

平成12年2月

# 納豆菌ガム

大日本製薬株式会社

食品化成品部

## 1. 緒言

本報告は既存添加物名簿に記載されている「納豆菌ガム」について味の素(株)で実施した試験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確認試験、純度試験、定量法等について調査研究を行い、この結果を踏まえ、規格(案)を策定した。

## 3. 試験法

### 1) 純度試験

食品添加物公定書第六版に準じた試験法で重金属、毒素、乾燥減量、強熱残分について3ロット、3回試験した。次項に結果を示す。

### 2) 鉛、微生物限度

食品添加物公定書第七版に準拠する。

### 3) 定量法

次のような試験法で3ロット3回、含量を測定した。

#### ●定量法詳細

##### (1) 試薬

水：イオン交換水を再蒸留する。あるいは注射用蒸留水を用いる。

塩酸：市販特級試薬(関東化学)

アミノ酸分析試薬緩衝液：三菱化学(株)製L-8500用 Buffer pH-Kit

ニンヒドリン試薬：和光純薬工業(株)製L-8500形 NinKIT

##### (2) 機器

ブロックヒーター、遠心濃縮器、アミノ酸分析器

##### (3) 試験溶液の調製

ガラス製アンプル管に $\gamma$ -PGA 0.1g を精秤する。約2mLの6 mol/L塩酸を加えた後、減圧下でアンプル管を封管する。アンプル管をブロックヒーターにて110℃、24時間加熱する。冷却後、アンプル管内の加水分解液を遠心濃縮器により濃縮物を得る。濃縮物をメスフラスコに回収し、100 mLに定容する。その後20倍に希釈し、マイクロフィルター(0.45 $\mu$ m)により濾過して試験溶液としてアミノ酸分析に供する。

##### (4) 定量試験

アミノ酸分析計を用いて定量する。

##### ☆分析条件

検出器：日立L-8500形高速アミノ酸分析計

カラム：4.6mmID×60mm(パッドカラム標準分析用)

日立カスタムイオン交換樹脂 #2622SC

ガードカラム : 4.6mmID×50mm

日立カスタムイオン交換樹脂 #2619-F

(5) 計算式

☆グルタミン酸含量から次式によりγ-PGA量を求める。

$$\text{ポリグルタミン酸量} = \text{グルタミン酸量 (mg)} \times \frac{A}{B}$$

A : 129 (ポリグルタミン酸中のグルタミン酸残基の分子量)

B : 147 (グルタミン酸分子量)

☆γ-PGA含量は次式より求める。

$$\text{ポリグルタミン酸含量 (\%)} = \frac{\text{グルタミン酸量}}{\text{試料採取量}} \times \frac{A}{B} \times 100$$

(6) 試験操作のフローチャート

試料の秤量——酸加水分解——試験溶液の調製——アミノ酸分析——計算

4. 結果

含量等5項目についての3ロット3回の測定値、計算値を一覧表で示す。

サンプル名	PGA含量 (%)	重金属 (μg/g)	ヒ素 (μg/g)	LD (%)	強熱残分 (%)
KL9807	80.7	20 以下	4.0 以下	7.0	24.4
KL9807	86.0	20 以下	4.0 以下	7.1	24.4
KL9807	82.5	20 以下	4.0 以下	7.0	24.4
970225	86.0	20 以下	4.0 以下	2.1	25.6
970225	86.9	20 以下	4.0 以下	2.1	25.8
970225	83.4	20 以下	4.0 以下	2.1	25.6
TT-6	82.5	20 以下	4.0 以下	2.5	29.4
TT-6	85.1	20 以下	4.0 以下	2.7	29.4
TT-6	77.2	20 以下	4.0 以下	2.6	29.6

5. 考察

試験結果を勘案し、含量については70.0%以上、乾燥減量(LD)は15.0%以下、強熱残分は30.0%以下(乾燥物換算)、重金属は20μg/g以下、ヒ素は4.0μg/g以下を提案したい。

