

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 年度～平成 22 年度年度分担総合研究報告書

天然物酸化防止剤の併用効果の解析法に関する研究

研究分担者 松井 利郎 九州大学農学研究院 准教授

研究分担者 石川 洋哉 福岡女子大学人間環境学部 准教授

研究分担者 松本 清 九州大学農学研究院 教授

研究協力者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

研究要旨

食品添加物である酸化防止剤の併用効果の判定を目的として、薬剤の併用効果解析に汎用されている Median effect analysis の適用性を検討した。2 種類の酸化防止剤を混合した場合の併用効果（相殺・相加・相殺効果）を 3 種類の抗酸化能評価法（DPPH 法、WST-1 法、ORAC 法）の結果に基づき解析した。DPPH 法と WST-1 法では概ね一致した結果が得られたが、反応原理の異なる ORAC 法との一致性は認められなかった。DPPH 法に基づく併用効果の解析に関しては、ラジカル消去過程での消去速度が重要な併用性発現因子の一つであることが示唆された。

研究成果の総括

食品への用途が認められている酸化防止剤の混合系における相互作用（併用性）評価法の設定を目的とし、その基礎となる解析法の検証を行った。

混合系における抗酸化物間の相互作用は、相加効果の予測値を基準として判定されるが、抗酸化物混合系における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、平成 17～19 年度厚生科学研究「天然物酸化防止剤の抗酸化活性評価に関する研究」において、抗酸化物の併用効果の検討に使用された実績を有する Fractional product method を用いて酸化防止剤の併用効果の判定を試みたが、Fractional product method では、個々の化合物が独立して作用し、且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という制限がある。そこで、

有効な併用効果の解析法を模索し、薬剤の併用効果解析法として用いられてきた『Median effect analysis』を抗酸化食品成分併用効果の新規解析法として新たに提案した。

まず、「既存添加物名簿収載品目リスト」に収載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる 7 種類の添加物（カテキン、ケセルチン、セサモール、フェルラ酸、モリン、エラグ酸、*d*- $\alpha$ -トコフェロール）を用い、10 通りの組み合わせで併用効果を検討した。抗酸化能評価法として DPPH ラジカル消去活性測定法（以下、DPPH 法）を選択し、Median effect analysis による解析を試みた。解析の結果、相乗効果 1 組、相加効果 6 組、相殺効果 3 組という判定結果が得られた。Fractional product method での判定結果と比較すると、判定結果は若干異なるものであったが、Fractional product method で相乗効果と判定された 4 組が本法で相加効果と判定された点に関しては、

Fractional product method でも相加性を僅かに上回る程度の相乗効果しか認められていないことから、両法の判定結果は大きく異なるものではないと考えられた。一方、Fractional product method で相乗効果と判定されていたセサモールとエラグ酸の組み合わせでは、本法で相殺効果と判定され、全く逆の結果が得られたことから、両者の判定方法について更なる検証が必要と判断された。

続いて、天然物酸化防止剤の種類と組合せを増やし、DPPH 法で計 14 通りの併用効果を Median effect analysis により解析した。さらに、スーパーオキシドアニオン消去活性測定法である WST-1 法で 8 通りの組み合わせで併用効果を検討し、両者の解析結果を比較した。DPPH 法と WST-1 法では概ね一致した解析結果が得られた。また、Median effect analysis による反応型 (I~IV 型) の検証 (該当型の判別) により、酸化防止剤併用時の反応型が I あるいは III 型に該当していること、すなわち互いの酸化防止剤が排他的 (拮抗的) に作用していることが示唆された。この反応型は、Fractional product method の適用条件に適合しないため、Fractional product method は酸化防止剤の併用効果解析に適用不可能であることが判明した。Median effect analysis では、実験結果を基に反応型を推定し、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、さらに濃度レベルに応じた判定も可能であることから酸化防止剤の併用効果の判定法として有力であると考えられた。

近年注目されている Oxygen Radical Absorbance Capacity 法 (ORAC 法) を用いて Median effect analysis による併用性評価を試みた。「既存添加物名簿収載品目リスト」に収載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる 5 種類の添加物、及びカテキン類 (エピカテキン (EC), エピカテキンガレー

ト (ECg), テピガロカテキン (EGC), エピガロカテキンガレート (EGCg)) を用い、7 通りの組合せで併用性を評価した。その結果、ORAC 法での解析結果は、DPPH 法の結果とほとんど一致しないことが判明した。ORAC 法は、水素原子の転移反応に基づく測定法であり、DPPH 法や WST-1 法での一電子転移反応によるものと本質的に反応メカニズムが異なる。このことが、解析結果の相違を引き起こす要因になったと考えられる。また、今回 ORAC 法での測定結果を解析するにあたり、便宜的に阻害率を算出する方法を新たに定義しており、その点も議論の余地が残り、ORAC 法への Median effect analysis の適用に関しては今後更なる検証が必要と考えられた。

酸化防止剤として重要な *d*- $\alpha$ -トコフェロール、および相殺効果を示す傾向が認められているエラグ酸を中心として併用効果を確認した。*d*- $\alpha$ -トコフェロールと 14 種類の化合物 (カテキン、EC、EGC、EGCg、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン、ルチン、モリン、セサモール、エラグ酸、フェルラ酸、没食子酸、アスコルビン酸) の組合せでは、一部で相乗効果が認められたものの、そのほとんどの組合せが相加効果であった。一方、エラグ酸との組合せでは、13 通り中 8 通りの組合せで相殺効果を示すことが確認され、エラグ酸との併用は相殺効果を引き起こす可能性が高いことが示唆された。

DPPH 法での測定結果に基づく Median effect analysis では、反応型が I 型あるいは III 型に該当することが明らかになった。このことは、個々の抗酸化物が排他的に作用し、DPPH ラジカルを拮抗 (競争) 的に消去することを示唆している。したがって、併用効果の解析結果には、個々の抗酸化物の DPPH ラジカル消去速度が大きく影響を及ぼしている可能性があるかと推察された。そこで、「既存添加物名簿収

載品目リスト」に記載されている 8 種類の天然物酸化防止剤の DPPH ラジカル消去速度（初速度）を測定し、Median effect analysis の結果と照合することにより併用効果発現因子の解明を試みた。その結果、各酸化防止剤のラジカル消去速度が速い物質どうしの組合せは相乗性を示し、遅い物質との組合せは相殺性を示す傾向が認められた。また、DPPH ラジカル消去反応において、平衡状態に至るまでのラジカル消去挙動全体に着目した場合、消去挙動が類似した抗酸化物の組合せで相乗・相殺効果が生じる可能性が高いことが明らかになった。以上より、酸化防止剤併用性の評価に対して、ラジカル消去過程での消去速度が重要な併用性発現因子となっていることが示唆された。

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 年度分担研究報告書

NMR を用いた既存添加物の新規分析法の開発と応用に関する研究

研究分担者	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 室長
研究分担者	多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官
研究分担者	水上 元	名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授
研究協力者	田原 麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 研究員
研究協力者	永津 明人	金城学院大学薬学部 教授

#### 研究要旨

NMR による定量分析法(定量 NMR, qNMR)は、測定対象成分の標準物質がなくても試料中の個別成分含量を絶対定量可能であるという特長をもつことから、定量用標準品の供給が困難な場合に威力を発揮することが期待できる。そこで、既存添加物の分析に応用することをめざして、年度ごとに対象品目をかえて検証した。次のことを実施した。

コチニール色素中の主色素成分カルミン酸の含量測定、ベニバナ赤色素製品に含まれる主色素成分カルタミンの定量、ソバ乾麺中のクエルセチン含量測定、クエルセチン配糖体を成分とする食品添加物と市販試薬の純度測定、セスキテルペンとアルカロイドを成分とする植物抽出物と市販試薬の純度測定、ステビア抽出物の規格試験に使用する定量用試薬の純度測定、カラメル規格試験に使用する定量用試薬の純度測定、qNMR 法と多変量解析を組み合わせた方法で、カラメル製品の区別分類と原材料の特定が可能であるかの検討。

本プロジェクトの波及効果として、qNMR 法が食品添加物の定量用標準物質（試薬）の純度測定法として採用された。また、qNMR 法で純度測定した、国際単位系にトレーサブルな試薬が市販されるまでになった。

#### 1. 研究目的

食品添加物の定量分析には、クロマトグラフィーを利用する方法、化学的な反応を利用する方法(滴定法等)、化合物固有の吸光度を利用した方法(吸光度法)等が主に利用されている。しかしながら、分析対象とする品目が複雑な混合物であり、且つ分析対象の化合物の標準物質(定量用標準品)が入手不可能な多くの既存添加物(天然添加物)では、上記のいずれの方法によっても信頼性の高い定量値を求めることは実質的に不可能であり、実際にこれらの品質規

格基準設定が遅れており、その解決策も現状の分析化学の分野におけるあらゆる方法論の中からも見いだせていない。また、1990 年代から経済活動がグローバル化し、食品添加物の原料、製品があらゆる国から流れ込みあらゆる国に出て行く時代となり、それらの安全性や信頼性が国境を越えて問われるようになった。このため、各国の食品添加物の規格基準についても、国際的な整合性や標準化の推進が要求されているが、各国の技術的障壁だけでなく分析法自身の計量トレーサビリティの欠如がこれを妨

