

た結果、残留物の採取量に関係なく、二酸化ケイ素の量は、その配合量にほぼ一致する結果を得られた(表9)。

熱分解条件

装置： 環状炉型

採取量： 残留物 0.1~0.5 g (磁器製サンプルポートに広げて入れる)

窒素流量： 200 ml/min

温度： 室温~700°C, 5°C/min で昇温

表9 熱分解残分量の測定結果

	熱分解測定 の試料量 (g)	熱分解残分 (%) ／ヘキサン溶解残 分	熱分解残分 (%) ／試料B
試料B (遠心分離ヘキサ ン溶解残分)	0.1	4.9	9
	0.2	5.0	9
	0.5	5.1	9

4. 結論

シリコーン樹脂を、有害試薬を用いずに測定する試験方法の検討を行ってきたが、従来の方法であるソックスレー抽出法で、抽出溶媒をヘキサンに変更する方法では、シロキサン抽出率が悪く、対応できなかった。一方、医薬品添加物規格(1998年)の「ジメチルポリシロキサン・二酸化ケイ素混合物」の純度試験の方法で試験を行った場合、純度試験(1)~(3)については対応可能であったが、純度試験(4)の二酸化ケイ素量においては、粘度が高いシロキサンを使用した製品については対応できないことが判明した。しかし、このヘキサンでの抽出方法に加え、残留物を窒素ガス気流中で熱分解を行った結果、二酸化ケイ素の配合量に近い値が得られることが証明され、「シリコーン樹脂」につき、有害試薬である四塩化炭素を用いない試験方法(別紙参照)が確立された。

以 上

別紙

シリコーン樹脂

Silicone Resin

ポリジメチルシロキサン

性 状 本品は、無～淡灰色で、透明若しくは半透明の粘ちような液体又はペースト状の物質で、ほとんどにおいがない。

確認試験 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の液膜法により測定するとき、 $2,960\text{cm}^{-1}$ 、 $1,260\text{cm}^{-1}$ 、 $1,124\sim 1,010\text{cm}^{-1}$ 及び 800cm^{-1} のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

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

本品 20 g を量り、ヘキサン 100 ml を加えて振り混ぜてよく分散させた後、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。上澄み液を分取し、先の上澄み液と合わせ、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、屈折率を測定する。(注 1)

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

(1) の検液の 25°C における動粘度を測定する。

(3) 比重 $0.96\sim 1.02$

(4) 二酸化ケイ素 15.0%以下

(1) で抽出した後の残留物を、次の操作条件で熱分解を行い、シリコーン油成分をクラッキング分解で揮散させ、残量物の重量を量る。(注 2)

操作条件

装置 環状炉型

窒素流量 200 ml/分

温度 室温～ 700°C 、 $5^\circ\text{C}/\text{分}$ で昇温

— 注 —

(注 1) 遠心分離法では、二酸化ケイ素を沈降分離し、上澄み液が完全に透明になるためには、遠心分離条件として毎分 10,000 回転で 30 分間程度が望ましい。微粉シリカを混入した製品などでは、遠心分離条件が十分でない場合に、二酸化ケイ素の分離が不十分で上澄み液が透明にならないことがある。

(注 2) 二酸化ケイ素の量は 3～15% の範囲に規定されているが、(1) で抽出した後の残留物が、ヘキサンによるシリコーン油の溶解分離が不十分で 15% 以上となることがある。純度試験 (1) のヘキサン不溶残留物を窒素ガス気流下で熱分解を行い、シリコーン油成分をクラッキング分解で揮散させることによって、二酸化ケイ素量を正確に定量することができる。

以 上

分担研究報告書

食品中の茶抽出物の 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指し、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茶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

茶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、飲料、菓子など多くの加工食品に使用されている。しかし、茶抽出物が多く成分から構成されていることから本物質の一斉分析は困難である。今回カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、カフェイン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートを中心に食品からの茶抽出物の 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

食品中の茶抽出物は、固相カラムによる前処理を行った後、UV 検出器付き HPLC を用いてグラジエ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 (5.0 mL) は直接、固体食品 (5.0 ~ 50.0 g) はフードミルで粉碎後、適当な溶媒 (酢酸エチル等) で抽出した後、固相カラム (CARBOGRAPH 300 mg/6 mL) に負荷し、先ず、水で洗浄し不用物質を除去する。次にアセトニトリル : ヘキサン (95:5) 150 mL で茶抽出物を溶出させ、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) をエタノールで調製した後、さらにエ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シリカゲル

カラム : Inertsil ODS-2 粒子径 3 μm

(250 × 4.6 mmI.D.)

ガードカラム : Inertsil ODS-3

(5 × 4.6 mmI.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ジエントプログラムにて使用する。(移動相 A の比率)

0~12分；18%→20%

12~20分；20%→40%

20~25分；40%

流速：1.0 mL/min

波長：270 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) カテキン
- (2) エピカテキン
- (3) エピガロカテキン
- (4) カフェイン
- (5) エピカテキンガレート
- (6) エピガロカテキンガレート
- (7) リン酸：特級
- (8) エタノール：特級
- (9) アセトニトリル：HPLC 用
- (10) ヘキサン：特級

C. 研究結果

1. 操作のフローチャートを下記に示す。

試料

CARBOGRAPH 300 mg/6 mL に負荷

H₂O で洗浄

CH₃CN/ヘキサン(95:5)で溶出

濃縮乾固

CH₃OH で溶解

HPLC で分析

2. 検量線

カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、カフェイン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートの良好な検量線 ($r^2=0.992\sim 0.998$) が得られた。

3. 本法による各茶抽出物の添加回収実験の結果を示す。

(n=3)

試料	回収率 (%)					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
飲料	101.9	86.7	88.4	93.4	99.2	87.6
ゼリー	90.6	99.0	85.6	97.6	98.8	88.9
アメ	98.1	99.8	99.0	97.8	94.6	96.0

(1) カテキン (2) エピカテキン (3) エピガロカテキン (4) カフェイン (5) エピカテキンガレート (6) エピガロカテキンガレート

4. 本法による各茶抽出物の試料中の含量を示す。

(n=3)

試料	含量 (μ g/g)					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
飲料	24.0	16.1	26.3	23.1	17.6	28.3
ゼリー	1.25	0.14	0	8.07	2.57	0.92
アメ	1.68	2.52	22.3	75.5	16.0	51.2

