

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）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 24 年度分担研究報告書

既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明

研究分担者 受田浩之 高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 教授
研究協力者 島村智子 高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 准教授
研究協力者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官
研究協力者 石附京子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部
研究協力者 柏木丈拡 高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 准教授
研究分担者 松井利郎 九州大学大学院農学研究院 教授
研究分担者 石川洋哉 福岡女子大学国際文理学部 准教授

研究要旨

既存添加物カンゾウ油性抽出物は、天然由来の酸化防止剤であり、その基原はウラルカンゾウ、チヨウカカンゾウ又はヨウカンゾウの根又は根茎と記載されている。しかし、そこに含まれる成分や成分組成は不明であったため、昨年度の研究において成分組成の解明に取り組んだ結果、glabridin が顕著に検出されることが明らかとされている。今年度は、カンゾウ油性抽出物の抗酸化力価と主要成分含量の関係を調べると共に、抗酸化成分の詳細な解明にも取り組んだ。その結果、測定に用いた 8 種類すべてのカンゾウ油性抽出物に抗酸化活性を確認することができた。しかし、既知物質の抗酸化力価に対する寄与率は低かった。カンゾウ油性抽出物の HPLC による分離・分画後、各 Fraction の活性測定を行った結果からも未知の抗酸化成分の存在が強く示唆された。従って、現在、各 Fraction に含まれる成分の構造解析を進めているところである。今後、物質の詳細が明らかになることで、抗酸化成分の全容解明に近づくものと期待される。

A. 研究目的

現在日本国内で使用されている酸化防止剤は、指定添加物と既存添加物の 2 種類に大別される。指定添加物は安全性と有効性が確認された上で成分規格が設定されている。一方、既存添加物は平成 7 年に食品衛生法の改正に伴い、経過措置的にその使用が認められているものである。これらは天然由来の複雑な混合物である場合が多く、有効成分含量、あるいは成分組成を指標とした規格基準の設定が遅れている。既存添加物については規格基準の設定を目的として、成分組成の確認、有効成分の同定、及び定量法の開発が行われているが、現状の機器分析では不可能である場合も多い。従って、成分組成に基づいた規格が未だ設定できていない既存添加物に対しては一定の品質確保の

ため、抗酸化力価に基づいた新たな評価法を規格基準法として適用する必要があると考えられる。

このような背景のもと、本研究ではこれまでに、抗酸化力価に対する公定法の候補として 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法を提案した¹⁾。また適用例の一つとして、既存添加物の中で成分組成の解明が比較的進んでいるチャ抽出物中の成分含量と DPPH 法で評価した抗酸化力価の関連性を調べ、両者の間に有意な相関が認められることを報告した²⁾。

そこで本研究では、昨年度に主要構成成分が明らかとなったカンゾウ油性抽出物³⁾の抗酸化力価と主要成分含量の関係を調べると共に、抗酸化成分の詳細な解明にも取り組んだ。

B. 研究方法

(1) 試料

本研究では、日本食品添加物協会を通じて供与されたカンゾウ油性抽出物 8 種類 (KZ01、KZ02、KZ03、KZ04、KZ05、KZ33、KZ34、KZ35) を測定試料として用いた。6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は Aldrich 製の試薬を使用した。また、DPPH、glabridin、isoliquiritigenin、liquiritigenin、glycyrrhizic acid、glycyrrhetic acid、liquiritin は和光純薬工業から入手し、licochalcone A は Sigma 社製の試薬を使用した。すべての実験において蒸留水を Auto Pure WQ501 (Millipore 製) に通して処理した非抵抗 $18 \Omega \cdot \text{cm}$ の MilliQ 水を用いた。

(2) DPPH ラジカル消去活性測定

2-1. DPPH ラジカル消去活性測定手順

試験管、またはサンプリングチューブに試料溶液 $200 \mu\text{L}$ と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) $800 \mu\text{L}$ を添加して混合し、そこに DPPH 溶液 1 mL を加え、直ちに試験管ミキサーで 10 秒間攪拌した。その後、室温暗所にて静置した。DPPH 溶液の添加から正確に 30 分後に 517 nm の吸光度を測定した。吸光度測定ブランク溶液には 99.5% エタノール 1.2 mL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) $800 \mu\text{L}$ の混合液を用いた。

試料溶液添加時の吸光度を A_s 、試料溶液の代わりに 99.5% エタノールを添加した際の吸光度を A_c とし、次の計算式から阻害率 (%) を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

2-2. IC_{50} の算出方法

各試料の IC_{50} の算出は以下の手順に従って行った: ① 試料濃度 (x) に対して阻害率 (y) をプロットし、回帰直線 ($y = ax + b$) を引いた。② 50% の阻害率を挟む 2 点を選び出し、その 2 点を通る回帰直線 ($Y = AX + B$) を引いた。③ ②の回帰式の Y に 50 を代入した際の X (試料濃度) を求めた。

④ 3回の繰り返し測定の各回で求められた③の値の平均値を求めた。これを試料の IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) とした。

2-3. Trolox 等価活性算出方法

試料の IC_{50} が Trolox の IC_{50} と同一の活性を有しているとみなし、各試料の DPPH ラジカル消去活性を Trolox 等価活性 (TEAC) で示すこととした。算出には以下の式を用いた。

TEAC =

$$\text{Trolox の } \text{IC}_{50} (\mu\text{g}/\text{mL}) / \text{試料の } \text{IC}_{50} (\mu\text{g}/\text{mL})$$

(3) カンゾウ油性抽出物の HPLC による分画

カンゾウ油性抽出物 (KZ01、KZ34) の HPLC による分画は下記の条件で実施した。保持時間 0.3 分～ 59.6 分にかけて、 4.5 mL (約 56 秒)ごとに分画し、計 64 画分を分取した。

HPLC カラム: Inertsil ODS-3 ($10 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, GL Science 製)、カラム温度: 35°C 、移動相: 0.05% ギ酸を含むアセトニトリル、アセトニトリル濃度 (gradient): 30% ($0-3$ 分) $\rightarrow 80\%$ (-53 分) $\rightarrow 90\%$ ($54-60$ 分) $\rightarrow 30\%$ ($62-75$ 分)、流速: $5 \text{ mL}/\text{min}$ 、注入量: $400 \mu\text{L}$ 、検出: $200-500 \text{ nm}$ 。分取 HPLC 装置 (島津製作所製) の構成は下記の通りであった。LC: LC-10AD、system controller: SCL-10A VP、degasser: DGU-12A、auto injector: SIL-10A、diode array detector: SPD-M10AVP、column oven: CTO-10A、fraction collector: FRC-10A。

C. 研究結果及び考察

(1) カンゾウ油性抽出物の抗酸化力価

カンゾウ油性抽出物 8 種類の抗酸化力価を DPPH 法により測定したところ、全てにおいて TEAC を求めることが可能であった (表 1)。なお、カンゾウ油性抽出物は 99.5% エタノールに溶解して測定に供した。

(2) カンゾウ油性抽出物構成成分の抗酸化力価への寄与

昨年度の研究³⁾においてカンゾウ油性抽出物の構成成分であると判明した物質のうち、標品が入手可能な7種類の物質 (glabridin, isoliquiritigenin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid, glycyrrhetic acid, liquiritin, licochalcone A) について DPPH 法による抗酸化活性測定を実施した。その結果、glabridin、isoliquiritigenin、licochalcone A について IC₅₀ を求めることが可能であり、その TEAC はそれぞれ、0.57、0.58、0.27 であった。その他の 4 種類の標品の抗酸化活性は低く、溶解度ぎりぎりの濃度でも阻害率 50% を超えることはなかった。

そこで、TEAC を求めることが可能であった glabridin、isoliquiritigenin、licochalcone A の各カンゾウ油性抽出物中における含量を参考に TEAC の予測値を求めることとした。また同時に、予測値の実測値に対する割合、すなわち上記 3 種の化合物の抗酸化活性への寄与率も求めた。表 2 にその結果を示す。その結果、寄与率は最も高いもので 53.6%、低いもので 4.6% となった。この結果より、カンゾウ油性抽出物中には glabridin、isoliquiritigenin、licochalcone A 以外の主要抗酸化成分が含まれている可能性が高いと推察された。

