

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
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

平成 16 年度協力研究報告書
酵素分解ハトムギ抽出物の主構成成分の分析

研究協力者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨 天然保存料酵素分解ハトムギ抽出物の主構成成分について HPLC で分析した結果、1~7 個のグルコースが α -(1→4)結合したオリゴ糖の混合物であることがわかった。

A. 研究目的

酵素分解ハトムギ抽出物は、天然保存料の一つであり、主にイチゴの鮮度保持剤として用いられている。既存添加物名簿収載品目リストには、その基原・製法・本質は、「ハトムギ (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* STAPP) の種子より、熱時水で抽出し、酵素 (α -アミラーゼ) 分解した後、エタノールで処理したもの」と記載されている。しかし、主成分に関する記載がないことから、我々は既に本抽出物の成分について分析を行い、主構成成分が 1~7 個のグルコースが α -(1→4)結合したオリゴ糖の混合物であることを報告している(Sugimito, N. et al., *J. Food Hyg. Japan*, 42, 309-315 (2001).)。そこで、今回、毒性試験に供するため入手した酵素分解ハトムギ抽出物製品においても成分組成に差異がないか既報の方法により検討した。

B. 研究方法

1) 試料

酵素分解ハトムギ抽出物製品(液体製剤)は、日本食品添加物協会を通じて入手したもの

を用いた。Glucose (無水), maltose (1 水和物) は和光純薬工業(株)より購入したものを用いた。Maltotriose (1 水和物)は Sigma より購入したものを用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

2) HPLC 分析

高速液体クロマトグラフィー(HPLC): LC-10Avp system (島津製作所(株)製)。分析条件: Column, YMC-Pack Polyamine II (4.6 x 250 mm, 5 μ m); sampler temp., 15°C; column temp., 40°C; solvent, 65% CH₃CN; rate, 1.0 mL/min; inject., 10 μ L; detect., RI.

3) HPLC 分析用試料溶液の調製

酵素分解ハトムギ抽出物製品 6.0 mL を精密に量りとり、減圧乾燥した。得られた残渣 350 mg に 2.0 mL の H₂O を加え再溶解したものを 0.45 mm フィルター(Millipore, Millex-LH)を通したろ液を HPLC 分析用試料溶液とした。

Glucose, maltose および maltotriose 10.0 mg をそれぞれ H₂O 1.0 mL に溶解し標準溶液とした。精密に量りとり、MeOH 2.0 mL に溶解した。Glucose 標準溶液は、1/2 希釈を繰り返して、濃度 10, 5, 2.5 mg/mL に調製し、検量線作

成用標準溶液とした。

C. 研究結果および考察

既報において、HPLC によるオリゴ糖の分析の際、アミノ基による順相分離カラム(アミノカラム)(Capcellpak NH₂ (資生堂))を用いたが、今回は、ポリアミンを化学結合したポリアミンカラムを用いた。ポリアミンカラムは糖類の分離に有効なカラムであり、一般的なアミノカラムに比べ、耐久性が高く、ピーク分離も優れている。

本抽出物を RI を検出器とした HPLC に付したところ、7 つの主要なピークが観察された(Fig. 1)。この内、3 つのピークは、グルコースが 1-3 個からなる α -(1 \rightarrow 4)結合したオリゴ糖標品(glucose, maltose, maltotriose)と一致した。残り 4 つのピークについては、 α -(1 \rightarrow 4)結合した糖の数と保持時間の間の関係から、maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, malto heptaose と決定した(Fig. 2)。したがって、酵素分解ハトムギ抽出物の主構成成分は、1-7 個のグルコースが α -(1 \rightarrow 4)結合したオリゴ糖の混合物であることが確認された。次に RI 検出器では、マルトオリゴ糖のような繰り返し構造を持つ化合物は、重合度に関わらず、ピーク面積と濃度に比例関係が成り立つことから glucose の検量線($y = 54573x - 2603.5$, $r^2 = 0.9996$)により各オリゴ糖の濃度を求めた(Table 1)。その結果、既報で分析した結果と比べると今回入手した試料は、maltose, maltotriose, maltohexaose の含有量が比較的大きく異なっ

ていたが、全オリゴ糖含量に殆ど差はなかった。これは、本抽出物の製造時に用いる酵素 (α -アミラーゼ) の活性の度合いや抽出方法に起因していると考えられた。

D. 結論

今回入手した酵素分解ハトムギ抽出物の主構成成分について HPLC で分析した結果、1-7 個のグルコースが α -(1 \rightarrow 4)結合したオリゴ糖の混合物であることがわかった。

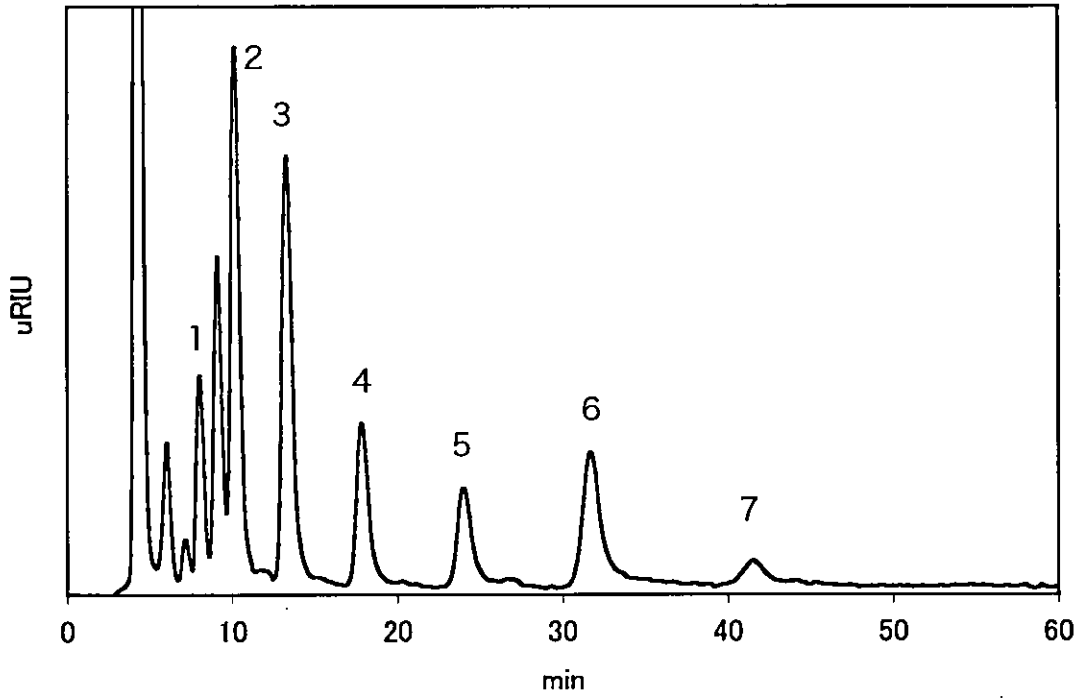


Fig. 1 HPLC profile of enzymatically hydrolyzed coix extract
1 = glucose, 2 = maltose, 3 = maltotriose, 4 = maltotetraose,
5 = maltopentaose, 6 = maltohexaose, 7 maltoheptaose

