

W : 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (g 又は ml)

(5) 試薬・試液

1) L-ロイシル-p-ニトロアニリド塩酸塩 (市販試薬生化学用)

たとえば, 和光純薬工業製 (製品番号 124-02253) 又は同等品が使用できる。

2) p-ニトロアニリン (市販試薬特級)

たとえば, 和光純薬工業製 (製品番号 147-01542) 又は同等品が使用できる。

3) 0.05mol/l リン酸緩衝液 (pH7.0)

第1液: リン酸一カリウム 6.81 g を水に溶かして 1,000ml とする。

第2液: リン酸二ナトリウム 12 水塩 17.6g を水に溶かして 1,000ml とする。

第1液と第2液を混ぜ, pH4.0 に調整する。

4) 0.1mol/l トリス緩衝液 (pH8.0)

第1液: トリス 121 g に脱塩水 (Milli-Q 水) を加え, 1000 ml とする。

第2液: 2M 塩酸

第1液 100 ml に第2液 32 ml を加え, 脱塩水を加えて 1000 ml とする。適宜水酸化ナトリウム溶液または塩酸にて, pH を 8.0 に調整する。

## アミノペプチダーゼ測定結果

品名 スミチームFLAP (基原: *Aspergillus oryzae* 由来)

| 規格項目                                       | 規格   | 測定回数  | 製造番号                |                     |
|--|--|-------|---------------------|---------------------|
|  |  |       | 050111T3-10         | 050111T3-23         |
| 性状   | 白～濃褐色の粉末若しくは粒状又はペースト状、又は無～濃褐色の液状である。においはないか又は特異なにおいがある | 3回    | 濃褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある | 濃褐色の粉末で僅かに特異なにおいがある |
| 確認試験                                       | 酵素活性を示す  | ①     | 酵素活性を示した            | 酵素活性を示した            |
|  |  | ②     | 酵素活性を示した            | 酵素活性を示した            |
|  |  | ③     | 酵素活性を示した            | 酵素活性を示した            |
| 鉛  | Pbとして<br>5.0 μg/g 以下                                   | ①     | 5.0 μg/g 以下         | 5.0 μg/g 以下         |
|  |  | ②     | 5.0 μg/g 以下         | 5.0 μg/g 以下         |
|  |  | ③     | 5.0 μg/g 以下         | 5.0 μg/g 以下         |
| ヒ素   | As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として<br>4.0 μg/g 以下      | ①     | 4.0 μg/g 以下         | 4.0 μg/g 以下         |
|  |  | ②     | 4.0 μg/g 以下         | 4.0 μg/g 以下         |
|  |  | ③     | 4.0 μg/g 以下         | 4.0 μg/g 以下         |
| 細菌数  | 10,000/g 以下  | ①     | 100/g 以下            | 100/g 以下            |
|  |  | ②     | 100/g 以下            | 100/g 以下            |
|  |  | ③     | 100/g 以下            | 100/g 以下            |
| 大腸菌  | 認めない   | ①     | 認めない                | 認めない                |
|  |  | ②     | 認めない                | 認めない                |
|  |  | ③     | 認めない                | 認めない                |
| 酵素活性<br>アミノペプチダーゼ活性測定法<br>(ペプチダーゼ活性測定法第2法) | 単位/g   | ①     | 5,280               | 8,470               |
|  |  | ②     | 5,280               | 8,210               |
|  |  | ③     | 5,370               | 8,240               |
|  |  | ④     | 5,460               | 8,370               |
|  |  | ⑤     | 4,960               | 7,520               |
|  |  | ⑥     | 5,060               | 7,520               |
|  | 平均 (n=6)   | 5,235 | 8,055               |                     |
|  | 標準偏差   | 189   | 425                 |                     |
|  | CV (%)   | 3.62  | 5.27                |                     |
| 最大値  | 5,460  | 8,470 |                     |                     |
| 最小値  | 4,960  | 7,520 |                     |                     |

\* 確認試験の方法

アミノペプチダーゼ活性測定法 (ペプチダーゼ活性測定法第2法) に準じた。

\* 酵素活性測定法の測定条件

試料液 : ペプチダーゼ活性測定法第2法で 0.16~0.40 単位/ml になるように本品に水を加えて溶解し、試料液とした。

製造番号 050111T3-10 (1→18,000)

製造番号 050111T3-23 (1→30,000)

# ムラミダーゼ

Muramidase

**定 義** 本品は、放線菌 (Actinomyces, Streptomyces) 又は細菌 (Bacillus) の培養物より得られた、ムコ多糖類を加水分解する酵素である。乳糖、デキストリン、ブドウ糖又はショ糖を含むことがある。

**酵素特性** 本品は、細菌の細胞膜物質を溶解する。ペプチドグリカンの N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸間、及びキトデキストリンの N-アセチル-D-グコサミン基間の  $\beta$ -1,4 結合を加水分解する。

ECナンバー (参考) : EC 3.2.1.17 (peptidoglycan N-acetylmuramoylhydrolase)

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

**確認試験** 酵素活性測定法のムラミダーゼ活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す。

**純度試験** (1) 鉛 Pb として  $5.0 \mu\text{g/g}$  以下 (2.0g, 第1法)

(2) ヒ素  $\text{As}_2\text{O}_3$  として  $4.0 \mu\text{g/g}$  以下 (0.50g, 第3法, 装置B)

**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、細菌数は 10,000 以下である。また、大腸菌は認めない。

**酵素活性測定法** 酵素活性測定法のムラミダーゼ活性測定法により試験を行う。但し、測定条件 (反応温度, 反応 pH, 緩衝液の種類, 試料希釈液等) は、ムラミダーゼの基原, 性質に応じて適切なものを選択する。

## ムラミダーゼ活性測定法

酵素を *Bacillus subtilis* K168 株の分散・懸濁液に作用させ、溶菌作用による吸光度(濁度)の減少を測定して酵素活性を求める方法である。

### (1) 試料溶液

操作法により試験するとき、溶菌酵素活性が試料濃度に比例する範囲内の濃度になるように、本品に適量の水(又は適切な緩衝液、塩類溶液)を加えて溶かし、試料溶液とする。その濃度は通例 7.5~10 単位/ml である。

### (2) 基質溶液

*Bacillus subtilis* K168 株のアセトン処理乾燥菌体を波長 640nm における吸光度が 1.2~1.4 になるように、pH6.2 リン酸緩衝液に良く分散・懸濁する。基質溶液は測定毎に調製を行い、氷冷で保存し、30 分以内に使用する。

