

させること、鉛以外の金属の規格は必要に応じて設定すること、鉛は原則 $2\mu\text{g/g}$ 以下（理由があれば $5\mu\text{g/g}$ 以下）などの低濃度の規格設定が提案された。

以上のことから、第 4 版自主規格では、カカオ色素の純度試験（1）重金属の規格は、純度試験（2）鉛の規格に統合し、現在よりも低濃度で管理することを下記の通り提案した。

なお、引き続き、製品中の重金属含量の低減方法を検討するとともに、カドミウムなどの他の有害性物質の調査を行い、第 9 版食品添加物公定書の改正時にはより適切な規格設定ができるように鋭意研究を進める所存である。

以上

第四版自主規格 (変更案)

カカオ色素

Cacao color

ココア色素

定義 本品は、アオギリ科カカオ(Theobroma Cacao LINNE)の種子(カカオ豆) 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 ($E_{1\text{cm}}^{10\%}$) は 50 以上で、その表示量の 90~120%を含む。

性 状 本品は、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、さらに 30 分以上放置し、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき^{*}、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、0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて溶かし、正確に 100ml とし、この溶液 5ml に 0.1mol/L 塩酸 10ml を加え酸性にした液に、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) 100 μ l 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~黄褐色の沈殿を生じる。

純度試験 (1) 鉛 Pb として 5 μ g/g 以下 (2.0g, 第1法)

(2) ヒ素 As₂O₃ として 4.0 μ g/g 以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

(3) アセトン 30 μ g/g 以下 (色価 50 に換算して)

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

*注: 平成 19 年度厚生労働科学研究にて報告

研究年月日 : 2007年4月～2008年2月29日
 研究者名 : 日本食品添加物協会 第二部会
 グリコ栄養食品株式会社
 三井製糖株式会社

第四版自主規格「カカオ色素」確認試験(3)改訂の件

目的: 確認試験(3)における沈殿発生の確認方法について再検討する。

第四版既存添加物自主規格(案)のパブリックコメント(2007年11月17日～12月17日)において、「カカオ色素の確認試験(3)」(※)に関して、明確な沈殿の判定が出来ないとの意見が提出されたことから、その確認方法を再検討し規格改定を含めた確認をすることを目的とした。

※確認試験(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。

規格の確認および改定規格の確認 添付資料1、添付資料2

試験方法:

確認試験(3)に従い、塩化第二鉄溶液を加えた試料溶液を30分放置した後、毎分3000rpmで10分間遠心分離を行い、沈殿の有無を確認する。

試験結果:

グリコ栄養食品(株)、ならびに三井製糖(株)のカカオ色素製品8ロットについて、3回の分析を行なった結果、目視で沈殿の確認が可能であった。

以上より、塩化第二鉄溶液を加え、30分放置した後に、遠心分離を行うことにより、沈殿の確認が可能であると考えられる。

	1回目	2回目	3回目
グリコ栄養食品(株) サンプル①	○	○	○
グリコ栄養食品(株) サンプル②	○	○	○
三井製糖(株) サンプル①	○	○	○
三井製糖(株) サンプル②	○	○	○
三井製糖(株) サンプル③	○	○	○
三井製糖(株) サンプル④	○	○	○
三井製糖(株) サンプル⑤	○	○	○
三井製糖(株) サンプル⑥	○	○	○

○: 沈殿を目視確認可能

規格の改定 添付資料3

沈殿の有無については、視覚の感じ方であるためはっきりとした確認方法が必要と考える。指摘事項の確認の結果、確認試験(3)を以下のように変更する。

確認試験(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、さらに30分以上放置し、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行うとき、黒褐色の沈殿を生じる。

以上

平成 20 年 1 月 18 日

カカオ色素確認試験(3) (第四版既存添加物自主規格(案))について

パブリックコメント(2007 年 11 月 17 日～12 月 17 日)対応、試験法の適合性検討

三井製糖株式会社

第四版既存添加物自主規格(案)のパブリックコメント(2007 年 11 月 17 日～12 月 17 日)において、「カカオ色素の確認試験(3)*」に関し「塩化第二鉄溶液(1→10)を3滴加えるとなっている(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)が、3滴では液の色は直ちに黒褐色に変わったが、沈殿を生じない試料があった」という意見が出された。そこで、これまで本委員会のクロス分析試験に用いた3試料を含む7のカカオ色素について、上記確認試験の反応性を調べなおした。

その結果、(i)沈殿の確認には、塩化第二鉄溶液(1→10)を加えてから20分～1晩程度の放置時間が必要であること、(ii)しかし、遠心分離操作を加える、または塩化第二鉄溶液(1→10)の添加量を3滴から10滴に増やすようにすれば、それぞれ20分または2時間程度の放置時間で済むことが示唆された。

*確認試験(3)(案):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。

1. 試験方法

1. 1 試料

①三色会・茶系色素技術委員会の確認試験クロス分析試験に供試した三井製糖㈱製カカオ色素サンプル A、②同三井製糖㈱製カカオ色素サンプル B、③同グリコ栄養食品㈱製カカオ色素サンプル、④三井製糖㈱製カカオ色素サンプル A-2、⑤三井製糖㈱製カカオ色素サンプル A-3、⑥三井製糖㈱製カカオ色素サンプル B-2、⑦三井製糖㈱製カカオ色素サンプル B-3

