(1999年6月9日受付・1999年8月17日受理)

抗菌防臭加工繊維製品中のヒノキチオール分析法

大阪府立公衆衛生研究所 中島晴信・宮野直子・松永一郎・沢辺善之
大阪府立産業技術総合研究所 高塚 正

Analysis of Hinokitiol in Antimicrobial/deodorant Processed Textiles

Harunobu Nakashima^{*1}, *Naoko Miyano*^{*1}, *Ichiro Matsunaga*^{*1}, *Yosiyuki Sawabe*^{*1}
and *Tadasi Takatuka*^{*2}

^{*1}Osaka Prefectural Institute of Public Health, 3-69, Nakamichi 1 Chome, Higashinari-ku, Osaka, 537-0025, Japan

^{*2}Technology Research Institute of Osaka Prefecture, 7-1, Ayumino 2 Chome, Izumi City, Osaka Pref., 594-1157, Japan

Abstract : The analytical method for identifying hinokitiol (HN) in antimicrobial/deodorant processed textiles was examined by high performance liquid chromatography (HPLC) with a photo diode array detector. The detection limit at 240nm wavelength was 3ng as S/N=5.

First, the presence of HN in hiba oil was determined, and then the extraction method from hiba oil filled microcapsules was examined. Second, HN in the hiba oil filled microcapsules which adhered to the cloth was analyzed. As a result, HN was surely found in the cloth immediately after processing.

To analyze the level of HN in antimicrobial/deodorant processed textiles, HN was extracted from samples with methanol under reflux at 70°C. To remove the polar materials, 20mM phosphate buffer (pH=2.4) was added to the extract, and HN was then reextracted into cyclohexane from the methanolic phase. After the extract was concentrated, it was applied to a C₁₈ cartridge column, HN was then eluted with methanol. After concentration, the elute was applied to the HPLC.

Although good recoveries of HN were developed in each operating step, the overall recoveries from textiles fortified at 10μg and 100μg were only 10~14% and 40~55%, respectively. Probably, the cause of such low recoveries was due to the photolysis and sublimation ability of HN. Therefore, quantitative analysis of HN was difficult using this method, but qualitative analysis was possible above the range of 10μg.

Five brands of antimicrobial/deodorant processed textiles using HN were analyzed by this method, however HN was not detected in any of the samples. Consequently, it is doubtful that the antimicrobial effect of those products was dependent on the activity of HN.

(Received 9 June, 1999 ; Accepted 17 August, 1999)

1. 緒 言

ヒノキチオール(β -thujaplicine, 2-hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatriene-1-one)は、台湾ヒノキ、青森ヒバ、

ウェスタンレッドセダーなどの精油中に含まれるトロポロン誘導体(七員環炭素化合物)である。1936年、野副は台湾ヒノキの酸性画分から抗菌性のあるフェノール性物質を単離してヒノキチオールと命名し¹⁾、その後この物質

の構造を決定した²⁾。現在は天然抽出物だけではなく工業的に合成された物もある³⁾。ヒノキチオールは抗菌性を有し、抗菌スペクトルも広いことから、古くから歯磨き剤や頭髮用化粧品に配合されている³⁾。また、食品の保存料として既存食品添加物にもなっている⁴⁾。さらに、最近では安全な天然抗菌剤をうたい文句にヒノキチオールで抗菌加工をほどこしたという繊維製品が多くなってきている⁵⁾。しかし、整髪料や育毛剤中のヒノキチオールに感作されたアレルギー患者の症例報告^{6,7)}などもあり、それら製品の安全性が確認されている訳ではない。また、それら製品中にヒノキチオールがどのくらい含有されているのかは不明である。そこで、抗菌製品中のヒノキチオールがどのくらいの濃度で使われているのかを調査するために分析法を検討することとした。

