

セルロースアセテート膜電気泳動：試料溶液 (1 mg/mL) をセルロースアセテート膜に 1 μ L、また両端にガイドマーカとしてインディゴトリスルフォネートを塗布し、0.1 M ピリジン/0.47 M ギ酸緩衝液 (pH 3.0) を用い、1 mA/cm で泳動した。泳動終了後、0.5% トリジンブルーで 10 分間染色し、7% AcOH で数回脱染色を行った。

単糖組成分析：試料 (X mg) に 0.1 M トリフルオロ酢酸 (TFA, 0.5 mL) を加え、80°C で 3 時間加水分解した。TFA を留去後、NaBH₄ (10 mg/mL in 1 M アンモニア水, 0.5 mL) を加え、室温で 1 時間還元し、数滴の酢酸を加え過剰の NaBH₄ を分解後、10% AcOH/MeOH (2 mL) を加え濃縮乾固する操作を 3 回、次いで MeOH (2 mL) を加え濃縮乾固する操作を 3 回行った。次に 2 M TFA (0.5 mL) を試料に加え、120°C で 1 時間加水分解を実施し、NaBH₄ で還元する操作を行った。得られたアルジトールは 1-メチルイミダゾール (0.1 mL) と無水酢酸 (2 mL) によりアセチル化した。クロロホルムと水で分配後、クロロホルム層を水で洗浄し、クロロホルム層を乾固した。得られたアルジトールアセテート誘導体は GC および GC-MS にて分析した。

分子量の測定：試料溶液 (1 mg/mL) を GPC にて分析した。検量線は分子量既知のブルーラン (Shodex) を用いて作成した。

C. 研究結果

精製カラギナン製品を透析により分画した結果、高分子量画分 (1.1 g) と低分子量画分 (0.9 g) を得た。次に、KCl による溶解度の差を用いて分画したところ、可溶画分 (KS, 288.8 mg) および不溶画分 (KP, 847.5 mg) をそれぞれ得た。それぞれを GPC で分析した結果 (Fig. 1)、それぞれの重量

平均分子量 (Mw) は 9.79×10^5 と 9.69×10^4 であった。また、セルロースアセテート膜電気泳動にて分析したところ、Fig. 2 のように泳動された。この結果、KS 画分はほぼシングルバンドとして泳動されたのに対し、KP 画分はメインバンドの他にスミアなバンドを検出した。

構成糖を分析したところ、CKP 画分ではガラクトースと 3,6-アンハイドロガラクトースが約 1:0.25 の比で含まれていた。一方、CKS 画分ではガラクトースと 3,6-アンハイドロガラクトースが約 1:0.13 の比で含まれていたほか、グルコースも検出された (Fig 3)。

D. 考察

一般に、カラギナンはゲル化性のあるカッパー (κ -) 及びイオター (ι -) カラギナンやゲル化性のないラムダ (λ -) カラギナンに分類される。今回検討した試料について、どのカラギナンが含まれているかは、さらにメチル化分析や NMR による解析が必要である。CKS 画分でグルコースが検出されたことは、本試料にデンプンが含まれている可能性が考えられた。

E. 結論

本試料中には κ -カラギナンなど数種の多糖が含まれていることが推察された。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

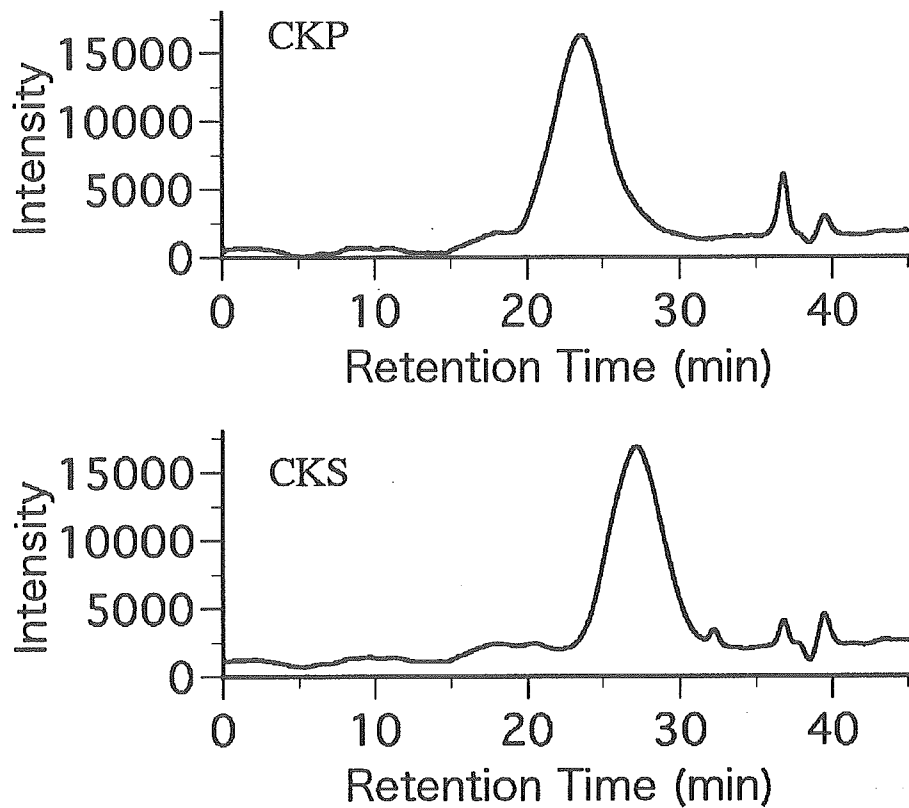
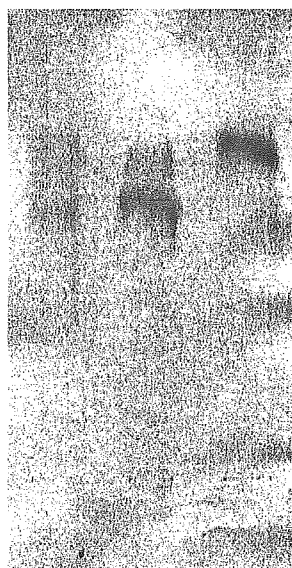


Fig. 1. GPC of CKP and CKS Fractions.



CH CKP CKS

Fig. 2. Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis.
 CH: High molecular fraction, CKP: KCl insoluble fraction, and CKS: KCl soluble fraction.

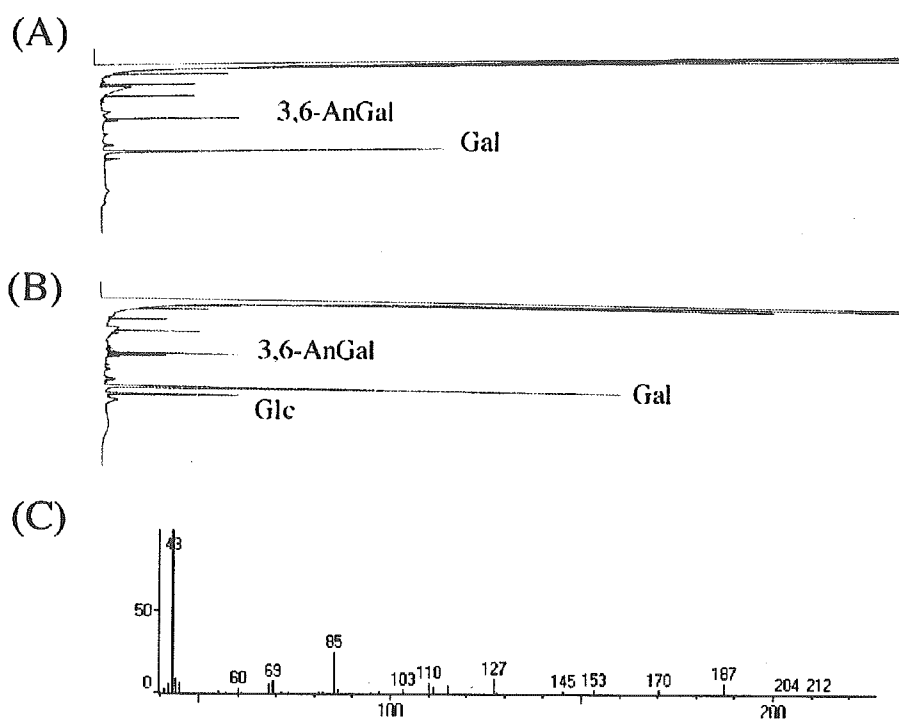


Fig. 3. GC chromatograms and mass spectrum of 3,6-anhydrogalactitol peracetate.

