

平成18年度 食品・添加物等規格規準に関する試験検査報告書

「食品添加物の規格基準の設定及び改良並びに製造基準の改良等」について
下記表題で検討したので報告する

表 題

食用赤色104号及び105号中のヘキサクロロベンゼン規格の設定に関する検討

国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部

佐藤恭子

建部千絵

古庄紀子

棚元憲一

薬事/食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会（平成19年1月16日）における指摘により、一部修正を行った。

概要

指定添加物として使用が認められている食用赤色 104 号 (R104) 及び食用赤色 105 号 (R105) は、テトラクロロ無水フタル酸とレゾルシンから合成される。テトラクロロ無水フタル酸 (TCPA) は、不純物としてヘキサクロロベンゼン (HCB) を含み、R104 及び R105 に HCB が残留する可能性があるため、R104 及び R105 中の HCB の含有量についての規格限度値の設定が必要とされた。

そこで、R104 及び R105 中の純度試験としてのヘキサクロロベンゼンの試験法について検討した。また、HCB 摂取量について試算した結果、R104 及び R105 に HCB が $10 \mu\text{g/g}$ 混入すると仮定した場合、R104 及び R105 からの HCB の摂取量は、 $0.0004 \mu\text{g/人/日}$ であり、IPCS 指針値の 0.005% に相当し、直ちに問題となる量ではないと考えられた。さらに、過去の HCB 測定結果をもとに、規格限度値を試算した結果、R104 では $5.0 \mu\text{g/g}$ 、R105 では $6.5 \mu\text{g/g}$ が適当と考えられた。

はじめに

指定添加物として使用が認められている食用赤色 104 号 (R104, フロキシシン, Fig.1) 及び食用赤色 105 号 (R105, ローズベンガル, Fig.2) は, 有機塩素系化合物であるテトラクロロ無水フタル酸 (TCPA Fig.3) とレゾルシンから合成される¹⁾. TCPA は, 不純物として, 第一種特定化学物質及び POPs*に指定されているヘキサクロロベンゼン** (HCB Fig.4) を含んでいるため, R104 及び R105 に HCB が混入する可能性がある. 旧国立医薬品食品衛生研究所大阪支所食品試験部 (大阪支所) は, 平成 13 年度に, R104 及び R105 中の HCB 含有量実態調査を行い, ①平成 10~13 年度製品検査合格検体 (R104, R105) の計 32 検体全てから HCB が検出されたが, 平成 13 年度の 1 検体を除き, HCB 含有量は減少し, ②色素由来の HCB 一日摂取量を, 水質基準に基づいて算出した飲料水由来の HCB 摂取量と比較したところ, 非常に少ない量であったと報告した²⁾. これを受け, 厚生労働省医薬局食品保健部基準課より平成 14 年 4 月に, 事業者に対し, R104 及び R105 について, 不純物 HCB による健康被害の発現の懸念はないものと考えられるが, 製品への HCB の混入率低下へ向けての対策につき留意するよう事務連絡が出された. そのため, タール色素製造業者は, 自主基準 (限度値 20ppm) を設け, HCB の低減化を図ってきた. 一方, 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) 関係では, 厚生労働省, 経済産業省, 環境省は, 平成 18 年 3 月に, 「化学物質審査規制法第一種特定化学物質ヘキサクロロベンゼンの副生に係る対応について」を公表し, 環境への影響を最小限にとどめるために, 化審法に基づき「利用可能な最良の技術 (BAT : Best Available Technology)」の観点に立った削減レベルの設定を行い, HCB の排出削減の徹底を図ることとされた. これを受け, 専門家からなる合同委員会が設置され, 11 月に報告書がまとめられた. 以上の経緯を考慮しつつ, R104 及び R105 中の HCB 限度規格を設定するため, HCB 試験法の開発等を行ったので報告する.

実験方法

1. 試料

市販食用赤色 104 号 (R104) 1 検体及び同 105 号 (R105) 1 検体.

