

化粧品・医薬部外品中の乳アレルギータンパク質の分析

(2014 年 6 月 17 日受付)

(2014 年 9 月 2 日受理)

大月典子^{a)}、杉本理恵^{b)}、佐藤恭子^{a)}、杉本直樹^{a)}、秋山卓美^{a)}、豊田正武^{b)}、穂山 浩^{a)}

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) 実践女子大学

The determination of major allergens from cow's milk in cosmetics and quasi-drugs for skin care

(Received June 17, 2014)

(Accepted September 2, 2014)

Noriko Otsuki^{a)}, Rie Sugimoto^{b)}, Kyoko Sato^{a)}, Naoki Sugimoto^{a)},
Takumi Akiyama^{a)}, Masatake Toyoda^{b)}, Hiroshi Akiyama^{a)}

a) National Institute of Health Sciences

b) Jissen Women's University

Abstract

The onset and exacerbation of food allergies in children has recently been increasing. To investigate the correlation between the development of milk allergies and epicutaneous sensitization with milk allergens, we determined the amount of milk allergens in cosmetics and quasi-drugs used for skin care. The amount of α s1-casein and β -lactoglobulin was determined in 29 products using immunochromatography and enzyme-linked immunosorbent assay.

In 9 of the 29 products, the levels of α s1-casein and β -lactoglobulin were quantified in the range of 7.1–18,810 μ g/g and more than the limit of detection (LOD) to 10,429 μ g/g, respectively. Both α s1-casein (7.1–18,810 μ g/g) and β -lactoglobulin (4.4–10,429 μ g/g) were detected in 5 products that displayed unfractionated milk ingredients such as yogurt or dried nonfat milk on the labels. On the other hand, β -lactoglobulin was detected in only 2 of 15 products (6.6 μ g/g and 6.9 μ g/g) that displayed whey fraction on the label. In addition, the amount of α s1-casein was less than LOD in 23 products that displayed whey, casein, or nonprotein fraction on the labels. According to these results, the levels of α s1-casein and β -lactoglobulin tend to be influenced by the forms of milk ingredients.

Thus, these analyses revealed that 31% of randomly selected products contained detectable levels of α s1-casein and β -lactoglobulin. Moreover, 4 of the 9 allergen-positive products, including soap, lotion, and bath powder, were recommended for infant use. Our study provides the first data regarding cosmetics containing allergens and the development of food allergy. These results suggest that the continuous use of cosmetics containing milk allergens may induce epicutaneous sensitization with milk allergens.

Keywords : 乳アレルギータンパク質、 α s1-casein、 β -lactoglobulin、イムノクロマトグラフィー、ELISA
milk allergens, α s1-casein, β -lactoglobulin, immunochromatography, ELISA

I 緒言

食物アレルギーは、「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して、生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義され¹⁾、乳児から成人まで幅広い年齢層に発症の可能性がある。特に有病率の高い年代は乳児から幼児早期にかけてであり、その三大原因食品原材料

として、卵、乳、小麦があげられる。乳幼児期に発症した食物アレルギーは、消化器機能の発達と免疫機構の成熟に伴い、抗原(アレルギータンパク質)に対する耐性を獲得し、症状が軽快していくことが一般的である。しかし、その一方でアレルギーの発症を発端として、年齢に応じて異なる症状、異なる抗原で発症する様々なアレルギーに発展する「アレルギーマーチ: allergy march」²⁾に進行するリスクがある。そ

のため、乳幼児期における食物アレルギーの発症を予防することはアレルギーマーチへの発展を防ぐための有効な対策と考えられる。

三大原因食品原材料の一つ、牛乳は栄養バランスの優れた食品であり、貴重なカルシウム源でもある。牛乳のタンパク質画分は弱酸性(pH 4.6)でカゼイン画分と乳清画分(ホエイ画分)に分けられ、カゼイン画分は総タンパク質画分の80%を占める。一方乳清画分には、ラクトグロブリン、ラクトアルブミン、ラクトフェリン、血清アルブミン、免疫グロブリン、など様々なタンパク質が含まれている³⁾。牛乳中の主要アレルギータンパク質として、カゼイン画分には分子量23.6 kDの α s1-caseinが、乳清画分には分子量18.3 kDの β -lactoglobulinが知られている⁴⁾。

乳幼児の食物アレルギー発症の要因は、母乳あるいは離乳食からの食物アレルギータンパク質による経口感作が主要な経路だと考えられている⁵⁾。しかしながら近年では、乳幼児の食物アレルギーの発症と、患児の皮膚創傷や食品由来成分との接触頻度との相関性が指摘され、食物アレルギータンパク質の経皮感作も食物アレルギー発症の一因であることが示唆されている⁶⁾。

食品成分を含有した化粧品の使用後、同成分を含む食品を摂取したことが原因と推察される食物アレルギーの発症事例が、小麦^{7,8)}、牛乳^{9,10)}、果実^{11,12)}、豆類¹³⁾、あるいは食用色素¹⁴⁻¹⁶⁾などで報告されている。特に、加水分解コムギ末含有洗顔石鹸の継続的な使用後、小麦を含む食品を摂取したことによるアナフィラキシー発症が報告された事例は、重大な社会問題となった¹⁷⁻²⁰⁾。

化粧品は薬事法により全成分表示が規定されており、それに準じて医薬部外品も業界の自主基準で全成分表示を推奨している²¹⁾。化粧品、医薬部外品には乳を原材料とする製品が多い。乳を原材料とする場合は、「乳」「ミルク」「カゼイン」「ホエイ」「ヨーグルト」などと表示されるが²²⁾、乳アレルギータンパク質の濃度に関しての実態は把握されていない。

本研究において、我々は乳幼児用11製品を含む、牛乳を原材料とする国産化粧品と医薬部外品、主に浴用石鹸やローション等、29製品中の乳アレルギータンパク質である、 α s1-caseinおよび β -lactoglobulinについて、イムノクロマトグラフィーによるアレルギー検出キットを用いた検出とenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による定量を行い、乳を原材料とするスキンケア製品中に含まれる乳アレルギータンパク質の量的、質的な情報を明らかにすることを試みた。また、乳アレルギータンパク質の経皮感作の可能性について考察した。

II 研究方法

1. 試料

東京都内のスーパーおよびインターネットにおいて浴用石鹸類13製品、乳液・ローション・クリームを含む皮膚および頭髮の保護・保湿剤9製品、入浴剤7製品の、26製品の化

粧品および3製品の医薬部外品を購入した(Table 1)。29製品中11製品は乳幼児への使用を推奨しているものを選択した。すべての製品には日本国内の企業が製造元であることが記載されていた(計18社)。

記載されている乳成分は脱脂粉乳(2製品)、スキムミルク(3製品)、ヨーグルト(1製品)、ヨーグルト液(3製品)、ホエイ(13製品)、ラクトフェリン(3製品)、加水分解カゼイン(2製品)、加水分解カゼインNa(1製品)、乳脂(3製品)、乳糖(2製品)、の10種類であった。2種類以上の乳成分を原材料としている製品が7製品存在した。

2. イムノクロマトグラフィー

α s1-Casein および β -lactoglobulin の検出は、アレルギーアイ[®] イムノクロマトキット 加熱用(製品番号:カゼイン:056682、ホエイ:056718、プリマハム株式会社)を用いて測定した。試料の調製は各キットに付属したプロトコールに従った。詳述すると、製品1gを秤量し、キット付属の試料抽出液を加えて20 mLになるよう調製した(pH6.0 ~ 8.0)。ミキサーを用いて完全に攪拌・混合した後、20分に一回攪拌しつつ、100℃の沸騰水浴中で60分加熱した。流水で室温に冷却後、4℃、4000 rpm、20分間遠心分離を行い、上清を回収した。上清はろ紙(JIS P3801:5種A、東洋濾紙)でろ過し、測定用試料として用いた。試料液調製から検出まで2回の検討を行い、結果を示した。

3. ELISA

β -Lactoglobulin はアレルギーアイ[®]ELISA 牛乳キット(プリマハム株式会社)、 α s1-casein はモリナガFASPEK 特定原材料測定キット 牛乳測定キット(カゼイン)(株式会社森永生化学研究所)を用いて測定した。試料の調製は各キットに付属したプロトコールに従った。詳述すると、1gの製品を秤量し、試料抽出液を加えて室温で12時間振とう混和し、均等に分散させて20 mLになるよう調製した(pH6.0 ~ 8.0)。付属の希釈用緩衝液でさらに20倍希釈し、測定用試料とした。検出にはマイクロプレートリーダー(EMax[®], Molecular devices, Sunnyvale, CA)を使用し、吸光度を測定した。試料液調製から検出まで2回の検討を行い、その平均値を測定用試料の測定値とした。

測定用試料の測定値(X ng/mL)に測定時の希釈倍率として20倍、さらに抽出時の希釈倍率として20倍を乗じた後、単位を統一し、製品重量1g当たりのタンパク質濃度として、Y μ g/gを算出した。以下に換算式を示す(式A)。

Y μ g/g = X ng/ml $\times$ 20 (測定時の希釈倍率) $\times$ 20 (抽出時の希釈倍率) $\times$ 1/1000 (式A)

III 結果

1. イムノクロマトグラフィーによる分析

乳由来成分を原材料とする29製品を試料として、イムノクロマトグラフィーによる α s1-casein、 β -lactoglobulinの検出を

行った。使用したそれぞれのキットの添付文書によると、検出限界は両キットともに、食品製品重量あたりのアレルゲンタンパク質量 2 µg/g とされている。

α_{SI}-Casein は、乳幼児用製品では入溶剤 A-11 の 1 製品、一般用製品ではボディソープ B-1 および B-2、フェイスパック B-11、入溶剤 B-15 の 4 製品の計 5 製品から検出された。日時を変えて再分析したところ、上記 5 製品は同様に検出され、さらに一般用入溶剤 B-14 から検出された。本分析により、29 製品中、乳幼児用 1 製品を含む 6 製品の化粧品および医薬部外品より α_{SI}-casein が検出された (Table 1)。

β-Lactoglobulin は、乳幼児用製品では全身シャンプー A-1、ローション A-7 および入溶剤 A-11 の 3 製品から、一般用製品ではボディソープ B-2、フェイスパック B-11、および入溶剤 B-15 の 3 製品から検出された。日時を変えて再分析したところ、先の 6 製品は同様に検出された。さらに一般用入溶剤 B-14 と乳幼児用入溶剤 A-10 の 2 製品より、検出限界に近いと思われる薄いバンドが検出された。本分析により、29 製品中、乳幼児向け 4 製品を含む 8 製品の化粧品および

医薬部外品より β-lactoglobulin が検出された (Table 1)。

これらの結果により、29 製品中 9 製品から α_{SI}-casein と β-lactoglobulin の両方、あるいはいずれかの乳アレルゲンタンパク質が検出された。また、初回に検出されず、再分析で検出された製品が 2 製品あった (A-10: β-lactoglobulin、B-14: α_{SI}-casein、β-lactoglobulin)。その理由として、含まれている乳アレルゲンタンパク質量が、検出限界に近い量であったこと、あるいは製品の難溶性により試料抽出液に均等に分散せず、測定試料液の均一化が不十分であったことが考えられた。

2. ELISA による分析

ELISA により 29 製品中の α_{SI}-casein および β-lactoglobulin を定量した。両キットともに、定量限界は食品製品重量あたりのアレルゲンタンパク質量 0.31 µg/g であった。

α_{SI}-Casein は、乳幼児用 1 製品を含む 5 製品 (A-11、B-1、B-2、B-11、B-15) から定量された。それぞれの製品における含有量は、乳幼児用製品として入溶剤 A-11 が 18,800

Table 1. 牛乳由来成分が表示された化粧品・医薬部外品に含まれるアレルゲンタンパク質の分析結果

	化粧品および医薬部外品	順位 / 全表示成分	成分表示	α _{SI} -casein		β-lactoglobulin				
				イムノクロマト グラフィ	ELISA (μg/g)	イムノクロマト グラフィ	ELISA (μg/g)			
				1	2	1	2			
乳幼児用	A-1	全身シャンプー	8 / 12	ラクトフェリン	-	-	LOD	+	+	6.6
	A-2	髪用シャンプー	5 / 13	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-3	全身シャンプー	16 / 24	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-4	ハンドソープ	10 / 25	ヨーグルト液 (ヨーグルトエキス)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-5	ハンドソープ (医薬部外品)		ホエイ	ラクトフェリン液	-	-	LOD	-	LOD
	A-6	石鹸	3 / 11	乳脂 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-7	ローション	8 / 23	ホエイ	-	-	LOD	+	+	6.9
	A-8	ローション	13 / 45	ラクトフェリン	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-9	乳液	7 / 17	ヨーグルト液 (ヨーグルトエキス)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-10	入溶剤 (医薬部外品)		加水分解カゼイン Na	-	-	LOD	-	(4)	<LOQ
A-11	入溶剤 (医薬部外品)		脱脂粉乳	+	+	18810	+	+	10429	
一般用	B-1	ボディソープ	8, 9 / 20	ホエイ (牛乳)	スキムミルク (牛乳)	+	+	7.1	-	7.4
	B-2	ボディソープ	8, 9 / 20	ホエイ (牛乳)	スキムミルク (牛乳)	+	+	54.4	+	4.4
	B-3	シャンプー	10 / 22	加水分解カゼイン	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-4	シャンプー	9 / 19	加水分解カゼイン	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-5	ボディソープ	11 / 20	ラクトフェリン (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-6	ボディソープ	3 / 7	乳脂 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-7	ボディソープ	11 / 26	乳脂 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-8	ローション	4 / 21	ホエイ	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-9	ローション	8 / 35	ホエイ	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-10	ボディクリーム	17 / 27	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-11	フェイスパック	9 / 25	ヨーグルト	+	+	569	+	+	1240
	B-12	ヘアトリートメント	25 / 30	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-13	リップクリーム	16 / 23	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-14	入溶剤	8, 10 / 22	スキムミルク (牛乳)	ホエイ (牛乳)	-	+	LOD	-	1.3
	B-15	入溶剤	6, 8 / 16	ヨーグルト液 (牛乳)	脱脂粉乳	+	+	487	+	1.3
	B-16	入溶剤	7 / 15	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-17	入溶剤	5 / 27	乳糖 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-18	入溶剤	3 / 21	乳糖 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD

LOQ: 定量限界 (0.31 µg/g)、LOD: 検出限界以下

乳幼児への使用を推奨している 11 製品については製品 A-1 から A-11 とし、特に言及のない製品については B-1 から B-18 とした。

化粧品に関して全表示成分のうちの順番を記した。表示上のホエイとは乳清のことである。

µg/g、一般用製品としてボディソープ B-1 が 7.1 µg/g、同じくボディソープ B-2 が 54.4 µg/g、フェイスパック B-11 は 569 µg/g、入溶剤 B-15 は 487 µg/g であった (Table 1)。

β-lactoglobulin は、乳幼児向け 3 製品を含む 8 製品 (A-1、A-7、A-11、B-1、B-2、B-11、B-14、B-15) から定量値が得られた。これら 8 製品のうち B-1 のみ、イムノクロマトグラフィでは検出されていないが、他の 7 製品はすべて検出されていた。さらにイムノクロマトグラフィでは検出の判別が困難であった乳幼児用入溶剤 A-10 は、定量限界未満 (<0.31 µg/g)、検出限界以上として検出された。その他 20 製品は検出限界以下であった。各濃度は、乳幼児用全身シャンプー A-1 が 6.6 µg/g、ベビーローション A-7 が 6.9 µg/g であった。一般用製品では B-1 および B-2 のボディソープがそれぞれ 7.4 µg/g と 4.4 µg/g であった。さらに B-11 のフェイスパックが 1240 µg/g であった。一般用入溶剤の B-14 および B-15 はいずれも 1.3 µg/g の比較的低い値であったが、乳幼児用入溶剤 A-11 は 10,429 µg/g の濃度を検出した (Table 1)。

これらの結果により、29 製品中、乳幼児向け 4 製品を含む 9 製品の化粧品および医薬部外品より α_{SI}-casein、β-lactoglobulin の両方、あるいはいずれかの乳アレルゲンタンパク質が ELISA により検出され、そのうち 8 製品が、1.3 µg/g 以上の定量値を得た。定量された製品のうち、最も低濃度な α_{SI}-casein 濃度を示した製品は一般用ボディソープ B-1 の 7.1 µg/g であり、β-lactoglobulin では一般用入溶剤 B-14,15 の 1.3 µg/g であった。また、α_{SI}-casein が 18,810 µg/g と最も高濃度を示した乳幼児用入溶剤 A-11 の製品は、β-lactoglobulin も 10,429 µg/g と高い値を示し、両乳アレルゲンタンパク質が定量された。

3. 乳に関する成分表示と ELISA による定量結果の関係

α_{SI}-Casein はカゼイン画分に、β-lactoglobulin は乳清画分に存在する。そこで乳成分の表示画分と ELISA による定量結果の関係について検討するために、測定結果を表示成分別に再編集した (Table 2)。29 製品に記載された乳成分を、I、II、III、IV の 4 つのグループに分類した。脱脂粉乳、スキムミルク、ヨーグルトなど、全乳から加工された成分が表示されている製品を I、ヨーグルト液、ホエイ、ラクトフェリンなど乳清画分に含まれる成分のみが表示されている製品を II とした。一方、加水分解カゼイン等、カゼイン画分に含まれる成分が表示されている製品を III とし、乳脂、乳糖など非タンパク質画分である成分が表示されている製品を IV とした。全乳から加工された成分を表示した I に分類された製品は 6 製品存在した。そのうちの 5 製品から α_{SI}-casein と β-lactoglobulin の両方の乳アレルゲンタンパク質が定量され、残り 1 製品からは β-lactoglobulin が定量された。一方、乳清画分に含まれる成分を表示した II に分類された 15 製品からは、2 製品のみ、β-lactoglobulin が単独で定量され、α_{SI}-casein は定量されなかった。残り 13 製品はどちらの乳アレルゲンタンパク質も検出限界以下であった。カゼイン画分である「加水分解カゼイン」と表示された III の 3 製品からは、いずれの製品からも α_{SI}-casein は検出されず、1 製品のみ定量限界以下、検出限界以上の β-lactoglobulin が検出された。非タンパク質画分である乳脂、乳糖と表示された IV の 5 製品からはいずれの乳アレルゲンタンパク質も検出されなかった。この結果により、全乳から加工された成分を表示した製品に乳アレルゲンタンパク質が含まれる可能性が高

Table 2. 乳に関する表示成分と検出したアレルゲンタンパク質

画分	表示成分	製品数	アレルゲンタンパク質			
			α _{SI} -casein	β-lactoglobulin	β-lactoglobulin	<LOD ^{a)}
I	脱脂粉乳	1	6	1 (A-11)		
	ホエイ・スキムミルク	3		1 (B-14)		
	ヨーグルト	1		2 (B-1, B-2)		
	ヨーグルト液 (牛乳)・脱脂粉乳	1		1 (B-11)		
II	ヨーグルト液 (ヨーグルトエキス)	2	15	1 (B-15)		
	ホエイ	9		2		2
	ラクトフェリン	3		1 (A-7)		8
	ホエイ・ラクトフェリン	1		1 (A-1)		2
III	加水分解カゼイン	2	3	1		1
	加水分解カゼイン Na	1		2		2
IV	乳脂	3	5	1 (A-10) ^{b)}		
	乳糖	2		3		2
計		29	0	4	5	20

^{a)} <LOD: 検出限界以下

^{b)} LOD 以上 LOQ 以下の結果を得た製品 (<0.31 µg/g)

く、特に α_{S1} -casein と β -lactoglobulin の両方が含まれる可能性が高いことが示された。一方、乳清画分、カゼイン画分、あるいは非タンパク質画分など、精製画分を表示した製品の、 α_{S1} -casein、 β -lactoglobulin は比較的低値あるいは検出限界以下を示した。

