

ール、タイ王国、マレーシアがネガティブリストによる規制であった他は全て個別化合物でのポジティブリストにより規制をしていて、国際的には個別化合物によるポジティブリストによる規制が一般的であることが分かった。なお、これら各国の規制リストは資料として入手し有用に活用できるようにした。香料化合物に関してはリストを持たない国・地域、ネガティブリスト制の国・地域、或いはポジティブリスト制を採用している国・地域とが混在していることが分かった。ポジティブリスト制を採用している国をみると、独自のリストを持つ国・地域（EU、米国など）と、「FEMA-GRAS, 21CFR, CoE等のリストに記載されている香料化合物は使用できる」とする形式を取っている国（フィリピン、オセアニア（オーストラリア・ニュージーランド）など）に大別されたが、独自のリストで規制している国・地域は少なく、FEMA-GRAS, 21CFR等のリストで運用している国・地域が多かった。なかには独自のポジティブリストを持っているが、一方でFEMA-GRAS等を受け入れるという柔軟な規制で国際整合化を図っている韓国のような国もあった。なお、日本を含めて独自のリストを持つ国間ではリストに掲載されている品目に数多くの不整合が見られ、加工食品の交易量が増大する中、これら香料に使用する原材料については安全性評価基準を世界的に統一した上での整合化が急務であることも分かった。

#### 4-2) 香料の副剤、抽出溶媒

2011年度（平成23年度）の調査研究では、香料製造に深く関わる副剤と天然香料製造に使用する抽出溶媒規制について調査研究した。

香料副剤について定義している国・地域はインドネシア、中国、米国、メキシコ、メルコスール、EUであり多くの国・地域では定義無く

副剤を使用していることが分かった。

香料副剤については日本はじめ多くの国・地域で法的定義がなかった。法律で定義している国はわずかにインドネシア、中国、メルコスール、米国、メキシコの5ヶ国・地域のみであり、定義の内容は「香料に添加できる食品添加物や食品などの食品成分で、香料の溶解、拡散、若しくは希釈、または香料の生産、保管、取り扱い、及び使用に必要とされるもの」とされていて、法的に定義を持たない日本と実質的に同等な内容であった。

法律において定義している国・地域における定義の内容をみると「香料に添加できる食品添加物や食品などの食品成分で、香料の溶解、拡散、分散、若しくは希釈、または香料の生産、保管、取り扱い、及び使用に必要とされるもの」とされ、定義を持たない国・地域での考え方と基本は一緒であった。また、副剤の規制は、加工食品の製造が無いがあっても極少量の国・地域では副剤規制は無く、加工食品製造が活発と思える国は全て副剤の規制が有った。

次に天然香料の製造に使用する抽出溶媒規制を見ると、副剤同様天然香料の製造或いは加工食品製造が活発と思われる国・地域では抽出溶媒規制があり、天然香料の製造が無く加工食品の製造も余り無い国・地域では抽出溶媒規制は無かった。抽出溶媒規制のある12の国・地域（インド、インドネシア、韓国、シンガポール、中国、オセアニア、米国、カナダ、メキシコ、メルコスール、EU、ロシア）では殆どの国がポジティブリストで規制していたが、台湾、中国、メキシコについては規制はしているものの具体的溶媒についての記載は無かった。また、米国についてはポジティブリストとはなっていないが規則（21CFR）により19の溶媒が条件付で使用を認めている。

天然香料製造に使用する抽出溶媒の種類については各国・地域によってかなり異なっていた。また抽出溶媒の残留基準では、日本は天然香料自体に対する規制であるが、諸外国の中には加工食品への残留基準で規制している国・地域もあるので注意が必要であることも分かった。

#### 4-3) 香料の表示

2012年度（平成24年度）には、香料に関わる表示についての調査研究をした。

##### 4-3-1) 香料製品の表示

調査した22ヶ国・地域のうち15ヶ国・地域（インド、インドネシア、タイ、韓国、台湾、中国、バングラデシュ、フィリピン、ベトナム、マレーシア、オセアニア（オーストラリア・ニュージーランド）、米国、メルコスール、EU、南アフリカ共和国）で香料に対してもしくは食品添加物としての香料に対して表示基準を持っていて、そのうちの約半数はCodexや我が国と同様に、「食品添加物であること、賞味期限、使用基準・使用方法、製造者名・住所」等の表示項目を要求していた。

香料の表示で日本と諸外国とで異なる点は、諸外国では表示要求事項としてフレーバーのクラス（合成、天然等）と香料の原産国に関する項目があることであり、逆に日本では香料製剤中の副剤の表示が求められていることである。特にフレーバーのクラス（合成、天然等）に関する表示項目はインドネシア、EU、米国等多くの国々で要求されていたが、安全性の見地からいえば天然、合成等の区別なく表示するという我が国の考え方の方が適切であると考えられる。

##### 4-3-2) 加工食品への香料表示

調査対象国・地域で規定していないのはモンゴル、バングラデシュのみであり、ほとんどの国・地域が加工食品への香料の表示を規定していた。表示を規定している全ての国・地域では

一括名表示することが可能であることが理由なのか、個別香料原料で表示することについての法令条項は見当たらなかった。

##### 4-3-3) アレルギー表示

各国・地域のアレルギー表示の調査では、調査した22ヶ国・地域の中で14の国・地域（EU、米国、カナダ、オセアニア（オーストラリア・ニュージーランド）、韓国、中国、香港、インドネシア、シンガポール、マレーシア、メキシコ、ロシア、GCC、南アメリカ）でアレルギー表示義務が規定され、表示対象品目が示されていた。アレルギー対象品目13項目（グルテン含有穀類、卵、乳、ピーナッツ、甲殻類、魚類、大豆、ナッツ類、そば、フルーツ、肉類、10mg/kg以上の亜硫酸塩、その他）を国・地域で比較すると韓国は12項目、EU、カナダ、オセアニア（オーストラリア・ニュージーランド）が10項目、アメリカ、香港、インドネシア、シンガポール、メキシコ、南アフリカ共和国は9項目、中国は8項目、マレーシアは7項目、ロシアは2項目で規制していた。

2012年度の調査研究により、日本では現在のところ未だアレルギー対象品目となっていないが海外ではアレルギー表示対象品目としているものに、トマト、ゴマ、セロリ、マスタード、ハウチワマメ、小麦以外の麦類、クルミ以外のナッツ類、イガイ・イシガイ類、貝類、軟体動物、蜂花粉、プロポリス、ローヤルゼリー等あることが分かった。

アレルギー表示にみられる各国間における若干の規制の差は、各国・地域とも食生活の中で実際に発症した事例に基づいて規制しているからであると考えられる。例えば規制している国・地域の中でそばを表示の対象としているのは日本と韓国のみだが、これは他の国では食生活上そばを食する機会が少なく、結果としてア

アレルギー症例が少ないためと思われる。またフルーツを指定している国も日本と韓国のみで韓国は桃のみだが、日本はオレンジ、桃、キウイフルーツ、りんご、バナナと多い。くわえて肉類を指定しているのも日本と韓国のみで、韓国は豚肉のみに対し、日本では牛肉、鶏肉、豚肉まで指定しているが、その理由は民族的なものか或いは宗教上なのか理由は不明である。また、法的規定が無いか或いは表示を義務化としながらも品目を規定していない等の国・地域は、香料製造や加工食品の製造の無いと思われる国・地域であった。そのなかで唯一台湾は香料製造もあり加工食品の製造も活発であるにも関わらずアレルギー表示への規定が定めていないことが分かったが、その理由は不明である。

#### 4-3-4) GMO表示

GMO表示に関する規制がある国・地域は、調査した22ヶ国・地域のうち11の国・地域(EU, オセアニア(オーストラリア・ニュージーランド)、韓国、中国、インドネシア、タイ、台湾、ベトナム、マレーシア、ロシア、南アフリカ)であった。日本と同様に主として加工食品に対する表示規制と思われる国・地域が8ヶ国・地域であり、加工食品以外に食品添加物まで表示を明確に求めている国・地域はオセアニア(オーストラリア・ニュージーランド)、中国とEUであった。

GMO表示では、食品添加物まで表示義務を課している国・地域、加工食品への表示を課している国・地域、或いは表示なしとする国・地域など様々であるが、表示に対する考え方がかなり違っていた。食品添加物まで表示を求める国・地域(EU, オセアニア(オーストラリア・ニュージーランド)、中国)がある一方、米国、メキシコ、メルコスールでは規制が無く、アジア諸国も規制の無い国が多かった。規制をして

いない国・地域についてその理由でみると、米国はGMO開発国であり安全性については十分管理されていると考え、メキシコ、メルコスール等もこの考え方を認めてのことだと思われる。一方アジア諸国で規制の無い国はそもそも加工食品の製造が少なく自国で規制しても余り意味をなさないからだと思われる。GMOについては各国間・地域の間における考えの差が表示規制に強く現れていた。

