

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

食品香料の規格定量法及び不純物に関する研究

分担研究者 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

研究要旨

食品添加物公定書「香料試験法」への採用を目的として、香料化合物の含量測定法（一点検量法）として GC 法の測定値の信頼性について、官能基を基準に選別した 8 品目の化合物を使用し、詳細な検討を行った。また、天然香料中の残留溶媒分析法については、昨年度作成した天然香料中残留溶媒試験法（案）を改良し、食品添加物公定書の製造基準において天然香料等への残存限度値の規定されている溶媒について、ヘッドスペース（HS）-GC（FID および MS 検出）による限度試験法を作成し、その妥当性を検討した。

協力研究者

植松 洋子 東京都立衛生研究所
伊佐川 聡 (財)日本食品分析センター
所 一彦 高砂香料工業(株)
立場 秀樹 小川香料(株)
富澤 政仁 小林香料(株)
大崎 和彦 三栄源エフ・エフ・アイ(株)
長谷部昭雄 曾田香料(株)
渋谷 三郎 高砂香料工業(株)
仁井 皓迪 長岡香料(株)
東仲 隆治 日本香料薬品(株)
渡部 一郎 長谷川香料(株)

A. 研究目的

第 7 版食品添加物公定書（平成 11 年 4 月に告示）において、香料化合物の定量法として、滴定等の化学的測定法が採用されているが、国際的規格である JECFA 規格と同様の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。また、同公定書では、製造基準に一部の既存添加物及び天然香料について使用できる抽出溶媒が規定され、メタノール等 6 溶媒については、残存限度値が設

けられたが分析法は規定されていない。そこで、本研究では、昨年度、香料化合物の GC 法を用いた含量測定法の「面積百分率法」及び「難揮発性及び不揮発性物質の簡易検査法」について検討を行い、妥当性を確認した。また、標準添加法を用いたヘッドスペースーガスクロマトグラフィー（HS-GC 法）による天然香料中の残留溶媒分析法について検討し、19 種類の溶媒を対象とした残留溶媒試験法（案）を作成した。

今年度は、I) 第 8 版食品添加物公定書での、香料化合物の GC 法による含量測定法の収載に向けて、香料化合物と内標準物質の「重量比と面積比の直線性」及び「純度と面積比の直線性」の検討を行い、一点検量法（簡易定量法）の妥当性を確認した。II) 天然香料の残留溶媒分析法については、昨年度作成した残留溶媒試験法(案)について検討を加え、10 機関の協力を得て、6 溶媒の限度試験法を作成した。なお、I については、日本香料工業会に依頼した。

以下に II の検討結果を報告する。I の検討結果については、別添 3 として提出する。

II. 天然香料の限度試験法に関する研究

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

天然香料は、日本香料工業会より提供されたフェネグリーク 2 検体 (1: 含水エタノール抽出、2: メタノール抽出)、バニラオレオレジン 2 検体 (1: エタノール抽出、2: エタノール・水・グリセリン抽出)、ウコン 2 検体 (1: アセトン・ヘキサン抽出、2: アセトン抽出)、コショウ抽出物 1 検体およびシヨウガ抽出物 1 検体を用いた。

分析対象としたアセトン、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、1-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、ジエチルエーテル、酢酸メチル、酢酸エチル、エチルメチルケトン、シクロヘキサン、2-メチル-1-プロパノール、酢酸イソブチル、トルエン、1,2-ジクロロエタン、四塩化炭素は試薬特級あるいは、98%以上の純度のものを用いた。DMSO は、メルク社製セッコソルブを用いた。

2. 装置

ヘッドスペースサンプラー: Hewlett Packard 社製 HP7694 等

ガスクロマトグラフ: Hewlett Packard 社製 HP5890 シリーズII (水素炎イオン化検出器 (FID)) 等

インテグレータ: (株) 島津製作所製クロマトバック C-R7A 等

GC/MS: 日本電子 (株) 製 Automass 及び D-300

ホットプレート付きマグネチックスターラー: 東京理化学器械 (株) 製 RCH-3L 等

バイアル: 10 mL 容等

セブタム及びキャップ: 低温用ブチルゴム

/PTFE セブタム及びアルミキャップ等

3. ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出器 (GC-FID) 条件

1) ヘッドスペースサンブラ条件 (例)

オープン温度: 50°C、バイアル加熱時間: 40分間、ループ温度: 80°C、トランスファライン温度: 100°C、加圧時間: 0.5分間

2) GC 条件 (例)

カラム: Aquatic-2 内径 0.25 mm、長さ 60 m、膜厚 1.4 μm 、ジーエルサイエンス (株) 製、カラムオープン温度: 40°C (5 min) \rightarrow (4°C/min) \rightarrow 110°C \rightarrow (40°C/min) \rightarrow 240°C (3.5 または 9.25 min)、注入口温度: 250°C、検出器温度: 260°C、キャリアーガス: He、注入方法: スプリット注入、カラムヘッド圧: 175 kPa

4. ガスクロマトグラフ-質量分析 (GC/MS) 条件

GC 条件に準じた。スキャン範囲は 25~150 amu、イオン源温度は 108°C、インターフェース温度は 250°C。

5. 標準溶液の調製

1) 残留溶媒一斉分析法用標準溶液

予め約 5 mL の DMSO を入れた 20 mL 容のメスフラスコに 20 種類の溶媒各 0.2 g ずつを精秤し、DMSO を用いて 20 mL に定容したものを混合標準原液とした。