6 結び

試験結果に基づき規格の他に食品添加物公定書第7版に準拠した規格も設定し、自主規格(案)を策定したので次に示す。

# 納豆菌ガム自主規格(案)

納豆菌ガム

Bacillus natto gum

納豆菌粘質物

**定義** 納豆菌の培養液から得られた、ポリグルタミン酸を主成分とするものをいう。

**含量** 本品を乾燥したものは、ポリグルタミン酸 70.0%以上を含む。

**性状** 本品は白～淡褐色の吸湿性の強い粉末又は塊もしくは粒で、無臭もしくはわずかににおいがある。

**確認試験** (1) 本品の水溶液 (1→1,000) 5 ml を 6 mol/l 塩酸中で 110℃、24 時間加水分解した後、ニンヒドリン試液 1 ml を加え、3 分間加熱するとき、液は青紫色を呈する。

(2) 本品 1～2 mg をとり、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するとき、1600cm<sup>-1</sup> 付近に弱い吸収帯と 1410cm<sup>-1</sup> 付近に強い吸収を認める。

**純度試験** (1) 重金属 Pb として 20 μg/g 以下 (1.0g、第 1 法、比較液 鉛標準液 0.20ml)

(2) 鉛 Pb として 10 μg/g 以下 (1 g、第 1 法)

(3) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> として 4.0 μg/g 以下 (0.5 g、第 1 法、装置 B)

**乾燥減量** 15.0%以下 (減圧、40℃、24 時間)

**強熱残分** 30.0%以下 (乾燥物換算)

**微生物限度** 微生物限度試験法により試験を行うとき、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** 本品を乾燥した後、その約 100 mg を精密に量り、10 ml の水に溶解後、その 0.5 ml を 6 mol/l 塩酸中で 110℃、24 時間加水分解後、アミノ酸分析計を用いて、グルタミン酸量を求める。グルタミン酸量から次式によりポリグルタミン酸含量を求める。

$$\text{ポリグルタミン酸含量} = \frac{\text{グルタミン酸量}}{\text{試料採取量}} \times \frac{A}{B} \times 100$$

(%)

A : 129 (ポリグルタミン酸中のグルタミン酸残基の分子量)

B : 147 (グルタミン酸分子量)

酵素処理イソクエルシトリン  
Enzymatically modified isoquercitrin

**定 義** 本品は、ルチン酵素分解物とでん粉又はデキストリンの混合物に、シクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼを用いてグルコースを付加して得られたものである。 $\alpha$ -グルコシルイソクエルシトリンを主成分とする。

**含 量** 本品を乾燥したものは、酵素処理イソクエルシトリンを 60.0%以上を含む。

**性 状** 本品は、黄～黄橙色の粉末で特異なにおいがある。

- 確認試験** (1) 本品 5mg に水 10ml を加えて溶かし、塩化第二鉄溶液 (1→50) 1～2 滴を加えるとき、液は黒褐色を呈する。
- (2) 本品 5mg に水酸化ナトリウム溶液 (1→1000) 10ml を加えて溶かした液は、橙色を呈する。
- (3) 本品 5mg に水 5ml を加えて溶かし、塩酸 2ml 及びマグネシウム末 50mg を加えるとき、液は徐々に橙色を呈する。
- (4) 本品 100mg に 0.5mol/l 硫酸 100ml を加えて溶かし、2 時間煮沸後冷却するとき、黄色の析出物を生じる。
- (5) 本品 10mg にリン酸溶液 (1→1000) を加えて溶かした液は、黄色を呈し、波長 255～260nm と 348～353nm に極大吸収部がある。

- 純度試験** (1) (重金属) Pb として  $10\mu\text{g/g}$  以下 (2.0g, 第 2 法、比較液 鉛標準液 2.0ml)
- (2) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$  として  $2.0\mu\text{g/g}$  以下 (0.50g, 第 4 法、装置 C)