1. 2 試験

試験1(塩化第二鉄溶液添加後放置時間の影響、及び遠心分離操作の効果の検討)

試料①、②、及び③について、「確認試験(3)(案)」に従って調製した試料溶液に、塩化第二鉄溶液(1→10)を3滴加えて、直後、20分後、または1時間後に遠心分離(1000rpm、10分間)し、沈殿の有無を確認した。

試験2(塩化第二鉄溶液の添加量の検討)

試料①、②、及び③について、「確認試験(3)(案)」に従って調製した試料溶液に、塩化第二鉄溶液(1→10)を3滴(0.15ml)、5滴(0.25ml)、または10滴(0.5ml)加え、直後から2時間目までの間と1晩後に、液の様子を観察した。

試験3(再現性確認試験)

三井製糖㈱製カカオ色素サンプル A の3ロット(試料②、⑥、及び⑦)及び三井製糖㈱製カカオ色素サンプル B の3ロット(試料①、④、及び⑤)について、「確認試験(3)(案)」に従って調製した試料溶液に、塩化第二鉄溶液(1→10)を3滴加え、20分後に遠心分離し、沈殿の有無を確認した。これを3回繰り返し行った。

2. 結果及び考察

試験1(塩化第二鉄溶液添加後放置時間の影響、及び遠心分離操作の効果の検討)

溶液の液色は、何れも、塩化第二鉄溶液(1→10)添加後、直ちに黒褐色に変わった。

沈殿は、添加直後に遠心分離した場合に、試料①が確認しにくかった。しかし、添加後20分または1時間後に遠心分離した場合は、何れの試料も確認できた。

試験2(塩化第二鉄溶液の添加量の検討)

溶液の液色は、何れも、塩化第二鉄溶液(1→10)添加直後に黒褐色に変わった。

沈殿は、何れの試料も、塩化第二鉄溶液(1→10)を添加後2時間以内では、同液の添加量が3滴または5滴の場合に確認しにくかった。10滴の場合は、2時間目で確認できた。しかし、一晩放置すれば、何れの試料、何れの場合も、確認できた。

試験3(再現性確認試験)

試験1及び試験2の結果から、塩化第二鉄添加による沈殿の確認には添加20分～1晩の放置時間が必要であるが、確認前に遠心分離操作を加えるようにすれば、その時間を比較的短く(塩化第二鉄溶液(1→10)添加後20分)にできることが示唆された。そこで、これを確認するため、三井製糖(株)製カカオ色素サンプルAの3ロット(試料②、⑥、及び⑦)及び三井製糖(株)製カカオ色素サンプルBの3ロット(試料①、④、及び⑤)について、「確認試験(3)(案)」に従って調製した試料溶液に、塩化第二鉄溶液(1→10)を3滴加え、20分後に遠心分離し、沈殿の有無を確認した(各試料とも3回ずつ繰り返し)。

その結果、溶液の色は、サンプルAもサンプルBも、全ロット、全回とも、塩化第二鉄溶液(1→10)添加直後に黒褐色に変わった。沈殿も、何れの全ロット、全回とも、確認することができた。

表1 沈殿の確認結果

試験	試験1			試験2						試験3			
	遠心分離	○		×	×	×	×	×	×	○			
塩化第二鉄溶液(1→10)添加量		3滴		3滴	5滴	10滴	3滴						
確認時間(放置時間)		直後	20分	1時間	0~2時間	2時間	1晩	0~2時間	2時間	1晩	0~2時間	2時間	1晩
① 三井製糖(株)製カカオ色素サンプルA	△	●	●	△	△	●	△	△	●	△	●	●	●
② 三井製糖(株)製カカオ色素サンプルB	●	●	●	△	△	●	△	△	●	△	●	●	●
③ グリコ栄養食品(株)製カカオ色素サンプル	●	●	●	△	△	●	△	△	●	△	●	●	●
④ 三井製糖(株)製カカオ色素サンプルA-2												●	●
⑤ 三井製糖(株)製カカオ色素サンプルA-3												●	●
⑥ 三井製糖(株)製カカオ色素サンプルB-2												●	●
⑦ 三井製糖(株)製カカオ色素サンプルB-3												●	●

- △ 沈殿の確認が困難
● 沈殿確認

以上より、カカオ色素確認試験(3)(第四版既存添加物自主規格(案))について、(i)沈殿の確認には、塩化第二鉄溶液(1→10)を加えてから20分～1晩程度の放置時間が必要である、(ii)しかし、遠心分離操作を加える、または塩化第二鉄溶液(1→10)の添加量を3滴から10滴に増やすようにすれば、それぞれ放置時間を20分または2時間程度にできると思われ、確認試験法(3)の改正案として次の3案が考えられる。

- 案1: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、さらに20分以上放置して遠心分離すると黒褐色の沈殿を生じる。
- 案2: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10滴加えると、直ちに黒褐色に変わり、さらに2時間以上放置すると黒褐色の沈殿を生じる。
- 案3: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、さらに一晩以上放置すると黒褐色の沈殿を生じる。

