

ペクチン分解物（改訂案）

Pectin Digests

定義 本品は、ペクチン（アカザ科サトウダイコン (*Beta vulgaris* Linné var. *rapa* Dumortier), キク科ヒマワリ (*Helianthus annuus* Linné), ミカン科アマダイダイ (*Citrus sinensis* Osbeck), ミカン科グレープフルーツ (*Citrus paradisi* Macf.), ミカン科ライム (*Citrus aurantifolia* Swingle), ミカン科レモン (*Citrus limon* Burm. f.) 又はバラ科リンゴ (*Malus pumila* Miller) より、水又は酸性水溶液で抽出したものより得られたもの又はこれをアルカリ性水溶液若しくは酵素で分解したものより得られたもので、メチル化ポリガラクチュロン酸等の多糖類を成分とするものをいう。) から得られた、ガラクチュロン酸を主成分とするものである。

性状 本品は、茶褐～黒褐色の液体で、特有の味とにおいがある。

確認試験 (1) 本品 1 g を水 9 ml に加えてよくかき混ぜるときゲルを形成しない。

(2) 本品の 1% 溶液 5 ml に水酸化ナトリウム溶液 (2→25) 1 ml を加えて、15 分間放置するとき、ゲル又はゲル状の沈殿を生じない。

(3) 硫酸 (8→9) 3 ml に、本品の水溶液 (1→100) 0.5 ml を加え、水浴中で 10 分間加熱した後、急冷し、カルバゾール・無水エタノール試液 0.1 ml を加えて水浴中で 15 分間加熱するとき、赤色になる。

純度試験 (1) ガラクチュロン酸 40%以上

【遊離型及びエステル化カルボキシル基の滴定】

本品約 0.5 g を精密に量り、その質量を W (mg) とする。これに煮沸して冷却した水 100 ml を加えて振り混ぜた後、フェノールフタレイン試液を 5 滴加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定し、滴定値を V_1 とする。次に 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 ml を正確に量って加え、よく振り混ぜ、15 分間静置する。さらに、0.5 mol/L 塩酸 20 ml を正確に量って加え、液の紅色が消えるまで振り混ぜ、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定し、滴定値を V_2 (エステル化カルボキシル基量) とする。終点は、激しく降り混ぜるとき、液がわずかに紅色を呈するときとする。

【アミド化カルボキシル基の滴定】

上記の滴定した液を水蒸気蒸留装置の蒸留フラスコに移し、あらかじめ 0.1 mol/L 塩酸 20 ml 及び新たに煮沸して冷却した水 150 ml を吸収用フラスコに入れ、冷却器の下端部に置く。水酸化ナトリウム溶液 (1→10) 20 ml を蒸留フラスコに入れ、泡立ち過ぎないように注意しながら加熱し、80～120 ml が留出するまで蒸留する。メチルレッド試液を数滴加え、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で滴定し、滴定値を S とする。別に空試験を行い、滴定値を B とする。

【滴定値からのガラクチュロン酸含量の算出】

$$\text{ガラクチュロン酸の含量} = \frac{19.41 \times \{V_1 + V_2 + (B - S)\}}{W \times \frac{100 - \text{本品の乾燥減量 B}}{100}} \times 100 (\%)$$

(2) 重金属 Pbとして20.0 $\mu\text{g/g}$ 以下 (1.0g, 第2法, 比較液 鉛標準液 2.0ml)

(3) 鉛 Pbとして10.0 $\mu\text{g/g}$ 以下 (1.0g, 第1法)

(4) ヒ素 As_2O_3 として4.0 $\mu\text{g/g}$ 以下 (0.5g, 第3法, 装置B)

乾燥減量 70%以下 (100°C, 3時間)

ブドウ種子抽出物中のモノマー（カテキン）類の分析報告

キッコーマン(株)研究開発本部 佐野敦志

【要旨】

- ベースラインを安定化させた逆層 HPLC グラジエントを改良した
- 産地・産年・品種の異なる 15 種のブドウ種子抽出物 (GSE) を質量分析に供した結果、含有するモノマー類は 4 種 (C、EC、Cg、ECg) であり、ガロタイプのモノマー類が全く存在せず、近接ピークは 2 量体または 3 量体であることが判明した
- HPLC-UV 法での GSE 分析法として、グラジエント条件改良に加え GSE に含有するモノマー類 (C、EC、Cg、ECg) に限定した定量法が適切であり正確である

【背景と目的】

GSE は、カテキンやエピカテキン等のモノマー類と、これらモノマー類が重合したプロアントシアニジン (PA) との混合物である。近年、食品機能性成分の健康効果が注目される中、モノマー類と PA との栄養学的な差異が見出されるにつれて区別して分析されることの重要性が高まっている。ところが、自主規格による現行の HPLC モノマー分析⁽¹⁾では PA によってベースラインが不安定であること、ブドウ種子中に含有しないモノマー類も分析項目に入っていることといった分析上の改善すべき課題がある。

そこで分析法を改良し正確な測定値を与えると共に、産地・産年・品種の異なるロットを分析し GSE 自主規格分析法⁽¹⁾を適切な方法に改善することを目的とする。

【方法】

1. モノマー類と重複または近接するピーク付近が良く分離するよう、溶離液の組成とグラジエント、流量を変更する。
2. それぞれの重複近接ピークは質量分析 (MS) により同定する。

LC-MS 条件：

装置： LCMSMS (Waters Micromass Quattro Micro ver.4.0)

