

クチナシ青色素

Gardenia Blue

定 義 本品は、クチナシ (*Gardenia augusta* Merrill 又は *Gardenia jasminoides* Ellis) の果実から得られたイリドイド配糖体とタンパク質分解物の混合物に 8-グルコシダーゼを添加して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。

色 価 本品の色価 ($E_{1\%}^{1cm}$) は 50 以上で、その表示量の 90~110%を含む。

性 状 本品は、暗紫~青色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なおいがある。

確認試験 (1) 本品の表示量から、色価 50 に換算して 0.2g に相当する量を取り、クエン酸緩衝液 (pH7.0) 100ml に溶かした液は、青~青紫色を呈する。

(2) 本品をクエン酸緩衝液 (pH7.0) に溶かした液は、波長 570~610nm に極大吸収部がある。

(3) 本品の表示量から、色価 50 に換算して 0.2g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この液 5ml に塩酸 1~2 滴を加えた後、次亜塩素酸ナトリウム試液 1~3 滴加えるとき、速やかに色が消える。

(4) 本品の表示量から色価 50 に換算して 0.2g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この液 5ml に水酸化ナトリウム溶液 (1→25) 5ml を加え、40~43℃で 20 分間加熱するとき、明らかな色の変化は認められない。

純度試験 (1) 重金属 Pb として 40 μ g/g 以下 (0.50g, 第 2 法, 比較液 鉛標準液 2.0ml)

(2) 鉛 Pb として 8.0 μ g/g 以下 (1.25g, 第 1 法)

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

(4) メタノール 0.10%以下 (色価 50 に換算)

本品の表示量から、色価 50 に換算して 1.00g に相当する量を 10ml のメスフラスコに正確に量り、水を加えて溶かし、内標準溶液 2ml を正確に加えた後、更に水を加えて 10ml とし、試料液とする。グラフアイトカーボンミニカラム (500mg) にエタノール 4ml, 続いて水 10ml を注入し、流出液は捨てる。このカラムに正確に 1ml の試料液を注入し、流出液を 5ml のメスフラスコにとる。次に、水を注ぎ、流出液の総量が 5ml になるまで青色素が溶出しないような速さで流し、得られた流出液を検液とする。別にメタノール 0.50g を量り、水を加えて正確に 100ml とする。この液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とする。更にこの液 2ml を正確に量り、内標準溶液 2ml を正確に加えた後、水を加えて正確に 50ml とし、比較液とする。ただし、2-プロパノール 0.50g を量り、水を加えて 100ml とし、更にこの液 10ml を量り、水を加えて 100ml とし、内標準溶液とする。検液及び比較液をそれぞれ 2.0 μ l ずつ量り、次の操作条件でガスクロマトグラフィーを行うとき、検液の 2-プロパノールのピーク面積に対するメタノールのピーク面積の比は、比較液の 2-プロパノールのピーク面積に対するメタノールのピーク面積の比を超えない。

操作条件

検出器 水素炎イオン化検出器

カラム充填剤 180~250 μ m のガスクロマトグラフィー用スチレン-ジビニルベンゼン系多孔性樹脂

カラム管 内径 3~4mm、長さ 1~2m のガラス管又はステンレス管

カラム温度 120℃付近の一定温度 注入口温度 160~200℃

キャリアーガス 窒素又はヘリウム

流量 メタノールの保持時間が2～4分になるように調整する。

色価測定法 色価測定法により次の操作条件で試験を行う。

操作条件

測定溶媒 クエン酸緩衝液 (pH7.0)

測定波長 波長 570～610nm の極大吸収部

〈参考情報〉

グラファイトカーボンミニカラム (500mg) : SEP cartridge CARBOGRAPH 500mg/6 ml

Cat. No. 5010-23010 (ジーエルサイエンス社製)

ガスクロマトグラフィー用カラム : 180～250 μ m のスチレン-ジビニルベンゼン系多孔性樹脂
Gaskuropack 54 60/80 メッシュ Cat. No. 1002-45406 (ジーエルサイエンス社製)

活栓 : ニードルチップ (ストップコックバルブ付き) (ウォーターズ社製)

〈試薬・試液〉

クエン酸緩衝液 (pH7.0)

第1液 : クエン酸 21g を量り、水を加えて溶かし、1,000ml とする。

第2液 : リン酸二ナトリウム 71.6g を量り、水を加えて溶かし、1,000ml とする。

第1液 35 容量と第2液 165 容量とを混和する。必要ならば、更にいずれかの液を加えて pH7.0 に調整する。

次亜塩素酸ナトリウム NaClO 「次亜塩素酸ナトリウム」 ただし、有効塩素 5% 以上のものを用いる。

次亜塩素酸ナトリウム試液 次亜塩素酸ナトリウムを有効塩素 5% としたものを用いる。

グラファイトカーボンミニカラム (500mg) 内径 10～15mm のポリエチレン製のカラム管に、グラファイトカーボン 500mg を充てんしたもの、又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

ガスクロマトグラフィー用スチレン-ジビニルベンゼン系多孔性樹脂

スチレン-ジビニルベンゼン系多孔性樹脂、ガスクロマトグラフィー用を見よ。

スチレン-ジビニルベンゼン系多孔性樹脂、ガスクロマトグラフィー用

ガスクロマトグラフィー用に製造したものを用いる。

クチナシ赤色素

Gardenia Red

定 義 本品は、クチナシ (*Gardenia augusta* Merrill 又は *Gardenia jasminoides* Ellis) の果実から得られたイリドイド配糖体のエステル加水分解物とタンパク質分解物の混合物に β -グルコシダーゼを添加して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。

