

グメント中の N の数を示す。ピーク X の MS シグナルを測定した結果、ゲニピン(G) と  $^{15}\text{N}$ -ベンジルアミン( $^{15}\text{B}$ )より生成したものの( $\text{B}+^{15}\text{N}$ )では  $m/z$  555.6、ゲニピン(G)と  $^{14}\text{N}$ -ベンジルアミン(14B)より生成したものの( $\text{B}+^{14}\text{N}$ )では  $m/z$  553.5 にシグナルが観察された。よって、両者のシグナルを比較すると、 $m/z$  2.1 の差が見られたことから、分子中には、N が 2 つ含まれていることが推察された。また、 $\text{B}+^{14}\text{N}$  及び  $\text{B}+^{15}\text{N}$  の  $m/z$  値の小数点以下の値が .5、.6 を示し、整数値を示さないことから、観察されたシグナルが多価イオンによるものとも考えられた。したがって、ピーク X を示す化合物の分子内には、N 原子が 2 個入っているものの  $n$  重合体であることが予想された。

Fig. G4 に現在までに報告されているクチナシ青色素の中間体の構造式を示した。いずれの文献もゲニピンとメチルアミン、ゲニピンとグリシンを用いて、モデル実験を行い構造推定したものである。今回、ゲニピンとベンジルアミンを用いてモデル実験を行った反応生成物も同様な骨格を持つものと考えられ、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、Fig.G5 に示すようなステップで青色素が生成していると考えられた。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する予定である。

### 6.3 qNMR法によるポリソルベート類中のオキシエチレン基の定量

Fig. E1 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、ステアリン酸が 3 つエステル結合したものである。さらに最近の研究では、ポリソルベートのコアに相当するソルビタン部にはいくつかの異性体が存在し、また、脂肪酸とエステル結合していないもの、脂肪酸が多数結合したものも含む混合物であることがわかっている。すなわち、各ポリソルベートの主な分子種は Fig. E1 に示す構造式で表すことができるものの、実際には多種多様な異性体の混合物であると考えられる。したがって、クロマトグラフィーにより、ポリソルベート類の定量は非常に困難であり、さらに EO 基の含量測定は不可能であると考えられる。

$^1\text{H-NMR}$  において、ポリソルベート類の EO のシグナルを同定するために、ポリソルベート 20、ソルビタンモノラウレート及びポリエチレングリコールジステアレートの NMR シグナルを比較した(Fig. E2、E3)。ソルビタンモノラウレートは、ポリソルベート類と同じく、ソルビタンをコアとし、脂肪酸としてラウリン酸が 1 つソルビタン部に直接エステル結合したものであり、EO を含まないものである。ポリエチレングリコールジステアレートは、2 つのステアリン酸が EO 基とエステル結合したものである。すなわち、両者は、ポリソルベート類の部

分構造を含む化合物であり、部分構造に特徴的な NMR シグナルを与えることから、ポリソルベート類の EO の同定に有効であると考えられた。

ソルビタンモノラウレート及びポリエチレングリコールジステアレートの脂肪酸に由来するシグナルが 0.9~2.4ppm に観察された。ソルビタンモノラウレートでは、ソルビタン部に由来する小さな多数のシグナルが 3.4~5.0ppm に観察された。ソルビタンモノラウレートのソルビタン部が小さな多数のシグナルとして観察されるのは、ソルビタンモノラウレートが脂肪酸のエステル結合の位置の異なる多数の異性体の混合物であることに由来すると考えられた。また、ソルビタン部を分子中に含まないポリエチレングリコールジステアレートでは、3.6 ppm 及び 4.2ppm に EO に由来すると考えられるシグナルが観察された。ポリエチレングリコールジステアレートについて、HMBC 測定を行ったところ、4.2ppm に観察されたシグナルはステアリン酸のカルボキシル基(-O-C=O-)と相関が観察されたことから、脂肪酸がエステル結合した末端の EO 基の-CH<sub>2</sub>O-に由来すると決定した。よって、脂肪酸がエステル結合していない殆どの EO 基のシグナルは、3.6ppm に観察されることがわかった。この結果とポリソルベート 20 のシグナルを比較することより、ポリソルベート 20 の EO 基に由来するシグナルは 3.6ppm 及び 4.2ppm であると同定された。脂肪酸とエステル結合した EO 基のシグナルが 4.2ppm に観察されたが、3.6ppm の大

きな EO 基のシグナルに対して非常に小さなものであり、EO 基の含量を測定するに当たり無視できるものと考えられた。なお、他のポリソルベート類についても同様に比較を行った結果、EO 基に由来するシグナルはすべて同じ位置に観察された。

現在一般的に用いられている NMR 装置は、パルスフーリエ変換(FT)型のものである。通常各社の FT-NMR 装置の<sup>1</sup>H-NMR 初期測定条件は、構造解析を行う場合に特別問題にならない程度の定量性が設定されている。すなわち、低分子の化合物のプロトンシグナルの定量性が 90% 程度確保できていれば、構造解析には通常、化合物のプロトン数を整数値として扱うため必要十分である。しかし、FT-NMR 装置による定量性(>99%)を向上するための条件設定として以下が重要である。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。1 の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理由として、ラジオ波(RF)パルスが観測中心から離れるほど強度が低下するため、観測幅の両端では定量誤差を与えるためである。2 のパルス幅を短くする理由として、RF パルスをより広範囲に均一に照射し定量誤差を小さくするためである。3 のパルス遅延時間をシグナルの緩和時間( $T_1$ )の 5 倍以上に設定する理由として、NMR シグナルが定量性を持つためには、パルスにより励起された磁化が、次にパルスを照射されるま

で十分に緩和していなければならないためである。したがって、1、2、3を満たす条件として、Table E1に示すように設定した。Fig. E4にTable E1の条件でポリソルベート20の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定した結果を示した。ポリソルベート20のEO基の大きなプロトンシグナルが約3.6ppmに観察された。また、内部標準物質として用いた容量分析用標準物質フタル酸水素カリウム(PHP)のベンゼン環上の4つのプロトンシグナルが7.5ppm及び8.2ppmに観察された。次に、PHPを一定量含むNMR溶媒3.0mLにポリソルベート20を精密に10~100mg溶解し、PHPのプロトンシグナルの積分値を4としたときのEOシグナルの積分値と試料の濃度の関係を観察した。その結果、ポリソルベート20の濃度とEOシグナルの積分値の間に高い相関関係( $R^2 = 0.9996$ )が認められた。よって、ポリソルベート類中のEOの含量測定にqNMRが利用可能であると確かめられた。

理論上、NMR装置間の測定誤差は同一の条件で測定した場合、非常に小さいと考えられる。そこで、実際に測定誤差が小さいことを確認するために、試薬のポリソルベート類(20、60、65、80)を一定量のPHPを含むNMR溶媒に精密に溶解し、PHP及びEOに由来するプロトンの積分値の比よりEO含量(%)を次式により算出した。

Table E2に試薬のポリソルベート類中のEOの含量を2つのNMR装置(MERCURY(400MHz、VARIAN)及びECA500(500MHz、JEOL))で定量した結果を示した。MERCURYでは、

ポリソルベート20、60、65及び80を各5回ずつ測定し、平均値と標準偏差を求めた。ECA500では、ポリソルベート20及び60について9回及び5回測定し、平均値(AV)と標準偏差(SD)を求めた。その結果、MERCURYでは、標準偏差が0.5~1.3であり、ばらつきの小さい安定した定量値を与えた。また、MERCURYとECA500の測定結果を比較すると、ほぼ等しい値を示していることから、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。

