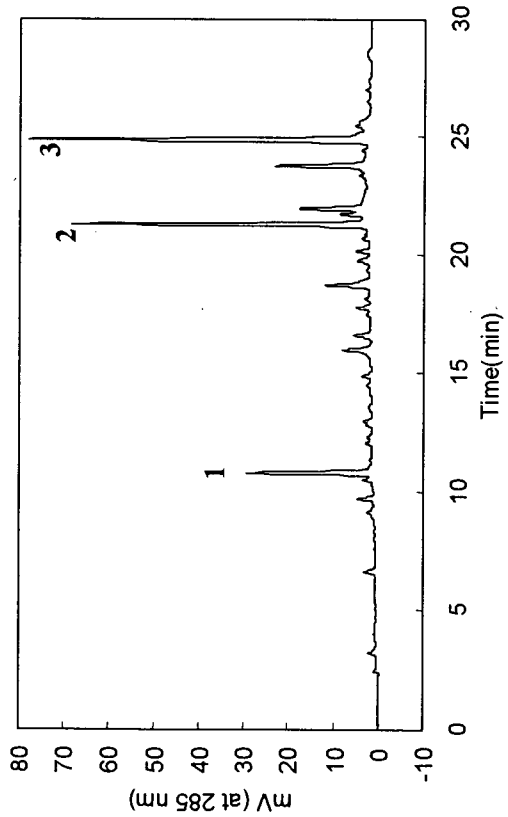


(A) ローズマリー抽出物 (A社粉末試料)



(B) ローズマリー抽出物 (B社液体試料)

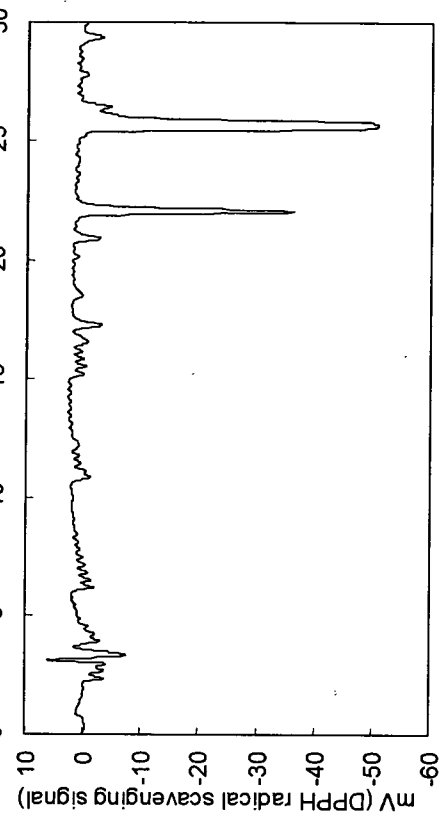
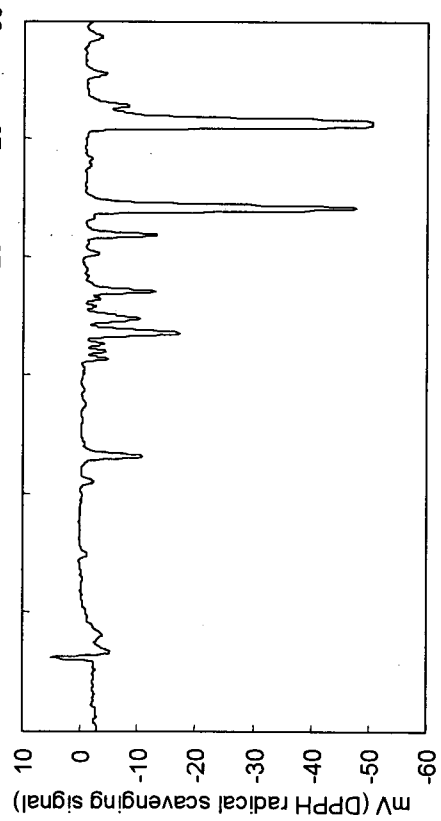
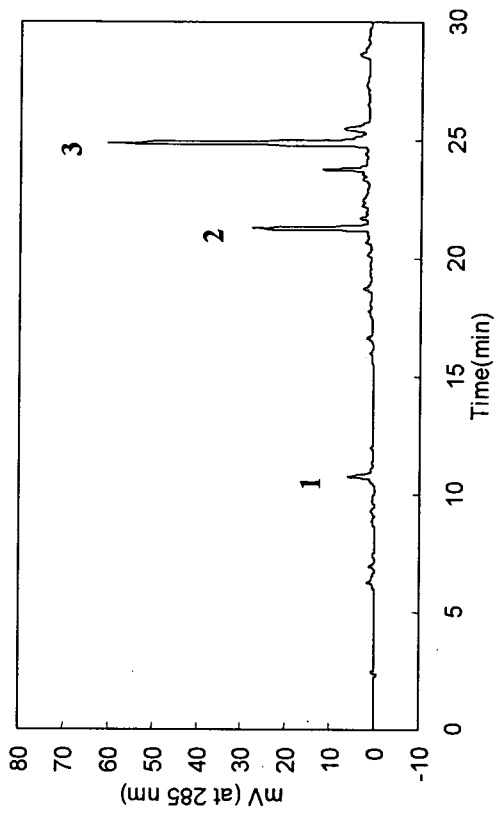


図2 ローズマリー抽出物のクロマトグラム(上)とポストカラム法によるDPPHラジカル消去クロマトグラム(下)

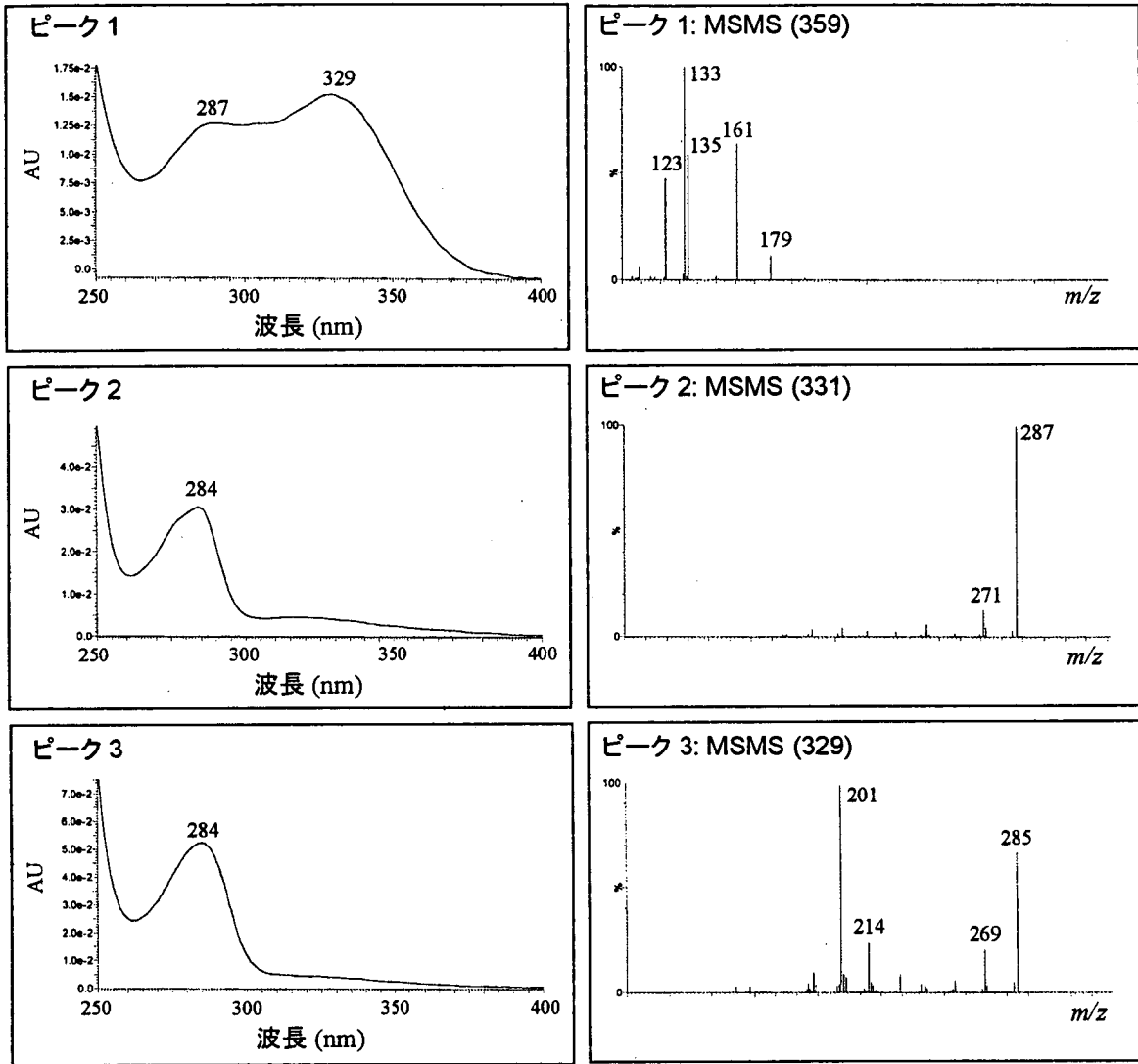
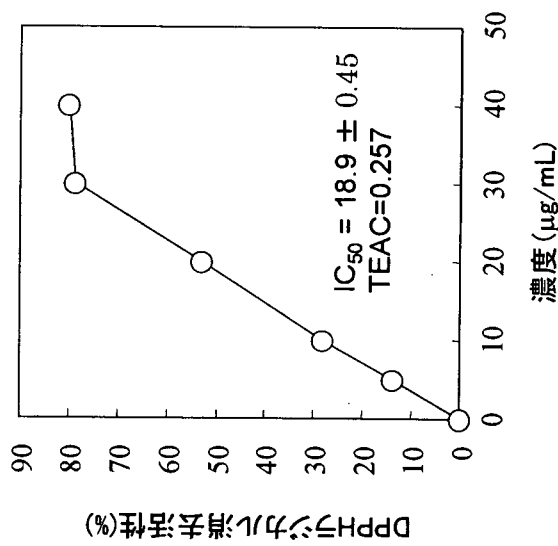


