

管(G, F)を少量の水で洗い、受器中の捕集液をビーカーに移し、メチルレッド試液2滴を加え、1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液を液の色が黄色に変わるまで加える。この液に1 mol/l 塩酸溶液4滴を加えて煮沸し、塩化バリウム溶液(1→6) 2 mlを徐々に加える。この液を水浴上で1時間加熱し、冷後、一夜放置し、定量分析用ろ紙(5種C)を用いてろ過し、ろ紙上の残留物を洗液が塩化物の反応を呈さなくなるまで温水で洗い、残留物をろ紙とともに乾燥した後、恒量となるまで強熱し、硫酸バリウムとして重量を精密に量り、次式により計算する。更に固形物換算する。

$$\text{二酸化硫黄 (SO}_2\text{) の含量} = \frac{\text{硫酸バリウムの量 (g)} \times 0.2745}{\text{試料の採取量 (g)}} \times 100 (\%)$$

カラメルIII

Caramel III(ammonia process)

カラメル

定 義 本品は、でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物に、アンモニウム化合物を加えて、又はこれに酸若しくはアルカリを加えて熱処理して得られたもので、亜硫酸化合物を使用していないものである。

性 状 本品は、暗褐～黒色の粉末、塊、ペースト又は液体で、においがいいか又はわずかに特異なにおいがあり、味がいいか又はわずかに特異な味がある。

確認試験 (1) 本品の水溶液(1→100)は、淡褐～黒褐色を呈する。

(2) カラメルIの確認試験(2)を準用する。ただし、その値は0.50以下である。

(3) カラメルIの確認試験(3)を準用する。ただし、その値は0.50以上である。

純度試験 (1) 重金属 Pbとして25 μ g/g以下(2.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液5.0ml)

(2) 鉛 Pbとして2 μ g/g以下(5.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As₂O₃として1.0 μ g/g以下(2.0g, 第3法, 装置B)

(4) 固形物含量 53%以上

カラメルIの純度試験(4)を準用する。

(5) アンモニア性窒素 0.4%以下(固形物換算)

0.05mol/l 硫酸25mlを500mlの捕集用フラスコに入れ、ケルダール接続部と冷却管からなる蒸留装置につなぎ、冷却管の先が捕集用フラスコの酸液に浸るようにする。本品約2gを精密に量り、800mlのケルダール分解フラスコに移し、酸化マグネシウム2g、水200ml及び沸騰石数個を加える。分解フラスコをよく振り内容物を混合した後、速かに蒸留装置に接続する。分解フラスコを液が沸騰するまで加熱し、捕集用フラスコに留出液約100mlを受ける。留出管の先端を水2～3mlで洗い、捕集用フラスコに洗液を受け、メチルレッド試液を4～5滴加え、0.1mol/l水酸化ナトリウム溶液で滴定し、滴定量(ml)をSとする。同様の方法で空試験を行い0.1mol/l水酸化ナトリウム溶液の滴定量(ml)をBとする。次式によりアンモニア性窒素の含量を求め、固形物換算する。

$$\text{アンモニア性窒素の含量} = \frac{(B - S) \times 0.0014}{\text{試料の採取量 (g)}} \times 100 (\%)$$

(6) 総硫黄 0.3%以下(固形物換算)

カラメルIの純度試験(5)を準用する。

(7) 総窒素 6.8%以下(固形物換算)(約0.50g, ケルダール法)

(8) 4-メチルイミダゾール 0.30mg/g 以下 (固形物換算)

カラメル I の純度試験(7)を準用する。ただし、対照液は3.0 μ l を用い、検液と同様に操作して対照液から得たスポットに対応するスポットの色は対照液のスポットの色より濃くない。

(9) 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 40 μ g/g 以下 (固形物換算)

本品0.20-0.25g を精密に量り、3 ml の水に溶解する。その溶液を組合わせカラムの上側に定量的に移す。合計約100ml の水がカラムを通過するまで水で溶出する。上側のカラムを外し、下側のカラムを0.5mol/l 塩酸溶液で溶出する。最初の溶出液10ml を捨て、その後に溶出液35ml を集める。

その溶液を40 $^{\circ}$ C、2.0kPa で乾燥状態まで濃縮する。そのシロップ状の残留物をカルボニル基除去メタノール250 μ l で溶解し、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩試液250 μ l を加える。その反応混合物をセブタムキャップ付きのガラス瓶に移し室温で5時間保管し、検液とする。別に、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン0.50g を塩酸1 ml に加え、次にエタノール10ml を加えて、水浴上で溶液になるまで加熱する。2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール0.1g をその熱い溶液に加える。数分で2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール-2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの結晶化が始まり、室温まで冷却し結晶化が完全になったら、ろ過分離する。この2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール-2,4-ジニトロフェニルヒドラジンをエタノール5 ml 当たり塩酸1滴を加えたエタノールから再結晶することにより精製する。精製した結晶をろ過分離し、デシケーター中で乾燥する。この約0.01g を精密に量り、カルボニル基除去メタノールで正確に100ml とする。この溶液の一部をカルボニル基除去メタノールで10倍に希釈し、標準液とする。検液及び標準液それぞれ5 μ l ずつを量り、それぞれの液につき、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。標準液のピーク面積を測定し、検量線を作成する。また、検液のピーク面積を測定し、検量線から2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールの量を計算する。ただし、2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール-2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの保持時間が6.3 \pm 0.1分となるように調整する。

操作条件

検出器 紫外外部吸収検出器 (測定波長 385nm)

カラム充てん剤 10 μ m の化学結合型オクチルシラン

カラム管 内径4.6mm 長さ25cm のステンレス管

カラム温度 常温

移動相 メタノール：0.1mol/l リン酸 (1：1)

流速 2.0ml /分

組合わせカラム 一つのカラムの上に他のカラムを連結するというように、2つの連続したカラム。

上側のカラムは、150 \times 12.5mm、充てん物の最大高9 cm、内径1 mm の細管出口を備えたもの、又は200 \times 10mm、充てん物の最大高14cm、内径1 mm の細管出口を備えたものを用い、それぞれ高さ約50~60mm、又は80~90mm になるように弱酸性陽イオン交換樹脂(微粒)を充てんする。下側のカラムは、全長175mm、内径10mm、細管出口とテフロン製止栓を備えたものを用い、高さ約60mm まで強酸性陽イオン交換樹脂(微粒)を充てんする。また、溶剤貯留用としてテフロン製止栓を備えた滴下漏斗(100ml)を使用する。全ての部品は、標準すりガラス接続部(14.5mm)で接続する。

