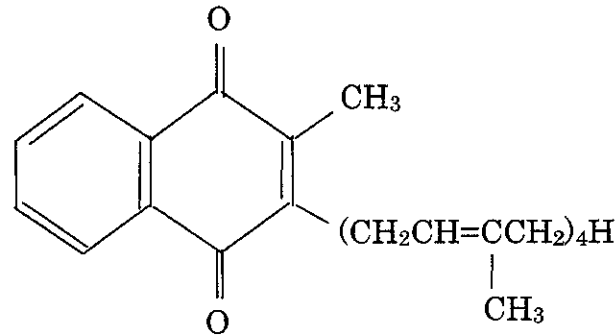


メナキノンの規格及び試験方法



$C_{31}H_{40}O_2$ 444.66

定義

細菌(*Arthrobacter nicotianae*)の培養液より、室温時ブタノールで抽出後、室温時ヘキサンで抽出し、精製して得られたものである。主成分はメナキノン-4である。

含量

本品は定量するとき、換算した脱水物に対し、メナキノン-4 ($C_{31}H_{40}O_2$) 98.0~102.0%を含む。

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。

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。
- (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 標準品の参照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。

純度試験

- (1) 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)

(2) ヒ素

As₂O₃として2μg/g以下(1.0g、第3法、装置B)

(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。

水分

0.5%以下(0.5g、容量滴定法、直接滴定)

強熱残分

0.10%以下(1g)

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20μl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。

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

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5μm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んする。

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分になるように調整する。

カラムの測定 : 標準溶液20μl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。

自主規格案「オゾケライト」

研究期間 平成 11 年 12 月 1 日～平成 12 年 1 月 31 日

研究報告者 株式会社ロッテ 中央研究所

1. 目的

既存添加物リスト No69「オゾケライト」の自主規格作成のため、含量・定量法および確認試験法等について調査研究を行い、この結果をふまえて規格案を策定し、その妥当性に関して調査研究を実施する。

2. 検討方法

オゾケライトは化粧品種別配合成分規格に記載されている。また本品は鉱物性ワックスで炭化水素類を成分としており、既存添加物であるパラフィンワックス（リスト No336）およびマイクロクリスタリンワックス（リスト No419）と成分的に類似するため、それらの自主規格（天然添加物の自主規格追補版に記載）の項目も参考とした。

・化粧品種別配合成分規格「オゾケライト」

定義

性状

確認試験 燃焼臭気

融点 61～90°（第 2 法）

純度試験

1) 液性

2) イオウ化合物

3) 重金属 Pb として 30ppm 以下（1.0g、第 4 法、比較液 鉛標準液 3.0ml）

4) ヒ素 As_2O_3 として 2ppm 以下（1.0g、装置 C）

強熱残分 0.05%以下（第 1 法、5g）

・既存添加物自主規格「パラフィンワックス」

定義

性状

確認試験 赤外吸収スペクトル測定

純度試験

1) 融点 43～70°（融点測定法、第 2 種物質）

2) 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）

3) ヒ素 As_2O_3 として 4.0 μ g/g 以下（0.25g、第 3 法、装置 A）

4) 紫外線吸光度 (CFR § 172-886)

波長 (nm)	最大吸光度/cm 光学距離
280~289	0.15
290~299	0.12
300~359	0.08
360~400	0.02

強熱残留物 0.10%以下

3. 検討結果

確認試験：本試験項目としてはカルナウバロウ、カンデリラロウ（食品添加物公定書規格）、パラフィンワックス（既存添加物自主規格）等の食品添加物ワックスと同じく、赤外吸収スペクトルを測定し、参照スペクトルと比較する方法がもっとも望ましいと考えられる。尚、吸収帯ピークは 725cm^{-1} 、 1.378cm^{-1} 、 1.467cm^{-1} 、 2.849cm^{-1} および 2.918cm^{-1} 付近に認められる。

純度試験：化粧品種別配合成分規格項目の液性、重金属、ヒ素および融点の適用は問題ない。また食品添加物としての管理から、成分的に類似したパラフィンワックス、マイクロクリスタリンワックスと同じく多環芳香族炭化水素の含有に関わる紫外線吸光度（FCC 石油系ワックス試験法）を規格項目として設けることが適切と考えられる。

強熱残分：化粧品種別配合成分規格の項目をそのまま適用できる。

4. 結論（オゾケライト自主規格案）

「オゾケライト」 Ozokerite

定義：ワックスシェールの鉍脈に含まれるロウより精製したものである。成分は $\text{C}_{29}\sim\text{C}_{53}$ の炭化水素である。

性状：無色または白色の結晶性の固体で無味、わずかに特有のにおいを有する。

確認試験：本品を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、同一波長のところに同様の強度の吸収を認める。

純度試験

- 1) 融点 $55\sim 80^\circ\text{C}$
- 2) 液性 本品 10g を加熱して融解し、熱エタノール 10ml を加え、振り混ぜて放置するとき、分離したエタノール層は中性である。
- 3) 重金属 Pb として $30\ \mu\text{g/g}$ 以下 (1.0g、第 2 法、比較液 鉛標準液 3.0ml)
- 4) ヒ素 As_2O_3 として $2.0\ \mu\text{g/g}$ 以下 (0.5g、第 3 法、装置 B)
- 5) 紫外線吸光度 (CFR § 172-886)