図3 ローズマリー抽出物中成分の吸収スペクトルとMSスペクトル

(A) ローズマリー抽出物 (A社粉末製品)



(B) ローズマリー抽出物 (B社液体製品)

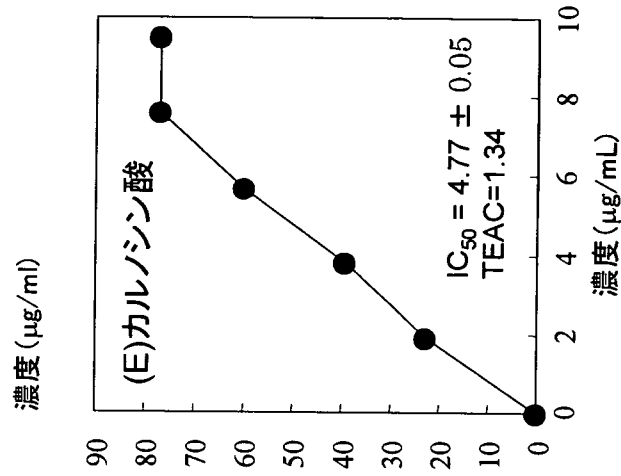
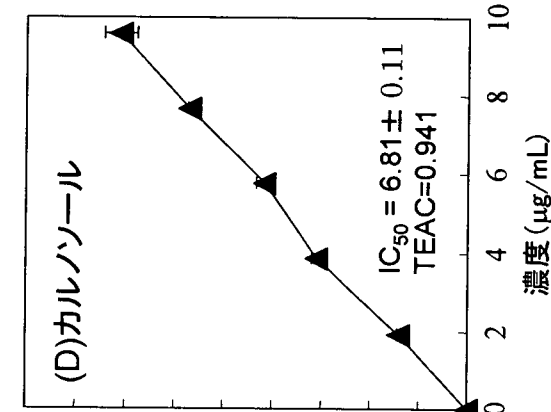
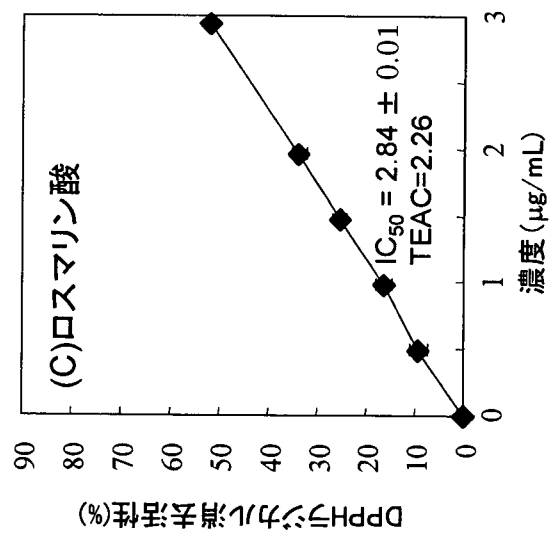
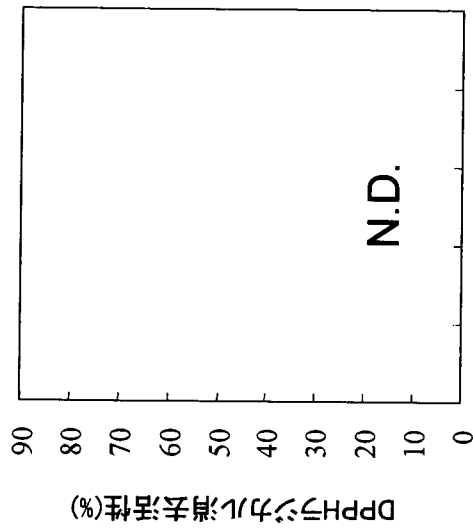


図4 ローズマリー抽出物および含有成分のDPPHラジカル消去活性

表1 抗酸化物質とローズマリー抽出物の混合時の活性と予測値との比較

| | 抗酸化物質 の活性 I_A (%) | ローズマリー抽出 物の活性 I_B (%) | 混合試料の 実測値 I_M (%) | 予測値 I_E (%) | I_M / I_E |
|--------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|------------------|-------------|
| BHA (2.40 µg/mL) | 35.0 | 25.3 | 55.5 | 51.4 | 1.08* |
| BHT (2.79 µg/mL) | 32.1 | 25.3 | 52.4 | 49.3 | 1.06* |
| AsA (2.38 µg/mL) | 30.8 | 25.7 | 59.8 | 48.6 | 1.23* |
| α-Toc (4.75 µg/mL) | 20.8 | 25.5 | 48.2 | 41.0 | 1.18* |
| δ-Toc (5.45 µg/mL) | 27.9 | 25.3 | 53.7 | 46.1 | 1.17* |
| EA (0.86 µg/mL) | 23.2 | 25.3 | 46.6 | 42.6 | 1.10* |
| SM (2.11 µg/mL) | 31.7 | 28.1 | 56.4 | 50.8 | 1.11* |
| pHyB (52.3 µg/mL) | 1.0 | 23.2 | 24.4 | 24.0 | 1.02 |
| VA (6.08 µg/mL) | 32.6 | 24.4 | 38.4 | 49.0 | 0.782* |
| PA (1.09 µg/mL) | 25.0 | 23.2 | 50.1 | 42.4 | 1.18* |
| GA (0.78 µg/mL) | 27.9 | 28.1 | 51.1 | 48.1 | 1.06* |
| pCou (57.0 µg/mL) | 31.4 | 24.5 | 38.6 | 48.1 | 0.807* |
| Fer (3.23 µg/mL) | 22.5 | 25.7 | 49.6 | 42.4 | 1.17* |
| Caf (1.43 µg/mL) | 25.4 | 25.6 | 51.1 | 44.5 | 1.23* |
| AG (4.75 µg/mL) | 1.4 | 25.6 | 25.7 | 26.6 | 0.967* |
| LT (1.62 µg/mL) | 20.0 | 23.2 | 43.3 | 38.6 | 1.12* |
| CT (1.24 µg/mL) | 29.3 | 28.1 | 48.6 | 49.1 | 0.989* |
| TX (1.74 µg/mL) | 23.2 | 23.2 | 48.0 | 41.0 | 1.17* |
| KM (4.05 µg/mL) | 29.5 | 23.2 | 53.7 | 45.9 | 1.17* |
| QC (1.09 µg/mL) | 28.0 | 28.1 | 52.8 | 48.2 | 1.10* |
| MY (1.05 µg/mL) | 24.5 | 25.6 | 48.5 | 43.8 | 1.11* |
| MO (3.20 µg/mL) | 27.6 | 28.1 | 51.2 | 47.9 | 1.07* |
| FT (0.99 µg/mL) | 26.0 | 23.2 | 50.6 | 43.2 | 1.17* |
| RU (3.33 µg/mL) | 22.9 | 25.6 | 47.9 | 42.6 | 1.12* |
| CY (0.81 µg/mL) | 28.0 | 25.6 | 51.3 | 46.4 | 1.10* |
| PG (3.80 µg/mL) | 27.6 | 25.6 | 49.4 | 46.1 | 1.07* |