次に全表示成分中の乳成分の表示順位と分析結果について比較した (Table 1)。医薬部外品 3 製品に関しては成分配合量の順位の情報がなため検討から除外した。検討した化粧品 26 製品は、表示成分が 7 成分で構成されている製品から 45 成分で構成されている製品まで存在した。非タンパク質画分である油脂、乳糖を原材料とした製品では、B-18 で 21 成分中 3 番目、A-6 で 11 成分中 3 番目など、比較的上位の表示順位にあり、相対的な配合量が多いと考えられたが、いずれの乳アレルギータンパク質も検出限界以下であった。加水分解カゼインを原材料とした製品では、いずれの乳アレルギータンパク質も検出限界以下であったが、B-3 で 22 成分中 9 番目、B-4 で 19 成分中 9 番目であった。全乳を原材料とした製品では、 α_{S1} -casein を比較的高い値で検出した B-2 のスキムミルクの表示が 20 成分中 9 番目、B-15 の脱脂粉乳の表示が 18 成分中 8 番目であった。 α_{S1} -casein と β -lactoglobulin の両方を高く検出した B-11 のフェイスパックは、ヨーグルトの表示が 25 成分中 9 番目であった。このように、原材料の乳成分の表示順位が上位でも乳アレルギータンパク質が検出されない製品があり、表示順位が中位でも乳アレルギータンパク質が検出される製品もあり、検出と表示順位に明らかな相関は認められなかった。むしろ、Table 2 に示されたように、全乳を原材料とした製品は、乳タンパク質、非タンパク質ともに精製画分を原材料とした製品よりも、乳アレルギータンパク質が高く検出されたことから、乳アレルギータンパク質量は、製品中の乳成分の種類には依存するが、乳成分の配合割合には依存しない傾向が示された。

IV 考察

本研究において、乳を原材料とした国産の化粧品および医薬部外品より、牛乳アレルギーの主要アレルギータンパク質である、 α_{S1} -casein および β -lactoglobulin の検出と定量を試みた。本稿は市販の化粧品および医薬部外品中の乳アレルギータンパク質を分析した初めての報告である。29 製品中の 8 製品よりいずれかの乳アレルギータンパク質が定量された。また、定量限界以下、検出限界以上の β -lactoglobulin を検出した 1 製品を含め、乳アレルギータンパク質が検出された製品は 29 製品中 9 製品で、その比率は 31% であった。

B-14 の入溶剤中の α_{S1} -casein は、イムノクロマトグラフィーでは陽性を示したが、ELISA では検出限界以下であった。感度の高い ELISA で検出限界以下であったこと、イムノクロマトグラフィーの 2 回の測定結果は陰性と陽性の結果を一度ずつ示したことから、B-14 の測定試料液中には、検出限界近くの非常に微量な α_{S1} -casein が存在し、イムノクロマトグラフィーで検出された可能性が考えられた。また B-1 のボディ

ソープ中の β -lactoglobulin の検出結果は、イムノクロマトグラフィーでは陰性だったが、ELISA では 7.4 $\mu\text{g/g}$ と定量された。ELISA の測定試料液の調製過程には、室温で 12 時間以上、抽出液との振とう混和を行う操作がある。この操作により様々な加工条件で変性した製品中の β -lactoglobulin を抽出することが可能とされている²³⁾。一方、イムノクロマトグラフィーの測定試料液の調製過程では、沸騰水中で 60 分間の振とう混和による抽出を行う。このような、分析法による製品からのタンパク質抽出法の相違が、2 種類のキットの検出感度の違い (イムノクロマトグラフィー: 2 $\mu\text{g/g}$ 、ELISA: 0.31 $\mu\text{g/g}$) の一因と考えられた。

石鹸・ローションでは、乳幼児用 2 製品、一般用 2 製品より乳アレルギータンパク質が検出された。特に一般用 1 製品から、 α_{S1} -casein が 54.4 $\mu\text{g/g}$ と比較的高濃度で検出された。いずれも希釈せずに用いる製品であるため、連続した使用による経皮感作が懸念された。入溶剤では、乳幼児への使用を目的とした医薬部外品の A-11 が、29 製品の中で α_{S1} -casein 18,810 $\mu\text{g/g}$ 、 β -lactoglobulin 10,429 $\mu\text{g/g}$ という高値を示した。使用時には希釈するため、製品 1 包 20 g を浴槽 200 L の水に溶解した場合、最終濃度は各アレルギータンパク質とも 1.0 ~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$ になる。この濃度での経皮感作の可能性については明らかではないが、乳幼児は皮膚の感受性が高く乳児湿疹を発生しやすいことから、繰り返しの使用により乳アレルギータンパク質の感受性が高くなることが推察された。その点からも乳幼児、あるいは牛乳アレルギー患者には、石鹸・ローション、入溶剤などの浴用化粧品の選別には十分な配慮が必要である。また、B-11 のフェイスパックより、569 $\mu\text{g/g}$ の α_{S1} -casein と 1240 $\mu\text{g/g}$ の β -lactoglobulin が検出された。製品の目的上、乳幼児は使用しないことが予想されるが、使用者の皮膚には乳アレルギータンパク質を含むパック剤が数分間接触する状態になる。顔面への使用は、湿疹や小さな傷などに気付かないことがあるため、特に牛乳アレルギー患者の連続使用は、注意が必要であると思われる。

本研究の分析では、全乳から加工された原材料を使用した 6 製品中 5 製品より α_{S1} -casein と β -lactoglobulin の両方が検出され、検出濃度も高い傾向にあった。それらの原材料表示としてスキムミルク、脱脂粉乳、ヨーグルトの 3 種類の表示が記載されていた。いずれも、生乳を高温加熱殺菌したのち、脱脂粉乳・スキムミルクは高速遠心分離により脱脂後、噴霧乾燥したもので、またヨーグルトは乳酸菌や酵母による発酵の過程を経たものであり、それ以上の分画精製を行っていない。この結果より、全乳から加工された原材料を使用した製品では、製造工程を経た後も α_{S1} -casein と β -lactoglobulin は本研究で使用したイムノクロマトグラフィーおよび ELISA の抗体で認識される部位を維持して存在している可能性が示唆された。

一方、乳清画分に含まれる、ヨーグルトの上清部分を分離したヨーグルト液、ホエイ、ラクトフェリン等を原材料とする 15 製品の分析では、2 製品より 6.6 $\mu\text{g/g}$ と 6.9 $\mu\text{g/g}$ と比較的低濃度の β -lactoglobulin が検出され、残り 13 製品は検出限界以下であった。この結果より、乳清に精製した画分を原料

料とした製品では、画分の精製過程、あるいは製品の製造工程で乳清中の β -lactoglobulin が分解、変性、あるいは除去される可能性が考えられた。

また、乳清画分、カゼイン画分、油脂、乳糖を原材料とした 23 製品では、いずれの製品からも α_{S1} -casein は検出されなかった。カゼイン画分を除去して精製した、乳清画分、油脂、乳糖の場合、カゼインの特性である酸性条件下やカルシウム存在下で沈殿する性質を利用することで、比較적으로容易にカゼイン画分の除去が可能であることが推察された。一方、カゼイン画分を加水分解カゼインとして精製した成分は、検出抗体の認識するカゼイン上の抗原決定基の配列に、加水分解に伴う変性や分解が起きている可能性が考えられた。また、これらの結果からは、化粧品由来の共存物質が検出反応を部分的に阻害している可能性を否定することはできない。

ピーナッツアレルギーを対象とした Lack らのコホート研究によると、乳児の皮膚創傷の存在、あるいはピーナッツオイルを含む保湿剤で継続的に肌の手入れを行う行為は、ピーナッツアレルギー発症頻度とそれぞれ独立した相関性を示したことにより、経皮感作によるアレルギー発症の可能性が示唆された²⁴⁾。同時期、T 細胞抗原受容体遺伝子改変マウスを用いた検討で、免疫寛容を誘導する抗原を、経口投与前に皮膚に塗布した結果、免疫寛容誘導が阻害される現象が、オボアルブミン (OVA)²⁵⁾、次いでピーナッツタンパク質²⁶⁾を抗原として報告され、経皮感作の成立と経口免疫寛容の破綻に正の相関がある可能性が示唆された。

さらに遺伝子解析により、表皮の最上層である角質層の保護バリア機能を担うタンパク質、filaggrin をコードする塩基配列に、アトピー素因特異的な遺伝子変異が発見され、保護バリア機能を欠失した数種の filaggrin 変異体が存在する事が報告された^{27, 28)}。角質の一つ下層である顆粒層では、外部からの異物を認識する機能をもつランゲルハンス細胞が樹状突起を伸長し、侵入しようとする異物を捕獲することが知られている²⁹⁾。正常な状態では角質層の保護バリア機能により顆粒層には到達しない異物が、Filaggrin の機能欠損により角質層に侵入し、外来抗原として認識され、抗体・サイトカイン産生、細胞浸潤を伴う組織の炎症が誘導されることが示された³⁰⁾。

経皮感作による食物アレルギーの発症を誘導した代表的な例として、小麦タンパク質の加水分解物を含む化粧品の使用による即時型小麦アレルギーの発症例が国外で報告されている^{7, 8, 31, 32)}。我が国においては、洗顔石鹸に含まれていた加水分解コムギ末、グルバール 19S との継続的な接触の原因とする経皮感作により、小麦を含む食品を摂取した後に小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis: WDEIA) を発症した事例が報告され、社会問題化した¹⁷⁻²⁰⁾。加水分解コムギ末の不完全な分解、再重合による分子量の増大 (30 ~ 50 kD)、あるいは分解反応後の新たな抗原決定基の出現、などにより、感作性を有するに至る結果となったことが推察されている²⁰⁾。

一方、食品成分のアレルゲン性を低減化する試みは既に行われている³³⁾。特定の食物アレルギータンパク質について、

感作と症状惹起に関わる抗原決定基の修飾、変性、分解等による低アレルゲン化が報告されている。また、アレルゲン性を修飾する物質として、化粧品成分の皮膚への浸透や拡散を促進する基剤・界面活性剤なども機能している可能性が考えられる。食品由来の有効成分に含まれるアレルゲン性の低減化と適切な基剤・界面活性剤の選択により、経皮感作のリスクの軽減が期待されることから、より機能的で安全性の高い、化粧品および医薬部外品の原材料の開発が望まれる。

本研究により、乳アレルギータンパク質を含む国産の化粧品、医薬部外品の継続的な使用による経皮感作のリスクが考えられた。本研究では国産製品に限定したが、国内に流通する海外製品も検討する必要があると考えられる。また、 α_{S1} -casein、 β -lactoglobulin 以外の乳アレルギータンパク質や卵、小麦、果実、豆類⁷⁻¹³⁾などに由来する他の食物アレルギータンパク質についても調査することが望まれる。

V 結論

近年、食物アレルギー発症のメカニズムの一因として経皮・経粘膜感作が示唆されている。我々は乳幼児に多い、牛乳アレルギーの発症と経皮感作の可能性について考察するために、乳幼児向け 11 製品を含む、乳成分配合の国産化粧品および医薬部外品 29 製品について、市販キットを用いて牛乳アレルギーの主要アレルギータンパク質である α_{S1} -casein と β -lactoglobulin の測定を試みた。その結果、乳幼児用 4 製品を含む 9 製品から乳アレルギータンパク質を検出した。そのうち、全乳から加工された成分を原材料とした 5 製品から β -lactoglobulin および α_{S1} -casein の両方が検出された。一方、乳清画分、カゼイン画分、乳糖画分、油脂画分を原材料とした 23 製品は 3 製品から比較的低濃度の β -lactoglobulin が検出されたが、 α_{S1} -casein は検出限界以下であった。化粧品・医薬部外品に含まれる食品由来のアレルギータンパク質の濃度やアレルゲン性に関する情報の蓄積は、食物アレルギーの発症とアレルギーマーチの予防のために重要と考ええる。

VI 謝辞

本稿で紹介した内容の一部は、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) によるものである。実験に協力して下さった実践女子大学食生活科学科生活基礎化学研究室的の学生の皆様に感謝します。

VII 参考文献

- 1) 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会 (宇理須原雄、近藤直実監修) “食物アレルギー診療ガイドライン 2012” 東京、共和企画、2012.

- 2) Baba, M., Yamaguchi, K.: "The allergy march": Can it be prevented? *Allergy & Clinical Immunology News*, 1(3), 71-73 (1989).
- 3) Renner E., (Furuyama, J. trs.), "Milk and dairy products in human nutrition (Gyunyu To Nyuseihin No Hikaku)", Tokyo, Technical Research Institute, Snow Brand Milk Prodsuts Company, 1983.
- 4) Wal, J. M.: Structure and function of milk allergens. *Allergy*, 56, Suppl 67, 35-38 (2001).
- 5) Pali-Scholl, I., Renz, H., Jensen-Jarolim, E.: Update on allergies in pregnancy, lactation, and early childhood. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(5), 1012-1021 (2009).
- 6) Lack, G.: Epidemiologic risks for food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1331-1336 (2008).
- 7) Lauriere, M., Pecquet, C., Bouchez-Mahiou, I., Snegaroff, J., Bayrou, O., Raison-Peyron, N., Vigan, M.: Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis*, 54(5), 283-289 (2006).
- 8) Olaiwan, A., Pecquet, C., Mathelier-Fusade, P., Frances, C.: Contact urticaria induced by hydrolyzed wheat proteins in cosmetics. *Ann. Dermatol. Venereol.*, 137(4), 281-284 (2010).
- 9) Wang, J., Nowak-Węgrzyn, A.: Reactions of 2 young children with milk allergy after cutaneous exposure to milk-containing cosmetic products. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 158(11), 1089-1090 (2004).
- 10) Bito, T., Kanda, E., Tanaka, M., Fukunaga, A., Horikawa, T., Nishigori, C.: Cows milk-dependent exercise-induced anaphylaxis under the condition of a premenstrual or ovulatory phase following skin sensitization. *Allergology International*, 57(4), 437-439 (2008).
- 11) Vieira, T., Cunha, L., Neves, E., Falcao, H.: Diagnostic usefulness of component-resolved diagnosis by skin prick tests and specific IgE to single allergen components in children with allergy to fruits and vegetables. *Allergologia et Immunopathologia*, 42(2), 127-135 (2014).
- 12) Antignac, E., Nohynek, G. J., Re, T., Clouzeau, J., Toutain, H.: Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food Chem. Toxicol.*, 49(2), 324-341 (2011).
- 13) Gu, X., Beardslee, T., Zeece, M., Sarath, G., Markwell, J.: Identification of IgE-binding proteins in soy lecithin. *International Archives of Allergy and Immunology*, 126(3), 218-225 (2001).
- 14) Kotobuki, Y., Azukizawa, H., Nishida, Y., Murota, H., Katayama, I., Yoshikawa, K.: Case of urticaria due to cochineal dye in red-colored diet. *Arerugi (Japanese Society of Allergology)*, 56(12), 1510-1514 (2007).
- 15) Yamakawa, Y., Oosuna, H., Yamakawa, T., Aihara, M., Ikezawa, Z.: Cochineal extract-induced immediate allergy. *J. Dermatol*, 36(1), 72-74 (2009).
- 16) Suzuki, K., Hirokawa, K., Yagami, A., Matsunaga, K.: Allergic contact dermatitis from carmine in cosmetic blush. *Dermatitis*, 22(6), 348-349 (2011).
- 17) Chinuki, Y., Sakieda, K., Kaneko, S., Nakamura, C., Murata, S., Sumikawa, Y., Niihara, H., Yoshida, Y., Tohgi, K., Morita, E.: Three cases of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis possibly sensitized by hydrolyzed wheat proteins in soap. *Jpn. J. Dermatol.*, 120(12), 2421-2425 (2010).
- 18) Chinuki, Y., Kaneko, S., Sakieda, K., Murata, S., Yoshida, Y., Morita, E.: A case of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolysed wheat protein in a soap. *Contact Dermatitis*, 65(1), 55-57 (2011).
- 19) Fukutomi, Y., Itagaki, Y., Taniguchi, M., Saito, A., Yasueda, H., Nakazawa, T., Hasegawa, M., Nakamura, H., Akiyama, K.: Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), 531-533 (2011).
- 20) Teshima, R.: Kasui Bunkai Komugi Ni Yoru Arerugi Ni Tsuite. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 49, No.2 116-120 (2013).
- 21) 厚生省告示第 332 号 (2000) "薬事法第五十九条第八号及び第六十一条第四号の規定に基づき名称を記載しなければならぬものとして厚生労働大臣の指定する医薬部外品及び化粧品成分" 平成 12 年 9 月 29 日。
- 22) Japan Cosmetic Industry Association. ed., "Nihon Keshohin Seibun Hyoji Meisho Jiten, 3rd Ed.", Tokyo, Yakuji Nippo Sha, 2007.
- 23) Kato, S., Yagi, T., Namioka, M., Akimoto, M., Arihara, K.: Development of a cow's milk detection sandwich ELISA kit using monoclonal antibodies. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 61(6), 223-231 (2014).
- 24) Lack, G., Fox, D., Northstone, K., Golding, J.: Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N. Engl. J. Med.*, 348(11), 977-985 (2003).
- 25) Hsieh, K. Y., Tsai, C. C., Wu, C. H., Lin, R. H.: Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 33(8), 1067-1075 (2003).
- 26) Strid, J., Hourihane, J., Kimber, I., Callard, R., Strobel, S.: Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin. Exp. Allergy*, 35(6), 757-766 (2005).
- 27) Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J., O'Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W. H.: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.*, 38(4), 441-446 (2006).
- 28) Osawa, R., Konno, S., Akiyama, M., Nemoto-Hasebe, I., Nomura, T., Nomura, Y., Abe, R., Sandilands, A., McLean, W. H., Hizawa, N., Nishimura, M., Shimizu, H.: Japanese-specific filaggrin gene mutations in Japanese patients suffering from atopic eczema and asthma. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(12), 2834-2836 (2010).
- 29) Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., Amagai, M.: External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 2937-2946 (2009).
- 30) Oyoshi, M. K., Murphy, G. F., Geha, R. S.: Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(3), 485-493, 493 e481 (2009).
- 31) Sanchez-Perez, J., Sanz, T., Garcia-Diez, A.: Allergic contact dermatitis from hydrolyzed wheat protein in cosmetic cream. *Contact Dermatitis*, 42(6), 360 (2000).
- 32) Varjonen, E., Petman, L., Makinen-Kiljunen, S.: Immediate contact allergy from hydrolyzed wheat in a cosmetic cream. *Allergy*, 55(3), 294-296 (2000).
- 33) Ogawa, T.: Shokuhin Arerugi To Arerugen (Food allergis and allergens). *Eiyogaku Zasshi (The Japanese Journal of Nutrition)*, 53, 155-166 (1995).