2. 試薬・試液

ヘキサシンは, 残留溶媒試験用を, ヘキサクロロベンゼン (HCB) は, 純度 98%以上のものを用いた. その他の試薬は試薬特級を用いた.

3. 装置

電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ (GC-ECD) : Agilent 社製 6890N (μ -ECD) を用いた.

4. GC-ECD 測定条件

カラム : InertCap 5MS/NP (ジーエルサイエンス社製), 内径 0.25mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μ m

カラム温度 : 60°C (2min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 150°C (10min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 280°C (5min)

注入口温度 : 260°C

検出器温度 : 300°C

キャリアーガス : 窒素ガス コンスタントプレスモード (25psi)

注入方式：スプリットレス（30sec）

注入量 1 μ l

5. 検液の調製

試料 0.02g を、50ml の遠心管に入れ、水 30ml を加えて溶かし、ヘキサン 10ml を正確に加え、5 分間機械振とうを行った。ヘキサン層を栓付試験管にとり、無水硫酸ナトリウム 0.5g を加えて振り混ぜ、ヘキサン層をとる、検液とした。

6. 検量線用標準液の調製

HCB 0.01g を精密に量り、ヘキサンを加えて正確に 100ml とし、この液 5 ml を正確に量り、ヘキサンを加えて正確に 50ml とし、標準原液とした。標準原液 1 ml を正確に量り、ヘキサンを加えて正確に 100ml とした。この液 1 ml、4 ml 及び 8 ml を正確に量り、ヘキサンを加えてそれぞれ正確に 10ml とし、検量線用標準液とした（10, 40, 80ng/ml）。さらに、10ng/ml の検量線用標準液 1、2 ml を正確に量り、ヘキサンを加えてそれぞれ正確に 20ml とし、検量線用標準液（0.5, 1ng/ml）とした。

7. 添加回収試験

1) 添加用標準液の作製

標準原液 2 ml を正確に量り、ヘキサンを加えて正確に 50ml とし、添加用標準液③とした（③400ng/ml）。さらに、添加用標準液③ 1 及び 2.5ml を正確に量り、ヘキサンを加えて正確に 10ml とし、添加用標準液①及び②とする（①40ng/ml, ②100ng/ml）。

2) 添加回収試験用検液の調製

色素約 0.02g を精密に量り、50ml の遠心管に入れ、水 30ml を加えて溶かし、添加用標準液 1ml を正確に加え、1 分間振り混ぜた。さらに、ヘキサン 9ml を正確に加えた後、5. 検液の調製にしたがって操作し、添加回収試験用検液とした。

3) 検量線の範囲

HCB 添加濃度 2 μ g/g 及び 5 μ g/g の場合には、検量線の範囲を 0.5~20ng/ml とし、20 μ g/g については 0.5~80ng/ml とした。

8. 共同試験による分析法の評価

5 分析機関で、R104 と R105 について HCB の添加回収試験を行った。試料は国立医薬品食品衛生研究所が配布したものをを用いた。5 機関の分析値（n=3）を用いて平均値、併行再現性（RSD_r）及び室間再現性（RSD_R）を算出した。

結果及び考察

1. 試験法の検討

大阪支所の試験法²⁾では、色素を水に溶解し、ヘキサン抽出を行い、ヘキサン層を濃縮し、分析を行っている。しかし、HCB は POPs（その多くは半揮発性有機塩素化合物のため、空气中に蒸発し拡散する）の中でも揮発性が高いため、減圧濃縮の際に揮発する可能性があると考えられた。そこで、近年、検出器の感度が向上していることを考慮し、濃縮操作を省いた試験法を検討することとした。また、抽出には、50ml の遠心管が扱い易いことから、試料量及び抽出溶媒量を大阪支所の試験法の 1/5 とした。

