

解物は「ルチン（抽出物）から得られた、イソクエルシトリン (isoquercitrin) を主成分とするものをいう」と定義されている。現在、食品添加物公定書には、ルチン（抽出物）の内実際に市場で流通している「エンジュ抽出物」と、ルチン酵素分解物のみが記載されている<sup>1)</sup>。食品添加物公定書におけるこれら2品目の定量法として、ルチンは定量用ルチンを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のピーク面積からの算出法が規定されており、イソクエルシトリンは定量用ルチンとの吸光度比からの算出法が規定されている。一方、既存添加物クエルセチンは、食品添加物公定書には未記載で、業界の自主規格<sup>2)</sup>にのみ記載されており、クエルセチンの定量法として、酢酸試液添加後の吸光度による算出法が規定されている。これらの方法は、品質規格試験として十分有用であり、実用的には問題ないと考えられるものの、各化合物の絶対量の算出が必要とされる場合には、いくつかの課題がある。例えば、ルチンとイソクエルシトリンの定量用標準品として用いられる定量用ルチンには、計量学的に正確な純度が値づけられた定量用標準品が市場に流通していない。実際には、ルチン三水和物として各社がそれぞれに HPLC の面積百分率等から純度を付けた市販試薬が用いられており、HPLC で検出できない不純物は純度値に反映されないことから、各社製品の純度値にはばらつきが予想される。またルチン同様、イソクエルシトリンおよびクエルセチンについても、定量用標準品を用いた HPLC 等での定量法の採用が期待される。しかしながら、イソクエルシトリン市販試薬には不純物としてクエルセチンを含んでいるものが、また、クエルセチン試薬には X 水和物として市販されているものがある。そのため、市販試薬の純度値には信頼性がなく、正確な純度が値づけられた定量用標準品は市場に流通していない。

そこで本研究では、これらクエルセチンおよびその配糖体の絶対量を求める新たな方法として、NMR を用いた定量法 (quantitative NMR; qNMR)<sup>3)~6)</sup> の応用を試みた。現在、われわれは、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1つとして、qNMR の開発を行っている。qNMR は、純度値が明らかな他の化合物「qNMR 基準物質」を内部標準として、測定対象物質と混合し、両物質の NMR シグナルを測定する定量法である。また、個々の測定対象の化合物の定量用標準品を必要としない絶対定量法であり、あらゆる測定対象の有機化合物の純度あるいは含量を迅速に求めることが可能な方法である。

本研究では、qNMR の応用範囲を天然由来の既存添加物に拡充することを目的に、ルチン（抽出物）製品中のルチン、ルチン酵素分解物製品中のイソクエルシトリン、およびクエルセチン製品中のクエルセチンの含量（純度）測定を行った。さらに、これら3種の化合物の市販試薬製品の含量（純度）測定を行った。また、これまでは、計量学的に正確に値づけられた qNMR 基準物質が存在しな

かったため、2段階方式による SI トレーサビリティの確保を余儀なくされていた。今回新たに、計量学的に正確に値づけられた 1,4-ビストリメチルシリルベンゼン- $d_4$  (1,4-BTMSB- $d_4$ ) を qNMR 基準物質として用い、1段階の qNMR 測定でより簡便な絶対定量を行った。その結果、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの定量値を、qNMR を用いることで、個別に分離操作や測定対象化合物と同一の標準品を必要とせず、計量学的かつ正確に求められることを実証した。

## 実験方法

### 1. 試薬および試料

ルチン三水和物市販試薬 7 製品（試料 1~7）、イソクエルシトリン市販試薬 3 製品（試料 12~14）およびクエルセチン水和水物市販試薬 4 製品（試料 17~20）は各試薬メーカーより購入したものをを用いた。既存添加物ルチン（抽出物）4 製品（試料 8~11）、既存添加物ルチン酵素分解物 2 製品（試料 15, 16）および既存添加物クエルセチン 2 製品（試料 21, 22）は、日本食品添加物協会より供与していただいたものをを用いた。なお、試料 1~22 の付帯情報を Table 1 に示した。

有機溶媒可溶の qNMR 基準物質として、(独)産業技術総合研究所により SI トレーサブルな分析法により純度の値づけがされた 1,4-BTMSB- $d_4$  標準物質 (1,4-bis(trimethylsilyl) benzene- $d_4$ ) (和光純薬工業 (株) 製, Cods No. 021-16441, Lot. 081204; 純度 99.8% $\pm$ 0.2%) を用いた。qNMR 測定用重溶媒として重メタノール (methanol- $d_4$ ) (Isotec 社製) を用いた。高純度フタル酸ジエチル (diethyl phthalate: DEP) (認証標準物質 (certified reference material: CRM) (品番 NMIJ CRM 4022-b; 純度 99.98% $\pm$ 0.09%) は(独)産業技術総合研究所製を用いた。

### 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-ECA600 (600 MHz) (日本電子 (株) 製)。qNMR のケミカルシフト値は、methanol- $d_4$  のプロトンシグナルを基準シグナル (3.30 ppm) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。

### 3. qNMR による分析

#### (1) qNMR 標準液の調製および 1,4-BTMSB- $d_4$ の濃度確認

1,4-BTMSB- $d_4$  約 20 mg を精密に量り採り、methanol- $d_4$  100 mL に定容とし、qNMR 標準液とした。qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB- $d_4$  の濃度を、1,4-BTMSB- $d_4$  の正確な秤量値とあらかじめ値づけされた SI トレーサブルな純度 (99.8% $\pm$ 0.2%) から算出した。

なお、今回の研究では、得られる定量値の信頼性の確保を念頭に置き、計量学的に妥当な手順によって値づけられ、SI トレーサビリティが保証された認証標準物質 (CRM) の1つである DEP を用い、測定用に調製した

Table 1. Sample information for quercetin and quercetin glycoside reagent and natural food additives

No.	Sample type	Manufacturer
Rutin trihydrate		
1	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	Tokyo Chemical Industry, CAT No. R035, Lot. AL02
2	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	Tokyo Chemical Industry, CAT No. R0035, Lot. SDLXE
3	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	*MP Biomedicals, CAT No. 102824, Lot. 5744E
4	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	*Alfa Aesar, CAT No. A13670, Lot. 10138396
5	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	**Alexis Biochemicals, CAT No. 460-028, Lot. L20108
6	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	***Sigma, CAT No. 84082, Lot. 1339877
7	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	***Fluka, CAT No. 78095, Lot. 1380505
Rutin (extract)		
8	Food additive	Company A
9	Food additive	Company B Lot. 1
10	Food additive	Company B Lot. 2
11	Food additive	Company C
-----		
Isoquercitrin		
12	Reagent	Kanto Chemical, CAT No. 20311-96, Lot. 903X1354
13	Reagent	***Fluka, CAT No. 17793, Lot. 1392631
14	Reagent	Tokiwa Phytochemical, CAT No. P2203, Lot. 20370903
Enzymatically decomposed rutin		
15	Food additive	Company B Lot. 1
16	Food additive	Company B Lot. 2
-----		
Quercetin		
17	Reagent (xH <sub>2</sub> O)	Tokyo Chemical Industry, CAT No. P0042, Lot. GM01
18	Reagent (xH <sub>2</sub> O)	Kanto Chemical, CAT No. 35030-40, Lot. 906W2148
19	Reagent (2H <sub>2</sub> O)	Wako Pure Chemical Industries, CAT No. 173-00403, Lot. PE3352
20	Reagent (2H <sub>2</sub> O)	Wako Pure Chemical Industries, CAT No. 177-00401, Lot. WAN0446
Quercetin		
21	Food additive	Company B
22	Food additive	Company C

\* Purchased from Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.

\*\* Purchased from Funakoshi, Co., Ltd.

\*\*\* Purchased from Sigma-Aldrich Co., Ltd.

qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 濃度を随時確認<sup>7)</sup>して使用した。すなわち, DEP 約 20 mg を精密に量り採り, qNMR 標準液 4.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管 (5 mmφ×200 mm, S-type (和光純薬工業 (株)製)) に封入したものを 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 濃度確認用試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し, DEP のメチレンプロトン CH<sub>2</sub>×2 (δ 4.34 ppm) および 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> のメチル基のプロトン CH<sub>3</sub>×6 (δ 0.23 ppm) に由来するシグナル積分値, 分子量, 濃度等を式 (1) に代入し, qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> の濃度を算出し確認した。

$$C_{\text{BTMSB}} = \left( \frac{M_{\text{BTMSB}} \times I_{\text{BTMSB}}}{H_{\text{BTMSB}}} \right) / \left( \frac{M_{\text{DEP}} \times I_{\text{DEP}}}{H_{\text{DEP}} \times W_{\text{DEP}}} \right) \times \frac{P_{\text{DEP}}}{100} \quad (1)$$

ただし,  $C_{\text{BTMSB}}$  = 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 濃度 (mg/mL),  $W_{\text{DEP}}$  = 認証標準物質 DEP の秤量濃度 (mg/mL),  $M_{\text{BTMSB}}$ ,  $M_{\text{DEP}}$  = 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> および DEP の分子量 (MW 226.50 および 222.24),  $I_{\text{BTMSB}}$ ,  $I_{\text{DEP}}$  = 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> および DEP の特定プロトンシグナル積分値,  $H_{\text{BTMSB}}$ ,  $H_{\text{DEP}}$  = 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> および DEP の特定基のプロトン数 (1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> = CH<sub>3</sub>×6, DEP = CH<sub>2</sub>×2),  $P_{\text{DEP}}$  = DEP の純度 (99.98%)。

## (2) qNMR による市販試薬および既存添加物製品の純度測定

ルチン三水合物市販試薬, イソクエルシトリン市販試薬, 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約 20 mg を精密に量り採り, あらかじめ調製した qNMR 標準液 2.0 mL に溶解した。クエルセチン市販試薬, 既存添加物クエルセチンはそれぞれ約 20 mg を精密に量り採り, あらかじめ調製した qNMR 標準液 4.0 mL に溶解した。これらの各溶液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し, 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> のプロトンシグナル積分値, クエルセチンまたはクエルセチン配糖体に由来するそれぞれの特定プロトンシグナルの相対積分値, 分子量, 濃度等を式 (2) に代入し, 市販試薬および既存添加物製品のクエルセチンまたはクエルセチン配糖体の純度 (含量) (w/w%),  $P_{\text{Q(or QG)}}$  を算出した。

$$P_{\text{Q(or QG)}} = \frac{I_{\text{Q(or QG)}}/H_{\text{Q(or QG)}}}{I_{\text{BTMSB}}/H_{\text{BTMSB}}} \times \frac{M_{\text{Q(or QG)}}/W_{\text{Q(or QG)}}}{M_{\text{BTMSB}}/C_{\text{BTMSB}}} \times 100 \quad (2)$$

ただし,  $C_{\text{BTMSB}}$  = 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 濃度 (mg/mL),  $W_{\text{Q(or QG)}}$  = クエルセチンまたはクエルセチン配糖体含有試料の濃度 (mg/mL),  $M_{\text{BTMSB}}$ ,  $M_{\text{Q(or QG)}}$  = 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> およびクエ

ルセチンまたはケルセチン配糖体の分子量 (1,4-BTMSB- $d_4$  =  $C_{12}H_{18}D_4Si_2$  (MW 226.50), rutin (as anhydrate) =  $C_{27}H_{30}O_{16}$  (MW 610.52), isoquercitrin =  $C_{21}H_{20}O_{12}$  (MW 464.38) および quercetin (as anhydrate) =  $C_{15}H_{10}O_7$  (MW 302.24)),  $I_{BTMSB}$ ,  $I_{Q(or QG)}$  = 1,4-BTMSB- $d_4$  およびケルセチンまたはケルセチン配糖体の特定プロトンシグナル積分値,  $H_{BTMSB}$ ,  $H_{Q(or QG)}$  = 1,4-BTMSB- $d_4$  およびケルセチンまたはケルセチン配糖体の特定基のプロトン数 (1,4-BMSB- $d_4$  =  $CH_3 \times 6$ , ケルセチンまたはケルセチン配糖体 =  $PhH \times 1$ ).

