

**Table 1.** Sample information about carminic acid reagents and cochineal dye products

No. Sample type	Manufacturer	Catalog specification Content of carminic acid
Carminic acid		
1 Highly purified sample for X-ray analysis	Obtained from Dr. Baba (Osaka University of Pharmaceutical Sciences.)	—
2 Reagent	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	>70% (HPLC)
3 Reagent	Merck KGaA	>95% (Spectrophotometric)
4 Reagent	Sigma-Aldrich Co.	—
5 Reagent	Extrasynthese S.A.	—
6 Reagent	MP Biomedicals, LLC	95%
7 Reagent	Acros Organics	70~90%
8 Reagent (for analysis of food additive)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	—
Cochineal dye product		
9 Food additive (powder type)	San-Ei Gen F.F.I., Inc.	—
10 Food additive (powder type (low allergen))	San-Ei Gen F.F.I., Inc.	—
11 Food additive (powder type)	San-Ei Gen F.F.I., Inc.	—
12 Food additive (liquid type)	San-Ei Gen F.F.I., Inc.	—

の HPLC に付し、18.2 分に観察されたカルミン酸のピーク面積を求めた。HPLC 条件：注入量、5.0  $\mu$ L；カラム、Waters XTerra RP18 (2.1 $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m (Waters 社製))；カラム温度、40 $^{\circ}$ C；移動相、0.1%ギ酸水溶液：メタノール=95：5 (0 min) $\rightarrow$ 5：95 (25–30 min)；流量、0.2 mL/min；検出波長、490 nm。

#### 4. qNMR による分析

##### 4.1 qNMR 標準液の調製および DSS- $d_6$ の濃度校正

DSS- $d_6$  約 100 mg を精密に量り採り、D<sub>2</sub>O 50 mL に定容した。この溶液を D<sub>2</sub>O で 5 倍希釈したものを qNMR 標準液とした。qNMR 標準液中の DSS- $d_6$  の濃度 400.5  $\pm$  2.8  $\mu$ g/mL ( $n=3$ , AV  $\pm$  SD) を下記に従い、PHP により校正して求めた。すなわち、CRM の 1 つである PHP 約 30 mg を精密に量り採り、qNMR 標準液 1.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管 (5 mm  $\phi$   $\times$  200 mm, S-type (和光純薬工業(株)製)) に封入したものを DSS- $d_6$  濃度校正用試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し、PHP のフェニルプロトン PhH  $\times$  4 ( $\delta$  7.57 ppm, 7.72 ppm) および DSS- $d_6$  のメチル基プロトン CH<sub>3</sub>  $\times$  3 ( $\delta$  0 ppm) に由来するシグナル面積、分子量、濃度などを式 (1) に代入し、qNMR 標準液中の DSS- $d_6$  の濃度を校正した。

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

ただし、 $W_{DSS}$ ,  $W_{PHP}$  = DSS- $d_6$  および PHP の濃度 (mg/mL),  $M_{DSS}$ ,  $M_{PHP}$  = DSS- $d_6$  および PHP の分子量 (MW 224.36 および 204.22),  $I_{DSS}$ ,  $I_{PHP}$  = DSS- $d_6$  および PHP の特定基のシグナル面積,  $H_{DSS}$ ,  $H_{PHP}$  = DSS- $d_6$  および PHP の特定基のプロトン数 (DSS- $d_6$  = CH<sub>3</sub>  $\times$  3, PHP = PhH  $\times$  4),  $P_{PHP}$  = PHP の純度 (100.00%)。

##### 4.2 qNMR による純度測定

高純度カルミン酸 (試料 1), カルミン酸市販試薬 (試料 2~8), および食品添加物コチニール色素製品 (試料 9~12) をそれぞれ約 20 mg 精密に量り採り、あらかじめ

め調製した qNMR 用標準液 1.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し、DSS- $d_6$  のシグナル面積、カルミン酸に由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積、分子量、濃度などを式 (2) に代入し、カルミン酸 (CA) の純度 (含量) (w/w%) を算出した。

$$P_{CA} = \frac{I_{CA}/H_{CA}}{I_{DSS}/H_{DSS}} / \frac{M_{CA}/W_{CA}}{M_{DSS}/W_{DSS}} \times 100 \quad (2)$$

ただし、 $W_{DSS}$ ,  $W_{CA}$  = DSS- $d_6$  および CA の濃度 (mg/mL),  $M_{DSS}$ ,  $M_{CA}$  = DSS- $d_6$  および CA の分子量 (DSS- $d_6$  = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>D<sub>6</sub>NaO<sub>3</sub>SSi (MW 224.36) および carminic acid = C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>13</sub> (MW 492.39), carminic acid - H<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> + 3 H<sub>2</sub>O = C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>O<sub>13</sub><sup>-</sup> K<sup>+</sup>  $\cdot$  3 H<sub>2</sub>O (MW 584.53),  $I_{DSS}$ ,  $I_{CA}$  = DSS- $d_6$  および CA の特定基のシグナル強度面積,  $H_{DSS}$ ,  $H_{CA}$  = DSS- $d_6$  および CA の特定基のプロトン数 (DSS- $d_6$  = CH<sub>3</sub>  $\times$  3, CA = PhH  $\times$  1),  $P_{CA}$  = CA の純度 (含量) (w/w%)。

##### 4.3 qNMR 測定条件および解析処理

qNMR 測定条件の基本情報は Table 2 に示した。qNMR データ解析には、得られた FID データを定量解析ソフトウェア (日本電子(株)開発中) に導入して自動処理した。すなわち、このソフトウェア上で、qNMR データをフーリエ変換 (Window 関数: function = exponential, BF = 0.12 Hz, zero filling = 1, T1 = T2 = 0%, T3 = 90%, T4 = 100%) および自動位相調整を行い、DSS- $d_6$  および特定シグナルの積分範囲などを設定後、あらかじめ入力した DSS- $d_6$  および試料の濃度 (mg/mL), 分子量, 特定基のプロトン数などの化合物情報から自動解析処理を行い、純度 (含量) (w/w%) を式 (2) に従い算出した。

#### 結果および考察

##### 1) HPLC による分析

高純度カルミン酸 (試料 1), カルミン酸市販試薬製品 (試料 2~8) および食品添加物コチニール色素市販製品

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	45°
Pulse delay	30 s (>5*T <sub>1</sub> )
Scan time	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	25°C
Solvent	D <sub>2</sub> O
qNMR reference material	DSS-d <sub>6</sub>
Primary standard material	Potassium hydrogen phthalate (PHP) (NMIJ CRM3001a)

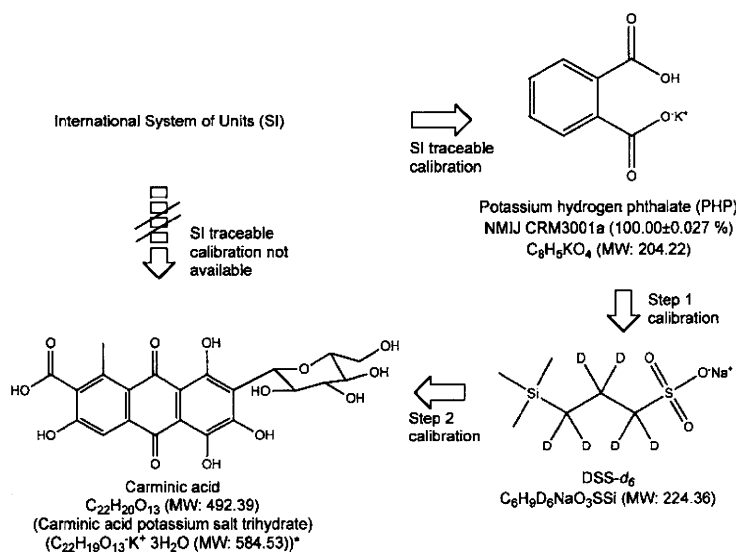


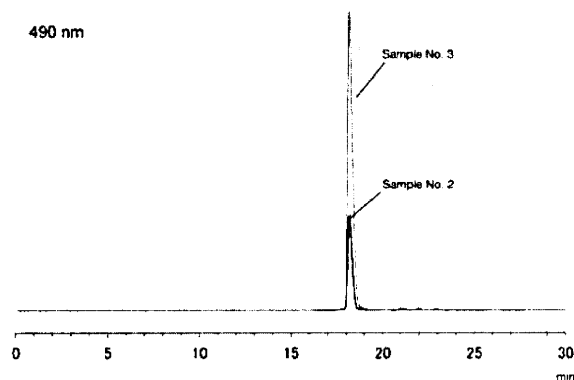
Fig. 1. Strategy of SI-traceable quantification based on qNMR

\* The crystalline formula was confirmed by X-ray analysis.

(試料 9~12) を HPLC に付したところ、検出波長 490 nm において、保持時間 18.2 分にカルミン酸に由来するピークのみが観察され、本条件において他に特筆すべきピークは観察されなかった。Fig. 2 には、その代表的なクロマトグラムとして市販試薬 (試料 2 および 3) の結果を示した。また、Table 3 にはカルミン酸のピーク面積を示した。市販試薬のカタログ成績値として、試料 2 は HPLC によるカルミン酸の含量 70% 以上、試料 3 は吸光度法により 95% 以上と記載されていた (Table 1)。両者の市販試薬製品に記載のカルミン酸の含量値が正しいとすれば、下記の関係式 (式 (A)) より、試料 3 中のカルミン酸含量比は試料 2 を 1 としたとき、1.4~1.0 と推定される。

$$\frac{\text{Content}_{\text{sample3}}}{\text{Content}_{\text{sample2}}} = \frac{95 \sim 100}{70 \sim 100} = 1.4 \sim 1.0 \quad (\text{A})$$

次に、同一化合物の同条件における HPLC のピーク面積の比はその絶対量の比に等しいことから、試料 2 および試料 3 に観察されたカルミン酸のピーク面積 (実測値) 比を求めた (式 (B))。

Fig. 2. Typical LC profiles of carminic acid reagents  
The LC conditions are described in the experimental section.

$$\frac{\text{Area}_{\text{sample3}}}{\text{Area}_{\text{sample2}}} = \frac{19189340}{6439525} = 3.0 \quad (\text{B})$$

式 (A) から求めた推定値が式 (B) から求めた実測値と一致しないことから、両者に記載されている含量値の少なくとも一方に誤りがあると予想された。含量値が記載されて

**Table 3.** Quantitation of carminic acid in different reagents and cochineal dye products, calculated from the content of carminic acid in the samples using qNMR, and the peak area on LC

No.	Sample type	LC peak area at 490 nm	qNMR	
			(% as carminic acid)	(% as carminic acid potassium salt trihydrate) <sup>a)</sup>
Carminic acid				
1	Highly purified sample	20682647	81.8	97.1
2	Reagent	6439525	21.3	25.3
3	Reagent	19189340	78.3	92.9
4	Reagent	21172301	68.3	81.1
5	Reagent	19028131	68.1	80.8
6	Reagent	20561664	77.2	91.6
7	Reagent	19521465	72.9	86.5
8	Reagent (for analysis of food additive)	7079698	24.4	29.0
Cochineal dye product				
9	Food additive (powder type)	5785440	21.6	25.6
10	Food additive (powder type (low allergen))	6519563	23.5	27.9
11	Food additive (powder type)	7006552	25.7	30.5
12	Food additive (liquid type)	1232696	3.9	4.6

a) The crystalline formula (carminic acid - H<sup>+</sup> + 3H<sub>2</sub>O + K<sup>+</sup>) was reported by Dr. Baba.