さらに、抽出溶媒、抽出回数等について検討を加え、最終的に、検液の調製を実験方法 5. に示す方法とした。また、報告書²⁾では、GC-ECD 及び GC-MS での結果を報告しているが、GC-ECD が高感度であること及び GC-MS は食品添加物公定書には収載されていないことを考慮し、GC-ECD を用いた試験法を作成した。当部で使用した GC-ECD 装置において、標準液のクロマトグラムから S/N 比が 3 を示す HCB 量を求めて得られた検出下限は 0.05 μ g/g であった。検量線の相関係数は、0.99999 と良好な値を示した。

大阪支所の試験法を Scheme 1, 本試験法を Scheme 2 に示す。大阪支所の試験法と本試験法の違いは、主に濃縮操作である。そこで、R104 に 5 μ g/g の HCB を添加した試料について、濃縮前のヘキサン抽出液及び濃縮後のヘキサン抽出液を分析し、濃縮操作による回収率を求めたところ、Table 1 に示すように、97.4~99.4%であり、両試験法での結果に大きな差はなかった。しかし、ヘキサン抽出液を濃縮乾固した場合には、回収率は 59%と減少し (data not shown)、濃縮操作では乾固させないよう注意が必要であると考えられた。

2. 添加回収試験

添加回収試験の結果を Table 2 に示した。各色素に対して HCB を 2 μ g/g, 5 μ g/g 及び 20 μ g/g 添加したときの平均回収率は、88.1~104.3%と良好であった。Fig.5 に HCB の標準液、HCB 無添加の R104 及び R105 のクロマトグラムを示した。

3. HCB の一日摂取量

次に、安全性を考えるための手がかりとして、R104及びR105からのHCB摂取量について検討した。

IPCS (国際化学物質安全性計画) においては、悪性新生物以外の影響を指標とした場合のTDIは、0.17 μ g/kg体重/日である。一方、悪性新生物を指標とする場合、発ガン性投与量TD₅ (i.e., the intake associated with a 5% excess incidence of tumours in experimental studies in animals.) に基づき、健康についての指針値 (health-based guidance value) を0.16 μ g/kg体重/日としている。

マーケットバスケット方式による食品添加物の一日摂取量の推定³⁾ (平成 15 年度) によると R104 の一日摂取量は 0.015mg/人/日であったが、R105 は検出されなかった。一方、生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定⁴⁾ (平成 14, 15 年度) によると、R104 及び R105 の一日摂取量はそれぞれ 0.036 及び 0.004mg/人/日となっている。HCB が R104 及び R105 に 10 μ g/g 混入すると仮定し、生産流通調査方式による摂取量をもとに HCB 摂取量を求めると、

$$(\text{HCB の推定摂取量}) = (0.036+0.004) (\text{mg/人/日}) \times 10 (\mu\text{g/g}) = 0.0004 (\mu\text{g/人/日})$$

となる。つまり、HCB が 5 μ g/g 混入すると仮定した場合は 0.0002 μ g/人/日、1 μ g/g 混入すると仮定した場合は、0.04ng/人/日となる。

HCB の混入を 10 μ g/g とし、平均体重を 50kg とすると、

$$\begin{aligned} \text{IPCS 指針値との比} &= 0.0004 (\mu\text{g/人/日}) / (0.16 (\mu\text{g/kg 体重/日}) \times 50 (\text{kg/人})) \times 100 \\ &= 0.005 (\%) \end{aligned}$$

以上より、R104 及び R105 に HCB が 10 μ g/g 混入すると仮定した場合でも、R104 及び R105 からの HCB の摂取量は、IPCS 指針値の 0.005%に相当し、直ちに問題となる量ではないと考えられる。

参考のため、食品全体からと色素からの HCB 摂取量の比較を行った。

国立医薬品食品衛生研究所食品部の報告⁵⁾によると、HCBは主に魚介類から摂取されており、2005年度の日摂取量は $0.021\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ であった。食品からのHCB摂取量に対するR104及びR105中のHCBの割合(%)を求めると、

$$0.0004(\mu\text{g}/\text{人}/\text{日})\div 0.021(\mu\text{g}/\text{人}/\text{日})\times 100=1.9(\%)$$