げる結果となっている。したがって、今後の天然添加物の品質規格基準設定や国際的整合性確保を推進するためにも、これらの問題を抜本的に解決する新たな方法論の構築が急務である。

このような背景から、我々は、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分析法の一つとして、核磁気共鳴に基づく定量分析法(quantitative NMR(qNMR))の開発を行った。SIに基づく計量学的な分析法を一次標準測定法といい、一次標準直接法と一次標準比率法に分類される。一次標準直接法は、「物質量の基準となる他の化学物質を用いず、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、重量分析法及び凝固点降下法がある。一方、一次標準比率法は、「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、すでに実用化されているものに滴定法及び同位体希釈質量分析法がある。これらの方法は、一般に分析の迅速性に欠け、また分析できる物質の種類に制限がある。一方、我々が開発したqNMRは、純度値が明らかな他の化合物を基準物質(内標準)として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一次標準比率法の資格を有する方法である。<sup>1</sup>H-NMRスペクトル上に観察される異なる化合物のシグナル強度の比は化合物のモル比に対応することから、一方の化合物の純度が明らかであれば、得られた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(あるいは濃度)を決定できることを原理とし、測定対象化合物の標準品を参照せずに純度値を決定できる点で従来法より優れている。

本研究では、qNMRによる絶対定量法を既存添加物の分析法に応用し、従来法に比べて信頼性の高い分析値を導くことが可能であるこ

と、さらに規格基準の設定に有効な方法であることを証明した。

## 2. qNMRを用いたコチニール色素(カルミン酸)の絶対定量

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))の純度決定を行った。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。DSS-*d*<sub>6</sub>の $\delta$  0 ppmに観察されるMe基に由来のシグナル面積値(9H)に対する $\delta$  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た。

## 3. qNMRを用いたベニバナ赤色素製品に含まれる主色素成分カルタミンの含量測定

既存添加物中の指標成分の定量分析へのqNMR法の適用について検討した。食品着色料として用いられる既存添加物「ベニバナ赤色素」に含まれるcarthaminのH-16に由来する

δ 9.34 ppm のシグナル強度を、NMR 基準物質である hexamethyldisilane (HMD) の δ 0 ppm のシグナルを介して認証標準物質である bisphenol A の δ 1.62 ppm のシグナル強度と関連づけることによって定量する方法を確立した。qNMR 用標準品として最近市販された 1,4-bis(trimethylsilyl)benzene (BTMSB) は、δ 0.5 ppm 付近のシグナルが存在する製品があり、すべての製品で基準物質として用いることはできなかった。

入手した 5 種類の製品の carthamin 含量は 0.17~6.59% であった。BTMSB と重なるシグナルが存在しなかった 3 種の製品では、基準物質として HMD を用いた場合と BTMSB を用いた場合で定量値にほとんど差はなかった。

#### 4. qNMR によるクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量

qNMR の応用例として、既存添加物ルチン(抽出物)、ルチン酵素分解物およびクエルセチンの各原体製品中のルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチン、さらにこれら化合物の市販試薬について、絶対定量を行った。qNMR 基準物質として、計量学的に正確に値付けられた 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、その Me 基と測定化合物の各 2' 位のプロトンシグナルとの面積比から含量を算出し、迅速かつ簡便な 1 段階の qNMR 測定を行った。市販試薬および添加物製品の定量値は 77.3 %~98.2 % であり、相対標準偏差は 0.02 %~1.1 % と良好であった。以上の結果、qNMR により、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンを、HPLC などの分離操作を行うことなく、かつ、測定化合物と同一の標準品を参照せずに定量できることを見出した。

#### 5. qNMR を用いたダツタンソバ乾麺中のクエルセチンの迅速絶対定量

qNMR が食品中の天然添加物(既存添加物)について分離操作を伴わない迅速定量として応用可能であるか検証した。食品中の既存添加物クエルセチンの定量分析を想定し、ダツタンソバ (Tartary buckwheat: *Fagopyrum tartaricum* L.) 乾麺の機能性成分として含まれるとされるクエルセチンの含量測定を試みた。ダツタンソバ乾麺の抽出物を qNMR 標準液に溶解し、qNMR 基準物質ヘキサメチルジシラン(HMD)のメチル基とクエルセチンの 2' 位のプロトンシグナル面積比より、ダツタンソバ乾麺中のクエルセチンの含量を算出した結果、1.58±0.14 mg/g であった。また、qNMR により、クエルセチン市販試薬の純度を正確に値付けた後に、LC を用いた通常の定量分析を行い、得られた定量値を比較したところ、qNMR により、従来の LC と同等以上の精度で定量値が簡単に求められることを明らかとした。qNMR では、1 測定当たりの所要時間は約 10 分であり、かつ、測定対象の化合物と同一の標準品および検量線を必要としない。食品中の天然添加物の迅速かつ正確な定量法として、応用範囲の広い、かつ、信頼性の高い実用的な分析法であると考えられた。

#### 6. セスキテルペンとアルカロイドを成分とする植物抽出物中の指標成分の純度測定

天然抽出物中の指標成分の定量分析への qNMR 法の適用について検討した。天然薬物であるビャクジュツ抽出物の品質管理のために使用される指標成分である atractylon の H-12 に由来する δ 7.00 ppm のシグナル強度を、NMR 基準物質である hexamethyldisilane (HMD) の δ 0 ppm のシグナルを介して認証標準物質である potassium hydrogen phthalate の δ 7.23 ppm および δ 8.20 ppm の

シグナル強度と関連付けることによって、その絶対純度を決定することが可能であることを示した。同様に、オウレン抽出物の指標成分である 3 種のプロトベルベリンアルカロイド berberine, coptisine, palmatine の絶対純度の決定が可能であった。さらに、この方法を適用して、市販のプロトベルベリンアルカロイド試薬の評価するとともに、ビャクジュツおよびオウレン抽出物中でのこれら指標成分の定量法を確立した。

#### 7. qNMR によるステビオシドおよびレバウジオシド A 標準品の純度測定法の検討

qNMR の応用例として、既存添加物ステビア抽出物の主成分であるステビオシドおよびレバウジオシド A の各種標準品の絶対純度測定法の検討を行った。qNMR 基準物質として、計量学的に正確に値付けられた 1,4-ビストリメチルシリルベンゼン- $d_4$  (1,4-BTMSB- $d_4$ ) を用い、そのメチル基と各測定化合物に特有なプロトンシグナルとの面積比から含量を算出し、迅速かつ簡便な 1 段階の qNMR 測定を行った。その結果、製品により純度の違いが認められ、5 製品のステビオシド標準品の純度は 92.0~97.7%，5 製品のレバウジオシド A 標準品の純度は 94.7~96.6%であった。相対標準偏差は 0.2~1.1%と良好であった。qNMR は、1 測定が比較的短時間であり、かつ、分離操作を行うことなく絶対定量できる点で、各種標準品中の絶対純度測定法としても有望であることが示された。

#### 8. qNMR 多変量解析によるカラメル色素に関する研究

カラメル色素は、製法の違いから I~IV に分類されるが、市場に流通している製品を I~IV に区別、さらに各製品の原材料を特定することは容易ではない。また、カラメル色素に不純物

として含まれる 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (2-acetyl-4-(tetrahydroxybutyl)imidazole: THI), 4-メチルイミダゾール(4-methylimidazole: 4-MeI)の定量分析に必要な標準品の純度値についても科学的な根拠が求められる。そこで、SI にトレーサブルな定量値を導くことが可能である定量 NMR (qNMR)および多変量解析を組み合わせた qNMR 多変量解析法により、カラメル色素製品の区別分類、原材料の特定、不純物 THI の絶対定量が可能であるか検討した。その結果、qNMR 多変量解析が有効な手法の一つと成り得ることが示唆された。また、今回入手したカラメル色素 I(9 製品 26 ロット), III(4 製品 12 ロット)および IV(7 製品 18 ロット)について THI の存否を qNMR 多変量解析により確認したところ、すべての製品より検出されなかった。qNMR により、4-MeI 市販試薬および THI 標準品 3 製品について純度決定したところ 91~96%であった。

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	松藤寛、佐々怜一郎、本間友輝、宮島拓臣、千野誠、山崎壮、島村智子、受田浩之、松井利郎、松本清、山形一雄	抗酸化物質の2成分混合系におけるDPPHラジカル消去活性	日本食品科学工学会誌	56(3)	129-136	2009
2	杉本直樹、多田敦子、末松孝子、有福和紀、齋藤剛、井原俊英、吉田雄一、久保田領志、田原麻衣子、清水久美子、伊藤澄夫、山崎壮、河村葉子、西村哲治	定量NMRを用いたコチニール色素中のカルミン酸の絶対定量	食品衛生学雑誌	51(1)	19-27	2010
3	Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.	Quantitative determination of atractylon in Atractylodis Rhizoma and Atractylodis Lanceae Rhizoma by <sup>1</sup> H-NMR spectrometry	Journal of Natural Medicines	64(2)	161-166	2010
4	石川洋哉、松本清、受田浩之、島村智子、松藤寛、山崎壮	食品の抗酸化能評価法	FFIジャーナル	215(1)	5-16	2010
5	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
6	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を用いたダツタン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