### (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 2 に示した。得られた FID データは、フーリエ変換 (Window 関数: exponential function BF = 0.12 Hz, zero filling = 1, trapezoidal function T1 = T2 = 0, T3 = 90, T4 = 100) および自動位相調整を行い、1,4-BTMSB- $d_4$  および特定プロトンシグナルの積分値を求め、1,4-BTMSB- $d_4$  およびケルセチンまたはケルセチン配糖体の濃度 (mg/mL), 分子量, 特定基のプロトン数等の化合物情報とともに式 (2) に代入し、純度 (含量) (w/w%) を算出した。本研究では、フーリエ変換から純度 (含量) (w/w%) の算出までを自動処理できる定量解析ソフトウェア (日本電子(株)開発中) を用いてデータの解析を行った。

## 結果および考察

### 1. 定量用シグナルの選別

qNMR による定量分析では、各シグナル積分値の定量性を厳密に確保することが不可欠であるため、既報<sup>7,8)</sup>に従い、Table 2 に示す測定条件を設定した。またこれまで、計量学的に正確に値づけされた qNMR 基準物質が存在しなかったため、既報<sup>7,8)</sup>では、SIトレーサビリティが保証された認証標準物質 DEP を使ってまず qNMR 基準物質の含量を定量し、その qNMR 基準物質を使って測定対象物質を定量するという 2 段階方式による SI トレーサビリティの確保を余儀なくされていた。一方、今回の研究では、計量学的に正確に値づけされた 1,4-BTMSB- $d_4$  を qNMR 基準物質として新たに用い、Fig. 1 に示す 1 段階

Table 2. Instruments and acquisition parameters

Spectrometer	ECA600 (JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	-5-15 ppm
Data points	32,000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s ( $>5 \times T_1$ )
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	25°C
Solvent	Methanol- $d_4$
qNMR reference material	1,4-BTMSB- $d_4$
CRM (for calibration)	Diethyl phthalate (DEP) (NMIJ CRM4022-b)

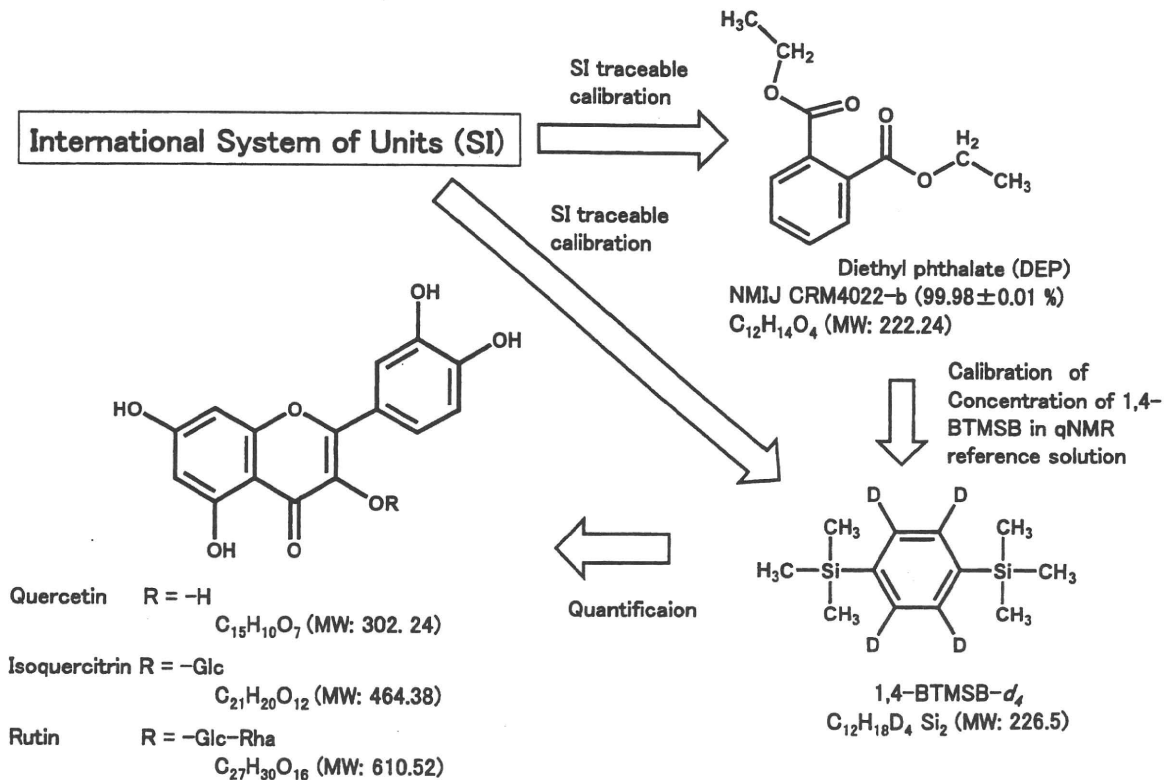


Fig. 1. Strategy of SI-traceable quantification based on qNMR

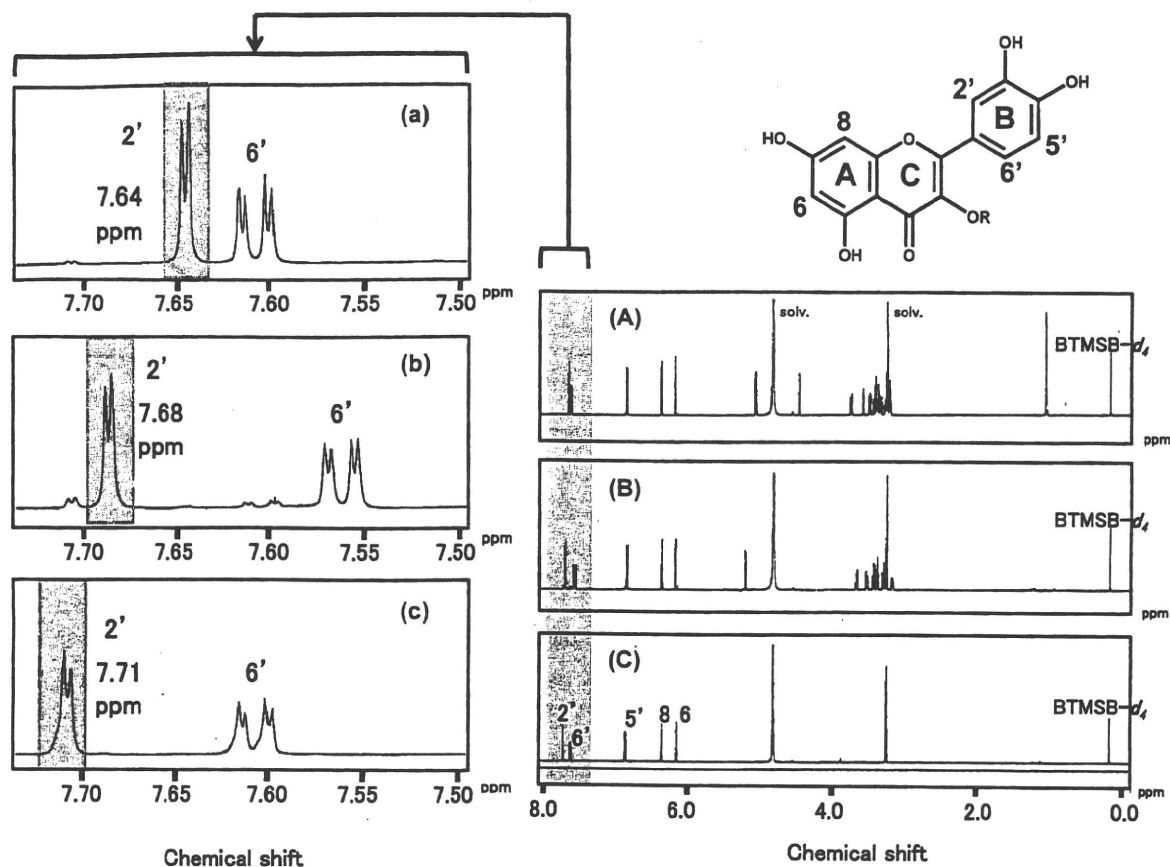


Fig. 2. qNMR spectra of rutin (A), isoquercitrin (B) and quercetin (C)

The spectra were obtained in qNMR solution (methanol- $d_4$ ) containing 1,4-BTMSB- $d_4$ . (a), (b) and (c) are magnified views of the 7.49–7.74 ppm region of (A), (B) and (C).

方式の qNMR 測定を行った。なお、調製した qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB- $d_4$  濃度を、SI トレーサビリティが保証された認証標準物質 (CRM) の DEP を用いて随時確認したところ、qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB- $d_4$  の濃度は調製値と等しく、その濃度誤差範囲は 1% 以内であった。したがって、本定量法で用いた 1,4-BTMSB- $d_4$  は、qNMR の一次標準として有効であることが確認された。

Fig. 2 には、qNMR 基準物質として 1,4-BTMSB- $d_4$  を 0.1943 mg/mL 含む qNMR 標準液を用い、試薬ルチン三水和物 (試料 1) を 16.02 mg/mL (Fig. 2(A), (a)), 試薬イソクエルシトリン (試料 12) を 15.34 mg/mL (Fig. 2(B), (b)) および試薬クエルセチン二水和物 (試料 19) を 7.79 mg/mL (Fig. 2(C), (c)) にそれぞれ調製した試料のスペクトルを例として示した。 $\delta$  0.23 ppm に 1,4-BTMSB- $d_4$  のメチル基が観察された。qNMR の定量用シグナルとしては、シグナルが十分に分離していること、不純物などのシグナルと重ならないことが要求される。そこで、600 MHz NMR を用い、qNMR 条件で 3 種の化合物の測定を行い、スペクトルの比較により定量用シグナルを検討した。その結果、3 種の化合物のアグリコンであるクエルセチン部分の各プロトンシグナルのシフト値は、6 位は

$\delta$  6.14 ppm, 8 位は  $\delta$  6.36 ppm, 5' 位は  $\delta$  6.86 ppm, 6' 位は  $\delta$  7.61 ppm に検出され、いずれも 3 種の化合物で相互に重なった。一方、B 環 2' 位のプロトンのみは、3 種の化合物でそれぞれシフト値が異なり、分離操作を行うことなく別々に検出できた。この 2' 位のシグナル、すなわち、ルチンは 7.64 ppm, イソクエルシトリンは 7.68 ppm, クエルセチンは 7.71 ppm のシグナルを定量用シグナルとし、qNMR 基準物質の 1,4-BTMSB- $d_4$  とのシグナル積分値の比を測定し、式 (2) に代入して定量値を求めた。

