

## 天然添加物「グレープフルーツ種子抽出物」の HPLC および LC/MS による成分分析

坂元 史歩・佐藤 恭子・米谷 民雄・山田 隆

### Analysis of Components in Natural Food Additive “Grapefruit seed extract” by HPLC and LC/MS

Shiho Sakamoto, Kyoko Sato, Tamio Maitani and Takashi Yamada

The components in a commercial natural food additive “Grapefruit seed extract” and the ethanol extract of grapefruit seeds were analyzed by HPLC and LC/MS. The HPLC chromatogram of the commercial grapefruit seed extract was quite different from that of the ethanol extract of grapefruit seeds. Three main peaks were observed in the chromatogram of the commercial grapefruit seed extract. By comparison of the retention times and the absorption spectra with those of authentic samples, two peaks were ascribed to methyl-*p*-hydroxybenzoate and 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether (triclosan). Triclosan was also identified by LC/MS by using the negative electrospray ionization method.

**Keywords** : grapefruit seed extract, 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether, methyl-*p*-hydroxybenzoate, HPLC, LC/MS

(Received May 31, 1996)

#### 緒 言

「食品衛生法および栄養改善法の一部を改正する法律」<sup>1)</sup>が、平成7年5月24日に公布された。この法律改正によって、新たに開発された天然由来の添加物（以下、天然添加物）は、香料や食材（一般に食品として飲食に供されるものであって添加物として使用されるもの）を除き、これまでの化学的合成品の食品添加物（以下、合成添加物）の場合と同様、指定制度が適用されることになった。しかし、法律改正時点で既に使用されていた天然添加物は、「既存添加物名簿」<sup>2)</sup>として同年8月10日に告示され、引き続き使用できるとされているが、順次規格基準を作成していく必要がある。

「グレープフルーツ種子抽出物」は、「既存添加物名簿」<sup>2)</sup>に、「グレープフルーツの種子から得られた、脂肪酸およびフラボノイドを主成分とするものをいう」と記載されており、抗菌活性を有するとして、主として日持向上剤として使用されると考えられるものである。本品目の抗菌活性については、野坂<sup>3)</sup>、仁科ら<sup>4)</sup>によって報告されている。野坂は、米国より輸入されたグレープフルーツ種子抽出物製剤が、4種のグラム陽性細菌類には最小発育阻止濃度(MIC)=6.25 ppm以下で、また4種の真菌類にはMIC=25~50 ppmで抗菌性があることを報告している<sup>3)</sup>。

他方、仁科ら<sup>4)</sup>は、ブラジルより輸入されたグレープ

フルーツ種子抽出物製剤が、5種のグラム陽性細菌類にはMICが5~25 ppmで、2種の真菌類にはMIC=10~25 ppmで抗菌性があるが、1種のグラム陰性細菌、4種の真菌類には抗菌性が全くないか、微弱であると報告している。この結果は、一般的な合成抗菌剤であるソルビン酸、プロピオン酸、安息香酸より高い抗菌活性を有することを示していた。更に、仁科らは、同製剤の活性本体は、合成抗菌剤として知られている、2,4,4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシジフェニルエーテル（以下、トリクロサン）とパラヒドロキシ安息香酸メチル（Fig. 1）であると報告している。これら2種の合成抗菌剤は、日本国内では、食品への使用が認められていない化合物であり、本輸入製剤の使用を差し控えるべきであろうとコメントしている。

このように、天然由来の添加物であっても、その本質が合成添加物であるならば、大きな問題となると考えられる。

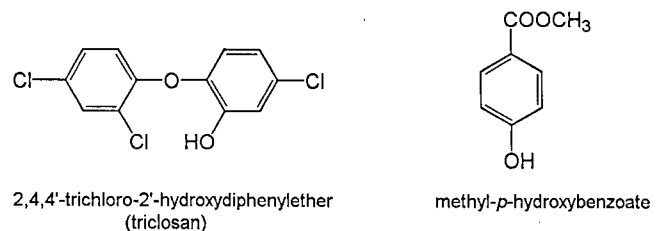


Fig. 1. Structures of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenylether (triclosan) and methyl-*p*-hydroxybenzoate

