

厚生労働科学研究研究費補助金
食品の安全性高度化推進研究事業

国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 四方田千佳子

平成18（2006）年 5月

目 次

- I. 総括研究報告
国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究
四方田千佳子 (国立医薬品食品衛生研究所)
- II. 分担研究報告
 1. 食品添加物の複合分析法に関する研究並びに生産量統計を基にした食品添加物の摂取量推定
四方田千佳子 (国立医薬品食品衛生研究所)
(資料) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定
 2. 食品添加物の残留溶媒基準及び食品香料規格に関する調査研究
佐藤恭子 (国立医薬品食品衛生研究所)

(資料) 食品香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究
(資料) 我が国において使用されている食品香料化合物データベースの
高度化に関わる調査研究
 3. ベタインの国際標準としての赤外線吸収スペクトルに関する研究
斉藤 寛 (岡山大学薬学部)
 4. 食品添加物の複合分析法に関する研究
—既存添加物クチナシ青色素の安定同位体を用いた構造解析—
杉本 直樹 (国立医薬品食品衛生研究所)
 5. 食品中の食品添加物の流通状態における消長調査
扇間 昌規 (武庫川女子大学薬学部)
 6. 食品添加物の食品中の共存物質との相互作用により生ずる分解生成物の解明
久保田浩樹 (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・別刷

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

平成 17 年度総括研究報告書

国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究

主任研究者 四方田千佳子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第一室長

研究要旨

国際整合の観点から、国際的に広く使用され安全性が確認されている食品添加物については、順次、指定の方向で検討が進められている。新規指定品目の規格設定にあたっては、国際規格を反映したものとする方向にあるが、食品添加物公定書既収載品の規格やその試験法についても、規格規準の国際整合を目指す必要があり、本研究では、その基盤となる調査研究を実施した。

まず、食品添加物の生産量統計調査を継続し、第 8 回の指定添加物における調査を実施し、基盤データの蓄積に努めた。香料に関しては、我が国の香料化合物使用量の 90% を占める 245 品目について個別規格化を検討し、129 品目の自主規格を完成した。香料データベースでは、欧米での流通品を追加して、4,329 品目の国際的なデータベースとし、香料の国際整合に向けたツールを充実させた。残留溶媒試験の整合では、増粘多糖類へのヘッドスペース-GC 法が、蒸留法と比較しやや小さな値を与える傾向が認められたが、適用可能であることを示した。赤外参照スペクトルに関しては、適切な参照が困難な事例により、種々のデータの整合のためには測定法の最適化が重要であることを示した。規格分析法への NMR の利用では、H-NMR がポリソルベートのエチレンオキシド含量の推定に応用可能であることを示した。安定同位体を用いる LC/MS 分析が、クチナシ青色素の化学構造推定に有用であることを示した。食品添加物の食品中での消長に関しては、ソルビン酸において、ソルビン酸とシステインとで生じる反応生成物の分取精製を試み、構造推定の準備が整った。次亜塩素酸ナトリウムによる副成生物の検討では、カット野菜殺菌処理時にジクロロアセトニトリル及び抱水クロラールが生成し、その量は、濃度、pH、温度に依存すること、クエン酸を添加時にはハロケトンが、リンゴ酸添加時には抱水クロラールが経時的に増加することを明らかにした。

以上の研究成果は、直接的に食品添加物規格の国際化に向けた改訂に役立つとともに、我が国の食品添加物行政の安心・安全の確保に資するものである。

佐藤恭子 国立医薬品食品衛生研究所室長

斉藤 寛 岡山大学薬学部教授

杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所主任研究官

扇間 昌規 武庫川女子大学薬学部教授

久保田浩樹 国立医薬品食品衛生研究所主任研究官

A. 研究目的

食の国際化により、輸入食品の我が国の食品に占める割合が増加し、輸入食品において、食品添加物に関わる食品衛生法上の違反事例の多くが、食品添加物の指定品目の国際的な不整合に基づくものであった。そこで、安全性に問題のない国際的に汎用

されている食品添加物については、指定が推進される方向にある。食品添加物の国際調和の要請に適切に対応しつつ、我が国の食品の安全性を確保するためには、さらに、食品添加物の規格基準の国際的視野での再整備が不可欠である。本研究では、食品添加物の規格の向上に関する調査研究を実施し、規格基準の国際化を推進することを目的とし、以下の検討を行う。①食品添加物の生産量調査に基づく摂取量調査では、引き続き我が国の食品添加物動向の把握に努める。②香料の規格設定では、規格化対象化合物として使用量の多いものを中心に、規格化を推進する。さらに、平成16年度に作成した香料化合物データベース(2,926品目)を基盤に、諸外国の香料化合物を追加し、4,329品目からなるデータベースとし、国際比較を可能とする。食品添加物の残留溶媒試験法の検討では、増粘安定剤の残留溶媒分析法として、ヘッドスペース-GC法を限外ろ過-GC法及び蒸留-GC法と比較検討を継続し、規格の整備に努める。③赤外吸収スペクトルの規格の最適化では、ベタインにつき、詳細に検討する。④LC-NMR等による食品添加物の複合分析法に関する研究では、NMRの規格試験法への応用として、ポリソルベートのエチレンオキサイド含量の測定を試みる。また、安定同位体を含むモデル化合物をLC/MSにより分析することで、クチナシ青色素の主成分の化学構造を検討する。⑤食品添加物の使用基準に向けた基礎研究として、食品添加物のソルビン酸、次亜塩素酸ナトリウムを取り上

