

Table 1 ^{13}C -qNMR 測定条件

Spectrometer	JEOL ECZ600
Probe	CH UltraCOOL probe
Spectral width	200 ppm (-25-225 ppm)
X point	131072
Acquisition time	2.8 s
Flip angle	90°
Pulse delay	97.2 s
Scan times	128
Spining	off
NOE	off
Probe temperature	30°C

Table 2 各シグナルより算出されたフルジオキソニル含量の比較 (n=3)

δ_{C} (ppm)	Content (%)	RSD (%)
89.9	99.9	5.1
108.2	100.6	5.6
120.2	94.6	7.5
121.9	96.7	6.2
124.7	99.9	8.5
139.0	98.4	5.6
143.1	100.1	6.6

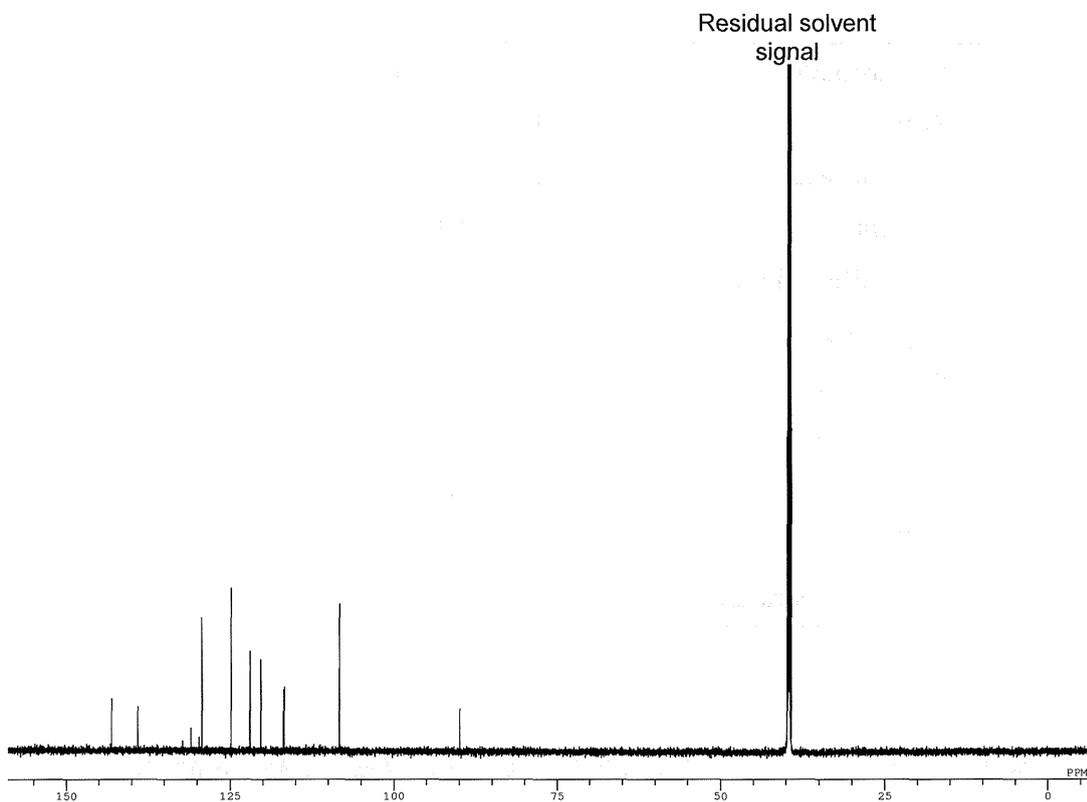


Fig. 1 フルジオキサニルの ^{13}C NMR スペクトル
(測定溶媒 : $\text{DMSO-}d_6$)

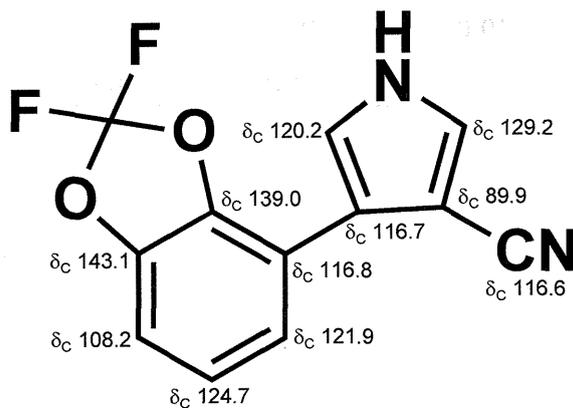


Fig. 2 フルジオキサニルの化学構造及び ^{13}C NMR 化学シフト

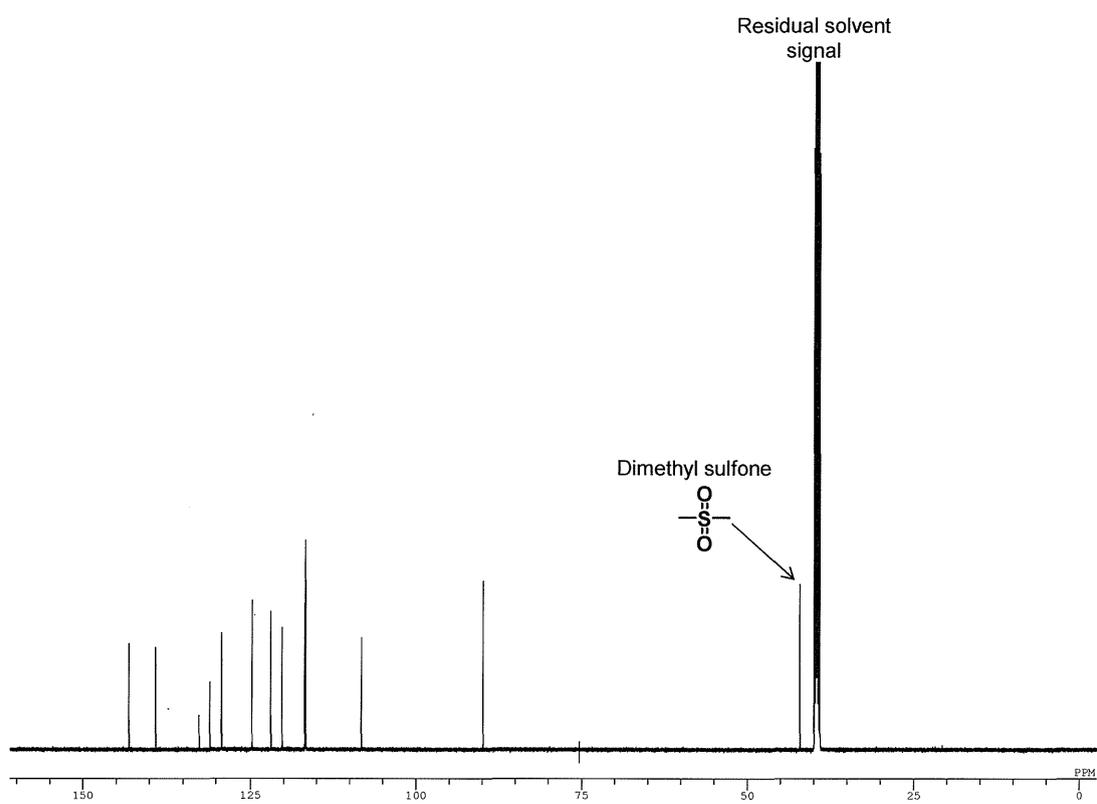


Fig. 3 フルジオキソニルの ^{13}C NMR スペクトル
(^{13}C -qNMR 測定条件, 測定溶媒: $\text{DMSO-}d_6$)

