

とから、新たに ABTS 法を用いた併用効果の解析を試みた。 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。

相乗効果の発現メカニズムについては不明な点も多いが、我々は上記の通り、抗酸化物の再生作用に起因すると推察している。すなわち、抗酸化反応後に生成する抗酸化物ラジカルを他方の抗酸化物が再生することによる協調的効果が相乗効果に重要な役割を果たしていると考えている。一方、チオール化合物が抗酸化物のカテコール構造を再生し、相乗効果を発現することが報告されている。本研究では代表的なチオール化合物であるグルタチオン・システインを用い、カテキン類・フラボノール・フェノールカルボン酸類など 15 種の抗酸化物との併用効果を網羅的に解析した。まず、グルタチオンと 15 種の抗酸化物の併用効果を解析した。その結果、フェルラ酸、ケンフェロール以外の 13 化合物は全て、相乗効果を示した。特に、上から 8 番目 (Q-3-G; ケルセチン-3-グルコシド) までの化合物は $CI < 0.5$ となっており相乗効果が極めて高いことが判明した。また興味深いことに、それら 8 化合物すべてが分子内にカテコール構造を有していることも確認された。相乗効果を示したその他化合物 (モリン以外) は分子内にピロガロール構造を有していた。以上の結果、カテコール・ピロガロール構造がいずれも相乗効果の発現に重要な因子となっており、相乗効果の程度はカテコール類 $>$ ピロガロール類となることが示された。上述の通り、抗酸化物間での相乗効果には、抗酸化物の再生効果が大きく関わっていると推測され

る。今回の実験結果は、それを強く支持するものであった。すなわち、抗酸化物の再生の程度については、カテコール $>$ ピロガロールの順に再生反応が起こりやすいことが明らかになっており、この抗酸化物の再生されやすさが、相乗効果に大きく影響を及ぼしている可能性が示唆された。続いて、システインとの併用効果を同様に検討した。グルタチオンの場合と同様にフェルラ酸、ケンフェロール以外の 13 化合物は全て、相乗効果を示したが、相乗効果の程度は全体的に僅かに小さい結果となった。 $CI < 0.5$ の強い相乗効果を発現したのは、ECg, EGCg の 2 種のカテキン類のみであった。また、カテコール・ピロガロール構造がいずれも相乗効果の発現に重要な因子と考えられるが、グルタチオンの場合のように、構造ごとのはっきりとした順列はつかなかった。以上の結果は、チオール化合物の種類 (アミノ酸とペプチドの違い) によっても併用効果が大きく異なることを示唆するものであった。

D. 結論

本研究では多種多様な抗酸化物を併用した場合の相互作用を Median effect analysis により網羅的に解析した。トコフェロール類を中心とした併用効果の解析を試みた結果、総 51 通りの組合せの約半数で相乗効果の発現を確認した。また、DPPH 法と ABTS 法での解析結果を比較した結果、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。チオール化合物であるグルタチオン・システインとの各種抗酸化物の併用効果の解析では、カテコール・ピロガロール構造を有する抗酸化物が大きな相乗効果を発現することが明らかになった。この相乗効果の発現には、カテコール・ピロガロール構造の再生反応が大きく関与することが確認され、発現メカニズムに関して重要な知見が得られた。

以上のように、本 Median effect analysis では、DPPH 法での評価結果をもとに簡便に相乗・相加・相殺効果を見積もることが可能である。すなわち、本解析結果は酸化防止剤の有効活用に対して有益

な知見を与えることから、今後本 Median effect analysis が酸化防止剤の利用に幅広く活用されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Median effect analysis による抗酸化成分の併用効果の解析 山元 涼子, 石川 洋哉, 藤原 幸江, 受田 浩之, 山崎 壮, 松井 利郎, 松本 清 第 48 回化学関連支部合同大会 (福岡) (2011.7)

山元 涼子, 石川 洋哉, 松本 奈実子, 受田 浩之, 山崎 壮, 松井 利郎, 各種抗酸化物のトコフェロール類に対する併用効果の解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会 (2012.3)

山元涼子, 石川洋哉, 于銀萍, 島村智子, 柏木丈拈, 受田浩之, 山崎壮, 松井利郎, 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 第 49 回化学関連支部合同大会 (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) (2012.6)

山元 涼子, 石川 洋哉, 山内 良子, 島村 智子, 柏木 丈拈, 受田 浩之, 穂山 浩, 松井 利郎, 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, 日本食品科学工学会第 59 回大会(2012.8)

山元 涼子, 藤田 睦, 山内 良子, 島村 智子, 柏木 丈拈, 受田 浩之, 穂山 浩, 松井 利郎, 石川 洋哉, 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, 日本農芸化学会 2012 年度大会 (2013.3)

山元 涼子, 藤田 睦, 山内 良子, 島村 智子, 柏木 丈拈, 受田 浩之, 穂山 浩, 松井 利郎, 石川 洋哉 Median effect analysis によるチオール化合物と各種抗酸化物の相互作用解析

第 50 回化学関連支部合同大会 (2013.7)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 23 年度～平成 25 年度分担総合研究報告書

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

食品添加物である酸化防止剤の抗酸化能評価における公定法策定を目指し、その有力候補である DPPH 法と各種抗酸化能評価法を比較検証した。まず、DPPH 法と ABTS 法に関して、両者の活性相関を検討した結果、カテコール構造を有する化合物群で DPPH 法の活性値が高く見積もられることを明らかにした。また、DPPH 法では金属イオンに対する還元能を ABTS 法よりも高く反映していることを明らかにした。さらに、WST-1 法との比較では、両者が類似した活性傾向を示すことを明らかにし、DPPH 法ではスーパーオキシドの消去活性も反映している可能性を示した。

研究成果の総括

A. 研究目的

当研究グループでは、抗酸化活性評価法の公定法の確立を目指してきた。平成 17～19 年度、平成 20～22 年度の研究では、公定法候補の選定と妥当性について検討を加えている。すなわち、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) 短時間での測定が可能であること、(3) 特殊な測定機器を必要としない汎用性の高い分光学的測定法であることの 3 項目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物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、テータ解

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 法を中心とした公定法策定を目指す場合には、これまで有力候補としてきた ABTS 法、WST-1 法における各種抗酸化物の反応特性との相違点を明らかにしておく必要がある。酸化防止剤として利用される可能性のある抗酸化物は様々な物理・科学特性を有しており、ここの抗酸化物が各種試験法条件下でどの様なメカニズムに基づき評価されるのかを十分に把握しておく必要がある。そこで、本研究期間においては、DPPH 法を中心に、ABTS 法、WST-1 法などにおける各種抗酸化物の反応特性を詳細に検討することにより、DPPH 法の公定法としての妥当性を検討した。

