

## 「酵素処理フラボノイドの定量法について」の考察

東洋精糖株式会社  
研究開発部

酵素処理ステビアの定量法における新たな考え方（元の配糖体の測定、付加糖をアミラーゼ処理後に測定）を基本に以下の酵素処理フラボノイドについても同等な考えの基に定量が可能かどうかをこれまでの情報に基づき検討致しました。

- ① 酵素処理ルチン
- ② 酵素処理イソケルシトリン
- ③ 酵素処理ヘスペリジン
- ④ 酵素処理ナリンジン

その結果、④を除き基本的に可能と考えられます。しかし、多くのフラボノイドの $\alpha$ -グルコシル配糖体がアミラーゼによって完全に元の配糖体まで加水分解されるには構造によって難易度があるため、使用酵素、作用条件の検討が必要と思われる。

なお、製造法が同じ酵素処理ということで、甘味料、酸化防止剤、着色料等々を同じ方法で定量するのが良いのかどうかということも検討してみる必要があると思われる。

自主規格第三版に載っている各フラボノイドの定量法は大別すると下記の2通りになります。

- a.  $\alpha$ -グルコシル配糖体を含め計る方法
- b. 元のフラボノイド含有量を計る方法

a法は酵素処理ステビアの定量法と同様に新に生成した $\alpha$ -グルコシル配糖体を含め測定しています。一方、b法では単に含まれる配糖体を大元の出発物質に換算して算出しています。

酵素処理フラボノイドの効力はほぼ含まれる元の配糖体の比率に依存するため、測定が容易なb法は酵素処理フラボノイドの定量法として実用的な方法と思われる。

以上

## 「酵素処理ステビアの定量法の検討」

東洋精糖(株)  
日本製紙ケミカル(株)

酵素処理ステビアの定量法について、次の項目について検討いたしましたので結果を報告いたします。

1. ジアゾメタンを使わないステビオール配糖体の定量法の検討。
2. 付加しているグルコースの数にかかわらず、配糖体が吸着樹脂に吸着していることを検証する。
3. 配糖体中の糖定量

検討した方法は有効であることが確認でき、第三版既存添加物自主規格で示されている方法と置きかえることも可能と思われました。しかしステビオール配糖体の測定値は、第三版自主規格の方法で得たものとは差があり、運用面を考えるとさらに検討を続けることが必要と思われます（現在、業界では、第三版自主規格の方法で得た含量値を取引及び食品製造時の指針として使用しているため）。

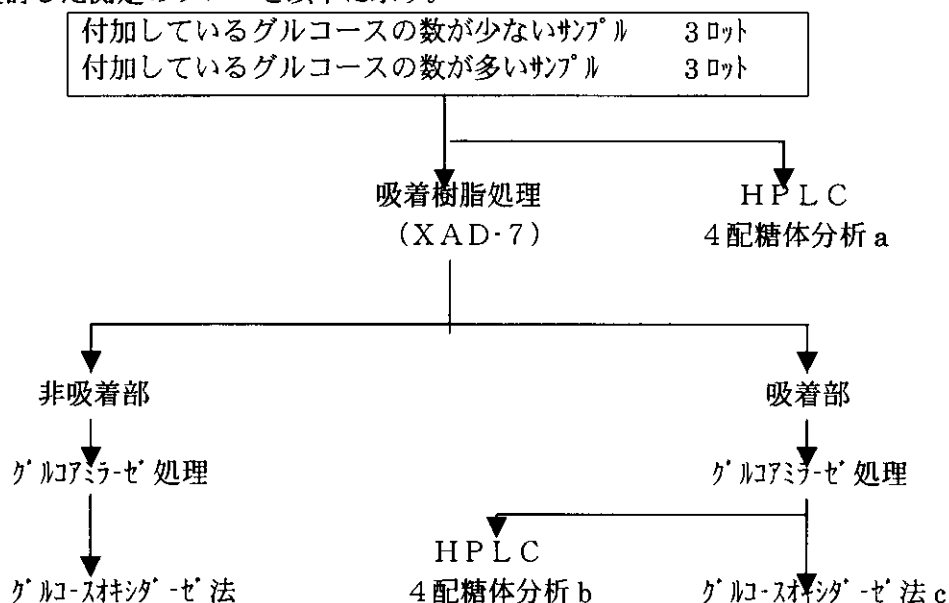
以下に検討結果を示します。

### 1. ジアゾメタンを使わないステビオール配糖体含量の定量法の検討

ステビオール配糖体の定量法を、現行のイソステビオールからステビオシドへの換算値と付加糖の和で求める方法（ジアゾメタンを使うメチル化処理を含むガスクロマトグラフィーを利用）から、 $\beta$ -グルコシルステビオール配糖体（4配糖体）と付加糖の和で求める方法（液体クロマトグラフィーを利用）への変更を検討した。