ICP-MS 等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

研究分担者 建部 千絵 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 二価の陽イオンを含む有機塩類の食品添加物中の鉛分析法について検討した。試料をマイクロウェーブにより灰化し、イミノ二酢酸基キレート樹脂充填型固相カートリッジを用いて鉛を抽出後、ICP-MS により鉛分析を行ったところ、添加回収試験で、平均回収率（相対標準偏差）は No gas モードで 85.1～96.3%（1.1～4.5%）、He モードでは 83.6～99.3%（1.6～3.9%）と良好な結果が得られた。本法は、二価の陽イオンを含む有機塩類の鉛分析において、ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム（APDC）溶媒抽出法を用いた原子吸光光度法の代替法として有用な方法であると考えられた。

A. 研究目的

第 9 版食品添加物公定書においては、海外規格との整合性をはかる目的から、一部の食品添加物を除き、鉛規格が設定されることとなった。ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等のようにイオン化エネルギーの低い陽イオンを多量に含む試料においては、原子吸光光度計による分析でイオン化干渉が起り、鉛の分析が困難となるため、これらの陽イオンを取り除くことが必要とされる。多量の陽イオンが含まれる試料の前処理法としては、ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム（APDC）溶媒抽出法や、イオン交換樹脂法などの、共存元素との分離や目的元素の濃縮を行う方法が採用されている。第 9 版食品添加物公定書の鉛試験法においても、陽イオンを多量に含む食品添加物に対しては、APDC 溶媒抽出法が設定されている。しかし、APDC 溶媒抽出法は操作が煩雑で、多検体を迅速に処理することは難しい。また、試験溶

液が酢酸ブチル溶液であるため、原子吸光光度計で分析する際、溶媒の揮散等、分析環境への配慮が必要である。

本研究では、これまで APDC 溶媒抽出法を用いた原子吸光光度法による食品添加物の鉛分析法の代替法として、1 年目は一価の陽イオン（ナトリウム及びカリウム等）を含む無機塩類を対象とし、イミノ二酢酸基キレート樹脂充填型固相カートリッジ（Inert Sep ME-1）を用いた鉛抽出法の検討を行い、良好な結果を得た。2 年目は二価の陽イオン（カルシウム及びマグネシウム）を含む無機塩類を対象とし、Inert Sep ME-1 を用いた鉛抽出法の検討を行い、一価の陽イオンと同じ条件で鉛の抽出が可能であることを明らかとした。3 年目である今回は、硫酸による試料の乾式灰化が必要とされる二価の陽イオンを含む有機塩類を対象とし、灰化操作の簡便化のため、マイクロウェーブによる灰化を行い、Inert Sep ME-1 を用いてこれまでと同様の条件で

鉛を抽出し、ICP-MSを用いた鉛の分析法を検討したので報告する。

B. 研究方法

1) 試料

ステアロイル乳酸カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、グルタミン酸カルシウム、グルタミン酸マグネシウム、乳酸カルシウム、プロピオン酸カルシウムは食品添加物用を用いた。

2) 試薬・試液

硝酸（有害金属測定用）、塩酸（有害金属測定用）、鉛標準液(1000 µg/mL)、過酸化水素（原子吸光測定用）はいずれも和光純薬工業㈱製を用いた。酢酸アンモニウム溶液(500 g/L、鉄試験用)、25%アンモニア水（有害金属測定用）は関東化学㈱製を用いた。

0.1 M 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム溶液 4 mL を水で 250 mL とした。

0.5 M 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム溶液 80 mL を水で 1000 mL とした。

塩酸(1→4)溶液：塩酸 250 mL を水で 1000 mL とした。

硝酸(1→100)溶液：硝酸 10 mL を水で 1000 mL とした。

鉛標準原液：鉛標準液(1000 µg/mL)5 mL を硝酸(1→100)で 50 mL とし、鉛標準原液とした。

鉛標準溶液：鉛標準原液(100 g/mL) 1 mL 及び 0.5 mL を正確に取り、硝酸(1→100)溶液で 50 mL とし、2 及び 1 µg/mL 標準溶液とした。1 µg/mL 標準溶液 5、2.5 及び 1 mL をそれぞれ正確に取り、硝酸(1→100)溶液で 50 mL とし、100、50 及び 20 ng/mL 標準溶液とした。100 ng/mL 標準溶液 5、2.5、1 mL

を正確に取り、硝酸(1→100)溶液で 50 mL とし、10、5 及び 2 ng/mL 標準溶液とした。

3) 器具・装置

ダイヤフラム真空ポンプ、SPE バキューム マニホールド、無機分析用吸引マニホールド DigiTUBE 用ラック、PTFE デリバリーチップ、1、3、6 mL アダプター付き 25 mL リザーバー、Inert Sep ME-1(250 mg/6 mL)及び DigiTube は GL サイエンス㈱製を用いた。ICP-MS(Agilent7800)及びオートサンプラー(Agilent G3160A)はアジレントテクノロジー㈱製を用いた。マイクロウェーブ灰化装置 (ETHOS One, HPR-1000/10 ローター) 及びクォーツインサート容器(QM-30)はマイルストーンゼネラル㈱製を用いた。

4) 操作法

4-1) 試験溶液の調製

①マイクロウェーブ灰化装置を用いた試料の灰化

試料 0.2 g をクォーツインサートに量り取り、硝酸 6 mL を加え、振り混ぜた後、蓋をした。別に、四フッ化エチレン樹脂容器をプロテクションシールドに挿入し、水 5 mL 及び過酸化水素 2 mL を加え、その中に先のクォーツインサートを静かに置き、マイクロウェーブ灰化装置で Fig.1 の加熱プログラムで分解を行った。得られた溶液を室温で放置し、冷後、試料液とした。

②Inert Sep ME-1 による鉛の抽出

Inert Sep ME-1 を硝酸(1→100)溶液 5 mL(流速 20 mL/min)で洗浄し、水 20 mL 以上(流速 20 mL/min)でカートリッジ内に残る硝酸を洗浄した。0.1 M 酢酸アンモニウム溶液 5 mL を流出させ、試料液を流速 5 mL/min

でカートリッジへ負荷した。0.5 M 酢酸アンモニウム 10 mL 及び水 10 mL で洗浄後、硝酸(1→100)溶液約 8 mL(流速 1 mL/min)でゆっくりと溶出し、その溶出液を回収し、硝酸(1→100)溶液で 10 mL とし、試験溶液とした。また、試料を用いずに試験溶液の調製と同様に操作し、得られた液を空試験溶液とした。