そこで著者らは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い「グレープフルーツ種子抽出物」の分析を行い、更にそのうちのいくつかの成分については、高速液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (LC/MS) を用い、同定を試みた。

## 実験方法

### 1. 試料

日本添加物協会を通じて入手した、1社1製品 (エフ・オー・バイオ(株)製) の市販グレープフルーツ種子抽出物を用いた。

グレープフルーツは都内のスーパーで購入した2製品を用いた。

### 2. 試薬

パラヒドロキシ安息香酸メチル：試薬特級 (和光純薬工業製)

パラヒドロキシ安息香酸エチル：試薬特級 (和光純薬工業製)

パラヒドロキシ安息香酸プロピル：試薬特級 (和光純薬工業製)

パラヒドロキシ安息香酸ブチル：試薬特級 (和光純薬工業製)

2,4,4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシジフェニルエーテル (トリクロサン)：当所環境衛生化学部木嶋博士よりいただいたものを用いた。

メタノール：高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製)

そのほかの試薬は、いずれも試薬特級 (和光純薬工業製) を用いた。

### 3. 装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC)：SC-8010 システム (東ソー製) に 991J フォトダイオードアレイ検出器 (Waters 製) を接続したものを用いた。

高速液体クロマトグラフ/マススペクトロメトリー (LC/MS)：高速液体クロマトグラフ部, HP1090 SERIES II；マスエンジン部, 5989B；インターフェイス部, 59987A (いずれも Hewlett Packard 製)

### 4. 試験溶液の調製

市販グレープフルーツ種子抽出物は、その 0.2 g をメタノール 10 ml で希釈したものを HPLC 用試料とした。

グレープフルーツは種子を取り、種子の 20 倍量のエタノールで一晩抽出した後、溶媒を減圧濃縮し、残渣をメタノール 1 ml に溶解し、HPLC 用試料とした。

### 5. グレープフルーツ種子抽出物の HPLC による分析

市販グレープフルーツ種子抽出物およびグレープフルー

ツの種子より調製した試験液は、以下の HPLC 条件にて分析した。

カラム：Inertsil ODS-2 (250×4.6 mm i.d., GL サイエンス製)

カラム温度：40℃

移動相：(条件 A) メタノールと 1% 酢酸とのグラジエント。0~10 分, 40% メタノール；10~30 分, 40~100% メタノール, 直線グラジエント；30~45 分, 100% メタノール

(条件 B) アセトニトリルと水とのグラジエント。0~30 分, 0~100% アセトニトリル, 直線グラジエント；30~45 分, 100% アセトニトリル

流速：0.8 ml/分

検出波長：280 nm および 200~500 nm

### 6. 市販グレープフルーツ種子抽出物の LC/MS による分析

(HPLC 部)

カラム：ODS Hypersil (100×2.1 mm i.d., 粒子径 5 μm, Hewlett Packard 製)

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリルと水のグラジエント。0~5 分, 20% アセトニトリル；5~12 分, 20~90% アセトニトリル, 直線グラジエント；12~15 分, 90% アセトニトリル

流速：0.4 ml/分

検出波長：280 nm

(MS 部)

イオン化法：エレクトロスプレー (ESI) 法

ネブライジングガス：酸素 (80 psi)

キャピラリー電圧：3.5 kV

測定モード：ネガティブモード

## 結果

### 1. グレープフルーツ種子抽出物の HPLC 分析

仁科らは、ブラジルより輸入されたグレープフルーツ種子抽出物製剤の抗菌活性本体は、合成抗菌剤であるトリクロサンとパラヒドロキシ安息香酸メチルであることを報告している<sup>4)</sup>。したがって、本実験で用いた市販グレープフルーツ抽出物中にも、トリクロサンあるいはパラヒドロキシ安息香酸エステル類が含まれている可能性が考えられる。そこで、まず入手可能な4種のパラヒドロキシ安息香酸エステル類 (メチル, エチル, プロピル, ブチル) およびトリクロサンの分離条件を検討した。既報<sup>5)</sup>の条件を参考に、メタノールと1%酢酸とのグラジエントを検討したところ、実験方法の5.に記載の(条件A)にて、5種の化合物は良好に分離した。