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)、

エピカテキンガラート (ECg)、エピガロカテキンガラート (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、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、 δ -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(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場合の吸光度をコントロール (A_c) 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)。

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

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 (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場合の吸光度をコントロール (A_c) 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 (μ mol TE/ μ mol) とした。

(5) WST-1 法 (スーパーオキシド消去能測定)

市販の SOD Assay-Kit WST を使用して測定を行った。96 穴マイクロプレートに試料溶液 20 μ L、WST working solution を 200 μ L、Enzyme working solution 20 μ L を順次添加し、プレートシェーカーで室温にて 10 分間攪拌した。その後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。試料添加時の吸光度を A_{sample} 、試料溶液のかわりに超純水、あるいは 99.5% エタノールを添加した際の吸光度を A_{blank1} 、Enzyme working solution のかわりに Dilution buffer を用いた際の吸光度を A_{blank2} 、Enzyme working solution のかわりに Dilution buffer を加え、かつ試料溶液のかわりに超純水、あるいは 99.5% エタノールを添加した際の吸光度を A_{blank3} とし、以下の式から各試料の阻害率 (%) を求めた。各試料の阻害曲線を基に、50% 阻害を与える試料濃度 IC₅₀ を求めた。WST 還元の 50% 阻害

を示すサンプル溶液 20 μ L に含まれる SOD を 1 単位 (U) と定義し、スーパーオキシド消去能を SOD 等価活性値 SOSA (U/ μ mol) として示した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

(6) キサンチンオキシダーゼ阻害活性測定法

1.5 mL 容チューブに 12.5 mM リン酸カリウム buffer 120 μ L、200 μ M キサンチン緩衝液 50 μ L、5 mU / mL キサンチンオキシダーゼ酵素緩衝液 20 μ L を混合し、37°C で 5 分間プレインキュベーションを行った。エタノールに溶解した試料 10 μ L を添加し 37°C で 10 分間反応を行った。反応後、3%過塩素酸溶液 25 μ L を加え反応を停止した後、HPLC に供した。なお、HPLC システムは島津製作所 SCL-10AVP、カラムはナカライテスク社製 COAMOAIL 5C₁₈-AR-II (4.6 mm \times 250 mm) を用い、0.02 M リン酸を移動相として流速 1.00 mL/min、検出波長 290 nm で分析を行った。試料としてエタノールを加えた時の尿酸のピーク面積値を阻害率 0%とし、試料添加時の尿酸のピーク面積値の減少割合から酵素活性阻害率 (%) を求めた。キサンチンオキシダーゼ阻害活性は、50%阻害を与える試料濃度 IC₅₀ として示した。

C. 研究結果およびD. 考察

まず、ポリフェノールを中心とした 21 種類の抗酸化物質を DPPH 法と ABTS 法を測定し、両者の活性相関を検討した結果、活性値が DPPH > ABTS の抗酸化物がいずれも分子内にカテコール構造を有していることが判明した。カテコール構造有り群 (DPPH \approx ABTS) とカテコール構造無し群 (DPPH > ABTS) に分けて、DPPH 法と ABTS 法の活性値の相関性を検討した結果、カテコール無し群では、傾きが 0.957 でほぼ原点を通る直線が得られた ($r = 0.998$)。一方、カテコール有り群では直線がほぼ平行移動した形となり (傾き 0.901, $r = 0.957$)、この移動量が TEAC 値でおよそ 1.3 (μ molTE/ μ mol) であることを明らかにした。この結果は抗酸

化物質にカテコール構造が存在する場合、DPPH 法では ABTS 法と比較して約 1.3 (μ molTE/ μ mol) 程度の活性値が上乘せされることを示している。さらに、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。この溶媒効果による再生反応が DPPH 法と ABTS 法の活性差を引き起こしていると考え、DPPH 法における溶媒効果を 25 年度に検証した。すなわち、カテコール化合物の再生を引き起こさないアセトニトリル溶媒を用いて DPPH 測定を行い、通常の水/エタノール系での活性値を比較した結果、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 種のカテコール化合物では TEAC 値で 1.06 ~ 2.20 (μ mol-TE/ μ mol) の活性値の差が認められた。この結果から、通常 DPPH 法ではカテコールの再生に伴い活性値が上積みされている可能性が高いことが確認された。

食品中の酸化防止においては、金属イオンに対する還元効果が重要となる。DPPH 法と ABTS 法の比較において、両法に対する金属イオンの還元能の反映度を検証した。金属イオンの還元能の評価法のひとつである FRAP 法での活性値との相関を検討した結果、DPPH 法と FRAP 法では比較的類似した傾向が認められた。特に、上記 DPPH > ABTS の化合物群を見てみると、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。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おり、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、DPPH 法と WST-1 法の比較検証を試みた。WST-1 法は、キサンチンオキシダーゼ酵素反応を利用したスーパーオキシド消去反応の測定法である。一電子転移反応に基づく化学反応を利用

する DPPH 法とは本質的に異なる測定法であるが、両者の活性値の高低に関しては類似点も認められることから、上記と同様に 21 種抗酸化物の測定を行い、両者の活性値の相違点を詳細に検討した。その結果、両者の相関係数は 0.660 となり、高い相関は認められなかった。しかしながら、化合物毎に詳細に見てみると、ピロガロール構造を有する EGCg、EGC、ECg、没食子酸は両法で高い活性値を示し、カテコール構造を有する化合物がそれに続く高い活性値を示す傾向が認められ、両法で類似した活性傾向が認められた。このことは、DPPH 法での活性評価にスーパーオキシド消去能もある程度反映されていることを示唆している。なお、WST-1 法反応系におけるキサンチンオキシダーゼに対する各種抗酸化物の阻害効果が DPPH 法と WST-1 法の相関性に影響を与えている可能性も示されている。

D. 結論

本研究期間においては、酸化防止剤評価の公定法として有力な DPPH 法と各種試験法を比較した。DPPH、ABTS、FRAP 法での活性値の比較では、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た。また、DPPH 法における各種抗酸化物の反応特性に及ぼす溶媒効果を検証した結果、水/エタノール溶媒中ではカテコール・ピロガロール構造の再生反応が生じ、活性値が増加する傾向になることも確認した。続いて、DPPH 法と WST-1 法の活性相関を検討した結果、類似した活性傾向を示すことが明らかになった。このことは、DPPH 法での活性評価にスーパーオキシド消去能もある程度反映されていることを示唆している。以上のように、DPPH 法は各種抗酸化能評価法と相関性が高く、金属イオンに対する還元能、あるいはスーパーオキシド消去能などを包括して代表的に使用出来る可能性を有している。DPPH 法に関しては、各研究機関による共同試験も順調に進んでいることから、今後公定法として確立され幅広く利用されることを期待する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Arung, E. T., Furuta, S., Ishikawa, H., Tanaka, H., Shimizu, K., Kondo, R. Melanin Biosynthesis Inhibitory and Antioxidant Activities of Quercetin-3'-O- β -D-glucoside Isolated from *Allium cepa*, *Z. Naturforsch.* 66 c, 209 – 214 (2011)