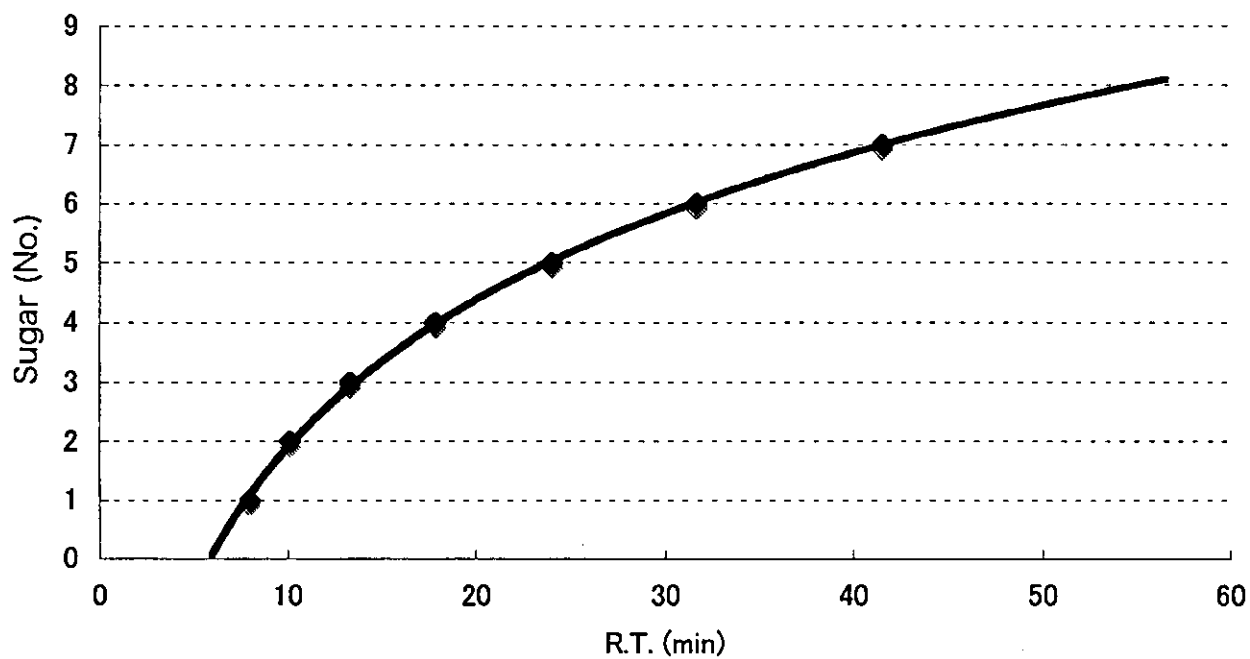


Fig 2. Relationship between numbers of glucose units of α -(1 \rightarrow 4) conjugated oligosaccharide and retention times

◆ α -(1 \rightarrow 4) $y = 3.5825\ln(x) - 6.3494$ $r^2 = 0.9992$

厚生労働科学研究費補助金（食品安全性高度化推進研究事業）
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

平成 16 年度協力研究報告書
ばい煎ダイズ抽出物の成分分析

研究協力者 金 哲龍 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
多田 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨

製造用剤ばい煎ダイズ抽出物製品の成分組成を明らかにする目的で、LC/MS を用いて検討した。その結果、maltol と共にダイズのイソフラボン類である daidzin, genistin, daidzein, genistein, 6'-*O*-acetyldaizin, 6'-*O*-acetylglycitin, 6'-*O*-acetylgenistin 等が含有されることがわかった。絶対検量線法により、daidzin が 3950 µg/g, genistin が 4820 µg/g, daidzein が 350 µg/g, genistein が 350 µg/g 含まれることがわかった。また、maltol は 140 µg/g 検出されたが、プロテアーゼ、10% HCl で処理した結果、定量値に上昇が観察されたことから、maltol はばい煎ダイズ抽出物製品中に残存するタンパク質や鉄イオンと複合体を形成して存在するのではないかと考えられた。

A. 研究目的

ばい煎ダイズ抽出物(roasted soybean extract) は、主に畜肉(モツ, レバー等)や鶏肉等の消臭に用いられ、その用途は製造用剤に分類される。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、「ダイズの種子を脱脂し、ばい煎したものより、熱時水で抽出後、温時エタノールでタンパク質を除去して得られたものであり、成分としてマルトールを含む。」と記載されているが、それ以外の成分の詳細な記述はない。また、maltol はダイズの真性サポニンである DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4*H*-pyran-4-one) サポニンから加熱により生成するとされている²⁾。消臭効果はマルトール誘導体と NH 基との結合による窒素化合物臭気の低減作用機構によると云われるが、詳細は解明されていない。

そこで、既存添加物の安全性評価研究の一環として、LC/MS により、ばい煎ダイズ抽出物製品の成分分析を行い、有効成分とされるマルトールと共にダイズに特有のイソフラボン類の daidzin, genistin, daidzein および genistein [Fig. 1] の

定量を行った。また、ダイズ由来の変異原・癌原物質として知られている 2-amino-3methyl-9*H*-pyrido [2, 3-*b*] indole(MeAαC) [Fig. 1] の存否について検討した。

B. 研究方法

1) 試料

ばい煎ダイズ抽出物 (roasted soybean extract) 製品(黒褐色液体)は日本食品添加物協会を通じて入手したものをを用いた。マルトール (maltol), daidzin, genistin 及び MeAαC は和光純薬工業 (株), daidzein, genistein およびブルーレーヨンはフナコシ (株), プロテアーゼ M 「アマノ」G は天野エンザイム (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

液体クロマトグラフ/質量分析装置 (LC/MS): Waters 社製 LC/MS system (LC: Alliance 2695; PDA: 2996; MS: ZQ-4000)

3) LC/MS 分析条件

LC 条件：カラム, Shiseido Capsell Pak C18 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm); カラム温度, 30°C; 移動相, CH₃CN (0.1% HCOOH) : H₂O (0.1% HCOOH) = 95:5 (0 min) → 60:40 (60 min) → 0:100 (80 min) → 0:100 (90 min); 流速, 0.3 mL/min; 検出波長, 254 nm.

MS 条件：ソース温度, 120°C; 脱溶媒温度, 350 °C; 脱溶媒ガス, 350 L/h; コーンガス, 60 L/h; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 30 V (ESI pos.); スキャン範囲, *m/z* 50-1500.

4) 分析試料の調製

ばい煎ダイズ抽出物製品を精密に量り, 10 mg/mL のばい煎ダイズ抽出物溶液 (CH₃OH:H₂O:CH₃CN=1:1:2)を調製し, 0.45 μm フィルター (Millipore, Millex-LH)を通した後, ろ液を分析試料とした。

ばい煎ダイズ抽出物製品 30 mg を精密に量りとり, プロテアーゼ M「アマノ」G 25.4 mg, H₂O 1.5 mL を加え, スクリュー栓付き試験管内で混合し, 50°C で 1 時間, または 5 時間反応させた。冷却後, H₂O 1.5 mL を加え, 濃度が 10 mg/mL になるよう調製した。0.45 μm フィルターを通した後, ろ液を分析試料とした。

ばい煎ダイズ抽出物製品 28 mg を精密に量りとり, 10 % HCl 1.4 mL を加え, スクリュー栓付き試験管内で混合し, 90 °C で 1 時間加熱した。冷却後, 2 M NaOH を加え, pH(3-4) に調製し, H₂O を加え, 濃度が 10 mg/mL となるよう調製した。0.45 μm フィルターを通した後, ろ液を分析試料とした。

Maltol を精密に量りとり, 5 μg/mL の標準溶液 (CH₃OH:H₂O=1:1)を調製した。また, daidzin, genistin, daidzein, genistein を精密に量りとり, 各濃度 20, 20, 4, 4 μg/mL の標準混合液 (CH₃OH:H₂O:CH₃CN=1:1:2)を調製した。

MeAaC を精密に量りとり, 1 mg/mL の標準溶液 (CH₃OH:H₂O=1:1)を調製した。標準溶液を繰り返し希釈する方法により, 各濃度 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01 mg/mL の標準混合液

(CH₃OH:H₂O=1:1)を調製し分析試料とした。

5) 定量

検量線作成のため調製した maltol 標準溶液 1, 2, 4, 8, 16 μL, イソフラボン標準混合液 1, 2.5, 5, 12.5 μL LC/MS に注入した。検出には選択イオン検出 (Selected Ion Recording: SIR) 法を採用した。モニターイオン *m/z* 127 [M_{maltol}+H]⁺, *m/z* 417 [M_{daidzin}+H]⁺, *m/z* 433 [M_{genistin}+H]⁺, *m/z* 255 [M_{daidzein}+H]⁺, *m/z* 271 [M_{genistein}+H]⁺ より得られたピーク面積を求め, 絶対検量線を作成した。

