

報 文

モル吸光係数比を利用したジャマイカカussia抽出物中のクアシンおよびネオクアシンの新規定量法の開発

(平成27年4月7日受理)

西崎雄三^{1,*} 多田敦子¹ 石附京子¹ 伊藤裕才²
小野田 絢³ 杉本直樹¹ 穂山 浩¹

Development of a Novel Method for Quantifying Quassin and Neoquassin in Jamaica Quassia Extracts Using the Molar Absorption Coefficient Ratio

Yuzo NISHIZAKI^{1,*}, Atsuko TADA¹, Kyoko ISHIZUKI¹, Yusai ITO²,
Aya ONODA³, Naoki SUGIMOTO¹ and Hiroshi AKIYAMA¹

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

²Kyoritsu Women's University: 2-2-1 Hitotsubashi,
Chiyoda-ku, Tokyo 101-8437, Japan;

³Nagoya City Public Health Research Institute:
1-11 Hagiyama-cho,

Mizuho-ku, Nagoya 467-8615, Japan;

* Corresponding author

A novel HPLC-based method employing molar absorption coefficient ratios to 4-hydroxybenzoic acid (4HBA) was developed for the determination of quassin and neoquassin in Jamaica quassia extract, which is used as a food additive in Japan. Based on comparisons of quantitative NMR (qNMR) spectra and HPLC chromatograms of an artificial mixture of quassin, neoquassin, and 4HBA, the molar absorption coefficient ratios of quassin and neoquassin to 4HBA were determined as 0.84 and 0.85, respectively. Quassin and neoquassin were quantified in food additives by qNMR and HPLC based on molar absorption coefficient ratios using 1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-*d*₄ and 4HBA as internal standards, respectively. The differences in quantitation values between qNMR and HPLC analyses were below 1.2%. Our proposed novel HPLC-based quantitation method employing the molar absorption coefficient ratios is a reliable tool for determining levels of quassin and neoquassin in food additives and processed foods.

(Received April 7, 2015)

Key words: モル吸光係数比 molar absorption coefficient ratio; 定量 NMR qNMR; フォトダイオードアレイ検出 HPLC HPLC-PDA; クアシン quassin; ネオクアシン neoquassin; 4-ヒドロキシ安息香酸 4-hydroxybenzoic acid

付録資料: 付録資料 (Fig. S1) はJ-Stageの日本食品衛生学雑誌 (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/shokueishi/56.185>) で閲覧できる

緒 言

食品衛生分野において、食品に含まれる機能性成分や有効成分の含量を正確に定量することは、食の品質や安全を確保するうえで重要である。一般にこれらの定量分析にお

いては、分離能と検出感度に優れたクロマトグラフ法が多用され^{1)~3)}、純度が明記された測定対象物質と同一の標準品の濃度とピーク面積の関係から正確な定量値が求められる。しかし、クロマトグラフ法は、定量用標準品が入手できない場合は定量分析ができないという欠点がある。

このような背景から、近年、定量NMR (quantitative NMR (qNMR)) を用いた分析法が注目されている^{4)~6)}。qNMRの最大の特徴としては、定量用に最適化された分析条件下において、分子間における測定スペクトルの面積

* 連絡先 ynishizak@nihs.go.jp

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

² 共立女子大学: 〒101-8437 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1

³ 名古屋市衛生研究所: 〒467-8615 名古屋市瑞穂区菘山町 1-11

値(積分値)に「水素数×モル濃度」を反映させることである^{7),8)}。すなわち正確な純度が値づけされた1つの標準物質(国際単位系(SI)に基づく計量トレーサビリティが確保された標準物質)を内標準物質として用いることで、さまざまな測定対象物質について信頼性が確保された正確な定量値が導き出せることである。このような特徴から、qNMRは、残留農薬分析用標準品、食品添加物標準品等の供給体制の飛躍的な発展に貢献した。しかし、qNMRを利用した天然由来の有機化合物の標準品の供給は、局方生薬の指標成分等、品質管理のうえで重要な成分にとどまっている。すなわち、単離精製が困難なものや食品成分の定量用標準品の拡充は、需要と供給の関係から期待できず、天然由来の有機化合物の正確な定量分析はまだまだ困難である。そこでわれわれはこの問題を解決するために、測定対象物質とは別の標準物質を用いた方法、すなわち、測定対象物質の特性値を入手可能な標準物質に置き換え、測定対象物質と同一の標準物質を必要としない新規定量分析法の開発を行っている。

ジャマイカカシア抽出物は、既存添加物名簿^{*1)}に記載されている天然苦味料の1つであり、ニガキ科ジャマイカカシア(*Quassia excelsa* Swartz)の幹枝または樹皮より、水で抽出して得られたもので、その主成分はquassin (1) および neoquassin (2) である(Fig. 1)。また、天然香料基原物質集⁹⁾に記載されている天然香料クワツシャは、ニガキ科のジャマイカカシア、ニガキ(*Picrasma quassioides* Bennet) またはアメリカニガキ(*Quassia amara* Linne)を原料とする香料として使用されており、その主成分はquassin (1) および neoquassin (2) であると推定される。しかし、quassin (1) および neoquassin (2) の定量用標準品は共に市販されていないため、HPLC等を用いた通常の定量分析法が設定不可能であり、正確な定量値も報告されていない。

そこで、本研究では、安価でコンスタントに入手容易な4-ヒドロキシ安息香酸(4-hydroxybenzoic acid; 4HBA)を内標準物質として選抜し、qNMRを用いて4HBAを正確に純度づけし、さらにqNMRとフォトダイオードアレイ検出HPLC(HPLC-PDA)による測定結果から4HBAに対するquassin (1) および neoquassin (2) のモル吸光係数比を決定し、HPLC-PDAにおいて測定対象物質の定量用標準品を必要としない簡便かつ正確な定量法を開発し、その有効性を評価した(Fig. 1)。また、食品添加物公定書未記載のジャマイカカシア抽出物の規格案設定のための基礎的な情報を得るために、ジャマイカカシア抽出物製品とクワツシャ製品の成分組成の比較分析を行ったので、併せて報告する。

