

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

食品用香料及び天然添加物の化学的安全性確保に関する研究

平成14年度 総括・分担報告書

主任研究者 米谷民雄

平成15年（2003年）4月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

食品用香料及び天然添加物の化学的安全性確保に関する研究  
米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所）

### II. 分担研究報告書

1. 食品香料の規格のあり方及び流通量調査による曝露量評価に関する研究  
米谷民雄（国立医薬品食品衛生研究所）

2. 食品香料の規格定量法及び不純物に関する研究  
佐藤恭子（国立医薬品食品衛生研究所）

3. 食品中香料の分析法に関する研究  
伊藤蒼志男（武庫川女子大学）

4. 香料基原植物の含有成分及びそれらの毒性評価に関する研究  
義平邦利（東亜大学大学院）

5. 天然添加物の規格設定及び有害試薬使用の排除のための研究  
山崎 壮（国立医薬品食品衛生研究所）

6. 食品中の天然添加物の分析法に関する研究  
扇間昌規（武庫川女子大学薬学部）

7. 食品香料を含む食品添加物の確認試験法としての赤外吸収スペクトルに関する研究  
斉藤 寛（岡山大学薬学部）

8. 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）

9. 生産量統計及び行政検査結果を基にした食品添加物の摂取量の推定  
四方田千佳子（国立医薬品食品衛生研究所）

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
総括研究報告書

食品用香料及び天然添加物の化学的安全性確保に関する研究  
主任研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨

食品用香料及び天然添加物の安全性を化学的研究により確保するために、  
(Ⅰ) 食品香料においては、①香料規格のあり方を検討するために、国内の各社規格を調査し、②香料化合物流通量から暴露量を評価するための調査を行い、③規格定量法で面積百分率法による GC 法が適用できることを明らかにし、また、残留溶媒試験法（案）を作成し、④食品中からの柑橘系香料の一斉分析法を検討し、⑤天然香料の基原植物等の成分として 3,401 化合物を明らかにした。また、(Ⅱ) 天然添加物においては、⑥第三版既存添加物自主規格作成を援助し、⑦規格・試験法から有害試薬を排除するための変更案の市販製品適用性を調べ、⑧食品添加物のアレルギー性試験法を検討し、⑨天然添加物茶抽出物の分析法を検討した。さらに、(Ⅲ) 食品添加物全般を対象として、⑩IR による確認試験のあり方をアスパルテームを例に検討し、⑪確認試験法の参照スペクトルとして採用するために各種品目の IR スペクトルを測定し、⑫未許可添加物のエビ用保存料 4-ヘキシルレゾルシノールの分析法を確立し、⑬生産量統計による食品添加物の摂取量調査では、指定添加物について第 7 回調査のアンケートを実施し、⑭行政検査に基づく食品添加物の摂取量調査では、試作した全国自治体による食品添加物の行政検査結果集計用データベースを使用し、ソルビン酸をモデル添加物として、システムの改良を試みた。以上の研究成果は、第 8 版食品添加物公定書用の基礎データとなり、また、行政的に規格基準や分析法を設定し摂取量を把握することにより、食品添加物の安全性を化学的に確保することが可能になり、ひいては国民の健康維持に役立つものである。

佐藤 恭子・国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

伊藤誉志男・武庫川女子大学薬学部・教授

義平邦利・東亜大学・副学長

山崎 壮・国立医薬品食品衛生研究所・室長

扇間 昌規・武庫川女子大学薬学部・教授

斉藤 寛・岡山大学薬学部・教授

川崎洋子・国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

所・主任研究官

四方田千佳子・国立医薬品食品衛生研究所・室長

A. 研究目的

食品用香料及び天然添加物の安全性を化学的研究により確保するために、(Ⅰ) 食品香料においては、①香料規格のあり方を検討し、②流通量調査により暴露量を評価し、③規格定量法や不純物試験法を検討し、さらに、

④食品中からの分析法の開発と、⑤天然香料基原植物の成分調査と毒性調査を行う。また、(Ⅱ)天然添加物においては、⑥天然添加物の公的規格基準設定に向けて、食品添加物業界の自主規格案の策定を行い、⑦第7版食品添加物公定書に収載の規格試験法から有害試薬を排除することを目的に、有害試薬を使用している試験の代替試験法案について、市場流通品への適用可否についての調査研究を行い、また、⑧天然添加物中の不純物および主成分のアレルゲン性について、アレルゲン性試験法の開発を目的にマウス膝窩リンパ節測定法の検討を行い、さらに⑨天然添加物の分析法を充実させるために、酸化防止剤茶抽出物の定量法を確立し、さらに、(Ⅲ)食品添加物全般を対象として、⑩IRによる確認試験のあり方の研究、⑪確認試験の参照スペクトルとして採用するIRスペクトルの測定、⑫食品中未許可添加物の分析法の開発を実施し、最後に、摂取量調査として、⑬生産量統計に基づく推定と、⑭行政検査結果に基づく推定を行う。以上の研究により、食品添加物の規格基準や分析法を設定し、また、食品添加物の摂取量を把握することにより、食品添加物の安全性を化学的に確保し、国民の健康維持に役立つことを目的とする。

