

200939007A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 恭子

平成22（2010）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、基準の向上に関する調査研究	1
佐藤恭子	
II. 分担研究報告	
1. 食品添加物の規格基準の向上と摂取量に関する調査研究	13
佐藤恭子	
(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使用実態調査に関わる調査研究	
生産量統計を基にした食品添加物摂取量推定に関わる研究	
2. 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	29
北村陽二	
3. 食品添加物の規格、分析法の国際整合性に関する研究	55
杉本直樹	
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	71
久保田浩樹	
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	91
扇間昌規	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	95
IV. 研究成果の刊行物・別刷	97

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 21 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

研究代表者 佐藤 恭子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

#### 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、規格及び規格試験法の向上に関する研究、摂取の実態に関する研究、食品成分との相互作用等の研究を行った。

増粘安定剤中の残留溶媒分析法について、粘性の高い試料に対し、加水分解酵素を用いた酵素処理ヘッドスペースーガスクロマトグラフ(HS-GC)法と蒸留-GC 法の比較を行ったが、酵素処理 HS-GC 法では酵素により十分な粘性低下が起らず、蒸留-GC 法ほどの溶媒量は得られなかった。

香料化合物の自主規格については、これまでに規格化を保留してきた香料化合物 706 品目について、再調査や既存データの精査等を行い、新たに 99 化合物の規格を策定した。また、58 化合物を準規格、275 化合物を暫定規格とすることで整理を行った。さらに、現状では暫定としてでも規格化が難しい 274 化合物を①流通規格が一つの規格に集約できなかった化合物、②希釈品、③流通規格データがない化合物、④その他、としてまとめ今後の解決に備えた。

天然香料基原物質の使用実態調査については、本年度は平成 20 年度に行った実態調査の回答内容を精査した上で集計し、調査年度（平成 20 年）に我が国で使用していた天然香料基原物質は 487（新規基原物質 6）であることを明らかにした。

生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定では、第 9 回調査の第 2 年度として、前年度実施した企業アンケート調査結果に検討を加え、未回答企業に対して調査票再送付・回収を行い、回答内容について確認を要するものについて、電話等により問い合わせを行い、前年度レポートを修正した。また、既存添加物についての生産・流通調査は平成 12 年以降 3 年毎に実施され、本年度は第 4 回調査の初年度として、企業アンケート調査を実施し、結果を集計化した。

簡便で確実な確認試験法である赤外(IR)スペクトル法については、基準となり得る赤外スペクトル (IR) を得るために、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム及びピロリジンの IR 測定法や測定条件を検討した。その結果、それぞれの測定法を確立し、

基準 IR として利用できる標準的な IR を得ることができた。

定量核磁気共鳴法(quantitative NMR: qNMR)については、分析値の信頼性と国際整合性の向上を図るため、タール色素 12 種の主色素成分の絶対定量を行い、その有効性及び妥当性について検証した。

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では、カット野菜を強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水により殺菌処理したときに生成する消毒副生成物の生成挙動を明らかとするため、ダイナミック HS-GC/MS 法を用い 60 種の揮発性化合物の分析を行い、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理による場合と生成挙動の比較を行った。強酸性及び微酸性次亜塩素酸水によるカット野菜の殺菌処理では THM 量は増加しなかった。また、微酸性次亜塩素酸水及び次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理では殺菌時間に応じてクロロメタンが増加し、次亜塩素酸ナトリウム及び強酸性次亜塩素酸水処理ではイソブチロニトリル、2-メチルブチロニトリル及びイソバレロニトリルの生成が確認された。カット野菜の強酸微及び微酸性次亜塩素酸水殺菌処理では THM が生成せず、殺菌及び流水洗浄後のカット野菜に残存する THM は水道水中の THM 量と同じレベルであった。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、マウス・マストサイトーマ P-815 細胞 (P-815) をモデルとして使用して、保存料のソルビン酸(SA)が細胞質内に移行し、細胞内情報伝達系の要である  $Ca^{2+}$  の濃度を変化させていることを明らかにした。また、LC/MS/MS による細胞質内に存在する SA の微量定量法を確立した。

#### 研究分担者

扇間 昌規 武庫川女子大学薬学部教授  
北村 陽二 国立大学法人金沢大学学際  
科学実験センター准教授  
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
環境衛生化学部第三室長  
久保田浩樹 国立医薬品食品衛生研究所  
主任研究官

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。

#### 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

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:(1) 増粘安定剤中の残留溶媒分析法の検討—第 8 版食品添加物公定書に記載されている増粘安定剤の残留溶媒試験法は、蒸留-ガスクロマトグラフ (GC)法であるが、ヘッドスペース(HS)-GC

