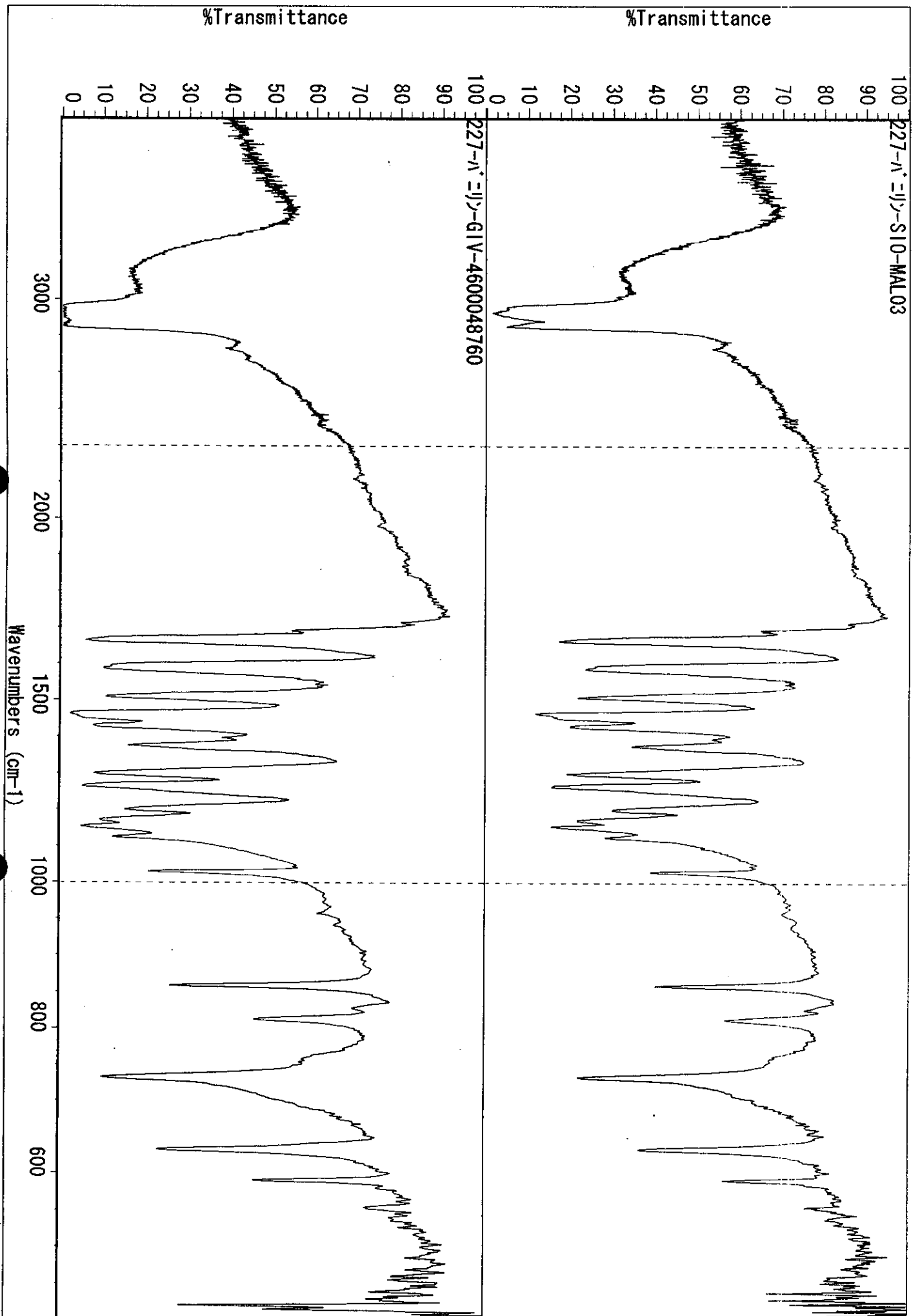
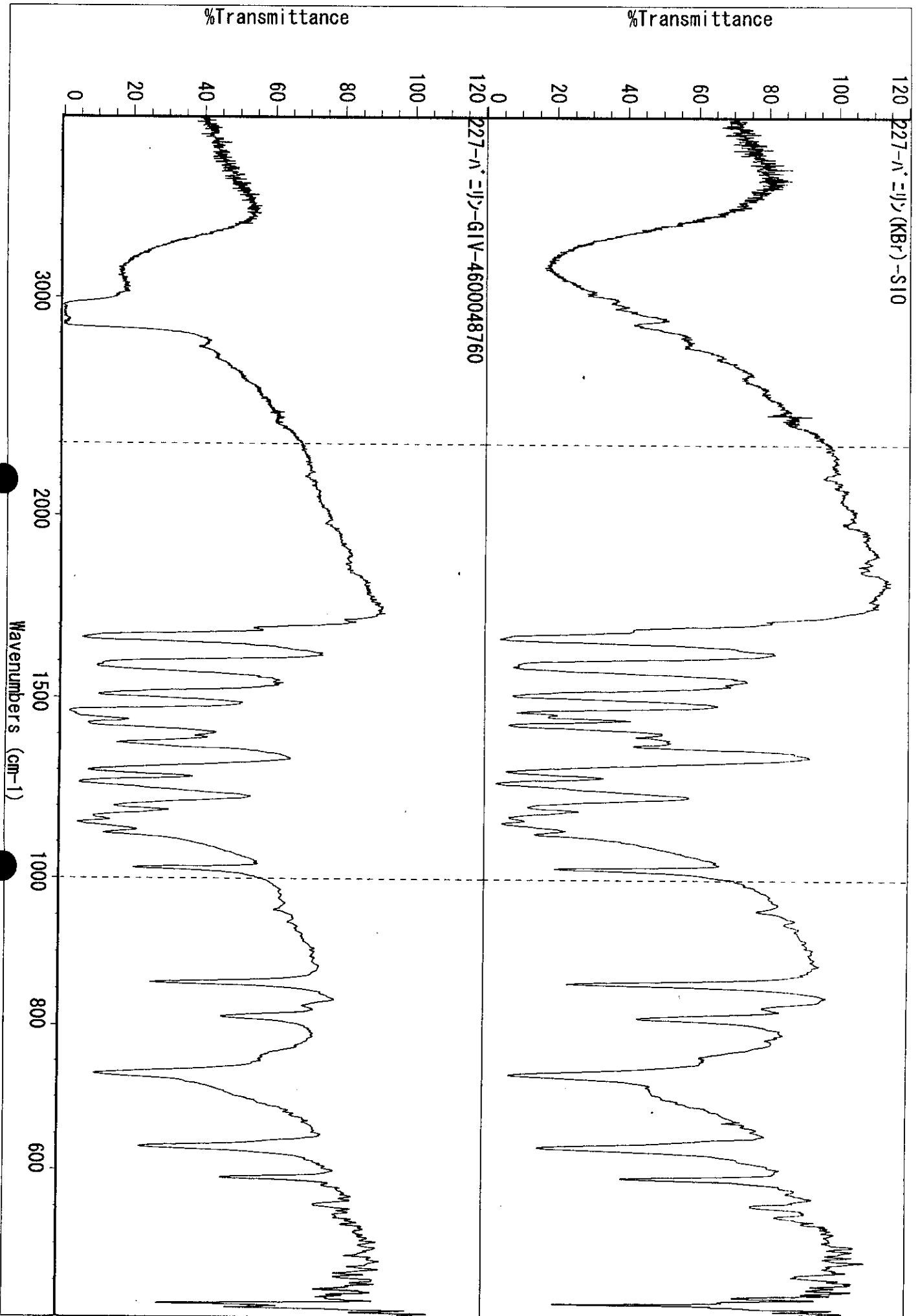
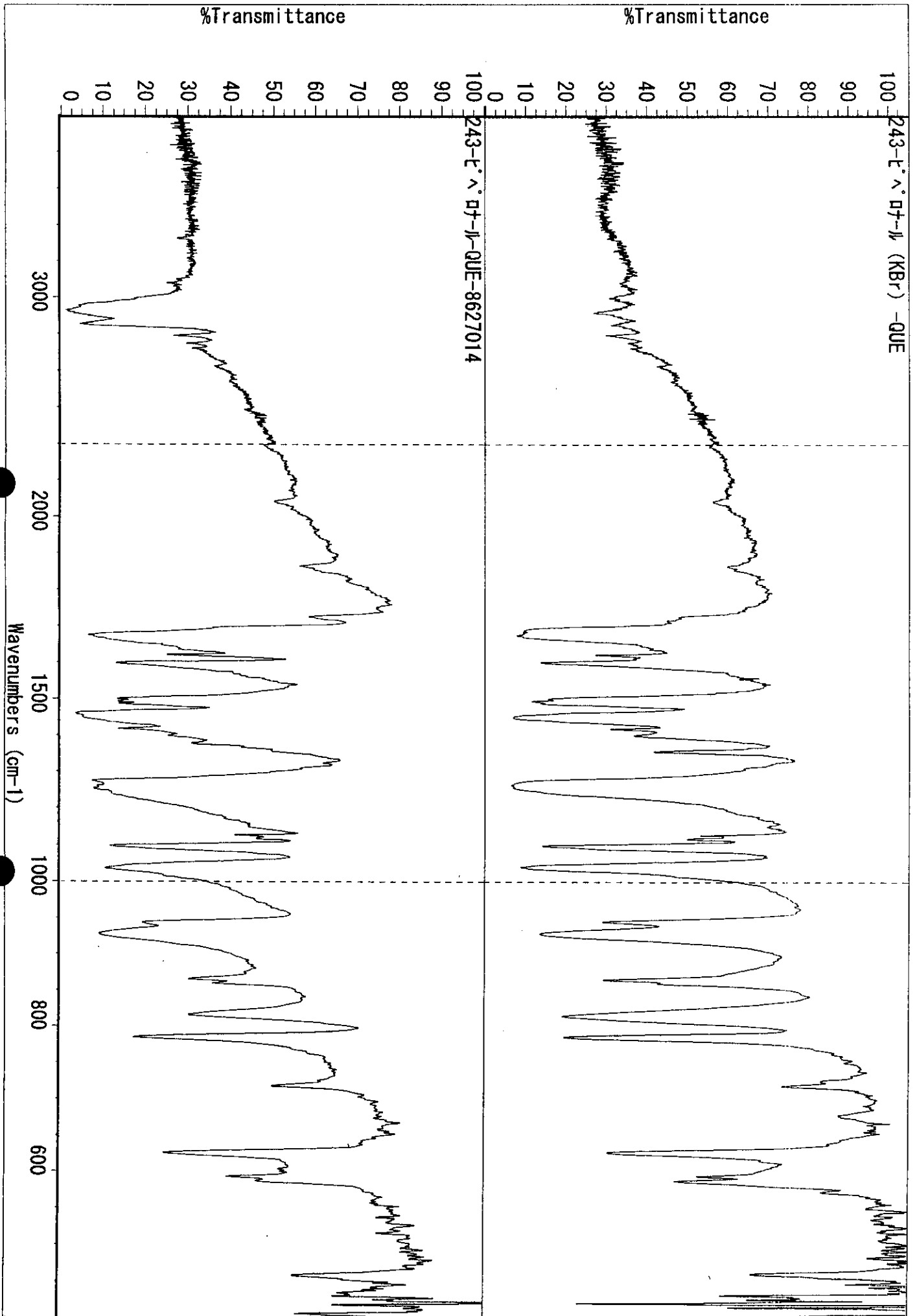