(1) カテキン (2) エピカテキン (3) エピガロカテキン (4) カフェイン (5) エピカテキンガレート (6) エピガロカテキンガレート

D. 考察

先ず、6種の茶抽出物（カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、カフェイン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート）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ジェント溶出法により、25分以内に6成分を完全に分離定量できることが判明した(図1)。茶抽出物6成分の紫外吸収スペクトルを測定したところ、いずれも270nm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270nm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CARBOGRAPHに負荷し溶出液にアセトニトリル/ヘキサン(95:5)を使用することにより、不用物質が除去でき、また茶抽出物6成分の回収率も良く再現性のある結果が得られた。

E. 結論

各種食品中の茶抽出物（カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、カフェイン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート）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、また各茶抽出物の添加回収率は、85%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。

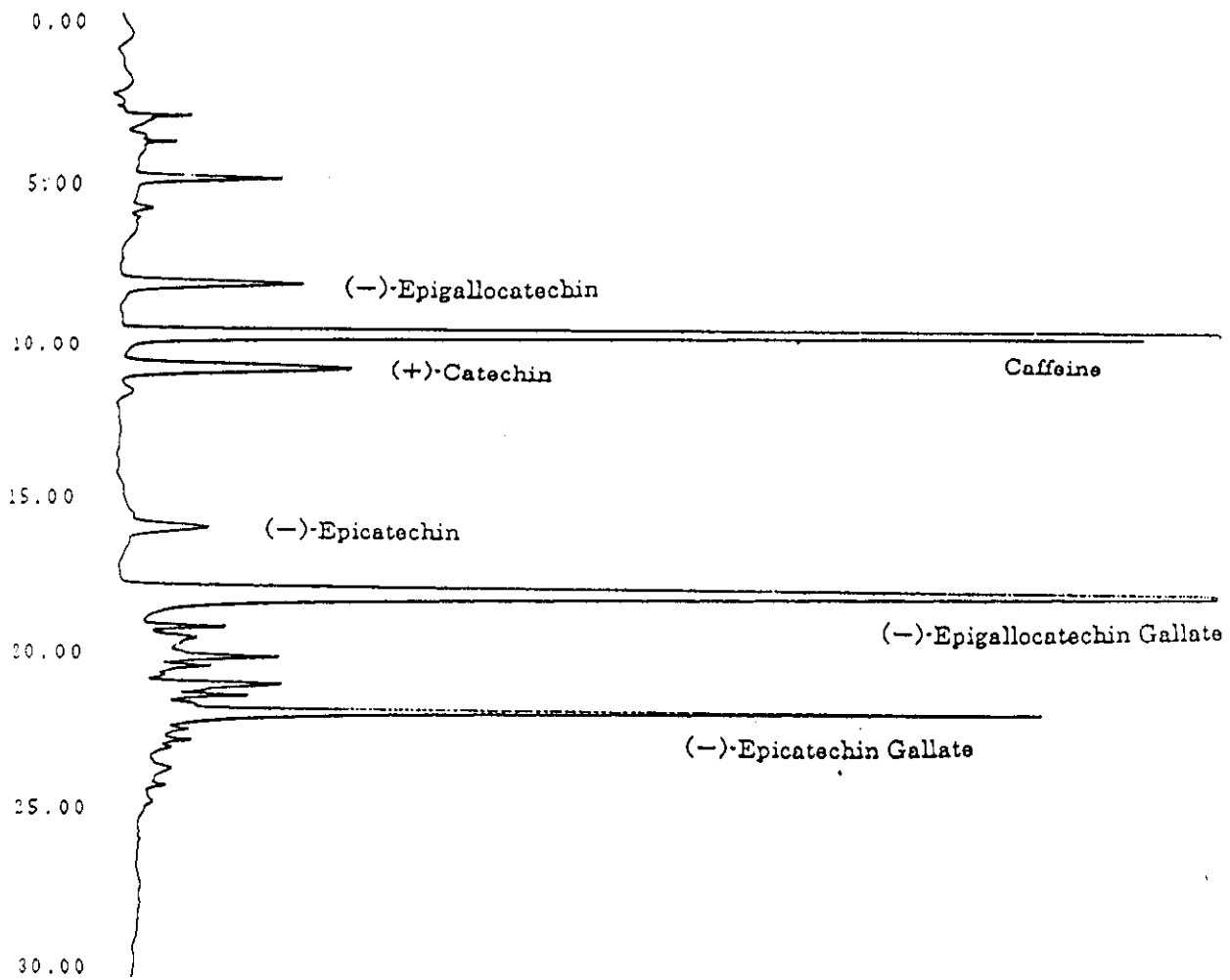


図1 茶抽出物の HPLC による分離

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

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 岡山大学薬学部教授

研究要旨 本研究では、昨年度に引き続き、確認試験法としての第 8 版食品添加物公定書に採用されるような赤外吸収スペクトル (IR) の模範又は基準となるスペクトルを得るため、第 7 版食品添加物公定書記載の参照赤外吸収スペクトルに疑義のあったものを再度検討した。さらに、食品香料や食品添加物についても IR を測定し、確認試験に IR が用いられるか否かを検討し、加えて、その測定法などの改良・改善について提言を行った。

A. 研究目的

赤外線吸収スペクトル (以下 IR と略する) その簡便性と確実性から、有機・無機化合物を問わず、その確認試験に有用で、世界的にも各種化合物の確認に広く活用されている。しかも、IR 測定用の機器も最近一段と進歩し、波数再現性のよいフーリエ変換型 (FT) 分光器なども安価に市販され、 $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ の領域の IR スペクトルを簡単に得られるようになってきている。このような状況のもとで、各種品目の確認試験に多用されるのは当然のことである。そこで、本研究では、食品香料や食品添加物についても IR を測定し、確認試験に IR が用いられるか否かを検討し、加えて、その測定法などの改良・改善について提言を行うことを目的とした。しかし、現在まで IR の測定法としては、多くの固体試料測定法が知られているにもかかわらず、臭化カリウム錠剤法 (KBr 法) が適用されることが多いが、古くから指摘されているように、試料と KBr との相互作用や KBr に含まれる水分の影響などによって、有機化合物でも、しばしば異常スペクトルが観測されることが知られている。そこで、本研究では、固体の IR は原則として、異常スペクトルが観測されにくいヌジョール法 (ペースト法, Nujol 法) で測定することにした。なお、ここでは、通常固体状態の IR は、その固体について結晶形などを含め固有の情報として扱われているため、「本来の試料のスペクトルとは異なるスペクトル」を「異常スペクトル」という表現で使用している。