## C-2 食品添加物の規格向上のためのIRに関する調査研究

### 1. ネオテームの測定基準の検討

#### 1-1. 透過法(ペースト法とKBr法)によるネオテームの測定基準の検討

従来の測定法(透過法)での測定条件を定めるため、まず、提供されたネオテーム(食品添加物製品)について、試料の乾燥(45℃、五酸化ニリン存在下、減圧乾燥)前後に、ペースト法でIRの測定を行った。その結果を、図2-1と図2-2に示す。両者のIRは明らかに異なっており、この結果は、提供ネオテームが水和物であることを示唆している。図2-1に示される、ペースト法で測定した乾燥前の提供ネオテームのIRが、ペースト法で測定した市販ネオテーム一水和物のIR(図2-3)と一致していることも、提供ネオテームが水和物であることを支持している。

一方、乾燥した提供ネオテームのIRをKBr法で測定したところ、図2-4の矢印で示されるようなピークが観察され、明らかな異常スペクトルを示した。また、乾燥前の提供ネオテームのIRをKBr法で測定した場合も、図2-5及び図2-6の矢印で示されるショルダーが観察され、異常スペクトルとなった。さらに、試料の調製に時間の掛かった図2-6のIRでは、○印で囲んだ3300

～3600 cm<sup>-1</sup>付近のピークの相対強度が図2-5と異なっていたことから、KBr法では、試料の調製時間によりスペクトルが変化し、再現性が得にくいことが分かった。

次に、ネオテームの乾燥条件を定めるため、ネオテームを常温、五酸化ニリン存在下で減圧乾燥し、ペースト法で測定した。その結果、図2-7の矢印で示すように、1750 cm<sup>-1</sup>付近にショルダーが観察された。したがって、ネオテームの乾燥には加熱が必要であり、ネオテームの融点が80～85℃程度であることを考慮すると、40～50℃程度に加熱するのが適当であると考えられる。実際に、45℃で減圧乾燥させたネオテームをペースト法で測定すると、再現性のよいIRを得ることができた。

以上の結果より、ネオテームの測定基準としては、40～50℃程度で、五酸化ニリン存在下で減圧乾燥し、ペースト法で測定するのが適当であると定めることができた。

## 1-2. ネオテームを用いた、ATR法によるIRの確認試験への利用の可能性に関する基礎的検討

### 1-2-1. ポリスチレンフィルムの吸光度での透過IRとATRの比較検討

まず、透過法でのIRと、ATR（反射）法について基礎的に検討するために、波数校正用のポリスチレンフィルムを用いて、吸光度を比較検討した。透過IRスペクトル（図2-8）では、実線の矢印で示されるピークは点線の矢印で示されるピークよりも顕著に大きい。それに対し、ATR補正を行っていないATR法でのスペクトル（図2-9）では、実線の矢印で示されるピークは点線の矢印で示されるピークよりも小さく観測され、透過IRスペクトルと相対強度が逆転した、全く異なったスペクトルとなった。さらに、ATR補正を行ったATRスペクトル（図2-10）でも、実線の矢印で示されるピークは点線の矢印

で示されるピークよりも小さく観測され、相対強度の逆転は補正されたものの、相対強度比は、透過IRスペクトルと大きく異なっていた。これらの結果は、ATRの原理通り、短波長（長波数）側ほどもぐり込み深さ（セル長に相当）が短く、長波長（短波数）側に比べ吸光度は小さく観測されることを示す結果であり、また、ATR補正機能での補正を行っても、透過IRスペクトルとは一致せず、異なったスペクトルであることを示している。

### 1-2-2. ネオテームを用いたペースト法とATR法の比較検討

次に、実際の食品添加物試料を用いて検討を行った。試料として、1.で測定基準を定めたネオテーム（食品添加物製品）を取り上げ、従来のペースト法やKBr法と、ATR法を比較検討した。まず、1.で定めた条件に従って乾燥したネオテーム（45℃、五酸化ニリン存在下、減圧乾燥）のIRスペクトルを、ATR法で測定した。なお、ATR法での測定においては、乾燥ネオテームをATR法で測定し（図2-11）、ATR補正を行った（図2-12）。さらに縦軸を吸光度（Abs）に変換し（図2-13）、演算機能で、吸光度を5～6倍に演算し（図2-14）、再び縦軸を透過率（%T）に変換した後（図2-15）、ベースライン補正を行った（図2-16）。こうして得られたATR法でのIRスペクトルと、ペースト法でのIRスペクトルを比較した結果を図2-17に示す。両者は比較的類似していたが、図2-17に示された、点線の○印で囲まれたピークの相対強度は、ペースト法のIRスペクトルと、ATR法のIRスペクトルとで異なっていた。従って、乾燥ネオテームの測定においては、ATR法でのIRスペクトルは、ペースト法のIRスペクトルとは異なるスペクトルであることが分かった。

さらに、乾燥前のネオテーム（ネオテーム一水

和物)についても、同様に、ペースト法と、ATR法で測定したIRスペクトルを比較した(図2-18)。その結果、ATR法で測定したスペクトル(図2-18下段)は、ペースト法で測定したスペクトル(図2-18上段)とは、点線の○印で囲まれたピークの相対強度が異なっており、比較的類似しているものの、ペースト法のIRスペクトルとは異なることが分かった。

以上の結果より、ペースト法で測定したIRとATR法で測定したIRを比較することはできず、試料の確認に利用することもできないと考えられる。

一方、ATR法で得られた乾燥ネオテーム(図2-17下段)と、ネオテーム一水和物(図2-18下段)のIRスペクトルは異なっていた。この結果は、ネオテームの場合、ATR法でのスペクトル同士を比較することで、無水物と水和物の区別が可能であることを示している。

### 1-2-3. ネオテームを用いたKBr法とATR法の比較検討

さらに、ATR法による乾燥ネオテームのIRスペクトルと、KBr法で測定した乾燥ネオテームのIRスペクトルとの比較も行った(図2-19)。両者を比較すると、図2-19下段の矢印で示される、KBr法での異常スペクトルは、ATR法(図2-19上段)では認められなかった。この原因としては、ATR法は、KBr法のような、試料とKBrとの混合、加圧を必要としないため、KBr法でしばしば認められる異常スペクトルを生じにくいためと考えられる。従って、ATRとの比較により、KBr法の異常スペクトルを検出できる可能性があると考えられる。

## 2. 食品添加物(香料化合物)の測定法、測定条件及び標準IRの確立に関する検討

### 2-1. 測定法、測定条件及び標準IRの確立

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、IRの測定法などを検討した結果、いずれの品目に関しても、再現性の良いIRを得る測定法を確立することができた。これら45品目の名称、純度、物性、測定法(最終案)はp-20~21の表1にまとめて記載した。最終的に得られたIRは図2-20~64に示した。これらのIRは、標準IRとして利用可能である。

### 2-2. 測定法について特筆すべき品目

アントラニル酸メチル、ケイ皮酸メチル、シンナミルアルコール、ピペロナル、dl-メントール、l-メントールは、いずれも融点が常温に近く、測定環境温度によって固体と液体の状態を取り得る。そこでこれらの品目に関して、温度と試料の相状態及び測定法の選択に関して検討した内容を以下に詳述する。

#### 2-2-1. 環境温度と試料の相状態

夏場を想定し、約30℃の部屋に試料を放置し、試料の相状態を観察した。

028: ケイ皮酸メチル(融点33): 完全液状。

048: シンナミルアルコール(融点35): 完全液状。

061: ピペロナル(融点37): 表面融解。

083: dl-メントール(融点27~28): 完全液状。

084: l-メントール(融点41): 表面わずかに融解。

また、冬場を想定し、試料を約23℃の部屋に放置し、試料の状態を観察した。

028: ケイ皮酸メチル(融点33): 最初液状だが、物理刺激(スパーテル挿入など)で凝固、以降は固体。

048: シンナミルアルコール(融点35): 最初液状だが、物理刺激(スパーテル挿入など)で凝固、以降は固体。

061: ピペロナル(融点37): 固体。

083: dl-メントール(融点27~28): 最初液状

だが、物理刺激（スパーテル挿入など）で凝固、以降は固体。

084：l-メントール（融点41）：固体。

以上のように、これら5品目は、日本で想定される季節による環境温度変化によって試料の状態が変化するため、測定条件及び測定法を規定する必要がある。

#### 2-2-2. ペースト法によるIR測定

上記5品目について、ペースト法による測定を試みたが、室温30℃ではいずれも液状のため、測定不能であった。また、試料を冷却し、凝固させた後にペースト法による測定も試みたが、ペースト試料調製中に、試料が融解したため、やはり測定不能であった。従って、これら5品目に関しては、ペースト法による測定は不可能と判断した。