(3) カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明

上記の結果より、カンゾウ油性抽出中には未知の主要抗酸化成分が含まれている可能性が高いと考えられたため、HPLC によるカンゾウ油性抽出物の分離・分画を行い、各分画物について DPPH 法による抗酸化活性測定を行った。なお、抗酸化活性に供した画分は 5 mg 原体相当/mL 濃度であり、溶媒には 99.5% エタノールを使用した。

3-1. KZ01

KZ01 の HPLC 分画物の抗酸化活性測定結果を図 1 に示した。測定の結果、Fraction 11、28、31、34、37 & 38 に活性のピークが認められた。このうち、Fraction 34 は既知物質の licochalcone A に相当すると考えられた。しかし、他の Fraction については未知物質である可能性が高かった。分取時の HPLC-PDA クロマトグラムには各々の Fraction に

ピークが確認されていることから、現在、各 Fraction に含まれる物質の構造解析を進めているところである。

3-2. KZ34

KZ34 の HPLC 分画物の抗酸化活性測定結果を図 2 に示した。測定の結果、Fraction 11、25、32、37、44 & 45、52 に活性のピークが認められた。このうち、Fraction 37 は既知物質の glabridin に相当すると考えられた。しかし、他の Fraction については未知物質である可能性が高かった。分取時の HPLC-PDA クロマトグラムには各々の Fraction にピークが確認されていることから、現在、各 Fraction に含まれる物質の構造解析を進めているところである。

D. 結論

カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明に取り組んだ。その結果、測定に用いた 8 種類すべてのカンゾウ油性抽出物に抗酸化活性を確認することができた。しかし、既知物質の抗酸化力価に対する寄与率は低かった。カンゾウ油性抽出物の HPLC による分離・分画後、各 Fraction の活性測定を行った結果からも未知の抗酸化成分の存在が強く示唆された。従って、現在、構造解析を進めているところである。今後、物質の詳細が明らかになることで、抗酸化成分の全容解明に近づくものと期待される。

E. 研究発表

(1) 論文発表
なし

(2) 学会発表
なし

参考文献

1) 受田浩之、松井利郎、石川洋哉、島村智子、柏木丈弘、酸化防止剤力価評価における DPPH 法の室間共同試験、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 22 年度 総括・分担研究報告書 分冊その 1、11-22 (2011)

2) 受田浩之、松井利郎、石川洋哉、伊藤裕才、島村智子、柏木丈拵、チャ抽出物の成分含量と抗酸化力価の関係、厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 既存添加物の品質

評価と規格試験法の開発に関する研究 平成 23 年度 総括・分担研究報告書、127-133 (2012)

3) 多田敦子、石附京子、既存添加物カンゾウ油性抽出物の成分解析、厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業 既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究 平成 23 年度 総括・分担研究報告書、87-98 (2012)

表1 カンゾウ油性抽出物の抗酸化力価

試料名	KZ01	KZ02	KZ03	KZ04	KZ05	KZ33	KZ34	KZ35
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	283	209	1890	670	1788	221	286	333
TEAC	0.25	0.32	0.04	0.10	0.04	0.30	0.23	0.20

表2 3種類の標品 (glabridin、isoliquiritigenin、licochalcone A) の

抗酸化力価から求めた予測値とその寄与率

試料名	KZ01	KZ02	KZ03	KZ04	KZ05	KZ33	KZ34	KZ35
予測値	0.057	0.058	0.006	0.005	0.005	0.163	0.067	0.015
TEAC 実測値	0.25	0.32	0.04	0.10	0.04	0.30	0.23	0.20
寄与率 (%)	22.6	18.1	18.2	4.6	12.8	53.6	28.6	7.5

