

り、良好な結果が得られている。単一化合物からなる酸化防止剤の結果についても再検証の必要はあるが、同様に空間再現精度の改善が見込まれることから、引き続きWST-1法も公定法候補として検討する予定である。

4. 抗酸化物質の相乗・相殺効果

食品や天然物抽出物中で、抗酸化物質が単独で存在することは希であり、多くは複合系として存在する。これら抗酸化物質の活性は、相加的に働いただけでなく、何らかの化合物との共存によって強められたり、弱められたりすることがある。実際、抽出液などの複合系では、しばしば抗酸化物質の濃度と活性との間に相関が無いことが報告されている。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。

混合系における抗酸化物質間の相互作用は、予測された値(予測値)よりも実測値が大きければ相乗効果 (synergistic effect)、小さければ相殺効果 (antagonistic effect)、同等であれば相加効果 (additive effect) と判定されるが、判定基準となる予測値の見積もりは極めて難しい。混合系における抗酸化物質の活性予測値について、その算出方法、算出根拠を明確に論じた報告例は見当たらない。

本稿では、薬剤での併用効果の判定 (活性予測値の算出) に利用されている2つの評価法を紹介するとともに、酸化防止剤併用効果の解析への応用例 (当研究グループの取り組み) について述べる。

4-1. Fractional product methodによる予測・評価¹⁸⁾

Webbら (1963年) が考案した方法であり、2つ以上の酵素阻害治療薬の併用効果を評価するための古典的な方法である。薬剤1と薬剤2の併用効果は以下の式で表される。

$$(f_{1,2}) = (f_1) \times (f_2) \tag{1}$$

ここで、 $(f_{1,2})$ は薬剤1と2併用時に薬剤の影響を受けていない割合を、 (f_1) は薬剤1単独使用時に影響を受けていない割合を、 (f_2) は薬剤2単独使用時に影響を受けていない割合を示す。

また、薬剤1と2併用時の阻害割合を $(f_{1,2})$ 、単独使用時の阻害割合を (f_1) 、 (f_2) とすると、式 (1) は以下のように表される。

$$[1 - (f_{1,2})] = [1 - (f_1)] [1 - (f_2)] \tag{2}$$

または

$$(f_{1,2}) = [(f_1) + (f_2)] - [(f_1) \times (f_2)] \tag{3}$$

Shi¹⁹⁾ は、引用先は不明であるが、恐らくこの概念に基づく以下の式を、抗酸化物質の併用効果に利用している。

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

ここで、 I_E は試料AとB併用時の予測される消去率を、 I_A は試料Aの消去率を、 I_B は試料Bの消去率を示す。実測値 I_M と予測値 I_E を比較することにより併用効果を判定する ($I_M/I_E > 1$ 相乗効果、 $I_M/I_E = 1$ 相殺効果、 $I_M/I_E < 1$ 相殺効果)。これらの式を利用して、例えば終濃度が IC_{50} を示す濃度の試料を混合した場合、予測値は75%となり、 IC_{25} の試料を混合すると予測値は43.8%となる。

実際、我々の実験で11種類の単一成分からなる酸化防止剤 (食品添加物) での2成分での組み合わせ (55通り) 及び安息香酸類、桂皮酸類、フラボノイド類、ビタミン類、ジテルペン類の24種類の抗酸化物質を用い、その全組み合わせ (276通り) での併用効果を検討した結果、酸化防止剤55通りの組み合わせでは、36通りにおいて相乗効果、1通りで相殺効果であること、24種の抗酸化物質の組み合わせでは、74通りにおいて相乗

表3. 酸化防止剤の2成分混合時のDPPHラジカル消去率と予測値との比

	BHA	BHT	CT	QC	SM	FA	GA	MO	EA	aTOC	dTOC
	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E	I_M/I_E
BHA	—	1.049*	1.010	1.069**	1.036	1.077**	1.050	1.063*	1.070*	1.074**	1.059*
BHT	—	—	0.996	1.031	1.058**	1.038*	1.025*	1.029	1.024	1.087**	1.076*
カテキン (CT)	—	—	—	1.039*	0.980	0.969	0.971	0.998	1.067	1.008	1.035
ケルセチン (QC)	—	—	—	—	1.129**	1.081	1.094	1.093*	1.082*	1.208**	1.151**
セサモール (SM)	—	—	—	—	—	1.195**	1.058**	1.128**	1.170*	1.162**	1.174**
フェルラ酸 (FA)	—	—	—	—	—	—	1.105*	1.177*	0.903*	1.108*	1.107**
没食子酸 (GA)	—	—	—	—	—	—	—	1.019	1.055**	1.140*	1.058
モリン (MO)	—	—	—	—	—	—	—	—	1.117**	1.201*	1.111**
エラグ酸 (EA)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.117**	1.135*
D- α -トコフェロール (aTOC)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.155**
D- δ -トコフェロール (dTOC)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

I_M/I_E の比が1以上で有意差ありは相乗効果、1以下で有意差ありは相殺効果。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

効果、61通りで相殺効果となった。表3に一例を示す。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、1.2以上の活性増強の組み合わせは14通り、0.8以下の活性低下の組み合わせは33通りであった²⁰⁾。

4-2. Median effect analysisによる予測・評価²¹⁾

Chou and Talalay (1984年)により提案された方法であり、薬剤の併用効果の解析法として現在のところ最も利用されている。現在までに1600以上の文献で引用されており、本法の解析ソフトも市販されている (BIOSOFT社 CalcuSyn)。本法は、上記Fractional product methodが、個々の薬剤が独立して作用している場合で、かつその反応が双曲線型に当てはまる場合にしか適用できず、薬剤の阻害様式を考慮していない点 (反応が双曲線型かシグモイド型か) 及び個々の薬剤の相互的な役割を考慮していない点 (個々の薬剤が独立して作用しているのか、排他的に作用しているのか) を指摘している。また、本法は他に古くから利用されているIsobologram method (Isobolとも呼ばれる) の問題点 (個々の薬剤が排他的に作用しているときのみしか評価できない) も指摘し、これらを含めた評価法を提案している。

本式は以下のように表され、

$$f_1/f_m = (D/D_m)^m \quad (5)$$

ここで、Dはdose (濃度)、D_mはMedian effect (IC₅₀)、mはHill型の係数を示す。式 (5) を変形すると、

$$\log(f_1/f_m) = m \log(D/D_m) \quad (6)$$

となり、 $\log(D/D_m)$ あるいは $\log D$ を横軸に、 $\log(f_1/f_m)$ を縦軸にプロットすることにより、個々の薬剤のmを求めることができる。m=1のとき、反応は双曲線型、すなわち一次反応型あるいはMichaelis-Menten型となり、m>1のとき高次反応型となる。本法は、m値を基に、実測値からCI (combination index) 値を算出し、併用効果を判定する (CI<1相乗効果、CI=1相加効果、CI>1相殺効果) ことができる。

本法は実験結果を基に薬剤の反応型を推定し、反応型に応じた併用効果の解析を行うため、汎用性が極めて高いとされている。しかし、Berenbaum²²⁾は指数関数的な濃度依存性を示す阻害剤は、この方法に適用できないことを指摘している。

我々は、Median effect analysisを用いて、単一化合物からなる酸化防止剤の併用効果の判定を試みている。一例として、D- α -トコフェロールとケルセチンのMedian effectプロットを示した (図7)。なお、抗酸化能の測定にはDPPH法を用いている。D- α -トコフェロール単独、ケルセチン単独、両者併用