R104及びR105からのHCBの摂取量は、HCBが $10\mu\text{g}/\text{g}$ 混入するとした場合、食品からのHCB摂取量全体からの1.9%にあたると思われる。

4. HCB規格限度値の試算

大阪支所による平成11～13年度製品検査合格検体のHCB分析結果(GC-ECDの分析結果、平成13年度のHCB含有量 $24.92\mu\text{g}/\text{g}$ の1検体を除く15検体)と、事業者から提出された平成13～18年度の製品(25検体)のHCB分析結果をTable 3に示す。また、参考のため、Table 4に、大阪支所による平成10年度製品検査合格検体のHCB分析結果を示す。平成11年度以降の製品は、平成10年度に比べ、HCB含有量は抑えられている。

IPCS指針値の0.005%の摂取量に相当する $10\mu\text{g}/\text{g}$ よりも製品検査の実測値は低いこと、HCBはPOPsであることからできるだけ低く抑えることが必要であることから、HCB規格限度値は、流通実態(検査の実測値)を踏まえて定めることが妥当と考えられた。そこで、HCB含有量の高い平成10年を除き、平成11年から平成18年の製品中のHCB含有量をもとに、新医薬品(原薬)の純度試験における不純物の規格限度値(ICH Q6A)のガイドラインを参考に、HCBの規格限度値を「不純物含量の〔平均値+信頼区間の上限(ロット分析データの標準偏差の3倍)〕」として試算を行った。

その結果、R104のHCBの規格限度値としては $5.0\mu\text{g}/\text{g}$ 、R105については $6.5\mu\text{g}/\text{g}$ が適当であると考えられた。HCBの基準限度値 5又は $6.5\mu\text{g}/\text{g}$ の場合の試験法を別紙に示す。

5. 共同試験

本試験法の信頼性を確認する目的から、5試験機関で添加回収試験を実施した。HCB添加濃度 $2\mu\text{g}/\text{g}$ 及び $5\mu\text{g}/\text{g}$ の回収率とそれらの平均値、併行再現性の相対標準偏差(RSD_r , %), 室間再現性の相対標準偏差(RSD_R , %)をTable 5に示した。また、室間再現精度は濃度の変数になっていることが報告されていることから⁶⁾、HORRAT値(実測値から求めた RSD_R とHorwitzの式($RSD_R\%(\text{predicted})=2C^{-0.1505}$)から予測した $RSD_R(\text{predicted})$ との比)をTable 5に示した。平均回収率は、98.2%(R104, $2\mu\text{g}/\text{g}$)～103.7%(R105, $2\mu\text{g}/\text{g}$)と良好であった。 RSD_r は、2.9%(R104, $5\mu\text{g}/\text{g}$)～6.0%(R104, $2\mu\text{g}/\text{g}$)であった。 RSD_R は、4.2%(R105, $5\mu\text{g}/\text{g}$)～9.3%(R104, $2\mu\text{g}/\text{g}$)であった。HORRAT値は1未満と室間再現性は良好であった。以上から、本分析法の妥当性が確認された。