カラメルⅣ

Caramel IV(sulfite ammonia process)

カラメル

定 義 本品は、でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物に、亜硫酸化合物及びアンモニウム化合物を加えて、又はこれに酸若しくはアルカリを加えて熱処理して得られたものである。

性 状 本品は、暗褐～黒色の粉末、塊、ペースト又は液体で、においがいいか又はわずかに特異なおいがあり、味がいいか又はわずかに特異な味がある。

確認試験 (1) 本品の水溶液(1→100)は、淡褐～黒褐色を呈する。

(2) カラメルⅠの確認試験(2)を準用する。ただし、その値は0.50以上である。

(3) カラメルⅡの確認試験(3)を準用する。ただし、その値は50以下である。

純度試験 (1) 重金属 Pbとして25 μ g/g以下(2.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液5.0ml)

(2) 鉛 Pbとして2 μ g/g以下(5.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As₂O₃として1.0 μ g/g以下(2.0g, 第3法, 装置B)

(4) 固形物含量 40%以上

カラメルⅠの純度試験(4)を準用する。

(5) アンモニア性窒素 2.8%以下(固形物換算)

カラメルⅢの純度試験(5)を準用する。

(6) 総硫黄 10.0%以下(固形物換算)

カラメルⅠの純度試験(5)を準用する。

(7) 総窒素 7.5%以下(固形物換算)(約0.50g, ケルダール法)

(8) 二酸化硫黄 0.5%以下(固形物換算)

カラメルⅡの純度試験(7)を準用する。

(9) 4-メチルイミダゾール 1.0mg/g以下(固形物換算)

カラメルⅠの純度試験(7)を準用する。ただし、対照液は10.0 μ lを用い、検液と同様に操作して対照液から得たスポットに対応するスポットの色は対照液のスポットの色より濃くない。

カラヤガム

Karaya Gum

[9000-36-6]

定 義 本品は、カラヤ又はキバナワタモドキの分泌液から得られた多糖類を主成分とするものである。

性 状 本品は、淡灰～淡赤褐色の粉末又は淡黄～淡赤褐色の塊で、酢酸のにおいがある。

確認試験 (1) 本品の粉末1gを水50mlに加えてかき混ぜるとき、粘りような液となり、その液は酸性を呈する。

(2) 本品の粉末0.4gをエタノール/水混液(3:2)10mlに加えてかき混ぜるとき、膨潤する。

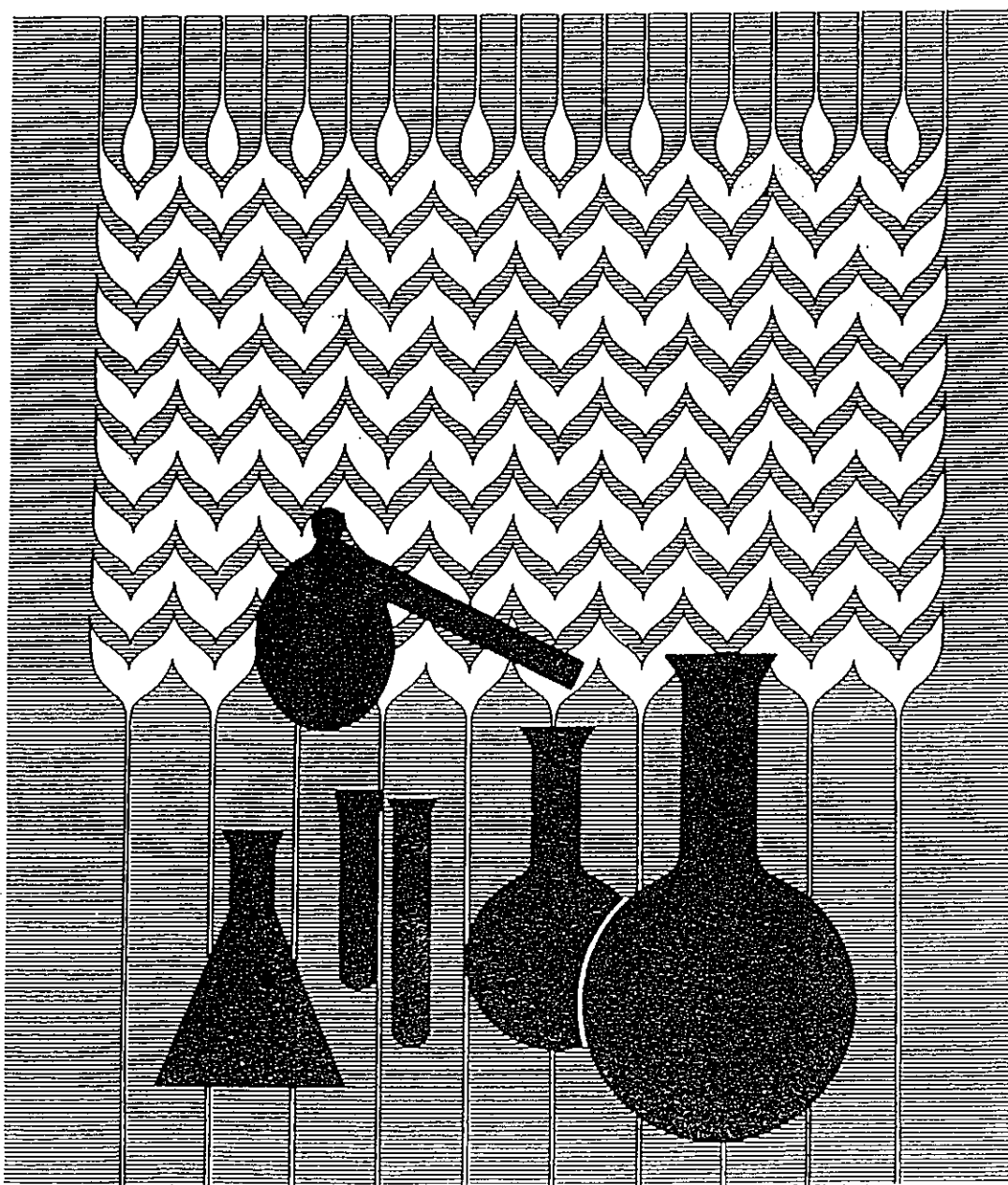
純度試験 (1) 塩酸不溶物 3.0%以下

本品の粉末約5.0gを精密に量り、塩酸(1→10)100mlを入れた三角フラスコに加えて溶かし、時計皿で覆い、ガム質が溶解するまで、徐々に加熱し煮沸する。あらかじめ105℃で1時間乾燥したガラスろ過器(1G3)の重量を測定した後、このガラスろ過器を用いて温時吸引ろ過し、残留物を温水でよく洗い、ガラスろ過器