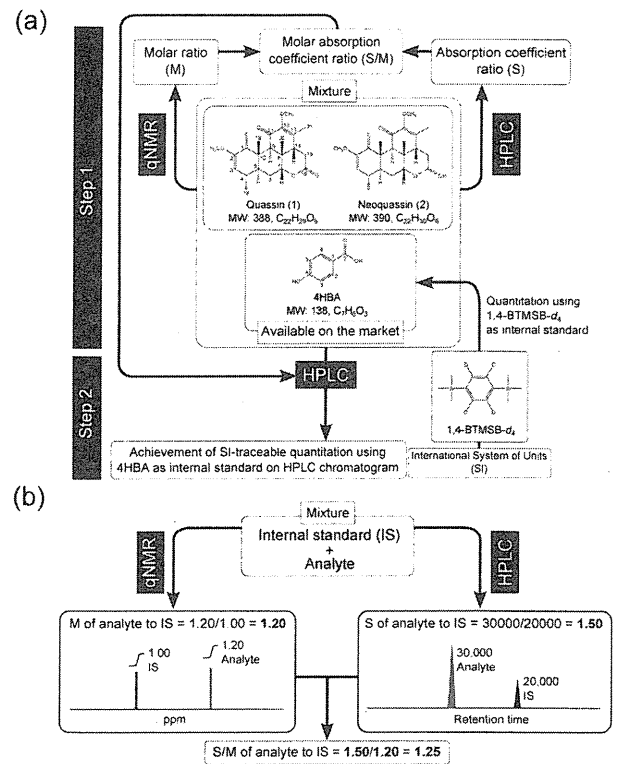


Fig. 1. Strategy of International System of Units (SI)-traceable quantitation of quassin and neoquassin

(a) Schematic representation of the strategy described in this study. 4HBA, 4-hydroxybenzoic acid. (b) Calculation of molar absorption coefficient ratio of analyte to internal standard (IS) (Step 1).

実験方法

1. 試料および試薬

ジャマイカカシア抽出物製品 (Jamaica quassia extract, 2社3製品: 製品A~C; 褐色粉末) と天然香料クワツシャ製品 (Quassia: 製品D; 褐色粉末) は、一般社団法人日本食品添加物協会を通じて入手した。

試薬クアシン (アメリカニガキ (*Quassia amara* Linne) からの精製品 (quassin (1) および neoquassin (2) の混合物), Cat. No. ASB-00017010-100, Lot. No. 17010-185) は、ナカライテスク(株)、4HBA (Cat. No. H0207, Lot. No. 44CWL-ST) は東京化成工業(株)より購入したものをを用いた。4-メトキシ-1-ビニル-β-カルボリン (4-methoxy-1-vinyl-β-carbolone; MVC (5)), 4,9-ジメトキシ-1-ビニル-β-カルボリン (4,9-dimethoxy-1-vinyl-β-carbolone: DMVC (6)) は、名古屋市衛生研究所より分与したものをを用いた。

qNMR基準物質には、1,4-ビストリメチルシリルベンゼン-*d*₄ (1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-*d*₄; 1,4-BTMSB-*d*₄) 標準物質 (Cat. No. 024-17031, Lot. No. DCL1923, 純度 99.8±0.2%, 和光純薬工業(株)製) をを用いた。qNMR測定用溶媒として重メタノール (methanol-*d*₄) (Isotec社製) をを用いた。1,4-BTMSB-*d*₄ 標準物質入り methanol-*d*₄

*1 厚生省生活衛生局長通知 “別添1既存添加物名簿収載品目リスト” (平成8年5月23日). 衛化第56号 (1996).

溶液 (qNMR 標準液) の濃度は, 認証標準物質高純度フタル酸ジエチル (diethyl phthalate; DEP) (品番 NMIJ CRM 4022-b, 純度 $99.98 \pm 0.01\%$, (独)産業技術総合研究所製) を用いて校正した。

その他の試薬はすべて市販特級品あるいは HPLC 用を用いた。

2. 装置

各種分析データの取得には, 以下の装置を使用した。

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC-MS): Waters 社製 ACQUITY UPLC/SQD system.

核磁気共鳴装置 (NMR): オートサンプラー付 JNM-ECA 600 (日本電子(株)製, 600 MHz). NMR のシフト値は, methanol- d_4 の溶媒ピークを基準シグナル (3.30 ppm) として, δ 値を ppm 単位で表した。

3. LC-MS による成分分析

既存添加物ジャマイカクアシン抽出物製品および天然香料クワッシャ製品 (A~D) をメタノールで 10 mg/mL に調製した後, 水を用いてメタノール濃度が 35 vol% になるように希釈し (3.5 mg/mL), この溶液を 0.2 μ m メンブレンフィルターでろ過したものを LC-MS 用試料液とし, 下記の LC-MS 条件に付した。

LC-MS 測定条件

LC 条件: カラム, XTerra MS C18 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 3.5 μ m, Waters 社製); カラム温度, 40°C; 移動相, 10 mmol/L ギ酸アンモニウム含有水: 10 mmol/L ギ酸アンモニウム含有メタノール = 65:35 (0 min) \rightarrow 20:80 (25 min); 注入量, 5 μ L; 流速, 0.2 mL/min; PDA 検出器, 200~500 nm; 検出波長, 255 nm.

MS 条件: キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 30 V (ESI-pos.); ソース温度, 120°C; 脱溶媒温度, 350°C; 脱溶媒ガス流量, 600 L/hr; コーンガス, 50 L/hr; スキャン範囲, m/z 100~1,000.

4. モル吸光係数比の算出

試薬クアシン (quassin (1) および neoquassin (2) の混合物) および 4HBA を合計で約 10 mg となるよう, 重量比でおおよそ 3:1~10:1 で秤量し混合したものを 4 検体調製し, 各検体を methanol- d_4 1.0 mL に溶解した試料液を NMR 試験管に移し, 下記の qNMR 条件に付した。

qNMR 測定条件: Probe, 5 mm broadband autotune probe; Spectral width, -5~15 ppm; Data points, 48,000; Flip angle, 90°; Pulse delay, 60 s; Scan times, 16; Sample spin, No spin; Probe temperature, 22~25°C.