B. 研究方法

前述「はじめに」に述べた観点から，参照 IR 記載の品目を入手し，現行第 7 版の参照 IR の妥当性と問題の有無などを検討するため，各品目についてペースト法（ヌジオール，Nujol 法），KBr 法及び液膜法で IR を測定した。

本研究では，ヌジオール法と液膜法については，対照に KBr セル板 1 枚（必要に応じて減光器を使用），分解能としては 2 cm^{-1} （50 回繰り返し）を用い，KBr 法については，原則として現行第 7 版の記載どおりの測定条件で，必要に応じて減光器も使用した。なお，使用した分光器（FT-IR 装置）は；簡易型の Nicoret Impact 400 で，公称 400 cm^{-1} まで測定可能であるが，実用的な波数限界は約 450 cm^{-1} である。

C. 研究結果

(1) カルバナロウの赤外吸収スペクトルについて

昨年度、カルバナロウの三つのメーカーの製品について、IRを測定した結果、1社の製品は、他の製品と異なるIRが得られることが分かった。そこで、結晶多形や異常スペクトルの可能性も含め、さらに検討した。

(1) - 1. 昨年度得られた異なるスペクトルと結晶多形や異常スペクトルの可能性について

他社と異なるIRを与えるF社製の製品（昨年度提供品）について、KBr法と固体薄膜法でも測定したが、スペクトルに変化が認められなかった。従って、他社と異なるIRは、測定法に依存する異常スペクトルでないと考えられる。次いで、他形の可能性を検討するため、昨年度提供品を加熱溶融後、種々の温度で固化させた資料について、IRを比較検討したが、スペクトル変化は認められなかった。このことは、多形とするより、むしろ他の物質と判断するのが妥当であることを示す。

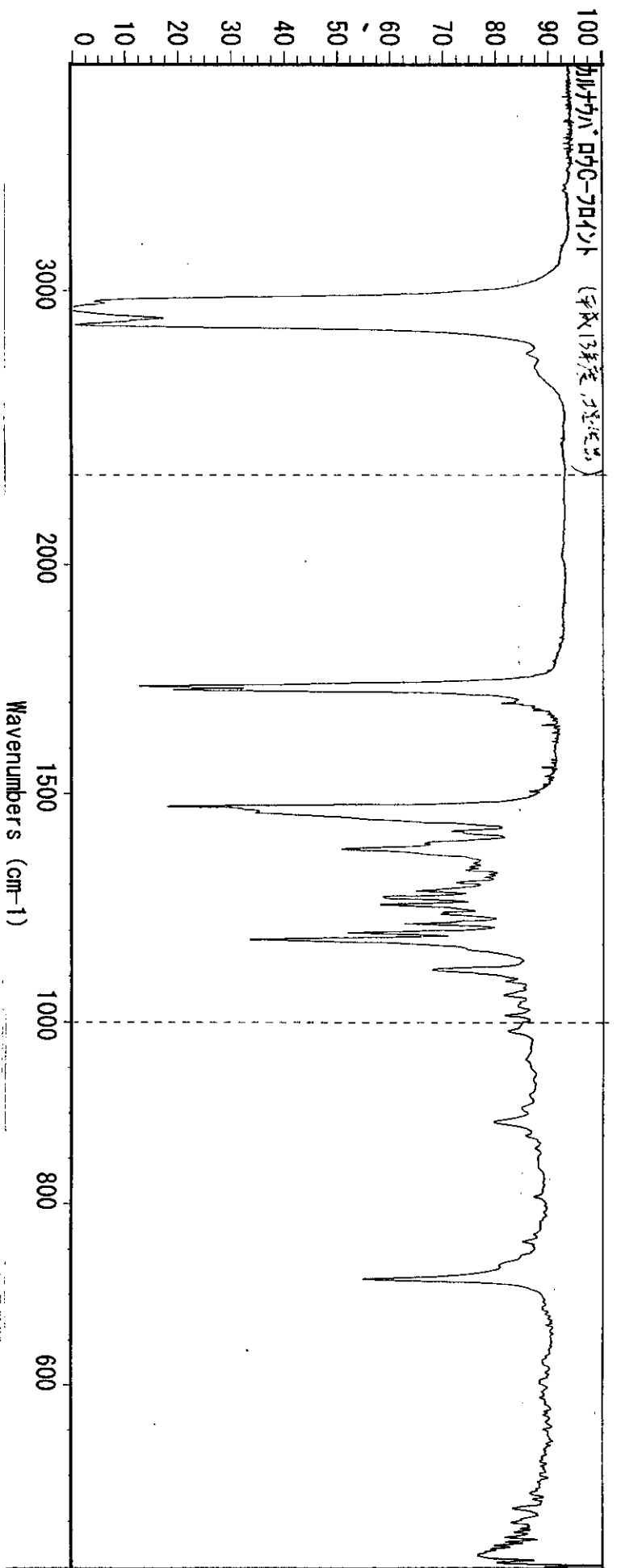
上記の結果を踏まえると、何故昨年度と今年度のF社製の製品が異なるIRが得られたか、との疑問が残る。そこで、この点を明らかにするため、昨年度のIRから、その物質の同定をIRから試みた。その結果、次の図で示すように、昨年度提供品のIRは、中性脂肪の一種であるトリステアリン（Tristearin）のIRと完全に一致し、昨年度提供品は、中性脂肪の一種であるトリステアリンであることがわかった。この結果は、参照IRの利用に、下記のように、重大な警告を与えるものとして受け止める必要がある。