(A) GC chromatogram of KS, (B) GC chromatogram of KS, and (C) mass spectrum of 3,6-anhydrogalactitol peracetate, AnGal: 3,6-anhydrogalactitol peracetate, Gal: galactitol peracetate, Glc: glucitol peracetate

6. ガムベース等の成分・品質に関する研究

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 17 年度分担研究報告書

ガムベース等の成分・品質に関する研究

—テルペノイド系ガムベースの分析—

分担研究者 秋山卓美 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 既存添加物名簿に記載されているテルペノイド系ガムベースの品質規格策定を目的として、成分と確認試験法に関する研究を行った。製品を TLC により分析した結果、異なる品目は互いに異なるパターンを示し、同一品目はほぼ同じパターンを示した。LCMS による分析では、いずれの品目についても主要構成成分を検出することができ、そして、品目に特異的で指標成分になり得る化合物が検出された。GC/MS を用いた場合、誘導体化した試料の分析により、いずれの品目においても主要構成成分を検出でき、特異的で指標成分になり得る化合物が検出された。以上のように、TLC, LC/MS, GC/MS とも確認試験法として有用であることが示された。

A. 研究目的

既存添加物名簿に記載されているガムベースの中には、未だ公的規格が策定されていないものが多い。28 品目中、第 7 版でダンマル樹脂の規格が設定されたのみで、8 版では新規掲載された品目はない。構成成分が十分明らかになっていない品目があること、試験法の検討が不十分であることなどに依る。

ガムベースには高分子からなるものと水溶性の低い低分子からなるものがあるが、低分子のものの中にテルペノイドが主成分と考えられるものがある。本研究ではガムベースのうち、トリテルペノイドが主成分とされているマスティック、ダンマル樹脂、ニューコウ、ベンゾインガム、エレミ樹脂の 5 品目とジテルペノイドが主成分とされているロシン、コーパル樹脂の 2 品目について、品質規格策定を目的として確認試験法に関する研究を行った。TLC, LC/MS, GC/MS により製品を分析し、これらの手法が確認試験として使用可能であるかどうか検討し

た。

B. 研究方法

(1) 試料

以下の試料を入手した。食品添加物製品は日本食品添加物協会より入手した。

マスティック:食品添加物, 試薬(ICN 製), 樹液の 3 製品. ダンマル樹脂:食品添加物, 試薬(和光純薬製), 画材の 3 製品. エレミ樹脂:食品添加物の 1 製品. ベンゾインガム:一般香料用 2 製品. ニューコウ:一般香料用 2 製品. ロシン:試薬(和光純薬製)の 1 製品. コーパル樹脂:食品添加物の 1 製品.

試料を乳鉢で粉末状にした後秤量し, 20 mg/ml の濃度となるようにメタノールを加えて攪拌後, 3,000rpm, 20℃で 20 分間遠心分離を行い, その上清をフィルターろ過してメタノール抽出液とした. メタノール抽出液にトリメチルシリルジアゾメタン(東京化成)を反応量加え, 30 分反応させてメチル化試料とした. メタノール抽出液 1mL を減圧乾固し, TMSI-H(GL

Science) 0.5mL を加えて 60°Cで数分反応させて TMS 化試料とした。メタノール抽出液 1mL をメチル化した試料を減圧乾固し、TMSI-H 0.5mL を加えて 60°Cで数分反応させて TMS 化し、メチル化 TMS 化試料とした。

(2) TLC

TLC 板: Silica gel 60 F₂₅₄

展開溶媒 1: エーテル-ヘプタン混液(6:5)

展開溶媒 2: エーテル-ヘプタン混液(2:1)

検出: 10%H₂SO₄ 噴霧後の加熱呈色

(3) LC/MS

Instrument: Micromass ZQ system (Waters)

HPLC conditions: column, ODS-100S (2.0 mm i.d. × 15 mm, Tosoh); column temperature, 35°C; solvent A, 80% acetonitrile; solvent B, 98% acetonitrile; solvent C, acetonitrile; flow rate, 0.4 ml/min; detection, PDA.

Gradient profile: 0-15 min, 100% A-100% B; 15-19 min, 100% B; 19-25 min; 100% B-100% C; 20-25 min, 100% B; 25-26 min, 100% C-100% A.

MS conditions: APCI positive or negative; cone voltage, 30 V; corona current, 1 μA.

(4) GC/MS

Instrument: GCMS-QP5050A (Shimadzu)

Conditions: column, DB-1MS (30m×0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness); injection, splitless; column temperature, 40°C (1 min) → (20°C/min) → 200°C → (10°C/min) → 300°C; detection, EI positive.

(倫理面への配慮)

特に無し。

C. 結果及び考察

(1) TLC を用いた確認試験

トリテルペノイド試料であるダンマル樹脂、マスチック、ニュウコウ、ベンゾインガム、エレミ樹

脂を溶媒 1 で分析したところ、互いに異なるパターンを示した(図 1)。また、ダンマル樹脂 3 製品及びマスチック 2 製品を分析したところ、同一品目の製品はほぼ同じパターンを示した(図 2)。ジテルペノイド試料のロシン、コーパル樹脂を溶媒 2 で分析したところ、品目間に明らかな差異がみられた(図 3)。

(2) LC/MS による分析と確認試験

ODS カラムを用いて分離し、大気圧化学イオン化法 (APCI) で検出する LC/MS でメタノール抽出物を分析し、分子イオンピークとフラグメントピークから成分を同定した。

例としてマスチックの 1 製品の結果を示す。図 4 のクロマトグラムは、上から順にダイオードアレイ検出器, APCI+ の TIC, APCI- の TIC である。また、クロマトピークのマススペクトルの例を図 5 に示した。図 5-A と図 5-B は moronic acid (6) または oleanonic acid (7) のマススペクトルであるが、 $m/z = 437$ のマスピークがベースピークであり、そのほかに $m/z = 409$, $m/z = 455$ のマスピークが見られる。 $m/z = 455$ のピークがプロトン付加イオン $[M+H]^+$ であり、 $m/z = 437$ は $[M+H-H_2O]^+$ である。また、図 5-C と図 5-D は masticdienonic acid (8) または isomasticdienonic acid (9) である。

そのほか、APCI+ で検出された化合物は、(8R)-3β,8-dihydroxypolypoda-13E,17E,21-triene (5), , hydroxydammarenone I (1) or hydroxydammarenone II (2), oleanonic aldehyde (3), 3-O-acetyl-3epimasticdienonic acid (10), 3-O-acetyl-3epiisomasticdienonic acid (11) であった。構造式を図 6 に示した。

APCI- では 6, 7, 8, 9, 10, 11 が検出された。

また、他の 2 製品のマスチックを同条件で分析したところ、同様の結果が得られた。

他の品目についても同様に分析したところ、

いずれの品目についても、テルペノイド系の主要構成成分を検出することができた。さらに検出された成分を品目間及び製品間で比較し、それぞれの品目に特異的で、確認試験における指標成分となり得る化合物を選定した。例えばマスチックでは 6, 7, 8, 9 である。

(3) GC/MS による分析と確認試験

試料のメタノール抽出物、メチル化試料、TMS 化試料、メチル化 TMS 化試料を分析した。クロマトピークのマススペクトルにおけるフラグメンテーションパターンから成分を同定した。

例として図 7 にダンマル樹脂の 1 製品の結果を示す。上から順にメタノール抽出物、メチル化試料、TMS 化試料、メチル化 TMS 化試料の TIC である。

メチル化試料のマススペクトルの例を図 8 に示した。図 8-A は dammarenolic acid methyl ester (14a) のマススペクトルであるが、 $[M-H_2O]^+$ である $m/z = 454$ と $m/z = 385$ のマスピークが見られる。また、図 8-B は ursonic aldehyde (19) であるが、 $m/z = 438$ のピークは分子イオンピーク $[M]^+$ である。その他、メチル化試料には、dammaradienone (12), dammaradienol (13), 1, 2, 3, 17, 21, ursonic acid methyl ester (18a), nor- β -amyrone (20) が検出された。これらの構造式を図 9 に示した。

