

## 7. 既存添加物の品質規格策定に関する研究

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 18 年度 分担研究報告書

既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究（総括）

分担研究者 山崎 壮 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部第二室長  
協力研究者 日本食品添加物協会

研究要旨

既存添加物（天然添加物）には国の規格基準設定が未設定である品目が多く残されている。国の成分規格が作成される場合、業界自主規格が国の成分規格素案になることが多い。そこで、国の成分規格を新規に設定するためには、業界自主規格の新規作成と見直しを支援することが求められる。今後の国による既存添加物成分規格案の新規作成をめざし、既存添加物の自主規格作成を食品添加物業界に依頼した。着色料・製造用剤 1 品目（金）、酵素 3 品目（アガラーゼ、アミノペプチダーゼ、ムラミダーゼ）の計 4 品目の成分規格を新規に作成した。30 品目の既設定規格（甘味料 1 品目、着色料 9 品目、増粘安定剤 2 品目、酵素 18 品目）を見直した。また、食品用酵素の流通実態調査を行った。調査項目は、(1)既存添加物酵素の名称、基原に関する調査、(2) 酵素活性規格の設定及び酵素活性測定法の統一に関する調査、(3) 微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての提案の検討、である。

A. 研究目的

既存添加物（天然添加物）には国の規格基準設定が未設定である品目が多く残されている。既存添加物 450 品目のうち、食品添加物の国際規格である JECFA 規格がある天然添加物を中心に既に 68 成分規格（既存添加物の品目数としては 69 品目）が第 7 版食品添加物公定書に収載され、第 8 版食品添加物公定書には 63 成分規格（既存添加物の品目数としては 61 品目）が新規収載された。しかし、それらを合わせても、国の成分規格が作成されたものは、既存添加物全体の約 1/3 に達したに過ぎない。天然添加物では我が国独自の品目が多いため、依然として多

くの品目の国の規格基準が設定されておらず、食品行政における重要課題になっている。国の成分規格が作成される場合、業界自主規格が国の成分規格素案になることが多い。そこで、国の成分規格を新規に設定するためには、業界自主規格の新規作成と見直しを支援することが求められる。既存添加物の業界自主規格が約 200 品目にしか設定されていない現状を踏まえて、業界自主規格の新規作成と見直しを日本食品添加物協会に依頼した。

B. 研究方法

既存添加物の自社規格・試験法の調査と自主規格案の策定を食品添加物業界に

依頼した。作業は日本食品添加物協会（日添協）の技術委員会の自主規格専門委員会が中心となって推進した。既存添加物を製造する企業が自社の品質管理に定めている規格・試験法等について調査を行ない、総合的にその規格内容の妥当性を評価・検討した。必要に応じ、新しい試験法の開発検討も進めた。新規規格策定に当たっては、主成分の確認、定量法の開発検討等を中心に行い、成分規格の設定並びにその妥当性等に関して評価・検討を行った。

今年度は、着色料・製造用剤 1 品目（金）、酵素 3 品目（アガラーゼ、アミノペプチダーゼ、ムラミダーゼ）の計 4 品目の成分規格を新規に作成した。30 品目の既設定規格（甘味料 1 品目、着色料 9 品目、増粘安定剤 2 品目、酵素 18 品目）を見直した。また、食品用酵素の流通実態調査を行った。

### C. 研究結果及び考察

詳細な報告は別冊報告書に記載したので、ここでは研究結果の概要と考察を述べる。

#### 1. 新規自主規格検討品目(4 品目)

##### 1.1. 着色料（1 品目）

品目：金

定義、含量、性状、確認試験、純度試験及び定量法について調査研究を行い、その結果に基づいて規格案を策定し、その妥当性について検討した。規格案の策定に当たっては、医薬品添加物規格、EU規格及び医薬部外品原料規格を参照した。

##### 1.2. 酵素（3 品目）

品目：アガラーゼ、アミノペプチダーゼ、ムラミダーゼ

これら 3 品目は、JECFA 規格及び FCC には収載されていない。

それぞれの品目について、性状、確認試験、純度試験、微生物限度、酵素活性測定法及び測定結果について調査研究を行い、この結果に基づいて規格案を策定し、その妥当性について検討した。各品目とも規格、試験方法の妥当性が検証された。

規格の記載方法は第 8 版食品添加物公定書（案）に準拠したが、第三版既存添加物自主規格の「酵素一般規格」に従って定義及び酵素特性を記載し、参考として EC ナンバーを記載した。

確認試験については「それぞれの活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す」こととした。また、純度試験については「酵素一般規格（改定案）」に基づいて設定することとした。さらに、微生物限度試験については、「酵素一般規格（改定案）」に基づいて設定することとした。

#### 2. 既設定規格の見直し（30 品目）

見直しを行った品目及び見直しの概要は次表 1 のとおりである。

#### 3. 食品用酵素の流通実態調査

食品用酵素の流通実態調査を行った。調査項目は、次の事項である。

##### (1) 既存添加物酵素の名称、基原に関する調査

1996 年制定の既存添加物酵素 76 品目のうち、報告のあったのは 66 品目、約 200 種類（品名と基原の組合せ）であった。流通報告のなかった 10 品目は、消除済又は消除予定の品目として 7 品目、自主規格作成予定の内品目として 3 品目であった。既存添加物酵素に関する問題点

として、品名、基原についての問題点を整理した。JECFA および FCC はじめ海外規格の品名、基原等の実態調査を行った。

(2) 酵素活性規格の設定及び酵素活性測定法の統一に関する調査

食品添加物はその成分規格において“含量規格”とそれを定義する“定量法”の設定が要求されているが、食品添加物公定書既収載酵素では、含量規格、定量法に代わるものとしてそれぞれ“酵素活性”規格、“酵素活性測定法”が設定されている。酵素の成分規格設定で問題となる“酵素活性規格”と“酵素活性測定法”について日本食品添加物協会酵素部会の意見をまとめた。酵素活性規格を品目毎に設定すること、及び酵素活性測定法を一品目、一測定法に統一することは困難であるとの結論に至った。なお、欧州の酵素事業者団体である Amfep (The Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products) と日本食品添加物協会酵素部会とは共通の見解である。

(3) 微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての提案の検討

将来微生物由来酵素を食品添加物公定書に収載するに当たっての構成、酵素の品名・基原名称の設定、および酵素活性規格・酵素活性測定法の設定に関して、日本食品添加物協会酵素部会の基本的考え方をまとめた。

昨年度報告書の総括の中で酵素規格における今後の検討課題として次の 4 項目を取り上げた。

1) 各酵素の定義を明確化する際に、特

定の酵素の定義が食品分野と生化学分野で一致しない問題

- 2) 規格の国際調和 (JECFA 規格、欧米の規格との調整)
- 3) 酵素活性測定法の提示方法
- 4) 品質規格の対象となる製品 (製剤) の本質記載

今回まとめられた日本食品添加物協会酵素部会の見解では、これらに対しても一定の考え方を示しており、今後の食品用酵素規格のあり方のたたき台になると考えられる。

#### D. 結論

1. 着色料・製造用剤 1 品目 (金)、酵素 3 品目 (アガラーゼ、アミノペプチダーゼ、ムラミダーゼ) の計 4 品目の成分規格を新規に作成した。
2. 30 品目の既設定規格 (甘味料 1 品目、着色料 9 品目、増粘安定剤 2 品目、酵素 18 品目) を見直した。
3. 食品用酵素の流通実態調査を行った。

#### E. 研究発表

なし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 日添協自主規格の見直しを行った品目及び見直しの概要