得られた混合標準原液を DMSO を用いて希釈し、0.2、0.1、0.05 mg/mL の標準溶液とした。

2) 限度試験法用標準溶液

予め約 50 mL の DMSO を入れた 100 mL 容のメスフラスコにアセトン 0.60 g、ジクロロメタン 0.60 g、1,1,2-トリクロロエテン 0.60 g、メタノール 1.00 g、2-プロパノール 1.00 g およびヘキサン 0.50 g を精秤し、DMSO を用いて 100 mL に定容したものを混合標準原液とした。得

られた混合標準原液5 mLを100 mL容のメスフラスコに採り、DMSOを用いて100 mLとしたものを標準溶液2倍液とした。

あるいは、予め約50 mLのDMSOを入れた100 mL容のメスフラスコにヘキサン0.50 gを精秤し、DMSOを用いて100 mLに定容したものをヘキサンの標準原液とし、同様に、アセトン0.60 g、ジクロロメタン0.60 g、1,1,2-トリクロロエテン 0.60 g、メタノール1.00 g及び2-プロパノール1.00 gについて各々の標準原液を調製した。得られた各標準原液5 mLずつを100 mL容のメスフラスコに合わせ、DMSOを用いて100 mLとしたものを標準溶液2倍液とした。

標準溶液2倍液を1/2、1/4濃度に希釈し、それぞれ、標準溶液1倍液、標準溶液1/2液とした。

6. 試料の調製

1) 添加溶液

10 mL容のメスフラスコに、2-プロパノール 225.8 mg、ジクロロメタン 145.33 mg、ヘキサン 126.59 mg、1,1,2-トリクロロエテン 144.66 mgをはかり、DMSOを加えて10 mLとし、添加溶液とした。

2) 試料の調製

ショウガ抽出物については、抽出物 220 gに対し、添加溶液 0.5 mLを加え、ホモジナイズした(各溶媒の添加量：2-プロパノール 51.3 µg/g、ジクロロメタン 33.0 µg/g、ヘキサン 28.8 µg/g、1,1,2-トリクロロエテン 32.9 µg/g)。3回分(計約 660 g)を合わせたのち、さらに3回に分けてホモジナイズを行った。メタノールおよびアセトンについては、検体に含まれていたため、添加しなかった。コショウ抽出物は、添加溶液を加えずにホモジナイズを行った。それぞれ、120 mL容のサンプル瓶に約 50 gずつ分注し、冷蔵保存し、

各分析機関に送った。各分析機関では、冷蔵保存とした。

7. 残留溶媒一斉分析法

1) GC/MSによる同定

試料(フェネグリーク 2検体、バニラオレオレジン 2検体、ウコン 2検体) 1.0 gをバイアルに秤取し、密栓した後、マグネチックスターラーを用いて、5分間程度攪拌した。攪拌後のバイアルを40°Cの恒温槽中に40分間静置し、各バイアル内の一定量の気相をガスタイトシリンジで採取し、GC-MSに注入し分析を行った。

2) 定量分析

① 1点検量線法

バイアル5本に試料0.20 gを精秤し、攪拌子を入れ、DMSO 50 µLを添加し、直ちに密栓した。他のバイアル5本に、DMSOの代わりに5.1)で調製した0.2 mg/mLの標準溶液を用い、同様に操作した。ホットプレート付きマグネチックスターラーを用いて、必要に応じて加温(50°C以下)し、試料と標準溶液が混和するよう5分間程度攪拌した。ヘッドスペースサンブラー(オープン温度を50°Cに設定)に40分間静置しGC-FIDにより分析を行った。

② 多点検量線法

0.2、0.1、0.05 mg/mLの標準溶液を用い、①と同様に操作した。

3) 検出限界

エタノール以外の溶媒について、それぞれ検出限界に近いと予想した濃度の1、2、3、4倍の濃度の標準溶液を調製し、それぞれ試料0.2 gに50 µLずつ添加し、定量分析と同様に操作した。

8. 限度試験法

1) GC/MSによる同定

7. 残留溶媒一斉分析法と同様に行った。

2) 定量分析

バイアル1本に試料（コショウ抽出物または溶媒を添加したショウガ抽出物）0.50 gを精秤し、攪拌子を入れ、DMSOまたは5.2)で調製した標準溶液（1/2液、1倍液、2倍液）100 μ Lを添加し、直ちに密栓した。マグネチックスターラーを用いて、試料と標準溶液が混和するよう5分間程度攪拌した。手動分析の場合、攪拌後のバイアルを40°Cの恒温槽中に40分間静置したものを、自動分析の場合には、ヘッドスペースサンプラー（オープン温度を50°Cに設定）に40分間静置したものを試験用バイアルとした。各バイアル内の一定量の気相を手動分析の場合はガスタイトシリンジで採取し、自動分析の場合はヘッドスペースサンプラーを用いてGC-FIDまたはGC-MSに注入し分析を行った。以上の操作を5回繰り返した。

3) 結果の取りまとめ

① 多点検量線法

各操作ごとに、各測定対象溶媒について、添加した濃度(μ g/g)を横軸に、各クロマトグラム上のピーク面積値を縦軸に取り、検量線を作成し、検量線が横軸と交わる濃度の絶対値を各測定対象溶媒の試料中濃度とした。

