

(2) 「 γ -オリサノール」

- ① 定量法については紫外可視吸光度法により6ロット×3回の試験を行い、試験誤差の小さいことを確認し、含量規格を設定した。
- ② 乾燥減量は既存添加物であることを考慮して第三版既存添加物自主規格の0.5%以下を30%以下に改定したい。

(3) 「酵素処理ヘスペリシン」

- ① 定量法を「ヘスペリシンとモノグルコシルヘスペリシン」量と「クルコアミラーセ処理により生成する付加糖」量とを測定し、その合計量により含量を求める方法に改定し、当該定量法によるデータを基に含量規格を改定した。
- ② 確認試験(3) に液体クロマトグラフ法試験による極大吸収部を明記し、併せてピークのモノグルコシルヘスペリシンに対する相対保持時間の幅とピーク個数を示すこととした。

以上

第五部会（酸化防止剤）既存添加物自主規格案検討結果報告
—第三版既存添加物自主規格「イノシトール」規格の見直し—

日本食品添加物協会 第五部会
研究者所属 エーザイ株式会社
扶桑化学工業株式会社
理研ビタミン株式会社
築野食品工業株式会社

1 目的

既存添加物「イノシトール」の自主規格は第三版既存添加物自主規格に記載されている。しかしながら、確認試験法の有害試薬対策及び定量法の改善の必要性等が生じたので、それらについて、試験法の見直しとその妥当性を検討した。

2 検討内容及び方法

- (1) 第三版既存添加物自主規格の確認試験(1)及び確認試験(2)において硝酸ストロンチウム及び塩基性酢酸鉛が使用されており、健康衛生の立場から、それらを使用しない代替試験法が望まれる。一方、イノシトールは医薬品添加物としての成分規格が医薬品添加物規格〔薬添規〕(2003)に新たに収載され、確認試験には赤外吸収スペクトル測定での吸収波数を特定する方法のみが採用されている。既存添加物についても薬添規法を準用することが妥当と考えた。
- (2) 第三版既存添加物自主規格の定量法は、イノシトールを無水酢酸によりヘキサアセチルイノシトールに変換して水不溶物として抽出し、その重量から含量を計算する方法である。一方、薬添規(2003)では液体クロマトグラフ法が採用されている。液体クロマトグラフ法は第三版既存添加物自主規格の定量法に比較し簡便で正確であり、既存添加物に薬添規法を準用することが妥当と考えた。
- (3) 既存添加物イノシトールと薬添規イノシトールとの含量規格は97.0%以上と同一であり、薬添規(2003)試験法の策定検討の中でその妥当性は検証されたものと考え、改めての妥当性試験は行なわなかった。

3 検討結果及び考察

別紙にそれぞれ個別の検討結果及びそれに基づく自主規格(案)を記載した。

(1) 「イノシトール」

- ① 第三版既存添加物自主規格の確認試験(1)及び(2)を削除し、医薬品添加物規格(2003)の確認試験を採用した。
- ② 第三版既存添加物自主規格の定量法に替え、医薬品添加物規格(2003)の定量法を採用した。含量規格については両規格で値が同じであり、改定は行なわない。
- ③ 流通する医薬品添加物「イノシトール」と既存添加物「イノシトール」は同一物質であり、含量規格も同じであることから妥当性の試験は行なわない。

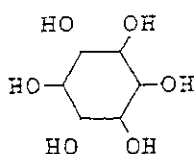
上

001062

イノシトール

Inositol

イノシット



$C_6H_{12}O_6$ 180.16

本品を乾燥したものは定量するとき、イノシトール ($C_6H_{12}O_6$) 97.0% 以上を含む

性状 本品は白色の結晶又は結晶性の粉末で、においはなく、味は甘い

本品は水に溶けやすく、エタノール (99.5) にほとんど溶けない

本品の水溶液 (1→10) は中性である

本品の水溶液 (1→10) は旋光性を示さない

確認試験 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測定するとき、波数 3380 cm^{-1} , 3220 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} , 1147 cm^{-1} , 1114 cm^{-1} 及び 1049 cm^{-1} 付近に吸収を認める

融点 $223 \sim 227^\circ\text{C}$

純度試験

(1) 溶状 本品 1.0 g を水 10 mL に溶かすとき、液は無色澄明である

(2) 塩化物 本品 2.0 g をとり、試験を行う 比較液には 0.01 mol/L 塩酸 0.30 mL を加える (0.005% 以下)

(3) 硫酸塩 本品 4.0 g をとり、試験を行う 比較液には 0.005 mol/L 硫酸 0.50 mL を加える (0.006% 以下)

(4) 重金属 本品 0.8 g をとり、第1法により操作し、試験を行う 比較液には鉛標準液 2.0 mL を加える (25 ppm 以下)

(5) 鉄 本品 2.0 g を水 40 mL に溶かし、塩酸 2 mL、ヘルオキシ二硫酸アンモニウム 0.04 g 及びチオシアン酸アンモニウム試液 2 mL を加えるとき、液の色は次の比較液より濃くない

比較液 鉄標準液 1.0 mL をとり、水 40 mL を加え、以下同様に操作する

(6) カルシウム 本品 1.0 g を水 10 mL に溶かし、ニュー酸アンモニウ

ム試液 1 mL を加え、1 分間放置するとき、液は澄明である

(7) ヒ素 本品 10 g をとり、第 1 法により検液を調製し、装置 B を用いる方法により試験を行う (2 ppm 以下)