7	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
8	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
9	Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.	Application of <sup>1</sup> 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
10	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
11	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

研究成果の刊行物・別刷

## 抗酸化物質の2成分混合系における DPPH ラジカル消去活性

松藤 寛<sup>\*1§</sup>, 佐々怜一郎<sup>\*1</sup>, 本間友輝<sup>\*1</sup>, 宮島拓臣<sup>\*1</sup>, 千野 誠<sup>\*1</sup>, 山崎 壮<sup>\*2</sup>,  
島村智子<sup>\*3</sup>, 受田浩之<sup>\*3</sup>, 松井利郎<sup>\*4</sup>, 松本 清<sup>\*4</sup>, 山形一雄<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> 日本大学生物資源学部食品科学工学科

<sup>\*2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所

<sup>\*3</sup> 高知大学農学部

<sup>\*4</sup> 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門

### 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical Scavenging Activity of Binary Mixtures of Antioxidants

Hiroshi Matsufuji<sup>\*1§</sup>, Ryoichiro Sasa<sup>\*1</sup>, Yuki Honma<sup>\*1</sup>, Hiromi Miyajima<sup>\*1</sup>, Makoto Chino<sup>\*1</sup>,  
Takeshi Yamazaki<sup>\*2</sup>, Tomoko Shimamura<sup>\*3</sup>, Hiroyuki Ukeda<sup>\*3</sup>, Toshiro Matsui<sup>\*4</sup>,  
Kiyoshi Matsumoto<sup>\*4</sup> and Kazuo Yamagata<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> Department of Food Science and Technology, College of Bioresource Sciences,  
Nihon University, Kameino 1866 Fujisawa, Kanagawa 252-8510

<sup>\*2</sup> Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences,  
Kamiyoga 1-18-1 Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

<sup>\*3</sup> Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe-B 200, Nankoku, Kochi 783-8502

<sup>\*4</sup> Division of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School  
Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

The effect of a binary mixture of antioxidants on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was investigated using 11 antioxidants as food additives or 24 natural antioxidants. Among 55 combinations of binary mixtures, including 11 antioxidants, BHA, BHT, catechin, quercetin, sesamol, ferulic acid, gallic acid, morin, ellagic acid,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\delta$ -tocopherol, the DPPH radical scavenging activity of 36 combinations were significantly greater than the expected activity of individual antioxidants, resulting in synergistic effects. Also, one combination showed antagonistic effect. Among 276 combinations of 24 natural antioxidants, including 4 benzoic acids, 3 cinnamic acids, 12 flavonoids, 2 vitamins, and 3 diterpenes, 74 showed synergistic effects and 61 showed antagonistic effects. However, the ratios of the actual to expected activity of many synergistic and antagonistic combinations were about 1.1-1.2 and 0.8-0.9, respectively. (Received Aug. 20, 2008 ; Accepted Dec. 3, 2008)

**Keywords** : antioxidant, antioxidant activity, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity, synergy, antagonism

**キーワード** : 酸化防止剤, 抗酸化活性, DPPH ラジカル消去活性, 相乗効果, 相殺効果

2008年1月現在, 我が国では酸化防止剤として19品目が指定添加物として, 42品目が既存添加物として認可されている<sup>1)</sup>. 指定添加物と異なり, 既存添加物の多くは天然由来の複雑な混合物であることから, 有効成分および成分組成の特定が困難であり, 有効成分含量あるいは成分組成を指標とした規格基準の設定が遅れている. 網羅的な成分組成の確認, 有効成分の同定, および定量法の開発がなさ

れているものの<sup>2)3)</sup>, 現状の機器分析では不可能である場合も多い. このような背景のもと, 著者らは抗酸化活性評価により, 酸化防止剤の品質評価ができるのではないかと考え, 酸化防止剤の抗酸化活性について検討を行ってきた. 前報<sup>4)</sup>において, 抗酸化活性の一つとしてラジカル消去活性を分光学的に測定する1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法および2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 法は, 単一の成分からなる酸化防止剤を高い測定精度をもって活性を評価しうること, またその活性は高い直線性をもって濃度依存性を示すことを明らかにした. 今後は, 単一ではなく, 天然物由来の複

<sup>\*1</sup> 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

<sup>\*2</sup> 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

<sup>\*3</sup> 〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

<sup>\*4</sup> 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

<sup>§</sup> 連絡先 (Corresponding author), hmatsufu@brs.nihon-u.ac.jp

雑な組成を持つ酸化防止剤に対する適用性, すなわち有効成分濃度と活性との相関を調べることが大きな課題となる。

しかし, 有効成分間あるいは含有成分が活性測定時において相互作用を引き起こす場合, 活性値から濃度を見積もることは困難となる。すなわち, 相乗効果を有する場合, 活性値から濃度を見積もると, 実際の濃度よりも高く見積もることになり, 相殺効果を有する場合は低く見積もることになる。実際, 抽出液などの複合系においては, しばしば抗酸化物質の濃度と活性との間に相関がないことが報告され, その詳細は不明であるが, 成分間の何らかの相互作用すなわち相乗効果あるいは相殺効果によるものと推察されている<sup>5)~7)</sup>。

アスコルビン酸と $\alpha$ -トコフェロールは相乗効果を示す代表的な組み合わせであり, *in vitro*<sup>8)9)</sup> および *in vivo*<sup>10)</sup> において相乗効果を示すことが確認されている。これはアスコルビン酸と $\alpha$ -トコフェロールがラジカルを消去するだけでなく,  $\alpha$ -トコフェロールがラジカルを消去した反応体をアスコルビン酸が還元し,  $\alpha$ -トコフェロールへと再生することによると考えられている。その他の組み合わせでは, Pekkarinenら<sup>11)</sup> はリノール酸メチルの酸化試験系において, フラボノイドであるミリセチンおよびルチンは $\alpha$ -トコフェロールの存在下で相乗的な抗酸化性を示すが, ケルセチンは相加的な抗酸化性を示すことを報告している。Hiramotoら<sup>12)</sup> は, 水相とヘキサン相からなる二相系での DPPH ラジカル消去活性測定系において, アスコルビン酸と $\alpha$ -トコフェロールの混合は相乗効果を示すものの, カテキン類やフラノン類などは相乗効果を示さないとしている。一方, Murakamiら<sup>13)</sup> は, DPPH-HPLC法とリポソーム酸化の2つの試験系を用いたところ, エピガロカテキンガレート, エピカテキンガレート, ケルセチンは $\alpha$ -トコフェロール存在下において DPPH-HPLC法では相加的な抗酸化性を示すが, リポソーム酸化系では相乗的な抗酸化性を示すことを明らかにしている。組み合わせは無数であり, 詳細な報告はあまり無いが, 成分間の相互作用の有無は試料濃度および選択する抗酸化試験法に依存すると考えられている。

そこで, 本研究では既存添加物名簿収載品目リストに収載されている単一からなる酸化防止剤 11 種の 2 成分混合系 (55 通り) における抗酸化効果を DPPH ラジカル消去活性を用いて 2 つの濃度レベルで検討した。さらに, 構造活性相関およびその他の成分影響の観点から, 安息香酸類, 桂皮酸類, フラボノイド類, ビタミン類, ジテルペン類の 24 種の抗酸化成分を用い, その組み合わせ (276 通り) での抗酸化効果も併せて検討した。

## 実験方法

### 1. 試薬

DPPH は和光純薬工業製を用いた。単一の化合物からな

る酸化防止剤 11 種: BHA, BHT, (+)-カテキン (CT), ケルセチン (QC), *trans*-フェルラ酸 (Fer), 没食子酸 (GA), モリン (MO), セサモール (SM) は東京化成製, D- $\alpha$ -トコフェロール (aTOC) は MP Biochemical 製, D- $\alpha$ -トコフェロール (dTOC), エラグ酸 (EA) は Sigma 製を用いた。安息香酸類 4 種; p-ヒドロキシ安息香酸 (pHyB), バニリン酸 (VA), プロトカテク酸 (PA) と没食子酸を, 桂皮酸類 3 種; カフェ酸 (Caf), p-クマル酸 (pCou) とフェルラ酸を, フラボノイド類 12 種; アピゲニン (AG), ルテオリン (LT), ケンフェロール (KM), ケルセチン, モリン, ミリセチン (MC), ルチン (RT), フィセチン (FT), タキシフォリン (TX) シアニジン (CY), ペラルゴニン (PG) とカテキンを, ビタミン類 2 種; アスコルビン酸 (AA) と $\alpha$ -トコフェロールを, ジテルペン類 3 種; ロスマリン酸 (Ros), カルノシン酸 (CarA), カルノソール (Car) は和光純薬工業, 東京化成, フナコシあるいは Sigma 社より購入した。その他の試薬は市販の特級試薬を, 水は Milli-Q 水を用いた。

