

図6 チャ抽出物がTK6細胞の細胞増殖、小核誘発、tk遺伝子突然変異に及ぼす影響

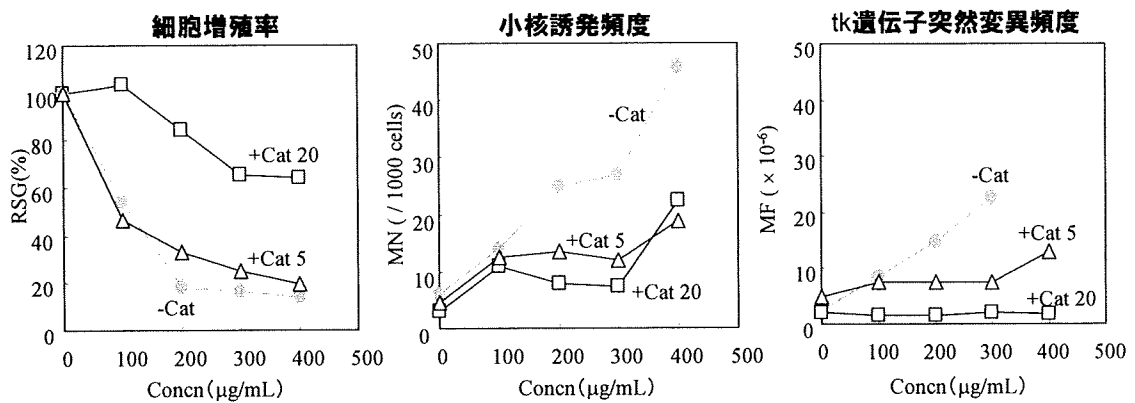


図7 カタラーゼ添加時のチャ抽出物の遺伝毒性

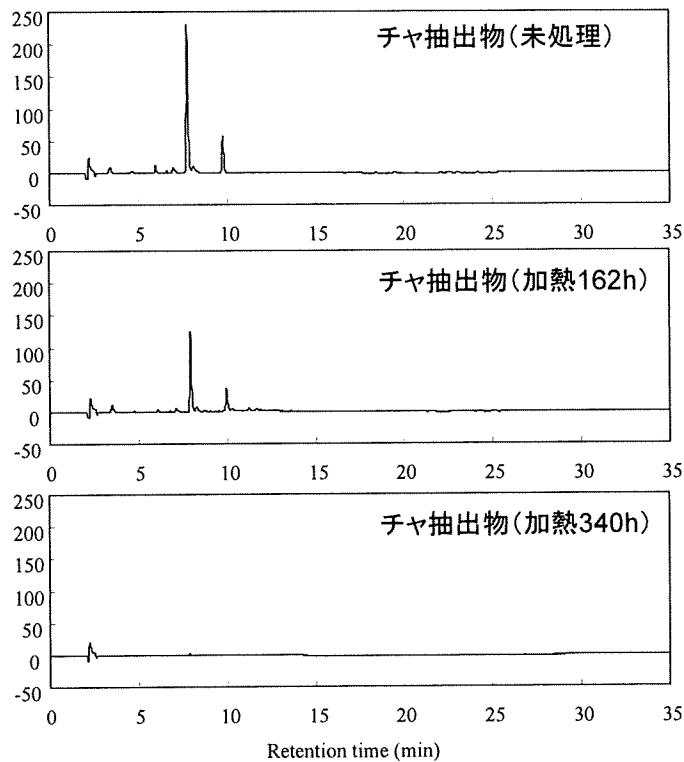


図8 加熱したチャ抽出物のクロマトグラム

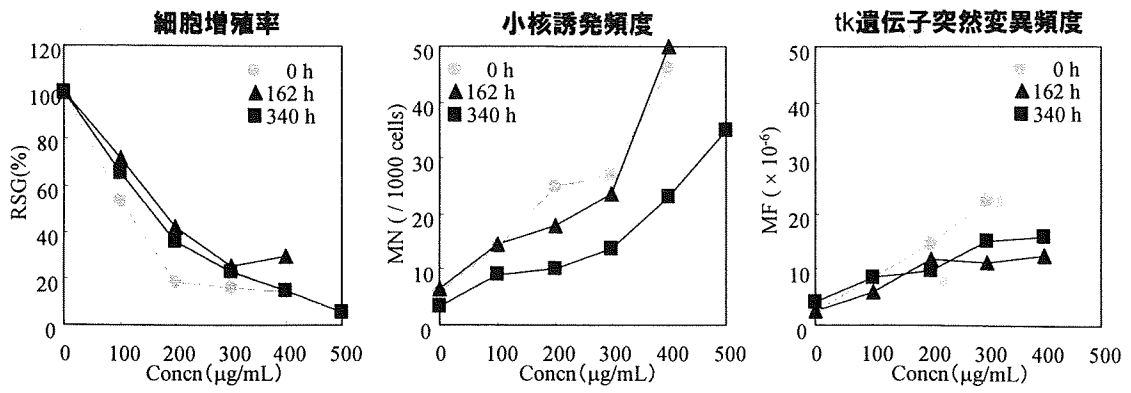


図9 チャ抽出物の熱分解物の遺伝毒性

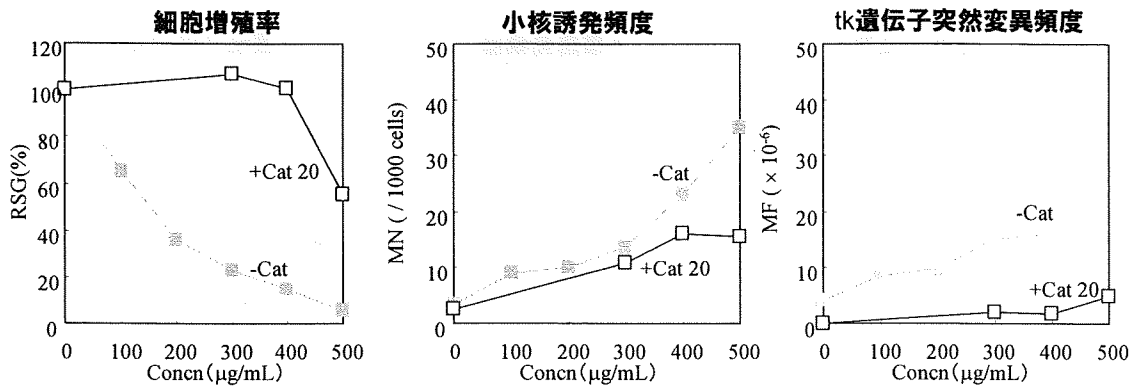


図10 カタラーゼ添加時の熱分解物の遺伝毒性

既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発

保存料・日持ち向上剤の抗菌活性と活性成分に関する研究

研究分担者 堀江正一（大妻女子大学）

研究協力者 小林晴美（埼玉県衛生研究所）

研究要旨

昨年度に引き続き、保存料・日持ち向上剤として用いられている既存添加物について、その抗菌活性を調べると共に、抗菌活性成分を明らかにするための基礎的検討を行った。

1. 抗菌活性の検査法として、昨年度採用した寒天培地法（ペーパーディスク法）に比べ、より感度良く検出可能とされる液体培地法を採用した。その結果、得られた抗菌活性の傾向は寒天培地法と同様であったが、寒天培地法では抗菌活性が認められなかった、あるいは極めて弱かったしらこたん白抽出物やユッカフォーム抽出物、トウガラシ水性抽出物等に抗菌活性があることが認められた。