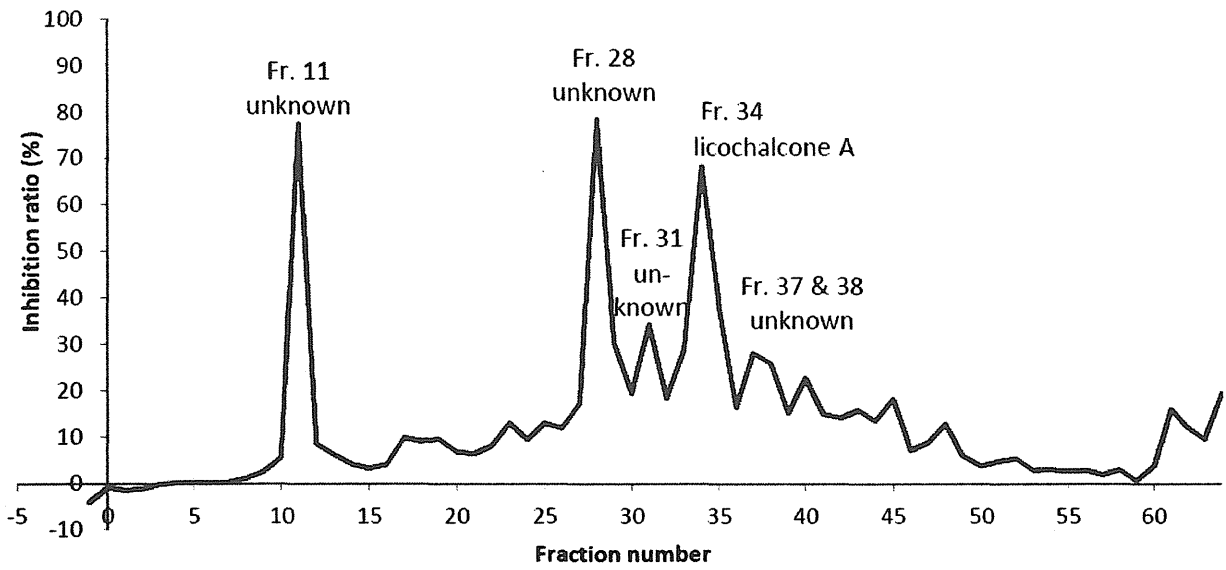


図1 KZ01 分画物の抗酸化活性

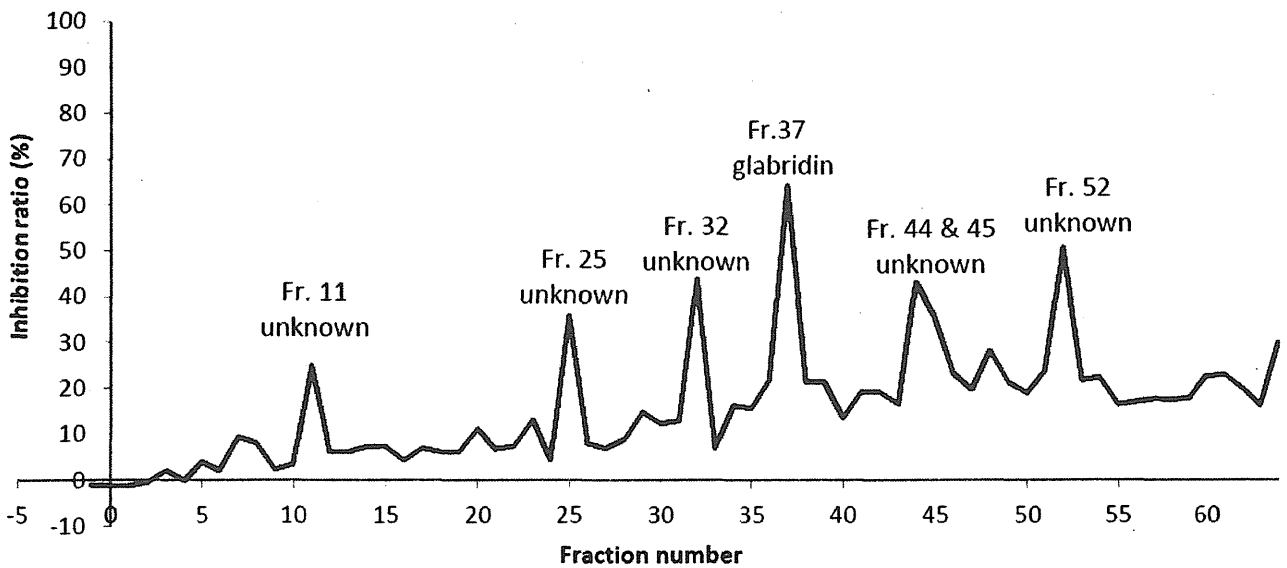


図2 KZ34 分画物の抗酸化活性

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 24 年度分担研究報告書

酸化防止剤力価評価における DPPH 法と各種測定法との相関性の検討と

酸化防止剤の併用効果の解析に関する研究

研究分担者 石川 洋哉 福岡女子大学国際文理学部 准教授

研究分担者 松井 利郎 九州大学農学部 教授

研究協力者 受田 浩之 高知大学農学部 教授

研究要旨

公定法の有力候補である DPPH 法について、各種抗酸化物の反応特性を明らかにするために、その他測定法における活性値との相関性を詳細に検討した。昨年度の研究では、DPPH 法と ABTS 法の比較を行ったが、本年度はさらに鉄イオンに対する還元能を評価する FRAP 法を新たに加え、3 者の活性相関を検討した。21 種の抗酸化物を評価し TEAC 値を比較した結果、DPPH 法と FRAP 法では比較的類似した活性傾向を示した。両者ともカテコール構造に対する反応性が高く、ABTS 法とは異なる傾向を示すことが確認された。また、この結果から DPPH 法では、抗酸化物のラジカル消去能力だけでなく金属イオンに対する還元性も評価し得ること、すなわち酸化防止剤の公定法として妥当な能力を有することも示唆された。続いて、Median effect analysis による酸化防止剤の併用効果の解析を試みた。本年度は、特に測定法として DPPH 法・ABTS 法での測定結果を基に解析を行い、両者の解析結果の違いを検討した。その結果、トコフェロールとフラボノール類・カテキン類との併用効果の解析において、測定法の違いにより解析結果が一部異なることが判明した。

A. 研究目的

当研究グループでは、厚生労働科学研究費補助金プロジェクトにおいて、抗酸化活性評価法の公定法の確立を目指している。平成 17～19 年度、平成 20～22 年度の研究において、公定法候補の選定と妥当性について検討を加えている。公定法候補の選定に当たっては、(1) 過去の研究において使用されてきた実績があること、(2) 短時間で測定が可能であること、(3) 特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法であることの 3 項目を重点条件としている。検討の結果、ラジカル消去活性測定法である DPPH 法と ABTS 法、スーパーオキシドアニオン消去活性測定法である WST-1 法を有力候補として挙げ、各測定法におけるプロトコルの最適化を試みるとともに、既存添

加物のうち単一化合物からなる酸化防止剤及び複数成分からなる天然由来酸化防止剤の測定を行い、得られた結果を詳細に比較検討してきた。なお、プロトコルの最適化においては、酸化防止剤試薬のロット、試薬秤取量、溶媒容量、溶液調製操作に用いる器具の種類、希釈手順、データ解析方法に至るまで詳細に検証し、公定法として妥当な条件を設定している。種々検討の結果、現時点では DPPH 法が公定法候補の最有力となっており、複数試験機関において共同試験等を実施し、その妥当性評価を進めている。

今後 DPPH 法を公定法として検討していく上で、他の測定法との反応特性の違いを明らかにしておく必要がある。昨年度の研究では、ABTS 法にお

ける反応特性の違いを詳細に検討したが、本年度はさらに Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) 法を加え、3 者の反応特性について検証した。

食品への用途が認められている酸化防止剤の品質規格を設定するうえで、酸化防止剤の相互作用を評価することは極めて重要である。我々は、薬剤の併用効果解析法である『Median effect analysis』¹⁾ を抗酸化食品成分併用効果の新規解析法として新たに提案した。平成 20-23 年度の研究では、「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる添加物を数種用い、DPPH 法により活性測定を行い、その結果を Median effect analysis により解析した。

これまで、併用効果の解析においては DPPH 法での測定結果をもとに Median effect analysis による解析を行ってきたが、測定法が変わると解析結果に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、本年度は、DPPH 法と ABTS 法での測定結果をもとに Median effect analysis による解析を行い、両者を比較することにより、解析結果に及ぼす測定法の影響を検討した。具体的には、 α -トコフェロールを中心として、フラボノール類・カテキン類との併用効果を解析し、その結果を比較検討した。

B. 研究方法

(1) 対象化合物

抗酸化物（酸化防止剤）として、カテキン水和物、エピカテキン(EC)、エピガロカテキン(EGC)、エピカテキンガレート(EGc)、エピガロカテキンガレート(EGcg)、ケルセチン水和物、ケンフェロール、ケルセチン-3-グルコシド、ルチン、ミリセチン、モリン水和物、ルテオリン、フェルラ酸、ピロカテコール、カフェ酸、没食子酸水和物、セサモール、エラグ酸、アスコルビン酸、グルタチオン（還元型）、 α -トコフェロールを用いた。

(2) DPPH ラジカル消去活性測定法

試験管に試料溶液 200 μ L、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800 μ L、0.20 mM DPPH エタノー

ル溶液 1 mL を添加し、10 秒間激しく攪拌した後、暗所で常温にて 30 分間静置した。30 分後、反応溶液の 517 nm における吸光度(As)を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をコントロール (Ac) とした。また、DPPH 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を求めた (下式)。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{\text{Ac} - \text{As}}{\text{Ac}} \times 100$$

各試料と標準物質であるトロロックスの IC₅₀ (μ mol/mL)をそれぞれ求め、下式によりトロロックス等価活性 TEAC (μ mol TE/ μ mol)を算出した。

$$\text{TEAC} = \frac{\text{トロロックスのIC}_{50}(\mu\text{mol/mL})}{\text{試料のIC}_{50}(\mu\text{mol/mL})}$$

(3) ABTS ラジカル消去活性測定法

試験管に ABTS working solution 1 mL を加え、100 μ L の試料溶液を添加後、10 秒間攪拌した。この溶液を 30°C でインキュベーションし、試料溶液の添加から正確に 4 分後に 734 nm における吸光度 (As)を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をコントロール (Ac) とした。また、ABTS 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を求めた (上式; DPPH 法と同様)。DPPH の場合と同様に、各試料と標準物質であるトロロックスの IC₅₀ (μ mol/mL)をそれぞれ求め、トロロックス等価活性 TEAC (μ mol TE/ μ mol)を算出した。

(4) FRAP 測定法

サンプル溶液 100 μ L と超純水 300 μ L を FRAP 溶液 (0.3 M 酢酸緩衝液, pH3.6 : 10 mM TPTZ 試薬 : 20 mM FeCl₃ 試薬 = 10 : 1 : 1) 3 mL に添加し、

37 °Cの温浴中で 30 分間インキュベートした。その後、593 nm でのサンプル吸光度を測定した。

試料濃度 (x) に対して吸光度 (y)をプロットし、その回帰直線の傾きを求めた。トロロックスについても同様にし、回帰直線の傾きを求めた。試料濃度の回帰直線の傾きをトロロックスの回帰直線の傾きで除し、各試料の濃度既知のトロロックスでの吸光度に対する相対値を求めた。これを FRAP 測定での TEAC ($\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$)とした。

(5) 併用効果の解析法

併用効果の判定は、Median effect analysis により行った。解析法の詳細については平成 20 年度の厚生科学研究報告書に記載している。

本実験では、各酸化防止剤 (単独使用) について DPPH 法による活性測定を行った後、2 種類の酸化防止剤を各々の IC_{50} 濃度の比 (モル比) に近い割合で混合して、再度測定を行った。得られた測定結果を基に Median effect plot を行い、Combination Index (CI) 値を算出した。なお本実験では、一連の解析 (Median effect plot の作成及び CI 値の算出) に、市販の解析ソフト (Biosoft 社 CalcuSyn ver. 2.0) を用いた。

C. 研究結果及び考察

21 種類の抗酸化物質を DPPH, ABTS, FRAP 法により測定した結果を表 1 に示した。まず、昨年度の報告書に示したように、DPPH と ABTS 法では分子内にカテコール構造を有する化合物において違いが認められた。すなわち、カテキン、EC、ECg、ケルセチン、ケルセチン-3-グルコシド、ルチン、ルテオリン、ピロカテコール、カフェ酸、エラグ酸の計 10 化合物では活性値が $\text{DPPH} > \text{ABTS}$ となり、TEAC 値でおよそ $1.3 (\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol})$ DPPH 法での活性値が高い結果となった。DPPH 法に関しては、カテコール構造を有する化合物が、DPPH ラジカル消去後にキノン構造に変化後、溶媒であるエタノールの求核攻撃の影響により再生され、再度活性を発現することが報告されている。したがって、DPPH 法ではカテコール構造を有する化