以上

2008年2月5日
 グリコ栄養食品㈱
 食品原料事業部

第4版自主規格(案) カカオ色素確認試験(3)について
 - 沈殿発生の確認についての試験法検討 -

[目的] 第4版既存添加物自主規格(案)カカオ色素確認試験(3)の試験において、約30分程度の放置では明確な沈殿の判定が出来ないとの見解が示された。そこで、塩化第二鉄の添加量を増加する、または遠心分離を利用した時に、約30分程度で明確な沈殿の確認ができるかを試験する。

[方法] 第4版既存添加物自主規格(案)のカカオ色素確認試験(3)に従って調製した試料溶液に、塩化第二鉄溶液(1→10)を3滴・10滴を加える。またこれを1,600×gで10分間遠心分離を行ない、沈殿の有無を確認する。
 * 食品添加物公定書第8版に「20滴の質量が0.90～1.10g」とあるため、正確を期すため1滴をオートピペットで50μlとし、3滴を150μl、10滴を500μlとして試験を行なった。

[試料] グリコ栄養食品㈱製カカオ色素サンプル①、②のそれぞれ3ロット
 三井製糖㈱製カカオ色素サンプルの1ロット
 以上について3回ずつ繰り返しの試験を行なった。

[結果] 全てのサンプルにおいて、塩化第二鉄溶液を加えると直ちに黒褐色に変色した。沈殿については、グリコ栄養食品㈱製カカオ色素サンプル①および②で30分程度でも僅かながら確認できたが、三井製糖㈱製のものは非常に微量であり、かなり凝視しないと確認できなかった。これは塩化第二鉄溶液の添加量を増やしても同様であった(一晩放置すると、塩化第二鉄の添加量を増加したもののほうが、より沈殿を確認しやすくなった)。30分放置した後に遠心分離を行なったものは、各サンプル共に目で沈殿の確認が可能であった。

		3滴添加	10滴添加	3滴添加 遠心分離
グリコ栄養食品㈱製①	(1)	○	○	◎
	(2)	○	○	◎
	(3)	○	○	◎
グリコ栄養食品㈱製②	(1)	○	○	◎
	(2)	○	○	◎
	(3)	○	○	◎
三井製糖㈱製	(1)	△	△	◎

全て3回ずつ繰り返し、△:確認しづらい、○何とか確認できる、◎はっきり確認できる

[考察] 上記の方法で、塩化第二鉄溶液を3滴加え、30分程度放置して遠心することで容易に沈殿の確認をすることができた。また、10滴加えても30分程度では沈殿の発生が確認しづらかったことから、第4版既存添加物自主規格(案)は、「塩化第二鉄を2～3滴加え、30分程度放置した後に遠心分離を行ない、沈殿の発生を確認する」という内容に修正するのが適当であると思われる。

以上

添付資料 3

第四版自主規格（変更案）

カカオ色素

Cacao color

ココア色素

定 義 本品は、アオギリ科カカオ(*Theobroma Cacao* LINNE)の種子(カカオ豆) 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 ($E_{1\text{cm}}^{1.0\%}$) は 50 以上で、その表示量の 90~120%を含む。

性 状 本品は、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、さらに 30 分以上放置し、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき、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、0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて溶かし、正確に 100ml とし、この溶液 5ml に 0.1mol/L 塩酸 10ml を加え酸性にした液に、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) 100 μ l を加えて攪拌後、50°C20 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~黄褐色の沈殿を生じる。

純度試験 (1) 鉛 Pb として 5 μ g/g 以下 (2.0g, 第 1 法) *注

(2) ヒ素 As₂O₃ として 4.0 μ g/g 以下 (0.50g, 第 3 法, 装置 B)

(3) アセトン 30 μ g/g 以下 (色価 50 に換算して)

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

*注: 平成 19 年度厚生労働科学研究にて報告

研究年月日 : 2006年4月~2007年2月29日

研究者名 :

日本食品添加物協会 第二部会

天然色素三色会 (OCI (株)、キリヤ化学 (株)、グリコ栄養食品 (株)、三栄源エフ・エフ・アイ (株)、
仙波糖化工業 (株)、三井製糖 (株)、(株) 第一化成、ヤエガキ醸酵技研 (株))

褐色フラボノイド系着色料における差別化の検討(II)の件

目的 : 褐色フラボノイド系着色料について差別化の方法を検討する。

本研究は褐色系着色料の公定規格化に向け、平成18年度に引き続き、既に自主規格として設定している褐色素の規格について差別化を目的として検討を行なった。

褐色フラボノイド系着色料 : カカオ色素、カキ色素、クロー色素、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、チコリ色素において、主成分の特定が不十分であることが指摘されており、カカオ色素のようにアントシアニンの重合物を主成分にしたものや、タマネギ色素のように主成分とされているケ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。その性質上、類似の性質を示すため差別化が非常に困難となっている。また、上記色素と類似な使用方法や性質を持つカラメル色素 (I, III, IV) を含めて原体の確認試験法の確立及び、各色素の定性分析をめざし、指標物質の検索等を目的として試験法の調査を実施し、確認方法への利用を検討することを目的とした。

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にしたものや、タマネギ色素のように主成分とされているケ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、既に差別化できるペカンナッツ色素、チコリ色素を除いて、カカオ色素、カキ色素、クロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素と「食品添加物公定書 第8版」に記載されているカラメルI、カラメルIII、カラメルIV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確認した。