#### 2-2-3. 液膜法によるIR測定

上記5品目いずれも、室温30℃で液膜法で測定したIRと、室温約23℃で個体試料を加温して融解し、液膜法で測定したIRは一致した。

また、最も融点の高いl-メントールでも、加温融解後、室温約23℃の部屋で、3分間は液状であったことから、測定中（32回積算で約40秒、試料の設置などの余裕をみても、1～1.5分程度）は十分に液状を保てると思われる。

これらの結果は、液膜法を用いれば、夏場、冬場のどちらの場合でも、同一のIRを得られることを示しており、これら5品目の測定には液膜法が適していると考えられる。

#### 2-2-4. 液膜法と薄膜法の比較検討

前述のとおり、上記5品目は液膜法による測定が適してと考えられるが、冬場では、液膜が凝固し、薄膜となる可能性も考えられるため、薄膜法に関しても検討を行った。

薄膜法による測定は23℃の部屋で行った。窓板に固体試料を挟み、加温融解して試料を窓板

の間に均一に行き渡らせた。次に、試料を完全に凝固させるため、冷房の吹き出し口で冷却し、さらに冷風の当たる場所で10分以上風冷し（冷房吹き出し口は低温のため、急に25℃に戻すと結露するのを防ぐ）、窓板が動かない（窓板に挟まれている試料が凝固している）ことを確認し、測定した。

028：ケイ皮酸メチル（融点33）

液膜法で測定したIR（図2-29）と、薄膜法（図2-65）では異なるIRを示した。

一方、液状試料を23℃の部屋で40分放置（図2-66）しても、冷却試料のIRとは一致せず、1時間放置すると凝固し（図2-67）、冷却試料と同様のIRとなった。この結果は、冬場においても、一旦融解した試料を凝固させて薄膜法で測定するには、室温放置では時間依存性があり再現性が得られないため、再現性を得るためには冷却する必要があることを示しており、薄膜法による測定は夏場、冬場いずれにおいても、手間と時間が掛かるうえ、液体と固体が混ざった状態の試料となり、再現性が得られない恐れがあるため、不適當であると考えられる。

048：シナミルアルコール（融点35）

061：ピペロナル（融点37）

083：dl-メントール（融点34-36）

084：l-メントール（融点41）

いずれの試料も、ケイ皮酸メチルと同様、液膜法と、薄膜法では異なるIRを示した。

また、薄膜法による測定は、ケイ皮酸メチルと同様に、夏場、冬場いずれにおいても、手間と時間が掛かるうえ、液体と固体が混ざった状態の試料となる恐れがあるため、不適當であると考えられる。

加えて、ピペロナルに関しては、液状試料を23℃の部屋で2.5時間放置して凝固させて薄膜法で測定したIRは、液膜法のIRとも、冷却し

て薄膜法で測定したIRとも一致しなかった。これらの結果は、冷却温度や時間によって、薄膜法でのIRが変化する可能性を示唆している。

以上より、薄膜法では測定に手間と時間を要し、再現性が得られにくい一方で、液膜法は、2-2-3.で述べたように、室温に依存せずに再現性の良いIRが得られるため、液膜法での測定が適していると考えられる。

### 3. ATR法の確認試験への利用の可能性の検討

ATR法が食品添加物の確認試験に利用可能かを検討するため、試料の状態や、結晶多形がATRスペクトルに及ぼす影響を検討し、さらに、従来法によるIRとATR法によるIRとを比較検討した。

#### 3-1. 試料の状態とATRスペクトルに関する検討

試料の状態によるATRスペクトルの変化を調べるため、前出のケイ皮酸メチルを取り上げ、固体状態と液体状態での測定を行い、比較検討を行った。その結果、液体状態と固体状態のATRスペクトルは異なっていた(図2-68)。この結果は、ATR法でも、液体状態と固体状態の区別は可能であることを示している。

また、ATR補正とベースライン補正を行っても、液体状態のケイ皮酸メチルを液膜法で測定したIRと、補正ATRスペクトルは一致せず(図2-69)、同様に、固体状態のケイ皮酸メチルについても、薄膜法で測定したIRと補正ATRスペクトルは一致しなかった(図2-70)。従って、従来法で測定した参照IRとATR法で得られるIRの比較では、試料の確認は困難であると考えられる。

以上の結果より、ATR法を確認試験に利用するには、標準ATRスペクトルを確立し、ATRスペクトル同士で比較する必要があること及び標準ATRスペクトルを確立するに際しても、測定

条件や試料の相状態を規定する必要があると考えられる。

#### 3-2. ATR法による結晶多形に関する検討

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、ATR法を確認試験に利用するには、結晶多形を区別できる必要がある。そこで、ATR法により結晶多形を区別できるか否かを判断するために、結晶多形を持つことが知られているコルチゾン酢酸エステルに関して、エタノールから結晶化させた試料と、アセトンから結晶化させた試料を作製し、ATRスペクトルを測定し、比較検討した。その結果、両者のATRスペクトルは異なったことから(図2-71)、ATR法でも結晶多形の区別は可能であると考えられる。

#### 3-3. ATR法によるピロリジンの測定に関する検討

ピロリジンは、吸湿しやすく、揮発性も高いため、液膜法で、素早く測定する必要があることを、これまでに報告した。このように測定すれば、水分の影響のないIR(図2-72)が得られる。一方、ATR法は、液体試料の場合、プリズム上に試料をのせるだけで簡便に測定が出来るが、液膜法のように、窓板に挟まれておらず、外気にさらされた状態で測定することになるため、測定中に吸湿や揮発などを生じる可能性がある。この点を確かめるため、ATR法での測定を行った。

まず、プリズム上にピロリジンをのせただけでの測定を行った。その結果、測定後には試料がほとんど残っておらず、測定中に揮発したと考えられ、得られたスペクトルは図2-73のように、図2-72とは全く異なっていた。次に、測定機器に付属している、粉体試料用の試料押さえヘッドを試料に近づけ、液柱を作ることで、常にプリズム上に試料が載っている状態を作るこ

とを試みたが (図2-74), 測定中に揮発し, 図2-75のように, 図2-72とは全く異なるスペクトルとなった. そこで, 測定機器に付属している揮発防止カバーを用いて測定を行った (図2-76). 揮発防止カバー本体は金属製のため, 測定中の状態を観察することが出来なかったが, 測定後に観察すると, 揮発防止カバーのゴムパッキン部分がピロリジンにより一部溶解し (図2-77), 得られたスペクトル (図2-78) も, 図2-72とは全く異なっていた. そこで, 薬品耐性の強いシリコンシートを用い, 液溜めの自作を試みた. すなわち, ステージ上にある程度の大きさに切り取ったシリコンシートに直径約5 mmの穴を空け, プリズムがその穴に入るように設置した (図2-79). ピロリジンを穴に入れプリズムを覆うようにして測定を行ったが, 測定後には揮発しており, 図2-80のように, 図2-72と全く異なるスペクトルとなった. そこで, カバーガラスを載せることで, 揮発を防止することを試みたが (図2-81), 密閉度が十分でなかったためか, 測定後にはピロリジンの液量が減り, プリズムが一部露出していた. 得られたスペクトルは, 図2-82のように, 図2-72と類似のスペクトルであったが, ピーク強度が低かった. また, プリズム上にピロリジンを多めに載せ, KBr板を載せることで揮発防止することも試みた (図2-83). その結果, 図2-84のように, 図2-72と類似のスペクトルが得られたが, プリズムがステージよりも飛び出した構造になっているため, 所にKBr板を載せているため, プリズムが傷つく恐れがある. そこで, HPLCのオートサンプラーで少量の試料を測定する際に用いるガラス製のバイアルインサートにピロリジンを入れ, 素早く逆向きに載せ, 試料でプリズムを完全に覆う状態にして測定した (図2-85). その結果, 測定後もプリズム上にピロリジンが

残っており, 図2-86のように, 図2-72と類似のスペクトルが得られ, 他の方法よりも強いピークを持つスペクトルが得られた. ATRスペクトルは本来縦軸を吸光度 (Abs) 表示するため, 図2-86のスペクトルの縦軸をAbsにし (図2-87), Sigma-Aldrich社のSpectral Viewerに収載されているピロリジンのATRスペクトル (図2-88) と比較すると, 一致した. これらの結果は, ATR法でピロリジンを測定するには, 揮発を防止することが必須であり, 揮発防止のための器具の材質にも注意する必要があることを示している.

### 3-4. ATR法による固体試料の測定に関する検討

ATR法では, プリズムと試料が接している面で反射する際に赤外光のもぐり込みが生じ, そのときの試料の赤外光の吸収を測定することで, スペクトルが得られる. 従って, ATR法においては, プリズムと試料が接している面積も重要となってくる. 液体試料では, 試料がプリズムを覆っていれば, 接する面積は一定であると考えられるが, 固体試料の場合, 粒子径によって, 接する面積が異なってくる可能性がある. そこで, 固体粉末試料として, バニリン, ケイ皮酸を取り上げ, すりつぶしによって細かい粉末にした場合の変化について検討を行った.

