量と内標準物質との比又は標準被検成分を横軸にとり、検量線を作成する。この検量線は、通例、原点を通る直線となる。次に同量の内標準物質を加えた検液を別に規定する方法で調製し、検量線を作成したときと同一条件でクロマトグラムを記録させ、被検成分のピーク高さ又はピーク面積と内標準物質のピーク高さ又はピーク面積との比を求め、検量線を用いて定量を行う。

II) 絶対検量線法：標準被検成分を段階的にとり、標準液を調製し、この一定量ずつを正確に量って注入する。得られたクロマトグラムから求めた標準被検成分のピーク高さ又はピーク面積を縦軸に、標準被検成分量を横軸にとり、検量線を作成する。この検量線は、通例、原点を通る直線となる。次に別に規定する方法で検液を調製し、検量線を作成したときと同一条件でクロマトグラムを記録させ、被検成分のピーク高さ又はピーク面積を測定し、検量線を用いて定量を行う。

② 「JECFA 試験法」

次の 3 方法が記載されている。

I) 内標準物質を用いない方法：インテグレーター（検出したピークの総面積を 100%に変換する自動積分計）により被検成分の含量を求める。この方法は検体試料の全成分がピークとして検出されることが前提となる。被検試料にピークとして検出されない成分の有無を確かめる必要がある時は、内標準物質あるいは外標準物質を用いて検証する。ピークとして検出されない成分が含まれていることが確かめられた試料は内標準法で定量する。

II) 内標準法

- i. 被検成分と、ピーク面積の検出応答がほとんど同じ内標準物質（化学構造が類似のもの）の混合物をピーク面積が等しくなるように調製し、GC 測定を行う。この場合、被検成分と内標準物質の重量比とピーク面積比が整合していると仮定し、別に記載された計算式で含量を求める。
- ii. 被検成分と内標準物質の重量比とピーク面積比が整合していない場合はあらかじめ含量の判っている標準被検成分と内標準物質からなる 3 種類の混合物を調製し、GC 測定を行い、計算式より補正ファクターを求める。次に被検成分と内標準物質の混合物をピーク面積が等しくなるように調製し、GC 測定を行った後、補正ファクターを用いる計算式から含量を求める。

2) 本研究における測定法

GC 含量測定法には上記の各種方法があるが、内標準物質を用いる定量法は検液調製が煩雑であり、日常的に多数の試料を測定するには適さない。

また、絶対検量線法は誤差が生じやすく熟練を必要とし一般的ではない。そこで、本研究では、業界内で日常の品質管理や分析業務に汎用されている「面積百分率法」が香料化合物の含量試験法として適用できるか否かについて検討した。

① 「面積百分率法」

試料は溶媒で希釈せず、一定量を直接シリンジに取り、GC に注入した。記録された各成分のピーク面積をインテグレーター（積分計）で百分率に変換した値から直接、含量を求めた。試料は上記 12 品目（ロットの異なる 2 検体：試料-1, 試料-2）、計 24 検体で、測定は 1 検体 3 回行い、その平均値と CV 値（変動係数）を求めた。

各社の GC 測定含量の結果は表-5 および表-7 に示した。

② 内標準法

「面積百分率法」の測定値の正しさを裏付けるために「JECFA 試験法」記載の内標準法（GC ファクターを用いる方法）に準じた方法でも含量測定を行った。

検体試料は上記「面積百分率法」で測定したものと同一である。

標準香料化合物として、できるだけ客観性をもたせたるために、試薬の純度の高いものを使用することとし、または、試薬が入手できないものについては手持ちの香料化合物を蒸留精製して得られた留分を用いた。

内標準物質は各社が分担した測定担当試料に最適と思われるものを用いた。

表-4 に各試料に用いた内標準物質を示した。

【測定】

内標準法で必要となるファクターを算出するため、下記 3 種類の混合物を調製した。

即ち、最初の検液は標準香料化合物と内標準物質を重量比で 1:1 混合調製し、他の二種類の検液は重量比を 2:3 および 4:3 になるように調製した。調製した各検液は各 3 回ずつ GC 測定を行い、それぞれの測定値から下記[式-1]よりファクターを計算し、その 3 回の平均値をその検液のファクターとし、さらにこの三種類の検液のファクターの平均値を求め、今回の分析に用いるファクターとした。

$$[\text{式}-1] \quad \text{ファクター (F)} = \frac{\text{標準香料化合物の重量} \times \text{純度}\%}{\text{内標準物質の重量} \times \text{純度}\%} \times \frac{\text{内標準物質の面積値}}{\text{標準香料化合物の面積値}}$$

検体試料の測定：

被検香料化合物と内標準物質の 1:1 重量混合物を 3 検液調製し、それぞれ各 1 回 GC 測定した後、[式-2]、[式-3] から香料化合物の含量を計算した。さらにその平均値と CV 値（変動係数）を求めた。

$$[\text{式}-2] \quad \text{検体混合物中の被検香料成分}\% = \frac{\text{被検香料面積値} \times \text{F} \times \text{検体混合物中の内標準物質の重量}\%}{\text{内標準物質面積値}}$$

$$[\text{式}-3] \quad \text{被検香料化合物の含量}(\%) = \frac{\text{検体混合物中の被検香料成分}\% \times 100}{\text{検体混合物中の被検香料化合物の重量}\%}$$