検討試験法

各会員会社よりフラボノイド褐色素であるカカオ色素、カキ色素、クロー色素、コウリヤン色素、タマネギ色素、タマリンド色素と「食品添加物公定書 第8版」に記載されているカラメルI、カラメルIII、カラメルIVの着色料の原体および製剤を提供いただき、会員会社において同一サンプルについて試験を行った。

①塩酸-ブタノール試験法

各色素について色価20に換算して0.5gに相当する量をはかり、40vol%エタノール溶液を加えて、攪拌し、正確に100mlとした。次に、毎分3000回転で10分間遠心分離して得られる上澄み液を検液とした。

各検液5mlに0.6mol/L塩酸-ブタノール5ml加えて攪拌したのち沸騰水中で2時間加熱した。その後、水冷を行い、毎分3000回転で10分間遠心分離し、褐色~暗褐色の沈殿の有無を観察した。

同様に加熱時間を短縮し、30分として実験を行い、沈殿の有無を観察した。

また、上澄液を試験溶液とし、液層の長さ1cmで370-700nmの吸光カーブを測定し、極大吸収波長を観察した。

②5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-HMF) の確認法 (HPLC分析) (追加報告)

昨年度の報告で、カラメル色素とフラボノイド系色素の差別化法の一つとして、提案していたが、クロー色素の一部に陽性（極微量）があった。との報告があり、完全にはできていなかった。今回、クロー色素について追加検討を行った。

○検液の調製

（コウリャン色素）色価 20 換算 0.5g 相当量を秤量し、エタノール：リン酸緩衝液（pH3）=4：6 の溶液を加えて正確に 100ml とする。これを 0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、検液とする。

（他の色素）色価 20 換算 0.5g 相当量を秤量し、リン酸緩衝液（pH3）を加えて正確に 100ml とする。これを 0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、検液とする。

（リン酸緩衝液（pH3））0.05M リン酸二水素カリウム溶液と 0.005M 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液を等量混合し、リン酸で pH3.0 に調整する。

○HPLC 条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 285nm）

カラム充てん剤：5~10 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル（例：L-Column ODS（ ϕ 4.6×250mm））

カラム温度：室温

流速：1.0ml/分

注入量：20 μ l

移動層：リン酸緩衝液（pH3）：メタノール=92.5：7.5

○検量線

5-HMF（5-Hydrxymethyl furfural）0.100g を正確に量り、水を加えて溶かし正確に 1000ml とし標準液とする（この液 1ml は 5-HMF100 μ g を含む）。標準液 25ml 及び 50ml をそれぞれ正確に採り、水を加えて正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml はそれぞれ 5-HMF 0, 25, 50 μ g 及び 100 μ g を含む）。検量線用標準液から 20 μ l ずつを採り、高速液体クロマトグラフィーにより、得られたピーク面積から検量線を作成する。

○定量

得られたピーク面積と検量線により、試料中の 5-HMF 濃度を算出する。

試験結果

①塩酸-ブタノール試験法

試験結果については別紙にて報告

【参考資料 A】

今回検討した結果より、沈殿による定性反応では、一部の色素については沈殿の有無で区別できるが、全体的にバラツキが多く、判断が難しかった。しかし、上澄み液の吸光度を測定することにより、コウリャン色素とタマリンド色素の一部に極大吸収部を確認した。タマリンド色素は統一した結果がとれなかったため、試験の採用はできなかったが、コウリャン色素について波長 480~500nm 付近に極大吸収部が確認できた。また、加熱時間を 30 分と 2 時間と変えて確認したが、タマリンド色素の一部のみ極大吸収波長の変化があったが、他の色素については同様の結果であった。本確認試験により、コウリャン色素と他の茶系色素（カカオ色素、カキ色素、クロー色素、タマネギ色素、タマリンド色素、カラメルⅠ、カラメルⅢ、カラメルⅣ）との差別化が可能と考えられる。

コウリャン色素の確認試験として採用するため、Lot 単位でのバラツキ確認を行った。詳細については次に報告する。

新規規格設定

着色料「コウリャン色素」の規格追加改定の件

【コウリャン色素】

1. 目的： コウリャン色素と茶系色素の差別化を目的として、確認方法を検討した。
2. 結果：

コウリャン色素の規格追加改訂内容

- (4) 「本品の表示量から、色価 20 に換算して 0.5g に相当する量をはかり、40vol%エタノール溶液を加えて、攪拌し、正確に 100ml とした。次に、毎分 3000 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。

各検液 5ml に 0.6mol/L 塩酸-ブタノール 5ml 加えて攪拌したのち沸騰水中で 30 分加熱した。その後、水冷を行い、毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液を試験溶液とし、液層の長さ 1cm で 370-700nm の吸光カーブを測定したとき、波長 475~500nm に極大吸収部がある。

3. 試験データ

【参考資料 B】

確認試験の結果、全てのコウリャン色素で波長 475~500nm に極大吸収部が確認できた。

②5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-HMF) の確認法 (HPLC分析) (追加報告)

昨年度の報告では、「クーロー色素の一部に陽性 (極微量) があつた。」が今回、クーロー色素について追加確認することにより、5-HMF のリテンションタイムにピークは観察されるが、波形の違いが確認できたため、クーロー色素からは 5-HMF は検出されないと考えられた。