合物が再生され活性が増加し、ABTS 法との活性値の差が生じた可能性がある」と推察している。続いて、DPPH 法と FRAP 法を比較してみると、比較的類似した傾向が認められた。特に、上記 $\text{DPPH} > \text{ABTS}$ の化合物群 (10 化合物) を見てみると、いずれも DPPH と FRAP 法での活性値は近い結果となり、FRAP 法でもカテコール構造の反応性が高いことが示唆された。一方、ピロガロール構造を有する化合物群 (EGC、EGCg、ミリセチン、没食子酸) では、3 法でほぼ同等の活性値が得られた ($\text{DPPH} \approx \text{ABTS} \approx \text{FRAP}$)。さらに、FRAP 法のみで特徴的に活性値が高い化合物が認められた ($\text{DPPH} \approx \text{ABTS} < \text{FRAP}$)。すなわち、ケンフェロール、モリン、フェルラ酸では、FRAP 法での活性値が他の 2 法のものと比較して、約 2 倍の活性値が得られている。これら化合物中の水酸基の存在位置が FRAP 構造を高めている可能性はあるが詳細は明らかではない。

DPPH、ABTS、FRAP 法はいずれも一電子転移反応 (SET 機構) の反応機構に属する。すなわち、ラジカル消去反応だけでなく金属イオンの還元反応もこの SET 機構に属するとされている。酸化防止剤としての利用を考えた場合、金属イオンは食品中の脂質等の酸化反応の促進因子であることから、酸化防止剤の評価法としては、ラジカル消去能だけでなく金属イオンの還元能を反映した評価法が望ましいと考えられる。本研究により、DPPH 法と FRAP 法では、一部活性値が異なる化合物も認められたが、全体的には比較的類似した傾向が認められている。このことは、DPPH 法ではラジカル消去活性だけでなく、鉄イオンに対する還元能も同時に評価できる可能性が高いことを示唆している。現在、当研究グループでは、DPPH 法を公定法の最有力候補として検討を進めているが、本結果は DPPH 法の酸化防止剤規格試験法としての妥当性を強く支持するものであった。

続いて、抗酸化物の併用効果の解析を試みた。これまでの一連の研究では、DPPH 法で得られた測定結果を薬剤の併用効果判定に汎用されている Median effect analysis を用いて解析してきた。しか

しながら、上述の通り用いる測定法により、対象となる抗酸化物の反応特性が異なることが予想され、結果として併用時の解析結果が異なる可能性が考えられたことから、本実験では新たに ABTS 法を用いた併用効果の解析を試みた。本実験では、 α -トコフェロールを中心として、フラボノール類 (7 種) 及びカテキン類 (4 種) との併用効果を検討した。DPPH 法と ABTS 法での解析結果の比較を表 2 及び表 3 にまとめて示した。その結果、DPPH 法と ABTS 法で同じ解析結果のものも認められたが、 α -トコフェロールとケルセチン、 α -トコフェロールと EC など解析結果が全く異なる組合せも認められた。また、解析結果は同じでも、その効果の程度が異なる場合も認められた。すなわち、 α -トコフェロールと EGCg との組合せ (図 1) のように、判定結果は同じ (相乗効果) でも、その程度は異なり ABTS 法での相乗効果が大きく見積もられる場合が存在することが明らかになった。EGCg は、 α -トコフェロキシラジカルの α -トコフェロールへの再生効果が大きいことが、ESR を用いた研究により明らかにされている²⁾。したがって、本実験で認められた相乗効果も EGCg による α -トコフェロール再生効果に起因する可能性が高いと考えられる。DPPH 法と ABTS 法での反応系の違いが、この再生効果に影響を与えている可能性も考えられ、今後検討の必要があると推察された。

D. 結論

本年度の研究では、DPPH, ABTS, FRAP 法での活性値の比較により、DPPH 法がラジカル消去活性だけでなく、鉄イオンに対する還元能も同時に評価できる可能性が高いことを示し、酸化防止剤の規格試験法として妥当であることを示した。また、DPPH 法と ABTS 法での解析結果に基づき、Median effect analysis を用いた併用効果の解析を試みた結果、一部で解析結果の異なる組合せが存在することを明らかにし、抗酸化評価法の選定の重要性を明示した。

DPPH 法を公定法として採用するためには、さ

らに他の試験法との相違点を明らかにする必要がある。また、抗酸化物の併用効果についてはそのメカニズムも含めて不明な点も多い。以上の点に重点を置き、次年度以降の研究を進めていきたい。

E. 研究発表

(1) 論文発表

なし

(2) 学会発表

1. Median effect analysis によるラジカル消去反応系における酸化防止剤併用効果の解析 山元涼子・石川洋哉・于銀萍・島村智子・柏木丈弘・受田浩之・山崎壮・松井利郎(福岡女子大国際文理・高知大農・国立衛研・九大院農) 第 49 回化学関連支部合同大会 (北九州) 6 月 30 日

第 49 回化学関連支部合同大会日本農芸化学会西日本支部ポスター賞受賞

2. ラジカル消去反応系における酸化防止剤の相乗・相殺効果の解析、山元涼子¹, 石川洋哉¹, 山内良子¹, 島村智子², 柏木丈弘², 受田浩之², 穂山浩³, 松井利郎⁴ (1 福岡女子大国際文理, 2 高知農大, 3 国立衛研, 4 九大院農) 日本食品科学工学会第 59 回大会 8 月 29-31 日 (札幌、藤女子大学)

3. ラジカル消去反応におけるチオール化合物と各種抗酸化物の併用効果、山元涼子、藤田睦、山内良子、島村智子¹, 柏木丈弘¹, 受田浩之¹, 穂山浩², 松井利郎³, 石川洋哉(福岡女子大国際文理・高知大農¹・国立衛研²・九大院農³) 日本農芸化学会 2012 年度大会 (仙台) 2013 年 3 月

参考文献

- 1) T. C. Chou and P. Talalay Adv. Enzyme Regul., 22, 27-55(1984)
- 2) M. Pazos, M. L. Andersen, I. Medina, and L. H. Skibsted, J. Agric Food Chem., 55, 3661-3666 (2007).

表 1 DPPH, ABTS, FRAP 法により評価した各種抗酸化物の活性値比較

測定化合物		DPPH ($\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$)	
フラボノイド系	フラバノール類	カテキン	2.47±0.09	0.96±0.05	2.17±0.05
		エピカテキン(EC)	3.35±0.10	1.57±0.08	2.44±0.05
		エピガロカテキン(EGC)	3.12±0.05	2.98±0.06	2.76±0.07
		エピカテキンガレート(EGCg)	4.86±0.21	3.11±0.13	4.30±0.08
		エピガロカテキンガレート(EGCG)	4.83±0.18	4.67±0.08	4.67±0.17
	フラボノール類とその配糖体	ケンフェロール	1.01±0.01	1.00±0.01	2.05±0.04
		ケルセチン	3.18±0.03	2.01±0.09	4.26±0.17
		ミリセチン	3.09±0.11	3.11±0.19	3.02±0.12
		モリン	0.97±0.01	0.86±0.12	1.69±0.04
		ケルセチン-3-グルコシド	2.22±0.11	0.96±0.04	2.35±0.01
		ルチン	2.40±0.11	0.98±0.04	2.23±0.11
	フラボン類	ルテオリン	2.22±0.07	1.04±0.26	2.17±0.02
	その他	フェルラ酸	0.71±0.04	0.64±0.06	1.17±0.00
		ピロカテコール	2.73±0.09	1.08±0.03	2.22±0.09
		カフェ酸	2.46±0.01	1.08±0.04	2.39±0.05
		没食子酸	2.52±0.06	2.49±0.20	2.45±0.04
		セサモール	0.78±0.02	2.03±0.09	2.13±0.04
		エラグ酸	3.84±0.30	2.74±0.32	5.00±0.00
		アスコルビン酸	0.87±0.00	1.06±0.04	1.00±0.00
グルタチオン(還元型)		0.70±0.00	0.80±0.04	0.23±0.00	
α -トコフェロール		0.90±0.05	0.94±0.01	0.75±0.00	

