

The interaction of sorbic acid with amino acid may alter the quality of processed foods somewhere in the food chain from production to table

(Received October 11, 2006)

(Accepted February 19, 2007)

Takanori Mine, Yasuyo Okada, Masanori Semma

School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University

Abstract

Foodstuffs are exposed to transient or repeating high temperature in manufacturing and distributing processes. It will be important to establish a simulation method for estimation of the effect of high temperature on the interaction between food additives and food constituents.

The interaction in a solution of sorbic acid widely used as a preservative with amino acids was examined by the momentary heating using an electric oven (microwave heater) or the standing at room temperature. Residual sorbic acid in the reaction mixture was determined by HPLC with UV detection at 254 nm.

Cysteine was most reactive with sorbic acid among 9 amino acids tested in the present study. The sorbic acid in the mixed solution with cysteine decreased in time- and dose-dependent manner of coexisting cysteine under the standing at room temperature.

However, the decrease of sorbic acid in the mixture with cysteine was strongly inhibited by previous momentary heating by microwave irradiation to the solution. The effect of the momentary heating was suspected to be preferentially on cysteine side in the mixed solution.

Key words: sorbic acid; amino acid; cysteine; microwave irradiation; food additive

I. Introduction

Foodstuffs temporarily suffer from transient and/or repeating high temperature exposures in sterilizing process, distributing stage or cooking. It will be significant to establish the simulation method for a short period of time on the quality change of a food additive itself or the interaction between food additives and food constituents by high temperature exposures. The residual sorbic acid (SOA) under the momentary heating using an electric oven (microwave heater) and the standing at room temperature was examined on transient or repeating high temperature exposures between SOA and amino acids. SOA is widely used as a preservative in many processed foods such as cheese, fish meat pastes, smoked products, bean jams, pickles, fruit wines, lactic acid drinks and so on, and amino acids are most common food constituents.

SOA is stable in dry powder or crystal state for a long period at room temperature¹⁾. However, SOA has been shown to develop auto-oxidation in solution or in foods during storage and liber-

ated several carbonyl compounds etc¹⁾. Wedzicha et.al.²⁾ and Khandelwal et.al.³⁾ also reported that SOA reacted gently with thiols or cysteine (Cys) in aqueous solution at 80°C, pH 3.7-5.7 forming labile adducts or 3-hexenoic acid derivative susceptible to hydrolysis. The reactivities of SOA with sulfhydryl groups in proteins and with amines as well as interaction of SOA with anti-oxidizing agents, transition metals, salts, sugars, glycerol, ascorbic acid, nitrous acid etc were reviewed by Scotter et al.⁴⁾. In the present study, we investigated the interaction of widely used reactive substance SOA with amino acids, with respect to the quality change of a food additive on the function of high temperature in the presence of common food constituents.

II. Materials and Methods

1. Electric oven (Microwave heater)

The fixed irradiation type "Imaflex MO-0341" (Imanishi-

Corresponding author: Takanori Mine, Dept. of Hygienic Chemistry, Fac. of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University
11-68, Kyuban-cho, Koshien, Nishinomiya

kinzoku industry Co. Ltd.) was used.

voltage: 100 V, high frequency output: 400 W, oscillating frequency: 2450 MHz, rating power consumption: 800 W, and Size of the heating chamber : width 245 mm, depth 247 mm and height 168 mm.

Microwave irradiation starts readily by closing the oven door after setting the irradiation time and putting a sample bottle on a plate. The irradiation finishes immediately by pushing a stop button. If a stop watch is used, the irradiation control of a second unit will be possible.

2. Reagents

SOA (Wako Pure Chemicals Industry: guaranteed grade), L-Amino acids: glycine (Gly), alanine (Ala), valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), serine (Ser), tryptophane (Try), cysteine hydrochloride/monohydrate (Cys) and methionine (Met) (MP Biomedicals, LLC), Methanol (Wako Pure Chemicals Industry: liquid chromatography grade), Phosphoric acid (Wako Pure Chemicals Industry: guaranteed grade), the ultra pure water prepared in the laboratory was used as purified water.

3. Preparation of standard solutions and combined solutions

SOA standard solution [1,000 μ g/mL]

100 mg of SOA was dissolved in 10 mL of methanol, filling up to 100 mL with purified water.

Amino acid standard solution [1,000 μ g/mL]

Each amino acid standard solution was prepared with purified water to the same concentration of 1,000 μ g/mL

Combined solutions of SOA [100 μ g/mL] and Cys [100 μ g/mL] or each amino acid [1,000 μ g/mL]

Combined solutions of SOA and Cys were adjusted to contain 100 μ g/mL of SOA and Cys. Similarly, adjusted to contain 100 μ g/mL of SOA and 1,000 μ g/mL of each amino acid.

4. High performance liquid chromatograph with a UV detector

- Pump: Shimadzu Corporation, LC-9A
- UV Detector: Shimadzu Corporation, SPD-6A
- Data processor: Shimadzu Corporation, C-R6A Chromatopak integrator
- Column oven: Chromato Science Co. Ltd., CS-300B
- Column: JASCO Corporation, Crest Pack C18S (5 μ m) 4.6 mm I.D. \times 15 cm
- Mobile phase: 50 % (v/v) Aqueous methanol contained 0.05 % (v/v) phosphoric acid
- Flow rate: 0.5 mL/min.
- Detection wave length: 254 nm
- Column oven temperature: 30 $^{\circ}$ C
- Injection volume: 10 μ L

5. Momentary heating

Heating by the electric oven was performed for 3 mL of purified water or test solutions poured in a brown hard-glass bottle (inner volume: 15 mL, outer diameter: 22 mm, height: 50 mm). Test solutions were allowed to stand in the dark at room temperature either just after the microwave irradiation for 30 seconds or without the microwave irradiation. The residual SOA of both test solutions were determined by HPLC by means of the calibration curve obtained by linearly diluted SOA standard solution.

III. Results and Discussion

1. Momentary heating of the solution by microwave

Fig. 1. shows the temperature of the purified water in the bottle immediately after microwave irradiation for 10 to 35 seconds in the electric oven.

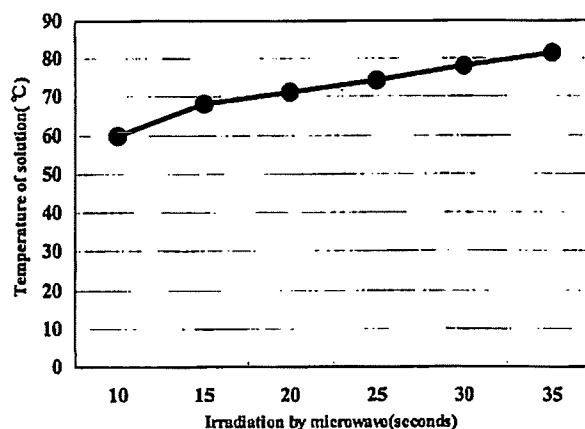


Fig. 1. Momentary heating of the solution by microwave
Each circle represents the mean value of three trials.

The temperature of the water raised from 24 $^{\circ}$ C to 82 $^{\circ}$ C in 35 seconds. Since the concentration by evaporation of the solution in a bottle was suspected over 80 $^{\circ}$ C, the irradiation time was fixed to 30 seconds.

2. Residual SOA in the amino acid combined solutions

Table 1. summarizes the residual percent of SOA in the combined solution of SOA and each amino acid kept in the dark at room temperature for 3 weeks without the microwave irradiation.

As shown in Table 1. the residual SOA was the lowest in the combination with Cys among the nine amino acids tested in the present experiment. Therefore, subsequent experiments were carried out for the combination of SOA and Cys.

Table 1. Residual sorbic acid (%) in the mixed solution of sorbic acid and each amino acid

mixed solution	after 3 weeks	CV% (n=3)
SOA	99.9	0.26
SOA+Gly	95.5	1.00
SOA+Ala	95.3	0.92
SOA+Val	98.7	0.06
SOA+Leu	97.0	0.88
SOA+Ile	97.9	0.36
SOA+Ser	93.7	1.60
SOA+Try	101.3	0.10
SOA+Cys	43.0	2.33
SOA+Met	98.0	0.26

Residual sorbic acid (%) is the sorbic acid concentration that remains in the mixed solution after three weeks as 100% at the preparation. The mixed solution contains 100 μ g/mL of SOA and 1,000 μ g/mL of each amino acid and the pH of these solutions is as follows: SOA(pH3.85), SOA+Gly(pH4.11), SOA+Ala(pH4.09), SOA+Val(pH4.06), SOA+Leu(pH4.08), SOA+Ile(pH4.08), SOA+Ser(pH4.08), SOA+Try(pH4.05), SOA+Cys(pH2.42), SOA+Met(pH4.03). After three weeks, SOA in the solution was analyzed by HPLC.

3. Residual SOA in the Cys combined solution standing at room temperature

Fig. 2. indicates that SOA decreased in time dependent manner about the all of samples.

Furthermore, the decreasing of SOA was suggested to be depending on the dose of coexisting Cys. With respect to the concentration ratio of SOA to Cys was 1:1 for the sample (A) or (C), and 1:10 for the sample (B) or (D) respectively.

Interestingly, this time- and Cys dose-dependent decrease of the SOA was delayed by the previous microwave irradiation for 30 seconds (C and D).