時の直線の傾きm値は、それぞれ1.83、1.74、1.93と算出され、この値をもとにCI値が見積もられる。CIプロットの代表例を図8に示す。

D- α -トコフェロールとケルセチンの組み合わせでは、いずれの阻害割合においてもCI<1となり両者の併用効果は、相乗効果と判定された。また、フェルラ酸とエラグ酸ではいずれの阻害割合においてもCI>1となり両者の併用は相殺効果を示すことが判明した。D- α -トコフェロールとモリンではCIプロットの結果から、両者の効果はほぼ相加性であると判断したが、その効果は阻害割合 (混合時の濃度レベル) によって異なっていた。すなわち両者の効果は、 $f_1 < 0.5$ では相殺性を示したものの、 $f_1 > 0.5$ では逆に相乗性を示すことが判明した。この結果は、混合時の濃度レベルが低い場合、両者は相殺的に作用し、高濃度では相乗的に作用することを示している。Median effect analysisでは、併用時の濃度レベルに応じた併用効果の判定が可能であったことから、本法の有用性が確認された²³⁾。表4にFractional product methodとMedian effect analysisで得られた判定結果の一部を示す。D- α -トコフェロールとケルセチン、フェルラ酸とエラグ酸の組み合わせは両法で同様の判定結果を得たが、Fractional product methodで相乗効果と判定された2組 (D- α -トコフェロールとモリン、セサモールとエラグ酸) では異なる結果となった。特に、セサモールとエラグ酸の組み合わせでは、両法の判定結果が全く逆となり、Median effect analysisで相殺効果と判定された。Fractional product methodは、限定された条件下での解析法であることを考慮すると、Median effect analysisでの判定結果の信頼性が高いと考えられたが、この点に関しては今後詳しく検討する必要がある。

以上、薬剤の併用効果の解析法を紹介するとともに、我々のデータの一部を示した。これらの解析法によると、予測値は単一系の単なる足し算ではなく、また個々の薬剤の反応様式等を把握しなければ見誤った予測値を見積もることになる。さらに、解析法の選択によって判定結果が全く異なる場

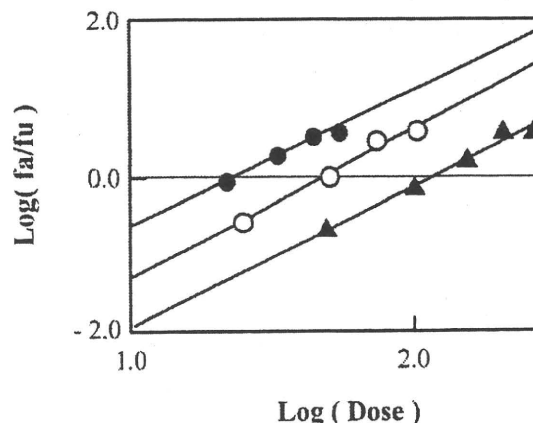


図7. 酸化防止剤の組み合わせによるMedian effectプロット
○: 併用、▲: D- α -トコフェロール、●: ケルセチン

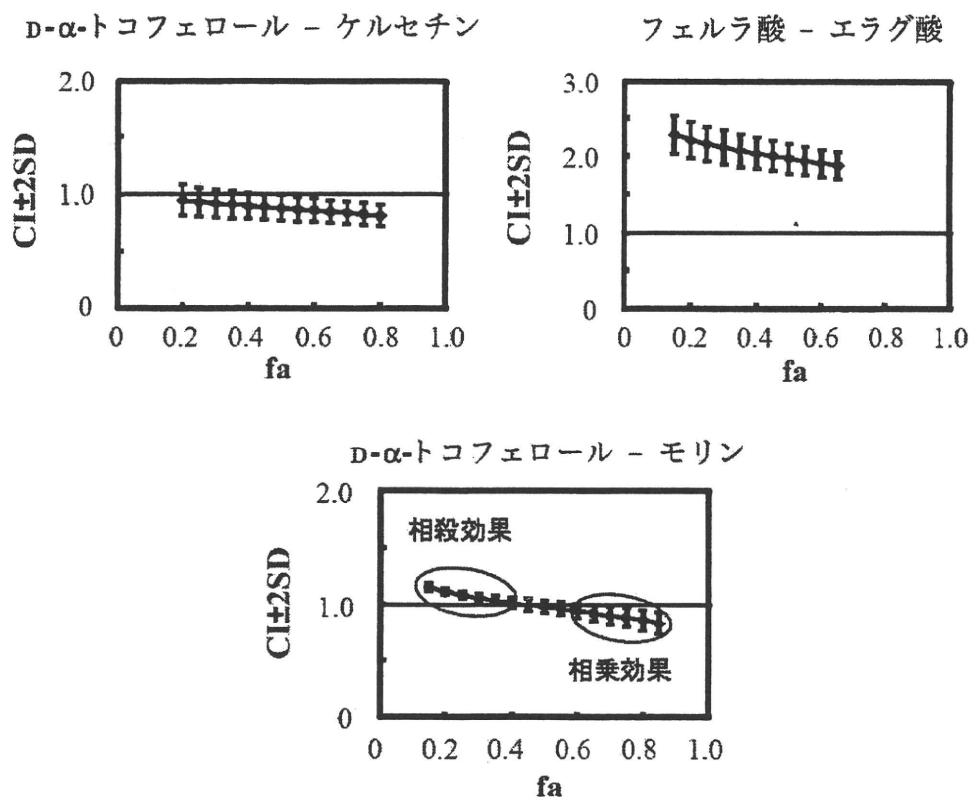


図8. 酸化防止剤の組み合わせによるCIプロット

表4. Fraction product methodとMedian effect analysisによる酸化防止剤併用効果の比較

化合物の組み合わせ	Fractional product method	Median effect analysis
D- α -トコフェロール-ケルセチン	相乗	相乗
フェルラ酸-エラグ酸	相殺	相殺
D- α -トコフェロール-モリン	相乗	相加
セサモール-エラグ酸	相乗	相殺

合があるため、解析法の妥当性を慎重に評価すべきである。現在、我々はMedian effect analysisを中心に酸化防止剤の併用効果の解析を試み、その有効性を評価している。今回示した結果はその一部であり、解析のもととなるデータは、DPPH法による測定値のみである。しかし、上述のように抗酸化能評価法は様々であり、測定法により抗酸化物質の作用様式は異なる。抗酸化能評価法に応じた併用効果の評価系を確立することも、相乗効果、相殺効果を議論するためには必要となるであろう。

5. おわりに

本総説では代表的な抗酸化能評価法を紹介したが、抗酸化能評価法は多種多様であるばかりでなく、その測定メカニズムも異なる。従って、同一の試料でも測定法が違くと得られ

る抗酸化能が異なる上、各測定法で得られた値が相関しない場合が多い。個々の測定法におけるプロトコルが統一されていない点がこの状況をさらに複雑にしている。抗酸化能評価を行う場合、実験者は評価対象試料に応じて試験法を選ぶ必要があるが、実際にはその選択が極めて難しい。結果として、複数の評価法を併用せざるを得ないのが現状である。また、生体内での食品の抗酸化能を評価するための試験法と、食品保存に使用する酸化防止剤の抗酸化能を評価するための試験法を区別する必要もあろう。