次に、市販グレープフルーツ種子抽出物を同一の条件にて分析したところ、保持時間よりパラヒドロキシ安息香酸

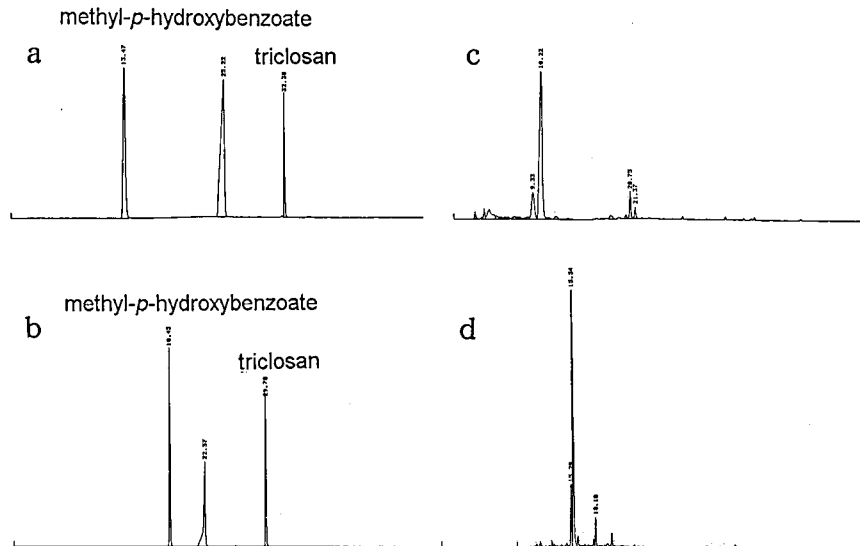


Fig. 2. HPLC chromatograms of commercial grapefruit seed extract (a, b) and ethanol extract of grapefruit seeds (c, d)

a, c: analyzed under condition A

b, d: analyzed under condition B

メチルおよびトリクロサンと考えられるピークが、それぞれ13.5分および32.4分に認められた (Fig. 2a)。しかし、移動相に酢酸を用いると、フォトダイオードアレイ検出器による吸収スペクトルの測定の際、短波長側のスペクトルが測定できないため、アセトニトリルと水とのグラジエントを検討した。その結果、上記5.に記載した (条件B) において、良好な分離が得られ (Fig. 2b)、保持時間および吸収スペクトルの結果から、18.4分のピークはパラヒドロキシ安息香酸メチルと、29.8分のピークはトリクロサンと同定された。

他方、2種の市販グレープフルーツの種子のエタノール抽出液を (条件A) および (条件B) で分析したところ、市販グレープフルーツ種子抽出物とは全く異なったクロマトグラムが得られ、パラヒドロキシ安息香酸エステル類およびトリクロサンに相当するピークは認められなかった (Fig. 2c, d)。

なお、市販グレープフルーツ種子抽出物中に観察された、保持時間22.6分のピークに相当する化合物が何であるか不明である。

## 2. 市販グレープフルーツ種子抽出物のLC/MS分析

1.で同定されたパラヒドロキシ安息香酸メチルおよびトリクロサンについて、LC/MSによる分析を検討した。

まず、トリクロサンについて、ESI法によるLC/MSを行ったところ、アセトニトリル：水=80：20の移動相を用いたフローインジェクション法により、ネガティブモードで $[M-H]^-$ が $m/z$  287に検出された。更に、トリクロサンの分子中に存在する、3個の塩素原子由来の同位体ピークである $m/z$  289, 291, 293も観察された (Fig. 3)。

次に、パラヒドロキシ安息香酸エステル類およびトリクロサンについて、LC/MSを検討した。HPLC条件は、検討の結果、方法の6.に記載の条件を用いた。同条件を用い、ネガティブモードでマススペクトルを測定し、SIMモードにて各化合物の $[M-H]^-$ でモニターしたところ、パラヒドロキシ安息香酸メチルの感度がやや低かったものの、すべての化合物が検出された。

そこで、市販グレープフルーツ種子抽出物について、同じ条件でLC/MSを行った。HPLCのクロマトグラムでは、Fig. 2bの場合と異なり、ピークは2本しか検出されなかった。これら2本のピークについてマススペクトルを測定し、パラヒドロキシ安息香酸メチルおよびトリクロサンの $[M-H]^-$ でモニターした結果、保持時間11.3分のピークは、明らかにトリクロサンであった。他方、保持時間2.9分のピークは、そのマススペクトルから、パラヒドロキシ安息香酸メチルと他の未知物質の混合物の可能性が高いことが明らかとなった (Fig. 4)。

