

2003年1月7日

自主規格確認試験分析結果

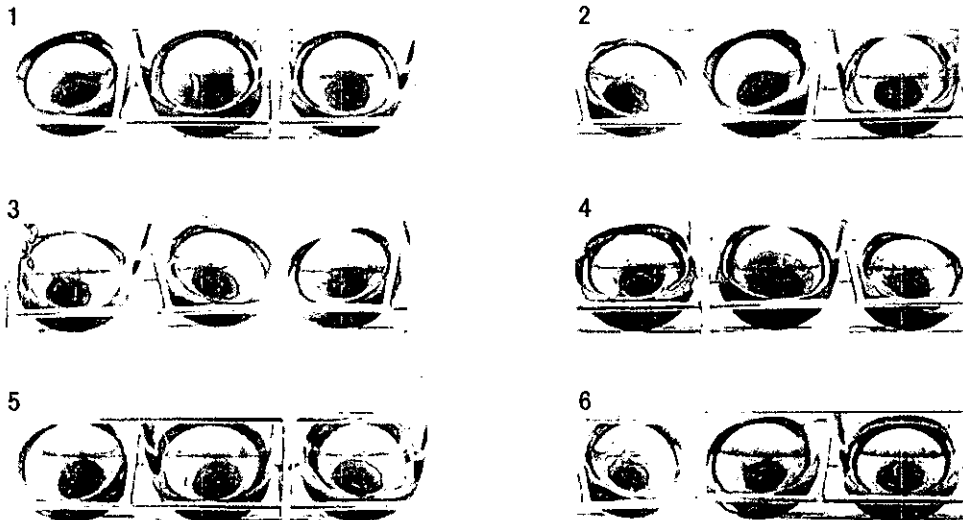
三栄源エフ・エフ・アイ(株)
 第三研究部
 プロダクツ色素

(コウリヤン色素)

サンプルNo.	サンプル名	Lot
1.	コウリヤン色素 A	990215
2.	"	991014
3.	"	011225
4.	コウリヤン色素 B	2002410
5.	"	20021010
6.	"	20021120

	サンプルNo.											
	1		2		3		4		5		6	
色価	適	205	適	200	適	182	適	272	適	276	適	286
確認試験	1		2		3		4		5		6	
3	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色
	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色
	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色	適	暗褐色

確認試験結果



2003年1月15日

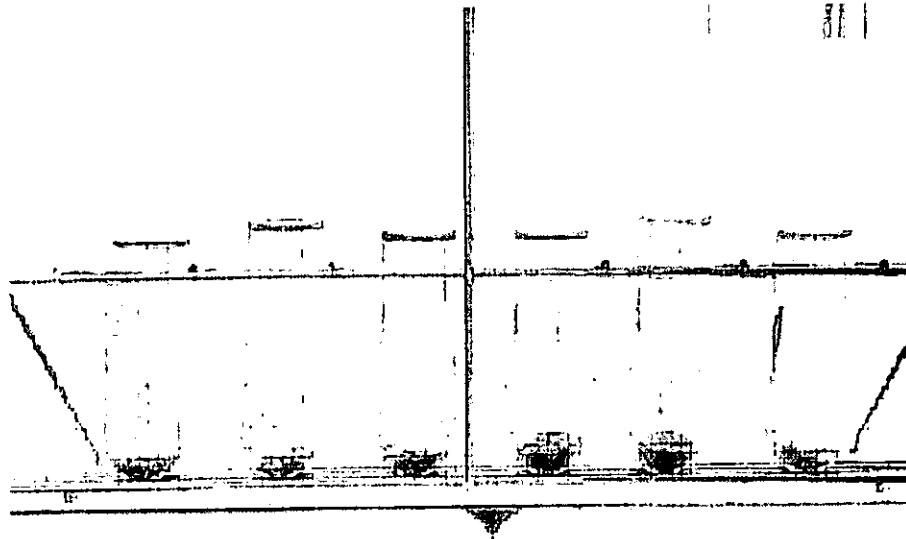
自主規格確認試験の分析結果

キリヤ化学株式会社

<コウリャン色素>

サンプルNo.	サンプル名	Lot No.
1.	コウリャン色素K-1	010126
2.	"	020610
3.	"	020807
4.	コウリャン色素K-2	020808
5.	"	020909
6.	"	61005