## B. 研究方法

①食品香料の規格のあり方を考えるにあたり、規格未設定の品目について、国内各社の自社規格を調査し、国際的

な規格と比較した。②香料化合物の使用実態調査を行い、部分的な品目については、JECFAの安全性評価法を用いた評価を実施した。③食品添加物公定書の香料化合物の定量法として、ガスクロマトグラフィー（以下、GC法）への移行が望まれているため、香料化合物のGC法による含量測定法の収載に向けて、難揮発性成分や不揮発性成分などが存在する場合の簡便な内標準法としての一点検量法を、8機関で検討した。また、公定書の製造基準では一部の既存添加物および天然香料について使用溶媒が規定されており、メタノール等6溶媒には残存限度値が設けられているが分析法は規定されていない。そこで、昨年度検討した天然香料中残留溶媒一斉分析法（案）を改良するとともに、6溶媒の限度試験法を作成し、11機関で検討した。また、香料化合物の含量測定法については、官能基別に選択した8品目の香料化合物を用いて、8研究室において、内標準法により分析を行った。天然香料の残留溶媒一斉分析法では、3品目6種類の天然香料を対象に、20種類の溶媒について、標準添加法によるヘッドスペース・ガスクロマトグラフィー（HS-GC/FID (MS)）により分析を行った。残存溶媒の限度試験法については、コショウ抽出物およびショウガ抽出物を対象香料とし、標準添加法によるHS-GC/FID (MS)により、アセトン、エタノール、メタノール、2-プロパノール、1,1,2-トリクロロエテン、ジクロロメタン、ヘキサン

の分析を行った。④食品中の柑橘系香料の分析法として、SPME法(固相マイクロ抽出法)による前処理を行った後、GC/MSを用いて一斉分析する方法を検討した。⑤昨年度に引き続き「サ」のサイプレスから「ハ」のバンレイシまでの天然香料基原の植物・動物・微生物および近縁動物・植物・微生物について、含有成分の調査をした。また、それらの各成分について生理活性物質、障害・毒性物質等があるかどうか調査研究をした。⑥天然添加物規格設定のための研究を、日添協技術委員会・自主規格専門委員会を中心として推進した。既存添加物製造企業の自社品質規格・試験法等について調査を行い、その規格内容の妥当性を評価した。必要に応じ、新規試験法を開発検討した。⑦有害試薬使用の排除のための研究では、日添協技術委員会が中心となって、代替試験法案の市場流通品への適用可否について調査研究するとともに、適用不可能なものにあつては、改めて代替試験法の開発検討を行った。⑧天然添加物中のアレルギー物質に関する研究では、水溶性物質として着色料をモデル化合物に用い、化学構造あるいは色素の精製度とマウス膝窩リンパ節測定法(PLNA)二次応答の強さとの相関について比較検討した。⑨茶抽出物の分析では、固相カラムで前処理を行った後、UV検出器付きHPLCを用いて、グラジエント溶出する分析法の検討を行った。⑩食品添加物アスパルテム2社5製品及び試薬アスパルテム1社1製

品を用いて、種々の前処理を行った後、IRスペクトルを測定した。⑪確認試験法として赤外吸収スペクトルを採用するために、カルナウバロウ、魚鱗粉およびガムベース(3品目)を入手し、各品目についてペースト法(ヌジョール法)および臭化カリウム錠剤法(KBr法)でIRを測定した。また、食品香料24品目(49製品)も入手し、主に液膜法で測定し、必要に応じてヌジョール法とKBr法も用いた。使用した分光器(FT-IR装置)は、簡易型のNicolet Impact 400である。⑫エビへの保存料4-ヘキシルレゾルシノールの分析法では、固相カートリッジによる精製後、HPLCで定量する方法を検討した。⑬指定添加物について、その製造・輸入事業者を対象に、食品添加物グレードの製造、輸入量、年間純食品向け出荷量、輸出量について、第7回調査のアンケートを実施した。⑭行政検査に基づく食品添加物の摂取量調査では、試作した全国自治体による食品添加物の行政検査結果集計用データベースを使用し、システムの改良を試みた。

(倫理面への配慮)

特になし。

### C. 研究結果

①18類に帰属される二千数百種の香料化合物の規格を調査した。今年度は、その内、実際に使用実態(会社数)が多い化合物やわが国独自の化合物から40品目を選択し、JECFA、FCC

などの国際規格と比較した。②流通量調査による暴露量評価に関しては、有効回答率は96.2%であった。国内で使用されている全食品香料化合物の総使用量に対する78品目の総使用量の比率は65.1%であった。③香料化合物と内標準物質の重量比とピーク面積比の検量線、純度とピーク面積比の検量線は良好な直線性を示し、一点検量法による含量測定は、信頼性ある結果を与えた。天然香料の残留溶媒一斉分析法では、多点検量線法と一点検量線法により同様の結果が得られ、限度試験法として、一点検量線法（簡便法）が使用できると考えられた。残留溶媒の限度試験法（案）を作成し、試験法の評価を行った。自動分析を行った8機関により報告された多点検量線法および簡便法による分析値の併行再現性の相対標準偏差および室間再現性の相対標準偏差を理論値と比較し、いずれの方法でも精度は許容できる範囲と考えられた。④食品中の柑橘系香料の分析法として、液体試料1.0 mLをセプタム付きバイアル瓶に入れ、密封したバイアル瓶にSPMEのセプタム貫通針を貫通させ、50℃で20分間加温し、香気成分をSPMEファイバーに吸着させた後、GC/MSに導入する方法を確立した。⑤「サ」のサイプレスから「ハ」で始まるバンレイシまでの206品目の天然香料について、基原植物・動物・微生物の含有成分に関する調査研究をした。また、それらの各成分について毒性評価に関する調査を行った。本年度調査した206品目