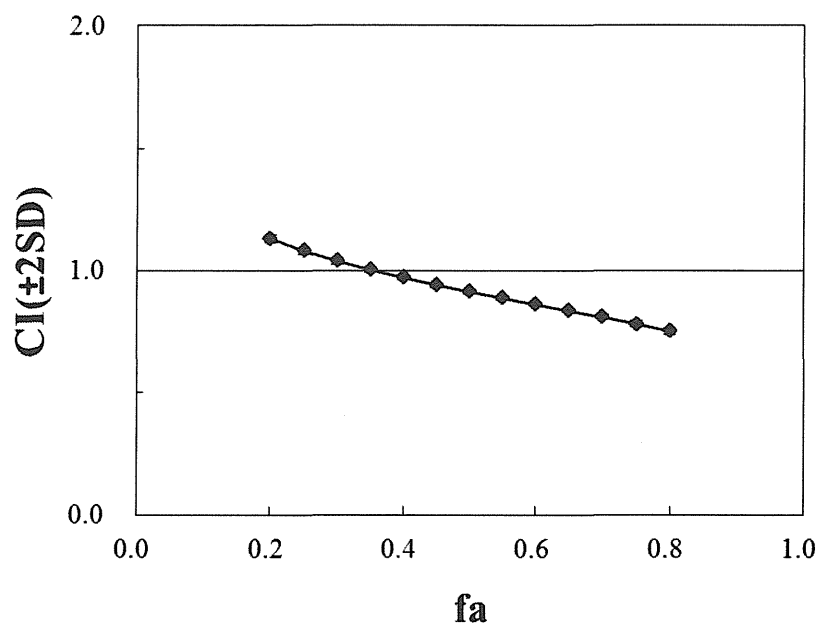
表 2 α -トコフェロールとフラボノール類の併用効果の解析結果

試薬名	併用割合	CI値の範囲(CI \pm 2SD)	判定
ケンフェロール			
DPPH 法	1:0.47	0.81 \pm 0.01 \sim 1.12 \pm 0.05	相乗(fa:0.6 以上)
ABTS 法	1:0.62	0.76 \pm 0.03 \sim 1.07 \pm 0.04	相乗(fa:0.5 以上)
ケルセチン			
DPPH 法	1:0.17	0.85 \pm 0.01 \sim 1.05 \pm 0.07	相乗(fa:0.6以上)
ABTS 法	1:0.26	0.96 \pm 0.04 \sim 1.33 \pm 0.14	相殺
ミリセチン			
DPPH 法	1:0.21	0.89 \pm 0.06 \sim 1.08 \pm 0.06	弱い相乗(fa:0.7以上)
ABTS 法	1:0.19	1.02 \pm 0.04 \sim 1.07 \pm 0.02	相加

表 3 α -トコフェロールとカテキン類の併用効果の解析結果

試薬名	併用割合	CI値の範囲(CI \pm 2SD)	判定
EC			
DPPH 法	1:0.17	0.96 \pm 0.05 \sim 1.03 \pm 0.07	相加
ABTS 法	1:0.19	1.17 \pm 0.01 \sim 1.33 \pm 0.07	相殺
EGC			
DPPH 法	1:0.16	0.92 \pm 0.07 \sim 0.95 \pm 0.04	弱い相乗
ABTS 法	1:0.17	0.96 \pm 0.04 \sim 1.09 \pm 0.06	相加
ECg			
DPPH 法	1:0.17	0.80 \pm 0.04 \sim 1.03 \pm 0.05	相乗(fa:0.4 以上)
ABTS 法	1:0.19	0.40 \pm 0.03 \sim 0.90 \pm 0.02	相乗
EGCg			
DPPH 法	1:0.16	0.75 \pm 0.01 \sim 1.13 \pm 0.02	相乗(fa:0.5 以上)
ABTS 法	1:0.19	0.40 \pm 0.03 \sim 0.90 \pm 0.02	相乗

(a) CI plot DPPH 法



(b) CI plot ABTS 法

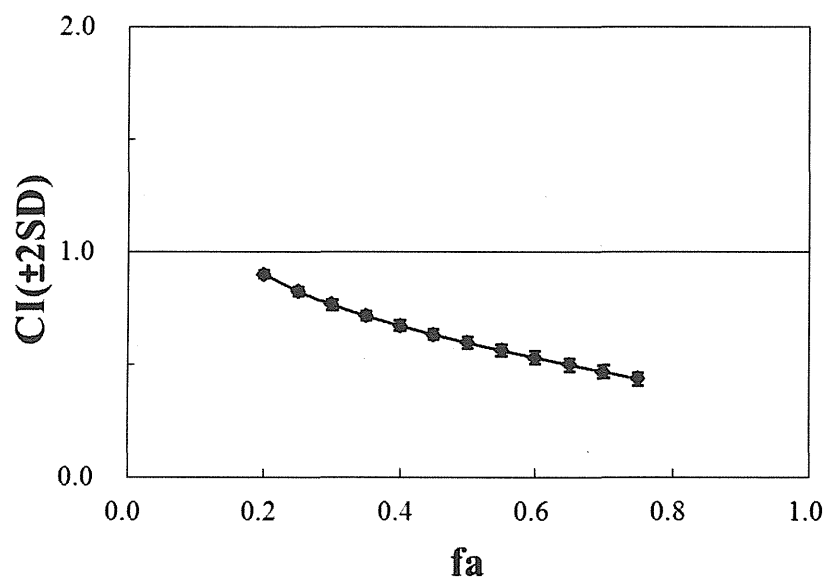


図1 α -トコフェロールと EGCg の併用結果

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito Y., Ishizuki K., Sekiguchi W., Tada A., Akiyama T., Sato K., Yamazaki T., Akiyama H.	The analysis of residual solvents in annatto extracts using a static headspace gas chromatography method.	Am. J. Anal. Chem.	3	638-645	2012
田原麻衣子, 末松孝子, 早川昌子, 合田幸広, 小西良子, 杉本直樹	定量NMRによるトリコテセン系マイコトキシン類市販試薬の純度決定	Micotoxins	62	111-119	2012
杉本直樹, 田原麻衣子, 末松孝子, 三浦亨	NMRによる有機化合物の絶対定量の可能性	食品衛生学雑誌	53	J228-J233	2012
Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H., Kawamura, Y	Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy.	Anal. Chim. Acta	734	54-61	2012
Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H., Kawamura, Y.	Absolute quantification for benzoic acid in processed foods using quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy.	Talanta	99	342-348	2012
Watanabe-Ishizuka A., Akiyama H., Kondo K., Obitsu S., Kawahara N., Teshima R., Goda Y.	Determination of Cyanogenic Glycoside Linamarin in Cassava Flour using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	Jpn. J. Food Chem. Safety	19	38-43	2012
田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻崇, 多田敦子, 穂山浩, 合田幸広, 西村哲治	定量分析値の信頼性確保のためのqNMRを用いた市販試薬の純度決定	環境化学	22	33-41	2012
Watanabe S., Taguchi H., Temmei Y., Hirao T., Akiyama H., Sakai S., Adachi R., Uehara A., Teshima R.	Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction	J. Agric. Food Chem	60	2108-2115	2012

