

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| | 発表者氏名 | 論文タイトル | 発表雑誌 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--|------------------------------|------------|---------|------|
| 1 | 石川洋哉 | 抗酸化食品成分の成分間相互作用の解析～相乗・相殺効果をどのように判定するか～ | フードリサーチ | 9月号 | 50-53 | 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, 田原麻衣子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 河村葉子, 西村哲治 | 定量 NMR を用いたダッタソバ乾麺中のクエルセチンの迅速定量 | 日本食品化学学会誌 | 17(3) | 179-184 | 2010 |
| 3 | 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀 | 定量 NMR を用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保 | FFI ジャーナル | 215 (2) | 129-136 | 2010 |
| 4 | 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎 壮, 河村葉子 | 定量 NMR に基づく既存添加物中のクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量 | 食品衛生学雑誌 | 51(5) | 205-212 | 2010 |
| 5 | Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H. | Application of ¹ H-NMR spectroscopy to validation of berberine alkaloid reagents and to chemical evaluation of Coptidis Rhizoma | Journal of Natural Medicines | 65(2) | 262-267 | 2011 |
| 6 | 石附京子, 多田敦子, 杉本直樹, 松本清, 受田浩之, 松藤 寛, 山崎 壮, 河村葉子 | 既存添加物ドクダミ抽出物の品質評価 | 日本食品化学学会誌 | 17(3) | 192-197 | 2010 |
| 7 | 秋山卓美, 佐々木亮, 山崎壮, 棚元憲一, 山形一雄, 河村葉子 | SDS-PAGE による既存タンパク質酵素のタンパク質分離パターン | 日本食品化学学会誌 | 17(2) | 88-95 | 2010 |

(第37回) 抗酸化食品成分の成分間相互作用の解析 ～相乗・相殺効果をどのように判定するか～

福岡女子大学 人間環境学部 准教授 石川洋哉

はじめに

抗酸化能とは、言葉通りにとれば単に「酸化に逆らう能力」である。どのような場面で酸化反応を抑制するかにより、その意味合いは異なってくる。生化学辞典(第2版、東京化学同人)によれば、抗酸化剤は酸化防止剤と同義とされており、この場合の抗酸化能は食品、医薬品中で内容成分の酸化劣化を抑制する能力を指す。しかしながら、本誌の読者が「抗酸化能」という言葉を聞いて、はじめに思い浮かぶのは「生体内における酸化反応を抑制する能力」のことであろう。

我々は、生体で産生される活性酸素・フリーラジカルによる酸化傷害から生体を防御する役割を担うものを総称して抗酸化物(antioxidant)といい、その活性を抗酸化能と呼んでいる。この意味合いが強くなったのは、老化予防、アンチエイジングという言葉が社会に浸透し、食品成分によるアンチエイジングの可能性に期待が寄せられていることが一因となっている。

これまで、数多くの食品由来・天然物由来成分の抗酸化能が報告されているが、その一部で抗酸化成分間での相互作用(相乗・相殺効果)が報告されている。抗酸化能を有する化合物間に相互作用が生じる場合があること自体は古くから知られている。 α -トコフェロールとアスコルビン酸がその代表例である。

α -トコフェロールは、生体膜において抗酸化作用を発揮した後 α -トコフェロキシルラジカルに変換されるが、細胞外

のアスコルビン酸によって再生される¹⁾。この再生効果により、相乗効果が生じるとされている。いずれも*in vitro*試験の結果であるが、 α -トコフェロールとの組合せで、クロロゲン酸²⁾、ケルセチン³⁾、カテキン³⁾、カロテノイド類⁴⁾なども相乗効果を示すことが報告されている。また、 α -トコフェロキシルラジカルから α -トコフェロールへの再生効率に関して、ESRを用いた詳細な検討が行われている⁵⁾。 α -トコフェロール以外にも、フェノール酸-フラボノイド、フラボノイド同士の相互作用も報告されている⁶⁾。

抗酸化成分間の相互作用は、相加効果の予測値(理論値)よりも実測値が大きければ相乗、小さければ相殺効果と判定されるが、判定基準となる予測値の見積もりは極めて難しい。混合系における抗酸化成分の活性予測値について、その算出方法、算出根拠を明確に論じた報告例は見当たらない。

我々は、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「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20～22年度)において、この問題に着手している。本プロジェクトは、国立医薬品食品衛生研究所(山崎 社)、高知大学(受田浩之、島村智子)、九州大学(松井利郎、松本清(現 崇城大学))、日本大学(松藤 寛)との共同研究である。

その中で我々は、酸化防止剤を対象としたものではあるが、抗酸化成分間での相互作用の解析を試みている。本稿では、薬剤の併用効果解析法を参考に、プ

ロジェクトで検討している酸化防止剤併用効果の解析方法、特徴及び応用例の一部を紹介したい。

1) 薬剤の併用効果解析法

我々は、高い実績を有する薬剤の相互作用の解析法を検証し、抗酸化成分間での相互作用の解析への適用性を検討している。薬剤の併用効果の解析法として代表的なものにFractional product methodとMedian effect analysisが挙げられる。Fractional product methodはWebbら(1963)が考案した古典的な方法である⁷⁾。薬剤1と薬剤2の併用効果は以下の式で表される。

$$(f_{12}) = (f_{11}) \times (f_{22}) \quad \text{--- (1)}$$

ここで、 (f_{12}) は薬剤1と2併用時に薬剤の影響を受けていない割合を、 (f_{11}) は薬剤1単独使用時に影響を受けていない割合を、 (f_{22}) は薬剤2単独使用時に影響を受けていない割合を示す。

また、薬剤1と2併用時の阻害割合を (f_{12}) 、単独使用時の阻害割合を (f_{11}) 、 (f_{22}) とすると、式(1)は以下のように表される。

$$[1 - (f_{12})] = [1 - (f_{11})][1 - (f_{22})] \quad \text{--- (2)}$$

または

$$(f_{12}) = [(f_{11}) + (f_{22})] - [(f_{11}) \times (f_{22})] \quad \text{--- (3)}$$

本理論に基づくと推察される予測式が一部の抗酸化成分の相乗効果の判定に使

用されている。例えば、Shiらの論文⁸⁾では以下の式が用いられている。

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100) \quad \text{--- (4)}$$

ここで、 I_E は試料AとB併用時の予測される消去率を、 I_A は試料Aの消去率を、 I_B は試料Bの消去率を示す。実測値 I_M と予測値 I_E を比較することにより併用効果が判定されている ($I_M / I_E > 1$ 相乗効果、 $I_M / I_E = 1$ 相加効果、 $I_M / I_E < 1$ 相殺効果)。しかしながら、本Fractional product methodの使用には、適用条件がある。本法は、個々の薬剤が独立して作用している場合で、かつその反応が双曲線型に当てはまる場合にしか適用できない。すなわち、本法を用いるには個々の成分の作用様式が予め特定されてなければならない。このタイプの子測式を用いた報告例では、いずれも算出根拠が明らかにされておらず、この点に関して全く言及されていない。

Fractional product methodの問題点を考慮し、Chou and Talalay (1984)により提案された方法がMedian effect analysisである⁹⁾。本法では、薬剤の阻害様式に応じた解析が可能であり、汎用性が極めて高い。現在までに1600以上の文献で引用されており、本法の解析ソフトも市販されている (BIOSOFT社 CalcuSyn、販売HULINKS社)。Median effect analysisは、以下の式に基づく解析法である。

$$f_a/f_u = (D / D_m)^m \quad \text{--- (5)}$$

ここで、 D はdose (濃度)、 D_m はMedian effect濃度 (IC_{50})、 m はHill型の係数を示す。式 (5) を変形すると、

$$\log(f_a / f_u) = m \log(D / D_m) \quad \text{--- (6)}$$

となり、 $\log(D / D_m)$ あるいは $\log D$ を横軸に、 $\log(f_a / f_u)$ を縦軸にプロットすることにより、個々の薬剤に対して直線を得ることが出来る (図1)。このプロ

ットをMedian effectプロットと呼び、本プロットの単独時の直線の傾き (m_1 , m_2) 及び混合時の傾き ($m_{1,2}$) により、反応はI~IV型に分類される (表1)。例えば、 IC_{50} 濃度で2成分を混合した場合の相加効果の予測値は、表に示したように、反応型により67~90%と大

きく異なる。なお、上述のFractional product methodの反応型はMedian effect analysisのII型に相当し、予測値は75%となる。

本法では、 m 値を基にCombination index (CI) 値を算出することにより併用効果を判定することが可能である (図2)。

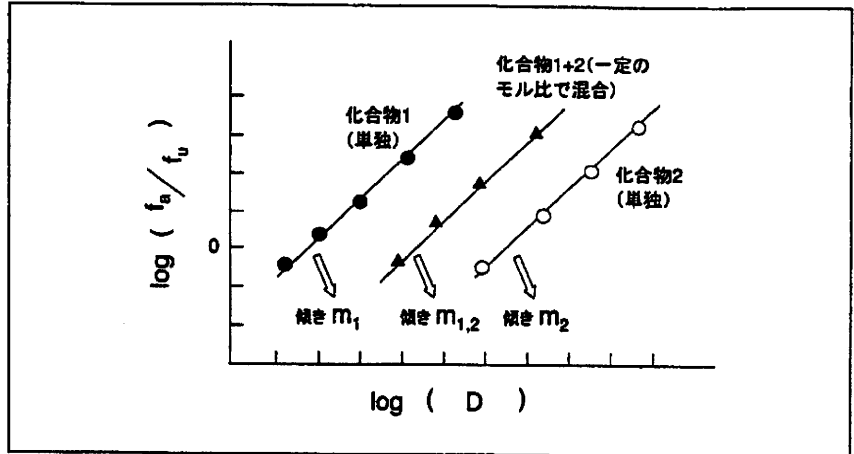


図1: 2成分混合系でのMedian effectプロット

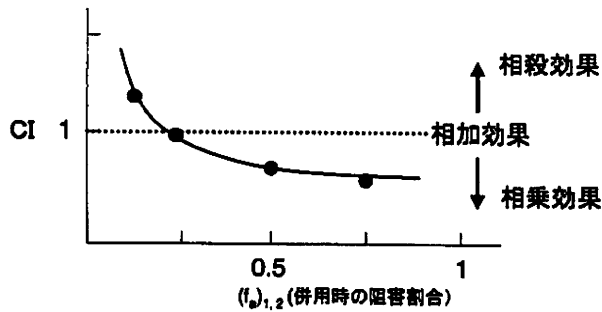


図2: 2成分混合系でのCIプロット

表1: 2成分を IC_{50} 濃度で混合した場合の阻害率予測値の比較

| | | |
|---|---|-------------------------|
| (I型) $m=1$ 一次反応 (双曲線型、個々の薬剤が排他的に作用) | $(f_a)_{1,2} / (f_u)_{1,2} = (D)_1 / (IC_{50})_1 + (D)_2 / (IC_{50})_2$ | 予測値 67% |
| (II型) $m=1$ 一次反応 (双曲線型、個々の薬剤が独立して作用) | $(f_a)_{1,2} / (f_u)_{1,2} = (D)_1 / (IC_{50})_1 + (D)_2 / (IC_{50})_2 + (D)_2(D)_1 / (IC_{50})_1(IC_{50})_2$ | 予測値 75% |
| (III型) $m>1$ 高次反応 (シグモイド型、個々の薬剤が排他的に作用) | $[(f_a)_{1,2} / (f_u)_{1,2}]^{1/m} = (D)_1 / (IC_{50})_1 + (D)_2 / (IC_{50})_2$ | 予測値 80% ($m=2$ の場合) |
| (IV型) $m>1$ 高次反応 (シグモイド型、個々の薬剤が独立して作用) | $[(f_a)_{1,2} / (f_u)_{1,2}]^{1/m} = (D)_1 / (IC_{50})_1 + (D)_2 / (IC_{50})_2 + (D)_2(D)_1 / (IC_{50})_1(IC_{50})_2$ | 予測値 90% ($m=2$ の場合) |