(8) 糖類 本品 50 g を水 15 mL に溶かし、希塩酸 40 mL を加え、還流冷却器を付け、水浴中で 3 時間加熱する。冷後、水酸化ナトリウム試液で中和する (指示薬 メチルオレンジ試液 2 滴)。更に水を加えて 50 mL とし、その 10 mL をフラスコに量り、水 10 mL 及びフェーリング試液 40 mL を加えて穏やかに 3 分間煮沸した後、放置し、酸化銅(I)を沈殿させる。次に上澄液をガラスろ過器 (G4) を用いてろ過し、沈殿を温湯で洗液がアルカリ性を呈しなくなるまで洗い、洗液は先のガラスろ過器でろ過する。フラスコ内の沈殿を硫酸鉄(III)試液 20 mL に溶かし、これを先のガラスろ過器を用いてろ過した後、水洗し、ろ液及び洗液を合わせ、80 °C に加熱し、0.02 mol/L 過マンガン酸カリウム液で滴定するとき、その消費量は 10 mL 以下である

乾燥減量 0.5 % 以下 (1 g, 105 °C, 4 時間)

強熱残分 0.10 % 以下 (1 g)

定量法 本品及び定量用イノシトールを乾燥し、その約 0.2 g ずつを精密に量り、それぞれ水 30 mL に溶かし、次に内標準溶液 5 mL ずつを正確に加えた後、水を加えて 50 mL とし、試料溶液及び標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ 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い、内標準物質のピーク面積に対するイノシトールのピーク面積の比 Q_1 及び Q_2 を求める

$$\text{イノシトール (C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{) の量 (mg)} = \text{定量用イノシトールの量 (mg)} \times \frac{Q_1}{Q_2}$$

内標準溶液 1-プロパノールの水溶液 (3→25)

試験条件

検出器 示差屈折計

カラム 内径 8 mm、長さ 30 cm のステンレス管に 8 μ m の液体クロマトグラフ用強酸性イオン交換樹脂 (Na 型) を充てんする

カラム温度 65 °C 付近の一定温度

移動相 水

流量 イノシトールの保持時間が約 9 分になるように調整する

システム適合性

システムの性能 標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、イノシトール、内標準物質の順に溶出し、その分離度は 2.0 以上である

システムの再現性 標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰

り返すとき，内標準物質のピーク面積に対するイノシトールのピーク面積の比の相対標準偏差は 10 % 以下である

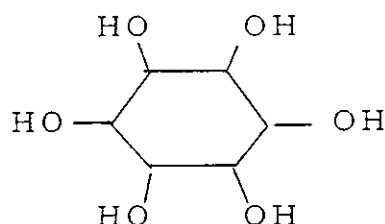
時法 容器 密閉容器

投与経路 経口投与，静脈内注射，筋肉内注射

イノシトール

Inositol

イノシト



$C_6H_{12}O_6$

分子量 180.16

定 義 本品は、米ぬか又はトウモロコシの種子から得られたフィチン酸を分解したものより、又はアカザ科サトウダイコン(Beta vulgaris LINNE var rapa DUMORTIER)の糖液又は糖蜜より、分離して得られたものである。成分はイノシトールである。

含 量 本品を乾燥したものは、イノシトール ($C_6H_{12}O_6$) として 97.0%以上を含む。

性 状 本品は、白色の結晶又は結晶性の粉末で、においはなく、味は甘い。

確認試験 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測定するとき、波数 3380 cm^{-1} 、3220 cm^{-1} 、1446 cm^{-1} 、1147 cm^{-1} 、1114 cm^{-1} 及び1049 cm^{-1} 付近に吸収を認める。

純度試験 (1) 融点 223~227℃

(2) 溶状 無色、澄明 (1.0g、水10ml)

(3) 塩化物 Clとして0.005%以下 (2.0g、比較液 0.01mol/l 塩酸0.30ml)

(4) 硫酸塩 SO_4 として0.006%以下 (4.0g、比較液 0.005mol/l 硫酸0.05ml)

(5) 重金属 Pbとして25 $\mu g/g$ 以下(1.0g、第1法、比較液 鉛標準液2.5ml)

(6) 鉄 Feとして5 $\mu g/g$ 以下 (1.0g、第1法、比較液 鉄標準液0.5ml)

(7) カルシウム 本品1.0gを水10mlに溶かし、シュウ酸アンモニウム溶液(1→30) 1mlを加え、1分間放置するとき、液は透明である。

(8) ヒ素 As_2O_3 として2.0 $\mu g/g$ 以下(1.0g、第1法、装置B)

(9) 還元性物質 本0.50gを水10mlに溶かし、フェーリング試液5mlを加えて3分間加熱した後30分間放置するとき、帯黄だいたい色~赤色の沈殿を生じない。

乾燥減量 0.50%以下 (105℃, 2時間)

強熱残分 0.10%以下

定 量 法 本品及び定量用イノシトールを乾燥し、その約0.2gずつを精密に量り、それぞれ水30mlと内標準溶液5mlずつを正確に加えた後、水を加えて50mlとし、試料溶液及び標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液10 μl につき、次の操作条件で液体クロマトグラフ法により試験を行い、内標準物質のピーク面積に対する試料溶液及び標準溶液のピーク面積の比 Q_T 及び Q_S を求め、次式によりイノシトール含量を求める。

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充填剤 8 μm の液体クロマトグラフ法用強酸性イオン交換樹脂 (Ia型)