げ、食品中での消長、副成生物の有無、それらの詳細構造につき検討を継続する。

以上の研究により、食品添加物規格の向上と、食品添加物規格の基礎となりうる新たな研究分野の開拓をめざすことを目的とする。

B. 研究方法

①指定添加物に関する生産・流通調査は3年毎に実施されているが、本年度は第8回調査の初年度に当たり、例年どおり食品添加物製造・輸入業者に対してアンケート調査を実施した。

②香料の規格の国際整合では、我が国において使用されている香料化合物の中で規格の無い2,776品目について、使用量順に整理し、上位245品目を抽出、この245品目について判断樹を使用した個別化合物に対する仮規格項目の設定、市場流通品規格の解析整理、日本香料工業会としての規格作成基準の策定、実態調査を基に規格案作成、規格案とJECFA・FCC規格との比較による国際的な整合化を図り、日本香料工業会としての規格を作成することとした。また、昨年度構築した香料化合物データベース(以後、「平成16年度データベース」と略す)を基盤にして、これに収載されていないが我が国及び欧米で使用実績のある香料化合物を調査、抽出し、差分品目として新たにデータベースに加えた。さらに構築した基本データベースの各品目に関して、品目名の修正及び統一化、各品目に付随する関連情報の検証及び修正を行い、収載情報の精度及び情報量を高め、本データベー

スの高度化を推し進めた。食品添加物中の残留溶媒規格については、増粘安定剤としてカロブビーンガム、グアーガム、ジェランガム、ペクチン（リンゴ由来及びかんきつ類由来）を取り上げ、残留溶媒分析におけるヘッドスペース-GC 法と蒸留法-GC 法の比較検討をさらに詳細に実施した。

③赤外吸収スペクトルでは、ベタインにつき、2社の製品を入手し、諸外国の参照スペクトルや、我が国のデータベースと、実際に測定したスペクトルを比較検討し、国際整合の観点から慎重に原因を解明した。

④NMR スペクトル等の利用については、通常の分析では困難なポリソルベートの親水基部分の定量を、フタル酸カリウムを内標物質とする¹H-NMRにより検討した。さらに、クチナシ青色素の主色素成分の生成過程および反応生成物の化学構造を明らかにするため、反応出発原料となるゲニピン(genipin)と安定同位体を分子内に含むベンジルアミンを用いてモデル実験を行い、反応生成物について、LC/MSにより検討した。

⑤食品添加物の食品中での消長、変化については、まず、ソルビン酸とアミノ酸のシステインとが水溶液中での室温放置又は電子レンジによる短時間の加熱により両者の反応生成物が生じることから、この生成物の分取規模での生成方法、生成物の分取条件及びその分取を試みた。次亜塩素酸ナトリウムについては、殺菌処理により生成する消毒副生成物としてハロアセトニトリル(HAN)や抱水クロラール(CH)などの不揮発性塩素化合物を中心に生成挙動の解明

に向け検討を行った。

C. 研究結果及び考察

①食品添加物の生産量調査に基づく摂取量調査では、食品添加物製造・輸入業者名簿を基に、事業者へ出荷実需の調査表を送ることにより、平成16年度の指定添加物生産量統計のアンケート調査を実施した。アンケートでは各企業・事業所に対し食品添加物毎の生産、あるいは輸入し、出荷した量（食添出荷量）と、国民が口にする食品に使用する目的で出荷した量（純食品向け出荷量）の回答を求めたが、この意味合いが理解されず、食品添加物卸業者への出荷量を「純食品向け」から除外したと思われる回答が複数見られた。この結果、強化剤（L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸ナトリウムなど）、調味料（5'-グアニル酸二ナトリウムなど）、その他で、前回調査と比較して、「食添出荷量」では大差がないにもかかわらず、「純食品向け出荷量」が大幅に減少した。企業・事業所に対しそれぞれの出荷先での用途について聞き取りを行い、追調査の上、精度を高める必要があると思われた。

②香料の規格設定では、規格化対象化合物として、使用量の多い順から、わが国で使用されている香料の90%以上を占めることになる245品目を取り上げ、流通品規格を詳細に検討したところ、多成分でありながら単一成分を想起させる品名で流通しているものや判断樹からは規格項目が設定できない固体化合物等を対象候補から除外後、規格値の信頼性という点から複数社からの規格回答のあったものに限定すると、本年

度は 129 化合物について規格を完成した。さらに、平成 16 年度に作成した香料化合物データベース (2,926 品目) を基盤にし、これに欧米で使用実績のある品目及びそれらの関連情報を付加して、日本、米国、EU で使用実績のある香料化合物の全てを網羅したデータベース (4,329 品目) を構築した。食品添加物の残留溶媒試験法の検討では、増粘安定剤の残留溶媒分析法として、ヘッドスペース-GC 法を限外ろ過-GC 法及び蒸留-GC 法と比較検討し、ヘッドスペース-GC 法は限外ろ過-GC 法とはほぼ同等と考えられたが、ヘッドスペース-GC の結果は、蒸留-GC 法の結果の 75~102% となり、増粘安定剤中の残留溶媒分析においては、その差を規格設定等において考慮する必要があると考えられた。

③赤外吸収スペクトルの規格の最適化では、ベタインの IR スペクトルは、The Sigma Library of FT-IR Spectra、独立行政法人産業技術総合研究所・有機化合物のスペクトルデータベース SDBS および National Institute of Standards and Technology、USA (NIST) の 3 種であるが、産業技術総合研究所のものは KBr 法によるもの、その他のものはペーパースト法によるものと考えられる。これらの IR スペクトルは、互いに異なり、さらに、メーカー測定用の KBr 法の IR スペクトルも異なっていた。原因は、湿度やアルカリハライドとの相互作用と考えられ、適切に乾燥後ペーパースト法で測定するのが適切と結論された。