ヒノキチオールの分析法としては、化粧品中のヒノキチオールを分析するための方法が報告されている。古くはヒノキチオールと鉄の錯体の呈色反応を利用して比色定量する方法⁸⁾、最近では高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量法^{9,10)}が報告されている。しかし、繊維製品中のヒノキチオールを分析した報告は見あたらない。そこで、HPLC検出法、抽出法、精製法などの各段階での方法を検討し、繊維製品中のヒノキチオールの分析法を作成した。さらに、その方法で市販繊維製品の分析を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

ヒノキチオールまたは天然ヒバ油加工と表示の繊維製品5試料を購入し、試験試料とした。

2.2 試薬

標準試薬：高砂香料工業製ヒノキチオールSPを用いた。標準溶液系列はヒノキチオール1,000 μ g/mlの標準原液を作成し希釈溶液で用時希釈調製した。

希釈溶液：標準溶液や試料溶液の希釈に用いる、600 μ Mのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)を溶解した水-メタノール(3:7)溶液

ヒバ油：環境科学開発社製 ヒバ油充填マイクロカプセル：環境科学開発社製、同社製ヒバ油をセラミック製マイクロカプセルに充填したもの。

加工布作成用原液：環境科学開発社製、重量比にして、ヒバ油充填マイクロカプセル2とバインダー8を水90に分散したもの。

標準加工布作製用添付白布：JIS染色堅ろう度試験用(JIS L 0803準拠)綿(かなきん3号)勸日本規格協会製

メタノール、アセトニトリル、シクロヘキサンは関東化学製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。リン酸二水素カリウム、リン酸二水素ナトリウムは和光純薬製試

薬特級を用いた。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムは同人化学研究所製試験研究用を用いた。

C₁₈ミニカートリッジカラムはウォータース社製セブパックプラスを用いた。

2.3 器具および装置

高速液体クロマトグラフ装置：ヒューレットパッカード社製HP1100シリーズ(ポンプ、低圧グラジュエント装置、カラム恒温槽、自動注入装置、フォトダイオードアレイ検出器)

データ処理装置：ヒューレットパッカード社製ケムステーション

使用したガラス器具類はすべてEDTA溶液で洗浄処理した。

2.4 高速液体クロマトグラフ条件

カラム：L-column ODS(4.6mm ϕ ×150mm)勸化学用品検査協会製

注入量：10 μ l、カラム温度：40℃、

移動相流量：1ml/min

移動相：アセトニトリル/20mMリン酸二水素カリウム＝30/70

測定波長：240nm、320nm

2.5 標準加工布の作製

ヒバ油を充填したマイクロカプセルと樹脂バインダーを分散させた加工原液を水で希釈し、その希釈液に綿添付白布を浸した後マングルで絞り、絞り率100%(布と溶液の重量比が1:1)に調製した。その布を100℃で1時間乾燥しマイクロカプセルを布に固着させた。加工原液の希釈倍率が100倍の加工布を1%加工布という。加工原液の希釈倍率を変え、同様に2%(50倍希釈)、4%、8%、16%の加工布を作製した。加工布は加工後すぐに遮光保存した。

2.6 試験溶液の調製

細切した試料5gを500mlナスフラスコに採り、メタノール250mlを加え70℃で1時間還流抽出した。抽出液をガラスフィルター(G-2)でろ過し、500mlのナスフラスコに採った。100mlのメタノールでガラス器具を洗い、洗液はろ液とあわせた。その溶液を10mlに濃縮し50ml遠沈管に採った。20mMリン酸二水素ナトリウム(pH=2.4)15mlおよびシクロヘキサン10mlを加え5分間振とうし3000r.p.m.で5分間遠心した。その上澄み液(シクロヘキサン相)を200mlナスフラスコに採った。さらにシクロヘキサン10mlを加え同様の操作を2回行った。シクロヘキサンを濃縮し、メタノール10mlに転溶した。その溶液を、予め調製したC₁₈カートリッジカラムに負荷した。さらにカラムにメタノール20mlを流しヒノキチオールを溶出させた。溶出液を10mlに濃縮し、さらに高純度アルゴンを吹き付けて2ml