以上より、本試験の利用で、カラメル色素 (カラメルⅠ、カラメルⅢ、カラメルⅣ) とフラボノイド系茶系色素 (カカオ色素、カキ色素、クーロー色素*、コウリャン色素、シアナット色素、タマネギ色素*、タマリンド色素) の差別化が可能と考えられた。

注意：タマネギ色素とクーロー色素で類似のピークが観察されるが、他 (MS や波形等) の試験法と組み合わせることで区別できる。

【参考資料 C】

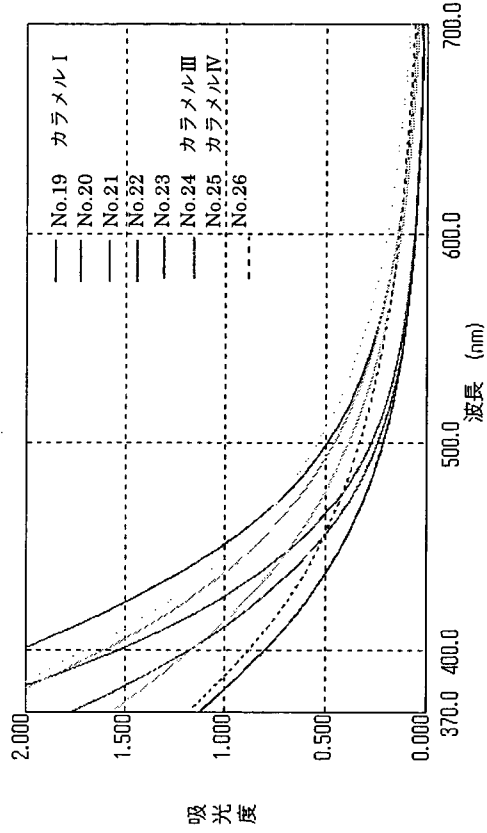
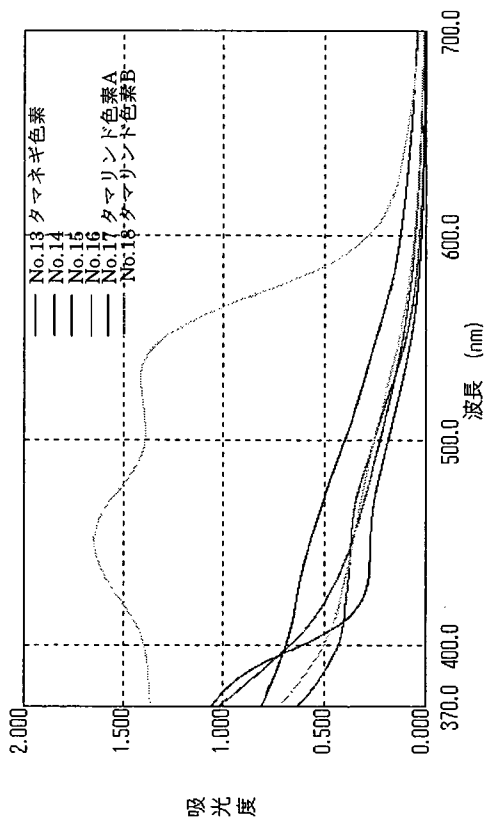
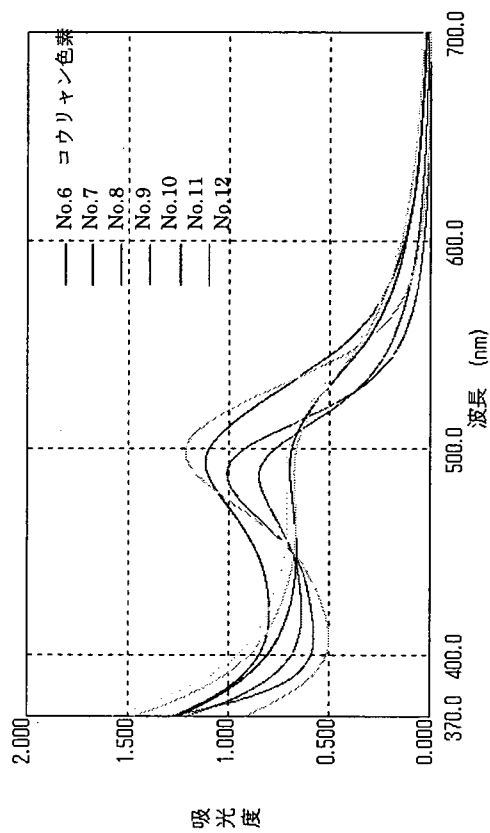
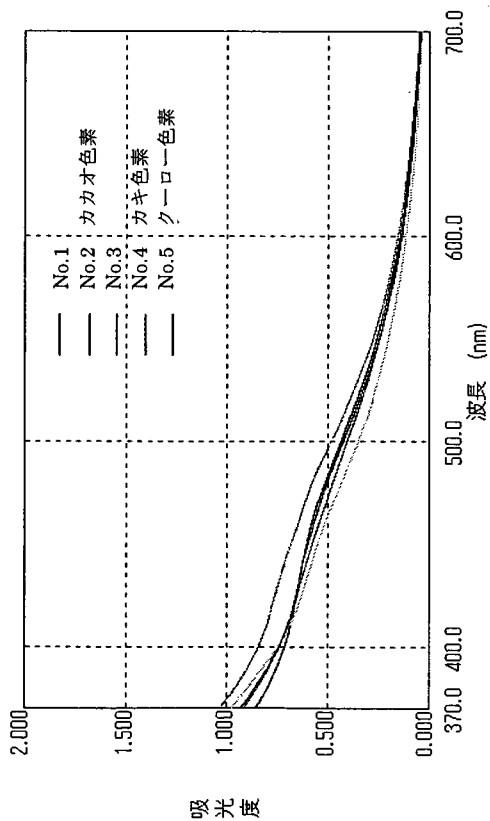
今後の検討課題：

