

200939007B

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～21年度 総合研究報告書

研究代表者 佐藤 恭子

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 110
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 111

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 年度総合研究報告書

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、規格及び規格試験法の向上に関する研究、使用実態に関する研究、食品成分との相互作用等に関する研究を行った。

食品添加物の規格向上のための赤外吸収スペクトル(IR)に関する調査研究：食品添加物の国際規格の確認試験としても汎用されている IR 測定法について検討し、気温や湿度など、外国とは環境の異なる我が国でも確認試験に有効な IR 測定法を確立し、規格基準となりうる標準的な IR を得ることができた。さらに、混合物に対する IR 法の有効性についても検討を加えた。その結果、混合物でも、混合比率がある程度一定であれば、参照 IR 法による確認が有効であることを明らかにした。

定量核磁気共鳴法(qNMR)による絶対定量の検討：NMR の食品添加物規格への適用の可能性を探るため、食品添加物の信頼性の高い分析法、すなわち、国際整合性が確保された分析法の構築を目指し、国際単位系(SI)へのトレーサビリティを確保した qNMR の構築を目的として、香料ピラジン類及びタール色素の絶対定量について検討した。その結果、食品添加物の絶対定量法として実用的であることを見出した。

増粘安定剤の残留溶媒分析法の検討：増粘安定剤の残留溶媒分析における酵素処理ヘッドスペースガスクロマトグラフ (HS-GC 法) 法の最適化、規格試験法としての提案を検討した結果、比較的粘性の低い増粘安定剤については、前処理に増粘安定剤の主鎖に応じた加水分解酵素を加えることにより、分析時間を短縮することができたが、高粘性のカラギーナン等については酵素による効果は認められなかった。

香料化合物の自主規格化：国内において流通している食品香料化合物の実態を取りまとめ、国内外に積極的に情報公開することを目的に、自主規格作成に関する調査研究を進めてきた。平成 19、20 年度において 1050 化合物に自主規格を設定した。平成 21 年度は、平成 20 年度までに規格化を保留した 706 化合物について、規格化の検討を行い、99 化合物に自主規格を設定した。

天然香料基原物質の使用実態調査：我が国の天然香料基原物質は、衛化第 56 号（平成 8 年通知）の別添 2 に、その当時使用されていた基原物質が例示されたが、それ以降現在に至るまで使用実態に関わる調査研究はない。そこで、日本香料工業会の会員企業を対象に使用実態調査を行い、平成 20 年に使用していた天然香料基原物質は 487 品（新規基原物質 6 品を含む）であることを明らかにした。

生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定：日常生活において国民一人が一日に摂取する食品添加物量をそれぞれの物質の製造・輸入量の統計データから推定するものである。指定添加物については第8回アンケート調査より食品添加物ごとの一日平均摂取量を推定し、第9回のアンケート調査及びその追加調査、再調査を行い、既存添加物等については第3回生産量統計を取りまとめ、第4回のアンケート調査を実施した。また、輸入加工食品からの食品添加物摂取量の推定方法を検討した。

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：次亜塩素酸ナトリウム、亜塩素酸ナトリウム、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の解明に向けて検討を行った。カット野菜をそれぞれの殺菌料により殺菌処理した場合、種類により消毒副生成物の生成挙動に違いがみられた。今後も新たな殺菌料の指定要請や他の食品添加物との混和による効果的な殺菌方法の研究開発が進むと考えられたため、微生物学的リスクに対する有効性を十分に考慮しつつ、食品成分等との複合作用に関する化学的リスク調査研究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：保存料のソルビン酸は、そのユニークな分子構造から、食品に添加されたとき、食品成分や他の化学物質、さらには生体成分や細胞との相互作用が推測される。試験管内でソルビン酸とアミノ酸 L-システインが反応して得られた化合物について、その分子構造を解明した。さらに、マウス・マストサイトーマ P-815 細胞をモデルとして、ソルビン酸が細胞を殺さず増殖を遅延させることを明らかにし、その機構を詳細に解析した。

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。

分担研究者

扇間 昌規	武庫川女子大学薬学部教授
北村 陽二	金沢大学準教授
杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所 室長
久保田浩樹	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

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。国際的視野に立った食品添加物の規格、基準の整備のためには、国際規格の導入を検討するだけでなく、国際規格へのよりよい試験法の提案に向けた検討も重要である。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-1 食品添加物の規格向上のための赤外吸収スペクトル (IR) に関する調査研究

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

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。さらに、近年、IR測定用機器の普及が進み、波数再現性のよいフーリエ変換型 (FT) 分光器なども安価に市販され、4000~600あるいは4000~400 cm^{-1} の領域のIRを簡単に得られるようになっていいる。一方、IR法は、ほとんど試薬を必要としないため、有機溶媒などを多用する化学的な確認試験法に比べ、有機溶媒などの廃棄量も少なく、有機廃液の焼却処理に伴う二酸化炭素の排出が少ないなど、自然環境に影響を与えない優れた確認試験法であると考えられる。このような状況を考えれば、IR法が各種品目の確認試験に多用され、食の安全に寄与していることは当然のことである。そこで、本研究では、食の安全に資する食品添加物等の国内規格の向上などを目的にして、食品添加物に指定される可能性のある化合物に関して、外国での参照IRを調査・検討するとともに、気温や湿度など、外国とは環境の異なる日本国において、再現性の良いIRを得るための測定法などを検討することにした。さらに、混合物が食品添加物として指定された場合のIR法の有効性についても検討を加えた。

A-2 定量核磁気共鳴法(qNMR)による絶対定量の検討

近年、食品添加物の厳密な分析法として、液体クロマトグラフ(LC)及びガスクロマトグラフ(GC)の検出器として質量分析装置(MS)を接続したLC/MS及びGC/MSが一般的となりつつある。MSを検出器とすることによって分子量情報や部分構造情報が得られることから、化合物の同定が可能である。