4-2) マイクロウェーブ灰化条件の検討

グルタミン酸カルシウム試料 0.2 g を 3 つのクォーツインサートにそれぞれ量り取り、それぞれ 1 µg/g 相当の鉛標準溶液を添加し、30 分放置した。硝酸 4, 5 または 6 mL をそれぞれ加え、振り混ぜた後、蓋をした。以下 4-1) 試験溶液の調製に従い、試験溶液を調製した。得られた試験溶液中の鉛濃度を 4-4) ICP-MS 法による鉛の定量に従い、算出し、添加回収率を求めた。

4-3) 食品添加物試料を用いた鉛の添加回収試験の検討

4-1) 試験溶液の調製に準じて、食品添加物試料をクォーツインサートに量り取り、Table 1 に示した各食品添加物の鉛規格値相当量となるように、標準溶液を添加し、その後、4-1) 試験溶液の調製に準じて、試験溶液を調製し、4-4) ICP-MS 法による鉛の定量に従い、検量線より、試験溶液中の鉛濃度を算出し、鉛の添加回収率を求めた。なお、4-1) ①試料溶液の調製の際の加熱時間は第 9 版食品添加物公定書における各試料の各条鉛規格の試料液調製方法に従い加熱、または必要に応じて蒸発乾固後、更に塩酸(1→4)溶液に溶解し、試料溶液とした。

4-4) ICP-MS 法による鉛の定量

試験溶液、標準溶液及び空試験溶液につき、ICP-MS 法により次の操作条件で強度(cps)を測定した。標準溶液の強度より検量線を作成

し、試験溶液強度から空試験溶液吸光度を差し引いた値から、検量線を用いて試験溶液中の鉛濃度を求め、試料中の鉛量を算出した。

測定は下記に示す条件で実施し、No gas モード及び He モードで同時測定した。

測定モード	No gas	He
プラズマモード	一般用	一般用
引き出し電極2	-200 V	-200 V
オメガレンズ	9.4 V	9.4 V
オメガバイアス	-80 V	-80 V
偏光レンズ	11.8 V	0.4 V
He流量	—	5 mL/min
OctP RF	190 V	190 V
測定質量数(m/z)	208	208

C. 研究結果及び考察

1) マイクロウェーブ灰化条件の検討

マイクロウェーブ灰化装置条件を決定するために、規格値相当の鉛標準溶液を添加したグルタミン酸カルシウム 0.2 g に異なる量の硝酸(4~6 mL)を加え、4-2) マイクロウェーブ灰化条件の検討に従い、鉛の添加回収率を求めたところ、Fig. 2 に示すように 0.2 g の試料に対し、6 mL の硝酸を加えた場合が、最も良い回収率であった (84.4%)。以上の結果と、6 mL 以上加えるとクォーツインサート容器内から硝酸があふれる危険性を考慮し、以後のマイクロウェーブ灰化は 0.2 g に硝酸 6 mL を加えて分解を行うこととした。

2) ICP-MS 条件の検討

ヘリウムはマトリックスに起因する干渉の低減に有益であることがあるため、No gas モード及び He モードで測定を行った。標準溶液を用いて 4-4) ICP-MS 法による鉛の定量

に従い、測定を行い、検量線を作成した。その結果、Fig. 3に示すように、No gasモードの感度はHeモードの2倍以上であり、No gasモード及びHeモードいずれも5~50 ng/mLの範囲で良好な直線性が得られた ($R^2=0.9999$)。

3) 食品添加物試料を用いた鉛の添加回収試験の検討

アスコルビン酸カルシウム、グルタミン酸カルシウム、グルタミン酸マグネシウム、ステアロイル乳酸カルシウム、乳酸カルシウム、プロピオン酸カルシウム、各試料にTable 1に示した規格値となるように鉛標準溶液を添加し、マイクロウェーブ灰化後、Inert Sep ME-1による鉛の添加回収試験を行った。その結果、マイクロウェーブ灰化後の試料溶液はいずれも、無色透明な液であり、十分灰化がなされていると考えられた。Inert Sep ME-1による試料溶液からの鉛の抽出後得られた各試料のn=5での鉛の平均添加回収率(相対標準偏差)は、Table 2~7に示すように、No gasモードで85.1~96.3% (1.1~4.5%)、Heモードでは83.6~99.3% (1.6~3.9%)であり、いずれの測定モードにおいても83.6%以上の回収率が得られ、相対標準偏差も5%以内であり、真度及び精度共に良好な結果が得られた。ステアロイル乳酸カルシウムやプロピオン酸カルシウムではいずれの測定モードで平均回収率は良好であったものの、t検定を行ったところ、No gasモードとHeモードでの結果は有意差がみられた ($p<0.05$)。この原因としては、多量の共存元素の存在による非スペクトル干渉や、質量スペクトル上で目的元素と同じ質量数に何らかの妨害イオンが重なるスペクトル干渉、溶媒の粘性によ

る物理干渉が考えられた。しかし、Fig.4に示すICP-MSによるステアロイル乳酸カルシウムからの試験溶液のHeモードで測定したマスキャンの結果から、無添加試料中に鉛以外のm/z208と重なる妨害は見られず、鉛以外の元素がいくつか検出されたものの(炭素、ナトリウム、カリウム、亜鉛、ランタン等)その量は添加した鉛の強度と比較して非常に小さく、プロピオン酸カルシウムでも同様のマスキャン結果であった。また、試料に多量に含まれていたカルシウムの大部分はInert Sep ME-1で取り除かれていたことから、これらの元素による干渉が原因とは考えにくく、Inert Sep ME-1で取り除けなかった物質による、何らかの物理干渉の影響が考えられた。このような物理干渉の影響は内標準法や、標準添加法による定量による補正が有効であるかもしれない。

以上の結果からカルシウムやマグネシウムを含む有機塩の場合でもInert Sep ME-1による鉛の抽出は可能であり、試料によってはICP-MS測定時にマトリックスの影響を受ける可能性があるため、その際は内標準法や標準添加法の検討が必要であろう。

D. 結論

有機塩類(二価の陽イオンを含む)について、Inert Sep ME-1を用いた鉛の抽出法の検討を行った。アスコルビン酸カルシウム、グルタミン酸カルシウム、グルタミン酸マグネシウム、ステアロイル乳酸カルシウム、乳酸カルシウム、プロピオン酸カルシウムに規格値相当(Table 1)の鉛標準溶液を添加し、マイクロウェーブによる灰化を行った後、Inert Sep ME-1による鉛の抽出操作を行ったところ、平均添加回収率(相対標準偏差)はNo gas

モードで 85.1～96.3% (1.1～4.5%) , He モードでは 83.6～99.3% (1.6～3.9%) となり, 良好な回収率が得られた. 以上の結果から, 二価のカルシウム及びマグネシウム塩を含む有機塩類の鉛試験法については, マイクロウェーブによる灰化操作で分解後, 一価の陽イオンや二価の陽イオンを含む無機塩類と同様の抽出条件で, Inert Sep ME-1 を用いた鉛の鉛抽出が可能であり, APDC 溶媒抽出法の代替法として簡便で, 有用な方法であると考えられた.