の香料の基原動植物数は、318種であった。今回の調査で得られた物質は、3401化合物であった。⑥天然添加物規格設定のための研究では、189品目の自主規格を収載した「第三版既存添加物自主規格（日本食品添加物協会）」を刊行し、新たに22品目の既存添加物について自主規格案の策定を行った。「自主規格」収載品目のうち、19品目について規格内容の見直しを行った。⑦昨年度からの継続を含め、15品目（12試験項目）について調査研究を行った。β-カロテン類、カラメル、ビタミンA類、ポリイソブチレン、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルの試験法で代替試験法案を見出した。⑧天然添加物中のアレルギー物質に関する研究では、合成色素であるキサンテン系色素、アゾ系色素、トリフェニルメタン系色素、インジゴ色素で検討した結果、基本骨格と反応性に明らかな関係がみられた。またfootpadから血中への移行が速やかな化合物は反応性が低い傾向を示した。天然色素であるコチニール色素について、通常精製度色素と高精製度色素の投与群のindexを比較すると、前者の方が高いindexを示した。⑨茶抽出物の分析には、固相カラムはCARBOGRAPH、溶出液はアセトニトリル/ヘキサン（96：5）が良かった。HPLC条件は、カラムにODSカラム、移動相は（A）アセトニトリルと（B）0.01%リン酸のリニアグラジエントを用いた。これにより25分以内に6成分を完全に分離定量

できた。⑩全ての製品の IR スペクトルは、厳密には、参照スペクトルとは一致しなかった。しかし、乾燥減量の条件で乾燥することにより、全製品のスペクトルを同一にすることができた。⑪カルナウバロウ（5 製品）、魚鱗粉、ガムベース（3 品目）および食品香料 24 品目（49 製品）について、液膜法、又はヌジョール法および KBr 法で標準的な IR を得た。⑫エビの保存料はメタノールで抽出し、固相カートリッジで精製後、HPLC で測定することができた。臭素酸塩は水抽出液を酢酸亜鉛溶液および水酸化ナトリウム溶液により、除タンパク後、銀カラム並びに逆相・陰イオン交換カートリッジにより精製、濃縮し、HPLC で定量した。⑬生産量統計に基づく食品添加物の摂取量調査では、第 7 回目の食品添加物製造・輸入業者に対するアンケート調査を開始し、調査票を回収して順次結果を集計することにより、統計量に基づく中間報告をまとめた。⑭行政検査に基づく食品添加物の摂取量調査では、試作した全国自治体による食品添加物の行政検査結果集計用データベースを使用し、システムの改良を試みた。

#### D. 考察

①今後、食品用香料の成分規格をフル規格の形で設定するのは現実的ではないこと、一方、現に 78 品目についてはフル規格が設定されているため、新たな香料規格の枠組みを早急に決定する必要があると考えられた。②78

品目の使用量の全香料使用量に対する比率は 65.1%であり、78 品目が食品香料製造のために極めて多量に消費されていることを示していた。③天然香料の残留溶媒一斉分析法では、限度値を超える溶媒、使用が認められていない溶媒も検出された。分析法を定めるに当たっては、それぞれの香料について、原料由来の成分について、把握しておく必要があると考えられた。④各種食品中の 5 種類の柑橘系香料を SPME 法により試料を採取し、GC/MS により定量する方法の添加回収率は、再現性良く 85%以上と良好であった。柑橘系香料では、シトラール、リモネン、リナロールなどの使用が目立ち、酢酸リナリルの使用はみられなかった。⑤今回調査した 206 品目の天然香料のうち、36 品目については成分に関する研究報告はなかった。3401 化合物のうち化学物質毒性データ(RTECS)があるのは、243 物質であった。⑥作成できた自主規格は、公的規格作成時のたたき台になると考えられる。⑦規格試験法から有害試薬を排除するための変更案は、規格基準の次期改訂時に活用されると考えられる。⑧PLNA が、水溶性の遅延型アレルギーを検出するための簡便な免疫学的方法になりうる可能性が示唆された。⑨カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、カフェイン、エピカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレートの HPLC 分析条件を検討した結果、短時間で上記の 6 成分を完全に分離定量できた。⑩アスパルテ



ーム製品における IR スペクトルの相異は、水和物の存在と結晶多形による可能性が考えられた。⑪液膜法、ペースト法、KBr 法で製品間の IR に差が認められなかった品目については、確認試験に液膜法や KBr 法による IR を使用するのが適切と考えられた。測定法での IR に差が認められた品目では、ペースト法を使用すべきと考えられた。しかし、類似の波数に吸収帯を持つものも多いため、波数規定ではなく、参照スペクトル法で行う方が良いと考えられた。⑫保存料の分析では回収率 80%以上、検出限界 0.5 mg/kg であり、また、臭素酸塩では定量限界 2mg/kg と良好な結果が得られた。⑬生産量統計による食品添加物の摂取量調査は、20 年間に 3 年ごとに 6 回のアンケート調査を実施してきており、指定添加物の他、既存添加物に対する調査も並行して実施されてきた。これらの長年に渡る調査は、食品添加物摂取の時代推移を捉え、他の手法による食品添加物摂取量調査と共に重要な蓄積データである。今後、食品添加物の使用量と残存量の関係などの実験的データ蓄積により、さらに適切な摂取量評価を可能にしていく予定である。⑭行政検査に基づく食品添加物の摂取量調査では、試作した食品添加物の行政試験検査結果集計用データベースを用い、試験検査機関からモデルとしてソルビン酸のデータを収集して始動し、食品添加物摂取量モニタリング用サーバーの設置とシステムの改良を試みた。