### (3) 操作法

均一に懸濁した基質溶液 3.8ml を正確に試験管に量り、 $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で 3 分間加温した後、試料溶液 200  $\mu\text{l}$  を正確に加えて直ちに振り混ぜ、直ちに層長 10mm のセルに移す。これを直ちに分光光度計(セルホルダーを  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に設定)に移して、波長 640nm における吸光度を経時的に測定する。測定開始より 3 分後、10 分後の吸光度をそれぞれ  $A_3$ 、 $A_{10}$  とする。

又、ブランクとして、pH6.2 リン酸緩衝液 200  $\mu\text{l}$  を用いて同様な操作を行い、波長 640nm の吸光度を経時的に測定し、測定開始より 3 分後、10 分後の吸光度をそれぞれ  $B_3$ 、 $B_{10}$  とする。

その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1 分間に吸光度を 0.001 減少させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g 又は単位/ml)} = \frac{(A_3 - A_{10}) - (B_3 - B_{10})}{7} \times 1,000 \times \frac{1}{W}$$

但し、

|          |   |                               |
|----------|---|-------------------------------|
| $A_{10}$ | : | 反応 10 分後の酵素反応液の 640nm における吸光度 |
| $A_3$    | : | 反応 3 分後の酵素反応液の 640nm における吸光度  |
| $B_{10}$ | : | 反応 10 分後のブランクの 640nm における吸光度  |
| $B_3$    | : | 反応 3 分後のブランクの 640nm における吸光度   |
| 7        | : | 反応時間 (分)                      |
| 1,000    | : | 吸光度 0.001 を 1 単位への換算係数        |
| W        | : | 試料液 1ml 中の試料の量 (g 又は ml)      |

### (4) 試薬・試液

#### 1) pH6.2 リン酸緩衝液

第 15 改正 日本薬局方 リン酸緩衝液 pH6.2 を使用する。

#### 2) *Bacillus subtilis* K168 株のアセトン処理乾燥菌体

*Bacillus subtilis* K168 株を LB 培地 50ml で、約 18 時間培養 (500ml 容三角フラスコ、 $37^\circ\text{C}$ 、160rpm) する。この培養液を LB 培地 500ml に植菌し、4~5 時間培養 (3 L 容バッフル付き三角フラスコ、 $37^\circ\text{C}$ 、80rpm) する。波長 660nm における吸光度が約 1.8 になることを確認する。

この培養液を遠心分離 (8,000rpm、15 分、 $10^\circ\text{C}$ ) で菌体を回収する。菌体を 50ml の水で洗浄し、遠心分離 (8,000rpm、15 分、 $10^\circ\text{C}$ ) で菌体を回収する。

この菌体を 50ml のアセトンに十分分散させ、遠心分離 (8,000rpm、15 分、 $10^\circ\text{C}$ ) で菌体を回収する、同じアセトン分散操作をもう一度繰り返す。得られたアセトン処理菌体を一晩室温で真空乾燥し、*Bacillus*

subtilis K168 株のアセトン処理乾燥菌体とする。

LB培地

|                       |      |
|-----------------------|------|
| トリプトン（ベクトン・ディッキンソン社製） | 1%   |
| 酵母エキス（ベクトン・ディッキンソン社製） | 0.5% |
| 塩化ナトリウム               | 1%   |

pH無調整、

殺菌条件：121℃、20分

## ムラミダーゼ測定結果

名 ムラミダーゼ NAGASE (基原: Streptomyces sp. 由来、同定中)

| 見格項目 | 規格   | 測定回数 | 製造番号            |                 |                 |
|------|--|------|-----------------|-----------------|-----------------|
|      |  |      | MRD-1           | MRD-2           | MRD-3           |
| 性状   | 白～濃褐色の粉末若しくは粒状又はペースト状、又は無～濃褐色の液状である。においはないか又は特異なおいがある。 | ①    | 黄褐色の粉末で特異なおいがある | 黄褐色の粉末で特異なおいがある | 黄褐色の粉末で特異なおいがある |
|      |  | ②    | 黄褐色の粉末で特異なおいがある | 黄褐色の粉末で特異なおいがある | 黄褐色の粉末で特異なおいがある |
|      |  | ③    | 黄褐色の粉末で特異なおいがある | 黄褐色の粉末で特異なおいがある | 黄褐色の粉末で特異なおいがある |
| 確認試験 | 酵素活性を示す  | ①    | 酵素活性を示した        | 酵素活性を示した        | 酵素活性を示した        |
|      |  | ②    | 酵素活性を示した        | 酵素活性を示した        | 酵素活性を示した        |
|      |  | ③    | 酵素活性を示した        | 酵素活性を示した        | 酵素活性を示した        |
| 鉛    | Pbとして<br>5.0 μg/g 以下                                   | ①    | 5.0 μg/g 以下     | 5.0 μg/g 以下     | 5.0 μg/g 以下     |
|      |  | ②    | 5.0 μg/g 以下     | 5.0 μg/g 以下     | 5.0 μg/g 以下     |
|      |  | ③    | 5.0 μg/g 以下     | 5.0 μg/g 以下     | 5.0 μg/g 以下     |
| ヒ素   | As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> として<br>4.0 μg/g 以下      | ①    | 4.0 μg/g 以下     | 4.0 μg/g 以下     | 4.0 μg/g 以下     |
|      |  | ②    | 4.0 μg/g 以下     | 4.0 μg/g 以下     | 4.0 μg/g 以下     |
|      |  | ③    | 4.0 μg/g 以下     | 4.0 μg/g 以下     | 4.0 μg/g 以下     |
| 細菌数  | 10,000/g 以下  | ①    | 100/g 以下        | 100/g 以下        | 100/g 以下        |
|      |  | ②    | 100/g 以下        | 100/g 以下        | 100/g 以下        |
|      |  | ③    | 100/g 以下        | 100/g 以下        | 100/g 以下        |
| 大腸菌  | 認めない   | ①    | 認めない            | 認めない            | 認めない            |
|      |  | ②    | 認めない            | 認めない            | 認めない            |
|      |  | ③    | 認めない            | 認めない            | 認めない            |
| 酵素活性 | 単位/g   | ①    | 139             | 153             | 144             |
|      |  | ②    | 142             | 142             | 146             |
|      |  | ③    | 136             | 151             | 148             |
|      |  | ④    | 139             | 150             | 138             |
|      |  | ⑤    | 149             | 145             | 147             |
|      |  | ⑥    | 156             | 148             | 151             |
|      | 平均 (n=6)   |      | 144             | 148             | 146             |
|      | 標準偏差   |      | 7.6             | 4.1             | 4.4             |
|      | CV (%)   |      | 5.3             | 2.8             | 3.0             |
|      | 最大値  |      | 156             | 153             | 151             |
|      | 最小値  |      | 136             | 142             | 138             |