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。今回、コウリャン色素において差別化試験が確認できたが、他の茶系色素 (カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、タマネギ色素、タマリンド色素) についても差別化の検討を行う必要があり、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。

以上

【参考資料 A】3/3
塩酸-ブタノール法(極大吸収波長分析結果)

200802 三色会技術委員会(茶色系)



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
阪本薬品工業株式会社
アサマ化成株式会社
キッコーマン株式会社
株式会社タケックス・ラボ
日本油脂株式会社

1. 目的

既存添加物について自主規格策定を行ってきたが、本年度は、カワラヨモギ抽出物は強熱残分、定量法のHPLC注入量、英文名について、ペクチン分解物はペクチンの規格に準じる方向で、ブドウ種子抽出物は定量法について、モウソウチク抽出物は定量法と確認試験について見直しを行った。

2. 検討結果及び考察

カワラヨモギ白抽出物については、従来規格の見直しを行い、強熱残分を規格範囲が狭く実測値を上回る可能性があったため、0.5%から2.0%に変更した。さらに、定量法のHPLC注入量をエリア面積が小さく精度が悪くなるため5 μ Lから20 μ Lに変更した。また、英文名「Rumput roman」について再調査したが、この呼称の情報が全くなく、学術名やINCI名が何れも「*Artemisia capillaris*」と表記されていたため、「*Artemisia capillaris* extract」が適切と思われた。

ペクチン分解物については、ペクチンに準じた規格に変更した。すなわち含量と定量法を削除し、純度試験に含量規定の項目を作成した。また、性状のペーストを液状へ、酸味を特有の味とにおいて、確認試験の表現をよりの確なものに、乾燥減量を50%以下から70%以下にそれぞれ変更した。

ブドウ種子抽出物については、定量法であるHPLC分析条件をベースラインがフラットになるように改良し、ブドウ中に存在しないガロタイプカテキン類を除外した。

モウソウチク抽出物については、従来のクロロホルムを使用する定量法を見直したが、クロロホルムを使用しないと上手く定量できなかったため、含量規格を削除し、定量法の代わりにオープンカラムで主成分のベンゾキノンを濃縮し、Ft-IRで標品と比較する確認試験を追加した。

別紙に試験結果と改訂した自主規格案を報告する。

2. 研究結果の概要

2-1. 検討対象品目

本年度は以下の品目について、規格・試験法の内容についての見直しを行なった。

(1) 平成19年度 新規自主規格検討品目 なし

(2) 既策定規格の見直し品目

本年度見直しを行った品目及び見直しの概要は次のとおりである。

平成19年度 既策定規格の見直し品目

用途名(品目数)	検討品目	見直しの概要
保存料 (4品目)	カワラヨモギ抽出物	強熱残分、定量法の HPLC 注入量、英文名の見直しを行った。
	ペクチン分解物	ペクチン規格に準じ、定量法、純度試験、性状、確認試験、乾燥減量の見直しを行った。
	ブドウ種子抽出物	ブドウ中に存在しないガロタイプカテキン類の除外及び定量法の HPLC 分析条件の見直しを行った。
	モウソウチク抽出物	定量法を見直し、含量規定を削除し代わりに確認試験の追加を行った。

3. 研究結果の概要

3-2. 既策定規格の見直し品目

(3) 保存料(4品目)

①カワラヨモギ抽出物

本年度は従来の規格の見直しを行い、先ず、強熱残分を規格範囲が狭く実測値を上回る可能性があったため、0.5%から 2.0%に変更した。さらに、定量法の HPLC 注入量をエリア面積が小さく精度が悪くなるため5 μ L から20 μ Lに変更した。また、英文名「Rumput roman」について再調査し、この呼称の情報が全くなく、学術名や INCI 名が何れも「Artemisia capillaris」と表記されていたため、「Artemisia capillaries extract」が適切と思われた。

②ペクチン分解物

ペクチンに準じた規格に変更した。すなわち含量と定量法を削除し、純度試験に含量規定の項目を作成した。また、性状のペーストを液状へ、酸味を特有の味とにおいへ、確認試験の表現をよりの確なものに、乾燥減量を 50%以下から 70%以下にそれぞれ変更した。

③ブドウ種子抽出物

定量法であるHPLC分析条件をベースラインがフラットになるように改良し、ブドウ中に存在しないガロタイプカテキン類を除外した。

④モウソウチク抽出物

従来のクロロホルムを使用する定量法を見直したが、クロロホルムを使用しないと上手く定量できなかったため、含量規格を削除し、定量法の代わりにオープンカラムで主成分のベンゾキノン濃縮し、Ft-IR で標品と比較する確認試験を追加した。

