

研究年月日 : 2009年4月～2010年2月8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)、(株) 第一化成、三井製糖 (株)、
 ヤエガキ醱酵技研 (株))

褐色フラボノイド系着色料における差別化の検討(IV)の件

目的:

本研究は褐色系着色料の公定規格化に向け、昨年度に引き続き、既に自主規格として設定している褐色系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:

昨年報告した茶系色素の分画樹系図から、区別が明確でないタマネギ色素、タマリンド色素、クロー色素、カキ色素について重点的に分析法の検討を行った。

- (1) タマリンド色素を主に確認試験 (80%エタノール上清スペクトル) の検討を行った。
- (2) クロー色素を主に硫酸第一鉄による比較試験検討を行った。

(1) タマリンド色素を主に確認試験の検討

<試験方法>・・・80%エタノール上清スペクトル確認試験

各色素原体色価 200 (10%E)に換算して 5.0 g相当する量を取り、pH=7.0のクエン酸緩衝液を加えて 100ml とする。(完全に溶解しない試料もあるが、懸濁液としてそのまま次の操作に入る)。この溶解液 (懸濁液) とエタノールを 2:8 で混合 (体積比混合) し、エタノール濃度を 80(v/v)%に調整する。その後、室温にて 30 分程度攪拌混合し、3000rpm 20 分間の遠心分離を行い、その上清を得る。得られた上清液は 80(v/v)%エタノールで波長 500nm の吸光度が 0.3～1.0 の範囲に入るよう適宜希釈して、対照液 80(v/v)%エタノールを用いて 370～700nm のスペクトルを測定する。

*pH=7.0 クエン酸緩衝液・・・第八版食品添加物公定書「試薬・試液」の項参照。

*エタノール・・・関東化学 試薬特級 Ethanol(99.5)

<結果>

表1に各試験サンプルと上記試験法で確認できた極大吸収部を示した。

表1：試験サンプルと極大検出波長 λ max(nm)

No.	色素名	提供会社名	λ max(nm)	備考
1	カカオ色素原末	グリコ栄養食品㈱	—	極大吸収部なし
2	カカオ色素 A	三井製糖㈱	445 付近, 475 付近	2 ピーク検出
3	カカオ色素 B	三井製糖㈱	440 付近, 470 付近	2 ピーク検出
4	カキ色素	ヤエガキ醸造技術研㈱	—	極大吸収部なし
5	クロー色素	㈱第一化成	—	極大吸収部なし
6	コウリャン色素 A	OCI㈱	—	極大吸収部なし
7	コウリャン色素 B	OCI㈱	—	極大吸収部なし
8	コウリャン色素 A	三栄源エフ・エフ・アイ㈱	—	極大吸収部なし
9	コウリャン色素 B	三栄源エフ・エフ・アイ㈱	—	極大吸収部なし
10	コウリャン色素 C	三栄源エフ・エフ・アイ㈱	—	極大吸収部なし
11	コウリャン色素 (K-1)	キリヤ化学㈱	508 付近	1 ピーク検出
12	コウリャン色素 (K-2)	キリヤ化学㈱	—	極大吸収部なし
13	タマネギ色素 A	OCI㈱	490 付近 1 ピーク 445 付近, 470 付近	1 又は 2 ピーク検出 (試験差あり)
14	タマネギ色素 B	OCI㈱	490 付近	1 ピーク検出
15	タマネギ色素 A	三栄源エフ・エフ・アイ㈱	—	極大吸収部なし
16	タマネギ色素 B	三栄源エフ・エフ・アイ㈱	475 付近	1 ピーク検出
17	タマリンド色素 A	ヤエガキ醸造技術研㈱	440 付近, 475 付近	2 ピーク検出
18	タマリンド色素 B	ヤエガキ醸造技術研㈱	445 付近, 475 付近、 515 付近	3 ピーク検出
19	カラメル色素 A	カラメル I・仙波糖化工業㈱	—	極大吸収部なし
20	カラメル色素 B	カラメル I・仙波糖化工業㈱	—	極大吸収部なし
21	カラメル色素 C	カラメル I・仙波糖化工業㈱	—	極大吸収部なし
22	カラメル色素 D	カラメル I・仙波糖化工業㈱	—	極大吸収部なし
23	カラメル色素 E	カラメル I・仙波糖化工業㈱	—	極大吸収部なし
24	カラメル色素 F	カラメル III・仙波糖化工業㈱	—	極大吸収部なし
25	カラメル色素 G	カラメル IV・仙波糖化工業㈱	—	極大吸収部なし
26	カラメル色素 H	カラメル IV・仙波糖化工業㈱	—	極大吸収部なし

<まとめ>

タマリンド色素及びカカオ色素以外でも 1 箇所以上の極大吸収部が見られるサンプルがあったが、2 箇所以上の極大吸収部を検出したのはタマリンド色素とカカオ色素の一部であった。また、タマネギ色素の一部において、445, 475 付近に 2 箇所以上の極大吸収部を検出する結果と 490nm 付近に 1 箇所以上の極大吸収部を検出する結果の試験差があった。

カカオ色素においては、2008 年度に「カカオ色素中のテオブロミン分析」を報告しており、タマリンド色素及びタマネギ色素との半別冊は可能と思われる。また、タマネギ色素の試験間差の検証については、次回の検討課題である。

(2) クーロー色素を主に硫酸第一鉄による比較試験を検討

「植物染料に関する研究 (第2報) ソメモノイモの染色性」を参照し、硫酸第一鉄による比較試験を検討した。

参考資料：「植物染料に関する研究 (第2報) ソメモノイモ(*Dioscorea chirrhosa* Lour.)の染色性」
琉球大学農学部学術報告 屋我 嗣良 他 36:115-121(1989)