## 3. 市販グレープフルーツ種子抽出物中のパラヒドロキシ安息香酸メチルおよびトリクロサンの定量

市販グレープフルーツ種子抽出物中のパラヒドロキシ安息香酸メチルおよびトリクロサンの含量を定量した結果、試料1g当たり、それぞれ16.6mgおよび19.6mgであった。

## 考 察

### 1. グレープフルーツ種子抽出物のHPLC分析

市販グレープフルーツ種子抽出物と、市販グレープフルーツの種子のエタノール抽出物をそれぞれ2種類の

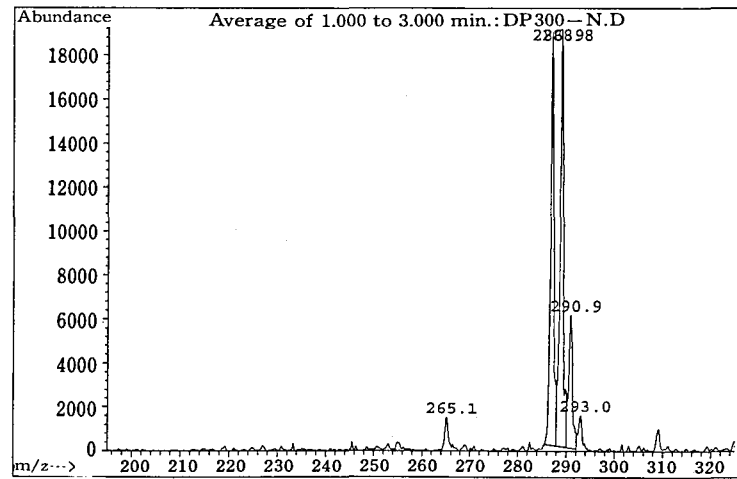


Fig. 3. Electrospray mass spectrum of triclosan

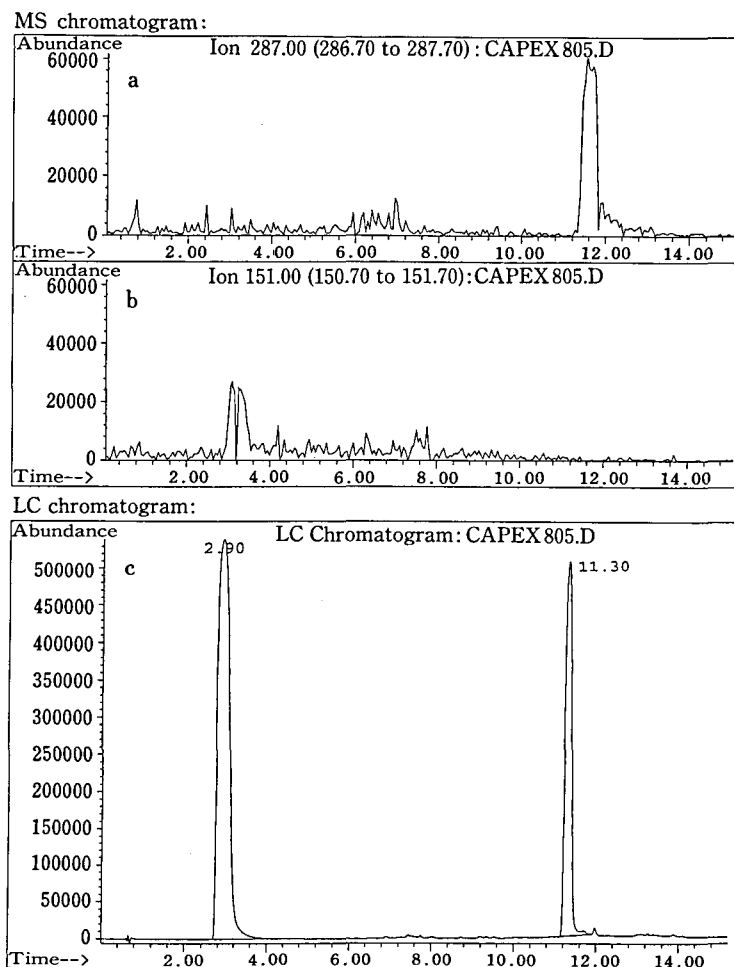


Fig. 4. Extracted ion chromatograms (a, b) and HPLC chromatograms (c) of grapefruit seed extract  
 a:  $m/z$  287, b:  $m/z$  151, c: 280 nm

