

### 3 まとめ

#### ① RP-18F<sub>254S</sub> (MERCK)を使用した場合

三色会配付資料結果(2003/11/13 アイゼン保土谷株)と比較すると、Rf値0.93~0.97のスポット以外では、スポット数及びRf値はほぼ一致した。またこれらのスポットは、アンモニア水の噴霧により暗赤紫色を呈した。

#### ② REVERSED PHASE OCTADECYLSILANE BOUNDED KC18 (Whatman)を使用した場合

Rf値0.90~0.93の範囲に紫色のスポットを一つのみ認めた。これらのスポットは、アンモニア水の噴霧により暗赤紫色を呈した。

#### ③ セルロース (MERCK)を使用した場合

Rf値が0.47~0.51の範囲に1つ、Rf値が0.19~0.28の範囲に2つのたいたい色~赤色のスポットを認めた。これらのスポットは、アンモニア水の噴霧により暗赤紫色を呈した。

三色会配付資料結果とスポット数及びRf値は一致した。

C18 逆相 TLC の結果は、同一担体でありながら、メーカーの種類によってスポット数及びRf値が大きく違うことが確認できた。また、セルロース TLC の結果は、三色会配付資料結果と一致した。しかし、今回の試験では1種だけの薄層板で行っているため、C18 担体と同様に他メーカーのセルロース薄層板を使用した場合、スポット数、Rf値が大きく変わらないことの確認が必要と思われる。

自主規格 ラノク色素確認試験

【試供サンプル】

Lot	色価
サンプルA	1631
サンプルB	1468
サンプルC	1552

【使用した薄層板】

Fluka Cellulose fibers on TLC-plates

セルロース (MERCK)

セルロース (Whatman) \* 自社にて入手

1 *Fluka Cellulose fibers on TLC-plates*

【使用した薄層板】

Fluka Cellulose fibers on TLC-plates

【方法】

本品の表示量から色価 1,000 に換算して 0.1g に相当する量を取り、エタノール 10ml を加えて溶かした液を遠心分離して得られた上澄み液を検液とした。検液 2 $\mu$ l を量り、対照液を用いず、n ブタノール/水/酢酸混液(4:2:1)を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行なった。薄層板には担体として薄層クロマトグラフィー用セルロースを 110 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱したものを使用した。展開溶媒の先端が原先より 10cm の高さに上昇したとき展開をやめ、風乾した後アンモニア水を噴霧した。

【結果 Rf 値】

サンプルA		サンプルB		サンプルC	
①	②	①	②	①	②
0.53	0.53	0.52	0.52	0.52	0.53

【結果】

セルロース (MERCK)を用い、当社でクロマトクラフィーを行った結果、Rf 値が 0.52～0.53 の範囲に薄いたいたい色のスポットを認めた。その他に Rf 値 0.10～0.47 の範囲に線状の紫色の染みか認められた。また Rf 値 0.00～0.17 の範囲にも青紫色の線状の紫色の染みが認められ、この青紫色の染みはアンモニア水の噴霧により紫色を呈した。

### 2 Merck CELLULOSE

【使用した薄層板】

セルロース (MERCK)

【方法】

1 と同様の方法で TLC を行なった。

【結果 Rf 値】

サンプルA			サンプルB			サンプルC		
①	②	③	①	②	③	①	②	③
0.51	0.48	0.51	0.50	0.47	0.48	0.49	0.47	0.49
0.28	0.26	0.28	0.26	0.26	0.27	0.26	0.27	0.28
0.20	0.19	0.20	0.20	0.19	0.19	0.20	0.19	0.21

【結果2】

セルロース (MERCK)を用い、当社でクロマトクラフィーを行った結果、Rf 値が 0.47～0.51 の範囲にたいたい色のスポットを認めた。Rf 値が 0.19～0.28 の範囲にもだいたい色の2つのスポットを認めた。これらのスポットは、アンモニア水により暗赤紫色を呈した。

### 3 Whatman CELLULOSE

また自社にて入手した、微結晶セルロース TLC プレート (whatman) を用いて 1 と同様の方法で実験を行った。

【使用した薄層板】

CELLULOSE (Whatman)

【結果 Rf 値】

サンプルA			サンプルB			サンプルC		
①	②	③	①	②	③	①	②	③
0.65	0.65	0.65	0.63	0.61	0.66	0.64	0.62	0.65
0.39	0.39	0.39	0.38	0.34	0.38	0.34	0.35	0.39

Rf 値が 0.61~0.66 の範囲、Rf 値が 0.34~0.39 の範囲にだいたい色のスポットを認めた。これらのスポットはアンモニア水の噴霧により紫色を呈した。

#### 4 まとめ

① Fluka Cellulose fibers on TLC-plates を使用した場合

Rf 値が 0.52~0.53 の範囲に薄いたいだい色のスポットが一つ認められ、また、Rf 値 0.10~0.47 に紫色、Rf 値 0.00~0.17 の範囲に青色の線状の染みが認められた。この結果は三色会配付資料結果のスポット数及び Rf 値とは著しく違った。

② セルロース TLC プレートを使用した場合 (MERCK)

Rf 値が 0.47~0.51 の範囲に 1 つ、Rf 値が 0.19~0.28 の範囲に 2 つのたいだい色~赤色のスポットを認めた。これらのスポットは、アンモニア水の噴霧により暗赤紫色を呈した。三色会配付資料結果とスポット数及び Rf 値は一致した。

③ 微結晶セルロース TLC プレート (whatman) を使用した場合

Rf 値が 0.61~0.66 の範囲、Rf 値が 0.34~0.39 の範囲にスポットが認められた。これらのスポットはアンモニア水の噴霧により紫色を呈した。この結果は三色会配付資料結果のスポット数及び Rf 値とは異なった。