## 2. qNMR によるルチン, イソクエルシトリンおよびクエルセチンの定量精度の確認

qNMR において、試料濃度と試料中に含まれる測定対象化合物の qNMR 定量値との間に直線関係が成り立つことは、すでに報告<sup>9)</sup>されているが、本研究においても、内部標準としての qNMR 基準物質を一定濃度にしたときに、試料濃度と測定対象化合物の qNMR 定量値との間に直線関係が成り立つかを確認した。ルチン, イソクエルシトリンおよびクエルセチンそれぞれの試薬を用い、今回の qNMR 測定濃度領域における定量精度を調べた。Fig. 3 の (A) および (B) に、試薬ルチン三水和物 (試料 1) および試薬イソクエルシトリン (試料 12) を、それぞれ今回の測定濃度領域の 5~15 mg/mL で定量した結果 (試料

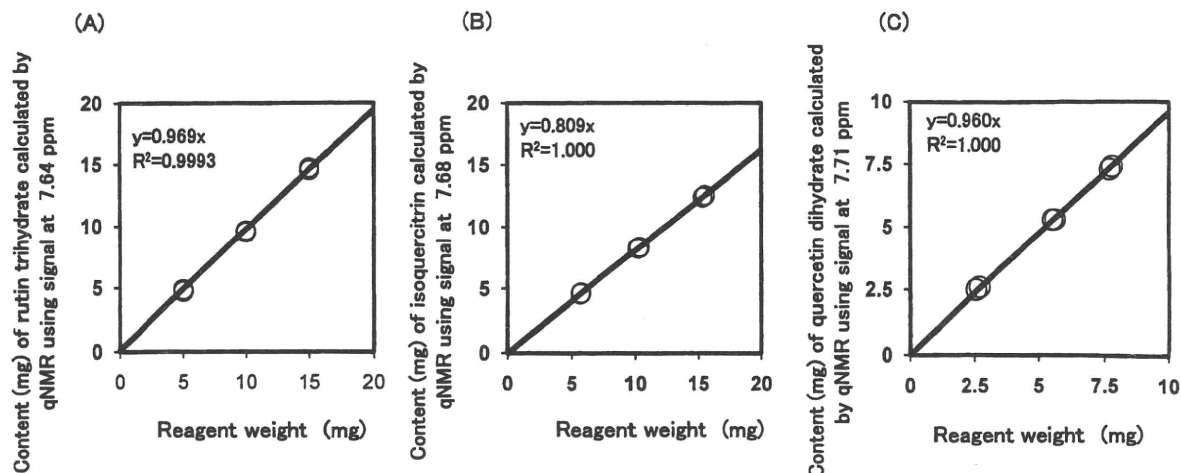


Fig. 3. Relationship between reagent weight and contents of quercetin or quercetin glycosides calculated by qNMR

The ability of qNMR to quantify the compounds, rutin trihydrate (A), isoquercitrin (B) and quercetin (C), within the range of 5–15 mg/mL ((A), (B)) and 2.5–7.5 mg/mL (C) was investigated.

Table 3. Purity measurements of rutin in the different reagents and rutin (extract) food additive products by qNMR

No.	Sample type	Purity (%) <sup>*</sup> as anhydrate	Purity (%) <sup>*</sup> as rutin trihydrate	RSD (%) <sup>**</sup>
Rutin trihydrate				
1	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	88.8±0.4	96.7±0.4	0.4
2	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	90.2±0.3	98.2±0.4	0.4
3	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	71.0±1.0	77.3±1.1	1.4
4	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	83.4±0.05	90.8±0.06	0.06
5	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	82.3±0.4	89.6±0.4	0.5
6	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	83.9±0.8	91.4±0.9	1.0
7	Reagent (3H <sub>2</sub> O)	83.2±0.1	90.6±0.1	0.1
Rutin (extract)				
8	Food additive	88.9±0.7	96.8±0.8	0.8
9	Food additive	88.2±0.4	96.1±0.4	0.5
10	Food additive	86.6±0.2	94.3±0.2	0.2
11	Food additive	89.0±0.2	96.9±0.2	0.2

\* AV±SD, n=3, signals at 7.64 ppm were used for calculation.

\*\* RSD, relative standard deviation

調製 n=2) を示した。Fig. 3 の (C) には、試薬クエルセチン二水和物 (試料 19) を 2.5~7.5 mg/mL で定量した結果 (試料調製 n=2) を示した。横軸には qNMR 標準液 1 mL 当たりの試薬量 (秤量値) を mg で示し、縦軸には qNMR により算出したルチン (三水和物換算)、イソクエルシトリンおよびクエルセチン (二水和物換算) の 1 mL 当たりの各定量値を mg で示した。その結果、試料の秤量値と qNMR による定量値との間に高い直線関係があることが確認された。すなわち、今回の測定濃度領域において、試薬に含まれているルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの絶対量が、qNMR の定量値から非常に精度良く求められることが明らかとなった。したがって、qNMR 基準物質 1,4-BTMSB-d<sub>4</sub> を内部標準として 1 点濃度で加えて測定するだけで、測定対象化合物ごとの定量用標準品も検量線も必要とせず、精度良く定量できることが示された。

Table 4. Purity determination of isoquercitrin in the different reagents and enzymatically decomposed rutin food additive products by qNMR

No.	Sample type	Purity (%) <sup>*</sup>	RSD (%) <sup>**</sup>
Isoquercitrin			
12	Reagent	80.9±0.2	0.2
13	Reagent	80.1±0.7	0.9
14	Reagent	94.8±0.1	0.1
Enzymatically decomposed rutin			
15	Food additive	85.4±0.3	0.3
16	Food additive	87.9±0.4	0.5

\* AV±SD, n=3, signals at 7.68 ppm were used for calculation.

\*\* RSD, relative standard deviation

### 3. qNMR によるルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの絶対定量

Table 3, 4 および 5 に、それぞれルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの定量結果を、3 回の試料調

Table 5. Purity determination of quercetin in the different reagents and quercetin food additive products by qNMR

No.	Sample type	Purity (%) <sup>*</sup> as anhydrate	Purity (%) <sup>*</sup> as quercetin dihydrate	RSD (%) <sup>**</sup>
Quercetin				
17	Reagent (xH <sub>2</sub> O)	92.8±0.02	—	0.03
18	Reagent (xH <sub>2</sub> O)	92.9±0.03	—	0.03
19	Reagent (2H <sub>2</sub> O)	86.0±1.0	96.2±1.1	1.1
20	Reagent (2H <sub>2</sub> O)	86.2±0.3	96.5±0.4	0.3
Quercetin				
21	Food additive	87.3±0.5	97.7±0.5	0.5
22	Food additive	88.3±0.9	98.8±1.0	1.0

\* AV±SD, n=3, signals at 7.71 ppm were used for calculation.

\*\* RSD, relative standard deviation

製の平均値で示した。試薬ルチン三水和物 7 製品は無水物純度として 71.0~90.2%±0.05~1.0% および三水和物純度として 77.3~98.2%±0.06~1.1%, 試薬イソクエルシトリン 3 製品は 80.1~94.8%±0.1~0.7%, および試薬クエルセチン 4 製品は、クエルセチン無水物純度として 86.0~92.9%±0.02~1.0% であった。次に既存添加物製品を測定した。ルチン (抽出物) 4 製品のルチンの純度は、無水物としては 86.6~89.0%±0.2~0.7%, 三水和物としては 94.3~96.9%±0.2~0.8% であった。ルチン酵素分解物 2 製品のイソクエルシトリンの純度は、85.4±0.3% および 87.9±0.4% であった。クエルセチン 2 製品のクエルセチンの純度は、無水物として 87.3±0.5% および 88.3±0.9% であった。これらの既存添加物試料の定量値の相対標準偏差は 0.2~1.0% と良好であった。

qNMR では、NMR 装置を qNMR 条件に最適化することや、測定対象のシグナルが他の化合物と完全に分離していることが適用条件である。したがって既存添加物試料中のクエルセチンおよびクエルセチン配糖体を定量する場合、NMR 装置を qNMR 条件に最適化した上で、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの各 2' 位のシグナルが分離できる条件が得られれば、本定量法が適用できる。qNMR は、今後さらにさまざまな物質にも応用できると考えられる。特に、測定対象化合物ごとの定量用標準品を必要としない点や、特別な前処理なしで定量操作ができる点は、天然物の定量および天然物からの抽出物の品質管理手法として優れた特性であり、今後の応用拡大が期待できる。

## 結 論

以上本研究では、われわれが開発を行っている定量 NMR (quantitative NMR; qNMR) を応用し、既存添加物ルチン (抽出物) 製品中のルチン、ルチン酵素分解物製品中のイソクエルシトリンおよびクエルセチン製品中のクエルセチンの絶対定量を行うとともに、これら 3 種の市販試薬製品について絶対定量を行った。qNMR 基準物質として、SI トレサブルな分析法により純度が値づけされた 1,4-ビストリメチルシリルベンゼン-*d*<sub>4</sub> (1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>) を用いて、基準物質のメチル基と、ルチン、

イソクエルシトリンおよびクエルセチンの各 2' 位のプロトンシグナル積分値の比より、含量または純度を算出した。市販試薬試料および既存添加物試料の定量値はそれぞれ 77.3~98.2% および 85.4~96.9%, 相対標準偏差はそれぞれ 0.02~1.1% および 0.2~1.0% と良好であった。以上の結果より、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの定量値を、qNMR を用いることにより、個別に分離操作や測定対象の化合物と同一の標準品を必要とせず、計量学的かつ正確に求められることを見いだした。また、計量学的に正確に値づけされた 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> を qNMR 基準物質として用いることによって、1 段階の qNMR 測定を行うことができ、簡便な絶対定量が可能となった。qNMR は、既存添加物中の各種成分の絶対定量法、あるいは各定量用標準品の正確な純度測定法だけでなく、定性スペクトルとしても非常に有用と考えられる。

## 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」および経済産業省研究開発プロジェクト「1 対多型校正技術の研究開発」の一部を含むものである。

## 文 献

- 1) 厚生労働省「第 8 版食品添加物公定書」2007.
- 2) 日本食品添加物協会技術委員会自主規格専門委員会編「第 4 版既存添加物自主規格」東京、日本食品添加物協会、2008.
- 3) 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).
- 4) 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 Addit. Contam.*, 24, 799-806 (2007).
- 5) 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 quanti-

- tative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
- 6) 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).
- 7) Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, A., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamonoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Nihon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **16**, 28-33 (2009).
- 8) 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 (J. Food Hyg. Soc. Japan.)*, **51**, 19-27 (2010).
- 9) Malz, F., Jancke, H. Validation of quantitative NMR. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **38**, 813-823 (2005).



# Application of $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy to validation of berberine alkaloid reagents and to chemical evaluation of *Coptidis Rhizoma*

Keiko Hasada · Takamitsu Yoshida · Takeshi Yamazaki ·  
Naoki Sugimoto · Tetsuji Nishimura · Akito Nagatsu ·  
Hajime Mizukami

Received: 12 August 2010 / Accepted: 21 October 2010 / Published online: 25 December 2010  
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer 2010

**Abstract** Berberine, palmatine, and coptisine are major pharmacologically active protoberberine alkaloids in *Coptidis Rhizoma*, and have been used as indices for chemical evaluation of the crude drug.  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy was applied to determination of purities of commercial reagents of protoberberine alkaloids. The purities of the alkaloids were calculated from the ratios of the intensities of the H-13 singlet signal at about  $\delta$  8.7 ppm of target protoberberine alkaloids to integration of a hexamethyldisilane (HMD) signal at 0 ppm. The concentration of HMD was corrected with SI traceability using potassium hydrogen phthalate of certified reference material (CRM) grade. The purity of the reagent estimated by the  $^1\text{H-NMR}$  was, in general, lower than that claimed by the manufacturer, leading to over-estimation of the alkaloid contents of *Coptidis Rhizoma* when determined by HPLC. The present quantitative  $^1\text{H-NMR}$  method was also applicable to direct determination of protoberberine alkaloid contents in *Coptidis Rhizoma*.

