

電話あるいはEメールで照会等を行い、集計化向上と精密化を期した。さらに、本年度新たに追加した7社への調査に加え、初年度未回答企業への電話あるいはEメールでの再調査を101件、合計108件の調査を行った。

2) 既存添加物

- ① 調査方法 アンケート方式
 - ② 調査対象年度 平成26年4月から27年3月までの1年間あるいは平成26年を過半日数含む1年間
 - ③ 調査対象企業 平成24年の第5回目調査の回答状況より既存添加物等の製造・輸入の可能性のあった企業(395社)
 - ④ 調査対象添加物 既存添加物名簿」に記載されている全品目365品目及び「一般に食品として飲食に供されているものであって添加物として使用される品目リスト」のうち、第8版食品添加物公定書で成分規格が定められている品目、品名に色素とうたわれている品目及びその他(一般飲食物添加物品名番号一覧表記載品目)の53品目(合計418品目)
 - ⑤ 記載要求事項
 - a) 製造・輸入を行っているものの品名
 - b) 製造・輸入の区別
 - c) 製造・輸入の数量(換算単位が記載してあるものについては換算した数値)
 - d) 換算単位が明示されていない品目にあってはその純度
 - e) 用途(食品/非食品)別出荷量、輸出量(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

1. 香料化合物規格の国際整合化に係わる調

査研究

1) 実測値(Ⅱ)とJECFA規格との比較

1-1) 実測値(Ⅱ)の調査品目の特定

平成26年度の実測値(Ⅰ)の調査で、追加の調査が必要と思われた108品目に対し、各測定値がJECFA規格を満たしているか、いない場合はどのような違いがあるかを規格項目毎に判断記号を付け、実測が必要な品目と項目の再確認を行った。なお、判定しやすくするためにグラフ化も行った。その結果、4品目はJECFA規格で問題なし、1品目はデータ数が少ないがJECFA規格で問題なし、48品目はJECFA規格の修正が必要、55品目はさらなる調査が必要となった。そのうち5品目は調査方法等の再検討が必要と考えられたため、50品目に対して実測値(Ⅱ)の調査を行った。

2-2) 実測値(Ⅱ)の収集のための調査票の検討及び調査の実施

調査対象とする規格項目はこれまでの自主規格での設定項目である含量、含量の範囲(異性体含むかどうか)、定量法、屈折率、比重、酸価、融点・凝固点、(比)旋光度とした。また、測定条件の異なるデータ、例えば比重に関しては測定条件が15.5℃、20℃及び25℃のものが混在していることがわかっていたため、測定条件毎の記入欄を設け誤記を防止するようにした。本年度は平成22年度の使用量調査時に使用報告のあった会社すべてを対象として調査を行った。

3-3) 調査結果の集計と各規格項目の比較

調査対象の50品目すべてで1製品以上の測定値が得られた。各測定値がJECFA規格を満たしているか、満たしていない場合はどのような違いがあるかを規格項目毎に判断記号を付け、昨年度の実測値(Ⅰ)のデータも

含めて整理した。明らかな異常値が報告されている製品は外れ値として集計には用いなかった。なお、判定しやすくするためにグラフ化を行った。

① 含量：JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上あり満たさない製品が無かったもの、もしくは 8 割以上の製品が JECFA 規格を満たしているもの 35 品目、JECFA 規格なお、異性体の取り扱いが不明なため、今回は規格を設定せず、今後検討することとしたものが 1 品目あった。

② 融点・凝固点：JECFA 規格で設定があった 19 品目のうち、JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上報告されており満たさない製品の報告が無かったもの、もしくは 8 割以上の製品が JECFA 規格を満たしていたものは 7 品目、JECFA 規格を満たしており、かつ JECFA 規格を満たす製品の数が 2 つ以下であったが、規格を満たさない製品の報告がなかったものは 1 品目であった。融点ではなく凝固点あるいは凝固点ではなく融点の設定が望ましいと思われるものも含め、JECFA 規格修正検討依頼が 6 品目であった。なお通常液体で屈折率、比重の設定を行い、融点規格は不必要と思われるものが 5 品目あった。

③ 屈折率：JECFA 規格で設定があった 40 品目のうち、JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上あり満たさない製品が無かったもの、もしくは 8 割以上の製品が JECFA 規格を満たしているものは 23 品目あった。JECFA 規格修正検討依頼が 10 品目で、JECFA 規格が 1 点規格で規格修正検討依頼は 2 品目であった。融点もしくは凝固点を設定するため、設定不要としたものは 4 品目であった。なお、含量における異性体

の取り扱いが不明なため、今回は規格を設定せず、今後検討することとしたものが 1 品目あった。

④ 比重：JECFA 規格で設定があった 40 品目のうち、JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上あり満たさない製品が無かったもの、もしくは 8 割以上の製品が JECFA 規格を満たしているものは 9 品目あった。JECFA 規格を満たす製品が 2 つ以下だが JECFA 規格を満たさない測定値が報告されていないものは 1 品目あった。JECFA 規格修正検討依頼が 21 品目、JECFA 規格が 1 点規格で規格修正検討依頼が 3 品目、規格設定が不要と思われるものは 4 品目であった。なお、含量における異性体の取り扱いが不明なため、あるいはデータが矛盾しているため、今回は規格を設定せず、今後以降検討することとしたものが 2 品目あった。

⑤ 酸価：JECFA で規格設定があった 26 品目のうち、JECFA 規格を満たす製品が 3 つ以上あり満たさない製品が無かったもの、もしくは 8 割以上の製品が JECFA 規格を満たしているものは 20 品目、製品の数が 2 つ以下でも JECFA 規格を満たしており、かつ JECFA 規格を満たさない製品が報告されていないものは 1 品目であった。JECFA 規格修正検討依頼が 3 品目、フェノールエーテル類のため規格設定が不要と思われるものは 2 品目であった。