IRによる確認法として、①従前行われていた数本の特性吸収帯の波数の一致による同定、②現行のパターンの一致による同定、の二法がある。問題点は、第7版食品添加物公定書には、②が記載され、しかも¹⁰厚生省生活衛生局長名での通知（生衛発第642号、平成11年4月6日）の第2改正の要点3で、知事などに通知されているにもかかわらず、食添業界では、いまだに①の波数による規定の考えが根強いことである。昨年度のIRも①でみると、一致（図中矢印参照）するので、確認できるように見える。しかし、現行の②で確認すると不一致となり、公定書の規定外（不適合品）となる。従って、F社が、故意とは思わないが、①の波数規定で製品を確認し、カルバナロウとトリステアリンとを取り違えたものとするのが妥当である。とはいえ、現在の食品を取り巻く環境を考えると、許されることではない。

上記のような誤りを避けるには、第7版食品添加物公定書の記載の文章“同

一波数のところに同様の強度の吸収が認められる”を正確に理解する必要がある。すなわち、ここには“強い吸収のみ”との記載もないことから、弱い吸収やショルダーバンド（肩吸収帯）も含まれること、および“同様の強度の吸収”という表現には相対強度に注意することが含まれることに留意すべきである。一般に、IRでは、類似化合物は、類似のIRを示すことが多いので、弱い吸収、ショルダーバンド（肩吸収帯）や相対強度にも注意を払うのが当然である。物質の確認は、○印のIRの僅かの差でしか、できないことに注意されたい。また、上記カルバナロウの場合も、カルバナロウもトリストエアリンもエステルであるので、特性吸収帯がよく似ていることに起因する誤りである。さらに、現在ほど機器分析が普及していなかった数十年以前には、物質の確認には、化学的な手法、すなわち官能基の同定しか方法がなかった。しかし、機器分析による定性分析法が進歩した現在は、公定書記載どおりの確認（“同一波数のところに同様の強度の吸収が認められる”。ただし、ここには弱い吸収やショルダーも含まれ、相対強度も含まれる）を行うことを、業界などにも周知徹底すべきことであろう。

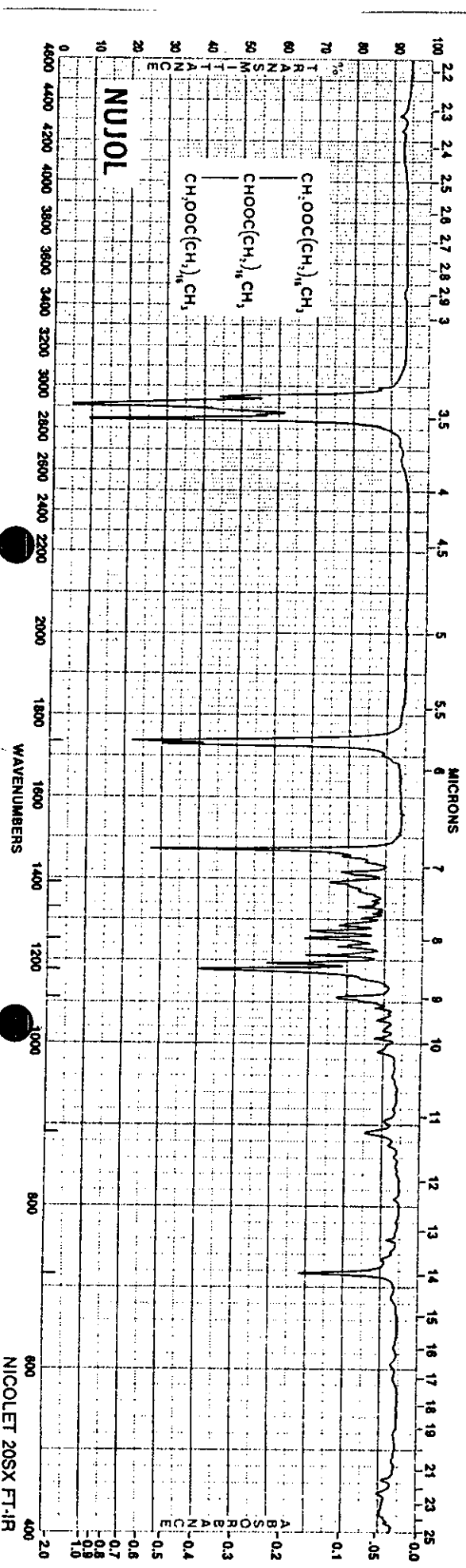
%Transmittance



T5016 CAS [555-43-1]
TRISTEARIN (C18:0) Sigma Grade Approx. 99%

FW 891.5
mp 70-71°C

1736.7 1255.0 891.8
1392.0 1180.3 717.0
1331.7 1115.7



(1) - 2. 製品のカルバナロウの IR について

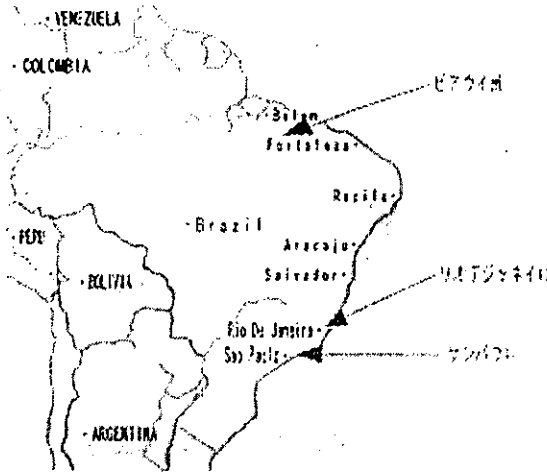
今年度、再度三社から製品を入手し、再測定を行った。その結果、次の図に示すように、いずれのスペクトルも、○印を付けた吸収帯の相対強度にわずかに差が認められる。しかしこの差は昨年度ほどではなく、基本的に互いにほぼ一致し、IR で確認できることが分かった。この結果と上記 (1) - 1. の結果から、カルバナロウには、結晶多形や異常スペクトルの可能性はないと結論できる。しかし、本品は天然物であるので、等級などによって IR が異なる可能性がある。そこで、異なる等級のカルバナロウの IR を次に検討することにした。ここでは、相対強度に注目していることには、とくに留意願いたい。

なお、次ページに示すように、カルバナロウには、3 等級あって主に色が異なっており、1号 (Prime Yellow)、2号 (Light Fatty Grey) 3号 (Filtered Fatty Grey または Centrifuged Fatty Grey) と記載されている。