なお、作成した検量線の相関係数(r)が0.99未満の場合は、検量線よりはずれる濃度の標準溶液を添加した試験用バイアルについて試験をやり直し、得られた値を用いて検量線を作成し直した。その結果、相関係数(r)が0.99未満の場合は、最初から操作を繰り返した。

② 1点検量線法

多点検量線法に使用した測定値のうち、DMSO及び標準溶液1倍液を添加して得られた結果より、次式により、各測定物質の試料中濃度を算出し、1点検量線法の結果とした。

$$C_i = \frac{W_0 \times A_1}{(A_2 - A_1) \times W_1}$$

但し、

C_i : 検体中の測定対象物質濃度(μ g/g)

W_1 : 試料採取量(0.50 g)

W_0 : 添加した測定対象物質質量(μ g)

A_1 : DMSOを添加した試験用バイアル中の測定対象物質のピーク面積

A_2 : 混合標準溶液1倍液を添加した試験用バイアル中の測定対象物質のピーク面積

機関ごとに各測定物質について、多点検量線法と1点検量線法で得られたそれぞれの結果(n=5)の平均値、標準偏差を求めた。

C. 研究結果と考察

1. 残留溶媒一斉分析法

1) 標準溶液の添加量の検討

希釈溶媒(DMSO)量が多いほど、各測定物質の検出感度が下がるため、高濃度の標準溶液を少量添加する方が、低濃度の標準溶液を多量に添加するより、感度は高くなる。しかし、測定物質が揮発しやすくなるため、結果にばらつきを生じやすくなる。そこで、操作性も考慮し、0.20 gの試料に対し、標準溶液の添加量を50 μ Lとした。

2) 内標準物質の検討

昨年度、内標準物質として、アセトニトリルを検討したが、内標準物質の添加は、はじめに他のピークとの分離を確かめる必要があり、操作がより煩雑になること、マニュアル注入の場合でも、バイアルの加熱から、注入までの時間、温度などにより、結果が大きくばらついた場合には、値の信頼性がないと考えられることから、内標準物質は添加しないこととした。

3) 天然香料中の残留溶媒

6種類の試料について、0.2 mg/mLの標準溶液を用いて20種類の溶媒を分析した結果をTable 1に示す。試料によりメタノール、2-プロパノールあるいはアセトンの残存限度値に近いもの、それらを超えるものも見られた。メタノールはフェネグリーク2の抽出溶媒として使われているが、天然にも広く存在するため、その他の試料については、天然由来であることも考えられた。2-プロパノールについては天然に存在し、またアメリカでは香料成分として使用が認められている。ウコンのアセトンについては、抽出溶媒が残留したものと考えられた。また、ウコンから検出されたトルエンについては抽出溶媒としては用いていないとのコメントを得ているが、さらに調査が必要と考えられた。抽出溶媒として用いられていなくても検出された溶媒があることから、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。なお、フェネグリーク2とバニラ1のエタノールについては、希釈して測定する必要があると考えられた。

4) 1点検量線法と多点検量線法の比較

ウコン1を例に取り、1点検量線法と多点検量線法の結果をTable 2に示した。両方法で同様の結果が得られたことから、限度試験法として、1点検量線法が使用できると考えられた。

5) 検出限界

メタノールとエタノールのみ検出されたバニラ2について検出限界の検討を行った。

エタノール以外の溶媒について、検出限界に近い濃度の混合溶液標準溶液を添加し、残差の標準偏差と検量線の傾きから、検出限界

を算出したところ、Table 3に示すように、0.3~9 µg/gとなった。アルコール系、塩素系溶媒では、検出限界が高くなる傾向が見られた。

2. 限度試験法

第7版食品添加物公定書の製造基準において、限度値の設定されている6溶媒について、限度試験法(案)を作成し、11機関において分析を行い、得られた結果から、試験法の評価を行った。

1) 試料液の調製法の検討

① 試料の採取量の検討

残留溶媒試験法では、試料の採取量を0.20 gとしたが、限度試験法では操作性を考慮し、0.50 gとした。

② 標準溶液の添加量の検討

残留溶媒一斉分析法に準じ、操作性も考慮し、0.50 gの試料に対し、標準溶液の添加量を100 µLとした。

2) GC-MSでの確認

シヨウガ抽出物およびコシヨウ抽出物よりメタノール、エタノールおよびアセトンが確認された。コシヨウ抽出物は、シヨウガ抽出物に比べ、粘性が高く、均一な試料調製が難しいと考えられた。そのため、シヨウガ抽出物について、メタノールとアセトン以外の測定物質を限度値に近い濃度となるよう添加した試料を調製し、コシヨウ抽出物については、無添加の試料とした。

3) 多点検量線法による分析

今回、はじめてヘッドスペース法を行った機関も多かったが、いずれも良好な検量線が得られた。

11機関中2機関が手動分析、9機関が自動分析で行った。多点検量線法で算出した分析値をTable 3に示す。

シヨウガ抽出物について、期間をおいて 2 回分析を行った機関については、2 回目のデータは、1 回目のデータに比べ、すべて低い値を示していたため、1 回目のデータを他機関との比較に用いた。

