

2,5-ジメチルピラジン：2,3-ジメチルピラジン=90：10、97：3で混合した試料においても、前者（図43）では2,3-ジメチルピラジン由来の明確なピークが、後者（図44）では、小さなピークやショルダーのみが観測され、異なるIRとなった。

さらに、2,6-ジメチルピラジンに他の異性体を加えた場合のIRを検討した。前述の通り、2,6-ジメチルピラジンは常温で固体であるため、加温して液状にし、異性体を加えて混和した後にIR測定を行った。なお、異性体の割合が10%の場合、常温に戻しても液状であったため、液膜法で測定し、異性体の割合が3%以下の場合では、空冷して固化した後、ペースト法で測定した。2,6-ジメチルピラジン：2,3-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、混合比率によって2,3-ジメチルピラジン由来のピークの大きさが異なっていた（図45、46）。さらに、2,6-ジメチルピラジン：2,5-ジメチルピラジン=90：10、97：3で混合した試料を測定した場合でも、混合比率によって、2,5-ジメチルピラジン由来のピークの大きさは明らかに異なっており、混合比率によって異なるIRとなった（図47、48）。また、これらのいずれの場合も、IRの再現性を確認することができた。

これらの結果から、いずれの組み合わせにおいても、混合比率が3%以上のときに、単体と異なるIRを示し、さらに、混合比率が10%になると、3%の場合とも異なるIRになることがわかった。従って、いずれの異性体においても、ジメチルピラジン単体について規格を設定する場合は、他の異性体の混入は、3%程度以内とするのが妥当であると考えた。すなわち、異性体の合計の含量95%が担保されている場合の、同定可能

なIRを与える主成分の含量は92%、また、異性体の合計の含量98%が担保されている場合では、95%を規格として設定すべきであると推奨する。一方で、ここで得られた結果は、いずれの異性体においても、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、再現性良く同一のIRになることを示しており、言い換えると、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示している。

3. 5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムに関する検討

JECFAでは5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムはKBr法によって測定されている。そこで、本研究では、この妥当性を検討するため、KBr法とペースト法の両方で測定し、それらをJECFAのIRと比較検討することにした。

図49に示すように、JECFAのIRにおいては、①の実線で囲んだ領域（1300 cm⁻¹付近）のピークが2つに分かれているが、試料を乾燥せずに、KBr法（図50）及びペースト法（図51）で測定した場合、①の実線で囲まれる領域のピークが2つに分かれずに一つのピークとなり、JECFAのIRとは異なっていた。

高温多湿な日本でIRを測定した場合、吸湿により、乾燥した海外で測定したIRとは異なるIRを与えることが多い。そこで、試料を五酸化二リン存在下、120℃減圧で一晩乾燥させ、KBr法（図52）及びペースト法（図53）で測定したところ、いずれのIRにおいても、①の実線で囲まれる領域のピークは2つに分かれていた。これらの結果から、測定前に試料の乾燥が必要であると判断し

た。

次いで、乾燥した試料に関して測定法の比較・検討を行った。KBr法（図52）及びペースト法（図53）で測定して得られたIRと図1のJECFAのIRとを比較検討したところ、②の一点波線で囲んだ領域の2つのピーク（3290、3400 cm^{-1} 付近）の相対強度がJECFAのIR（図49）と一致するのは、ペースト法で測定したIR（図53）であった。

さらに、JECFAのIRには③の波線で囲んだ3、600 cm^{-1} 付近のピークが認められ、それは図53のペースト法によるIRではショルダーとして観測されるが、図52のKBr法によるIRでは観測されなかった。なお、図49のJECFAのIRでは③が明確なピークとして観測されるのは、このIRは1600 cm^{-1} 付近にある試料の最大ピーク強度（%T）が0.0%に達するほど、試料の濃度が非常に濃い状態で測定しているためと考えられる。

以上のことから、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図53の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。

4. 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。

4-1. ピロリジンのIRに及ぼす水分の影響に関する検討

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。その結果、図54に示すように、得られたIRは、水によると思われるピークが1550、1650 cm^{-1} 付近に観測され、JECFA、NIST及びThe Sigma Library of FT-IR Spectraなどの国外で測定されたIRとは異なっていた。また、日本国内で測定されたSDBSのIR（図55）とも一致しなかった。そこで、1550、1650 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 μL の水を添加してIRの測定を行った。その結果、図56~60に示されるように、水の添加によって、1550、1650 cm^{-1} 付近のピークが大きく変化した。この結果は、1550、1650 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、水の添加量によるピーク高さの変化を定量的に検討するため、縦軸を吸光度（Abs）に変換した図を作成した（図61）。次いで、1080 cm^{-1} 付近のピークを、ピロリジン由来の基準ピークとして、ベースライン法でピーク高さを求め、基準ピークに対する1550、1650 cm^{-1} 付近のピーク高さの比をそれぞれプロットした（図62、63）。図62に示すように、1650 cm^{-1} 付近のピーク高さ比は、ほぼ、水の添加量に依存して増加した。一方、1550 cm^{-1} 付近のピーク高さ比は、図63に示すように、水20 μL 添加までは添加量に依存して増加したが、それ以上の添加量になると、減少していった。これは、水の量が増加すると、ピークの出現位置が1550 cm^{-1} 付近から1650 cm^{-1} 付近にシフトすることを示している。この点を確かめるために、極端な例として、水100、200 μL を添加してIRを測定すると、図64、65に示されるように、1550 cm^{-1} 付近

のピークはほぼ消失し、1650 cm⁻¹付近のピークが非常に大きくなった。なお、図64のIRは、SDBSのスペクトル(図55)とほぼ一致していたことから、SDBSのIRは、かなり吸湿した試料を測定したIRと推察される。

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。そこで、1 mLのピロリジンに対し、200 μL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、図66に示すように、1550 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。

4.2. 水分の妨害を受けないピロリジンのIR測定法の確立

前述の通り、ピロリジンは吸湿性が高く、水分の影響を強く受ける。そこで、水分の妨害を受けないピロリジンのIR測定法を確立するため、水分混入の経路を調べることにした。まず、試料をモレキュラーシーブ3Aで乾燥させ、通常の測定を行ったが、水によるピークは完全には消失しなかった。このことは、ピロリジンは、速やかに吸湿することを示唆している。そこで、吸湿を避けるため、試料調製を非常に短時間で行ったところ、図67に示すように、水のピークのないIRを得ることができた。なお、このIRは、外国の乾燥した環境で測定されたThe Sigma Library of FT-IR SpectraのIR(図68)とも一致する。従って、これらの事実から、図67のIRは吸湿していないピロリジンのIRと結論でき、標準IRとすべきで

あると考えられる。また、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おり、試料調製を短時間で行う必要があることを示している。

特に、今後、IRを用いる確認試験が汎用される可能性があることから、測定に時間がかかると、異なるIRが得られ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。