Compendium of food additive specifications

Addendum 8

52
Add. 8



WORLD
HEALTH
ORGANIZATION



Food
and
Agriculture
Organization
of
the
United
Nations



CARAMEL COLOURS

Prepared at the 55th JECFA (2000) and published in FNP 52 Add 8 (2000), superseding specifications prepared at the 31st JECFA (1987), published in FNP 38 (1988) and in FNP 52 (1992). An ADI for Class I 'Not specified' was established at the 29th JECFA (1985), for Class II of 0-160 mg/kg bw was established at the 55th JECFA (2000) and an ADI for Class III of 0-200 mg/kg bw (0-150 mg/kg bw on solids basis) was established at the 29th JECFA (1985) and an ADI for Class IV of 0-200 mg/kg bw (0-150 mg/kg bw on solids basis) was established at the 29th JECFA (1985).

SYNONYMS

Caramel colours are divided into four classes. The synonyms for each class are:

Class I: Plain caramel, caustic caramel; INS No. 150a

Class II: Caustic sulfite caramel; INS No. 150b

Class III: Ammonia caramel; INS No. 150c

Class IV: Sulfite ammonia caramel, INS No. 150d

DEFINITION

Complex mixtures of compounds, some of which are in the form of colloidal aggregates, manufactured by heating carbohydrates either alone or in the presence of food-grade acids, alkalis or salts; classified according to the reactants used in their manufacture as follows:

Class I: Prepared by heating carbohydrates with or without acids or alkalis; no ammonium or sulfite compounds are used.

Class II: Prepared by heating carbohydrates with or without acids or alkalis in the presence of sulfite compounds; no ammonium compounds are used.

Class III: Prepared by heating carbohydrates with or without acids or alkalis in the presence of ammonium compounds; no sulfite compounds are used.

Class IV: Prepared by heating carbohydrates with or without acids or alkalis in the presence of both sulfite and ammonium compounds.

In all cases the carbohydrate raw materials are commercially available food-grade nutritive sweeteners consisting of glucose, fructose and/or polymers thereof. The acids and alkalis are food-grade sulfuric or citric acids and sodium, potassium or calcium hydroxides or mixtures thereof.

Where ammonium compounds are used they are one or any of the following: ammonium hydroxide, ammonium carbonate and ammonium hydrogen carbonate, ammonium phosphate, ammonium sulfate, ammonium sulfite and ammonium hydrogen sulfite.

Where sulfite compounds are used they are one or any of the following: sulfurous acid, potassium, sodium and ammonium sulfites and hydrogen sulfites.

Food-grade anti-foaming agents may be used as processing aids during manufacture.

DESCRIPTION

Dark brown to black liquids or solids having an odour of burnt sugar

FUNCTIONAL USES

Colour

CHARACTERISTICS

IDENTIFICATION

Solubility (FNP 5)

Miscible with water

Identification of colouring matters (FNP 5)

Passes test

Classification

Class I: Not more than 50% of the colour is bound by DEAE Cellulose and not more than 50% of the colour is bound by Phosphoryl Cellulose.

- Class II: More than 50% of the colour is bound by DEAE Cellulose and it exhibits an Absorbance Ratio of more than 50.
 Class III: Not more than 50% of the colour is bound by DEAE Cellulose and more than 50% of the colour is bound by Phosphoryl Cellulose.
 Class IV: More than 50% of the colour is bound by DEAE Cellulose and it exhibits an Absorbance Ratio of not more than 50.
 See description under TESTS

PURITY

Note: Arsenic and lead metals limits apply to all classes of caramel and are expressed on the basis of the product as is:
 Other limits and ranges apply to the individual classes as indicated and, unless otherwise stated, are expressed on a solids basis.

Solid content

- Class I: 62-77%
 Class II: 65-72%
 Class III: 53-83%
 Class IV: 40-75%
 See description under TESTS

Colour intensity

- Class I: 0.01-0.12
 Class II: 0.06-0.10
 Class III: 0.08-0.36
 Class IV: 0.10-0.60
 See description under TESTS

Total nitrogen

- Class I: max 0.1%
 Class II: max 0.2%
 Class III: 1.3 -6.8%
 Class IV: 0.5-7.5%
 Determine as directed under Nitrogen Determination (Kjeldahl Method) using Method II (FNP 5)

Total sulfur

- Class I: max 0.3%
 Class II: 1.3 -2.5%
 Class III: max 0.3%
 Class IV: 1.4-10.0%
 See description under TESTS

Sulfur dioxide

- Class I: -
 Class II: max 0.2%
 Class III: -
 Class IV: max 0.5%
 See description under TESTS

Ammoniacal nitrogen

- Class I: -
 Class II: -
 Class III: max 0.4%
 Class IV: max 2.8%
 See description under TESTS

4-Methylimidazole (MEI)

- Class I: -
 Class II: -
 Class III: max 300 mg/kg & max 200 mg/kg on an equivalent colour basis
 Class IV: max 1000 mg/kg & max 250 mg/kg on an equivalent colour basis
 See description under TESTS

2-Acetyl-4-tetrahydroxy-butylimidazole (THI)

- Class I: -
 Class II: -
 Class III: max 40 mg/kg & max 25 mg/kg on an equivalent colour basis.
 Class IV: -
 See description under TESTS

Arsenic (FNP 5)	Not more than 1 mg/kg (Method II)
Lead	Not more than 2 mg/kg Determine using an atomic absorption technique appropriate to the specified level. The selection of sample size and method of sample preparation may be based on the principles of the method described in FNP 5, "Instrumental methods".

TESTS

IDENTIFICATION TESTS

Classification/Colour bound by DEAE Cellulose For the purposes of this specification, colour bound by DEAE cellulose is defined as the percentage of decrease in absorbance of a caramel colour solution at 560 nm after treatment with DEAE Cellulose.

