

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 米谷 民雄

平成13(2001)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究
米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所）

II. 分担研究報告

1. 規格試験法、分析法からの有害試薬の除去
米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所）
 2. 既存添加物の規格設定のための検討
米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所）
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）
 3. 既存添加物の主要成分の構造に関する研究
義平邦利（東亜大学大学院）
 4. 食品中のルチン関連物質のHPLCによる定量法の改良
伊藤誉志男（武庫川女子大学）
 5. 食品中の未許可添加物の分析法の開発
川崎洋子（国立医薬品食品衛生研究所）
 6. 生産統計を基にした食品添加物の摂取量の推定
生産統計を基にした食品添加物の摂取量の推定 その2
既存添加物リスト品目（天然添加物品目）
藤井正美（神戸学院大学）
 7. 1998年度（平成10年度）の食品中の食品添加物の行政検査結果を基
にした保存料の摂取量の推定
石綿 肇（国立医薬品食品衛生研究所）
 8. ゴム製器具・容器包装中の間接添加物に関する研究
河村葉子（国立医薬品食品衛生研究所）
- 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
小見邦雄（日本食品添加物協会）
- 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
日本における食品香料化合物の使用実態調査
平井孝一（日本香料工業会）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
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 米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長

研究要旨

食品添加物の安全性を化学的研究により確保するために、(I)規格基準設定に向けての研究として①有害試薬の除去、②既存添加物の規格設定、③既存添加物の主要成分の構造に関する研究を、(II)規格基準や未許可添加物の監視に必要な分析法設定に向けての研究として④食品中の食品添加物の定量法と、⑤食品中の未許可添加物の分析法に関する研究を、(III)食品添加物の摂取量が許容一日摂取量を超えていないかを調べるために⑥生産量統計を基にした摂取量推定、⑦行政検査結果を基にした摂取量推定の研究を、および(IV)間接添加物に関する研究として⑧ゴム製器具・容器包装中の間接添加物の研究を実施した。

分担研究者

米谷民雄・国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部長

協力研究者

山崎 壮・国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部室長

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・専務理事

分担研究者

義平邦利・東亜大学大学院・副学長

伊藤誉志男・武庫川女子大学薬学部・教授

川崎洋子・国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部主任研究官

協力研究者

中里光男・東京都立衛生研究所

石橋 享・東京顕微鏡院

分担研究者

藤井正美・神戸学院大学薬学部・教授

石綿 肇・国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部室長

河村葉子・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

渡辺悠二・東京都立衛生研究所・主任研究員

金子令子・東京都立衛生研究所・主任研究員

船山恵市・東京都立衛生研究所・主任研究員

尾崎麻子・大阪市立環境科学研究所・研究員

馬場二夫・大阪市立環境科学研究所・研究主任

和久井千世子・国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部

A. 研究目的

食品添加物の安全性を化学的に確保するために、規格基準の設定等に向けて、以下の目的で研究を実施した。

- ①有害試薬の除去に関しては、食品添加物公定書及び食品中の食品添加物分析法には、人体や環境に有害試薬を使用している試験法が多く残されたままになっている。そこで、有害試薬を使用しない代替試験法の検討方針を提案することを目指した。
- ②既存添加物の規格設定に向けては、(i)酵素を用いて製造する方法が開発されたベニバナ赤色素につき、従来からのアルカリ・酸を用いた抽出法と新たに開発された酵素処理による合成法により製造された製品の色素成分の異同について検討し、(ii)既存添加物のうち、規格未設定の品目につき、日本食品添加物協会に自主規格の設定を依頼し、(iii)国内での食品香料化合物の使用実態調査を、日本香料工業会に依頼した。
- ③既存添加物の主要成分の構造に関する研究では、今後のベニコウジ色素の動向を予想し対応する目的で、文献調査を実施した。また、ベニコウジ色素ともにVCの食品中からの分析法の改良を研究目的とした。
- ④食品中の食品添加物の定量法に関してはルチン関連物質（酸化防止剤）につき、迅速分析法の作成を目指した。
- ⑤食品中の未許可添加物の分析法の開発では、高タンパク食品及び脂肪含有食品からの保存料の簡便な一斉分析法の開

発ならびに指定外着色料の食品中からの検出法の確立を目指した。

- ⑥生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定では、昭和57年以来厚生科学研究で実施している調査を継続した。
- 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においても、平成5年度からの厚生科学研究を継続した。
- ⑧ゴム製器具・容器包装中の間接添加物に関する研究では、ゴム製器具・容器包装の衛生性に関わる報告が少ないことから、材質試験、溶出試験などを行うことによりそれらの衛生性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

- ①「第7版食品添加物公定書」の中で有害試薬を使用しない代替試験法を作成する必要のある試験法について、国内外の食品添加物および医薬品の規格における試験法を比較し、代替試験法への適用の可能性を検討した。また、「食品中の食品添加物分析法第2版」の中のベンゼンを用いた分析法を採用している水溶性アナトーについて、色素製剤中及び食品中の水溶性アナトーの分析に関する報告を文献調査した。
- ②(i)市販ベニバナ赤色素、酵素処理法により得られたベニバナ赤色素及びベニバナの花弁より抽出した赤色素につき、HPLCにより色素成分を分析した。さらに、市販のベニバナ赤色素に存在する未同定赤色素について単離同定を試みた。(iii)日本香料工業会会員のうち食品香料に携わる135社を対象に、使用している香料化

化合物の品目をアンケート調査し、日本市場における香料化合物の使用実態の把握及び国際的リストとの比較を行った。

③最近のベニコウジ色素に関する動向を調査をするために、JICSTを用いて過去5年間の文献の調査をした。食品中からのVCの分析は、酵素法を用いてその改良を検討をした。

④ルチン関連物質を各種食品から有機溶剤により抽出後、必要に応じて固相カラムで前処理を行い、電気化学検出器(ECD)及びUV検出器付きHPLCを用いて分析した。

⑤保存料は試料を80%メタノールで透析し、前処理用カートリッジを用いてクリーンアップ後、HPLCで測定した。着色料はハイポーラスポリマーHP-20で精製、単離し、予想される色素を合成してTLC及びHPLCで比較、検討した。

⑥指定添加物について、1年目に食品添加物の製造業・輸入業に対しての前年次品目別出荷量等をアンケートし、2年目に点検補充調査を行い、3年目に評価考察、所要のデータ開示を行ってきた。今年度は平成11年度を1年目とする第6回目の調査の2年目である。一方、天然添加物の法的体制がほぼ整備されてきたことから、この調査も併せて試みた。

⑦1996年度の全国自治体による食品添加物の行政検査結果を集計し、食品別の16種の食品添加物の平均濃度を求めた。これに食品別喫食量を乗じて食品添加物の一人一日当たりの摂取量を求めた。

⑧ニトリルゴム製手袋の蒸発残留物、各種元素や化合物などの溶出試験、及びアクリロニトリルの材質試験、ゴム

製品中の内分泌攪乱物質の検索などを行うとともに、赤外分光分析及び熱分解ガスクロマトグラフィーによる材質鑑別法を検討した。

C. 研究結果と考察

①第8版食品添加物公定書作成に向けて、個々の試験法について有害試薬を用いない代替試験法の検討作業方針を提案した。また、第2版食品中の食品添加物分析法に収載の水溶性アナトーの分析法の問題点と代替試験法の検討の参考になる文献情報を得た。

②(i)市販ベニバナ赤色素はカルタミンの他に赤及び黄色素を含み、酵素処理法で調製したベニバナ赤色素には副色素は見られなかった。副色素の構造はカルタミンに類似し、花卉の色素分析から副色素は原料由来と考えられた。(ii)27品目の既存添加物の自主規格が設定できた。(iii)有効回答70社から延べ22,837品を得た。使用実態品目は2,578品で、その内訳はEU Registerリストとの致品1,801品、FEMA GRASリストとの合致品目1,249品、JECFA評価済品目646品、日本独自使用品目777品であった。

③最近のベニコウジ色素に関する文献調査をした結果、115件の文献を得、分析し、動向調査をした。食品中からのVCの分析は、従来の酵素法にアルゴンガスを用いることで改良することが出来た。

④ルチン関連物質を、食品中の夾雑物と良好に分離して、分析することが出来た。添加回収率は86%以上と、良好な結果が得られた。

⑤食品中の未許可添加物の分析法の開

発では、保存料は 80%メタノールを用いた透析法により高タンパク食品及び脂肪含有食品を含む食品での一斉分析法が可能となった。着色料では、特許公報に基づいて合成された未許可色素の判別が可能となった。