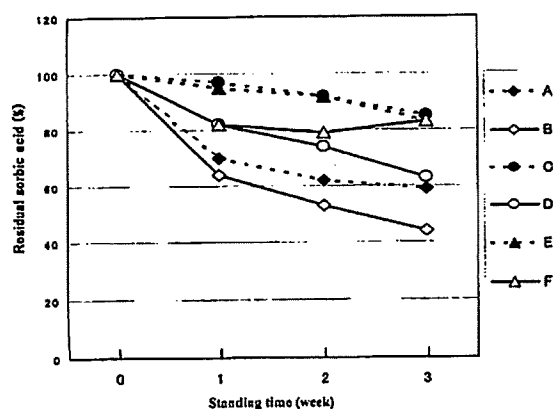


Fig. 2. Residual sorbic acid (%) under cysteine coexistence. Each symbol represents the single analysis value. The mixed solutions of SOA 100 μ g/mL and Cys 100 μ g/mL are A, C and E. The mixed solution of SOA 100 μ g/mL and Cys 1,000 μ g/mL are B, D and F. A and B were kept at room temperature after preparation. C and D were on standing at room temperature after the momentary heating. E and F were adjusted to contain the above concentration of SOA and Cys, where Cys solutions were momentary heated immediately before preparation of the mixed solutions.

4. Effect of the momentary heating on the residual SOA

The effect of momentary microwave heating on the delay of decrease of SOA in combined solution with Cys was examined by reconstruction of the solution for combination of SOA and Cys. Cys solution was irradiated by microwave for 30 seconds immediately before mixing with SOA solution. The mixed solution was adjusted to attain the same concentrations of the reagents to the sample (A) and (B). Thus, sample (E) and (F) were kept in the dark at room temperature. As shown in Fig. 2, both (E) and (F) samples maintained SOA more than 80% after 3 weeks.

In the present study, it was indicated that SOA in aqueous solution could interact with Cys in the form of changing the chemical structure which occurred at room temperature in time- and Cys dose-dependent manner detectable by HPLC. Previous momentary heating of the mixed solution by microwave irradiation could hinder the interaction. The microwave irradiation might affect preferentially on Cys rather than on SOA.

The interaction of food additives with food constituents leading to structural changes in both components should be considered carefully as to the sufficient function of the additives and safety of the foods. The structural change of SOA as a result of the interaction with Cys was suspected to be reflecting either decomposition of SOA or formation of other substances in the solution. Both of the structural changes would spoil the function of SOA in foods containing Cys. On the other hand, it was found that momentary heating by microwave could control the interaction of SOA and Cys in the solution. Details of the interaction and mechanisms of the control are being investigated.

IV. References

- 1) Thakur, B.R., Singh, R.K. and Arya, S.S.: Chemistry of sorbate a basic perspective. *Food Reviews Intern.*, 10(1), 71-91(1994)
- 2) Wedzicha, B.L., Brook, M.A.: Reaction of acid with nucleophiles: preliminary studies. *Food Chem.*, 31, 29-40(1989)
- 3) Khandelwal, G.D., Wedzicha, B.L.: Derivatives of sorbic acid-thiol adducts. *Food Chem.*, 37, 159-169(1990)
- 4) Scotter, M.J., Castle, L.: Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. *Food Add. - Contam.*, 21(2), 93-124(2004)

Acknowledgments

This work was supported by a Grant for Scientific Research Expense for Health, Labor and Welfare Programs from the Japanese Government.

ノ ー ト

食品の製造から流通までの品質変化を想定したソルビン酸とアミノ酸の反応
—電子レンジでの瞬間加熱と室温放置との消長比較—

(2006年10月11日受付)

(2007年2月19日受理)

峯孝則、岡田安代、扇間昌規

武庫川女子大学薬学部

キーワード: ソルビン酸、アミノ酸、システイン、電子レンジ加熱、食品添加物

概 要

食品はその製造から流通過程あるいは調理において、一過性あるいは繰り返しの高温曝露を受ける場合があり、高温曝露により食品添加物自体の化学変化や食品添加物と他の食品成分との相互作用が起こり得る。今回、電子レンジ(マイクロ波加熱器)を用いた瞬間加熱と室温放置での成分間の相互作用について、食品添加物として広く使われるソルビン酸と食品成分として最も普遍的な成分の一つであるアミノ酸について検討した。

供試した9種類のアミノ酸の中で、ソルビン酸との相互作用が最も顕著であったのはシステインであった。そこでソルビン酸とシステインの瞬間加熱と室温放置とを比較したところ、ソルビン酸の残存率は瞬間加熱のほうが高かった。このことから、加熱によりシステイン自体が優先的に化学変化を引き起こしているものと推察され、ソルビン酸による食品中での保存効果を十分発揮させるためには、添加方法も考慮する必要があることが示唆された。

Sensitive and Simple Analysis of Sorbic Acid Using Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

Shizuyo HORIYAMA,*^a Chie HONDA,^a Kiyoko SUWA,^a Yuko UMEMOTO,^a Yasuyo OKADA,^a Masanori SEMMA,^a Atsushi ICHIKAWA,^a and Mitsuo TAKAYAMA^b

^aSchool of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University; 11–68 Koshien-Kyuban-cho, Nishinomiya, Hyogo 663–8179, Japan; and ^bInternational Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University; 22–2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236–0027, Japan.

Received July 30, 2007; accepted January 10, 2008; published online January 11, 2008

Sorbic acid (SA: $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$) and its salts are widely used as preservatives in foodstuff because of their growth inhibitory effects on mold, yeast and a wide range of bacteria. However, it is still unclear whether SA and its salts are actually incorporated in these organisms and a higher organisms like mammalian cells. Acidic compounds such as SA are usually analyzed by HPLC with eluents containing acetic acid, formic acid and their ammonium acetates, but such acidic buffers may suppress the ionization efficiency of the acidic compounds in negative-mode electrospray ionization (ESI). In this study, we present a sensitive and simple method for analysis of SA by HPLC with non-acidic solvents such as $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ by negative ion mode ESI-LC/MS. As a result, SA at less as 30 fmol was selectively determined by the selected reaction monitoring (SRM) mode. It was defined as the peak area with a signal-to-noise ratio (S/N) of 3. Good linearity was obtained in the range from 55 fmol (S/N 3) to 500 fmol ($r^2=0.9968$) for SA by using LC/MS with the SRM mode. We also show that the method is useful to analyze SA level in the cytosol of mastocytoma cells, which were pretreated with SA. These results suggest the applicability of this method for the highly sensitive determination of SA in the mammalian tissues and cells.

Key words sorbic acid; LC/MS/MS; electrospray ionization; selected reaction monitoring

Sorbic acid (SA) and its salts are commonly used as food additives because of their antibacterial and growth inhibitory activities against yeast and fungi. They are used in cosmetics, pharmaceuticals and tobacco products.¹⁾ Since SA and its salts are classified as “Generally Recognized as Safe” (GRAS) additives by U.S. FDA,²⁾ their use in food preservation is considered safe for human consumption. On the other hand, previous reports have shown that SA and its salts exhibit a weak genotoxic potential^{3–5)} including damage to DNA⁶⁾ and alkylating activity on nucleophile 4-(*p*-nitrobenzyl) pyridine (NBP).⁷⁾ Also, Soschin and Leyden reported that SA induced erythema and edema of human skin,⁸⁾ but the mechanism was not clarified.

We are interested in understanding the actions of SA and its salts in terms of the possible cytostatic or cytotoxic effects in mammalian tissues and cells, although few studies have been performed to consider the effect of SA on cultured mammalian cells.^{9,10)}

Incidentally, SA has been analyzed by HPLC with acetic acid or formic acid buffer, but the detection limit for SA was less than 1 pmol (S/N 3) which is not enough to determine the cellular SA level. Thereafter, Negri *et al.* reported that SA in urine could be measured by selected ion monitoring (SIM) of m/z 111.13 with ESI-LC/MS in the negative ion mode with the detection limit of 4 $\mu\text{mol/l}$,¹¹⁾ and Cartwright *et al.*, reported that SA derivative at less than 4 fmol was detected by using ESI-LC/MS/MS using a mixture of acetonitrile and 0.05% (v/v) formic acid in the positive ion mode, and using detection of the SRM mode.¹²⁾ Generally, the SRM mode is more selective and sensitive than the SIM mode, and the technique of SA derivative requires extra time for analysis owing to unwanted side products.

In the present study, we have developed a simple and sensitive method for the determination of SA in cells by using LC/MS in the SRM mode. We performed three experiments. First, to evaluate the optimum detection conditions for trace analysis of SA, we compared the performance of this method with those using ESI and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and positive and negative ion modes based on the peak intensities of the protonated or deprotonated molecular ion. In the analysis of acidic compounds, acid and buffer solvents are usually selected for the mobile phase on an ODS column, but this can suppress the ionization efficiency of these target compounds in the negative ion mode. Second, we compared the use of acid solvents with the use of ammonium acetate and neutral solvents ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$). Third, to evaluate the matrix effect for the analysis of SA using LC/MS with the SRM mode we measured the recovery of SA from the cytosol of SA-preloaded mastocytoma P-815 cells, which are used as a proper model of growing mammalian cells because P-815 cells are favorable for examining growth and differentiation, and also for evaluation of various compounds on cytotoxicity, phototoxicity and immunotoxicity.^{13–19)}

Experimental

Materials SA, guaranteed grade, and LC/MS-grade of H_2O , CH_3OH and CH_3CN were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Guaranteed grades of HCOOH , HCOONH_4 and $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ were purchased from Nacal Tesque, Inc. (Kyoto, Japan). Argon gas (99.99%) used as the collision gas of the SRM mode was obtained from Neriki Gas Co., Ltd. (Hyogo, Japan).