Meng, T-X., Furuta, S., Fukamizu, S., Yamamoto, R., Ishikawa H., Arung, E. T., Shimizu, K., Ohga, S., Kondo, R. Evaluation of biological activities of extracts from the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus* for skin cosmetics, *Journal of Wood Sci.*, 57(5), 452-458 (2011)

Meng, T-X., Ishikawa H., Shimizu, K., Ohga, S., Kondo, R. A glucosylceramide with antimicrobial activity from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus* *Journal of Wood Sci.*, 58(1), 81-86 (2012)

Arung, E. T., Furuta, S., Sugamoto, K., Shimizu, K., Ishikawa, H., Matsushita Y., Kondo, R.

The Inhibitory Effects of Representative Chalcones Contained in *Angelica keiskei* on Melanin Biosynthesis in B16 Melanoma Cells, *Natural Product Communications*, 7(8), 1007-1010 (2012)

山元 涼子、西村 奈保子、于 銀萍、中村 強、石川 洋哉、オイゲノールおよびチモールの抗酸化活性に及ぼすシクロデキストリン包接効果、*福岡女子大学人間環境学部紀要「人と環境」*、29-33、(2012)

Bang, T. H., Suhara, H., Doi, K., Ishikawa, H., Fukami, K., Parajuli, G. P., Katakura, Y., Yamashita, S., Watanabe, K., Adhikari, M. K., Manandhar, H. K., Kondo, R., Shimizu, K., Wild Mushroom in Nepal: Some potential Candidates as Antioxidant and ACE Inhibition Sources,

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, in press (2014)

酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH および ABTS ラジカル消去能評価法の特性比較
山内良子、深水さやか、小浜友紀子、島村智子、
柏木丈拵、受田浩之、穉山 浩、松井利郎、石川洋哉 *日本食品保蔵科学会誌* 2014 (印刷中)

2. 学会発表

酸化防止剤評価における各種抗酸化測定法の
相関、山内良子、小浜友紀子、島村智子、柏木
丈拵、受田浩之、穉山 浩、松井利郎、石川洋
哉 第 62 回日本食品保蔵科学会大会 (2013.6)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
秋山卓美, 山崎 壮, 棚元憲一	改良ジエチルジチオア セタール化法による増 粘多糖類構成糖の分析	食品衛生学雑 誌	52(1)	40-46	2011
Hasada, K., Yoshi da, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Miz ukami, H.	Application of ¹ H-NMR spectroscopy to validat ion of berberine alkalo id reagents and to chem ical evaluation of Copti dis Rhizoma	Journal of Nat ural Medicines	65 (2)	262-267	2011
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
Tada A., Takahas hi K., Ishizuki K., Sugimoto N., Suematsu T., Arif uku K., Tahara M., Akiyama T., Ito Y., Yamazaki T., Akiyama H. a nd Kawamura Y.	Absolute Quantitation o f Stevioside and Rebau dioside A in Commerci al Standards by Quantit ative NMR	Chem. Pharm. Bull.	61	33-38	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, 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 an alysis 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 pro cessed foods using qua ntitative proton nuclear magnetic resonance spe ctroscopy	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, 穰山浩, 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., Urisu 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	Biosci. Biotechnol. Biochem	76	980-985	2012
Tsuruda S., Akaki K., Hiwaki H., Akiyama H.	Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of <i>Omphalotus guepiniformis</i> and <i>Lentinula edodes</i>	Biosci. Biotechnol. Biochem	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., Kato 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	Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)	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	Am. J. Anal. Chem.	3	570-575	2012
Ito A., Taguchi T., Mogi T., Wakeda 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	Jpn. J. Food Chem. Safety	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	Jpn. J. Food Chem. Safety	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	Jpn. J. Food Chem. Safety	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	1262	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
Nuntaporn Moonrungrungsee, Tomoko Shimamura, Takehiro Kashiwagi, Jaroon Jakmunee, Keiro Higuchi, and Hiroyuki Ukeda	Sequential injection spectrophotometric system for evaluation of mushroom tyrosinase-inhibitory activity	Talanta	101	233-239	2012
Akiyama, T., Sekiguchi, W., Yamazaki, T. Akiyama, H	Assessment of Three Methods for the Identification of Enzymatically Hydrolyzed Guar gum	Food Hygiene and Safety Science	54 (1)	71-74	2013

Akiyama, T., Sekiguchi, W., Sugimoto, N., Tada, A., Ito, Y., Yamazaki, T., Akiyama, H.	Revised method for analyzing 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole in caramel III	Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	20 (3)	190-195	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
A. Tada, K. Ishizuki, J. Iwamura, H. Mikami, Y. Hirao, I. Fujita, T. Yamazaki, H. Akiyama and Y. Kawamura	Improvement of the Assay Method for Steviol Glycosides in the JECFA Specifications	American Journal of Analytical Chemistry	4	190-196	2013
Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H.	Quantitative determination of carthamin in Carthamus Red by ¹ H-NMR spectroscopy	Chemical and Pharmaceutical Bulletin	61(12)	1264-1268	2013
Nuntaporn Moonrungrsee, Tomoko Shimamura, Takehiro Kashiwagi, Jaroon Jankmune, Keiro Higuchi, Hiroyuki Ukeda	An automated sequential injection spectrophotometric method for evaluation of tyramine oxidase inhibitory activity of some flavonoids	Talanta	122	257-263	2014
Bang, T. H., Suhara, H., Doi, K., Ishikawa, H., Fukukami, K., Parajuli, G. P., Katakura, Y., Yamashita, S., Watanabe, K., Adhikari, M. K., Manandhar, H. K., Kondo, R., Shimizu, K.	Wild Mushroom in Nepal: Some potential Candidates as Antioxidant and ACE Inhibition Sources	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine			2014(in press)
山内良子, 深水さやか, 小浜友紀子, 島村智子, 柏木丈弘, 受田浩之, 穉山 浩, 松井利郎, 石川洋哉	酸化防止剤力価評価を目的としたDPPHおよびABTSラジカル消去能評価法の特性比較	日本食品保蔵科学会誌			2014(印刷中)

改良ジエチルジチオアセタール化法による増粘多糖類構成糖の分析

(平成 22 年 5 月 12 日受理)