抗酸化能評価法を統一化し、標準的な測定法を提示しようとする試みが国内外で行われている²⁰⁾。その第一候補となっているのが上述のORAC法である。しかしながら、上記の理由により評価法を統一することは極めて困難である。今回我々は、DPPH法、ABTS法、WST-1法の3法に関して公定法化の可能性を検討してきた。その結果、現時点では、いずれの方法も酸化防止剤の抗酸化能評価における公定法の候補と

なり得るという結論に至っている。DPPH法及びABTS法に関しては、高い精度を有し、かつ広い適用性を有することから公定法の最有力候補としているが、脂溶性物質の測定と測定精度に課題が残るWST-1法に関しても公定法化への可能性を十分残していると考えている。その理由としては、植物系試料中に多く含まれる抗酸化酵素の活性測定には、DPPH法及びABTS法は適さず、WST-1法が極めて有力と考えられるからである。このことは、測定対象物に対して最適な抗酸化評価法を選択する必要があるということを示している。今後、上記3法にORAC法も含めて分析法の妥当性確認を行い、各種試料に対して適切な抗酸化評価法を提示することが必要であろう。

本総説では抗酸化成分の相乗・相殺効果についても述べた。抗酸化能を指標とした酸化防止剤の品質規格基準を設定する上では、抗酸化物質の相互作用を評価することは極めて重要である。特に、酸化防止剤使用時に相殺効果が生じた場合、期待される抗酸化効果が得られなくなるため重大な問題となる。本稿では、2種類の併用効果の解析法 (Fractional product method及びMedian effect analysis) を例に挙げ、その解析方法、特徴及び応用例について解説した。特に、Median effect analysisでは、反応メカニズムに応じた解析が可能だけでなく、抗酸化物質の濃度レベルに応じて併用効果 (相加・相乗・相殺) を判定できる点で有用性は高い。濃度レベルに応じた判定結果は、実際に酸化防止剤を用いる場合に非常に有益な情報となるであろう。

抗酸化能評価法の標準化に向けて、残されている課題は多い。多数の研究機関がこの難題に取り組んでいる。現時点では、我々の取り組みもその一部にすぎないが、今後本研究の成果が食品の抗酸化機能研究の進展や食品添加物の品質確保の一助となることを期待したい。

引用文献

- 1) 今田伊助, 佐藤英介, 井上正康, 化学と生物, 37, 411-419 (1999).
- 2) 澤智裕, 赤池孝章, 前田浩, 化学と生物, 40, 15-21 (2002).
- 3) 二木悦雄, 化学と生物, 37, 554-561 (1999).
- 4) G. Cao, H. M. Alessio and R. G. Cutler, *Free Radical Biol. Med.*, 14, 303-311 (1993).
- 5) B. Ou, M. Hampsch-Woodill and R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619-4926 (2001).
- 6) D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. Flanagan and E. Deemer, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1815-1821 (2002).
- 7) R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannale, M. Yang and C. Rice-Evans, *Free Radical Biol. Med.*, 26, 1231-1237 (1999).
- 8) M. S. Blois, *Nature*, 181, 1199-1200 (1958).
- 9) T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba and J. Terao, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1201-1204 (1998).
- 10) 大柳善彦, "活性酸素と病気", 化学同人, 1989.
- 11) 井上正康, "活性酸素と医食同源", 共立出版, 1996.
- 12) H. Ukeda, Y. Hasegawa, T. Ishii and M. Sawamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 2039-2042 (1997).
- 13) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda and M. Sawamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 63, 485-488 (1999).
- 14) H. Ukeda, A. K. Sarker, D. Kawana and M. Sawamura, *Anal. Sci.*, 15, 353-357 (1999).
- 15) Y. Noda, K. Anzai, A. Mori, M. Kohno, M. Shinmei and L. Packer, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 42, 35-44 (1997).
- 16) 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, 日食科工誌, 54, 482-487 (2007).
- 17) 後藤哲久, "食品分析法の妥当性の確認ハンドブック 第1版", 永田忠博編, サイエンスフォーラム, 2007, pp. 32-38.
- 18) J. L. Webb, "Enzyme and metabolic Inhibitors," Vol. 1, Academic press, New York, 1963, pp. 66-79, 488-512.
- 19) J. Shi, Q. Qu, Y. Kakuda, S. J. Xue, Y. Jiang, S. Koide and Y. -Y. Shim, *J. Food Comp. Anal.*, 20, 603-608 (2007).
- 20) 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, 日食科工誌, 56, 129-136 (2009).
- 21) T. C. Chou and P. Talalay, *Adv. Enzyme Regul.*, 22, 27-55 (1984).
- 22) M. C. Berenbaum, *J. Theor. Biol.*, 114, 413-431 (1985).
- 23) 井邊早春, 石川洋哉, 受田浩之, 山崎壮, 松井利郎, 松本清, 日本食品科学工学会第56回大会講演要旨集, 101 (2009).
- 24) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, 山崎光司, 津志田藤二郎, 生物と化学, 47, 237-243 (2009).

松本 清

九州大学大学院農学研究院
教授
農学博士



1974年九州大学農学部助手、1978年同大学農学部助教授、1989年同大学農学部教授、2000年同大学大学院農学研究院教授。

受田 浩之

高知大学
教授
農学博士



1982年九州大学農学部食糧化学工学科卒業、1984年同大学大学院農学研究科修士課程修了、1986年同大学大学院農学研究科博士課程中途退学、同年同大学農学部助手、1991年高知大学農学部助教授、2004年同教授、2005年地域連携推進本部長、国際・地域連携センター長兼務、2006年高知大学副学長兼務、1990年農学博士（九州大学）、1991年ドイツ国立バイオテクノロジー研究所（GBF）、～92年客員研究員。

島村 智子

高知大学農学部
准教授
博士（農学）



2002年愛媛大学大学院連合農学研究科博士課程修了、同年～2005年日本獣医畜産大学（現日本獣医生命科学大学）助手、2005年～高知大学農学部准教授。

松藤 寛

日本大学生物資源科学部食品生命学科
准教授
博士（農学）



1996年九州大学大学院農学研究科博士後期課程修了、同年日本大学生物資源科学部助手、1999年同専任講師、2002年～2003年米国カリフォルニア大学デービス校環境毒性部客員研究員、2008年日本大学生物資源科学部准教授、現在に至る。

山崎 壮

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
第二室長
薬学博士



1983年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了、同年国立衛生試験所（現国立医薬品食品衛生研究所）勤務、食品添加物部研究員、機能生化学部第一室長を経て、2000年～食品添加物部第二室長。

PROFILE

石川 洋哉

福岡女子大学人間環境学部栄養健康科学科
准教授
博士（農学）



1997年九州大学大学院農学研究科博士後期課程修了、同年同大学ベンチャービジネスラボラトリー講師（中核の研究機関研究員）、2000年日本学術振興会特別研究員、同年九州大学大学院農学研究科助手、2007年同助教、2009年福岡女子大学人間環境学部栄養健康科学科准教授、現在に至る。

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

福岡女子大学 人間環境学部 准教授 石川洋哉

はじめに

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

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

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

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

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

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

我々は、厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業「既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発」(平成20～22年度)において、この問題に着手している。本プロジェクトは、国立医薬品食品衛生研究所(山崎 社)、高知大学(受田浩之、島村智子)、九州大学(松井利郎、松本清(現 崇城大学))、日本大学(松藤 寛)との共同研究である。

