

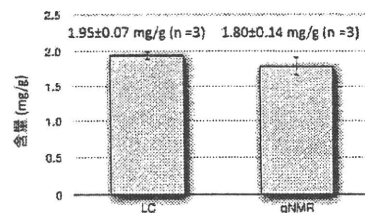
図8. ソバ中のルチンおよびケルセチンの定量分析
 定量ルート1: ソバのメタノール抽出物について直接qNMR測定を行い、2'-Hのシグナル面積からルチンおよびケルセチンを定量した。
 定量ルート2: qNMRによりルチンおよびケルセチンの試薬の純度決定をした後に、絶対検量線を作成してLCにより定量した。

4-2. ソバ中のルチンとケルセチンの絶対定量⁴⁾

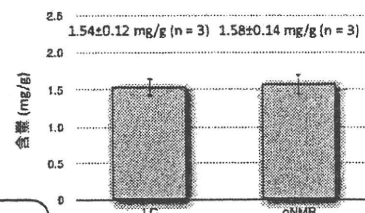
ソバ中のルチンおよびケルセチンの含量測定は、天然物化学あるいは食品分析学の実習課題として採用している大学も多く、その実習の手引き書には「LCにより市販試薬を標品とした絶対検量線法で定量すること」と記載されており、実習後、学生は何の疑いもなく「正確な定量値を求めた」とレポートを提出するだろう。しかし、クロマトグラフ法による定量分析の原理に基づけば、間違った定量値を報告していることになる。なぜなら、フラボノイドとして最も有名なルチンおよびケルセチンといえども正確に純度が値付けられた標準物質は存在しないだけでなく、市販試薬ルチンは三水和物として、ケルセチンはX水和物として主に供給されており、乾燥状態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

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

ソバ茶(茶葉)中のルチン(三水和物として)



韃靼ソバ(乾麺)中のケルセチン(無水物として)



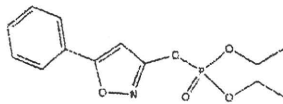
LCによる定量
絶対検量線が必要

qNMRによる直接定量
|測定当たり10-20分
絶対検量線の作成は不要

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

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

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



イソキサチオンオキソン標準品 (isoxathion oxon std)

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

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

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

4-3. イソキサチオンオキソン標準品の絶対定量⁵⁾

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

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

5. まとめ

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

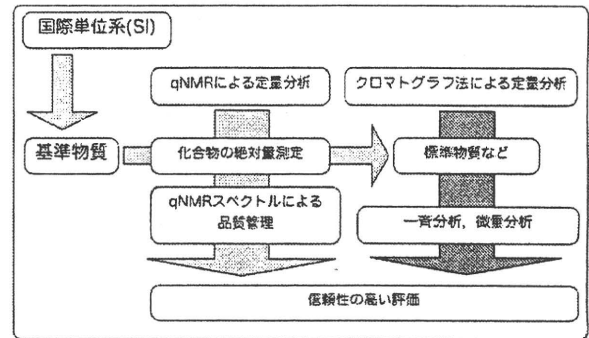


図11. qNMRの役割と分析値の信頼性の確保

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

6. おわりに

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

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

7. 追記

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

引用文献

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

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

PROFILE

杉本 直樹

国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
第3室室長
薬学博士



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

多田 敦子

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
第2室主任研究官
理学博士



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

末松 孝子

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



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

有福 和紀

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



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

報 文

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

(平成 22 年 3 月 23 日受理)

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

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

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

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

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

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

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

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

(Received March 23, 2010)

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

緒 言

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

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

* 連絡先

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

² 日本電子株式会社: 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2

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

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

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

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

そこで本研究では、これらクエルセチンおよびその配糖体の絶対量を求める新たな方法として、NMR を用いた定量法 (quantitative NMR; qNMR)^{3)~8)} の応用を試みた。現在、われわれは、国際単位系 (SI) に基づく計量トレーサビリティが確保された新たな絶対定量分析法の1つとして、qNMR の開発を行っている。qNMR は、純度値が明らかな他の化合物「qNMR 基準物質」を内部標準として、測定対象物質と混合し、両物質の NMR シグナルを測定する定量法である。また、個々の測定対象の化合物の定量用標準品を必要としない絶対定量法であり、あらゆる測定対象の有機化合物の純度あるいは含量を迅速に求めることが可能な方法である。

