

201234003B

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

食品添加物の規格の向上と使用実態の把握等に関する研究

平成22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 佐藤 恭子

平成25（2013）年 3月

## 目 次

I. 総合研究報告		
食品添加物の規格の向上と使用実態の把握等に関する研究	-----	1
佐藤恭子		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	136
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	137

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

平成 24 年度総合研究報告書

食品添加物の規格の向上と使用実態の把握等に関する調査研究

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、食品の安全性確保のため、食の国際化により重要性を増した食品添加物の規格の向上及び使用実態の把握目的とし、以下の研究を行った。

食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究－1) アルギン酸塩類の定量法に関する研究では、食品添加物公定書の定量法（水銀バルブを使用した装置による蒸留法（公定法））の代替法として、(1)米国薬局方（United States Pharmacopeia ; USP）のアルギン酸の定量に採用されている蒸留法（水銀不使用）、(2)マンヌロン酸及びグルロン酸を標準品とする HPLC による加水分解物の定量及び(3)アルギン酸ナトリウムを標準品とした比色法（レゾルシノール法）について検討した。このうち、(1)は、蒸留時間を延長することで、適用可能であったが、(2)及び(3)では良好な結果が得られず、規格試験への適用が困難であると考えられた。

2) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究では、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 9 回の生産量統計を基にした摂取量の推定をまとめ、第 10 回のアンケート調査及びその追加調査、再調査を行った。また、既存添加物等については、第 4 回の調査より生産量統計を取りまとめ、第 5 回のアンケート調査を実施した。

3) 食品香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究では、日米欧が共通して調査する化合物のリスト（コアリスト）を作成し、これに各国・地域が独自に調査する化合物を加え、同時期に調査を実施し、我が国の前 2 回の調査結果と比較するとともに、欧米の調査結果とも比較し、日米欧の香料化合物の使われ方について検討した。

4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究では、香料業界における国際的なコンプライアンス、国際整合化に向けた我が国における香料規制のあり方の検討の基礎資料とするため、諸外国の香料規制、具体的には香料の定義、主剤として使用できる原料、香料製造に関する規制（抽出溶媒、副剤等）、香料表示に関する規制及び宗教による制約などを調査、整理した。

食品添加物の規格基準向上のための赤外スペクトルに関する調査研究－食品添加物の規格基準の向上のため、食品添加物公定書で確認試験として赤外スペクトル（IR）が設定されていない香料化合物 45 品目について、その測定法の確立し、標準 IR の作成を行った。また、減衰全反射法（Attenuated Total Reflection ; ATR 法）の確認試験への利用の可能性を検討し、ATR 法は、再現性に優れ、結晶多形も区別可能であるなど、有用な測定法であるものの、ATR 法で得られる IR と既存の参照 IR との比較での試料の確認は、困難であり、品目によっては、測定条件によ

てペクトルが変化する可能性があるため、食品添加物への確認試験に利用するためには、品目毎に測定条件を調査し、ATR法での測定条件と標準IRの確立が必要であると結論した。

**食品添加物規格試験法の精度向上に向けた定量NMR法の適用に関する検討**—国際単位系へのトレーサビリティが確保された絶対定量法である定量NMR法を用いたアスコルビン酸、フルジオキシニル、チアベンダゾール、アゾキシストロビン及びピリメタニルの定量分析に関する検討を行った。その結果、本法は、良好な真度、併行精度、直線性を有することが明らかとなり、これらの定量分析に適用できることが明らかとなった。また、混合物に対する本法の適用性を明らかにするため、アスコルビン酸含有製品についても併せて検討し、従来法であるHPLC法と同程度に正確な定量結果を与えることが確認された。また、HPLC法と比べ、迅速性、簡便性が大幅に向上し、混合物に対する定量においても本法は適用可能であることが判明した。

**香料化合物の遺伝毒性予測に関する研究**—我が国独自の食品香料について、国際的ハーモナイゼーションを目指した規格向上のために、3年間で126検体の簡易遺伝毒性試験を行った。陰性予測の物質を対象に実施した場合は93%が陰性だったが、構造活性相関手法(SAR)のソフト3種類による予測がいずれかで陽性になったものについて実施した場合は14%のみ陽性だった。個々のSARによる遺伝毒性の予測の正確度は4~11%であったことから、一つのソフトに絞って香料を対象にカスタマイズすることが効率よい安全性評価につながることを示唆された。

**食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明**—各種生鮮食品を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理したときに副次的に生成する塩素系消毒副生成物の推定暴露量を調査するため、殺菌洗浄処理モデルを用いて生鮮食品中の消毒副生成物残存量をダイナミックヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析装置、ガスクロマトグラフ質量分析装置及びECD検出器付ガスクロマトグラフ分析装置を用いて分析を行った。

生鮮野菜(葉菜類及び根菜類)及び魚介類(鮮魚、貝類)、鶏肉等、計13品目を次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌処理を行ったとき、クロロホルム、ジクロロアセトニトリル、抱水クロラール、ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸が生成し、食品の種類により生成量に違いがみられた。また、殺菌処理した試料を水道水で流水洗浄し、流水洗浄による副生成物の除去効果について調べたところ、洗浄後には食品の副生成物量が減少していることが確かめられた。さらに、殺菌料として次亜塩素酸ナトリウムの代わりに次亜塩素酸水でカット野菜を殺菌処理した場合、ハロアセトニトリル、抱水クロラール、及びハロ酢酸は生成せず、次亜塩素酸ナトリウムとは異なる挙動を示した。

さらに、今回の調査結果をもとに、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理後の生鮮食品からの消毒副生成物の経口暴露量を推計したところ、何れの副生成物も耐容一日摂取量(TDI)若しくは実質安全量(VSD)を下回ることが確かめられた。

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全の確保に資するものである。

#### 分担研究者

北村 陽二	国立大学法人金沢大学 准教授
山田 雅巳	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
大槻 崇	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

### A. 研究目的

食品の安全の確保には、食品添加物の品質と適正な使用を欠かすことはできない。食品添加物の品質を担保するために重要なのが食品添加物の規格である。近年、国際的に食品添加物としての必要性が高かつ安全性が確認されている物質について指定に向けた検討を国主導で行っており、新規指定品目の成分規格については、国際整合性が重視されている。食品添加物の国際調和の要請に適切に対応しつつ、我が国の食品の安全性を確保するためには、食品添加物の規格の向上が重要である。また、食品添加物の適正な使用のためには、使用実態の把握や摂取量の推定等が重要となる。そこで、本研究では以下の研究を行った。

#### A-1 食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究

##### 1) アルギン酸塩類の定量法に関する研究

第8版食品添加物公定書における、アルギン酸塩類の定量法は、水銀バルブを有する複雑なガラス器具による装置を使用した蒸留法が設定されている。本研究は、水銀を使用しない定量法を検討することを目的とし、米国薬局方（USP）で使用されている水銀バルブのない簡単な装置による蒸留法、HPLC法及び比色法に

よる定量法の検討を試みた。

##### 2) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究

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とした。

##### 3) 食品香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究

食品香料化合物の使用実態の動向把握と安全性の確認を目的とし、日米欧が同時期に共通の化合物リストを基に 2010 年（1 月～12 月）中に使用した食品香料化合物の使用量を調査し、各化合物の推定摂取量を算出した。

本調査は日米欧三極が同時期に実施する使用量調査であるため、国際的比較が正確にできるということに加え、平成 16 年(2004 年)以降我が国で新たに指定香料となった化合物（いわゆる国際汎用香料）の摂取量の追跡調査であるという意味でも意義がある。

##### 4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

国際統合化に向けた我が国における香料規制のあり方についての検討資料とするため、各国・地域の香料規制、具体的には香料の定義、主剤として使用できる原料、香料製造に関する規制（抽出溶媒、副剤等）、香料表示に関する規制及び宗教による制約などの調査を行った。