④LC-NMR 等による食品添加物の複合分析法に関する研究では、ポリソルベート類中

のオキシエチレン(EO)の含量%の測定法として、定量 NMR 法が FCC に記載の滴定法に代わる簡便且つ有効な手段であると考えられた。また、安定同位体を含むモデル化合物を LC/MS により分析することにより、クチナシ青色素の主成分の化学構造を検討したところ、ゲニピンとベンジルアミンを用いた反応生成物も同様に分子内にベンジルアミンを含み、それが重合したものと予想されたが、構造を確定することはできなかった。MS スペクトルからは、分子内に N を二つ含むもの化合物の重合体と予想され、今後、各種クロマトグラフにより単離し、NMR 等のスペクトルデータを解析することで構造が確定可能であると思われる。

⑤食品添加物の使用基準の設定のための基礎研究として、食品添加物の食品中での消長、副成生物の有無の検討を実施した。ソルビン酸では、ソルビン酸とアミノ酸のシステインとが水溶液中での室温放置又は電子レンジによる短時間の加熱により両者の反応生成物が生じるが、ソルビン酸 2 種とシステイン 2 種による組合せで室温下、水溶液中に放置したところ両者の反応生成物が得られ、ソルビン酸カリウム、システイン遊離塩基生成物の組み合わせで反応させた場合に、最も夾雑物が少なかったため、これらの系から HPLC による分析及び分取条件を検討し、十数回の分取により単一副成生物が得られた。次亜塩素酸の食品中の消長では、カット野菜を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理すると、ジクロロアセトニトリル及び抱水クロラルの生成が認

められ、消毒副生成物量は次亜塩素酸ナトリウムの初期濃度や pH、温度に依存した。さらに次亜塩素酸ナトリウムにクエン酸を混和した殺菌液よりハロケトンが、リンゴ酸を混和した殺菌液から抱水クロラールが検出され、経時的に増加することが明らかとなった。さらに、殺菌処理後、カット野菜を十分な水で洗浄し、洗浄工程の前後における消毒副生成物の残存量変化を調べたところ、水洗浄後には消毒副生成物の残存量が減少し、殺菌処理前とほぼ同等のレベルまで消毒副生成物を除去することが可能であった。

D. 結論

食品添加物の生産量統計調査については、平成 16 年度の生産量調査を実施し、さらに調査の精度向上の必要が示唆された。

香料においては、我が国において使用されている食品香料化合物の品質規格を自主整備するため、規格項目、試験方法、記載様式について日米欧の局方及び食品添加物規格を比較考察した。また、我が国で使用されている 2,926 化合物につき、国際的に類を見ないデータベースの構築を開始した。ヘッドスペース-GC 法はペクチンの規格試験に採用されている限外ろ過-GC 法とは同等と考えられた。他の増粘安定剤の規格試験に採用されている蒸留-GC 法と比較すると、得られる値が 75%程度となる場合があるため、その点について考慮する必要がある。

赤外吸収スペクトルでは、国際規格での確認試験法への赤外吸収スペクトルの増大

傾向を受け、食品添加物への赤外吸収スペクトルの適切な採用を指向した。

NMR 等の食品添加物規格への適用の可能性では、NMR 法の高分子物質測定への応用では、化合物間の感度は等しいことから補正が不要であり、標準品が入手できない場合においても、絶対量の測定が可能であり、NMR シグナルが十分分離したものであれば、原理的にどのような化合物でも迅速に定量可能であることが示唆された。クチナシ青色素の分析法を確立するために、主色素成分の構造について検討し、安定同位体を分子内に含む ^{15}N -ベンジルアミンを用いてモデル化合物を合成し、LC/MS による構造推定が有益な情報を与えることが明らかとなった。

さらに、食品添加物の使用基準設定のための基礎研究として、食品添加物を食品中で追跡する研究を継続し、ソルビン酸とアミノ酸のシステインとの水溶液中での生成物について、分取生成を試み、構造決定に向けた準備が整った。さらに、次亜塩素酸ナトリウムを用いた殺菌処理により生じる副成生物では、一般に次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理では、塩素臭除去のために流水ですすぎ洗いが行われており、これらの副成生物も、洗い流されることが示されたことから、食品に残存する可能性は低いと考えられた。

以上の研究成果は、直接的に第 9 版食品添加物公定書の国際整合に向けた規格整備に役立つとともに、我が国の食品添加物行政の基盤として食品の安全確保に資するも

のである。

E. 健康機器管理情報

特になし。

F. 研究発表

1. 発表論文

Sugimoto N, Yomota C, Furusho N, Sato K, Yamazaki T, Tanamoto K. Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR) to the identification of ethyldimethylpyrazine, a food flavoring agent. Food Addit. Contam. submitted. (2006).

2. 学会発表

1) Sugimoto N, Yomota C, Furusho N, Sato K, Yamazaki T, Tanamoto K. Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR) to the identification of ethyldimethylpyrazine, a food flavoring agent. Pacifichem 2005, Honolulu (2005.12).

2) Kubota H, Sato K, Yomota C, Tanamoto K. Formation of Volatile Halogenated Organic Compounds in Fresh-cut Vegetables Treated with Sodium Hypochlorite. 119th AOAC annual meeting and exposition. (2005.9).

3) 久保田浩樹、佐藤恭子、四方田千佳子、棚元憲一、次亜塩素酸ナトリウム処理によるカット野菜からのトリハロメタンの生成、日本食品衛生学会第90回学術講演会 (2005.10).