<試験方法>：「植物染料に関する研究 (第2報) ソメモノイモの染色性」参照

1. 全ての検体を色価 20 に調整
2. 色価 20 に調整した後に 0.5w/v% に調製
3. 0.5w/v%硫酸第一鉄 7 水和物溶液 5mL を 2 調製液 100mL に滴下し混合
4. 室温暗所にて一晚～48 時間静置
5. 3,000rpm、10 分間 (1,500G) で遠心

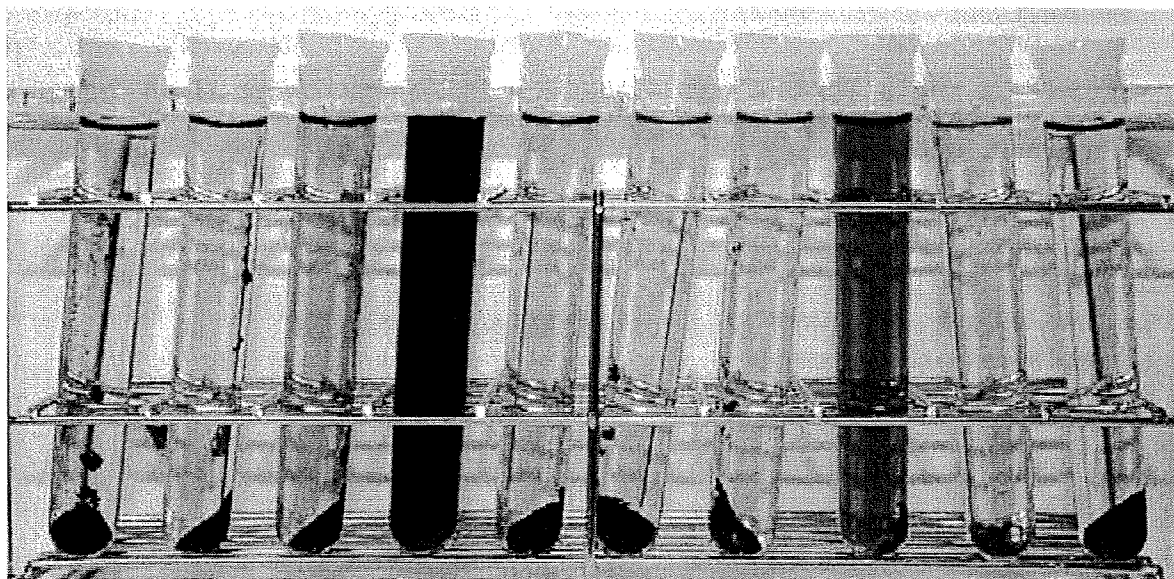
<結果>

No.	色素名	提供会社名	結果
1	カカオ色素原末	グリコ栄養食品(株)	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=2)
2	カカオ色素 A	三井製糖(株)	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=2)
3	カカオ色素 B	三井製糖(株)	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=2)
4	カキ色素	ヤエガキ醸酵技研(株)	褐色溶液 (n=3)
5	クーロー色素	(株)第一化成	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=5)
6	コウリャン色素 A	OCI(株)	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=2)
7	コウリャン色素 B	OCI(株)	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=2)
8	コウリャン色素 (K-1)	キリヤ化学(株)	上澄み淡褐色 褐色沈殿 (n=2)
9	コウリャン色素 (K-2)	キリヤ化学(株)	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=2)
10	コウリャン色素 A	三栄源エフ・エフ・アイ(株)	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=2)
11	コウリャン色素 B	三栄源エフ・エフ・アイ(株)	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=2)
12	コウリャン色素 C	三栄源エフ・エフ・アイ(株)	上澄み無色透明 褐色沈殿 (n=2)
13	タマネギ色素 A	OCI(株)	褐色溶液 (n=3) 一部褐色沈殿
14	タマネギ色素 B	OCI(株)	褐色溶液 (n=3) 一部褐色沈殿
15	タマネギ色素 A	三栄源エフ・エフ・アイ(株)	褐色溶液 (n=2)
16	タマネギ色素 B	三栄源エフ・エフ・アイ(株)	褐色溶液 (n=3)
17	タマリンド色素 A	ヤエガキ醸酵技研(株)	上澄み透明 褐色沈殿 (n=3) *注
18	タマリンド色素 B	ヤエガキ醸酵技研(株)	上澄み透明 褐色沈殿 (n=3) *注