参考：カルバナロウの等級について

株式会社加藤洋行殿のホームページ (www.katoyoko.co.jp) から転載

カルナウバワックス



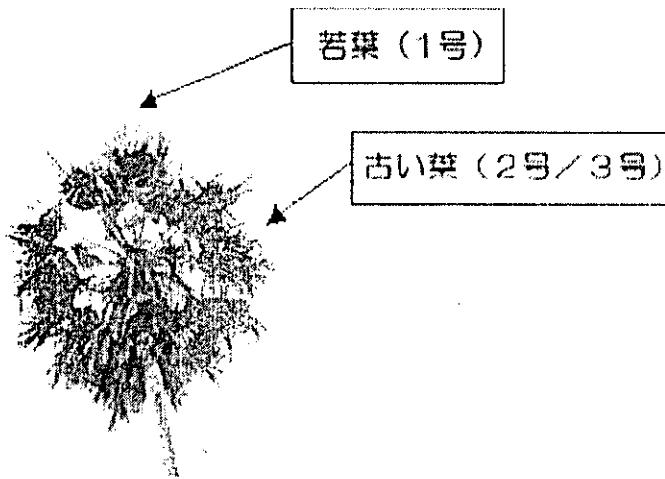
カルナウバワックスは、ブラジル北部のピアウイ州近辺に自生するカルナウバヤシの木 (学名: COPERNICIA CERIFERA MART) の葉より採取されたワックスです。樹木の先端にある柔らかい若葉より採取されるワックスは最上質とされ、1号(Prime Yellow)と呼ばれます。古い葉より取れる色の薄いワックスは2号(Light Fatty Grey - 薄茶色)、色の濃いワックスは、3号(Fatty Grey - 茶黒色)と呼ばれています。

若葉:

葉の色が淡黄緑色でこの葉より1号が採れます。

古葉:

太陽光線をいっぱい受け葉緑素が多くなると、濃緑色になり、この葉より2号/3号が採れます。



樹木より葉を切り取る為、樹木は枯れたりしません。雨期には新しい芽を出し大きな葉となります。

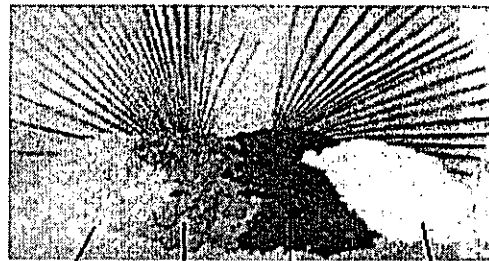
カルナウバワックスのグレード

1号 (Prime Yellow)

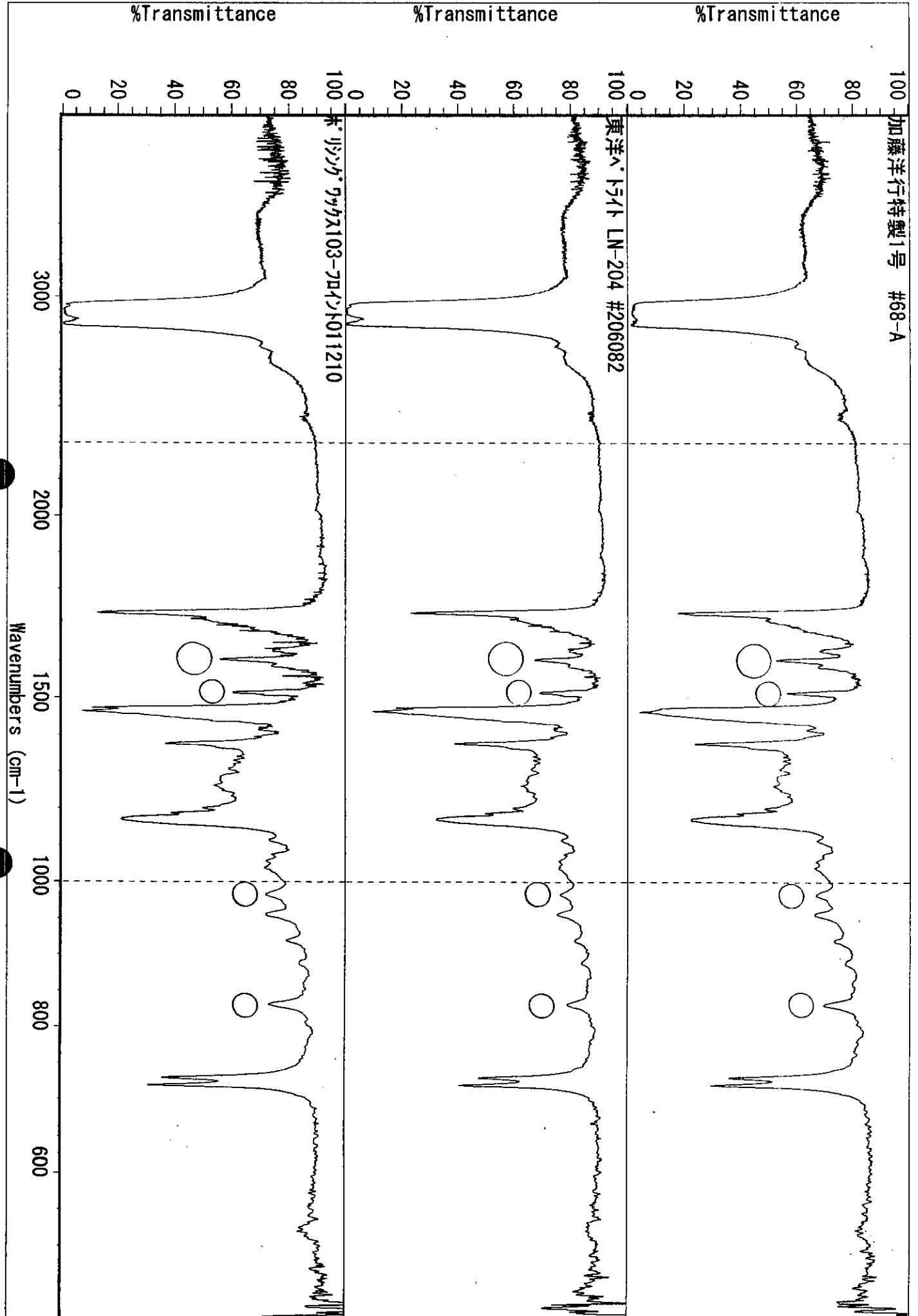
2号 (Light Fatty Grey)