2. 昨年度実施した寒天培地法により抗菌活性が認められたポリリシン、チャ抽出物、カンゾウ油性抽出物等について、固相抽出法（Oasis HLB）により粗分画を行い、各分画の抗菌活性を調べた。チャ抽出物はOasis HLB保持分画に抗菌活性が見られた。一方、ポリリシン及びカンゾウ油性抽出物は、Oasis HLB流出分画、保持分画に抗菌活性が認められた。

A. 研究目的

既存添加物の多くは天然物からの抽出物であり、原材料の種類や産地の違い、製法の違いなどから製品の成分組成や含量は必ずしも一定ではない。加えて、有効成分も明確でない品目もある。既存添加物の保存料・日持ち向上剤は、抗菌もしくは静菌作用があるとされているが、市販製品の抗菌力と抗菌活性成分が不明確である上、有効性を担保する成分規格も設定されていない。そこで、有効性を担保するための成分試験法を開発することを目的に、活性成分を解析し、抗菌活性評価の指標成分を明らかにすることを目的とする。本年度は、昨

年度に引き続き保存料・日持ち向上剤として用いられている既存添加物について、その抗菌活性を調べると共に、抗菌活性成分を明らかにするための基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料

保存料に区分されている既存添加物及び既存添加物名簿収載品目リスト注解書（1999年、日本食品添加物協会）に抗菌作用があると記載されている品目のうちから、表1に示した既存添加物の市場流通製品を日本食品添加物協会から提供していただき、研究試料として用いた。

2. 試薬・器材

供試試験菌：グラム陽性菌，グラム陰性菌，芽胞形成菌，酵母及びびかびから代表的菌種として一種ずつ選び，使用した。

グラム陽性菌：*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (NBRC 13276, ATCC 6538) グラム陰性菌：*Escherichia coli* (NBRC 3972, ATCC 8739)

芽胞形成菌：*Bacillus subtilis* (NBRC 3134, ATCC 6633)

酵母：*Candida albicans* (NBRC 1594, ATCC 2091, ATCC 10231)

かび：*Aspergillus niger* (NBRC 9455, ATCC 16404)

ペトリ皿（シャーレ）：合成樹脂製で，内径 90 mm の滅菌したものを用了。

斜面培地 A：精製水 1L に対してポリペプトン 10g，酵母エキス 2g，硫酸マグネシウム 1g 及び寒天 15g を採り，内容物を十分溶解した後，pH7.0±0.2 に調整する。これを 25mL 試験管に約 10mL 分注してから 121℃，15 分間高压滅菌処理する。滅菌後試験管を水平面に対して 15 度傾けて置き，内容物を凝固させて斜面培地 A を調製する。

斜面培地 B：精製水 1L に対してペプトン 5g，酵母エキス 3g，麦芽エキス 3g，グルコース 10g 及び寒天 15g を採り，内容物を十分溶解した後，pH7.0±0.2 に調整する。これを 25mL 試験管に約 10mL 分注してから 121℃，15 分間高压滅菌処理する。滅菌後試験管を水平面に対して 15 度傾けて置き，内容物を凝固させて斜面培地 B を調製する。

斜面培地 C：精製水 1L に対して市販の調製済み培地ポテト・デキストロース寒天培地 39g を採り，内容物を十分

溶解する。これを 25mL 試験管に約 10mL 分注してから 121℃，15 分間高压滅菌処理する。滅菌後試験管を水平面に対して 15 度傾けて置き，内容物を凝固させて斜面培地 C を調製する。

ブイヨン培地：精製水 1L に対してペプトン 10g，肉エキス 5g 及び塩化ナトリウム 5g を採り，内容物を十分溶解した後，pH 7.0±0.2 に調整する。これを 50mL 三角フラスコに約 25mL 分注してから 121℃，15 分間高压滅菌処理する。

細菌増菌用培地：日本製薬（株）製ソイビーン・カゼインダイジェスト培地を用いた。

真菌増菌用培地：Difco 社製ポテト・デキストロース培地を用いた。

細菌計測用培地：日本製薬（株）製ソイビーン・カゼインダイジェスト寒天培地をペトリ皿に 18mL 注入し，水平に静置させ，凝固させた。

真菌計測用培地：Difco 社製ポテト・デキストロース寒天培地をペトリ皿に 18mL 注入し，水平に静置させ，凝固させた。

パルプディスク：アドバンテック東洋（株）製の直径 10mm，厚さ 1.2mm（吸水量 0.08mL±0.01mL）の厚手のパルプディスクを 121℃，15 分間高压滅菌後，十分乾燥させてから用いた。

Oasis HLB：Waters 社製 Oasis HLB（500mg）カートリッジは，予めメタノール 10mL，水 10mL でコンディショニングした後使用した。

その他の試薬は，いずれも特級品を用いた。

3. 試験菌液及び検査用培地の作製

3.1 寒天培地の作製

試験菌液及び培地の調製は，「繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果：

JIS L 1902」に準拠し、概ね次のとおり調製した。

細菌類 NBRC 3134, 3972, 13276 の試験菌液：斜面培地 A に各試験菌を移植後 18～24 時間培養する。斜面培地上の菌をブイヨン培地 25mL に 1 白金耳移植し、30℃で 18～24 時間培養する。ブイヨン培地中の菌濃度は $10^6 \sim 10^7$ 個/mL 程度とする。

酵母 NBRC 1594 の試験菌液：斜面培地 B に酵母を移植後 3 日間培養する。斜面培地上の酵母をブイヨン培地 25mL に 1 白金耳移植し、25℃で 3 日間培養する。ブイヨン培地中の菌濃度は $10^6 \sim 10^7$ 個/mL 程度とする。