Preparation of Cytosol and HPLC Analysis The procedure for preparation of cytosol from mastocytoma P-815 cells, treated with 2.5 mmol/l SA for 0.5 h is summarized in Fig. 1. SA was extracted and analyzed by HPLC and LC-MS/MS. The HPLC system LC-9A (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: horiyama@mukogawa-u.ac.jp

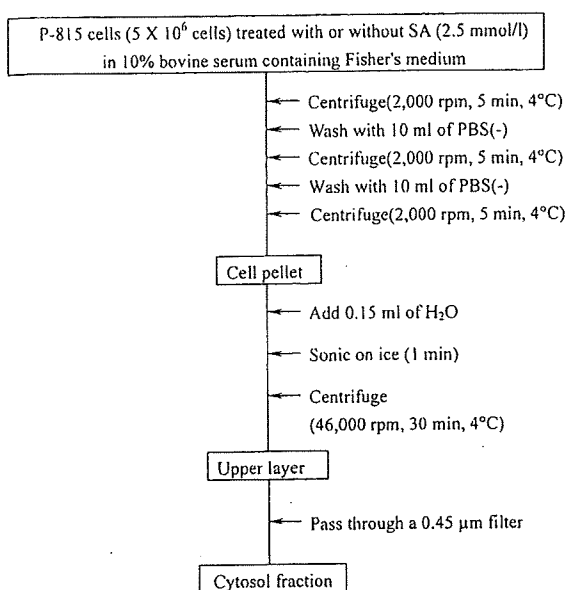


Fig. 1. Flow Diagram for Preparation of Cytosol Fraction from Mouse Mastocytoma P-815 Cells Treated with or without SA

with UV detector SPD-6A at 251 nm (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) was used. Separation was performed on a Handy ODS (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m) from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) with 0.05% HCOOH-CH₃OH (40:60) as the eluent at a flow rate of 0.8 ml/min. SA (10 mmol/l, 10 μ l) was added to filtered cytosol (10 μ l), and then the mixture (10 μ l) was injected to HPLC.

Triple-Quadrupole Mass Spectrometer Conditions A Quattro premier triple-quadrupole LC-MS (Micromass, Manchester, U.S.A.), equipped with an ESI source and an APCI source was used for the MS/MS analyses coupled to the alliance HT Waters 2795 separation module (Waters Co., Milford, MA, U.S.A.). All chromatographic separation using TSKgel ODS-100V (4.6 \times 150 mm, 3 μ m) from TOSOH Co. (Tokyo, Japan) was performed at a flow of 0.4 ml/min. The mass spectrometer was operated at low resolution for both Q1 and Q3 in the SRM mode. Both positive ionization and negative ionization modes were used for analysis. The parameters of the ionization efficiency were optimized by evaluating the sensitivity based on flow injection analysis. SA, 1 mmol/l, was injected at 10 μ l/min by syringe and connected with a line of 0.4 ml/min mobile phase of CH₃OH-H₂O system via a T-joint. The instrumental parameters were optimized with regard to the maximum signal intensity of the protonated molecular ion [M+H]⁺ and deprotonated molecular ion [M-H]⁻ by injections of 10 μ mol/l standard solutions, and the parameters were determined. MS/MS was performed based on the collision-induced dissociation (CID) of the specific precursor ion and the generation of characteristic fragment ions. Subsequently, product ion spectra were obtained by scanning Q3 over the mass range of m/z 45–130. Both Q1 and Q3 quadrupoles' LM and HM resolution values were 15. The flow rate of argon collision gas for fragmentation in the SRM mode was 0.3 ml/min (3.37–3.39 \times 10⁻³ mbar) by which the collisional energy was optimized for the fragment ion of SA. During the SRM analysis, both Q1 and Q3 quadrupoles' LM and HM resolution values were 10.

Results and Discussion

Optimization of MS Conditions To obtain the most sensitive ionization condition for analysis, the ESI and APCI modes were used in both positive and negative modes. In the positive ion mode ESI and APCI experiments of SA, one peak due to the protonated molecular [M+H]⁺ m/z 113 was obtained with low intensity, accompanied by many background noise peaks (Figs. 2A,B). With the expectation of enhancement of the peak intensity in the positive ion mode as an adduct ion [M+NH₄]⁺, 5 mmol/l HCOONH₄-CH₃CN was used as an eluent. The signals of [M+NH₄]⁺ as well as [M+H]⁺ did not appear. In the negative ion mode ESI and

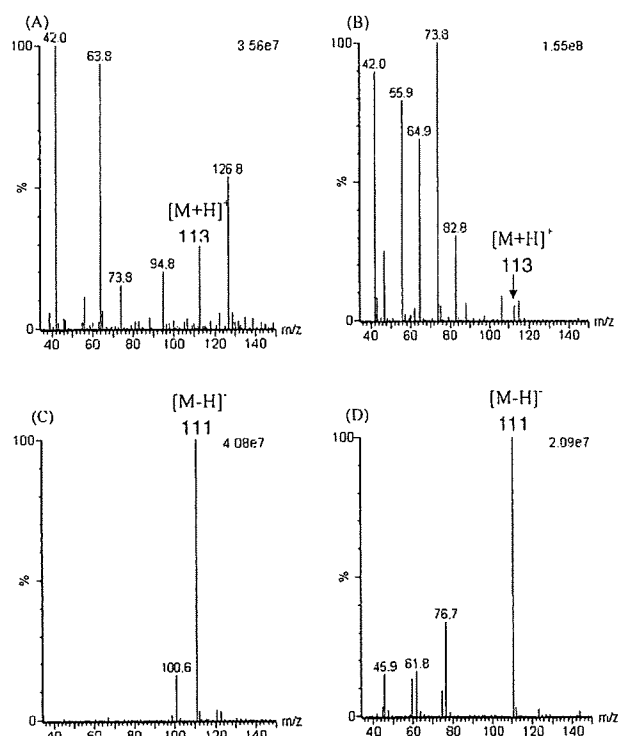


Fig. 2. ESI and APCI Mass Spectra of SA: in the Positive Ion Mode (A) ESI, (B) APCI; in the Negative Ion Mode (C) ESI, (D) APCI

APCI experiments, one peak due to the deprotonated molecule [M-H]⁻ m/z 111 was obtained as the base peak and lesser peaks appeared (Figs. 2C, D). The peak intensity at m/z 111 in the negative ion mode was higher than m/z 113 in the positive ion mode. As SA includes a carbonyl group, it is not a good proton acceptor but is a good proton donor compound.

Our preliminary experiments indicated that the signals of [M+H]⁺ and [M-H]⁻ increased significantly when the voltage of the cone increased from 17 to 20 for ESI and to 17 for APCI study. The parameters of the analyzer were optimized when the source and desolvation temperatures were 120 °C and 350 °C for ESI, 150 °C and 200 °C for APCI, respectively, and the probe was 200 °C for APCI. The gas flow rate (l/h) of the cone and desolvation were 100 and 1000 for ESI and 50 and 200 for APCI, respectively. The capillary voltage was 3.5 kV for the positive ion mode and 3.2 kV for the negative one.

Optimization of MS/MS Conditions In MS/MS studies, both ESI and APCI interfaces were used in conjunction with the flow injection system for optimization of the MS/MS parameters. The product ion mass spectra of protonated and deprotonated molecule ion, [M+H]⁺, m/z 113 and [M-H]⁻, m/z 111 of SA were obtained in the scan range of m/z 35–150. As can be seen in Fig. 3, the major ions at m/z 67 and 95 appeared in the positive ion mode, and m/z 67 was absorbed in the negative ion mode ESI and APCI production mass spectra. Therefore, the mass transition patterns, m/z 113 \rightarrow m/z 67 and 95 were selected to monitor SA in the positive ion mode, and m/z 111 \rightarrow m/z 67 was selected to monitor SA in the negative ion mode and in SRM analyses under ESI and APCI modes. The extent of the fragmentation of the precursor ion depends on the collisional energy. The effects of

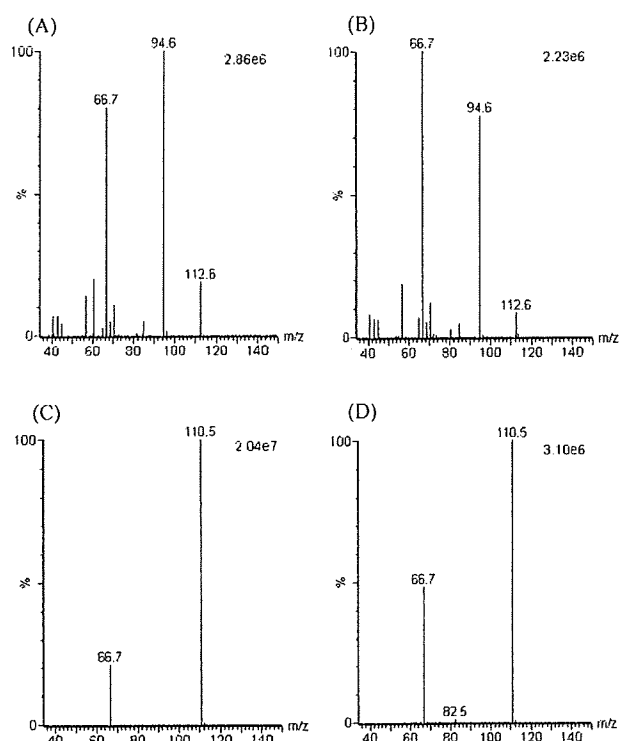


Fig. 3. Product Ion Spectra of SA under Optimized Collisional Energies: from the Precursor Ion m/z 113 (A) ESI, (B) APCI; from the Precursor Ion m/z 111 (C) ESI, (D) APCI

this energy on the fragmentation efficiencies were also investigated to generate the maximum MS/MS performance of this mass analysis. When the collisional energies of 5–20 eV were examined, the maximum performance was reached at the collisional energy of 11 for the positive ion ESI mode, 9 for the negative ion one, 13 for the positive ion APCI mode and 11 for the negative ion one. SRM chromatograms of SA were obtained under these conditions. The maximum peak area was obtained in the negative ion ESI mode and less than 1/20 times of area was obtained in negative ion APCI mode. Under the positive ion ESI and APCI modes, no desirable results were obtained, and therefore the negative ion ESI mode was used for SRM analysis of SA. The mass transition patterns of m/z 111 \rightarrow m/z 67 indicate $[M-H]^-$ breakdown to $[M-CO_2H+H-H]^-$.