三社のセルロース担体の薄層板を用いてラック色素の TLC を行ったか、出現するスポットの数や Rf 値は、ODS 担体の TLC 結果と同様に、セルロース担体の薄層板を用いた場合でもメーカー間によって差が生じる結果となった。

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  
－既策定自主規格案の見直し－

日本食品添加物協会 第三部会  
研究者所属 株式会社タイショーテクノス  
キッコーマン株式会社  
チッソ株式会社

## 1 目的

既存添加物について自主規格策定を行ってきたか、フトウ種子抽出物は定義、性状、乾燥減量について、 $\epsilon$ -ポリリシンは定義、含量、性状、確認試験、純度試験、強熱残分、定量法について見直しを検討した。

## 2 検討結果及び考察

フトウ種子抽出物については、定義に「デキストリン、果糖又はフトウ糖を含むことかある。」を追加し、性状の「淡褐色～褐色」を「淡黄褐色～濃褐色」に、「粉末」を「粉末又は液体」に、「わずかに渋み」を「渋み」に変更し、乾燥減量「8%以下(105℃, 2時間)」を「液体試料の場合80.0%以下(110℃, 3時間)、粉末試料の場合8.0%以下(105℃, 2時間)」に変更した。これら変更点について検体で検証した結果、性状、確認試験、純度試験、含量(定量法に基づく)は何れも規格を満足したため、規格変更は可能と判断した。

$\epsilon$ -ポリリシンについては、定義に「デキストリンを含むことかある。」を追加、含量の「87%以上(乾燥物換算)」を「25%以上で、その表示量の95%～115%を含む」に、性状に「淡黄色の液体」を追加した。さらに、純度試験及び強熱残分の試料採取量を「 $\epsilon$ -ポリリシンとして」に変更、定量法の試料採取量を「乾燥物換算」から「 $\epsilon$ -ポリリシン0.25gに対応する量」に変更した。これら変更点について検体で検証した結果、性状、確認試験、純度試験、強熱残分、含量(定量法に基づく)は何れも規格を満足したため、規格変更は可能と判断した。

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

2004年2月16日  
キッコーマン株式会社  
ハイオケミカル事業部

## ブドウ種子抽出物の分析

ブドウ種子抽出物の分析につき、下表の通り報告申し上げます。

規格項目	規格	測定回数	製造番号					
			ブドウ種子抽出物(液体)	ブドウ種子抽出物(液体)	ブドウ種子抽出物(液体)	ブドウ種子抽出物(粉末)	ブドウ種子抽出物(粉末)	ブドウ種子抽出物(粉末)
			GSE-P2000 No 8	GSE-P2000 No 47	GSE-P2002 No 1	GVN0004	GVT0003	GVT0005
性状	本品は 淡黄～濃褐色の粉末又は液体で 洗みを有し わずかに特有のおいがある	①	濃褐色の液体で洗みがあり わずかににおいがある	濃褐色の液体で洗みがあり わずかににおいがある	濃褐色の液体で洗みがあり わずかににおいがある	褐色の粉体で洗みがあり わずかににおいがある	褐色の粉体で洗みがあり わずかににおいがある	褐色の粉体で洗みがあり わずかににおいがある
		②	濃褐色の液体で洗みがあり わずかににおいがある	濃褐色の液体で洗みがあり わずかににおいがある	濃褐色の液体で洗みがあり わずかににおいがある	褐色の粉体で洗みがあり わずかににおいがある	褐色の粉体で洗みがあり わずかににおいがある	褐色の粉体で洗みがあり わずかににおいがある
		③	濃褐色の液体で洗みがあり わずかににおいがある	濃褐色の液体で洗みがあり わずかににおいがある	濃褐色の液体で洗みがあり わずかににおいがある	褐色の粉体で洗みがあり わずかににおいがある	褐色の粉体で洗みがあり わずかににおいがある	褐色の粉体で洗みがあり わずかににおいがある
確認試験	本品5mgを50%エタノール10mlに溶かし この液1mlに対してn-ブタノール/塩酸混液(95:5)10mlを加えたものは 淡黄～淡黄褐色であるか これを97℃で30分間加熱すると赤色を呈する	①	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する
		②	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する
		③	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する	淡黄褐色であり 赤色を呈する
純度試験	鉛 Pbとして10μg/g以下(1.0g 第1法)	①	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
		②	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
		③	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
	ヒ素 As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として4μg/g以下(0.5g 第3法 装置B)	①	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
		②	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
		③	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
残留溶媒 アセトン30μg/g以下	①	1.12	1.88	1.3	N D	N D	N D	
	②	1.03	1.38	1.28	N D	N D	N D	
	③	1.43	1.81	1.29	N D	N D	N D	
乾燥減量	液体試料の場合 80.0%以下(110℃ 3時間) 粉末試料の場合 8.0%以下(105℃ 2時間)	①	66.45	70.5	66.69	3.94	2.6	3.87
		②	66.37	70.44	67.75	3.06	2.92	3.94
		③	64.16	70.87	66.87	3.9	3.11	3.89
含量	本品を乾燥物換算したものは プロアントニンジンを25%以上含む	①	62.3	60.03	60.22	43.86	43.47	33.12
		②	60.57	57.48	59.6	43.8	44.07	33.49
		③	62.44	59.93	60.13	42.95	42.39	32.61
		④	57.76	58.36	55.66	43.63	44.28	33.07
		⑤	60.6	57.48	59.66	42.87	42.76	32.34
		⑥	57.77	58.39	55.75	43.61	44.2	33.2
	平均 (n=6)	60.24	58.61	58.50	43.45	43.53	32.97	
	標準偏差	2.08	1.13	2.18	0.43	0.80	0.42	
	CV (%)	3.4	1.9	3.7	1.0	1.8	1.3	
	最大値	62.44	60.03	60.22	43.86	44.28	33.49	
最小値	57.76	57.48	55.66	42.87	42.39	32.34		

