

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐藤 恭子

平成19（2007）年 3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 -----	1
佐藤恭子	
II. 分担研究報告	
1. 食品添加物規格、生産量統計の国際比較及び香料規格に関する調査研究 ---	9
佐藤恭子	
(資料)	
我が国で使用している食品香料化合物の生産使用量・摂取量調査に関わる調査研究	
食品香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究	
生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定 (その1 指定添加物品目)	
生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定 (その2 既存添加物品目)	
2. 食品添加物の赤外吸収スペクトルに関する国際的な規格と国内規格 向上に関する調査研究 -----	25
齋藤 寛	
3. NMR等による食品添加物の規格分析法に関する研究 -----	44
杉本直樹	
4. 食品中の食品添加物の流通状態における消長調査 -----	55
扇間昌規	
5. 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 -----	60
久保田浩樹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	81
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	82

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

平成 18 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 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第一室長

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、指定に向けた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、国際整合を目指す必要がある。食の安全性確保のため、香料化合物を含む食品添加物の摂取量の把握も重要である。本研究では、その基盤となる調査研究を実施した。香料化合物の生産使用量・摂取量調査では、構築した高度化データベースを使用して調査を行い、調査開始から集計まで僅か9ヶ月という短期間で調査結果を得ることができた。平成 17 年に使用した香料化合物（新規指定品目を含む）の品目数は 2,164、年間総使用量は約 1,217t であり、安全性に問題があるような摂取量の化合物はないことが分かった。また、香料化合物の自主規格作成では、213 化合物について流通規格を反映した規格を整備することができた。生産量統計を基にした食品添加物の摂取量推定では、指定添加物の第 8 回アンケート調査の追加調査及び再調査を行い、さらに、既存添加物の平成 17 年の製造・輸入分を対象に、第 3 回のアンケート調査を実施し、基礎データの蓄積に努めた。増粘安定剤の残留溶媒分析法については、酵素を用いたヘッドスペース-GC 法が蒸留-GC 法の代替法となりうることを示した。簡便で確実な確認試験法である赤外スペクトル法（赤外線吸収スペクトル、IR）については、ネオテームなどの規格の向上を試みた。その結果、確認試験に活用でき得るこれらの IR 測定法を確立できた。NMR 等による食品添加物の規格分析法に関する研究では、ポリソルベートの定量法の検討を行い、定量 NMR が食品添加物中の特定の置換基の含量を簡便に測定する方法として非常に有効であることを明らかにした。食品添加物の食品中での消長に関しては、ソルビン酸とシステインとで生じる反応生成物の同定を目的に分取精製を試み、ソルビン酸とシステインの添加形態によって、反応性の異なること、複数の生成物が形成されていることが推測された。次亜塩素酸ナトリウムによる副成生物の検討では、カットキャベツを次亜塩素酸ナトリウム溶液により殺菌処理し、ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸の生成が確認され、これら消毒副生成物は次亜塩素酸ナトリウムの初期濃度や pH、温度

に応じて変化し、生成量が増加する傾向が認められた。また、次亜塩素酸ナトリウムに各種有機酸を添加し、消毒副生成物量の変化を調べたところ、クエン酸を混和した殺菌液よりジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸が、経時的に増加していく傾向が認められた。さらに、殺菌処理後の水洗浄が消毒副生成物の低減化に有効であることが確認された。

以上の研究成果は、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。

分担研究者

齊藤 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、我が国では安全性に問題がなくかつ国際的に広く使用されている食品添加物（香料化合物を含む）については、既に主導で指定に向けた検討が進められている。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を目指し、以下の調査研究を行った。

①香料化合物については日米欧同時期の使用量調査を実施した。また、国際的整合化及び安全性の保証として広く社会へ情報公開することを目的とし、香料化合物の自

主規格作成を推進した。生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定では、引き続き我が国の食品添加物動向の把握に努めた。増粘安定剤の残留溶媒分析法については、ヘッドスペース-GC法及び蒸留-GC法の改良について検討した。②赤外吸収スペクトルの規格向上では、ネオテーム等の規格向上を試みた。③NMR等による食品添加物の規格分析法に関する研究では、昨年度検討したポリソルベートのエチレンオキサイド（EO）定量法について、精度向上を目指し再検討を行った。④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とシステインとの反応生成物、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した。

B. 研究方法

1. 我が国で使用している香料化合物の生産使用量・摂取量に関わる調査研究

平成16、17年度に構築した「高度化データベース」を利用して、平成17年1月～12月に国内で食品香料製造に使用された香料化合物の量について、食品香料製造会社に

対して調査を行い、使用量を集計し摂取量を算出した。また、本調査結果と前回の調査結果を比較、検討した。

2. 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

平成 17 年度の研究で規格を設定できなかった品目を含めて、使用量上位 553 位 (10kg/年以上)までの 424 化合物について規格化の検討を以下の手順で行った。

- 1)平成 17 年度調査からの問題点の抽出
- 2)平成 14 年調査回答に対する再調査
- 3)日本香料工業会自主規格作成方針見直し
- 4)自主規格検討

3. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物については、平成 16 年の製造・輸入分を対象に、前年度実施した第 8 回アンケート調査の追加調査及び再調査を行った。前年の調査で未回答であった事業者への調査票再送付、回答内容について確認の必要な事業者への電話等による聞き取りを行った。既存添加物については、平成 17 年の製造・輸入分を対象に、第 3 回のアンケート調査を実施した。回答内容について再度確認が必要な事項を抽出した。