かび NBRC 9455 の試験菌液：斜面培地 C にかびを移植後 5～7 日間培養する。斜面培地上のかびを 0.05% Tween 80 生理食塩水 25mL に白金耳移植し、十分混合したものを試験菌液とする。生理食塩水中の菌濃度は $10^6 \sim 10^7$ 個/mL 程度とする。

検査用平板は、Difco 社製のポテト・デキストロース寒天培地及び日本製薬製のソイビーン・カゼインダイジェスト(SCD)寒天培地を使用した。これらの培地を 121℃、15 分間高圧滅菌後、55℃ ± 1 に保持する。細菌類 NBRC 3134, 3972 及び 13276 にあっては、SCD 寒天培地に、かび NBRC 9455 及び酵母 NBRC 1594 にあってはポテト・デキストロース寒天培地に、各試験菌液を培地の 1/50 量加え、十分に混合した後、その 15 mL をペトリ皿に注入し、水平に静置して凝固させて検査用平板培地を作製した。

3.2 液体培地の作製

細菌類 NBRC 3134, 3972, 13276 の試験菌液：斜面培地 A に各試験菌を移植後 18～24 時間培養する。斜面培地上の

菌をブイヨン培地 20mL に 1 白金耳移植し、30℃で 20 時間培養する。ブイヨン培地中の菌濃度は 10^8 個/mL 程度とする。

酵母 NBRC 1594 の試験菌液：斜面培地 B に酵母を移植後 3 日間培養する。斜面培地上の酵母をブイヨン培地 20mL に 1 白金耳移植し、25℃で 3 日間培養する。ブイヨン培地中の菌濃度は 10^8 個/mL 程度とする。

かび NBRC 9455 の試験菌液：斜面培地 C にかびを移植後 5～7 日間培養する。斜面培地上のかびを 0.05% Tween 80 生理食塩水 20mL に白金耳移植し、十分混合したものを試験菌液とする。生理食塩水中の菌濃度は 10^8 個/mL 程度とする。

4. 微生物発育阻止試験

4.1 寒天培地法

パルプディスクを試験溶液に浸漬し、検査用平板培地上に置いた。それらの平板培地は、約 5℃で 30 分間放置した後、細菌類は 30℃で 18～24 時間、酵母及びかびは 25℃で 5 日間培養した。

パルプディスク周辺に出現した阻止円の直径をノギスで測定した。

4.2 液体培地法

1) 細菌類 NBRC 3134, 3972, 13276
細菌用増菌培地 9.4mL に各試験菌液 0.1mL 及び試験溶液 0.5mL を加え、30℃で 20 時間培養した。培養液 0.5mL を試験管に採り、滅菌精製水 4.5mL と混和後、その希釈液 0.5mL を別の滅菌精製水 4.5mL と混和する。同様の操作を 2～3 回行い、培養液の $10^0 \sim 10^6$ 希釈液を作製する。希釈液 0.1mL をあらかじめ用意しておいた細菌計測用培地に移植し、30℃で 20 時間培養後、

菌数を測定した。

2) 酵母 NBRC 1594

真菌用増菌培地 9.4mL に各試験菌液 0.1mL 及び試験溶液 0.5mL を加え、25℃で3日間培養した。培養液 0.5mL を試験管に採り、滅菌精製水 4.5mL と混和後、その希釈液 0.5mL を別の滅菌精製水 4.5mL と混和する。同様の操作を2～3回行い、培養液の $100\sim 10^6$ 希釈液を作製する。各希釈液 0.1mL をあらかじめ用意しておいた真菌計測用培地に移植し、25℃で3日間培養後、菌数を測定した。

3) かび NBRC 9455

真菌増菌用培地 9.4mL に各試験菌液 0.1mL 及び試験溶液 0.5mL を加え、25℃で7日間培養した。培養液 0.5mL を試験管に採り、滅菌精製水 4.5mL と混和後、その希釈液 0.5mL を別の滅菌精製水 4.5mL と混和する。同様の操作を2～3回行い、培養液の $100\sim 10^6$ 希釈液を作製する。希釈液 0.1mL をあらかじめ用意しておいた真菌計測用培地に移植し、25℃で7日間培養後、菌数を測定した。

5. 試験溶液の調製

5.1 液体培地用試料溶液

試料 1 g を 15 mL ポリプロピレン製遠心チューブに採り、80%メタノール 10 mL を加えて10分間振とう抽出後、遠心分離 (3,500rpm, 10分間) し、その上清を試験溶液とした (10%溶液)。

5.2 粗分画試験溶液

試料 0.2g を 50mL ポリプロピレン製遠心チューブに採り、精製水 20 mL を加えて10分間振とう抽出後、遠心分離 (3,500rpm, 10分間) した。上清 10mL を Oasis HLB に負荷し、流出液をカートリッジ流出分画試験溶液とした。次

いで、カートリッジを精製水 2mL で洗浄後メタノール 7mL で溶出した。溶出液に精製水を加え 10mL とし、これをカートリッジ保持分画成分試験液とした。

C. 結果及び考察

1. 微生物発育阻止試験 (液体培地法)

液体培地を用いることにより昨年度のペーパーディスク法よりも高感度に観測することが可能になった (表 2)。
・細菌類 3 種において、2.5g/kg 安息香酸 及び 2.5g/kg ソルビン酸では、 10^{-2} の増菌抑制を観測した。(昨年度は、試験菌液 : 培地 = 1:150 の検査平板において弱抑制程度の観測であった。)

・各試験溶液について昨年度は 1% 溶液までの抗菌力しか観測できなかったが、本年度は 0.5% 溶液の抗菌力を観測できた。

・寒天培地法では抗菌活性が認められなかった、あるいは極めて弱かったしらこたん白抽出物やユッカフォーム抽出物、トウガラシ水性抽出物等に抗菌活性があることが認められた。

・一方、チャ抽出物は寒天培地法の方が NBRC 13276 に対して比較的強い抗菌活性を示す傾向が認められた。

2. 粗分画液の抗菌活性

昨年度実施した寒天培地法により抗菌活性が認められたポリリシン、チャ抽出物、カンゾウ油性抽出物等について、固相抽出法 (Oasis HLB) により粗分画 (カートリッジ流出分画及び保持分画) を行い、各分画の抗菌活性を調べた (表 3)。チャ抽出物は Oasis HLB 保持分画に抗菌活性が見られた。一方、ポリリシン及びカンゾウ油性抽出物

は、Oasis HLB 流出分画，保持分画に抗菌活性が認められた。

D 結論

昨年度に引き続き保存料・日持向上剤として用いられている既存添加物について，その抗菌活性を調べると共に，抗菌活性成分を明らかにするための基礎的検討を行った。

1. 抗菌活性の検査法として，昨年度採用した寒天培地法（ペーパーディスク法）に比べ，より感度良く検出可能とされる液体培地法を採用した。その結果，得られた抗菌活性の傾向は寒天培地法と同様であったが，寒天培地法では阻止円が認められなかった，あるいは極めて弱かったしらこたん白抽出物やユッカフォーム抽出物，トウガラシ水性抽出物等に抗菌活性があることが認められた。