\* 確認試験の方法

ムラミダーゼ活性測定法

\* 酵素活性測定の条件

試料液 : ムラミダーゼ活性測定法で 7.5~10 単位/ml になるようにリン酸緩衝液で溶解し、試料溶液とした。

第一部会(甘味料)既存添加物自主規格検討結果報告書  
——既策定自主規格案の見直し——

「ブラジルカンゾウ抽出物」の定量法の見直し

1. 平成16年3月に報告した規格案をもとに「第4版 自主規格書式設定要領(案)」等に基づき、字句修正を行った。
2. 定量法として、下記に示す理由により新たに「質量分析計検出器による液体クロマトグラフィー」を検討した。

理由

- ブラジルカンゾウ抽出物中の甘味成分であるペリアンドリン類（ペリアンドリンⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ）の定量では、標準品は市販されておらず、またそれらを調整することも困難なため、入手可能なグリチルリチン酸標準品を定量用試薬として用いていた。
- その方法は、紫外吸光光度計検出による液体クロマトグラフィーによるもので、ペリアンドリン類およびグリチルリチン酸の分子内に存在する三残基のカルボキシル基を4-ニトロベンジル化し、高感度に検出するものであった。
- このUVラベル化法の欠点としては、
  - (1) 4-ニトロベンジル化の反応率が各ペリアンドリンで異なり、安定した感度比が保たれない傾向が見受けられたこと。
  - (2) 4種のペリアンドリン類は、ラベル化により極性の差が小さくなり、液体クロマトグラフィーで4種を分別定量することが不可能であること。が、挙げられる。
- これらの欠点を解消できる定量方法を検討し、多くの研究機関で導入され一般的になってきた質量分析計を検出器とする高速液体クロマトグラフィーが適当であると思われた。この方法は、検体のラベル化は必要なく、4種のペリアンドリンを個別に、かつ高感度に検出できるものである。

3. 試験結果

- 質量分析計による定量方法を規格案としてまとめた（ブラジルカンゾウ抽出物規格案参照）。
- この方法では、グリチルリチン酸、ペリアンドリンⅠ及びⅡの検出には  $Q1/Q3 = 821.2/351.0$  を、また、ペリアンドリンⅢ及びⅣの検出には  $Q1/Q3 = 823.2/351.0$  を用いた。これは、化合物間での定量値の差異を極力少なくするために、親イオンとしての分子量821.2（または823.2）をフラグメント化し、グリチルリチン酸及び4種のペリアンドリンに共通な、 $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-(1→2)- $\beta$ -D-glucuronopyranoside 残基イオンの分子量である351.0を検出するものである。

- 規格案の方法で試験したブラジルカンゾウ抽出物の分析結果を表1に示す。比較のため従来の紫外吸光光度計検出による結果も併記した。
- 2種の定量法におけるグリチルリチン酸およびブラジルカンゾウ抽出物の代表的な溶出パターンを資料1～4として添付する。

表1. ブラジルカンゾウ抽出物の分析結果

| ロット番号       |                            | 050308      | 050703      | 060224      |       |
|-------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| 純度試験        | 不溶物 (%)                    | 7.2         | 6.4         | 1.5         |       |
|             | 液性 (pH)                    | 5.06        | 4.92        | 4.87        |       |
|             | 重金属                        | 10 µg/g 以下  | 10 µg/g 以下  | 10 µg/g 以下  |       |
|             | ヒ素                         | 2.0 µg/g 以下 | 2.0 µg/g 以下 | 2.0 µg/g 以下 |       |
| 乾燥減量 (%)    |                            | 2.74        | 2.41        | 2.77        |       |
| 強熱残分 (%)    |                            | 6.99        | 5.79        | 6.77        |       |
| 見かけの<br>定量値 | 質量分析計<br>検出による<br>方法 (%)   | Exp. 1      | 9.56        | 15.46       | 10.19 |
|             |                            | Exp. 2      | 9.62        | 15.08       | 10.38 |
|             |                            | Exp. 3      | 9.79        | 15.19       | 10.51 |
|             |                            | 平均          | 9.7         | 15.2        | 10.4  |
|             |                            | CV (%)      | 1.24        | 1.28        | 1.55  |
|             | 紫外吸光光<br>度計検出に<br>よる方法 (%) | Exp. 1      | 3.79        | 5.76        | 3.86  |
|             |                            | Exp. 2      | 3.61        | 6.01        | 3.69  |
|             |                            | Exp. 3      | 3.42        | 6.35        | 3.52  |
|             |                            | 平均          | 3.6         | 6.0         | 3.7   |
|             |                            | CV (%)      | 5.13        | 4.90        | 4.61  |

#### 4. 考察

- 表1から、質量分析計検出による試験結果と、従来案の紫外吸光光度計検出による方法とで見かけの定量値（補正係数を考慮していない値、即ち、グリチルリチン酸標準品とペリアンドリン類の検出感度比を1:1として定量した値）が大きく異なった。  
この詳細の確認のため、当社で精製したペリアンドリンI～IV、およびグリチルリチン酸標準品（各々100 µg/ml）を用いて試験を実施し比較した。  
表2に、グリチルリチン酸標準品のクロマトピークエリア値を100としたときの試験結果を示す。



表2. 2種の定量法における各化合物間でのエリア値の比較

|                    |        | グリシリン酸 | ペリアンドリン<br>I | ペリアンドリン<br>II | ペリアンドリン<br>III | ペリアンドリン<br>IV |
|--------------------|--------|--------|--------------|---------------|----------------|---------------|
| 質量分析計検出<br>による方法   | Exp. 1 | 100    | 120.50       | 98.70         | 135.04         | 145.13        |
|                    | Exp. 2 | 100    | 118.19       | 95.18         | 133.88         | 143.25        |
|                    | Exp. 3 | 100    | 121.35       | 96.26         | 132.26         | 142.04        |
|                    | 平均     | 100    | 120.0        | 96.7          | 133.7          | 143.5         |
|                    | CV(%)  | -      | 1.36         | 1.86          | 1.04           | 1.09          |
| 紫外吸光光度計<br>検出による方法 | Exp. 1 | 100    | 41.50        | 38.98         | 48.25          | 41.27         |
|                    | Exp. 2 | 100    | 43.12        | 38.28         | 49.02          | 40.66         |
|                    | Exp. 3 | 100    | 42.36        | 37.62         | 47.68          | 40.43         |
|                    | 平均     | 100    | 42.3         | 38.3          | 48.3           | 40.8          |
|                    | CV(%)  | -      | 1.91         | 1.78          | 1.39           | 1.06          |