結果は表-6、表-7 に示した。

③ 難揮発性および不揮発性物質の簡易検査法

GC 法で測定可能な試料は揮発性化合物である。多くの香料化合物は製造工程の最終段階で蒸留精製され、難揮発性および不揮発性成分は除去される。

従って、市場にある香料化合物は一般には、難揮発性および不揮発性物質は除去された揮発性化合物であるといえる。しかし、成分の経時変化あるいはその他の理由で難揮発性および不揮発性物質が混在する可能性がある。この場合には、「面積百分率法」では正しい含量を測定することができない。そこで、予め試料

中の難揮発性あるいは不揮発性成分の有無を知ることが極めて重要となるが、一般に簡便でかつ正確な判別方法に対する報告は無い。そこで本研究では、簡便かつ正確な難揮発性および不揮発性物質の判別方法の検討も行った。

上記「JECFA 試験法」においても、『「面積百分率法」において、被検試料中に GC に検出されない化合物が含まれている可能性がある場合は、内標準物質または外標準物質を用いてその存在を確かめる』ことが記載されている。

本研究では以下のような発想を基に実施した。即ち、GC 測定で検出されるピークの総面積値は注入した量に比例する。仮に二つの同じ試料があり、一方の試料中に 10%の難揮発性および不揮発性物質が含まれているとすると、同じ量を GC に注入してもその試料の GC 総面積値は他方よりも 10%減少するはずである。

しかし、注入量を全く同じにすることは至難であり、正確さに欠ける。

そこで比較的簡便で注入誤差などの影響を極力なくす方法として共通の内標準物質を添加する方法をを検討した。即ち、難揮発性および不揮発性物質を含まない標準香料化合物と内標準物質の等量混合物を GC 測定し、被検成分と内標準物質のピーク面積の比を求め、次に難揮発性および不揮発性物質を含む香料化合物と内標準物質の等重量混合物を測定し、被検成分と内標準物質のピーク面積の比を求める。仮に、10%の難揮発性物質が含まれていれば被検成分と内標準物質のピーク面積の比の値は難揮発性および不揮発性物質が含まれていない標準香料化合物での比の値より 10%減少することになる。このような方法によれば、簡便で、かつ正確に難揮発性および不揮発性物質の存在が判定できるはずである。また、共通の基準となる内標準物質を用いているので多少の注入量等の誤差による影響は少ない。

以下にこの方法を用いた簡便な難揮発性および不揮発性物質混在の検査方法を述べる。

【測定法】

標準香料化合物に難揮発性および不揮発性物質と仮定した **Benzyl benzoate** を、5 重量%および 10 重量%混合し、おのおのの試料を調製した。 **Benzyl benzoate** は通常の GC 条件ではピークが検出されるが、検出されない難揮発性および不揮発性物質と仮定し、**Benzyl benzoate** のピーク面積は無いものとして香料成分と内標準物質の面積値だけを計算の対象とした。

測定に用いた標準香料化合物および内標準物質は表-4 に示したものをを用いた。

実際の測定にあたっては、まず、次の 3 種類の検液を調製した。

検液-1：標準香料化合物と内標準物質の 1:1 (重量比) 混合物。

検液-2：(**Benzyl benzoate** を 5 重量%含有する標準香料化合物) と内標準物質の 1:1 (重量比) 混合物。

検液-3：(Benzyl benzoate を 10 重量%含有する標準香料化合物) と内標準物質の 1:1 (重量比) 混合物。

上記の 3 種類の検液 (検液-1、検液-2、検液-3) はそれぞれ 3 検体を調製し、香料成分と内標準物質の面積値の比 (香料成分の面積値÷内標準物質の面積値) を GC 測定 (各 1 回) により求め、それぞれの平均値を求めた。

検液-1 の平均値を A、検液-2 の平均値を B、検液-3 の平均値を C とするとき、下記の式から難揮発性および不揮発性物質と仮定した Benzyl benzoate の含量を求めた。

$$\text{検液-2 中の Benzyl benzoate の含量} = 100 - (B \div A) \times 100$$

$$\text{検液-3 中の Benzyl benzoate の含量} = 100 - (C \div A) \times 100$$

この方法で測定した結果を表-8 に示した。

上記の測定はモデル系であり、検液-1、検液-2 および検液-3 の調製には同一の標準香料化合物を用いたので、その純度は考慮する必要はない。

ただし、被検香料化合物を測定する場合は被検香料化合物と標準香料化合物の純度が異なるので、それぞれの純度を考慮して計算を行う必要がある。

次に実際に使用する場合の測定方法について記す。

i) 検液の調製

検液-4：標準香料化合物と内標準物質を 1:1 (重量比) で混合した溶液

検液-5：被検香料化合物と内標準物質を 1:1 (重量比) で混合した溶液

ii) GC 測定

a. 標準香料化合物を「面積百分率法」で GC 測定し、純度 (%) を求める。

b. 被検香料化合物を「面積百分率法」で GC 測定し、純度 (%) を求める。

c. 検液-4 を GC 測定し、主要成分の面積値と内標準物質の面積値を求める。

d. 検液-5 を GC 測定し、主要成分の面積値と内標準物質の面積値を求める。

iii) 香料化合物の面積値の再計算

検液-4 および検液-5 中の標準香料化合物および被検香料化合物の純度を 100%と仮定して GC 面積値を再計算する。

計算式を下記に示す：

a. 検液-4

$$D = \frac{F}{E} \times 100$$

D: 標準香料化合物の主要成分の面積再計算値

E: 標準香料化合物の純度(%)