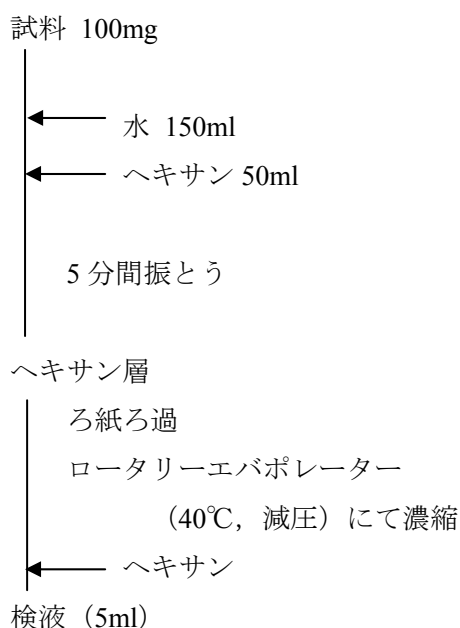
まとめ

旧国立医薬品食品衛生研究所大阪支所食品試験部²⁾の報告を参考に、より簡便なHCB試験を検討した。R104及びR105中のHCB(添加量2, 5, $20\mu\text{g}/\text{g}$)の平均回収率は88.1～104.3%と良好であった。また、HCB摂取量について試算したところ、R104及びR105にHCBが $10\mu\text{g}/\text{g}$ 混入すると仮定した場合、R104及びR105からのHCBの摂取量は、 $0.0004\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ であり、IPCS指針値の0.005%に相当し、直ちに問題となる量ではないと考えられた。さらに、これまでのHCB定量結果をもとに規格限度値を試算

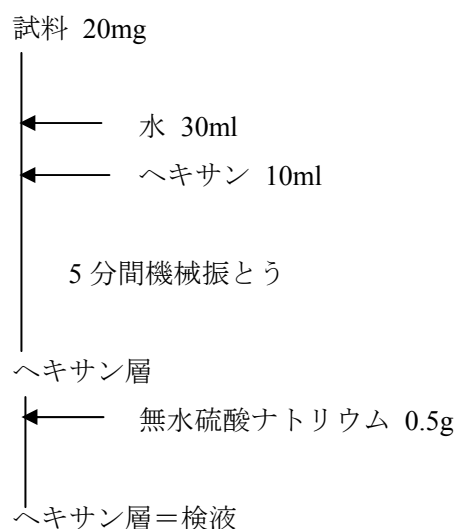
したところ、R104は5.0 μ g/g、R105は、6.5 μ g/gが適当であると考えられた。また、5分析機関による共同試験により試験法の妥当性が確認された。

参考文献

- 1) 第7版 食品添加物公定書解説書，廣川書店，D-718（1999）
 - 2) 海野ら，食用赤色104号及び105号中の不純物ヘキサクロロベンゼン含有量実態調査．平成13年度食品等試験検査費（2002）
 - 3) 四方田ら，マーケットバスケット方式による保存料と着色料の摂取量調査．平成15年度食品等試験検査費（2004）
 - 4) 四方田ら，国際的動向を踏まえた食品添加物の規格の向上に関する調査研究（資料）生産量統計を基にした食品添加物の摂取量の推定．平成17年度厚生労働科学研究費補助金報告書 食品の安全性高度化推進研究事業（2006）
 - 5) 松田ら，食品中の有害物質などの摂取量の調査及び評価に関する研究．平成17年度 厚生労働科学研究費（2006）
 - 6) Horwitz, W., Kamps, L. R., Boyer, K. W., Quality control. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. J. AOAC, 63, 1344-1354 (1980)
- * 環境省 保健・化学物質対策：<http://www.env.go.jp/chemi/pops/index.html>
- ** 環境省 化学物質の環境リスク評価 第1巻（平成14年3月）ヘキサクロロベンゼンの評価：
<http://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/chap01/03/32.pdf>
- IPCS：<http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg107.htm#PartNumber:3>
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc195.htm#SectionNumber:1.10>
- ATS DR：<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp90.pdf>



Scheme 1 検液調製法（大阪支所試験法）



Scheme 2 検液調製法（本試験法）

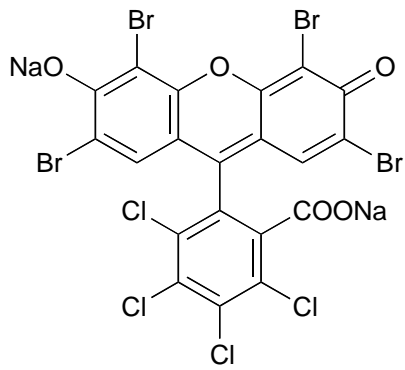


Fig.1 食用赤色104号 (フロキシソ)