しかしながら、位置異性体や立体異性体など共通の組成式を持ち、構造的にはほぼ等しい化合物を同定することは困難である。また、分析対象の化合物がイオン化しにくい場合、高分子化合物の混合物である場合、未知化合物を含み且つ成分組成が明らかとされていない場合、上記の方法は適用不可能であり、定量分析にも利用できない。さらに、一般的なクロマトグラフ法による定量分析値の信頼性は、基本的に3つのファクター、1. 分析法(公定法など)、2. 分析者・実務者の技術力、3. 定量用標準品(標準物質)の純度、に依存しており、これらそれぞれの信頼性が確保されていることを大前提としている。1と2に関しては分析のバリデーションの実施と分析者自身の日々の技術力の向上によって一定以上の信頼性を確保することが可能である。しかし、3に関してはすべての測定対象と同一の化合物について計量学的に正確に値付けられた標準物質の供給・入手が現状では困難であるため、標準物質が入手できない場合には代用品として用いた試薬や自ら単離精製した化合物等の純度の誤差が分析値の信頼性を大きく損なう可能性を否定できないという問題を抱えている。この問題は、あまりにも基本的な問題ではあるが、有効な解決策がないために議論の場にすらほとんどあがることもなく、また、食品添加物の規格基準へクロマトグラフ法の導入が遅れている大きな理由となっている。しかし、食品添加物の規格基準の国際整合性化を考えると、標準品の供給と分析値の信頼性の問題を避けて通ることはできず、この問題を解決する新たな方法論の構築が必須である。

そこで、化合物毎の物性値に基づく定量法では、上記の問題を抜本的に解決できな

いため、別の視点や技術からの定量法の構築を目指すこととした。有機化合物は炭素、水素、酸素などが共有結合した分子である。異なる分子構造で異なる物性値を持つ分子であっても、構成する最小単位の原子だけをみれば、同種の原子同士は等価であるといえる。したがって、分子上の特定の原子の数を「ものさし」とした定量法が構築できると考えられた。よって、分子上の原子認識が可能、かつ、異なる分子上であっても原子の単位でみれば、同じ数の原子が等しい信号強度として観察・測定可能な核磁気共鳴法(NMR)がその候補としてあげられた。

NMRは既に化合物の構造を決定するための代表的な定性分析法の一つとして広く利用されている。NMRスペクトルから得られる化学シフトやスピン結合などは、分子上の原子核の構造情報を反映している。¹H-NMRでは、化学シフトの異なる各シグナルの面積比は、分子上の各炭素に結合した水素原子の数の比に対応し、測定対象の化合物の分子構造に関わらず、すべて水素原子が定量的な信号として観測される。このことから、¹H-NMRにおいては水素の原子核を認識・定量的に測定可能であるので、化合物Aの特定の置換基上の水素のシグナル面積(I_A)は、置換基上の水素の数(H_A)×化合物Aのモル濃度(m_A)として観察される(式1の分子)。別の分子構造の化合物Bの特定の置換基上の水素のシグナル面積(I_B)についても同様な関係式が当然成り立つ(式1の分母)。よって、2つのシグナルが異なる化合物(A、B)に由来する場合には個々のシグナル面積と化合物のモル濃度は式1の関係式で表すことができる。

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A m_A}{H_B m_B} = \frac{H_A W_A / M_A}{H_B W_B / M_B} \quad \dots (1)$$

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / W_{\text{std}}} \times P_{\text{std}} \quad \dots (2)$$

ただし、 I = シグナル面積、 H = 特定基のプロトン数、 m = モル濃度、 W = 重量、 M = 分子量、 P = 純度%、sample = 試料、std = 基準物質。

さらに、2つの化合物のうち、一方の化合物として純度が明らかな基準物質(std)を「ものさし」として用いれば、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含量を決定できる式2の関係が成り立つ。定量NMR (quantitative NMR: qNMR)による絶対定量は、式2を利用し、純度あるいは濃度が既知の基準物質を予め加えた溶液中で測定対象の化合物の¹H-NMR測定を行い、得られたスペクトル上に観察される基準物質と測定対象の化合物に由来するシグナル面積、水素数及び濃度比の関係から定量値を算出する方法である。これを言い換えるとqNMRでは、¹H-NMRの水素原子の認識能を利用して、基準物質と測定対象の化合物の水素の原子数の比を測定可能であるので、測定対象の化合物とは異なる一つの基準物質を「ものさし」とするだけで、あらゆる測定対象の化合物の純度や含量が算出可能となる。

既述したように、クロマトグラフ法で有機化合物の正確な定量値を得るためには、測定対象の化合物毎に同一の標準物質「も

のさし」が必須であるため、無限の数の「ものさし」の供給体制を整える必要がある。一方、qNMRを、有機化合物の定量分析における「メートル原器」的なものとして位置づければ、1つのqNMR基準物質から、無限の数の「ものさし」を校正することが可能となり、標準物質の供給体系も根本的に刷新することができる。また、「長さ」が世界中どこでもだれでも正確に測れるように、世界中で測定された化合物の純度、含量値、定量値などの測定値が1つのqNMR基準物質に紐付けられることとなり、食品添加物等の分析法の国際整合性の問題が解決されると考えられる。実際に、qNMR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始めている。よって、本技術を用いれば、少なくとも類似構造の食品添加物群は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、本研究では食品添加物の信頼性の高い分析法、すなわち、国際整合性が確保された分析法の構築を目指し、国際単位系(SI)へのトレーサビリティを確保した定量NMR (qNMR)の構築を目的として、1.香料ピラジン類の絶対定量、2.タール色素の絶対定量、について検討した。その結果、食品添加物の絶対定量法として実用的であることを見出した。

A-3 増粘安定剤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、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、マクロホモプシスガム、ラムザンガム、ペクチンに残留溶媒規格が設定されており、ペクチンを除く増粘安定剤にパックドカラムを用いた蒸留・GC法が採用された。

一方、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。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、キサントガムの増粘安定剤中の残留溶媒分析法として、HS・GC法及び蒸留・GC法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法と蒸留・GC法でほぼ同じ結果が得られている。しかし、HS・GC法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。そこで、グアーガム、カロブビーンガム、ジェランガムに酵素（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、カラギーナン（主に硬く強いゲルを作る κ -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 ι -カラギーナンを含むカラギーナンタイプII）、キサントガムについても蒸留・GC法の代わりにHS・GC法の適用を検討し、さらに酵素を用いたHS・GC法の検討を行った。