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

食品添加物の複合分析法に関する研究並びに生産量統計を基にした食品添加物の摂取量推定
-¹H 核磁気共鳴法によるポリソルベートの定量-

分担研究者	四方田 千佳子	国立医薬品食品衛生研究所	薬品部	第 1 室室長
協力研究者	田中 晋		日本油脂(株)	
協力研究者	脇阪 達司		花王(株)	
協力研究者	杉本 直樹	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	古庄 紀子	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部	研究員

研究要旨

(1) 食品安全委員会において食品健康影響評価が進められているポリソルベート類の定量法について、¹H 核磁気共鳴法(¹H-NMR)を利用した方法を検討した。本法は、内部標準物質を含む NMR 用溶媒に試料を溶解し、内部標準と試料の特徴的なシグナルの強度比から定量を簡便且つ迅速に行う方法である。3 研究機関において、ポリソルベート類の NMR による定量を行った結果、各機関間に定量値の差が観察されたが、内部標準溶液と試料溶液の調製法を再検討することで、定量 NMR 法が規格試験法として適用可能と考えられた。また、定量が困難とされる他の品目についても応用可能であると考えられた。

(2) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量推定では、本年度は第 8 回の指定添加物に関する生産・流通量調査を実施した。アンケートの回収率が、70%程度であること、食品向け出荷量の中に、食品添加物向け集荷量を除外した回答があるなど、次年度の追調査が不可欠であった。(報告書別添)

A. 研究目的

食品添加物の定量分析には、高速液体クロマトグラフ(HPLC)およびガスクロマトグラフ(GC)等のクロマトグラフィーを利用する方法と化学的な反応を利用する方法(滴定法)が一般的に利用されている。しかしながら、分析対象とする食品添加物によっては、主に 2 つの問題点がある。すなわち、クロマトグラフィーによる方法では、構造異性体等の共通の組成式を持つ化合物や繰り返し構造を持つオリゴマーとポリマーの定量が困難である場合が多いこと、また、化学的な反応による方法では、反応率を 100%と仮定した方法であることから真の定量値を求めているかどうか不明であることである。前者は内部標準法、後者はモデル反応を用いることによって補正し、真値に近い値を求めることが可能であるが、あくまで

も推定値である。したがって、厳密に定量を行う場合には、標準品との比較を行う必要があるが、概して標準品が得られない場合が多い。

一方、核磁気共鳴法(NMR)による定量分析には、次の多くの利点がある。1. 一般的に化合物をクロマトグラフィーで化合物を定量する場合、測定対象物質と同物質の濃度標準が必要であるが、NMR ではこれを必要としない。すなわち、プロトン(¹H)シグナル強度の比は異なる化合物のモル比に対応することから、一方の化合物の純度が明らかであれば、得られたモル比と溶液の調製値の関係から測定対象の化合物の純度(あるいは濃度)が測定される量の標準を参照せずに決定できる。2. 分離精製・前処理の必要がない。3. 複数の成分を同時に定量できる。4. 不安定な化合物を迅速に測定できる。等である。

NMR による定量法は、国際度量衡委員会 (CIPM) の物質諮問委員会 (CCQM) で定義された一次標準測定法になり得ることが期待され、国際的な予備的研究も実施されている。よって、本技術を用いれば、きわめて効率的に純度（あるいは濃度）値を付与することが可能になるものと考えられる。

そこで本研究では、食品安全委員会において食品添加物として審議中のポリソルベート類について、NMR による定量分析が応用可能であるか検討した。

B. 研究方法

1) 試料

ポリソルベート(polysorbate)類(20 (5 製品), 60 (5 製品), 65 (4 製品), 80 (5 製品))(以下 P-20A~E, P-60 A~E, P-65 A~D, P-80 A~E)は、UNIQUEMA, BASF, 花王, 日光ケミカルズ, 日本油脂より提供していただいたものを用いた。フタル酸水素カリウム(容量分析用標準物質)は関東化学製, NMR 用溶媒(重メタノール (CD₃OD) および 重アセトン (acetone-d₆with 0.03% TMS)) は AQUOS ORGANICS 製を用いた。

2) 装置

NMR: JEOL ECA-600 (600 MHz), Variann Mercury400 (400MHz)

3) NMR 定量分析条件

観測幅, 6410 Hz; パルス幅, 45°; パルス遅延時間, 30 sec; 積算回数, 8 回; データポイント, 64K; 室温。

4) 内部標準液の調製

フタル酸水素カリウムを軽く砕いた後, 120°C で約 1 時間加熱し, デシケーターに入れて放冷する。その試料 300mg を精密に量り, 重メタノール/重アセトン (1/1)に十分溶解(超音波使用)した後, 正確に 100 mL とした。

5) 試料の調製

実試料 100 mg を精密に量り, 内部標準溶液を 3 mL ホールピペットにて添加し, これを試料溶液とした。

6) エチレンオキシド(EO)の定量法

内部標準の積分値(プロトン 4 個), 実試料の EO シグナル積分値(プロトン 4 個)と試料量から次のように算出した。

$$EO (\%) = 100 \times$$

実試料の特定シグナル積分値/4x44/実試料の重量 (mg)

内標の積分値/4x204/内部標準溶液 3 mL 中の内標の重量 (mg)