⑥ (比) 旋光度：今回の調査品目において JECFA で規格設定があるものなかった。

4-4) 総合判定

(3) の各規格項目の検証結果を総合的に検討し、JECFA 規格を満たしているものは 7 品目、満たしていないものは 43 品目であっ

た。43品目中実測値より JECFA 規格の修正が必要と判断したものは 41 品目であり、融点、屈折率、比重が混在したため、もしくは異性体の取り扱いが不明なため、規格設定できなかったものが 2 品目あった。

2) JECFA 規格と実測値 (I) の比較

2-1) 本年度調査品目の選定

平成 25 年度の調査で、平成 16~19 年度の厚生労働科学研究において自主規格を作成した香料化合物のうち JECFA 規格の存在した 1068 品目について両規格を比較検討したところ、979 品目で違いが見られた。その中から平成 25 年度は 258 品目、平成 26 年度は 199 品目の実測値 (I) を調査した。本年度は、未調査の品目のうち使用量の多い 200 品目を実測値 (I) の調査品目とした。

2-2) 実測値 (I) の調査の実施 (試験成績表及び受け入れ検査値)

調査対象とする規格項目はこれまでの自主規格での設定項目である含量、含量の範囲 (異性体含むかどうか)、定量法、屈折率、比重、酸価、融点・凝固点、(比) 旋光度とした。また、測定条件の異なるデータ、例えば比重等に関しては、測定条件が 20℃と 25℃のものが混在していることが分かっていたため、測定条件毎の記入欄を設け誤記を防止するようにした。本年度は平成 22 年度の使用量調査時に使用報告のある会社すべてに対して調査を行った。

2-3) 各規格項目と JECFA 規格との比較

調査対象の 200 品目のすべてでデータが得られた。各測定値について、JECFA 規格を満たしているか満たしていない場合はどのような違いがあるかを規格項目毎に判断記号を付け、整理した。明らかな異常値が報告され

ている製品は外れ値として集計には用いなかった。

① 含量: 146 品目の JECFA 含量規格には問題はなく、11 品目は緊急にその JECFA 規格を見直す必要はないと判定された。

JECFA 規格修正検討依頼が 22 品目であった。異性体情報等が必要で、今後さらなる検討が必要と思われるものが 21 品目あった。

② 融点・凝固点: JECFA 規格で設定があった 22 品目のうち、JECFA 規格に問題ないと判定されたものは 7 品目、緊急に見直す必要はないと判定されたものは 1 品目であった。融点ではなく凝固点あるいは凝固点ではなく融点の設定が望ましいと思われるものも含め、JECFA 規格修正検討依頼が 3 品目であった。今回データが得られなかった、あるいは少なかったため規格設定できなかったものは 7 品目、JECFA 規格と測定条件が異なるため規格設定できなかったものは 3 品目であった。また、屈折率、比重があり、融点が不要と考えられるものは 1 品目であった。なお、含量規格のみで規格設定されているものがあり、実測値データより融点規格があった方がよいと思われるものが 1 品目あった。

③ 屈折率: JECFA 規格で設定があった 183 品目のうち、134 品目の JECFA 規格には問題はなく、緊急に見直す必要はないと判定されたものは 11 品目であった。JECFA 規格修正検討依頼が 24 品目で、JECFA 規格が 1 点規格のため規格修正検討依頼が 5 品目であった。通常固体のため、屈折率の設定は不要と思われるものが 2 品目、含量における異性体の取り扱いが不明なため、あるいはデータ数が少ないため、今回は規

格を設定せず、今後検討することとしたものが7品目あった。

- ④ 比重：比重は基本となる測定温度が JECFA 規格では 25℃、我が国では 20℃のため、JECFA の指定する温度での測定値はほとんど得られなかった。このため、20℃の測定値については暫定的に 0.003 を減じて 25℃の規格値と比較を行った（その逆も同じ）。ただし、同一のロットまたは製品で 20℃と 25℃の測定値が得られている品目はその差を用いて当該品目の他の測定値を補正した。JECFA に規格設定があった 183 品目のうち、91 品目の JECFA 規格には問題はなく、緊急に見直す必要はないと判定されたものは 10 品目であった。JECFA 規格修正検討依頼が 50 品目、JECFA 規格が 1 点規格のため規格修正検討依頼が 9 品目、規格設定が不要と思われるものは 2 品目であった。含量における異性体の取り扱いが不明なため、あるいはデータ数が少ないため、今回は規格は設定せず、今後検討することとしたものが 21 品目あった..
- ⑤ 酸価：JECFA で規格設定があった 76 品目のうち、49 品目の JECFA 規格には問題はなく、緊急に見直す必要はないと判断されたものは 5 品目であった。なお、フェノール類、エーテル類等で規格設定する必要がない、もしくは設定できないものであるにもかかわらず、JECFA に規格設定されているものが 16 品目 (F) があった。含量における異性体の取り扱いが不明なため、あるいはデータ数が少ないため、今回は規格は設定せず、今後検討することとしたものが 6 品目 (J) があった。
- ⑥ (比) 旋光度：JECFA 規格で設定があっ

た 5 品目のうち、1 品目の JECFA 規格には問題はなく、JECFA 規格修正検討依頼が 1 品目、名称が光学活性体に限定されていないため、JECFA 規格が不要と思われるものが 3 品目あった。

3) 問題点の整理

実測によって JECFA 規格に問題が見つかった例の中には、JECFA の規格設定の根拠に問題があるものが多数みられた。異性体混合物のガスクロマトグラフィーによる含量測定の場合、その多くはどのピークを合算するのか明確にされていない。また室温で通常固体の物質に屈折率、比重を設定しているもの、室温で液体の物質に融点・凝固点を設定されているものが見られた。前者は過冷却での測定となるため測定法として問題があり、後者は規格として屈折率、比重が代用可能で、単に物理的性質が記載されているだけでも考えられる。このような規格項目自体の妥当性に由来する不一致は、他にも酸価、旋光度等において多数見られた。規格の幅に関しても、屈折率等通常ある程度の幅が必要な項目に対して、1 点の規格が設定されているもの、幅が著しく狭いもの、逆に著しく広いものも存在した。屈折率、比重、旋光度の測定温度が統一されていない点も問題と考えられた。