A-4 香料化合物の自主規格化

日本香料工業会では過去食品衛生法で個別指定されている香料化合物について、我が国での流通品とJECFA規格・FCC規格との比較や試験法等についての検討を平成5年度から厚生科学研究の中で実施してきた。しかしながら、個別指定され規格がある香料化合物は、我が国で使用している約3000

の香料化合物（平成12年実施の使用実態調査）からすると僅か5%にも満たない数であり、また、市場に流通している香料化合物の安全性の一つの指標となる規格が国際的に見ても使用している化合物数の多さに比べ極めて少ないという状況にあったことから、国内において流通している香料化合物のうち公定書収載香料化合物以外の化合物について規格の実態を取りまとめ、自主規格として国内外に積極的に情報公開することを目指した。対象化合物が多数のため、平成16年度から平成18年度までを第一次の調査研究として342化合物について自主規格を策定し、次いで第二次の調査研究を平成19年度から開始した。

A-5 天然香料基原物質の使用実態調査

食品香料の原料として重要な素材のひとつに天然香料がある。安全なものとして使用されている天然香料は、一般に基原物質を物理的手段のみにて処理することにより得られる。天然香料は、基原物質の果実、花、蕾、樹木、樹皮、枝、葉、茎、根等の部位と産地及び製法（抽出、蒸留、圧搾等）の組み合わせから実に多種多様なものが得られ使用されているため、その実態が極めて複雑になり円滑に調査することは難しい。

我が国での天然香料基原物質は、衛化第56号（平成8年通知）の別添2に、その当時我が国で使用されていた基原物質が例示されたが、それ以降現在に至るまで使用実態に関わる調査研究はない。日本香料工業会では衛化第56号が通知されてから10年以上経過していることに鑑み、会員企業を対象に、アンケート調査することで我が国で使用している天然香料基原物質の実態を明らかにすることとした。

A-6 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

食の国際化が進み、食生活が変化しており、一方、食品添加物の国際的整合化が図られているなか、食品添加物毎の摂取量をADIと比較し、食品添加物に係わる行政の管理の妥当性を確認するとともに、日常生活における食品添加物の摂取の動向を把握して食品衛生行政の推進に役立てることを目的に、生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定を行った。

A-7 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(NaClO)は、野菜や魚介類加工品及び食品製造工程に用いられる装置や器具などの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。食品の次亜塩素酸ナトリウム処理に伴うトリハロメタン(THM)生成挙動の解明に関しては、いくつかの報告があるが、これまでのところTHMの生成挙動の全容を解明するまでには至っていない。

また、近年になり新たな殺菌料として希塩酸や食塩を電気分解することで次亜塩素酸を主成分した殺菌液を生成する、いわゆる電解水生成装置が開発され徐々に普及し始めている。このうち一部の酸性殺菌液に関しては、平成14年に次亜塩素酸水として新規添加物に指定されている。食品添加物規格に適合する次亜塩素酸水としては、塩化ナトリウム水溶液を有隔膜電解槽内で電解して陽極側より得られる水溶液を用いた強酸性次亜塩素酸水と、希塩酸を無隔膜電化槽内で電解して得られる水溶液を用いた微酸性次亜塩素酸水があり、それぞれにつ

いて有効塩素濃度及びpHが規格値として設定されている。しかし、技術進歩にともない現行の規格に適合しない新たな殺菌水生成装置が開発されており、成分規格の改正が検討される等、次亜塩素酸水の使用実態が日々変化している。また、無隔膜電解方式により製造されるアルカリ性(pH>7.5)の電解液(いわゆる電解次亜水)に関しては、平成11年6月25日、厚生省生活衛生局食品化学課長通知「いわゆる電解水の取扱いについて」において、所定の条件を満たすものに関しては次亜塩素酸ナトリウム希釈液と同等の扱いとされている。

この他に、塩素系殺菌料として、亜塩素酸ナトリウム(NaClO_2)も使用されている。亜塩素酸ナトリウムは柑橘類果皮(菓子製造に用いるものに限る。)、サクランボ、生食用野菜類、卵類(卵殻の部分に限る。)、フキ、ブドウ及びモモの殺菌及び漂白に使用されており、また、2005年に使用基準が改正され、かずのこの調味加工品(干しカズノコ及び冷凍カズノコを除く。)が追加されている。さらに、米国では1999年に亜塩素酸ナトリウムにGRASの酸を加えてpH2.3~3.9に調整した酸性化亜塩素酸ナトリウム液(ASC)が認可されるなど、国際的な亜塩素酸ナトリウム系殺菌料の使用状況にも変化がみられる。このため殺菌処理にともな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、本研究では食品添加物の食品成分等との複合作用により生ずる副生成物の解明として、亜塩素酸ナトリウム、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水に着目し、各塩素系殺菌料によりカット野菜を殺菌処理したときに生じるTHM及びアルデヒド(Ald)類

の生成量を調査し、次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理との比較検討を行った。

A-8 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

食品添加物・保存料のソルビン酸(SA)は、そのユニークな分子構造から、食品に添加されたとき、食品成分や他の化学物質、さらには生体成分や細胞との相互作用が推測される。先に、SAが試験管内でアミノ酸L-システイン(Cys)水溶液と反応して新しい化合物を生成することを見つけたので、この生成物の分子構造を解明し、さらに、食品とともに摂取されたSAは動物の消化管粘膜細胞にどのような影響を与えるかを調べた。

B. 研究方法

B-1 食品添加物の規格向上のためのIRに関する調査研究

測定試料は、国立医薬品食品衛生研究所、日本香料工業会から提供を受けたもの及び市販品を用いた。測定試料について、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)及び臭化カリウム錠剤法(KBr法)によってIRを測定した。本研究で測定に用いた装置は、JASCO FT/IR-4100(日本分光社製)である。測定は、分解能 4 cm^{-1} (32回繰り返し)、測定領域 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ で行った。ペースト法とフィルム法の測定には、原則として、大きさ $30\sim 35\text{ mm}\times 30\sim 35\text{ mm}$ 、厚さ 5 mm のKBr板を窓板として使用した。なお、対照にはこのKBr板1枚を使用した。また、流動パラフィン、メルク社製の赤外用Nujol®を使用した。KBr錠剤法については、原則として現行第8版食品添加物公定書の記載