に濃縮し、フィルターでろ過して試験溶液とした。ガラス器具類はすべてEDTA溶液で洗浄し、実験操作は出来る限り遮光して行った。

3. 結果および考察

3.1 高速液体クロマトグラフィーによる測定法の検討

3.1.1 検出法の検討: ヒノキチオール分析法としては、化粧品中のヒノキチオールの分析法の報告例が幾つかある。古くはヒノキチオールと三価の鉄イオンの錯体の発色を利用して、比色定量する方法⁸⁾が一般的に用いられてきたが、この方法は操作法も煩雑で共存物質の妨害の影響が大きいため高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量法が検討されてきた。しかし、ヒノキチオールは共存する金属イオンと容易に錯体を形成することなどから、再現性よく良好なクロマトグラムが得られないことが多かった。著者らが検討した装置およびカラムのなかにも良好なクロマトグラムが得られない場合があった。そこで、HPLCの移動相に銅イオンを添加して定量する方法⁹⁾や、トリフルオロボロンと反応させジフルオロボロン化合物とし定量する方法¹⁰⁾などが報告されている。しかし、これらの方法も、金属イオンが装置に影響を与えたり反応操作が煩雑である。繊維製品中のヒノキチオールを分析するには、測定までの前処理法も必要であり、しかも微量測定が要求される。そこでやはり試験溶液をそのままHPLCで測定できる方法が望ましい。最近になり、金属イオンの影響の少ないHPLC装置やカラムが改良されてきている。そこで種々検討した結果、実験の部に記載した装置およびカラムにより比較的良好的なクロマトグラムが得られた(Fig.1)。また、検出法としてはクロマトグ

ラムピークの同定確認ができるフォトダイオードアレイ検出器を用いた。つまり、ヒノキチオールが極大吸収を持つ紫外部240nmおよび320nmの波長で定量し、ヒノキチオールと同じ保持時間の試料ピークの波長をスキャンし同定確認することとした。

3.1.2 移動相条件の検討: 繊維製品の加工にはヒノキチオール単独の加工ではなくヒバ油を加工したものが多く考えられる。ヒバ油はセスキテルペン類からなる中性油分と、フェノール類からなる酸性油分から構成されており知られているだけでも41種類はある¹¹⁾。ヒノキチオールの含有量はその1~20%といわれている¹¹⁾。そこでヒノキチオールを他の成分と相互分離できる移動相条件の検討を行った。ヒバ油1gをメタノールで100倍に希釈し、波長240nmおよび320nmにおける他の成分との相互分離を検討した。その結果、前述したHPLC条件により、他の成分の妨害なくヒノキチオールを相互分離できた(Fig.2)。このヒノキチオールと同一保持時間のピークのUVスペクトルはヒノキチオール標準品と一致した。さらにピークの純度検定を行い、purity factorが98%であり、ほとんど単一品であることが分かった。そこで今回使用したヒバ油中のヒノキチオール含有量を定量したところ、0.4%(重量比)であった。

3.1.3 検量線: 10 μ g/mlのヒノキチオール標準溶液10 μ lをHPLCに供し、5回繰り返し実験により精度を求めたところ、波長240nmでの変動係数はピーク面積で3.1%、ピーク高さで4.3%であり、波長320nmでの変動係数はピーク面積で3.4%、ピーク高さで4.1%でありいずれもピーク面積のほうが再現性は良好であった。そこで、ピーク面積による検量線を求めたところ2 μ g/ml~100 μ g/mlの範

Fig. 1 HPLC chromatogram of hinokition (100ng) at 320nm and 240nm UV wavelength

Fig. 2 HPLC chromatogram of hiba oil (100 times dilute solution) at 320nm and 240nm UV wavelength

囲でいずれも良好な直線性を示した ($R^2=0.99$ 以上)。また240nmでの検出限界は $S/N=5$ として3ngであり、320nmでの検出限界は $S/N=5$ として10ngであった。