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

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

1) 薬剤の併用効果解析法

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

$$(f_{a})_{12} = (f_{a})_1 \times (f_{a})_2 \quad \text{—— (1)}$$

ここで、 $(f_{a})_{12}$ は薬剤1と2併用時に薬剤の影響を受けていない割合を、 $(f_{a})_1$ は薬剤1単独使用時に影響を受けていない割合を、 $(f_{a})_2$ は薬剤2単独使用時に影響を受けていない割合を示す。

また、薬剤1と2併用時の阻害割合を $(f_{i})_{12}$ 、単独使用時の阻害割合を $(f_{i})_1$ 、 $(f_{i})_2$ とすると、式(1)は以下のように表される。

$$[1 - (f_{i})_{12}] = [1 - (f_{i})_1][1 - (f_{i})_2] \quad \text{—— (2)}$$

または

$$(f_{i})_{12} = [(f_{i})_1 + (f_{i})_2] - [(f_{i})_1 \times (f_{i})_2] \quad \text{—— (3)}$$

本理論に基づくと推察される予測式が一部の抗酸化成分の相乗効果の判定に使

用されている。例えば、Shiらの論文⁸⁾では以下の式が用いられている。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

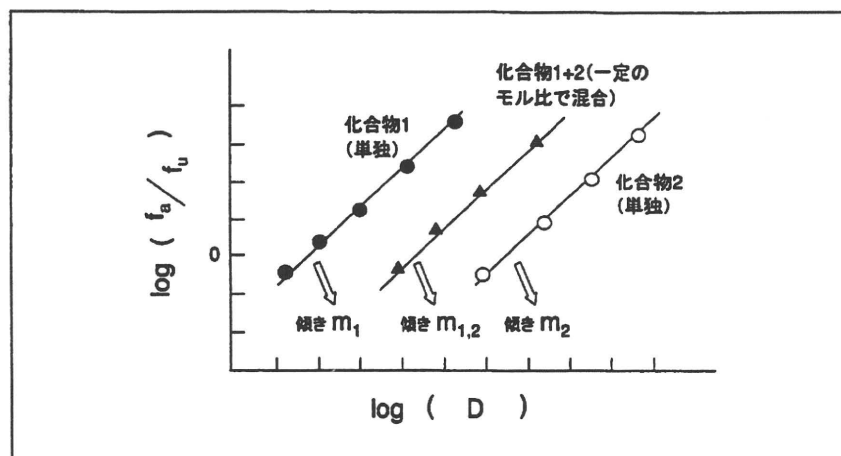


図1: 2成分混合系でのMedian effectプロット

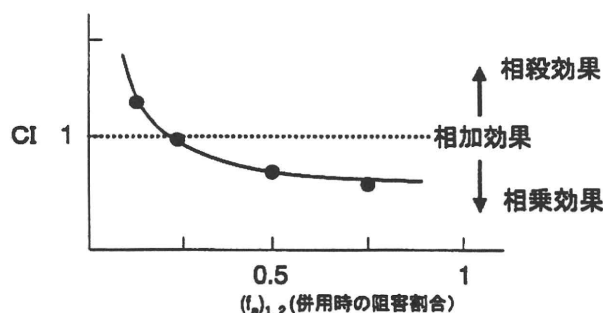


図2: 2成分混合系でのCIプロット

表1: 2成分を IC_{50} 濃度で混合した場合の阻害率予測値の比較

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

CI値は以下の式により算出される。

I or III型

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

II or IV型

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

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

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

法の第一候補として検討を進めている。

2) Median effect analysis による 抗酸化成分の成分間相互作用の解析¹⁰⁾

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

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

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

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

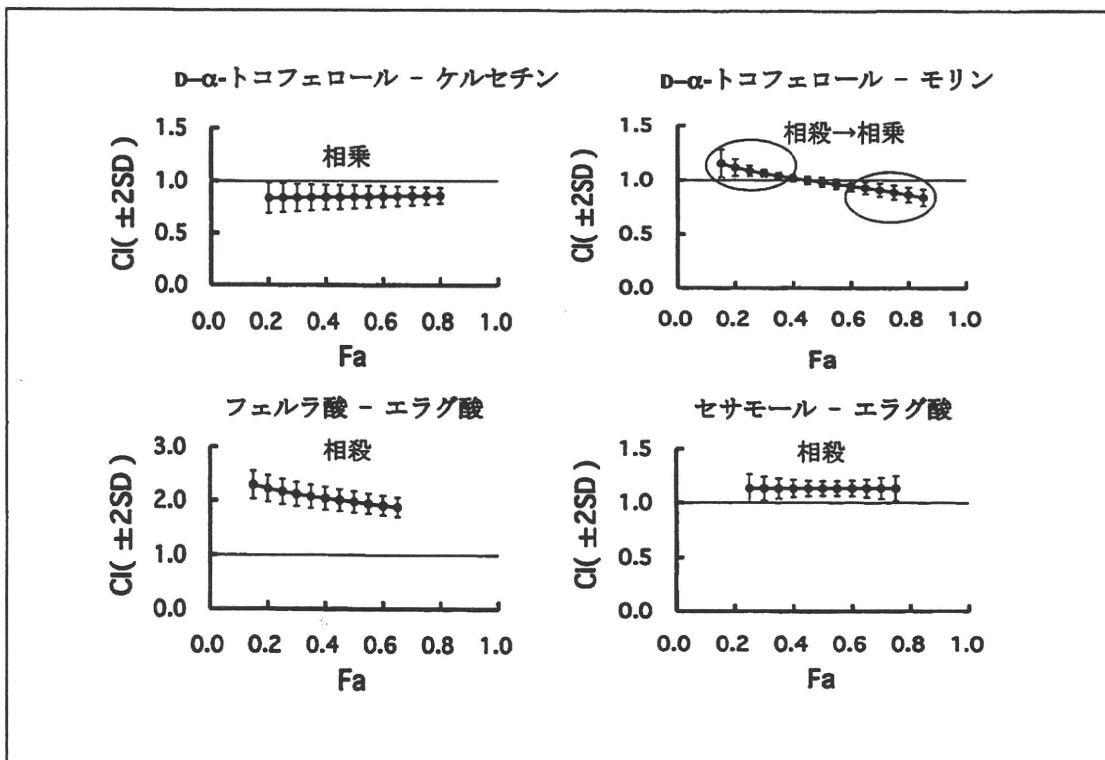


図3：酸化防止剤の組合せによるCIプロット

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

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

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

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

おわりに

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

—◇—◇—◇—◇—◇—◇—◇—◇—

次回執筆者として、中村学園大学栄養科学科 太田英明先生をご紹介します。

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

<参考文献>

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



プロフィール

石川 洋哉 (いしかわ ひろや)

福岡女子大学人間環境学部 准教授

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

定量 NMR を用いたダツタンソバ乾麺中のケルセチンの迅速定量

(2010年7月26日受付)

(2010年10月8日受理)

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

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) 日本電子株式会社

c) 独立行政法人 産業技術総合研究所 計測標準研究部門

d) 和光純薬工業株式会社

Rapid quantification of quercetin in tartary buckwheat noodle by quantitative NMR

(Received July 26, 2010)

(Accepted October 8, 2010)