4. 増粘安定剤の残留溶媒分析におけるヘッドスペース (HS) -GC 法の改良と蒸留法-GC 法との比較

増粘安定剤の残留溶媒分析として、酵素(セルラーゼ)を用いた HS-GC 法を検討し、

グアーガム、カロブビーンガム及びジェランガムを試料として、蒸留-GC 法及び昨年度検討した HS-GC 法(試料溶液を一晩放置した後分析)との比較を行った。

5. 食品添加物の赤外吸収スペクトルに関する国際的な規格と国内規格向上に関する調査研究

ネオテームやトコフェロール類を試料として、各製品についてペースト法(ヌジョール、Nujol 法)、KBr 錠剤法及び NaCl 錠剤法で IR を測定し、FCC や JECFA 記載の参照 IR スペクトルなどと比較検討した。

6. NMR 等による食品添加物の規格分析法に関する研究

ポリソルベート 20、60、65、80 及び類縁物質を試料、フタル酸水素カリウムを内部標準として、Table I に示す条件で ¹H-NMR 測定を行い、得られた NMR スペクトルの内部標準の積分値(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 EO 含量 (%) を算出した。

7. 食品中の食品添加物の流通状態における消長調査

ソルビン酸あるいはソルビン酸カリウムのメタノール水溶液とシステイン塩酸塩あるいはシステイン遊離体のメタノール水溶液とをそれぞれ等量混和した各組合せで室温放置し、反応生成物を含む溶液を HPLC を用いて分析した。

8. 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
細切キャベツを試料として、次亜塩素酸ナトリウム溶液での殺菌処理により生成するハロ酢酸を、硫酸・メタノール溶液を用いてメチルエステル化し、GC/ECD 及び GC/MS で分析した。また、消毒副生成物生成に対する有効塩素濃度、温度、pH の影響及び次亜塩素酸ナトリウムと各種酸を混和した殺菌液により生成する消毒副生成物量を調べた。

C. 研究結果及び考察

1. 我が国で使用している香料化合物の生産使用量・摂取量に関わる調査研究

本年度に実施した我が国で 2 回目となる香料化合物の「生産使用量・摂取量」調査は、平成 16 年度及び平成 17 年度の両年度をかけて構築した高度化データベースを使用したことから調査開始から集計まで僅か 9 ヶ月という短期間で調査結果を得ることができた。本年度の調査研究では、平成 17 年 1 月から 12 月までの 1 年間に使用した香料化合物(新規指定品目を含む)の品目数は 2,164、年間総使用量は約 1,217t、平均推定摂取量は 142 μ g/人/日であり、安全性に問題があるような摂取量の化合物はないことが分かった

2. 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

香料(製剤)の安全性を担保し、且つ商取引に役立てる目的で本調査研究を行った。

平成 17 年度の調査研究では 129 化合物について規格を整備したが、本年度平成 18 年度の調査研究においては 213 化合物について流通規格を反映した規格をまとめることができた。平成 17 年度、18 年度の 2 ケ年度で合計 342 化合物に規格を整備することができたが、これらの 342 化合物のうちには FCC に収載されていない化合物が 161 もあることから、国際的にも大いに貢献する調査研究であったと確信している。

3. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

前年の調査で未回答であった事業者への調査票再送付、回答内容について確認の必要な事業者への電話等による聞き取りを行い、データをそろえることが出来た。既存添加物については、平成 17 年の製造・輸入分を対象に、第 3 回のアンケート調査を実施し、回答内容について再度確認が必要な事項を抽出した。

4. 残留溶媒

酵素(セルラーゼ)溶液を添加後、60°C で 40 分間加熱し、HS-GC 法で分析すると、グアーガム及びカロブベーンガムのように加水分解が起こりやすいガムについては、蒸留-GC 法等とほぼ同様か若干高い値が得られ、代替法となりうると考えられた。しかし、ジェランガムのようにセルラーゼで加水分解されにくいガムでは値が低く、別の酵素を用いる必要があると考えられた。また、蒸留で得られた留液について、HS-GC

法と同じキャピラリーカラムで分析を行ったところ、良好な結果が得られ、蒸留-GC法でもキャピラリーカラムの使用は可能であると考えられた。

5. 食品添加物の赤外吸収スペクトルに関する国際的な規格と国内規格向上に関する調査研究

ネオテームに無水物と水和物が存在することを明らかにした。無水物の場合はペースト法のみ、水和物の場合はペースト法とKBr法のいずれでも測定できることを明らかにした。さらに、トコフェロール酢酸エステルなどの標準となるIRを得ることができた。

6. NMR等による食品添加物の規格分析法に関する研究

FT-NMR装置による定量性(>99%)を向上するため、1. 測定対象のスペクトル範囲が観測幅の80%以内になるようにする。2. パルス幅を短くする。3. パルス遅延時間をシグナルの緩和時間(T_1)の5倍以上に設定する。を満たす条件として、Table 1に示す条件で測定することにより、NMR装置の違いによる測定誤差は非常に小さいことが確認できた。さらに、食品添加物として諸外国で流通している各社の市販ポリソルベート20, 60, 65および80について、EO含量を測定した結果、すべてFCCおよびJECFAに規定された範囲内であった。したがって、ポリソルベート類中のオキシエチレン基(EO)含量(%)の測定法として、 ^1H 核磁気共鳴法による定量分析法

(qNMR)がJECFA及び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。

7. 食品中の食品添加物の流通状態における消長調査

ソルビン酸(あるいはソルビン酸カリウム)とシステイン(あるいはシステイン塩酸塩)の組合せで調製した4種類の試料溶液を室温暗所に3ヶ月間放置した結果、ソルビン酸とシステイン(あるいはシステイン塩酸塩)の試料溶液でHPLC上3ピークに経時的な増加が認められ、ソルビン酸とシステイン塩酸塩の試料溶液の方がピークの増加度合いが高かった。

