かんきつ類中のクマロン-インデン樹脂の分析法

(昭和 53 年 4 月 11 日受理)

内山 貞夫* 近藤 龍雄* 内山 充*

Analysis of Coumarone-indene Resin Coated on Citrus Fruits

Sadao UCHIYAMA, Tatsuo KONDO and Mitsuru UCHIYAMA

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga
1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

Analysis of coumarone-indene resin (CI resin), a protective coating for citrus fruit, was examined. It was concise in the procedure and specific to the resin. The use of thin-layer chromatography with a mixed fluorescence substance resulted in that the spot of the resin was detected colorfully in accordance with its ultraviolet absorbing wave length. On the other hand, the double developing method using two kinds of developing solvents and diphenyl as a reference substance was successful in good separation and making one spot for the resin.

In conclusion, the detective limit was 20 ppm. CI resin was not detected in marketed grapefruit, orange and lemon imported from USA.

(Received April 11, 1978)

クマロン-インデン樹脂はタール系の樹脂であり、グレープフルーツ、レモンおよびオレンジなどの被膜剤として米国では 200 ppm 以下で使用許可されている¹⁾。日本では許可外の樹脂として使用禁止されているものである。

クマロン-インデン樹脂は硫酸存在下でコールタール中に含まれるクマロンおよびインデンの重合反応によって合成されるもので、樹脂自体はいろいろの分子サイズをもった重合体の混合物である。

従来、この樹脂の分析法は樹脂自体²⁾や分解物の分析法^{3,4)}はあるが、食品に対する適切な検出法はない。そこでかんきつ類に対するより簡便で特異的な検出法を検討した。

クマロン-インデン樹脂は実際には被膜剤として 100 ppm 前後で比較的多量に使用されるものと推定し、使用基準の1/10、すなわち 20 ppm 程度の検出限界を目的とした。したがって操作の簡便化を行い、さらに判定の確かさを高めるために混合けい光体薄層クロマトグラフィー^{5,6)}を用いた。また混合物のスポットを単一化する方法として2段展開法を開発した。

実験方法

1. 試薬および樹脂

* 国立衛生試験所：東京都世田谷区上用賀 1-18-1

ジフェニル (mp 70°), o-フェニルフェノール (mp 56°), パラオキシ安息香酸ブチル (mp 215°): 和光純薬工業(株)製の試薬を使用。シアベンダゾール: 大日本製薬(株)製サイベンゾール散を3回エタノールで再結晶したもの (mp 304°)。クマロン-インデン樹脂 (CI 樹脂) およびカルシウムポリベイル樹脂: 米国食品添加物 (規格品)。

オレイン酸、カルナバワックス、モルホリン脂肪酸塩およびセラック樹脂: リンレイ(株)製のものを使用。オキシエチレン高級脂肪酸アルコール: 日研化学(株)製、食品添加物規格品。石油パラフィン: 日本精蠟(株)製のものを使用。酢酸ビニル樹脂: 和光純薬工業(株)製の試薬を使用。

薄層クロマトグラフィー用展開溶媒: 第1展開溶媒、シクロヘキサノン-ベンゼン (2:1); 第2展開溶媒、ベンゼン。再確認用展開溶媒: 第1展開溶媒、メタノール; 第2展開溶媒、クロロホルム

2. 装置および薄層クロマトプレート

混合けい光体入り薄層プレート: 和光純薬工業(株)製, Wako gel FM プレート (5×20 cm)。混合けい光体用ランプ: 東芝(株)製 PAN-UV ランプ。

254 nm 発光けい光体入りプレート: メルク(株)製, Silica Gel 60 F₂₅₄ プレート (5×20 cm)。254 nm 発光

用ランプ: 大沢紫外線工業(株)製スーパーライト。

高速液体クロマトグラフ: LDC-UV 検出器および昭和電工(株)製屈折計 SE-11 型を検出器とした組立型液体クロマトグラフ。カラムは Shodex GPC, A-802 および A-803 を使用。