#### A-2 食品添加物の規格基準向上のための赤外スペクトルに関する調査研究

赤外スペクトル（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、国際的にも各種化合物の確認試験に汎用されている。

また、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  $\text{cm}^{-1}$ の領域のIRを簡便に測定できるようになっている。さらに、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、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。このような背景のもと、IR法が各種食品添加物の確認試験にも多用され、食の安全に寄与している。そこで、本研究では、食品添加物等の国内規格の向上などを目的にして、種々の測定法で得られるIRを比較検討した。IRの測定法は、透過法と反射法に大別される。透過法としては、臭化カリウム錠剤法 (KBr法)、溶液法、ペースト法、液膜法、薄膜法及び気体試料測定法など多くの測定法が存在する。固体試料の測定には、KBr法とペースト法あるいは薄膜法のいずれかとなる。しかし、KBr法では、加圧錠剤形成時における試料とKBrとの相互作用、KBrに含まれる水分や加圧などの影響によって、有機化合物でも、しばしば異常スペクトルが観測されることがある。なお、通常固体状態のIRは、その固体について結晶形などを含め固有の情報として扱われているため、ここでは、「本来の試料のスペクトルとは異なるスペクトル」を「異常スペクトル」という表現で使用している。従って、本研究においては、固体試料の測定についてはペースト法あるいは薄膜法で検討した。また、本研究では、公定書には規定されていないが、近年普及しつつある減衰全反射法 (Attenuated Total Reflection ; ATR法) も調査の対象に含め、それぞれの測定法のIRに差が生じる原因の解明を試みるとともに、ATR法によるIRの、確認試験への利用の可能性を検討した。本研究では、

食品添加物であるネオテームや、食品添加物公定書で確認試験としてIRが設定されていない香料化合物45品目について、測定法や測定条件に検討を加え、標準IR及びその測定法を定めることとした。さらに、それらを含め、種々の試料を用いて、近年普及しつつあるATR法の確認試験への利用の可能性を検討した。

### A-3 食品添加物規格試験法の精度向上に向けた定量 NMR 法の適用に関する検討

食品添加物は、食品衛生法第 11 条第 1 項に基づき、その成分規格や使用基準などが定められている。分析法によっては標準物質を必要とするが、その純度値は、試薬メーカーが品質保証の意味で評価した値であり、計量学的に正確に純度が算出されたものではない。従って計量学的に正確ではない標準物質を用いて各試験を実施した場合、得られる分析値の信頼性が損なわれることが懸念される。近年、国際単位系 (SI) へのトレーサビリティが確保された絶対定量法として定量 NMR (quantitative NMR ; qNMR) 法が注目を集めており、農薬、添加物、生薬、天然化合物などの定量分析へ応用されている。qNMR 法のうち、 $^1\text{H}$  NMR を利用した qNMR (qHNMR) は、計量学的に正確な純度が付与された SI にトレーサブルな認証標準物質を内部標準として用い、測定対象物質と混合して  $^1\text{H}$  NMR 測定を行う。 $^1\text{H}$  NMR 上で観察される内部標準及び測定対象物質のシグナル面積の強度比 (積分値比) は、「モル濃度×水素数」に比例することから、測定対象物質及び内部標準のシグナル面積強度比、水素数、秤量濃度の関係から、測定対象物質の含量 (純度) の算出が可能である。また、本法は個々の測定対象物質と同一の定量用標準物質を必要としないとともに、簡便性、迅速性、環境負荷の低減の面で

も格段と優れている。さらに、混合物に含まれる測定対象物質を測定する際、<sup>1</sup>H NMR 上で測定対象物質と夾雑物質のシグナルが十分に分離されていれば、クリーンアップ、誘導体化等の前処理が不要な迅速、簡便かつ選択性の高い絶対定量が可能と考えられる。このように、本法は極めて汎用性の高い分析法であり、得られる定量値の信頼性、国際整合性も確保されていると言える。

当部では、食品添加物の規格試験法の精度向上を目指した研究の一環として、食品添加物分析への qHNMR 法の適用に関する検討を行い、これまでに、食品香料ピラジン類や食用合成色素（タール色素）及びコチニール色素に含まれる主成分の正確な絶対定量が可能であることを明らかにした。そこで本研究では、食品添加物分析への本法の有効性、汎用性を更に明らかにするため、今年度はアスコルビン酸（酸化防止剤）、フルジオキソニル（防かび剤）、チアベンダゾール（防かび剤）、アゾキシストロピン（防かび剤）及びピリメタニル（防かび剤、指定要請中）を対象に検討を行った。

#### A-4 食品香料の規格化のための遺伝毒性予測に関する研究

欧米を中心として流通している食品香料のポジティブリスト化は、JECFAにおける安全性評価を軸として進行しており、国内における規格も、国際ハーモナイゼーションを踏まえた規格向上を検討することが望まれている。特に、我が国では独自の食品香料が多く使用されており、それらについてはもちろん、JECFAによる安全性評価がなされていない。これらは種類が多いため、すべてについて遺伝毒性試験を実施することは、期間、費用の面で問題があり、構造活性相関手法（SAR）を導入することが効率化の面で有用であると考えられる。

また、多くの食品香料は暴露量が微量であるため、年間使用量に匹敵するような検体量を要する毒性試験の実施には疑問が残る。最も簡便なスクリーニング遺伝毒性試験であるAmes試験を実施するにしても、数百mgの検体を必要とする。そこで、簡易スクリーニング法、フラクチュエーションAmes試験（FAT）法が導入できれば、毒性試験の負担が多くの点で軽減されると予想される。

以上を踏まえ、本研究では、遺伝毒性に基づいた安全性規格の向上を効率的に進めるために、構造活性相関手法が遺伝毒性予測に適用できるかどうかを検討する。初年度で、遺伝毒性試験としてFATの導入を検討し、有用であるという結論を得た。2年目は、JECFAでは、遺伝毒性試験の結果がない香料のうちSARの陰性結果を、FATで確認した。最終年度は、SARの陽性結果をFATで確認するとともに、新しいソフトウェアTiMeSでの予測も検討した。

#### A-5 食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明

次亜塩素酸ナトリウム（次亜Na）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剤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。

次亜Naは古くから水道の消毒薬としても利用されてきたが、トリハロメタン（THM）の他、ハロアセトニトリルや抱水クロラール、ハロ酢酸などの様々な消毒副生成物の存在が確認されている。このため、世界中で消毒副生成物の健康影響について評価を行い、飲料水の水質基準値を設定している。また、これまでに食品の次亜Na処理にともなうTHM生成影響についても調査が行われ、鶏肉や野菜類の塩素殺菌処理に

よりクロロホルム (CF) が生成し、また、牛乳製造プラントにおいて次亜Naと界面活性剤を併用して殺菌洗浄した時のCFの生成挙動について報告されている。しかし、これら研究の多くは一部の食品に限られており、また、THM以外の消毒副生成物の調査は限定的であり、生鮮食品由来の消毒副生成物の暴露影響について十分な調査が行われていない。そこで、食品の安全確保推進の研究調査の一環として、食品由来の消毒副生成物の経口暴露量を推計するため、生鮮食品の殺菌処理により生成する消毒副生成物の残存量について調査を行い、殺菌処理された食品由来の各種消毒副生成物の暴露量の推計を行った。一方、近年、新たな殺菌料として希塩酸や食塩水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装置（いわゆる電解水製造装置）の一部が次亜塩素酸水として食品添加物に認可され、徐々に普及し始めている。次亜塩素酸水については、野菜の殺菌処理によるTHM生成能について調査されているが、その他の消毒副生成物の生成能については未解明であり調査が必要であることから、次亜塩素酸水のうち、強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水でカット野菜を殺菌処理したときの消毒副生成物の生成能について、次亜塩素酸ナトリウムと比較検証を行った。