### 2. DPPH ラジカル消去活性測定法

前報<sup>4)</sup> に準じて行った。すなわち, エタノールに溶解した試料 200  $\mu$ l に 0.1 mol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800  $\mu$ l, 0.2 mmol/l DPPH-エタノール溶液 1 ml を順次添加し, 10 秒間攪はん後, 室温暗所下にて 30 分間放置した。その後, 517 nm の吸光度 ( $A_s$ ) 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 (Ac) として, 試料の消去率を以下の式で求めた。また, 50% 消去率を与える試料溶液の濃度を  $IC_{50}$ , 25% 消去率を与える試料濃度を  $IC_{25}$  とした。

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

### 3. 2 成分混合系の評価

終濃度がそれぞれ  $IC_{50}$  値あるいは  $IC_{25}$  値の濃度になるように 2 成分の混合溶液を作成した。すなわち,  $IC_{50}$  値または  $IC_{25}$  値の 2 倍となる濃度溶液を調製し, 等量で混合した。この溶液を用いて, 上記方法にて DPPH ラジカル消去活性 ( $I_M$ ) を測定した。

一般的に DPPH ラジカル消去活性は調製した DPPH 濃度や反応時間に影響を受けることから, 標準物質としてトロロックスを同時に測定し, トロロックス等量 TEAC として規格化されることが多い。しかし, 本試験においては 2 成分間の影響を見ることを目的とするため, トロロックスでの規格化は行わず, 代わりに試料 A + 試料 B の混合物の活性測定と同時に, 毎回試料 A と試料 B (それぞれ 2 倍希釈) を測定することとした。

### 4. 予測値との比較

試料 A と試料 B の混合試料の消去率の予測値 ( $I_E$ ) は, 既報<sup>4)15)</sup> に従い, 以下の式で求めた。

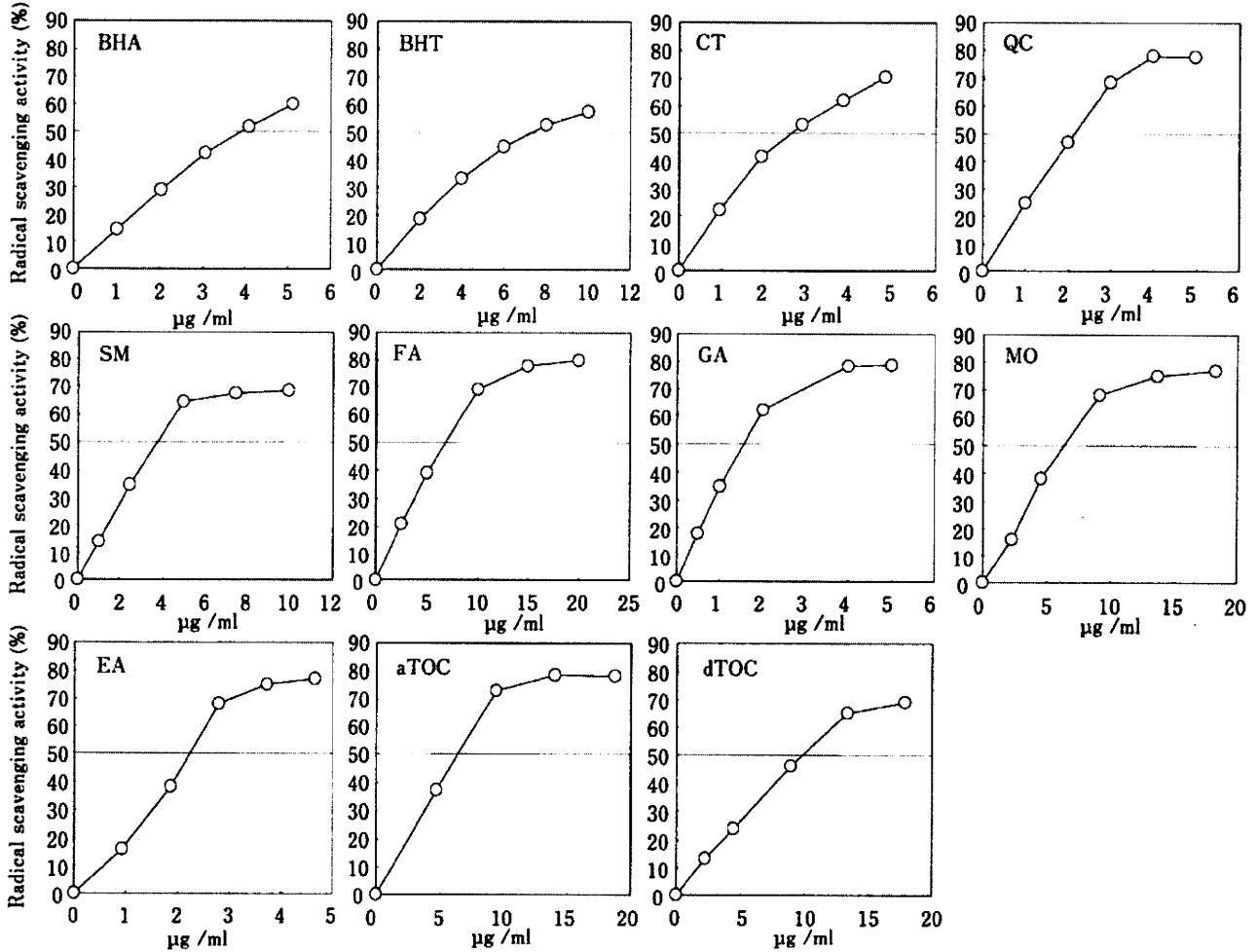


図1 酸化防止剤のDPPH 消去活性

$$I_E = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B / 100) \tag{2}$$

ここで  $I_A$  は試料 A の消去率、 $I_B$  は試料 B の消去率を示す。したがって、この予測値  $I_E$  と実測値  $I_M$  とを比較し、混合系の消去率に及ぼす影響を評価した。評価基準は、 $t$  検定により予測値  $I_E$  と実測値  $I_M$  の平均値の差の検定を行い、危険率 5% で差の有無を判定した。 $I_E/I_M$  比が 1 以上で有意差ありの場合を相乗効果、1 以下で有意差ありの場合を相殺効果、それ以外の場合を相加効果と判定した。なお、本実験は独立した系で最低 3 回繰り返して行い、 $I_E/I_M$  比が大きい (1.2 以上) あるいは小さい場合 (0.8 以下) は計 6 回繰り返して行った。

### 実験結果

#### 1. 各試料の DPPH ラジカル消去活性

各種酸化防止剤の DPPH ラジカル消去活性を図 1 に示す。本実験で用いた 11 種類の酸化防止剤の活性は、濃度依存的に上昇したが、消去率 60~70% を示す濃度以上から頭打ちを示す傾向が認められた。しかし、60% の消去率を

示す濃度までは相関係数 0.96 以上の直線性をもって DPPH ラジカルを消去した。そこで、本試験法を用いて 2 成分の混合系による評価を試みることにした。

#### 2. 50% 阻害濃度における混合系評価

まず、終濃度がそれぞれ  $IC_{50}$  値の濃度になるように 2 成分の混合溶液を作製し、11 種のすべての組み合わせ (55 通り) で DPPH ラジカル消去活性を測定した。表 1 に示すように、各混合系の組み合わせは 64.2% (dTOC と BHA) から 78.8% (aTOC と BHT) の範囲にあった。50% 阻害濃度の組み合わせによることから、混合物の阻害率は 100% 近い値を出すと思われたが、結果的には 75% 前後であり、混合物の阻害率は個々の阻害率の足し算にはならないと考えられた。一方、式 (2) においては、消去率 50% を示す 2 成分の混合試料の消去率は 75% を示すと予測される。したがって、本結果は予測値から大きく外れるものではなく、成分の混合による活性は、相加的に上昇すると考えられた。しかし、図 1 に示すように、DPPH 消去活性測定はいくつかの試料においては消去率 60~70% 以上で濃度依存的ではなく頭打ちを示すことから、高い消去率を示す濃度

表 1 酸化防止剤の 50% 消去濃度での 2 成分混合系における消去率 (%)