LC Optimization We tried to use 0.05% HCOOH-CH₃OH, an eluent usually used for HPLC analysis of acid compounds. Under acid eluent conditions, we did not obtain a sufficient peak area of m/z 111 \rightarrow 67 for quantification of SA in the cells (Fig. 4A). Under ESI conditions, the ionization efficiency depends on both the chemical nature of the sample and the presence of contaminants. For a high sensitivity of analyte under the negative ion mode, such as for the acid compound SA (pK_a 4.6²⁰), the anion form must be retained in the eluent. For this reason, the ionization efficiency of SA would be suppressed in an acid eluent. To solve this problem, we tried to use 5 mmol/l HCOONH₄, 5 mmol/l CH₃COONH₄ and H₂O as eluents, and evaluated them for ionization efficiency based on the peak area of the SRM chromatogram of SA. SRM chromatograms of SA, the mass transition pattern, m/z 110.8 \rightarrow 66.8, obtained with these eluents are shown in Figs. 4B and C. The maximum peak area

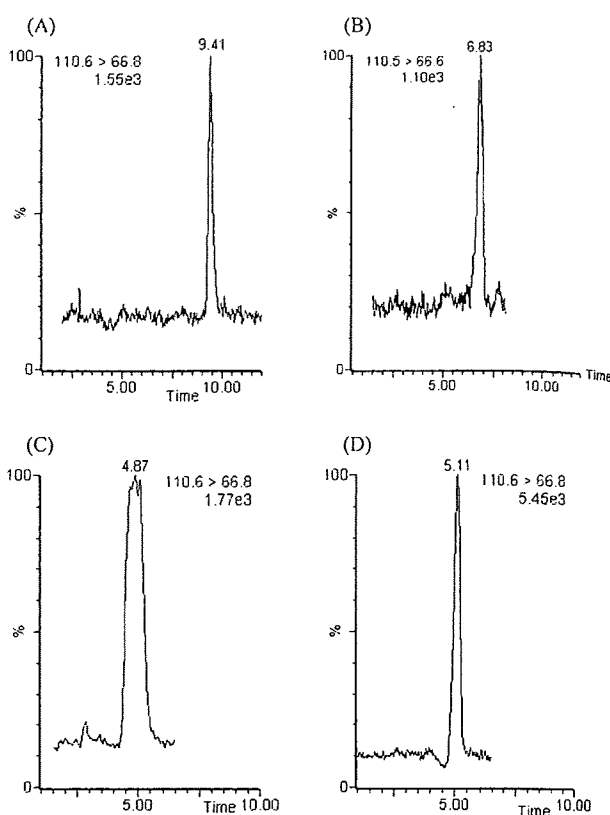


Fig. 4. SRM Chromatograms of SA: (A) 0.05% HCOOH-CH₃OH (40:60), 2500 nmol/l of SA, 5 μ l Injected; (B) 5 mmol/l HCOONH₄-CH₃OH (60:40), 1000 nmol of SA, 5 μ l Injected; (C) CH₃OH-H₂O (40:60), 500 nmol/l of SA, 5 μ l Injected; (D) CH₃CN-H₂O (40:60), 500 nmol/l of SA, 5 μ l Injected.

Table 1. Effect of Eluent on Ionization Efficiency

Eluent	pmol	Peak area	Peak area ratio
0.05% HCOOH-CH ₃ OH	12.5	322.827	1
5 mmol/l CH ₃ COONH ₄ -CH ₃ OH	5.0	96.244	0.7
5 mmol/l HCOONH ₄ -CH ₃ OH	5.0	267.656	2.1
H ₂ O-CH ₃ OH	2.5	1152.039	17.8
H ₂ O-CH ₃ CN	2.5	1500.347	23.2

of SRM was obtained under H₂O conditions (Fig. 4C), and 5 mmol/l HCOONH₄ condition (Fig. 4B), was better than 5 mmol/l CH₃COONH₄. With respect to the peak sharpness in chromatographic resolution, the mobile phase composed of CH₃OH/CH₃CN-H₂O was optimized in terms of both band broadening and ionization efficiency. In this study, the CH₃CN-H₂O mixture (40:60) gave symmetrical peaks and better detection sensitivity than the CH₃OH-H₂O (40:60) mixture (Fig. 4D). The effects of the eluents on ionization efficiency are shown in Table 1 as peak area ratios.

Sensitivity and Matrix Effect Using these optimized conditions, calibration was performed at five different concentrations by LC-ESI-MS/MS with the SRM method. The calibration graph for SA was generated from the peak areas of the mass transition pattern, m/z 110.8 \rightarrow 66.8 in SRM method. A calibration curve was constructed using the least-squares method of quantities versus peak area. The linearity was good up to 1000 fmol ($r^2=0.9982$), and the detection

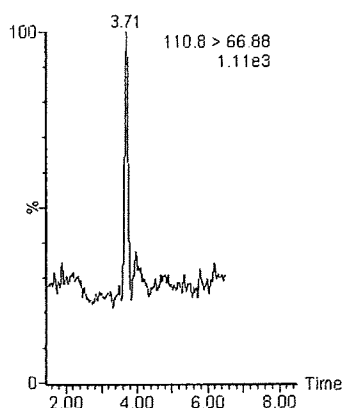


Fig. 5. SRM Chromatogram of Cytosol Fraction from P-815 Treated with SA

Eluent: CH₃CN-H₂O (40 : 60); flow rate: 0.4 ml/min.

limit was 30 fmol (S/N 3).

Next, the matrix effect was evaluated by comparing the peak areas of the cytosol blank spiked with SA to those prepared in the mobile phase at the corresponding concentration. A linear calibration curve was constructed using the same method mentioned above. Good linearity was obtained up to 500 fmol ($r^2=0.9968$) and the detection limit was 55 fmol (S/N 3). By using this SRM chromatogram of the SA (Fig. 5), we examined the content of SA present in the cytosol fraction of P-815 cells, which were pretreated with 2.5 mmol/l of the acid for 0.5 h, and followed by washing by PBS according to the procedure described in Fig. 1.

On the other hand, compared the UV-HPLC analysis with the ESI-LC/MS/MS in operation time, the former required about 45 min while the latter took only about 8 min. Furthermore, the detection limits of SA in the former vs. the latter were 1 pmol (S/N 3) and 55 fmol, respectively. These results showed that the LC/MS/MS method was more rapid and sensitive than the HPLC-UV method. Under ESI conditions, slight ionization suppression was observed and the retention time of SA was slightly shorter than the standard one. This may have been caused by the cytosol fraction in what some call the matrix effect and may depend on the number of P-815 cells. However, although the retention time was changed, it was possible to detect SA by the SRM method. By using the SRM method under the conditions described above, the average of SA level recovered from the cytosol of P-815 cells, which were preloaded with SA (2.5 mmol/l) for 0.5 h, was 160 fmol/ 5×10^6 cells ($n=3$). On the basis of antibacterial activity of SA, it is assumed that the acid would be incorporated into yeast and fungi.¹⁾ However, so long as we know, there is no published date dealing with the incorporation of the acid in those organisms. In addition, compared with microorganism, the metabolism of SA has not been examined at all in mammalian tissues and cells. Therefore, the value mentioned above may be the first preliminary data suggesting the incorporation of SA in mammalian cells. However, it surely needs to determine the cellular localization of SA in the mammalian cells.

There have been several papers concerning designs to improve the specificity or sensitivity of SA determination. For example, Cartwright *et al.*¹²⁾ studied the derivatisation of carboxylic acid groups for enhancement of sensitivity, and

Negri *et al.*¹¹⁾ studied the single ion monitoring (SIM) technique for determination of SA in urine. However, the derivatisation reaction procedure requires extra time and produces unwanted side products. Also, the SIM technique is less selective and sensitive than SRM. This method could be applicable for the determination of trace amounts of SA in the mammalian tissues and cells.

Conclusion

In this study, we established a highly sensitive and specific analysis of SA via LC-negative ion ESI-MS/MS (SRM method) using a CH₃CN-H₂O system as an eluent of HPLC. This eluent system is effective for detecting acidic compounds in the negative ion mode, because it retains the anion form in the eluents of neutral pH. This is the first demonstration of a non-acidic and non-buffer eluent being used for highly sensitive analysis of SA. In addition, the method using our non-acidic and non-buffer eluent system is very simple and swift for the detection of SA in the homogenate of mastocytoma P-815 cells; the detection limit was 55 fmol and good linearity was obtained up to 500 fmol. This SRM method may be applicable to determine the localization and metabolic effect of SA in mammalian tissues and cells.

Acknowledgments The authors would like to thank Ms. N. Kato (Waters Co.) for her interesting suggestions and technical support.

References

- 1) Thakur B. R., Singh K., Arya S. S., *Food Rev. Int.*, **10**, 71–91 (1994).
- 2) (U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.) FDA List of Food Additives that are Generally Recognized as Safe (GRAS) U.S. GPO: Washington, DC, (2005).
- 3) Münzer R., Guigas C., Renner H. W., *Food Chem. Toxicol.*, **28**, 397–401 (1990).
- 4) Würzler F. E., Schlatter J., Maier P., *Mutat. Res.*, **283**, 107–111 (1992).
- 5) Ferrand C., Marc F., Fritsch P., Cassand P., *Food Addit. Contam.*, **17**, 895–901 (2000).
- 6) Ferrand C., Marc F., Fritsch P., Cassand P., de Saint Blanquat G., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3605–3610 (2000).
- 7) Perez-Prior M. T., Manso J. A., del Pilar Garcia-Santos M., Calle E., Casado J., *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 10244–10247 (2005).
- 8) Soschin D., Leyden J. J., *J. Am. Acad. Dermatol.*, **14**, 234–241 (1986).
- 9) Schlattler J., Wuergler F. E., Kraenzlin R., Maier P., Holliger E., Graf U., *Food Chem. Toxicol.*, **30**, 843–851 (1992).
- 10) Sugihara N., Shimomichi K., Furuno K., *Toxicology*, **120**, 29–36 (1997).
- 11) Negri S., Bono R., Maestri L., Ghittori S., Imbriani M., *Chemico-Biological Interaction*, **153–154**, 243–246 (2005).
- 12) Cartwright A. J., Jones P., Wolff J.-C., Evans E. H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 1058–1062 (2005).
- 13) Altevogt P., *Cancer Res.*, **46**, 2912–2916 (1986).
- 14) Keler T., Kovats E., Nguyen V., Samu J., Sanavi F., Somlyo B., Nowotny A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 1033–1041 (1987).
- 15) Smialowicz R. J., Luebke R. W., Riddle M. M., *Toxicology*, **15**, 235–247 (1992).
- 16) Davis N., Liu D., Jain A. K., Jiang S. Y., Jiang F., Richter A., Levy J. G., *Photochem. Photobiol.*, **57**, 641–647 (1993).
- 17) Waterfield E. M., Renke M. E., Smits C. B., Gervais M. D., Bower R. D., Stonefield M. S., Levy J. G., *Photochem. Photobiol.*, **60**, 383–387 (1994).
- 18) Howard T. T., Lingerfelt B. M., Purnell B. L., Scott A. E., Price C. A., Townes H. M., McNulty L., Handl H. L., Summerville K., Hudson S. J., Bowen J. P., Kiakos K., Hartley J. A., Lee M., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 2941–2952 (2002).
- 19) Mahadevan B., Luch A., Bravo C. F., Atkin J., Steppan L. B., Pereira C., Kerkvliet N. I., Baird W. M., *Cancer Lett.*, **227**, 25–32 (2005).
- 20) Pethybridge A. D., Ison R. W., Harrigan W. F., *J. Food Technol.*, **18**, 789–796 (1983).