いた試料 6 および試料 7 についても同様に、推定値と実測値が一致せず、市販試薬に記載されている含量値がカルミン酸の絶対量を示すものではないことが示唆された。この結果は、天然由来の化合物では、たとえ測定対象の化合物の市販試薬が入手できたとしても試薬メーカーはその絶対量を保証しているわけではないという現状の問題を明確に示していた。したがって、コチニール色素製品中のカルミン酸含量は、いずれの市販試薬製品を定量用標準品の代用品としても、HPLC では正確に求められないことが確認された。

## 2) qNMR によるカルミン酸の絶対定量

qNMR による定量分析は、<sup>1</sup>H-NMR において観察されるそれぞれシグナル面積比が分子中の個々の置換基上の水素原子数の比に対応する特性を利用した方法である。2つのシグナルが異なる化合物 (A, B) に由来する場合には個々のシグナル面積と化合物の濃度は関係式 (3) で表すことができる。

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A m_A}{H_B m_B} = \frac{H_A W_A / M_A}{H_B W_B / M_B} \quad (3)$$

$$P_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / W_{\text{std}}} \times P_{\text{std}} \quad (4)$$

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

よって、A と B の化合物のうち、A として純度が明らかな基準物質 (std) を用いれば、モル比と溶液の調製値の関係から測定対象の化合物 B (sample) の含量 (純度) を決定できる関係式 (4) が成り立つ。qNMR による定量分析は、関係式 (4) を利用し、純度あるいは濃度が既知の基

準物質 (std) をあらかじめ加えた溶液中で測定対象の化合物 (sample) の <sup>1</sup>H-NMR 測定を行い、得られたスペクトル上に観察される基準物質 (std) と測定対象の化合物 (sample) に由来するシグナル面積、水素数および濃度比から定量値を算出する方法である。

qNMR による定量分析では、各シグナル面積の定量性を厳密に確保することが不可欠であるため、Table 2 に示す測定条件を設定した。また、qNMR 基準物質としては、既報<sup>11)</sup>においてヘキサメチルジシラン (hexamethyl disilane (HMD)) を報告したが、HMD は水に不溶であるため、多くの有機溶媒に不溶で水に可溶性カルミン酸の測定には適さない。そこで、水溶性の DSS-*d*<sub>6</sub> を qNMR 基準物質として採用した。また既報<sup>11)</sup>と同様に、qNMR による定量値の SI トレーサビリティを、Fig. 2 に示す方式で実現した。すなわち、計量学的に妥当な手順によって値付けされ、計量学的トレーサビリティが証明された認証標準物質 (CRM) の一つであるフタル酸水素カリウム (PHP) を一次標準として用い、qNMR 標準液中の DSS-*d*<sub>6</sub> の濃度を PHP により校正した後に、DSS-*d*<sub>6</sub> を二次標準として測定対象化合物の qNMR 測定を行う 2 段階の方式を用いることとした。

Fig. 3 には、qNMR 基準物質として DSS-*d*<sub>6</sub> を 0.4005 mg/mL 含む qNMR 標準液に高純度カルミン酸 (試料 1) を 12.36 mg/mL 溶解したものの実際のスペクトルを例として示した。δ 0 ppm に DSS-*d*<sub>6</sub> のメチル基、δ 1.9 ppm、δ 3.5~4.7 ppm および δ 6.6 ppm にカルミン酸の 8 位のメチル基 (8-Me)、C-グルコシル基 (C-Glc) およびアントラキノン骨格上の 5 位のフェニルプロトン (PhH)/(5-H) 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、他の不純物のシグナルと重ならないことが理想的である。また、一般的に NMR スペクトルでは、高磁場側よりも低磁場側のシグナルの方が化合

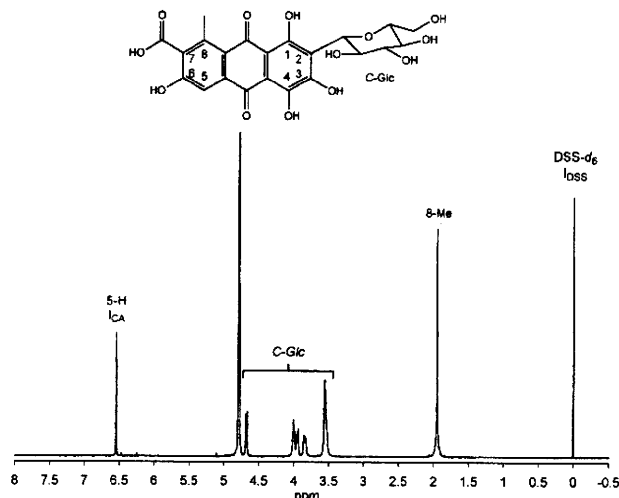


Fig. 3. qNMR profile of highly purified carminic acid sample (1)

The spectrum was obtained in  $D_2O$  containing  $DSS-d_6$  as a qNMR reference material. The concentrations of sample and  $DSS-d_6$  were 12.36 mg/mL and 0.4005 mg/mL, respectively. The intensities of target and reference signals were measured, and the values ( $I_{DSS}=9.00$ ,  $I_{CA}=11.51$ ), weights ( $W_{DSS}=0.4005$  mg/mL,  $W_{CA}=12.36$  mg/mL), number of protons ( $H_{DSS}=9$ ,  $H_{CA}=1$ ) and molecular weights ( $M_{DSS}=224.36$ ,  $M_{CA}=492.39$  (free form) or 584.53 (salt form)) were substituted into formula (2) to calculate the content (purity) (w/w%) in the sample.

物の骨格に特徴的なシグナルを示し、他の不純物のシグナルと重なってしまう危険性が低い。そこで、試料1~12を測定した結果、他の不純物や賦形剤とシグナル分離が最も良好であったPhH (5-H)を定量用シグナルとし、qNMR基準物質の $DSS-d_6$ およびカルミン酸のシグナル面積( $I_{DSS}$ および $I_{CA}$ )を測定し、それぞれの濃度( $W_{DSS}$ および $W_{CA}$ )、プロトン数( $H_{DSS}$ および $H_{CA}$ )、分子量( $M_{DSS}$ および $M_{CA}$ )を式(2)に代入して定量値を求めた。

Fig. 4には、今回測定したカルミン酸市販試薬(試料2~8)および食品添加物コチニール色素製品(試料9~12)のqNMRスペクトルを示した(Fig. 4)。試料3~7では $\delta$  1.9~2.2 ppmの範囲にメチル基(8-Me)、 $\delta$  6.5~6.7 ppmの範囲にPhH (5-H)、 $\delta$  3.5~4.7 ppmの範囲にC-Glc基のシグナルが観察され、高純度カルミン酸(試料1)とほぼ同一のスペクトルパターンを示した。また、試料2, 8~11は、賦形剤として用いたと推定されるデキストリンに由来するシグナルが $\delta$  3.3~5.4 ppmに観察され、試料12(液体試料)には、液化に用いたプロピレングリ

コールに由来するシグナル( $\delta$  1.1, 3.4, 3.5, 3.9 ppm)が観察された。試料2, 9, 12については、カルミン酸に由来するメチル基およびPhH (5-H)のシグナルの化学シフトが少し異なっていたが、これは夾雑物、賦形剤あるいはpH調整剤などの影響によるものと考えられた。また、本研究においては個々の賦形剤等の絶対量を定量していないが、qNMRでは、スペクトルデータそのものが定量性を伴っており、各シグナル面積を精査することにより、各製品の品質評価も可能であると考えられた。

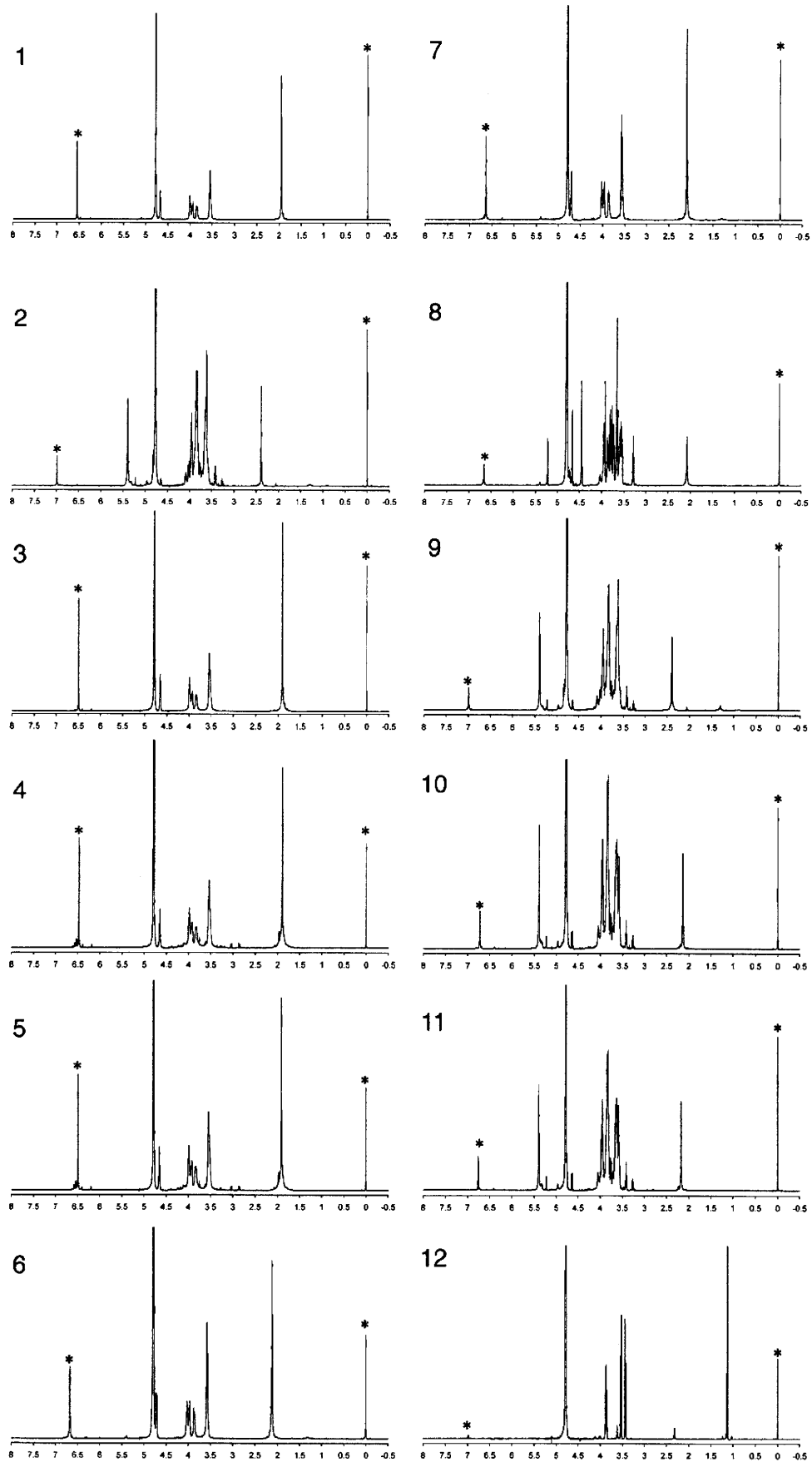
次に、これらの試料中のカルミン酸の含量(純度)を式(2)により算出した。その結果、カルミン酸(フリー体:  $C_{22}H_{20}O_{13}$  (MW 492.39))として、高純度カルミン酸(試料1)に81.8%、カルミン酸市販試薬7製品(試料2~8)に21.3~78.3%、コチニール色素4製品(CA9~12)に3.9~25.7%の含量が算出された。また、単離精製して得られた高純度カルミン酸(試料1)は、X線結晶解析よりカルミン酸カリウム塩3水和物(carminic acid potassium salt trihydrate)の化学構造を有することが報告されていることから<sup>12)</sup>、 $C_{22}H_{19}O_{13} \cdot K^+ \cdot 3H_2O$  (MW 584.53)として再計算したところ、高純度カルミン酸(試料1)に97.1%、カルミン酸市販試薬7製品(試料2~8)に25.3~91.6%、コチニール色素4製品(試料9~12)に4.6~30.5%の含量が算出された。高純度カルミン酸(試料1)中のカルミン酸カリウム塩3水和物(carminic acid potassium salt trihydrate)としての含量が97.1%とほぼ100%に近い値で算出されたことから、X線結晶解析の結果が正しいことが再確認された。