⑥指定添加物の生産流通量調査の調査回答品目数は 350 (出荷なし 32 品目) で、数値集計としては今までと比し最も充実している感がある。一方、天然添加物品目のアンケート調査結果は、回答に混乱がみられたため、次年度に併せて補完調査を行い、より前進を期すこととした。そのため、指定添加物、天然添加物とも、本年度は集計段階である。

⑦行政検査結果に基づく推定摂取量では、安息香酸、デヒドロ酢酸、プロピオン酸の推定摂取量を算出した。安息香酸の摂取量は ADI の 2.2%であった。

⑧ニトリルゴム製手袋の半数で 4%酢酸によるカルシウム、亜鉛、イオウ及び蒸発残留物の溶出がやや多く、加硫促進剤の溶出もみられた。また、各種ゴム製品からノニルフェノール、オクチルフェノールなどの内分泌攪乱物質が検出された。さらに、赤外分光分析及び熱分解ガスクロマトグラフィーによるゴムの材質判別法を検討し確立した。

D. 結論

①第 8 版食品添加物公定書の作成に向けて、速やかに、モデル試料及び市場製品を用いた実証的検討作業に入ることが必要である。また、第 2 版食品中の食品添加物分析法中の水溶性アナトーの分析法は、分析法全体を再検討することが望ましいと

思われる。

②(i)酵素処理により得られたベニバナ赤色素には従来の色素とは異なる色素成分は最終的に残らないと考えられた。(ii)10 品目の自主規格については、平成 13 年度も継続して検討が必要となった。(iii) 欧米と我が国の使用実態品目の差は、香料の定義や範囲及び現行法の 18 類の限定による差異に加え、食の地域的、文化的な要因に基づくものと推定された。今後、流通化合物の量的および規格値の把握、安全性評価基準等の検討が必要と考えられた。

③ベニコウジの培養に関する研究が盛んに行われており、今後引き続き、新規成分とその安全性について注目していくことが必要と考えられた。食品中からの VC の分析法は、更に改良が必要であった。

④食品中のルチン関連物質の簡便かつ迅速な定量法を作成することができた。ルチン関連物質は、ECD-HPLC では UV-HPLC に比べて 10-40 倍高感度に検出することができ、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では、未許可保存料を含む保存料の高タンパク食品及び脂肪含有食品からの簡便な一斉分析法が確立された。また、輸入食品に使用されていた未許可色素が同定された。

⑥生産流通量のアンケート調査では、平成 13 年度に指定・天然添加物両者の出荷量(純食品向け出荷量を含む)を集計し、指定添加物については品目別一日摂取量を考察する。

⑦行政検査結果に基づく安息香酸の推定摂取量は、天然由来も含めADI以下であり、また、前回の推定と比較しても大差はなかった。

⑧ニトリルゴム製手袋において4%酢酸で蒸発残留物がやや高いものがみられ、また、天然ゴム製品などからノニルフェノール、オクチルフェノールなどの内分泌攪乱物質が検出されたが、食品衛生法に違反する製品はみられなかった。また、ゴムの材質判別法を確立した。

E. 健康危険情報

特記事項なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

米谷民雄：食品添加物に関する最近の動向について。食品衛生研究, (2001), 51(2), 105-113.

H. Ishiwata, A. Fukushima, Y. Abe, T. Yamada, M. Nishijima, Y. Fukasawa: Estimation of BHA, BHT, Propylene glycol, and sodium saccharin concentrations in foods and their daily intake based on official inspection results in Japan in fiscal year 1996. J. Food Hyg. Soc. Japan, (2000), 41, 86-93.

H. Ishiwata, T. Sugita, Y. Kawasaki, Y. Takeda, T. Yamada, M. Nishijima, Y. Fukasawa: Estimation of inorganic food additive (nitrite, nitrate, and sulfur dioxide) concentrations in foods and their daily intake based on official inspection results in Japan

in fiscal year 1996. J. Food Hyg. Soc. Japan, (2000), 41, 79-85.

河村葉子, 中島明子, 山田隆：食品用天然ゴム製品中の残存化学物質。食衛誌, (2001), 印刷中

2. 学会発表

義平邦利, 栗山明広, 渡辺敏郎, 長谷川直樹, 村上哲也, 栗原宏二郎, 平井孝昌, 稲波治, 澤木武, 西山浩司, 園田忠道, 加藤喜昭, 中村幹雄:市販ベニコウジ色素の調査 色素成分の構造について(その3)。日本食品化学学会第6回大会(2000).

河村葉子, 和久井千世子, 岸 香織, 米谷民雄：各種使い捨て手袋からの溶出物に関する検討, フォーラム 2000：衛生薬学・環境トキシコロジー (2000).

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長

研究要旨

「第7版食品添加物公定書」の中で有害試薬を使用しない代替試験法を作成する必要がある試験法について、国内外の食品添加物および医薬品の規格における試験法を比較し、代替試験法への適用の可能性を検討した。食品添加物公定書第8版作成に向けて、有害試薬を用いない代替試験法の検討作業方針を示した。また、「食品中の食品添加物分析法第2版」の中にも有害試薬を用いた分析法が含まれている。その中で、ベンゼンを用いた分析法を採用している水溶性アナトーについて、色素製剤中及び食品中のアナトー色素の分析法に関する報告を文献調査し、現行法の問題点と代替試験法への応用の可能性を検討した。

協力研究者

山崎 壮（国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部）

佐藤恭子（国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部）

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7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、人及び環境に配慮した試験法となるように努める。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、食品添加物公定書及び食品中の食品添加物分析法の改訂作業では、これらの点に関して十分な期間をかけた検討がなされなかったため、有害試薬を使用している項目が多く残されたままになっている。そこで、本調査研究では、「第7版食品添加物公定書」及び「食品中の食品添加物分析法第2版」について、有害試薬を使用している試験法を調査する。さらに、国内外の食品添加物および医薬品の規格を調査し、試験法の国際比較

を行う。得られた結果から、代替試験法の検討作業方針を提案することをめざす。本研究調査の結果は、次回の改訂に向けた必要不可欠な基礎資料となる。

これまでに、平成10年度では「第7版食品添加物公定書」について、平成11年度では「食品中の食品添加物分析法第2版」について、有害試薬を使用している試験項目を調査し、明らかにした。平成12年度は、「第7版食品添加物公定書」の中で有害試薬を使用しない代替試験法を作成する必要がある試験法について、国内外の食品添加物および医薬品の規格における試験法を比較し、代替試験法への適用の可能性を検討した。また、また、「第2版食品中の食品添加物分析法」中の有害試薬を用いた分析法のうち、参照分析法として記載され、ベンゼンを用いた分析法を採用している水溶性アナトーについて、色素製剤中及び食品中の水溶性アナトーの分析に関する報告を文献調査し、現行法の問題点と代替試験法への応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

B-1. 第7版食品添加物公定書中で有害試薬を使用している試験法の国際比較

以下の規格を調査した。

(1) 食品添加物公定書第7版（1998年）〔食添7〕

- (2) 医薬品添加物規格（1998年）〔医添規 98〕
- (3) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, FAO Food and Nutrition Paper 52 Compendium of Food Additives Specifications Vol.1 (1993), Vol.2 (1993), Addendum 1 (1992), Addendum 2 (1993), Addendum 3 (1995), Addendum 4 (1996), Addendum 5 (1997), Addendum 6 (1998), Addendum 7 (1999) [JECFA]
- (4) 第13改正日本薬局方（1996年）、第1追補（1998年）、第2追補（2000年）〔日局 13〕
- (5) European Pharmacopoeia 3rd Edition (1997), Supplements (1998, 1999, 2000) [EP3]
- (6) The United States Pharmacopoeia 23 and The National Formulary 18 (1995), First Supplement (1995), Second Supplement (1995), Third Supplement (1995), Fourth Supplement (1996), Fifth Supplement (1996), Sixth Supplement (1997), Seventh Supplement (1997), Eighth Supplement (1998), Ninth Supplement (1998), Tenth Supplement (1999) [USP23/NF18]
- (7) Food Chemical Codex 4th Edition (1996) [FCC4]

[] 内の表記は、本報告書での省略名を示す。

また、定性反応一般の解説書として、次の書籍を参照した。

- (1) 微量定性分析 理論と実験、石館守三著、南山堂、1974年
- (2) 日本薬局方試験法 医薬品分析、長瀬雄三、鈴木郁生、井上哲男、江島昭、杉浦衛著、広川書店、1977年