に従って、KBr錠剤（直径10 mm）を作成し、測定時の対照にはKBrのみの錠剤を使用した。なお、錠剤法では、日本分光社製の赤外用KBrブロックを用いた。

B-2 qNMRによるの絶対定量の検討

1. qNMRによる香料ピラジン類の絶対定量

1) 試料及び試薬

食品添加物用途品のピラジン類(14品目14製品: P1~P14)は、日本香料工業会を通じて入手したものを用いた。食品添加物用途品として入手できなかったものは市販試薬を代用品とした(Table P1)。高純度フタル酸水素カリウム(認証標準物質(CRM)、NMIJ-CRM3001a:純度100.00±0.027%) (PHP)は(独)産業技術総合研究所製を用いた。ジエチルエーテル(Et₂O)及び99.5%エタノール(EtOH)は和光純薬工業(株)製を用いた。NMR測定用重溶媒として重水(D₂O)(Isotec製)を用いた。

2) 装置

ガスクロマトグラフ/水素炎イオン化型検出装置(GC/FID): Agilent製 6890N。

ガスクロマトグラフ/質量分析装置(GC/MS): Agilent製 5973MSD。

核磁気共鳴装置(NMR): 日本電子(株)製 JNM-ECA (500 MHz)。

3) GCによるピラジン類の含量測定

「香料のガスクロマトグラフィー」に記載の方法に準じた。すなわち、各試料をGC用バイアルに取り、下記の条件のGC/FIDに付し、測定時間内に観察された成分のピーク面積の総和を100とし、それに対する被検成分のピーク面積百分率を求め、含量と

した。ただし、試料が固体の場合には、Et₂Oに溶解して1000 ppmに調製したものをGC/FIDに付し、溶媒由来のピークを除いたピーク面積の総和を100とした。

GC/FID条件

カラム、InertWax (0.25 mm φ × 30 m, thickness 0.25 μm); カラム温度、50°C (5 min)→5°C/min.→230°C; 注入口及び検出器温度、150°C及び250°C; ガス流量、1.0 mL/min; キャリアーガス、窒素; スプリット比、100:1; 注入量、1.0μL。

なお、試料が構造異性体の混合物であり、各異性体に由来するピークの分離が不十分でピーク面積比を求められない場合には、スプリット比を240:1、ガス流量を0.8 mL/minに調整し再度測定した。また別に、マスフラグメントスペクトルによる構造異性体の同定には、同GC条件のGC/MSに試料を付し、キャリアーガスとしてヘリウムを用い、イオン化電圧70 eVとしてMS検出範囲 *m/z* 25 – 300を走査した。

4) qNMRによる絶対定量

qNMR用内標準液の調製: PHP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後、約300 mgを精密に量り、D₂Oに溶解し正確に100 mLとした。

試料溶液の調製: 各試料約50-100 mgを精密に量り、内標準液を3.0 mLホールピペットにて添加し、これを試料溶液とした。試料溶液0.6 mLをNMR試験管に移し、Table P2の条件で¹H-NMR測定した。得られた各試料のFIDは、NMRデータ処理ソフトウェア(Delta Ver. 4.3.6 (日本電子(株)製))上でフーリエ変換(Window function = exponential, BF = 0.2 Hz, Zero filling = 1, T1 = T2 = 0%, T3 = 80%, T4 = 100%)後、

自動位相補正した。

ピラジン類の純度(%) : $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上に観察された内標準PHP及び試料のプロトンシグナル積分値と試料量から式Aにより含量(%)を算出した。

$$\text{content}(\%) = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}} \times M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}} \times M_{\text{std}} / W_{\text{std}}} \times 100$$

---式A

ただし、 I = シグナル積分値、 H = プロトン数、 M = 分子量、 W = 重量、sample = 試料、std = 内標準(PHP)。

5) GCとqNMRの測定値の比較

2-ethyl-6(or5)-methylpyrazine (2E6MPと2E5MPの約7:3の混合物)製品にEtOHを加え、2-ethyl-6(or5)-methylpyrazine : EtOH = 80 : 20 (w/w) に調製したものを試料とした。GC及びqNMRにより、この試料中の各異性体及びEtOHの含量を求め比較した。

2. qNMRによるタール色素の絶対定量

1) 試料及び試薬

食品添加物用合成色素(タール色素)市販品 12 品目(食用赤色 2 号(R2)、食用赤色 3 号(R3)、食用赤色 40 号(R40)、食用赤色 102 号(R102)、食用赤色 104 号(R104)、食用赤色 105 号(R105)、食用赤色 106 号(R106)、食用黄色 4 号(Y4)、食用黄色 5 号(Y5)、食用青色 1 号(B1)、食用青色 2 号(B2)、食用緑色 3 号(G3)、各 1 製品)を試料として用いた(Fig. D1、D2)。

高純度フタル酸水素カリウム(CRM、NMIJ-CRM3001a) : 純度 $100.00 \pm 0.027\%$ (PHP)は(独)産業技術総合研究所製を用いた。なお、PHP は、添付の使用法に従い、

軽く砕いた後、用時 120°C で約 1 時間加熱乾燥し、デシケーター中で放冷後、使用した。水溶性 qNMR 基準物質として高純度 DSS- d_6 (和光純薬特注品)を用いた。qNMR 測定用重溶媒として D_2O (Isotec 製)を用いた。

2) 装置

核磁気共鳴装置(NMR) : オートサンプラー付き JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子(株)製)。qNMR のケミカルシフト値は、DSS- d_6 を基準シグナル(0 ppm)とし、 δ 値を ppm 単位で表した。

3) TiCl_3 法 (for R2、R40、R102、R106、Y4、Y5、B1、B2、G3)

第 8 版食品添加物公定書の一般試験法のタール色素試験法及びタール色素等の各条に従い測定した。各試料につき 3 試行し、得られた含量値は AV(%), RSD(%)で示した。

4) 質量法(重量法) (for R3、R104、R105)

第 8 版食品添加物公定書の一般試験法のタール色素試験法及び R3、R104、R105 の各条に従い測定した。各試料につき 4 試行し、得られた含量値は AV(%), RSD(%)で示した。

