調査・資料

既存添加物エステル系ガムベースの成分分析

(2007年3月19日受理)

多田 敦子^{1,*} 増田 愛乃^{2,3} 杉本 直樹¹
山形 一雄² 山崎 壮¹ 棚元 憲一¹

Analysis of Constituents of Ester-Type Gum Bases Used as Natural Food Additives

Atsuko TADA^{1,*}, Aino MASUDA^{2,3}, Naoki SUGIMOTO¹,
Kazuo YAMAGATA², Takeshi YAMAZAKI¹ and Kenichi TANAMOTO¹¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;²College of Bioresource Sciences, Nihon University: 1866 Kameino,
Fujisawa-shi, Kanagawa 252-8510, Japan;³Present address: Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences,
University of Shizuoka: 52-1 Yata, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan;

*Corresponding author

The differences in the constituents of ten ester-type gum bases used as natural food additives in Japan (urushi wax, carnauba wax, candelilla wax, rice bran wax, shellac wax, jojoba wax, bees wax, Japan wax, montan wax, and lanolin) were investigated. Several kinds of gum bases showed characteristic TLC patterns of lipids. In addition, compositions of fatty acid and alcohol moieties of esters in the gum bases were analyzed by GC/MS after methanolysis and hydrolysis, respectively. The results indicated that the varieties of fatty acids and alcohols and their compositions were characteristic for each gum base. These results will be useful for identification and discrimination of the ester-type gum bases.

(Received March 19, 2007)

Key words: 食品添加物 food additive; ガムベース gum base; ワックス wax; エステル ester; 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

緒 言

既存添加物名簿収載品目リスト^{*1}に収載されている天然由来のガムベースの中には、ワックス（ろう）と総称されている品目群が含まれている。ワックスとは狭義には高級脂肪酸と高級アルコールのエステル（以下、長鎖エステル）を指す。しかし、一般的には、これと似た性状を示す、脂肪酸とステロールのエステル、脂肪酸とグリセロールのエステル（トリグリセリド）、さらには長鎖炭化水素までを含めて広義にワックス（ろう）と言われることが多い。原料も植物、動物、鉱物、石油と多岐にわたる。食品

添加物においても広義のワックスがガムベースとして既存添加物名簿に収載されている。これまで、既存添加物として国内で流通しているワックスの成分については詳細な検討がなされておらず、成分組成に関する情報も少ないため、その成分内容等の実態が把握できていない。これらのうち、エステル結合をもつ化合物を構成成分として含有するとされている品目（以下、エステル系ガムベース）に注目すると、成分規格がある品目としては、カルナウバロウ、カンデリラロウおよびミツロウが第7版食品添加物公定書¹⁾に収載されており、ラノリンが第8版²⁾に新規収載された。また、日本食品添加物協会による第三版既存添加物自主規格³⁾には、ウルシロウ、コメヌカロウ、シェラックロウ、ホホバロウ、モクロウおよびモンタンロウが収載されている。現時点では既存添加物としての国の成分規格が定められていない品目が多いことから、今後国の成分規格案を検討するうえでも詳細な成分分析が必要である。

そこで、日本食品添加物協会より既存添加物として提供されたエステル系ガムベース 10 品目を用い、その成分内

* 連絡先

¹ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1² 日本大学, 生物資源科学部, 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866³ 現所属: 静岡県立大学大学院, 生活健康科学研究科, 〒422-8526 静岡県駿河区谷田 52-1^{*1} 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19年9月11日]