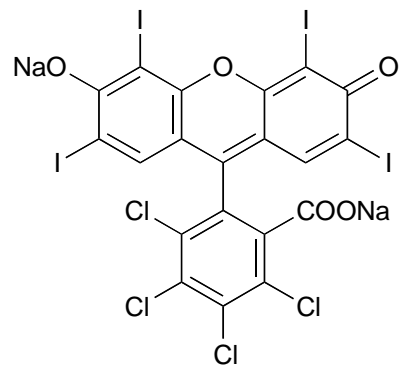


Fig.2 食用赤色105号 (ローズベンガル)

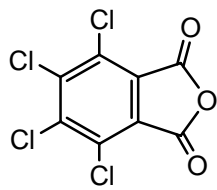


Fig.3 テトラクロロ無水フタル酸 (TCPA)

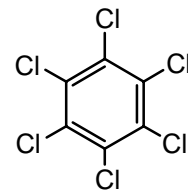


Fig.4 ヘキサクロロベンゼン (HCB)

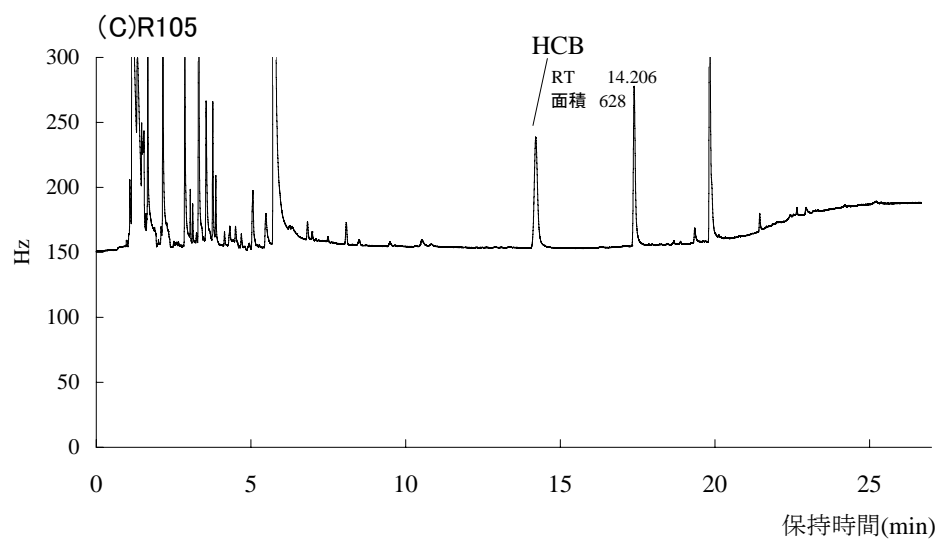
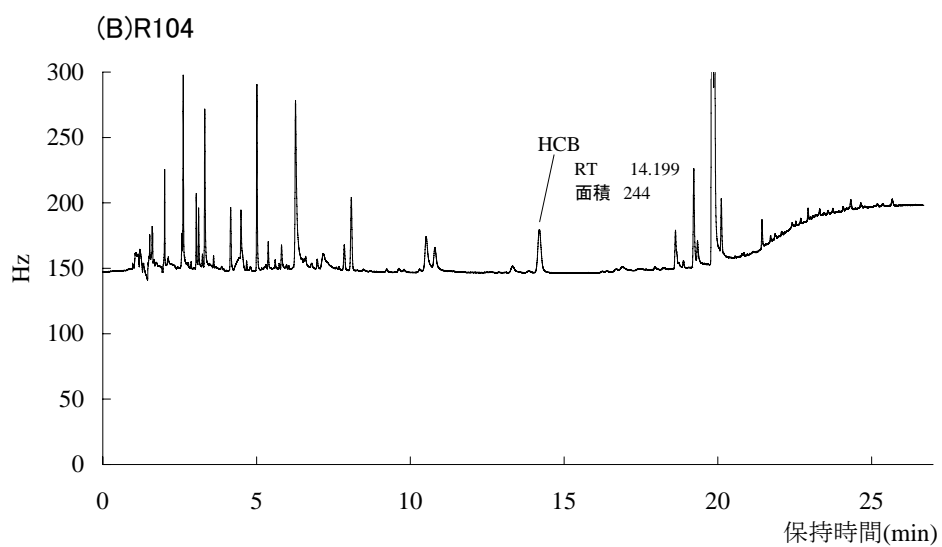
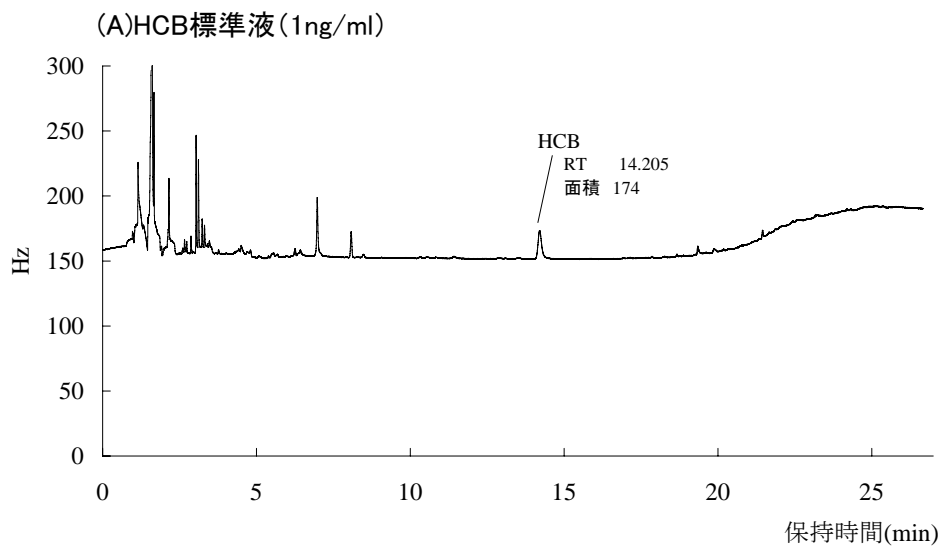