法が簡便であることからその適用を目指し、検討を行っている。粘性の低い試料では、酵素を用いた HS-GC 法が有効であったことから、高粘性の試料への適用性について検討した。(2) 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究—我が国で使用されている食品香料化合物は、現在、約 3,000 化合物とも言われているが、公的な規格が設定されているのは、食品衛生法施行規則別表第一に個別指定されている 98 品目のみである。そのため、我が国で流通している化合物の規格実態を整理して積極的な自主規格化を図ることとした。本年度の研究では、これまでに保留とした 706 化合物の規格化を検討した。(3) 我が国で使用している天然香料基原物質の使用実態調査に関わる調査研究—天然香料を製造するための素材である基原物質については、平成 8 年通知の衛化第 56 号の別添 2 に例示収載されてから既に 10 年以上を経過したが、この間社会環境も国際環境も大きく変わり、消費者の嗜好も多様化していることから、我が国で使用している天然香料基原物質の実態調査を行った。(4) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定—食品衛生行政の推進に役立てるため、食品添加物の生産・輸入量のアンケート調査を行い、日本人の平均一日食品添加物摂取量を推定する。

2) 食品添加物の規格向上のための赤外吸収(IR)スペクトルに関する調査研究: IR 法は、その簡便性と確実性から、有機・無機化合物を問わず、物質の確認試験として、世界的にも各種化合物の確認に広く活用されている。我が国においては、IR の測定法

としては、多くの固体試料測定法が知られているにもかかわらず、臭化カリウム錠剤法(KBr 法)が適用されることが多い。しかし、KBr 法では、試料と KBr との相互作用、KBr に含まれる水分や加圧などの影響によって、有機化合物でも異常スペクトルが観測されることがある。

そこで、上記のことを踏まえて、本研究では、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウム及びピロリジンが食品添加物(香料を含む)として指定された場合を想定し、IR 測定法の確立と標準 IR の作成を検討することにした。

3) 食品添加物の規格、分析法の国際整合性に関する研究: NMR を用いた新規定量分析法(quantitative NMR (qNMR))は、純度値が明らかな他の化合物を基準物質(内標準)として測定対象の有機化合物の純度を求めることが可能な方法である。今年度は、qNMR を市販合成赤色素の純度決定に応用し、qNMR による定量値の SI トレーサビリティの確保及びその利便性の拡張について検討した。

国際単位系(International System of Units: SI units)に基づく計量学的な分析法を一次標準測定法といい、本法は一次標準直接法と一次標準比率法に分類される。我々は、簡便且つ応用範囲の広い分析法または校正法として、一次標準比率法の資格を原理的に有する核磁気共鳴に基づく定量分析法(quantitative NMR (qNMR))の開発を行ってきた。qNMR では、純度値が明らかな他の化合物を基準物質(内標準)として測定対象の有機化合物の純度を求めること

が可能な方法である。さらに分析値の信頼性と国際整合性の向上を図るため、タール色素 12 種の主色素成分の絶対定量を行い、その有効性及び妥当性について検証することとした。

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：近年、新たな殺菌料として次亜塩素酸水が指定される等、殺菌料の使用実態が日々変化しつつあり、殺菌処理に伴う消毒副生成物の挙動解明に関しても、現況を踏まえた調査が必要となっている。そこで本年は、強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水により殺菌処理したときのトリハロメタン(THM)類の生成挙動について明らかとするため、揮発性化合物60種についてダイナミックHS-GC/MS法を用いて分析を行い、次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理との比較検討を行った。

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：昨年度、P-815 の *in vitro* 培養系に添加した SA が細胞を殺すことなく細胞周期を遅延させることを明らかにしたので、今年度は、その作用機構の解析を目的とした。同時に P-815 細胞内に存在する SA の微量定量法の確立を目指した。

## B. 研究方法

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

(1)増粘安定剤中の残留溶媒分析法の検討

メタノール等の溶媒を添加したカラギーナン及びキサンタンガムを試料として、ヘ

ミセルラーゼまたは $\beta$ アガラーゼを用いたHS-GC法、酵素無添加HS-GC法及び蒸留法-GC法の比較検討を行った。

(2)香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

平成 14、15 年度に実施した食品香料化合物使用量及び規格実態調査の結果、平成 19 年度及び 20 年度に実施した規格値に関する再アンケート調査の結果の他、必要に応じて使用会社または製造会社へ個別に問合せた結果を用いた。また、確認試験のための参照スペクトルデータ(IR、MS、NMR)については、第三者機関での収載状況を調査した結果を用いた。これらのデータベースに収載されていなかった香料化合物については、産総研との共同研究「香料化合物の規格作成に関わるスペクトルデータ集積」において得られた公開結果を用いた。

(3)天然香料基原物質の使用実態調査

実態調査により使用が報告された基原物質の総回答数 6113 について、回答内容に疑義のあるもの等は回答会社へ直接問い合わせを行うなどの方法により回答内容の精度を高め整理してから、使用実態調査結果を集計し解析した。

(4)生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物については事業者へ出荷実需の調査表を送り、平成 19 年度の数値の記入を依頼し、回収した調査表を集計し、さらに未報告者、数値確認等について再調査、再集計処理を行った上で、日本人の平均一日食品添加物の摂取量を推定する。既存添加物については、事業者へ調査票を送り、平成 20 年度の数値の記入を依頼し、回収し