C-2 qNMRによる絶対定量の検討

1. 香料ピラジン類の絶対定量

1.1. GC と qNMR による分析値の精度比較

NMRは、分子構造に関するスペクトル情報が多く得られることから化合物の分子構造解析及び同定に広く用いられている。

¹H-NMRにおいて、プロトンシグナル強度の比は分子中の置換基のプロトン数に対応する。さらに2つのシグナルが異なる分子に由来する場合には個々のシグナル積分値と化合物の濃度の関係は式Bにより表される。

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{n_1 m_1}{n_2 m_2} = \frac{n_1 W_1 / M_1}{n_2 W_2 / M_2} \quad \text{式 B}$$

ただし、 n = プロトン数、 m = モル濃度、 W = 重量、 M = 分子量

次に、観察されるすべてのシグナル積分値の定量性が確保された¹H-NMRスペクトルでは、2つの一方の化合物の純度が明らか

であれば、得られたモル比と溶液の調製値の関係から測定対象の化合物の含量(あるいは純度、濃度)が測定される量の標準を参照せずに決定できるため、式Aが成り立つ。

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

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)。

実際のqNMRによるピラジン類の定量では、濃度既知の一次標準物質PHPを含むD₂O溶媒に試料を一定量溶解し、ピラジン環とPHPのベンゼン環上のプロトンシグナル積分値、秤量値等を式Aに代入することで含量を算出した。また、GCによる含量測定は、「食品、添加物等の規格基準 第2 添加物(平成19年3月改正、昭和34年厚生省告示第370号)」に記載される「B. 一般試験法、15. 香料試験法、9. 香料のガスクロマトグラフィー」に記載に従い、qNMR法による結果と比較した。

qNMRが、香料ピラジン類の定量法として応用可能かどうか検証するため、2-ethyl-6(or5)-methylpyrazine (P1:2-ethyl-6-methylpyrazine と 2-ethyl-5-methylpyrazineの約7:3の混合物)、また、この製品に不純物が混入した場合を想定し、EtOHを加え、2-ethyl-6(or5)-methylpyrazine : EtOH = 80 : 20 (w/w) に調整したものを試料とし、qNMR及びGCで含量測定し、結果を比較した(Table P3)。Fig. P1にEtOHを添加した2-ethyl-6(or5)-methylpyrazine製品(Table P3, entry 2)の¹H-NMRスペクトル

を示した。内標準のPHPのベンゼン環上の4つのプロトンが7.56 ppm及び7.73 ppmに、2-ethyl-6-methylpyrazine 及び 2-ethyl-5-methylpyrazineのピラジン環上の2つのプロトンに由来するシグナルがそれぞれ8.26 ppm付近及び8.32 ppm付近に、また、EtOHの-CH₂O-に由来するシグナルが3.68 ppmに観察された。なお、EtOH無添加ではEtOHのシグナルは全く観察されない。これらの観察されたシグナル積分値、分子量等を式Aに代入し、それぞれの含量を求めた。

また、Fig. P2にEtOHを添加した2-ethyl-6(or5)-methylpyrazine 製品 (P1) (Table P3, entry 2)のGCによる結果を示したが、保持時間4.6分にEtOHに由来するピークが、16.8分及び16.9分に2-ethyl-6(or5)-methylpyrazineの各異性体に由来するピークA及びBが観察された。ピークA及びBについては、その含量比からピークAが2-ethyl-6-methylpyrazine、ピークBが2-ethyl-5-methylpyrazineに由来するものと考えられたが、両者のフラグメントマスペクトルは酷似しており、判別できるものではなかった。

EtOH無添加の2-ethyl-6(or5)-methylpyrazine製品の異性体比及び総含量は、GC及びqNMRでほぼ一致した(Table P3, entry 1)。次に、EtOHを添加したものは、qNMRではEtOH含量を19.29%と求めることができたが、GCでは14.83%と実際の添加量より低い値を示した(Table P3, entry 2)。この結果より、GC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。

1-2. qNMRによるピラジン類の含量測定

同様にGC及びqNMRによりピラジン類製品(P1-P14)について定量を行った結果をTable P4に示した。qNMRによる定量値は、GCに比べ、概ね1%ほど小さい結果となった。

GCは、分離分析という点では優れているが、求められた定量値は、あらゆる不純物のレスポンスファクターが一定であると仮定し、クロマトグラム上に観察されるすべての成分のピーク面積の総和に対する被検成分のピーク面積百分率であり、常に真値に近い値を示す方法とは言い難い。さらに、GCでは標準品がない場合、異性体混合物の各異性体の同定は不可能であった。

一方、qNMR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、方法論的にも真値に非常に近い値が求められていると考えられた。さらに得られた¹H-NMRスペクトルデータは構造解析にも利用可能であり、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。

以上の結果より、香料ピラジン類の定量法として、GC法以外にqNMRが有効な手段の一つに成り得ることが確認された。また、qNMRスペクトルデータより化学構造が同定可能であることがGC法より優れていた。

2. qNMRによるタール色素の絶対定量

2-1. qNMRの測定条件の改良

前項までに、qNMRでは、スペクトル上に観察される基準物質と測定対象化合物のシグナル強度とモル濃度との関係から、基準物質の濃度を測定対象化合物の濃度に転嫁することが可能であることを示した。

一方、一般的に利用されている定性分析

(構造解析)用¹H-NMR測定初期条件では、プロトンシグナル面積は整数値として得られれば化合物中の置換基の水素数が推測できるため、得られるシグナル面積の定量性を犠牲にして感度やS/Nを優先した条件に設定されている。qNMRによる定量分析では、各シグナル面積の定量性を厳密に確保することが不可欠であるため、Pauli及びSaitoらの報告(Pauli G. F. et al. *J. Natural Prod.*, 70, 589-595 (2007). Saito, T. et al. *Metrologia*, 41, 213-218 (2004).)を参考にTable D1に示すように測定条件を改良した。すなわち、シグナル面積の定量性の確保には、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に十分緩和していなければならないため、パルス遅延時間をシグナルのスピンの格子緩和時間(T_1)の5倍以上に設定した。さらに、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し、観測幅の両端では定量誤差を与えるため、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-5 ppm~15 ppmを測定範囲とした。また、本研究では、シム調整を厳密に行い、良好なシグナル形状及びS/Nを得た上で測定し、得られたFID信号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、同一処理条件下で自動処理し、一元的に定量値を算出した。qNMRによる1測定当たりの所要時間は約10~20分であり、且つ得られた測定値は高い再現性を示し、不確かさは概ね2%以内と見積もられた。