E. 研究発表

学会発表

建部千絵, 古庄紀子, 久保田浩樹, 佐藤恭子, 穂山浩, キレート樹脂固相カートリッジを用いた食品添加物中の鉛試験法の開発, 日本食品化学学会第 21 回総会・学術大会, 東京 (2015. 5)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

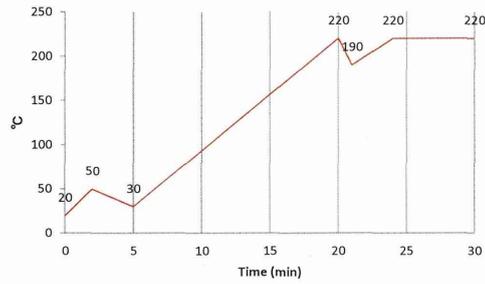


Fig. 1 マイクロウェーブ灰化装置加熱プログラム

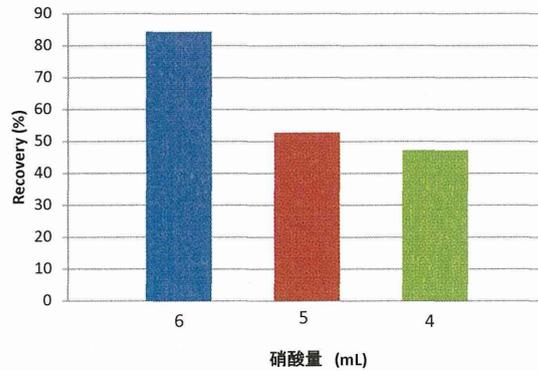


Fig. 2 異なる硝酸量でのマイクロウェーブ灰化後の鉛回収率
(試料：グルタミン酸カルシウム，鉛添加濃度：1 μg/g，ICP-MS 測定モード：He モード)

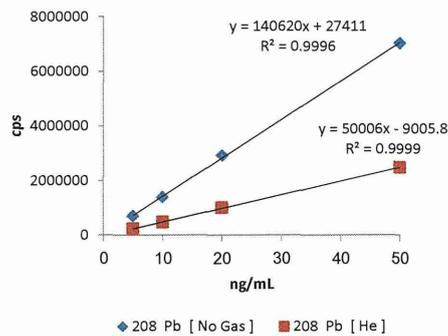


Fig. 3 異なる ICP-MS 測定モードによる検量線

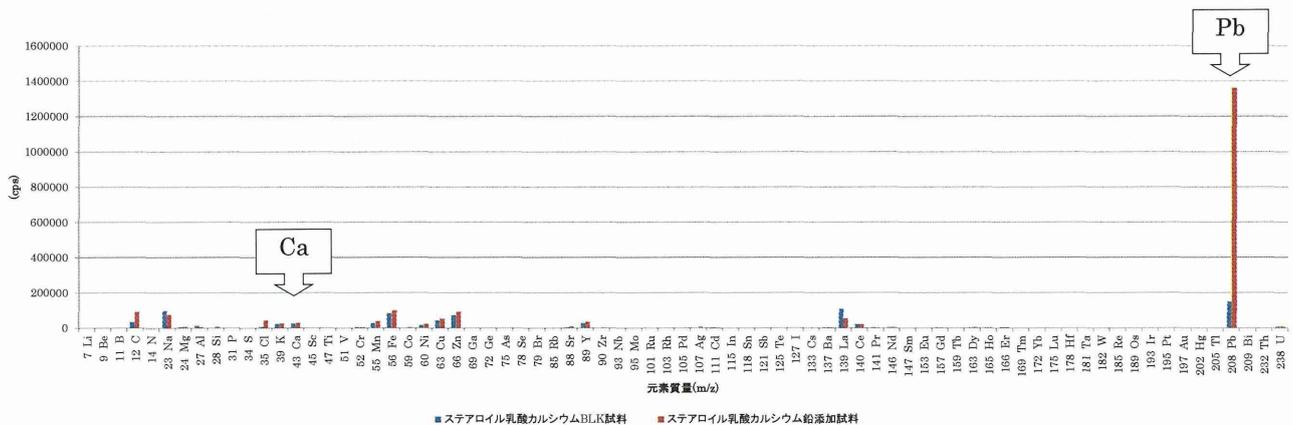


Fig. 4 ステアロイル乳酸カルシウム BLK 及び鉛添加試料からの試験溶液のマススキャンデータ

Table 1 各食品添加物の第9版食品添加物公定書における鉛規格値

食品添加物	鉛規格値(μg/g)
アスコルビン酸カルシウム	2
グルタミン酸カルシウム	1
グルタミン酸マグネシウム	1
ステアロイル乳酸カルシウム	2
乳酸カルシウム	2
プロピオン酸カルシウム	5

Table 2 アスコルビン酸カルシウムの鉛添加回収試験結果 (BLK : 鉛無添加, Smp : 鉛添加)

規格値 2 μg/g	208 Pb [No Gas]				208 Pb [He]			
	cps.	ng/mL	-BLK (ng/mL)	recovery(%)	cps.	ng/mL	-BLK (ng/mL)	recovery(%)
アスコルビン酸Ca BLK	363700	2.4			136463	2.9		
アスコルビン酸Ca Smp-1	5519909	39.1	36.7	91.7	2052875	41.2	38.3	95.8
アスコルビン酸Ca Smp-2	5404801	38.2	35.8	89.6	1932607	38.8	35.9	89.8
アスコルビン酸Ca Smp-3	5268831	37.3	34.9	87.2	1899370	38.2	35.3	88.1
アスコルビン酸Ca Smp-4	5365448	38.0	35.6	88.9	1927284	38.7	35.8	89.5
アスコルビン酸Ca Smp-5	5430441	38.4	36.0	90.1	1955701	39.3	36.4	91.0
			Average	89.5			Average	90.8
			RSD(%)	1.8			RSD(%)	3.2

Table 3 グルタミン酸カルシウムの鉛添加回収試験結果 (BLK : 鉛無添加, Smp : 鉛添加)

規格値 1 μg/g	208 Pb [No Gas]				208 Pb [He]			
	cps.	ng/mL	-BLK (ng/mL)	recovery(%)	cps.	ng/mL	-BLK (ng/mL)	recovery(%)
グルタミン酸Ca BLK	628887	4.3			224029	4.7		
グルタミン酸Ca Smp-1	3162809	22.3	18.0	90.1	1108832	22.4	17.7	88.5
グルタミン酸Ca Smp-2	2969056	20.9	16.6	83.2	1041193	21.0	16.3	81.7
グルタミン酸Ca Smp-3	3014940	21.2	17.0	84.8	1054365	21.3	16.6	83.0
グルタミン酸Ca Smp-4	3008968	21.2	16.9	84.6	1050395	21.2	16.5	82.6
グルタミン酸Ca Smp-5	2959235	20.8	16.6	82.9	1047580	21.1	16.5	82.3
			Average	85.1			Average	83.6
			RSD(%)	3.4			RSD(%)	3.3

Table 4 グルタミン酸マグネシウムの鉛添加回収試験結果 (BLK : 鉛無添加, Smp : 鉛添加)