	サンプルNo.											
	1		2		3		4		5		6	
色価	適	350.3	適	398.8	適	406.3	適	204.2	適	263.7	適	413.2
確認試験	1		2		3		4		5		6	
3	適	黄褐色	適	黄褐色	適	黄褐色	適	赤褐色	適	赤褐色	適	赤褐色
	適	黄褐色	適	黄褐色	適	黄褐色	適	赤褐色	適	赤褐色	適	赤褐色
	適	黄褐色	適	黄褐色	適	黄褐色	適	赤褐色	適	赤褐色	適	赤褐色



左からサンプルNo. 1, 2, 3, 4, 5, 6

別紙－ 5

「シアナット色素」関係データ

別紙-5

シアナット色素の確認試験結果

試料

シアナット色素

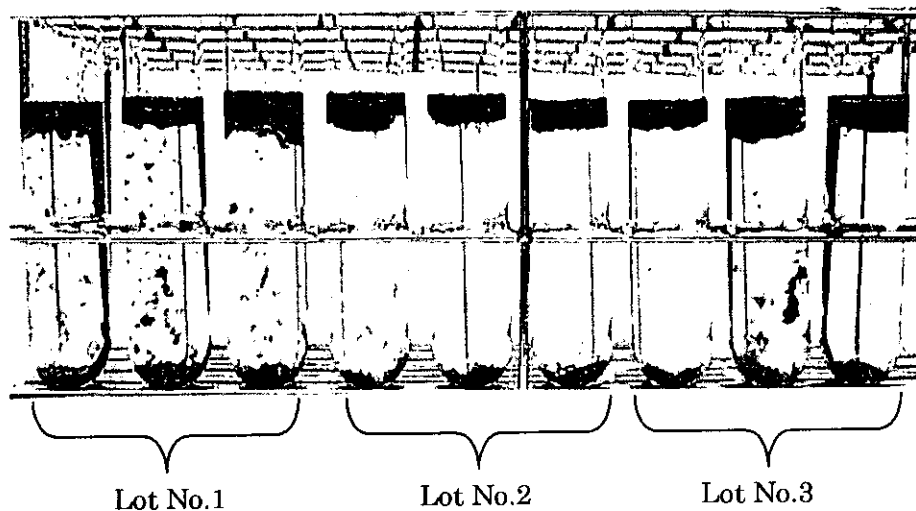
結果 確認試験 (3)

色素	Lot.No	確認試験(3)試験結果					
		1回目		2回目		3回目	
シアナット色素	1	適	○	適	○	適	○
	2	適	○	適	○	適	○
	3	適	○	適	○	適	○

沈殿有り：○ 沈殿無し：×

試料に沈殿が生じ、同様の試験をそれぞれ3回ずつ繰り返したが、違いは見られなかった。

シアナット色素



別紙－6

「タマネギ色素」関係データ

タマネギ色素の確認試験結果

試料

タマネギ色素A

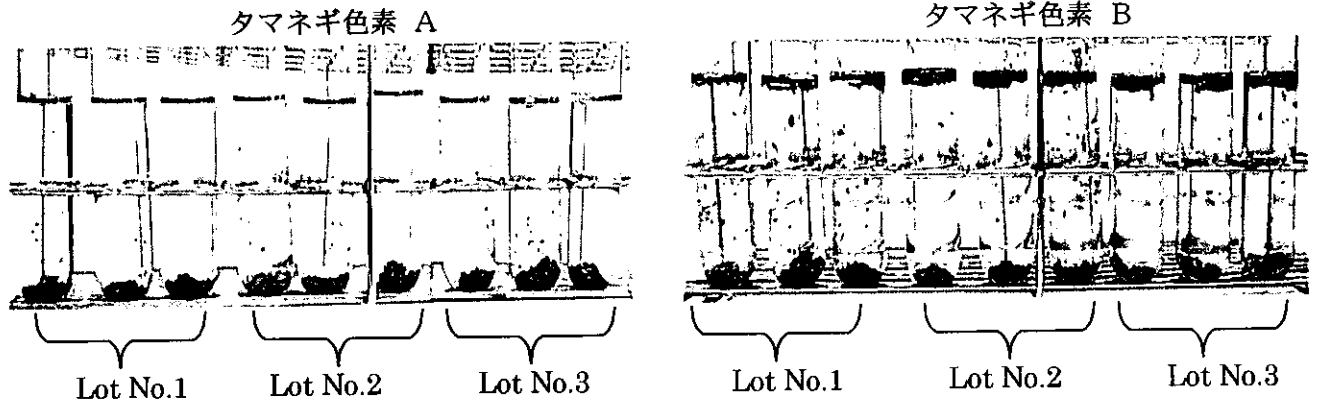
タマネギ色素B

結果 確認試験 (3)