4HBA の 2, 6 位プロトンシグナル (7.86 ppm, 2H, d, $J=8.75$ Hz) と 3, 5 位のプロトンシグナル (6.80 ppm, 2H, d, $J=8.75$ Hz) の平均面積と, quassin (1) の 3 位と 7 位のプロトンシグナル (5.52 ppm, 1H, d, $J=2.50$ Hz: H-3; 4.41 ppm, 1H, t, $J=2.75$ Hz: H-7) の平均面積, neoquassin (2) の 3 位 (5.48 ppm, d, 1H, $J=2.50$ Hz) と 16 位のプロトンシグナル (5.32 ppm, d, $J=2.75$ Hz:

H-16 α : 4.75 ppm, dd, $J=2.00, 9.75$ Hz: H-16 β) の平均面積から 4HBA に対する quassin (1), neoquassin (2) の試料液中のモル比 (M) を算出した (Fig. 1b). qNMR 測定は各試料液につき 6 回行った。

次に NMR 試験管から試料液を取り出し, 水で希釈した後, 下記の HPLC-PDA 条件に付した。測定波長 255 nm におけるクロマトグラム上に観察された 4HBA, quassin (1) および neoquassin (2) のピーク面積を求め, 4HBA に対する quassin (1) および neoquassin (2) の吸光度比 (S) を算出した (Fig. 1b)。なお, HPLC-PDA 測定は各試料につき 3 回行い平均を求めた。

HPLC-PDA 測定条件: カラム, 4 社製品の ODS (C₁₈) カラム (Cosmosil 5C₁₈-MSII (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m, ナカライテスク(株)製), DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m, ダイソー(株)製), XTerra MS C18 (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 3.5 μ m, Waters 社製), L-Column2 ODS (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 3 μ m, 化学物質評価機構); カラム温度, 40°C; 移動相, 0.1 vol% ギ酸含有水 / 0.1 vol% ギ酸含有メタノール = 65:35 (0 min) \rightarrow 20:80 (25 min); 注入量, 10 μ L; 流速, 0.1 mL/min (L-Column2 ODS) または 0.5 mL/min (Cosmosil 5C₁₈-MSII, DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP, XTerra MS C18); PDA 検出器, 200~500 nm; 検出波長, 255 nm.

qNMR および HPLC-PDA 測定結果より得られた試料液中のモル比 (M) および吸光度比 (S) の関係から, 4HBA に対する quassin (1) および neoquassin (2) のモル吸光係数比 (S/M) を求めた (Fig. 1b)。

5. HPLC-PDA による定量

既存添加物ジャマイカクアシン抽出物製品および天然香料クワッシャ製品 (A~D) 5~10 mg を精密に量り採り, 下述の qNMR による純度づけが成された 4HBA 39.9 μ g/mL 含有の初期移動相 20 mL に溶解し, HPLC-PDA 用試料液とし, 下記の HPLC-PDA 条件に付した。なお, 測定は 3 回行った。

HPLC-PDA 測定条件: カラム, Cosmosil 5C₁₈-MSII; 0.1 vol% ギ酸含有水 / 0.1 vol% ギ酸含有メタノール = 65:35 (0 min) \rightarrow 20:80 (25 min); 注入量, 10 μ L; 流速, 0.3 mL/min; PDA 検出器, 200~500 nm; 検出波長, 255 nm.

6. qNMR による定量

既存添加物ジャマイカクアシン抽出物製品および天然香料クワッシャ製品 (A~D) 50~70 mg を精密に量り採り, 認証標準物質である DEP を用いて校正した 1,4-BTMSB- d_4 (0.20 mg/mL) 含有 methanol- d_4 (qNMR 標準液) 1.0 mL に溶解し, その溶液 600 μ L を NMR 試験管に封入したものを qNMR 用試料液とした。この qNMR 用試料液を qNMR に付し, 1,4-BTMSB- d_4 のプロトンシグナル面積 (0.24 ppm, 18H, s), 分子量, 秤量値, 純度, quassin (1) および neoquassin (2) に由来するそれぞれの 3 位プロトンシグナル面積 (5.52 ppm, 1H, d, $J=2.50$ Hz:

quassin (1); 5.48 ppm, 1H, d, $J=2.50$ Hz: neoquassin (2)), 分子量, 秤量値から, quassin (1) および neoquassin (2) の純度 (含量 (w/w)) を算出した。

4HBAについては, 約5 mgを精密に量り採ったものを, 上述のqNMR標準液に溶解し, 4HBAの2, 6位プロトンシグナル (7.86 ppm, 2H, d, $J=8.75$ Hz) と3, 5位プロトンシグナル (6.80 ppm, 2H, d, $J=8.75$ Hz) からその純度を算出した。なお, qNMR測定は, 各qNMR試料液につき3回行い平均を求めた。

結果および考察

1. LC-MSを用いた添加物製品中のquassin (1) およびneoquassin (2) の同定

内標準物質を用いたHPLC-PDAによる定量分析法を確立するうえで, 予備検討として既存添加物ジャマイカカシヤ抽出物3製品 (A~C) と天然香料クワッシャ1製品 (D) に含まれる成分をLC-MSを用いて解析した。その結果, 杉本らの報告と同様に¹⁾, 4製品において255 nmに極大吸収をもつ成分I, IIが主ピークとして確認された (Fig. 2)。MSスペクトルにおいて成分I, IIは, それぞれ m/z 389 $[M+H]^+$, 391 $[M+H]^+$ の値を示したことから, 成分Iをquassin (1), 成分IIをneoquassin (2) (16位立体異性体混合物) と同定した。また多田らは, ジャマイカカシヤ抽出物製品中には, 主成分であるquassin (1) お

よびneoquassin (2) のほかに, 11-ジヒドロ-12-ノルネオクアシン (11-dihydro-12-norneoquassin (3)), カンチン-6-オン (canthin-6-one (4)), MVC (5), DMVC (6) (Fig. 3) の副成分が含まれていることを明らかにしている¹⁰⁾。各製品のHPLCクロマトグラムの縦軸を10倍に拡大してみると, 成分III, IVが確認できた (Fig. 2)。成分III, IVは, MSスペクトルにおいてそれぞれ m/z 379 $[M+H]^+$, 221 $[M+H]^+$ の値を示したことや, 多田らの報告と同様なPDAスペクトルを示したことから, 成分IIIを11-dihydro-12-norneoquassin (3), 成分IVをcanthin-6-one (4) と推定した。MVC (5), DMVC (6) については, 検出波長255 nmにおけるクロマトグラム上には各製品中にピークは検出されなかったが, m/z 225 $[M+H]^+$ (MVC (5)), 255 $[M+H]^+$ (DMVC (6)) についての抽出クロマトグラム上に, 両者の標品と保持時間 (16.6 min : MVC (5), 22.4 min : DMVC (6)) が一致するピークが観察されたことから, 各製品中にMVC (5), DMVC (6) がごく微量含まれていることが確認された。