次に、今回測定した試料についてqNMRにより求められたカルミン酸の含量とHPLCピーク面積との相関関係を確認した。qNMRによりカルミン酸カリウム塩3水和物(carminic acid potassium salt trihydrate)として算出した含量を右軸に、LCピーク面積を左軸として、両者の関係を確認したところ、高い相関性が予想された(Fig. 5)。さらに、qNMRによる含量測定値とHPLCピーク面積の関係を求めたところ、両者の間に良好な正の相関( $R^2=0.997$ )が得られた(Fig. 6)。したがって、qNMRが幅広い含量(純度)範囲で絶対定量法として有効であり、計量学的に信頼性の高い分析値を導いていることが確認された。今回行ったqNMRによるカルミン酸の絶対定量は、試料を重溶媒に溶解して測定するだけで操作が単純である点、1測定当たりの所要時間が約10分以内で極めて迅速である点、測定対象の化合物と同一の定量用標準品を必要としない点が優れていた。

qNMRにより前もって値付けしたカルミン酸市販試薬

Fig. 4. qNMR profiles of all carminic acid samples (1-12) examined in this study

The spectra were obtained in qNMR solution ( $D_2O$ ) containing  $DSS-d_6$  ( $W_{DSS}=0.4005$  mg/mL). The sample concentrations ( $W_{CA}$  (mg/mL)) were as follows: 1=12.36, 2=27.16, 3=20.15, 4=26.56, 5=22.85, 6=18.52, 7=23.54, 8=25.03, 9=25.22, 10=26.16, 11=27.92, 12=37.15. The marked signals (\*) were used as target and reference signals, and the contents were calculated.



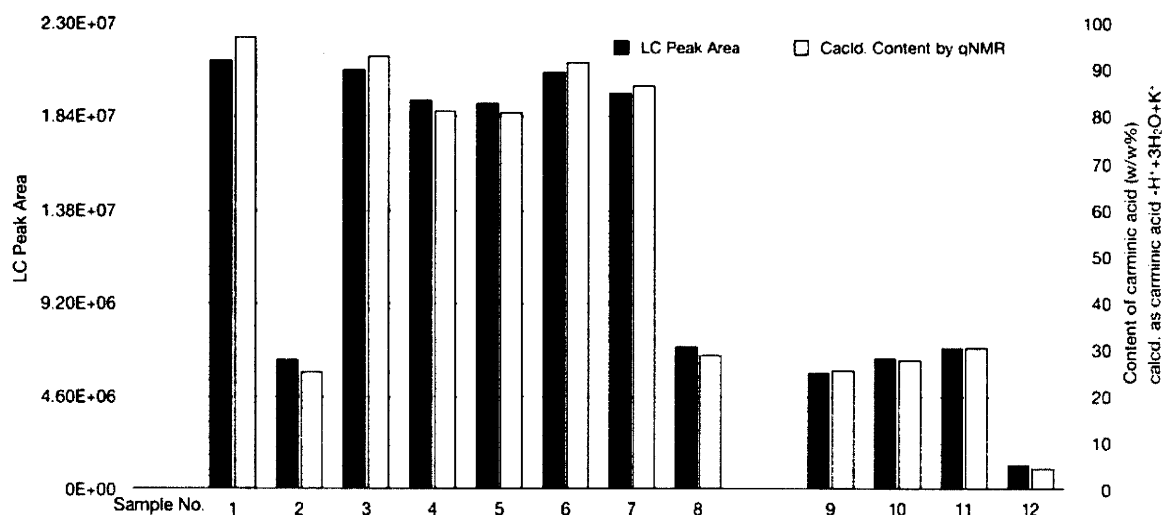


Fig. 5. Comparison between LC peak area and content of carminic acid in the reagents and cochineal dye products  
Sample No. 1 = highly purified carminic acid, Nos. 2-8 = reagents, Nos. 9-12 = cochineal dye products.

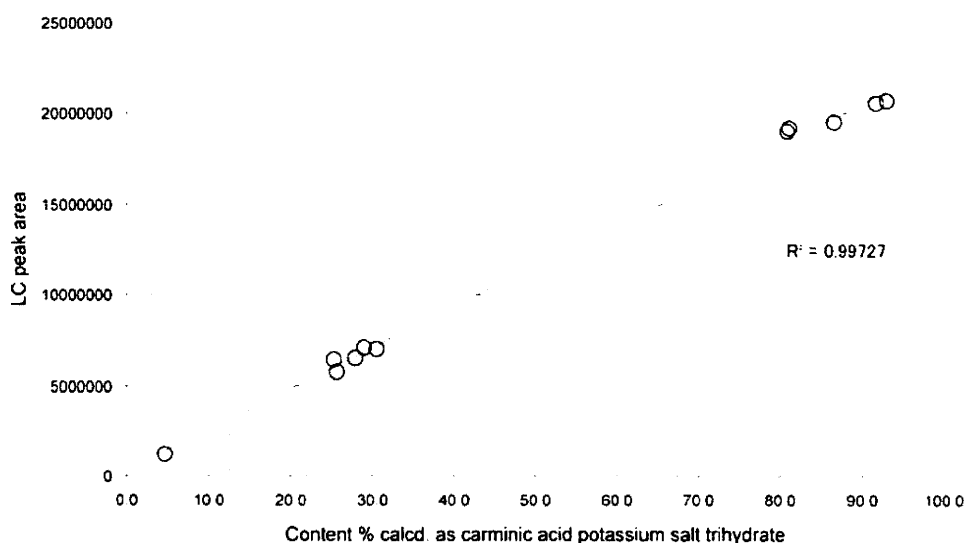


Fig. 6. Relationship between LC peak area and content of carminic acid in the reagents and cochineal dye products  
The contents as carminic acid potassium salt trihydrate (carminic acid  $\cdot$   $\text{H}^+$  +  $3\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{K}^+$ ) were calculated from qNMR data.

を定量用標準品としてHPLCに用いれば、食品添加物コチニール色素製品だけでなく食品中のカルミン酸の含量も間接的に計量学的に正確に求められる方法が構築できる。qNMRによる絶対定量はカルミン酸市販試薬以外の天然由来の市販試薬の純度試験としても有効であると考えられ、今後、qNMRによる絶対定量は、分析値の信頼性向上のための重要な1つのツールとしてなりうるものと思われた。

## 結 論

カルミン酸市販試薬製品および食品添加物コチニール色素製品中の主色素成分カルミン酸の絶対定量法としてqNMRを応用した。qNMRを用いた絶対定量法により、カルミン酸市販試薬製品および食品添加物コチニール色素製品中のカルミン酸(carminic acid)またはカルミン酸カ

リウム塩3水和物(carminic acid potassium salt trihydrate)としての含量を求めたところ、製品ごとにそれぞれ含量が異なることを明らかとした。また、qNMRスペクトル中に観察されるすべてのシグナルは定量性を伴っており、各製品中の賦形剤等を推定することが可能であるだけでなく、品質評価法としても有効であることが示唆された。

現在、我々は、qNMRの応用範囲を拡充するとともに、得られる分析値の信頼性をさらに向上するために高感度および高精度化を目指した研究を継続中である<sup>10)</sup>。

## 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。また、高純度カルミン酸を分与していただいた大阪薬科大学の馬場きみ江教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 厚生労働省 “第 8 版食品添加物公定書” 2007.
- 2) Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Analysis of constituents in Jamaica quassia extract, a natural bittering agent. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 328-331 (2003).
- 3) Lancaster, F. E., Lawrence, J. F. Determination of annatto in high-fat dairy products, margarine and hard candy by solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.*, **12**, 9-19 (1995).
- 4) Iso, T., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Ishibashi, K., Shiomi, S., Tanamoto, K. Identification test of Aloe extract from *Aloe arborescens*, a natural thickening stabilizer. *Nihon Shokuhin Kagaku Kaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, **12**, 23-27 (2005).
- 5) Inoue, K., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. Evaluation of the Turmeric (*Curcuma longa* L.) based on the flow-injection analysis with ultraviolet and fluorometric detections. *Anal. Lett.*, **34**, 1711-1718 (2001).
- 6) Itakura, Y., Ueno, E., Oka, H., Ozeki, N., Hayashi, T., Yamada, S., Kagami, Y., Otsuji, Y., Hatano, R., Yamada, E., Suzuki, R. Analysis of Lac and Cochineal colors in foods using reversed-phase thin-layer chromatography/scanning densitometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **40**, 183-188 (1999).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hirai, T. A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
- 10) 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**(1), 12-22 (2009).
- 11) Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Nihon Shokuhin Kagaku Kaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, **16**, 28-33 (2009).
- 12) Ishida, T., Inoue, M., Baba, K., Kozawa, Inoue, K., Inouye, H. Absolute configuration and structure of carminic acid existing as the potassium salt in *Dactylopius cacti* L. *Acta Cryst.*, **C43**, 1541-1544 (1987).

## Quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

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

Received: 17 November 2009 / Accepted: 6 January 2010 / Published online: 19 February 2010  
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer 2010

**Abstract**  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy was successfully applied to the quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* (dried rhizomes of *Atractylodes ovata* and *A. japonica*) and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* (dried rhizomes of *Atractylodes lancea* and *A. chinensis*). The analysis was carried out by comparing the integral of the H-12 singlet signal of atractylon, which was well separated in the range of  $\delta$  6.95–7.05 ppm in the NMR spectrum, with the integral of a hexamethyldisilane (HMD) signal at  $\delta$  0 ppm. The atractylon contents obtained by the  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy were consistent with those obtained by the conventional HPLC analysis. The present method requires neither reference compounds for calibration curves nor sample pre-purification. It also allows simultaneous determination of multiple constituents in a crude extract. Thus, it is applicable to chemical evaluation of crude drugs as a powerful alternative to various chromatographic methods.

**Keywords** Quantitative  $^1\text{H-NMR}$  · qHNMR · Atractylon · *Atractylodis Rhizoma* · *Atractylodis Lanceae Rhizoma*

### Introduction

Atractylon is a major sesquiterpene compound accumulated in rhizomes of *Atractylodes japonica* and *A. ovata* (Compositae). This compound exhibits various pharmacological activities including anti-inflammation [1], cytotoxicity against various human cancer cell lines [2, 3], acaricidal activity [4], and inhibition of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity [5], and, therefore, it has been considered that atractylon is one of the constituents responsible for pharmacological action of the crude drug, *Atractylodis Rhizoma* (dried rhizomes of *A. japonica* and *A. ovata*). Furthermore, since atractylon is hardly detected in *Atractylodis Lanceae Rhizoma* (dried rhizomes of *A. lancea* and *A. chinensis*), it has been used as a marker constituent for discrimination of *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* [6]. Thus, atractylon is an important compound for quality control of these two crude drugs. For quantitative estimation of atractylon in *Atractylodis Rhizoma*, HPLC is currently been used. However, it is difficult to obtain a standard sample of atractylon unless isolated from plant materials. Atractylon is chemically unstable and readily oxidized during isolation and storage, and we are unable to unambiguously determine the purity of an atractylon sample used for preparation of a calibration curve. Thus, accurate quantitative evaluation of atractylon is difficult by chromatographic analyses.