容の実態把握を目的として、各品目の成分組成を TLC および GC/MS により分析した。さらに、含有成分の差異について検討した。

実験方法

1. 試料および試薬

既存添加物エステル系ガムベースは、日本食品添加物協会より現在入手可能な品目として提供を受けた 10 品目各 1 検体 (ウルシロウ (urushi wax), カルナウバロウ (carnauba wax), カンデリラロウ (candelilla wax), コメヌカロウ (rice bran wax), シェラックロウ (shellac wax), ホホバロウ (jojoba wax), ミツロウ (bees wax), モクロウ (Japan wax), モンタンロウ, (montan wax) および ラノリン (lanolin)) を用いた。また、上記既存添加物と同様の製品名を有する試薬が市販されている場合には購入し、比較対照として用いた。カルナバワックス (carnauba wax) (Alfa Aesar 社製, 和光純薬工業(株)販売) および カルナウバロウ黄色 (carnauba wax yellow) (Acros Organics 社製, 関東化学(株)販売) をカルナウバロウの対照試薬として、蜜ろう白色ペレット (bees wax, white pellets), 蜜ろう黄色ペレット (bees wax, yellow pellets) (和光純薬工業(株)製), ミツロウ黄色 (bees wax, yellow), ミツロウ白色 (bees wax, white) (ナカライテスク(株)製), および蜜ろう (bees wax) (関東化学(株)製) をミツロウの対照試薬として、ラノリン無水 (lanolin Anhydrous) (MP Biomedicals 社製, 和光純薬工業(株)販売), ラノリン無水 (lanolin, anhydrous (technical grade)) およびラノリン (lanolin) (Alfa Aesar 社製, 和光純薬工業(株)販売) をラノリンの対照試薬として用いた。

TLC および GC/MS 分析用標品として、次に示す試薬を用いた。脂肪酸メチルエステル混合物 (oil reference standard, AOCS, Cat. No. O7756, SUPELCO 社製, C14~C24 直鎖偶数飽和脂肪酸, C18, C20, C22 直鎖一価不飽和脂肪酸, C18 直鎖二価および三価不飽和脂肪酸の計 11 種含有), 直鎖飽和脂肪酸メチルエステルキット (Cat. No. ME7-1KT, SUPELCO 社製, C25~C31 直鎖飽和脂肪酸メチルエステル 7 種含有), およびバクテリア酸メチルエステル (Bacterial acid methyl ester CP mix, AOCS, Cat. No. 47080-U, SUPELCO 社製, C16 の 2-ヒドロキシ直鎖飽和脂肪酸他 25 種の脂肪酸メチルエステルを含有)。長鎖脂肪酸およびトリグリセリド標品として *cis*-11-イコセン酸 (*cis*-11-icosenoic acid) およびトリパルミチン (tripalmitin) (SIGMA-ALDRICH 社製), 炭化水素標品として *n*-ヘプタコサン (*n*-heptacosane), *n*-ノナコサン (*n*-nonacosane), *n*-ヘントリアコンタン (*n*-hentriacotane) および *n*-トリトリアコンタン (*n*-tritriacotane) (FLUKA 社製), *cis*-13-ドコセノール (*cis*-13-docosenol) (長鎖アルコール標品, 東京化成工業(株)製), 11-イコセノール (11-icosenol) (長鎖アルコール標

品, MP Biomedicals 社製), ジおよびモノグリセリド標品として 1-モノパルミチン (1-monopalmitin) および 1,2-ジパルミチン (1,2-dipalmitin) (フナコシ(株)製), ステロール標品としてスチグマステロール (stigmasterol) (タマ生化学(株)製) を用いた。また、日本食品添加物協会を通じて入手した既存添加物植物性ステロール (phytosterols mixture) を、ステロールエステルおよびステロール確認用標品として用いた。

トリメチルシリル (TMS) 化およびメタノリシスの反応試薬として、トリメチルシリル化試薬 (TMSI-H, ジーエルサイエンス(株)製) および 5% 塩化水素-メタノール溶液 (和光純薬工業(株)製) を用いた。

2. 装置

ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS): (株)島津製作所製 GC/MS system (GCMS-QP5050)