HPLC： Alliance 2690 system (Waters Corp.), Flow rate: 0.2 ml/min,

column: L-column C18 2.1x150 mm (CERI),

column temperature: 28°C, Injection volume: 5 μ L

Solvent A: 0.01% HCOOHaq, Solvent B: CH₃OH containing 0.01% HCOOH

Time	A%	B%
0.0	95	5
10.0	75	25
25.0	70	30
30.0	0	100
40.0	95	5

MS 条件 : ESI-negative mode, Capillary voltage: 2.50 kV, Cone voltage: 30 V,
 Desolving plate: 350°C, Source temperature: 150°C, Desolving gas: 600 L/hr,
 Cone gas: 50 L/hr,
 MS 取り込み条件: Selected Ion Recording (SIR: m/z 289, 305, 441, 457 [$M-H^-$])

3. 分析条件が固まってきたら、原料ブドウの品種、産地、産年が異なる 15 種の GSE サンプルを分析に供し、信頼性を検証する。

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
産地	中国 K	ドイツ 1	米国	米国	米国 1	米国 2	中国 1	中国 2
年度	2004	2001	2004	2004	2003	2003	2002	2002
品種 *	K/R	M/B	WR	S	WR	WR	K/R	K/R

No.	9	10	11	12	13	14	15
産地	ドイツ 2	ドイツ 1	ドイツ 2	米国	中国 T	中国 K1	中国 K2
年度	2001	2000	2000	2004	2005	2005	2005
品種 *	M/B	M/B	M/B	WR	K/R	K/R	K/R

* K/R : 貴人香と雷司令のブレンド、WR : ホワイトリースリング、S : シャルドネ、
 M/B : ミュラートウルガウとブラックリースリングのブレンド

4. なお、分析に供した GSE は、ワイン用ブドウ (*Vitis vinifera*) の種子を含水エタノールで抽出して得られたものである。

【結果と考察】

1. 分析条件の改良

ピーク重複の低減と急グラジエントによるベースライン持ち上がりの解消を主眼とした

ODS カラム (4.6×250mm)、流速 : 1.0 ml/min、カラム温度 : 25°C

UV : 280 nm、注入量 : 10 μL

・ 溶媒 A : 0.05%(v/v)ギ酸

B : メタノール/ギ酸 = 99.95 : 0.05 (v/v)

・ グラジエント (分析時間 55 分、分析サイクル 75 分)

時間	溶媒 A	溶媒 B
0 分	95%	5%
10 分	80%	20%
30 分	75%	25%
50 分	55%	45%
55 分	0%	100%
60 分	95%	5%

【表1】

改良 HPLC 法によるモノマー類分析結果 (GSE 中のモノマー含量%, 水分補正なし)

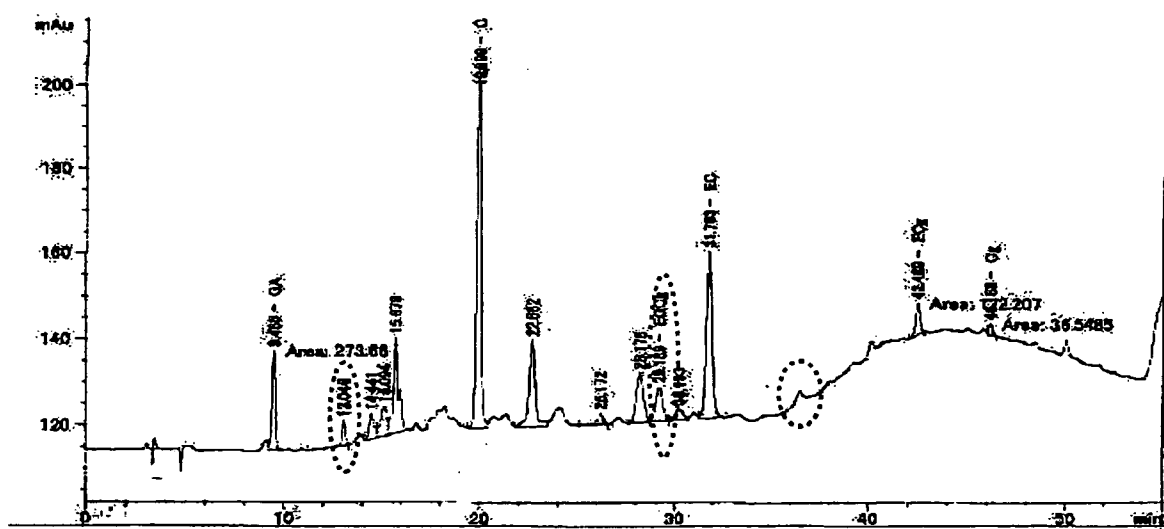
モノマー	サンプル							
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8
	中国K 2004	ドイツ1 2001	米国 2004	米国 2004	米国1 2003	米国2 2003	中国1 2002	中国2 2002
	KR	MB	WR	S	WR	WR	KR	KR
GA	0.05	0.13	0.13	0.12	0.13	0.13	0.25	0.16
C	5.2	2.7	1.9	2.5	1.6	1.9	3.1	3.0
EC	6.1	2.0	1.2	2.4	0.9	0.9	2.7	3.0
ECg	0.09	0.29	0.11	0.11	0.08	0.08	0.16	0.11
Cg	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.07	0.06
モノマー合計	11.5	5.1	3.2	5.0	2.7	3.0	6.0	6.1

concentration (%)

モノマー	サンプル						
	No.9	No.10	No.11	No.12	No.13	No.14	No.15
	ドイツ2 2001	ドイツ1 2000	ドイツ2 2000	米国 2004	中国T 2005	中国K1 2005	中国K2 2005
	MB	MB	MB	WR	KR	KR	KR
GA	0.17	0.17	0.13	0.17	0.23	0.05	0.09
C	2.6	1.8	1.8	1.4	2.4	5.4	1.8
EC	2.0	1.4	2.2	1.0	3.7	5.9	2.7
ECg	0.30	0.19	0.21	0.19	0.47	n.d.	0.12
Cg	0.07	0.06	0.05	0.06	0.08	n.d.	n.d.
モノマー合計	5.0	3.4	4.3	2.7	6.6	11.3	4.6

concentration (%)