2. 昨年度実施した寒天培地法により抗菌活性が認められたポリリシン，チャ抽出物，カンゾウ油性抽出物等について，固相抽出法（Oasis HLB）により粗分画を行い，各分画の抗菌活性を調べた。茶抽出物は Oasis HLB 保持分画に抗菌活性が見られた。一方，ポリリシン及びカンゾウ油性抽出物は，Oasis HLB 流出分画，保持分画に抗菌活性が認められた。

E. 研究発表

該当なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

G. 健康危険情報

該当なし。

表1 試験に供した既存添加物

No.	品目	主な成分(記載)	備考
1	チャ抽出物	茶ポリフェノール81.4%(EGCg 40.2% 他)	
2	チャ抽出物	茶ポリフェノール47%(EGCg + ECg = 25.9% 他)	
3	チャ抽出物	茶ポリフェノール87.6%(EGC32.2%, EGC 18.7% 他)	
4	モウソウチク抽出物		
5	モウソウチク抽出物		アルコール95%
6	モウソウチク抽出物		アルコール95%
7	モウソウチク抽出物		アルコール95%
8	カワラヨモギ抽出物		
9	ポリリジン	ポリリジン 50.7%	50%粉末
10	ポリリジン	ポリリジン 25.8%	25%粉末
11	しらこたん白抽出物		さけ由来
12	しらこたん白抽出物		にしん由来
13	ブドウ種子抽出物	総フラバノール 99.2%	
14	ホコッシ抽出物		
15	トウガラシ水性抽出物		
16	ペクチン分解物		
17	ユッカフォーム抽出物		
18	カンゾウ油性抽出物		エタノール溶液
19	カンゾウ油性抽出物	グラブリジン 1±0.1%	水溶性製剤製品
20	クワ抽出物		
21	ブドウ果皮抽出物		

(注) 同一品目が複数ある場合、製品No.5～7以外は、同一品目の別製品である。製品No.5～7は同一製品の別ロット品である。

表2 0.5%試料溶液(*1)の試験菌に対する増殖抑制効果

No.	試料	NBRC3972 (<i>Escherichia coli</i>)	NBRC13276 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> (BGA)	NBRC1594 (<i>Candida albicans</i>)	NBRC9455 (<i>Aspergillus niger</i>)
1	チャ抽出物	1.4E+05	1.5E+04	0.0E+00	4.4E+07	
2	チャ抽出物	1.0E+09	8.8E+08	0.0E+00	2.8E+07	
3	チャ抽出物	1.6E+06	2.0E+05	0.0E+00	9.2E+06	
4	モウソウチク抽出物	1.3E+09	1.2E+09	7.1E+07	1.7E+07	
5	モウソウチク抽出物	1.0E+09	1.0E+09	2.5E+07	1.4E+07	
6	モウソウチク抽出物	8.8E+08	1.0E+09	1.6E+08	2.0E+07	
7	モウソウチク抽出物	1.8E+09	1.2E+09	1.3E+08	1.5E+07	
8	カワラヨモギ抽出物	1.2E+09	1.0E+09	4.1E+07	1.3E+07	0.0E+00
9	ポリリシン	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
10	ポリリシン	1.8E+03	6.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
11	しらこたん白抽出物	8.0E+00	9.2E+01	0.0E+00	0.0E+00	
12	しらこたん白抽出物	2.3E+01	1.9E+02	0.0E+00	0.0E+00	
13	ブドウ種子抽出物	1.0E+09	1.3E+09	0.0E+00	2.2E+05	
14	ホコッシ抽出物	8.5E+08	8.6E+08	1.9E+01	3.4E+06	
15	トウガラシ水性抽出物	1.4E+09	7.9E+08	2.5E+07	0.0E+00	
16	ペクチン分解物	7.8E+08	9.0E+08	5.0E+07	6.9E+06	
17	ユッカフォーム抽出物	8.0E+08	2.0E+09	4.3E+07	0.0E+00	
18	カンゾウ油性抽出物	1.2E+09	1.5E+09	0.0E+00	5.1E+06	1.0E+01
19	カンゾウ油性抽出物	9.0E+08	7.9E+08	0.0E+00	9.1E+06	1.0E+01
20	クワ抽出物	1.3E+09	2.3E+09	0.0E+00	1.6E+07	
21	ブドウ果皮抽出物	1.2E+09	7.4E+08	3.3E+03	6.2E+06	
Control (*2)	2.5g/L 安息香酸 (*3)	8.0E+06	2.9E+08	1.5E+02	0.0E+00	0.0E+00
	5.0g/L 安息香酸	0.0E+00	0.0E+00	1.3E+02	0.0E+00	0.0E+00
	2.5g/L ソルビン酸	7.0E+06	7.3E+06	1.7E+02	0.0E+00	0.0E+00
	5.0g/L ソルビン酸	0.0E+00	0.0E+00	1.5E+02	0.0E+00	0.0E+00
Blank	80%メタノール	1.2E+09	1.0E+09	1.7E+08	1.7E+07	

表中の数値は、液体培地法による微生物発育阻止試験において培養液1mLあたりの菌数を示す。
灰色網掛けは、Blank(80%メタノール)に比べ、菌の増殖が抑制されていることを示す。

*1 天然保存料試料No.1~No.21では、80%メタノールに溶かした10%試料溶液を試験菌培養液に添加した時の最終濃度が0.5%になるようにした。

*2 天然保存料の10%試料溶液に代わりに、10%試料溶液と同量の右記濃度の合成保存料試料溶液を試験菌培養液に加えた。

*3 食品衛生法(第22年法律第233号)に基づく食品添加物一般の使用基準における安息香酸の使用量の最大量が2.5g/kgである。

表3 粗分画液の抗菌活性

No.	試料	試験溶液	NBRC9972 (<i>Escherichia coli</i>)	NBRC13276 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> (BGA)	NBRC1594 (<i>Candida albicans</i>)	NBRC9455 (<i>Aspergillus niger</i>)
		1%水溶液	11.1	14.4	15.8	—	—
1	チャ抽出物	カートリッジ流出液	—	—	—	—	—
		カートリッジ溶出液	10.5	12.2	13.2	—	—
		1%水溶液	—	—	12.1	—	—
2	チャ抽出物	カートリッジ流出液	—	—	—	—	—
		カートリッジ溶出液	—	—	10.7	—	—
		1%水溶液	—	—	13.2	—	—
3	チャ抽出物	カートリッジ流出液	—	—	—	—	—
		カートリッジ溶出液	—	—	11.2	—	—
		1%水溶液	14.6	14.6	17.1	—	12.7
9	ポリリン	カートリッジ流出液	13.9	12.8	14.7	—	—
		カートリッジ溶出液	11.5	11.4	13.5	—	11.0
		1%水溶液	12.3	12.0	14.4	—	—
10	ポリリン	カートリッジ流出液	—	11.2	—	—	—
		カートリッジ溶出液	10.9	11.3	11.7	—	—