CI値は以下の式により算出される。

I or III型

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 \quad \text{--- (7)}$$

II or IV型

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1 (D)_2 / (D_x)_1 (D_x)_2 \quad \text{--- (8)}$$

ここで、Dはdose（濃度）、D_xはx%の阻害効果を与える場合のdose（濃度）である。本CIプロットでは、2成分混合時に得られた阻害効果(Fa)に応じたCI値を見積もり、CI < 1の場合を相乗効果、CI > 1の場合を相殺効果と判定する。

以上、本Median effect analysisでは、実験結果を基に薬剤の反応型を推定し、反応型に応じた併用効果の解析を行うため汎用性が極めて高く、CIプロットによる詳細な相互作用解析が可能である。我々は、本法を抗酸化成分の相互作用解析

法の第一候補として検討を進めている。

2) Median effect analysis による

抗酸化成分の成分間相互作用の解析¹⁰⁾

Median effect analysisを用いて、単一化合物からなる酸化防止剤の併用効果を判定した例を図3に示す。なお、本実験では抗酸化活性の測定にDPPH法を用いている。図のCIプロットより、α-トコフェロール-ケルセチンの組合せでは、CI < 1となり両者の併用効果は、相乗効果と判定された。また、フェルラ酸-エラグ酸及びセサモール-エラグ酸の組合せでは、いずれもCI > 1となり

相殺効果を示した。α-トコフェロール-モリンでは、興味深いことに阻害割合(Fa)によって効果が異なっていた。すなわち両者の併用では、Fa < 0.5で相乗性を示したものの、Fa > 0.5では逆に相乗性を示すことが判明した。Faは混合時の濃度レベルに依存していることから、濃度レベルが低い場合、両者は相殺的に作用し、高濃度では相乗的に作用することが示唆された。表2はMedian effect analysisで得られた判定結果をFractional product methodの結果と比較したものである。α-トコフェロール-ケルセチン、フェルラ酸-エラグ酸の組

表2：Median effect analysis と Fraction product method による解析結果の比較

| 化合物の組合せ | Median effect analysis | | Fractional product method |
|---------------------|------------------------|-------|---------------------------|
| | 反応型 | 判定結果 | 判定結果 |
| D-α-トコフェロール - ケルセチン | III型 | 相乗 | 相乗 |
| D-α-トコフェロール - モリン | III型 | 相殺→相乗 | 相殺 |
| フェルラ酸 - エラグ酸 | I or III型 | 相殺 | 相殺 |
| セサモール - エラグ酸 | I型 | 相殺 | 相乗 |

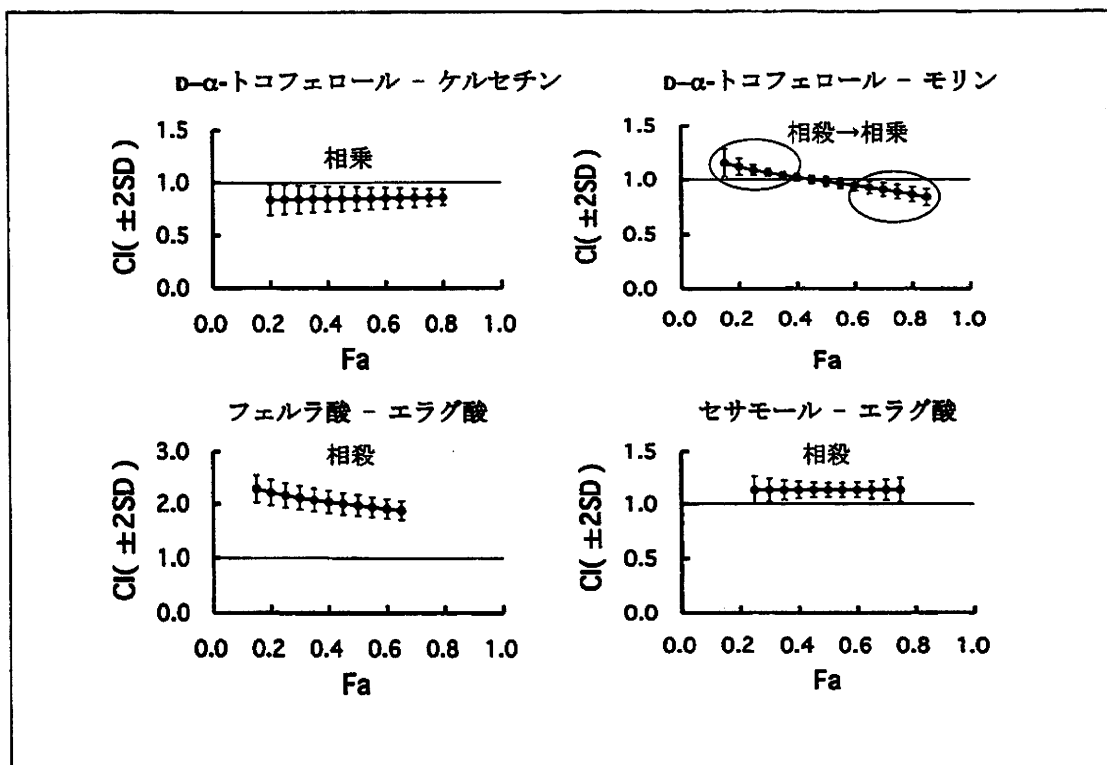


図3：酸化防止剤の組合せによるCIプロット

合せは両法で同じ判定結果を得たが、残りの2組 (α -トコフェロール-モリン、セサモール-エラグ酸) では異なる結果となった。特に、セサモール-エラグ酸の組合せでは、両法の判定結果が全く逆となっている。さらに、Median effect analysisでの反応型を見ると、いずれもI型もしくはIII型となっており、併用した2成分が排他的(拮抗的)に作用していることが判明した。

このことは、本実験での反応がFractional product methodの適用条件を満たしていないことを示唆している。反応型を基に解析されている点を考慮すると、Median effect analysisでの判定結果の信頼性は高いと考えられたが、この点に関しては今後詳しく検証する必要がある。

以上、Median effect analysisによる抗酸化成分間相互作用の解析例として、我々のデータの一部を示した。本法では、実験値を基に併用時の反応型の推定が可能であること、CIプロットにより反応型に応じた相互作用の解析が可能であること、さらに混合時の濃度レベルに応じた判定が可能であること等数多くの利点を有している。現在、我々は検証例を増やし、Median effect analysisの適用性を詳細に検討している。さらに、今回示したのはDPPH法による測定値を基にした解析例であるが、他の抗酸化能評価法での測定結果の解析も試みている。現在用いられている抗酸化活性の*in vitro*測定法は多種多様であり、測定法により抗酸化物質の作用様式が異なるため¹¹⁾、

どの測定法を採用するかは極めて重要な問題となる。今後この点も考慮し、抗酸化能評価法に応じた相互作用の解析法を確立する必要があると考えられる。

おわりに

抗酸化成分の相互作用を評価することは極めて重要である。特に、相殺効果が生じた場合、期待される抗酸化効果が得られなくなるため重大な問題となる。本稿では、2種類の解析法(Fractional product method及びMedian effect analysis)を例に挙げ、その解析方法、特徴について解説した。これらの解析法によると、予測値は単一系の単なる足し算ではなく、また個々の薬剤の反応様式等を把握しなければ見誤った予測値を見積もることになる。さらに、解析法の選択によって判定結果が全く異なる場合があるため、解析法の妥当性を慎重に評価すべきである。Median effect analysisでは、反応メカニズムに応じた解析が可能だけでなく、抗酸化物質の濃度レベルに応じて併用効果(相加・相乗・相殺)を判定できる点で有用性は高い。濃度レベルに応じた判定結果は、抗酸化物を利用した食品開発に非常に有益な情報となるであろう。今後本研究の成果が食品の抗酸化機能研究の一助となることを期待したい。

—◇—◇—◇—◇—◇—◇—◇—◇—◇—

次回執筆者として、中村学園大学栄養科学科 太田英明先生をご紹介します。

太田先生は、食品成分による体調調節機能の解明ならびに新規加工技術・機能性食品の開発を行われています。機能性成分の研究においてはカンキツの一種である沖縄産シイクワシャーに着目し、その多様な生理機能を明らかにするとともに、新規機能性飲料の開発に取り組まれるなど精力的に研究活動を展開されています。

<参考文献>

- 1) 山内 亮, *FFIジャーナル*, 215, 17-23 (2010).
- 2) W. L. S. Sim, M. Y. Han, and D. Huang, *J. Agric Food Chem.*, 57, 3409-3414 (2009).
- 3) P. Pedrielli, and L. H. Skibsted, *J. Agric Food Chem.*, 50, 7138-7144 (2002).
- 4) M. T. Schroeder, E. M. Becker, and L. H. Skibsted, *J. Agric Food Chem.*, 54, 3445-3453 (2009).
- 5) M. Pazos, M. L. Andersen, I. Medina, and L. H. Skibsted, *J. Agric Food Chem.*, 55, 3661-3666 (2007).
- 6) M. Hidalgo, C. S.-Moreno, and S. P.-Teresa, *Food Chem.* 121, 691-696 (2010).
- 7) J. L. Webb, "Enzyme and metabolic Inhibitors," Vol. 1, Academic press, New York, 1963, pp. 66-79, 488-512.
- 8) J. Shi, Q. Qu, Y. Kakuda, S. J. Xue, Y. Jiang, S. Koide, and Y. -Y. Shim, *J. Food Comp. Anal.*, 20, 603-608 (2007).
- 9) T. C. Chou, T. C. and P. Talalay, *Adv. Enzyme Regul.*, 22, 27-55 (1984).
- 10) 井邊早春, 石川洋哉, 受田浩之, 山崎壮, 松井利郎, 松本満, 日本食品科学工学会 第56回大会講演要旨集, p101 (2009).
- 11) 石川洋哉, 松本 満, 受田浩之, 島村智子, 松藤 寛, 山崎 壮, *FFIジャーナル*, 215, 5-16 (2010).