8. 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

カットキャベツを次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理すると、ジクロロ酢酸(DCAA)及びトリクロロ酢酸(TCAA)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温度依存的に増加した。また、pHの影響については、強酸性条件においてTCAA生成量が若干高くなるが、弱酸性から中性領域においてはDCAA及びTCAA生成量に殆ど変化はみられなかった。一方、pH10の弱アルカリ性領域を中心としてDCAA及びTCAAともに生成量が増加する傾向が認められ、強アルカリ性になるとDCAA及びTCAA生成量が急激に低下した。さらに次亜塩素酸ナトリウム・クエン酸混液では、調製直後より

DCAA が生成し始め、TCAA も僅かながら生成が確認された。一方、次亜塩素酸ナトリウム・リンゴ酸混液では、調製直後 DCAA が僅かに生成するが、混液調製 10 分後以降はほぼ一定の濃度となった。さらに、殺菌処理後、カットキャベツ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、水洗浄によりハロ酢酸の残存量は減少した。

D. 結論

香料化合物の使用量・摂取量に関わる調査研究は、日米欧 3 極同時期の使用量調査という目的を伴って実施された。本研究では、食品衛生法施行規則別表第 1 収載の香料化合物について国内での使用量を把握するとともに、推定摂取量を明らかにした。今回の調査では、日本の食品香料製造会社全体の平成 17 年における年間販売数量の 96.6%をしめる 59 社から有効回答が得られ、本調査結果は国内における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る。香料化合物の自主規格の作成については、平成 17 年度の研究で規格を設定することができなかった品目について、再調査を実施し、これを含めて使用量上位 553 位 (10kg/年以上) までの 424 化合物について規格かの検討を行い、213 品目について自主規格を設定した。生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定では、指定添加物の第 8 回調査の第 2 年度として再調査、追加調査を行い、平成 17 年度の調査分と統合した。既存添加物等については、第 3 回調査の初

年度にあたり、アンケート調査をまとめた。増粘安定剤の残留溶媒分析法については、蒸留-GC 法の代替法として、酵素(セルラーゼ)溶液を添加した HS-GC 法を検討した。その結果、セルラーゼにより加水分解されるグアーガム及びカロブビーンガムについては、蒸留-GC 法等とほぼ同様の結果が得られ、代替法となりうると考えられた。しかし、ジェランガムのようにセルラーゼで加水分解されにくいガムでは、別の酵素を用いる必要があると考えられた。また、蒸留-GC 法でもキャピラリーカラムの使用は可能であると考えられた。

赤外吸収 (IR) スペクトルについては、標準となり得る IR スペクトルを得るために、ネオテームなどの測定法や測定条件に検討を加えた。ここで得られた IR スペクトルは、標準的な参照 IR スペクトルとして利用できると考えられる。また、国内規格を設定するにあたっては、諸外国の参照 IR も参照することも必要であるが、独自に検討を加えて、より確実に優れた参照 IR を規格として設定し、食の安全性に寄与すべきであると結論した。NMR 等による食品添加物の規格分析法に関する研究では、ポリソルベートの定量法の検討を行い、定量 NMR が食品添加物中の特定の置換基の含量を簡便に測定する方法として非常に有効であることを明らかにした。食品添加物の食品中での消長に関しては、ソルビン酸とシステインとで生じる反応生成物の同定を目的に分取精製を試み、ソルビン酸とシステインの添加形態によって、反応性の異なる

こと、複数の生成物が形成されていることが推測された。次亜塩素酸ナトリウムによる副成物の検討では、カットキャベツを次亜塩素酸ナトリウム溶液により殺菌処理し、ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸の生成が確認され、これら消毒副生成物は次亜塩素酸ナトリウムの初期濃度や pH、温度に応じて変化し、生成量が増加する傾向が認められた。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、水洗浄後にはハロ酢酸は減少し、水洗浄が消毒副生成物の低減化に有効であることが確認された。

E. 康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugimoto, N., Yomota, C., Furusho, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance *spectroscopy* to the identification of ethyldimethylpyrazine, a food flavoring agent, *Food Add. Contam.*, **23**, 1253-1259. (2006).
- 2) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add.*

Contam., accepted. (13 Feb. 2007).

- 3) Kitamura, Y., Iwasaki T., Saito, M., Mifune, M., Saito, Y., Sato, K., Yomota C. and Tanamoto K, Standard Infrared Absorption Spectrum of Betaine and Optimal Conditions for its Measurement. *J. Food Hygienics Society of Japan*, 47(5), 232-236 (2006).
- 4) Mine, T., Okada, Y. and Semma, M., The interaction of sorbic acid with amino acid may alter the quality of foods somewhere in the food chain from production to table. *Jpn. J. Food Chem.*, 14, In press (2007).

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. *Pacificchem 2005*, Honolulu (Dec. 2005).
- 2) 杉本直樹, 古庄紀子, 四方田千佳子, 佐藤恭子, 山崎壮, 棚元憲一, ¹H 核磁気共鳴法によるポリソルベートの定量, 全国衛生化学技術協議会年会, 米子 (Nov. 2006)

G. 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

Table I. Instruments and acquisition parameters.