## E. 結論

①食品香料の規格については、第 8 版食品添加物公定書検討の初期段階に、枠組みについての決断が必要である。②78 品目の食品香料化合物の推定摂取量（暴露量）を求め、毒性及び代謝が J E C F A により公表されている品目について判断樹による安全性評価を試みた結果、安全性に懸念を抱かせる化合物は存在しなかった。③面積百分率法に一点検量法を組み合わせた GC による含量測定法は、汎用的に一般の香料化合物に利用可能であることが結論された。HS-GC 法による天然香料の一斉分析法および公定書の製造基準の許容限度値についての限度試験法として、簡便な分析法を確立することができた。④食品中からの柑橘系香料の一斉分析法を確立した。⑤本調査結果では、調査で得られた成分のうち 10%弱については化学物質毒性データ (RTECS) に登録があり、専門家による検討が必要と思われる。⑥天然添加物の成分規格設定を目標に、既存添加物の自社規格・試験法の調査と自主規格案の策定を行った。⑦食品添加物公定書の規格試験法から有害試薬を排除するための、新たな試験法変更案を検討した。⑧各種着色料をモデル化合物として、マウス膝窩リンパ節測定法による水溶性物質の抗原性評価への応用性を検討した。⑨各種食品中の茶抽出物の定量法を、固相カラムによる前処理と HPLC による分析に基づいて検討した。本法

を市販食品（飲料、ゼリー、アメ）に適用したところ、再現性のある定量結果が得られた。⑩水和物や結晶多形による影響をなくすために、アスパルテムの参照スペクトルは乾燥減量の条件で乾燥したもので示し、各条において、前処理法を規定しておくことが必要と考えられた。⑪公定書で参照IRスペクトルを採用する場合には、公定書の記載「同一波数のところに同様の強度の吸収を認める」に留意すべきと考えられた。⑫食品中未許可添加物の分析法として、簡便で精度の高い分析法が確立された。⑬生産量統計に基づく摂取量推定で、第7回目の調査を実施し、中間報告をまとめた。⑭全国自治体の行政検査結果に基づく摂取量推定では、試作した行政検査結果集計用データベースを使用し、ソルビン酸をモデル添加物として、システムの改良を試みた。

以上の研究成果は、第8版食品添加物公定書用の基礎データとなり、また、行政的に規格基準や分析法を設定し摂取量を把握することにより、食品添加物の安全性を化学的に確保することが可能となり、ひいては国民の健康維持に役立つと考えられる。

## F. 健康危機管理情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 米谷民雄：食品添加物の分析法  
ぶんせき 2002, 691-696 (2002)

2) 米谷民雄：食品用香料および天然添加物の安全性 食品衛生研究  
53(4) 24-29 (2003)

3) 佐藤恭子、米谷民雄：クチナシ赤色素およびクチナシ青色素中のメタノールの分析 食品衛生学雑誌、  
44(1)73-76(2003)

### 2. 学会発表

1) 佐藤恭子、植松洋子、棚元憲一、米谷民雄：標準添加ヘッドスペースGCによる天然香料中の残留溶媒分析法 日本食品衛生学会第84回学術講演会（大阪） 2002年11月

2) 長岡（浜野）恵、山崎壮、棚元憲一、米谷民雄：マウス膝窩リンパ節測定法（populiteal lymph node assay: PLNA）による水溶性物質の抗原性評価の試み 日本薬学会第123回年会（長崎） 2003年3月

## H. 知的所有権の取得状況

なし。

## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
分担研究報告書

食品香料の規格のあり方及び流通量調査による暴露量評価に関する研究  
分担研究者 米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

研究要旨

(1) 18 類に含まれる香料化合物について、国内各社で設定されている規格を調査し、総件数 17,125 の回答を得た。使用会社数が多い香料化合物およびわが国独自の香料化合物から、代表的な 40 品目を選択し、それらについて、規格内容をまとめ、国際的な規格例との比較を行なった。

(2) 食品香料化合物の安全性評価を行う際に極めて重要な情報となる推定摂取量（暴露量）を求めた。食品衛生法別表第 2 の 78 品目と 18 類品目の二つに分け、年間使用量について調査を行い、本年度は 78 品目について年間使用量及び P C T T 法による推定摂取量を算出した。今回算出した推定摂取量に基づき、毒性及び代謝が J E C F A により公表されている品目について判断樹による安全性評価を試みた結果、安全性に懸念を抱かせる化合物は存在しなかった。

(3) 赤外吸収スペクトル（I R）では結晶形の違いを区別できる特徴があるが、逆に結晶形が違えばスペクトルが異なるため、どのような参照スペクトルを公定書に記載するかが問題となる。そこで、食品添加物一般の I R による確認試験のあり方を、アスパルテームを例に検討した。アスパルテームには水和物があることに加えて、複数の結晶多形も存在し、いずれも異なる I R を与える。検討の結果、I R 測定前に 105℃で加熱・乾燥すれば、結晶形の統一ができることを明らかにし、その結果に基づき、その試料前処理法や測定法の変更について提言を行った。

協力研究者

新村嘉也・日本食品添加物協会

[業務委託]

(1) 食品香料化合物の規格調査

(報告書：日本において使用流通している食品香料化合物の規格実態の調査)

(2) 食品香料化合物の使用実態調査

(報告書：日本における食品香料化合物の使用量実態調査)