5) 吸光度測定法(法定色素ハンドブック法)(for R2、R3、R40、R102、R104、R105、R106、Y4、Y5、B1、B2、G3)

法定色素ハンドブックの定量法に従い測定した。各試料につき 5 試行し、得られた含量値(%)は AV(%), RSD(%)で示した。なお、計算に用いた吸光係数は、法定色素ハンドブック記載の値を用いた。

なお、TiCl₃法、質量法及び吸光度測定法により求めた含量値は、平成 17 年度 食品・添加物等規格基準に関する試験検査報告書：-タール色素及びタール色素アルミニウムレーキの確認試験及び定量法に関する研究- により報告した値を用いた。

6) qNMR 法による含量測定

(1) qNMR 標準溶液の調製

DSS-*d*₆ 約 100 mg を精密に量り取り、D₂O 100 mL に定容した。この溶液を D₂O で 5 倍希釈したものを qNMR 用標準液とした。qNMR 用標準液中の DSS-*d*₆ の濃度 183.6±1.0 µg/mL (n = 3, AV±SD) を下記に従い、PHP により校正して求めた。すなわち、CRM の一つである PHP 約 10 mg を精密に量り取り、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(5 mm φ x 200 mm, S-type (和光純薬工業(株)製))に封入したものを DSS-*d*₆濃度校正用試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し、PHP の PhH x 2 及び DSS-*d*₆の CH₃ x 3 に由来するシグナル強度面積、分子量、濃度等を式(1)に代入し、qNMR 用標準液中の DSS-*d*₆の濃度を校正した。

$$W_{DSS} = \left(\frac{M_{DSS} \times I_{DSS}}{H_{DSS}} / \frac{M_{PHP} \times I_{PHP}}{H_{PHP} \times W_{PHP}} \right) \times \frac{P_{PHP}}{100} \quad - (1)$$

ただし、 W_{DSS} 、 W_{PHP} = DSS-*d*₆及び PHP の濃度(mg/mL)、 M_{DSS} 、 M_{PHP} = DSS-*d*₆及び PHP の分子量(MW 224.36 及び 204.22)、 I_{DSS} 、 I_{PHP} = DSS-*d*₆の CH₃ x 3 及び PHP の PhH x 2 のシグナル強度面積、 P_{PHP} = PHP の純度(100.00%)。

(2) qNMR によるタール色素の純度測定
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*₆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*₆及び TX の濃度(mg/mL)、 M_{DSS} 、 M_{TX} = DSS-*d*₆及び TX の分子量、 I_{DSS} 、 I_{TX} = DSS-*d*₆及び TX の特定基のシグナル強度面積、 H_{DSS} 、 H_{TX} = DSS-*d*₆及び TX の特定基のプロトン数、 P_{TX} = TX の純度(%)。

(3) qNMR 測定条件及び解析処理

qNMR 測定条件の基本情報は Table D1 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*₆ 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*₆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。

B-3 増粘安定剤の残留溶媒分析法の検討

1) 試料

カロブビーンガム、グアーガム、ジェランガム、カラギーナンタイプI、カラギーナンタイプII及びキサントランガムは2-プロパノール及びメタノールを添加した後、ドラフト内に1週間放置し、試料とした。

2) 装置

(1) HS-GC法

ヘッドスペースサンプラー：HP社製 HP7694

GC/FID：HP社製 HP5890

(2) 蒸留-GC法

GC/FID：島津製作所製GC14BまたはAgilent社製GC6890

3) HS-GC法

(1)標準溶液

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A10mL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。

(2)酵素溶液添加試料溶液の分析

ヘッドスペース用バイアルに、試料0.04g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5mLを正確に加え、グアーガム、カロブビーンガム、ジェランガムまたはキサントランガムを試料とした場合には、ヘミセルラーゼ(1500unit/mL) 0.5mLを、カラギーナンタイプI及びカラギーナンタイプIIを試料と

した場合にはβアガラーゼ(1unit/μL) 6μL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、ヘッドスペースサンプラーに入れ、HS-GC法で分析を行い、2-プロパノール及びメタノールのピーク面積を求めた。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4℃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。

(3) 酵素溶液無添加試料溶液の分析

ヘッドスペース用バイアルに、試料0.04g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5mLを正確に加え、直ちに密封し、一晚放置した。翌日、マグネチックスターラーで1分間攪拌後、ヘッドスペースサンプラーに入れ、酵素溶液添加試料溶液と同様に分析を行った。

(4) HS-GC条件

① ヘッドスペースサンプラー

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、10mL

② GC/FID

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100kPa、空気250kPa；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℃

(5) 定量

試料溶液中への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。

4) 蒸留・GC法

(1) 内標準溶液

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) 標準液

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。

(3) 検液

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。なお、グアーガム、キサントガムについては、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。

(4) 分析

検液及び標準液につき、GC/FID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 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) × Q_T/Q_S × 0.4 (%)

(5) GC/FID条件

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)→4 $^{\circ}$ C/min→110 $^{\circ}$ C → 25 $^{\circ}$ C/min → 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

B-4 香料化合物の自主規格化

平成15年、平成18年に実施した流通品の規格実態調査結果及び平成18年度以降に実施した使用会社或いは製造会社へ直接行った再調査結果を基に、「日本香料工業会規格作成指針」に沿って自主規格として取りまとめた。

B-5 天然香料基原物質の使用実態調査

実態調査を円滑に進め、調査した後の回答を正確に集計・解析するために、平成19年度に、天然香料基原物質データベースを「天然香料基原物質の解説：日本香料工業会編集 食品化学新聞社」を基に構築した。次いで「天然香料基原物質データベース」を利用して調査用の電子媒体を整えると同時に日本香料工業会会員企業を対象にアンケート形式による実態調査を行い、総数6113の回答を得た（平成20年度）。平成21年度は調査回答に疑義のあるものについて再調査及び検討を行って回答の精度を高めた後集計を行った。