Ishizaki S, Sakai Y, Yano T, Nakano S, Yamada T, Nagashima Y, Shiomi K, Nakao Y, Akiyama H	Specific Detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) of Potentially Allergenic Salmonid Fish Residues in Processed Food	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem</i>	76	980-985	2012
Tsuruda S., Akaki K., Hiwaki H., Akiyama H.	Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of <i>Omphalotus guelpiniformis</i> and <i>Leptinula edodes</i>	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem</i>	76	1343-1349	2012
Akiyama H., Minogishi Y., Makiyama D., Mano J., Sakata K., Nakamura K., Noguchi A, Takabatake R., Futo S., Kondo K., Kitta K., Katoyama Y., Teshima R.	Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System.	<i>Shokuhin Eiseigaku Zasshi</i>	53	157-165	2012
Tatebe C., Ohtsuki T., Kubota H., Sato K., Akiyama H., Kawamura Y.	Extraction Method and Determination of Sudan I from Sunset Yellow FCF by Isocratic High-Performance Liquid Chromatography.	<i>Am. J. Anal. Chem.</i>	3	570-575	2012
Ito A., Taguchi T., Mogi T., Wakiye H., Tanaami T., Akiyama H., Teshima R., Sasaki N., Yamada A, Ozeki Y.	Comparison of signal amplification methods using DNA microarrays for screening GM crops.	<i>Jpn. J. Food Chem. Safety</i>	19	141-148	2012
Kubota H., Sato K., Sasaki N., Ozeki Y., Akiyama H.	Formation of volatile halogenated compounds in fresh-cut vegetables treated with sodium hypochlorite.	<i>Jpn. J. Food Chem. Safety</i>	19	94-103	2012
Mikawa T., Kubota H, Ozeki Y., Yoshida M., Nakanishi T., Sato K., Akiyama H.	Determination of sodium stearoyl lactylates in foods using HPLC after derivatization with 2-nitrophenyl hydrazine .	<i>Jpn. J. Food Chem. Safety</i>	19	178-184	2012

Yokota A, Kubota H. Komiya S., Sato K., Akiyama H., Koshiishi I.	Sensitive and simple determination of bromate in foods disinfected with hypochlorite reagents using high performance liquid chromatography with post-column derivatization	J. Chromatogr. A	A1262	219-222	2012
佐藤恭子, 大月典子, 大迫勉, 大堀昭男, 珍田充, 古庄紀子, 穠山浩, 河村葉子	食品添加物シリコーン樹脂の純度試験に関する検討	国立衛研報告	130	71-74	2012
古庄紀子, 大月典子, 大槻崇, 建部千絵, 佐藤恭子, 穠山浩, 河村葉子	有害試薬不使用のチアベンダゾール定量法の改良	国立衛研報告	130	46-49	2012
久保田浩樹, 箕川剛, 小関良宏, 佐藤恭子, 穠山浩	食品添加物ステアロイル乳酸ナトリウムのLC-MSによる組成分析	食品衛生学雑誌	53	14-18	2012
笠間菊子, 井上雪乃, 穠山浩, 鈴木達也, 坂田こずえ, 中村公亮, 大島赴夫, 小島幸一, 近藤一成, 手島玲子	プラスミドDNAを用いた中国産安全性未承認遺伝子組換えコメ検査に関する外部精度管理調査	日本食品化学学会誌	19	215-222	2012
Tada, A., Takahashi, K., Ishizuki, K., Sugimoto N., Suematsu, T., Arifuku, K., Tahara, M., Akiyama, T., Ito, Y., Yamazaki, T., Akiyama, H., Kawamura, Y.	Absolute Quantitation of Stevioside and Rebaudioside A in Commercial Standards by Quantitative NMR	Chem. Pharm. Bull.	61(1)	1-6	2013
伊藤裕才	フラボノイドの分離と検出	ぶんせき	1	18-24	2013



Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy

Takashi Ohtsuki*, Kyoko Sato, Naoki Sugimoto, Hiroshi Akiyama, Yoko Kawamura

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 November 2011
Received in revised form 24 April 2012
Accepted 26 April 2012
Available online 17 May 2012

Keywords:

Absolute quantification
Food analysis
Processed food
Quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
Sorbic acid

ABSTRACT

An analytical method using solvent extraction and quantitative proton nuclear magnetic resonance (qHNMR) spectroscopy was applied and validated for the absolute quantification of sorbic acid (SA) in processed foods. The proposed method showed good linearity. The recoveries for samples spiked at the maximum usage level specified for food in Japan and at 0.13 g kg^{-1} (beverage: 0.013 g kg^{-1}) were larger than 80%, whereas those for samples spiked at 0.063 g kg^{-1} (beverage: 0.0063 g kg^{-1}) were between 56.9 and 83.5%. The limit of quantification was 0.063 g kg^{-1} for foods (and 0.0063 g kg^{-1} for beverages containing *Lactobacillus* species). Analysis of the SA content of commercial processed foods revealed quantities equal to or greater than those measured using conventional steam-distillation extraction and high-performance liquid chromatography quantification. The proposed method was rapid, simple, accurate, and precise, and provided International System of Units traceability without the need for authentic analyte standards. It could therefore be used as an alternative to the quantification of SA in processed foods using conventional method.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sorbic acid (SA) and its potassium and calcium salts are extensively used as food preservatives to prevent the alteration of foods by microorganisms, as they inhibit the growth of fungi, yeasts, molds, and bacteria [1–3]. The toxicology of these compounds has been studied and they are classified as generally recognized as safe in the US [4]. For these reasons, they have been the leading preservatives in the global food sector over the past 30 years [5–7]. The acceptable daily intake value for SA and sorbate salts is 25 mg kg^{-1} body weight, accessed by the Joint US Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives [8]. The Codex Committee has set maximum usage levels of these preservatives for specific foods, and many countries regulate them according to specific legislation. However, a reliable analytical method is required to determine their levels in processed foods and to ensure that they remain within permitted ranges.

Several analytical methods, including high-performance liquid chromatography (HPLC) [9–13], gas chromatography [1,14–16], thin-layer chromatography [17], and capillary electrophoresis [18,19], have been developed for the determination of SA in various processed foods. These methods require complicated and time-consuming pre-treatments to extract and/or clean-up SA from

processed foods, such as steam distillation [9,10,18], liquid extraction [12,16,17], solid-phase extraction [11,13,15,19], headspace solid-phase micro extraction [14], and headspace liquid-phase micro extraction [1]. In addition, for accurate relative quantification, the methods require the use of an authentic standard, such as a certified reference material (CRM), which might be difficult to obtain and can be of questionable accuracy.

Quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy can analyze the absolute concentration of a substance without the need to use a reference material to quantify the analyte itself [20]. This method has additional advantages in terms of simple sample preparation, reduced sample consumption, rapid measurement, provisional qualification data, involved structural information, and non-destructive analysis [21–23]. Quantitative proton NMR (qHNMR) is the most commonly used approach because of its high sensitivity and the widespread presence of this hydrogen isotope in organic molecules, although most other NMR active nuclei can also be employed.

In qHNMR, the concentration of the analyte is obtained using the ratio between the area of a specific signal of the analyte and that of an accurate internal standard (IS). The intensities of a given NMR resonance are directly proportional to the molar concentrations of the analyte and the IS, respectively. qHNMR development has recently been accelerated because of substantial increases in the sensitivity of high-field NMR spectrometers, and the establishment of accurate and precise data-processing and data-evaluation methods [21]. qHNMR has consequently been used to study the

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9403; fax: +81 3 3700 9403.
E-mail address: ohtsuki@nihs.go.jp (T. Ohtsuki).

quantities of crude samples such as metabolites in urine or serum [24,25], naturally occurring compounds in medicinal plants [26,27], and organic compounds in pharmaceutical samples [28]. These studies have also used qHNMR to analyze beverages, including the quantification of organic and amino acids in beer [29], (–)-epicatechin [30] and formic acid in apple cider [31], malic and citric acids in fruit juices [32], methanol in a traditional Cypriot spirit [33], and organic compounds in vinegars [34] and wine [35].

In 2009, Saito et al. reported that using an International System of Units (SI)-traceable reference material as an IS could improve the measurement accuracy of qHNMR [20]. Accordingly, we proposed that qHNMR and an SI-traceable reference material could be used to determine the absolute content of quercetin in tartary buckwheat noodle [36]. However, there have been no reports for application of qHNMR with SI-traceability in processed foods such as cheese, sausage, jam, and miso paste.

In this study, we demonstrated about application and validation of the absolute quantification method of SA in processed foods using solvent extraction and qHNMR. We also demonstrated that the proposed method was simple, rapid, selective, accurate, and precise compared with conventional method using steam distillation and HPLC.

2. Materials and methods

2.1. Processed food samples

Eleven processed foods without SA (cheese, fish paste, sausage, dried cuttlefish, syrup, vegetables pickled in soybean sauce, jam, miso paste, noodle soup, ketchup, and a beverage containing *Lactobacillus* species) and six processed foods with SA (cheese, fish paste, sausage, dried cuttlefish, syrup, and jam) were purchased at markets in Tokyo, Japan.

