

平成 16 年 2 月 6 日

「水溶性アナトー」確認試験(1)(1)三塩化アンチモン代替についての検討結果

株式会社 第一化成

試 料 水溶性アナトー色素 1 Lot LX3976 KY2821 AZ7653
水溶性アナトー色素 2 Lot AY7245 AZ7832 BX8103

検討方法

試料の調製（確認試験(1)）

本品 0.5g に水 20ml を加えて溶かし、硫酸（1→20）2ml を加えて振り混ぜた後、ろ過する。
ろ紙上の残留物を水 20ml ずつで 3 回洗う。

試験方法（確認試験(n)案）

残留物の一部をエタノールに溶かし、その 1 滴をろ紙上にスポットした後、風乾する。
次に 5%亜硝酸ナトリウム溶液 2～3 滴、続けて 0.5mol/L 硫酸 2～3 滴を滴下したとき、ろ
紙上の黄色は脱色する。

結 果

水溶性アナトー色素 1

Lot	1 回目	2 回目	3 回目
LX3976	脱色	脱色	脱色
KY2821	脱色	脱色	脱色
AZ7653	脱色	脱色	脱色

水溶性アナトー色素 2

Lot	1 回目	2 回目	3 回目
AY7245	脱色	脱色	脱色
AZ7832	脱色	脱色	脱色
BX8103	脱色	脱色	脱色

写 真

水溶性アナトー色素 1

1回目 2回目 3回目 1回目 2回目 3回目

Lot LX3976

Lot KY2821

Lot AZ7653

スポット時

5%亜硝酸ナトリウム溶液 2 滴,
続けて 0.5mol/L 硫酸 2 滴を滴下後

水溶性アナトー色素 2

1回目 2回目 3回目 1回目 2回目 3回目

Lot AY7245

Lot AZ7832

Lot BX8103

スポット時

5%亜硝酸ナトリウム溶液 2 滴,
続けて 0.5mol/L 硫酸 2 滴を滴下後

平成 16 年 2 月 4 日

「水溶性アナトー」確認試験(1)(1)三塩化アンチモン代替についての検討結果

ダイワ化成株式会社

試 料 水溶性アナトー色素 Lot A,B,C

検討方法

試料の調製 (確認試験(1))

本品 0.5g に水 20ml を加えて溶かし、硫酸 (1→20) 2ml を加えて振り混ぜた後、ろ過する。ろ紙上の残留物を水 20ml ずつで 3 回洗う。

試験方法 (確認試験(1)案)

残留物の一部をエタノール 10ml に溶かし、その 1 滴をろ紙上にスポットした後、風乾する。次に 5%亜硝酸ナトリウム溶液 2~3 滴、続けて 0.5mol/L 硫酸 2~3 滴を滴下したとき、ろ紙上の黄色は脱色する。

結 果

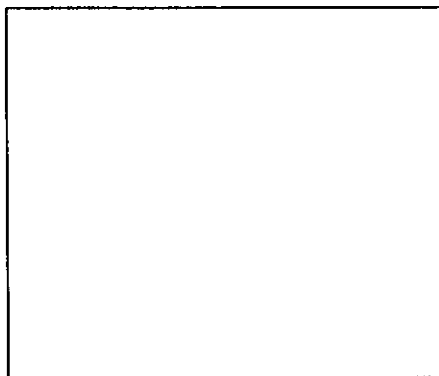
Lot	1 回目	2 回目	3 回目
A	直ちに脱色	直ちに脱色	直ちに脱色
B	直ちに脱色	直ちに脱色	直ちに脱色
C	直ちに脱色	直ちに脱色	直ちに脱色

写 真 1 回目 2 回目 3 回目 1 回目 2 回目 3 回目

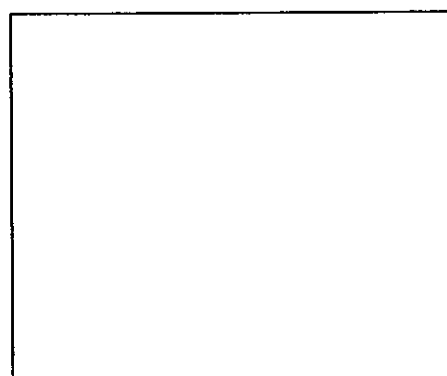
サンプル A

サンプル B

サンプル C



スポット時



5%亜硝酸ナトリウム溶液 2~3 滴、
続けて 0.5mol/L 硫酸 2~3 滴を滴下後

水溶性アナトー (案)