以上

# ブドウ種子抽出物

## Grape seed extract

**定義** 本品は、アメリカブドウ又はブドウの種子から得られた、プロアントシアニジンを中心とするものである。デキストリン、果糖又はブドウ糖を含むことがある。

**含量** 本品を乾燥物換算したものは、プロアントシアニジンを中心とする。

**性状** 本品は、淡黄～濃褐色の粉末又は液体で、澱みを有し、わずかに特有のにおいがある。

**確認試験** (1) 本品5mgを50%エタノール10mlに溶かし、この液1mlに対して*n*-ブタノール/塩酸混液 (95 : 5) 10mlを加えたものは、淡黄～淡黄褐色であるが、これを97℃で30分間加熱すると赤色を呈する。

**純度試験** (1) 鉛 Pbとして10μg/g以下 (10g, 第1法)

(2) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として40μg/g以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

(3) 残留溶媒 アセトン30μg/g以下

**乾燥減量** 液体試料の場合 80.0%以下 (110℃, 3時間)

粉末試料の場合 8.0%以下 (105℃, 2時間)

**定量法** 次の(1)及び(2)で得たTF及びTCの値から、次式によりプロアントシアニジンの含量を求め乾燥物換算する。

プロアントシアニジンの含量 (%) = TF (%) - TC (%)

(1) 総フラハノール 総フラハノール約25mgに対応する量の本品を精密に量り、水/エタノール混液 (1 : 1) を加えて正確に100mlとし、これを試料溶液 (原液) とする。試料溶液 (原液) は用時調製する。試料溶液 (原液) 0.5mlを褐色試験管に正確に量りとり、ハニリンのメタノール溶液 (1→25) 3.0mlを加え、よく振り混ぜる。この液に塩酸1.5mlを速やかに加え、蓋で密栓して直ちによく振り混ぜる。これを20～30℃で、20～40分間静置して試料溶液 (定量用) とする。水/エタノール混液 (1 : 1) を対照液として波長500nmにおける試料溶液 (定量用) の吸光度Asを測定する。別に試料溶液の代わりに水/エタノール混液 (1 : 1) 0.5mlを量り、以下試料溶液 (定量用) の場合と同様に操作して調製したものをブランク液とし、波長500nmにおけるブランク液の吸光度Abを測定する。

また試料液0.5mlを褐色試験管に正確に量りとり、バニリンのメタノール溶液の代わりにメタノール3.0mlを加え、以下試料溶液 (定量用) の場合と同様に操作して調製したものをコントロール液とし、波長500nmにおけるコントロール液の吸光度Acを求める。

次式から試料溶液 (定量用) の吸光度Aを測定する。

$$A = A_s - A_b - A_c$$

(+) カテキン約10mg, 20mg, 30mgを精密に量り、水/エタノール混液 (1 : 1) を加えてそれぞれ正確に100mlとする。これらを用いて試料溶液 (定量用) の場合と同様に操作して、同一の対照液を用い、波長500nmにおける吸光度を測定し、検量線を作成する。

ここで得た検量線と試料溶液 (定量用) の吸光度Aとにより、試料中の総フラハノール含量TF (%) を求める。

(2) 総カテキン類 本品約0.1gを精密に量り、0.1mmol/L EDTA含有の10mmol/Lリン酸/メタノール混液 (1 : 1) を加えて正確に100mlとし、試料溶液とする。別に定量用カテキン、定量用エピカテキン、定量用ガロカテキン、定量用エピガロカテキン、定量用カテキンカレート、定量用エピカテキンカレート、定量用ガロカテキンカレート及び定量用エピガロカテキンカレートをそれぞれ約2mg精密に量り、メタノールを加えて正確に100mlとし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液をそれぞれ10μlずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフ法を行う。試料溶液のカテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、

カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート及びエピガロカテキンガレートのピーク面積Acc, Acec, Acgc, Acegc, Accg, Acecg, Acgcg及びAcegcg, 並びに標準溶液のカテキン, エピカテキン, ガロカテキン, エピガロカテキン, カテキンガレート, エピカテキンガレート, ガロカテキンガレート及びエピガロカテキンガレートのピーク面積Asc, Asec, Asgc, Ascg, Asecg, Asegc, Asgcg及びAsegcgを測定し, 次式により総カテキン類の含量TC (%)を求める。

総カテキン類の含量TC (%)

$$= (\text{Acc}/\text{Asc} \times \text{Sc} + \text{Acec}/\text{Asec} \times \text{Sec} + \text{Acgc}/\text{Asgc} \times \text{Sgc} + \text{Acegc}/\text{Asegc} \times \text{Segc} + \text{Accg}/\text{Ascg} \times \text{Scg} + \text{Acecg}/\text{Asecg} \times \text{Secg} + \text{Acgcg}/\text{Asgcg} \times \text{Sgcg} + \text{Acegcg}/\text{Asegcg} \times \text{Segcg}) \times 100 / \text{試料の採取量 (mg)} \times 100 (\%)$$

ただし,

Sc 標準溶液のカテキンの濃度 (mg/ml)

Sec 標準溶液のエピカテキンの濃度 (mg/ml)

Sgc 標準溶液のガロカテキンの濃度 (mg/ml)

Segc 標準溶液のカテキンガレートの濃度 (mg/ml)