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

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

実験方法

1. 試薬および試料

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

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

2. 装置

各種分析データの取得には、以下の機器を用いた。

核磁気共鳴装置 (NMR): オートサンプラー付き JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子(株)製)。qNMR のケミカルシフト値は、methanol-*d*₄ のプロトンシグナルを基準シグナル (3.30 ppm) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。

3. qNMR による分析

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

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

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

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

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

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

** Purchased from Funakoshi, Co., Ltd.

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

qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB-*d*₄ 濃度を随時確認⁷⁾して使用した。すなわち, DEP 約 20 mg を精密に量り採り, qNMR 標準液 4.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管 (5 mmφ×200 mm, S-type (和光純薬工業 (株)製)) に封入したものを 1,4-BTMSB-*d*₄ 濃度確認用試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し, DEP のメチレンプロトン CH₂×2 (δ 4.34 ppm) および 1,4-BTMSB-*d*₄ のメチル基のプロトン CH₃×6 (δ 0.23 ppm) に由来するシグナル積分値, 分子量, 濃度等を式 (1) に代入し, qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB-*d*₄ の濃度を算出し確認した。

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

ただし, C_{BTMSB} = 1,4-BTMSB-*d*₄ 濃度 (mg/mL), W_{DEP} = 認証標準物質 DEP の秤量濃度 (mg/mL), M_{BTMSB} , M_{DEP} = 1,4-BTMSB-*d*₄ および DEP の分子量 (MW 226.50 および 222.24), I_{BTMSB} , I_{DEP} = 1,4-BTMSB-*d*₄ および DEP の特定プロトンシグナル積分値, H_{BTMSB} , H_{DEP} = 1,4-BTMSB-*d*₄ および DEP の特定基のプロトン数 (1,4-BTMSB-*d*₄ = CH₃×6, DEP = CH₂×2), P_{DEP} = DEP の純度 (99.98%)。