	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	BHA	BHT	CT	QC	SM	Fer	GA	MO	EA	aTOC	dTOC
BHA	3.89 $\pm$ 0.07	—	73.4 $\pm$ 0.4	69.5 $\pm$ 0.7	69.0 $\pm$ 0.9	66.1 $\pm$ 0.5	76.0 $\pm$ 0.7	68.9 $\pm$ 1.3	73.0 $\pm$ 0.7	76.3 $\pm$ 1.4	73.3 $\pm$ 0.7	64.2 $\pm$ 1.6
BHT	7.32 $\pm$ 0.13	—	—	75.9 $\pm$ 0.3	74.1 $\pm$ 1.6	70.3 $\pm$ 0.2	77.6 $\pm$ 0.4	73.9 $\pm$ 0.9	76.5 $\pm$ 1.2	76.9 $\pm$ 0.6	78.8 $\pm$ 0.2	72.3 $\pm$ 1.4
CT	2.63 $\pm$ 0.03	—	—	—	72.0 $\pm$ 2.5	70.8 $\pm$ 0.5	73.4 $\pm$ 0.9	66.4 $\pm$ 2.5	75.0 $\pm$ 1.8	78.4 $\pm$ 0.2	69.9 $\pm$ 1.4	65.6 $\pm$ 2.0
QC	2.13 $\pm$ 0.06	—	—	—	—	72.2 $\pm$ 0.2	76.0 $\pm$ 0.5	78.5 $\pm$ 1.6	78.7 $\pm$ 0.1	77.2 $\pm$ 1.5	66.8 $\pm$ 1.4	74.2 $\pm$ 0.4
SM	3.73 $\pm$ 0.01	—	—	—	—	—	74.1 $\pm$ 0.3	70.8 $\pm$ 0.4	74.1 $\pm$ 0.2	75.6 $\pm$ 0.4	63.7 $\pm$ 0.2	69.4 $\pm$ 1.3
Fer	6.80 $\pm$ 0.06	—	—	—	—	—	—	72.8 $\pm$ 1.0	76.6 $\pm$ 0.5	67.5 $\pm$ 1.4	67.3 $\pm$ 0.3	72.4 $\pm$ 1.4
GA	1.55 $\pm$ 0.04	—	—	—	—	—	—	—	76.5 $\pm$ 1.1	78.6 $\pm$ 0.3	70.7 $\pm$ 1.2	69.5 $\pm$ 1.6
MO	6.41 $\pm$ 0.41	—	—	—	—	—	—	—	—	78.5 $\pm$ 0.2	74.5 $\pm$ 1.7	77.2 $\pm$ 1.2
EA	2.24 $\pm$ 0.08	—	—	—	—	—	—	—	—	—	74.3 $\pm$ 0.2	76.9 $\pm$ 0.1
aTOC	6.37 $\pm$ 0.10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	67.1 $\pm$ 2.5
dTOC	9.89 $\pm$ 0.17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

値は 3 回の繰り返し測定での平均値 $\pm$ 標準偏差で表示。

表 2 酸化防止剤の 25% 消去濃度での 2 成分混合系における消去率 (I<sub>M</sub>) と予測値 (I<sub>E</sub>)

	BHA		BHT		CT		QC		SM		Fer		GA		MO		EA		aTOC		dTOC		
	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	
BHA	—	—	58.0	55.3	51.6	51.1	53.2	49.7	58.2	56.1	58.3	54.2	56.4	53.7	56.9	53.5	53.6	50.0	51.8	48.2	56.2	53.1	
BHT	—	—	—	—	51.0	51.2	51.3	49.8	51.0	48.2	48.7	46.9	48.5	47.3	48.2	46.8	49.0	47.8	49.9	45.9	54.9	51.0	
CT	—	—	—	—	—	—	46.9	45.1	50.7	51.7	37.8	39.0	45.3	46.6	48.7	48.8	45.0	42.2	43.5	43.2	48.0	46.3	
QC	—	—	—	—	—	—	—	—	57.4	50.8	52.5	48.6	44.9	41.1	52.3	47.9	44.9	41.4	46.4	38.4	52.5	45.6	
SM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	52.0	43.5	46.5	44.0	49.0	43.4	52.8	45.1	51.3	44.1	57.6	49.0	
Fer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	48.5	43.9	47.5	40.4	38.4	42.5	45.9	41.5	51.6	46.6	
GA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	37.5	36.8	43.0	40.7	42.7	37.5	47.1	44.6	
MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	44.4	39.8	49.7	41.4	48.5	43.7	
EA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43.3	38.8	50.6	44.6
aTOC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49.1	42.5
dTOC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

値は 3 回あるいは 6 回の繰り返し測定での平均値で表示。

での混合系評価だけでは、2 成分間の影響を十分に反映しないと考えられた。そこで次に直線性の範囲内に入る IC<sub>25</sub>を示す濃度での混合系の評価を行った。

### 3. 25% 消去濃度における混合系評価

IC<sub>50</sub> 値を示す濃度の試料を調製後、これを等量で混合した 2 成分の混合溶液を作製し、11 種のすべての組み合わせ (55 通り) での活性を測定した。また、測定時の誤差を軽減するために、各試料の阻害率を混合試料と同時に毎回測定し、各試料の消去率 (式 (2) における I<sub>A</sub> および I<sub>B</sub>) を求めた。表 2 にすべての組み合わせの実測消去率 (I<sub>M</sub>) と予測消去率 (I<sub>E</sub>) を示す。概ね I<sub>M</sub> と I<sub>E</sub> は一致する傾向を示した。各組み合わせにおける平均値の差の有意差を判定した組み合わせを図 2 に示す。比の値が 1 以上で有意差ありの組み合わせは相乗効果、比の値が 1 以下で有意差ありの組み合わせは相殺効果と判定したところ、55 通りの組み合わせのうち、36 通りで相乗効果、1 通り (フェルラ酸とエラグ酸) で相殺効果が観察された。しかし、どちらの効果においてもその比は最大で 1.2 程度、最小で 0.9 程度であり、わずかに相乗効果を上回る、あるいは下回る程度であった。

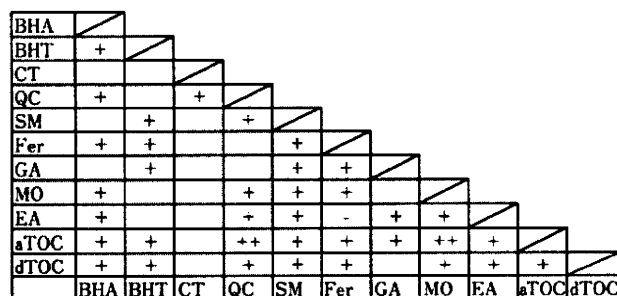


図 2 酸化防止剤の組み合わせによる DPPH ラジカル消去活性予測値に対する効果

- + : I<sub>M</sub>/I<sub>E</sub> の比が 1.0 以上 1.2 未満で有意差あり。
- ++ : I<sub>M</sub>/I<sub>E</sub> の比が 1.2 以上で有意差あり。
- : I<sub>M</sub>/I<sub>E</sub> の比が 0.8 以上 1.0 未満で有意差あり。

### 4. 他成分における混合系評価

検討した 11 種類の酸化防止剤の混合系における抗酸化効果が、わずかに相加効果を上回る、あるいは下回る程度であったことから、いくつかの他成分を用いて同様に検討した。すなわち、安息香酸類 4 種、桂皮酸類 3 種、フラボ

ノイド類12種、ビタミン類2種、ジテルペン類3種を用いて、計276通りの組み合わせにおけるDPPHラジカル消去活性を検討した。表3に各試料のIC<sub>50</sub>値を示す。活性の強弱を安息香酸類、桂皮酸類、フラボノイド類でみると、フェノール性水酸基の数に依存しており、これらについては明らかにされている構造活性相関<sup>6)</sup>と一致する。次に得られた値を参考に、これらの組み合わせの活性に及ぼす影響について検討した。なお、pHyBとAGは本条件ではほとんど活性を示さなかった(pHyBの消去率%：50μg/ml, 2.0%；100μg/ml, 3.0%；200μg/ml, 3.8%；300μg/ml, 4.7%；500μg/ml, 5.7%、AGの消去率%：20μg/ml, 2.6%；40

μg/ml, 5.4%；60μg/ml, 7.3%；80μg/ml, 8.9%；100μg/ml, 12.1%)が、それぞれ100μg/mlおよび10μg/mlとなるように調製し、混合試験に供することとした。また、図2と一部重なる組み合わせ(GA, Fer, QC, MO, CT, aTOCの15通り)については、新たに測定することとした。全組み合わせによる実測消去率と予測消去率を表4に、また混合による活性予測値に対する効果を図3に示す。276通りの組み合わせのうち、74通りで相乗効果、61通りで相殺効果が観察され、半数は相加的であった。しかし、表3と同様、相乗および相殺効果は弱く、I<sub>M</sub>/I<sub>E</sub>比が1.2以上を示した組み合わせは14通り、I<sub>M</sub>/I<sub>E</sub>比が0.8以下を示した組み合わせは33通りであった。1.2以上の組み合わせのうち、6通りはaTOCとの組み合わせ、4通りはPAとの組み合わせであり、0.8以下の組み合わせのうち、17通りはVAとの組み合わせ、12通りはpCouとの組み合わせであった。

表3 使用した抗酸化物質のIC<sub>50</sub>値

	IC <sub>50</sub> (μg/ml)		IC <sub>50</sub> (μg/ml)
pHyB	>500	MC	2.58±0.08
VA	12.8±0.28	RT	7.10±0.07
PA	2.14±0.01	FT	2.42±0.04
GA	1.63±0.04	TX	4.04±0.04
pCou	125±6.5	CY	2.88±0.07
Fer	6.58±0.14	PG	8.17±0.40
Caf	2.96±0.06	CT	2.57±0.02
AP	>500	AA	4.84±0.05
LT	3.60±0.07	aTOC	10.4±0.02
KM	9.09±0.03	Ros	2.84±0.01
QC	2.36±0.01	CarA	4.77±0.05
MO	6.18±0.02	Car	6.81±0.11