NMR spectroscopy has been shown to be a powerful tool not only for structure elucidation of organic compounds, but also for chemical characterization of agricultural and food products [7, 8]. Proton-specific quantitative NMR (qHNMR) has been shown to have an enormous potential for quantitative analysis of natural products [9]. qHNMR has various advantages over other quantitative analysis methods including HPLC: (1) it is rapid,

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



non-invasive, and does not require laborious sample pre-cleaning steps; (2) no standard compounds are required to prepare calibration curves; and (3) all the compounds present in the extract can be simultaneously detected. These features may make qHNMR the method of choice for quantitative determination of chemical constituents in crude drugs. In the present paper we describe the application of qHNMR for quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* obtained in markets.

## Materials and methods

### Chemicals

High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile and methanol were purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan). Methanol-*d*<sub>4</sub> (99.8 at.% D) and chloroform-*d* (99.8 at.% D) were purchased from Isotec, Inc. (Miamisburg, OH, USA). Hexamethyldisilane (HMD, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) was used as an internal standard for NMR measurement. Potassium hydrogen phthalate (PHP, NMIJ CRM 3001-a) was purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) and used as a certified reference material. The purity of this compound is certified to be 100.00 ± 0.027%. Silica gel BW-200 (Fuji Silysia Chemical, Ltd., Kasugai, Japan) was used for column chromatography.

### Crude drugs

*Atractylodis Rhizoma* (Lot. No. 6K06M) was purchased from Daiko Shoyaku (Nagoya, Japan) and used for isolation of atractylon. Crude drug samples (Table 1) were purchased in local markets in China, and voucher samples were deposited in the Department of Pharmacognosy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University. The origins of the crude drug samples were confirmed by the DNA authentication method as described previously [10].

### Isolation of atractylon

Atractylon was isolated from *Atractylodis Rhizoma* as described by Zhao and He [11]. Thus, powdered *Atractylodis Rhizoma* (100 g) was extracted with 700 ml ethyl acetate three times at 70°C for 1 h. The combined ethyl acetate extracts were concentrated at 35°C under reduced pressure. Then, the extract was purified by silica gel column chromatography, eluting with hexane and chloroform (3:1) to give atractylon fraction (2.18 g). No further purification of the atractylon fraction was carried out because

**Table 1** List of crude drugs used in the present investigation

Crude drug name and code	Origin <sup>a</sup>	Place of production or habitat	Date of collection (year.month)
<i>Atractylodis Rhizoma</i>			
ByJ-1	<i>A. ovata</i>	Shaanxi	2004.12
ByJ-2	<i>A. ovata</i>	Zhejiang	2004.01
ByJ-3	<i>A. ovata</i>	Zhejiang	2004.01
ByJ-4	<i>A. ovata</i>	Zhejiang	2004.12
ByJ-5	<i>A. ovata</i>	Zhejiang	2004.12
ByJ-6	<i>A. ovata</i>	Hunan	2004.12
ByJ-7	<i>A. japonica</i>	Heilongjiang	2003.12
ByJ-8	<i>A. japonica</i>	Heilongjiang	2004.06
ByJ-9	<i>A. japonica</i>	Inner Mongolia	2004.12
ByJ-10	<i>A. japonica</i>	Heilongjiang	2004.12
ByJ-11	<i>A. japonica</i>	North Korea	2004.12
ByJ-12	<i>A. japonica</i>	Ningxia	2004.10
ByJ-13	<i>A. japonica</i>	Inner Mongolia	2004.08
ByJ-14	<i>A. japonica</i>	Jilin	2004.09
ByJ-15	<i>A. japonica</i>	Heilongjiang	2004.10
ByJ-16	<i>A. japonica</i>	North Korea	2004.12
<i>Atractylodis Lanceae Rhizoma</i>			
SoJ-1	<i>A. chinensis</i>	Hubei	2004.08
SoJ-2	<i>A. chinensis</i>	Hubei	2004.08
SoJ-3	<i>A. chinensis</i>	Anhui	2004.10
SoJ-4	<i>A. chinensis</i>	Hebei	2004.10
SoJ-5	<i>A. chinensis</i>	Liaoning	2004.12
SoJ-6	<i>A. chinensis</i>	Inner Mongolia	2004.12
SoJ-7	<i>A. chinensis</i>	Shaanxi	2005.01
SoJ-8	<i>A. chinensis</i>	Inner Mongolia	2005.01
SoJ-9	<i>A. chinensis</i>	Shaanxi	2005.01
SoJ-10	<i>A. chinensis</i>	Shaanxi	2005.01
SoJ-11	<i>A. chinensis</i>	Shaanxi	2005.01
SoJ-12	<i>A. chinensis</i>	Shaanxi	2005.01
SoJ-13	<i>A. chinensis</i>	Shaanxi	2005.01
SoJ-14	<i>A. chinensis</i>	Shanxi	2005.01
SoJ-15	<i>A. chinensis</i>	Shaanxi	2005.01
SoJ-16	<i>A. chinensis</i>	Henan	2005.01
SoJ-17	<i>A. lancea</i>	Anhui	2005.01
SoJ-18	Hybrid <sup>b</sup>	Shaanxi	2004.07
SoJ-19	Hybrid	Hubei	2005.01
SoJ-20	Hybrid	Shaanxi	2005.01

<sup>a</sup> Origin of crude drugs was determined based on the nucleotide sequences of ITS regions of ribosomal DNA

<sup>b</sup> Interspecific hybrid between *A. lancea* and *A. chinensis*

atractylon was rapidly degraded; instead, purity of atractylon was determined by qHNMR analysis as described below and used for preparing a calibration curve for HPLC analysis. The <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the isolated fraction

was completely identical to that of atractylon [11].  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS): 0.76 (3H, s, 14-H), 1.4–1.7 (5H, m), 1.95 (3H, s, 13-H), 2.0–2.4 (6H, m), 4.70 (1H, s, 15- $\text{H}_a$ ), 4.86 (1H, s, 15- $\text{H}_b$ ), 7.06 (1H, s, 12-H).

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

$^1\text{H-NMR}$  spectra were recorded on a JEOL JNM-ECA500 (500 MHz) spectrometer. NMR acquisition and processing were essentially performed as described by Saito et al. [12]. For each sample, eight scans were recorded with a  $90^\circ$  pulse and a 60-s relaxation delay. Start and end points of the integration of peak area were selected manually. Chemical shifts are given in  $\delta$  values (ppm) relative to HMD as an internal standard.

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

HMD (40 mg) was dissolved in methanol- $d_4$  (20 ml) as a qHNMR reference stock solution. The accurate concentration of HMD in the stock solution was analyzed by qHNMR with PHP as an internal standard. PHP (10.0 mg) was weighed and dissolved in methanol- $d_4$  (2.0 ml). The PHP solution was added to the qHNMR reference stock solution (0.50 ml) and 0.60 ml of the mixed solution was subjected to  $^1\text{H-NMR}$  measurement. The HMD concentration in the qHNMR reference stock solution was calculated by using the ratio of the signal integral at  $\delta$  0 ppm (HMD) to that at  $\delta$  8.20 ppm or 7.53 ppm (PHP). The concentration of HMD was calculated from Eq. (1):

$$C_{\text{HMD}} = 8 \times \left( \frac{I_{\text{HMD}}}{I_{\text{PHP}}} \right) \times C_{\text{PHP}} \quad (1)$$

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

#### Determination of atractylon by qHNMR

Powdered crude drug samples (150 mg) were sonicated in 1.0 ml methanol- $d_4$  at room temperature for 30 min. A 0.25-ml aliquot of the qHNMR reference stock solution (2 mg/ml HMD in methanol- $d_4$ ) was added to the extract which was then centrifuged for 3 min. The supernatant (0.60 ml) then underwent  $^1\text{H-NMR}$  measurement. The atractylon concentration was calculated based on the ratio of the peak integral at  $\delta$  7.00 ppm (H-12 of atractylon) to that at  $\delta$  0 ppm (HMD). The concentration of atractylon (ATR) was calculated from Eq. (2):

$$C_{\text{ATR}} = 0.25 \times \left( \frac{I_{\text{ATR}}}{I_{\text{HMD}}} \right) \times C_{\text{HMD}} \quad (2)$$

where  $C_{\text{ATR}}$  is molar concentration of atractylon in the methanol extract,  $C_{\text{HMD}}$  is molar concentration of HMD in the qHNMR reference stock solution,  $I_{\text{ATR}}$  is signal intensity per proton at  $\delta$  7.00 ppm (H-12, atractylon), and  $I_{\text{HMD}}$  is signal intensity per proton at  $\delta$  0 ppm (HMD).

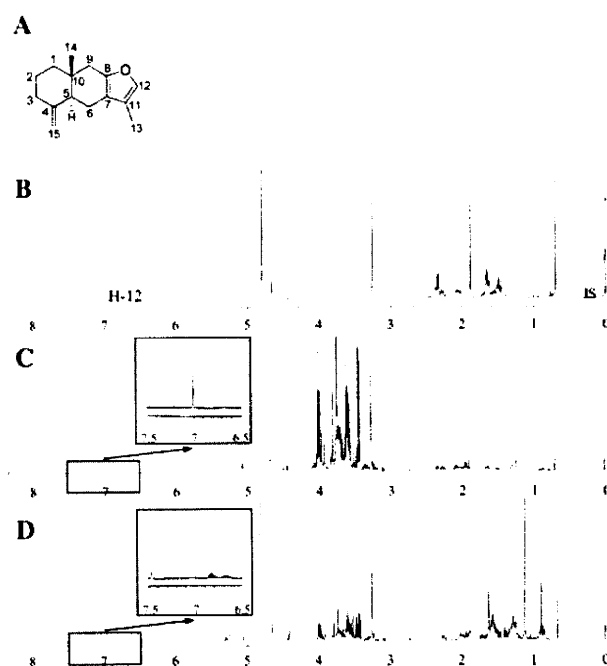
#### HPLC analysis of atractylon

The remaining crude drug extract was diluted tenfold with methanol and subjected to HPLC chromatography (Nucleosil 5C18,  $4.6 \times 250$  mm, Chemco Scientific, Osaka, Japan), using isocratic elution with acetonitrile–water (3:1). Flow rate was 1.0 ml/min and the elution was monitored at 220 nm.

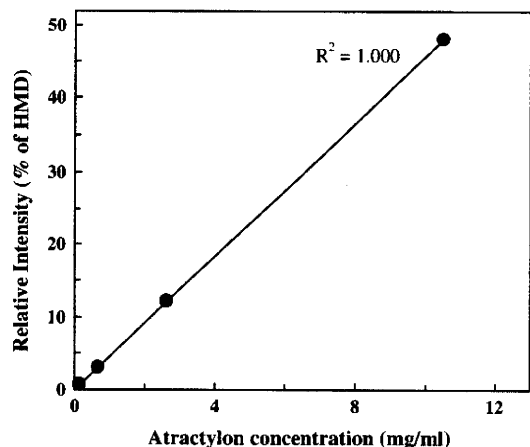
## Results and discussion

#### NMR analysis and purity of atractylon

For the quantitative analysis of atractylon (Fig. 1a), H-12 was selected as a target signal in the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum because this signal was fully separated from other signals of the molecule (Fig. 1b). The signal was clearly identified



**Fig. 1** a Chemical structure and b  $^1\text{H-NMR}$  spectra of atractylon and crude drug extracts. A typical  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the methanol extract of c *Atractylodes Rhizoma* (ByJ-1) or d *Atractylodes Lanceae Rhizoma* (SoJ-1) are also shown



**Fig. 2** Relationship between atractylon concentration and ratio of the integral of H-12 signal of atractylon to that of HMD signal

when the methanol extract of *Atractylodis Rhizoma* was subjected to NMR analysis (Fig. 1c). The signal was not detected in the extract of *Atractylodis Lanceae Rhizoma* and the overall signal profile in the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum was quite different from that of the *Atractylodis Rhizoma* extract (Fig. 1d).

In the present investigation, HMD was used as an internal standard for  $^1\text{H-NMR}$  measurement instead of tetramethylsilane (TMS). HMD is less volatile and, therefore, can be more readily weighed than TMS. We can accurately determine the HMD concentration in the reference stock solution by comparing signal integral at  $\delta$  0 ppm with aromatic hydrogen signals of PHP at  $\delta$  7.73 ppm and/or  $\delta$  8.20 ppm, because we can purchase PHP standard whose purity is strictly confirmed. Thus, the qHNMR method leads to absolute quantification of HMD and atractylon.

The ratio of the signal integral corresponding to H-12 of atractylon to that of HMD was proportional to the atractylon concentration in the range of 0.16–10.5 mg/ml as shown in Fig. 2. However, it should be noted that no calibration curves are necessary for quantitative assay of atractylon because the integral of a signal per one hydrogen atom is proportional to the amount of the compound and the same for all the organic molecules. The purity of atractylon was calculated to be  $54.4 \pm 0.3\%$  (mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ) from the ratio of the peak intensity to HMD. The quantification limit of atractylon was 0.16 mg/ml. For estimating recovery rate of atractylon by the present qHNMR method, 1.0 mg atractylon was spiked into 150 mg *Atractylodis Rhizoma*. Three sets of the spiked samples and a blank extract (without addition of atractylon) were subjected to qHNMR analysis. The recovery rate was determined to be 100.6%.

#### qNMR determination of atractylon content in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* obtained in markets

Sixteen samples of *Atractylodis Rhizoma* and 20 samples of *Atractylodis Lanceae Rhizoma* obtained in Chinese markets were quantitatively analyzed for atractylon content by using the qHNMR method. Of the 16 *Atractylodis Rhizoma* samples six were identified as *A. ovata* and 10 as *A. japonica* based on the nucleotide sequences of the ITS region in ribosomal DNA. Of 20 *Atractylodis Lanceae Rhizoma* one sample was identified as *A. lancea*, 16 as *A. chinensis*, and three as hybrid species between *A. lancea* and *A. chinensis*. For all the *Atractylodis Rhizoma* samples either from *A. ovata* or *A. japonica*, the signal derived from H-12 of atractylon was detected as a well-separated signal from other signals, and no interfering signals were detected in the range of  $\delta$  6.75–7.25 in the NMR spectrum as typically shown in Fig. 1c. The atractylon contents varied in the range of 1.37–23.3 mg/g dry weight (Table 2). Atractylon was detected in three samples of *Atractylodis Lanceae Rhizoma* from *A. chinensis*. The atractylon contents of these samples were somewhat lower than those of *Atractylodis Rhizoma* but still comparable to the atractylon contents of some *Atractylodis Rhizoma* samples. The presence of atractylon in *Atractylodis Lanceae Rhizoma* was also described in earlier papers [13, 14].

Finally, to confirm the efficiency of the present qHNMR method for quantitative determination of atractylon, the results obtained by the qHNMR assay were compared with the data obtained by HPLC analysis. As shown in Fig. 3, atractylon contents determined by qHNMR were quite consistent with those determined by HPLC. The coefficient of correlation was calculated to be 0.986, and the slope of the regression line was very close to 1 (0.937).

Wang et al. [2] analyzed atractylon contents of *Atractylodis Rhizoma* purchased in Taipei by using HPLC. Atractylon contents in the raw crude drugs varied in the range of 1.67–5.87 mg/g dry weight with an average content of 2.87 mg/g dry weight. The average content decreased to 1.92 mg/g dry weight in the processed *Atractylodis Rhizoma* because atractylon was readily oxidized to atractylenolides II and III during processing. The atractylon contents in the dried rhizomes of *A. ovata* and *A. japonica* were also evaluated by gas–liquid chromatography (GLC) [15]. The average atractylon content was 13.0 mg/g dry weight in *A. ovata* rhizomes and 22.0 mg/g dry weight in *A. japonica* rhizomes. The high atractylon contents may be due to the fact that the rhizomes of freshly collected plants were used for analysis and that atractylon might be spontaneously oxidized in the commercial crude drug samples during storage. Thus, the present results were comparable to these previously described data.

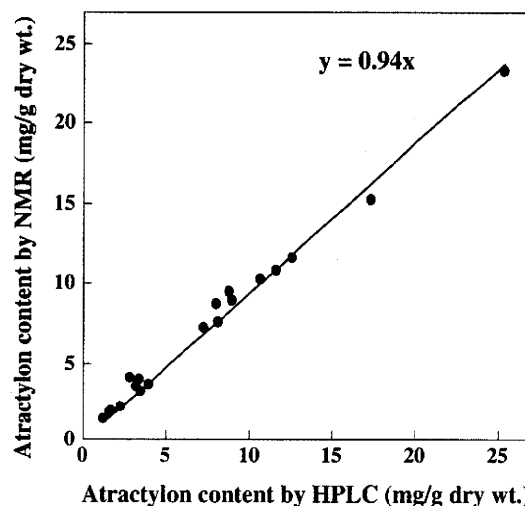
**Table 2** Atractylon contents in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* obtained in markets

Crude drug name and code	Origin	Atractylon content (mg/g dry wt.)
<b>Atractylodis Rhizoma</b>		
ByJ-1	<i>A. ovata</i>	8.91 ± 0.17 <sup>a</sup>
ByJ-2	<i>A. ovata</i>	3.62 ± 0.04
ByJ-3	<i>A. ovata</i>	11.5 ± 0.06
ByJ-4	<i>A. ovata</i>	3.15 ± 0.04
ByJ-5	<i>A. ovata</i>	10.3 ± 0.05
ByJ-6	<i>A. ovata</i>	7.58 ± 0.10
ByJ-7	<i>A. japonica</i>	1.37 ± 0.06
ByJ-8	<i>A. japonica</i>	8.62 ± 0.15
ByJ-9	<i>A. japonica</i>	23.3 ± 0.11
ByJ-10	<i>A. japonica</i>	10.8 ± 0.10
ByJ-11	<i>A. japonica</i>	1.75 ± 0.04
ByJ-12	<i>A. japonica</i>	15.2 ± 0.08
ByJ-13	<i>A. japonica</i>	9.44 ± 0.04
ByJ-14	<i>A. japonica</i>	7.19 ± 0.01
ByJ-15	<i>A. japonica</i>	4.10 ± 0.03
ByJ-16	<i>A. japonica</i>	2.15 ± 0.04
<b>Atractylodis Lanceae Rhizoma</b>		
SoJ-1	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-2	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-3	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-4	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-5	<i>A. chinensis</i>	1.93 ± 0.04
SoJ-6	<i>A. chinensis</i>	3.89 ± 0.05
SoJ-7	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-8	<i>A. chinensis</i>	3.46 ± 0.12
SoJ-9	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-10	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-11	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-12	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-13	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-14	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-15	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-16	<i>A. chinensis</i>	ND
SoJ-17	<i>A. lancea</i>	ND
SoJ-18	Hybrid	ND
SoJ-19	Hybrid	ND
SoJ-20	Hybrid	ND

ND not detected

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

In conclusion, the atractylon content of the crude drug *Atractylodis Rhizoma* can be determined by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. The method is simpler and more rapid than conventional chromatographic analyses. Furthermore, no calibration curve is required for determination and, therefore, atractylon can be quantified without the standard



**Fig. 3** Relationship between atractylon content estimated by qHNMR and the content determined by HPLC

sample. It is also interesting to note that overall profile of organic compounds in the extract is obtained by <sup>1</sup>H-NMR analysis and simultaneous determination of constituents present in a crude drug extracts is possible. The present method is also applicable for determining purities of standard samples of natural products either isolated or commercially obtained. Further application of qHNMR to the crude drug evaluation is under investigation.

**Acknowledgments** We would like to thank Dr. Y. Yamamoto, Tochimoto tenkaido Co., Ltd., and Dr. M Fujita, Uchida Wakanyaku Co., Ltd., for providing us with crude drug samples of *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma*. This work is supported by Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Welfare and Labor of Japan.

## References

- Prieto JM, Recio MC, Giner RM, Máñez S, Giner-Larza EM, Ríos JL (2003) Influence of traditional Chinese anti-inflammatory medicinal plants on leukocyte and platelet functions. *J Pharm Pharmacol* 55:1275–1282
- Wang KT, Chen LG, Yang LL, Ke WM, Chang HC, Wang CC (2007) Analysis of the sesquiterpenoids in processed *Atractylodis Rhizoma*. *Chem Pharm Bull* 55:50–56
- Wang CC, Chen LG, Yang LL (2002) Cytotoxic activity of sesquiterpenoids from *Atractylodes ovata* on leukemia cell lines. *Planta Med* 68:204–208
- Kim HK, Yun YK, Ahn YJ (2007) Toxicity of atractylon and atractylenolide III identified in *Atractylodes ovata* rhizome to *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Agric Food Chem* 55:6027–6031
- Satoh K, Nagai F, Ushiyama K, Kano I (1996) Specific inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by atractylon, a major component of Byaku-jutsu, by interaction with enzyme in the E2 state. *Biochem Pharmacol* 51:339–343
- Ministry of Health and Welfare (2000) The Japanese Pharmacopoeia, 15th edn, Japan, pp 11–12; see also pp 13–14

7. Alberti F, Belton PS, Gil AM (2002) Application of NMR to food science. *Annu Rep NMR Spectrosc* 47:109–148
8. 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 isoxanthion oxon based on qNMR. *Jpn J Food Chem Safety* 16:28–33
9. Pauli GF, Jaki BU, Lankin GC (2005) Quantitative  $^1\text{H}$  NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *J Nat Prod* 68:133–149
10. Guo Y, Kondo K, Terabayashi S, Yamamoto Y, Shimada H, Fujita M, Kawasaki T, Maruyama T, Goda Y, Mizukami H (2006) DNA authentication of So-jutsu (*Atractylodes lancea* rhizome) and Byaku-jutsu (*Atractylodes* rhizome) obtained in the market based on the nucleotide sequence of the 18S–5.8S rDNA internal transcribed spacer region. *J Nat Med* 60:149–156
11. Zhao C, He C (2006) Preparative isolation and purification of atractylon and atractylenolide III from the Chinese medicinal plant *Atractylodes macrocephala* by high-speed counter-current chromatography. *J Sep Sci* 29:1630–1636
12. 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
13. Takeda O, Miki E, Morita M, Okada M, Lu Y, He SA (1994) Variation of essential oil components of *Atractylodes lancea* growing in Mt. Maoshan area in Jiangsu Province, China. *Nat Med* 48:11–17
14. Kohda H, Goto K, Anetai M, Yamagishi T (1994) Studies on the botanical origin of *Atractylodes lancea* “Cang Zhu”. *Nat Med* 48:58–62
15. Mizukami H, Shimizu R, Kohda H, Kohjyouma M, Kawanishi F, Hiraoka N (1996) Restriction fragment length polymorphisms of rDNA and variation of essential oil composition in *Atractylodes* plants. *Biol Pharm Bull* 19:577–580

## Methods for the Estimation of Antioxidant Capacities in Foods

## 食品の抗酸化能評価法

石川 洋哉<sup>a)</sup> 松本 清<sup>b)</sup> 受田 浩之<sup>c)</sup> 島村 智子<sup>c)</sup> 松藤 寛<sup>d)</sup> 山崎 壮<sup>e)</sup>  
 Hiroya Ishikawa Kiyoshi Matsumoto Hiroyuki Ukeda Tomoko Shimamura Hiroshi Matsufuji Takeshi Yamazaki

<sup>a)</sup> 福岡女子大学人間環境学部栄養健康科学科

福岡市東区香住ヶ丘1-1-1

Department of Nutrition and Health Science, Faculty of Human Environmental Science, Fukuoka Women's University  
 1-1-1 Kasumigaoka, Higashi-ku, Fukuoka 813-8529, Japan

<sup>b)</sup> 九州大学大学院農学研究院

福岡市東区箱崎6-10-1

Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University  
 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

<sup>c)</sup> 高知大学農学部

高知県南国市物部乙200

Faculty of Agriculture, Kochi University  
 B-200 Monobe, Nankoku-shi, Kochi 783-8502, Japan

<sup>d)</sup> 日本大学生物資源科学部食品生命学科

神奈川県藤沢市亀井野1866

Department of Food Bioscience and Biotechnology, College of Bioresource Sciences, Nihon University  
 1866 Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa 252-8510, Japan

<sup>e)</sup> 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

東京都世田谷区上用賀1-18-1

Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences  
 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

## Summary

Research on natural antioxidants in foods has become of interest in recent years and numerous articles have presented the antioxidative activity of various food constituents. A wide variety of methods have been used to evaluate the antioxidative activity *in vitro*. It is a critical subject to select a suitable evaluation method for each antioxidant. In Japan, there has been a need for a new quality criterion for antioxidants based on their antioxidative activity, and therefore novel official methods of evaluating the antioxidative activities of food additives are required. This review summarizes the assay methods to evaluate the antioxidative activity and provides a basis for developing official methods. The assays can be classified into two types based on the reaction mechanism: one based on hydrogen atom transfer (HAT) reaction and the other based on a single electron transfer (SET). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay represents the HAT mechanism and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assays represent the SET mechanism. These assays are reviewed, presenting the chemical principle, the assay protocol, the important advantages, etc. In addition, WST-1 assay to evaluate the superoxide anion scavenging activity (SOSA) is also discussed. Collaborative study for developing official methods is introduced. We examined the reproducibilities of three simple

conventional antioxidant assays (DPPH assay, ABTS assay, and WST-1 assay), and concluded that the DPPH and ABTS assays would be candidates in validation studies of methods for the purpose of developing an official methodology. The evaluation of the antioxidative activities of antioxidant mixtures is an additional important problem. The interaction between the antioxidants could result in synergistic or antagonistic effects. We investigated the effects of a binary mixture of antioxidants on DPPH radical scavenging activity by the fractional product method. Synergistic and antagonistic effects were observed in the combinations of food additives, or natural antioxidants, but the effects were smaller than expected. Median effect analysis for the determination of interactions between the antioxidants was also introduced. The combination index (CI) values from the analysis gave more useful information on the combination effects than that from the fractional product method. The effects, i.e., the synergistic, the antagonistic, or the additive effects, were evaluated according to the concentration of the antioxidants. Results from the median effect analysis were slightly different from the fractional product method. The accumulation study on the median effect analysis is required to determine the interaction effects between the antioxidants.

## 1 はじめに

好気性生物のエネルギーは主に酸化的リン酸化に依存しており、その生命の維持には莫大な酸素を必要とする。ちなみに、ヒト成人では日常生活の維持に1日約500リットルの酸素を消費している。酸素消費量は臓器、細胞及び個体の状態により著しく異なる。例えば、脳は体重の2%にも満たない臓器であるが、その酸素要求量は全身の約20%にも達する。生体内に取り込まれた酸素の数%は、常に種々の酵素代謝系により、スーパーオキシドアニオン ( $O_2^{\cdot-}$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシルラジカル ( $OH^{\cdot}$ )、ヒドロペルオキシルラジカル ( $HOO^{\cdot}$ )、次亜塩素酸 ( $ClO^-$ )、あるいは一重項酸素 ( $^1O_2$ ) などの活性酸素に変化している。これらの分子種の多くは反応性が高く、生体内で脂質、タンパク質、核酸、糖質などを攻撃し、その機能を低下させる。この反応が過度に進行すれば、各種疾病の発症や老化の促進が見られるようになる。一方、一重項酸素が不飽和脂肪酸に付加すると、過酸化脂質の一つである脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) が生成する。脂質ヒドロペルオキシドは金属イオンの触媒作用で容易に脂質ペルオキシルラジカル ( $LOO^{\cdot}$ ) を形成する。また、不飽和脂肪酸から何らかの反応により脂質ラジカル ( $L^{\cdot}$ ) が生成すると、酸素と反応して脂質ペルオキシルラジカルが生成する。これが引き金となりラジカル連鎖反応が進行して、様々な過酸化脂質ラジカルが生成する。過酸化脂質ラジカルは、活性酸素の作用のみならず、酵素 (リポキシゲナーゼ) や金属イオンの触媒作用でも生成する。高脂肪食が発ガンリスクファクターである理由は、この過酸化脂質ラジカルが原因であると考えられている<sup>1)</sup>。

このような酸化ストレスに対して、生物は無防備ではなく、優れた防御システムによって自らを守っている。それらの役割を担うものを総称して抗酸化物質 (antioxidant) といい、その活性を抗酸化能と呼んでいる。我々は多種多様な抗酸化物質を体内で産生したり、食物から取り入れている。それらのあるものは酵素、タンパク質などの高分子化合物であり、あるものは低分子化合物である。これらを機能の面から次のように分類することができる<sup>2)</sup>。

- ① 活性酸素種、フリーラジカルの発生を未然に防ぐ抗酸化物質 (スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなど)
- ② フリーラジカルを捕捉、安定化する抗酸化物質 (アスコルビン酸、トコフェロール、カロテノイドなど)
- ③ 傷害を引き起こす酸化物の無毒化、排除、損傷の修復、損失の再生を行う抗酸化物質 (ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、DNA修復酵素など)

生体を持つこの防御能を上回る量の活性酸素やフリーラジカルが生じると、重篤な病態を誘起し得る。従って、生体の

有する抗酸化能を評価することは、臨床化学的には個人の酸化ストレスに対する抵抗性を把握する上で重要な指針となる。また、日常の食生活において摂取される食品の抗酸化能の計測は、各食品の有する健康の維持・増進作用 (生体調節機能) を評価する上でも重要である。

一方、抗酸化物質は実際の食品試料において、その品質を低下させる酸化の防止に活用されている。現在、日本国内で使用されている酸化防止剤は、指定添加物と既存添加物に大別される。既存添加物とは、平成7年の食品衛生法の改正に伴い、従来から使用されていた天然添加物に対する経過措置として使用が認められているものである。指定添加物では、成分含量または組成に基づく規格基準が設定されている。その一方で、既存添加物は、天然由来の複雑な混合物である品目も多く、有効成分及び成分組成の特定が困難である場合が多い。そのため、有効成分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。これらについては、網羅的な成分組成の確認、有効成分の同定及び定量法の開発を行っているが、現状の機器分析では不可能である場合も多い。従って、成分規格の対象とする有効成分が特定できない既存添加物に対しては、一定の品質を確保するために、成分分析法以外の新たな評価法を適用する必要があると考えられる。このうち、酸化防止剤の場合は、その有効性、すなわち抗酸化能に基づく新たな品質評価法の策定並びに公定法への適用が検討事項になっている。

このように、食品の機能性評価、酸化防止剤の力価判定、さらには生体の抗酸化能測定など、抗酸化能の計測は様々な分野でますます重要性を増していると言える。抗酸化能を評価する方法は、反応液中で発生させた活性酸素やフリーラジカルを直接分光学的にモニターする直接法と、それらと反応し得る各種プローブを試料と競合させる競合法とに分けられる。活性酸素やフリーラジカルは一般に反応性が高く、寿命が短いことから、正確な反応の制御が再現性の高い結果を得るために強く必要とされている。これまでに多くの評価法が開発され、そのうちいくつかの方法については、公定法を目指した統一した評価基準設定の動きもある。しかしながら、依然、理想的な評価法として利用できる万能な方法は無く、どの方法も一長一短であり、各方法の有する特徴を理解した上で活用する姿勢が強く求められている。

本総説では、現在、抗酸化能評価法として比較的広く利用されている方法を中心に、各方法の特徴について解説し、利用していく上で留意すべき点を整理しておきたい。さらに、我々が現在取り組んでいる厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業「既存添加物の成分と品質評価に関する研究」(平成17~19年度)並びに「既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発」(平成20~22年度)について紹介し、その概要を解説するとともに公定法策定に向けた今後の展望について述べたい。



## 2. 代表的な抗酸化能評価法

抗酸化能評価に関しては、これまでにその原理や簡便性に基つき多種多様な方法が開発されている。分類としては、まずHAT (Hydrogen Atom Transfer) 機構と、SET (Single Electron Transfer) 機構とに分類される。抗酸化物質がラジカルに水素原子を供与することで基質の酸化を抑制する原理を利用するHAT機構の代表的な方法がoxygen radical absorption capacity (ORAC) 法やlow density lipoprotein (LDL) 酸化法である。一方、SET機構では、抗酸化物質がラジカルや酸化物などに1電子を供与することで基質を還元する。様々なラジカル発生剤と検出プローブの組み合わせの抗酸化能評価法が開発されているが、代表的な方法として、ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) 法、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法、2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 法などが挙げられる。この他にも、酸化ストレスの亢進において、大きな関与をする活性酸素種 (ROS) の消去活性を評価する方法もある。各評価法には検出法を含め、多くの変法があり、全てをここで説明することはできないが、この中から本総説では、ORAC法、ABTS法、DPPH法とROSのうち、 $O_2^{\cdot-}$ の消去活性 (superoxide anion-scavenging activity: SOSA) 評価法について以下に触れる。

### 2-1. ORAC法

ORAC法は米国老化研究所のCaoらによって開発 (1993年) された方法である<sup>4)</sup>。米国農務省が果実・野菜の抗酸化能測定に採用している。ORAC法では、2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) から発生するペルオキシラジカル (2-amidinopropane-2-peroxyl radical) 存在下で、蛍光プローブが分解され、蛍光強度が減弱する過程

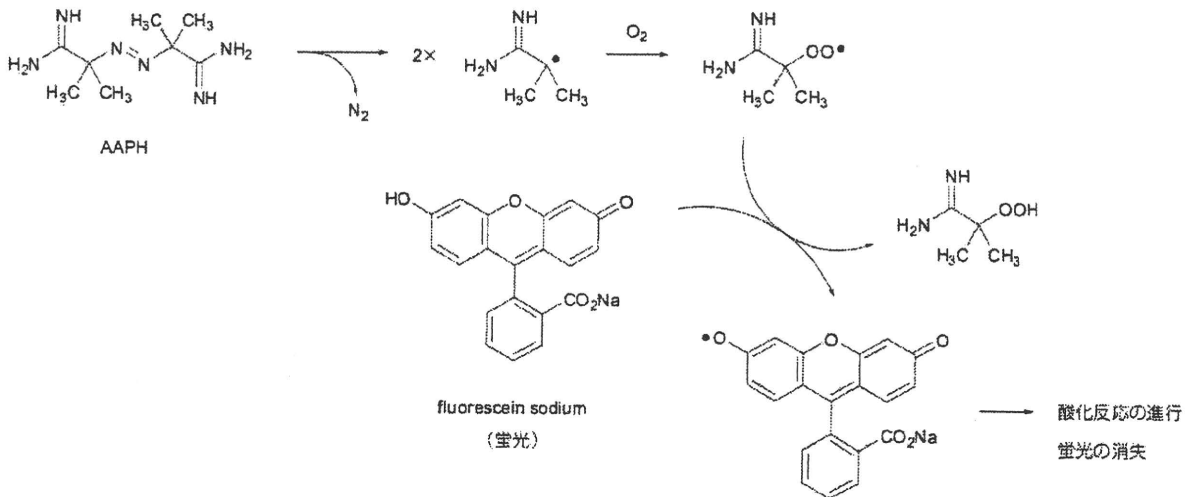


図1. ORAC法の反応原理

を経時的に測定する (図1)。

この反応系に抗酸化物質が共存すると、蛍光プローブの酸化による蛍光強度の減弱が遅延 (抑制) されるため、この遅延効果を抗酸化能として評価する。具体的には、試料共存下での蛍光強度の経時変化曲線の曲線下面積 (AUC) と試料非共存下 (ブランク) でのAUCとの差 (net AUC) を指標として抗酸化能を算出する (図2)。

使用する蛍光プローブとして、開発当初蛍光タンパク質B-フィコエリスリンが用いられていたが<sup>4)</sup>、試薬ロット間でのバラツキが大きいため、現在では再現性が高く安価なFluorescein (励起波長485 nm、蛍光検出波長535 nm付近) が用いられている (表1)<sup>5)</sup>。

標準物質には、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) が用いられ、試料の抗酸化能はTrolox等量として算出される。具体的には、濃度既知のTroloxを用いてnet AUCの検量線を作成し、試料のnet AUCをTrolox検量線に代入することにより、ORAC値が求められる。

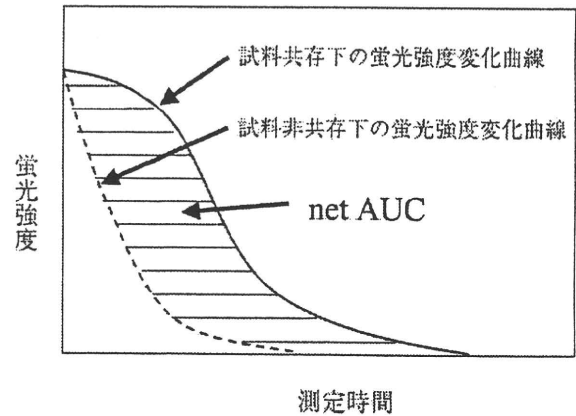


図2. ORAC法の測定原理  
AAPHから発生するペルオキシラジカル共存下でのFluorescein (励起波長485 nm、検出波長535 nm付近) の蛍光強度の経時変化を測定。



なお、ORAC法は水溶液中での測定なので、脂溶性成分を測定する場合にはランダムメチル化β-シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンなどのシクロデキストリン系化合物を用いることにより、親油性成分を可溶化して測定される<sup>9)</sup>。

本法は生体内の脂質過酸化で発生する脂質ペルオキシラジカルを想定してペルオキシラジカルを使用する。さらに水素原子が移行する反応（HAT機構）はラジカルの連鎖反応のモデルであり、SET機構の評価法に比べて、より生体関連性が高いと考えられている。また水溶性、脂溶性どちらの試料も分析可能である。これらの点から、生体内での抗酸化能を*in vitro*試験系で簡便に評価する方法として注目されている。しかしながら、本法では、ラジカル発生剤として用いるAAPHからのラジカル生成（分解）が温度感受性であり、反応温度の影響を強く受けること、多検体の分析には蛍光検出に基づくマイクロプレートリーダーが必要であり、分析に比較的時間を要すること、さらにはβ-カロテンや不飽和脂肪酸

など、反応の機序が異なる抗酸化物質は測定できないことなど問題点もある。

## 2-2. ABTS法<sup>7)</sup>

ABTS法は別名Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC) 法とも呼ばれる。アッセイはまずABTSをペルオキシ二硫酸カリウムにてそのラジカルカチオンに酸化した後、試料と混合する。酸化反応は過酸化水素とペルオキシダーゼの組み合わせでも可能である。ラジカルカチオンは414 nm、645 nm、734 nm、815 nmに吸収極大を有しており、鮮やかな緑を呈するが、試料にこのラジカルカチオンを還元する活性が認められれば無色となる。ラジカルカチオンとの反応速度は、抗酸化物質の性質によって大きな差が認められる。従って、アッセイ条件としては、1分から30分まで様々な条件設定が行われる。測定原理と我々が設定した測定プロトコルを図3に示した。

この分光学的方法は極めて簡便であり、抗酸化能の迅速な

表1. 代表的な抗酸化能評価法における酸化活性を担うラジカルと検出プローブ

抗酸化能評価法	酸化活性を担うラジカル	検出プローブ (検出指標)	抗酸化反応 (ラジカル捕捉反応) によるプローブの変化
ORAC法	AAPH 由来のペルオキシラジカル	fluorescein sodium (蛍光強度)	ペルオキシラジカルによるfluoresceinの酸化反応(蛍光消失)速度が低下
ABTS法	ABTSとペルオキシ二硫酸カリウム	ABTS(酸化型)(734nm吸光度)	ABTSラジカル(酸化型、緑色)から還元型分子(無色)に変化
DPPH法	DPPH	DPPH(酸化型)(517nm吸光度)	DPPHラジカル(酸化型、紫色)から還元型分子(淡黄色)に変化
SOSA評価法	hypoxanthine-xanthine oxidase 反応で生成するスーパーオキシドアニオン(O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	WST-1 (WST-1を基質とする発色反応生成物の450nm吸光度)	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> によるWST-1からの発色反応生成物の生成量が減少

注：AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride  
 ABTS: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)  
 DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

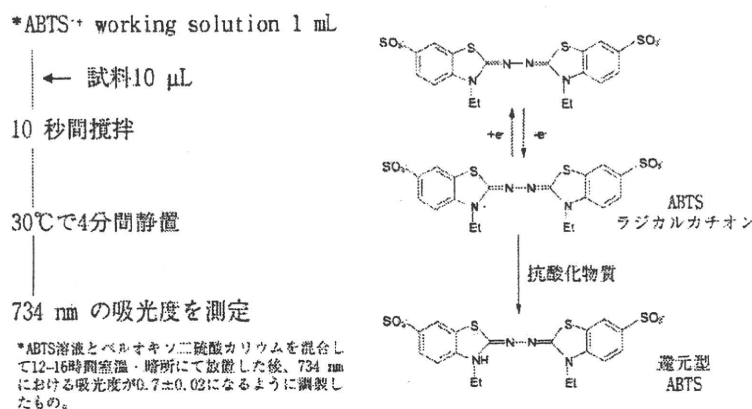


図3. ABTS法の測定手順と原理

スクリーニングには大変適した方法である。またラジカルは水にも有機溶媒にも可溶であるので、水溶性、脂溶性どちらの試料にも適用が可能である。一方、本測定法はSET機構に基づく原理であり、さらに生体に存在しない安定なラジカルを用いていることから生体系の情報を反映しているのかという問題が指摘されている。また特異性に関しては、ABTSラジカルカチオンの酸化還元電位が0.68 V程度であることから、これよりも低い酸化還元電位を有する物質には全てラジカルの還元が認められることになる。

### 2-3. DPPH法<sup>8,9)</sup>

DPPHもABTSラジカルカチオン同様、安定なラジカルである。特にDPPHはラジカルの状態で市販されており、何ら反応前に特別な処理を必要としない。この物質はエタノールと水の混合溶液中で濃い紫色を呈する（50%以上のエタノール環境において）。抗酸化物質と共存させるとSET機構でラジカルの還元が起こり、紫色が消えて、薄い黄色になる。この変化を分光光度計にて517 nmでモニターする。測定原理と我々が設定した測定プロトコルを図4に示した。

本法も極めて簡易で、簡便な方法であることから、スクリーニングをはじめ、多くの試料の評価には適した方法であり、利用されている例は最も多い。しかしながら、いくつかの問題点についても理解しておく必要がある。まず50%以下のエタノール環境ではラジカル構造に変化が生じる。従って、極性が高い環境でなければ安定に存在できない試料については適用できない。低分子のラジカルをアッセイに活用する方法と比べて、試料の本ラジカルへの接近が高分子化合物では立体的に困難な場合が認められる。その場合は見かけ上活性が低く評価されることがある。このことが理由で、低分子物質の方が高い活性を示すことが多い。技術的には、517 nmの検出波長がカロテンなどの食品成分の吸収と重なることも欠点

として挙げられる。またABTS法でも述べたように、本法はSET機構であり、生体内に存在しないモデルラジカルであることから、生体関連性がどの程度あるのかが不明である。

### 2-4. SOSA法

酸素呼吸に必須の三重項酸素が1電子還元を受けると $O_2^{\cdot-}$ に変わる。この $O_2^{\cdot-}$ はキサンチン酸化酵素(XOD)などの酵素反応や還元性物質の自動酸化で生成し、動脈硬化症、肺気腫などの発症にかかわっている<sup>10)</sup>。一方、生体は $O_2^{\cdot-}$ の無毒化機構としてスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を備えている。この酵素は2分子の $O_2^{\cdot-}$ を不均化して酸素と過酸化水素に変換する反応を触媒し、 $O_2^{\cdot-}$ の反応性を低下させる。これまでの研究からSODは酸素呼吸をする生物の寿命を決定する因子の一つであることや<sup>11)</sup>、SODの翻訳後修飾反応が糖尿病合併症の誘発に深く関与していることが示唆されている<sup>12)</sup>。そこで、生合成されるSODに加えて、SODと同様に $O_2^{\cdot-}$ を不均化したり、あるいは消去し得る成分を食品から積極的に取り入れ、老化や生活習慣病を抑えようとする考えがにわかにより高まりを見せている。これに伴い、食品工業では、SOD活性並びに $O_2^{\cdot-}$ 除去活性(SOSA)を有する成分の簡便なスクリーニング法の開発が必要とされている。

SOD活性並びにSOSAの測定原理は基本的に同じである。その測定法としては、酵素反応で発生させた $O_2^{\cdot-}$ の捕捉能力を発色プローブと競合させる間接法が一般的に利用されている。発色プローブとして汎用されているのは、WST-1である。WST-1法の測定原理を図5に示す<sup>13,14)</sup>。

本測定原理に基づいて、マイクロプレートでの多検体測定を可能としたSOD Assay Kit-WST (株式会社同仁化学研究所)がすでに市販されるに至っている。なお本キットのアッセイpHは10.2である。試料の代わりに水を添加した際の吸光度変化をAc (マニュアルではA<sub>blank</sub>)、試料添加での吸光度変化を

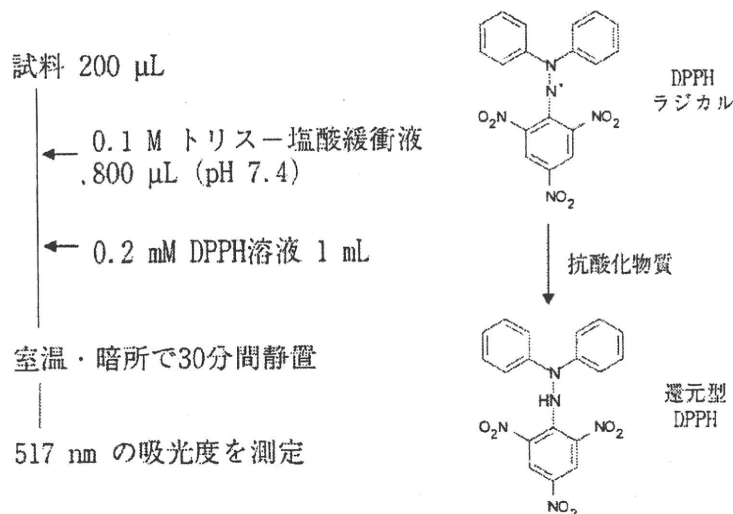


図4. DPPH法の測定手順と原理

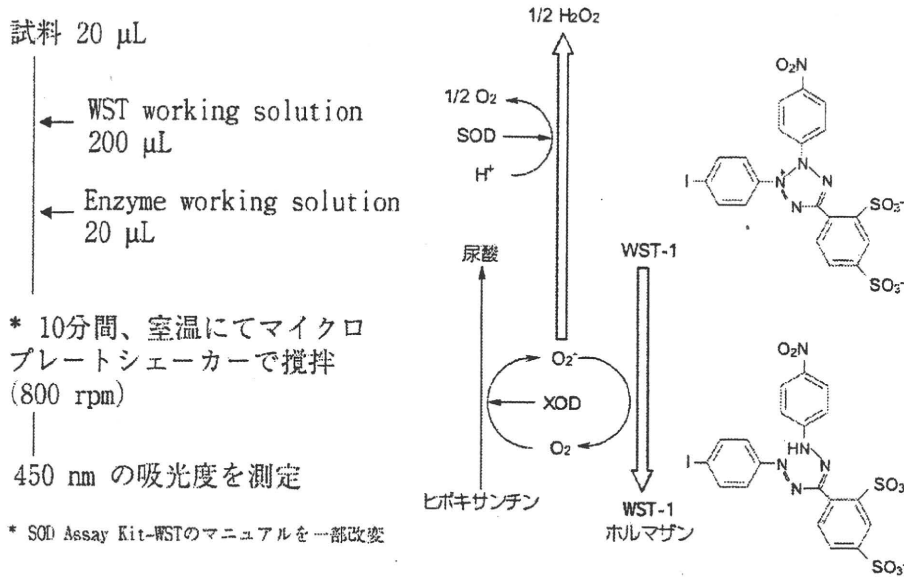


図5. WST-1法の測定手順と原理

As (同じく  $A_{\text{sample}}$ ) として、通常は阻害率I (%) を

$$I = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

で計算できる。50%阻害を与える試料の希釈倍率を正確に求め、その希釈倍率における試料溶液が  $IC_{50}$  値を示すSOD標品の濃度と等価であると考えて、試料原液または試料固体重量当たりのSOSAを算出する。なお、算出に用いるSOD酵素単位に関して、従来はシトクロムc法により決定されたSOD酵素単位を用いてきた。しかしながら、後に述べるように本酵素単位の定義が測定値の室間再現精度に影響を及ぼすことが判明したことから、我々は新たに「WST還元50%阻害を示すサンプル溶液20  $\mu\text{L}$  に含まれるSOD量を1単位 (U) とする」との定義を導入した。現在、SOD Assay Kit-WSTの測定マニュアルにも、この新たな定義が記載されている。本総説には、新定義の導入前・後の結果が示されていることを予めご了承ください。

通常の生化学試料では、この式に基づいて、SODの活性測定が可能であるが、食品試料の場合には、試料成分による直接的なWST-1の還元がどの程度起こっているかを常に知っておく必要がある。その評価は、XOD溶液の代わりに緩衝液 (キットではDilution bufferに相当) を添加した系について吸光度変化 ( $A_b$ : マニュアルでは  $A_{\text{blank}}$ ) を測定し、 $A_c$  と比較することで可能である。

本法は簡便な分光学的検出でSOSAを評価できる大変簡易なスクリーニング法である。一般に本法は水溶性の試料への適用が前提となっているため、脂溶性の試料への適用は限られる。また  $\text{O}_2^{\cdot-}$  の発生に使用している酵素XODに直接阻害を示す物質が共存する場合には、見かけ上、活性を示すことに

なる。その懸念がある場合には、キットの中のWST-1濃度を変化させて  $IC_{50}$  を測定してみる。もしXODを直接阻害している場合には、WST-1の濃度が変化してもその値が変化しないはずである ( $\text{O}_2^{\cdot-}$  と競合すれば、WST-1濃度が増加すると  $IC_{50}$  は大きくなる)。また試料の色に基づく妨害が問題になることもある。このような場合には、WST-1をスピントラップ剤DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) に代えて、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  のスピニアダクトを電子スピン共鳴 (ESR) 装置にて検出する方法がある<sup>15)</sup>。

### 3. 各種試料に対する方法の比較

我々は、上述の厚生労働科学研究費補助金プロジェクトにおいて、抗酸化能評価法の公定法候補を選定し、その妥当性評価を行った<sup>16)</sup>。選定条件は、(1) 過去の研究において使用されてきた実績があること、(2) 短時間での測定が可能であること、(3) 特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法であることの3項目とし、結果としてラジカル消去活性測定法であるDPPH法とABTS法、活性酸素消去活性測定法であるWST-1法を候補として選定した。本プロジェクトでは上記3法を用いて、既存添加物のうち単一化合物からなる酸化防止剤及び複数成分からなる天然物由来酸化防止剤の測定を行い、得られた結果を比較した。

#### 3-1. 単一化合物からなる酸化防止剤

既存添加物のうち単一化合物からなる酸化防止剤9種類 (カテキン、ケルセチン、*trans*-フェルラ酸、没食子酸、モリン、セサモール、D- $\alpha$ -トコフェロール、D- $\delta$ -トコフェロール、

表2. 単一化合物からなる酸化防止剤の抗酸化能測定における共同試験結果

酸化防止剤	DPPH法			ABTS法			WST-1法		
	RSD <sub>d</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	HorRat値	RSD <sub>d</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	HorRat値	RSD <sub>d</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	HorRat値
カテキン	3.29	18.10	1.32	3.16	52.06	3.72	14.34	29.91	3.01
ケルセチン	8.63	13.45	0.95	3.34	27.74	1.88	16.25	45.16	5.31
セサモール	3.13	12.29	0.94	2.01	7.10	0.44	13.81	44.32	10.39
フェルラ酸	1.80	9.89	0.83	8.90	82.68	6.19	11.68	16.86	2.40
没食子酸	3.69	12.62	0.85	4.12	7.44	0.46	15.87	57.32	3.59
モリン	5.12	12.60	1.05	3.44	3.40	0.26	27.43	33.03	4.61
エラグ酸	4.74	9.16	0.63	7.53	15.99	1.04	18.59	54.93	4.71
D- $\alpha$ -トコフェロール	3.81	42.85	3.72	2.84	9.96	0.81	—	—	—
D- $\delta$ -トコフェロール	5.08	12.48	1.11	2.84	10.13	0.80	—	—	—

エラグ酸)の抗酸化能評価に関する3試験機関での共同試験を行った。共同試験では、酸化防止剤試薬のロット、試薬秤取量、溶媒容量、溶液調製操作に用いる器具の種類、希釈手順、データ解析方法を全て指定し、同一プロトコルにて測定を行った。DPPH法とABTS法では各種酸化防止剤の抗酸化能をTrolox等価活性として示し、WST-1法ではSOD等価活性として示した。各手法で求められた抗酸化能の繰り返し精度RSD<sub>d</sub>(%)、室間再現精度RSD<sub>r</sub>(%)、及び室間再現精度の予測値との比(HorRat値)を求めた(表2)。

なお、HorRat値はその値が2以下であれば、室間再現精度が許容範囲内であるとみなされる。検証の結果、DPPH法では8種類、ABTS法では7種類の酸化防止剤の測定においてHorRat値が2以下となったことから、これらの方法は高い測定精度を有していると考えられた。一方、WST-1法では、D- $\alpha$ -トコフェロールとD- $\delta$ -トコフェロールの測定が不能であっただけでなく、残り全ての測定結果においてHorRat値が2以上となり、室間再現精度が若干劣ることが判明した。

### 3-2. 天然物由来酸化防止剤

複数成分からなる天然物由来酸化防止剤(26種類):チャ抽出物(4種類)、緑茶エキス、ミックストコフェロール、D- $\alpha$ -トコフェロール、D- $\gamma$ -トコフェロール、D- $\delta$ -トコフェロール、トコトリエノール、カンゾウ油性抽出物、ブドウ種子

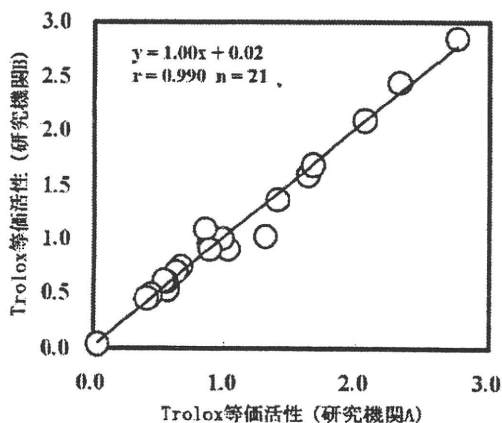


図6. 2ヶ所の研究機関で求めたTrolox等価活性の相関(DPPH法)

抽出物、単糖・アミノ酸複合物、生コーヒー豆抽出物、ローズマリー抽出物(2種類)、コメヌカ酵素分解物、コメヌカ油抽出物、 $\gamma$ -オリザノール、フェルラ酸、ヤマモモ抽出物、エンジュ抽出物、酵素処理イソクエルシトリン、ルチン酵素分解物、ルチン、酵素処理ルチンの抗酸化能評価を行った。本実験は、2ヶ所の試験機関で行い、得られた結果を回帰分析により評価した。DPPH法での回帰分析結果を図6に示した。

2試験機関の測定結果に有意な直線性が認められ( $r=0.990$ )、回帰式の傾きが1.00であったことから、両試験機関で得られた値が極めて高い一致性を示すことが確認された。ABTS法においても同様の結果が得られている(傾き1.11、 $r=0.990$ )。この結果より、DPPH法並びにABTS法では、天然物由来酸化防止剤の評価に対しても十分対応可能であることが示された。一方、WST-1法は脂溶性の高い酸化防止剤に対しては対応不能であり、その適用範囲が限定されることが判明した。さらに、測定可能であった酸化防止剤(17種)の回帰分析結果では、直線の傾きが1.25となり、両研究機関の測定値に25%の差が認められた。この原因を検証した結果、測定法自体に問題があるわけではなく、シクロムc法により決定されたSOD酵素単位をSOD等価活性の算出に用いたことが原因と判明した。そこで、我々は「WST還元50%阻害を示すサンプル溶液20 $\mu$ Lに含まれるSOD量を1単位(U)とする」と新たに定義し、測定結果の再解析を試みた。その結果、回帰分析の結果が大幅に改善され、WST-1法においても良好な室間再現性が確認された(傾き1.03、 $r=0.992$ )。

上記の結果、DPPH法及びABTS法については、今後本格的な分析法の妥当性確認を行うことにより、公定法として採用出来る可能性が高いと考えられた。分析法の公定化に向けた妥当性確認方法のガイドラインはいくつか存在するが、AOAC、ISO、IUPACの三者が合意したHarmonized protocolが代表的である。この場合、定量法では8ヶ所以上、定性法では10ヶ所以上の共同試験参加機関による共同試験の有効なデータがなければならぬとされている<sup>11)</sup>。一方、WST-1法では、単一化合物からなる酸化防止剤の測定において十分な室間再現精度が得られなかったものの、天然物由来酸化防止剤の測定結果では、SOD酵素単位の定義を変更することによ