Special reagent: DEAE (diethylaminoethyl) Cellulose of 0.7 meq/gram capacity, e.g. Cellex D from Bio-Rad or equivalent DEAE Celluloses of higher or lower capacities in proportionately higher or lower quantities.

Procedure: Prepare a caramel colour solution of approximately 0.5 absorbance unit at 560 nm by transferring an appropriate amount of caramel colour into a 100-ml volumetric flask with the aid of 0.025 N hydrochloric acid. Dilute to volume with 0.025 N hydrochloric acid and centrifuge or filter, if solution is cloudy. Take a 20 ml aliquot of the caramel colour solution, add 200 mg of DEAE Cellulose, mix thoroughly for several min, centrifuge or filter, and collect the clear supernatant. Determine the absorbance of the caramel colour solution and the supernatant in a 1-cm cell at 560 nm, with a suitable spectrophotometer previously standardized using 0.025 N hydrochloric acid as reference. Calculate the percentage of Colour Bound by DEAE Cellulose by the formula:

$$\frac{(X_1 - X_2)}{X_1} \times 100$$

where

X_1 is the absorbance of the caramel colour solution at 560 nm

X_2 is the absorbance of the supernatant after DEAE Cellulose treatment at 560 nm

Classification/Colour bound by phosphoryl cellulose For the purposes of this specification colour bound phosphoryl cellulose is defined as the percentage of decrease in absorbance of a caramel colour solution at 560 nm after treatment with Phosphoryl Cellulose.

Special Reagent: Phosphoryl Cellulose of 0.85 meq/gram capacity, e.g. Cellex P from Bio-Rad or equivalent Phosphoryl Celluloses of higher or lower capacities in proportionately higher or lower quantities.

Procedure: Transfer 200-300 mg of caramel colour into a 100-ml volumetric flask, dilute to volume with 0.025 N hydrochloric acid, and centrifuge or filter, if solution is cloudy. Take a 40 ml aliquot of the caramel colour solution, add 2.0 g Phosphoryl Cellulose and mix thoroughly for several min. Centrifuge or filter, and collect the clear supernatant. Determine the absorbance of the caramel colour solution and the supernatant in a 1-cm cell at 560 nm, with a suitable spectrophotometer previously standardized using 0.025 N hydrochloric acid as reference. Calculate the percentage of Colour Bound by Phosphoryl Cellulose by the formula:

$$\frac{(X_1 - X_2)}{X_1} \times 100$$

where

X_1 is the absorbance of the caramel colour solution at 560 nm

X_2 is the absorbance of the supernatant after Phosphoryl Cellulose treatment at 560 nm

Classification/ For the purposes of this specification, Absorbance Ratio is defined as the absorbance of

Absorbance ratio

caramel colour at 280 nm divided by the absorbance of caramel colour at 560 nm.

Procedure: Transfer 100 mg of caramel colour into a 100-ml volumetric flask with the aid of water, dilute to volume, mix and centrifuge if solution is cloudy. Pipet a 5.0 ml portion of the clear solution into a 100-ml volumetric flask, dilute to volume with water, and mix. Determine the absorbance of the 0.1% solution in a 1-cm cell at 560 nm and that of the 1:20 diluted solution at 280 nm with a suitable spectrophotometer previously standardized using water as reference. (A suitable spectrophotometer is one equipped with a monochromator to provide a band width of 2 nm or less and of such quality that the stray-light characteristic is 0.5% or less.) Calculate the Absorbance Ratio of the caramel colour by dividing the absorbance units at 280 nm multiplied by 20 (dilution factor) by the absorbance units at 560 nm.

PURITY TESTS

Solids content

The solids content of Caramel Colour is determined by drying a sample upon a carrier composed of pure quartz sand that passes a No. 40 but not a No. 60 sieve and has been prepared by digestion with hydrochloric acid, washed acid-free, dried and ignited. Mix 30.0 g of prepared sand accurately weighed with 1.5-2.0 g Caramel Colour accurately weighed and dry to constant weight at 60° under reduced pressure 50 mm/Hg (6.7 kPa). Record the final weight of the sand plus caramel. Calculate the % solids as follows:

$$\% \text{ solids} = \frac{(w_F - w_S)}{w_C} \times 100$$

where

w_F = final weight of sand plus caramel

w_S = weight of sand

w_C = weight of caramel initially added

Calculation on a solids basis: The contents of Total Nitrogen, Total sulfur, Ammoniacal nitrogen, sulfur dioxide, 4-MEI and THI are expressed on a solids basis. The concentration (C_i) of each impurity is determined on an "as is" basis; the concentration (C_s) on a solid basis is then calculated using the formula:

$$C_s = \frac{C_i \times 100}{\% \text{ solids}}$$

Colour Intensity

For the purpose of this specification, Colour Intensity is defined as the absorbance of a 0.1% (w/v) solution of Caramel Colour solids in water in a 1 cm cell at 610 nm.

Procedure: Transfer 100 mg of Caramel Colour into a 100 ml volumetric flask, dilute to volume with water, mix and centrifuge if the solution is cloudy. Determine the absorbance (A_{610}) of the clear solution in a 1 cm cell at 610 nm with a suitable spectrophotometer previously standardized using water as a reference. Calculate the Colour Intensity of the Caramel Colour as follows:

$$\text{Colour intensity} = \frac{A_{610} \times 100}{\% \text{ solids}}$$

Determine % solids as described under Solids content.

Calculation on an equivalent colour basis: Where additional limits for 4-MEI and THI are expressed on an equivalent colour basis the concentrations are first calculated on a solids basis as directed under "Calculations on a solids basis", and then expressed on an equivalent colour basis according to the formula:

$$\text{Equivalent colour basis} = \frac{C_s}{\text{Colour intensity}} \times 0.1$$

where C_s = concentration on a solids basis.

This gives content expressed in terms of a product having a Colour Intensity of 0.1 absorbance units.