プロフィール

石川 洋哉 (いしかわ ひろや)

福岡女子大学人間環境学部 准教授

- 1992年 九州大学農学部食糧化学工学科卒業
- 1994年 同大学大学院農学研究科食糧化学工学専攻 修士課程修了
- 1997年 同大学大学院農学研究科食糧化学工学専攻博士課程修了 博士(農学)
- 1997年 九州大学ベンチャービジネス ラボラトリー 講師(中核的研究機関研究員)
- 2000年 日本学術振興会特別研究員(九州大学)
- 2000年 九州大学大学院農学研究科 助手
- 2007年 九州大学大学院農学研究科 助教
- 2009年 福岡女子大学人間環境学部 准教授 現在に至る

定量 NMR を用いたダツタンソバ乾麺中のケルセチンの迅速定量

(2010年7月26日受付)

(2010年10月8日受理)

杉本直樹^{a)}、多田敦子^{a)}、末松孝子^{b)}、有福和紀^{b)}、齋藤 剛^{c)}、井原俊英^{c)}、吉田雄一^{d)}、
田原麻衣子^{a)}、久保田領志^{a)}、清水久美子^{a)}、山崎 壮^{a)}、河村葉子^{a)}、西村哲治^{a)}

- a) 国立医薬品食品衛生研究所
 b) 日本電子株式会社
 c) 独立行政法人 産業技術総合研究所 計測標準研究部門
 d) 和光純薬工業株式会社

Rapid quantification of quercetin in tartary buckwheat noodle by quantitative NMR

(Received July 26, 2010)

(Accepted October 8, 2010)

Naoki Sugimoto^{a)}, Atsuko Tada^{a)}, Takako Suematsu^{b)}, Kazunori Arifuku^{b)}, Takeshi Saito^{c)},
Toshihide Ihara^{c)}, Yuuichi Yoshida^{d)}, Maiko Tahara^{a)}, Reiji Kubota^{a)}, Kumiko Shimizu^{a)},
Takeshi Yamazaki^{a)}, Yoko Kawamura^{a)}, Tetsuji Nishimura^{a)}

- a) National Institute of Health Sciences
 b) JEOL Ltd.
 c) National Metrology Institute of Japan, AIST
 d) Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Abstract

Quantitative NMR (qNMR) method was applied for the quantification of quercetin in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* L.) noodle. In the reagent market, quercetin is generally provided as quercetin + X hydrate of which the purity is not determined exactly. Hence, if using the reagent as the reference material for LC quantification, the reliability of analysis data will not be assured. qNMR is based on the fact that the signal intensities of a given NMR resonance are directly proportional to the molar amount of that nucleus in the sample, and is able to determine the contents with traceability to International System of Units (SI units). The content of quercetin was calculated from the ratio of the signal intensities of a proton at H-2' on quercetin to eighteen protons of the methyl groups on hexamethyldisilane (HMD) used as the internal standard, after the concentration of HMD was corrected using potassium hydrogen phthalate (PHP), which is one of certified reference material (CRM). In the result, the content of quercetin in tartary buckwheat noodle was determined with SI-traceability to 1.58 ± 0.14 mg/g as the anhydrate formula. The quantitative value was verified using general LC method after the purity of reagent was determined exactly. qNMR does not need its reference compound, the calibration curve and separation column like LC method. Our procedure in this study is rapid and simple with overall analysis time of only 10 min, and also the result is traceable to SI units.

Keywords : ダツタンソバ、ケルセチン、国際単位系、ヘキサメチルジシラン、定量核磁気共鳴法
 tartary buckwheat, quercetin, International System of Unit, hexamethyldisilane, quantitative NMR

I 緒言

現在、食品中の機能性成分や有効成分などの天然有機化合物の定量用標準品はほとんど流通していない。よって、定量用標準品が入手不可能な場合には、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の割合から正確な定量値が求められるものである。すなわち、定

連絡先 : 〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 杉本直樹

Corresponding author: Naoki Sugimoto, National Institute of Health Sciences,
 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

量用標準品とした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。

我々は、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定量分析法として、NMR を用いた定量法 (quantitative NMR (qNMR)) の開発を行っている¹⁻⁶⁾。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1個あたりのシグナル面積比は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 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。我々は、これまでに qNMR を応用し、残留農薬試験用イソキサチオンオキシソロン標準品⁵⁾、食品添加物コチニール色素の主色素成分カルミン酸の絶対量⁶⁾が計量学的に正確に算出可能であることを報告した。

ダツタンソバ (Tartary buckwheat: *Fagopyrum tataricum* L.) には、主成分として機能性物質ルチン (rutin) がソバより多く含まれており、ダツタンソバ茶をはじめ健康食品として注目されている。一方、市販のダツタンソバ乾麺には、ルチンがほとんど検出されずルチンのアグリコンであるクエルセチン (quercetin) が主成分として検出される場合が多い。これは、ダツタンソバの実にはルチン分解酵素が含まれており、ソバ粉に水を加えて練る加工過程で、ダツタンソバに含まれるルチンが加水分解されてクエルセチンとなるためであるとされている⁷⁾。

ルチンおよびクエルセチンは、ダツタンソバ以外にも数多くの植物に含まれ、代表的なフラボノイドの一種であることから、正確な純度を値付けられた定量用標準品が市場に流通し、高速液体クロマトグラフ (LC) により、ダツタンソバ乾麺中のクエルセチンの含量は、これら標準品を用いた絶対検量線法から正確に求められると思われる。しかし、ルチンは3水和物として、クエルセチンはX水和物の試薬として市場に流通しているのみで、さらに、これらの市販試薬にラベル表示される純度値はLCの面積百分率 (%) (= 主成分ピーク面積 / 総ピーク面積 × 100) 等から値付けしただけのものである。すなわち、これらの標準品の代用とされる市販試薬は、ロット間、またはメーカー間によってその純度にばらつきがある可能性を否定できない以上、食品中の代表的なフラボノイドの定量分析値の信頼性でさえ、厳密な意味で未だ確保されているとは言えない状況にある。

そこで本研究では、qNMR が分離操作を伴わない迅速かつ

正確な食品中の機能性成分の定量に応用可能であるかを検証するため、ダツタンソバ乾麺中のクエルセチンの含量測定を試み、一般的な分析法であるLCによる結果と比較検証した。その結果、qNMR により、ダツタ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。

II 実験方法

1. 試薬および試料

ダツタンソバ乾麺1製品 (A社製) は、市場より購入したものをを用いた。

クエルセチン市販試薬 (quercetin $C_{15}H_{10}O_7 \cdot XH_2O$ (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 $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$ (MW: 610.52 as anhydrate)、純度 (ラベル表示) >98.0%) は東京化成工業 (株) 製を用いた。

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) 製)、qNMR 用重溶媒として重メタノール (methanol-*d*₄) (Isotec 製) を用いた。高純度フタル酸水素カリウム (potassium hydrogen phthalate: PHP) 認証標準物質 (certified reference material: CRM) (品番 NMIJ CRM 3001-a: 純度 $100.00 \pm 0.027\%$) は (独) 産業技術総合研究所製を用いた。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

各種分析データの取得には、以下の機器を用いた。

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 (LC): Shimadzu LC10AVP system (島津製作所 (株) 製)。

セミマイクロ天秤: AEG-80SM (島津製作所 (株) 製)。試料の秤量値は、特に断りのない限り、最小目盛 0.01 mg まで読み取った値を用いた。

なお、標準液および試料溶液の調製には、化学用体積計 (50 mL メスフラスコ) または電動オートピペッター (マルチピペット Xstream (エッペンドルフ製)、10 mL (不確かさ $\pm 0.4\%$)、3 ~ 5 mL (不確かさ $\pm 0.5\%$)) を用いた。

3. 分析試料の調製

ダツタンソバ乾麺を約 1 cm に切断し、乳鉢上で磨り潰した粉末約 2.0 g を精密に量り取り、メタノール 50.0 mL に懸濁し、室温下、時々振り混ぜながら3日間抽出した。抽出後、遠心分離 (3,000 rpm) により不溶物を取り除き、得られた抽出液を遠心エバポレーターを用いて減圧下乾燥した。得られた残渣にあらかじめ HMD の濃度を校正した 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 を綿栓ろ過して NMR 試験管に封入したものを qNMR 用試料溶液とし、一方、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)。なお、別途、遠心分離により取り除いた不溶物中のクエルセチン (QC) は検出下限以下であることを確認した。

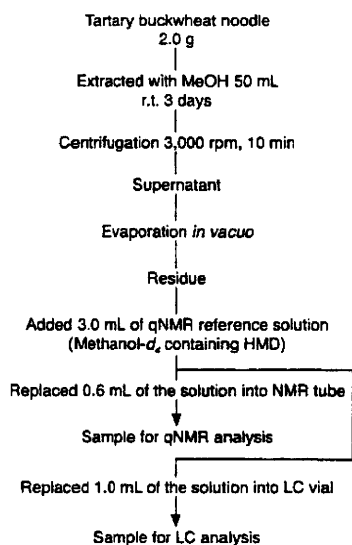


Fig. 1. Extraction of quercetin from tartary buckwheat noodle and sample preparation for qNMR and LC analysis

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

qNMR 標準液の調製および HMD の濃度校正は既報^{5,6)}に準じた。すなわち、HMD 約 100 mg を精密に量り取り、methanol- d_4 を加えて溶解し、正確に 50.0 mL とした。この溶液 10.0 mL を正確に取り、methanol- d_4 で 50.0 mL に定容して 5 倍希釈したものを qNMR 標準液とした。qNMR 標準液中の HMD の濃度は、認証標準物質 (CRM) である PHP により校正して求めた。すなわち、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 \times 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 \times 4 (87.53 ppm, 8.15 ppm) および HMD のメチルプロトン CH₃ \times 6 (80 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 (W_{HMD}) を校正し、(404.2 \pm 1.8) μ g/mL (AV \pm SD, n = 3) を得た。