また, 製品中に含まれる成分について¹H-NMRから得られるスペクトル情報も参考に検討した。各製品 (A~D) と試薬クアシンをmethanol- d_4 に溶解し, NMR測定を行った結果をFig. 4に示す。試薬クアシンは, 各製品 (A~D) とは逆にneoquassin (2) よりもquassin (1) を多く含有しているため (Fig. 5b), 両化合物に由来するシ

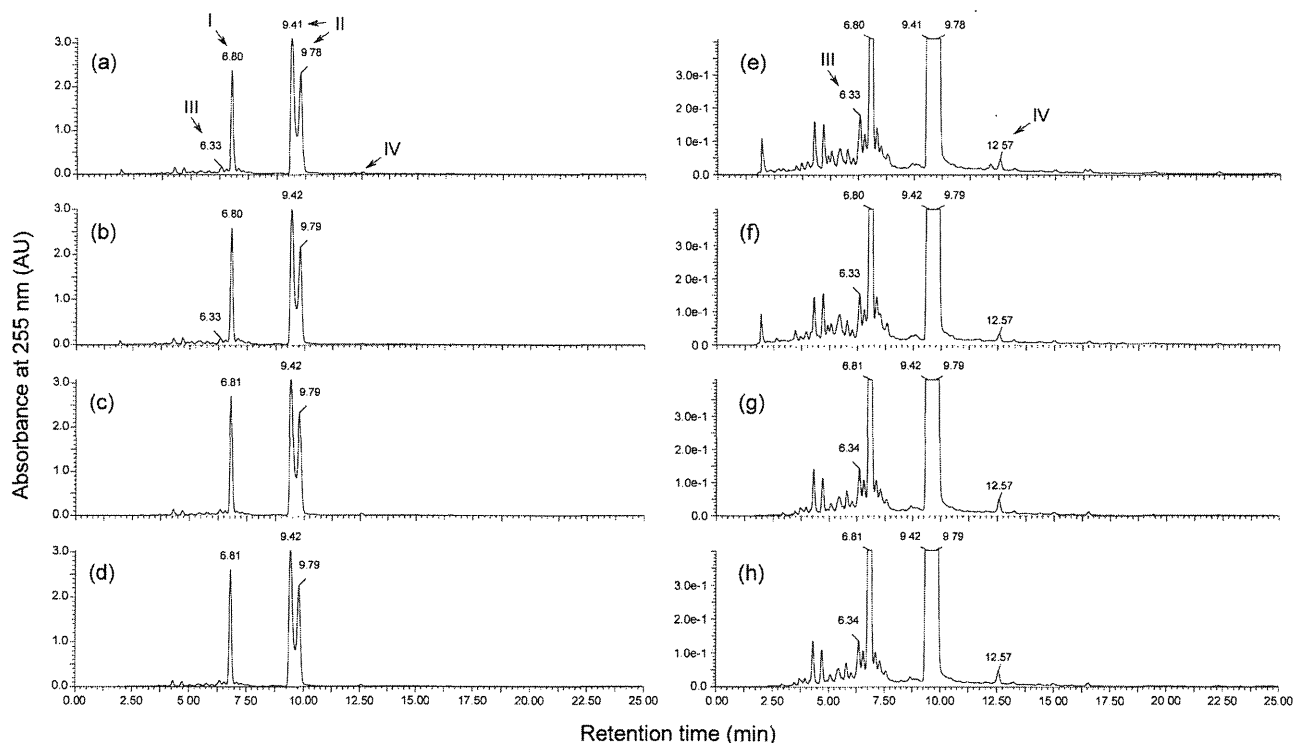


Fig. 2. LC-MS analysis of four food additives

(a) Product A; (b) Product B; (c) Product C; (d) Product D. (e)–(h) Magnification of chromatograms shown in (a)–(d), respectively. The separations were carried out using an XTerra MS C18 column (2.1 mm i.d. \times 150 mm). In MS analysis (ESI-pos), the m/z for peaks I, II, III, and IV were 389, 391, 379, and 221, respectively. All HPLC chromatograms were recorded at 255 nm. I, quassin; II, neoquassin; III, 11-dihydro-12-norneoquassin; IV, canthin-6-one.

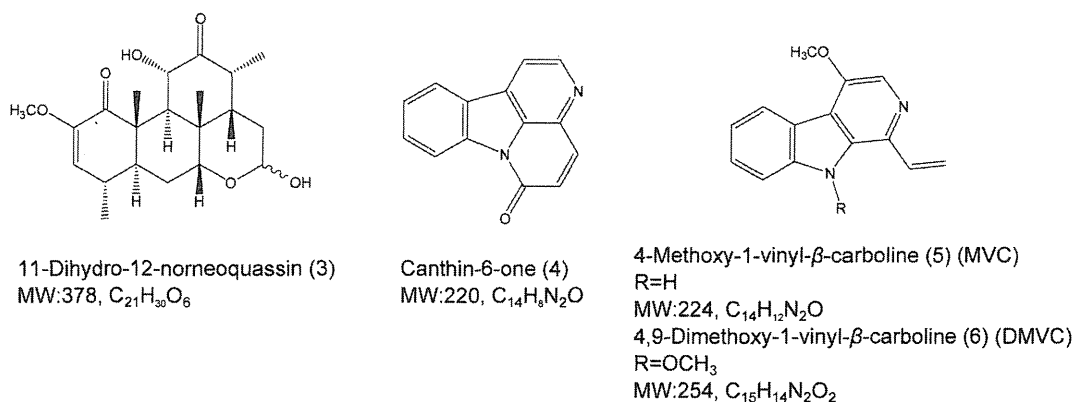
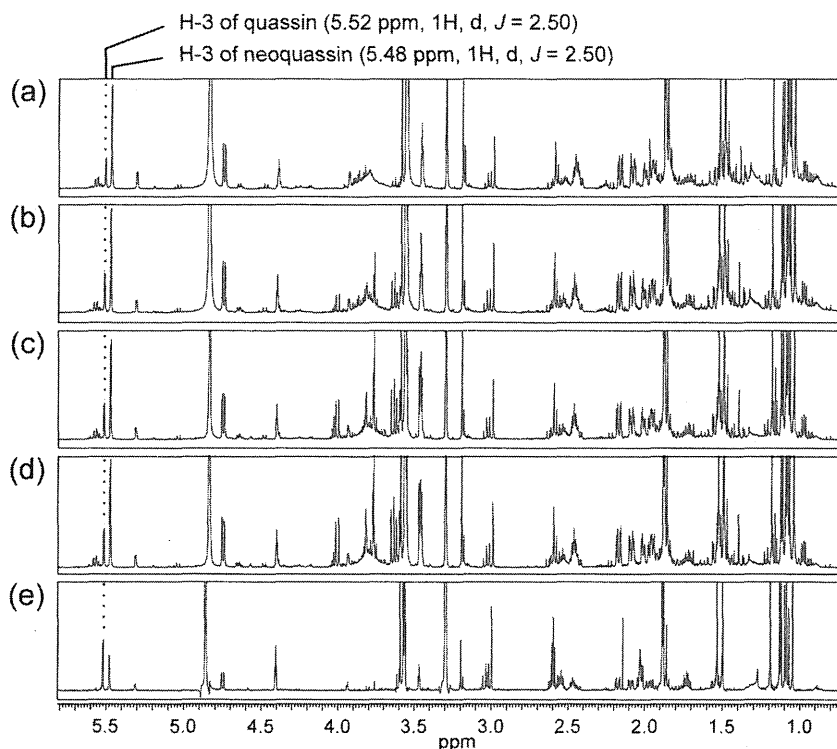