色素	Lot.No	確認試験(3)試験結果					
		1回目		2回目		3回目	
タマネギ色素 A	1	適	○	適	○	適	○
	2	適	○	適	○	適	○
	3	適	○	適	○	適	○
タマネギ色素 B	1	適	○	適	○	適	○
	2	適	○	適	○	適	○
	3	適	○	適	○	適	○

沈殿有り：○ 沈殿無し：×

全ての試料に沈殿が生じ、同様の試験をそれぞれ3回ずつ繰り返したが、違いは見られなかった。



2003年1月7日

自主規格確認試験分析結果

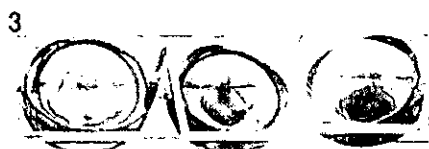
三栄源I7・I7・A(株)
 第三研究部
 プロダクツ色素

(タマ社'色素)

サンプルNo.	サンプル名	Lot
1.	タマ社'色素 A	020603
2.	タマ社'色素 B	020610
3.	"	020903
4.	"	021122

サンプルNo.								
	1		2		3		4	
色価	適	140.9	適	70.5	適	70.5	適	68.4
確認試験	1		2		3		4	
3	適	褐色	適	褐色	適	褐色	適	褐色
	適	褐色	適	褐色	適	褐色	適	褐色
	適	褐色	適	褐色	適	褐色	適	褐色

確認試験結果



別紙－ 7

「タマリンド色素」関係データ

平成15年1月15日

タマリンド色素の確認試験結果

ヤエガキ醸酵技研株式会社

【試験項目、方法】

確認試験（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。」

Steasny 試薬：濃塩酸 10ml, 30%ホルマリン 20ml, 水 5ml

各色素サンプルにつき、それぞれ 3 Lot、3 回分析を行った。

【試験結果】

	Lot	試験回数		
		1 回目	2 回目	3 回目
タマリンド色素 A	①	○	○	○
	②	○	○	○
	③	○	○	○
タマリンド色素 B	①	○	○	○
	②	○	○	○
	③	○	○	○

判定 ○：沈殿物あり、×：沈殿物なし

全ての試験において、暗褐色～褐色の沈殿が確認された。

平成15年2月

第三部会（保存料及び日持ち向上剤）既存添加物自主規格案検討結果報告書
－「第三版自主規格」の見直し－

日本食品添加物協会 第三部会

研究者所属：（株）タイショーテクノス
大阪有機化学工業（株）
チッソ（株）横浜研究所

1. 目的

既存添加物について自主規格策定を行ってきたが、ツヤプリシン（抽出物）及びε-ポリリシンの2品目について定量法の見直しを検討した。

2. 検討結果及び考察

ツヤプリシン（抽出物）については、有害試薬を使用した分光光度計による定量法に代わり、ガスクロマトグラフィー法による定量法を検討した結果、変更可能と判断した。

ε-ポリリシンについては、ケルダール法に代わり、高速液体クロマトグラフィー法による迅速定量を検討した結果、変更可能と判断した。

別紙に自主規格案及び試験結果報告を報告する。

試 験 報 告 書

平成 15 年 1 月 17 日
大阪有機化学工業株式会社

ヒノキチオール（天然品）のガスクロマトグラフィー（GC 法）による定量分析

ヒノキチオール（天然品）の定量分析は、GC 法により内標準法を用いて下記の分析条件で行った。

また、化学的合成品以外の食品添加物自主規格の定量法との比較も行った。

1. ヒノキチオール（天然品）の GC 定量分析

1-1 【分析方法】

《検量線の作成》

10ml メスフラスコにジフェニールエーテル（Wako Lot No. DWN4402。内標準物質）を 2.0152g 精秤し、エチルアルコール（日本アルコール販売株 特定アルコール 99 度以上 1 級発酵 021119）で正確に 10ml とした（内標準液）。

