

2018年1月10日

小林香料株式会社

HMB カルシウムの分析方法

被験物質 : HMB カルシウム (弊社製品名: 小林 HMBCa)
化学名 : カルシウム ビス-3-ヒドロキシ-3-メチルブチレートモノヒドレート
関与成分名 : 3-ヒドロキシ-3-メチルブチレート (HMB)

【ご注意】

本資料は、弊社独自に設定した「HMB カルシウム (原材料単体) の分析方法」を記載したものです。錠剤・顆粒・飲料など最終商品中の関与成分を定量する分析方法は、配合する副材料の特性に応じて商品毎に個別の検討、設定が必要になります。

【小林 HMBCa 品質規格】

| 項目 | 規格 |
|--|--|
| 1. 性状 | 白色の粉末 |
| 2. 確認試験 (IR) | 陽性 (本品のスペクトルと標準品のスペクトル又は参照スペクトルを比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。) |
| 3. 水溶性 | 無色澄明 |
| 4. 重金属 (Pd として) | 10 μ g/g 以下 |
| 5. ヒ素 (As ₂ O ₃ として) | 1 μ g/g 以下 |
| 6. 乾燥減量 | 6.2%以下 |
| 7. カルシウム含量 | 13.6~14.8% |
| 8. HMB 含量 | 80.0~87.0% |
| 9. 含量 (無水換算) <Assay by HPLC> | 98.0%以上 |
| 10. 一般生菌数 | 1000 個/g 以下 |
| 11. 大腸菌群 | 陰性 |

【分析方法】

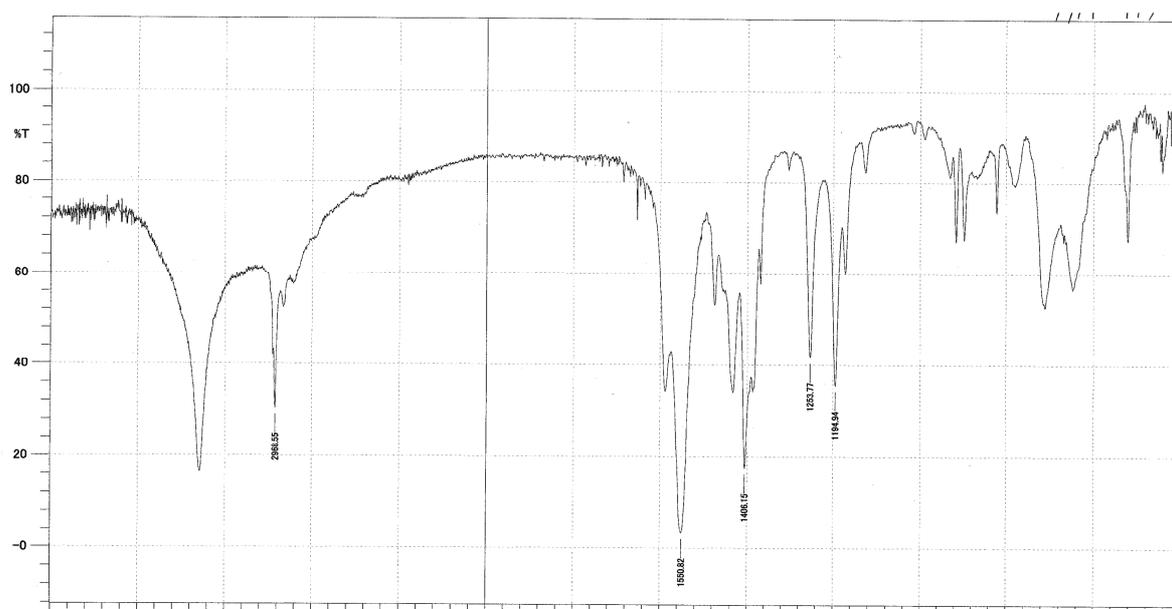
1. 性状

本品 1g を白紙上または白紙上に置いた時計皿 (ϕ 55 mm) にとり、観察する。

2. 確認試験 (IR)

本品を日本薬局方一般試験法の赤外吸収スペクトル測定法臭化カリウム錠剤法により測定し、本品のスペクトルとカルシウム ビス-3-ヒドロキシ-3-メチルブチレート標準品（以下、「HMBCa 標準品」と記載）のスペクトル又は参照スペクトルを比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。参照スペクトルを以下に示す。

<参照スペクトル>



3. 水溶性

本品 0.5 g を水 20 mL に溶かし、観察する。

4. 重金属 (Pb として)

日本薬局方一般試験法の重金属試験法の第 2 法

5. ヒ素 (As_2O_3 として)

日本薬局方一般試験法のヒ素試験法の第 1 法

6. 乾燥減量

日本薬局方一般試験法の乾燥減量試験法 (1g, 120°C, 2 時間)

