

201522001B

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

食品添加物の規格試験法の向上及び摂取量推定等に関する研究

平成25年度～27年度 総合研究報告書

研究代表者 佐藤 恭子

平成28(2016)年 5月

目 次

I. 総合研究報告 食品添加物規格試験法の向上と使用実態の把握等 佐藤恭子	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	95
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	97

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 25 年度～27 年度 総合研究報告書

食品添加物の規格試験法の向上及び摂取量推定等に関する研究

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長

研究要旨 食品添加物の安全確保には、その品質の担保のための成分規格試験法の向上及び摂取量等使用実態の把握が欠かせないことから、以下の研究を行った。

食品添加物規格試験法の向上と使用実態の把握等

1) 香料化合物規格の国際整合化に係わる調査研究:我が国においては国際汎用香料の規格作成及び第 9 版食品添加物公定書の改正検討の際には食糧農業機関/世界保健機関合同食品添加物専門家会議 (JECFA) 規格が参照されたが、明らかな間違いや流通実態に即していない等の理由から JECFA 規格をそのまま採用できなかった品目があった。JECFA 規格は重要な位置づけであるにもかかわらず、その検証は十分になされてきていないと考えられる。そこで、JECFA 規格の検証のため、日本香料工業会自主規格を作成した香料化合物のうち JECFA 規格の存在する 1088 品目について両規格を比較検討したところ、88 品目は JECFA 規格で問題なく、両規格に違いが見られたもののうち 603 品目について実測値調査及び一部について再調査を行った結果、289 品目は JECFA 規格で問題なし、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。

2) 我が国で使用している天然香料の使用量調査研究:天然香料は食品の着香の目的に用いられる重要な素材である。現実的な調査方法を検討するために、予備調査を行い、予備調査及び調査方法の検討を踏まえ、初めての天然香料使用量調査を実施した。今回の調査により、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。食品香料の安全性を考える上、欧米に先駆け、複雑な天然香料の使用量調査に着手できたことの意義は大きい。

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:行政による食品添加物管理状況の妥当性の確認及び経年による食品添加物摂取の変化の把握のために、指定添加物に関しては、第 10 回調査として、平成 22 年度の製造数量等のアンケート調査を元に、各食品添加物について国民 1 人が 1 日に摂取する量を推定し、許容一日摂取量との比較を行った。また、使用基準のある発色剤 3 品目及び酸化防止剤 2 品目を対象に、輸入食品中の食品添加物含有量推定を行った。さらに、第 11 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 5 回の調査として、平成 23 年度の製造・輸入量のアンケート調査を実施し、生産量統計を取りまとめ、さらに、第 6 回のアンケート調査を行った。

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

簡便で確実な確認試験法である赤外スペクトル (IR) 法は、諸外国でも食品添加物等の確認試験に汎用されている。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、ATR 法による IR の確認試験への利用の可能性を検討した。測定試料としてポリビニルピロリドン (PVP) 類、塩化コリン、香料化合物を取り上げ、ATR 法による IR 測定法について検討を加え、四季により気温や湿度など環境の異なる日本国において、再現性の良い IR を得るための測定法などを検討した。その結果、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、困難であったが、一方で、ATR 法は再現性に優れ、吸湿性が極めて高く、試料調製時の取り扱いの難しい化合物には、ATR 法が非常に有効であることを示した。しかし、品目によっては、測定条件によってスペクトルが変化する可能性があった。従って、再現性に優れた ATR 法といえども、ATR 法を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(測定する際に用いるプリズムや光の入射角も含む)と標準 IR の確立が必要であると結論した。以上のように、ATR 法を確認試験に利用するための提言を示すことができた。

定量 NMR 法による定量用標準物質の純度分析法の確立

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 ^1H -qNMR 法を用いたグルタミンバリングリシン及び 5-Benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acid (DKP) 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、本法が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、フルジオキソニルをモデル試料として ^{13}C -qNMR を用いた定量分析に関する検討を行い、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。

ICP-MS 等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

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。第 9 版食品添加物公定書においては、陽イオンを多量に含む食品添加物に対しては、鉛試験法にピロリジンジチオカルバミン酸 (APDC) 溶媒抽出法が設定されている。しかし、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。そこで、本研究では一価または二価の陽イオンを含む無機塩及び有機塩の食品添加物を対象とし、APDC 溶媒抽出法の代替法としてキレート樹脂固相等を用いた鉛の抽出方法の検討を行った。ナトリウムやカルシウム等の陽イオンを含む無機塩及び有機塩類については、有機塩類はマイクロウェーブによる灰化が必要であるが、キレート樹脂固相を用いる鉛抽出が可能であり、キレート樹脂固相を用いることができない無機塩類には高選択性分子認識ゲル固相やリン酸イットリウム共沈法による鉛抽出が可能であった。これらの鉛抽出法は APDC 溶媒抽出法の代替法として有用であると考えられた。