Fig. 3. Structures of minor constituents of Jamaica quassia extract

Fig. 4. ¹H-NMR spectra of four food additives

(a) Product A; (b) Product B; (c) Product C; (d) Product D; (e) Quassin standard reagent (mixture of quassin and neoquassin). Signals at 5.52 and 5.48 ppm were used for the calculation of quassin and neoquassin contents in food additive products, respectively (Table 4).

グナルの相対強度は異なるものの、各添加物製品の¹H-NMRスペクトル形状は、試薬クアシンに酷似しており、すなわち、含有主成分は、quassin (1) と neoquassin (2) であることが確認された。また既存添加物ジャマイカクアシア抽出物製品と天然香料クワッシャ製品の成分組成に大きな差異は確認されなかった。

2. 4HBAに対するquassin (1) およびneoquassin (2) のモル吸光係数比の算出

HPLC-PDA分析条件下における、正確なモル吸光係数比を算出するために、¹H-NMRスペクトル上とHPLC-PDAクロマトグラム上においてquassin (1) およびneoquassin (2) と良好な分離を示す化合物を、内標準物質と

して選抜する必要がある (Fig. 1)。Fig. 5に示すように¹H-NMRスペクトルにおいて、quassin (1) およびneoquassin (2) は、6.0 ppmより低磁場側にシグナルを示さない^{1), 10), 11)}。このことから、一般に6.0 ppmより低磁場側にシグナルを示す芳香族有機酸が、quassin (1)、neoquassin (2) の内標準物質として好ましいと考えた。そこで4HBAを内標準物質として試薬クアシンと混合し、混合濃度が異なる4検体を調製してそれぞれqNMRを行った。その結果、4HBAのH-2とH-6に由来する1つのシグナル (7.86 ppm, 2H, d, $J = 8.75$ Hz) とH-3とH-5に由来する1つのシグナル (6.80 ppm, 2H, d, $J = 8.75$ Hz), そしてquassin (1) のH-3シグナル (5.52 ppm, 1H, d,

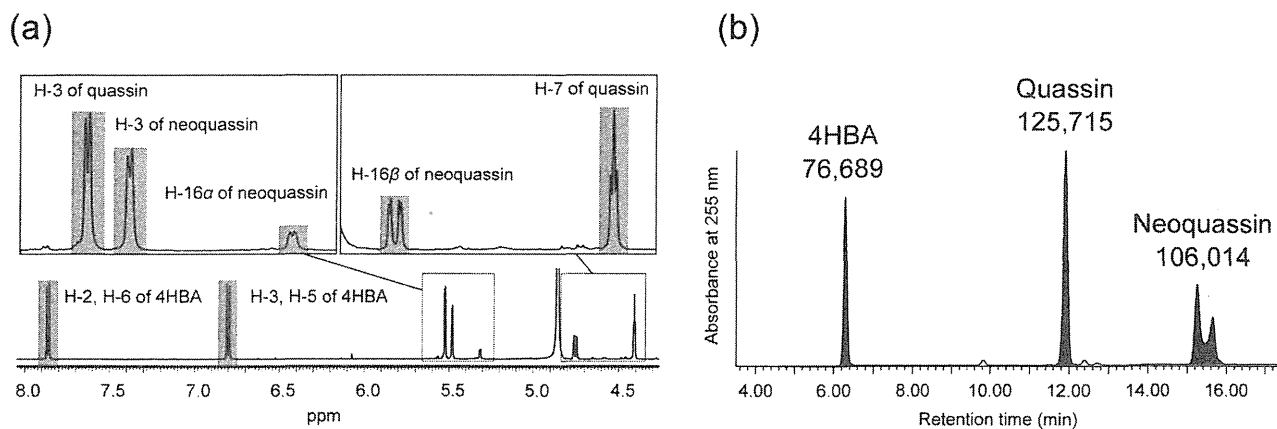


Fig. 5. ^1H -NMR spectrum and HPLC-PDA chromatogram of 4HBA and quassin standard reagent (Test solution 1)

(a) Signals used for the calculation of the molar ratios are highlighted in gray. (b) The separations were carried out using a Cosmosil 5C₁₈-MSII column. Flow rate, 0.5 mL/min. Area values are indicated above the peaks.