- 表2から、定量法の違いによる感度比の違いは大きく、更にペリアンドリン間でも無視できないほどの差があることが確認された。
- 現段階では、質量分析計検出による方法での定量計算式には0.8程度の補正係数を設定することが適当であると考え（規格案へは未反映）。
- 質量分析計検出による方法と紫外吸光光度計検出による方法のいずれも再現性があり、定量法としての条件は備えていると考え。3回の測定結果のばらつき（CV(%)；変動係数＝標準偏差／平均値 x 100）をみても定量法としての感度も十分に備えた方法であると思われる。
- しかしながら、その定量感度は、紫外吸光光度計検出によるものは質量分析計検出によるものの1/100であり、ラベル化は他の成分の妨害を受ける可能性があることから、甘味成分を分別して、分子量という要素で直接高感度に測定できる質量分析計検出による方法は、これからの時代に求められる高精度分析に対応できるものと考え。
- 高感度であること、他の化合物の妨害を受けにくいこと、および、4種のペリアンドリンを分別定量できることから、質量分析計検出器を用いた方法が優れており、本定量法を採用すべきであると考え。
- 今後、高純度のペリアンドリンI～IVを調製し、化合物ごとの定量値の違いが、一定のファクターとして表せるものかどうか明らかにする必要があると思われる。

#### ○ブラジルカンゾウの定義について

ブラジルカンゾウの学名については、既存添加物名簿収載品目リストの基原・製法・本質で、Periandra dulcis と記載されている。しかし以下の理由から Periandra mediterranea (Vellozo) Taubert が正しい学名と考えられる。

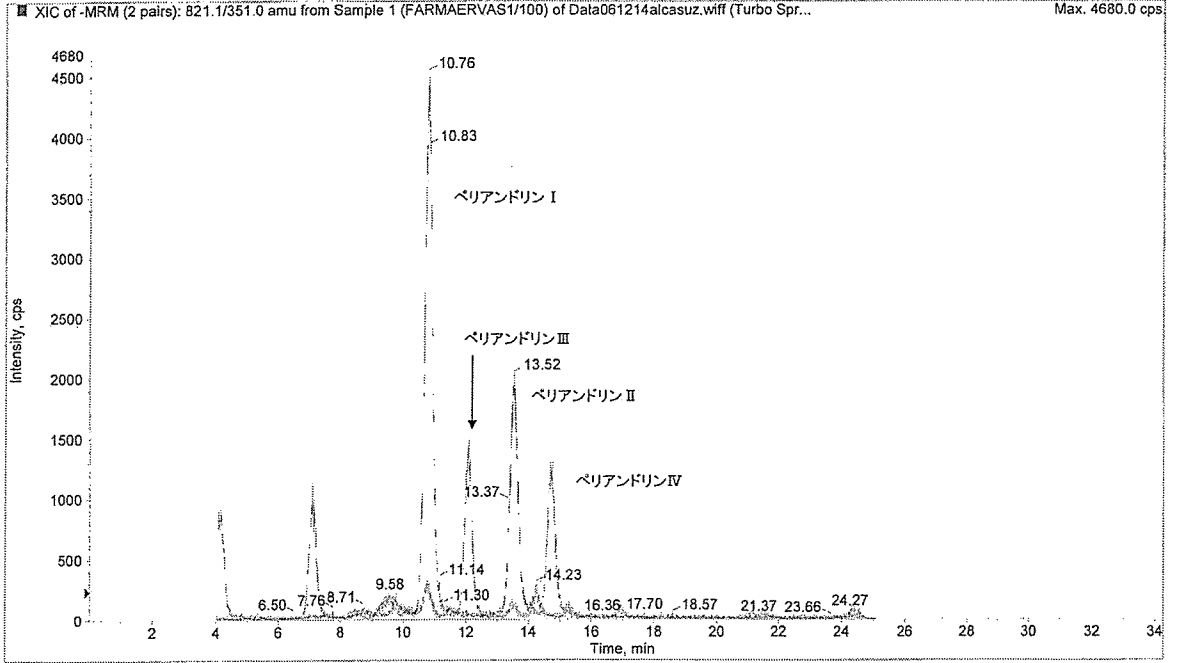
ブラジルカンゾウは、1829年 Vellozo が、カンゾウと同じ Glycyrrhiza 属の一種として Glycyrrhiza mediterranea の学名で報告した。その後1838年 Martius により属名が修正され、Periandra dulcis とされ、更に1894年には、学名の命名規則に従い、Taubert により Periandra mediterranea が正しい学名とされた。

資料1. LC/MS/MS チャート(ブラジルカンゾウ抽出物 Lot. 060224)

Printing Date: Wednesday, January 10, 2007  
 Printing Time: 7:01:45 PM

Analyst Version: 1.4.1  
 Page 1 of 1

Polarity/Scan Type: Negative MRM  
 Acq. Date: Thursday, December 14, 2006  
 Acq. Time: 17:48