F: 標準香料化合物の主要成分の面積値

b. 検液-5

$$G = \frac{I}{H} \times 100$$

G: 被検香料化合物の主要成分の面積再計算値

H: 被検香料化合物の純度(%)

I: 被検香料化合物の主要成分の面積値

iv) D および G の内標準物質に対する面積比(J および L)の算出

$$J = \frac{D}{K} \times 100$$

K: 検液-4 の内標準物質の面積値

$$L = \frac{G}{M} \times 100$$

M: 検液-5 の内標準物質の面積値

v) 被検香料化合物中の難揮発性および不揮発性物質の含量 N (%) の計算

$$N(\%) = 100 - \frac{L}{J} \times 100$$

L の値は J の値より、難揮発性および不揮発性物質の混在量に比例して低くなる。被検香料化合物に難揮発性および不揮発性物質が混在していなければ $N(\%) = 0$ となる。

C. 結果と考察

1. 香料化合物12品目のGC測定

1) α -アミルシンナムアルデヒド(α -Amylcinnamaldehyde)

[公定書含量規格: >98.0%]

この化合物は通常少量の *cis*-体を含む *trans*-体であるが、一般的に香料化合物としては両者を一つの物質として扱っており、公定書法(香料試験法: アル

デヒド、ケトン類・第2法)では両者とも含量測定の対象となる。GC測定の場合、極性カラムでは異性体物質は重なって1ピークになるが、非極性カラムでは異性体物質は分離される。従って非極性カラムによる「面積百分率法」では2つの異性体ピークの合計値を以って含量とした。

公定書法での測定値は試料-1が99.4%、試料-2は99.3%であった。これに対し「面積百分率法」では、試料-1は極性カラムで99.0%、非極性カラムで99.1%、試料-2は極性カラムで98.6%、非極性カラムで98.9%という近い値を示し、公定書法に代わり得る含量測定法であることが判った。なお、公定書法の含量規格下限値は98.0%であるがJECFAでは97%となっている。

2) オイゲノール(Eugenol) [公定書含量規格：>98.0vol%]

公定書法(香料試験法：フェノール類)測定では試料-1は100.0%、試料-2は100.1%であった。「面積百分率法」では、極性、非極性カラムいずれの場合も試料-1、試料-2共に99.6~99.9%であり公定書法に近似した値を示した。

3) デカノール(Decanol) [公定書含量規格：>98.0%]

公定書法(香料試験法：アルコール類・第1法)測定では試料-1、試料-2、共に98.2%であった。これに対して、「面積百分率法」ではそれぞれ極性カラムで試料-1は94.9%と試料-2は95.9%、非極性カラムで試料-1は96.6%、試料-2は99.9%の値を示した。99.9%の数値は他に比べて高いが、それ以外の測定値は94.9~96.6%の範囲にあり公定書法よりやや低い値を示した。

非極性カラムの高い値は長さが15mと短く、分離能が十分でないカラムを用いて測定された値であるため、他成分を含む含量となった。

一方、「面積百分率法」による測定値が公定書法より低めになる原因を調べるため、GC-MS分析を行った。その結果、オクタノール、ノナノール、ドデカノールなどの同族体のアルコール類が共存していることを確認し、またデカノールとそれら同族体アルコール類が総計としておよそ97%存在することも確認した。

公定書法では、これらのアルコール類をデカノールとして含量計算するためGC法より含量値は高い値となる。

デカノールは椰子油中のトリグリセライドから得られる脂肪酸の還元によって製造される。製品化にあたっては、蒸留などにより精製を十分に行うが、なお、同族体アルコール類、脂肪族アルデヒド類、直鎖炭化水素類などが製品中に共存する。

しかし、これらの共存物は香料成分として特異なものではなく、共存することによる安全性に特に問題はない。今回の「面積百分率法」測定結果および被検試料を分析した結果、更には製造方法などを考慮すれば、将来含量測定法と併せてデカノール含量規格値についても改定する必要があるものと考えられる。

なお、その場合、JECFA規格の98%以上(GC)の設定も検討する必要であろう。

試料-1 について測定した内標準法の値は極性カラムで 93.4%、非極性カラムで 93.0%とさらに低い値を示した。試料-2 については、内標準法では極性カラムで 92.7%、非極性カラムで 97.0%の値を示し測定値にバラツキが出た。

4) 酢酸フェネチル(Phenylethyl acetate) [公定書含量規格：>98.0%]

公定書法（香料試験法：エステル含量）での測定は、試料-1 では 99.0%、試料-2 では 99.9%を示し、「面積百分率法」ではカラム極性による差が少なく 99.5~99.6% の範囲の値であった。ただ、内標準法での測定にあたってファクターにバラツキがあり、その結果、101.3%となる測定値があった。