## B. 研究方法

### B-1 食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究

#### 1) アルギン酸塩類の定量法に関する研究

アルギン酸塩類についてUSP法を行い、公定法との比較を行った。また、アルギン酸ナトリウムを硫酸で加水分解後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離精製して得られたウロン酸を用いて陰イオン交換カラムを用いた

HPLCによる定量法を検討した。比色法では、アルギン酸塩類の構成糖以外のウロン酸を用いて、様々な比色法を検討した。

#### 2) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関する研究

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。

#### 3) 食品香料化合物の使用量調査及び摂取量に関する調査研究

日本香料工業会会員企業145社に対し記入アンケート方式により調査を実施した。日米欧三極が共通で調査する化合物を抽出し、その化合物にCAS番号、FEMA番号、FL番号との関係を整理して三極共通の調査リスト(コアリスト)とし、これに日本だけで調査する化合物を加えて調査票とした。

#### 4) 諸外国の香料規制に関する調査研究

調査は、当該国政府・省庁の Web site、米国農務省など貿易相手国政府・省庁及び各種団体・調査機関の調査報告書等を参考にした。また、香料会社が直接貿易相手国の政府・省庁から得た情報や海外支店等から得た情報資料によっても行った。

### B-2 食品添加物の規格向上のためのIRに関する調査研究



ネオテームは国立医薬品食品衛生研究所から提供を受け、ピロリジンはWako社製の市販品を用いた。食品添加物公定書で確認試験としてIRが設定されていない香料化合物45品目については、日本香料工業会より提供を受けた。

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<sup>-1</sup>（32回繰り返し）、測定領域4000～400 cm<sup>-1</sup>で行なった。液膜法、薄膜法及びペーパースト法の測定には、原則として、大きさ30～35 mm×30～35 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、KBr法では、日本分光社製の赤外用KBrブロックを用いた。ATR法の測定には、前述の赤外分光光度計に、ダイヤモンドプリズム一回反射ATR装置（日本分光社製）を装着した装置を用い、分解能2または4 cm<sup>-1</sup>（積算回数96回）、測定領域4000～400 cm<sup>-1</sup>で測定を行なった。ATR法で得られたスペクトルは、必要に応じて、スペクトルマネージャーVer. 2（日本分光社製）のATR補正機能、演算機能、ベースライン補正機能を用いて補正を行った。

### B-3 食品添加物規格試験法の精度向上に向けた定量NMR法の適用に関する検討

#### 1) 試料及び試薬

アスコルビン酸標準品は、(財)日本公定書協会製、アスコルビン酸（特級品）は和光純薬製を用いた。アスコルビン酸含有製品7種（試料1：食品添加物用アスコルビン酸、試料2：ビタミンE、C主薬製剤（第3種医薬品）、試

料3：ビタミンC主薬製剤（第3類医薬品）、試料4：日本薬局方アスコルビン酸原末（第3類医薬品）、試料5：ビタミンC含有食品、試料6：ビタミンC含有食品（栄養機能食品）、試料7：ビタミン類含有食品（栄養機能食品）は都内のスーパーマーケットで購入したものを用いた。フルジオキソニルは、和光純薬製の残留農薬試験用標準品を使用した。チアベンダゾール標準物質は、和光純薬製（食品添加物試験用、Code No.202-07761）を用いた。アゾキシストロピンは、和光純薬（株）製（残留農薬試験用標準品、Cat. No.015-19003、Lot. DCR2844）、ピリメタニルは和光純薬（株）製（TRM、Cat. No.024-17031、Lot. DCL5334）を用いた。

2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸-d<sub>6</sub>ナトリウム塩（sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3-d<sub>6</sub>-sulfonate DSS-d<sub>6</sub>）標準物質は、和光純薬製の Traceable Reference Material（Code No.048-31071、Lot.No.EPL1095:純度 92.2±1.0%）を用いた。DSS-d<sub>6</sub>認証標準物質は、和光純薬製（Code No.044-31671、Lot.No.DCP5376:純度 92.2%±0.7%）を用いた。DSS-d<sub>6</sub>は Isotec 製を用いた。DSS-d<sub>6</sub>は Isotec 製を用いた。1,4-ビス（トリメチルシリル）ベンゼン-d<sub>4</sub>（1,4-BTMSB-d<sub>4</sub>）認証標準物質は、和光純薬製（Cat. No.024-17031、Lot.No.DCL5334、純度 99.8%、拡張不確かさ：0.5%）を用いた。1,4-ビス（トリメチルシリル）ベンゼン-d<sub>4</sub>（1,4-BTMSB-d<sub>4</sub>）認証標準物質は、和光純薬製（Cat. No.024-17031、Lot.No.DCL5334、純度 99.8%、拡張不確かさ：0.5%）を用いた。高純度フタル酸カリウム（potassium phthalate:PHP）認証標準物質（品番 NMIJ-CRM 3001a：純度 100.00±0.027%）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、120℃で約1時間加熱乾燥しデシケーターで放冷後、使用した。重水 (D<sub>2</sub>O)、重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*<sub>6</sub>)、重水素化メタノール (MeOH-*d*<sub>4</sub>) 及び重水素化アセトニトリル (MeCN-*d*<sub>3</sub>) は Acros 製を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

## 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)。HPLC : LC-10AD<sub>VP</sub> システム (ポンプ : LC-10AD<sub>VP</sub> × 2, 恒温槽 : CTO-10A<sub>VP</sub>, 多波長検出器 : SPD-M10A<sub>VP</sub>, デガッサー : DGU-14A, オートサンプラー : SIL-10AD<sub>VP</sub>, データ処理装置 : LC solution) (島津製作所製)。

## 3) アスコルビン酸の定量

### 3-1) qHNMR 法

#### 3-1-1) qHNMR 標準溶液の調製

DSS-*d*<sub>6</sub> 57.1 mg を精密に量り、重水 50 g を加え qHNMR 標準溶液とした。qHNMR 標準溶液の DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度 (1.05 mg/g) は、下記に従い PHP により校正し算出した。すなわち、PHP 約 10 mg を精密に量り、qNMR 標準溶液 1.0 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qNMR に付した。δ<sub>H</sub> 7.57 及び 7.71 ppm に観測される PHP に由来するプロトンシグナル (4H) 及び δ<sub>H</sub> 0 ppm に観測される DSS-*d*<sub>6</sub> に由来するメチルプロトンシグナル (9H) のシグナル面積強度 (積分値)、分子量、濃度等を下記の式に代入し、qHNMR 標準溶液中の DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度 (mg/g) を算出した。

$$C_{\text{DSS}} = \left( \frac{M_{\text{DSS}} \times I_{\text{DSS}}}{H_{\text{DSS}}} \right) \div \left( \frac{M_{\text{PHP}} \times I_{\text{PHP}}}{H_{\text{PHP}} \times W_{\text{PHP}}} \right) \times \frac{P_{\text{PHP}}}{100}$$

ただし、C<sub>DSS</sub>=DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度 (mg/g), M<sub>DSS</sub>,

M<sub>PHP</sub>=DSS-*d*<sub>6</sub> 及び PHP の分子量 (MW:224.36 及び 242.31), I<sub>DSS</sub>, I<sub>PHP</sub>=DSS-*d*<sub>6</sub> 及び PHP の特定基のシグナル面積強度, H<sub>DSS</sub>, H<sub>PHP</sub>=DSS-*d*<sub>6</sub> 及び PHP の特定基のプロトン数 (DSS-*d*<sub>6</sub> : CH<sub>3</sub>×3=9, PHP : CH×2×2=4) W<sub>PHP</sub>=PHP の秤量濃度 (mg/g), P<sub>PHP</sub>=PHP の純度 (100.00%)。