3. TLC 分析

各種エステル系ガムベース製品は、ヘキサンに溶解して 10 mg/mL の試料溶液を調製し、5 μ L を silica gel 60 F₂₅₄ HPTLC plates (10 $\times$ 10 cm, No. 5628, Merck 社製) にスポットした。ただし、シェラックロウはヘキサンに不溶であったためトルエンに溶解し、5 mg/mL の試料溶液を調製し、10 μ L をスポットした。また、各種標準試薬の調製に用いた溶媒、濃度およびスポット量は、次に示すとおりである。ヘントリアコンタン (20 mg/mL トルエン, 8 μ L), 既存添加物植物性ステロール (5 mg/mL ヘキサン, 1 μ L), トリパルミチン, 1,2-ジパルミチンおよび 1-モノパルミチン (5 mg/mL ヘキサン, 6 μ L), *cis*-11-イコセン酸および *cis*-13-ドコセノール (10 mg/mL ヘキサン, 1.5 μ L), スチグマステロール (ステロール標準品, 10 mg/mL ヘキサン, 0.5 μ L)。また、長鎖エステル標品として、既報⁴⁾で合成したイコセン酸イコセニル (1 mg/mL ヘキサン, 5 μ L) を用いた。展開溶媒として、ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸混液 (80:20:1) を用いた。原点より約 8 cm 展開後、十分に風乾した後に、10% 硫酸エタノール溶液を噴霧し加熱するか、またはヨウ素ガスに曝露させて、各スポットの可視化を行った。各試料の TLC 分析は 2 回ずつ繰り返して 2 試験の結果が一致することを確認し、結果として示した。

4. GC/MS 分析

各ガムベースの総脂肪酸および長鎖アルコールの組成を比較するために、以下に示す方法で遊離およびエステル構成脂肪酸および長鎖アルコールを誘導体化し、GC/MS で分析した。

脂肪酸組成分析用には、各試料 3.0 mg を既報⁴⁾と同様の方法でメタノリシスし、脂肪酸メチルエステル体に誘導体化し、ヘキサン抽出層を 3.0 mL に定容した試料を用いた。別途、脂肪酸メチルエステル混合物、直鎖飽和脂肪酸メチルエステルキットおよびバクテリア酸メチルエステルの各 1.0 mg/mL ヘキサン溶液を調製し、比較標準液とした。

Fig. 1. TLC profiles of various kinds of ester-type gum bases used as natural food additives and the standards

Solvent: hexane-diethyl ether-acetic acid=80:20:1

A) Spots were visualized with 10% H_2SO_4 followed by heating; B) Spots were visualized with iodine vapor

長鎖アルコール組成分析用には、各試料 10 mg を既報³⁾と同様の方法でアルカリ加水分解後、生成した長鎖アルコールを TMS 化アルコールに誘導体化し、ヘキサン抽出層を 1.5 mL に定容した試料を用いた。別途、11-イコセノールおよび *cis*-13-ドコセノールより TMS 化体を合成し、比較標準液を調製した。

調製した試料溶液は、以下の条件の GC/MS に付した。GC/MS 測定条件：カラム、DB-1 (0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚, 0.25 μ m, J&W Scientific); カラム入口圧, 100 kPa; キャリヤガス流量, 1.0 mL/min; 注入口温度, 300°C; カラム温度, 180°C→5°C/min→280°C→15°C/min→300°C (8 min); イオン源温度, 250°C; イオン化エネルギー, 70 eV; 注入量, 1.0 μ L; 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 60~800)。

各試料の分析は 2 回ずつ繰り返して行い、2 試験の結果が一致することを確認し、結果として示した。

結果および考察

1. TLC 分析

TLC 分析により、エステル系ガムベース品目間の成分組成の比較を行った。Fig. 1A に硫酸発色、Fig. 1B にヨウ素発色の結果を示した。今回用いた TLC 条件では、標準品の移動度は R_f 値の高いほうから順に、炭化水素 (0.96)、ステロールエステル (0.91)、長鎖エステル (0.85)、トリグリセリド (0.59)、脂肪酸 (0.27)、アルコール (0.20)、ジグリセリド (0.10)、ステロール (0.09)、モノグリセリド (0.01) であった。硫酸発色 (Fig. 1A) では、ステロールエステル、ステロールが赤～赤紫色に、遊離脂肪酸が黄色に、炭化水素、長鎖エステル、アルコールが褐色に発色した。トリ、ジ、モノパルミチン (パルミチンのトリ、ジ、

