

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、基準の向上に関する調査研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐藤 恭子

平成20(2008)年 4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、基準の向上に関する調査研究 佐藤恭子	1
II. 分担研究報告	
1. 食品添加物規格の規格基準の向上と摂取量に関する調査研究 佐藤恭子	9
2. 食品添加物の規格、分析法の国際整合性に関する研究 杉本直樹	25
3. 食品添加物の規格向上のための赤外スペクトルに関する調査研究 齋藤 寛	35
4. 食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明 久保田浩樹	59
5. 食品添加物が動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する研究 扇間昌規	73
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	79
IV. 研究成果の刊行物・別刷	81
(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 我が国で使用している天然香料基原物質の調査方法に関わる調査研究 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、その2)	

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 19 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、基準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

本研究では、食品添加物の規格基準の向上と国際的整合化を推進し、食品の安全性を確保するために多方面からの研究を行った。食品添加物の規格基準の向上のため、香料ピラジン類の定量法として、定量核磁気共鳴（qNMR）法を検討し、標準品が入手できない場合においても、qNMR法により絶対定量が可能であることを明らかとした。また、ヘッドスペースガスクロマトグラフィー（HS-GC）を増粘安定剤中の残留溶媒分析に応用するため、酵素処理HS-GCの検討を進め、操作時間短縮に有効であることを示した。赤外スペクトル（IR）法については、外国の食品添加物の参照IRを調査・検討し、得られた結果を基に測定法等を検討し、国内規格の向上を試み、確認試験に活用でき得るIR測定法を確立した。香料化合物の自主規格に関する調査研究では、我が国で流通している香料化合物の規格実態を明らかにすることを目的に、データ再収集を行うと共に規格作成指針を見直しながら規格化の検討を進め、370品目の自主規格を策定した。また、天然香料の使用実態を明らかにするための調査に必要な調査集計用データベースを構築した。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回の調査として、平成16年度の実生産量調査より、国民1人が1日に摂取する食品添加物量を推定した。また、既存添加物に関しては第3回の調査として、平成17年度の実生産量統計を調査した。食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明として、カット野菜を亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理し、消毒副生成物（23種の揮発性化合物）の分析を行ったところ、揮発性化合物の生成は認められなかった。また、亜塩素酸ナトリウムにクエン酸を混和しても、揮発性化合物は生成せず、次亜塩素酸ナトリウムとは異なる生成挙動を示すことが明らかとなった。食品添加物が動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する研究では、ソルビン酸と共存する栄養素との相互作用に着目し、混在する標的微生物や消化管粘膜細胞のタンパク質部分のアミノ酸残基との相互作用を検討するため、まず、水溶液中で容易に形成されるソルビン酸とシステインの反応生成物の構造決定を行い、システインがソルビン酸の断片に付加した物質であることを明らかにした。

分担研究者

杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究官
斉藤 寛 岡山大学薬学部教授
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

近年、国際的に必要性が高くかつ安全性が確認されている食品添加物（香料化合物を含む）の指定に向けた検討を国主導で行っており、新規指定品目については、国際規格を反映する方向が支持されている。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、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、食品添加物の規格基準の向上と国際的整合化を推進し、食品の安全性を確保するために、以下の調査研究を行った。

1) 食品添加物の規格基準向上及び分析法の国際整合性に関する研究：香料の定量法には、JECFAにおいて、面積百分率を用いたガスクロマトグラフィー（GC法）が採用されているが、未知の不純物を含む場合等には、得られた純度には疑問が残ることから、香料ピラジン類の定量法として、定量核磁気共鳴（qNMR）法を検討した。増粘安定剤中の残留溶媒分析法については、ヘッドスペース（HS）-GC法が簡便であるものの、時間がかかることから、操作時間短縮を目的とし、酵素（ヘミセルラーゼ）処理を検討した。赤外（IR）スペクトルについては、食品添加物の国内規格の向上等を目的に、諸外国の参照 IR スペクトルの

測定法等を調査・検討し、国内規格を得るための測定法の改良・改善について検討を行うことにした。

2) 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究：我が国では約 3,000 品目の香料化合物が使用されているが、我が国の公定規格のあるものは 93 品目に過ぎない。香料化合物のポジティブリスト化という国際的動向を踏まえ、香料化合物の規格向上のために、我が国で流通し、使用されている香料化合物の規格実態に基づいた自主規格の策定を推進した。

3) 天然香料基原物質の調査方法に関わる調査研究：香料製剤の重要な素材である天然香料を製造するための基原物質は、平成 8 年通知の衛化第 56 号の別添第 2 に例示収載されてから既に 10 年以上を経過した。この間、社会環境も国際環境も大きく変わり、平成 8 年当時とは消費者の香気嗜好も変化したと考えられることから、天然香料の安全性確保と規格向上のため、現在、我が国で使用している基原物質の実態調査を行うための方法に関わる調査研究を行った。

4) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定：食の安全性確保のため、食品添加物の生産量調査を継続した。指定添加物については生産量統計による摂取量の推定及び許容一日摂取量（ADI）との比較を実施し、既存添加物については生産量統計の把握に努めた。

