

有害試験 四塩化炭素	食添7 オスミウム酸(試薬)	使用用途 オスミウム酸がJIS試薬にないので、試薬の品質を規定。定量法の溶媒に混合。	医添規98 未収載	JECFA 未収載	日局13 未収載	EP3 Osmium tetroxide: 性の記載はあるが、品質規格なし	USP23/NF18 Osmium Tetroxide: 品質規格あり。ただし、含量と定量法の規定はなし。	FCC4 未収載	参考 オスミウム酸は硫酸第二セリウム溶液(容量分析用標準液)の標定に使用。セリウムを使った酸化還元滴定に、公定書では硫酸第二セリウムアンモニウム溶液と硫酸第二セリウム溶液の2種類を収載。両者は共に、硫酸第二セリウムアンモニウムを溶かした溶液であり、実質的に同じ性能。JP13では、硫酸第二セリウムアンモニウム溶液のみ収載。硫酸第二セリウムアンモニウム溶液の標定にはオスミウム酸は使用しない。
	0.1 mol/l 及び0.01 mol/l 硫酸第二セリウムアンモニウム溶液(容量分析用標準液)	標定に三酸化ヒ素とオスミウム酸は使用しない。終点指示薬はデンプン。	「0.01 mol/l 硫酸第二セリウムアンモニウム溶液」の調製は13局に準拠。	未収載	0.1 mol/L 及び0.01 mol/L 硫酸第二セリウムアンモニウム(IV)溶液: 標定はヨウ化カリウムを加えてからオスミウムナトリウム液で滴定する。終点指示薬はデンプン。標定に三酸化ヒ素とオスミウム酸は使用しない。	0.1 M Ammonium and cerium sulphate, 0.01 M Ammonium and cerium sulphate, ; Ammonium and cerium sulphateを溶かす。; 0.1 M Ammonium and cerium nitrate, 0.01 M Ammonium and cerium nitrate ; Ammonium and cerium nitrateを溶かす。; nitrateもsulfateも三酸化ヒ素を一次標準物質にして標定。オスミウム酸も使用。終点指示薬はferroin。	0.05 N Ceric Ammonium Nitrate: ceric ammonium nitrateを溶かす。標定は、評定した ferrous ammonium sulfateを測定して行う。終点指示薬は nitrophenanthroline。三酸化ヒ素、オスミウム酸は使用しない。	未収載	

有害試薬	三酸化ヒ素	食添7 0.1 mol/l 硫酸第二セリウム溶液 (容量分析用標準液)	使用用途 三酸化ヒ素は、標定の一次標準物質。オスミウム酸も使用。終点指示薬は orthophenanthroline。JECFAと同様の原理。	医添規98 未収載	JECFA 0.1N Ceric Sulfate: ceric ammonium nitrateを溶かす。標定に三酸化ヒ素とオスミウム酸を使用。0.01 N Ceric Sulfate for Tocopherol assay: ceric sulfateまたは ceric acid sulfateを溶かす。一次標準物質に hydroquinone を使って標定。終点指示薬は diphenylamine。標定に三酸化ヒ素とオスミウム酸は使用しない。[FNP Rev.2 p.288]	日局13 未収載	EP3 0.1 M Cerium sulphate: cerium sulphateを溶かす。標定はヨウ化カリウムを加えてチオチオ硫酸ナトリウム液で滴定する。終点指示薬はデンプン。標定に三酸化ヒ素とオスミウム酸は使用しない。	USP23/NF18 0.1 N Ceric Sulfate: ceric ammonium nitrateを溶かす。標定に三酸化ヒ素とオスミウム酸を使用。終点指示薬は orthophenanthroline。JECFAと同様の原理。	FGC4 0.1 N Ceric Sulfate: ceric ammonium nitrateを溶かす。標定に三酸化ヒ素とオスミウム酸を使用。終点指示薬は orthophenanthroline。JECFAと同様の原理。0.01 N Ceric Sulfate: ceric sulfateまたは ceric acid sulfateを溶かす。一次標準物質に hydroquinone を使って標定。終点指示薬は diphenylamine。標定に三酸化ヒ素とオスミウム酸は使用しない。JECFAの0.01 N Ceric Sulfate for Tocopherol assayと同様。	参考 食添7では、グルコン酸第一鉄の定量とd-α-トコフェロールの定量に使用。
第一鉄化合物の定量法	グルコン酸第一鉄の定量: 0.1 mol/l 硫酸第二セリウム溶液で滴定。終点指示薬: オルトフェナントロリン試液	第一鉄化合物は未収載	未収載	第一鉄化合物は未収載	未収載	未収載	未収載	未収載	未収載	未収載

有言試薬	食添7	使用用途	医添規98	JECFA	日局13	EP3	USP23/NF18	FCC4	参考
dl- α -トコフェロール フェエロール等の定量法	dl- α -トコフェロール: 硫酸第二セリウムア ンモニウム溶液で滴 定。終点指示薬はジ フェニルアミン試液。 ミックストコフェロール と α -トコフェロール の定量: HPLC法。		α - δ -トコフェロール の定量法(1)総トコ フェロールの測定: 「0.01 mol/l 硫酸第二 セリウムアンモニウム 液」を使用。指示薬は ジフェニルアミン試 液。	「dl- α -Tocopherol」, 「d- α -Tocopherol」, 「Concentrate」, 「Tocopherol Concentrate」, 「Mixed」: GLC法、内部 標準はhexadecyl hexadecanoate。	トコフェロール(別名 dl- α -トコフェロー ル)、Tocopherol、酢 酸トコフェロール、 Tocopherol Acetate、 コハク酸トコフェロー ルカルシウム、 Tocopherol Calcium Succinate: HPLC法、 標準品使用。	α -Tocopherol, RRR- α -Tocopherol, α -Tocopheryl Acetate, RRR- α - Tocopheryl Acetate, DL- α -Tocopheryl Hydrogen Succinate, RRR- α -Tocopheryl Hydrogen Succinate: GLC法、内部標準は dotriacontane。[EP3 Suppl. 2000]	Vitamin E: GLC法、内 部標準はhexadecyl hexadecanoate。	「DL- α - Tocopherol」, 「D- α - Tocopherol Concentrate」, 「D- α - Tocopherol Concentrate」, Mixed」, 「D- α - Tocopheryl Acetate」, 「DL- α - Tocopheryl Acetate」, 「D- α - Tocopheryl Acetate Concentrate」, 「D- α - Tocopheryl Acid Succinate」: GLC法、 内部標準は hexadecyl hexadecanoate。	
四塩化炭素	モルホリン(試薬)	溶状試験の溶媒: 水、ベンゼン、四塩化 炭素	「モルホリン試液、濃」 を収載。「モルホリン」 の規格の記述はなし	未収載	未収載	Morpholine(試薬): soluble in water and in alcohol.	Morpholine(試薬): Use ACS reagent grade.	Morpholine: 定義の中 で性状の溶解性を規 定する溶媒は、水、ア セトン、エーテル、ヒ マシ油、メタノール、 アルコール、亜麻仁 油、松油	Merk index 12th: miscible with water, acetone, benzene, ethewr, castor oil, methanol, ethanol, ethylene glycol, 2- hexanone, linseed oil, turpentine, pine oil.
四塩化炭素	ポリイソブチレン、 Polyisobutylene	純度試験(5)総不飽 和物の溶媒は四塩化 炭素。水銀試薬も使 用。ヨウ素価を測定、 限度値: 2.0%以下。	ポリイソブチレン、 Polyisobutylene: 純度 試験(3)総不飽和物 で、溶媒はシクロヘキ サン。油脂試験法の ヨウ素価測定法を採 用。水銀試薬は使用 せず。限度値: 0.5%以 下	Iodine Value: Wijs method [FNP 5 Rev.2 p.194]	油脂試験法のヨウ素 価測定法で脂肪酸の 不飽和度を測定。ウイ イス(Wijs)試験を使 用	未収載	未収載	Polyisobutylene: 総不 飽和物の限度規格は ない。	食添7のポリイソブチ レンの純度試験(5)で は、四塩化炭素を含 む溶媒として、四塩化 炭素、トリクロロ酢酸・ 四塩化炭素溶液(1→ 5)、ヨウ素・四塩化炭 素試液を用いてい る。

