

Fig. 2 カンゾウ油性抽出物製品の
LC/UVクロマトグラム

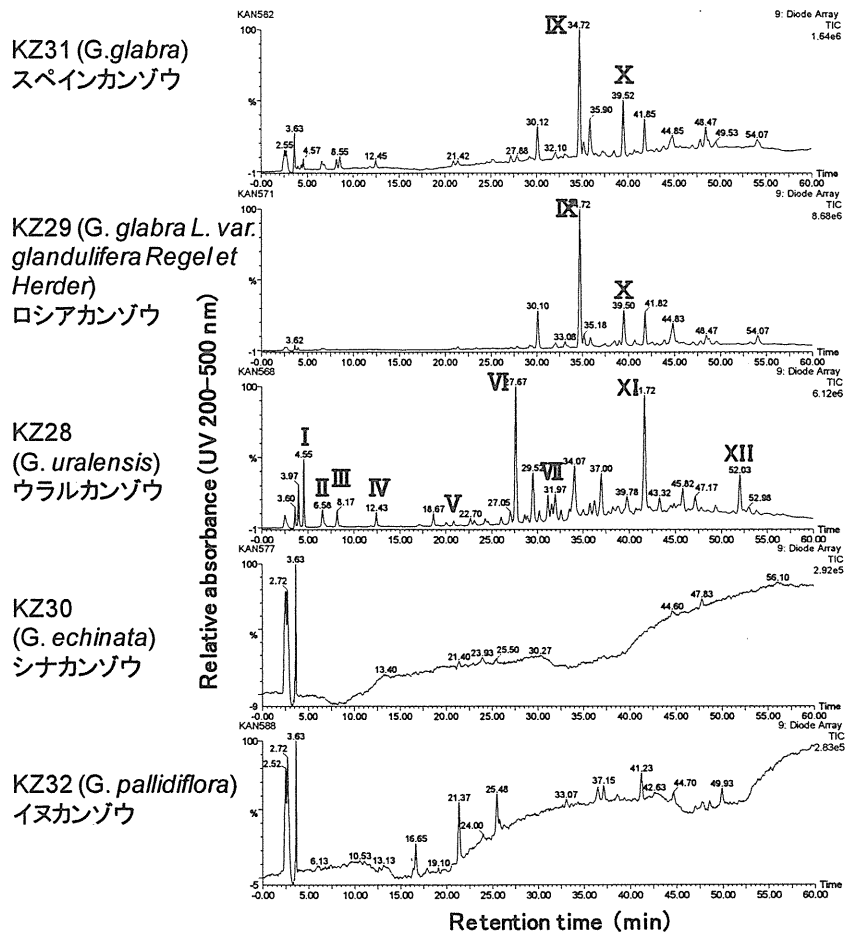


Fig. 3 カンゾウ標準植物の根からのエタノール抽出物の LC/UVクロマトグラム

Table 3 LC/MS(ES-) 定量結果

試料		濃度(%)						
		① liquiritin	② liquiritigenin	③ isoliquiritigenin	④ licochalcone A	⑤ glabridin	⑥ glycyrrhizinic acid	⑦ glycyrrhetic acid
添加物カンゾウ油性抽出物								
KZ01	原体(粉)	0.12	0.25	0.13	19.68	0.53	0.05	0.49
KZ02	原体(塊)	0.06	0.21	0.08	0.02	10.07	0.19	0.22
KZ03	原体(液)	ND	0.01	0.00	0.00	1.12	ND	0.01
KZ04	原体(液)	ND	ND	ND	ND	0.79	ND	0.12
KZ05	製剤(液)	0.01	0.01	0.01	0.00	0.83	0.02	0.02
KZ33	原体(粉)	0.01	0.08	0.15	0.08	28.35	0.02	0.08
KZ34	原体(塊)	0.07	0.23	0.11	0.03	11.63	0.16	0.29
KZ35	原体(粉)	ND	ND	ND	0.00	2.65	ND	0.55
添加物カンゾウ抽出物								
A27	原体(粉)	0.25	0.09	0.06	0.03	0.01	42.65	0.24
A326	原体(塊)	0.26	0.14	0.10	0.03	0.02	6.64	0.06
生薬(EtOH抽出物)								
KZ09		0.12	0.02	0.01	0.00	ND	0.02	0.00