色 価 本品の色価 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) は 50 以上で、その表示量の 90~110% を含む。

性 状 本品は、暗赤紫~赤色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なにおいがある。

確認試験 (1) 本品の表示量から、色価 50 に換算して 0.2g に相当する量を取り、酢酸緩衝液 (pH4.0) 100ml に溶かした液は、赤~赤紫色を呈する。

(2) 本品を酢酸緩衝液 (pH4.0) に溶かした液は、波長 520~545nm に極大吸収部がある。

(3) 本品の表示量から、色価 50 に換算して 0.2g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、この液 5ml に塩酸 1~2 滴を加えた後、次亜塩素酸ナトリウム試液 1~3 滴を加えるとき、速やかに色が消える。

(4) 本品の表示量から色価 50 に換算して 0.2g に相当する量を取り、水を加えて 100ml とし、検液とする。検液 5ml に水酸化ナトリウム溶液 (1→25) 5ml を加えてアルカリ性にするとき、濁りを生じる場合があるが、明らかな色の変化は認められない。また、検液 5ml に塩酸 1~3 滴を加えるとき、濁りを生じる場合があるが、明らかな色の変化は認められない。

純度試験 (1) 重金属 Pb として $40\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第 2 法, 比較液 鉛標準液 2.0ml)

(2) 鉛 Pb として $8.0\mu\text{g/g}$ 以下 (1.25g, 第 1 法)

(3) ヒ素 As_2O_3 として $4.0\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第 3 法, 装置 B)

色価測定法 色価測定法により次の操作条件で試験を行う。

操作条件

測定溶媒 酢酸緩衝液 (pH4.0)

測定波長 波長 520~545nm の極大吸収部

〈試薬・試液〉

酢酸緩衝液 (pH4.0) 無水酢酸ナトリウム 2.95g を量り、水 900ml を加えて溶かし、酢酸を滴加して pH4.0 に調整した後、水を加えて 1,000ml とする。

クチナシ黄色素

Gardenia Yellow

定 義 本品は、クチナシ (*Gardenia augusta* Merrill 又は *Gardenia jasminoides* Ellis) の果実から得られた、クロシン及びクロセチンを主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。

色 価 本品の色価 ($E_{1\text{cm}}^{10\%}$) は 100 以上で、その表示量の 90~120% を含む。

性 状 本品は、黄~暗赤色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なにおいがある。

確認試験 (1) 本品の表示量から色価 100 に換算して 0.1g に相当する量を取り、0.02mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100ml を加えるとき、黄色を呈する。

(2) 本品の表示量から色価 100 に換算して 0.1g に相当する量を取り、0.02mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100ml を加えて 50℃ の水浴中で 20 分間加温し、振り混ぜながら溶かした液は、波長 410~425nm に極大吸収部がある。

(3) 本品の表示量から色価 100 に換算して 0.1g に相当する量を取り、必要があれば水浴上で蒸発乾固し、冷後硫酸 5ml を加えるとき、青色を呈し、次いで紫色を経て褐色に変わる。

(4) 本品の表示量から色価 100 に換算して 1g に相当する量を取り、0.02mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100ml を加えて 50℃ の水浴中で 20 分間加温し、必要があれば振り混ぜて溶かし、検液とする。検液 5 μ l を量り、対照液を用いず、テトラヒドロフラン/アセトニトリル/シュウ酸溶液 (1→80) 混液 (8:7:7) を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行い、展開溶媒の先端が原線より約 10cm の高さに上昇したとき展開をやめ、風乾するとき、 R_f 値が 0.4~0.6 付近に黄色のスポットを認める。ただし、薄層板には、担体として薄層クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを 110℃ で 1 時間乾燥したものを使用する。

純度試験 (1) 重金属 Pb として 40 μ g/g 以下 (0.50g, 第 2 法, 比較液 鉛標準液 2.0ml)

(2) 鉛 Pb として 8.0 μ g/g 以下 (1.25g, 第 1 法)

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

(4) ゲニポシド 0.5% 以下 (色価 100 に換算)

本品の表示量から色価 100 に換算して 1.0g に相当する量を量り、水/アセトニトリル混液 (17:3) を加えて正確に 25ml とし、必要があれば遠心分離し、その上澄液を検液とする。別にゲニポシドをデシケーターで 24 時間乾燥した後、その約 0.01g を精密に量り、水/アセトニトリル混液 (17:3) に溶かし、正確に 100ml とする。更にこの液 1ml, 5ml, 10ml を正確に量り、水/アセトニトリル混液 (17:3) を加えて、それぞれ正確に 100 ml とした液を標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ 10 μ l ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。それぞれの標準液のゲニポシドのピーク面積を測定し、検量線を作成する。この検量線と検液のゲニポシドのピーク面積から検液中のゲニポシドの濃度 (μ g/ml) を求め、次式によりゲニポシドの量を求める。

$$\text{ゲニポシドの量 (色価 100 に換算)} = \text{検液中のゲニポシド濃度 } (\mu\text{g/ml}) \times 0.0025 (\%)$$

操作条件

検出器 紫外吸光光度計 (測定波長 238nm)

カラム充てん剤 5 μ m 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 4 ~ 5 mm, 長さ 15 ~ 30 cm のステンレス管

カラム温度 40℃

移動相 水/アセトニトリル混液 (17:3)