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

a) National Institute of Health Sciences

b) JEOL Ltd.

c) National Metrology Institute of Japan, AIST

d) Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Abstract

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

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

I 緒言

現在、食品中の機能性成分や有効成分などの天然有機化合物の定量用標準品はほとんど流通していない。よって、定量用標準品が入手不可能な場合には、一般的に自ら単離精

製または全合成したもの、あるいは市販試薬を定量用標準品の代用品としたクロマトグラフ法による定量分析が常法となっている。しかしながら、クロマトグラフ法は、純度または濃度既知の定量用標準品に対する測定対象のピーク面積の割合から正確な定量値が求められるものである。すなわち、定

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

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

量用標準品とした化合物の純度が正確に値付けられていなければ、得られた定量値の信頼性を確保しているとは言えない。

我々は、上述の問題を根本的に解決することを目的とし、国際単位系 (SI) に基づく計量トレーサビリティが確保された新たな定量分析法として、NMR を用いた定量法 (quantitative NMR (qNMR)) の開発を行っている¹⁻⁶⁾。qNMR は、他の定量分析法のほとんどが個々の化合物に特有の物性値を利用しているに対し、化合物中に等価に存在する水素原子の数を指標として定量値を求める方法である。すなわち、一つの¹H-NMR スペクトル上に2つの化合物が同時に観察される場合、プロトン1個あたりのシグナル面積比は2つの化合物のモル濃度に比例することから、一方の化合物の純度と濃度が明らかであれば、もう一方の化合物の純度あるいは含量を、観察されるシグナル面積比と調製値の関係から算出可能であることを利用している。したがって、qNMR は、測定対象と同一の化合物の定量用標準品を必要とせず、別の物質を基準として定量分析が可能な定量法であり、SI にトレーサブルな一次標準測定法のうち、一次標準比率法、すなわち「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」の資格を原理的に有する方法である。我々は、これまでに qNMR を応用し、残留農薬試験用イソキサチオンオキソン標準品⁵⁾、食品添加物コチニール色素の主色素成分カルミン酸の絶対量⁶⁾ が計量学的に正確に算出可能であることを報告した。

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

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

そこで本研究では、qNMR が分離操作を伴わない迅速かつ

正確な食品中の機能性成分の定量に応用可能であるかを検証するため、ダツタンソバ乾麺中のクエルセチンの含量測定を試み、一般的な分析法である LC による結果と比較検証した。その結果、qNMR により、ダツタンソバ乾麺中のクエルセチンの絶対量を、迅速かつ簡便に、かつ、SI にトレーサブルに求められることを明らかとした。

II 実験方法

1. 試薬および試料

ダツタンソバ乾麺1製品 (A社製) は、市場より購入したものをを用いた。

クエルセチン市販試薬 (quercetin $C_{15}H_{10}O_7 \cdot XH_2O$ (MW: 302.24 as anhydrate)、純度 (ラベル表示) >95.0%) およびルチン市販試薬 (rutin $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$ (MW: 610.52 as anhydrate)、純度 (ラベル表示) >98.0%) は東京化成工業 (株) 製を用いた。

qNMR 基準物質として高純度ヘキサメチルジシラン (hexamethyldisilane: HMD) (和光純薬工業 (株) 製)、qNMR 用重溶媒として重メタノール (methanol-*d*₄) (Isotec 製) を用いた。高純度フタル酸水素カリウム (potassium hydrogen phthalate: PHP) 認証標準物質 (certified reference material: CRM) (品番 NMIJ CRM 3001-a: 純度 100.00 ± 0.027%) は (独) 産業技術総合研究所製を用いた。なお、PHP は、添付の使用法に従い、軽く砕いた後、120°C で約1時間加熱し、デシケーター中で放冷後、用時使用とした。

2. 装置

各種分析データの取得には、以下の機器を用いた。

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

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

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

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

3. 分析試料の調製

ダツタンソバ乾麺を約 1 cm に切断し、乳鉢上で磨り潰した粉末約 2.0 g を精密に量り取り、メタノール 50.0 mL に懸濁し、室温下、時々振り混ぜながら3日間抽出した。抽出後、遠心分離 (3,000 rpm) により不溶物を取り除き、得られた抽出液を遠心エバポレーターを用いて減圧下乾燥した。得られた残渣にあらかじめ HMD の濃度を校正した qNMR 標準液

(methanol- d_4) 3.0 mL を正確に加えて溶解した。この溶液 0.6 mL を綿栓ろ過して NMR 試験管に封入したものを qNMR 用試料溶液とし、一方、1.0 mL を LC バイアル瓶に封入したものを LC 用試料溶液とした (Fig. 1)。なお、別途、遠心分離により取り除いた不溶物中のクエルセチン (QC) は検出下限以下であることを確認した。

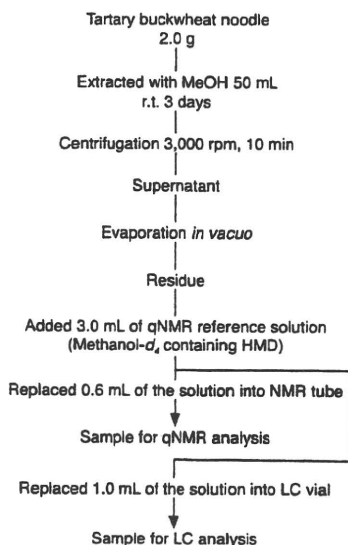


Fig. 1. Extraction of quercetin from tartary buckwheat noodle and sample preparation for qNMR and LC analysis

4. qNMR による定量分析

4-1) qNMR 標準液の調製および HMD の濃度校正

qNMR 標準液の調製および HMD の濃度校正は既報^{5,6)}に準じた。すなわち、HMD 約 100 mg を精密に量り取り、methanol- d_4 を加えて溶解し、正確に 50.0 mL とした。この溶液 10.0 mL を正確に取り、methanol- d_4 で 50.0 mL に定容して 5 倍希釈したものを qNMR 標準液とした。qNMR 標準液中の HMD の濃度は、認証標準物質 (CRM) である PHP により校正して求めた。すなわち、PHP 約 15 mg を精密に量り取り、qNMR 標準液 5.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管 (5 mm ϕ x 200 mm, S-type (和光純薬工業 (株) 製)) に封入したものを HMD 濃度校正用試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し、PHP のフェニルプロトン PhH \times 4 (87.53 ppm, 8.15 ppm) および HMD のメチルプロトン CH₃ \times 6 (80 ppm) に由来するシグナル面積、分子量、濃度等を式 (1) に代入し、qNMR 標準液中の HMD の濃度 (W_{HMD}) を校正し、(404.2 \pm 1.8) μ g/mL (AV \pm SD, n = 3) を得た。

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

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

= PHP の純度 (100.00%)。

4-2) qNMR によるクエルセチンの絶対定量

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

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

ただし、 W_{TBN} = TBN の濃度 (mg/mL) (= TBN 2.0 g/qNMR 用試料溶液 3.0 mL)、 M_{QC} = QC の分子量 (quercetin as anhydrate) = C₁₅H₁₀O₇ (MW 302.24)、 I_{QC} = QC の特定基のシグナル強度面積、 H_{QC} = QC の特定基のプロトン数 (QC = PhH \times 1)、 C_{QC} = QC の含量 (mg/g)。