44: エチレンオキシド(EO)の分子量

204: 内部標準の分子量

実試料の特定シグナル積分値: EO シグナル積分範囲 3.50~3.85

ppm

内標の積分値: 内部標準積分範囲 7.48~7.66 + 8.20~8.38 ppm

C. 結果及び考察

1) ポリソルベート類の定量法に関する問題

ポリソルベート類は、アメリカ, EU, 韓国, 対等で食品添加物として認められ, 乳化剤として使用されているが, 現在, 我が国では, その使用は認められていない。しかし, 国際的に使用が広く認められている食品添加物については, 指定に向けた審議が開始されており, ポリソルベート類もこれに該当し, ポリソルベート-20, -60, -65, -80 について食品安全委員会で食品健康影響評価が進められている。現在までは, 指定外添加物であり検出されれば違反となるため, 定性に重点を置いた分析法が検討されてきた。しかし, 今後, 近い将来, 食品添加物として指定されると予想されることから, 確認試験法等の規格設定が必要となる。ポリソルベート類の規格については Food Chemicals Codex (FCC) (4th edition, p.306-309)に記載があり, 国際調和の観点から, 我が国におけるポリソルベート類の規格設定は, まずはこれに準じたものとなると思われる。その内, ポリソルベート類中のオキシエチレン(EO)の含量は, それぞれ規定されているが, その定量を行うには, 非常に複雑な反応装置を組む必要がある。また, 実験操作も煩雑であることから, 多大な分析時間を要し, 更に誤差のない定量値を得るためには熟練を

要すると考えられる。したがって、FCCに記載の方法は、現実的には実行力がないと思われ、その方法に代わる簡便且つ迅速な方法を早急に検討すべきであり、 $^1\text{H-NMR}$ による定量法がその候補としてあげられる。

2) 定量 NMR 法の分析条件の検討

定量 NMR 法により化合物の定量を行う場合、NMR 測定時の測定条件と測定装置の違いが定量値に大きく誤差を与えると予想される。そこで、どの装置を用いて測定しても、各シグナルの積分強度比の誤差が生じないようにするために、NMR 測定条件をパルス幅を 45° 、パルス遅延時間を 30 sec ($>5T_1$)、積算回数を 8 回、データポイントを 64K に統一し、各研究機関に測定を依頼した。また、定量 NMR 法による分析には、試料が測定溶媒に溶解し、 $^1\text{H-NMR}$ において、内部標準のプロトンに由来するシグナルと試料を定量するための特徴的なシグナルが十分に分離して検出されることが不可欠である。よって、内部標準として用いたフタル酸水素カリウムとすべてのポリソルベート類の溶解性を考慮して、数種の測定溶媒を検討して結果、重メタノール/重アセトン ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{acetone-}d_6$) (1/1)が若干フタル酸水素カリウムが溶けにくいという欠点があるものの良好な $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを与えた。

Fig. 1 に今回検討したポリソルベート類の構造式を示した。ポリソルベート類は、ソルビタンの水酸基にオキシエチレン($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) (EO)が約 20 個重合し、ポリソルベート 20, 60, 80 はそれにそれぞれラウリン酸、ステアリン酸、オレイン酸が 1 つエステル結合したものであり、ポリソルベート 65 は、オレイン酸が 3 つエステル結合したものである。Fig. 2 にポリソルベート 20 (P-20)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを分析例として示した。内部標準として使用したフタル酸水素カリウムのベンゼン環上の 4 つのプロトンが 7.56 ppm および 8.29 ppm に観察された。また、ポリソルベート 20 (P-20)のオキシエチレン(EO)のプロトンに由来するシグナルが 3.62 ppm に観察された。よって、内

部標準として用いたフタル酸水素カリウムと EO のプロトンの積分強度比より、分子中の EO の含量が定量可能であることがわかった。また、他のポリソルベート類の EO のプロトンに由来するシグナルも P-20 と同じ位置に観察された。したがって、同一の分析条件で、すべてのポリソルベート類の EO の含量が測定可能であると判断した。

3) 定量結果

Table 1 に 3 機関によるポリソルベート類中の EO の含量を定量した結果を示した。機関 1, 2 (Lab1, Lab2)の結果は、FCC に規定されるポリソルベート類中の EO の含量範囲より大きな値を示した。一方、機関 3 (Lab3)ではいくつかの試料が FCC に規定される含量範囲に収まらないものがいくつか観察されたが、概ね規定値に近い値を示した。ポリソルベート類中の EO の数は、Fig. 3 の式により、定量された EO の含量%より逆算できる。FCC に規定される EO の含量範囲より逆算するとそれぞれ EO が 18~22 個分子内に含まれることを示している。しかし、Table 2 に定量値より逆算した結果を示したが、機関 1, 2 (Lab1, Lab2)では、EO の数は規定の範囲より大きく観察された。機関 3 (Lab3)では、分子中の EO が概ね 18~22 個であることを示した。今回、各機関の NMR 測定条件を等しくしていることから NMR 装置の違いによる測定誤差は理論上、非常に小さい($<1\%$)と予測される。しかし、3 研究機関(Lab1, Lab2, Lab3)の EO(%)の実測値を比較すると P-20, P-60, P-65, P-80 のすべての試料においておよそ 10%の差が観察された。この測定誤差が生じた原因は、測定結果の比を比較することによって以下の様に推定された。Lab1/Lab2 が試料にかかわらず、およそ 1.08 であり、同様に Lab1/Lab3, Lab2/Lab3 がそれぞれ 1.20, 1.11 であることから、各機関間に一定の測定誤差が観察されるが、試料間の誤差は小さく、これは、各機関で調製した内部標準溶液の濃度が異なっていたことに起因していると考えられた。すなわち、内部標準物質のシグナルに対し、EO のシグナルは非常に大きいので、内部標

準溶液の濃度の誤差が EO の定量値に大きな誤差を与えたと考えられた。

したがって、上記の原因により、今回の NMR によるポリソルベート類中の EO の定量結果は、各機関間に測定誤差が大きく観察されたため、再度、内部標準溶液と試料溶液の調製法を検討する必要があると考えられた。