Fig.5 GC-ECDクロマトグラム

Table 1 HCB 定量値*に対する濃縮操作の影響

濃縮前 $\mu\text{g/g}$	濃縮後 $\mu\text{g/g}$	回収率 %
5.77	5.62	97.4
5.71	5.68	99.4
6.25	6.20	99.3
6.24	6.12	98.2
6.20	6.07	98.0

*R104 約 0.02g に HCB 添加用標準液 (100ng/ml) 1ml を添加

Table 2 R104 及び R105 からの HCB の回収率

試料	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)
R104	2	88.1 \pm 2.6
	5	89.4 \pm 3.4
	20	101.2 \pm 1.8
R105	2	104.3 \pm 9.9
	5	103.8 \pm 2.2
	20	99.2 \pm 3.6

Table 3 規格限度値の推定

	R104 HCB 含量 ($\mu\text{g/g}$)	R105 HCB 含量 ($\mu\text{g/g}$)
大阪支所での検査	0.56	5.83
平成 11 年度	0.49 2.28 0.71 0.44 0.69 5.19	
平成 12 年度	0.67 0.26 0.27 0.21	0.84
平成 13 年度*	0.36 0.74 0.41 0.47	0.14
事業者 (自主検査)	0.57	
平成 13 年	0.26 0.18 0.31 0.09 0.40	
平成 14 年	0.40 1 > (定量下限未満) **	2.20
平成 15 年	0.52 0.63 0.59 0.50 0.40	2.40
平成 16 年	0.13	
平成 17 年	2.95 0.62 0.70 0.5 > (定量下限未満) ** 0.40 1.40 1.40 2.10 1 > (定量下限未満) **	1.94 1.07 0.61
平成 18 年	7.00 1 > (定量下限未満) **	0.42 0.18 0.30
A 平均値	0.97	1.45
B 信頼区間の上限 (3σ)	4.03	5.00
規格限度値 [A+B]	5.00	6.45