### 3-1-2) アスコルビン酸含量の測定

アスコルビン酸 (標準品及び特級品)、アスコルビン酸含有製品は、それぞれ約 10 mg を精密に量りとり、qHNMR 標準溶液約 1.0 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qHNMR 測定を行った。DSS-*d*<sub>6</sub> のシグナル面積強度を 9.000 としたときのアスコルビン酸に由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、アスコルビン酸含量 (%) を算出した。

$$C_{\text{ASA}} = \left( \frac{I_{\text{ASA}}/H_{\text{ASA}}}{I_{\text{DSS}}/H_{\text{DSS}}} \times \frac{M_{\text{ASA}}/W_{\text{ASA}}}{M_{\text{DSS}}/C_{\text{DSS}}} \right) \times 100$$

ただし、I<sub>ASA</sub>, I<sub>DSS</sub>=アスコルビン酸及び DSS-*d*<sub>6</sub> のシグナル面積強度 (DSS-*d*<sub>6</sub> : 9.000), H<sub>ASA</sub>, H<sub>DSS</sub>=アスコルビン酸及び DSS-*d*<sub>6</sub> の特定基のプロトン数 (DSS-*d*<sub>6</sub>:CH<sub>3</sub>×3=9), M<sub>ASA</sub>, M<sub>DSS</sub>=アスコルビン酸及び DSS-*d*<sub>6</sub> の分子量 (MW:176.12 及び 224.36), W<sub>ASA</sub>=アスコルビン酸の秤量濃度 (mg/g), C<sub>DSS</sub>=DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度 (1.05 mg/g)。

### 3-1-3) qHNMR 測定条件及びデータの解析

qHNMR 測定の基本条件を表 3-1 に示した。なお、qHNMR の化学シフト値は、DSS-*d*<sub>6</sub> のプロトンシグナルを基準シグナル (δ 0 ppm) とし、δ 値を ppm 単位で表した。得られた FID データは、フーリエ変換 (Windows 関数 : exponential function BF=0.12 Hz, zero

filling=1, trapezoidal function T1=T2=0, T3=90, T4=100) 及び位相補正を行った。DSS- $d_6$  及び特定シグナルの積分範囲を設定した後、DSS- $d_6$  のシグナル面積強度を 9.000 としたときのアスコルビン酸に由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を式 (2) に代入し、アスコルビン酸含量を算出した。なお、データの解析は、フーリエ変換から含量の算出までを自動処理できる定量解析ソフトウェア Alice 2 for qNMR ピュアリティ (日本電子 (株) 製) を用いた。

### 3-2) 滴定法

第 8 版食品添加物公定書に記載された L-アスコルビン酸定量法に従った<sup>10)</sup>。すなわち、アスコルビン酸 200 mg を精密に量り、メタリン酸溶液 (1→50) 50 mL を加えて溶かし、指示薬としてデンプン試薬を添加し 0.05 mol/L ヨウ素溶液で滴定した。滴下したヨウ素溶液量などを下記の式に代入し、アスコルビン酸含量 (%) を算出した。

$$C = \frac{8.806 \times F \times V}{W} \times 100$$

ただし、C=アスコルビン酸含量 (%), F=0.05 mol/L ヨウ素溶液のファクター (1.004), V=滴下したヨウ素溶液量 (mL), W=アスコルビン酸の秤取量 (mg)

### 3-3) HPLC 法

#### 3-3-1) 試料溶液の調製

アスコルビン酸含有製品約 10 mg を精密に量り、2%メタリン酸溶液を加えて 10 mL に定容した。このうち 3 mL を褐色試験管に入れ、4.5 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 0.4 mL 及び 2%インドフェノール溶液 70  $\mu$ L を加えて混合した。速やかに *O*-フェニレンジアミン溶液 0.5 mL を加えて混合した後、遮光下 37°C の水浴で 30 分間振とうした。この溶液をあらかじめメタノール

10 mL, 水 5 mL でコンディショニングされた ODS カートリッジに付し、0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.8) -メタノール混液 (7:3) 3 mL で溶出させた。溶出された溶液のうち 1 mL をとり、2%メタリン酸溶液で 50 倍希釈したものを試料溶液とした。

#### 3-3-2) アスコルビン酸含量の測定

得られた試料溶液を下記に示す条件を用い HPLC にて分析した。

【HPLC 条件】カラム: L-column2 ODS (粒径 5  $\mu$ m, 4.6 mm i.d. x 250 mm), 移動相: 0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.8) -メタノール (8:2), 流速: 0.8 mL/min, カラム温度 40°C, 検出: 蛍光検出 (励起波長: 355 nm, 検出波長: 425 nm), 注入量: 10  $\mu$ L

なお、定量分析は絶対検量線法により行った。すなわち、アスコルビン酸濃度が 0.05~20  $\mu$ g/mL の範囲になるように検量線用アスコルビン酸標準溶液を注入し、得られた 6 点のクロマトグラムピーク面積より検量線を作成した。検量線から試料溶液のアスコルビン酸濃度 ( $\mu$ L/L) を求め、下記の式よりアスコルビン酸含有製品のアスコルビン酸含量 (%) を算出した。

$$C = \frac{A}{2W} \times 100$$

ただし、C=アスコルビン酸含量 (%), A=試料溶液のアスコルビン酸濃度 (mg/mL), W=製品の秤取量 (mg)

### 4) フルジオキソニル

#### 4-1) qHNMR 法によるフルジオキソニルの含量測定

試料約 20 mg 及び DSS- $d_6$  約 4 mg をそれぞれ精密に量り、重水素化ジメチルスルホキシド 2 mL を加えてこれらを溶解した。この液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qNMR

に付した。DSS-*d*<sub>6</sub>のシグナル面積強度を 9.000 としたときのフルジオキソニルに由来する δ<sub>H</sub> 7.31~7.40, 7.56 及び 7.85 ppm のシグナル面積強度等を下記の式に代入し、フルジオキソニル含量 (%) を算出した。

$$C_{FL} = \frac{W_{DSS} \times I \times P}{W_{FL} \times N} \times 1.106$$

ただし、C<sub>FL</sub>=フルジオキソニル含量(%), W<sub>FL</sub>, W<sub>DSS</sub>=フルジオキソニル及び DSS-*d*<sub>6</sub> の秤取量 (mg), I=3 種のシグナル (δ<sub>H</sub> 7.31~7.40, 7.56 及び 7.85 ppm) の面積強度の和, N=3 種のシグナルの水素数の和, P= DSS-*d*<sub>6</sub> 標準物質の純度 (92.2%)

#### 4-2) qHNMR 測定条件及びデータの解析

測定条件を表 3-1 に示した。得られた FID データは、3-1-3)に示す条件でフーリエ変換及び位相補正した。DSS-*d*<sub>6</sub>のシグナルを δ<sub>H</sub> 0 ppm とし、δ<sub>H</sub> 7.31~7.40, 7.56 及び 7.85 ppm 付近のシグナルの面積強度をそれぞれ A<sub>1</sub> (水素数 3 に相当), A<sub>2</sub> (水素数 1 に相当) 及び A<sub>3</sub> (水素数 1 に相当) としたとき、(A<sub>1</sub>/3)/A<sub>2</sub> 及び(A<sub>1</sub>/3)/A<sub>3</sub> 及び A<sub>2</sub>/A<sub>3</sub> がそれぞれ 1.0 であることを確認した。DSS-*d*<sub>6</sub>のシグナル面積強度を 9.000 としたときの A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 及び A<sub>3</sub> の和などを上記の式に代入しフルジオキソニルの含量を求めた。

#### 5) チアベンダゾール

##### 5-1) チアベンダゾールの NMR スペクトル分析 (シグナルの帰属)

チアベンダゾール標準物質約 10 mg を量りとり、DMSO-*d*<sub>6</sub>約 1.0 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、各種 NMR 測定 (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC) を行った。

