

- SM : ヒメマツタケ抽出物製品の MeOH 抽出物
 SH : ヒメマツタケ抽出物製品の H₂O 抽出物
 SMC : ヒメマツタケ抽出物製品の MeOH 抽出物からの CHCl₃ 抽出物
 SHC : ヒメマツタケ抽出物製品の H₂O 抽出物からの CHCl₃ 抽出物
 CM : 中国産のヒメマツタケ抽出物製品の MeOH 抽出物
 BM : ブラジル産のヒメマツタケ抽出物製品の MeOH 抽出物
 CH : 中国産のヒメマツタケ抽出物製品の H₂O 抽出物
 BH : ブラジル産のヒメマツタケ抽出物の H₂O 抽出物

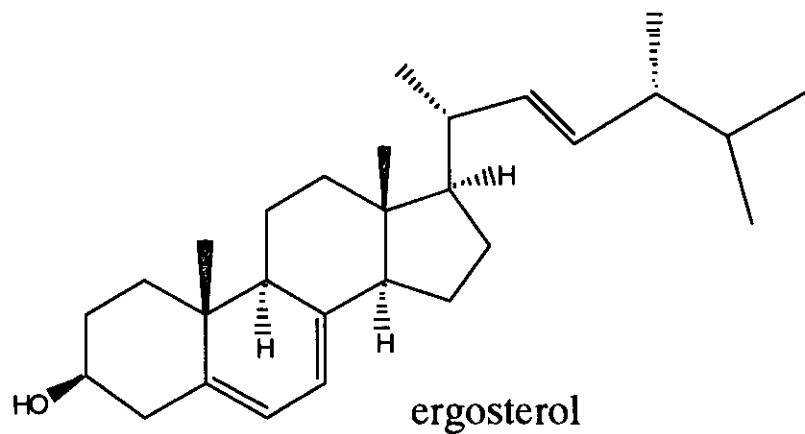


Fig.1. Comparing of ergosterol and some solvent extracts of Himematsutake

別添

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
(食品安全確保研究事業)

既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究

協力研究報告

天然製造用剤メバロン酸の分析

協力研究者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨 メバロン酸製品（天然製造用剤）の成分分析を行った。メバロン酸製品の比旋光度測定およびキラルカラムを用いた HPLC 分析より、メバロン酸製品中のメバロノラクトンが R(-)体であることが確認された。また LC/MS 分析で、メバロン酸製品中のメバロノラクトン濃度を絶対検量線法により定量したところ、97.6%であった。更に、メバロン酸製品を LC/MS の gradient 溶出により分離し、PDA および MS で不純物ピークを確認したところ、メバロン酸製品は R(-)-メバロノラクトン標準品と比べ、不純物を含有することが分かった。

A. 研究目的

メバロン酸は、乳製品、発酵乳、飲料等に用いられる天然製造用剤で、既存添加物名簿収載品目リスト¹⁾に、その基原・製法・本質として、「細菌(*Saccharomyces fibuligera*)によるコーンスチープリカー又はカゼイン由来のペプトンを主原料とする発酵培養液より、有機溶剤で抽出して得られたものである。成分はメバロン酸である。」と記載されている。また、既存添加物名簿収載品目リスト注解書においては²⁾、その概要として、「動物や植物中に広く含まれている生体物質であり、分子内に不斉炭素を持ち天然には R(-)体が存在する。本品は酵母菌 *Saccharomyces fibuligera* を用いる醗酵法により得られる R(-)-メバロン酸が、環化したラクトン構造をとる。食品の栄養強化や、乳酸菌等の有用腸内細菌の

活性化のために使用する。」と記載されている。

本年度、染色体異常試験を行ったメバロン酸製品（酵母(*Saccharomyces fibuligera*)の培養液より分離して得られたもの）について、比旋光度を確認するとともに、LC/MS による分析を行った。

B. 研究方法

1. 試料

試料として、日本食品添加物協会を通じて入手したメバロン酸製品を用いた。メバロノラクトン標準品として和光純薬工業(株)より購入した R(-)-3-Hydroxy-3-methyl-5-pentanolide (R(-)-メバロノラクトン、R(-)-mevalonolactone) 及び (±)-3-Hydroxy-3-methyl-5-pentanolide ((±)-メバロノラク

トン、(±)-mevalonolactone) を用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2. 装置

各種機器データは、次の機器を用いた。

旋光計：DIP-370(日本分光工業(株)製)

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)：

LC-10Avp system (島津製作所(株)製)

液体クロマトグラフ/質量分析装置(LC/MS)：Waters LC/MS system (Waters社製) (LC: Alliance 2695 separations module, PDA: 2996 photodiode array detector. MS: micromass ZQ)

3. 比旋光度の測定

第7版 食品添加物公定書解説書³⁾に記載されている方法に基づいて測定した。試料及び *R*(-)-メバロノラクトン標準品 1 g を各々精密に量りとり、全量 20 mL メスフラスコに入れ、エタノールでメスアップした($n=3$)。旋光計により 25°C で比旋光度を測定した。

4. HPLC 条件

Column, Ceramosoher Chiral RU-2 (4.6 x 250 mm, 5 μ m, Shiseido); column temp., 25°C; solvent, 60% methanol in 1% acetic acid; rate, 0.4 mL/min; inject., 5 μ L; detect., PDA 190~800 nm.

5. LC/MS 条件

1) 試料中のメバロノラクトンの定量

LC conditions: column, AtlantisTM dC₁₈ (2.1 x 150 mm); column temp., 30°C; solvent, 20 mM ammonium formate (pH 8.0); flow rate, 0.2 mL/min; inject., 5 μ L.

MS conditions: source temperature, 120°C; desolvation temperature, 350°C; desolvatoin gas, 350L/h; cone gas, 60L/h; capillary, 3.0 kV; cone, 10 V (ESI pos. m/z

148), 20 V (ESI pos. m/z 131); scan range, m/z 65-600.

2) 試料中の不純物の分析

LC conditions: column, AtlantisTM dC₁₈ (2.1 x 150 mm); column temp., 30°C; solvent, 20 mM ammonium formate (pH 8.0); acetonitrile 0 min = 95 : 5 → 10 min = 95 : 5 → 15 min = 0 : 100 → 30 min = 0 : 100; flow rate, 0.2 mL/min; inject., 5 or 10 μ L; detect., PDA 190-500 nm.

MS conditions: source temperature, 120°C; desolvation temperature, 350°C; desolvatoin gas, 350 L/h; cone gas, 60 L/h; capillary, 3.0 kV; cone, 30 V (ESI pos.), -30 V (ESI neg.); corona, 10 μ A; cone, 30 V (APCI pos.), -30 V (APCI neg.); scan range, m/z 65-600.

6. HPLC 分析用試料溶液の調製

試料及びメバロノラクトン標準品を、50%メタノールを用いて 100 mg/mL に調製した。

7. LC/MS 分析用試料溶液の調製

試料及び *R*(-)-メバロノラクトン標準品を、2 g ずつ精密に量りとり、20 mM ammonium formate (pH 8.0) 20 mL に溶解した。これらの溶液の希釈を繰り返し、濃度 5、10、25、100 μ g/mL の試料溶液及び *R*(-)-メバロノラクトン標準溶液を調製した。

5、10、25 μ g/mL の *R*(-)-メバロノラクトン標準溶液各 5 μ L の ESI pos. m/z 131 におけるピーク面積より作成した絶対検量線を用い、試料溶液 (25 μ g/mL, 5 μ L) 中のメバロノラクトンを定量した。

また、試料中の不純物の PDA による測定には、試料及び *R*(-)-メバロノラクトン標準

溶液 100 µg/mL を 10 µL ずつ用い、MS による測定には、これらの溶液 25 µg/mL を 5 µL ずつ用いた。

C. 結果及び考察

1. 比旋光度の測定

試料および *R*(-)-メバロノラクトン標準品の 25°C における比旋光度はそれぞれ $-20.6 \pm 0.39^\circ$ 、 $-21.3 \pm 0.37^\circ$ であった。従って、試料中には、*R*(-)-メバロノラクトンが主に含まれることが確認されたが、比旋光度の絶対値は *R*(-)-メバロノラクトン標準品の値より僅かに低く、試料のメバロノラクトン純度あるいは *R*(-)体の光学異性体純度が僅かに低いものと予想された。