上記の問題については必ずしも JECFA 規格が誤っているわけではないが、測定条件が統一されていない場合は、測定者の負担増となることから修正が望ましい。

2. 我が国で使用している天然香料の使用量調査研究

1) 使用品目の前回調査との比較

前回の調査においては、消食表第 377 号通

知別添 2 (調査当時) 収載の天然香料基原物質と新たに報告された基原物質の合計使用品目数は 487 品目であったが、今回調査では 281 品目であった。前回使用されていたが今回使用の報告がなかった基原物質数は 209 に及んだ (Table 1)。

Table 1 使用品目の前回調査との比較

比較内容	品目数
前回, 今回ともあり	278
前回なし, 今回あり	3
前回あり, 今回なし	209
前回, 今回ともなし	130
合計	620

前回調査：平成 21 年厚生労働科学研究

また、各基原物質由来の天然香料が何社に使用されているかをまとめると、全く使用されていない (使用会社数=0) の基原物質の数は 339 に及び、前回調査 (平成 21 年度厚生労働科学研究) の 131 と比較して著しく増加していた。また使用が 1~5 社の基原物質は 140 であり、使用量が報告された半数の基原物質由来の天然香料についてはごく限られた会社によってしか使用されていないことがわかった。前回使用している基原物質数が 300 品目以上の会社が 2 社であったが、今回最も多く使用している会社でも 163 品目であった。

全体的に使用報告数が前回と比較して減少した理由としては、前回の使用品目実態調査では過去複数年間に製造あるいは輸入調査香料中に使用されていることが確認された基原物質名をのみの回答を求めたのに対し、今回の調査では平成 25 年の 1 年間に自社で使用

または食品会社に販売した天然香料の基原物質名と使用量の回答を求めたことからきた差であり、他社香料製剤 (特に輸入品) 中の天然香料について量的に把握できないためであったと考えられる。

また使用量の面から考えると、使用会社数の多いレモン、オレンジ、バニラ、グレープフルーツ等は使用量も上位であるが、その一方オールスパイス、セロリー、クローブ、ナツメグ等は使用会社数が多いものの使用量自体は多くない。これらは一般的にアクセントとして用いられる場合が多く、少量でも十分に効果が発揮されることによるものと考えられる。

2) 分類名による使用品目の前回調査との比較

Table 2 に分類名ごとの使用物質数と使用量をまとめた。1 基原物質が複数の分類にまたがっているため合計量は合わないが、我が国で使用されている天然香料の基原が主に植物性であることがわかる。また、合計使用量約 2730 トンのうち一般食品を基原とする天然香料が約 98%を占めていた。

Table 2 基原物質の分類名と使用実態のあった物質数及び使用量

分類名	平成 26 年使用量調査	
	使用物質数	使用量(トン)
植物性	263	2490.4
動物性	24	269.3
加工品	24	213.8
混合品	2	2.4
一般食品	178	2672.6

3) 系統名による使用品目の前回調査との比較

Table 3 に系統名ごとの使用物質数及び使用量を集計した。

Table 3 基原物質の系統名と使用実態のあった物質数及び使用量

系統名	平成 26 年使用量調査		
	使用物質数	のべ使用会社数	使用量(トン)
海藻	3	12	0.2
果菜	5	30	11.8
柑橘	11	290	1257.2
茸	3	8	0.7
穀類	6	18	14.2
根菜	4	20	0.1 未満
酒	6	76	15.0
水産物	6	26	23.7
茶	3	39	82.3
調味料	5	11	1.4
ナッツ	5	15	3.5
乳	7	55	211.3
豆	5	30	16.3
葉菜	3	20	0.4

柑橘の系統に属する天然香料が全使用量約 2730 トンの約 46%を占めており、のべ使用会社数も 290 社と非常に多く、一般的な嗜好にあった天然香料であることがうかがえる。

また酒の系統に属する天然香料は、使用量は少ないものの、のべ使用会社数は 76 と多く、その大部分が蒸留酒、発酵酒、フーゼル油で占められている。これらは伝統的に香料原料として使用されてきたことが理由と思われる。調味料では醤油の使用が特徴として挙げられる。さらに水産物の大部分がカツオブ

シであること、豆の大部分がフェネグリークであることが特筆される。

3. 生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究

1) 指定添加物

昨年度の追調査を行った結果、85 社から回答を得た。平成 26 年度と 27 年度の合計調査数は 657 件、回収数は 569 件、回収率は 86.6%であった。

回収された調査票をもとにデータをコンピュータ入力し集計を行い下記の集計票を作成した。

集計 1 食品添加物用途別 食品添加物名と全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

集計 2 食品添加物名別 製造会社数、全出荷量、純食品向け出荷量、輸出量調べ

2) 既存添加物

2-1) 調査の留意点

今回の調査では既存添加物収載品目リスト及び一般飲食物添加物品目リストを中心に既存添加物等の出荷量の実態を把握することを目的とした。リストが公表されて 20 年が経過し、成分規格が定められているものが増加したが、未設定のものも依然多い。これらについて純度など量的基準を明確に記入してもらうよう留意した。

また、今後の調査の精度を上げていく試みとして、用途（食品/非食品）別出荷量、輸出量を設問したが、記入者側が実態を把握していないことが多く、統計値としては利用していない。

2-2) コンピュータへのインプット、集計

指定添加物の調査と同様に、調査票の回答をコンピュータ入力し、集計した。

2-3) 調査票の回収結果

調査票発送数は395件、回収数は329件(回収率 83.3%)、製造または輸入していると回答した企業は231社(回収に対する比率70.2%)であった。

D. 結論

香料化合物規格の国際整合化に係わる調査研究では、香料化合物のJECFA規格の検証のため、平成26年度の実測値(I)の調査を再度詳細に検討し、5品目はJECFA規格で問題なし、48品目はJECFA規格の修正が必要、5品目は保留、50品目はさらなる調査が必要と判断し、実測値(II)の追加調査を行い、7品目はJECFA規格で問題なく、41品目はJECFA規格の修正が必要、2品目はより詳細な検討が必要と考えられた。また、JECFA規格に問題を持つ可能性のある品目のうち、200品目の実測値(I)の調査を行い、その結果62品目はJECFA規格で問題なし、92品目はJECFA規格の修正が必要、46品目はさらなる調査が必要と考えられた。平成25年度にJECFA規格と自主規格を比較した香料化合物は1068品目であったが、平成25年度の調査の追加等で、全調査対象品目は1088品目となった。これらのうち88品目は自主規格との比較によりJECFA規格で問題なしとなった。検討が必要と考えられた残りの1000品目中、603品目のJECFA規格を実測値により検討したところ、このうちの約5割にあたる289品目はJECFA規格を満たしていることが確認された。また約4割にあたる230品目はJECFA規格の修正が必要、84品目はさらなる調査が必要となった。実測値調査未実