**乾燥減量** 10.0%以下 (135℃、2 時間)

**定量法**

本品を乾燥し、その約 0.2g を精密に量り、水 50ml を加えて溶かし、必要があればガラスろ過器でろ過し、水で洗い、ろ液と洗液を合わせ、正確に 100ml とする。この液 1ml を正確に量り、リン酸溶液 (1→1000) を加えて正確に 100ml とし、試験溶液とする。別にルチンを 135℃で 2 時間乾燥し、約 0.2g を精密に量り、メタノール 80ml を加えて加熱して溶かし、冷後メタノールを加えて正確に 100ml とする。この液 1ml を正確に量り、リン酸溶液 (1→1000) を加えて 100ml とし、標準溶液とする。試験溶液及び標準溶液につき、リン酸溶液 (1→1000) を対照とし、波長 351nm における吸光度 A1 及び A2 を測定し、次式により酵素処理イソクエルシトリンの含量を求める。ルチン換算量でもって酵素処理イソクエルシトリン含量とする。

$$A = \frac{A1 \times R}{A2 \times S} \times 100 \quad (\%)$$

A : 酵素処理イソクエルシトリン含量 (ルチン換算量) (%)

A1 : 試料液の吸光度

A2 : ルチン溶液の吸光度

S : 試料採取量 (mg)

R : ルチンの採取量 (mg)

ルチン  $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$  MW 664.57

## 試験結果

品名	酵素処理イソクエルシトリン		
LOT NO.	991004		
測定回数	1回目	2回目	3回目
性状	適	適	適
乾燥減量	4.79%	5.08%	5.37%
確認試験1	適	適	適
確認試験2	適	適	適
確認試験3	適	適	適
確認試験4	適	適	適
ヒ素	0.5 μg/g	0.5 μg/g以下	0.5 μg/g以下
重金属	5 μg/g以下	5 μg/g以下	5 μg/g以下
含量	71.34%	68.47%	68.80%

品名	酵素処理イソクエルシトリン		
LOT NO.	990316		
測定回数	1回目	2回目	3回目
性状	適	適	適
乾燥減量	8.29%	8.30%	8.28%
確認試験1	適	適	適
確認試験2	適	適	適
確認試験3	適	適	適
確認試験4	適	適	適
ヒ素	0.5 $\mu$ g/g以下	0.5 $\mu$ g/g以下	0.5 $\mu$ g/g以下
重金属	5 $\mu$ g/g以下	5 $\mu$ g/g以下	5 $\mu$ g/g以下
含量	77.00%	73.20%	74.13%

品名	酵素処理イソクエルシトリン		
LOT NO.	981026		
測定回数	1回目	2回目	3回目
性状	適	適	適
乾燥減量	4.72%	4.90%	4.92%
含量	73.49%	71.44%	71.47%
確認試験1	適	適	適
確認試験2	適	適	適
確認試験3	適	適	適
確認試験4	適	適	適
ヒ素	0.5 $\mu$ g/g以下	0.5 $\mu$ g/g以下	0.5 $\mu$ g/g以下
重金属	5 $\mu$ g/g以下	5 $\mu$ g/g以下	5 $\mu$ g/g以下