ノート

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の簡易検出法の確立

田中秀典¹⁾・北崎康生¹⁾・中村公亮²⁾・穂山 浩²⁾・明石 良¹⁾¹⁾ 宮崎大学大学院農学研究科, 宮崎県宮崎市, 〒 889-2192²⁾ 国立医薬品食品衛生研究所, 東京都世田谷区, 〒 158-8501

Development of a simple detection method for genetically modified papaya PRSV-YK

Hidenori Tanaka¹⁾, Yasuo Kitazaki¹⁾, Kosuke Nakamura²⁾, Hiroshi Akiyama²⁾ and Ryo Akashi¹⁾¹⁾ Graduate School of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan²⁾ National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

キーワード

パパイヤ, 遺伝子組換え体検出, PRSV-YK, FTA カード

緒言

遺伝子組換え (GM) 作物は, バイオテクノロジーを応用した農産物の一種であり, 人口増加に伴う食糧不足対策を主な目的として, 除草剤耐性や害虫抵抗性に代表される有用形質を付与した系統などが開発されている。厚生労働省および農林水産省のウェブサイトにて 2014 年 7 月現在で掲載されている情報によると, 我が国においても安全性が確認された 8 種類 290 品種の食品および 6 種類 72 品種の飼料の流通が認められている。また, 栄養成分の改変や薬効成分を含む系統など, 消費者にとっての利益が重視された第二世代 GM 作物の開発も急速に進められている。それに伴い, GM 作物の安全性に関して消費者の関心が高まり, その安全性確保が強く求められるようになった。

我が国では, 厚生省告示第 232 号 (2000a) および 233 号 (2000b) により, 食品衛生法の規格基準の改正を行い, GM 食品の安全性審査の義務化と表示の制度が開始された。これにより, 2001 年 4 月 1 日から, 安全性審査を受けていない GM 食品またはこれを原材料に用いた食品は, 輸入, 販売などが法的に禁止されている。また, 農林水産省 (2000) は, 農林物資の規格化および品質表示の適正化に関する法律 (JAS 法) に基づく GM 食品に関する品質表示基準を告示し, 安全性が確認された GM 農作物とその加工食品に対する表示を行うことを決定した。しかしながら, 様々な GM 作物が各国で開発され流通量が拡大することに伴い, 意図せずに未承認の GM 作物が混

入し流通する恐れが高まっている。実際に, 2011 年 2 月には, 食品衛生法上で安全性未審査である GM パパイヤ (*Carica papaya* L.) が, 国内に流入していることが明らかになった (環境省 2011, 厚生労働省 2011, 農林水産省 2011)。この流入したパパイヤは, パパイヤリングスポットウイルス台湾株 (YK) の外被タンパク質の遺伝子が導入された GM パパイヤ (PRSV-YK) であることがわかった。

一般に GM 作物の検査法は, 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 (2001) や農林水産消費安全技術センター JAS 分析試験ハンドブック “遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル第 3 版” (2012) によって定められており, DNA 抽出にはシリカゲル膜タイプキット法, イオン交換カラム法, 臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 法などが, 検出にはリアルタイム PCR が主に用いられている。これらの方法は, GM 作物を高感度で検出することができるが, 操作が煩雑であるという欠点がある。PRSV-YK においても, シリカゲル膜タイプキット法あるいはイオン交換カラム法を用いた DNA 抽出とリアルタイム PCR による検出が厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 (2011) により策定された。本研究は, この通知検査法に基づき, PRSV-YK の葉を用いて, 簡易かつ低コストで多検体処理が可能な検出法を検討したので報告する。

材料および方法

1. 試料

試料は, GM パパイヤ (PRSV-YK) が混入している可能性のある, 宮崎県内の数カ所のパパイヤ農家においてハウス内で育成されていた, 全てのパパイヤ (221 検体) の成葉の一部を用いた。

2. 機器

破砕機は Tissue Lyser II (キアゲン社製), 冷却遠心器は MX-300 (トミー社製), 分光光度計は NanoDrop ND-1000 (ナノドロップ社製) を用いた。PCR は Veriti サーマルサイクラー (ライフテクノロジーズ社製), 定量 PCR は ABI Prism 7000 Sequence Detection System (ライフテクノロジーズ社製) を使用した。電気泳動は, MCE-202 MultiNA (島津製作所社製) に DNA-500 キット (島津製作所社製) を用いて行った。この MultiNA は, マイクロチップ中で電気泳動されながら蛍光標識された核酸を蛍光検出し, 時系列の電気信号を取得し, サンプルサイズや濃度定量などを行う機器である。

3. DNA の調製

DNA の抽出精製には, DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社製) を使用した。また, 簡便な DNA 抽出精製法として, FTA プラントセーバーカード (GE ヘルスケア社製) を用いた。DNA の抽出精製は, 2.0 mL 容チューブに試料とジルコニアボール 1 個 (直径 7 mm) を入れ液体窒素で凍結した後, サンプル破砕装置 (TissueLyser II; キアゲン社製) にて毎秒 30 往復の条件で 30 秒間震盪することで行った。この破砕した試料を用いて DNeasy Plant Mini Kit に添付のマニュアルに従い DNA を抽出し, DNA 濃度を 50 ng/μL に調整して PCR および定量 PCR に使用した。

簡便な DNA 抽出精製法の検体については, 約 3 cm 角に切った葉片を FTA プラントセーバーカードに載せ, カバーをした後に上からドライバの柄などで 15 秒間押さえつけカードに転写したものを使用した (図 1A)。十分に乾燥させたカードの一部をディスク状 (直径 2.0 mm) にくり抜き (図 1C), 1.5 mL 容チューブに入れた。このチューブに, FTA 精製試薬 (FTA Purification Reagent; GE ヘルスケア社製) を 200 μL 入れ, 軽く混ぜた後, 5 分間室温にて放置し FTA 精製試薬をビベットにて取り除いた。この操作を 2 回行った。次に, FTA 精製試薬の代わりに 1/10 TE バッファー (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) を用いて同様の操作を行った。これらの操作にてディスクより PCR 阻害物質やその他の不純物を取り除き, 室温または 56°C の恒温器にて十分に乾燥させたディスクを PCR に直接使用した。

4. PCR 法による検出

プライマー対は, 通知検査法に従い, カリフラワーマザイクウイルス 35S プロモーター (CaM) 配列検出用 (35S-F: 5'-GCC TCT GCC GAC AGT GGT-3' および 35S-R: 5'-AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C-3', 推定増幅長 82 bp) と *Papaya ringspot virus* coat protein (PRSV-cp) 遺伝子の境界領域 (PRSV-YK) 検出用 (YK-2F: 5'-ACA CGG GGG ACT CTA GAG-3' および YK-2R: 5'-ACC GGT ATC CAC AGC TTC-3', 推定増幅長 76 bp) の 2 種類を用い

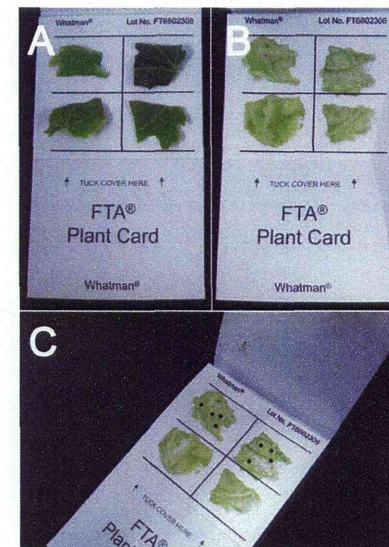


図 1. 切り出したパパイヤ葉の FTA カードへの転写とスポッティング。
(A) 転写前, (B) 転写後, (C) スポッティング後の FTA カード。

た。パパイヤ陽性対照試験には Chymopapain (Chy) 遺伝子配列を検出するプライマー対 (Chy-1F2: 5'-CCA TGC GAT CCT CCC A-3' および Chy-2R: 5'-CAT CGT AGC CAT TGT AAC ACT AGC TAA-3', 推定増幅長 73 bp) を用いた。PCR 混合液は, 10 μL 容量で, 5 μL AmpliTaq Gold 360 Master Mix (ライフテクノロジーズ社製), 10 pmol 各プライマー, 50 ng 鋳型 DNA を混和した。また, FTA プラントセーバーカードを用いた反応の場合は, 鋳型 DNA の代わりに直径 2.0 mm のディスクを 1 枚入れた。PCR 反応は, 95°C で 10 分間変性後, 95°C で 30 秒, 60°C で 30 秒を 35 サイクル行った。反応液は, そのまま MCE-202 MultiNA による電気泳動に供し増幅を確認した。

5. 定量 PCR 法による検出

定量 PCR 法による検出は, 全て通知検査法に従った。すなわち, 先の PCR 用プライマー対に加え, カリフラワーマザイクウイルス 35S プロモーター配列検出用プローブ (YK-2P: 5'-FAM-TCC CTT CCA TGG CGT C-TAMRA-3'), PRSV-cp 遺伝子の境界領域検出用プローブ (35S-P: 5'-FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA-3'), Chy 遺伝子検出用プローブ (Q-Chy-P: 5'-FAM-TTC CCT TCA T(BHQ1)CC ATT CCC ACT CTT

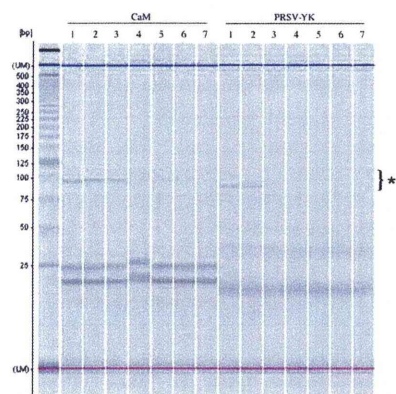


図2. PCR法とチップ式電気泳動装置により検出可能なPRSV-YKとCaMのコピー数。
1, 2×10^4 コピー；2, 1×10^4 コピー；3, 8×10^3 コピー；4, 6×10^3 コピー；5, 4×10^3 コピー；6, 2×10^3 コピー；7, 1×10^3 コピー；*, 各アンプリコンの推定増幅範囲。

GAG A-3')を用いた。定量PCR混合液は、25 μ L容量で、12.5 μ L TaqMan Gene Expression Master Mix (ライフテクノロジーズ社製)、20 pmol 各プライマー、2.5 pmol ブローブ、50 ng 鋳型DNAを混和した。また、鋳型DNAを添加しないNon-Template Control (NTC)も準備した。反応は、50°C、2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加熱し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 15秒間、60°C 1分間を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行った。

結果および考察

1. マイクロチップ式電気泳動装置による検出限界

パパイヤの葉におけるGMパパイヤ検出試験の前に、マイクロチップ式電気泳動装置MCE-202 MultiNAにおけるPRSV-YKおよびCaM試験の検出限界の確認を行った。限界の判定は、MultiNAが出力する信号強度が3 mV以上のものとした。確認には、予めコピー数が測定された陽性判定用プラスミドを用いてPCRを行い、電気泳動を行った。その結果、PRSV-YKにおいては 8×10^3 コピー (8.67 mV) まで、CaMにおいては 8×10^3 コピー (3.55 mV) までシグナルを確認することができた (図2)。この結果より、試料液中に 8×10^3 コピー以上存在すれば本法により検出可能であることが確認された。

2. PCR法によるPRSV-YKの検出

PCR法による検出は、先の信号強度の基準に加え、増幅断片長の条件を加えた。すなわち、MultiNAとDNA-500

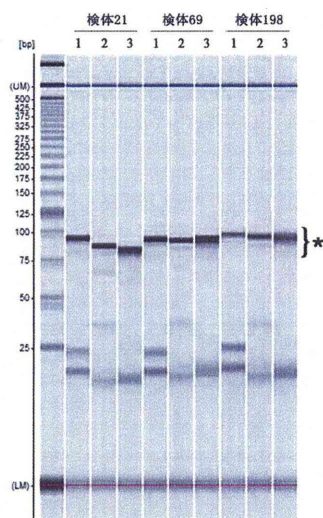


図3. FTAカードにより抽出されたDNAを用いて検査を行った際のチップ式電気泳動装置のゲルイメージ。
1, CaM；2, PRSV-YK；3, Chy；*, 各アンプリコンの推定増幅範囲。

キットの組み合わせにおいては、25-100 bpのレンジで ± 5 bpの正確さで分離可能なため、各増幅断片サイズがこの範囲内なのは陽性と判定した。PRSV-YKの陽性判定は、2回の独立した試行に基づき、その2回ともにおいてPRSV-YKおよびCaMの両方で陽性と判定された検体を陽性と判定した。FTAカードを用いた実験の結果、221検体中、全ての検体においてChy試験の陽性バンドが確認され、3検体においてはPRSV-YKおよびCaM試験の両方に陽性を示した (図3)。同様の結果は、抽出したDNA溶液においても確認された。また、2回の試行のうち1回において、8検体でCaMに、4検体でPRSV-YKに陽性を示した。これらの検体に対してさらに2回の試行を行ったところ、2回とも陽性を示さなかった。このことから、これらの検体は陰性であると判定した。

3. 定量PCR法によるPRSV-YKの検出

FTAカードによる試験において陽性と判定された3検体とPRSV-YKまたはCaM試験で1回でもバンドが確認された12検体について、定量PCRにて判定を行った。判定は、DNA抽出キットにより抽出したDNAを用いて行い、全て通知検査法におけるプロトコルに従った。その結果、先の簡易抽出法にて陽性を示した3検体は全て陽性判定基準値 (最適なThreshold lineにおけるCt値が

48未満) に達しており、全ての結果が一致した。その他の12検体は全て陰性を示し、簡易抽出法による結果と一致した。これらの結果より、FTAカードによるDNA抽出とPCR法により、パパイヤ葉における遺伝子組換え体の簡易検査が可能であると考えられた。

今回の検討では、定量PCR装置のような高価な機材や、蛍光プライマー等を使うことなく、実用上問題のない範囲で植物体よりPRSV-YKの検出を行うことができた。また、今回は全ての作業を実験室内で行ったが、FTAプラントセーバーカードへの転写は、屋外でも十分に作業できると考えられる。これまでの報告では、海外での植物相調査において11日間で890点の採取に用いられ、日本国内での実験室でPCR反応に問題なく使用した報告もあり (塚谷・池田 2005)、現場で多検体を迅速にサンプリングし、次のアプリケーションに用いることが可能であると思われる。また、メーカーによれば、乾燥した状態で暗所に保管すれば、室温で長期間、安定的な状態で保存できるとされている。筆者らは、約2年間、冷蔵庫 (4°C) にて保存したFTAカードを用いて、再度PCR法による検出実験を行った結果、同様の結果が得られることを確認した。

本法は、定量PCR法に比べると感度が悪いが、抽出可能なDNA量の少ない高度に加工された食品や、水分含量の少ない植物においては適用困難な場合も考えられるが、幼苗や葉切片であれば十分な感度で検出できることが確認された。また、FTAプラントセーバーカードは、1枚あたり4検体の組織を転写することができ、1検

体あたりの精製までコストは約190円であり、カラムを用いたキットによる通常のDNA抽出にかかるコスト (約300~450円) より安価に測定が可能であった。さらに、FTAカードを用いた方法は、作物が栽培されている場所でDNA抽出作業ができるため、遺伝子組換え体である可能性のある植物体の運搬により生じる飛散等のリスクを回避することができる。今後、この方法は様々な農作物において適用できる可能性が高く、未承認遺伝子組換え体の際での阻止および生物多様性への影響防止に役立つことが期待される。

引用文献

- 環境省 (2011) 報道発表資料 <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=13514>
厚生省 (2000a) 告示第232号。
厚生省 (2000b) 告示第233号。
厚生労働省 (2011) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/qa/110222-1.html>
厚生労働省医薬局食品保健部長通知 (2001) 食発第110号。
厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 (2011) 食安監発0222第4号。
農林水産省 (2000) 告示第517号。
農林水産省 (2011) プレスリリース <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/110222.html>
(独) 農林水産消費技術センター (2012) JAS分析試験ハンドブック “遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル第3版”。
塚谷裕一・池田 博 (2005) 分類5: 127-135。

技術論文

¹H NMR による精確な定量分析のための
内標準液を用いる試料調製法の検討

山崎 太一^{①1}, 大槻 崇², 三浦 亨³, 末松 孝子¹, 堀之内嵩暁³, 村上 雅代¹,
齋藤 剛¹, 井原 俊英¹, 多田 敦子², 田原麻衣子², 合田 幸広², 穂山 浩²,
中尾 慎治³, 山田 裕子³, 小池 亮³, 杉本 直樹²

核磁気共鳴 (NMR) を用いた定量分析法 (定量 NMR 法) は原子核を基準にできる特性から、測定対象の標準物質を必要としないで定量できるユニバーサルな分析法として急速に注目を集めている。特に内標準法は精確な値が得られることから公定法にも採用され始めている一方で、現状の内標準法では、試料調製において高分解能な天秤を用いた精確な秤量が必要とされるという点が課題となっている。そこで本研究では、試料調製におけるコストと時間を低減するために、内標準液を用いた定量 NMR 法について検討した。質量比混合法と容量法の二つの方法で試料調製を行い、測定結果に与える調製方法の影響について考察した。さらに複数機関による共同分析を実施することで、内標準液を用いた方法の妥当性を評価し、より簡便な容量法においても 1 % 以下の精確さで定量分析ができることを明らかにした。

1 緒言

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、有機化学において主に分子構造解析などを目的に用いられてきた。NMR による構造解析では検出されるシグナルの化学シフト値、カップリングや分子内積分比などの情報から分子構造を推定することができるため、定性分析において高い有用性がある。また、NMR ではシグナルの示す積分比が分子内の原子数比を示すことから、定量分析への利用についても報告されている¹⁾²⁾。しかし、定性に用いる一般的な測定条件では精確な積分比を示さないことから、NMR は定量分析には不向きと考えられていた。

近年、NMR を用いた精確な定量分析が検証され始め、定量用に最適化された測定条件を設定することで、分子内のみならず分子間の積分比を正確に示す測定例が報告されている^{3)–5)}。NMR はシグナルの検出が測定対象物質の吸光や蛍光などの物性に依存せず、原子核の物質量を基にしているため、測定対象物質と異なる標準物質を基準として定量することが可能である。このように、NMR による定量分

析法 (定量 NMR 法) は、他の機器分析には無い特長を有していることから、最近では試薬の純度を正確に評価できる分析法として用いられている^{6)–8)}。特に、食品添加物の定量用標準物質の純度決定に適用されるなど公定法への利用⁹⁾が進み、定量 NMR 法による日本薬局方試薬の純度の規格化に関する検討も始まっている¹⁰⁾¹¹⁾。これらの公定法は食品への添加物や医薬品の品質の適性を評価するための公定法で、食品や医薬品の安全に寄与しているため社会的に重要となっている。

定量 NMR 法では、値の付与された標準物質を物質量の基準に用いて測定対象物質の純度または濃度を評価する。このとき定量法としては、標準物質を外部標準として用いる方法 (外標準法)¹²⁾や内部標準として用いる方法 (内標準法)¹³⁾があり、さらには電気信号に置き換える方法¹⁴⁾なども提案されている。外標準法では標準試料と測定試料を別の試料管に調製・測定し、それぞれのスペクトルから得られた面積値を比較して定量する分析法であり、内標準法は一つの試料管に標準試料と測定試料を加えて測定し、一つのスペクトル内で得られた面積値を比較して定量する分析法である。上述した公定法では、内標準法が採用されており、この方法に用いるための定量 NMR 用標準物質が開発されている¹⁵⁾。内標準法は外部標準法と比較して、シグナルの分離が必要不可欠であるが、厳密な調製濃度が不要であることに加えて、1 測定で評価できるために装置状態や測定条件が安定であるという利点がある。しかし、公定法で定められた試料調製では、¹H の信号強度が相対的に強い

内標準物質の数ミリグラムを精密に採取することが要求されるために、試料調製ではウルトラマイクロ天秤が必要とされる。そのため、簡便に試料を調製することが難しく、コスト面からも汎用的とは言えないなどの課題がある。

本報では、簡便かつ迅速な定量 NMR 法を確立するため、内標準物質があらかじめ重溶媒で希釈された内標準液を用いた定量法の精確さについて評価した。標準液を定量 NMR 法に用いた際の定量結果の精確さについて評価された例はなく、得られる定量結果に標準液を用いた調製法が及ぼす影響について検証した。内標準液を用いた定量法では、精確な濃度の内標準液の調製が前提となるが、精確な試料調製を行う方法を確立することが求められる。そこで、精確な濃度に調製した内標準液を用いて、質量比混合法及びより簡便な容量法について試料調製を行い、調製精度に与える影響について検討した。このとき、測定対象物質に純度既知の標準物質を用いることで、調製値のかたよりについても考察した。