Annatto, Water soluble

CI No 75120

定 義 本品は、ベニノキ *Bixa orellana* L (*Bixaceae*)の種子の赤色被覆物から加水分解を経て作られ、その色素成分は、ノルビキシンのカリウム塩又はナトリウム塩である。

含 量 本品は、ノルビキシシ ($C_{24}H_{28}O_4=380.48$) として表示量の 100~125% を含む。

性 状 本品は、赤褐~褐色の粉末、塊、液体又はペースト状の物質で、わずかに特異なにおいがある。

確認試験 (1) 本品 0.5g に水 20ml を加えて溶かし、硫酸 (1→20) 2ml を加えて振り混ぜた後、ろ過する。ろ紙上の残留物を水 20ml ずつて 3 回洗う。

(i) 残留物の一部に水酸化ナトリウム (1→2,500) を加えて溶かした液は、波長 452~456nm 及び 480~484nm 付近に吸収を認める。

(ii) 残留物の一部をエタノールに溶かし、その 1 滴をろ紙上にスポットした後、風乾する。次に 5% 亜硝酸ナトリウム溶液 2~3 滴、続けて 0.5mol/L 硫酸 2~3 滴を滴下したとき、ろ紙上の黄色は脱色する。

(2) 本品 1g に水 50ml を加えて振り混ぜた後、ろ過する。ろ液に塩酸 (1→4) 2ml を加えるとき、赤褐~黄褐色の沈殿を生じる。

純度試験 (1) 遊離アルカリ 本品 10g を量り、水 100ml を加えて振り混ぜ、1 mol/L 塩酸 8ml を加えてよくかき混ぜ、30 分間放置した後、ろ過した液の pH は、7.0 以下である。

(2) 重金属 Pb として 10 μg/g 以下

本品 2.0g を量り、試料とし、必要があれば水浴上で蒸発乾固した後、第 2 法により操作し、試験を行う。比較液には鉛標準液 2.0 ml を用いる。

(3) ヒ素 As_2O_3 として 4.0 μg/g 以下 (タール色素試験法)

(4) 吸光比 確認試験(1)の(i)と同様に操作して 480~484nm 及び 452~456nm における極大吸収部の吸光度をそれぞれ A_1 及び A_2 とするとき、 A_2/A_1 は 1.11~1.25 である。

定量法 本品 0.1~1g を精密に量り、0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて正確に 100ml とし、よく混和する。この液 1ml を正確に量り、0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて正確に 100ml とする。この液の波長 454nm 付近の極大吸収における吸光度 A を測定し、次式によりノルビキシシの含量を求める。

$$\text{ノルビキシシ (C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{) の含量} = \frac{A}{3,473} \times \frac{100,000}{\text{試料採取量 (mg)}} \times 100 (\%)$$

2 第8版公定書への規格試験法改定案

平成13年度、平成14年度及び今年度の調査結果に基づき、第8版公定書への規格試験法改定案を以下に記載する。【 】は報告年度である。

(1) 着色料

1-1 β -カロテン、デュナリエラカロテン、ニンジンカロテン、パーム油カロテン (確認試験(1)、(2)におけるクロロホルム、三塩化アンチモンの代替)

1) β -カロテン

① 確認試験 (1) 【H13, H15】

本品をアセトン/シクロヘキサン混液(1:1)に溶かした液(1→1000)10mlはだいたい色を呈し、この液1mlにアセトンを加えて25mlにした液5mlに5%亜硫酸ナトリウム溶液1mlを加え、続けて0.5mol/L硫酸1mlを加えるとき、直ちに脱色する。

② 確認試験 (2) 【H15】

本品をアセトン/シクロヘキサン混液(1:1)に溶かした液(1→250)0.5mlにシクロヘキサン1000mlを加えた液は、波長454~456nm及び482~484nmに極大吸収部がある。

2) デュナリエラカロテン

① 確認試験 (1) 【H13, H15】

本品の表示量から、色価2,500に換算して50mgに相当する量を取り、アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)5mlに溶かした液は、だいたい色を呈する。

② 確認試験 (2) 【H15】

本品の表示量から、 β -カロテンとして約1mg/mlになるようにアセトン/シクロヘキサン混液(1:1)に溶かした液1mlにアセトンを加えて25mlとする。この液5mlに5%亜硫酸ナトリウム溶液1mlを加え、続けて0.5mol/L硫酸1mlを加えるとき、直ちに脱色する。