た調査票を集計し、検討を加え、再調査を行い、生産・輸入された総量を推定する。

## 2) 食品添加物の規格向上のための赤外吸収スペクトルに関する調査研究

試料の性質に応じて、ペースト法、フィルム法（液膜法、薄膜法を含む）、臭化カリウム錠剤法（KBr 法）によって IR を検討した。

## 3) 食品添加物の規格、分析法の国際整合性に関する研究

各タール色素(TX)を約 20~30 mg 精密に量り取り、予め調製した qNMR 用標準液 2.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し、DSS-*d*<sub>6</sub> のシグナル強度面積、各合成赤色素に由来するそれぞれの特定シグナルの相対強度面積、分子量、濃度等を式(2)に代入し、TX の純度(%)を算出した。

$$P_{TX} = \frac{I_{TX} / H_{TX}}{I_{DSS} / H_{DSS}} \times \frac{M_{TX} / W_{TX}}{M_{DSS} / W_{DSS}} \times 100 \quad (2)$$

ただし、 $W_{DSS}$ ,  $W_{TX}$  = DSS-*d*<sub>6</sub>及びTX の濃度(mg/mL)、 $M_{DSS}$ ,  $M_{TX}$  = DSS-*d*<sub>6</sub>及びTX の分子量、 $I_{DSS}$ ,  $I_{TX}$  = DSS-*d*<sub>6</sub>及びTX の特定基のシグナル強度面積、 $H_{DSS}$ ,  $H_{TX}$  = DSS-*d*<sub>6</sub>及びTX の特定基のプロトン数、 $P_{TX}$  = TX の純度(%)。

qNMR 測定条件の基本情報は Table 1 に示した。qNMR データ解析には、得られた

FID データを定量解析ソフトウェア(日本電子(株)開発中)に導入して自動処理した。すなわち、このソフトウェア上で、qNMR データをフーリエ変換(Window 関数: function = exponential、BF = 0.12 Hz、zero filling = 1、T1 = T2 = 0%、T3 = 90%、T4 = 100%)及び自動位相調整を行い、DSS-*d*<sub>6</sub> 及び特定シグナルの積分範囲等を設定後、予め入力した DSS-*d*<sub>6</sub> 及びタール色素(TX)の濃度、分子量、特定基のプロトン数等の化合物情報から自動解析処理を行い、定量値(純度%)を式(2)に従い算出した。

## 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

試料 2 g を 50 mL のスクリーキャップバイアルに採り、有効塩素濃度として 100µg/mL となるように調製した次亜塩素酸水溶液あるいは次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、直ちに密栓し、冷所で 10 分間放置し殺菌処理を行った。殺菌処理後、アスコルビン酸ナトリウム(4→10) 200µL を加えて反応を止め、よく攪拌した後、冷所に保管した。試料をヘッドスペースバイアルに採り、攪拌子、塩化ナトリウム 3 g 及び測定用精製水 10 mL を加え、次いでマイクロシリンジを使用して内部標準液を 5 µL 注入し、直ちにテフロンシート付きセプタムを装着したキャップで密封し GC/MS により分析した。

## 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

フィッシャー培地中にて約 48 時間で倍加する P-815 細胞を 37°C の CO<sub>2</sub> インキュ

ベーターで培養し、SA の存在下及び非存在下での P-815 細胞の細胞質の動態を比較測定した。また細胞質内 SA の LC/MS/MS 分析の最適条件を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

## C. 研究結果及び考察

### 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

#### (1) 増粘安定剤中の残留溶媒分析法の検討

カラギーナンを加水分解する酵素としてはカラギーナーゼが存在するが、市販されていないため、カラギーナンの主鎖が 1→3 結合 β-D-ガラクトースと 1→4 結合 α-D-ガラクトースから成り、アガロースと似た構造をしていることから β アガラーゼを用いた。また、キサントガムは主鎖が β 1, 4-グルコースから成るため、ヘミセルラーゼを用いることとした。カラギーナンタイプ I (添加試料)、カラギーナンタイプ II (添加試料) 及びキサントガム (添加試料) 中の残留溶媒について、HS-GC 法 (一晚室温放置後分析したもの、直ちに分析したもの)、酵素溶液を加え直ちに分析したもの) と蒸留-GC 法との比較を行った。各 HS-GC 法では、検出された溶媒量は同程度であり、蒸留-GC 法で検出された溶媒量に至らなかった。

#### (2) 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

これまで行ってきた自主規格作成の調査研究の中で何らかの理由から規格化を保留してきた 706 化合物について規格化の検討を行った。検討の結果、確認試験用参照ス

ペクトルデータなど新たな情報資料の入手などにより 99 化合物に自主規格を設定した。さらに、規格項目全て (比重、屈折率、物質確認に要する第三者機関により公開されている参照分析データ等々) が揃わず、部分的にしか規格値が無い化合物については準規格設定化合物 (58 物質)、暫定規格設定化合物 (275 物質) としてまとめた。また、現状では暫定としてでも規格化が難しい 274 化合物を①流通規格が一つの規格に集約できなかった化合物、②希釈品、③流通規格データがない化合物、④その他、としてまとめ今後の解決に備えた。これらのうち準規格化合物、暫定規格化合物については将来データが全て揃えば自主規格とする予定である。保留とした化合物については規格化のための新たな考え方について検討する必要がある。

#### (3) 天然香料基原物質の使用実態調査

天然香料は実に多種多様な天然物及びそれらの加工品や混合品から成る基原物質を原料として製造される。本年度は平成 20 年度に行った実態調査の回答内容を精査した上で集計し、調査年度 (平成 20 年) に我が国で使用していた天然香料基原物質は 487 (新規基原物質 6) であることを明らかにした。