B-2. 水溶性アナト一の分析法に関する文献調査

アナト一色素の成分である bixin, norbixin の分析法のうち、色素製剤中及び食品中のアナト一色素の分析法に関する報告を調査した。

C. 研究結果

C-1. 第7版食品添加物公定書中で有害試薬を使用している試験法の国際比較

平成10年度に、「第7版食品添加物公定書」について、有害試薬を使用している試験項目を調査し、その中で有害試薬を使用しない代替試験法を作成する必要がある試験法を報告した。それらの項目に関して、国内外の食品添加物および医薬品の規格における試験法を比較し、代替試験法への適用の可能性を検討した。調査結果の概要を表1に示す。

各試験法との比較と、それに基づいた代替試験法の検討方針を以下に述べる。

1. 水銀化合物を用いている試薬、試験法

メタノール、水分測定用：

カールフィッシャー法による水分測定用メタノールを調製する際に、必要に応じて塩化第二水銀を用いることになっている。日局 13 記載の水分

測定用メタノールは、塩化第二水銀を用いずに調製する方法を採用している。食添でもそのまま採用することができる。

チアベンダゾールの定量法：

食添 7、EP3、USP23/NF18 いずれも非水滴定法を採用している。食添 7、USP23/NF18 は終点を色変化でみる方法であり、酢酸第二水銀を使用している。一方、EP3 は、非水滴定を電位差滴定で行い、水銀試薬を使用しない。従って、EP3 の定量法を代替法の候補に採用できる。

アルギン酸、アルギン酸ナトリウムの定量法：

日米欧共に JECFA 規格を採用している。脱炭酸させて炭酸を測定する専用装置を使う方法であり、そこで金属水銀を使用している。代替法としては、別の測定原理を使った定量法を新規に検討する必要がある。優れた方法が確立できた際には、JECFA に提案することが望まれる。

クエン酸イソプロピルの確認試験 (2)：

食添 7 に記載の「クエン酸イソプロピル」はクエン酸イソプロピルとグリセリン脂肪酸エステル混合物であると定義されている。確認試験は、(1) クエン酸塩の確認と、(2) 2-プロパノールの確認からなる。水銀試薬を使用するのは確認試験 (2) である。そこで、他の規格書の 2-プロパノールの確認試験法を比較すると、日局 13 と EP3 が水銀試薬を使用しない定性反応を採用している。ただし、両者共に、2-プロパノールをアセトンに酸化するためにニクロム酸カリウムを使用しており、環境上必ずしもふさわしいとは言えない。酸化剤を検討する余地がある。そこで、日局 13 と EP3 の 2-プロパノールの確認試験法を基にして代替法を検討することがふさわしいと考えられる。

1,8-シネオールの純度試験 (6) レゾルシン：

1,8-シネオールの中にはレゾルシン付加物による製造法があることから、レゾルシンの限度値規格が設けられている。本法は、Millon 試薬（硝酸第二水銀）によるフェノールの定性反応である。

まず、1,8-シネオールの現在の製造法から考えて、この規定が意味あるかを確認する必要がある。フェノールの定性反応では、Gibbs 試薬（2,6-dichloroquinone-4-chloroimide）が水銀化合物を含まず、感度が Millon 試薬と同程度である。従って、これを代替法の候補に採用できる。

ポリイソブチレンの純度試験 (5) 総不飽和物：

医添規 98 が、日局 13 の油脂試験法の中のヨウ素価試験法を採用している。この方法は水銀試薬を使用しない。また、溶媒も、食添 7 が四塩化炭素なのに対して、医添規 98 では日局 13 と同じシクロヘキサンを使用している。従って、医添規 98 の試験法をそのまま代替法に採用できる。ただし、総不飽和物の規格値は食品添加物公定書用に設定

し直す必要がある。

2. シアン化合物を用いている試薬、試験法

グルコン酸亜鉛の純度試験 (1) 重金属、および硫酸亜鉛の純度試験 (2) 重金属：

重金属を硫化ナトリウムで沈殿させ、総重金属量を確認する方法であるが、大量に含まれる亜鉛イオンをシアンイオンとキレートさせて硫化ナトリウムで沈殿しないようにしている。この方法を採用する限り、シアン化合物は必須である。現在、重金属の限度規格は、総重金属量で規制する方法から個別の金属毎に規制値を設定する方法に変更することが国際的な流れになっている。従って、EP3 のように原子吸光法で重金属を個別に測定する方法を、代替法として検討することがふさわしい。

3. ベンゼンを用いている試薬、試験法

モルホリン (試薬) の溶状試験：

溶状試験の溶媒として水、ベンゼン、四塩化炭素が指定されている。そこで、代替規格としては、溶解性を確認する溶媒からベンゼンを除き、代わりに、アセトンやエタノールなどを加える。

ポリイソブチレンの純度試験 (6) 低重合物：

抽出溶媒にベンゼンを使用している。医添規 98 が、抽出溶媒にシクロヘキサンを使用した方法を採用している。従って、医添規 98 の方法を代替法に採用できる。ただし、食添 7 の限度値が 1.2% 以下なのに対して、医添規 98 では 0.5% 以下になっている。これが溶媒による抽出効率の違いを反映しているのか、あるいは食添 7 よりも医添規 98 の方がきびしい不純物規格を採用しているのかを確認し、それに基づいて食添での規格値を設定する必要がある。

モルホリン脂肪酸塩の確認試験 (1)：

モルホリン脂肪酸塩を水解して、生成したモルホリンをピクレートにして融点測定する方法を採用しているが、ピクレートの再結晶溶媒にベンゼンを使用している。代替法としては、新しい方法を検討することが望ましいと思われる。一つの候補としては、生成したモルホリンを GLC 分析することが考えられる。試料を水解して生成した 2 級アミンを GLC で分析する例としては、JECFA が、シヨ糖脂肪酸エステル純度試験のジメチルホルムアミドの試験法として採用している。

4. 四塩化炭素を用いている試薬、試験法

オスミウム酸 (試薬) の定量法：

オスミウム酸は硫酸第二セリウム溶液 (容量分析用標準液) の標定に使用している。このオスミウム酸の品質規格の中で、定量法に使う溶媒に四塩化炭素が用いられている。代替法としては、次の 2 つの方針が考えられる。

[候補 1]

日局 13 と同様に、容量分析用標準液の硫酸四アンモニウムセリウム (IV) 溶液をヨウ化カリウムとチオ硫酸ナトリウムの組み合わせで標定して使用する。これによって、三酸化ヒ素とオスミウム酸を使用しないで済む。

[候補 2]

セリウム塩溶液を用いた滴定をやめる。グルコン酸第一鉄の定量は、日局 13 の硫酸鉄 (Ferrous Sulfate) と同様に過マンガン酸カリウム液で滴定する。また、dl- α -トコフェロールの定量は、日局 13 のトコフェロールの定量法 (HPLC 法、局方標準品を使用) を採用する。

モルホリン (試薬) の溶状試験：

溶解性を確認する溶媒から四塩化炭素を除く。代わりに、アセトンやエタノールなどを加える。

[3. ベンゼンを用いている試薬、試験法 モルホリン (試薬) の溶状試験を参照]

ポリイソブチレンの純度試験 (5) 総不飽和物：

[1. 水銀化合物を用いている試薬、試験法 ポリイソブチレンの純度試験 (5) 総不飽和物を参照]

この試験法を変更する場合には、「ヨウ素・四塩化炭素試液」を削除する。

シリコーン樹脂の純度試験 (1)：

シリコーン樹脂の抽出溶媒に四塩化炭素を使用している。医添規 98 の「ジメチルポリシロキサン・二酸化ケイ素混合物」の純度試験 (1) では、シクロヘキサンを抽出溶媒に採用している。従って、医添規 98 の方法を代替法に採用できる。ただし、食添 7 の限度値が 15% 以下なのに対して、医添規 98 では 3.0~7.0% になっている。これが溶媒による抽出効率の違いを反映しているのか、あるいは食添 7 よりも医添規 98 の方がきびしい不純物規格を採用しているのかを確認し、それに基づいて食添での規格値を設定する必要がある。

5. 三酸化ヒ素を用いている試薬、試験法

0.1 mol/l 硫酸第二セリウム溶液 (容量分析用標準液)：

オスミウム酸 (試薬) を使う試験法の代替法と同じ考えができる。

[4. 四塩化炭素を用いている試薬、試験法 オスミウム酸 (試薬) の定量法を参照]