ND: 定量下限未満、太字: 1 %以上

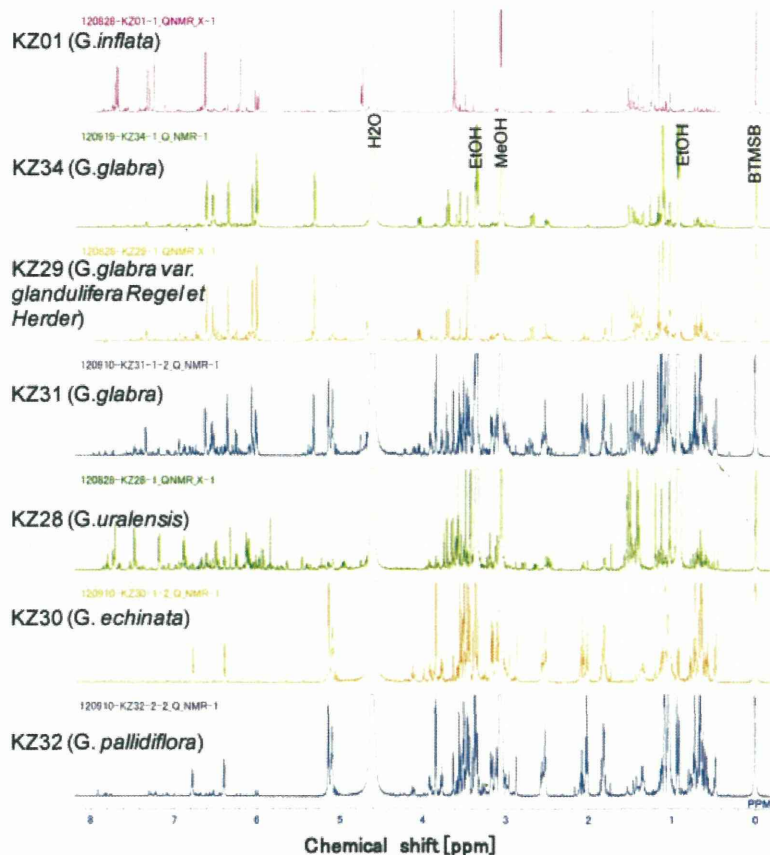


Fig. 4 カンゾウ油性抽出物製品およびカンゾウ標準植物の根からのエタノール抽出物のNMRスペクトル

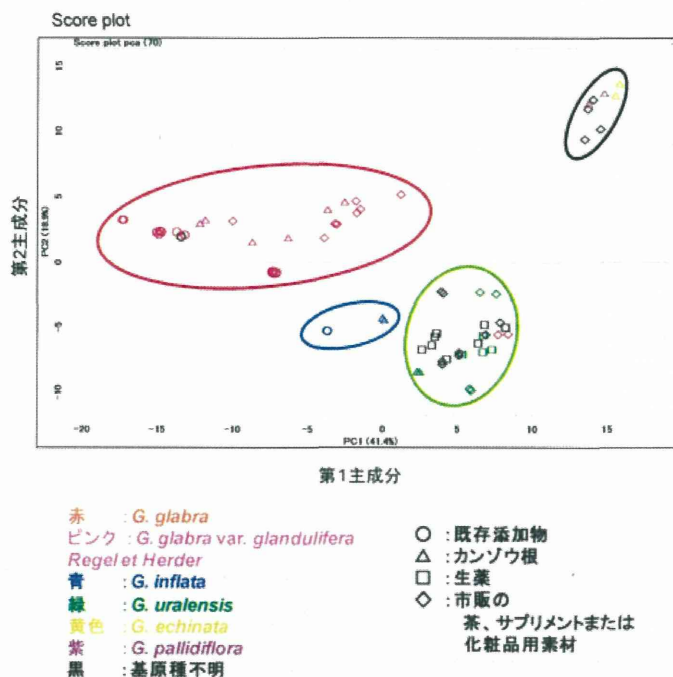


Fig. 5 各種カンゾウ由来試料のNMRスペクトル測定結果を用いた主成分分析

分担研究課題 定量NMR法の既存添加物と天然抽出物への適用に関する研究

分担研究者 水上 元

名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 既存添加物中の指標成分の定量分析への定量NMR法の適用について検討した。昨年度に報告したベニバナ赤色素中の主要色素成分であるcarthaminのqNMRによる定量について、定量法のvalidationを実施した。次に、カンゾウ抽出物中の甘味成分であるglycyrrhizic acidについて、市販標準品の純度をqNMR法によって評価した。

A. 研究目的

$^1\text{H-NMR}$ におけるシグナル面積比は分子中の個々の置換基上のプロトン数に比例している。また、一定の濃度の化合物のプロトン当たりのシグナル面積は、化合物の種類によらずに一定である。これらの特質を利用した定量NMR（qHNMR:proton-specific quantitative NMR）法は、

(1) クロマトグラフ法と異なり、検量線を作製する必要がないため、測定対象化合物の標準物質がなくても測定が可能である、(2) 内部標準物質として絶対純度が保証された認証標準物質を用いることによって、対象とする化合物の絶対純度が決定できる、という大きなメリットを有している。¹⁾

本研究では、qHNMR法のこのような特徴に着目し、既存添加物中の指標成分の定量への応用を目的として研究を実施している。本年度は、(1) 昨年度の「ベニバナ赤色素」中の赤色素成分carthaminの $^1\text{H-NMR}$ を利用する定量法に関する研究を継続し、定量法のvalidationを実施

した。さらに、天然甘味料として用いられるカンゾウ抽出物に含まれる甘味成分であるglycyrrhizic acidについて、市販標準品の純度の評価を行った。

B. 研究材料と方法

化合物

認証標準物質であるbisphenol A (NMIJ CRM 4030 A) および定量NMR用基準物質1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_6 (1,4-BTMSB)は和光純薬から購入した。その他の試薬は、すべて市販品を用いた。

「ベニバナ赤色素」製品

昨年度使用した5種類の製品のうちsample Cを用いた。Sample Cは粉末状の製品で、qHNMR法によって測定されたcarthamin含量は $10.3 \pm 0.01\%$ 、色価は1375である。

HMD濃度の測定

Hexamethyldisilane (HMD) の約10 mgを精確に秤取り、pyridine-*d*₅ 50.0mLに溶解したものをqHNMR reference stock solutionとして用いた。Bisphenol A 約10.0 mgを精秤しqHNMR reference stock solution 1.00 mLに溶解して、¹H-NMRスペクトルを測定した。HMDに由来する0 ppmのシグナル強度とPHPのメチル基水素に由来する1.62 ppmのシグナル強度との比から、qHNMR reference stock solutionに含まれるHMDの量を求めた。

「ベニバナ赤色素」中のcarthaminの定量

「ベニバナ赤色素」約150 mgまたは1.00 gを精秤し、それぞれにmethanol 約1 mLまたは約7 mLを加えて室温で30分間、超音波抽出した。抽出液を1500rpmで3分間遠心分離することにより上清を得た。この操作を3回繰り返し、上清を合わせて減圧濃縮した。得られた抽出物を1.00 mLのqHNMR reference stock solutionに溶かしたものをNMR測定用試料とした。測定用試料0.600 mLにmetanaol-*d*₄ 30.0 μLを加えてNMRを測定した。Carthaminの16位のプロトンに由来するシグナル (9.34ppm)²⁾ とHMDの0 ppmのシグナルの強度比から、測定溶液中のcarthamin量を計算した。