(2) qNMR による市販試薬および既存添加物製品の純度測定

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

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

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

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

(3) qNMR 測定条件および解析処理

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

結果および考察

1. 定量用シグナルの選別

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

Table 2. Instruments and acquisition parameters

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

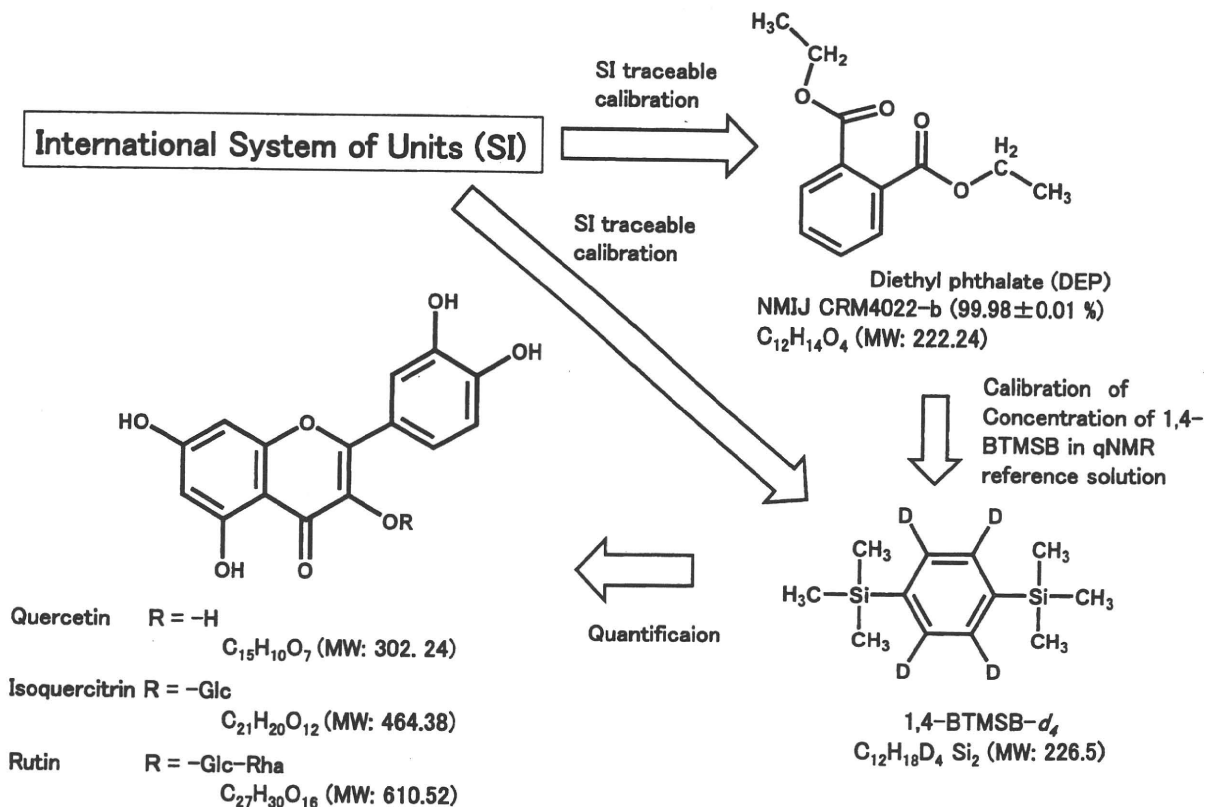


Fig. 1. Strategy of SI-traceable quantification based on qNMR

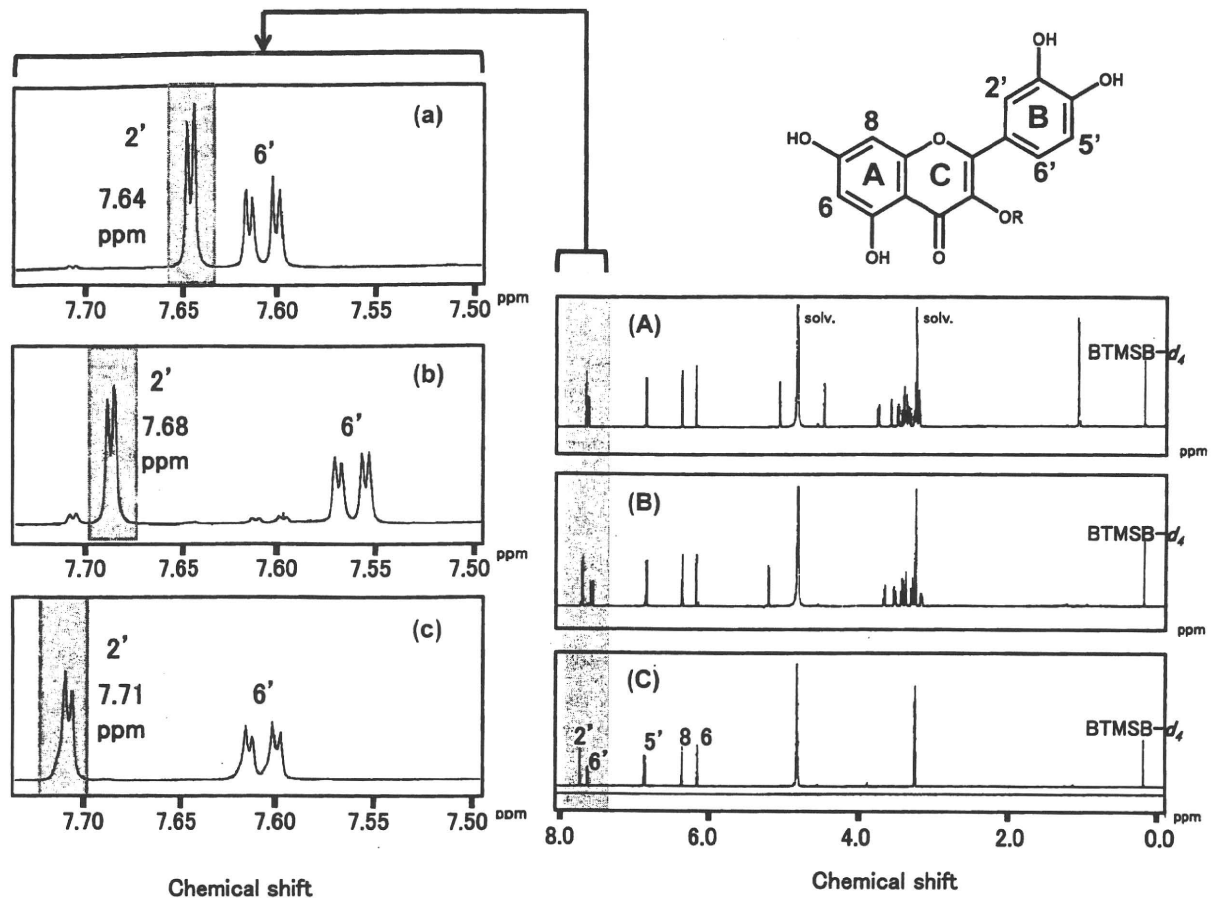


Fig. 2. qNMR spectra of rutin (A), isoquercitrin (B) and quercetin (C)