6) 変異原物質の確認

ばい煎ダイズ抽出物製品 88 g を 1.5 L の精製水で希釈し, 吸着剤ブルーレーヨン 2.5 g を入れ, 1 時間ゆるやかに振とうし, MeAaC 等の多環性芳香族化合物を吸着させた。これを計 2 回繰り返して, 処理したブルーレーヨンを 500 mL の精製水で 5 回洗浄して乾燥させ, 650 mL のメタノール:25 %アンモニア水=50:1 で 2 回抽出した。抽出物を減圧乾固した後, 50 μL で再希釈し, 0.45 μm フィルターを通した後, ろ液を LC/MS 分析試料とした (20 μL 注入, モニターイオン *m/z* 198 [M_{MeAaC}+H]⁺)。

C. 結果及び考察

1) ばい煎ダイズ抽出物製品の構成成分の確認

ばい煎ダイズ抽出物の構成成分を LC/MS により分析した。本抽出物製品の検出波長 254 nm におけるクロマトグラムを Fig. 2 に示す。イソフラボン類の標品 daidzein, genistein, daidzin および genistin との比較により, ピーク 2 が daidzin, ピーク 4 が genistin, ピーク 8 が daidzein, ピーク 10 が genistein であることを確認した。ピーク 3, 5, 6, 7, 9 は ESI-MS (pos.) において, それぞれ *m/z* 447 [M+H]⁺, 459 [M+H]⁺, 489 [M+H]⁺, 475 [M+H]⁺, 284 [M+H]⁺ を与え, また, PDA スペクトルが文献値³⁾と一致することから, それぞれ glycitin, 6'-*O*-acetyldaizin, 6'-*O*-acetylglycitin, 6'-*O*-acetylgenistin, glycitein (Fig. 1) と同定した。次に, maltol 標

品との比較により、本抽出物製品中の maltol の存否を精査した結果、ピーク 1 が、それに相当することが示唆された。ピーク 1 は非常に小さく、またその直後に観察されるピークと分離することが出来なかったため、SIR 法により、モニターイオン m/z 127 $[M_{\text{maltol}}+H]^+$ を走査し、ピーク 1 が maltol であることを確認した。したがって、今回入手し本抽出物製品は、ダイズ由来のイソフラボン類と共に maltol を少量含むことが確認された。

2) 定量

絶対検量線法により、ばい煎ダイズ抽出物製品中のイソフラボン類数種を定量した (Fig. 3, Table 1)。その結果、本抽出物製品中にイソフラボン類として、daidzin が 3950 $\mu\text{g/g}$, genistin が 4820 $\mu\text{g/g}$, daidzein が 350 $\mu\text{g/g}$, genistein が 350 $\mu\text{g/g}$ 含まれることがわかった。乾燥ダイズでは、1g 当たり 2000~5000 μg のイソフラボン類が含まれているとされているが⁶⁾、今回測定した本抽出物製品中のイソフラボン類の総量は、9470 $\mu\text{g/g}$ であったことから、本抽出物製品中には、大豆由来の成分が濃縮されているものと考えられた。次に、同様にして絶対検量線法により、maltol の定量を行った (Fig. 3, Table 1)。その結果、本抽出物製品中には、maltol が 140 $\mu\text{g/g}$ 含有されることがわかった。しかし、maltol の一部分は鉄イオンとの反応による褐変物質として存在すると考えられること⁶⁾、たんぱく質などの高分子に随伴して含まれていると考えられていることから⁷⁾、maltol の定量値が真の値を示していないことが考えられた。そこで、本抽出物製品をプロテアーゼ処理した結果、1時間反応させた場合、240 $\mu\text{g/g}$ 、5時間反応させた場合、300 $\mu\text{g/g}$ と定量値が上昇した。また、本抽出物製品を 10% HCl と 1時間反応させた場合においても 390 $\mu\text{g/g}$ と定量値が上昇した。したがって、製品中において maltol は、残存するタンパク質やばい煎によって生成したメイラード反応生成物などと複合体を形成しているか、あるいは鉄イオンと錯体を形成していると考えられた。実際、maltol 溶液と Fe^{3+} イオン

の反応により、紅褐色の錯体化合物の生成が確認され、10%塩酸によって、錯体が解離し、溶液が無色に変化された。今後、これらの影響については引き続き検討する必要があると思われる。

3) 変異原物質の確認

LC/MS 分析における変異原・がん原物質 MeAcC の検出限界は 0.3 μg であった。ばい煎ダイズ抽出物製品 44 g に相当する濃縮試料の MeAcC 分析を行ったが、検出限界以下であり、ばい煎大豆抽出物製品における存在量は、6.8 $\mu\text{g/g}$ 未満であることが確認された。

D. 結論

ばい煎ダイズ抽出物製品の構成成分について LC/MS を用いて検討した。その結果、maltol と共に大豆のイソフラボン類である daidzin, genistin, daidzein, genistein, 6'-O-acetyldaizin, 6'-O-acetylglucitin, 6'-O-acetylgenistin 等が検出された。絶対検量線法により、イソフラボン類として daidzin が 3950 $\mu\text{g/g}$, genistin が 4820 $\mu\text{g/g}$, daidzein が 350 $\mu\text{g/g}$, genistein が 350 $\mu\text{g/g}$ 含まれることがわかった。また、maltol は本抽出物製品中に 140 $\mu\text{g/g}$ 検出されたが、褐変物質の生成、タンパク質等の高分子の影響により、実際の含有量はより高いと考えられた。今回の研究では、ばい煎ダイズ抽出物から変異原・がん原物質 MeAcC は検出されなかった。

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. Kudou S, Tonomura M, Tsukamoto C, Uchida T and Okubo K: Isolation and structural elucidation of DDMP-conjugated soyasaponins as genuine saponins from soybean seeds. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 546-550, 1993.

3. Huei-ju Wang, Patricia A. Murphy:
Isoflavone content in commercial Soybean
foods. *J. Agric. Food chem.* 42, 1666-
1673, 1994.
4. Kudou S, Okubo K: Malonyl isoflavone
glycosides in Soybean seeds. *Agric. Biol.
Chem.* 55 (9), 2227-2233, 1991.
5. 扇谷陽子, 相澤博, 大谷倫子:大豆のイソフ
ラボン量について;産地による比較. 札幌市
衛研年報, 29, 83-89, 2002.
6. Okubo K, Yoshiki Y, Okuda K, Sugihara T,
Tsukamoto C and Hoshikawa:
DDMP-conjugated saponins isolated from
groundnut (*Apios Americana*). *Biosci.
Biotech. Biochem*, 58, 2248-2250, 1994.
7. 大久保一良, 吉城由美子:大豆加工食品の風
味(香りと色)に及ぼす DDMP サポニンの影
響. 大豆たん白質研究会会誌, 15, 36-40,
1994.