**Keywords** Quantitative  $^1\text{H-NMR}$  · Reagent purity · Berberine · Palmatine · Coptisine · *Coptidis Rhizoma*

K. Hasada · T. Yoshida · H. Mizukami (✉)  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori,  
Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan  
e-mail: hajimem@phar.nagoya-cu.ac.jp

K. Hasada · A. Nagatsu  
College of Pharmacy, Kinjo Gakuin University,  
2-1723 Omori, Moriyama-ku, Nagoya 463-8521, Japan

T. Yamazaki · N. Sugimoto · T. Nishimura  
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga,  
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

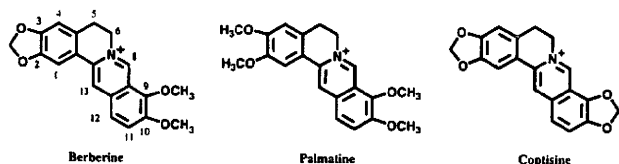
## Introduction

Berberine, palmatine and coptisine are major isoquinoline alkaloids which accumulate in rhizomes of the genus *Coptis* (Fig. 1). These compounds exhibit various pharmacological activities [1–5], and, therefore, have been considered as one of the constituents responsible for the pharmacological action of the crude drug, *Coptidis Rhizoma* (dried rhizomes of *Coptidis japonica*, *C. chinensis*, *C. deltoidea* and *C. teeta*). These protoberberine alkaloid contents have thus been used as chemical indices for quality control of the crude drug. In fact, high performance liquid chromatography (HPLC) determination of berberine content is adopted by the Japanese Pharmacopoeia for evaluation of *Coptidis Rhizoma* [6].

At present, HPLC is a powerful tool for quantitative determination of small organic molecules in natural medicines. Increasing numbers of standard natural compounds have been available from various commercial sources, because the standard compounds are essential not only for use as a reference compound for peak identification but also to construct calibration curves for quantitative analysis using HPLC. However, true purities of the standard natural compounds are essentially unknown, because, in most cases, the purities are only estimated from the area percentage of a main peak on the chromatogram, and the impurities which are not sensitive to the particular detection method and/or are not eluted from the column by the particular elution method cannot be estimated. Thus, the results of the HPLC methods only give the relative values, and are difficult to compare with each other if standard compounds from different sources are used as the standard for quantification.

It has been recognized that, besides structure determination, NMR spectroscopy can be used for quantitative determination of organic molecules. Proton-specific





**Fig. 1** Chemical structures of berberine, palmatine, and coptisine

quantitative NMR (qHNMR) has an enormous potential for quantitative analysis of natural products [7, 8]. Two of the unique features of the qHNMR method are: (1) it leads to absolute quantification of the organic compounds by comparing the signal integral of the particular compound with that of an appropriate certified reference material (CRM) [9], and (2) the obtained values are theoretically traceable to the International System of Units (SI) by using CRMs or other compounds whose concentrations are SI-traceably determined as a qHNMR reference material [10–12]. In addition, the advantage of qHNMR over HPLC is that it is rapid and non-invasive, and in most cases does not require laborious sample pre-clean steps. Furthermore, no standard compounds are required to prepare calibration curves, and all the compounds present in the extract can be simultaneously detected. These make qHNMR a method of choice for quantitative determination of chemical constituents in crude drugs and purity evaluation of commercial reagents.

In the present paper we show that qHNMR can be applied to purity determination of commercial reagents of berberine, palmatine and coptisine, and also that qHNMR is an efficient tool for quantitative determination of these alkaloids in *Coptidis Rhizoma*.

## Materials and methods

### Chemicals and crude drugs

Methanol- $d_4$  (99.8 at.% D) was purchased from Merck & Co. Inc. (Darmstadt, Germany). Hexamethyldisilane (HMD, Sigma–Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) was used as an internal standard for NMR measurement. Potassium hydrogen phosphate (PHP; NMIJ CRM 3001-a), a CRM, was purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan). The purity of this compound is certified to be  $100.00 \pm 0.027\%$ . Berberine chloride (Ber-1, Ber-2), palmatine chloride (Pal-1, Pal-2) and coptisine chloride (Cop-1) were obtained from various commercial sources. Berberine chloride of Japanese Pharmacopoeia Reference Standard (Ber-3) was purchased from the Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan. The compounds were used without water content measurement. *Coptidis Rhizoma* samples were from our laboratory stock.

### $^1\text{H-NMR}$ apparatus and parameters

$^1\text{H-NMR}$  spectra were recorded on a Bruker AVANCE 600 (600 MHz) spectrometer. NMR acquisition and processing were essentially performed as described by Saito et al. [10]. For each sample, eight scans were recorded with a  $90^\circ$  pulse and a 30-s pulse delay, because high precision qHNMR spectra can be achieved when the pulse angle is  $90^\circ$  and the pulse delay time is greater than the quintuple spin–lattice relaxation time ( $>5 \times T_1$ ). Start and end points of the integration of peak area were selected manually. Chemical shifts are given in values (ppm) relative to HMD as an internal standard.

### Determination of HMD concentration in qHNMR reference stock solution

Preparation of qHNMR reference stock solution was essentially performed as described by Tahara et al. [11] and Sugimoto et al. [12]. In brief, HMD (10 mg) was dissolved in methanol- $d_4$  (50 ml) to make qHNMR reference stock solution, and the accurate concentration of HMD was determined by measuring  $^1\text{H-NMR}$  spectrum with PHP as an internal standard. PHP (12.00 mg) was weighed and dissolved in 2.00 ml methanol- $d_4$ . The PHP solution was added to 0.500 ml of the qHNMR reference stock solution and the mixed solution was subjected to  $^1\text{H-NMR}$  measurement. The concentration of HMD in the qHNMR reference stock solution was calculated from Eq. 1:

$$C_{\text{HMD}} = 4 \times \frac{I_{\text{HMD}}}{I_{\text{PHP}}} \times C_{\text{PHP}} \quad (1)$$

where  $C_{\text{HMD}}$  is the molar concentration of HMD in the qHNMR reference stock solution,  $C_{\text{PHP}}$  is the molar concentration of PHP in the standard PHP solution,  $I_{\text{HMD}}$  is the signal intensity per proton at 0 ppm (HMD), and  $I_{\text{PHP}}$  is the average signal intensity per proton at 8.20 and 7.53 ppm (PHP).

### Determination of purities of protoberberine alkaloid reagents

Alkaloid (8.00 mg) was dissolved in 1.00 ml of the qHNMR reference stock solution and was subjected to  $^1\text{H-NMR}$  measurement. The concentration of the alkaloid was calculated from Eq. 2:

$$C_{\text{ALK}} = \frac{I_{\text{ALK}}}{I_{\text{HMD}}} \times C_{\text{HMD}} \quad (2)$$

where  $C_{\text{ALK}}$  and  $C_{\text{HMD}}$  are the molar concentrations of the protoberberine alkaloid and HMD, respectively, in the qHNMR reference stock solution,  $I_{\text{ALK}}$  is the H-13 signal

intensity per proton at about 8.7 ppm (protoberberine alkaloid), and  $I_{\text{HMD}}$  is the signal intensity per proton at 0 ppm.

Quantitative determination of protoberberine alkaloids by qHNMR

Powdered crude drug sample (100.0 mg) was sonicated in 1 ml methanol for 30 min and centrifuged at 15000 rpm for 5 min. The extraction procedure was repeated three times. The supernatants were combined and concentrated to dryness in vacuo. The residue was dissolved in 1.00 ml of the qHNMR reference stock solution and subjected to  $^1\text{H-NMR}$  measurement. The protoberberine alkaloid concentrations were calculated as chloride salts using Eq. 3:

$$C_{\text{ALK}} = \frac{I_{\text{ALK}}}{I_{\text{HMD}}} \times C_{\text{HMD}} \quad (3)$$

where  $C_{\text{ALK}}$  is the molar concentration of protoberberine alkaloid in the methanol extract,  $C_{\text{HMD}}$  is the molar concentration of HMD in the qHNMR reference stock solution,  $I_{\text{ALK}}$  is the signal intensity per proton of alkaloids (H-13), and  $I_{\text{HMD}}$  is the signal intensity per proton at 0 ppm (HMD).

For estimating the recovery rate, the crude drug sample spiked with 5.02 mg berberine chloride (Ber-1) was used for preparation of the extract, and subjected to qHNMR measurement.

HPLC analysis of protoberberine alkaloids

The protoberberine alkaloid (1.00 mg) was dissolved in 10.0 ml methanol, and 10  $\mu\text{l}$  aliquots of the solution were subjected to HPLC analysis.

For HPLC determination of the alkaloid contents of *Coptidis Rhizoma*, powdered crude drug samples (100 mg) were sonicated in 1.0 ml methanol for 30 min at room temperature, and centrifuged for 5 min. The extraction was repeated two more times. The methanol extracts were combined and diluted with methanol to 20 ml. The resulting solution was subjected to HPLC analysis. Ber-1 for berberine, Pal-1 for palmatine, and Cop-1 for coptisine were used for construction of calibration curves. The concentration of the standard solution was corrected based on the qHNMR-determined purity of the reagent.

The chromatographic separation was performed using YMC-Pack ODS-AL (4.6  $\times$  250 mm; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan). The mobile phase was composed of acetonitrile–water (1:1) containing  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.34%) and sodium dodecyl sulfate (0.17%). Flow rate was 1.0 ml/min and the elution was monitored at 345 nm.

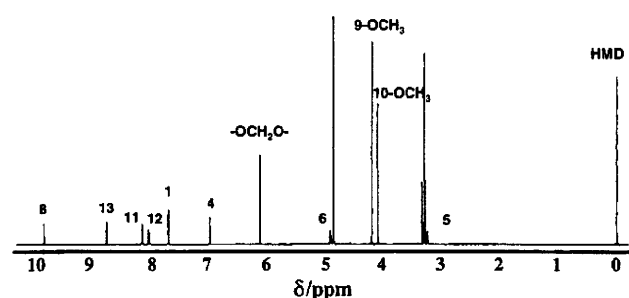
## Results and discussion

Selection of a target signal for quantification using  $^1\text{H-NMR}$

The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of berberine chloride was recorded in methanol- $d_4$  as shown in Fig. 2. Signals from H-5 and H-6 protons were indistinguishable from those of water and solvent, but the other signals were clearly detected as separate signals in the spectrum. The ratio of the intensity of each signal per proton to the intensity of HMD was calculated. As shown in Table 1, the ratio was constant (37.0–37.7%) regardless of the signal used for calculation. The result indicates that any signal can be used as a target signal for qHNMR analysis. We then compared the  $^1\text{H-NMR}$  spectra of berberine, palmatine, and coptisine. H-13 signals of berberine (8.60 ppm), palmatine (8.71 ppm), and coptisine (8.62 ppm) could be distinguished from each other, and were fully separated from other signals of the molecule (data not shown). The signals were also clearly identified when the methanol extract of *Coptidis Rhizoma* was subjected to NMR analysis (Fig. 3). Thus, H-13 was selected as a target signal for the quantitative  $^1\text{H-NMR}$ .