生産量統計を基にした 食品添加物摂取量推定に関する研究

生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定研究グループ
グループ員・研究業務委任受託者 高野 靖

1. はじめに

この報告は、厚生労働科学研究費(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研究」の分担研究「食品添加物の規格基準の向上と摂取量推定に関する調査研究」(分担研究者：国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第一室 佐藤恭子室長)の中で、「生産統計を基にした食品添加物の摂取量の推定」に関する研究として、平成17, 18, 19年度を通じて行われた調査研究のまとめとして、平成20年3月に提出された報告書の抜粋である。平成16年4月から平成17年3月までの1年間に、製造あるいは輸入された指定添加物の量から、国民一人当たり一日の摂取量を推定したものである。

本調査研究は昭和60年(1985年)に第1回の報告を行って以来ほぼ3年毎に1回継続的に実施されてきたものであって、その第8回調査研究のまとめである。

昭和50年当時は食品添加物の使用に関する一般の人々の不安が強く、食品添加物の使用の実態、国民の摂取量の実態を明らかにする事が強く望まれていた。そこで厚生省(現厚生労働省)は昭和54年から食品添加物の一日摂取量調査を実施し、色々な調査方法を検討した結果、市場から食品を購入しその中に含まれる食品添加物を分析して食

品添加物の一日摂取量を推定するいわゆるマーケットバスケット方式による方法と、国内の食品添加物製造業者及び輸入業者にたいするアンケート調査を基に食品添加物の一日摂取量を推定するいわゆる生産流通調査方式による方法が並行して継続的に行われてきた。

ここで報告される後者の生産流通調査方式による調査には企業の理解と協力が不可欠であり、1,000社に及ぶ食品添加物関連事業者を会員としている日本食品添加物協会が厚生労働省の調査研究の一端を担うという形で実施されてきた。このような行政の指導と業界の協力による統計調査が継続的に行われるのは世界にも例のない貴重なものであり、我が国の食品添加物の安全性確保、リスク管理状況の把握、規格基準の設定、消費者への啓発等の基礎資料としても大きな役割を果たしてきた。

本調査研究は3年を1サイクルとして行われ、初年度は食品添加物の生産・輸入・販売業者に取扱量についてのアンケート用紙の配布と回収に当てられる。アンケート用紙を配布する業者の選定は厚生労働省が全国保健所の協力の下に作成している「食品添加物製造(輸入)業者名簿」に基づいて過去の調査結果を加味して行われる。なお、事業者に送付したアンケート調査票には、集計した調査結果を公表する予定である旨を明記した。

2年度は回収されたアンケート結果を点検し記載に間違いはないか、食品以外の用途に使われているものがそのまま記載されていることがないか等の記載の不備を調べ、必要な場合は再調査を行い集計精度の向上を図る。また本調査は行政が行っている統計法に基づく指定統計ではなく厚生労働省の調査研究費によって行われているものであり、アンケートの回答に強制力を伴っていない。従って回答のない企業に対しては再調査等の対応を要することとなる。

最終年度（3年度）は整備された再集計データに基づき業界各分野に詳しい専門家からなる調査研究班の集中的作業によって品目ごとに純食品向け査定量を定める。すなわちアンケートの結果を集計して得られた純食品向け出荷量を基に、貿易統計などにより明らかになる添加物の動き、業界紙の見積もり出荷数値、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を行い、また医薬品・化粧品・プラスチック添加剤等食品以外に転用されたり、食品添加物グレード品が新たに食品添加物合成原料に使われたりしている可能性や、輸入加工食品に伴って国民の口に入る添加物の可能性推定を調査考察しながら純食品向け査定量を決定する。

さらに食品添加物が食品加工に提供された後の人の口に入るか否かの点検、すなわち食品廃棄損失、食品加工時の損失、食品流通、保存時の損失なども考察した上で摂取量を定める。この摂取量を人口で割ることによってこの調査研究が目的としている一人一日摂取量が算定されるのである。

本報告書ではこのようにして得られた食品添加物品目ごとの一人一日摂取量をADIとも対比して一覧表として掲げている。本報告が食品添加物業界の方々、食品添加物の研究に従事して居られる方々に参考になれば幸いである。

最後に、本調査研究グループのリーダーとして終始ご指導いただいた元神戸学院大学教授 藤井正美氏に厚く感謝を申し上げたい。

また本調査研究にご協力いただいた企業、企業関係者の皆様方にも深くお礼を申し上げる次第である。

2. 調査方法

本食品添加物生産・流通調査は、日本国内の食品添加物製造事業者・輸入販売事業者に調査表を送付し食品添加物原体（食品添加物の文字が表示されていて出荷されるもの及び自家消費されたもの：食品添加物グレードの用語とほぼ同じ）の種類・生産・販売・使用についての量的調査である。

本調査では、指定添加物（食品衛生法施行規則別表第1に掲げられている添加物）について平成16年度の生産・販売・使用を対象に調査を行った。

この指定添加物を対象とした調査は昭和59年度第1回報告（昭和60年3月末）を行って以来、第2回を除き毎年3年毎に行われ継続、今回は第8回目の調査結果である。

1. 平成17年度調査

- (1) 調査法 アンケート方式（資料I：送付調査資料一式）
- (2) 調査対象年度 平成16年度あるいは平成16年を含む近々の1年間
- (3) 調査対象 指定添加物370品目
- (4) 調査内容
 - ① 業務の形態
 - ② 製造又は輸入した品目名
 - ③ 食品添加物としての出荷量及び自家消費量
 - ④ 食品添加物原料としての使用状況
 - ⑤ 食品用としての使用量
 - ⑥ 輸出力
 - ⑦ 食品以外への使用分野
- (5) 調査対象製造所

原則として、平成12年に厚生省生活衛生局食品化学課が調査を実施し作成した「食品添加物製造

（輸入）業者名簿」（平成12年1月現在）を使用し、指定添加物の製造または輸入の営業の申請を行っている業者の全製造所、および平成11年度の第4回調査、追調査で追加された業者をベースにし、7回目までの調査結果等の情報を加味して調査対象を拡大した。

複数の事業所を有するところは本社でまとめて報告してもらった。

1-2. 平成18年度調査（17年度調査の追調査）

追加調査とは調査報告未到着の企業への再発送、報告は届いたが例年の報告に比して確認を要する内容である場合の問い合わせ、新たに加わっ

た、あるいは判明した食品添加物事業所、あるいはその他の集計上理解困難な場合の記述（電話等による確認方式）が主なものである。

(1)調査法 (2)調査対象年度 (3)調査対象 (4)調査内容は平成17年度と同一とするが、近々の1年間のデータでも差し支えないとしている。

(5)調査対象製造所は、
○17年度未回答のうち、明らかに該当しないものを除いた279社
○回答を検討した結果新たに追加すべきとされた8社
計287社を対象とした。

2. 調査表回収結果

表2-2 調査票回収結果

(1) 回収結果

	第7回			第8回		
	14年度	15年度	合計	17年度	18年度	合計
発 送	500	137	508	1059	287	1079
回 収	369	69	438	743	128	868
回収率(%)	73.8	48.9	86.2	70.2	44.6	80.4

(2) 回収率の比較 (%)

	第2回 (昭和62年対象)	第3回 (平成元年対象)	第4回 (平成4年対象)	第5回 (平成7年対象)
回収率(%)	62.7	89.3	90.8	90.4
	第6回 (平成10年対象)	第7回 (平成13年対象)	第8回 (平成16年対象)	
回収率(%)	89.0	86.2	80.4	

第1次調査（17年度）では70.2%、18年度実施された追調査により、最終的には80.4%となった。過去の平均回収率よりはやや低いですが、これは調査対象を拡大したためであり依然高水準であり、絶対数（868）は前回のほぼ2倍であった。

なお、回収率100%が望ましいところであるが、本調査対象は市場シェアとくに国内産から輸入へ

の移行等変動が激しく、これを注意深く見守り調査対象を上げる必要がある。量的影響を与える事業所には更なる繰り返し調査も行っており、かかる点から、指定統計並の統計値が得られる90%程度の回収率を目指して継続して努力する必要がある。

3. 調査表集計上での問題点

本調査も8回を重ねて調査票への記入の間違いは減少しているが、不注意で単位を間違っているもの、調査票Ⅱの品名欄に複数の品名を書いているもの、企業番号のないもの等が散見された。電話連絡等で出来るかぎり修正を行った。