波長(nm)	最大吸光度/cm 光学距離
280~289	0.15
290~299	0.12
300~359	0.08
360~400	0.02

強熱残分：0.10%以下（1g）

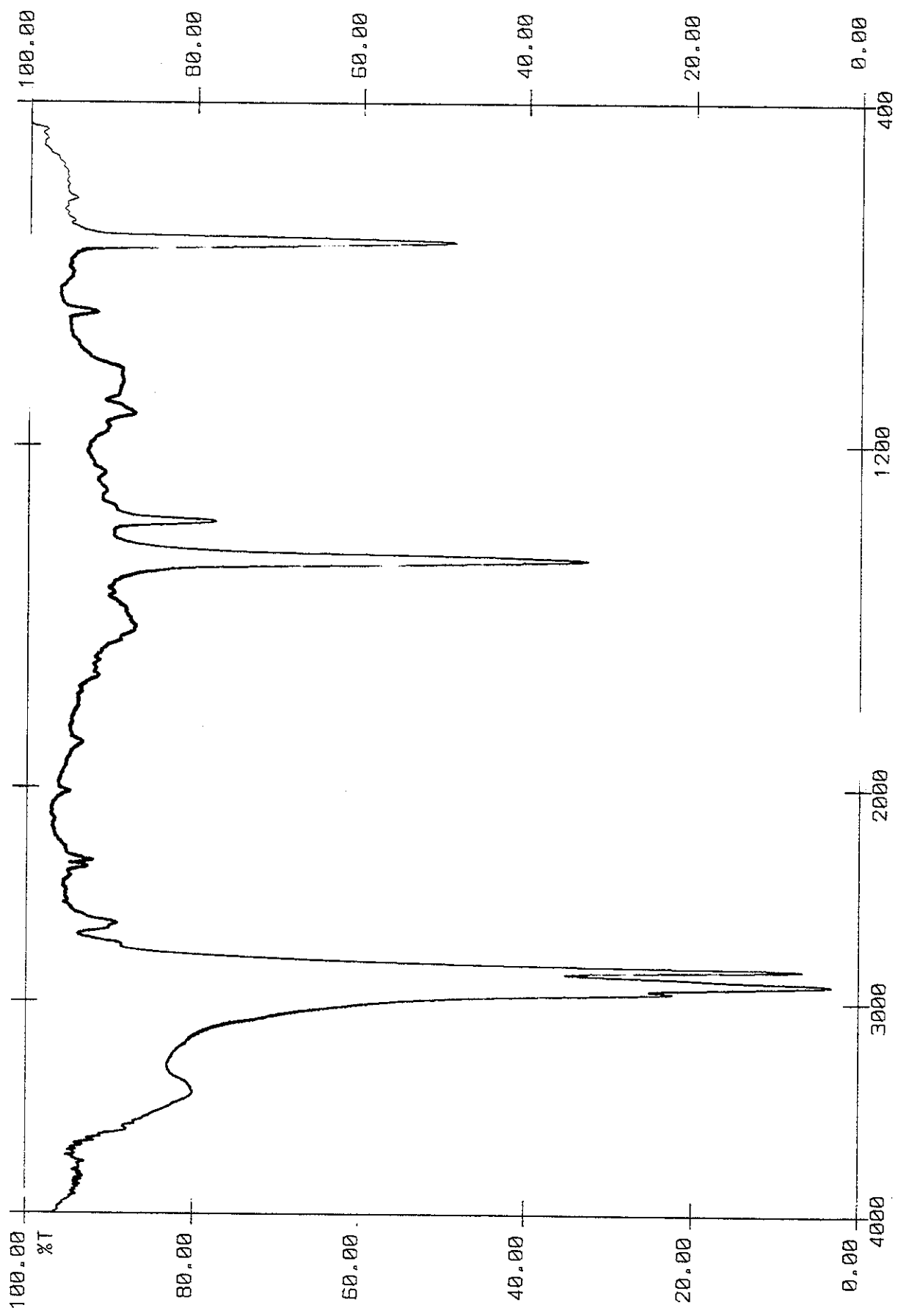
5. 規格案の妥当性確認

規格案に基づき、（株）加藤洋行より提供されたオゾケライト試料（商品名：オゾケライト 075）2ロットについて分析試験を実施したところ（純度試験の紫外部吸収については社会法人 日本食品衛生協会にて実施）、以下に記される結果が得られ、案の妥当性が確認された。但し、確認試験の参照スペクトルについては今後適切なものを選定する必要がある。