試料番号 227 (バニリン) は固体である。そこで、ヌジヨール法と KBr 法で測定し、得られた IR 比較検討した。その結果を次ページと次々ページに示す。次ページから分かるように、ヌジヨール法による IR には製品間の差は認められなかった。しかも、次々ページに示すように、ヌジヨール法と KBr 法による IR にも差が認められなかった。したがって、いずれの方法を用いて確認を行っても良いと考えられる。しかし、類似の波数に吸収帯を持つものも多いので、参照スペクトル法で行う方が良いと考えている。

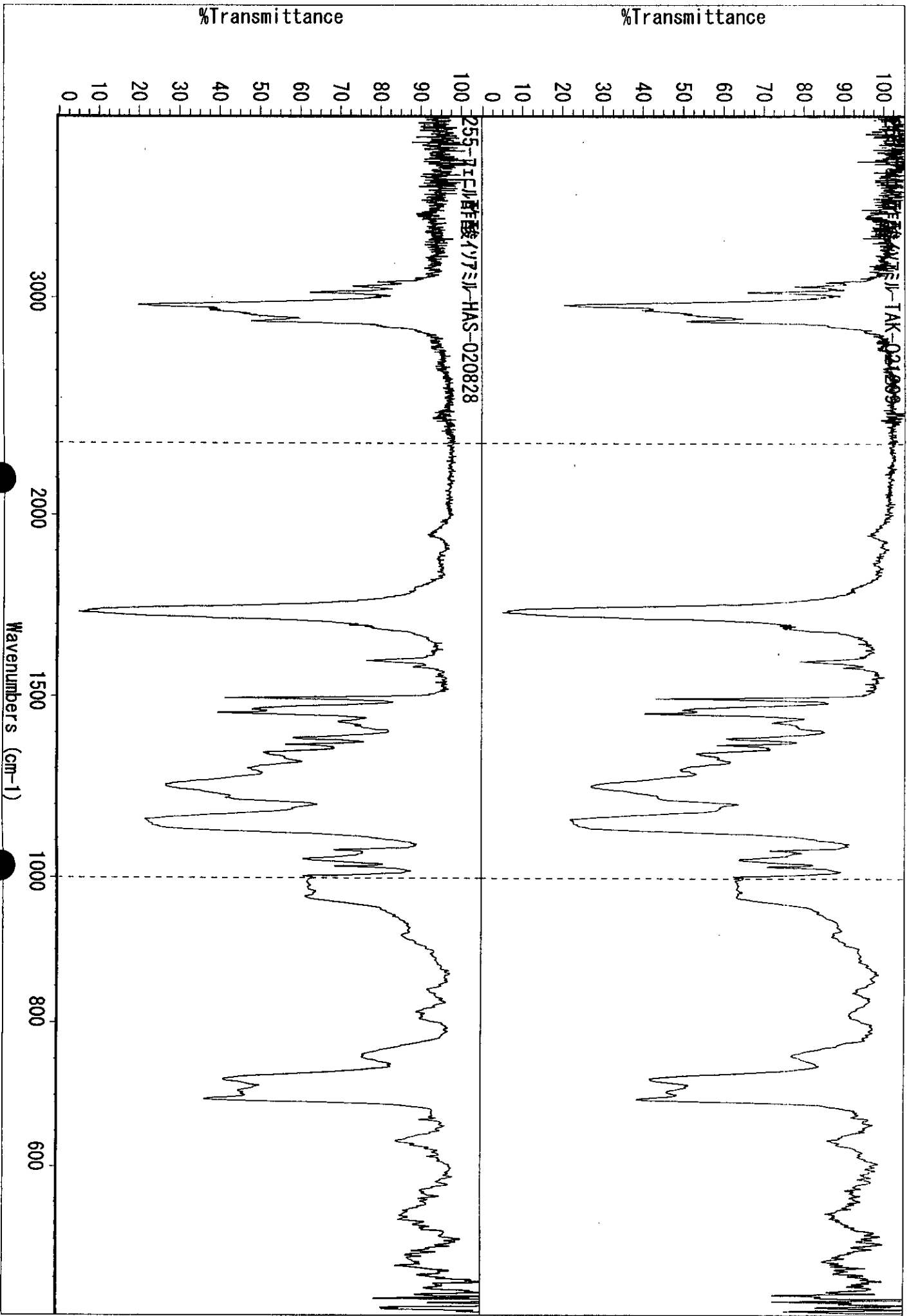


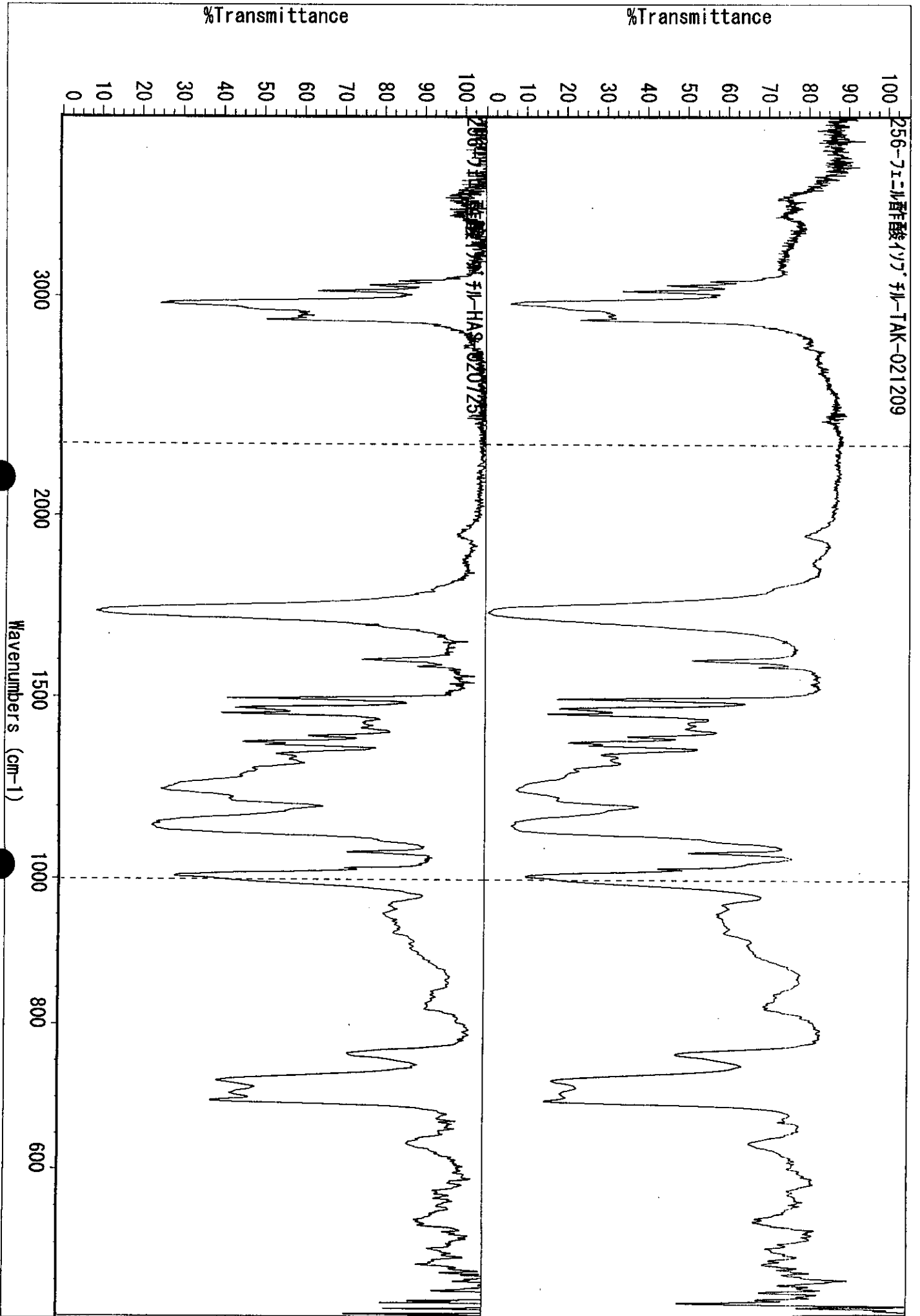