3号 (Filtered Fatty Grey)

3号 (Centrifuged Fatty Grey)



2号 3号(F) 3号(C) 1号

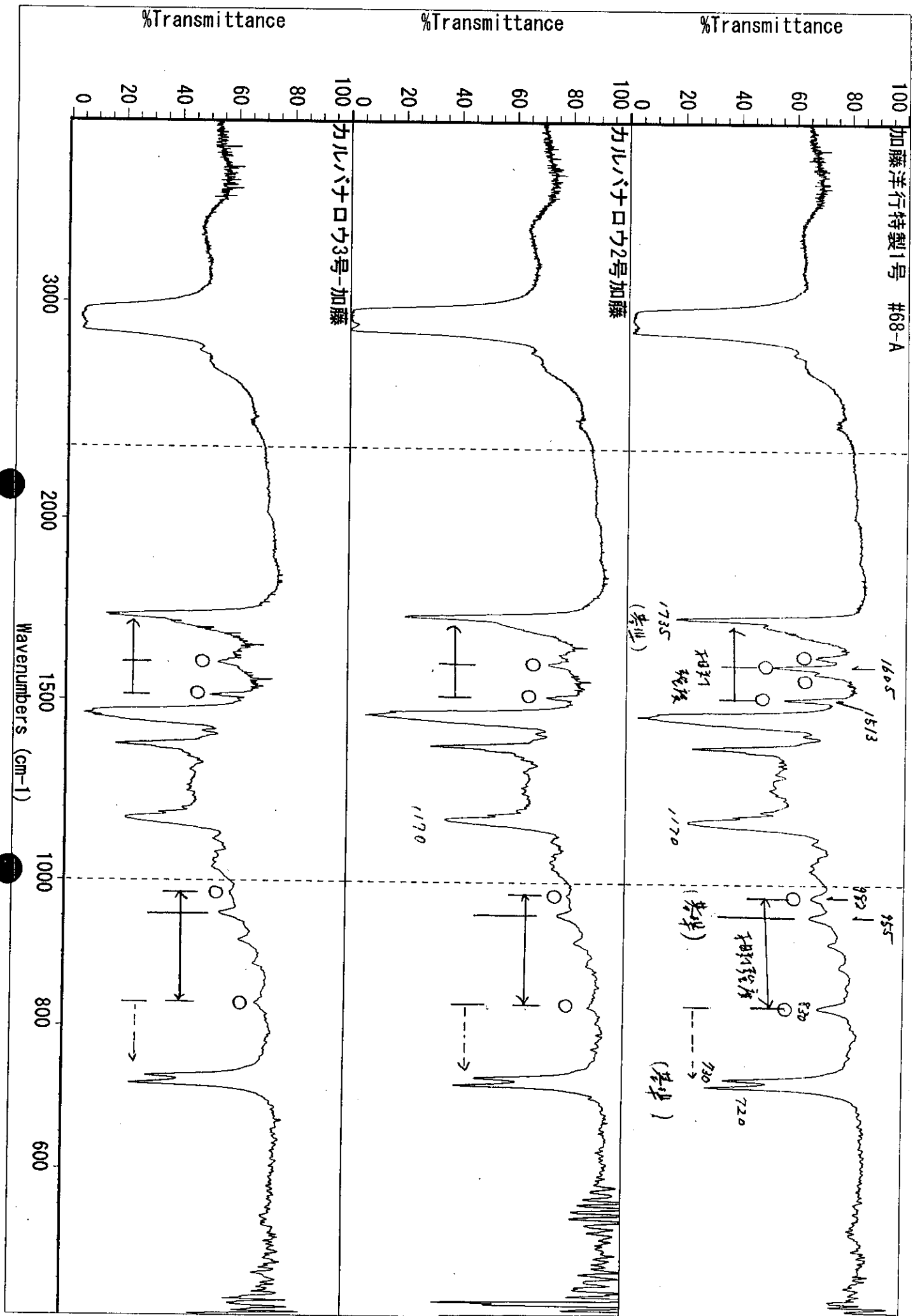


(1) - 3. 異なる等級のカルバナロウの IR と標準となる IR について

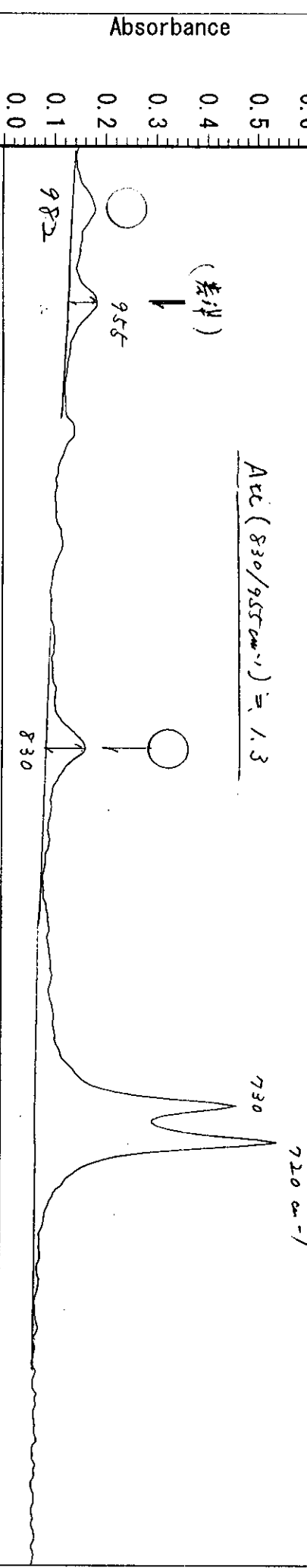
第7版公定書では、「淡黄～淡褐色の明瞭な破断面のあるもろい固体」と規定されている。しかし、上記(1) - 2. で検討した製品はいずれも粉末で、明瞭な破断面のあるもろい固体ではなかった。言い換えれば、固体を粉末にすると見かけの色が変化するので、規定にあっているか否かは、判らなかつた。さらに、外観から何号品、または混合物かあるか否かも特定できなかつた。加えて色みの判断では、現地などで脱色されれば、一般の人では、等級を区別できなくなる(実際には、プロが肌触りなどでも実際に判断されていると思う)。そこで、IR で区別できないか、さらに標準的な IR をどうするかを検討するために、2号品と3号品の提供を受け、その IR を測定した。その結果を、次のページに、同じメーカーの1号品(特製)の IR と共に示した。