Determination of purity of protoberberine alkaloid reagents

Through the qHNMR approach, absolute quantitative determination of organic molecules can be attained by comparing the signal intensity of a particular proton of the molecule to that of CRMs such as *p*-toluenesulfonic acid, potassium hydrogen phthalate, dimethylsulfone, and benzoic acid. However, the signals from these compounds sometimes overlap the signals from the target compounds. We used hexamethyldisilane (HMD) as a qHNMR internal standard because the proton signal of HMD appears at 0 ppm, well separated from any proton of the target compounds [11]. HMD is less volatile and can be more readily



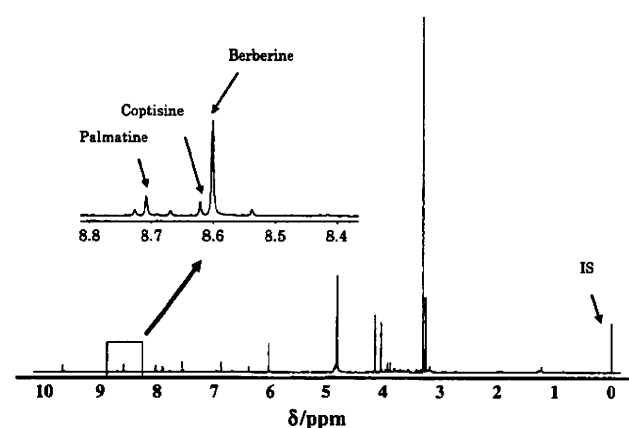
**Fig. 2** A  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of berberine. The spectrum was recorded in methanol- $d_4$  containing hexamethyldisilane (HMD) as an internal standard. The position of the proton corresponding to each signal is shown in the spectrum

**Table 1** Relative intensities of proton signals from berberine to that from HMD

Target signal (ppm)		Relative intensity <sup>a</sup> (% of HMD)	Target signal (ppm)		Relative intensity <sup>a</sup> (% of HMD)
H-1	7.62 s	37.5 ± 0.5	H-13	8.66 s	37.2 ± 0.4
H-4	6.92 s	37.0 ± 0.4	–OCH <sub>2</sub> O–	6.06 s	37.0 ± 0.4
H-8	9.72 s	37.5 ± 0.4	–OCH <sub>3</sub>	4.15 s	37.6 ± 0.4
H-11	8.07 d	37.5 ± 0.4	–OCH <sub>3</sub>	4.06 s	37.7 ± 0.5
H-12	7.95 d	37.5 ± 0.5			

s Singlet, d doublet

<sup>a</sup> Average ± standard deviation from triplicate measurements

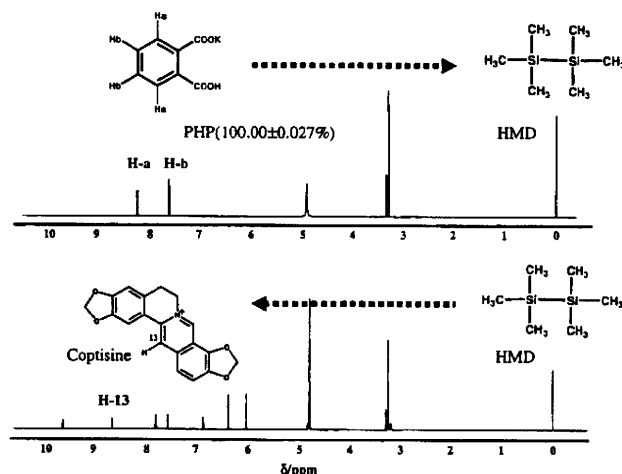


**Fig. 3** A typical <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the methanol extract of Coptidis Rhizoma. The inset shows H-13 signals from berberine, palmatine, and coptisine

weighed than trimethylsilane (TMS), a commonly used <sup>1</sup>H-NMR standard.

Protoberberine alkaloid reagent purchased from various commercial sources was dissolved in 1.00 ml of the qHNMR standard solution containing HMD. The concentration of HMD was accurately determined by comparing the signal integral at 0 ppm of HMD with the intensities of aromatic hydrogen signals of PHP of CRM grade at 7.73 ppm and/or 8.20 ppm. The purity of CRM-grade PHP is 100.00 ± 0.027% and the value is traceable to SI units. Thus, the present qHNMR approach leads to absolute quantification of protoberberine alkaloid reagents with SI-traceability based on the CRM substrate (PHP), as shown schematically in Fig. 4. The qHNMR-determined purity of the reagent was not consistent with the purity described by the manufacturer except for Ber-3, the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard (Table 2).

To confirm the qHNMR-determined purities of the reagents, the alkaloid solution was subjected to HPLC analysis and the peak area corresponding to each alkaloid was compared with the qHNMR-determined purity of the reagent (Fig. 5). The relative peak areas among three



**Fig. 4** A schematic diagram illustrating a basic principle of purity determination by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Purity of hexamethyldisilane (HMD) is first confirmed based on the signal intensity at 0 ppm relative to the signal intensity of potassium hydrogen phthalate (PHP) of certified reference material (CRM) grade at 8.20 or 7.53 ppm. Then the purity of the alkaloid (e.g., coptisine) is determined based on the ratio of signal intensity at 8.62 ppm (H-13) to that at 0 ppm

berberine alkaloid reagents and those between two palmatine reagents were quite consistent with the relative purities of these alkaloids determined by the qHNMR method, suggesting that the qHNMR-determined purity of the reagent reflects the true purity of the compound better than the purity claimed by the manufacturer.

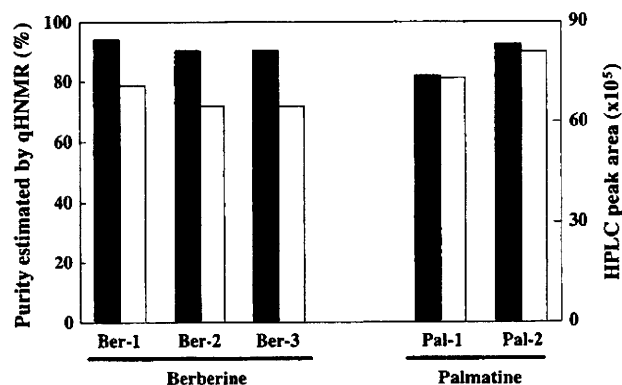
It is interesting to note that Ber-2, distributed as a standard for crude drug evaluation, exhibited much lower purity than Ber-1, distributed as a reagent grade chemical. The purity of a palmatine reagent (Pal-1) was 15% less than that claimed by the manufacturer. In contrast, the purity described by the manufacturer of the berberine reagent (Ber-3) distributed as the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard was identical with that determined by the qHNMR method. These results clearly indicate that protoberberine alkaloids contents in the crude drugs determined by HPLC may not be reliable

**Table 2** Purity of the protoberberine alkaloid reagents determined by the qHNMR method

Alkaloid	Code	Description	Purity described by manufacturer (%)	Purity determined by qHNMR (%) <sup>a</sup>
Berberine chloride	Ber-1	Reagent grade	97	94.3 ± 3.8
	Ber-2	Standard for crude drug analysis	>99	90.6 ± 3.7
	Ber-3	Japanese Pharmacopoeia Reference Standard	90.6	90.7 ± 2.4
Palmatine chloride	Pal-1	Reagent grade	97	81.8 ± 1.5
	Pal-2	Standard for crude drug analysis	>99	98.7 ± 6.9
Coptisine chloride	Cop-1	Standard for crude drug analysis	<sup>b</sup>	91.0 ± 4.4

<sup>a</sup> Average ± standard deviation from triplicate measurements

<sup>b</sup> Described as “one spot by TLC”



**Fig. 5** Comparison of the purities of the reagents determined by qHNMR (closed columns) with the HPLC peak areas of the reagents (open columns). A 10  $\mu$ l aliquot of the alkaloid solution (0.100 mg/ml in methanol) was injected into the HPLC column and elution was monitored at 345 nm. For information on the reagents, see Table 2

unless the purities of the standard compounds used for constructing calibration curves are strictly determined, and may be over-estimated because the real purity of the standard reagent is lower than that described by the manufacturer. Limited amounts of the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard are available at present, and it is desirable that more natural product reagents of the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard are provided to the market.

#### Determination of protoberberine alkaloid contents in *Coptidis Rhizoma* by qHNMR

The qHNMR method was applied to quantitative determination of berberine, palmatine, and coptisine in *Coptidis*

*Rhizoma*. Five samples of *Coptidis Rhizoma* were obtained in markets, and their protoberberine alkaloid contents were estimated by comparing the intensities of H-13 signals of protoberberine alkaloids with the signal intensity of HMD. For all the *Coptidis Rhizoma* samples, the signals derived from H-13 of berberine, palmatine, and coptisine were clearly detected with no interfering signals, and can be distinguished each other (Fig. 3). The alkaloid contents varied in the ranges 5.11–6.58% for berberine, 1.32–1.69% for palmatine, and 0.95–1.63% for coptisine (Table 3). The recovery rate of the assay was determined to be 93.9% by spiking the berberine chloride (Ber-1) to the extract. We also determined the alkaloid contents of the crude drug samples by HPLC. The alkaloid contents by HPLC analysis were corrected based on the qHNMR-determined purities of the alkaloid reagents used for constructing the calibration lines. The alkaloid contents determined by the two methods were generally consistent each other. The coefficients of correlation were 0.888 for berberine and palmatine, and 0.808 for coptisine.

Quantitative determination of protoberberine alkaloids in *Coptidis Rhizoma* has been extensively investigated by using various methods including TLC densitometry [13], HPLC [14], UPLC [15], and capillary electrophoresis [16, 17]. The estimated alkaloid contents are in the ranges 5–8% for berberine and 0.5–2.5% for palmatine and coptisine. The results obtained in the present qHNMR method were comparable to those of previously described data.

Recently Li et al. reported the application of <sup>1</sup>H-NMR to determination of protoberberine alkaloids in *Rhizoma Coptidis* [18]. They used anthracene as an internal standard, and determined the alkaloid contents by comparing the signal intensities of H-13 from the alkaloids with that at 8.40 ppm from anthracene. However, they did not determine the purity of the anthracene reagent. In addition, the proton signal from anthracene is present in the signal-crowded region and may interfere with the H-13 signals from protoberberine alkaloids. These points make their results less reliable.

The present paper indicates that the purities of protoberberine alkaloid reagents can be accurately estimated based on the ratio of the signal integral corresponding to H-13 of protoberberine alkaloid to that of HMD. The HMD concentration is pre-determined based on the ratio of signal intensity to PHP of CRM grade to give SI-traceability to the qHNMR analysis. Although the present qHNMR approach can be applicable to direct measurement of protoberberine alkaloid contents in the crude drugs, the sensitivity of detection is relatively low (0.1 mg/ml). Therefore, it may be practical to apply HPLC determination in which the calibration curves of protoberberine

**Table 3** Protoberberine alkaloid contents in *Coptidis Rhizoma* obtained in markets

Sample	Berberine content (%) <sup>a</sup>		Palmatine content (%) <sup>a</sup>		Coptisine content (%) <sup>a</sup>	
	by NMR	by HPLC	by NMR	by HPLC	by NMR	by HPLC
1	5.47 ± 0.33	5.19 ± 0.40	1.32 ± 0.11	1.16 ± 0.08	0.95 ± 0.12	0.77 ± 0.06
2	5.26 ± 0.12	5.45 ± 0.05	1.46 ± 0.04	1.31 ± 0.01	1.51 ± 0.05	1.37 ± 0.02
3	5.11 ± 0.62	5.26 ± 0.33	1.51 ± 0.20	1.36 ± 0.08	1.38 ± 0.19	1.28 ± 0.12
4	6.26 ± 0.07	5.84 ± 0.18	1.61 ± 0.03	1.34 ± 0.04	1.63 ± 0.02	1.23 ± 0.02
5	6.58 ± 0.06	6.91 ± 0.19	1.69 ± 0.02	1.67 ± 0.04	1.31 ± 0.06	1.34 ± 0.03

<sup>a</sup> Average ± standard deviation from triplicate measurements

alkaloids are constructed using the reagent whose purity is estimated by the qHNMR method.