メタノール抽出物では 12, 13, 1, 2, 3, 17, 19, 20 が検出され、TMS 化試料では 12, dammaradienol trimethylsilyl ether (13b), dammarenolic acid di-trimethylsilyl ether (14e), hydroxydammarenone I trimethylsilyl ether (1b) or hydroxydammarenone II trimethylsilyl ether (2b), dammarenediol I trimethylsilyl ether (17), dammarenediol II trimethylsilyl ether (21), 19, メチル化 TMS 化試料では 12, 13b, 14e,

1b or 2b, 3, 18a, 19 が検出された。14e はカルボキシル基が TMS 化を受けたと考えられる。

他の品目についても同様に分析したところ、いずれの品目についても、テルペノイド系の主要構成成分を検出することができた。さらに検出された成分を品目間及び製品間で比較し、それぞれの品目に特異的で、確認試験における指標成分となり得る化合物を選定した。例えばダンマル樹脂では、メチル化試料における 14a, 19 のピークである。

D. 考察

(1) TLC を用いた確認試験

トリテルペノイド試料、ジテルペノイド試料とも、異なる品目は互いに異なるパターンを示し、同一品目はほぼ同じパターンを示した。したがって、TLC を簡便な確認試験法として使用できると考えられた。しかし、どの品目においてもスポットが数多くあるので確認試験を行う際は 4 つ以上のスポットを指定するか、他の分析法と併せて確認試験を行うことが望ましいと考えられる。

(2) LC/MS による分析と確認試験

いずれの品目についても、テルペノイド系の主要構成成分を検出することができ、そして、品目に特異的で指標成分になり得る化合物が検出されたため、LC/MS が確認試験法として有用であることが示された。

テルペノイドは UV 吸収が弱いので、検出はマススペクトロメトリーをメインに行って分子量情報から同定した。negative mode では主にカルボン酸が検出され、positive mode ではカルボン酸に加え、ケトンやアルコールが検出された。APCI 法はソフトなイオン化法なので、マススペクトルでは分子量情報を得ることができた。positive mode ではプロトン付加により、分子量 +1 のマスピークがみられ、negative mode では

プロトン脱離により分子量-1のマスピークがみられた。ただし、フラグメンテーションが少なく構造情報が少ないため、構造が非常によく似ている異性体を区別することが不可能であった。

(3) GC/MS による分析と確認試験

いずれの品目においても主要構成成分を検出でき、特異的で指標成分になり得る化合物が検出されたため、GC/MS が確認試験法として有用であることが示された。

GC/MS はメタノール抽出物を直接分析しても検出できる化合物が少ないため、誘導体化した試料も分析した。トリテルペノイドのピークは主に保持時間 17~23 分に現れ、ジテルペノイドのピークは主に 11~16 分に現れた。LC/MS と比較するとフラグメンテーションが多く、構造情報は多く得られた。

最も多く化合物が検出できたピークが見られたのはメチル化試料であった。メチル化 TMS 化試料では、トリテルペノイドにおいてはピークの数が増加したが、ジテルペノイドにおいては減少した。また、メチル化 TMS 化試料ではフラグメンテーションが複雑になり、化合物の同定が困難な場合もあった。いずれの品目においてもメチル化試料で特異的な化合物がみられ、また、操作の面においてもトリメチルシリルジアゾメタンによるメチル化は簡便であるため、確認試験にはメチル化した試料を用いるのが一番適していると考えられる。

E. 結論

(1) トリテルペノイド試料、ジテルペノイド試料とも、異なる品目は互いに異なるパターンを示し、同一品目はほぼ同じパターンを示した。したがって、TLC を簡便な確認試験法として使用できると考えられた。

(2) メタノール抽出物を ODS カラムを用いた LC/MS で分析したところ、いずれの品目についても、カルボン酸、アルコール、ケトンなどテルペノイド系の主要構成成分をすべて検出することができ、また、品目に特異的で指標成分になり得る化合物が検出されたため、LC/MS が確認試験法として有用であることが示された。

(3) 試料のメタノール抽出物、メチル化した試料、TMS 化した試料、メチル化と TMS 化を行った試料を GC/MS で分析した。いずれの品目についても、特異的で指標成分になり得る化合物を含めたほとんどの主要構成成分が検出されたので、GC/MS もまた確認試験法として有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

秋山, 多田, 杉本, 山崎, 棚元, 林, 尹, 功刀, 日本食品衛生学会第 90 回学術講演会, 2005 年 10 月 21 日, 埼玉「テルペノイド系ガムベースの成分と試験法に関する研究」