秋山卓美^{1,*} 山崎 壮¹ 棚元憲一^{1,2}

Analysis of Thickening Polysaccharides by the Improved Diethyldithioacetal Derivatization Method

Takumi AKIYAMA^{1,*}, Takeshi YAMAZAKI¹ and Kenichi TANAMOTO^{1,2}¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;²Present address: Musashino University: 1-1-20 Shimmachi, Nishitokyo, Tokyo 202-8585, Japan;

* Corresponding author

The identification test for thickening polysaccharides containing neutral saccharides and uronic acids was investigated by GC analysis of constituent monosaccharides. The reported method, in which monosaccharides were converted to diethyldithioacetal derivatives with ethanethiol followed by trimethylsilylation, was improved in terms of operability and reproducibility of GC/MS analysis. The suitability of the improved diethyldithioacetal derivatization method was determined for seven thickening polysaccharides, *i.e.*, carob bean gum, guar gum, karaya gum, gum arabic, gum ghatti, tragacanth gum and peach gum. The samples were acid-hydrolyzed to form monosaccharides. The hydrolysates were derivatized and analyzed with GC/FID. Each sugar derivative was detected as a single peak and was well separated from others on the chromatograms. The amounts of constituent monosaccharides in thickening polysaccharides were successfully estimated. Seven polysaccharides were distinguished from each other on the basis of constituent monosaccharides. Further examination of the time period of hydrolysis of polysaccharides using peach gum showed that the optimal times were not the same for all monosaccharides. A longer time was needed to hydrolyze glucuronic acid than neutral saccharides. The findings suggest that hydrolysis time may sometimes affect the analytical results on composition of constituent monosaccharides in polysaccharides.

(Received May 12, 2010)

Key words: 増粘多糖類 thickening polysaccharide; 構成糖 constituent monosaccharide; ジエチルジチオアセタール diethyldithioacetal; GC/MS; GC/FID

はじめに

食品添加物公定書では、増粘多糖類の確認試験としてゲル形成による増粘反応や液性などを用いる試験法が採用されている¹⁾。これらの試験法は、製品の主成分である多糖類の特性を利用したものであるため、品目ごとに操作法が大きく異なる。そのため、複数の品目の製品に共通する分析法とはならない。一方、JECFA の増粘多糖類成分規格では、増粘反応などの試験法とともに、加水分解産物の TLC 分析により構成糖の検出を行う方法が定められている²⁾。増粘多糖類の種類によって構成糖の組成比に違いが

あることが報告されており、JECFA の構成糖検出方法は含有量の多い構成糖の存在を確認するだけであるが、確認試験としては意義がある。ただし、品目が不明な場合の鑑別まではできない。それに対して、各増粘多糖類の組成比を含量の低い構成糖も含めて詳細に分析したデータを用意し、それとの比較を行えば、品目が不明な増粘多糖類の品目鑑別、言い換えれば基原の確認ができる可能性がある。しかも、構成糖の確認試験法は、増粘多糖類に共通の試験法にもなりうる。そこで、現行の確認試験法の代替法にも利用可能な増粘多糖類の構成糖分析法を検討した。

増粘多糖類には構成糖としてウロン酸を含有するものがある。それらは 4 種類以上の構成糖を持つものが多く、構成糖の組成比のみで基原の確認ができる可能性が高いと推測された。多糖類の構成糖の組成比を分析する手法とし

* 連絡先 akiyamat@nihs.go.jp

¹ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野貫 1-18-1² 武蔵野大学: 〒202-8585 東京都西東京市新町 1-1-20

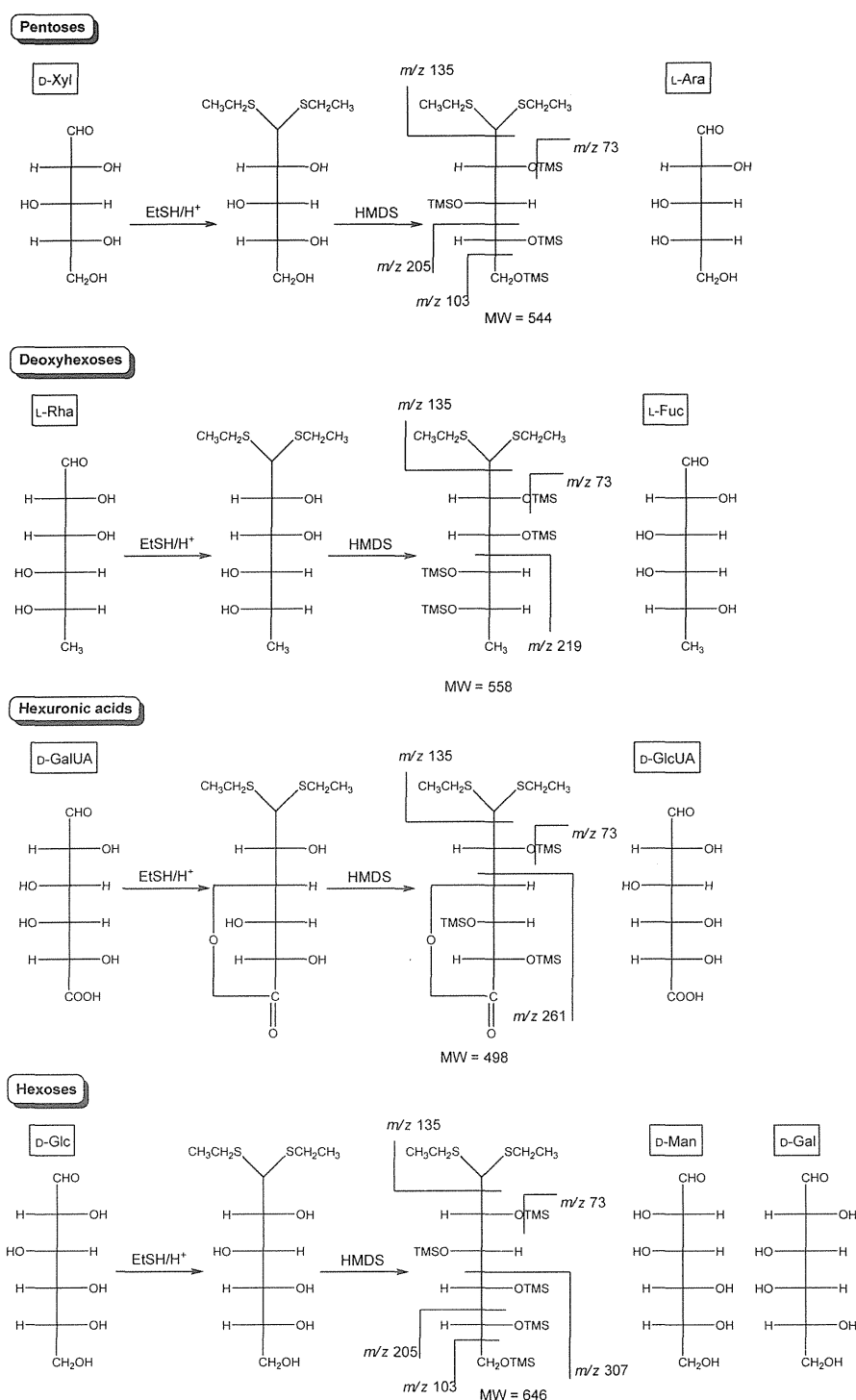


Fig. 1. Structures of monosaccharides and their diethylthioacetal-TMS derivatives