自主規格案		オゾケライト 075 Lot 416	オゾケライト 075 Lot 727
確認試験	適 (参照スペクトル比較)	※1	※1
純度試験	融点	55～80℃	61.8℃
	液性	適 (中性)	適
	重金属	Pbとして 30 μg/g以下	10 μg/g以下
	ヒ素	As ₂ O ₃ として 2.0 μg/g以下	1.0 μg/g以下
	紫外部吸光度	適 (最大吸光度) 280～289nm 0.15 290～299nm 0.12 300～359nm 0.08 360～400nm 0.02	適 ※2 (最大吸光度) 280～289nm 0.05 290～299nm 0.04 300～359nm 0.03 360～400nm 0.00
強熱残分	0.10%以下	0.05%以下	0.05%以下

※1 別添のスペクトルチャート参照、2ロット共に同じパターンを示し、同一波長のところに同様の強度の吸収が認められる。

※2 社団法人 日本食品衛生協会 試験成績書 91-6815号、91-6816号



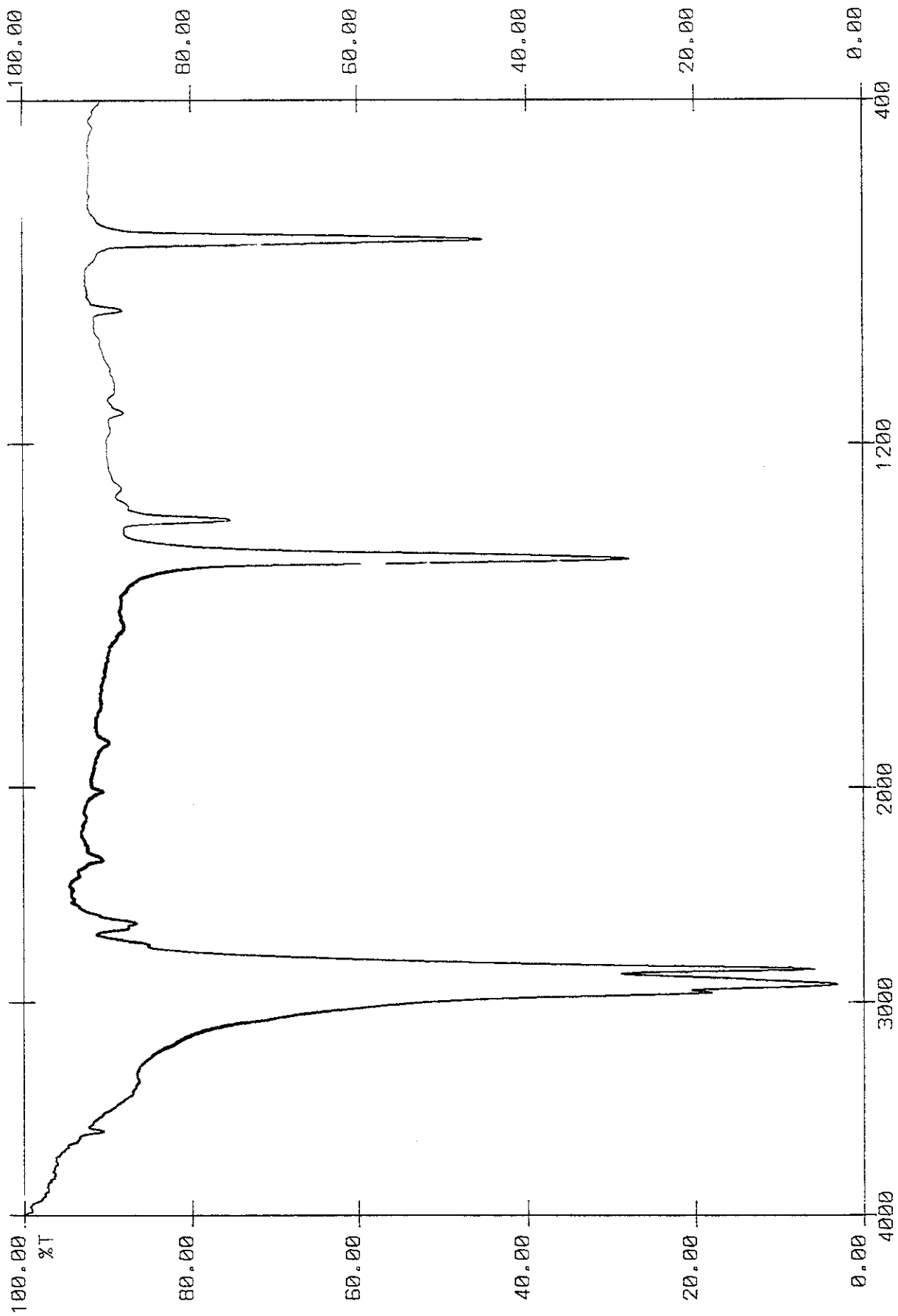
PERKIN-ELMER 1700
 SCANS 10
 RESOLUTION 4 CM-1

DATE 00-03-06
 TIME 16:51

OPERATOR

SAMPLE 020KERITE TYPE075

lot: 416



PERKIN-ELMER 1700
 SCANS 10
 RESOLUTION 4 CM-1
 DATE 00-03-06
 TIME 17:00
 OPERATOR SAMPLE
 OPERATOR SAMPLE 0200EPT113 TYPE 095 Lot: 927