10ml サンプル瓶にヒノキチオール標準品（Wako 生化学用 Lot NO. TPF7800）を 0.1525g、0.2060g、0.2529g 精秤し、内標準液を 1ml ずつ加えた。

各試料溶液 0.5 μ l を GC に注入し検量線を作成した（各試料溶液 3 回分析平均値）。

《定量分析》

ヒノキチオール(天然品)を 10ml サンプル瓶に 0.2081g (Lot No. 02078101)、0.2034g (Lot No. 12072101)、0.2093g (Lot No. 02071201) 精秤し、内標準液を 1ml 加えた。各試料液 0.5 μ l を GC に注入し検量線より定量を行った（各試料溶液 6 回分析平均値）。

《計算》

ヒノキチオール（天然品）の含量は下記の式より算出した。

$$\text{ヒノキチオールの含量 (\%)} = (1.1805 \times A_{HT}/A_I) \times W_I \div W_{HT} \times 100$$

【GC 条件】

装置 GC-17A (SHIMADZU)、C-R6A CHROMATPAC (SHIMADZU)
(水素炎イオン化型検出器付きキャピラリー仕様)

分析条件 Column ; DB-1 30m×ID0.25mm 0.25μm film
Oven ; 100℃ to 250℃ at 10℃/min
Inj. ; 250℃
Det. ; 250℃
Carrier ; nitrogen, 47ml/min
Spl. ; 10:1

1-2 【定量結果】

A_{HT} : ヒノキチオール GC-AREA

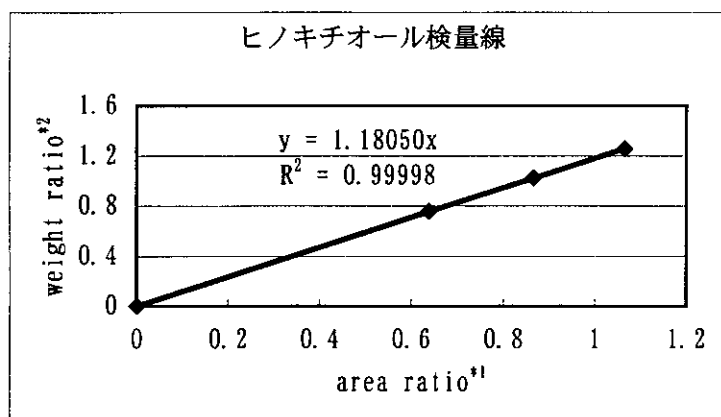
A_I : 内標準物質ジフェニールエーテルの GC-AREA

W_{HT} : ヒノキチオールの重量

W_I : 内標準物質ジフェニールエーテルの重量

*1) Area ratio : A_{HT}/A_I

*2) Weight ratio : W_{HT}/W_I



回帰方程式 : $y=1.1805x$

相関係数 : $R^2=0.99998$

上述の回帰方程式及び相関係数は Excel を用いて求めた。

《検量線作成データ》

ヒノキチオール (mg)	ジフェニルエーテル (mg)	W _{HT} /W _I	A _{HT}	A _I	A _{HT} /A _I
152.5	201.52	0.7567	943492	1479347	0.6378
			954257	1489661	0.6406
			922650	1445998	0.6381
平均					0.6388
206	201.52	1.0222	1147188	1344927	0.8530
			1141513	1305476	0.8744
			1234812	1424640	0.8668
平均					0.8647
252.9	201.52	1.2550	1496390	1408950	1.0621
			1546134	1459940	1.0590
			1508784	1403447	1.0751
平均					1.0654