#### (4) 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

指定添加物については、第 9 回調査の第 2 年度にあたり、平成 19 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 548 箇所の会社・事業所となった。回収数は 408 (回収率 74.5%) で、回



収率は過去の調査の平均回収率よりやや低い回収率となった。既存添加物については、本年度は第4回調査の初年度にあたり、平成20年度を調査対象として、全国487箇所の事業所に調査票を送付した。調査票の回収率は73.1%、製造または輸入していると回答した企業は226社（回収数に対する比率は63.5%）であった。回収数は前回調査を若干上回っているものの、「製造・輸入あり」と回答した件数は過去3回調査の追加調査を含めた数に及ばないので、追加調査を行って精度を高める必要がある。全般に、企業再編あるいはOEM生産などが進行しており、また、輸入食品が増大しているので、適切な調査先を把握する努力が必要である。

回収された調査票もとにデータをコンピュータ入力し集計を行い下記の集計票を作成した。

集計1 用途別 名称と全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

集計2 食添番号順 製造会社数、全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

集計3 食品添加物名別 食添以外の用途調べ

## 2) 食品添加物の規格向上のための赤外吸収スペクトルに関する調査研究

### (1)5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムに関する検討

JECFAのIRと比較検討することにより、測定前に試料の乾燥が必要であると判断した。さらに、乾燥した試料に関して測定法の比較・検討を行い、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムについては、試料を乾燥

させ、ペースト法で測定することが必須と判断した。この条件の下で測定したIRは、規格基準の参考となり得る標準IRとして有効であると考えられた。

### (2)ピロリジンに関する検討

ピロリジンは非常に吸湿性の高い化合物である。日本のような高温多湿の環境下で、このような化合物のIRスペクトルを測定した場合、水による妨害を受けることが頻繁に起こる。そこで本研究では、標準となる得るIRスペクトルを選定するため、水の妨害を受けない測定法を確立することにした。ピロリジンはいずれも常温で液体であるため、通常どおりの液膜法による測定を行った、得られたIRは、水によると思われるピークが1550、1650  $\text{cm}^{-1}$ 付近に観測され、JECFA、NIST及びThe Sigma Library of FT-IR Spectra等の国外で測定されたIRとも、SDBSのIRとも一致しなかった。そこで、1550、1650  $\text{cm}^{-1}$ 付近に観測されたピークが水に由来することを確かめるために、1 mLのピロリジンに対し、2~80  $\mu\text{L}$ の水を添加してIRの測定を行った。その結果、水の添加によって、1550、1650  $\text{cm}^{-1}$ 付近のピークが大きく変化した。この結果は、1550、1650  $\text{cm}^{-1}$ 付近のピークが水に由来することを示している。さらに、水分が多い場合、窓板からKBrが溶出し、IRに影響与える可能性が考えられることから、1 mLのピロリジンに対し、200  $\mu\text{L}$ の水を添加した試料を窓板に挟んで数分放置し、さらに、KBrの溶出を促すために、窓板を開閉したのちに測定すると、1550  $\text{cm}^{-1}$ 付近のピークが再度出現した。この結果は、窓板から溶出したKBrが水分子と相互作用し、

水の分子振動に影響を与えたことを示唆しており、非常に興味深い。

試料をモレキュラーシーブ 3A で乾燥させ、試料調製を非常に短時間で行ったところ、水のピークのない IR を得ることができたが、この結果は、試料調製時にも水分が混入することを示唆している。他の試料の場合でも、測定に時間かかると、異なる IR が得られる可能性があることには注意しておく必要があると考えられる。すなわち、標準 IR を設定するにあたっては、既存の IR が存在する場合でも、自ら検討し、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いえる。

### 3) 食品添加物の規格、分析法の国際整合性に関する研究

各タール色素を qNMR 標準液にそれぞれ溶解し、qNMR 測定を行った。各プロトンシグナルの帰属を行い、qNMR スペクトル上に観察された基準物質 DSS- $d_6$  及び各タール色素に由来する各シグナル面積、水素数、濃度等を関係式(2)に代入し、それぞれの純度値(AV(%))、RSD(%))、 $n = 3$ )を算出した。

R2、R40、R102、R104、R105、R106、Y5、B2 は各 3 試料間の RSD(%))が 1.4%以下、かつ、同一色素中のシグナル間の定量値の RSD(%))が 2.7%以下と小さく、試料調製の誤差に起因する分析誤差が小さいだけでなく、各タール色素中のどのシグナルを定量用シグナルとしても、ほぼ同等な定量値が得られることが確認された。これらについては、十分に定量用シグナルが分離し、