Spectrometer	MERCURY400 (VARIAN) and ECA500 (JEOL)
Probe	5 mm indirect detection probe
Spectral width	- 2.5 - 12.5 ppm
Data points	64000
Flip angle	45°
Pulse delay	30 s ($>5T_1$)
Scan times	8
Sample spin	15 Hz
Probe temperature	25 °C
Solvent	Mixture of methanol- d_4 and acetone- d_6 (1 : 1)
Internal standard	Potassium hydrogen phthalate (PHP)
Range of integral signal	Oxyethylene group (EO) = 3.40 - 3.85 ppm
	4 protons of PHP = 7.46 - 7.66 ppm + 8.18 - 8.38 ppm

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

平成 18 年度分担研究報告書

食品添加物規格、生産量統計の国際比較及び香料規格に関する調査研究

分担研究者 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部第一室長
研究協力者 建部 千絵 国立医薬品食品衛生研究所 研究員

研究要旨

増粘安定剤中の残留溶媒分析法として、第 8 版食品添加物公定書には、蒸留-GC 法が記載されたが、残留溶媒分析法としては、ヘッドスペース-GC 法も簡便な方法であることから、蒸留-GC 法の代替法として、酵素(セルラーゼ)溶液を添加した HS-GC 法を検討した。その結果、セルラーゼにより加水分解されるグアーガム及びカロブビーンガムについては、蒸留-GC 法等とほぼ同様の結果が得られ、代替法となりうると考えられた。しかし、ジェランガムのようにセルラーゼで加水分解されにくいガムでは、別の酵素を用いる必要があると考えられた。

香料化合物の生産使用量・摂取量調査は、平成 16 年度及び平成 17 年度の両年度をかけて構築した高度化データベースを使用し、調査開始から集計まで僅か 9 ヶ月という短期間で調査結果を得ることができた。平成 18 年度の調査研究では、平成 17 年 1 月から 12 月までの 1 年間に使用した香料化合物(新規指定品目を含む)の品目数は 2,164、年間総使用量は約 1,217t、平均推定摂取量は 142 μ g/人/日であり、安全性に問題があるような摂取量の化合物はないことが分かった。

香料化合物の自主規格作成では、213 化合物について流通規格を反映した規格を整備することができた。

生産量統計を基にした食品添加物の摂取量推定では、平成 16 年の製造・輸入分を対象に、前年度実施した指定添加物の第 8 回アンケート調査の追加調査及び再調査を行い、さらに、既存添加物の平成 17 年の製造・輸入分を対象に、第 3 回のアンケート調査を実施し、基礎データの蓄積に努めた。

A. 研究目的

増粘安定剤については、JECFA との整合性から、残留溶媒の規格が求められ、第 8 版食品添加物公定書では、7 品目に残留

溶媒限度規格（2-プロパノールまたは、2-プロパノールとメタノールの合計量）が設けられた。このうち、加工ユーケマ藻類、カロブビーンガム、キサントガム、グア

ーガム、ジェランガム、精製カラギナン、ラムザンガムについては、蒸留-GC法が採用された。一方、ヘッドスペース (HS) -GC法は、残留溶媒の分析法として、比較的簡便であり、医薬品や水中の残留溶媒分析に利用されている。昨年度、増粘安定剤中の残留溶媒分析法として、HS-GC法について蒸留-GC法との比較検討を行ったところ、操作条件については、なお検討の余地があると考えられた。また、HS-GC法では1晩増粘安定剤を膨潤させる操作があり、分析するまでに長時間を要する。そこで、本年度は、増粘安定剤を加水分解することができる酵素(セルラーゼ)を添加し、操作時間の短縮ができないか検討を行った。また、一方では、第8版食品添加物公定書において、増粘安定剤中の残留溶媒の分析法(蒸留-GC法)には、パックドカラムが用いられているが、パックドカラム用のGC装置を持たない分析機関も増えているため、キャピラリーカラムを用いた分析法が望まれる。そこで、蒸留-GC法において、パックドカラムからキャピラリーカラムへの変更が可能かどうかについての検討も行った。

指定添加物にあつては、品目ごとに原則として、一日摂取許容量(ADI)が検討評価されている。従って、指定添加物ごとに一日摂取量の実態を把握しておくことが衛生管理上求められている。そこで、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基に指定添加物の一日摂取量の推定を行

っている。また、既存添加物等も日本の食品添加物の中では重要な位置を占めていることから、既存添加物及び一般飲食物添加物の生産出荷統計調査を行った。

香料化合物の摂取量に関する情報は、安全性評価の重要な要素の一つである。そこで、平成16、17年度に構築した、香料化合物の国際情報を収載した高度化データベースを活用して、日米欧同時期の使用量調査を実施し、我が国で使用されているすべての香料化合物について摂取量推定を行った。さらに、日本においては、流通している約3,000種類の香料化合物のうち、個別指定されている90品目にのみに規格が設定されていることから、国際的整合化を目指し、また、安全性の保証として広く社会へ情報公開することを目的とし、香料化合物の自主規格作成を推進した。なお、食品添加物の摂取量の推定、我が国で使用している香料化合物の生産使用量・摂取量及び自主規格に関わる調査研究に関しては、本報告書の添付資料を参照されたい。

B. 研究方法

1. 増粘安定剤の残留溶媒分析におけるヘッドスペース-GC法及び蒸留法-GC法の比較

1.1 試薬

tert-ブタノール、2-プロパノール、メタノールは試薬特級を用いた。

1.2 増粘安定剤試料

カロブビーンガム、グアーガム、ジェランガムは、和光純薬製を用いた。

1.3 溶媒添加試料の調製

カロブビーンガム (添加試料) : カロブビーンガム 200g に 2-プロパノール及びメタノール各 100ml を添加した後、ドラフト内に 1 週間放置し、その後、冷蔵保存した。

グアーガム (添加試料) : グアーガム 200g に 2-プロパノール及びメタノール各 100ml を添加した後、ドラフト内に 1 週間放置し、その後、冷蔵保存した。