注) タマリンド色素については一晚では沈殿物が沈降を起こさない場合があり、48 時間放置すると沈殿が確認できた。

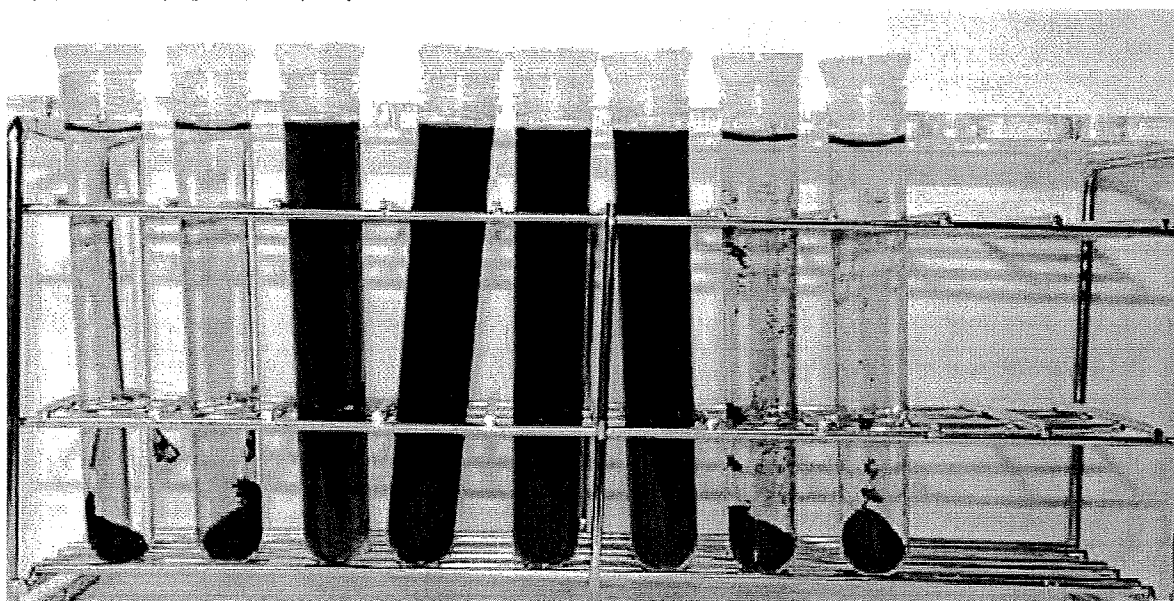
硫酸第一鉄を添加して48 時間静置し、遠心分離直後の写真を下記に示す。

写真1：遠心直後の各色素の状態



(左から No. 1→No. 10)

写真2：遠心直後の各色素の状態



(左から No. 11→No. 18)

確認試験データ(別紙データ)

○(株)第一化成、三栄原エフ・エフ・アイ(株)、ヤエガキ醸造技研(株)

<まとめ>

完全に上清がクリアになった検体は、カカオ色素、クーロー色素、タマリンド色素となり、カキ色素、タマネギ色素は上清が着色された状態であった。コウリャン色素については、コウリャン色素(K-1)キリヤ(株)の1ロットのみ、やや褐色を帯びた上清であったが、その他は完全にクリアな上清となった。

タマリンド色素については、一晩で沈殿物が沈降を起こさない現象も見られており、現状では48時間という長時間の分析時間を要する。硫酸第一鉄の濃度の上げると、静置時間を短縮できる結果もあり、今後、反応時間の短縮が課題として残る。

以上の結果から、(1)により、タマリンド色素とクーロー色素、カキ色素の区別、(2)によりタマリンド色素、クーロー色素とタマネギ色素、カキ色素の2組への区別が示唆された。

今後は、実験法の時間短縮とバラツキの有無の確認を行う必要がある。

今後の検討課題：

今回検討された結果をふまえ、今後も引き続き、茶系色素（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、茶系色素原体の確認試験法の確立及び、各色素の定性分析を継続する。

以上

【考察】

今回の結果を元に、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」と第9版新規収載予定品目「カカオ色素、コウリヤン色素、タマネギ色素、タマリンド色素」について分画樹系図(図1)を作成した。