カラム 内径8mm、長さ30cmのステンレス管

カラム温度 65℃付近の一定温度

移動相 水

流量 イノシトールの保持時間が約9分になるように調整する。

内標準溶液 1-プロパノールの水溶液 (3→25)

$$\text{イノントール (C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{) 含量} = \frac{\text{定量用イノシトールの採取量 (mg)} \times Q_T}{\text{試料採取量 (mg)} \times Q_S} \quad (\%)$$

Q_T 試料溶液のピーク面積 / 内標準液のピーク面積
 Q_S 標準溶液のピーク面積 / 内標準液のピーク面積

第5部会（酸化防止剤）既存添加物自主規格案検討結果報告
 —第三版既存添加物「 γ -オリザノール」自主規格の見直し—

日本食品添加物協会 第5部会
 研究者所属 エーザイ株式会社
 扶桑化学工業株式会社
 理研ヒタミン株式会社
 築野食品工業株式会社

1 目的

既存添加物「 γ -オリザノール」の自主規格は第3版既存添加物自主規格に記載されている。しかしながら、当規格には含量規格が設定されておらず、製品品質管理の立場から含量規格の設定が望まれた。また、乾燥減量規格は0.5%以下と設定されているか、この規格値は製造管理の立場からは厳しく改定が望まれた。これらの観点から第3版既存添加物自主規格を見直すこととした。

2 検討内容・方法及び結果

(1) 定量法及び含量測定

「 γ -オリザノール」については、第2版化学的合成品以外の食品添加物自主規格において定量法が設定されていたが含量規格が設定されておらず、第3版既存添加物自主規格において定量法規格が削除された。本検討においては当該試験法により製品6ロット×3回繰返し試験を行い試験結果のばらつきを考察し、得られた結果を基に含量規格を策定した。試験法は自主規格案に示した方法により、試験結果は表1に示した。

表1 γ -オリザノールの測定結果

Lot No	試料採取量 (g)	吸光度	γ -オリザノールの含量 (%)
F03522	1	0.0515	99.8
	2	0.0505	99.2
	3	0.0523	99.2
F03523	1	0.0505	98.2
	2	0.0519	98.3
	3	0.0521	98.1
F03524	1	0.0508	98.2
	2	0.0499	98.2
	3	0.0523	99.2
F03527	1	0.0521	99.2
	2	0.0524	99.4
	3	0.0521	98.8
L01027	1	0.0534	99.8
	2	0.0538	100.0
	3	0.0529	99.4

(2) 乾燥減量

上記定量法に使用した製品試料の乾燥減量は6ロット共に0.5%以下であるか、製造における乾燥減量追跡試験によれば、3.0%以下の設定が望ましいと評価された。

3 考察

(1) 含量規格

試験結果は98.0%以上ではあるか、既存添加物であることから規格値としては90%以上と設定したい。

(2) 乾燥減量

実績の累積データはないか、製造試験の結果より3.0%以下と改定したい。

以上

γ-オリザノール

γ-Oryzanol

定義 本品は、米ぬか又は胚芽油から得られた、ステロールとフェルラ酸及びトリテルペンアルコールとフェルラ酸のエステルを主成分とするものである。

含量 本品を乾燥したものは、γ-オリザノールとして90%以上を含む。

性状 本品は、淡黄～黄色の結晶性の粉末で、においがなく又はわずかに特異なにおいがある。

確認試験 (1) 本品0.01gをエタノール製水酸化カリウム試液10mlに加温して溶かすとき、液は黄色を呈する。

(2) 本品0.01gをクロロホルム5mlに溶かし、硫酸4滴を加えて振り混ぜるとき、液は黄色を呈する。この液に無水酢酸10滴を加えるとき、液は赤紫色を経て徐々に緑色を呈する。

(3) 本品0.01gをクロロホルム5mlに溶かし、硫酸5mlを加えて振り混ぜた後、静置するとき、クロロホルム層は淡黄色、水層は橙色を呈する。

(4) 本品のn-ヘプタン溶液(1→100,000)は、波長229～233nm, 289～293nm及び313～317nmに極大吸収部がある。

純度試験 (1) 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)

(2) 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℃, 3時間)

強熱残分 0.10%以下

定量法 本品を乾燥し、その約0.05gを精密に量り、ヘプタン70mlに70～80℃に加熱して溶かし、冷後、ヘプタンを加えて正確に100mlとする。この液2mlを正確に量り、ヘプタンを加えて正確に100mlとし、この液につき紫外可視吸光度測定法により試験を行い、315nm付近の吸収極大の波長における吸光度Aを測定し、次式により含量を計算する。

$$\gamma\text{-オリザノールの含量} = \frac{A \times 5000}{359 \times \text{試料採取量 (g)}} \quad (\%)$$

A 試料溶液の吸光度

第五部会（酸化防止剤）既存添加物自主規格案検討結果報告
—第三版既存添加物自主規格「酵素処理ヘスペリジン」規格の見直し—

日本食品添加物協会 第五部会
研究者所属 エーザイ株式会社
理研ビタミン株式会社
東洋精糖株式会社

1 目的

既存添加物「酵素処理ヘスペリジン」の自主規格は第三版既存添加物自主規格に記載されている。しかしながら、その後の研究により製品中の成分の同定と、その成分を基準とした確認試験法及び定量法が開発されたので、それら試験法による試験を行い、試験法の妥当性の確認と測定結果に基づき含量規格及び確認試験法の見直しを行なった。