有雷試薬 四塩化炭素	食添7 シリコン樹脂、 Silicone Resin	使用用途 純度試験(1)抽出シリコン油の屈折率の測定において、抽出溶媒が四塩化炭素。二酸化ケイ素の限度値が15.0%以下。	医添98 ジメチルポリシロキサン、二酸化ケイ素混合物、 Polydimethylsiloxane Silicone Dioxide Mixture: 純度試験(1)抽出溶媒はヘキサン、二酸化ケイ素の限度値が3.0~7.0%	JECFA Polydimethylsiloxane: 純度試験として、有機溶媒抽出残留物中の二酸化ケイ素量の規定はない。 [Compendium P.1099]	日局13 シリコン樹脂(試薬、試液)の品質規格: 抽出溶媒は四塩化炭素	EP3 silicon Oil Used as a Lubricant(潤滑油)の重金属の限度試験、および、Silicone Elastomer for Closures and Tubingの残存過酸化物試験で、樹脂からの抽出タンを使用して、純度試験として、有機溶媒抽出残留物中の二酸化ケイ素量の規定はない。	USP23/NF18 未収載	FCC4 Dimethylpolysiloxane: 純度試験として、有機溶媒抽出残留物中の二酸化ケイ素量の規定はない。また、有機溶媒で抽出する操作のある試験もない。	参考
二硫化炭素	シヨ糖脂肪酸エステル、Sucrose Esters of Fatty Acids	純度試験(2)ジメチルホルムアミドの残存検出。原理は、ジメチルホルムアミドを水にし、生成したジメチルアミンをクロロホルム中で二硫化炭素と反応させて、ジチオカールバミン酸塩にする。	シヨ糖脂肪酸エステル、Sucrose Esters of Fatty Acids: 純度試験(2)ジメチルホルムアミドの残存検出、方法は公定書と同一	Sucrose Esters of Fatty Acids: 純度試験 Dimethyl formamideの測定は、試験料を水解し、生成したジメチルアミンをGLCで分析する。 [FNP Addendum 5, P.173]	未収載	未収載	未収載	未収載	脂肪族第二アミンの定性反応: 脂肪族第二アミンがアルカリ性下にニトロプロピルシドナトリウムとアセトアルデヒドと反応。[微量定性分析 p.401]ただし、ニトロプロピルシドナトリウムは、アルカリ性下に活性メチレンとも反応する。 [微量定性分析 p.386]
クロロホルム	α -L-アスパルチル-D-フェニルエステル(試薬)	純度試験で、TLCの展開溶媒として使用。	アスパルチル、Aspartame: 光学異性体不純物の規格はない。	アスパルチル、Aspartame: 光学異性体不純物の測定に使用し、規格は記載されていない。味の素(株)から入手可能と記載されているだけ。	未収載	Aspartame: 類縁物質の限度試験では、2-(5-benzyl-3,6-dioxopiperazin-2-yl)acetic acid, L-aspartyl-L-phenylalanine、220nmで検出される全不純物をHPLCで測定。不純物質の試験の品質確認試験法の記載はない。光学異性体不純物の限度規定はない。	Aspartame: 類縁物質の限度試験では、5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acidと210nmで検出される全不純物を測定。光学異性体不純物の限度規定はない。	Aspartame: 類縁物質の限度試験では、5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acidと210nmで検出される全不純物を測定。光学異性体不純物の限度規定はない。	食添7の α -L-アスパルチル-D-フェニルエステル(試薬): アスパルチル、Aspartameの純度試験(7)他の光学異性体の測定の対象物質。

有害試験薬	食添7	使用用途	医添規98	JECFA	日局13	EP3	USP23/NF18	FCC4	参考
クロロホルム	三塩化アンチモン試験液	試験を溶かすための溶媒として使用。	日局13の試験薬を使用する。	Carr-Price Reagent TS: chloroformに試験を溶かす [FNP 2 Rev.2 p.261]	塩化アンチモン(III)試験液: 溶媒はクロロホルム	Antimony trichloride solution: ethanol-free chloroformに溶かす。	Antimony Trichloride TS: chloroformに溶かす。	Antimony Trichloride TS: chloroformに溶かす。	三塩化アンチモン試験液は、carotenesやretinolの定性反応(Carr-Price反応)の試験。JP13はじめ諸外国で広く採用。クロロホルムの代わりにトルエンを使用し、濾紙にスポットする検査法が提案済み[(株)アイゼンからの資料、平成9年]。JECFAで一部のβ Carotensで採用されている。
クロロホルム	パラフェニルフェノール(試験薬)	溶状試験の溶媒として使用。	未記載	o-Phenyphenol, Sodium o-Phenyphenol, Phenylphenol, Sodium o-Phenyphenolの純度試験に、p-phenylphenolの限度値規格はない [Compendium p.1079]。Sodium o-Phenyphenolの規格にもp-phenylphenolの限度値規格はない [Compendium p.1377]。	未記載	o-Phenyphenol も p-Phenyphenol も未記載。	3-Phenyphenol (m-Phenyphenol)(試験薬): 溶状試験は規定されていない。定量法はGLC法。	o-Phenyphenol は未記載。p-Phenyphenol TSが記載されているが、p-Phenyphenol 自体の品質規格はない。	食添7記載のオルトフェニルフェノールの純度試験(3)パラフェニルフェノール及びその他の有機性不純物の測定での、測定対象物質。