(注) 三酸化ヒ素は様々な試験法に採用されているが、今回はそれらをすべて検索したのではない。「硫酸第二セリウム溶液」の調製で三酸化ヒ素が用いられていることを明記したにとどまる。

6. 二硫化炭素を用いている試薬、試験法

シヨ糖脂肪酸エステル純度試験 (2) ジメチルホルムアミド：

シヨ糖脂肪酸エステル製造過程で、シヨ糖の

溶剤としてジメチルホルムアミドを使用する製法があるため、この規定が設定されている。ただし、日本ではこの製法は採用されていないという。ジメチルホルムアミドの残存量規定は JECFA には記載されている。試験法は、ジメチルホルムアミドを水解し、生成したジメチルアミンを検出する。食添 7 では、ジメチルアミンをクロロホルム中で二硫化炭素と反応させてジチオカルバミン酸に誘導し、それを検出する方法を採用している。JECFA では、ジメチルアミンを GLC で分析する方法を採用している。

脂肪族第二アミンの定性反応として、炭酸ナトリウムアルカリ性下でニトロプルシッドナトリウムとアセトアルデヒドとの反応で青紫色の溶性化合物を生ずることが知られている。ジエチルアミンの確認限界が約 $4\mu\text{g}$ とされている。この方法が代替試験法として利用できる可能性がある。ただし、活性メチレン化合物がアルカリ性でニトロプルシッドナトリウムと反応し呈色する (Legal 反応)。また、SH 基をもつ化合物も呈色する。従って、ニトロプルシッドナトリウムを用いる定性反応がシヨ糖脂肪酸エステルの純度試験に利用できるかは、実際に検討してみる必要がある。

代替試験法の別候補としては、JECFA が採用している GLC 法がある。

7. クロロホルムを用いている試薬、試験法

α -L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (試薬) の純度試験 :

α -L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステルは、アスパルテームの光学異性体不純物として規格が設定されている測定対象物質である。試薬としての 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品質規格の中の純度試験で、クロロホルムが使用されている。

医添規 98、EP3、USP23/NF18、FCC4 のいずれもが、アスパルテームの規格として、この光学活性不純物の限度規格を設定していない。食添 7 のアスパルテームの規格においても、光学活性不純物 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規定を削除し、同時に α -L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル (試薬) も削除するのが適当と考えられる。

三塩化アンチモン試液 :

三塩化アンチモン試液は、カロテン類やレチノール類の定性反応 (Carr-Price 反応) の試薬である。日局 13 をはじめ、日米欧の規格に広く採用されている。その中で、JECFA のカロテンの確認試験として、日本から提案された Carr-Price 反応の変法が採用された (1998 年)。試料と三塩化アンチモン共にトルエン溶液を使い、濾紙にスポットして判定する方法である。この方法を代替法にすることで、クロロホルムの使用を避けることができる。

[7. クロロホルムを用いている試薬、試験法

β -カロテン、ニンジンカロテン、パーム油カロテンの確認試験を参照]

パラフェニールフェノール (試薬) の溶状試験 :

パラフェニールフェノールは、「オルトフェニールフェノール」の純度試験(3)での測定対象物質である。試薬としてのパラフェニールフェノールの品質規格として、溶解性を確認する溶媒の一つにクロロホルムが指定されている。「オルトフェニールフェノール」の純度試験(3)で使用する有機溶媒はエタノールだけであり、クロロホルムを使用しない。従って、パラフェニールフェノールの品質規格からクロロホルムを削除しても問題は生じないと考えられる。

5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸 (試薬) の純度試験 :

5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸は、アスパルテームの純度試験での測定対象物質である。アスパルテームの規定の中で、5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸の測定法は、食添 7 と JECFA では GLC 法を採用し、医添規 98、EP3、USP23/NF18、FCC4 では HPLC 法を採用している。

医添規 98 が、試薬としての 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸の純度試験を規定しているが、その方法はアスパルテーム中の 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸を測定する純度試験と同一の方法である。食品添加物公定書においても、アスパルテームの規定の中で、5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸の測定法、及び、5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸 (試薬) の純度試験に、医添規 98 の方法を代替法として採用できる。

塩化カリウムの純度試験 臭化物、及び、同 ヨウ化物 :

食添 7、JECFA、日局 13、USP23/NF18、FCC4 において、臭化物あるいはヨウ化物の混入を規定する純度試験法の中で、生成した臭素またはヨウ素を捕集する溶媒としてクロロホルムが使用されている。一方、EP3 では、一定量の還元剤を加えた後に依然として残る臭素またはヨウ素を検出する方法を採用している。EP3 の方法はクロロホルムを使用しない点で優れており、代替法の候補となる。食添 7 の現行法と EP3 の方法とでは確認限界値が異なると推測されるので、限度値の検討を行う必要がある。

カラメルの純度試験 4-メチルイミダゾール :

日米欧いずれも、カラメル中の 4-メチルイミダゾールの試験法で、抽出溶媒としてクロロホルムまたはジクロロメタンを使用している。従って、代替法の候補はない。代替の非ハロゲン系有機溶媒を探す必要がある。または、別の原理による検出方法を検討する必要がある。

希釈過酸化ベンゾイルの確認試験と定量：

確認試験法と定量法で試料を溶かす溶媒としてクロロホルムを使用している。JECFA では確認試験と定量ではアセトン溶液を使用している。JECFA の試験法を食品添加物公定書でなぜ採用しなかったか、その理由を再確認する必要がある。特に問題がなければ JECFA 法が代替法の候補になる。また、アセトン以外にも代替有機溶媒を探す検討も必要と思われる。

グリセリン脂肪酸エステル純度試験 (4) ポリオキシエチレン：

ポリオキシエチレンの確認は日本独自の規格である。日米欧の規格の比較の中では代替法の候補がない。従って、代替の非ハロゲン系有機溶媒を探すか、別のポリオキシエチレンの確認試験法を検討することが必要である。

[7. クロロホルムを用いている試薬、試験法 ソルビタン脂肪酸エステル純度試験 (4) ポリオキシエチレンを参照]

シエラックの純度試験 (4) ロシン、及び (5) ロウ：

シエラック類の純度試験でロシンおよびロウを測定する試験法では、日米欧の規格いずれもハロゲン系溶媒（クロロホルム、ジクロロメタン、四塩化炭素）を使用している。従って、代替法の候補はない。代替の非ハロゲン系有機溶媒を探す必要がある。または、別の原理による検出方法を検討する必要がある。

ジフェニルの純度試験 (3) ナフタレンおよびその誘導体：

GLC で分析するために、試料であるジフェニルを溶かす溶媒としてクロロホルムを使用している。日局 13 では、ジフェニル（試薬）の純度試験として、試料をアセトンに溶かし、GLC 法で定量する。従って、食添でも、ジフェニルを溶かす溶媒としてアセトンを採用する。

シヨ糖脂肪酸エステル純度試験 (2) ジメチルホルムアミド：

[6. 二硫化炭素を用いている試薬、試験法 シヨ糖脂肪酸エステル純度試験 (2) ジメチルホルムアミドを参照]

ソルビタン脂肪酸エステル純度試験 (4) ポリオキシエチレン：

ポリオキシエチレンの確認は食添 7 独自の規格である。諸外国では許可され、日本では許可されていないポリオキシエチレン系界面活性剤の混入を防ぐための規定である。ポリオキシエチレン系界面活性剤の確認試験として、チオシアン酸アンモニウム・硝酸コバルト試液による発色反応が日局 13、医添規 98、JECFA で採用されている。生

成する青色色素の抽出にクロロホルムを使用する。

日米欧の規格の比較の中では代替法の候補がない。従って、代替有機溶媒を探すか、別のポリオキシエチレンの確認試験法を検討することが必要である。

[7. クロロホルムを用いている試薬、試験法 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を参照]

ダンマル樹脂の確認試験 (2) 及びヨウ素価測定：

TLC による確認試験と Wijs 法によるヨウ素価測定において、試料を溶かす溶媒としてクロロホルムを使用している。医添規 98 の「ダンマルゴム」では、Wijs 法によるヨウ素価測定を、日局 13 の規定に従って試料をシクロヘキサンに溶かして行っている。従って、食品添加物公定書でもダンマル樹脂を溶かす溶媒としてシクロヘキサンを採用できる。また、ヨウ素価測定法は、日局 13 の油脂試験法の中のヨウ素価試験法を採用するため、ヨウ素価の規格値を食品添加物公定書用に設定し直す必要がある。