自主規格案「ロジン」

研究期間 平成 11 年 11 月 1 日～12 月 20 日

研究報告者 荒川化学工業株式会社 富士工場 製造管理課

1. 目的

既存添加物リスト No487「ロジン」の自主規格作成のため、含量・定量法および確認試験法等について調査研究を行い、この結果をふまえ規格案を策定し、その妥当性に関して調査研究を実施する。

2. 検討方法

ロジンは新訂版化粧品原料基準に記載されている。また第七版食品添加物公定書にはチューインガム基礎剤としてエステルガムが記載されているが、これはロジンとグリセリン、ペンタエリスリトール等各種アルコールのエステル化合物であり、性状的には出発原料となるロジンと似通っている部分が多い。従って本品の規格策定についてはこれら双方の規格を参考とした。

・化粧品原料基準規格「ロジン」

定義

性状

確認試験 ロジン樹脂酸分子中の二重結合部に起因する呈色反応

酸価 150～180 (第 1 法、0.5g)

純度試験 液性

強熱残分 0.10%以下 (第 1 法、1 g)

・食品添加物公定書規格「エステルガム」

定義

性状

確認試験

1) ロジン樹脂酸分子中の二重結合部に起因する呈色反応

2) ロジン樹脂酸石ケンの界面活性作用

3) アルコールの種類の確認としての GC による定性試験

純度試験

1) 溶状

2) 酸価 グリセリン系及びメタノール系エステルガム 8.0 以下

ペンタエリスリトール系エステルガム 18.0 以下

3) 重金属 Pb として 40 μ g/g 以下 (0.50g、第 2 法、比較液 鉛標準液 2.0ml)

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

強熱残分 0.10%以下

3. 検討結果

確認試験：樹脂酸分子中の二重結合に起因する呈色反応はリーベルマン反応に用いられる無水酢酸および硫酸試薬を使用するものである。エステルガムにおいても同様の呈色反応が生じるが、放置してもロジンと異なり色調の変化は見られない。

純度試験：酸価およびエステルガムの純度試験に含まれる重金属、ヒ素が適用できる。エステルガムの酸価は遊離樹脂酸を対象とするものでグリセリン系およびメタノール系エステルで 8.0 以下、ペンタエリスリトール系エステルで 18.0 以下と小さい値であるが、ロジンは-COOH 基がそのまま存在しているためこの値は非常に高くなる。

強熱残分：ロジンおよびエステルガムの項目をそのまま適用できる。

4. 結論（ロジン自主規格案）

「ロジン」 Rosin

定義：マツ科マツ（*Pinus palustris* MILL.）の樹皮より分泌物を採取し、低沸点分を蒸留により除去、精製して得られたものである。成分はアビエチン酸である。

性状：淡黄色～黄褐色でガラス様の透明な破碎しやすい塊で、特有の臭い（松脂臭）を有する。

確認試験：本品 0.1g に無水酢酸 10ml を加え、水浴中で加温して溶かし、冷後、硫酸 1 滴を加えるとき、液の色は紫赤色となり、ついで紫色に変わる。

純度試験：

1) 酸価 150 以上

本品約 3g を精密に量り、トルエン／エタノール混液（2：1）50ml を量って加えて溶かし、検液とする。油脂類試験法中の酸価の試験を行う。

2) 重金属 Pb として 40 μ g/g 以下（0.5g、第 2 法、比較液 鉛標準液 2.0ml）

3) ヒ素 As₂O₃ として 4.0 μ g/g 以下（0.5g、第 3 法、装置 B）

強熱残分：0.10%以下（1 g）

5. 規格案の妥当性確認

自主規格案に基づき中国産ロジン試料3ロットについて(財)日本食品分析センターにて分析試験を実施したところ、以下に記される結果が得られ、案の妥当性が確認された。

自主規格案		ロジン AWW 12/9-3	ロジン AWW 8/8-3B	ロジン ASW 11/11-3B	
確認試験	適 (呈色)	適	適	適	
純 度 試 験	酸価	150以上	171	172	171
	重金属	Pbとして 40 μ g/g以下	適	適	適
	ヒ素	As ₂ O ₃ として 4.0 μ g/g以下	適	適	適
強熱残分	0.10%以下	適(0.05%以下)	適(0.05%以下)	適(0.05%以下)	
備考 (試験成績書 No)		200020577-001号	200020577-002号	200020577-003号	

酵素「カタラーゼ」「セルラーゼ」「プロテアーゼ」「ペクチナーゼ」 「ヘミセルラーゼ」5品目の自主規格(案)作成の調査研究

研究者名・所属：浅田 敏・天野製菓（株）

北原 昇吾・新日本化学工業（株）

大脇 純・ナガセ生化学工業(株)

上野 琴子・ポルテ・イソバ・イオンダ・ストリ(株)

福本 俊一・田辺製菓（株）

長尾 一徳・日本食品添加物協会・第7部会長
田辺製菓（株）

日本食品添加物協会・第7部会（酵素部会）・自主規格作成検討会を中心に、既存添加物酵素「カタラーゼ」、「セルラーゼ」、「プロテアーゼ」、「ペクチナーゼ」、「ヘミセルラーゼ」について自主規格策定のための調査研究を行ったので、その概要を報告する。