また、クエルセチン市販試薬の純度測定は以下の様に行った。すなわち、クエルセチン市販試薬約 20 mg を精密に量り取り、予め調製した qNMR 標準液 5.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを qNMR に付し、HMD およびクエルセチンに由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積、分子量、濃度等を式 (3) に代入し、市販試薬中のクエルセチン (QC) の純度 (P_{QC}) (w/w%) を算出した。

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

ただし、 P_{QC} = QC の純度 (w/w%)。

4-3) qNMR 測定条件および解析処理

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

Table 1. Instruments and acquisition parameters

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

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

5. LCによる分析

LC用試料溶液を以下の条件で分析を行い、22.7分に観察されたクエルセチンのピーク面積を求め、絶対検量線法 ($r^2 = 0.98$)により、ダットンソバ乾麺 1g中のクエルセチンの含量 (mg)を求めた。なお、絶対検量線の作成には、予め qNMRにより純度を補正したクエルセチン(無水物としての純度: $P_{QC} = 92.8\%$)市販試薬を定量用標準品とし、1.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.50 mg/mLにメタノールで希釈調製したものを用いた。LC条件: 注入量, 5.0 μ L; カラム, J'sphere ODS-H80 (4.6 x 250 mm, 5 μ m (YMC製)); カラム温度, 40°C; 移動相, 0.1% 酢酸水溶液: 0.1% 酢酸メタノール = 95 : 5 (0 min) \rightarrow 5 : 95 (25-30 min); 流量, 1.0 mL/min; 検出波長, UV 356 nm。

III 結果及び考察

1. qNMRによる定量分析

qNMRでは、スペクトル上に観察される基準物質と測定対象化合物のシグナル強度とモル濃度との関係から、測定対象化合物の濃度を導くことが可能である。そこで、既報^{5,6)}と同様に、qNMRにより得られる定量値のSIトレーサビリティを、Fig. 2に示す方式で実現した。すなわち、計量学的に妥当な手順によって値付けされ、計量学的トレーサビリティが確保された認証標準物質(CRM)の一つであるフタル酸水素カリウム(PHP)を一次標準として使い、qNMR標準液中のHMDの濃度をPHPにより校正した後に、HMDを二次標準として測定対象化合物のqNMR測定を行う2段階の方式を用いることとした。

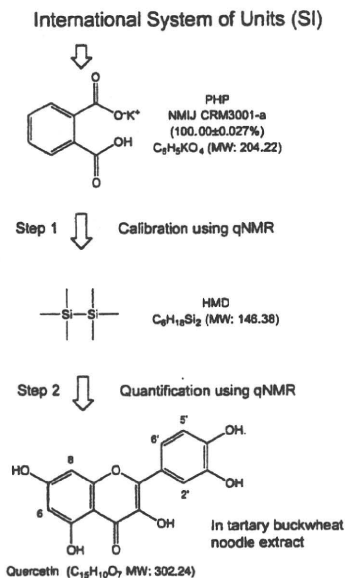


Fig. 2. Strategy of SI-traceable absolute quantification based on qNMR

Fig. 3には、qNMR基準物質としてHMDを404.2 μ g/mL含むqNMR標準液3.0 mLにダットンソバ乾麺製品2.0 gのメタノール抽出物を溶解したものの実際のqNMRスペクトルを示した。 δ 0 ppmにqNMR基準物質のHMDのメチル基のシグナル、 δ 0.7 ~ 5.4 ppmに夾雑物として考えられる脂肪酸や糖類等によるシグナルと共に、 δ 6.14 ppm、6.36 ppm、6.83 ppm、7.59 ppmおよび δ 7.69 ppmにクエルセチンの6, 8, 5', 6', 2'位に由来するシグナルが観察された。qNMRにより正確な定量分析を行うためには、他の不純物と重ならない十分に分離したシグナルを選択することが重要である。そこで、クエルセチンおよびルチン市販試薬についてqNMRスペクトルの測定を行い、ダットンソバ乾麺の抽出物のスペクトルと比較した(Fig. 4)。その結果、クエルセチンとルチンの6, 8, 5', 6'位のシグナルは、ほぼ完全に重なることが確認された。また、ダットンソバ乾麺の抽出物中のクエルセチンの6, 8, 5', 6'位のシグナルの付近には、極微量のルチンと共に他のフラボノイド配糖体やフェノール性化合物^{8,9)}に由来すると考えら

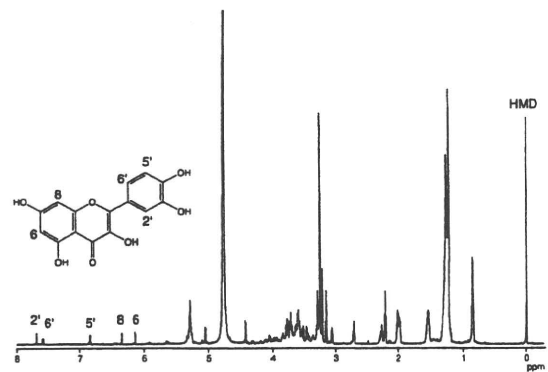


Fig. 3. qNMR spectra of tartary buckwheat noodle extract. The 1H chemical shift were shown as the δ scale in ppm, relative to HMD (hexamethyldisilane) ($\delta = 0.00$ ppm).

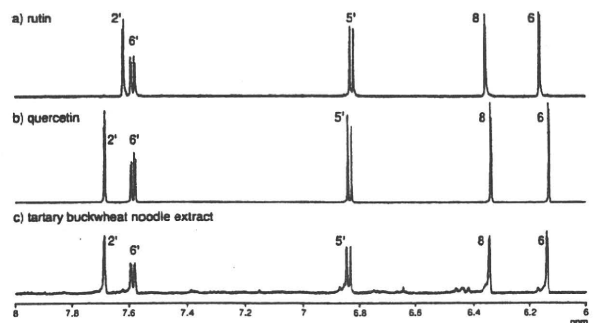


Fig. 4. qNMR spectra of rutin, quercetin and tartary buckwheat noodle extract

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

れる小さなシグナルが観察され、このことから定量用シグナルとして不適であると判断された。一方、ケルセチンの2'位のシグナルはルチンと完全に分離し、他の不純物の影響を受けていないと予想されたことから、このシグナルを定量用として選定した。qNMR 基準物質の HMD とのシグナル面積比から式 2 により定量値を求めた結果、ダツタンソバ乾麺中にケルセチン (無水物として) が、 (1.58 ± 0.14) mg/g (AV \pm SD, $n = 3$) 含まれていると算出された。

2. LC による定量分析

ダツタンソバ乾麺のメタノール抽出物を LC に付したところ、検出波長 UV 364 nm において、22.7 分にケルセチンに由来する大きなピークが、19.5 分にルチンに由来する小さなピークが観察された (Fig. 5)。

ケルセチン市販試薬が X 水和物であること、またそのラベル表示された純度値が LC におけるピーク面積百分率を示しただけであり、計量学的に正確な純度が値付けられたものでないことから、まず、既報^{5,6)}に従い、qNMR を用いてケルセチン市販試薬の絶対純度を決定した。すなわち、ケルセチン市販試薬を qNMR 標準液に溶解し、ケルセチンの 2' 位と HMD のシグナル面積比を測定し、式 3 より、純度 (w/w%) を求めた。その結果、ケルセチン市販試薬の計量学的に正確な純度は、無水物として 92.8% であることがわかった。