流量 ゲニポシドの保持時間が約 15 分になるように調整する。

色価測定法 本品の表示量から、色価 100 に換算して約 5 g に相当する量を精密に量り、0.02mol/L 水酸化ナトリウム溶液 50ml を加えて 50℃ の水浴中で 20 分間加温し、必要があれば振り混ぜながら溶かし、水を加えて正確に 100ml とする。その 1 ml を正確に量り、50vol% エタノールを加えて正確に 100ml とし、必要があれば遠心分離し、その上澄液を検液とする。50vol% エタノールを対照として、410 ~ 425nm の極大吸収部における、液層の長さ 1 cm での吸光度 A を測定し、次式により色価を求める。

$$\text{色価} = \frac{A \times 1,000}{\text{試料の採取量 (g)}}$$

〈参考情報〉

薄層板: メルク社製 RP-18F 254S

〈試薬・試液〉

テトラヒドロフラン C_4H_8O K9705 : 1996

ゲニポシド $C_{17}H_{24}O_{10}$

性 状 本品は、白色の結晶または結晶性の粉末で、においが無い。

確認試験 本品約 5 mg を精密に量り、メタノールを加えて溶かして正確に 10ml とする。この液 1 ml を正確に量り、メタノールを加えて 10ml とした液の吸光度を測定するとき、波長 238nm 付近に極大吸収部がある。

純度試験 (1) 比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (240nm 付近の極大吸収部) = 249 ~ 269

本品約 0.01g を精密に量り、メタノール (1 → 2) を加えて溶かし、正確に 500ml とする。

この液の 240nm 付近の極大吸収部における吸光度を測定する。

(2) 類縁物質 本品約 0.01g を精密に量り、水/アセトニトリル混液 (17:3) を加えて溶かし、正確に 100ml とし、検液とする。検液 2ml を正確に量り、水/アセトニトリル混液 (17:3) を加えて正確に 100ml とし、比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 20 μ l ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い、ピーク面積を測定するとき、検液の主ピーク以外のピークの合計面積は、比較液の主ピークのピーク面積より大きくない。ただし、面積測定範囲は、溶媒ピークの後ろから主ピークの保持時間の約 2 倍までとする。

操作条件

検出器 紫外吸光光度計 (測定波長 238 nm)

カラム充填剤 5 μ m 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 4 ~ 5 mm, 長さ 15 ~ 30 cm のステンレス管

温度 40℃

移動相 水/アセトニトリル混液 (17:3)

流量 ゲニポシドの保持時間が約 15 分になるように調整する。

薄層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

オクタデシルシリル化シリカゲル, 薄層クロマトグラフィー用を見よ。

オクタデシルシリル化シリカゲル, 薄層クロマトグラフィー用

薄層クロマトグラフィー用に製造したもの。

α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア

α-Glucosyltransferase Treated Stevia

酵素処理ステビア

定 義 本品は、「ステビア抽出物」に、α-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。α-グルコシルステビオシドを主成分とする。

含 量 本品を乾燥物換算したものは、α-グルコシルステビオール配糖体及び未反応のステビオール配糖体（ステビオシド、ズルコシドA、レバウジオシドA、レバウジオシドC）の総量として80.0%以上を含み、α-グルコシルステビオール配糖体65.0%以上を含む。

性 状 本品は白～淡黄色の粉末、薄片又は粒で、においはないかわずかに特有のにおいがあり、強い甘味がある。

確認試験 (1) 本品0.1gを水20mlに溶かし、検液とする。検液10μlにつき、「ステビア抽出物」の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、ステビオシド又はレバウジオシドAより遅い保持時間に複数のピークを認める。ただし、定量用ステビオシド及びレバウジオシドAのそれぞれ5mgを水10mlに溶かし、標準液とする。

(2) (1)の検液の残りの液に、グルコアミラーゼ20,000単位を加え、55℃で約45分間放置し、室温まで冷却した後、検液とする。検液10μlにつき、(1)と同じ操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、(1)でステビオシド又はレバウジオシドAより遅い保持時間に認められた複数のピークの面積は減少し、ステビオシド又はレバウジオシドAのいずれか、あるいは両方のピーク面積が増大する。

純度試験 (1) 重金属 Pbとして10μg/g以下 (2.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液2.0ml)

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

乾燥減量 6.0%以下 (105℃, 2時間)

強熱残分 1.0%以下

定 量 法 (1) α-グルコシルステビオール配糖体及び未反応のステビオール配糖体の総量の定量

本品約1gを精密に量り、水50mlに溶かす。この溶液をアクリル酸エステル系吸着用樹脂又はスチレン-ジビニルベンゼン系吸着用樹脂50mlを充てんした内径約25mmのガラス管に注ぎ、1分間に3ml以下の速さで流出させ、次いで水250mlで洗浄した後、50vol%エタノール250mlを1分間に3ml以下の速さで流す。この溶出液を約100mlまで濃縮し、酢酸緩衝液 (pH4.5) 40mlを正確に加えて、更に水を加えて約180mlとする。この液を55℃で約5分間放置した後、グルコアミラーゼ20,000単位を加え、55℃で約45分間放置する。更に95℃で約30分間加熱した後、室温まで冷却し、水を加えて正確に200mlとし、検液とする。別に定量用ステビオシドを乾燥し、その約0.1gを精密に量り、水に溶かし、正確に200mlとし、ステビオシド標準液とする。検液及びステビオシド標準液をそれぞれ10μlずつ量り、「ステビア抽出物」の定量法を準用してステビオール配糖体量を求める。次に、検液20μlを量り、ブドウ糖定量用発色試液3mlを正確に加えて振り混ぜた後、37℃で正確に5分間放置する。室温まで冷却した後、波長505nmにおける吸光度を測定する。対照液は、水20μlを用いて検液と同様に操作して調製する。別に空試験を行い補正する。ただし、空試験液は、酢酸緩衝液 (pH4.5) 40mlを正確に量り、水を加えて約180mlとしたものを55℃で約5分間放置した後、グルコアミラーゼ20,000単位を加え、55℃で約45分間放置し、更に95℃で約30分間加熱し、室温まで冷却し、水を加えて正確に200mlとした液とする。空試験液を検液と同様に操作して、吸光度を測定する。別にブドウ