手動分析（機関 a、b）では、SD がやや大きい傾向がみられた。しかし、機関 b の分析値（メタノールを除く）は自動分析と同程度であったことから、操作法の習熟により、手動分析でも限度試験法の実施は可能と考えられた。また、自動分析の機関 k については、各測定値の標準偏差および 2-プロパノールの値が他機関に比べて大きかった。その原因として、分析時の攪拌を行わなかったこと、カラムが異なり、2-プロパノールと他のピークの分離が悪かった可能性があることが考えられた。そこで、これらの機関のデータは以下の評価には用いなかった。

コシヨウ抽出物については、機関 a、h が他の機関に比べ、メタノール、アセトンともに分析値が高かったが、他の機関は近い値を示していた。

シヨウガ抽出物について、自動分析 8 機関により報告された各測定物質の分析値の平均値、併行再現性の相対標準偏差 (RSD_r) および室間再現性の相対標準偏差 (RSD_R) を Table 2 に示した。また、Horwitz の式

$$RSD_R\%(\text{predicted})=2^{(1-0.5\log C)}\sim 2^{C-0.1505}$$
から計算した $RSD_R(\text{predicted})$ および RSD_R の 2/3 として算出した $RSD_r(\text{predicted})$ と分析法の評価の指標となる HORRAT 値 ($\text{HORRAT}=\text{RSD}/\text{RSD}(\text{predicted})$) を併せて Table 2 に示した。

RSD_R は 8.7~19.4%、 RSD_r は 4.5~11.4% であった。 RSD_R は $RSD_R(\text{predicted})$ を上回る測定物質があり、室間再現性はやや劣って

いたが、メタノール以外の測定物質の RSD_r はいずれも $RSD_r(\text{predicted})$ を下回っており、併行再現性はほぼ良好であった。また、HORRAT 値が 2 以下であったことから、この分析法の精度は許容できる範囲とみなされると考えられた。

4) 多点検量線法と 1 点検量線法

シヨウガ抽出物について、自動分析 8 機関において 1 点検量線法で算出された各測定物質の分析データの平均値、併行再現性の相対標準偏差 (RSD_r) および室間再現性の相対標準偏差 (RSD_R) を Table 3 に示した。多点検量線法の場合と、同様の傾向が見られた。従って、自動分析の場合には、限度試験法として 1 点検量線法が使用できるものと考えられた。

5) 残留溶媒限度試験法

以上の検討結果から、次のような残留溶媒限度試験法を作成した。次年度、この試験法について共同研究を行い、食品添加物公定書への収載を目指す予定である。

[残留溶媒限度試験法 (案)]

1. 分析項目

メタノール、2-プロパノール、アセトン、ジクロロメタン、1,1,2-トリクロロエテンおよびヘキサン

2. 試薬

メタノール、2-プロパノール、アセトン、ジクロロメタン、1,1,2-トリクロロエテンおよびヘキサン 98%以上

DMSO 純度 99.5%以上

3. 標準液

残留溶媒限度試験用標準原液 予め約 50 mL の DMSO を入れた 100 mL 容のメスフラスコにアセトン 0.60 g、ジクロロメタン 0.60

g、1,1,2-トリクロロエテン 0.60 g、メタノール 1.00 g、2-プロパノール 1.00 g およびヘキサン 0.50 g を精秤し、DMSO を加えて混和し 100 mL とする。

残留溶媒限度試験用標準液 残留溶媒限度試験用標準原液5 mLを200 mL容のメスフラスコに採り、DMSOを加えて混和し200 mLとする。

4. 残留溶媒限度試験法

試料1.0 gをバイアルに量り、セプタム及びクリップキャップで密栓した後、マグネチックスターラーを用いて5分間攪拌する。攪拌後のバイアルを40°Cで40分間静置し、バイアル内の一定量の気相をガスタイトシリンジで採取し（ヘッドスペース装置（50°C、40分間）を用いてもよい）、下記の条件に準じ、GC-MSにより残留溶媒の同定を行う。同定された残留溶媒につき、以下の定量を行う。

別のバイアル2本に、試料0.50 gずつを精密に量り、攪拌子を入れ、DMSOまたは残留溶媒限度試験用標準液100 µLを添加し、直ちに密栓する。マグネチックスターラーを用いて、試料と標準溶液が混和するよう5分間攪拌する。攪拌後のバイアルを40°Cで40分間静置し、バイアル内の一定量の気相をガスタイトシリンジで採取し（ヘッドスペース装置（50°C、40分間）を用いてもよい）、下記の条件でGC-FIDまたはGC/MSにより試験を行う。以上の操作を5回繰り返す。

DMSO及び残留溶媒限度試験用標準液を添加して得られた結果より、次式により、各測定対象溶媒の試料中濃度を算出し、平均値を求める。メタノールおよび2-プロパノールは50 µg/g、アセトンは30 µg/g、ジクロロメタンおよび1,1,2-トリクロロエテンはその合計量が30 µg/g、ヘキサンは25 µg/g以下である。

$$C_i = \frac{W_0 \times A_1}{(A_2 - A_1) \times W_1}$$

但し、

C_i : 検体中の測定対象溶媒濃度(µg/g)

W_1 : 試料採取量(0.50 g)

W_0 : 添加した測定対象溶媒量(µg)