**Acknowledgment** This work is supported by Health and Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

## References

- Lee CH, Lee HJ, Jeon JH, Lee HS (2005) In vivo antifungal effects of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids against phytopathogenic fungi. *J Microbiol Biotechnol* 15:1402–1407
- Tanabe H, Suzuki H, Mizukami H, Inoue M (2005) Double blockade of cell cycle progression by coptisine in vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 70:1176–1184
- Hu JP, Nishishita K, Sakai E, Yoshida H, Kato Y, Tsukuba T, Okamoto K (2008) Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF- $\kappa$ B and Akt pathways. *Eur J Pharmacol* 580:70–79
- Cui G, Qin X, Zhang Y, Gong Z, Ge B, Zang YQ (2009) Berberine differentially modulates the activities of ERK, p38 MAPK, and JNK to suppress Th17 and Th1 T cell differentiation in type 1 diabetic mice. *J Biol Chem* 284:28420–28429
- Jung HA, Min BS, Yokozawa T, Lee JH, Kim YS, Choi JS (2009) Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol Pharm Bull* 32:1433–1438
- Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (2006) The Japanese Pharmacopoeia, 15th edn. Jiho, Tokyo, pp 1187–1188
- Pauli GF, Jaki BU, Lankin DC (2005) Quantitative <sup>1</sup>H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *J Nat Prod* 68:133–149
- Hasada K, Yoshida T, Yamazaki T, Sugimoto N, Nishimura T, Nagatsu A, Mizukami H (2010) Quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *J Nat Med* 64:161–166
- Pauli GF (2001) QNMR—a versatile concept for the validation of natural product reference compounds. *Phytochem Anal* 12:28–42
- Saito T, Ihara T, Koike M, Kinugasa S, Fujimine Y, Nose K, Hira T (2009) 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
- 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 (2009) Quality control of organophosphorous isoxathion oxon based on qNMR. *Jpn J Food Chem Saf* 16:28–33
- 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 (2010) Absolute quantification of carminic acid in cochineal extract by quantitative NMR. *Food Hyg Saf Sci* 51:19–27
- Ikuta A, Kobayahi A, Itokawa H (1984) Studies on the quantitative analysis of protoberberine alkaloids in Japanese, Chinese and other countries *Coptis rhizomes* by thin layer chromatography-densitometry. *Shoyakugaku Zasshi* 38:279–282
- Yoneda K, Yamagata E, Miyaura M, Longjin H, Mizuno M (1987) Quantitative analysis of berberine type alkaloids and Japanese *Coptis Rhizoma*. *Shoyakugaku Zasshi* 41:205–208
- Kong WJ, Zhao YL, Xiao XH, Jin C, Li ZL (2009) Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of *Rhizoma Coptidis chinensis* based on UPLC-PAD combined with chemometrics methods. *Phytomedicine* 16:950–959
- Sun SW, Tseng HM (2005) Sensitivity improvement on detection of *Coptidis* alkaloids by sweeping in capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 37:39–45
- Chen J, Zhao H, Wang X, Lee FSC, Yang H, Zheng L (2008) Analysis of major alkaloids in *Rhizoma coptidis* by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight mass spectrometry with different background electrolytes. *Electrophoresis* 29:2135–2147
- Li CY, Tsai SI, Damu AG, Wu TS (2009) A rapid and simple determination of protoberberine alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by <sup>1</sup>H NMR and its application for quality control of commercial prescriptions. *J Pharm Biomed Anal* 49:1272–1276

## 既存添加物ドクダミ抽出物の品質評価

(2010年8月19日受付)

(2010年10月20日受理)

石附京子<sup>a)</sup>、多田敦子<sup>a)</sup>、杉本直樹<sup>a)</sup>、松本 清<sup>b,c)</sup>、受田浩之<sup>d)</sup>、松藤 寛<sup>e)</sup>、山崎 壮<sup>a)</sup>、河村葉子<sup>a)</sup>

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) 九州大学大学院農学研究院

c) 現所属：崇城大学生物生命学部

d) 高知大学農学部

e) 日本大学生物資源科学部

## Quality evaluation of Dokudami extract, a natural food additive

(Received August 19, 2010)

(Accepted October 20, 2010)

Kyoko Ishizuki<sup>a)</sup>, Atsuko Tada<sup>a)</sup>, Naoki Sugimoto<sup>a)</sup>, Kiyoshi Matsumoto<sup>b,c)</sup>,  
Hiroyuki Ukeda<sup>d)</sup>, Hiroshi Matsufuji<sup>e)</sup>, Takeshi Yamazaki<sup>a)</sup>, Yoko Kawamura<sup>a)</sup>

a) National Institute of Health Sciences

b) Faculty of Agriculture, Kyushu University

c) Present address: Faculty of Biotechnology and Life Science, Sojo University

d) Faculty of Agriculture, Kochi University

e) College of Bioresource Sciences, Nihon University

## Abstract

Dokudami extract, a natural antioxidant agent used as a food additive, is described as a purified ethanol extract of leaves of *Houttuynia cordata* (Japanese name: Dokudami) and is composed mainly of isoquercitrin, in the Notice (1996) relating to the existing food additives used in Japan. In order to evaluate the quality of the Dokudami extract products, we have analyzed the two products by LC/MS. The results showed that quercitrin and hyperin were more major components than isoquercitrin. However, the Dokudami extract products were confirmed to be made from the leaves of *H. cordata*, because the compositions of the constituents in the products are similar to those in the extracts of the dried leaves of *Houttuynia herba* products ('Juuyaku' in Japanese) derived from *H. cordata*. The antioxidative activities of the food additive products were confirmed by detection of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities. These results are also useful for quality evaluation of not only Dokudami extract products as food additives but also various kinds of commercially available Dokudami products as food or folk medicines.

Keywords: 食品添加物、ドクダミ抽出物、酸化防止剤、ドクダミ、ケルセチン配糖体

food additive, Dokudami extract, antioxidant agent, *Houttuynia cordata* THUNB., quercetin glycoside

## I 緒言

ドクダミ科 (Saururaceae) ドクダミ (*Houttuynia cordata* THUNB.) は、わが国では古くから民間薬として用いられており、ドクダミ *H. cordata* の花期の地上部を乾燥したものは、生薬ジュウヤク (十薬) とされ、その煎液は緩下、利尿薬として用いられている。また、現在ではドクダミ茶等の

健康食品としても市場で流通している。一方、ドクダミ *H. cordata* の葉の抽出物はドクダミ抽出物と呼ばれ、酸化防止効果を持つ天然由来の食品添加物として使用が許可されている。既存添加物名簿<sup>1)</sup>には、「ドクダミの葉から得られた、イソケルシトリンを主成分とするものをいう。」と定義されており、既存添加物名簿取載品目リスト<sup>2)</sup>には、ドクダミ抽出物の基原・製法・本質として、「ドクダミ科ドクダミ (*Houttuynia*

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 食品添加物部 多田敦子

Corresponding author: Atsuko Tada, Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

*cordata* THUNB.) の葉より、エタノールで抽出し、精製して得られたものである。主成分はイソクエルシトリンである。」と記載されている。ドクダミそのものの含有成分については、イソクエルシトリン等の各種フラボノイド<sup>3-5)</sup>の他にクロロゲン酸類<sup>5)</sup>を含有することが報告されている。しかしながら、食品添加物としてのドクダミ抽出物製品の成分組成に関する報告はこれまでにない。そこで本研究では、既存添加物ドクダミ抽出物として提供された製品の品質を明らかにする目的で、イソクエルシトリン等の各種フラボノイドおよびクロロゲン酸類の定量分析を行い、さらに、ドクダミを基原とする生薬ジウヤクから調製した抽出物との成分比較により本抽出物製品の基原の確認を行った。また、既存添加物製品の1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を測定し、酸化防止剤としての有効性を評価した。

## II 研究方法

### 1. 試料・試薬

既存添加物ドクダミ抽出物製品は、日本食品添加物協会より提供された2社各1製品 (DO-1 および DO-2 と略す) を使用した。ドクダミを基原とする日本薬局方ジウヤク (十薬) (*Houttuyniae Herba*) は、4社計6製品 (中国産1製品: HC-1、および国産5製品: HC-2~6) を購入して用いた。

ドクダミ抽出物中のフラボノイド (Fig. 1) の分析用標品として、ルチン三水和物 rutin trihydrate (1) (東京化成工業 (株)、Cat. No. R0035)、ヒペリン hyperin (ヒペロシド hyperoside) (2) (フナコシ (株)、Cat. No. TKW P2202)、イソクエルシトリン isoquercitrin (3) (関東化学 (株)、Cat. No. 20311-96)、クエルシトリン quercitrin (4) (ChromaDex 社製、和光純薬工業 (株) 販売、Cat. No. ASB-00017170)、クエルセチン二水和物 quercetin dihydrate (5) (和光純薬工業 (株)、Cat. No. 177-00401)、ならびにカフェオイルキナ酸 (Fig. 2) のクロロゲン酸 0.5 水和物: 3-caffeoylquinic acid hemihydrate (II) (和光純薬工業 (株)、Cat. No. 039-14243)

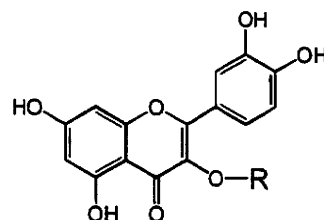
[CAS No. 327-97-9: CA Index Name cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxy-, (1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-の水和物] を用いた。

抗酸化活性測定用試薬として、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (和光純薬工業 (株)、Cat. No. 047-04051)、(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma-Aldrich 社、Cat. No. 23,881-3)、Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) (Sigma-Aldrich 社、Cat. No. T1503) を使用した。

上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品あるいは HPLC 用を使用した。

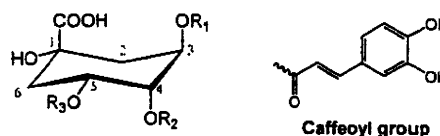
### 2. 装置

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS): Waters 社製 LC/MS system (LC: Alliance 2695、PDA: 2996 photodiode array detector、MS: micromass ZQ)



No.	Compound	R
1	Rutin	Glc <sup>a</sup> -Rha
2	Hyperin	Gal
3	Isoquercitrin	Glc
4	Quercitrin	Rha
5	Quercetin	H

Fig. 1. Structures of flavonoids in Dokudami extract



No.	Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
I	5-O-Caffeoylquinic acid	H	H	caffeoyl
II	3-O-Caffeoylquinic acid	caffeoyl*	H	H
III	4-O-Caffeoylquinic acid	H	caffeoyl	H

Fig. 2. Structures of caffeoylquinic acid isomers in Dokudami extract

\*Caffeoyl: caffeoyl group

### 3. LC/MS による成分分析および定量

既存添加物ドクダミ抽出物製品 DO-1 (褐色液状、乾燥減量 44.1%) は 125 μg/mL、DO-2 (黄色粉末、乾燥減量 3.2%) は 62.5 μg/mL となるように 50%(v/v) エタノールで溶解し、0.2 μm フィルターでろ過した後、10 μL を LC/MS に導入した。