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

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 \times 6, PHP = PhH \times 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

ダツタンソバ乾麺中のクエルセチンの定量は以下の様に行った。すなわち、qNMR 用試料溶液を qNMR に付し、HMD (80 ppm) およびクエルセチンに由来する特定シグナル (87.69 ppm) の相対面積、分子量、濃度等を式 (2) に代入し、ダツタンソバ乾麺 (TBN) 中のクエルセチン (QC) の含量 (C_{QC}) (mg/g) を算出した。

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

ただし、 W_{TBN} = TBN の濃度 (mg/mL) (= TBN 2.0 g/qNMR 用試料溶液 3.0 mL)、 M_{QC} = QC の分子量 (quercetin (as anhydrate) = C₁₅H₁₀O₇ (MW 302.24))、 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 \times 1)、 C_{QC} = QC の含量 (mg/g)。

また、クエルセチン市販試薬の純度測定は以下の様に行った。すなわち、クエルセチン市販試薬約 20 mg を精密に量り取り、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、市販試薬中のクエルセチン (QC) の純度 (P_{QC}) (w/w%) を算出した。

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

ただし、 P_{QC} = QC の純度 (w/w%)。

4-3) qNMR 測定条件および解析処理

qNMR 測定条件の基本情報は Table 1 に示した。qNMR データ解析には、自動定量解析ソフトウェア (日本電子 (株) 開発中) を用いた。qNMR データをフーリエ変換 (Window 関数: function = exponential, BF = 0.12 Hz, zero filling = 1, T1 = T2 = 0%, T3 = 90%, T4 = 100%) および自動位相補正した後に、qNMR 標準物質および測定対象化合物の情報から

Table 1. Instruments and acquisition parameters

| | |
|---------------------------|--|
| Spectrometer | JNM-ECA (600 MHz) (JEOL) |
| Probe | 5 mm broadband autotune probe |
| Spectral width | - 5 - 15 ppm |
| Data points | 32000 |
| Auto filter | On (8 times) |
| Flip angle | 90° |
| Pulse delay | 60 s ($>5 \times T_1$) |
| Scan | 8 times |
| Sample spin | No spin |
| Probe temperature | 30°C |
| Solvent | Methanol- d_4 |
| qNMR reference material | HMD |
| Primary standard material | Potassium hydrogen phthalate (PHP) (NMIJ CRM3001a) |

自動解析処理を行い、式(2)または式(3)に従い、含量(C_{QC}) (mg/g) または純度(P_{QC}) (w/w%) を算出した。

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 ($r^2 = 0.98$) 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、予め qNMR により純度を補正したクエルセチン (無水物としての純度: $P_{QC} = 92.8\%$) 市販試薬を定量用標準品とし、1.5 mg/mL、1.0 mg/mL、0.50 mg/mL にメタノールで希釈調製したものをを用いた。LC 条件: 注入量, 5.0 μ L; カラム, J'sphere ODS-H80 (4.6 \times 250 mm, 5 μ m (YMC 製)); カラム温度, 40 $^{\circ}$ C; 移動相, 0.1% ギ酸水溶液: 0.1% ギ酸メタノール = 95 : 5 (0 min) \rightarrow 5 : 95 (25-30 min); 流量, 1.0 mL/min; 検出波長, UV 356 nm。

III 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、測定対象化合物の濃度を導くことが可能である。そこで、既報^{5,6)}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確保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) を一次標準として使い、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。

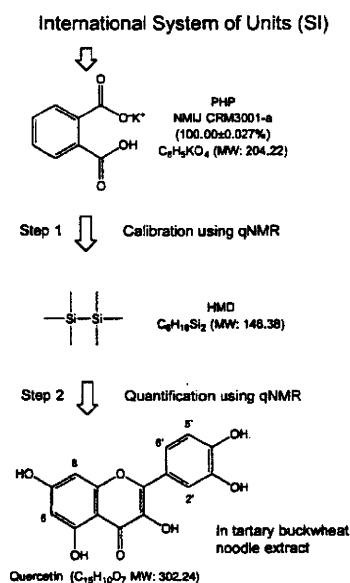


Fig. 2. Strategy of SI-traceable absolute quantification based on qNMR

Fig. 3 には、qNMR 基準物質として HMD を 404.2 μ g/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 qNMR 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 7.69 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やフェノール性化合物^{8,9)}に由来すると考えら

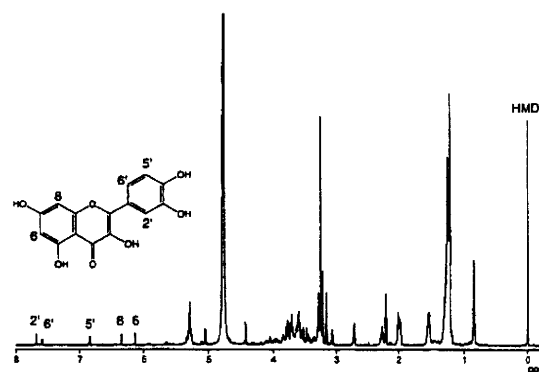


Fig. 3. qNMR spectra of tartary buckwheat noodle extract
The 1H chemical shift were shown as the δ scale in ppm, relative to HMD (hexamethyldisilane) ($\delta = 0.00$ ppm).

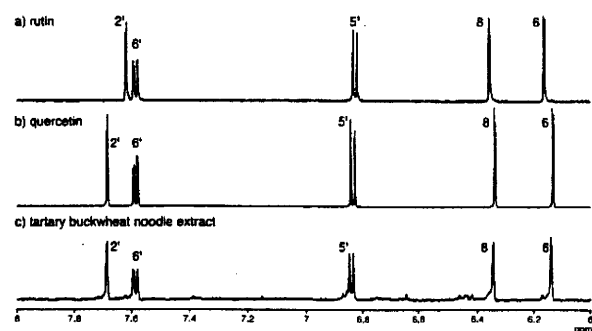


Fig. 4. qNMR spectra of rutin, quercetin and tartary buckwheat noodle extract

a) rutin (quercetin 3-O- β -rutinoside ($C_{27}H_{30}O_{16}$ MW: 610.52)), b) quercetin, c) tartary buckwheat noodle extract. The 1H chemical shift were shown as the δ scale in ppm, relative to HMD (hexamethyldisilane) ($\delta = 0.00$ ppm). The signals at δ 7.70 ppm and δ 0.00 ppm were used as the target and reference signals for the quantification.

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、他の不純物の影響を受けていないと予想されたことから、このシグナルを定量用として選定した。qNMR 基準物質のHMDとのシグナル面積比から式2により定量値を求めた結果、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 \pm 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(Fig. 5)。

クエルセチン市販試薬がX水合物であること、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、既報^{5,6)}に従い、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 \pm 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とほぼ一致し、qNMRによって直接評価した定量値が正確であることを裏付けるものであった(Fig. 6)。以上のことから、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確認された。さらに、qNMRでは、1測定当たりの所要時間が約10分以内と迅速であり、LCと同様以上にハイスルーブットな分析法として実用であると考えられた。

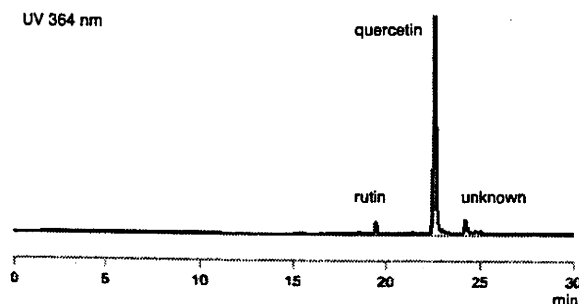


Fig. 5. LC profile of methanol extract from tartary buckwheat noodle

LC conditions are described in the experimental section.

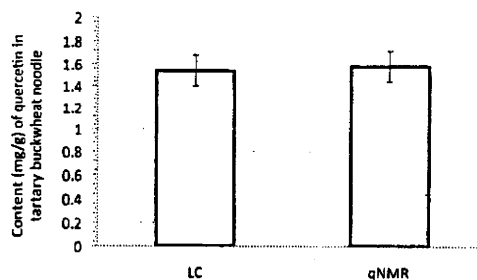


Fig. 6. Comparison of the quantitative values obtained by LC and qNMR

LC quantification was carried out using the absolute calibration method, and the purity of quercetin reagent as reference was corrected to 92.8% by qNMR. Error bar means SD ($n = 3$).

IV 結論

ダットンソバ乾麺中のクエルセチンの迅速かつ正確な定量法として、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を応用することによって、ダット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によるダット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あり、操作が単純である点、並びに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も可能である。

以上のことから、食品中の機能性成分等の天然有機化合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に達したと考えられる。我々は、qNMRの分析値の信頼性を更に向上するために、高感度化および高精度化に関する研究と共にqNMRによる複合分析法の開発を継続中である⁴⁾。

V 謝辞

本研究の成果は、厚生労働科学研究費補助金「食品の安心・安全確保推進事業」および経済産業省委託事業「1対多型校正技術の研究開発」の一部を含むものである。

VI 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 Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, 16, 28-33 (2009).
 - 6) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Ito, S., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T.: Absolute quantification of carminic acid in cochineal extract by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, 51, 19-27 (2010).
 - 7) Yasuda, T., Nakagawa, H.: Purification and characterization of the rutin-degrading enzymes in tartary buckwheat seeds. *Phytochemistry*, 37, 133-136 (1994).
 - 8) Wu, Y., Sun, B., Huang, J., Gao, H., Wu, L.: A new flavonoid glycoside from the seeds of *Fagopyrum tataricum*. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 2, 202-205 (2007).
 - 9) Kim, S.-J., Zaidul, I.S.M., Suzuki, T., Mukasa, Y., Hashimoto, N., Takigawa, S., Noda, T., Matsumura-Endo, C., Yamauchi, H.: Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) spouts. *Food Chemistry*, 110, 814-820 (2008).

定量NMRを用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保

杉本 直樹^{a)} 多田 敦子^{b)} 末松 孝子^{c)} 有福 和紀^{d)}

Naoki Sugimoto

Atsuko Tada

Takako Suematsu

Kazunori Arifuku

^{a)} 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部

東京都世田谷区上用賀1-18-1

Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^{b)} 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

東京都世田谷区上用賀1-18-1

Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^{c)} 日本電子株式会社NM事業ユニットNMアプリケーショングループ

東京都昭島市武蔵野3-1-2

NM Application Group, NM Business Unit, JEOL Ltd.