ジェランガム (添加試料) : ジェランガム 200g に 2-プロパノール及びメタノール各 100ml を添加した後、ドラフト内に 1 週間放置し、その後、冷蔵保存した。

1.4 酵素溶液の調製

セルラーゼ (MP biochemicals 社製) 0.1 g を水に溶かし 10 ml とし (1 % 酵素溶液)、4°C で冷蔵保存した。

1.5 標準添加ヘッドスペース(HS)-GC 法

(1) 2-プロパノール及びメタノールそれぞれ約 0.8g を精密に量り、水を加えて正確に 100ml とした。この液 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準溶液 A とした。標準溶液 A 10ml 及び 5ml をそれぞれ正確に量り、水を加えて正確に 20ml とし、標準溶液 B 及び標準溶液 C とした。ただし、ジェランガムに関しては 2-プロパノールの残留溶媒量が多かったため、標準溶液を A、B、C それぞれ 10 倍濃いものを調整し用いた。まず、ヘッドスペース用バイアルに、試料 0.04 g を量り、攪拌子と水又は標準溶液 A、標準溶液 B、標準溶液 C のいずれか 5 ml ずつを正確に加え、直ちに密封し、一晩放置した。翌

日、マグネチックスターラーで 1 分間攪拌後、HS-GC/FID により 2-プロパノール及びメタノールのピーク面積を測定した。一方、酵素添加試料は、ヘッドスペース用バイアルに、試料 0.04 g を量り、攪拌子と水又は標準溶液 A、標準溶液 B、標準溶液 C のいずれか 5 ml ずつを正確に加え、更に 1% 酵素溶液 0.1 ml を加え、直ちに密封し、マグネチックスターラーで 1 分間攪拌後、直ちにヘッドスペースサンプラーに入れ、40°C または 60°C で 40 分間加熱し、分析を行った。なお、試料溶液の調製は同時に行い、1 試行の 4 つのバイアルは同時にヘッドスペースサンプラーにセットした。他のバイアルはヘッドスペースサンプラーで加熱する直前まで、4°C で保存し、加熱を開始する直前にヘッドスペースサンプラーにセットした。HS-GC-FID により 2-プロパノール及びメタノールのピーク面積を測定した後、測定用試料中への 2-プロパノールまたはメタノールの添加濃度を横軸に、クロマトグラム上の各ピーク面積値を縦軸に取り、関係線を作成し、関係線の横軸との交点と原点との距離から、試料中の 2-プロパノール及びメタノール濃度を求めた。

(2) GC 測定条件

(i) ヘッドスペースサンプラー (HP7694、HP 社製)
オープン温度、40°C または 60°C ; ループ温度、110°C ; トランスファーライン温度、130°C ; バイアル平衡時間、40 分間 ; Shake、High ; バイアル容量、10 mL

(ii) GC-FID (HS-GC法 : HP5890、HP社製)
カラム、Aquatic-2 (内径0.25mm、長さ60m、膜厚1.4 μ m、ジーエルサイエンス (株) 製) ; カラム温度、40 $^{\circ}$ C (6min) \rightarrow 4 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 110 $^{\circ}$ C \rightarrow 25 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 240 $^{\circ}$ C (10min) ; 注入口温度、200 $^{\circ}$ C ; ガス流量、ヘリウム (キャリアーガス) 175kPa、水素 100 kPa、空気 250 kPa ; 注入方法、スプリット注入 (スプリット比=10 : 1) ; 検出器温度、260 $^{\circ}$ C

(iii) GC-FID (蒸留-GC法 : GC14B、島津製作所製)
カラム、Aquatic-2 (内径0.25mm、長さ60m、膜厚1.4 μ m、ジーエルサイエンス (株) 製) ; カラム温度、40 $^{\circ}$ C (6min) \rightarrow 4 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 110 $^{\circ}$ C \rightarrow 25 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 240 $^{\circ}$ C (10min) ; 注入口温度、200 $^{\circ}$ C ; ガス流量、ヘリウム (キャリアーガス) 250 kPa、水素 50 kPa、空気 50 kPa ; 注入方法、スプリット注入 (スプリット比=100 : 1) ; 検出器温度、260 $^{\circ}$ C

1.6 蒸留-GC法

tert-ブタノール 0.1g に水を加え 100ml とし、内標準溶液とした。2-プロパノール及びメタノールをそれぞれ約0.5gずつ精密に量り、水を加えて正確に 50ml とした。この液 5ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準液とした。試料 2g を 300ml 容のナス型フラスコに精密に量り、水 200ml、沸騰石数個及びシリコーン樹脂約 3ml を入れよく混和した。内標準溶液 4ml を正確に量り、100ml 容のメスフラスコに入れ、蒸留装置を組み立て、すり合わせ連

結部を水でぬらした。泡がしぶき止め付き蒸留管に入らないように調整しながら、1 分間に 2~3ml の留出速度で留分が約 90ml になるまで蒸留した。この留分に水を加えて正確に 100ml とし、検液とした。検液及び標準液につき、GC-FID (条件 : GC 測定条件(2)(iii)) で分析を行った。グアーガムについては、加熱温度が高すぎると泡が出て、しぶき止めに入ってしまうため、最初高温で加熱し、沸騰し始めたら、温度を低くし蒸留を行った。検液及び標準液の *tert*-ブタノールのピーク面積に対する溶媒 (2-プロパノール及びメタノール) のピーク面積比 Q_T 及び Q_S を求め、以下の式により 2-プロパノール及びメタノールの量を求めた。
溶媒量 = 溶媒の採取量(g)/試料の採取量(g) $\times Q_T / Q_S \times 0.4$ (%)