2. HPLC による *R*(-)体としての純度の確認

資生堂、DICEL、住化分析センターのキラルカラムを用いて検討し、研究方法 4 に示した条件で、メバロノラクトンの(+)体と(-)体のピークを分離することができた。試料を分析した結果、*S*(+)-メバロノラクトンの保持時間に一致するピークは検出されなかった。従って、試料中のメバロノラクトンは *R*(-)体と考えられた。

3. LC/MS による試料中のメバロン酸の定量

R(-)-メバロノラクトン(MW 130)標準品を用い、ESI-MS (pos.及び neg.)、APCI-MS (pos.及び neg.) で、20 mM ammonium formate 中で検出される mass スペクトルを確認した。その結果、ESI-MS (pos.) で顕著なシグナルが観察され (Fig. 1)、既に報告⁴⁾があるように m/z 131 及び 148 にそれぞれ $[M+H]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ を示すシグナルが認められた。

そこで実際に LC/ESI-MS(pos.)で *R*(-)-メバロノラクトン標準品の分析を行ったところ、Fig. 2-A に示すように m/z 131、148 及び total ion いずれのクロマトグラムにおいても、11.2 分に顕著なピークが認められ、これを *R*(-)-メバロノラクトン由来の主ピークと決定した。また、試料を分析しても同様の結果が得られた (Fig. 2-B)。更に、(+)-メバロノラクトン標準品を同じ条件で分析したところ、同一の保持時間のみにピークが観察され、この LC 条件では *R*(-)体と *S*(+)体が同じ保持時間に溶出されることが分かった。

試料中のメバロノラクトンを定量するために、*R*(-)-メバロノラクトン標準品の濃度と m/z 131、148 におけるピーク面積より絶対検量線を作成し、Fig. 3 に示した。試料 (25 µg/mL、5 µL) のメバロノラクトンのピーク面積を測定し、*R*(-)-メバロノラクトン標準品の m/z 131 の絶対検量線に照らし合わせて相当量を算出した結果、試料のメバロノラクトン純度は 97.6 %であると計算された。

4. LC/MS による試料中の不純物の測定

試料中の不純物の存在を確認するために LC/MS 分析を行った。PDA による検出では、試料及び *R*(-)-メバロノラクトン標準品いずれにおいても、保持時間 15 分までに不純物ピークが観察され、その結果を Fig. 4 に示した。試料では、保持時間 4.47 (ピーク 5)、5.98 (ピーク 7) 及び 10.95 (ピーク 8) 分に主にピークが観察された。この内ピーク 5 は、ESI-MS (pos.) において m/z 131 $[M+H]^+$ 及び 148 $[M+NH_4]^+$ を与え、メバロノラクトン (MW 130) 由来のピークと決定した。従って、ピーク 5 以外

のピーク (1~4 及び 6~9) は不純物由来と考えられた。この内ピーク 1、2、4、7 及び 8 は R(-)-メバロノラクトン標準品からも検出され、ピーク 8 以外はいずれも試料においてその含有量が増大しており、特にピーク 7 の増大が顕著であった。また、試料中には、R(-)-メバロノラクトン標準品では検出されないピーク 3、6 及び 9 が不純物として含まれることが分かった。これらピークの UV スペクトルを Fig. 5 に示した。不純物ピークの内、試料中に多量に含まれていたピーク 7 は、その UV スペクトル及び極大吸収がメバロノラクトン (ピーク 5) と非常に近く、類似化合物であるものと示唆された。一方、ピーク 2、3 及び 9 の UV スペクトルはメバロノラクトンと著しく異なり、別の基本骨格を有する不純物であることが予想された。

また、UV では検出されない不純物を確認するために、同じ LC 条件で ESI-MS (pos. 及び neg.)、APCI-MS (pos. 及び neg.) による検出を行った。その結果、ESI (pos. 及び neg.) 及び APCI (pos.) では特にピークは認められなかったが、Fig. 6 に示すように APCI (neg.) で、保持時間 3 分までに不純物ピークが認められ (Fig. 6)、この内 1.50、2.03 及び 2.88 分のピークは R(-)-メバロノラクトン標準品では認められない不純物ピークであった。

以上より、試料は R(-)-メバロノラクトン標準品に比べ、多数の不純物に含有することが明らかとなった。

D. 結論

メバロン酸製品 (天然製造用剤) の成分分析を行った。メバロン酸製品の比旋光度

測定及びキラルカラムを用いた HPLC 分析により、メバロン酸製品中のメバロノラクトンが主に R(-)体であることが確認された。また LC/MS による分析の結果、メバロン酸製品中のメバロノラクトン含量は 97.6% であった。さらに、メバロン酸製品中の不純物について LC/MS (gradient 溶出) で確認したところ、メバロン酸製品は R(-)-メバロノラクトン標準品に比べ、多数の不純物を含有していた。

E. 参考文献

1. 厚生省生活衛生局長通知 “別添 1 既存添加物名簿収載品目リスト” (平成 8 年 5 月 23 日) 衛化第 56 号(1996)
2. 日本添加物協会 技術委員会 編、既存添加物名簿収載品目リスト注解書 (1999).
3. 第 7 版 食品添加物公定書解説書 (1999).
4. Abrar, M., Martin, P. D., Validation and application of an assay for the determination of mevalonic acid in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **773**, 103-111 (2002).

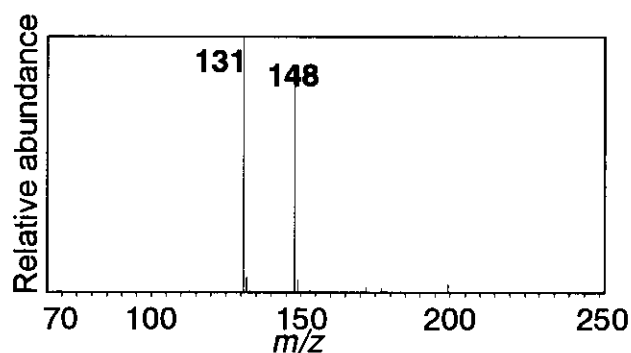


Fig. 1 Mass spectrum of *R*(-)-mevalonolactone standard reagent in 20 mM ammonium formate

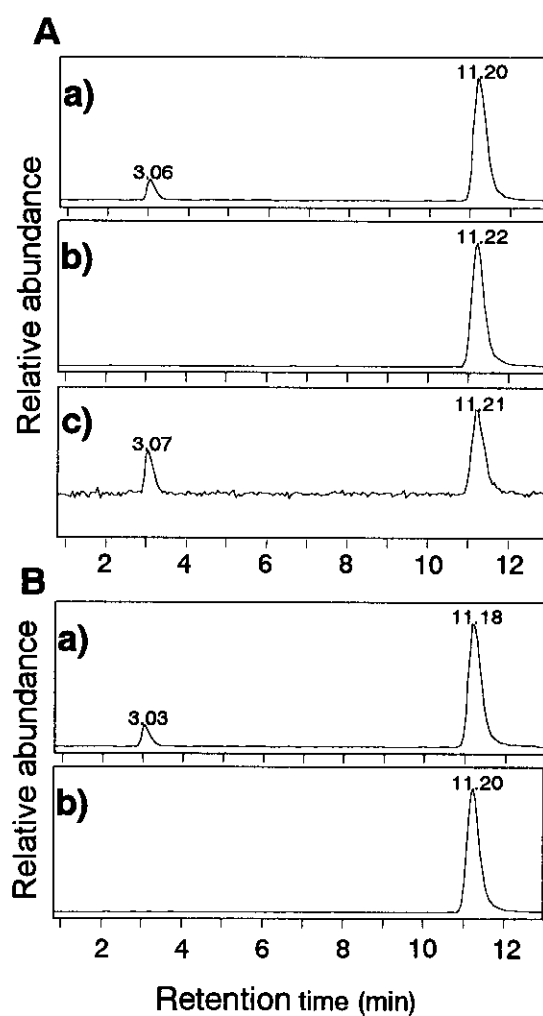


Fig. 2 LC/ESI-MS(+) total ion chromatograms of *R*(-)-mevalonolactone standard reagent (A) and mevalonic acid sample (B)
 a) chromatogram at m/z 131, b) chromatogram at m/z 148,
 c) total ion chromatogram