施の香料化合物は397品目あり、今後調査を進めていく予定である。

我が国で使用している天然香料の使用量調査研究では、昨年度実施した調査に基づき集計及び考察を行った。昨年行った調査から、使用量が把握できた基原物質数は281品目、単純合計使用数量は約2730トンであることが明らかになった。調査年度はやや異なるが、平成22年の合成香料化合物の合計使用量(約1256トン)と比較して考えると、非常に大量の天然香料が我が国で流通している食品中に使用されていることがわかった。

研究方法については、回答されたデータを多方面から考察するために、平成19年度に構築した天然香料基原物質データベースで定義した分類及び系統名を集計表に加えた。これらの考察により、我が国における天然香料の使用実態が質的な面ばかりでなく量的な面においても明らかになった。使用会社数の多いレモン、オレンジ、バニラ、グレープフルーツ等は使用量も上位であるが、その一方オールスパイス、セロリー、クローブ、ナツメグ等は使用会社数が多いものの使用量自体は多くない。これらは一般的にアクセントとして用いられる場合が多く、少量でも十分に効果が発揮されることによるものと考えられる。また、我が国で使用されている天然香料の基原は主に植物性であること及び、合計使用量約2730トンのうち一般食品を基原とする天然香料が約98%を占めていることが明らかとなった。本研究により、多数の基原物質に由来する天然香料の使用実態を簡便に把握し、形態等にかかわらず基原物質毎の全体量を回答する方式を策定し、結果として600品目を超える基原物質毎に天然香料の使用量の概要を把握することができた。

生産量統計を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究では,追加調査を実施し,既存添加物については基礎的な情報を得た.

上田要一, 佐藤恭子. 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. JAFAN 35(3), 143-261 (2015)

E. 研究発表
論文発表

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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27年度分担研究報告書

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

研究分担者 北村陽二 国立大学法人金沢大学学際科学実験センター准教授

研究要旨 食品添加物の規格基準の向上を目的として、食品添加物の確認試験に国際的に多用されている赤外スペクトル（IR）法について、近年普及著しいATR法の確認試験への利用の可能性を検討した。その結果、ATR法を添加物への確認試験に利用する際には、プリズムや測定試料の屈折率、光源の入射角など、ATR法での測定条件に留意し、標準ATRの確立が必要であると結論した。

A. 研究目的

赤外スペクトル（以下IRと略する）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 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。一方、減衰全反射法（Attenuated Total Reflection；ATR法）は、現在では公定書には規定されていないが、その測定の簡便さと再現性の良さから、近年急速に普及しつつある。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、ATR法によるIRの確認試験への利用の可能性を検討

した。測定試料として香料化合物を取り上げ、ATR法によるIR測定法を検討した。

B. 研究方法

測定試料は、国立医薬品食品衛生研究所より提供を受けた食品添加物試料を用いた。これらの試料について、液膜法、及び、ATR法によりIRを測定した。

本研究で測定に用いた装置は、JASCO FT/IR-4100（日本分光社製）である。液膜法の測定は、分解能4 cm^{-1} （32回繰り返し）、測定領域4000～600 cm^{-1} で行った。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、対照にはこの同じ材質の窓板を使用した。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、光の入射角45度固定）を装着した装置を用い、分解能4 cm^{-1} （積算回数96回）、測定領域4000～600 cm^{-1} で測定を行った。

（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

1) プロピオン酸エチルに関する検討

屈折率の低い試料として、屈折率が1.38であるプロピオン酸エチルを取り上げ、液膜法及びATR法による測定を行った。その結果、両者は完全には一致せず、ピークの相対強度変化、ピークの低波数側へのシフトが認められた (Fig. 1)。

2) ヘキサン酸エチルに関する検討

次に屈折率の低い試料として、屈折率が1.41であるヘキサン酸エチルを取り上げ、液膜法及びATR法による測定を行った。その結果、両者は完全には一致せず、ピークの相対強度変化、ピークの低波数側へのシフトが認められた (Fig. 2)。

3) 酢酸フェネチルに関する検討

次に屈折率の比較的高い試料として、屈折率が1.50である酢酸フェネチルを取り上げ、液膜法及びATR法による測定を行った。その結果、両者は一致せず、ピークの相対強度変化、ピークの低波数側へのシフトが認められ、その程度はプロピオン酸エチルやヘキサン酸エチルよりも大きかった (Fig. 3)。

4) N-メチルアントラニル酸メチルに関する検討

次に屈折率の高い試料として、屈折率が1.58であるN-メチルアントラニル酸メチルを取り上げ、その結果、両者は一致せず、ピークの相対強度変化、ピークの低波数側へのシフトが認められ、その変化の程度は測定した全化合物の中で最も大きかった (Fig. 4)。

D. 考察

本研究では、食品添加物等の国内規格基準の向上などを目的にして、ATR法によるIRの確認試験への利用の可能性を検討した。測定試料として香料化合物を取り上げ、ATR法によるIR測定法を検討した。

香料化合物としては、それぞれ屈折率の異なる、プロピオン酸エチル、ヘキサン酸エチル、酢酸フェネチル、N-メチルアントラニル酸メチルを取り上げ、液膜法とATR法でのスペクトルを比較した。

いずれの化合物も、ATR法で測定したスペクトルは、液膜法で測定したスペクトルとは一致せず、ATR法で測定したスペクトル同士と比較で確認することが必要と考えられる。