1.7 酵素活性測定

カロブベーンガム、グアーガム及びジェランガムをそれぞれ約 0.04 g 精密に量りとり、水 5 ml を加え、マグネチックスターラーで 1 分間攪拌し、基質溶液とした。基質溶液は約 15 分間 40 $^{\circ}$ C の水浴で温め、酵素溶液を 0.1 ml 加え、数秒間攪拌し反応を開始した。反応時間 0、30、60、150 分の時に、反応溶液をカロブベーンガムの場合は 5 μ l、グアーガム及びジェランガムは 100 μ l 採取し、水で 1 ml とし、反応溶液とした。直ちに反応溶液に Schales 試薬 (0.5 M 炭酸ナトリウム 1L に 0.5 g フェリシアン化カリウムを溶解したもの) 2 ml を加え、15 分間煮沸した。冷後、420 nm で吸光度を測定した。別に D-グルコース 0、5、10、20、50 μ g/ml

溶液を調製し、同様の操作を行い、検量線を作成し、得られた検量線から、酵素加水分解によって生成した還元糖量を定量した。

2. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物については、厚生労働省が作成した「平成12年1月末現在・食品添加物製造・輸入業者名簿」を基に、その後の情報を加えて、これら業者へ出荷実需の調査表を送り、平成16年の数値の記入を依頼した。回収した調査票を集計し、研究班で未報告者、数値確認など精密調査事項を抽出し、2年目アンケートを行い、再度集計処理した報告書に基づき、3年目、研究班が内容を検討かつ評価、解析、考察を行い、日本人の平均一日食品添加物の摂取量を推定する。

既存添加物等については、平成15、16年度に実施した調査で、当該品目の製造・輸入の実績があると回答のあったものに、その後の情報を付け加えて、これら事業者へ調査票を送り、平成17年度の数値の記入を依頼した。回収した調査票を集計し、研究班で検討を加え、次年度、再調査、追加調査を行い、研究班が内容の評価、解析、考察を行い、生産・輸入された総量を推定する。

3. 我が国で使用している香料化合物の

生産使用量・摂取量に関わる調査研究
平成16年度及び平成17年度に構築した「高度化データベース」を利用して作成した使用量調査表を使い、平成17年（2005

年）1月～12月に国内で食品香料製造に使用された香料化合物の量について、食品香料を製造している会社から回答を得た。得られた回答については内容・数量等を精査した後、「高度化データベース」を使用して回答処理を行い、使用量を集計し摂取量を算出した。また、本調査結果と前回の調査結果を比較、検討した。

4. 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

平成17年度の研究で規格を設定できなかった品目を含めて、使用量上位553位（10kg/年以上）までの424化合物について規格化の検討を以下の手順で行った。

- 1)平成17年度調査からの問題点の抽出
- 2)平成14年調査回答に対する再調査
- 3)日本香料工業会自主規格作成方針見直し
- 4)自主規格検討

なお、2.については生産量統計をもとにした食品添加物の摂取量の推定研究グループにより行われた。リーダー及びグループ員は下記の通りである。

リーダー：藤井正美、グループ員：高野 靖、浅野貞男、石井健二、大畑育雄、小見邦雄、川本明男、北村利雄、香田隆俊、塩見利紀、高橋仁一、平川 忠、福江紀彦、湯川宗昭。また、3. 及び4. については、日本香料工業会の会員のうち香料化合物を使用している企業の協力のもと、同工業会の食品香料委員会技術専門委員会及び事務局の分担作業により行われた。分担作業協力者は下記の通りである。

飯 忠司、石田正秀、稲井隆之、馬野克己、宇山修二、大崎和彦、岡村弘之、笠原陽子、柏崎秀明、嘉屋和史、斉藤憲二、佐藤修司、渋谷次郎、杉沢義夫、鈴木 潤、関谷史子、土屋一行、所 一彦、仁井皓迪、野坂昭夫、野崎 忠、東仲隆治、深谷 摂、福本隆行、彌勒地義治、山本隆志、吉川 宏、和田 昭、渡部一郎、渡邊武俊、今野忠彦、丸山進平、河内龍二郎

C. 研究結果及び考察

1. 増粘安定剤の残留溶媒分析におけるヘッドスペース(HG)-GC法

1) HS-GC法の検討

増粘安定剤に取り込まれた溶媒は、多糖類を水に膨潤することで、遊離するとされている。1 晩室温で放置し、バイアル加熱条件 60℃、40 分間の HS-GC 法で分析したものが、蒸留-GC 法と近い溶媒量が得られたという昨年の結果から、グアーガム、ジェランガム及びカロブビーンガムについて、一晩室温で放置し分析した場合（バイアル加熱条件 60℃、40 分間）と、一晩放置せず、1%酵素溶液を加えて分析した場合（バイアル加熱条件 40℃または 60℃、40 分間）を比較検討した。酵素溶液を添加した試料のバイアル加熱温度については、酵素の安定性から、40℃で加熱することが望ましいと思われたが、HS-GC 法では温度が高いほどピークが大きくなるため、分析の精度が上がるということを期待し、60℃でも分析を行った。

その結果、いずれの増粘安定剤でも、酵

素溶液を加え 60℃で加熱した方が各溶媒のピークが大きかった。また、ヘッドスペースサンプラーによって加熱する場合は、40℃では温度が低く、温度の変動が大きいため、60℃で加熱する方がより安定した測定結果が得られると推測された。