食品香料の規格化のため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実施した構造活性相関 (SAR) モデルによる予測と、簡易 Ames 試験 (FAT) の結果を、126 化合物について精査し、SAR 予測が陰性で FAT が陽性であった 12 化合物のうち、流通実態のある 10 化合物について、標準的な Ames 試験を実施し、すべて陰性の結果を得た。FAT の Ames 試験結果予測性は低く、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と考える。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、優先順位を下げよう。

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

希釈過酸化ベンゾイルを添加した小麦粉を用いて小麦粉加工食品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小麦粉加工食品 (パン及びパウンドケーキ、クッキー、うどん) を調製し、各小麦粉加工食品中のベンゼン量を分析したところ、BPO の添加量に比例してベンゼンの含有量が増加し、パンでは、主に耳の部分にベンゼンが残存しやすいことが明らかとなった。本研究の調査結果をもとに、BPO を添加した小麦粉加工食品全体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 0.10% 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。

分担研究者

北村 陽二	国立大学法人金沢大学 学際科学実験センター
山田 雅巳	国立医薬品食品衛生研究所
久保田浩樹	国立医薬品食品衛生研究所
建部 千絵	国立医薬品食品衛生研究所
大槻 崇	国立医薬品食品衛生研究所

となる。そこで、以下の研究を行った。

1. 食品添加物規格試験法の向上と用実態の把握等

香料化合物の規格は、製品中の不純物の基準というだけでなく、製品の同一性を確認する上でも重要な要素である。第 9 版食品添加物公定書改正作業等においては、食糧農業機関/世界保健機関食品添加物専門家会議 (JECFA) 規格を参考にし、香料化合物の規格値が実測された結果、いくつかの JECFA 規格は香料化合物の実態を反映していないことが確認された。そのため、流通している香料化合物の規格値に関する実態調査を行い、JECFA 規格の検証を行うこととした。また、天然香料は食品の着香の目的に用いられる重

A. 研究目的

食品添加物の安全確保には、そ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り、それを支える規格試験法である。また、食品添加物の適正な使用のためには、摂取量等使用実態の把握が重要

要な素材であることから、我が国における天然香料の使用実態の概要を定量的に把握することを目的とし、天然香料の使用量調査を行った。さらに、食の国際化が進み、食生活が変化しており、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、生産量統計調査を基にした指定添加物の摂取量の推定を継続した。また、食品添加物の摂取量調査を実施する上で、輸入食品からの摂取量は重要と考えられることから、使用基準のある発色剤3品目及び酸化防止剤2品目を対象に、輸入食品に含まれる食品添加物の量を推定するための調査を行った。一方、既存添加物等については、出荷量の実態を把握することを目的とし、製造・輸入量調査を行った。

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(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。

3. 定量NMR法による定量用標準物質の純度分析法の確立

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。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ことで、2つの化

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、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) とも呼ばれている。また、本法は試料を正確に秤量して溶媒に溶解させるのみで測定が可能であることや使用する溶媒量は 1 検体あたり 2 mL 以下であることなど、他の分析法に比べ迅速性や環境負荷の低減の面でも格段と優れている。さらに、混合物分析においては、 ^1H 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、煩雑なクリーンアップや誘導体化等の前処理は不要となり、迅速かつ簡便な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。このような特徴から、 ^1H -qNMR 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、生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析へ利用されている。また、我々は、これまで食品添加物分析への ^1H -qNMR の適用に関する検討を進め、防かび剤などの分析において、本法は精確な定量分析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

の規格試験法の精度向上を目指した研究の一環として、グルタミンバリングリシン及び 5-Benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acid (DKP) の定量分析における ^1H -qNMR の有効性に関する検討を行った。また、 ^1H NMR と比べ観測範囲が広い (分解能が高い) ^{13}C NMR を用いた定量 NMR (^{13}C -qNMR) の有効性に関してフルジオキソニルをモデル試料として併せて検討した。

4. ICP-MS 等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

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、バリウム、カルシウム等イオン化エネルギーが低い陽イオンを多量に含む食品添加物においては、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。共存元素との分離や目的元素の濃縮を行う方法としては、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が採用されている。第 9 版食品添加物公定書においても、陽イオンを多量に含む食品添加物に対しては、鉛試験法に APDC 溶媒抽出法が設定されている。しかし、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。一方、イオン交換樹脂を用いる方法は選択性に乏しいため、目的元素以外の元素が濃縮され、それらが干渉する可能性がある。以上の理由からより簡便な方法で、