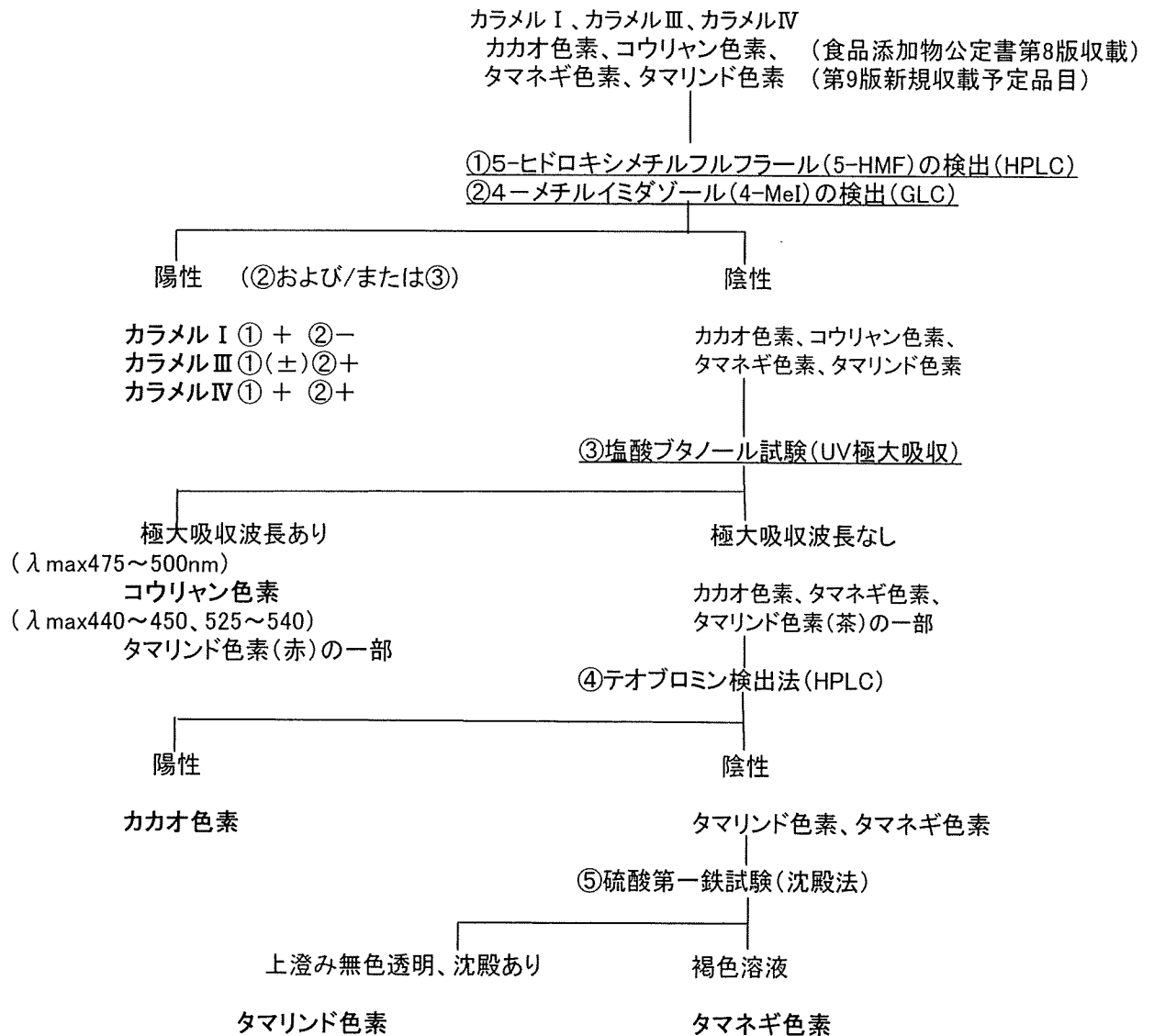


図1. 茶色系色素の分画樹形図

タマリンド色素硫酸第一鉄沈殿分画判別試験
～株式会社第一化成様プロコール試験法～

<試験方法> : 「植物染料に関する研究 (第二報) ソメモノイモの染色性」 参照

1. 全ての検体を色価 20 に調整
2. 色価 20 に調整した後に 0.5w/v% に調製
3. 0.5w/v% 硫酸第一鉄 7 水和物溶液 5mL を 2 調製液 100mL に滴下し混合
4. 室温暗所にて一晚静置
5. 3,000rpm、10 分間 (1,500G) で遠心

<サンプル>

タマリンド色素 (A,B を含む) 5 ロット実施

<結果>

①一晚静置 (約 20 時間後) の結果

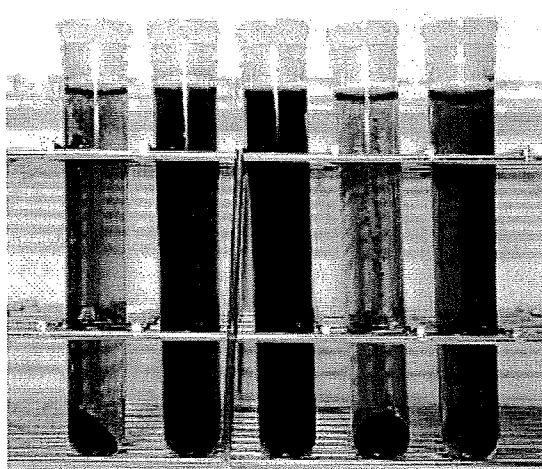


写真 1 : 20 時間後の沈殿形成 (左からロット A,B,C,D,E)

②同試験サンプルを更に一晚静置 (約 48 時間後) の結果

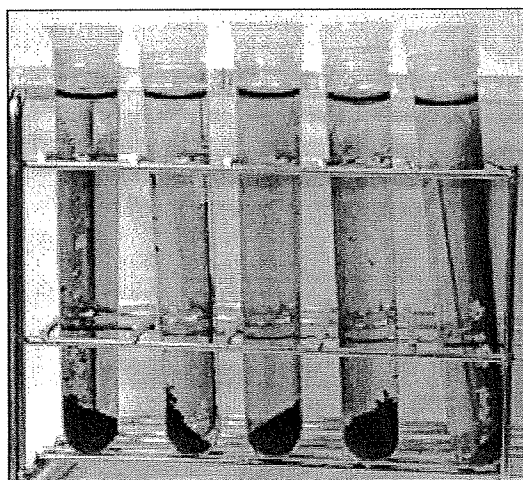


写真 2 : 48 時間後の沈殿形成 (左からロット A,B,C,D,E)

<考察>

20 時間後の沈殿形成においては、ロット間の差が確認できたが、更に 48 時間の反応時間を要すとロット間のバラツキもなく、沈殿形成し、遠心後の上清はクリアなものとなった。

次に、20 時間では上清がクリアにならなかったロットサンプルを用いて、硫酸第一鉄の濃度を基本試験法の 0.5w/v%とその倍濃度の 1.0w/v%で 20 時間の試験を行った結果を下記写真に示す。

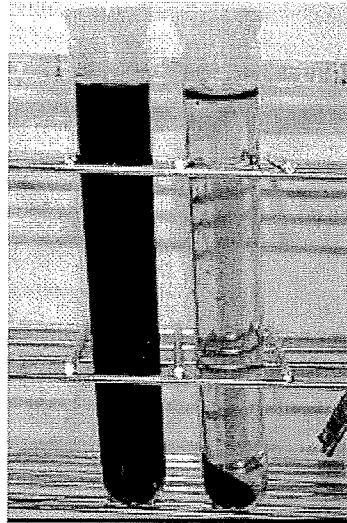


写真 3 : 硫酸第一鉄濃度を変化させ 20 時間静置後 (左 0.5w/v%、右 1.0w/v%)

写真 3 が示すように硫酸第一鉄の濃度を上げることで、基本試験法では沈殿形成しなかったロットサンプルにおいても、クリアな結果が得られた。

<まとめ>

静置時間の延長または硫酸第一鉄の濃度を上げることで、タマリンド色素のロット間の差は埋めることが出来ると思われるが、今回はタマリンド色素のみの試験実施のため、他の茶色系色素でどのような挙動を示すか再度検証が必要と思われる。