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

方式の qNMR 測定を行った。なお、調製した qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB- d_4 濃度を、SI トレーサビリティが保証された認証標準物質 (CRM) の DEP を用いて随時確認⁷⁾したところ、qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB- d_4 の濃度は調製値と等しく、その濃度誤差範囲は 1% 以内であった。したがって、本定量法で用いた 1,4-BTMSB- d_4 は、qNMR の一次標準として有効であることが確認された。

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

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

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

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

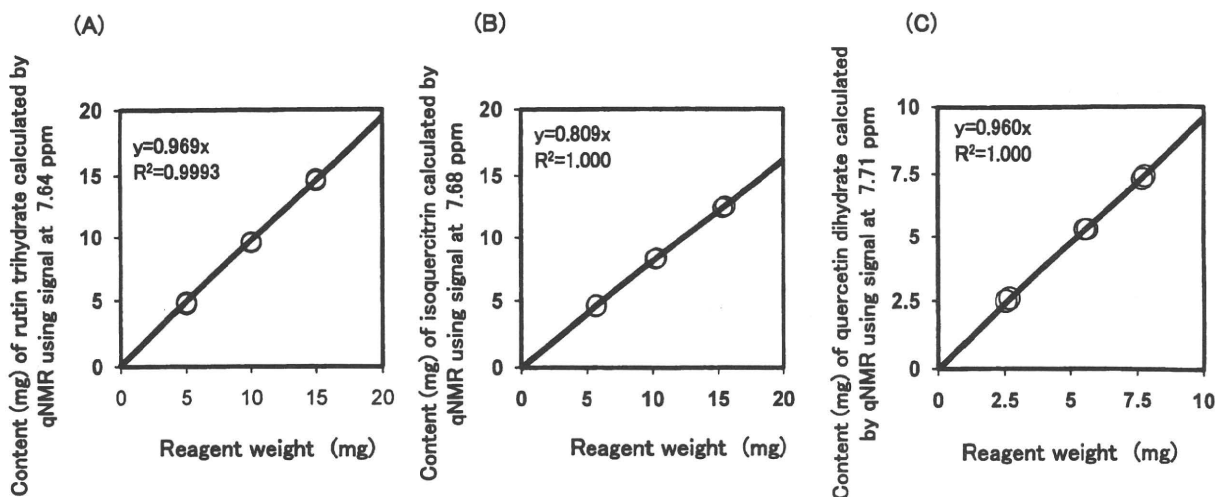


Fig. 3. Relationship between reagent weight and contents of quercetin or quercetin glycosides calculated by qNMR

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

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

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

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

** RSD, relative standard deviation

調製 n=2) を示した。Fig. 3 の (C) には、試薬クエルセチン二水和物 (試料 19) を 2.5~7.5 mg/mL で定量した結果 (試料調製 n=2) を示した。横軸には qNMR 標準液 1 mL 当たりの試薬量 (秤量値) を mg で示し、縦軸には qNMR により算出したルチン (三水和物換算)、イソクエルシトリンおよびクエルセチン (二水和物換算) の 1 mL 当たりの各定量値を mg で示した。その結果、試料の秤量値と qNMR による定量値との間に高い直線関係があることが確認された。すなわち、今回の測定濃度領域において、試薬に含まれているルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの絶対量が、qNMR の定量値から非常に精度良く求められることが明らかとなった。したがって、qNMR 基準物質 1,4-BTMSB-d₄ を内部標準として 1 点濃度で加えて測定するだけで、測定対象化合物ごとの定量用標準品も検量線も必要とせず、精度良く定量できることが示された。