\* 4配糖体とはステビオシド、レバウジオシドA、レバウジオシドC、ズルコシドAをいう。

検討した測定の流れを以下に示す。



操作条件

- ・ HPLC4 配糖体分析条件  
     第三版自主規格の「ステビア抽出物」の定量法に準拠
- ・ グルコースオキシダーゼ法  
     グルコース CII-テストワコーを使用。

測定結果：

(1) 付加しているグルコースの数が多いサンプル

単位 (%)

項目 \ サンプル ロット番号		T I 1 8	T S 0 2	T S 0 5
4 配糖体含量( $\beta$ -G)= a		5.50%	5.95%	4.19%
糖定量値 c	1	37.88	40.91	47.70
	2	39.71	41.26	48.04
	3	39.82	41.59	48.27
	4	40.62	42.61	48.38
	5	40.73	42.71	48.38
	6	40.84	43.84	49.06
	Av.	39.93	42.16	48.30
4 配糖体含量 = b	1.	46.10	43.60	39.41
b-a	1.	40.60	37.65	35.22
$\alpha$ -グルコシルステviol配糖体 = b-a+c	Av.	80.53	79.81	83.52
ステviol配糖体 b+c		86.03	85.76	87.71
自主規格法ステviol配糖体		96.73	96.88	96.62

非吸着部		3.57	3.62	3.88
------	--	------	------	------

## (2) 付加しているグルコースの数が少ないサンプル

単位 (%)

項目	サンプル名 ロット番号	670213	670218	670236
4配糖体含量( $\beta$ -G) a		4.65	4.03	4.40
糖定量値 c	1	26.83	28.37	28.02
	2	28.23	28.58	28.42
	3	28.16	30.11	29.14
	4	27.11	28.67	29.03
	5	27.91	30.82	28.80
	6	27.79	29.41	29.32
	A v	27.67	29.32	28.79
4配糖体含量 b	1	61.24	60.12	60.00
	2	61.12	60.16	59.77
	3	61.41	59.19	59.54
	4	61.28	59.79	60.23
	5	60.96	60.12	60.50
	6	60.67	59.54	59.86
	A v	61.11	59.82	59.98
糖付加していた4配糖体 b-a	1	56.60	56.09	55.60
	2	56.47	56.13	55.37
	3	56.76	55.15	55.14
	4	56.63	55.76	55.84
	5	56.31	56.09	56.10
	6	56.02	55.51	55.46
	A v	56.47	55.79	55.59
$\alpha$ -グルコシルステピ オール配糖体 b-a+c	1	83.43	84.46	83.62
	2	84.70	84.71	83.79
	3	84.92	85.26	84.28
	4	83.74	84.43	84.87
	5	84.22	86.91	84.90
	6	83.81	84.92	84.78
	A v	84.14	85.11	84.38
ステピオール配糖体 b+c	A v	88.78	89.14	88.77
自主規格法によるステピ オール配糖体		90.86	90.97	91.10

非吸着部		5.13	6.38	7.10
------	--	------	------	------

この方法により測定されたステピオール配糖体の値は、自主規格による方法よりも1.83~11.12%低い値となったが、再現性はあることが確認できた。

2. 付加しているグルコースの数にかかわらず、配糖体が吸着樹脂に吸着していることを検証する。

第三版自主規格「 $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア」の定量法を用い、付加しているグルコースの数の違う6検体の試料につき試験し、回収率を確認した。回収率は全て良好な値を示し、配糖体は、付加しているグルコースの数にかかわらず吸着樹脂に吸着していることを確認できた。

(1)付加しているグルコースの数が多いタイプ (%)

項目 サンプル	遊離糖	ステビオール配糖体		回収率(遊離糖+ステビオール配糖体)
		配糖体中の糖	ステビオール	
TI1810200	3.26	78.37	17.97	96.34
TI0510200	3.37	79.01	17.37	96.38
TS0210200	3.04	74.96	19.31	94.27

(2)付加しているグルコースの数が少ないタイプ (%)