3) ニンジンカロテン

① 確認試験 (1) 【H13, H15】

本品の表示量から、色価200に換算して1gに相当する量を取り、アセトン/シクロヘキサン混液(1:1)10mlに溶かした液は、だいたい色を呈する。

②確認試験 (2) 【H15】

確認試験 (1) の液1mlにアセトンを加えて25mlとする。この液5mlに5%亜硫酸ナトリウム溶液1mlを加え、続けて0.5mol/L 硫酸1mlを加えるとき、直ちに脱色する。

4) パーム油カロテン

①確認試験 (1) 【H13, H15】

本品の表示量から、色価 7,500 に換算して 15mg に相当する量を取り、アセトン／シクロヘキサン混液(1:1)5mlに溶かした液は、だいたい色を呈する。

②確認試験 (2) 【H15】

「デュナリエラカロテン」の確認試験 (2) を準用する。

1-2 水溶性アナー、トウガラシ色素、マリーゴルト色素

(確認試験における三塩化アンチモンの代替)

1) 水溶性アナー 【H15】

確認試験 (1) Ⅱ

残留物の一部をエタノール 10ml に溶かし、その液1滴をろ紙上にスポットした後、風乾する。次に5%亜硫酸ナトリウム溶液2～3滴、続けて0.5mol/L 硫酸2～3滴を滴下するとき、ろ紙上の黄色は脱色する。

2) トウガラシ色素 【H13】

確認試験 (4)

本品の表示量から、色価 300 に換算して 0.2g に相当する量を取り、アセトン 20ml に溶かし、検液とする。検液5 μ lを量り、対照液を用いず、エタノール／シクロヘキサン混液(1:1)を展開溶媒として、薄層クロマトグラフ法により試験を行なうとき、R_f値が0.88～0.96及び0.75～0.90に黄赤色の主スポットを認める。このスポットは5%亜硝酸ナトリウムを噴霧し、続けて0.5mol/L 硫酸を噴霧するとき直ちに脱色する。ただし、薄層板には、担体として薄層クロマトグラフ法用シリカゲルを 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 上昇したとき展開をやめ、風乾した後、5%亜硝酸ナトリウム及び0.5mol/L 硫酸を噴霧する。

3) マリーゴルト色素 【H13】

確認試験 (3)

本品の表示量から、色価 2,500 に換算して 0.1g に相当する量を取り、エタノー

ル／ヘキサン混液(1:1)100mlに溶かし、検液とする。検液5 μ lを量り、対照液を用いず、トルエン／酢酸エチル／エタノール混液(15:4:1)を展開溶媒として、薄層クロマトグラフ法により試験を行なうとき、R_f値が0.8付近(ルテインの脂肪酸エステル)及び0.75~0.90付近(ルテイン)の両方又はいずれかに黄赤色の主スポットを認める。これらのスポットは5%亜硝酸ナトリウムを噴霧し、続けて0.5mol/L硫酸を噴霧するとき直ちに脱色する。ただし、薄層板には、担体として薄層クロマトグラフ法用シリカゲルを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上昇したとき展開をやめ、風乾した後、5%亜硝酸ナトリウム及び0.5mol/L硫酸を噴霧する。

1-3 カラメルⅠ、Ⅲ、Ⅳ【H14】

(純度試験(4-メチルイミダゾール)におけるクロロホルムの代替)

1)カラメルⅠ

純度試験 (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とり、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。この混合物を、底にパイレックスガラスウールを詰めたポリテトラフルオロエタン製止栓の付いた22×300mmクロマトグラフ法用カラム管に移し、カラム管を垂直にクッションのある表面へ約10cmの高さから繰返して落とすことにより混合物がほぼカラム管の底部より250mm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エチルを試料ビーカーを洗浄しながら流し込み、溶媒が止栓に達したとき止栓を閉じる。5分間放置後止栓を開け、カラム管に酢酸エチルを注ぎ250mlの丸底フラスコに流出液約200mlを採る。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の酢酸エチルに溶かしたもの)を丸底フラスコに加え、減圧下35℃以下で酢酸エチルを留去する。残留物をアセトンに溶かして5mlとし、試料溶液とする。別に2-メチルイミダゾール20.0mgをアセトンに溶かして100mlとし、標準溶液とする。試料溶液と標準溶液5 μ ずつを量り、次の操作条件でガスクロマトグラフ法により試験を行なうとき、試料溶液は標準溶液から得られたピークに相当するピークを認めない。

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、75%カーボワックス 20M+
2%水酸化カリウム

カラム管 内径4mm、長さ1m のガラスカラム
キャリアーガス及び流量 窒素ガス, 50ml/分
注入口温度 200 °C
カラム温度 180 °C
検出器温度 250 °C

2)カラメルⅢ

純度試験 (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。

3)カラメルⅣ

純度試験 (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。

(2)増粘安定剤

・ダンマル樹脂【H13】

(確認試験(2)及び純度試験(3)におけるクロロホルムの代替)

①確認試験 (2)

本品の粉末をトルエンに溶かした溶液(1→10)を調製し、検液とする。検液2μlを量り、対照液を用いず、ジエチルエーテル/ヘプタン混液(6/5)を展開溶剤として薄層クロマトグラフ法により試験を行なうとき、R_f値が0.7付近及び0.8付近にスポットを認める。ただし、薄層板には、担体として薄層クロマトグラフ法用シリカゲルを105℃で2時間乾燥したものを使用し、展開溶媒の先端が約10cmの高さに上昇したとき展開をやめ、風乾した後、硫酸を噴霧し、105℃で10分間加熱する。

②純度試験 (3) ヨウ素価 10~40

本品の粉末約1.0gを精密に量り、ガラス容器に入れる。この容器を500mlの共栓フラスコに入れ、トルエン10mlに溶かし、正確にウィイス試液25mlを加えてよく混和する。溶液が澄明にならないときはトルエンを更に追加して澄明にした後、密栓して遮光し20~30℃で時々振り混ぜて30分間放置する。その後ヨウ化カリウム溶液(1→10)20ml及び水100mlを加えて振り混ぜ、遊離したヨウ素を0.1mol/Lチオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する(指示薬 デンプン試液1ml)。別に空試験を行い、次式によりヨウ素価を求める。

$$\text{ヨウ素価} = \frac{(a-b) \times 1269}{\text{試料の採取量 (g)}}$$

- ただし a 空試験における 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の消費量 (ml)
 b 試料を用いたときの 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の消費量 (ml)

(3) 酸化防止剤・ビタミン

1) ビタミンA脂肪酸エステル

(確認試験(1)及び純度試験(2)におけるクロロホルム、三塩化アンチモンの代替)

① 確認試験 (1) 【注】 薄層クロマトグラフ法に変更する。【H13】

本品のビタミン A 1,500 単位に相当する量を量り、石油エーテル 5ml に溶かし、検液とする。検液 5 μ l を量り、シクロヘキサン/ジエチルエーテル混液 (4 : 1) を展開溶媒として薄層クロマトグラフ法により試験を行なうとき、Rf 値 0.09, 0.45 あるいは 0.62 付近に、それぞれビタミン A、ビタミン A 酢酸エステル及びビタミン A パルミチン酸エステルに対応するスポットを認める。ただし、薄層板には担体として薄層クロマトグラフ法用シリカゲル(蛍光剤入り)を 105 $^{\circ}$ C で 2 時間乾燥したものを使用し、展開溶媒の先端が約 10cm の高さに上昇したとき展開をやめ、風乾した後、紫外線照射(主波長 254nm)により検出する。

② 純度試験 (2) トルエン不溶物 【H14】

本品 0.5g を量り、トルエン 30ml に溶かすとき、不溶物を認めない。

注1) 本試験ではクロロホルムにおいても澄明に溶けない。

注2) 現在流通している製品の実態に即さない規格で、削除することが適当である。

2) ビタミンA油

(確認試験及び純度試験(2)におけるクロロホルム、三塩化アンチモンの代替)

① 確認試験 【注】 薄層クロマトグラフ法に変更する。【H13】

ビタミン A 脂肪酸エステルの確認試験(1)、(2)を準用する。

② 純度試験 (2) 【H14】

ビタミン A 脂肪酸エステルの純度試験(2)を準用する。

3) 粉末ビタミン A 【H13】

(確認試験におけるクロロホルム、三塩化アンチモンの代替)

確認試験 【注】 薄層クロマトグラフ法に変更する。

本品のビタミン A 1,500 単位に相当する量を量り、乳鉢ですりつぶし、温湯 10ml を加え

よくかき混ぜて乳状とし、エタノール 10ml を加えて乳化状態をなくす。この液をフラスコに移し、更にヘキサン 20ml を加えてよく振り混ぜた後、静置するか、又は遠心分離して二層に分ける。ヘキサン層を採り、水 20ml を加えてよく振り混ぜて洗い、水層を分離し、ヘキサン層を減圧下で蒸発乾固する。残留分を石油エーテル5ml に溶かし、検液とする。検液5 μ l を量り、ビタミンA脂肪酸エステルの確認試験(1) に準じて薄層クロマトグラフ法により試験する。

(4)ガムヘース・光沢剤

1)シェラック【H13】

(純度試験(4), (5) におけるクロロホルムの代替)

①純度試験 (4) ロシン

本品 20g を無水エタノール 10ml に溶かし、振り混ぜながらヘキサン 50ml を徐々に加える。この液を 200ml の分液漏斗に入れ、水 50ml ずつで2回洗い 上層液を採りろ過し、ろ液を水浴上で蒸発乾固する。残留物を無水酢酸5ml に溶かし(必要なら水浴上で加温する)、20ml 比色瓶に移し、硫酸1滴を加えるとき、紫赤色→紫色→黄土色の呈色をしない。

②純度試験 (5) ロウ 含ロウ品 55 %以下 脱ロウ品 02 %以下

本品 100g に炭酸ナトリウム溶液(1→60)150ml を加え、水浴上で振り混ぜて溶かし、更に時計皿で覆い、静置したまま3時間加熱した後、水で1時間以上冷却する。浮遊するロウをろ取し、ロウ及びろ紙を水で洗った後、ビーカーに入れ、ほとんど水がなくなるまで 65℃以下で乾燥し、ロウをろ紙とともにソックスレー抽出器内の円筒ろ紙に入れる。ビーカーにはヘキサンを適量注ぎ、加温してロウを溶かし、先の円筒ろ紙に入れ、ヘキサンで2時間抽出する。ヘキサン液を蒸発乾固し、残留物を 105℃で3時間乾燥し、質量を測定する。

2)ポリイソブチレン

(純度試験(5) における四塩化炭素、酢酸第二水銀の代替)

(純度試験(6) におけるヘンセンの代替)

①純度試験 (5) 総不飽和物 20 %以下【H14】

本品を切断して細片とし、その約 0.5g を精密に量り、シクロヘキサン 100ml を加え、密栓して一夜放置して溶かす。不溶物が残る場合は、約1時間振り混ぜて完全に溶かし、ガラス容器に入れる。この容器を 500ml 共栓フラスコ中に入れ、正確にウィイス液 15ml を加えてよく混和する。溶液が澄明にならないときは、シクロヘキサンを添加して澄明にした後、密栓して遮光し、20~30℃でときどき振り混ぜて 30 分放置する。その後、ヨウ化カリウム溶液(1→10)20ml 及び水 100ml を加えて振り混ぜ、遊離した

ヨウ素を 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する(指示薬 デンプン試液 1ml)。別に空試験を行い、次式により総不飽和物の含量を求める。

$$\text{総不飽和物含量} = \frac{187 \times (a-b) \times 0.1}{\text{試料の採取量(g)}} \quad (\%)$$

ただし a 空試験における 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の消費量(ml)

b 本試験における 0.1mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の消費量(ml)

②純度試験 (6) 低重合体 12%以下【H13】

本品を切断して細片とし、その約 10g を精密に量り、シクロヘキサン 40ml を加え、還流冷却器を付け、時々振り混ぜながら水浴上で加熱して溶かす。冷後、メタノール 40ml を加えよく振り混ぜた後、冷所に1時間静置する。上澄液をフラスコに移し、約 50°Cで減圧留去し、減圧デシケーター中で 20 時間乾燥し、残留物の質量を精密に測る。

(5) 乳化剤

1) ショ糖脂肪酸エステル【H14】

(純度試験 (2) におけるクロロホルムの代替)

純度試験 (2) ジメチルホルムアミド ジメチルホルムアミドとして 10 μg/g 以下

本品 200g を 20ml のメスフラスコに量り、テトラヒドロフランに溶かして、正確に 20ml とし、試料溶液とする。別に、ジメチルホルムアミド 100mg を 100ml のメスフラスコに量り、テトラヒドロフランに溶かして正確に 100ml とする。この液 1ml を正確に量り、テトラヒドロフランを加えて正確に 100ml とする。更に、この液 1ml を正確に量り、テトラヒドロフランを加えて正確に 100ml とし、比較液とする。試料溶液及び比較液 10 μl ずつを量り、次の操作条件でガスクロマトグラフ法により試験を行うとき、試料溶液のジメチルホルムアミドのピーク面積は、比較液のジメチルホルムアミドのピーク面積を超えない。

操作条件

検出器 窒素リン検出器

カラム充填剤 ガスクロマトグラフ法用ポリエチレングリコールを 0.5 μm の厚さでコーティングしたもの。

カラム管 内径 0.32mm, 長さ 30m のケイ酸ガラス製の細管

注入温度 40°C で 2 分間保持し、その後、毎分 20°C で昇温し、160 °C に到達後 2 分間保持する。

注入口温度 180 °C

検出器温度 325 °C

注入方式 スプリットレス

キャリアーガス及び流量 ヘリウムを用いる。シメチルホルムアミトのピークが約 64 分後に現れるように流量を調整する。

2) ソルビタン脂肪酸エステル【H13】

(純度試験(4)におけるクロロホルムの代替)

純度試験(4)

本品 0.1g を量り、イソオクタン 10ml に溶かし、水 20ml を加え、加温してよく振り混ぜ、冷後、放置するときイソオクタン層は青色を呈さない。

3) プロピレングリコール脂肪酸エステル

(確認試験(2)及び純度試験(4)におけるクロロホルムの代替)

① 確認試験(2)【H14】

本品約 5g にエタノール製水酸化カリウム試液 50ml を加え、還流冷却器を付け、水浴中で 1 時間加熱する。この液のメタノール液(1→5)を検液とする。メタノール/プロピレングリコール混液(9/1)及びメタノール/グリセリン混液(9/1)を対照液とし、それぞれの液 5 μ l についてアセトン/水混液(9/1)を展開溶媒として薄層クロマトグラフ法により試験を行なうとき、対照液のプロピレングリコールと同位置に黄褐色のスポットを認める。また、更に対照液のグリセリンと同位置に黄褐色のスポットを認めることもある。ただし、薄層板には、担体として薄層クロマトグラフ法用シリカゲルを 110°C で 1 時間乾燥したものを使用し、展開溶媒の先端が原線より 15cm の高さに上昇したときに展開をやめ、風乾し、110 °C で 10 分間加熱して溶媒を除き、冷後、チモール・硫酸試液を噴霧した後、110 °C で 20 分間加熱して呈色させる。

② 純度試験(4)【H13】

ソルビタン脂肪酸エステルの純度試験(4)を準用する。

4) レシチン【H14】

(水分試験におけるクロロホルムの代替)

【注】水分規格を乾燥減量規格に変更する。

乾燥減量 20 % 以下 (30g, 105 °C 1 時間)

試料の厚みが 5mm 以下になるようにひょう量瓶の径を選択する。試料が塊状あるいは高粘度の場合にあつては海砂 15g を加えて、速やかに 2mm 以下に粉碎又は均質に混合して測定試料とする。

(6)強化剤

1)グルコン酸亜鉛【H13】

(純度試験(1)におけるシアン化カリウムの代替)

【注】 重金属規格を鉛規格に変更する。

純度試験(1) 鉛 Pbとして10 μ g/g以下

本品100gを量り、硝酸1ml及び水20mlに溶かし、水を加えて正確に100mlとして検液とし、第2法により操作を行なう。

2)硫酸亜鉛【H13】

(純度試験(2)におけるシアン化カリウムの代替)

【注】 重金属規格を鉛規格に変更する。

純度試験(2) 鉛 Pbとして10 μ g/g以下

本品100gを量り、硝酸1ml及び水20mlに溶かし、水を加えて正確に100mlとして検液とし、第2法により操作を行なう。

(7)調味料

・塩化カリウム【H13】

(純度試験(2)、(3)におけるクロロホルムの代替)

① 純度試験(2) 臭化物 Brとして0.10%以下

本品10gを量り、水に溶かして500mlとする。この液5mlを量り、希フェノールレッド試液2ml及びクロラミンT溶液(1→10,000)1mlを加え、直ちに混和し、2分間放置後、1mol/Lチオ硫酸ナトリウム溶液0.15mlを加えて混和した後、水を加えて10mlとして、検液とする。別に臭化カリウムを110℃で4時間乾燥した後、その2.979gを正確に量り、水に溶かして正確に1,000mlとし、更に、この液1mlを正確に量り、水を加えて正確に1,000mlとする。この液5mlを正確に量り、以下、検液と同様に操作し、比較液とする。検液及び比較液につき、波長590nmにおける吸光度を測定するとき、検液の吸光度は比較液の吸光度よりも大きくない。

② 純度試験(3) ヨウ化物

本品5gを量り、亜硝酸ナトリウム溶液(1→10)0.15ml、希硫酸1ml、デンプン試液25ml及び水25mlを用時混合したものを滴下して湿らせる。5分後、自然光下で観察するとき、青色を呈さない。

(8)製造用剤

1)シリコーン樹脂【H14】

(純度試験(1)、(2)、(4)における四塩化炭素の代替)

①純度試験(1) 抽出シリコーンの屈折率 $n_D^{25} = 1.400 \sim 1.410$

本品 20g を量り、ヘキサン 100ml を加えてよく振り混ぜてよく分散させた後 毎分 10,000 回転で 30 分間程度遠心分離する。上澄液を分取し 残留物にヘキサンを加えてよく振り混ぜた後、再び遠心分離する。上澄液を分取し、先の上澄液と合わせ、水浴上でヘキサンを減圧留去して得た粘性の液を検液として、屈折率を測定する。

②純度試験(2) 抽出シリコーン油の動粘度 $100 \sim 1,100 \text{mm}^2 \text{s}^{-1}$

純度試験(1) の検液の 25℃における動粘度を測定する。

③純度試験(4)

純度試験(1)で抽出した後の残留物を窒素ガス気流下で熱分解を行い、シリコーン油部分をクラッキング分解で揮散させ、残留物の質量を量る。

2)モルホリン脂肪酸塩【H13】

(確認試験(1)におけるヘンセンの代替)

確認試験(1)

本品の水溶液にワックスを加えて乳化した被膜剤 50g に薄めた塩酸(3→5)10g を加え、時々かき混ぜながら水浴中で 10 分間加熱した後放冷する。析出した固形分をろ過して除き、ろ液を水酸化ナトリウム試液でアルカリ性にする。この液をメタノールで1/3に希釈して試料溶液とする。別に、モルホリンのメタノール溶液(1→200)を調製し、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10μl ずつを量り、次の操作条件でガスクロマトグラフ法により試験を行うとき、試料のピークの保持時間は、モルホリンのピークの保持時間に一致する。

操作条件

検出器 水素炎イオン化検出器

カラム充填剤

膜厚 0.25 μm

液相 担体に対して、5%のフェニルメチルポリシロキサン

カラム温度 50℃に1分間保持し、毎分 10℃で 250℃まで昇温し 更に毎分5℃で 325℃まで昇温する。

キャリアーガス及び流量 窒素を用いる。約 1.2ml/分の一定量

(9)香料

1,8-シネオール【H13】

(純度試験(6)における硝酸第二水銀の代替)

純度試験(6)

本品 10ml を量り, 水5ml を加え, ホウ酸ナトリウム溶液(1→500)4ml 及び 2,6-ジクロロキノクロイミトの小結晶を加えて振り混ぜるとき, 液は, 青～青紫色を呈さない。

以上

Ⅱ 分担研究報告書

5 食品中の天然添加物の分析法に関する研究

分担研究者 扇間 昌規

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

分担研究報告書

食品中のヤマモモ抽出物の HPLC による定量

分担研究者 扇間昌規（武庫川女子大学薬学部）

研究要旨 我が国の「食品中の食品添加物の定量法」は、ほとんど全ての食品に適用できる事を目標にし、指定添加物に関しては1970～1980年にかけて作成できた

しかしながら、既存添加物に関する定量法については、未だ不備な点が数多く残っている

今年度は、酸化防止剤として既存添加物名簿に記載されているヤマモモ抽出物の各種食品からの簡便、迅速な定量法として HPLC による分析法を検討した

A. 研究目的

ヤマモモ抽出物は既存添加物名簿に記載されている酸化防止剤で、調味料、飲料、菓子、乳製品など最近多くの加工食品に使用され出した。今回、ヤマモモ抽出物の主成分であるミリントリンおよびミリセチンを中心に食品からのヤマモモ抽出物の HPLC による一斉分析法を検討した。

B. 研究方法

1 試験法の概要

食品中のヤマモモ抽出物は、固相カラムによる前処理を行った後、UV 検出器付き HPLC を用いてグラフェント溶出による一斉分析を行う。

2 試験法

(1) 検体採取および試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

液体食品(50 mL)は直接、固体食品(50～500g)はフードミルで粉砕後、適当な溶媒(酢酸エチル等)で抽出した後、固相カ

ラム (Sep-Pak Plus C18 Cartridge 360 mg) に負荷し、先ず、水で洗浄し不用物質を除去する。次にメタノール アセトニトリル (80/20) 20 mL でヤマモモ抽出物を溶出させ、溶出液を濃縮乾固後、メタノールに溶解させ試験液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

各標準品の標準原液(1mg/mL)をメタノールで調製した後、さらにメタノールを用いて適宜希釈した。

(4) 測定法

測定条件

UV 検出器付き HPLC にて、次の条件によって測定する。

充填剤 オクタデシル基結合ノリカケル
カラム Inertsil ODS-2 粒子径 3 μm
(250×46 mm I D)

ガードカラム Inertsil ODS-3
(5×46 mm I D GL カート)
以上 GL サイエンス社製

移動相 (A) アセトニトリル
(B) 0.01% リン酸

を以下のリニアグラデーションプログラムにて使用する。(移動相 A の比率)

0 ~ 5 分, 25% → 30%

5 ~ 16 分, 30%

流速 1.0 mL/min

波長 256 nm

カラム温度 30 °C

装置 ポンプ PU-980、検出器 UV-970
日本分光(株)製

3 検量線

各標準原液 (1mg/mL) を種々の濃度に希釈し、その 10 μ L を HPLC に注入した。得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、絶対検量線法により作成した。

4 試薬

- (1) ミリントリン
- (2) ミリセチン
- (3) ヤマモモ抽出物
- (4) リン酸 特級
- (5) メタノール HPLC 用
- (6) アセトニトリル HPLC 用

C. 研究結果

1 操作のフローチャートを下記に示す。

試料

↓
Sep-Pak Plus C18 Cartridge 360 mg に負荷

↓

H₂O で洗浄

↓

CH₃OH/CH₃CN (80/20) で溶出

↓

濃縮乾固

↓

CH₃OH で溶解

↓

HPLC で分析

2 検量線

ミリントリンおよびミリセチンの良好な検量線 ($r^2 = 0.992 \sim 0.998$) が得られた。

3 本法によるヤマモモ抽出物の添加回収実験の結果を示す。

(n=3)

試料	回収率 (%)	
	ミリントリン	ミリセチン
飲料	101.9	97.8
乳製品	90.6	89.0
菓子	92.1	89.8

4 本法によるヤマモモ抽出物の試料中の含量を示す。

(n=3)

試料	含量 (μ g/g)	
	ミリントリン	ミリセチン
飲料	3.35	不含
乳製品	0.33	不含
菓子	不含	不含

D 考察

まず、ヤマモモ抽出物 (ミリントリンおよびミリセチン) の HPLC 分析条件を検討した結果、ODS カラムを用いて、移動相にアセトニトリルと 0.01% リン酸を用いたグラデーション溶出法により、25 分以内に 2 成分を完全に分離定量できることが判明した。ヤマモモ抽出物 (ミリントリンおよびミリセチン) の紫外吸収スペクトルを測定したところ、いずれも 256 nm 付近に吸収極大波長を示したことから、UV 検出器の検出波長は 256 nm とした。前処理として、固相カラムによる方法を検討した。その結果、逆相系の Sep-Pak Plus C18 Cartridge に負荷し溶出液にメタノール/アセトニト

リル (80 20) を使用することにより、不
用物質が除去でき、またヤマモモ抽出物
(ミリシトリンおよびミリセチン) の回収
率も良く再現性のある結果が得られた。

E. 結論

各種食品中のヤマモモ抽出物 (ミリント
リンおよびミリセチン) の定量法を固相カ
ラムによる前処理と HPLC による分析条件
について検討した。本法を数種の市販食品
に適用したところ、再現性のある定量結果
が得られ、またヤマモモ抽出物 (ミリント
リンおよびミリセチン) の添加回収率は、
88% 以上の良好な結果であった。

F. 健康危機管理情報

本研究で得られた結果において、上記に
関する特筆すべき知見は特に無かった。

G. 研究発表

今後、学会発表及び学会誌に投稿する予
定である。

Ⅱ 分担研究報告書

- 6 食品香料を含む食品添加物の確認試験法としての
赤外吸収スペクトルに関する研究

分担研究者 齋藤 寛