#### 3-4-1. ATR法によるバニリンの測定に関する検討

まず, バニリン粉末試料を, そのままプリズムにのせ, 試料押さえヘッドを用いて測定を行った. その結果, 図2-89に示すスペクトルが得られた. 次に, バニリンを瑪瑙乳鉢ですりつぶし, より細かい粉末にしてプリズムにのせ, 試料押さえヘッドを用いて測定を行い, 図2-90に示すスペクトルを得た. この両者のスペクトルを比較すると, 1586  $\text{cm}^{-1}$ 付近と1428  $\text{cm}^{-1}$ 付近



のピーク強度，及び，731  $\text{cm}^{-1}$ 付近と631  $\text{cm}^{-1}$ 付近のピーク強度が逆転していた（図では赤線丸囲いで表示）。

#### 3-4-2. ATR法によるケイ皮酸の測定に関する検討

ケイ皮酸粉末試料を，そのままプリズムにのせ，試料押さえヘッドを用いて測定を行った。その結果，図2-91に示すスペクトルが得られた。次に，ケイ皮酸を瑪瑙乳鉢ですりつぶし，より細かい粉末にしてプリズムにのせ，試料押さえヘッドを用いて測定を行い，図2-92に示すスペクトルを得た。この両者のスペクトルを比較すると，1280  $\text{cm}^{-1}$ 付近と1220  $\text{cm}^{-1}$ 付近のピーク強度が逆転していた（図では赤線丸囲いで表示）。このピーク強度の逆転が，試料すりつぶしの際の吸湿によるものかを確かめるため，ケイ皮酸粉末試料に，まずNujolを添加し，表面を覆った後，瑪瑙乳鉢ですりつぶして測定を行った。その結果，図2-93に示すスペクトルが得られ，Nujolを加えずにすりつぶした図2-92と同様のスペクトルであった。この結果は，すりつぶしによるピーク強度の逆転は，吸湿による物ではないことを示している。

赤外スペクトル（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，食品添加物の規格基準の向上を目的として，種々の測定法で得られるIRを比較検討した。まず，ネオテームについて，従来の測定法（透過法）での測定基準を定めるため，ペースト法とKBr法により，乾燥前後のネオテームのIRを測定し，得られたIRを比較検討した。さらに，乾燥条件についても検討を加えた。その結果，ネオテームの測定基準としては，40～50℃程度で，五酸化二リン存在下で減圧乾燥し，ペースト法で測定するのが適当であると定めることができた。この結果は，規格基準の

向上に寄与するものと考えられる。

さらに，近年普及しつつある ATR 測定法について，ATR 法による IR の確認試験への利用の可能性を検討した。まず，ポリスチレンフィルムを用いて，透過 IR スペクトルと，ATR 法による IR スペクトルを比較検討した。さらに，実際の食品添加物として，ネオテームを用い，従来のペースト法や KBr 法と，ATR 法を比較検討した。その結果，以下に示すような問題点があることが分かった。まず，ATR 法は，原理的に波長依存性があり，基本的に透過法による IR スペクトルとは異なるため，透過法による IR スペクトルとの比較による確認は不可能である。実際に，試料としてネオテームを用いた場合，従来の測定（透過）法であるペースト法と ATR 法とを比較すると，ATR 法で得られた IR は，ペースト法による IR とは異なるため，両者を併用した確認試験には問題がある。また，ATR 法において，ATR 補正を行うと，機器メーカーによって ATR 補正機能（補正法）が異なる可能性があり，さらに，演算やベースライン補正などコンピューターによる種々の加工を行うため，測定者の恣意的な補正が行われる危険性も考えられる。

一方で，ネオテームを用いた検討において，ATR 法によるスペクトルでも，ネオテームの水和物と無水物の区別が可能であったことや，ATR 法との比較で，KBr 法での異常スペクトルを検出可能であったことから，ATR 法は簡便な操作で定性的な分析が可能であるという利点を有していると考えられる。

次に，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，測定法や測定条件を検討した。化合物の融点が室温に近い場合は，測定環境の温度変化によって相状態が液体状から固体状に変化し，それに

伴ってIRも変化した。従って、四季を有し、季節による温度変化の激しい日本においては、独自に検討を行い、再現性のあるIR測定法及び測定条件を定める必要がある。本研究では特に、融点が室温に近いアントラニル酸メチル、ケイ皮酸メチル、シンナミルアルコール、ピペロナール、*d*lメントール、*l*メントールの5品目に関して、測定法と環境温度変化について詳細に検討を加え、加温融解させた状態で液膜法により測定すれば、環境温度の影響を受けず、簡便に再現性のあるIRを得られることを明らかにした。よって、今回検討した45品目全てに関して、標準IR及びその測定法を定めることができ、規格基準の向上に寄与できたと考えられる。

また、ケイ皮酸メチルを用いて、ATR法についても検討した。その結果、ATR法でも、液体状と固体状の相状態の違いを区別できるものの、ATR法で得られるIRと従来法で測定したIRは一致せず、既存の参照IRとの比較では試料の確認は困難であり、ATR同士での比較が必要であることを明らかにした。さらに、コルチゾン酢酸エステルを用いた検討から、ATR法は、結晶多形を区別することも可能な有用な測定法であることを明らかにした。

加えて、ATR法でのIR測定の問題点を明らかにするため、液体試料としてピロリジンを、固体試料としてバニリン及びケイ皮酸を取り上げ、ATR法によるIR測定法を検討した。

ATR法は、原理的に光路長が短いため、試料厚さの影響を受けず、その特性はプリズムと隙間の生じない液体試料において、最大限に発揮される。従って、一般に、液体試料での再現性は非常に優れている。しかし、今回取り上げたピロリジンは、揮発性が高いため、測定途中にプリズム上から揮発する可能性がある。実際に、揮発を防止せずに測定すると、測定終了後には

プリズム上にピロリジンはほとんど残っておらず、液膜法で測定したスペクトルとは大きく異なるスペクトルとなった。測定機器の付属品である揮発防止カバーを用いても、測定終了後には、ゴムパッキンがピロリジンにより一部溶解し、液膜法でのスペクトルとは大きく異なっていた。そこで、揮発を防止する種々の工夫を行ったところ、HPLC用のガラス製バイアルインサートを用いて、プリズムが常にピロリジンで覆われている状態にすれば、本来のスペクトルが得られることが明らかとなった。これらの結果は、ATR法でピロリジンを測定する際には、揮発を防止することが必須であり、揮発防止のための器具の材質にも注意する必要があることを示している。

また、固体試料についての検討も行った。ATR法では、プリズムと試料が接している面で反射する際に赤外光のもぐり込みが生じ、そのときの試料の赤外光の吸収を測定することで、スペクトルが得られる。従って、ATR法においては、プリズムと試料が接している面積も重要となってくる。液体試料では、試料がプリズムを覆っていれば、接する面積は一定であると考えられるが、固体試料の場合、粒子径によって、接する面積が異なってくる可能性がある。そこで、固体粉末試料として、バニリン、ケイ皮酸を取り上げ、すりつぶしによって細かい粉末にした場合の変化について検討を行った。その結果、いずれの試料においても、すりつぶしによって、ピーク強度が逆転する箇所があることが分かった。試料にNujolを添加し、表面が外気に触れないようにしてすりつぶして測定しても変化が見られなかったことから、この変化はすりつぶしの際の吸湿ではないと考えられる。今後、この原因について詳細に検討していく必要がある。

### C-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)アスコルビン酸

##### 1-1) qNMR法によるアスコルビン酸（特級品及び標準品）の含量測定及び定量下限

qNMR法は、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の関係から、測定対象化合物の濃度を絶対定量することが可能である。また、SIにトレーサブルな基準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が向上することが期待される。そこで、本法の食品添加物分析への適用性を明らかにするため、酸化防止剤であるアスコルビン酸についてqNMR測定を行った。なお、本法により得られた定量値のSIトレーサビリティを確保するため、PHP（認証標準物質）を用いてqHNMR基準物質DSS- $d_6$ の濃度を定量した後、アスコルビン酸含量を算出した。アスコルビン酸の化学構造及び $^1\text{H}$  NMRケミカルシフトを図3-1、標準品及び標準品の $^1\text{H}$  NMRチャートを図3-2、qHNMR法によるアスコルビン酸含量を表3-2にそれぞれ示した。 $\delta\text{H}$  3.75 ppm（水素数2）、 $\delta\text{H}$  4.07 ppm（水素数1）、及び $\delta\text{H}$  4.96 ppm（水素数1）にアスコルビン酸に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのシグナルより算出されたアスコルビン酸含量は、特級品で98.7%、標準品で99.2%であった。各シグナルから得られる含量値に着目すると、標準品では3種のシグナル間の含量値に大きな違いは認められなかった。一方、特級品では、 $\delta\text{H}$  4.96 ppmより得られた含量値（99.2%）が、他の2種の含量値（ $\delta\text{H}$  3.75 ppm：98.6%、 $\delta\text{H}$  4.07 ppm：98.4%）より0.6~0.8%高めに算出された。本測定では、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qHNMR測定を