5) シトロネロール(Citronellol) [公定書含量規格：>94.0%]

公定書法（香料試験法：アルコール類・第1法）による含量は試料-1 では 100.1%、試料-2 では 94.2%であった。これを「面積百分率法」で測定すると、試料-1 は 95.6~96.4%、試料-2 は 92.8~92.9%であった。なお、「面積百分率法」の値は主成分である β -体と少量存在する異性体の α -体を加算したものである。

検体として用いたいずれの試料も GC-MS 測定によれば、ゲラニオール、3,7-ジメチルオクタノール、イソゲラニオール、ネロール、セスキテルペン類が同定され、原料が天然物であることを示唆した。試料-1 および試料-2 の含量の違いは、シトロネロールが天然由来のシトロネロールを原料として製造されているため、混在物の量の差により含量の測定値に差が出たと思われる。また、公定書法では混在するこれらのアルコール類がシトロネロールとしての含量値に加算されるので、規格値の 94.0%を超える値となったが、GC 測定では特定の成分のみを含量として測定するため、試料-2 のように規格値以下の数値となる場合もあった。

6) 1,8-シネオール(1,8-Cineole) [公定書含量規格：>85.0%]

公定書法（香料試験法：o-Cresol 付加体の凝固点から換算表で含量を求める方法）による含量は試料-1 は 87.2%、試料-2 は 88.7%であった。「面積百分率法」では試料-1、試料-2 が極性カラムでそれぞれ 88.7%、89.4%、非極性カラムで 96.7%、95.9%、とカラムの性質によって大きな差が出た。この原因は非極性カラムでは混在するリモネン(GC-MS で確認)の保持時間が 1,8-シネオールとまったく同じであることがわかり、両者の合計値が見かけの値となったためである。従って、1,8-シネオールにあつては、非極性カラムは不適であり、極性カラムが適していることが判った。

内標準法でも非極性カラムではピークの重なりにより高い値を示したが、極性カラムでは公定書法に近似した値であった。

7) デカナール(Decanal) [公定書含量規格：>93.0%]

公定書法（香料試験法：アルデヒド、ケトン類・第2法）による含量は、試料-1では97.9%、試料-2では95.1%であった。「面積百分率法」では極性カラムでそれぞれ98.9%と94.6%、非極性カラムで99.4%と98.0%の値を示した。

本品の内標準法による測定では108.0%および106.7%と高い値が出た。

通常GC法では類縁成分が分離されるので、それらを一括して被検成分とみなす化学的測定法よりも低い値となる傾向にあるが、デカナールに関しては逆であった。この現象は、先に触れた難揮発性または不揮発性の成分が混在している場合の挙動に似ている。従って、測定に用いた標準香料物質をGPC測定（分子量の大きさを測定）した。その結果、明らかにデカナールより高分子量の化合物の混在が確認された。

8) γ -ノナラクトン(γ -Nonalactone) [公定書含量規格：>98.0%]

公定書法（香料試験法：エステル含量）で含量は試料-1では98.9%、試料-2では99.8%に対して、「面積百分率法」では極性カラムでそれぞれ99.5%、100.0%、非極性カラムで99.6%、100.0%の値を得た。いずれのカラムでも公定書法に近似した値であった。

試料-2はデカノールを用いた内標準法で測定し、極性カラムで99.4%、非極性カラムで99.5%と近似した値を示した。

9) フェニル酢酸エチル(Ethyl phenylacetate) [公定書含量規格：>98.0%]

公定書法（香料試験法：エステル含量）による含量は、試料-1では98.0%、試料-2では99.8%に対して、「面積百分率法」ではそれぞれ極性カラムで99.7%、100.0%、非極性カラムで99.8%、100.0%の値を得た。いずれのカラムでも公定書法に近似した値であった。

内標準法では試料-1、試料-2ともに内標準物質としてデカノールを用い、極性カラムで99.9%、100.0%、非極性カラムで99.5%、99.9%の近似した値を示した。

10) ヘキサノ酸アリル(Allyl hexanoate) [公定書含量規格：>98.0%]

公定書法（香料試験法：エステル含量）による含量は試料-1では99.5%、試料-2では100.7%であった。「面積百分率法」では試料-1は極性、非極性カラムともに99.4%、試料-2は極性、非極性カラムともに100.0%を示し妥当な数値であった。

内標準法では試料-1、試料-2ともに内標準物質としてノナノールを用いて測定した結果、99.3~99.7%といずれも近似した範囲の値であった。

11) ベンジルアルコール(Benzyl alcohol) [公定書含量規格：>98.0%]

公定書法（香料試験法：アルコール類・第2法）で試料-1、試料-2 はともに 99.9%を示した。

「面積百分率法」ではそれぞれ極性および非極性カラム共に 99.7~100.0%の範囲の値で測定値に問題はなかった。試料-1、試料-2 とも内標準物質にオクタノールを用いて測定し、試料-1 は極性カラムで 97.5%と低めの値であったのに対し非極性カラムでは 100.7%という高めの値が出た。試料-2 は公定書法に近似した値であった。

12) 酪酸エチル(Ethyl butyrate) [公定書含量規格：>98.0%]