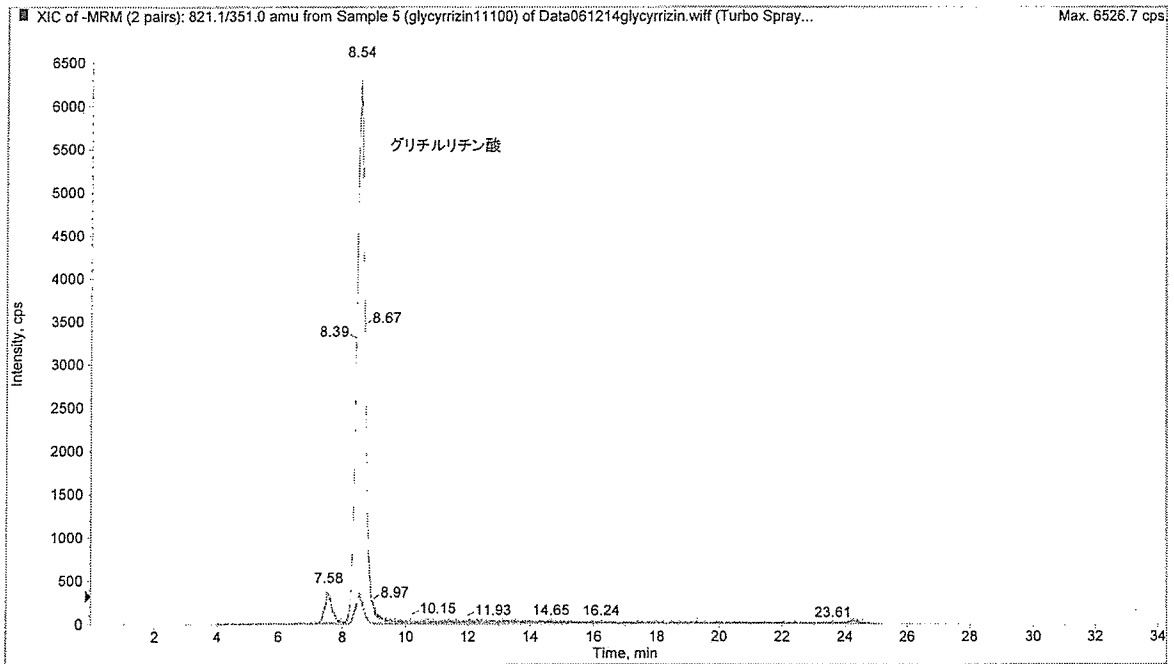


資料2. LC/MS/MS チャート(グリチルリチン酸)

Printing Date: Wednesday, January 10, 2007  
 Printing Time: 7:03:50 PM

Analyst Version: 1.4.1  
 Page 1 of 1

Polarity/Scan Type: Negative MRM  
 Acq. Date: Thursday, December 14, 2006  
 Acq. Time: 13:11

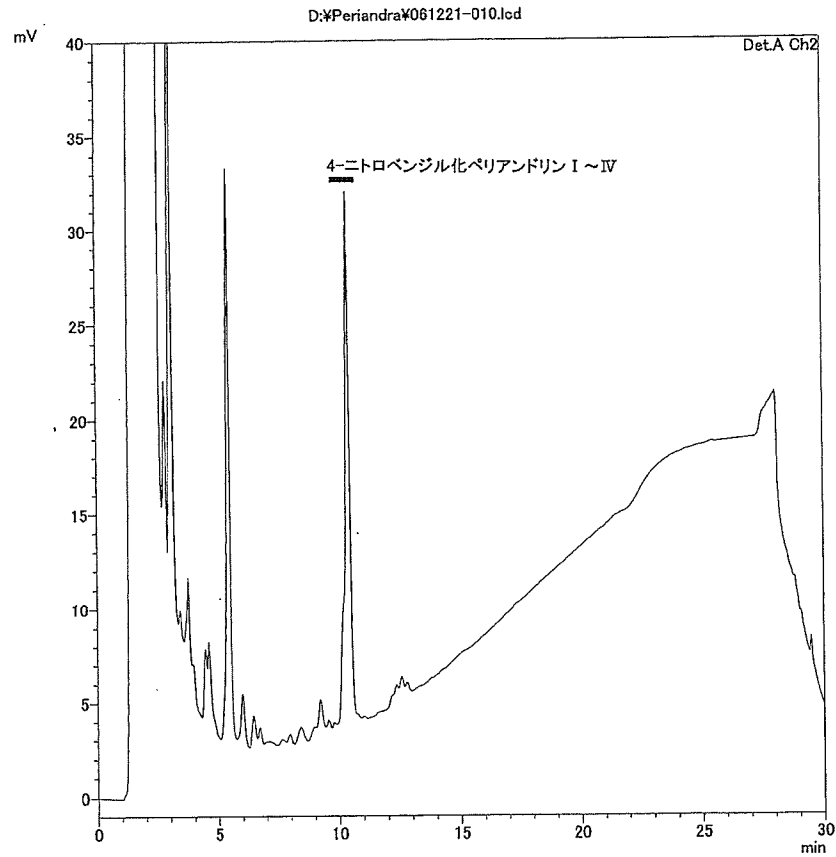


資料3. UV ラベル化法 HPLC チャート(ブラジルカンゾウ抽出物 Lot. 060224)

==== Shimadzu LCsolution 分析レポート ====

分析者 : Administrator  
サンプル名 : 061221-10  
サンプルID : Lot.060224  
トレイ番号 : 1  
バイアル番号 : 10  
注入量 : 1 uL  
データファイル : 061221-010.lcd  
メソッドファイル : pNBPD定置.lcm  
バッチファイル : pNBPD定置0612121.lcb  
レポートファイル : Default.lcr  
分析日時 : 2006/12/21 22:20:24  
解析日時 : 2007/01/10 18:28:08

<クロマトグラム>

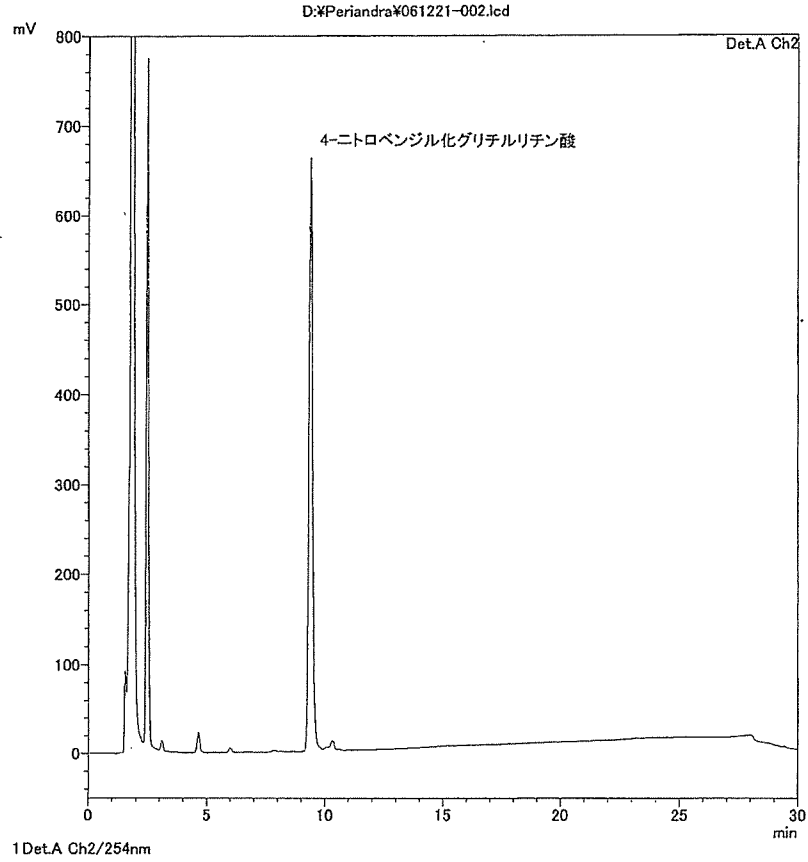


D:\\*Periandra\*061221-010.lcd

==== Shimadzu LCsolution 分析レポート ====

分析者 : Administrator  
サンプル名 : 061221-2  
サンプルID : グリチルリチン酸  
バイアル番号 : 2  
注入量 : 1 uL  
データファイル : 061221-002.lcd  
メソッドファイル : pNBPD定置.lcm  
バッチファイル : pNBPD定置061221.lcb  
レポートファイル : プラカンレポート.lcr  
分析日時 : 2006/12/21 15:36:40  
解析日時 : 2007/01/10 18:34:09  
コメント