*24.92 $\mu\text{g/g}$ は除外

**定量下限として計算

Table 4 大阪支所における平成 10 年度の色素検体中の HCB 含量実態調査

R104 (μ g/g)	R105 (μ g/g)
32.12	5.06
32.36	9.78
32.73	
30.95	
28.54	
31.60	
0.72	
1.29	
0.82	
20.24	

Table 5 5機関による共同試験結果

添加濃度 試験機関	R104						R105					
	回収率(%)						回収率(%)					
	2μg/g			5μg/g			2μg/g			5μg/g		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	90.9	101.4	115.5	104.1	106.4	113.3	107.0	104.3	114.5	110.3	99.6	105.8
B	84.5	87.0	90.1	90.7	84.8	88.4	95.3	99.9	103.7	103.1	101.8	104.8
C	105.3	107.7	107.8	101.0	98.6	100.1	105.6	102.1	102.1	102.6	104.2	96.8
D	103.8	98.7	99.8	101.9	105.2	101.8	95.6	107.0	111.6	100.4	109.9	106.6
E	93.3	92.1	94.9	102.0	101.1	98.1	103.2	102.1	102.0	98.3	96.3	100.5
平均値(%)		98.2			99.8			103.7			102.7	
併行再現性 (RSD _R ,%)		6.0			2.9			4.7			3.7	
室間再現性 (RSD _R ,%)		9.3			7.7			5.0			4.2	
HORRAT値 ^{a)}		0.6			0.7			0.5			0.7	

^{a)} HORRAT 値 = RSD_R%(observed) / RSD_R%(predicted) . RSD_R%(predicted) = 2C^{-0.1505}, C=実測値の平均値

HCB 分析法案

(8) ヘキサクロロベンゼン 5 μ g/g 以下 又は 6.5 μ g/g 以下

本品約 0.02g を精密に量り、50ml の遠心管に入れ、水 30ml を加えて溶かし、ヘキサン 10ml を正確に加え、5 分間振り混ぜる。ヘキサン層を栓付試験管にとり、無水硫酸ナトリウム 0.5g を加えて振り混ぜ、ヘキサン層をとる。別にヘキサクロロベンゼン 0.01g を精密に量り、ヘキサンを加えて正確に 100ml とし、この液 5 ml を正確に量り、ヘキサンを加えて正確に 100ml とし、この液 1 ml を正確に量り、ヘキサンを加えて正確に 100ml とする。この液 1 ml、1 ml、2 ml、3 ml 及び 6 ml を正確に量り、ヘキサンを加えてそれぞれ正確に 50ml、10ml、10ml、10ml、10ml とし、標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ 1 μ l ずつ量り、次の操作条件でガスクロマトグラフィーを行う。次に標準液のヘキサクロロベンゼンのピーク面積を測定し、検量線を作成する。この検量線と検液のヘキサクロロベンゼンのピーク面積から検液中のヘキサクロロベンゼンの量を求める。

操作条件

検出器 電子捕獲型検出器

カラム 内径 0.25 mm、長さ 30m のケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用 5%ジフェニル 95%ジメチルポリシロキサンを 0.25 μ m の厚さで被覆したもの。

カラム温度 60°C で 1 分間保持し、その後昇温し、280°C に到達後、5 分間保持する。昇温条件は、ヘキサクロロベンゼンのピークが他のピークと分離し、10~15 分後に現れるように調整する。

注入口温度 260°C

検出器温度 300°C

注入方式 スプリットレス

キャリアーガス 窒素

流量 ヘキサクロロベンゼンのピークが 10~15 分後に現れるように調整する。

【試薬試液の項】

ヘキサクロロベンゼン C_6Cl_6 本品はヘキサクロロベンゼン 98%以上を含む。

融点 本品の融点は 226°C である。