以上

硫酸第一鉄試験法の追試

【目的】

第一化成様より、2010年1月26日付の報告書でご提案のあった、硫酸第一鉄による沈殿試験法の追試を行った。

【供試サンプル】

2009年更新クロス分析用サンプル

No.	色素名	提供会社	商品名
4	カキ色素	ヤエガキ醱酵技研(株)	カキ色素
5	クーロー色素	(株)第一化成	クーロー色素
13	タマネギ色素	OCI(株)	タマネギ色素 A
14			タマネギ色素 B
15		三栄源	タマネギ色素 A
16			タマネギ色素 B
17	タマリンド色素	ヤエガキ醱酵技研(株)	タマリンド色素 A
18			タマリンド色素 B

【方法】

1. 色価 20 液を調製する。
 2. 1 液の 0.5w/v%水溶液 100mL を調製する。
 3. 0.5w/v%硫酸第一鉄* 溶液を調製する。
 4. 2 液 100mL に 3 液 5mL を添加し混合。
 5. 室温・暗所にて 20h(一晩)静置後、3,000rpm 10 分遠心。
- * 硫酸鉄(II)・七水和物(試薬特級、和光純薬製)

【結果】

遠心後の写真を写真 1, 2 に示した。
20 時間静置後、5, 17, 18 は遠心なしで明確な沈殿が見られた。
13~16 は遠心分離後、少量の沈殿を確認した。
なお、15, 16 については過去ロットと比較したところ(未掲載)、古いものほど沈殿量が増える傾向が見られた。

写真 1. 外観

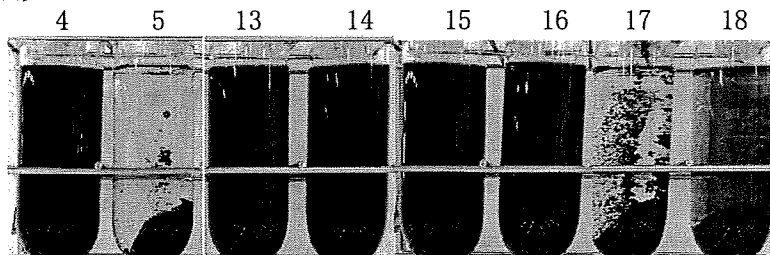
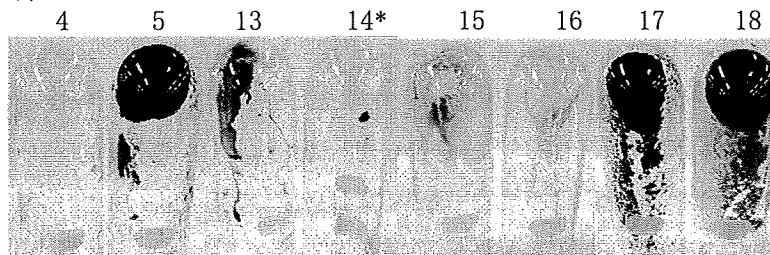


写真 2. 底部



* 13と同程度の沈殿量であるが、大部分を流失

【まとめ】

本方法により、カキ色素とクーロー色素、またはカキ色素とタマリンド色素、の識別が可能である。さらに沈殿量の多少を判断要素に加えられるのであれば、クーロー色素とタマネギ色素、またタマリンド色素とタマネギ色素の識別にも適用できると考えられた。また、試験時間を短縮する検討が必要であると思われる。

以上

硫酸第一鉄沈殿試験褐色系色素確認試験

目的：カキ色素、クーロー色素、タマリンド色素およびタマネギ色素の分画

検体：

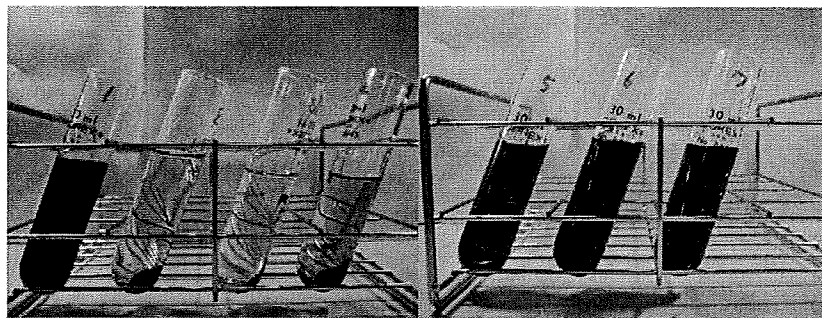
- ④カキ色素（ヤエガキ発酵技研）
- ⑤クーロー色素（第一化成）*
- ⑰タマリンド色素 A（ヤエガキ発酵技研）
- ⑱タマリンド色素 B（ヤエガキ発酵技研）
- ⑬タマネギ色素 A（OCI）
- ⑭タマネギ色素 B（OCI）
- ⑮タマネギ色素 B（三栄源 FFI）

*：クーロー色素については追加で 2Lot 試験を行った

試験方法：「植物染料に関する研究（第二報）ソメモノイモの染色性」参照

1. 全ての検体を色価 20 に調整
2. 色価 20 に調整した後に 0.5w/v% に調製
3. 0.5w/v% 硫酸第一鉄 7 水和物溶液 5mL を 2 調製液 100mL に滴下し混合
4. 室温暗所にて一晩静置
5. 3,000rpm、10 分間（1,500G）で遠心