7. カルシウム含量

本品約 1 g を精密に量り、水を加えて正確に 100 mL とする。この液 30 mL を正確に量り、水 70 mL, 0.05 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム液 18 mL 及び 8 mol/L 水酸化カリウム試液 4 mL を加えて 3~5 分間攪拌した後、NN 指示薬 0.1 g を加え、直ちに 0.05 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム液で滴定する。ただし滴定の終点は液の赤色が完全に消失して青色となるときのときとする。次式によりカルシウム含量を求める。

<計算式>

$$\text{カルシウム含量 (\%)} = \frac{0.05 \times F \times V \times 40.08}{W} \times \frac{100}{30} \times \frac{100}{1000}$$

V : 0.05 mol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム液の消費量 (mL)

F : 0.05 mol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム液のファクター

W : 本品の秤取量 (g)

8. HMB 含量 9. 含量 (無水換算) <Assay by HPLC>

本品約 0.10 g を精密に量り，移動相を加えて正確に 20 mL とし^(注1)，孔径 0.45 μm のメンブランフィルター^(注2) でろ過し，ろ液を試料溶液とする．別に，HMBCa 標準品約 0.10 g を精密に量り，移動相を加えて正確に 20 mL とし^(注1)，孔径 0.45 μm のメンブランフィルター^(注2) でろ過し，ろ液を標準溶液とする．試料溶液及び標準溶液 10 μL につき，次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行う．各液のピーク面積を自動積分法により測定し^(注3)，次式により HMB 含量及び含量 (無水換算) を求める．

<計算式>

$$\text{HMB 含量 (\%)} = \frac{W_{\text{std}} \times (100 - L_{\text{std}}) \times 0.01 \times P}{W_{\text{smp}}} \times \frac{A_{\text{smp}}}{A_{\text{std}}} \times 100$$

$$\text{含量 (無水換算) (\%)} = \frac{W_{\text{std}} \times (100 - L_{\text{std}}) \times 0.01}{W_{\text{smp}} \times (100 - L_{\text{smp}}) \times 0.01} \times \frac{A_{\text{smp}}}{A_{\text{std}}} \times 100$$

Astd : 標準溶液の HMB のピーク面積

Asmp : 試料溶液の HMB のピーク面積

Wstd : HMBCa 標準品の秤取量 (g)

Wsmp : 本品の秤取量 (g)

Lstd : HMBCa 標準品の乾燥減量 (%), 測定条件: (1g, 120°C, 2 時間)

Lsmp : 本品の乾燥減量 (%), 測定条件: (1g, 120°C, 2 時間)

P : HMBCa 標準品の乾燥物中の HMB 含量=0.854 (*)

$$(*) P = \frac{\text{標準品中の HMB 分子量}}{\text{標準品の分子量}} = \frac{234.25}{274.32} = 0.854$$

<試験条件>

検出器 : 紫外吸光光度計 (測定波長: 210 nm)

カラム : 内径 4.6 mm, 長さ 15 cm のステンレス管に 5 μm の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する．例: Inertsil ODS-3

カラム温度 : 35°C 付近の一定温度

移動相 : リン酸二水素アンモニウム水溶液^(*)/アセトニトリル (95 : 5)

流量 : HMB の保持時間が 5~6 分になるように調整する (およそ 1.0 mL/min)

面積測定範囲 : 40 min

*1：リン酸二水素アンモニウム 5.75 g を水に溶かし、1000 mL とする (0.05 mol/L)。この液にリン酸を加えて pH を 3.0 に調整する。

<システム適合性>

システムの性能：標準溶液 10 μL につき、上記の条件（面積測定範囲は 10 分に短縮してもよい）で操作するとき、HMB ピークのシンメトリー係数は 3.0 以下、理論段数は 4000 以上である。

システムの再現性：標準溶液 10 μL につき、上記の条件（面積測定範囲は 10 分に短縮してもよい）で試験を 5 回繰り返すとき、HMB のピーク面積の相対標準偏差は 1 % 以下である。

注 1：リン酸カルシウムが析出するため懸濁する。

注 2：（例）東洋濾紙株式会社, ADVANTEC® Disposable Membrane Filter Unit, DISMIC®-13HP, PTFE

注 3：ブランク溶液（移動相）に認められるピーク、及び 0～2.2 分の間に認められるピークはカウントしない。

10. 一般生菌数

衛生試験法

11. 大腸菌群

衛生試験法

【HMBCa 標準品】

本資料で記載する HMBCa 標準品は、下記の規格を満たすものです。

弊社の取扱う HMBCa 標準品は、外部試験機関にて定期的に分析を行っています。

| 項目 | 規格 |
|-------------------|--|
| 1. 性状 | 白色の粉末 |
| 2. 確認試験 (IR) | 本品のスペクトルと参照スペクトルを比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。 |
| 3. 乾燥減量 | 6.2%以下 |
| 4. カルシウム含量 (無水換算) | 14.0～15.0% |
| 5. HPLC 面積百分率 | 99.0%以上 |

以上