NMR 法は、化合物間の感度は等しいことから補正が不要であり、標準品が入手できない場合においても、絶対量の測定が可能である。また、NMR シグナルが十分分離したものであれば、原理的にどのような化合物でも迅速に測定可能である。したがって、従来の手法では困難である食品添加物の純度測定に応用可能であると考えられ、今後、応用例を検討する予定である。

D. 結論

ポリソルベート類中のオキシエチレン(EO)の含量%の測定法として、定量 NMR 法が FCC に記載の滴定法に代わる簡便且つ有効な手段であると考えられた。しかし、今回 3 研究機関で測定を行った結果では、研究機関間におよそ 10%の含量測定誤差が観察された。この原因として、試料溶

液および内部標準溶液の調製法に問題があったと考えられることから、今後、調製法を再検討し、定量 NMR 法が食品添加物の定量法として有効であることを証明するとともに、従来法では定量が困難である他の品目についても応用を試みる予定である。

E. 研究発表

1) 論文発表

Sugimoto, N., Yomota, C., Furusho, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR) to the identification of ethyldimethylpyrazine, a food flavoring agent. Food Addit. Contam. submitted. (2006).

2) 学会発表

Sugimoto, N., Yomota, C., Furusho, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance (LC-NMR) to the identification of ethyldimethylpyrazine, a food flavoring agent. Pacifichem 2005, Honolulu (Hawaii), 15-20, Dec. (2005).

$w + x + y + z = \text{approx. } 20$

$\text{Total EO} = (\text{C}_2\text{H}_4\text{O}) \times 20 = \text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{O}_{20} \text{ (MW881.1)}$

Compound	Formula (MW)	EO(%) in molecule
Polysorbate 20 (P-20) (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ (MW1227.5)	EO(%) = 71.8
Polysorbate 60 (P-60) (polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate)	$\text{C}_{64}\text{H}_{126}\text{O}_{26}$ (MW1311.7)	EO(%) = 67.2
Polysorbate 65 (P-65) (polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate)	$\text{C}_{100}\text{H}_{194}\text{O}_{28}$ (MW1844.6)	EO(%) = 47.8
Polysorbate 60 (P-80) (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	$\text{C}_{63}\text{H}_{122}\text{O}_{26}$ (MW1295.6)	EO(%) = 68.0

Fig. 1 Structures of Polysorbates

Molecular weights were shown as average masses. EO(%) were estimated from rate of molecular weights and total oxyethylene units on the assumption that oxyethylene units were 20 in molecules.

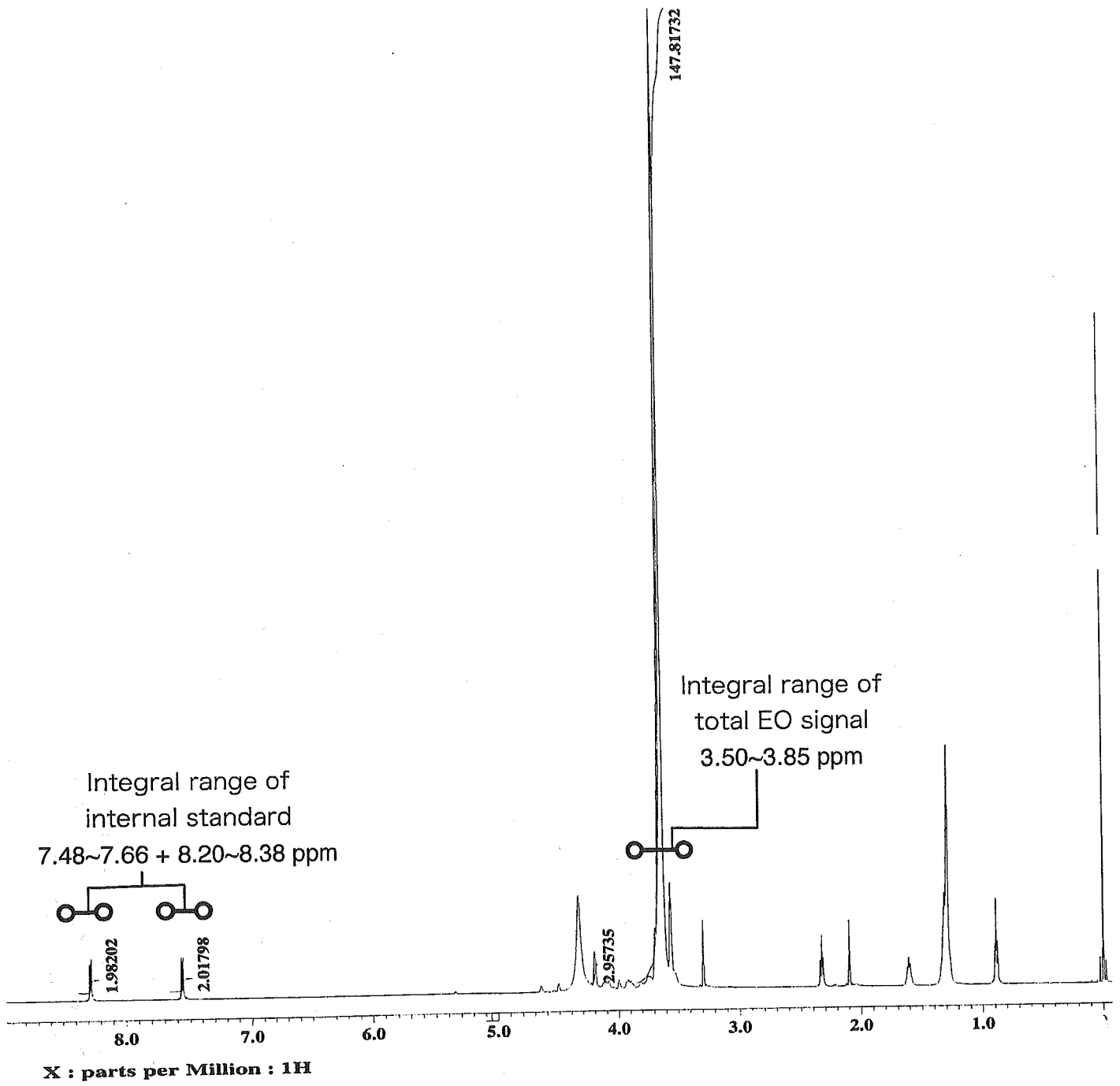
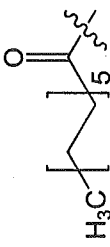
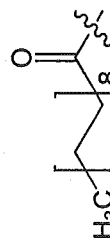