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

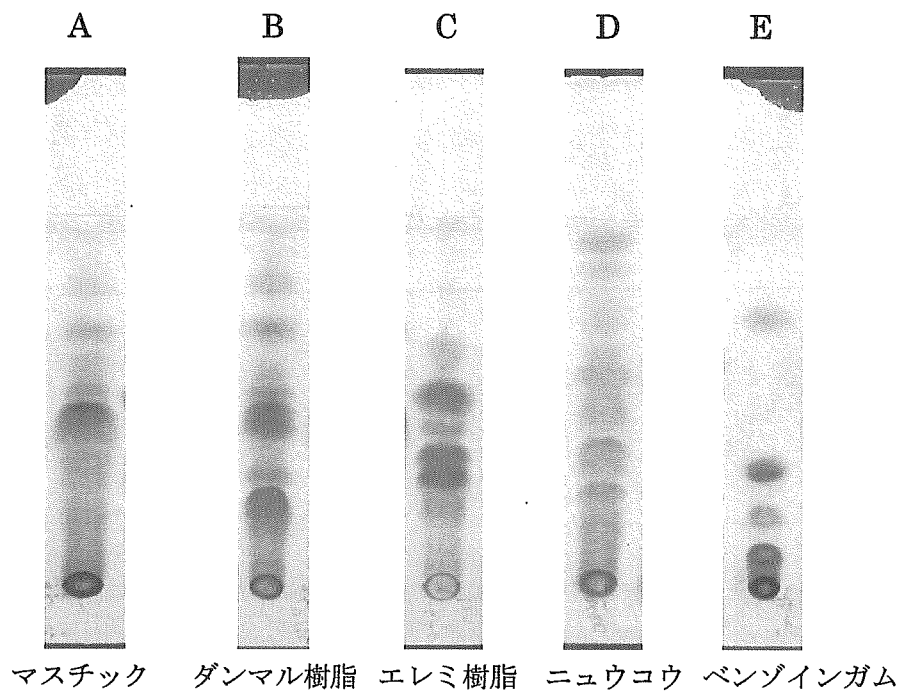


図1 トリテルペノイドと考えられる5品目のTLC分析

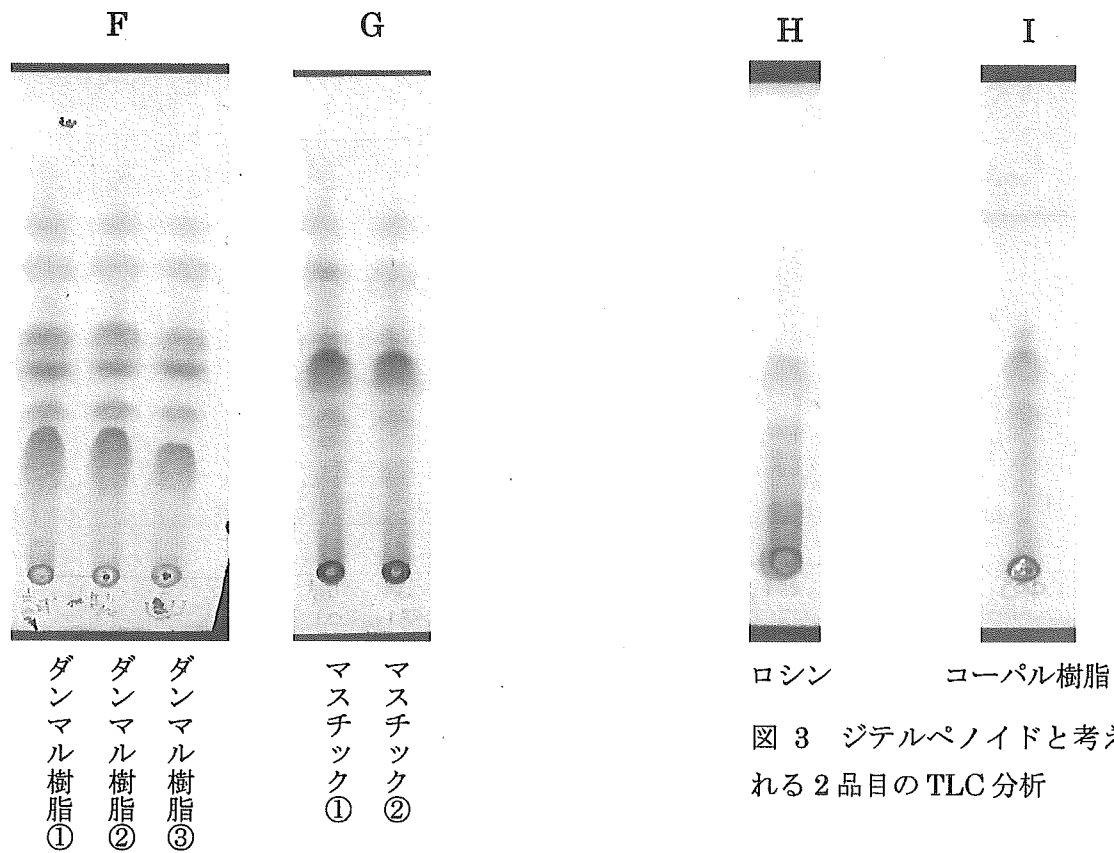


図3 ジテルペノイドと考えられる2品目のTLC分析

図2 同一品目の製品の比較

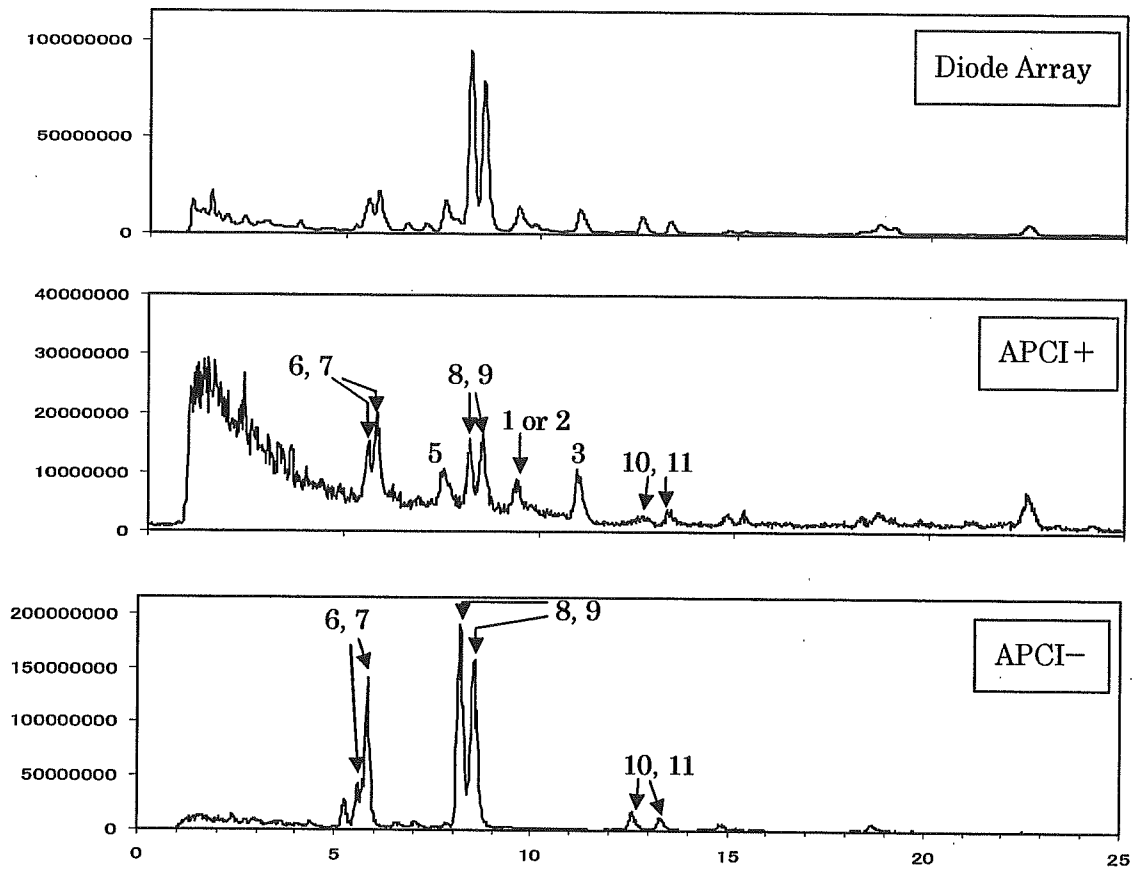


図4 マスチックのLC/MS分析

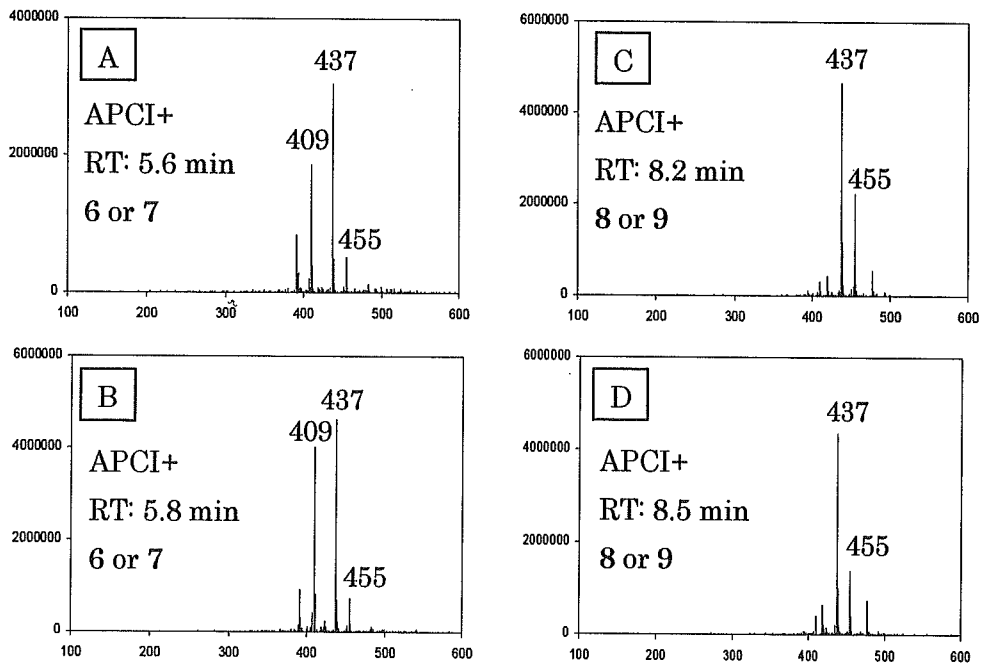