A_1 : DMSOを添加したバイアル中の測定対象溶媒のピーク面積

A_2 : 残留溶媒限度試験用標準液を添加したバイアル中の測定対象溶媒のピーク面積

ヘッドスペース装置の操作条件

バイアル内平衡温度 50°C付近の一定温度

バイアル内平衡時間 40分間

注入ライン温度 100°C付近の一定温度

キャリアーガス ヘリウム

加圧時間 0.5分間

試料注入量 1.0 mL

操作条件

検出器 水素炎イオン検出器またはMS

カラム 内径 0.25 mm、長さ 60 m のケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィ用 25%ジフェニル-75%ジメチルポリシロキサンを 5 µm の厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 40°Cで5分間保持し、その後毎分4°Cで昇温し、110°Cに到達後、毎分40°Cで昇温し、240°Cに到達後3~10分間保持する。

注入口温度 250°C

注入方法 スプリット (30:1)

キャリアーガス ヘリウム

カラムヘッド圧 175kPa

6) 分析時の注意点

今回の分析を行った際に出てきた留意点を挙げる。

—手動分析と自動分析に共通の留意点—

① テフロン攪拌子に非極性溶媒の吸着が激しく、ジクロロメタン、ヘキサン、特にヘキサンの再現性が取り難い。

解決策：攪拌子を有機溶剤にて洗浄後 10% 硫酸に 3 時間漬けた後、水洗する。

② オレオレジン中の溶媒は全般に飛びやすい。

解決策：バイアルへの秤量等の一連の操作を速やかに行う。

③ DMSO は 18.5°C で凍結。特にヘキサンのバランスが崩れる。

解決策：気密性の高い容器に入れ、凍結しない場所に保管する。長期保存しない。

—手動分析の留意点—

① シリンジの取扱いにおいて温める温度が問題（シリンジ内の容積がたえず変化しデータのバラツキにつながる）。

② バイアル内で気体を採取するシリンジの高さを一定にする。

③ 自動分析と異なりスプリット法では、良い結果は得られなかった。

④ 操作に対する慣れ等、微妙な調整が必要。分析条件の見直し、ライナーの選択（ライナ

—はガス分析用（ダイレクトライナー）のものを推奨）等。

⑤ 熟練者でないと難しい可能性がある。手動での注入法では結果が出ず、オートサンプラーにて再測定を行った機関があった。

これらの点に注意することにより、分析法の精度を上げることができるものとする。

D. 結論

HS-GC 法による天然香料の限度試験法を検討した。その結果、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。

E. 研究発表

1. 論文発表

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

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．(社)日本食品衛生学会第 84 回学術講演会，2002.11.8 (大阪)．

Table 1. Residual Solvent Levels in Natural Flavors

	Fenugreek		Vanilla		Turmeric	
	1	2	1	2	1	2
						($\mu\text{g/g}$)
Methanol	30	44	50	2.8	14	2.3
Ethanol	42	—	—	248	17	6.9
2-Propanol			4.2		109	
Acetone	0.6	0.9	0.9		212	134
Hexane					4.3	
1-Propanol		5.0				
Ethyl acetate		8.2	1.0			
2-Methyl- 1-propanol		7.7				
Cyclohexane					3.0	
Toluene					10	7.6

Table 2. Residual Solvent Levels in Turmeric 1

	Single Point Calibration	Multipoint Calibration
	Curve Method	Curve Method
		($\mu\text{g/g}$)
Methanol	14	13
Ethanol	17	17
2-Propanol	109	110
Acetone	212	216
Hexane	4.3	3.8
Cyclohexane	3.0	2.5
Toluene	10	10

Table 3. Detection Limit of Solvents in Vanilla 2

Solvent	Detection limit (µg/g)	Solvent	Detection limit(µg/g)
Diethyl ether	0.3	1,2-Dichloroethane	1
Cyclohexane	0.3	1,1,2-Trichloroetene	1
Hexane	0.4	Methanol	2
Toluene	0.4	2-Propanol	2
Ethyl acetate	0.5	Dichloromethane	2
Methyl ethyl ketone	0.6	2-Butanol	2
Isobutyl acetate	0.6	2-Methyl-1-propanol	3
Acetone	0.7	1-Propanol	4
Methyl acetate	0.7	Carbon tetrachloride	4
		1-Butanol	9