Table 1A. Relative integral values determined from qNMR spectra for each test solution containing 4HBA, quassin, and neoquassin

Integral value	4HBA		Quassin		Neoquassin	
	H-2 and H-6	H-3 and H-5	H-3	H-7	H-3	H-16 (H-16 α +H-16 β)
	δ 7.86 ppm	δ 6.80 ppm	δ 5.52 ppm	δ 4.41 ppm	δ 5.48 ppm	δ 5.32 ppm and 4.75 ppm
Test solution 1	2.00	2.01 \pm 0.00	2.06 \pm 0.00	2.00 \pm 0.01	1.63 \pm 0.00	1.64 \pm 0.04 (0.39 \pm 0.00+1.25 \pm 0.04)
Test solution 2	2.00	2.01 \pm 0.00	0.62 \pm 0.01	0.60 \pm 0.00	0.49 \pm 0.00	0.52 \pm 0.01 (0.14 \pm 0.00+0.38 \pm 0.01)
Test solution 3	2.00	2.00 \pm 0.00	0.62 \pm 0.00	0.63 \pm 0.00	0.51 \pm 0.00	0.54 \pm 0.02 (0.15 \pm 0.00+0.39 \pm 0.02)
Test solution 4	2.00	2.00 \pm 0.00	1.04 \pm 0.01	1.05 \pm 0.00	0.83 \pm 0.00	0.87 \pm 0.03 (0.25 \pm 0.01+0.62 \pm 0.03)

The integral value of the signal observed at 7.86 ppm in each test solution, which was derived from H-2 and H-6 of 4HBA, was set at 2.00. Each integral value is the mean \pm SD of six independent determinations. Solvent, methanol-*d*₄.

Table 1B. Relative molar values determined from qNMR spectra for each test solution containing 4HBA, quassin, and neoquassin

Molar value	4HBA	Quassin	Neoquassin
	Average	Average	Average
Test solution 1	1.00	2.03	1.63
Test solution 2	1.00	0.61	0.51
Test solution 3	1.00	0.63	0.52
Test solution 4	1.00	1.05	0.85

The molar values of 4HBA in each test solution were calculated from the 7.86 (derived from H-2 and H-6) and 6.80 ppm signals (derived from H-3 and H-5) and were set at 1.00.

$J=2.50$ Hz) と H-7 シグナル (4.41 ppm, 1H, t, $J=2.75$ Hz) また neoquassin (2) の H-3 シグナル (5.48 ppm, d, 1H, $J=2.50$ Hz) と H-16 の 2 つのシグナル (5.32 ppm, d, $J=2.75$ Hz: H-16 α ; 4.75 ppm, dd, $J=2.00$, 9.75 Hz: H-16 β) の分離は互いに良好であった (Fig. 5a)。そのため、上記の計 7 つのシグナルを用い、各検体における 4HBA に対する quassin (1) および neoquassin (2) のモル比 (M) を算出することにした。4HBA の H-2 と H-6 に由来する 1 つのシグナル面積値を 2.00 に設定した際に与えられる、4HBA の H-3 と H-5 に由来するシグナルの面積値は、いずれの試料液中においても、 2.00 ± 0.00 または 2.01 ± 0.00 であり、qNMR 測定に定量性が反映されていることを確

認でき、この条件下で与えられる quassin (1) および neoquassin (2) に由来する 5 つのシグナル面積値を Table 1A に示した。次に、シグナル面積値を由来するプロトン数で除した後、各化合物における平均の物質量を算出し、4HBA の物質量を 1.00 に設定した際に与えられる quassin (1) および neoquassin (2) の物質量 (モル比 (M) (quassin/4HBA, neoquassin/4HBA)) を Table 1B に示した。

qNMR 試料液中における quassin/4HBA, neoquassin/4HBA の吸光度比 (S) を算出するために、qNMR に用いた試料液を 35 倍または 175 倍 (L-Column2 ODS 検討時) に希釈し、HPLC-PDA で分析した。移動相に 0.1 vol% ギ

Table 2. Effect of flow rate on absorption coefficient ratios

Flow rate (mL/min)	Area value (Retention time (min))			Absorption coefficient ratio	
	4HBA	Quassin	Neoquassin	Quassin/4HBA	Neoquassin/4HBA
0.30	128,727 (9.9)	207,767 (16.4)	176,677 (19.9, 20.3)	1.61	1.37
0.35	110,380 (8.7)	178,874 (14.8)	150,751 (18.3, 18.7)	1.62	1.37
0.40	96,442 (7.7)	155,871 (13.6)	127,019 (17.1, 17.5)	1.62	1.32
0.45	85,774 (6.9)	139,556 (12.7)	117,660 (16.3, 16.5)	1.63	1.37
0.50	76,689 (6.3)	125,715 (11.9)	106,014 (15.3, 15.6)	1.64	1.38
			Average	1.62	1.36
			SD	0.01	0.03
			RSD (%)	0.63	1.89

A mixture of 4HBA, quassin, and neoquassin (Test solution 1) was subjected to HPLC-PDA analysis using a Cosmosil 5C₁₈-MSII column. Absorption coefficient ratios were calculated from the peak areas of HPLC chromatograms recorded at 255 nm. RSD, relative standard deviation.

Table 3. Molar absorption coefficient ratios of quassin and neoquassin to 4HBA

Molar ratio of quassin to 4HBA	Test solution 1	Test solution 2	Test solution 3	Test solution 4			
		2.03	0.61	0.63	1.05		
Column	Molar absorption coefficient ratio of quassin to 4HBA				Average	SD	RSD (%)
Cosmosil 5C ₁₈ -MSII	0.81	0.82	0.83	0.83	0.82	0.01	1.3
DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP	0.83	0.84	0.85	0.85	0.84	0.01	1.3
XTerra MS C18	0.81	0.84	0.84	0.84	0.83	0.01	
1.6 L-Column2 ODS	0.84	0.83	0.87	0.86	0.85	0.02	2.0
	Average	0.82	0.83	0.85	0.85	0.84	
	SD	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	
	RSD (%)	1.9	0.83	2.1	1.6	2.0	

Molar ratio of neoquassin to 4HBA	Test solution 1	Test solution 2	Test solution 3	Test solution 4			
		1.63	0.51	0.52	0.85		
Column	Molar absorption coefficient ratio of neoquassin to 4HBA				Average	SD	RSD (%)
Cosmosil 5C ₁₈ -MSII	0.85	0.84	0.84	0.86	0.85	0.01	1.2
DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP	0.84	0.83	0.84	0.86	0.84	0.01	1.6
XTerra MS C18	0.84	0.84	0.85	0.85	0.85	0.01	
0.66 L-Column2 ODS	0.86	0.83	0.85	0.86	0.85	0.02	2.0
	Average	0.85	0.83	0.84	0.86	0.85	
	SD	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	
	RSD (%)	0.98	0.93	0.75	0.50	1.4	

All test solutions were subjected to HPLC-PDA analysis, and absorption coefficient ratios were calculated from the peak areas of HPLC chromatograms recorded at 255 nm. Molar absorption coefficient ratios were calculated by dividing values for absorption coefficient ratio by values for molar ratio. Flow was set at 0.1 mL/min (L-Column2 ODS) or 0.5 mL/min (other columns). RSD, relative standard deviation.