有言試薬	食添7	医添規98	JECFA	日局13	EP3	USP23/NF18	FCC4	参考
クロロホルム	5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸(試薬)	類縁物質である5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸の含量を測定する純度試験は、アスパルテーム中の5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸の測定と同一条件のHPLC法。クロロホルムは使用しない。	アスパルテーム、Aspartame: 純度試験 5-Benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acidの測定に使う標準物質の品質規格は記載されていない。Food Chemical Codex から入手可能と記載されているだけ。	未収載	Aspartame: 類縁物質の純度試験では、2-(5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazinyl)acetic acid, L-phenylalanine, 220nmで検出される全不純物をHPLCで測定。純物質の試験の記載はない。2-(5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazinyl)acetic acidを含む不純物標準品を収載。	Aspartame: 類縁物質の純度試験では、5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acidと210nmで検出される全不純物を測定。5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acidのUSP標準品を収載。	Aspartame: 類縁物質の純度試験では、5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acidと210nmで検出される全不純物を測定。5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazineacetic acidのUSP標準品を使用。	食添7収載の5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸(試薬): アスパルテーム、Aspartameの純度試験(6) 5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸(試薬)の測定対象物。5-ベンジル-3,6-ジオキソ-2-ピペラジン酢酸を、食添7、JECFAではGLC法で分析、医添規98、EP3、USP23/NF18ではHPLC法で分析。EP3では、アスパルテームの不純物として、さらにL-aspartyl-L-phenylalanine、phenylalanineも測定対象にしている。
クロロホルム	塩化カリウム、potassium Chloride	未収載	Potassium Chloride: 純度試験 Iodine or bromide で、塩素溶液を加えて生成する臭素やヨウ素を捕集する溶媒として使用	塩化カリウム、Potassium Chloride: 純度試験(3) 臭化物の試験で臭素を捕集する溶媒として使用	Potassium Chloride: 純度試験 Bromides: chloramine 溶液、0.1M sodium thiosulfateを加えた後、590nmの吸光度測定。Iodides: sodium nitrite 溶液、0.5M sulphuric acid, デンブンプン溶液を加えて、青色を呈さないことを確認。	Potassium Chloride: 純度試験 Iodine or bromide で、塩素溶液を加えて生成する臭素やヨウ素を捕集する溶媒として使用	Potassium Chloride: 純度試験 Iodine or bromide で、塩素溶液を加えて生成する臭素やヨウ素を捕集する溶媒として使用	
クロロホルム	カラメルI、Caramel I (plain)	カラメル、Caramel: 純度試験(6) 4-メチルイミダゾールの試験で、抽出溶媒及びTLCの展開溶媒として使用	Caramel Colours: 純度試験 4-methylimidazoleの測定は、dichloromethaneで抽出し、GLCで分析。	未収載	未収載	未収載	Caramel: 純度試験 4-methylimidazoleの測定は、dichloromethaneで抽出し、GLCで分析。	
クロロホルム	カラメルIII、Caramel III (ammonia process)	純度試験(7) 4-メチルイミダゾールの試験で抽出溶媒及びTLCの展開溶媒として使用。カラメルの純度試験(7)と同一	Caramel Colours: 純度試験 4-methylimidazoleの測定は、dichloromethaneで抽出し、GLCで分析。	未収載	未収載	未収載	Caramel: 純度試験 4-methylimidazoleの測定は、dichloromethaneで抽出し、GLCで分析。	

有害医薬ム	食添7 カラメルIV、Caramel IV (sulfite ammonia process)	使用用途 純度試験(9)4-メチルイミダゾールの試験で抽出溶媒及びTLCの展開溶媒として使用、カラメルの純度試験(7)と同一	医薬類98 カラメル、Caramel: 純度試験(6)4-メチルイミダゾールの試験で、抽出溶媒及びTLCの展開溶媒として使用	JECFA Caramel Colours: 純度試験 4-methylimidazoleの測定は、dichloromethaneで抽出し、GLCで分析。	日局13 未収載	EP3 未収載	USP23/NF18 未収載	FCO4 Caramel: 純度試験 4-methylimidazoleの測定は、dichloromethaneで抽出し、GLCで分析。	参考
クロロホルム	希釈過酸化ベンゾイル、Diluted Benzoyl Peroxide	確認試験(賦形剤の沈殿と4,4'-ジアミノジフェニルアミンを酸化する能力を確認)と定量法(酸化還元滴定)で、試料を溶かすための溶媒として使用	未収載	Benzoyl Peroxide: 確認試験としての酸化力試験は、アセトン溶液中でヨウ化カリウムからのヨウ素の生成を見ている。定量では、アセトンに溶かしている。 [Compendium P.189]	過酸化ベンゾイル、25%含水(試薬): 溶解性の記載の中にクロロホルムも入っている	未収載	未収載	Benzoyl Peroxide: 確認試験は、アルコーリ性水酸化カリウム中で加熱して水分解し、生成したbenzoic acidの融点を測定。定量では、アセトンに溶かしている。	

有害試験	食添7	使用用途	医添規98	JECFA	日局13	EP3	USP23/NF18	FCC4	参考
クロロホルム	シエラック、Shellac	純度試験(4)ロシン及び(5)ロウの測定で溶媒として使用	未収載	Shellac [FNP Addendum 1 P.105], Shellac, Bleached [FNP Addendum 6 P.133]: 純度試験 Rosinでは、四塩化炭素を、純度試験 Waxではクロロホルムを溶媒として使用。	未収載	Shellac (wax-containing shellac, bleached shellac, dewaxed shellac, shellac の4 types): 純度試験 Colophony (-rosin)では、ジクロロメタン、メタノール、混合溶媒に試料を溶かし、TLCで分析。Rosinでは、四塩化炭素とwaxを確認。展開溶媒は酢酸、メタノール、ジクロロメタンの混合液。	Shellac (Orange Shellac, Dewaxed Orange Shellac, Regular Bleached Shellac, Refined Bleached Shellacの4 types): 純度試験 Rosinでは、四塩化炭素を、純度試験 Waxではクロロホルムを溶媒として使用。	[Shellac, Bleached], [Shellac, Bleached, Wax-free]: 純度試験 Rosinでは、ジクロロメタンを、純度試験 Waxではクロロホルムを溶媒として使用。	
クロロホルム	ジフェニル、Diphenyl	純度試験(3)ナフタレン及びその誘導体の測定(GLC法)で、試料を溶かすための溶媒として使用	未収載	Diphenyl: Solubility: Insoluble in water, soluble in ether and in ethanol. 純度試験にナフタレン及びその誘導体の限度値の規定はない。 [Compendium P.525]	ジフェニル(試薬): 純度試験は、試料をアセトンに溶かし、GLCでジフェニル含量を測定	未収載	未収載	未収載	
クロロホルム	シヨ糖脂脂肪酸エステル、Sucrose Esters of Fatty Acids	純度試験(2)ジメチルホルムアミドの残存検出、原理は、ジメチルホルムアミドを水に溶解し、生成したジメチルホルムアミンをクロロホルム中で二硫化炭素と反応させて、ジチオカカルバミン酸塩にする。	シヨ糖脂脂肪酸エステル、Sucrose Esters of Fatty Acids: 純度試験(2)ジメチルホルムアミドの残存検出、方法は公定書と同一	Sucrose Esters of Fatty Acids: 純度試験 Dimethyl formamideの測定は、試料を水に溶解し、生成したジメチルホルムアミンをGLCで分析する。 [FNP Addendum 6, P.151]	未収載	未収載	未収載	未収載	