規格値 1 μg/g	208 Pb [No Gas]				208 Pb [He]			
	cps.	ng/mL	-BLK (ng/mL)	recovery(%)	cps.	ng/mL	-BLK (ng/mL)	recovery(%)
グルタミン酸Mg BLK	535153	3.6			192843	4.0		
グルタミン酸Mg Smp-1	3016403	21.3	17.6	88.2	1084999	21.9	17.8	89.2
グルタミン酸Mg Smp-2	3103364	21.9	18.3	91.3	1118738	22.6	18.5	92.6
グルタミン酸Mg Smp-3	3128106	22.1	18.4	92.2	1131322	22.8	18.8	93.8
グルタミン酸Mg Smp-4	2962127	20.9	17.3	86.3	1066213	21.5	17.5	87.3
グルタミン酸Mg Smp-5	3063799	21.6	18.0	89.9	1091968	22.0	18.0	89.9
			Average	89.6			Average	90.6
			RSD(%)	2.7			RSD(%)	2.9

Table 5 ステアロイル乳酸カルシウムの鉛添加回収試験結果 (BLK : 鉛無添加, Smp : 鉛添加)

規格値 2 µg/g	208 Pb [No Gas]				208 Pb [He]			
	cps.	ng/mL	—BLK (ng/mL)	recovery(%)	cps.	ng/mL	—BLK (ng/mL)	recovery(%)
ステアロイル乳酸Ca BLK	463851	6.1			159713	5.9		
ステアロイル乳酸Ca Smp-1	3602178	46.6	40.5	101.3	1186349	41.6	35.7	89.1
ステアロイル乳酸Ca Smp-2	3467706	44.9	38.8	97.0	1179270	41.3	35.4	88.5
ステアロイル乳酸Ca Smp-3	3404111	44.1	38.0	94.9	1116888	39.2	33.2	83.1
ステアロイル乳酸Ca Smp-4	3372395	43.7	37.6	93.9	1185916	41.6	35.6	89.1
ステアロイル乳酸Ca Smp-5	3386304	43.8	37.7	94.4	1226711	43.0	37.1	92.6
			Average	96.3			Average	88.5
			RSD(%)	3.2			RSD(%)	3.9

Table 6 乳酸カルシウムの鉛添加回収試験結果 (BLK : 鉛無添加, Smp : 鉛添加)

規格値 2 µg/g	208 Pb [No Gas]				208 Pb [He]			
	cps.	ng/mL	—BLK (ng/mL)	recovery(%)	cps.	ng/mL	—BLK (ng/mL)	recovery(%)
乳酸Ca BLK	690673	4.7			255332	5.3		
乳酸Ca Smp-1	5754041	40.7	36.0	90.0	2072935	41.6	36.3	90.9
乳酸Ca Smp-2	5749595	40.7	36.0	89.9	2057933	41.3	36.0	90.1
乳酸Ca Smp-3	5823026	41.2	36.5	91.2	2018420	40.5	35.3	88.1
乳酸Ca Smp-4	5666051	40.1	35.4	88.5	2003418	40.2	35.0	87.4
乳酸Ca Smp-5	5774582	40.9	36.2	90.4	2043829	41.1	35.8	89.4
			Average	90.0			Average	89.2
			RSD(%)	1.1			RSD(%)	1.6

Table 7 プロピオン酸カルシウムの鉛添加回収試験結果 (BLK : 鉛無添加, Smp : 鉛添加)

規格値 5 µg/g	208 Pb [No Gas]				208 Pb [He]			
	cps.	ng/mL	—BLK (ng/mL)	recovery(%)	cps.	ng/mL	—BLK (ng/mL)	recovery(%)
プロピオン酸Ca BLK	537440	3.6			193639	4.1		
プロピオン酸Ca Smp-1	13751845	97.6	94.0	94.0	5253331	105.2	101.2	101.2
プロピオン酸Ca Smp-2	13719644	97.4	93.7	93.7	5043459	101.0	97.0	97.0
プロピオン酸Ca Smp-4	14986086	106.4	102.7	102.7	5373540	107.6	103.6	103.6
プロピオン酸Ca Smp-5	13689906	97.2	93.5	93.5	5106146	102.3	98.2	98.2
プロピオン酸Ca Smp-6	13509167	95.9	92.2	92.2	5009478	100.4	96.3	96.3
			Average	95.2			Average	99.3
			RSD(%)	4.5			RSD(%)	3.1

日本独自の香料化合物についての遺伝毒性評価予測システムの研究

研究分担者 山田雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 室長

研究要旨 126 の香料について、構造活性相関 (SAR) の予測と簡易 Ames 試験 (FAT) , さらにフォローアップの Ames 試験の結果を精査した。今年度 Ames 試験を実施した 1 化合物の結果 (陰性) を追加し、3 種類の SAR モデルによる FAT もしくは Ames 試験が陰性であるという予測率は 97.2% になった。初期スクリーニングとして、SAR は一定の役割を果たせると考えられる。

A. 研究目的

食品添加物の安全性確保の一環として、我が国独自の香料規格の向上が重要と考え、中でも適切な安全性評価の整備を目指す。本研究では、構造活性相関手法に基づく遺伝毒性予測システムの研究を通して効率的かつ有効なアプローチを検討する。

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 によ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ふまえた規格向上を検討することが望まれている。我が国では独自に使用されている食品香料が多く、それらについては JECFA による安全性評価がなされていないため、日本で評価を実施する必要がある。しかし、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る。そこで、構造活性相関手法 (SAR) の導入が効率化の面で有用であると考えた。

初年度、SAR モデルによる予測と簡易 Ames 試験を実施した 126 化合物の結果について、SAR モデルの予測性、予測結果の組合せの検討などを実施した。昨年度は、SAR モデルの陰性予測が簡易 Ames 試験と一致しなかった 12 化合物に着目し、一般化

化合物として市販されている 9 化合物について標準的な Ames 試験を実施した。最終年度は、流通実態のある残りの 1 化合物について、同様に標準的な Ames 試験を実施した。

B. 研究方法

Ames試験

【試験の概略】ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 及び TA98 の 2 菌株を用いて実施した。プレインキュベーション法により、S9mix 存在下及び非存在下で実施した。初めに、5000 µg/plate を最高用量に用量設定試験を行い、生育阻害が認められた場合は、その用量を最高用量として本試験を実施した。陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められた場合を陽性と判定した。

【被験物質】試験に供した化合物は、verbenone (4,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, CAS 番号: 80-57-9, 純度: 98%)。陽性対照物質は、S9mix 存在下では 2-aminoanthracene (和光純薬工業株), S9mix 非存在下では 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (和光純薬工業株, AF-2) を用いた。いずれも dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、所定の濃度に調製した

ものを冷凍保存し、用時解凍して用いた。

【検定菌】「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471」を参考にし、その中で推奨されている菌株のうち、スクリーニングにおいて汎用される *Salmonella typhimurium* 5 菌株のうち、TA100 及び TA98 を試験に用いた。

【試験操作】Amesらの標準法を参考にして、プレインキュベーション法により、用量設定試験と本試験を各1回実施した。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させるS9 mix非存在下、及びラットのもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験するS9 mix存在下で行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL, S9 mix非存在下では0.1 M ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL, S9 mix存在下ではS9 mix 0.5 mL, 試験菌液0.1 mLを混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、2.0 mLのトッパガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに使用媒体0.1 mLまたは陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照及び陽性対照とした。

培養は37°Cで48時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー (CA-11, システムサイエンス, 面積補正有り) または目視により計測した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。平板は各用量、陰性及び陽性対照につき2枚ずつ使用し、変異コロニー数について平板2枚の平均値を求めた。陰性及び陽性対

照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値及び陽性対照値とした。

【試験用量】用量設定試験においては、「OECD 化学物質試験法ガイドライン 471」を参考に、15, 50, 150, 500, 1500 及び 5000 µg/plate の6用量を設定した。

本試験においては、以下の用量を設定した。

S9 mix 非存在下

TA100: 250, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 及び 5000 µg/plate

TA98: 156, 313, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate

S9 mix 存在下

すべての検定菌: 156, 313, 625, 1250, 2500 及び 5000 µg/plate

(倫理面への配慮)

in silico と in vitro の研究であるので、該当しない。

C. 研究結果

用いたいずれの検定菌においても、S9 mixの有無にかかわらず、陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった (Table 1, 2)。

すべての試験において、用いた最高用量の被験物質調製液及びS9 mixへの雑菌の混入は認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix非存在下及び存在下ともに、いずれの用量においても認められなかった。いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値及び陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内 (平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差) であった。したがって、当該試験系の妥当性が確認されたと考える。

D. 考察

今年度 Ames 試験を実施した 1 化合物, FAT 陽性, の結果が陰性であったことから, 3 種類の SAR モデルで陰性の判定を得た 72 物質のうち, 70 物質が FAT or Ames で陰性だったことになる. これは, FAT or Ames 試験が陰性であることを, SAR モデルが正しく予測する確率が $70/72 = 97.2\%$ ということである. 残りの 2 物質は FAT 陽性のデータしかないが, SAR 陰性 10 物質が FAT 陽性であっても Ames で陰性となったこと, 類縁物質の遺伝毒性評価等から推察して, それらの遺伝毒性は懸念されるものではないと考える.

本研究課題において取り扱った 126 の香料の SAR モデルによる Ames 試験の判定予測と FAT の試験結果を Table 3 にまとめた. SAR モデルの予測は陽性が 54, 陰性 (正確には「陽性のカテゴリーではないもの」) が 72. 陽性と予測された 54 のうち FAT 陽性は 12, 陰性は 42. 一方, 陰性と予測された 72 については, FAT 陽性 12, FAT 陰性 60 であったが, Ames 試験を実施したことから, FAT 陽性 2, FAT/Ames 陰性 70 に修正された (上述). Sui らの, FAT と Ames 試験の同等性を研究した論文 (Genes & Environ, 31, 47, 2009) では, FAT 陽性の 20 物質がすべて Ames 陽性, FAT 陰性の 20 物質のうち 8 物質が Ames 陽性だった (偽陰性率 40%) と報告している (Table 4). これらの結果に基づき, SAR モデル予測/FAT 結果/Ames 試験結果 (一部) について考察する.

【FAT の Ames 試験結果予測性】

Table 4 より, FAT の Ames 陽性予測性は 100%, 陰性予測性は 60%, 全体としての

Ames 試験結果予測性は $80\% [(20+12)/40]$ で, FAT の結果が偽陰性になる確率が 40% と計算できる. 一方, 昨年度, 今年度を実施した 10 物質の Ames 試験の結果では, FAT の偽陽性率が 100% だった. 以上の数字を見る限り, FAT の Ames 試験結果予測性は低く, 簡便な方法ではあるが, 現時点では, 少なくとも香料について FAT を実施する利点は低いと考える.

【SAR の FAT/Ames 試験結果予測性】

Table 3 より, SAR の陽性予測率は 22%, 陰性予測率は 83% (FAT のみ) もしくは 97.2% (Ames 試験による補正後) であるから, 全体としての予測率は 57.1 もしくは 65% となる. 予測率としてあまり高い数値とは言えないが, SAR 陰性 10 物質については, FAT 陽性でも 100% が Ames 試験陰性であった. Sui らの論文の FAT 偽陰性率 40% の数字を考慮すると, SAR モデル陰性で FAT のみ陰性の 60 物質については, 24 物質が陽性の可能性があるとして計算できるが, Ames 試験陽性になる物質があるとしても, SAR 陰性の選択バイアスの影響から 24 物質よりは少ない数と予想される. SAR の FAT/Ames 試験結果予測性のうち, 複数の SAR モデルによる Ames 試験陰性の予測は正しいと考えてよく, 安全性評価をする際には, 優先順位を下げてもよいと考える.

【SAR モデルによる予測結果の問題点】

本研究課題では, SAR モデルにより陽性と予測された 54 物質については, Ames 試験実施のフォローをしていない. SAR 陽性/FAT 陰性の 42 物質に Table 4 の計算結果を当てはめれば, 約 17 物質は Ames 試験が陽性になる可能性がある一方で, FAT 陽性の 12 物質については Ames 試験陰性になる

可能性もある。SAR 陰性/FAT 陽性の 10 物質については、100%が Ames 試験陰性であったことが、SAR モデルによる予測の正確さを表しているとするれば、SAR 陽性/FAT 陽性の 12 物質について Ames 試験を実施し、こちらはほぼ陽性になるという結果が得られることが裏付けになると考える。

E. 結論

FAT or Ames試験が陰性であることを、SARモデルが正しく予測する確率が 97.2% になった。FATのAmes試験結果予測性は低

く、簡便な方法ではあるが、少なくとも香料について現行のFATを実施する利点は少ない。SARモデルにはアラートの違いがあるため、複数のSARモデルによるAmes試験の陰性予測は正しいと考えてよく、安全性評価をする際には、優先順位を下げてもよい。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 verbenone の Ames 試験 (用量設定試験)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間: 2015年5月19日より2015年5月22日			
		復帰変異数		コロニー数/plate (平均)	
		塩基対置換型	フレームシフト型	TA100	TA98
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	103 (111)	119	20 (20)	19
	15	90 (95)	99	24 (23)	21
	50	109 (105)	101	19 (21)	22
	150	122 (116)	109	23 (25)	26
	500	133 (133)	132	29 (26)	23
	1500	179 (195)	211	22 (28)	33
	5000	0* (0)	0*	0* (0)	0*
	0 (陰性対照)	101 (105)	109	32 (34)	36
S9 mix (+)	15	114 (120)	125	36 (38)	39
	50	120 (115)	110	26 (28)	30
	150	116 (109)	102	40 (37)	33
	500	101 (104)	107	26 (29)	32
	1500	102 (99)	95	29 (27)	24
	5000	0* (0)	0*	0* (0)	0*
陽性	S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	AF-2	
	用量(µg/plate)	0.01		0.1	
対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2AA	2AA	
	用量(µg/plate)	1		0.5	
対照	コロニー数/plate	403 (371)	338	316 (297)	277
	コロニー数/plate	1070 (1139)	1208	508 (500)	492

陰性対照, ジメチルスルホキシド
AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA, 2-Aminoanthracene
*, 生育阻害が認められた。