1,4-BTMSB溶液の作製

1,4-BTMSB (qHNMR用認証標準物質) 約25.00mgを精確に秤取りdimethylsulfoxide-*d*₆ 25.0 mLに溶解して、1,4-BTMSBの1.0 mg/mL溶液を調製した。

Glycyrrhizic acid 標準品の純度の検定

Glycyrrhizic acid 約5.00mgを正確に秤取り、上記の1,4-BTMSB溶液1.00 mlに溶解した。この溶液の0.600 mlを用いてNMRを測定した。

NMR装置と測定条件

¹H-NMRスペクトルの測定にはJEOL JNM-

ECA500 (500 MHz) を用いた。NMRの測定は、杉本らの報告¹⁾に準じて行なった。

C. 結果と考察

1. qHNMR法によるcarthamin定量法のvalidation

(1) Repeatabilityの検討

Sample C の methanol 抽出物を qHNMR reference stock solutionに溶解し、metanaol-*d*₄を加えて、qHNMR用測定条件でNMRを5回、連続して測定し、carthaminの16位のプロトンに由来するシグナル (9.34ppm) とHMDの0 ppmのシグナルの強度比をそれぞれ計算し、そのバラツキを検討した (表1)。その結果、シグナル強度比の変動係数は1.53%であった。

(2) Reproducibilityの検討

Sample Cを用いて、qHNMR法による定量を同一の日に5回繰り返して実施することにより求めた日内変動係数 (intra-day variation) と別の日に定量することによって得られた測定値の日間変動係数 (inter-day variation) は、それぞれ、3.35%と2.46%であった (表2、表3)。

(3) 定量限界

qHNMR法によるcarthaminの定量限界を求めるために、sample C抽出物を順次希釈し、シグナル面積比とcarthamin濃度との関係を検討したところ、両者は非常に高い正の相関性を示した (図1)。S/N比=5を検出限界とすると、その時のcarthamin濃度は0.24mMであった。

2. qHNMRによるglycyrrhizic acid標準品の純度の測定

カンゾウ抽出物に含まれる甘味物質であるglycyrrhizic acidの市販試薬の純度をqHNMR法を用いて評価することを目的として研究を実施した。まず、glycyrrhizic acidのNMRスペクトル

を測定したところ、H-12 (5.58 ppm, singlet)、H-1'' (4.64ppm, doublet)、H-1' (4.42ppm, doublet) のシグナル³⁾が明瞭に観察された(図2A、B)。そこで、これらのプロトンシグナルのうちもっとも低磁場側にあり、かつシングレットであるH-12のシグナルを対象として、qHNMR用の認証標準物質であるBTMSBを基準としてglycyrrhizic acidの純度を求めた(表4)。Glycyrrhizic Acid Standard (99.0%)のqHNMR純度は67.4%、Glycyrrhizic Acid Disodium Salt (96.0~102.0%)のqHNMR純度は73.5%であり、いずれも表示純度よりはかなり低い値を示した。さらに検体数を増やして検討するとともに、HPLCピーク面積などとの比較を行っていくことが必要である。

D. 結論

昨年度報告した「ベニバナ赤色素」中のcarthamin含量のqHNMR法による定量について補足的な検討を行い、昨年度の研究で使用した16位のプロトンに加えて、8,8'位および9,9'位のプロトンを用いても定量可能であり、測定値は非常によく一致することを示した。qHNMR法によって得た定量値は、文献上に報告されている吸光係数を用いる方法に比較して低くなった。

Glycyrrhizic acidの12位のシグナルを用いて市販のglycyrrhizic acid試薬の純度を評価できた。このようにして純度を評価した標準品を用いてHPLCの定量が可能になるものと考えられる。

引用文献

- 1) 田原麻衣子、杉本直樹、末松孝子、有福和紀、斉藤 剛、井原俊英、吉田雄一、多田敦子、久保田領志、清水久美子、山崎 壮、棚元憲一、中澤裕之、西村哲治：qNMRに基づく有機リン系農薬イソキササンチンオキシソンの品質管理、*日本食品化学会雑誌* **16**, 28-33 (2010).
- 2) Sato, K., Sugimoto, N., Ohta, M., Yamazaki, T., Maitani, T., Tanamoto, K.: Structure determination of minor red pigment in carthamus red colorant isolated by preparative LC/MS, *Food Additives and Contaminants*, **20**, 1015-1012 (2003).
- 3) Baltina, L. A., Kunert, O., Fatykhov, A. A., Kondratenko, R. M., Spirikhin, L. V., Baltina (Jr.), L. A., Galin, F. Z., Tolstikov, G. A., Haslinger, E.: High-resolution ¹H and ¹³C NMR of glycyrrhizic acid and its esters, *Chemistry of Natural Compounds*, **41**, 432-435.

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 同一のサンプルを5回繰り返して測定したときのcarthaminとHMDのシグナル面積比

測定番号	シグナル面積比	平均値	標準偏差	変動係数(%)
1	1.44			
2	1.40			
3	1.44	1.44	0.0219	1.53
4	1.44			
5	1.46			

表2 qHMR法によるcarthamin定量の日内変動

測定番号	サンプル重量(mg)	シグナル面積比	シグナル面積比/サンプル重量
1	49.3	1.44	0.0292
2	49.5	1.52	0.0307
3	50.9	1.48	0.0291
4	49.9	1.45	0.0291
5	49.8	1.55	0.0311
平均値			0.0298
標準偏差			0.00100
変動係数(%)			3.35

同じベニバナ赤色素製品を用いて秤量から測定までを5回並行して行った。

表3 qHMR法によるcarthamin定量の日間変動

測定日	サンプル重量(mg)	シグナル面積比	シグナル面積比/サンプル重量
A	49.3	1.44	0.162
B	50.4	1.53	0.169
C	49.7	1.45	0.162
平均値			0.164
標準偏差			0.00404
変動係数(%)			2.46