BHT: ブチルヒドロキシトルエン、BHA: ブチルヒドロキシアニソール、AsA: アスコルビン酸、α-Toc, α-トコフェロール、δ-Toc, δ-トコフェロール、EA: エラグ酸、SM: セサモール、pHyB, *p*-ヒドロキシ安息香酸、VA: バニリン酸、PA: プロトカテク酸、GA: 没食子酸、pCou, *p*-クマル酸、Fer: フェルラ酸、Caf: カフェ酸、AG: アピゲニン、LT: ルテオリン、CT: カテキン、TX: タキシフォリン、KM: ケンフェロール、QC: ケルセチン、MY: ミリセチン、MO: モリン、FT: フィセチン、RU: ルチン、CY: シアニジン、PG: ペラルゴニジン。ローズマリー抽出物濃度: 9.45 µg/mL。* $p < 0.05$ 。

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）

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 19 年度分担研究報告書

酸化防止剤等の品質評価法に関する研究

-天然酸化防止剤 γ -オリザノールの NMR を用いた定量法に関する研究-

分担研究者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官

研究要旨

昨年度に引き続き、 γ -オリザノールの定量法と抗酸化活性の評価法について検討した。本品の含量について、HPLC法、定量核磁気共鳴(qNMR)法およびERETIC (Electronic REference To access In vivo Concentrations)法で定量した。qNMR法は、ヘキサメチルジシラン(HMDS)を濃度標準とする方法であり、ERETIC法は、スペクトル中に任意の周波数を持つ電気信号を与え、その信号とのシグナル強度比より未知濃度試料の定量を行う方法である。求められた定量値は、HPLC法=qNMR法=ERETIC法であった。特に、qNMR法は測定対象の標準品が入手できない場合においてもHPLC法と同等の定量値を求めることが可能な方法であり、且つ、得られるスペクトルデータは定量性を持つ参照スペクトルとしても有用であると考えられた。したがって、従来法では有効成分の定量が困難であると思われる他の既存添加物中の規格基準法として活性評価による評価法以外にもqNMR法が有効であることが示唆された。

A. 研究目的

食品添加物の定量分析には、クロマトグラフィーを利用する方法、化学的な反応を利用する方法(滴定法等)、化合物固有の吸光度を利用した方法(吸光度法)等が主に利用されている。しかしながら、分析対象とする品目が複雑な混合物であり、且つ分析対象の化合物の標準品が入手不可能な場合、上記のいずれの方法によっても真の定量値を求めることは実質的に不可能である。実際に上記条件に相当し、数多くの定量不可能な食品添加物があり、これらの品質規格基準設定が遅れている。

一方、食品添加物公定書において天然色素類では、各色素成分の含量を規定せず、「色価」という色の強度値を限度値として採用している。これは、天然色素の有効性が色調やその強度であることから、「色価」を評価し、その値が基準値以上であればその天然色素の品質がある一定以上に確保されているという考え方に基づいている。こ

のように定量分析が困難で規格基準設定が遅れている他の天然添加物についても有効性から一定の規制値を付加する評価法を早急に設定し、食品添加物の品質確保がすることが必要であると思われる。

天然酸化防止剤 γ -オリザノールは、「米ぬか又は胚芽油から得られた、ステロールとフェルラ酸及びトリテルペンアルコールとフェルラ酸のエステルを主成分とするものである。」と既存添加物名簿に定義されている。また、その基原・製法・本質は、「イネ科イネ(*Oryza sativa* LINNE)の種子より得られる米ぬか又は胚芽油より、室温時含水エタノール及びn-ヘキサン又はアセトンで分配した後、含水エタノール画分から得られたものである。主成分はステロールとフェルラ酸及びトリテルペンアルコールとフェルラ酸のエステルである。」と既存添加物名簿収載品目リスト注解書に記載されている。

本品は主に油脂の酸化防止剤として用いられ、その酸化防止能はフェルラ酸の*p*-OH基によるものとされている。しかし、本品の定量法については、十分に検討されておらず、公的な方法が提出されていない。これは、本品が定義に記載の通り、Fig. 1に示すステロールとフェルラ酸及びトリテルペンアルコールとフェルラ酸のエステル類を主構成成分とする混合物であるため、正確に含量を求めることのできる定量法を設定することが困難であることに起因する。

そこで前年度までに、天然酸化防止剤 γ -オリザノールの抗酸化価を簡便且つ迅速に評価する方法としてDPPH法について検討した。その結果、DPPH法により求められた抗酸化価が γ -オリザノール中のフェルラ酸エステル類の含量に比例することが明らかとなり、本法を用いて有効性を評価・規定することによって γ -オリザノールの品質を確保することが可能と考えられた。しかし一方で、有効性を評価・規定する方法ではある一定の品質を確保するだけのものであり、含有成分や不純物の同定・定量という点では不十分であることは否めない。

そこで本年度は、 γ -オリザノール中の含有成分の同定および絶対定量を目的として、定量核磁気共鳴(quantitative Nuclear Magnetic Resonance: qNMR)法およびERETIC (Electronic REference To access In vivo Concentrations)法を検討した。得られた結果について、前年度までのHPLCによる定量結果と比較しqNMR法の有効性について評価した。

B. 研究方法

1) 試料および装置

天然酸化防止剤 γ -オリザノール(γ -oryzanol)は、日本添加物協会を通じて得た1製品(Lot. No. F03633)を用いた。なお、製品の付帯情報として、定量値 98.1%と記載されていたがその定量法は不明であった。シクロアルテニルフェルレート(cycloartenyl *trans*-ferulate, (CF))標準品(γ -オリザ

ノール定量用、製品番号031-16741)およびフタル酸水素カリウム(PHP: 認定標準物質(CRM3001a: purity 100.00±0.027%))は、和光純薬工業(株)より購入したものをを用いた。ヘキサメチルジシラン((CH₃)₃-Si-Si-(CH₃)₃; HMDS: No. H0638, purity >98% GC)は東京化成工業(株)より購入したものをを用いた。

NMR測定は日本電子(株)製ECA500 (500 MHz)およびECA600 (600 MHz)を用いた。

2) HMDSを内標準としたqNMR法

2-1) HMDSの純度測定

HMDS約200 mgを精密に量り、重クロロホルム50 mLに溶解したものをHMDS stock solutionとした。PHP約10 mgを精密に量り、重メタノール4.0 mLに溶解し、HMDS stock solution 1.0 mLを加え混和した。この溶液0.6 mLをNMRチューブに移し、HMDS純度測定用サンプルとした。Table 1に示す条件で¹H-NMR測定を行い、次式(A)に従い、HMDSの純度を求めた。

式A)

$$\text{Purity}(\%) = \frac{I_{\text{HMDS}} / H_{\text{HMDS}}}{I_{\text{PHP}} / H_{\text{PHP}}} \times \frac{M_{\text{HMDS}} / W_{\text{HMDS}}}{M_{\text{PHP}} / W_{\text{PHP}}} \times 100$$

I = シグナル積分値, H = プロトン数(HMDS = 18, PHP = 4), M = 分子量(HMDS = 146.4, PHP = 204.2), W = 5 mL中の重量

2-2) qNMR法による γ -オリザノールの含量測定

CF標準品約10 mgを精密に量り、重クロロホルム4.0 mLに溶解し、2-1)で純度測定したHMDS stock solution 1.0 mLを加え混和した。この溶液0.6 mLをNMRチューブに移し、含量測定用サンプルとした。 γ -オリザノール製品も同様に調製し、次式B)に従い、含量を求めた。