3. 調査結果のまとめ方、査定及び総括表

3年間を要する本調査の8回目、平成17、18年度の一日摂取量査定等の一括調査結果（データ）を表3-1（用途別）と表3-2（添加物名アイウエオ順）に一括する。これらは指定添加物につき、その製造・輸入業者名簿によりアンケートを発送し膨大な項目数の数値を処理し、点検し、再度アンケート等を行ない、生産流通量を整理したのち、約1年かけて食品添加物別1日摂取量を求めるための作業を進めた結果である。最終作業が統計法による各種指定統計で行われる工業統計と異なる。食品添加物の統計処理目的は何がどれ位生産流通しているかではない。厚生労働大臣の指定する食品衛生法の各添加物は当該物質の資料により安全性を評価し、ADIに基づく十分な安全許容範囲で、さらに必要あれば使用基準による使用方法規制を加えて添加物が指定されている。また指定された物は医薬品の如く製造者ごとに品目の承認を要することなく、製造業の許可のみで生産し、販売し、かつ使用も出来る開放型の生産・使用物質となる。食生活が自由であり、国民の志向によって徐々に変化してゆくとき、当初の使用基準の背景となった当該添加物の国民1人あたり1日摂取量とADIの相関による安全性が常に維持されているかどうかは行政としては把握体制が必要である。

本調査は昭和57年に始められた。以降一貫して原則として手法はそのまま継続され、専らこの内容の充実をはかりながら引き継がれてきている。

(1) アンケート申告生数値の取扱い

アンケートは食品添加物グレード（出荷時、食

品衛生法の規程による食品添加物〇〇の表示をした製品）として生産し、あるいは輸入して出荷した量とその輸入量および輸出货量。さらに製造または輸入した量の内医薬用、化粧品用等食品用以外に販売した数量を除き、食品用として前年販売した量を「純食品向け出荷量」としてアンケートの中に記すようお願いされている。食添グレードあるいは純食品向け出荷量の積算値は、当該品目の製造販売業者の担当や業界誌記者は勘として大体を把握している。本調査研究班もこうした面の熟達者によって構成されており、その根拠を勘のみではなく、アンケート集計結果に基づいて行っているのであるが、逆に報告値に拘束される。報告のあるなし、数値ミスなどがまず勘案されなければならないが、さらに、整理された積算が大きな間違いのないものであるか、業界誌あるいは班員の市場見積りとの整合性の検討がどうしても必要である。3年間を要する作業の因でもある。エラーがあると数値的バランスがくずれて来るので慣れた者が眺めると割り合い容易にチェック出来る。報告企業名から最後まで報告の来なかった会社も解るし、他に輸入貿易会社の存在も想定されてもくる。こうした再確認の作業は主として2年目に行われている。

(2) 純食品向け査定量

一方において、指定添加物はどういう食品にどれ位の率と量で使われているか、変化がある程度食品動向から予測できる。そのため、最終集計値の見積もり（総括表の純食品向け査定量）時には最新の食品産業統計等から加工食品生産変動なども勘案して、アンケートにおける申告集計とを勘案しながら年間国内供給量を全員で討議し査定を進めている。この作業がもっとも専門性を要する部分である。従前から研究班で解りにくいものに無機薬品工業会の生産物があった。工業用、局方用、食添グレード、試薬など製造元は一括生産し、近年同一品質物が色々な規格に適合してしまうところから、出荷の際要請による表示包装物に入れ

られ出荷されている。通例、製造と出荷販売の間に卸業があり、アンケートの製造業者は用途先を必ずしも把握していない。本調査でも、前回に引き続き無機薬品工業会の調査結果を参考に食品・食品添加物業界の動向を加えて処理している。

以上は一つの解決例であるが、全般的に食品添加物は食品添加物用以外の用途をもっているのが通例である。医薬品、医薬品添加剤、化粧品、飼料添加物はもとより、近年の化学物質に対する世の中の安全性への関心は食品添加物が使われているとの説明にもなり、プラスチック添加剤、家庭用衛生用品成分、農薬等、意外な例に食添グレード塩化カルシウムが融氷剤として冬季都市の傾斜道路におかれているのを見る。アンケートでは念のため「純食品向け出荷量」を設問し、かつ、食品グレードの食品外用途量記入欄も付しているが、不明申告も多く、多くは査定作業の対象である。一般的ながら輸入商社の場合は純食品用途等に関心が薄い例が多い。このような場合、使用食品生産量から逆算方式で辿ってゆくが定量的とは称し難い。査定値を有効数字2～3桁で示している理由でもある。

この食添グレードのアンケート集計で定量材料にもっとも注意されるのが、生産され、出荷された食添グレードたる製品純度の高いを原材料として新しい添加物が合成されるケースで、調査しないと二重積算となる。かつてのリン酸がいい例でリン製造所から食添グレードリン酸が売られ、リン酸化合物メーカーが購入して各種リン酸塩を合成している。需要によってナトリウム塩がカリウム塩に再度変えられる場合もある。その他クエン酸、水酸化ナトリウム、安息香酸、アスコルビン酸等々同一系品目群にはすべて注意と確認が要求されている。

(3) 摂取量 (T) と 1 日平均摂取量

表 3-1, 3-2 には「摂取量 (T)」の欄がある。食品に添加物が使用されるのは加工食品と郊外レストランチェーンで一括調理される半調理食品な

ど量的に大きい。当然、製造中の損失、流通時の廃棄、飲食店と家庭での期限切れ廃棄と食べ残しが主要なものと考えられる。本調査を研究班では人の口に入らない食添量を原則として第1回目10%。第2回、15%、第3回以降20%と見積って×0.8をもって実際に人の口に入っている摂取分量と思考して来たが、第6回報告書以降そのよってきたる所以を検討しこれを記し(第5章)、廃棄(損失)率20%を継続することとした。

単純な摂取(査定)量は純食品向け査定量の0.8掛として算出されているが、本報告書では輸入食品を勘案しなければならない対象添加物があり、的確な食品別統計が乏しいので正確性は到底期しがたいが、第6章のような論拠から、見積り計算して逆にプラスしてあるので必ずしも×0.8と一致しないものが増えている(各論参照)。

複雑な見積りの添加物も多い。たとえばトウフ凝固用添加物が何種類もあり、凝固排液に出るもの、おからまたはトウフに残留するもの、また充填トウフの場合ほか凝固剤情報は全国豆腐工業会資料によっている。めん類の添加物の場合ゆでた煮汁への逸出量が要求される。膨脹剤は化合物分解があり、酸・アルカリ中和の場合は元の添加物はない。澱粉の糖化の場合をシュウ酸を進め、水酸化カルシウムを加えてシュウ酸カルシウム沈殿濾去のケースでは人の摂取量は零と見積られる。他でもシュウ酸は二酸化炭酸と水になることもある。これらは各種実験結果がある場合は参考となるが、ないときは科学技術庁の栄養成分表を用い、大豆とオカラのカルシウムと豆腐のカルシウムから塩化カルシウムの残存量を計算する方法をとっている。

摂取量 (T) までの数値は特殊な見積り計算をした場合は、いちいち記録にも残せないで積算値で示している場合もあるが、原則として有効数字2桁とし、内容によって1桁まとめ3桁表示も採用している。これは年間食生活供給添加物量から1人1日平均摂取量を求める計算は今回であれ

ば、平成17年人口12,800(万人)で除し、さらに365(日)で除している。即ち467(億)2,000(万)での割算となるが、1日摂取量はmg数となり、添加物の安全上計算はμg単位までで十分とし、総供給量の査定では随所で4捨5入によって桁数を丸めている。一方1日摂取量計算の割り算も簡便化のため463億で行っているが、計算であるため、数値だけはmg小数点以下3桁(μg)まで表示してある。

(4) 出荷量、純食品向査定量 摂取量(T)の例示
表3-3に出荷量の上位ランキング10品目を例示し標記の3数値を示す。

各種集計表における純食品向け出荷量は企業の添加物毎の申告値積算量である。したがって、食品グレード出荷量の数値がもっとも多い品目があるが、多くは純食品向け量が解らないとする回答であり、本調査報告では省略してある。次の右欄は研究班が、アンケートの純食品向け出荷量ではあるが、この数値には不明の医薬品向け、再合成原材料向けも含まれるとして、人の口に実際に入る摂取食品用としてこれくらいが出荷されたとして査定した数値である。

一般の指定統計ではこういうことは許されないし、かかることをするシステムにはなっていない。

何故かかる作業をするのか、一例を記す。炭酸水素アンモニウムは膨脹剤である。加熱されてCO₂とNH₃となり気化する。食添グレード品の圧倒的使用先は発泡プラスチック、発泡ゴム製品用で、食添用は僅かなオコボレが使われている量的関係になる。労働環境において化学的物質がガス化する。食添グレード製品であれば労働者も安心感をいなく。これらの取引は薬品問屋や工業薬品販売業が取り仕切っており、添加物製造元は馴染みがなく食品だと申告してくる添加物グレードである。

二酸化炭素その他の解説がその例になろう。大きな数値は食品には吸収されないドライアイス量が多く、人摂取は炭酸飲料、発泡酒または焼酎加工用である。また炭酸利用加工は、とにかく気化しやすく取り扱い上随所でロスを生じる。次亜塩素酸ナトリウムは食品グレードが要求されるが水道原水向け使用は、原水は食品ではないから、食添ではない。食添使用量は生野菜、モヤシの殺菌剤。給食では野菜消毒に使用が義務づけられている。調理場衛生の殺菌剤としても必ず食添グレードが用いられているが人の摂取と関係しない。L-グルタミン酸ナトリウムはかつてように原料からの醗酵による国内製造ではない。原料(糖蜜)産

表3-3 申告値集計上位10品目添加物の純食品向査定量と摂取量計算の対比例(第8回分)

(単位:トン)