図5 マスチックのLC/MS分析

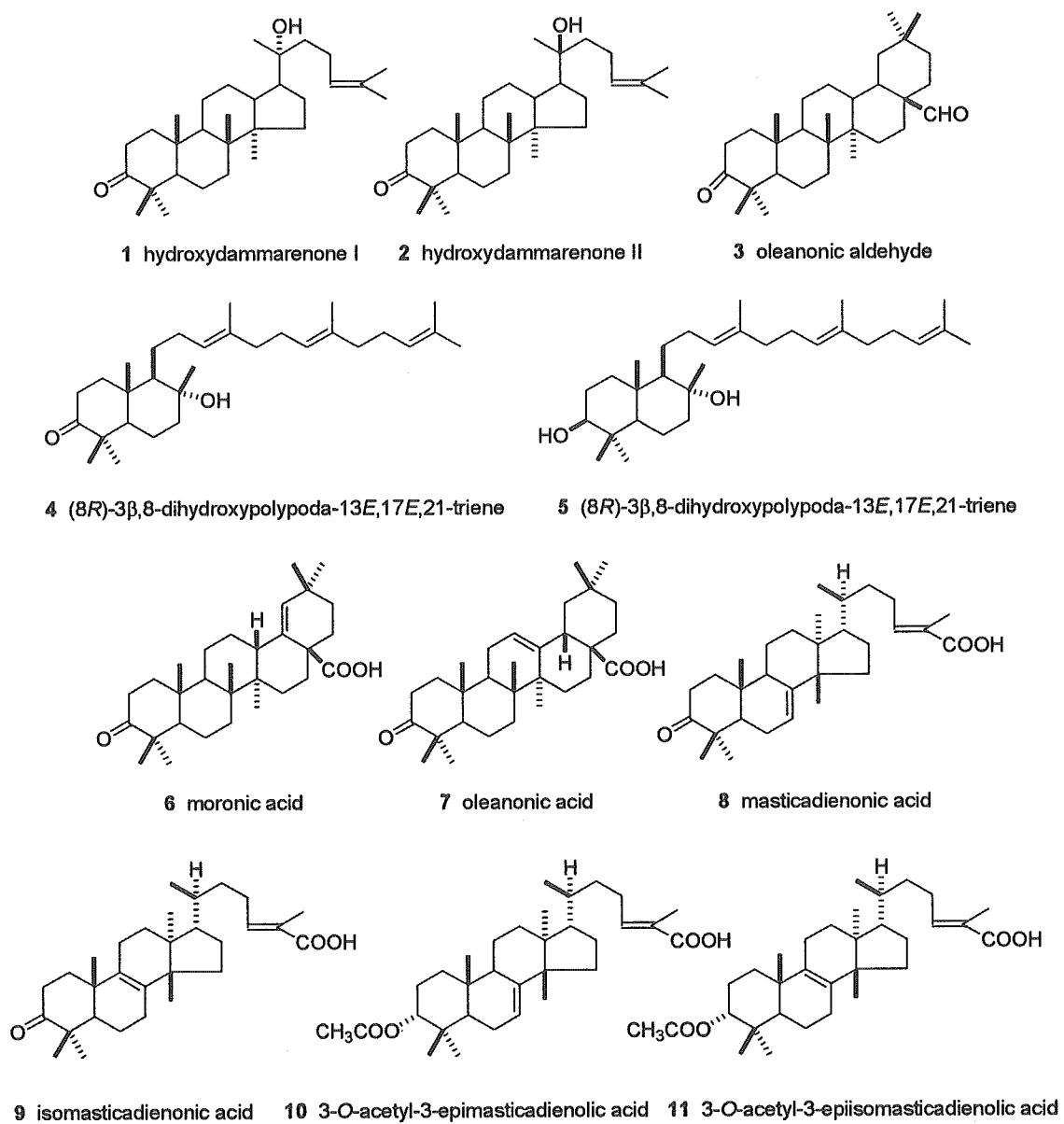


図6 マスチックの構成成分

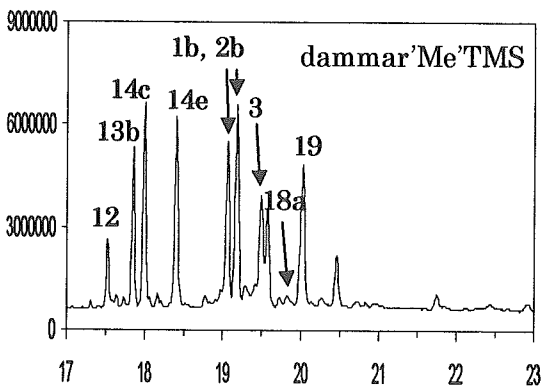
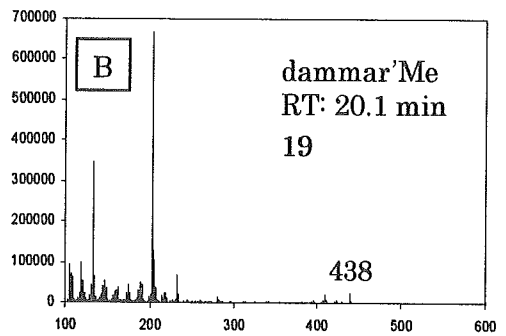
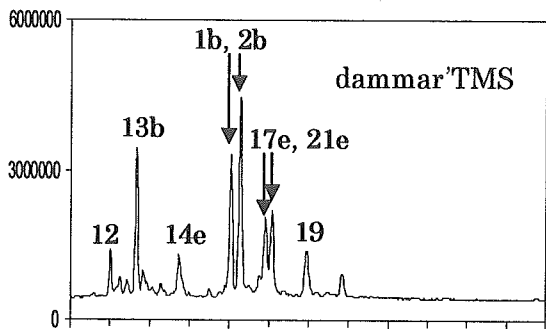
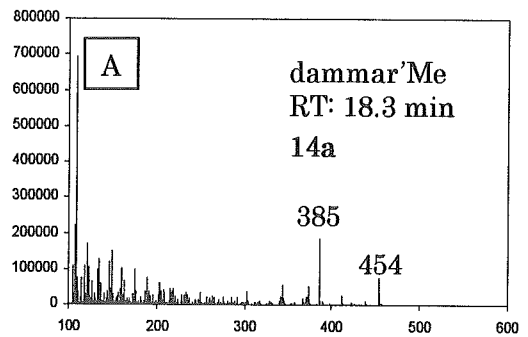
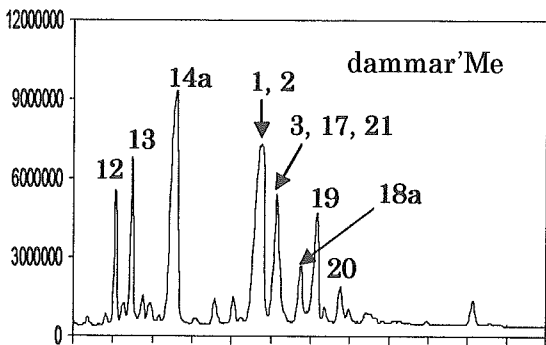
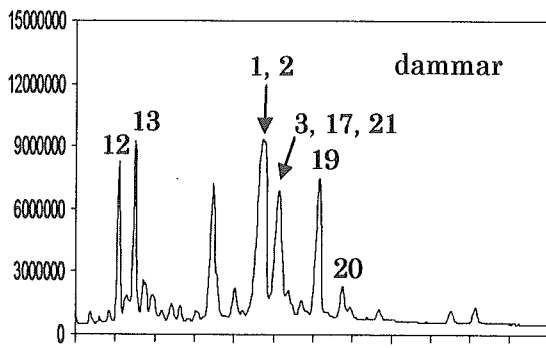