公定書法（香料試験法：エステル含量）による含量は、試料-1 では 99.5%、試料-2 では 100.2%であった。「面積百分率法」では試料-1 が極性、非極性カラムともに 99.8%、試料-2 が極性、非極性カラムともに 100.0%といずれも公定書法に近似した数値であった。

内標準法では試料-1、試料-2 ともに内標準物質にヘキサノールを用いて測定したが、いずれも公定書法に近似した値であった。

2. GC 測定条件と含量値

今回のGC測定は、日本香料工業会・食品香料委員会加盟の6社が担当し、資料-1のJECFA試験法、「GAS CHROMATOGRAPHIC(GC) ASSAY OF FLAVOUR CHEMICALS」記載のGC法分析条件をほぼ満たす範囲内で、各社独自の条件を用いて検討した。その各社のGC測定条件は表-1に示した。

カラムは「JECFA試験法」に準じた複数メーカー品を使用した。極性カラムではTC-WAX、DB-WAX、INO-WAX等のメーカーの異なる3種類を使用し、また非極性カラムはTC-1、HP-5、HP-1、DB-1の4種類で、若干の違いがあるもののほぼ同じ極性のカラムを使用した。カラムの内径は0.2mm~0.53mm、カラムの長さでは15m~60mを使用した。カラムの長さは分離能に影響与えた。また、今回使用したカラムの膜厚は、「JECFA試験法」に記載の膜厚(1~3 μ m)よりも薄く、0.25 μ m~1.5 μ mであったが、最近のカラムのコーティング技術の進歩等を考慮すれば、膜厚は今回使用した範囲内でも問題はないと考えられる。

キャリアーガスおよび流速はそれぞれカラムサイズに合わせた最適条件で使用した。特にキャリアーガスは分離能にほとんど差のないHe、N₂の2種類を使用した結果、測定値に差は見られなかった。カラム温度は45~255°Cの範囲で測定した。昇温条件は表-1に示した種々の条件であったが、再現性が得られる条件であれば特に問題はないと考えられる。注入量は0.1~1.0 μ l、スプリット比は1:10~1:200であった。カラムの内径が0.53mmの場合に「JECFA試

験法」記載のスプリット比 1:50 より大きい比 1:10 で測定したが、他のカラムの測定結果との差は特に見られなかった。

今回のGC測定は、「JECFA 試験法」をほぼ満たす範囲内において、各社の条件で測定し、良好なデータを得た。

ただし、香料化合物によって適性な測定条件を選択する必要性が確認された。

例えば、 α -アミルシンナムアルデヒドの場合、極性カラムでは1ピークであるが、非極性カラムでは *cis*-体と *trans*-体が分離して2本のピークとなった。

また、1,8-シネオールの場合は極性カラムでは共存するリモネンを分離できたが、非極性カラムでは分離できなかった。さらに長さ 15m の非極性カラムを使用したデカノールの測定では、分離能が十分でなく、複数の成分ピークの重なり含量値となった。

3. 公定書法含量と「面積百分率法」測定値との比較

公定書法に採用されている化学的分析法は、あくまでも官能基特性を利用した化学反応によるため、対象となる化合物の分離が十分とはいえない。一方、GC法は成分を分離する過程が入るため、被検試料が揮発性成分である限りより純度の高い状態として化合物を分析することができる。

α -アミルシンナムアルデヒドのGC-MS分析により、*cis*-および *trans*-異性体以外に微量の **pentyl-2-nonenal** が認められた。この **pentyl-2-nonenal** はヘプタナールとベンズアルデヒドの縮合反応により α -アミルシンナムアルデヒドが製造される際に副生されたものである。公定書法のアルデヒド・ケトン類第2法は、試料とヒドロキシアミンの反応でシッフ塩基を生成させ、残存する過剰のヒドロキシアミンを逆滴定することによりアルデヒド含量を求める方法である。

そのため、 α -アミルシンナムアルデヒドと共に **pentyl-2-nonenal** も含量として検出される。このことが、「面積百分率法」では含量が 98.6~99.1%であるのに対し、化学的分析法に基づく公定書法の実測値 (99.3、99.4%) が高くなる理由と考えられる。

オイゲノールの公定書法は、フェノール性水酸基の弱酸としての性質を利用し、アルカリ水溶液に溶解させるものである。フェノール含量は、その際の不溶物の体積を量ることから逆算して算出される。GC法に比べて限られた試料量で精度を確保することは難しい。しかし実際には、公定書法の結果が 100.0~100.1%であったことから、GCの測定結果との間には良い一致が認められた。

デカノールは、GC-MS分析の結果、デカナール、デカン酸、炭化水素類、さらに、オクタノール、ノナノール、ウンデカノール、ドデカノールなど、種々のアルコール類が共存物として認められた。デカノールは椰子油を原料として油脂の加水分解および還元反応により製造されるため、上記の共存物が混在する。

公定書法のアルコール類第1法では、アルコールの水酸基を無水酢酸によりアセチル化し、得られたアセチル化物を別途ケン化、過量のアルカリを塩酸で逆滴定することで測定する。従って、上記アルコール類もデカノールとともに含量として検出されることとなる。一方、「面積百分率法」では GC の分離能が十分である場合、上記アルコール類がデカノールと分離されるため、含量が 94.9~96.6% となり、公定書法の実測値 (98.2%) を下回る測定値を与えることとなった。