3. クマロン-インデン樹脂 (CI 樹脂) 標準溶液

A 液: CI 樹脂をクロロホルムに溶かし濃度 2 mg/ml とする (5 μ l 中に 10 μ g)。

B 液: CI 樹脂およびジフェニルのクロロホルム混合溶液。濃度は各々 2 mg/ml とする。

4. 試験溶液の調製

表皮に水分が付着している場合は口紙で簡単に取り除いた後、合計重量 200 g になるよう 2~4 個のレモン、オレンジおよびグレープフルーツについて、果実の中心線を横切るように切ったもの (1 個について 4~8 片) を各個から均等に採集する。次に表皮を果肉から分離しビーカーに入れ、170 ml のクロロホルムを加えた後、ビーカーの口をアルミはくで覆い、60 分以上振り動かしながら表皮に付着する樹脂を抽出する。もし表皮が大きすぎるときは最小必要限度で細切し、できるだけ精油成分が抽出されるのを避ける。抽出済みの表皮はさらに 30 ml のクロロホルムで洗い、洗液は抽出液に合わせる。抽出液は口紙でろ過し、ろ液に無水硫酸ナトリウム少量を加え脱水した後、抽出液 50 ml をとりクロロホルムを留去する。残留物はクロロホルム 1 ml に溶かして試験溶液とする。

5. CI 樹脂の薄層クロマトグラフィー

混合けい光体入り薄層プレートに標準溶液 B 5 μ l, 試験溶液 5 μ l, 次に試験溶液 5 μ l および標準溶液 A 5 μ l の混合スポットの順でスポットし、計 3 個のスポットを展開させる。

展開法は 2 段展開法を用い、第 1 展開溶媒で原点より 13 cm 展開し、展開溶媒を室温放置もしくはドライヤー (室温) を用いて完全に揮散させた後、暗所で PAN-UV ランプを照射すると標準溶液 B の溶媒先端に赤色のジフェニルのスポットを確認できる。次にジフェニルのスポットより 1 cm 下の位置 (原点より約 8 cm の位置) まで第 2 展開溶媒で展開し前回同様に完全にプレート上の溶媒を揮散させ、PAN-UV ランプで再び照射すると白色のプレート原点より 7.4 cm の位置に CI 樹脂の暗かっ色のスポットが確認される。対照として標準溶液 B を用い、また表皮に常在する物質の影響は混合スポットを参照して判断し確認する (Fig. 1)。

この方法による場合検出限界はかんきつ類 200 g に対して 20 ppm である。

6. 他の展開溶媒を用いる再確認法

前記方法で判定不可能な場合のみ使用するものである。前項と同様に 3 種の溶液をプレート上にスポットし、メタノールを第 1 展開溶媒で展開する (13 cm)。プ

Fig. 1. Thin-layer chromatography of CI resin by double developing method

A, first development; B, second development; TLC conditions, plate, Wako gel FM plate; first developing solvent, cyclohexane-benzene (2:1); second developing solvent, benzene; 1, CI resin+diphenyl; 2, prepared solution; 3, prepared solution + CI resin

Spot: a, CI resin (dark brown); b, diphenyl (red)

Color of a plate, white under the light of PAN-UV lamp

レート上の溶媒を揮散させた後、展開されたプレート上ジフェニルをはじめとするスポットのうちで最も移動距離の少ないスポット (他の添加物およびかんきつ類成分のスポットも含む) から 1 cm 下の位置までクロロホルムを第 2 展開溶媒として展開する。この場合 CI 樹脂はクロロホルム移動先端の付近に暗かっ色のスポットとして確認できる。

実験結果

1. CI 樹脂の抽出

かんきつ類の精油成分をできるだけ除去するため、CI 樹脂をよく溶かすクロロホルムで表皮上の樹脂のみ抽出する方法をとった。実際に CI 樹脂を使用している試料を入手することが困難であったので、CI 樹脂およびジフェニルを含まないレモン 200 g に 100 ppm に相当する CI 樹脂のクロロホルム溶液を表皮に塗り、2 日間室温で放置し乾燥した。

この CI 樹脂含有レモンを本法によりクロロホルム抽出し、抽出液をメルク社製 254 nm 発光けい光体入りプレートに帯状にスポットし、ベンゼンで展開後、紫外線ランプ (254 nm) 下プレート上の暗点部分のシリカゲルを分取し、CI 樹脂を 20 ml のクロロホルムで抽出した。次に抽出液のクロロホルムを留去し、残留物を n -ヘキサン 800 ml に溶かして吸収スペクトルを測定した。その結果 Fig. 2 のように 265 nm における吸光度の比較から本法による抽出操作の回収率は 90.5% であることが

Fig. 2. Absorption spectra of coumarone-indene resin (CI resin) in the *n*-hexane solution
A, CI resin (concentration, 25 µg/ml);
B, CI resin extracted from lemon coated with CI resin (corresponding to the concentration of 25 µg/ml); C, absorption derived from an adsorbent on a plate