HPLC 条件で分析したところ、互いに全く異なるクロマトグラムが得られた (Fig. 2a~d)。すなわち、市販グレープフルーツ種子抽出物では、グレープフルーツの種子由来の化合物のピークは全く認められず、代わりに合成抗菌

剤であるパラヒドロキシ安息香酸メチルとトリクロサンが検出された。このことは、既に仁科らによって報告<sup>4)</sup>されている結果と同様であった。

パラヒドロキシ安息香酸エステル類は化粧品原料基準<sup>6)</sup>

に、またトリクロサンは化粧品原料基準外成分規格<sup>7)</sup>に記載されている化合物で、いずれも現在わが国では、食品への使用が認められていない化合物である。トリクロサンは、以前は繊維製品にも使用されていたが、1980年代後半に、漂白、燃焼等によりダイオキシン類が生成するという報告がなされ<sup>8-10)</sup>、現在では繊維製品には使用されていない。

本実験に用いた製品中のパラヒドロキシ安息香酸メチルとトリクロサンの含量は、試料1g当たりそれぞれ16.6mgおよび19.6mgであった。本製品を、食品にどのくらいの量使用するか分からないので、使用された場合の、これらの化合物の与える影響については不明であるが、これらの化合物がいかなる経路を経て本製品に入ったかを調べる必要があると思われる。

他方、本製品中に含まれていた未知化合物については、吸収スペクトルの形状から、やはり芳香族化合物である可能性が示唆されるが、詳細を検討するには至っていない。今後の検討課題である。

## 2. グレープフルーツ種子抽出物のLC/MS分析

トリクロサンは、その構造から、ESI法によるLC/MSの分析が可能であると予想され、検討した結果、ネガティブモードで容易に疑似分子イオンを検出することができた。本化合物は、分子内に塩素原子を3個有する化合物であるため、それら塩素原子由来の同位体ピークが存在し、2マスユニットずつの差で、計4本のピークが存在する (Fig. 3)。このことは、トリクロサンの同定をより確かなものにすると考えられる。更に市販グレープフルーツ種子抽出物

を用いたLC/MSにより、試料中の同物質の同定が可能であることが明らかとなった。

他方、パラヒドロキシ安息香酸メチルは、LC/MSを行うにはやや分子量が小さいと考えられたが、事実、他のパラヒドロキシ安息香酸エステル類 (エチル、プロピル、ブチルと比較しても検出感度は低かった。

以上の結果より、LC/MSは非常に簡便かつ確実な化合物の同定手段であると思われる。今後は定量や、他の様々な添加物の分析への応用を検討する予定である。

## 文 献

- 1) 食品衛生法および栄養改善法の一部を改正する法律、法律第101号 (1995年5月24日公布)
- 2) 厚生省：既存添加物名簿、告示第160号 (1995年8月10日)
- 3) 野坂：New Food Industry, **33**, 6~16 (1991)
- 4) 仁科淳良, 木原 浩, 内堀 毅, 大井 高：防菌防黴, **19**, 401~404 (1991)
- 5) Gagliardi, L., Cavazzutti, G. and Turchetto, L.: J. Chromatogr., **508**, 252~258 (1990)
- 6) 厚生省：第二版化粧品原料基準 (1982)
- 7) 化粧品原料基準外成分規格 1993, 薬事日報社 (1993)
- 8) Kanetoshi, A., Ogawa, H., Katsura, E. and Kaneshima, H.: J. Chromatogr., **389**, 139~153 (1987)
- 9) Kanetoshi, A., Ogawa, H., Katsura, E. and Kaneshima, H.: J. Chromatogr., **442**, 289~299 (1988)
- 10) Kanetoshi, A., Ogawa, H., Katsura, E. and Kaneshima, H.: J. Chromatogr., **454**, 145~155 (1988)