良好な分析環境で試験でき、目的元素への選択性が高い方法が望まれている。

近年、イオン交換樹脂と比較して、選択性が優れているキレート樹脂が利用されており、親水性メタクリレート之母体としたイミノニ酢酸基を導入した固相カートリッジ (Inert Sep ME-1 (GLサイエンス(株)), NOBIAS Chlate PA-1 (日立ハイテクノロジー) やキレートディスク (エムポア™ キレートディスク (住友スリーエム社)) を用いた方法が報告されている。しかし、これらの報告は食品、河川、海水及び尿中の微量金属の分析法に対する報告であり、食品添加物に対しての報告はない。

そこで、本研究では、一価の陽イオン (ナトリウムやカリウム等) あるいは二価の陽イオン (カルシウムやマグネシウム) を含む無機塩類の食品添加物を対象とし、原子吸光度法の前処理法として、Inert Sep ME-1 を用いた鉛抽出法の検討を行ったので報告する。なお、二価の鉄イオンを含む試料については、高選択性分子認識ゲル固相カートリッジ (MetaSEP AnaLig®) 及びリン酸イットリウム共沈法を用いた方法による鉛の抽出を検討した。更に、試料の灰化が必要とされる二価の陽イオン (カルシウムやマグネシウム) を含む有機塩類の食品添加物を対象とし、マイクロウェーブによる灰化を行い、Inert Sep ME-1 を用いて無機塩類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。

5. 食品香料の規格化のための遺伝毒性予測に関する研究

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。

6. 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

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。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。

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。

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含量の範囲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、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。

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)。我が国では、水道法水質基準において、Integrated Risk Information System (IRIS, 2000) 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、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。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において、非発がん毒性を指標とした場合の TDI を 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 $2.5 \times 10^{-2}/(\text{mg}/\text{kg}$ 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。

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、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 (パン及びパウンドケーキ、クッキー、うどん) 中のベンゼン残存量を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 (DHS-GC/MS) を用いて測定を行った。さらに、この調査結果を用いて小麦粉加工食品全体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. 食品添加物規格試験法の向上と用実態の把握等

1) 香料化合物規格の国際整合化に関わる調査研究

以下の方法で規格に問題を持つ可能性のある品目を抽出し、問題点を整理した。

1-1) JECFA 規格と自主規格の比較

- ・ JECFA 規格と自主規格の双方にある香料化合物の抽出
- ・ 抽出された香料化合物の各規格項目の比較
- ・ 流通品の実測を行う必要があると思われる品目の抽出

1-2) 実測値調査及び JECFA 規格との比較

- ・ 品目の特定
- ・ 規格に関する実測値（Ⅰ）（試験成績表・受け入れ検査値）及び実測値（Ⅱ）（実測値（Ⅰ）では規格の設定条件が異なる等で妥当性を判断できなかったため、測定項目及び測定条件を限定して得られた値）の収集のための調査票の検討及び調査の実施
- ・ 調査結果の集計と各規格項目の比較
- ・ 詳細な調査を行う必要があると思われる項目の抽出

2) 我が国で使用している天然香料の使用量調査に関わる調査研究

天然香料の使用量調査は非常に困難を伴うことが予想されたため、平成 25 年度に、まず使用量調査の方法について調査研究するため、予備調査を行い、平成 26 年度には平成 25 年度の予備調査を踏まえた方法により、すべての基原物質について使用量調査を実施し、平成 27 年度に使用量調査の集計、精査を行った。

2-1) 予備調査の概要

①調査票：各基原物質毎に作成した。種類、部位、製法、fold（濃縮倍率）使用量、備考の回答欄を設け、回答の便宜をはかり、なるべく統一性をもたせることを目的に、種類～fold はプルダウンで選択できるように設定した。

②調査対象会社：日本香料工業会食品香料委員会委員会社 18 社

③調査対象項目：平成 24 年 1～12 月の年間使用量（天然香料の形態、採取部位、製法、濃縮度別）

④調査対象品目：「食品添加物 香料」、「食品添加物 香料製剤」、「食品添加物 香料複合製剤」及び「食品」に直接使用したオレンジ、バニラ、コーヒー、シナモン、ペパーミント、リンゴ、コショウ、タマネギ、バター、ハチミツ、タマゴ、エビを基原物質とする 12 の天然香料

⑤調査対象範囲：日本で飲食に供する加工食品に使用されている天然香料とし、医薬品類、タバコ製品、口腔衛生用品（歯磨き等）、洗剤、ペットフード及び化粧品（フレグランス）の用途は除いた。

⑥調査方法：作成した調査票及び入力説明書を E-mail で調査対象会社に配信し、返信にて回答を得た。

⑦回答期間：平成 25 年 9～10 月

2-2) 本調査の概要

① 調査対象会社：日本香料工業会全会員 140 社

② 調査対象使用量：平成 25 年 1～12 月の使用量

③ 調査対象品目：消食表第 377 号通知別添 2 収載の天然香料基原物質及び追加品目

④ 調査対象範囲：日本で飲食に供する加工食品に使用されている天然香料のみを対象と

し、医薬品類、タバコ製品、口腔衛生用品(歯磨き等)、洗剤、ペットフード及び香粧品等の用途は除く。

⑤ 調査方法:作成した調査票及び入力説明書をE-mailで配信し、返信にて回答を得た。

⑥ 回答期間:平成26年7月1日から10月31日まで

2-3) 集計及び精査

基原物質毎の集計を行い、①使用品目の前回調査との比較、②分類名による使用品目の前回調査との比較、③系統名による使用品目の前回調査との比較を行った。

3) 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

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。

3-1) 指定添加物

3-1-1) 第10回摂取量調査

調査法:アンケート方式

調査対象年度:平成22年4月から23年3月までの1年間

調査対象:指定添加物413品目

調査内容:製造及び輸入した品目名

①総供給量 製造量及び輸入量

②総出荷量 食品向け、輸出、食品以外の用途。

調査対象製造所:日本国内の食品添加物製造事業者・輸入販売事業者(689事業者)(前回比較151事業者増)。

3-1-2) 調査表回収結果

Table 1-1 回収結果

	第10回		
	23年度	23~24年度	合計
発送	688	65(※)	689
回収	502	64	566
回収率(%)	73.0	98.5	82.1

※未回答のため再発送した調査先64社+24年度に追加した1社。

1年目調査では73.0%、2年目、3年目に実施された追調査により、最終的には82.1%となった(Table 1-1)。

平成26年度より、第11回摂取量調査を開始している。

3-2) 輸入食品中の食品添加物

① 使用したデータ

含有量推定の調査対象食品添加物:使用基準のある発色剤の亜硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、酸化防止剤のエチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムの5種類

食品添加物及び対象食品添加物を含有する食品の輸入量データ:厚生労働省統計資料(平成22年4月1日から平成24年3月31日)
輸入食品データ:輸入食品監視統計(平成22年4月1日から平成24年3月31日)

② 輸入加工食品中の食品添加物含有量の推定

上記5種類の食品添加物を使用していると

して検疫所に届出られた加工食品を抽出し、その中から各々の添加物の使用基準を基に、使用基準のある加工食品を抽出し、それらの食品での含有量を推定した。なお、届出時には食品添加物の含有量の記載が無いため、今回の調査においても、前回と同様に含有量は基準値の50%量として計算を行った。

3-3) 既存添加物 第5回製造・輸入量調査 調査法：アンケート方式

調査対象時期：平成23年4月から24年3月までの1年間あるいは平成23年を過半数含む1年間

調査対象企業：平成21年に実施された第4回調査の回答状況を基に、既存添加物等の製造・輸入の可能性のあった企業453社
調査対象添加物

- ①「既存添加物名簿収載品目リスト」に収載されている全品目381品目
- ②「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」を含む品目、その他（一般飲食物添加物名番号一覧表記載品目）、合わせて53品目（①、②合計434品目）

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

2. 食品添加物の規格向上のためのIRに関する調査研究

測定試料のポリビニルピロリドン（PVP）類、塩化コリンは、国立医薬品食品衛生研究所より提供を受けた。これらの試料について、KBr法、ペースト法、液膜法、薄膜法、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、薄膜法、ペースト法の測定は、分解能 4 cm^{-1} （32回繰り返し）、測定領域 $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ で行った。測定には、原則として、大きさ $30\sim 35\text{ mm}\times 30\sim 35\text{ mm}$ 、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 4 cm^{-1} （積算回数96回）、測定領域 $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ で測定を行った。

3. 定量NMR法による定量用標準物質の純度分析法の確立

1) 試薬

グルタミルバリルグリシン及びDKPは、味の素株式会社よりご供与いただいた。
2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- d_6 sodium salt (DSS- d_6) は和光純薬工業株式会社製定量NMR用内標準物質（Cat. No. 044-31671, Lot.No. DCM1095 及び TLP 6524, 純度92.2または92.5%, 拡張不確かさ：0.7%または0.6%）を用いた。ジメチル