Table 2 verbenone の Ames 試験 (本試験)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/plate)	試験実施期間: 2015年5月25日より2015年5月28日				
		復帰変異数		コロニー数/plate (平均)		
		塩基対置換型	フレームシフト型	TA100	TA98	
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	116 (120)	124	21 (20)	19	
	156	NT		26 (21)	16	
	250	127 (119)	110	NT		
	313	NT		17 (24)	31	
	500	128 (125)	122	NT		
	625	NT		21 (18)	14	
	1000	162 (158)	153	NT		
	1250	NT		30 (29)	27	
	1500	152 (155)	158	NT		
	2000	159* (154)	148*	NT		
	2500	NT		13* (12)	11*	
	3000	0* (0)	0*	NT		
	4000	0* (0)	0*	NT		
	5000	0* (0)	0*	0* (0)	0*	
	S9 mix (+)	0 (陰性対照)	129 (137)	145	28 (29)	29
		156	128 (117)	106	25 (27)	29
313		121 (128)	134	24 (24)	23	
625		113 (129)	144	31 (31)	30	
1250		136 (121)	106	27 (28)	29	
2500		90* (92)	94*	17* (23)	29*	
5000		0* (0)	0*	0* (0)	0*	
陽性		S9 mixを必要とするもの	名称	AF-2	AF-2	
	用量(µg/plate)	0.01		0.1		
対照	S9 mixを必要とするもの	名称	2AA	2AA		
	用量(µg/plate)	1		0.5		
対照	コロニー数/plate	441 (427)	412	397 (383)	369	
	コロニー数/plate	1170 (1199)	1227	531 (517)	503	

陰性対照, ジメチルスルホキシド
AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; 2AA, 2-Aminoanthracene
*, 生育阻害が認められた。
NT, 実施せず。

Table 3 SAR モデルによる Ames 試験の判定予測と FAT の試験結果の相関 (126 物質について)

		SAR 予測	
		陽性	陰性 (補正 ^{※1})
FAT 結果	陽性	12	12 (2)
	陰性	42	60 (70)

※1FAT 結果陽性で SAR 陰性の 10 物質について, Ames 試験を実施した結果, すべて陰性であったため, FAT 陽性から 10 物質を除き, 陰性に 10 物質を加える補正を行った。

Table 4 FAT と Ames 試験結果の相関 (40 物質について)

		Ames 試験結果	
		陽性	陰性
FAT 結果	陽性	20	0
	陰性	8	12

※2Sui et al., Genes and Environ, 31, 47 (2009)

食品添加物の食品中における消長と副生成物に関する研究

分担研究者 久保田浩樹 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 希釈過酸化ベンゾイルを添加した小麦粉を用いて麺類を調製したときに副次的に生成するベンゼンの暴露影響を調査するため、ダイナミックヘッドスペースーガスクロマトグラフ質量分析計を用いて分析を行った。

使用基準の半分及び最大使用量に相当する 33 及び 66 mg/kg の過酸化ベンゾイル (BPO) を添加した小麦粉を用いてうどんを調製し、うどん中の揮発性化合物を分析したところ、ベンゼンが検出された。66 mg/kg の BPO 添加うどん中のベンゼン残存量は、13.5 ng/g であり、うどん中のベンゼン量は BPO の添加量に応じて増加した。

今回の調査結果をもとに、BPO を添加した麺類からのベンゼンの経口暴露量を推計したところ、20 歳以上における一人当たりの耐容一日摂取量 (TDI) に対する一日摂取量の割合は 0.08% であり、BPO を添加した食品からのベンゼン暴露量は、TDI を大きく下回ることが確かめられた。

A. 研究目的

希釈過酸化ベンゾイルは、小麦粉改良剤として用いられる過酸化ベンゾイル (BPO) を含む食品添加物製剤であり、小麦粉に含まれるカロテノイドの漂白分解に利用される¹⁾。本品の主成分である BPO は、加熱、衝撃、摩擦などによって爆発を起こしやすいため、25%の水を添加したものが試薬として販売されている。食品添加物製剤として用いられる希釈過酸化ベンゾイルは、BPO をミョウバン、リン酸のカルシウム塩類、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム及びデンプンのうち 1 種以上のもので希釈した製剤であり、BPO 19.0~22.0%を含むと規定されている²⁾。

我が国では、希釈過酸化ベンゾイルに使用

基準が設定されており、小麦粉以外の食品に使用してはならず、希釈過酸化ベンゾイルの使用量は、小麦粉 1kg につき 0.30 g 以下 (BPO として 66 mg/kg 以下に相当) に制限されている。2004 年に食品中の BPO の改正分析法が通知され、市販食品の検査が行われている³⁾。

2010 年に輸入食品検査の過程で、海外では BPO 32%を含む製剤が流通している実態が明らかとなった。このため、小麦粉及びその加工品より、使用基準相当量を超える BPO が検出された場合には、食品衛生法 11 条違反として取り扱うように通知⁴⁾されるとともに、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会において、希釈過酸化ベンゾイルの成分規格及び使用基準の改正 (BPO 含量の範

困拡大及び使用基準の希釈過酸化ベンゾイルとしての限度値設定から、BPO としての使用限度値設定への変更) に向けて、食品安全委員会への食品健康影響評価の依頼等必要な手続きを進めることとされた。

BPO は工業的には加熱により、開裂して2つのベンゼンカルボキシラジカルとなり、さらに二酸化炭素が脱離して、フェニルラジカルを生成するため⁶⁾、ポリマーの重合開始剤として合成に利用されている。しかし、BPO とフタル酸からなる硬化剤を加熱するとベンゼンが生成するとの報告がある⁶⁾。

International Agency for Research on Cancer (IARC) ではベンゼンを Group 1 に分類している (IARC, 1995)⁷⁾。我が国では、水道法水質基準において、Integrated Risk Information System (IRIS, 2000)⁸⁾における 10^{-5} 発がんリスクに関する評価などを参考に 0.01 mg/L に設定しており⁹⁾、また、WHO 水道水水質ガイドライン第4版においても、ガイドライン値を 0.01 mg/L としている¹⁰⁾。食品安全委員会は、清涼飲料水の規格基準の改正に係る食品健康影響評価において、ベンゼンのリスク評価を、非発がん毒性を指標とした場合の TDI を $18 \text{ } \mu\text{g/kg}$ 体重/日、発がん性を指標とした場合の発がんユニットリスクを $2.5 \times 10^{-2}/(\text{mg/kg}$ 体重/日)と設定している。平成26年12月に清涼飲料規格が改正され、ミネラルウォーター類のうち殺菌または除菌を行うものについては、ベンゼンを 0.01 mg/L に設定している¹¹⁾。

これまでに、食品添加物製剤として小麦粉に添加された BPO は、時間経過とともに安息香酸に分解することが知られているが¹²⁾、ベンゼン生成について調査した研究報告はない。本研究では、食品の安全確保推進の研究