表4 qHMR法によるglycyrrhizic acid試薬の純度評価

試薬名	表示純度	qHNMR 純度
Glycyrrhithic acid Standard	>99.0% (HPLC)	67.4±1.6%
Glycyrrhizic acid dipotassium salt	96.0~102%	73.5±2.0%

mean±SD (n=5)

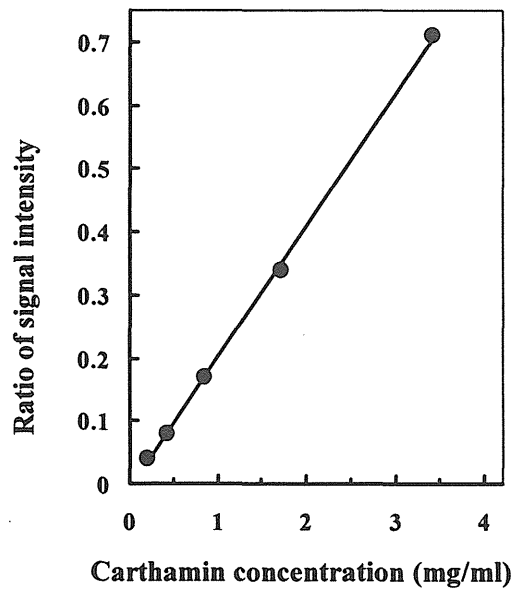


図1 qHNMR測定液中のcarthamin濃度とcarthamin H-16シグナルとHMDシグナルの面積比

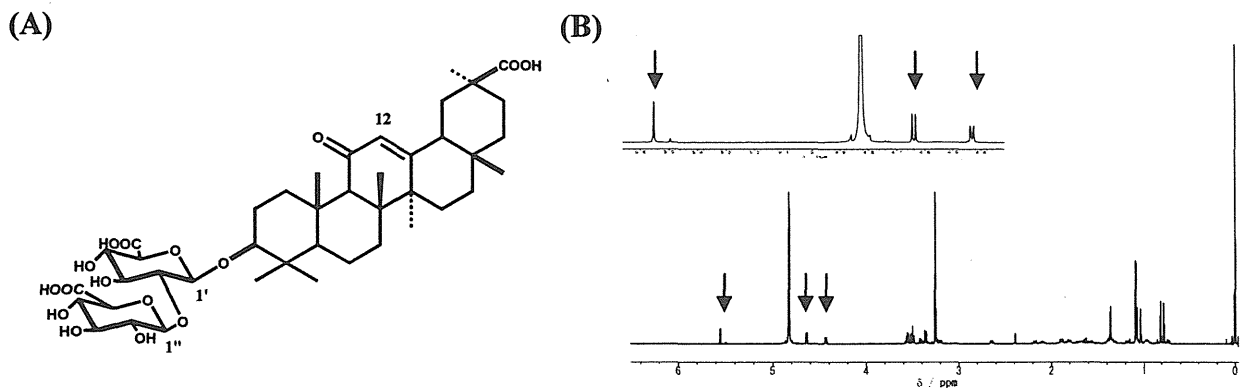


図2 (A) Glycyrrhizic acidの化学構造。(B) Glycyrrhizic acidの¹H-NMRスペクトル。矢印は、低磁場側からH-2, H-1', H-1''のシグナルを示している。

カラメルⅢ中の2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールのHPLC及びLC/MSによる分析法

研究協力者 秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 室長

研究要旨 . カラメル III(アンモニウム化合物添加)に含まれる2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール(THI)を, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)と反応させてヒドラゾン(THI-DNPH)とした後にHPLCで分離して定量する純度試験において, 第8版食品添加物公定書の方法では夾雑物との分離が不十分であるため, カラム温度を30°Cに固定してHPLCの移動相の条件を検討した. また, 8版公定書の方法と定量値を比較し, さらにLC/MSで定量した場合と定量値との比較を行った. その結果, 移動相条件を変更した改良法で得られた定量値は第8版公定書の方法で得られた定量値より高い値を与えた. 別にLC/MS法により定量分析を行った結果, 第8版公定書の方法で得られた定量値より高い値が得られたが, この値は改良法により得られた定量値と同等であった. この結果から本改良法は, 規格法より正確に定量できることが示唆された.

A. 研究目的

食品添加物色素のカラメル III(製造時にアンモニウム化合物添加)にはラットにおいてリンパ球減少作用などの免疫毒性が報告されている2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール(THI, Fig. 1)が検出される可能性がある¹⁻³⁾, 日本の食品添加物規格のカラメル IIIの規格において, THI 定量法として2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH, Fig. 1)で誘導体化後にHPLC法で定量する方法(第8版公定書の方法, 以下, 公定法)が純度試験に設定されている(資料参照)^{4,5)}. この方法はKröplienらに確立された方法で⁶⁾, JECFA規格⁷⁾, EU規格, FCC規格でも同様の方法が定められている.

本法はカラメル IIIから2種類の陽イオン交換カラムを組み合わせたカラムでTHIを精製した後, DNPHと反応させてヒドラゾン(THI-DNPH, Fig. 1)に誘導体化後に, オクチルカラムを用いて0.1mol/Lリン酸/メタノール(1:1)を移動相とするHPLC法で分離して定量する方法である.

しかしながら, 公定法では夾雑物との分離が不十分であることが多く, 定量値の信頼性に問題点があった. また, JECFA規格には粒子径10µmの破碎型充填剤のHPLC用オクチルカラムが推奨されているが, 近年市販されているHPLC用オクチルカラムは粒子径5µmのビーズ状充填剤が一般的である.

そこで昨年度, 広く市販されているHPLC用オクチルカラムを用いて, THI-DNPHと不純物の分離と定量値の信頼性に対する移動相の影響やカラムの種類の影響を検討し, 極大吸収波長359nmの不純物ピークAと分離できた場合に正しい定量値が得られると考えられること, 移動相比の違いによりこのピークとの分離が可能になること, 同じ移動相比でもカラムにより分離パターンが異なることを見いだした.

今年度の本研究では, カラム温度を一定にした場合の分離を確認し, 8版公定書の方法と定量値を比較し, さらにLC/MSで定量した場合と定量値との比較を行った.

B. 研究方法

1. 試料, 試薬および器具

キャラメル III 製品は日本キャラメル工業会より昨年度入手した6製品のうち1製品, H23-5A(粉末製品)を使用した. THI は日本キャラメル工業会より入手した. リン酸, DNPH, メタノール, エタノールは特級の試薬を用いた. ただし HPLC の溶媒には HPLC 用メタノールを用いた. 組み合わせカラムは公定書規格に合う物を製造して使用した. 上部カラム充填剤として Amberlite CG-50 を, 下部カラム充填剤として Dowex 50W-X8 を使用した. いずれも和光純薬工業から購入した.

2. 検液および THI-DNPH の調製

公定書の方法に従って製品から検液を調製し, また, THI から THI-DNPH を合成し, THI-DNPH をメタノールに溶解して 0, 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ としたものを標準液として用いた.

3. HPLC 分析条件

HPLC 装置は Alliance Separations Module 2695 および Photodiode Array Detector 2996 (Waters)を用いた. 以下の3種のオクチルカラムを使用した.

カラム A: LiChrosorb RP-8, 4.6 mm i.d. \times 250 mm, 10 μm (GL Science).

カラム B: TSKgel Octyl-80Ts, 4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μm (東ソー).

カラム C: Wakosil-II 5C8 HG, 4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μm (和光純薬工業).

カラム温度は 30 $^{\circ}\text{C}$ とした. 移動相は 0.1 mol/L リン酸/メタノール混液(7 : 3)とした. 流量はカラム A では THI-DNPH の保持時間が 6.3 \pm 0.1 min となるように 0.7 mL/min に調整し, カラム B および C では 0.8 mL/min とした. 検出器の測定

波長は 200–500 nm とし, 定量では 385 nm とした.

4. LC/MS 分析条件

LC/MS 装置は ACQUITY UPLC/SQD system (Waters)を用いた. 以下の3種の ODS カラムを使用した.

カラム D: L-column2 ODS, 2.1 mm i.d. \times 150 mm, 3 μm (化学物質評価研究機構).

カラム E: Inertsil ODS-4, 2.1 mm i.d. \times 150 mm, 3 μm (GL Science).

カラム F: TSKgel ODS-100V, 2.0 mm i.d. \times 150 mm, 3 μm (東ソー).

その他の条件は以下の通りである. カラム温度: 30 $^{\circ}\text{C}$, 移動相: 0.1%ギ酸/メタノール混液(7 : 3), 流量: 0.2 mL/min, イオン化: ESI positive, キャピラリー電圧: 3.0 kV, コーン電圧: 30 V, ソース温度: 110 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶媒温度: 350 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶媒ガス流量: 800 L/hr, コーンガス流量: 30 L/hr, 検出: SIR mode, m/z 411.

C. 研究結果および考察

1. カラム温度および移動相の検討

カラム A は粒径が 10 μm の破碎型充填剤のオクチルカラム, カラム B とカラム C は粒径 5 μm のビーズ状充填剤のオクチルカラムである. 粒径 5 μm の典型的なオクチルカラムであるカラム B と予備検討により, 最も THI 含量が高いと判定された試料 H23-5A から調製した検液を用いて, カラム温度を 30 $^{\circ}\text{C}$, 移動相組成比は昨年度の検討で良好であった 0.1 mol/L リン酸:メタノール = 7 : 3 に固定して検討を行った. その結果, 常温で行った昨年度と同様に THI-DNPH のピークが夾雑物のピーク A と完全に分離した. HPLC の移動相の改良として, 組成比 7 : 3 の条件を用いることが正確な定量値を得るためには適当と

考えられた。

2. 公定法, 改良法およびLC/MS法による定量値の比較

試料 H23-5A から検液の調製を 3 回行い, 調製された 3 検液について粒子径 10 μm の破碎型充填剤のカラム A を用い, THI-DNPH の保持時間が 6.3 ± 0.1 min となるように流量を 0.7 mL/min に調整し試験した。これは公定法の測定条件である。次に, 同一の 3 検液を用いて, 粒子径 5 μm のカラム B およびカラム C を用いて改良移動相で試験した。公定法および 2 種のカラムと改良移動相 (0.1 mol/L リン酸/メタノール混液 (7 : 3)) で評価した典型的なクロマトグラムを Fig. 2 に示した。カラム A を用いた公定法では THI-DNPH のピークはベースラインが大きく隆起している時間に溶出されたが, 改良法ではベースラインの隆起が生じなかった。試料中の THI 含量を算出したところ, いずれの検液においても改良移動相を用いた方法が従来法と比べ高い定量値を示した (Table 1)。また, 検液調製は従来規格試験法に従ったが, すべての定量値の標準偏差 (SD) が小さいことから, 従来規格試験法の検液調製法には問題がないことが示唆された。

次に, 得られた定量値の妥当性を確認するため, LC/MS を用いた試験を行った。従来規格試験法, 改良移動相を用いた方法, ODS カラムを用いた分析例⁸⁾の移動相はすべて不揮発性の酸であるリン酸を高い濃度で含有していることから, LC/MS には不適であるため, 揮発性の酸として 0.1%ギ酸を用い, 3 種の ODS カラムについて検討した。先に調製された 3 検液における定量値を求めた結果, THI-DNPH は UV 385 nm 検出では夾雑物の影響によりベースラインが大きく隆起し, また夾雑物のピークとの分離が良

好ではなかった。しかし, ESI ポジティブモードにおいて, $[\text{M}+\text{H}]^+$ イオンである m/z 411 を SIR 測定したところ, ほぼ単一のピークとして検出することができた (Fig. 3)。SIR 測定による THI-DNPH のピーク面積から絶対検量線法により検液中の THI-DNPH 濃度を算出した。LC/MS を用いた方法においては, 3 種類の ODS カラムを用いて試料中 THI 含量を算出したが, 得られた定量値はいずれも同等な値を示した (Table 2)。