<クロマトグラム>



D:\\*Periandra\061221-002.lcd

# ブラジルカンゾウ抽出物

Brazilian Licorice Extract

ペリアンドリン

**定義** 本品は、ブラジルカンゾウ (*Periandra dulcis* Mart.) の根から得られた、ペリアンドリンを主成分とするものをいう。

**含量** 本品を乾燥したものは、ペリアンドリンとして2.0%以上を含む。

**性状** 本品は、黄～茶褐色の粉末、薄片、粒、又は塊である。

**確認試験** (1) 本品 0.01～0.1g を量り、20%エタノール5ml に溶かし、検液とする。別に薄層クロマトグラフィー用グリチルリチン酸を20%エタノール5ml に溶かし、対照液とする。検液及び対照液2 $\mu$ l ずつを量り、クロロホルム/メタノール/水/酢酸混液(15:7:1:1)を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行うとき、検液は、 $R_f$ 値0.07付近及び0.13付近に赤紫～青紫色のスポットを認める。また対照液は、 $R_f$ 値0.05付近に赤紫～青紫色のスポットを認める。ただし、薄層板は、薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製したものを105℃で2時間乾燥した後用いる。展開溶媒の先端が原線より10cmの高さに上昇したとき展開を止め、風乾した後、呈色液を噴霧し80℃以上で乾燥した後、自然光下で観察する。呈色液は、エタノール/硫酸混液(19:1)100ml にバニリン1gを溶かし調製する。

(2) 本品につき定量法の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、ペリアンドリンI, III, II, IVのピークが、それぞれ保持時間約10.8, 12, 13.5, 14.8分付近に溶出する。このとき、グリチルリチン酸標準品のピークは保持時間約8.5分に溶出する。

**純度試験** (1) 不溶物 本品を乾燥し、その5.0gに20%エタノール100mlを加えて攪拌し、質量既知のろ紙を用いてろ過し、20%エタノールで洗った後、残留物を105℃で2時間乾燥するとき、その量は1.0g以下である。

(2) 液性 pH 3.5～6.5 (1.0g, 20%エタノール100ml)

(3) 重金属 Pbとして10 $\mu$ g/g以下 (2.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

(4) ヒ素 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として2.0 $\mu$ g/g以下 (1.0g, 第3法, 装置B)

**乾燥減量** 8.0%以下 (105℃, 2時間)

**強熱残分** 8.0%以下

**定量法** 本品を乾燥し、その約0.25gを精密に量り、20%エタノールに溶かし正確に50mlとし、その2.0mlを正確に量り、20%エタノールに溶かし正確に100mlとし、検液とする。別に、グリチルリチン酸標準品を乾燥し、その約0.025gを精密に量り、検液の場合と同様に操作し、標準液とする。検液及び標準液1 $\mu$ l ずつを量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。検液の4種のペリアンドリンのピーク面積の和 $A_T$ 及び標準液のグリチルリチン酸のピーク面積 $A_S$ を測定し、次式により含量を求める。但し、4種のペリアンドリンの保持時間は、グリチルリチン酸の保持時間が8.5分のとき、約11～15分となる。

$$\text{ペリアンドリンの含量} = \frac{\text{グリチルリチン酸標準品の採取量 (g)}}{\text{試料の採取量 (g)}} \times \frac{A_T}{A_S} \times 100 (\%)$$

#### 操作条件

検出器 質量分析計 (ネガティブモードエレクトロスプレーイオン検出器)

タンデム型質量分析計 (MS/MS) では分子イオン 821.2 (グリチルリチン酸、ペリアンドリン I、ペリアンドリン II) および 823.2 (ペリアンドリン III、ペリアンドリン IV) を検出、フラグメント化し、351.0 (グルクロニルグルクロン酸イオン) を検出する。

シングル型質量分析計 (MS) では分子イオン 821.2 および 823.2 を検出する。

カラム充填剤 5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 3 mm, 長さ 15 cm のステンレス管

カラム温度 40°C

移動層 A : 水/酢酸アンモニウム (999 : 1)

B : アセトニトリル

濃度勾配 A : B (80 : 20) から A : B (70 : 30) まで直線濃度勾配を 30 分間行う。

流量 グリチルリチン酸の保持時間が約 8.5 分になるように調製する (0.4 ml/分)

#### (参考)

定量法 紫外吸光光度計検出器を用いる液体クロマトグラフィー

本品を乾燥し、その約 0.25g を精密に量り、ジメチルホルムアミドに溶かし正確に 50 ml とし、その 1.0 ml を正確に量り、4-ニトロベンジルブロミドジメチルホルムアミド溶液 (1 → 20) 0.4 ml 及びトリエチルアミン 0.01 ml を加え、50°C で 2 時間加熱し、4-ニトロベンジル誘導体とし、冷後、検液とする。別に、グリチルリチン酸標準品を乾燥し、その約 0.025g を精密に量り、検液の場合と同様に操作し、標準液とする。検液及び標準液 1 μl ずつを量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。検液のペリアンドリン誘導体のピーク面積  $A_T$  及び標準液のグリチルリチン酸誘導体のピーク面積  $A_S$  を測定し、次式により含量を求める。但し、4 種のペリアンドリン誘導体の保持時間は、グリチルリチン酸誘導体の保持時間が 9.5 分のとき、10~12 分となり、この保持時間内の全てのピークをペリアンドリン誘導体ピークとする。

$$\text{ペリアンドリンの含量} = \frac{\text{グリチルリチン酸標準品の採取量 (g)}}{\text{試料の採取量 (g)}} \times \frac{A_T}{A_S} \times 100 (\%)$$

#### 操作条件

検出器 紫外吸光光度計 (測定波長 254 nm)

カラム充填剤 3～7 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 2～5 mm, 長さ 10～30 cm のステンレス管