式B)

$$\text{Content}(\%) = \frac{I_{\text{S-X}} / H_{\text{S-X}}}{I_{\text{HMDS}} / H_{\text{HMDS}}} \times \frac{M_{\text{S}} / W_{\text{S}}}{M_{\text{HMDS}} / W_{\text{HMDS}}} \times 100$$

I = シグナル積分値(HMDS = CH₃-Si, S-X = 特定置換基の積分値), H = プロトン数(HMDS = 18, S-X = 特定置換基のプロトン数), M = 分子量

(HMDS = 146.4, S = 602.9 (= CFの分子量)), W = 5 mL中の重量

3) ERETIC法 γ -オリザノールの含量測定

CF標準品約20 mgを精密に量り、重クロロホルムに溶解し、5.0, 2.5, 1.25 mg/mLに希釈調製した。この溶液0.6 mLをNMRチューブにそれぞれ移し、検量線作成用試料とした。Table 2に示すERETIC条件で測定を行い、4.3 ppmのERETIC信号のシグナル積分値を10としたときの3.9 ppmに観察されるMeO基のシグナル積分値とCFの濃度の関係より検量線を作成した(Fig. 6)。

別に食品添加物 γ -オリザノール製品を重クロロホルムに溶解し、5.0 mg/mLに調製したものを試料溶液とし、同条件で測定を行いCF標準品より作成した検量線から含量%を求めた(Fig. 5)。

4) LC/MS分析

CF標準品および γ -オリザノール製品を EtOH:Acetone (1/1)に溶解し、1.0 mg/mLにそれぞれ調製し、LC/MS分析用試料とした。

LC/MS条件 : column, TSKgel ODS-80Ts QA (2.0 \times 250 mm, 5 μ m); column temp., 40°C.; solvent, CH₃CN/MeOH (9/1):H₂O=9:1(0 min) - 1:0 (10-45 min); rate, 0.4 mL/min; inj., 5 μ L; detect, UV 320 nm, ESI negative mode.

C. 結果及び考察

1) HPLC 法による純度測定

LC/MSにより、CF標準品および γ -オリザノールに含有される主な化合物の確認を行った。検出波長 320 nm において、Fig. 2 の様にピークが観察され、ESI-MS および文献値との比較から、ピーク 1 を *cycloartenyl trans-ferulate*, ピーク 1' を *cycloartenyl cis-ferulate*, ピーク 2 を *24-methylenecycloartenyl trans-ferulate*, ピーク 3 を *campesteryl trans-ferulate*, ピーク 4 を *sitosteryl trans-ferulate*, ピーク 5 を *campestanol trans-ferulate*, ピーク 6 を *sitostanyl trans-ferulate* と同定した。CF標準品には、ピーク 1, 1', 2 が観察され、そのピーク

面積比は 1:1':2 = 97.7:1.5:0.8 であった。よって、1, 1', 2 のモル吸光係数が等しい、すなわち全て化合物のレスポンスファクターが等しいと仮定したとき、CF標準品の純度は 97.7% (異性体の合計 = 99.2%) と算出された。

次に CF標準品を用いてピーク 1 の面積と濃度の関係から検量線 ($R^2=1$) を作成し、 γ -オリザノール製品中のフェルラ酸エステル類の含量を CF として求めた。その結果、 γ -オリザノール製品に観察されたピーク 1~6 を合計した場合、93.1% と求められた。

2) qNMR 法による純度測定

クロマトグラフィーにより被検物中の有機化合物を定量する場合、測定対象物質と同物質の定量用(校正用)標準品が必要であり、さらに分析に用いた定量用標準品の濃度や純度の不確かさが明示されているときのみ、測定値の信頼性が厳密に確保される。しかし、実際のクロマトグラフィーによる分析では、被検成分の定量用標準品が入手できないことが多く、入手できたとしてもその含量や純度の不確かさについて明示されていることが希であるため、その測定値の信頼性については常に疑問が残る。なぜなら、現状では有機化合物の含量や純度の値付けは非常に困難であるため、実際にはクロマトグラフ上に検出されたすべてのピーク面積の和に対する主ピーク面積の比などから純度値を見積もっただけで十分に評価されているとは言い難いものなどが標準品として用いられているためである。さらに、純度の高い市販試薬を定量用標準品の代用品として用いれば何の問題はないと思われるかもしれないが、試薬メーカーは JIS や独自規格に適合するものを販売しているのであって絶対量を保証しているわけではないため、厳密には市販試薬の純度の不確かさが測定値に影響を及ぼす。すなわち、求められた定量値は、あくまでも「標準品」として用いたものを標準としたときの相対値であり、真値が求められているわけではない。

したがって、「定量用標準品」を使って定量を

行えば、その定量値が正確であると考えるのが分析化学の常識となっているが、「定量用標準品」の絶対純度が保証されていない限り、真値を求めるのは不可能であり、これが現状の定量分析法の限界である。

一方、核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance: NMR)法は、化合物の構造解析・定性分析に一般的に用いられ、日本薬局方(JP)および米国薬局方では既に数十種の品目の確認試験法に採用されている。NMR が化合物の構造解析の強力なツールとしてなる1つの理由として、観測核のシグナルが定量的に測定可能であることである。通常の¹H-NMR測定条件で得られるスペクトルに観察される化合物のプロトンシグナルは、置換基によって通常 0-15 ppm の測定範囲内に観察され、さらに観察された各シグナル積分値は置換基のプロトン数にほぼ対応する。さらにあまり知られていないが測定条件を最適化したときすべてのシグナル積分値は 99%以上の定量性を持つ。

よって、化合物上の2つの置換基のプロトン数(N₁, N₂)とシグナル積分値(I₁, I₂)の関係は式Cで表される。

式C

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{N_1}{N_2}$$

I = 置換基1および2のプロトンシグナル積分値,
N = 置換基上のプロトン数

さらに、2種の化合物(1, 2)が測定試料に混合されている場合には、シグナル積分値は各化合物のモル濃度に比例するので式Dとして拡張できる。

式D

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{n_1 m_1}{n_2 m_2} = \frac{n_1 W_1 / M_1}{n_2 W_2 / M_2}$$

n = プロトン数, m = モル濃度, W = 重量, M = 分子量

すなわち、式Dではいずれか一方の化合物に濃度および純度が明らかな化合物を内標準として用いれば、式Eが成立する。

式E

$$P_{sample} = \frac{I_{sample} / H_{sample}}{I_{std} / H_{std}} \times \frac{M_{sample} / W_{sample}}{M_{std} / W_{std}} \times P_{std}$$

sample = 試料, std = 内標準, P = 純度(%)

I = プロトンシグナル積分値, H = プロトン数,
M = 分子量, W = 重量

なお、¹H-NMRにおいて各シグナルが定量性を持つための測定条件については既に Pauli らおよび Saito らの報告に準じた(Table 1)。

qNMR 法により、γ-オリザノール製品および CF 標準品の純度を測定するために、基準物質兼濃度標準として HMDS (hexamethyldisilane)を用いた。¹H-NMR 測定において、基準周波数(0 ppm)を決めるための基準物質として TMS (tetramethylsilane)が通常用いられるが、沸点が低いため正確に秤量することが困難である。一方、HMDS は高温 NMR 測定において TMS の代わりに用いられる基準物質であり、沸点が高く秤量可能であり、濃度標準としても利用できる。そこで、HMDS を CDCl₃に溶解した HMDS stock solution を調製し、これを qNMR 測定時には5倍希釈して使用することとした。フタル酸水素カリウム (PHP: 認定標準物質(CRM3001a: purity 100.00 ± 0.027%))を用いて式Aより濃度校正を行った結果、HMDS の純度は 98.5%、今回調製した HMDS stock solution 中の HMDS の濃度は 27.58 mMであった。

次に、CF 標準品およびγ-オリザノール製品の純度を 0 ppm に観察される HMDS の Me 基に由来するシグナル積分値(18*H)に対する 3.90 ppm に観察されるフェルラ酸部の MeO 基(3*H)のシグナル積分値より、式Bにより CF として求めた(Fig. 3, 4)。その結果、CF 標準品の純度は 97.2% (SD = 0.6, n = 3)であり、γ-オリザノール製品の純度は CF として 93.7% (SD = 0.4, n = 3)と求められた。なお、3.89 ppm に小さなシグナルが観察されたが、cis-フェルラ酸エステル MeO 基に由来するものと考えられた。