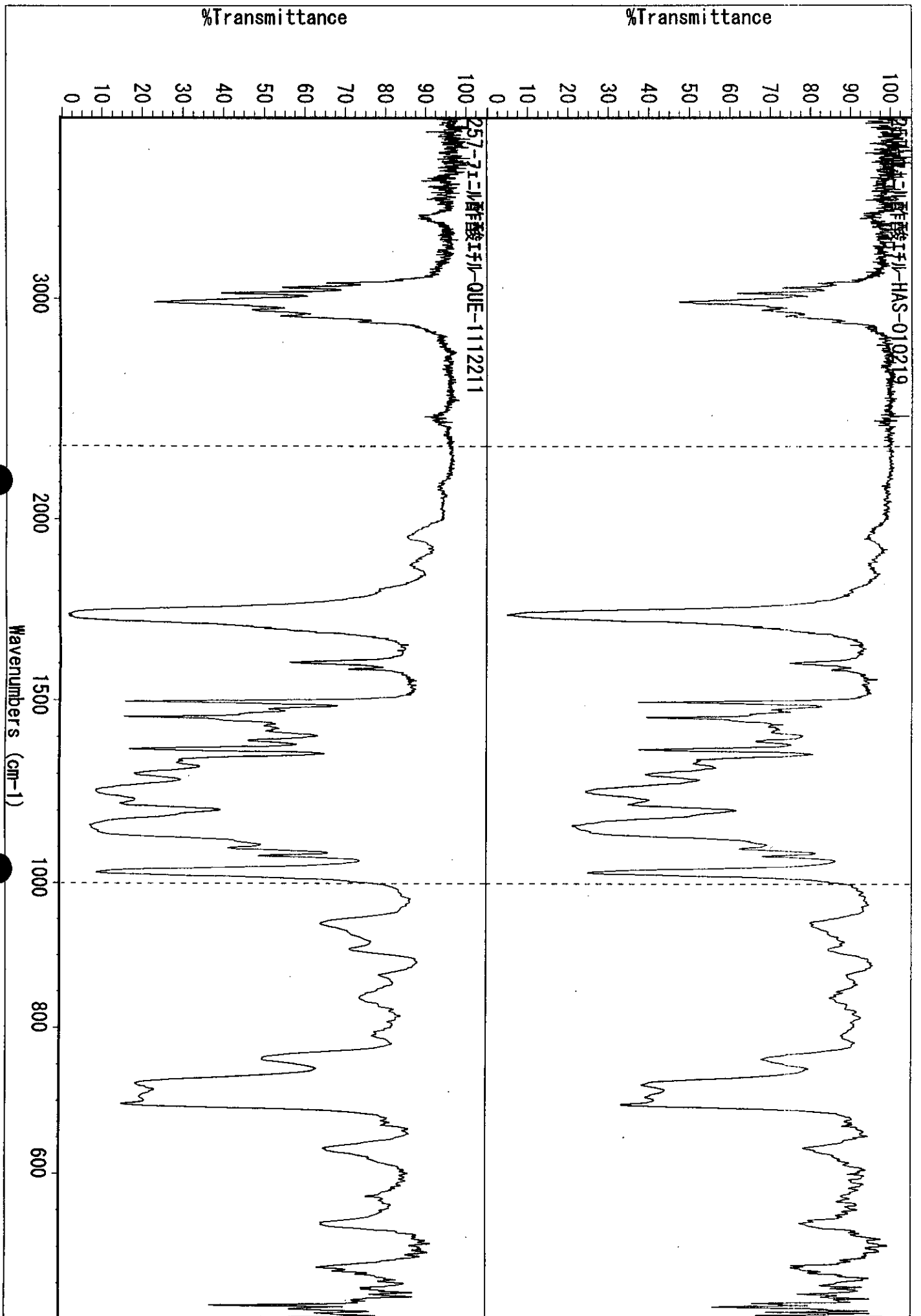
試料番号 243 (ピペロナル) も固体である。そこで、ヌジヨール法と KBr 法で測定し、得られた IR 比較検討した。その結果を次ページに示す。次ページから分かるように、ヌジヨール法と KBr 法とによる IR を比較すると、両者に明らかに差が認められる。ピペロナルがヌジヨールに溶けるとは考え難いので、KBr 法による IR が異常スペクトルと考えられる。従って、ヌジヨール法を用いて確認を行うべきであろうと考えられる。また、類似の波数に吸収帯を持つものも多いので、参照スペクトル法で行う方が良いと考えている。