尚、定量に当たっては、東京化成(株)から市販されているルチン（純度 98%以上）を、定量用標準品として用いた。

ヤマモモ抽出物

Chinese bayberry extract

定 義 本品は、ヤマモモの果実、葉、樹皮から得られたミリシトリンを主成分とするものである。

性 状 本品は、薄い灰黄色～赤褐色の液体又は固体で、特異なにおいがある。

- 確認試験 (1) 本品 5mg にメタノール 10ml を加えて溶かし、塩化第二鉄・塩酸試液 1～2 滴を加えるとき、液は緑色を帯びた黒色を呈する。
- (2) 本品 5mg にエタノール 5ml を加えて溶かし、塩酸 2ml 及びマグネシウム末 50mg を加えるとき、液は徐々に赤色を呈する。
- (3) 本品 10mg にエタノール 1L を加えて溶かした液は、ごく薄い黄色～褐色を呈し、波長 255～268nm と 355～365nm に極大吸収部がある。
- (4) 本品をメタノールに溶かした液 (1→20) を調製し、検液とする。検液 2 $\mu$ l を量り、検液 2 $\mu$ l を量り、対照液を用いず、酢酸エチル/2-ブタノン/ギ酸/水 (5:3:1:1) を展開溶媒として、薄層クロマトグラフィーを行うとき、Rf 値が 0.60～0.80 に黄褐色の主スポットを認める。このスポットは塩化第二鉄・塩酸試液を噴霧することにより黒色を呈する。ただし、薄層板には、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、塩化第二鉄・塩酸試液を噴霧する。

純度試験 (1) (重金属) Pb として 10 $\mu$ g/g 以下 (2.0g, 第 2 法、比較液 鉛標準液 2.0ml)

(2) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> として 2.0 $\mu$ g/g 以下 (0.5g, 第 4 法、装置 C)

## 試験結果

品名	ヤマモモ抽出物		
LOT NO.	990714		
測定回数	1回目	2回目	3回目
性状	適	適	適
確認試験1	適	適	適
確認試験2	適	適	適
確認試験3			
色調	ごく薄い黄色	ごく薄い黄色	ごく薄い黄色
λ max	358nm	358nm	358nm
λ max	262nm	265nm	265nm
確認試験4	0.786(主スポット)	0.769(主スポット)	0.774(主スポット)
ヒ素	0.5 μg/g以下	0.5 μg/g以下	0.5 μg/g以下
重金属	5 μg/g以下	5 μg/g以下	5 μg/g以下

品名	ヤマモモ抽出物		
LOT NO.	990524		
測定回数	1回目	2回目	3回目
性状	適	適	適
確認試験1	適	適	適
確認試験2	適	適	適
確認試験3			
色調	ごく薄い黄色	ごく薄い黄色	ごく薄い黄色
λ max	359nm	358nm	358nm
λ max	264nm	265nm	265nm
確認試験4	0.781(主スポット)	0.773(主スポット)	0.784(主スポット)
ヒ素	0.5 μg/g以下	0.5 μg/g以下	0.5 μg/g以下
重金属	5 μg/g以下	5 μg/g以下	5 μg/g以下



品名	ヤマモモ抽出物		
LOT NO.	990215		
測定回数	1回目	2回目	3回目
性状	適	適	適
確認試験1	適	適	適
確認試験2	適	適	適
確認試験3			
色調	ごく薄い黄色	ごく薄い黄色	ごく薄い黄色
λ max	358nm	358nm	358nm
λ max	265nm	265nm	265nm
確認試験4	0.781(主スポット)	0.783(主スポット)	0.775(主スポット)
ヒ素	0.5 μg/g以下	0.5g/g以下	0.5 μg/g以下
重金属	5 μg/g以下	5 μg/g以下	5 μg/g以下

メナキノンの  
規格及び試験方法に関する資料

協和醗酵工業株式会社

## 結 言

メナキノンの規格及び試験方法を、自主規格案に基づき、適合性の調査を行なった。

試験は、食品添加物公定書通則並びに食品公定書一般試験法に準じて実施した。

尚、本試験の試料には、協和醗酵工業株式会社防府工場で製造した3ロットを用いた。

## 目 次

1. 試験結果 .....	4
(1) 性 状 .....	4
(2) 確認試験 .....	5
(3) 純度試験 .....	7
(4) 水 分 .....	8
(5) 強熱残分 .....	9
(6) 定量法 .....	10
2. 試験実施場所 .....	11