項目 サンプル	遊離糖	ステビオール配糖体		回収率(遊離糖+ステビオール配糖体)
		配糖体中の糖	ステビオール	
TI1710400	3.07	69.55	25.51	95.06
TR2010400	2.28	71.95	26.51	98.46
TR2110400	3.29	71.69	26.18	97.87

遊離糖+ステビオール配糖体の和が元のサンプル量にほぼ等しいことから、この範囲では付加しているグルコースの数の多寡にかかわらず配糖体は吸着樹脂に吸着していると考えられる。

3. 配糖体中の糖定量

$\alpha$ -結合で付加した糖(酵素処理で付加した糖)のみを測定するため、次の条件でグルコアミラーゼ処理し生成したグルコースを、グルコースオキシダーゼ法と液体クロマトグラフ法で分析し、糖定量法として利用できることを確認した。

<グルコースアミラーゼ処理条件>

使用酵素: グルクザイム NL4.2 (天野エンザイム社製) 80  $\mu$ L/試料 200mg

反応条件: pH5.0、60 $^{\circ}$ C、一晩(約16時間)

・グルコースオキシダーゼ法

グルコースCII-テストワコーを使用。

・HPLC法

Column: Shodex Asahipak NH2P-50(4.6mm  $\phi$   $\times$  250mm)

移動相: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN=20/80, 流速: 1ml/min, 検出: Shodex RI-71, Column

temp: 35 $^{\circ}$ C

結果: (数値は測定値 $\times$ 0.90) %

	TI18	TS02	TS05
グルコ-スチヂ-ゼ法	39.93	42.16	48.30
HPLC法	37.38	39.46	45.59
差	2.55	2.70	2.71

以上

# α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア

α-Glucosyltransferase treated stevia

酵素処理ステビア

- 定義** 本品は、「ステビア抽出物」から得られた、α-グルコシルステビオシドを主成分とするものである。
- 含量** 本品を乾燥したものは、ステビオール配糖体として80.0%以上を含む。未反応のステビオール配糖体は15.0%以下である。
- 性状** 本品は白～淡黄色の粉末、薄片または粒で、においはないかわずかに特有のにおいがあり、清涼な甘味がある。

**確認試験** 本品約0.5gを量り、水100mlに溶かし、この溶液を二分する。一方はそのまま未反応のステビオール配糖体定量法に従って操作し、ステビオシドまたはレバウジオシドAのピークの後方にピーク群がある事を確認する。他方の液には、「グルコアミラーゼ」を本品100mgに対して1,800単位添加し、55℃で0.5時間処理する。この液を未反応のステビオール配糖体定量法に従って操作したとき、ステビオシドまたはレバウジオシドAのピークより後方に現れるピーク面積が減少し、またステビオシドまたはレバウジオシドA、あるいはステビオシドとレバウジオシドAのピーク面積の合計が増大する。ただし、ステビオシド及びレバウジオシドAのピークの保持時間の確認には、定性用ステビオシド、定性用レバウジオシドAを用いる。

**純度試験** (1) 重金属 Pbとして10μg/g以下 (2.0g, 第2法, 標準液 鉛標準液2.0ml)

(2) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として2.0μg/g以下 (1.0g, 第3法, 装置B)

**乾燥減量** 6.0%以下 (1.0g, 105℃, 2時間)

**強熱残分** 1.0%以下 (1.0g)

**定量法** (1) 未反応のステビオール配糖体定量法

本品約2.0gを量り、水100mlに溶かし、この溶液を正確に二分する。一方は水で正確に4倍希釈し、以下「ステビア抽出物」の定量法を準用し、未反応のステビオール配糖体含量を求める。(a)%

(2) β-グルコシルステビオール配糖体の定量法

(1)で二分した他方の溶液は、この溶液を吸着用樹脂(配糖体用)50mlを用いて作った直径約2.5cmの樹脂柱に注ぎ、1分間に3ml以下の速さで流出させ、次いで水250mlで洗浄する。次に、50vol%エタノールを1分間に3ml以下の速さで通液し、吸着されている成分を溶出する。この溶出液を約半量まで濃縮してアルコール分を除去し、水を加えて全量を約180mlとする。「グルコアミラーゼ」を本液に対して1,800単位添加し、55℃で0.5時間反応させ、その後、水を加えて正確に200mlとする。この液を未反応のステビオール配糖体定量法に従って操作し、元になるβ-グルコシルステビオール配糖体含量を求める。(b)%