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

No.	Sample type	Purity (%) [*]	RSD (%) ^{**}
Isoquercitrin			
12	Reagent	80.9±0.2	0.2
13	Reagent	80.1±0.7	0.9
14	Reagent	94.8±0.1	0.1
Enzymatically decomposed rutin			
15	Food additive	85.4±0.3	0.3
16	Food additive	87.9±0.4	0.5

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

** RSD, relative standard deviation

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

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

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

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

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

** RSD, relative standard deviation

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

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

結 論

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

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

謝 辞

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

文 献

- 1) 厚生労働省 “第 8 版食品添加物公定書” 2007.
- 2) 日本食品添加物協会技術委員会自主規格専門委員会編 “第 4 版既存添加物自主規格” 東京, 日本食品添加物協会, 2008.
- 3) Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A., Maeda, T. Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia*, **41**, 213-218 (2004).
- 4) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Addit. Contam.*, **24**, 799-806 (2007).
- 5) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hirai, T. A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quanti-

- tative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79–86 (2009).
- 6) Ihara, T., Saito, T., Sugimoto, N. Expansion of organic reference materials for the analysis of hazardous substances in foods and environments—Realization of an efficient metrological traceability using the quantitative NMR method—. *Synthesiology*, **2**, 12–22 (2009).
- 7) Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, A., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamonoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Nihon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **16**, 28–33 (2009).
- 8) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Ito, S., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T. Absolute quantification of carminic acid in cochineal extract by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan.)*, **51**, 19–27 (2010).
- 9) Malz, F., Jancke, H. Validation of quantitative NMR. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **38**, 813–823 (2005).

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

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

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

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

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

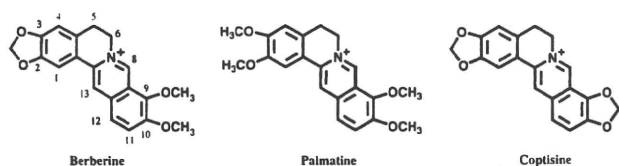


Fig. 1 Chemical structures of berberine, palmatine, and coptisine

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

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

Materials and methods

Chemicals and crude drugs

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

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

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

Determination of HMD concentration in qHNMR reference stock solution

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

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

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

Determination of purities of protoberberine alkaloid reagents

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

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

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

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

Quantitative determination of protoberberine alkaloids by qHNMR

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

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

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

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

HPLC analysis of protoberberine alkaloids

The protoberberine alkaloid (1.00 mg) was dissolved in 10.0 ml methanol, and 10 μl aliquots of the solution were subjected to HPLC analysis.

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

The chromatographic separation was performed using YMC-Pack ODS-AL (4.6 \times 250 mm; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan). The mobile phase was composed of acetonitrile–water (1:1) containing NaH_2PO_4 (0.34%) and sodium dodecyl sulfate (0.17%). Flow rate was 1.0 ml/min and the elution was monitored at 345 nm.

Results and discussion

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

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

Determination of purity of protoberberine alkaloid reagents

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

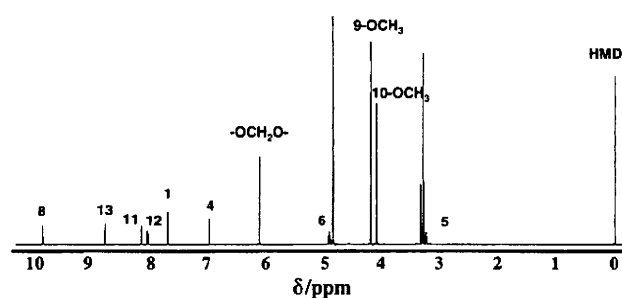


Fig. 2 A $^1\text{H-NMR}$ spectrum of berberine. The spectrum was recorded in methanol- d_4 containing hexamethyldisilane (HMD) as an internal standard. The position of the proton corresponding to each signal is shown in the spectrum

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

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

s Singlet, d doublet

^a Average ± standard deviation from triplicate measurements

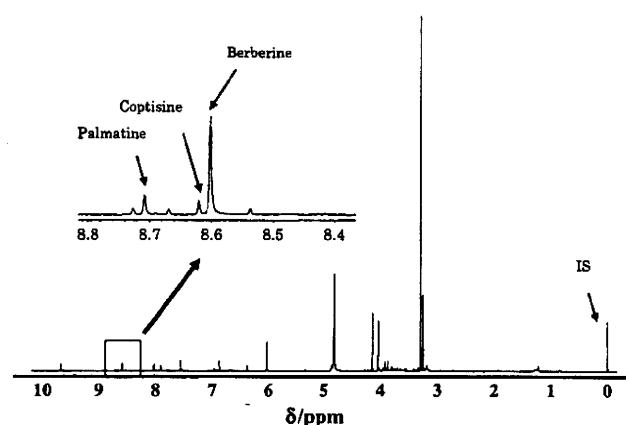


Fig. 3 A typical ¹H-NMR spectrum of the methanol extract of *Coptidis Rhizoma*. The inset shows H-13 signals from berberine, palmatine, and coptisine