生薬ジウヤクは、葉部 10 g を選別し、既存添加物製品の製造工程を参考に、30%(v/v) エタノール水溶液 160 mL で常温、18 hr 抽出した。50%(v/v) エタノール水溶液を用いて 80~500 倍に適宜希釈後、0.2 μm フィルターでろ過し、10 μL を LC/MS に導入した。

各分析用標品の 1 mg/mL 溶液を 50%(v/v) エタノール水溶液で調製した。さらにこれら各溶液を希釈し、クエルシトリンは 0.05、0.4、0.8、1.2、1.6 μg/mL、他の化合物は 0.025、0.2、0.4、0.6、0.8 μg/mL となるようそれぞれ計 5 濃度の標品希釈液を作製した。各種成分の定量には、LC/MS による SIR (ESI-) 測定でのピーク面積値を用いた。各標品のピーク面積より作成した検量線を基に、各試料中の成分を定量した。なお、試薬ルチン三水和物、試薬クエルセチン二水和物および試薬クロロゲン酸 0.5 水和物は、無水物に換算した値で検量線を作成した。また、各標品の HPLC 面積百分率 (UV 254 nm) を確認したところ、イソクエルシトリンのみは、顕著な不純物ピーク (クエルセチン) が検出されなかった。



め、添付文書記載の試薬純度値 92.2% を用いて純度補正をした。

LC 条件: ODS カラム Atlantis T3 (2.1 × 150 mm, 3 μm, Waters 社製)、流速 0.2 mL/min、カラム温度 30℃、移動相 H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN : 1% ギ酸 = 92 : 7 : 1 (0-3 min) → 83 : 16 : 1 (21-40 min) → 9 : 90 : 1 (50-80 min)

MS 条件: ソース温度 120℃、脱溶媒温度 350℃、脱溶媒ガス流量 400 L/hr、コーンガス 50 L/hr、キャピラリー電圧 3.0 kV、コーン電圧 20 ~ 50 V、スキャン範囲 *m/z* 100-1000 (ESI-)、SIR (Single Ion Recording) (ESI-)

本研究では、分析条件を種々検討し、分子量が同一のクエルセチン配糖体であるヒペリン (2) とイソクエルシトリン (3) を上記の条件により分離可能であることを見出した。さらに各化合物の SIR(ESI-) 検出に適したコーン電圧を検討し、Table 1 に示した。

#### 4. DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性の測定は、島村らの方法<sup>6)</sup>に従った。すなわち、50% エタノールに溶解した試料溶液 0.2 mL に 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 0.8 mL、0.2 mM DPPH-エタノール溶液 1.0 mL を順次添加し、10 秒間攪拌後、室温暗所下にて 30 分静置した。その後 517 nm の吸光度 (*A<sub>s</sub>*) を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した際の吸光度をコントロール (*A<sub>c</sub>*) として、試料のラジカル消去率 (%) を以下の式 (1) で求めた。また本実験では、試料濃度とラジカル消去率の関係を調べ、50% 消去率をはさむ 2 点間での回帰直線より、試料溶液が 50% 消去率を与える濃度 IC<sub>50</sub> (μg/mL) を求めた。さらに Trolox を標準物質として同様の方法で IC<sub>50</sub> (μg/mL) を求め、以下の式 (2) を用い、各試料のラジカル消去活性を Trolox 等価活性 (TEAC) として算出した。

$$\text{消去率 (\%)} = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad \dots \text{式 (1)}$$

$$\text{TEAC } (\mu\text{g trolox}/\mu\text{g}) = \text{Trolox の IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{試料の IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) \quad \dots \text{式 (2)}$$

### III 結果および考察

#### 1. 添加物製品中の成分の分析

Fig. 3 に、標品混合溶液 (各試薬標品 0.2 μg/mL、ただし試薬クエルシトリンのみ 0.4 μg/mL) (a) と既存添加物ドクダミ抽出物 2 製品 DO-1 (b) および DO-2 (c) について、Table 1 に示した SIR (ESI-) 選択イオンを分析した際のトータルイオンクロマトグラムを示す。既存添加物 2 製品に含まれる成分組成はほぼ同じであり、クエルセチン (5) やクエルセチン配糖体 (1 ~ 4) に加え、3-*O*-caffeoylquinic acid (II) を含有していた。さらに、3-*O*-caffeoylquinic acid (II) の前後の保持時間に、類似した UV スペクトルおよび同じ MS 分子量関連イオン *m/z* 353 を示す peak I および III が検出され (Fig. 4)、既報<sup>7-9)</sup> の ODS カラムでの LC 溶出パターンや MS フラグメントパターンとの一致から、それぞれ caffeoylquinic

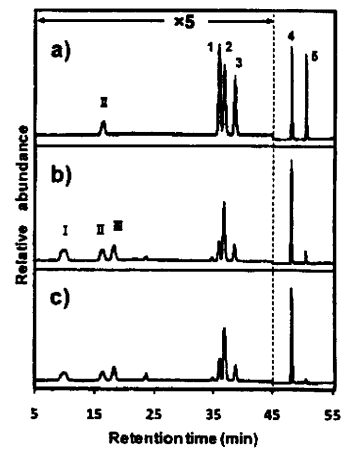


Fig. 3. LC/MS (ESI-) total ion chromatograms (SIR selected ions: see Table 1) of standard mixture and Dokudami extract products

(a): standard mixture, (b): DO-1 and (c): DO-2  
II : 3-*O*-caffeoylquinic acid, I: rutin, 2: hyperin,  
3: isoquercitrin, 4: quercitrin, 5: quercetin  
x5: The vertical axis is enlarged to five times.

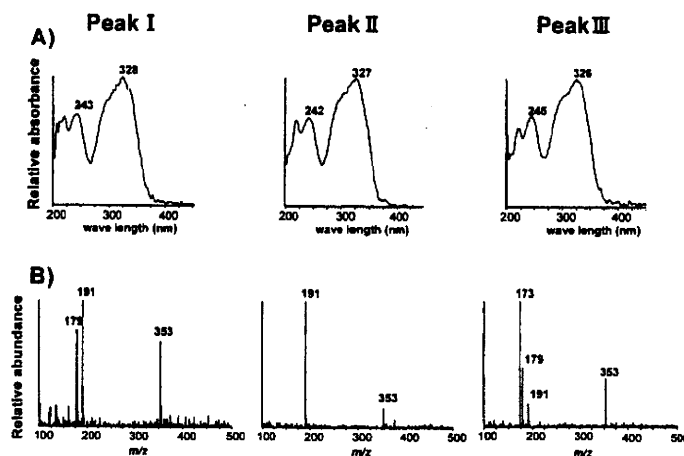


Fig. 4. UV (A) and MS (B) spectra of peaks I, II (3-*O*-caffeoylquinic acid) and III, shown in Fig. 3

acidの異性体である5-*O*-caffeoylquinic acid (I) および4-*O*-caffeoylquinic acid (III)と推定した。

## 2. 添加物製品中の成分の定量

Table 1にLC/MSによる添加物2製品(DO-1およびDO-2)中の各含有成分の定量結果を示した。液状製品(DO-1)の含有成分濃度は、粉末製品(DO-2)の約2分の1であったが、両製品の乾燥減量(44.1%および3.2%)を考慮すると乾燥重量当たりの濃度はほぼ等しく、また、両製品が含有する成分組成もほぼ等しいことが示された。これらの主要フラボノイドはクエルシトリン(4)、次いでヒペリン(2)であり、既存添加物名簿<sup>1)</sup>の定義に主成分として記載されているイソクエルシトリン(3)の濃度は、クエルシトリン(4)の約10分の1であった。また、3-*O*-caffeoylquinic acid (II)と、5-および4-*O*-caffeoylquinic acidの推定 peak IおよびIIIの含有量(3-*O*-caffeoylquinic acid (II)換算)を合わせ、caffeoylquinic acid類として算出すると、クエルシトリン(4)と同程度で比較的多量であった。これら添加物製品の成分組成は、ドクダミの葉部のフラボノイド含有量を測定した既報<sup>3-5)</sup>の組成と類似していた。

## 3. 生薬ジュウヤク葉部から調製した抽出物の分析

ドクダミ *H. cordata*の花期の地上部を基原とする生薬ジュウヤク (*Houttuyniae Herba*) 6製品の葉部の30%(v/v)エタノール抽出物をLC/MSで測定し、Table 1に示したSIR (ESI-)選択イオンを分析した際のトータルイオンクロマトグラムをFig. 5に示す。6製品とも抽出物の成分組成はほぼ同じで、中国産(HC-1)と他の国産製品(HC-2~HC-6)の間で顕著な差異は認められなかった。これら生薬製品の抽出物は既存添加物製品の成分組成と類似し、主要成分としてクエルシトリン(4)を含み、その他にクエルセチン(5)、クエルセチン配糖体(1~3)およびcaffeoylquinic acid異性体(I~III)を含有していた。

以上の結果、今回分析対象とした既存添加物ドクダミ抽出物製品は、ドクダミの葉部からの抽出物の成分組成に関する既報<sup>3-5)</sup>に加え、ドクダミを基原とする生薬製品の葉部からの抽出物の成分組成とも類似したため、既存添加物2製品

の基原は、既存添加物名簿収載品目リスト<sup>2)</sup>に記載のあるドクダミ科ドクダミ *H. cordata*の葉であると確認された。また、今回分析した既存添加物製品のみならず、既報<sup>3-5)</sup>のドクダミの葉部に関する結果や生薬ジュウヤク葉部からの調製抽出物においても、主要フラボノイドはクエルシトリンでありイソクエルシトリンは微量であったことから、既存添加物名簿の主成分の記述については、今後再検討が必要だと考えられる。

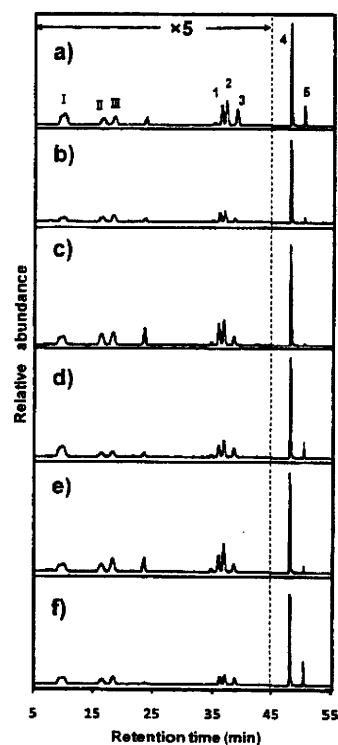


Fig. 5. LC/MS (ESI-) total ion chromatograms (SIR selected ions: see Table 1) of 30% ethanol extracts of *Houttuyniae Herba* (leaves)

a) ~ f): HC-1 ~ HC-6, respectively  
 II : 3-*O*-caffeoylquinic acid, 1: rutin, 2: hyperin,  
 3: isoquercitrin, 4: quercitrin, 5: quercetin  
 x5: The vertical axis is enlarged to five times.