糖約1gを精密に量り、水に溶かして正確に100mlとする。この液5ml、10ml、20ml及び30mlを正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に100mlとし、標準液とする。これらの標準液につき、検液と同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作成する。この検量線と補正した検液の吸光度から検液中のブドウ糖濃度を求め、次式により検液中の α -グルコシル残基量を求める。

$$\alpha\text{-グルコシル残基量} = \frac{\text{検液中のブドウ糖濃度 (mg/ml)} \times 200}{\text{乾燥物換算した試料の採取量 (g)} \times 1,000} \times 0.900 \times 100 (\%)$$

α -グルコシルステビオール配糖体及び未反応のステビオール配糖体の総量を次式により求める。

$$\begin{aligned} & \alpha\text{-グルコシルステビオール配糖体及び未反応のステビオール配糖体の総量} (\%) \\ &= \text{ステビオール配糖体量} (\%) + \alpha\text{-グルコシル残基量} (\%) \end{aligned}$$

(2) α -グルコシルステビオール配糖体の定量

本品約1gを精密に量り、水を加えて正確に200mlとし、検液とする。検液及び(1)のステビオシド標準液10 μ lずつにつき、「ステビア抽出物」の定量法を準用してステビオール配糖体量を測定し、その値を未反応のステビオール配糖体量とする。次式により α -グルコシルステビオール配糖体の含量を求める。

$$\begin{aligned} & \alpha\text{-グルコシルステビオール配糖体含量} (\%) \\ &= \text{ステビオール配糖体量} (\%) + \alpha\text{-グルコシル残基量} (\%) - \text{未反応のステビオール配糖体量} (\%) \end{aligned}$$

〈試薬・試液〉

酢酸緩衝液 (pH4.5)

第1液：酢酸 6.0g に水を加えて、1,000ml とする。

第2液：無水酢酸ナトリウム 8.2g を量り、水に溶かし 1,000ml とする。

第1液と第2液を混ぜ、両液を用いて pH4.5 に調整する。

定量用ステビオシド

ステビオシド、定量用を見よ。

ステビオシド、定量用 $C_{38}H_{60}O_{18}$

性 状 本品は、白色の粉末である。

確認試験 本品 0.6g を水 100ml に溶かし、1-ブタノール 100ml を加え、よく振り混ぜた後、放置する。1-ブタノール層 5ml を試験管にとり、アントロン試液 5ml を管壁に沿って静かに加え層積するとき、接界面は、青〜緑色を呈する。

純度試験 類縁物質 本品 0.05g をアセトニトリル/水混液 (4 : 1) 50ml に溶かし、検液とする。この液 1ml を正確に量り、アセトニトリル/水混液 (4 : 1) を加えて正確に 100ml とし、比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 20 μ l ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィを行い、ピーク面積を測定するとき、検液の主ピーク以外のピークの合計面積は、比較液の主ピーク面積より大きくない。ただし、面積測定範囲は、溶媒ピークの後ろから主ピーク

の保持時間の2倍までとする。

操作条件

「ステビア抽出物」の定量法の操作条件を準用する。

ただし、流量は、ステビオシドの保持時間が約10分になるように調整する。

乾燥減量 5.0%以下 (105℃, 2時間)

レバウジオシドA $C_{44}H_{70}O_{23}$

性 状 本品は、白色の結晶又は結晶性の粉末である。

比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = -20 \sim -24^\circ$ 本品を110℃で2時間乾燥し、その0.05gをメタノール50mlに溶かし、旋光度を測定する。

融 点 239~244℃

グルコアミラーゼ

Aspergillus niger から得られた、白~褐色の粉末又は淡黄~濃褐色の液体である。においてはな
いか又は特異なにおいがある。本品の1単位は、デンプンを基質として、pH4.5、40℃において60
分間に1mgのブドウ糖を生成する酵素量とする。

ブドウ糖定量用発色試液

フェノール0.50g、ムタロターゼ130単位、グルコースオキシダーゼ9,000単位、ペルオキシダー
ゼ650単位及び4-アミノアンチピリン0.1gをリン酸緩衝液(pH7.1)に溶かし、正確に1,000mlとす
る。2~10℃で保存し、1ヶ月以内に使用する。

リン酸緩衝液(pH7.1)

第1液：リン酸二ナトリウム21.2gを量り、水に溶かし1,000mlとする。

第2液：リン酸一カリウム8.2gを量り、水に溶かし1,000mlとする。

第1液2容量と第2液1容量とを混和し、両液を用いてpHを7.1に調整する。

ムタロターゼ

ブタ腎臓から得られたもので、白色の50%グリセロール懸濁液である。本品の1単位は、 α -D-
グルコースを基質として、pH7.2、25℃において1分間に1 μ molの β -D-グルコースを生成する酵
素量とする。

グルコースオキシダーゼ

Penicillium 属から得たもので、白色の粉末である。本品の1単位は、D-グルコースを基質とし
て、pH7.0、25℃において1分間に1 μ molのD-グルコノ-1,5-ラク톤を生成する酵素量とする。

ペルオキシダーゼ

西洋ワサビから得たもので、赤褐色の粉末である。本品の1単位は、過酸化水素を基質として、
pH7.0、25℃において1分間に1 μ molの水を生成する酵素量とする。