【図1】 サンプル No.6 の改良 HPLC 分析チャート

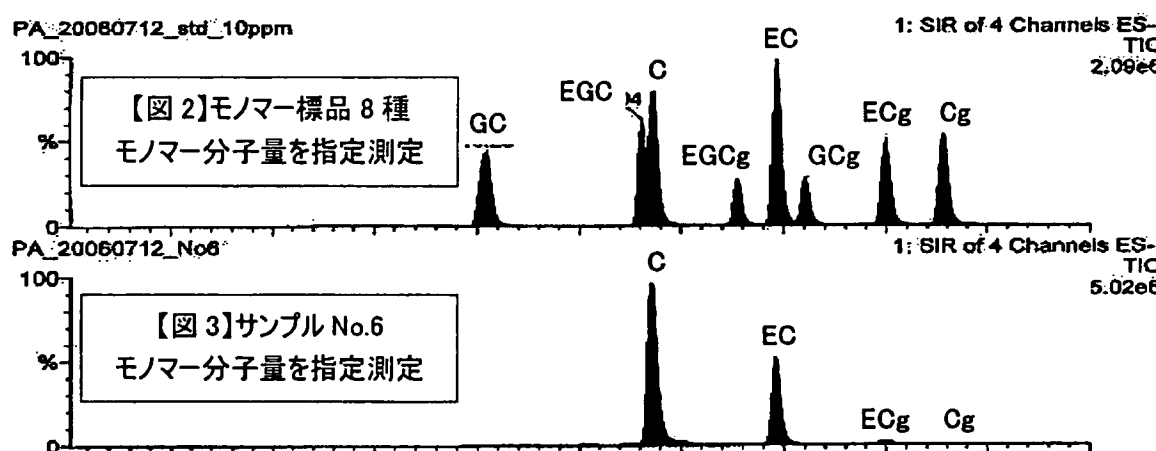


【図1】中の赤で囲んだピークは、それぞれ GC、ECg、Cg と溶出時間が近接しており、UV 検出器では安定した数値を与えなかった。

2. 質量分析

【図1】中の点線で囲んだピークが本当にモノマー類 (GC、EGCg、GCg) なのか、或いは別成分なのかを検証するために、該当ピークの質量分析を LCMS にて実施した。また、EGC 溶出時間付近のピークについても同様の理由から質量分析をおこなった。

【図2】はモノマー標品 8 種を LCMS で分析したときのチャートである。このときのモノマー類の分子量は異性体の関係から 4 種類 [m/z 289, 305, 441, 457] であり、ピーク形状と検出レベルは充分であることがわかる。一方、例示した【図3】のチャートでは、C、EC、ECg の 3 種類のみ検出されており、ガロタイプモノマー類 (GC、ECG、EGCg、GCg) は検出されなかった。他のサンプルでは C、EC、ECg のほか Cg も検出されることがあったが、ガロタイプモノマー類は分析した 15 サンプル全てで検出されなかった。Kennedy ら (2000 年)⁽²⁾ や Núñez ら (2006 年)⁽³⁾ はブドウ種子中のフラバン-3-オール類 (モノマー類) は、C と EC およびそれらの GA エステル類であると HPLC-UV 法と LC-MS 法で報告していることから、今回の結果は支持される。



さらに、HPLC-UV法でGCおよびEGC付近に見られた近接ピークは分子量 [m/z 577] を、EGCgおよびECg付近の近接ピークは分子量 [m/z 866] をそれぞれ有することから、2量体、3量体と同定された。これら質量分析の結果から、HPLC-UV法でGCやEGC等のGSEに含有しない (またはCやECと比して無視できる量の) モノマー類を定量対象にする場合は、近接ピークとの識別に特別な注意を要すると思われる。

以上の LCMS 分析の結果から、今回分析した GSE 中にはガロタイプのモノマー類は検出限界未満で、HPLC-UV 法で検出することがあったガロタイプモノマー類のピークは GSE 中に含まれる 2 量体と 3 量体であったことが判明した。

【提言】 適切で正確な GSE 中のモノマー類分析のために

- ・ グラジエント条件を例えば前述のように穏やかな条件とし、ピーク重複とベースライン安定化を図る
- ・ GSE に含有しないガロタイプのモノマー類 (GC、EGC、EGCg、GCg) は定量対象から外す

【参考文献】

- (1) 財団法人 日本健康・栄養食品協会 ブドウ種子エキス食品規格基準 (平成 16 年 7 月 1 日発行) および 日本食品衛生協会 第三版 既存添加物自主規格 (平成 14 年 11 月発行)
- (2) Kennedy JA, Troup GJ, Pilbrow JR, Hutton DR, Hewitt D, Hunter CR, Ristic R, Iland PG and Jones GP, Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Aus. J. Grape Wine Res.*, **6**, 244-254, (2000)
- (3) Verónica Núñez, Carmen Gómez-Cordovés, Begoña Bartolomé, Yun-Jeong Hong, Alyson E. Mitchell, Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *J. Sci. Food Agric.*, **86**, 915-921, (2006)

以上

ブドウ種子抽出物（改訂案）

Grape Seed Extract

定義 本品は、アメリカブドウ (*Vitis rabrusca* Linné) 又はブドウ (*Vitis vinifera* Linné) の種子から得られた、プロアントシアニジンを中心とするものである。デキストリン、果糖又はブドウ糖を含むことがある。

含量 本品を乾燥物換算したものは、プロアントシアニジンを25%以上含む。

性状 本品は、淡黄～濃褐色の粉末又は液体で、渋みを有し、わずかに特有のにおいがある。

確認試験 本品の総フラバノール約5mgに対応する量を水/エタノール混液(1:1)10mlに溶かし、この液1mlに対してn-ブタノール/塩酸混液(95:5)10mlを加えたものは、無～淡黄褐色であるが、これを97℃で30分間煮沸すると赤色を呈する。