(3) 配糖体中の糖定量法

(2)で「グルコアミラーゼ」処理した液は、水を用いて同様の方法で処理した液をブランクとし、市販のグルコース測定キット(ムタロターゼ・GOD法)により、グルコース量を求める(Fmg/ml)。

配糖体中の糖量 (c)% =  $F \times 200 \times 0.9 \times 100 / [1000 \times (\text{試料の採取量}/2)]$

F: 得られたグルコース量 (mg/ml)

(4) ステビオール配糖体含量

次の計算式によりステビオール配糖体含量を求める。

ステビオール配糖体含量 (%) = (b)% + (c)%

平成15年2月

第二部会（着色料）既存添加物自主規格案検討報告書  
－「第三版自主規格」の見直し－

研究年月日 : 平成14年4月～平成15年2月  
研究者名 : 日本食品添加物協会 第二部会  
天然色素三色会（大阪化学合金（株）、キリヤ化学（株）、グリコ栄養食品（株）、三栄源エフ・エフ・エフ株式会社、仙波糖化工業（株）、台糖（株）、（株）第一化成、ヤエガキ醗酵技研株式会社）及び、日本カラメル工業会（天野実業（株）、池田糖化工業（株）、昭和化学工業（株）、仙波糖化工業（株）、森田フードシステム（株））

自主規格第三版 フラボノイド系着色料の確認試験における酢酸鉛代替検討の件

目的：規格試験における鉛化合物の代替について検討する。

鉛化合物は、現時点有害試薬と指定されていないが、労働安全衛生法第57条（令第18条）に、名称等表示すべき有害物とされている。

日本食品添加物協会 第二部会（着色料）としては、既存品添加物及び一般飲食品添加物として自主規格化されている、フラボノイド系着色料：アルカネット色素、カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素、ペカンナッツ色素、チコリ色素について、確認試験の見直し検討を実施している。

フラボノイド系着色料の分析方法を調査し、規格化されている酢酸鉛による沈殿法の酢酸鉛を使用しない確認方法を検討することを本年度の目的とした。

フラボノイド系着色料であるピーナッツ色素においては、流通実態が無いことと、酢酸鉛試験法を導入していないため除外した。

【参考資料 A】 第三版 既存添加物 自主規格 平成14年11月 日本食品添加物協会  
アルカネット色素、カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素、ピーナッツ色素、ペカンナッツ色素、（一般飲食物添加物 チコリ色素）

検討方法：

カカオ色素のようにアントシアニンの重合物を主成分とされているものや、タマネギ色素のように主成分とされているクエルセチンが微量にしか存在されていないもの等、フラボノイド系着色料については、主色素成分の特定されていないものが多い。そのため、フラボノイド系化合物の定性分析について試験法の調査を実施し、確認方法への利用を検討した。

#### 検討試験法（フラボノイド確認試験）

##### ① 塩酸－イソアミルアルコール反応

（各色素水溶液に 4mol/l 塩酸を添加し、イソアミルアルコールを加え分配したとき、沈殿の有無を調べる。検液 5ml に対し 4mol/l 塩酸 5ml 添加し、ついでイソアミルアルコール 5ml 添加し攪拌後放置）

##### ②塩酸－ホルマリン反応

（各色素水溶液に、Steasny 試薬（塩酸 10ml、30%ホルマリン 20ml、水 5ml の混液）を添加し、沈殿の有無について調べる。検液 5ml に Steasny 試薬 5ml 添加し攪拌後室温にて放置）

##### ③塩化亜鉛（pH3.0）反応

（5%塩化亜鉛（pH3.0）水溶液（塩化亜鉛 1g を秤量し、水 19g を加え、2 倍希釈塩酸で pH3.0 に調整）と各色素溶液と反応させ沈殿の有無を調べる。検液 5ml に対し試液 100  $\mu$ l 添加し攪拌後室温にて放置）

試験結果については別紙にて報告

【参考資料 B】

また、褐色系着色料として既に「食品添加物公定書 第7版」に記載されているカラメルⅠ、カラメルⅡ、カラメルⅢ、カラメルⅣとの比較試験を日本カラメル工業会と共同で確認した。

【参考資料 C】

結果：今回検討した試験法の中で②塩酸－ホルマリン反応による確認試験法の可能性が高く、鉛試験法の代替案として採用する方向で検討することとした。詳細については色素毎に報告する。（別紙 試験データ 1～7）