3) ERETIC 法による純度測定

ERETIC (Electronic Reference To access In vivo

Concentrations)法とは、¹H-NMR スペクトル中に任意の周波数を持つ電気信号を与え、その信号との強度比より未知濃度試料の定量を行うものである。基準とするのは電気信号であるため、実際の試料に他の化合物を与える必要がない点で優れている。実際の方法は、濃度基準となる濃度既知の試料を用意し測定し、ERETIC 信号のオフセット・位相の調整を行う。次に ERETIC 信号の濃度を求め、同条件において未知濃度試料を測定し、ERETIC 信号との強度比より濃度計算する。すなわち、既知濃度試料と ERETIC 信号の強度比は式 F で表される。

式 F

$$ERETIC = REF \times \frac{A_{ERETIC}}{A_{REF}}$$

ERETIC = ERETIC 信号濃度, REF = 既知濃度試料の濃度, A_{ERETIC} = ERETIC 信号の積分値, A_{REF} = 既知濃度試料の積分値

次に、同 ERETIC 条件により未知濃度試料を測定するとき、未知濃度試料の濃度は式 G により求められる。

式 G

$$Comp = k \times ERETIC \times \frac{A_{comp}}{A_{ERETIC}}$$

Comp = 未知濃度試料の濃度, k = プロトンの数比

さらに、ERETIC 信号濃度を一定にしたとき、未知濃度試料のシグナル積分値は濃度と比例するため、式 H の検量線が成立する。

式 H

$$Comp = aX + b$$

a = A_{REF}/A_{ERETIC}, X = 未知濃度試料の積分値, b = 切片

そこで、CF 標準品を用いて、Table 2 に示す ERETIC 条件で測定を行い、4.3 ppm の ERETIC 信号のシグナル積分値を 10 としたときの 3.90 ppm に観察される MeO 基のシグナル積分値と CF の濃

度の関係より検量線(R² = 0.999)を作成した(Fig. 6)。次に、γ-オリザノール製品について同条件下で測定し、CF 標準品より作成した検量線から含量%を求めた(Fig. 5)。その結果、γ-オリザノール製品の純度は CF として 93.9% (SD = 3.1, n = 10) と求められた。ERETIC 法は試料に他の化合物を与える必要がない点で優れていたが、SD 値が 3.1 (n = 10)と大きく測定値の信頼性という点では満足できるものではなかった。これは温度、電磁波、電気ノイズ等の NMR 装置室内条件の変化により、ERETIC 信号強度が一定にならないためと考えられた。

D. まとめ

HPLC 法では、混合物中の成分の分離分析という点では優れているが、定量分析には純度既知の標準品が必須である点で劣っている。また、標準品自体の真の純度の確認はその測定原理上不可能であり、標準品の純度検定には別途試験法が必要である。

qNMR 法では、定量分析に被検成分と同物質の標準品を必要としない点で優れているが、分離分析という点では HPLC 法に比べ劣っている。しかし、得られた NMR スペクトル中の各シグナルはすべて定量性を持つことから、測定対象とした製品の品質を表す参照スペクトルとして有用であると考えられた。

ERETIC 法では、定量分析に標準品を必要としない点で最も優れているが、装置条件による測定誤差が大きいと考えられた。また、分離分析という点では qNMR 法と同様に HPLC より劣っていると考えられた。

γ-オリザノールの定量法として qNMR 法および ERETIC 法を検討し、従来の HPLC 法と結果を比較した(Table 3)。γ-オリザノール製品の含量を CF として求めたところ、HPLC 法、qNMR 法および ERETIC 法より求められた値はほぼ等しい結果となった。特に、qNMR 法は測定対象の標準品が入手できない場合においても HPLC 法と同等の定量値を求めることが可能な方法であり、且つ、得

られるスペクトルデータは定量性を持つ参照スペクトルとしても有用であると考えられた。

E. 参考文献

Akoka S, Trierweiler M. 2002. Improvement of the ERETIC Method by Digital Synthesis of the Signal and Addition of a Broadband Antenna Inside the NMR Probe. *Instrumentation Science & Technology* 30: 21-29.

Pauli GF. 2001. qNMR — a versatile concept for the validation of natural product reference compounds. *Phytochemical Analysis* 12:28-42.

Pauli GF, Jake BU, Lankin DC. 2005. Quantitative ¹H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis. *Journal of Natural Products* 68:133-149.

Pauli GF, Jake BU, Lankin DC. 2005. Quantitative ¹H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis. *Journal of Natural Products* 68:133-149.

Saito T, Ihara T, Sato H, Jancke H, Kinugasa S. 2003. International comparison on the determination of an ethanol aqueous solution by ¹H nuclear magnetic resonance. *Bunsaki Kagaku (The Japan Society for Analytical Chemistry)* 52:1029-1036.

Saito T, Nakaie S, Kinoshita M, Ihara T, Kinugasa S, Nomura A, Maeda T. 2004. Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia* 41:213-218.

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Sugimoto N, Koike R, Furusho N, Tanno M, Yomota C, Sato K, Yamazaki T, Tanamoto K. 2007. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Additives and Contaminants* 24: 799-806.

2. Uekusa Y, Sugimoto N, Yun YS, Sato K, Kunugi A, Yamazaki T, Tanamoto K. 2007. Neocrocic A:

a novel crocetin glycoside with a unique system for binding sugars isolated from gardenia yellow. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 55: 1643-1646.

3. Maruyama T, Sugimoto N, Kuroyanagi M, Kim IK, Kamakura H, Kawasaki T, Fujita M, Shimada H, Yamamoto Y, Tada A, Goda Y. 2007. Authentication and chemical study of *Isodonis Herba* and *Isodonis* extracts, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 55: 1626-1630.

4. 杉本直樹, 多田敦子, 山崎壮, 棚元憲一. 2007. 天然保存料カワラヨモギ抽出物の有効成分の確認. *食品衛生学雑誌* 48: 106-111.

5. 杉本直樹, 多田敦子, 黒柳正典, 米田祐子, 尹永淑, 功刀彰, 佐藤恭子, 山崎壮, 棚元憲一. 2008. グレープフルーツ種子抽出物および配合製品中の合成殺菌剤の調査. *食品衛生学雑誌* 49: 56-62.

(2) 学会発表

1. 杉本直樹, 古庄紀子, 建部千絵, 多田敦子, 末松孝子, 内海博明, 佐藤恭子, 山崎壮, 棚元憲一: 核磁気共鳴に基づく食品添加物の新規定量法の開発, 日本食品化学学会第14回総会・学術大会, 2008年5月, 西宮 [発表予定]

2. 島村智子, 平山大剛, 杉本直樹, 山崎壮, 松井利郎, 松本清, 受田浩之: 酸化防止剤の力価評価に対する各種抗酸化活性評価法の適用性 —天然物由来酸化防止剤について—, 日本食品科学工学会第55回大会, 2008年9月, 京都 [発表予定]