〈参考情報〉

ブドウ糖定量用発色試液

グルコース測定試薬であるグルコース CII-テストワコー(和光純薬工業社製 体外診断用医薬品 製品コード 439-90901 ; 437-90902)を使用することができる。本製品は、ムタロターゼで α -D-グルコースを β 型に変換するとともに、グルコースオキシダーゼにより β -D-グルコースを酸化して発生させた過酸化水素と、ペルオキシダーゼの作用で発色試薬(フェノール, 4-アミノアンチピリン)を縮合, 発色させ、その吸光度を測定することによりグルコースを定量する酵素法試薬キットである。

グルコアミラーゼ

Sigma-Aldrich 社製 Amyloglucosidase (製品コード A-3042)

天野エンザイム社 グルクザイム NL4.2 -液状糖化酵素-がある。

ムタロターゼ

和光純薬工業製 Mutarotase, from Pig Kidney...ムタロターゼ, ブタ腎臓製 [オリエンタル酵母] (製品コード 305-506991 ; 301-50693 ; 309-50694) がある。

グルコースオキシダーゼ

和光純薬工業製 Glucose Oxidase, from Microorganism (GOD)...グルコースオキシダーゼ, 微生物製...凍結乾燥品 [オリエンタル酵母] (製品コード 304-50661 ; 300-50663 ; 308-50664) がある。

ペルオキシダーゼ

和光純薬工業製 Peroxidase, from Horseradish Roots (POD)...ペルオキシダーゼ, わさび製...凍結乾燥品 [オリエンタル酵母] (製品コード 303-50991) がある。

アクリル酸エステル系吸着用樹脂

オルガノ株式会社製 アンバーライト XAD-7 HP がある。

スチレン-ジビニルベンゼン系吸着用樹脂

三菱化学株式会社製 ダイヤイオン HP-20 がある。

酵素処理イソクエルシトリン
Enzymatically Modified Isoquercitrin
糖転移イソクエルシトリン

定 義 本品は、「ルチン酵素分解物」とでん粉又はデキストリンの混合物に、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。主成分は α -グルコシルイソクエルシトリンである。

含 量 本品を乾燥したものは、 α -グルコシルイソクエルシトリンをルチン ($C_{27}H_{30}O_{16}=610.52$) として 60.0%以上を含む。

性 状 本品は、黄～黄だいたい色の粉末、塊又はペースト状で、わずかに特異なおいがある。

確認試験 (1) 本品 5mg を水 10ml に溶かした液は、黄～黄だいたい色を呈し、塩化鉄 (III) 溶液 (1→50) 1～2 滴を加えるとき、液の色は黒褐色に変わる。

(2) 本品 5mg を水 5ml に溶かした液は、黄～黄だいたい色を呈し、塩酸 2ml 及びマグネシウム末 0.05g を加えるとき、液の色は徐々にだいたい～赤色に変わる。

(3) 本品 0.1g を 0.5mol/L 硫酸 100ml に溶かし、2 時間煮沸し、冷却するとき、黄色の析出物を生じる。

(4) 本品 0.01g をリン酸溶液 (1→1,000) 500ml に溶かした液は、波長 255nm 付近及び波長 350nm 付近に極大吸収部がある。

(5) 本品 0.1g を水 20ml に溶かし、検液とする。検液 5 μ l につき定量用ルチンのメタノール溶液 (1→20) 2 μ l を対照液とし、1-ブタノール/酢酸/水混液 (4:2:1) を展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行い、展開溶媒の先端が原線より約 15cm の高さに上昇したとき展開をやめ、風乾した後、塩化鉄 (III)・塩酸試液を噴霧するとき、定量用ルチンの主スポットよりも大きい Rf 値を示す褐色のスポットを認め、また、定量用ルチンの主スポットと同じ、又は小さい Rf 値を示す褐色のスポットを複数認める。ただし、薄層板には、担体として薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを 110℃で 1 時間乾燥したものを使用する。

純度試験 (1) 重金属 Pb として 10 μ g/g 以下 (2.0g, 第 2 法, 比較液 鉛標準液 2.0ml)

(2) 鉛 Pb として 5.0 μ g/g 以下 (2.0g, 第 1 法)

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

乾燥減量 50.0%以下 (135℃, 2 時間)

定 量 法 本品を乾燥し、その約 0.05g を精密に量り、水に溶かして正確に 100ml とする。必要があればろ過する。この液 4ml を正確に量り、リン酸溶液 (1→1,000) を加えて正確に 100ml とし、検液とする。別に定量用ルチンを 135℃で 2 時間乾燥し、その約 0.05g を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 100ml とする。この液 4ml を正確に量り、リン酸溶液 (1→1,000) を加えて正確に 100ml とし、標準液とする。検液及び標準液につき、紫外可視吸光度測定法により、リン酸溶液 (1→1,000) を対照として、波長 351nm における吸光度 A_T 及び A_S を測定し、次式によりルチンとして α -グルコシルイソクエルシトリンの含量を求める。

$$\alpha\text{-グルコシルイソクエルシトリンの含量 (ルチン } (C_{27}H_{30}O_{16}) \text{ として)}$$

$$= \frac{\text{定量用ルチンの採取量 (g)}}{\text{試料の採取量 (g)}} \times \frac{A_T}{A_S} \times 100 (\%)$$

〈試薬・試液〉

定量用ルチン ルチン，定量用を見よ。

ルチン，定量用 $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$

性 状 本品は，淡黄～淡黄緑色の結晶性の粉末である

確認試験 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき，
1,655 cm^{-1} ，1,605 cm^{-1} ，1,505 cm^{-1} ，1,360 cm^{-1} ，1,300 cm^{-1} ，1,200 cm^{-1} 及び810 cm^{-1} のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