さらに、測定化合物の屈折率が高いほど、ピークの相対強度変化、ピークの低波数側へのシフトの程度が大きくなる傾向が認められた。この結果は、ATR法の原理である、プリズムと試料の境界で光が全反射する際に、光が波長に比例した深さだけ試料にもぐり込み、その際のもぐり込み深さはプリズムの屈折率、試料の屈折率、入射光の波長と入射角に依存し、ピーク強度やピークシフトはもぐり込み深さに依存することを反映していると考えられる。本研究では、プリズムとしてダイヤモンドプリズム (屈折率2.4)、入射角45度固定の装置のみを用いたため、同じ試料での液膜法とATR法でのスペクトルの違いの程度は、試料の屈折率に依存する傾向を認めたのみであったが、実際の測定においても、ATR法の原理を反映していることを示すことができた。従って、同じ試料をATR法で測定する場合であっても、異なるプリズムを用いた場合や、光の入射角が異なるATR装置で測定すれば、それらのATRス

ペクトルも異なってくると考えられる。

以上より、食品添加物の測定法をATR法で規定する場合は、ATR補正を行わない、生スペクトルの測定結果と、ATR法による標準IRと比較することだけでなく、ATR法で測定する際に用いるプリズムや光の入射角も揃える必要があると考えられる。

E. 結論

食品添加物の規格基準の向上を目的として、食品添加物の確認試験に国際的に多用されているIR法について、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。その結果、食品添加物の測定法をATR法で規定する場合は、ATR補正を行わない、生スペクトルの測定結果と、ATR法による標準IRと比較することだけでなく、ATR法で測定する際に用いるプリズムや光の入射角も揃える必要があると結論した。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

赤外吸収スペクトル

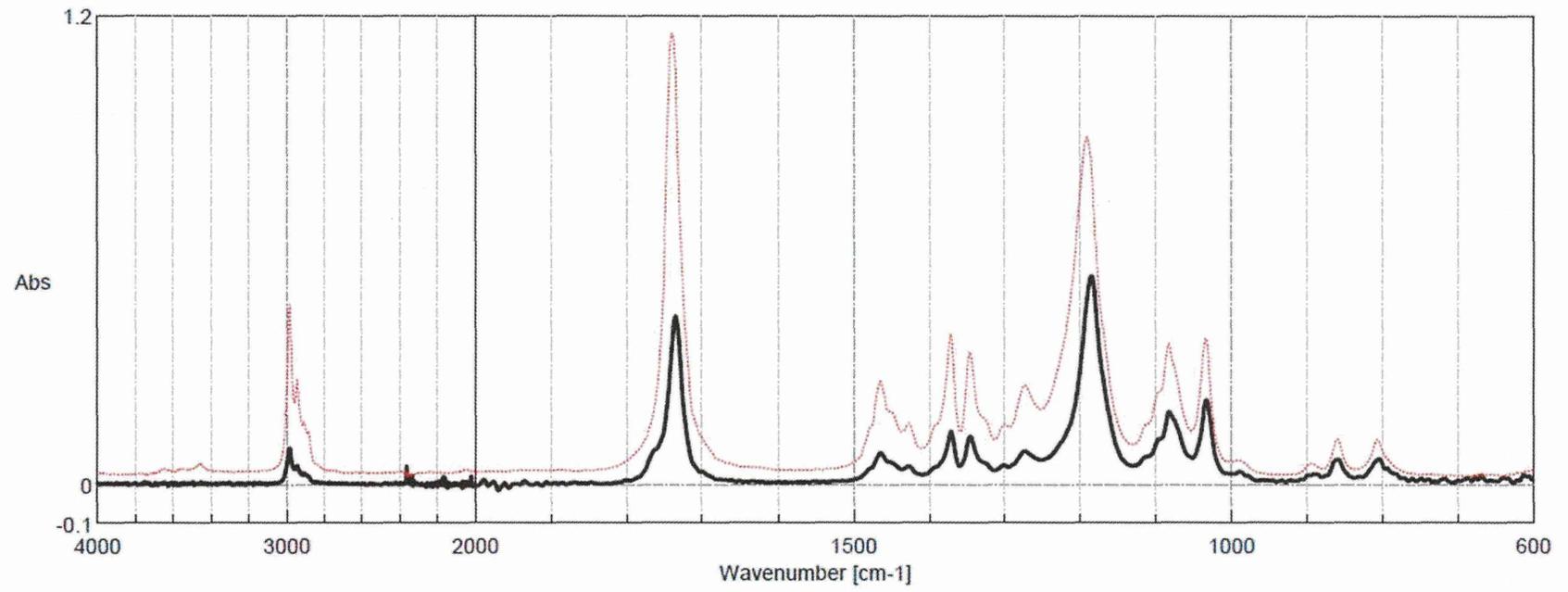


Fig. 1 プロピオン酸エチル (直線 : ATR 法, 破線 : 液膜法)