今後の検討課題：

褐色系の着色料においては、先に記したように、主成分の特定が不十分である。

今後の課題として、原体の確認試験法の確立及び、各色素の定性分析が必要となる。

これは、食品中からの分析方法にも関係するが、カラメルとの違いも視野において各褐色系着色料の定性分析の確立が急務である。

また、ホルマリンの有害性についても今後の課題として残るため、引き続き確認試験法改善の検討課題とした。



## 新規規格設定

### 試薬・試液の設定

〈試薬〉 Steasny 試薬：塩酸 10ml, 30%ホルマリン 20ml 及び水 5ml の混液

#### 着色料「アルカネット色素」の規格改定の件

##### 【アルカネット色素】

1. 目的： アルカネット色素の確認試験（3）は、「(1)の溶液に、酢酸鉛溶液（1→20）を加えるとき、紫～暗紫色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

##### 2. 結果

アルカネット色素の規格改定内容

**確認試験（3）を削除する。**

理由：本品は、アルカニンを主成分としているため、確認試験（5）において「本品の表示量から、色価 20 に換算して 2g に相当する量を取り、エタノール 10ml を加えてかき混ぜた後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離して得られる上澄み液を検液とする。検液 2  $\mu$ l を量り、対照液を用いず、アセトニトリル/0.6vol% 酢酸混液（9：1）を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行うとき、 $R_f$  値が 0.4～0.7 の範囲に 2 個以上の赤紫色スポットを認める。ただし、薄層板は、担体として薄層クロマトグラフィー用オクタデシルシランを 110℃で 1 時間乾燥したものを使用する。展開溶媒の先端が原線より約 10cm の高さに上昇したとき展開をやめ、風乾した後、観察する。」と規定しているため、確認試験（3）の必要性が低いものと判断した。

以上

#### 着色料「カカオ色素」の規格改定の件

##### 【カカオ色素】

1. 目的： カカオ色素の確認試験（4）は、「本品の表示量から、色価 50 に換算して 0.4g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に酢酸鉛溶液（1→20）を 2～3 滴加えて放置するとき、暗褐～褐色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

##### 2. 結果：

カカオ色素の規格改定内容

(4)「本品の表示量から、色価 20 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に Steasny 試薬 5ml を加えて攪拌後、50℃20 分間加熱し、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき、暗褐～褐色の沈殿を生じる。」

##### 1. 試験データ

別紙－1 参照

本品の確認試験で、酢酸鉛溶液を用いず塩酸－ホルマリン反応（Steasny 試薬）を用

いる方法により代替可能と考えられる。

以上

#### 着色料「カキ色素」の規格改定の件

##### 【カキ色素】

1. 目的： カキ色素の確認試験（4）は、「本品の表示量から、色価 20 に換算して 0.5g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に酢酸鉛溶液（1→20）を 2～3 滴加えて放置するとき、黒褐色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

3. 結果：

カキ色素の規格改定内容

（4）「本品の表示量から、色価 20 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に Steasny 試薬 5ml を加えて攪拌後、50℃20 分間加熱し、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき、暗褐～褐色の沈殿を生じる。」

2. 試験データ

別紙－2 参照

本品の確認試験で、酢酸鉛溶液を用いずに塩酸－ホルマリン反応（Steasny 試薬）を用いる方法により代替可能と考えられる。

以上

#### 着色料「クーロー色素」の規格改定の件

##### 【クーロー色素】

1. 目的： クーロー色素の確認試験（4）は、「本品の表示量から、色価 20 に換算して 0.5g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に酢酸鉛溶液（1→20）を 2～3 滴加えて放置するとき、暗褐～褐色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

4. 結果：

クーロー色素の規格改定内容

（4）「本品の表示量から、色価 20 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に Steasny 試薬 5ml を加えて攪拌後、50℃20 分間加熱し、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき、暗褐～褐色の沈殿を生じる。」

3. 試験データ

別紙－3 参照

本品の確認試験で、酢酸鉛溶液を用いずに塩酸－ホルマリン反応（Steasny 試薬）を用いる方法により代替可能と考えられる。

以上

### 着色料「コウリヤン色素」の規格改定の件

#### 【コウリヤン色素】

1. 目的： コウリヤン色素の確認試験 (3) は、「(1) の溶液 10ml に、酢酸鉛溶液 (1→20) を 1ml 加えるとき、褐～暗褐色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