カラム温度 40℃

移動層 A : 水 / トリフルオロ酢酸混液 (999 : 1)

B : アセトニトリル / トリフルオロ酢酸混液 (999 : 1)

濃度勾配 A : B (50 : 50) から A : B (0 : 100) まで直線濃度勾配を 20 分間行う。

流量 グリチルリチン酸誘導体の保持時間が約 10 分になるように調製する (約 1.0 ml/分)

### 試薬・試液

・トリエチルアミン (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N 本品は、無色透明の液で、強いアミン臭がある。

比重 d<sub>4</sub><sup>20</sup> 0.722～0.730

沸点 89～90℃

・4-ニトロベンジルブロミド NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>Br 本品は、黄～黄褐色の針状結晶で、エタノール、エーテル、酢酸に溶けやすく、水に溶けにくい。

・薄層クロマトグラフィー用グリチルリチン酸 C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>·nH<sub>2</sub>O 白色の結晶性の粉末で、異なる甘味がある。熱湯又はエタノールに溶けやすく、ジエチルエーテルにほとんど解けない。融点：213～218℃ (分解)。

純度試験 類縁物質 本品 0.010 g を 50%エタノール 5 mL に溶かし、検液とする。この液 1 mL を正確に量り、50%エタノールを加えて正確に 100 mL とし、標準液とする。検液及び標準液 10 μL につき、「カンゾウ抽出物」の確認試験を準用し、試験を行うとき、検液から得た R<sub>f</sub> 値約 0.3 の主スポット以外のスポットは、標準液から得たスポットより濃くない。

### 参考情報

カラム充てん剤 和光純薬工業(株)、Wakosil-II 5C18 (4.0 x 200 mm)

Waters、XTerra RP18 5μm (3.0 x 150 mm)

トリエチルアミン 和光純薬工業(株)、特級 (Cat No. 208-02643)

4-ニトロベンジルブロミド 東京化成工業(株) (Cat No. N 0181)

2007年3月

研究年月日 : 2006年4月~2007年2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)、グリコ栄養食品 (株)、三栄源I7・I7・I7 (株)、仙波糖化工業 (株)、(株) 第一化成、三井製糖 (株)、ヤエガキ醗酵技研株式会社)

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)、森田フードシステム (株))

### 褐色(フラボノイド)系着色料における差別化の検討(I)の件

目的: 既存添加物及び一般飲食品添加物に記載されている褐色(フラボノイド)系着色料について差別化の方法を検討する。

本研究は褐色系着色料の公定規格化に向け、平成14年度の厚生労働科学研究に引き続き、既に自主規格として設定している褐色系色素の規格について差別化を主として見直しを行い、業界内で継続的に行った検討結果をまとめたものである。現在のところ結論には達していないが、今後も継続し検討する。

褐色(フラボノイド)系着色料は、カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素、ペカンナッツ色素、チコリ色素において、主成分の特定が不十分であることが指摘されており、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クエルセチンが微量にしか存在されていないもの等フラボノイド系着色料については、主色素成分の特定されていないものが多い。その性質上、類似の性質を示すため差別化が非常に困難となっている。また、上記色素と類似な使用法や性質を持つカラメル色素(I, III, IV)を含めて原体の確認試験法の確立及び、各色素の定性分析をめざし、指標物質の検索等を目的として試験法の調査を実施し、確認試験方法への利用を検討した。

検討内容:

- (1) 褐色(フラボノイド)系着色料の文献調査の実施
- (2) 確認試験方法の検討

#### 【褐色(フラボノイド)系着色料の文献調査の実施】

褐色(フラボノイド)系着色料: カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、コウリヤン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素、ペカンナッツ色素、チコリ色素について文献調査を実施し、【参考資料A】に調査結果一覧表を作成した。



#### 【確認試験方法の検討】

褐色(フラボノイド)系着色料を取り扱う企業の知見や調査した文献などを基にし、検討試験法を検討作成し確認試験として実施した。評価サンプルについては、着色料を扱う企業から代表サンプルを集め、各社に同一ロットサンプルを配布し、ほぼ同時期に実施した。

#### 検討試験法

##### ① 塩化第二鉄反応

各色素水溶液に塩化第二鉄溶液(1→10)を加えて、液色と沈殿の有無を調べる。検液5mlに対し塩化第二鉄溶液(1→10)2～3滴添加し攪拌後放置

##### ② 塩酸-イソアミルアルコール反応

各色素水溶液に4mol/L塩酸を添加し、イソアミルアルコールを加え分配したとき、沈殿の有無を調べる。検液5mlに対し4mol/L塩酸5ml添加し、ついでイソアミルアルコール5ml添加し攪拌後放置

##### ③ 塩酸-ホルマリン反応

各色素溶液に、Steasny 試薬(塩酸10ml, 30%ホルマリン20ml, 水5mlの混液)を添加し加熱後放置し、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、加熱し、室温にて放置

##### ④ バニリン硫酸法

各色素水溶液に、バニリン試薬(Vanilin 1gに70%硫酸を加えて溶かし100mlとする)を添加し、室温放置後反応液の吸光値を測定する。検液5mlにバニリン試薬10mlを10～15秒かけて滴下し、攪拌後、15分放置し、500nmにおける吸光値を測定する。この際、色素を添加していない水についてブランク試験を行い補正する。

##### ⑤ 塩化亜鉛

各色素溶液に、5%塩化亜鉛(pH7.0)水溶液を添加し、さらに2%KOH水溶液を加え沈殿の有無を調べる。検液5mlに5%塩化亜鉛(pH7)水溶液を5滴添加し、さらに2%KOH水溶液を5滴添加し、攪拌後、室温にて放置

##### ⑥ 塩化亜鉛(pH3.0)反応

各色素溶液に、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)を添加し、沈殿の有無を調べる。検液5mlに対し5%塩化亜鉛(pH3.0)水溶液100 $\mu$ l添加し攪拌後室温にて放置

##### ⑦ Folin-CIOCALTEU'S (ポリフェノール)反応

各色素水溶液に、Folin-CIOCALTEU'S 試薬(SIGMA -F9252)を添加し、攪拌後、20%炭酸ナトリウム水溶液を添加し、室温放置後反応液の吸光値を測定する。検液5mlにFolin-CIOCALTEU'S 試薬5mlを加えて、攪拌後、1分放置し、さらに、20%炭酸ナトリウム水溶液5mlを加えて攪拌後1時間室温放置し765nmにおける吸光値を測定する。この際、色素を添加していない水についてブランク試験を行い補正する。