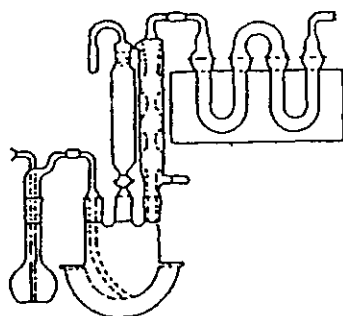
Total sulfur

In the largest available casserole that fits in an electric muffle furnace, place 1-3 g MgO or equivalent quantity of $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (6.4 - 19.2 g), 1 g powdered sucrose, and 50 ml HNO_3 . Add 5-10 g caramel colour. Place same quantities of reagents in another casserole for blank. Evaporate on steam bath to paste. Place casserole in cold electric muffle (25°) and gradually heat until all NO_2 fumes are driven off. Cool, dissolve and neutralize with HCl (1+2.5), adding excess of 5 ml. Filter, heat to boiling, and add 5 ml 10% $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution dropwise. Evaporate to 100 ml, let stand overnight, filter, wash, ignite, and weigh the BaSO_4 . Correct result for BaSO_4 obtained in blank and report as mg S/100 g. Commercial instruments that analyse for total sulfur such as, the the Leco-Combustion/Titration procedure can also be used and are recommended for sample amounts of about 200 mg.

Sulfur dioxide

Apparatus

Use a modified Monier-Williams apparatus (available from SGA Scientific, Inc., Bloomfield, N.J., USA) for the determination of sulfurous acid, or construct the apparatus as shown in the figure. The assembly consists of a 1000-ml three-neck round-bottom distillation flask having 24/40 standard-taper ground-glass joints. A 30-cm Allihn condenser is attached in the reflux position to an outer neck of the flask, and the other end of the condenser is connected with 1/4-inch Tygon or silicon tubing (preboiled with 1 in 20 hydrochloric acid solution and rinsed with water) to the absorption tube assembly (having 35/20 ball joints or the equivalent). Connect the centre neck of the flask with a 125-ml cylindrical separator, and attach a piece of tubing to a short U-tube inserted through a rubber stopper in the neck of the separator. Attach a curved glass inlet tube, reaching nearly to the bottom of the flask, to the other outer neck of the flask, and connect the inlet tube to a 250-ml gas-washing bottle with a piece of the tubing. The gas-washing bottle, in turn, is connected by tubing to a nitrogen cylinder.



Grind 4.5 g of pyrogallol (pyrogallol acid) with 5 ml of water in a small mortar, and transfer the slurry to the gas-washing bottle. Grind the residue again, and transfer it quantitatively to the bottle with two 5-ml portions of water. Pass nitrogen from the cylinder to the bottle to flush out air, and then add to the bottle, through a long-stem funnel, a cooled solution of 65 g of potassium hydroxide in about 85 ml of water. Place the head of the bottle in position, and bubble nitrogen through it to remove air from the headspace. Clamp off the tubing on both sides of the bottle, and connect it to the glass inlet tube of the distillation flask. The gas-washing bottle must be prepared with fresh pyrogallol solution as described on the day of use.

To each U-tube of the absorption tube assembly add the following: two pieces of 8-mm glass rod about 25 mm in length, 10 ml of 3-mm glass beads at the exit side, 10.0 ml of 3% hydrogen peroxide solution, and 1 drop of methyl red TS.

Assemble all pieces of the apparatus, and check for leaks by blowing gently into the tubing attached to the neck of the separator. While blowing, close the stopcock of the separator. Let stand for a few min; if the liquid levels in the U-tubes equalize, reseal all connections and test again. If the system is airtight proceed as directed below.

Procedure

Disperse about 25 g of the sample, accurately weighed, in 300 ml of recently boiled and cooled water, and transfer the slurry to the flask with the aid of water, using a large-bore funnel. Dilute to about 400 ml with water, and reseal the separator. Add 90 ml of 4 N hydrochloric acid to the separator, and force the acid into the flask by blowing gently into the tube in the neck of the separator. Close the stopcock of the separator.

Unclamp the tubing on both sides of the gas-washing bottle, and start the nitrogen flow at a steady stream of bubbles. Heat the distilling flask with a heating mantle to cause refluxing in approximately 20 min. When steady refluxing is reached, apply the line voltage to the mantle and reflux for 1.75 h. Turn off the water in the condenser, and continue heating until the inlet joint of the first U-tube shows condensation and slight warming. Remove the separator and turn off the heat.

When the joint at the top of the condenser cools, remove the connecting assembly and rinse it into the second U-tube, leaving the crossover tube attached to the exit joint of the first U-tube but disconnected from the entrance of the second U-tube. Rotate the crossover tube until the free end almost touches the entrance of the first U-tube. Add 1 drop of methyl red TS to the first U-tube, and titrate with 0.1 N sodium hydroxide just to a clear yellow colour, mixing with a gentle rocking motion. After titrating the first U-tube, remove the crossover tube, attach it to the second U-tube exit, and titrate similarly. Record the sum of the two titers as S, in ml.

Perform a blank determination, and record the volume of 0.1 N sodium hydroxide required as B. Calculate the percentage of sulfur dioxide in the sample by the formula

$$\text{SO}_2 \% = \frac{(S - B) \times 0.0032 \times 100}{W}$$

where W is the weight of the sample taken, in g.

Ammonium nitrogen

Add 25 ml of 0.1 N sulfuric acid to a 500-ml receiving flask, and connect it to a distillation apparatus consisting of a Kjeldahl connecting bulb and a condenser such that the condenser delivery tube is immersed beneath the surface of the acid solution in the receiving flask. Transfer about 2 g of caramel colour, accurately weighed, into an 800-ml long-neck Kjeldahl digestion flask, and to the flask add 2 g of magnesium oxide (carbonate-free), 200 ml of water, and several boiling chips. Swirl the digestion flask to mix the contents, and quickly connect it to the distillation apparatus. Heat the digestion flask to boiling, and collect about 100 ml of distillate in the receiving flask. Wash the tip of the delivery tube with a few ml of water, collecting the washings in the receiving flask, then add 4 or 5 drops of methyl red indicator (500 mg of methyl red in 100 ml of alcohol), and titrate with 0.1 N sodium hydroxide, recording the volume, in ml, required as S. Conduct a blank determination, and record the volume, in ml, of 0.1 N sodium hydroxide required to neutralize as B. Calculate the percentage of ammoniacal nitrogen in the sample by the formula:

$$\text{Ammoniacal nitrogen} = \frac{(B - S) \times 0.0014 \times 100}{W}$$

where W is the weight of caramel colour taken, in g.

4-Methylimidazole

NB: Information on an improved method is sought.

The following materials and reagents are required (the reagents should be ACS grade or equivalent where applicable).