Scg 標準溶液のエピガロカテキンの濃度 (mg/ml)

Secg 標準溶液のエピカテキンガレートの濃度 (mg/ml)

Sgcg 標準溶液のガロカテキンガレートの濃度 (mg/ml)

Segcg 標準溶液のエピガロカテキンガレートの濃度 (mg/ml)

操作条件

検出器 紫外外部吸収検出器 (測定波長 280nm)

カラム充填剤 5 $\mu$ mの化学結合型オクタデシルシラン

カラム管 内径4.6mm, 長さ25cmのステンレス管

カラム温度 40 $^{\circ}$ C

移動層 A 10mmol/Lリン酸, B 10mmol/Lリン酸/メタノール混液 (1 : 4)

濃度勾配 A : B (100 : 0) からA : B (62.5 : 37.5) までの濃度勾配を45分間行い, 次いでA : B (62.5 : 37.5) からA : B (50 : 50) までの濃度勾配を25分間行い, 次いでA : B (50 : 50) からA : B (0 : 100) までの濃度勾配を5分間行い, 最後にA : B (0 : 100) で10分間保持する。

流量 0.5ml/分



# ε-ポリリシン 試験報告書

2004年2月18日 テノ株式会社

ε-ポリリシン 検査結果(50%デキストリン粉末及び25%溶液、各3ロット)

## 確認試験

### (1)トラーゲントルフ試験

50%粉末

Lot No	検査回数	測定結果	判定
1031001	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合
1031003	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合
1031005	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合

25%溶液

Lot No	検査回数	測定結果	判定
2030901	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合
2031002	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合
2031004	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合

### (2)メチルオレンジ試験

50%粉末

Lot No	検査回数	測定結果	判定
1031001	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合
1031003	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合
1031005	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合

25%溶液

Lot No	検査回数	測定結果	判定
2030901	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合
2031002	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合
2031004	1	赤褐色の沈殿生成	適合
	2	赤褐色の沈殿生成	適合
	3	赤褐色の沈殿生成	適合

### (3)薄層クロマト

50%粉末

Lot No	検査回数	測定結果	判定
1031001	1	標準と色調及びRf同し	適合
	2	標準と色調及びRf同し	適合
	3	標準と色調及びRf同し	適合
1031003	1	標準と色調及びRf同し	適合
	2	標準と色調及びRf同し	適合
	3	標準と色調及びRf同し	適合
1031005	1	標準と色調及びRf同し	適合
	2	標準と色調及びRf同し	適合
	3	標準と色調及びRf同し	適合

25%溶液

Lot No	検査回数	測定結果	判定
2030901	1	標準と色調及びRf同し	適合
	2	標準と色調及びRf同し	適合
	3	標準と色調及びRf同し	適合
2031002	1	標準と色調及びRf同し	適合
	2	標準と色調及びRf同し	適合
	3	標準と色調及びRf同し	適合
2031004	1	標準と色調及びRf同し	適合
	2	標準と色調及びRf同し	適合
	3	標準と色調及びRf同し	適合

## 純度試験

### (1)重金属(Pbとして)

50%粉末

Lot No	検査回数	測定結果	判定
1031001	1	10µg/g以下	適合
	2	10µg/g以下	適合
	3	10µg/g以下	適合
1031003	1	10µg/g以下	適合
	2	10µg/g以下	適合
	3	10µg/g以下	適合
1031005	1	10µg/g以下	適合
	2	10µg/g以下	適合
	3	10µg/g以下	適合

25%溶液

Lot No	検査回数	測定結果	判定
2030901	1	10µg/g以下	適合
	2	10µg/g以下	適合
	3	10µg/g以下	適合
2031002	1	10µg/g以下	適合
	2	10µg/g以下	適合
	3	10µg/g以下	適合
2031004	1	10µg/g以下	適合
	2	10µg/g以下	適合
	3	10µg/g以下	適合

### (2)ヒ素(As2O3として)

50%粉末

Lot No	検査回数	測定結果	判定
1031001	1	4µg/g以下	適合
	2	4µg/g以下	適合
	3	4µg/g以下	適合
1031003	1	4µg/g以下	適合
	2	4µg/g以下	適合
	3	4µg/g以下	適合
1031005	1	4µg/g以下	適合
	2	4µg/g以下	適合
	3	4µg/g以下	適合

25%溶液

Lot No	検査回数	測定結果	判定
2030901	1	4µg/g以下	適合
	2	4µg/g以下	適合
	3	4µg/g以下	適合
2031002	1	4µg/g以下	適合
	2	4µg/g以下	適合
	3	4µg/g以下	適合
2031004	1	4µg/g以下	適合
	2	4µg/g以下	適合
	3	4µg/g以下	適合

## 強熱残分

50%粉末

Lot No	検査回数	測定結果	判定
1031001	1	10%以下	適合
	2	10%以下	適合
	3	10%以下	適合
1031003	1	10%以下	適合
	2	10%以下	適合
	3	10%以下	適合
1031005	1	10%以下	適合
	2	10%以下	適合
	3	10%以下	適合

25%溶液

Lot No	検査回数	測定結果	判定
2030901	1	10%以下	適合
	2	10%以下	適合
	3	10%以下	適合
2031002	1	10%以下	適合
	2	10%以下	適合
	3	10%以下	適合
2031004	1	10%以下	適合
	2	10%以下	適合
	3	10%以下	適合

