

卵殻未焼成カルシウム

Non-calcinated Eggshell Calcium

卵殻カルシウム

定義 本品は、卵殻を、殺菌、乾燥し、粉末にして得られたものである。主成分は炭酸カルシウムである。

含量 本品を乾燥したものは、炭酸カルシウム ($\text{CaCO}_3=100.09$) 90.0%以上を含む。

性状 本品は、白色の微細な粉末で、わずかに特有のにおいがある。

確認試験 本品1gに水10ml及び酢酸(1→4)7mlを加えるとき、泡立ってほとんど溶ける。この液を煮沸した後、アンモニア試液で中和した液は、カルシウム塩の反応を呈する。

純度試験 (1) 総窒素 0.6%以下(約0.5g, セミマイクロケルタール法)

(2) 重金属 Pbとして20 $\mu\text{g/g}$ 以下

本品1.0gを量り、塩酸(1→4)8mlを加えて溶かし、水を加えて約20mlとし、振り混ぜながら、わずかに白濁を生じるまでアンモニア試液を滴加し、酢酸(1→20)2ml及び水を加えて50mlとし、検液とする。比較液は、鉛標準液2mlを正確に量り、酢酸(1→20)2ml及び水を加えて50mlとする。

(3) ヒ素 As_2O_3 として4.0 $\mu\text{g/g}$ 以下

本品0.50gを量り、水2mlで潤し、塩酸(1→4)8mlを加えて溶かし、検液とする。装置Bを用いる。

乾燥減量 1.0%以下(105℃, 3時間)

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1gにつき、生菌数は3,000以下である。また大腸菌は認めない。

定量法 本品を乾燥し、その約1gを精密に量り、塩酸(1→4)10mlに徐々に加えて溶かし、水を加えて正確に100mlとし、検液とし、カルシウム塩定量法中の第1法により定量する。

0.05mol/l EDTA溶液1ml=5.004mg CaCO_3

「生石灰」分析結果

研究者 日本石灰協会

試験項目		サンプル1			サンプル2			サンプル3		
		1回	2回	3回	1回	2回	3回	1回	2回	3回
性状	白色～灰白色の塊、粒状または粉状	適	適	適	適	適	適	適	適	適
含量	<EDTA滴定法> 93.0%以上	96.0	95.7	95.4	95.5	95.8	96.0	96.3	96.1	96.3
		95.4	95.8	95.6	95.7	96.0	96.1	96.1	96.0	96.1
確認試験	(1) アルカリ性を呈する	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	(2) カルシウム塩の反応	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
純度試験	(1) 塩酸不溶物 0.60%以下	0.16	0.20	0.12	0.22	0.20	0.36	0.35	0.42	0.40
	(2) 炭酸塩 著しく泡立たない	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
	(3) 重金属 40μg/g以下	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
	(4) アルカリ金属 及ヒマグネシウム 6.0%以下	4.1	3.6	3.6	4.1	3.8	3.8	3.6	3.1	4.0
	(5) ハリウム 0.030%以下	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
	(6) ヒ素 4.0μg/g以下	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
強熱減量	5.0%以下	2.3	1.9	1.5	1.5	2.0	1.8	1.8	2.0	2.4

生石灰

Quicklime

CaO

分子量 56.08

定義 本品は、石灰石を焼成して得られたものである。主成分は酸化カルシウムである。

含量 本品は、酸化カルシウム (CaO) 93.0%以上を含む。

性状 本品は、白色～灰白色の塊、粒状または粉状である。

確認試験 (1) 本品を水で潤すとき発熱し、これに約5倍量の水を加えたものはアルカリ性を呈する。

(2) 本品1gに水20ml及び酢酸(1→3)6mlを加えて溶かした液は、カルシウム塩の反応を呈する。

純度試験 (1) 塩酸不溶物 0.60%以下

本品2.0gを量り、水を加え泥状にし、塩酸10ml及び水20mlを加えて溶かし、煮沸する。冷後、水を加えて200mlとし、定量分析用ろ紙(5種C)でろ過し、ろ紙上の残留物を洗液か塩化物の反応を呈さなくなるまで熱湯で洗った後、ろ紙と共に灰化し、その重量を量る。

(2) 炭酸塩 本品2.0gを量り、水50mlを加えてよく振り混ぜた後、塩酸(1→4)25mlを加えるとき、著しく泡立たない。

(3) 重金属 Pbとして40μg/g以下

本品0.5gを量り、塩酸(1→4)10mlを加え溶かし、水浴上で蒸発乾固した後、酢酸(1→20)2ml及び水20mlを加えて溶かし、必要があればろ過し、水を加えて50mlとし、検液とする。比較液は、鉛標準液2.0mlを正確に量り、酢酸(1→20)2ml及び水を加えて50mlとする。

(4) アルカリ金属及びマクネシウム 6.0%以下

本品0.50gを量り、水を加え泥状にし、塩酸(1→10)30mlを加えて溶かし、1分間煮沸する。シュウ酸溶液(3→50)40mlを速やかに加え、以下「塩化カルシウム」の純度試験(4)を準用する。

(5) ハリウム Baとして0.030%以下

本品1.50gを量り、水を加え泥状にし、塩酸(1→4)20mlを加えて溶かし、水を加えて30mlとし、ろ過する。ろ液20mlを量り、検液とし、酢酸ナトリウム2g、酢酸(1→20)1ml及びクロム酸カリウム溶液(1→20)0.5mlを加え、15分間放置するとき、その液の濁度は、次の比較液の濁度より濃くない。比較液はハリウム標準液0.30mlを量り、水を加えて20mlとし、以下検液の場合と同様に操作して調製する。