さらに、定量 NMR 法による測定結果は試料調製法や解析法により、バイアスがかかることがあるため、内標準液を用いた定量 NMR 法を複数機関において実施することにより、質量比混合法及び容量法それぞれの試料調製方法の妥当性を評価した。

2 実験

2-1 装置・試薬及び器具

調製方法の検討では、NMR 装置は VNS 600 (Varian 製、¹H 核の共鳴周波数: 600 MHz) を用いた。試料調製のための天秤には、ウルトラマイクロ天秤 (メトラー・トレド製、XP6U) を用い、内標準液の調製にはセミマイクロ天秤 (メトラー・トレド製、XP205V) を用いた。データ解析ソフトウェアには MestReNova (Mestrelab Research 製) を用いた。内標準液の密度測定には振動式密度計 (アントンパール製、DMA5000M) を用いた。また、機関間の共同分析において使用した各機関の装置、天秤及びデータ解析ソフトウェアは Table 1 に示した。

内標準液の調製には認証標準物質の 1,4-ビストリメチルシリルベンゼン-*d*₄ (1,4-BTMSB-*d*₄, 和光純薬工業製) を用い、調製溶媒にはジメチルスルホキシド-*d*₆ (DMSO-*d*₆, 和光純薬工業製) を用いた。また、調製方法の検討及び機関間の比較測定における測定対象物質には、認証標準物質の安息香酸 (NIST SRM 350a, 0.999958 ± 0.000027 kg kg⁻¹, *k* = 2) を用いた。

2-2 内標準液の調製

内標準物質として約 12 mg の 1,4-BTMSB-*d*₄ を精密に秤量して 30 mL スクリューバイアルに加え、ここに溶媒として約 24 g の DMSO-*d*₆ を加えて秤量したのち、溶解して約 500

µg g⁻¹ の内標準液を調製した。調製した 1,4-BTMSB-*d*₄/DMSO-*d*₆ 内標準液は 10 mL のセプタム付アルミシールバイアルに 5 mL ずつ小分けした。なお、DMSO-*d*₆ の吸湿性が高いことから、秤量から小分けまでのすべての操作を湿度 3 % 以下の乾燥窒素雰囲気下のグローブボックスで行った。

2-3 試料溶液の調製

測定対象物質として安息香酸 5–10 mg をアルミニウムパンを用いて精密に秤量し、スクリューバイアルに移したのち、ガスタイトシリンジ又はピペッターを用いて内標準液 1 mL を正確に加えて秤量したのち、溶解させ試料溶液とした。これらの作業は大気環境中及び湿度 3 % 以下の乾燥窒素雰囲気下のグローブボックス中の両者で行った。

2-4 NMR 測定パラメーターと純度算出

試料調製方法の検討における測定パラメーターはこれまで報告されている測定条件を参考に最適化したものを用いた¹⁶⁾。

一方、機関間の比較測定では、各機関で独自に最適化した条件で測定及び解析を行うこととし、Table 1 に示すパラメーターにより測定及び解析を各機関で独立に実施した。データ解析では測定で得られた自由誘導減衰 (FID) をフーリエ変換し、得られたスペクトルを位相補正後、積分、ベースライン補正することで各シグナルの面積値を得た。また、積分操作では ¹³C サテライトシグナルを基準として、外側 30 Hz までを積分範囲として統一して解析した。

なお、純度は下記の式を用いて算出した。

$$P_{\text{RA}} = \frac{A_{\text{RA}}}{A_{\text{BTMSB}}} \frac{N_{\text{BTMSB}}}{N_{\text{RA}}} \frac{M_{\text{RA}}}{M_{\text{BTMSB}}} \frac{m_{\text{BTMSB}}}{m_{\text{RA}}} P_{\text{BTMSB}}$$

ここで安息香酸の純度 (kg kg⁻¹) を *P*_{RA}、安息香酸及び 1,4-BTMSB-*d*₄ の測定面積値を *A*_{RA}、*A*_{BTMSB}、¹H 数を *N*_{RA} (5)、*N*_{BTMSB} (18)、分子量を *M*_{RA} (122.1213)、*M*_{BTMSB} (226.4987)、試料量 (mg) を *m*_{RA}、*m*_{BTMSB}、1,4-BTMSB-*d*₄ の純度 (kg kg⁻¹) を *P*_{BTMSB} とした。内標準液を用いた際には、調製濃度から *m*_{BTMSB} を算出して、純度測定に用いた。

3 結果と考察

3-1 内標準液の密度評価

調製した内標準液の濃度の単位は質量分率 (kg kg⁻¹) であるため、質量比混合法での試料調製にはそのまま用いることができるが、天秤で秤り取った測定対象物質に内標準液を一定容積加える容量法に用いるためには、質量濃度 (kg m⁻³) に単位変換する必要がある。そこで、小分け後の内標準液について、振動式密度計により温度 20 °C から

^① E-mail: tyamazaki@aist.go.jp

¹ 独立行政法人産業技術総合研究所: 305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 3

² 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

³ 和光純薬工業株式会社: 350-1101 埼玉県川越市大字の場 1633

⁴ 株式会社 JEOL RESONANCE: 196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2

⁵ 花王株式会社: 640-8580 和歌山県和歌山市湊 1334

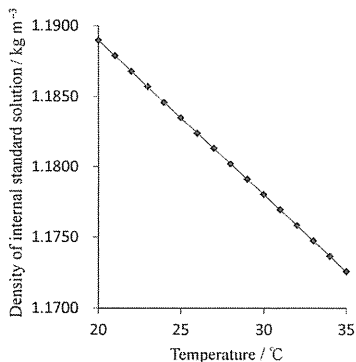


Fig. 1 Temperature dependency of the density of the internal-standard solution

35℃の範囲で1℃ 間隔で溶液の密度を測定した。その結果を Fig. 1 に示すが、内標準液の密度は温度に対して直線的に変化し、1℃ 温度が変わることで約 0.1 % 密度が変化することが確認された。このことから、容量法では試料調製時の溶液温度が重要であることが示唆される。そこで、容量法において調製温度の影響を受けない結果を得るために、試料調製時の室温を記録し、Fig. 1 の結果から得られる密度補正式により内標準液の質量濃度を求めて用いた。

3.2 試料調製法の検討

試料溶液の調製は2.3で述べた方法により行ったが、2.2で述べたように、本実験で用いた調製溶媒であるDMSO-*d*₆は吸湿性が高いことから、吸湿による内標準液の濃度変化が懸念される。そこで、セプタム付アルミシールバイアルに小分けされた内標準液の採取方法として、乾燥窒素雰囲気グローブボックス中でのガスタイトシリンジによる採取(条件1)、大気中でのガスタイトシリンジによる採取(条件2)、大気中でセプタム開封直後にガスタイトシリンジによる採取(条件3)、大気中でセプタム開封直後にピペッターによる採取(条件4)、大気中でセプタム開封後10分程度かけてピペッターによる採取(条件5)を比較することとし、測定対象物質である安息香酸が秤量されたバイアルにそれぞれの条件で内標準液を添加した。なお、容量法における採取量は1 mLとし、すべての条件において内標準液添加前及び添加後の試料溶液の質量を測定することで、質量比混合法の値も併せて得た。

上記の5条件で調製した試料溶液についてNMR測定を行い、Fig. 2に示すスペクトルを得た。安息香酸では三つのシグナルが観測され、化学シフトが隣接した高磁場の二

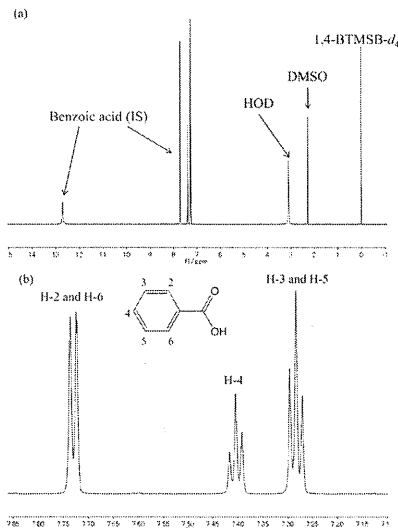


Fig. 2 ¹H NMR spectra of benzoic acid dissolved in a 1,4-BTMSB-*d*₄ standard solution (a) a full-scan and (b) expansion of 7.10 ppm to 7.85 ppm

つのシグナル(3位及び5位, 7.27 ppm, 2H)及び4位(7.41 ppm, 1H)は一括で積分し、最も低磁場のシグナル[2位及び6位(7.73 ppm, 2H)]は単独で積分したが、両者に有意な差が認められなかったことから、すべてのシグナルから得られた定量値を用いた。Fig. 3に各試料調製条件において得られた安息香酸の純度(認証値を1.0として規格化)を、質量比混合法及び容量法それぞれについてプロットしたものを示す。ここでは、3回調製した試料について3回測定を行った結果の標準偏差をエラーバーで示した。

まず、質量比混合法と容量法の測定結果を比較すると、両者はおおむね一致するもののすべての調製条件において、容量法は質量比混合法に比べ低い値となった。この原因として、採取量が1 mLよりも少ないことも考えられるが、採取器具に依存せずに質量比混合法と一定の差が確認されたことから、質量濃度への換算の問題と推定した。バイアスの程度は約0.2%と一定であるが、これはFig. 1の密度補正式から温度として約2℃の差に相当する密度の影響と同等である。本検討では、操作を行った実験室の温度を内標準液の温度として質量濃度を算出したため、このような一定のバイアスが観測された可能性があり、より厳密な純度評価においては、採取時における内標準液の温度

device and parameter		organization				
		A	B	C	D	E
balance (for sample)	Mettler Toledo XPeU	Mettler Toledo XPeU	Mettler Toledo XPeU	Mettler Toledo XPeU	Mettler Toledo XPeU	Mettler Toledo XPe6
minimum indicated value	0.0001 mg	0.002 mg	0.001 mg	0.002 mg	10 mg	0.001 mg
sample volume	> 5 mg	> 5 mg	> 5 mg	10 mg	10 mg	10 mg
balance (for standard solution)	Mettler Toledo XP205	A&D BM-232	Mettler Toledo XP56	Sartorius CPA220D	Mettler Toledo XP56	Mettler Toledo XP56
minimum indicated value	0.01 mg	0.01 mg	0.001 mg	0.01 mg	0.001 mg	0.001 mg
sampling instrument	gas-tight syringe (5 mL)	auto-microsyringe (5 mL)	microsyringe (2 mL)	auto-microsyringe (5 mL)	microsyringe (5 mL)	microsyringe (5 mL)
preparation temperature	27.2-27.6℃	28℃	29.8℃	22℃	26℃	26℃
device	JEOL ECS-400	JEOL ECS-600	JEOL ECS-400	JEOL ECS-400	JEOL ECS-400	JEOL ECS-400
spectrometer frequency	400 MHz	600 MHz	400 MHz	400 MHz	400 MHz	600 MHz
spectrum width	100 ppm	20 ppm	20 ppm	20 ppm	20 ppm	20 ppm
digital filter	off	on (32 times)	on	on (32 times)	on (32 times)	on (32 times)
exciting center	4 ppm	5 ppm	5 ppm	5 ppm	5 ppm	5 ppm
pulse angle	90°	50°	90°	90°	90°	90°
acquisition time	4 s	4 s	4 s	4 s	4 s	4 s
relaxation delay time	60 s	60 s	60 s	60 s	60 s	60 s
measurement temperature	25℃	off	off	off	off	25℃
¹³ C decoupling	on	off	on	off	off	25℃
decoupling sequence	MPF8	MPF8	MPF8	MPF8	MPF8	MPF8
number of scan	8 times	8 times	8 times	8 times	8 times	8 times
dummy scan	2 times	2 times	2 times	2 times	2 times	2 times
software	Winova 7	Alice2 for gNMR	Winova	Alice2 for gNMR	Alice2 for gNMR	Alice2 for gNMR
window function	off	off	off	off	off	off
phase correction	manual	auto	manual	auto	auto	auto
baseline correction	on	on	on	on	on	on

a) Broadening factor:

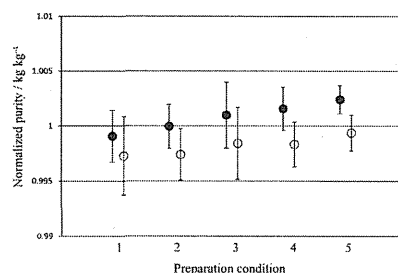


Fig. 3 Comparison of the normalized purity of benzoic acid determined by several conditions

The samples were prepared either under nitrogen (condition 1) or atmospheric (conditions 2 to 5). In addition, standard solutions were weighed using either a gastight syringe (conditions 1 to 3) or a pipette (conditions 4 and 5). In condition 3, the standard solution was used without taking off the septum cap of the vial. ●, Gravimetric method; ○, Volumetric method.

を直接測定する必要があると考えられる。また、超純水を用いて採取器具を校正すると、理論値と0.1%以下のバイアスで校正することができ、採取量の影響ではなく、温度の影響を大きく受けていると考えられた。

次に、調製条件の違いによる純度への影響について比較したところ、測定ばらつきの範囲でおおむね一致したが、条件1から昇順に高い値になる傾向が認められた。それぞれの¹H NMRスペクトルにおいて1,4-BTMSB-*d*₄のシグナルに対する水のシグナル強度を比較したところ、純度と同様の増加傾向を示し、条件5において相対的な水のシグナル強度が最大となった。操作中のDMSO-*d*₆の吸湿によって内標準液の濃度が低下した可能性が高いことが示唆され、試料調製方法の違いから考えて妥当と考えられる結果であった。なお、DMSO-*d*₆の吸湿で内標準液の濃度はわずかに低下するものの、測定ばらつきの範囲内であった。なお、条件3と条件4の純度及び再現性の結果から、採取器具による有意な差は確認されなかった。

これらの結果から、より厳密には乾燥雰囲気での試料調製が望ましいが、実験室環境においても試料調製の方法間で顕著な差は認められず、吸湿の影響は無視できる水準であることが明らかとなった。ただし、DMSO-*d*₆を溶媒として容量法を適用する場合は、調製した内標準液について密度と温度の関係を測定しておき、試料調製時における内標準液の温度を正確に測定することが求められる。また、他の有機溶媒もDMSO-*d*₆と同様に温度の影響で密度が変化することが懸念される。NMRを用いた定量分析では内標

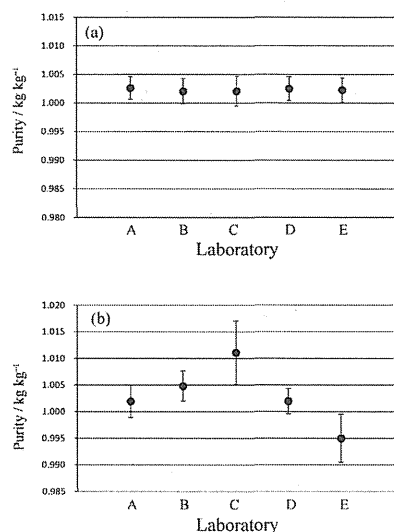


Fig. 4 Purity determination of benzoic acid in each laboratory

(a) Gravimetric method; (b) volumetric method.

準と測定試料が十分に溶解し、シグナル分離していることが必須であるため、選択する溶媒ごとに密度の影響を評価することで本報を適用できると考えられる。

3.3 機関間比較による内標準液法の妥当性評価

3.2の検討結果を踏まえて、内標準液法を用いたNMRによる定量分析法の妥当性を評価するために、5機関で共同分析を行った。この共同分析では、調製した内標準液(1,4-BTMSB-*d*₄/DMSO-*d*₆)及び測定対象物質として安息香酸を各機関に配布し、試料調製、NMR測定及びデータ解析を各機関で独立に実施した。各機関の試料調製条件、測定条件、解析条件をTable 1、質量比混合法による測定結果をFig. 4 (a)、容量法による測定結果をFig. 4 (b)にそれぞれ示した。ここでは、6回調製した試料について3回測定を行った結果の標準偏差をエラーバーで示した。

質量比混合法による各機関の測定結果は、良く一致しており、約0.3%の機関間差で定量することが可能であった。機関Bのデータ解析条件で一括解析した結果、定量値の変動は確認されなかったことから、この差は調製及び測定によるものであることが分かるが、定量NMR法の精確さから考えて問題にならない程度と考えられる。

文 献

一方、容量法では約1%の機関間差が観測された。特に、機関C及び機関Eでは質量比混合法で評価した際には他機関と同等の値が得られたにもかかわらず、容量法ではわずかに異なる結果が得られたことから、内標準液を採用する際に用いた器具の容量誤差もしくは試料調製時の温度が正確に測定できていない可能性がある。

5機関で行った純度測定の結果は、どちらの試料調製法を用いた場合においても認証値と同等の定量結果が得られ、特に質量比混合法では公定法で採用されている内標準法とほとんど変わらない精確さで純度が得られることから、内標準液は十分に有用であることが確かめられた。機関Aでは定量精度を保証するためにウルトラマイクロ天秤を用い、他の機関ではマイクロ天秤またはセミマイクロ天秤を用いた。ここで、ウルトラマイクロ天秤は最少表示値が0.1 µg、マイクロ天秤は最少表示値が1 µg、セミマイクロ天秤は最少表示値が10 µgの天秤と考えて考察した。定量結果はすべての機関で同等であり、汎用的に利用できる手法であると考えられた。

4 結 言

本研究では、NMRを用いた定量分析における簡便な試料調製法を確立するために、内標準液法について検討した。質量比混合法を用いることにより分析結果の精確さを0.3%程度に抑えられることが可能であり、内標準液の秤量にマイクロ天秤またはセミマイクロ天秤でも精確な定量NMR法が実現できることが確かめられた。また、容量法においては、内標準液の容量の精確さと合わせて、DMSO-*d*₆のような温度によって密度変化が大きい有機溶媒を用いる際に内標準液の温度測定に注意することで1%以内の正確さで純度測定が可能であると考えられる。

本法を用いることで、多検体試料を迅速に測定する必要がある品質管理等への利用が進むことで、定量NMR法の更なる普及に繋がることが期待される。

- 1) J. L. Jungnickel, J. W. Forbes : *Anal. Chem.*, **35**, 938 (1963).
- 2) P. J. Paulsen, W. D. Cooke : *Anal. Chem.*, **36**, 1713 (1964).
- 3) T. Saito, S. Nakaie, M. Kinoshita, T. Ihara, S. Kinugasa, A. Nomura, T. Maeda : *Metrologia*, **41**, 213 (2004).
- 4) 齋藤 剛, 井原俊英, 佐藤浩志, JANCKE Harald, 衣笠晋一 : 分析化学 (*Bunski Kagaku*), **52**, 1029 (2003).
- 5) T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fujimine, K. Nose, T. Hirai : *Accred Qual Assur*, **14**, 79 (2009).
- 6) A. Tada, K. Takahashi, K. Ishizuki, N. Sugimoto, T. Suematsu, K. Arifuku, M. Tahara, T. Akiyama, Y. Ito, T. Yamazaki, H. Akiyama, Y. Kawamura : *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 33 (2012).
- 7) M. Tahara, T. Suematsu, M. Hayakawa, Y. Goda, R. Konishi, N. Sugimoto : *Micotoxins*, **62**, 111 (2012).
- 8) M. Tahara, N. Sugimoto, T. Ohtsuki, A. Tada, H. Akiyama, Y. Goda, T. Nishimura : *J. Environ. Chem.*, **22**, 33 (2012).
- 9) 食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品に関する省令の一部を改正する命令 (府令・省令：内閣府・厚生労働省), 食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件 (告示：厚生労働省307号), (官報, 号外第191号, 平成23年8月31日).
- 10) J. Hosoe, N. Sugimoto, T. Suematsu, Y. Yamada, M. Hayakawa, Y. Katsuhara, H. Nishimura, Y. Goda : *PMDRS*, **43**, 182 (2012).
- 11) J. Hosoe, N. Sugimoto, Y. Goda : *PMDRS*, **41**, 960 (2010).
- 12) 畑田耕一, 寺脇義男, 北山辰樹 : 高分子論文集, **49**, 335 (1992).
- 13) T. Rundlof, M. Mathiasson, S. Bekiroglu, B. Hakkarainen, T. Bowden, T. Arvidsson : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 645 (2010).
- 14) S. Akoka, L. Barantin, M. Trierweiler : *Anal. Chem.*, **71**, 2554 (1999).
- 15) M. Weber, C. Hellriegel, A. Ruck, R. Sauermoser, J. Wuthrich : *Accred Qual Assur*, **14**, 79 (2009).
- 16) 山崎太一, 齋藤 剛, 三浦 亨, 井原俊英 : 分析化学 (*Bunski Kagaku*), **61**, 963 (2012).

Study of Sample Preparation Method Using Internal Standard Solution to Accurate Quantitative Analysis with ^1H NMR Spectroscopy

Taichi YAMAZAKI^{*1}, Takashi OHTSUKI², ToFu MIURA³, Takako SUEMATSU⁴, Takaaki HORINOUCHI⁵,
Masayo MURAKAMI¹, Takeshi SAITO¹, Toshihide IHARA¹, Aisuko TADA², Maiko TAHARA²,
Yukihiro GODA², Hiroshi AKIYAMA², Shinji NAKAO³, Yuko YAMADA³, Ryo KOIKE⁵ and Naoki SUGIMOTO⁵

^{*}E-mail: t-yamazaki@aist.go.jp

¹National Metrology Institute of Japan (NMIJ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1, Umezono, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8563

²National Institute of Health Sciences (NIHS), 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

³Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 1633, Matoba, Kawagoe-shi, Saitama 350-1101

⁴JEOL RESONANCE Inc., 3-1-2, Musashino, Akishima-shi, Tokyo 196-8558

⁵Kao Corporation, 1334, Minato Wakayama-shi, Wakayama 640-8580

(Received August 22, 2013; Accepted December 15, 2013)

Since nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy obtains a quantitative value on the basis of a nucleus, the quantitative NMR technique does not require an identical standard. For this reason, it is expected to be a universal quantitative method. Recently, the quantitative NMR method was adopted also as a regulating method. However, the quantification using an NMR requires a high-resolution balance in the sample preparation for accurate weighing of the mass of samples. This is the biggest problems to disseminate a quantitative NMR as a generally used method. In this paper, we discuss the quantitative NMR method using the internal standard solution in order to resolve the problem. We examined two methods of sample preparation: the gravimetric method and the volumetric method. The influence of the preparation method and condition was evaluated using a standard solution. Additionally, some organizations have used this method to measure the purity of a high-purity reference material for the validation of this standard solution method. The accuracy of the results was evaluated using an internal standard solution by the volumetric method, and measured at 1 % or less.

Keywords: quantitative NMR; standard solution; ^1H NMR.

一般論文 定量 NMR による多環芳香族炭化水素市販試薬の純度決定

田原麻衣子[†]・杉本 直樹・大槻 崇・多田 敦子・
 篠山 浩・合田 幸広・五十嵐良明

摘 要

物質量の絶対値は国際単位系 (SI) にトレーサブルな測定によって得られると定義されている。しかし、環境分析において測定対象となる化合物は多種多様であり、計量計測学的に純度が証明された標準物質はほとんど流通していない。環境分析に活用されているクロマトグラフィーで正確な定量値を求めるためには、計量計測トレーサビリティが確保された純度値が決定された測定対象の標準物質が必須である。本研究では、環境中の多環芳香族炭化水素 (PAH) 類について SI にトレーサブルな分析法を構築するため、定量核磁気共鳴法 (定量 NMR: quantitative NMR (qNMR)) の一つである AQARI (Accurate quantitative NMR with internal reference substance) 法を応用した。AQARI 法を応用することにより、科学的な根拠に基づいた、且つ、計量計測学的に信頼性を確保した純度値が求められる。定量用標準物質の代用品として使用される市販試薬製品 18 種の PAH および水酸化 PAH (OH-PAH) について、計量計測学的に信頼性の高い純度値を測定した。その結果、各市販試薬製品の純度は $90.2 \pm 0.04 \sim 101.6 \pm 0.9\%$ (arithmetic mean $\pm$ RSD) と算出された。このことから、メーカー成績書の純度値より最大 6.6% 下回るものが認められ、メーカー成績書記載の純度値を質量%純度とし定量用標準物質として扱うことは適切ではない場合があることが示唆された。また、市販試薬製品の品質管理や使用時の純度が定量分析値の精度に大きく影響を及ぼすため、標準物質として使用する市販試薬製品の正確な純度の把握が重要であることが明らかとなった。

キーワード：多環芳香族炭化水素、定量 NMR、純度、市販試薬

1. はじめに

環境分析においては、水や大気等の時間軸上で流動的な試料、すなわち、再採取不可能な試料を分析対象とすることが多いため、より多くのデータを迅速かつ簡便に一括で得る方法として、分離能および迅速性に優れたクロマトグラフィーによる一斉分析がよく用いられる。相対測定法の一つであるクロマトグラフィーによる定量分析の一連の操作過程には、①試料の採取、②試料調製、③測定対象化合物の標準物質の入手、④検量線作成、⑤定量分析 (データ解析) があり、これらすべての過程の妥当性が評価されて正確に実施されているとき、得られた定量分析値の信頼性が確保される。しかし、環境

分析の対象となる化合物は多岐にわたるため、科学的な根拠に基づいて絶対純度や絶対含量が証明された標準物質が入手できない場合が多く、③の測定対象化合物の標準物質の入手は、得られた定量分析値の信頼性を厳密な意味で確保するために常に問題とされる。

近年、工場からの煙や自動車の排気ガスが主な排出原因とされている微小粒子状物質の人体への影響が危惧され、日本においても大気汚染の原因物質として関心が高まっている。このため、2009 年 9 月に環境省から PM 2.5 の環境基準についての告示が出された¹⁾。粒子状物質の代表的なものとして、多環芳香族炭化水素 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAH) が挙げられる。2010 年に国

際がん研究機関 (IARC) より発行された評価書では、PAH は燃焼等に伴って生成し、多くの PAH に発がん性や変異原性がある、もしくは、疑われると報告されている²⁾。また、PAH は太陽光の紫外線やヒドロキシラジカル等により水酸化体やキノン体に変換されることが知られており³⁾、これらが内分泌攪乱作用を示すことも指摘されている⁴⁾。このため、最近では、PAH の環境中での汚染実態の監視だけでなく、PAH の変質および分解過程、その有害影響について包括的な調査研究が要求されている。水酸化 PAH (OH-PAH) およびニトロ化 PAH 等⁵⁾、さまざまな PAH の反応生成物を含めた多成分の類縁化合物の一斉分析には、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) や液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) 等の相対測定法が一般的に用いられている⁶⁻¹¹⁾。しかし、定量用標準物質として用いた PAH の純度について言及された例はなく、得られた定量分析値の信頼性に懸念が残る。

定量用標準物質の代用品として用いられる有機化合物の市販試薬は、試薬メーカー独自の方法、例えば、比吸光度あるいはクロマトグラム上で観察される主ピークの面積百分率等から純度や含量を示している場合が多い。クロマトグラフィーによる面積百分率から示した純度値は、あらゆる不純物のレスポンスファクターが主成分と同じであると仮定して主成分の相対比を示すもので、ピーク面積百分率は、クロマトグラム上に観察されるすべての成分のピーク面積の総和に対する測定対象化合物のピーク面積を比率として表したものであり、元素組成比の異なる不純物を含む混合物の純度値を正確に表したものではない。一方、物質量の絶対値は普遍的な国際計量標準である国際単位系 (International System of Units: SI) にトレーサブルな測定によって得られると定義されている。この定義に従って、「国家標準物質」を上位標準とした標準物質供給システムで値付けされた市販試薬はほとんど供給されていない。試薬メーカーは品質保証の目的で独自の方法で値付けしている場合が多い。したがって、SI への計量計測トレーサビリティの連鎖から外れているため、極端に言えば、これらに表示された純度値を確保する根拠はないに等しいということになる¹²⁾。

有機化合物は炭素、水素、酸素などが共有結合した分子である。異なる分子構造で異なる物性値を持つ分子であっても、構成する最小単位の同種の原子同士は等価である。定量用に最適化された¹³⁾H-NMR では、化学シフトの異なる各シグナルの

面積比は、分子上の各炭素に結合した水素原子の数の比に対応し、測定対象の化合物の分子構造に関わらず、すべて水素原子が定量的な信号として観測される。このことから、スペクトル上に観察される異なる化合物のシグナル強度の比は化合物に寄与する水素のモル比に対応する特徴を有する。この原子レベルの比較分析特性を利用した qNMR は、SI にトレーサブルな定量分析値 (純度) を得ることが可能であり、これまでの標準物質供給システムを刷新する手法 (図 1) として国内外の研究機関および試薬会社より注目され始めている。

このような背景から、我々がこれまでに開発した核磁気共鳴装置 (nuclear magnetic resonance: NMR) を用いた定量分析法 (quantitative NMR: qNMR) の一つである AQARI (Accurate quantitative NMR with internal reference substance) 法を応用し、PAH および類縁化合物である OH-PAH の市販試薬製品について、計量計測学的に信頼性の高い純度値を決定したので報告する。

2. 研究方法

2.1 対象化合物

市販試薬製品の PAH 9 種、今後、監視が必要な OH-PAH として、二環性のナフタレンを中心に、ナフタレンモノ置換体の 2 種およびジ置換体の 6 種と三環性 1 種の計 18 種を測定対象化合物と

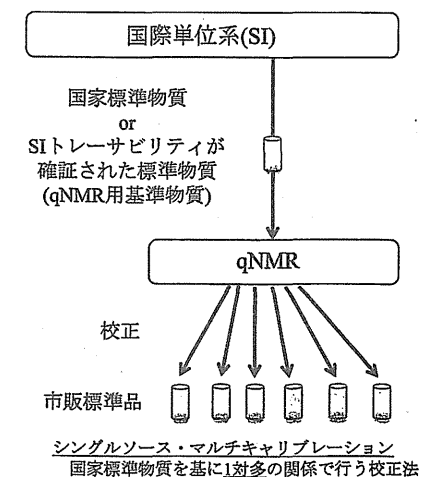


図1 qNMRを用いた SI トレーサビリティ体系による次世代の標準物質供給システム

2013 年 12 月 19 日受付, 2014 年 3 月 3 日受理

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

[†] Corresponding author: tahara@nihs.go.jp

した。PAH 9 種および OH-PAH の二環性 8 種は、和光純薬工業株式会社、東京化成工業株式会社、関東化学株式会社、ACROS ORGANICS、Sigma-Aldrich Inc. のいずれかのメーカーより製品を購入した。三環性の 4-hydroxybenzo[a]anthracene (4-HBA) は金沢大学 早川和一教授および戸次加奈江博士から分与された市販試薬（現在、流通無し）を試料として用いた。純度測定に供した対象化合物名および化学式、分子量を表 1 に示す。

2.2 試薬および試液

qNMR の基準物質には、1,4-bis (trimethylsilyl) benzene-*d*₆ (BTMSB, 定量 NMR 用標準物質, 和光純薬工業株式会社) および高純度 hexamethyldisilane (HMD, 和光純薬工業株式会社特注品) を、基準物質の校正には認証標準物

質 (Certified Reference Material: CRM) である diethyl phthalate (DEP, NMJ CRM 4022-b, 純度 99.98 ± 0.09 w/w%, 独立行政法人 産業技術総合研究所) を使用した。重溶媒は acetone-*d*₆ (99.9 atom% D, Isotec) を用いた。

2.3 装置

核磁気共鳴装置 (NMR) はオートサンブラー付き JNM-ECA (600 MHz, 日本電子株式会社 (現: 株式会社 JEOL RESONANCE)) を使用した。qNMR 測定条件を表 2 に示す。

ウルトラマイクロ天秤は XP2U (メトラートレド株式会社) を使用した。試料の秤量値は、最小目盛 0.0001 mg まで読み取った値を用いた。なお、標準液および試料溶液の調製には、化学用体積計 (25, 50 mL メスフラスコ) または電動オートピベッ

表 1 PAH および OH-PAH の化合物情報

PAHs (和名)	(英名)	略語	分子式	構造式	分子量
アントラセン	Anthracene	—	C ₁₄ H ₁₀		178.22920
フルオランテン	Fluoranthene	—	C ₁₆ H ₁₀		202.25060
ベンゾ(a)アントラセン	Benzo(a)anthracene	—	C ₁₈ H ₁₂		228.28788
ベンゾ(b)フルオランテン	Benzo(b)fluoranthene	—	C ₂₀ H ₁₂		252.30928
ベンゾ(k)フルオランテン	Benzo(k)fluoranthene	—	C ₂₀ H ₁₂		252.30928
ベンゾ(a)ピレン	Benzo(a)pyrene	—	C ₂₀ H ₁₂		252.30928
インデノ(1,2,3-cd)ピレン	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	—	C ₂₂ H ₁₂		276.33068
ジベンゾ(a,h)アントラセン	Dibenzo(a,h)anthracene	—	C ₂₂ H ₁₄		278.34656
ベンゾ(g,h,i)ペリレン	Benzo(g,h,i)perylene	—	C ₂₂ H ₁₂		276.33068
1-ヒドロキシナフタレン	1-Hydroxy naphthalene	1-HNP	C ₁₀ H ₈ O		144.16992
2-ヒドロキシナフタレン	2-Hydroxy naphthalene	2-HNP	C ₁₀ H ₈ O		144.16992
1,3-ジヒドロキシナフタレン	1,3-Dihydroxy naphthalene	1,3-DNP	C ₁₀ H ₆ O ₂		160.16933
1,5-ジヒドロキシナフタレン	1,5-Dihydroxy naphthalene	1,5-DNP	C ₁₀ H ₆ O ₂		160.16933
1,6-ジヒドロキシナフタレン	1,6-Dihydroxy naphthalene	1,6-DNP	C ₁₀ H ₆ O ₂		160.16933
2,3-ジヒドロキシナフタレン	2,3-Dihydroxy naphthalene	2,3-DNP	C ₁₀ H ₆ O ₂		160.16933
2,6-ジヒドロキシナフタレン	2,6-Dihydroxy naphthalene	2,6-DNP	C ₁₀ H ₆ O ₂		160.16933
2,7-ジヒドロキシナフタレン	2,7-Dihydroxy naphthalene	2,7-DNP	C ₁₀ H ₆ O ₂		160.16933
4-ヒドロキシベンゾ[a]アントラセン	4-Hydroxybenzo[a]anthracene	4-HBA	C ₁₈ H ₁₂ O		244.28940

表 2 装置および測定パラメーター

装置	JNM-ECA600
プローブ	5 mm ブロードバンドオートチューンプローブ
¹³ C デカップリング	Multi pulse decoupling with Phase and Frequency switching (MPF-8)
観測範囲	- 5 ~ 15 ppm
データポイント数	64000
オートフィルター	on (8 倍)
フリップ角	90°
待ち時間	60 s (> 5 * T ₁)
積算回数	8
サンプルスピン	なし
プローブ温度	22 ~ 25℃
サンプル溶媒	アセトン- <i>d</i> ₆
qNMR 基準物質	1,4-BTMSB- <i>d</i> ₆ または HMD
窓関数	—

ター (マルチピベット Xstream (エッペンドルフ製), 1.5 mL (不確かさ ± 0.5%)) を用いた。

2.4 qNMR によるトレーサビリティの確保された定量分析

qNMR は測定対象の化合物以外の標準物質を上位標準として定量分析値を得ることが可能であり、一次標準測定法のうち、一次比率法すなわち「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測定する方法」である。本報告では、qNMR 基準物質として BTMSB もしくは HMD を用いた。qNMR による定量分析値の SI トレーサビリティの確保には、SI にトレーサブルな認証標準物質 (CRM) である DEP を一次標準として用い、qNMR 標準液中の BTMSB もしくは HMD の濃度を校正した後に、BTMSB もしくは HMD を二次標準として測定対象化合物の qNMR 測定を行う二段階方式を採用した。すなわち、BTMSB もしくは HMD を qNMR 基準物質として用いた際の測定対象化合物の定量分析値の SI トレーサビリティは、CRM の DEP を介して実現し、内部標準法の AQARI 法を応用した¹²⁻¹⁴⁾。

qNMR 用標準液には、BTMSB 約 10 mg を精密に量り取り acetone-*d*₆ 50 mL に定容したもの、または、HMD 約 100 mg を精密に量り取り acetone-*d*₆ 25 mL に定容し、acetone-*d*₆ で 5 倍希釈したものをを用いた。qNMR 用標準液中の基準物質の濃度は、DEP を内標準物質として校正した。すなわち、CRM である DEP 約 10 mg を精密に量り取り、

qNMR 用標準液 1.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管 (5 mm φ × 200 mm) に封入したものを基準物質濃度校正用試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し、DEP の CH₂ × 2 に由来するシグナル (δ 4.27 ppm) および qNMR 標準液中の基準物質の CH₃ × 6 に由来するシグナル面積、分子量、濃度等を式 (1) に代入し、qNMR 用標準液中の基準物質の濃度を校正した。

$$W_{RM} = \frac{M_{RM} \times I_{RM}}{H_{RM}} / \frac{M_{DEP} \times I_{DEP}}{H_{DEP} \times W_{DEP}} \times \frac{P_{DEP}}{100} \quad \dots (1)$$

ただし、 W_{RM} , W_{DEP} = 基準物質および DEP の濃度 (mg/mL), M_{RM} , M_{DEP} = 基準物質および DEP の分子量 (BTMSB 226.4983, HMD 146.3781 および DEP 222.2337), H_{RM} , H_{DEP} = 基準物質の CH₃ × 6 および DEP の CH₂ × 2 のプロトン数, I_{RM} , I_{DEP} = 基準物質の CH₃ × 6 および DEP の CH₂ × 2 のシグナル面積, P_{DEP} = DEP の純度 (99.98 w/w%) を示す。

2.5 qNMR による PAH および OH-PAH の純度測定

市販試薬製品を約 10 mg 精密に量り取り、予め調製した qNMR 用標準液 1.0 mL に溶解した。4-HBA は秤量が不可能であったため、試薬瓶に表記された 2.102 mg を秤量値とし、qNMR 用標準液 1.0 mL で溶解して 2.102 mg/mL とした。これらの溶液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを試料溶液とした。この試料溶液を qNMR に付し、基準

物質のシグナル強度面積、化合物に由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積、分子量、濃度等を式(2)に代入し、各シグナルより純度を算出した。この一連の操作を3試行し、得られた純度値の算術平均値 ($n = 3$) を最終的に対象化合物の純度値として表した。

$$P_{\text{target}} = \frac{I_{\text{target}}/H_{\text{target}}}{I_{\text{RM}}/H_{\text{RM}}} \times \frac{M_{\text{target}}/W_{\text{target}}}{M_{\text{RM}}/W_{\text{RM}}} \times 100 \quad \dots (2)$$

ただし、 W_{RM} 、 W_{target} = 基準物質および対象化合物の濃度 (mg/mL)、 M_{RM} 、 M_{target} = 基準物質および対象化合物の分子量 (BTMSB 226.4983, HMD 146.3781 および Table 1)、 I_{RM} 、 I_{target} = 基準物質および対象化合物の特定基のシグナル強度面積、 H_{RM} 、 H_{target} = 基準物質および対象化合物の特定基のプロトン数、 P_{target} = 対象化合物の純度 (%) を示す。

2.6 qNMR 解析処理

qNMR のケミカルシフト値は、BTMSB および HMD を基準シグナル (0 ppm) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。qNMR データ解析は、得られた Free Induction Decay (FID) 信号データを定量解析ソフトウェア (Alice2 for qNMR, 日本電子株式会社 (現: 株式会社 JEOL RESONANCE)) に導入して自動処理した。すなわち、このソフトウェ