斎藤 寛・岡山大学教授

赤外吸収スペクトルを用いた規格中確認試験のあり方に関する研究

A. 研究目的

米国では 2002 年までに FEMAGRAS 物質と

して 1,200 強の食品香料化合物が評価され、欧州では E U の決定により、1999 年登録の約 2,700 品目の食品香料化合物を 2004 年までに安全性評価し、ポジティブリスト化する作業が行われている。また、J E C F A においては食品香料化合物の安全性評価が 2002 年までに 1,150 品目に達し、米国および E U がその評価方法と結果を共有していることから、わが国の規制においても、国際的整合化が早急に必要である。

それに対応するため、1) 食品香料規格のあり方を検討するために、わが国で使用・流通している食品香料化合物の規格の実態調査を行い、2) わが国における食品香料化合物の使用量の実態調査を行い、3)

食品添加物一般の国際的規格において多用されている、赤外吸収スペクトル（IR）による確認試験のあり方について検討を行った。

#### A-1. わが国で使用・流通している食品香料化合物の規格の実態調査

わが国で使用されている食品香料化合物は、78品目と18類に分類される。そのうち、78品目に関しては一般の食品添加物と同様に詳細な規格が設定され、食品添加物公定書に記載されている。一方、18類に含まれる2,000以上の化合物には、規格が設定されていないのが実状である。しかし、それら2,000以上の個々の化合物については、フル規格を設定し、食品添加物公定書に記載するのは現実的ではない。そこで、本研究では食品香料の規格のあり方について検討するため、国内における香料規格の実態調査を実施した。

#### A-2. わが国における食品香料化合物の使用量の実態調査

上述のように、現在、EUでは食品香料化合物のポジティブリスト化にむけて作業中であり、JECFAにおいても食品香料化合物の安全性評価が積極的に実施されており、第59回JECFA会議までに、約1,150品目の評価が終了したところである。一般に、化合物の安全性評価においては暴露量が重要であるが、JECFAの安全性評価手順をわが国で採用する場合においても、暴露量の推定は必要である。そこで、わが国で使用されている食品香料化合物への暴露量を、流通量調査から推定した。

#### A-3. 赤外吸収スペクトルを用いた確認

#### 試験のあり方に関する研究

食品香料化合物の規格を設定する場合、赤外吸収スペクトル（IR）による確認試験と、ガスクロマトグラフィーによる定量を主にすることが考えられる。IRは化合物を確認できるだけでなく、その結晶形の違いも区別できる特徴がある。しかし、結晶形が違くと得られるスペクトルも異なるため、どのような参照スペクトルを食品添加物公定書に記載するかが問題となる。そこで、IRによる確認試験のあり方に関する研究を実施した。

#### B. 研究方法

#### B-1. わが国で使用・流通している食品香料化合物の規格の実態調査

日本香料工業会会員のうち食品香料を製造・販売・輸入（以下、使用という）している会員で、平成12年度厚生科学研究「日本における食品香料化合物の使用実態調査」において有効回答をした75社を対象に、国内で使用されている食品香料化合物の規格値の実態を調査した。各香料化合物に設定されていた各規格値の上限値と下限値から、国内で使用流通している化合物の規格実態を考察した。

#### B-2. わが国における食品香料化合物の使用量の実態調査

上述の75社を対象に、国内で使用されている食品香料化合物の年間使用量を調査した。得られた各香料化合物の年間総使用量からPCTT法により摂取量を推定した。今回の使用量実態調査では、JECFA評価において採用されている欧米の推定摂取量と比較するため、欧米の使用量実態調査

の条件とできる限り同じになるようにした。なお、回答すべき香料化合物の最低使用量を 0.01 kg とした。

### B-3. 赤外吸収スペクトルを用いた規格中確認試験のあり方に関する研究

2 社 5 製品 (A 社 A-1、A-2、B 社 B-1~B-3) の食品添加物グレードのアスパルテームを、日本食品添加物協会を通じて入手した。さらに、市販の試薬 (アルドリッチ・シグマ社製) を購入し、合計 6 品について検討を行った。

## C. 研究結果

### C-1. わが国で使用・流通している食品香料化合物の規格の実態調査

詳細については、別添の資料を参照のこと。ここでは、概略について説明する。

18 類に帰属される二千数百種の香料化合物の規格を調査した。今年度は、その内、実際に使用実態 (会社数) が多い化合物やわが国独自の物質から 40 品目を選択し、それらの含量 (GC%)、含量 (GC 以外)、沸点、融点、屈折率、比重、酸価、確認試験、溶解性について整理し、JECFA、FCC などの国際規格と比較した。

今回選択した 40 品目については、品質管理を目的として何らかの規格をもって国内で使用されていることが判明した。一方、国際的には 35 品目が流通しているが、JECFA 規格か FCC 規格のいずれか一方、あるいはその両方で公表された規格の存在する物質は 21 品目であった。その 21 品目の規格の位置づけは JECFA と FCC では異なっていた。すなわち、JECFA の規格が主として安全性評価の対象物質を特

定するためのものであるのに対し、FCC 規格は今回調査した規格と同様に流通を主たる目的としていた。

各規格項目については、含量は 1 品 (ウンデカトリエン) を除くすべての物質に設定されていた。

沸点は、日本において 68% の品目に設定されていたが、JECFA では 17 品目中 16 品 (94%)、FCC では 18 品目中 16 品 (89%) に設定されていた。また、わが国独自の化合物では、5 品目中 2 品目に設定されていた。沸点は不純物含量を大まかに推量できるのが特徴であるが、GC 装置が一般に普及している現在では、余り有効な規格項目とはなっていない。