1-2-3 Musashino, Akishima-shi, Tokyo 196-8558, Japan

^{d)} 日本電子株式会社データソリューション事業部総合企画推進室R&Dビジネス推進部

東京都昭島市中神町1156

R&D Business Promotion Department, General Planning and Promotion Office, JEOL Ltd.

1156 Nekagami-cho, Akishima-shi, Tokyo 196-0022, Japan

Summary

For the quantification of any compound in foods, chromatographic methods such as GC-MS and LC-MS are currently widely used. Reference materials are very important to ensure the reliability of analytical data. However, it is very difficult to obtain pure compounds and determine purities that are traceable to the International System of Units (SI). When reference materials for the target compounds are not obtained from the reagent manufacturers, we have no choice but to use reagents, or isolated or synthesized compounds as reference materials for which the purities are not known exactly. For all of these reasons, present chromatographic methods might result in degrading the reliability of analysis data. To improve the reliability of analytical data in the field of food chemistry, we are developing quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) as a simple absolute quantification method that is able to determine the purities of compounds or absolute content in foods with SI-traceability. qNMR is based on the fact that the signal intensities of a given NMR resonance are directly proportional to the molar amount of that

nucleus in the sample. If appropriate instrument settings have been made, any NMR user can apply NMR spectroscopy to quantitative analysis of any compound. To build up SI-traceable qNMR analysis and boost convenience, we chose 2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- α sodium salt (DSS- α) and hexamethyldisilane (HMD) as qNMR reference materials after correction of the concentrations by using certified reference materials (CRMs) such as diethyl phthalate (DEP) and potassium hydrogen phthalate (PHP). Thus, qNMR can calculate the purity or content with SI-traceability from the ratio of the signal intensities of the target compound to the qNMR reference material. qNMR analysis requires no calibration curves and also it is rapid and simple with overall analysis time of only 10-20 min. In this review, several applications using qNMR analysis are shown: the absolute quantification for the reagents of natural compounds and reference materials for pesticides. We believe that qNMR will be one of the key technologies providing highly efficient metrological traceability to analytical data in the future.

1. はじめに

食品、健康食品などの機能性や有効性だけでなく、安全性

に関する国民の関心は高い。国民の安心・安全を確保するためには、食品分析により得られる分析値の信頼性は可能な限り高いものでなくてはならない。特に、食品中の食品添加物や残存する農薬などについては、食品の安全性を評価・確保

するために規制値の強化や分析のための公定法の設定が行われており、これに伴い、試験検査機関においては高度な分析手法として分子認識能と微量分析に優れたガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) や液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) などの導入が必須となりつつある。

クロマトグラフ法による分析値の信頼性は、基本的に3つのファクター、1. 分析法 (公定法など)、2. 分析者・実務者の技術力、3. 定量用標準品 (標準物質) の純度、に依存しており、これらそれぞれの信頼性が確保されていることを大前提としている。1と2に関しては分析のバリデーションの実施と分析者自身の日々の技術力の向上によって一定以上の信頼性を確保することが可能である。しかし、3に関してはすべての測定対象と同一の化合物について計量学的に正確に値付けられた標準物質の供給・入手が現状では不可能であるため、標準物質が入手できない場合には代用品として用いた試薬や自ら単離精製した化合物等の純度の誤差が分析値の信頼性を大きく損なっている可能性を否定できないという問題を抱えている。さらに、食品中の測定対象とした化合物の生理活性や有効性、安全性の評価は対象化合物の含量値 (定量値) との関係に基づいて行われるため、図1に示すようなピラミッド構造から得られた評価結果の信頼性も実は十分に保証できていない場合もあり得る。この問題は、あまりにも基本的な問題ではあるが、有効な解決策がないために議論の場にすらほとんどあがらない。しかし、今後の食品分析の分野における分析値や評価値の信頼性の向上・確保のためには、この問題を解決する新たな方法論の構築が必須であると考えられる。

著者らは、上記の問題の抜本的な解決を目指し、その基盤技術として核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance : NMR) を用いた有機化合物の絶対定量法 (quantitative NMR : qNMR) の開発を行ってきた^{1,2)}。本稿では、qNMRの基本原理、また、これを利用した食品分析の分野における分析値の信頼性の確保・向上の必要性、具体的な応用例³⁻⁵⁾ について述べる。

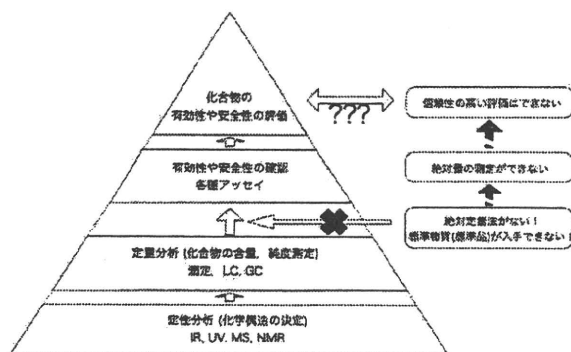


図1. 有機化合物の定量分析および有効性や安全性の評価における問題点

2. クロマトグラフ法とqNMRの違いとは?

ところで、世界中どこでもだれでも簡単に「長さ」を正確に測ることができる。なぜなら、だれもが「長さ」を測るための世界共通の「ものさし」を持っているからである。一方、有機化合物の純度や含量を正確に測定することはそう簡単ではない。「長さ」の測定と同じようにただ一つの「ものさし」さえあればよいというわけにはいかない。

有機化合物はその分子構造に起因した固有の物性値を持っている。物性値とは分子量、紫外可視吸収スペクトルなどであり、化合物の分子構造が違えば、それぞれの分子量、吸光係数をはじめ様々な物性値が化合物毎に異なることとなる。クロマトグラフ法は、これらの化合物毎の物性値の違いを利用しており、カラムによる分離と検出器による分子認識に頼った分析法である。検出器の応答性は化合物毎に異なるため、測定対象の化合物が異なれば、そのすべてに対して一つずつ「ものさし」に相当する標準物質を用意する必要がある (図2左)。正確な「ものさし」、つまり計量学的に正確に値付けられ国際単位系 (International System of Units : SI) にトレーサブルな認証標準物質 (certified reference material : CRM) またはそれに準じたものを使用した分析結果でなければ、厳密な意味で分析値の信頼性を保証することができないことになる。このことから、有機化合物の標準物質の整備・供給体制の強化は継続的に行われている。しかし、測定対象となり得る化合物は人工的な化合物だけでも数十万以上、天然由来のものを含めれば、その数は無限であり、これらすべてについて正確に純度が値付けられた標準物質「ものさし」の供給が必要であり、従来法を用いては実現不可能であることは容易に想像できる。

そこで、化合物毎の物性値に基づく定量法では、上記の問題を抜本的に解決できないため、別の視点や技術からの定量法の構築を目指すこととした。有機化合物は炭素、水素、酸

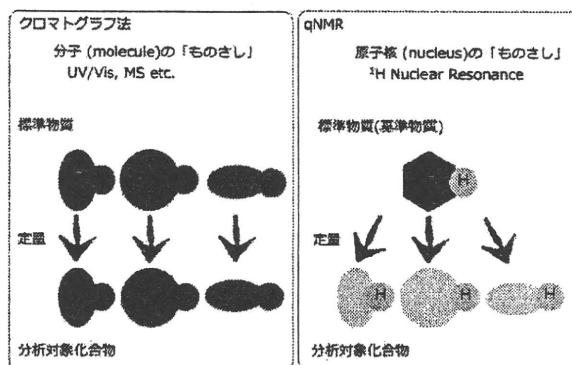


図2. クロマトグラフ法とqNMRの違い

クロマトグラフ法では分析対象化合物と同一の標準物質が必要。qNMRでは分析対象化合物と同一の標準物質を必要とせず、別の化合物を基準として水素の原子数の比から様々な化合物が定量できる。

素などが共有結合した分子である。異なる分子構造で異なる物性値を持つ分子であっても、構成する最小単位の原子だけをみれば、同種の原子同士は等価であるといえる。したがって、分子上の特定の原子の数を「ものさし」とした定量法が構築できるのでは？という考えに基づき、分子上の原子認識が可能であり、異なる分子上であっても原子の単位でみれば、同じ数の原子が等しい信号強度として観察・測定可能なNMRをその候補としてあげた。

NMRは既に化合物の構造を決定するための代表的な定性分析法の一つとして広く利用されている。(NMR現象の基本原理解については専門書^{6,7)}を参照していただきたい) NMRスペクトルから得られる化学シフトやスピン結合などは、分子上の原子核の構造情報を反映している。¹H-NMRでは、化学シフトの異なる各シグナルの面積比は、分子上の各炭素に結合した水素原子の数の比に対応し、測定対象の化合物の分子構造に関わらず、すべて水素原子が定量的な信号として観測される。このことから、¹H-NMRにおいては水素の原子核を認識・定量的に測定可能であるので、化合物Aの特定の置換基上の水素のシグナル面積 (I_A) は、置換基上の水素の数 (H_A) × 化合物Aのモル濃度 (m_A) として観察される (式1の分子)。別の分子構造の化合物Bの特定の置換基上の水素のシグナル面積 (I_B) についても同様な関係式が当然成り立つ (式1の分母)。よって、2つのシグナルが異なる化合物 (A, B) に由来する場合には個々のシグナル面積と化合物のモル濃度は式1の関係式で表すことができる。

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A m_A}{H_B m_B} = \frac{H_A W_A / M_A}{H_B W_B / M_B} \quad (1)$$

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / W_{\text{std}}} \times P_{\text{std}} \quad (2)$$

ただし、 I =シグナル面積、 H =特定基のプロトン数、 m =モル濃度、 W =重量、 M =分子量、 P =純度%、sample=試料、std=基準物質。

さらに2つの化合物のうち、一方の化合物として純度が明らかな基準物質 (std) を「ものさし」として用いれば、モル比と溶液の調製値の関係から測定対象の化合物の純度あるいは含量を決定できる式2の関係が成り立つ。qNMRによる絶対定量は式2を利用し、純度あるいは濃度が既知の基準物質をあらかじめ加えた溶液中で測定対象の化合物の¹H-NMR測定を行い、得られたスペクトル上に観察される基準物質と測定対象の化合物に由来するシグナル面積、水素数および濃度比の関係から定量値を算出する方法である。これを言い換えるとqNMRでは、¹H-NMRの水素原子の認識能を利用して、基準物質と測定対象の化合物の水素の原子数の比を測定可能であるので、測定対象の化合物とは異なる一つの基準物質を「ものさし」とするだけで、あらゆる測定対象の化合物の純度や含量が算出可能となる (図2右)。