定量結果は別ノート参照

定量結果

2004年2月18日チソ株式会社

50%粉末

Lot No	検査回数	測定結果	平均	平均2と標準偏差
1031001	1	50 3	50 4	平均2 50 5 標準偏差 0 19
		50 4		
		50 4		
	2	50 6	50 6	
		50 7		
		50 6		
	3	50 4	50 5	
		50 5		
		50 5		
	4	50 3	50 3	
		50 3		
		50 4		
	5	50 6	50 7	
		50 7		
		50 7		
	6	50 7	50 8	
		50 8		
		50 9		
1031003	1	50 8	50 9	平均2 50 4 標準偏差 0 28
		50 9		
		50 9		
	2	50 3	50 4	
		50 4		
		50 4		
	3	50 6	50 7	
		50 7		
		50 7		
	4	50 0	50 1	
		50 1		
		50 2		
	5	50 2	50 2	
		50 2		
		50 2		
	6	50 3	50 4	
		50 4		
		50 4		
1031005	1	50 9	50 9	平均2 50 6 標準偏差 0 21
		50 9		
		50 9		
	2	50 5	50 6	
		50 6		
		50 6		
	3	50 7	50 7	
		50 7		
		50 7		
	4	50 2	50 3	
		50 3		
		50 3		
	5	50 7	50 7	
		50 7		
		50 7		
	6	50 7	50 7	
		50 7		
		50 7		

25%溶液

Lot No	検査回数	測定結果	平均	平均2と標準偏差
2030901	1	25 7	25 7	平均2 25 6 標準偏差 0 14
		25 7		
		25 7		
	2	25 5	25 6	
		25 6		
		25 6		
	3	25 9	25 9	
		25 9		
		25 9		
	4	25 6	25 6	
		25 6		
		25 6		
	5	25 5	25 5	
		25 5		
		25 5		
	6	25 6	25 6	
		25 6		
		25 6		
2031002	1	25 5	25 6	平均2 25 7 標準偏差 0 25
		25 6		
		25 6		
	2	25 7	25 7	
		25 7		
		25 7		
	3	26 2	26 2	
		26 2		
		26 2		
	4	25 5	25 5	
		25 5		
		25 5		
	5	25 7	25 7	
		25 7		
		25 7		
	6	25 6	25 6	
		25 6		
		25 6		
2031004	1	25 4	25 5	平均2 25 6 標準偏差 0 19
		25 5		
		25 5		
	2	25 4	25 4	
		25 4		
		25 4		
	3	25 8	25 9	
		25 9		
		25 9		
	4	25 6	25 6	
		25 6		
		25 6		
	5	25 8	25 8	
		25 8		
		25 8		
	6	25 7	25 7	
		25 7		
		25 8		

## ε-ポリリシン

ε - Polylysine

ε - ポリリシン

**定 義** 本品は、放線菌 (*Streptomyces albulus*) の培養液より、イオン交換樹脂を用いて吸着、分離して得られたものである。成分はε-ポリリシンである。デキストリンを含むことがある。

**含 量** 本品は、ε-ポリリシンとして25%以上で、その表示量の95~115%を含む。

**性 状** 本品は、淡黄色の液体又は吸湿性の強い淡黄色の粉末で、わずかに苦味を有する。

**確認試験** (1) 本品の水溶液 (1→1,000) 1 ml にトラーケントルフ試液 1 ml を加えるとき、赤褐色の沈澱を生ずる。

(2) 本品 0.1 g にリン酸緩衝液 (pH 6.8) 100 ml を加えて溶かした液 1 ml にメチルオレンジ試液 1 ml を加えるとき、赤褐色の沈澱を生ずる。

(3) 本品の水溶液 (1→100) 1 ml に塩酸 1 ml を加え、110℃で24時間加熱分解し、冷却後水酸化ナトリウム溶液 (1→5) 約 1 ml を加え pH を 6~8 に調整して試料溶液とする。別に L-リシン塩酸塩 10 mg を水 10 ml に溶解し、標準溶液とする。これらの液につき薄層クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液及び標準溶液 2 μl ずつを薄層クロマト用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に *n*-ブタノール/水/酢酸混液 (4 : 2 : 1) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これにニンヒドリンのアセトン溶液 (1→50) を均等に噴霧した後 90℃で10分間加熱する。試料溶液から得たスポットは、標準溶液から得た赤紫色のスポット (L-リシン) と色調及び  $R_f$  値が等しい。

**純度試験** (1) 重金属 Pb として 10 μg/g 以下 (ε-ポリリシンとして 2.0 g, 第 2 法, 比較液 鉛標準液 2.0 ml)

(2) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> として 4.0 μg/g 以下 (ε-ポリリシンとして 0.5 g, 第 3 法, 装置 B)

**強熱残分** 1.0% 以下 (ε-ポリリシンとして 0.5 g)

**定 量 法** 内部標準として L-フェニルアラニン 150 mg を正確に量り、移動相を加えて溶かし、正確に 100 ml とする。この液 5 ml を取り移動相を加えて正確に 100 ml とし内部標準液とする。本品の ε-ポリリシン 0.25 g に対応する量を精密に量り、移動相を加えて溶かし正確に 50 ml とする。この液 1 ml を取り、内部標準液 10 ml を加えて移動相にて正確に 50 ml 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 310 mg を精密に量り、移動相を加えて溶かし、正確に 100 ml とする。その液 25 ml をとり移動相を加えて正確に 100 ml 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 10 ml、8 ml、6 ml をとり、それぞれに内部標準液 10 ml を加え、移動相にて正確に 50 ml 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、検量線を用いて含量を求める。

**操作条件**

検出器 紫外吸光検出器 (測定波長 215 nm)

カラム充填剤 5~10 μm の化学結合型オクタデシルシラン

カラム管 内径 4.6 mm, 長さ 25 cm のステンレス管

カラム温度 40℃ 付近の一定温度

移動相 リン酸二カリウム 1.74 g 及び硫酸ナトリウム 1.42 g をとり水約 800 ml に溶かし、リン酸で pH を 3.4 に調整する。この溶液を水で 1 l に定容する。この液 920 ml アセトニトリル 80 ml を加える。