値は3回の繰り返し測定での平均値±標準偏差で表示。

考 察

全組み合わせのうち、α-トコフェロール(aTOC)との組み合わせだけを見ると、多くの化合物と相乗効果を示し、アスコルビン酸(AA)との組み合わせでは活性は約1.24倍に増強した。一方、aTOCとフラボノイドとの組み合わせをみると、相乗効果が認められたものはルテオリン(LT)、ケンフェロール(KM)、ケルセチン(QC)、モリン(MO)、フィセチン(FT)との組み合わせであり、その他(アピゲニン(AP)、ミリセチン(MC)、ルチン(RT)、タキシフォリン(TX)、シアニジン(CY)、ペラルゴニジン(PG)、カ

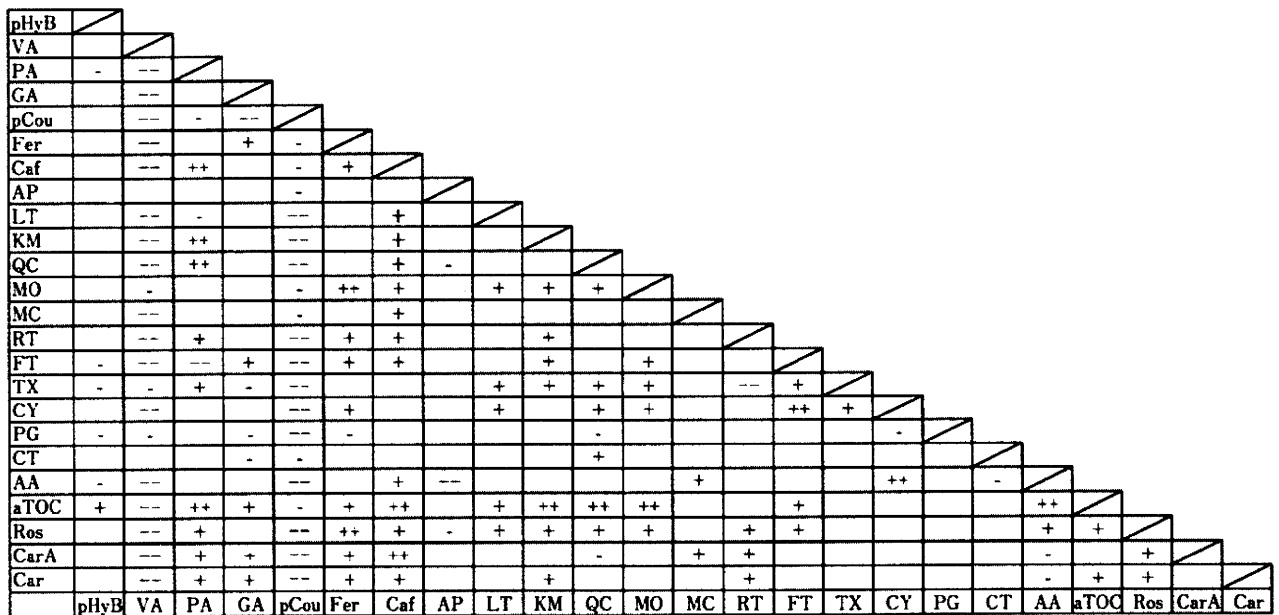


図3 24種の抗酸化物質の組み合わせによるDPPHラジカル消去活性予測値に対する効果

- + : I<sub>M</sub>/I<sub>E</sub>の比が1.0以上1.2未満で有意差あり。
- ++ : I<sub>M</sub>/I<sub>E</sub>の比が1.2以上で有意差あり。
- : I<sub>M</sub>/I<sub>E</sub>の比が0.8以上1.0未満で有意差あり。
- : I<sub>M</sub>/I<sub>E</sub>の比が0.8未満で有意差あり。



表 4 抗酸化物質の 25% 消去濃度での 2 成分混合系における消去率 (I<sub>M</sub>) と予測値 (I<sub>E</sub>)

	pHyB		VA		PA		GA		pCou		Fer		Caf		AP		LT		KM		QC		MO			
	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>		
pHyB	—	—	33.5	35.4	18.7	20.6	27.2	25.1	30.2	29.3	21.8	21.9	26.8	23.9	0.0	0.0	18.0	17.2	29.5	28.4	26.2	27.6	23.0	21.2		
VA	—	—	—	—	30.8	50.7	34.0	53.0	40.1	54.9	34.3	49.6	30.7	52.4	36.7	32.8	35.0	45.3	33.4	52.5	36.4	47.8	37.5	46.5		
PA	—	—	—	—	—	—	41.8	38.8	35.2	43.9	46.5	42.2	50.7	40.7	23.6	24.9	37.0	39.3	53.0	42.8	46.4	36.4	45.4	41.6		
GA	—	—	—	—	—	—	—	—	34.9	45.5	48.5	43.9	44.5	41.6	23.2	24.0	36.0	36.2	46.0	45.3	44.9	41.1	37.5	39.2		
pCou	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.7	44.0	38.2	45.0	29.8	31.8	31.3	41.5	35.9	51.2	39.8	51.2	35.5	44.3		
Fer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45.7	39.6	21.5	19.8	41.8	39.7	46.8	43.5	40.1	38.5	49.2	40.4		
Caf	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29.8	32.5	38.8	35.0	57.7	51.2	59.5	51.4	48.6	41.0		
AP	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	31.9	34.7	30.5	28.7	17.9	21.2	33.5	35.0		
LT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43.0	41.9	50.1	48.5	67.6	57.6
KM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	44.9	44.3	49.1	43.6
QC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	54.1	48.8
MO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

	MC		RT		FT		TX		CY		PG		CT		AA		aTOC		Ros		CarA		Car	
	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>
pHyB	20.6	20.2	21.7	21.5	24.1	29.0	25.0	27.9	24.8	24.2	17.4	21.7	20.2	21.9	21.7	24.7	22.0	19.3	27.3	25.8	24.1	24.4	31.0	30.8
VA	32.9	45.5	31.7	47.4	36.8	46.6	40.5	45.0	35.0	49.1	39.4	44.9	41.3	44.1	33.1	47.4	33.5	43.6	34.3	52.1	33.7	50.7	27.3	49.2
PA	40.7	37.7	45.3	40.1	20.3	39.6	61.3	55.3	46.3	45.1	40.7	41.5	42.5	40.4	48.8	44.5	51.7	40.6	59.7	51.2	60.1	50.3	59.1	49.6
GA	39.7	36.1	40.8	42.9	45.6	39.6	41.1	46.3	42.4	43.2	36.6	39.4	37.0	43.2	40.4	41.6	42.7	37.4	45.5	43.4	47.5	42.3	56.3	48.4
pCou	36.4	43.5	35.4	45.2	38.5	52.4	38.6	50.6	34.6	49.4	33.8	44.2	36.7	45.5	16.9	47.5	35.0	43.7	39.3	49.4	38.4	48.4	40.4	51.8
Fer	36.2	35.3	42.8	38.7	46.0	41.8	40.6	42.5	44.1	38.5	36.0	40.0	37.8	39.0	49.3	47.6	52.2	43.9	57.5	41.5	46.2	40.3	52.1	46.5
Caf	45.1	40.0	49.1	42.2	46.8	43.0	45.1	40.6	49.7	49.3	40.6	42.4	42.9	42.5	47.1	41.5	46.5	37.5	57.5	49.4	58.5	48.4	58.6	49.4
AP	17.4	14.7	21.2	20.7	24.1	25.5	28.8	27.8	15.6	15.6	20.8	22.0	32.0	31.7	12.5	20.6	20.1	20.7	26.2	27.9	22.1	25.7	31.1	32.6
LT	31.3	30.8	37.4	35.0	47.2	46.5	61.3	52.8	48.6	44.9	35.5	35.9	55.0	55.4	33.1	36.5	39.9	36.4	43.7	41.3	40.8	39.5	39.5	39.1
KM	36.5	35.9	45.0	41.9	50.3	43.0	46.1	41.7	51.1	49.4	43.6	41.8	44.5	48.0	44.9	45.0	51.5	41.1	53.2	46.7	49.6	45.7	59.6	50.8
QC	36.3	33.7	40.1	38.3	38.4	35.5	50.9	43.1	38.3	33.5	34.0	38.1	51.3	46.2	43.5	42.6	46.4	38.4	51.0	44.0	36.4	42.2	42.5	41.1
MO	35.4	32.9	49.6	45.3	52.5	46.8	59.9	53.1	48.8	45.1	38.0	38.5	56.7	55.6	48.2	45.3	49.7	41.4	50.1	42.5	43.0	40.8	43.3	43.8