酸含有水をA液, 0.1 vol%ギ酸含有メタノールをB液として, B液が25分間で35%から80%となる直線勾配で分析したところ, 4HBA, quassin (1) および neoquassin (2) は良好に分離した (Fig. 5b). また, 4HBAは分析時における極大吸収波長が255 nmを示し, quassin (1), neoquassin (2) も同じく255 nmに極大吸収を示した. そこで255 nmにおけるそれぞれのピーク面積から吸光度比 (S) を算出することにした.

まず, 流速による吸光度比 (S) への影響について検討した. Cosmosil 5C₁₈-MSII カラムを用いて, 4HBAと試

薬クアシンを混合した試料液 (Test solution 1) を, 流速 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50 mL/min で, B液が25分間で35%から80%となる直線勾配のHPLC-PDA条件に付し, 吸光度比 (S) を算出したところ, 流速が増すごとに各ピーク面積および保持時間は減少したが, 4HBAに対する quassin (1), neoquassin (2) の吸光度比 (S) はほとんど変化しないことが明らかとなった (Table 2). そのため, 4HBAに対する quassin (1), neoquassin (2) のモル吸光係数比の算出には, 内径が4.6 mmのカラムについては流速0.5 mL/min, 内径が2.1 mmのカラムについては,

カラムの耐圧を考慮して流速0.1 mL/minでの分析結果を用いることとした。

次に、4種のODSカラムを用いて分析を行い、4HBAに対するquassin (1), neoquassin (2) の吸光度比 (S) を、上述のqNMRにより得られたモル比 (M) で除し、4HBAに対するquassin (1), neoquassin (2) のモル吸光係数比 (S/M) を算出した。その結果 (Table 3), 4種のカラムで最も相対標準偏差 (RSD) が高かったのは、L-Column2 ODSであり、その値はquassin (1), neoquassin (2) 共2.0%であった。また4種のカラム間で、4HBA, quassin (1) およびneoquassin (2) の保持時間は異なったが、カラム間におけるRSDは0.83~2.1% (quassin (1)), 0.50~0.98% (neoquassin (2)) であり、異なるカラムを用いた際に4HBAに対するモル吸光係数比 (S/M) に差異がほとんど生じていないことが確認された。

以上の検討結果から、本研究で用いたHPLC-PDA分析条件において、一般的なODSカラムを用いた際のquassin/4HBAおよびneoquassin/4HBAのモル吸光係数比 (S/M) は、それぞれ0.84, 0.85であり、流速および保持時間の影響を受けにくい堅牢な値であることが明らかとなった。

3. qNMRによる4HBAの純度検定

われわれが考案したモル吸光係数比を利用したHPLC-PDAによるquassin (1) およびneoquassin (2) の定量分析法で正確な定量値を得るためには、内標準物質とする4HBAの正確な純度が既知である必要がある。そこで、Fig. 1aに示すように4HBAの純度測定を行った。すなわち既報と同様に^{4), 5)}、計量学的トレーサビリティが確保された認証標準物質 (CRM) であるDEPを一次標準物質として用い、qNMR標準液中の1,4-BTMSB-*d*₄の濃度をDEPにより校正した後に、1,4-BTMSB-*d*₄を二次標準として4HBAのqNMR測定を行う2段階の方式を用いた。1,4-BTMSB-*d*₄のシグナル (0.24 ppm, 18H, s) および

4HBAに由来するH-2, H-6シグナル (7.86 ppm, 2H, d, *J*=8.75 Hz) とH-3, H-5シグナル (6.80 ppm, 2H, d, *J*=8.75 Hz) の相対面積、分子量、秤量値、1,4-BTMSB-*d*₄の濃度等から純度を算出した。その結果、本研究で使用した4HBAの純度 (w/w) は100.43±0.16%, RSDは0.16%であった。

4. モル吸光係数比を利用したHPLC-PDAによる製品中のquassin (1) およびneoquassin (2) の定量

前述のqNMR法によって算出された結果より、内標準物質である4HBAの純度を100.43%と設定し、qNMRとHPLC-PDAを併用して算出されたモル吸光係数比を適用したHPLC-PDAによる添加物製品中のquassin (1), neoquassin (2) の含量を測定した。4HBA 39.9 µg/mLを含む初期移動相に添加物製品を溶解した液10 µLをHPLCに付し、検出波長255 nmで、ピークが分離していることを確認し、各ピーク面積を求めた (Fig. S1)。各測定において4HBAのピーク面積を実際に注入した4HBAの物質質量で校正し、各添加物製品中のquassin (1) とneoquassin (2) の濃度を4HBA相当物質質量として算出した。さらに前項で求めた各化合物の4HBAに対するモル吸光係数比0.84および0.85を用いて補正計算することで、quassin (1) とneoquassin (2) の正確な物質質量を算出し、各製品中の含量を計算した。その結果、Table 4に示すように、各添加物製品中のquassin (1) とneoquassin (2) の含量 (w/w) は、それぞれ12.2~14.3%および39.4~41.9%であり、RSDは0.09~0.42%および0.07~0.42%であり、添加物製品間におけるquassin (1), neoquassin (2) の含量に大きな差は確認されなかった。

5. qNMRによる製品中のquassin (1) およびneoquassin (2) の定量

本研究のLC-MSおよびNMRを用いた各添加物製品中の成分分析から得られた情報より、添加物製品を直接qNMRを用いてquassin (1) とneoquassin (2) を定量す

Table 4. Quassin and neoquassin contents in food additive products, as determined using HPLC-PDA and qNMR

Food additive	HPLC-PDA		qNMR	
	Quassin	Neoquassin	Quassin	Neoquassin
Product A	12.2±0.01 ^{*1} 0.12 ^{*2}	41.8±0.07 0.17	12.8±0.04 0.30	40.6±0.12 0.30
Product B	14.0±0.03 0.22	39.4±0.07 0.18	14.0±0.15 1.08	39.5±0.22 0.55
Product C	14.2±0.06 0.42	41.9±0.18 0.42	14.4±0.04 0.29	40.8±0.10 0.26
Product D	14.3±0.01 0.09	41.9±0.03 0.07	14.7±0.19 1.31	41.0±0.20 0.48