純度試験 (1) 比吸光度 $E_{1\%}^{1cm}$ (350nm 付近の極大吸収部) = 290 以上

本品を 135℃，2 時間乾燥し，その約 0.05g を精密に量り，メタノールに溶かして正確に 100ml とする。この液 2ml を正確に量り，メタノールを加えて正確に 100ml とし，紫外可視吸光度測定法によりこの液の吸光度を測定する。

(2) 類縁物質 本品約 0.05g をメタノール 25ml に溶かす。この液 5ml を正確に量り，水／アセトニトリル／リン酸混液 (800 : 200 : 1) を加えて正確に 50ml とし，検液とする。別に検液 1ml を正確に量り，メタノール 5ml を加えた後，水／アセトニトリル／リン酸混液 (800 : 200 : 1) を加えて正確に 50ml とし，比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 20 μ l ずつ量り，次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い，ピーク面積を測定するとき，検液の主ピークと溶媒ピークとを除くピークの合計面積は，比較液の主ピーク面積より大きくない。ただし，面積測定範囲は，主ピークの保持時間の 2 倍までとする。

操作条件

検出器 紫外吸光光度計 (測定波長 254nm)

カラム充てん剤 5～10 μ m 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 内径 3～6mm，長さ 15～25cm のステンレス管

カラム温度 40℃

移動相 水／アセトニトリル／リン酸混液 (800 : 200 : 1)

流量 ルチンの保持時間が 8～12 分になるように調整する。

〈参考情報〉

液体クロマトグラフィー用カラム: 5～10 μ m 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 Inertsil ODS-3 250×4.6mm I.D. Cat. No. 5020-01732 (ジーエルサイエンス社)

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、果汁又は種子より、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 本品を乾燥したものは、総ヘスペレチン配糖体として30.0%以上を含む。

性 状 本品は、ごくうすい黄～黄褐色粉末で、わずかに特異なおいがある。

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

(2) 本品0.5gを水/アセトニトリル/酢酸混液(80:20:0.01)100mlに溶かし、検液とする。別に定量用モノグルコシルヘスペリジン0.05gを水/アセトニトリル/酢酸混液(80:20:0.01)250mlに溶かし、標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ10 μ lずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、本品はモノグルコシルヘスペリジンの位置に波長280～286nmに極大吸収部を有するピークを認める。

操作条件

検出器 フォトダイオードアレイ検出器(測定波長 280nm, 200～400nm)

カラム充填剤 5～10 μ m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3.9～4.6mm、長さ15～30cmのステンレス管

カラム温度 40℃

移動相 水/アセトニトリル/酢酸混液(80:20:0.01)

流量 モノグルコシルヘスペリジンの保持時間が約15分になるように調整する。

純度試験 (1) 溶状 澄明(0.5g, 水100ml)

(2) 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)

(3) 鉛 Pbとして10 μ g/g以下(1.0g, 第1法)

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

乾燥減量 6.0%以下(2.7kpa以下, 120℃, 2時間)

定 量 法 (1) ヘスペリジン及びモノグルコシルヘスペリジンの定量

乾燥した本品約1gを精密に量り、水100mlに溶かす。この液をアクリル酸エステル系吸着用樹脂50mlを充填した内径約25mmのガラス管に注ぎ、1分間に2.5ml以下の速さで流出させた後、水250mlで洗浄する。次に、50vol%エタノール200mlを1分間に2.5ml以下の速さで流し、吸着画分を溶出する。この溶出液を濃縮して全量を約40mlとする。この液にグルコアミラーゼ10,000単位を添加し、55℃で正確に30分間放置する。更に95℃で30分間加熱した後、室温まで冷却し、水を加えて正確に50mlとし、A液とする。この液3mlを正確に量り、水/アセトニトリル/酢酸混液(80:20:0.01)を加えて正確に50mlとし、検液とする。別に乾燥した定量用モノグルコシルヘスペリジン約0.05gを精密に量り、水/アセトニトリル/酢酸混液(80:20:0.01)に溶かして正確に250mlとし、標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ10 μ lずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。検液のヘスペリジン及びモノグルコシルヘスペリジンのピーク面積A_{TH}及びA_{TM}並

びに標準液のモノグルコシルヘスペリジンのピーク面積 A_s を測定し、次式によりヘスペリジン及びモノグルコシルヘスペリジンの含量を求める。ただし、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約1.1である。

ヘスペリジンの含量

$$= \frac{\text{乾燥した定量用モノグルコシルヘスペリジンの採取量 (g)}}{\text{乾燥した試料の採取量 (g)}} \times \frac{A_{TH}}{A_s} \times 0.790 \times 100 (\%)$$

モノグルコシルヘスペリジンの含量

$$= \frac{\text{乾燥した定量用モノグルコシルヘスペリジンの採取量 (g)}}{\text{乾燥した試料の採取量 (g)}} \times \frac{A_{TM}}{A_s} \times 100 (\%)$$

操作条件

検出器 紫外吸光光度計 (測定波長 280nm)

カラム充てん剤 5~10 μ m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3.9~4.6mm, 長さ15~30cmのステンレス管

カラム温度 40℃

移動相 水/アセトニトリル/酢酸混液 (80:20:0.01)