2. 結果：

コウリヤン色素の規格改定内容

(3) 「本品の表示量から、色価 20 に換算して 1g に相当する量を取り、40vol%エタノールを加えて 100ml とし、この溶液 5ml に Steasny 試薬 5ml を加えて攪拌後、50℃ 20 分間加熱し、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき、黄赤～褐色の沈殿を生じる。」

注：黄赤～褐色と変更したのは、褐色系に置いても赤味の強いもの、黄味の強いものがあるため、JIS の表現より設定。

3. 試験データ

別紙－4 参照

本品の確認試験で、酢酸鉛溶液を用いずに塩酸－ホルマリン反応 (Steasny 試薬) を用いる方法により代替可能と考えられる。

以上

### 着色料「シアナット色素」の規格改定の件

#### 【シアナット色素】

1. 目的： シアナット色素の確認試験 (3) は、「本品の表示量から、色価 30 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 10ml に酢酸鉛溶液 (1→20) 1ml を加えるとき、暗褐色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

2. 結果：

シアナット色素の規格改定内容

(3) 「本品の表示量から、色価 20 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に Steasny 試薬 5ml を加えて攪拌後、50℃ 20 分間加熱し、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき、暗褐～褐色の沈殿を生じる。」

3. 試験データ

別紙－5 参照

本品の確認試験で、酢酸鉛溶液を用いずに塩酸－ホルマリン反応 (Steasny 試薬) を用いる方法により代替可能と考えられる。

以上

着色料「タマネギ色素」の規格改定の件

【タマネギ色素】

1. 目的： タマネギ色素の確認試験（3）は、「本品の表示量から、色価 50 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 500ml とし、この溶液 10ml に酢酸鉛溶液（1→20）1ml 加えるとき、褐～暗褐色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

2. 結果：

タマネギ色素の規格改定内容

- (3)「本品の表示量から、色価 20 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に Steasny 試薬 5ml を加えて攪拌後、50℃20 分間加熱し、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき、暗褐～褐色の沈殿を生じる。」

3. 試験データ

別紙－6 参照

本品の確認試験で、酢酸鉛溶液を用いずに塩酸－ホルマリン反応（Steasny 試薬）を用いる方法により代替可能と考えられる。

以上

着色料「タマリンド色素」の規格改定の件

【タマリンド色素】

1. 目的： タマリンド色素の確認試験（4）は、「本品の表示量から、色価 20 に換算して 0.5g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に酢酸鉛溶液（1→20）2～3 滴加えて放置するとき、黒褐色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

2. 結果：

タマリンド色素の規格改定内容

- (4)「本品の表示量から、色価 20 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この溶液 5ml に Steasny 試薬 5ml を加えて攪拌後、50℃20 分間加熱し、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき、暗褐～褐色の沈殿を生じる。」

3. 試験データ

別紙－7 参照

本品の確認試験で、酢酸鉛溶液を用いずに塩酸－ホルマリン反応（Steasny 試薬）を用いる方法により代替可能と考えられる。

以上

### 着色料「ペカンナッツ色素」の規格改定の件

#### 【ペカンナッツ色素】

1. 目的： ペカンナッツ色素の確認試験（3）は、「本品の表示量から、色価 50 に換算して 0.5g に相当する量を取り、水を加えて 500ml とし、この溶液 10ml に酢酸鉛溶液（1→20）1ml 加えるとき、褐～暗褐色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

#### 2. 結果：

ペカンナッツ色素の規格改定内容

**確認試験（3）を削除する。**

理由：本品の確認試験（4）「本品の表示量から、色価 15 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 500ml とし、この溶液 10ml にバニリン試液 10ml 加えるとき、褐色に変わる。」と規定しているため、確認試験（3）の必要性が低いものと判断した。

以上

### 着色料「チコリ色素」の規格改定の件

#### 【チコリ色素】

1. 目的： チコリ色素の確認試験（3）は、「本品の表示量から、色価 15 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 500ml とし、この溶液 10ml に酢酸鉛溶液（1→20）1ml 加えるとき、黄～褐色の沈殿を生じる。」となっているが、本法には酢酸鉛溶液が用いられている。よってこれを使用しない試験法を検討した。

#### 2. 結果

チコリ色素の規格改定内容

**確認試験（3）を削除する。**

理由：本品の確認試験（4）「本品の表示量から、色価 15 に換算して 1g に相当する量を取り、水を加えて 500ml とし、この溶液 10ml にバニリン試液 10ml 加えるとき、褐色に変わる。」と規定しているため、確認試験（3）の必要性が低いものと判断した。