5) 食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明：亜塩素酸ナトリウム及び次亜塩素酸ナトリウムは、殺菌料として広く利用されている食品添加物であり、食品衛生における微生物学的危害防止ため重要な役割を果たしている。使用環境が日々変化しつつあるため、殺菌料からの消

毒副生成物の挙動解明には現況に合わせた調査が必要となる。本年は、カット野菜を亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理したときのトリハロメタンの生成能について、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理と比較しながら検討を行った。

6) 食品添加物が動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する研究：食品中の食品添加物が、流通過程の様々な条件の中でどのように変動するかを解明することは、食品の安全性や品質を高める上で極めて重要な事柄である。そこで、保存料の一種であるソルビン酸とアミノ酸のシステインの反応物の構造を解明し、反応機構を推測することを目的とした。

B. 研究方法

1. 食品添加物の規格基準の向上及び分析法の国際整合性に関する研究

食品添加物の定量法については、14品目のピラジン類を試料とし、面積百分率法を用いたGC法及びqNMR法により分析し、測定値の精度の比較を行った。

増粘安定剤中の残留溶媒試験法については、グアーガム、カロブベーンガム及びジェランガムを試料として、一晚室温放置及び酵素溶液添加のHS-GC法により2-プロパノール及びメタノールを分析した。また、ヘミセルラーゼを用いたグアーガム、カロブベーンガム及びジェランガムの加水分解生成物を分析した。

IRスペクトルは、主にペースト法(ヌジョール、Nujol法)あるいはKBr錠剤法を用い、気体はガスセル(光路長5cm)に封入して測定し、FCCやJECFA記載の参照IRスペクトルなどと比較検討した。

2. 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

平成18年に実施した香料化合物使用量実態調査において実際に使用したと回答のあった香料製造企業を指定して規格値データ収集を目的にしたアンケート調査を実施するとともに、規格作成指針の見直しを行い、自主規格を策定した。

3. 天然香料基原物質の調査方法に関わる調査研究

平成8年通知衛化第56号別添第2(天然香料基原物質リスト)に記載されている612の基原物質についての解説書「天然香料基原物質の解説：日本香料工業会編 食品化学新聞社発行」を基本資料(基原物質の範囲、製法、成分、国際的規制等)として調査用データベースの構築化を図った。

4. 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・輸入分を対象に行った、第8回アンケート調査及び再調査の結果を集計し、その結果を調査研究班が評価、考察、解析を行い、品目別1人1日摂取量を査定した。既存添加物については、平成17年の製造・輸入分を対象に行った、第3回アンケート調査に追加の調査を加え、製造・輸入出荷量を集計した。

5. 食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明

試料としてカットキャベツを用い、有効塩素濃度として500 µg/mlの亜塩素酸ナトリウム溶液又は100 µg/mlの次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて殺菌処理を行った。チオ硫酸ナトリウム溶液及び硫酸溶液を加えて反応を止めた後、試料をヘッドスペースバイアルに採り、塩化ナトリウム、測

定用精製水及び内部標準液を加え、ガスクロマトグラフ質量分析計で分析した。また、亜塩素酸ナトリウム・クエン酸混液及び次亜塩素酸ナトリウム・クエン酸混液での殺菌処理を行った試料についても同様に分析した。

6. 食品添加物が動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する研究

ソルビン酸とシステインとの反応生成物をダイアイオン HP20 カラム及び ODS カラムで精製し、高分解能 NMR (Bruker 社、Avance DMX750、重水で測定) による解析、FT-ICR-MS (Bruker Daltonics 社、apex-Qe、エレクトロスプレー方式によるイオン化) を用いた高分解能測定を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 食品添加物の規格基準の向上及び分析法の国際整合性に関する研究

qNMR 法の香料ピラジン類の定量法としての応用可能性を検証するために、2-ethyl-6 (or 5)-methylpyrazine 及び不純物が混入した製品を想定し、2-ethyl-6 (or 5)-methylpyrazine : EtOH = 80 : 20 (w/w) に調整したものを試料とし、qNMR 法及び GC 法で含量測定し、結果について比較した。EtOH 無添加の 2-ethyl-6 (or 5)-methylpyrazine 製品の異性体比及び総含量は、GC 法と qNMR 法でほぼ一致した。一方、EtOH を添加した試料中の EtOH 含量は NMR 法では 19.29%、GC 法では 14.83%であったことから、GC 法では分析対象とする各化合物のレスポンスファクターの差が定量値に大きな誤差を与えることが確認された。ピラジン類製品について GC 法及び qNMR 法により定量を行った結果、qNMR 法による定量値は、GC 法に比べ、概ね 1%

ほど小さい結果となった。qNMR 法で得られた $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータは構造解析に利用可能であり、各種 2D-NMR 測定を行うことにより、異性体の同定にも応用できる点で優れていると考えられた。