No.	試料	試験溶液	NBR3972 (<i>Escherichia coli</i>)	NBR13276 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> (BGA)	NBR1594 (<i>Candida albicans</i>)	NBR9455 (<i>Aspergillus niger</i>)
		1%水溶液	—	—	12.7	—	—
13	ブドウ種子抽出物	カートリッジ流出液	—	—	11.0	—	—
		カートリッジ溶出液	—	—	10.8	—	—
		1%水溶液	—	—	18.5	—	—
19	カンゾウ油性抽出物	カートリッジ流出液	—	—	16.8	—	—
		カートリッジ溶出液	—	—	13.3	—	—
Blank	70%メタノール		—	—	—	—	—

表中の数値は、寒天培地法による微生物発育阻止試験において阻止円の直径(単位 mm)を示す。
「—」は阻止円が認められなかったことを示す。

B. 定量NMR法を利用した既存添加物分析法の開発

4. NMRを用いた既存添加物の新規分析法の開発と応用に関する研究

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）
既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発
平成 21 年度分担研究報告書

NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発に関する研究
-qNMR を用いたダッタンソバ乾麺中のクエルセチンの迅速絶対定量-

研究分担者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 第三室長

研究要旨

食品中の天然有機化合物を定量する場合、純度が正確に値付けられた標準品を入手することが困難であるため、対応する市販試薬を標準品の代用としてクロマトグラフ法により定量することが常法となっている。しかし、標準品の代用とした市販試薬には正確な純度が値付けられていないことも多く、結果として定量値の信頼性には疑問が残る。そこで、国際単位系(SI)にトレーサブルな定量値を導くことが可能である定量NMR (qNMR)が、食品中の天然添加物(既存添加物)について分離操作を伴わない迅速定量として応用可能であるか、また信頼性の高い定量値が得られるかについて検証した。ダッタンソバ乾麺中のクエルセチンの迅速定量に応用した。食品中の既存添加物クエルセチンの定量分析を想定し、ダッタンソバ(Tartary buckwheat: *Fagopyrum tartaricum* L.)乾麺の機能性成分として含まれるとされるクエルセチンの含量測定を試みた。ダッタンソバ乾麺の抽出物をqNMR標準液に溶解し、qNMR基準物質ヘキサメチルジシラン(HMD)のメチル基とクエルセチンの2'位のプロトンシグナル面積比より、ダッタンソバ乾麺中のクエルセチンの含量を算出した結果、 1.58 ± 0.14 mg/gであった。また、qNMRにより、クエルセチン市販試薬の純度を正確に値付けた後に、LCを用いた通常定量分析を行い、得られた定量値を比較したところ、qNMRにより、従来のLCと同等以上の精度で定量値が簡単に求められることを明らかとした。qNMRでは、1測定当たりの所要時間は約10分であり、かつ、測定対象の化合物と同一の標準品および検量線を必要としない。食品中の天然添加物の迅速かつ正確な定量法として、応用範囲の広い、かつ、信頼性の高い実用的な分析法であると考えられた。

A. 研究目的

食品添加物の品質規格として、クロマトグラフ法を利用する方法、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定量用標準品が入手不可能な多くの天然添加物(既存添加物)では、上記のいずれの方法によっても信頼性の高い純度値や含量値を求めることが困難である。実際にこれらの品質規格基準設定は遅れており、その具体的

な解決策は、従来の方法論からの見いだせていない。さらに、食品中の天然添加物の定量分析には、通常、クロマトグラフ法が用いられるが、定量用標準品の入手が困難である天然添加物では、一般的に自ら単離精製または全合成したもの、あるいは市販試薬を定量用標準品の代用品としたクロマトグラフ法による定量分析が常法となっている。しかしながら、クロマトグラフ法は、純度または濃度既知の定量用標準品に対する測定対象のピーク面積比から正確な定量値が求めるものである。すなわち、定量用標準品の代用とした化

化合物の純度が正確に値付けられていなければ、得られた定量値の信頼性を確保しているとは言えない。したがって、今後、天然添加物の品質規格基準設定および食品中の分析法を推進するためにも、この問題を抜本的に解決する新たな方法論の構築が急務であると考えられる。

このような背景から、上述の問題を根本的に解決することを目的とし、国際単位系(SI)に基づく計量トレーサビリティが確保された新たな絶対定量分析法の一つとして、NMR を用いた定量法(quantitative NMR (qNMR))の開発を行っている。qNMR は、他の定量分析法のほとんどが個々の化合物に特有の物性値を利用しているに対し、化合物中に等価に存在する水素原子の数を指標として定量値を求める方法である。すなわち、一つの¹H-NMR スペクトル上に2つの化合物が同時に観察される場合、プロトンシグナル面積比は2つの化合物のモル濃度に比例することから、一方の化合物の純度と濃度が明らかであれば、もう一方の化合物の純度あるいは含量を観察されるシグナル面積比と調製値の関係から、算出可能であることを利用している。したがって、qNMR では、測定対象と同一の化合物の定量用標準品を必要とせず、別の物質を基準として定量分析が可能な絶対定量法であり、SI にトレーサブルな一次標準測定法のうち、一次標準比率法、すなわち「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」の資格を原理的に有する方法である。

昨年度は qNMR を応用し、食品添加物コチニール色素中の主色素成分カルミン酸の絶対量が計量学的に正確に算出可能であることを報告した。本年度は、食品中の天然添加物について分離操作を伴わない迅速定量に qNMR が応用可能であるか、また信頼性の高い定量値が得られるか検証した。食品中の既存添加物クエルセチンの定量分析を想定し、ダットンソバ(Tartary buckwheat: *Fagopyrum tartaricum* L.)乾麺の機能性成分として含まれるとされるクエルセチンの含量測定を試みた。さらに常法である LC による結果と比較検

証した。その結果、qNMR により、ダットンソバ乾麺中のクエルセチンの絶対量を、迅速かつ簡便に、かつ、SI にトレーサブルに求められることを明らかとしたので報告する。