Samples of four food additives (A, B, C, and D) were dissolved in 35 vol% methanol containing 0.1 vol% formic acid and 4HBA and analyzed by HPLC-PDA using a Cosmosil 5C₁₈-MSII column. Flow rate, 0.3 mL/min. Chromatograms were recorded at 255 nm, and the levels of quassin and neoquassin were calculated based on the molar absorption coefficient ratio to 4HBA. Food additives dissolved in methanol-*d*₄ containing 1,4-BTMSB-*d*₄ were subjected to qNMR analysis. Signals at 0.24 ppm (1,4-BTMSB-*d*₄), 5.52 ppm (H-3 of quassin), and 5.48 ppm (H-3 of neoquassin) were used for the calculations. ^{*1} Data are shown as the mean±SD (%) of three independent determinations. ^{*2} RSD (relative standard deviation).

ることが可能であると判断し、その結果を基に、上述の4HBAを内標準物質としたHPLC-PDAによる定量結果について評価を行った。qNMRでは、添加物製品中の夾雑物の影響が見られないquassin (1) およびneoquassin (2) のH-3シグナル (5.52 ppm, 1H, d, $J=2.50$ Hz: quassin (1); 5.48 ppm, 1H, d, $J=2.50$ Hz: neoquassin (2)) を定量対象シグナルとした (Fig. 4)。4HBAのqNMRによる純度測定と同様に1,4-BTMSB- d_4 のシグナルおよびquassin (1) とneoquassin (2) に由来するそれぞれのH-3シグナルの相対面積、分子量、秤量値、1,4-BTMSB- d_4 の濃度などからquassin (1) とneoquassin (2) の正確な含量を算出した。その結果、各添加物製品中におけるquassin (1) とneoquassin (2) の含量 (w/w) は12.8~14.7%および39.5~41.0%であった (Table 4)。qNMR測定でのRSDは、0.29~1.31%、0.26~0.55%であった。この定量結果と、4HBAを内標準物質としたHPLC/PDAによる定量結果の間には、ほとんど差異が確認されず、1.2%以下であった。このことから、4HBAとのモル吸光係数比を適用したHPLC-PDAによるquassin (1) およびneoquassin (2) の定量法は、正確な定量値が得られる精度の良い定量法であることが明らかとなった。

結 論

本研究では、既存添加物ジャマイカカシア抽出物および天然香料クワッシャ製品中のquassin (1) およびneoquassin (2) の新規定量分析法の開発を行った。分離能と検出感度に優れたHPLC-PDAと、物質量を直接定量可能なqNMRを併用し、測定対象物質と別の内標準物質との間の正確な物質特性値の比、すなわち、モル吸光係数比を算出可能であることを示した。さらに、モル吸光係数比を適用することによって、測定対象物質とは異なる物質を定量用内標準物質としたHPLC-PDAによる新規定量分析法が構築できることを示した。

計量学的トレーサビリティが確保された4HBAは市販されていない。ジャマイカカシア抽出物中のquassin (1) およびneoquassin (2) の公的な定量法として、すべての分析機関でNMR装置が普及していないことを考慮して、HPLC-PDAで定量可能な本法を採用するならば、今後、複数社が製造する4HBA試薬の純度について調査する必要がある。あるいは、民間企業と連携し、計量学的トレーサビリティが確保された4HBAの流通を図ることが必要と考えている。

本研究で示した新規定量分析法は、限られた分析条件下ではあるものの、測定対象物質の定量用標準品が入手できない場合の正確な定量分析法として応用範囲は広いと考えられる。また、1種類の定量用標準品に対する、さまざまな測定対象物質の物質特性値の比を蓄積していくことで、測定対象物質と同一の定量用標準品を必要としない定量分析法や品質管理手法が構築可能であると考えられることから、今後、さらにほかの応用例も検討する予定である。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金「食品の安心・安全確保推進研究事業」により実施したものである。ジャマイカカシア抽出物製品、天然香料クワッシャ製品の提供にご協力いただいた日本食品添加物協会に深謝いたします。

文 献

- 1) Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Analysis of constituents in Jamaica quassia extract, a natural bittering agent. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 328-331 (2003).
- 2) Lancaster, F. E., Lawrence, J. F. Determination of annatto in high-fat dairy products, margarine and hard candy by solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.*, **12**, 9-19 (1995).
- 3) Iso, T., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Ishibashi, K., Shiomi, S., Tanamoto, K. Identification test of aloe extract from *Aloe arborescens*, a natural thickening stabilizer. *Nihon Shokuhin Kagaku Kaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **12**, 23-27 (2005).
- 4) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Ito, S., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T. Absolute quantification of carminic acid in cochineal extract by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **51**, 19-27 (2010).
- 5) Tada, A., Takahashi, K., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Ishizuki, K., Nishimura, T., Yamazaki, T., Kawamura, Y. Absolute quantification of quercetin and the glycosides in natural food additives by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **51**, 205-212 (2010).
- 6) Ohtsuki, T., Sato, K., Abe, Y., Sugimoto, N., Akiyama, H. Quantification of acesulfame potassium in processed foods by quantitative ^1H NMR. *Talanta*, **131**, 712-718 (2015).
- 7) 末松孝子. 有機化合物の純度をはかる一核磁気共鳴法 (NMR) を用いたSI (国際単位系) トレーサブルな定量分析技術一. *化学と生物*, **52**, 473-477 (2014).
- 8) 大槻 崇. qHNMRの食品添加物分析への応用. *化学と生物*, **52**, 622-626 (2014).
- 9) 日本香料工業会食品香料委員会編. 天然香料基原物質の解説. 東京, 食品化学新聞社, 1999, p. 174-175. (ISBN 4-916143-06-X)
- 10) Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K., Akiyama, T., Asanomo, M., Yun, Y. S., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Examination of original plant of Jamaica quassia extract, a natural bittering agent, based on composition of the constituents. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 16-21 (2009).
- 11) Krebs, H. C., Schilling, P. J., Wartchow, R. and Bolte, M. Quassinoids and other constituents from *Picrasma crenata*. *Z. NATURFO. B*, **56**, 315-318 (2001).