既述したように、クロマトグラフ法で有機化合物の正確な定量値を得るためには、測定対象の化合物毎に同一の標準物質「ものさし」が必須であるため、無限の数の「ものさし」の供給体制を整える必要がある。一方、qNMRを有機化合物の定量分析における「メートル原器」的なものとして位置づければ、一つのqNMR基準物質から無限の数の「ものさし」を校正することが可能となり、標準物質の供給体系も根本的に刷新することができる。また、「長さ」が世界中どこでもだれでも正確に測れるように、世界中で測定された化合物の純度、含量値、定量値などの測定値が一つのqNMR基準物質に紐付けられることとなり、国際的な室間精度の問題などが解決されると考えられる。

3. qNMRにおけるSIトレーサビリティの確保

従来の定性分析用の¹H-NMR測定条件では、分子上の水素原子の数が整数比で確認できれば、構造解析に必要な情報が十分に得られるのでNMR現象の定量性を犠牲にして検出感度を優先した測定条件に設定されている。一方、qNMRでは分析対象の化合物の分子上の原子の数に信号強度が正確に比例して観察されることが必須条件であるので、qNMR用に測定条件の最適化が必要である。そこで、NMRの定量性に関する報告のうち、信頼性が高いと考えられたPauliおよびSaitoらの報告⁸⁻¹⁰⁾を参考に測定条件の検証と最適化を行った。まず、パルス繰り返し時間の影響を検証した。図3には、パルス繰り返し時間と縦磁化の回復の関係を示したが、フリップ角を45°および90°に設定したところ、縦磁化が99.9%以上回復するためには、45°および90°ではシグナルのスピングリッド緩和時間 (T_1) の6倍~7倍以上になるようにパルス繰り返し時間を設定する必要があることが確認された。さらに、ラジオ波 (RF) パルスが観測中心から離れるほど強度が低下し、観測幅の両端では定量誤差を与えるため、測定対象のスペクトル範囲が観測幅の80%以内になるように-5 ppm~15 ppmを

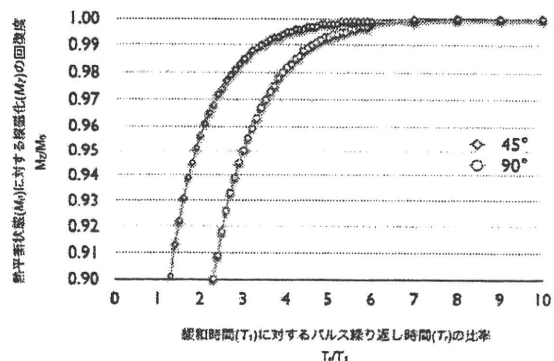


図3. パルス繰り返し時間と縦磁化の回復の関係

測定範囲とし、観測幅の両端での定量誤差の影響を避ける必要があった。また、シム調整を厳密に行い、良好なシグナル形状およびS/Nを得た上での測定が不可欠であった。これらの検討結果を踏まえ、最終的には得られたFID信号データを自動解析処理するためのqNMRスペクトル解析ソフトウェアを別途開発し、同一処理条件下で一元的に定量値を算出することが可能となった。

次にqNMR基準物質の選定を行った。qNMR基準物質の候補として既に多くの化合物が報告されている(図4)^{2, 11, 12)}。しかし、これまでに報告されたqNMR基準物質は重溶媒に対する溶解性を考慮する必要があるばかりでなく、測定対象の化合物のシグナルと重ならないものを選択して使用しなければならなかった。また、計量学的に正確に純度が値付けられたものはほとんどなく、これらを基準物質として得られた定量値の信頼性の確保が不可能であった。すなわち、qNMRによ

る定量分析には利便性と信頼性に欠点が残されていた。そこで、qNMR基準物質として2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸-*d*₆ナトリウム塩(DSS-*d*₆) (水系用)およびヘキサメチルジシラン(HMD) (有機溶媒用)を用いることとした。DSS-*d*₆とHMDは、テトラメチルシラン(TMS)と同様に0 ppm付近にシグナルを示すため、これらを基準物質として用いたqNMRスペクトルは通常の¹H-NMRスペクトルと同様に扱うことができる。水溶性化合物用にDSS-*d*₆、有機溶媒溶解性化合物用にHMDをqNMR基準物質としてそれぞれ一般化することによって、基準物質の選択の際の煩雑さが省かれるだけでなく、測定対象の化合物の純度、含量や品質を明確に表したqNMRスペクトルデータベースとしても有用となり、qNMRによる定量分析の利便性と信頼性が大幅に改善できると考えた。

しかしながら、qNMRの技術開発を開始した当初、計量学

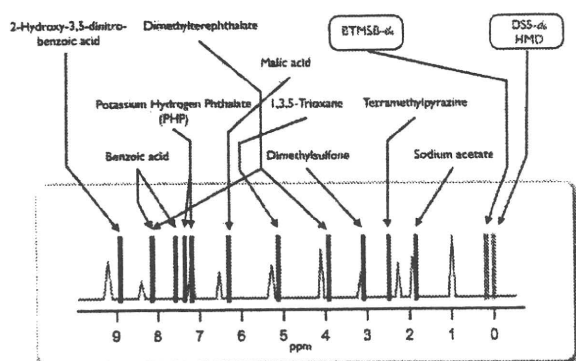


図4. qNMR基準物質の化学シフト値

定量NMR (qNMR) に関する論文で既に報告されている様々な基準物質の化学シフト値。新たにqNMR基準物質として設定したDSS-*d*₆とHMDは0 ppmにシグナルを与える。HMDは液状であり秤量に注意が必要であるため、取り扱いが簡単で安定な固体のBTMSB-*d*₆が別途開発されている。

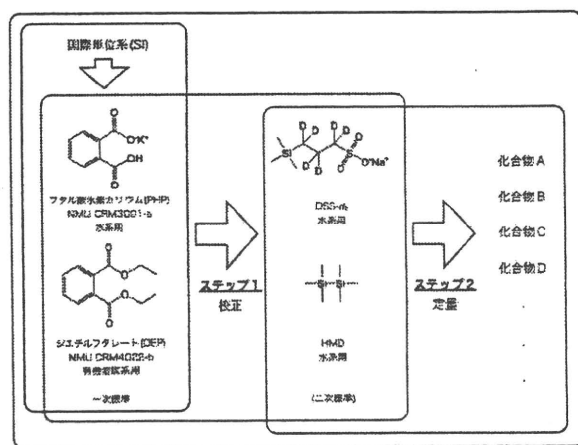


図5. qNMRにおけるSIトレーサビリティの確保

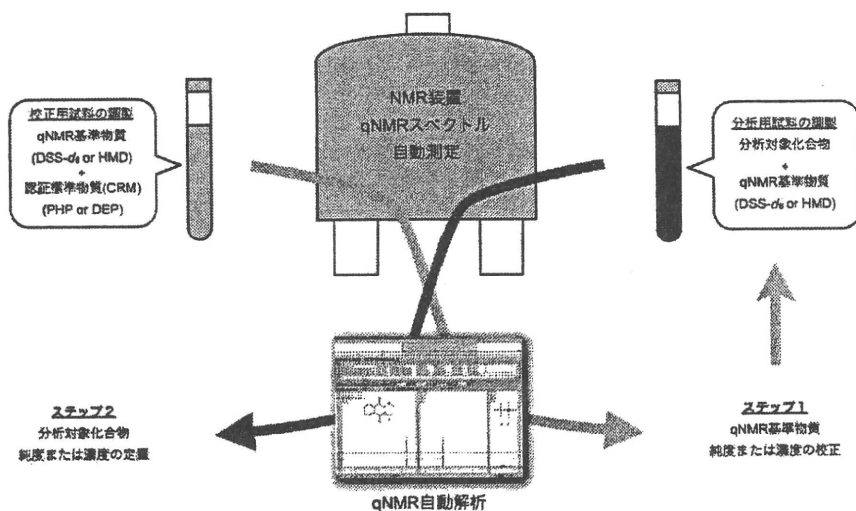


図6. qNMRによる定量分析のフロー

認証標準物質 (CRM) を用いてqNMR基準物質の正確な純度または濃度を値付ける (ステップ1)。次にqNMR基準物質を用いて分析対象化合物の純度または濃度の絶対量を求める (ステップ2)。すなわち、定量分析の結果は、qNMR基準物質を介してSIにトレーサブルな認証標準物質 (CRM) に紐付けられる。また、SIにトレーサブルなqNMR基準物質の供給が開始されれば、ステップ1の校正は省略できる。

的に正確に純度が値付けられたDSS- d_6 とHMDは流通していなかったため、厳密な純度値あるいは濃度値が要求されるqNMR基準物質としてそのまま用いることができなかった。そこで、qNMRによって得られる定量値の国際単位系 (SI) へのトレーサビリティが確保された認証標準物質 (CRM) であるNMIJ CRM 3001-a (フタル酸水素カリウム: PHP、水系用) またはNMIJ CRM 4022-b (ジエチルフタレート: DEP、有機溶媒系用) を一次標準として用い、qNMR標準液中のDSS- d_6 またはHMDの濃度を校正した後に、DSS- d_6 または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。すなわち、qNMRの基準物質としてDSS- d_6 およびHMDを用いた際の測定対象の化合物の定量値のSIトレーサビリティは、CRMであるPHPまたはDEPを介して実現した (図5)^{2,5)}。

図6には、qNMRによる定量分析の実際の手順を示した。まず、校正用試料としてqNMR基準物質とCRMを混合したものを調製して測定を行い、シグナル面積と濃度比の関係からqNMR基準物質の正確な純度または濃度を値付ける。次に、正確に値付けられたqNMR基準物質と分析対象化合物を混合したものを調製して測定と解析を行うことによって、分析対象化合物の純度または濃度の絶対量が求められる。(本稿が掲載される時点では、計量学的に正確に値付けられ、トレーサビリティ源としてそのまま使用可能なqNMR基準物質DSS- d_6 (水系用) と1,4-ビス (トリメチルシリル) ベンゼン- d_4 (1,4-BTMSB- d_4) (有機溶媒系) の供給が開始されている可能性が高い。なお、HMDは液状であり秤量に注意が必要であるため、取り扱いが簡単で安定な固体の1,4-BTMSB- d_4 が別途開発されている。これらを用いれば、図6のステップ1の校正作業は省略できる。) また、qNMRによる1測定当たりの所要時間は約10~20分であり、qNMRスペクトルの測定と解析を自動化することによって、だれでも簡便かつ迅速に定量分析を行うことが可能となった。さらに、得られた測定値は高い再現性を示し、不確かさは概ね1.0%以内に達し、qNMRによる定量分析の利便性と信頼性を大幅に向上させることができた。