流量 モノグルコシルヘスペリジンの保持時間が約15分になるように調整する。

(2) グルコアミラーゼ処理により遊離する α -グルコシル残基量の定量

定量法(1)で得られたA液を検液とする。検液20 μ lを量り、ブドウ糖定量用発色試液3mlを正確に加えて振り混ぜた後、37℃で正確に5分間放置する。室温まで冷却した後、波長505nmにおける吸光度を測定する。対照液は、水20 μ lを用いて検液の場合と同様に操作して調製する。空試験を行い補正する。ただし、空試験液は、水約40mlにグルコアミラーゼ10,000単位を添加し、55℃に30分間放置した後、95℃で約30分間加熱し、室温まで冷却し、水を加えて正確に50mlとした液とする。空試験液を検液と同様に操作して吸光度を測定する。別にブドウ糖約1gを精密に量り、水に溶かして正確に100mlとする。この液5ml, 10ml, 20ml及び30mlを正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に100mlとし、標準液とする。この標準液につき、検液と同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作成する。この検量線と補正した検液の吸光度から検液中のブドウ糖濃度を求め、次式によりグルコアミラーゼ処理により遊離する α -グルコシル残基量を求める。

グルコアミラーゼ処理により遊離する α -グルコシル残基量

$$= \frac{\text{検液中のブドウ糖濃度 (mg/ml)} \times 50}{\text{乾燥した試料の採取量 (g)} \times 1,000} \times 0.900 \times 100 (\%)$$

(3) 総ヘスペレチン配糖体の含量 (乾燥物)

次の計算式により総ヘスペレチン配糖体の含量を求める。

総ヘスペレチン配糖体の含量 (乾燥物) (%)

= ヘスペリジンの含量 (%) + モノグルコシルヘスペリジンの含量 (%) + グルコアミラーゼ処理により遊離する α -グルコシル残基量 (%)

(試薬・試液)

定量用モノグルコシルヘスペリジン

モノグルコシルヘスペリジン, 定量用を見よ。

モノグルコシルヘスペリジン, 定量用

性 状 本品は, 淡黄～黄褐色の粉末で, わずかに特異なにおいがある。

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

(2) 本品 0.01 g を水 500 ml に溶かした液は, 波長 280～286 nm に極大吸収部がある。

乾燥減量 6.0%以下 (2.7 kPa 以下, 120℃, 2 時間)

純度試験 類縁物質 本品約 0.1 g を精密に量り, 水/アセトニトリル/酢酸混液 (80:20:0.01) に溶かして正確に 200 ml とし, 検液とする。検液 1 ml を正確に量り, 水/アセトニトリル/酢酸混液 (80:20:0.01) に溶かして正確に 50 ml とし, 比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 10 μ l ずつ量り, 次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い, ピーク面積を測定するとき, 検液の主ピーク以外のピーク面積の合計は, 比較液の主ピーク面積より大きくない。ただし, 面積測定範囲は, 主ピークの保持時間の 2 倍までとする。

操作条件

「酵素処理ヘスペリジン」の定量法の操作条件を準用する。

塩化鉄 (III) 試液

塩化鉄 (III) 9 g を水に溶かし, 100 ml とする。

塩化鉄 (III) 試液, 希

塩化鉄 (III) 試液 2 ml に水を加えて 100 ml とする。用時調製する。

希塩化鉄 (III) 試液

塩化鉄 (III) 試液, 希を見よ。

グルコアミラーゼ

Aspergillus niger から得られた, 白～褐色の粉末又は淡黄～濃褐色の液体である。においはないか又は特異なにおいがある。本品の 1 単位は, デンプンを基質として, pH 4.5, 40℃において 60 分間に 1 mg のブドウ糖を生成する酵素量とする。

ブドウ糖定量用発色試液

フェノール 0.50g, ムタロターゼ 130 単位, グルコースオキシダーゼ 9,000 単位, ペルオキシダーゼ 650 単位及び 4-アミノアンチピリン 0.1g をリン酸緩衝液 (pH7.1) に溶かし, 正確に 1,000ml とする。2~10℃で保存し, 1ヶ月以内に使用する。

リン酸緩衝液 (pH7.1)

第1液: リン酸二ナトリウム 21.2g を量り, 水に溶かし 1,000ml とする。

第2液: リン酸一カリウム 8.2g を量り, 水に溶かし 1,000ml とする。

第1液2容量と第2液1容量とを混和し, 両液を用いて pH を 7.1 に調整する。

ムタロターゼ

ブタ腎臓から得られたもので, 白色の 50%グリセロール懸濁液である。本品の 1 単位は, α -D-グルコースを基質として, pH7.2, 25℃において 1 分間に 1 μ mol の β -D-グルコースを生成する酵素量とする。

グルコースオキシダーゼ

Penicillium 属から得たもので, 白色の粉末である。本品の 1 単位は, D-グルコースを基質として, pH7.0, 25℃において 1 分間に 1 μ mol の D-グルコノ-1,5-ラク톤を生成する酵素量とする。

ペルオキシダーゼ

西洋ワサビから得たもので, 赤褐色の粉末である。本品の 1 単位は, 過酸化水素を基質として, pH 7.0, 25℃において 1 分間に 1 μ mol の水を生成する酵素量とする。

〈参考情報〉

計算式の係数 0.790 の計算

$$0.790 = \frac{\text{ヘスペリジンの分子量 (610.57)}}{\text{モノグルコシルヘスペリジンの分子量 (772.71)}}$$

定量用モノグルコシルヘスペリジン

林原生物化学研究所製 モノグルコシルヘスペリジンがある。

ブドウ糖定量用発色試液

グルコース測定試薬であるグルコース CII-テストワコー (和光純薬工業社製 体外診断用医薬品 製品コード 439-90901 ; 437-90902) を使用することができる。本製品は、ムタロターゼで α -D-グルコースを β 型に変換するとともに、グルコースオキシダーゼにより β -D-グルコースを酸化して発生させた過酸化水素と、ペルオキシダーゼの作用で発色試薬 (フェノール, 4-アミノアンチピリン) を縮合、発色させ、その吸光度を測定することによりグルコースを定量する酵素法試薬キットである。