モノグリセリド) はヨウ素発色法 (Fig. 1B) のみで検出された。

TLC 分析により、各ガムベース品目の大まかな含有脂質成分組成を把握できた。また TLC パターンの比較により大きく次の 3 つのグループに分けることができた。1) 炭化水素、ステロールエステル、長鎖エステルなどに相当する R_f 値に濃いスポットが認められる品目 (ミツロウ R_f =0.73, 0.85, 0.91, 0.96, ホホバロウ R_f =0.85, ラノリン R_f =0.91, シェラックロウ R_f =0.73, 0.93, およびカンデリラロウ R_f =0.85, 0.94), 2) 脂肪酸のグリセリンエステル (トリ、ジ、モノグリセリド) に相当する R_f 値に濃いスポットが認められる品目 (ウルシロウおよびモクロウ), 3) 遊離脂肪酸よりも R_f 値の高い領域に濃いスポットを示さない品目 (コメヌカロウ, モンタンロウおよびカルナウバロウ)。グループ 1 の品目は、TLC パターンにより相互に区別が可能であった。エステル系ガムベースの多くでは、確認試験として赤外吸収スペクトル (IR) が採用されているが、グループ 2 のウルシロウとモクロウ、また、グループ 3 のコメヌカロウ、モンタンロウおよびカルナウバロウは、同じグループの品目同士で IR スペクトル³⁾が類似しているため区別が不可能であるうえ、今回行った TLC でも相互に区別できなかった。そこで、次に GC/MS 分析により、さらに詳しい構成成分の調査を行った。

2. GC/MS による脂肪酸組成分析

エステル系ガムベース製品の構成脂肪酸を確認するために、各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。化合物の同定は、脂肪酸メチルエステルおよび飽和炭化水素標準品の MS スペクトル、その保持時間と炭素鎖長との関係式、MS スペクトルのライブラリー (NIST および WILEY) データとの一

Fig. 2. GC/MS TIC profiles of fatty acid methyl esters obtained by methanolysis of ester-type gum bases used as natural food additives

A) carnauba wax, B) montan wax, C) rice bran wax, D) shellac wax, E) jojoba wax, F) lanolin, G) bees wax, H) candelilla wax, I) urushi wax, J) Japan wax

* The abbreviation $C_{18:0}$ means of the methyl ester of the normal chain fatty acid with 18 carbons and no (0) unsaturated bond.

致、および既報の成分分析の結果^{4)~29)}との比較により行った。その結果 (Fig. 2), 品目間で脂肪酸組成が異なり、TLC パターンが類似した品目同士 (カルナウバロウ (Fig. 2A) とモンタンロウ (Fig. 2B) とコメヌカロウ (Fig. 2C), ウルシロウ (Fig. 2I) とモクロウ (Fig. 2J)) でも、脂肪酸組成を調べることで、品目相互の区別が可能であることが示された。また各品目の組成分析の結果は下に述べるが、これまでの脂肪酸組成に関する報告 (ウルシロウ^{5)~7)}, カルナウバロウ⁸⁾, カンデリラロウ^{9)~11)}, コメヌカロウ^{11), 12)}, シェラックロウ^{13), 14)}, ホホバロウ^{4), 15)~17)}, ミツロウ^{18)~20)}, モクロウ^{7), 21), 22)}, モンタンロウ^{14), 23), 24)}, およびラノリン^{19), 25), 26)}) とおおよそ一致した。

各品目は、検出された成分内容により大きく次の4グループ、F-I) 主に偶数炭素飽和脂肪酸が検出された品目 (カルナウバロウ, モンタンロウおよびコメヌカロウ), F-II) 主に一価不飽和脂肪酸が検出された品目 (ホホバロウ), F-III) 脂肪酸以外の成分も検出された品目 (シェラックロウ, ラノリン, ミツロウおよびカンデリラロウ), および F-IV) ジカルボン酸が検出された品目 (ウルシロウおよびモクロウ) に分けることができた。