図 8 ダンマル樹脂の GC/MS 分析

図 7 ダンマル樹脂の GC/MS 分析

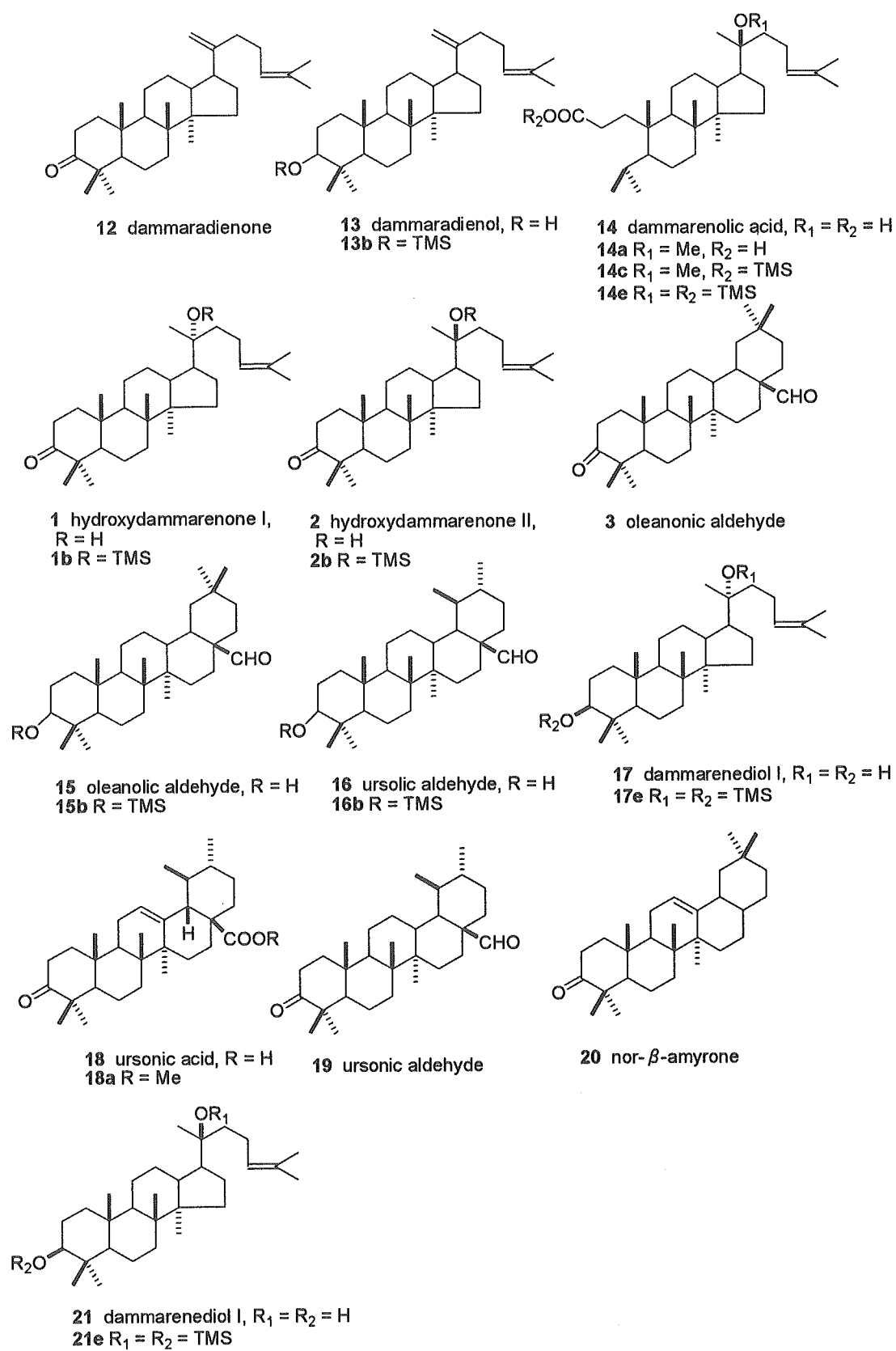


図9 ダンマル樹脂の構成成分と誘導体

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 17 年度分担研究報告書

天然由来エステル系ガムベースの分析

分担研究者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

研究要旨 天然由来エステル系ガムベース 10 品目の成分分析を行い、含有成分組成の違いにより各品目を確認する試験法を検討した。TLC 分析の結果、各品目間で含有脂質成分組成に違いが見られ、TLC は確認試験法の一つとして有用であると考えられた。また、GC/MS により構成脂肪酸・アルコールを分析したところ、種類や相対比率が各品目毎に特徴的であり、また、IR スペクトルが似ている品目同士も、脂肪酸組成分析に加えアルコール組成分析を組み合わせることで、品目同士を区別できることが分かった。今回用いた分析法は簡便な方法であることから、各品目の成分組成の確認に有用な方法であることが確認された。

A. 研究目的

既存添加物名簿収載品目リスト¹⁾に収載されている天然由来のガムベースの中には、その主成分として高級脂肪酸と高級アルコールのエステルを含有するものが種々存在する。この内、カルナウバロウ、カンデリラロウ及びミツロウは、第 7 版食品添加物公定書²⁾に収載されており、ラノリンは第 8 版に収載される予定、ウルシロウ、コメヌカロウ、シェラックロウ、ホホバロウ、モクロウ、モンタンロウは、日本食品添加物協会による第三版既存添加物自主規格³⁾に記載されている。

しかしながら、これまで、既存添加物として実際に流通している製品の成分についての詳細な検討はなされていない。また、これらガムベースの多くで確認試験に赤外吸収スペクトルを採用しており、脂肪族系エステルの特徴を示すが、エステル系ガムベース品目同士で比較すると、中には、ウルシロウとモクロウ、カルナウバロウとモ

ンタンロウのように、スペクトルのよく似たものもあり、各品目相互の成分確認には適していない。

そこで、含有成分の組成から各品目を確認する試験法を検討するために、これらエステル系ガムベースの主成分を、各種クロマトグラフィーにより分析した。

B. 研究方法

1. 試料

エステル系ガムベース 10 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 (Cat. No. 07756) は SUPELCO 社製のものを、*cis*-11-eicosenoic acid は SIGMA-ALDRICH 社製のものを、ヘントリアコンタンは FLUKA 社製のものを、5% 塩化水素メタノール及び 11-イコセノール (MP Biomedicals 社製) は和光純薬工業 (株) のものを購入して用いた。*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、トリパルミチン、1,2-ジパルミチン及び1-モノパルミチンはフナコシ(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、HPLC用あるいはGC用を用いた。

2. 装置

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

各種エステル系ガムベース製品は、ヘキサンに溶解し、10 mg/mLの試料溶液を作製し、5 µLをsilica gel 60 F₂₅₄ HPTLC plates (10 x 10 cm, No. 5628, Merck社製)にスポットした。ただし、シエラックロウのみはトルエンに溶解し、5 mg/mLの試料溶液を作製し、10 µLをスポットした。また、各種標準試薬の調整に用いた溶媒、濃度及びスポット量は、次に示す通りである。ヘントリアコンタン(炭化水素標準品、20 mg/mLトルエン、8 µL)、食品添加物ステロール(ステロールエステル標準品、5 mg/mLヘキサン、1 µL)、イコセン酸イコセニル(合成品)(ワックスエステル標準品、1 mg/mLヘキサン、5 µL)、トリパルミチン、1,2-ジパルミチン及び1-モノパルミチン(トリ、ジ及びモノグリセリド標準品、5 mg/mLヘキサン、6 µL)、*cis*-11-イコセン酸及び*cis*-13-ドコセノール(脂肪酸及びアルコール標準品、10 mg/mLヘキサン、1.5 µL)、食品添加物精製植物ステロール(ステロール標準品、5 mg/mLヘキサン、0.5 µL)。展開溶媒には、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸混液(80:30:1または80:20:1)を用い、約10 cm展開させ、風乾した後、10%硫酸エタノール溶液またはヨウ素により発色させ、

スポットを観察した。

4. エステル構成脂肪酸及びアルコールの誘導体化

GC/MS分析は、各ガムベースのエステル構成成分である脂肪酸とアルコールを別々に誘導体化して行った。

脂肪酸組成は、メタノリシスにより、遊離脂肪酸や、エステル結合している脂肪酸等を、脂肪酸メチルエステル体に誘導体化した。即ち、試料各3 mgをそれぞれスクリュウ栓付き試験管に量りとり、1 mLの5%塩化水素メタノール、ベンゼン3滴を加え、沸騰水浴中100°Cで3時間加熱した。冷却後、水1 mLを加え、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、エバポレーターで濃縮した。濃縮後、ヘキサンを加えて3 mLに調整し、GC/MSによる脂肪酸組成分析試料とした。また、脂肪酸メチルエステル混合試薬(Cat. No. 07756)は、ヘキサンで濃度1 mg/mLになるように調整して用いた。