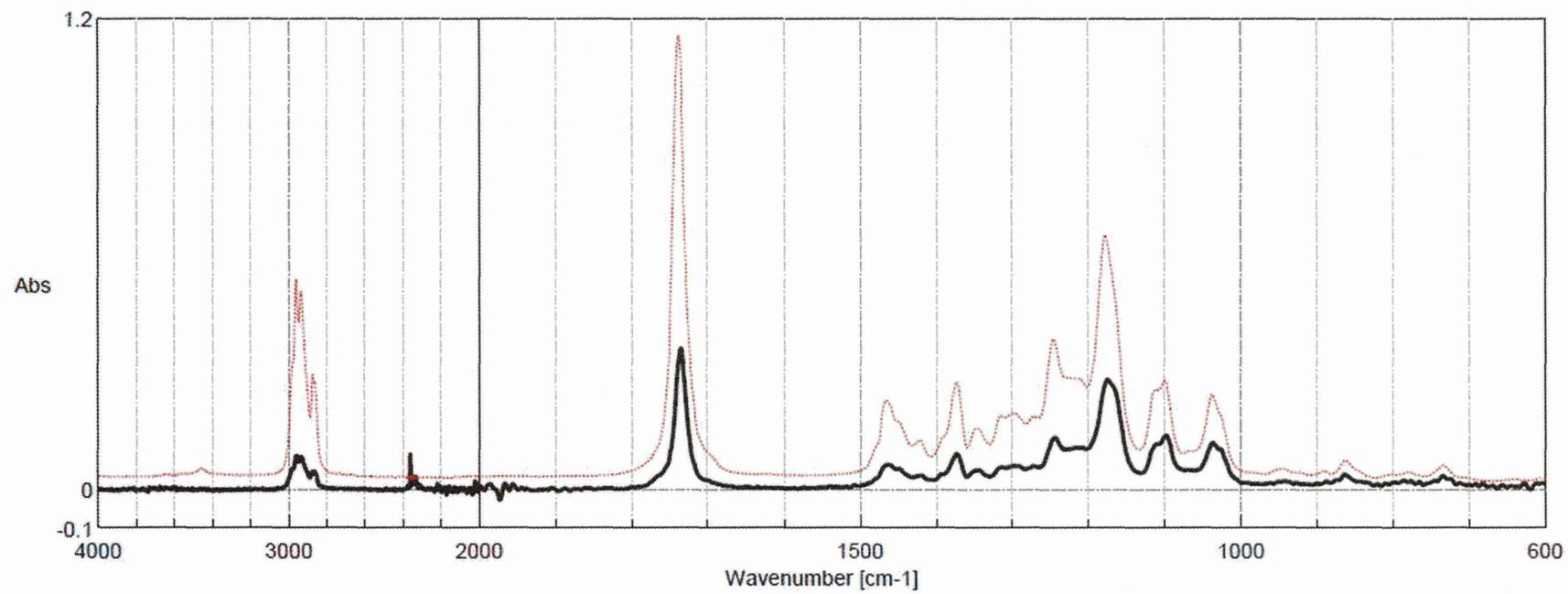


Fig. 2 ヘキサン酸エチル (直線 : ATR 法, 破線 : 液膜法)

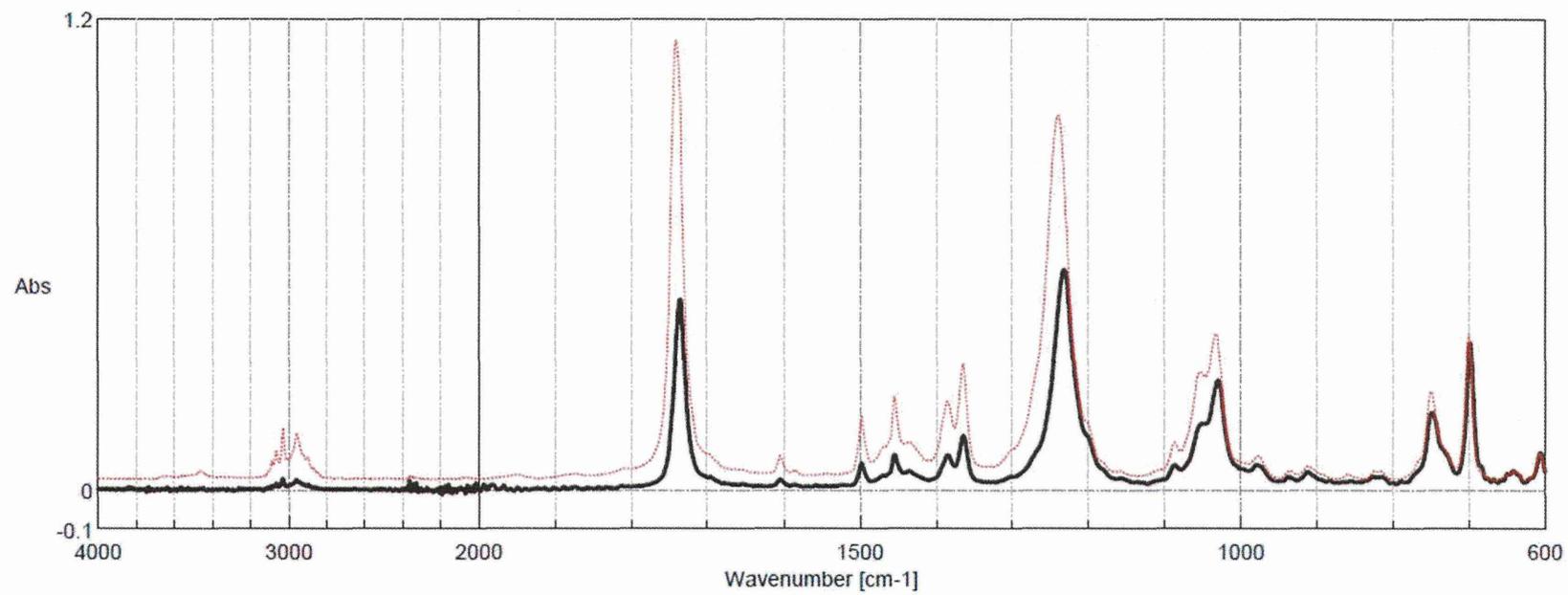


Fig. 3 酢酸フェネチル ((直線 : ATR 法, 破線 : 液膜法)