以上

参考資料 A

**第 三 版**

**既存添加物 自主規格**

**平成14年11月**

**■日本食品添加物協会■**

# アルカネット色素

Alkanet color

アルカンナ色素

**定 義** 本品は、アルカネットの根から得られた、アルカニンの主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。

**色 価** 本品の色価 ( $E_{1\%}^{1cm}$ ) は20以上で、その表示量の90~110%を含む。

**性 状** 本品は、赤~暗紫色の粉末、ペースト、又は液体で、わずかに特異なおいがある。

**確認試験** (1) 本品の表示量から、色価20に換算して2gに相当する量を取り、50%エタノール500mlを加えて溶かした液は、赤~暗紫色を呈する。

(2) (1)の溶液に、水酸化ナトリウム溶液(1→25)を加えてアルカリ性にするとき、青~暗青色を呈する。

(3) (1)の溶液に、酢酸鉛溶液(1→20)を加えるとき、紫~暗紫色の沈殿を生じる。

(4) (1)の溶液は、波長515~530nmに極大吸収部がある。

(5) 本品の表示量から、色価20に換算して2gに相当する量を取り、エタノール10mlを加えてかき混ぜた後、毎分3,000回転で10分間遠心分離して得られる上澄み液を検液とする。検液2 $\mu$ lを量り、対照液を用いず、アセトニトリル/0.6vol%酢酸混液(9:1)を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行うとき、 $R_f$ 値が0.4~0.7の範囲に2~4個の赤紫色スポットを認める。ただし、薄層板は、担体として薄層クロマトグラフィー用オクタデシルシランを110℃で1時間乾燥したものを使用する。展開溶媒の先端が原線より約10cmの高さに上昇したとき展開をやめ、風乾した後、観察する。

**純度試験** (1) 重金属 Pbとして40 $\mu$ g/g以下(0.50g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(2) 鉛 Pbとして10 $\mu$ g/g以下(1.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として4.0 $\mu$ g/g以下(0.50g, 第3法, 装置B)

**色価測定法** 色価測定法により次の操作条件で試験を行う。

操作条件

測定溶媒 50%エタノール

測定波長 波長515~530nmの極大吸収部



# カカオ色素

Cacao color

ココア色素

**定義** 本品は、カカオの種子から得られた、アントシアニンの重合物を主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。

**色価** 本品の色価 ( $E_{1\%}^{1cm}$ ) は50以上で、その表示量の90~120%を含む。

**性状** 本品は、帯赤褐~黒色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なおいがある。

**確認試験** (1) 本品の表示量から、色価50に換算して0.2gに相当する量を取り、クエン酸緩衝液 (pH7.0) 100mlを加えて溶かした液は、褐色を呈する。

(2) 本品の表示量から、色価50に換算して0.4gに相当する量を取り、水を加えて100mlとし、この溶液5mlに塩酸2~3滴を加えて放置するとき、暗褐~褐色の沈殿を生じる。

(3) 本品の表示量から、色価50に換算して0.4gに相当する量を取り、水を加えて100mlとし、この溶液5mlに塩化第二鉄溶液 (1→10) を2~3滴加えると、直ちに黒褐色に変わり、その後、放置すると黒褐色の沈殿を生じる。

(4) 本品の表示量から、色価50に換算して0.4gに相当する量を取り、水を加えて100mlとし、この溶液5mlに酢酸鉛溶液 (1→20) を2~3滴加えて放置するとき、暗褐~褐色の沈殿を生じる。

**純度試験** (1) 重金属 Pbとして $40\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(2) 鉛 Pbとして $10\mu\text{g/g}$ 以下 (1.0g, 第1法)

(3) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$ として $4.0\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

(4) 残留溶媒 アセトン  $30\mu\text{g/g}$ 以下

**色価測定法** 色価測定法により次の操作条件で試験を行う。

操作条件

測定溶媒 クエン酸緩衝液 (pH7.0)

測定波長 波長500nm

# カキ色素

Japanese persimmon color

**定義** 本品は、カキの果実から得られたフラボノイドを主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。

**色価** 本品の色価 ( $E_{1\%}^{1cm}$ ) は20以上で、その表示量の90～110%を含む。

**性状** 本品は赤褐～黒褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なにおいがある。

**確認試験** (1) 本品の表示量から、色価20に換算して2.5gに相当する量を取り、クエン酸緩衝液 (pH7.0) 100mlを加えて溶かした液は、黄褐～赤褐色を呈する。

(2) 本品の表示量から、色価20に換算して2.5gに相当する量を取り、水を加えて100mlとし、この溶液5mlに塩酸2～3滴を加えて放置するとき、赤褐～黒褐色の沈殿を生じる。