β -カロテン、デュナリエラカロテン、ニンジンカロテン、パーム油カロテンの確認試験及び純度試験：

溶液の色をみる確認試験、Carr-Price 反応による確認試験、UV 可視極大吸収部の確認による確認試験、及び、純度試験 (5) 吸光度比において、試料を溶かす溶媒としてクロロホルムを使用している。

カロテン類やレチノール類の定性反応として、三塩化アンチモン試液を使う Carr-Price 反応が、日局 13 をはじめ、日米欧の規格書に広く採用されている。その中で、JECFA のカロテンの確認試験として、日本から提案されたトルエン溶液を用いた Carr-Price 反応の変法が採用された。Carr-Price 反応は、この方法を代替法にすることで、クロロホルムの使用を避けることができる。

[7. クロロホルムを用いている試薬、試験法 三塩化アンチモン試液を参照]

食添 7 の β -カロテンでは、試料の UV 可視スペクトル測定において、試料をまずクロロホルムに溶かしてからシクロヘキサンで希釈する。一方、食添 7 のデュナリエラカロテン、ニンジンカロテン、パーム油カロテンにおける UV 可視スペクトル測定、及び、医添規 98 の β -カロテンにおける純度試験の吸光度比測定においては、試料を直接シクロヘキサンに溶かしている。JECFA においても UV 可視スペクトル測定はシクロヘキサン溶液で行われている。従って、食品添加物公定書においても、UV 可視極大吸収部の確認及び吸光度比測定をすべてシクロヘキサン溶液で行う方法に変更できる。

また、溶液の色をみる確認試験もシクロヘキサン溶液でできると思われるので、確認してみる必

要がある。

ビタミン A 脂肪酸エステル、ビタミン A 油、粉末ビタミン A の確認試験及び純度試験 (2) クロロホルム不溶物：

Carr-Price 反応による確認試験において、溶媒としてクロロホルムを使用している。この反応は、トルエン溶液を用いる方法に変更できる。

[7. クロロホルムを用いている試薬、試験法三塩化アンチモン試液を参照]

また、ビタミン A 脂肪酸エステル及びビタミン A 油の純度試験 (2) クロロホルム不溶物は、この規格が本当に必要かを再検討することが望まれる。

プロピレングリコール脂肪酸エステルの確認試験 (2)：

試料を水解して生成したプロピレングリコールとグリセロールを確認するための TLC 展開溶媒として、クロロホルムを使用している。JECFA で採用されている total propylene glycol の確認試験法は亜ヒ酸ナトリウムを使用するため、代替法としては必ずしもふさわしくない。代替法として、次の方法が考えられる。

[候補 1]

クロロホルムを使用しない TLC 展開溶媒を検討する。

[候補 2]

IR 測定法を検討する。

医添規 98 の「モノステアリン酸プロピレングリコール」の確認試験では IR 測定法（液膜法）が採用されている。食添 7 の「プロピレングリコール脂肪酸エステル」は固体または粘ちょうな液体と規定されており、液膜法が使用できない場合がある。試料調製法を含めて、IR 測定法が適用可能かを検討する必要がある。

ミツロウの純度試験 (3) 過酸化物質：

試料を溶かすための溶媒として使用している。日局 13、EP3、FCC4 にミツロウが収載されているが、いずれにも過酸化物の規格がない。この規格が本当に必要かを再検討する必要がある。過酸化物の規格が必要な場合には、代替の非ハロゲン系有機溶媒を探すことが必要である。

リボフラビンの純度試験 (2) ルミフラビン：

リボフラビン類の純度試験としてルミフラビンの確認試験が、日米欧の医薬品、食品添加物の規格として収載されているが、いずれもハロゲン系溶媒（クロロホルム、ジクロロメタン）を使用している。従って、代替法の候補はない。代替の非ハロゲン系有機溶媒を探すことが必要である。または、別の原理による検出方法を検討する必要がある。

リボフラビン酪酸エステルの純度試験 (1) 溶状：

純度試験として、試料をクロロホルムに溶かした時に澄明な液になることを確認している。日局 13 によると、「リボフラビン」が水に極めて溶けにくく、エタノール、氷酢酸、エーテルにほとんど溶けないのに対して、「酪酸リボフラビン」はメタノール、エタノール、クロロホルムに溶けやすく、エーテルに溶けにくく、水にほとんど溶けないと記載されている。本試験がリボフラビンとリボフラビン酪酸エステルを区別する事を目的とするのであれば、溶媒をクロロホルムからメタノールまたはエタノールに変更することが可能と考えられる。本純度試験の目的と照らし合わせて、代替の非ハロゲン系有機溶媒を採用する検討が必要である。

レシチンの純度試験 (4) 過酸化物質、及び、水分測定：

食添 7 の「リン脂質」はリン脂質を主成分とする脂質画分である。純度試験 (4) 過酸化物質、及び、水分測定において、試料を溶かすための溶媒としてクロロホルムを使用している。リン脂質を溶かす溶媒としては古くからハロゲン系溶媒が多用されており、非ハロゲン系の代替有機溶媒の検討はむずかしいと思われる。ヘキサノールと 2-プロパノールの混合液が検討候補になる可能性はある。

C-2. 水溶性アナトーの分析法に関する文献調査

食品中の食品添加物分析法第 2 版に参照分析法として収載されている水溶性アナトーの分析法では、次の項目にベンゼンが使用されている。

ベンゼンを使用している箇所

2. 試験法

(4) 測定法

- 1) 定性 a 吸収スペクトル法、b 薄層クロマトグラフィー
- 2) 定量 a 検量線用標準液の調製等

*ベンゼンは、試料液及び水溶性アナトーからのノルビキシンの抽出に使用されている。

対応方針としては、

- (1) 現行の分析法の基本はそのままにして、アナトー色素の抽出にベンゼン以外の溶媒を使用する、
 - (2) 現行法とは別の原理または操作法による分析法に変える、
- の両方を検討する必要がある。そこで、アナトー色素の成分である bixin、norbixin の分析法のうち、色素製剤中及び食品中のアナトー色素の分析法に関する報告を中心に調査した。

1. 道衛研所報 第 33 集, 28-34 (1983)

天然着色料の分析法に関する研究 (第 1 報)

食品および色素製剤中のアナトー色素、クチナン黄色素の分析、西沢信、他

1) 標品：単離

- bixin : 市販の試薬を酢エチで再結晶。
 norbixin : 水溶性アナトー製剤 1kg から、アセトン、メタノール、NaOH、EtOAc、HCl、n-ブロパノールを用いて精製。
- 2) 食品中の bixin、norbixin の定量
 マーガリン : n-ヘキサン、NaOH、エーテル、HCl、EtOAc、MeOH で抽出等
 他の食品 : 伊藤らの方法 (分析化学 32,55(1983))、セライトカラム法で分画。
2. 東京衛研年報 40, 178-182 (1989) 平田恵子、他
 天然着色料製剤中の色素成分の分析 (第 1 報) アナトー色素中のピキシン、ノルピキシンおよびウコン色素中のクルクミンの定量
 着色料製剤中の色素成分の分析
- 1) 標準色素
 bixin : ピキシンパウダー (ピキシン含量 90.5%、三栄化学)
 norbixin : ノルピキシンパウダー (ノルピキシン含量 35.5%、三栄化学)
- 2) 分析方法
 吸光度法 (クロロホルム使用) により色素含量を測定して希釈して使用。
 TLC : ベンゼン使用
3. 東京衛研年報 43, 111-117 (1992) 荻原勉、他
 輸入食品中の天然色素の使用実態調査
 アナトー色素
- 1) 標準色素
 前報 (食衛誌 21: 207-213 (1980)、同上 24: 1-6 (1983)、分析化学 33: 586-590 (1984)、東京衛研年報 41:133-139 (1990)) 参照
- 2) 分析方法
 水又は水・エタノール混液を加えてホモジナイズ、酢酸又はアンモニア水で pH6~7 とし、エーテル、水で抽出。
4. 仙台衛生研究所報 第 21 号 平成 3 年度, 213-217
 佐藤通子、他
 HPLC による天然着色料 (アナトー色素) の簡易分析法
 アナトー色素
- 1) 標準色素
 アナトー色素 (和光、食品添加物試験用)
- 2) 分析方法
 食品中の天然食品添加物分析法試案 (レポート No.39) の改良 (セライトカラムを用いない)。ヘキサン、酢エチを使用。
5. Food Additives and contaminants 11 (3): 301-315 (1994) M.J.Scotter, et al.
 Characterization of the principal coloring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection.
 ピキシン、ノルピキシンの cis 及び trans 異性体の HPLC 分析
6. Food Additives and contaminants 12 (1): 9-19 (1995) F.E.Lancaster, et al.
 Determination of annatto in high-fat dairy products, margarine and hard candy by solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography
 ハードキャンディー、チーズ等の抽出ークロロホルム使用
7. J. Chromatography A, 732: 394-398 (1996) F.E.Lancaster, et al.
 High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, α - and β -bixin, and α - and β -norbixin, and the determination of carminic acid in foods
 各成分の HPLC 分析
8. 沖縄県衛生環境研究所報 第 28 号 53-55 (1994) 山城興博
 Sep-pak C18 カートリッジを用いた水溶性アナトーの分析法について
 厚生省依頼の添加物一日摂取量調査の一環。公定法では、食品群によっては抽出過程で乳化して回収率が低くなるものがあった。
 添加回収試験で 2 つのピークに分かれた。
9. Analyst 120: 351-354 (1995) U.Haas, et al.
 Qualitative and semiquantitative analysis of annatto and its content in food additives by photoacoustic spectrometry
10. J. AOAC International, 78(2): 491-496 (1995) M.Isabel, et al.
 Detection of Bixin, Lycopene, canthaxanthin, and β -apo-8'-carotenol in products derived from red pepper
- 1) Pigment Standard 種子より、エーテル、KOH-MeOH、酢酸を使用して抽出後、TLC (ヘキサン-アセトン) で bixin を集めた。
 2) アセトン、エーテルで抽出等
11. Analyst 122: 977-980 (1997) L.W.Levy, et al.
 Bixin and Norbixin in Human Plasma: determination and study of the absorption of a single dose of annatto food color
 抽出 : クロロホルム使用
12. J. Food Science 56 (1): 80-83 (1991) R.R.Chao, et al.
 Supercritical CO₂ extraction of annatto (*Bixa orellana*) pigments and some characteristics of the color extracts
 超臨界 CO₂ 抽出
 TLC : トルエン-アセトン
13. JECFA
 Annatto Extracts
 Annatto Extracts (Oil- and Alkali-extracted)