Table 1. Conditions of the LC/MS analysis and concentrations of constituents in Dokudami extract products (DO-1 and -2)

Peak* No.	Compound	M.W.	LC/MS conditions		Concentrations** (%) in products	
			SIR(ESI-) ( <i>m/z</i> )	cone (V)	DO-1	DO-2
I - III	Caffeoylquinic acids	354	353	20	0.55 ± 0.037	0.91 ± 0.001
1	Rutin	610	609	50	0.04 ± 0.002	0.10 ± 0.008
2	Hyperin	464	463	30	0.16 ± 0.009	0.36 ± 0.031
3	Isoquercitrin	464	463	30	0.05 ± 0.001	0.11 ± 0.004
4	Quercitrin	448	447	30	0.49 ± 0.026	1.05 ± 0.074
5	Quercetin	302	301	30	0.03 ± 0.001	0.03 ± 0.001

\* Peaks shown in Fig. 3

\*\* Concentrations (%) are expressed as means ± SD (*n* = 3).

#### 4. ドクダミ抽出物および含有成分の抗酸化活性

これまでの報告<sup>10, 11)</sup>に、ドクダミから作製した抽出物の DPPH ラジカル消去活性を調べた例はあるが、既存添加物ドクダミ抽出物製品についての報告は無い。そこでまず、既存添加物 2 製品の DPPH ラジカル消去活性を調べた。2 製品とも濃度に依存して活性が上昇し、60% の消去率を示す濃度までは相関係数 0.99 以上の直線性を持ってラジカルを消去したが、消去率 60 ~ 70% を超える濃度から頭打ちを示す傾向が認められた。DO-1 および DO-2 の IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 658.0 ± 5.10 μg/mL および 289.9 ± 0.73 μg/mL、TEAC 値は 0.09 および 0.21 μg trolox/μg と算出された。

さらに、添加物製品から検出された成分の試薬製品を用いて DPPH ラジカル消去活性を測定し、IC<sub>50</sub> 値および TEAC 値を求めた (Table 2)。試薬濃度 (μg/mL) は、無水物換算で示した。なお、試薬イソケルセチンのみは、LC/MS による分析の結果、不純物としてケルセチンを 4.31% 含有していたため、不純物ケルセチンに起因するラジカル消去活性を差し引いて IC<sub>50</sub> 値を算出した。いずれの成分も TEAC 値が 1 μg trolox/μg より大きく、Trolox より強い DPPH ラジカル消去活性を示した。また、今回試薬標品が入手できなかった 5- および 4-*O*-caffeoylquinic acid (peak I および III) の DPPH ラジカル消去活性は、既報<sup>12)</sup> によると IC<sub>50</sub> 値が 3-*O*-caffeoylquinic acid の約 0.9 および 1.2 倍であり、3-*O*-caffeoylquinic acid とほぼ同じレベルであることが報告されている。

Table 2. DPPH radical scavenging activity of compounds identified in Dokudami extract products

Compound	IC <sub>50</sub> value* (μg/mL)	TEAC** (μg trolox/μg)
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	30.9 ± 0.42	1.95
Rutin	56.3 ± 0.41	1.07
Hyperin	40.8 ± 0.65	1.48
Isoquercitrin	50.5 ± 0.73	1.19
Quercitrin	45.9 ± 0.25	1.31
Quercetin	20.1 ± 0.12	3.00

\* IC<sub>50</sub> values were determined by regression line and expressed as means ± SD (n = 3).

\*\* TEAC (μg trolox/μg) are expressed as means (n = 3).

つぎに、LC/MS による定量値 (Table 1) および DPPH ラジカル消去活性の TEAC 値 (Table 2) の結果から、ドクダミ抽出物全体の抗酸化活性に対する各成分の寄与について考察した。各成分の寄与の大きさは成分の定量値 (Table 1) × 成分の TEAC 値 (Table 2) として考えると、ケルセチンの TEAC 値は、ケルシトリンおよびクロロゲン酸 (3-*O*-caffeoylquinic acid) の 2.3 および 1.5 倍と高かったものの、含有量がこれら成分の 30 分の 1 以下と極めて少量であったため、全体の抗酸化活性への寄与としては、ケルシトリンおよびクロロゲン酸より低かった。一方、ケルシトリンおよびクロロゲン酸の TEAC 値は、ケルセチン以外のルチン、ヒペリンおよびイソケルシトリンの 0.9 ~ 1.8 倍と、

同等かそれ以上であり、さらに含有量はこれら成分の 2.5 ~ 10.5 倍と著しく高かった。そのため今回調べた成分の内、ケルシトリンおよびクロロゲン酸類の抗酸化活性が、既存添加物ドクダミ抽出物製品全体の活性に大きく寄与していることが示唆された。

## IV まとめ

天然由来の酸化防止剤である既存添加物ドクダミ抽出物製品の品質を明らかにするため、LC/MS により含有フラボノイド成分およびクロロゲン酸類の定量を行った。ドクダミ抽出物 2 製品は性状が異なることもあり、成分濃度に 2 倍程度の違いは見られたものの、ケルセチンとその配糖体およびクロロゲン酸類が検出され、検出された成分の組成はほぼ同じであった。主成分はケルシトリン、ヒペリンであり、既存添加物名簿<sup>1)</sup> の定義に主成分として記載のあるイソケルシトリンは少なかった。しかしながら、既存添加物ドクダミ抽出物のフラボノイド等の成分組成は、ドクダミの成分に関する既報<sup>3-5)</sup> およびドクダミを基原とする生薬ジュウヤクの葉部からの抽出物と類似していたことから、既存添加物として提供された 2 製品の基原がドクダミ科ドクダミ *H. cordata* の葉であることが確認された。既存添加物名簿の主成分の記述については、今後再検討が必要だと考えられる。既存添加物製品および製品中から検出された各成分の DPPH ラジカル消去活性を測定した結果、添加物製品は抗酸化活性を有することが確認された。また、各成分の含有量と TEAC 値から、今回調べた成分の内、ケルシトリンおよびクロロゲン酸類の抗酸化活性が既存添加物製品全体の活性に大きく寄与していることが示唆された。

本研究により得られた既存添加物ドクダミ抽出物製品の品質評価の結果は、民間業あるいは健康食品として市場に流通している各種ドクダミ製品の品質管理を行う上でも有用と考えられる。

## V 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業により実施したものである。ドクダミ抽出物の収集にご協力いただいた日本食品添加物協会に深謝いたします。

## VI 参考文献

- 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).
- 2) 厚生省生活衛生局長通知 別添 1 “既存添加物名簿 収載品目リスト” 平成 8 年 5 月 23 日、衛化第 56 号 (1996).

- 3) Kawamura, T., Hisata, Y., Okuda, K., Noro, Y., Tanaka, T., Yoshida, M., Sakai, E.,: Pharmacognostical studies of *Houttuyniae Herba* (1) flavonoid glycosides contents of *Houttuynia cordata* THUNB.. *Natural Medicines*, **48**, 208-212 (1994).
- 4) Fuse, J., Kanamori, H., Sakamoto, I., Yahara, S.,: Studies on flavonol glycosides in *Houttuynia cordata*. *Natural Medicines*, **48**, 307-311 (1994).
- 5) Meng, J., Leung, K.S.-Y., Jiang, Z., Dong, X., Zhao, Z., Xu, L.-J.,: Establishment of HPLC-DAD-MS Fingerprint of Fresh *Houttuynia cordata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1604-1609 (2005).
- 6) Shimamura, T., Matsuura, R., Tokuda, T., Sugimoto, N., Yamazaki, T., Matsufuji, H., Matsui, T., Matsumoto, K., Ukeda, H.,: Comparison of conventional antioxidants assays for evaluating potencies of natural antioxidants as food additives by collaborative study. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **54**, 482-487 (2007).
- 7) Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N.,: Hierarchical Scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2900-2911 (2003).
- 8) Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N.,: Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3821-3832 (2005).
- 9) Matsui, Y., Nakamura, S., Kondou, N., Takasu, Y., Ochiai, R., Masukawa, Y.,: Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of chlorogenic acids and their metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B*, **858**, 96-105 (2007).
- 10) Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K.,: Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, **163**, 1161-1168 (2002).
- 11) Cho, E.J., Yokozawa, T., Rhyu, D.Y., Kim, S.C., Shibahara, N., Park, J.C.,: Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine*, **10**, 544-551 (2003).
- 12) Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., Fujita, T.,: In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4893-4898 (2004).

## SDS-PAGE による既存添加物酵素のタンパク質分離パターン

(2010年3月15日受付)

(2010年3月31日受理)

秋山卓美<sup>a)</sup>、佐々木 亮<sup>b)</sup>、山崎 壮<sup>a)</sup>、棚元憲一<sup>a,c)</sup>、山形一雄<sup>b)</sup>、河村葉子<sup>a)</sup>

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) 日本大学

c) 武蔵野大学

## Protein separation patterns of food manufacturing enzymes obtained by SDS-PAGE

(Received March 15, 2010)

(Accepted March 31, 2010)

Takumi Akiyama<sup>a)</sup>, Ryo Sasaki<sup>b)</sup>, Takeshi Yamazaki<sup>a)</sup>, Kenichi Tanamoto<sup>a,c)</sup>, Kazuo Yamagata<sup>b)</sup>, Yoko Kawamura<sup>a)</sup>

a) National Institute of Health Sciences

b) Nihon University

c) Musashino University

## Abstract

Food manufacturing enzymes are named according to enzyme functions in Japan. Active enzyme proteins are not identified as substances. Therefore, in the List of Existing Food Additives, most items consist of enzymes from different origins. If a chemical analysis of proteins in enzyme products can identify origins, the method will be a probable candidate for a simple identification test for enzyme origins. SDS-PAGE was applied to  $\alpha$ -amylases,  $\beta$ -amylases, catalases,  $\beta$ -galactosidases, glucoamylases, cellulases, proteases, and hemicellulases. As many products as possible were collected to cover most of currently circulating products in Japan. One hundred and three products available in Japan were analyzed by SDS-PAGE. Molecular weights of major proteins were calculated. Characteristic electrophoresis patterns were found in most products. Useful information on relationships between origins and separation patterns of proteins was obtained. Identification of species was achieved for all products from plants and many products from bacteria or fungi although identification was limited to the genera level for some microorganisms like *Bacillus*.

Keywords : 食品用酵素、タンパク質、SDS-PAGE、基原

food manufacturing enzyme, protein, SDS-PAGE, origin

## I 緒言

既存添加物名簿<sup>1)</sup>に含まれる酵素は2010年1月現在69品目であり、食品添加物公定書第8版<sup>2)</sup>には5品目が収載されている。既存添加物名簿における品目名はその添加物が持つ酵素活性に基づいた名前が付けられている。酵素の基原が指定されていないため、全く異なる生物種に由来する製品が一つの品目として収載されており、実際に多くの品目において基原の異なる様々な製品が流通している。同じ品目でも基原によって酵素タンパク質は異なり、酵素特性も酵素活性測定法も異なることが、酵素の成分規格を作成することを困難にしており、酵素品目の多くが食品添加物公定書未収載である要因の一つにもなっている。また、微生物に由来する

製品の場合、生物種としては同じであっても菌株が異なる製品も存在する。異なる生物種や株に由来する酵素製品は酵素特性が違う場合が多く、食品製造においては区別して用いられる場合が多い。

酵素製品の特性は基原に関する情報や酵素活性などにより判断されるが、化学的分析によっても確認できることが望ましい。分析対象物質としてまず考えられるのがタンパク質である。食品添加物として使用される酵素製品は、一般に酵素タンパク質だけを高度に精製したものではなく、酵素生産菌の培養液や原料生物から酵素タンパク質を含む画分を抽出したものが、もしくは簡単な分画のみを行って調製したものである。酵素製品には安定化などの目的のために、塩類や賦形剤として多糖類などが添加されている場合があるが、基原

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食品添加物部 秋山卓美

Corresponding author: Takumi Akiyama, Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan