

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のトッパア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。

6. 食品添加物と食品成分等の複合作用による副生成物の解明

1) 試料

モデル食品として、パン及びパウンドケーキ、クッキー、うどんを調製し、実験に使用した。これら食品の材料は、都内スーパーにおいて購入し、食品の調製には、ホームベーカリー及びオーブンレンジを用いた。

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 mL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の SD-BM106, オープンレンジはパナソニック製 NE-M156 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

(パンの調製法)

強力粉への BPO 添加量が 33, 66, 105 mg/kg となるように 22%及び 35%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。

食パンの各パン 1 斤分当たりの材料組成を以下に示す。

食パン：強力粉 250 g, バター 15 g, 砂糖 17 g, スキムミルク 6 g, 塩 5 g, 水 180 mL, ドライイースト 2.8 g

食パンは、パン生地の調製から焼成までホームベーカリーを用い、装置の設定コースに従って調製した。

(バターケーキ及びクッキーの調製法)

強力粉への 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。

バターケーキ及びクッキーの材料組成を以下に示す。

バターケーキ：薄力粉 100 g, 食塩不使用バター 100 g, 砂糖 100 g, 卵 100 g, 牛乳 15 g, ベーキングパウダー 7g

クッキー：薄力粉 120 g, 食塩不使用バター 60 g, 砂糖 40 g, 卵黄 15 g

バターケーキは、手作業で生地を調製した後、オープンレンジで 170°C, 40 分間焼成した。クッキーは、フードプロセッサーで生地を混和後、冷蔵庫にて 30 分間放置した後、カットし、オープンレンジで 170°C, 27 分間焼成した。

(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 µL 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

パン及びパウンドケーキ、クッキーは、試
料 2 g, うどんは、試料 50 g に等量の水を加
え、ホモジナイズした試料 4 g を 40 mL の
VOA バイアルに採取し、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 µL
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。

(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. 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関わる調

査研究

日本国内で流通している香料化合物は、平
成 18 年度の厚生労働科学研究での調査によ
ると 2164 品目であり、そのほとんどは 18 項
目の類または誘導体として指定されており、
個別に指定され、成分規格が定められている
ものは 133 品目のみである。それ以外の香料
化合物については、規格の実態調査と集約を
行い(平成 16~21 年度厚生労働科学研究)、
自主的な規格として日本香料工業会ホームペ
ージに公開されている(以下自主規格)。

自主規格で規格設定した 1453 品目につい
て、名称が JECFA の規格データベースと完
全に一致している品目、及び名称が異なる場
合も構造から同一の化合物と考えられる品目
を抽出し、最終的に 1088 品目が抽出された。

抽出された香料化合物の自主規格と
JECFA 規格について、含量、屈折率、比重、
酸価、融点・凝固点、(比)旋光度を比較し
た。その結果、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(I)
及び実測値(II)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。397 品目については、実測値調査未実
施であり、今後調査が必要である。

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

平成 19~21 年度の厚生労働科学研究として
実施された使用品目に関する実態調査では、
調査年度中に我が国で使用された天然香料基

原物質は 487 品目であった。これは天然香料基原物質リストに記載されている基原物質数の 80%にあたる。この調査では定性的な結果が得られたのみであるため定量的調査の必要性も議論されたが、当時は、使用量の調査は困難であると結論していた。

しかしながら、天然香料は香料化合物と並ぶ香料素材であることから、使用量を把握することが重要と考え、使用量調査を実施することにした。

2-1) 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) 記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 1-2)。

Table 1-2. 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合香料中に使用されていることが確認された基原物質名のみで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。

2-2) 分類名による使用品目の前回調査との比較

Table 1-3 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 1-3. 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

2-3) 系統名による使用品目の前回調査との比較

Table 1-4 に系統名ごとの使用物質数及び使用量を集計した。

Table 1-4 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) 食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定に関わる研究

指定添加物の摂取量の推定は、昭和 57 年を第 1 回とする調査研究であり、第 10 回調査として、指定添加物の製造・輸出入事業者を主対象に、自社における平成 22 年度中の食品添加物グレードの取り扱いについて、アンケート調査を行い、精査、検討を加え、国民 1 人あたり一日品目別摂取量を求めた。

3-1) 指定添加物の摂取量調査

指定添加物に関しては、第10回調査をまとめた。食品添加物の生産量を基にして求めた一日摂取量の多かった品目は、L-グルタミン酸ナトリウム (2312mg/人/日)、酢酸デンプン (1284 mg/人/日)、D-ソルビトール (1231mg/人/日)、二酸化炭素 (570 mg/人/日)、ヒドロキシプロピル化リン酸架橋デンプン (388 mg/人/日)、クエン酸 (377 mg/人/日)、リン酸架橋デンプン (311 mg/人/日)、グリセリン脂肪酸エステル (212 mg/人/日) 等であった。また、ADIとの比較からも問題がなかった。

3-2) 輸入食品中の食品添加物

平成22年度には我が国は約3180万トンの食品が輸入されている。その中には多くの加工食品が含まれていることから、輸入される加工食品中に含まれている食品添加物の含有量を推定することとした。今回の調査では、発色剤である亜硝酸ナトリウム、硝酸カリウム及び硝酸ナトリウムと酸化防止剤である、エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを調査対象品目とした。

平成22年度に届け出られた亜硝酸ナトリウムを使用した食品類は約76447トンであった。その内、亜硝酸ナトリウムの使用基準のある食品（食肉製品（乾燥食肉製品、非加熱食肉製品、加熱食肉製品）、魚肉ソーセージ、すじこ及びたらこ）について算出した結果、亜硝酸ナトリウム含有量は合計で約3198 kgであった。他の品目についても同様に集計した結果、輸入食品中の食品添加物量は、亜硝酸ナトリウム3198 kg、硝酸カリウムが4642 kg、硝酸ナトリウム1006 kg、エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム799 kg及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム71 kgであった。この量を国内における出荷量調査と比べると、輸入食品中に含まれる割合は硝酸ナトリウム142%、硝酸カリウム50%、エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム25%と高かったが、亜硝酸ナトリウムは1.9%、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムは0%と低い結果となった。ただ、亜硝酸ナトリウム以外は元々の量が少なく摂取量としては影響がない量になると考える。

3-3) 既存添加物等の製造・輸入量調査

個々の品目毎では量的に小さいものが多く、市販の既存添加物には一定純度とする規格が

ないものもあり、同一名称で生産・輸入の出荷を調査してもその積算は成分量として意味をなさない場合もあるが、出荷量の実態を把握することを目的とし、第5回調査として、平成23年度の製造・輸入量についてアンケート調査を実施し、回答内容を集計した。さらに、第6回調査を開始した。

第5回の生産量統計調査は、「既存添加物名簿」+「一般飲食物添加物品目リスト」を対象に、まとめた。出荷量の多かったものは、製造用剤ケイソウ土(58420 トン)、製造用剤活性白土(31900 トン)、製造用剤トレハロース(25000)、製造用剤流動パラフィン(13964 トン)、着色料カラメルI(13530 トン)等であった。

2. 食品添加物の規格向上のためのIRに関する調査研究

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。測定試料としては、ポリビニルピロリドン、塩化コリン、香料化合物を取り上げ、従来の測定法と、ATR法を比較検討した。

1) ポリビニルピロリドンに関する検討

ポリビニルピロリドン(PVP)は、1-ビニル-2-ピロリドンの重合体であり、その重合の度合いに応じ、PVP25、PVP30、PVP90が存在している。本研究では、これらの重合度の違いや、測定法によりIRに差が出るか否かを明らかにするため、検討を行った。

まず、KBr法で測定を行ったところ、1440 cm^{-1} 付近と、2120 cm^{-1} 付近がPVP25、PVP30と、PVP90では異なっていた(Fig. 2-1~3)。

さらに、いずれの化合物においても、3500 cm^{-1} 付近に、PVPには存在しないはずのOH

基のピークが観測され、その強度もPVP25、PVP30と、PVP90で異なっていた。PVP90は粘性の高い粒子状で、非常にすりつぶしにくく、すりつぶしが不十分な場合、KBr錠剤に粒子が残存するほど不均一な錠剤となることがあった。不均一な錠剤を避けるために、まず試料自体を可能な限りすりつぶし、KBr粉末を少量加えてすり混ぜる操作を繰り返した後、加圧して錠剤を形成していたため、すり混ぜの時間が10分程度かかっていた。よって、KBr錠剤の調製時における吸湿が原因と考え、KBr法による測定は不適であると考えた。そこで、吸湿の生じにくい、ペースト法での測定を行った。ペースト法での試料調製は、試料に流動パラフィンを加え、表面を覆った後にすり混ぜることで、吸湿を抑えるようにして行った。しかし、均一なペーストを作製することは難しく、すり混ぜにも時間を要した。得られたスペクトルでは、 1440 cm^{-1} 付近と、 2120 cm^{-1} 付近がPVP25、PVP30と、PVP90では異なっており、また、いずれの化合物においても、 3500 cm^{-1} 付近にピークが観測された (Fig. 2-4~6)。従って、ペースト法でも、試料調製時に吸湿が生じていると考えた。

そこで、試料調製をほとんど必要としないATR法での測定を行った。その結果、3化合物のスペクトルは一致し、 3500 cm^{-1} 付近のピークも非常に小さかった (Fig. 2-7~9)。従って、PVPのように、重合度によって吸湿性が大きく変化する化合物には、ATR法による測定が最も適していると考えた。

ポリビニルピロリドン類の検討において、重合度の異なるPVP25、PVP30、PVP90を比較検討したところ、KBr法や、ペースト法では、重合度の違いによってスペクトルが異

なっており、また、いずれの化合物でも、吸湿に起因すると考えられるピークが観測された。一方、ATR法で測定したところ、3化合物は同じスペクトルとなり、吸湿によるピークも非常に小さかった。これらの結果は、ATR法では、試料調製がほぼ不要であるため、試料調製時の吸湿を避けることができたためと考えられる。従って、PVPのように、重合度によって吸湿性が大きく変化し、ペースト法でも吸湿の生じるような取り扱いの難しい化合物には、ATR法による測定が最も適していると考えた。

2) 塩化コリンに関する検討

2-1) KBr, KCl, NaCl錠剤法を用いた検討

塩化コリンは、1荷のカチオン化合物と、塩化物イオンの塩化合物である。したがって、錠剤法を用いる場合は、塩交換の生じないNaCl, KClを選択すべきであるが、比較のため、KBrについても検討を行った。

まず、NaClで錠剤作製を行ったところ、吸湿により錠剤表面が一部潮解していた。その錠剤を測定しても、Fig. 2-10の通り、全体に透過率の低い異常スペクトルを示し、 3400 cm^{-1} 及び、 1650 cm^{-1} 付近に水分由来と思われる大きなピークが観察された。従って、NaCl錠剤法は不適であると判断した。また、KClを用いた場合でも、NaClと同様の異常スペクトルを示す結果となった (Fig. 2-11)。KBrを用いた場合では、錠剤表面の潮解や全体の透過率は認められなかったが、 3400 cm^{-1} 及び 1650 cm^{-1} 付近に水分由来のピークが認められたため (Fig. 2-12)、KBr錠剤法も不適切であると判断した。

2-2) ペースト法を用いた検討

次に、吸湿の生じにくい、ペースト法での

測定を行った。ペースト法での試料調製は、試料に流動パラフィンを加え、表面を覆った後にすり混ぜることで、吸湿を抑えるようにして行った。また、窓板として、塩化コリンのCl⁻と塩交換を生じないNaCl板を用い、比較のため、KBr板での検討も行った。その結果、すり混ぜに時間を掛けると、ペーストが明らかに吸湿する様相を呈し、すり混ぜ時間を短縮しすぎると、塩化コリン結晶の粒が残存し、ペースト状にならないといった問題点があった。また、すり混ぜ時間が長いもの、短いもの、得られたスペクトルを比較すると、NaCl板、KBr板いずれの場合でも、3400 cm⁻¹及び1650 cm⁻¹付近に大きなピークが観察された (Fig. 2-13~16)。従って、ペースト法でも、試料調製時に吸湿が生じていると考えた。

2-3) ATR法を用いた検討

そこで、試料調製をほとんど必要としないATR法での測定を行った。まず、塩化コリン結晶を粉末化するため極短時間すりつぶし、測定した結果、3400 cm⁻¹及び1650 cm⁻¹付近のピークは観察されなかった (Fig. 2-17)。このスペクトルは、Fig. 2-18に示すSigma-Aldrich社Spectral Viewer収載のATRスペクトルと一致した。また、塩化コリンを粉末化するすりつぶし時間を長くすると、全体にピークが大きくなり、3400 cm⁻¹付近のショルダー及び1650 cm⁻¹付近にブロードなピークが観察された (Fig. 2-19)。従って、ATR法を用いる場合でも、粉末化するためのすりつぶし時間は短時間で行う必要があると考えられる。

また、錠剤法での異常スペクトルについて調べるため、NaCl粉末、KCl粉末、KBr粉末を加えてすり混ぜた後、ATR法で測定した結

果、いずれも3400 cm⁻¹付近のショルダー及び1650 cm⁻¹付近のピークが観察された (Fig. 2-20~22)。さらに、KBr粉末を加えた場合のみ、3005 cm⁻¹と3025 cm⁻¹の2つのピークが3016 cm⁻¹の単一ピークになり、1412 cm⁻¹のピークが1404 cm⁻¹にシフトするなど、他と異なるスペクトルを与えた。

塩化コリンの検討においては、まず、錠剤法による検討を行った。錠剤法に用いるハロゲン化アルカリとして、塩交換を生じないNaCl、KClと、比較として、KBrを用いた検討を行った。その結果、NaCl、KClを用いた場合、錠剤表面が潮解しており、その錠剤を測定しても、全体に透過率の低い異常スペクトルを示し、スペクトルとしての体を成さなかった。また、NaCl、KCl、KBrのいずれの場合でも水由来と思われる3400 cm⁻¹及び1650 cm⁻¹付近に大きなピークが観察された。従って、錠剤法は不適であると判断した。

次に、一般に試料調製時の吸湿の少ないペースト法での検討を行った。ペースト法での試料調製は、試料に流動パラフィンを加え、表面を覆った後にすり混ぜることで、吸湿を抑えるようにして行ったが、結果としては3400 cm⁻¹及び1650 cm⁻¹付近に水分由来と思われるピークが観察された。従って、ペースト法を用いても試料調製時に吸湿が生じていると考え、塩化コリンの測定には適さないと判断した。

そこで、試料調製をほとんど必要としないATR法の検討を行った。

まず、塩化コリン結晶を粉末化するため極短時間すりつぶし、測定した結果、3400 cm⁻¹及び1650 cm⁻¹付近のピークは観察されなかった。また、塩化コリンを粉末化するすりつぶし時間を長くすると、3400 cm⁻¹付近のショ

ルダール及び1650 cm^{-1} 付近にブロードなピークが観察された。従って、ATR法を用いる場合でも、結晶を粉末化するためのすりつぶし時間は短時間に抑える必要があると考えられる。

なお、塩交換の影響を調べるため、NaCl粉末、KCl粉末、KBr粉末を加えてすり混ぜた後、ATR法で測定した結果、いずれの場合でも、3400 cm^{-1} 付近のショルダー及び1650 cm^{-1} 付近のピークが、塩化コリン単独ですりつぶした場合よりも顕著に表れた。また、KBr粉末を加えた場合のみ、3005 cm^{-1} と3025 cm^{-1} の2つのピークが3016 cm^{-1} の単一ピークになり、1412 cm^{-1} のピークが1404 cm^{-1} にシフトするなど、他と異なるスペクトルを与えた。錠剤法でKBrを用いた場合にも同様の傾向が認められたことから、塩化コリンとKBrのすり混ぜを行うと、塩交換が生じていると考えられる。

従って、塩化コリンの様に吸湿性が極めて高く、ペースト法でも吸湿の生じるような取り扱いの難しい化合物には、ATR法による測定が最も適していると考えた。また、ATR法を塩化コリンの確認試験に用いる場合には、結晶を粉末化するすり混ぜ時間は可能な限り短くする必要があると考えられる。

3) 香料化合物に関する検討

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、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。

3-1) 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. 2-23)。

3-2) 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.2-24)。

3-3) 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. 2-25)。

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、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. 2-26)。

香料化合物の検討においては、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の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が示すことができた。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。

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) グルタミンバリングリシン

1-1) グルタミンバリングリシンの各水素シグナルの帰属

^1H -qNMRによる精密な定量には、試料に由来するNMRシグナルを帰属するとともに、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しなければならない。そこで、グルタミンバリングリシンについて ^1H 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、Fig. 3-1に示した ^1H

NMRスペクトルが得られた。また、本結果及び ^{13}C 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(Fig. 3-2)。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。1-2) ^1H -qNMR法によるグルタミンバリングリシン含量の測定

^1H -qNMR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、グルタミンバリングリシンについて ^1H -qNMRに関する検討を行った。通常、我々は ^1H -qNMR測定を行う際に、多数の有機化合物を測定するためにTable 3-1に示す条件を用いることが多い。特に、シグナルの正確な積分値(面積強度)を得るためには、繰り返し待ち時間(Pulse delay)を定量に用いるシグナルの縦緩和時間(T_1)の10倍以上に設定する必要がある。そこで、グルタミンバリングリシンの各シグナルの T_1 を測定したところ、Fig. 3-3に示すように、最大で2.54秒(δ_{H} 3.82)であり、Table 3-1に示す繰り返し待ち時間(60秒)はグルタミンバリングリシンの定量において適切であることが確認された。そこで、Table 3-1に示す条件を用いて ^1H -qNMR測定を行い、グルタミンバリングリシン含量を算出した。その結果、Fig. 3-4に示すように、 δ_{H} 0.97 (水素数6)、 δ_{H} 2.10-2.20 (水素数3)、 δ_{H} 2.54 (水素数2)、 δ_{H} 3.82 (水素数1)、 δ_{H} 3.97 (水素

数 2) 及び δ_{H} 4.16 (水素数 1) にグルタミルバリルグリシンに由来するシグナルがそれぞれ観察された。また Table 3-3 に示すように、これらのシグナルより算出されたグルタミルバリルグリシン含量は、 δ_{H} 0.97, δ_{H} 2.54, δ_{H} 3.82, δ_{H} 3.97 及び δ_{H} 4.16 のシグナルでは、99.4%–99.5%と同等の結果であった。一方、 δ_{H} 2.10–2.22 のシグナルでは、99.9%と他のシグナルと比べ高い結果を示した。これらのシグナルは、 δ_{H} 2.13 (水素数 1) 及び δ_{H} 2.16 (水素数 2) のシグナルが部分的に重っており、シグナルはそれぞれ多重に分裂していることから、積分範囲が通常よりも広くなり、他のシグナルの定量値より大きくなったものと考えられた。これらの点を考慮し、定量用シグナルとしては、 δ_{H} 0.97, δ_{H} 2.54, δ_{H} 3.82, δ_{H} 3.97 及び δ_{H} 4.16 を用いることが適切と考えられた。なお、これらのシグナルの相対標準偏差 (RSD) は 0.1–0.2 % と良好であった。

1-3) ^1H -qNMR 及び滴定によるグルタミルバリルグリシン含量の比較

グルタミルバリルグリシンの規格試験法案では、定量法として過塩素酸を用いた非水滴定が示されている。そこで、 ^1H -qNMR と滴定によるグルタミルバリルグリシン含量を比較した。その結果、5種のシグナルより算出した ^1H -qNMR からのグルタミルバリルグリシンの含量及び RSD は、滴定の結果とほぼ同等であり、 ^1H -qNMR により算出された定量値は正確であることが確認された (Table 3-4)。 ^1H -qNMR 及び滴定はともに検量線を必要としない絶対定量法である。特に今回用いた ^1H -qNMR の場合、得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。

2) DKP

2-1) DKP の各水素シグナルの帰属

DKP について ^1H 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、Fig. 3-5 に示した ^1H NMR スペクトルが得られた。また、本結果及び ^{13}C 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、各水素シグナルを帰属した (Fig. 3-6)。なお、これらのケミカルシフトは、2)の検討と整合させるため、DSS- d_6 の水素シグナルを基準シグナル (δ_0) としたときの、 δ 値 (ppm) として示した。

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。

2-2) ^1H -qNMR による DKP 含量の測定

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、アスパルテームの分解産物である DKP について ^1H -qNMR 測定を行った。本研究では、Table 3-1 に示す測定条件を用いて ^1H -qNMR を行った (Fig. 3-7)。その結果、Table 3-5 に示すように δ_{H} 1.59, δ_{H} 2.07, δ_{H} 4.06, δ_{H} 4.23 及び δ_{H} 7.1-7.4 のシグナルより算出された DKP 含量は、96.0%–96.5%であった。一方、 δ_{H} 2.96, δ_{H} 3.12, δ_{H} 7.88 及び δ_{H} 8.14 より算出された DKP 含量はそれぞれ、97.3%, 100.2%, 94.0%及び 94.7%と他のシグナルから得られた DKP 含量と比べ 1~4%程度差が認められた。これは、 δ_{H} 2.96 については、シグナルの左裾が δ_{H} 3.12 のシグナルの裾と隣接していること、 δ_{H} 3.12 については、 δ_{H} 3.3 付近に観察される DMSO- d_6 中の水に由来するシグナルの裾が δ_{H} 3.12 のシ

グナルと重なり、適切な積分範囲を設定できていないため、定量値が高くなったと考えられた。また、 δ_H 7.88 及び δ_H 8.14 については、それぞれ分子内の窒素に結合した水素が交換性の性質を有しているため、定量値は低く観察され、正確な定量は困難と考えられた。

なお、 δ_H 7.1-7.4 のシグナル群より算出された DKP の定量値は、他のシグナルとほぼ同等であったが、これらを定量用シグナルとして用いる場合、製品の純度によっては、これらのシグナルの範囲内に夾雑物由来のシグナルが重なる可能性も懸念される。以上の点を考慮すると、DKP の定量には、 δ_H 1.59, δ_H 2.07, δ_H 4.06, δ_H 4.23 を用いることが適切と考えられた (DKP 平均含量 : 96.1%)。また、これら 4 種のシグナルから算出された相対標準偏差 (RSD) は 0.1-0.3 % と良好であった。

3) フルジオキソニル

3-1) 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、Fig. 3-8 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 (Fig. 3-9)。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) ^{13}C -qNMR によるフルジオキソニル含量の測定

^{13}C -qNMR 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測定を行った。本研究では、Table 3-2 に示す測定条件を用いて ^{13}C -qNMR を行った (Fig. 3-10)。その結果、Table 3-6 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。

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) カートリッジへの鉛の吸着量の検討

Inert Sep ME-1(250 mg/6 mL)への鉛吸着量を検討するために、鉛濃度 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の塩酸(1→4)溶液 20 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL を採取し、アンモニア水で pH5~6 に調整した液を試料液とし、鉛の抽出操作を行ったところ、Table 4-2 に示すように 85.5~96.2% の鉛が回収された。以上の結果から、Inert Sep ME-1(250 mg/6 mL)へは鉛として、

4~40 µg 相当が吸着可能であることが明らかとなった。これらの鉛量は鉛規格値 2 µg/g として、試料採取量 2~20 g に相当するが、原子吸光光度計で分析した場合でも、試料 2 g を採取し、Inert Sep ME-1 で鉛を抽出後、試験溶液 10 mL として、鉛濃度 0.4 µg/mL でも十分分析が可能であった。ただし、装置の感度が異なる場合も考慮すれば、必要に応じて試料採取量を増やすことも可能であることが明らかとなった。

また、試料液 200 mL の場合、pH を調整するために多量のアンモニア水を要したため、試験溶液中に多量の塩が生じたことが推測されたが、Inert Sep ME-1 により鉛が選択的に抽出されたことにより、多くの塩が取り除かれ、原子吸光光度計でも分析が可能となり、良好な鉛の回収率が得られることが明らかとなった。

2) 塩化カリウムを用いたカートリッジを使用した鉛試験検討 (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、2 M 硝酸 2 mL で溶出し、水で 10 mL としたもの及び硝酸(1→100)溶液約 7 mL で溶出し硝酸(1→100)溶液で 10 mL としたもので、鉛の添加回収試験を行ったところ、Table 4-3 及び 4-4 に示すように、n=3 での平均添加回収率 (相対標準偏差) は 2 M 硝酸で溶出したものは 104.3%(5.3%)、硝酸(1→100)溶液では 96.9%(10.1%)となり、いずれも良好な回収率が得られた。以上の結果から、ICP や ICP/MS への応用を考慮した場合、酸由来の干渉を避ける必要があることや、現在食品添加物公定書における鉛試験における検液及び比較液は硝酸(1→100)溶液で調製されていることから、溶出液は硝酸(1→100)溶液を用いることが望

ましいと考えられた。

3) 食品添加物試料を用いた鉛の添加回収試験の検討

塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、硫酸ナトリウムを試料とし、各試料に 2 µg/g となるように鉛を添加し、Inert Sep ME-1 による鉛の添加回収試験を行った。その結果、Table 5~9 に示すように、いずれも空試験溶液からは鉛が検出されなかった。

また、鉛の n=3 での鉛の平均添加回収率 (相対標準偏差) は、塩化カリウムで 105.2%(2.8%)、塩化アンモニウムで 102.6%(5.2)、酢酸ナトリウムで 98.4%(3.2%)、硝酸ナトリウムで 89.8%(4.8%)、硫酸ナトリウムで 4.46%となり、硫酸ナトリウムで回収率が低かった。

4) 硫酸ナトリウムの前処理法の検討

3) 食品添加物試料を用いた鉛の添加回収試験の検討において、硫酸ナトリウムで鉛の回収率が悪かった原因として、硫酸イオンと鉛イオンから硫酸鉛が生成し、不溶化することから、Inert Sep ME-1 の上部に詰まってしまい、溶出されなかったことが考えられた。

硫酸鉛は塩酸溶液中で加熱することで可溶化されることから、鉛を 2 µg/g となるように鉛を添加した硫酸ナトリウムを塩酸(1→4)溶液で溶解する際、加熱を試みた。加熱方法は、ホットプレートを 300°C に設定し、試料液が半分程度に濃縮されるまで加熱する方法と、蒸発乾固させる方法の 2 通りを行った。それぞれ、加熱した後、冷後、蒸発した水を補い、20 mL とし、試料液として Inert Sep ME-1 による鉛の抽出を行った。その結果 Table

4-10 に示すように、回収率は 85.2%及び 83.0%となりいずれも良好な回収率が得られた。蒸発乾固させた場合、乾固させた後に、試料が飛び散ることや、試料が部分的に高温で加熱される可能性があり、鉛の回収率の低下やばらつきが生じることがあるため、半分程度に濃縮することが望ましいと考えられた。そこで、鉛を 2 µg/g となるように鉛を添加した硫酸ナトリウムを試料とし、塩酸(1→4)溶液を加えて、300°Cで加熱し、半分程度に濃縮後、蒸発した水を補った後、Inert Sep ME-1 で鉛を抽出したところ、Table 4-11 に示すように、n=3 での平均回収率(相対標準偏差)は 92.7%(4.7%)となり、良好な結果が得られた。

5) Inert Sep ME-1 を使用した鉛試験検討(鉛添加回収試験)

二価の陽イオンを含む無機塩類として、炭酸カルシウム及び硫酸第一鉄を用い、Inert Sep ME-1 を用いた規格値相当の鉛を添加し、添加回収試験を行ったところ、炭酸カルシウムでは 97.5%の回収率が得られた。一方、硫酸第一鉄では、試料溶液の調製の際、pH4 以上にすることにより多量の褐色の沈殿が析出し、試験が不可能であった。これは、試料溶液中の鉄イオン(Fe²⁺)がアンモニア水を加えることにより、水酸化鉄(Fe(OH)₂)となって沈殿し、空気中の酸素により酸化が進み褐色の水酸化第二鉄(Fe(OH)₃)の沈殿となるためと考えられた。キレート樹脂は鉛イオン(Pb²⁺)と同様 Fe²⁺も吸着してしまうため、Fe²⁺をあらかじめ取り除くか、固相中のイミノ二酢酸とキレートを形成しないようマスキング剤を添加する必要がある。そこで、Fe²⁺が 1,10-

フェナントロリン-水和物と水溶性の錯イオンを生成することから、2 g の硫酸第一鉄に過量の 1,10-フェナントロリン-水和物に加え、pH を調整したところ、濃赤色の鉄フェナントロリン錯体が生成したが、Fe(OH)₃ の沈殿の生成は完全には抑制されず、一部沈殿が生成し、Inert Sep ME-1 に保持されてしまい、完全に Fe²⁺を除去することは困難であった。

6) 食品添加物試料を用いた鉛の添加回収試験の検討

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、各試料に 2 µg/g (炭酸カルシウムは 3 µg/g) となるように鉛を添加し、Inert Sep ME-1 による鉛の添加回収試験を行った。その結果、Table 4-12 ~4-19 に示すように、鉛無添加の炭酸カルシウム及び炭酸マグネシウムからは 0.26 µg/mL(1.3 µg/g) 及び 0.078 µg/mL(0.39 µg/g)の鉛が検出されたが、いずれも規格値(3 µg/g 及び 2 µg/g)以下であり、炭酸カルシウム及び炭酸マグネシウム以外の試料からは鉛が検出されなかった。

また、鉛の n=5 での鉛の平均添加回収率(相対標準偏差)は、水酸化カルシウムで 103.3%(4.8%)、炭酸カルシウム 103.2%(3.4%)、塩化カルシウム 94.6%(3.9%)、サンゴ未焼成カルシウム 98.9%(3.8%)、グルコン酸カルシウム 97.1%(5.0%)、酸化マグネシウム 88.0%(5.9%)、塩化マグネシウム 89.6%(4.0%)、炭酸マグネシウム 97.2%(7.7%)であり、良好な結果が得られた。以上の結果から、カルシウムやマグネシウムを多量に含む試料の場合でも Inert Sep ME-1 による鉛の抽出は可能であることが明らかとな

った。

7) MetaSEP AnaLig®を用いた鉛試験の検討

硫酸第一鉄は試料溶液の調製段階で沈殿が析出し、Inert Sep ME-1による前処理が不可能であったことから、鉛を特異的に捕集するMetaSEP AnaLig®を用いて検討を行った。硫酸第一鉄に2 µg/gとなるように鉛を添加し、MetaSEP AnaLig®に負荷し素通り画分、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、鉛の添加回収率を求めた。その結果Fig. 4-6に示すように、素通り画分並びに洗浄画分1~4では鉛は検出されず、負荷した試料溶液中の鉛のうち平均99.9%(n=5)の鉛が0.03M EDTA・NH₄溶出画分1で溶出しており、鉄マトリックスを含む試料中の鉛の抽出にもMetaSEP AnaLig®が有用であることが明らかとなった。

8) 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)

7) MetaSEP AnaLig®を用いた鉛試験の検討の結果を踏まえ、1本のMetaSEP AnaLig®を用い、添加回収試験を行った。Table 4-20に示すように、回収率(相対標準偏差)は99.9%(9.2%)と、相対標準偏差が大きくなった。MetaSEP AnaLig®はコストの面から繰り返し使用が望ましいが、カートリッジに残存する鉛が結果に影響する可能性があり、注意が必要である。

9) リン酸イットリウム共沈法を用いた鉛試験法の検討

硫酸第一鉄に2 µg/gとなるように鉛を添加し、鉛の抽出方法として、リン酸イットリウム共沈法を用い、n=5での鉛の平均添加回収

率を求めた。その結果、Table 4-21に示すようにn=5の平均回収率(相対標準偏差)は82.4%(5.0%)となった。本法は鉄鋼中の微量鉛の定量を参考にした方法であり、リン酸イットリウムが鉛及び鉄と広い範囲のpHで定量的に共沈するのに対し、Fe²⁺とはpH3以下で沈殿を生成しないことによる。すでに報告されている方法は、電気加熱原子吸光分析法での方法であったが、今回の検討で、原子吸光度法でも共沈剤であるリン酸イットリウムの影響がほとんどなく、良好な鉛回収率が得られた。本法は定量可能元素が鉛のみである場合には、操作が簡便であることから鉄マトリックス中の鉛試験法として有用な方法の一つであると考えられた。

10) 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、4-13)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.4-7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以上加えると灰化容器内で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。

11) ICP-MS条件の検討

標準溶液を用いて4-15)ICP-MS法による鉛の定量に従い、ICP-MSにより測定を行い、検量線を作成した。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(Fig.4-5)。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、食品添加物試料を用いた鉛添加回収試験においても両モードで測定することとした。実試料を用いた添加回収試験での両モードでの測定値はステアロイル乳酸カルシウム及びプロピオン酸カルシウム以外ではほぼ同じ真度、精度であり、今回用いた試料においては特にマトリックスに起因する干渉は受けておらず、いずれのモードで測定しても問題ないと考えられたが、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、*t* 検定の結果、Non Gas モードと He モードで回収率に有意差が見られた($P>0.05$)。この原因としては、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とから、内標準法や、標準添加法による補正が有効であるかもしれない。

12) 食品添加物試料を用いた鉛の添加回収試験の検討

食品添加物用の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 4-1 に示した規格値となるように鉛標準溶液を添加し、Inert Sep ME-1 による鉛の添加回収試験を行った。その結果、Table 4-22~4-27 に示すように、2 試料からは 5.3~5.9 ng/mL(265~295 ng/g)の鉛が検出されたが、いずれも規格値(Table 4-1 参照)以下であった。

また、各食品添加物試料の $n=5$ での鉛の平均添加回収率(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%)であった。以上

の結果よりカルシウムやマグネシウムを多量に含む有機塩試料の場合でもマイクロウェーブ灰化後、二価の陽イオンを含む試料の場合も一価の陽イオン(カリウムやナトリウム等)を含む試料と同じ抽出条件で Inert Sep ME-1 による鉛の抽出は可能であることが明らかとなった。

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

1) SARの予測に関する結果

SARでAmes試験結果を予測した物質126化合物を3回に分けて簡易Ames試験(FAT)を実施した結果と、SARの各モデルの予測との相関を調べた。SARの予測結果が陽性でFATが陽性であった物質は12化合物でいずれも一つのモデルだけが陽性を予測したものであった。一方、陰性予測で陰性であったもののほとんどが、3つのモデルともに陰性の予測をしたものであった。パラメータを算出したところ、いずれのモデルも精度、一致率に大きな差はなかったが、偽陽性率、偽陰性率についてはMultiCASEが他より15%程度小さい値であり、より良い結果を示した。SARモデルがいずれも陰性を予測し、FATの結果が陽性だった12化合物(Table 5-1)は、香料における18項目の中のエーテル類、エステル類、ケトン類がほとんどで、構造の共通性が見られた。FATの陽性を正しく予測できた化合物が、SARモデルごとに異なっていたことから、複数のSARモデルが陽性と判断すれば陽性の可能性が高いとは言えないことがわかる。一方、それぞれのSARモデルが陰性と判定し、実際に陰性だった化合物にはほとんど重なりがあり、複数のSARモデルが陰性と判定した場合、実際の化合物に変異原性が

ないと考えてよいだろう。SARで陽性と判定されなかったにもかかわらず、FATで陽性になった12化合物について文献検索等から得られた情報では、いずれの化合物についても構造類似物質の安全性には懸念がないとされている (Table 5-1)。したがって、これら12化合物については標準的なAmes試験を実施して、FATの結果を確認することとした。

2) Ames試験結果

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。

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。

今回の結果より、9化合物についてのSARによるAmes試験結果予測と類縁化合物の情報、実際のAmes試験の結果と一致していたことが明らかになった。したがって、SARによる予測に加えて、類縁化合物の情報も香料評価には十分参考になることがわかる。

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

1) BPO を添加した小麦粉加工食品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各種小麦粉加工食品 (パン及びパウンドケーキ、クッキー、うどん) 中のベンゼン残存量を調べた。

小麦粉へのBPO添加量は、現行基準の食品添加物製剤の希釈過酸化ベンゾイル (BPO含量 22%) を使用して使用基準値の半分 (0.15g/kg) を添加した場合及び使用基準値 (0.30g/kg) を添加した場合にあわせて 33 mg/kg, 66 mg/kg に設定した。また、パンについては、BPO 含量 35%の希釈過酸化ベンゾイルを使用基準値 (0.30g/kg) で添加したときに相当する、105 mg/kg 添加についても検討した。

BPO を添加した食パンを分析したところ、BPO 無添加パンからはベンゼンは検出されなかったが、33 mg/kg, 66 mg/kg, 105 mg/kg のBPO添加パンから、それぞれ 3.6 ng/g, 5.0 ng/g, 9.2 ng/g のベンゼンが検出された (Fig. 6-1)。

また、バターケーキの分析では、BPO 無添加バターケーキのベンゼン含量は 0.7 ng/g であったが、33 mg/kg, 66 mg/kg のBPO添加バターケーキから、それぞれ 3.9 ng/g, 9.4 ng/g のベンゼンが検出された (Fig. 6-2)。クッキーでは、BPO 無添加のベンゼン含量は 0.6 ng/g であったが、33 mg/kg, 66 mg/kg のBPO添加クッキーから、それぞれ 1.3 ng/g, 2.5 ng/g のベンゼンが含まれていた (Fig. 6-3)。

うどんを分析した場合、BPO 無添加うどんのベンゼン含量は 0.4 ng/g であったが、33 mg/kg, 66 mg/kg のBPO添加うどんから、それぞれ 7.3 ng/g, 13.5 ng/g のベンゼンが検出された (Fig. 6-4)。各食品中のベンゼン残存量はいずれもBPO添加量に対応して増加していた。

また、各食品を調製する前の BPO を添加した小麦粉や小麦粉生地中のベンゼン含量について調べたところ、いずれも、この小麦粉から調製した食品中のベンゼン含量に対する割合の 4~12%であった。

小麦粉への BPO 添加量と小麦粉加工食品中のベンゼン残存量の関係について調べたところ、BPO 添加量に応じて、食品中のベンゼン含量が増加した。

BPO は加熱により、フェニルラジカルを生成することが一般に知られている。このため、食品の調製過程において高温で加熱処理することにより、BPO の一部が分解して、フェニルラジカルを生成し、食品中のベンゼン量が増加したと考えられた。しかし、米国食品医薬品局 (FDA) ではトータルダイエツトスタディの一環として食品中の揮発性化合物の残存量を継続的にモニタリングしており、様々な食品に 1~190 ng/g のベンゼンが含まれていることを報告している。このため、本調査において明らかとなった BPO 添加食品中のベンゼン残留量は、一般的な食品中のベンゼン残留量の範囲内に含まれると考えられた。

2) BPO 添加パン及びバターケーキ中のベンゼン分布状況の調査

BPO 添加パン中のベンゼンの分布状態を調べるため、食パンの各箇所におけるベンゼン残存量を調査した (Fig. 6-5)。105 mg/kg BPO を添加した食パン 1 斤を調製し、スライスした食パンを (a) パンの外側から深さ 2 cm 以上内側の上側 3 分の 1 (Upper inside)、(b) 外側からの深さ 2 cm 以上内側のパン下側 3 分の 2 (Lower inside)、c) 外側からの深さ 2 cm までのパンの耳部分 (Crust) の 3 つの部位に分け、それぞれにおけるベンゼン