LC/MS 法による定量値と, 従来規格試験法および改良法の定量値を比較したところ, 従来規格試験法が LC/MS 法と比べて有意な差ではないが若干低い値を示したが, 改良法は LC/MS 法と同等の値を示した (Table 2)。

D. 結論

以上, カラメル III 中の THI の日本の規格試験法において THI のピークと夾雑ピークとの分離が不十分であり, 定量精度の改善が必要であったことから, 昨年度移動相条件の最適化を検討し, 今年度はさらに改良した。最適化された改良法による定量値の信頼性を検証するため, LC/MS 法を用いて検討した結果, 改良法が従来の規格試験法に比べ, 正確な定量値を算出できることが示唆された。

E. 参考文献

- 1) Sinkeldam, E. J., de Groot, A. P., van den Berg, H., Chappel, C. I. : The effect of pyridoxine on the number of lymphocytes in blood of rats fed Caramel Colour III. *Food Chem. Toxicol.*, **26**, 195–203 (1988).
- 2) Kröplien, U., Rosdorfer, J., van der Greef, J., Long R. C., Jr., Goldstein, J. H., : 2-Acetyl-4(5)-(tetrahydroxybutyl)-imidazole: Detection in commercial caramel colour III and

preparation by a model browning reaction. *J. Org. Chem.*, **50**, 1131–1133 (1985).

- 3) Houben G. F., Penninks A. H., 1994. Immunotoxicity of the colour additive Caramel Colour III; A review on complicated issues in the safety evaluation of a food additive. *Toxicology*, **91**, 289–302 (1994).
- 4) Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 7th Ed., Ministry of Health and Welfare, Japan (1999).
- 5) Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 8th Ed., Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (2007).
- 6) Kröplien, U.: Quantitative analysis of 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutylimidazole. *J. Chromatogr.*, **362**, 286–290 (1986).
- 7) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 74th Session ed., “Compendium of food additive specifications”, Rome, FAO, 2011, p. 18-19. (ISBN 978-92-5-107004-8)
- 8) Sakamoto-Sasaki, S., Goda, Y., Maitani, T. : Content of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole in commercial caramel color products. *Jpn. J. Food Chem.*, **5**, 47–50 (1998).

F. 研究発表

1. 論文発表

なし.

2. 学会発表

秋山卓美, 関口若菜, 山崎壮, 穂山浩, カラメルⅢ中 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールの HPLC 分析法. 日本食品衛生学会第 103 回学術講演会 (2012 年 5 月, 東京).

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし.

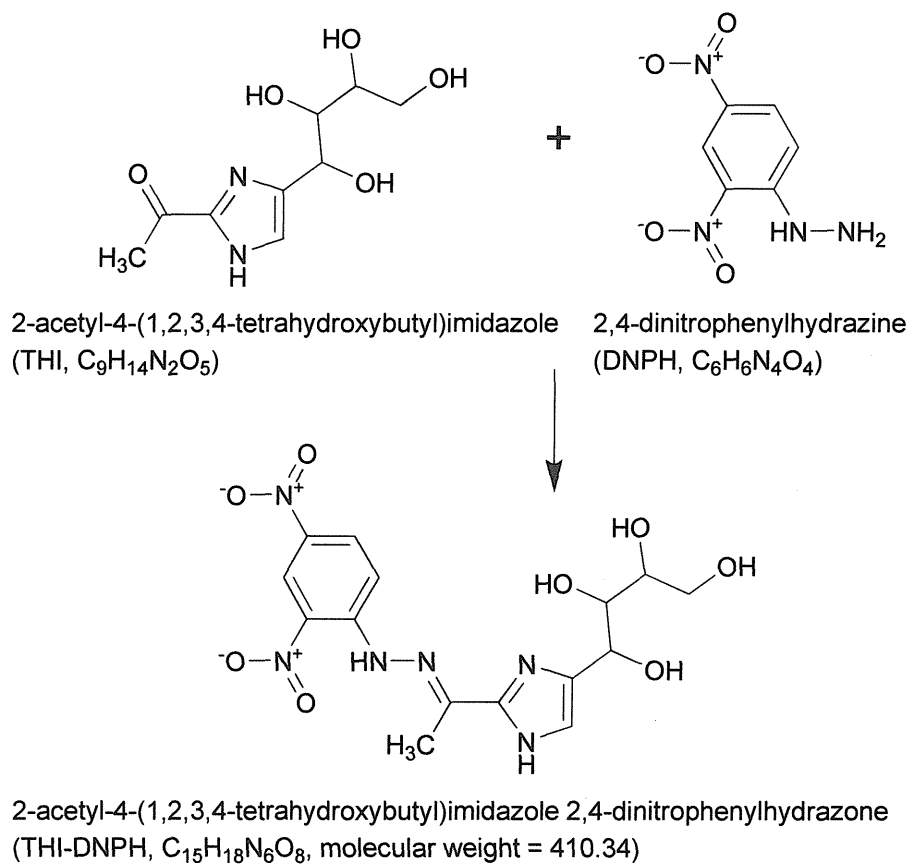


Fig. 1. Structure of 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole (THI).