また、定量用シグナルに不純物に由来するがほとんど重なっていないためと考えられた。一方、R3、Y4、G3 では、各タール色素中のシグナルにより、得られる定量値は大きく異なり、その RSD(%))は 4.1~10.3% となった。定量に用いたシグナルにより定量値が異なったのは、同等な化学構造を有する不純物(分解物あるいは異性体)に由来するシグナルが定量用シグナルに重なっているためと考えられた。また、qNMR 法により求めたタール色素の定量値は、公定法(TiCl<sub>3</sub>法、質量法あるいは吸光度測定法)により求めた定量値より総じて低い値を示した。qNMR 法で求められた定量値は、観察されたプロトンのシグナル積分値より絶対定量された値であり、計量学的に信頼性の高く、色素本体の純度の真値に非常に近い値が求められていると考えられる。一方、TiCl<sub>3</sub>法、質量法及び吸光度測定法では、その測定原理よりタール色素中の主色素成分だけでなく付随色素及び不純物を合算した総量が定量値として導かれる。すなわち、総じて大きな値を示す可能性が高いことから、今回の結果は予想の範囲内であった。また、公定法(TiCl<sub>3</sub>法及び質量法)の結果を基準として考えると、各タール色素によって多少異なるが、公定法値% = qNMR 値% $\times$ 1.01~1.12 の関係式が成り立つことが確認された。

### 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

#### (1) 殺菌料原体の分析

強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水に含まれる THM 濃度の確認を行った。

強酸性次亜塩素酸水、微酸性次亜塩素酸水中の総 THM 濃度は 17.0 及び 18.3ng/mL と、水道水中の THM 濃度(18.3ng/mL)とほぼ同じであり、電解生成による次亜塩素酸水中の THM 濃度上昇はなかった。

#### (2)塩素殺菌処理により生成する揮発性化合物の分析

本法を用いて次亜塩素酸ナトリウム及び次亜塩素酸水により殺菌処理を行ったときに生成する消毒副生成物について、ダイナミック HS-GC/MS 法により分析した結果、次亜塩素酸ナトリウム処理及び強酸性次亜塩素酸水処理群において、イソブチロニトリル、2-メチルブチロニトリル及びイソバレロニトリルと推定され、各試薬と保持時間及びマススペクトルパターンが一致したことから推定された化合物と同じであると同定した。

#### (3)塩素殺菌処理により生成する消毒副生成物の経時変化

各殺菌溶液にカットキャベツを浸漬させ、生成する消毒副生成物生成量の経時的な測定を試みた結果、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水により殺菌処理した場合には、THM 量の増加は確認できなかった。また、次亜塩素酸ナトリウム及び微酸性次亜塩素酸水処理においてクロロメタンやクロロエタン量の経時的な増加傾向がみとめられたが、強酸性次亜塩素酸水処理では明瞭な傾向は確認できなかった。

#### (4)殺菌液の温度による CF 生成量の変化

殺菌液の温度を 10 及び 20℃に設定し、カット野菜を各塩素系殺菌料により 10 分間殺菌後のカット野菜に残存する THM 生成量を比較した。次亜塩素酸ナトリウムに

より殺菌した場合、温度上昇によって CF 量が約 1.6 倍に増加したが、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水処理では、温度上昇にともなう CF 量の増加は確認できなかった。

#### 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

##### (1)SA による P-815 細胞内 pH 変動

P-815 細胞の SA 無添加時の細胞質内 pH (pHi) は 7.47~7.54 であった。SA 添加 20 分後の pHi 変化は、1mM で 7.39~7.46、2.5mM では 7.28~7.37、そして 5mM では 7.01~7.20 となり、持続的な減少が認められた。

##### (2)細胞内 Ca<sup>2+</sup>イオンへの影響

Fura-2-AM は細胞内で加水分解され Fura-2 となる。このものは Ca<sup>2+</sup>と結合するとブルーシフトし、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇とともにその蛍光強度は増す。SA 無添加、添加濃度を 2.5mM、5mM で測定すると、SA 濃度に依存して細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が確認できた。

##### (3)P-815 細胞内の SA 濃度測定

LC/MS/MS により、一定時間 SA 添加培養後の P-815 細胞ペレットを超音波破碎・遠心上清の細胞質画分の SA の定量を行った。細胞内に取り込まれた SA 濃度は 7 時間後にピークとなり、その後時間とともに減少していくことが分かった。各時間における培地中の SA 濃度は変わらないことから、細胞内で代謝、分解されるのではなく、細胞外へ排出されていることが示唆された。

##### (4)SA 取り込み阻害実験

P-815 細胞への SA の取り込みへの、代表的な膜輸送阻害剤の影響を調べた。P 糖

タンパクの基質である Verapamil 及び  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase 阻害剤である Sodium azide のどちらの存在下においても SA の細胞内取り込みは抑制された。

P-815 細胞の培地中に添加した SA が、既知のあるいは未知の細胞膜輸送系を介して細胞質中に移行し、濃度依存的に細胞質の pH を低下させ、一方では細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させていた。また細胞質内に移行した SA は、その後時間とともに、減少していくことが分かった。これは SA 取り込みが特定のチャンネル阻害剤で抑制されることと考え合わせると、P-糖タンパク質による細胞質内異物排除が関係しているかもしれない。

#### D. 結論

増粘安定剤中の残留溶媒分析法の検討では、カラギーナンタイプ I、カラギーナンタイプ II 及びキサントガムを試料とした場合、酵素を用いても HS-GC 法では蒸留-GC 法と同様な結果を得ることができなかった。これらは、酵素による加水分解を受けにくく、粘度が低くならないことが原因であると考えられた。