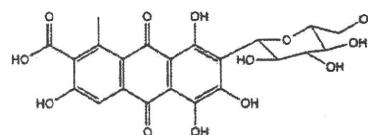
物質量の絶対値は、SIにトレーサブルな測定によって得られると定義されている。このような測定法は「一次標準測定法」³⁾と呼ばれている。「一次標準測定法」の資格を有する分析法は「一次直接法」と「一次比率法」に分類される。「一次直接法」は「物質量の基準となる他の化学物質を用いずに、自分自身で目的の化学物質の物質量を測れる方法 (絶対測定法)」であり、電量分析法、重量分析法および凝固点降下法がある。これらの分析法は物質量の絶対値が得られるが、一般に分析の迅速性に欠け、また分析できる物質の種類が限られる。一方、「一次比率法」は「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」であり、既に実用化されているものに測定

法および同位体希釈質量分析法がある。したがって、qNMRは測定試料中にある水素原子の数、言い換えれば物質量にトレーサブルな測定値を得ることが可能な方法であり、原理的にも「一次標準測定法」の中の「一次比率法」としての資格を有する分析法であるといえる。

4. qNMRを用いた絶対定量の応用例

4-1. 天然赤色素カルミン酸の純度決定³⁾

qNMRの応用例として食品添加物として用いられているコチニール色素 (Cochineal extract) の主色素成分カルミン酸 (carminic acid (CA)) の純度決定を示す。現在、CAとしてその純度がラベル表示された試薬グレードのものが各メーカーより販売されているが、その値はメーカーが品質保証としてHPLC法または吸光度法により値付けただけであり、絶対純度を保証しているわけではない。図7には、CAの構造式と市販試薬AとBのラベルに記載されていた値とqNMRにより求められた絶対量 (%w/w) を示した。DSS- d_6 の δ 0 ppmに観察されるメチル基由来のシグナル面積値 (9H) に対する δ 6.50~7.00 ppm付近に観察されるCAの5位のシグナル面積値 (1H) のプロトン数と分子量の比の関係から絶対量 (%w/w) を求めた。その結果、試薬AおよびBはラベル表示に>70%および>95%と記載されているにも関わらず、それぞれの絶対量は21.3%および78.3%であることが明らかとなった。したがって、qNMRによるCAの絶対量の測定結果から、天然由来の有機化合物の試薬に記載されている値がその絶対量とはかけ離れている可能性が示唆された。またqNMRにより、あらかじめ絶対量を測定したものをHPLCの定量用の標準物質として用いることによって、食品中の天然有機化合物の定量分析の結果の信頼性が飛躍的に向上し、より真値に近い分析値が求められると考えられる。



カルミン酸 (carminic acid)

| 試薬会社 | ラベル値 | qNMR |
|------|-------------------|-------|
| A | >70% (LC面積百分率) | 21.3% |
| B | >95% (分光光度法) | 78.3% |

図7. カルミン酸市販試薬のラベル値とqNMRによる絶対純度
ラベル値は試薬瓶またはカタログに記載されていたもの。

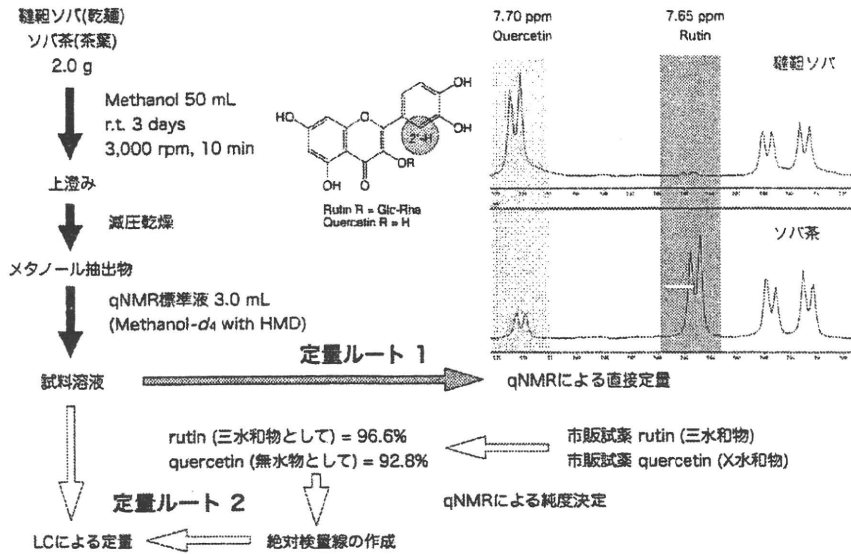


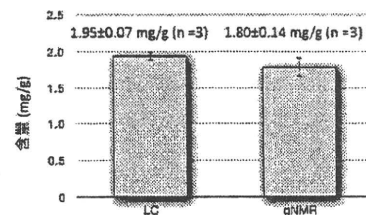
図8. ソバ中のルチンおよびクエルセチンの定量分析
 定量ルート1: ソバのメタノール抽出物について直接qNMR測定を行い、2-Hのシグナル面積からルチンおよびクエルセチンを定量した。
 定量ルート2: qNMRによりルチンおよびクエルセチンの試薬の純度決定をした後に、絶対検量線を作成してLCにより定量した。

4-2. ソバ中のルチンとクエルセチンの絶対定量⁴⁾

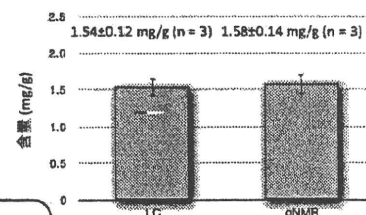
ソバ中のルチンおよびクエルセチンの含量測定は、天然物化学あるいは食品分析学の実習課題として採用している大学も多く、その実習の手引き書には「LCにより市販試薬を標品とした絶対検量線法で定量すること」と記載されており、実習後、学生は何の疑いもなく「正確な定量値を求めた」とレポートを提出するだろう。しかし、クロマトグラフ法による定量分析の原理に基づけば、間違った定量値を報告していることになる。なぜなら、フラボノイドとして最も有名なルチンおよびクエルセチンといえども正確に純度が値付けられた標準物質は存在しないだけでなく、市販試薬ルチンは三水和物として、クエルセチンはX水和物として主に供給されており、乾燥状態によって純度にばらつきが生じる可能性が否定できないためである。したがって、これらを標品としたLCによる定量分析では「およその値が求められた」とレポートした学生の方が実は優秀である。

そこでqNMRにより、ソバ茶中のルチンおよび韃靼ソバの乾麺中のクエルセチンの絶対定量を試みた(図8)。ソバ茶および韃靼ソバの乾麺の抽出液についてqNMRスペクトルを直接測定し、ルチンおよびクエルセチンに由来する δ 7.65 ppmおよび δ 7.70 ppmの2'位のプロトンのシグナル面積からそれぞれの含量(mg/g)を求めた(図8定量ルート1)。その結果、ソバの茶葉中のルチン(三水和物として)が 1.80 ± 0.14 mg/g、韃靼ソバの乾麺中のクエルセチン(無水物として)が 1.58 ± 0.14 mg/gと求められた(図9)。別にqNMRにより、あらかじめそれぞれの市販試薬の純度決定を行った後にLCによる絶対検量線を作成し(図8定量ルート2)、ソバの茶葉中のルチンおよび韃靼ソバの乾麺中のクエルセチンの含量を求めたと

ソバ茶(茶葉)中のルチン(三水和物として)



韃靼ソバ(乾麺)中のクエルセチン(無水物として)



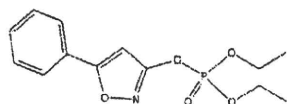
LCによる定量
絶対検量線が必要

qNMRによる直接定量
測定当たり10-20分
絶対検量線の作成は不要

図9. qNMRおよびLCによるソバ中のルチンおよびクエルセチンの定量値の比較

ころ、得られた値は、qNMRによる定量値とほぼ一致した(図9)。この結果から、qNMRにより食品中の化合物の絶対量が正確に求められるだけでなく、測定対象の化合物のシグナルが分離していれば、クロマトグラフィーによる分離操作を必要としない点、測定対象化合物毎に検量線の作成を必要としない点において、ハイスループットな絶対定量分析法としても応用可能であることが示唆された。

一般に、食品中の生理活性物質や天然物に含まれる有効成分の定量分析では、自ら単離した有効成分や対応する市販試薬を標準物質の代用品として使う場合が多いが、その純度



イソキサチオンオキソン標準品 (isoxathion oxon std)

| ロット | ラベル値 | qNMR |
|--------|-------------------|-------|
| Lot. 1 | 96.9% (GC-FID) | 75.4% |
| Lot. 2 | 98.9% (GC-FID) | 98.5% |

図10. イソキサチオンオキソン標準品のラベル値とqNMRによる絶対純度
ラベル値は標準品の添付文書に記載されていたもの。

(あるいは濃度)の評価が不十分であることから定量値の信頼性は低い。qNMRはこのような適切な標準物質が得にくい場合にも信頼性の高い強力な定量分析法になり得ると考えられる。

4-3. イソキサチオンオキソン標準品の絶対定量⁵⁾

試薬メーカーより、有機化合物の「標準品」が販売されているが、標準品であっても開封後の純度は徐々に低下していくものも多いと考えられる。

そこで有機リン系農薬のうち、冷蔵保存しておいたイソキサチオンオキソン標準品2ロットについて、qNMRによる絶対定量を行った。その結果、図10に示すようにロット1とロット2の純度値は大きく異なり、ロット1が75.4%、ロット2が98.5%であり、ロット1のqNMRスペクトル上には分解物と推定されるいくつかのシグナルが観察された。この結果は、標準品として入手したものについても、適切な管理・保存が行われていなければ、その標準品としての純度と品質が維持できないことを示している。このようにqNMRは標準品などの絶対純度の確認や品質管理に応用可能であると考えられる。

5. まとめ

現在、食品分析においてクロマトグラフ法が一般的に用いられており、様々な物質の分析値が報告されている。しかし標準物質の存否から、今日においても得られた分析値の信頼性が厳密に確保されているとはいえないものも存在することは事実である。食品分析の信頼性を向上するためには、科学的な根拠に基づいた分析値のトレーサビリティの確保が今後の「鍵」となると思われる。qNMRは技術・操作的にも簡単かつ迅速な分析法であり、たった一つのqNMR標準物質「ものさし」を用いてあらゆる有機化合物の絶対量を算出できる。この点を活用すれば、最も基本的で重要な問題である標準物