次の図からもわかるように、1号品に比べ、2号や3号品では、○印を付けた吸収帯(1600 cm^{-1} 付近の3本、1513 cm^{-1} 、982 cm^{-1} 及び 830 cm^{-1}) が他の吸収帯に比べ明らかに弱く、相対強度が異なることが分かる。また、定量的には、吸光度で比較する必要があるので、同じスペクトルを 1000～600 cm^{-1} の領域について吸光度表示し、ベースライン法を用いて比較検討した。その結果、図にも示すように、1号品では、830 と 955 との吸光度比 (A_{830}/A_{955} , A 比) が 1.0 を超えるのに比べ、2号や3号品では 0.5 程度と明らかに異なる。また、1600 cm^{-1} 付近の3本、1513 cm^{-1} 、982 cm^{-1} の吸収帯についても同様である。言い換えれば、上級品ほど、不純物を多く含んでいることになる。恐らく、この不純物がワックスとしての効果を高めていると考えられる。

一方、先にも述べたように、IR による定性・確認では、相対強度まで含めた合致が原則である。このことと、上記のことを考慮すると、公定書では「何号品までを含めるか」が問題となる。しかも、2号品の IR を基準または参照 IR として採用すると、1号品は不純物を多く含む不合格品となる。このようなことを避けるため、公定書では1号品を想定し、参照 IR には1号品の IR を採用し、補足として「830 と 955 cm^{-1} 付近に同程度の強度を持つ吸収帯を持つ」を加えることを提案したい。ただし、カルバナロウは、採取時期や地域によっても異なる可能性があるため、メーカーや協会の協力のもと、さらに検討が必要であると考えている。