スルホンは、Sigma-Aldrich 製 TraceCERT (純度 99.73%) を用いた。重水 (D₂O) 及び重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆) は Aldrich 製を用いた。非水滴定用 0.1 mol/L 過塩素酸 (酢酸溶媒) は和光純薬株式会社製の非水滴定用、酢酸は関東化学株式会社製の非水滴定用をそれぞれ用いた。ギ酸は関東化学株式会社製の特級品を用いた。

2) 装置

核磁気共鳴装置 (NMR) : オートサンプラー付き JNM-ECA600 及び ECZ600 (ともにプロトン共鳴周波数 600 MHz) (日本電子(株) 製)。

自動滴定装置 : GT-100 型 (三菱化学アナリテック製)

3) グルタミンバリングリシンの定量

3-1) グルタミンバリングリシンの NMR 分析 (シグナルの帰属)

グルタミンバリングリシン約 10.0 mg を量りとり、D₂O 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, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC) を行った。

3-2) ¹H-qNMR によるグルタミンバリングリシンの定量

グルタミンバリングリシン約 20 mg 及び DSS-*d*₆ 約 4 mg をそれぞれ精密に量り、D₂O 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、qHNMR 測定を行った。DSS-*d*₆ のシグナル面積強度を 9.00 としたときのグルタミンバリングリシ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、グルタミンバリングリシン含量 (C_{GL}, %) を算出した。

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

ただし、I_{GL}, I_{DSS} はグルタミンバリングリシン及び DSS-*d*₆ のシグナル面積強度 (DSS-*d*₆ : 9.00), H_{GL}, H_{DSS} はグルタミンバリングリシン及び DSS-*d*₆ の特定基の水素数 (DSS-*d*₆:CH₃×3=9), M_{GL}, M_{DSS} はグルタミンバリングリシン及び DSS-*d*₆ の分子量 (グルタミンバリングリシン : 303.31, DSS-*d*₆ : 224.36), W_{GL}, W_{DSS} はグルタミンバリングリシン及び DSS-*d*₆ の秤取量 (mg) である。

3-3) ¹H-qNMR 測定条件及びデータの解析

¹H-qNMR 測定の基本条件を Table 3-1 に示した。なお、¹H-qNMR の化学シフト値は、DSS-*d*₆ 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。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 及びグルタミンバリングリシンの定量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 9.00 としたときのグルタミンバリングリシンに由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を「3-2) qHNMR によるグルタミンバリングリシンの定量」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 ver.5 (JEOL RESONANCE 製) を用いた。

4) DKP の定量

4-1) DKP の NMR 分析 (シグナルの帰属)

DKP 約 10 mg を量りとり、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, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC) を行った。

4-2) ^1H -qNMR による DKP の定量

DKP 約 10 mg 及び DSS- d_6 約 4 mg をそれぞれ精密に量り、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、qHNMR 測定を行った。DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.00 としたときの DKP 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、DKP 含量 (C_{DKP} , %) を算出した。

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

ただし、 I_{DKP} , I_{DSS} は DKP 及び DSS- d_6 のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.00), H_{DKP} , H_{DSS} は DKP 及び DSS- d_6 の特定基の水素数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3 = 9$), M_{DKP} , M_{DSS} は DKP 及び DSS- d_6 の分子量 (DKP: 262.26, DSS- d_6 : 224.36), W_{DKP} , W_{DSS} は DKP 及び DSS- d_6 の秤取量 (mg) である。

4-3) ^1H -qNMR 測定条件及びデータの解析

^1H -qNMR 測定の基本条件を Table 3-1 に示した。なお、 ^1H -qNMR の化学シフト値は、DSS- d_6 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。得られた FID データは、フーリエ変換 (zero filling=1) 及び位相補正を行った。DSS- d_6 及び DKP の定量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 9.00 としたと

きの DKP に由来するそれぞれの特定基のシグナル面積強度等を「4-2) ^1H -qNMR による DKP 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。

5) フルジオキソニルの定量

5-1) 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、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, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC) を行った。

5-2) ^{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 DSS- d_6 約 4 mg をそれぞれ精密に量り、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} はフルジオキシ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, フルジオキシニル: 248.19), W_{FLU} , W_{DMS} はフルジオキシニル及びジメチルスルホンの秤取量 (mg) である。