用途名（品目数）	検討項目	見直しの概要
甘味料（1品目）	ブラジル甘草抽出物	質量分析計検出器による液体クロマトグラフィーによる定量法について検討を行った。
着色料（9品目）	カカオ色素、カキ色素、クーロー色素、コウリャン色素、シアナット色素、タマネギ色素、タマリンド色素、ペカンナッツ色素、チコリ色素	褐色(フラボノイド)系着色料の識別のための試験法の調査を実施し、確認試験方法への利用について検討を行った。
増粘安定剤 （2品目）	ウエランガム アグロバクテリウムスクシノグリカン	確認試験の改良について検討を行った。
酵素（18品目）	$\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、インベルターゼ、キシラナーゼ、キチナーゼ、グルカナナーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼ、グルコースイソメラーゼ、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、セルラーゼ、トランスグルコシダーゼ、プルラナーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ホスホリパーゼ	酵素活性測定法の追加検討を行った。 キチナーゼと $\alpha$ -グルコシルトランスフェラーゼについては、成分規格の見直しと酵素活性測定法の追加検討を行った。
	酵素一般規格	JECFA 規格改定に基づく改正検討を行った。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Sugimoto, N., Kuroyanagi, M., Kato, T., Sato, K., Tada, A., Yamazaki, T., Tanamoto, K.	Identification of the main constituents in sandarac resin, a natural gum base	J. Food Hyg. Soc. Japan	47	76-79	2006
金 哲龍、多田敦子、杉本直樹、佐藤恭子、増田愛乃、山形一雄、山崎 壮、棚元憲一	既存添加物ウルシロウの成分分析	食品衛生学雑誌	47	167-172	2006

# Identification of the Main Constituents in Sandarac Resin, a Natural Gum Base

Naoki SUGIMOTO<sup>\*1,†</sup>, Masanori KUROYANAGI<sup>\*2</sup>, Takashi KATO<sup>\*2</sup>, Kyoko SATO<sup>\*1</sup>,  
Atsuko TADA<sup>\*1</sup>, Takeshi YAMAZAKI<sup>\*1</sup> and Kenichi TANAMOTO<sup>\*1</sup>

(<sup>\*1</sup> National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

<sup>\*2</sup> School of Bioresources, Hiroshima Prefectural University: 562, Nanatsuka, Shobara,  
Hiroshima 727-0023, Japan; † Corresponding author)

(Note)

食品衛生学雑誌 第47巻 第2号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygienics Society of Japan

Vol. 47, No. 2, April 2006

J. Food Hyg. Soc. Japan  
(SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI)

食 衛 誌



## Note

## Identification of the Main Constituents in Sandarac Resin, a Natural Gum Base

(Received August 18, 2005)

Naoki SUGIMOTO<sup>\*1,†</sup>, Masanori KUROYANAGI<sup>\*2</sup>, Takashi KATO<sup>\*2</sup>, Kyoko SATO<sup>\*1</sup>,  
Atsuko TADA<sup>\*1</sup>, Takeshi YAMAZAKI<sup>\*1</sup> and Kenichi TANAMOTO<sup>\*1</sup>

(<sup>\*1</sup> National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

<sup>\*2</sup> School of Bioresources, Hiroshima Prefectural University: 562, Nanatsuka, Shobara, Hiroshima 727-0023, Japan; <sup>†</sup> Corresponding author)

Sandarac resin, a natural gum base, is described as “a substance composed mainly of sandaracopimaric acid obtained from the secretion of sandarac trees” in the List of Existing Food Additives in Japan. To evaluate its quality as a food additive, the main constituents in a sandarac resin product were investigated. Three constituents were isolated and identified as sandaracopimaric acid, sandaracopimarinol and 4-epidehydroabiatic acid by MS and 2D-NMR. Quantification of the main constituent, sandaracopimaric acid, was performed by HPLC and its content in the product was determined to be 11.6%.

**Key words:** food additive; gum base; sandarac resin; *Tetraclinis articulata*; sandaracopimaric acid

### Introduction

Most natural food additives have many constituents, but to date, there have been few investigations on the constituents in most of them. It is necessary for the evaluation of natural food additives to analyze the constituents as completely as possible, since the chemical nature and concentrations of the constituents may differ depending on the extraction and processing methods, and the collection season of the plant of origin. We have been investigating the main and minor constituents in various food additives, for which there are no analytical data and/or reports, in order to develop official analytical methods<sup>1), 2)</sup>.

The List of Existing Food Additives in Japan<sup>3)</sup> stipulates that sandarac resin is a natural gum base, which is a substance composed mainly of sandaracopimaric acid (1) obtained from the secretion of sandarac trees. Sandarac tree is *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast., belonging to the Cupressaceae family. It is native to Morocco and is a coniferous tree closely related to arborvitae. The existence of several diterpenoids in the leaves of *T. articulata* has recently been reported<sup>4)</sup>. Sandarac resin has been used for many years as a natural resin for artwork. Many reports<sup>5), 6)</sup> have been published on the characterization and identification of natural resins for painting. It was reported that the dominant component in sandarac resin used for painting is sandaracopimaric acid (1). However, the main constituents of sandarac resin as a food additive have not been clarified. In this study, we identified several constituents of sandarac resin as sandaracopimaric acid (1), sandaracopimarinol (2) and 4-epidehydroabiatic acid (3) by MS and 2D-NMR,

and quantified the content of the main constituent, sandaracopimaric acid (1), by HPLC.

### Materials and Methods

#### 1. Sample and chemicals

A sample of sandarac resin product was obtained through the Japan Food Additives Association. Silica gel 60 F<sub>254</sub> (20 cm×20 cm, Art. 1.05715) (Merck Co., Ltd.) was used for TLC. Silica gel 60N (63–200 μm Cat. No. 37565-79) (Kanto Chemical Co., Inc.) was used for open column chromatography. All chemicals were of reagent grade and were used without further purification.

#### 2. Spectroscopic analysis

NMR spectra were recorded on JNM-ECA800 and JNM-ECA500 (800 MHz and 500 MHz) instruments (JEOL Co., Ltd.) with chloroform-*d* (CDCl<sub>3</sub>) as the solvent. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra were referenced internally to tetramethylsilane (TMS). Assignments of the proton and carbon signals of all isolated compounds were confirmed by pulse field gradient (PFG) heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), PFG heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC), double quantum filtered correlation spectroscopy (DQF-COSY) and nuclear Overhauser effect (NOE) experiments. High-resolution electron impact mass spectrometry (HR-EI-MS) spectra were obtained with a JMS-700 (JEOL) mass spectrometer. Melting points were determined using a MP-S3 apparatus (Yanaco New Science Inc.) without correction.

### 3. TLC and HPLC conditions

Analytical and preparative HPLC conditions: pump, PU-1580 (JASCO); detector, UV-1575 (JASCO); column, Mightysil RP-18 (4.6 mm i.d. × 250 mm (for analysis), 20 mm i.d. × 250 mm (for preparation), Kanto Chemical); column temp., 30°C; solvent, acetonitrile(CH<sub>3</sub>CN)-water (H<sub>2</sub>O)-acetic acid(AcOH)=90:10:0.3; injection volume, 10 μL (for analysis), 100 μL (for preparation); flow rate, 1.0 mL/min (for analysis), 8.0 mL/min (for preparation); detection, UV 210 nm.

TLC conditions: developing solvent, chloroform (CHCl<sub>3</sub>)-methanol(MeOH)=75:1. After development to about 10 cm, the spots of constituents were visualized by spraying the plate with 50% sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) followed by gentle heating.

### 4. Isolation of compounds 1, 2 and 3

Sandarac resin product (5.0 g) was dissolved in CHCl<sub>3</sub>. The solution was added to a small amount of silica gel with stirring and then the solvent was evaporated *in vacuo*. The silica gel with absorbed sandarac resin was applied on an open silica gel column and fractionated by eluting with CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:0→0:100 gradient), with monitoring by TLC. The eluates were concentrated *in vacuo*, affording seven fractions (Frs. 1-7). Fr. 2

(610 mg), including compounds 1-3, was fractionated by preparative HPLC (see preparative HPLC conditions) to give pure compounds 1 (146 mg), 2 (94 mg) and 3 (113 mg), respectively.

Compound 1: sandaracopimaric acid<sup>7)</sup>, colorless needles, mp 171-172°C (from MeOH),  $[\alpha]_D^{26} -17.7^\circ$  (c 0.13, EtOH) (lit.<sup>8)</sup>: mp 171-173°C,  $[\alpha]_D^{26} -19.8^\circ$  (c 0.2, EtOH). HR-EI-MS: *m/z* 302.2220 M<sup>+</sup> (Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> *m/z* 302.2246).

Compound 2: sandaracopimarinol<sup>9)</sup>, amorphous solid,  $[\alpha]_D^{26} -9.5^\circ$  (c 0.092, MeOH) (lit.<sup>9)</sup>:  $[\alpha]_D^{26} -20^\circ$  (c 0.1, MeOH). HR-EI-MS: *m/z* 288.2440 M<sup>+</sup> (Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O *m/z* 288.2453).

Compound 3: 4-epidehydroabiatic acid<sup>10)</sup>, colorless prisms, mp 149-150°C (from aq. EtOH),  $[\alpha]_D^{26} +128^\circ$  (c 0.094, MeOH) (lit.<sup>11)</sup>: mp 144-145°C,  $[\alpha]_D^{26} +106.6^\circ$  (c 0.8, MeOH). HR-EI-MS: *m/z* 300.2094 M<sup>+</sup> (Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> *m/z* 300.2089).

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data of compounds 1, 2 and 3 are shown in Table 1.

### 5. Quantification of sandaracopimaric acid (1)

Sandarac resin product (50 mg) was dissolved in MeOH (10 mL). The quantity of sandaracopimaric acid (1) was determined by using an absolute calibration

Table 1. NMR Data of Compounds Isolated from Sandarac Resin

Position <sup>d</sup>	Sandaracopimaric acid (1)			Sandaracopimarinol (2)			4-Epidehydroabiatic acid (3)		
	$\delta_C^a$	$\delta_H^b$ (J in Hz)		$\delta_C^c$	$\delta_H^d$ (J in Hz)		$\delta_C^c$	$\delta_H^d$ (J in Hz)	
1	38.3	1.13	dt, 5.0, 12.8	39.0	1.00	dt, 5.1, 12.4	39.4	1.38	dt, 4.3, 13.2
		1.64	br. d, 12.8		1.71	br. d, 12.4		2.24	m overlapped
2	18.6	1.55	m overlapped	18.4	1.45-1.60	m overlapped	20.0	1.6	m
								1.98	m overlapped
3	37.0	1.31	br. d, 12.8	35.5	1.32-1.47	m overlapped	37.5	1.08	dt, 4.0, 13.2
		1.78	dt, 5.0, 12.8					2.24	m overlapped
4	47.3	—		37.9	—		43.9		
5	48.9	1.91	dd, 2.7, 12.8	47.9	1.34	m overlapped	52.9	1.57	dd, 1.5, 12.1
6	24.9	1.26	m overlapped	22.5	1.30	m overlapped	21.0	2.16	m
		1.45	m overlapped		1.47	m overlapped		2.01	m overlapped
7	35.5	2.11	br. dt, 5.5, 14.2	35.8	2.06	br. t, 11.8	32.1	2.86	br. dd, 4.6, 14.2
		2.21	ddd, 1.8, 4.6, 14.2		2.23	ddd, 1.8, 4.3, 11.8		2.78	dt, 4.6, 14.2
8	136.6	—		137.1	—		135.1	—	
9	50.6	1.80	br. t, 7.8	50.6	1.75	br. t, 7.5	145.5	—	
10	37.8	—		38.2	—		38.4	—	
11	18.2	1.50	m overlapped	18.9	1.44	m overlapped	125.5	7.17	d, 8.0
		1.60	m overlapped		1.58	m overlapped			
12	34.5	1.36	dt, 3.6, 12.3	34.6	1.32-1.47	m overlapped	124.1	6.99	dd, 1.7, 8.0
		1.45	m overlapped						
13	37.4	—		37.5	—		145.8	—	
14	129.2	5.21	br. s	128.8	5.20	br. s	126.9	6.88	d, 1.7
15	148.9	5.76	dd, 10.5, 17.3	149.2	5.77	dd, 10.6, 17.4	33.5	2.81	hep., 6.9
16	110.2	4.87	dd, 1.5, 10.5	110.1	4.87	dd, 1.4, 10.6	24.1	1.21	d, 6.9
		4.90	dd, 1.5, 17.3		4.90	dd, 1.4, 17.4			
17	26.1	1.03	s	26.0	1.03	s	24.1	1.21	d, 6.9
18	184.4	—		72.3	3.12	d, 10.9	183.7	—	
					3.39	d, 10.9			
19	16.8	1.20	s	18.0	0.80	s	28.8	1.32	s
20	15.2	0.83	s	15.7	0.83	s	23.3	1.11	s

All signals were assigned based on DQF-COSY, HMQC, and HMBC experiments.

a) Recorded at 200 MHz. b) Recorded at 800 MHz. c) Recorded at 125 MHz. d) Recorded at 500 MHz.

curve based on peak height at UV 210 nm of compound (1) isolated from sandarac resin product.

## Results and Discussion

### 1. Identification of the main constituents in sandarac resin

The silica gel TLC profile of the sandarac resin product is illustrated in Fig. 1. Several spots were observed on the TLC plate along with the tailing spot after spraying the plate with  $H_2SO_4$ , followed by gentle heating. The spot at  $R_f$  0.28 was the most intense one. The HPLC profile of the product is illustrated in Fig. 2. Six to seven peaks were observed, and the largest peak (peak B) at  $T_R$  13.0 min corresponded to the most intense spot on the TLC plate. In order to identify the major constituents, the sandarac resin product was fractionated *via* silica gel and preparative HPLC, affording compounds 1 (peak B), 2 (peak C), and 3 (peak A). The structures were elucidated on the basis of the spectral data.

Compound 1 showed a molecular ion peak at  $m/z$  302.2220 in HR-EI-MS. The ion peak indicated that the molecular formula could be represented as  $C_{20}H_{30}O_2$ . The  $^1H$ -NMR spectrum showed three singlet methyl signals [ $\delta$  0.83 (3H, s), 1.03 (3H, s), 1.20 (3H, s)], vinyl groups [ $\delta$  5.76 (1H, dd,  $J=17.3$ , 10.5 Hz), 4.87 (1H, dd,  $J=10.5$ , 1.5 Hz), 4.90 (1H, dd,  $J=17.3$ , 1.5 Hz)], a detached olefinic group [ $\delta$  5.21 (1H, br. s)], and many methylene signals. The  $^{13}C$ -NMR spectrum showed a carboxyl group ( $\delta$  184.4), two olefinic signals including an exomethylene group ( $\delta$  110.2, 129.2, 136.6, 148.9), and 15 other signals due to methyl, methylene, and methine carbons. All the  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR signals of compound 1 were assigned based on 2D-NMR results (DQF-COSY, HMQC, HMBC). Compound 1 was identified as sandaracopimaric acid<sup>7,8)</sup> (Fig. 3). The reported  $^{13}C$ -NMR assignments<sup>5)</sup> at C-4, 5 and 18 of 1 should be revised

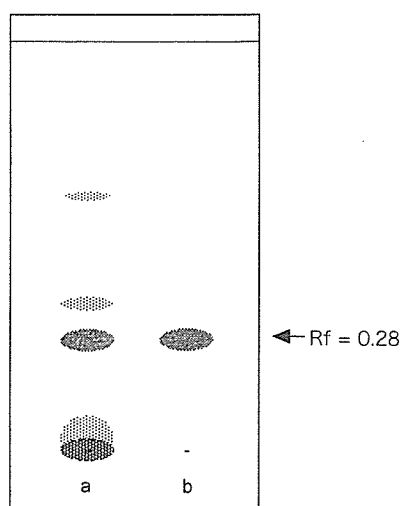


Fig. 1. Silica gel TLC profiles of sandarac resin product and sandaracopimaric acid (1)

a) Sandarac resin product. b) Sandaracopimaric acid (1). Solvent:  $CHCl_3$ : MeOH=75:1. Spots were visualized with  $H_2SO_4$ /heat.

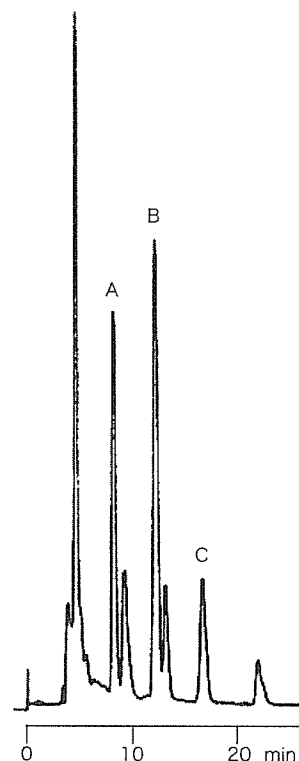


Fig. 2. HPLC profile of sandarac resin product

Peak A=4-epidehydroabiatic acid (3). Peak B=sandaracopimaric acid (1). Peak C=sandaracopimarinol (2).

according to our assignment.

Compound 2 showed a molecular ion peak at  $m/z$  288.2440, indicating that its molecular formula is  $C_{20}H_{32}O$ . The  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR spectra of compound 2 were very similar to those of sandaracopimaric acid (1). Comparison of compound 2 with sandaracopimaric acid (1) indicated that compound 2 is also an isopimarane derivative having one hydroxyl methyl group [ $^1H$ :  $\delta$  3.12, 3.39 (each  $^1H$ , d,  $=10.9$  Hz),  $^{13}C$ :  $\delta$  72.3], instead of the carboxyl group at C-18 on sandaracopimaric acid (1). Since the  $^{13}C$ -NMR data of compound 2 were the same as the literature data for sandaracopimarinol, compound 2 was identified as sandaracopimarinol<sup>9)</sup> (Fig. 3).

The molecular formula of compound 3,  $C_{20}H_{28}O_2$ , was deduced from the molecular ion peak at  $m/z$  300.2094. The  $^1H$ -NMR spectrum showed two singlet methyl signals [ $\delta$  1.11 (3H, s), 1.32 (3H, s)], a doublet methyl signal [ $\delta$  1.21 (6H, d,  $J=6.9$  Hz)], three aromatic signals [ $\delta$  6.88 (1H, d,  $J=1.7$  Hz), 6.99 (1H, dd,  $J=1.7$ , 8.0 Hz), 7.17 (1H, d,  $J=8.0$  Hz)], and many methylene signals. The  $^{13}C$ -NMR spectrum showed a carboxyl group [ $\delta$  183.7] and an aromatic group [ $\delta$  124.1, 125.5, 126.9, 135.1, 145.5, 145.8], and 13 other signals derived from methyl, methylene and methine carbons. NOE was observed for the methyl group [ $\delta$  1.32 (3H, s)] on C-4 with H-5 $\alpha$  [ $\delta$  1.57 (1H, dd,  $J=1.5$ , 12.1 Hz)]. By comparison of the spectral and physical data with published data<sup>11), 12)</sup>, compound 3 was identified as 4-epidehydroabiatic acid<sup>10), 11)</sup> (Fig. 3).

Other peaks on HPLC were still mixtures of two or

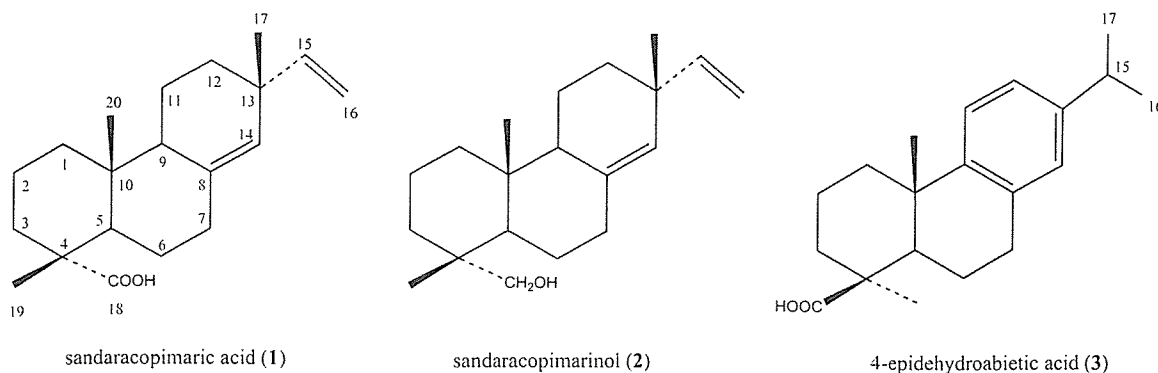


Fig. 3. Structures of sandaracopimaric acid (1), sandaracopimarinol (2) and 4-epidehydroabietic acid (3)

more diterpenoids, and hence could not be identified at this time. The concentrations of the other diterpenoids appear to be lower than that of sandaracopimaric acid (1), because peak B due to sandaracopimaric acid (1) was the largest on HPLC. Therefore, the main constituent, sandaracopimaric acid (1), was selected as a characteristic constituent to develop a quality standard and/or verification test of sandarac resin.

#### 2. Quantification of sandaracopimaric acid (1) in sandarac resin product

In order to quantify sandaracopimaric acid (1), a calibration curve based on peak height was prepared within the range of 0.25–2.0 mg/mL of sandaracopimaric acid (1). The concentration of sandaracopimaric acid (1) in the sandarac resin product was found to be 11.6% by HPLC. Since neither other sandarac resin products nor *T. articulata*, the origin of sandarac resin, are available in Japan, comparisons could not be made. However, we concluded that the sandarac resin product used in this research had been derived from *T. articulata*, since sandaracopimaric acid (1), a characteristic constituent in sandarac resin, was detected as the main constituent.

#### Conclusion

This report is the first investigation of the major constituents of commercial sandarac resin product used as a food additive. The major constituents were isolated from the product and identified as sandaracopimaric acid (1), sandaracopimarinol (2) and 4-epidehydroabietic acid (3) by 2D-NMR. Based on TLC and HPLC analyses, we confirmed that the main constituent was sandaracopimaric acid (1) and its content was found to be 11.6%. This result will be useful for setting official standards for sandarac resin as a natural food additive.

#### Acknowledgments

This work was supported by a Grant-in-Aid for Research on Food Sanitation from the Ministry of Health, Labor and Welfare. The authors are grateful to the

Japan Food Additives Association for providing sandarac resin.

#### References

- 1) Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of constituents in Jamaica quassia extract, a natural bittering agent. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 328–331 (2003).
- 2) Yashiro, T., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of absinthin in absinth extract bittering agent. *Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, **11**, 86–90 (2004).
- 3) Notice No. 210 (Apr. 16, 1996) List of Existing Food Additives. Ministry of Health and Welfare.
- 4) Barrero, A. F., Quilez del Moral, J. F., Lucas, R., Payá, M., Akssira, M., Akaad, S., Mellouki, F., Diterpenoids from *Tetractinis articulata* that inhibit various human leukocyte functions. *J. Nat. Prod.*, **66**, 844–850 (2003).
- 5) Osete-Cortina, L., Doménech-Carbó, M. T., Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry with on line trimethylsilylation. *J. Chromatogr. A*, **1065**, 265–278 (2005).
- 6) Scalarone, D., van der Horst, J., Boon, J. J., Chiantore, O., Direct-temperature mass spectrometric detection of volatile terpenoids and natural terpenoid polymers in fresh and artificially aged resins. *J. Mass Spectrom.*, **38**, 607–617 (2003).
- 7) Sakar, M. K., Feliciano, A. S., Diterpenoids of *Juniperus foetidissima* unripe berries. *Fitoterapia*, **65**, 304–306 (1994).
- 8) Afonso, A., 4-Carbomethoxy-5 $\alpha$ -androstane derivatives. Synthesis of (–)-sandaracopimaric acid. *J. Org. Chem.*, **35**, 1,949–1,953 (1970).
- 9) Morisawa, J., Kim, C.-S., Kashiwagi, T., Tebayashi, S., Horiike, M., Repellents in the Japanese cedar, *Cryptomeria japonica*, against the pill-bug, *Armadillidium vulgare*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2424–2428 (2002).
- 10) Carman, R. M., Marty, R. A., Diterpenoids, *Aust. J. Chem.*, **23**, 1,457 (1970).
- 11) Lee, C.-K., Fang, J.-M., Cheng, Y.-S., Abietanes from leaves of *Juniperus chinensis*. *Phytochemistry*, **35**, 983–986 (1994).
- 12) Miguel Del Corral, J. M., Gordaliza, M., Salinero, M. A., San Feliciano, A., <sup>13</sup>C NMR data for abieta-8,11,13-triene diterpenoids. *Magn. Reson. Chem.*, **32**, 774–781 (1994).

# 既存添加物ウルシロウの成分分析

金 哲龍 多田敦子 杉本直樹 佐藤恭子  
増田愛乃 山形一雄 山崎 壮 棚元憲一

## Analysis of Constituents in Urushi Wax, a Natural Food Additive

Zhe-Long JIN<sup>\*1,\*3</sup>, Atsuko TADA<sup>\*1,†</sup>, Naoki SUGIMOTO<sup>\*1</sup>, Kyoko SATO<sup>\*1</sup>, Aino MASUDA<sup>\*2</sup>,  
Kazuo YAMAGATA<sup>\*2</sup>, Takeshi YAMAZAKI<sup>\*1</sup> and Kenichi TANAMOTO<sup>\*1</sup>

(<sup>\*1</sup> National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

<sup>\*2</sup> College of Bioresource Sciences, Nihon University: 1866, Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa  
252-8510, Japan; <sup>\*3</sup> Present address: Department of Food Testing, Inspection Center of  
Chiba Prefectural Pharmaceutical Association: 2-3-36, Oonodai, Midori-ku,  
Chiba 267-0056, Japan; † Corresponding author)

(ノ - ト)

食品衛生学雑誌 第47巻 第4号 別刷

Reprinted from the Journal of Food Hygienics Society of Japan

Vol. 47, No. 4, August 2006

J. Food Hyg. Soc. Japan  
(SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI)

食 衛 誌

## ノート

## 既存添加物ウルシロウの成分分析

(平成 18 年 1 月 16 日受理)

金 哲龍<sup>\*1,\*3</sup> 多田 敦子<sup>\*1,†</sup> 杉本直樹<sup>\*1</sup> 佐藤 恭子<sup>\*1</sup>  
 増田 愛乃<sup>\*2</sup> 山形 一雄<sup>\*2</sup> 山崎 壮<sup>\*1</sup> 棚元 憲一<sup>\*1</sup>

## Analysis of Constituents in Urushi Wax, a Natural Food Additive

Zhe-Long JIN<sup>\*1,\*3</sup>, Atsuko TADA<sup>\*1,†</sup>, Naoki SUGIMOTO<sup>\*1</sup>, Kyoko SATO<sup>\*1</sup>, Aino MASUDA<sup>\*2</sup>,  
 Kazuo YAMAGATA<sup>\*2</sup>, Takeshi YAMAZAKI<sup>\*1</sup> and Kenichi TANAMOTO<sup>\*1</sup>

(\*<sup>1</sup> National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

\*<sup>2</sup> College of Bioresource Sciences, Nihon University: 1866, Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa  
 252-8510, Japan; \*<sup>3</sup> Present address: Department of Food Testing, Inspection Center of

Chiba Prefectural Pharmaceutical Association: 2-3-36, Oonodai, Midori-ku,

Chiba 267-0056, Japan; † Corresponding author)

Urushi wax is a natural gum base used as a food additive. In order to evaluate the quality of urushi wax as a food additive and to obtain information useful for setting official standards, we investigated the constituents and their concentrations in urushi wax, using the same sample as scheduled for toxicity testing. After methanolysis of urushi wax, the composition of fatty acids was analyzed by GC/MS. The results indicated that the main fatty acids were palmitic acid, oleic acid and stearic acid. LC/MS analysis of urushi wax provided molecular-related ions of the main constituents. The main constituents were identified as triglycerides, namely glyceryl tripalmitate (30.7%), glyceryl dipalmitate monooleate (21.2%), glyceryl dioleate monopalmitate (2.1%), glyceryl monooleate monopalmitate monostearate (2.6%), glyceryl dipalmitate monostearate (5.6%), glyceryl distearate monopalmitate (1.4%). Glyceryl dipalmitate monooleate isomers differing in the binding sites of each constituent fatty acid could be separately determined by LC/MS/MS.

(Received January 16, 2006)

**Key words:** 食品添加物 food additive; ウルシロウ Urushi wax; トリグリセリド triglyceride; 脂肪酸 fatty acid; ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS; 液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC/MS

## 緒 言

漆ろうは木ろうとともに、日本古来の天然ワックスであり、日常の灯火、神仏事の灯明には欠かせないロウソクの原料として珍重されてきたものであるが、天然食品添加物としてもガムベースまたは光沢剤として、チューインガム、キャンディや果実などに用いられる。天然食品添加物として用いられる漆ろうは、既存添加物名簿<sup>1)</sup>に「ウルシロウ」の名称で記載され、「ウルシの果実から得られた、グリセリンパルミタートを主成分とするものをいう。」と定義されている。また、その基原・製法・本質として、「ウルシ科ウルシ (*Rhus verniciflua* LINNE) の果実より、

融解、さらして得られたものである。主成分はグリセリンパルミタートである。」と記載されている<sup>2)</sup>。また、既存添加物名簿収載品目リスト注解書<sup>3)</sup>には、「主に中国産のウルシの実の種子の中果皮より抽出されたトリグリセリドを漂白精製したもので、正式には油脂に分類される物質である。成分はパルミチン酸などのモノカルボン酸のグリセリンエステルが主体であるが、ジカルボン酸のグリセリンエステルも含有する。」と概説されている。しかし、食品添加物としてのウルシロウは、業界自主品質規格<sup>4)</sup>が設定されているものの、成分組成や安全性についての報告はなく、食品添加物公定書にも未収載である。

従来から厚生労働省は既存添加物の安全性確認を進めているが、本品目も国による安全性確認試験(反復経口投与毒性試験)を実施することになり、今回食品添加物として流通実績のある同一製品を試験対象試料として入手した。そこで、われわれは、既存添加物ウルシロウの品質規格および品質評価法設定の基礎資料とするために、この安全性

† 連絡先

\*<sup>1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1\*<sup>2</sup> 日本大学, 生物資源科学部: 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866\*<sup>3</sup> 現所属: 千葉県薬剤師会検査センター, 食品検査部: 〒267-0056 千葉市緑区大野台

試験対象試料のウルシロウ製品を用い、GC/MSによる脂肪酸組成の分析を行った。脂肪酸組成については、漆の生ろうおよび天日さらしろうでの報告<sup>5)</sup>があるが、どのような組み合わせでトリグリセリドが構成されているかについての詳細な報告は見られない。そこでさらにLC/MSを用い、ウルシロウ中に含まれる各種トリグリセリドの分析条件を検討し、各トリグリセリドの結合脂肪酸種を明らかにするとともに、これらトリグリセリドの定量を行ったので併せて報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

ウルシロウ (英名: urushi wax) は、安全性試験の対象試料と同一ロットの1検体と、これと同じ製品で別ロットの1検体の計2検体を日本食品添加物協会を通じて入手した。今回入手したウルシロウ製品は、白～微黄色の粒状固体であった。業界自主規格 (融点 48～54℃, 酸価 30 以下, けん化価 200～235, ヨウ素価 5～40) に適合した製品である。以下に示す分析は、この2検体につき、それぞれ3回の繰返し分析を行い、各分析値は2検体の平均値を求め、結果として示した。

### 2. 試薬

トリグリセリド標品 (Table 1) として、glyceryl 1,2,3-tripalmitate (PPP) は Doosan Serdary Research Laboratories 社製、glyceryl 1,2-dipalmitate 3-oleate (PPO), glyceryl 1,3-dipalmitate 2-oleate (POP), glyceryl 1,2-dioleate 3-palmitate (POO), glyceryl 1,2-dipalmitate 3-stearate (PPS), glyceryl 1,2-distearate 3-palmitate (PSS), glyceryl 1-palmitate 2-oleate 3-stearate (POS) は Larodan Fine Chemicals AB 社製のものを使用した。パルミチン酸メチルエステル, ステアリン酸メチルエステル, オレイン酸メチルエステル, 5% 塩化水素メタノール溶液は和光純薬工業(株)製, その他の溶媒はすべて市販特級品あるいは HPLC 用を使用した。

### 3. 装置

ガスクロマトグラフ/質量分析計: (株)島津製作所製 GC/MS system (GCMS-QP5050); 高速液体クロマトグラフ/質量分析計: Waters 社製 LC/MS system (LC: Alli-

ance 2695; フォトダイオードアレイ検出器 (PDA): 2996 photodiode array detector; MS: Quatro Micro API).

### 4. 構成脂肪酸の GC/MS 分析

ウルシロウ製品 6.75 mg を精密に量り取り, 5% 塩化水素メタノール溶液 1.0 mL, ベンゼン 3 滴をスクリー栓付き試験管内で混合し, 沸騰水溶液中で 3 時間反応させた。冷却後水 1.0 mL を加え, ヘキサン (3 mL×2 回) で抽出し, ヘキサン抽出液を約 1 mL に濃縮した。これにヘキサンを加えて 1.5 mL に調整した後, さらに 10 倍希釈したものを GC/MS 分析試料とした。別途各脂肪酸メチルエステル標品 (パルミチン酸メチルエステル, ステアリン酸メチルエステル, オレイン酸メチルエステル) の 1.0 mg/mL ヘキサン溶液を調製し, 標準溶液とした。次の操作条件で GC/MS 分析を行った。

GC/MS 測定条件: カラム, DB-1 (0.25 mm×30 m, 膜厚, 0.25 μm, J&W Scientific); カラム入口圧, 100 kPa; キャリヤーガス流量, 1.0 mL/min; 注入口温度, 300℃; カラム温度, 180℃→5℃/min→300℃ (8 min); イオン源温度, 250℃; イオン化エネルギー, 70 eV; 注入力, 1.0 μL; 試料注入方式, スプリット (4:1); 測定モード, EI スキャン法 ( $m/z$  50～800)。

### 5. トリグリセリドの LC/MS および LC/MS/MS 分析

ウルシロウ製品をヘキサンに溶解し, 濃度 5.0 μg/mL に調製したものを分析試料とし, Kusaka らの報告<sup>6)</sup>を参考にして, 次の条件で LC/MS 分析を行った。

LC/MS 条件: LC 条件: カラム, Capcell Pak C 18 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm, Shiseido); 流速, 0.4 mL/min; カラム温度, 40℃; 移動相, アセトニトリル-ヘキサン-2-プロパノール=60:0:40 (0 min)→40:20:40 (50 min)→40:20:40 (60 min); PDA, 192～600 nm; 検出波長, 220 nm. MS 条件: ソース温度, 130℃; 脱溶媒温度, 400℃; 脱溶媒ガス流量, 300 L/hr; コーンガス, 50 L/hr; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 60 V (APCI pos.); スキャン範囲,  $m/z$  100～1,000; SIM (Selected Ion Monitoring) [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>. MS/MS 条件: コーン電圧, 25 V (APCI pos.); コリジョンガス, アルゴン; コリジョン電圧, 40V.

### 6. トリグリセリドの定量

ウルシロウ製品はヘキサンに溶解し, 濃度 50 μg/mL に調製した。別に PPP (1 μg/mL), PPO (1 μg/mL), POO (0.1 μg/mL), POS (0.1 μg/mL), PPS (0.2 μg/mL) および PSS (0.1 μg/mL) を含む標準混合溶液を, ヘキサンを用いて調製した。これらを LC/MS に注入した。検出には選択イオン検出 (SIM) 法を採用し, 次に示すトリグリセリド分子量関連イオンをモニターイオンとし, クロマトグラムピーク面積を求め, 混合標準溶液で作成した検量線から各トリグリセリドを定量した。

PPP:  $m/z$  829.6 [ $M_{PPP}+Na$ ]<sup>+</sup>; PPO:  $m/z$  855.6 [ $M_{PPO}+Na$ ]<sup>+</sup>; POO:  $m/z$  881.6 [ $M_{POO}+Na$ ]<sup>+</sup>; POS:  $m/z$  883.6 [ $M_{POS}+Na$ ]<sup>+</sup>; PPS:  $m/z$  857.6 [ $M_{PPS}+Na$ ]<sup>+</sup>; PSS:  $m/z$

Table 1. Structures of TG Standard Samples

Compound formula	MW	CH <sub>2</sub> - CH - CH <sub>2</sub>			
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
PPP	C <sub>51</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	807.3	P	P	P
PPO	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	833.3	P	P	O
POP	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	833.3	P	O	P
POO	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	859.3	P	O	O
PPS	C <sub>53</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	835.3	P	P	S
PSS	C <sub>55</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>	863.4	P	S	S
POS	C <sub>55</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	861.4	P	O	S

TG: triglyceride

Palmitic acid (P), Oleic acid (O), Stearic acid (S)

885.6[M<sub>PSS</sub>+Na]<sup>+</sup>.

### 7. 異性体比の推定

LC/MS/MS 分析により、各トリグリセリド分子量関連イオンのプロダクトイオン  $m/z$  551.3[PP]<sup>+</sup>;  $m/z$  577.3[PO]<sup>+</sup>;  $m/z$  579.3[PS]<sup>+</sup>;  $m/z$  603.3[OO]<sup>+</sup>;  $m/z$  607.3[SS]<sup>+</sup>;  $m/z$  605.3[OS]<sup>+</sup> の MRM (Multiple Reaction Monitoring) 測定を行い、トリグリセリドごとにプロダクトイオンのクロマトグラムピーク面積比を求め、標品で得られた値と比較することにより、異性体の存在および割合を推定した。

### 結果および考察

#### 1. ウルシロウの構成脂肪酸の組成および相対含量の推定

ウルシロウ製品について TLC 分析 (展開溶媒: ヘキサソージエチルエーテル-酢酸混液 (80:30:1), 検出: ヨウ素による発色) を行った結果、トリグリセリドを主成分とし、遊離脂肪酸やジグリセリドなどを少量含むことが明らかになった。

そこで、ウルシロウ製品の構成脂肪酸を確認するために、ウルシロウ製品をメタノリシスし、得られた脂肪酸メチルエステルを GC/MS で分析した (Fig. 1)。その結果、主成分としては保持時間 4.6 分 (ピーク 1), 5.9 分 (ピーク 2), 6.1 分 (ピーク 3) の 3 つのピークが観察された。NIST ライブラリー検索および脂肪酸メチルエステル標品との比較の結果、ピーク 1 はパルミチン酸メチルエステル (C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>), M<sup>+</sup>:  $m/z$  270, ピーク 2 はオレイン酸メチルエステル (C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>), M<sup>+</sup>:  $m/z$  296, およびピーク 3 はステアリン酸メチルエステル (C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>), M<sup>+</sup>:  $m/z$  298 と

同定した。TIC クロマトグラム上に観察された総ピーク面積を 100% として各成分の相対含量を示すと、ピーク 1, 2, 3 は、それぞれ 72.5%, 17.1%, 8.8% であり、パルミチン酸メチルエステルの占める割合が非常に高かった。ほかに、保持時間 7.6 分 (ピーク 4), 10.2 分 (ピーク 5) および 11.9 分 (ピーク 6) に極小のピークが観察された。これらは、NIST ライブラリー検索を行った結果、ピーク 4 はアラキジン酸メチルエステル (C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>), M<sup>+</sup>:  $m/z$  326, ピーク 5 はイコサン二酸ジメチルエステル (C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>), [M-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>:  $m/z$  339, ピーク 6 はドコサン二酸ジメチルエステル (C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>), [M-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>:  $m/z$  367 と推定された。相対含量は、それぞれ 0.6%, 0.8%, 0.2% で、これらの総量は全体の約 1.6% であり、ピーク 1, 2, 3 の含量と比較し非常に微量であった。したがって、今回入手したウルシロウ製品の構成脂肪酸は、パルミチン酸、オレイン酸およびステアリン酸を主とすることが示された。

本研究では、安全性試験対象試料として入手可能であったウルシロウ製品 2 検体の脂肪酸組成について分析し、その平均値を求めた。これまでに、橘ら<sup>5)</sup>は漆の生ろうと漂白のため天日さらしたものをを用い、それぞれ分画して得た遊離脂肪酸画分とグリセリド画分の脂肪酸組成を調査しているが、ウルシロウの主要構成脂肪酸がパルミチン酸、オレイン酸およびステアリン酸である点は、本研究のウルシロウ製品の結果と一致した。しかし、実験材料と実験方法が異なるためか、脂肪酸の詳細な組成比や微量脂肪酸については、類似しているものの一致しない部分も見られた。したがって、既存添加物以外の目的で使用される漆ろうの脂肪酸組成が、今回の結果と類似しているか否かについては、別に検討を行う必要があると考える。

#### 2. ウルシロウの構成成分および定量

次に、ウルシロウ製品中の各脂肪酸グリセリンエステルの構成脂肪酸の種類を明らかにするために、LC/MS 分析を行った (Fig. 2)。その結果、保持時間 44.55 分 (P-1), 45.48 分 (P-2), 46.43 分 (P-3), 49.27 分 (P-4), 50.22 分 (P-5), 53.87 分 (P-6) の 6 つのピークが観察された。P-3 は、APCI(pos.) において、 $m/z$  829.7 を与え、これは、ウルシロウの主成分とされるグリセリンパルミタート (glyceryl tripalmitate, PPP (MW: 807.3)) の分子量関連イオン [M+Na]<sup>+</sup> に相当した。また同様に、P-1, 2, 4, 5, 6 は、それぞれ  $m/z$  881.8,  $m/z$  855.7,  $m/z$  883.8,  $m/z$  857.8,  $m/z$  885.8 を与えた。メタノリシス後の GC/MS による分析の結果、ウルシロウ製品の構成脂肪酸が、主としてパルミチン酸 (P), オレイン酸 (O), ステアリン酸 (S) であったことを踏まえ、トリグリセリド標品 POO, PPO, PPP, POS, PPS および PSS と保持時間を比較した結果、ピーク P-1~6 とそれぞれ一致した。

しかし今回の LC 条件においては、glyceryl dipalmitate monooleate の異性体である PPO と POP の標品は同じ保持時間に溶出され、分離することができなかった。

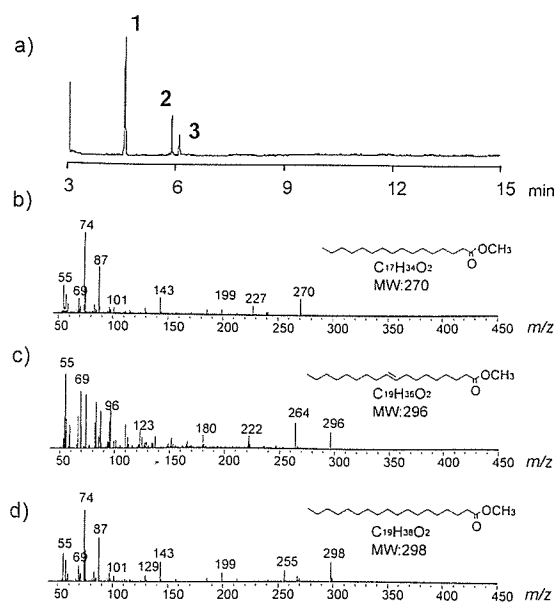


Fig. 1. GC/MS analysis of fatty acid methyl esters obtained by methanolysis of urushi wax

a) TIC, b) MS spectrum of peak 1, c) MS spectrum of peak 2, d) MS spectrum of peak 3



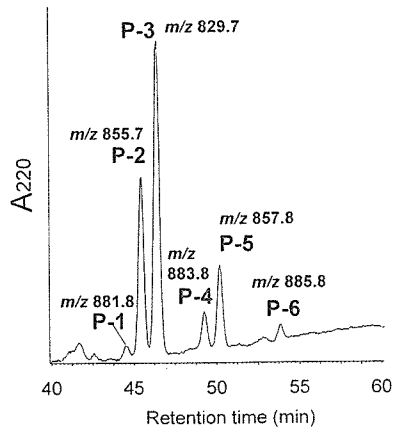


Fig. 2. HPLC chromatogram of urushi wax at UV 220 nm

The  $m/z$  values of the peaks show the pseudo-molecular ions detected by LC/MS APCI(pos.) mode

Table 2. Possible TG Isomers in Urushi Wax by LC/MS APCI Mode

Peak No.	Observed $[M+Na]^+$	Predicted		
		Formula	TG isomers	
P-1	881.8	$C_{55}H_{102}O_6$	POO	OPO
P-2	855.7	$C_{53}H_{100}O_6$	PPO	POP
P-3	829.7	$C_{51}H_{98}O_6$	PPP	
P-4	883.8	$C_{55}H_{104}O_6$	POS	PSO SPO
P-5	857.8	$C_{55}H_{102}O_6$	PPS	PSP
P-6	885.8	$C_{55}H_{106}O_6$	PSS	SPS

TG: triglyceride

$[M+Na]^+$ : pseudomolecular ion

同様に、他のトリグリセリドについても、脂肪酸の結合位置が異なる異性体は、区別されずに検出されたと推測した。よって、ピーク P-1~6 は、脂肪酸の結合位置が異なるトリグリセリド異性体の混合物であると考えた (Table 2)。

次に、今回の LC/MS 条件では、異性体である PPO と POP の標品は同じ分子イオン強度を与えたことから、他のトリグリセリド異性体についても同様であり、各ピークが異性体の混合物であったとしても、各トリグリセリドのいずれか 1 種の異性体を標品とすれば、SIM 法により定量可能と判断した。各種トリグリセリド標品 (PPP, PPO, POO, POS, PPS, PSS) を用い絶対検量線を作成し、定量を行った結果、ウルシロウ中に glyceryl tripalmitate (PPP) が  $30.7 \pm 5.0\%$ , glyceryl dipalmitate monooleate (PPO および POP) が  $21.2 \pm 2.4\%$ , glyceryl dioleate monopalmitate (POO および OPO) が  $2.1 \pm 0.6\%$ , glyceryl monopalmitate monooleate monostearate (POS, PSO および OPS) が  $2.6 \pm 0.3\%$ , glyceryl dipalmitate monostearate (PPS および PSP) が  $5.6 \pm 0.9\%$ , glyceryl distearate monopalmitate (PSS および SPS) が  $1.4 \pm 0.3\%$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ ) であり、PPP と PPO (PPO

と POP の混合物) が主成分であることが分かった。

Laakso らは、トリグリセリドのマスマスペクトルのフラグメントパターンには異性体ごとに特異性があると指摘している<sup>7,8)</sup>。そこで標品 PPO および POP を Product ion scan 法で比較した結果、プロダクトイオン  $[M-RCOO]^+$  の相対強度に注目すると、PPO では  $[PP]^+/[PO]^+$  が 0.86 であるのに対し、POP では 0.46 であり、PPO と POP では明らかに異なっていた (Fig. 3a, b)。また、標品 PPO および POP を混合して、PPO の割合が、0, 25, 50, 75, 100% となるように調製した溶液のプロダクトイオン比  $[PP]^+/[PO]^+$  を測定したところ、Fig. 4 に示すように直線関係が成立することが分かった。一方、ウルシロウ製品 2 ロットを用いてピーク P-2 (Fig. 3c) の  $[PP]^+/[PO]^+$  を調べたところ、その値は 0.769 および 0.772 であった。したがって P-2 は、PPO と POP の混合物のピークであ

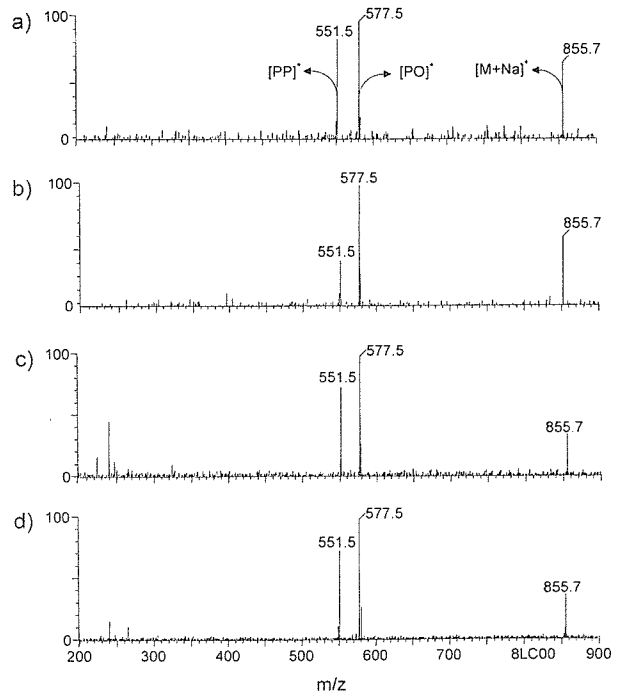


Fig. 3. LC/MS/MS spectra of urushi wax peak P-2 in Fig. 2 and triglyceride isomer standard samples a) PPO; b) POP; c) urushi wax peak P-2 in Fig. 2; d) mixture of PPO/POP=78/22

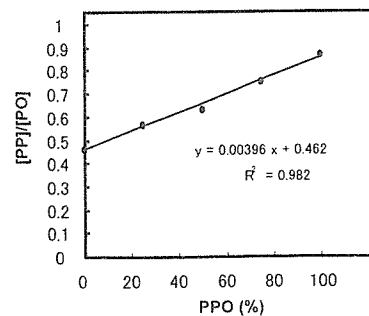


Fig. 4. Relationship between percentage of PPO in the mixture of PPO and POP isomers and product ion ratio of  $[PP]/[PO]$

**Table 3.** Diacylglycerol Fragment Ions of TG Peaks in Urushi Wax and Their Ratios by LC/MS/MS

Peak No.	Predicted			[M-RCOO] <sup>+</sup>			Relative intensity ratios of [M-RCOO] <sup>+</sup> ion peaks		
	Formula	TG isomers							
P-1	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	POO	OPO	[OO] <sup>+</sup>	[PO] <sup>+</sup>		[OO] <sup>+</sup> /[PO] <sup>+</sup>	0.37	
P-2	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	PPO	POP	[PP] <sup>+</sup>	[PO] <sup>+</sup>		[PP] <sup>+</sup> /[PO] <sup>+</sup>	0.78	
P-3	C <sub>51</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	PPP		[PP] <sup>+</sup>					
P-4	C <sub>55</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	POS	PSO	SPO	[PO] <sup>+</sup>	[PS] <sup>+</sup>	[OS] <sup>+</sup>	[PS] <sup>+</sup> /[PO] <sup>+</sup>	1.14
								[PS] <sup>+</sup> /[OS] <sup>+</sup>	1.38
								[OS] <sup>+</sup> /[PO] <sup>+</sup>	0.86
P-5	C <sub>53</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	PPS	PSP	[PP] <sup>+</sup>	[PS] <sup>+</sup>		[PP] <sup>+</sup> /[PS] <sup>+</sup>	0.58	
P-6	C <sub>55</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>	PSS	SPS	[SS] <sup>+</sup>	[PS] <sup>+</sup>		[SS] <sup>+</sup> /[PS] <sup>+</sup>	0.84	

TG: triglyceride

[M-RCOO]<sup>+</sup>: diacylglycerol fragment ion created by the loss of a fatty acid group from the TG molecular ion.**Table 4.** Diacylglycerol Fragment Ions of Authentic TGs and Their Ratios by LC/MS/MS

TG	[M-RCOO] <sup>+</sup>		Relative intensity ratio of [M-RCOO] <sup>+</sup> ion peaks		
POO	[OO] <sup>+</sup>	[PO] <sup>+</sup>	[OO] <sup>+</sup> /[PO] <sup>+</sup>	0.53	
PPO	[PP] <sup>+</sup>	[PO] <sup>+</sup>	[PP] <sup>+</sup> /[PO] <sup>+</sup>	0.86	
POP	[PP] <sup>+</sup>	[PO] <sup>+</sup>	[PP] <sup>+</sup> /[PO] <sup>+</sup>	0.46	
POS	[PO] <sup>+</sup>	[PS] <sup>+</sup>	[OS] <sup>+</sup>	[PS] <sup>+</sup> /[PO] <sup>+</sup>	0.60
				[PS] <sup>+</sup> /[OS] <sup>+</sup>	0.66
				[OS] <sup>+</sup> /[PO] <sup>+</sup>	0.91
PPS	[PP] <sup>+</sup>	[PS] <sup>+</sup>	[PP] <sup>+</sup> /[PS] <sup>+</sup>	0.74	
PSS	[SS] <sup>+</sup>	[PS] <sup>+</sup>	[SS] <sup>+</sup> /[PS] <sup>+</sup>	0.57	

TG: triglyceride

[M-RCOO]<sup>+</sup>: diacylglycerol fragment ion created by the loss of a fatty acid group from the TG molecular ion.

り, Fig. 4 の関係式から, PPO の割合が 2 ロットの平均値として 77.9% であることが予想された. 実際に, 標品 PPO と POP を 78:22 に混合したものは, ウルシロウ製品のピーク P-2 と同様な保持時間を示し, 両者のピーク P-2 はほぼ同様なフラグメントパターンを与えた. したがって, ウルシロウ中の glyceryl dipalmitate monooleate は, PPO と POP が約 8:2 の割合で混在していると推測された (Fig. 3c, d). ピーク P-1, 4~6 についても, プロダクトイオンの相対比が標品 POO, POS, PPS, PSS と一致しなかったことから, それぞれ対応する異性体の混合物であることが予想された (Table 3, 4). しかしながら, 対応する異性体すべての標品を入手できなかったため, これらの異性体混合比については測定を行わなかった.

従来, トリグリセリド混合物に含まれる脂肪酸の結合位置が異なるトリグリセリド異性体を分別定量することは難しいとされてきた. トリグリセリドの脂肪酸を疎リパーゼを用いて位置特異的に加水分解し, 得られた脂肪酸の組成比を測定することで, 1, 3 位と 2 位の脂肪酸をそれぞれ分析することは行われてきたが, 個々のトリグリセリド異性体を分別定量できる方法ではなかった. 今回, LC/MS/MS 分析でプロダクトイオン [M-RCOO]<sup>+</sup> の相対強度を測定することによりトリグリセリド異性体を分別定量できることを示した.

## まとめ

われわれは, 既存添加物ウルシロウの安全性確認試験の試験対象試料 1 製品 (2 検体) の成分を確認するとともに, 既存添加物ウルシロウの規格および品質評価法設定のための基礎的知見を得るため, ウルシロウ製品中の主成分の確認および定量を行った. ウルシロウ製品は, トリグリセリドを主成分とし, 遊離脂肪酸やジグリセリドなどを少量含むことが確認された. GC/MS 分析の結果, ウルシロウの構成脂肪酸は, 主としてパルミチン酸, オレイン酸, ステアリン酸であることが分かった. ウルシロウ製品中のトリグリセリドを, LC/MS-SIM 法によって定量した結果, 主成分として glyceryl tripalmitate が 30.7±5.0%, glyceryl dipalmitate monooleate が 21.2±2.4% 含まれており, 他に微量成分として, glyceryl dioleate mono-palmitate が 2.1±0.6%, glyceryl monopalmitate monooleate monostearate が 2.6±0.3%, glyceryl dipalmitate monostearate が 5.6±0.9%, glyceryl distearate monopalmitate が 1.4±0.3% が含まれていることを明らかとした. 以上のように, 既存添加物ウルシロウの安全性確認試験対象試料の成分を明らかにすることができた.

また, LC/MS/MS 分析でプロダクトイオン比を比較することにより, 脂肪酸の結合位置が異なるトリグリセリド異性体を分別定量できることを示した.

既存添加物の中には, ウルシロウのみならずいまだ国の品質規格の定められていないろう状物質が種々残されている. これらろう状物質品目間の判別が行えるよう, 各添加物品目の成分組成に基づく品質規格作成を検討することが今後必要になると考えられる. 既存添加物ウルシロウのトリグリセリド組成についてはこれまで報告されていなかったことから, 本研究により得られたウルシロウ流通製品の詳細な成分解析結果は, 今後の品質規格作成に有用であると考えられる.

## 謝辞

本研究は, 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により実施したものである. ウルシロウの収集にご協力いただいた(財)日本食品添加物協会に深謝

いたします。

## 文 献

- 1) 厚生省告示第 210 号 (1996) “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日。
- 2) 厚生省生活衛生局長通知 “食品衛生法に基づく添加物の表示等について、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)。[最終改正 平成 17 年 2 月 25 日]
- 3) 日本食品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”，東京，日本食品添加物協会，1999。
- 4) 日本食品添加物協会自主規格専門委員会編 “第三版既存添加物自主規格”，東京，日本食品添加物協会，2002。
- 5) Tachibana, S., Sakuragi, M., Sumimoto, M., Chemical conversion of extractives for the production of chemicals and fuels III. Sunlight bleaching of urushi wax. *Mokuzai Gakkaishi*, **35**, 356-361 (1989).
- 6) Kusaka, T., Composition analysis of normal plant triacylglycerols and hydroperoxidized *rac*-1-stearoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-*sn*-glycerols by liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **730**, 1-7 (1996).
- 7) Laakso, P., Characterization of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -linolenic acid oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1,291-1,300 (1997).
- 8) Neff, W. E., Byrdwell, W. C., Characterization of model triacylglycerol (triolein, trilinolein and trilinolenin) autoxidation products *via* high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **818**, 169-186 (1998).

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18年度 総括・分担研究報告書 分冊 その2

平成18年度 既存添加物の成分と品質評価に関する研究

— 既存添加物の規格化に関する調査研究—

日本食品添加物協会