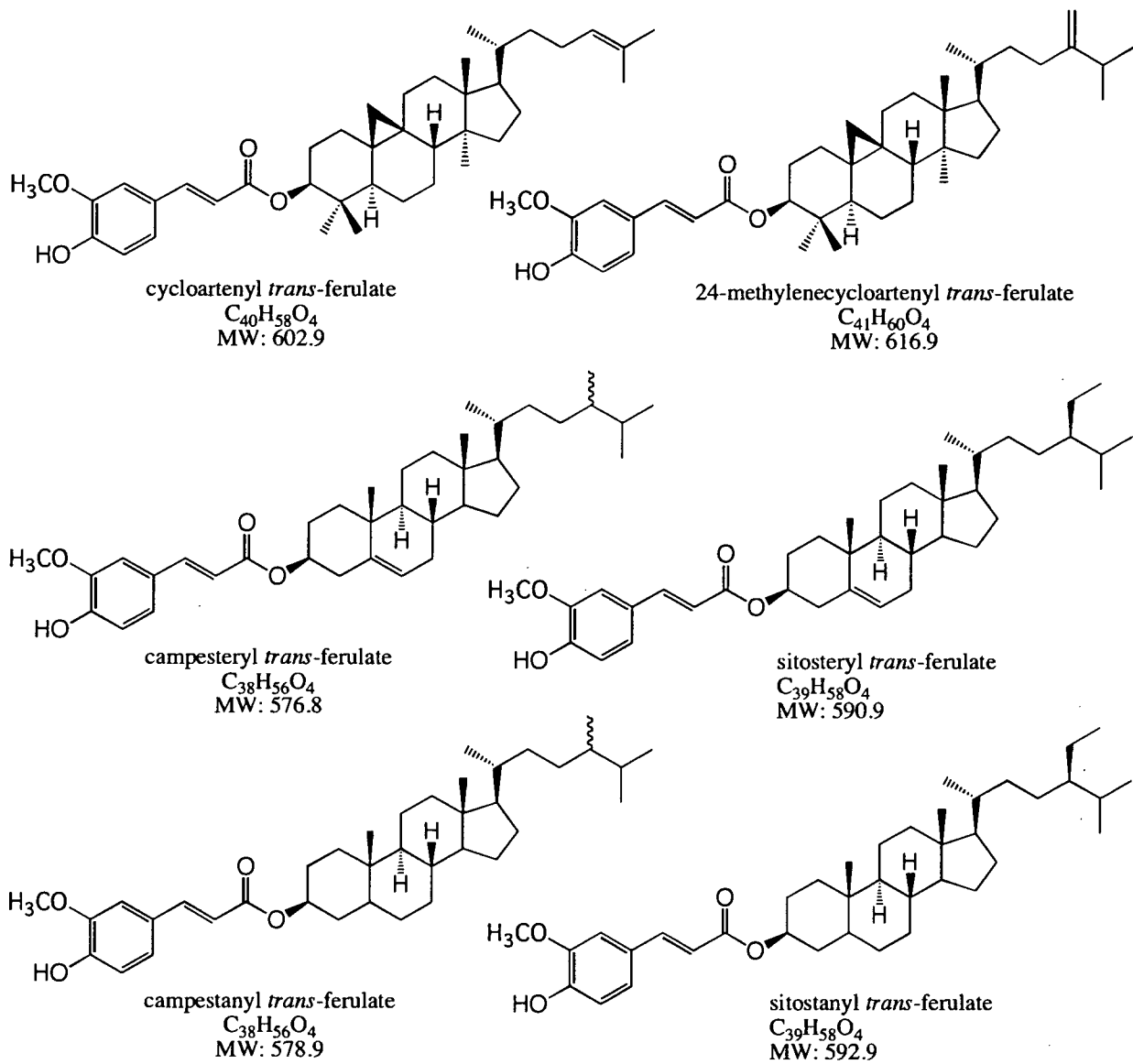


Fig. 1 Main constituents of γ -oryzanol

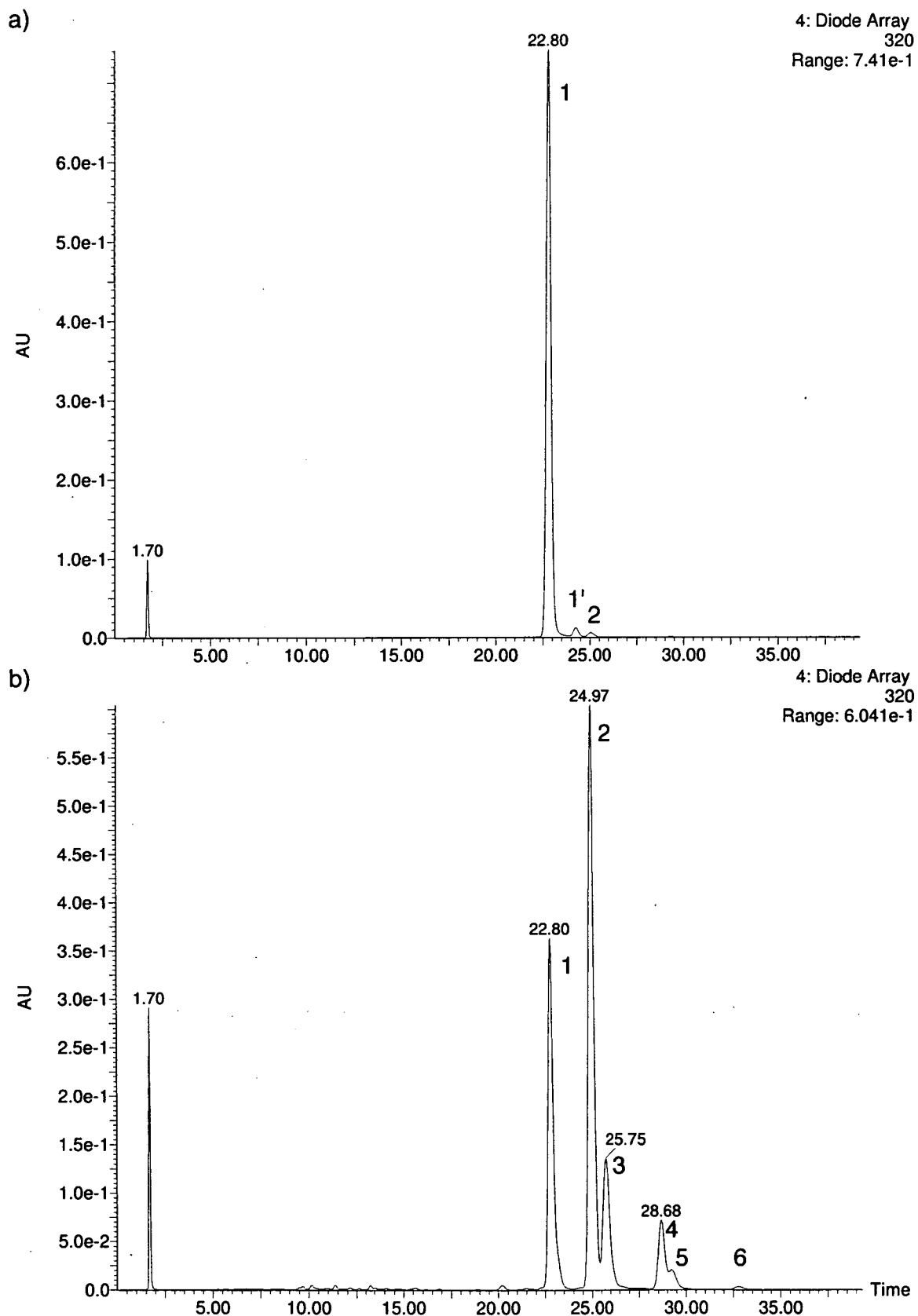


Fig. 2 LC profiles of cycloartenyl *trans*-ferulate standard (CF) and γ -oryzanol product
 a) Cycloartenyl *trans*-ferulate standard (CF). b) γ -oryzanol product.
 1 = cycloartenyl *trans*-ferulate, 1' = cycloartenyl *cis*-ferulate, 2 = 24-methylenecycloartenyl *trans*-ferulate, 3 = campesteryl *trans*-ferulate, 4 = sitosteryl *trans*-ferulate, 5 = campestanyl *trans*-ferulate, 6 = sitostanyl *trans*-ferulate