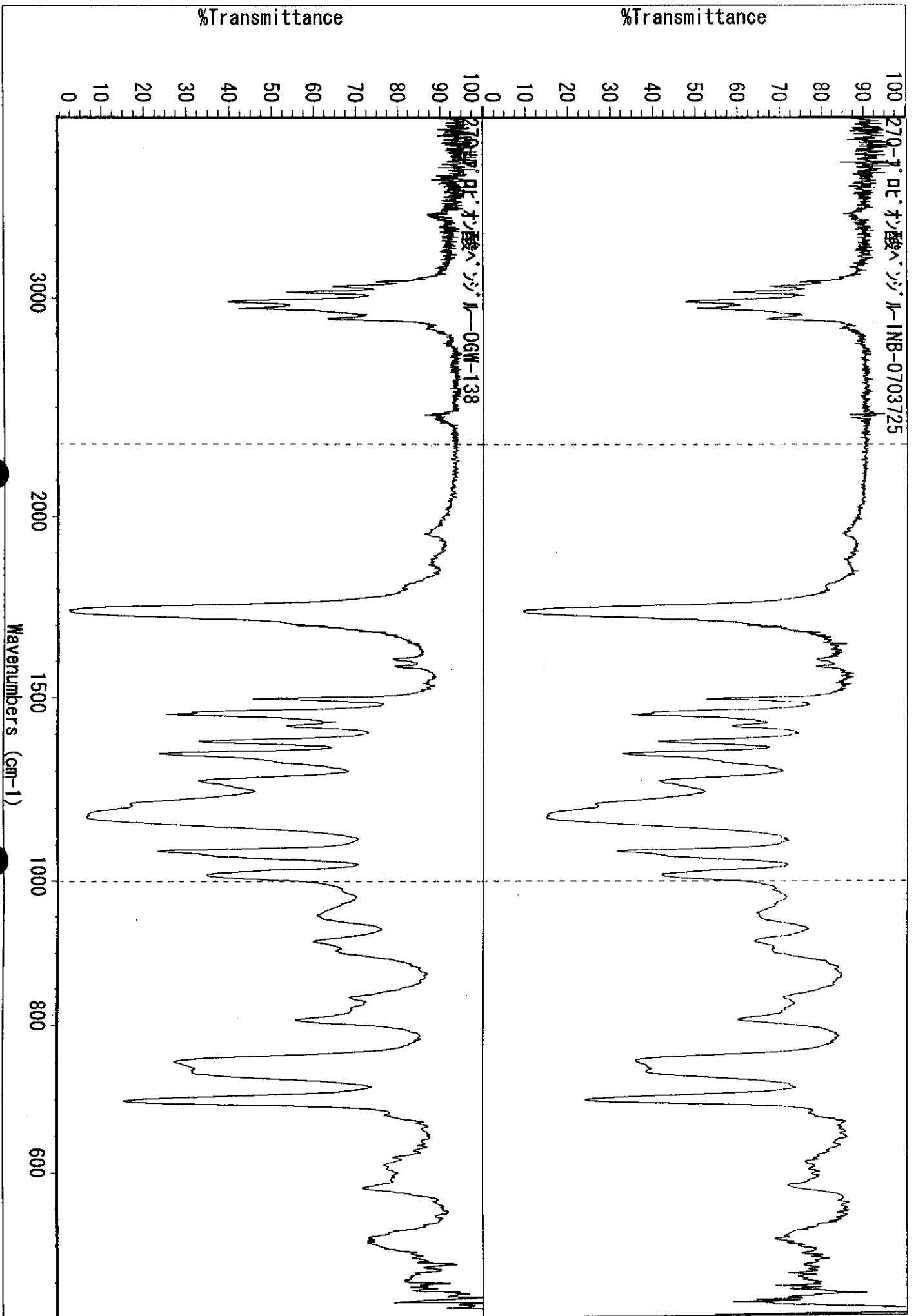


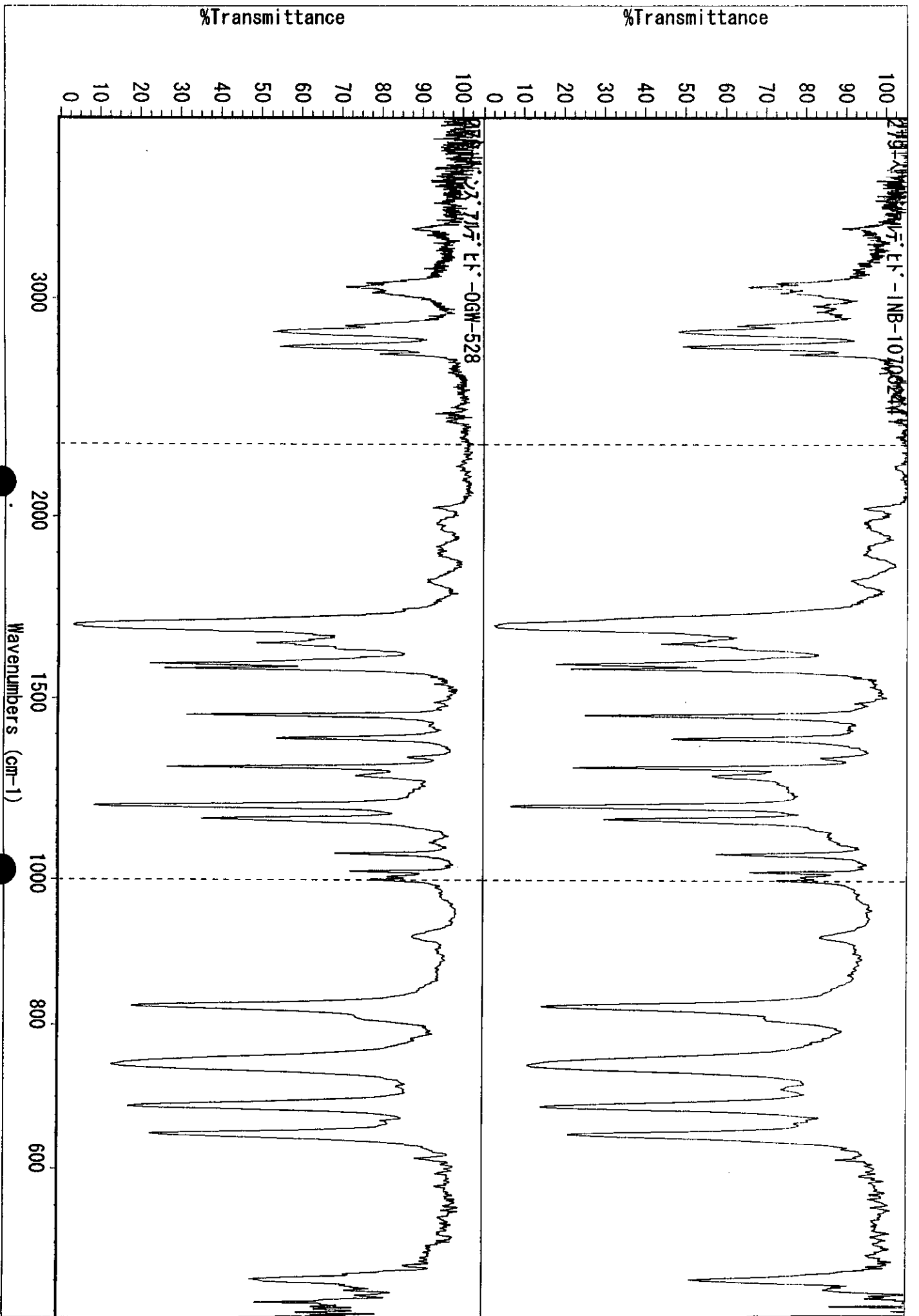
試料番号 255, 256, 257, 270, 279, 及び 307 製品は, 液体であって, 良好な IR が得られた. また, 2 製品提供を受けた製品についても, 製品間の IR に差が認められなかった. したがって, 確認試験に液膜法による IR を使用するのが適切であると考えられる. しかし, 類似の波数に吸収帯を持つものも多いので, 参照スペクトル法で行うほうが良いと考えている.