流量 ポリリシンの保持時間が約4分になるように調整する (0.5ml/分)

注入量 100  $\mu$ l

試薬

- (1) L-フェニルアラニン  $C_9H_{13}NO_2$  (特級)
- (2)  $\epsilon$ -ポリリシン塩酸塩 (定量用) 精製品 (純度98%以上、L-リノ塩酸塩として)

$\epsilon$ -ポリリシン塩酸塩 (定量用) の作製方法 (例)

本品 ( $\epsilon$ -ポリリシン25%溶液) を、塩酸 (試薬特級) で酸性 (pH4~5) に調節する。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)。その後、沈殿をアセトンで洗浄し、乾燥 (40℃、減圧) することにより精製した  $\epsilon$ -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)

メタノール、アセトン 試薬特級 (和光純薬)

- (1) 本品 ( $\epsilon$ -ポリリシン25%溶液) 1000g
- ↓
- (2) 塩酸で酸性 (pH4~5) に調節
- ↓
- (3) 晶析 (①メタノール1.5L、②アセトン4.5L)
- ↓
- (4) 濾過、沈殿洗浄 (水:メタノール:アセトン=1:1:3溶液 500ml)
- ↓
- (5) 沈殿洗浄 (アセトン 500ml)
- ↓
- (6) 沈殿乾燥 (40℃ 減圧14時間)
- ↓
- $\epsilon$ -ポリリシン塩酸塩 (定量用) 約200g

第四部会（糊料・増粘安定剤）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 第四部会  
研究者所属 三栄原エフ エフ アイ株式会社  
大日本製薬株式会社

1 目的

アウレオハシウム培養液、微小繊維状セルロースについて、現行規格の見直し案を設定するための調査検討を行い、改定自主規格案を策定し、その妥当性を確認した。試験内容、方法等は第7版公定書の増粘安定剤の規格に基づき実施した。

2 検討結果並びに考察

- ・ アウレオハシウム培養液は、アウレオハシウムの培養液から得られた、多糖類 $\beta$ -1,3-1,6クルカンの主成分とするものである。第3版既存添加物自主規格で設定した規格に対して、含量規格と定量法、動粘度規格を追加した。また純度試験のうち、ヒ素の規格値を改定した。見直しの根拠として、3ロット各3回の試験結果が得られている。
- ・ 微小繊維状セルロースは、パルプ又は綿を微小繊維状にして得られた、セルロースを主成分とするものである。第3版既存添加物自主規格で設定した規格に対して、確認試験（1）及び（3）を改訂、純度試験の重金属規格を削除し鉛規格値を国際的な動向にあわせた。また乾燥減量の規格値を改訂した。見直しの根拠として、3ロット各3回の試験結果が得られている。

3 規格（案）及び試験結果

別紙のとおり

以上

# アウレオバシジウム培養液

平成16年3月

研究者名・所属

大日本製薬株式会社・フートサイエンス部

## 1 緒言

本報告は既存添加物「アウレオバシジウム培養液」について、株式会社ソフィテ策定実施した結果をもとにまとめたものである。

## 2 目的

自主規格作成のため、含量、定量方法等について調査研究を行い、この結果を踏まえて規格（案）を作成した。

## 3 試験法

食品添加物公定書に準じた。

含量および定量法については、本多糖類が側鎖に負の極性を持つことから、カチオン系の界面活性剤である塩化ベンザルコニウム（塩化アルキルベンシルジメチルアンモニウム、 $C_{22}H_{40}ClN$ ）との反応性を利用して、多糖類を凝集沈殿させ、全糖量を測定してアウレオバシジウム培養液の含量とした。

## 4 結果

試験結果は以下の通りである。

3ロットについて、含量は6回繰り返し試験を、その他規格項目については3回繰り返し試験の結果を示した。

## 含量

Lot	検体	含量 (g/L)
SAP-010403	①	3.4
SAP-010403	②	3.2
SAP-010403	③	3.6
SAP-010403	④	3.2
SAP-010403	⑤	3.2
SAP-010403	⑥	3.5
SAP-010403	平均	3.3
SAP-010903	①	3.0
SAP-010903	②	3.5
SAP-010903	③	3.1
SAP-010903	④	3.2
SAP-010903	⑤	3.2
SAP-010903	⑥	3.1
SAP-010903	平均	3.2
SAP-011003	①	3.5
SAP-011003	②	3.9

SAP-011003	③	4.1
SAP-011003	④	3.8
SAP-011003	⑤	3.7
SAP-011003	⑥	3.8
SAP-011003	平均	3.8

粘度

Lot	検体	粘度 (Pa·s)
SAP-010403	①	1.1
SAP-010403	②	1.1
SAP-010403	③	1.0
SAP-010403	平均	1.1
SAP-010903	①	1.1
SAP-010903	②	1.2
SAP-010903	③	1.2
SAP-010903	平均	1.2
SAP-011003	①	1.3
SAP-011003	②	1.2
SAP-011003	③	1.3
SAP-011003	平均	1.3

重金属 (Pb として) ・ ヒ素 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> として) ・ 鉛 (Pb として)

Lot	検体	重金属	鉛	ヒ素
SAP-010903	①	限度内	限度内	限度内
SAP-010903	②	限度内	限度内	限度内
SAP-010903	③	限度内	限度内	限度内
SAP-011003	①	限度内	限度内	限度内
SAP-011003	②	限度内	限度内	限度内
SAP-011003	③	限度内	限度内	限度内
SAP-011103	①	限度内	限度内	限度内
SAP-011103	②	限度内	限度内	限度内
SAP-011103	③	限度内	限度内	限度内