2) キャピラリーカラムを用いた蒸留-GC法の検討

蒸留を行った留液を HS-GC 法で用いたものと同じカラム (Aquatic-2) で分析したところ、メタノールは 4.2 分、2-プロパノールは 6.8 分、*tert*-ブタノールは 7.4 分付近にピークが見られ、分離も良好であった。パックドカラムを用いた場合では *tert*-ブタノールのピークが若干ブロードであったのに対し(Fig. 1 a))、いずれのピークもシャープであった(Fig. 1 b))。また、それぞれの面積のバラつきも少なく、繰り返しサンプルの注入を行ったが、特にカラムの劣化などはみられなかった。以上の結果から、蒸留を行った留液をキャピラリーカラムで分析を行っても特に問題なく、良好な結果が得られると思われた。

3) 蒸留-GC法と一晩室温放置及び酵素溶液添加 HS-GC法の比較

グアーガム (添加試料)、カロブビーンガム (添加試料) 及びジェランガム (添加試料) 中の残留溶媒について蒸留-GC 法及び一晩室温放置あるいは酵素溶液添加 HS-GC 法で分析を行った。結果を Table 1 に、それぞれのクロマトグラムを Fig. 2~5 に示す。蒸留-GC 法の結果と一晩室温で放置し HS-GC 法で分析した場合(バイアル加

熱条件 60℃、40 分間) は、ほぼ同様の結果となった。酵素溶液を加え 40℃で加熱した HS-GC 法の場合は、ジェランガムの 2-プロパノールを除いて、蒸留-GC 法と同様の結果となった。また、酵素溶液を加え 60℃で加熱した HS-GC 法の場合は、ジェランガムを除いて、蒸留-GC 法と同程度の量あるいは高い値を示した(グアーガムの 2-プロパノール)。以上のことから、グアーガムや、カロブبینガムについては、酵素溶液を加えた HS-GC 法が蒸留-GC 法の代替法になると考えられたが、ジェランガムについてはさらに検討する必要があると考えられた。

4) セルラーゼを用いたグアーガム、カロブبینガム及びジェランガムの加水分解生成物の分析

今回用いたセルラーゼはエンドグルカナナーゼ (E.C.3.2.1.4)、エキソグルカナナーゼ (E.C.3.2.1.91)、 β -グルコシダーゼ (E.C.3.2.1.21)及びその他 2 種類の糖加水分解酵素が混合したものであるが、酵素を用いる場合は、基質となるガムの構造が酵素の加水分解に大きく影響すると思われた。そこで、それぞれのガムを基質とし、1%酵素溶液を加え、加水分解によって生成した還元糖量を定量した。その結果を Fig.6 に示す。グアーガム及びカロブبینガムは加水分解反応時間が 150 分の時点でも加水分解反応が進んでいたが、ジェランガムでは反応時間 60 分以上になっても還元糖量が増えることはなく、加水分解が進んでいないことがわかった。以上の結果から、ジ

ェランガムは今回用いた酵素溶液では加水分解が起こりにくく、これはジェランガムがグルコース、グルクロン酸、グルコース、ラムノースの 4 種の反復ユニットで構成される構造であることが大きく影響していると思われた。それゆえに、HS バイアル内の試料も、粘度が高い状態のままであり、ジェランガムから溶媒の遊離が起こりにくかったため、酵素溶液を加えた場合の HS-GC 法の値は、蒸留-GC 法よりも低かったと思われた。一方、グアーガム及びカロブبینガムはいずれも酵素溶液を加え加熱すると粘性が低くなる傾向がみられ、溶媒の遊離が起こりやすくなったため蒸留-GC 法と近い値が得られたと思われた。

このように、酵素溶液を添加した場合、増粘安定剤を 60℃で加熱し、HS-GC 法で分析すると、グアーガム及びカロブبینガムのように加水分解が起こりやすいガムについては、蒸留-GC 法の代替法となりうると考えられた。しかし、ジェランガムのように、セルラーゼで加水分解されにくい多糖類の場合は、別の酵素を用いる必要があるであろう。

2. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物については、本年度は第 8 回調査の第 2 年度にあたり、平成 16 年度を調査対象に、再・追加調査を実施した。発送した調査票は初年度分と本年度の再・追加調査分を合わせて全国 1,079 カ所の会社・事業所となった。

回収数は 858 (回収率 79.5%) で、回収

率は、過去7回の調査の中では最低であったが、これは調査票発送数を大幅に拡大した結果であって、回答総数は前7回の調査より増加した。回収された調査票のデータから下記の集計を作成した。

集計 1 用途別 名称と全出荷量、純食品向け出荷量、輸入量調べ

集計 2 食品添加物番号順 製造会社数、全出荷量、純食品向け出荷量、輸入量調べ

集計 3 食品添加物名別 食添以外の用途調べ

既存添加物等については、本年度は第3回調査の初年度にあたり、平成17年度を調査対象として、全国435カ所の事業所に調査票を送付した。初年度としては回収率、製造・輸入実績ありとする率が高いが、製造実績のあると思われる事業者で未回答のものがあり、再度、精密な調査が必要である。現時点でのデータから下記の集計を作成した。

集計 1 既存添加物別 回答企業数・製造・輸入・合計量

集計 2 既存添加物用途別 回答企業数・製造・輸入・合計量

集計 3 一般飲食物添加物別 回答企業数・製造・輸入・合計量

集計 4 一般飲食物添加物用途別 回答企業数・製造・輸入・合計量

全般的に、企業再編あるいはOEM生産等がさらに進行しており、また、輸入食品が増大しているため、適切な調査先を把握する必要がある。既存添加物等についての調査は初年度であり、回答数、製造・