Materials

Pyrex glasswool, 22 x 300 mm chromatography column with PTFE stopcock (e.g. Kimax 17800); 150 ml polypropylene beaker (e.g. Nalge 1201); 250 ml round-bottom flask (e.g., Pyrex 4320); 75 mm powder funnel; 5 cm spatula; rotary vacuum evaporator; hot plate; pan for water bath; disposable Pasteur pipets; 5 ml volumetric flask.

Reagents

Acetone; Celite 545; methylene chloride; sodium hydroxide; and tetrahydrofuran.

Procedure

After thoroughly mixing the caramel colour sample by shaking or stirring, weigh a 10.00 g aliquot into a 150 ml polypropylene beaker. Polypropylene is considered superior to glass because of its hydrophobic surface which facilitates quantitative sample transfer. A 5.0 g portion of 3.0 N NaOH is added and thoroughly mixed to ensure that the pH of the entire sample exceeds 12. A 20 g portion of Celite 545 is added to the beaker, and the contents are mixed until a semi-dry mixture is obtained. This normally requires approximately 2 to 3 min. With samples of unusually high water content, the resultant caramel colour-Celite 545 mixture may be overly wet. In such cases, a 5.00 g aliquot of caramel colour may be mixed with 2.5 g of 3.0 N NaOH and 15 g of Celite 545 and carried through the remainder of the analysis.

A plug of Pyrex glasswool is placed in the bottom of a 22 x 300 mm chromatographic column with PTFE stopcock. The caramel colour-Celite 545 mixture is placed in the column with the aid of a 75 mm powder funnel. The column contents are settled by repeatedly allowing the column to fall vertically about 10 cm to a padded surface. When properly settled, the caramel colour-Celite 545 mixture should occupy approximately the lower 250 mm of the column. Care should be exercised at this point to avoid a column bed which is either too loosely or too tightly packed. Loose packing will allow too rapid elution of the methylene chloride and possibly incomplete extraction. A too tightly packed column, e.g., the result of tamping down the column contents, can result in regions of the bed which are relatively inaccessible to the extraction solvent. This can also result in incomplete extraction.

With the stopcock open, the column is filled with methylene chloride poured from the sample beaker. When the solvent reaches the glasswool plug, the stopcock is closed and the solvent is allowed to stand in contact with the bed for 5 min. The stopcock is then opened and the column is further eluted with methylene chloride until 200 ml have been collected in a 250 ml round-bottom flask. A 1.00 ml aliquot of 2 MEI internal standard solution (50.0 mg of 2 MEI/50.0 ml of methylene chloride) is added to the collected eluate. The 2 MEI is well separated from the 4 MEI under the GLC conditions employed and has not been found in caramel colour.

The bulk of the solvent is then removed from the eluate on a rotary vacuum evaporator operated at 45-50 kPa and with the round-bottom flask maintained at 35° in a water bath. The extracted residue is transferred quantitatively to a 5 ml volumetric flask with a disposable Pasteur pipet, by rinsing the round-bottom flask several times with small (ca. 0.75 ml) portions of either tetrahydrofuran or acetone. Both solvents have been used with equal success. After mixing the contents thoroughly by several inversions of the flask, the extract is ready for GLC analysis. The extracts should be analysed as soon as possible after their preparation, because stability problems have occasionally been encountered with extracts more than 1 day old.

The GLC analysis is carried out using a gas chromatograph equipped with a hydrogen flame detector. The column is glass, 1 mm x 6 mm o.d. x 4 mm i.d., filled with 7.5% Carbowax 20M + 2% KOH on 90/100 mesh Anakrom ABS. The GLC parameters are as follows: carrier, nitrogen, 50 ml/min; hydrogen, 50 ml/min; oxygen, 80 ml/min; injection port, 200°; column isothermal, 180°; detector, 250°; sample size, 5 µl. All quantitation is done by using the internal standard technique.

2-Acetyl-4-tetrahydroxy-
butylimidazole (THI)

NB: Information on an improved method is sought.

THI is converted into its 2,4-dinitrophenylhydrazone (THI-DNPH). This derivative is separated from excess reagent and carbonylic contaminants by HPLC on RP-8, then determined by its absorbance at 385 nm.

Procedure

Caramel colour (200-250 mg) is weighed accurately, then dissolved in water (3 ml). The solution is transferred quantitatively to the upper part of a Combination Column. Elution with water is started, and a total of about 100 ml of water is passed through the columns.

The upper column is then disconnected. The lower column is eluted with 0.5 N HCl. The first 10.0 ml of eluate are discarded, then a volume of 35 ml is collected.

The solution is concentrated to dryness at 40° and 15 torr. The syrup residue is dissolved in carbonyl-free methanol (250 µl) and the 2,4-dinitrophenylhydrazine reagent (250 µl) is added. The reaction mixture is transferred to a septum-capped vial and stored for 5 h at room temperature.

A volume of 5 µl (but also from 1 to 25 µl) is injected onto a LiChrosorb RP-8 (10 µm) HPLC column. The mobile phase is MeOH/0.1 M H₃PO₄ 50/50 (v/v). Adjustments in mobile phase composition may be needed as column characteristics vary, depending upon the manufacturer. (Use of LiChrosorb RP-8, 10 µm, 250 x 4 mm "Vertex" column manufactured by Knauer, Bad Homburg, F.R.G. is strongly recommended). At a mobile phase flow rate of 2 ml/min and column dimensions of 250 x 4.6 mm, THI-DNPH is eluted at about 6.3±0.1 min. It is detected at 385 nm and the peak height is measured. The amount is calculated from a calibration curve prepared with THI-DNPH in methanol.

Materials

- 2,4,-Dinitrophenylhydrazine hydrochloride reagent: Commercial 2,4-dinitrophenylhydrazine (5 g) is added to concentrated hydrochloric acid (10 ml) in a 100-ml erlenmeyer flask, and the latter is gently shaken until the free base (red) is converted to the hydrochloride (yellow). Ethanol (100 ml) is added and the mixture is heated on a steam bath until all the solid has dissolved. After crystallization at room temperature, the hydrochloride is filtered off, washed with ether, dried at room temperature and stored in a desiccator. On storage the hydrochloride is slowly converted to the free base. The latter can be removed by washing with dimethoxyethane. The reagent is prepared by mixing 0.5 g of 2,4-dinitrophenylhydrazine hydrochloride in 15 ml of 5% methanol in dimethoxyethane for 30 min. It should be stored in the refrigerator and be checked periodically by HPLC.
- Cation-exchange resin (strong): Dowex 50 AG x 8, H⁺, 100-200 mesh.
- Cation-exchange resin (weak): Amberlite CG AG 50 I, H⁺, (100-200 mesh). (Sediment two or three times prior to use).
- Methanol, carbonyl-free: Methanol is prepared after Y. Peleg and C.H. Mannheim, J. Agr. Fd. Chem, 18 (1970) 176, by treatment with Girard P reagent.
- Dimethoxyethane: If impure, dimethoxyethane is purified by distillation from 2,4-dinitrophenylhydrazine in the presence of acid and redistilled from sodium hydroxide. Immediately prior to use it is passed through a column of neutral aluminium to remove peroxides.