有畜試薬 クロロホルム	食添7 ソルビタン脂肪酸エステル、Sorbitan Esters of Fatty Acids	使用用途 純度試験(4)ポリオキシエチレンの測定で、生成色素の抽出溶媒として使用	医添規98 モノオレイン酸ソルビタン、Sorbitan Monooleate、モノステアリン酸ソルビタン、Sorbitan Monostearate、モノパルミチン酸ソルビタン、Sorbitan Monopalmitate、モノラウリン酸ソルビタン、Sorbitan Monolaurate、ポリオキシエチレンを試験する規格がない。	JECFA Sorbitan Monolaurate [FNP Addendum 6 P.149] Sorbitan Monooleate [Compendium P.1407] Sorbitan Monopalmitate [Compendium P.1409] Sorbitan Monostearate [Compendium P.1411] Sorbitan Tristearate [FNP Addendum 1 P.113]: ポリオキシエチレンを試験する規格がない。	日局13 未収載	EP3 Sorbitan Laurate、Sorbitan Oleate、Sorbitan Palmitate、Sorbitan Stearate、Sorbitan Trioleate: ポリオキシエチレンを試験する規格がない	USP23/NF18 Sorbitan Monolaurate、Sorbitan Monopalmitate、Sorbitan Monostearate、Sorbitan Sesquioleate: ポリオキシエチレンを試験する規格がない	FCC4 Sorbitan Monostearate: ポリオキシエチレンを試験する規格がない	参考 ポリオキシエチレン基の確認は日本独自の規格。諸外国では、ソルビタン脂肪酸エステルにエチレンオキサイドを付加したポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル)が指定されているので、その混和を防ぐための規定。 ポリオキシエチレン系界面活性剤 (polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters, polyoxyethylene fatty acid esters, polyoxyethylene alkyl ethers, polyoxyethylene alky/phenyl ethersなど)の確認試験として、JP13、医添規98、JECFAなどで、チオシアン酸アンモニウム・硝酸コバルト試液による発色反応が広く採用されている。生成する青色色素の抽出にクロロホルムが使用されている。なお、USP23とFCC4では確認試験の中にこの定性反応は採用されていない。
クロロホルム	ダンマル樹脂、Dammar Resin	確認試験(2)(TLC法)及びヨウ素価測定(ウイイス法)で、試料を溶かすための溶媒として使用	ダンマルゴム、Dammar Resin: ヨウ素価測定は局方式(ウイイス法)で、試料を溶かすための溶媒はシクロヘキサ-	Dammar Gum: ヨウ素価測定はWijs methodで、試料を溶かす溶媒は四塩化炭素 [FNP 5 Rev.2 p.194]	未収載	未収載	未収載	Dammar Gum: 確認試験で試料を溶かす溶媒にchloroformを使用。	

有害試験	食添7	使用用途	医添規98	JECFA	日局13	EP3	USP23/NF18	FCC4	参考
クロロホルム	β-カロテン、β-Carotene	確認試験(1)(Carr-Price反応)、同(2)(UV可視種大吸収部の確認)、及び純度試験(5)吸光度比の測定で、β-カロテン溶液の溶媒として使用。	β-カロテン、β-Carotene: 確認試験はIR測定法(KBr錠剤法)。純度試験(3)吸光度の比は、シクロヘキサンの溶媒に溶かして測定。	Beta-Carotene (Synthetic) [Compendium P.385] の確認試験 Carr-Price Reaction では、三塩化アンチモニのクロロホルム溶液を使用。確認試験 Spectrophotometry では cyclohexane 溶液を使用。; Carotenes (Algae) [FNP Addendum 6 P.25]、Carotenes (Vegetable) [FNP Addendum 6 P.27] の確認試験 Carr-Price Reaction では、トルエン溶液を濾紙にスプレイトし、三塩化アンチモニのトルエン溶液をスプレイトまたは垂らす。確認試験 Spectrophotometry では cyclohexane 溶液を使用。	未収載	未収載	Beta Carotene: 確認試験は試料の chloroform 溶液を cyclohexane で希釈してから種大吸収部の吸光度比測定。	β-Carotene: 確認試験は試料の chloroform 溶液を cyclohexane で希釈してから種大吸収部の吸光度比測定。	食添7の確認試験(1): 三塩化アンチモニ試液による Carr-Price 反応。確認試験(2): 種大吸収部の確認。純度試験(5)の吸光度比測定の溶媒: クロロホルムに溶かした後、シクロヘキサンの希釈。 Carotenes や Retinol の定性反応として、Carr-Price 反応は、JP13 はじめ諸外国で広く採用されている。クロロホルムの代わりにトルエンを使用し、濾紙にスプレイトする検査法が提案済み [(株)アイゼンからの資料、平成9年]
クロロホルム	デュナリエラカロテン、Dunaliella Carotene	確認試験(1)(溶液の色の確認)と同(2)(Carr-Price反応)で、試料を溶かすための溶媒として使用。	未収載	未収載	未収載	未収載	未収載	未収載	食添7の確認試験(3)では、シクロヘキサンの溶かして吸光度測定。
クロロホルム	ニンジンカロテン、Carrot Carotene	確認試験(1)(溶液の色の確認)と同(2)(Carr-Price反応)で、試料を溶かすための溶媒として使用。	未収載	Carotenes (Vegetable): 確認試験 Carr-Price Reaction では、トルエン溶液を濾紙にスプレイトし、三塩化アンチモニのトルエン溶液をスプレイトまたは垂らす。確認試験 Spectrophotometry では cyclohexane 溶液を使用。 [FNP Addendum 6 P.27]	未収載	未収載	未収載	未収載	食添7の確認試験(3)では、シクロヘキサンの溶かして吸光度測定。