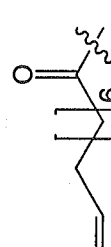


Fig. 2 ^1H -NMR Spectrum of Polysorbate 20 (P-20)
EO(%) was estimated from integral value of total EO on comparison with the value of internal standard.

Compound	Formula	EO(%) in molecule
Polysorbate 20 (P-20) (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)	$R_1 =$  $R_2 = R_3 = H$	$\frac{(C_2H_4O)_n \times 100}{C_{18}H_{34}O_6 + (C_2H_4O)_n}$
Polysorbate 60 (P-60) (polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate)	$R_1 =$  $R_2 = R_3 = H$	$\frac{(C_2H_4O)_n \times 100}{C_{24}H_{46}O_6 + (C_2H_4O)_n}$
Polysorbate 65 (P-65) (polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate)	$R_1 = R_2 = R_3 =$ 	$\frac{(C_2H_4O)_n \times 100}{C_{60}H_{114}O_8 + (C_2H_4O)_n}$
Polysorbate 60 (P-80) (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)	$R_1 =$  $R_2 = R_3 = H$	$\frac{(C_2H_4O)_n \times 100}{C_{23}H_{42}O_6 + (C_2H_4O)_n}$

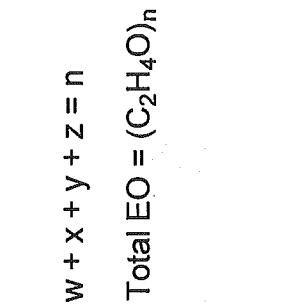


Fig. 3 Calculation Method of Total Number of Oxyethylene Groups in Polysorbate Derivatives.

Tabel 1 Results of quantitative NMR

Compound	Stipulated value	EO (%)			AV	SD	Error of Measurement			Estimated Total Number of EO			
		Lab1	Lab2	Lab3			Lab1/Lab2	Lab1/Lab3	Lab2/Lab3	Lab1	Lab2	Lab3	AV
Polysorbate 20 70.0-74.0%													
P-20A		83.0	80.9	72.2	78.7	5.7	1.03	1.15	1.12	38	33	20	29
P-20B		83.9	79.4	69.9	77.7	7.1	1.06	1.20	1.14	41	30	18	27
P-20C		81.4	77.9	68.7	76.0	6.6	1.05	1.18	1.13	34	28	17	25
P-20D		82.5	78.3	69.9	76.9	6.4	1.05	1.18	1.12	37	28	18	26
P-20E		83.6	80.0	70.7	78.1	6.6	1.05	1.18	1.13	40	31	19	28
Average		82.9	79.3	70.3	77.5	6.7	1.05	1.18	1.13	38	30	19	27
Polysorbate 60 65.0-69.5%													
P-60A		80.2	76.1	68.9	75.1	5.7	1.05	1.16	1.11	40	31	22	29
P-60B		77.1	70.6	64.6	70.8	6.2	1.09	1.19	1.09	33	23	18	24
P-60C		80.8	74.8	65.9	73.8	7.5	1.08	1.23	1.14	41	29	19	28
P-60D		77.8	70.1	65.0	71.0	6.5	1.11	1.20	1.08	34	23	18	24
P-60E		77.8	72.7	64.8	71.8	6.6	1.07	1.20	1.12	34	26	18	25
Average		78.8	72.9	65.8	72.5	6.7	1.08	1.20	1.11	36	26	19	26
Polysorbate 65 46.0-50.0%													
P-65A		57.9	52.0	47.6	52.5	5.2	1.11	1.22	1.09	30	24	20	24
P-65B		53.9	48.8	43.9	48.9	5.0	1.11	1.23	1.11	26	21	17	21
P-65C		53.0	50.2	44.5	49.2	4.3	1.06	1.19	1.13	25	22	18	21
P-65D		51.4	50.7	44.4	48.9	3.9	1.01	1.16	1.14	23	23	17	21
Average		54.1	50.4	45.1	49.9	4.6	1.07	1.20	1.12	26	22	18	22
Polysorbate 80 65.0-69.5%													
P-80A		79.6	74.5	67.6	73.9	6.0	1.07	1.18	1.10	37	27	20	27
P-80B		76.8	72.5	65.4	71.6	5.8	1.06	1.17	1.11	31	25	18	24
P-80C		82.1	73.2	66.2	73.9	8.0	1.12	1.24	1.11	43	26	18	27
P-80D		76.8	71.7	64.4	71.0	6.2	1.07	1.19	1.11	31	24	17	23
P-80E		78.7	73.8	65.3	72.6	6.8	1.07	1.21	1.13	35	26	18	25
Average		78.8	73.1	65.8	72.6	6.6	1.08	1.20	1.11	35	26	18	25

Lab1 used JEOL ECA600. Lab2 and Lab3 used Variann Marcury400.