香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究では、本年度は昨年度までに規格作成を保留してきた 706 化合物について検討した。個々の品目に関して収集データを精査検討した結果、最終的に本年度は 99 化合物について自主規格を設定し、準規格として 58 化合物、暫定規格として 275 化合物の規格を設定し、274 化合物を保留品とした。

天然香料基原物質の使用実態調査では、

日本香料工業会所属会員企業に対して行った天然香料基原物質の使用実態調査結果を整理し詳細に解析した。その結果、我が国で使用されている天然香料基原物質は 487 品目に及び、非常にバラエティに富んだ天然香料により食品香料が製造されている実態が明らかになった。

生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量推定では、指定添加物については再・追加調査を実施して、ほぼ調査活動を完了し、既存添加物については基礎的な情報を得た。

食品添加物の規格向上のための赤外吸収スペクトルに関する調査研究では、標準となり得る IR を得るために、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムやピロリジンの測定法や測定条件を検討した。本研究で得られた IR は、標準的な参照 IR 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、国内外の標準 IR を参照することも必要であるが、独自に検討を加えて、再現性のある IR 測定法を確立するとともに、測定条件や注意点を併記することで、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。

食品添加物の規格、分析法の国際整合性に関する研究では、qNMR によるタール色素の絶対定量について検討した結果、タール色素の定量法として、qNMR が有効な手段の一つに成り得ることが明らかとなった。qNMR 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、信頼性の高い絶対量

の測定が可能であること、qNMR スペクトルデータが定量性を伴った参照スペクトルとして有用であること、化学構造の確認が可能であること等、従来法より優れている。また、今回行った qNMR による定量分析は、タール色素を qNMR 標準液に溶解して測定するだけで操作が単純である点、1 測定当たりの所要時間が約 10 分以内で迅速である点が優れていた。以上のことから、タール色素の迅速かつ正確な定量分析法として、qNMR は十分に実用レベルであると考えられる。また、公定法における確認試験法、純度試験法あるいは定量法としての資格を有すると共に、SI にトレーサブルな分析値を算出可能であることから、分析値、分析法の国際整合性の確保が可能な次世代の定量分析法としても有望であると考えられた。

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した場合、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水による殺菌処理では THM を生成しないことが明らかとなった。これら塩素系殺菌料は、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欠かすことのできない重要な役割を果たしている。今後とも微生物学的リスクを十分に考慮した上での化学的リスク評価の検討が必要と考えられる。

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、これまでの研究成果と総合すると SA はその分子型の脂溶性と、P-815 細胞膜に存在していると思われるいくつかの膜輸送機構により細胞質内に取り込まれ、細胞質内 pH を低下させ、

この変動が要因となりセカンドメッセンジャーである  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させることで、細胞質内情報伝達系への影響を及ぼし、細胞周期を遅延化し、再び細胞外へ排出されている。この排出機構は腫瘍系細胞である P-815 に固有のものなのか、他の正常細胞にも等しく備わった異物排除を目的とする機構であるかは非常に興味深い。そのこともあって、SA は細胞を殺さず、生育を抑制しているだけ、食品添加物として静菌作用の機構に関係しているのかもしれない。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 高野靖. 生産量統計を基にした食品添加物摂取量推定に関わる研究. JAFAN 29(1), 28-60 (2009)
- 2) Tatebe, C., Kawasaki, H., Kubota, H., Sato, K., Tanamoto, K., Kawamura, Y. Analysis of residual solvent in thickeners by headspace gas chromatography using a standard addition method. Japanese Journal of Food Chemistry and Safety 16(2), 78-83 (2009)
- 3) Horiyama, S., Honda, C., Suwa, K., Okada, Y., Semma, M., Ichikawa, A., Takayama, M. Negative and positive ion mode LC/MS/MS for simple, sensitive analysis of sorbic acid Chem. Pharm. Bull., 58(1), 106-109 (2010)

### 2. 学会発表

- 1) Sugimoto, N., Tada, A., Sato, K., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R.,

- Yamazaki, T., Kawamura, Y.,  
Nishimura, T.: Application of  
quantitative nuclear magnetic  
resonance spectroscopy to  
determination of the contents of  
synthetic food colors. 123rd AOAC  
INTERNATIONAL Annual Meeting &  
Exposition (2009.9)
- 2) Kubota, H., Sato, K., Tanamoto, K.,  
Kawamura, Y. Frmation of Aldehydes  
in Fresh-Cut Vegetables Treated with  
Sodium Hypochlorite and Sodium  
Chlorite. 123rd AOAC  
INTERNATIONAL Annual Meeting  
& Exposition (2009.9)
- F. 健康危険情報  
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
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）

平成 21 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

研究分担者 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

増粘安定剤中の残留溶媒分析法について、粘性の高いカラギーナン及びキサントガムを試料とし、加水分解酵素（アガロースまたはヘミセルラーゼ）を用いた酵素処理ヘッドスペースガスクロマトグラフ(HS-GC)法と蒸留-GC 法の比較を行ったが、これらの試料では、酵素により十分な粘性低下が起こらず、蒸留-GC ほどの溶媒量は得られなかった。