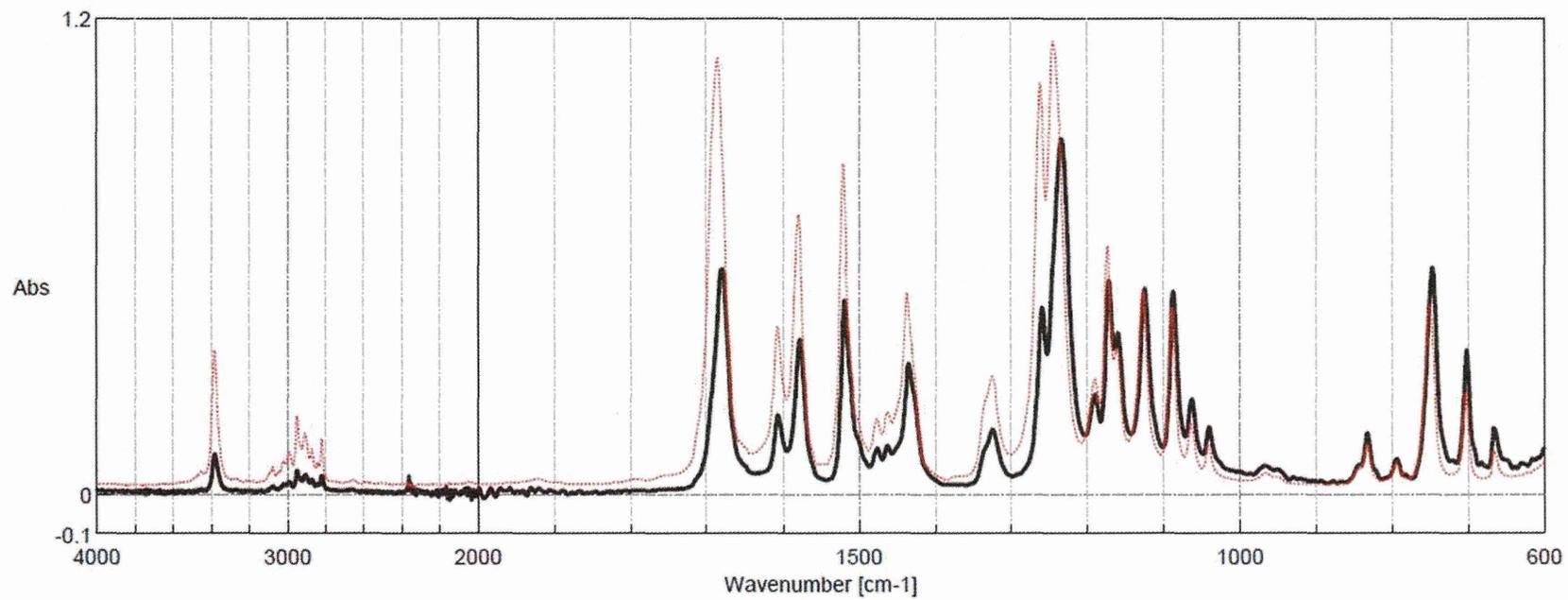


Fig. 4 N-メチルアントラニル酸メチル (直線：ATR法, 破線：液膜法)

定量 NMR 法による定量用標準物質の純度分析法の確立

研究分担者 大槻 崇 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官

研究要旨 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、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 のうち ^{13}C NMR を用いた定量分析に関する検討を行った。その結果、フルジオキソニルをモデル試料として検討したところ、本法は約 5% 程度のばらつき (S/N : 約 200) で定量が可能であることが判明した。

A. 研究目的

日本では食品添加物の安全性や品質を確保する目的で、食品添加物の性状、含量（純度）などの成分規格や食品添加物を使用できる食品の種類、使用量などの使用基準等が設定され、第 8 版食品添加物公定書に記載されている。成分規格には、原則として含量とその分析法が定められており、同分析では、HPLC 等が使用されることが多く、純度が正確な定量用標品が必要である。しかし、標品となる定量用試薬の純度は、主に滴定や HPLC 等を用いて算出されているが、HPLC 等では必ずしも絶対純度が計測されていない。また、この純度は自社規格により保証されたもの、すなわち計量学的に正確とは言えず、結果として分析値の信頼性が損なわれる可能性を否定できない。従って、食品添加物の品質確保の観点から、信頼性の高い純度分析法の確立が急務である。

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) が注目

を集めている¹⁾。qNMR のうち、 ^1H NMR を利用した qNMR (^1H -qNMR) は、定量性が確保された測定条件を用いる事で、2 つの化合物間のシグナル面積強度比が「各化合物のモル濃度×各置換基上の水素数」に比例する原理を利用した定量法である。NMR は原子核を対象に測定を行っているため、これら 2 つの化合物は同一の化学構造である必要はない。従って、計量学的に正確な純度が付与された認証標準物質のような SI へのトレーサビリティが確保された標品を内標準物質として用いることにより、内標準物質と測定対象化合物のシグナル面積強度比、水素数、秤量濃度の関係から、様々な測定対象化合物の含量や純度を求めることが可能である。このような定量値の計量計測トレーサビリティを確保した ^1H qNMR は、AQARI (Accurate QuAntitative NMR with Internal reference material) とも呼ばれており、本法は残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬などの純度分析^{2, 3)}、生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析^{4⑥)}へ利用されている。なお、 ^1H NMR

は、定量に用いることができるシグナルの観測範囲が 0~10 ppm と限られており、試料によってはシグナルの重なりなどにより定量が困難なケースも懸念される。一方で、 ^{13}C NMR は、 ^1H NMR 同様汎用的に NMR 測定に用いられている分析法に 1 つで、その測定感度は ^1H NMR と比べ低いものの、定量に用いるシグナルの観測範囲が 0~200 ppm と ^1H NMR と比べ 20 倍以上と広い。また、シグナルもカーボンデカップリングにより一重線として観測されることから、解析が容易で、他のシグナルと重なる可能性も比較的低いことが予想され、 ^1H NMR で定量が困難な試料の分析への代替法となり得ることが期待される。

そこで本研究では、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、 ^{13}C NMR を用いた定量 NMR (^{13}C -qNMR) の有効性に関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬

ジメチルスルホンは、Sigma-aldrich 製 (TraceCERT) (純度 99.73%) を用いた。フルジオキソニルは、定性分析では和光純薬製、定量分析では林純薬工業製 (定量) をそれぞれ用いた。重ジメチルスルホキシド ($\text{DMSO}-d_6$) は Aldrich 製を用いた。

2) 装置

核磁気共鳴装置 (NMR) : ECZ600 (プロトン共鳴周波数 600 MHz) (日本電子製)

3) フルジオキソニルの NMR 分析 (シグナルの帰属)

フルジオキソニル約 10.0 mg を量りとり、

$\text{DMSO}-d_6$ 約 0.75 mL に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に液高が約 4 cm になるように入れ、密閉し、各種 NMR 測定 (^1H NMR, ^{13}C NMR, $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, HMQC, HMBC) を行った。