Table 4. Contents of Solvents in Natural Flavors ($\mu\text{g/g}$)^{a)}

	Methanol	2-Propanol	Acetone	Dichloromethane	Hexane	1,1,2-Trichloroethene
Ginger^{b)}						
Lab.						
a	2.9 ± 2.9	31.3 ± 2.9	24.4 ± 3.9	25.4 ± 3.0	33.3 ± 19.1	40.4 ± 9.2
b	9.7 ± 3.7	46.3 ± 3.7	32.7 ± 3.1	24.3 ± 1.8	28.7 ± 0.8	29.1 ± 2.3
c	6.1 ± 0.4	44.9 ± 2.0	30.1 ± 1.1	24.2 ± 0.7	24.1 ± 0.5	29.6 ± 1.4
d	5.6 ± 0.7	46.5 ± 0.6	33.4 ± 0.9	28.3 ± 0.6	26.5 ± 0.6	32.4 ± 1.9
e	6.8 ± 0.5	46.7 ± 1.9	32.0 ± 1.3	26.6 ± 1.2	22.6 ± 1.2	29.5 ± 1.0
f	5.7 ± 1.1	41.6 ± 2.0	27.8 ± 1.1	23.5 ± 0.5	17.6 ± 0.9	25.9 ± 0.8
g	7.6 ± 1.2	38.0 ± 1.2	27.5 ± 0.4	30.2 ± 1.0	29.2 ± 1.1	29.1 ± 1.6
h	6.4 ± 0.3	42.8 ± 2.6	28.2 ± 0.9	25.4 ± 2.6	21.2 ± 1.0	26.6 ± 1.9
i	4.9 ± 0.1	41.4 ± 0.9	28.1 ± 1.0	23.0 ± 0.9	21.5 ± 1.9	27.1 ± 1.0
j	6.0 ± 0.8	47.1 ± 4.1	33.5 ± 1.9	26.8 ± 2.1	31.4 ± 1.1	26.0 ± 1.6
k	4.7 ± 2.5	68.7 ± 8.5	24.5 ± 2.9	26.2 ± 4.2	23.4 ± 8.0	28.2 ± 3.5
Pepper						
Lab.						
a	9.4 ± 2.7		37.5 ± 9.0			
b	5.3 ± 4.8		16.8 ± 2.3			
c	5.5 ± 0.6		15.6 ± 0.7			
d	4.7 ± 0.4		15.2 ± 0.5			
e	6.8 ± 0.4		18.9 ± 0.8			
f	5.7 ± 1.6		15.6 ± 1.7			
g	5.4 ± 1.6		14.2 ± 1.8			
h	12.8 ± 0.6		42.9 ± 3.7			
i	4.2 ± 0.3		13.8 ± 0.7			
j	4.5 ± 0.6		16.2 ± 1.9			
k	3.5 ± 1.1		11.2 ± 1.9			

^{a)} The data were calculated by the multipoint calibration method. mean ± SD (n=5).

^{b)} Ginger extract spiked with 2-propanol (51.3 $\mu\text{g/g}$), dichloromethane (33.0 $\mu\text{g/g}$), hexane (28.8 $\mu\text{g/g}$), and 1,1,2-trichloroethene (32.9 $\mu\text{g/g}$).

Table 5. Results of Interlaboratory Study for the Determination of Solvents in Ginger Extract (1)^{a)}

	Methanol	2-Propanol	Acetone	Dichloromethane	Hexane	1,1,2-Trichloroethene
Mean	6.1	43.6	30.1	26.0	24.3	28.3
Spiked level ($\mu\text{g/g}$)	0.0	51.3	0.0	33.0	28.8	32.9
Repeatability($\text{RSD}_r, \%$)	11.4	5.0	3.7	5.4	4.5	5.3
$\text{RSD}_r, \%$ (predicted)	8.1	6.0	6.4	6.5	6.6	6.5
HORRAT_r	1.4	0.8	0.6	0.8	0.7	0.8
Reproducibility($\text{RSD}_R, \%$)	16.3	8.7	9.0	10.4	19.4	9.2
$\text{RSD}_R, \%$ (predicted)	12.2	9.1	9.6	9.8	9.9	9.7
HORRAT_R	1.3	1.0	0.9	1.1	2.0	1.0

^{a)} The data which were calculated by the multipoint calibration curve method were used.

Table 6. Results of Interlaboratory Study for the Determination of Solvents in Ginger Extract (2)^{a)}

	Methanol	2-Propanol	Acetone	Dichloromethane	Hexane	1,1,2-Trichloroethene
Mean	6.4	45.7	30.5	25.2	26.9	32.1
Spiked level ($\mu\text{g/g}$)	0.0	51.3	0.0	33.0	28.8	32.9
Repeatability($\text{RSD}_r, \%$)	14.2	5.0	4.9	6.8	7.3	6.0
$\text{RSD}_r, \%$ (predicted)	8.1	6.0	6.4	6.6	6.5	6.4
HORRAT_r	1.8	0.8	0.8	1.0	1.1	0.9
Reproducibility($\text{RSD}_R, \%$)	22.0	8.3	7.5	8.7	20.3	8.8
$\text{RSD}_R, \%$ (predicted)	12.1	9.0	9.6	9.8	9.8	9.7
HORRAT_R	1.8	0.9	0.8	0.9	2.1	0.9

^{a)} The data which were calculated by the single point calibration curve method were used.

平成14年度 厚生労働科学研究報告書

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

(香料化合物のガスクロマトグラフィーによる簡易含量測定法)

日本香料工業会

所 一彦

平成14年度 厚生労働科学研究報告書

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

(香料化合物のガスクロマトグラフィーによる簡易含量測定法)