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

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

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

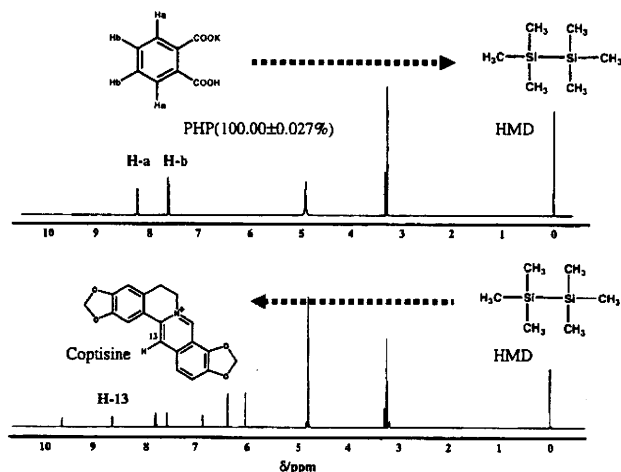


Fig. 4 A schematic diagram illustrating a basic principle of purity determination by ¹H-NMR spectroscopy. Purity of hexamethyldisilane (HMD) is first confirmed based on the signal intensity at 0 ppm relative to the signal intensity of potassium hydrogen phthalate (PHP) of certified reference material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

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

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

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

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

^a Average ± standard deviation from triplicate measurements

^b Described as "one spot by TLC"

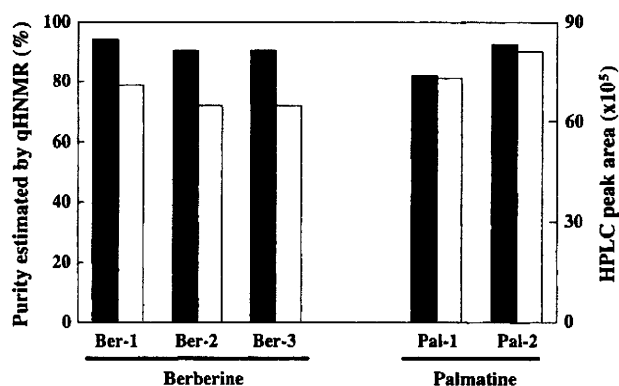


Fig. 5 Comparison of the purities of the reagents determined by qHNMR (closed columns) with the HPLC peak areas of the reagents (open columns). A 10 μ l aliquot of the alkaloid solution (0.100 mg/ml in methanol) was injected into the HPLC column and elution was monitored at 345 nm. For information on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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