	MC		RT		FT		TX		CY		PG		CT		AA		aTOC		Ros		CarA		Car					
	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>	I <sub>M</sub>	I <sub>E</sub>				
MC	—	—	35.8	33.0	34.9	32.5	37.7	35.6	28.5	30.0	33.0	35.2	37.4	36.6	43.0	38.2	38.4	34.7	33.2	31.1	39.9	34.7	36.8	40.4				
RT	—	—	—	—	38.4	36.9	17.2	34.3	41.7	38.2	37.2	38.0	36.6	36.1	36.9	39.7	43.7	39.8	47.5	41.0	45.5	39.9	48.5	44.7				
FT	—	—	—	—	—	—	46.6	40.9	39.1	30.9	36.0	36.5	45.7	44.1	35.6	39.0	45.6	39.1	46.7	42.6	43.2	40.9	45.1	42.3				
TX	—	—	—	—	—	—	—	—	45.5	39.1	38.0	38.5	41.1	40.7	38.8	42.7	49.2	42.8	44.3	41.0	40.7	39.1	44.9	43.0				
CY	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	37.6	41.4	44.5	42.4	49.4	39.8	35.2	34.6	39.2	37.1	43.4	40.6	50.1	48.1				
PG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	36.4	37.0	39.7	42.1	38.6	37.8	48.7	46.1	39.7	38.1	38.7	42.4				
CT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.0	43.1	43.5	43.2	42.4	42.7	38.5	40.9	38.1	40.3				
AA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	43.1	34.6	56.4	47.1	36.7	40.1	42.5	47.0				
aTOC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49.0	43.1	44.4	41.3	49.8	45.0			
Ros	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	48.4	43.8	59.2	53.4
CarA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	44.4	44.1	

値は 3 回あるいは 6 回の繰り返し測定での平均値で表示。なお、IC<sub>50</sub> 値が得られなかった pHyB は 100 μg/ml, AP は 10 μg/ml の濃度で使用した。

テキン (CT)) とは相加的であった。また、AA とフラボノイドとの組み合わせをみると、相乗効果が認められたものは MC と CY, 相殺効果が認められたものは AP と CT であり、その他はすべて相加的であった。Murakami ら<sup>15)</sup> は DPPH-HPLC 法を用いて aTOC あるいは AA と 15 種のフラボノイドをそれぞれ 10 μM で混合し、各活性値の和

と混合物の活性値を比較して、aTOC とフラボノイド間、AA とフラボノイド間では相加的であったことを明らかにしている。Murakami らの結果と比較しうるフラボノイド 5 種 (QC, KM, RT, CY, CT) 10 通りを比較すると、aTOC vs QC, aTOC vs KM, AA vs CY, AA vs CT の 4 つの組み合わせで結果が異なっていた。しかし、Murakami ら



の方法とは ①同一の濃度での検討と同一の活性値 ( $IC_{25}$ )での検討, ②予測活性値の算出の違いの点で大きく異なる。著者らは, 50%の消去率同士を混ぜ合わせても100%にはならない点, 高濃度では活性値に頭打ちが認められる点, 活性が大きく異なる試料同士では濃度を統一することができない点から, 混合系の評価の判定に式(2)を用いた。ただ, 混合系での効果の判定は, 他にも解析方法がいくつか報告<sup>17)~19)</sup>されており, 今後他の解析方法による判断が必要であろう。

SaitoとKawabata<sup>20)</sup>はプロトカテック酸およびその類縁体とチオール類またはアミン類との相乗効果を明らかにし, プロトカテック酸のカテコール構造の再生が関与していることを報告している。本研究では, チオール類およびアミン類は使用していない。カテコール構造の有無から判断すると, 安息香酸類, 桂皮酸類, KM, QC, MOおよびCY, PGなどの比較は何らかの情報を与えてくれると考えられるが, カテコール構造の有無による影響を述べるには更なる検討が必要であろう。すなわち, 単一の化合物の活性評価においては, 理に適った構造活性相関が観察されているにも関わらず, 2成分間の混合効果を比較するとあまり構造には基づいておらず, この点からも, 複数の解析による判断が必要であることが推察される。

本結果から組み合わせの約半数は相加的であり, また相乗効果および相殺効果が認められた組み合わせにおいても, その多くは相加効果をわずかに上回る, あるいは下回る程度であることが明らかとなった。須田ら<sup>21)</sup>は66種類の果実・野菜の抽出液のDPPHラジカル消去活性とポリフェノール含量を測定し, 可食部あるいは未利用部のアセトンと80%エタノール抽出液の活性総和と含量の間に, 相関係数としてそれぞれ0.947あるいは0.964と高い相関を有していることを明らかにしている。活性と含量の間における高い相関は, 抗酸化物質間に起きる効果の打ち消し, あるいは効果を検知しないことを示唆する。Murakamiら<sup>13)</sup>はリボソーム酸化系では相乗効果を示した組み合わせもDPPH-HPLC法では相加的な抗酸化性を示すことを報告している。今回の我々の結果やこれらの報告を考慮すると, DPPHラジカル消去活性測定法は抗酸化物質間に起こる効果を検知しにくいかもしれない。今後, 濃度依存性も含めて更なる検討が必要であろう。

## 要 約

DPPHラジカル消去活性測定法を用いて, 2成分間の活性に及ぼす効果(相乗効果, 相加効果, 相殺効果)について検討した。11種の酸化防止剤55通りの組み合わせでは, 36通りにおいて統計上相乗効果, 1通りで相殺効果と判定される結果が得られた。一方, 24種の化合物276通りの組み合わせ(うち15通りは重複)では, 74通りにおいて相乗効果, 61通りで相殺効果が得られた。しかし, これらの多

くの組み合わせによる効果は弱く, 相加効果をわずかに上回る, あるいは下回る程度であり, 2割以上の活性増強が認められた組み合わせは14通り, 2割以下の活性低下が認められた組み合わせは33通りであった。一方,  $\alpha$ -トコフェロールとの組み合わせのうち6通りで, *p*-クマル酸との組み合わせのうち4通りで2割以上の活性増強が観察され, バニリン酸との組み合わせのうち17通りで, *p*-クマル酸との組み合わせのうち12通りで2割以下の活性低下が観察された。

本研究の一部は, 平成18年度, 平成19年度厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)により行われた。

## 文 献

- 1) 食品・食品添加物等規格基準(抄), 食衛誌, 49, J119-J156 (2008).
- 2) Tada, A., Jin, Z.-L., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T. and Tanamoto, K., Analysis of the constituents in Jojoba wax used as a food additive by LC/MS/MS. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 46, 198-204 (2005).
- 3) Sugimoto, N., Noike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T. and Tanamoto, K., Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add. Contam.*, 24, 799-806 (2007).
- 4) 島村智子, 松浦理太郎, 徳田貴志, 杉本直樹, 山崎 壮, 松藤 寛, 松井利郎, 松本 清, 受田浩之, 酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験, 食科工, 54, 482-487 (2007).
- 5) Plumb, G.W., Lambert, N., Chambers, S.J., Wanigatunga, S., Heaney, R.K., Plumb, J.A., Aruoma, O.I., Halliwell, B., Miller, N.J. and Williamson, G., Are the extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetable antioxidants? *Free Rad. Res.*, 25, 75-86 (1996).
- 6) Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I. and Lajolo, F.M., Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2928-2935 (2005).
- 7) Dasgupta, N. and De, B., Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chem.*, 101, 471-474 (2007).
- 8) Packer, J.E., Slater, T.F. and Willson, R.L., Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278, 737-738 (1979).
- 9) Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. and Gotoh, N., Interaction among vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.*, 6, 1322S-1326S (1995).
- 10) Hamilton, I.M.J., Gilmore, W.S., Benzie, I.F.F., Mulholland, C.W. and Strain, J.J., Interactions between vitamins C and E in human subjects. *Br. J. Nutr.*, 84, 261-267 (2000).
- 11) Pekkarinen, S.S., Heinonen, I.M. and Hopia, A.I., Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *J. Sci. Food. Agric.*, 79, 499-506 (1999).
- 12) Hiramoto, K., Miura, Y., Ohnuki, G., Kato, T. and Kikugawa, K., Are water-soluble natural antioxidants syn-

- ergistic in combination with  $\alpha$ -tocopherol? *J. Oleo. Sci.*, **51**, 569-576 (2002).
- 13) Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H. and Matoba, T., Effects of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol on antioxidant activity of polyphenolic compounds. *J. Food Sci.*, **68**, 1622-1625 (2003).
- 14) Webb, J.L., Effect of more than one inhibitor. In "Enzyme and metabolic Inhibitors," Vol. 1, (Academic press, New York), pp. 66-79, 488-512 (1963).
- 15) Shi, J., Qu, Q., Kakuda, Y., Xue, S. J., Jiang, Y., Koide, S. and Shim, Y. -Y., Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *J. Food Comp. Anal.*, **20**, 603-608 (2007).
- 16) Rice-Evans, C., Miller, N.J. and Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biol. Med.*, **20**, 933-956 (1996).
- 17) Chou, T.C. and Talalay, P., Quantitative analysis of dose-effect relationships : the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27-55 (1984).
- 18) Berenbaum M.C. (1985) The expected effect of a combination of agents : The general solution. *J. Theor. Biol.*, **114**, 413-431 (1985).
- 19) Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M. and Perry, E.K., Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol. Biochem. Behavior*, **75**, 661-668 (2003).
- 20) Saito, S. and Kawabata, J., Synergistic effects of thiols and amines on antiradical efficiency of protocatechuic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 8163-8168 (2004).
- 21) 須田郁夫, 沖 智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一, 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, *食科工*, **52**, 462-471 (2005).
- (平成 20 年 8 月 20 日受付, 平成 20 年 12 月 3 日受理)