次に、qNMR により計量学的に正確に純度が決定されたケルセチンを用い、絶対検量線を作成し、ダツタンソバ乾麺中のケルセチンの含量を無水物として求めたところ、その定量値は (1.54 ± 0.12) mg/g (AV \pm SD, $n = 3$) であった。この結果は、qNMR により得られたダツタンソバ乾麺中のケルセチンの定量値 (1.58 ± 0.14) mg/g とほぼ一致し、qNMR によって直接評価した定量値が正確であることを裏付けるものであった (Fig. 6)。以上のことから、qNMR により、食品中の測定対象と同一の化合物の定量用標準品を必要とせず、別の物質を基準として SI にトレーサブルな定量値を算出可能であることが確認された。さらに、qNMR では、1 測定当たりの所要時間が約 10 分以内と迅速であり、LC と同等以上にハイスループットな分析法として実用的であると考えられた。

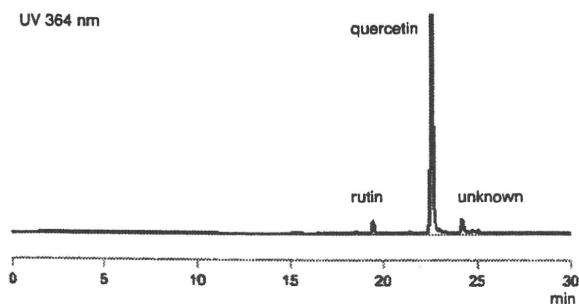


Fig. 5. LC profile of methanol extract from tartary buckwheat noodle

LC conditions are described in the experimental section.

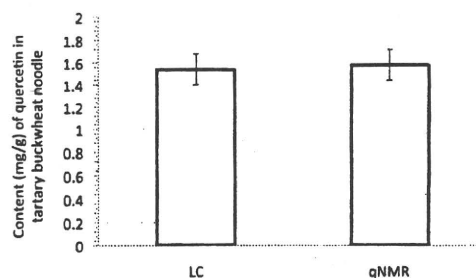


Fig. 6. Comparison of the quantitative values obtained by LC and qNMR

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

IV 結論

ダツタンソバ乾麺中のケルセチンの迅速かつ正確な定量法として、qNMR を応用した。その結果、正確な純度が値付けられたケルセチンの標準品が入手できない場合においても、qNMR を応用することによって、ダツタンソバ乾麺中のケルセチンの含量が迅速かつ計量学的に正確に求められることが確認された。また、今回行った qNMR によるダツタンソバ乾麺中のケルセチンの定量分析では、抽出物を qNMR 標準液に転溶して測定するだけであり、操作が単純である点、並びに 1 測定当たりの所要時間が約 10 分以内で迅速である点が優れていた。

現状では、qNMR の検出感度は他の多くの分析法に劣る。しかし、qNMR を用いて市販試薬の純度を正確に値付けた後に、クロマトグラフ法の定量用標準品として用いる等、従来法の利点を組み合わせることによって、その弱点を補うことも可能である。

以上のことから、食品中の機能性成分等の天然有機化合物の迅速かつ正確な定量分析法として、qNMR は十分に実用レベルに達したと考えられる。我々は、qNMR の分析値の信頼性を更に向上するために、高感度化および高精度化に関する研究と共に qNMR による複合分析法の開発を継続中である⁴⁾。

V 謝辞

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

VI 参考文献

- 1) Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa,

- S., Nomura, A., Maeda, T.: Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia*, 41, 213-218 (2004).
- 2) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K.: Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add. Contam.*, 24, 799-806 (2007).
 - 3) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hirai, T.: A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, 14, 79-86 (2009).
 - 4) Ihara, T., Saito, T., Sugimoto, N.: Expansion of organic reference materials for the analysis of hazardous substances in foods and environments. -Realization of an efficient metrological traceability using the quantitative NMR method-. *Synthesiology*, 2, 12-22 (2009).
 - 5) Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T.: Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Nihon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, 16, 28-33 (2009).
 - 6) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Ito, S., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T.: Absolute quantification of carminic acid in cochineal extract by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, 51, 19-27 (2010).
 - 7) Yasuda, T., Nakagawa, H.: Purification and characterization of the rutin-degrading enzymes in tartary buckwheat seeds. *Phytochemistry*, 37, 133-136 (1994).
 - 8) Wu, Y., Sun, B., Huang, J., Gao, H., Wu, L.: A new flavonoid glycoside from the seeds of *Fagopyrum tataricum*. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 2, 202-205 (2007).
 - 9) Kim, S.-J., Zaidul, I.S.M., Suzuki, T., Mukasa, Y., Hashimoto, N., Takigawa, S., Noda, T., Matsumura-Endo, C., Yamauchi, H.: Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) spouts. *Food Chemistry*, 110, 814-820 (2008).

定量NMRを用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保

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

Naoki Sugimoto

Atsuko Tada

Takako Suematsu

Kazunori Arifuku

^{a)} 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部

東京都世田谷区上用賀1-18-1

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

^{b)} 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

東京都世田谷区上用賀1-18-1

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

^{c)} 日本電子株式会社NM事業ユニットNMアプリケーショングループ

東京都昭島市武蔵野3-1-2

NM Application Group, NM Business Unit, JEOL Ltd.
1-2-3 Musashino, Akishima-shi, Tokyo 196-8558, Japan

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

東京都昭島市中神町1 156

R&D Business Promotion Department, General Planning and Promotion Office, JEOL Ltd.
1 156 Nakagami-cho, Akishima-shi, Tokyo 196-0022, Japan

Summary

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

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

1. はじめに

食品、健康食品などの機能性や有効性だけでなく、安全性

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

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

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

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

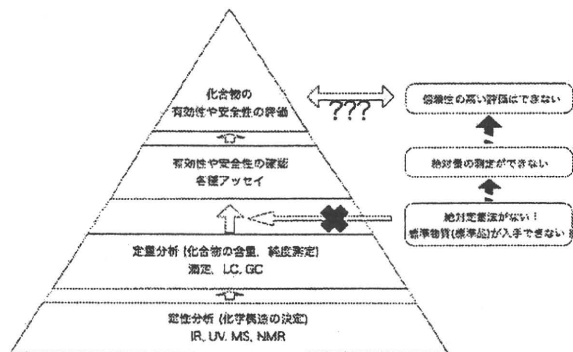


図1. 有機化合物の定量分析および有効性や安全性の評価における問題点

2. クロマトグラフ法とqNMRの違いとは?