Stipulated values of EO are listed in Food Chemical Codex (FCC).

平成17年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

「国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究」

分担研究

「我が国における食品添加物生産量統計とその国際比較」

生産量統計を基にした 食品添加物の摂取量の推定

平成18年3月31日

分担研究者

四方田 千佳子

（国立医薬品食品衛生研究所薬品部第一室長）

「生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定」研究グループ

グループリーダー

藤井 正美（前神戸学院大学薬学部）

研究業務委任受託

高野 靖（日本食品添加物協会）

目次

まえがき	1
1. 調査方法及び調査結果	4
2. 資料	7
資料Ⅰ 調査資料一式	7
資料Ⅱ 第8回調査 調査票送付先リスト	27
3. 集計	45
集計1 食品添加物用途別 食添名と全出荷量、純食品向け出荷量、 輸出量調べ	45
集計2 食品添加物名別 製造会社数、全出荷量、純食品向け出荷量、 輸出量調べ	57
集計3 食品添加物名別 食添以外用途調べ	71

まえがき

[経過]

指定添加物にあつては品目ごとに原則としてその人1日摂取許容量（ADI）が検討評価されている。したがって、行政上各添加物ごとに日本人1人1日実摂取量の実態を把握しておくことは衛生管理上もとめられている。

化学品や医薬品は統計法にもとづく指定統計として製造等事業所へのアンケートによって生産量等がまとめられているが、食品添加物は指定されておらず、規制の緩和化時代でもあり、新たな指定統計申請も困難であった所から、この「生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定」にかかわる厚生労働科学研究（前厚生科学研究）が昭和57年度厚生省環境衛生局食品化学課によって始められ、現厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課に引き継がれている。我が国における指定添加物の製造・輸入業者を対象に一定年次における品目別生産量を調査する方式からその目的を達成しようとするものである

第1回調査は57、58年度に行われ、昭和59年度（昭和60年3月31日付）に集計結果の解析による食品添加物別1日摂取量を含む総括調査報告書がまとめられている。第2回は昭和62年度を調査1年目とし平成元年度に総括調査報告書がまとめられ、以降3年毎に繰り返され平成16年度（同17年3月31日付）にその第7回総括調査報告書がまとめられている。

今回の平成17年度本レポートは平成19年度を最終総括年とする標題の調査研究の1年目、企業アンケート調査結果を整理・集計化したものである。したがって数値の確認調査などを行っていないので、品目によっては粗データが含まれており、本レポートを利用される場合、そのことの承知方を願います。

[本レポートの調査]

調査は原則として3年間を1クールとして行われてきている。表1-1のごとく、平成16年度に第7回目の実態把握をまとめ、今平成17年度から同19年度にかけて第8回目の調査に入る、その初年度のものである。すなわち、わが国における指定添加物についてその製造・輸入事業者を対象に自社における平成16年度の年間の食品添加物グレードの取扱い量について、その製造・輸入別数量および年間の純食品用向けに出荷した数量、その他輸血量等についてアンケート調査を行い、まず初年度これを集計化したものである。

次年度にはアンケート個票ならびに、その集計表を点検して、記入不備・記入値等疑問事業所を抽出してTel・Fax 照会や未報告事業所に再アンケート等を行い、集計化向上と精密化を期した再調査を実行する。

次々年度に整備された再集計データに基づき調査研究班の集中的作業によって品目毎数値の検討を、貿易統計などにより明らかになる添加物の荷動き、業界誌見積もり、出荷

数値、食品産業関係の加工食品生産統計値など各種統計上の照合と共に、食品添加物グレードに出荷された量が流通上、医薬品、化粧品またはプラスチック添加物に使用される例がきわめて多いことから、これらを考察しながら、国民1人あたり1日摂取量を3年毎の総括調査報告書に、査定の理由付け解説と共に一括まとめることとなる。

一方、既存添加物については、平成12年から調査を開始したが、第8回指定添加物調査のクールでも既存添加物についての経験蓄積の立場から4回目の調査を予定している。即ち前回と同様、次年度の2年目：アンケート調査、3年目：2年目の未報告企業、疑問回答企業、報告不備企業に対し再アンケート、名称と物質の相関量が解るものについてはTel・Faxによる確認作業をおこない集計し直し、指定添加物と同時に報告書とする予定である。既存添加物については調査研究班の自主的調査として指定添加物と同様な調査を行い、レポート化してきているので、表1-1中で併行調査と記した。

表1-1 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定研究班
報告書作成作業年表

西暦年	日本暦年	指定添加物調査	併行調査(既存添加物)
1982	昭和57	はじめてのアンケート調査	
83	58	同調査継続・疑問確認調査	
84	59	疑問確認。解析・レポート化	食品企業添加物使用調査
85	60	第1回報告書	同調査継続
86	61		同調査継続 集計案作成年度
87	62	第2回アンケート調査	報告書
88	63	再精密調査	
89	平成1	解析・レポート化	
90	2	第2回報告書。第3回アンケート調査	
91	3	再精密調査	
92	4	解析・レポート化	
93	5	第3回報告書。第4回アンケート調査	
94	6	再精密調査	天然添加物生産アンケート調査
95	7	解析・レポート化	天然添加物集計報告書
96	8	第4回報告書。第5回アンケート調査	
97	9	再精密調査	
98	10	解析・レポート化	
99	11	第5回報告書。第6回アンケート調査	
2000	12	再精密調査	既存添加物生産アンケート調査