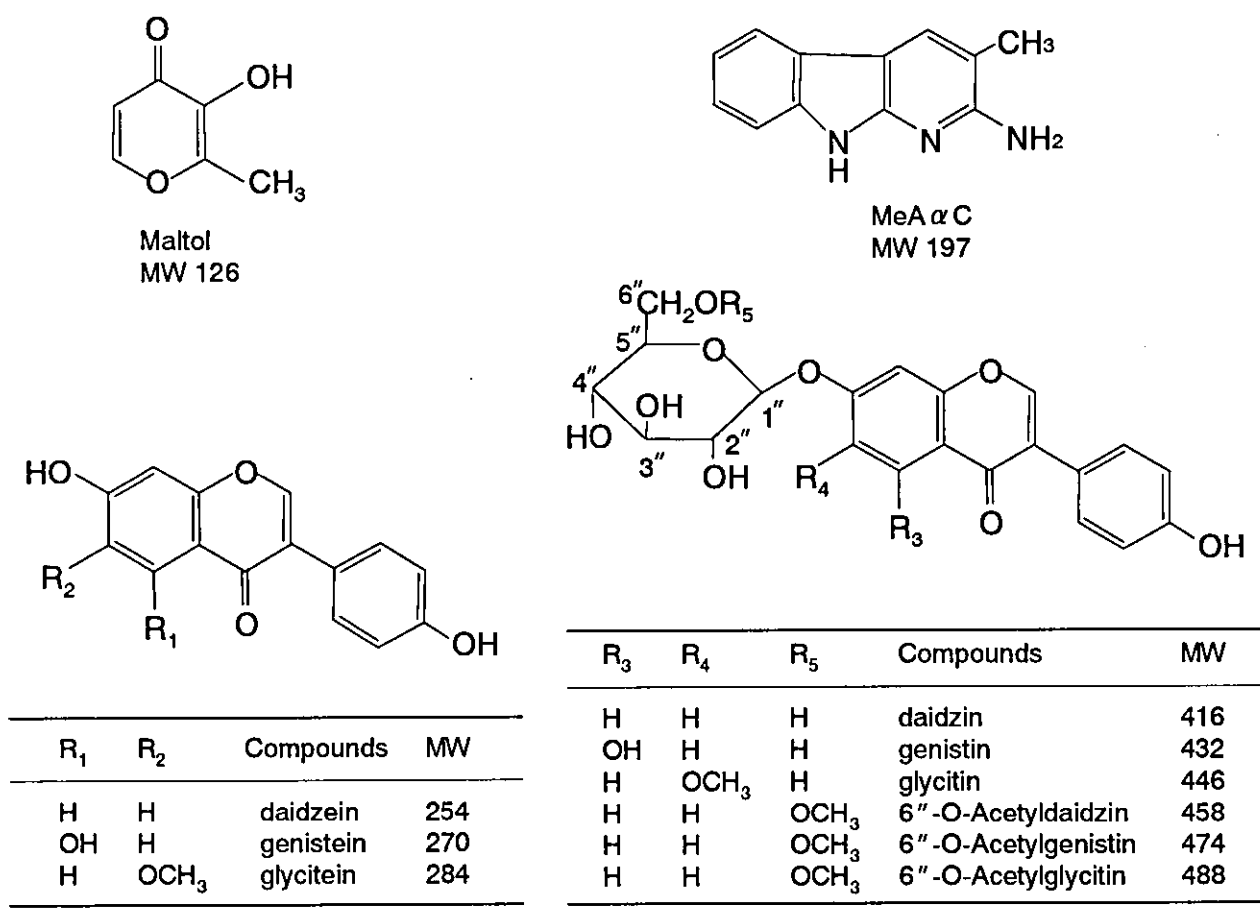


Fig. 1 Chemical structures of maltol, MeA α C and 9 isoflavone isomers.

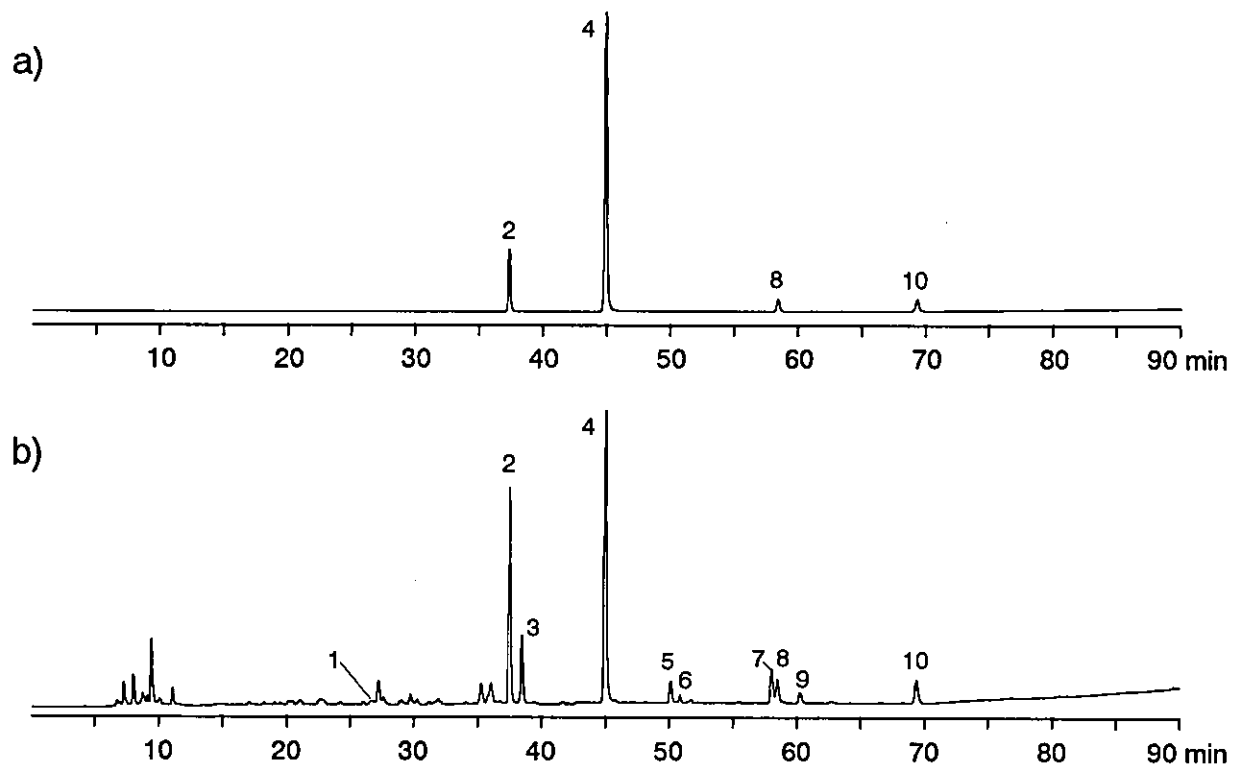


Fig. 2 LC-MS profiles of standards and roasted soybean extract.

a) standards of daidzin(2), genistin(4), daidzein(8) and genistin(10).

b) roasted soybean extract.

m/z: (1) 127[M+H]⁺ (2) 417[M+H]⁺ (3) 447[M+H]⁺ (4) 433[M+H]⁺ (5) 459[M+H]⁺ (6) 489[M+H]⁺
 (7) 475[M+H]⁺ (8) 255[M+H]⁺ (9) 285[M+H]⁺ (10) 271[M+H]⁺.