既存添加物酵素は、「既存添加物名簿」には76品目が収載されている。規格の設定は、第7版食品添加物公定書には4品目、日本食品添加物協会・自主規格（第2版、第2版追補）には12品目が収載され、残りの60品目については規格が定められていない。そこで酵素一般規格（案）、汎用されている酵素5品目の成分規格（案）並びに酵素活性測定法（案）を作成した。

1. 酵素一般規格（案）

（1）目的

既存添加物酵素の規格策定が急務な課題であり、食品添加物酵素の共通規格を定めると共に国際的な整合性を図る調査を行った。

（2）検討方法

第7部会・自主規格作成検討会（9社参加）は、JECFAの酵素一般規格（V. METHODS FOR ENZYME PREPARATIONS GENERAL SPECIFICATIONS FOR ENZYME PREPARATIONS USED IN PROCESSING）を参考に、酵素（原体及び製剤）の定義、酵素特性、基原・製法、賦形剤・希釈剤等について示し、性状、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法について規定の検討を行った。

（3）検討結果並びに考察

食品添加物酵素（原体及び製剤）の「酵素一般規格」（案）を策定し、成分規格への記載事項並びに酵素の共通規格として性状、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法の規定内容につき検討を行った。

①性状を規定した。

②酵素特性として成分規格にECナンバーを参考に記載することとし、酵素活性の表示方法について記載した。

酵素活性測定法は、食品添加物公定書並びに自主規格では成分規格で定めているが、一般試験法に「酵素活性測定法」を新規設定して収載することを規定した。

③純度試験は、重金属、鉛、ヒ素の3項目を規定した。尚、金属酵素が規格値（Pbとして40 μ g/g以下）を超えるもの（例えばポリフェノールオキシダーゼでは800～1000 μ g/g）が判明したので成分規格で定める場合は規定しないとした。その他、JECFAで規定しているT.O.S（全有機物固形分%）は任意の規定とした。

④微生物限度は細菌数、大腸菌を規定した。

以上、第7部会・自主規格作成検討会は、「酵素一般規格」（案）について第7版食品添加物公定書収載の4品目を除いた既存添加物酵素72品目に適用させる規格として適切であると判断した。

（4）規格案

別紙「酵素一般規格」案のとおり

（5）参考文献

○JECFAのGeneral Method V. METHODS FOR ENZYME PREPARATIONS GENERAL SPECIFICATIONS FOR ENZYME PREPARATIONS USED IN PROCESSING (FNP 5 / Rev.2 1991)

2. 酵素5品目の成分規格（案）

（1）目的

汎用されている既存添加物酵素「カタラーゼ」、「セルラーゼ」、「プロテアーゼ」、「ペクチナーゼ」、「ヘミセルラーゼ」、の自主規格作成のため、性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法について調査研究を行い、この結果に基づき規格（案）を策定し、その妥当性について調査研究を行った。

（2）検討方法

第7部会・自主規格作成検討会（9社）は、5品目の成分規格について作成担当会社を決め、性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法について各社の試験方法を調査し、その結果に基づき自主規格（案）を策定し、規格（案）の妥当性について確認した。作成担当者並びに作成担当会社は、以下の通りである。

- ①カタラーゼ : 大脇 純、ナガセ生化学工業（株）
- ②セルラーゼ : 上野 琴子、ボルデイスバインダストリ（株）
- ③プロテアーゼ : 浅田 敏、天野製薬（株）
- ④ペクチナーゼ : 福本 俊一、田辺製薬（株）
- ⑤ヘミセルラーゼ : 小西 哲哉・北原 昇吾、新日本化学工業（株）

(3) 検討結果並びに考察

性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法につき、5品目の各3ロットの繰り返し試験を行った結果、測定値の全てが規格（案）に適合し、規格案の妥当性が確認された。尚、酵素の基原・性質により測定条件（反応pH、緩衝液の種類、試料希釈液等）を選択してもよいとした。

(3) - 1. カタラーゼ

確認試験は、過酸化水素との反応を確認する方法を採用した。

酵素活性測定法は、第1法として吸光度法、第2法として滴定法の2つの測定方法を採用した。第1法、第2法共に反応原理、基質は同じである。第1法は、過酸化水素の分解に伴う波長240nmの吸光度減少を測定する方法で、分光光度計のセル中での反応をモニターする方法なので試料数が少ない場合には短時間で測定が可能である。一方第2法は、一定時間内に過酸化水素と反応させた後、残存する過酸化水素をチオ硫酸ナトリウム滴定にて測定する方法で、試験管を並べて一度に多くの試料を測定することが可能である。

酵素活性は、同一試料について同一の測定条件（反応pH、緩衝液、試料希釈液）で測定した結果、第1法：第2法=1.22：1.00と第1法が高い数値が得られた。これは両者の酵素反応時の液量、温度、反応時間などの差によるものと思われる。したがって第1法、第2法共に一長一短があり、これら2つの測定方法を、カタラーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