Abbreviations: D-Xyl, D-xylose; L-Ara, L-arabinose; L-Rha, L-rhamnose; L-Fuc, L-fucose; D-GalUA, D-galacturonic acid; D-GlcUA, D-glucuronic acid; D-Glc, D-glucose; D-Man, D-mannose; D-Gal, D-galactose

では、加水分解により遊離させた単糖を定量する方法がよく用いられている。遊離する単糖のうち、中性糖、アミノ糖、硫酸化糖の一斉分析には、糖分析カラムを使う HPLC 分析と GC/MS 分析の両方が多用されている。一方、ウロン酸を含んだ単糖類混合物の場合、HPLC 分析では満足する分離を得られる方法が報告されていなかっ

た。また、多糖類の GC による構成糖分析法として、加水分解後に TMS 化する方法³⁾、メタノリシス後に TMS 化する方法^{4), 5)}が報告されているが、ウロン酸は中性糖よりも誘導体の種類が多く、定量が困難である。また、加水分解後にアルジトールアセタート化する方法⁶⁾は中性糖の誘導体化法としてよく知られているが、ウロン酸には適用で

きない。Pitthardらは、加水分解後にジエチルジチオアセタール化とTMS化を行う方法を、ウロン酸を含有する植物由来の多糖類の構成糖分析に応用した⁷⁾。各単糖をジエチルジチオアセタール化とTMS化して得られる誘導体の構造をFig. 1に示した。ジエチルジチオアセタール化はウロン酸が分析可能である点と誘導体化反応のステップが少ない点が、よく知られたアルジトールアセテート化法よりもすぐれた特徴である。そこで、このPitthardらの方法(以下、原法とする)を増粘多糖類7品目(カロブビーンガム、グァーガム、カラヤガム、アラビアガム、ガティガム、トラガントガムおよびモモ樹脂)の分析に応用を試みた。しかし、検液調製時の操作や、内部標準物質を用いた時の再現性に問題が見られたため、改良を加え、これら7品目の確認試験法として適合可能な方法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

増粘多糖類の試料は以下のものを使用した。

カロブビーンガム、グァーガム、カラヤガム、トラガントガム: SIGMA社製試薬

ガティガム: ICN Biomedicals社製試薬

アラビアガム試料1(由来不明): SIGMA社製試薬

アラビアガム試料2(*Acacia senegal*由来): 食品添加物製品

アラビアガム試料3(*Acacia seyal*由来): 食品添加物製品

モモ樹脂: 食品添加物製品

上記のうち、食品添加物製品は日本食品添加物協会を通じて入手した。

単糖であるD-キシロース(D-Xyl), L-アラビノース(L-Ara), L-ラムノース(L-Rha), L-フコース(L-Fuc), D-ガラクトース(D-Gal), D-グルクロン酸(D-GlcUA), D-グルコース(D-Glc), D-マンノース(D-Man)およびD-ガラクトース(D-Gal)は片山化学(株)製特級試薬を用いた。マンニトールはSIGMA社製試薬を用いた。トリフルオロ酢酸(TFA), ピリジン, ヘキサメチルジシラザン(HMDS), ヘキサンは特級, エタンチオールは一級の試薬を用いた。

2. 原法による単糖標品の誘導体化⁷⁾

上述9種類の単糖とマンニトールの10 mmol/L混合水溶液200 μ Lをスクリーキャップ付き1 mL容円錐底反応バイアル(Pierce社製 Reacti-vial)に採り、減圧乾固した。20 μ Lのエタンチオール-TFA混液(2:1)を加えて室温で10分間放置した後、50 μ Lのピリジン, 100 μ LのHMDS, 30 μ LのTFAを順に加え、ときどき振り混ぜながら室温で1時間放置した。窒素気流下で溶媒をできるだけ除いた後、600 μ Lのヘキサンを加えて振とうした後数分間放置し、上層であるヘキサン層を検液とした。

3. 改良法による単糖標品の誘導体化

上述9種類の単糖の10 mmol/L混合水溶液(以下、単糖標準溶液)0.1 mLをスクリーキャップ付きガラス試験管に採り、減圧乾固した。100 μ Lのエタンチオール-TFA混液(2:1)を加えて室温で10分間放置した後、250 μ Lのピリジン, 500 μ LのHMDS, 150 μ LのTFAを順に加え、ときどき振り混ぜながら室温で1時間放置した。窒素気流下で溶媒をできるだけ除いた後、250 μ Lの水を加えて混合し、つづいて2 mLのヘキサンを加えて振とうした後数分間放置し、上層であるヘキサン層を検液とした。

4. 増粘多糖類試料の加水分解と誘導体化

試料10 mgをスクリーキャップ付きガラス試験管に採り、0.85 mLの水を加えて溶かし、窒素ガス置換を行った後に0.15 mLのTFAを加えて105°Cで所定時間(品目間の比較を行った実験では6時間、最適化実験では6, 11, 23, 35時間)加熱した。反応液0.2 mLを別のスクリーキャップ付きガラス試験管に採り、減圧乾固した。以下、単糖標品と同様に改良法により誘導体化した。

5. GC/MS

GC/MS分析は下記の条件により行った。

装置: GCMS-QP5050A ((株)島津製作所)

カラム: DB-5ms (J&W, 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness)

注入方法: スプリット (スプリット比1:9)

気化室温度: 250°C

カラム温度: 165°C (0 min) \rightarrow (2°C/min) \rightarrow 235°C (0 min)

インターフェイス温度: 250°C

検出: EI positive, スキャンモード

測定質量範囲: m/z 10~700.