## 報 文

## 定量 NMR を用いたコチニール色素中のカルミン酸の絶対定量

(平成 21 年 9 月 10 日受理)

杉本直樹<sup>1,\*</sup> 多田敦子<sup>1</sup> 末松孝子<sup>2</sup> 有福和紀<sup>2</sup> 齋藤 剛<sup>3</sup>  
井原俊英<sup>3</sup> 吉田雄一<sup>4</sup> 久保田領志<sup>1</sup> 田原麻衣子<sup>1</sup> 清水久美子<sup>1</sup>  
伊藤澄夫<sup>5</sup> 山崎 壮<sup>1</sup> 河村葉子<sup>1</sup> 西村哲治<sup>1</sup>

## Absolute Quantification of Carminic Acid in Cochineal Extract by Quantitative NMR

Naoki SUGIMOTO<sup>1,\*</sup>, Atsuko TADA<sup>1</sup>, Takako SUEMATSU<sup>2</sup>, Kazunori ARIFUKU<sup>2</sup>, Takeshi SAITO<sup>3</sup>,  
Toshihide IHARA<sup>3</sup>, Yuuichi YOSHIDA<sup>4</sup>, Reiji KUBOTA<sup>1</sup>, Maiko TAHARA<sup>1</sup>, Kumiko SHIMIZU<sup>1</sup>,  
Sumio ITO<sup>5</sup>, Takeshi YAMAZAKI<sup>1</sup>, Yoko KAWAMURA<sup>1</sup> and Tetsuji NISHIMURA<sup>1</sup>

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

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

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

<sup>4</sup>Wako Pure Chemical Industries, Ltd.: 3-1-2 Doshomachi, Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan;

<sup>5</sup>San-Ei Gen F.F.I., Inc.: 1-4-9 Hirano-cho, Chuo-ku, Osaka 540-8688, Japan;

\* Corresponding author

A quantitative NMR (qNMR) method was applied for the determination of carminic acid. Carminic acid is the main component in cochineal dye that is widely used as a natural food colorant. Since several manufacturers only provide reagent-grade carminic acid, there is no reference material of established purity. To improve the reliability of analytical data, we are developing quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR), based on the fact that the intensity of a given NMR resonance is directly proportional to the molar amount of that nucleus in the sample. The purities and contents of carminic acid were calculated from the ratio of the signal intensities of an aromatic proton on carminic acid to nine protons of three methyl groups on DSS-*d*<sub>6</sub> used as the internal standard. The concentration of DSS-*d*<sub>6</sub> itself was corrected using potassium hydrogen phthalate, which is a certified reference material (CRM). The purities of the reagents and the contents of carminic acid in cochineal dye products were determined with SI-traceability as 25.3–92.9% and 4.6–30.5% based on the crystalline formula, carminic acid potassium salt trihydrate, which has been confirmed by X-ray analysis. The qNMR method does not require a reference compound, and is rapid and simple, with an overall analysis time of only 10 min. Our approach thus represents an absolute quantitation method with SI-traceability that should be readily applicable to analysis and quality control of any natural product.

(Received September 10, 2009)

**Key words:** カルミン酸 carminic acid; コチニール色素 cochineal dye; 絶対定量 absolute quantitation; 2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸-*d*<sub>6</sub> ナトリウム塩 DSS-*d*<sub>6</sub>; 定量 NMR qNMR

## 緒 言

コチニール色素 (Cochineal extract) は、天然由来の赤色素の 1 つであり、食品添加物として使用されている。食品添加物公定書には、「エンジムシ (*Dactylopius coccus* Costa (*Coccus cacti* Linnaeus)) から得られた、カルミン

酸 (carminic acid) を主成分とするものである」とその基原が定義されている<sup>1)</sup>。現在、食品添加物公定書では、コチニール色素の品質規格として色価測定法により求められた色価 (色素濃度: 可視部での極大吸収波長における吸光度を測定し、10 w/v% 濃度の吸光度に換算した値 ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ))

## \* 連絡先

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 日本電子株式会社: 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 1-18-1

<sup>3</sup> 独立行政法人 産業技術総合研究所 計量計測研究部門:  
〒305-8663 つくば市梅園 1-1-1 中央第 3

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

<sup>5</sup> 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社: 〒540-8688 大阪市中央区平野町 1-4-9

が規定されている<sup>1)</sup>。色価測定法は、天然由来の色素中の色素成分の全体量を簡便に推定することができ、品質規格試験としては非常に有用である。事実、色価測定法による品質規格は、他の天然由来の色素にも採用されており、これは、天然由来の色素の組成が一般的に単一ではなく多成分から構成されていることに加えて、それらすべての定量用標準品を入手することも不可能であるため、含まれている色素成分ごとに正確な濃度を測定して規格化することができないからでもある。しかし、色価測定法では、仮に天然着色料に主たる色素成分以外の他の色素や不純物が混入していたとしても、それを判別できないだけでなく、食品に添加した天然着色料の色素量をそれぞれ正確に求めることができないという欠点がある。

一方、食品中の天然由来の添加物や着色料の分析には、主として分離能の優れた HPLC<sup>2)~4)</sup>、LC/MS<sup>5)</sup> や TLC による一斉分析<sup>6)</sup>が実施されている。クロマトグラフ法は、純度または濃度既知の定量用標準品に対する測定対象のピーク面積比から正確な定量値が求められるものであり、測定対象の定量用標準品が入手できない場合、正確な定量分析ができない。しかし、天然由来の添加物や着色料の定量用標準品はほとんど流通していないため、定量用標準品が入手不可能な場合、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分析が行われており、代用品とした化合物の純度が正確に決定されていない以上、この方法で得られた分析結果の信頼性は非常に低いと言える。この問題を抜本的に解決すれば、クロマトグラフ法による食品中の天然由来の添加物や着色料などの正確な定量分析が可能となり、食品分野の分析値の信頼性も飛躍的に向上すると思われる。

このような背景から、我々は、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、NMR を用いた定量法 (quantitative NMR (qNMR)) の開発を行っている<sup>7)~10)</sup>。qNMR は、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル上に観察される化合物のシグナル面積比が分子中の個々の置換基上のプロトン数に比例することを利用して、2 つの化合物が同時に存在する場合、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求められる。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、別の標準物質を基準として定量分析が可能な絶対定量法であり、SI にトレーサブルな一次標準測定法のうち、一次標準比率法、すなわち「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」の資格を原理的に有する。本法を用いれば、あらゆる化合物の絶対量が計量学的に正確に求められるだけでなく、その応用範囲は非常に広い。

我々は、既報<sup>11)</sup>において、有機リン系農薬イソキサチオ

ンオキソン標準品の絶対定量に qNMR を応用し、計量学的に正確な純度を求め、市販標準品のロット間でもそれぞれ純度が異なる可能性を示した。

本研究では、qNMR のさらなる応用範囲の拡充を目的に、食品添加物コチニール色素製品およびその主色素のカルミン酸の含量測定と市販されているカルミン酸試薬製品について含量 (純度) 測定を行った。その結果、qNMR により、現在まで不可能であったコチニール色素製品およびカルミン酸市販試薬製品中のカルミン酸の絶対量を計量学的に正確に求めることが可能であることを初めて見いだした。また、本法は、迅速かつ簡便なだけでなく、得られた qNMR スペクトルデータが信頼性の高い品質管理に有効であると考えられた。

## 実験方法

### 1. 試薬および試料

高純度カルミン酸 (highly purified carminic acid) (試料 1) として大阪薬科大学薬学部馬場きみ江教授より分与していただいたものを用いた。なお、試料 1 は馬場ら<sup>12)</sup>により X 線結晶解析によりカルミン酸カリウム塩 3 水和物 (carminic acid potassium salt trihydrate (carminic acid  $-H^+ + K^+ + 3H_2O = C_{22}H_{19}O_{13}^- K^+ \cdot 3H_2O$ )) の化学構造が証明されたものである。また、カルミン酸市販試薬 7 製品 (試料 2~8) は各試薬メーカーより購入したものを、食品添加物用コチニール色素 4 製品 (試料 9~12) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社より分与していただいたものを用いた。実験に供した試料 1~12 の情報を Table 1 に示した。

水溶性 qNMR 基準物質として高純度 2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸-*d*<sub>6</sub> ナトリウム塩 (2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate-*d*<sub>6</sub> sodium salt (DSS-*d*<sub>6</sub>)) (和光純薬工業 (株) 特注品)、qNMR 測定用重溶媒として重水 (D<sub>2</sub>O) (Isotec 社製) 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 (certified reference material: CRM) (品番 NMIJ CRM 3001a: 純度 100.00 ± 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。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC): Agilent 1100 series (アジレント・テクノロジー (株) 製)

核磁気共鳴装置 (NMR): オートサンプラー付き JNM-ECA 600 (600 MHz) (日本電子 (株) 製)。qNMR のケミカルシフト値は、DSS-*d*<sub>6</sub> を基準シグナル (0 ppm) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。

### 3. HPLC による分析

試料 (1~12) 約 5 mg を量り取り水に溶解し、1.0 mg/mL に定容したものを HPLC 用試料とした。以下の条件