屈折率および比重については 88% の品目に設定され、JECFA および FCC も同程度の割合で設定されていた。これらの規格項目は、含量確認のための品質管理の指標として簡便と考えられ、GC 測定で問題となる不揮発性成分の影響を補う上で、有用と考えられる。

酸価の設定は、不飽和度の高い構造やアルデヒド基などを持つ酸化しやすい化合物やラクトン類などには有用であるが、エステル類やアルコール類などの化学的に安定な構造をもつ物質には有用ではない。今回の品目については、国際間での設定率に大きな差はなかった。

### C-2. わが国における食品香料化合物の使用量の実態調査

詳細については、別添の各資料を参照のこと。ここでは、概略について説明する。

有効回答した 74 社に対する食品香料の平成 13 年度年間販売量、および日本香料工

業会会員 168 社に対する食品香料の平成 13 年度年間販売量に基づいて算出した結果、有効回答率は 96.2%となった。国内で使用されている全ての食品香料化合物の総使用量に対する 78 品目の総使用量の比率は 65.1%であった。78 品目が食品香料製造のために極めて多量に消費されていることを示している。

78 品目を個別にみると、使用会社数が多い品目としては、バニリン、エチルバニリン、酢酸イソアミル、酢酸エチルなどがあげられるが、各品目における使用会社数は最大でも 50 社までであった。また、使用量から見ると、10 社以上の会社で 1 トン以上使用している品目は、バニリン、エチルバニリン、酢酸イソアミル、酢酸エチル、ベンジルアルコールなどであった。これらを含めた上位 10 品目までの総使用量に占める割合は 80%であった。

### C-3. 赤外吸収スペクトルを用いた規格中確認試験のあり方に関する研究

#### (1) 市販アスパルテームの IR について

図 1 に、2 社 5 製品と試薬の計 6 製品の IR を示す。これらの IR を互いに比較すると、類似の IR ではあるが、○印を付けた  $3300\text{ cm}^{-1}$  付近、 $1750\text{ cm}^{-1}$  前後および  $630\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収帯などに相対強度の差が観測される。特に、IR で重視される C=O 伸縮振動による吸収帯 ( $1750\text{ cm}^{-1}$  前後) に、A 社の 2 製品には明確な吸収帯が、B 社の 3 製品には弱いショルダーが観測されている。加えて、両社の製品には、 $670\text{ cm}^{-1}$  前後の ↑ を付けた吸収帯に波数の差が認められる。なお、シグマ社から入手した試薬の IR は、A-1 製品に類似していた。

次いで、これらの IR を参照 IR と比較すると、上記いずれかの点で参照 IR とは一致しなかった。第 7 版食品添加物公定書には、“同一波数のところに同様の強度の吸収を認める”と記載されている。ここには“強い吸収のみ”との記載がないことから、弱い吸収やショルダーバンド（肩吸収帯）も含まれること、また“同様の強度の吸収”という表現には相対強度も含まれてくると解釈できる。それゆえ、IR では化学反応によるよりも確実な確認が可能であり、参照スペクトルでは波数で規定するよりも正確に確認ができるわけである。

しかし、各製品で IR が異なった場合に、異なる化合物なのかという疑問が出てくるが、一般には、上記のような IR の差は、同じ物質でも、水和物や結晶多形の共存率の差によって生じることも多いため、この観点から参照 IR スペクトルのあり方について検討した。

#### (2) 水和物について

現在のアスパルテームの確認試験には、臭化カリウム錠剤法が採用されている。一方、乾燥減量の規定は 4.5%以下 ( $105^{\circ}\text{C}$ , 4 時間) である。換言すると、その程度の水分を含んだ状態で IR を測定することになる。そこで、水和物の混入の可能性を検討した。

一般に、水和物は水からの再結晶で得られることが多い。そこで、試料として A-1 製品を用いて、精製水から再結晶した品について、①結晶を水から濾取後、室温約  $20^{\circ}\text{C}$  で 2 時間風乾させたもの、②結晶を水から濾取後、室温約  $20^{\circ}\text{C}$  で 2 時間、10 mmHg 減圧下、五酸化リン上で乾燥させたもの、③結晶を水から濾取後、減圧化  $105^{\circ}\text{C}$

で4時間乾燥させたものについてIRを測定した。

図2に示すように、風乾させた①のIRは、上で述べた製品間で異なる部分に加えて、 $920\text{ cm}^{-1}$ 付近でもスペクトルが異なった。しかも、①に特徴的な吸収帯は全て製品のIRに観測されることから、製品には水和物が混入している可能性が高い。また、②で示すように、減圧下乾燥しても、 $3300\text{ cm}^{-1}$ 付近の水による吸収帯の減少を除いて、IRは変化しない。このことは、ここで得られた水和物は安定で、減圧乾燥程度では無水化しないことを示している。さらに、 $105^{\circ}\text{C}$ で4時間乾燥させた③のIRは明らかに②とは異なり、無水化したアスパルテームのIRであると考えられた。したがって、アスパルテームには、水和物と無水物が存在すると考えられる。しかし、アミノ酸誘導体特性として、他の水和物（例えば2水和物など）も存在する可能性は否定できない。