《ヒノキチオール (天然品) 3Lot 分析結果》

LOT NO.	サンプル量 (mg)	分析No.	A _{HT}	A _I	A _{HT} /A _I	定量値 (%)
02078101	208.1	1	1168204	1342162	0.8704	99.50
		2	1251278	1446357	0.8651	98.90
		3	1276766	1478481	0.8636	98.72
		4	1244380	1447843	0.8595	98.25
		5	1232495	1422421	0.8665	99.05
		6	1222090	1390876	0.8786	100.44
平均					99.15	
12072101	203.4	1	1212307	1446466	0.8381	98.03
		2	1248951	1489849	0.8383	98.05
		3	1253138	1479753	0.8469	99.05
		4	1743217	2054775	0.8484	99.22
		5	1216083	1446965	0.8404	98.30
		6	1699490	1992794	0.8528	99.74
平均					98.73	
02071201	209.3	1	1291658	1497407	0.8626	98.04
		2	1277972	1453317	0.8793	99.95
		3	1263780	1447956	0.8728	99.20
		4	1263943	1443844	0.8754	99.50
		5	1481261	1688490	0.8773	99.71
		6	2048901	2353596	0.8705	98.95
平均					99.23	

2. 食品添加物自主規格・定量法（分光光度計法）とGC法の比較。

Lot No.	分光光度計法 (%)	GC法 (%)
02078101	99.3	99.15
12072101	101.2	98.73
02071201	101.3	99.23

1- 3 【考察】

今回の定量分析において、ヒノキチオール濃度は20%と高濃度で使用した。予備試験においてヒノキチオール濃度6%で分析した場合、Lot02078101 検体は93.8%~102.8%、Lot02071201 検体は96.5%~102.8%、Lot12072101 検体は96.5%~104.5%となり、バラツキが大きかった（ヒノキチオール面積値：12万~16万）。次に、濃度20%で分析した場合、ヒノキチオール面積は100万~200万と面積値がワンオーダー上がり、バラツキの幅が狭くなった。従って、ヒノキチオール濃度は20%濃度で行うことにした。尚、今回はスプリット分析のみ行った。スプリットレス分析でのヒノキチオール濃度とバラツキの関係は今後の課題である。

検量線の作成及び定量分析において内標準液1mlを加える方法で測定を行った。この場合、内標準物質であるジフェニールエーテル既知濃度の内標準液（w/v）を一定量加え、体積の影響を受けないように重量比で測定した。

今回の試験結果より、GC法による定量分析は可能と判断する。

ツヤプリシン（抽出物）

Thujaplicin (extract)

Hinokitiol (extract)

ヒノキチオール（抽出物）

定義 本品は、ヒバの幹枝又は根から得られた、ツヤプリシン類を主成分とするものである。

含量 本品を乾燥したものは、 β -ツヤプリシン98.0%~101.0%を含む。

性状 本品は、白~黄色の結晶で、結晶性の粉末又は塊で、特異なおいがある。

確認試験 本品0.1gにエタノール10mlを加えて溶かし、塩化第二鉄試液1滴を加えるとき、液は暗赤色を呈する。

純度試験 (1) 溶状 澄明 (1.0g, エタノール5.0ml)

(2) 重金属 Pbとして $20\mu\text{g/g}$ 以下 (1.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(3) ヒ素 As_2O_3 として $4.0\mu\text{g/g}$ 以下 (0.5g, 第3法, 装置B)

乾燥減量 0.5%以下 (1g, 1.7~2.0kPa, シリカゲル, 4時間)

強熱残物 0.05%以下 (2g)

定量法 本品を乾燥し、その約200mg (Wt) を精密に量り、内標準溶液1mlを正確に加えて試料溶液とする。別に β -ツヤプリシン (定量用) を乾燥し、その約200mg (Ws) を精密に量り、内標準溶液1mlを正確に加えて標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液の $0.5\mu\text{l}$ につきガスクロマトグラフ法により試験を行い、内標準物質ジフェニルエーテルのピーク面積に対する β -ツヤプリシンのピーク面積の比Qt及びQsを求め、次式により β -ツヤプリシンの含量を求める。

$$\beta\text{-ツヤプリシンの含量} = \frac{W_s}{W_t} \times \frac{Q_t}{Q_s} \times 100 (\%)$$

内標準溶液 ジフェニルエーテルの無水エタノール液 (1→5)

操作条件

検出器 水素炎イオン化検出器付きキャピラリー仕様

カラム管 DB-1 30m×ID0.25mm 0.25 μm film

カラム温度 100℃から250℃まで毎分10℃で昇温する。

注入口温度 250℃

注入方式 スプリット (10:1)