##### 5-2) qHNMR 法によるチアベンダゾールの定量

##### 5-2-1) qHNMR 標準溶液の調製

DSS-*d*<sub>6</sub> 21.85 mg を精密に量り、DMSO-*d*<sub>6</sub> 100 g を加え qHNMR 標準溶液とした (DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度 : 0.201 mg/g)。

##### 5-2-2) チアベンダゾール含量の測定

チアベンダゾール標準物質約 13 mg を精密に量りとり、qHNMR 標準溶液約 1.0 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qHNMR 測定を行った。DSS-*d*<sub>6</sub> のシグナル面積強度を 9.000 としたときのチアベンダゾールに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、チアベンダゾール含量 (C<sub>TBZ</sub>, %) を算出した。

$$C_{TBZ} = \frac{I_{TBZ} / H_{TBZ}}{I_{DSS} / H_{DSS}} \times \frac{M_{TBZ} / W_{TBZ}}{M_{DSS} / C_{DSS}} \times 100$$

ただし、I<sub>TBZ</sub>, I<sub>DSS</sub>=チアベンダゾール及び DSS-*d*<sub>6</sub> のシグナル面積強度 (DSS-*d*<sub>6</sub>:9.000), H<sub>TBZ</sub>, H<sub>DSS</sub>=チアベンダゾール及び DSS-*d*<sub>6</sub> の特定基の水素数 (DSS-*d*<sub>6</sub>:CH<sub>3</sub>×3=9), M<sub>TBZ</sub>, M<sub>DSS</sub>=チアベンダゾール及び DSS-*d*<sub>6</sub> の分子量 (チアベンダゾール:201.25, DSS-*d*<sub>6</sub>:224.36), W<sub>TBZ</sub>=チアベンダゾールの秤量濃度 (mg/g), C<sub>DSS</sub>=DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度 (0.201 mg/g)。

##### 5-2-3) qHNMR 測定条件及びデータの解析

qHNMR 測定の基本条件を表 3-1 に示した。得られた FID データは、3-1-3)に示す条件でフーリエ変換及び位相補正した。qHNMR の化学シフト値は、DSS-*d*<sub>6</sub>の水素シグナルを基準シグナル (δ 0) とし、δ 値を ppm 単位で表した。DSS-*d*<sub>6</sub> 及び定量シグナルの積分範囲を設定した後、DSS-*d*<sub>6</sub>のシグナル面積強度を 9.000 としたときのチアベンダゾールに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を上記 5-2-2)で示した計算式に代入し、チアベンダゾール含量

を算出した。

## 6) アゾキシストロピン及びピリメタニル

### 6-1) アゾキシストロピン及びピリメタニルの NMR 分析 (シグナルの帰属)

各試料約 20.0 mg を精密に量りとり、アゾキシストロピンでは MeCN-*d*<sub>3</sub>、ピリメタニルでは MeOH-*d*<sub>4</sub> 約 2.0 g にそれぞれ溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、各種 NMR 測定 (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC) を行った。

### 6-2) qHNMR 法による定量

#### 6-2-1) アゾキシストロピンの含量測定

アゾキシストロピン約 20 mg 及び 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 約 4 mg をそれぞれ精密に量り、MeCN-*d*<sub>3</sub> 2 mL を加えてこれらを溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qHNMR 測定を行った。1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> のシグナル面積強度を 18.00 としたときのアゾキシストロピンに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、アゾキシストロピン含量 (C<sub>AZ</sub>, %) を算出した。

$$C_{AZ} = \frac{I_{AZ}/H_{AZ}}{I_{BTMSB}/H_{BTMSB}} \times \frac{M_{AZ}/W_{AZ}}{M_{BTMSB}/W_{BTMSB}} \times 100$$

ただし、I<sub>AZ</sub>、I<sub>BTMSB</sub> はアゾキシストロピン及び 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> のシグナル面積強度 (1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> : 18.00)、H<sub>AZ</sub>、H<sub>BTMSB</sub> はアゾキシストロピン及び 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> の特定基の水素数 (1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>×6=18)、M<sub>AZ</sub>、M<sub>BTMSB</sub> はアゾキシストロピン及び 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> の分子量 (アゾキシストロピン : 403.39、1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> : 226.50)、W<sub>AZ</sub>、W<sub>BTMSB</sub> はアゾキシストロピン及び 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> の秤取量 (mg) である。

#### 6-2-2) ピリメタニルの含量測定

ピリメタニル約 20 mg 及び 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 約 4 mg をそれぞれ精密に量り、MeOH-*d*<sub>4</sub> 2 mL を加えてこれらを溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ、密閉し、qHNMR 測定を行った。1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> のシグナル面積強度を 18.00 としたときのピリメタニルに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、ピリメタニル含量 (C<sub>PY</sub>, %) を算出した。

$$C_{PY} = \frac{I_{PY}/H_{PY}}{I_{BTMSB}/H_{BTMSB}} \times \frac{M_{PY}/W_{PY}}{M_{BTMSB}/W_{BTMSB}} \times 100$$

#### 6-3) qHNMR 測定条件及びデータの解析

qHNMR 測定の基本条件を表 3-1 に示した。得られた FID データは、3-1-3) に示す条件でフーリエ変換及び位相補正した。qHNMR の化学シフト値は、1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> の水素シグナルを基準シグナル (δ 0.23) とし、δ 値を ppm 単位で表した。1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 及び定量シグナルの積分範囲を設定した後、1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> のシグナル面積強度を 18.00 としたときのアゾキシストロピンまたはピリメタニルに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を上記 6-2-1) 及び 6-2-3) で示した計算式に代入し、それぞれの含量を算出した。

## B-4 食品香料の規格化のための遺伝毒性予測に関する研究

### 1) 構造活性相関手法 (SAR)

遺伝毒性評価を目的とする次の 3 種類、DEREK (Lhasa Ltd.)、ADMEWORKS (AWorks; 富士通九州システムエンジニアリング)、MULTICASE (MCCase; Multicase Inc.) を SAR のソフトウェアとして用いた。DEREK は、知識ベースのエキスパートシステムで、既

知データからAmes試験で陽性判定になる特徴的な部分構造を定義し、ルール化された経験則に基づき、定性的にAmes試験結果の予測を行う。一方、AWorksは、人工知能型アプローチのシステムで、化学物質の構造をフラグメントに分解後、パラメータ(数値データ)に変換し、Ames試験の陽性判定と相関の高いパラメータに基づき、多変量解析、パターン認識により試験結果を予測する。数値データから定量的な毒性の予測が可能である。したがってこれは定量的構造活性相関(QSAR)を調べることができるソフトである。MCASEはこれらの中間型で、化学物質の構造と特徴を表す構造記述子と、多数の部分的構造を機械的に検出し、統計理論からAmes試験の陽性判定と相関する構造記述子を選別し、予測を行うシステムである。新しく検討するTiMeSモデルは、ラット肝のS9での代謝反応、及び非生物的反応の総合的ライブラリーと、代謝による変換確率の推定値を用いて妥当な代謝マップを創り出す帰納的アルゴリズムに基づくものである。構造クラスごとに一つ又は複数の記述子を用いた多変量モデルに基づく予測を行う。

## 2) FATに用いた検定菌

検定菌として *Salmonella typhimurium* TA100及びTA98を用いた。

## 3) FATに供した被験物質

H22年度に40物質(表4-1)、H23年度に43物質(表4-2)、H24年度に43物質(表4-3)を選択した。

## 4) 被験物質溶液の調製

被験物質が液体の場合には、被験物質をジメチルスルホキシド(DMSO、和光純薬工業株)で所定の濃度に希釈した。被験物質が粉末の場合には、所定量秤量し、DMSOに溶解して最高用量の溶液を調製し、以下DMSOで段階希釈し