平成15年3月

厚生労働科学研究 米谷班

日本香料工業会

所 一彦

目 次

	頁
はじめに	2
A. 研究目的	3
B. 研究	4
1. 測定条件	4
2. GC装置の適正試験	5
研究 1 香料化合物と内標準物質の重量比とピーク面積比に対する直線性の検証	6
1) 試料	
2) 方法	
3) 結果および考察	
研究 2 香料化合物の純度とピーク面積比に対する直線性の検証	7
1) 試料	
2) 方法	
3) 結果および考察	
研究 3 香料化合物の一点検量法による含量測定	8
1) 試料	
2) 方法	
3) 結果および考察	
C. まとめ	10
おわりに	10
引用文献リスト	12
表-1 ガスクロマトグラム測定条件	13
表-2 GC装置の適正試験	14
表-3、4 被検香料化合物のGC面積百分率法による含量測定	15
表-5 被検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および寄与率 ..	17
表-6 被検香料化合物の純度と 1 / F の検量線および寄与率	18
表-7~14 被検香料化合物と内標準物質の重量比とピーク面積比のデータ	19
表-15~30 被検香料化合物の真値と 1 / F の検量線および一点検量法のデータ	27
表-31 一点検量法による被検香料化合物の測定結果	43
図-1~8 被検香料化合物と内標準物質の重量比とピーク面積比の直線性の検証	45
図-9~16 被検香料化合物の純度と 1 / F の直線性の検証	53
ガスクロマトグラム	61
資料-1 「Gas Chromatographic (GC) assay of flavouring agents」	71
(JECFA, Compendium of food additives specifications, Addendum 8)	
資料-2 仮訳「食品香料化合物のガスクロマトグラフィ一定量法」	74

平成 14 年度厚生労働科学研究

香料化合物のガスクロマトグラフィーによる簡易含量測定法

研究報告書

研究要旨

香料化合物の含量測定法としてのガスクロマトグラフィー法（以下、GC 法）は、国連 JECFA 規格或いは米国の FCC 規格等に基本的な定量法として採用されている。しかしながら我が国では GC 法が、香料化合物の含量測定を含めて日常的品質管理業務に使用されているが、公的測定法としては未だ認められていない。一方食品添加物の安全性・規格基準そのものに国際的整合性が強く求められている今日、我が国においても公的測定法として採用されることが急務であると考ええる。

我が国において GC 法が公的測定法として採用されるためには、日本国内において検討された香料化合物に対する GC 法の信頼性を検証した資料が必要となる。日本香料工業会としては、JECFA 試験法に記載されている方法（以下「JECFA 法」という）を基に平成 11 年度厚生科学研究では「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」、平成 13 年度厚生科学研究では、ベンジルアルコールを試料として「香料化合物の含量測定法における GC 法の有効性の検討」を行い、面積百分率法の有効性について検証し、更には JECFA 法を改良した、より簡便に測定できる内標準法等についても報告した。

本研究では、香料化合物の含量測定法（一点検量法）として GC 法の測定値の信頼性について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、官能基を基準に選別した 8 品目の化合物を使用して、より詳細に下記の検討を行った。

- ① 香料化合物と内標準物質の重量比とピーク面積比に対する直線性の検証
- ② 香料化合物の純度とピーク面積比に対する直線性の検証
- ③ 香料化合物の一点検量法による含量測定

その結果、8 品目の化合物すべてにおいて、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が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。

香料化合物の含量測定法について厚生科学研究を通じた一連の研究より、面積百分率法は香料化合物に最も適した含量測定法であることが確認され、さらに一点検量法（簡易含量測定法）はその面積百分率法を補う実用的な方法であることが実証された。

はじめに

食品流通が世界的規模で広がる今日、食品および食品添加物の安全性・規格基準そのものにも国際的整合性が強く求められている。日本香料工業会では、厚生科学研究「食品添加物の規格基準の国際的整合性に関する研究」の一環として、平成5年度より香料の規格基準などについて一連の研究を行ってきた。

その研究の中から日本において使用されている香料化合物は、平成12年度「日本における食品香料化合物の使用実態調査」により約2600品目であることが判明した¹⁾。それらの規格および品質の確認には、正確性・簡便性そして迅速性が強く要求されるものであると示唆された。含量は品質管理で求められる重要な項目であり、その測定法として、GC法は国際的に認知されている。すなわち、国際的なJECFA規格あるいは米国の食品化学物質規格集(FCC規格)等では、香料化合物の含量測定法にGC法を採用しているが、我が国の食品添加物公定書に定められている香料化合物の含量は、全て化学的な試験法で行うこととされている。一方、日常の品質管理業務あるいは香料化合物の分析研究においてGC法が実用的な方法として使用されている実情からして、香料業界はGC法が食品添加物公定書へ採用されることを強く望んでいる。

これらを背景に、平成11年度厚生科学研究「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」²⁾ および平成13年度厚生科学研究「香料化合物の含量測定法におけるGC法の有効性の検討」³⁾ を行い、香料化合物の含量測定法としてGC法は測定値に信頼性のある方法であることを報告した。

本研究では、香料化合物の含量測定法としてGC法の測定値の信頼性について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、官能基を基準に選別した8品目の化合物を使用して、より詳細に検討を行った。

【この報告書で引用した略語および用語】

JECFA	: FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会
JECFA 規格	: JECFA が安全性評価後に設定した食品香料化合物の規格および試験法で、Compendium of food additive specifications, Addendum 9 までに記載されている。
JECFA 試験法	: Compendium of food additive specifications Addendum 8 に記載されている試験法のうち「Gas Chromatographic (GC) assay of flavouring agents」をいう。
FCC	: 「FOOD CHEMICALS CODEX」食品化学物質規格集(米国)
GC 法	: ガスクロマトグラフィー
GC	: ガスクロマトグラムまたはガスクロマトグラフ
一点検量法	: 難揮発性・不揮発性物質を含む香料化合物を測定する内標準物質