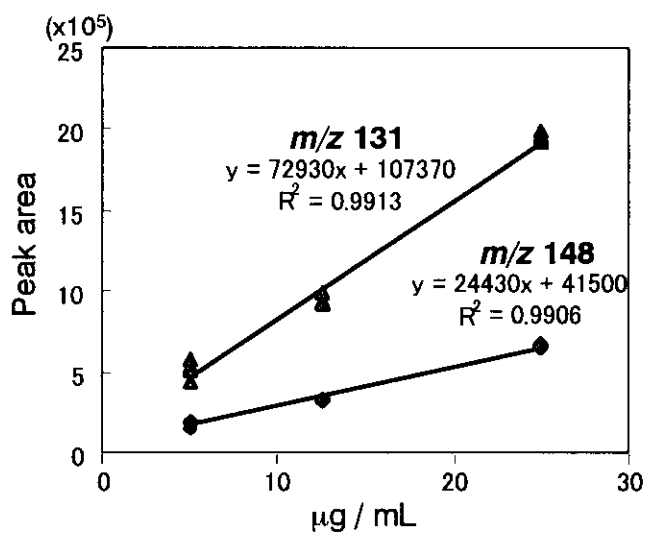


Fig. 3 Calibration Curves of *R*(-)-mevalonolactone standard reagent

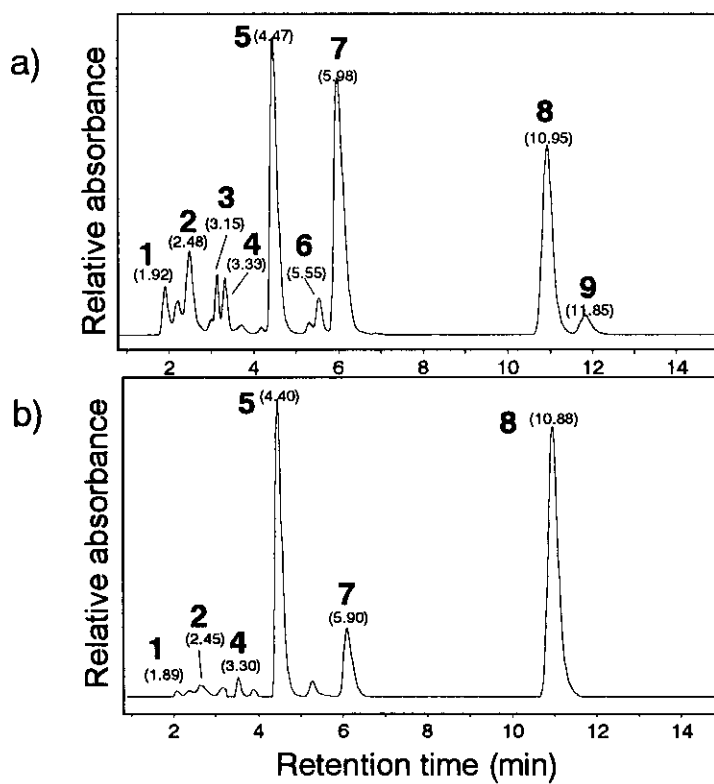


Fig. 4 HPLC chromatograms analyzed by photodiode array detector
 a) mevalonic acid sample, b) *R*(-)-mevalonolactone standard reagent
 Retention times of peaks are shown in parentheses.

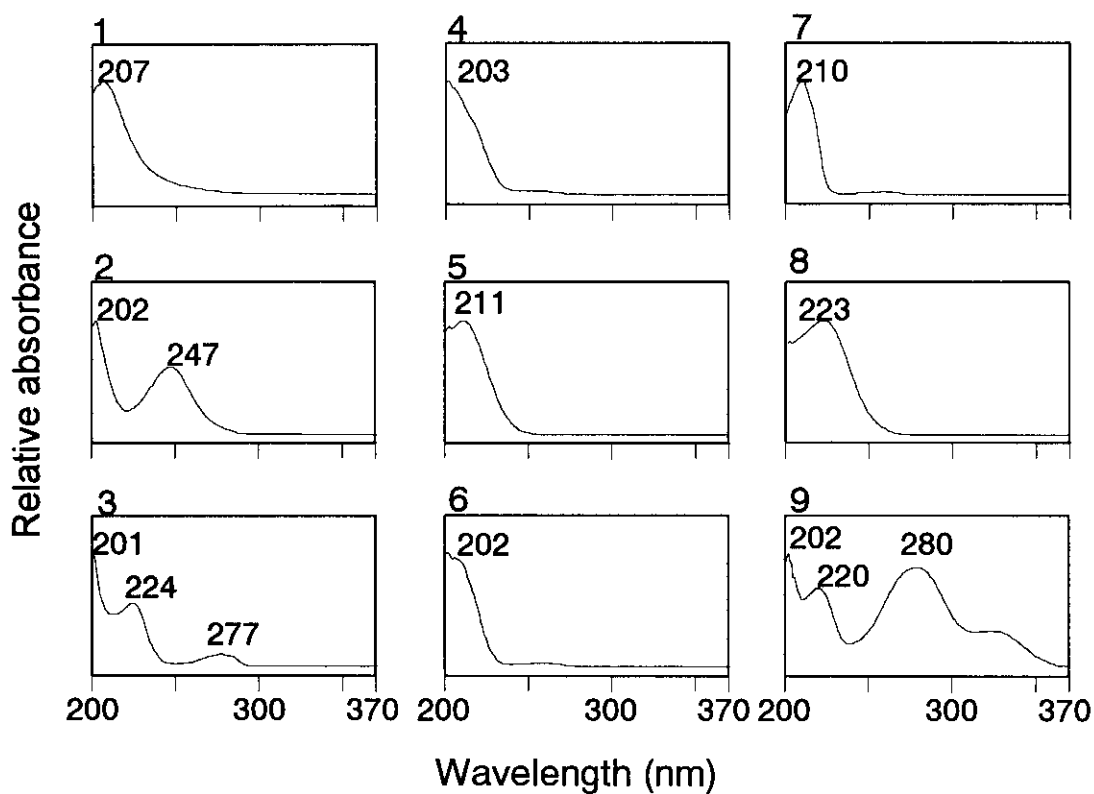


Fig. 5 UV spectra of peaks separated by HPLC from mevalonic acid sample
The numbers of UV spectra are corresponded to peak numbers in Fig. 4.

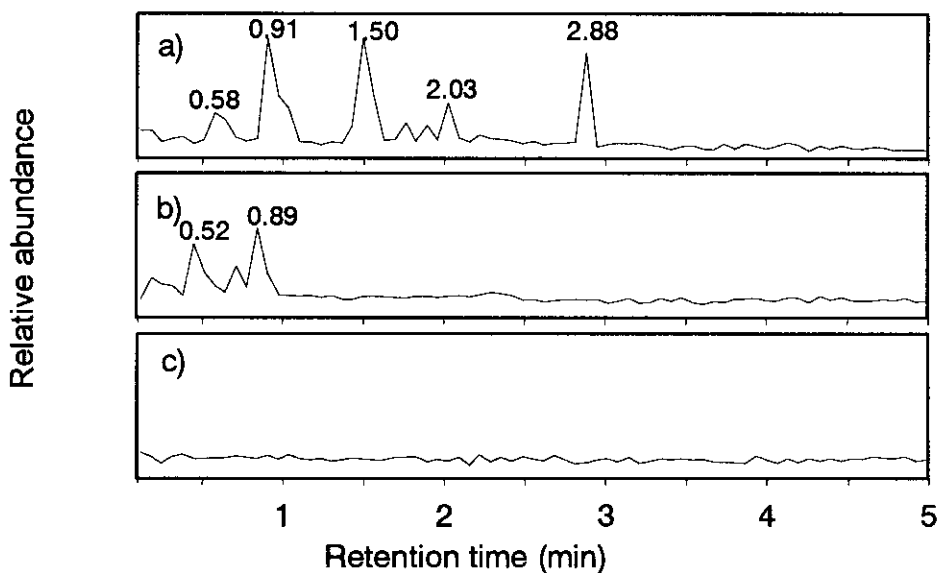


Fig. 6 LC/APCI-MS(-) total ion chromatograms of mevalonic acid sample (a)
and *R*(-)-mevalonolactone standard reagent (b) and solvent (c)

別添

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
(食品安全確保研究事業)

既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究

協力研究報告

天然酸化防止剤没食子酸の分析

協力研究者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨 没食子酸製品(酸化防止剤)の成分分析を行った。没食子酸製品中の水分含量を求めると乾燥減量を測定したところ、 9.30 ± 0.06 %と没食子酸・一水和物標準品の値とほぼ同じ値を示し、没食子酸製品中の没食子酸が主に一水和物として存在することが示唆された。また、没食子酸製品及びその乾燥品中の没食子酸濃度を絶対検量線法により定量し、各々99.7%及び99.3%という値が得られた。更に、没食子酸製品をHPLCのgradient溶出により分離したところ、没食子酸以外に明らかなピークは認められず、製品中の没食子酸純度が非常に高いことが確認された。

A. 研究目的

没食子酸は、古くから知られている生薬の一つであり、既存添加物としての没食子酸は、酸化防止剤として魚油、油脂、煮干、節類などに用いられる。その定義は既存添加物名簿収載品目リスト¹⁾に、「ウルシ科ヌルデ(*Rhus lavanica* LINNE)に発生する五倍子、ブナ科(*Quercus infectoria* OIV.)に発生する没食子より、水、エタノール又は有機溶剤で抽出したタンニン、又はマメ科タラ(*Caesalpinia spinosa* (MOLINA) KUNTZE)の実の夾より、温時水で抽出したタンニンを、アルカリ又は酵素(タンナーゼ)により加水分解して得られたものである。成分は没食子酸である。」と記載されている。本年度、小核試験を行った没食子酸製品(タラの実の夾より抽出したタンニンをアルカリ加水分解し精製して得られた

もの)について、成分確認及び没食子酸純度測定を目的に、HPLCによる分析を行った。

B. 研究方法

1. 試料

没食子酸製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した。没食子酸は、ACROS ORGANICSより、没食子酸・一水和物は、和光純薬工業(株)より購入したものをを用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2. 装置

各種機器データは、次の機器を用いた。
高速液体クロマトグラフィー(HPLC):
LC-10Avp system (島津製作所(株)製)

3. 乾燥減量の測定

第7版 食品添加物公定書解説書²⁾に記載

載されている方法に基づいて測定した。予め秤量瓶を 105 °C で 30 分加熱し、デシケーター内で 30 分間放冷した後、精密に重量を測定した。この秤量瓶に、没食子酸製品、没食子酸及び没食子酸・一水和物を精密に 1 g ずつ量りとり (n = 3)、105 °C で 2 時間加熱し、デシケーター内で 30 分間放冷した後、精密に乾燥減量を測定した。

4. HPLC 条件

1) 没食子酸の定量

Column, DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (4.6 x 150 mm); column temp., 40°C; solvent, 1% formic acid; rate, 1.0 mL/min; inject., 10 µL; detect., PDA 270 nm.

2) 製品中の不純物の測定

(1) Column, DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (4.6 x 150 mm); column temp., 40°C; solvent, 1% formic acid : MeOH = 100 : 0 (0-15 min), 100 : 0 → 0 : 100 (15-30 min), 0 : 100 (30-60 min); rate, 1.0 mL/min; inject., 10 µL; detect., PDA 190-800 nm, 270 nm.

(2) Column, CAPCELL PAK C18 MG (4.6 x 250 mm); column temp., 40°C; solvent, 5 % acetic acid : MeOH = 100 : 0 → 50 : 50 (0 → 30 min), 50 : 50 → 15 : 85 (30 → 35 min), 15 : 85 (35-40 min), 15 : 85 → 10 : 90 (40 → 50 min), 10 : 90 → 100 (50 → 55 min), 0 : 100 (55-70 min); rate, 1.0 mL/min; inject., 10 µL; detect., PDA 190-800 nm, 270 nm.

1) HPLC 分析用試料溶液の調製

没食子酸製品およびその乾燥品 100 mg を精密に量りとり、精製水 100 mL に溶解した。これを 1/2 希釈し 0.5 mg/mL としたものを、没食子酸製品試料溶液とした。

没食子酸 (ACROS ORGANICS 社製)、没食子酸・一水和物 (和光純薬工業 (株) 社製)、およびこれらの乾燥品 100 mg を精密に量りとり、精製水 100 mL に溶解した。これらの溶液の希釈を繰り返し、濃度 1、0.5、0.1 mg/mL の各標準溶液を調製した。

没食子酸は極大吸収を 270、234 nm に示したため (Fig. 1)、検出波長 270 nm において、各濃度の標準溶液 10 µL のピーク面積より作成した絶対検量線より、没食子酸製品およびその乾燥品中の没食子酸を定量した。

C. 結果及び考察

1. 乾燥減量の測定

没食子酸標準品、没食子酸・一水和物標準品および没食子酸製品の乾燥減量はそれぞれ 0.55 ± 0.12 、 9.44 ± 0.03 、 9.30 ± 0.06 % であった。没食子酸製品の乾燥減量は、没食子酸・一水和物標準品の値とほぼ同じであり、かつ没食子酸・一水和物中の水和水の重量濃度 (9.58 %) と非常に近いことから、没食子酸製品中の没食子酸は主に一水和物として存在するものと示唆された。

2. HPLC による製品中の没食子酸の定量

没食子酸製品中の没食子酸を定量するために、没食子酸、没食子酸・一水和物、およびこれらの乾燥品を標品にその濃度と検出波長 270 nm におけるピーク面積より絶対検量線を作成した (Fig. 2)。没食子酸製品およびその乾燥品 (0.5 mg/mL) のピーク面積を測定し、没食子酸・一水和物の検量線および没食子酸乾燥品の絶対検量線にそれぞれ照らし合わせて、各相当量を算出した結果、0.498 mg/mL および 0.497 mg

/mL という値が得られた。従って、没食子酸製品中の没食子酸が全て一水和物だと仮定するとその純度は 99.7%、乾燥品中の没食子酸純度を算出すると 99.3%であると計算され、没食子酸製品純度が非常に高いことが明らかとなった。

3. HPLC による製品中の不純物の測定

2. の結果から、没食子酸製品の乾燥品の純度が高いこと、また乾燥前の没食子酸製品が主に没食子酸・一水和物であると仮定するとその純度が高いことが明らかとなった。しかしながら、乾燥による減量分が全て製品中の水和水によるものであるか否かは明らかでなく、乾燥により揮発しやすい他の不純物が含まれている可能性は否定できなかった。そのため、没食子酸製品を gradient 溶出による HPLC で分離し、UV 190 ~ 800 nm の広範囲のスクリーニングで没食子酸以外のピークが認められるか否かを検討した。その結果、2種の HPLC 溶出条件のいずれにおいても、没食子酸以外に明らかなピークは認められず(Fig. 3 及び Fig. 4)、製品中の没食子酸純度が非常に高いことが確認された。

D. 結論

没食子酸製品（酸化防止剤）の成分分析を行った。没食子酸製品中の水分含量を求めため乾燥減量を測定したところ、9.3%と没食子酸・一水和物標準品の値とほぼ同じ値を示し、没食子酸製品中の没食子酸が主に一水和物として存在することが示唆された。また、没食子酸製品及びその乾燥品中の没食子酸濃度を絶対検量線法により定量し、各々99.7%及び 99.3%という値が得

られた。更に、没食子酸製品を HPLC の gradient 溶出により分離したところ、没食子酸以外に明らかなピークは認められず、製品中の没食子酸純度が非常に高いことが確認された。

E. 参考文献

1. 厚生省生活衛生局長通知“別添1 既存添加物名簿収載品目リスト”(平成8年5月23日).衛化第56号(1996)
2. 第7版 食品添加物公定書解説書(2000).

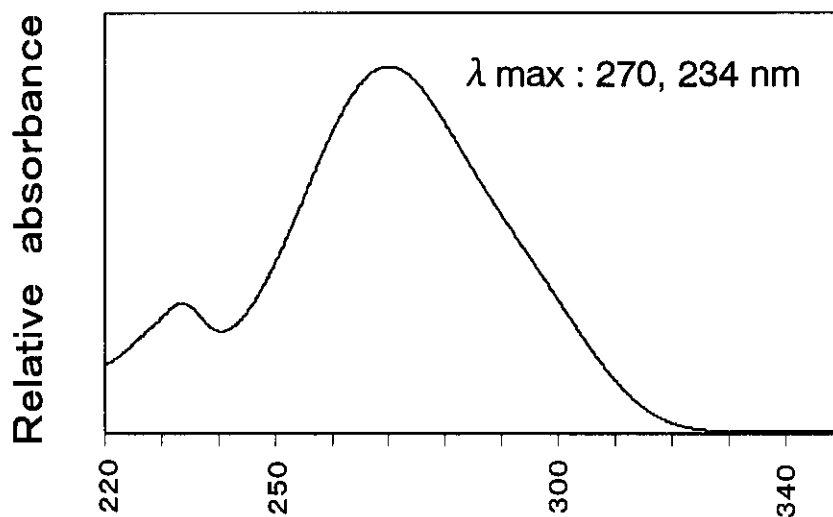


Fig. 1 UV spectrum of gallic acid

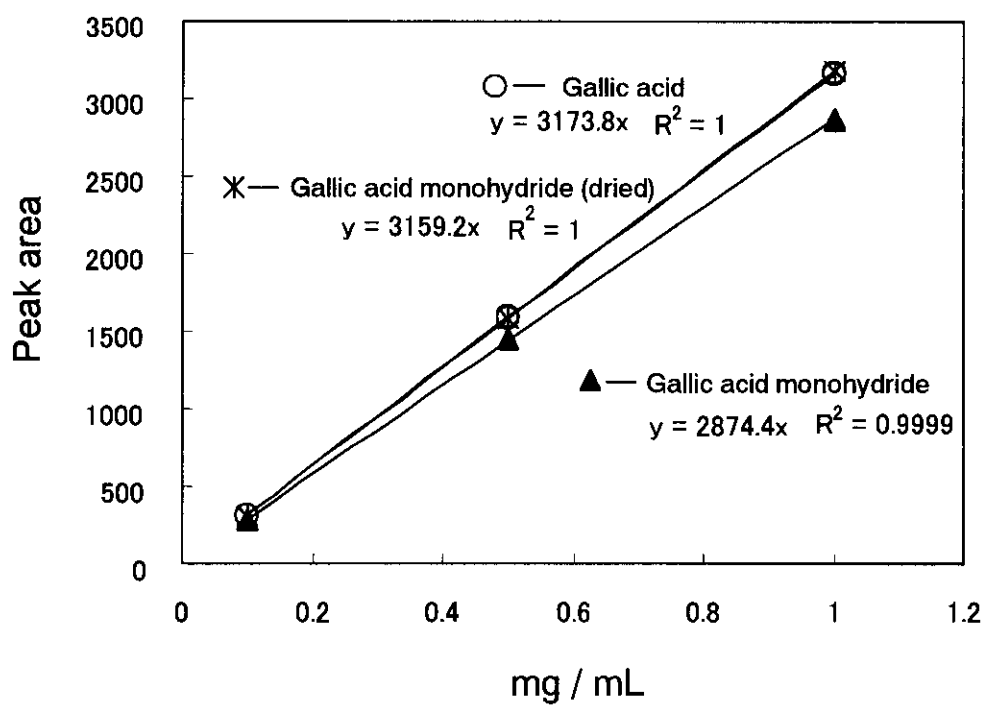


Fig. 2 Calibration Curves of gallic acid standard reagents

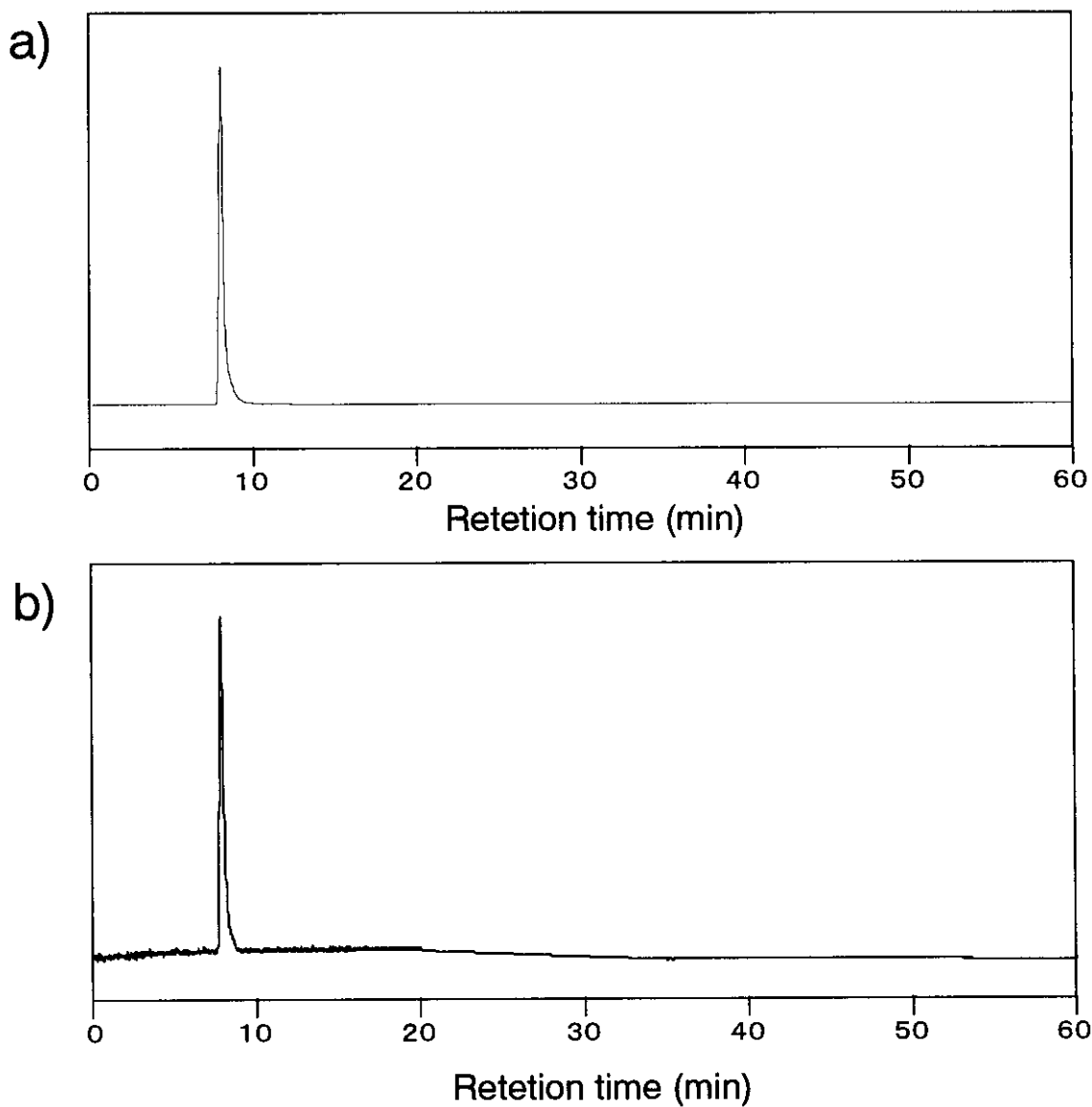


Fig. 3 HPLC profiles of an additive of gallic acid
 a) UV 270 nm. b) Max plot of UV spectra (UV190 ~ 800 nm).
 Column: DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (4.6 x 150 mm).
 Solvent: 1% formic acid:MeOH 0 min = 100:0 → 15 min = 100:0 →
 30 min = 0:100 → 60 min = 0:100
 Retention time of gallic acid: 7.90 min

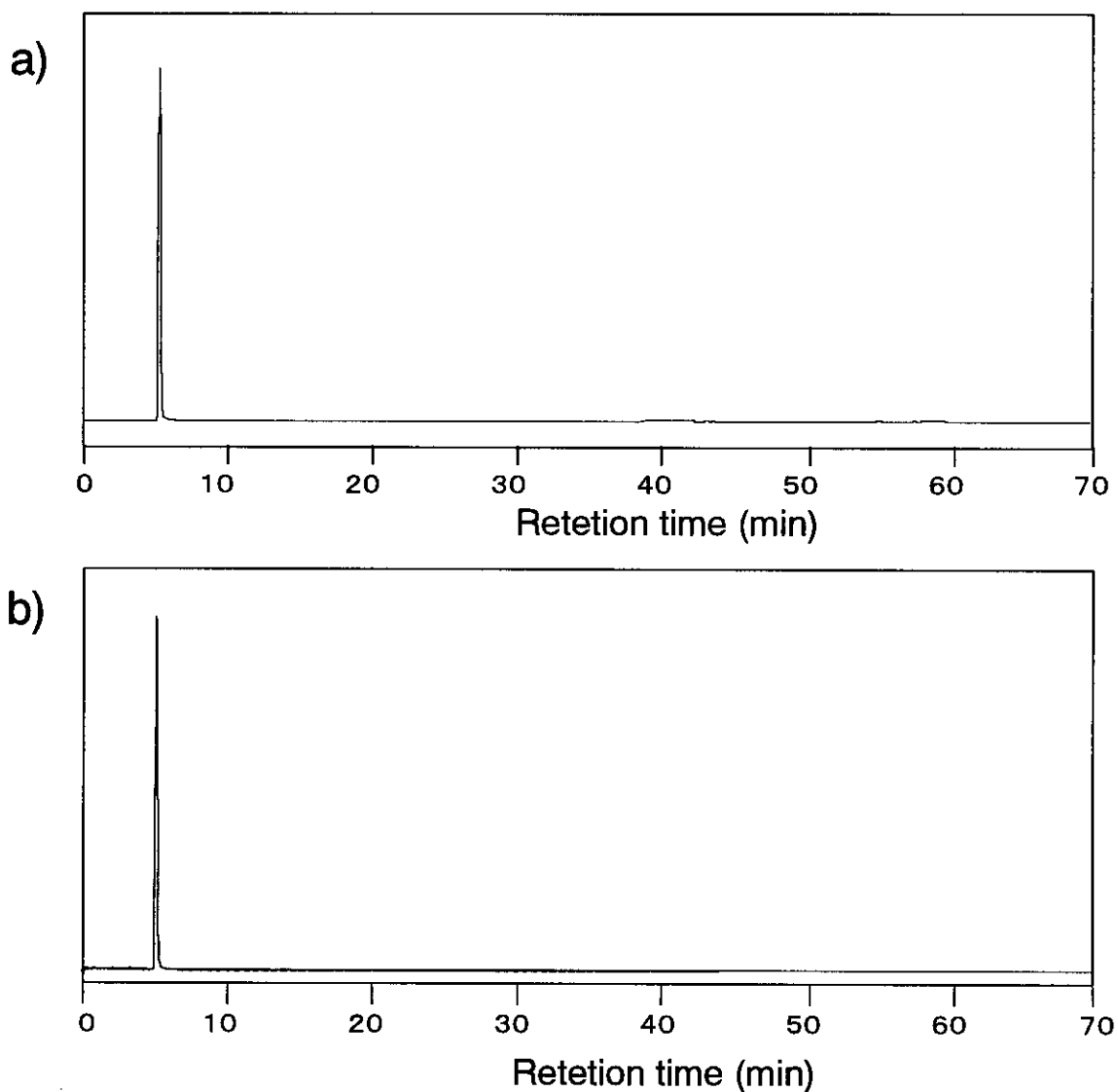


Fig. 4 HPLC profiles of an additive of gallic acid

a) UV 270 nm. b) Max plot of UV spectra (UV190 ~ 800 nm).

Column: CAPCELL PAK C18 MG (4.6 x 250 mm).

Solvent: 5 % acetic acid:MeOH 0 min = 100:0 → 30 min = 50:50 → 35 min = 15:85 → 40 min = 15:85 → 50 min = 10:90 → 55 min = 0:100 → 70 min = 0:100

Retention time of gallic acid: 5.12 min

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金
(食品安全確保研究事業)
既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究
協力研究報告

天然着色料ログウッド色素の主成分および安定性に関する研究

協力研究者 杉本直樹 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 毒性試験に供した天然着色料ログウッド色素製品の主成分について LC/MS を用いて検討した結果、主色素とされるヘマトキシリン及びその酸化体ヘマテインを検出した。また、本色素の安定性について検討した結果、長期保存によってもその成分組成は変化しないことが確認された。

A. 研究目的

天然着色料ログウッド色素は、既存添加物収載品目リスト¹⁾にその基原・製法・本質として、「マメ科ログウッド (*Haematoxylon campechianum*) の心材より、熱時水で抽出して得られたものである。主色素はヘマトキシリン (hematoxylin (1)) である。黒褐色を呈する。」とされているが、1 自体は無色ないし淡黄色であり、空气中で酸化されて赤色のヘマテイン (hematein (2)) になることが知られている²⁾ (Fig. 1)。したがって、黒褐色を示す天然着色料ログウッド色素の主色素として 1 が既存添加物名簿収載品目リスト中に記載されているが誤りであり、1 ではなく 2 が主色素であるか、あるいは、全く別の色素が本色素の色素成分本体であると疑われた。ログウッド色素は、平成 13 年度に変異原性試験が行われ、平成 14 年度、本研究において研究対象とした品目であるが、前回入手した試料は、成分分析の結果、シタン色素の誤りであったため、再度、ログウッド色素を入手し、その主成分の確認を行うとともに、安定性について LC/MS を用いて検討した。

B. 研究方法

1) 試料

ログウッド色素 (Logwood color) 製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した。Hematoxylin (1) 及び hematein (2) は、Merck 社より購入したものをを用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2) 装置

各種機器データは、次の機器を用いた。

液体クロマトグラフ/質量分析装置 (LC/MS): Waters LC/MS system (Waters 社製) (LC: Alliance 2695. PDA: 2996 photodiode array detector. MS: Micromass Quattro micro™. PDA: 2996 photodiode array detector.)

3) LC/MS 条件

Analytical LC conditions: column, J'share ODS-H80 (2.0 mm i.d. x 150 mm, YMC); column temp., 40°C.; solvent, MeOH:2%AcOH = 10:90 (0 min)→90:10 (20 min)→100:0 (25 min); inject, 2 µL; rate, 0.3 mL/min; detect, 290 nm (for 1), 450 nm (for 2).

MS conditions: source temperature, 120°C; desolvation temperature, 350°C; desolvation

gas, 350 L/h; cone gas, 50 L/h, capillary, 3.0 kV; cone, 50 V; scan range, m/z 100-600.

4) LC/MS 分析用試験溶液の調製

ログウッド色素製品を MeOH に溶解し 2 mg/mL に調製したものを分析用試料とした。また、1 および 2 をそれぞれ精密に 5.0 mg 取り、MeOH 10 mL に溶解した後、1/2 希釈を繰り返したものを検量線作成用溶液とした。

5) 色素成分の安定性試験

ログウッド色素製品粉末約 10 g をガラスサンプル瓶にとり、毒性試験(反復投与 90 日)と同一条件下に 12 日間放置した。測定直前に MeOH に 0.5 mg/mL になるように溶解し、安定性試験溶液とした。なお、対照として別に遮光冷蔵保存したログウッド色素製品を用いた。

C. 結果及び考察

1. ログウッド色素製品の LC/MS 分析

ログウッド色素製品を LC/MS に付した結果を Fig. 2 に示した。検出波長 290 nm 及び 450 nm において、3.85 分及び 9.03 分にピークが観察され、3.85 分に観察されたピーク 1 は、ESI(neg.) において m/z 301 [M-H]⁻ を与え、1 と推定された(Fig. 3)。一方、9.03 分に観察されたピーク 2 は 299 [M-H]⁻ を与え、2 と推定された。さらに、1 および 2 の標品と比較したところ、保持時間、PDA スペクトルおよび MS スペクトルがそれぞれ完全に一致したことから、ピーク 1 および 2 がそれぞれ 1 および 2 に由来するものであると決定した。次に、1 および 2 の標品を用いて絶対検量線を作成し、両者の定量を行ったところ、ログウッド色素製品中に 1 が 27.3%、2 が 7.2% 含まれることが明らかとなった(Fig. 4, Table 1)。したがって、主成分は、無色ないし淡黄色を示すとされる 1 であることが明らかとなったが、暗赤色の 2 がログウッド色素の色素成分の本体であ

ることから、既存添加物収載品目リストにその基原・製法・本質として記載されている「マメ科ログウッド(*Haematoxylon campechianum*)の心材より、熱湯水で抽出して得られたものである。主色素はヘマトキシリンである。黒褐色を呈する。」は誤りであり、「. . . 主成分はヘマトキシリンである。黒褐色を示す。」とするか、「. . . 主色素はヘマテインである。黒褐色を示す。」等と修正することが妥当であると考えられた。

2. ログウッド色素製品の安定性

ログウッド色素製品を毒性試験(反復投与 90 日)実行時とほぼ同一条件下に放置し、12 日後の成分組成を LC/MS により分析した結果、その成分組成は全く変化しないことが確認された。したがって、長期にわたる毒性試験(反復投与 90 日)においても、その試験中にログウッド色素製品の成分組成は変化しないと考えられた。

D. 結論

天然着色料ログウッド色素製品の主色素成分について分析した結果、主色素と考えられる 2 およびその還元体で淡黄色を示す 1 を検出した。さらに、本色素の安定性について検討した結果、長期保存によってもその成分組成が変化しないことが確認された。

E. 参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知 “別添 1 既存添加物名簿収載品目リスト” (平成 8 年 5 月 23 日). 衛化第 56 号(1996).
- 2) Kahr, B., Lovell, S., Subramony, A. J., The progress of logwood extract, *Chirality*, 10, 66-77 (1998).

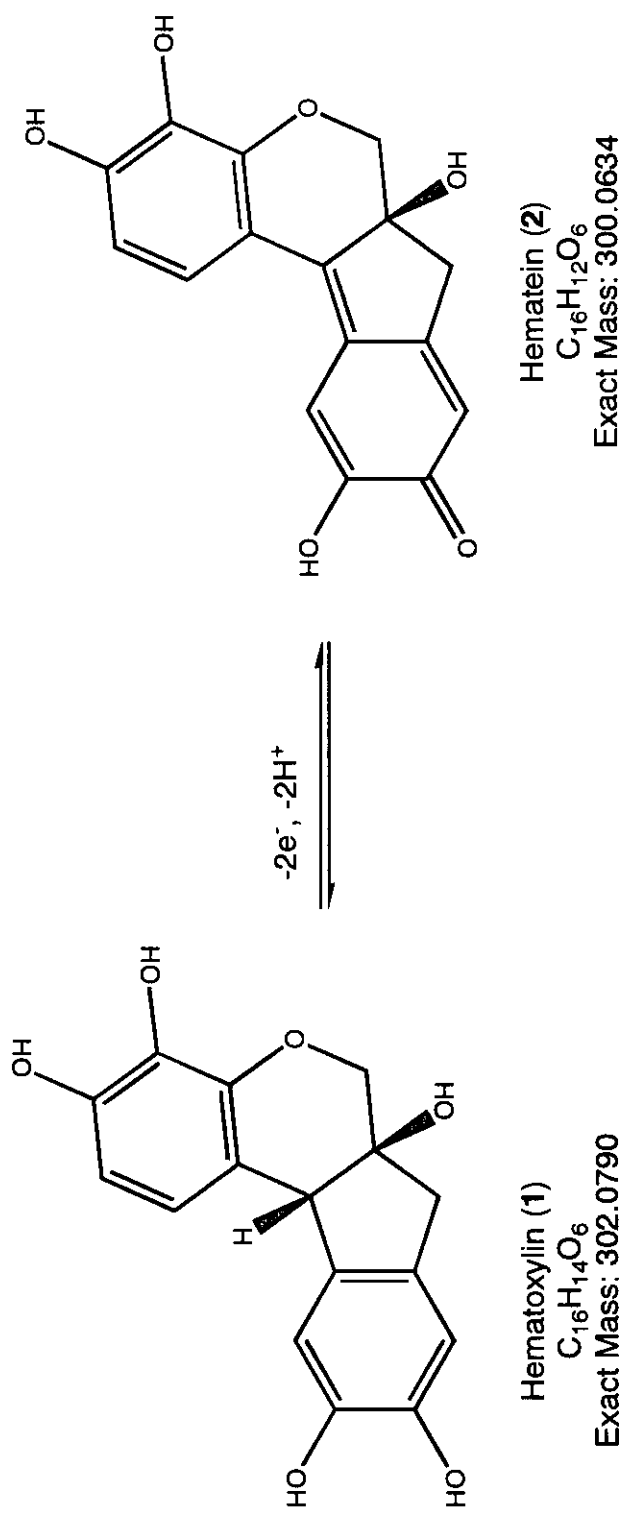


Fig. 1 Structures of hematoxylin (1) and hematein (2)

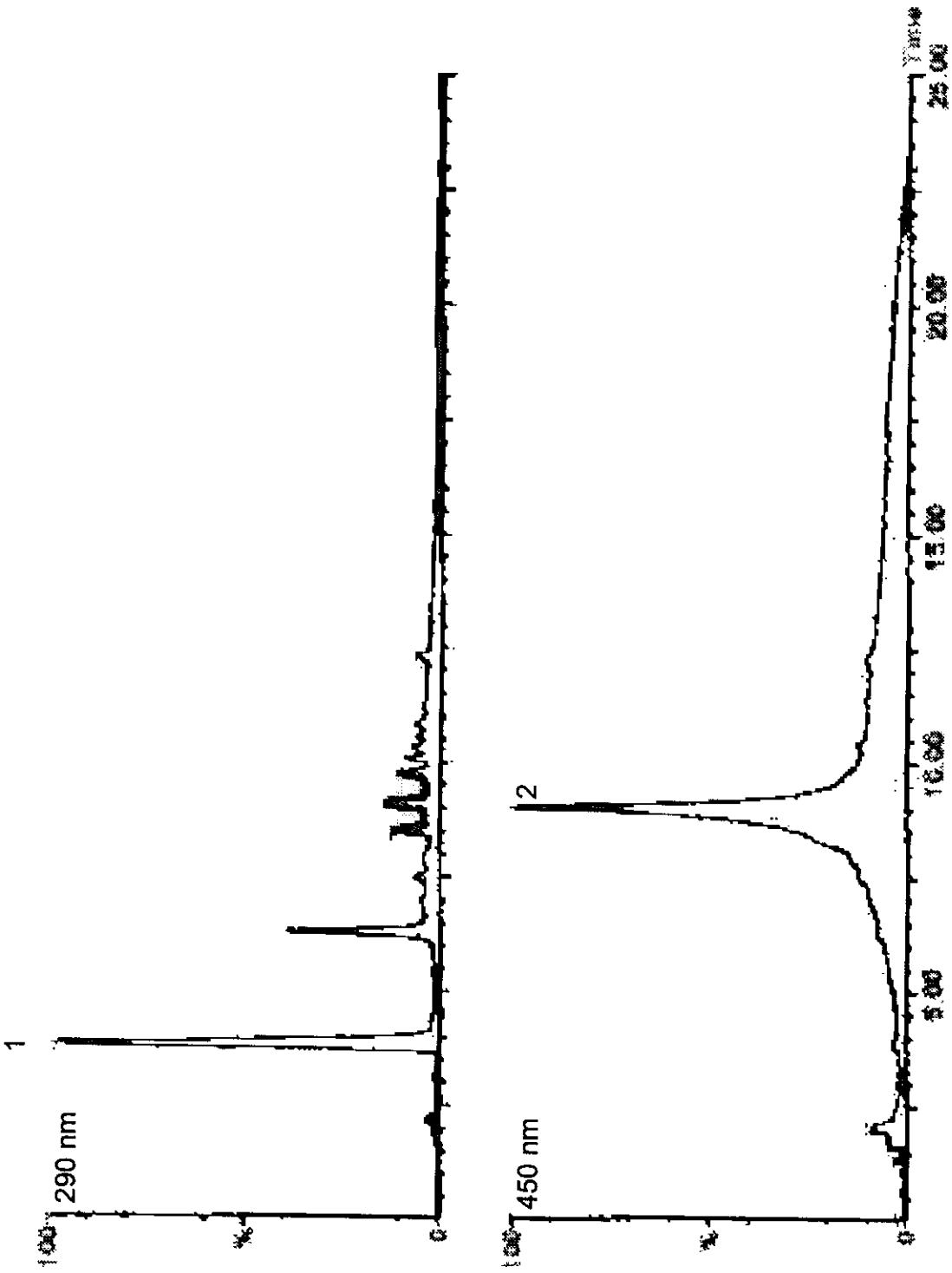


Fig. 2 LC profiles of logwood color product

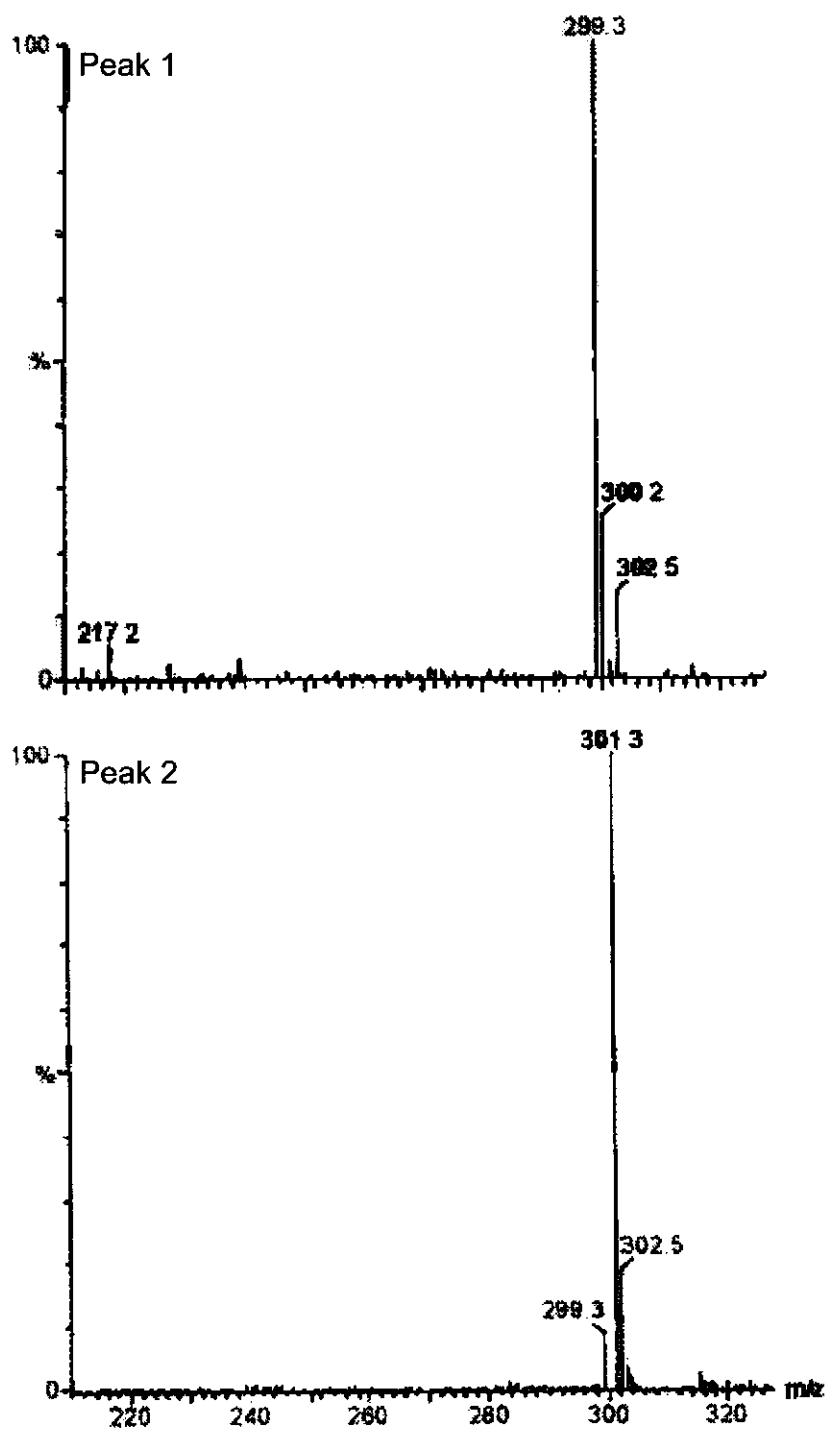


Fig. 3 Mass spectra of peak 1 and 2
The spectra of peak 1 and 2 were obtained by ESI negative mode.

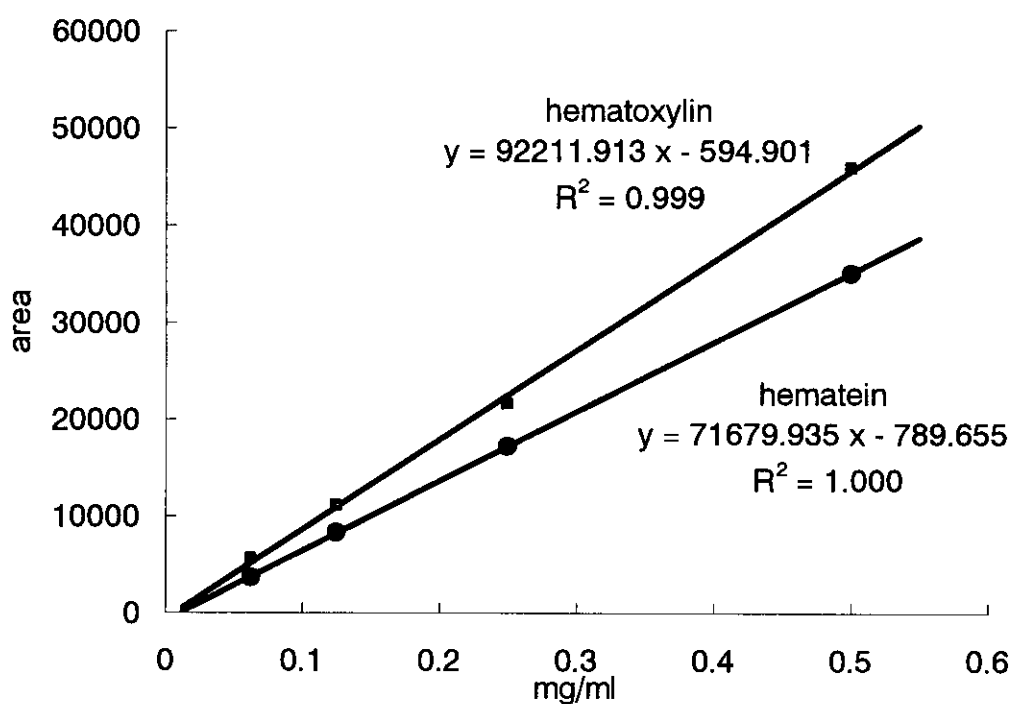


Fig. 4 Calibration curves of hematoxylin (1) and hematein (2)

Table 1 Contents of hematoxylin (1) and hematein (2) in logwood color product

Sample	Compound	Area	%
Logwood color product	hematoxylin (1)	24572.371	27.3
	hematein (2)	4353.383	7.2