アルコール組成は、アルカリ加水分解後、生成したアルコール等の成分を抽出し、トリメチルシリル化により、TMS化アルコールに誘導体化した。即ち、試料及びTMS化アルコール標準品用試薬(11-イコセノール及び*cis*-13-ドコセノール)各10 mgをそれぞれスクリュウ栓付き試験管に量りとり、1.5 mLの0.5 MKOH溶液(90% MeOH中に溶解)を加え、沸騰水浴中100°Cで3時間加熱した。冷却後、水1.5 mLを加え、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をスクリュウ栓付き試験管にとり、窒素で濃縮後、真空低温乾燥機を用い40°C、30分乾燥させ、十分に水を飛ばした。TMSI-H試薬500 µLを加え60°C、1時間加熱し、冷却後、水1 mLを加え、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、これを GC/MS によるアルコール組成分析試料とした。

5. 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

C. 結果及び考察

1. TLC 分析

TLC により各ガムベースの大まかな成分組成を調べた。検出は、各種脂質を発色できる、ヨウ素により行った。今回用いた TLC 条件では、標準品の Rf 値は、値の大きい方から順に、炭化水素、ステロールエステル、ワックスエステル、トリグリセリド、脂肪酸、アルコール、ジグリセリド、ステロール、モノグリセリドであった。

図 1 に、展開溶媒としてヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸=80:30:1 を用い、ミツロウ、カルナウバロウ、ラノリンのそれぞれ同一品目内で、食品添加物製品とそれに対応する市販試薬の比較を行った結果を示した。その結果、添加物と試薬で TLC パターンはほぼ一致し、その成分組成はほぼ同じであり、各品目毎に共通する特徴を、TLC で検出できることが確認された。

次に、TLC 展開条件をヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸=80:20:1 に最適化した後、品目間で比較をした。図 2 の左に硫酸発色、右にヨウ素発色の結果を示し、それぞれ、標準品と各種ガムベース品目の結果を示した。硫酸発色では、薄層板の加温時間の経過により発色の様子が図 2 の上段から下段

へと変化し、加温を始めてすぐ (図 2 上段) では、ステロールエステル、ステロールが赤～赤紫色に、遊離脂肪酸が黄色に発色した。この段階では、ガムベースの内、ラノリンとカンデリラロウでのみ発色し、ラノリンでは、ステロールエステル由来と思われるスポットと共に、Rf 値の小さい部分に、紫と青が交互に並んだ特徴的なスポット群が認められた。さらに加温すると (図 2 下段)、炭化水素、ワックスエステル、アルコールが褐色に発色し、トリ、ジ、モノグリセリドはこの段階でも発色しにくく、ヨウ素発色により、感度よく検出できた。

各ガムベースの品目間で比較した結果、少しずつ異なる展開パターンを示し、その含有脂質成分組成に違いが見られ、TLC は簡便な成分確認法の 1 つとして有用であると考えられた。しかしながら、IR のスペクトルが似ているウルシロウとモクロウ、カルナウバロウとモンタンロウは、やはり TLC でもパターンが似ていたため、次に、GC/MS を用い、より詳しい成分確認法を検討した。

2. GC/MS による脂肪酸組成分析

図 3 に GC/MS による脂肪酸組成分析の結果を示し、食品添加物製品以外に市販試薬が入手できた 4 品目について、各品目内での結果を比較した。脂肪酸は全てメチルエステル体として検出し、化合物の推定は、MS スペクトルのライブラリー検索、既知の報告、及び標準品の保持時間の一致等により行った。モクロウは、食品添加物製品以外に化粧品用添加物として市販されているものを入手でき、両方で検出された脂肪酸の種類と比率はほぼ同じで、モクロウに特徴的といわれる、C20, C22 のジカルボン酸のジメチルエステルが検出された。ミツロウ

は、市販試薬1を除き、クロマトグラムはほぼ一致した。今回の条件では、脂肪酸以外に、各種炭化水素由来のピークが検出され、試薬1では炭化水素ピークが非常に高く、精製度等が異なるためではないかと推察された。カルナウバロウ、及びラノリンは、その種類、含有比率、共に食品添加物製品と試薬とで完全に一致した。以上、同一品目内では脂肪酸組成に大きな差がなく、この方法で、各品目に共通する特徴的な成分のパターンが検出できることが分かった。

次に、各品目間での脂肪酸組成を比較した(図4)。その結果、IR や TLC の結果が似ている品目同士でも、結果が異なることが分かった。例えばウルシロウとモクロウを比べると、モクロウではオレイン酸含量が少なく、微小ピークではあるもののC20、C22 のジカルボン酸が検出され、カルナウバロウ、モンタンロウ、コメヌカロウも、その脂肪酸組成の違いにより互いに判別できることが分かった。またホホバロウでは、特徴的な不飽和一価脂肪酸が検出された。今回の条件では、脂肪酸以外にラノリンではコレステロールが特徴的に検出され、このピークは、C25 の脂肪酸メチルエステルと保持時間が近かったが、ライブラリー検索により容易に区別することができた。また、カンデリラロウではエステルより、炭化水素ををより多く含むことが報告されており、今回の分析でも、C31 の炭化水素が大きいピークとして検出され、こちらもMSスペクトルにより判別することができた。以上、各品目毎にクロマトグラムパターンが異なり、このような脂肪酸組成分析を行うだけで、各ガムベース品目に特徴的な成分を判別できたことから、この方法が成分確認試験法の一つとして有用であることが分

かった。

3. GC/MS によるアルコール組成分析

次に、GC/MS によるアルコール組成分析を行った。まず、食品添加物製品以外に市販試薬が入手できた品目について、品目内での結果を比較した(図5)。アルコールは全てトリメチルシリル(TMS)体として検出し、化合物の推定は、MS スペクトルのライブラリー検索、既知の報告、及び標準品の保持時間の一致等により行った。ミツロウは、食品添加物と試薬とでクロマトグラムはほぼ一致し、ここに示すようなアルコールが検出された。ラノリンでも、食品添加物と試薬とでクロマトグラムはほぼ一致し、アルコールに加え、コレステロール、ジヒドロラノステロール、ラノステロールのトリメチルシリル体が検出された。カルナウバロウでは、食品添加物と試薬とで大体の結果は一致していたが、30分付近の2つのピークの比率が互いに異なり、食品添加物では前のC30のドトリアコンタノールのピークが高く、試薬では後ろが高いという結果であった。以上、検出されるアルコールの種類としては、同一品目内で大きな違いがなく、この方法でも、各品目に共通する特徴的な成分を確認できることが分かった。

次に、各品目間でのアルコール組成を比較した。その結果(図6)、IR や TLC の結果が似ているカルナウバロウ、モンタンロウ、コメヌカロウも、アルコール組成の違いにより互いに判別できることが分かった。またホホバロウでは、特徴的な不飽和一価アルコールが検出され、カンデリラロウでは保持時間22分過ぎに大きいピークが検出され、MSスペクトルからC31の炭化水素であると判別できた。

以上、各品目ごとにクロマトグラムパタ

ーンが異なり，脂肪酸組成分析に加え，アルコール組成分析を行うことで，各ガムベース品目に特徴的な成分組成を確認できることが分かった．特に，IR スペクトルが似ているカルナウバロウ，モンタンロウ，コメヌカロウは，脂肪酸組成分析ではカルナウバロウとモンタンロウ，アルコール組成分析ではモンタンロウとコメヌカロウが，それぞれ似たパターンを示したが，両組成分析結果を組み合わせることで，各ガムベース品目に特徴的な成分組成を確認でき，品目同士を区別できることが分かった．

D. 結論

天然由来エステル系ガムベース 10 品目の成分分析を行い，含有成分組成の違いにより各品目を確認する試験法を検討した．TLC 分析の結果，各品目間で含有脂質成分組成の違いが見られ，TLC は確認試験法の一つとして有用であると考えられた．また，GC/MS により構成脂肪酸・アルコールを分析したところ，種類や相対比率が各品目毎に特徴的であり，また，IR スペクトルが似ている品目同士も，脂肪酸組成分析に加えアルコール組成分析を組み合わせることで，品目同士を区別できることが分かった．今回用いた分析法は簡便な方法であることから，各品目の成分組成の確認に有用な方法であることが確認された．今後さらに，LC/MS 分析条件を検討するなどして，各品目のエステル体としての主成分の構造を解明していきたいと考えている．

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，日本食品添加物協会，1999.
3. 第三版既存添加物自主規格，日本食品添加物協会，2002.