	を用いる一点による定量法（簡易含量測定法）
面積百分率法	: ガスクロマトグラフィーにおいて総ピーク面積を 100 としたときに、目的成分の面積百分率を含量とする算出法。
AVER	: Average 平均値
SD	: Standard Deviation 標準偏差
RSD	: Relative Standard Deviation 相対標準偏差
R ²	: R Square 寄与率
R	: Relative Coefficient 相関係数
真値	: 真の値（測定値の正しい値） ⁴⁾

A. 研究目的

食品添加物公定書一般試験法の「香料試験法」に「GC 法」による含量測定法を収載することを目的として、これまでに GC 法の有効性について検討を重ねてきた。すなわち、平成 11 年度厚生科学研究「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」、および平成 13 年度厚生科学研究「香料化合物の含量測定における GC 法の有効性の検討」を行い、GC 法は、香料化合物の含量測定法として極めて有効な方法であることを報告した。

香料化合物は一般的に蒸留精製された揮発性物質であるため、適正な条件で測定される限り全成分を GC 法で測定することができる。従って、一般には面積百分率法による百分率をもって香料化合物の含量値とみなすことができ、この方法は日常的に利用されている。難揮発性や不揮発性成分などが存在する場合には、面積百分率法による測定法は利用できない。そのため、現在 JECFA⁵⁾ や FCC⁶⁾ では、面積百分率法と内標準法による測定を併用している。しかしそこで採用されている内標準法は、煩雑な手順を要するため、実用的な方法とはいえない。

そこで、より簡便な内標準法を開発するため、本研究において一点検量法を検討した。

なお、本研究では、食品衛生法施行規則別表第 2 に収載されている香料化合物のうち、官能基を基準に選別したプロピオン酸、*l*-メントール、オクタナール、酢酸ブチル、酢酸ベンジル、酪酸シクロヘキシル、アセトフェノン、 γ -ウンデカラク톤の 8 品目を試験サンプルに用いて、下記の研究を行った。

- ①香料化合物と内標準物質の重量比とピーク面積比に対する直線性の検証
- ②香料化合物の純度とピーク面積比に対する直線性の検証
- ③香料化合物の一点検量法による含量測定

B. 研究

平成 11 年度厚生科学研究「香料化合物の含量測定における GC 法の有効性の検討」では、ベンジルベンゾエートを用いて検証した「不揮発性物質の簡易検査法」が、不揮発性物質を検出できない「面積百分率法」の欠点を補う簡便でかつ再現性の高い方法であることを明らかにした。また、平成 13 年度厚生科学研究では、被検香料化合物としてベンジルアルコールを用い、繰り返し測定回数は 3 回で、被検香料化合物と内標準物質の重量比とピーク面積比に対する直線性の検証と被検香料化合物の純度と $1/F$ (面積補正係数の逆数) に対する直線性の検証を行った。これらの結果から一点検量法が簡易な内標準法であることを明らかにした。

本年度は、繰り返し精度を向上させるために測定回数を 5 回とし、8 研究室で食品衛生法施行規則別表第 2 に収載されている香料化合物から、官能基別に選択したプロピオン酸、 α -メントール、オクタナール、酢酸プチル、酢酸ベンジル、酪酸シクロヘキシル、アセトフェノン、 γ -ウンデカラクトンの 8 品目を被検香料化合物として以下の研究を行った。第一に被検香料化合物と内標準物質の重量比とピーク面積比に対する直線性を検証した。第二に、一般に香料化合物の含量の規格値は 90% 以上であることから、被検香料化合物の 90% 以上の 4 つの純度と $1/F$ (面積補正係数の逆数) に対する直線性を検証した。第三に簡易な内標準法であることを検証するために被検香料化合物の一点検量法による含量測定を行った。

- 研究 1 香料化合物と内標準物質の重量比とピーク面積比に対する直線性の検証
- 研究 2 香料化合物の純度とピーク面積比に対する直線性の検証
- 研究 3 香料化合物の一点検量法による含量測定

1. 測定条件

本研究は、日本香料工業会・食品香料委員会所属の会社より試料提供を受け、日本香料工業会・食品香料委員会内に組織されている技術専門委員会 8 社が担当した。

GC 測定は JECFA 試験法の GC 分析条件を満たす範囲内で各社の条件で実施した。各社の GC 条件は表-1 に示した。

「JECFA 試験法」の GC 分析条件

カラム	: 長さ30m×内径0.25~0.53mm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/minのヘリウム (原文は、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0.25~0.35mm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 $^{\circ}$ C
検出器温度	: 250~300 $^{\circ}$ C
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 いずれかを使用する。
オープンプログラム	: 50~240 $^{\circ}$ C、5 $^{\circ}$ C/min昇温、240 $^{\circ}$ C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 装置の適正試験

GC 装置の適正試験は JECFA 試験法に記載の方法をそのまま踏襲した。

装置の適正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正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、面積百分率は下記の表に示された値との差が 10%以内であることを各社で予め確認した。適正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、同一のものを使用した。3 回繰り返し測定を行い、その平均値を求めた。

結果は添付の表-2 に示した。ピークの溶出は 8 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、すべての値が 5%以下であった。GC 装置の適正試験結果より、8 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っても、5 成分の面積%の RSD は 2.5%以内であった。

以上より、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。