酢酸フェネチル、フェニル酢酸エチル、ヘキサン酸アリルおよび酪酸エチルのエステル類は、通常精製された酸類およびアルコール類を原料としてエステル化することで製造されるため、共存物が少なく各々の含量が高い。その結果、「面積百分率法」と公定書法のエステル含量測定法でのデータに差が少なく、良い一致が認められた。

シトロネロールは、GC-MS 分析の結果、グラニオール、3,7-ジメチルオクタノール、イソグラニオール、ネロール、セスキテルペン炭化水素類などが共存物として認められた。このような共存物の存在は、シトロネロールが天然由来のシトロネラルの還元あるいはピネンを原料とした一連の反応によって製造されていることに起因する。公定書法によるシトロネロールの含量は、デカノールと同様にアルコール類第1法によって測定される。従って、テルペンアルコール類がシトロネロールとともに検出されることとなる。「面積百分率法」では、上記テルペンアルコール類がシトロネロールと分離されるため、含量がそれぞれ試料-1 で 95.6~96.4%、および試料-2 で 92.8~92.9% となり、公定書法の実測値 (試料-1 : 100.1% および試料-2 : 94.2%) を下回る測定値を与えることとなった。

1,8-シネオールは、天然精油より精留して製造されるため、1,8-シネオールと沸点が近いテルペン系炭化水素類 (リモネン、ピネン類、パラサイメンなど) が多く共存物として含有されている。公定書法では、1,8-シネオールと *o*-クレゾールとの付加体を生成させ、その付加体から 1,8-シネオールの含量を求める含量測定法であるため、共存物の影響が少ない。従って、その含量は公定書法でも低く設定されている。それ故、共存物のリモネンとの分離状態の良い極性カラムによる「面積百分率法」と公定書法との間に、差はあまり認められなかった。

デカナールは、デカノールを酸化することで製造されるため、デカン酸が共存物として混在する。しかし実測値は、「面積百分率法」で 94.6~99.4%、公定書法 (香料試験法 : アルデヒド・ケトン第2法) で 95.1~97.9% と大きな差は認められなかった。この種の脂肪族アルデヒド類は重合し易い。この点については、この後の項で改めて触れたい。

γ -ノナラク톤は、ヘプタナールを塩基の存在下にマロン酸と縮合させ、得られたノニレン酸をさらに硫酸共存下にラクトン化させて製造される。一般に製品の分離精製が容易なため、純度の高い製品が得られる。従って、前述のエステル類と同様、「面積百分率法」と公定書法のエステル含量測定法での結果に良い

一致が認められた。

ベンジルアルコールは、塩化ベンジルの加水分解反応またはベンズアルデヒドあるいは安息香酸エステルの還元反応など、工業製品を原料として製造される。そのため、製品は、物理的、化学的性質の類似した共存物が少なく純度が高い。その結果、「面積百分率法」の含量（99.7～100.0%）と公定書法のアルコール法第2法の含量（99.9%）との間には、共存物に由来する差が現れず良い一致が認められた。

4. 「面積百分率法」と内標準法との比較

「面積百分率法」の測定が正しいことの裏付けを得るために、異なった測定方法の内標準法でも同一試料を使って測定し、「面積百分率法」の測定結果と比較した。

1) 内標準法に用いた標準物質の純度（表-4 参照）

① 標準香料化合物

α -アミルシンナムアルデヒド 96.3%、シトロネラール 96.8%、デカノール 98.4%とやや純度が低かったが、その他はすべて 99.3%以上の高純度であった。

② 内標準物質

1,8-シネオール、デカナール、 γ -ノナラク톤、フェニル酢酸エチルに用いた内標準物質のデカノールの純度が 97.9%とやや低く、その他はすべて高純度であった。

2) 「面積百分率法」と内標準法の測定結果（表-7 参照）

① α -アミルシンナムアルデヒド

試料-2 の非極性カラムでの値が「面積百分率法」で 98.9%、内標準法で 97.0%とやや差が認められたが、その他は良い一致を示した。

② オイゲノール

試料-1 は極性、非極性いずれのカラムでも良い一致を示した。

試料-2 の内標準法の値が極性カラムおよび非極性カラムそれぞれ 100.9%、101.0%と規格限度値の 100.5%を越える値を示した。

③ デカノール

試料-2 の極性カラムと試料-1 の極性および非極性いずれのカラムでも

「面積百分率法」より内標準法が低めの値を示した。また、試料-2 の非極性カラムでの値は「面積百分率法」で 99.6%、内標準法で 97.0%という高い値を示した。この理由は、内部標準物質と同一のオクタノールが試料-2 のデカノールにわずかな量含まれていたことに起因し、この点で内標準物質の選定に問題があった。