5-3) ^{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 Table 3-2 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 (δ 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。フルジオキシ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 (δ 42.1) としたときのフルジオキシ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「5-2) ^{13}C -qNMR によるフルジオキシニルの定量」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。

4. ICP-MS等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究

1) 試料

塩化カリウム, 塩化アンモニウム, 硫酸ナトリウム, 酢酸ナトリウム, 硝酸ナトリウム, 水酸化カルシウム, 炭酸カルシウム, 塩化カルシウム, サンゴ未焼成カルシウム, グルコン酸カルシウム, 酸化マグネシウム, 塩化マグネシウム, 炭酸マグネシウム, 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。塩化カリウム, 炭酸カルシウム, 硫酸第一鉄 (硫

酸鉄(II)七水和物) は和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

2) 試薬・試液

硝酸 (有害金属測定用) は和光純薬工業(株)製, 酢酸アンモニウム溶液 (500 g/L, 鉄試験用) は関東化学(株)製, リン酸及びアスコルビン酸は試薬特級, 酸化イットリウム (99.99%), クエン酸水素二アンモニウム (原子吸光分析用), 硝酸 (有害金属測定用), 塩酸 (有害金属測定用) 及び塩酸 (有害金属測定用), 鉛標準液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は和光純薬工業(株)製を用いた。1,10-フェナントロリン-水和水物は試薬特級, シグマアルドリッチジャパン(株)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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 5 mL を水で 50 mL とし, 鉛標準原液とした (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 。

鉛標準溶液: 鉛標準原液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 5 mL, 2.5 mL, 1 mL 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り, 硝酸(1→100)溶液で 50 mL とし, 10, 5, 2 及び 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準溶液とした。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準溶液 2.5, 1 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り, 硝酸(1→100)溶液で 50 mL とし, 0.5, 0.2 及び 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準溶液とした。1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 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.

1 M 硝酸: 硝酸 74 mL を水で 1 L とした.

0.03M EDTA・NH₄ 溶液: EDTA 4.38 g を水 100 mL で溶かし, 25%アンモニア水 2.2 mL を加え, 5%アンモニア水で pH9.2 となるように調整し, 水で 500 mL とした.

鉛標準原液(EDTA): 鉛標準液(1000 µg/mL)5 mL を 0.03M EDTA・NH₄ 溶液で 50 mL とし, 鉛標準原液(EDTA)とした(100 µg/mL).

鉛標準溶液(EDTA): 鉛標準原液(EDTA) 5 mL, 2.5 mL, 1 mL 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り, 0.03M EDTA・NH₄ 溶液で 50 mL とし, 10, 5, 2 及び 1 µg/mL 標準溶液(EDTA)とした. 10 µg/mL 標準溶液(EDTA) 2.5, 1 及び 0.5 mL をそれぞれ正確に取り, 0.03M EDTA・NH₄ 溶液で 50 mL とし, 0.5, 0.2 及び 0.1 µg/mL 標準溶液(EDTA)とした.

イットリウム溶液: 酸化イットリウム 100 mg を塩酸 0.5 mL に溶かし, 水で 10 mL とした.

0.5 mol/L リン酸溶液: リン酸 1.7 mL を水で 50 mL 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), DigiTube は GLサイエンス(株)製を用いた. 原子吸光度計は(株)島津製作所製 AA-6800 を用いた.

Omnipore™ メンブランフィルター(1.0

µm)はミリポア(株)製を用いた. フィルターホルダー(ファンネル 300 mL, ガラスベース及びクランプはいずれも φ47 mm 用, 吸引ろ過びん 1L)は柴田科学(株)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(株)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(株)製を用いた.

4) 操作法

4-1) Inert Sep ME-1 による前処理法の検討

①試料液の調製 (一価の陽イオンを含む無機塩類)

各試料 2 g を量り, 塩酸(1→4)溶液 20 mL に溶解し, アンモニア水を加え, pH5~6 となるように調整し, 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 で流速 1 mL/min でゆっくりと溶出し, その液を回収し, 硝酸(1→100)溶液で 10 mL とし, 試験溶液とした. ただし, 試料を用いずに試料液と同様に操作し, 得られた液を空試験溶液とした.