純度試験 (1) 鉛 Pbとして10μg/g以下(1.0g, 第1法, 乾燥物換算)

(2) ヒ素 As₂O₃として4.0μg/g以下(0.50g, 第3法, 装置B, 乾燥物換算)

乾燥減量 液体試料の場合 80.0%以下(110℃, 3時間), 粉末試料の場合 8.0%以下(105℃, 2時間)

定量法 次の(1)及び(2)で得たTF及びTCの値から、次式によりプロアントシアニジンの含量を求め乾燥物換算する。

プロアントシアニジンの含量(%) = TF(%) - TC(%)

(1) 総フラバノール(TF, Total Flavanol)の定量

本品を総フラバノール約25mgに対応する量で精密に量り、水/エタノール混液(1:1)を加えて正確に100mlとし、試料液とする。試料液は用時調製する。試料液1.0mlを褐色試験管に正確に量りとり、バニリンのメタノール溶液(1→25)6.0mlを加え、よく振り混ぜる。この液に塩酸3.0mlを速やかに加え、蓋で密栓して直ちによく振り混ぜる。これを20～30℃で、20～40分間静置して検液とする。水/エタノール混液(1:1)を対照液として波長500nmにおける上記試料液の吸光度(A_T)を測定する。試料液の代わりに水/エタノール混液(1:1)1.0mlを用い、以下同様に測定した吸光度をブランク(A_B)とする。また試料液1.0mlを褐色試験管に正確に量りとり、バニリンのメタノール溶液の代わりにメタノール3.0mlを加え、以下同様に測定した吸光度をコントロール(A_C)とする。次式により検液の吸光度(A)を求める。

$$A = A_T - A_B - A_C$$

(+) カテキン約10mg, 20mg, 30mgを精密に量り、水/エタノール混液(1:1)を加えてそれぞれ正確に100mlとする。これらを用いて上記と同様に波長500nmにおける吸光度を測定し、検量線を作成する。

検液の吸光度(A)と検量線とにより、試料中の総フラバノール含量TF(%)を求める。

(2) 総カテキン類(TC, Total Catechin)の定量

本品の総フラバノール約0.1gに対応する量を精密に量り、0.1mmol/L EDTA含有の10mmol/L リン酸/メタノール混液(1:1)を加えて正確に100mlとし、検液とする。定量用カテキン、定量

用エピカテキン、定量用カテキンガレート、定量用エピカテキンガレートをそれぞれ約2mg精密に量り、メタノールを加えて正確に100mlとし、標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ10 μ lずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。検液のカテキン、エピカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレートのピーク面積 Q_{TC} 、 Q_{TEC} 、 Q_{TCG} 、 Q_{TECG} 並びに標準液のカテキン、エピカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレートのピーク面積 Q_{SC} 、 Q_{SEC} 、 Q_{SCG} 、 Q_{SECG} を測定し、次式により総カテキン類の含量TC (%)を求める。

総カテキン類の含量TC (%)

$$= (Q_{TC}/Q_{SC} \times S_C + Q_{TEC}/Q_{SEC} \times S_{EC} + Q_{TCG}/Q_{SCG} \times S_{CG} + Q_{TECG}/Q_{SECG} \times S_{ECG}) \times 100 / \text{試料の採取量 (mg)} \times 100 (\%)$$

ただし、

S_C : 標準液のカテキンの濃度 (mg/ml)

S_{EC} : 標準液のエピカテキンの濃度 (mg/ml)

S_{CG} : 標準液のカテキンガレートの濃度 (mg/ml)

S_{ECG} : 標準液のエピカテキンガレートの濃度 (mg/ml)

操作条件

検出器 紫外部吸光光度計 (測定波長 280 nm)

カラム充填剤 粒子径5 μ mの化学結合型オクタデシルシラン

カラムサイズ 内径4.6 mm、長さ25 cmのステンレス管

例えば (財) 化学物質評価研究機構 (CERI) 製のL-columnが使用できる。

カラム温度 25 $^{\circ}$ C

移動層 A 0.05% (v/v) ギ酸, B メタノール/ギ酸=99.95 : 0.05

濃度勾配

時間	移動層 A	移動層 B
0分	95%	5%
10分	80%	20%
30分	75%	25%
50分	55%	45%
55分	0%	100%
60分	95%	5%

流量 1.0 ml/分は以下の通りとする。

なお、次サンプルの注入までに、初期条件 (A:95%、B:5%) にて30分間程度、安定化のための間隔を設けること。

試薬

(一)-エピカテキン, 定量用

含量 本品は, (一)-エピカテキン ($C_{15}H_{14}O_6$) として98%以上を含む。

性状 本品は灰白色～黄褐色粉末である。

確認試験

- (1) 溶状 本品10mgを量り, アセトン/水混液 (1:1) 1.0mlを加えて溶かすとき, 液は無色～黄色澄明である。
- (2) 呈色反応 本品25mgに水/エタノール混液 (1:1) を加えて100mlとし, 試料液とする。試料液は用時調製する。試料液1.0 mlにバニリンのメタノール溶液 (1→25) 6.0mlを加え, よく振り混ぜる。この液に塩酸 3.0 mlを速やかに加え, よく振り混ぜる。これを遮光下の室温で, 20～40分間静置し, 赤～桃色の呈色を確認する。

定量法 本品12.5mgを量り, リン酸/水/アセトニトリル混液 (2:99:99) を加えて溶かして正確に100mlとし, 検液とする。この検液10 μ lを採り, 次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い, 主ピークの保持時間の約2倍の範囲について, ピーク面積を自動積分法により測定し, 総面積に対する主ピークの面積比を計算する。

操作条件 検出器 紫外外部吸収検出器 (測定波長 220nm)