6. GC/FID

GC/FID分析は下記の条件により行った。

装置: GC-14B ((株)島津製作所)

カラム DB-1 (J&W, 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness)

注入方法: スプリット (スプリット比1:10)

気化室温度: 300°C

カラム温度: 165°C (0 min) \rightarrow (2°C/min) \rightarrow 235°C (0 min)

検出器温度: 300°C

結果および考察

1. 原法による誘導体化の再評価

原法を用いて単糖とマンニトールの混合標準試料の分析を行った。予備検討からPitthardらの用いた5% diphenyl 95% dimethyl polysiloxaneカラムと同等な分離が得られたDB-5msカラム(5% polysilarylene 95% polydimethylsiloxane)を用いてGC/MS分析を行った。

その結果、まず、検液調製時の操作に問題があることが判明した。原法は溶媒を除いた後に残る物質をヘキサンに完全に溶解することにより試料ごとのばらつきのない検液を調製する方法であるが、窒素気流下で試料を乾固させる

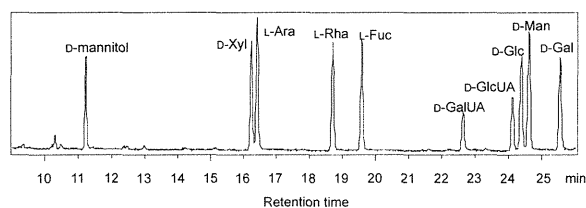


Fig. 2. GC/MS analysis of standard monosaccharides by the original derivatization method reported by Pitthard *et al.*⁷⁾

The GC/MS column was DB-5ms instead of the column reported by Pitthard *et al.*

Table 1. Coefficients of variation of peak areas in TIC chromatograms*¹

	Original derivatization method		Modified derivatization method (C)
	Peak area (A)	Normalized peak area (B)	
Mannitol	59.32		
D-Xyl	32.13	55.44	4.95
L-Ara	33.22	50.10	3.01
L-Rha	34.11	59.16	3.01
L-Fuc	37.12	48.51	3.68
D-GalUA	50.29	77.61	2.50
D-GlcUA	38.82	71.81	9.76
D-Glc	42.51	50.92	4.09
D-Man	42.63	46.24	3.47
D-Gal	46.81	44.05	3.68

*¹ Derivatization reactions were repeated five times. Single GC/MS analysis was performed for each reaction. Values were expressed as percentages.

ことができず、ヘキサンと混和しない油状物質が残ることが観察された。

Fig. 2 に 9 種類の単糖とマンニトールの標品混合溶液を GC/MS 分析したときの典型的な TIC クロマトグラムを示した。D-Xyl, L-Ara, L-Rha, L-Fuc, D-GalUA, D-GlcUA, D-Glc, D-Man, D-Gal の各誘導体をいずれも単一のピークとして検出できた。次に、TIC クロマトグラムのピーク面積の再現性を検討した。単糖標品混合溶液を誘導体化して GC/MS 分析を行う操作を 5 回繰り返した。Table 1 列 A に TIC クロマトグラムのピーク面積の CV 値を示した。いずれのピーク面積も偏差が大きく、定量性の再現性が著しく低いことが判明した。また、Table 1 列 B に、内部標準物質マンニトールのピーク面積に対する相対ピーク面積の CV 値を示した。この場合にも再現性は著しく低かった。マンニトールのピーク面積は単糖のものとは異なる要因により変動すると考えられた。したがって、マンニトールを内部標準物質として使用することは不適當であった。

このように、実験操作の一部が実施不可能である点、測定値の偏差が大きい点、そして内部標準物質が不適當である点から、原法は多糖類の糖組成分析法としては適さないと判断した。

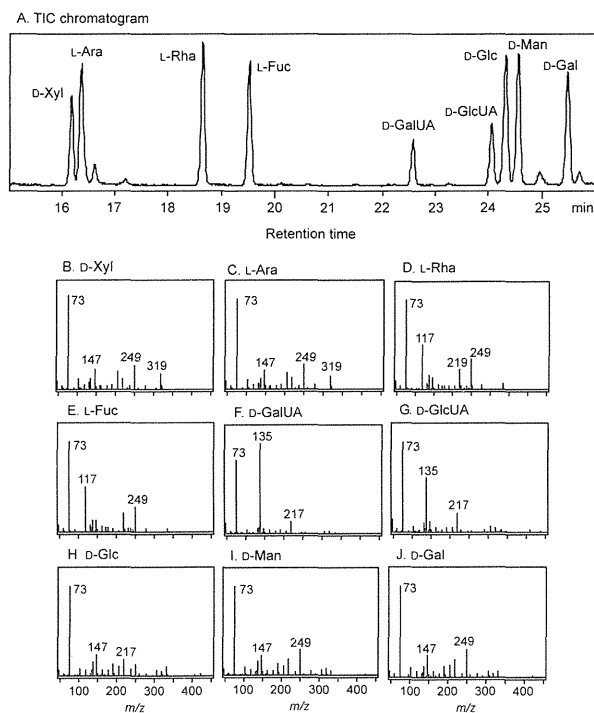


Fig. 3. GC/MS analysis of standard monosaccharide derivatives obtained by using the modified derivatization method.

A: The total ion current chromatogram. B-J: Mass spectra of peak tops corresponding to the monosaccharides, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, L-fucose, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, D-glucose, D-mannose and D-galactose, respectively.

2. 改良法による単糖の分析

原法では反応液量が 200 μ L と小さいため、特殊な円錐底密閉反応バイアルを使用する必要があり、操作性に難があった。そこで、原法に改良を加えた。まず、誘導体化反応に供する単糖を半量にし、試薬量を 5 倍にした。反応液量を 5 倍にすることで通常のスクリーキャップ付き丸底ガラス試験管で誘導体化反応を行うことが可能になった。次に、誘導体化反応物をヘキサンに再溶解するのではなく、水を加えてヘキサンで抽出する方法に変更した。すなわち、単糖の誘導体化反応後、窒素気流下で溶媒をできるだけ攪拌後静置して水層とヘキサン層を分離することにより、ヘキサン層回収が容易になった。Fig. 3A に、9 種類の単糖標品混合溶液（マンニトールは加えていない）の GC/MS 分析したときのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示した。TIC クロマトグラムのピーク面積の CV 値を Table 1 列 C に示した。GlcUA を除いて 5% 以下であった。誘導体化反応の操作法の改良により定量値の再現性が顕著に向上した。

Fig. 3B~J に各単糖誘導体のマススペクトルを示した。主要フラグメントの解釈を Fig. 1 に示した。単糖誘導体のマススペクトルには、共通して m/z 73 のフラグメントが検出された。マススペクトルから単糖の種類を一意に特