(6) ヒ素 As₂O₃として4.0μg/g以下

本品0.50gを量り、水を加え泥状にし、塩酸(1→4)5mlを加え溶かし、検液とする。装置Bを用いる。

強熱減量 5.0%以下 (1000℃ 30分)

定量法 本品約2gを精密に量り、塩酸(1→4)30mlを加えて溶かし、更に水を加えて正確に250mlとし、検液とし、カルシウム塩定量法中の第1法により定量する。

0.05mol/l EDTA溶液1ml=2.8039mgCaO

「木酢液」分析結果

分析者 大幸TEC株式会社

試験項目		サンプル1			サンプル2			サンプル3		
		1回	2回	3回	1回	2回	3回	1回	2回	3回
性状	無～褐色の透明な液体	適	適	適	適	適	適	適	適	適
含量	(1)酢酸 20～20.0%	10.0 9.4	9.7 9.3	9.1 9.2	10.4 9.7	9.2 9.8	9.2 9.2	9.3 9.5	9.4 9.5	9.5 9.5
	(2)カルホニル 10～25.0%	3.54 3.23	3.49 3.14	3.47 3.11	3.42 3.50	3.54 3.55	3.55 3.58	4.38 3.59	4.20 3.62	4.12 3.67
	(3)フェノール 0.10～16.0%	0.79 0.76	0.80 0.72	0.69 0.76	0.82 0.79	0.79 0.77	0.82 0.75	0.69 0.70	0.76 0.71	0.81 0.78
確認 試験	(1)弱酸性である	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	(2)だいたい色を呈する	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	(3)白色の沈殿	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
純度 試験	(1)鉛 2 μg/g以下	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
	(2)ヒ素 4.0 μg/g以下	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内
	(3)ヘンゾ[a]ピレン 2 μg/kg以下	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内	限度内

木酢液

Wood Vinegar
Pyrolytic Acid

定義 本品はサトウキビ、竹材、トウモロコシ又は木材などの植物性成分を熱分解（燃焼または乾留）して発生したカス成分を冷却して捕集し得られたもの（粗木酢液）を静置した後、上層の油層及び下層のタール分を除いた中間部分を蒸留し精製したものである。本品は酢酸、フェノール類、ケトン類等および水分を含む水溶性の液体である。

含量 本品は、酢酸 ($C_2H_4O_2=60.05$) 2.0~20.0%、ヘプタナール [$CH_3(CH_2)_5CHO=114.19$] として 2.0~25.0%及び2,6-シメトキシフェノール [$(C_6H_5O)_2C_6H_3OH=154.16$] として 0.10~1.60%を含む。

性状 本品は、無色〜褐色の透明な液体で、特異な燻煙臭と酸臭がある。

確認試験 (1) 本品の水溶液 (1→100) は弱酸性である。

(2) 本品 1g に無アルデヒドエタノール 1ml 及びエタノール製 2,4-ジニトロフェニルヒトラシン試液 2ml を加え 10 分間放置するとき、液は、たいたい色を呈する。

(2) 本品の水溶液 (1→10) 5ml に臭素試液を滴下するとき、白色の沈殿を生じ、揺り動かすとき、初めは溶け、更に過量の臭素試液を加えるとき沈殿は溶けなくなる。

純度試験 (1) 鉛 Pb として $2\mu\text{g/g}$ 以下 (5.0g, 第1法)

(2) ヒ素 As_2O_3 として $4.0\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第1法, 装置B)

(3) ヘンゾ[a]ピレン $2\mu\text{g/kg}$ 以下

本品 10g を量り、エタノール 20ml、水酸化カリウム溶液 (4→5) 2ml 及び沸騰石を加え、すり合わせの還流冷却器を付け、水浴上で時々振り混ぜながら 2 時間還流する。冷却後、分液漏斗に移し、フラスコを水 20ml、エタノール 10ml、ヘキサン 15ml で洗い、洗液は先の分液漏斗に入れ、よく振り混ぜて放置する。下層を分離し、別の分液漏斗に入れ、ヘキサン 15ml を加え、同様に操作し、下層を捨てる。残った各ヘキサン層に水 3ml を加えて振り混ぜ、水層を捨てる。各ヘキサン層を、あらかじめ無水硫酸ナトリウム 25g を積層したグーチャーつぼを用いてろ過する。ヘキサン 15ml を加えて無水硫酸ナトリウム層を洗浄する。洗液及びひろ液を集め、約 1ml になるまで水浴中で減圧下に濃縮する。この液を、ジクロロメタン 15ml 及びヘキサン 3ml で調整した固相抽出カラム (シリカゲル 1000mg) に積層する。更に容器をヘキサン 1ml ずつで 2 度洗った後、洗液をカラムに積層する。溶出した液を捨て、次に、ヘキサン/ジクロロメタン混液 (3:1) 5ml で溶出する。最初の溶出液 1ml を捨て、その後の溶出液を集める。カラムに残った液を加圧して押し出し、先の溶出液に合わせ、アセトニトリル 4ml を加え、約 1ml になるまで水浴中で減圧下に濃縮する。ジクロロメタン 15ml 及びアセトニトリル 5ml で調整した固相抽出カラム (オクタデシルシリル化シリカゲル 1000mg) に濃縮したサンプルを積層し、更に容器をアセトニトリル 0.5ml ずつで 2 度洗い、洗液をカラムに積層する。溶出液を捨て、次に、アセトニトリル/ジクロロメタン混液 (9:1) 5ml で溶出させ、溶出液を集める。カラムに残った液を加圧して押し出し、先の溶出液に合わせ水浴中で減圧下に濃縮した後、アセトニトリルを加えて正確に 5ml とする。この液を孔径 $0.5\mu\text{m}$ 以下のメンブランフィルターをろ過して検液とする。別に、ヘンゾ[a]ピレン 10mg を正確に量り、アセトニトリルを加えて溶かし、正確に 1,000ml とする。この液の適量を正確に量り、水/アセトニトリル混液 (1:1) を加えて 1,000ml 中にヘンゾ[a]ピレン $0.5\sim 10\mu\text{g}$ を含むように正確に薄め、標準液とする。検液及び標準液それぞれ $20\mu\text{l}$ 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。標準液のピーク高さを測定し、検量線を作成する。検液のピーク高さを測定し、検量線からその量を求める。