HS-GC 法による増粘安定剤中の残留溶媒分析については、ヘミセルラーゼの最適温度は 40°C 前後であるが、水中の溶媒が安定して検出されるには、60°C の加熱が必要であり、ピークも大きくなるという点や、装置の温度安定性から、60°C での加熱が適当であると考えられた。バイアル加熱条件 60°C、40 分間のとき、一晚室温放置した場合と、ヘミセルラーゼ溶液を加えた場合で、カロブビンガムの 2-プロパノール以外ではほぼ同じ溶媒量が得られた。還元糖の生成量からはグアーガムやジェランガムはヘミセルラーゼによる加水分解を受けにくいという結果が得られたが、グアーガムもヘミセルラーゼを加えるとガムの粘性は著しく低下していた。これらの結果から、いずれのガムにおいても、粘度が低くなる程度に部分的な加水分解が起きれば、溶媒が遊離しやすくなるのではないかと考えられた。酵素添加 HS-GC 法は、操作時間の短縮を可能とし、一晚室温放置 HS-GC 法の代替法として、有効であることが示された。

IR スペクトル法については、外国の食品添加物の参照 IR スペクトルを調査・検討し、得られた結果を基に測定法等を検討した結果、吸湿性の高い物質については、通常の試料調製では、操作中の水分の混入により、参考とした海外の IR スペクトルと同様のスペクトルが得られなかった。今回、試料調製、測定時の注意事項を明らかにし、標準 IR スペクトルを作成した。標準 IR スペクト

ルを設定するにあたっては、日本の気候・風土を考慮し、測定条件や注意事項を明らかにし、再現性の良い測定法を確立すべきであると考えられた。

2. 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

従来からの系統的な作成指針では規格作成ができない化合物が数多くあることが明らかとなったため、安全性に配慮しつつ作成指針を見直し修正しながら自主規格の検討を行い、昨年度までの342品目に加え、新たに370品目の自主規格が作成できた。指針の修正として、今までは異性体の存在する化合物では含量が各異性体含量の合算で記載される場合、内容が定義できず「規格設定できず」としてきたが、実際にはそれぞれの異性体割合が不明なままで流通している化合物が多数あることから「異性体含量の合算」でも含量規格とすることとした。これらについては今後、異性体比率を規定する必要性の検討等の対応が必要となろう。酸価は物理恒数ではなく品質管理における努力目標であることから、今回のアンケート調査結果においても実際の規格値が得られなかった品目においては、日本香料工業会として推奨値を設定することとした。また比重や屈折の幅に関しても、中心値が物理恒数的な意味を持つのに対し、幅には品質管理の努力目標の意味合いが含まれる。そこでこれまでの規格作成指針における幅の制限を緩和し、実態を反映させることを優先する作成指針とすることに考え方を修正した。一方、実際にその化合物を使用している企業を指定してのアンケート調査方式は規格データ収集に対して有効であることが分かった。

3. 天然香料基原物質の調査方法に関わる調査研

究

平成8年通知衛化第56号により例示されている基原物質を系統的に分類し、これに調査に必要な基原物質の範囲や別名等の情報を加えることにより調査用データベースを構築完成させた。しかしながら、基本資料とした「天然香料基原物質の解説：日本香料工業会編 食品化学新聞社発行」は、平成8年通知の基原物質リストに忠実に従って作成したため、系統や範囲が不明確なまま分類され解説されている。そこで、本研究では612の基原物質をまず系統立てて分類することから開始し、欧米の天然香料基原物質に係わる資料（CFR、CE(III)、FEMA・GRASリスト）の情報も含めて基原物質の範囲や別名等を中心に調査に必要な情報等に加え、天然香料の実態調査に向けたデータベースを構築した。

4. 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物に関する生産・流通調査は、昭和57年以来、26年間に渡る継続調査となっている。第8回調査の最終年度に当たり、アンケート調査及び再調査の結果を集計し、その結果を調査研究班が評価、考察さらに解析を行い、品目別1人1日摂取量を査定した。過去の調査結果と大きく外れるものではなく、マーケットバスケット方式による結果と矛盾するものではなかった。また、ADIとの比較からも問題がなかった。推定摂取量がADI値よりも十分に低い値であることは、我が国の食品衛生関連法体系が添加物に関する安全性確保に適切に機能していることを示している。また、既存添加物に関しては第3回の調査として、平成17年度の実態調査を調査した。調査した503品目のうち、274品目について生産流通が報

告された。品目によっては、調査年度によって生産流通量が大きく変動していた。食品添加物の管理の国際的整合化が図られているなか、摂取実態や、その経年的変化を把握し続けることは重要であり、輸入加工食品からの添加物の摂取量の推定など新たな視点での調査を加え、より精度の高い調査研究とすべきと考える。

5. 食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明

次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理ではクロロホルムが検出されたが、亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理では、クエン酸の有無にかかわらず、対象とした 23 種の揮発性化合物の生成は認められなかった。

今枝らは豆腐を次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム溶液で浸漬処理を行い、亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理ではクロロホルムが生成しないことを報告しているが、豆腐などのタンパク食品だけでなく、使用基準適応範囲に含まれる生食用野菜類についても THM を生成しないことが明らかとなった。亜塩素酸ナトリウムは、次亜塩素酸ナトリウムのように残留塩素を生じないことが、THM などの消毒副生成物を生成しない要因と考えられる。亜塩素酸ナトリウムより生じる二酸化塩素は塩素付加反応には関与しないため、今回対象とした塩素系揮発性化合物のみならず、ハロアセトニトリルやハロ酢酸など、他の塩素系消毒副生成物についても生成する可能性は低いと考えられる。ただし、一方において二酸化塩素は酸化力に優れており、水道水の二酸化塩素消毒により、アルデヒド類や有機酸などの非塩素系の消毒副生成物を生成するとの報告もある。今後、これら化合物についても調査を進めて