B. 研究方法

1) 試薬および試料

ダットンソバ乾麺 1 製品(A 社製)は、市場より購入したものを用了。

クエルセチン市販試薬(quercetin C₁₅H₁₀O₇ · XH₂O (MW: 302.24 as anhydrate), 純度(ラベル表示)>95.0%) およびルチン市販試薬(rutin C₂₇H₃₀O₁₆ · 3H₂O (MW: 610.52 as anhydrate), 純度(ラベル表示)>98.0%)は東京化成工業(株)製を用了。

qNMR 基準物質として高純度ヘキサメチルジシラン(hexamethyldisilane: HMD)(和光純薬工業(株)特注品)、qNMR 用重溶媒として重メタノール(methanol-*d*₄)(Isotec 製)を用了。高純度フタル酸水素カリウム(potassium hydrogen phthalate: PHP) 認証標準物(certified reference material: CRM)(品番 NMIJ CRM3001a: 純度 100.00±0.027%)は(独)産業技術総合研究所製を用了。なお、PHP は、添付の使用法に従い、軽く砕いた後、120°C で約 1 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、用時使用とした。

2) 装置

核磁気共鳴装置(NMR): オートサンプラー付き JNM-ECA (600 MHz) (日本電子(株)製)。qNMR のケミカルシフト値は、HMD を基準シグナル(0 ppm)とし、 δ 値を ppm 単位で表した。

高速液体クロマトグラフィー(LC): Shimadzu LC10AVP system (島津製作所(株)製)

3) 分析試料の調製

粉碎したダットンソバ乾麺2.0 gを量り取り、メタノール50 mLに懸濁し、室温下、3日間抽出後、遠心分離(3,000 rpm)して不溶物を取り除き、得られた抽出液を減圧下乾燥した。得られた残渣を、

HMD濃度をあらかじめ校正したqNMR標準液(methanol-*d*₄) 3.0 mLを正確に加えて、溶解した。この溶液0.6 mLをNMR試験管に封入したものをqNMR用試料溶液とし、1.0 mLをLCバイアル瓶に封入したものをLC用試料溶液とした(Fig.1)。

4) qNMRによる定量分析

4-1) qNMR標準液の調製およびHMDの濃度校正

HMD 約 100 mg を精密に量り取り、重メタノール 50 mL に定容した。この溶液を重メタノールで 5 倍希釈したものを qNMR 標準液とした。qNMR 標準液中の HMD の濃度 404.2±1.8 μg/mL (n = 3, AV±SD) を下記に従い、PHP により校正して求めた。すなわち、CRM の一つである PHP 約 15 mg を精密に量り取り、qNMR 標準液 5.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管(5 mm φ x 200 mm, S-type (和光純薬工業(株)製))に封入したものを HMD 濃度校正用試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し、PHP のフェニルプロトン PhH×4 (δ 7.53 ppm, 8.15 ppm)および HMD のメチル基プロトン CH₃×6 (δ 0 ppm)に由来するシグナル面積、分子量、濃度等を式(1)に代入し、qNMR 標準液中の HMD の濃度を校正した。

$$W_{HMD} = \left(\frac{M_{HMD} \times I_{HMD}}{H_{HMD}} / \frac{M_{PHP} \times I_{PHP}}{H_{PHP} \times W_{PHP}} \right) \times \frac{P_{PHP}}{100} \quad - (1)$$

ただし、W_{HMD}, W_{PHP} = HMD および PHP の濃度 (mg/mL), M_{HMD}, M_{PHP} = HMD および PHP の分子量 (MW 146.38 および 204.22), I_{HMD}, I_{PHP} = HMD および PHP の特定基のシグナル面積, H_{HMD}, H_{PHP} = HMD および PHP の特定基のプロトン数 (HMD = CH₃×6, PHP = PhH×4), P_{PHP} = PHP の純度 (100.00%)。

4-2) qNMRによるクエルセチンの絶対定量

qNMR 用試料溶液を qNMR に付し、HMD (δ 0 ppm)およびクエルセチン (δ 7.70 ppm)に由来する特定シグナルの相対面積、分子量、濃度等を式(2)に代入し、ダットンソバ乾麺(TBN)中のクエルセチン(QC)の含量(mg/g)を算出した。

$$C_{QC} = \left(\frac{M_{QC} \times I_{QC}}{H_{QC} \times W_{TBN}} / \frac{M_{HMD} \times I_{HMD}}{H_{HMD} \times W_{HMD}} \right) \times 1000 \quad - (2)$$

ただし、W_{TBN} = TBN の濃度(mg/mL), M_{QC} = QC の分子量(quercetin (as anhydrate) = C₁₅H₁₀O₇ (MW 302.24)), I_{DSS}, I_{QC} = QC の特定基のシグナル強度面積, H_{QC} = QC の特定基のプロトン数(QC = PhH×1), C_{QC} = QC の含量(mg/g)。

また、クエルセチン市販試薬をそれぞれ約 20 mg 精密に量り取り、予め調製した qNMR 標準液 5.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを qNMR に付し、HMD およびクエルセチンに由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積、分子量、濃度等を式(3)に代入し、市販試薬中の quercetin (QC)の純度(w/w%)を算出した。

$$P_{QC} = \frac{I_{QC} / H_{QC}}{I_{HMD} / H_{HMD}} \times \frac{M_{QC} / W_{QC}}{M_{HMD} / W_{HMD}} \times 100 \quad - (3)$$

ただし、P_{QC} = QC の純度(w/w%)。

5) LCによる分析

LC用試料溶液を以下の条件で分析を行い、22.7 分に観察されたクエルセチンのピーク面積を求め、絶対検量線法(r² = 0.98)により、ダットンソバ乾麺1g中のクエルセチンの含量(mg)を求めた。なお、絶対検量線の作成には、クエルセチン市販試薬を標準品の代用とし、1.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.5 mg/mLにメタノールで希釈調製したものを用い、別途、qNMRにより算出したクエルセチン(無水物として)の純度(P_{QC} = 92.8%)で補正した。

LC条件：注入量, 5.0 μL; カラム, J'sphere ODS-H80 (4.6 x 250 mm, 5 μm (YMC製)); カラム温度, 40°C; 移動相, 0.1%ギ酸水溶液 : 0.1%ギ酸メタノール = 95 : 5 (0 min)→5 : 95 (25-30 min); 流量, 1.0 mL/min ; 検出波長, UV 356 nm.