4) ^{13}C -qNMR によるフルジオキソニルの定量

フルジオキソニル約 10 mg 及び $\text{DSS}-d_6$ 約 4 mg をそれぞれ精密に量り、 $\text{DMSO}-d_6$ 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 試料管に液高が約 4 cm になるように入れ、密閉し、 ^{13}C NMR による qNMR 測定を行った。ジメチルスルホンのシグナル面積強度を 2.00 としたときのフルジオキソ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、フルジオキソニル含量 (C_{FLU} , %) を算出した。

$$C_{\text{FLU}} = \frac{I_{\text{FLU}}/H_{\text{FLU}}}{I_{\text{DMS}}/H_{\text{DMS}}} \times \frac{M_{\text{FLU}}/W_{\text{FLU}}}{M_{\text{DMS}}/W_{\text{DMS}}} \times 100$$

ただし、 I_{FLU} , I_{DMS} はフルジオキソニル及びジメチルスルホンのシグナル面積強度 (ジメチルスルホン : 2.00), H_{FLU} , H_{DMS} はフルジオキソニル及びジメチルスルホンの特定基の水素数 (ジメチルスルホン : $\text{CH}_3 \times 2 = 2$), M_{FLU} , M_{DMS} はフルジオキソニル及びジメチルスルホンの分子量 (ジメチルスルホン : 94.13, フルジオキソニル : 248.19), W_{FLU} , W_{DMS} はフルジオキソニル及びジメチルスルホンの秤取量 (mg) である。

5) ^{13}C -qNMR 測定条件及びデータの解析

^{13}C -qNMR 測定の基本条件を表 1 に示した。なお、 ^{13}C -qNMR の化学シフト値は、

DMSO- d_6 の炭素シグナルを基準シグナル (8 39.5) とし, δ 値を ppm 単位で表した. 得られた FID データは, フーリエ変換及び位相補正を行った. フルジオキソニル及びジメチルスルホンの定量シグナルの積分範囲を設定した後, ジメチルスルホンのシグナル面積強度を 2.00 (8 42.1) としたときのフルジオキソ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「4) ^{13}C -qNMR によるフルジオキソニルの定量」で示した計算式に代入し, 含量を算出した. なお, データの解析は, Alice 2 for qNMR ver.2 を用いた.

C. 結果及び考察

1) フルジオキソニルの各炭素シグナルの帰属

^{13}C -qNMR により精密な定量を行うには, 試料に由来する NMR シグナルを帰属するとともに, 分析対象成分及び標純物質のシグナルに夾雑物や溶媒由来のシグナルが重ならないこと, 各シグナルの S/N などを確認しなければならない. そこで, フルジオキソニルについて ^{13}C 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 1 に示した ^{13}C NMR スペクトルが得られた. また, 本結果及び ^1H NMR, 各種 2 次元 NMR (^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC) スペクトルの詳細な解析により, 各水素シグナル及び炭素シグナルを帰属した (図 2). 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.

2) ^{13}C -qNMR によるフルジオキソニル含量の測定

^{13}C -qNMR 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

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, 計量計測トレーサビリティが確保された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, 本法の食品添加物や純度規定が設けられている物質への適用性を明らかにするため, フルジオキソニルについて ^{13}C -qNMR 測定を行った. 通常, ^{13}C -qNMR では, 定量性を確保した条件を用いる必要がある. 測定条件を表 1 に示す. 本研究では, この測定条件を用いて ^{13}C -qNMR を行った (図 3). その結果, 表 2 に示すように, δ_{c} 89.9, 108.2, 124.7, 139.0 及び 143.1 のシグナルより算出されたフルジオキソニル含量は, 99.9%, 100.6%, 99.9%, 98.4%及び 100.1%であった. また, これらのシグナルから算出された含量値の相対標準偏差 (RSD) は 5.1~8.4%であった. 一方で, δ_{c} 120.2 及び 121.9 のシグナルより算出されたフルジオキソニル含量は 94.6% (RSD : 7.5%) 及び 96.7% (RSD : 6.2%) と他のシグナルから得られたフルジオキソニル含量と比べ 2~5%程度差が認められた. なお, δ_{c} 116 付近に観察された 3 本のシグナルについては, 各々のシグナルが近接していること, δ_{c} 129.2 に観察されたシグナルは不純物と考えられるシグナルが重なっていたことから, 正確な定量が困難であった.

D. 結論

本研究では, 食品添加物の規格試験法の精度の向上を目指して, フルジオキソニルをモデル試料として ^{13}C -qNMR の適用性を検討した. 今回の検討では, 各シグナルから得られた定量値のばらつきが最大で 5%程度あり, また相対標準偏差も最大で 8.4%とこれまで

検討した ^1H -qNMR による各食品添加物標品の定量と比べ、その分析精度は若干劣るものであった。今回の ^{13}C -qNMR の測定条件では、定量シグナルの S/N が 200 であり、 ^1H -qNMR の場合と比較し定量シグナルに対するベースラインのノイズが大きい。このことが ^{13}C -qNMR における定量精度に大きく影響を及ぼした原因の 1 つと考えられた。従って、S/N を改善することが定量 ^{13}C NMR の精度の向上に繋がるものと予想されるが、一方で測定試料の必要量の増加や測定時間の増大などとのトレードオフともなる。ゆえに、 ^{13}C -qNMR を使用する場合は、その特徴を良く理解し、必要とする分析精度に応じて、秤取量、分析時間（積算回数）を設定することが実用的に運用する上で重要と考えられた。

E. 研究発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

なし

参考文献

- 1) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hira, T. *Accred. Qual. Assur.*, 14, 79-86 (2009).
- 2) Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 16, 28 (2009).
- 3) Hosoe, J., Sugimoto, N., Goda, Y., *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 41, 960 (2010).
- 4) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H. *J. Nat. Med.*, 65, 262 (2011).
- 5) Tada, A., Takahashi, K., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Ishizuki, K., Nishimura, T., Yamazaki, T., Kawamura, Y. *Food Hyg. Saf. Sci.*, 51, 205 (2010).
- 6) Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H. *Chem. Pharm. Bull.*, 61, 1264 (2013).