Instrumental

Combination Columns: Similar to the set-up described in J. Agr. Fd. Chem. 22 (1974) 110. The upper column (150 x 12.5 mm, filling height max. 9 cm, or 200 x 10 mm, filling height max. 14 cm, with capillary outlet of 1 mm i.d.) is filled with weakly acidic cation-exchanger; bed height, approx. 50-60, or 80-90 mm, respectively. The lower column (total length 175 mm, i.d. 10 mm, with capillary outlet and Teflon stopcock) is filled with strongly acidic cation-exchanger to a bed-height of 60 mm. As a solvent reservoir, a dropping funnel (100 ml) with Teflon stopcock is used. All parts are connected by standard ground-glass joints (14.5 mm).

HPLC: With the column specified above and an ultraviolet detector capable of reading at 385 nm.

Calibration: THI-DNPH is dissolved in absolute, carbonyl-free methanol (about 100 mg/l; calculated concentration of THI: 47.58 ng/ μ l). A portion of this solution is diluted tenfold with methanol (4.7 ng THI/ μ l). THI-DNPH standard solutions are stable for at least twenty weeks when stored in the refrigerator.

4-メチルイミダゾール規格（案）

カラメルⅠ

（7）4-メチルイミダゾール

本品の固形分 10g 相当量を精密に量り、150ml のポリプロピレンビーカーに採る。3.0mol/l 水酸化ナトリウム 5.0g を加え、完全に混合し pH12 以上とする。ビーカーにセライト 545 を 20g 加え、内容物が半乾燥の混合物になるまで完全に混合する。

パイレックスガラスウールを PTFE 製止栓の付いた 22×300mm クロマトグラフィー用カラム管の底に詰める。カラメル色素とセライト 545 の混合物を 75mm 粉末ロートを用いてカラム管中に充填する。カラム管内容物は、カラム管を垂直にクッションのある表面へ約 10cm の高さから繰り返して落とすことにより固める。カラメル色素とセライト 545 の混合物はほぼカラム管の低部より 250 mm を占めるように充填する。

カラム管の止栓を開け、カラム管に酢酸メチルを試料ビーカーを洗浄しながら流し込む。溶媒が止栓に達したとき止栓を閉じる。5 分間放置し混合物と溶媒を十分に接触させておく。放置後、止栓を開け、カラム管に酢酸エチルを注ぎ 250ml の丸底フラスコに酢酸エチル約 200ml を集める。1ml の 2-メチルイミダゾール内部標準溶液（50.0mg の 2-メチルイミダゾールを 50.0ml の酢酸エチルに溶解したもの）を丸底フラスコに加える。

ロータリーエバポレーターを用い、35℃以下で酢酸エチルを除去する。残留物にアセトンを加えて溶かし 5ml とする。その 5 μ l を検液とし、ガスクロマトグラフィーにより試験を行うとき、対照液から得られたピークに相当するピークを認めない。対照液は、4-メチルイミダゾール 20.0mg をアセトンに溶かし 100ml とし、検液と同様に操作しその 5 μ l を用いる。

操作条件

検出器	水素炎イオン化検出器
カラム充填剤	90/100 メッシュのアナクロム ABS、7.5%カーボワックス 20M+2%水酸化カリウム
カラム管	1m×6mm o.d.×4mm i.d.のガラスカラム
キャリアー	窒素 50ml/min.
試料量	5 μ l
注入口温度	200℃
カラム温度（等温）	180℃
検出器	250℃

全ての定量は内部標準法を用いて行う。

カラメルⅢ

（8）4-メチルイミダゾール 0.30mg/g 以下（固形物換算）

カラメルⅠの純度試験（7）を準用する。内部標準法を用いて検量線を作成し、濃度を測定する。

カラメルⅣ

(9) 4-メチルイミダゾール 1.0mg/g 以下 (固形物換算)

カラメルⅠの純度試験(7)を準用する。内部標準法を用いて検量線を作成し、濃度を測定する。

今後の課題

今回の試験は、上記 JECFA 法を準用して実施しているが、内部標準物質の添加時期やカラメルⅢ、カラメルⅣにおける検量線の作成方法及びカラムサイズを含めガスクロマトグラフィーの操作条件等の細部にわたる検討が必要となる。

「ビタミンA 脂肪酸エステル」及び「ビタミンA 油」分析試験法の有機溶剤代替検討報告

日本食品添加物協会第五部会
研究者：理研ビタミン株式会社

1. 目的

第7版食品添加物公定書「ビタミンA脂肪酸エステル」及び「ビタミンA油」の純度試験（2）に使用されるクロロホルムをより安全な溶剤に代替する試験を行う。

2. 試験

（1）試験－1：単純代替試験

① 供試試料

ビタミンA脂肪酸エステルとしては酢酸エステルとパルミチン酸エステルが市販されているが、本試験では、ビタミンAパルミチン酸エステル（170万IU）及びビタミンA油（ビタミンAパルミチン酸エステル30万単位を含む）を使用した。

② 供試溶剤

本純度試験はビタミンA油及びビタミンA脂肪酸エステル製造時の製造工程に由来するたん白質などの混在物、または水分の存在を試験するもので、たん白質等の混在がなく、多量的水分がなければクロロホルムに澄明に溶解する（廣川書店：第七版食品添加物公定書解説書，1999）とされている。