尚、JECFA規格は、ベーカー法（過酸化水素の分解並びに過酸化水素によるカタラーゼ失活を測定）がある。この方法は、基質（過酸化水素）濃度が高いため、基原の相違によるカタラーゼの過酸化水素への反応性が異なる場合があり、反応性の悪いものは見かけ上、酵素活性は低く測定される。

(3) - 2. セルラーゼ

確認試験は、セルロース糖化力並びにセルロースの粘度低下を確認する2つの方法を採用した。

酵素活性測定法は、第1法、第2法共に吸光度法の2つの測定方法を採用した。第1法はセルロースの分解にて生成した還元糖をニトロ試薬にて発色させ、波長540nmの吸光度で測定するニトロ試薬法であり、第2法は、生成した還元糖を銅試薬にて発色させ、波長750nmの吸光度で測定する銅試薬法である。第2法は、「昭和55年4月22日 薬審第523号 各都道府県衛生主管部（局）あて厚生省薬務局審査課長通知 医薬品の制酸力及びpHの試験法並びに消化酵素の消化力を測定する試験法について」に準ずる方法である。これら2つの測定方法は、セルラーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

尚、JECFA規格では、粘度法（セルロースの粘度低下をブロックフィールドモデルLVF粘度計にて測定）の測定方法である。

(3) - 3. プロテアーゼ

確認試験は、酵素活性、カゼインの分解、ゼラチンの粘度低下を確認する3つの方法を採用した。

酵素活性測定法は、2つの測定方法を採用した。第1法（カゼイン-フォリン法）は、酵素を基質

カゼインに作用させ、カゼインの分解に伴い生成した酸可溶性低分子分解物をフォリン試液にて発色させ、波長 660nm における吸光度を測定する方法である。本測定方法は、第 13 改正日本薬局方、一般試験法、24. 消化力試験法(2)たん白消化力試験法に準ずる方法である。プロテアーゼはその基原、性質が多様であるため、試験溶液の調製方法、基質溶液の pH、トリクロロ酢酸試液 (A 又は B) はプロテアーゼの種類に応じて適切な方法を選択することとした。第 2 法 (ヘモグロビン法) は、酵素を基質ヘモグロビンに作用させ、生成した分解物を波長 275nm における吸光度により測定する方法である。第 2 法は、第 1 法で使用する基質カゼインの等電点付近の pH でも測定可能であるため、第 1 法を補完する方法として採用した。尚、第 2 法は FCC/JECFA に記載された糸状菌プロテアーゼ活性測定法 (HUT) に準ずる方法である。これら 2 つの測定方法は、プロテアーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

尚、JECFA 規格では、ゼラチンの粘度低下を測定する方法、カゼイン分解物を波長 275nm における吸光度で測定する方法 3 種類 (細菌プロテアーゼ: PC、糸状菌プロテアーゼ: SAP、植物プロテアーゼ)、ヘモグロビン法 (糸状菌プロテアーゼ: HUT) の 5 つの測定方法がある。植物プロテアーゼの測定法は、第 7 版食品添加物公定書に「パパイン」「プロメライン」の酵素活性測定法に収載されている。

(3) - 4. ペクチナーゼ

確認試験は、酵素活性、ペクチンの粘性低下を確認する 2 つの方法を採用した。

酵素活性測定法は、3 つの測定方法を採用した。第 1 法 (ペクチン酸糖化力測定法) は酵素をペクチン酸に作用させて生じる還元糖 (ガラクチュロン酸) をチオ硫酸ナトリウム滴定で測定する方法である。本測定法は、醸造用資材規格に準ずる方法であり、飼料及び飼料添加物成分規格「ペクチン糖化力試験法」に準じる方法でもある。第 2 法及び第 3 法 (共にペクチン粘度降下力測定法) は、酵素をペクチンに作用させて粘度低下を測定する方法で、基原、性質の違いによりそれぞれの方法を採用した。第 2 法は、酵素を基質アップルペクチンに pH4.0 で作用させて粘度低下をキャノンフェンスケ型粘度計にて測定する方法である。第 3 法は酵素を基質レモンペクチンに pH3.5 で作用させて粘度低下をウベローデ型粘度計にて測定する方法で、本測定法は、飼料及び飼料添加物成分規格「ペクチン液化力試験法」に準じる方法である。これら 3 つの測定方法は、ペクチナーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

尚、JECFA 規格には、本活性測定法はない。

(3) - 5. ヘミセルラーゼ

確認試験は、キシラナーゼ活性又はガラクトマンナーゼ活性を確認する 2 つの方法を採用した。

酵素活性測定法は、4 つの測定方法を採用した。第 1 法は酵素を基質キシランに作用させ、グルコシド結合の切断により生成した還元糖を測定するキシラン糖化力測定法である。本測定方法はさらに発色試薬の違いにより 2 つの方法を採用した。生成する還元糖をソモギー試液にて発色させ、波長 500nm における吸光度を測定する方法、ニトロ試液にて発色させ、波長 540nm における吸光度を測定する方法である。第 2 法は、酵素を基質ローカストビーンガムに作用させ、マンノシッド結合の切断を測定するガラクトマンナーゼ活性測定法である。本測定方法も 2 つの方法を採用した。生成し