有害試験	食添7	使用用途	医添規98	JECFA	日局13	EP3	USP23/NF18	FCC4	参考
クロロホルム	パーム油カロテン、 Palm Oil Carotene	確認試験(1)(溶液の色の確認)と同(2)(Carr-Price反応)で、試料を溶かすための溶媒として使用。	未収載	未収載	未収載	未収載	未収載	未収載	食添公定書の確認試験(3)では、シクロヘキサンに溶かして吸光度測定。
クロロホルム	ビタミンA脂肪酸エステル	確認試験(1)(Carr-Price反応)および純度試験(2)クロロホルム不溶物で、試料を溶かすための溶媒として使用。	未収載	未収載	酢酸レチノール、Retinol Acetate、パルミチン酸レチノール、Retinol Palmitate: 確認試験(1)は三塩化アンチモンとの反応でクロロホルム溶液で行う。確認試験(2)と定量は「ビタミンA定量法第1法」に従う。イソプロパノール溶液で行う。	Vitamin A Concentrate, Synthetic (Oily Form): esters of retinoidからなる。確認試験では、吸収極大測定は2-propanol溶液で測定、TLCのための展開溶液は cyclohexane と ether の混合溶液、三塩化アンチモンとの反応はクロロホルム溶液を用いる。	Vitamin A (retinol) esters of retinols formed from fatty acidsを含む): 確認試験の試料溶液はクロロホルム溶液。三塩化アンチモンとの反応とTLCで確認	Vitamin A (retinol) esters of retinols formed from fatty acidsを含む): 確認試験の試料溶液はクロロホルム溶液。三塩化アンチモンとの反応とTLCで確認	食添7の確認試験(1)は、三塩化アンチモンとの反応。確認試験(2)は、2-プロパノールに溶かして吸光度測定。
クロロホルム	ビタミンA油、Vitamin A in Oil	確認試験(1)(Carr-Price反応)及び純度試験(2)クロロホルム不溶物の測定で、試料を溶かすための溶媒として使用。	未収載	未収載	ビタミンA油、Vitamin A Oil: 確認試験は三塩化アンチモンとの反応、クロロホルム溶液で行う。	Vitamin A: 確認試験としての吸収極大測定は2-propanol溶液で行う	Vitamin A (retinol) esters of retinols formed from fatty acidsを含む): 確認試験の試料溶液はクロロホルム溶液。三塩化アンチモンとの反応とTLCで確認。	Vitamin A (retinol) esters of retinols formed from fatty acidsを含む): 確認試験の試料溶液はクロロホルム溶液。三塩化アンチモンとの反応とTLCで確認。	食添7の確認試験(1)は、三塩化アンチモンとの反応。確認試験(3)は、2-プロパノールに溶かして吸光度測定。
クロロホルム	粉末ビタミンA、Dry Formed Vitamin A	確認試験(Carr-Price反応)で試料を溶かすための溶媒として使用。	未収載	未収載	未収載	Vitamin A Concentrate, Synthetic (Powder Form): esters of retinoidからなる。確認試験では、吸収極大測定は2-propanol溶液で測定、TLCのための展開溶液は cyclohexane と ether の混合溶液、三塩化アンチモンとの反応はクロロホルム溶液を用いる。	未収載	未収載	確認試験では、クロロホルム溶液に溶かして三塩化アンチモンとの反応。

有害医薬	食添7 プロピレングリコール 脂肪酸エステル、 Propylene Glycol Esters of Fatty Acids	使用用途 確認試験(2)で、水 解して生成したプロピ レングリコールとグリ セロールを確認する ためのTLC展開溶媒 として使用。	医添規98 モノステアリン酸プロ ピレングリコール、 Propylene Glycol Monostearate: 確認 試験はIR測定法(液 膜法)	JECFA Propylene Glycol Esters of Fatty Acids: 確認試験とし てpropylene glycolの 確認は、方法が特定 されていない。純度 試験 Total propylene glycolを確認試験とし て利用してもよいとあ る。その方法は、試料 を水解して生成したプ ロピレングリコールを 過ヨウ素酸処理後、 亜ヒ酸トリウム、ヨ ウ化カリウムを加え、 ヨウ素液で滴定。 [FNP Addendum 5 P.135]	日高13 未収載	EP3 Propylene Glycol Monopalmitostearate 、Propylene Glycol Monostearate(どちら もmixture of propylene glycol mono- and diesters and of stearic acid palmitic acids): 確認 試験は、融点、構成 脂肪酸のGLC分析、 monoestersのゲル濾 過HPLC分析(溶媒: THF)	USP23/NF18 Propylene Glycol Diacetate: 確認試験 はIR; Propylene Glycol Monostearate (a mixture of the propylene glycol mono- and diesters of stearic acid and palmitic acids): 確認 試験の規定がない。	FCC4 propylene Glycol Mono- and Diesters: 確認試験の規定がな い。	参考
クロロホルム	ミツロウ	純度試験(3)過酸化 物価の測定で試料を 溶かすための溶媒と して使用。	未収載	Beeswax, White and Yellow: 純度試験の 過酸化物価の測定で 試料を溶かすための 溶媒として使用。公定 書の方法と同じ。 [FNP Addendum 1 P.7]	ミツロウ、Yellow Beeswax; サラシミツ ロウ、White Beeswax: 酸価、けん 化価の測定は加温し たエタノールに溶かし て行う。	「Beeswax, White」、 「Beeswax, Yellow」: 過酸化物価の規定は ない。酸価、けん化価 の測定は加温した xyleneとalcoholの混 合液に溶かして行う。	未収載	「Beeswax, White」、 「Beeswax, Yellow」: 酸価の測定は加温し たアルコールに溶か して行う。	JECFAの記載では、 Insoluble in water, Sparingly soluble in alcohol, Very soluble in chloroform and ether. EP3の記載で は、partially soluble in hot alcohol (90 per cent V/V) and completely soluble in fatty and essential oils. FCC4の記載で は、Boiling alcohol dissolves cerotic acid and part of the myricin, which are constituents of the wax. It is completely soluble in chloroform in ether, and in fixed and volatile oils. It is completely soluble in carbon disulfide at temperature of 30° or above.

有害試験薬	食添7	使用用途	医添規98	JECFA	日局13	EP3	USP23/NF18	FCC4	参考
クロロホルム	リボフラビン	純度試験(2)ルミフラビンの測定で、試料を溶かすための溶媒として使用。JECFAの方法と同じ。	未収載	Riboflavin [Compendium P.1267]. Riboflavin from <i>Bacillus subtilis</i> [FNP Addendum 7 P.73]: 純度試験の Lumiflavin の測定で試料を溶かす溶媒として使用。	リボフラビン、 Riboflavin: 純度試験のルミフラビンの測定で試料を溶かす溶媒として使用。公定書の方法と同じ。	Riboflavin: 純度試験の Lumiflavin の測定で試料を溶かす溶媒として使用。	Riboflavin: 純度試験の Lumiflavin の測定で試料を溶かす溶媒として使用。	Riboflavin: 純度試験の Lumiflavin の測定で試料を溶かす溶媒として使用。	EP3では、Riboflavin Sodiun Phosphateの純度試験に Lumiflavinの規定がある。試料を dichloromethaneに溶かす。
クロロホルム	リボフラビン酪酸エステル	純度試験(1)溶状測定で試料を溶かすための溶媒として使用。	未収載	未収載	酪酸リボフラビン、 Riboflavin Butyrate: 純度試験(4)類縁物質の測定で、試料を溶かすための溶媒、及びTLCの展開溶媒として使用。	未収載	未収載	未収載	
クロロホルム	レシチン、Lecithin	純度試験(4)過酸化物質の測定、及び水分測定(カールフインシャー法)で、試料を溶かすための溶媒として使用	大豆レシチン、 Soybean Lecithin, SBPhosphatide: 純度試験(4)過酸化物質の測定で、試料を溶かすための溶媒として使用	Lecithin: 純度試験の過酸化物質の測定で、試料を溶かすための溶媒として使用	未収載	未収載	Lecithin: 過酸化物質、水分測定(カールフインシャー法)の規定がない。純度規定としては、acetone-insoluble matterの含有量規定がある。有機溶媒への可溶性を利用した純度試験としては、Hexane-insoluble matter(0.3%以下)の規定がある。	Lecithin, hydroxylated Lecithin: 純度試験の過酸化物質の測定で、試料を溶かすための溶媒として使用。純度規定としては、acetone-insoluble matterの含有量規定がある。有機溶媒への可溶性を利用した純度試験としては、Hexane-insoluble matter(0.3%以下)の規定がある。	