いく予定である。

6. 食品添加物が動物消化管細胞機能へ及ぼす影響に関する研究

COSY、TOCSY、NOESY、ROESY、HSQC、HMBC の 2 次元測定結果を詳細に検討し、FT-ICR-MS を用いた高分解能測定の結果を踏まえて、ソルビン酸とシステインの反応生成物は、ソルビン酸由来の炭素骨格の一部が開裂した炭素数 4 の部分にシステイン 2 分子が付加した形の化合物の 2 つの立体異性体であった。

D. 結論

qNMR 法では、分析対象とする化合物の標準品が入手できない場合や不純物の混入がある場合においても、NMR シグナルが十分分離したものであれば、絶対量の測定が可能であり、香料ピラジン類の定量法として、GC 法以外に qNMR 法が有効な手段の一つに成り得ることが確認された。qNMR 法は他の食品添加物の定量にも応用可能であり、今後更に他の品目について検討する予定である。増粘安定剤中の残留溶媒分析法については、酵素を利用した HS-GC 法が有効であると考えられた。また、IR スペクトルについては、測定法や測定条件を検討し、標準的な参照 IR スペクトルとして利用できる IR スペクトルを得ることができた。国内規格を設定するにあたっては、独自に検討を加えて、より確実に優れた参照 IR スペクトルを規格として設定し、再現性のある IR スペクトル測定法を確立するとともに、測定の条件や注意点を併記することで、食の安全性に寄与すべきであると結論した。

香料化合物の自主規格については、アンケート調査の工夫と規格作成基準の見直しによって、新

たに 370 品目に自主規格を策定した。昨年度までの 342 品目及び公定書掲載の 93 品目と合わせると 805 品目に規格が策定でき、流通実態を反映したのものとしては、世界最大の香料化合物の規格集となった。また、我が国で使用している天然香料基原物質を適切に調査するための調査用データベースを構築完成させた。本データベースは調査用に最適であることは勿論であるが、また一般消費者や香料研究者にも十分利用されうるものである。指定添加物の第 8 回の生産量統計を基にした摂取量の推定では、国民 1 人が 1 日に摂取する指定添加物量について、過去の調査結果と大きく外れるものではなく、マーケットバスケット方式による結果と矛盾するものではないことが明らかとなった。また、ADI との比較からも問題がなかった。既存添加物に関しては第 3 回の調査として、平成 17 年度の生産量統計調査をまとめた。

食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明として、カット野菜を亜塩素酸ナトリウムで殺菌処理したところ、次亜塩素酸ナトリウムとは異なり、消毒副生成物の生成は認められなかった。食品添加物が動物消化管細胞機能へ及ぼす影響について検討するため、まず、水溶液中で容易に形成されるソルビン酸とシステインの反応生成物の構造決定を行い、ソルビン酸由来の炭素骨格の一部が開裂した炭素数 4 の部分にシステイン 2 分子が付加した形の化合物であることを明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. Food Add. Contam. 24(8), 799-806 (2007).
- 2) T.Mine, Y.Okada, M.Senma : The interaction of sorbic acid with amino acid may alter the quality of processed foods somewhere in the food chain from production to table. Jap.J.Food Chem.,14(1),23-26(2007)

2. 学会発表

- 1) Sugimoto, N., Furusho, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Application of quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy to determination of the contents of Food Additives. 121st AOAC international (2007.9).
- 2) 古庄 紀子, 杉本 直樹, 佐藤 恭子, 山崎 壮, 棚元 憲一. ¹H 核磁気共鳴法による香料ピラジン類の定量. 全国衛生化学技術協議会年会 (2007.11).

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

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、基準の向上に関する調査研究
平成 19 年度分担研究報告書

食品添加物の規格基準の向上と摂取量に関する調査研究

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食品添加物部研究員

研究要旨

ヘッドスペースガスクロマトグラフィー (HS-GC) は、残留溶媒分析法として簡便であるものの、増粘安定剤中の分析には時間がかかることから、操作時間短縮を目的とし、酵素（ヘミセルラーゼ）処理を検討した結果、HS-GC による増粘安定剤中の残留溶媒分析法には酵素の利用が有効であると考えられた。

香料化合物の自主規格作成では、370 品目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。また、多種多様な天然香料の製造用原料である天然香料基原物質が平成 8 年の通知衛化第 56 号別添 2 により例示されてから既に 10 年以上経過していることから、天然香料の安全性確保と規格向上のため、天然香料の使用実態調査を行うこととし、本年度は、効率的な調査方法に欠かせない調査集計用データベースを構築した。