行い、積分範囲も含め同一の解析条件により含量値を算出している。標準品における各シグナルの含量値及び試薬品の $\delta\text{H}$  3.75 ppm及び $\delta\text{H}$  4.07 ppmの含量値がほぼ同等であることを考慮すると、特級品の $\delta\text{H}$  4.96 ppmの定量値が高めに算出されたことは、このシグナルと重なる不純物による影響と推定された。なお、相対標準偏差（RSD）は標準品で0.2%、特級品で0.6%であり定量再現性は良好であった。

また、qHNMR法におけるアスコルビン酸の定量下限は、以下のように算出した。すなわち、アスコルビン酸標準品の秤量濃度（0.16, 0.32, 0.62, 1.2, 2.5, 5.0及び50 mg/g）とqHNMRにより得られた測定濃度の相対誤差及び3回の繰り返し測定による測定濃度のRSDがともに1%以下である最小濃度を定量下限とした。表3-3に示すように、 $\delta\text{H}$  3.75 ppmのシグナルでは、0.63 mg/g以上の秤量濃度では、測定濃度との相対誤差及び測定濃度のRSDは1%を下回る結果であった。一方、0.16及び0.32 mg/gでは、図3-3に示すように各シグナルのS/Nは小さいことから、測定濃度との相対誤差及び測定濃度のRSDも1%を超える結果となった。これらの値は、濃度が低くなるにつれて大きくなる傾向であった。 $\delta\text{H}$  4.07 ppm及び $\delta\text{H}$  4.96 ppmのシグナルにおいても相対誤差及びRSDは、 $\delta\text{H}$  3.75 ppmのシグナルより得られた結果と同様であった。以上より、qNMRにおけるアスコルビン酸の定量下限は、試料濃度として0.63 mg/gと決定した。

##### 1-2) qHNMR法及び滴定法によるアスコルビン酸含量の比較

第8版食品添加物公定書では、L-アスコルビン酸の定量法としてヨウ素溶液を用いた酸化還元滴定が示されている。そこで、アスコルビン酸標準品を対象にqNMR法と滴定法によるア

スコルビン酸含量を比較した。その結果、表3-4に示すようにqHNMR法の含量値及びRSDは、滴定の結果とほぼ一致し、qHNMR法により算出された定量値が正確であることが確認された。qHNMR法及び滴定法はともに検量線を必要としない絶対定量法である。特にqHNMR法の場合、求められる定量値は計量学的に信頼性が高いことから、真値をより正確に反映した絶対定量法であると考えられた。

### 1-3) アスコルビン酸含有製品のアスコルビン酸含量

これまでに、標準品、特級品など比較的純度の高い製品を用いてqHNMR法に関する検討を行った。qHNMR法の特徴の一つとしては、混合物に含まれる測定対象成分を、誘導体化等の処理を行わず非分離で短時間に絶対定量ができることが挙げられる。そこで、この特徴を生かし、アスコルビン酸を含有する市販のビタミン製剤や食品添加物規格品についてqHNMR法によるアスコルビン酸の含量測定を行い、得られた結果をHPLC法と比較した。なお、図3-4に示すように、特に試料2, 3, 5及び8では、アスコルビン酸に由来する $\delta$ H 3.75 ppm及び $\delta$ H 4.07 ppmのシグナルは、賦形剤などの夾雑物に由来すると考えられるシグナルとの分離が不十分であるため、これらのシグナルからアスコルビン酸含量を正確に定量することは困難と考えられた。一方、 $\delta$ H 4.96 ppmのシグナルは、すべての試料において夾雑物由来のシグナルと十分に分離していることが確認された。そこで、 $\delta$ H 4.96 ppmを定量用シグナルとして選択し、本シグナルより製品中のアスコルビン酸含量を算出することとした。qNMR法及びHPLC法により算出された各製品のアスコルビン酸含量を表3-5に示す。すべての試料において、qNMR法により得られたアスコルビン酸含量はHPLC

法により得られた結果とほぼ同等であり、両分析法における含量値の差は最大で2.7% (試料1, qHNMR: 100.1%, HPLC: 102.8%)であった。なお、qHNMRによる各試料のRSDは0.3~2.8%と定量再現性も良好であった。なお、HPLC法で用いたアスコルビン酸標準品は、qHNMRにより計量学的に正確に純度(99.2%)を決定した後に使用した。従って、HPLC法により得られたアスコルビン酸含量は、SIにトレーサブルな定量値と言える。qHNMR法とHPLC法の含量値がほぼ同等であったことから、qHNMR法は定量用アスコルビン酸標準品を用いず別の基準物質を用いてSIにトレーサブルなアスコルビン酸含量を算出できることが、本検討からも裏付けられた。また、HPLC法はアスコルビン酸を選択的に測定できる点で有用ではあるものの、誘導体化などの煩雑な操作が必要となる。また検量線の作成等により分析に時間を要する。一方、qHNMR法は試料を直接qHNMR標準溶液へ溶解した後、qHNMR測定を行うのみで製品中のアスコルビン酸含量の絶対定量が可能である。今回確立したqHNMRによるアスコルビン酸の定量分析法は、従来のHPLC法に比べ簡便性、迅速性の面で優位性があり、定量値の信頼性も向上した新たな方法である。今後、食品等に含まれるアスコルビン酸の定量分析などへの応用が期待される。

### 2) フルジオキシニル

#### 2-1) qHNMR法によるフルジオキシニルの含量測定

フルジオキシニルの定量法としてのqHNMR法の適用性を明らかにするため検討を行った。なお、アスコルビン酸では、DEP(認証標準物質)を用いてqHNMR基準物質DSS- $d_6$ の濃度を定量し、そのqHNMR基準物質を使って測定対象物質を定量する2段階方式で定量値のSIトレ

ーサビリティーを確保していた。最近、試薬メーカーより計量学的に正確に値づけされたDSS- $d_6$ 標準物質の販売が開始されたことから、本検討ではこれをqHNMR基準物質として用い、1段階方式で定量値のSIトレーサビリティーを確保した。また、測定試料は同一のフルジオキソニルから別々に秤量し調製した4サンプルを用いて非連続で6回測定した。フルジオキソニルの化学構造及び $^1\text{H}$  NMRケミカルシフトを図3-5、フルジオキソニルの $^1\text{H}$  NMRチャートを図3-6、フルジオキソニル含量を表3-6に示した。4サンプルのフルジオキソニル含量は98.9～99.3%とほぼ同等であった。また、4サンプル間の定量値のRSDは0.1%であり、定量再現性は良好であった。さらに、同一サンプルの6回繰り返し測定によるRSDも0.1%と繰り返し測定精度も良好であることが確認された。以上より、qHNMR法はフルジオキソニルの定量に十分適用可能であることが確認された。

### 3) チアベンダゾール

#### 3-1) チアベンダゾールの各水素シグナルの帰属

各シグナルのS/N比、各シグナル間または重溶媒中の水や残留プロトンのシグナルとの分離度合いなどを確認するため、チアベンダゾールについて $^1\text{H}$  NMR測定を行い、スペクトルパターン情報を収集した。その結果、図3-7に示した $^1\text{H}$  NMRスペクトルが得られた。また、本結果及び $^{13}\text{C}$  NMR、各種2次元NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC) スペクトルの詳細な解析により、各水素シグナルを帰属した(図3-8)。得られたスペクトルパターン情報を基に、次の検討を行った。

#### 3-2) qHNMR法によるチアベンダゾール含量の測定

qHNMR法は、スペクトル上に観察される標

準物質と測定対象物質のシグナル面積強度(積分値)とモル濃度の関係から、測定対象化合物の濃度を絶対定量することが可能である。また、SIにトレーサブルな標準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が大幅に向上した方法と言える。そこで、本法の食品添加物分析への適用性を明らかにするため、チアベンダゾールについてqHNMR測定を行った。なお、本法により得られた定量値のSIトレーサビリティーを確保するため、認証標準物質であるDSS- $d_6$ を用いてチアベンダゾール標準物質中のチアベンダゾール含量を算出した。その結果、図3-9に示したように、 $\delta\text{H}$  7.24 (水素数2)、 $\delta\text{H}$  7.55-7.68 (水素数2)、 $\delta\text{H}$  8.48 (水素数1)及び $\delta\text{H}$  9.37 (水素数1)にチアベンダゾールに由来するシグナルがそれぞれ観察された。また表3-7に示したように、これらのシグナルより算出されたチアベンダゾール含量は99.3%-99.6%、相対標準偏差(RSD)は0.1-0.3%であった。従って、各シグナルより得られるチアベンダゾールの含量値及び併行精度はほぼ同等であることが明らかとなった。しかし、これらのうち $\delta\text{H}$  7.24のシグナルは若干ブロードな形状を示し、また、 $\delta\text{H}$  7.55及び7.68のシグナルは、シグナル間の分離が不十分であった。qHNMRでは、形状がシャープで多重度が小さいシグナルを定量に用いることがより精確な定量に繋がると考えられている。また、このようなシグナルは、夾雑物のシグナルの影響も受けにくい。さらに、S/Nが大きいシグナルを定量用シグナルとして選択することによって、より低い濃度(低い含量)での定量も可能となる。これらの点を鑑みると、 $\delta\text{H}$  7.24、 $\delta\text{H}$  7.55及び $\delta\text{H}$  7.68のシグナルは、夾雑物が多く含まれる試料の場合、定量精度に疑義が生じる可能性が推測された。一方、 $\delta\text{H}$  8.48 及び $\delta\text{H}$  9.37のシ