食品添加物名	純食品向出荷量 (申告値)(トン)	純食品向査定量 考察値(トン)	摂取量 (人の体内入り)
水酸化ナトリウム(無水物換算)	834,200	> 75,000	0
次亜塩素酸ナトリウム	189,790	> 200	0
二酸化炭素	147,491	= 147,500	13,200
塩酸	145,500	> 100,000	0
L-グルタミン酸ナトリウム	101,759	= 101,800	81,400
D-ソルビトール	65,920	< 97,800	69,400
クエン酸(無水物換算)	36,000	> 25,000	20,000
炭酸水素ナトリウム	27,700	> 12,000	5,800
アンモニア	26,800	> 2,000	0
炭酸ナトリウム	26,600	> 10,000	1,600

地でL-グルタミン酸または1-グルタミン酸ナトリウムを製造し、輸入する形となっている。その製造輸入メーカーは限られているが、他の外国産安価品の輸入業者も現れ、申告会社外取引がアンケート数値に出て来ない。加工製品、食品供給量を数値計算化すると申告値を上回る。

D-ソルビトール：荷動きが大きい。国内生産に限界があるのに相場が上昇しない。海外流れタマを拾う貿易商も考えられ、国内需要から査定すると増加量を計算しなければならない。

塩酸は解りにくい製造用添加物である。まず食品製造用にすべて添加物グレードが使われているのか、ソーダ工場の濃い塩酸から、塩ビモノマー工場での副生希塩酸まで両者とも純度上問題ないと見られるが、利用法も立地しだいであろうから、食品製造時の所要量から積算しないと解からない。水酸化ナトリウムも同様。食品用は液体が主体だが、一般の人は試薬の粒子のようなものが使用されていると考える。

水酸化カルシウム：既存添加物リストの貝殻等焼成カルシウム等との関係、生石灰の使用時水酸化などもあり複雑。コンニャク凝固剤の他、酸アルカリ中和量も多い。荷動きというより実態がいまい。極上の石灰岩を用いれば粉末化し炭酸カルシウムの局方、食添規格に適合する。水酸化カルシウムはそれを焼成して水を加えて作られている。

二酸化ケイ素：ほとんどは食品の乾燥剤。袋入り食品には接触するが加わらない。コショウ、食塩などの固結防止剤として食品の2.0%以下で加えられることになっているのが純食品用である。今回から微粒二酸化ケイ素を区別して調査した。

以上、それぞれ各論からここに例示したが、総理府統計法によるわが国統計出版物の集計方法に準拠した手法を用いながらも、食品添加物市場の多様性から、かつ、1日摂取量の把握という最終目的上査定という人為的手法を導入せざるを得ないことを理解して頂きたい。

表 3-1 指定添加物 一日平均摂取量 総括表 (用途品目別)

用途名	食添NO.	食品添加物名	章	純食品向け 出荷量 (Kg)	純食品向け 査定量 (Kg)	摂取量 (Kg)	1人一日摂取量 (mg/人/日)	ADI 1) (mg/人/日)	ADI比 (A/B %)	注
甘味料	12	アスパルテーム	1	109,651	110,000	88,000	1.88	2,000	0.094	
甘味料	13	アセスルファムカリウム	1	155,000	155,000	124,000	2.650	750	0.35	
甘味料	76	キシリトール	1	7,616,266	7,620,000	6,096,000	130.5	特定せず	—	
甘味料	90	グリチルリチン酸二ナトリウム	1	2,500	2,500	2,000	0.043	—	—	
甘味料	127	サッカリン	1	20,000	100	80	0.0017	250	0.0007	
甘味料	128	サッカリンナトリウム	1	401,000	290,000	232,000	4.96	250	1.98	
甘味料	179	スクラロース	1	93,000	93,000	74,400	1.59	750	0.21	
甘味料	184	D-ソルビトール	1	65,919,767	97,800,000	69,438,000	1,490	特定せず	—	
甘味料	306	D-マンニトール	1	412,066	380,000	304,000	6.50	特定せず	—	
着色料 (タール)	160	食用赤色2号	2	1,719	2,000	1,600	0.034	25	0.1	
着色料 (タール)	161	食用赤色3号	2	2,617	3,300	2,112	0.045	5	0.9	20)
着色料 (タール)	162	食用赤色40号	2	251	250	200	0.004	350	0.0011	20)
着色料 (タール)	163	食用赤色102号	2	25,234	25,800	19,608	0.420	200	0.21	
着色料 (タール)	164	食用赤色104号	2	626	1,300	1,040	0.022			
着色料 (タール)	165	食用赤色105号	2	200	380	274	0.006			
着色料 (タール)	166	食用赤色106号	2	3,013	3,200	2,560	0.050			
着色料 (タール)	167	食用黄色4号	2	52,421	51,200	25,200	0.540	375	0.14	20)
着色料 (タール)	168	食用黄色5号	2	10,804	14,000	11,200	0.240	125	0.192	20)
着色料 (タール)	169	食用緑色3号	2	0	0	0	0	1,250	0	
着色料 (タール)	170	食用青色1号	2	5,511	5,500	4,400	0.090	625	0.014	20)
着色料 (タール)	171	食用青色2号	2	839	1,200	960	0.021	250	0.0082	20)
着色料	72	β-カロテン	3	6,217	7,000	5,600	0.121	250	0.048	
着色料	131	三酸化鉄	3	40	40	32	0.00069	25	0.0028	
着色料	207	鉄クロロフイリンナトリウム	3	130	130	104	0.0022	設定なし		
着色料	215	銅クロロフイリンナトリウム	3	4,700	5,000	4,000	0.086	750	0.012	
着色料	216	銅クロロフイリ	3	7,140	7,140	5,712	0.122	750	0.016	
着色料	230	二酸化チタン	3	6,800	4,350	3,600	0.074	制限せず		
着色料	236	ノルビキシンカリウム	3	51,701	11,285	9,028	0.190	30	0.64	27)
着色料	237	ノルビキシンナトリウム	3	150	—	—	—	30		27)
保存料	25	安息香酸	4	81,000	81,000	64,800	[6.608]	[250]	[2.64]	5)

用途名	食添NO.	食品添加物名	章	純食品向け 出荷量 (Kg)	純食品向け 査定量 (Kg)	摂取量 (Kg)	1人一日摂取量 (mg/人/日)	ADI (1) (mg/人/日)	ADI比 (A/B %)	注
保存料	26	安息香酸ナトリウム	4	360,000	360,000	288,100				5)
保存料	185	ソルビン酸	4	635,000	635,000	508,000	[20.724]	[1,250]	[1.66]	21)
保存料	186	ソルビン酸カリウム	4	771,500	771,500	617,200				21)
保存料	209	デヒドロ酢酸ナトリウム	4	50,000	50,000	40,000	[0.757]			22)
保存料	239	パラオキシ安息香酸イソプロピル	4	3,500	3,500	2,800	[0.175]		[0.04]	28)
保存料	240	パラオキシ安息香酸イソプロピル	4	4,500	4,500	3,600				28)
保存料	241	パラオキシ安息香酸エチル	4	0	0	0		500※		※エチル、オキシル及びプロピルエステルのGroup ADI 28)
保存料	242	パラオキシ安息香酸ブチル	4	6,000	6,000	4,800				28)
保存料	243	パラオキシ安息香酸プロピル	4	0	0	0				28)
保存料	280	プロピオン酸	4	6,300	6,300	5,000	[1.88]	制限せず		35)
保存料	283	プロピオン酸カルシウム	4	72,000	72,000	57,600				35)
保存料	284	プロピオン酸ナトリウム	4	60,000	60,000	48,000				35)
漂白剤	2	亜塩素酸ナトリウム	5	33,000	33,000	0	0			
漂白剤	21	亜硫酸ナトリウム	5	105,000	200,000	160,000	3.42	35.0	9.77	4)
殺菌剤	66	過酸化水素 (100%換算)	5	240,000	240,000	0	0	設定せず		
殺菌剤	107	高度サラン粉	5	151,000	300,000	0	0			
殺菌剤	132	次亜塩素酸水	5	140,000	140,000	0	0			
殺菌剤	133	次亜塩素酸ナトリウム	5	189,790,000	200,000	160,000	☆3.42	☆二酸化塩素として (6.96)		15)
漂白剤	134	次亜硫酸ナトリウム	5	624,000	150,000	120,000	☆2.57			16)
漂白剤	226	二酸化硫黄	5	532,000	60,000	48,000	☆1.03	二酸化塩素として 35	19.9	23)
漂白剤	261	ピロ亜硫酸カリウム	5	0	15,000	12,000	☆0.26			32)
漂白剤	262	ピロ亜硫酸ナトリウム	5	228,000	230,000	184,000	☆3.94			32)
糊料	23	アルギン酸ナトリウム	6	230,000	230,000	184,000	3.94	特定せず		
糊料	24	アルギン酸プロピレングリコールエステル	6	30,000	30,000	24,000	0.510			
糊料	68	カゼインナトリウム	6	6,319,000	6,300,000	5,040,000	107.88	制限せず		
糊料	70	カルボキシメチルセルロースカルシウム	6	3,600	3,600	2,880	0.060	特定せず		
糊料	71	カルボキシメチルセルロースナトリウム	6	130,000	130,000	104,000	2.2	特定せず		
糊料	212	デンブングリコール酸ナトリウム	6	300	300	240	0.01			
糊料	213	デンブングリコール酸エステルナトリウム	6	0	0	0	0			
糊料	298	ポリアクリル酸ナトリウム	6	536,000	20,000	16,000	0.340			