2 検討内容及び方法

(1) 定量用モノグルコシルヘスペリジン

第三版既存添加物自主規格においては定量用標準試薬を設定していなかったが、本検討においてはヘスペリジンより高純度に精製され、水への溶解度が高く取り扱い性の良いモノグルコシルヘスペリジンを定量用標準試薬として開発した（図1）。本試薬は確認試験用標準試薬としても使用することとした。

(2) 製品中成分

新たに開発した液体クロマトグラフ法による試験により、製品成分としてはモノグルコシルヘスペリジンの保持時間を1としたときのヘスペリジンの相対保持時間が1.03~1.13に位置し、ヘスペリジンに対するグルコースの付加数に応じて、0.81~0.90, 0.64~0.74, 0.53~0.63あるいは0.45~0.57にピークを認めることが確認された（図2）。

(3) 確認試験

定量用モノグルコシルヘスペリジンを標準試薬を使用してフォトダイオードアレイ検出器により液体クロマトグラフ法による試験を行うとき、波長280~286及び323~333に極大吸収部が存在することを明記した。液体クロマトグラフ法によるピークの数については(2)に記したか、 k_1 規格の上では、精製の技術を勘案して2ヶ以上とした。

(4) 定量法

製品をグルコアミラーゼ処理することにより付加配糖体ははずし、はずされた糖量をグルコース測定キットで定量し、アグリコンであるヘスペリジンとモノグルコシルヘスペリジン（図3）とを液体クロマトグラフ法により定量し、アグリコン量とグルコアミラーゼ処理により精製する付加糖量の合計量をもってヘスペレチン配糖体の量とすることにした。

3 検討結果及び考察

別紙に自主規格（案）を記載した。

(1) 別紙に記載の自主規格（案）の試験法により試験した確認試験(3)、確認試験(4)、乾燥減量及び定量（含量）結果を表1に示した。

①確認試験(3)については3ロットにおいて、284.0nm及び328.0または329.0nmに極大吸収部を認めた。

②確認試験(4)については、3ロット共に対応する保持時間にピーク2ヶ以上のピークを認めた。

③含量は約 32.5～33.8 の範囲であった。

表 1 試験結果

製品ロット	確認試験(3)	確認試験(4)		乾燥減量 (%)	含量 (%)
	極大吸収部(nm)	相対保持時間	極大吸収部(nm)		
AP 2 5 1 7 0	284.0, 329.0	0.485, 0.544, 0.661, 0.832, 1.099	283.5, 327.7～328.9	3.03	32.83
A 1 0 6 1 7 0	284.0, 328.0	0.486, 0.545, 0.661, 0.832, 1.099	283.5, 327.7	3.29	33.78
0 4 0 1 2 3	284.0, 328.0	0.456, 0.485, 0.594, 0.832, 1.099	283.5, 327.7	1.34	33.52

(2) 定量用モノグルコシルヘスペリジンの分析結果を以下に示す。

- ① 極大吸収部 283.5nm 及び 328.9nm
- ② 液体クロマトグラフ保持時間 14.935 分
- ③ 乾燥減量 2.81%
- ④ 含量 95.90%

(3) 上記結果より、改定規格試験法（案）及び規格値は妥当と考える。

以上



レポート作成者 System

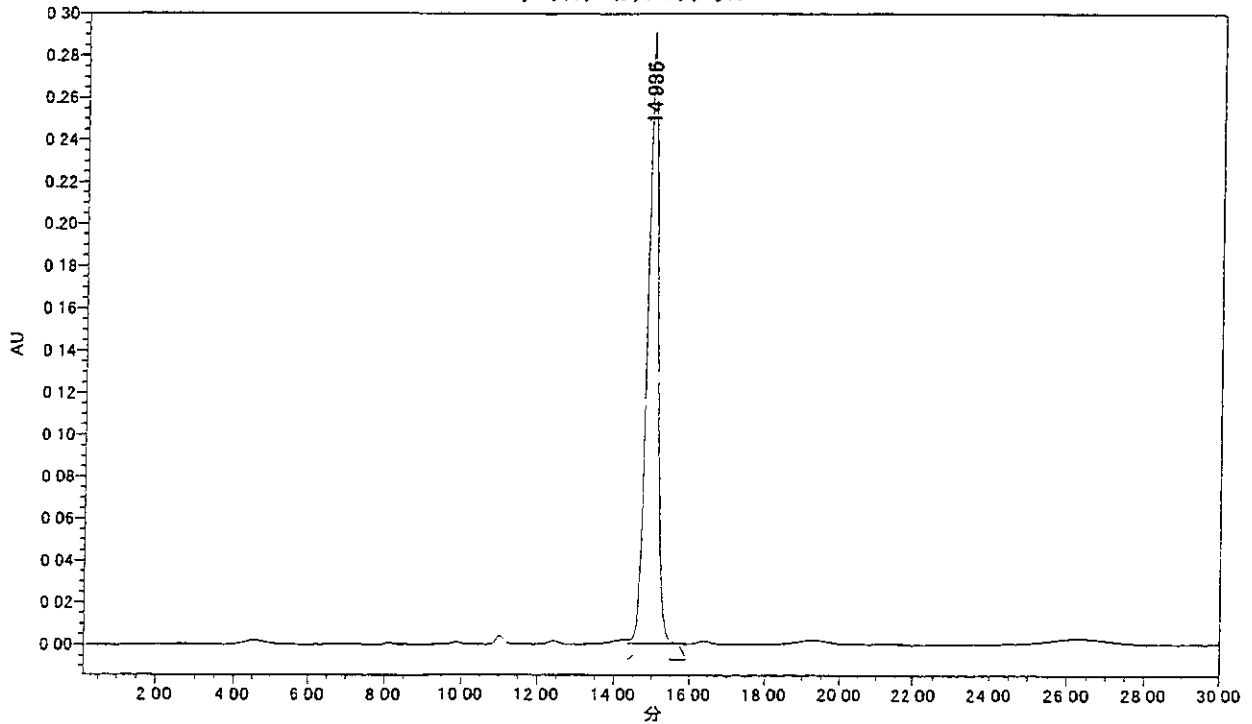
☑ 1 - 1 モノグルコシルヘスペリジン

(液体クロマトグラム)