以上

自主規格の検証

1. 試験サンプルの調製

カワラヨモギ (*Artemisia capillaris* Thunb.) にエタノールを加え 37°C/24 時間抽出を行なった。各ろ液をサンプルとして用いた。

2. 各試験項目の結果

各条件は自主規格 第三版に準ずる

項目	規格値	サンプルA	サンプルB	サンプルC
性状	黄～黄褐色又は暗緑～濃緑色の液体で、特有のにおいがある。	○	○	○
確認試験	TLCでのスポット確認 (Rf0.5 付近) ※1	○	○	○
純度試験	(1) 重金属…20 μg/g 以下	○	○	○
	(2) ヒ素 …4.0 μg/g 以下	○	○	○
乾燥減量	14.0%以下	○	○	○
強熱残分	0.5%以下	0.6%▲	0.6%▲	○ (0.4%)
含量	乾燥物にカピリン 0.2%以上 (φA 4.6mm×250mm) ※2	○	○	○

○：合格、または規格内、 ▲：規格外、 ※1：別紙1参照、 ※2：別紙2～3参照

3. 考察

・性状

いずれのサンプルも規格に合致した。

・確認試験

いずれのサンプルも規格に合致した。

・純度試験

いずれのサンプルも規格に合致した。

・乾燥減量

いずれのサンプルも規格に合致した。

・強熱残分

サンプルA、サンプルBが規格を上回る値となった。現状の規格値 0.5%では規格外となる可能性が大きい。サンプルAの原草の灰分 7.4%であり、原草の灰分が多いこと、試料には濃縮物を用いることから規格範囲が狭いと思われる。