判明した。

2. 薄層クロマトグラフィー

2.1 CI 樹脂

CI 樹脂は重合体であり Fig. 1-A に見られるように展開液媒によって様々の *R_f* 値を示すスポットが得られる。したがってこの重合体のスポットが一つのスポットに集合するのが望ましく、展溶媒を検討したところシリカゲル系プレート (和光純薬工業(株)製, メルク社製ともに) ではベンゼンおよびクロロホルムを用いることにより Fig. 1-B のように一つのスポットになった。しかし CI 樹脂のスポットはいずれの場合も展開プレートの溶媒前線に非常に接近していた。

2.2 ジフェニルの妨害

ジフェニルはかんきつ類の防ばい剤として使用されており, CI 樹脂と同様にクロロホルムで容易に抽出される。また本法において, ベンゼンおよびクロロホルムで展開すると同じ *R_f* 値を示し, CI 樹脂の薄層クロマトグラフ法に対して重大な妨害物であることが判明した。そこでジフェニルと CI 樹脂を分離すべく展開溶媒および操作法を検討した結果, シクロヘキサン-ベンゼン混液 (2:1) およびメタノールが展開溶媒として有効であった。したがってジフェニルを展開標準物質として用いることにより, 先に記した (実験結果, 2.1) 展開溶媒を合わせて本法のようなシクロヘキサン-ベンゼン系を用いる 2 段展開法を設定した。

Fig. 3. Thin-layer chromatography of substances related to citrus fruit by double developing method

A, first development; B, second development; TLC conditions, the same as Fig. 1; 1, CI resin; 2, calcium poly pale resin; 3, diphenyl + *o*-phenylphenol + thiabendazole + butyl *p*-hydroxybenzoate

Spot: a, CI resin (dark brown); b, diphenyl (red); c, *o*-phenylphenol (purple)

Color of a plate, white under the light of PAN-UV lamp

2.3 他の樹脂および関連化合物

関連ある樹脂の中でカルシウムポリベイル樹脂 (松脂由来) がクロロホルムに溶け, 254 nm にも吸収があるので CI 樹脂の妨害の可能性もあったが, 第1展開, 第2展開においても原点にとどまり, CI 樹脂の妨害とはならなかった。

その他の関連ある物質としてパラオキシ安息香酸ブチル, *o*-フェニルフェノールおよびチアベンダゾールが吸収を有する化合物として妨害の可能性があったが, 第1展開で原点にとどまり, 第2展開では CI 樹脂と明確に分離できることから, 全く妨害とはならなかった (Fig. 3)。

その他の樹脂としてオキシエチレン高級脂肪酸族アルコール, 酢酸ビニル樹脂, オレイン酸, カルナバワックス, 石油パラフィン, モルホリン脂肪酸塩およびセラック樹脂は光の吸収がないもの, またあっても少ないものがあり有色スポットを生じない場合や, 第1, 第2展開において原点より移動しない場合があったりして妨害にはならなかった。

2.4 他の展開溶媒を用いる方法

再確認のための他展開溶媒の検討をした結果, 本法とほぼ同様の操作を行い第1展開溶媒をメタノール, 第2展開溶媒をクロロホルムとする方法を設定した。第1展開ではジフェニルをはじめとする妨害物質として可能性のある光吸収化合物は溶媒前線に移動し CI 樹脂のみが原点にとどまった。かんきつ類精油成分も含めて最も移

Table 1. Coumarone-indene Resin in Marketed Fruits

Sample		Coumarone-indene resin	Note ^{a)}
Grapefruit	1	ND ^{b)}	Diphenyl
	2	"	"
	3	"	"
	4	"	Diphenyl trace
	5	"	
Orange	1	"	
	2	"	
	3	"	
	4	"	
	5	"	
Lemon	1	"	
	2	"	
	3	"	
	4	"	
	5	"	

^{a)} Other substance detected^{b)} ND, not detected

Fig. 4. High performance liquid chromatography of CI resin using GPC-column

A, detected by absorption at 254 nm; B, detected by RI.

Solid line, CI resin; broken line, standard polystyrene for molecular weight; peak 1, 1.1×10^5 ; peak 2, 3.7×10^4 ; peak 3, 1.0×10^4 ; peak 4, 2.2×10^3 .