C. 結果及び考察

1) qNMR による定量分析

qNMR では、スペクトル上に観察される基準物質と測定対象化合物のシグナル強度とモル濃度との関係から、基準物質の濃度を測定対象化合物の濃度に転嫁することが可能である。そこで、昨年度と同様に、qNMR により得られる定量値の SI トレーサビリティを、Fig. 2 に示す方式で実現した。すなわち、計量学的に妥当な手順によって値付けされ、計量学的トレーサビリティが証明された認証標準物質(CRM)の一つであるフタル酸水素カリウム(PHP)を一次標準として用い、qNMR 標準液中のHMDの濃度をPHPにより校正した後に、HMDを二次標準として測定対象化合物のqNMR測定を行う2段階の方式を用いることとした。

Fig. 3には、qNMR基準物質としてHMDを404.2 µg/mL含むqNMR標準液3.0 mLにダットンソバ乾麺製品2.0 gのメタノール抽出物を溶解したものの実際のスペクトルを示した。δ 0 ppmにqNMR基準物質のHMDのメチル基のシグナル、δ 0.7~5.4 ppmに夾雑物として考えられる脂肪酸や糖類等に由来するシグナルと共に、δ 6.14 ppm, 6.36 ppm, 6.83 ppm, 7.59 ppmおよびδ 7.70 ppmにクエルセチンの6, 8, 5', 6', 2'位に由来するシグナルが観察された。qNMRにより正確な定量分析を行うためには、他の不純物と重ならない十分に分離したシグナルを定量用として選択することが重要である。そこで、クエルセチンおよびルチン市販試薬についてqNMRスペクトルの測定を行い、ダットンソバ乾麺の抽出物のスペクトルと比較した(Fig. 4)。その結果、クエルセチンとルチンの6, 8, 5', 6'位のシグナルは、ほぼ完全に重なることが確認された。また、ダットンソバ乾麺の抽出物中のクエルセチンの6, 8, 5', 6'位のシグナルの付近には、極微量のルチンと共に他のフラボノイド配糖体⁸⁾に由来すると考えられる小さなシグナルが観察され、このことから定量用シグナルとして不適であると判断された。一方、クエルセチンの2'位のシグナルはルチンと完全に分離し、最も

他の不純物の影響を受けていないと判断された。以上のことから、クエルセチンの2'位のシグナルを定量用として選定し、qNMR基準物質のHMDとのシグナル面積比を測定し、式2に化合物情報を入力し、定量値を求めた。その結果、ダットンソバ乾麺中にクエルセチン(無水物として)が、 1.58 ± 0.14 mg/g (AV±SD%, n=3)含まれていると算出された。

2) LCによる定量分析

ダットンソバ乾麺のメタノール抽出物をLCに付したところ、検出波長UV 364 nmにおいて、22.7分にクエルセチンに由来する大きなピークが、19.5分にルチンに由来する小さなピークが観察された。

クエルセチン市販試薬がX水和物であること、またそのラベル表示された純度値がLCにおけるピーク面積百分率を示しただけであり、計量学的に正確な純度が値付けられたものでないことから、まず、qNMRを用いてクエルセチン市販試薬の絶対純度を決定した。すなわち、クエルセチン市販試薬をqNMR標準液に溶解し、クエルセチンの2'位とHMDのシグナル面積比を測定し、式3より、純度(w/w%)を求めた。その結果、クエルセチン市販試薬の計量学的に正確な純度は、無水物として92.8%であることがわかった。

次に、qNMRにより計量学的に正確に純度が決定されたクエルセチン市販試薬を用い、絶対検量線を作成し、ダットンソバ乾麺中のクエルセチンの含量を無水物として求めたところ、その定量値は 1.54 ± 0.12 mg/g (AV±SD%, n=3)であった。この結果は、qNMRにより得られたダットンソバ乾麺中のクエルセチンの定量値 1.58 ± 0.14 mg/gとほぼ等しく、qNMRによる定量分析の結果が正確であることを裏付けるものであった。また、qNMRにより、食品中の測定対象と同一の化合物の定量用標準品を必要とせず、別の物質を基準としてSIにトレーサブルな定量値を算出可能であることが証明された。さらに、qNMRでは、1測定当たりの所要時間が約10分以内で迅速であり、LCと

同等以上にハイスループットな分析法であった。

D. まとめ

本年度は、食品中の天然添加物について分離操作を伴わない迅速定量に qNMR が応用可能であるか、また信頼性の高い定量値が得られるか検証した。食品中の既存添加物クエルセチンの定量分析を想定し、ダッタンソバ乾麺中のクエルセチンの迅速定量法として、qNMR を応用した。その結果、正確な純度が値付けられたクエルセチンの標準品が入手できない場合においても、qNMR ではダッタンソバ乾麺中のクエルセチンの含量が迅速かつ計量学的に正確に求められることが確認された。また、今回行った qNMR によるダッタンソバ乾麺中のクエルセチンの定量分析では、抽出物を qNMR 標準液に転溶して測定するだけで操作が単純である点、1 測定当たりの所要時間が約 10 分以内で迅速である点が優れていた。

現状では、qNMR の検出感度は他の多くの分析法に劣る。しかし、qNMR を用いて市販試薬の純度を正確に値付けた後に、クロマトグラフ法の定量用標準品として用いる等、従来法の利点を組み合わせることによって、その弱点を補うことが可能であることが示唆された。以上のことから、食品中の天然添加物の迅速かつ正確な定量分析法として、qNMR は十分に実用レベルであると考えられた。qNMR の分析値の信頼性を更に向上するために、高感度および高精度化に関する研究と共に複合分析法の開発を継続中である。

E. 参考文献

- 1) Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A., Maeda, T. Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia*, **41**, 213–218 (2004).
- 2) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K.: Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add. Contam.*,

24, 799-806 (2007).

- 3) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hirai, T.: A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
- 4) Ihara, T., Saito, T., Sugimoto, N.: Expansion of organic reference materials for the analysis of hazardous substances in foods and environments. –Realization of an efficient metrological traceability using the quantitative NMR method-. *Synthesiology*, **2**, 12-22 (2009).
- 5) Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Nihon Shokuhin Kagaku Kaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, **16**, 28-33 (2009).