・含量

いずれのサンプルも規格に合致した。

※ 測定条件の注入量 5 μl ではサンプル量が少なくエリア面積が小さくなるため、精度を考慮し 20 μl に変更した。

・英名について

Rumput roman は一般的な名称ではないため *Artemisia capillaris* extract が妥当と思われる。

【別紙 1】

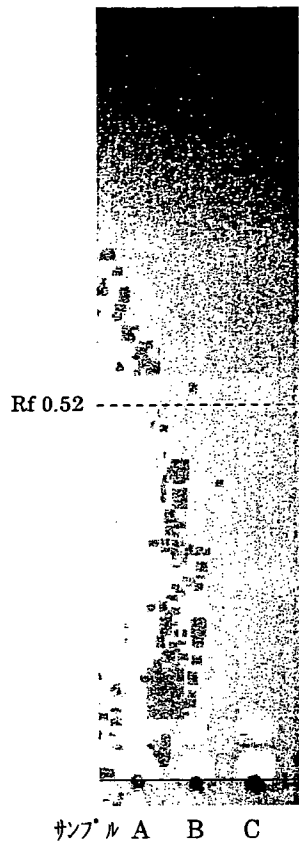


図 1. 自主規格

【別紙2】

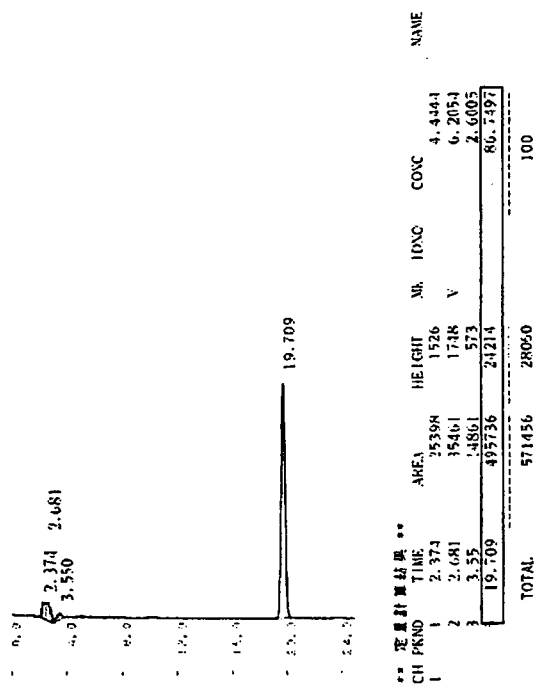


図4. カピリン標準液 HPLCチャート

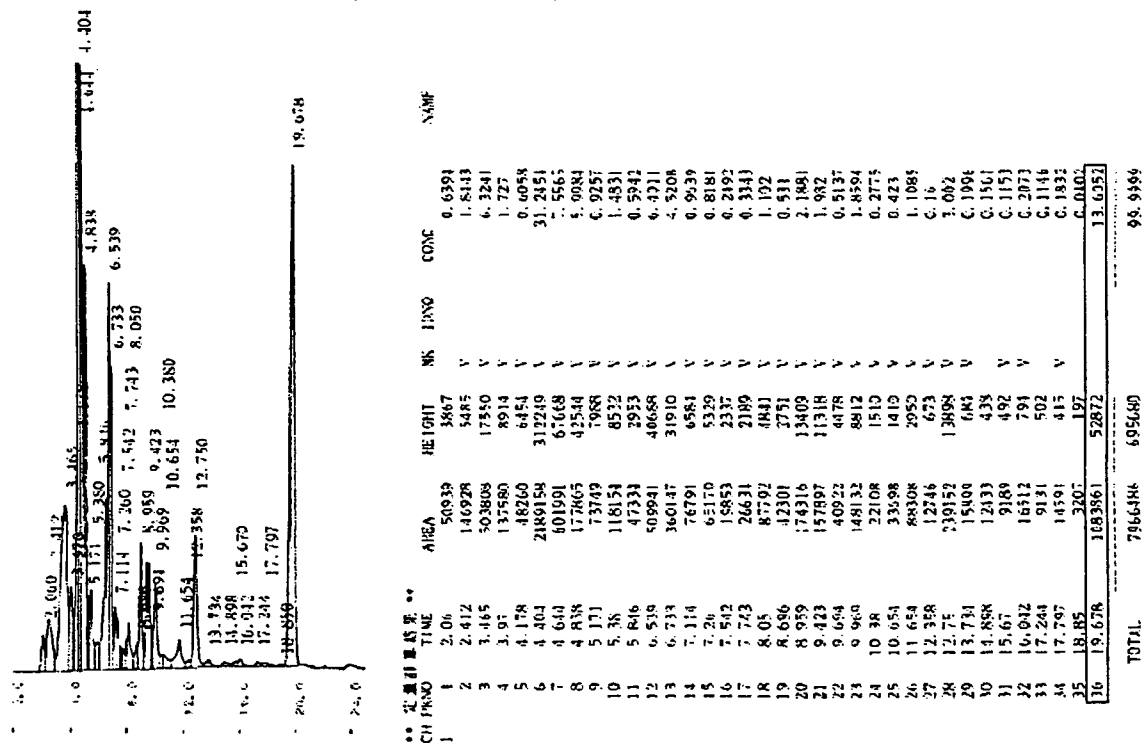


図5. サンプルA HPLCチャート

カワラヨモギ抽出物（改訂案）

Rumput Roman Extract

定 義 本品は、カワラヨモギ (*Artemisia capillaris* Thunb.) の全草から得られた、カピリンを主成分とするものである。

含 量 本品を乾燥したものは、カピリン 0.2%以上を含み、その表示量の 80~120%を含む。

性 状 本品は、黄~黄褐色又は暗緑~濃緑色の液体で、特有のにおいがある。

確認試験 本品の溶媒を減圧加温条件下で留去したもの 1g にエタノール 50ml を加えて溶解し、検液とする。検液 10 μ l をとり、ヘキサン/酢酸エチル混液 (9:1) を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行い、風乾後、紫外線 (254nm) を照射するとき、 R_f 値 0.50 付近にスポットを認める。

ただし、薄層板は20×5cmのものを用い、担体として薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを110℃で1時間乾燥したものを用いる。薄層板の下端2cmの位置にスポットし、溶媒を留去後展開し、展開溶媒の先端がプレートの上端より約3cmの位置まで展開した後風乾し、更に同じ展開溶媒でもう一度展開する。

純度試験 (1) 重金属 Pbとして20 μ g/g以下 (1.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(2) ヒ素 As₂O₃として4.0 μ g/g以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

乾燥減量 14.0%以下 (本品の溶媒を微温湯中、10~18kPa で留去したもの 2.0g, 105℃, 5時間)

強熱残分 2.0%以下 (本品の溶媒を微温湯中、10~18kPa で留去したもの 2.0g)

定 量 法 本品を乾燥し、その約 1g を精密に量りエタノールで正確に 100ml とする。その 10ml を正確に量り、メタノールを加えて正確に 100ml として検液とする。

定量用カピリン約10mgを精密に量り100mlのメスフラスコに入れエタノールで正確に100mlとする。その10mlを正確に量りメタノールを加えて正確に100mlとして標準液とする。検液及び標準液 20 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し、次式によりカピリン含量を求める。

$$\text{カピリンの含量 (\%)} = \frac{\text{定量用カピリン採取量 (mg)}}{\text{試料採取量 (mg)}} \times \frac{\text{検液のカピリンピーク面積}}{\text{標準液のカピリンピーク面積}} \times 100$$

測定条件

検出器 紫外吸光光度計 (測定波長 280nm)

充てん剤 液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 内径4.6mm, 長さ25cm

カラム温度 40℃

移動相 水/アセトニトリル混液 (1:1)

流量 1ml/分

注入量 20 μ l

試験成績書

東京都中央区日本橋小伝馬町20-3

アサマ化成株式会社

品名	ペクチン分解物	
ロット番号	No. 060510	
項目	規格値	分析値
性状	淡褐～褐色のペーストで、酸味がある	適
確認試験	(1)	適
	(2)	適
純度試験	(1)ガラクトキロン酸含量 40%以上	52.0% 50.8% 52.2% 平均 51.7% 適
	(2)重金属 Pbとして 20 μ g/g以下	適
	(3)鉛 Pbとして 10 μ g/g以下	適
	(4)ヒ素 As ₂ O ₃ として 4.0 μ g/g以下	適
乾燥減量	70%以下 (1g、100℃、3時間)	64.4% 64.4% 64.7% 平均 64.5% 適