検出器温度 250℃

キャリアーガス ヘリウム

流速 47ml/min

試 験 報 告 書

2003年2月5日

チッソ株式会社

横浜研究所

1. ポリリシン定量法

内部標準としてL-フェニルアラニン150mgを正確に量り、移動相を加えて溶かし、正確に100mlとする。この液5mlを取り移動相を加え正確に100mlとし内部標準液とする。

本品約250mgを精密に量り、移動相を加えて溶かし正確に50mlとする。この液1mlを取り、内部標準液10mlを加え移動相にて正確に50mlとし試料溶液とする。

ϵ -ポリリシン塩酸塩(定量用)を乾燥(105℃、3時間)し、その約310mgを精密に量り、移動相を加えて溶かし、正確に100mlとする。その液25mlをとり移動相を加えて正確に100mlとし、標準原液とする。 ϵ -ポリリシン塩酸塩に対する ϵ -ポリリシンの比は0.7785としてポリリシン濃度を算出する。

標準原液10ml、8ml、6mlをとり、それぞれに内部標準液10mlを加え、移動相にて正確に50mlとし、標準液とする。

試料溶液、標準液につき次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。

それぞれの標準液より内部標準に対するポリリシンのピーク面積比と標準液に含まれるポリリシン濃度から検量線を作成し、試料溶液の内部標準に対するポリリシンのピーク面積比を求め、検量線を用いて定量を行う。

操作条件

- (1) 検出器 紫外吸光検出器 (測定波長 215nm)
- (2) カラム 充填剤 5~10 μ m の化学結合型オクタデシルシラン
- (3) カラム管 内径 4.6mm, 長さ 25cm のステンレス管
- (4) カラム温度 40℃付近の一定温度
- (5) 移動相 硫酸ナトリウム 1.74g 及びリン酸ナトリウム 1.42g をとり水約 800ml に溶かし、リン酸でpHを3.4に調整する。この溶液を水で1Lに定容する。この液 920ml にアセトニトリル 80 ml を加える。
- (6) 流量 ポリリシンの保持時間が約 4 分になるように調節する(0.5ml/分)
- (7) 注入量 : 100 μ l

試薬

- (1) L-フェニルアラニン : $C_9H_{13}N_2O_2$ (特級)
- (2) ϵ -ポリリシン塩酸塩(定量用) : 自社精製品(純度98%以上、L-リシン塩酸塩として)
 ϵ -ポリリシン塩酸塩(定量用)の作製は次の手順で行う。

本品(ϵ -ポリリシン)を水溶解(25%水溶液)し、塩酸(試薬特級)でpH4.5に調節する。次に活性炭(白鷺AW50)を ϵ -ポリリシンの2倍量加え1hr攪拌し、濾過する。濾過溶液を晶析する(溶液:メタノール(試薬特級):アセトン(試薬特級)=1:1:3)。晶析品を再溶解し、再晶析を3回繰り返す。その後、乾燥(40℃、減圧)し、精製した ϵ -ポリリシン塩酸塩(定量用)を得る。

手順は以下の通り。

試薬 塩酸 : 試薬特級(和光純薬)

活性炭 : 白鷺AW-50(タケダ化学)

メタノール、アセトン : 試薬特級(和光純薬)

- (1)本品(ε-ポリリシン) 250g
- ↓
- (2)溶解(水、750g)、またはε-ポリリシン25%溶液(チツソ品)
- ↓
- (3)塩酸で中和(pH4.5)
- ↓←活性炭 500g
- (4)攪拌1hr 濾過(押しだし約0.5L)
- ↓
- (5)濾過液1.5L
- ↓
- (6)晶析-1(①メタノール1.5L、②アセトン4.5L)
- ↓
- (7)濾過、沈殿洗浄(水:メタノール:アセトン=1:1:3溶液 500mL)
- ↓
- (8)沈殿洗浄(アセトン 500mL)
- ↓
- (9)沈殿乾燥(40°C 減圧14hr)
- ↓
- (10)溶解(水、30%溶液)
- ↓
- (6)~(10)を3回繰り返す(晶析-2~4)
- 晶析4を乾燥で終了。

(3)硫酸ナトリウム: Na_2SO_4 (特級)