④ フェニル酢酸エチル

試料-2は極性、非極性いずれのカラムでも良い一致を示した。

試料-1の内標準法の値は極性カラムでの値が101.3%と規格限度値の100.5%を超える値を示した。

⑤ シトロネロール

試料-1、試料-2のそれぞれの極性カラム、非極性カラムでの測定結果が「面積百分率法」と内標準法で良い一致を示した。

⑥ 1,8-シネオール

試料-2の非極性カラムにおいては、内標準法での値が93.4%、「面積百分率法」の値が95.9%と差が認められたが、その他は良い一致を示した。

⑦ デカナール

試料-1で内標準物質にトリデカンを用いて測定した結果、極性カラムおよび非極性カラムそれぞれ108.0%、106.7%と高い値を示した。

試料-2で内標準物質にデカノールを用いて測定した結果、極性カラムで95.7%、非極性カラムで99.3%の値を示した。

デカナールは不安定な化合物である。試料-1では、標準香料化合物自体が不揮発性の共存物を含んでいた(GPCで確認)。これによりファクターが高くなり、高い値を示す結果となった。

試料-2の場合は、発熱反応が認められたことより内標準物質として選んだデカノールに問題があったと考えられる。従って、GCにおける「面積百分率法」と内標準法との比較はできなかった。

⑧ γ-ノナラクトン

試料-2は極性、非極性いずれのカラムでも良い一致を示したが、試料-1の内標準法の値が極性カラム、非極性カラムそれぞれ100.9%、101.0%と規格限度値の100.5%を超える値を示した。

⑨ フェニル酢酸エチル

試料-1および試料-2ともに全データが100%前後と近似した値であった。

⑩ ヘキサン酸アリル

試料-1および試料-2ともに全データが100%前後と近似した値であった。

⑪ ベンジルアルコール

試料-1の極性カラムでの値が内標準法で97.5%と低めであったがその他は「面積百分率法」と内標準法の値が良い一致を示した。

⑫ 酪酸エチル

試料-1および試料-2ともに全データが100%前後の大変近似した値であった。

3) 比較結果のまとめ

- ① シトロネロール、フェニル酢酸エチル、ヘキサン酸アリル、酪酸エチルは試料-1および試料-2ともに、極性カラム、非極性カラムでの測定結果

が「面積百分率法」と内標準法とで良い一致を示した。

② デカノールの試料-2の非極性カラムでの値は「面積百分率法」で99.6%、内標準法で97.0%と他の条件の値よりも高い値を示したが、これは15mの短いカラムを用いたために共存物との分離が充分でなかったためと考えられる。また、試料-2で内標準物質としてオクタノールを選定したが、試料のデカノールにも微量のオクタノールが含まれていたことからこの選定に問題があった。

③ デカナールは、試料-1の内標準法の値が極性カラムおよび非極性カラムにおいてそれぞれ108.0%、106.7%と高い値を示した。標準香料化合物をGPC測定したところデカナールより高分子量の化合物の存在が確認された。これはデカナールが不安定な化合物のため標準香料化合物自体が変化し生成したものと考えられる。このように標準香料化合物にGCで検出されない化合物が存在すれば測定結果は高くでる。

一方、試料-2では内標準物質にデカノールを用い、極性、非極性いずれのカラムでも良く一致した結果を得た。しかし、別の実験でデカノールとデカナールを混合すると発熱を伴って反応しアセタールが生成したと推定される現象が認められた。従って、この数値の信憑性が疑われる。デカナールのような不安定な香料化合物を分析する場合は、標準香料化合物および内標準物質などの取扱に充分注意を払う必要がある。

④ α -アミルシンナムアルデヒドの試料-2の非極性カラム、デカノールの試料-1の極性および非極性両カラム、1,8-シネオールの試料-2の非極性カラム、ベンジルアルコールの試料-1の極性カラムでは、内標準法の数値が「面積百分率法」より低い値を示した。

また、オイゲノールの試料-2の極性カラムおよび非極性カラム、フェニル酢酸エチルの試料-1の極性カラム、 γ -ノナラク톤の試料-1の極性カラム、非極性カラム、ベンジルアルコールの試料-1の非極性カラムでの内標準法の数値が規格限度値の100.5%を越える値を示した。

内標準法で測定する場合、面積比を重量比に変換するためのファクターを必要とする。しかし、そのファクターを算出するには、操作手順が多いことから、熟練しないと誤差が生じやすい。また、この分析法は高純度の標準香料化合物の主要成分と含量が100%に近い被検香料化合物の主要成分との比較による含量測定法であるため、分析手順の中でわずかな誤差があっても100%を越える可能性がある。また逆に低めの値が出る可能性もある。

内標準法は、高純度品の成分含量を測定するよりも、むしろ高純度品に共存する微量成分の含量を測定するのに適した方法である。そのために初期の目的、即ち、異なった方法で「面積百分率法」の測定結果の正しさを裏付けるということを、内標準法の測定結果を使って評価することはかなり難しいこととなった。し

かし、規格限度値 100.5%などの条件を入れずに単純に測定数値のみで比較すれば「面積百分率法」と内標準法の間で大きな差異は認められず、概ね「面積百分率法」の正しさが裏付けられたものと思われる。