ア上で、qNMR データをフーリエ変換および位相調整を行い、基準物質および特定シグナルの積分範囲設定等を設定後、基準物質および対象化合物の濃度、分子量、特定基のプロトン数等の化合物情報から、定量分析値 (純度 %) を式 (2) に従い算出した。

3. 結果と考察

3.1 PAH および OH-PAH の市販試薬製品の純度測定

qNMR による純度決定は 1,5-DNP を例とする (図 2)。1,5-DNP の qNMR スペクトル上に観察されたシグナル a (δ 6.84 ppm, 2H), b (δ 7.16 ppm, 2H), c (δ 7.67 ppm, 2H), d (δ 8.78 ppm, 2H) のうち、OH 基のシグナル d は重水素置換によりシグナル強度が安定しないため定量用シグナルから除外した。qNMR スペクトル上に観察される基準物質のシグナルおよび測定対象化合物 1,5-DNP に由来する定量用シグナルの面積、水素数、濃度等を関係式 (2) にそれぞれ代入し純度値を算出した。各定量用シグナルより算出された純度値の算術平均値を各試行の純度として表した。他の PAH についても同様に純度値を算出した。表 3 には、各定量用シグナルに対応するプロトン数、各シグナルのスピン-スピン結合、ケミカルシフト値および純度、各試行の純度 (各シグナルにおける純度の算術平均値)、シグナル間の相対標準偏差 (RSD)

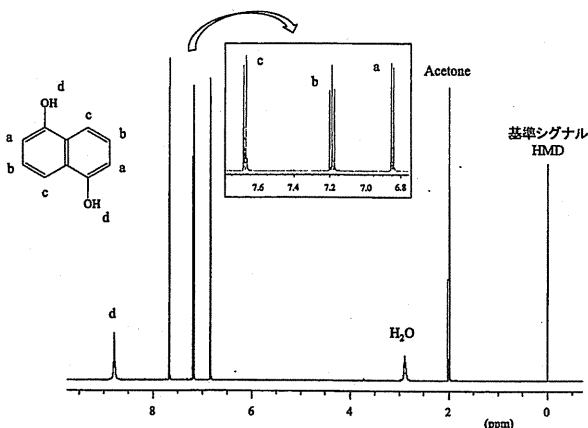


図 2 1,5-DNP の qNMR スペクトル

HMD を qNMR の内標準物質および基準シグナルとして使用した。1,5-DNP のプロトンの帰属をスペクトルおよび構造式上にアルファベットで示した。

表 3 PAH および OH-PAH の定量用シグナルの純度

PAHs	シグナル										算術平均値 (RSD %)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Anthracene	a) 4H, m b) 7.25 c) 98.6	4H, m 7.82 98.3	2H, s 8.29 98.1								98.3 (0.2)
Fluoranthene	a) 2H, m b) 7.17 c) 98.5	2H, m 7.45 99.0	2H, d 7.68 99.7	2H, m 7.79 99.4	2H, d 7.85 99.0						99.1 (0.4)
Benzo(a)anthracene	a) 2H, m b) 7.35 c) 96.2	1H, t 7.41 94.2	2H, m 7.48 94.5	1H, d 7.65 96.1	1H, d 7.69 95.0	1H, m 7.88 94.9	1H, m 7.99 95.3	1H, s 8.26 95.6	1H, d 8.73 95.5	1H, s 9.16 95.2	95.2 (0.6)
Benzo(b)fluoranthene	a) 2H, m b) 7.22 c) 99.3	1H, t 7.45 98.6	1H, t 7.50 98.0	1H, t 7.60 99.4	1H, m 7.81 99.1	3H, m 7.92 99.5	1H, s 8.23 100.0	1H, d 8.39 99.3	1H, d 8.57 98.9		99.1 (0.6)
Benzo(k)fluoranthene	a) 2H, m b) 7.29 c) 99.0	2H, t 7.50 98.3	2H, d 7.70 97.6	2H, m 7.77 98.6	2H, d 7.94 98.2	2H, s 8.26 98.0					98.3 (0.5)
Benzo(a)pyrene	a) 1H, t b) 7.59 c) 89.5	1H, t 7.64 90.6	2H, d+ 7.79 91.0	1H, d 7.85 90.7	1H, d 7.95 90.7	1H, d 8.09 89.5	1H, d 8.14 89.0	1H, d 8.19 89.6	1H, s 8.42 89.9	2H, d+d 8.96 91.6	90.2 (0.9)
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	a) 2H, t+ b) 7.25 c) 91.1	2H, t+d 7.90 88.7	1H, d 7.95 89.9	2H, d+d 8.01 89.8	2H, d+d 8.12 90.9	2H, d+d 8.30 89.2	1H, s 8.57 90.8				90.1 (1.0)
Dibenzo(a,h)anthracene	a) 2H, t b) 7.43 c) 95.6	2H, t 7.51 95.8	2H, d 7.62 95.9	2H, d 7.76 96.0	2H, d 7.85 95.9	2H, d 8.78 95.5	2H, s 9.17 95.4				95.7 (0.2)
Benzo(g,h,i)perylene	a) 2H, t b) 7.86 c) 95.0	2H, d 7.97 94.7	2H, d 8.02 95.1	2H, d 8.08 95.3	2H, s 8.25 94.6	2H, d 8.97 94.4					94.8 (0.3)
1-HNP	a) 1H, d b) 6.85 c) 101.0	1H, t 7.24 100.5	1H, d 7.32 101.0	2H, m 7.40 101.0	1H, d 7.75 101.2	1H, d 8.18 101.2					101.0 (0.2)
2-HNP	a) 1H, d b) 7.09 c) 101.6	1H, s 7.14 101.1	1H, t 7.21 101.9	1H, t 7.33 101.7	1H, d 7.61 101.6	2H, d+d 7.71 101.6					101.6 (0.2)
1,3-DNP	a) 1H, s b) 6.55 c) 98.6	1H, s 6.67 98.8	1H, t 7.15 101.3	1H, t 7.25 98.9	1H, d 7.46 98.8	1H, d 8.02 99.3					99.3 (1.0)
1,5-DNP	a) 2H, d b) 6.84 c) 96.9	2H, t 7.19 96.5	2H, d 7.67 96.4								96.6 (0.3)
1,6-DNP	a) 1H, d b) 6.63 c) 93.5	1H, d 7.02 94.1	1H, s 7.06 93.3	2H, m 7.12 93.2	1H, d 8.05 93.0						93.4 (0.4)
2,3-DNP	a) 4H, s+ b) 7.15 c) 99.9	2H, d+d 7.54 99.6									99.7 (0.2)
2,6-DNP	a) 2H, d b) 7.00 c) 97.6	2H, s 7.06 97.5	2H, d 7.50 97.5								97.5 (0.1)
2,7-DNP	a) 2H, d b) 6.08 c) 100.6	2H, s 6.93 99.7	2H, d 7.57 100.3								100.2 (0.4)
4-HBA	a) 1H, d b) 7.09 c) 94.3	1H, t 7.47 93.6	2H, m 7.52 94.7	1H, d 7.79 93.3	1H, m 8.06 95.1	1H, d 8.09 94.3	1H, m 8.17 94.5	2H, d+s 8.42 94.3	1H, s 9.29 94.1		94.3 (0.5)

a) プロトン数とスピン-スピン結合 (s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet), b) シグナルのケミカルシフト値 (ppm), c) 各シグナルの純度 (%)

を示した。qNMRでは、不純物のシグナルが測定対象の定量用シグナルに重なっている場合、そのシグナルから求めた純度値は大きくなり、結果的に各シグナルより求めた純度値のばらつき（相対標準偏差：RSD）が大きくなる。今回求めた18種PAHの測定値は、シグナル間のRSDがすべて1.0%以下と小さかったことから、各シグナルより正確に純度が求められていると考えられた。

また、各化合物の純度は、qNMR測定の前3回試行における定量結果の算術平均値±相対標準偏差（arithmetic mean ± RSD）で算出した。3回試行のRSDは最大でも1.22%であり、測定間のばらつきは小さく、精度良く純度値が求められていることが確認された。PAH製品により純度値が異なり、 $90.2 \pm 0.04 \sim 101.6 \pm 0.9\%$ （3回試行における定量結果の算術平均値±相対標準偏差：arithmetic mean ± RSD）の幅があることがわかった。qNMRより得られた各化合物の純度と試薬製品に記載されていたクロマトグラフィーを用いた面積百分率等による純度値とを比較した（表4）。18化合物中13化

合物が純度95%以上で、試薬製品に記載された純度との差はなかったが、5化合物の製品については試薬製品に記載された純度と5%以上の差があった。そのうち、qNMRにより得られた純度値が94.6%のbenzo (g,h,i) perylene、94.3%の4-HBAおよび93.4%の1,6-DNPについては、製品に純度値の記載がなかったが、仮にこれらの純度を100%として定量用標準物質の代用とし、検量線を作成し定量分析を行ったとすると、得られる定量分析値はそれぞれ5.4、5.7および6.6%の誤差として、定量結果が過大となる。

3.2 PAHの開封による品質低下

試薬のメーカー成績書記載の純度保証の有効期限は、開封前のメーカーの保証期間であり、開封後についてメーカーは保証していない。今回測定したOH-PAH製品は測定時まですべて未開封であり、且つ、純度保証の有効期限内のものである。OH-PAH製品について、qNMRによる純度値がメーカー成績書記載の純度値より低いものが観察されたことから、成績書記載の純度値を質量%純度として

文 献

- 1) 環境省 (2009) 告示「微小粒子状物質に係る環境基準について」.
- 2) International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012) Agents Classified by the IARC Monographs <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> (accessed 2013-12-19).
- 3) Yao J.J., Z.H. Huang and S. J. Masten (1998) The ozonation of benz[a]anthracene: pathway and product identification. Wat. Res., 32, 3235-3244.
- 4) Kurihara R., F. Shiraishi, N. Tanaka and S. Hashimoto (2005) Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters. Environ. Toxicol. Chem., 24, 1984-1993.
- 5) Kameda T., K. Inazu, Y. Hisamatsu, N. Takenaka and H. Bandow (2006) Isomer distribution of nitrotriphenylenes in airborne particles, diesel exhaust particles, and the products of gas-phase radical-initiated nitration of triphenylene. Atmos. Environ., 40, 7742-7751.
- 6) 岸田真男・今村 浩・亀田貴之・早川和一・坂本博 (2010) GC-MSを用いた大気中多環芳香族炭化水素酸化物の分析法開発に関する基礎検討. 環境化学, 20, 173-181.
- 7) 高橋保雄・小野寺祐夫・森田昌敏・寺尾良保 (2007) 河川水、水道水及び加熱した水道水中の多環芳香族炭化水素. 水環境学会誌, 30, 309-315.
- 8) Lintelmann J., K. Fischer and G. Matuschek (2006) Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate matter using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1113, 241-247.
- 9) Rissanen T., T. Hyötyläinen, M. Kallio, J. Kronholm, M. Kulmala and M.L. Riekkola (2006) Characterization of organic compounds in aerosol particles from a coniferous forest by GC-MS. Chemosphere, 64, 1185-1195.
- 10) Itoh N., H. Tao and T. Ibusuki (2005) Optimization of aqueous acetylation for determination of hydroxyl polycyclic aromatic hydrocarbons in water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 535, 243-250.
- 11) W. Jira (2004) A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes. Eur. Food Res. Technol., 218, 208-212.
- 12) 田原麻衣子・杉本直樹・末松孝子・有福和紀・齋

表4 PAHおよびOH-PAHの市販試薬製品のqNMRによる純度とメーカー添付文書のクロマトグラフィーを用いて算出された純度値との比較

PAHs	純度 (%)		メーカー添付文書*	
	qNMR n = 3 平均	RSD %	記載値	測定方法
Anthracene	98.6	0.54	> 99.5	GC
Fluoranthene	99.2	0.10	—	—
Benzo(a)anthracene	95.3	0.21	—	—
Benzo(b)fluoranthene	99.3	0.17	99.9	HPLC/UV
Benzo(k)fluoranthene	98.2	0.27	> 99	—
Benzo(a)pyrene	90.2	0.04	> 96	HPLC
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	91.0	0.95	96.2	HPLC/UV
Dibenzo(a,h)anthracene	96.0	0.31	97.1	HPLC/UV
Benzo(g,h,i)perylene	94.6	1.22	—	—
1-HNP	101.0	1.2	> 99.0	GC
2-HNP	101.6	0.9	> 99.0	GC
1,3-DNP	99.3	0.8	> 98.0	GC
1,5-DNP	96.6	0.6	> 98.0	GC
1,6-DNP	93.4	0.4	—	—
2,3-DNP	99.7	0.5	> 98.0	GC
2,6-DNP	97.5	1.1	—	—
2,7-DNP	100.2	0.1	> 98.0	GC
4-HBA	94.3	—	—	—

*メーカーによる添付文書記載の純度はクロマトグラムのピーク面積百分率を用いて算出

扱い、これをクロマトグラフィー等の定量用標準物質としてそのまま用いることは適切ではない場合があることが確認された。一方、今回測定したPAH製品は開封済であり、化合物の安定性は化合物毎に異なることから、保存中の変質や分解等により純度が低下した可能性は否定できない。すなわち、qNMRを用いた純度測定により、市販製品に記載された純度値と絶対量が異なることを確認し、また、開封後の品質管理が重要であることが示唆された。

我々は、計量計測トレーサビリティの確保されていない市販試薬を定量分析に用いた場合、得られた定量分析値に非常に大きなばらつきがあり、結果として、市販試薬の純度の差が定量分析値の不確かさを大きくし、研究室間精度に影響を与えていることを既に報告している¹⁰⁾。qNMRでは計量計測トレーサビリティの確保された純度値が簡便に決定できることから、市販試薬が定量用標準物質として使用できる許容範囲の純度を有するかどうかを判定する品質管理の目的にも有用であると考えられる。

4. ま と め

本研究では、PAHの市販試薬製品に対し、SIにトレーサブルな定量分析法 qNMR の一つであるAQARI法により、18種の市販試薬製品の純度値を決定した。その結果、各市販試薬製品の純度は $90.2 \pm 0.04 \sim 101.6 \pm 0.9\%$ (arithmetic mean ± RSD)であった。メーカー成績書記載の純度値は計量計測トレーサビリティが確保されていないため精確でない場合があり、質量%純度とし定量用標準物質として扱うことは適切ではないこと、さらに市販試薬製品の開封後の品質管理が定量分析値の精度に影響を及ぼす可能性が高いことが示唆された。現在、本手法のqNMRは標準物質供給システムとして国内外の研究機関および試薬会社より注目され、同様な方法が市販試薬製品に対して応用され始めている。したがって、このように計量計測トレーサビリティの確保された純度が精確な標準物質が普及し、これらを使用していくことで、環境中の化学物質の自動モニタリングにおける定量分析値の信頼性が向上すると考えられる。

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「政策創薬マツチング研究事業」の一部を含むものである。

- 藤 岡・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 (2009) qNMR に基づく有機リン系農薬
イソキサチオンオキシソンの品質管理. 日本食品化
学学会誌, 16, 28-33.
- 13) 杉本直樹・多田敦子・末松孝子・有福和紀 (2010)
定量 NMR を用いた有機化合物の絶対定量法の
開発と食品分析の信頼性の確保. FFI ジャーナル,
215, 129-136.
- 14) 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 (2012) 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.
- 15) 田原麻衣子・中島晋也・杉本直樹・有蘭幸司・西
村哲治 (2012) 水道水質試験の標準液調製におけ
る不確かさと定量精度に影響を及ぼす要因. 水道
協会雑誌, 81 (5), 10-16.

Application of Quantitative Nuclear Magnetic Resonance to Determine the Purities of Analytical Standards of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Maiko TAHARA, Naoki SUGIMOTO, Takashi OHTSUKI, Atsuko TADA,
Hiroshi AKIYAMA, Yukihiro GODA and Yoshiaki IKARASHI

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

Abstract

The absolute value of substance should be determined with traceability to International System of Units (SI units). However, it is very difficult to provide and/or obtain the analytical standards with the purity certifications because miscellaneous chemicals are targeted in the environmental assessments. In fact, the most of commercial reagents of standards are labeled relative values on manufacturer's own approaches without traceability to SI units. This missing traceability causes a problem that quantitative values using chromatography are not robust because of getting only relative value against its analytical standards. In this study, to find a solution to this problem, we targeted determination of the purities of commercial reagents of environmental pollutant polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) which are used generally as the analytical standards. 18 kinds of PAH and hydroxyl PAH (OH-PAH) were measured the reliable purity by using AQARI (Accurate quantitative NMR with internal reference substance) method which is a traceable quantitative technique. The purities were distributed from 94.6 ± 1.2 to 101.6 ± 0.9 % (arithmetic mean $\pm$ RSD).

Key Words: Polycyclic aromatic hydrocarbons, qNMR, purity, standard material

Applicability of the DPPH Assay for Evaluating the Antioxidant Capacity of Food Additives – Inter-laboratory Evaluation Study –

Tomoko SHIMAMURA,^{*1†} Yoshihiro SUMIKURA,^{*1} Takeshi YAMAZAKI,^{*2,*3} Atsuko TADA,^{*2}
Takehiro KASHIWAGI,^{*1} Hiroya ISHIKAWA,^{*4} Toshiro MATSUI,^{*5} Naoki SUGIMOTO,^{*2}
Hiroschi AKIYAMA,^{*2} and Hiroyuki UKEDA^{*1}

^{*1} Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe B-200, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

^{*2} National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

^{*3} Faculty of Human Life Sciences, Jissen Women's University, 4-1-1 Osakaue, Hino, Tokyo 191-8510, Japan

^{*4} International College of Arts and Sciences, Fukuoka Women's University, 1-1-1 Kasunigaoka, Higashi,
Fukuoka 813-8529, Japan

^{*5} Faculty of Agriculture, Graduated School of Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi,
Fukuoka 812-8581, Japan

An inter-laboratory evaluation study was conducted in order to evaluate the antioxidant capacity of food additives by using a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Four antioxidants used as existing food additives (*i.e.*, tea extract, grape seed extract, enju extract, and *d*- α -tocopherol) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were used as analytical samples, and 14 laboratories participated in this study. The repeatability relative standard deviation (RSD_r) of the IC₅₀ of Trolox, four antioxidants, and the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) were 1.8–2.2%, 2.2–2.9%, and 2.1–2.5%, respectively. Thus, the proposed DPPH assay showed good performance within the same laboratory. The reproducibility relative standard deviation (RSD_R) of IC₅₀ of Trolox, four antioxidants, and TEAC were 4.0–7.9%, 6.0–11%, and 3.7–9.3%, respectively. The RSD_r/RSD_R values of TEAC were lower than, or nearly equal to, those of IC₅₀ of the four antioxidants, suggesting that the use of TEAC was effective for reducing the variance among the laboratories. These results showed that the proposed DPPH assay could be used as a standard method to evaluate the antioxidant capacity of food additives.

Keywords DPPH assay, inter-laboratory study, antioxidant, food additive

(Received April 22, 2014; Accepted May 23, 2014; Published July 10, 2014)

Introduction

In Japan, antioxidants are widely used as food additives in order to prevent oxidative rancidity and oxidative discoloration of fat and oil in food. Because the oxidative degradation of food constituents reduces the value of food, and ingestion of peroxides may have hazardous effects on the human body, antioxidants play an important role. Quality evaluation of antioxidants is crucial.¹

The antioxidants commercially used in Japan are classified into designated additives or existing food additives. For designated additives, ingredient standards are established after their safety and availability have been validated. On the other hand, the use of existing food additives has been approved as a transitional measure since the revision of the Food Sanitation Act in 1995. Many existing food additives are complicated mixtures originating in nature, and the standards used as the index of known antioxidative compounds and/or compositions of these compounds need to be established.² To establish the

standards for existing additives, verification of composition, identification of active compounds, and development of quantitative methods have been reported.^{3–4} However, it is often difficult to identify all the active compounds found in existing food additives. Thus, for antioxidants such as existing food additives, which do not have standards based on known antioxidant compounds, it seems to be necessary to propose a standard based on their antioxidant capacities to ensure quality.