グナルは、 $\delta$ H 7.24,  $\delta$ H 7.55及び $\delta$ H 7.68のシグナルと比べ、シグナルの多重度は小さく、シグナル形状も良好であった。また、これらのシグナルは $\delta$ H 7.24,  $\delta$ H 7.55及び $\delta$ H 7.68のシグナルと比べS/Nが大きいことから、より低濃度での定量も可能と考えられた。チアベンダゾールの定量可能な濃度範囲の及び定量分析の精確さを考慮すると、定量用シグナルとしては、 $\delta$ H 8.48 及び $\delta$ H 9.37を用いることが適切と考えられた。

### 3-3) 本法の直線性の評価

次に、チアベンダゾールの定量におけるqHNMR法の直線性について検討を行った。チアベンダゾール標準物質をqHNMR標準溶液に溶解し各濃度(0.31, 0.63, 1.2, 2.4, 4.8, 10及び20 mg/g, 各濃度3検体ずつ)に調製した。これらをqHNMR測定し、 $\delta$ H 8.48 及び $\delta$ H 9.37のシグナルより得られたデータを用いてそれぞれ検量線を作成した。X軸にチアベンダゾール濃度、Y軸にチアベンダゾールと内部標準(DSS-*dk*)のシグナル面積強度比をとり、検量線の決定係数(R<sup>2</sup>)より直線性を評価した。その結果、図3-10に示したように、両シグナルともに0.31-20 mg/gの範囲でR<sup>2</sup>=1の良好な直線性が得られた。

### 3-4) 本法の真度及び精度の評価

次に、本法の真度及び精度について検討を行った。前項で示した方法と同様に各濃度(0.16, 0.31, 0.63, 1.2, 2.4, 4.8, 10及び20 mg/g) 3検体ずつチアベンダゾール標準溶液を調製しqHNMR測定を行った。真度は、秤量濃度とqHNMRによる実測値との相対誤差より評価した。また、精度(併行精度)は、各濃度3検体の実測値のRSDより評価した。表3-8に示したように、 $\delta$ H 8.48のシグナルでは、0.31 mg/g以上の秤量濃度において、実測値との相対誤差は

1%以下であった。また、この濃度範囲における各試料のRSDは0.1-0.6%であり、併行精度も良好であった。同様に、 $\delta$ H 9.37のシグナルでは、0.31 mg/g以上の秤量濃度において実測値との相対誤差は1%を下まわるとともに、この濃度範囲における併行精度も良好であった(RSD: 0.03-0.3%)。一方、秤量濃度が0.16 mg/gの場合、秤量濃度と実測値の相対誤差及びRSDが、 $\delta$ H 8.48のシグナルでは-3.8% (RSD:4.4%)、 $\delta$ H 9.37のシグナルでは-5.5% (RSD: 4.0%)となり、定量値の精確さが低下した。

以上の結果より、 $\delta$ H 8.48及び $\delta$ H 9.37のシグナルを定量に用いた場合、0.31-20 mg/gの範囲において精確な定量分析が可能であることが判明した。

### 3-5) 本法の定量下限について

qHNMR測定におけるチアベンダゾールの定量下限は、測定濃度と実測値の相対誤差及び併行精度がともに1%以下を示す最小濃度とした。表3-8に示したように、この条件を満たす最小濃度は0.31 mg/gであったことから、本法の定量下限を0.31 mg/gとした。

## 4) アゾキシストロピン及びピリメタニル

### 4-1) アゾキシストロピン及びピリメタニルの各水素シグナルの帰属

各シグナルのS/N比、各シグナル間または重溶媒中の水や残留プロトンのシグナルとの分離度などを確認するため、アゾキシストロピン及びピリメタニルについて<sup>1</sup>H NMR測定を行いスペクトルパターン情報を収集した。その結果、図3-11に示した<sup>1</sup>H NMRスペクトルが得られた。また、本結果及び<sup>13</sup>C NMR、各種2次元NMR(<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC)スペクトルの詳細な解析により、各水素シグナルを帰属した(図3-12)。なお、アゾキシストロピンについては、十分に分離されたシグナルのみ

帰属した。得られたスペクトルパターン情報を基に、次の検討を行った。

#### 4-2) qHNMR法によるアゾキシストロピン及びピリメタニル含量の測定

qHNMR法は、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度（積分値）とモル濃度の関係から、測定対象化合物の濃度を絶対定量することが可能である。また、SIにトレーサブルな標準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が大幅に向上した方法と言える。そこで、本法の食品添加物分析への適用性を明らかにするため、アゾキシストロピン及びピリメタニルについてqHNMR測定を行った。なお、本法により得られた定量値のSIトレーサビリティを確保するため、認証標準物質である1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>を用いて各標準物質中のアゾキシストロピンまたはピリメタニル含量を算出した。

その結果、アゾキシストロピンについては、図3-13に示したように、 $\delta$ H 3.53（水素数3）、 $\delta$ H 3.70（水素数3）、 $\delta$ H 6.43（水素数1）、 $\delta$ H 7.22（水素数1）、 $\delta$ H 7.26–7.36（水素数3）、 $\delta$ H 7.38–7.48（水素数3）、 $\delta$ H 7.73（水素数1）、 $\delta$ H 7.80（水素数1）及び $\delta$ H 8.28（水素数1）にアゾキシストロピンに由来するシグナルがそれぞれ観察された。また表3-9に示したように、これらのシグナルより算出されたアゾキシストロピン含量は99.2%–99.8%、相対標準偏差（RSD）は0.1–0.4%と良好であった。これらのうち $\delta$ H 7.22、 $\delta$ H 7.26–7.36、 $\delta$ H 7.38–7.48に観察されたシグナルは、お互いのシグナルが近接していた。また、 $\delta$ H 7.73及び $\delta$ H 7.80に観察されたシグナルについても同様であった。このようなシグナルを使って定量を行った場合、測定者により積分範囲の設定にずれが生じ、積分誤差が生じる可能性が高いと考えられた。ま

た、夾雑物が多く含まれる試料の場合、定量精度に疑義が生じる可能性も推測された。一方、 $\delta$ H 3.53、 $\delta$ H 3.70、 $\delta$ H 6.43及び $\delta$ H 8.28に観察されたシグナルは、形状がシャープで多重度も小さく、近傍に他のシグナルも観察されなかった。qHNMRでは、このようなシグナルを定量に用いることにより、より精確な定量が可能になると考えられている。また、このようなシグナルは、夾雑物のシグナルの影響も受けにくい。さらに、S/Nが大きいシグナルを定量用シグナルとして選択することによって、より低い濃度（低い含量）での定量も可能となる。これらの点を考慮し、定量用シグナルとしては、 $\delta$ H 3.53、 $\delta$ H 3.70、 $\delta$ H 6.43及び $\delta$ H 8.28を用いることが適切と考えられた。

ピリメタニルについては、図3-13に示したように、 $\delta$ H 2.32（水素数6）、 $\delta$ H 6.56（水素数1）、 $\delta$ H 6.94（水素数1）、 $\delta$ H 7.25（水素数2）及び $\delta$ H 7.66（水素数2）にピリメタニルに由来するシグナルがそれぞれ観察された。また表3-10に示したように、これらのシグナルより算出されたピリメタニル含量は99.6%–99.9%、相対標準偏差（RSD）は0.04–0.2%と良好であった。また、観察された全てのシグナルの多重度は小さく、シグナル形状も良好であった。さらに、各シグナル間の分離も精確な定量には十分と考えられた。以上より、ピリメタニルの定量には、全てのシグナルが適用可能と考えられた。

#### 4-3) 本法の直線性の評価

次に、アゾキシストロピン及びピリメタニルの定量における直線性について検討を行った。アゾキシストロピンまたはピリメタニル標準物質を重水素化溶媒2 mLに溶解し各濃度（アゾキシストロピン：1.0, 2.6, 5.1, 10及び15 mg/mL、ピリメタニル：1.0, 2.5, 5.1及び10 mg/mL、