^a Average ± standard deviation from triplicate measurements

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

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

References

- Lee CH, Lee HJ, Jeon JH, Lee HS (2005) In vivo antifungal effects of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids against phytopathogenic fungi. *J Microbiol Biotechnol* 15:1402–1407
- Tanabe H, Suzuki H, Mizukami H, Inoue M (2005) Double blockade of cell cycle progression by coptisine in vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 70:1176–1184
- Hu JP, Nishishita K, Sakai E, Yoshida H, Kato Y, Tsukuba T, Okamoto K (2008) Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppressing the NF- κ B and Akt pathways. *Eur J Pharmacol* 580:70–79
- Cui G, Qin X, Zhang Y, Gong Z, Ge B, Zang YQ (2009) Berberine differentially modulates the activities of ERK, p38 MAPK, and JNK to suppress Th17 and Th1 T cell differentiation in type 1 diabetic mice. *J Biol Chem* 284:28420–28429
- Jung HA, Min BS, Yokozawa T, Lee JH, Kim YS, Choi JS (2009) Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol Pharm Bull* 32:1433–1438
- Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (2006) The Japanese Pharmacopeia, 15th edn. Jiho, Tokyo, pp 1187–1188
- Pauli GF, Jaki BU, Lankin DC (2005) Quantitative ¹H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *J Nat Prod* 68:133–149
- Hasada K, Yoshida T, Yamazaki T, Sugimoto N, Nishimura T, Nagatsu A, Mizukami H (2010) Quantitative determination of atractylon in *Atractylodis Rhizoma* and *Atractylodis Lanceae Rhizoma* by ¹H-NMR spectroscopy. *J Nat Med* 64:161–166
- Pauli GF (2001) QNMR—a versatile concept for the validation of natural product reference compounds. *Phytochem Anal* 12:28–42
- Saito T, Ihara T, Koike M, Kinugasa S, Fujimine Y, Nose K, Hira T (2009) A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred Qual Assur* 14:79–86
- Tahara M, Sugimoto N, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara T, Yoshida Y, Tada A, Kubota R, Shimizu K, Yamazaki T, Tanamoto K, Nakazawa H, Nishimura T (2009) Quality control of organophosphorous isoxathion oxon based on qNMR. *Jpn J Food Chem Saf* 16:28–33
- Sugimoto N, Tada A, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara T, Yoshida Y, Kubota R, Tahara M, Shimizu K, Ito S, Yamazaki T, Kawamura Y, Nishimura T (2010) Absolute quantification of carminic acid in cochineal extract by quantitative NMR. *Food Hyg Saf Sci* 51:19–27
- Ikuta A, Kobayahi A, Itokawa H (1984) Studies on the quantitative analysis of protoberberine alkaloids in Japanese, Chinese and other countries *Coptis* rhizomes by thin layer chromatography-densitometry. *Shoyakugaku Zasshi* 38:279–282
- Yoneda K, Yamagata E, Miyaura M, Longjin H, Mizuno M (1987) Quantitative analysis of berberine type alkaloids and Japanese *Coptis Rhizoma*. *Shoyakugaku Zasshi* 41:205–208
- Kong WJ, Zhao YL, Xiao XH, Jin C, Li ZL (2009) Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of *Rhizoma Coptidis chinensis* based on UPLC-PAD combined with chemometrics methods. *Phytomedicine* 16:950–959
- Sun SW, Tseng HM (2005) Sensitivity improvement on detection of *Coptidis* alkaloids by sweeping in capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 37:39–45
- Chen J, Zhao H, Wang X, Lee FSC, Yang H, Zheng L (2008) Analysis of major alkaloids in *Rhizoma coptidis* by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight mass spectrometry with different background electrolytes. *Electrophoresis* 29: 2135–2147
- Li CY, Tsai SI, Damu AG, Wu TS (2009) A rapid and simple determination of protoberberine alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by ¹H NMR and its application for quality control of commercial prescriptions. *J Pharm Biomed Anal* 49:1272–1276

既存添加物ドクダミ抽出物の品質評価

(2010年8月19日受付)

(2010年10月20日受理)

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

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) 九州大学大学院農学研究院

c) 現所属：崇城大学生物生命学部

d) 高知大学農学部

e) 日本大学生物資源科学部

Quality evaluation of Dokudami extract, a natural food additive

(Received August 19, 2010)

(Accepted October 20, 2010)

Kyoko Ishizuki^{a)}, Atsuko Tada^{a)}, Naoki Sugimoto^{a)}, Kiyoshi Matsumoto^{b,c)},
Hiroyuki Ukeda^{d)}, Hiroshi Matsufuji^{e)}, Takeshi Yamazaki^{a)}, Yoko Kawamura^{a)}

a) National Institute of Health Sciences

b) Faculty of Agriculture, Kyushu University

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

d) Faculty of Agriculture, Kochi University

e) College of Bioresource Sciences, Nihon University

Abstract

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

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

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

I 緒言

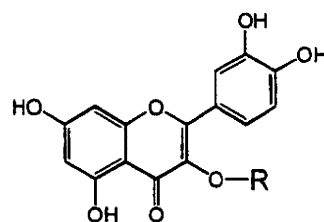
ドクダミ科 (Saururaceae) ドクダミ (*Houttuynia cordata* THUNB.) は、わが国では古くから民間薬として用いられており、ドクダミ *H. cordata* の花期の地上部を乾燥したものは、生薬ジュウヤク (十薬) とされ、その煎液は緩下、利尿薬として用いられている。また、現在ではドクダミ茶等の