In a previous report,⁵ the candidates of standard methods for evaluating the antioxidant capacity of existing food additives were selected for the following reasons: (i) they have been widely applied in past studies, (ii) they can be performed within a short time, (iii) they are commonly-used spectrophotometric assays. Consequently, we selected the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay and the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay among the methods used to measure the radical scavenging activity. In addition, the 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-1) assay was chosen among the methods used to measure the active oxygen species scavenging activity. In a small-scale collaborative study conducted at three laboratories,⁶ nine antioxidants (*i.e.*, catechin, quercetin, sesamol, ferulic acid, gallic acid, morin, ellagic acid,

d- α -tocopherol, and *d*- δ -tocopherol) were evaluated using the above-mentioned assays. The protocol of the DPPH assay was then improved based on the results of the small-scale collaborative study. Herein, the antioxidative activities of five analytical samples, four antioxidants used as existing food additives (*i.e.*, tea extract, grape seed extract, enju extract and *d*- α -tocopherol), and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were evaluated using the DPPH assay based on the improved protocol at fourteen laboratories. Thereafter, we investigated the validity of this assay as a standard method.

Experimental

Participating laboratories

This inter-laboratory evaluation study was conducted according to an international harmonized protocol.⁶ The fourteen laboratories that participated in this study was as follows: Food Analysis Technology Center SUNATEC; International College of Arts and Sciences, Fukuoka Women's University; Mycotoxin Research Association; Japan Food Research Laboratories; Faculty of Agriculture, Graduated School of Kyushu University; Japan Inspection Association of Food and Food Industry Environment; Japan Frozen Foods Inspection Corporation; College of Pharmacy, Kinjo Gakuin University; Faculty of Agriculture, Kochi University; Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University; Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences; College of Bioresources Science, Nihon University; Shin Nihon Kentei Kyokai; Tokyo Kenbikyoin Foundation. These laboratories were indicated as A to N in a random order. The analytical procedure listing the methods for preparing reagents and analytical samples, measuring, and the handling of data was distributed to the participating laboratories.

Analytical samples

Tea extract (main component: catechin), grape seed extract (main component: proanthocyanidin), enju extract (Japanese Pagoda Tree extract; main component: rutin), and *d*- α -tocopherol were obtained from the Japan Food Additive Association. One gram of the food additive sample from the same lot was distributed to each laboratory. The water solubility of active compounds in tea extract and grape seed extract is relatively high, and that in enju extract and *d*- α -tocopherol is relatively low. Based on the results of a preliminary experiment, tea extract and grape seed extract, which belonged to the class of high antioxidant capacity, enju extract, which belonged to the class of medium activity, and *d*- α -tocopherol, which belonged to the class of low activity, were selected as analytical samples among the various antioxidants of existing food additives.

Trolox of the same lot was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and distributed to each laboratory without opening. The method used for storing analytical samples was detailed in the analytical procedure.

DPPH radical scavenging assay

In this study, the DPPH assay was conducted according to the following procedure. DPPH (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) of the same lot was distributed to the participating laboratories. The methods for preparing each reagent were detailed in the analytical procedures. To prevent the influence of static electricity during the weighing of a reagent, a static electricity remover (EST-M, Ishiyama Seisakusyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) was distributed to the participating laboratories.

(1) Preparing DPPH solution

DPPH (7.89 mg) was weighed on a chemical balance with a minimum weighing limit of 10 μ g or smaller. Thereafter, it was dissolved in 99.5% ethanol to obtain a constant volume by filling 100 mL of a measuring flask or a measuring cylinder with a stopper (0.2 mM DPPH). The absorbance of a DPPH solution is empirically known to decrease with time until approximately 1 h after preparation. Therefore, it was kept in the dark for 2 h until the absorbance stabilized. After 2 h, 1 mL of the DPPH solution was added into a test tube or sampling tube, and then 200 μ L of ethanol and 800 μ L of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) were added. After mixing, the absorbance at 517 nm was measured. A mixed solution containing 1.2 mL of ethanol and 800 μ L of Tris-HCl buffer was used as the blank. When the absorbance was in a range of 1.00 ± 0.05 , the prepared DPPH solution was used directly for the measurements; when the absorbance exceeded 1.05, ethanol was added to dilute the solution to be within a range of 1.00 ± 0.05 . Afterwards, the solution was used for the measurements. The DPPH solution was stored in the dark at room temperature during the assay, and used up on the day of preparation.

(2) DPPH assay procedure

After 200 μ L of an analytical sample solution and 800 μ L of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) were added into a test tube or sampling tube, 1 mL of the DPPH solution was added. Immediately, the solution was mixed with a test tube mixer for 10 s. Thereafter, it was left at room temperature in the dark. Exactly 30 min after the addition of the DPPH solution, the absorbance of the solution at 517 nm was measured. A mixed solution of 1.2 mL of ethanol and 800 μ L of Tris-HCl buffer was used as the blank.

The absorbance at the addition of the analytical sample was expressed as *A*_s, the absorbance at the addition of ethanol instead of the sample as *A*_c, and the inhibition ratio (%) was obtained from the following equation:

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = \{(A_c - A_s)/A_c\} \times 100.$$

In the analytical procedure distributed, the measurements at six points of concentration, including control, were required. The measurement of the DPPH radical scavenging activity for the analytical sample solution at each concentration was repeated three times.

(3) Calculation of IC₅₀

The IC₅₀ of each analytical sample was calculated according to the following procedure:

(1) Inhibition ratios (*y*) were plotted against the sample concentrations (*x*) at all six points, and the respective regression line (*y* = *ax* + *b*) was drawn.

The regression line was not required to pass through the origin. In this step, we verified that all of the measurement points were basically on the regression line. In addition, it was also verified that two points at around the 50% inhibition did not have a deviation from the regression line. In fact, because the inhibition curve is not completely straight, but slightly curved, we decided to calculate the IC₅₀ value using the interpolation method by joining the two points around the 50% inhibition with a straight line as follows:

(2) Two points enclosing a 50% inhibition ratio were selected, and a regression line (*Y* = *AX* + *B*) was drawn. The regression line was not required to pass through the origin.

(3) *X* (sample concentration) was calculated, when *Y* in the regression equation of (2) was substituted with 50.

[†] To whom correspondence should be addressed.
E-mail: tomokos@kochi-u.ac.jp

Table 1 IC₅₀ of antioxidants used as existing food additives determined using the DPPH assay in the inter-laboratory study

Laboratory	IC ₅₀ /μg mL ⁻¹ a			
	tea extract	grape seed extract	enju extract	d-α-tocopherol
A	27.0 ± 0.4	38.0 ± 0.8	76.6 ± 0.4	141 ± 1.7
B	25.2 ± 0.3	33.7 ± 1.8	75.6 ± 0.2	139 ± 5.4
C	25.7 ± 1.0	33.5 ± 0.7	73.9 ± 1.5	133 ± 3.5
D	29.4 ± 0.2	32.7 ± 0.2	77.6 ± 1.0	137 ± 0.8
E	24.2 ± 0.4	31.1 ± 0.3	77.8 ± 0.9	133 ± 0.9
F	30.8 ± 1.7	36.1 ± 0.8	77.8 ± 3.0	142 ± 3.0
G	25.3 ± 0.8	33.4 ± 1.1	74.1 ± 0.5	128 ± 1.7
H	24.4 ± 0.03	33.5 ± 0	74.9 ± 0.1	134 ± 0
I	26.2 ± 0.6	32.9 ± 0.9	78.2 ± 0.5	143 ± 0.8
J	20.7 ± 1.4	31.4 ± 0.4	74.6 ± 2.0	148 ± 6.4
K	25.3 ± 0.1	37.5 ± 1.4	76.4 ± 4.5	150 ± 3.1
L	27.5 ± 0.4	35.9 ± 0.6	92.1 ± 1.2	137 ± 1.6
M	25.7 ± 0.8	34.4 ± 0.9	75.3 ± 3.7	130 ± 4.1
N	26.3 ± 0.5	31.5 ± 0.5	74.3 ± 1.4	135 ± 1.7

a. Mean ± S.D. (n = 3).

(4) The average value of (3) obtained at each of the three repetitive measurements was calculated. This value was set as the IC₅₀ (μg mL⁻¹) value of each analytical sample.

(4) Calculation of Trolox equivalent antioxidant capacity

The DPPH radical scavenging activity of each analytical sample was expressed as the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). TEAC was calculated as follows:

$$\text{TEAC} = \text{IC}_{50} \text{ of Trolox } (\mu\text{g mL}^{-1}) / \text{IC}_{50} \text{ of sample } (\mu\text{g mL}^{-1}).$$

The higher TEAC value means the higher DPPH radical scavenging activity. In this study, the values of the IC₅₀ of an analytical sample and IC₅₀ of Trolox, measured on the same day, were used to obtain the TEAC.

Statistical Analyses

Statistical analyses of the collected data were conducted as follows:⁶ outlier detection was conducted using the Cochran's test, single-Grubbs' test, and paired-Grubbs' test. The Cochran's test was used to identify the outlying variance. The single and paired-Grubbs' tests were used to identify the outlying value from the averages. Based on the result of each test, the outliers were rejected. An analysis of the variance was then conducted for each analytical sample so as to calculate the repeatability standard deviation (S_r), reproducibility standard deviation (S_R), repeatability relative standard deviation (RSD_r), reproducibility relative standard deviation (RSD_R), and RSD ratio (RSD_R/RSD_r). Microsoft Office Excel 2010 was used for data analysis.

Results

Values reported by the participating laboratories

Tables 1 and 2 show the IC₅₀ of the antioxidants (μg mL⁻¹) and the IC₅₀ of Trolox (μg mL⁻¹), respectively, which were reported by the fourteen laboratories. In this study, one antioxidant and Trolox were measured on the same day, and the TEAC of each antioxidant was calculated based on the IC₅₀ of Trolox obtained on the same day. Therefore, as shown in Table 2, Trolox measured on each day was dealt as an

Table 2 IC₅₀ of Trolox determined using the DPPH assay in the inter-laboratory study

Laboratory	IC ₅₀ /μg mL ⁻¹ a			
	tea extract	grape seed extract	enju extract	d-α-tocopherol
A	64.2 ± 0.8	64.3 ± 0.7	64.6 ± 1.0	61.3 ± 1.2
B	57.9 ± 2.0	61.9 ± 2.4	61.4 ± 2.2	63.0 ± 1.9
C	62.9 ± 1.1	60.8 ± 1.4	59.8 ± 1.1	58.6 ± 1.6
D	65.9 ± 0.08	61.8 ± 0.5	63.5 ± 0.5	62.7 ± 0.3
E	56.7 ± 0.2	57.6 ± 0.2	61.5 ± 0.7	61.8 ± 0.8
F	61.2 ± 1.1	65.2 ± 1.4	62.7 ± 0.5	65.1 ± 1.2
G	59.1 ± 1.8	59.1 ± 1.9	59.3 ± 1.8	58.5 ± 0.7
H	56.4 ± 0.1	58.1 ± 0.1	58.5 ± 0.1	60.5 ± 0.1
I	62.9 ± 0.5	61.2 ± 1.0	63.1 ± 0.4	61.9 ± 0.7
J	55.9 ± 1.2	55.5 ± 1.3	61.2 ± 0.4	64.4 ± 2.0
K	61.5 ± 2.8	50.6 ± 1.3	61.0 ± 1.8	63.0 ± 1.7
L	64.1 ± 0.8	62.9 ± 1.2	70.1 ± 1.0	61.5 ± 0.6
M	58.8 ± 1.8	61.4 ± 1.8	57.6 ± 3.4	58.3 ± 1.6
N	59.1 ± 1.3	58.0 ± 0.3	59.3 ± 0.3	61.9 ± 0.3

a. Mean ± S.D. (n = 3).

Table 3 TEAC of antioxidants used as existing food additives determined using the DPPH assay in the inter-laboratory study

Laboratory	TEAC ^a			
	tea extract	grape seed extract	enju extract	d-α-tocopherol
A	2.38 ± 0.04	1.69 ± 0.04	0.84 ± 0.004	0.44 ± 0.005
B	2.30 ± 0.03	1.84 ± 0.10	0.81 ± 0.002	0.45 ± 0.02
C	2.45 ± 0.10	1.82 ± 0.04	0.81 ± 0.02	0.44 ± 0.01
D	2.24 ± 0.01	1.89 ± 0.009	0.82 ± 0.01	0.46 ± 0.003
E	2.34 ± 0.04	1.85 ± 0.02	0.79 ± 0.009	0.47 ± 0.003
F	1.99 ± 0.11	1.81 ± 0.04	0.81 ± 0.03	0.46 ± 0.01
G	2.34 ± 0.07	1.77 ± 0.06	0.80 ± 0.006	0.46 ± 0.006
H	2.32 ± 0.003	1.73 ± 0	0.78 ± 0.001	0.45 ± 0
I	2.40 ± 0.06	1.86 ± 0.05	0.81 ± 0.005	0.43 ± 0.003
J	2.71 ± 0.18	1.77 ± 0.03	0.82 ± 0.02	0.44 ± 0.02
K	2.44 ± 0.008	1.35 ± 0.05	0.80 ± 0.05	0.42 ± 0.008
L	2.33 ± 0.03	1.76 ± 0.03	0.76 ± 0.01	0.45 ± 0.005
M	2.29 ± 0.07	1.79 ± 0.05	0.77 ± 0.04	0.45 ± 0.01
N	2.25 ± 0.04	1.85 ± 0.03	0.80 ± 0.02	0.46 ± 0.006

a. Mean ± S.D. (n = 3).

independent data point for statistical analysis. Table 3 gives the TEAC calculated from the values appearing in Tables 1 and 2.

Results of inter-laboratory study

Tables 4 and 5 show the results of an inter-laboratory study on the IC₅₀ of the antioxidants used as existing food additives and the IC₅₀ of Trolox, respectively. Table 6 gives the results of the inter-laboratory study on TEAC.

(1) IC₅₀ of the antioxidants used as existing food additives

In the results on the IC₅₀ of tea extract, grape seed extract, enju extract and d-α-tocopherol (Table 4), the result of enju extract measured by Laboratory L was determined as an outlier by a single-Grubbs' test. The reason was that the average of IC₅₀ at Laboratory L was largest among all of the laboratories (Table 1), because the decrease ratio of the absorbance due to

Table 4 Inter-laboratory study results for IC₅₀ of antioxidants used as existing food additives

	tea extract	grape seed extract	enju extract	d-α-tocopherol
Number of laboratories	14 (0)	14 (0)	13 (1) ^a	14 (0)
Grand mean/μg mL ⁻¹	26.0	34.0	75.9	138
Repeatability standard deviation (S _r)	0.76	0.88	2.02	3.05
Repeatability relative standard deviation (RSD _r , %)	2.9	2.6	2.7	2.2
Reproducibility standard deviation (S _R)	2.96	2.76	2.38	8.27
Reproducibility relative standard deviation (RSD _R , %)	11	8.1	3.1	6.0
RSD _R /RSD _r	3.9	3.1	1.2	2.7

a. Laboratory L was determined as outlier.

Table 5 Inter-laboratory study results for IC₅₀ of Trolox

	Trolox			
	tea extract	grape seed extract	enju extract	d-α-tocopherol
Number of laboratories	14 (0)	14 (0)	12 (2) ^a	14 (0)
Grand mean/μg mL ⁻¹	60.5	59.9	61.3	61.6
Repeatability standard deviation (S _r)	1.34	1.30	1.11	1.21
Repeatability relative standard deviation (RSD _r , %)	2.2	2.2	1.8	2.0
Reproducibility standard deviation (S _R)	4.05	4.74	2.43	2.70
Reproducibility relative standard deviation (RSD _R , %)	6.7	7.9	4.0	4.4
RSD _R /RSD _r	3.0	3.6	2.2	2.2

a. Laboratory L and M were determined as outliers.

Table 6 Inter-laboratory study results for TEAC of antioxidants used as existing food additives

	tea extract	grape seed extract	enju extract	d-α-tocopherol
Number of laboratories	12 (2) ^a	14 (0)	14 (0)	14 (0)
Grand mean	2.34	1.77	0.80	0.45
Repeatability standard deviation (S _r)	0.05	0.04	0.02	0.01
Repeatability relative standard deviation (RSD _r , %)	2.1	2.5	2.5	2.3
Reproducibility standard deviation (S _R)	0.09	0.17	0.03	0.02
Reproducibility relative standard deviation (RSD _R , %)	3.8	9.3	3.8	3.7
RSD _R /RSD _r	1.8	3.8	1.5	1.6

a. Laboratory F and J were determined as outliers.

the addition of an analytical sample at Laboratory L was quite smaller than those at other laboratories on that day.

The RSD_r of IC₅₀ of the four antioxidants was 2.2 - 2.9%, and RSD_R was 3.1 - 11%.

(2) IC₅₀ of Trolox

The results of Trolox evaluated on the same day as enju extract at Laboratories L and M were determined as outliers by a single-Grubbs' test and Cochran's test, respectively (Table 5). In the case of Laboratory L, the reason for such a result was that its average IC₅₀ was largest among all of the laboratories, because the decrease ratio of the absorbance due to the addition of an analytical sample at Laboratory L was quite smaller than those at other laboratories on that day. In the case of Laboratory M, the reason was that the variance of the results of the three repetitive measurements was determined to be larger than those at other laboratories.

The RSD_r of IC₅₀ of Trolox was 1.8 - 2.2%, and RSD_R was 4.0 - 7.9%.

(3) TEAC

The results of the TEAC of tea extract evaluated at Laboratory F and J were determined as outliers by single-Grubbs' test and Cochran's test, respectively (Table 6). In the case of Laboratory

F, the reason was that the average TEAC was smallest among all of the laboratories. This was caused by the fact that the IC₅₀ of Trolox was an average value, whereas IC₅₀ of tea extract measured on the same day was the largest among all of the laboratories. In the case of Laboratory J, the reason was that the variance of the results of three repetitive measurements was larger than those at other laboratories. This was caused by the fact that the variance of the IC₅₀ of tea extract was relatively larger. On the other hand, the TEAC of enju extract measured at Laboratory L, where both IC₅₀ of enju extract and IC₅₀ of Trolox on the same day were determined as outliers, did not result in an outlier. The reason seems to be that both IC₅₀ of enju extract and Trolox were higher than those at other laboratories, which compensated in the conversion to the TEAC. The RSD_r of TEAC was 2.1 - 2.5%, and RSD_R was 3.7 - 9.3%.

Discussion

The RSD_r of both IC₅₀ and TEAC was smaller than 3.0%, which showed that the proposed DPPH assay had a high repeatability within the same laboratory. In general, the RSD ratio of a chemical analysis is expected to be 1.5 - 2.⁷ Although most of the RSD ratios were larger than 2 for the results of IC₅₀ (Tables 4

and 5), the RSD ratios of tea extract, enju extract, and *d*- α -tocopherol were smaller than 2 concerning the result of TEAC (Table 6). This result suggests that the use of the TEAC, a value calculated from the IC₅₀ of the antioxidant and IC₅₀ of Trolox measured on the same day, was effective for reducing the inter-laboratory differences by compensating for the variations.