Column: Shodex GPC, A802+A803

Eluent: Tetrahydrofuran

Flow rate: 1.0 ml/min

Pressure: 14.0 kg/cm²

Column temp.: 16°C

Sample size: 0.5%, 100 μ l

動距離の少ないスポットの 1 cm 下まで第 2 展開を行うと溶媒前線の近くに暗かっ色の CI 樹脂を確認できた。

3. 市販かんきつ類中の CI 樹脂

市販米国産のかんきつ類について本法を用いて調べた結果、レモン、グレープフルーツおよびオレンジ各 5 検体からはいずれも CI 樹脂は検出しなかった (Table 1)。

4. 高速液体クロマトグラフィーの検討

CI 樹脂が重合体であることから定量化への検索および平均分子量とその分散状態を調べるために GPC カラム (ゲル浸透クロマトグラフィー用カラム) を用いて高速液体クロマトグラフィーを行った。

Fig. 4 のように Shodex GPC カラム, A-802 および A-803 を連結して使用した結果、平均分子量は標準ポリスチレンを対照とすると 1,000 前後を示し、当初推定された分子量よりも小さい値を示した。また数種の重合体が存在しピークがブロードであってこのままの条件では定量化は不可能であった。

考 察

CI 樹脂は重合体であり数種の重合度の異なるものを含有しているので薄層クロマトグラフ法による分析は困難を極めた。それはプレート上で 1 個のスポットに集合させる必要があること、さらにこの限定された条件下で他の樹脂、添加物およびかんきつ類自体の成分から分離することであった。最も妨害する可能性のあるジフェニルは展開標準物質として用いることにより解決した。またこの操作によりかんきつ類中のジフェニルも 20 ppm は同時に検出可能であった。

CI 樹脂の検出限界について、本法では試験溶液 5 μ l をスポットしたが、それ以上の容量をスポットすることにより、またクロロホルム抽出液全部を濃縮しスポットすることにより検出限界を下げることは理論的には可能である。しかし実際には展開時におけるテーリングの問題や CI 樹脂が被膜剤として多量に使用されることなど考慮して分析法の簡易化を行った結果、本法の検出限界は 20 ppm であった。

検出判定に際して、本法はシクロヘキサノン-ベンゼン系溶媒による展開距離とスポットの色調で判断したが、近似のスポットが存在し非常に判定が困難なときに限り再確認としてメタノール-クロロホルム系溶媒を用いた方がよかった。なぜならメタノール-クロロホルム展開法の場合は抽出成分中の妨害スポットの位置により第 2 展開距離が決定され、十分に展開距離を確保できず薄層クロマトグラフィーの意味をなさないときもあるからである。また溶媒にベンゼンを使用した場合はベンゼンの吸収がプレート上赤色を示すので十分にベンゼンを揮散させてからスポットを観察すべきであった。

スポットの展開距離について、表現として R_f 値も考慮したが 2 段展開するので非常に複雑になるので直接展開距離を表示した。

CI 樹脂の定量化について、プレート上で標準溶液のスポット面積比を求めれば半定量的に定量することは可能であろう。また試験溶液の全部をプレート上にスポットし分離した後 CI 樹脂の 265 nm における吸光度を求めても可能であったが、操作が非常に繁雑になり、簡便に検出する目的に反していた。また高速液体クロマトグラフィーによる定量化も可能性の高いものであったが、重合体の混合物でもあり今後カラムの選択などの検討が必要であろう。

要 約

1) かんきつ類の被膜剤 CI 樹脂の簡便で特異的な分析法を検討した。

2) 混合けい光体薄層クロマトグラフィーを行い吸収波長の差異によるスポットの色調から CI 樹脂を判定した。

3) 重合体である CI 樹脂を one spot 化するために 2 度異なる溶媒で展開する 2 段展開法を設定し、CI 樹脂を妨害もなく良好に分離することができた。

4) 妨害物質であるジフェニルは展開距離標準物質として用いることにより解決された。

5) CI 樹脂の検出限界は 20 ppm であり、市販米国

産グレープフルーツ、オレンジおよびレモンからは検出されなかった。

終わりに、CI 樹脂など種々の被膜剤の御提供をいただいた厚生省環境衛生局食品衛生課長野健一氏ならびに GPC 高速液体クロマトグラフィーの測定に御協力いただいた日本理化学電子(株)に感謝致します。

文 献

- 1) Department of Health, Education and Welfare of USA: "Code of Federal Regulations" Food and Drugs Parts, p. 430 (1975), U. S. A.
- 2) 神原 周, 藤原鎮男: "高分子分析ハンドブック" p. 213 (1965), 朝倉書店.
- 3) 松田種光, 戸原春彦, 後藤田正夫, 加賀俊平: "高分子材料" p. 436 (1962), 産業図書.
- 4) Groebel, W.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 129, 292 (1966). [Anal. Abstr., 14, 5010 (1967).]
- 5) 田村善蔵, 金 昌洙, 細田信子, 滝谷昭司, 鈴木政雄, 鈴木瑞枝, 井上正夫: 分析化学, 19, 518 (1970).
- 6) Tamura, Z.: Talanta, 19, 573 (1972).