た。いずれの場合も被験物質溶液は用時調製とし、速やかに試験に供した。

## 5) 陽性対照物質

試験実施施設で蓄積データが得られている物質を使用した。反応液中(プレインキュベーション時)での濃度は次のとおり：S9 mix非存在下では、TA100及びTA98について、それぞれナトリウムアジド水溶液、1 µg/mLと、4-ニトロキノリン-1-オキシドDMSO溶液、1 µg/mLを用いた。S9 mix存在下では、TA100及びTA98について、いずれも2-アミノアントラセンDMSO溶液、0.4 µg/mLを用いた。

## 6) 試験に用いた材料

最小グルコース寒天平板培地と代謝活性化を調べるためのラットS9はそれぞれ、極東製薬工業製、キッコーマン製を用いた。

## 7) FAT法の手順

ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid製)を12 mL入れたL字型試験管(容積：29 mL)に、解凍した凍結保存菌24 □Lをすみやかに接種し、37°Cで10時間、往復振とう培養して前培養菌液とした。増殖の確認は分光光度計により660 nmの吸光度の測定により行った。段階希釈法(106倍希釈)によって、前培養菌液中の生菌数を求めた。

24ウェルマイクロプレートの所定のウェルに、S9 mix非存在下では被験物質調製液(10 µL/ウェル)及び試験菌液(490 µL/ウェル)、S9 mix存在下では被験物質調製液(10 µL/ウェル)、S9 mix(75 µL/ウェル)及び試験菌液(415 µL/ウェル)を分注する。ウェル数は、3ウェル/用量/条件/菌を使用する。

分注操作終了後、24ウェルマイクロプレートに蓋をし、回転振とう(37°C、90分間、回転数：170 rpm)する(プレインキュベーション)。プレインキュベーション後、24ウェルマイクロ

レートの各ウェル中の被験物質に由来する沈殿の有無を目視により観察する。全ての群について、24ウェルマイクロプレートにインジケータ培地（2.5 mL/ウェル）を加え、混合液を調製して、再度沈殿の有無を目視により観察する。マルチチャンネルマイクロピペットを用い、混合液を24ウェルマイクロプレート（1ウェル）1枚から384ウェルマイクロプレート（48ウェル）3枚へ分注する。分注量は、60  $\mu$ L/ウェル（384ウェルマイクロプレート）とする。

すべての分注操作終了後、384ウェルマイクロプレート（蓋付き）をチャック付きビニール袋に入れ（プレート数：4枚以下/袋）、チャックを閉めたのち、静置培養（37 $^{\circ}$ C、72時間）する。培養後、チャック付きビニール袋から384ウェルマイクロプレートを取り出し、全ての群について、混合液が黄色に変化したウェル数（黄変ウェル数）を目視によって計測する。

同一用量における3区画の黄変ウェル数が全て0となる用量が連続して2用量以上認められる場合、それらの用量は生育障害が認められるものと判断する。

数式を用いて、同一処理内容の3区画における平均黄変ウェル数及び黄変ウェル出現頻度（%）を算出する。なお、陰性対照群及び陽性対照群の黄変ウェル出現頻度（%）は、それぞれ陰性対照値及び陽性対照値とする。

## B-5 食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明

### 1) 試料

都内スーパーで購入したキャベツ、レタス、キュウリ、ニンジン、タマネギ、ダイコン、モヤシ、カイワレ大根、アジ、エビ、カキ、鶏もも肉及び絹ごし豆腐を用いた。鶏もも肉を除く各試料は超純水ですすいだ後、小さく切り分け

試料とした。

### 2) 試薬

揮発性有機化合物（VOC）標準原液、ハロアセトニトリル(HAN)混合標準原液(トリクロロアセトニトリル[TCAN], モノクロロアセトニトリル[MCAN], ジクロロアセトニトリル[DCAN], モノブromoアセトニトリル[MBAN], ブロモクロロアセトニトリル[BCAN], ジブromoアセトニトリル[DBAN]), 抱水クロラール[CH]標準原液、ハロ酢酸混合標準原液(クロロ酢酸[MCAA], ジクロロ酢酸[DCAA], トリクロロ酢酸[TCAA], ブロモ酢酸[MBAA], ジブromo酢酸[DBAA], トリブromo酢酸[TBAA], ブロモクロロ酢酸[BCAA], ブロモジクロロ酢酸[BDCAA], ジブromoクロロ酢酸[DBCAA])及び内部標準原液として関東化学製の水道水質試験用標準液を用いた。VOC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及び4-ブromoフルオロベンゼン標準原液を用い、ハロアセトニトリル並びにハロ酢酸の内部標準液として関東化学製の1,2,3-トリクロロプロパン標準原液を用いた。また、サロゲートとしてSUPELCO社製の2,3-ジブromoプロピオン酸を用いた。ハロ酢酸分析のサロゲートとして、SUPELCO社製の2,3-ジブromoプロピオン酸を用いた。VOC標準液の希釈溶媒には和光純薬工業社製のTHM用メタノールを用い、ハロアセトニトリル並びにハロ酢酸標準液の希釈溶媒には関東化学社製の残留農薬・PCB試験用tert-ブチルメチルエーテル (MTBE)を用いた。硫酸ナトリウムは和光純薬工業社製の残留農薬試験用いた。次亜塩素酸ナトリウムには和光純薬工業社製又は関東化学社製の食品添加物用を用いた。その他の試薬は特級を用いた。次亜塩素酸ナトリウムは第8版食品添加物公定書19)に従いあらかじめヨウ素滴定法で定量した後、有効塩素

濃度が10または100  $\mu\text{g/ml}$ となるように適宜希釈し殺菌液を調製した。

### 3) 器具及び装置

ダイナミックヘッドスペース (DHS) は 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 4.8cm のニードル (ジールサイエンス製) を使用した。ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) は島津製作所製の GCMS-QP2010 を用いた。

DHS サンプルバイアル (50 ml) 及びテフロンライナー付シリコンセプタムは、I-CHEM 製の EPA 規格に準拠した 40ml VOA バイアルを用いた。バイアル瓶は 100°C で 3 時間加熱後、放冷し、バイアル内部及びセプタムを窒素パージ処理した後、分析に使用した。

ECD 検出器付ガスクロマトグラフ (GC/ECD) は 6890N (Agilent Technologies) を用いた。全てのガラス器具は 105°C で 3 時間加熱後、放冷して用いた。

### 4) THM 測定条件 (DHS-GC/MS)

ダイナミックヘッドスペース条件

サンプルカップ温度: 60°C, サンプルニードル温度: 60°C, バルブオープン及びトランスファーライン温度: 150°C, 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°C, デソープ時間: 6 min, デソープ温度: 220°C, ベーク時間: 35 min, ベーク温度: 230°C, スターラー攪拌: 弱回転, クライオフォーカス: なし

GC/MS 条件

カラム: AQUATIC-2 60m $\times$ 0.25mm I.D. 膜厚 1.4  $\mu\text{m}$ , カラム温度: 40°C (3min) $\rightarrow$ (4°C/min) $\rightarrow$ 200°C (7min), 注入口温度: 160°C, イン

ターフェース温度: 200°C, イオン化法: EI, イオン化電圧: 70ev

### 5) ハロアセトニトリル測定条件 (GC/MS)

カラム: DB-1 (Agilent Technologies) 30m $\times$ 0.25mm ID, 膜厚 1.0  $\mu\text{m}$ , カラム温度: 40°C (10 min) $\rightarrow$ (20°C/min) $\rightarrow$ 300°C (2 min), スプリットレス, 注入口温度: 250°C, インターフェース温度: 250°C, イオン化法: EI, イオン化電圧: 70ev, 線速度: 43 cm/min