用途名	食添NO.	食品添加物名	章	純食品向け 出荷量 (Kg)	純食品向け 希定量 (Kg)	摂取量 (Kg)	1人一日摂取量 (mg/人/日)	ADI (1) (mg/人/日)	ADI比 (A/B %)	注
糊料	300	ポリビニルピロリドン	6	280,000	280,000	0	0.000			
糊料	312	メチルセルロース	6	20,000	20,000	16,000	0.340	特定せず		
酸化防止剤	49	エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム	7	1,000	5,000	4,000	0.086	125	0.07	
酸化防止剤	50	エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム	7	400	0	0	0			
酸化防止剤	52	エリソニンビン酸	7	2,600	[333,000]	[266,000]	[3.706]	特定せず		6)
酸化防止剤	53	エリソニンビン酸ナトリウム	7	406,000						6)
酸化防止剤	79	クエン酸イソプロピル	7	0	100	80	0.002	700	0.0003	
酸化防止剤	136	L-システイン塩酸塩	7	17,600	10,000	0	0			
酸化防止剤	143	ジブチルヒドロキシトルエン	7	100,000	20,000	16,000	0.340	15	2.27	
酸化防止剤	217	dl- α -トコフェロール	7	16,300	16,300	13,000	0.028	100	0.03	
酸化防止剤	275	ブチルヒドロキシシアニソール	7	150,000	20,000	16,000	0.340	25	1.36	
酸化防止剤	297	没食子酸プロピル	7	1,000	2,000	1,600	0.034	70	0.05	
発色剤	5	亜硝酸ナトリウム	8	143,933	35,000	[12,200]	[0.261]	10	2.61	2)
発色剤	158	硝酸カリウム	8	20,624	17,100	[4,100]	[0.088]	10	0.88	19)
発色剤	159	硝酸ナトリウム	8	39,870	17,100	[4,800]	[0.103]	10	1.03	19)
防ばい剤	41	イマザリル	9	0	0	0	0			
防ばい剤	64	オルトフェニルフェノール	9	0	0	0	0			
防ばい剤	64-2	オルトフェニルフェノールナトリウム	9	0	0	0	0			
防ばい剤	142	ジフェニル	9	0	0	0	0			
防ばい剤	194	チアベンダゾール	9	0	0	0	0			
ガムベース	45	エステルガム	10	710,000	870,000	0	0			
ガムベース	121	酢酸ビニル樹脂	10	1,500,000	1,790,000	0	0			
ガムベース	299	ポリイソブチレン	10	560,000	730,000	0	0			
ガムベース	301	ポリブテン	10	80,000	110,000	0	0			
調味料	11	L-アスパラギン酸ナトリウム	11	586,000	406,000	325,000	6.95			
調味料	20	DL-アラニン	11	1,581,000	1,580,000	1,264,000	27.1			
調味料	22	L-アルギニンL-グルタミン酸塩	11	300	300	240	0.0051			
調味料	40	5'-イノシン酸ナトリウム	11	2,698,900	1,430,000	1,250,000	26.7	特定せず		
調味料	43	5'-ウリジル酸ナトリウム	11	26,005	4	4	0.0001			
調味料	77	5'-グアニル酸ナトリウム	11	125,000	40,000	32,000	0.68	特定せず		
調味料	86	グリシン	11	7,787,915	7,700,000	6,160,000	131.8			

用途名	食添NO.	食品添加物名	章	純食品向け 出荷量 (Kg)	純食品向け 査定量 (Kg)	摂取量 (kg)	1人一日摂取量 (mg/人/日)	ADI (1) (mg/人/日)	ADI比 (A/B %)	注
調味料	97	L-グルタミン酸	11	13,600	13,600	10,900	0.233	特定せず	—	
調味料	98	L-グルタミン酸カリウム	11	0	1	0.8	0.00002	特定せず	—	
調味料	99	L-グルタミン酸カルシウム	11	0	1	0.8	0.00002	特定せず	—	
調味料	100	L-グルタミン酸ナトリウム	11	101,759,073	101,700,000	81,360,000	1.741	特定せず	—	
調味料	101	L-グルタミン酸マグネシウム	11	0	1	0.8	0.00002	特定せず	—	
調味料	137	5'-シチジル酸二ナトリウム	11	5	5	4	0.0001	—	—	
調味料	203	L-テアニン	11	22,000	22,000	17,600	0.376	—	—	
調味料	329	5'-リボスクレオチドカルシウム	11	38,000	38,000	30,400	0.65	特定せず	—	
調味料	330	5'-リボスクレオチドナトリウム	11	1,658,920	1,630,000	1,304,000	27.1	特定せず	—	
乳化剤	88	グリセリン脂肪酸エステル	12	13,100,000	13,300,000	9,920,000	212	限定せず	—	9)
乳化剤	172	ショ糖脂肪酸エステル	12	2,960,000	3,500,000	2,570,000	55	1,500	3.7	
乳化剤	182	ステアロイル乳酸カルシウム	12	208,000	210,000	170,000	3.60	1,000	0.36	
乳化剤	183	ソルビタン脂肪酸エステル	12	1,020,000	1,100,000	880,000	18.8	1,250	1.5	
乳化剤	287	プロピレングリコール脂肪酸エステル	12	1,100,000	1,100,000	880,000	18.8	1,250	1.5	
強化剤 (アミノ酸系)	39	L-イノシシン	13	120,500	120,500	96,400	2.060	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	218	DL-トリプトファン	13	0	0	0	0	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	219	L-トリプトファン	13	2,100	2,100	1,700	0.086	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	221	DL-トレオニン	13	2,000	2,000	1,600	0.084	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	222	L-トレオニン	13	6,500	6,500	5,200	0.110	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	245	L-バリン	13	106,400	106,400	85,100	1.820	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	249	L-ヒスチジン塩酸塩	13	15,600	15,600	12,500	0.27	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	268	L-フェニルアラニン	13	5,000	5,000	4,000	0.086	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	309	DL-メチオニン	13	10,800	10,800	8,600	0.18	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	310	L-メチオニン	13	1,500	1,500	1,200	0.026	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	325	L-リジンL-アスパラギン酸塩	13	0	0	0	0	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	326	L-リジン塩酸塩	13	336,000	336,000	269,000	5.76	—	—	
強化剤 (アミノ酸系)	327	L-リジンL-グルタミン酸塩	13	0	0	0	0	—	—	
強化剤 (ビタミンC)	6	L-アスコルビン酸	14	7,640,300	7,640,000	4,278,000	91.549	—	—	
強化剤 (ビタミンC)	7	L-アスコルビン酸2-グルコシド	14	70	70	20	0.0004	—	—	
強化剤 (ビタミンC)	8	L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル	14	0	0	0	0	—	—	3)
強化剤 (ビタミンC)	9	L-アスコルビン酸ナトリウム	14	3,165,300	3,165,000	1,245,000	26.643	※ステアリン酸・パルミチン酸エステル類のGroup ADI	3)	

用途名	食添NO.	食品添加物名	章	純食品向け 出荷量 (Kg)	純食品向け 査定量 (Kg)	摂取量 (Kg)	1人一日摂取量 (mg/人/日)	ADI (1) (mg/人/日)	ADI比 (A/B %)	注
強化剤 (ビタミンC)	10	L-アスコルビン酸パルチミン酸エステル	14	14,900	14,900	3,538	0.076	[62.5]※	[0.12]	3)
強化剤 (ビタミンD)	54	エルゴカルシフェロール	14	0	0	0	0			
強化剤 (ビタミンD)	111	コレカルシフェロール	14	280	280	134	0.00287			13)
強化剤 (ビタミンB1)	144	ジベンゾイルチアミン	14	200	200	82	0.0018			
強化剤 (ビタミンB1)	145	ジベンゾイルチアミン塩酸塩	14	2,500	2,500	870	0.019			
強化剤 (ビタミンB1)	195	チアミン塩酸塩	14	44,000	16,000	7,680	0.164			
強化剤 (ビタミンB1)	196	チアミン硝酸塩	14	63,300	20,000	10,185	0.218			
強化剤 (ビタミンB1)	197	チアミンセチル硫酸塩	14	0	0	0	0			
強化剤 (ビタミンB1)	198	チアミンチオシアン酸塩	14	0	0	0	0			
強化剤 (ビタミンB1)	199	チアミンナフタレン-1,5-ジスルホン酸塩	14	0	0	0	0			
強化剤 (ビタミンB1)	200	チアミンラウリル硫酸塩	14	10,000	10,000	2,460	0.053			
強化剤 (ナイアシン)	224	ニコチン酸	14	4,900	4,900	2,940	0.063			
強化剤 (ナイアシン)	225	ニコチン酸アミド	14	130,400	130,400	63,218	1.353			
強化剤 (パントテン酸)	246	パントテン酸カルシウム	14	38,000	38,000	27,885	0.447			
強化剤 (パントテン酸)	247	パントテン酸ナトリウム	14	0	0	0	0			
強化剤 (ビタミンB1)	250	ビスベンチアミン	14	0	0	0	0			
強化剤 (ビタミンA)	251	ビタミンA	14	0	0	0	0			29,30)
強化剤 (ビタミンA)	252	ビタミンA 脂肪酸エステル	14	15,900	15,900	7,632	0.163			
強化剤	260	ポリドキシリン塩酸塩	14	113,900	21,400	10,567	0.226			31)
強化剤	314	メチルヘスベリジン	14	11,200	11,200	6,272	0.134			
強化剤	318	葉酸	14	5,400	1,500	840	0.018			
強化剤 (ビタミンB2)	331	リボフラビン	14	22,800	22,800	12,768	0.273			
強化剤 (ビタミンB2)	332	リボフラビン 5'-リン酸エステル	14	200	200	69	0.0015			
強化剤 (ビタミンB2)	333	リボフラビン 5'-リン酸エステルナトリウム	14	8,600	8,600	3,777	0.081	[25]※	[1.42]	
香料	14	アセト酢酸エチル	15	15,043	15,000	12,000	0.260			
香料	15	アセトフェノン	15	145	200	160	0.0034			
香料	17	アニスアルデヒド	15	297	300	240	0.0051			
香料	19	α-アミルシンナムアルデヒド	15	306	300	240	0.0051			
香料	27	アントラニル酸メチル	15	7,719	8,000	6,400	0.137	75	0.18	
香料	29	イオノン	15	282	300	240	0.0051	5	0.102	
香料	32	インオイタノール	15	217	220	176	0.0037			