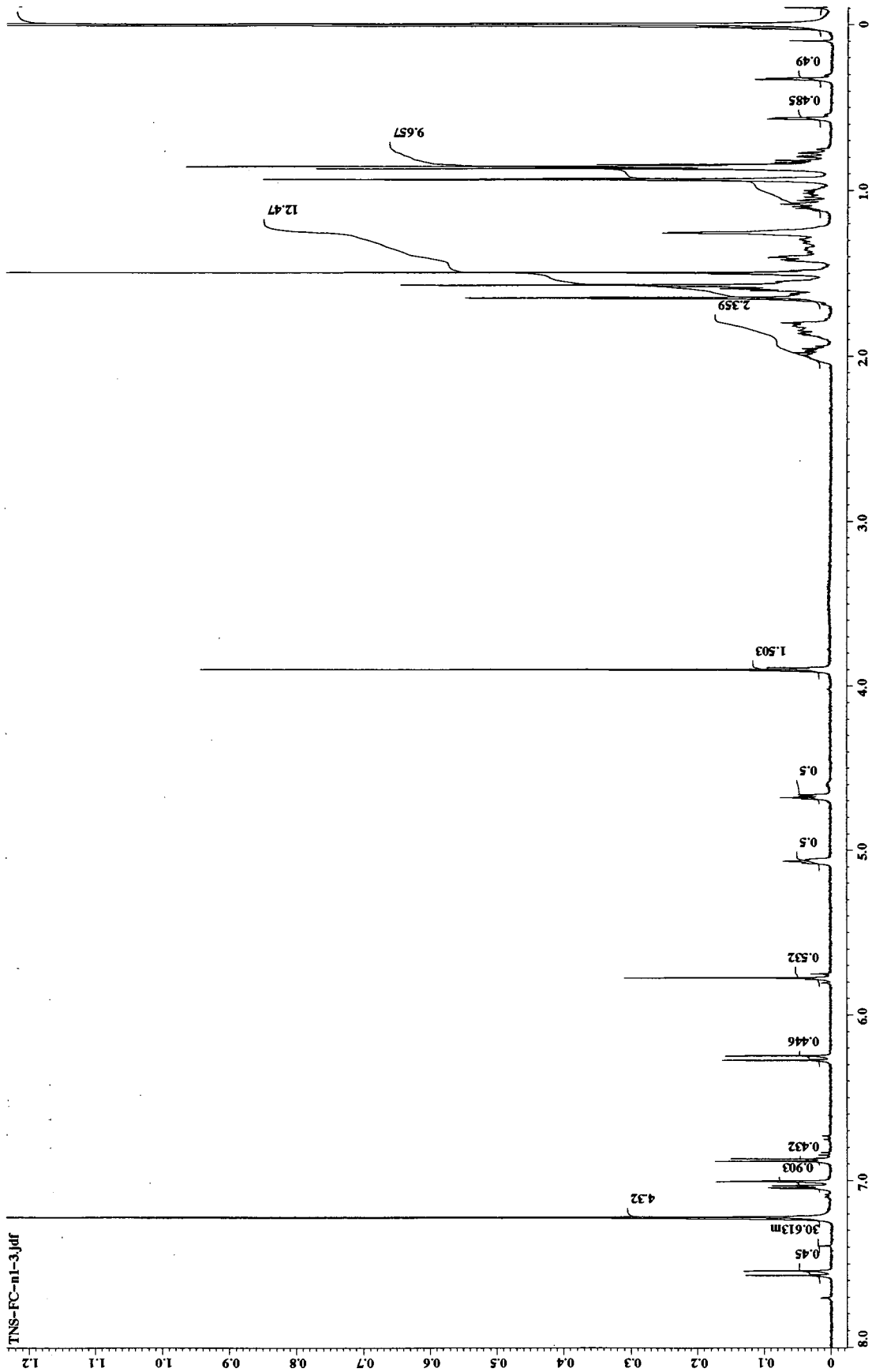


Fig. 3 ¹H-NMR (in CDCl₃) of Cycloartenyl trans-ferulate standard
 HMDS = 5.516 mM, Cycloartenyl *trans*-ferulate standard = 2.86 mM

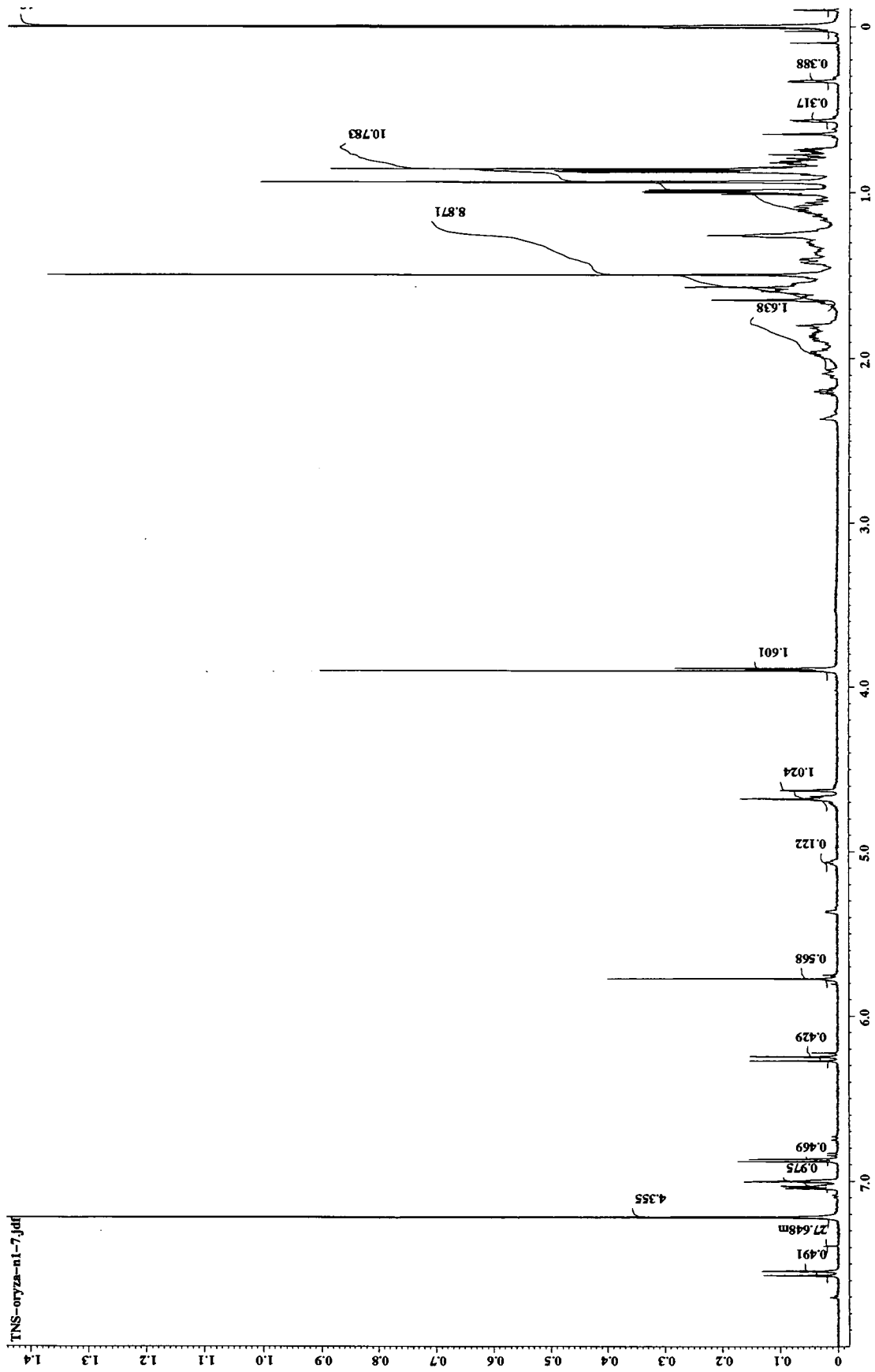


Fig. 4 $^1\text{H-NMR}$ (in CDCl_3) of γ -oryzanol
 HMDS = 5.516 mM, γ -oryzanol = 3.10 mM (calcd. as cycloartenyl *trans*-ferulate standard)