次に、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及び80について、EO含量を測定した(Table E3)。その結果、すべてFCC及び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、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

7.1 褐色ガラス瓶に一定量の精製水を入れ、家庭用電子レンジでマイクロ波を照射すると、液量をほとんど維持して、35秒以内に液温を約85°Cに到達させることができた。照射時間で所定の温度が得られる。

7.2 ソルビン酸と9種類のアミノ酸との混合溶液を室温で調製し、ソルビン酸のHPLC分析を行ったところ、システインの濃度に依存して混合溶液中のソルビン酸の残存率が経時的に低下した。

7.3 電子レンジで加熱したシステイン溶液

をソルビン酸溶液と混合した場合は、ソルビン酸の残存率の低下は顕著に抑制された。

7.4 システインとの混合溶液中では、ソルビン酸の残存率の低下とともに、新たなピークが出現し、そのピークは経時的に高くなっていった。

7.5 ソルビン酸とシステインの相互作用で出現すると思われる反応物の効果的な生成条件及び精製条件を検討し、分取した。食品に使用された食品添加物の流通状態における消長を実験室レベルで小規模で短時間にシミュレーションする方法として、化学的に変動をもたらしやすいのは、高温度条件と、食品成分と添加物との相互作用であり、それらの研究は基礎的な情報を提供することができると思われる。高温暴露実験には、家庭用電子レンジのマイクロ波の一定時間照射及び反復間欠照射による化学物質の変動を調べることも可能である。水溶液の短時間加熱で、溶存酸素の急激な減少がソルビン酸やシステインとの相互作用にどのように影響するかは未だ解明されていない。またソルビン酸とシステインとの反応性生物の構造、その有益性及び有害性も早急に解明されなければならない。さらに、システインと反応したためにソルビン酸の微生物に対する静菌活性が失われる可能性も否定できない。微生物の増殖に影響する効果を使用目的とする食品添加物の活性試験はこの問題を無視してはならないと思われる。

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

8.1 次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する消毒副生成物の経時変化

試料としてカットキャベツを用い、有効塩素濃度として 100 µg/ml の次亜塩素酸ナトリウム溶液により殺菌処理を行ったところ、CF、DCAN、CH、DCAA、TCAA の生成が確認された。各消毒副生成物の生成量を経時的にモニタリングしたところ、いずれの化合物も殺菌処理直後から速やかに生成し始め、30 分以内にはほぼ一定の生成量を示した(Fig.1)。殺菌処理 30 分後における各消毒副生成物の生成量をモル換算し、構成比率を求めたところ、DCAA が全体の 69% を占めており、続いて、CF が 9%、DCAN が 9%、CH が 9%、TCAA が 4% であった(Fig.2)。水道水の塩素処理試験では CF が最も多く 6 割を占めており、DCAA を含むハロ酢酸は全体の 3 割であるが、これに対して、今回の実験には、DCAA が最も多く全体の 7 割近くを占めていた。水道水ではハロ酢酸などは時間をかけて分解し、その結果として CF 生成量が徐々に増えていくと考えられるが、食品では塩素殺菌処理時間が短いため、前駆対のハロ酢酸として多く存在し、構成比率が異なる結果になったと推察される。

8.2 次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する消毒副生成物の各種環境因子の検討

次亜塩素酸ナトリウム濃度、温度等の各種因子による消毒副生成物生成量の変化を調べたところ、次亜塩素酸ナトリウムの初期濃度や温度に応じて、消毒副生成物量(CF、DCAN、CH、DCAA)が増加する傾向が認

められた。食品の殺菌処理における次亜塩素酸ナトリウムの初期濃度は、10-300 µg/ml の濃度範囲で使用されており、通常の使用濃度範囲において消毒副生成物の生成量が大きく変化する可能性は低いと考えられる。また、殺菌温度が高いほど消毒副生成物の生成量が多くなることが明らかとなった。消毒副生成物のコントロールには低温での殺菌処理が有効と考えられるが、微生物に対する殺菌力と温度の関係から考えた場合、温度が高いほど殺菌効果が高く<sup>20)</sup>、微生物学的危害と化学的危害の両面から見た、殺菌処理に最適な温度を考えていくことが今後、必要になると思われる。

また、次亜塩素酸浸漬液の pH を 2~12 の範囲で変更し、カットキャベツを殺菌処理したときの pH 変化による消毒副生成物生成量の変化を調べた(Fig. 3)。pH の調整には塩酸及び水酸化ナトリウムを用いた。

次亜塩素酸ナトリウム浸漬液が酸性領域では、CF、DCAA、TCAA 生成量は低くなるが、強酸性溶液において DCAN 及び CH 生成量が高くなる傾向がみられた。一方、アルカリ性領域では、DCAN、DCAA に関しては pH10 の弱アルカリ性領域を中心として最も生成量が増加し、pH12 の強アルカリ性溶液になると DCAA 生成量が急激に低下するが、これに対し CF 生成量は pH12 において最も高くなった。アルカリ性領域では生成反応と同時に、加水分解反応も進行しており、さらに、温度や残留塩素との接触時間や濃度などの影響を受けやすく、これら複合要因により消毒副生成物の生成

挙動が変化していると考えられる。

### 8.3 次亜塩素酸ナトリウム・酸混液中の消毒副生成物の分析

次亜塩素酸ナトリウムはアルカリ性の液体であるが、酸性側において殺菌力が増すため、次亜塩素酸ナトリウム溶液に酸を添加して殺菌効果を高め使用される場合がある。そこで次亜塩素酸ナトリウム溶液に各種酸を混和した殺菌液を調製し、生成する消毒副生成物量を経時的に調べた (Fig. 4)。混和した酸には食品添加物としての使用が認められているクエン酸、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸水素ナトリウム、塩酸を用いた。次亜塩素酸ナトリウム溶液の pH は殺菌処理において一般に使用していると考えられる pH6-7 付近に調整した<sup>18)</sup>。

次亜塩素酸ナトリウム溶液単独、及び、酒石酸、コハク酸、フマル酸水素ナトリウム、塩酸を添加した群では、消毒副生成物の生成量増加は確認できなかったが、クエン酸を添加した場合には、次亜塩素酸ナトリウム・クエン酸混液を調製直後より、速やかに CF や DCAA が生成し始め、TCAA も僅かながら生成が確認された。また、スキャンマスペクトルによる解析の結果、新たに複数のピークの検出され、これらのピークは NIST 及び WILEY のライブラリーとの照合の結果、1,1-ジクロロ-2-プロパノン、1,1,1-トリクロロ-2-プロパノン、1,1,3-トリクロロ-2-プロパノン、1,1,3,3-テトラクロロ-2-プロパノン、1,1,1,3-テトラクロロ-2-プロパノンと一致した。この内、メインピークとして確認されたのは、1,1,3,3-テトラ

クロロ-2-プロパノンであり、その他はマイナーピークとして検出された。この理由としては、クエン酸が次亜塩素酸により酸化されアセトンジカルボン酸となり、さらに、酸性条件下にエノール化され、求電子付加反応に基づき 2 位及び 4 位の炭素が連続的に塩素化され、脱炭酸を経て 1,1,3,3-テトラクロロ-2-プロパノンやペンタクロロ-2-プロパノンを生成し、最終的に CF や DCAA、TCAA が生成したと考えられる(Fig.6)。また、次亜塩素酸ナトリウム・リンゴ酸混液は、調製直後より抱水クロラールが生成し、僅かであるが DCAA の生成も確認された。この反応メカニズムは、リンゴ酸が次亜塩素酸により酸化され 3-オキソプロパネートとなり、さらに、酸性条件下にエノール化され、求電子付加反応に基づき 2 位炭素が連続的に塩素化され、脱炭酸を経てクロラールアルデヒドとなり、抱水クロラールが生成したと考えられる(Fig.7)。このため、次亜塩素酸ナトリウムをクエン酸やリンゴ酸と混和し、長時間放置した場合、消毒副生成物濃度の増加が懸念される。次亜塩素酸・クエン酸混液調製後、直ちに使用した場合には、次亜塩素酸ナトリウム単独使用と比べ、CF 生成量に大きな差は認められないが、長時間放置した場合には、時間とともに CF 生成量が増加している。このため有機酸混和後、直ちに殺菌処理を行う場合には、消毒副生成物の生成量も少なく、殺菌処理後の水洗浄で消毒副生成物を低減させることが可能であるが、次亜塩素酸と有機酸を混和させた商品を販売した場合、時間

経過により製剤中において消毒副生成物が増加するとともに、有効塩素が分解し、殺菌効力が急激に低下する恐れがあるため、有機酸を次亜塩素酸ナトリウムに混和して使用する場合には、2004 年 8 月の通知「次亜塩素酸ナトリウムに酸を混和して使用することについて」に従って適切な指導を行い、用時調製後、速やかに使用することが消毒副生成物低減化のために望ましいと考えられる。

また、次亜塩素酸ナトリウム・酸混液を調製直後(0 min)の浸漬液を用いて殺菌処理を行った場合、次亜塩素酸単独処理に比べ、クロロホルム生成量が若干低くなる傾向が見られた(Fig.5)。一方、酸添加後に冷暗所にて保存した混液を用いた場合には、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、フマル酸水素ナトリウム及び塩酸を添加した混液では、次亜塩素酸単独使用の場合と大きな違いは認められなかったが、クエン酸添加した場合、時間経過と共にクロロホルム生成量が増加した。次亜塩素酸・クエン酸混液調製 3 時間後の浸漬液を用いてカットキャベツを殺菌処理したときのクロロホルム残存量は、1.2 µg/g であり、これは次亜塩素酸単独の場合の 28.7 倍であった。また、無機酸(塩酸)に関しては、塩酸・次亜塩素酸ナトリウム混液調製段階において、塩酸過剰添加によって塩素が発生する恐れがあり、調製時には注意が必要であるが、次亜塩素酸ナトリウム単独使用の場合に比べ、殺菌力が強くなるとともに、THM 生成量が低く抑えられるなど、クエン酸にはない利点があると

考えられる。

#### 8.4 水洗浄による消毒副生成物の除去効果

次亜塩素酸トリウムにより殺菌処理を行った場合、食品に塩素が残存することから、十分な流水ですすぎ洗いをを行うことが「大量調理施設衛生管理マニュアル」において指示されている<sup>19)</sup>。そこで、食品に残存する消毒副生成物の水洗浄による除去効果のモデル実験を行った。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後、カット野菜に超純水を加えて、3回繰り返しの振とう洗浄を行い、水洗浄工程前後における消毒副生成物量の測定を行った。塩素殺菌処理のより生成した CF、DCAN、CH、DCAA は、いずれも水洗浄により低減化させることができた。このため、殺菌処理後の水洗浄は、残留塩素の除去のみでなく、消毒副生成物の低減化ためにも有用な手段であると思われる。

#### E. 結論

香料化合物の使用量・摂取量に関わる調査研究では、平成 16 年度、平成 17 年度の 2 ヶ年度をかけて構築したデータベースは予想通り「生産使用量・摂取量」調査集計にとって有効な手段であった。本調査は我が国における 2 回目の調査であるが、前回同様 96.6%という高い回答率をもって終了することができた。調査結果からは、①少量で使用している化合物が極めて多いこと、②全使用化合物 2,164 品目の 92.4%に当たる 1,999 品目が 90  $\mu$ g/人/日 (JECFA の香料評価法判断樹) におけるの構造クラス III の閾

値) 以下での摂取量であることなどが分かり、現在における香料の使用量は人に対して健康危害を及ぼす量ではないことも分かった。今回の調査結果は、今後の香料化合物の安全性評価資料として有効に活かされるものと思われる。

香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究では、合計 342 化合物の自主規格を整備した。公定書収載の 90 化合物と併せると我が国では 432 化合物、香料総使用量の約 88%に流通実態を反映した規格が設定されたことになる。一方、我が国では約 3,000 の香料化合物が使われている実態もあることから今後とも自主規格の整備に努力を払いたい。

生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定については、過去 7 回の指定添加物についての調査の結果、ADI のある添加物 1 目毎の摂取量推定値は、その ADI 値よりも十分に低い値であった。諸外国では、近年、これに類する調査は行われておらず、我が国の調査結果が JECFA でも活用されている。既存添加物については、摂取量に関する情報がきわめて少なく、この調査研究を積み重ね、精度を向上させることにより、摂取の実態が把握できる。

増粘安定剤の残留溶媒分析法については、HS-GC 法と蒸留-GC 法あるいは限外ろ過-GC 法との比較検討を行った。HS-GC 法(酵素添加法)は、酵素により加水分解され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。また、限外ろ過-GC 法

との比較では、限外ろ過-GC 法の方がばらつきは少なかったが、同様の値が得られ、HS-GC 法は代替法として使用可能と考えられた。

赤外吸収 (IR) スペクトルについては、簡便で確実な確認試験法である赤外線吸収スペクトル (IR) は、諸外国でも食品添加物の確認に汎用され、しかも、その簡便さ故の“省エネ性”に注目されている。そこで、外国の添加物の参照 IR を調査・検討し、得られた結果を基に、測定法などを検討し、主にテトラメチルピラジン、ベタインやネオテームなどの国内規格を向上する提言をすることができた。

NMR 等による食品添加物の規格分析法に関する研究では、異性体混合物の 2-ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine の分析に、LC-NMR を応用し、各異性体の同定と精密な構造確認が迅速に可能であること、標準品が入手不可能な場合でも  $^1\text{H-NMR}$  情報から純度評価が可能であることを明らかとした。クチナシ青色素の化学構造について、安定同位体を用いたモデル合成を行い、LC-MS により検討し、LC-MS は主色素の構造解析に有効であることが確認された。ポリソルベート類中のオキシエチレン基の定量法として、簡便且つ高精度な NMR を用いた定量法(qNMR 法)を開発し、本法が高分子中の置換基を定量する方法として有効であることを明らかとした。

食品添加物の食品中での消長に関しては、食品添加物の温度による変動の実験室レベルの小規模、簡便なシミュレーションには、

家庭用電子レンジを活用することが有益であることが示された。また、保存料のソルビン酸は食品中でシステインと反応して複合体を生成することが強く示唆された。

次亜塩素酸ナトリウムによる副成生物の検討では、カット野菜を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行うことにより、CF、DCAN、CH、DCAA、TCAA の生成が確認されたが、殺菌処理後、カット野菜を十分な水で洗浄することで、消毒副生成物を低減化させることが確認された。

また、殺菌効果を高めることを目的として、次亜塩素酸ナトリウムにクエン酸を混和して使用した場合、次亜塩素酸とクエン酸が反応し、CF、DCAA、TCAA が生成し、次亜塩素酸ナトリウム・リンゴ酸混液では CH が生成することが明らかとなった。

有機酸混和後、直ちに殺菌処理を行う場合には、消毒副生成物の生成量も少なく、殺菌処理後の水洗浄で消毒副生成物を低減させることが可能であるが、次亜塩素酸と有機酸を混和させた商品を販売した場合、時間経過により製剤中において消毒副生成物が増加するとともに、有効塩素が分解し、急激に殺菌効力が低下する恐れがあるため、有機酸を次亜塩素酸ナトリウムに混和して使用する場合には、通知に従って適切に指導していくことが必要と考えられる。

次亜塩素酸ナトリウムは、野菜や魚介類加工品など生鮮食品の微生物学的危害を防止する上で重要な役割を果たしており、近年問題となっているノロウイルスによる食中毒危害防止のためにも欠かせない添加物



である。今後とも微生物学的リスクに対する有効性を十分に考慮しつつ、化学的リスク評価を行っていく必要があると考えられる。

E. 康危険情報  
なし

#### F. 参考論文

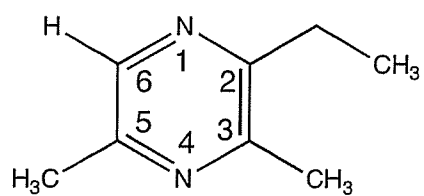
- 1) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 21(3), p259 (1972)
- 2) Rook, J.J.: Water Treatment and Examination, 23(2), p234-243 (1974)
- 3) WHO: Guidelines for Drinking-water Quality 3rd Ed. (2004)
- 4) Susan D. Richardson: Trends in Analytical Chemistry, 22(10), p666-684 (2003)
- 5) Official Journal of the European Communities Council Directive 98/83/EC (1998)
- 6) 厚生労働省令第百一号:水質基準に関する省令 (2003)
- 7) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 32(4), p308-314 (1991)
- 8) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 33(3), p267-273 (1992)
- 9) Hidaka, T. et al.: 食品衛生学雑誌, 35(4), p357-364 (1994)
- 10) Imaeda, K. et al.: 衛生化学, 40(6), p527-533 (1994)
- 11) Tiefel, P., Guthy, K.: Milchwissenschaft, 52(12), p686-691 (1997)
- 12) Resch, P., Guthy, K.: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 95, p418-523 (1999)
- 13) Resch, P., Guthy, K.: Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 96, p9-16 (2000)
- 14) Chang, T. L. et al.: Analytical Letters, 21(11), p2049-2067 (1988)
- 15) 官報 第 3378 号、厚生労働省令第七十五号、p1 (2002)
- 16) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知:食安基発第 0825001 号 (2004)
- 17) 厚生省:食品添加物公定書第 7 版, p269 (1999)
- 18) 長谷川美典: カット野菜ハンドブック, p170-173 (2002)
- 19) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知:大量調理施設衛生管理マニュアル, 食安発第 0829008 号(2003)
- 20) 日本食品洗浄剤衛生協会: 次亜塩素酸ナトリウム, p13-15 (2002)
- 21) Streicher, R. P. et al.: Analytical Letter, 19(5-6), p681-696 (1986)

#### G. 研究発表

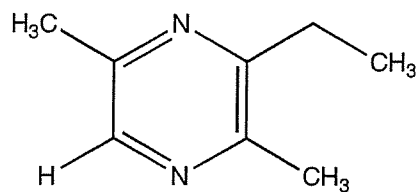
##### 1. 論文発表

- 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 (2005. 12).
- 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,  $^1\text{H}$ 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 (2006. 11).
- 3) 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).
- 4) 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).
- H. 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



2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1)



2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2)

Figure P1. Structures of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1) and 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine (2).

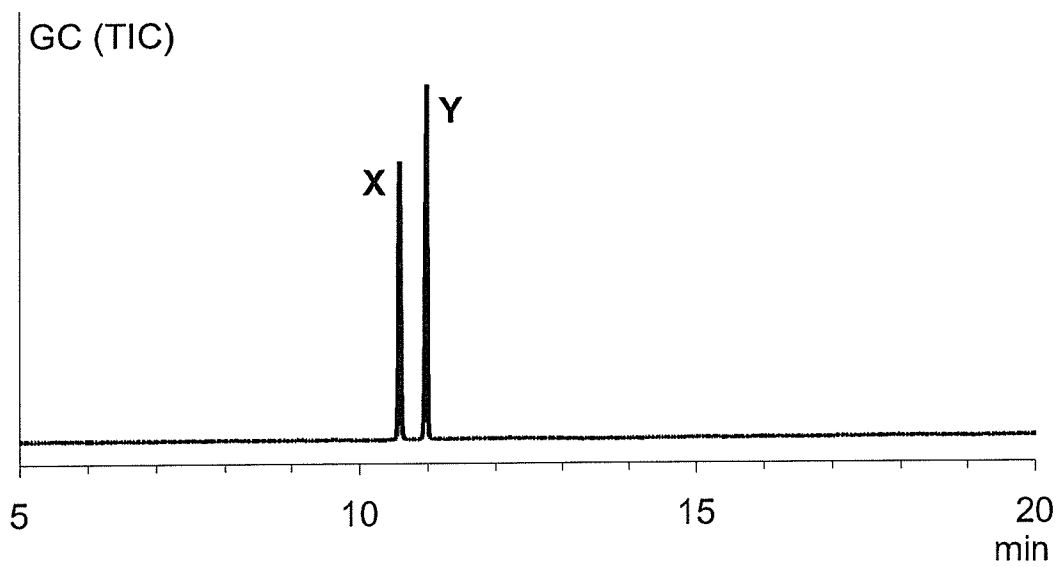
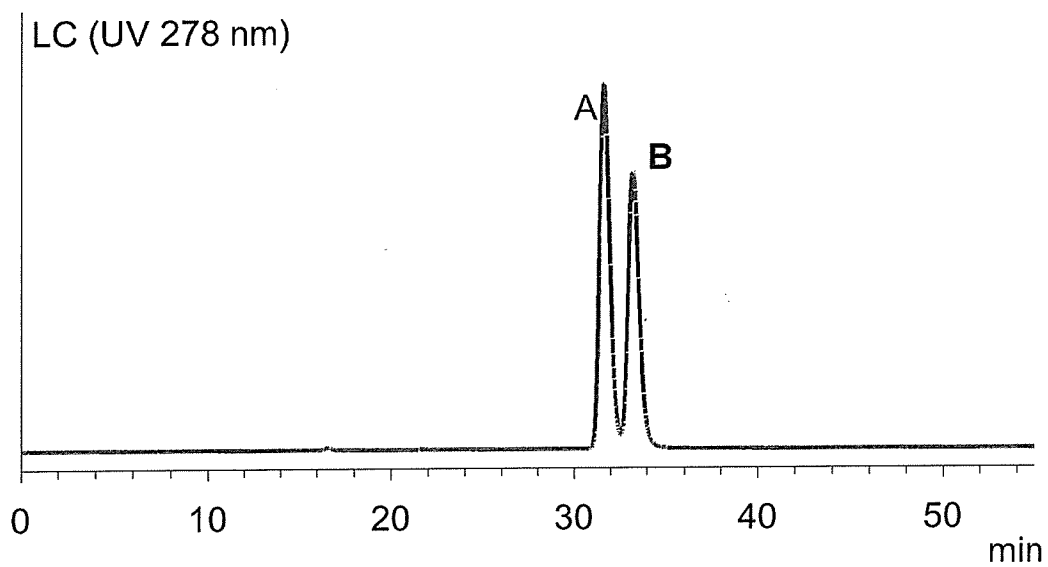


Figure. P2. LC and GC profiles of comercial ethyldimethylpyrazine product.

GC and LC conditions were described in experimental section.

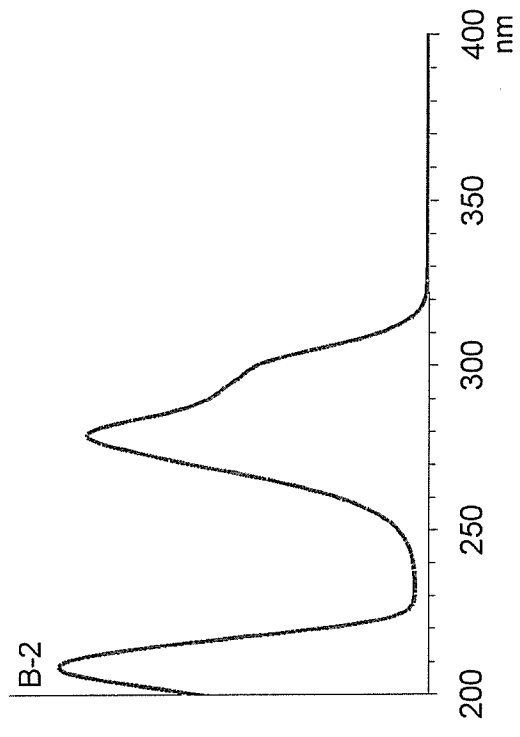
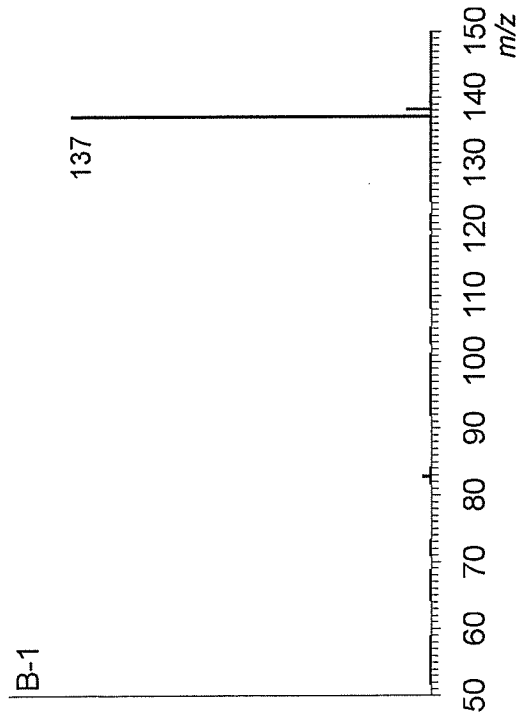
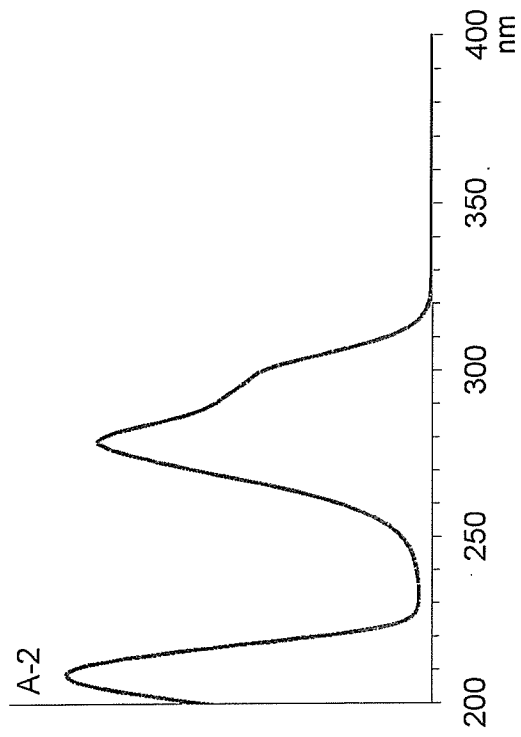
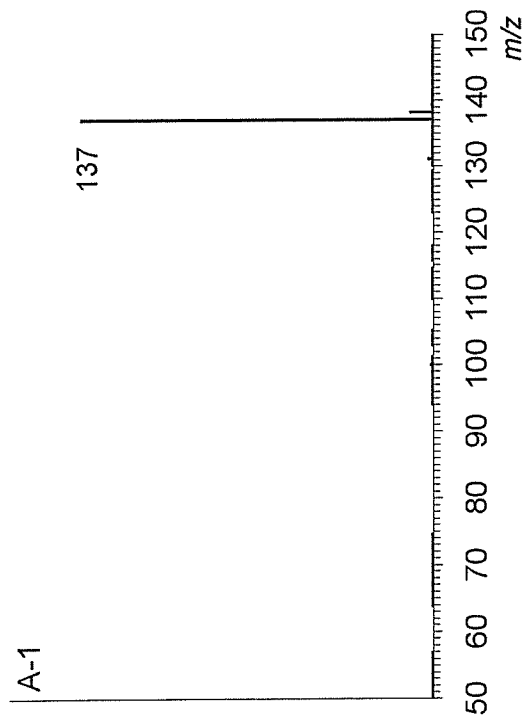


Figure P3. ESI-MS and PDA spectra of peaks A and B.

A-1) ESI-MS of peak A. A-2) PDA of peak A.

B-1) ESI-MS of peak B. B-2) PDA of peak B.

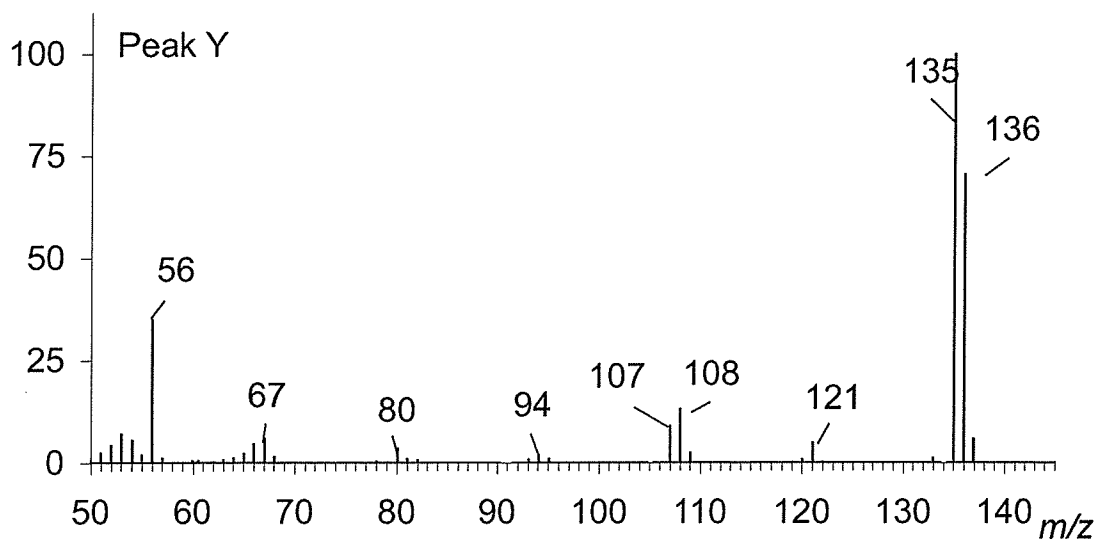
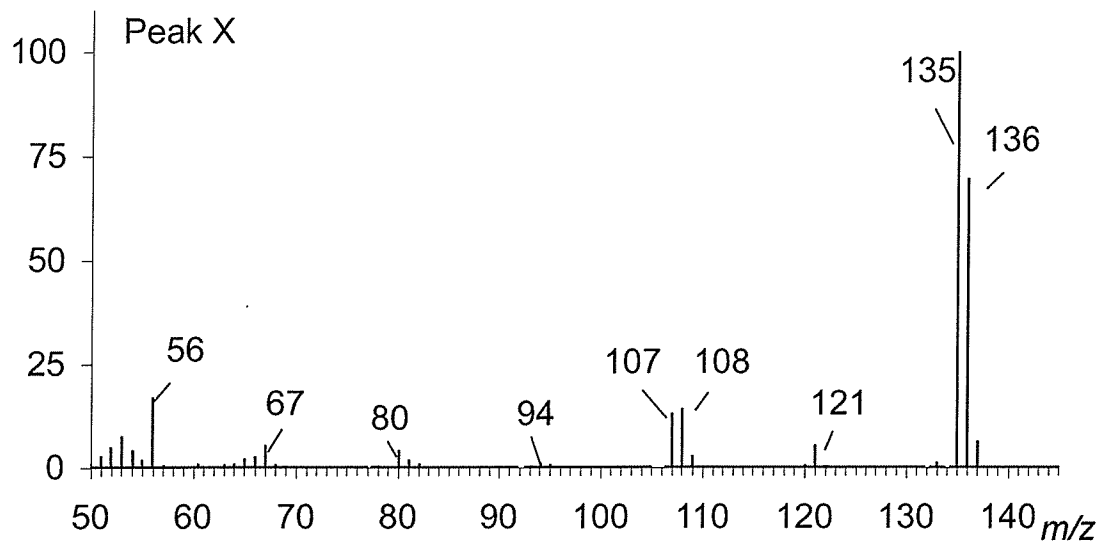


Figure P4. EI-MS spectra of peaks X and Y.

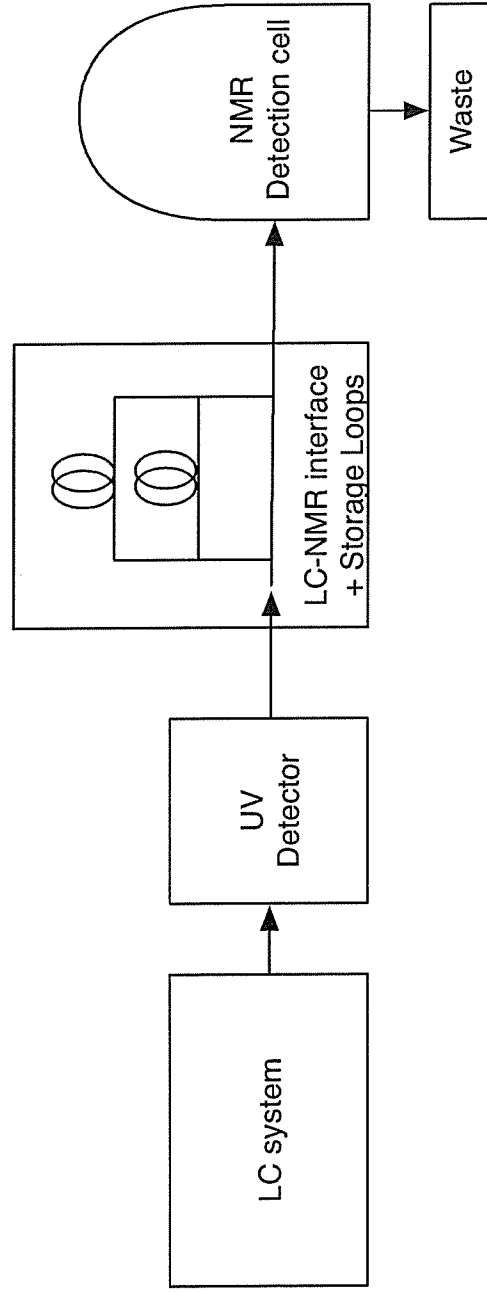


Figure P5. Schematic of LC-NMR system.

*LC system is connected to NMR detection cell through UV detector. On on-flow mode, real-time sequence of  $^1\text{H-NMR}$  is acquired after the constituents are separated by LC system. On fraction loop mode, the separated constituents are collected into fraction storages with trigger of UV detection, and then each constituent is moved to NMR detection cell, respectively.*

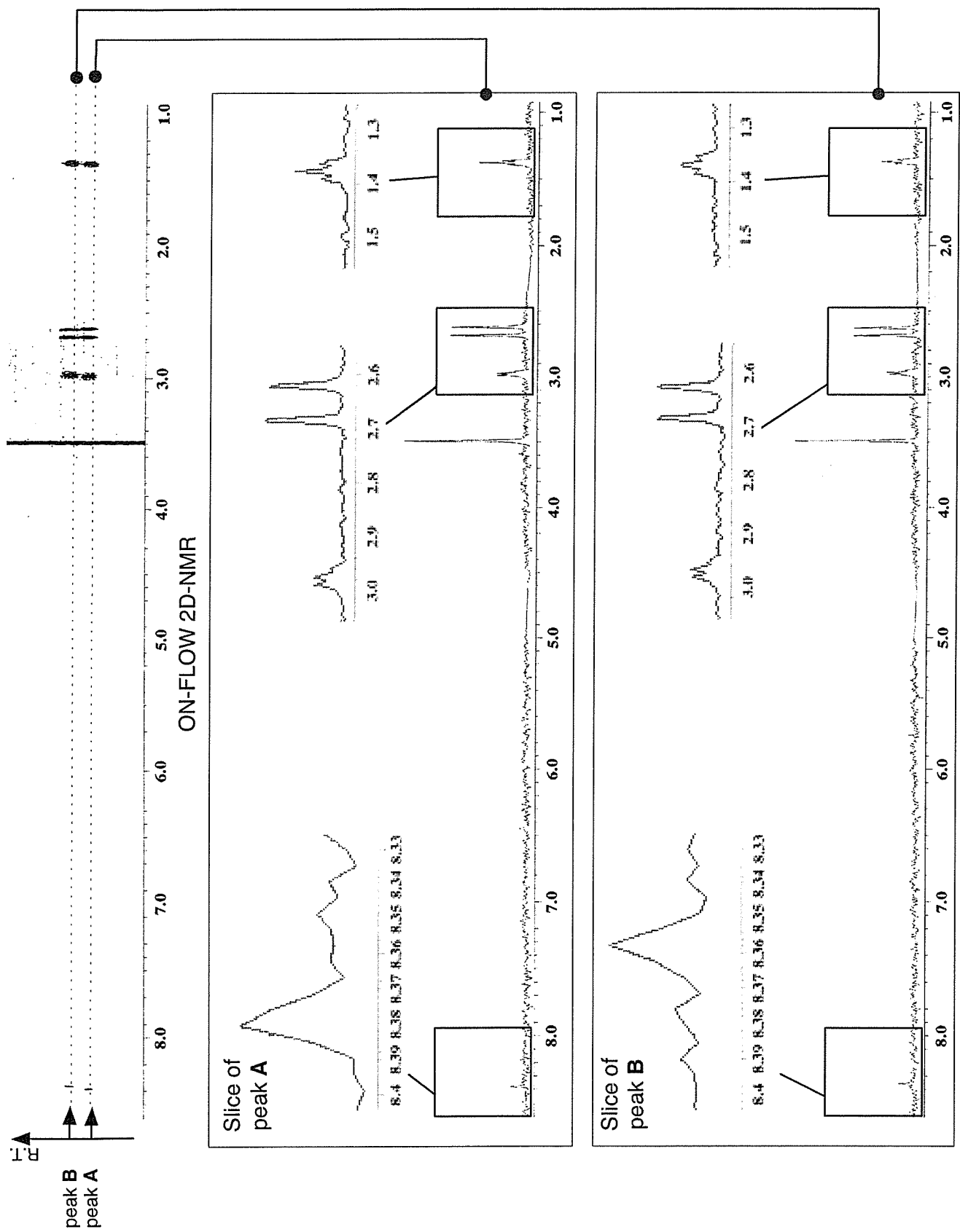


Figure P6.  $^1\text{H-NMR}$  data of peaks A and B by using 2D on-flow mode LC-NMR.



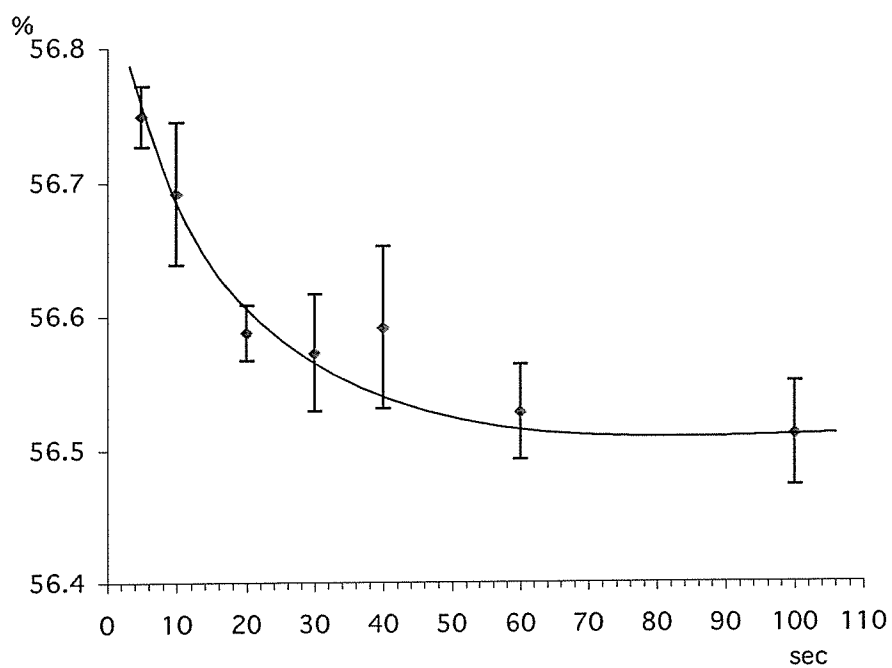


Figure P7. Relationship between relaxation delay and composition rate of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (1)

◆:  $AV \pm SD$  ( $n = 3$ )

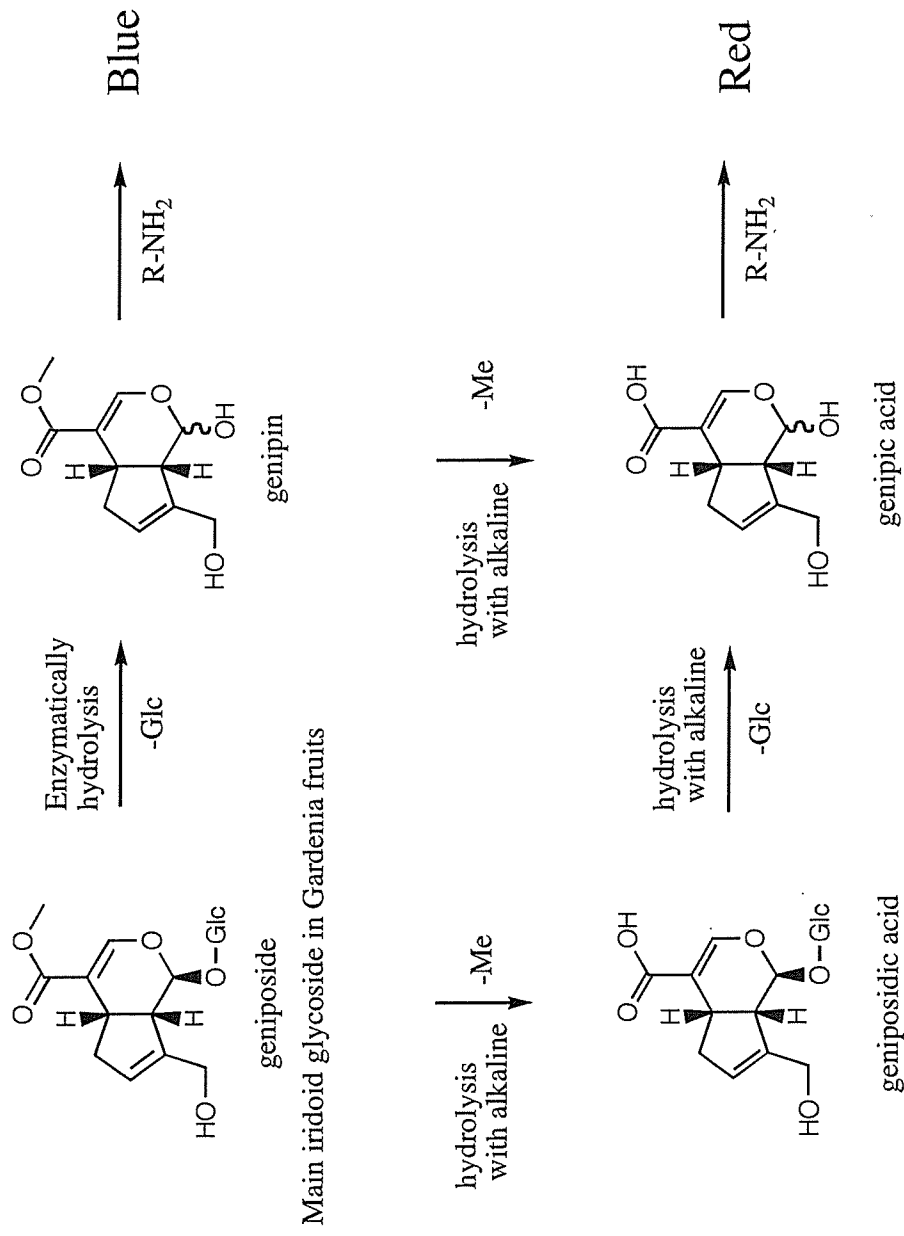


Figure G1. Proposed generation mechanism of Gardenia blue and red

This scheme is summarized from publications of Japanese patent applications for Gardenia blue and red.

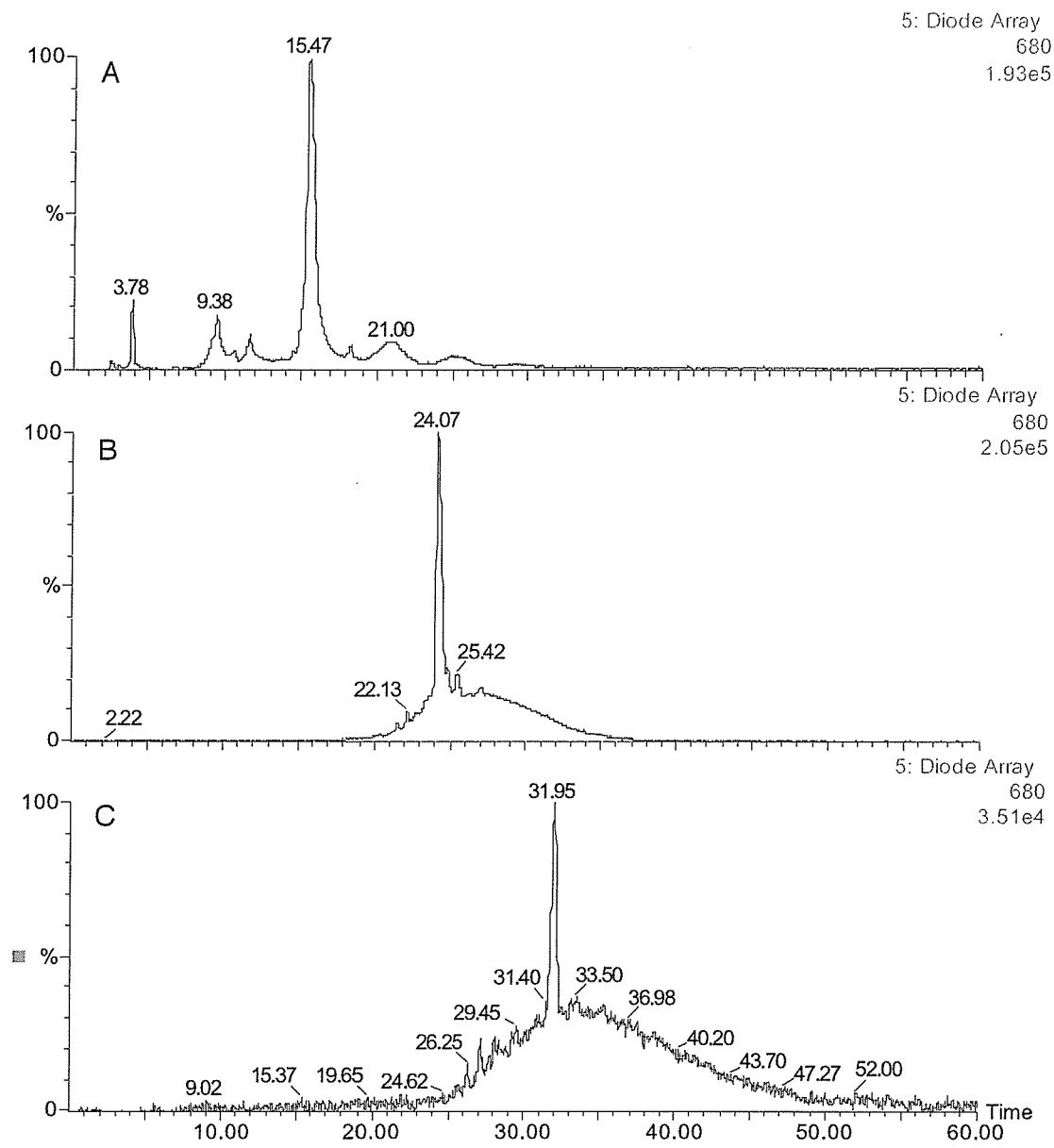


Figure G2. Comparison of LC conditions  
 Detect, 680 nm; A) HILIC column (LC Conditions 1). B) CN column (LC Conditions 3). C) C8 column (LC Conditions 2).

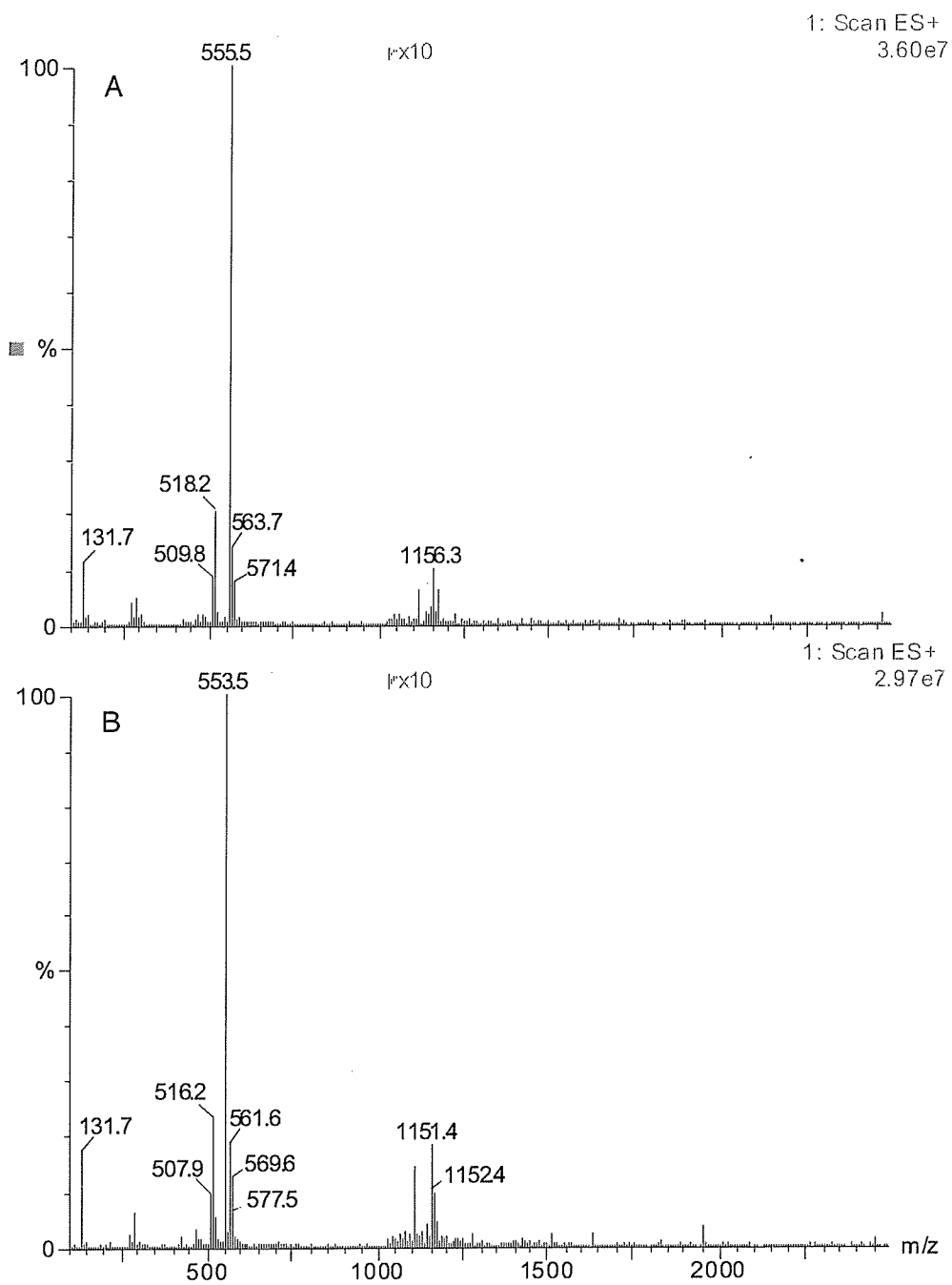


Figure G3. Mass spectra of peak X

A) Reaction product between  $^{15}\text{N}$ -benzylamine and genipin

B) Reaction product between  $^{14}\text{N}$ -benzylamine and genipin