カラム 内径4.6mm, 長さ25cmのステンレス管

カラム充てん剤 5 μ mの化学結合型オクタデシルシラン

カラム温度 室温 (一定)

移動相 A リン酸/水混液 (1:99), B リン酸/アセトニトリル混液 (1:99)

濃度勾配 A:B (90:10) からA:B (70:30) までの濃度勾配を30分間行う。

流量 主ピークが約8分後に現れるように調整する。

(一)-エピカテキンガレート, 定量用

含量 本品は, (一)-エピカテキンガレート ($C_{22}H_{18}O_{10}$) として98%以上を含む。

性状 本品は灰白色粉末である。

確認試験

- (1) 溶状 本品5mgを量り, 水1.0mlを加えて溶かすとき, 液は無色澄明である。
- (2) バニリン塩酸法によるフラバノールの呈色反応 (一)-エピカテキン, 定量用の確認試験を準用する。

定量法 本品25mgを量り, 水を加えて溶かして正確に100mlとし, 検液とする。この検液10 μ lを採り, 次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い, 主ピークの保持時間の約2倍の範囲について, ピーク面積を自動積分法により測定し, 総面積に対する主ピークの面積比を計算する。

操作条件 検出器 紫外外部吸収検出器 (測定波長 280nm)

カラム 内径4.6mm, 長さ25cmのステンレス管

カラム充てん剤 5 μ mの化学結合型オクタデシルシラン

カラム温度 室温 (一定)

カラム温度 室温 (一定)

移動相 アセトニトリル/酢酸エチル/リン酸(1→2,000)混液(12:2:86)を45分間通液する.

流量 主ピークが約30分後に現れるように調整する.



モウソウチク抽出物の定性分析

拝啓 益々ご清栄のこととお慶び申し上げます。

さて、表記の件につきまして、下記の通りご報告させていただきます。ご検討の程、よろしく願い申し上げます。

敬具

記

試料：モウソウチク抽出物 粉末 ①
モウソウチク抽出物 粉末 ②

抽出・精製方法：

<粉末製剤①>検体約 5g を水/メタノール混液 (1:1) 10mL で溶解し、溶けた部分をカラム分画処理に供した。

<粉末製剤②>賦形剤が多いため、検体約 10g をエタノールで抽出し、抽出液を濃縮乾燥したもの水を水/メタノール混液 (1:1) 5mL で溶解し、溶けた部分をカラム分画処理に供した。

それぞれの溶解物を、ODS シリカゲル 150mL をスラリー充填した内径 30mm、長さ 300mm のクロマトグラフ管に流し込む。ODS シリカゲルは水/メタノール混液 (7:3) で膨潤しておくものとする。水/メタノール混液 (7:3) でモウソウチク抽出物を溶出し、精製する。約 10 秒毎に 1 滴の間隔で三角フラスコに 50mL ずつ分画し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で 2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンが多く入った部分を確認し、その画分の溶媒を留去後、残留物を検体とする。

なお、HPLC にて 2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノン標準品のピークの溶出時間を確認しておき、それに準じて試料の分画を行う。HPLC の条件は以下に示す。HPLC 条件は以下の通り

HPLC 条件 :

検出器 : 紫外線吸光光度計

測定波長 : 286nm

カラム : STR ODS-II (信和化工株式会社製) 150mm×4.6 mmID、充填剤 5 μ m

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相 : 水/メタノール混液 (7 : 3)

流速 : 0.5mL/min

注入量 : 10 μ L

FT-IR 測定方法 (臭化カリウム錠剤法) :

IR 吸収測定用臭化カリウムをメノウ乳鉢ですりつぶす。そこに精製した検体を臭化カリウムの約 1/10~1/100 量を加えて、十分に粉碎・混合する (希釈)。臭化カリウムで希釈した試料を錠剤成型器 (直径 3mm、日本分光 MT-1C など) に入れ、プレスで圧縮し透明な円盤状に成型する。これを錠剤ホルダーに入れて測定する。測定器はフーリエ変換形赤外分光光度計を用いる。試料精製物の FT-IR スペクトルを 2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンのスペクトルと比較し、同様の波数の吸収を認める。

結果 :