結果



④ ⑤ ⑰ ⑱ ⑬ ⑭ ⑮
写真 1. 硫酸第一鉄添加一晩静置後、3,000rpm、10 分間遠心

考察

硫酸第一鉄添加後一晩静置し遠心分離を行ったところ、クーロー色素、タマリンド色素 A および B において著しい沈殿が生じた（写真 1：クーロー色素 2Lot 分の写真は割愛）。工程の 4（室温暗所にて一晩放置）を省略して硫酸第一鉄添加後直ちに遠心処理（12,000rpm、10 分：20,000G）、または硫酸第一鉄添加後沸騰浴中で 10 分間加熱後遠心処理（12,000rpm、10 分：20,000G）を行った場合は同様の結果にはならなかったため、硫酸第一鉄滴下後に静置しておく時間が必要であることが確認された。また、④、⑬、⑭、⑮を硫酸第一鉄添加後一晩静置し、遠心分離の回転数を上げた場合（12,000rpm、10 分：20,000G）でも⑤、⑰、⑱のような沈殿は生じなかった。

平成 22 年 2 月 10 日

第 10 部会既存添加物自主規格検討結果報告書
－既策定済み自主規格の見直し－

「精製植物性ステロール」の定量法の見直し

日本食品添加物協会 第 10 部会
タマ生化学株式会社
三栄源 F F I 株式会社
理研ビタミン株式会社
太陽化学株式会社（文責）

1. 目的

「第 4 版自主規格：精製植物ステロール」の定量法中のフィトステロールの計算式について、規定されている計算式の係数（0.97）は科学的に説明がつかない係数ではないかとの意見が出されたため、当該定量法の係数の妥当性、および係数を除外した場合の含量規格の見直しを行った。なお、合わせて定量用標準品がスチグマステロールで問題がないことを確認した。

2. 検討内容

係数に関する検討および標準品の検討をタマ生化学株式会社、三栄源 F F I 株式会社、理研ビタミン株式会社の 3 社で実施した。別紙資料添付。

別紙 1：「第 4 版自主規格検証試験成績書」タマ生化学株式会社

別紙 2：「植物ステロール定量法に関する検証結果」タマ生化学株式会社

別紙 3：「自主規格（第 4 版）追補の植物性ステロールの含量定量法の検討」、「植物ステロール定量法に関する検証結果」三栄源 F F I 株式会社

別紙 4：「植物性ステロール スチグマステロールに対する同族体の重量相対感度検証」
理研ビタミン株式会社

3. 検討結果

係数に関する検討の結果、係数の意味が合理的に説明がつかないことを関係各社にて確認し、係数を削除することが合意された。定量法に用いるスチグマステロールに対する他のステロールの相対感度測定結果を以下の表に示す。

各社からのデータ（スチグマステロールに対する 3 品の相対感度）

	スチグマステロール	ブラシカステロール	カンパステロール	β-シトステロール
タマ生化学	1.0	1.027	1.003	0.944
三栄原エフエフアイ	1.0	1.04	1.04	1.00
理研ビタミン	1.0	0.992	0.994	0.996

他ステロールの相対感度はスチグマステロールに対して 1.0 を挟んで各社若干の違いがあるが、

誤差の範囲と考えられた。タマ生化学の β -シトステロールの相対感度がやや低いですがデータのピークの波形処理に起因するとの見解であり、問題ないとの意見で一致した。

4. 対処

上記結果を踏まえ、対処は以下の通りとした。

- ① 標準品はスチグマステロールで問題なく、測定手順も変更なしと結論された。
- ② 係数(0.97)については「 $\times 0.97$ 」を計算式分母から削除する。
- ③ 「精製植物ステロール」の含量規格を、係数(0.97)を計算式分母から削除したため、90.0以上から「87.3%以上」とする。
- ④ 「植物ステロール」の含量規格は、「精製植物ステロール」の含量規格を「87.3%以上」としたことから、「67.9%以上、87.3%未満」とする。

以上

植物性ステロール

Vegetable Sterol

定 義 本品は、油糧種子から得られた、フィトステロールを主成分とするものである。

精製植物性ステロール

含 量 本品は、フィトステロール ~~90.0~~97.3~102.0%を含む。

性 状 本品は、白~わずかに黄色を帯びた結晶性の粉末、粉末、薄片、粗末又は粒状で、ほとんどにおいが無い。

確認試験 本品5mgをヘキサン2mlに溶かし、無水酢酸1ml及び硫酸1滴を加えて振り混ぜるとき、下層は初め赤色を呈し、青色を経て緑色に変わる。

純度試験 (1) 融点 131~151°C

(2) 溶状 微濁

本品0.50gを共栓フラスコに量り、温無水エタノール50mlを加えて、60~70°Cの水浴中で加熱して溶かし、20~40°Cで2時間放置する。

(3) 酸価 5.0以下

ただし、溶媒には、無水エタノール/トルエン混液(1:1)100mlを用い、加熱して溶かし検液とする。温時試験を行う(油脂類試験法)。

(4) 重金属 Pbとして10μg/g以下(2.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

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

乾燥減量 3.0%以下(105°C, 2時間)

強熱残分 0.50%以下

定量法 本品のフィトステロール約70mgに対応する量を精密に量り、酢酸エチルを加えて溶かし、正確に50mlとし検液とする。別にスチグマステロール(定量用)約70mgを精密に量り、酢酸エチルを加えて溶かし、正確に50mlとし標準液とする。

検液及び標準液3μlにつき、次の条件でガスクロマトグラフィーを行う。

操作条件

検出器 水素炎イオン化検出器

カラム 内径約3mm, 長さ約2mのガラス管にガスクロマトグラフィー用メチルシリコンポリマーを150~250μmのガスクロマトグラフ用ケイソウ土に1~2%の割合で被覆したものを充填する。

カラム温度 約250°C付近の一定温度

検出器温度 280°C

キャリアーガス 窒素又はヘリウム

流速 スチグマステロールの保持時間がおおよそ25分になるようにカラム温度又はキャリアーガ

ス流量を調整する。このときのブラシカステロール、カンペステロール及びβ-シトステロールのスチグマステロールに対する相対保持時間は、それぞれ約0.8、0.9及び1.2である。