(4)リン酸二カリウム: K_2HPO_4 (リン酸水素二カリウム、特級)

(5)リン酸 : H_3PO_4 (リン酸、特級)

(6)アセトニトリル : CH_3CN (特級)

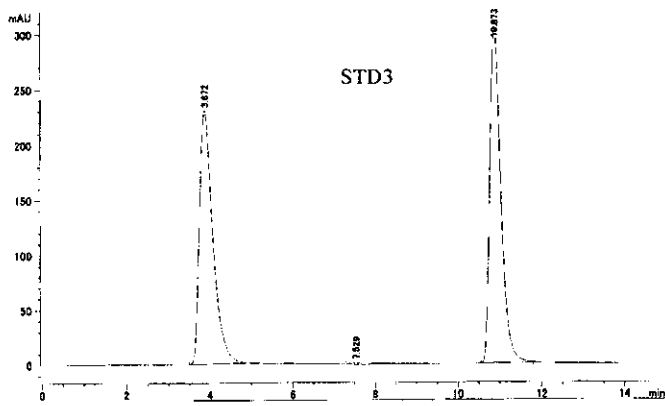
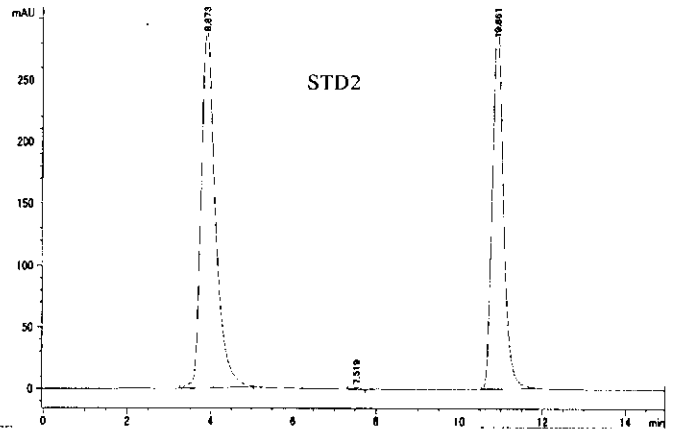
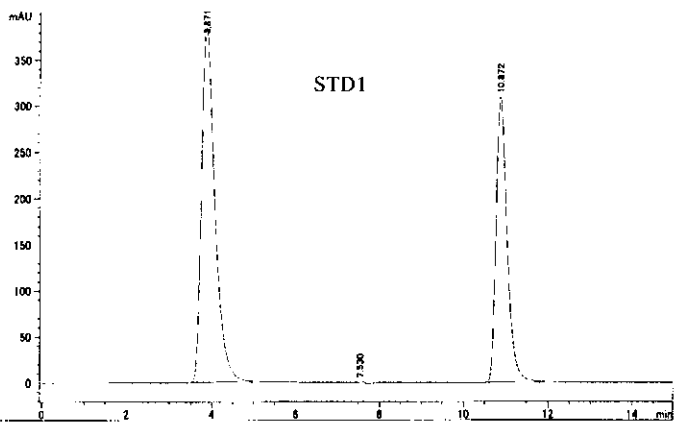
参考