Although many inter-laboratory evaluation studies on standard methods for food components have been conducted, there are few reports on a large-scale evaluation study on antioxidant capacity assays.⁸ In the case of the inter-laboratory collaborative study on improved Hydrophilic Oxygen Radical Absorbance Capacity (H-ORAC) assay, in which 14 laboratories participated, and (+)-catechin, ferulic acid, caffeine acid, hesperetin, Trolox, and five kinds of food (*i.e.*, cabbage, onion, apple, Satsuma orange, and eggplant) were used as analytical samples, it was reported that the RSD_r of the H-ORAC value ($\mu\text{mol Trolox/L}$) was 4.6 – 19%, and the RSD_R was 7.0 – 21%.⁹ As the result of evaluating further improved H-ORAC assay at five laboratories using similar samples, it was reported that the RSD_r was 1.8 – 9.4%, and the RSD_R was 4.4 – 14%.⁹ An inter-laboratory collaborative study on the DPPH assay for 11 kinds of food and beverages at nine laboratories was also reported.¹⁰ In the DPPH assay used in the previous report,¹⁰ the DPPH concentration was 0.1 mM, the volume of the reaction solution was approximately 50 mL, the reaction time was 4 h, and the reaction temperature was 35°C; those reaction conditions were largely different from those used in this study. As a result, it was reported that the RSD_r of the antioxidant capacity ($\mu\text{mol Trolox/100 g}$) was 1.1 – 25%, and RSD_R was 5.3 – 59%.¹⁰ Since the measurement principle of the DPPH assay was different from that of the ORAC assay, and the procedure and nature of the analytical samples in the DPPH assay used in the previous report were largely different from those in our study, the results of the two studies cannot be directly compared. However, the repeatability and reproducibility obtained in our study was found to be higher than those in the previous two reports.^{9,10}

Herein, the absorbance was measured with spectrophotometers owned by the laboratories. Therefore, the equipment type was not unified. Although one of the laboratories used a shipper unit to measure the absorbance, neither the difference in types of spectrophotometers nor the difference in absorbance measuring methods had any influence on the results of this study. Therefore, the proposed DPPH assay had robustness not to be affected by types of the spectrophotometer.

As mentioned above, we selected antioxidants having different water solubility and antioxidant capacity based on the results of a preliminary experiment. The inter-laboratory evaluation revealed that the difference in the water solubility and antioxidant

capacity of antioxidative compounds did not have a large influence on the precision of the proposed DPPH assay. Therefore, the proposed DPPH assay is applicable for evaluating the antioxidant capacity of a wide range of antioxidants.

Based on the above reasons, we concluded that the protocol of the DPPH assay used in this study is applicable as a standard method to evaluate the antioxidant capacity of antioxidants used as existing food additives. From now on, the antioxidative capacities of other existing food additives will be continuously collected to establish standard values for individual antioxidants based on their antioxidant capacities.

Acknowledgements

We expressed our deepest appreciation to all of the participating laboratories in this study. This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Welfare and Labour of Japan.

References

1. H.-D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle, “*Food Chemistry*”, 4th ed., **2009**, Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, 187.
2. K. Sato, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **2010**, *51*, 331.
3. T. Yoshida, K. Terasaka, S. Kato, F. Bai, N. Sugimoto, H. Akiyama, T. Yamazaki, and H. Mizukami, *Chem. Pharm. Bull.*, **2013**, *61*, 1264.
4. K. Ishizuki, A. Tada, N. Sugimoto, K. Matsumoto, H. Ukeda, H. Matsufuji, T. Yamazaki, and Y. Kawamura, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **2010**, *17*, 192.
5. T. Shimamura, R. Matsuura, T. Tokuda, N. Sugimoto, T. Yamazaki, H. Matsufuji, T. Matsui, K. Matsumoto, and H. Ukeda, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **2007**, *54*, 482.
6. W. Horwitz, *Pure Appl. Chem.*, **1995**, *67*, 331.
7. W. Horwitz, L. R. Kamps, and K. W. Boyer, *J. AOAC Int.*, **1980**, *63*, 1344.
8. A. Hakoda, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **2010**, *57*, 134.
9. J. Watanabe, T. Oki, J. Takebayashi, K. Yamasaki, Y. Takano-Ishikawa, A. Hino, and A. Yasui, *Anal. Sci.*, **2012**, *28*, 159.
10. D. W. Plank, J. Szpylka, H. Sapirstein, D. Woollard, C. M. Zapf, V. Lee, C. Y. Chen, R. H. Liu, R. Tsao, A. Dusterloh, and S. Baugh, *J. AOAC Int.*, **2012**, *95*, 1562.

ORIGINAL RESEARCH

Method for the determination of natural ester-type gum bases used as food additives via direct analysis of their constituent wax esters using high-temperature GC/MS

Atsuko Tada¹, Kyoko Ishizuki¹, Takeshi Yamazaki², Naoki Sugimoto¹ & Hiroshi Akiyama¹

¹National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

²Jissen Women's University, Hino, Japan

Keywords

Food additive, gum base, high-temperature GC/MS, wax ester

Correspondence

Atsuko Tada, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan.
Tel: +81 3 3700 1141; Fax: +81 3 3700 9409;
E-mail: atada@nihs.go.jp

Funding Information

This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Welfare and Labor of Japan.

Received: 6 January 2014; Revised: 2 April 2014; Accepted: 6 April 2014

Food Science & Nutrition 2014; 2(4): 417–425

doi: 10.1002/fsn3.117

Introduction

Natural ester-type gum bases are used worldwide as food additives to provide, for example, specific textures to chewing gums and surface coatings for chocolates and fruits. There are various kinds of natural ester-type gum bases, and each is comprised of a characteristic mixture of wax esters composed of a specific combination of long-chain fatty acids and long-chain fatty alcohols, and thus they each have different properties with respect to their elasticity and flexibility. To assess the safety of these ester-type gum bases and to appropriately manage their quality control, it is necessary to establish their specifications.

Specifications for some ester-type gum bases such as beeswax, candelilla wax, and carnauba wax have been adopted by the Joint FAO/WHO Expert Committee on

Abstract

Natural ester-type gum bases, which are used worldwide as food additives, mainly consist of wax esters composed of long-chain fatty acids and long-chain fatty alcohols. There are many varieties of ester-type gum bases, and thus a useful method for their discrimination is needed in order to establish official specifications and manage their quality control. Herein is reported a rapid and simple method for the analysis of different ester-type gum bases used as food additives by high-temperature gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). With this method, the constituent wax esters in ester-type gum bases can be detected without hydrolysis and derivatization. The method was applied to the determination of 10 types of gum bases, including beeswax, carnauba wax, lanolin, and jojoba wax, and it was demonstrated that the gum bases derived from identical origins have specific and characteristic total ion chromatogram (TIC) patterns and ester compositions. Food additive gum bases were thus distinguished from one another based on their TIC patterns and then more clearly discriminated using simultaneous monitoring of the fragment ions corresponding to the fatty acid moieties of the individual molecular species of the wax esters. This direct high-temperature GC/MS method was shown to be very useful for the rapid and simple discrimination of varieties of ester-type gum bases used as food additives.

Food Additives (JECFA; FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations; WHO: World Health Organization), the EU, and the USA. In Japan, the use of many varieties of ester-type gum bases as natural food additives is allowed. However, for the most ester-type gum bases, there is no specification in the Japanese food additive regulation. To establish official specifications for these ester-type gum bases, a simple analytical method for confirmation and discrimination of the different ester-type gum bases is required. We previously reported (Tada et al. 2007) an analytical method for 10 types of food additive gum bases such as lanolin, beeswax, and jojoba wax using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) following hydrolysis and derivatization of the wax esters. Using the method, major constitutive fatty acids and alcohols of the food additive gum bases were identified,

Direct GC/MS Method for Food Additive Gum Bases

A. Tada et al.

and it was clarified that each ester-type gum base has a characteristic composition of these constituent fatty acids and alcohols. However, this is a time-consuming and complicated procedure. In addition, it does not provide information on the composition of the wax ester species in the gum bases or the combination of fatty acids and fatty alcohols in each wax ester.

Several direct analytical methods for wax esters have been reported (Moldovan et al. 2002a; Regert et al. 2006; Stránský et al. 2006; Fitzgerald and Murphy 2007; Vrkošlav et al. 2010, 2011; Zhang et al. 2010). However, GC/MS methods using conventional temperatures (Stránský et al. 2006; Fitzgerald and Murphy 2007; Zhang et al. 2010) can be applied only for wax esters with carbon numbers of ~40 and are not suitable for the detection of wax esters with carbon numbers of 50–60. Because the volatilities of long-chain wax esters are extremely low, they are not sufficiently detectable via GC using conventional column temperatures, which are typically less than 330°C. Although liquid chromatography/atmospheric-pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC/APCI-MS) and LC/APCI-MS/MS methods (Vrkošlav et al. 2010, 2011) have been applied for the detection of wax esters with carbon numbers of 52 and 54 and are more suitable for the detection of unstable highly unsaturated wax esters (Vrkošlav et al. 2010), these methods take longer than 100 min for the detection of wax esters with carbon numbers greater than 52. Furthermore, some direct high-temperature GC/MS for the detection of wax esters have been reported (Moldovan et al. 2002a; Regert et al. 2006; Vrkošlav et al. 2010), but the target materials for these analyses were mainly wax ester standards or sculptures. To the best of our knowledge, development of a direct GC/MS method for the determination of many varieties of gum bases used as food additives has not yet been achieved.

Therefore, we developed a high-temperature GC/MS method for the discrimination and identification of ester-type gum bases used as food additives via direct detection of the wax esters. With this method, the wax esters in gum bases can be directly analyzed with simultaneous identification of the constituent fatty acids of each wax ester using the MS spectrum of each ester peak.

Materials and Methods

Samples

Samples of nine types of natural gum bases used as food additives (one sample each of lanolin [LA-1], beeswax [BE-1], jojoba wax [JO-1], candelilla wax [CA-1], shellac wax [SH-1], carnauba wax [CR-1], rice bran wax [RI-1], and Japan wax [JA-1] and two samples of urushi wax [UR-1 and UR-2]), along with montan wax (MO-1), which was

listed as a type of food additive in Japan up to May 2011, were obtained through the Japan Food Additives Association. Additional experimental reagents corresponding to the above food additives were purchased as follows: l. Lanolin anhydrous (MP Biomedical, LLC, Santa Ana, CA) (LA-2), lanolin (Alfa Aesar Co. Ltd., Ward Hill, MA) (LA-3), beeswax (white pellets, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) (BE-2), beeswax (yellow pellets, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), beeswax (yellow, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) (BE-3), beeswax (white, Nacalai Tesque, Inc.) (BE-4), carnauba wax (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (CR-2), carnauba wax yellow (Acros Organics [part of Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium]) (CR-3), Jojoba oil (JO-2), two candelilla wax samples (CA-2 and CA-3), rice bran wax (RI-2), Japan wax (for cosmetics) (JA-2), Japan wax (unbleached) (JA-3), and Japan wax (bleached) (JA-4) were purchased from Japanese online shops.

Standards for GC/MS analysis

Fatty acid methyl ester standards: An oil reference standard (containing various types of fatty acid methyl esters) (Supelco, Bellefonte, PA), methyl 16-methylhepta-decanoate, methyl 12-hydroxystearate, and DL- α -hydroxystearic acid methyl ester were purchased from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO. Methyl lignoleate (18:3) (Fluka, Buchs, Switzerland) was purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. Fatty acid methyl esters (saturated straight chains) and a bacterial acid methyl ester CP mix were manufactured by Supelco.

Long-chain ester standards: Stearyl arachidate, arachidyl arachidate, behenyl arachidate, oleyl behenate, arachidyl behenate, behenyl behenate, behenyl oleate, and behenyl stearate manufactured by NU-CHEK-PREP Inc., Elysian, MN, were purchased from Funakoshi Co. Ltd., Tokyo, Japan. The esters, 2-octyldodecyl myristate, hexadecyl 2-ethylhexanoate, and isohexadecyl stearate were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Glyceride standards: Tripalmitin (Fluka) was purchased from Sigma-Aldrich Co. Ltd. Glyceryl-1,2-palmitin-3-olein, glyceryl-1,3-palmitin-2-olein, glyceryl-1,2-palmitin-3-stearin, glyceryl-1,2-olein-3-palmitin, glyceryl-1-palmitin-2-olein-3-stearin, and glyceryl-1,2-stearin-3-palmitin were manufactured by Larodan AB Co. Ltd., Malmö, Sweden and were purchased along with 1,2-dipalmitin and 1-monopalmitin from Funakoshi Co. Ltd. All other chemicals were GC reagent grade and used without further purification.

Instrumentation

The GC/MS system (Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) consisted of a GC-17A gas chromatograph equipped with

an MS-QP5050 mass spectrometer run in electron ionization (EI) mode using an AOC-20i auto injector.

GC/MS analysis of wax esters in gum bases

GC/MS analysis of the wax esters was performed on a DB-1 HT fused-silica capillary column (15 m × 0.25 mm, film thickness of 0.10 μm; J&W Scientific, Folsom, CA). The injector and detector temperatures were set at 390°C, and the column temperature was programmed from 120°C to 240°C at 15°C/min and then from 240°C to 390°C at 8°C/min and finally maintained at 390°C for 6 min. Samples (1 μL) were injected through a split-injector (1/5). MS spectra were detected in EI mode by scanning m/z values ranging 50–920. Samples and standards were dissolved in hexane, toluene, or ethanol (0.1–1.0 mg/mL). Each sample solution was injected in duplicate, and reproducibility of the results was confirmed.

Results and Discussion

Establishment of a direct analytical method for wax esters via high-temperature GC/MS on a capillary column

The major constituents of gum bases used as food additives are wax esters. They are composed of long-chain fatty acids and long-chain alcohols. Since the volatilities

of these wax esters are very low, they are not sufficiently detected via GC using conventional column temperatures (<330°C). To overcome this problem, a GC/MS method was developed using a capillary column that enables high-temperature analysis for the direct detection of wax esters. The appropriate temperatures for the capillary column, injector, and detector were examined using standard wax ester mixtures. It was observed that, considering the sensitivity, the suitable temperature for the injector and detector was 390°C. In addition, an increasing program for the column temperature from 120°C to 390°C provided good separation of the structural isomers of the various triglycerides in the standard mixtures.

Figure 1A shows the GC/MS total ion chromatogram (TIC) of a standard mixture of various esters analyzed using the established method. This standard mixture contained straight-chain esters, branched-chain esters, saturated esters, unsaturated esters, and hydroxy esters with carbon numbers ranging from 19 to 44. All of the standard esters were well-separated within 19 min. As shown in Figure 1B, retention times of the standard esters approximately correlate with their carbon numbers, regardless of their structural type (Stránský et al. 2006; Zhang et al. 2010). These results suggest that the carbon number of esters can be estimated from the retention times of their peaks. Next, to assess the linearity of the relationship between peak areas in the TIC and the concentrations of the standard esters, calibration curves

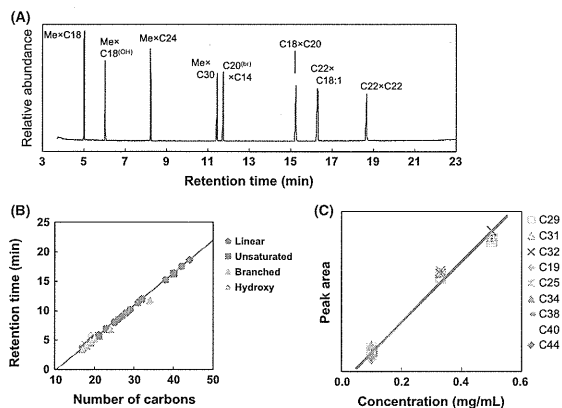


Figure 1. GC/MS analysis of long-chain esters standards. (A) Total ion chromatogram (TIC) of a standard mixture of esters. Esters are labeled as the carbon number of the constitutive alcohol × the carbon number of the constitutive fatty acid. Me, methanol; OH, hydroxy; br, branched; C18:1:C18 fatty acid with an unsaturated bond. (B) Correlation between the number of carbons in the standard esters and their retention times. Linear, unsaturated, branched, and hydroxy indicate the types of ester structures. (C) Correlation between the concentration of the standard esters and their peak areas in the TICs. The labels C29–C44 indicate esters with carbon numbers ranging from 29 to 44.

were constructed. As can be seen in Figure 1C, sufficient linearity for rough determination of the concentrations of wax esters with carbon numbers ranging from 29 to 44 is observed over the concentration range 0.1–0.5 mg/mL (correlation coefficient $R^2 = 0.9876$). These results indicate that analysis of the TIC peak areas of the wax esters can be used to roughly determine the concentrations of the corresponding esters in the gum bases.

Application of the established GC/MS method to the analysis of wax esters in food additive gum bases and experimental reagents

To investigate the types and quantities of esters contained in various gum base samples, TIC patterns of food additive gum bases and experimental reagents were determined using the established GC/MS method. As shown in Figure 2, similar TIC patterns were observed for gum bases derived from the same waxes. It was also confirmed that MS spectra of the TIC peaks were consistent with those of TIC peaks observed at identical retention times for gum bases derived from the same types of wax (data not shown). These results confirm that the gum

bases formulated with the same types of wax have specific and characteristic TIC patterns and ester compositions.

Next, GC/MS TIC patterns of 10 types of food additive gum bases derived from different types of wax were obtained (Fig. 3). Based on the results for the molecular ions and correlation between the retention times and ester carbon numbers (Fig. 1B), it was possible to estimate the carbon numbers of the wax esters represented by the individual TIC peaks. In addition, the other constituents were also identified using previously reported data (Asano 1977; Lawrence et al. 1982; Tonogai et al. 1985; Tachibana et al. 1992; Jover et al. 2002; Moldovan et al. 2002b; Bonaduce and Colombini 2004; Jiménez et al. 2004; Jin et al. 2006) and by comparison to the analyses results described above for the standards and libraries of MS spectra such as NIST 147, NIST 27, and Wiley 7. As shown in Figure 3, each TIC of the 10 types of food additive gum bases has a characteristic pattern. In addition, it was observed that the composition of major esters in the food additive gum bases was nearly the same as those previously reported (Asano 1977; Lawrence et al. 1982; Tonogai et al. 1985; Tachibana et al. 1992; Jover et al. 2002; Moldovan et al. 2002b; Bonaduce and Colombini 2004; Jiménez et al. 2004; Jin et al. 2006). For lanolin

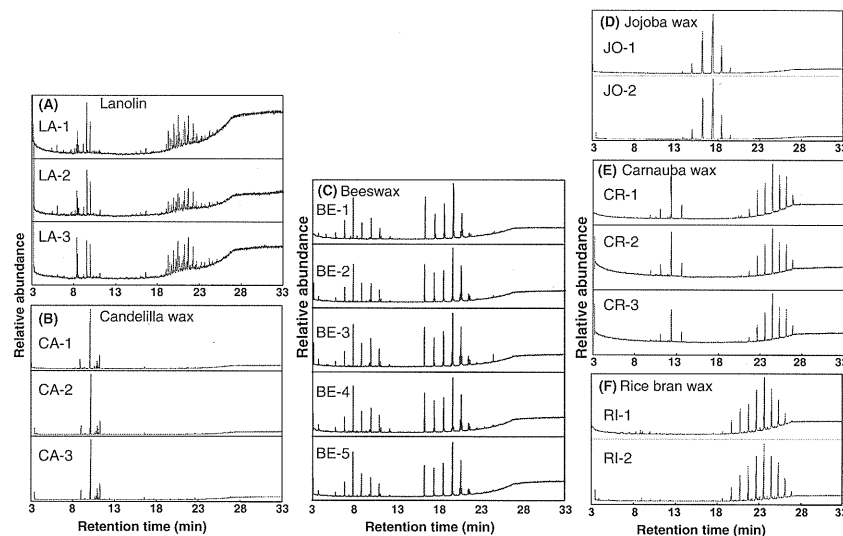


Figure 2. GC/MS TICs of food additive gum bases [LA-1 (A), CA-1 (B), BE-1 (C), JO-1 (D), CR-1 (E), and RI-1 (F)] and commercial samples.