サンプル情報

サンプル名	モノグルコシルヘスペリジン	分析担当者	System
サンプルの種類	未知試料	分析日	04/02/12 午後 5:07:17
ハイアル	1	取り込みメソッド	220_400
注入 #	8	解析日	04/02/12 午後 5:47:53
注入量	10.00 ul	解析メソッド	KATO
分析時間	30.00 分	チャンネル名	波長 Ch1
サンプルセット名		解析チャンネルの説明	PDA 280.0 nm

オートスケールクロマトグラム

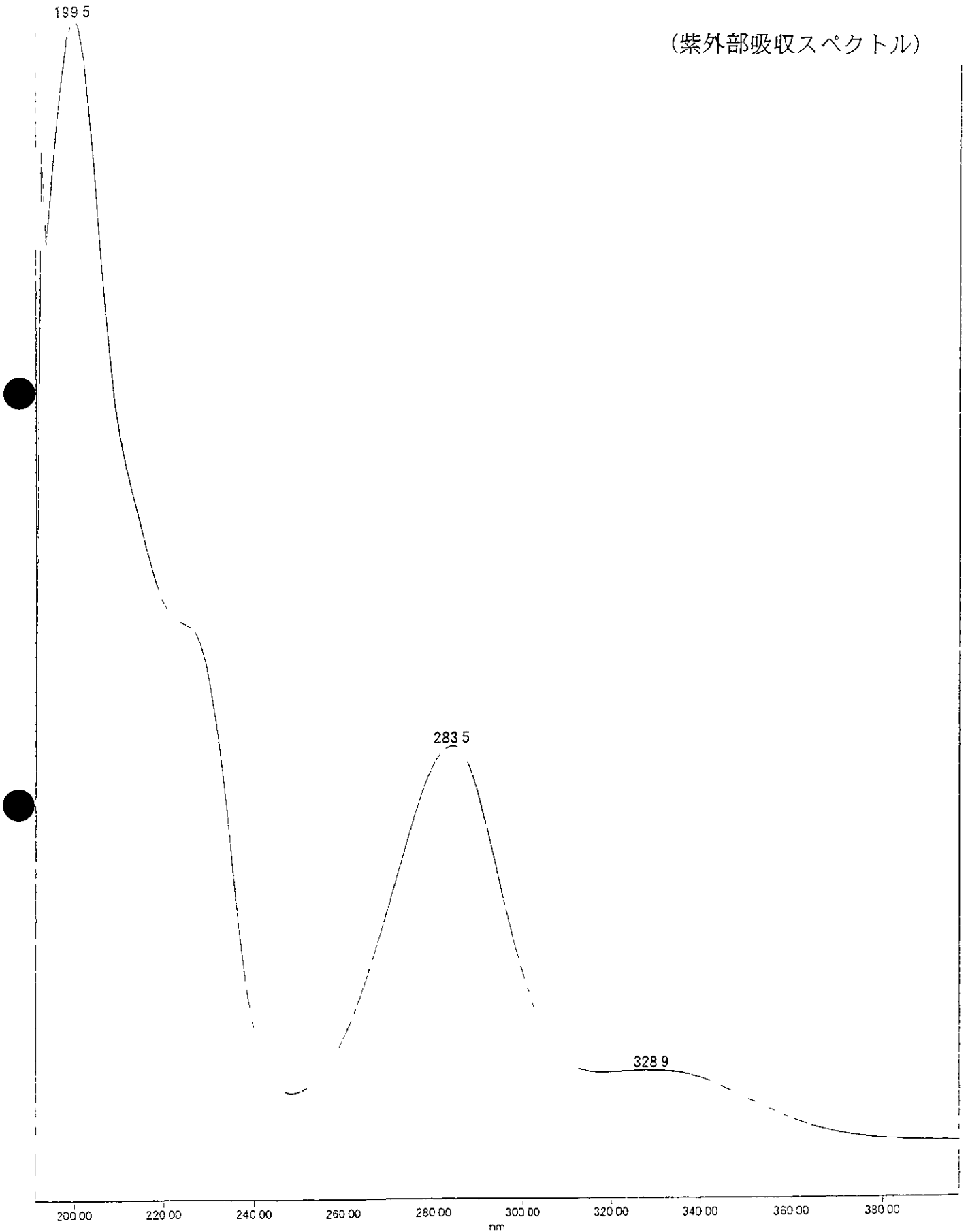


ピークテーブル

名前	保持時間	面積	高さ	%面積
1	14.935	5724815	284685	100.00

図 1-2 モノクルコシルヘスペリン

(紫外部吸収スペクトル)