B-6 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

国民一人が一日に摂取する食品添加物量を、それぞれの物質の製造・輸入量の統計データから推定する。

食品添加物を国内で製造している、あるいは、輸入している事業者に対し、アンケート形式で、食品添加物1品目毎に1)製造・輸入量、2)差し引くべき輸出量、食品以外の用途向けの使用量・出荷量、3)食品向けの使用量・出荷量の回答を求め、これを集計した上で、添加後の食品加工工程での消長、食品の廃棄率、等の考察を加え、人口・年間日数で除して、一日の推定摂取量とする調査を3年1サイクルで行う。

B-7 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) 試料

都内スーパーで購入したキャベツを幅約1 mmに細切し実験に用いた。

2) 試薬

各種消毒副生成物混合標準原液として関東化学社製の水質試験用23種揮発性化合物混合標準原液またはAccuStandard製のEPA Method 502.2用揮発性化合物(VOC)混合標準原液を用いた。VOC分析用内部標準原液として関東化学社製のフルオロベンゼン標準原液、4-ブロモフルオロベンゼン標準原液を用いた。FA標準原液には関東化学社製の水質試験用標準液を用いた。アセトアルデヒド(AA)、プロパナル(Pro)、ブタナル、ペンタナル、ヘキサナル、ヘプタナル、ベンズアルデヒドについては、上水試験方法2001年版のAld試験法に

従って試薬特級あるいは1級試薬を希釈しAld標準原液を調製した。グリオキサール(Gly)は関東化学製の40%グリオキサール溶液を用いた。Ald分析用内部標準原液(1-クロロデカン)及び誘導体化試薬o-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロベンジル)ヒドロキシルアミン塩酸塩(PFBOA)は関東化学製の水質試験用を用いた。次亜塩素酸ナトリウム及びクエン酸、DL-リンゴ酸、L-酒石酸には和光純薬工業社製または関東化学社製の食品添加物用を用い、フマル酸水素ナトリウムには和光純薬工業社製の試薬1級を用いた。測定用精製水には、超純水あるいはEDS水を用いた。その他の試薬は特級を用いた。各殺菌料は第8版食品添加物公定書に従いあらかじめヨウ素滴定法で定量した。次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム液はカット野菜の殺菌に使用される濃度となるように適宜希釈して実験に使用した。強酸性次亜塩素酸水は陽極及び陰極隔膜槽を塩事業センターの精製塩1.0 gを溶解させた700 mLの水溶液で満たして電解後、陽極側より得られた水溶液を使用した。微酸性次亜塩素酸水は装置付属の希釈塩酸溶液を注入した電極を10Lの水が入ったタンクに投入し、電解後、よく攪拌して用いた。次亜塩素酸水は使用前に用時調製を行い、有効塩素濃度を確認した後、希釈せずに使用した。

3) 器具及び装置

ヘッドスペースバイアル(20 mL)及びテフロンライナー付シリコンセプタム、アルミクリップキャップは、パーキンエルマー社製を用いた。オートヘッドスペースサンプラーはパーキンエルマー社製のTurboMatrix HS40を用いた。ダイナミッ

クヘッドスペースシステムとしてTeledyne Tekmar製のパージ&トラップ装置AQUA PT5000J Plus及びオートサンプラー SOLAtek72を用いた。SOLAtek72のサンプルニードルには、ダイナミックヘッドスペース分析用に成型された長さ4.8 cmの短いニードル（ジューエルサイエンス製）を使用した。GC/MSは島津製作所製のGCMS-QP2010を用いた。全てのガラス器具は100℃で3時間加熱後、放冷して用いた。

4) THM分析用スタティックヘッドスペースGC/MS測定条件

(1)スタティックヘッドスペース

バイアルオープン温度、60℃；ニードル温度、140℃；トランスファーライン温度、150℃；バイアル加熱時間、30 min；バイアル加圧時間、0.5 min (15 psi)

(2)GC/MS

カラム、AQUATIC-2 60m×0.25mm I.D. 膜厚 1.4μm；カラム温度、40℃(5min)→(4℃/min)→120℃→(8℃/min)→200℃(5 min)；注入口温度、200℃；インターフェース温度、200℃；イオン化法、EI；イオン化電圧、70ev

5) 60種VOC分析用ダイナミックHS-GC/MS測定条件

(1)ダイナミックHS

サンプルカップ温度、40℃；サンプルニードル温度、60℃；バルブオープン及びトランスファーライン温度、150℃；パージ時間、8 min；パージ流量、40 mL/min；ドライパージ時間、5 min；ドライパージ温度、150℃；デソープ時間、6 min；デソープ温度、220℃；ベーク時間、35 min；ベーク温度、30℃；スターラー攪拌、オン；クラ

イオフォーカス、なし

(2) GC/MS

カラム、AQUATIC 60 m×0.25 mm I.D. 膜厚 1.0μm、カラム温度、40℃(3min)→(4℃/min)→200℃(7min)；注入口温度、200℃；インターフェース温度、200℃；イオン化法、EI；イオン化電圧、70ev

6) Ald分析用GC/MS測定条件

カラム、DB-5MS+DG 30m×0.25mm I.D. 膜厚 0.25μm；カラム温度、50℃(1min)→(4℃/min)→220℃→(20℃/min)→250℃(10min)；注入口温度、220℃；インターフェース温度、250℃；イオン化法、EI；イオン化電圧、70ev

7) 次亜塩素酸ナトリウム処理方法

殺菌処理は通例、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100 μg/mLの次亜塩素酸ナトリウム溶液、500 μg/mLの亜塩素酸ナトリウム溶液または次亜塩素酸水を加え、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、THM及びVOC分析用試料にはアスコルビン酸ナトリウム(4→10) 200 μLを加えて反応を止め、Ald分析用にはチオ硫酸ナトリウム(5→10) 200μL及び硫酸(1+1) 40 μLを加えて反応を止めた後、直ちに試料を採取した。

8) THM及び60種VOC分析用GC/MS試験液の調製

試料をバイアルに採り、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VOC分析用内部標準液を注入し、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用試験液とした。

9) Ald分析用GC/MS試験液の調製

試料を測定用精製水20 mLを含むバイアルに移し、10分間振とう抽出した後、この抽出液5 mLをフタル酸水素カリウム50 mg添加した15 mLのスクリーキャップ付試験管に採取した。この液に1 mg/mL PFBOA 1mLを加え密栓した後、ヒートブロック上で35°C、2時間反応させ誘導体化を行った。放冷後、硫酸(1+1) 80 μ L及び塩化ナトリウム2 gを加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌した後、Ald分析用内部標準液含有ヘキサシアン5 mLを加え、3分間振とう抽出を行った。抽出後、3000rpm、5°Cで5分間遠心分離した後、ヘキサシアン層の一定量を分取し GC/MS用試験液とした。