3.2 前処理法の検討

化粧品などのヒノキチオールの定量にはほとんど前処理法を必要としないが、繊維製品中のヒノキチオール含有量は化粧品よりも微量で、しかも界面活性剤や染料などの様々な物質が多量に共存していると考えられる。また、繊維に加工する場合ヒバ油などをマイクロカプセルに充填し、それを繊維に付着させるなどの方法をとる場合が多い。そこで、標準加工布を作製し抽出法を含めた分析法を検討することとした。

3.2.1 抽出法の検討：まず、ヒバ油充填マイクロカプセル中のヒバ油の重量を求めるために、ヒバ油充填マイクロカプセルをマッフル炉中で灰化し(1100℃、4時間)、残った無機成分重量を求めたところ48.3%であった(加熱減量法)。この条件では、ヒバ油の99.8%が消失し、セラミック製マイクロカプセルは96%が残存するので、ヒバ油充填マイクロカプセル中のヒバ油重量はほぼ半分である事が分かった。次に、マイクロカプセルからヒノキチオールを抽出するための抽出溶媒および抽出法を検討した。メタノールおよびアセトニトリルを用い、振とう抽出法、超音波抽出法、環流抽出法(70℃)の三法を比較検討した。その結果、最高の抽出効率、メタノールを用い、70℃、1時間還流抽出した時に得られた。ヒバ油中のヒノキチオール含有量(0.4%)およびマイクロカプセルの重量から計算すると、その抽出効率は、70～80% ($n=5$)であった。

3.2.2 標準加工布のヒノキチオールの分析：各濃度の標準加工布5gを細切り500mlナスフラスコに採り、メタノール250mlを加え70℃で1時間還流抽出した。抽出液をガラスフィルター(G-2)でろ過し、500mlのナスフラスコに採った。100mlのメタノールでガラス器具を洗い、洗液はろ液とあわせた。その溶液を10mlに濃縮し、さらに高純度アルゴンを吹き付けて2mlに濃縮し、フィルターでろ過して試験溶液とし、HPLCで測定したところ4μg/g～16μg/gのヒノキチオールが検出できた(各濃度の試料数 $n=3$)。原液の希釈率とヒノキチオール濃度は正比例しなかったが、この理由は、加工原液希釈率とマイクロカプセルの布に対する付着率が必ずしも正比例しないためと考えられる。本加工法は実際の市販製品に行われている加工方法および加工濃度である。この加工布は作製後すぐに遮光保存し、2日目にヒノキチオールの測定を行った。従って、加工後短期間しかたえず遮光保存しておいた加工布中には確かにヒノキチオールが存在することが分かった。なお、ヒノキチオール10μgおよび100μgをメタノール250mlに添加し同様の操作を行ったところ、いずれの濃度でも回収率は100%であることを確認している。

3.2.3 共存極性物質の除去：試料のメタノール抽出液には多量に共存物質が混在する。そこでまず、共存極性物質の除去のための液-液分配法を検討した。10μgと100μgの濃度のヒノキチオールをメタノール10mlに添加し、20mMリン酸二水素ナトリウム(pH=2.4)水溶液15mlおよびシクロヘキサン10mlを加え5分間振とうしたところ70～85%のヒノキチオールがシクロヘキサン相に移行していることが分かった。そこで、シクロヘキサン-水分

配による極性物質の除去を行うこととした。この抽出操作を三回行ったところ、90～98%の回収率が得られた。なお、抽出溶媒としてn-ヘキサン、ジクロロメタンも検討したが、シクロヘキサンが一番抽出効率が良かった。さらに、酸性の水溶液として0.1M塩酸なども検討したがリン酸二水素ナトリウム(pH=2.4)水溶液と同様の結果であった。

3.2.4 C₁₈カートリッジカラムによる共存非極性物質の除去：10 μ gと100 μ gの濃度のヒノキチオールの特メノール溶液1mlを、予め調製したC₁₈カートリッジカラムに負荷し、カラムにメタノール10mlずつ100mlを流し10画分を得た。その結果最初の2画分(20ml)までにどちらの濃度のヒノキチオールも100%溶出できた。そこで、メタノール30mlでカラムからヒノキチオールを溶出させることとした。