2.2. Chemicals and reagents

All reagents were purchased from Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan), were of HPLC or analytical grade, and were used without further purification. SA standard and dimethyl sulfoxide (DMSO)- d_6 were purchased from Kanto Chemical Co. Inc. 2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- d_6 sodium salt (DSS- d_6) was obtained from ISOTEC (Miamisburg, OH). Diethyl phthalate (DEP) (NMIJ CRM 4022-b, purity: 99.74 ± 0.09%), which was the CRM standard, was purchased from the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba, Japan).

2.3. Instruments

The qHNMR spectrum was recorded on JEOL JNM ECA 600 spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). HPLC was performed on a Shimadzu HPLC system (LC-10A) equipped with an SPD-M10Av diode array detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.4. Sample preparation and extraction

2.4.1. Solvent extraction

The solid samples (cheese, fish paste, sausage, and dried cuttlefish) were cut into small pieces before weighing. With the exception of the beverage containing *Lactobacillus* species, 5 g of each food was accurately weighed in glass centrifuge tubes. Saturated sodium chloride solution (20 mL), 10% sulfuric acid solution (10 mL), and diethyl ether (20 mL) were added, and the tubes were subjected to high-speed homogenization for approximately 1 min. The homogenate was centrifuged at 1500 × g for 5 min, and the upper layer was transferred into a clean flask. The residue was homogenized with 20 mL diethyl ether and centrifuged at 1500 × g

for 5 min. The upper-layer solution was again transferred into a clean flask, and then dried for 2 min to yield the extract for qHNMR analysis.

For cheese and sausage samples, 10 mL methanol was added to the extract to remove oil components. Subsequently, the methanol layer was evaporated to obtain the defatted extract for qHNMR analysis.

For the beverage containing *Lactobacillus* species, the quantities were modified as follows: 50 g of sample, 40 mL of saturated sodium chloride solution, 10 mL of 10% sulfuric acid solution, and 40 mL of diethyl ether.

2.4.2. Steam distillation

A 5 g sample was weighed into a 1 L distillation flask, and 100 mL ultrapure water, 10 mL of 15% (w/v) tartaric acid solution and 60 g sodium chloride were added. The mixture was distilled at a flow rate of 10 mL min⁻¹. When the volume in the flask reached approximately 490 mL, the distillate was transferred to a volumetric flask, and adjusted to 500 mL by adding ultra-pure water. The final solution was filtered with a 0.45 μm syringe filter and used for HPLC analysis.

2.5. qHNMR analysis

2.5.1. Preparation of stock solution and determination of DSS- d_6 concentration

DSS- d_6 (16.92 mg) was dissolved in 100 g DMSO- d_6 as the stock solution. The concentration of DSS- d_6 in the stock solution was accurately determined by qHNMR analysis using DEP as the CRM standard. DEP (10 mg) was accurately weighed and dissolved in 1 g stock solution. Approximately 600 μL of the solution was then introduced into an NMR tube with a 5 mm outer diameter (Kanto Chemical Co., Inc.) and subjected to qHNMR analysis, which enables to measure, automatically. The DSS- d_6 concentration in the stock solution was calculated using the ratio of the signal integral at δ_H 0 (DSS- d_6) to that at δ_H 4.29 (DEP). The concentration of DSS- d_6 was 0.1560 mg g⁻¹ according to the following equation (formula 1):

$$\text{Concentration (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{M_{\text{DSS}} \times I_{\text{DSS}} \times H_{\text{DEP}} \times W_{\text{DEP}} \times P_{\text{DEP}}}{H_{\text{DSS}} \times M_{\text{DEP}} \times I_{\text{DEP}} \times 100}$$

Here M_{DSS} and M_{DEP} are the molecular weights of DSS- d_6 and DEP, I_{DSS} and I_{DEP} are the signal integral values of DSS- d_6 and DEP, H_{DSS} and H_{DEP} are the numbers of protons of signal from DSS- d_6 and DEP, W_{DEP} is the concentration of DEP (mg g⁻¹), and P_{DEP} is the purity of DEP (99.74%).

2.5.2. qHNMR analysis of SA standard

A 12 mg sample of the SA standard was accurately weighed, dissolved in 1 g stock solution, and subjected to qHNMR analysis as described in Section 2.5.1. The purity of the SA standard was calculated using the following equation (formula 2):

$$\text{Purity (\%)} = \frac{I_{\text{SA}} \times H_{\text{DSS}} \times M_{\text{SA}} \times C_{\text{DSS}} \times 100}{H_{\text{SA}} \times I_{\text{DSS}} \times C_{\text{SA}} \times M_{\text{DSS}}}$$

Here I_{SA} and I_{DSS} are the signal integral values of SA and DSS- d_6 , H_{SA} and H_{DSS} are the numbers of protons of signal from SA and DSS- d_6 , M_{SA} and M_{DSS} are the molecular weights of SA and DSS- d_6 , C_{SA} is the concentration of SA (10 mg g⁻¹), and C_{DSS} is the DSS- d_6 concentration in the stock solution (0.1560 mg g⁻¹).

2.5.3. qHNMR analysis of SA in processed foods

The sample obtained from solvent extraction was dissolved in 1 g stock solution and subjected to qHNMR analysis as described

above. The SA content of the food sample was calculated using the following equation (formula 3):

$$\text{Content (g kg}^{-1}\text{)} = \frac{I_{SA} \times H_{DSS} \times M_{SA} \times C_{DSS}}{H_{SA} \times I_{DSS} \times W_{FD} \times M_{DSS}}$$

Here W_{FD} is the concentration of the food sample by weight (g g⁻¹; 5 or 50 g food sample/1 g stock solution).

2.5.4. qHNMR measurement parameters

qHNMR was carried out with the following optimized parameters: irradiation frequency, 600 MHz; probe temperature, 25 °C; spinning, off; number of scans, 8; spectral width, 20 ppm; auto filter, on (eight times); acquisition time, 4 s; relaxation delay, 60 s; pulse angle, 90°; pulse width, 12.2 μs; free induction decay (FID) data points, 64k; and ¹³C decoupling, multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8). The data were processed with JEOL Alice 2 for qNMR software. The signal integral was used for quantitative analysis. The chemical shift of all data was referenced to the DSS-d₆ resonance at 0 ppm.

2.6. HPLC analysis

The extracted sample solution obtained from steam distillation was subjected to HPLC analysis on an L-column2 octadecyl silane column (4.6 mm × 250 mm; Chemical Evaluation and Research Institute, Saitama, Japan) at 40 °C and a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ using MeOH–H₂O–200 mM phosphate buffer (pH 4.0) mixed solvents (36:59:5) as the mobile phase at 260 nm. The content of SA in the food sample was calculated from the following equation (formula 4):

$$\text{Content (g kg}^{-1}\text{)} = \frac{C \times V}{1000 \times W}$$

Here C is the content of SA in the sample extract solution, V is the volume of sample extract solution, and W is the weight of the sample (g).

2.7. Neutralization titration

Before titration, ethanol was neutralized by adding 0.8% (w/v) sodium hydroxide solution and several drops of phenolphthalein solution (1% in ethanol). SA standard (250 mg) was accurately weighed and dissolved in 25 mL neutralized ethanol. Subsequently, the obtained solution was titrated with 0.1 mol L⁻¹ sodium hydroxide solution (factor: 1.003 at 20 °C) after the addition of a few drops of phenolphthalein solution. In this titration, 1 mL of 0.1 mol L⁻¹ sodium hydroxide is used to neutralize 11.21 mg of SA. Therefore, the purity of the SA standard was calculated using the following equation (formula 5):

$$\text{Purity (\%)} = \frac{11.21 \times F \times V \times 100}{W}$$

Here F is the factor of sodium hydroxide (1.003), V is the volume of sodium hydroxide solution dropped into the sample solution, and W is the weight of SA (mg).

3. Results and discussion

3.1. qHNMR measurement of SA standard

To determine whether qHNMR could be used for quantification of the SA content in the processed foods, the SA standard was subjected to it and we analyzed the resolution of each individual signal on the ¹H NMR spectrum. As shown in Fig. 1, the ¹H NMR spectrum demonstrated characteristic proton signals: one doublet signal of methyl proton at δ_H 1.84 integrating for three protons (H-1

Table 1
Purity of SA standard determined by qHNMR.