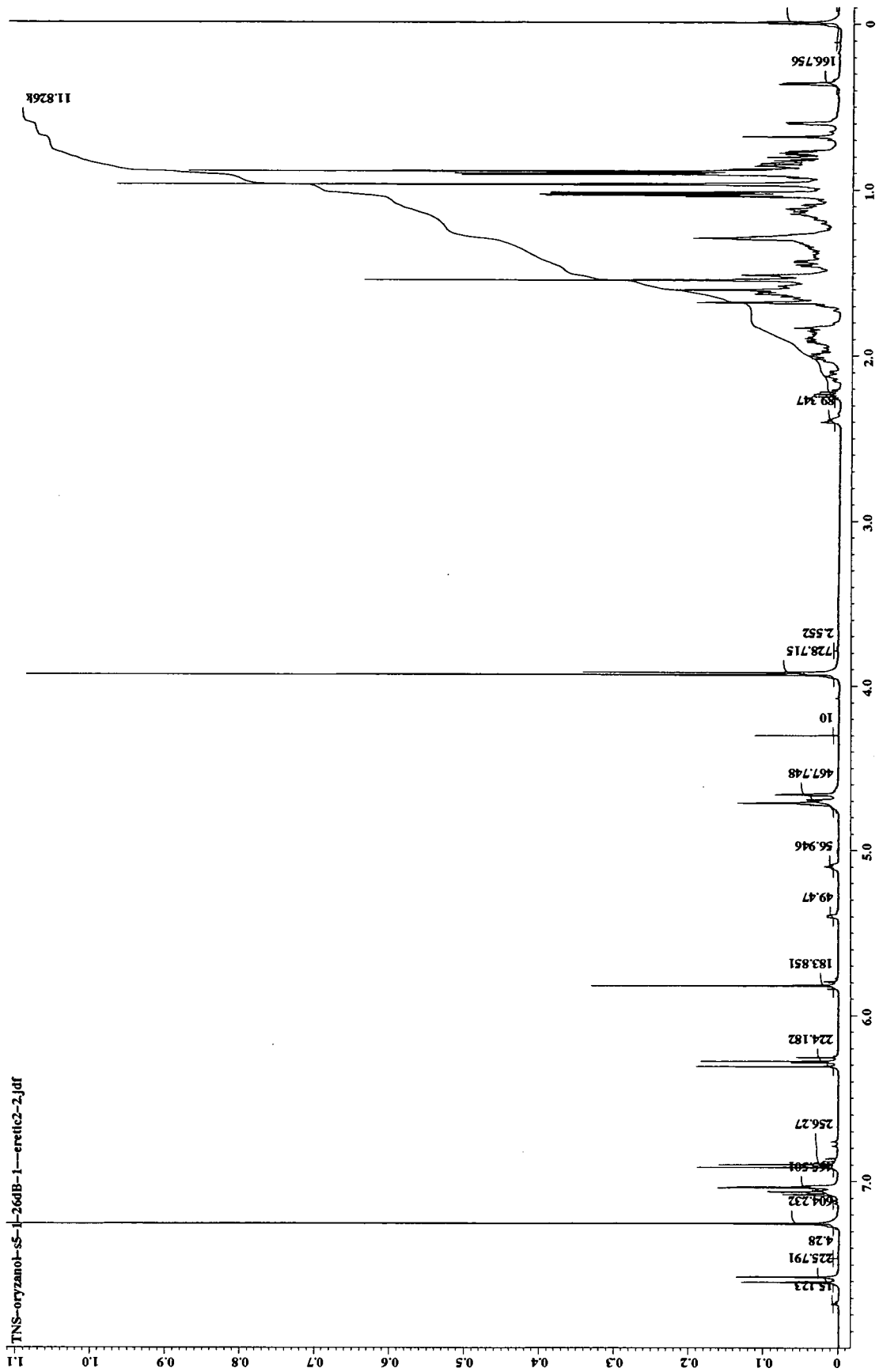


Fig. 5 ERETIC ¹H-NMR (in CDCl₃) of γ-oryzanol

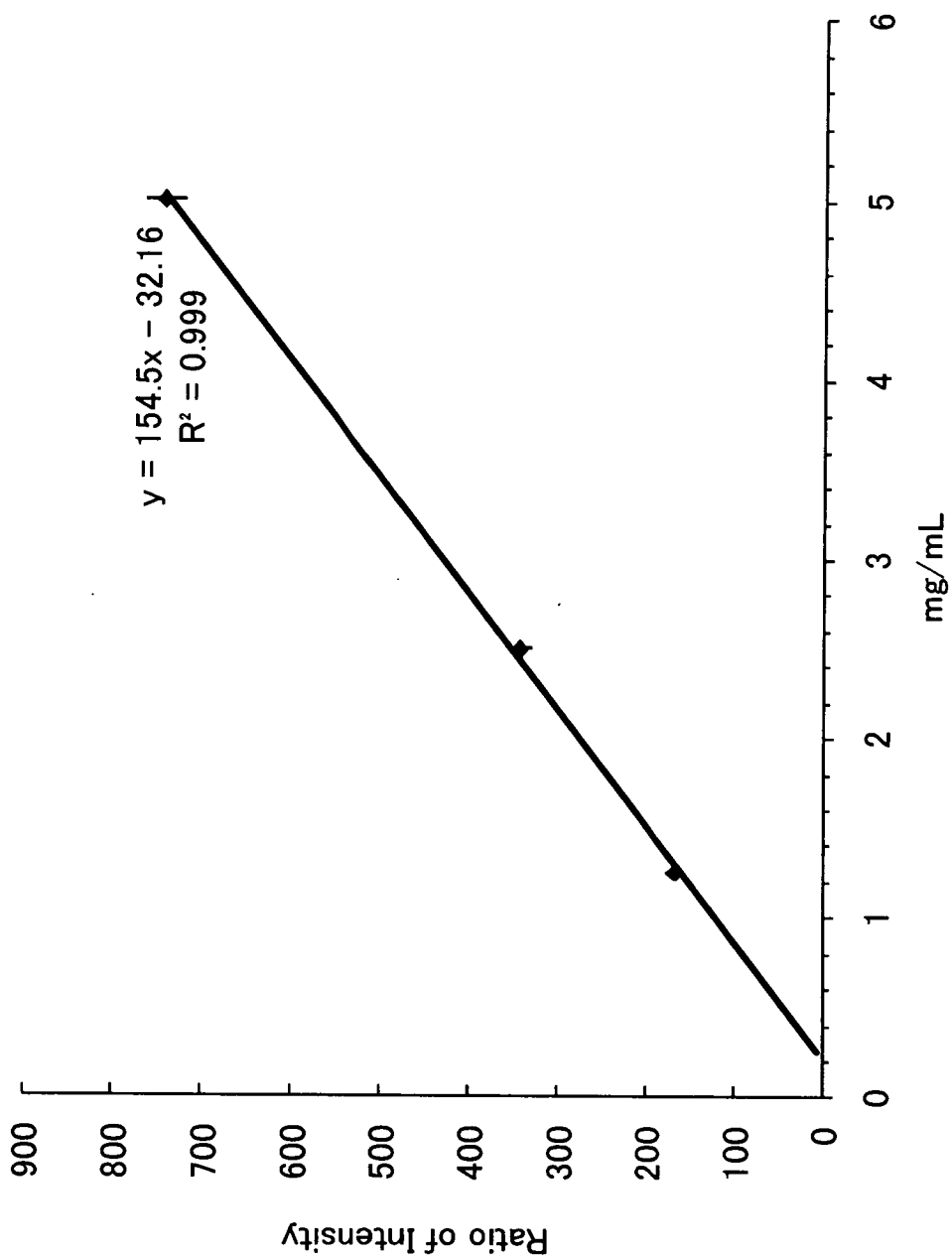


Fig. 6 Calibration curve of cycloartenyl *trans*-ferulate standard using ERETIC NMR

Table 1. Instrument and acquisition parameters

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| Spectrometer | JNM-ECA (600 MHz) |
| Probe | 5 mm indirect detection probe |
| Probe temperature | 25°C |
| Spectral width | - 5 - 15 ppm |
| Data points | 32000 |
| Flip angle | 45° |
| Pulse delay | 30 s ($>5 \cdot T_1$) |
| Scan times | 8 |
| Sample spin | 0 Hz |
| Internal standard | Potassium hydrogen phtalate (PHP) |

Table 2. Instrument and ERETIC acquisition parameters

| Spectrometer | JNM-ECA (500 MHz) |
|---------------------|-------------------------------|
| Probe | 5 mm indirect detection probe |
| Probe temperature | 25°C |
| Spectral width | - 2.5 - 12.5 ppm |
| Data points | 32000 |
| Flip angle | 90° |
| Pulse delay | 5 s |
| Scan times | 8 |
| Sample spin | 15 Hz |
| ERETIC offset | 4.3 ppm |
| ERETIC attenuator | 26 dB |
| ERETIC phase | -60 |

Table 3 HPLC法, qNMR法およびERETIC法より求めた含量の比較

| Method | Content | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| | Cycloartenyl <i>trans</i> -ferulate standard (CF std) | γ -oryzanol ^{a)} |
| HPLC | 99.2% (<i>trans</i> isomer = 97.7%, <i>cis</i> isomer = 1.5%) ^{b)} | 93.1% (sum of peaks 1-6) |
| qNMR | 97.2% (SD = 0.6, n = 3) | 93.7% (SD = 0.4, n = 3) |
| ERETIC | - | 93.9% (SD = 3.1, n = 10) |

a) 含量値は全てCFとして求めた。

b) 観察された全ピークの面積の合計に対する面積百分率

2. 酸化防止剤の成分・品質に関する研究