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（分担研究報告書）

既存添加物の規格設定のための検討

分担研究者：米谷 民雄（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長）

研究要旨

既存添加物の規格設定及び規格適合性のための検討として、I) 既存添加物のベニバナ赤色素につき、酵素処理法と従来法による製品成分の異同及び規格適合性につき検討を加えるとともに、II) JECFA 規格のない既存添加物品目に対する業界自主規格の検討、及びIII) わが国独自の食品香料品目の調査を行った。

協力研究者

佐藤 恭子（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官）

小見 邦雄（日本食品添加物協会常務理事）

川村 洋（日本香料工業会専務理事）

A. 研究目的

本研究では、既存添加物の規格設定及び規格適合性のための研究として、I) 酵素反応を用いて製造される着色料品目につき、実験的研究を行った。平成 10 年度はクチナシ青色素を、平成 11 年度はクチナシ赤色素を対象とし、規格設定時に問題となると考えられる項目に関する実験的研究を行った。本年度は、第 7 版食品添加物公定書に新たに収載されたベニバナ赤色素につき、従来の製法と酵素処理法による色素成分の異同について検討した。

一方、我が国で規格を設定する際には、国際的規格（JECFA 規格）と整合性をとる必要がある。天然添加物には JECFA 規格がある品目とない品目があるが、JECFA 規格がある既存添加物品目については、今回作成された第 7 版食品添加物公定書において、多くの品目につき成分規格が設定されたところである。そこで、II) JECFA 規格のない既存

添加物品目に対して、日本食品添加物協会に自主規格の検討を依頼するとともに、III) 日本香料工業会に、我が国独自の食品香料品目の調査を依頼した。

以下に I の検討結果を詳しく報告する。なお、II 及び III の検討結果については、それぞれ別添 1 及び別添 2 として提出するので、それらを参照されたい。

I) 既存添加物ベニバナ赤色素に関する実験的研究

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

ベニバナ赤色素 2 社 3 製品：日本食品添加物協会を通じて入手した。

ベニバナ花乾燥品：中国（破砕品）は日本食品添加物協会を通じて入手した。中国産、山形産（最上紅花）および埼玉産は購入した。

メタノール：片山化学工業（株）製高速液体クロマトグラフ用又は和光純薬工業製試薬特級品。

ジメチルスルホキシド・ d_6 （DMSO）：ISOTEC INC. 製。

カラムクロマトグラフィー用担体：Amersham Pharmacia Biotech 社製、セファデックス LH-20。

微結晶セルロース：フナコシ製 フナセル。
グルコースオキシダーゼ：和光純薬（株）
製，Aspergillus niger 由来。

パーオキシダーゼ：オリエンタル酵母
（株）製，セイヨウワサビ根由来。

他の試薬は試薬特級品を用いた。

水は，ミリ Q SP Standard（日本ミリポ
ア製）により精製して得られた超純水（比抵
抗値 18 M Ω · cm 以上）を用いた。

HPLC 前処理用フィルター：片山科学工
業（株）製 KC プレップオムニ 4（直径 4
mm，孔径 0.5 μ m）。

固相抽出カートリッジ：ダイソー（株）
製，SPE ODS-A。

2. 装置

自記分光光度計：UV-1600（（株）島津製
作所製）。

高速液体クロマトグラフ（分析用）：ポン
プ LC-10AD 2 台，オートインジェクター
SIL-10A，カラムオープン CTO-10A，ダ
イオードアレイ検出器 SPD-M10A VP，コ
ミュニケーションバスモジュール CBM-10A
（（株）島津製作所製）。

高速液体クロマトグラフ（分取用）：ポン
プ LC-10AVP 2 台，カラムオープン
CTO-10A VP，ダイオードアレイ検出器
SPD-M10A VP，システムコントローラー
SCL-10A VP（（株）島津製作所製）

高速液体クロマトグラフ／質量分析装置：
液体クロマトグラフ HP 1090 II/L，MS エ
ンジン HP 5989B，インターフェース HP
59987A Electrospray（Hewlett Packard
製）。

核磁気共鳴装置：JNM-A600 及び JNM-
A500（日本電子（株）製）。

質量分析計：JMS-700（日本電子（株）
製）

3. 吸収スペクトル測定条件

測定溶媒：ジメチルホルムアミド
（DMF）

第 7 版食品添加物公定書 ベニバナ赤色
素 確認試験法(1)に準拠して行った。

4. 薄層クロマトグラフィー（TLC）条件

第 7 版食品添加物公定書 ベニバナ赤色
素 確認試験法(3)に準拠して行った。

薄層板：Merck 社製 TLC プレート シリ
カゲル 60F₂₅₄ 20×20 cm，展開溶媒：n-ブタ
ノール-水-酢酸混液（4:2:1）

5. 高速液体クロマトグラフィー（HPLC） 条件

1)分析 HPLC：カラム J'sphere ODS-H80
（250×4.6 mm i.d.，S-4 μ m，8 nm，
（株）ワイエムシイ製），カラム温度 40 °C，
流速 1 mL/min，移動相 メタノール-0.5%
酢酸（3:1），測定波長 200～600 nm。

2)分取 HPLC：カラム J'sphere ODS-H80
（250×20 mm i.d.，S-4 μ m，8 nm，
（株）ワイエムシイ製），カラム温度 室温，
流速 6 mL/min，移動相 メタノール-
0.5%酢酸（3:1），測定波長 200～600 nm，
注入量 50 μ L。

6. 液体クロマトグラフィー／エレクトロスブ
レー質量分析法（LC/ESI-MS）分析条件
HPLC 条件：カラム J'sphere ODS-H80
（150×2 mm i.d.，S-4 μ m，8 nm，（株）
ワイエムシイ製），カラム温度 40 °C，流速
0.06 mL/min，移動相 メタノール-0.5%酢
酸（3:1），測定波長 200～600 nm，注入
量 2 μ L。

MS 条件：ネガティブモード

7. HPLC および LC/MS 用試験溶液の調製
ベニバナ赤色素あるいは精製した色素成分
を DMF またはメタノールに懸濁あるいは溶
解し，HPLC 前処理用フィルターでろ過し，

HPLC および分析用溶液とした。

8. 高分解能 Fast Atom Bombardment・マススペクトロメトリー (FAB-MS) 条件

ネガティブモード, マトリックス: グリセロールまたは 3-ニトロベンジルアルコール

9. ベニバナ赤色素からの主色素成分及び副色素成分の単離

1) 試料 A2 からの主色素成分の単離

試料をメタノールに懸濁し, LH20 カラム (15×1.5 cm i.d.) に負荷してメタノールで溶出し, 主色素成分を単離した。

2) 試料 B からの色素成分の単離

試料 B は DMF やメタノール等の各種溶媒に完全には溶解しないため, メタノールにより色素成分を抽出し, 濃縮液について, カラムクロマトグラフィー (CC) を行った。濃縮液を LH-20 カラム (20×2.0 cm i.d.) に負荷して 0.5%酢酸含有メタノールで溶出し, 主色素成分および副色素成分を含む画分を集めた。