残存量を分析した。分析の結果、パンの内側の Upper inside と Lower inside のベンゼン残存量は低く、2.3~2.4 ng/g であったが、パンの耳 (Crust) には 16.8 ng/g のベンゼンが残存していた。

同様に、バターケーキの外側と内側におけるベンゼン残存量の比較を行った (Fig. 6-6)。66 mg/kg の BPO 添加バターケーキを調製し、(a) バターケーキの外側から深さ 1 cm 以上内側の部分 (Inside)、(b) 外側からの深さ 1 cm までの外側の部分 (Outside) に分け、それぞれにおけるベンゼン残存量を分析した。分析の結果、バターケーキ内部 (Inside) のベンゼン残存量は低く、5.6 ng/g であったが、バターケーキ外側 (Outside) には 11.1 ng/g のベンゼンが残存していた。

3) BPO 添加小麦粉加工食品からのベンゼン暴露量の推計

BPO 添加小麦粉から調製した小麦粉加工食品を喫食したことによるベンゼンの暴露量の推計を行った。各種小麦粉加工食品の喫食量は独立行政法人 国立健康・栄養研究所の平成 22 年度食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務報告書の表 7 食品添加物のマーケットバスケット調査データを参考にした。小麦粉加工食品中のベンゼン残存量代表値として、今回の調査において使用基準の中で最も残存量が高かった 66 mg/kg BPO 添加時のパン (5.0 ng/g) 及びバターケーキ (9.4 ng/g)、クッキー (2.5 ng/g)、うどん (13.5 ng/g) のベンゼン残存量の結果を用い、該当する食品分類に当てはめた。これらのデータをもとに 20 歳以上の一人当たりの小麦粉加工食品全体からのベンゼン推定暴露量を計算した。

食品安全委員会の化学物質・汚染物質専門

調査会清涼飲料水部会では、ベンゼンの評価結果を、発がん性を指標とした場合の発がんユニットリスク (VSD) を $2.5 \times 10^{-2}(\text{mg/kg}$ 体重/日), 非発がん毒性を指標とした場合の耐容一日摂取量 (TDI) を $18 \mu\text{g/kg}$ 体重/日としている。今回の調査結果を評価値の厳しい TDI と比較した場合、TDI に対する小麦粉加工食品全体からの暴露量の割合は 0.10% であった。また、1-6 歳、7-14 歳、15-19 歳の各年齢層の TDI に対する割合は、それぞれ 0.26%、0.18%、0.12% であり、最大でも評価値の 0.26% 以下であった。なお、算定された小麦粉加工食品からの推定暴露量は、本調査結果の使用基準最大限度における残存量を代表値として計算した結果であり、実際の暴露量は、この結果より低い数値になると予想される。このため、BPO 添加した小麦粉加工食品からのベンゼンの推定暴露量は、評価値に比べて十分に低い値であり、健康に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

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、1088 品目の香料化合物について、JECFA 規格と自主規格を比較した結果、88 品目は 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。

我が国で使用している天然香料の使用量調査研究では、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。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、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かった。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。

食品添加物の生産量統計調査を基にした摂取量の推定では、第 10 回の生産量統計を基にした指定添加物の摂取量の推定をまとめた。国民 1 人が 1 日に摂取する指定添加物量は、過去の調査結果と大きく外れるものではなく、また ADI との比較からも問題がなかった。輸入食品中の食品添加物含有量推定では、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ところ、亜硝酸ナトリウム以外は元々の量が少なく摂取量としては影響がない量にないと考えられた。既存添加物等の第 5 回の生産量統計調査では、製造用剤の出荷量

が多かった。

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では、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、ポリビニルピロリドンや、塩化コリンのような極めて吸湿性の高い化合物の場合、従来汎用されていたKBr法やペースト法では試料調整中に吸湿が生じるのに対し、ATR法は試料調製が不要のため、吸湿のない本来のスペクトルが得られることが分かった。また、ATRで測定する場合でも、結晶を粉末化するすり混ぜ時間は可能な限り短くすべきであることを示した。さらに、屈折率の異なる香料化合物を液膜法とATRで測定した場合のスペクトルの変化の程度を比較し、実際の測定においても、ATR法の原理を反映していること示すことができた。従って、食品添加物の確認試験に、ATR法を積極的に取り入れていくべきであり、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。

定量NMR法による定量用標準物質の純度分析法の確立では、食品添加物の規格試験法の精度向上を目指して、 ^1H -qNMRによるグルタミンバリルグリシン及びDKPの定量及び ^{13}C -qNMRによるフルジオキソニルの定量に関する検討を行った。その結果、 ^1H -qNMRに関する検討では、対象試料の検討において良好な真度、精度、直線性を有し、各試料の絶対定量に有効な分析法であることが判明した。本検討結果は、これらの食品添加物分析の精度並びに信頼性を更に向上させ

る知見であり、将来的な公定法における純度試験法または定量法への適用へ向けた基礎的データが得られたものと考えられた。

また、 ^{13}C -qNMRに関する検討では、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。

ICP-MS等を用いた食品添加物中の鉛分析法に関する研究では、一価の陽イオンを含む無機塩類（塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、硝酸ナトリウム）について、2 µg/g相当の鉛を添加し、Inert Sep ME-1による鉛の抽出操作を行ったところ、いずれの試料においても、平均回収率89.8~105.2%の良好な回収率が得られた。硫酸ナトリウムでは回収率が低かったが、硫酸ナトリウムに塩酸(1→4)溶液を加えた後、加熱し、半分程度に濃縮した後、蒸発した水を補った後、Inert Sep ME-1により鉛の抽出操作を行ったところ、92.6%の回収率が得られた。以上の結果