調査の一環として、BPO を含む小麦粉を用いて小麦粉加工食品を調製したときに、食品中に副次的に生成するベンゼンの暴露影響について明らかとするため、各種小麦粉食品中のベンゼン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計 (DHS-GC/MS) を用いて分析を行った。昨年度までに、BPO 添加小麦粉を用いて調製したパン及び小麦粉菓子中のベンゼン残留量を調べ、BPO の添加量に応じてベンゼンが増加するとともに、パンでは耳の部分にベンゼンが残存しやすいことを明らかとした。今年度は、麺類の代表として、うどんをモデル食品に用い、同様に調査を行った。さらに、この調査結果を用いて麺類からのベンゼン暴露量を推計し、評価値との比較を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 試料 モデル食品として、うどんを調製し、実験に使用した。うどんの材料 (薄力粉、強力粉、食塩) は都内スーパーで購入した。

2) 試薬 BPO は東京化成工業(株)製の過酸化ベンゾイル (約 25%水湿潤品) を用いた。ベンゼン標準原液及びフルオロベンゼン標準原液は、関東化学(株)製の水質試験用を用いた。塩化ナトリウムは和光純薬工業(株)製の水質試験用、メタノールは和光純薬工業(株)製のトリハロメタン測定用を用いた。その他は、試薬特級を用いた。

過酸化ベンゾイル (約 25%水湿潤品) は第8版食品添加物公定書の希釈過酸化ベンゾイルの定量法²⁾に従い、BPO 含量を求めた。その後、過酸化ベンゾイル (約 25%水湿潤品) に、BPO 含量が食品添加物含量規定の最大量 (22%) となるように、デンプン (トウモロ

コシ由来)を加えて乳鉢中で良く混和し、希釈過酸化ベンゾイルを調製した。調製した希釈過酸化ベンゾイルは実験に使用するまで冷蔵庫にて保管した。

3) 内部標準溶液の調製

少量のメタノールを入れた 10 mL のメスフラスコに、フルオロベンゼン標準原液 1 mL を正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 mL とし、内部標準原液とした。内部標準原液 1 mL を正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 mL とし、内部標準溶液とした。

4) ベンゼン標準液の調製

試料添加用のベンゼン標準液として、少量のメタノールを入れた 2 本の 10 mL のメスフラスコに、ベンゼン標準原液 0.05 または 0.5 mL を正確に採り、メタノールを加えて正確に 10 mL とし、5 及び 50 µg/mL のベンゼン標準液を調製した。

5) 器具及び装置

ホームベーカリーはパナソニック製 SD-BM106 を用いた。試験液のバイアルは I-CHEM 製の EPA 規格に準拠した VOA バイアル (テフロンライナー/シリコンセプタムを装着したキャップ付) を用いた。なお、バイアルは 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。

DHS システムとして 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、DHS 分析用に短く成型された長さ 4.8cm のニードル (ジーエルサイエンス製) を使用し

た。GC-MS は島津製作所製の GCMS-QP2010 を用いた。

6) DHS-GC/MS 測定条件

DHS 側条件 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: 6 min, パージ流量: 40 mL/min, ドライパージ時間: 5 min, デソープ時間: 6 min, デソープ温度: 220°C, ベーク時間: 15 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 側条件 カラム: AQUATIC-2 60 m × 0.25 mm I.D. 膜厚 1.4 µm, カラム温度: 40°C (2 min) → 4°C/min → 100°C → 20°C/min → 200°C (3 min), 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: 70 eV, 測定モード: スキャン, 測定質量数: ベンゼン m/z 78, フルオロベンゼン m/z 96

7) 試料調製方法 (うどんの調製法)

小麦粉への BPO 添加量が 33 または 66 mg/kg となるように 22%希釈過酸化ベンゾイルを添加し、BPO を添加した小麦粉を調製した。

うどんの材料組成を以下に示す。

薄力粉 150 g, 強力粉 150 g, 食塩 10 g, 温水 150 mL。

うどんは、ホームベーカリーで生地を調製した後、細切し、沸騰水中で 13 分間茹でて調製した。

8) 検量線用標準溶液の調製

6 本の少量のメタノールを入れた 10 mL のメスフラスコに、内部標準原液 1 mL ずつを

正確に採り、ベンゼン標準原液 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 または 1 mL を正確に加え、メタノールを加えて正確に 10 mL とし、検量線用標準原液とした。VOA バイアルに攪拌子、塩化ナトリウム 3 g 及び水 13 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原液を 2 μ L 注入し、直ちにキャップで密封し、検量線用標準溶液とした。

9) DHS-GC/MS 用試験溶液の調製

うどん 50 g をブレンダーに採取し、水 50 mL を加えてホモジナイズし、ペースト状の試料とした。この試料 4.0 g を 40 mL の VOA バイアルに採り、攪拌子、塩化ナトリウム 3 g 及び水 9 mL を加え、次いでマイクロシリンジを使用して内部標準溶液を 2 μ L 注入し、直ちにキャップで密封した後、マグネチックスターラーでバイアル中の試料を良く攪拌し、DHS-GC/MS 用試験溶液とした。

C. 研究結果

1) DHS-GC/MS 分析条件の検討

ペースト状にした試料に 5 μ g/mL のベンゼン標準液 2 μ L を添加した試料について DHS-GC/MS で分析した時のトータルイオンクロマトグラムを Fig. 1 に示した。15.8 分にベンゼン、16.4 分に内部標準物質であるフルオロベンゼンのピークが検出された。なお、ベンゼン及びフルオロベンゼンの保持時間近傍に妨害ピークはなく、良好な分離を示した。なお、S/N 比 10 とした定量限界は 0.4 ng/g であった。

2) ベンゼンの添加回収試験

ペースト状とした試料に 5 ng/g または 50 ng/g となるようにベンゼン標準液を添加し、

食品からの添加回収試験を実施した (Table 1)。無添加試料では、ベンゼンは定量限界以下であった。ベンゼンを添加した試料からの添加回収率は、5 ng/g 添加において 96.8%、50 ng/g 添加は 102.0% であり、相対標準偏差は 0.8% 以下の良好な結果を示した。そこで本試験法を用いてうどんをモデル食品とした麺類中のベンゼン残存量について調査を実施した。

3) BPO を添加した小麦粉より調製した、うどん中のベンゼン残存量の調査

BPO を添加した小麦粉を用いて調製したうどん (以後、BPO 添加うどんとする) 中のベンゼン残存量を調べた。66 mg/kg の BPO 添加うどん (うどんへの BPO 添加量 0.04 mg/g に相当) の試験溶液のトータルイオンクロマトグラムを Fig. 2 に示した。BPO 無添加のうどんではベンゼン保持時間のピークは定量限界以下であったが、66 mg/kg BPO 添加うどんにおいてピークが確認された。また、このピークのマスマスペクトルをベンゼンの検量線標準液と比較したところ非常に良い一致を示し、検出されたピークがベンゼンと同定された (Fig. 3)。なお、19.2 分に検出された大きなピークは NIST 及び Wiley ライブラリとの比較から、分析カラム由来のシクロシロキサン化合物と推定された。

BPO 添加うどんよりベンゼンが検出されたことから、次に小麦粉への BPO 添加濃度を変化させて、うどんを調製し、BPO 添加濃度によるうどん中のベンゼン残存量の変化を調べた (Fig. 4)。また同時に、66 mg/kg の BPO を添加した小麦粉から調製したうどん生地中のベンゼン量も調べた。BPO 添加量は、現在の食品添加物製剤の希釈過酸化ベンゾイ