香料化合物の自主規格については、これまでに規格化を保留してきた香料化合物 706 品目について、再調査や既存データの精査等を行い、新たに 99 化合物の規格を策定した。また、確認試験用参照スペクトル以外のすべての規格項目（フルスペック）が設定できた 58 化合物を準規格、フルスペックにまとめられなかった 275 化合物については暫定規格とすることで整理を行った。さらに、現状では暫定としてでも規格化が難しい 274 化合物を①流通規格が一つの規格に集約できなかった化合物、②希釈品、③流通規格データがない化合物、④その他、としてまとめ今後の解決に備えた。

天然香料基原物質の使用実態調査については、本年度は平成 20 年度に行った実態調査の回答内容を精査した上で集計し、調査年度（平成 20 年）に我が国で使用していた天然香料基原物質は 487（新規基原物質 6）であることを明らかにした。

生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定では、第 9 回調査の第 2 年度として、前年度実施した企業アンケート調査結果に検討を加え、未回答企業に対して調査票再送付・回収を行い、回答内容について確認を要するものについて、電話等により問い合わせを行い、前年度レポートを修正した。また、既存添加物についての生産・流通調査は平成 12 年以降 3 年毎に実施され、本年度は第 4 回調査の初年度として、企業アンケート調査を実施し、結果を集計化した。

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

西島 基弘 実践女子大学生生活科学部教授

長谷川徳二郎 日本香料工業会会長

## 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、国際規格 (FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA)規格) 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、精製カラギーナンにはメタノール及び 2-プロパノールの合計で 0.1%以下と設定されており、その他の増粘安定剤では 2-プロパノールのみの規格で、カロブビーンガムで 1.0%、キサンタンガムで 0.05%、グアーガムで 1%、ジェランガムで 0.075%、マクロホモプシスガムで 0.05%、ラムザンガムで 0.10%となっており、いずれもパックドカラムを用いた蒸留・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。これまで、グアーガム、カロブビーンガム、ジェランガム、カラギーナン、キサンタンガムの増粘安定剤中の残留溶媒分析法として、HS-GC と蒸留-GC との比較検討を行い、グアーガム、カロブビーンガム、ジェランガムの 3 種類の増粘安定剤については、HS-GC と蒸留-GC で

ほぼ同じ結果が得られている。しかし、カラギーナン (主に硬く強いゲルを作る  $\kappa$ -カラギーナンを含むカラギーナンタイプ I 及び主に軟らかいゲルを作る  $\iota$ -カラギーナンを含むカラギーナンタイプ II)、キサンタンガムについて 2-プロパノール、メタノールを添加溶媒とした場合、HS-GC より蒸留-GC での残留溶媒の検出量が高い傾向がみられている。また、HS-GC では一晩室温での膨潤操作があるため、分析までに長時間を要することから、グアーガム、カロブビーンガム、ジェランガムに酵素(セルラーゼやヘミセルラーゼ)を加えることによって、膨潤時間の短縮を試みたところ、ヘミセルラーゼを加え、60℃で 40 分間加温し、HS-GC で分析したところ、カロブビーンガムのメタノール以外で、一晩放置したものと同程度の溶媒検出量が得られた。しかしながら、カラギーナンタイプ I、タイプ II 及びキサンタンガムでは蒸留-GC で HS-GC よりも残留溶媒の検出量が高いという結果が得られていることから、本年度は HS-GC での残留溶媒検出量の増加及び膨潤時間の短縮を期待し酵素を用いた HS-GC 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

食品香料化合物は、現在、世界的に約 4,500化合物が使用され、我が国ではこのうちの約3,000化合物を使用している。一方これらの化合物の中で規格が設定されている化合物は、我が国の食品衛生法施行規則別



表第一に個別指定されている98品目（平成22年3月1日現在）を除けば、米国FCCに収載されている約450化合物とJECFA規格の約1800化合物のみである。これらのうちJECFA規格は測定値のみで規格化されているものなどがあり、必ずしも市場流通品を反映したものとは言えない。このような状況の下、日本香料工業会により、我が国で流通している化合物の規格実態を整理して積極的に自主規格化が図られた。平成16年度から平成18年度の第一次の調査研究では342化合物の自主規格を、平成19年度からの第二次の調査研究では平成20年度までに1050化合物に自主規格が設定された。本年度の研究では、これまでに保留とした706化合物の規格化が検討された。

#### A-3 我が国で使用している天然香料基原物質の使用実態調査に関わる調査研究

天然香料を製造するための素材である基原物質が、平成8年通知の衛化第56号の別添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年当時と比べ消費者の嗜好も多様化してきている。そこで日本香料工業会により、我が国で使用している天然香料基原物質の実態調査が行われた。本年度は平成20年度に実施した調査回答から疑義のあるものについて回答会社へ直接問い合わせ等を行い、回答内容の精度を高めた後、実態調査結果を詳細に解析して、国内で使用している天然香料基原物質の使用実態を明らかにすることとした。

#### A-4 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

食品添加物の生産・輸入量をその生産・輸入業者にアンケート調査し、その回答を基礎に内容を解折・検討し、日本人の平均一日食品添加物摂取量を推定し、食品衛生行政の推進に役立てる。

なお、香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究(日本香料工業会)、天然香料基原物質の使用実態に関わる調査研究(日本香料工業会)及び、生産量統計を基にした食品添加物摂取量推定に関わる研究(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) 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。ヘミセルラーゼはSIGMA製、βアガラーゼはニッポンジーン製を用いた。