定することは困難であるが、クロマトグラム上の小さいピークが確かに単糖誘導体由来のものであることを確認するためにはGC/MSが有用と考えられた。

3. 増粘多糖類試料の分析

単糖誘導体の分析にはGC/MSが有用と考えられるが、質量分析器を持たない事業所でも分析できるように、GC/FIDによる分析法も整備しておく必要があると考えた。そこで、GCカラムを再検討した。DB-1カラム(100% dimethylpolysiloxane)を用いて単糖標品溶液をGC/FID分析したときのクロマトグラムをFig. 4Aに示した。DB-1カラムを用いると、DB-5msカラムを用いた場合(Fig. 3A)よりも分析時間が長くなるものの、グルクロン酸とグルコースの分離が良くなり、FID検出でも微量のグルコースを容易に検出できるようになった。そこで、GC/FID分析ではDB-1カラムを用いることにした。

次に増粘多糖類7製品(カロブビーンガム、グァーガム、カラヤガム、アラビアガム試料1、ガティガム、トラガントガム、モモ樹脂)を試料として用い、TFAを用いて6時間加水分解してから誘導体化し、構成糖の組成比をGC/FIDで分析した。クロマトグラムをFig. 4B~Hに示した。保持時間から酸加水分解産物中の糖の同定を行った。小さいピークについては、別途GC/MS分析を行って糖の同定を行った。その結果、カロブビーンガムとグァーガムは構成糖の種類が同じであり、類似したクロマトグラム(Fig. 4B, C)を示した。アラビアガム、ガティガムおよびモモ樹脂は類似したクロマトグラムを示したが(Fig. 4E, F, H)、アラビアガムでは検出されなかったD-Manがガティガムとモモ樹脂では少量検出され、さらにモモ樹脂にはガティガムには存在しないD-Xylが存在した。カラヤガム(Fig. 4D)とトラガントガム(Fig. 4G)は上述の5品目とは異なるクロマトグラムパターンを示した。カロブビーンガムとグァーガムとの区別を除いては、品目間の区別はGC/FID分析のクロマトグラムの比較のみで十分可能であった。

次に構成糖の組成比を定量した。各単糖標準溶液から希釈系列を作成し、誘導体化後にGC/FIDで分析して検量線を作成した。増粘多糖類の酸加水分解産物に含まれる単糖を定量し、増粘多糖類の構成糖組成を算出した。分析結果をTable 2に示した。クロマトグラムだけでは区別ができなかったカロブビーンガムとグァーガムについては、D-ManとD-Galのモル比が両者で異なっており、この値を見ることにより区別が可能であった。

アラビアガムの3試料を分析した結果をTable 3に示した。試料1と試料2は組成比が類似していたが、試料3は大きく異なっていた。アラビアガムでは、*A. senegal*由来の製品と*A. seyal*由来の製品では物性が異なり、用途を使い分けられていると言われている。今回の分析結果では、試料2(*A. senegal*由来の製品)と試料3(*A. seyal*由来の製品)とで構成糖のモル比が大きく異なっていた。特に、*A. senegal*由来の製品ではL-ラムノースの相対含量

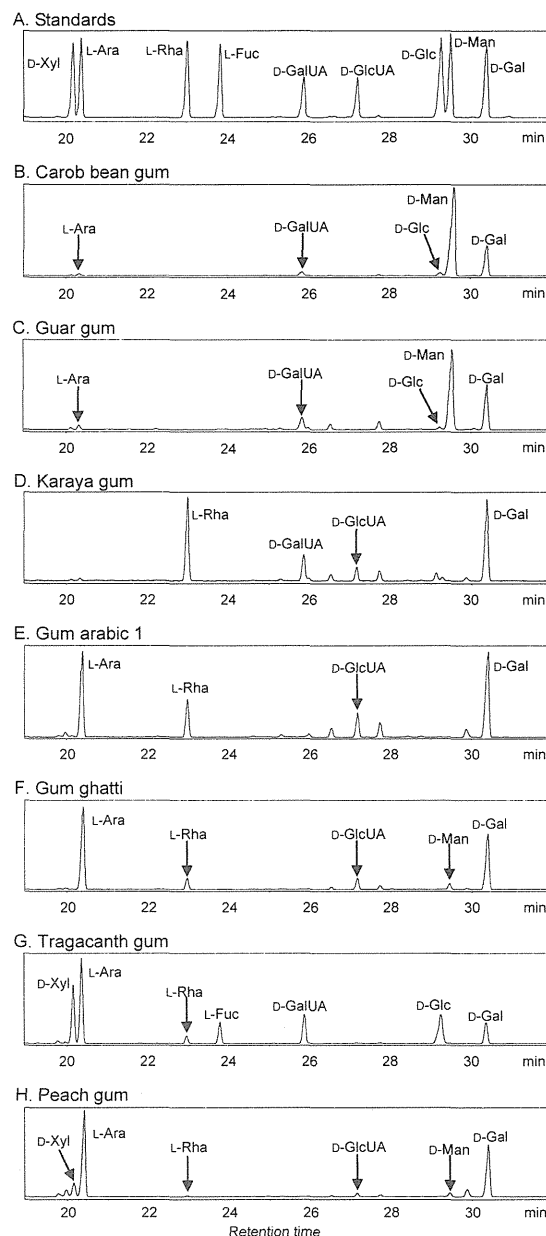


Fig. 4. GC/FID chromatograms of the standard monosaccharides (A) and thickening polysaccharide samples (B-G) obtained by using the modified derivatization method

が高かった。第8版食品添加物公定書に記載のアラビアガムの成分規格では、*A. senegal*由来の製品と*A. seyal*由来の製品を判別するために旋光度を測定する確認試験が採用されている。構成糖組成比を分析することによっても*A. senegal*由来の製品と*A. seyal*由来の製品を区別できる可能性が示された。またこの結果からは、基原が不明であった試料1が*A. senegal*由来であることが示唆された。

以上のように、増粘多糖類を加水分解し、ジェチルジチオアセタール化とTMS化を施してGC分析する方法に改良を加えた。この操作法により、今回分析した製品については、構成糖の種類と主要構成糖のモル比から互いに区別

Table 2. Quantitation of liberated monosaccharides from thickening polysaccharides by acid hydrolysis

	Carob bean gum	Guar gum	Karaya gum	Gum arabic 1	Gum ghatti	Tragacanth gum	Peach gum
Ratio (mol%)							
D-Xyl						20.4	8.6
L-Ara	1.3	2.8		35.5	51.2	30.4	54.5
L-Rha			33.6	13.6	5.6	2.8	0.5
L-Fuc						8.0	
D-GalUA	5.4	16.6	20.5			18.6	
D-GlcUA			9.4	14.6	9.2		3.0
D-Glc	1.8	1.3				11.7	
D-Man	70.2	51.9			2.6		1.9
D-Gal	21.3	27.3	36.5	36.3	31.4	8.1	31.5
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Man/Gal	3.3	1.9					