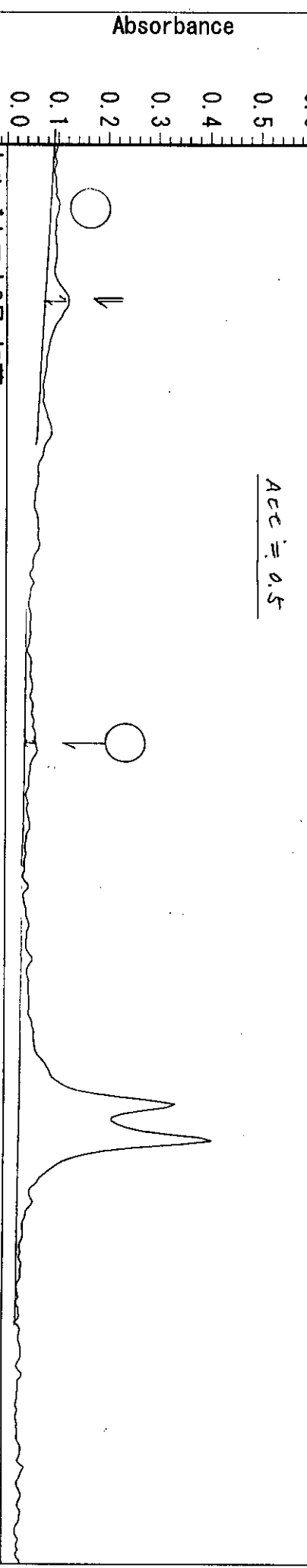


加藤洋行特製1号 #68-A



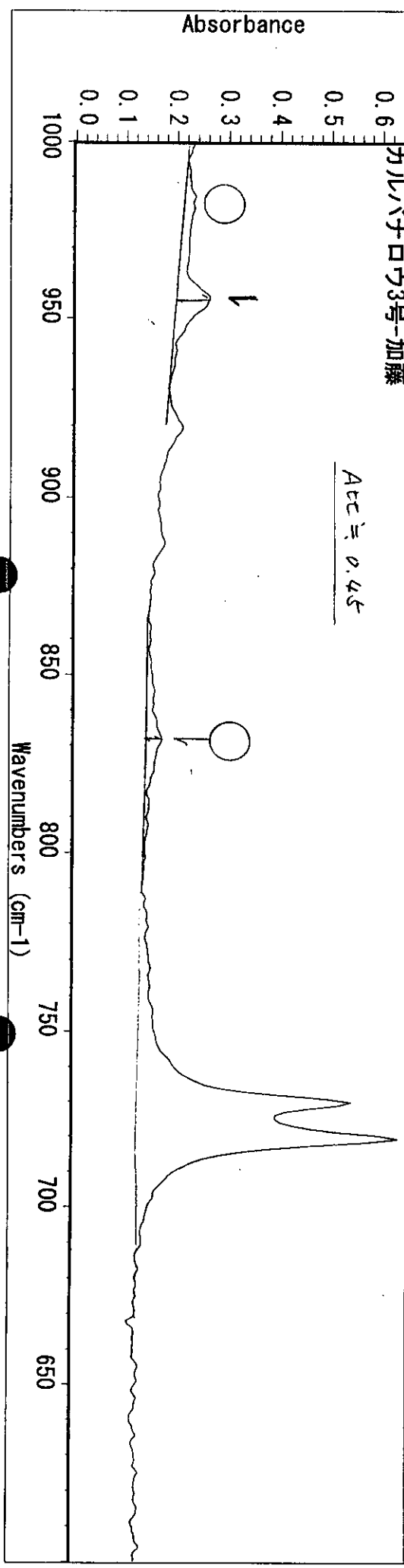
カルバチロウ2号加藤

$A_{830} = 0.5$



カルバチロウ3号加藤

$A_{830} = 0.45$



(2) 第7版公定書に記載されている食品添加物の IR について

今年度は、天然由来の添加物4品目について、それらの IR を測定した。

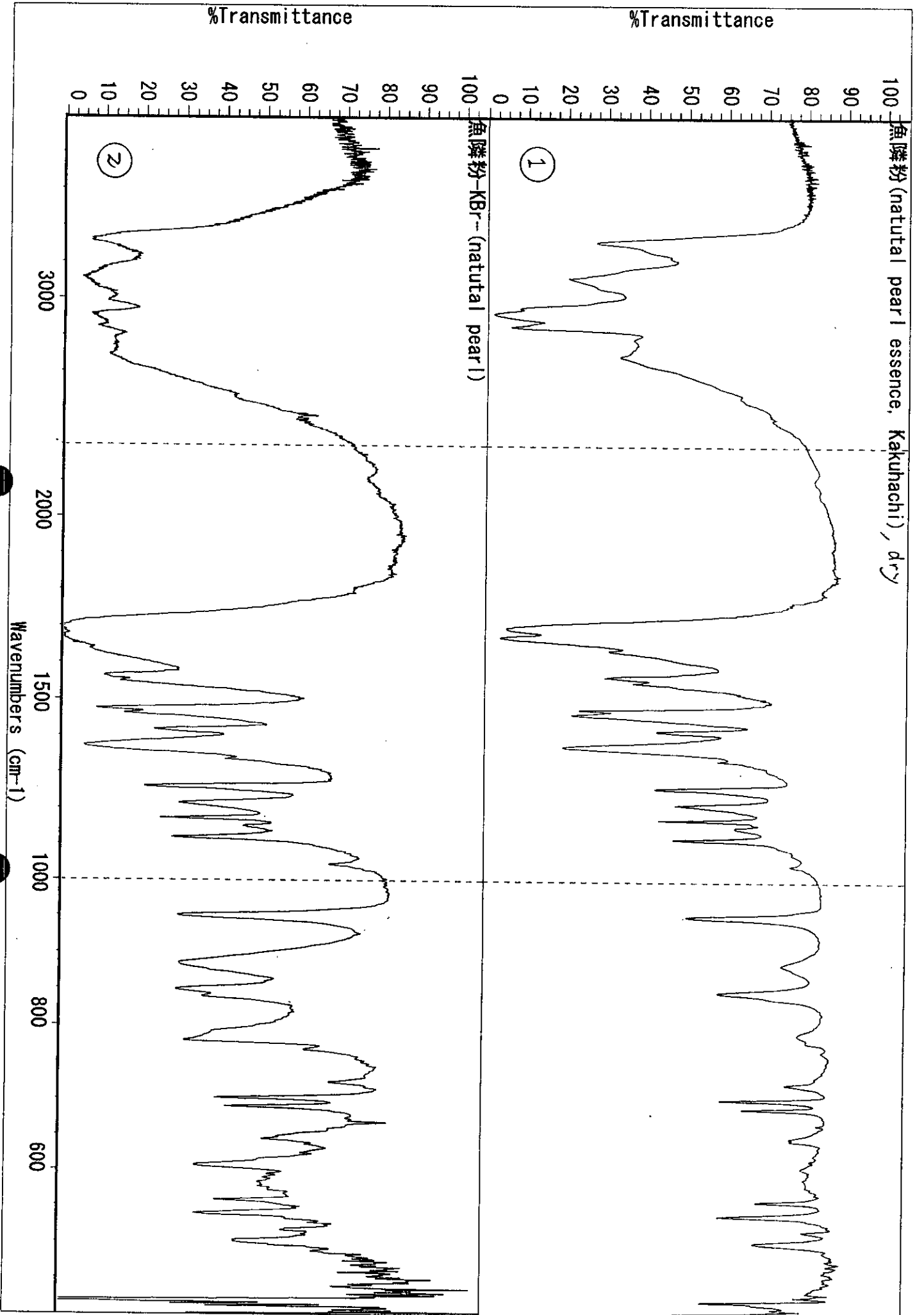
(2) - 1. 魚鱗粉 (natural pearl essence)

入手した魚鱗粉は、アルコール懸濁液であるので、このままの状態では IR の測定ができない。そこで、懸濁液を減圧乾燥して、魚鱗粉のみとして、IR をヌジヨール法と KBr 法で測定した。なお、乾燥後得られた魚鱗粉を2ヶ月放置したのものについても、ヌジヨール法で測定した。これらの結果を次に示す。

次の図から、先ず気づくことは、①のヌジヨール法と②の KBr 法による IR が、波数は類似しているが、一致しないことである。とくに、指紋領域の一部である $1000\sim 750\text{ cm}^{-1}$ の領域での不一致が目につく。また、魚鱗粉を乾燥状態で2ヶ月放置したもののヌジヨール法の IR には、放置前の IR と差が認められなかった。したがって、KBr 法では、異常スペクトルが得られると考えた。

魚鱗粉は、既存添加物名簿収載品目リスト注解書によれば、主成分はグアニンである。そこで、上記で得られた IR をグアニンの IR と比較検討した。その結果、次に示すように、KBr 法の IR は、"The Sigma Library of FT-IR spectra" 集のグアニンの IR (ヌジヨール法, ③) と、ヌジヨールの吸収帯を除き完全に一致する。したがって、KBr 法の IR から判断すると、魚鱗粉を乾燥品は基本的に試薬クラスのグアニンであるように見える。しかし、試薬のグアニンは、それ自身も、アルコール懸濁しても、魚鱗粉のような真珠様光沢を持たない。一方、メルクインデックス (Merck Index) によれば、試薬のグアニンは、アモロファス (不晶形) である。これらのことを考え合せると、魚鱗の主成分はグアニンであるが、魚鱗は、試薬とは異なって、グアニンがある特定の方向で配列した (結晶に近い) ため、特殊な真珠様光沢を持つものと考えられる。このようなことを考慮すると、ヌジヨール法では、特定の配列を保ったグアニンが測定できるが、KBr 法では錠剤作成時に配列が壊れ、不晶形グアニンへと変化するため、ヌジヨール法とは異なる IR (異常スペクトル) が得られると判断できる。すなわち、ヌジヨール法でないで、魚鱗粉の確認はできないと考えられる。

以上のことから、本研究では、魚鱗粉の IR による確認としては、「減圧乾燥した魚鱗粉をヌジヨール法で測定するとき、参照 IR と一致する」という方法を推奨したい。ただし、魚種によって、IR が異なる可能性もあるので、魚種が異なる魚鱗粉についても、さらに検討する必要がある。



G0381 CAS [73-40-5]
GUANINE Sigma Grade

3

FW 151.1

$E_{2300}^{1.0} = 11.4$, pH 1.0

3320.9 1674.0 1262.3
3118.4 1565.0 1174.0
2695.1 1417.5 778.5