各濃度3検体ずつ)に調製した。それぞれに1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 4 mgを溶解後、qHNMR測定を行い、各化合物の定量用シグナルより得られたデータを用いてそれぞれ検量線を作成した。X軸に各試料濃度、Y軸に試料と内部標準(1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>)のシグナル面積強度比をとり、検量線の決定係数(R<sup>2</sup>)より直線性を評価した。その結果、図3-14に示したように、検討した濃度範囲において、アゾキシストロビンでは全てのシグナルでR<sup>2</sup>=0.9999、ピリメタニルでは全てのシグナルでR<sup>2</sup>=0.9994-0.9995の良好な直線性が得られた。

#### 4-4) 本法の真度及び精度の評価

次に、本法の真度及び精度について検討を行った。3)本法の直線性の評価で示した方法と同様に各濃度(アゾキシストロビン:1.0, 2.6, 5.1, 10及び15 mg/mL, ピリメタニル:1.0, 2.5, 5.1及び10 mg/mL)3検体ずつ試験溶液を調製しqHNMR測定を行った。真度は、秤量濃度とqHNMRによる実測値との相対誤差より評価した。また、精度(併行精度)は、各濃度3検体の実測値のRSDより評価した。

アゾキシストロビンでは、表3-11に示したように実測値との相対誤差は全てのシグナルで0.4%以下であった。また、この濃度範囲における併行精度も0.5%以下と良好であった。特に、試料濃度が10 mg/mL以上では、実測値との相対誤差は全てのシグナルで0.2%以下、併行精度は0.1%以下であることが明らかとなった。従って、より精度の高い定量を必要とする場合には、試料濃度を10 mg/mL以上に設定する必要があると考えられた。

ピリメタニルでは、表3-12に示したように実測値との相対誤差は全てのシグナルで0.5%以下であった。また、この濃度範囲における併行精度も0.3%以下と良好であった。また、試料濃度

が5.1 mg/mL以上では、実測値との相対誤差は全てのシグナルで0.2%以下、併行精度は0.2%以下であることが確認された。従って、試料濃度を5.1 mg/mL以上であれば、より精度の高い定量が可能であることが確認された。

#### 4-5) 本法の室内精度

本分析法の室内精度を確認するため、試料濃度が10 mg/mLの試験溶液(試料:20 mg, 重水素化溶媒:2 mL, 内部標準:4 mg)を調製し、一日当たり2検体ずつ併行して分析し、この分析を5日間実施した。各シグナルより得られた含量値を一元配置の分散分析により解析し、併行と日間条件下での分散を推定した。併行条件下での分散に基づき併行精度を、併行と日間条件下での分散を合成することで室内精度をそれぞれ算出した。

表3-13に示したように、アゾキシストロビンでは各シグナルより得られた含量値の併行精度(RSD<sub>r</sub>)及び室内精度(RSD<sub>ip</sub>)は0.2%以下であった。また、ピリメタニルでは、表3-14に示したように、各シグナルより得られた含量値の併行精度(RSD<sub>r</sub>)及び室内精度(RSD<sub>ip</sub>)は0.1%であった。以上の結果より、アゾキシストロビン及びピリメタニル標準物質の純度分析において、本法は十分な精度を有する測定法であることが明らかとなった。

### C-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) SARの結果

H22年度:日本独自で使用している香料1405化合物について、前出の3つのソフトウェアで解析した結果、DEREKで陽性になったものが62, MCASEで陽性になったものが62, AWorksで陽性になったものが18あった。3つのソフトウェア



アすべてで陽性の判定になった化合物は一つもなく、いずれか二つで陽性になった化合物は18あった。そのうち16化合物はDEREKとMCASEで陽性になったもので、残りの2化合物はDEREKとAWorksで陽性になったものであった。MCASEとAWorksで同時に陽性になった化合物はなかった。少なくとも一つで陽性になったものは119化合物で、そのうちCAS番号が同一のものの重複を除くと、99化合物あった。

H23年度：わが国独自の食品香料について、JECFAの構造グループ番号のあるものを1774物質、抽出した。その中から、JECFA評価で遺伝毒性データのないものを抽出し、前出の3つのソフトウェアでSARを実施した。SARの結果がいずれも陰性で年間使用量 1 g以上（ただし平成18年のデータ）のものを抽出し、JECFAの構造グループ番号順、使用量順にソートしたものが約200物質あった。それについて、LUMO（Lowest Unoccupied Molecular Orbital; 最低空軌道）計算した。OECD\_QSAR\_ToolBoxに変異原性データがあった物質を除外した。JECFAの構造グループを基準に、まず、1グループの中に1-2物質しかないグループを選定した。1グループの中に3物質以上ある場合、LUMO値の小さい方から2物質を選定し、合計39化合物を選んだ。

H24年度：わが国独自の食品香料について、JECFAの構造グループ番号のあるものを1774物質抽出し、前出の3つのソフトウェアでSARを実施した。3つのソフトでともに陽性だった物質は1品目、いずれか2つのソフトで陽性になった物質は25品目、いずれか1つのソフトで陽性になった物質は147品目あった。その中で流通量の多いもの、純度が95%以上のもので、試験可能な量が入手できた43品目を選んだ。

## 2) FATの結果

H22年度：SARで一つでも陽性に出た99化合物のうち必要量が入手できたのは11化合物だった。総合判定が陰性で、SARのDEREKとMCASEの両方で陽性になったocimene oxideはFATでは4条件で陰性の結果であり、一致しなかった。SARの3種類のソフトでいずれも陰性だった化合物1286のうち、必要量が入手できた29化合物についてFATを実施した。20化合物は総合判定が陰性だった。残りの9化合物については、4条件もしくは3条件で陽性になった化合物が1つずつ、1条件のみで陽性になったものが7化合物あった（表4-4）。

H23年度：43物質すべてSARの予測結果が陰性だった物質についてのFATの結果は、40物質が総合判定陰性で、陽性になったのは3物質であった（表4-5）。Methyl-N, N-dimethylantranilate（図4-1(a)）は代謝活性化がある条件で、Neryl acetate（図4-1(b)）とVervenone（図4-1(c)）は代謝活性化がない条件下で、いずれもTA100で変異原性を示した。

FATは新しい手法で、従来の方法で実施されたAmes試験の結果との一致率は80%であると報告されている。

健康影響を評価する場合、個々のハザードとともに暴露量を考慮することが重要であるが、香料は使用が特定されるため、残留農薬などのように生産量からの割り出しでは暴露評価が困難である。したがって、本研究課題では暴露量を考慮しないものとした。

FATでは4条件（2菌株、 $\pm$ S9）のうちひとつでも陽性になった場合、SARでは少なくとも一つのソフトウェアで陽性になった場合をそれぞれ「陽性」とし、陰性は陽性でない場合とする。この基準に照合するとH22年度の40検体についてSARの陽性判定のFATとの一致率（感度）は55%、陰性判定のFATとの一致率（精度）は69%

ということになる。一般的な化学物質についてのDEREK及びMCASEの感度は70%程度、精度は90%程度であることを勘案すると、今回の香料についての結果はその8割程度であったことになる。このことから、SARを香料について実施する場合、一般的な化学物質とは違う判断基準を必要とすることが推察された。

H23年度はSAR陰性判定の物質のみをFATの対象としたため、感度の算出はせず、一致率(精度)93%だった。一般的な化学物質についてのDEREK及びMCASEの精度が90%程度であることを勘案すると、H23年度の香料43検体についての結果は一般化学物質と同等であったことになる。

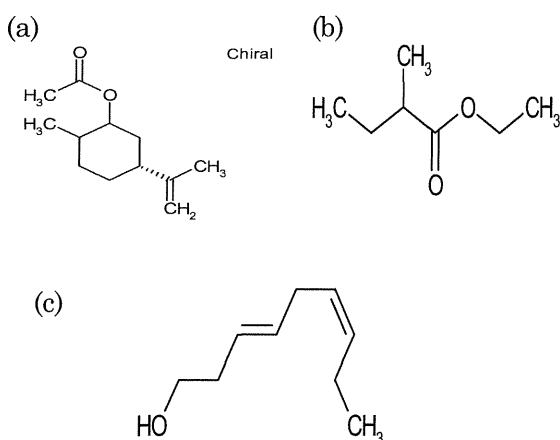


図4-1 FATで変異原性陽性を示した化合物の構造

H24年度: SARとFATの結果対照表を表4-6に示す。43検体について陽性判定のFATとの一致率(感度)は、DEREK, MCASE, AWorksの順に11%, 10%, 4%, 陰性判定のFATとの一致率(精度)は同じく、81%, 77%, 70%と算出された。さらに今回の43品目についてTiMeSモデルでAmes試験結果を予測したところ14個が陽性と予測されたが、その中にFAT陽性判定の6個は含まれていなかった。現時点でTiMeSには香料の遺伝毒性予測のための基本データが不足していることが考えられる。また、予測モデルを複数