Signal (δ, ppm)	Number of proton	Integral value ^a	Purity (%) ^b
1.84	3	451.1	99.2 ± 0.3
5.79	1	150.5	99.3 ± 0.3
6.26	2	302.2	99.7 ± 0.3
7.18	1	150.0	99.0 ± 0.3
12.2	1	139.6	92.1 ± 0.6

^a Values represent the mean of three independent experiments.

^b Values represent the mean ± standard deviation of three independent experiments.

position); one doublet signal of olefinic methine proton at δ_H 5.79 integrating for one proton (H-5 position); overlapped signal of each olefinic methine proton at H-2 and H-3 at δ_H 6.26 integrating for two protons; one double doublet signal of olefinic methine proton at δ_H 7.18 integrating for one proton (H-4 position); and one broad singlet of carboxyl proton at δ_H 12.2 integrating for one proton. The absolute purity of SA was calibrated from the ratio of the signal integral values (signal area values) of each signal to that of DSS-d₆. As shown in Table 1, the purities of SA calculated from the three signals (δ_H 1.84, 5.79, and 7.18) were similar; however, those calculated from signals at δ_H 6.26 and 12.2 deviated from these three signals.

It is generally believed that a desirable signal for qHNMR quantification is well resolved from other intra-molecular signals and not subjected to exchangeable protons such as hydroxyl groups or nitrogen-bearing protons [37]. Moreover, accurate quantification requires a good signal shape and low multiplicity of signal. On this basis, we confirmed that the three signals observed at δ_H 1.84, 5.79, and 7.18 were suitable for SA quantification by qHNMR.

To determine the linearity and the measuring range of the three signals, we prepared SA standards at eight different concentrations including 0.077, 0.16, 0.32, 0.63, 1.3, 2.5, 5.0, and 50 mg g⁻¹ and plotted the ratio of the integral value of each individual signal to that of DSS-d₆ versus the SA concentration. In all calibration curves, good linearity was obtained in the range of 0.077–50 mg g⁻¹ for the δ_H 1.84 signal and 0.32–50 mg g⁻¹ for the other two signals (Fig. 2). The correlation coefficients of all calibration curves were equal to 0.9999.

3.2. Comparison of qHNMR and neutral titration methods

Next, we compared the purity of SA obtained by qHNMR and neutral titration methods, to evaluate the precision of absolute quantification by the former. As shown in Table 2, the purities were 99.2 ± 0.3% and 99.4 ± 0.1% (mean ± standard deviation) from qHNMR and neutral titration, respectively, indicating that both methods showed similar accuracy and precision for the absolute quantification of SA.

3.3. Pre-treatment method of processed foods

Steam distillation is a conventional pre-treatment method for the quantification of SA in processed foods. However, water in the

Table 2
Comparison of purities determined by qHNMR and neutralization titration methods.

	Purity (%)
qHNMR	99.2 ± 0.3 ^a
Neutralization titration	99.4 ± 0.1 ^b

^a Values represent the mean ± standard deviation of purities obtained from three signals (δ_H 1.86, 5.79, and 7.18).

^b Values represent the mean ± standard deviation of three independent experiments.

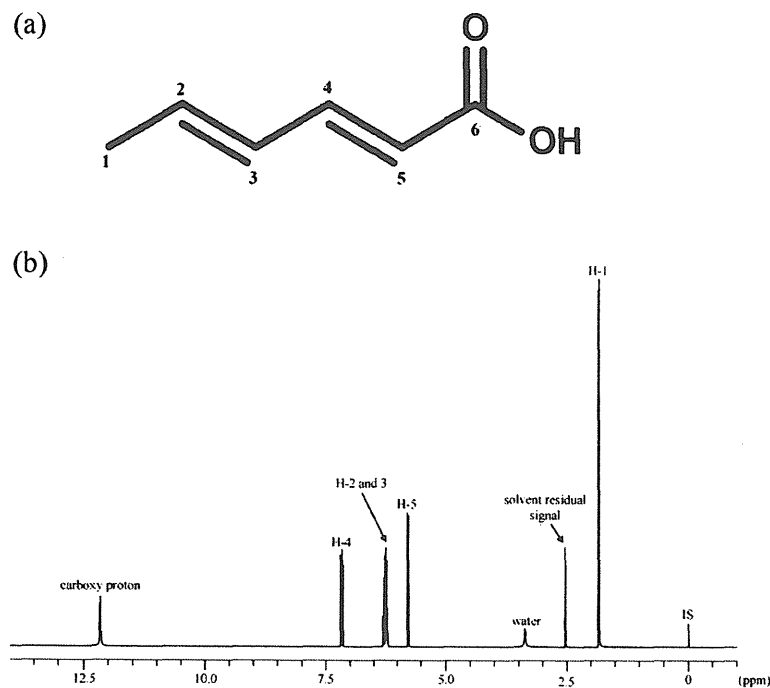


Fig. 1. Chemical structure of SA (a) and ^1H NMR spectrum of SA standard in $\text{DMSO}-d_6$ containing $\text{DSS}-d_6$ (b). IS, internal standard ($\text{DSS}-d_6$).

obtained distillation solution degrades the quality of ^1H NMR spectra resulting in a low spectrum resolution and an overlap of signals between water and samples. In addition, the complete evaporation of water from this solution *in vacuo* is a time-consuming process. To avoid these problems, we modified the previously reported solvent extraction method with diethyl ether [16] and used it as a pre-treatment. SA is quite soluble in diethyl ether. Diethyl ether does not also mix with water. Therefore, we estimated that diethyl ether is the best extraction solvent and the proposed pre-treatment give low intensity of interference water signal following qHNMR analysis. In addition, this pre-treatment is unnecessary in multi-step purifications, because the SA content of processed foods can be readily quantified if the SA signals on the ^1H NMR spectrum are sufficiently separated from interference signals. Moreover, the number of extraction cycle was optimized two cycles, which could be efficiency extraction of SA in processed food and save the solvent and pre-treatment time. Therefore, we estimated that the proposed pre-treatment is simple and rapid compared with steam distillation.

3.4. Recovery test

We investigated whether the proposed method, combined with solvent extraction and qHNMR, could be used to quantify SA in processed foods. To assess intra-day accuracy and precision, we performed the recovery tests at three different concentrations for 11 foods that are permitted to contain SA in Japan. Fig. 3 shows the ^1H NMR spectra of SA-spiked sample extracts and blank sample extracts. It is necessary that the overlapped signal for quantification should not overlap the other signals including those from other ingredients in processed foods, and that the quantification signal should show larger intensity and lower multiplicity than other SA signals.

Although the signal at δ_{H} 1.84 had a lower signal multiplicity and larger signal intensity than the other two signals (δ_{H} 5.79 and 7.18), whole and/or partial overlap of signals between it and other ingredients was observed in some processed foods. These overlap signals would particularly affect the accurate quantification at low concentrations of spiked SA. Therefore, the SA content of nine of

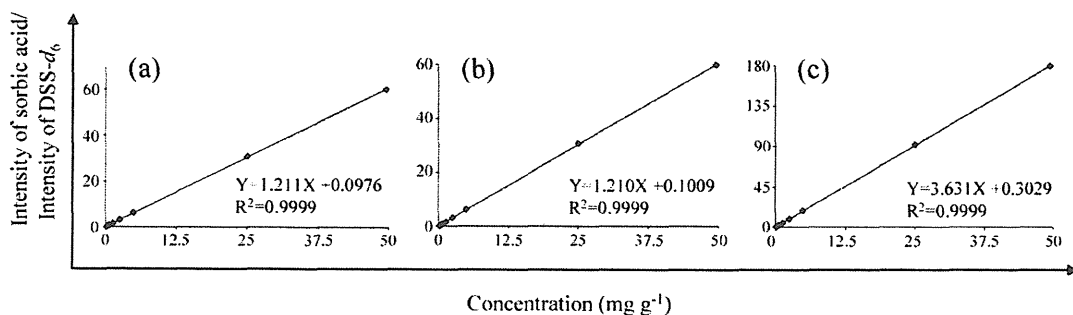


Fig. 2. Relationship between SA concentration and ratio of the integral of SA: $\text{DSS}-d_6$ signals. (a) δ_{H} 7.18, (b) δ_{H} 5.79, (c) δ_{H} 1.84.