上記の結果を基に、参照IRや(1)で得られたIRと、②と③のIRを比較検討すると、可能性として、参照IRなどが水和物と無水物との混合物である可能性が考えられる。事実、(1)で○印を付けた $3300\text{ cm}^{-1}$ 付近、及び $630\text{ cm}^{-1}$ 付近の吸収帯の相対強度の差や、↑を付けた $670\text{ cm}^{-1}$ 前後の吸収帯の波数の差などは説明できる。しかし、 $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動による吸収帯の波数は水和物と無水物とも $1735\text{ cm}^{-1}$ と一致し、A社2製品には明確な吸収帯が、B社3製品には弱いショルダーが観測されたことを説明できない。このことは、水和物以外の可能性、すなわちアスパルテーム製品には結晶多形が存在する可能性を示唆している。そ

こで、結晶多形の可能性を検討した。なお、水和物と無水物の混晶の可能性や他の水和物の混入の可能性も否定できないことも指摘しておく。

### (3) 結晶多形について

結晶多形は、しばしば結晶を析出させる溶媒に依存する。そこで、①アセトン-水(4:1)混液から析出した結晶と、②95%メタノールから析出した結晶について、IRを測定した。その結果を図3に示す。図中の①、②と(1)で得られたIRを比較すると、やはり $1300\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ の指紋領域が一致しない。また、(2)での水和物と無水物とのIRと比較しても、無水物のIRに類似しているが完全には一致しない。このことは、アスパルテームには多形も存在することを示している。そこで、これらのIRを詳しく検討してみると、指紋領域以外に、興味を引くことには、アセトン-水(4:1)混液から析出した結晶の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動による吸収帯の波数が、他と比べて約 $5\text{ cm}^{-1}$ ほど高波数にあることがわかる。従って、無水物や水和物に、このような多形が混入すれば、 $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動による吸収帯にショルダーなどが観測される可能性がある。ただし、本研究の目的が多形の解明ではないので、さらに詳しい検討は行なわなかった。したがって、本研究で得られた多形以外に多数の多形が存在する可能性もある。

以上の結果から、(1)で述べた参照IRなどのスペクトル差は、製品ごとに、水和物、無水物あるいは多形が複雑に混合していることが原因と考えられる。そこで、このような混合物でも同じIRが得られる方法を検討することにした。

### (4) 多形と結晶形の統一について



参照スペクトルと比較する確認試験では、製品の結晶形を統一する必要がある。既に(2)で述べたように、水和物は105℃に加熱すれば無水化するうえ、このような高温では多形が存在しても全て高温型へ移行すると考えられる。そこで、各社製品一品目ずつ、および含水アセトンやメタノール系から得られた結晶について、105℃で2時間加熱・乾燥したもののIRを測定し比較した。その結果を図4に示す。なお、①はA-1製品、②はB-2製品、③はシグマ社製の試薬である。図からわかるように、いずれの製品も同じIRを与えた。さらに、乾燥時間を6時間に延長しても、④に示すように、IRに変化は認められない。また、⑤と⑥に示すように、含水アセトンやメタノール系から得られた結晶からも、上記と同じIRが得られた。したがって、試料を105℃で2時間以上乾燥すれば、結晶形の統一が図られると考えられる。

#### (5) 測定法について

次いで、測定法について検討した。固体の測定法としては、臭化カリウム錠剤法(KBr法)とペースト法(ヌジョール法)が一般的である。しかし、KBr法では加圧による結晶形の変化、あるいはKBrに含まれる水分の影響による水和などが起こる可能性がある。そこで、乾燥品について、KBr法で測定し、ヌジョール法のIRと比較検討することにした。

図5の①(KBr法)と(4)の①(ヌジョール法)(両者ともA-1製品)を比較して分かるように、KBr法でもヌジョール法でも、ヌジョールの吸収を除き、IRにはほとんど差は認められない。当然ながら、KBr法のIRにはOH伸縮振動の領域に、水に

よる吸収帯が現れている。また、図5の②は、①のKBr錠剤を2日間デシケーター中に保存した後に測定したものであるが、これを①と比較すると、↑をつけた吸収帯に強度の変化が認められ、錠剤を放置すればIRが変化することも分かった。

一般に、品質管理の部署では測定環境(時期など)が多様であり、しかも測定者も代わる。このような状況下では、測定室の湿度、KBr中の水分、すり混ぜ時間、加圧条件などを一定に保てない。換言すれば、条件によっては、水和物の混入や、上記のようなスペクトル変化が起こる可能性が高い。そのため、IRの測定法としては、ヌジョール法を選択する方が優れていると考えられる。

## D. 考察

### D-1. わが国で使用・流通している食品香料化合物の規格の実態調査

確認試験としてのIRは、JECFAおよびFCCに規格のある化合物の中では、それぞれ17品目中16の品目(94%)および18品目中14の品目(78%)に採用されていたが、国内ではまったく設定されていなかった。その理由の第一として、確認試験としてのIRが仮に一致したとしても、香気が不合格となる場合が多々見られることから、業界では香料物質の確認に香気が最も重要な要素となっていることである。第二に、香気とGCの保持時間の組み合わせで香料物質の確認が十分に判断可能と考えられており、IRによる確認は、日常の品質管理上、実質的に利用されていないと推察される。このように、現在公的規格がない品目においては、IRのデータなしで、

製品管理や受け入れが行われている。しかし、公的規格においては、国際的な規格のように、IRを採用せざるをえないであろう。香気は香料化合物の最も重要な要素であるが、香気を公的規格の確認試験に導入するのは困難であろう。