2-2. qNMR基準物質の設定とSIトレーサビリティの確保

qNMR基準物質としては、*p*-トルエンスルホン酸、フタル酸水素カリウム、ジメチ

ルスルホン、安息香酸などが既に報告されているが、これらのシグナルが測定対象の化合物のシグナルと重なってしまった場合には基準物質として使えない。よって、qNMR基準物質を選択する場合には、測定対象化合物のシグナルを予測し、シグナルが重ならない物質を事前に選択して使用する必要があるばかりか、得られたスペクトルは基準物質のシグナルと混ざった状態で得られるため、測定対象の化合物の構造解析と定量分析を同時に行おうとした場合、利便性が悪いという欠点がある。そこで、qNMR基準物質としてDSS-*d*₆を用いることとした。DSS-*d*₆は、無色粉末、水溶性のNMR基準物質として用いられるものである。また、0 ppmにシグナルを示すため、得られたqNMRスペクトルは、通常の¹H-NMRと同等であり、一般的な測定対象化合物のシグナルと重ならないため、qNMRの基準物質として適している。

しかしながら、現在、SIにトレーサブルな、すなわち、計量学的に正確に純度が値付けられたDSS-*d*₆が流通していないため、厳密な純度値あるいは濃度値が要求されるqNMR基準物質としてそのまま用いることができない。そこで、qNMRによる分析値のSIトレーサビリティの確保のため、Fig. D3に示すように計量学的に妥当な手順によって値付けされ、計量学的トレーサビリティが証明されたCRMの一つであるフタル酸水素カリウム(PHP)を一次標準として用い、qNMR標準液中のDSS-*d*₆の濃度を校正した後に、DSS-*d*₆を二次標準として測定対象化合物のqNMR測定を行う2段階の方式を用いることとした。すなわち、qNMR標準液にPHPを溶解し、PHPのPhH × 2に由来するシグナル(7.46 ppm)に対する

qNMR標準液中のDSS-*d*₆の(CH₃) × 3に由来するシグナル面積比を測定し、関係式(1)よりDSS-*d*₆の濃度(183.6±1.0 µg/mL (n = 3, AV±SD))を校正した。このようにして、DSS-*d*₆をqNMR基準物質として用いた際の測定対象化合物の定量値のSIトレーサビリティを、CRMのPHPを介して実現した。

2-3. qNMRによるタール色素の絶対定量

次に、DSS-*d*₆を基準物質として含むqNMR標準液に各タール色素を溶解し、qNMR測定を行い、得られたスペクトルをFig. D4に示した。重溶媒にはタール色素の溶解性を考慮してD₂Oを用い、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。なお、qNMRデータ解析には、FIDデータを定量解析ソフトウェア(日本電子(株)開発中)を用い、定量解析アルゴリズムを統一し、一元的に自動処理した。

Table D2には、qNMRによる分析値を示した。Fig. D4に各タール色素のqNMRスペクトルを示したが、定量用のプロトンシグナルとして、基本的にベースライン分離したシグナルを用いた。ベースライン分離が十分でなく、2つ以上のシグナルが重複するものについては、それらを含む範囲をシグナルとして積算し、定量用シグナルとした。その結果、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。

2-4. TiCl₃法、質量法、吸光度測定法及びqNMRによる定量値の比較

Table D3にTiCl₃法、質量法、吸光度測定法及びqNMRにより求めた定量値を示した。qNMRにより求めたタール色素の定量値は、TiCl₃法、質量法及び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、TiCl₃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(TiCl₃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% × 1.01~1.12の関係式が成り立つことが確認された。

C-3 増粘安定剤の残留溶媒分析法

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、カロブベーンガムのメタノールを除いてはほぼ蒸留-GC法と同様の値が得られた。ジェランガムのようなセルラーゼなどの酵素による加水分解が起きにくいガムについて、ヘミセルラーゼの利用が可能であると思われる。一方、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については、いずれの増粘安定剤においても、蒸留-GC法で得られた溶媒量の方がHS-GC法で得られた溶媒量より多い結果が得られた。さらに、酵素による加水分解で粘性を下げることを試みた。カラギーナンではアガラゼ、キサンタンガムではヘミセルラーゼを加えたが、カラギーナンタイプIIでHS-GC法での溶媒検出量より多い結果が得られたものの、蒸留-GC法で得られた溶媒検出量には至らなかった。カラギーナンタイプIIではヘッドスペースオープンでの加熱後、冷却されるとゲルを形成していたが、酵素を加えると流動性のあるゲル状にしか固まらず、ある程度の加水分解は起きていると思われる、その分、HS-GC法での結果より多く検出されたと思われた。しかし、カラギーナンタイプI及びキサンタンガムではHS-GC法で得られた結果と同程度しか検出されず、蒸留-GC法での検出量には至らなかった。

C-4 香料化合物の自主規格化

平成18年に実施した生産・使用量調査においてその使用が確認されていた約2098香料化合物(公定書収載98品を除く)のうち平成19年度から平成21年度にかけて行った調査研究において1050化合物、平成16年度

からの研究で延べ1491化合物（公定書収載品を含む）に自主規格を策定した。

また、調査研究の最終年度の平成21年度は、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）、保留化合物（274物質）としてまとめた。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。

C-5 天然香料基原物質の使用実態調査

6113のアンケート調査回答を集計・精査した結果、衛化第56号別添2「天然香料基原物質リスト（以下「リスト」という。）」に収載されている612基原物質のうち使用されていた基原物質の総数は481品目であり、リストのうちおよそ80%が使用されている実態が明らかになった。一方予想に反してリストに収載されていない基原物質は6品目と少ないこともわかった。その理由として、既存の基原物質は範囲が広く大概のバラエティー種は既存の基原物質の範囲に含まれるからであると考えられた。

今回の調査によるリスト品に無い新規基原物質とは具体的にはアセロラ、カブルーバ、カンディア、クズウコン、プルメリア、ムラサキバレンギクの6品目である。これらの新規基原物質は、食のグローバル化による嗜好の変化や流通技術の進歩に伴い日本の市場に浸透してきたものであり、今後も徐々にではあるが増えていくものと思われる。

また、既存添加物とその用途が重なるスモーク香料の基原物質に対する調査では既存添加物の原材料と重なるオーク、ケード、ヒッコリー、ブナ等の外にバニラ、アズキ、オレンジ、レモンなど予想外の基原物質が使われていることも初めてわかった。このことからみても既存添加物と天然香料との使用目的の違いわかり、多様な特長をもつ天然香料を得るため多岐に亘る手段や基原物質が用いられている実態が明らかになった。

C-6 生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定

昭和57年より開始した過去8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品目毎の摂取量推定値は、そのADIよりも十分に低い値であった。この結果は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。第7回調査と第8回調査の間の経年変化については、甘味料、強化剤で増加傾向が、保存料で減少傾向が認められた。甘味料については、平成9年から平成12年にかけて新規指定された添加物の影響が、また、保存料については、業界及び消費者の「保存料」表示に対する忌避傾向の影響があったものと推察している。既存添加物については平成12年に調査を開始し、過去3回、品目毎に推定摂取量をまとめた。

推定摂取量がADI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が、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することは重要である。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。

C-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. 各種塩素系殺菌料で殺菌処理後に生成する消毒副生成物の経時変化

各種殺菌料による消毒副生成物の生成能を明らかとするため、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及び500 µg/mLの次亜塩素酸ナトリウム溶液で殺菌処理したときのTHM及びAld量の経時的な変化を調べた(Fig.1)。次亜塩素酸ナトリウム処理により、殺菌直後から20分後にかけてCFが速やかに生成し、その後も徐々に増加傾向を示したが、亜塩素酸ナトリウムではCFは生成しなかった。また、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウム殺菌処理により殺菌直後からAld類のAA量が増加し、10分後には3~4 µg/gとなり、その後徐々に減少したが、亜塩素酸ナトリウム処理では30分後以降、再び増加する傾向がみられた。この他に微量成分としてFA及びProが検出された(Fig.2)。

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、CFは生成しなかった。しかし、次亜塩素酸ナトリウム及び微酸性次亜塩素酸水殺菌処理ではクロロメタン量が殺菌時間にしたがって徐々に増加する傾向がみられた(Fig.3)。

2. 塩素系殺菌料の酸との混和による消毒副生成物の分析

次亜塩素酸ナトリウム及び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。また、亜塩素酸ナトリウムも、サクランゴなどの漂白剤として使用する場合、クエン酸等の食品添加物用の有機酸を添加して漂白が行われている。そこで次亜塩素酸ナトリウム及び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。殺菌料の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に調整した。

次亜塩素酸ナトリウムをクエン酸と混和した場合、調製直後よりCFが生成し徐々に増加したが、亜塩素酸ナトリウム・クエン酸混液ではCFは生成しなかった(Fig.4)。また、次亜塩素酸ナトリウムを酒石酸と混和した場合、時間経過とともにGlyが生成し徐々に増加した。一方、亜塩素酸ナトリウムに酒石酸を微酸性(pH 6.3)となるように混和した場合にはAldは生成しなかった(Fig.5)。近年、米国で認可された酸性亜塩素酸ナトリウム液は、亜塩素酸ナトリウムにGRASの酸を加えpHを2.3~3.9に調製して使用している。そこで、亜塩素酸ナトリウム・酒石酸混液をpH2に調整したところ、酒石酸添加後10分以内にGly量が急激に増加し、その後、24時間かけて徐々に減少した。

3. 水洗浄による消毒副生成物の除去効果

次亜塩素酸ナ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。また、次亜塩素酸水は、使用基準において最終製品に残存しないことが定められている。そこで、食品に

残存したTHMの水洗浄による除去効果について検討した(Fig.6)。カット野菜に対し、次亜塩素酸ナトリウム及び水道水で調製した強酸性及び微酸性次亜塩素酸水で10分間殺菌処理を行い、殺菌前と殺菌後、水道水による流水洗浄後の各工程におけるTHM残存量の測定を行った。次亜塩素酸ナトリウム殺菌処理後、CF残存量が19.2 ng/gまで増加したが、毎分6Lの水道水で流水洗浄することで6.7 ng/gまで減少した。一方、次亜塩素酸水による殺菌処理と流水洗浄後のCF残存量はそれぞれ3.2~3.5 ng/g、3.1~3.2 ng/gであり、殺菌処理後の流水洗浄によらずCFは殆ど残存していなかった。

C-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・Cys複合体の構造

SAとCysの混合物を室温、暗所に静置しつつHPLCにて経時的に増加が認められた3つのピークを、ニンヒドリン反応とUV吸収で確認し、分取カラムなどで計11画分を得、それらを凍結乾燥後NMRを中心とする構造解析を試みた。その中の1つから、COSY、TOCSY、NOESY、ROESY、HSQC、HMBCの2次元測定結果を詳細に検討し、またFT-ICR-MSを用いた高分解能測定の結果も踏まえて、組成式が $C_{10}H_{14}N_2O_5S_2$ である構造(図1)を確定した。さらに別の画分からその立体異性体も確定できた。その他SA由来の炭素骨格の一部が開裂した部位にCys 2分子が付加した分子や、SA分子構造が保持されたところにCysが2分子付加した化合物と推定される未知の物質の存在、さらにはSA分子の開裂・重生成体を示唆する化合物の存在も示唆された。

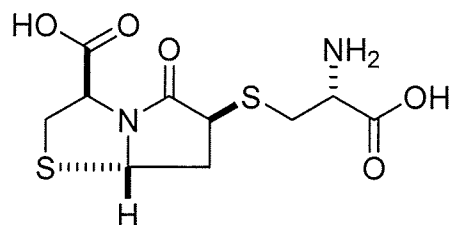


図1 SA・Cys複合体の構造

2. SAのマウス・マストサイトーマP-815細胞への影響

P-815細胞をSA 2.5 mM存在下で培養し経時的に細胞数を測定したところ、SAは一過性にP-815細胞の増殖を抑制した。その抑制効果はSA処理1日後に強く現れ、対照に比べ30%ほどの増殖抑制であった。また細胞倍加時間を12~15時間延長し、その後、再び元の増殖能の回復があることから、SAはP-815細胞の増殖を一過性に抑制したが、細胞死を誘導しなかった。またこの抑制はSAの代謝産物であるムコン酸やクロトン酸によるものではなかった。さらにSAによるP-815細胞に対するこの一過性の増殖抑制は、BrdU-FITC・抗BrdUとPIによる2重(蛍光)染色法を用いてフローサイトメトリー(FACS)による個々の細胞の蛍光強度の分布解析の結果、SAが細胞周期のうち、S期の減少とG1及びG2/M期の増加という変動を起こさせていることによることが関係していることが分かった。

細胞質内pHの測定及び Ca^{2+} 濃度の変化をそれぞれ特異的な蛍光試薬と、蛍光強度分析器で測定した。培地中に添加したSA濃度に依存的に細胞質内pHは7.54から7.20まで低下した。また添加したSA濃度依存的に細胞質内 Ca^{2+} 濃度も上昇した。

一定時間SA添加培養後のP-815細胞を遠

心分離で培養液を除去したペレットとして集め、それを超音波破碎・遠心上清の細胞質画分のSAの定量法をLC/MS/MSにより確立した。本法により細胞内に取り込まれたSA濃度を経時的に測定することが可能になった。細胞内に取り込まれたSA濃度は図2のように、7時間後にピークになり、その後は時間とともに減少していった。各時間における細胞質内と培地中のSA濃度の総和は変わらないことから、取り込まれたSAは細胞質内で代謝・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。P-815細胞へのSAの取り込みは、図3のように、代表的な膜輸送阻害剤であるVerapamil及びSodium azideの存在下では抑制された。

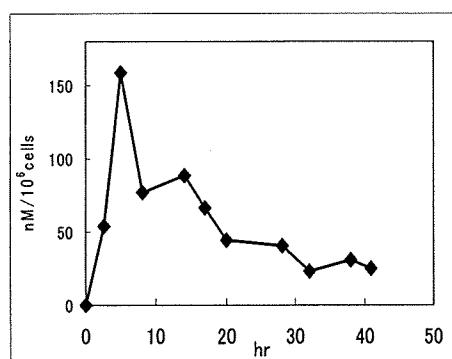


図2 P-815細胞質内のSA濃度の経時動

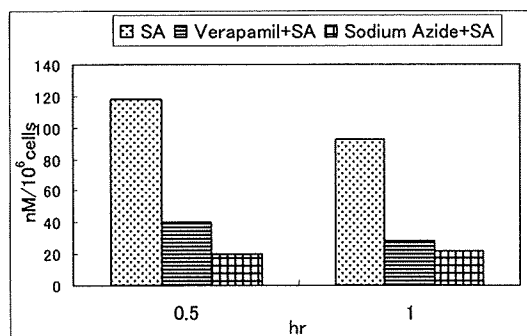


図3 阻害剤によるSAの取り込み抑制

D. 考察

食品添加物の規格向上のためのIRに関する調査研究では、まず、構造の異なる4種のポリソルベート類をとりあげ、それぞれについて複数メーカーの製品についてIRを測定し、比較検討した。その結果、構造の違いに由来する物性(融点)の違いに応じて、高温多湿期でも、再現性のよい適切な測定法を確立し、それらの測定法によって測定したIRがポリソルベート類の確認試験として有用であることを示した。

一方、IR法は、一般に単品に適用されることが多いが、食品添加物には、混合物が指定される場合もある。そこで、国内規格の向上に資する基礎的情報を得るため、混合物が食品添加物として指定された場合を想定して、混合物のIRについて、測定法を含め検討を行った。

まず、混合物でも、参照IR法による確認が有効であるか否かを検討した。2,3-、2,5-及び2,6-ジメチルピラジンの3種の構造異性体について、比率を変えて混合し、IRを測定して比較検討した。その結果、混合比率が大きく異なると、IRに差が生じること、また、混合比率がほぼ一定であれば、再現性良く同一のIRを得られ、参照IR法による確認が有効であることを明らかにした。また、単体として規定する場合は、他の異性体の混入限度は3%程度以内とするのが妥当であると提言することができた。

今後、混合物が食品添加物として指定される可能性が考えられるが、混合物の場合でも、再現性の良い測定法と、標準IRを確立することで、IR法による確認試験を有効に活用すべきであるといえる。

また、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムについても検討し、その測定において、

国際基準と一致するIRを得るためには、測定前に試料を乾燥させる必要があることを明らかにした。この結果は、日本のような高温多湿の国においては、試料の保存過程、あるいはKBr法を用いた場合には、測定試料の調製中においても、吸湿によりIRが変化する可能性があることに十分注意を払う必要があることを示している。従って、5-メチルテトラヒドロ葉酸カルシウムの測定においては「試料を五酸化ニリン存在下、120℃減圧で一晩乾燥させペースト法で測定する」といった、測定における注意事項を表記することも考慮すべきである。

さらに、ピロリジンのIRに与える水の影響についても詳細に検討した。一般に、IRの測定においては、水分の影響などによって、有機化合物でも、しばしば本来のIRと異なるIRを与えることがある。本研究では、吸湿性の高い化合物としてピロリジンを取り上げて検討を加えた結果、水分含量に依存してピロリジンのIRが変化することを明らかにした。また、水分含量が多い場合には、窓板から溶出したKBrが水分子と相互作用することで、IRがさらに変化することを見出した。さらに、水分の妨害を受けないIR測定法の確立にも成功した。すなわち、ピロリジンをモレキュラーシーブ3Aで乾燥させ、試料調整を非常に短時間で行うことで、水分の妨害を受けず、再現性の良いIRを得られることを明らかにした。従って、ピロリジンの測定においては、「試料の保存及び測定試料調製中に吸湿する可能性があるため、試料を乾燥させ、試料調製を短時間で行うことが必要」といった、測定における注意事項を表記することも検討すべきである。

確認試験は、再現性よく正確に測定でき

ることが必須条件である。今後、IRを用いる確認試験が汎用される可能性があることから、日本の気候・風土を考慮に入れた独自の規格を設定すべきである。すなわち、標準IRを設定するにあたっては、国際的あるいは他国の基準の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。

増粘安定剤の残留溶媒分析法の検討では、カロブビーンガム、グアーガム、ジェランガムで一晩水に膨潤させ、HS-GC法で分析することで蒸留-GC法と同程度の溶媒量を検出できた。また、カロブビーンガムはセルラーゼ、グアーガム、ジェランガムはヘミセルラーゼ溶液を添加することで、一晩放置しなくても、一晩放置したときと同様の結果が得られ、分析時間の短縮が可能となった。これらの結果はカロブビーンガム、グアーガム、ジェランガムが比較的粘度の低い増粘安定剤であり、蒸留-GC法とHS-GC法でほぼ同じ結果が得られていたため、酵素を用いた分析時間の短縮が可能となったと思われた。一方、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では、HS-GC法で蒸留-GC法と同じ程度の溶媒検出量が得られず、酵素を用いたとしても、蒸留-GC法と同程度の溶媒量が得られなかった。これらの原因としては、カラギーナンやキサンタンガムの粘性が非常に高いこと、カラギーナンに用いたアガラーゼがカラギーナンに特異的でなかったこと、キサンタンガムでは側鎖が大きく、構造が強固であったため、ヘミセルラーゼが主鎖を加水分解することができなかったことが原因と思われた。また、加水分解が起きたカラギーナンタイプIIでも粘性

はかなり残っており、HS-GC法よりは少し多く検出されたが、完全に溶媒を気相へ出すことができず、全体的に蒸留-GC法よりも低い検出量となったと思われた。このようにカラギーナンやキサントガムは粘性が高く、酵素による加水分解も有効とは言えなかった。このような粘性が高い増粘安定剤は蒸留-GC法でも泡立ちやすく、蒸留-GC法でも温度調節が重要であると思われた。

香料化合物の自主規格化では、平成18年の調査で使用が確認された約2098化合物のうち平成21年度までで化合物数で約71%（準規格、暫定規格を含めると約87%）、使用量数で97%超（準規格、暫定規格を含めると約98%）の化合物に自主規格を策定することができた。しかしながら、平成18年調査で使用が確認できなかった化合物が未だ約1000程度ある。また、それ以外に異性体混合物のまま使用している化合物類、同族体混合物のまま使用している化合物類、天然物（主として精油類）をエステル化した化合物類等々、流通品規格から直ちに一つの規格にまとめることが困難で規格を保留した化合物が相当数あり、これらに対する規格化のための新たな考え方について検討することが今後の課題である。

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、まず、殺菌処理によるカットキャベツ中の消毒副生成物の生成量の経時変化について検討した。カットキャベツを次亜塩素酸ナトリウムで処理することによりCFが生成し、時間経過と共にCFが増加したのに対し、亜塩素酸ナトリウム及び次亜塩素酸水処理ではTHM量は生成しなかった。一般に次亜塩素酸によるTHMの生成メカニズムとしては、ハロホル

ム反応に基づいた反応経路が示されている。この反応ではメチルケトン構造をもつ化合物に対し塩基性条件下、メチル基を連続的に塩素化し、加水分解されてTHMが生成する。次亜塩素酸ナトリウムと亜塩素酸ナトリウムを比較した場合、次亜塩素酸ナトリウムは塩素型の化学種であり塩素付加反応に関与するが、亜塩素酸ナトリウムは二酸化塩素型のためアルケンに対する塩素付加反応は一般に起こらないとされている。この結果、亜塩素酸ナトリウム殺菌処理では食品成分とハロホルム反応が進行しないため、THMが生成しなかったと考えられる。

また、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水は、次亜塩素酸ナトリウムと同じ次亜塩素酸を主成分とする液体である。このため塩素化反応を進行させTHMを生成する可能性を有すると思われた。しかし、結果として次亜塩素酸水処理においてTHMは生成しなかった。この原因として殺菌液のpHの違いが挙げられる。次亜塩素酸ナトリウムが塩基性の液体であるのに対し、次亜塩素酸水は酸性の液体である。これまで水道水の塩素処理においてpHが高くなるにつれてTHM生成能が高まることが知られている。これは塩基性条件下においてメチルケトン構造化合物の連続的塩素化後の加水分解反応が速やかに進行するためと考えられており、酸性の液体である次亜塩素酸水では、加水分解反応の進行が妨げられ、THMが生成しなかったと考えられる。

これ以外にTHM生成の阻害要因として有効塩素濃度の違いも挙げられる。次亜塩素酸の殺菌効果は、次亜塩素酸イオン型(CIO⁻)よりも、次亜塩素酸分子型(HCIO)において殺菌効果が高まることが知られている。次亜塩素酸のpKaは7.5であるため、酸

性条件下において殺菌効果が高まる分子型として存在する。これより酸性溶液では塩基性溶液に比べて低い有効塩素濃度で強い殺菌効果を得ることができる。カット野菜の殺菌処理に使用される次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素濃度は、通例100~200 µg/mLであるのに対し、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水の有効塩素濃度は21~25 µg/mLであった。これは次亜塩素酸ナトリウム有効塩素濃度の約4~8分の1である。有効塩素濃度が低くなることで、連続的な塩素付加反応に必要な十分な塩素が存在せず、途中で反応が停止したと考えられる。以上の結果として、次亜塩素酸水は酸性条件下において、THM生成に必要な塩素付加及び加水分解反応の2つの反応が進行せず、THMが生成しなかったと推察される。

次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムいずれの殺菌処理を用いた場合も、AAを中心としたAld類の生成が確認された。これまでに水道水の二酸化塩素処理においてAldやカルボン酸が生成することが知られている。二酸化塩素は亜塩素酸ナトリウムの酸性条件下における存在形態であり強い酸化力を有している。このため亜塩素酸ナトリウムは、次亜塩素酸ナトリウムのような塩素化によるトリハロメタン生成能力はないが、酸化反応にともないAldのような非塩素系消毒副生成物を生成することが示された。ただし、一般食品の中には天然由来のAldが含まれており、殺菌処理にともなって生成したAldは、天然由来として含まれるAld量に比べ少なく、殺菌処理によって生じたAldが健康に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

次に、次亜塩素酸ナトリウム及び亜塩素酸ナトリウムに食品添加物として使用が認

められている各種酸を混和し、酸共存下における消毒副生成物の生成について調べた。次亜塩素酸ナトリウムにクエン酸を混和した場合、経時的にCF濃度が増加したが、亜塩素酸ナトリウムでは、いずれの有機酸との混和によってもCFは検出されなかった。亜塩素酸ナトリウムはハロホルム反応に基づいた塩素付加反応が進行しないためCFが生成しなかったと考えられる。また、次亜塩素酸ナトリウムに酒石酸を混和した場合には、Gly量が増加した。Changらは酒石酸への塩素処理によるGlyの生成の可能性について指摘しており、塩素の酸化力により酒石酸の2つの水酸基が酸化されジアルデヒドとなり、さらに脱炭酸を経てGlyが生成するメカニズムを提示している (Fig.7)。今回の結果は、これを裏付けるものである。一方、亜塩素酸ナトリウムに酒石酸を混和した場合には、微酸性条件下ではGlyは生成しないが、強酸性条件下では、混和後10分以内に速やかにGly生成が生成し、その後徐々に減少していった。次亜塩素酸ナトリウムの酸解離定数はpKa 7.5であるのに対し、亜塩素酸ナトリウムはpKa 1.9である。このためpH 6~7の微酸性条件下において次亜塩素酸ナトリウムは、分子型の次亜塩素酸となり反応性が高まるが、亜塩素酸ナトリウムは、pKa 1.9付近までは、亜塩素酸分子型あるいは亜塩素酸イオンとして存在するため、次亜塩素酸に比べ酸化力が弱くGlyを生成しないが、一方、強酸性条件下では酸化力の強い二酸化塩素へと化学種が変化するためGlyが生成したと考えられる。また、10分後以降、Glyが徐々に減少したが、これは酸化反応によってGlyがコハク酸やギ酸へと変化したものと考えられる。強酸性条件下において、亜塩素酸ナトリウムと

酒石酸など有機酸を混和した場合、二酸化塩素の強力な酸化力によって有機酸が酸化分解され、同時に亜塩素酸も徐々に分解していると予想される。このため亜塩素酸ナトリウムを有機酸と混和後、直ちに使用する場合には強力な殺菌効果が得られるが、混和後、長時間放置した場合、亜塩素酸が有機酸との反応により分解し、亜塩素酸濃度が低下するため、殺菌効果が減弱する可能性もある。このため米国では酸性化亜塩素酸ナトリウムは用時調整して使用されている。有機酸と混和して使用する場合には調製後の貯蔵期間と殺菌効力の関係について注意が必要と思われる。なお、現在のところ殺菌料へ混和する酸として、クエン酸が普遍的に使用されており、現状において殺菌料に酒石酸を混和して使用した事例は確認されていない。また、強酸性及び微酸性次亜塩素酸水についても、酸との混和が認められているが、次亜塩素酸水は酸性の殺菌料であり、有機酸を混和しなくても十分な殺菌効果が得られるため、酸を混和して使用する可能性は低いと考えられる。

殺菌処理後の水洗浄によるTHMの除去効果について調べた結果、次亜塩素酸ナトリウムで殺菌処理した場合、CFが生成するが水洗浄操作を加えることで、水道水中のTHM濃度量とほぼ同等のレベルまで減少させることが可能であった。次亜塩素酸水で殺菌処理した場合、流水洗浄操作の有無によらずTHMは殆ど残存していないが、次亜塩素酸水の使用基準において、最終食品の完成前に次亜塩素酸水を除去することが定められており、カット野菜に残存する残留塩素を除去するためには、次亜塩素酸水により殺菌処理を行った場合でも、流水洗浄は必要な操作と思われる。

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、SAのユニークな分子構造に着目した。すなわち、SAは共役二重結合とカルボキシル基とで平面構造をとる。このことは、カルボキシル基の電気陰性度によって共役系を通して5位の炭素がプラスに分極した状態となり、酸化分解を受けやすくなり、4、5位の二重結合の開裂と連動するCysの付加反応が考えられる。水溶液中のSAは高温で揮発することも考えられるが、水中の溶存酸素が激減するために酸素酸化が低下し付加物の生成量減少も起こり得る。SA自身が反応性に富み、水溶液中で酸化・開裂・重合を起こし得ることや、食品成分であるアミノ酸と複合体を形成し得ることが示唆された。SAの反応性が食品添加物としての機能を低下させる可能性や、新たな生成物が生体にどのような影響を及ぼすかという問題等について、注意をしなければならない。

また、SAは *in vitro* 培養系において、マウス由来の増殖性細胞株であるP-815細胞の培地中に添加されると、細胞を殺すことなく、その細胞周期を遅延させることにより、増殖を抑制した。SAはその構造的特徴から、分子型と解離型で存在し得るので、分子型で細胞膜を通過することが推測されるが、既知あるいは未知の膜輸送機構を介して細胞質内との間を往来している可能性も示唆された。SAは細胞質内ではpHを低下させることが示されたので、細胞質内環境変化は、情報伝達系を含む種々の細胞質内物質の可逆的な構造変化を誘導し、細胞を殺すことなく細胞周期を遅延させている可能性が推測された。これらは、細胞質内のSA濃度を定量することで明らかになった新事実である。

E. 結論

IR法は、その簡便性、確実性から、確認試験として世界的に用いられている。本研究では、日本国での規格基準向上のため、IRの測定法の確立と標準IRの作成を試みた。すなわち、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・検討し、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した。その結果、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。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。以上のように、種々の化合物や混合物について、それぞれに適した測定法を確立し、規格基準の向上に有益な標準的なIRを得ることができた。これらは、基準IRとして活用できると考えられ、日本国の食の安全に貢献することが期待できる。

qNMRは、原理的に一次標準比率法の一つとしての資格を有する。この点に着目し、SIにトレーサブルな分析値が得られる絶対定量法の構築を行った。濃度基準としてCRMであるPHPを内部標準物質として用い、得られる分析値のSIトレーサビリティはPHPを介して実現し、qNMRによる香料ピラジン類の分析値がGC法とほぼ同等であることを示した。しかしながら、PHPは有機溶媒に難溶であり、また、 $\delta 7\sim 8$ ppmにシグナルを与えることから、qNMR基準物質としては、汎用性に欠ける欠点があった。そこで、この欠点を解決するためDSS- d_6 を

基準物質として採用し、さらに、PHPを一次標準として用い、qNMR標準液中のDSS- d_6 の濃度を校正した後に、DSS- d_6 を二次標準として測定対象化合物のqNMR測定を行う2段階の方式を用いることとすることによって、qNMRによる分析値のSIトレーサビリティの確保だけでなく、qNMRの利便性を大幅に拡張した。DSS- d_6 を二次標準としてqNMRによるタール色素の絶対定量を行い、公定法であるTiCl₃法及び質量法と分析値の比較検証を行った結果、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。本研究により構築されたqNMRは迅速かつ計量学的に正確な定量分析法として十分に実用レベルであると考えられた。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採用される十分な精度と汎用性を有すると共に、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。

増粘安定剤の残留溶媒分析法へのHS-GC法の適用の検討では、カロブビーンガム、

グアーガム、ジェランガムなど比較的粘性の低い増粘安定剤については蒸留・GC法の代わりにHS-GC法の適用が可能であった。また、HS-GC法で一晩水に膨潤させる代わりにセルラーゼや、ヘミセルラーゼを用いることで、分析までの時間を短縮することができた。しかしながら、粘度の高い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では、酵素を加えたHS-GC法でも、蒸留・GC法の結果には至らず、HS-GC法においては、増粘安定剤の主鎖に応じた加水分解酵素を用いる必要があると思われた。

香料化合物の自主規格化では、1491化合物の自主規格を策定し、58化合物に準規格を275化合物に暫定規格を策定した。食品衛生法施行規則別表第1に記載されている個別指定香料98品目を含めると1589化合物に規格化が図られ、世界最大の流通実態を反映した規格集とすることができた。また、フルスペックではないが準規格・暫定規格として333化合物をまとめた意義も大きいものとする。本調査研究の結果は消費者あるいは利用者の安全と安心に十分寄与できるものとする。

天然香料基原物質については、リストの通知から12年後の平成20年について調査した結果、使用されてきたリスト収載基原物質は481品目、新規基原物質は6品目であることがわかった。既存の基原物質のうち約80%が使用され、また基原物質に該当する範囲が若干広いものがあるというものの新規基原物質が少なかったという結果は、リストの正しさを裏付けるものであった。

本調査研究は消費者あるいは利用者の安全と安心に十分寄与できたものであると考える。なお、今回の調査結果については日

本香料工業会のホームページで公開を予定している。

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8回の指定添加物についての調査の結果、ADIのある食品添加物毎の摂取量推定値は、そのADIよりも十分に低い値であった。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。

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ときCF及びAAが生成するが、亜塩素酸ナトリウム殺菌処理ではCFは生成せず、Aldのみが生成すること、また、次亜塩素酸水による殺菌処理では、強酸性及び微酸性次亜水ともにCFを生成しないが、微酸性次亜水においてのみ、クロロメタン量が増加することなど、塩素系殺菌料の種類によって消毒副生成物の生成挙動に違いがみられることを明らかにした。近年、食中毒の危害防止や新型インフルエンザ対策によって殺菌料の需要の高まっており、新しい殺菌方法の技術開発が精力的に行われている。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んでいくと考えられ、今後も殺菌料の使用実態を踏まえた調査が必要である。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重要な役割を果たしており、食の安全を維持するために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、食品成分等との複合作用に関し

た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では、食品添加物SAを取り上げた。SAはそのユニークな分子構造から、食品成分及び他の化学物質と相互作用をし、食品とともに摂取されると、ターンオーバーの早い消化管粘膜細胞へ管腔側から影響を与え、細胞を傷害することなく再びは排出されたり、血管側に吸収されていくことも推測される。動物生体内でも上記に類似の反応性を示しながら、代謝分解されていくものと思われる。

F. 康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. Horiyama, S., Honda, C., Suwa, K., Umemoto, Y., Okada, Y., Semma, M., Ichikawa, A., Takayama, M. Sensitive and simple analysis of sorbic acid using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.*, 56, 578-581 (2008)
3. 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)

4. 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)
5. 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, (2010) (in press)

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 Annual Meeting and Exposition (2007.9).
2. Kubota, H., Sato, K., Tanamoto, K.
Formation of Disinfection By-Products in Fresh-Cut Vegetables Treated with Sodium Hypochlorite. 121st AOAC International Annual Meeting and Exposition. (2007.9)
3. 久保田浩樹, 佐藤恭子, 棚元憲一. カット野菜の次亜塩素酸ナトリウム処理により生成する塩素系消毒副生成物について. 日本食品衛生学会第94回学術講演会(2007.10)

4. 古庄 紀子, 杉本 直樹, 佐藤 恭子, 山崎 壯, 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).
 5. 吉川 宏, 馬野克己: 我が国で使用している食品香料化合物の生産使用量・摂取量に関わる調査研究(その 1). 日本食品化学学会第 14 回学術大会 (2008.5).
 6. 吉川 宏, 馬野克己: 我が国で使用している食品香料化合物の生産使用量・摂取量に関わる調査研究(その 2). 日本食品化学学会第 14 回学術大会 (2008.5).
 7. 杉本直樹, 古庄紀子, 建部千絵, 末松孝子, 内海博明, 多田敦子, 佐藤恭子, 山崎 壯, 棚元憲一: 核磁気共鳴に基づく食品添加物の新規定量法の開発. 日本食品化学学会第 14 回学術大会 (2008.5).
 8. 建部千絵, 杉本直樹, 齋藤 剛, 井原俊英, 末松孝子, 有福和紀, 内海博明, 吉田雄一, 多田敦子, 佐藤恭子, 山崎壯, 棚元憲一, 西村哲治: qNMR に基づく食用合成色素の新規定量法. 日本薬学会第 129 年会 (2009.3).
 9. 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).
 10. 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)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

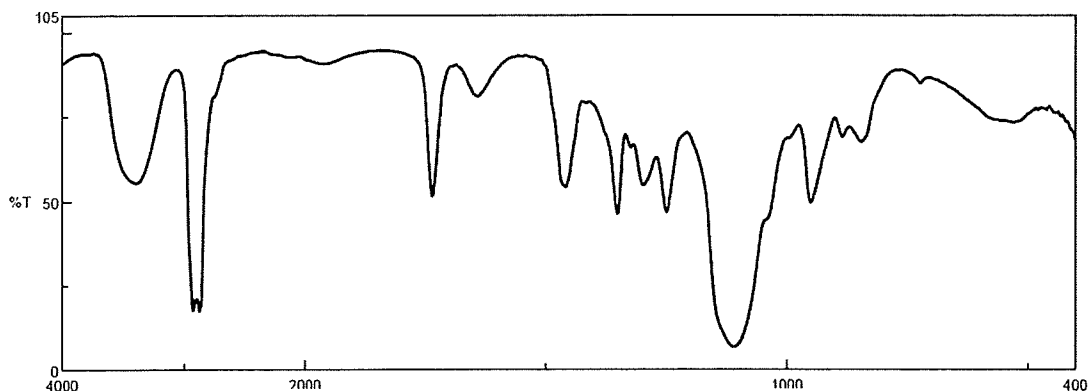


図 1 A社ポリソルベート-20のIRスペクトル

図 8 A社ポリソルベート-20のIRスペクトル

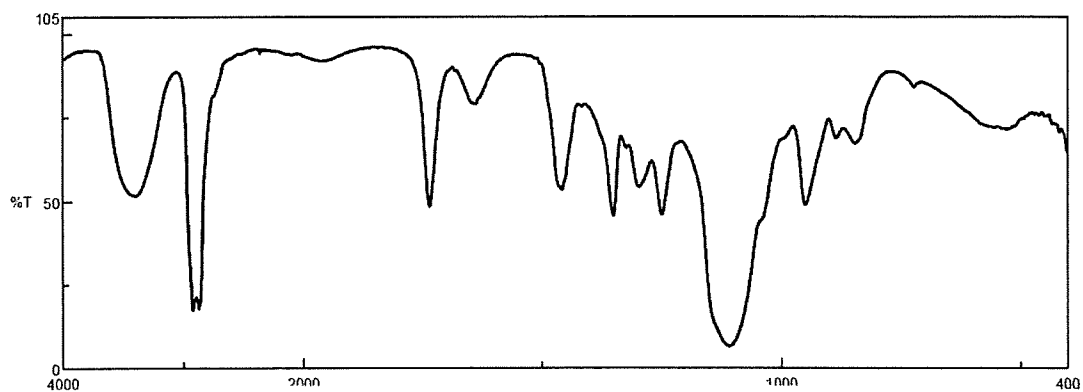


図 2 B社ポリソルベート-20のIRスペクトル

図 9 B社ポリソルベート-20のIRスペクトル

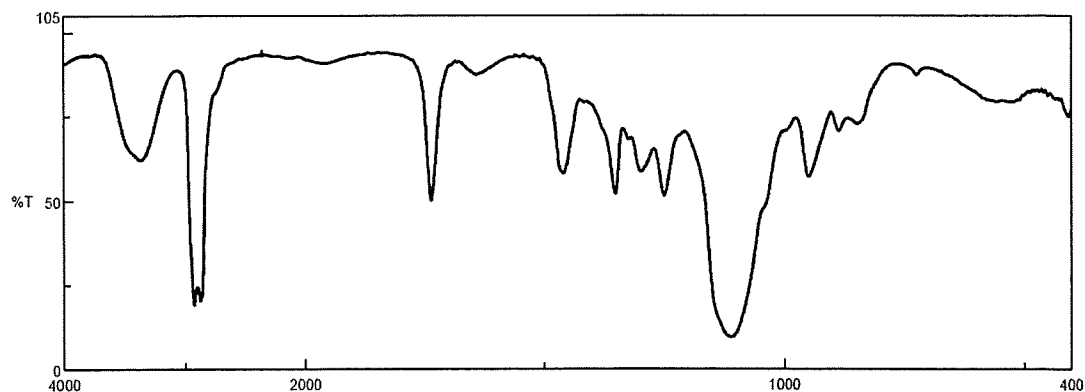


図 3 C社ポリソルベート-20のIRスペクトル

図 10 C社ポリソルベート-20のIRスペクトル