4-2) Inert Sep ME-1 に対する鉛吸着量の検討

鉛濃度 0.2 µg/mL の塩酸(1→4)溶液 20 mL, 50 mL, 100 mL 及び 200mL (鉛として 4, 10, 20 及び 40µg) をアンモニア水で pH5~

6 に調整した液を試料液とし、4-1) ② Inert Sep ME-1 による鉛の抽出に準じて、試験溶液を調製した。4-5)原子吸光光度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、カートリッジに吸着した鉛吸着量を算出した。

4-3) 塩化カリウムを用いた溶出液の検討 (鉛添加回収試験)

塩化カリウムに 2 µg/g 相当の鉛を添加し、4-1)② Inert Sep ME-1 による鉛の抽出に準じて試験溶液を調製し、鉛の添加回収率を求めた。ただし、溶出液は 2 M 硝酸及び硝酸(1→100)溶液の 2 種類で検討した。2 M 硝酸を用いた場合は 2 mL で溶出後、水で 10 mL とし試験溶液とし、硝酸(1→100)溶液を用いた場合は、約 7 mL で溶出し、硝酸(1→100)溶液で 10 mL とし試験溶液とした。4-5)原子吸光光度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。

4-4) 食品添加物試料 (一価の陽イオンを含む無機塩) を用いた鉛の添加回収試験の検討

食品添加物試料を用いて、各食品添加物の鉛規格値相当量の鉛を添加し、その後、4-1) Inert Sep ME-1 による前処理法の検討に準じて、試験溶液を調製し、4-5)原子吸光光度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。

4-5) 原子吸光光度法による鉛の定量

試験溶液、標準溶液及び空試験溶液につき、原子吸光光度法により次の操作条件で吸光度を測定した。標準溶液の吸光度より検量線を作成し、試験溶液吸光度から空試験溶液吸光度を差し引いた値から、検量線 (Fig. 4-1) 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。

操作条件

光源ランプ 鉛中空陰極ランプ

分析線波長 283.3 nm

支燃性ガス 空気

可燃性ガス アセチレン

4-6) Inert Sep ME-1 を用いた前処理による鉛添加回収試験

①試料溶液の調製 (二価の陽イオンを含む無機塩類)

炭酸カルシウム、硫酸第一鉄にそれぞれ 3 µg/g、2 µg/g 相当の鉛を添加し、塩酸(1→4)溶液 20 mL を加え、5 分間加熱し、穏やかに沸騰させ、冷後、アンモニア水を加え、pH5 ~6 となるように調整し、試料溶液とした。

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、試料溶液を流速 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 7 mL で流速 1 mL/min でゆっくりと溶出し、その液を回収し、硝酸(1→100)溶液で 10 mL とし、試験溶液とした。ただし、試料を用いずに調製した液を、試料溶液と同様に操作し、得られた液を空試験溶液とした。

4-7) 食品添加物試料 (二価の陽イオンを含む無機塩) を用いた鉛の添加回収試験の検討

食品添加物試料を用いて、各食品添加物の鉛規格値相当量の鉛を添加し、その後、4-6) Inert Sep ME-1 を用いた前処理による鉛添加回収試験に準じて、試験溶液を調製し、4-11)原子吸光光度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、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。

4-8) MetaSEP AnaLig®を用いた鉛試験の検討

①試料溶液の調製

硫酸第一鉄 2 g を量り、鉛規格値相当量(2 µg/g)の鉛を添加し、1M 硝酸 20 mL を加え、5 分間穏やかに沸騰させ、冷後、試料溶液とした。ただし、試料を用いずに調製した液を試料溶液と同様に操作し、得られた液を空試験溶液とした。

②MetaSep AnaLig®による鉛の抽出

MetaSep AnaLig®を水 50 mL で洗浄し、樹脂が水を含んだ状態でコックを閉じた。0.03M EDTA・NH₄溶液 10 mL を通液し(流速 1~2 mL/min)、洗浄した。水 10 mL 及び 1M 硝酸 10 mL を交互に通液し(流速 10 mL/min)、3 回繰り返した。試料溶液を通液(流速 2~3 mL/min)し、流液を素通り画分として回収した。1 M 硝酸 20 mL を通液し(流速 10 mL/min)、流液を回収し、洗浄画分 1 として回収した。その後、水 50 mL を通液(流速 10 mL/min)し、流液の pH が 5 付近であることを pH 試験紙で確認し、流液を回収し、洗浄画分 2 とした。その後、0.03M EDTA・NH₄溶液 2 mL を MetaSep AnaLig®へ馴染ませ、2 分放置した後、溶出し(流速 2~3 mL/min)、回収し、溶出画分 1 とした。同様に EDTA・NH₄溶液 2 mL を MetaSep AnaLig®へ負荷し、溶出画分 2~5 を回収した。更に、MetaSep AnaLig®は繰り返し使用が可能とされることから、0.03M EDTA・NH₄溶液及び水 10 mL