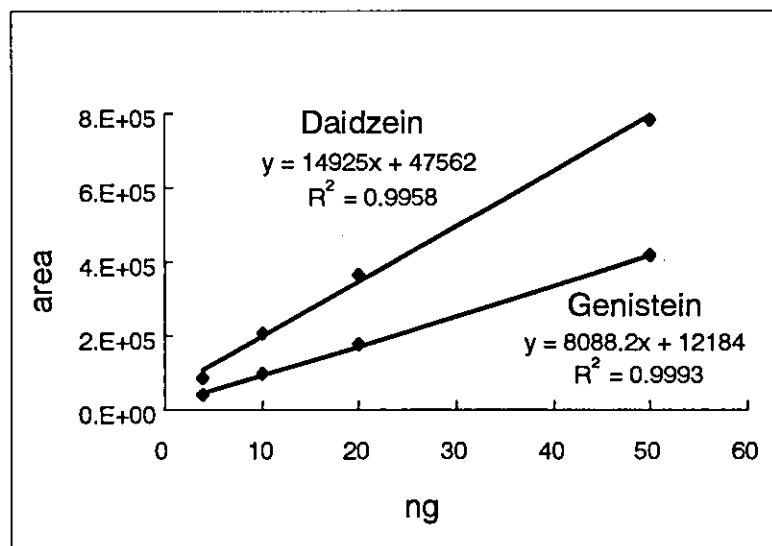
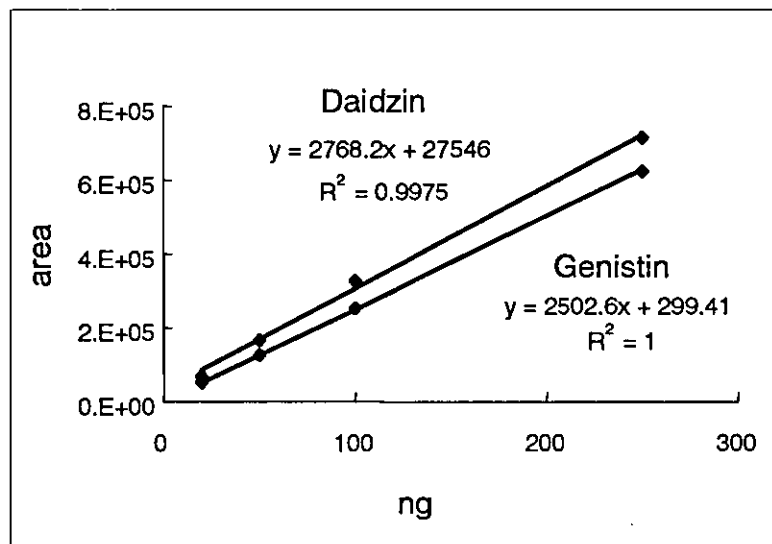
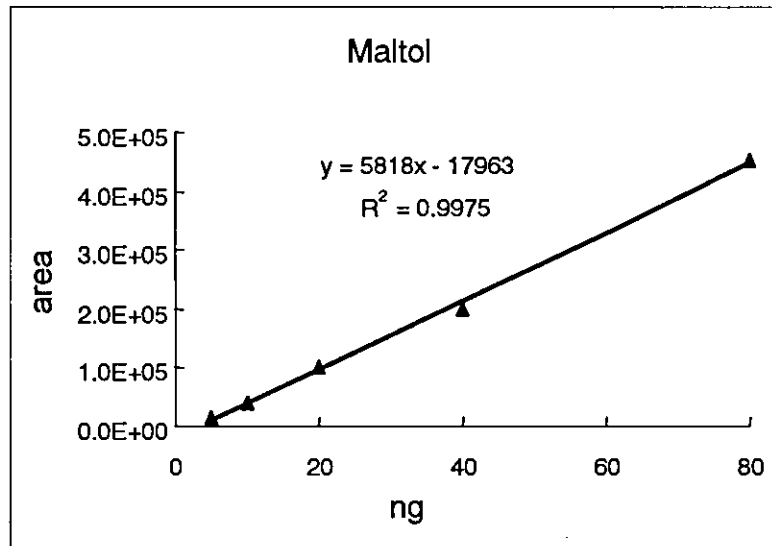


Fig. 3 Calibration Curves of Maltol, Daidzin, Genistin, Daidzein and Genistein.

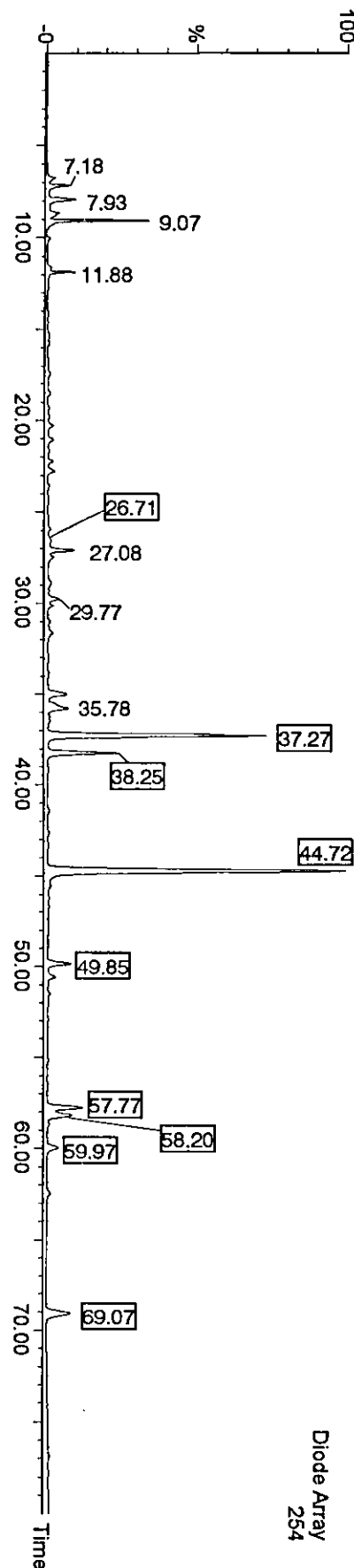
Table. 1 contents of maltol, daidzin, genistin, daidzein and genistein.

No	daidzin	genistin	daidzein	genistein
1	4180	5080	320	360
2	4560	5720	390	-
3	3470	4230	320	330
4	3610	4270	390	370
$\bar{X}(\mu\text{g/g})$	3950	4820	350	350

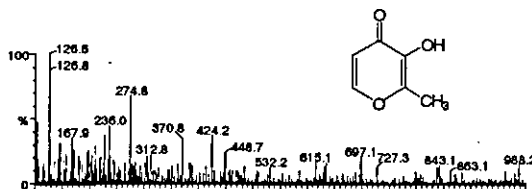
No	1	2	3*	4**	5***
Maltol($\mu\text{g/g}$)	130	140	240	300	390

* Protease (1h, 50 °C) ** protease (5h, 50 °C) *** 10% HCl (1h, 90 °C)

焙煎大豆のLC-MS分析結果と推理



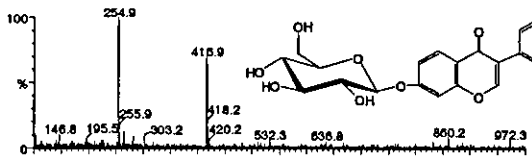
(26.7)



Maltol

$C_6H_6O_3$
Exact Mass: 126.03
Mol. Wt.: 126.11
C, 57.14; H, 4.80; O, 38.06

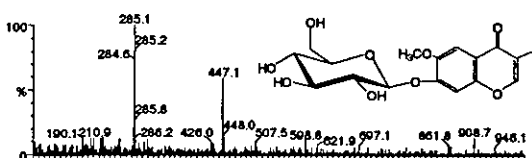
(37.3)



Daidzin

$C_{21}H_{20}O_9$
Exact Mass: 416.11
Mol. Wt.: 416.38
C, 60.58; H, 4.84; O, 34.58

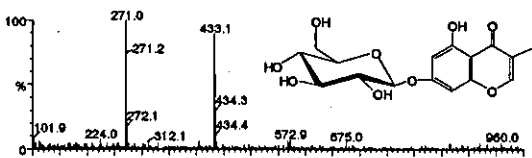
(38.3)



Glycitin

$C_{22}H_{22}O_{10}$
Exact Mass: 446.12
Mol. Wt.: 446.40
C, 59.19; H, 4.97; O, 35.84

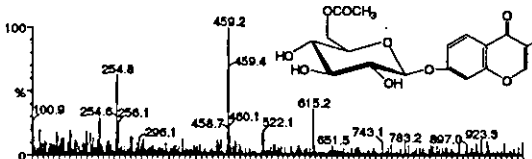
(44.7)



Genistin

$C_{21}H_{20}O_{10}$
Exact Mass: 432.11
Mol. Wt.: 432.38
C, 58.33; H, 4.66; O, 37.00

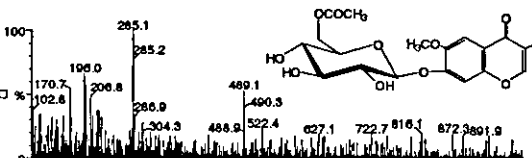
(49.9)