##### ⑧ 塩酸-マグネシウム反応

各色素溶液に、エタノールを添加し、ついで金属マグネシウムを添加後、10%塩酸を添

加し、沈殿の有無を調べる。検液 1ml にエタノール 5ml を加え、金属マグネシウム粉末少量を添加、水中で冷却しながら 10%塩酸数 ml を少しずつ添加し攪拌後室温にて放置

⑨ 塩酸-亜鉛反応

各色素溶液に、エタノールを添加し、ついで亜鉛粉末を添加後、10%塩酸を添加し、沈殿の有無を調べる。検液 1ml にエタノール 5ml を加え、亜鉛粉末少量を添加、水中で冷却しながら 10%塩酸数 ml を少しずつ添加し攪拌後室温にて放置

⑩ 塩化アルミニウム反応

各色素溶液に 1%塩化アルミニウム-アルコール溶液添加し、沈殿の有無を調べる。検液 5ml に 1%塩化アルミニウム-アルコール溶液を 5 滴添加し攪拌後室温にて放置

⑪ アンモニア検出確認法

各色素溶液 (1g に、2 mol/L NaOH を添加し、pH 試験紙 (リトマス試験紙) の色の変化を観察する。検液 20ml に 2 mol/L NaOH を 20ml 添加し、サンプル瓶の内部にイオン交換水で浸した pH 試験紙 (リトマス試験紙) をつるし、40℃の温浴中で 5 分間加熱する。

⑫ 5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-HMF) の確認法 (HPLC 分析)

○検液の調製

(コウリヤン色素) 色価 20 換算 0.5g 相当量を秤量し、エタノール：緩衝液\* = 4 : 6 の溶液を加えて正確に 100ml とする。これを 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し、検液とする。

(他の色素) 色価 20 換算 0.5g 相当量を秤量し、緩衝液\*を加えて正確に 100ml とする。これを 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し、検液とする。

(緩衝液) 0.05M リン酸二水素カリウム溶液と 0.005M 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液を等量混合し、リン酸で pH3.0 に調整する。

○HPLC 条件

検出器 : 紫外吸光光度計 (測定波長 285nm)  
カラム充てん剤 : 5~10 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル (例 : L-Column ODS (φ4.6×250mm))  
カラム温度 : 室温  
流速 : 1.0ml/分  
注入量 : 20 μl  
移動層 : 緩衝液 : メタノール = 92.5 : 7.5

○検量線

5-HMF (5-Hydrxymethyl furfural) 0.100g を正確に量り、水を加えて溶かし正確に 1000ml とし標準液とする (この液 1 ml は 5-HMF 100 μg を含む)。標準液 25ml 及び 50ml をそれぞれ正確に採り、水を加えて正確に 100ml とし、検量線用標準液とする (これらの液 1 ml はそれぞれ 5-HMF 0, 25, 50 μg 及び 100 μg を含む)。検量線用標準液から 20 μl ずつを採り、高速液体クロマトグラフィーにより、得られたピーク面積から検量線を作成する。

○定量

得られたピーク面積と検量線により、試料中の 5-HMF 濃度を算出する。

⑬ 4-メチルイミダゾール (4-MeI) の確認法 (GC分析)

カラメル I, III, IVの純度試験 (公定書法) 4-メチルイミダゾールにおけるクロロホルム代替法

○GC条件 (分析条件例)

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

○実験方法

抽出操作とガスクロマトグラフィー分析

本品の固形分 10g 換算量を精密に量り、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、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ついた 22×300mm クロマトグラフ用カラム管に移し、カラム管を垂直にクッションある表面へ約 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低部より 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に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 4-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を 5 μずつ量り、上記の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。

⑭ 蛍光スペクトルの測定

○検液の調整

色価 20 に換算して 0.25 g に相当する試料を緩衝液に溶解し、2 mol/L 塩酸または水酸化ナトリウムを用いて pH を 3.0 に調整後、緩衝液で 100 ml とした。これを 0.45 μメンブレンフィルターで濾過したものを検液とした。

○緩衝液

0.005 mol/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウムと 0.05 mol/L リン酸二水素カリウム溶液を等量混合し、リン酸で pH を 3.0 に調整したものを緩衝液とした。コウリャン色素はエタノール：緩衝液=4：6 に混合したものをを用いた。

## ○方法

測定機：蛍光分光光度計 FP-770（日本分光）または蛍光分光光度計 RF-1500（島津製作所）

測定条件：

### <蛍光スペクトル測定>

励起波長：366nm  
吸収波長：400～600nm  
データ間隔：0.5nm  
走査速度：100nm/min

### <励起スペクトル測定>

励起波長：280～400nm  
吸収波長：450nm  
データ間隔：0.5nm  
走査速度：100nm/min

## 【検討試験の結果】

検討結果の特徴的な結果は下記に記載する。また、参考資料としてまとめた。

【参考資料 B】 各色素検体数と試験法との対比表

【参考資料 C】 試験結果一覧表

【参考資料 D】 実験結果写真（代表例）

### ① 塩化第2鉄反応

第一版自主規格より褐色フラボノイド系着色料の確認試験として取り入れられている方法で、ポリフェノール成分、特にタンニン類との呈色反応が知られている。褐色フラボノイド系着色料の全てにおいて沈殿物が生成した。カラメル色素の一部に沈殿が生成しないものもあった。

### ② 塩酸-イソアミルアルコール反応

プロアントシアニジンの検出法として知見がある。コウリャン色素、タマネギ色素、タマリンド色素でイソアミルアルコール層が呈色される場合があったが、ハンドリングにより上下層に色合いが分かれることもあり、沈殿を形成する場合があった。

### ③ 塩酸-ホルマリン反応

カテキン類や縮合型タンニンは沈殿を生じ、加水分解型タンニンは沈殿しないことがいわれている。フラボノイド系茶色色素は沈殿反応を示し、カラメル色素の一部に沈殿があった。カラメルⅢでは沈殿物はなかった。試験法として厚生労働科学研究に報告したが、ホルマリンがハザード物質のため規格化は不適と考えた。

### ④ バニリン硫酸法

カテキンやプロアントシアニジンを呈色することで知見がある。チコリ色素、ピーナッツ色素、ペカンナッツ色素に強い反応があった。

自主規格においてはチコリ色素、ペカンナッツ色素で、確認試験として採用している。

### ⑤ 塩化亜鉛（pH7.0）反応

フラボン類に呈色することが知られている。すべての着色料について沈殿物が確認された。

### ⑥ 塩化亜鉛（pH3.0）反応（改良法）

⑤の試験の改良法