## 1. 試験結果

### (1) 性状

本品は黄色の結晶又は結晶性粉末、ろうようの塊又は油状。

本品3ロットについて繰り返し3回試験した結果は、表1に示すとおりである。

表1 形状の試験結果

ロット番号	回数	形状	判定
T-1	1	黄色の結晶性の粉末	適
	2	黄色の結晶性の粉末	適
	3	黄色の結晶性の粉末	適
T-2	1	黄色の結晶性の粉末	適
	2	黄色の結晶性の粉末	適
	3	黄色の結晶性の粉末	適
T-3	1	黄色の結晶性の粉末	適
	2	黄色の結晶性の粉末	適
	3	黄色の結晶性の粉末	適

(2) 確認試験

- 1) 本品 0.1g にエタノール(99.5)5ml を加え、加温して溶かし、冷後、水酸化カリウムのエタノール(99.5)溶液(1→10)1ml を加えるとき、液は青色を呈し、放置するとき、青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる。[確認試験(1)]
- 2) 本品につき、赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法により試験を行ない、本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認める。  
[確認試験(2)]

本品 3 ロットについて繰り返し 3 回試験した結果は、表 2 及び表 3 に示すとおりである。

表 2 確認試験の試験結果

ロット番号	回数	確認試験(1)	判定
T-1	1	液は青色を呈し、放置するとき青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる	適
	2	液は青色を呈し、放置するとき青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる	適
	3	液は青色を呈し、放置するとき青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる	適
T-2	1	液は青色を呈し、放置するとき青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる	適
	2	液は青色を呈し、放置するとき青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる	適
	3	液は青色を呈し、放置するとき青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる	適
T-3	1	液は青色を呈し、放置するとき青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる	適
	2	液は青色を呈し、放置するとき青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる	適
	3	液は青色を呈し、放置するとき青紫色から赤紫色を経て赤褐色に変わる	適

使用機器 : 上皿電子天秤・・・AアンドD/F A 2 0 0 型

表3 確認試験の試験結果

ロット 番号	回数	確認試験(2)	判定
T-1	1	本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた	適
	2	本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた	適
	3	本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた	適
T-2	1	本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた	適
	2	本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた	適
	3	本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた	適
T-3	1	本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた	適
	2	本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた	適
	3	本品のスペクトルとメナキノン-4 標準品のスペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた	適

使用機器 : 赤外分光光度計……日本分光FT/IR-7300型  
電子天秤……メトラー/AE163型

(3) 純度試験

1) 重金属

本品 1.0g をとり、第 2 法により操作し、試験を行なう。比較液には鉛標準液 2.0ml を加える ( $20 \mu\text{g/g}$  以下)。

本品 3 ロットについて繰り返し 3 回試験した結果は、表 4 に示すとおりである。

表 4 重金属 (第 2 法) の試験結果

ロット番号	回数	結果	判定
T-1	1	$20 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	2	$20 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	3	$20 \mu\text{g/g}$ 以下	適
T-2	1	$20 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	2	$20 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	3	$20 \mu\text{g/g}$ 以下	適
T-3	1	$20 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	2	$20 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	3	$20 \mu\text{g/g}$ 以下	適

使用機器 : 電気炉……ヤマト科学 / FP 3 1 型  
上皿電子天秤……AアンドD / FA 2 0 0 型

2) ヒ素

本品 1.0g をとり、第 3 法により検液を調整し、装置 B を用いる方法により、試験を行なう ( $2 \mu\text{g/g}$  以下)。

本品 3 ロットについて繰り返し 3 回試験した結果は、表 5 に示すとおりである。

表 5 ヒ素 (第 3 法) の試験結果

ロット番号	回数	結果	判定
T-1	1	$2 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	2	$2 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	3	$2 \mu\text{g/g}$ 以下	適
T-2	1	$2 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	2	$2 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	3	$2 \mu\text{g/g}$ 以下	適
T-3	1	$2 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	2	$2 \mu\text{g/g}$ 以下	適
	3	$2 \mu\text{g/g}$ 以下	適