た還元糖を、アルカリ性銅試液にて発色させ、波長 750nm における吸光度を測定するガラクトマンナン糖化力測定法、粘度低下をキャノンフェンスケ粘度計にて測定するガラクトマンナン粘度低下力測定法である。これら4つの測定方法は、ヘミセルラーゼ活性測定法として一般試験法・酵素活性測定法へ収載する。

尚、JECFA 規格では、粘度法（ローカストビーンガムの粘度低下をキャノンフェンスケ粘度計にて測定）の測定方法である。

以上、酵素5品目の成分規格（案）を策定したが、酵素活性測定法については各品目共に基原・性質により測定方法、測定条件が異なるため、食品添加物公定書への収載の際には、さらなる研究調査が必要であるとする。今後は、残りの55品目についても検討課題とする。

（4）規格案

別紙の各成分規格（案）、各酵素活性測定法（案）のとおり

3. 酵素活性測定法（案）

（1）目的

第7版食品添加物公定書並びに日本食品添加物協会・自主規格は、酵素の成分規格に酵素活性測定法を規定しているが、JECFA を参考に、例えば α -アミラーゼは、酵素一般規格（V. METHODS FOR ENZYME PREPARATIONS）の中で、成分規格とは別に α -アミラーゼ活性測定法（Alpha-Amylase Activity）を規定しているため、JECFA との整合性を図った。

（2）検討方法

「カタラーゼ」、「セルラーゼ」、「プロテアーゼ」、「ペクチナーゼ」、「ヘミセルラーゼ」の各酵素活性測定法を作成した。酵素活性測定法は、試験方法であり、今後、本測定方法を食品添加物公定書並びに日本食品添加物協会・自主規格へ収載するためには、一般試験法に「酵素活性測定法」を新規設定して各酵素活性測定方法を収載することで、JECFA の酵素の成分規格との国際的な整合性を図った。

（3）検討結果並びに考察

一般試験法・酵素活性測定法を設定し、カタラーゼ活性測定法、セルラーゼ活性測定法、プロテアーゼ活性測定法、ペクチナーゼ活性測定法、ヘミセルラーゼ活性測定法を収載する。

今回、5測定方法を作成したが、今後は第2版並びに第2版追補自主規格収載の12品目についても、酵素活性測定法へ収載すると共に新たに作成する酵素活性測定法は、追加収載する。

（4）規格案

別紙の各酵素活性測定法（案）のとおり

平成 11 年度

第 7 部会 自主規格作成検討会メンバー会社 9 社

- 天野製薬株式会社
- 三共株式会社
- 新日本化学工業株式会社
- 大和化成株式会社
- 田辺製薬株式会社
- 長瀬産業株式会社
- ナガセ生化学工業株式会社
- ノボノルディスクバイオインダストリー株式会社
- 阪急バイオインダストリー株式会社

カタラーゼ (案) Catalase

定 義 本品は、ブタの肝臓から又は糸状菌 (*Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenicis*, *Penicillium amagasakiense*)、細菌 (*Micrococcus lyzodeikticus*)、酵母 (*Saccharomyces*) の培養物から得られた過酸化水素を分解する酸化還元酵素である。

酵素特性 本品は、過酸化水素を水と酸素へ分解する。

ECナンバー : EC 1.11.1.6

性 状 本品は、白～濃褐色の粉末若しくは粒、又は無色～濃褐色の液体若しくはペーストである。においはないか又は特異なにおいがある。

確認試験 本品 1.0gに水又は適切な緩衝液 (反応至適pH) を加えて溶かし10mlとする。この液 0.2ml を過酸化水素試液10mlに加えるとき、泡を生じる。

純度試験 酵素一般規格 純度試験(1)、(2)及び(3)を適用する。

微生物限度 酵素一般規格 微生物限度を適用する。

酵素活性測定法 一般試験法・酵素活性測定法中のカタラーゼ活性測定法の第1法又は第2法により試験を行う。但し、測定条件 (反応pH、緩衝液の種類、試料希釈液等) は、カタラーゼの基原、性質に応じて適切なものを選択する。

一般試験法 酵素活性測定法

カタラーゼ活性測定法 (案)

第 1 法 (吸光度法)

本法は、過酸化水素が紫外部に吸収をもつことを利用して、分光光度計のセルの中で反応させ、減少する過酸化水素を波長240nmの吸光度を測定して酵素活性を測定する方法である。

(1) 試料溶液

本操作法により試験するとき、過酸化水素の分解による波長 240nm の吸光度の減少が、試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、試料に適量の 0.01mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH) , 酵素活性測定用を加えて溶かし試料溶液とする。その濃度は、通例32~38単位/mlである。

(2) 基質溶液

過酸化水素 0.135mlを量り、0.05mol/l リン酸緩衝液 (反応至適pH) , 酵素活性測定用を加えて100 mlとする。この液を、水を対照として、波長240nmの吸光度を測定し、0.520~0.550の範囲内にあることを確認する。ただし、吸光度が0.520以下の場合は過酸化水素を微量加え、0.550以上の場合には 0.05 mol/lリン酸緩衝液(反応至適pH) , 酵素活性測定用を加えて、波長240nmの吸光度が0.520~0.550になるように調整する。