グループ F-I では脂肪酸の炭素鎖長分布は品目により異なった (Fig. 2A, 2B, 2C)。グループ F-III では脂肪酸以外の成分に品目による特徴が認められた。つまり、シェラックロウ (Fig. 2D) では直鎖飽和脂肪酸以外に、 m/z 57 をベースイオンとし m/z 390 のイオンを示す 23 分付近の顕著なピーク (未同定) や、 $C_{29}H_{60}$ などの炭化水素など

が認められた。ラノリン (Fig. 2F) では、脂肪酸以外にコレステロールが検出された。また 2-ヒドロキシ- $C_{16:0}$ 脂肪酸が検出された。ミツロウ (Fig. 2G) では C_{24} ~ C_{30} の各直鎖偶数炭素飽和脂肪酸よりも少し短い保持時間にそれぞれ $C_{27}H_{56}$, $C_{29}H_{60}$, $C_{31}H_{64}$, $C_{33}H_{68}$ の飽和炭化水素が認められた。これら炭化水素の存在は既知の報告²⁸⁾と一致した。カンデリラロウ (Fig. 2H) ではエステルより、炭化水素をより多く含むことが報告^{9), 10), 29)}されており、今回の分析でも、 $C_{31}H_{64}$ の飽和炭化水素が顕著に認められた。グループ F-IV のウルシロウ (Fig. 2I) とモクロウ (Fig. 2J) では、主に $C_{16:0}$ のパルミチン酸が検出され、少量の $C_{18:1}$ (オレイン酸) や $C_{18:0}$ (ステアリン酸), さらに微量成分として C_{20} , C_{22} の飽和ジカルボン酸の存在が確認された。 $C_{20:0}$, $C_{22:0}$ のジカルボン酸は、モクロウ特有の粘弾性に関与すると推測されている成分^{5), 21)}であり、TIC で検出された全ピーク面積に対する $C_{20:0}$ ジカルボン酸と $C_{22:0}$ ジカルボン酸ピーク面積割合の合計は、ウルシロウで 1.1%, モクロウで 3.4% であった。ジカルボン酸の割合がウルシロウよりもモクロウのほうが高いという結果は、既報^{5), 21), 22)}とも一致した。

3. GC/MS によるアルコール組成分析

エステル系ガムベース製品の構成アルコールを確認するために、各製品を加水分解および TMS 化し、得られた TMS 化アルコールを GC/MS で分析した。化合物の同定は、長鎖アルコール標品 (*cis*-13-ドコセノールおよび 11-イコセノール) の TMS 化体の MS スペクトル、その保持

Fig. 3. GC/MS TIC profiles of trimethylsilylated alcohols obtained by hydrolysis and trimethylsilylation of ester-type gum bases used as natural food additives

A) carnauba wax, B) montan wax, C) rice bran wax, D) shellac wax, E) jojoba wax, F) lanolin, G) bees wax, H) candelilla wax

* The abbreviation C_{28:0} means the trimethylsilylated normal chain alcohol with 28 carbons and no (0) unsaturated bond.

時間と炭素鎖長との関係式、MS スペクトルのライブラリー (NIST および WILEY) データとの一致、および既報の成分分析の結果^{4)~31)}との比較により行った。その結果 (Fig. 3)、品目間でアルコール組成が異なり、TLC 結果の類似した品目同士 (カルナウバロウ (Fig. 3A) とモンタンロウ (Fig. 3B) とコメヌカロウ (Fig. 3C)) でも、アルコール組成を調べることで、品目相互の区別が可能であることが示された。また各品目の組成分析の結果は下に述べるが、これまでのアルコール組成に関する報告 (カルナウバロウ^{8), 29)}, カンデリラロウ^{11), 29)}, コメヌカロウ^{12), 14), 30)}, シェラックロウ^{13), 14)}, ホホバロウ^{4), 15~17)}, ミツロウ^{18), 19), 31)}, モンタンロウ^{4), 23)}, およびラノリン^{25), 26)}) とおおよそ一致した。