Annatto Extracts (Solvent-extracted)

ノルピキシンの抽出に溶媒としてトルエンを使用。

色素製剤中及び食品中のアナト一色素の分析法に関するこれまでの報告を調査した結果、食品中の食品添加物分析法第2版に記載されている現行法には、有害試薬であるベンゼンを使用しているという問題点以外にも、食品によってはうまく分析できない例のあることが指摘されている。一方、現行法とは違う方法で食品中のアナト一色素を分析した報告がある。食品中の食品添加物の分析においては、食品の種類によって個別に試料の前処理を工夫することが必要になる。従って、試料の前処理過程を含めて既報を参考にして、食品中のアナト一色素の分析法を再検討する必要があると思われる。現行の分析法の基本はそのままにして、アナト一色素の抽出にベンゼン以外の代替溶媒を使用するという対応策では不十分と思われる。

D. 考察

D-1. 第7版食品添加物公定書中で有害試薬を使用している試験法の改定のための検討

今回、第7版食品添加物公定書の中で有害試薬を使用しない代替試験法を作成する必要がある試験法について、国内外の食品添加物および医薬品の規格における試験法を比較し、代替試験法への適用の可能性を検討した。代替試験法作成にあたり、他の規格で採用している試験法を適用できるか、現行法を部分改良するだけでよいのか、あるいは別の原理に基づく試験法を検討する必要があるのかを判断した。その結果、かなりの項目に対して、有害試薬を用いない代替試験法の検討方針を提案できることがわかった。

平成10年度の調査研究で、第7版食品添加物公定書の「試薬・試液」の中には、一般試験法や各条で使用されていないにもかかわらず記載されている有害試薬が複数残っていることを指摘した。また、純度試験として有害物質の限度試験を行うために標準物質として使用する場合のように、今後も用いることがやむを得ない試薬・試液も指摘した。

以上の結果を総括すると、食品添加物公定書第8版作成に向けて、有害試薬を用いない代替試験法の検討作業方針としては、以下の対応が必要である。

これらの項目の多くは、実際に実験をして検討をする必要がある。また、市場の製品を対象に多数のロットで試験法を確認する必要がある。従って、食品添加物公定書第8版の作成に向けて速やかに検討作業に入ることが必要である。

また、今回の調査研究から、食品添加物公定書に記載されている試験法が、国内外の食品添加物及び医薬品の諸規格書に採用されている新たな試験法を取り入れる作業がこれまでで不十分であった

ことが推測された。国内外の諸規格書の調査研究、市販製品の製造法の動向などを踏まえて、食品添加物公定書に記載の試験法の見直し作業を行うことには多くの時間と人手を必要とする。そのためには、厚生労働省食品保険部を事務局とし、規格試験法の専門家を加えた、常設の食品添加物公定書改訂検討委員会を設置して、食品添加物公定書の改訂期間5年間をかけて検討作業をすることが望まれる。

1) 第8版の「試薬・試液」からその品目を削除すればよい：

1. エタノール性臭化第二水銀試液
2. 黄色酸化第二水銀
3. 酢酸第二水銀
4. 酢酸第二水銀試液、非水滴定用
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. ネスラー試薬
9. ヨウ化水銀カリウム試液
1-9: 水銀化合物を使用している。
10. アルミナ：
ベンゼンを使用している。
11. 4,4-テトラメチルジアミノジフェニルメタン：
ベンゼンを使用している。
12. テトラベース・クエン酸試液：
4,4-テトラメチルジアミノジフェニルメタンを使用して調製する試液
13. ヒドリングンチン：
ジオキサンを使用している。
14. ジチゾン試液、亜鉛用：
クロロホルムを使用している。

2) 日米欧の公的規格に記載されている試験法をそのまま採用することができる。規格値などの数値を食品添加物公定書用に見直す必要も特にない。：

1. メタノール、水分測定用：
日局13の「水分測定用メタノール」をそのまま採用する。
2. オスミウム酸（試薬）の定量法、及び、0.1 mol/l 硫酸第二セリウム溶液（容量分析用標準液）：
日局13と同様に、容量分析用標準液の硫酸四アンモニウムセリウム（IV）溶液をヨウ化カリウムとチオ硫酸ナトリウムの組み合わせで標定して使用する。これによってオスミウム酸と硫酸第二セリウム溶液が必要なくなる。
3. dl- α -トコフェロールの定量：
日局13のトコフェロールの定量法(HPLC法、局方標準品を使用)を採用する。セリウム塩溶液を用いた滴定をやめる。
4. 三塩化アンチモン試液、及び、カロテン類（ β -カロテン、ニンジンカロテン、パーム油

カロテン) やレチノール類 (ビタミン A 脂肪酸エステル、ビタミン A 油、粉末ビタミン A) の定性反応 (Carr-Price 反応) :

試料と三塩化アンチモン共にトルエン溶液を使い、濾紙にスポットして判定する方法を採用する。

5. アスバルテームの純度試験 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸の測定、及び、5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸 (試薬) の純度試験 :

医添規格 98 の試験法 (HPLC 法) を採用する。

3) 日米欧の公的規格に記載されている試験法をそのまま採用することができる。ただし、試験法を実際に追試することと、現在の規格値を必要に応じて試験法に合わせた規格値に見直す必要がある。 :

1. チアベンダゾールの定量法 :

EP3 の試験法を採用する。

2. ポリイソブチレンの純度試験 (5) 総不飽和物 :

医添規 98 の試験法を採用する。その際、「ヨウ素・四塩化炭素試液」を削除する。

3. ポリイソブチレンの純度試験 (6) 低重合物 :

医添規 98 の試験法を採用する。

4. シリコーン樹脂の純度試験 (1) :

医添規 98 の試験法を採用する。

5. 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 :

JECFA の試験法 (GLC 法) を採用する。

6. 塩化カリウムの純度試験 臭化物、及び同ヨウ化物 :

EP3 の試験法を採用する。

7. 希釈過酸化ベンゾイルの確認試験と定量 :

JECFA の試験法を採用する。

8. ジフェニルの純度試験 (3) ナフタレンおよびその誘導体 :

日局 13 のジフェニル (試薬) の規格と同様に、アセトンに溶かし、GLC 法で定量する。

9. ダンマル樹脂の確認試験 (2) 及びヨウ素価測定 :

医添規 98 の「ダンマルゴム」の試験法を採用する。

4) 代替試験法の基本方針の候補となる試験法がある。実際の試料を用いて具体的試験手順と規格値を検討する。必要に応じて改良を行う必要がある。検討の結果、試験法として利用できない可能性もあり得る :