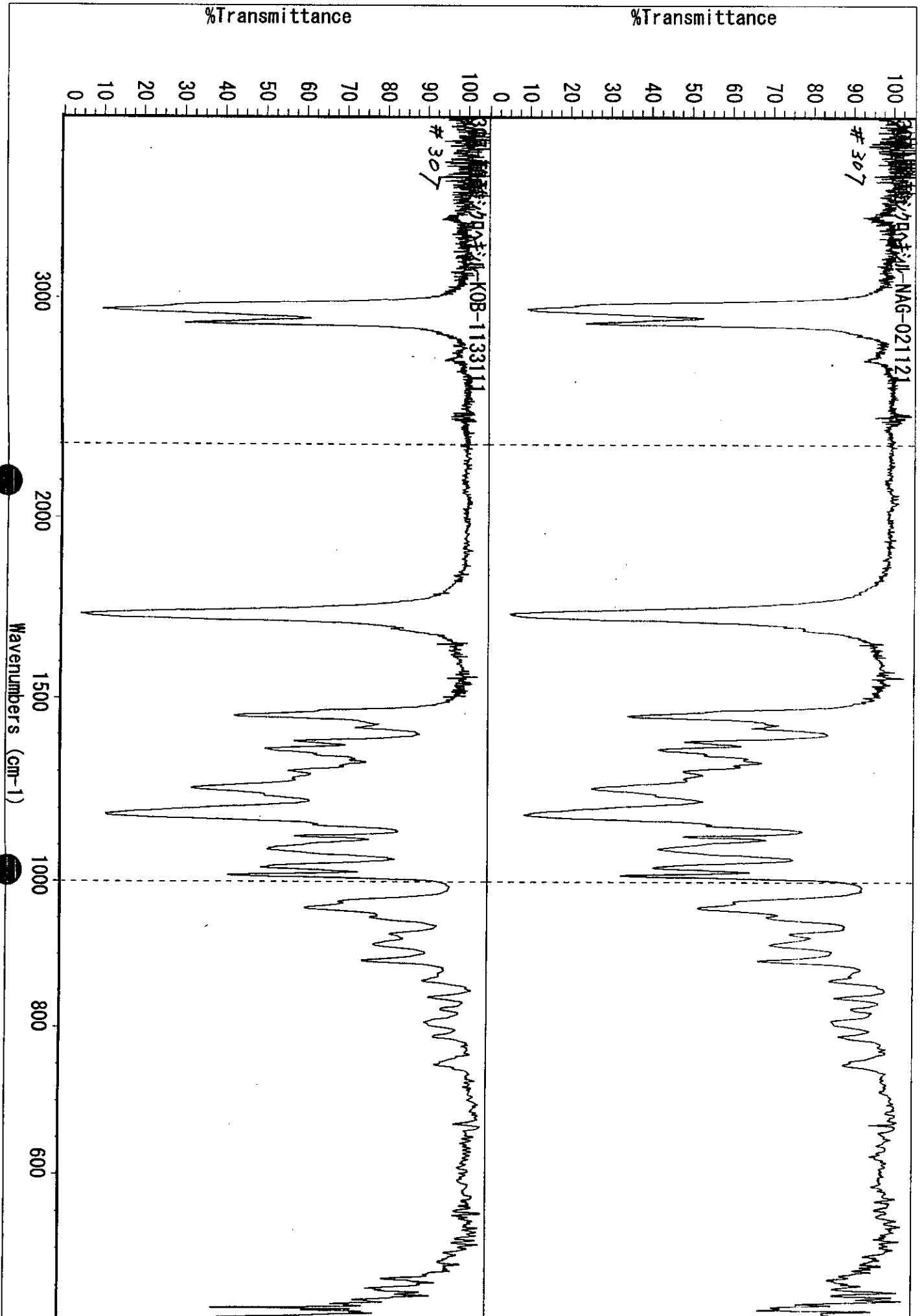




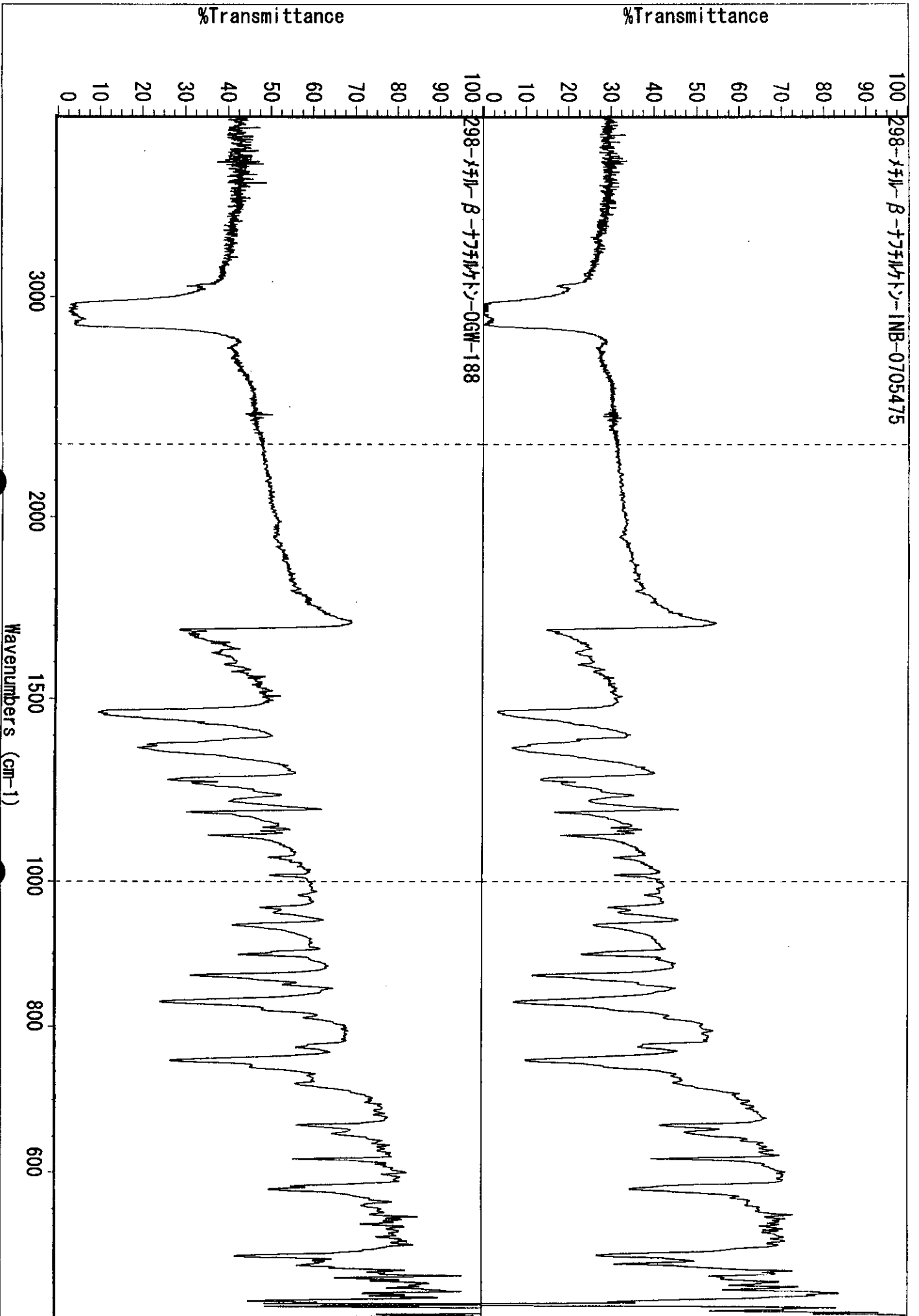


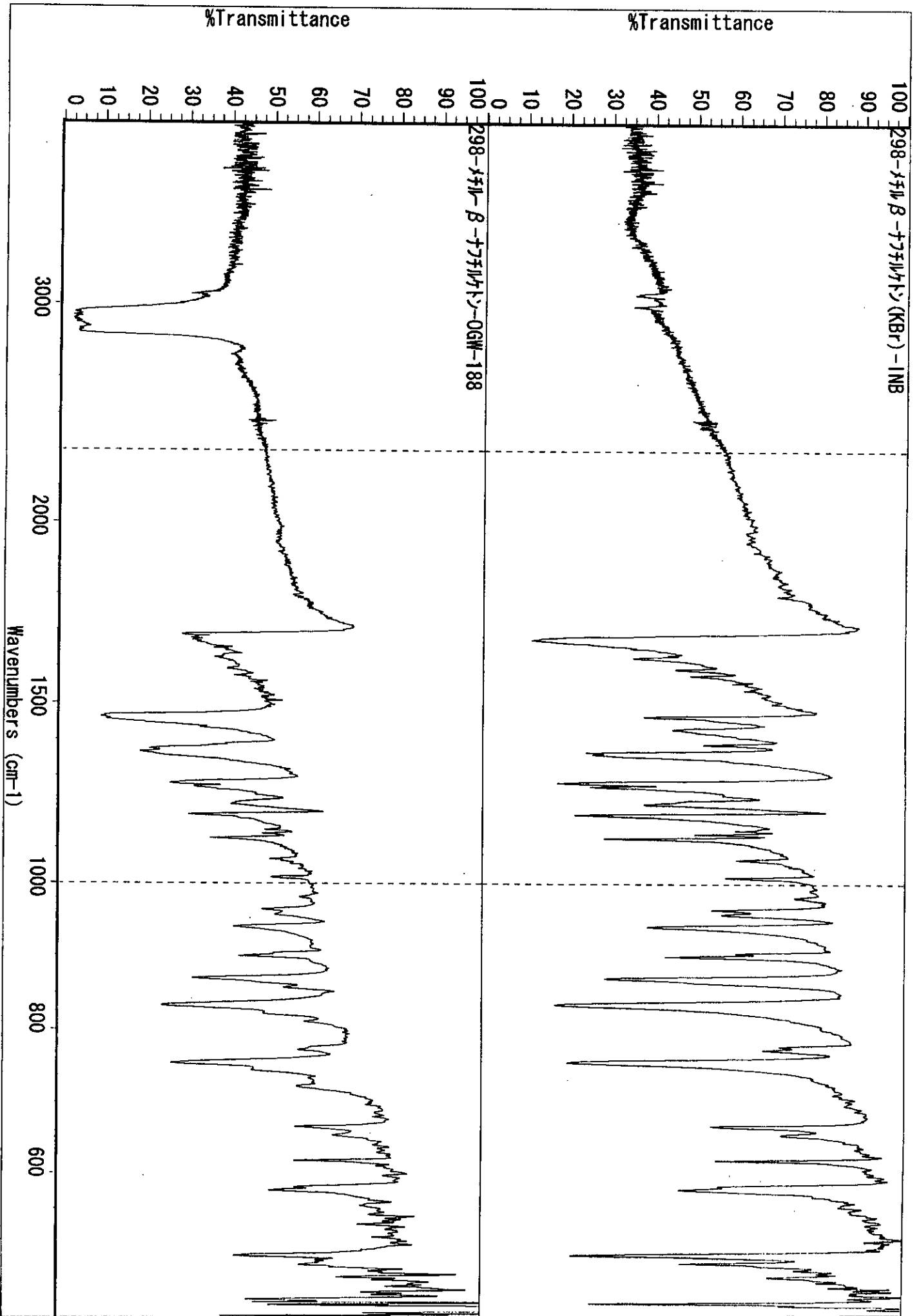






試料番号 298 (メチルーβ-ナフチルケトン) は固体である。そこで、ヌジヨール法と KBr 法で測定し、得られた IR 比較検討した。その結果を次ページと次々ページに示す。次ページから分かるように、ヌジヨール法による IR には製品間の差は認められなかった。しかも、次々ページに示すように、ヌジヨール法と KBr 法とによる IR を比較すると、両者に明らかに差が認められる。メチルーβ-ナフチルケトンがヌジヨールに溶けるとは考え難いので、KBr 法による IR が異常スペクトルと考えられる。従って、ヌジヨール法を用いて確認を行うべきであろうと考えられる。また、類似の波数に吸収帯を持つものも多いので、参照スペクトル法で行う方が良いと考えている。