3.2.5 添加回収実験：試料No.5(シーツカバー)に10 μ gおよび100 μ gのヒノキチオール合成標準品と、10 μ g、100 μ gのヒノキチオールを含有するヒバ油を添加し、風乾後、操作法に従って添加回収実験を行ったところ、いずれも10 μ g添加で10～14%、100 μ g添加で40～55%の回収率しか得られなかった。また回収率の再現性も良くなかった。各操作段階での回収率は良好なのに、一連の全操作を行うと回収率が悪い。この理由として以下のことが考えら

れる。①ヒノキチオールは光により短時間で分解しやすい。10 μ g/ml溶液の濃度だと調製後の翌日は分解していることもある。しかし、一連の全操作を行うと短時間では処理できず、さらに実験室を完全に遮光して実験することは困難であるためにヒノキチオールが光分解している。②繊維製品に含有されているヒノキチオールは微量でしかも共存物質の除去が必要なため、濃縮操作を何回かしなければならぬ。ところが、ヒノキチオールは昇華性があるため(そのため沸点は分からない)、濃縮操作時に損失している。③金属イオンとすぐに錯体を形成してしまうため器具類に残存している微量の金属とも錯体を作って変化してしまっている。

従ってこのような試料における低濃度のヒノキチオールの定量的な測定はかなり困難である。しかし、濃縮操作を注意して迅速に行えば、10 μ g程度のヒノキチオール定性分析は可能と考えられる。

3.3 市販繊維製品の分析結果

Table.1に市販繊維製品の分析結果を示す。すべての製品からヒノキチオールは検出されなかった。分析上の問題点もあり定量的な測定は難しいが、標準加工布の分析結果および添加回収実験の結果からみて、通常の濃度で加工されヒノキチオールが10 μ g以上(製品中の含有濃度にとすると2 μ g/g以上)残存していれば検出は可能と考えられ

Table 1 Analytical Results of Marketing Antimicrobial/ deodorant Processed Textile Products

Sample No.	Use	Material	Labelling	SEK mark*	Hinokitiol
1	Underwear (for babies)	Cotton	Antimicrobial /insecticidal processing, Hinokitiol	Not indicated	Not detected
2	Socks	Cotton,Acryl, Nylon, Polyurethane	Antimicrobial /deodorant processing, Hinokitiol	Not indicated	Not detected
3	Toilet seat cover	Acryl 85% Nylon 15%	Antimicrobial /deodorant processing, Hinokitiol	Indicated	Not detected
4	Dish towel	Cotton	Antimicrobial /deodorant processing, Hinokitiol	Indicated	Not detected
5	Bedding cover	Cotton	Antimicrobial /deodorant processing, Hiba oil	Indicated	Not detected

*SEK mark:the mark that a display is permitted from Sen-iseihin Sinkinou Hyouka Kyogikai.

る。従って、今回分析した試料中にはヒノキチオールが存在していないか、より微量しか存在しなかったものと考えられる。つまり、ヒノキチオールで加工していないか、加工したとしてもヒノキチオールが分解消失してしまったものと考えられる。それでは標準的な加工を施したとしてもヒノキチオールが分解消失し、市販製品からヒノキチオールが検出されなかった原因として以下の理由が考えられる。①ヒノキチオールは光分解しやすい。ところが、通常の繊維製品の販売状態は遮光していないため分解してしまった。ちなみにヒノキチオール配合の化粧品などは高濃度(100 μ g/ml程度)に配合しているにも関わらず完全遮光した容器に保存してある。②ヒノキチオールは昇華し製品から消失してしまった。マイクロカプセルでも薬剤の徐放機能を持たせてある。③ヒノキチオールは金属イオンとすぐに錯体を形成するので繊維製品の他の加工剤中の金属と錯体を作ってしまった。