生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定は、第 8 回調査の最終年度として、平成 16 年度の生産量調査及び追調査（アンケート調査）に精査、検討を加え、それぞれの物質について、国民 1 人が 1 日に摂取する食品添加物量を推定した。結果は、過去の調査結果と大きく外れるものではなく、マーケットバスケット方式による結果と矛盾するものではなかった。また、ADI との比較からも問題がなかった。既存添加物に関しては第 3 回の調査として、平成 17 年度の生産量統計調査をまとめた。

- A. 研究目的
- A-1 増粘安定剤中の残留溶媒分析法の検討
- 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、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、ラムザンガムの 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、規格試験法として、蒸留・ガスクロマトグラ

フィー（GC）が採用された。一方、ヘッドスペース（HS）-GC 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。増粘安定剤中の残留溶媒の HS-GC では、水を添加し、一晚膨潤させる操作があり、時間がかかってしまうため、まず、酵素（セルラーゼ）の加水分解能を利用した操作時間の短縮を検討したところ、セルラーゼで加水分解される増粘安定剤については、一晚室温放置し HS-GC を行ったものと同等の結果が得られたが、ジェランガムについては、セルラーゼによる加水分解を受けにくいいため、低い値が得られた。そこで、異なる酵素を用いて、同様の検討を行った。

A-2 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

香料化合物は現在、世界的に約 4,500 品目が使用され、我が国では約 3,000 品目を使用している。これらの化合物の規格としては、我が国の公定規格 93 品目、米国 FCC（Food Chemicals Codex）の約 450 品目、JECFA 規格の約 1,600 品目がある。FCC 規格は商取引用としての規格であるが、JECFA 規格は安全性評価化合物同定用としての規格であり、市場流通品を必ずしも反映したものとは言えない。本研究では、香料化合物の安全性を裏付けるものとするため、我が国で流通し、使用されている香料化合物の規格実態に基づいた自主規格の策定を推進した。

A-3 天然香料基原物質の調査方法に関わる調査研究

香料製剤の重要な素材である天然香料を製造するための基原物質は、平成8年通知の衛化第56号の別添第2に例示収載されてから既に10年以上を経過した。この間、社会環境も国際環境も大きく変わり、平成8年当時とは消費者の香気嗜好も随分変わってきている。そこで、本年度は現在我が国で使用している基原物質の実態調査をするための方法に関わる調査研究を行った。

A-4 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

食の安全性確保のため、日常生活における食品添加物 1 品目毎の摂取量の把握及び許容一日摂取量（ADI）との比較を目的として、生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定を継続した。指定添加物の摂取量の推定は、昭和 60 年を第 1 回とする調査研究であり、本年度は第 8 回調査の最終年度に当たる。また、既存添加物の調査は、平成 6 年に予備調査を行い、平成 12 年度を第 1 回とし、本年度は第 4 回調査の最終年度に当たる。

なお、香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究、天然香料基原物質の調査方法に関わる調査研究（日本香料工業会）及び、生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定（日本食品添加物協会）の詳細に関しては、本報告書の資料を参照されたい。

B. 研究方法

B-1 増粘安定剤中の残留溶媒分析法の検討

1. 増粘安定剤の HS-GC における酵素を

用いた方法の検討

1) 試薬

2-プロパノール、メタノールは試薬特級を用いた。

2) 増粘安定剤試料

カロブベーンガム、グアーガム、ジェランガムは、和光純薬製を用いた。

3) 溶媒添加試料の調製

カロブベーンガム (添加試料) : カロブベーンガム 100g に 2-プロパノール及びメタノール各 50ml 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 100g に 2-プロパノール及びメタノール各 50ml 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 100g に 2-プロパノール及びメタノール各 50ml 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。

4) 酵素溶液の調製

ヘミセルラーゼ (Sigma-Aldrich 社製) 1g を水に溶かし 10ml とし、4°C で冷蔵保存した。

5) 標準添加 HS-GC

(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。まず、HS 用バイアルに、試料 0.04g 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 5ml 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、HS 用バイアルに、試料 0.04g 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、更に酵素溶液 0.5ml 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 HS 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。さらに、酵素の効果を確認するために、酵素溶液を添加せず、試料溶液を調製し、40°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 HS サンプラーにセットした。他のバイアルは HS 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 HS サンプラーにセットした。また、ヘミセルラーゼ溶液を加えないサンプルについては代わりに水 0.5 ml を加えた。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℃または 60℃；ループ温度、110℃；トランスファーライン温度、130℃；バイアル平衡時間、40 分間；Shake、High；バイアル容量、10 mL

(ii) GC-FID (HP5890、HP 社製)

カラム、Aquatic-2 (内径 0.25mm、長さ 60m、膜厚 1.4µm、ジーエルサイエンス(株)製)；カラム温度、40℃(6min)→4℃/min→110℃→25℃/min→240℃(10min)；注入口温度、200℃；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℃

6) 酵素活性測定

カロブビーンガム、グアーガム及びジェランガムをそれぞれ約 0.04g 精密に量りとり、水 5ml 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℃の水浴で温め、酵素溶液を 0.5ml 加え、数秒間攪拌し反応を開始した。反応時間の時に、反応溶液を 10µl 採取し、水で 1ml とし、反応溶液とした。直ちに反応溶液に Schales 試薬(0.5M 炭酸ナトリウム 1L に 0.5g フェリシアン化カリウムを溶解したもの) 2ml を加え、15 分間煮沸した。冷後、420nm で吸光度を測定した。別に D-グルコース 0、5、10、20、50µg/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。