各品目は検出された成分内容により大きく 4 グループに分けることができた、A-I) 主に偶数炭素飽和アルコールが検出された品目 (カルナウバロウ、モンタンロウ、コメヌカロウおよびシェラックロウ)、A-II) 主に一価不飽和アルコールが検出された品目 (ホホバロウ)、A-III) アルコール以外の成分も検出された品目 (ラノリン、ミツロウおよびカンデリラロウ) および A-IV) 主に脂肪酸のグリセロールエステルを含有していた品目 (ウルシロウおよびモクロウ) (データは示さない)。グループ A-I ではアルコールの炭素鎖長分布が品目により異なっていた。グループ A-III のラノリン (Fig. 3F) では、アルコールに加え、コレステロール、ジヒドロラノステロール、ラノステロールが検出された。

4. 市販試薬の分析

またクロマトグラムなどは示していないが、上述した 10 品目の製品以外に、これら既存添加物と同様の製品名を有する市販試薬 (カルナウバロウ 2 種、ミツロウ 5 種およびラノリン 3 種) も分析し、TLC パターンや構成脂肪酸および構成アルコールの比較を行った。その結果、ミツロウの脂肪酸分析で他製品より炭化水素含量の高い試薬 1 製品が、またカルナウバロウのアルコール分析で未同定ピークの比率が高い試薬 1 製品が観察された。しかし、これら以外は添加物製品と、対応する市販試薬とで TLC パターンや GC/MS による構成脂肪酸およびアルコールの種類やピーク強度比はよく一致した。したがって、今回分析した既存添加物製品と試薬製品は、おおよそ同じ成分組成であると推察される。

結 論

天然由来のエステル系ガムベース 10 品目について、成分分析を行った。その結果、TLC 分析により、いくつかの品目では他品目と区別できることが確認された。TLC パターンのみでは判別できない品目同士については、GC/MS により構成脂肪酸およびアルコールを分析し、各ガムベース品目に特徴的な成分組成を確認することで判別できることが分かった。本研究で得られた結果は、エステル系ガムベース製品の種類の推定・判別を行ううえで、有用な情報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心・安全確保推進研究事業により実施したものである。エステル系ガムベースの収集にご協力いただいた日本食品添加物協会に深謝いたします。