###### 2) 増粘安定剤試料

カラギーナンタイプI及びカラギーナンタイプIIはシグマアルドリッチ製、キサントガムはFluka製を用いた。

###### 3) 溶媒添加試料の調製

カラギーナンタイプI(添加試料)：カラギーナンタイプI 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。

カラギーナンタイプ II (添加試料) : カラギーナンタイプ II 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。

キサントガム (添加試料) : キサントガム 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。

酵素溶液 : ヘミセルラーゼ 1g を水 10mL に溶解し、その後冷蔵保存した。βアガラーゼ溶液はそのまま使用した。

#### 4) GC 測定条件

(1) ヘッドスペースサンプラー(HP7694、HP 社製)

オープン温度、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

(2) GC-FID(HS-GC : 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℃(6min)→4℃/min→110℃→25℃/min→240℃ (1min) ; 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℃

(3) GC-FID (蒸留-GC : GC14B、島津製作所製)

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) 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℃

#### 5) 標準添加 HS-GC

エタノール、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、ヘッドスペース用バイアルに、試料 0.04 g を量り、攪拌子と水または標準溶液 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、試料溶液とした。一晩放置後、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、60℃で 40 分間加熱し、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。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。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。

#### 6) 蒸留-GC

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: 4) GC 測定条件(3)) で分析を行った。

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 QT 及び QS を求め、以下の式によりエタノール、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) × QT/ QS × 0.4 (%)

#### B-2 香料化合物の自主規格の作成に関わる調査研究

##### 1) 自主規格作成のための基礎データ

平成 14、15 年度に実施した食品香料化合物使用量及び規格実態調査の結果、平成

19 年度及び 20 年度に実施した規格値に関する再アンケート調査の結果の他、必要に応じて使用会社または製造会社へ個別に問合せた結果を用いた。

##### 2) 参照スペクトルデータ

確認試験のための参照スペクトルデータ (IR、MS、NMR) については、第三者機関での収載状況を調査した結果を用いた。これらのデータベースに収載されていない香料化合物については、産総研との共同研究「香料化合物の規格作成に関わるスペクトルデータ集積」において得られた公開結果を用いた。

#### B-3 我が国で使用している天然香料基原物質の使用実態調査に関わる調査研究

実態調査により使用が報告された基原物質の総回答数 6113 について、回答内容に疑義のあるもの、例えば基原物質名以外の名称が書かれていた場合や追加基原物質があった場合、或いはスモーク香料の基原物質として予想外の回答(バニラ、アズキ、レモン等)を受けた場合等は回答会社へ直接問い合わせを行うなどの方法により回答内容の精度を高め整理してから、使用実態調査結果を集計し解析した。

#### 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厚生省が作成した「平成 12 年 1 月末現在・食品添加物製造・輸入業者名簿」に基に、その後の情報を付け加えて、これら事業者へ出荷実需の調査表を送り、平成 19 年度の数値の記入を依頼

した。回収した調査表を集計し、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且つ評価、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。既存添加物については前回実施した調査で、当該品目の生産・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20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、2年目再調査、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。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

## 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. 蒸留-GC

カラギーナンタイプ I、カラギーナンタイプ II 及びキサンタンガムのクロマトグラムを Fig. 1、定量結果を Table 1 に示す。いずれの増粘安定剤からも添加した溶媒のピークが検出された。

カラギーナンタイプ I、カラギーナンタイプ II 及びキサンタンガムを蒸留する際は、高温で加熱すると泡が立ち、しぶき止めに入ってしまうことがあるため、注意が必要であった。いずれの増粘安定剤でも留液を回収するのに 1~2 時間、キサンタン

ガムについては 2 時間以上要することもあった。特にキサンタンガムは泡立ちやすく、一度沸騰させて低温で蒸留を行うか、一度沸騰させ中温で 30 分ほど加熱し続けたあと、高温へ上げるとしぶき止めまで試料が泡立つことなく蒸留することが可能であった。しかし、第 9 版食品添加物公定書では残留溶媒分析法の蒸留法での温度調節の詳細は書かれていないため、解説書等での言及が必要であろう。

## 2. 異なる前処理法での HG-GC の比較

### 1) HS-GC の前処理法の検討

増粘安定剤は水に容易に溶解しないものが多く、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。カラギーナンタイプ I、カラギーナンタイプ II 及びキサンタンガムの添加試料について、一晚室温で放置し、バイアル加熱条件 60°C、40 分間加熱し HS-GC で分析したものと、蒸留し GC で分析したものでは蒸留したものの方が溶媒量が多く検出されたことから、室温で一晩放置したもの、放置せずただちに分析したもの、放置せず酵素溶液を加え分析したものを分析することとした。カラギーナンを加水分解する酵素としてはカラギナーゼが存在するが、市販されていなかったため、カラギーナンの主鎖が 1→3 結合 β-D-ガラクトースと 1→4 結合 α-D-ガラクトースから成り、アガロースと似た構造をしていることから βアガラーゼを用いた。また、キサンタンガムは主鎖が β 1, 4-グルコースから成るため、ヘミセルラーゼを用いることとした。カラギー