### 6) ハロ酢酸測定条件 (GC/ECD)

カラム: DB-1701 (Agilent Technologies) 30m $\times$ 0.25 mm ID, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ , カラム温度: 40°C (5 min) $\rightarrow$ (5°C/min) $\rightarrow$ 60°C (10 min) $\rightarrow$ (10°C/min) $\rightarrow$ 100°C (5 min) $\rightarrow$ (20°C/min) $\rightarrow$ 260°C, スプリットレス, 注入口温度: 200°C, 検出器温度: 260°C, 線速度: 25 cm/min

### 7) 殺菌処理方法

試料 2 g を 50 ml のスクリュウキャップバイアルに採り、野菜、魚介類及び鶏肉の場合は有効塩素濃度として 100  $\mu\text{g/ml}$ , 豆腐には 10  $\mu\text{g/ml}$  となるように調製した次亜 Na 溶液 20 ml に浸し、室温で 10 分間殺菌処理を行った。殺菌処理後、アスコルビン酸ナトリウム (4 $\rightarrow$ 10) 200 $\mu\text{l}$  を加えて反応を止め、よく攪拌した後、余剰の殺菌液を取り除いた後、殺菌処理試料とした。

### 8) THM 試験液の調製

試料を VOA バイアルに採り、攪拌子、塩化ナトリウム 3 g 及び測定用精製水 10 ml を加え、次いでマイクロシリンジを使用して内部標準液を 2  $\mu\text{l}$  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 THM 試験液とした。

### 9) ハロアセトニトリル試験液の調製

試料を 50 ml のスクリュウキャップバイアルに採り、塩化ナトリウム 8 g を加え、軽く振って溶かした後、0.1 $\mu\text{g/ml}$  内部標準液を含む MTBE



5 ml を加え、5分間激しく振りまぜ3,000rpmで5分間遠心分離した後、MTBE層を分取し硫酸ナトリウムで脱水した後、GC/MS用試験液とした。なお、遠心分離後、MTBE層がゲル化した場合は、ゲル化したMEBE層を10 mlのスクリュウキャップ試験管に採取し、硫酸ナトリウム2 gを加えて振り混ぜた後、3,000rpmで5分間遠心分離して液状となったMTBE層を分取し、硫酸ナトリウムで脱水した後、ハロアセトニトリル試験液とした。

#### 10) ハロ酢酸試験液の調製

試料を50 mlのスクリュウキャップバイアルに採り、サロゲート及び硫酸ナトリウム8 gを加え、よく振とうした後、硫酸を滴下しpH0.5以下となるように調整した。1 µg/ml内部標準液を含むMTBE 5 ml を加え、5分間激しく振りまぜた後、3000 rpm,で5分間遠心分離後、MTBE層3 mlを10mlのスクリュウキャップバイアルに採り、10%硫酸メタノール溶液1 mlを加え、ヒートブロック上で50℃、2時間加熱し、メチルエステル化処理を行った。反応終了後、放冷し、飽和炭酸水素ナトリウム5 mlを加え中和を行い、炭酸ガスの発泡が少なくなるまでボルテックスミキサーを用いてよく攪拌した。静置後、MTBE層を1.5 mlバイアルに分取し、ハロ酢酸試験液とした。

#### 11) THM検量線用標準液の調製

フルオロベンゼン標準原液及び4-ブロモフルオロベンゼン標準原液1 mlをそれぞれ正確に少量のメタノールを入れたメスフラスコ10 mlに採り、メタノールを加えて正確に10 mlとし内部標準原液とした。この液1 mlを正確に採り、メタノールを加えて正確に10 mlとし内部標準液とした。

内部標準原液1 mlを正確に少量のメタノールを入れたメスフラスコ20 mlに採り、次いで、

揮発性有機化合物混合標準原液1mlを正確に採り、メタノールを加えて正確に20 mlとし揮発性有機化合物標準液とした。この液0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mlをそれぞれ正確に採り、メタノールを加えて正確に10 mlとし、検量線用標準源液とした。VOAバイアルに攪拌子、塩化ナトリウム3g及び測定量精製水10 mlを採り、次いでマイクロシリンジを使用して検量線用標準源液を2 µl注入し、直ちにテフロンシート付きセプタムをのせ、アルミキャップで密封し、検量線用標準液とした。

#### 12) ハロアセトニトリル及びハロ酢酸検量線用標準液の調製

各混合標準原液を段階的にメスフラスコに採り、希釈溶媒で正確にメスアップし、検量線用標準液とした。各検量線用標準液をそれぞれ正確に採り、以下、試験液と同様に操作を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

### C. 研究結果及び考察

#### C-1 食品添加物の規格の向上及び使用実態に関する研究

##### 1) アルギン酸の定量法に関する研究

蒸留法では、USP で採用されている蒸留法を検討したところ、蒸留時間がアルギン酸塩類の含量に影響することが明らかとなった。USP 法で2時間蒸留したときより、3時間蒸留したほうが含量が高くなり、3時間蒸留することが望ましいと考えられた。また、USP 法で流通品を定量した場合、いずれのアルギン酸塩類も規格含量値内に収まる結果が得られ、アルギン酸塩類の含量規格試験法として適用可能であると考えられた。

HPLC 法では、アルギン酸塩類の構成糖であるグルロン酸及びマンヌロン酸の標準品が入手

困難であったため、アルギン酸ナトリウムを硫酸で加水分解後、陰イオン交換樹脂で分離精製を行い、2つのウロン酸を得た。その結果、2つのウロン酸画分を得ることができた。それぞれの画分について、Zorbax SAX カラムを用いた HPLC 分析を行ったところ、それぞれの画分は単一なピークとして得られた。これらを用いて、マンヌロン酸及びグルロン酸を標準品として定量を試みたが、純度が低かったため、マンヌロン酸は試薬を用い、グルロン酸は分取した低濃度の標準品で検量線を作成し、それらの検量線を用いて定量することとした。試料として用いたアルギン酸塩類は、TFA で加水分解する方法を参考とした。しかし、多量のアルギン酸塩類が単糖であるグルロン酸及びマンヌロン酸となるまで完全に加水分解されなかったため、アルギン酸リアーゼを加え、酵素による更なる加水分解も試みた。酵素反応 30 分後、若干グルロン酸及びマンヌロン酸含量が増えたが、酵素反応 1 時間後はウロン酸含量が減るものもあった。いずれのアルギン酸塩類もグルロン酸 2.7~6.7%、マンヌロン酸 0.5~18.0%、合計でも 3.3~24.0% となり、いずれも低い含量値となり、特にアルギン酸カルシウムは合計が 3.3~5.0% と低く、これはアルギン酸カルシウムが不溶性であることが原因の一つであると考えられた。以上の結果から、HPLC を用いたアルギン酸塩類の定量はグルロン酸の標準品が入手不可能であることや、酸加水分解ではアルギン酸塩類を完全に単糖まで分解することが困難であることから、アルギン酸塩類の含量規格試験法としての適用は難しいと考えられた。

比色法による定量法の検討では、アルギン酸類の構成糖以外の他のウロン酸類（ガラクトuron酸、グルクロン酸、グルクロノラクトン等）を用いて比色法（カルバゾール硫酸法、オルシ