今回分析した製品の数はいくつか少ないが分析結果から考えると、ヒノキチオールによって製品の抗菌効果が発揮されているというのは疑わしい。製品の中には抗菌効果をヒノキチオールの効用として宣伝している製品もあり、60回洗濯後にヒノキチオールの効果が発揮されると表示したものもある。しかし、本報では詳細な記載は省略するが、例えば試料No.3は、黄色ブドウ球菌に対する明瞭な抗菌効果(殺菌活性)を示した。抗菌効果があるとすれば、ヒバ油中の他の成分の抗菌効果などの他の要因が考えられる。今後、標準加工布の耐光性試験を行い、布中ヒノキチオール量と抗菌効果を比較して観察する予定であり、その結果から抗菌効果の要因を考察していきたいと考える。

4. まとめ

繊維製品に使用されているヒノキチオールを定量するために、フォトダイオードアレイ検出器を用いたHPLCによる分析法を検討した。ピーク面積による検量線は2 μ g/ml~100 μ g/mlの範囲で良好な直線性を示した。波長240nmでの検出限界はS/N=5として3ngであり、波長320nmでの検出限界はS/N=5として10ngであった。ヒノキチオール標準加工布を作成し抽出法の検討および液-液分配およびC₁₈カートリッジカラムを用いた前処理法を検討した。

繊維製品中のヒノキチオールを分析するには、試料を

メタノールで70℃、1時間還流抽出した。極性物質を除去するために、抽出液に20mMリン酸二水素ナトリウム(pH=2.4)およびシクロヘキサンを加え、ヒノキチオールをシクロヘキサン相へ再抽出した。非極性共存物質を除去するために、抽出液をC₁₈カートリッジカラムへ負荷し、メタノールでヒノキチオールを溶出した。溶出液を濃縮後、試験溶液としてHPLCで測定した。

この方法で、10, 100 μ g添加による添加回収実験を行ったところ10 μ g添加で10~14%、100 μ g添加で40~55%の回収率しか得られなかったが、濃縮操作を注意して迅速に分析を行えば、10 μ g程度のヒノキチオールの定性分析は可能と考えられた。そこで、この分析法でヒノキチオール加工と表示のある市販繊維製品5試料を分析したところ、すべての試料からヒノキチオールが検出されなかった。しかし、黄色ブドウ球菌に対する明瞭な抗菌効果(殺菌活性)を示す試料もあり今後の検討課題を残した。

謝辞：化粧品中ヒノキチオールの分析法に関する資料を提供頂いた(株)ノエビアの水谷哲夫氏、およびヒノキチオールやヒバ油関係試薬の入手にご配慮頂いた国立医薬品食品衛生研究所の鹿庭正昭薬品第二室長に感謝いたします。

5. 文 献

- 1) 野副鉄男: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **11**, 295(1936).
- 2) 野副鉄男, 桂 重雄, 薬誌, **64**, 181-185(1944).
- 3) 化粧品原料基準 第二版 注解(1984).
- 4) 俣野和夫編: 化学的合成品以外の食品添加物リスト 注解書, p.142, (1991) 日本食品添加物協会
- 5) 読売新聞, ヒノキ香る抗菌タオル, 防ダニ寝具, 効果に疑問, 1995年12月16日.
- 6) Fujita, M., and Aoki, T., *Cont. Dermat.*, **9**, 61-65 (1983).
- 7) 細野久美子, 皮膚誌, **39**(1), 42-47(1997).
- 8) Maclean, H., Gardner, J. A. F.: *Anal. Chem.*, **28**, 509 (1956).
- 9) 花房文人, 中村 淳, 榎野清作, 太田忠男, 分析化学, **38**, 124-128(1989).
- 10) Endo, M., Mizutani, T., and Matsumura, M., *J of Chrom.*, **455**, 430-433(1988).
- 11) 岡部敏弘, 齊藤幸司, 加工技術, **29**, 689-693(1993).