(3) 操作法

分光光度計の恒温セルホルダーを 25±0.5℃に設定し、測定波長を 240nmに設定する。

石英セル(層長 10mm)に、基質溶液 2.9mlを正確に量り、25±0.5℃で 5分間放置した後、試料溶液 0.1mlを正確に加え、フタをして2~3回転倒して混ぜ、25±0.5℃で反応を開始する。

この液につき水を対照として波長240nmにおける吸光度を測定し、吸光度が 0.450→0.400に要する時間(t)を測定する。

ただし、試料溶液の添加直後に吸光度の上昇がある場合は、添加直後の吸光度を反応開始時の吸光度とする。

酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1分間に 1 μmolの過酸化水素を分解するのに必要な酵素量を 1 単位とし、次式により算出する。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は 単位/ml)} = \frac{3.45}{t} \times \frac{n}{0.1}$$

ただし、3.45 : 上記条件で吸光度の減少 0.450→0.400 は、過酸化水素 3.45 μmolに相当する。

t : 吸光度の減少 0.450→0.400 に要した時間(分、小数点以下 3 桁まで表示する)

吸光度が0.450→0.400に要する時間は通例 1分(60±5秒)である。

n : 試料希釈倍数

0.1 : 試料の量 (ml)

(4)試薬・試液

- 1) 0.01mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH), 酵素活性測定用:
0.2mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH) 50mlとエチレングリコール100mlを混和し、水を加えて1,000mlとする。
- 2) 0.05mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH), 酵素活性測定用:
0.2mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH) 25mlに水を加えて100mlとする。
- 3) 0.2mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH) :
第1液: リン酸第一ナトリウム31.2gを量り、水を加えて溶かし1,000mlとする。
第2液: リン酸第二ナトリウム71.6gを量り、水を加えて溶かし1,000mlとする。
第1液と第2液を混和し、反応至適pHに調整する。

第2法(滴定法)

本法は、過酸化水素に作用させ、反応停止後ヨウ化カリウムを加えることで、残存する過酸化水素量に比例して遊離するヨウ素を、チオ硫酸ナトリウムで滴定することにより酵素活性を測定する方法である。

(1)試料溶液

本操作法により試験するとき、過酸化水素の分解量と、試料濃度とが比例する範囲内の濃度になるように、試料に適量の0.01mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH), 酵素活性測定用を加えて溶かし試料溶液とする。その濃度は、通例2~4単位/mlである。

(2)基質溶液

過酸化水素1.25mlを量り、0.05mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH), 酵素活性測定用を加えて混和し、100mlとする。この液10mlを正確に量り、0.05mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH), 酵素活性測定用を加えて正確に100mlとする。

(3)操作法

試験管(30φ×200mm)に試料溶液 1.0mlを正確に量り、30±0.5°Cの恒温槽で5分間加温する。

これに、予め30±0.5°Cに保温した基質溶液を正確に 5.0ml加え、反応を開始する。

正確に5分後に0.5mol/l 硫酸 2mlを激しく振り混ぜながら加えて反応を停止させる。

これに10w/v%ヨウ化カリウム試液 1ml及び1w/v%モリブデン酸アンモニウム試液 1滴を加え、遊離したヨウ素をデンプン試液 5滴加えて 0.005mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する。(Aml)

別にブランクとして、試験管に試料溶液1.0mlを正確に採り、0.5mol/l 硫酸 2ml加えてから、基質 5.0mlを正確に加えて同様に操作し、滴定値(Bml)を求める。尚、滴定の終末点は青色が消えてから30秒間無色が持続したときとする。

酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1分間に1μmolの過酸化水素を分解するのに必要な酵素量を1単位とし、次式により算出する。

$$\text{本品中の酵素活性の単位(単位/g又は単位/ml)} = \frac{(B-A)}{5} \times 2.5 \times f \times n$$

- ただし、
5 : 反応時間 (分)
2.5 : 0.005mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液1mlは過酸化水素2.5 μ molに相当する。
f : 0.005mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター
n : 試料希釈倍数

(4) 試薬・試液

- 1) 0.01mol/l リン酸緩衝液(反応最至pH) , 酵素活性測定用 : カタラーゼ酵素活性測定法第 1 法を準用する。
- 2) 0.05mol/l リン酸緩衝液(反応至適pH) , 酵素活性測定用 : カタラーゼ酵素活性測定法第 1 法を準用する。
- 3) 10 w/v%ヨウ化カリウム試液 : 試薬特級ヨウ化カリウム10gに水を加えて溶かし100mlとする。
- 4) 1 w/v%モリブデン酸アンモニウム試液 : 試薬特級モリブデン酸アンモニウム1gに水を加えて溶かし100mlとする。
- 5) 0.005mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液 : 0.1mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液に水を加えて20倍容量に薄める。0.1mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液に準じて用時標定する。