使用機器 : 電気炉……ヤマト科学 / FP 3 1 型  
上皿電子天秤……AアンドD / FA 2 0 0 型



3) メナジオン

本品 0.20g に薄めたエタノール(99.5) (1→2)5ml を加えてよく振り混ぜた後、ろ過する。ろ液 0.5ml に 3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロンのエタノール(99.5)溶液(1→20)1 滴及びアンモニア水(28)1 滴を加え、2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない。

本品 3 ロットについて繰り返し 3 回試験した結果は、表 6 に示すとおりである。

表 6 メナジオンの試験結果 (局法)

ロット番号	回数	結 果	判定
T-1	1	2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない	適
	2	2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない	適
	3	2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない	適
T-2	1	2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない	適
	2	2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない	適
	3	2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない	適
T-3	1	2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない	適
	2	2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない	適
	3	2 時間放置するとき、液は青紫色を呈しない	適

上皿電子天秤……AアンドD/F A 2 0 0 型

(4) 水 分

0.5%以下 (0.5g)

本品 3 ロットについて繰り返し 3 回試験した結果は、表 7 に示すとおりである。

表 7 水分の試験結果 (直接滴定法)

ロット番号	回数	試料の重量 (g)	カルフィッシャー測定値(ml)	カルフィッシャー係数	水分 (%)	判定
T-1	1	0.50224	0.250	2.9750	0.15	適
	2	0.50108	0.236	2.9750	0.14	適
	3	0.50018	0.269	2.9750	0.16	適
T-2	1	0.50102	0.215	2.9750	0.13	適
	2	0.50093	0.202	2.9750	0.12	適
	3	0.50132	0.236	2.9750	0.14	適
T-3	1	0.50283	0.325	2.9750	0.19	適
	2	0.50237	0.355	2.9750	0.21	適
	3	0.50156	0.303	2.9750	0.18	適

使用機器 : カルフィッシャー水分測定装置……京都電子/MKA-210 型  
電子天秤……メトラー/AE163 型

(5) 強熱残分

0.10%以下 (1g)

本品3ロットについて繰り返し3回試験した結果は、表8に示すとおりである。

表8 強熱残分の試験結果(局法)

ロット番号	回数	強熱前の重量(g)	るつぼの重量(g)	試料量(g)	強熱後の重量(g)	残分重量(g)	強熱残分(%)	判定
T-1	1	37.44262	36.44024	1.00238	36.44069	0.00045	0.04	適
	2	38.15133	37.15115	1.00018	37.15159	0.00044	0.04	適
	3	36.86923	35.85213	1.01710	35.85230	0.00017	0.02	適
T-2	1	35.19624	34.19433	1.00191	34.19446	0.00013	0.01	適
	2	36.44926	35.43814	1.01112	35.43837	0.00023	0.02	適
	3	37.52486	36.51933	1.00553	36.51949	0.00016	0.02	適
T-3	1	38.50923	37.49933	1.00990	37.49950	0.00017	0.02	適
	2	37.71533	36.70814	1.00719	36.70862	0.00048	0.05	適
	3	36.57423	35.56233	1.01190	35.56270	0.00037	0.04	適

使用機器 : 電気炉……島津/MP-67型

電子天秤……メトラー/AE101型

(6) 定量法

本操作は直射日光を避け、遮光した容器を用いて行なう。本品及びメナキノ  
ン-4 標準品（別途本品と同様の方法で水分を測定しておく）約 0.1g ずつを精密  
に量り、それぞれを 2-プロパノール 50ml に溶かし、さらにエタノール(99.5)  
を加えて正確に 100ml とする。この液 10ml ずつを正確に量り、それぞれエ  
タノール(99.5)を加えて正確に 100ml とする。この液 2ml ずつを正確に量り、  
それぞれに内標準溶液 4ml を正確に加え、試料溶液及び標準溶液とする。試  
料溶液及び標準溶液 20  $\mu$ l につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により  
試験を行ない、内標準物質のピーク面積に対するメナキノ  
ン-4 のピーク面積  
の比  $Q_T$  及び  $Q_S$  を求める。

$$\text{メナキノ  
ン-4(C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_2) \text{ の量(mg)} = \frac{\text{脱水物に換算したメナキノ  
ン-4 標準品の量(mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S}$$