グルコアミラーゼ

Sigma-Aldrich 社製 Amyloglucosidase (製品コード A-3042)

天野エンザイム社製 グルコザイム NL 42 -液状糖化酵素-がある。

ムタロターゼ

和光純薬工業社製 Mutarotase, from Pig Kidney...ムタロターゼ, ブタ腎臓製 [オリエンタル酵母] (製品コード 305-506991; 301-50693; 309-50694) がある。

グルコースオキシダーゼ

和光純薬工業社製 Glucose Oxidase, from Microorganism(GOD)...グルコースオキシダーゼ, 微生物製...凍結乾燥品 [オリエンタル酵母] (製品コード 304-50661; 300-50663; 308-50664), 天野エンザイム社製 GO "Amano" II がある。

ペルオキシダーゼ

和光純薬工業社製 Peroxidase, from Horseradish Roots (POD)...ペルオキシダーゼ, わさび製...凍結乾燥品 [オリエンタル酵母] (製品コード 303-50991), 天野エンザイム社製 PO "Amano" III がある。

アクリル酸エステル系吸着用樹脂

オルガノ株式会社製 アンバーライト XAD-7 HP がある。

酵素分解レシチン

Enzymatically Decomposed Lecithin

定 義 本品は、アブラナ (*Brassica rapa* Linné 又は *Brassica napus* Linné) 若しくはダイズ (*Glycine max* Merrill) の種子から得られた植物レシチン又は卵黄から得られた卵黄レシチンから得られた、フォスファチジン酸及びリゾレシチンを主成分とするものである。酵素分解植物レシチンと酵素分解卵黄レシチンがある。

性 状 本品は、白～褐色の粉末、粒若しくは塊又は淡黄～暗褐色の粘稠な液体で、特異なにおいがある。

確認試験 (1) 本品 1g を分解フラスコに入れ、これに粉末とした硫酸カリウム 5g、硫酸銅 0.5g 及び硫酸 20ml を加える。次にフラスコを約 45° に傾け、泡立ちがほとんどやむまで穏やかに加熱し、更に温度を上げて沸騰させ、内容物が青色の澄明な液となった後、更に 1～2 時間加熱する。冷後、等容量の水を加え、この液 5ml にモリブデン酸アンモニウム溶液 (1→5) 10ml を加えて加熱するとき、黄色の沈殿を生じる。

(2) 脂肪酸 本品 1g にエタノール製水酸化カリウム試液 25ml を加え、1 時間還流後、氷冷するとき、カリウム石けんの沈殿又はにごりを生ずる。

純度試験 (1) 酸 価 65 以下 本品約 2g を精密に量り、酵素分解植物レシチンの場合はトルエン 50ml に溶かして検液とし、酵素分解卵黄レシチンの場合はメタノール 50ml を加えて、60℃以下の氷浴中で加温して溶かして検液とし、油脂類試験法中の酸価の試験を行う。

(2) アセトン可溶物 60%以下 本品約 2g を精密に量り、50ml 目盛付共栓遠心管に入れ、酵素分解植物レシチンの場合はトルエン 3ml を加え、酵素分解卵黄レシチンの場合はメタノール 3ml を加え、必要があれば 60℃以下の氷浴中で加温して、溶かす。この液にアセトン 15ml を加えてよくかき混ぜた後、氷水中に 15 分間放置する。これにあらかじめ 0～5℃に冷却したアセトンを加えて 50ml とし、よくかき混ぜ、氷水中に 15 分間放置した後、毎分約 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、上層液をフラスコにとる。なお、共栓遠心管の沈殿物に 0～5℃のアセトンを加えて 50ml とし、氷水中で冷却しながらよくかき混ぜた後、同様に遠心分離する。この上層液を先のフラスコに合わせ、氷浴上で蒸留し、残留物を 105℃で 1 時間乾燥し、その質量を精密に量る。

(3) 過酸化物価 10 以下

本品約 5g を精密に量り、250ml 共栓三角フラスコに入れ、クロロホルム/酢酸混液 (2:1) 35ml を加え、静かに振り混ぜて溶解又は均一に分散する。次に窒素を通じて器内の空気を十分に置換し、窒素を通じながらヨウ化カリウム試液 1ml を正確に量って加える。次に窒素をとめ、直ちに栓をして 1 分間振り混ぜた後、暗所に 5 分間放置する。この液に水 15ml を加え、再び栓をして激しく振り混ぜた後、0.01mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し (指示薬 デンプン試液)、次式によって過酸化物価を求める。別に空試験を行い、補正する。

0.01mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の消費量 (ml)

過酸化物価 = $\frac{\text{消費量}}{\text{試料の採取量}} \times 10$

試料の採取量 (g)

(4) 重金属 Pb として 40 $\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50g, 第 2 法, 比較液 鉛標準液 2.0ml)

(5) 鉛 Pb として 10 $\mu\text{g/g}$ 以下 (1.0g, 第 2 法)

(6) ヒ素 As_2O_3 として $4.0 \mu\text{g/g}$ 以下 (0.5g, 第3法, 装置B)

乾燥減量 4.0 %以下 (105℃, 1時間)。

本品が粉末の場合は, 乾燥減量測定法により試験を行う。本品が粒若しくは塊又は粘稠な液体の場合には, 本品約 3g をあらかじめ質量を精密に量った海砂約 15g 及び質量を精密に量った小ガラス棒と共にひょう量瓶に入れて, その質量を精密に量り, 小ガラス棒を用いて速やかに粉碎して 2mm 以下の大きさにし, 若しくは均一に混合した後, 小ガラス棒と共に加熱し, 乾燥減量を測定する。