を通液し、流液を回収し、洗浄画分 3 及び 4 とした。それぞれ 4-11) 原子吸光光度法による鉛の定量に従い、0.05~5 µg/mL 標準溶液(硝酸または EDTA)から作成した検量線より、素通り画分、洗浄画分 1~4、溶出画分 1~5 を試験溶液とし、試験溶液中の鉛濃度を算出し、鉛の添加回収率(n=5)を求め、各画分における鉛の溶出パターンを得た。

4-9) MetaSEP AnaLig®を用いた硫酸第一鉄の鉛試験の検討 (鉛添加回収試験)

硫酸第一鉄 2 g を量り、鉛規格値相当量(2 µg/g)の鉛を添加し、4-8) MetaSEP AnaLig®を用いた鉛試験の検討に従い添加回収試験(n=5)を行った。ただし、試料を用いずに調製した液を、試料溶液と同様に操作し、得られた液を空試験溶液とした。

4-10) リン酸イットリウム共沈法を用いた鉛試験法の検討

①試料溶液の調製

硫酸鉄第一鉄 2 g を量り、鉛規格値相当量(2 µg/g)の鉛を添加し、1 M 硝酸 100 mL を加え、5 分間穏やかに沸騰させ、冷後、試料溶液とした。

②リン酸イットリウム共沈法による鉛の抽出

試料溶液にアスコルビン酸 3 g を加え、溶解させ、イットリウム溶液 1 mL、0.5 mol/L リン酸溶液 3 mL を加えた後、アンモニア水で約 pH3 に調整した。約 30 分室温で放置し、生成した沈殿を沈降させた後、メンブランフィルターを用いて、吸引ろ過により沈殿を分離した。沈殿が付着したメンブランフィルターを 50 mL 遠沈管に取り、4 mol/L 硝酸 2 mL でメンブランフィルターに付着した沈殿を溶解し、その液を 10 mL メスフラスコに回収した。更に、水でメンブランフィルターを洗いこみ、その洗浄液を先の 10 mL メスフラスコ

に合わせ、水で10 mLとし、試験溶液とした。
ただし、試料を用いずに調製した液を、試料溶液と同様に操作し、得られた液を空試験溶液とした。4-11) 原子吸光光度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。

4-11) 原子吸光光度法による鉛の定量

試験溶液、標準溶液(硝酸またはEDTA)及び空試験溶液につき、原子吸光光度法により次の操作条件で吸光度を測定した。標準溶液の吸光度より検量線を作成し、試験溶液吸光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(Fig.4-2 及び 4-3)、試験溶液中の鉛濃度を求め、試料中の鉛量を算出した。なお、検量線に用いた標準溶液は試験溶液と同じ溶液により作成した検量線を用いて算出した。

操作条件

光源ランプ 鉛中空陰極ランプ

分析線波長 283.3 nm

支燃性ガス 空気

可燃性ガス アセチレン

4-12) 試験溶液の調製 (二価の陽イオンを含む有機塩類)

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. 4-4 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。ただし、試料を用いずに調製した液を、試料液と同様に操作し、得られた液を空試験溶液とした。

4-13) 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 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 4-12) 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 4-15) 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。

4-14) 食品添加物試料を用いた鉛の添加回収試験の検討

4-12) 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 4-1 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、4-12) 試験溶液の調製に準じて、試験溶液を調製し、4-15) 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。

4-15) 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(Fig. 4-5)、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

5. 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)

SARのソフトウェアとして、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 (MCase ; Multicase Inc.)を用いた。DEREKは、知識ベースのエキスパートシステムで、AWorksは、人工知能型アプローチのシステムで、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試験の陽性判定と関連する構造記述子を選別し、予測を行うシステムである。

2) Ames試験

【試験の概略】 検定菌として、*Salmonella*

typhimurium TA100及びTA98を用い、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、15, 50, 150, 500, 1500及び5000 µg/plateの6用量で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以下の10種類 (Table 5-1)。

Verbenoneは日本香料工業会より入手した。以下の9化合物は、東京化成工業㈱より購入した。

diisoamyl ether, *tert*-butyl acetoacetate, 2-hydroxyethyl salicylate, methyl *N,N*-dimethylantranilate, neryl acetate, 2,4-dimethyl-3-pentanone, 2-methyl-3-pentanone, 3,4-dimethoxyacetophenone, dinonyl sulfide.

また、陽性対照物質は、S9mix存在下では2-aminoanthracene, S9mix非存在下では2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamideを用いた。陰性対照物質(溶媒)にはdimethylsulfoxide (DMSO)を用いた。これらは和光純薬工業㈱より購入した。

【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S9mix非存在下、及びラットのもつ薬物代謝酵