測定条件

検出器 蛍光検出器 (励起波長 290 nm, 蛍光波長 410 nm)

カラム充てん剤 5 μm の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 のステンレス管

カラム温度 35℃

移動相 A 水/アセトニトリル混液 (1 : 1), B アセトニトリル

濃度勾配 A液を100%で3分間保持した後, A : B (100 : 0)から(0 : 100)までの直線濃度勾配を15分間行い, 更にB液100%で8分間保持する。

流速 1ml/分

定量法 (1) 酢酸 CH_3COOH として2.0~20.0%

本品約1gを精密に量り, 水100mlを加え, pH計を用いて0.1mol/l水酸化ナトリウム溶液でpHが8.15になるまで滴定を行う。

0.1 mol/l水酸化ナトリウム溶液1ml=60.05 mg $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$

(2) カルボニル ヘプタナールとして1.0~25.0%

本品約1gを精密に量り, 無アルデヒドエタノールを加えて, 正確に50mlとする。この液5mlを正確に量り, トルエン/無アルデヒドエタノール混液(9 : 1)を加えて正確に100mlとし, 検液とする。検液1mlにトルエン1ml, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液2ml及びトリクロロ酢酸のトルエン溶液(1→25)2mlを加え, ふたをして60℃で30分間加温した後, 直ちに氷冷する。水酸化カリウムの無アルデヒドエタノール溶液(1→25)5ml及び無アルデヒドエタノールを加えて25mlとする。水酸化カリウムの無アルデヒドエタノール溶液(1→25)を加えて10分間放置後, 波長430nmにおける吸光度を測定する。対照液は, 検液の代わりにトルエン1mlを用い, 検液と同様に操作して調製した液を用いる。別にヘプタナール適量を精密に量り, トルエンを加えて1ml中にヘプタナール1.0~30.0μgを含むように正確に薄め, 検量線を作成する。

ここに得た検量線及び検液の吸光度から, 試料中のヘプタナール [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CHO}$] の含量(%)を求める。

(3) フェノール 2,6-ジメトキシフェノールとして0.10~16.0%

本品約2gを精密に量り, 水を加えて正確に1,000mlとし, 検液とする。検液5mlに硫酸銅溶液(1→2,000)1ml, ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.8)5ml及び2,6-ジプロモキノクロロイミド試液4滴を加えてふたをし, 強く振り混ぜる。暗所に10分間放置後, 1-ブタノール10mlを加え, ふたをし, 静かに6~8回転倒後, 毎分約700回転で5分間遠心分離し, 上澄液につき波長610nmにおける吸光度を測定する。対照液は, 検液の代わりに水5mlを用い, 検液と同様に操作して調製した液を用いる。別に2,6-ジメトキシフェノール適量を精密に量り, 水を加えて1ml中に2,6-ジメトキシフェノール1.0~20.0μgを含むように正確に薄め, 検量線を作成する。

ここに得た検量線及び検液の吸光度から, 試料中の2,6-ジメトキシフェノール [$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{OH}$] の含量(%)を求める。

試薬・試液の追加

固相抽出カラム 化学結合型シリカゲル等の固定相を, 充填型固相カートリッジとしたものを用いる。

ジクロロメタン CH_2Cl_2 (特級)

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液, エタノール製 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン1.5gを硫酸10ml及び水10mlの冷混液に溶かし, 無アルデヒドエタノール1容量及び水3容量の混液を加えて100mlとし, 必要ならはろ過する。

2,6-ジプロモキノクロロイミド試液 2,6-ジプロモキノクロロイミド40mgを量り, メタノール10mlを加えて溶かす。用時調製する。

2,6-ジメトキシフェノール (CH₃O)₂C₆H₃OH

含量 本品は、2,6-ジメトキシフェノールを [(CH₃O)₂C₆H₃OH] 98.0%以上を含む。

性状 本品は、白～褐色の結晶、結晶性粉末又は塊である。

純度試験 溶状 ほとんど澄明 (1g, 無水エタノール 20ml)

定量法 本品約 1g を精密に量り、アセトンに溶かして 10ml とした液につき、次の操作条件でカスクロマトクラフィーを行い、主ピークの面積百分率を求める。別に空試験を行い結果を補正する。

操作条件

検出器 水素炎イオン化検出器

液相 ポリエチレングリコール

カラム管 内径 0.25mm, 長さ 30m のカラス管

カラム温度 200℃ 付近の一定温度

注入口温度 250℃ 付近の一定温度

注入方式 スプリット (100 : 1)

キャリアーガス及び流量 ヘリウムを用いる。1.33ml/分の一定量

ヘプタナール

含量 本品は、ヘプタナール [CH₃(CH₂)₅CHO] 95.0%以上を含む。

性状 本品は、無色又はわずかに黄色を帯びた透明な液体である。

比重 0.817～0.824

純度試験 酸 [CH₃(CH₂)₅COOH として] 1.0%以下

エタノール 50ml にフェノールフタレイン試液 3 滴を加え、0.05mol/l 水酸化ナトリウム溶液を、液がわずかに紅色を呈するまで滴加する。この液に、本品 1g 及び 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液 0.77ml を加えるとき、液の色はうすい紅色～紅色を呈する。

0.1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液 1ml = 13.018g CH₃(CH₂)₅COOH

定量法 本品につき、次の操作条件でカスクロマトクラフィーを行い、主ピークの面積百分率を求める。

操作条件

検出器 熱伝導度検出器

液相 シメチルポリシロキサン

カラム管 内径 0.52 mm, 長さ 15 m のガラス管

カラム温度 初期温度 50℃ に設定し、徐々に温度を上げて 150℃ まで昇温する。

注入口温度 200℃ 付近の一定温度

注入方式 スプリット (20 : 1)

キャリアーガス及び流量 ヘリウムを用いる。5ml/分の一定量

ベンゾ[a]ピレン

含量 本品は、ベンゾ[a]ピレン 97.0%以上を含む。

性状 本品は、淡黄～黄緑色の結晶性の粉末である。

純度試験 融点 176～180℃

溶状 澄明 (10mg, アセトン 10ml)

定量法 本品約 5mg を精密に量り、アセトニトリルを加えて溶かし、正確に 100ml とする。この液 10μl につき、次の操作条件で液体クロマトクラフィーを行い、主ピークの面積百分率を求める。別に空試験を行い結果を補正する。

操作条件

検出器 紫外部吸光検出器 (測定波長 254nm)

カラム充填剤 5μm の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15cmのステンレス管

カラム温度 35℃

移動相 アセトニトリル/水混液(4 : 1)

流速 1ml/分

ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH9.8) ホウ酸ナトリウム 24.8g を量り, 水 900ml を加えて溶かす。水酸化ナトリウム溶液を用いて, pH9.8 に調整し, 水を加えて 1,000ml とする。

平成16年3月

第一部会(甘味料)既存添加物自主規格検討結果報告書
(第三版既存添加物自主規格の見直し)

「*N*-アセチルグルコサミン」のHPLC法による定量法の確立

日本食品添加物協会 第一部会
研究者所属 焼津水産化学工業株式会社
東和化成工業株式会社

1 目的

HPLC法(液体クロマトグラフィー)が*N*-アセチルグルコサミンの定量方法として適していることを確認し、その方法を確立する。

2 方法

N-アセチルグルコサミンに特異性の高い比色方法であるライシッヒ法(Reissig法、第三版既存添加物自主規格)と、HPLC法(平成15年9月修正の自主規格)のそれぞれで*N*-アセチルグルコサミンの定量を行い、相関性と再現性を確認する。

3 試験

1) ライシッヒ法(Reissig法)(第三版既存添加物自主規格の定量法)

本品を乾燥し、その約0.1gを精密に量り、水1,000mlに溶かす。この0.3mlをとり、ホウ酸緩衝液0.1mlを加え沸騰湯浴中で3分間加熱する。急冷後、パラシメチルアミノベンズアルデヒド試液3.0mlを加え、37℃で20分間加温する。冷却後585nmの吸光度を測定する。別に定量用*N*-アセチルグルコサミンを用いて作成した検量線から含量を求める。

2) HPLC法(平成15年9月修正自主規格案の定量法)

本品を乾燥し、その約1gを精密に量り、水100mlに溶かす。ろ過又は遠心分離で不溶物を除き、その10 μ lにつき次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。別に定量用*N*-アセチルグルコサミンを用いて作成した検量線から*N*-アセチルグルコサミン含量を求める。

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充てん剤 液体クロマトグラフィー用アミノ基結合シリカゲル

カラム管 内径4.6mm、長さ25cmのステンレス管

カラム温度 室温

移動相 アセトニトリル/水混液(3:1)

流量 0.8ml/分

4 結果

1) ライシノヒ法 (Reissig 法)

検量線の作成

定量用 N-アセチル グルコサミン量 (μg)	吸光度 (585nm)			
	1	2	3	平均値
0	0	0	0	0
15	0.316	0.310	0.310	0.312
30	0.608	0.614	0.604	0.609

従って、検量線は次のようになる。

$$N\text{-アセチルグルコサミン}(\mu\text{g}) = 49.01 \times \text{吸光度} \quad (R=0.9998)$$

・試料の含量試験

試料ロット番号 -	0310291	0311201	0312241	
試料量 (μg)	20.68	20.62	21.05	
吸光度	1	0.430	0.430	0.430
	2	0.415	0.428	0.426
	3	0.418	0.417	0.415
	平均値	0.421	0.425	0.424
定量値 (μg)	20.63	20.83	20.78	
含量 (%)	99.8	101.0	98.7	

2) HPLC 法

・検量線の作成

定量用 N-アセチル グルコサミン (μg)	ピーク面積				
	1	2	3	4	平均値
50	942,829	964,519	906,596	937,599	937,886
100	1,946,815	1,941,457	1,920,576	1,885,580	1,923,607
150	2,963,414	2,956,224	2,954,389	2,940,147	2,953,544

従って、検量線は次のようになる。

$$N\text{-アセチルグルコサミン}(\mu\text{g}) = 0.0005129 \times \text{ピーク面積} \quad (R=0.9985)$$

試料の含量試験

試料ロット番号 -	0310291	0311201	0312241	
試料量 (μg)	100.4	100.4	100.2	
ピーク 面積	1	2,001,108	1,927,625	1,918,547
	2	1,991,934	1,983,968	1,942,887
	3	1,850,466	1,938,716	1,922,214
	4	1,932,008	1,944,606	1,906,033
	5	1,941,995	1,928,002	1,899,386
	6	1,969,440	1,935,383	1,934,337
	平均値	1,947,825	1,943,050	1,920,567
定量値 (μg)	99.90	99.66	98.51	
含量 (%)	99.5	99.3	98.3	

5 考察

・HPLC法の検量線の直線性

定量用 *N*-アセチルグルコサミンを用いて作成した検量線は、 $R=0.9985$ と優れた直線性を示し、HPLC法が定量の手段として適していることが確認できた。

HPLC法の再現性

6回の繰り返し分析を行ったときのピーク面積の平均値からの誤差は最大でも5%であり、再現性も問題ない。

定量性

比較のために行った比色定量法（ライシノヒ法）との分析値の差は最大1.7%であり、相関性も充分に取れている。

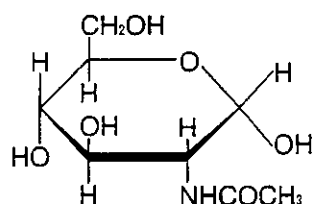
以上から、HPLC法は *N*-アセチルグルコサミンの定量法として適していると結論できる。

6 自主規格案

定量法をHPLC法とした規格を別紙に示す。

N-アセチルグルコサミン

N-Acetylglucosamine



$C_8H_{15}O_6N$

分子量 221.20

N-Acetyl-D-glucosamine

定 義 本品は、キチンを塩酸で加水分解し、分離して得られたものである。成分は、N-アセチル-D-グルコサミンである。

含 量 本品を乾燥したものは、N-アセチル-D-グルコサミン ($C_8H_{15}O_6N=221.20$) 95.0~101.0%を含む。

性 状 白~類白色の結晶又は粉末で、においがなく、特有の甘味を有する。

確認試験 本品の1%水溶液0.5mlに、ホウ酸緩衝液0.1mlを加え、90~100℃で3分間加熱する。急冷後、パラジメチルアミノベンズアルデヒド試液3.0mlを加え、37℃で20分間加温するとき液は赤紫色を呈する。

純度試験 (1) 溶状 無色、澄明 (1.0g, 水20ml)

(2) 塩化物 Clとして0.30%以下

本品約1gを精密に量り、水約30mlに溶かす。指示薬として5%クロム酸カリウム溶液5滴を加え、0.1mol/l硝酸銀溶液で滴定する。溶液が黄色から赤褐色に変化したところを終点とする。

0.1mol/l硝酸銀溶液1ml=0.3545mg Cl

(3) 重金属 Pbとして20μg/g以下 (1.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(4) 鉛 Pbとして10μg/g以下 (1.0g, 第1法)

(5) ヒ素 As_2O_3 として2.0μg/g以下 (1.0g, 第3法, 装置B)

乾燥減量 1.0%以下 (105℃, 3時間)

強熱残分 0.30%以下 (2.0g, 600℃, 8時間)

定 量 法 本品を乾燥し、その約1gを精密に量り、水100mlに溶かす。ろ過又は遠心分離で不溶物を除き、その10μlにつき次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。別に定量用N-アセチルグルコサミンを用いて作成した検量線からN-アセチルグルコサミン含量を求める。

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充てん剤 液体クロマトグラフィー用アミノ基結合シリカゲル

カラム管 内径4.6mm, 長さ25cmのステンレス管

カラム温度 室温

移動相 アセトニトリル/水混液 (3 : 1)

流量 0.8ml/分

第一部会（甘味料）既存添加物自主規格検討結報告書
（第三版既存添加物自主規格の見直し）

「L-アラビノース」の純度試験の検討

日本食品添加物協会 第一部会
研究者所属 台糖株式会社
東和化成工業株式会社

1 目的

第三版既存添加物自主規格では、「L-アラビノース」の純度試験の一つに「他の糖類」を設定し、試験方法はろ紙クロマトグラフィーとしている。

この試験について国立衛研から、方法は薄層クロマトグラフィーのほうが望ましい、との見解が示されたため、その可能性について検討する。

2 検討内容及び方法

L-アラビノース、D-キシロースを検体とし、ろ紙クロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィーを実施し両者を比較する。但し、薄層板は市販のものを使用する。

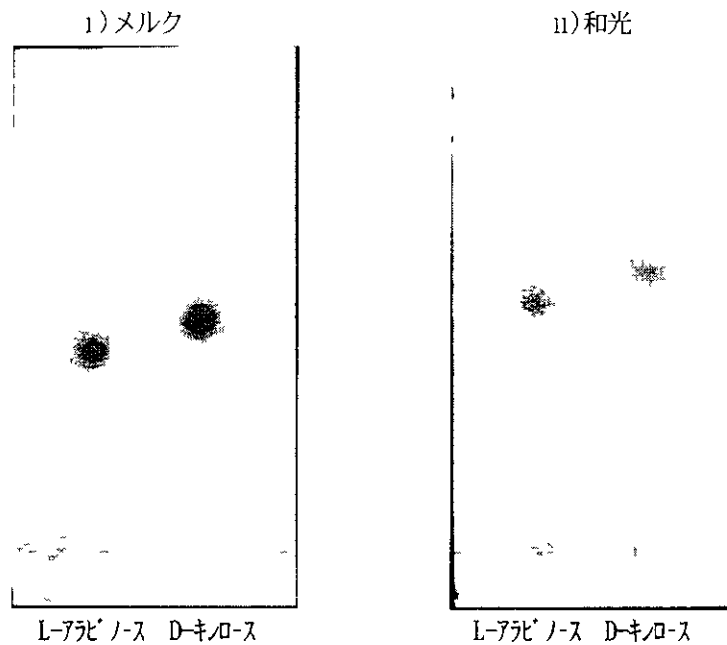
3 検討結果及び考察

(1) 薄層クロマトグラフィー試験条件の検索

代表的な試験条件及び結果を次に示す。

- ① サンプル L-アラビノース（特級、和光純薬工業株式会社）
D-キシロース（特級、和光純薬工業株式会社）
- ② サンプル調製 サンプルのおのおの0.05gをイオン交換水1mlに溶解
- ③ 薄層板 ⅰ) メルク株式会社 Silica Gel 60 F254（ガラス、50mm×100mm）
ⅱ) 和光純薬工業株式会社 Silicagel 70 F254（ガラス 50mm×100mm）
- ④ 展開溶媒 プロパノール/水/ブタノール混液=5 4 3
- ⑤ スポット量 キャピラリー（外径1.65±0.03、内径0.85±0.03、全長75±1.0mm）を用いて1スポット
- ⑥ 展開方法 薄層板の一端から10mmのところを原線を引き、原線上に約15mmの間隔でスポットを付けた。予め、展開用容器に、スポットの位置より液面が下になるように展開溶媒を入れ、容器内を展開溶媒で飽和しておいた。この展開用容器に薄層板を入れ、密封し、薄層板の上端より10mmのところまで展開を行った。
- ⑦ 検出方法 展開後、薄層板をよく風乾し、5%硫酸のエタノール溶液を薄層板に噴霧し、ホットプレートで加熱した。

⑧ 分析結果



TLCメーカー	Rf 値	
	L-アラビノース	キシロース
i)メルク	0.43~0.46	0.48~0.51
ii)和光	0.54~0.56	0.58~0.63

試験した条件では、L-アラビノースとD-キシロースのRf値の分散範囲は近く、標準品を用いずにその他の糖（キシロース）を確認することは困難であると考えられたが、展開溶媒の選択によっては他の糖類を判別することは可能と推察される。また薄層板メーカー間でRf値に差があり、Rf値のみではL-アラビノースを特定、確認する事は困難であると考えられた。

(2) 純度試験「他の糖類」の再検討

- ① 目的 「L-アラビノース」の自主規格では、他の糖類試験はろ紙クロマトグラフィーによるものであるが、含量試験はHPLCを採用している。この含量試験でも他の糖類は検出てき、また感度も良いことが予想されたため、他の糖類試験はHPLCで代用可能かどうかを確認する。
- ② サンプル L-アラビノース（特級、和光純薬工業株式会社）
D-キシロース（特級、和光純薬工業株式会社）
D-クルコース（特級、和光純薬工業株式会社）
- ③ 方法 ろ紙クロマトグラフィーとHPLCを用い、L-アラビノースを分析し両者の結果を比較する。
 - 3-1 検液 その他の糖類の例として、混入の可能性の高い、D-クルコース及びD-キシロースを選択し、L-アラビノースの含量が、100%、95%、及び90%になるよう調整したサンプル0.20gを量り、イオン交換水を加えて1000mlとし、これをろ紙クロマトグラフィーの検液とした。
HPLC用検液としては含量98%に調整したものをを用いた。
 - 3-2 操作方法は、L-アラビノース自主規格「純度試験(7) 他の糖類」及び「定量法」とした。

- ④ 試験結果 ろ紙クロマトグラフィー 100%L-アラビノース、95%及び90%L-アラビノース（D-グルコースで調整）の試験では一つの紅色スポット以外にスポットを認めなかった。一方、D-キシロースで調整した95%L-アラビノースの場合は、L-アラビノースのスポットの上部に、ごく薄く判然としないものの帯状の呈色が認められた。また、D-キシロースで90%に調整したものは、L-アラビノースのスポットの上部に帯状の薄い呈色が認められた。
- HPLC 他の糖類（2%のグルコース及びキシロース）は明らかに検出可能であり他の糖類の検出方法としては精度が高いことを確認できた。（別紙分析例参照）

4 考察

(1) 薄層クロマトグラフィーの適用の可能性

薄層クロマトグラフィーもろ紙クロマトグラフィーと同様にその他の糖を分離することができ、展開溶媒をさらに検討した後、試験方法として採用することは可能と思われた。

但し薄層板のメーカーの違いにより各糖のRf値が変化することが観察されたため、Rf値を指標とする試験には注意が必要である。

また第七版公定書では薄層板は自作することになっているが、その場合はさらにはらつきが大きくなることか予想され、市販薄層板を利用できるように一般試験法の改訂が期待される。

(2) 「他の糖類」試験の再検討

上記(1)で薄層クロマトグラフィーも利用可能であろうと思われたが、HPLCによれば更に精度良く試験できることを確認した。従って、ろ紙又は薄層クロマトグラフィーによる純度試験はHPLCによる含量試験で充分代替できると考える。

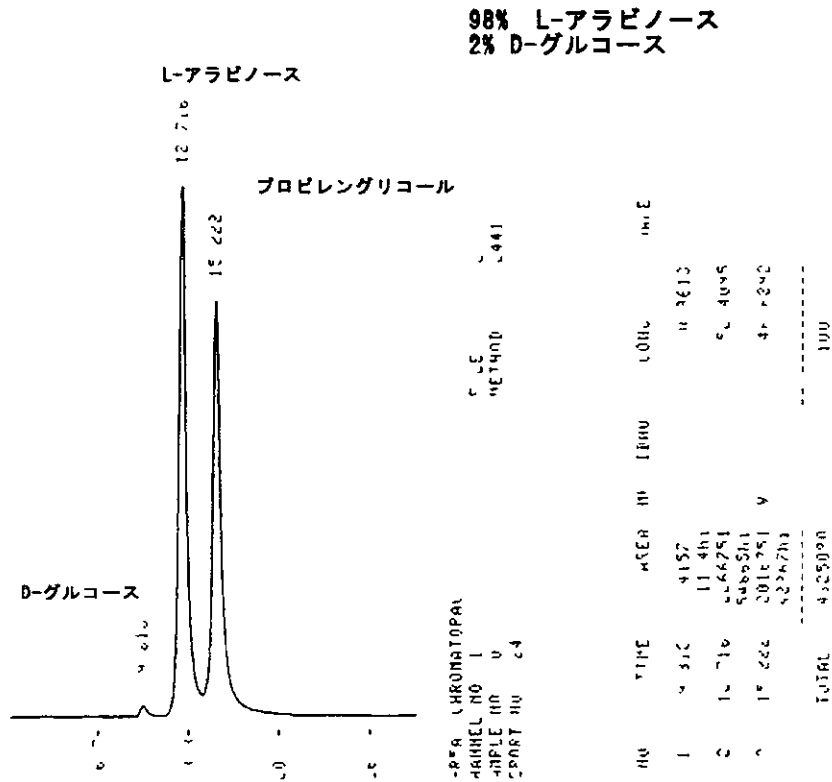
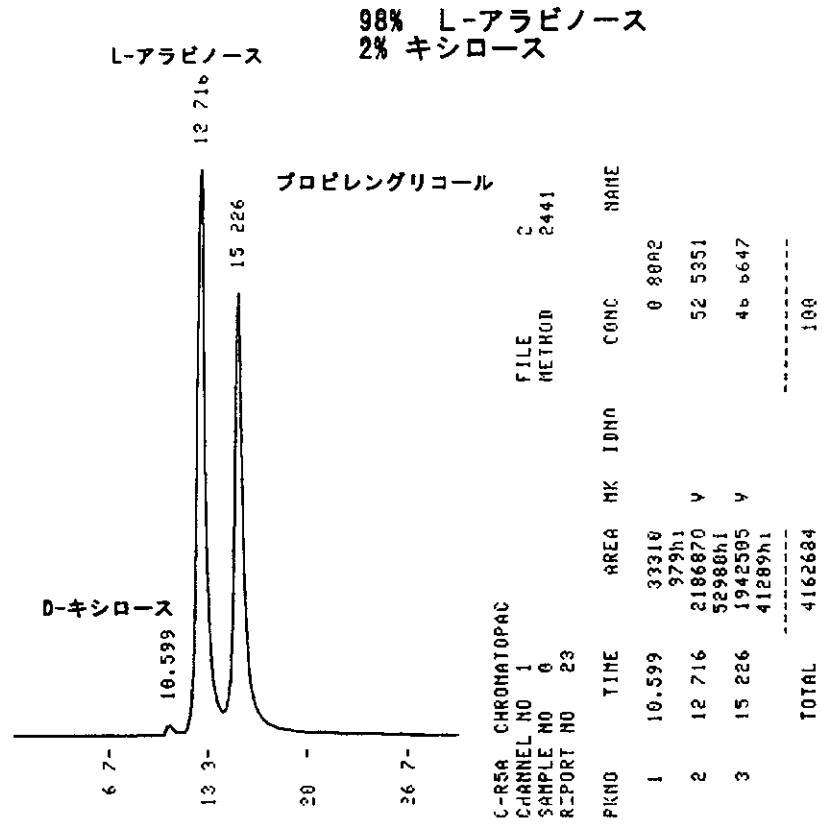
このため、自主規格から他の糖類の試験は削除することを提案する。

（食品添加物公定書では、L-アラビノースの異性体であるD-キシロースの試験は、他の糖類はろ紙クロマトグラフィー、定量法は滴定によるものと定められている。しかしL-アラビノースの定量法はHPLCによるものであり、D-キシロースの場合とは異なる。）

5 自主規格案

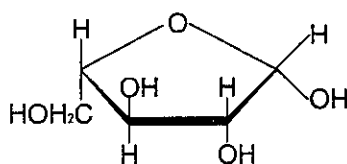
改訂した「L-アラビノース」自主規格案を別紙に示す。

L-アラビノース分析例



L-アラビノース

L-Arabinose



$C_5H_{10}O_5$

分子量 150.13

L-arabinose [87-72-9]

定義 本品は、アラビアガム、ガディガム又はコーンファイバーの配糖体又はサトウタイコンのバルプ（シュガービートバルプ）の多糖類（アラビナン）を、加水分解し、分離して得られたものである。成分はL-アラビノースである。

含量 本品を乾燥したものは、L-アラビノース（ $C_5H_{10}O_5=150.13$ ）95.0～101.0%を含む。

性状 本品は、無～白色の結晶又は白～淡黄白色の結晶性の粉末で、においがなく、甘味がある。

確認試験 (1) 本品の水溶液（1→20）2～3滴を沸騰したフェーリング試液5mlに加えるとき、赤色の沈殿を生じる。

(2) 本品1gに、新たに煮沸し冷却した水25mlを加えて溶かした液は、右旋性である。

(3) 本品1gに水3mlを加え、温めて溶かし、塩酸（1→4）/ジフェニルアミン・エタノール溶液（1→40）混液（5/2）3mlを加え、水浴中で5分間加熱するとき、液は、黄～淡だいたい色を呈する。

純度試験 (1) 溶状 無色、ほとんど透明（4.0g, 水20ml）

(2) 遊離酸 本品1.0gを量り、新たに煮沸し冷却した水10mlを加えて溶かし、フェノールフタレイン試液1滴を加え、0.2mol/l水酸化ナトリウム溶液1滴を加えるとき、液は、紅色を呈する。

(3) 硫酸塩 SO_4 として0.005%以下（1.0g, 比較液 0.005mol/l硫酸0.10ml）

(4) 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）

(5) 鉛 Pbとして10 μ g/g以下（1.0g, 第1法）

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

乾燥減量 1.0%以下（105℃, 3時間）

強熱残分 0.20%以下（5.0g, 600℃, 8時間）

定量法 本品及び定量用L-アラビノースを乾燥し、それぞれ約2gを精密に量り、それぞれ水/プロピレングリコール混液（4/1）10mlずつを正確に量って加える。更に、水を加えて溶かし、それぞれ正確に50mlずつとし、検液及び標準溶液とする。検液及び標準溶液10 μ lずつを正確に量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。それぞれの液のL-アラビノースとプロピレングリコールのピーク高又はピーク面積を測定し、プロピレングリコールのピーク高さ又はピーク面積に対するL-アラビノースのピーク高さ比又はピーク面積比 A_i 及び A_s を求め、次式により含量を求める。

$$\text{L-アラビノースの含量} = \frac{\text{定量用L-アラビノースの採取量}}{\text{本品の採取量}} \times \frac{A_i}{A_s} \times 100 (\%)$$

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充てん剤 7～11 μ mのゲル型強酸性陽イオン交換樹脂（Pb型）

カラム管 内径4~8mm, 長さ20~50cmのステンレス管の1本又は2本直列

カラム温度 60~70℃の一定温度

移動相 液体クロマトグラフィー用蒸留水又はこれに準ずるもの

流量 0.4~1.0ml/分の一定量

第二部会（着色料）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（フラホノイト系着色料） ——

研究年月日 平成15年7月～1月

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）、クリコ栄養食品（株）、三栄源エフエフエ株式会社、仙波糖化工業（株）、台糖（株）、（株）第一化成、ヤエガキ醗酵技研株式会社）及び、日本カラメル工業会（天野実業（株）、池田糖化工業（株）、昭和化学工業（株）、仙波糖化工業（株）、森田フートシステム（株））

第三版既存添加物自主規格フラボノイド系着色料確認試験におけるハザード物質「ホルマリン」の代替規格改定の件

目的 規格試験における有害試薬の代替について検討する。

第三版既存添加物自主規格（日本食品添加物協会 平成14年11月）に記載のフラホノイド系着色料 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、タマリント色素の確認試験において、酢酸鉛を添加しフラホノイト化合物が沈殿することを利用した確認法を規格化しているか、平成14年度厚生労働科学研究で有害試薬の鉛を使用しない確認方法、Steasny試薬（塩酸10ml、30%ホルマリン20ml、水5mlの混液）を添加しフラホノイト化合物の沈殿による確認法を規格化した。しかし、その後、ホルマリンの発ガン性リスクなどが新聞等で発表されたため、ホルマリンを使用しない確認方法を検討することを目的とする。

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、フラホノイト系着色料については、主色素成分が特定されていないものが多い。そこで、フラホノイト系化合物の定性分析について新たに試験法の調査を実施し、確認方法への利用を検討した。尚、フラホノイト系以外にも、第7版食品添加物公定書に記載されたカラメルⅠ、Ⅲ、Ⅳについても日本カラメル工業会と共同で同様の試験を実施して、フラホノイト系色素と比較した。

検討試験法

①塩酸-ホルマリン反応（平成14年度厚生労働科学研究）

（各色素水溶液に、Steasny試薬（塩酸10ml、30%ホルマリン20ml、水5mlの混液）を添加し加熱後、遠心分離し、沈殿の有無について調べる。検液5mlにSteasny試薬5ml添加し攪拌後、50℃、20分加熱し、毎分3000回転で10分間遠心分離し静置）

②塩化亜鉛（pH3.0）反応

（各色素溶液（コウリャン色素 40%エタノール、その他の色素 水）と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）と反応させ沈殿の有無を調べる。検液5mlに対し試液100μl添加し攪拌後50℃、20分加熱し、毎分3000回転で10分間遠心分離し静置）

③塩化亜鉛（pH3.0）（改）反応

②の方法に付け加えて色素の溶解手順を一本化した。（各色素溶液（0.1M水酸化ナトリウム溶液に溶解後、定容し、0.1M塩酸を加え酸性にした液）と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）と反応させ沈殿の有無を調べる。検液15mlに対し試液100μl添加し攪拌後50℃、20分加熱し、毎分3000回転で10分間遠心分離し静置）

検討結果

- ① 色素溶液の調製手順を一本化した「③塩化亜鉛 (pH3.0) (改) 反応」試験では、フラホノイト系色素全てが不溶化し遠心分離によって沈殿を起こすことかわかり、「①塩酸-ホルマリン反応」による試験結果と同じになった。【参考資料-A】

- ② 褐色系着色料として既に「第7版食品添加物公定書」に記載されているカラメルⅠ、カラメルⅢ、カラメルⅣとの比較試験を日本カラメル工業会と共同で確認した。その結果、カラメルⅠでは40サンプルのうち15サンプル、カラメルⅢでは、11サンプルのうち1サンプル、カラメルⅣでは16サンプルのうち4サンプルが不溶化し、沈殿する結果となり、フラホノイト系色素と比較して不溶化し難くなるものの、一部のカラメルでは沈殿を生じ、懸案事項であったフラホノイト系茶色素とカラメルを区別する方法には至らなかった。【参考資料-B】

結果 今回検討した結果より、塩化亜鉛 (pH3.0) (改) 試験法を塩酸-ホルマリン反応による確認試験法の代替として採用することとした。詳細については別紙にて報告する。

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。

今後の課題として、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。

これは、食品中からの分析方法にも関係するか、カラメルとの違いも視野において各褐色系着色料の定性分析の確立が急務である。