内標準溶液： フィトナジオンの 2-プロパノール溶液（1→20000）

操作条件

検出器： 紫外吸光光度計（測定波長：270nm）

カラム： 内径約 5mm，長さ約 15cm のステンレス管に 5  $\mu$ m の液体クロ  
マトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てる。

カラム温度： 40℃付近の一定温度

移動層： メタノール

流量： メナキノ  
ン-4 の保持時間が約 7 分になるに調整する。

カラムの測定： 標準溶液 20  $\mu$ l につき、上記の条件で操作するとき、メ  
ナキノ  
ン-4，内標準物質の順に溶出し、その分離度が 4  
以上のものを用いる。

本品 3 ロットについて繰り返し 6 回試験した結果は、表 9 に示すとおりである。

表 9 定量の試験結果（HPLC法）

ロット 番号	回 数	重量(mg)		ピ ク ア リ ア		内 部 標 準 物 質 の ピ ク ア リ ア		水分		含 量 (%)	判 定
		試料	標準品	試料溶液	標準溶液	試料溶液	標準溶液	試料	標準品		
T-1	1	101.91	101.01	1445017	1433300	1727765	1718506	0.15	0.04	99.5	適
	2	101.29	101.01	1447335	1433300	1733928	1718506	0.15	0.04	99.9	適
	3	101.49	101.01	1430200	1433300	1712261	1718506	0.15	0.04	99.8	適
	4	101.34	101.01	1411512	1433300	1694180	1718506	0.15	0.04	99.7	適
	5	100.87	101.01	1431548	1433300	1714275	1718506	0.15	0.04	100.4	適
	6	100.31	101.01	1441977	1433300	1735245	1718506	0.15	0.04	100.4	適
T-2	1	98.61	101.01	1449485	1433300	1794512	1718506	0.13	0.04	99.3	適
	2	99.41	101.01	1445918	1433300	1789020	1718506	0.13	0.04	98.6	適
	3	99.24	101.01	1445752	1433300	1787038	1718506	0.13	0.04	98.8	適
	4	99.43	101.01	1410531	1433300	1743270	1718506	0.13	0.04	98.6	適
	5	99.14	101.01	1434561	1433300	1769796	1718506	0.13	0.04	99.1	適
	6	99.19	101.01	1400256	1433300	1723288	1718506	0.13	0.04	99.3	適
T-3	1	98.68	101.01	1465017	1433300	1814523	1718506	0.19	0.04	99.2	適
	2	98.33	101.01	1435531	1433300	1780575	1718506	0.19	0.04	99.4	適
	3	99.03	101.01	1412727	1433300	1753498	1718506	0.19	0.04	98.7	適
	4	98.99	101.01	1392657	1433300	1727579	1718506	0.19	0.04	98.8	適
	5	98.73	101.01	1363708	1433300	1691384	1718506	0.19	0.04	99.1	適
	6	98.22	101.01	1385434	1433300	1718798	1718506	0.19	0.04	99.5	適

使用機器： 液体クロマトグラフィー……日立/L 6 3 0 0 型  
電子天秤……メトラー/AE 1 6 3 型

## 2. 試験実施場所

当該試験の実施に係わる場所、責任者及び期間は次のとおりである。

試験実施場所      山口県防府市協和町1-1  
協和醗酵工業株式会社 防府工場

試験実施責任者    友 弘    進

試験実施者        高 橋    金 次

試験実施期間      自 平成11年11月25日  
                         至 平成11年12月 1日