1. クエン酸イソプロピルの確認試験 (2) :

日局 13 と EP3 の 2-プロパノールの確認試験法を基にする

2. 1,8-シネオールの純度試験 (6) レゾルシン :

Gibbs 試薬の利用

3. グルコン酸亜鉛の純度試験 (1) 重金属、及び、硫酸亜鉛の純度試験 (2) 重金属 :

規制する金属毎に規格値を設定し、原子吸光法による試験法を作成する。EP3 の規格を基にする。

4. モルホリン (試薬) の溶状試験 :

溶解性を確認する溶媒からベンゼンと四塩化炭素を除き、代わりに、アセトンやエタノールなどを加える。

5. グルコン酸第一鉄の定量 :

日局 13 の硫酸鉄 (Ferrous Sulfate) と同様に、過マンガン酸カリウム液で滴定する。セリウム塩溶液を用いた滴定をやめる。

6. 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 :

脂肪族第二アミンの定性反応として、炭酸ナトリウムアルカリ性下でニトロプルシッドナトリウムとアセトアルデヒドとの反応で検出する。

7. パラフェニールフェノール (試薬) の溶状試験 :

溶解性を確認する溶媒からクロロホルムを除く。

8. β -カロテン、デュナリエラカロテン、ニンジンカロテン、パーム油カロテンの確認試験 (溶液の色をみる確認試験、UV 可視極大吸収部の確認による確認試験)、及び、純度試験 (純度試験 吸光度比) :

シクロヘキサン溶液で行う。食添 7 のデュナリエラカロテン、ニンジンカロテン、パーム油カロテンにおける UV・可視スペクトル測定、及び、医添規 98 の β -カロテンにおける純度試験の吸光度比測定が、試料を直接シクロヘキサンに溶かして測定している。

9. プロピレングリコール脂肪酸エステルの確認試験 :

各種試料調製法を含めて IR 測定法が適用可能かを検討する。医添規 98 の「モノステアリン酸プロピレングリコール」の確認試験では IR 測定法 (液膜法) が採用されている。

5) 現行の試験法の基本はそのままにして、代替の非ハロゲン系有機溶媒を探す。 :

1. カラメルの純度試験 4-メチルイミダゾール

2. 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、及び、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

3. シェラックの純度試験 (4) ロシン、及び (5) ロウ

4. プロピレングリコール脂肪酸エステルの確認試験 (2) (試料を水解して生成したプロピレングリコールとグリセロールを確認するための TLC)

5. ミツロウの純度試験 (3) 過酸化物価

6. リボフラビンの純度試験 (2) ルミフラビン

7. リボフラビン酪酸エステルの純度試験（1）
溶状
8. レシチンの純度試験（4）過酸化物価、及び、
水分測定

6) 現行の試験法とは別の原理に基づく試験法を新たに検討し、確立する。:

1. アルギン酸、アルギン酸ナトリウムの定量法
2. モルホリン脂肪酸塩の確認試験（1）モリホリンの確認
3. カラメルの純度試験 4-メチルイミダゾールの確認
4. 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確認、及び、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確認
5. シェラックの純度試験（4）ロシン、及び（5）ロウの確認
6. リボフラビンの純度試験（2）ルミフラビンの確認

7) 有害試薬が関係する規格自体の必要性を再検討する。:

1. 1,8-シネオール純度試験（6）レゾルシン
2. アスパルテームの光学異性体不純物 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規格、及び、 α -L-アスパルチル-D-フェニルアラニンメチルエステル（試薬）の純度試験
3. ビタミン A 脂肪酸エステル及びビタミン A 油の純度試験（2）クロロホルム不溶物
4. ミツロウの純度試験（3）過酸化物価

8) 第8版でも、各条の規格を変更しない限りそのまま記載する必要がある。:

1. 水銀標準液:
「水酸化カリウム」、水酸化カリウム液」、「水酸化ナトリウム」、「水酸化ナトリウム液」の純度試験 水銀の測定で使用
2. シアン標準液とシアン標準原液:
「エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム」の確認試験 シアン化物の測定で使用
3. ベンゼン:
「ヘキサシアン」の純度試験（5）ベンゼンの測定で、標準物質として使用

D-2. 食品中の食品添加物分析法第2版中の水溶性アナトーの分析法の改定に関する検討

食品中の食品添加物分析法第2版に参照分析法として記載されている水溶性アナトーの分析法には、有害試薬であるベンゼンを使用しているという問題点以外にも、食品によってはうまく分析できない例のあることが指摘されている。現行の分析法の基本はそのままにして、アナトー色素の抽出にベンゼン以外の代替溶媒を使用するという対応策では不十分と思われる。一方で、現行法とは違う方法で食品中のアナトー色素を分析した報告

がある。従って、色素製剤中及び食品中のアナトー色素の分析法に関する既報を参考にして、分析法全体を再検討することが望ましいと思われる。なお、食品中の食品添加物の分析においては、食品の種類によって個別に試料の前処理を工夫することが必要になる。従って、試料の前処理過程を含めてできるだけ多くの分析事例を収集する必要がある。今後、地方衛生研究所、検疫所、指定検査機関などでの試験報告も含めた分析例を収集することが必要である。

E. 結論

- 1 「第7版食品添加物公定書」の中で有害試薬を使用しない代替試験法を作成する必要がある試験法について、国内外の食品添加物および医薬品の規格における試験法を比較し、代替試験法への適用の可能性を検討した。食品添加物公定書第8版作成に向けて、有害試薬を用いない代替試験法の検討作業方針を示した。
2. 食品添加物公定書第8版の作成に向けて、速やかに、少数のモデル試料及び多数の市場製品を用いた実証的検討作業に入ることが必要である。
3. 「食品中の食品添加物分析法第2版」の中でベンゼンを用いた分析法を採用している水溶性アナトーについて、色素製剤中及び食品中のアナトー色素の分析法に関する報告を文献調査し、現行法の問題点と代替試験法への応用の可能性を検討した。
4. 食品中の食品添加物分析法第2版中の水溶性アナトーの分析法は、分析法全体を再検討することが望ましいと思われる。
5. 今後も、国内外の食品添加物及び医薬品の諸規格書を調査し、食品添加物公定書に記載の試験法の見直し作業をする必要がある。そのためには、規格試験法の専門家を加えた、常設の食品添加物公定書改訂検討委員会を設置し、食品添加物公定書の改訂期間5年間をかけて検討作業をすることが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