追記：分光器について

昨年度も記載したが、参照 IR の領域を測定できる市販の分光器 (FT-IR 装置) には大別して①400 cm^{-1} まで測定できる簡易型と②200 cm^{-1} 程度まで測定できる型の 2 種類ある。実際には、これらの分光器の実用的な波数限界は①では約 450 cm^{-1} 、②では約 250 cm^{-1} と公称波数よりも狭いのが現状である。これは、分光器に使用される光学系に①ではポリエチレン加工した KBr 板、②では KRS-5 などの素材が使用されるうえ、検出器も②では高感度のものが使用されるためである。なお、分解能は、確認などに用いる限り、実用的には差がない。本研究で使用した分光器は、①の簡易型であるが、参照 IR は②の分光器で測定されたものと考えられる。

一般に、品質管理の現場では、①の簡易型を使用している所が殆どであることを考慮すれば、測定範囲についても判断する必要があると考えられる。この点も踏まえ、第 8 版公定書では、改善されることを期待する。

一方、①の簡易型分光器も最近一段と進歩し、安価に市販され、4000-450 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いる。このような状況のもとで、公定書記載品目の確認試験に多用されるのは当然のことであり、今後、簡便な確認試験として適用品目が増加していくことを期待している。

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）

食品中の未許可添加物の分析法の開発

分担研究者：川崎洋子（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官）

研究要旨：1. エビ、カニの保存料（褐変防止剤）として、カナダ、オーストリア、ニュージーランド、中国等で許可されている4-ヘキシルレゾルシノール(4-HR)の分析法を開発した。細切した、エビ及びカニ肉からメタノールで4-HRを抽出した。抽出液を水で希釈し、Sep-Pak Vac C18 カートリッジに負荷し、水、メタノール：水(3:7)混液で順次、洗浄した後、メタノール・0.1%リン酸(1:1)混液で溶出したものを試験溶液とし、HPLCで分析した。カラムにはCapcell Pak C18 MG、移動相はアセトニトリル/0.1%リン酸(1:1)を用い、検出はUV 210 nmで行った。回収率は各試料共80%以上、検出限界は0.5 mg/kgであった。

2. 魚肉練り製品中の臭素酸塩の微量分析法を検討した。臭素酸塩の検出を妨害しない除タンパク剤として、抽出液に酢酸亜鉛溶液及び水酸化ナトリウム溶液を順次、加えることによって生じる水酸化亜鉛を用いた。脱塩のための銀カラム並びにODSと陰イオン交換の機能を持つOasis MAXを用いることにより、高感度の微量分析法が確立された。

協力研究者

中里光男（東京都立衛生研究所多摩支所食品化学研究室主任研究員）

杉本直樹（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部研究員）

1. エビ及びカニ肉からの4-ヘキシルレゾルシノールの分析

A. 研究目的

エビやカニなどの甲殻類は、水揚げ後、その肉に含まれるポリフェノールオキシダーゼの作用により色素沈着を起こし、肉の表面に黒点が生ずることがある¹⁾。従って、これを防止するために我が国ではエビとカニのむき身に漂白剤として亜硫酸塩の使用を認めている。しかし、カナダ²⁾、オース

トラリア³⁾、ニュージーランド³⁾、中国⁴⁾、フランス⁵⁾などではこの目的のために4-ヘキシルレゾルシノール(4-HR)の使用も認めている。

4-HRはポリフェノールオキシダーゼの阻害剤であり、その他、微生物の増殖を抑制する働きもある。また、極めて安価であり、臭いもなく、少量で効果が期待できるため、上記の国々を始め、それ以外の国からの輸入品にも使用されている可能性がある。しかしながら、使用の実態については全く明らかにされていない。

カニあるいはエビ肉中の4-HRの分析法としては、HPLCによる方法がいくつか報告されている⁵⁻⁷⁾。しかし、いずれもクリーンアップが不十分で、HPLCのクロマトグラム

上に現れる夾雑物のピークが長時間に渡って出現するため、検体の HPLC への注入間隔が長くなり、迅速性の面で問題があった。

そこで、この欠点を改良すべく検討を行うことにしたが、4-HR はフランスでのエビ中の暫定残留基準が 2mg/kg^7 と設定されていることから $1\ \mu\text{g/g}$ レベルの分析感度が求められる⁵⁻⁷⁾。したがって、微量分析ということも念頭において分析法の開発を行った。その結果、高感度で迅速、簡便な分析法を作成することができたので報告する。

B. 研究方法

1. 試料

市販のブラックタイガー（殻付き、インドネシア産）、むきえび（タイ産）及びズワイガニ（笹切り、カナダ産）の冷凍品を解凍して用い、殻のあるものはこれを取り去って試料とした。

2. 試薬

1) 標準溶液：4-HR（和光純薬工業^(株)製、純度 98%以上） $50.0\ \text{mg}$ を精秤し、アセトニトリル $50\ \text{mL}$ に溶解したのち、 0.1% リン酸を加えて全量 $100\ \text{mL}$ としたものを標準原液とした。これをアセトニトリル・ 0.1% リン酸（6:4）混液で希釈し、 0.05 , 0.1 , 0.2 , 0.5 , $1.0\ \mu\text{g/mL}$ の濃度系列を調製して 4-HR の標準溶液とした。

2) 前処理用カートリッジカラム：Sep-Pak Vac C18（ $1\ \text{g}/6\text{cc}$, Waters 社製）を用いた。本カートリッジは使用前にメタノール $10\ \text{mL}$ 及び水 $10\ \text{mL}$ で洗浄した。

3) アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィ用。

4) その他の試薬は市販特級品を用いた。

3. 装置

1) 高速液体クロマトグラフ：日本分光工業^(株)製 PU-980 型ポンプ、同 UV-970 型検出器、同 DG-980-50 型デガッサー、同 AS-950 型オートサンプラー、同 860-C0 型恒温槽及び^(株)島津製作所製 C-R6A 型データ処理装置で構成したものをを用いた。

2) ホモジナイザー：^(株)エスエムテール製 HF93 型

4. 試験溶液の調製

1) 抽出：細切した試料 $10.0\ \text{g}$ をホモジナイザーカップに採り、これに、メタノール $50\ \text{mL}$ を加えて 10 分間ホモジナイズ（ $10,000\ \text{rpm}$ ）した後、遠心（ $3,000\ \text{rpm}$ ）し、得られた上清を共栓メスシリンダーに分取した。遠心後の残渣に、さらに、メタノール $40\ \text{mL}$ を加え、同様に処理した後、得られた上清を合わせ、メタノールを用いて $100\ \text{mL}$ としたものをクリーンアップ用試料溶液とした。