細菌数 ・ 大腸菌

Lot	検体	細菌数	大腸菌
SAP-010903	①	300 以下/g	陰性
SAP-010903	②	300 以下/g	陰性
SAP-010903	③	300 以下/g	陰性
SAP-011003	①	300 以下/g	陰性
SAP-011003	②	300 以下/g	陰性
SAP-011003	③	300 以下/g	陰性
SAP-011103	①	300 以下/g	陰性
SAP-011103	②	300 以下/g	陰性
SAP-011103	③	300 以下/g	陰性

## 5 考察

以上の結果から、含量としては30g/L以上、すなわち0.3%以上と設定した。

アウレオハシシウム培養液は、培養により得られる多糖類を含む溶液そのものであり、残部は大部分が水である。なお、アウレオハシシウム培養液が $\beta$ -1,3-1,6グルカンであることは $\beta$ -1,3-1,6グルカン分解酵素を用いて分解することにより確認されている。

## 6 結び

自主規格（案）を次に示す。

以上



## アウレオバシジウム培養液（案）

Aureobasidium cultured solution

**定 義** 本品は、アウレオバシジウム培養液から得られた、 $\beta$ -1,3-1,6 グルカンの主成分とするものである。

**含 量** 本品は $\beta$ -1,3-1,6 グルカンをも 3%以上を含む。

**性 状** 本品は白色または淡黄白色の様な高粘性な液体で、特異なおいがあり、肉眼で確認できる菌糸型細胞が絡まったペレットを含まない。

**確認試験** 水 500 ml にカオリン 0.2 g を加え激しく攪拌した後、本品 1.0 g を加えて激しく攪拌する。この溶液に穏やかに攪拌しながら塩化マグネシウム 0.2 g を加え溶解した液を検液とする。検液に 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を滴下し、pH が 10.8~11.5 になるとき、白色の沈殿物を生じる。また同時に白濁していた検液が無色透明になる。

### 純度試験

(1) 動粘度 1.0 Pa·s 以上

本品 100g を精密に量り、 $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  で粘度を測定する。(第 2 法、回転式粘計法、2 号、6 回転、安定)

(2) 重金属 Pb として 10  $\mu\text{g/g}$  以下(1.0 g, 第 2 法, 比較液 鉛標準液 2.0 ml)

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

(4) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$  として 2.0  $\mu\text{g/g}$  以下(1.0 g, 第 3 法, 装置 B)

**微生物限度** 微生物限度試験法により試験を行う時、本品 1 g につき、細菌数は 10,000 以下である。また大腸菌は認めない。

**定量法** 本品 4ml を正確に採り、正確に 20ml とし、激しく攪拌した後、 $40000 \times g$  で 10 分の遠心分離により上清を得る。この上清 10 ml を正確に量り、塩化ベンザルコニウム溶液(1→100) 20 ml を加え激しく攪拌した後、 $40000 \times g$ 、20 分の遠心分離により沈殿を得る。沈殿を 0.3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 ml に溶解させる。この液 1 ml を正確に量り、フェノール(1→20)溶液 1 ml 及び硫酸 2.5 ml を加え激しく攪拌した後、水冷し検液とする。別に D(+)-グルコース 10 mg を正確に量り、0.3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 ml に溶解させる。この液 1 ml を正確に量り、フェノール(1→20)溶液 1 ml 及び硫酸 2.5 ml を加え激しく攪拌した後、水冷し標準液 1 とする。また 0.3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 ml を正確に量り、フェノール(1→20)溶液 1 ml 及び硫酸 2.5 ml を加え激しく攪拌した後、水冷した液を標準液 2 とする。検液及び標準液 1、標準液 2 につき、波長 490 nm における吸光度  $A_s$  及び  $A_1$ 、 $A_2$  を測定し次式により含量を求めらる。

$$\text{含量} = \frac{A_s - A_2}{A_1 - A_2} \times 0.1 \times 5$$

# 「微小繊維状セルロース」試験報告書

平成16年3月

研究者名・所属

三栄源エフ エフ アイ株式会社

ダイセル化学工業株式会社

## 1 緒言

本報告は既存添加物「微小繊維状セルロース」について、ダイセル化学工業株式会社に策定実施した結果をもとにまとめたものである。

## 2 目的

自主規格改定のため、確認試験(1)の見直しと確認試験(3)の追加、国際整合性の観点からの重金属削除と鉛規格見直し、及び乾燥減量規格改定について調査研究を行い、この結果を踏まえて規格(案)を作成した。

## 3 試験法

食品添加物公定書に準じた。

## 4 結果

試験結果は以下の通りである。

3ロットについて、3回繰り返し試験の結果を示した。

		規格値	①	②	③
確認試験	(1)	分離せず	分離せず 分離せず 分離せず	分離せず 分離せず 分離せず	分離せず 分離せず 分離せず
	(3)	通過しない	通過しない 通過しない 通過しない	通過しない 通過しない 通過しない	通過しない 通過しない 通過しない
純度試験	鉛	20 $\mu$ g/g以下 (乾燥物換算10g当り)	0.29 $\mu$ g/g 0.29 $\mu$ g/g 0.29 $\mu$ g/g	0.19 $\mu$ g/g 0.19 $\mu$ g/g 0.19 $\mu$ g/g	0.08 $\mu$ g/g 0.08 $\mu$ g/g 0.08 $\mu$ g/g
乾燥減量		50~92%	89.8%	65.0%	66.1%
			89.9%	65.3%	66.1%
			89.8%	65.4%	66.2%