従って、水との親和性の強いアルコール及びケトン系の溶剤は対象外とし、トルエン、酢酸エチル及びn-ヘキサンについて試験した。

③ 試験方法

試料約0.5gを量り、それぞれの溶剤3.0ml，6.0ml及び9.0mlを加えて常温での溶解状態を観察した。

④ 結果及び考察

クロロホルムを対照としたビタミンA脂肪酸エステルの溶解状態を表1に示した。

表1：試験－1の結果

溶媒	溶媒量 (ml)		
	3.0	6.0	9.0
n-ヘキサン	+	+	+
トルエン	±	±	±
酢酸エチル	+	+	+

+ クロロホルムより劣る

- + クロロホルムより劣る
- ± クロロホルムと同等

ビタミンAパルミチン酸エステル及びビタミンA油共に、溶解性はトルエン>酢酸エチル>n-ヘキサンで、トルエンに対しても澄明には溶解しなかった。

溶解性はビタミンAパルミチン酸エステルの溶解性に支配されると考えられる。

(2) 試験-2：加温による試験

① 供試試料

試験-1に使用したビタミンAパルミチン酸エステルを使用した。

② 試験方法

試料約0.5gを量り、それぞれの溶媒を3.0ml、6.0ml及び9.0mlを加えて密栓し、40℃水浴中で加温し経時的に溶解状態を観察した。

③ 結果

いずれの溶媒についても溶解状態は溶媒量あるいは時間に関係なかった。溶媒量9.0mlでの溶解状態を試験-1の結果と同様クロロホルムを対照として表2に示した。

表2：試験-2の結果（溶媒9.0ml）

溶媒	加温時間（分）						
	5	10	15	20	25	30	60
n-ヘキサン	+	+	+	+	+	+	+
トルエン	±	±	±	±	±	±	±
酢酸エチル	+	+	+	+	+	+	+

- ・クロロホルムそのものが澄明な溶解性を示さなかったが、トルエンがクロロホルムと同等の溶解性を示した。
- ・いずれの溶媒においても、溶媒量に関係なく溶解状態は同じであった。
- ・いずれの溶媒においても、40℃加温の効果は認められなかった。

④ 考察

澄明な溶解状態を示さないが、クロロホルムと同等の溶解性を示すとの立場からはトルエンで代替可能と考える。40℃加温及び溶媒量共に溶解性に影響せず、試料約0.5gに対する溶媒量3.0ml、常温試験で可と考えられる。

3. 総括

- (1) クロロホルム代替溶媒としてトルエンが可能である。
- (2) 本純度試験はビタミンA油及びビタミンA脂肪酸エステル製造時の製造工程に由来するたん白質などの混在物、または多量の水分の存在を試験するものであ

る（廣川書店：第七版食品添加物公定書解説書，1999）。

しかしながら、ビタミンA脂肪酸エステルは十分に精製されたビタミンAと脂肪酸とをエステル化反応して精製した合成品であり、たん白質は含まれず、水分も低いものである。現在流通しているビタミンA油はこのビタミンA脂肪酸エステルを食用油脂に溶解したものが大部分であり、天然由来のビタミンA油の流通は極少量であり、その天然由来のビタミンA油においてもこれら不純物は十分に除去されたものである。

従って、本規格は流通製品の品質実態に即したものとはいえず削除して差し支えないものとする。

以上

第 7 版食品添加物公定書規格における有害試薬代替の検討

ポリイソブチレンにおける「総不飽和物」の分析法について

日本食品添加物協会第六部会

研究者：株式会社ロッテ

【要 旨】

ポリイソブチレン純度試験法（総不飽和物）で、食品添加物公定書に定められた有害試薬の代替検討として、四塩化炭素及び酢酸第二水銀からクロロホルムとウイス液に変更しても特に問題なく、良好な結果を得ることができ、経緯報告した。（平成 13 年度 食品添加物規格試験法の改善に関する試験検査）

ポリイソブチレンはガムベース用の食品添加物として製造される他、工業用の原料としても製造加工される。工業用としての規格検査項目にも「総不飽和物」が必要とされることもあり、製造メーカー側としては有害試薬の代替検討として、食品添加物としてのポリイソブチレンにも工業用途のポリイソブチレンにも共通可能な測定方法を検討した結果、前回報告の結論に達した。

今回は、有害試薬レスの観点からさらにクロロホルムに替えてシクロヘキサンに代替できないか、検討を行ったところ、工業用途のポリイソブチレンでは試料溶解過程でクロロホルムの使用は欠かせない（シクロヘキサンのみでは透明にならない）が、食品添加物としてのポリイソブチレンは分子量の大小、イソブレン含有の有無に関係なく、どれもクロロホルムを全く使用しなくても測定に問題なく、同等の測定結果が得られることが判明した。

したがって四塩化炭素やクロロホルムのような有害な塩素系溶剤を使用しなくとも「総不飽和物」の含有量を求める可能性が見出されたので、食品添加物公定書に規定された有害試薬の代替は可能であると判断した。

【結 果】

試料： 表 1 記載の各ポリイソブチレン

1. 試料溶解工程－1

イソブレンを含まない検体：シクロヘキサンだけで完全に溶解し、クロロホルムの追加使用は不用であることが確認された。

（目視で完全に溶解している事を確認したが、用心のため 30 分間の攪拌を実施した。）

2. 試料溶解工程－2

ウイス液と混和した際、クロロホルムを使わなくとも透明であった。

3. 同一試料で測定した値は、クロロホルム法と同等であった。

4. シクロヘキサン法により同一試料で 6 回、再現性に問題はなかった。

[測定方法]

	クロロホルム法（前回の検討法）	シクロヘキサン法（今回検討法）
試料採取量	0.5 g	0.5 g
試料溶解工程-1	シクロヘキサン100ml加えて1夜放置し溶解する。 不溶解分が残る場合は1時間攪拌し、完全に溶解する。	シクロヘキサン100ml加えて1夜放置し溶解する。 不溶解分が残る場合は1時間攪拌し、完全に溶解する。
試料溶解工程-2	クロロホルム10ml及びウイス試薬液を15ml加え、混和する。 液が透明にならない時はクロロホルム追加。	ウイス試薬液を15ml加え、混和する。 液が透明にならない時はシクロヘキサンを添加する。
沃素化反応-1	遮光し、20～30℃で30分間攪拌。	遮光し、20～30℃で30分間攪拌。
沃素化反応-2	ヨウ化カリウム20mlと純水100ml添加し、攪拌する。	ヨウ化カリウム20mlと純水100ml添加し、攪拌する。
滴定	0.1mol/lチオ硫酸ナトリウムで滴定。	0.1mol/lチオ硫酸ナトリウムで滴定。