F. 研究発表

1. 論文発表

Atsuko TADA, Zhe-Long JIN, Naoki SUGIMOTO, Kyoko SATO, Takeshi YAMAZAKI, Ken-ichi TANAMOTO : Analysis of the Constituents in Jojoba Wax used as a Food Additive by LC/MS/MS. J.Food Hyg. Soc. Japan, 46, 198-204 (2005)

2. 学会発表

多田敦子，秋山卓美，杉本直樹，山崎壮，棚元憲一，増田愛乃，山形一雄：エステル系ガムベースの成分と試験法の検討．日本食品衛生学会第90回学術講演会，大宮(2005.10)

Atsuko TADA, Naoki SUGIMOTO, Kyoko SATO, Takeshi YAMAZAKI, Ken-ichi TANAMOTO : Quantification of Wax Esters in Jojoba Wax Used as a Food Additive in Japan by LC/MS/MS. PACIFICHEM 2005 (International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), Honolulu, Hawaii (2005.12)

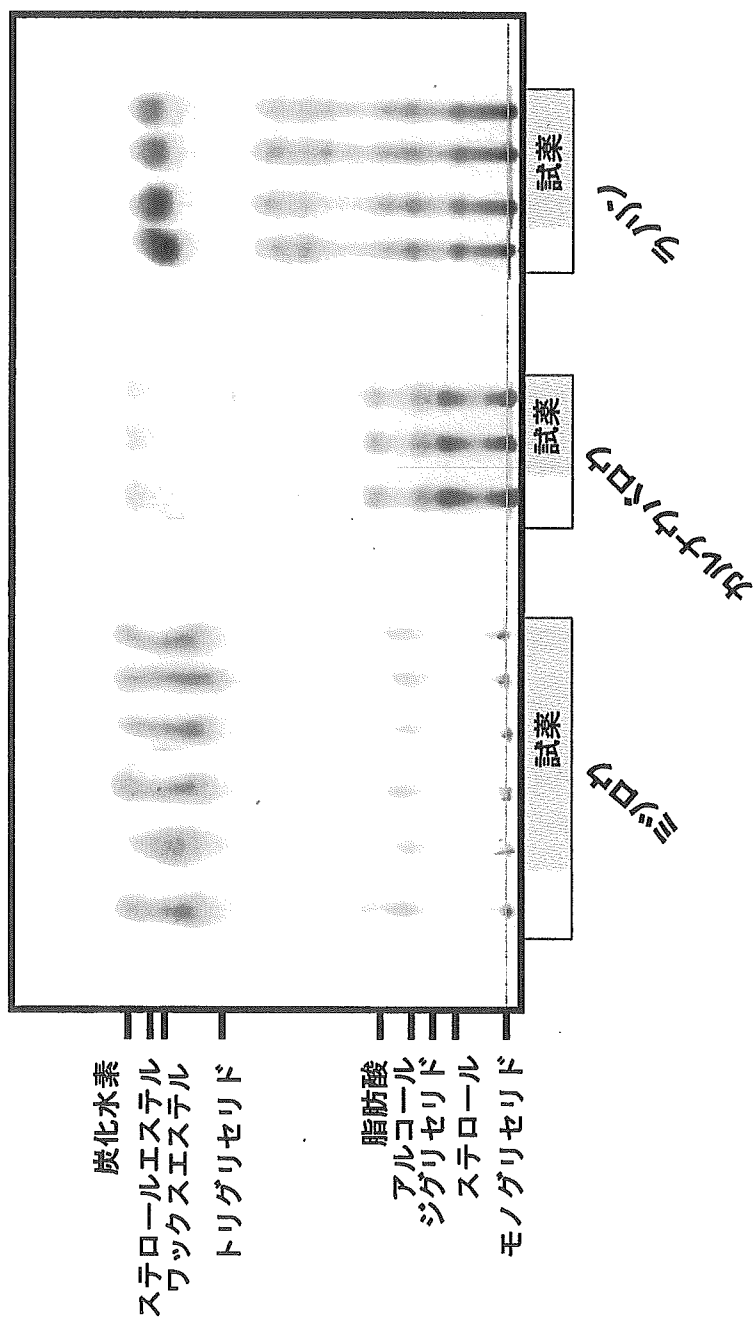


図1 TLCによる食品添加物及び市販試薬の成分組成の検討

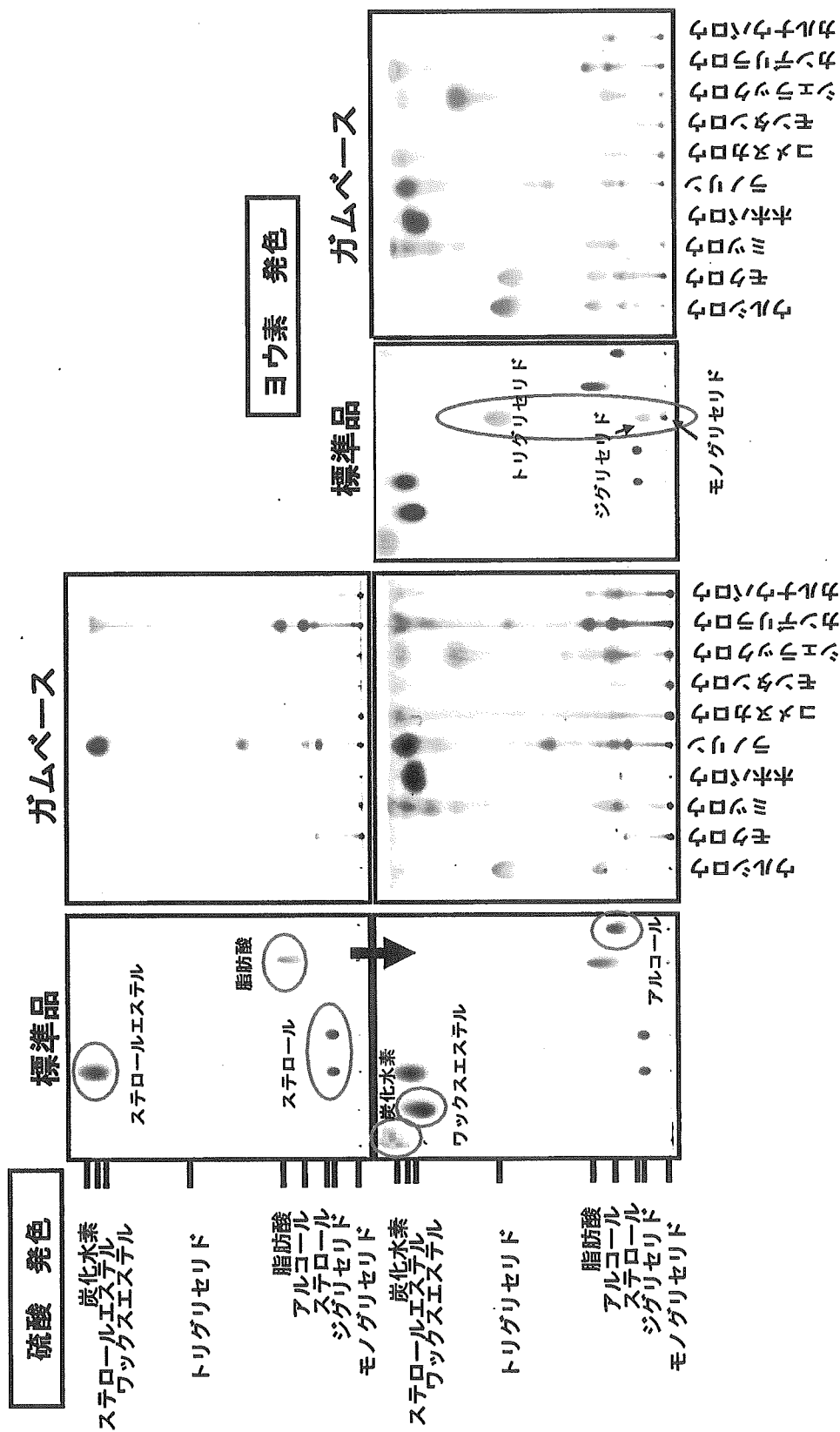


図2 TLCによる天然ガムベース各品目間の成分組成の比較