規格品か否かを判定するような高純度品の含量を測定する場合に操作上の複雑さから誤差の生じやすい内標準法に比べ、試料の一定量を直接 GC に注入するだけの簡単な操作のため誤差が出にくい「面積百分率法」の方がより適しているといえる。「面積百分率法」は、検出された全成分の面積値を百分率で表し、100 から主要成分以外の少量の混在物の値（数%）を差し引くと主要成分の含量となり、また、当然のことであるが「面積百分率法」では決して測定値が 100% を超えることはない。更に、表-5、表-6 で示したように「面積百分率法」の測定間における CV 値（変動係数）が大変小さいことから判るように、「面積百分率法」は測定の再現性、安定性がよいという特徴がある。以上のことを総合して考察すれば、蒸留精製した化学的に安定な香料化合物に対する含量測定法には、「面積百分率法」が適した方法であると結論づけることができる。

5. 難揮発性および不揮発性物質の簡易検査法

本研究の中で行った「面積百分率法」測定結果と内標準法での測定結果の比較により、「面積百分率法」が香料化合物の含量測定法として内標準法と同等か、場合によっては内標準法より優れた方法であることが判った。

しかしながら、このように優れた含量測定法である GC 「面積百分率法」であっても、難揮発性および不揮発性物質が混在しているものについては正しく含量が測定できないという欠点があることも一方で判っている（JECFA 試験法）。

現在市場で一般に流通している香料化合物は、その製造過程において蒸留精製され、難揮発性および不揮発性物質は除去されているので、通常「面積百分率法」で含量を測定することに問題はない。しかし何らかの理由で難揮発性および不揮発性物質が混在していることが予想される場合は、内標準物質または外標準物質を用いて測定しなければならない。この場合、内標準法は前述したように操作手順が多く誤差を生じやすく、また、外部標準法は再現性が得にくいという問題がある。そこでファクター計算を必要とせず、操作手順が少ない簡略化された内標準法を検討した。

本研究では、難揮発性又は不揮発性物質と仮定した **Benzyl benzoate** を標準香料化合物に 5 重量%、および 10 重量%混合したものを検液-2、検液-3として各調製し、検液中の **Benzyl benzoate** の含量を測定した。結果を表-8に示した。

① α -アミルシンナムアルデヒド

検液-2、検液-3ともに測定値は検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近

似していた。

② オイゲノール

検液-2の **Benzyl benzoate** の重量比 5.3%が極性カラムで 3.5%とやや低めの値であったが、他はすべて重量比と近似していた。

③ デカノール

検液-2の重量比 6.5%が極性カラムで 4.5%と低めの値であったが、他はすべて検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

④ 酢酸フェネチル

検液-2、検液-3ともに測定値は検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

⑤ シトロネロール

検液-2、検液-3ともに測定値は検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

⑥ 1,8-シネオール

検液-2、検液-3ともに測定値は検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

⑦ デカナール

検液-2、検液-3ともに測定値は検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

⑧ ャーノナラクトン

検液-2の重量比 5.8%が極性カラムで 2.0%と低い値であったが、他はすべて検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

⑨ フェニル酢酸エチル

検液-2、検液-3ともに測定値は検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

⑩ ヘキササン酸アリル

検液-2、検液-3ともに測定値は検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

⑪ ベンジルアルコール

検液-2の重量比 5.2%が極性カラムで 3.4%とやや低く、非極性カラムで 2.6%と低い値であったが原因は不明である。しかし、検液-3では極性カラム、非極性カラムとも検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

⑫ 酪酸エチル

検液-2、検液-3ともに測定値は検液中の **Benzyl benzoate** の重量比と近似していた。

本検査法は標準香料化合物と難揮発性または不揮発性物質と仮定した **Benzyl benzoate** を用いて行ったモデル実験であるが、上述の結果は香料化合物中の難

揮発性または不揮発性物質の混在を検査する方法として充分実用に見える方法であることを示している。

なお、実際の測定に際しては下記の計算式によって含量を求める。

i) 検液の調製

検液-4: 標準香料化合物と内標準物質を 1:1 (重量比) で混合した溶液

検液-5: 被検香料化合物と内標準物質を 1:1 (重量比) で混合した溶液

ii) GC 測定

a. 標準香料化合物を「面積百分率法」で GC 測定し、純度 (%) を求める。

b. 被検香料化合物を「面積百分率法」で GC 測定し、純度 (%) を求める。

c. 検液-4 を GC 測定し、主要成分の面積値と内標準物質の面積値を求める。

d. 検液-5 を GC 測定し、主要成分の面積値と内標準物質の面積値を求める。

iii) 香料化合物の面積値の再計算

検液-4 および-5 中の標準香料化合物および被検香料化合物の純度を 100% と仮定して GC 面積値を再計算する。

計算式を下記に示す。

a. 検液-4

$$D = \frac{F}{E} \times 100$$

D: 標準香料化合物の主要成分の面積再計算値

E: 標準香料化合物の純度 (%)

F: 標準香料化合物の主要成分の面積値

b. 検液-5

$$G = \frac{I}{H} \times 100$$

G: 被検香料化合物の主要成分の面積再計算値

H: 被検香料化合物の純度 (%)

I: 被検香料化合物の主要成分の面積値

iv) D および G の内標準物質に対する面積比(J および L)の算出

$$J = \frac{D}{K} \times 100$$

K: 検液-4 の内標準物質の面積値

$$L = \frac{G}{M} \times 100$$

M: 検液-5 の内標準物質の面積値