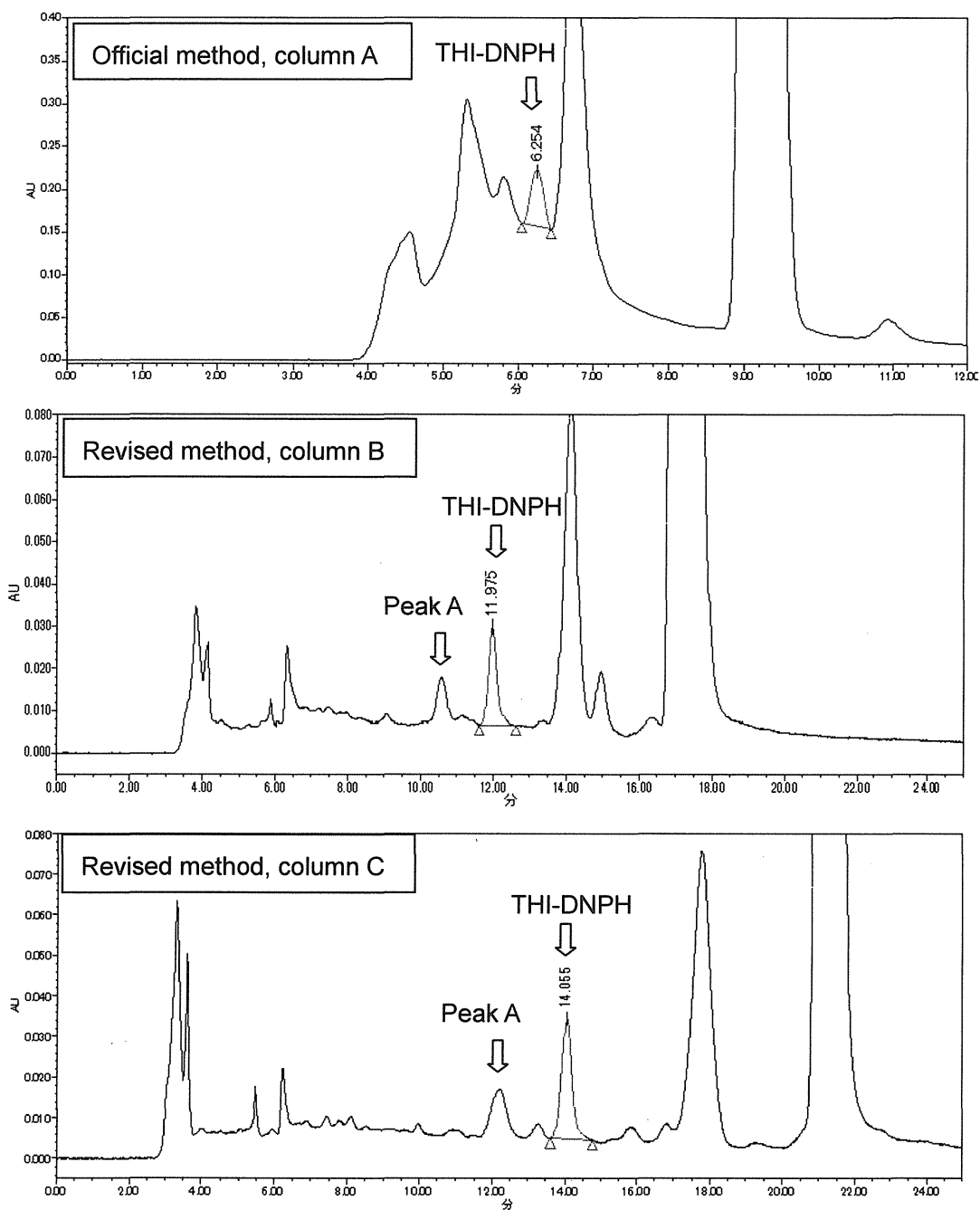


Fig. 2. HPLC chromatograms of test solution for official and revised methods.

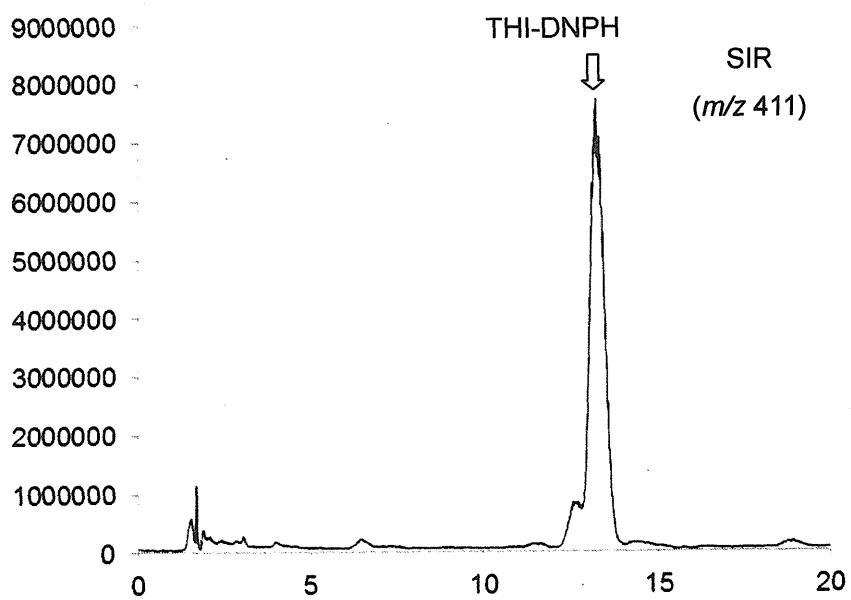
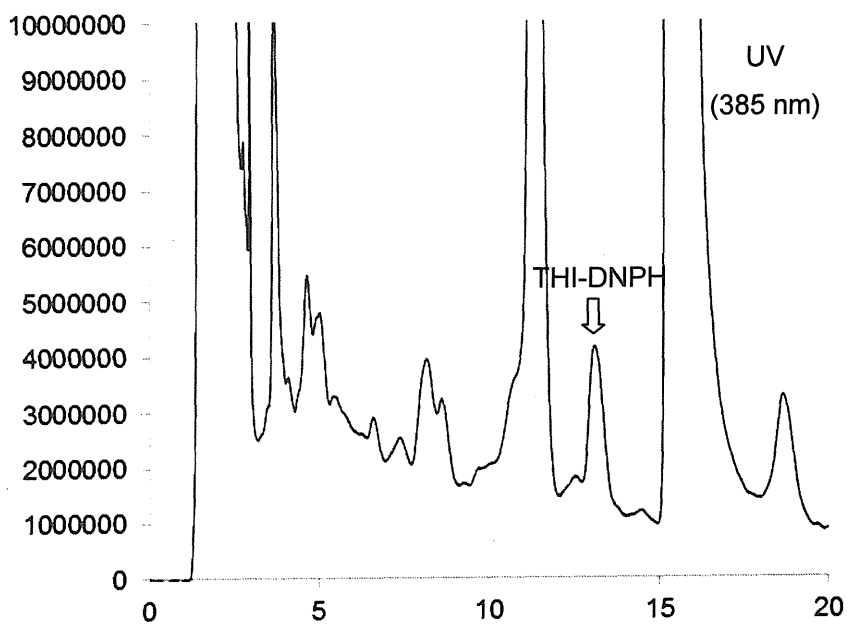


Fig. 3. LC/MS chromatograms of test solution separated with the column F.