検液のフィトステロール（ブラシカステロール、カンペステロール、スチグマステロール及びβ-シトステロール）の面積の総計及び標準液のスチグマステロールの面積を測定し、次式によりフィトステロール含量を求める。

$$\text{フィトステロールの含量} = \frac{\text{スチグマステロール(定量用)の採取量 (mg)}}{\text{試料採取量 (mg)} \times 0.97} \times \frac{A_s}{A_{st}} \times 100 (\%)$$

A_s : 検液フィトステロールの総面積

A_{st} : 標準液のスチグマステロールの面積

植物ステロール

含 量 本品は、フィトステロール ~~70.067.9%~~ 以上、~~90.087.3%~~ 未満を含む。

性 状 本品は、白～褐色の結晶性の粉末、粉末、薄片、粗末、粒状又はロウ状の塊、又は半流動体で、においがなく又は特異なにおいがある。

確認試験 本品5mgをヘキサン2mlに溶かし、無水酢酸1ml及び硫酸1滴を加えて振り混ぜるとき、下層は初め赤色を呈し、青色を経て緑色に変わる。

純度試験 (1) 酸価 5.0以下

ただし、溶媒には、無水エタノール/トルエン混液(1:1)100mlを用い、加温して溶かし、検液とする。温時試験を行う(油脂類試験法)。

(2) 重金属 Pbとして10μg/g以下(2.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(3) ヒ素 As_2O_3 として4.0μg/g以下(0.50g, 第3法, 装置B)

乾燥減量 3.0%以下(105°C, 2時間)

強熱残分 0.50%以下

定 量 法 本品のフィトステロール約70mgに対応する量を精密に量り、無水エタノール70ml及び水酸化カリウム溶液(9→10)10mlを加え、還流冷却器を付け、沸騰水浴中で60分間加熱して加水分解する。終了後、速やかに冷却した後、分液漏斗Aに移し、フラスコは水25mlずつで2回、更にジエチルエーテル35mlずつで2回洗い、洗液を分液漏斗Aに移し、激しく振り混ぜた後静置する。水層を分液漏斗Bに移し、ジエチルエーテル50mlを加え、激しく振り混ぜた後静置する。水層を先のフラスコに移し、ジエチルエーテル層を分液漏斗Aに合わせる。フラスコの水層を分液漏斗Bに移し、フラスコは水10ml、ジエチルエーテル25mlずつで2回洗い、洗液を分液漏斗Bに入れ激しく振り混ぜた後静置する。分液漏斗Bの水層を除去し、ジエチルエーテル層を分液漏斗Aに合わせる。分液漏斗Bは水25mlずつで2回洗いい分液漏斗Aに入れる。これを2～3回静かに倒立した後静置し、分離した水層を除く。水50mlずつで、洗液がフェノールフタレイン試液で呈色しなくなるまで水洗いする。水をできるだけ除き、ジエチルエーテル抽出液を300ml容褐

色共栓付ナス型フラスコに移し、分液漏斗Aはジエチルエーテル 10ml ずつで2回洗い、洗液はナス型フラスコへ加え、約 40°Cの水浴中でジエチルエーテルを留去する。残留物に直ちにジエチルエーテル 3～5 ml を加えて軽く振り混ぜる。約 60°Cの水浴中で溶媒を減圧留去した後、速やかに酢酸エチルを加えて溶かし、正確に 50ml とし検液とする。別にスチグマステロール（定量用）約 70mg を精密に量り、酢酸エチルを加えて溶かし、50ml とし標準液とする。検液及び標準液 3 μ l につき、精製植物性ステロールの定量法の条件でガスクロマトグラフィーを行う。

検証試験成績書様式

検証試験成績書

品名(商品名)	PHS-FK					
ロット番号	811274					
成分規格名(収載名)	精製植物性ステロール					
試験年月日(試験場所)	自社内 品質管理課試験室					
	試験 省略 (×)	試験結果 (実測値の出る項目 は実測値を記載)	忠実性 の確認 (○×)	試験 可否 (○×)	問題 点 (有無)	判定 (適・ 不適)
性状		白~わずかに黄色を帯びた結晶性の粉末、 粉末、薄片、粗末又は粒状	○	○	無	適
確認試験		下層は初め赤色を呈し、青色を経て緑色に 変る。	○	○	無	適
純度試験						
(1) 融点		140.8℃	○	○	無	適
(2) 溶状		適 (沈殿または混濁しない)	○	○	無	適
(3) 酸価		0.0	○	○	無	適
(4) 重金属		適	○	○	無	適
(5) ヒ素		適	○	○	無	適
乾燥減量		0.0%	○	○	無	適
強熱残分		0.0%	○	○	無	適
含量			×	○	有	適

定量法

フィトステロール 90.0～102.0%を含む。

100%忠実法①（誤記の方法：分母係数（0.97）あり。且つ、スチグマステロール(定量用)の純度検定値を加味せず。）

$$\text{フィトステロールの含量} = \frac{\text{スチグマステロール(定量用)の採取量}}{\text{試料採取量}(mg) \times 0.97} \times \frac{As}{Ast} \times 100$$

ブラシカステロール	5.1%
カンペステロール	25.2%
スチグマステロール	23.1%
βシトステロール	45.2%
フィトステロール含量	98.7% (適)

理論上の真実値（分母係数なし。スチグマステロール(定量用)の純度検定値を加味する。）

$$\text{フィトステロールの含量} = \frac{\text{スチグマステロール(定量用)の採取量} \times f}{\text{試料採取量}(mg)} \times \frac{As}{Ast} \times 100$$