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

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

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

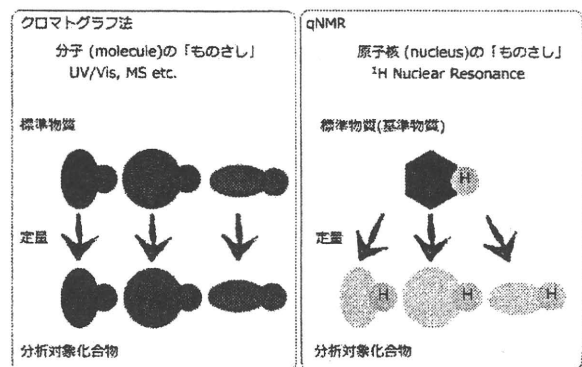


図2. クロマトグラフ法とqNMRの違い
クロマトグラフ法では分析対象化合物と同一の標準物質が必要。qNMRでは分析対象化合物と同一の標準物質を必要とせず、別の化合物を基準として水素の原子数の比から様々な化合物が定量できる。

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

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

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

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

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

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

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

3. qNMRにおけるSIトレーサビリティの確保

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

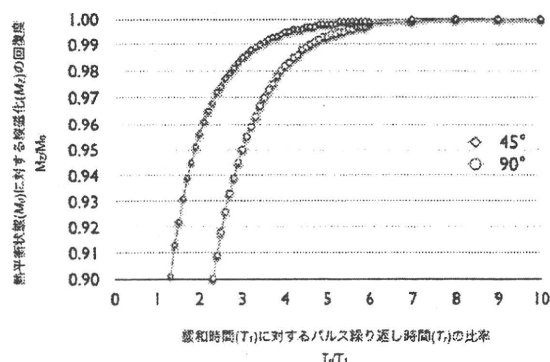


図3. パルス繰り返し時間と縦磁化の回復の関係

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

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

る定量分析には利便性と信頼性に欠点が残されていた。そこで、qNMR基準物質として2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸-d₆ナトリウム塩(DSS-d₆) (水系用) およびヘキサメチルジシラン(HMD) (有機溶媒系用) を用いることとした。DSS-d₆とHMDは、テトラメチルシラン(TMS)と同様に0 ppm付近にシグナルを示すため、これらを基準物質として用いたqNMRスペクトルは通常の¹H-NMRスペクトルと同様に扱うことができる。水溶性化合物用にDSS-d₆、有機溶媒溶解性化合物用にHMDをqNMR基準物質としてそれぞれ一般化することによって、基準物質の選択の際の煩雑さが省かれるだけでなく、測定対象の化合物の純度、含量や品質を明確に表したqNMRスペクトルデータベースとしても有用となり、qNMRによる定量分析の利便性と信頼性が大幅に改善できると考えた。

しかしながら、qNMRの技術開発を開始した当初、計量学

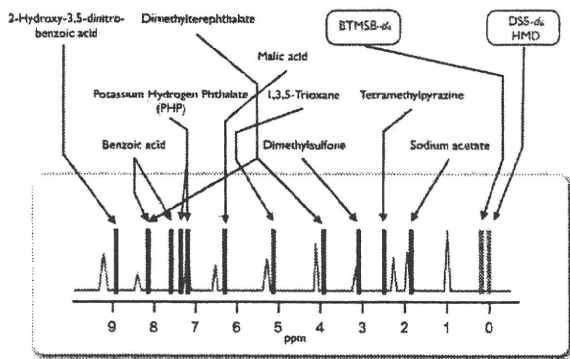


図4. qNMR基準物質の化学シフト値

定量NMR (qNMR) に関する論文中で既に報告されている様々な基準物質の化学シフト値。新たにqNMR基準物質として設定したDSS-d₆とHMDは0 ppmにシグナルを与える。HMDは液状であり秤量に注意が必要であるため、取り扱いが簡単で安定な固体のBTMSB-d₆が別途開発されている。

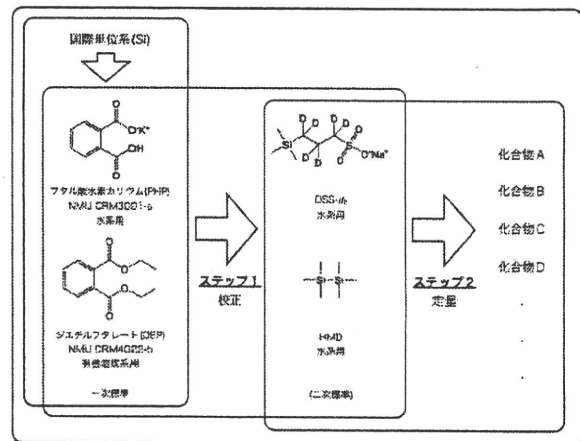


図5. qNMRにおけるSIトレーサビリティの確保

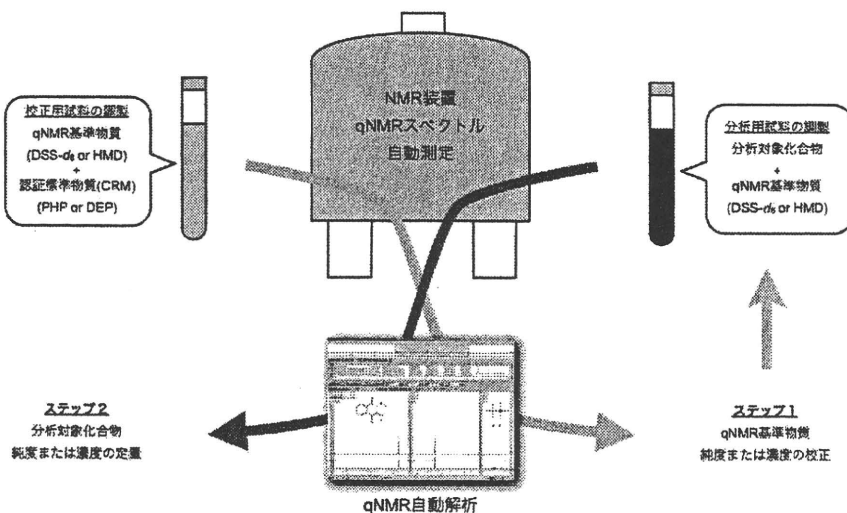


図6. qNMRによる定量分析のフロー

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

的に正確に純度が値付けられたDSS- d_6 とHMDは流通していなかったため、厳密な純度値あるいは濃度値が要求されるqNMR基準物質としてそのまま用いることができなかった。そこで、qNMRによって得られる定量値の国際単位系(SI)へのトレーサビリティが確保された認証標準物質(CRM)であるNMIJ CRM 3001-a(フタル酸水素カリウム:PHP、水系用)またはNMIJ CRM 4022-b(ジエチルフタレート:DEP、有機溶媒系用)を一次標準として用い、qNMR標準液中のDSS- d_6 またはHMDの濃度を校正した後に、DSS- d_6 またはHMDを二次標準として測定対象化合物のqNMR測定を行う2段階の方式を用いることとした。すなわち、qNMRの基準物質としてDSS- d_6 およびHMDを用いた際の測定対象の化合物の定量値のSIトレーサビリティは、CRMであるPHPまたはDEPを介して実現した(図5)^{2,3)}。

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

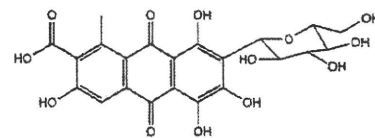
物質量の絶対値は、SIにトレーサブルな測定によって得られると定義されている。このような測定法は「一次標準測定法」³⁾と呼ばれている。「一次標準測定法」の資格を有する分析法は「一次直接法」と「一次比率法」に分類される。「一次直接法」は「物質量の基準となる他の化学物質を用いずに、自分自身で目的の化学物質の物質量を測れる方法(絶対測定法)」であり、電量分析法、重量分析法および凝固点降下法がある。これらの分析法は物質量の絶対値が得られるが、一般に分析の迅速性に欠け、また分析できる物質の種類に限られる。一方、「一次比率法」は「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質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

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

4. qNMRを用いた絶対定量の応用例

4-1. 天然赤色素カルミン酸の純度決定³⁾

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



カルミン酸(carminic acid)

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

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