B-2 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

平成 18 年に実施した香料化合物使用量実態調査において実際に使用したと回答のあった香料製造企業に対し、規格値データ収集を目的にしたアンケート調査の実施及び規格作成指針の見直しを行い、自主規格を作成した。

B-3 天然香料基原物質の調査方法に関わる調査研究

平成8年通知衛化第56号別添第2(天然香料基原物質リスト)に記載されている612の基原物質についての解説書「天然香料基原物質の解説：日本香料工業会編 食品化学新聞社発行」を基本資料(基原物質の範囲、製法、成分、国際的規制等)として調査用データベースを構築した。

B-4 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、わが国における食品添加物の製造・輸出入事業者を主対象に、自社における平成 16 年度中の食品添加物グレードの取り扱いについて、調査及び追加調査を行い、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、純食品用に出荷された量ながら、流通上、医薬品と化粧品添加物として、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、あるいは食品添加物グレード品が新たに食品添加物合成原料となる場合もあり、これらを調査考察しながら、実質的

に食用に供された添加物量を査定した。既存添加物については、平成8年4月16日告示された「既存添加物名簿」に記載されている全品目(450品目、平成19年3月の告示で削除された38品目を含む)、及び「一般に食品として飲食に供されているものであって添加物として使用される品目リスト」のうち、第7版食品添加物公定書(「食添7」)で成分規格が定められている品目及び品名に色素とある品目(53品目)の合計、503品目を対象品目とし、本調査及び追加調査を行い、各品目の生産流通量をまとめた。

C. 研究結果及び考察

C-1 増粘安定剤中の残留溶媒分析法の検討

1. 増粘安定剤の残留溶媒分析におけるHG-GC

1) 一晚室温放置及び酵素溶液添加HS-GCの比較

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、HS-GCが蒸留-GCと同等の方法であることが示されたが、HS-GCでは一晚室温で放置する操作があり、サンプル調製から分析を行うまでに二日間を要してしまう。また、HG-GCでは、試料溶液の粘性が低い方が平衡化しやすいと考えられることから、多糖類の加水分解

を目的として、セルラーゼを用いた実験を行った結果、グアーガム、カロブビーンガム、ジェランガムにセルラーゼ溶液を加え、バイアル加熱条件60℃、40分間のHS-GCで分析したところ、一晚放置した場合とほぼ近い値が得られた。しかし、ジェランガムについては、溶媒検出量が低かった。そこで、今回はセルラーゼの代わりに、ヘミセルラーゼを用いて検討を行った。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一晚室温放置あるいはヘミセルラーゼ溶液添加HS-GC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. 1~3に示す。

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、一晚室温放置し分析した場合(バイアル加熱条件60℃、40分間)と、一晚室温放置せず、ヘミセルラーゼ溶液を加えて分析した場合とを比較検討した。ヘミセルラーゼ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るため、ヘミセルラーゼ溶液を添加し(バイアル加熱条件40℃、40分間)、分析を行った。その結果、それぞれの溶媒ピークも小さく(Fig. 1(B)、2(B)、3(B))、検出された溶媒量も一晚放置した場合(バイアル加熱条件60℃、40分間)で分析した時と比較して、ジェランガムのメタノールを除いては、少ない量しか検出されなかった(Table 1)。これは、バイアル加熱条件が低いことが原因と思われたが、バイアル加熱温度を

上昇させると酵素の効果が分かりづらくなるため、バイアル加熱条件 40℃、40 分間の条件で、ヘミセルラーゼ溶液を加える場合と、ヘミセルラーゼ溶液を加えない場合で分析したところ、溶媒ピークの大きさに著しい変化は見られなかったが (Fig.1(A)、(B)、2(A)、(B)、3(A)、(B))、グアーガムを除いてはヘミセルラーゼを加えた方が、若干溶媒量が多く検出される傾向がみられたため、ヘミセルラーゼ溶液を添加することで少しではあるが効果が得られると考えられた (Table 1)。しかし、バイアル加熱条件が 40℃であると、得られるピークが小さいため、昨年度の結果を踏まえ、分析の精度が上がるということを期待し、バイアル加熱温度 60℃でも分析を行った。

その結果、いずれの増粘安定剤でも、ヘミセルラーゼ溶液を加えバイアル加熱温度 60℃で分析を行った方が、各溶媒のピークが大きく (Fig.1 (C)、2(C)、3(C))、溶媒の検出量も一晩室温放置した時 (バイアル加熱条件 60℃、40 分間) とほぼ近い値が得られた (Table 1)。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た。これらの結果は昨年度のセルラーゼ溶液を用いた時と同じ結果であった。

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

今回用いたヘミセルラーゼはアスペルギルス属由来の数種類の糖加水分解酵素の混

合物である。構成酵素としては、キシラナーゼ (E.C.3.2.1.8)、マンナーゼ、その他の酵素が挙げられる。一般にヘミセルラーゼはヘミセルロースを加水分解する混合酵素であり、ヘミセルロースを加水分解しセルロース生成し、更にはセルロースを加水分解しグルコースを生成する。それぞれのガムを基質とし、ヘミセルラーゼ溶液を加え、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.4 に示す。(A) にヘミセルロース溶液を用いた結果、(B) に昨年得られたセルラーゼ溶液を用いた結果を参考に示した。ヘミセルラーゼ溶液を用いた場合、カロブベーンガムは加水分解反応時間が 120 分の時点でも加水分解反応が進んでいたが、ジェランガムについては、反応開始時点から 2 時間経っても還元糖量は増えていなかった。昨年セルラーゼ溶液はセルラーゼ活性として 60 ユニット相当 (1 ユニット=37℃、pH5.0、1 時間の反応でセルロースから 1 μ mol のグルコースを生成する量) で用いたが、ヘミセルラーゼではヘミセルラーゼ活性として 750 ユニット相当 (1 ユニット=ローカストベーンガムを基質とし 40℃、pH4.5、5 分間での相対流動性変化が 1 となる量)、セルラーゼ活性として 1.25 ユニットのガムに添加した。セルラーゼとヘミセルラーゼは異なる酵素であるため、単純に比較することは不可能であるが、セルラーゼを用いた時と同様、ジェランガムではあまり加水分解が起きていないと思われたが、還元糖量はセルラーゼの時よりは若干多い結果が得られた。また、グ

アーガムでも反応時間 30 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わかった。しかし、セルラーゼを用いた時よりも還元糖量は多く生成しており、サンプル調製後すぐは、粘性のある溶液であるのに対し、ヘミセルラーゼ溶液を加えると、時間が経つにつれ、粘性が著しく低下し、さらさらの状態になった。しかし、水に溶けきらないガムが残っていたため、すべてのガムが加水分解されたとは考えられないが、部分的には加水分解は起きており、ある程度の加水分解が起きてしまうと、反応が進まないことが推測された。

グアーガム、カロブブーンガム、ジェランガムのいずれのガムにおいても、HS-GC による分析で、バイアル加熱条件 60℃、40 分間のとき、一晚室温放置した場合と、ヘミセルラーゼ溶液を加えた場合で、カロブブーンガムの 2-プロパノール以外ではほぼ同じ溶媒量が得られた。セルラーゼを用いた時は、ジェランガムで低い溶媒量しか得られなかったのに対し、ヘミセルラーゼを用いた場合、ジェランガムでの溶媒量は一晩放置した時とほぼ同じ量となった。

還元糖量の生成を見ると、グアーガムやジェランガムについてヘミセルラーゼによる加水分解が起こりにくいという結果が得られたが、ヘミセルラーゼを加え、バイアル加熱条件 60℃、40 分間での溶媒量が一晩室温放置したときと若干低い値が得られた。また、グアーガムもヘミセルラーゼを加えるとガムの粘性は著しく低

下していた。これらの結果から考えると、加水分解が起こりやすいことが、単純に溶媒量が多く検出される理由というわけではなく、いずれのガムにおいても、粘度が低くなる程度に部分的な加水分解が起きれば、溶媒が遊離しやすくなるのではないかと考えられた。また、ヘッドスペースオープンの加熱温度についても、ヘミセルラーゼの最適温度は 40℃前後であるが、水中の溶媒が安定して検出されるには、60℃の加熱が必要であり、ピークも大きくなるという点や、装置の温度安定性からも、60℃での加熱が適当であると考えられた。また、今回の結果から、一晚室温で放置する操作の代替法として、ヘミセルラーゼ溶液を加えることで、時間の短縮ができるということがわかった。また、セルラーゼなどの酵素が適さないガムに対しては、ヘミセルラーゼも使用可能であることが分かった。

C-2 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

従来からの系統的な作成指針では規格作成ができない化合物が数多くある。そこで安全性に配慮しつつ作成指針を見直し修正しながら自主規格の検討を行い、新たに 370 品目の自主規格が作成できた。指針の修正として、今までは異性体の存在する化合物では含量が各異性体含量の合算で記載される場合、内容が定義できず「規格設定できず」としてきたが、実際にはそれぞれの異性体割合が不明なままで流通している化合物が多数あることから「異性体含量の合算」でも含量規格とすることとした。こ

れらについては今後、異性体比率を規定する必要性の検討等の対応が必要となろう。

また、酸価は物理恒数ではなく品質管理における努力目標であることから、今回のアンケート調査結果においても実際の規格値が得られなかった品目においては、日本香料工業会として推奨値を設定することとした。類似の化合物の設定値を調査すると、エステル類は殆どが1以下、アルデヒド類及びラクトン類については5と10に多く分布していることが分かった。そこでエステル類で酸価のデータのみがなく規格化できないものについては「酸価1以下」を、アルデヒド類及びラクトン類で酸価のデータのみがなく規格化できないものについては「酸価10以下」を暫定的に与えることに作成指針を修正した。また比重や屈折の幅に関しても、中心値が物理恒数的な意味を持つのに対し、幅には品質管理の努力目標の意味合いが含まれる。そこでこれまでの規格作成指針における幅の制限を緩和し、実態を反映させることを優先する作成指針とすることに考え方を修正した。

一方、実際にその化合物を使用している企業を指定してのアンケート調査方式は規格データ収集に対して有効であることが分かった。

C-3 天然香料基原物質の調査方法に関わる調査研究

平成8年通知衛化第56号により例示されている基原物質を系統的に分類し、これに調査に必要な基原物質の範囲や別名等の情報を加えることにより調査用データベース

を構築完成させた。多種多様な天然香料の製造用原料である基原物質の実態調査を容易に行うため、更には調査した後の回答を正確に集計解析するためには、できるだけ基原物質の範囲、別名等詳細な情報が入って、且つ電子媒体化した調査用データベースが必要となる。データベース作成上必要な情報の入手という面から見ると、基原物質を天然香料の原料という観点から捉えた文献資料は「天然香料基原物質の解説：日本香料工業会編 食品化学新聞社発行」しかなく、これを基本資料としてデータベースを作成した。しかしながら、この基本資料である解説書は、平成8年通知の衛化第56号別添2で例示されている612の基原物質リストに忠実に従って作成したため、基原物質中に例えばシトラスとともに、重複するようにオレンジ、レモン、グレープフルーツなどのカンキツ類があり、或いは大豆という基原物質の範疇に納豆・味噌・醤油があるのではなく、これらが同レベルでそれぞれ独立した基原物質として記載される等、系統や範囲が不明確なまま分類され解説されている。したがって、本研究では612の基原物質をまず系統立てて分類することから開始する必要がある、その煩雑さから全体を整理するのに多大な時間を要した。また、欧米の天然香料基原物質に係わる資料を見ると、CFR, CE(III)においてはそれぞれ約400種類、約500種類ずつの天然香料基原物質が周知されており、FEMA-GRAS リストにおいては約400種類の天然香料が収載されている。これらの情報も含

めて基原物質の範囲や別名等を中心に調査に必要な情報等を加え、天然香料の実態調査に向けたデータベースを構築した。

C-4 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、過去の調査結果と大きく外れるものではなく、マーケットバスケット方式による結果と矛盾するものではなかった。また、ADI との比較からも問題がなかった。1 人 1 日摂取量の多かった品目は、L-グルタミン酸ナトリウム (1,741mg/人/日)、D-ソルビトール (1,490mg/人/日)、クエン酸(無水物換算、428 mg/人/日)、二酸化炭素 (288 mg/人/日)、グリセリン脂肪酸エステル (212 mg/人/日) 等であった。既存添加物に関しては第 3 回の調査として、平成 17 年度の生産量統計を調査した。調査した 503 品目のうち、274 品目について生産流通が報告された。品目によっては、調査年度によって生産流通量が大きく変動していた。平成 17 年度において、出荷量の多かったものは、製造用剤ケイソウ土(58,096 トン)、製造用剤活性白土 (39,100 トン)、製造用剤パーライト (21,775 トン)、製造用剤窒素 (15,181 トン)、着色料カラメル I (14,774 トン)、製造用剤粗製海水塩化マグネシウム (6,557 トン)、着色料カラメル IV (4,673 トン) 等であった。このうち、ケイソウ土、活性白土及びパーライトは、ろ過助剤や精製剤として使用されるものであり、直接食品とともに摂取されるものではない。また、窒素は、気体であるため、他の食品添加物とは

異なる。この調査からは食品とともに摂取される既存添加物としては、カラメル類がもっとも多いものと推察された。

D. 結論

ヘミ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、カロブビーンガムでは一晩室温放置しバイアル加熱温度 60℃、40 分間のとき、HS-GC 法で分析したものと、若干低いながらもほぼ同じ溶媒量が得られた。また、ジェランガムではほぼ同程度または若干高い溶媒量が得られた。以上の結果から、一晩放置する方法の代替法として、ヘミセルラーゼが利用可能であると考えられた。香料化合物の自主規格作成では、370 品目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。また、天然香料の使用実態を行うための効率的な調査方法に欠かせない天然香料基原物質調査集計用データベースを構築した。第 8 回の生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定では、国民 1 人が 1 日に摂取する指定添加物量について、過去の調査結果と大きく外れるものではなく、マーケットバスケット方式による結果と矛盾するものではないことが明らかとなった。また、ADI との比較からも問題がなかった。既存添加物に関しては第 3 回の調査として、平成 17 年度の生産量統計調査をまとめた。

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

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

Table 1 Comparison of the quantitative values obtained by HS-GC methods with and without enzyme.

Sample		Content (%)*			
		+enzyme 60°C, 40min	+enzyme 40°C, 40min	40°C, 40min	60°C, 40min**
Guar gum (add)	Methanol	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	2-propanol	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Carob bean gum (add)	Methanol	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.11
	2-propanol	0.12 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.00	0.16 ± 0.04
Gellan gum (add)	Methanol	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.00
	2-propanol	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.04	0.12 ± 0.05	0.14 ± 0.02

*Each value is mean ± S.D. of 3 trials

**HS-GC analysis was performed after keeping for overnight at room temperature.