輸入ありとする企業数とも前回調査を下回っており、また、重要な事業者から未回答であることもあり、追加調査が必要である。

3. 我が国で使用している香料化合物の生産使用量・摂取量に関わる調査研究

本年度に実施した我が国で2回目となる香料化合物の「生産使用量・摂取量」調査は、平成16年度及び平成17年度の両年度をかけて構築した高度化データベースを使用したことから調査開始から集計まで僅か9ヶ月という短期間で調査結果を得ることができた。本年度の調査研究では、平成17年1月から12月までの1年間に使用した香料化合物(新規指定品目を含む)の品目数は2,164、年間総使用量は約1,217t、平均推定摂取量は142 μ g/人/日であり、安全性に問題があるような摂取量の化合物はないことが分かった。

4. 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

香料(製剤)の安全性を担保し、且つ商取引に役立つ目的で本調査研究を行った。平成17年度の調査研究では129化合物について規格を整備したが、本年度平成18年度の調査研究においては213化合物について流通規格を反映した規格をまとめることができた。平成17年度、18年度の2ヶ年度で合計342化合物に規格を整備することができたが、これらの342化合物のうちにはFCCに収載されていない化合物が161もあることから、国際的にも大いに貢献する調査研究であったと確信している。

D. 結論

酵素(セルラーゼ)溶液を添加後、60℃で40分間加熱し、HS-GC法で分析すると、グアーガム及びカロブビーンガムのように加水分解が起こりやすいガムについては、蒸留-GC法等とほぼ同様か若干高い値が得られ、代替法となりうると考えられた。しかし、ジェランガムのようにセルラーゼで加水分解されにくいガムでは値が低く、別の酵素を用いる必要があると考えられた。また、蒸留で得られた留液について、HS-GC法と同じキャピラリーカラムで分析を行ったところ、良好な結果が得られ、蒸留-GC法でもキャピラリーカラムの使用は可能であると考えられた。生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定では、指定添加物について、第8回調査の第2年度として、再調査、追加調査を行い、平成17年度の調査分と統合した。さらに、添加物品目ごとの摂取量査定並びに一日一人あたり摂取量推定へまとめる。既存添加物等については、アンケート調査をまとめたが、データの精度をあげるために、追加調査、再調査を行い、生産・流通統計として取りまとめる。香料化合物の使用量・摂取量に関わる調査研究は、日米欧3極同時期の使用量調査という目的を伴って実施された。本研究では、

食品衛生法施行規則別表第1収載の香料化合物について国内での使用量を把握するとともに、推定摂取量を明らかにした。今回の調査では、日本の食品香料製造会社全体の平成17年における年間販売数量の96.6%をしめる59社から有効回答が得られ、本調査結果は国内における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る。香料化合物の自主規格の作成については、平成17年度の研究で規格を設定することができなかった品目について、再調査を実施し、これを含めて使用量上位553位(10kg/年以上)までの424化合物について規格かの検討を行い、213品目について自主規格を設定した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 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

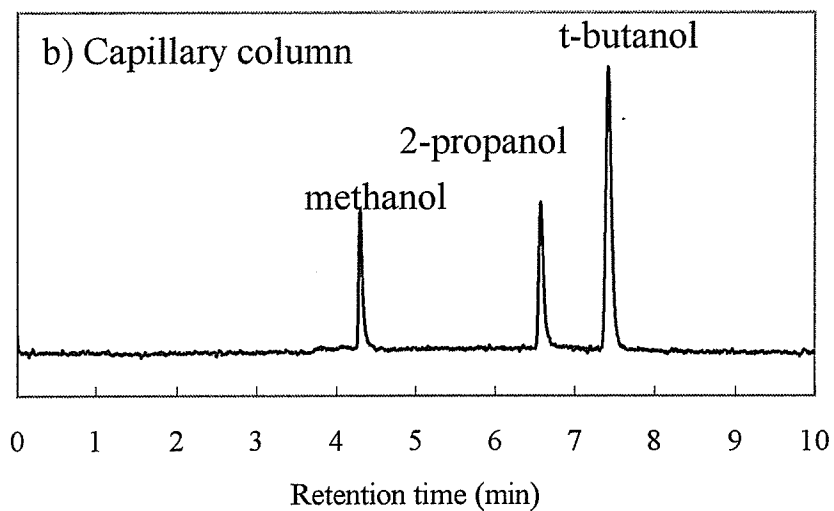
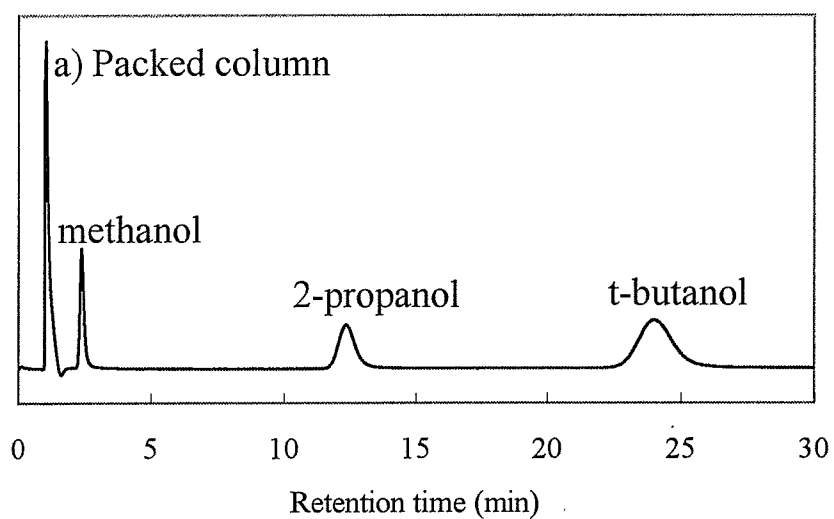


Fig. 1 GC-FID Chromatogram of methanol, 2-propanol, and t-butanol in water using a) packed column and b) capillary column.