Table 3. Compositions of constituent monosaccharides in gum arabic

	Sample 1 Reagent	Sample 2 <i>A. senegal</i>	Sample 3 <i>A. seyal</i>
Ratio (mol%)			
L-Ara	40.8	41.0	59.1
L-Rha	13.8	12.7	3.7
D-GlcUA	13.4	14.6	8.3
D-Gal	32.0	31.7	28.9
Total	100.0	100.0	100.0

Table 4. Monosaccharides liberated from peach gum after acid hydrolysis

	Amount (μmol) *1				Maximum value*3	Ratio (mol%)*4
	6 hr*2	11 hr*2	23 hr*2	35 hr*2		
D-Xyl	0.62	0.51	0.24	0.17	0.62	9.0
L-Ara	3.99	3.41	2.01	1.61	3.99	57.5
L-Rha	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.5
D-GlcUA	0.21	0.29	0.22	0.14	0.29	4.1
D-Man	0.10	0.13	0.11	0.11	0.13	1.9
D-Gal	1.87	1.57	1.04	0.90	1.87	26.9
Total						100.0

*1 Two milligrams of peach gum was used.

*2 Time of hydrolysis

*3 The largest value among the 4 columns on the left

*4 Calculated from the maximum values

することが可能であった。なお、今回分析対象とした増粘多糖類7品目は、各品目の試料数が少なく、品目内での構成糖組成のばらつきを評価することはできない。今後このGC分析法を用いて多くの増粘多糖類原体を分析し、変動の範囲を明らかにすれば、品目間の区別を行う確認試験や製品の品質評価に採用できると考えられる。

4. ウロン酸を含む増粘多糖類の加水分解条件の検討

ウロン酸結合は中性糖のグリコシド結合と比較して加水分解されにくく、逆に長時間の加水分解では遊離したウロン酸と中性糖の分解が起こることも知られている⁸⁾。しかし、ウロン酸の定量を可能とした原法の報告以降も、増粘多糖類中のウロン酸含量を正確に測定するための加水分解反応条件については十分な検討が行われた報告はない。Pitthardらの結果を詳細に検討すると、ウロン酸の測定値が同種の増粘多糖類を分析したほかの研究者の分析報告に比べて低い値であった。加水分解反応の最適化を十分に行っていないためと考えられる。そこで、今回原法を改良することで再現性のあるウロン酸と中性糖の定量法を確立できたので、ウロン酸を含む増粘多糖類の加水分解反応を行う時間の最適化を試みた。

最適化を行うモデル試料としてモモ樹脂を使用した。モモ樹脂の構成糖組成比はJonesらによりD-Xyl:L-Ara:L-Rha:D-GlcUA:D-Gal=14%:42%:2%:7%:35%と報告されており、グルクロン酸の存在量は全重量と中性糖量の差から計算されている⁹⁾。一方、Rosíkらはモモ樹脂などの構成糖であるウロン酸の定量について、中性糖の量

とは別にアルカリによる滴定でウロン酸量を算出する方法を報告している⁸⁾。このようにこれまで、モモ樹脂の構成糖を一斉分析で定量した例はない。

そこで、モモ樹脂2mgを2mol/L TFAに溶かして105°Cで6, 11, 23, 35時間加水分解し、生成した単糖を定量した。Table 4に示したように、D-Xyl, L-Ara, L-Rha, D-Galの量は6時間後が最も多く、D-GlcUA, D-Manの量は11時間後が最も多かった。最大値が真の値であると仮定して、モモ樹脂の構成糖組成比を算出した。これらの構成糖組成比の値はTable 2(加水分解時間:6時間)に示したモモ樹脂の値とはわずかに異なる結果となった。

今回の結果から、構成単糖によって最適な加水分解反応時間が異なり、グルクロン酸は中性糖よりも加水分解に時間がかかることが示された。これは多糖類の加水分解時間によって構成糖組成比が異なる分析結果になる場合があることを示唆する。このことから、品目間の識別は6時間の加水分解で十分であるが、構成糖組成比の精密な比較を行う場合には、構成糖ごとに加水分解時間の最適化を行う必要があることが分かった。

ま と め

(1) 多糖類を加水分解し、ジエチルジチオアセタール化とTMS化を施してGCで分析する方法について、報告された原法に変更を加え、操作性と再現性を向上させた。

(2) 加水分解した多糖類を改良法で誘導体化してGC/FIDで分析することにより、品目間の相違を明瞭に示すことができた。

(3) モモ樹脂をモデル試料として加水分解時間の最適化を試みた。構成単糖によって最適な反応時間が異なることが示された。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進事業により実施した。食品添加物製品をご提供いただいた日本食品添加物協会に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省. 第8版食品添加物公定書. 2007, 777p.
- 2) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Compendium of food additive specifications. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007, 155p. (ISBN 978-92-5-105866-4)

- 3) Nakajima, K., Hirokado, M., Nakajima, I., Mizoiri, S., Endo, F. Survey of commercial natural thickening and stabilizing agents in Tokyo. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **32**, 183-187 (1981).
- 4) Bleton, J., Mejanelle, P., Sansoulet, J., Goursaud, S., Tchaplal, A. Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums. *J. Chromatogr. A*, **720**, 27-49 (1996).
- 5) Ha, Y. W., Thomas, R. L. Simultaneous determination of neutral sugars and uronic acids in hydrocolloids. *J. Food Sci.*, **53**, 574-577 (1988).
- 6) Kennedy, J. F., Sandhu, J. S., Southgate, D. A. T. Structural data for the carbohydrate of ispaghula husk. *Carbohydr. Res.*, **75**, 265-274 (1979).
- 7) Pitthard, V., Finch, P. GC-MS analysis of monosaccharide mixtures as their diethylthioacetal derivatives: Application to plant gums used in art works. *Chromatographia*, **53**, S-317-S-321 (2001).
- 8) Rosík, J., Wilkie, K. C. B. Quantitative estimation of sugar residues in acidic gums. *Phytochemistry*, **14**, 1019-1021 (1975).
- 9) Jones, J. K. N. The structure of peach gum. Part I. The sugars produced on hydrolysis of the gum. *J. Chem. Soc., Abstracts* 1950, 534-537.

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

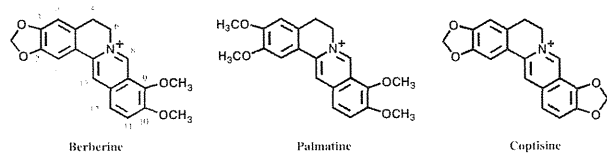


Fig. 1 Chemical structures of berberine, palmatine, and coptisine

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