主色素成分含量の高い画分については, 0.5%酢酸含有メタノールを用いた LH-20 CC による精製を繰り返した。各画分の純度を HPLC で確認し, 検出波長 520 nm における主色素成分のピーク面積が約 97%以上の画分を集めた。この画分を LH-20 カラムに負荷し, メタノールで溶出することで色素画分と酢酸を分離し, 色素画分をエバポレーターを用いて 30 °C以下で濃縮乾固し, 主色素成分を得た。

副色素成分を含む画分 (HPLC で副色素のピーク面積が約 20%以上の画分) については, メタノールを用いた LH-20 CC で酢酸を除去後, エバポレーターを用いて 30 °C以下で濃縮乾固し, 分取 HPLC 用試料とした。分取 HPLC で得られた画分は, 水で 4 倍に希釈し, 固相抽出カートリッジ (あらか

じめメタノールで洗浄し, 水でコンディショニングした) を通過させた。カートリッジは水 10 mL で洗浄し, メタノール 約 1 mL で色素成分を溶出した。得られた色素画分 3 ~ 5 mL を集め, メタノールを用いた LH-20CC で水分を除去後, エバポレーターを用いて 30 °C以下で濃縮乾固し, 副色素成分を得た。

10. 酵素処理による赤色素の調製

ベニバナ花乾燥品 (中国産破砕品) 5 g, グルコース 500 mg, グルコースオキシダーゼ 75 ユニット, パーオキシダーゼ 1500 ユニット, 0.5mol/L クエン酸緩衝液 (pH5.7) 100 mL, 微結晶セルロース 2 g を混合し, 30 °Cで 18 時間振とうした。微結晶セルロースを濾別後, 水洗し, DMF で色素成分を抽出した。HPLC 前処理用フィルターで濾過後, HPLC を行った。

11. ベニバナ花弁からの赤色素の抽出

1) メタノールおよび 0.5%酢酸メタノール抽出

ベニバナ花乾燥品 (4 種類) 各 1 g にメタノール 50 mL を加えて 5 分間超音波抽出を行い, 100 メッシュのナイロン網で濾過した。残さに 0.5%酢酸メタノール 50 mL を加えて 5 分間超音波抽出を行い, 100 メッシュのナイロン網で濾過した。得られたメタノールおよび 0.5%酢酸メタノール抽出液の一部をそれぞれ HPLC 前処理用フィルターで濾過し, HPLC 分析を行った。

2) DMF による抽出

ベニバナ花乾燥品 (4 種類) 各 1 g に DMF 5 mL を加えて暗所で一晩静置した。濾紙で濾過し, その一部を HPLC 前処理用フィルターで濾過し, HPLC 分析を行った。

3) 炭酸ナトリウムを用いた抽出

ベニバナ花乾燥品（4種類）各1 gを水洗し、100メッシュのナイロン網で濾過した。この操作を水の黄色がほとんどなくなるまで繰り返し、残さに1%炭酸ナトリウム溶液10 mLを加えて3分間超音波抽出を行い、100メッシュのナイロン網で濾過した。濾液5 mLに微結晶セルロース0.5 gおよび10%クエン酸1 mLを加えて静置した。微結晶セルロースを10%クエン酸および水で洗浄した後、DMFを加えて超音波抽出を行った。遠心分離（3,500r.p.m., 3分間）して得られた上清をHPLC前処理用フィルターで濾過し、HPLCを行った。

C. 研究結果と考察

1. 市販着色料の色素成分の分析

ベニバナ赤色素は、カルタミン¹⁾を主色素成分とする着色料である。カルタミンは、Fig.1に示す構造を持つフラボノイド系赤色素で、水に難溶である。ベニバナの色素成分としては、カルタミンの他に、ベニバナ黄色素の色素成分である水溶性のサフロミンA（ヒドロキシサフライエローA）²⁾、サフライエローB³⁾等が知られている。国によっては、ベニバナの水抽出物は、偽サフランとして用いられることがあり、その安全性に疑問が持たれるという報告もある⁴⁾。ベニバナ（紅花、Safflower）はキク科の1年生草木で、原産地はエジプトだが、現在では中国、インドで多く生産されている。日本では、主に中国から乾燥花弁を輸入している。従来より、ベニバナ赤色素は、ベニバナより水で黄色素を除去した後、弱アルカリ水溶液で抽出し、有機酸で中和して赤色素を分取することによって得られている。従来法では、カルタミン含量を高めるために、ベニバナ自体の酵素を利用する「摺り花」、「紅餅」などの前処理も行われて来た。

平成7年8月の厚生省生活衛生局食品科学課長通知の既存添加物名簿収載品目リストにお

いて、ベニバナ赤色素は、「キク科ベニバナ (*Carthamus tinctorius* LINNE)の花より、黄色素を除去した後、室温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はカルタミンである。赤色を呈する。」とされていたが、その後、訂正の申出により、平成8年5月の厚生省生活衛生局長通知の既存添加物名簿収載品目リストにおいては、「...の花又はこれを発酵若しくは酵素処理したものより、黄色素を除去した後、室温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、...」と一部変更された。

ベニバナの色素成分の研究は、山形大小野寺らのグループや弘前大奥野らと北海道東海大松本のグループなどにより行われてきた。その過程において、カルタミンの前駆体が明らかにされ⁵⁾、その前駆体はベニバナの培養細胞中でサフライエローBから誘導されることが明らかにされ⁶⁾、さらにサフライエローBを酵素処理して得る方法が見いだされた。この方法を応用したベニバナ赤色素の生産方法が開発され、平成8年6月には食品化学新聞に酵素による紅花赤色素生産について世界初の技術開発として紹介されている。

ベニバナ赤色素に関する特許としては、ベニバナを過マンガン酸カリウムと接触させてカルタミンを生成する方法、サフライエローBに酸化還元酵素を作用させてカルタミンに変換する方法など、カルタミンの合成に関するものや、セルロースからアルカリ溶液で再抽出し、高純度のカルタミン塩を得る方法などが出願されている。さらに、セルロースに赤色素を選択的に吸着させ安定化する方法、カルタミンの水への可溶化に関する特許など、色素製剤に関するものも出願されている。天然添加物の規格は原体に関するものであるため、本研究では、酵素処理により得られたベニバナ赤色素の色素成分について、従来法で得られたものとの比較を目的とした。市販ベニバナ赤色素として、酵素処理法を申

請した A 社のセルロースに吸着させた製剤 (試料 A1) と, 化粧品用として製剤から更に色素塩として精製したもの (試料 A2), および従来法でベニバナ赤色素を生産している B 社の色素原体 (試料 B) を日本添加物協会を通じて入手した。