ブラシカステロール	4.9%
カンペステロール	24.2%
スチグマステロール	22.2%
βシトステロール	43.4%
フィトステロール含量	94.8% (適)

提案法

分母係数(0.97)なしの場合（スチグマステロール(定量用)の純度検定値は加味せず。）

$$\text{フィトステロールの含量} = \frac{\text{スチグマステロール(定量用)の採取量}}{\text{試料採取量}(mg)} \times \frac{As}{Ast} \times 100$$

ブラシカステロール	5.0%
カンペステロール	24.5%
スチグマステロール	22.4%
βシトステロール	43.9%
フィトステロール含量	95.8% (適)

別添（問題点の内容）

問題点

フィトステロールの含量計算式で科学的に意味不明の係数がある。誤記ではないか。

$$\text{フィトステロールの含量} = \frac{\text{スチグマステロール（定量用）の採取量(mg)}}{\text{試料採取量(mg)} \times 0.97} \times \frac{A_s}{A_{s t}} \times 100$$

A s : 検液フィトステロールの総面積

A s t : 標準品のスチグマステロールの面積

この係数 0.97 は、スチグマステロール（定量用）の純度としての係数として設定されたものと思われる（C-1 試薬・試液等に スチグマステロール、定量用の項に含量 97.0%以上とある。）が、スチグマステロール（定量用）の採取量（mg）に掛かるものではなく、試料採取量(mg)に掛けられている。もし、スチグマステロール（定量用）の純度を意味する係数であれば、分子に掛けなければならない係数である。

また、当該分母係数を分子係数に改めたとしても、この固定的数値（0.97）が存在するならば、各試験施設において、97%純度のスチグマステロール標準品を持ち合わせねばならないことになる。また、標準品の含量が 97%を上回るなら、フィトステロール含量は理論値より低く算出される。

そのため、標準品の含量係数を記載するならば f とするか、記載しない方が良いと考える。

一般的に各条品目の濃度計算式において、標準品の固定的な純度検定値を計算式に盛り込む例はないため、当品目においても除外すべきと考える。

以下修正案

$$\text{フィトステロールの含量} = \frac{\text{スチグマステロール（定量用）の採取量(mg)}}{\text{試料採取量(mg)}} \times \frac{A_s}{A_{s t}} \times 100$$

A s : 検液フィトステロールの総面積

A s t : 標準品のスチグマステロールの面積

その他の意見として、「ブラシカステロール、カンペステロール、スチグマステロール、βシトステロールの各々の含量（各々のステロール標準品を用意する）からフィトステロール含量を求める方法」については、スチグマステロール以外の各々のステロール標準品が高価であることや、本法が絶対検量線法による定量であること、また日々の試験精度管理が煩雑になることなどを踏まえ、現在のスチグマステロール標準品による分析が有効と考えられる。

以上

植物ステロール定量法に関する検証結果
(ステロール同族体の重量相対感度測定)

2009/3/3

タマ生化学株式会社
甲府工場 品質管理課

品名/採取量	成分量 (mg)	n	面積値	重量相対感度 (Area/mg)	平均	感度係数 (Stigmaを1.0として)
Brassicasterol (99.0 %) 採取量 70.4 mg	69.70	1	19,814	284.292	287.305	1.027
		2	19,818	284.349		
		3	20,440	293.274		
Campesterol (98.6 %) 採取量 70.4 mg	69.41	1	19,534	281.411	280.614	1.003
		2	19,321	278.343		
		3	19,581	282.088		
Stigmasterol (99.0 %) 採取量 70.6 mg	69.89	1	19,493	278.894	279.747	1.000
		2	19,680	281.569		
		3	19,485	278.779		
β -Sitosterol (99.4 %) 採取量 70.9 mg	70.47	1	18,324	260.009	264.100	0.944
		2	18,616	264.152		
		3	18,897	268.139		

GCによる測定条件(指定条件)

Instrument : GC-14B (Shimadzu)

Detector : FID

Column : ID 3 mm×2 m、Silicon SE-30 2% Shimalite W 80~100 mesh

Temperature : Injection/Detector 280 °C

Column 250 °C

Carrier Gas : Nitrogen

Sample Size : 3 μ L (70mg/50mL Ethyl acetate Soln.)

植物性ステロール
スチグマステロールに対する同族体の重量相対感度検証

2009/3/30

品名/採取量	成分量 [mg] (採取量 × 含量)	n	面積値	重量相対感度 [Area/mg]	感度係数
ブラシカステロール 69.34mg	68.65	1	0.7280	0.01061	0.992
		2	0.7272	0.01059	
		3	0.7271	0.01059	
		4	0.7268	0.01059	
			平均値	0.01059	
カンバステロール 70.22mg	69.24	1	0.7358	0.01063	0.994
		2	0.7352	0.01062	
		3	0.7348	0.01061	
		4	0.7337	0.01060	
			平均値	0.01061	
スチグマステロール 69.59mg	68.89	1	0.7358	0.01068	1.000
		2	0.7356	0.01068	
		3	0.7355	0.01068	
		4	0.7349	0.01067	
			平均値	0.01068	
β-シトステロール 69.22mg	68.80	1	0.7317	0.01064	0.996
		2	0.7323	0.01064	
		3	0.7316	0.01063	
		4	0.7305	0.01062	
			平均値	0.01063	

GC 測定条件

Instrument GC-14B (Shimadzu)

Detector FID

Column ID 3.2mm × 2.1m, Silicone OV-1 2% Chromosorb W 80~100mesh AW-DMCS

Temperature Injection 280°C

Detector 280°C

Column 244°C

Nitrogen

Carrier Gas 3μl (70mg/50ml Ethyl acetate Soln.)

理研ビタミン(株) 食品改良剤開発部 技術第1グループ 柴田