B-8 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とCysの複合体の構造解析

SAとCys塩酸塩の混合水溶液(SA可溶化のために30%メタノール含有)を室温・暗所に5~12週間放置し、減圧濃縮後、UV検出機付きHPLC装置で経時的に増加するピーク部分を分離、分取した。それらを高分解能NMR、FT-ICR-MS装置、GC/MS装置などを駆使して生成物の構造を解析した。

2) SAの動物消化管細胞機能への影響

SAの動物消化管粘膜細胞への影響を調べるには、実験システムの開発が必要であるので、それを念頭に置きながら、SAの哺乳動物細胞への影響をin vitro 培養系で調べた。当研究室で研究蓄積のあるマウス・マストサイトーマP-815細胞株(以後P-815;増殖性の浮遊細胞で、培養操作、細

胞の計測も容易)で形態学的、細胞生物学的観察を行った。フィッシャー培地(pH7.4)中に、 1×10^5 /mLのP-815細胞を調整して通常のプラスチックシャーレで37°CのCO₂インキュベーターで培養した。倍加時間は約48時間である。少量のDMSOに溶解させた遊離型SAまたはSA-K(いずれも最終濃度2.5mM)を添加したP-815細胞群と、無添加P-815細胞群を同時に培養した。SAの代わりにその代謝産物とされているムコン酸やクロトン酸を添加して同様に培養した。細胞周期、細胞愛情報伝達系への影響を、蛍光標識した試薬を用いフローサイトメトリー(FACS)や細胞内Ca²⁺濃度、pH測定などを行った。同時に、GC/MS/MSによる培養P-815細胞中のSAの微量定量法も検討した。

C. 研究結果及び考察

C-1 食品添加物の規格向上のためのIRに関する調査研究

1. ポリソルベート類

ポリソルベート類は、ソルビタン脂肪酸エステルにエチレンオキシドが約20分子縮合したものである。脂肪酸エステル部位が1つで、含まれる脂肪酸が主にラウリン酸であるものがポリソルベート20、ステアリン酸及びパルミチン酸であるものがポリソルベート60、オレイン酸であるものがポリソルベート80である。また、脂肪酸エステル部位が3つで、含まれる脂肪酸が主にステアリン酸及びパルミチン酸であるものがポリソルベート65である。現在、米国、EUをはじめとする諸外国で、乳化剤等として広く利用されている。しかしFood Chemical Codex 5th Edition(以下FCCと略する)やJoint FAO/WHO Expert Committee on

Food Additives (以下JECFAと略する) 及びNational Institute of Standards and Technology, USA (NIST) のWebBookからIRを検索したが、参考となる参照IRは掲載されていなかった。

そこで、国内規格の確認試験として、基準となる標準IRを得ることを目的とした。ここでは、試料として、国立医薬品食品衛生研究所から複数メーカーの製品を提供していただき、それらのIRを検討した。さらに得られたIRスペクトルを各メーカー間で比較検討し、参照IR法が、確認試験として、有用であるか否かを検討した。さらに、常温で固体/ゲル状であるポリソルベート65に関しては、測定法の検討も行った。

1-1. ポリソルベート20

ポリソルベート20は、常温で油状の液体であるため、液膜法にて測定した。図1~6に、それぞれ各メーカーのポリソルベート20のIRを示す。図1~6に示されるように、ポリソルベート20のIRは、いずれのメーカー間においても、差は認められなかった。従って、液膜法で測定した標準IRは、ポリソルベート20の確認試験として有用であると判断できる。

1-2. ポリソルベート60

ポリソルベート60は、常温で油状の液体または、半ゲル状であるため、必要に応じて加温して溶解させて液膜法にて測定した。図7~12に、それぞれ各メーカーのポリソルベート60のIRを示す。図7~12に示すように、ポリソルベート60のIRは、いずれのメーカー間においても、差は認められなかった。なお、図には示していないが、試料を冷却して半ゲル状にして測定した場合でも、

IRに大きな変化は認められなかった。従って、液膜法で測定した標準IRは、ポリソルベート60の確認試験として有用であると判断できる。

1-3. ポリソルベート65

ポリソルベート65は、常温で固体であるため、まず、測定法の検討を行った。すなわち、加温して溶解させ、固化する前に液状で測定する液膜法で測定した場合と、加温して溶解させ、溶液をセル板に挟んだ後空冷して固化させて測定する薄膜法で測定した場合とを比較した。図13及び14には、それぞれ液膜法で測定した場合と薄膜法で測定した場合のポリソルベート65のIRを示す。その結果、どちらの方法で測定した場合でも、同じIRが得られることが分かった。しかし、液膜法で測定する場合、試料調製から測定までの時間を非常に短くする必要があり、また、気温の低い冬場は、試料が短時間で固化するため、液膜での測定が困難であった。そのため、液膜法による測定は不適切であると判断した。一方、薄膜法では、液化するなどの相変化は、認められなかった。従って、相変化を伴わずに測定できる薄膜法が適当であると判断した。

そこで、ポリソルベート65の測定法は薄膜法とし、各メーカー間でのIRを比較検討した。図15~19に、それぞれ各メーカーのポリソルベート65のIRを示す。図15~19に示すように、ポリソルベート65のIRは、いずれのメーカー間においても、差は認められなかった。従って、薄膜法で測定した標準IRがポリソルベート65の確認試験として有用であると結論した。

1-4. ポリソルベート80

ポリソルベート80は、常温で油状の液体であるため、液膜法にて測定した。図20～25に、それぞれ各メーカーのポリソルベート80のIRを示す。図20～25に示されるように、ポリソルベート80のIRは、いずれのメーカー間においても、差は認められなかった。従って、液膜法で測定した標準IRがポリソルベート80の確認試験として有用であるといえる。