1) 紫外可視吸収スペクトル

公定書の確認試験(1)を参考に, ベニバナ赤色素試料の吸収スペクトルを測定した。結果を Fig. 2 に示す。いずれも可視部の吸収極大は 525 nm から 535 nm に存在したが, 試料 B の方が短波長側の吸収が大きく, 赤色以外の成分を多く含むものと予想された。

2) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

公定書の確認試験(3)に従い, TLC を行った。結果を Fig. 3 に示す。

すべての試料において, Rf 値 0.44 に橙色のスポットが観察された。試料 B については, その他に Rf 値 0.39 にも橙色のスポットが観察され, 原点にも黄色が残った。TLC からも, 試料 B は多くの色素成分を含むことが予想された。

3) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による色素成分の分析

TLC の結果から, 試料 B には試料 A1, A2 とは異なる色素成分も含まれることが示唆されたため, さらに, HPLC を行うことにした。

① 分析条件の検討

Nakano らは, ODS カラムを用い, メタノール-水系の HPLC によりカルタミンと他の色素成分の分析を行っている。そこで, メタノール-水系の条件検討を行ったが, 色素成分は分離しなかった。そこで, Onodera らのメタノール-水-酢酸系の分析条件⁶⁾を参考に条件検討を行った。メタノール-1.5%酢酸 (7:3) を溶離液として, 東ソー製

TSK-GEL ODS 80Ts (250×4.6 mm i.d.)を用いた場合, 検出波長 520 nm において, 試料 A2 では 1 本のピークが観察されたが, 試料 B では, 分離の悪い 2 本のピークが観察された。そこで, 金属不純物の少ないシリカゲル基材を使用し, きわめて高い疎水性と表面修飾率を有するとされる, J'sphere ODS-H80 カラムを用いて同様の条件で分析を行ったところ, 試料 B においても良好な分離が見られた。ベニバナ赤色素 3 試料の検出波長 520 nm における HPLC クロマトグラムを Fig. 4 に示す。いずれの試料でも, 保持時間 12.1 分に, 吸収極大 519 nm のピークが観察された。さらに, 試料 B については, 保持時間 11.0 分にもピークが観察された。このピークは, 主色素成分と同様の吸収スペクトル (吸収極大 522 nm) を持つことから, 主色素成分と類似の化合物であると考えられた。

2. ベニバナ赤色素の主色素の構造決定

ベニバナ赤色素試料の主色素成分がカルタミンであることを確認するために, 主色素成分のピークに対応する化合物を精製し, 構造決定を試みた。

まず, 試料 A2 からは, 溶離液としてメタノールを用いた LH20 カラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより, 主色素成分を単離することができた。ところが, 試料 B については, 同様の条件では, 主色素成分と副色素成分を分離することができなかった。そこで, 0.5%酢酸含有メタノールを溶離液として LH20 カラムクロマトグラフィーを行ったところ, 主色素成分を単離することができた。しかし, 主色素成分の 0.5%酢酸含有メタノール溶液をエバポレーター (水浴温度 30 °C) で濃縮乾固すると, 黄変がみられたため, 分解するものと考えられた。そこで, 単離した主色素成分は 0.5%酢酸含有メタノール溶液のまま, LH20 カラムに負荷し, メタノールで溶出した。この操作により, 酢酸

と主色素成分を分離することができ、主色素成分は分解することなく、濃縮乾固できた。

試料 A2 および B から単離した主色素成分について LC/ESI-MS (ネガティブモード) および各種 NMR を測定した。いずれの主色素成分も、LC/ESI-MS で m/z 909 の擬分子イオンピークを示し、カルタミン (分子量 910, 分子式 $C_{45}H_{42}O_{22}$) と予想された。また、DMSO- d_6 中で測定した主色素成分の 1H -NMR および ^{13}C -NMR のデータはカルタミンの文献値と矛盾のないものであった。カルタミンは共役系が伸びており、左右対称な分子であるため、比較的大きな分子であるにもかかわらず、比較的単純なスペクトルを示した。さらに、H-H COSY, HMQC, HMBC スペクトルからも主色素成分がカルタミンであると考えられた。

3. ベニバナ赤色素の副色素の構造決定

試料 B のみに見られた副色素成分の構造を明らかにするため、副色素成分の単離を試みた。

試料 B から主色素成分の単離を行った際には、主色素成分は単離できたものの、副色素成分の画分には主色素成分も混入し、LH20 カラムクロマトグラフィーによる単離は困難であった。そこで、分取クロマトグラフィーにより精製を行うことにした。LH20 カラムクロマトグラフィーにより得られた画分をエバポレーターにより濃縮しても、副色素成分の著しい分解は見られなかったが、濃縮物に酢酸が高濃度で残留するため、濃縮の前に、主色素成分と同様、メタノールを溶離液とし LH20 カラムクロマトグラフィーを行い、酢酸を除去し、濃縮したものについて、分取クロマトグラフィーを行った。分取クロマトグラフィーには、メタノール-1.5%酢酸 = 3:1 を使用したため、得られた画分をそのまま濃縮乾固すると、黄変がみられ、副色素成分は分解するものと考えられた。そこ

で ODS 系の固相抽出カートリッジに色素を吸着させ、水で酢酸を溶出した後、色素画分をメタノールで溶出するという方法で酢酸の除去を行った。しかし、得られた色素画分は濃縮乾固により黄変した。そこで、さらに、カートリッジから溶出した色素画分について、メタノールを溶離液とした LH20 カラムクロマトグラフィーにより水の除去を行った。以上のような行程を経て得られた副色素成分画分には濃縮乾固による分解は見られなかった。

単離した副色素成分について LC/ESI-MS (ネガティブモード) を行ったところ、 m/z 953 の擬分子イオンピークを示した。カルタミンとの分子量の差は 44 と考えられた。そこで、高分解能 FAB-MS を行った結果、擬分子イオンピークは $C_{45}H_{46}O_{23}$ であり、カルタミンに C_2H_4O が結合した化合物であると考えられた。

副色素について DMSO- d_6 中で 1H -NMR, ^{13}C -NMR を測定したところ、左右が対称なカルタミンと異なり、多くのシグナルが観察された。DMSO- d_6 中で 1H -NMR を測定した場合、水酸基のプロトンのシグナルも観察されるため、より複雑となり、H-H COSY, HMQC, HMBC スペクトルによっても、完全な帰属を行うことができなかった。しかし、カルタミンのスペクトルと比較すると、糖部分のスペクトルの変化が大きかったことから、高分解能 FAB-MS の結果を基に、カルタミンの糖部分に C_2H_4O が結合した化合物であることが予想された。

4. 酵素処理ベニバナ赤色素

今回入手したベニバナ赤色素は、製造業者により色素成分組成が異なっていた。これは、製造方法の違いによるものであると考えられたが、酵素処理法で製造されたという確認はとれなかった。そこで、特許に記載された方法を基に、実験室でベニバナ花卉から酵素処理によるベニバナ赤色素の合成を試みた。