Acetyl Daidzin

$C_{23}H_{22}O_{10}$
Exact Mass: 458.12
Mol. Wt.: 458.41
C, 60.26; H, 4.84; O, 34.90

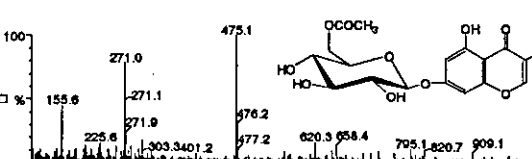
(50.7)



Acetyl Glycitin

$C_{24}H_{24}O_{11}$
Exact Mass: 488.13
Mol. Wt.: 488.44
C, 59.02; H, 4.95; O, 36.03

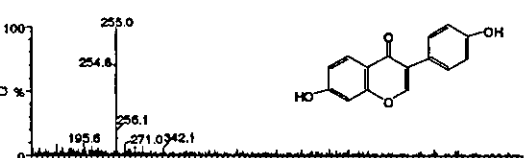
(57.8)



Acetyl Genistin

$C_{23}H_{22}O_{11}$
Exact Mass: 474.12
Mol. Wt.: 474.41
C, 58.23; H, 4.67; O, 37.10

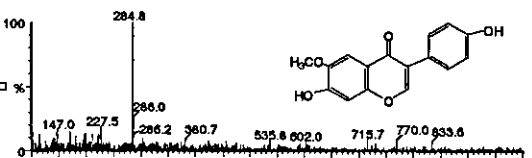
(58.2)



Daidzein

$C_{15}H_{10}O_4$
Exact Mass: 254.06
Mol. Wt.: 254.24
C, 70.86; H, 3.96; O, 25.17

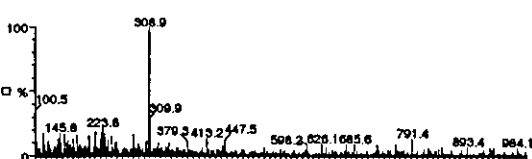
(59.9)



Glycitein

$C_{16}H_{12}O_5$
Exact Mass: 284.07
Mol. Wt.: 284.26
C, 67.60; H, 4.25; O, 28.14

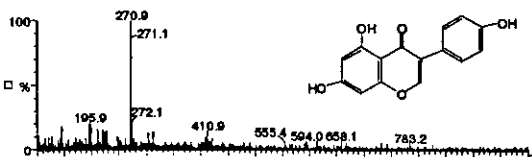
(62.4)



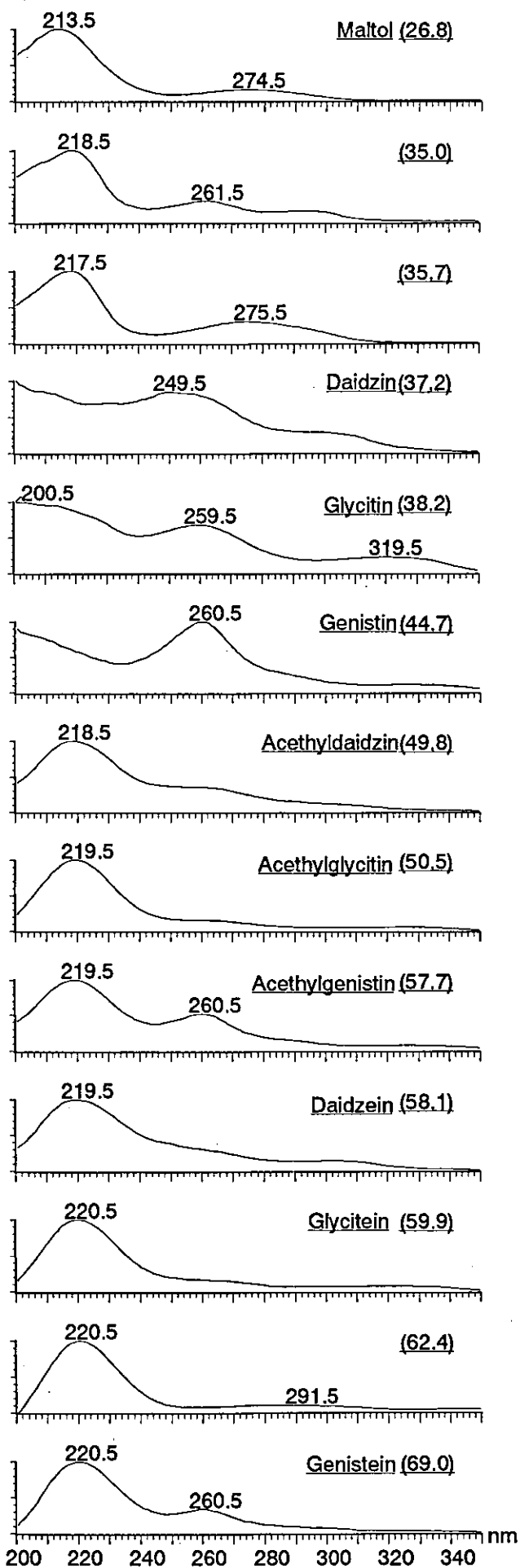
Genistein

$C_{15}H_{10}O_5$
Exact Mass: 270.05
Mol. Wt.: 270.24
C, 66.67; H, 3.73; O, 29.60

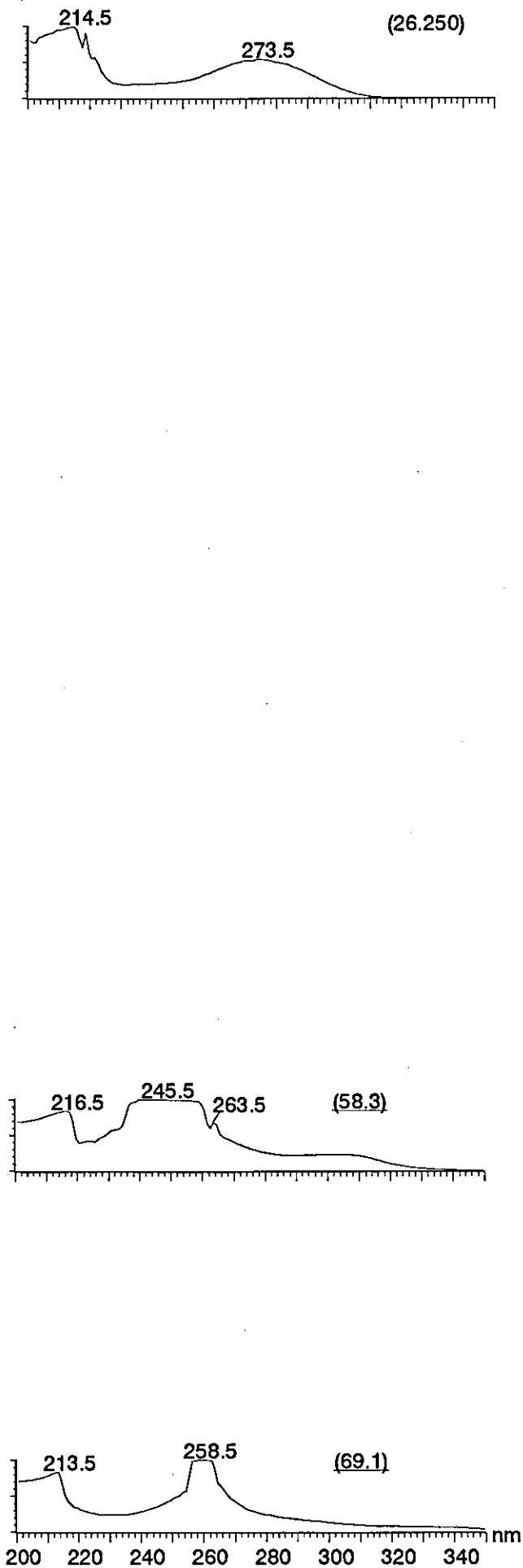
(69.1)



焙煎大豆の各成分のPDA



標品のPDA



別添

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

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

平成16年度協力研究報告書

天然ガムベース ホホバロウの分析

研究協力者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官
金 哲龍 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 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 主任研究官

研究要旨 天然ガムベース ホホバロウの成分分析を行った。LC/MS 分析で観察された6ピークの分子量関連イオンの値から、主成分はC36からC46までの炭素数が2ずつ異なる高級脂肪酸及び高級アルコールのエステル群であることが示唆された。この内、炭素数C38からC44の主要4ピークを分取LC/MSにより分画し、メタノリシス又はトリメチルシリル化後、GC/MSに付し、各ピークは種々の構成脂肪酸及びアルコールからなるエステルの混合物であることが判明した。この内、eicosenyl octadesenoate, eicosenyl eicosenoate 及び docosenyl eicosenoate を合成して標準品とし、ホホバロウ中の含量をLC/MS/MSにより定量した、その結果、eicosenyl eicosenoate (21.4%)及び docosenyl eicosenoate (37.8%)がホホバロウの主成分であることが分かった。

A. 研究目的

ホホバロウは、既存添加物名簿収載品目リスト¹⁾に記載される天然ガムベースの一つで、チューインガム等に使用される。その基原・製法・本質は、「ツゲ科ホホバ (*Simmondsia californica* NUTT.)の果実より採油したホホバ脂より、分離して得られた高融点ロウ物質である。主成分はイコセン酸イコセニルである。」と記載されているが、これまでに既存添加物ホホバロウの成分に関する詳細な検討はなされていない。

本年度、染色体異常試験実施予定品目とされたホホバロウ製品について、成分確認を目的に、各種クロマトグラフィーによる

分析を行った。

B. 研究方法

1. 試料

ホホバロウ製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した。脂肪酸メチルエステル混合試薬、cis-11-eicosenoic acid は、SIGMA 社製のものを、11-eicosenol, 5%塩化水素メタノール及び植物ステロール(β -sitosterol, stigmasterol, campesterol) は、和光純薬工業(株)のものを購入して用いた。Cis-9-octadecenoic acid, cis-13-docosenol は、東京化成工業(株)のものを、TMSI-H (トリメチルシリル(TMS))

化試薬)は、ジーエルサイエンス(株)のものを購入して用いた。その他の試薬はすべて市販特級品あるいはHPLC用を用いた。

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/タンデム質量分析装置(LC/MS/MS): Waters LC/MS/MS system (Waters社製)(LC: Alliance 2695 separations module, PDA: 2996 Photodiode array detector. MS: Quattro micro™)

分取液体クロマトグラフ/質量分析装置(分取LC/MS): Waters LC/MS-controlled preparative LC system (Waters社製)(Sample Manager: 2767, LC: 2525 Binary high-pressure pump, PDA: 2996 Photodiode array detector. MS: ZQ-2000)

ガスクロマトグラフ/質量分析装置(GC/MS): Shimadzu GC/MS system (Shimadzu社製)(GC: GC-17A, MS: MS-QP5050)

3. TLC条件

ホホバロウ製品を量り取り、ヘキサンに溶解し、5 mg/mLの試料溶液とした。試料溶液5 μ lをsilica gel 60 F₂₅₄ HPTLC plates (10 x 10 cm, No. 5628, Merck社製)にスポットし、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸混液(80:20:1)を展開溶媒として約10 cm展開させ、風乾した後、ヨウ素により発色させ、スポットを観察した。

4. LC/MS/MS条件

試料溶液: 5 mg/mL アセトン. LC条件: カラム, Symmetry³ C18 (2.1 x 150 mm); カラム温度, 40°C; 移動相, アセトニトリル:アセトン=7:3, 流速, 0.4 mL/min; 注入量, 10 μ l.

MS条件: ソース温度, 130°C; 脱溶媒温度, 400°C; 脱溶媒ガス流量, 300 L/h; コ

ーンガス, 50 L/h; コーン電圧, 25 V; コロナ, 10 μ A, コリジョンガス, アルゴン; コリジョン電圧, 15 V; 検出, APCI (pos.) スキャン範囲, m/z 200-700

5. 分取LC/MS条件

試料溶液: 10 mg/mL アセトン. LC条件: カラム, XTerra RP18 (19 x 100 mm); 移動相, アセトニトリル:アセトン=7:3; 流速, 10 mL/min; 注入量, 400 μ l

MS条件: 検出及び分取トリガー, APCI (pos.), m/z 561.6, 589.6, 617.5 and 645.6; メイクアップ溶媒, アセトニトリル:アセトン=7:3; 流速, 1.0 mL/min.

6. GC/MS条件

カラム, DB-1 (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m); 注入口温度, 300°C; イオン源温度, 250°C カラム温度, 180°C \rightarrow (5°C/min) \rightarrow 280°C \rightarrow (15°C/min) \rightarrow 300°C(8 min), 試料注入方式, スプリット(4:1); 注入量, 1 μ l; 検出, EI (pos.) スキャン範囲 m/z 60-800

7. エステルの加水分解及び構成脂肪酸及びアルコールの誘導体化

ホホバロウ及び分取したピーク画分2~5を各3 mgとり, 1 mLの5%塩化水素メタノールに溶解し, 100°Cで3時間加熱した。生成した脂肪酸のメチルエステルを3 mLのヘキサン2回で抽出し, 減圧乾固後, 5 mLのヘキサンに再溶解し, GC/MS分析試料とした。

ホホバロウ及び分取したピーク画分2~5を各10 mgとり, 1.5 mLの0.5 MのKOH溶液(90% MeOH中に溶解)と混合し, 100°Cで3時間加熱した。生成したアルコールを3 mLのヘキサンで抽出し, 3分の1を減圧乾固後, TMSI-Hを加え60°C, 1時間加熱し, 生成したトリメチルシリル(TMS)化アルコ

ールを 1.5 mL のヘキサンで抽出し、GC/MS 分析試料とした。

8. エステルの合成

ホホバロウ製品中に含まれることが示唆されたエステル, eicosenyl octadecenoate(I)(C20:1-C18:1), eicosenyl eicosenoate (II)(C20:1-C20:1) 及び docosenyl eicosenoate(III) (C22:1-C20:1)を合成した。各構成脂肪酸及びアルコール 0.13 mmol, *N,N'*-dicyclohexyl carbodiimide 0.26 mmol, 及び 4-dimethylaminopyridine (触媒) を 1.34 mL のベンゼンに混合し、窒素置換後、密封して 24 時間攪拌した。反応物をヘキサンと 0.3 M HCl で分配し、ヘキサン層に濃縮された合成エステルを分取 TLC (Silica gel 60 F₁₅₄, 20 cm x 20 cm, Art. 1.05715, Merck) (hexane:diethyl ether = 7:3) で展開後、精製した。また、LC/MS により純度を確認した。

9. LC/MS/MS によるエステルの定量

8. で合成したエステル I~III をアセトンに溶解し、濃度 0.01, 0.03, 0.06, 0.1 mg/mL の各エステル標準液とした。検出には multiple reaction monitoring (MRM)法を採用した。モニターイオン m/z 561.6→283.4, 589.6→311.4 及び 617.6→311.4 より得られたピーク面積を求め、I~III の絶対検量線を作成し、ホホバロウ製品の定量計算に用いた。

C. 結果及び考察

1. TLC 分析

ホホバロウ製品の TLC 分析の結果 (Fig. 1), 高級脂肪酸と高級アルコールのエステルの Rf 値と一致する主要スポットが認め

られ、植物ステロールと一致する Rf 値にも、薄く小さいスポットが認められた。従って、ホホバロウの主成分は、高級脂肪酸と高級アルコールのエステルであることが示唆された。