Table 1. Amount of THI determined by the official method and the revised method.

Test solution	Method	Column	Amount of THI ($\mu\text{g/g}$, average \pm SD)
1	Official	A	25.55 \pm 1.44
	Revised	B	28.33 \pm 0.65
		C	28.08 \pm 0.07
2	Official	A	25.96 \pm 2.33
	Revised	B	29.88 \pm 0.89
		C	27.73 \pm 0.12
3	Official	A	23.08 \pm 0.37
	Revised	B	31.74 \pm 0.31
		C	26.80 \pm 0.09

Table 2. Amount of THI determined by the official method, the revised method and the LC/MS method.

Method	Column	Amount of THI ($\mu\text{g/g}$, average \pm SD)
Official	A	24.86 \pm 1.56
Revised	B	29.99 \pm 1.71
	C	27.54 \pm 0.66
LC/MS*	D	30.24 \pm 1.61
	E	31.32 \pm 1.57
	F	31.88 \pm 1.51

* Detected in SIR mode.

資料. 第 8 版食品添加物公定書純度試験(9)

(9) 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール
40 μ g/g 以下(固形物換算)

(i) 装置 組合わせカラム

概略は次の図による。ただし、部品の接続部は標準すり合わせガラス接続とする。

A: 滴下漏斗(100ml)

B: テフロン製コック

C: ガラスカラム 内径 12.5mm, 長さ 150mm (接続部分を含む) 又は内径 10mm, 長さ 200mm(接続部分を含む)

D: 弱酸性陽イオン交換樹脂(微粒)

E: 綿栓

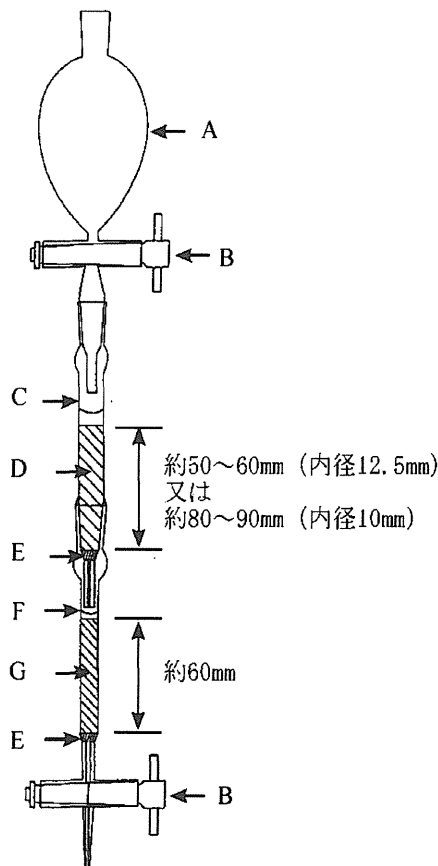
F: ガラスカラム 内径 10mm, 長さ 175mm (接続部分を含む)

G: 強酸性陽イオン交換樹脂(微粒)

(ii) 操作法

本品 0.20~0.25g を精密に量り、水 3ml を加えて溶かし、試料液とする。試料液を組合わせカラムの上側のカラム C に定量的に移す。カラムを

水約 100ml で洗浄する。上側のカラム C を外し、滴下漏斗 A を下側のカラム F に接続した後、カラム F を 0.5mol/L 塩酸溶液で溶出する。最初の溶出液 10ml を捨て、その後に溶出液 35ml を集める。その溶液を 40 $^{\circ}$ C, 2.0kPa で乾燥状態まで濃縮する。そのシロップ状の残留物をカルボニル基除去メタノール 250 μ l で溶解し、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン塩酸塩試液 250 μ l を加える。その反応混合物をセプタムキャップ付きのガラス瓶に移し室温で 5 時間保管し、検液とする。別に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 0.50g を塩酸 1ml に加えてかくはんした後、エタノール 10ml を加えて、水浴上で溶液になるまで加熱する。2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 0.1g をその熱い溶液に加える。数分で 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの結晶化が始まり、室温まで冷却し結晶化が完全になったら、ろ過分離する。この 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール-2,4-ジニトロフェニルヒドラジンをエタノール 5ml 当たり塩酸 1 滴を加えたエタノールから再結晶することにより精製する。精製した結晶をろ過分離し、デシケーター中で乾燥する。この約 0.01g を精密に量り、カルボニル基除去メタノールで正確に 100ml とする。この溶液をカルボニル基除去メタノールで希釈して、0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml の標準液を調製する。検液及び標準液をそれぞれ 5 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。それぞれの標準液のピーク面積を測定し、検量線を作成する。検液のピーク面積を測定し、検量線を用いて 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾールの量を求める。ただし、



2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン 100 μ g/ml は 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 47.58 μ g/ml に相当する.

操作条件

検出器 紫外吸光光度計(測定波長 385nm)

カラム充てん剤 10 μ m の液体クロマトグラフィー用オクチルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 4.6mm, 長さ 25cm のステンレス管

カラム温度 常温

移動相 0.1mol/L リン酸/メタノール混液(1:1)

流量 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの保持時間が 6.3 \pm 0.1 分となるように調整する.