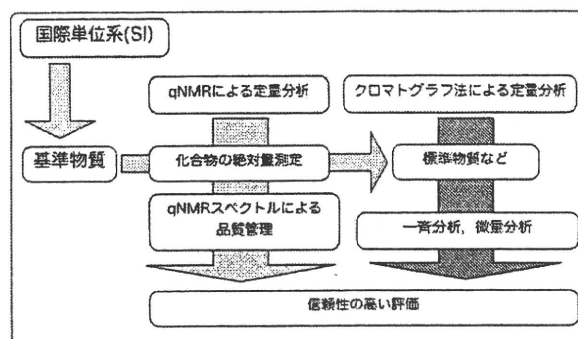


図11. qNMRの役割と分析値の信頼性の確保

質の供給・入手の問題を根本的に解消する方法の一つとなり得ると考えられる。また、食品化学の分野の研究にqNMRを導入し、既存の定量分析法と連携することによって、分析値だけでなく研究対象の化合物の有効性の評価を間接的にSIに紐付けることが可能となり、これまで漠然とした疑問の原因となっていた研究結果に対する信頼性の問題が解消されると考えられる(図11)。

6. おわりに

qNMRは、「NMR現象が定量的である」という古くから知られている原理に基づいているが、低分子化合物の定量分析法としては比較的新しい技術であり、方法論、技術的要素に関する検証、インフラなどの整備が現在進行形で行われている。継続的な基礎研究により、定量値の精度だけでなく、微量分析にも対応できるような検出感度のさらなる向上も期待できる。また、SIトレーサブルなqNMR標準物質の供給、qNMRに特化した安価なNMR装置の製品化、自動解析ソフトの開発も重要である。その上でバリデーションを行い、一般的かつ標準的な試験法の一つとして定着させることができれば、検査・試験機関や研究機関などにおいて幅広い分野での有機化合物の定量分析への活用が期待される。さらに、電気信号を基準としたERETIC (Electronic REFERENCE To access In vivo Concentrations)-qNMRや多変量解析qNMRなどの応用技術の開発により、今後の分析化学の分野において様々な問題を解決する重要な次世代の基盤技術の一つとなると確信している。

本稿で述べたqNMR技術を実際の試験研究や業務に結びつけば、多様な分野で分析値の信頼性の向上が実現できることを想像してほしい。また、読者自身からqNMR技術の新しい応用が発信されることで、食品分野だけでなく、分析化学に関連した研究活動全体の発展に繋がることを強く期待したい。

7. 追記

本稿で述べた内容は、現状の機器分析により得られる定量値の信頼性に対して共通の問題意識を持つ産官の研究機関の研究者がそれぞれの立場を超えて集まり、信頼性を確保した次世代の定量分析技術の構築を目指し、固定観念にとらわれず自由な発想に基づいた意見交換および情報収集を行った上で、それぞれの専門知識を持ち寄って目標を達成しつつある現在進行形の共同研究であることをここに記す。共同研究「qNMR標準化のための測定法の確立」、「qNMR普及のためのインフラの整備」ならびに「1対多型校正技術の研究開発」において、山田裕子氏、吉田雄一博士（和光純薬工業株式会社）、小池亮博士（花王株式会社）、井原俊英博士、齋藤剛博士（独立行政法人産業技術総合研究所）の研究成果の一部を含む。最後に、qNMRの技術開発に当たり、奇抜な発想による研究テーマに関わらず、当初からその必要性を理解して温かく見守っていただくと共に、本稿の執筆内容について貴重なご助言をいただいた佐藤恭子博士、山崎壮博士、河村葉子博士、合田幸広博士、西村哲治博士（国立医薬品食品衛生研究所）に感謝の意を表したい。

引用文献

- 1) T. Ihara, T. Saito and N. Sugimoto, *Synthesiology*, 2, 12-22 (2009).
- 2) N. Sugimoto, R. Koike, N. Furusho, M. Tanno, C. Yomota, K. Sato, T. Yamazaki and K. Tanamoto, *Food Add. Contam.*, 24, 799-806 (2007).
- 3) 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, *食衛誌*, 受理済 (2009).
- 4) 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, 山崎壮, 河村葉子, 西村哲治, 第51回天然有機化合物討論会講演要旨集, 2009, pp. 31-36.
- 5) 田原麻衣子, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤剛, 井原俊英, 吉田雄一, 多田敦子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎壮, 榎元憲一, 中澤裕之, 西村哲治, *食化誌*, 16, 28-33 (2009).
- 6) U. Holzgrabe, I. Wawer and B. Diehl, "NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis", Elsevier, Amsterdam, 2008.
- 7) 竹内敬人, 角屋和水, 加藤敏代, "初歩から学ぶNMRの基礎と応用", 朝倉書店, 2005.
- 8) G. F. Pauli, B. U. Jaki and D. C. Lankin, *J. Natural Prod.*, 70, 589-595 (2007).
- 9) T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura and T. Maeda, *Metrologia*, 41, 213-218 (2004).
- 10) T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fujimine, K. Nose and T. Hirai, *Accred. Qual. Assur.*, 14, 79-86 (2009).
- 11) G. Shao, R. Kautz, S. Peng, G. Cui and R. W. Giese, *J. Chromatogr. A*, 1138, 305-308 (2007).
- 12) qNMR Quantitative NMR at UIC Chicago, URL: <http://tiger.uic.edu/~gfp/qnmr/>

- 13) "分離分析化学事典", 日本分析化学会編, 朝倉書店, 2001, p. 350.

PROFILE

杉本 直樹

国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
第3室室長
薬学博士



1997年金沢大学大学院自然科学研究科博士課程修了(薬学博士)。同年国立衛生試験所(現、国立医薬品食品衛生研究所)入所、食品添加物部研究員。2005~2006年FDA(米国食品医薬品局)、CFSAN(食品安全応用栄養センター)にて、国際基準化を目指した食品添加物の複合分析法の開発研究に従事。2008年より、同研究所環境衛生化学部第3室室長。

多田 敦子

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
第2室主任研究官
理学博士



1995年お茶の水女子大学大学院家政学研究科修士課程修了。同年国立がんセンター研究所入所、変異原物質探索研究に従事。1999年お茶の水女子大学大学院より博士号(理学)取得。2003年より国立医薬品食品衛生研究所、食品添加物部第2室研究員。2004年、同研究部主任研究官。天然由来食品添加物の成分解析と分析法の開発研究に従事。

末松 孝子

日本電子株式会社
NM事業ユニットNMアプリケーショングループ
研究員
工学博士



1997年九州大学大学院工学研究科博士課程単位取得後退学(合成化学専攻)。1998年工学博士取得。同年日本電子株式会社入社。入社以来、核磁気共鳴装置の応用研究に従事。

有福 和紀

日本電子株式会社データソリューション事業部
総合企画推進室R&Dビジネス推進部
次長
工学学士



1985年福岡大学工学部卒業。同年日本電子データソリューション株式会社(現:日本電子株式会社)入社、NMR解析ソフトに関する研究開発に従事。1994年NMR測定・処理に関する研究開発に従事し、核磁気共鳴装置を製作。2004年メタボローム解析について研究に従事し、メタボローム解析ソフトウェアを製作。

報 文

定量 NMR に基づく既存添加物中のケルセチンおよび ケルセチン配糖体の絶対定量

(平成 22 年 3 月 23 日受理)

多田 敦子^{1,*} 高橋 加奈¹ 杉本 直樹¹ 末松 孝子² 有福 和紀²
齋藤 剛³ 井原 俊英³ 吉田 雄一⁴ 石附 京子¹
西村 哲治¹ 山崎 壮¹ 河村 葉子¹

Absolute Quantitation of Quercetin and the Glycosides in Natural Food Additives by Quantitative NMR

Atsuko TADA^{1,*}, Kana TAKAHASHI¹, Naoki SUGIMOTO¹, Takako SUEMATSU², Kazunori ARIFUKU²,
Takeshi SAITO³, Toshihide IHARA³, Yuuichi YOSHIDA⁴, Kyoko ISHIZUKI¹, Tetsuji NISHIMURA¹,
Takeshi YAMAZAKI¹ and Yoko KAWAMURA¹

¹ National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

² JEOL Ltd.: 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan;

³ National Metrology Institute of Japan, AIST: Tsukuba Central 3, 1-1-1 Umezono, Tsukuba 305-8563, Japan;

⁴ Wako Pure Chemical Industries, Ltd.: 3-1-2 Doshomachi, Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan; * Corresponding author

We are developing a simple absolute quantitation method for organic compounds, by means of quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR), with traceability to the International System of Units (SI units). The qNMR method was applied to the absolute quantitation of rutin, isoquercitrin and quercetin in natural food additives, rutin (extract), enzymatically decomposed rutin extract and quercetin, and those compounds as commercial reagents. In this study, 1,4-bis-(trimethylsilyl)benzene-*d*₄ (1,4-BTMSB-*d*₄) whose purity was precisely evaluated on the basis of metrology, was newly used as a qNMR reference material, to be added to the sample solution as an internal standard. The contents of quercetin and quercetin glycosides were calculated from the ratio of the signal intensities of each aromatic proton at the 2' position of the three compounds (these are observed at different chemical shifts) to the eighteen protons of the six methyl groups on 1,4-BTMSB-*d*₄ used as a qNMR reference material. Rapid and simple qNMR method with only one step process was carried by using 1,4-BTMSB-*d*₄. It was demonstrated that the purities of rutin, isoquercitrin and quercetin can be separately determined by qNMR without the need for a separation process or reference materials for all the target compounds.

(Received March 23, 2010)

Key words: ケルセチン配糖体 quercetin glycoside; 絶対定量 absolute quantitation; 定量 NMR qNMR; 食品添加物 food additive

緒 言

天然由来の既存添加物には、ケルセチンおよびケルセチン配糖体を含有する種々の品目がある。このうち、既

存添加物ケルセチンはケルセチンを主成分とする品目、既存添加物ルチン（抽出物）および既存添加物ルチン酵素分解物は、それぞれケルセチン配糖体であるルチンおよびイソケルシトリンを主成分とする品目であり、いずれも酸化防止剤として用いられる。既存添加物名簿^{*1}において、ルチン（抽出物）は「アズキの全草、エンジュのつぼみ若しくは花又はソバの全草から得られた、ルチン(rutin)を主成分とするものをいう」、また、ルチン酵素分

* 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 1-18-1

² 日本電子株式会社: 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2

³ 独立行政法人産業技術総合研究所計測標準研究部門: 〒305-8663 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 3

⁴ 和光純薬工業株式会社: 〒540-8605 大阪市中央区道修町 3-1-2

*1 厚生省告示第 120 号 “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日 (1996)