#### D-2. わが国における食品香料化合物の使用量の実態調査

96.2%という高い回答率が得られたことから、本調査結果は国内における食品香料化合物の使用実態を十分に反映していると考えられた。また、欧州、米国で以前実施された使用量調査での回答率は、それぞれ60%、87%であり、これらと比べても今回の調査結果の回答率は高かった。

使用会社、使用量共に多いバニリン、エチルバニリンは、単一化合物でバニラ系の香りをつける事ができ、酢酸エチル、酪酸エチル、酢酸イソアミルなどはフルーツ系香料に欠くことのできない素材として使用されている。

#### D-3. 赤外吸収スペクトルを用いた規格中確認試験のあり方に関する研究

市販アスパルテーム製品のIRは、厳密に言えば、すべて参照スペクトルと一致しなかった。この原因は結晶多形の存在か、水和物の存在によると考えられた。しかし、試料を乾燥減量の条件で乾燥すれば結晶形を統一することができ、同一のIRを得ることができた。このように、乾燥したものにおいてIRによる確認試験を行うことにより、結晶多形の問題が解決されるため、乾燥したアスパルテームの参照スペクトルを収載するのが望ましいと考えられる。第

7版食品添加物公定書の一般試験法には、「固体状態で測定された試料の吸収スペクトルが、標準品の吸収スペクトル又は参照スペクトルと異なるときは、試料を標準品と成分規格・保存基準各条において規定する同一の条件で処理した後、再測定する」と規定されている。この規定を有効に使えるように、今後、成分規格・保存基準各条を整備することが必要である。

一般に類似化合物のIRは類似のIRを示すことが多いため、弱い吸収、ショルダーバンド（肩吸収帯）、相対強度にも注意を払うのが当然である。現在ほど機器分析が普及していなかった数十年以前には、物質の確認には化学的な手法、すなわち官能基を同定するしか方法がなかったが、機器分析による定性分析法が進歩した現在では、IRにより結晶形の差まで区別できる。しかし逆に、参照スペクトルと違った結晶形の場合には、同一化合物であると確認されなくなってしまう。そのため、各条において、同一条件による処理を明確に規定しておくことが必須である。

また、IRの測定法としては、ヌジョール法を選択する方が優れていると考えられる。国際的なIRデータ集である“The Sigma library of FT-IR spectra”には、ヌジョール法による無水物のIRが記載されている。確実な確認試験としては、できるだけヌジョール法による無水物のIRを収載するのが望ましい。そのため、国際的規格で採用されている方法を調査する必要がある。

## E. 結論

### E-1.

国際的な規格である JECFA および FCC 規格では、含量、沸点、比重、屈折率および確認試験が主要な規格項目であったが、今回の調査結果の中から抽出した 40 品目については、含量、比重、屈折率、確認試験が一般的な規格項目に採用されていた。香料化合物の品質確保のためには、含量は最も大切な規格であるが、同時に、香味という嗅覚による評価が重要視されるのもまた香料化合物であり、国内では官能評価が重要な要素として採用されていた。

今後とも発生する新規化合物の採用ということを考えると、JECFA が設定している各香料化合物に対する規格項目、例えば IR による確認試験、比重、屈折率、酸価、重金属含量と同様の各社規格を、業界が自主的に整備し積極的に情報公開していくことが、最も必要であろう。

### E-2.

日本香料工業会として初めて、日本で使用されている食品香料化合物の使用量について実施調査を行った。香料化合物の総使用量は全指定添加物総生産量の 0.2% 程度とごく少なかった。78 品目の摂取量に基づき、JECFA 評価済みの 32 品目について判断樹を適用し安全性評価を試みたところ、いずれも「安全性の懸念がないと予想される」という結果に至った。

### E-3. 赤外吸収スペクトルを用いた規格中確認試験のあり方に関する研究

アスパルテームの IR による確認試験では、乾燥減量の条件で乾燥したものにつき

測定することにより、結晶多形の問題を解決できる。また、ヌジョール法で測定した IR を参照スペクトルとして採用する方が望ましいと考えられた。IR 法による確認試験において、単に官能基を特定するために大きな特徴的な吸収のみを比較するのであれば、波数を規定することで充分であり、参照スペクトルを収載する場合には、結晶多形による IR スペクトルの差がでない条件で測定したスペクトルを収載すべきであろう。第 8 版公定書作成の際には、IR スペクトルのあり方について、十分な議論が必要である。また、日本薬局方でも実施されたように、参照スペクトルの見直しを行い、国際的な場に出せるようなスペクトルを収載することが肝要である。

## F. 健康危機管理情報

食品添加物の安全性を評価するために、第一に考慮しなければならない事は、対象物の特定である。単に名称を決定することで十分なことは少なく、より詳細な化学的、物理的特性の情報を得ることが重要である。その上で、これらの情報の中から健康危害の懸念をなくすように、特性項目を決定する必要がある。本研究で得られた規格は、現在使用中の香料化合物の規格として、非常に有効かつ重要な情報である。

消費者に安心感を与えかつ安全性を担保するためには、食品香料化合物の安全性を評価し、その結果を公表することが必要である。日本で流通している香料化合物の使用量実態調査は、摂取量を算出するためのもので、摂取量は食品香料化合物の安全性評価のための重要な要素である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 米谷民雄：食品添加物の分析法 ぶん  
せき 2002, 691-696 (2002)

2) 米谷民雄：食品用香料および天然添加  
物の安全性 食品衛生研究 53(4) 24-29  
(2003)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。