使用することが必ずしも予測性を上げることに繋がらないことが分かった。

本研究課題で対象にしているのは香料で、一般的な化学物質とは異なる構造のものが多く含まれていると考えられる。したがって、予測性を上げるためにはSARのモデルのアラートについてカスタマイズの必要があるだろう。今回の判定率の差は決して大きくはないが、DEREKには「判定はできない(E, equivocal)」という判定基準があるなど、より細かい予測をしているので、香料の予測については今後DEREKを中心に予測性を上げていくのがよいかもしれない。

## C-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) 生鮮食品類の次亜Na殺菌処理及び水洗浄処理後の各種消毒副生成物残存の調査

次亜Naによる殺菌処理が想定される生鮮食品を用いて殺菌及び水洗浄処理後の各種消毒副生成物の残存量を調べた(表5-1, 2)。各試料は100 µg/L次亜Naにより10分間殺菌し、さらに、水道水で1分間流水洗浄処理を行い、それぞれを殺菌及び水洗浄処理後の試料とした。モデル試料として殺菌処理が想定される葉菜類、根菜類及び豆類等、計8種類の野菜を選び検討を行った。

### (1)生鮮野菜の次亜Na殺菌処理及び水洗浄処理後の各種消毒副生成物残存の調査

次亜Na殺菌処理により、CFが生成し、タマネギ、もやし及びカイワレ大根において、それぞれ42.2, 70.1, 39.0 ng/gのCFが検出されたが、その後の水道水による流水洗浄により25.0, 39.0, 21.9 ng/gまで減少した。その他の野菜類の流水洗浄後の残存量は3.2~6.3 ng/gであった。ハロアセトニトリル類については、殺菌処理後

にタマネギ、ダイコンでは、それぞれ135.7, 95.9 ng/gのDCANが検出されたが、その後の水道水による流水洗浄により、13.7, 20.6 ng/gまで減少した。その他の野菜類の流水洗浄後の残存量は定量下限値以下であった。

CHは、キャベツ、ニンジン及びダイコンの殺菌処理で、それぞれ15.1, 16.2, 12.5 ng/g残存しており、水洗浄処理により、5.0, 13.8, 5.4 ng/gまで減少した。その他の野菜類の流水洗浄後の残存量は定量下限値以下であった。

ハロ酢酸については、各種野菜より32.8～295.8 ng/gのDCAAが検出された。葉菜類ではキャベツ(249.2 ng/g)、根菜類ではニンジン(295.8 ng/g)が比較的高い残存量を示したのに対し、キュウリ(32.8 ng/g)やタマネギ(42.3 ng/g)の残存量は低いレベルであった。また、水道水による流水洗浄後には、キャベツは249.2 ng/g、ニンジンは295.8 ng/gまでDCAAの残存量が減少し、キュウリ及びタマネギは定量下限値以下になった。TCAAは、キャベツ、キュウリ、タマネギ、モヤシ、カイワレダイコンの殺菌処理で、それぞれ13.1, 17.4, 130.9, 39.1, 41.3 ng/g検出されたが、水洗浄処理後には、タマネギ、モヤシ、カイワレダイコンは、それぞれ23.1, 32.2, 35.0 ng/gまで減少した。その他の野菜類の流水洗浄後の残存量は定量下限値以下であった。

水洗浄後の食品に残存する各消毒副生成物の積算量を図5-1に示した。消毒副生成物の生成量が比較的多い食品には、主にハロ酢酸が残存する傾向がみられた。一方、タマネギやダイコンなど一部の野菜ではCFやDCAAのモル構成比率が高く、食品の種類により主要な各消毒副生成物の種類が異なることが示された。

## (2)魚介類の次亜Na殺菌処理及び水洗浄処理後

の各種消毒副生成物残存の調査

魚介類として魚(アジ)、甲殻類(エビ)及び貝類(カキ)を100 µg/ml次亜Naで10分間殺菌処理し、さらに、水道水で1分間流水洗浄したときの各種消毒副生成物の残存量を調べた(表5-6～10)。

次亜Na殺菌処理によりエビ、カキにそれぞれ5.3, 3.1 ng/gのCFが検出され、流水洗浄後には4.7, 3.3 ng/g残存していた。また、アジは殺菌処理直後には定量下限値以下であったが、流水洗浄後に1.8 ng/gのCFが検出された。

ハロアセトニトリル類は、殺菌処理後のアジに18.3 ng/gのDCANが検出されたが、その後の水道水による流水洗浄により不検出となった。その他の魚介類の殺菌及び流水洗浄後の残存量は検出下限以下であった。

CHは、殺菌処理前のアジより29.6 ng/g検出されたが、その後の殺菌及び水洗浄処理で10.6 ng/gに減少した。また、ハロ酢酸類は全ての魚介類が不検出となった。

## (3)鶏肉の次亜Na殺菌処理及び水洗浄処理後の各種消毒副生成物残存量の調査

鶏肉を100 µg/ml次亜Naで10分間殺菌液に浸漬処理したときの各種消毒副生成物残存量を調べた(表5-11～13)。

次亜Na殺菌処理により13.8 ng/gのCFが検出された。鶏肉は、通例加熱調理が行われるため、オーブンで5分間加熱調理後にCF残存量を調べたところ定量下限値以下であった。また、ハロアセトニトリル類、抱水クロラール及びハロ酢酸類について同様に調査したが、殺菌処理後、水洗浄後のどちらの試料からも検出されなかった。

## (4)豆腐の次亜Na殺菌処理及び水洗浄処理後の消毒副生成物残存量の調査

豆腐は、製造時に約10 µg/mlの次亜Naを容器

内に満たしてバック詰めされる場合があるため、10 µg/ml次亜Na浸漬処理後の各種消毒副生成物残存量の推移を調べた(表5- 14~16)。

CFは、殺菌処理後は定量下限値以下であったが、水洗浄後に2.0 ng/gのCFが検出された。また、ハロアセトニトリル類、抱水クロラール及びハロ酢酸類についても同様に調査したが、殺菌処理後、水洗浄後のどちらの試料からも検出されなかった。

各種生鮮野菜を次亜Naにより殺菌処理したところCF, DCAN, CH, DCAA及びTCAAが生成した。また、各消毒副生成物の生成量は、野菜の種類により異なることが明らかとなった。食品成分の違いにより消毒副生成物の種類や量に変化したと考えられた。

殺菌処理された食品を流水洗浄することにより、食品に残存していた各種消毒副生成物量が減少することが示された。次亜塩素酸トリウムにより殺菌処理を行った場合、残留塩素を除去する目的で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。今回の調査により流水洗浄が、食品中の残留塩素の除去だけでなく、消毒副生成物の低減にも有効であることが確かめられた。

アジや豆腐を殺菌処理したときCFは検出されず、水道水による流水洗浄後に微量のCFの残存が確認された。水道水には4 ng/mlのCFが含まれており、水道水由来のCFが食品表面に付着したと考えられた。また、エビやカキなどその他の魚介類のCF生成能は総じて低く、また、ハロアセトニトリルやハロ酢酸類も検出されなかったことから、魚介類由来の消毒副生成物の暴露影響は小さいと考えられた。

鶏肉の殺菌処理により13.8 ng/gのCFが検出されたが、オープンによる加熱調理により定量

下限値まで低下した。CFが加熱過程で揮散したと考えられる。また、殺菌処理された鶏肉よりハロアセトニトリル及びハロ酢酸類も検出されておらず、加熱調理された鶏肉に消毒副生成物はほとんど残存していないと考えられた。

## 2) カット野菜の次亜塩素酸水殺菌処理による消毒副生成物の生成能の検討

次亜Naの代替として、次亜塩素酸水によりカット野菜を殺菌処理したときの各種消毒副生成物の生成能について調査した(図5-2, 3)。次亜塩素酸水として、強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水の2タイプの次亜塩素酸水を希釈せずに殺菌に用い、100 µg/ml次亜Na殺菌処理と消毒副生成物生成量の比較を行った。

カットキャベツを次亜Naで殺菌処理したとき、DCAN, CH, DCAA及びTCAAが生成するが、強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水で殺菌処理した場合、殺菌処理後及び水洗浄後のどちらの試料からも消毒副生成物は検出されなかった。

次亜Naの代替として強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水で殺菌処理したところ、食品中にハロアセトニトリル及びハロ酢酸類は検出されなかった。

次亜Naは通常、塩素換算で100~200 µg/gの殺菌液が用いられるが、次亜塩素酸水は次亜Naに比べて低い塩素濃度で、次亜Naと同等の強い殺菌効果を示すことが知られており、今回使用した強酸性次亜塩素酸水及び微酸性次亜塩素酸水の残留塩素濃度は約20 µg/mlであり、次亜Naに比べ残留塩素濃度が低いことから、試料との塩素化反応の進行が低く抑えられたと考えられる。このため、消毒副生成物による化学的リスク影響の観点からみた場合、次亜Naより次亜塩素酸水が優れていると考えられた。

## 3) 殺菌処理された食品由来の消毒副生成物の