以下に FT-IR 測定チャートを示す。

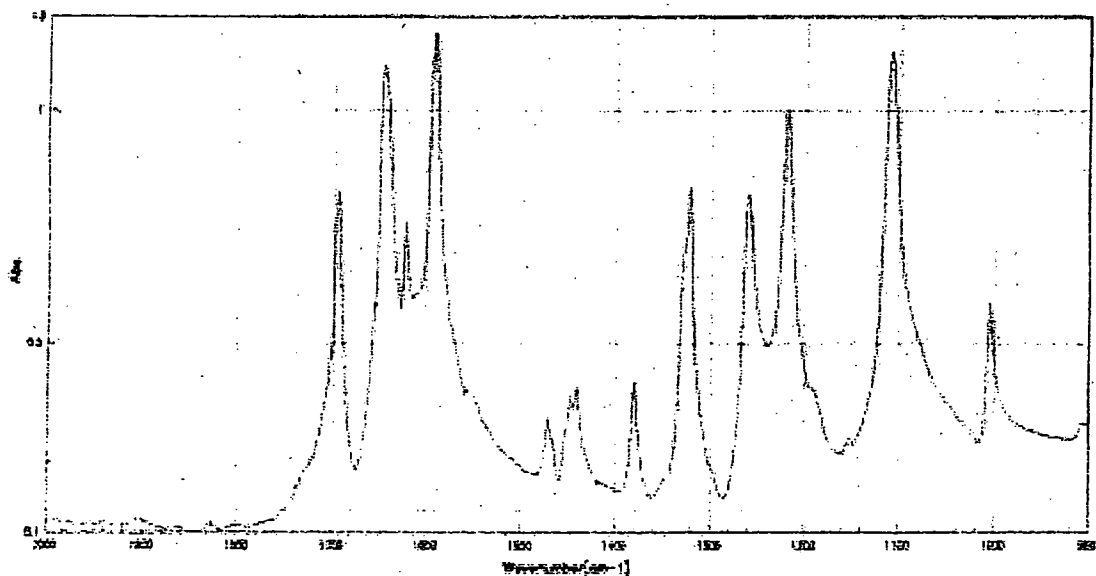


図 1 : 2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンの FT-IR 測定チャート

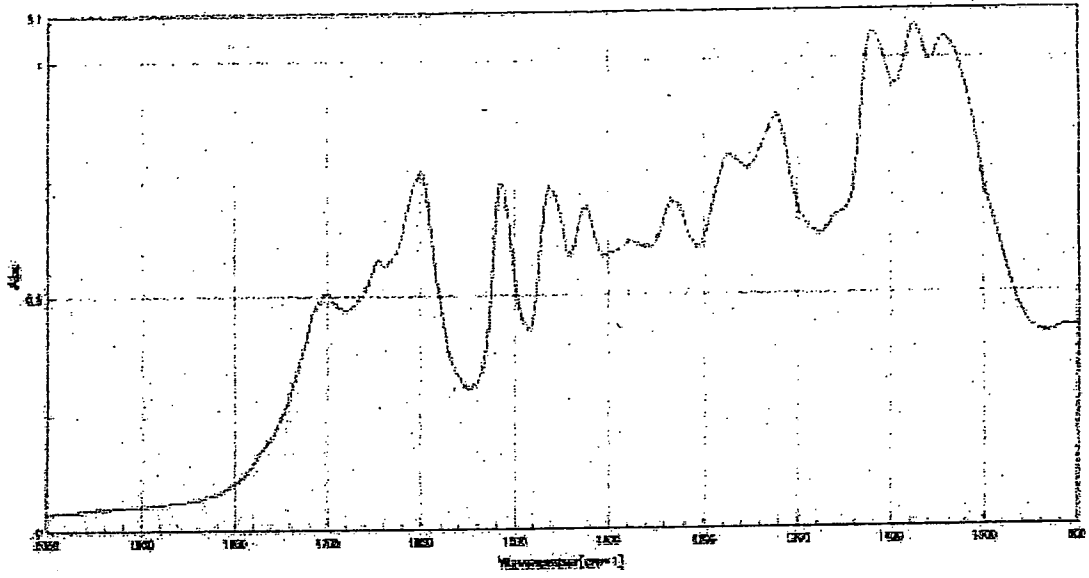


図 2 : 粉末 ①精製物

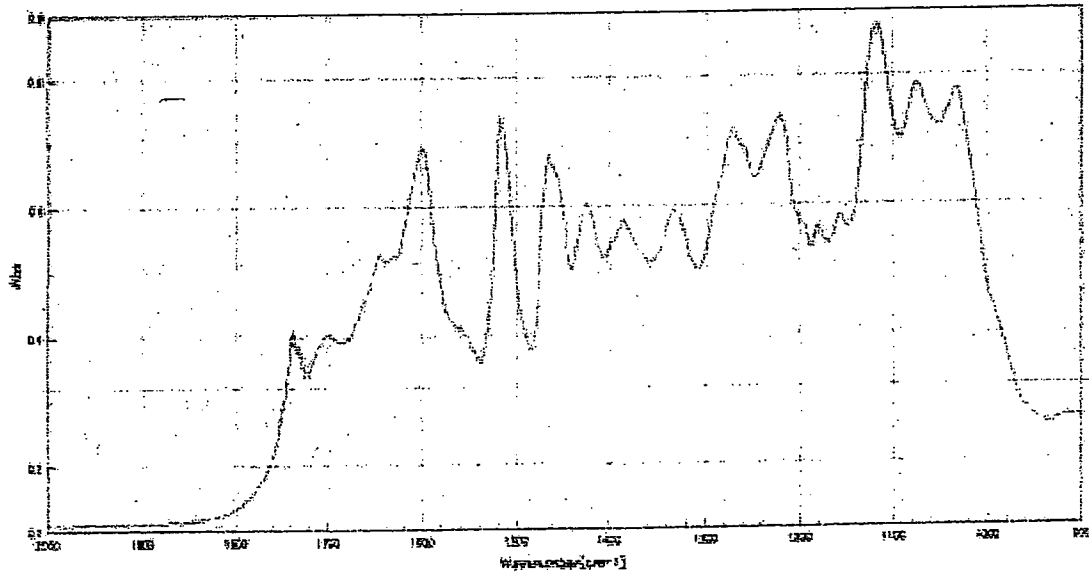


図 3 : 粉末 ②精製物

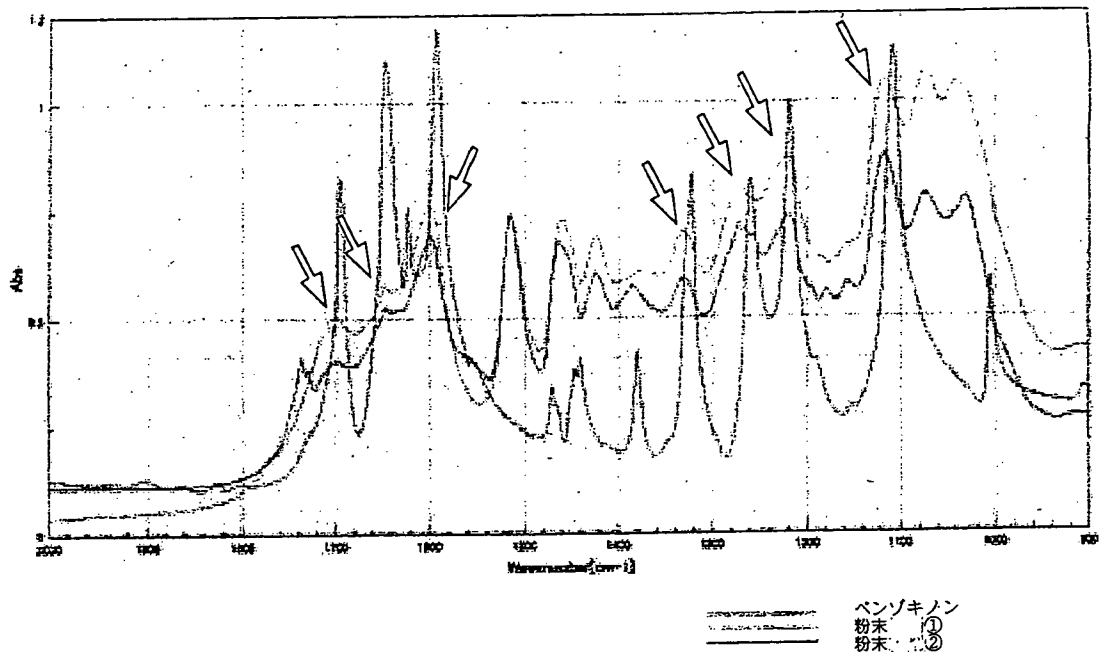


図 4：各スペクトルの比較

図に示したように、試料と標準物質は類似の波数に吸収を有していた。しかしながら、タケックス・テクノ様の試験結果に比べて吸収ピークのシャープさに欠けるのは、2回目の精製を行っていないために、検体純度が低いものと推察される。

以上

モウソウチク抽出物主成分の定量分析用溶媒比較試験

拝啓 益々ご清栄のこととお慶び申し上げます。

表記の件につきまして、下記の通りご報告させていただきます。ご検討の上、ご査収方よろしく
お願い致します。

敬具

記

1. 検体
2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノ
2. 試験目的
既存添加物自主規格第3版の「モウソウチク抽出物」規格に使用されているクロロホルムの変更について。
3. 試験概要
クロロホルム以外の溶媒を使用した場合、2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノが可溶で定量分析に適しているのかを調べる。
4. 試験方法
次の溶媒に 2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノを溶解させ、溶解度を確認する。なお、溶解する濃度は既存添加物自主規格第3版「モウソウチク抽出物」を参考に 2mg/25ml とする。
 - ① クロロホルム:メタノール=2:1
 - ② メタノール
 - ③ エタノール
 - ④ 酢酸エチル
 - ⑤ ヘキサン
 - ⑥ ジエチルエーテル

5. 結果

	溶媒	溶解度 (%)
①	クロロホルム:メタノール=2:1	100
②	メタノール	62
③	エタノール	45
④	酢酸エチル	85
⑤	ヘキサン	5
⑥	ジエチルエーテル	6

<溶解度確認方法>

各溶媒 25ml に 2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノ 2mg を溶解し、その液体をミニザルト RC15・孔径 0.45 μ m (ザルトリウス社製) にてろ過する。ろ過した液体をエバポレーターにて溶媒を気化させ、残存量を 2mg で割った値を溶解度とする。

6. 考察

結果より、クロロホルム:メタノール混液の溶解度に対し、他の溶媒では溶解度が低くなる傾向が見られました。したがって、クロロホルム未使用の溶媒では溶解が不十分であり、値の誤差が生じる為、定量分析に適さないことが示唆されます。



モウソウチク抽出物の定量用抽出溶媒比較

拝啓 益々ご清栄のこととお慶び申し上げます。

さて、表記の件につきまして、下記の通りご報告させていただきます。ご検討の程、よろしくお願ひ申し上げます。

敬具

記

試料：弊社モウソウチク抽出物製剤

抽出方法：所定の溶媒で超音波抽出し、ろ過して HPLC で定量

HPLC 条件は以下の通り

カラム：ERC-CN-1171 (ERMA OPTICAL WORKS, LTD)

6.0mm φ × 200mm、充填剤 3 μm

移動相：n-ヘキサン/エタノール (49 : 1) 混液

カラム温度：40℃

流速：1mL/min

抽出溶媒	ベンゾキノン含量	クロロホルム/メタノール 混液に対する抽出率
クロロホルム/メタノール 混液 (2 : 1)	0.0114%	—
エタノール	0.0071%	62.3%
メタノール	0.0082%	71.9%

上記のように、クロロホルム：メタノール混液抽出に対し、アルコール2種では定量値が低くなる傾向が見られました。このことは、クロロホルム使用時に比べ、アルコールのみでは抽出が不十分であり、定量分析の前処理には不適當であることを示唆しています。

以上

モウソウチク抽出物規格案検証試験

拝啓 益々ご清栄のこととお慶び申し上げます。

表記の件につきまして、下記の通りご報告させていただきます。ご検討の上、ご査収方よろしく
お願い致します。

敬具

記

1. 検体
モウソウチク抽出物
2. 試験目的
モウソウチク抽出物規格案の検証
3. 試験概要
モウソウチク抽出物を精製し、2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンに分画後、赤外吸収スペクトル法
(FT-IR)で測定し確認する。今回はモウソウチク抽出物1ロット・3回で FT-IR 測定を行う。
4. 試験方法

①分画方法

モウソウチク抽出物約 10gを水/メタノール混液(1:1)5mlで溶出し、溶けた部分を ODS シリカゲル 150
mlを充てんした内径 30mm、長さ 450mm のクロマトグラフ管に流し込む。予め、カラム中の溶媒は水/メ
タノール混液(7:3)で満たしておくものとする。

水/メタノール混液(7:3)でモウソウチク抽出物を溶出し、精製する。10~15秒毎に1滴の間隔で三角フ
ラスコに50mlずつ分画し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンを確認
し、そのピークが前後のピークと重なっていない分画区の溶媒を留去後、残留物を再度精製する。この
際には、ODSシリカゲル20mlを充てんした内径12mm、長さ300mmのクロマトグラフ管に流し込み、水/
メタノール混液(8:2)でカラムを満たし、分画区を溶出し、精製する。15秒毎に1滴の間隔で試験管に1
~2mlずつ分画し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンが多く入った
部分を確認し、その分画区の溶媒を留去後、残留物を検体とする。

なお、分画区をHPLCにかける前に、HPLCにて2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノン(標準品)のピークのリ
テンションタイムを確認し、分画時の参考にする。HPLCの条件は以下に示す。

<HPLC操作条件>

検出器 : 紫外線吸光光度計(測定波長:286nm)

カラム : 長さ×内径(mm)=150×4.6 Stype 5 μ m STR ODS-II (信和化工株式会社製)

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相 : 水/メタノール混液(7:3)

流速 : 0.5ml/分

注入量 : 10 μ l

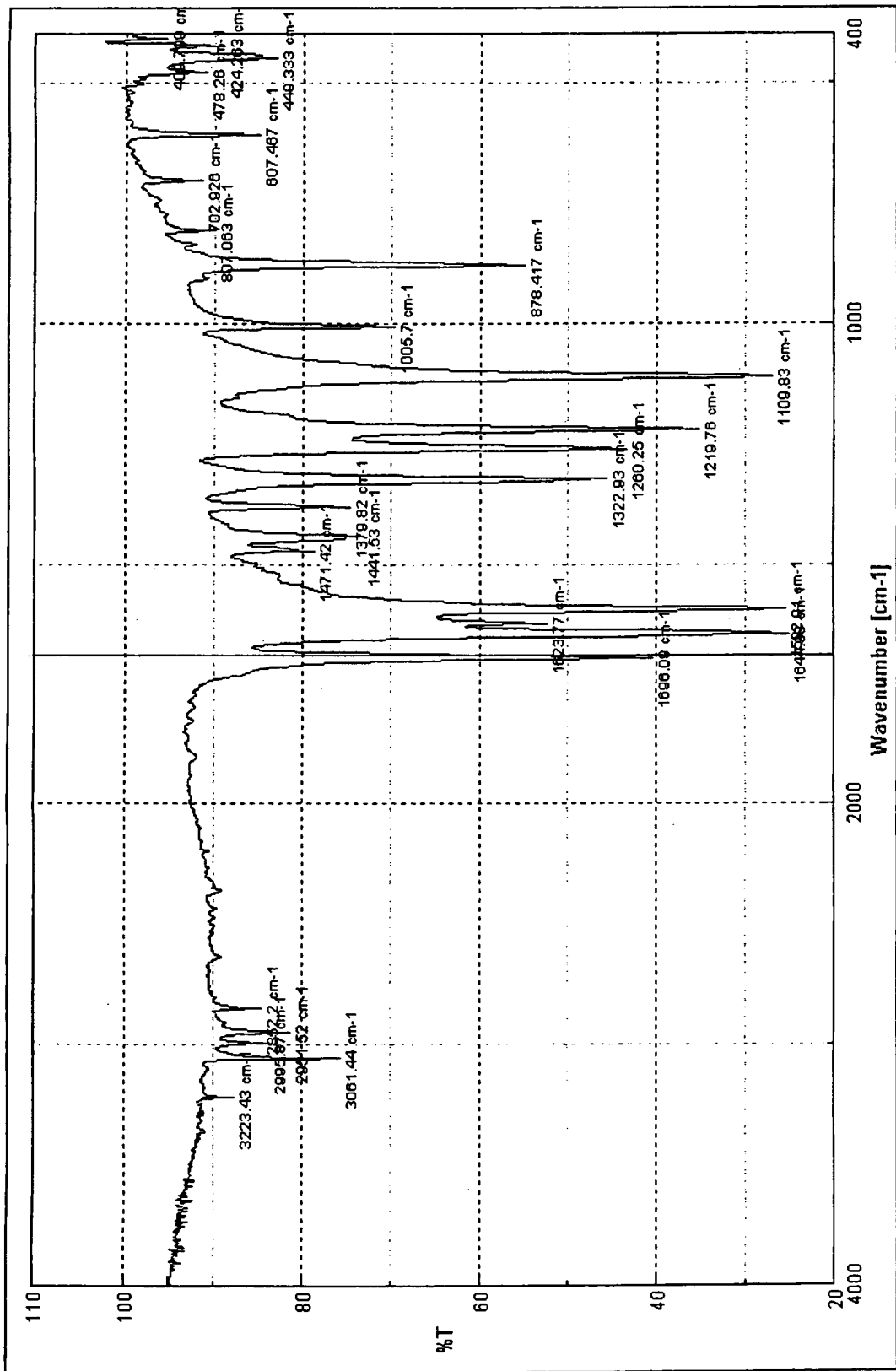
② FT-IR 測定方法 (臭化カリウム錠剤法)

IR 吸収測定用臭化カリウムをメノー乳鉢ですりつぶす。そこに精製した検体を臭化カリウムの約 1/10~
1/100量を加えて、十分に粉碎する。粉碎した試料は錠剤成型器(直径3mm)に入れ、プレスで圧縮し透
明な円盤状に成型する。これを錠剤ホルダー(3型)に入れ測定する。測定器はフーリエ変換形赤外分
光光度計を用いる。検体のスペクトルを参照スペクトルと比較するとき、同一波数
(1696,1644,1592,1322,1260,1219,1110 cm^{-1} 付近)のところに同様の強度の吸収を認める。

5. 結果

以下に FT-IR 測定チャートを示す。

2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノ



検体精製物: 1回目