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tahara, M., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T. Rapid quantification of quercetin in tartary buckwheat Noodle by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, submitted (2010).
2. 杉本 直樹, 多田 敦子, 末松 孝子, 有福 和紀, 齋藤 剛, 井原 俊英, 吉田 雄一, 久保田 領志, 田原 麻衣子, 清水 久美子, 伊藤 澄夫, 山崎 壮, 河村 葉子, 西村 哲治: 食品衛生学雑誌 **51** (1), 19-27 (2010).
3. Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: Quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae*

- Rhizoma by ¹H-NMR spectrometry. Journal of Natural Medicines, 64 (2), 161-166 (2010).
4. Amakura, Y., Yoshimura, M., Sugimoto, N., Yoshida, T. Marker constituents of the natural antioxidant "Eucalyptus leaf extract" for the evaluation of food. Biosci. Biotech. Biochem., **73**, 1060-1065 (2009).
 5. Ito, Y., Sugimoto, N., Akiyama, T., Yamazaki, Tanamoto, K. Cepaic acid, a novel yellow xanthylum pigment from the dried outer scales of the yellow onion *Allium cepa*. Tetrahedron Lett., **50**, 4084-4086 (2009).
 6. 多田敦子, 杉本直樹, 古庄紀子, 石附京子, 佐藤恭子, 山崎 壯, 棚元憲一: 既存添加物オゾケライトの成分調査. 食化誌, **16**, 92-96 (2009).
- 2) 学会発表
1. Saito, T., Yamada, Y., Yoshida, Y., Arifuku, K., Miura, T., Ihara, T., Suematsu, T., Tada, A., Sugimoto, N. Development of infrastructure for quantitative NMR. The 2nd International Meeting on NMR and Quantitative Analysis (2009.4).
 2. 杉本直樹, 多田敦子, 田原麻衣子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壯, 中澤裕之, 棚元憲一, 河村葉子, 西村哲治. qNMRに基づく有機リン系農薬イソキサチオンオキシソンの品質管理. 食品化学学会第15回総会・学術大会 (2009.5).
 3. 多田敦子, 杉本直樹, 石附京子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 山崎 壯, 西村哲治, 棚元憲一, 河村葉子. NMRによる既存添加物中のquercetin配糖体の定量. 食品化学学会第15回総会・学術大会(2009.5).
 4. 齋藤 剛, 三浦 亨, 井原俊英, 前田恒昭, 杉本直樹, 多田敦子, 西村哲治, 有福和紀, 末松孝子, 山田裕子, 吉田雄一. NMR を利用した有機化合物の定量における精確な秤量の重要性. 76回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会シンポジウム(2009.6).
 5. Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Yamazaki, T., Sato, K., Nishimura, T. Development of SI traceable quality control method for natural products based on qNMR. 50th ASP meeting (2009.6).
 6. Sugimoto, N., Tada, A., Sato, K., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T. Application of quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy to determination of the contents of synthetic food colors. 123rd AOAC Annual Meeting (2009.9).
 7. Tada, A., Sugimoto, N., Takahashi, K., Ishizuki, K., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Yamazaki, T., Nishimura, T., Kawamura, Y. Determination of the contents of quercetin glucosides in natural food additives by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. 123rd AOAC Annual Meeting (2009.9).
 8. 羽佐田桂子, 永津明人, 吉田貴光, 水上 元, 山崎 壯, 杉本直樹, 西村哲治. qNMRを利用した朮類生薬に含まれるatractylonの非分離定量. 日本生薬学会第56回年会(2009.10).
 9. 石附京子, 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 松本 清, 受田浩之, 松藤 寛, 山崎 壯, 河村葉子. LC/MSによる既存添加物ドクダミ抽出物中の成分の定量と抗酸化活性測定. 日本食品衛生学会学術講演会(2009.10).
 10. 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 久保田領志, 山崎 壯, 河村葉子, 西村哲治. 定量NMRを用いた天然有機化合物の絶対定量法の開発. 第51回天然有機化合物討論会(2009.10).
 11. 杉本直樹, 多田敦子, 田原麻衣子, 久保田領志, 清水久美子, 佐藤恭子, 山崎 壯, 河村葉子, 西村哲治. qNMRに基づく有機標準品の品質管理法の開発. 第46回全国衛生化学技術協議会年会(2009.11).
 12. 三浦 亨, 齋藤 剛, 井原俊英, 小池昌義, 前田恒昭, 杉本直樹, 多田敦子, 西村哲治, 有福和紀, 末松孝子, 山田裕子, 吉田雄一. NMRを利用して有機化合物を定量する場合の解析条件が定量値に与える影響に関する研究. 第48回NMR討論会(2009.11)

13. 吉田貴光, 羽佐田桂子, 水上 元, 永津明人,
山崎 壮, 杉本直樹, 西村哲治. qNMRによる
オウレン中のペルベリンアルカロイド類の定
量. 第38回生薬分析シンポジウム(2009.12).

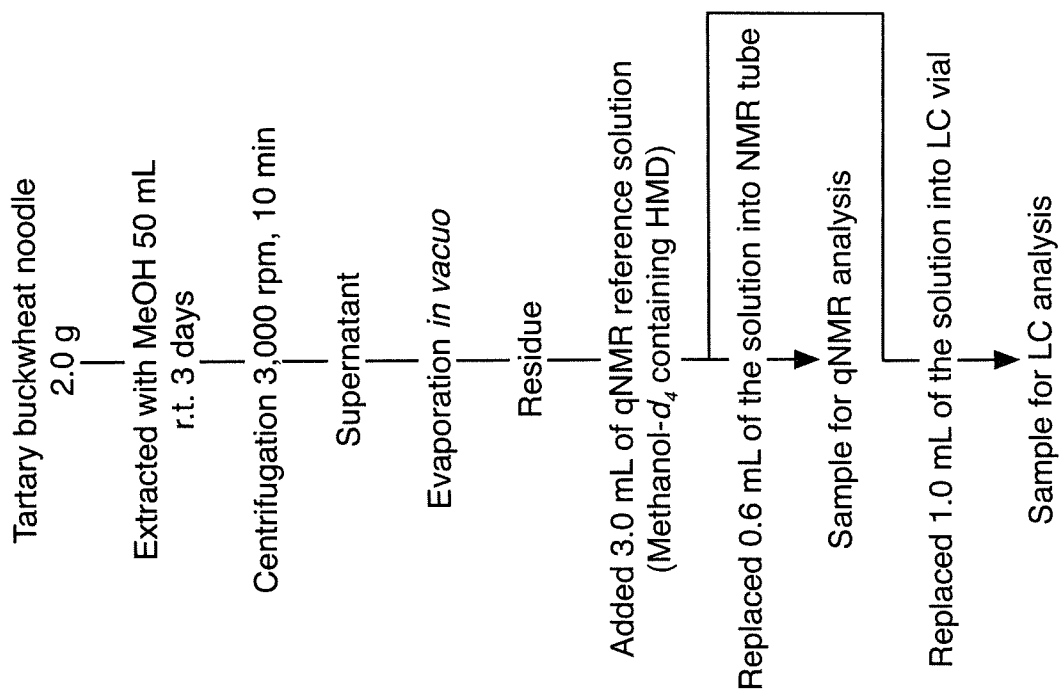


Fig. 1 Extraction of quercetin from tartary buckwheat noodle and sample preparation for qNMR and LC analysis