表1 日米欧の食品添加物規格、医薬品規格における有害試験薬を使用している試験法、品目の比較

有害試験薬	食添7 メタノール、水分測定用(試験薬)	使用用途 水分測定用メタノールの調製に、必要に応じて使用。	医添規98 未収載	JECFA Water Determination (Karl Fischer Titrimetric Method)が記載されている[FNP 5 Rev.2]が、水分測定用メタノールは記載されていない。	日局13 水分測定用メタノール(試験薬)、試験調製に水銀試験薬は使用しない。水分除去には乾燥用合成ゼオライトを使用。	EP3 Determination of Water (Karl Fischer法)が記載されている。「Methanolic Anhydrous」を収載。その調製に、必要に応じてmercuric chlorideを使用(食添7と同一方法)。	USP23/NF18 Water Determination (Karl Fischer法)が記載されているが、水分測定用メタノールは記載されていない。「Methanolic Anhydrous」は、Methanol (ACS reagent grade)を使用。	FCC4 Water Determination (Karl Fischer法)が記載されているが、水分測定用メタノールは記載されていない。「Methanolic Anhydrous」は、Methanol (ACS reagent grade)を使用。	参考 水分測定(カールフィッシャー法)に使用
砒酸第二水銀	チアベンダゾール、Thiabendazole	定量(非水滴定、終点:色変化)	未収載	Thiabendazole: specificationsの記載を未確認	未収載	Thiabendazole、定量(非水滴定、電位差滴定)、水銀試験薬は使用せず	Thiabendazole、定量(非水滴定、終点:色変化)	未収載	
水銀	アルギン酸、Alginic Acid、アルギン酸ナトリウム、Sodium Alginate	定量法は、JECFA規格と同一。脱炭酸させて炭酸を測定。アルギン酸定量装置で水銀を使用。	アルギン酸、Alginic Acid、アルギン酸ナトリウム、Sodium Alginate: 定量装置で水銀を使用。脱炭酸させて炭酸を測定。	Sodium Alginate: 定量法は、Carbon dioxide determination [FNP Addendum 5 p.155, FNP 5 Rev.2 p.93]、他に Ammonium Alginate, Calcium Alginate, Potassium Alginate, Propylene Glycol Alginate, Sodium Alginateが収載。	未収載	未収載	Sodium Alginate, Propylene Glycol Alginate: 定量法は、Alginates Assay、JECFAと同一	Alginic Acid, Sodium Alginate: 定量法は JECFA規格と同一	
硫酸第二水銀	クエン酸イソプロピル、Isopropyl Citrate	確認試験(2) 2-propanolの確認: 原理は、アルカリ水溶液で生成した2-propanolを酸化クロムで酸化し、できたアセトンを硫酸第二水銀と反応させる。白色~黄色の沈殿を生じる。JECFAと同一試験法。	Isopropyl Citrate Mixtureでの Isopropanolの確認に、JP10から水銀試験薬を採り替える方法を採用(確認試験2)。原理は2-propanolを硫酸と重クロム酸カリウムで加熱して酸化し、できたアセトンをサリチルアルデヒドと強アルカリ性で反応して赤色を呈することで確認。JP9までは硫酸第二水銀で検出。	Isopropyl Citrate Mixtureでの Isopropanolの確認に、JP10から水銀試験薬を採り替える方法を採用(確認試験2)。原理は2-propanolを硫酸と重クロム酸カリウムで加熱して酸化し、できたアセトンをサリチルアルデヒドと強アルカリ性で反応して赤色を呈することで確認。JP9までは硫酸第二水銀で検出。	インプロパノール、Isopropanol: 2-propanolの確認に、JP10から水銀試験薬を採り替える方法を採用(確認試験2)。原理は2-propanolを硫酸と重クロム酸カリウムで加熱して酸化し、できたアセトンをサリチルアルデヒドと強アルカリ性で反応して赤色を呈することで確認。JP9までは硫酸第二水銀で検出。	Isopropyl Alcoholの確認試験はIRスペクトル、定量はGLC法。	Isopropyl Alcohol: 確認試験はIRスペクトル、定量はGLC法。	Isopropyl Alcohol: 確認試験は、硫酸第二水銀と反応させ、白色~黄色の沈殿を確認する。	

有害試験 硝酸第二 水銀	食添7 1,8-シネオール、1,8- Cineole	使用用途 純度試験(6)レシールの確認、原理はMillon試験(硝酸第二水銀)によるphenolの確認。	医添規98 未収載	JECFA 未収載	日局13 未収載	EP3 Eucalyptus Leaf、Eucalyptus Oil:これらは天然抽出物。Resorcinolが収載:確認試験B.水溶液に水酸化ナトリウムとクロホルムを加えて加熱し、冷却。深紅を呈する。塩酸性にすると淡黄色に変わる。	USP23/NF18 Eucalyptol: Phenolsの限度試験A.水酸化ナトリウム試液と混合した際に、体積が減少しない。同B.水とかくはんし、得られた水層に塩化第二鉄溶液を加えたときに、紫色を呈さない。	FCC4 Eucalyptol (as Flavor Chemicals): Resorcinolの限度値規格はない。	参考 1,8-cineol = eucalyptol. Resorcinolの検出感度は: Millon試験では0.5 μg、Gibbs試験では1 μg、塩化第二鉄では66 μg。[微量定性分析 p.368-374]
硝酸第二 水銀	ポリイソブチレン、 Polyisobutylene	純度試験(5)総不飽和物、溶媒:四塩化炭素、水銀試験使用、ヨウ素価を測定、限度値:2.0%以下。	ポリイソブチレン、 Polyisobutylene: 純度試験(3)総不飽和物の溶媒:シクロヘキサレン、油脂試験法のヨウ素価測定法を採用せず。限度値:0.5%以下	未収載。Iodine Value: Wijs method、試料を溶かす溶媒は四塩化炭素 [FNP 5 Rev.2 p.194]	油脂試験法のヨウ素価測定法で脂肪酸の不飽和度を測定:ウイス(Wijs)試験を使用、試料を溶かすための溶媒はシクロヘキサレン。	未収載	未収載	Polyisobutylene: 総不飽和物の規格はない。	
シアニ化 ナトリウム	グルコン酸亜鉛、Zinc Gluconate	純度試験(1)重量金属の限度試験:多量の亜鉛をKCNで隠蔽し、重量金属を硫化ナトリウムで沈殿させる。限度値:Pbとして10 μg/g以下。	未収載	未収載	硫酸亜鉛、Zinc Sulfate: 純度試験(2)重量金属の亜鉛を多量の亜鉛をKCNで隠蔽し、重量金属を硫化ナトリウムで沈殿させる。限度値:Pbとして10 μg/g以下	Zinc Stearate, Zinc Sulphate, Zinc Acetate Dihydrate, Zinc Acexamate: カドミウム、鉛、銅、鉄の限度値試験は原子吸光法。原子化は、フレイム法でもグラファイト炉法でもよい。	Zinc Chloride, Zinc Sulfate: 鉛の限度試験は亜鉛をKCNで隠蔽し、重量金属を硫化ナトリウムで沈殿させる。: Zinc Gluconate: カドミウムの限度試験は原子吸光法、鉛の限度試験は、試験溶液にアスコルビン酸-ヨウ化ナトリウム溶液とtriethylphosphine oxide in 4-methyl-2-pentanoneを加えてかくはんし、有機溶媒層中の鉛を原子吸光法で分析する。: Zinc Stearate: 鉛の限度試験は、灰化後、KCNまたはNH ₃ CN存在下にdithizone in chloroformで抽出し、色を比較する。	Zinc Gluconate: カドミウムの限度試験は原子吸光法、鉛の限度試験はグラファイト炉原子吸光法	

有害試薬	食添7 硫酸亜鉛、Zinc Sulfate	使用用途 純度試験(2)重金属の限度測定:多量の亜鉛をKCNで隠蔽し、重金属を硫化ナトリウムで沈殿させる。限度値:Pbとして10μg/g以下。	医薬規98 酢酸亜鉛、Zinc Acetate:純度試験(6)重金属の限度測定:多量の亜鉛をKCNで隠蔽し、重金属を硫化ナトリウムで沈殿させる。限度値:Pbとして10μg/g以下。	JECFA 未収載	日局13 硫酸亜鉛、Zinc Sulfate:純度試験(2)重金属の限度測定:多量の亜鉛をKCNで隠蔽し、重金属を硫化ナトリウムで沈殿させる。限度値:Pbとして10μg/g以下。	EP3 Zinc Sulphate:鉛の限度規格はない。金属として鉛の限度値のみ(原子吸光法)。	USP23/NF18 Zinc Sulfate:上述	FCC4 Zinc Sulfate:カドミウムの限度試験は、フレーム原子吸光法、鉛の限度試験はKCNを加えた後、硫化ナトリウムを加えて沈殿をみる。水銀の限度試験は水銀酸化装置を使用した原子吸光度試験は、セレンニウムの限度試験は、diaminonaphthaleneによる発色法。	参考
ベンゼン	モルホリン(試薬)	溶状試験の溶媒:水、ベンゼン、四塩化炭素	「モルホリン試液、濃」を収載。「モルホリン」の規格の記述はなし	未収載	未収載	Morpholine(試薬): soluble in water and in alcohol.	Morpholine(試薬): Use ACS reagent grade.	Morpholine:定義の中性の溶解性を規定する溶媒は、水、アセトン、エーテル、ヒマシ油、メタノール、アルコール、亜麻仁油、松油 食添7で、モルホリン(試薬)は「グリセロール」の純度試験(4)塩素化合物の測定でのみ使用。 Merck lindex 12th: miscible with water, acetone, benzene, ether, castor oil, methanol, ethanol, ethylene glycol, 2-hexanone, linseed oil, turpentine, pine oil.	
ベンゼン	ポリイソブチレン、Polyisobutylene	純度試験(6)低重合物の限度試験において、抽出溶媒がベンゼン。限度値:1.2%以下。	純度試験(4)低重合物の限度試験、抽出溶媒にシクロヘキサエン、限度値:0.5%以下	未収載	未収載	未収載	未収載	Polyisobutylene:低重合物の限度規格はない。	
ベンゼン	モルホリン脂肪酸塩、Morpholine Salts of Fatty Acids	確認試験(1)モルホリンの確認。原理は、水解して生成したモルホリンをピクレートにし、ベンゼンから再結晶し、その融点測定。	未収載	未収載	未収載	未収載	未収載	未収載	