ン Fe<sup>3+</sup>塩酸法、ナフトレゾルシノール法）を検討した結果、ナフトレゾルシノール法では、他の 2 法に比べ、ウロン酸間の発色の差が小さかった。そこで、ガラクトuron酸を標準品としてナフトレゾルシノール法によりアルギン酸類の定量を行ったところ、各アルギン酸塩類の含量は 36~59% となり、公定法及び USP 法の含量値と一致しなかった。更に、マンヌロン酸を購入し、ナフトレゾルシノール法で検量線を作成したところ、マンヌロン酸の感度が一番良かった。しかし、高分子のアルギン酸ナトリウムを標準品とした場合では、感度が悪くマンヌロン酸の検量線の約半分の傾きとなった。蒸留法で純度が明らかとなったアルギン酸ナトリウムを標準品として、比色法で定量したところ、アルギン酸ナトリウムでは 91.1%、アルギン酸カリウム 95.0% であり、規格値に収まる値であったが、アルギン酸カルシウムでは 38.1% と低い値が得られ、アルギン酸アンモニウムでは 106.0%、アルギン酸では 108.9% となり、規格値を超える値が得られた。比色法はばらつきも少ない方法と考えられたが、構成糖であるマンヌロン酸での検量線と、アルギン酸ナトリウムでの検量線では傾きが大きく異なっており、以上の結果から比色法では、何を標準品として定量するかにより、得られる値が大きく異なる可能性があるため、標準品の選択が重要であると考えられた。

## 2) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究

指定添加物に関しては、第9回調査をまとめた。食品添加物の生産量を基にして求めた一日摂取量の多かった品目は、L-グルタミン酸ナトリウム（2540mg/人/日）、D-ソルビトール（1450mg/人/日）、クエン酸（無水物換算、376 mg/人/日）、二酸化炭素（218 mg/人/日）、グリ

セリン脂肪酸エステル (212 mg/人/日) 等であり、過去の調査結果と大きく外れるものではなかった。また、ADIとの比較からも問題がなかった。既存添加物に関しては、第4回の生産量統計調査をまとめた。出荷量の多かったものは、製造用剤ケイソウ土(45,390トン)、製造用剤活性白土(36,746トン)、製造用剤窒素(31,333)、製造用剤パーライト(15,720トン)、着色料カラメル I (13,107トン) 等であった。出荷量の多かったもののうち、ケイソウ土、活性白土及びパーライトは、ろ過助剤や精製剤として使用されるものであり、直接食品とともに摂取されるものではない。また、窒素は気体であるため、他の食品添加物とは異なる。この調査からは食品とともに摂取される既存添加物としては、カラメル類が最も多いものと推察された。

### 3) 食品香料化合物の使用量調査及び摂取量に関わる調査研究

#### 1. 日本における調査結果

調査は日本香料工業会所属の会員企業 145 社を対象に、2010 年(平成 22 年 1 月~12 月) 1 年間に食品香料製造に使用した香料化合物の使用量を記入式アンケート調査で回答を求めるとで行った。

調査企業 145 社のうち食品香料を製造している 86 社から 2000 を超える品目と総数約 20000 の回答件数を得た。これらの回答を精査整理した結果、食品香料の生産量を母数とする報告率は 98.8%となり業界の実態を十分反映している調査結果を得た。

- ①日本で使用していた食品香料化合物の品目数と年間使用量 結果を表 1-1 に示す。
- ②日本で使用していた香料化合物の使用量別品目数 結果を表 1-2 に示す。
- ③日本で使用していた食品香料化合物の推定摂取量 結果を表 1-3 に示す。

2010 年(平成 22 年) 1 年間に我が国で使用した香料化合物数は 2045 品で平成 17 年調査に比べると 110 品程少なかったが、使用量は平成 17 年(1217t) の前回調査比べて若干多い約 1264t であった。

使用した香料化合物を摂取量という面でみると、平成 17 年と同様 1.5 $\mu$ g/人/日以下で使用している化合物数が全体の 60%以上を占め相変わらず安全に少量で使用している実態が把握された。

Vanillin や Menthol など比較的多量に使用している上位 25 品目については、調査年度によって若干順位に変動はあるものの何時の調査年間でもよく使われていて、今回の調査でもその実態を把握できた。

新規指定香料化合物の使用状況については、調査期間の終わりに近い平成 22 年の 11 月に告示された 2 物質を除き全ての化合物の使用が確認でき国際汎用香料の我が国での必要性が高いことが分かった。

#### 2. 日米欧調査結果の比較

- 1) 日米欧三極で使用していたコアリスト中の食品香料化合物の品目数と年間使用量 結果を表 1-4 に示す。
- 2) 日米欧三極で使用していた食品香料化合物の推定摂取量 結果を表 1-5 に示す。

日本と同時期・同調査リストを使用した使用量調査では、欧米共に報告率が 80%と日本より低く報告されている。詳細は不明であるが、欧州では多国間に亘っての調査であるため、また米国では国土が広いと調査に徹底することが難しかった結果ではないかと推測している。

香料化合物の使用量をみると、人口を加味しても日本の使用量(1249t)は欧州(5249t)、米国(6697t)に比べ最も少なく、国際的に見ても日本が安全に使用している実態が初めて把

握できた。また、調査コアリスト化合物のみで見ると、総使用量のうち欧州では43.3%を占める化合物が、米国では45.3%を占める化合物が摂取量 1.5 $\mu$ g/人/日以下で使われており日本の52.7%より低いとはいうもののやはり少量で使用している実態が欧米にもあったことが確認できた。

このような実態の中で、日米欧とも最もよく使用されている香料化合物はVanillinであった。特に欧州では日米に比べ一段と多く使われていて、甘い匂いへの嗜好性の高いことが分かった。日米欧の地域特性については多量に使用している化合物というよりもむしろ少量で使用している化合物にあるようであるが詳細については不明である。比較的使用量の多い化合物の中から地域性のあると思われるものをあげると、日本ではやはり古くから親しみのあるワサビ様の香気成分である Allyl Isothiocyanate があげられ、米国では冬緑油（ツツジ科ヒメコウジ精油）の香気である Methyl Salicylate が、欧州では砂糖様の香気を持つ Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone をあげることができる。

また、日本で使用している化合物がどの程度欧米と整合しているかについてみると、使用量ベースではあるが FEMA 物質が 99.4%、残り 0.6%が EU 独自物質または日本独自の物質であることが明らかになり、一見整合化はかなり進んでいるように見える。しかしながら、香料の香調に特徴つけることができる国際汎用の少量使用化合物については現在まだ約 100 化合物ほどが未指定であり、これら化合物の安全性評価を経ての新規指定が急がれる。我が国で FEMA 物質が多く使用されている事実は、日本の香料メーカーが海外での適合性を考慮に入れた香料開発に努力した結果であると推定されるが、一方日本独自と思われる香料化合物もまた、

少量の使用ながら特徴的な香りを創造するために必須であり、海外でも使用できるようにする取り組みが引き続き必要である。

#### 4) 諸外国の香料規制に関わる調査研究

##### 4-1) 香料の定義及び香料主剤に対する規制

2010年度（平成22年度）の調査研究では、香料製造の基本にかかわる諸外国における香料の定義、定義に基づく主剤の規制について調査研究を行った。

香料の定義については、調査できた22カ国のうち、韓国以外の全てが「香気及び味の付与」を香料の定義としており、国際的には我が国の定義「香気を付与」と異なっていることが分かった。

Codex及び欧米においてflavorの機能としている「味」とは、古来香料としても使用されてきたスパイス・ハーブ類によってもたらされる様々な口中感覚をいうものと考えられる。これらの感覚と「香気」とを明確に区別することは難しいことから、諸外国では「香料」の機能にこれらの「味」を含めっていると推察された。

また、香料の主剤に関わる規制という面で見ると、天然香料については韓国、中国及び米国のみがポジティブリスト制を採用し、それ以外の国・地域ではネガティブリスト規制か或いはもともと規制するリストがなく、国際的には天然香料は原則自由であることが分かった。天然香料として使われる基原物質の多さを考えると、天然香料基原物質をポジティブリストで管理することは管理に多大なりソースを必要とする割にメリットは少ないと考えられることから天然香料に関しては多くの国・地域が、一部の安全性に懸念のある基原物質あるいはその中の特定成分を規制するネガティブリスト制を採用しているものと推察された。

一方合成香料についてはアジアのシンガポ