保持時間 14.930



サンプル情報

サンプル名	ヘスペリジンH AP25	分析担当者	System
サンプルの種類	未知試料	分析日	04/02/12 午後 3.28.22
ハイアル	1	取り込みメソッド	220_400
注入 #	5	解析日	04/02/12 午後 4.53.42
注入量	10.00 ul	解析メソッド	KATO
分析時間	30.00 分	チャンネル名	波長 Ch1
サンプルセット名		解析チャンネルの説明	PDA 280.0 nm

オートスケールクロマトグラム

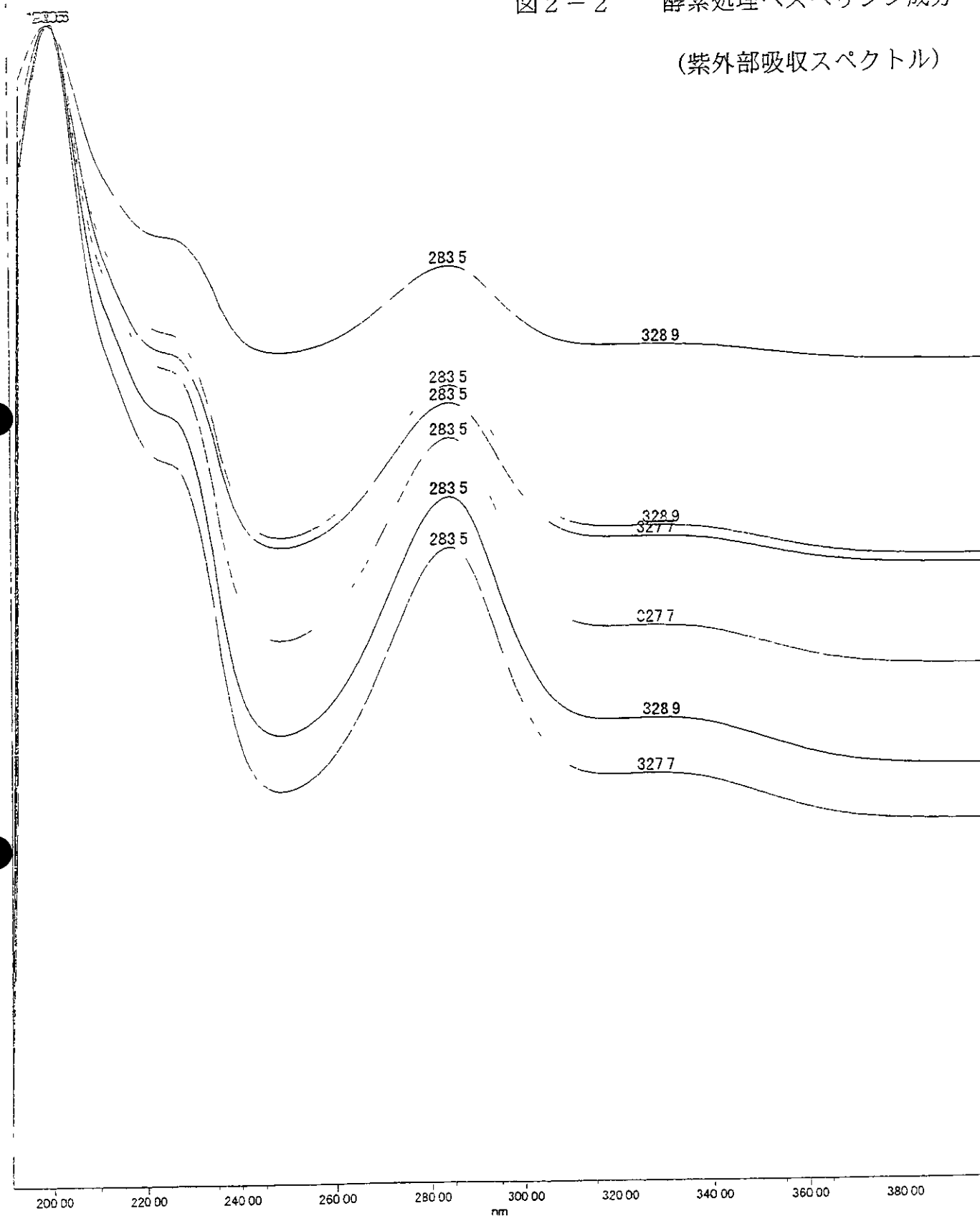


ピークテーブル

名前	保持時間	面積	高さ	%面積
1	7.218	2083077	152436	5.64
2	8.105	3615768	236116	9.79
3	9.845	4678555	278320	12.66
4	12.394	7818998	422841	21.17
5	14.893	11476383	566259	31.07
6	16.364	7268991	312858	19.68

図 2-2 酵素処理ヘスペリジン成分

(紫外吸収スペクトル)



- 保持時間 16.360
- 保持時間 14.890
- 保持時間 12.390
- 保持時間 9.840
- 保持時間 8.100
- 保持時間 7.210

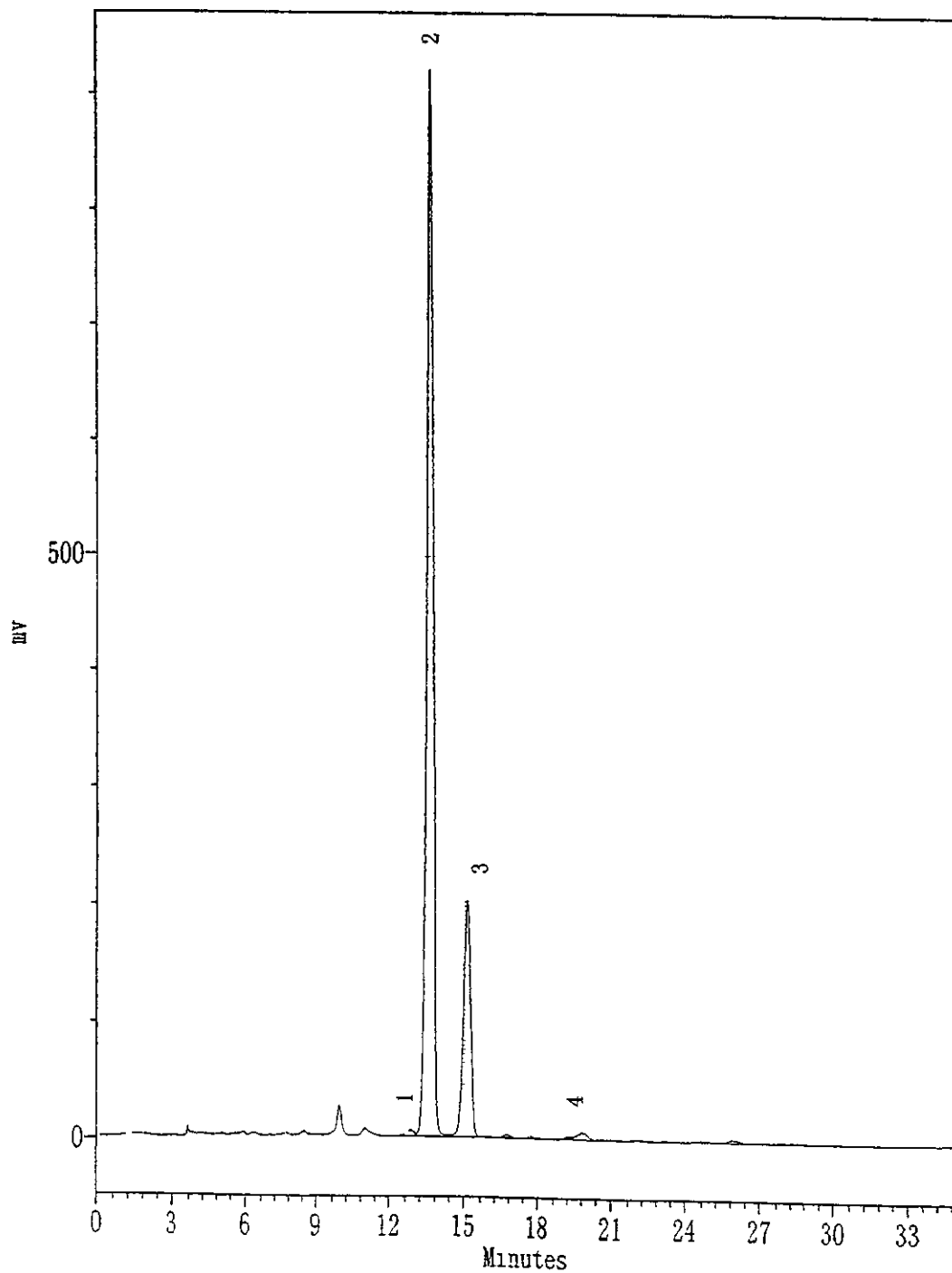
図3 グルコアミラーゼ処理後

ファイル名 A4207G55 CHR AP25-1
 試料注入, 日付 02-07-2004 時間 16 55.3

アグリコン成分 (液体クロマトグラム)

No	R T (分)	面積 (uv*sec)	面積%
1	12 873	108268	0 5229
2	13 584	16268210	78 5698
3	15 088	4154385	20 0642
4	19 899	174551	0 8430

合計 20705414



定量用モノグルコシルヘスペリジン規格 (案)

性状 本品は、淡黄色の結晶粉末で、微かに特異なおいかある。

含量 本品を乾燥したものは、モノグルコシルヘスペリジン ($C_{34}H_{44}O_{20}$) として 94.0% 以上を含む。

確認試験 (1) 本品 5 mg を水 10 ml に溶かし、希塩化第二鉄試液 1 ~ 2 滴を加えるとき、液は褐色を呈する。

(2) 本品 10 mg を水 500 ml に溶かした液は、波長 280 ~ 286 と 323 ~ 333 nm に極大吸収部がある。

乾燥減量 6.0 % 以下 (120 °C, 2.7 kPa 以下, 2 時間)

定量法 本品 100 mg を精密に量り、液体クロマトグラフ法用移動相に溶かして正確に 200 ml として試料溶液とし、次の操作条件で液体クロマトグラフ法により試験を行ない、自動積分法によりピーク面積を測定して、次式によりモノグルコシルヘスペリジン量を求める。なお、分析時間はモノグルコシルヘスペリジンの保持時間の約 4.0 倍とする。

操作条件

検出器 紫外吸収検出器 (測定波長 280 nm)

カラム充填剤 化学結合型オクタデシルシラン

カラム管 内径 3.9 ~ 4.6 mm, 長さ 150 ~ 300 mm のステンレス管

カラム温度 40 °C

移動相 水 / アセトニトリル / 酢酸混液 (80 : 20 : 0.01)

流量 1.0 ml / 分

注入量 10 µl

$$\text{モノグルコシルヘスペリジン含量} = \frac{\text{試料溶液のモノグルコシルヘスペリジンのピーク面積}}{\text{総ピーク面積}} \quad (\%)$$