2. ジメチルピラジン異性体に関する検討
ジメチルピラジンには2,3-、2,5-、2,6-置換体の三種類の構造異性体が存在する。ここでは、各異性体の単体について規格を設定する場合の、他の異性体の混入限度について検討した。さらに、これらの異性体を、混合比率を変えて混合したものを、混合物のモデルとし、それらのIRを比較検討し、混合物の確認におけるIR法の有効性について検討した。

2-1. ジメチルピラジン異性体の国際規格調査

まず、各ジメチルピラジン異性体の国際的な規格を、FCCやJECFAについて調査した。その結果、含量規格に関しては、2,3-ジメチルピラジンではFCCとJECFAとも異性体の合計が95%以上、2,5-ジメチルピラジンについては、FCCとJECFAでは異性体の合計がそれぞれ99%、98%以上、2,6-ジメチルピラジンについては、FCCとJECFAとも異性体の合計が98%以上と規定されていた。さらに、FCCやJECFA及びNational Institute of Standards and Technology (NIST)のChemistry WebBookについて参照IRを調査した。その結果、図26に示したJECFAの2,5-ジメチルピラジンのIRに代表

されるように、これらの参照IRには、測定時に混入した水分と思われる非常に強いピークが認められる、また、試料のピーク強度が適切でないなど、いずれのIRでも、参照IRとしては不適切と考えられる箇所があった。そこで、ジメチルピラジン異性体について、まず、標準となる単体のIRを得ることから始め、次いで、混合比率を変えた場合のIRを、測定法を含めて検討することにした。

2-2. ジメチルピラジン異性体のIR測定

2,3-ジメチルピラジン及び2,5-ジメチルピラジン単体でIRを測定したところ、それぞれ図27と28に示すような、単体の標準となるIRを再現性よく得ることができた。また、2,3-ジメチルピラジンのIR (図27) を見てみると、2,5-ジメチルピラジンの混入に由来すると思われるピーク(ショルダー)が観察された(1490及び1040 cm^{-1} 付近、図27では矢印で指示)。これを、混入した異性体の検出限界に近いと考え、この2,3-ジメチルピラジン単体でのIRに含まれる異性体の割合を求めることとした。このため、2,3-ジメチルピラジンと2,5-ジメチルピラジンとの混合比を、90 : 10または95 : 5で混合した試料を調製してIRを測定した。その結果、いずれのIRも、同様の位置に、2,5-ジメチルピラジン由来の明確なピークが観測された(図29、30)。

次に、定量的にピーク高さを求めるために、縦軸を吸光度(Abs)に変換し、ベースライン法でピーク高さを求めた(図31～33)。2,3-ジメチルピラジン由来のピーク(A;太矢印)と、2,5-ジメチルピラジン由来のピーク(B;細矢印)のピーク高さ比(B/A)を縦軸に取り、横軸に2,3-ジメチル

ピラジンを100としたときの2,5-ジメチルピラジンの混合比を取り、それぞれの混合試料における値をプロットし、検量線を作成した(図34)。この検量線を用い、2,3-ジメチルピラジン単体のAbs変換IRでのピーク高さ比から、2,3-ジメチルピラジン単体に含まれる2,5-ジメチルピラジンの割合を求めると、約0.64%となった。この結果から、検出限界は少なくとも1%弱であると判断した。一方、通常、IRで確認試験を行う際には、“同一波数のところに同様の強度の吸収を与えるとき、互いの同一性を確認することができる”と食品添加物公定書などに、定義されている。この定義に従えば、吸収帯を比較し、吸収帯のショルダー程度が観測される場合には、別の吸収帯と視認されず、異なるIRとは判断されない。そこで、混合した異性体が明確なピークとして観測され、単体のIRと異なるIRとみなせる限界は、異性体の混入が3%程度と推定し、その確認を行った。その結果、2,3-ジメチルピラジン：2,5-ジメチルピラジン=99：1、97：3で混合した試料を測定したところ、前者(図35)ではショルダー程度のピークしか観測されなかったのに対し、後者(図36)では、明確なピークとして観測され、2,3-ジメチルピラジン単体のIRとは一致しなかった。この結果から、単体について規格を設定する場合は、異性体の混入は、3%程度以内と見積もるのが妥当であると考えた。逆に、異性体の混合比率が3%以上のとき、単体のIRと異なるIRを示すと判断できる。さらに、混合比率が3%の場合と5%の場合のIRを比較しても、異なるIRであるとは断定できないが、3%と10%の場合のIRを比較すると、2,5-ジメチルピラジン由来のピークの大きさが明確に異なっていた。この結果

は、混合比率が大きく異なると、異なるIRとなるが、混合比率がある程度一定であれば、同一のIRになることを示している。

次いで、他の異性体の組合せの混合物に関しても検討を加えた。ここでの検討では、前述の検討結果に従い、10%混合したものと、3%混合したもののIRを測定することにした。

まず、2,6-ジメチルピラジン単体でIRを測定した。2,6-ジメチルピラジンは融点が35~40℃であり、室温では固体であるため、ペースト法で測定し、単体の標準となるIRを得た(図37)。また、他の液状の異性体に添加すると、溶解することから、液体での2,6-ジメチルピラジンのIRの測定も行った(図38)。すなわち、試料を加温して溶解させ、同様に加温しておいたKBrセルを用いて液膜法で測定した。測定操作を素早く行えば、測定終了後も液状であることを確認した。その結果、固体と液体では800~1000 cm^{-1} におけるIRに差がみられたため、2,6-ジメチルピラジンの混入を判断する際には、800~1000 cm^{-1} 以外のピークを用いることとした。そこで、2,3-ジメチルピラジン：2,6-ジメチルピラジン=90：10、97：3で混合した試料を測定したところ、前者(図39)では745 cm^{-1} 付近に2,6-ジメチルピラジン由来の明確なピークが観測されたが、後者(図40)では、同位置にノイズ程度の小さなピークしか観測されず、混合比率が大きく異なると、異なるIRとなることを確認できた。同様に、2,5-ジメチルピラジン：2,6-ジメチルピラジン=90：10、97：3で混合した試料においても、2,6-ジメチルピラジン由来のピークが1535 cm^{-1} 付近に観測されたが、そのピークの大きさは混合比率によって大きく異なっていた(図41,42)。一方、