次のページに代表的クロマトを示す。

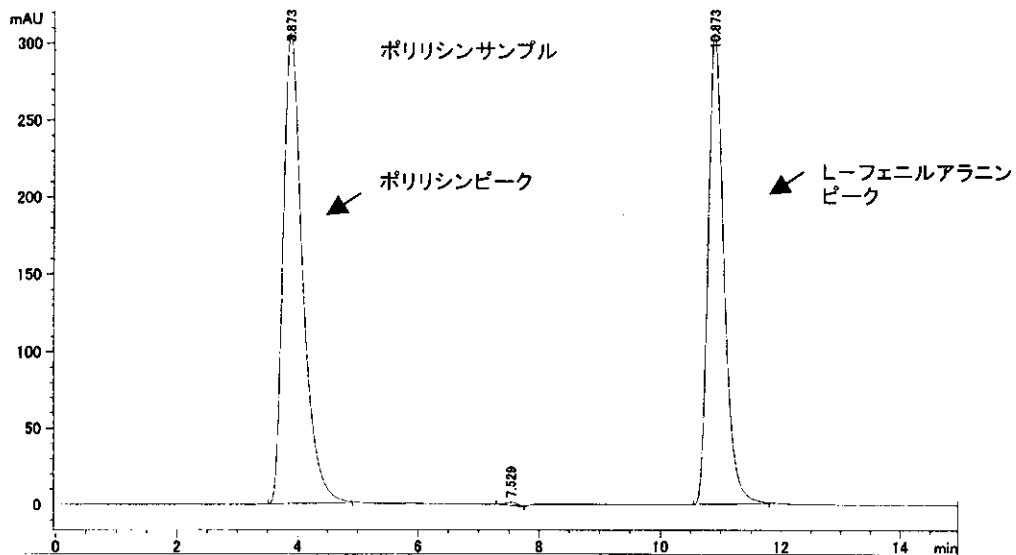
ポリリシンは分子量分布が狭いので上記条件で測定した場合、1ピークとして溶出される。これを標準と比較し、溶出位置からポリリシンと判断する。

この方法で、溶出位置と面積比から濃度定量は十分可能と判断する。

ポリリシン分析結果



STD1=標準原液 10ml
 STD2=標準原液 8ml
 STD3=標準原液 6ml



2. 分析結果の比較

HPLC法とケルダール法による分析値の比較を行った。

結果は次ページ以降に示した。

各分析法における平均値と標準偏差を比較した。

Lot No.	方法	平均含量(%)	標準偏差
2020201F	従来法	107.4	0.46
	HPLC法	98.1	0.79
2020203F	従来法	102.1	0.43
	HPLC法	98.3	0.77
2020402F	従来法	101.9	1.23
	HPLC法	98.7	0.69

この結果、

従来法では100%を大きく超える分析値(107.4%、Lot 2020201F)場合や標準偏差が大きい値(1.23%、Lot 2020402F)の場合がありバラツキが大きい結果となった。また、100%を超える値は現在の係数5.24(これは結合水ありのポリリシンのN%からの計算値を採用した。)について再考する必要もあるかとも思われる。

これに対しHPLC法は平均含量及び標準偏差ともLot間でのバラツキは少なく、安定した値が得られており従来法に比較して信頼性の高いものと判断する。

これらの結果より、ポリリシンの定量法はHPLC法に変更可能と判断する。

(1)HPLC法の結果

Lot No.	分析回数	濃度(%)			平均2と 標準偏差
		測定結果	水分換算	平均	
2020201F	1	95.7	97.2	97.0	平均2 98.1 標準偏差 0.79
		95.6	97.1		
		95.4	96.9		
	2	95.7	97.2	97.3	
		95.9	97.4		
		95.9	97.4		
	3	97.0	98.5	98.5	
		96.9	98.4		
		97.1	98.6		
	4	96.7	98.2	98.1	
		96.6	98.1		
		96.5	98.0		
	5	97.3	98.8	98.8	
		97.3	98.8		
		97.4	98.9		
	6	97.3	98.8	98.9	
		97.5	99.0		
		97.4	98.9		
2020203F	1	95.7	97.2	97.3	平均2 98.3 標準偏差 0.77
		95.8	97.3		
		96.0	97.5		
	2	96.5	98.0	97.8	
		96.4	97.9		
		96.1	97.6		
	3	96.5	98.0	98.1	
		96.8	98.3		
		96.5	98.0		
	4	96.6	98.1	98.2	
		96.8	98.3		
		96.7	98.2		
	5	97.4	98.9	98.8	
		97.4	98.9		
		97.3	98.8		
	6	97.9	99.4	99.5	
		98.1	99.6		
		97.9	99.4		
2020402F	1	96.4	98.0	98.0	平均2 98.7 標準偏差 0.69
		96.5	98.1		
		96.3	97.9		
	2	96.6	98.2	98.3	
		96.7	98.3		
		96.8	98.4		
	3	96.5	98.1	98.1	
		96.4	98.0		
		96.7	98.3		
	4	97.3	98.9	98.9	
		97.3	98.9		
		97.3	98.9		
	5	98.0	99.6	99.4	
		97.8	99.4		
		97.7	99.3		
	6	98.1	99.7	99.6	
		97.9	99.5		
		97.9	99.5		