(3) 本品の表示量から、色価20に換算して2.5gに相当する量を取り、水を加えて100mlとし、この溶液5mlに塩化第二鉄溶液 (1→50) を2ml加えると、黒褐色を呈する。

(4) 本品の表示量から、色価20に換算して0.5gに相当する量を取り、水を加えて100mlとし、この溶液5mlに酢酸鉛溶液 (1→20) を2～3滴加えて放置するとき、黒褐色の沈殿を生じる。

**純度試験** (1) 重金属 Pbとして $40\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(2) 鉛 Pbとして $10\mu\text{g/g}$ 以下 (1.0g, 第1法)

(3) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$ として $4.0\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

**色価測定法** 色価測定法により次の操作条件で試験を行う。

操作条件

測定溶媒 クエン酸緩衝液 (pH7.0)

測定波長 波長500nm

## クロー色素

Kooroo color, Matsudai color

ソメモノイモ色素

**定義** 本品は、ソメモノイモの根から抽出して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。

**色価** 本品の色価 ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) は20以上で、その表示量の90~120%を含む。

**性状** 本品は、赤褐~暗褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なおいがある。

**確認試験** (1) 本品の表示量から、色価20に換算して1gに相当する量を取り、クエン酸緩衝液 (pH7.0) 500mlを加えて溶かした液は、黄褐~赤褐色を呈する。

(2) 本品の表示量から、色価20に換算して0.5gに相当する量を取り、水を加えて100mlとし、その溶液5mlに塩酸2~3滴を加えるとき、黄褐~赤褐色の沈殿を生じる。

(3) 本品の表示量から、色価20に換算して0.5gに相当する量を取り、水を加えて100mlとし、この溶液5mlに塩化第二鉄溶液 (1→50) を2ml加えるとき、赤褐~黒褐色の沈殿を生じる。

(4) 本品の表示量から、色価20に換算して0.5gに相当する量を取り、水を加えて100mlとし、この溶液5mlに酢酸鉛溶液 (1→20) を2~3滴加えるとき、赤褐~黒褐色の沈殿を生じる。

**純度試験** (1) 重金属 Pbとして $40\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(2) 鉛 Pbとして $10\mu\text{g/g}$ 以下 (1.0g, 第1法)

(3) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$ として $4.0\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

**色価測定法** 色価測定法により次の操作条件で試験を行う。

操作条件

測定溶媒 クエン酸緩衝液 (pH7.0)

測定波長 波長500nm

## コウリャン色素

Kaoliang color

キビ色素

**定義** 本品は、コウリャンの種子から得られた、アピゲニニン及びルテオリニンを主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。

**色価** 本品の色価 ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) は50以上で、その表示量の90~110%を含む。

**性状** 本品は、褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なにおいがある。

**確認試験** (1) 本品の表示量から、色価50に換算して1gに相当する量を取り、40vol%エタノール500mlを加えて溶かした液は、黄褐~赤褐色を呈する。

(2) (1)の溶液10mlに、塩化第二鉄溶液(1→10) 1mlを加えるとき、褐~暗褐色を呈する。

(3) (1)の溶液10mlに、酢酸鉛溶液(1→20) 1mlを加えるとき、褐~暗褐色の沈殿を生じる。

**純度試験** (1) 重金属 Pbとして $40\mu\text{g/g}$ 以下(0.50g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(2) 鉛 Pbとして $10\mu\text{g/g}$ 以下(1.0g, 第1法)

(3) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$ として $4.0\mu\text{g/g}$ 以下(0.50g, 第3法, 装置B)

**色価測定法** 測定する吸光度が0.3~0.7の範囲になるように、本品を精密に量り、0.1mol/l水酸化ナトリウム溶液10mlを加えて溶かし、さらに水を加えて正確に100mlとする。この溶液2mlを正確にとり、水を加えて正確に100mlとし試験溶液とする(必要があれば遠心分離し、その上澄液を用いる)。水を対照とし、液層の長さ1cmで波長500nmにおける吸光度Aを測定し、次式により色価を求める。

$$\text{色価} = \frac{A \times 500}{\text{試料の採取量 (g)}}$$