2. LC/MS 分析

ホホバロウ製品を LC/MS で分析した際の UV204 nm 及び MS scan の結果を Fig. 2 (A, B)に示した。保持時間 6~22 分に、両方の検出条件で一致するピーク 1~6 が認められ、分子量関連イオンの値 (Fig. 2, C) から、C36 から C46 までの炭素数が 2 ずつ異なるエステル群であることが示唆された。ピーク 1~6 の UV 204 nm におけるピーク面積比を Table 1 に示した。

3. GC/MS 分析によるエステル構成脂肪酸及びアルコール組成の確認

LC/MS 分析で認められた 6 ピークの内、炭素数 C38 から C44 の 4 つの主要ピーク 2~5 を、 m/z 値をトリガーにして分取 LC/MS で分画し、メタノリシス、又は加水分解後 TMS 化し、GC/MS により脂肪酸 (Fig. 3) 及びアルコール (Fig. 4) 組成を確認し、Table 1 に示した。これらの結果、ホホバロウの主構成成分は、高級脂肪酸と高級アルコールのエステルであることが分かり、eicosenyl octadecenoate (I) (20:1,C18:1), eicosenyl eicosenoate (II) (C20:1,C20:1), docosenyl eicosenoate (III) (C22:1,C20:1), eicosenyl docosenoate (IV) (C20:1,C22:1), tetracosenyl eicosenoate (V) (C24:1,C20:1) であることが分かった。

4. エステルの定量

GC/MS 分析で、ピーク 2~5 は、それぞれ分子量が同一で脂肪酸組成の異なるエステ

ルの混合物からなることが分かったが、monitoring (MRM)法により組成の異なるエステル同士を別々に測定できることが明らかとなった(Fig. 5)。この方法を応用し、ホホバロウ中の I, II および III の定量を行った結果、5.5, 21.4 および 37.8 %であった。

D. 結論

天然ガムベース ホホバロウの成分分析を行った。LC/MS 分析で観察された 6 ピークの分子量関連イオンの値から、主成分は C36 から C46 までの炭素数が 2 ずつ異なる高級脂肪酸及び高級アルコールのエステル群であることが示唆された。この内、炭素数 C38 から C44 の主要 4 ピークを分取 LC/MS により分画し、メタノリシス又はトリメチルシリル化後、GC/MS に付し、各ピークは種々の構成脂肪酸及びアルコールからなるエステルの混合物であることが判明した。この内、

eicosenyl octadesenoate , eicosenyl eicosenoate 及び docosenyl eicosenoate を合成して標準品とし、ホホバロウ中の含量を LC/MS/MS により定量した、その結果、eicosenyl eicosenoate (21.4%) 及び docosenyl eicosenoate (37.8%) がホホバロウの主成分であることが分かった。

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)

F. 研究発表

1. 論文発表
食品衛生学雑誌, 投稿中
2. 学会発表
日本食品化学学会, 2005.4 (東京)

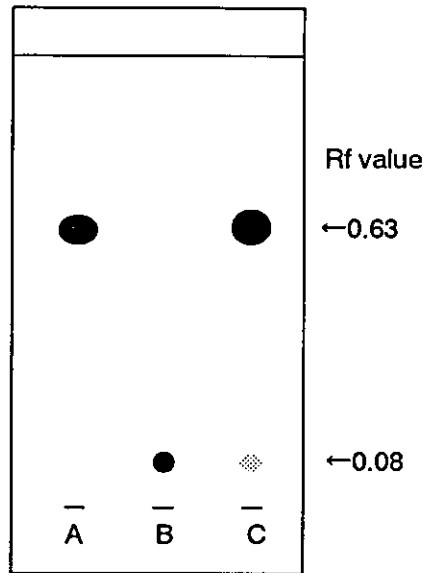


Fig. 1 TLC profile of jojoba wax.
 Solvent: hexane:diethyl ether:acetic acid = 80 : 20 : 1
 Line: A, wax ester mixture; B, phytosterol mixture; C,
 jojoba wax
 Spots were visualized with iodine.

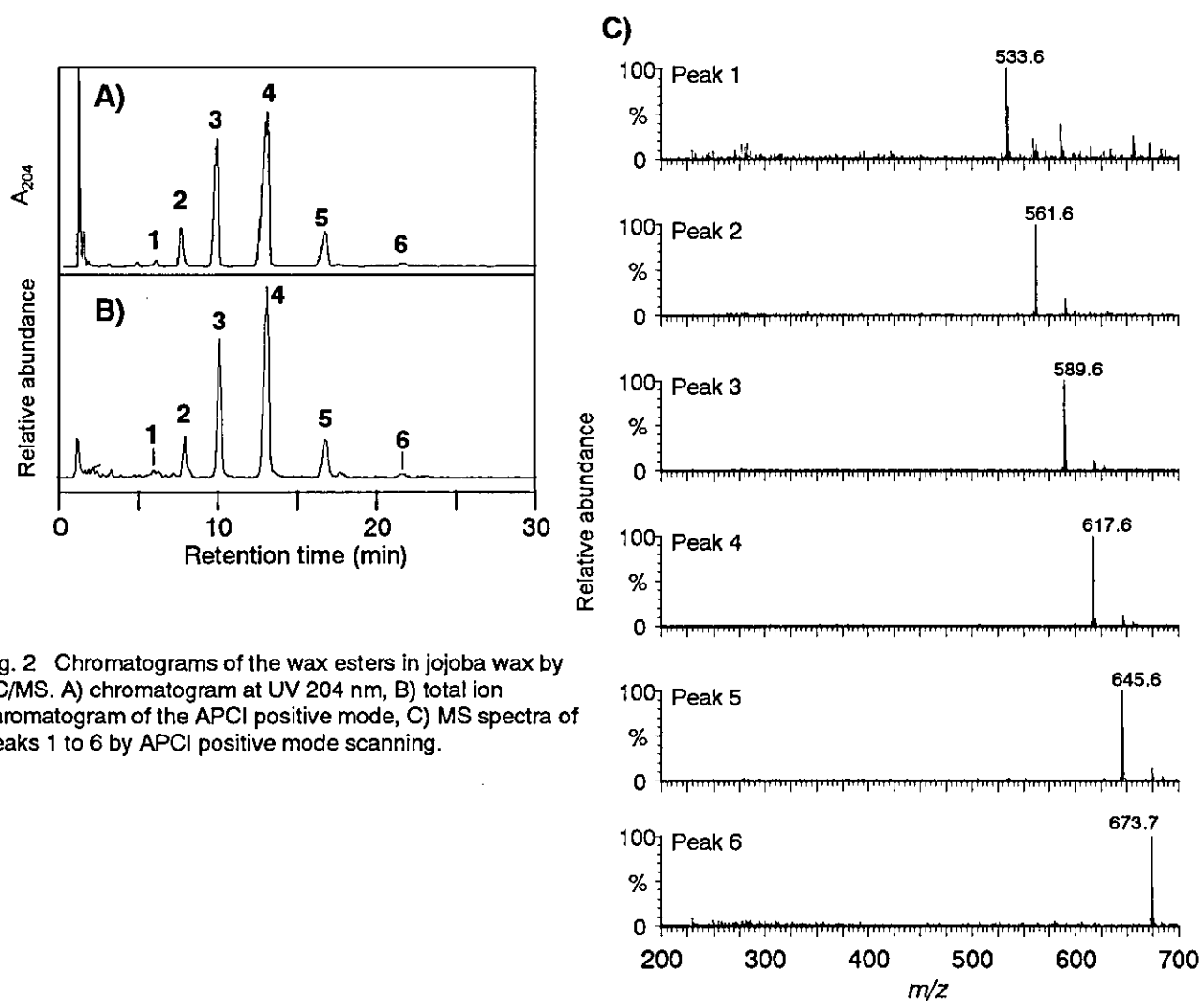


Fig. 2 Chromatograms of the wax esters in jojoba wax by LC/MS. A) chromatogram at UV 204 nm, B) total ion chromatogram of the APCI positive mode, C) MS spectra of peaks 1 to 6 by APCI positive mode scanning.