・試験品番 ①パルプ1種、固形分10%品、②パルプ2種、固形分35%品、③パルプ1種、固形分35%品

## 5 考察

以上の結果から、測定した全てのデータは規格値案に合致し妥当であると考えられる。また、国際的な動きから、鉛規格を導入し重金属を削除することは妥当であると考えられる。

## 6 結び

自主規格(案)を次に示す。

以上

## 微小繊維状セルロース（案）

Microfibrillated Cellulose

**定 義** 本品は、パルプ又は綿を微小繊維状にして得られた、セルロースを主成分とするものである。

**性 状** 本品は白色の湿綿状である。

- 確認試験**
- (1) 本品 50g (乾燥物換算) をとり、水を加えて 100g とし、羽根刃直径約 35mm、カップ容量約 150ml (カップ 上部内径約 59mm、下部内径約 44mm、深さ約 75mm) のホモナイザーにより毎分 10,000~12,000 回転で 3 分間強制的にかき混ぜるとき、混合物は白色不透明の分散状態となり、3 時間後も分離せずその状態を保つ。
  - (2) 本品を乾燥し、赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定し、本品のスペクトルを参照スペクトルと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。
  - (3) 本品 10g (乾燥物換算) をとり、水を加えて 100g とし、確認試験 (1) と同様のホモナイザー (毎分 10,000~12,000 回転) で 3 分間かき混ぜた溶液を静止状態の標準網ふるい 25 $\mu$ ml に通すとき、10 秒以内に本品を含む白濁液はほとんど通過しない。

- 純度試験**
- (1) 液性 pH5.0~8.0 (20g、水 100ml 懸濁液)
  - (2) 鉛 Pb として 20 $\mu$ g/g 以下 (10g、第 1 法)
  - (3) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> として 20 $\mu$ g/g 以下 (10g、第 3 法、装置 B)
  - (4) 水可溶物 0.5% 以下

本品 40g (乾燥物換算) を量り、精製水 200ml を加えてホモディスパーで毎分 5,000 回転で 5 分間かき混ぜた分散液をろ紙 (5C) で吸引ろ過し、ろ液 50ml をとり水浴上で蒸発乾固する。残留物を 120℃ で 1 時間乾燥し、デシケーターで放冷後、重量を精密に量る。

**乾燥減量** 50~92% (120℃、5 時間)

**灰 分** 0.5% 以下 (乾燥物換算)

**微生物限度** 微生物試験法により試験を行うとき、本品 1g につき、細菌数は 10,000 以下である。また大腸菌は認めない。

第五部会（酸化防止剤）既存添加物自主規格案検討結果報告  
—第三版既存添加物自主規格「イノシトール」「 $\gamma$ オリザノール」及び  
「酵素処理ヘスペリジン」の規格の見直し—

日本食品添加物協会 第五部会  
研究者所属 エーサイ株式会社  
扶桑化学工業株式会社  
理研ヒタミン株式会社  
築野食品工業株式会社  
東洋精糖株式会社

### 1 目的

既存添加物「イノシトール」、「 $\gamma$ -オリザノール」及び「酵素処理ヘスペリジン」の自主規格は第三版既存添加物自主規格に記載されている。しかしながら、確認試験法中の有害試薬対策及び定量法の改善の必要性等が生じたので、それらについて、試験法の見直しとその妥当性を検討した。

### 2 検討内容及び方法

「イノシトール」については、第三版既存添加物自主規格の確認試験(1)及び確認試験(2)において硝酸ストロンチウム及び塩基性酢酸鉛が使用されており、健康衛生の立場から、それらを使用しない代替試験法が望まれる。また、定量法はイノシトールをヘキサアセチルイノシトールに変換しその重量より含量を計算する方法であり、より簡便で正確な定量法の開発が求められていた。一方、イノシトールは医薬品添加物として医薬品添加物規格〔薬添規〕(2003)に新たに記載された。その薬添規(2003)では、確認試験で赤外吸収スペクトル測定での特定吸収波数か、また、定量法として液体クロマトグラフ法が採用され、既存添加物「イノシトール」の試験法もこれにならうことが妥当と考えた。

「 $\gamma$ -オリザノール」については、第2版化学的合成品以外の食品添加物自主規格においては、定量法規格は設定されていたか含量規格か設定されていなかったことから、第三版既存添加物自主規格においては定量法を削除した。しかしながら、製品品質の観点からは含量規格の策定が望ましく、当該定量法により含量の実態を把握し含量規格を策定した。また、製造管理の上から乾燥減量規格0.05%は厳しく妥当な規格の改定を検討した。

「酵素処理ヘスペリジン」については、第三版既存添加物自主規格に含量規格及び定量法が設定されているか、その後の研究で製品成分の実態が明らかになったことから、定量法及び含量規格の改定を行なうこととした。あわせて確認試験(3)の紫外外部吸収波長についてスペクトルを極大吸収部を明記し、併せてピークのモノグルコシルヘスペリジンに対する相対保持時間の幅とピーク個数を示すこととした。

### 3 検討結果及び考察

別紙にそれぞれ個別の検討結果及びそれに基づく自主規格(案)を記載した。

#### (1) 「イノシトール」

- ① 第三版既存添加物自主規格の確認試験(1)及び(2)を削除し、医薬品添加物規格(2003)の確認試験を採用した。
- ② 第三版既存添加物自主規格の定量法に替え 医薬品添加物規格(2003)の定量法を採用した。含量規格については両規格で値が同しており、改定は行なわない。
- ③ 流通する医薬品添加物「イノシトール」と既存添加物「イノシトール」は同一物質であり、含量規格も同してあることから妥当性の試験は行なわない。