酵素処理ヘスペリジン

Enzymatically modified Hesperidin

糖転移ヘスペリジン

糖転移ビタミンP

定義 本品は、柑橘類の果皮、果汁または種子より、室温時アルカリ性水溶液で抽出して得られるヘスペリジンに、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。

含量 本品を乾燥物換算したものは、ヘスペレチン配糖体として30%以上を含む。

性状 本品は、淡黄～黄褐色粉末で、わずかに特有のにおいがある。

確認試験 (1) 本品5mgに水10mlを加えて溶かし、希塩化第二鉄試液1～2滴を加えるとき、液は褐色を呈する。

(2) 本品10mgに水50mlを加えて溶かした液は、波長280～286nmと323～333nmに極大吸収部がある。

(3) 本品約0.5gを量り、高速液体クロマトグラフ法用移動相100mlに溶解して試料溶液とする。別に定量用モノグルコシルヘスペリジン約0.05gに高速液体クロマトグラフ法用移動相を加えて250mlとし標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液につき次の操作条件で高速液体クロマトグラフ法により試験を行うとき、本品はモノグルコシルヘスペリジンに対する相対保持時間が0.45～1.13の間に2個以上のピークを認める。また、それらの紫外吸収スペクトルはモノグルコシルヘスペリジンと同様、波長280～286nmと323～333nmに極大吸収部がある。

操作条件

検出器 フォトタイオードアレイ検出器 (測定波長 280nm、200～400nm)

カラム充てん剤 化学結合型オクタデシルシラン

カラム管 内径3.9～4.6mm、長さ150～300mm

カラム温度 40℃

移動相 水/アセトニトリル/酢酸 (80 20 0.01)

流量 1.0ml/分

注入量 10μl

純度試験 (1) 溶状 澄明 (0.5g、水100ml)

(2) 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)

(3) 鉛 Pbとして10μg/g以下 (1.0g、第1法)

(4) ヒ素 As₂O₃として20μg/g以下(1.0g、第3法、装置B)

乾燥減量 6.0%以下 (120℃、2.7kpa以下、2時間)

定量法 (1) ヘスペリジン、モノグルコシルヘスペリジンの定量

本品約0.5～1.0gを精密に量り、水100mlに溶解する。この溶液を吸着用樹脂(配糖体用)50mlの充填された直径約2.5cmの樹脂柱に注ぎ、1分間に2.5ml以下の速さで通液した後、水250mlで洗浄する。次に、50vol%エタノール200mlを1分間に2.5ml以下の速さで通液し、吸着画分を溶出する。この溶出液を約1/5量まで濃縮してアルコール分を留去し、全量を約40mlとする。グルコアミラーゼを本液に対して40単位添加し、55℃で0.5時間反応させる。反応後加熱失活(95℃ 30分)し、水で正確に50mlとしてグルコアミラーゼ処理により生成する付加糖量定量用の試料溶液とする。またこの試料溶液を高速液体クロマトグラフ法用移動相で4倍希釈しヘスペリジン、モノグルコシルヘスペリジン定量用の試料溶液とする。別に定量用モノグルコシルヘスペリジン約20～100mgを正確に量り高速液体クロマトグラフ法用移動相で正確に200mlとして標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液について、次の操作条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液のヘスペリジン、モノグルコシルヘスペリジンのピーク面積、及び標準溶液のモノグルコシルヘスペリジンのピーク面積を測定し、次式によりヘスペリジンとモノグルコシルヘスペリジンの含量を求める。た

だし各成分の保持時間は、モノグルコシルヘスペリジンに対するヘスペリジンの相対保持時間は1.03～1.13である。

$$\text{モノグルコシルヘスペリジンの含量 (MGH)} = (W_s/W) \times (A_a/A_s) \times 100 \quad (\%)$$

$$\text{ヘスペリジンの含量 (H)} = (W_s/W) \times (A_b \times 0.79/A_s) \times 100 \quad (\%)$$

W_s 定量用モノグルコシルヘスペリジンの採取量(mg)

W 試料の採取量(mg)

A_s 標準溶液のモノグルコシルヘスペリジンのピーク面積

A_a 試料溶液のモノグルコシルヘスペリジンのピーク面積

A_b 試料溶液のヘスペリジンのピーク面積

0.79 ヘスペリジンの分子量/モノグルコシルヘスペリジンの分子量=610/772

操作条件

検出器 紫外吸収検出器(測定波長280nm)

カラム充てん剤 化学結合型オクタデシルシラン

カラム管 内径3.9～4.6mm, 長さ150～300mm

カラム温度 40℃

移動相 水/アセトニトリル/酢酸(80:20:0.01)

流量 1.0ml/分

注入量 10μl

(2) グルコアミラーゼ処理により生成する付加糖量の定量

定量法(1)で得たグルコアミラーゼ処理により生成する付加糖量定量用の試料溶液について、水を用いて同様の方法で処理した液を対照とし、グルコース測定キット(ムタロターゼ・GOD法)により、グルコース量を求め、次の計算式によりグルコアミラーゼ処理により生成する付加糖量を求める。

$$\begin{aligned} \text{グルコアミラーゼ処理により生成する付加糖量 (GG)} \\ &= F \times 50 \times 0.9 \times 100 / [1000 \times (\text{試料の採取量})] \quad (\%) \\ &F \text{ 得られたグルコース量 (mg/ml)} \end{aligned}$$

(3) ヘスペレチン配糖体含量 次の計算式によりヘスペレチン配糖体含量を求める。

$$\text{ヘスペレチン配糖体含量} = \text{MGH} + \text{H} + \text{GG} \quad (\%)$$