2) クリーンアップ：クリーンアップ用試料溶液の $10.0\ \text{mL}$ を採り、これに水を加えて全量を $40.0\ \text{mL}$ とし、白濁が生じた場合にはメンブランフィルターでろ過した。この $20.0\ \text{mL}$ を前処理用カートリッジに負荷し、水 $10\ \text{mL}$ 及びメタノール・水（4:6）混液 $10\ \text{mL}$ で順次洗浄した。次いでアセトニトリル・ 0.1% リン酸（55:45）を流し、その溶出液 $10.0\ \text{mL}$ を分取し、試験溶液とした。

5. HPLC による定性及び定量

標準溶液及び試験溶液を高速液体クロマトグラフに付し、4-HR の標準品の保持時間と比較し、定性を行った。また、標準溶液を用いて作成した検量線から試験溶液中の 4-HR の濃度を求めた。

HPLC 条件

カラム：Capcell Pak C18 MG（ $5\ \mu\text{m}$, 4.6

mm I.D.×250 mm, 資生堂(株)製), アセトニトリル・0.1%リン酸(6:4)混液, 流速:1.0 mL/min, カラム温度:40°C, 検出波長:UV 210 nm, 注入量:10 μ L

C. 結果及び考察

1. 抽出溶媒

エビあるいはカニ肉からの 4-HR の抽出はアセトニトリル⁷⁾, メタノール⁸⁾及び酢酸エチル⁹⁾による方法が報告されている。このうち, 酢酸エチルで抽出する方法は, 抽出後の工程に煩雑な抽出溶媒の脱水や数回の濃縮操作, 順相系のカートリッジによるクリーンアップを含み, 簡便性という点に難点がある。一方, アセトニトリルあるいはメタノールで抽出する方法は, 比較的簡単な操作で引き続き逆相系のカートリッジによるクリーンアップが行える点で有利であると思われた。そこで, 本法ではメタノールを抽出溶媒に用いることにした。

2. クリーンアップ

エビ及びカニからの抽出溶液をそのまま HPLC に付した場合, HPLC クロマトグラム上に多くの夾雑ピークが出現し, 4-HR の測定を妨害するようなピークも認められた。さらに, クロマトグラム上, 3 時間に渡って大小の夾雑ピークが出現し, 特に 50~120 分の間に数本の大きなピークが出現して次の試料の注入間隔が大きく延びる結果となった。そこで, これらを除くためにカートリッジカラムを用いたクリーンアップについて検討した。

逆相系のカートリッジによるクリーンアップ法には C18 を用いた Smallwood⁷⁾らの方法があり, アセトニトリル抽出液を水で 3 倍に希釈し, これを C18 カートリッジに付

し, 水で洗浄後, エタノールで溶出している。しかし, この方法では, クロマトグラム上の 10 分程度までの夾雑物がわずかに除去できる程度であり, その後のピークの除去効果は全く認められなかった。

著者らは Sep-Pak Vac C18 カートリッジを用いて検討したが, 4-HR は C18 カートリッジへの保持が比較的強く, メタノール・水(1:1)混液を 20 mL 流しても全く溶出せず, 25 mL 付近から溶出し始めることが分かった。そこで, まずクリーンアップ用試料溶液を水で 4 倍に希釈し, 白濁が生ずる場合にはメンブランフィルターでろ過した後, その 20 mL を C18 カートリッジに負荷することにした。洗浄溶媒は比較的保持が強い低極性夾雑物の除去を期待してメタノール・水(4:6)混液 10 mL で洗浄することとし, 溶出はアセトニトリル・水(55:45)混液 10 mL で行うこととした。しかし, この操作によって 4-HR 付近の夾雑ピークの影響をかなり除くことは出来たものの, 10 分以降に現れる夾雑ピークは全く除くことができなかった(図 1)。そこで, 洗浄溶媒のメタノールの比率を増加したり, 洗浄溶媒をアセトニトリル・水系に変更して検討したが, 4-HR の回収率が低下するばかりで, 夾雑ピーク除去の改善には結びつかなかった。すなわち, これらの物質はカートリッジに負荷する際の溶媒であるメタノール・水(1:3)混液及び洗浄溶媒であるメタノール・水(4:6)混液ではカートリッジからほとんど溶出しなかったが, 溶出溶媒であるアセトニトリル・水(55:45)混液画分に 4-HR と共に大部分が溶出することが判明した。このような挙動と HPLC での保持時間から, これらの物質は中性物質ではなく, 両性のペプ

チド系物質ではないかと考えられた。そこで、溶出溶媒の比率は 55:45 のまま pH のみを変更してみることにした。その結果、溶出溶媒の pH を 3.0 以下に設定した時にこれらの物質はほとんどカートリッジに保持されたままとなり、4-HR と分離することが可能となった。そこで、溶出溶媒は pH が 2.5 付近を示すアセトニトリル・0.1%リン酸 (55:45) とすることにした。

3. HPLC 条件

HPLC での分離にはカラムに Capcell Pak C18 MG を用い、移動相にはアセトニトリル・水系を用いて検討した。その結果、移動相の溶媒比率を 6:4 とした時に 4-HR のリテンションタイムは約 8 分であり、前後の夾雑ピークとの分離も良好であったが、4-HR のピーク幅がやや広く、ブロードになる傾向があった。これは 4-HR が 2 価のフェノールであり、一部水酸基が解離するためと考えられた。そこで、この解離を抑制するために移動相の pH を 3.0 以下とすることとし、移動相の組成をアセトニトリル・0.1%リン酸 (6:4) としたところ、4-HR のシャープなピークが得られ、HPLC の分析時間も 1 検体あたり 20 分で行うことができた。

検出については 4-HR の紫外部の極大吸収は 200 nm 付近であることから、一般的には 210 nm 付近に検出波長を設定し測定を行う。また、蛍光 (Ex. 280 nm, Em. 310 nm) を測定する方法も報告されている⁹⁾。蛍光での検出は夾雑物の影響をあまり受けない点は有利であるが、励起波長である 280 nm 付近の吸収が極めて弱いため、感度が低く、微量分析には不向きであった。本法では UV210 nm で測定することにした。

4. 検量線

検量線は 4-HR の 0.05~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で直線性 ($r=0.999$) が得られた。定量限界は試料あたり 1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

5. 添加回収実験

市販のブラックタイガー、むきえび及びズワイガニに 4-HR を 1.0 及び 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるように添加し、本法にしたがって添加回収実験を実施した。結果は表 1 に示したように回収率は 1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ の添加で 83.8~92.2%, 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ の添加で 88.9~91.8% であった。

むきえびについてのクロマトグラムを図 2 に示した。

本法はエビやカニ肉中の 4-HR の分析法として十分使用できるものと思われる。

D. 結論

エビ及びカニ肉に使用された 4-HR の分析法について検討した。

試料からの 4-HR の抽出にはメタノールを用い、C18 カートリッジでクリーンアップを行った

HPLC による分析にはカラムに ODS を用い、移動相にはアセトニトリル・0.1%リン酸 (6:4) を用いて夾雑物を分離し、検出は UV210 nm で行った。

本法をカニ及びエビに 1.0 及び 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるように添加して添加回収実験を行ったところ、回収率は 1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ の添加で 83.8~92.2%, 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ の添加で 88.9~92.2% 以上であった。

定量限界は試料あたり 1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。

E. 文献

1) Montero, P., Lopez-Caballero, M. E.,