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

連絡先：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 多田敦子

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

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



No.	Compound	R
1	Rutin	Glc ⁶ -1Rha
2	Hyperin	Gal
3	Isoquercitrin	Glc
4	Quercitrin	Rha
5	Quercetin	H

Fig. 1. Structures of flavonoids in Dokudami extract

II 研究方法

1. 試料・試薬

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

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

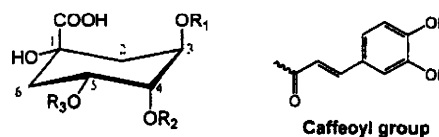
[CAS No. 327-97-9 : CA Index Name cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxy-, (1S,3R,4R,5R)- の水和物] を用いた。

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

上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品あるいは HPLC 用を使用した。

2. 装置

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



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

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

*Caffeoyl: caffeoyl group

3. LC/MS による成分分析および定量

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

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

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

め、添付文書記載の試薬純度値 92.2% を用いて純度補正をした。

LC 条件: ODS カラム Atlantis T3 (2.1 × 150 mm, 3 μm, Waters 社製)、流速 0.2 mL/min、カラム温度 30℃、移動相 H₂O : CH₃CN : 1% ギ酸 = 92 : 7 : 1 (0-3 min) → 83 : 16 : 1 (21-40 min) → 9 : 90 : 1 (50-80 min)

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

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

4. DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性の測定は、島村らの方法⁶⁾に従った。すなわち、50% エタノールに溶解した試料溶液 0.2 mL に 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 0.8 mL、0.2 mM DPPH-エタノール溶液 1.0 mL を順次添加し、10 秒間攪拌後、室温暗所下にて 30 分静置した。その後 517 nm の吸光度 (*A_s*) を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した際の吸光度をコントロール (*A_c*) として、試料のラジカル消去率 (%) を以下の式 (1) で求めた。また本実験では、試料濃度とラジカル消去率の関係を調べ、50% 消去率をはさむ 2 点間での回帰直線より、試料溶液が 50% 消去率を与える濃度 IC₅₀ (μg/mL) を求めた。さらに Trolox を標準物質として同様の方法で IC₅₀ (μg/mL) を求め、以下の式 (2) を用い、各試料のラジカル消去活性を Trolox 等価活性 (TEAC) として算出した。

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

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

III 結果および考察

1. 添加物製品中の成分の分析

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

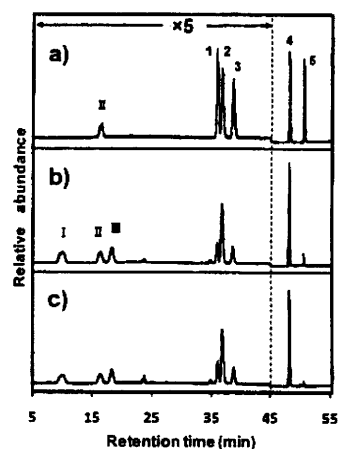


Fig. 3. LC/MS (ESI-) total ion chromatograms (SIR selected ions: see Table 1) of standard mixture and Dokudami extract products

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

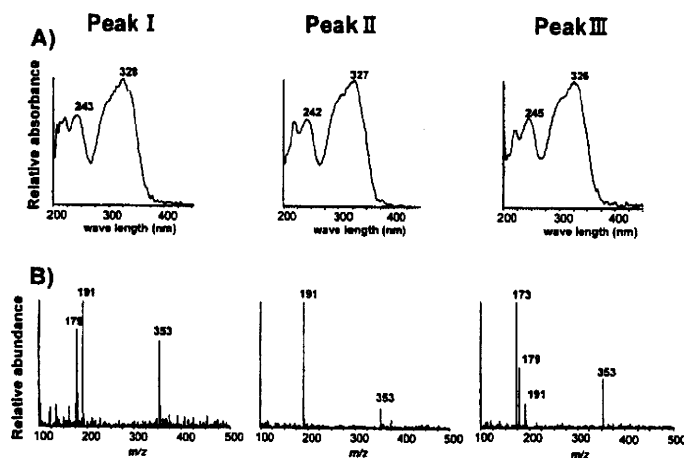


Fig. 4. UV (A) and MS (B) spectra of peaks I, II (3-*O*-caffeoylquinic acid) and III, shown in Fig. 3