文 献

- 1) 第7版食品添加物公定書。東京，日本食品添加物協会，1999。
- 2) 第8版食品添加物公定書。厚生労働省，2007。
- 3) 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。
- 4) Tada, A., Jin, Z.-L., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of the constituents in jojoba wax used as a food additive by LC/MS/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **46**, 198-204 (2005)
- 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) Jin, Z.-L., Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K., Masuda, A., Yamagata, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Analysis of constituents in urushi wax, a natural food additive. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **47**, 167-172 (2006).
- 7) Xu, J., Kawachi, S., Characteristics of major fatty acid components of Haze wax from different cultivars and habitats. *Mokuzai Gakkaishi*, **34**, 436-442 (1988).
- 8) 脂肪酸，アルコール組成，油脂及び油脂製品試験法部会・ガスクロデータ小委員会編。カルナウバろうの脂肪酸組成・付アルコール組成。油化学，**27**, 336 (1978)。
- 9) Tulloch, A. P., Comparison of some commercial waxes by gas liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 367-371 (1973).
- 10) Tonogai, Y., Tsuji, S., Ito, Y., Harada, M., Fundamental studies on a method for the analysis of natural waxes in foods by gas chromatography (Systematic determination method of natural waxes in foods. I). *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **26**, 160-168 (1985).
- 11) 脂肪酸，アルコール組成，油脂及び油脂製品試験法部会・ガスクロデータ小委員会編。キャンデリラろうの脂肪酸組成・付アルコール組成。油化学，**27**, 337 (1978)。
- 12) Iwai, M., Nagano, N., Utilization of lipase. II. Hydrolysis of rice bran wax ester by two kinds of commercial lipases. *Yukagaku (J. Japan Oil Chem. Soc.)*, **36**, 852-856 (1987).
- 13) Schmidt, H., Analytische Untersuchungen an Schellackwachs. *Fette Seifen Anstrichm.*, **84**, 478-488 (1982)
- 14) Lawrence, J. F., Iyengar, J. R., Page, B. D., Conacher, H. B. S., Characterization of commercial waxes by high-temperature gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **236**, 403-419 (1982)
- 15) Spencer, G. F., Plattner, R. D., Miwa, T., Jojoba oil analysis by high pressure liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 187-189 (1977).
- 16) Spencer, G. F., Plattner, R. D., Compositional analysis of natural wax ester mixtures by tandem mass spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 90-94 (1984).
- 17) Med, Gvedovici, A., Lazou, K., d'Oosterlinck, A., Zhao, Y., Sandra, P., Analysis of jojoba oil by LC-coordination ion spray-MS (LC-CIS-MS). *J. Sep. Sci.*, **25**, 173-178 (2002).
- 18) Yoshida, T., Sasaki, M., Identification and quality control of beeswax from Oriental and European honeybees. *Honeybee Sci.*, **16**, 167-174 (1995).
- 19) Asperger, A., Engewald, W., Fabian, G., Thermally assisted hydrolysis and methylation—A simple and rapid online derivatization method for the gas chromatographic analysis of natural waxes. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **61**, 91-109 (2001).
- 20) Jiménez, J. J., Bernal, J. L., Aumente, S., Toribio, L., Bernal, J. Jr., Quality assurance of commercial beeswax II. Gas chromatography-electron impact ionization mass spectrometry of alcohols and acids. *J. Chromatogr. A*, **1007**, 101-106 (2003).
- 21) Tachibana, S., Itoh, K., Ohkubo, K., Oki, T., Sumimoto, M., Chemical conversion of extractives for the production of chemicals and fuels IX, Chemical compositions and physical properties in haze-wax from 13 cultivars grown in Ehime prefecture. *Mokuzai Gakkaishi*, **38**, 1151-1158 (1992).
- 22) Sumimoto, M., Tachibana, S., Abe, Z., Kuroiwa, Y., Ishii, A., Conversion and utilization of wax as forest products. Research on Energy from Biomass: Reports of special project research on energy under grant in aid of scientific research of the Ministry of Education Science and Culture, Japan, **7**, 115-120 (1984).
- 23) Popl, M., Havel, Z., Über die chromatographische Auftrennung von montanwachs und die identifizierung der einzelfractionen mittels gaschromatographie und massenspektrometrie. *Fette Seifen Anstrichm.*, **77**, 51-54 (1975).
- 24) Asano, S., Characterization of Montan waxes by composition of fatty acids and hydrocarbons. *Kanzei Chuou Bunsekisho Hou*, **17**, 83-86 (1977).
- 25) Moldovan, Z., Jover, E., Bayona, J. M., Gas chromatographic and mass spectrometric methods for the characterization of long-chain fatty acids. Application to wool wax extracts. *Analyt. Chim. Acta*, **465**, 359-378 (2002).
- 26) 長澤則夫，羊毛，その魅力と科学。加工技術，**36**, 780-783 (2001)。
- 27) Apon, J. M. B., Nicolaides, N., The determination of the position isomers of the methyl branched fatty acid methyl esters by capillary GC/MS. *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 467-473 (1975).
- 28) Jiménez, J. J., Bernal, J. L., Aumente, S., del Nozal, M. J., Martín, M. T., Bernal, J. Jr., Quality assurance of commercial beeswax Part I. Gas chromatography-electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters. *J. Chromatogr. A*, **1024**, 147-154 (2004).
- 29) 府瀬川健蔵監修，改訂 ワックスの性質と応用 第2版。東京，幸書房，1993。
- 30) Vali, S. R., Ju, Y.-H., Kaimal, T. N. B., Chern, Y.-T., A process for the preparation of food-grade rice bran wax

-
- and the determination of its composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 57-64 (2005).
- 31) Bonaduce, I., Colombini, M. P., Characterization of beeswax in works of art by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry procedures. *J. Chromatogr. A*, **1028**, 297-306 (2004).