

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和6年度研究分担報告書
分析法及び試験法の開発に関する研究

相対モル感度(RMS)を利用したメナキノン及びフィトナジオンの定量法の検討

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 第二室長

研究要旨

既存添加物名簿収載品目のひとつである「メナキノン(抽出物)」の成分規格では、主成分であるメナキノン(MK-4)の定量法が設定されている。しかし、MK-4は光に弱く分解しやすいため、より安定かつ安価な別の物質を基準物質とする相対モル感度(RMS)法を検討した。MK-4はビタミンKの一種であり、ナフトキノン骨格を持つ側鎖の異なる類縁体が多く存在する。この中には、医薬品として用いられるフィトナジオン(K₁)(栄養上重要とされるMK-7も含まれている。本研究では、これらも同一の基準物質及びRMSで定量する手法を検討した。

研究協力者

岡田 真子 日本大学生物資源科学部実習生

A. 研究目的

近年、標準物質の入手が困難な化合物の定量において、代わりに他の物質を基準として設定(基準物質)し、それに対する定量対象化合物の相対モル感度(relative molar sensitivity, RMS)を利用する定量法(以下、RMS法)が注目されている。我々はこれまでに食品添加物をはじめ、天然物由来製品に含まれる有効成分や機能性成分のRMS法を報告している。

RMS法での定量には、基準物質に対する定量対象のRMS値が必要である。通常、RMS値は定量NMR(¹H-qNMR)とHPLCなどのクロマトグラフィーを用い、分析対象物質と基準物質の正確な純度や応答値を求めたうえで算出する。そのため、RMS算出時には、試薬グレードは問わないものの分析対象物質そのものが必要がある。しかし、類似構造の化合物はあっても分析対象物質の市販がなかったり単離精製が必要であったりする場合も少なくない。

本研究では、市販試薬の入手が困難な化合

物について、発色団が同一の類似化合物であればRMS値をある程度予測できないかと仮定し、ナフトキノン骨格を持つフェナキノン類やメナキノン類を対象としたRMS値を算出し比較した。また、実際に食品添加物や食品に含まれる対象化合物の定量が可能か評価した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

「メナキノン(抽出物)」(国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部内管理番号:A77)は日本食品添加物協会から入手した。ビタミンK含有食品として、ひきわり納豆(1社1製品)をスーパーマーケットにて購入し用いた。

定量NMR用基準物質として、1,4-BTMSB-d₄標準物質(以下、1,4-BTMSB-d₄, 純度100.0%±0.2%, k=2, lot. No. KCL2411)を用いた。また、本研究に使用した試薬を表1に示す。その他の試薬は、特級品または液体クロマトグラフィー用を用いた。

B-2) 装置及び器具

以下の装置を本研究に用いた。

NMR 装置: JNM-ECZ600R/S1 (日本電子(株)製)
 高速液体クロマトグラフィー:
 装置 A) 島津製作所(京都, 日本)製 Prominence series (オートサンプラー: SIL-20AC, 送液ポンプ: LC20AT, カラムオーブン: CTO-20AC, 多波長検出器: SPD-M20A, 紫外可視吸光度検出器: SPD-20A, データ処理ソフト: LabSolutions)
 装置 B) WatersTM (MA, USA)製 Alliance series (HPLC システム: e2695, 多波長検出器: 2998 PDA Detector, 紫外可視吸光度検出器: 2489 UV/Vis Detector, データ処理ソフト: MassLynx V4.1)
 ウルトラマイクロ天秤: XP2U (METTLER TOLEDO(株)製)
 セミマイクロ天秤: BM-252 ((株)エー・アンド・デイ)
 電動ピペット: Multipette E3X(Eppendorf)
 ソニケーター: ブランソニック 卓上型超音波洗浄器 2510 (日本エマソン(株))

B-3) メナキノン及びフィトナジオンの RMS 算出

B-3-1) 試料溶液調製

NMR 用試料液: ウルトラマイクロ天秤を用いて, 4-ヒドロキシ安息香酸ドデシル(D4HB)約 10 mg 及び 1,4-BTMSB-*d*₄約 1 mg をそれぞれ精密にひとつの褐色スクリュウバイアルに量りとり, MeOH-*d*₄ 2.0 mL を加えて溶解させたものを NMR 用試料液とした. NMR 用試料溶液 0.6 mL を 5 mm NMR 試料管に移し, トーチバーナーで封管して NMR 分析に付した. 他方, 試料として日本薬局方フィトナジオン標準品(K₁ 試薬), メナキノン-4 標準品(MK-4 試薬)及びメナキノン-7(MK-7 試薬)を用いた際も, 同様に操作した. ただし, これら 3 種の化合物については酸化防止剤として 3-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシアニソール(BHA) 20 mg も精秤し加えたほか, 溶解溶媒として THF-*d*₈を用いた.
HPLC 用試料液: NMR 用試料溶液(5000 µg/mL)を, メタノールを用いて精密に希釈し, 6 濃度の検量線用標準液(9.6-250 µg/mL)を調製し HPLC 用試料溶液とした.

B-3-2) 定量 NMR による純度測定

NMR 測定条件は以下のとおり.
 照射中心: 5 ppm, 観測幅: 20 ppm, デジタル分解能: 0.25 Hz, 遅延時間: 60 秒, 積算回数: 8 回, ダミースキャン: 2 回, サンプル回転: なし, ¹³C デカップリング: MPF8 (取込み時間のみのみ), 測定温度: 25°C.

取得した FID に対して窓関数の設定を外し, ゼロフィルでポイント数を 2 倍に増やした後, フーリエ変換を行った. 次に, 位相及びベースラインを補正し, 定量用の ¹H NMR スペクトルとした. このスペクトル上のシグナルに対して自動積分を行い, 式(1)及び式(2)を用いて試料の純度を算出した. 複数のシグナルを使用した場合は, それらの純度を平均して, 試料の純度(%)とした. なお, D4HB の定量には, 4.0, 6.5, 及び 7.6 ppm 付近のシグナルを, K₁, MK-4 及び MK-7 の定量には 3.1 ppm 付近のシグナルをそれぞれ用いた. これらの化学シフトは 1,4-BTMSB-*d*₄ のシグナルを 0 ppm としたときの値で示している.

$$molC_A = molC_B \times I_A/I_B \times H_B/H_A \quad (1)$$

$$P_A = molC_A \times MW_A/C_S \times 92.4\% \quad (2)$$

ここで, *molC*: モル濃度(mol/L), *I*: シグナル面積, *H*: プロトン数, *P*: 純度(%), *MW*: 分子量(g/mol), *C*: 濃度(mg/mL), *A*: 分析対象化合物, *B*: 1,4-BTMSB-*d*₄ (標準), *S*: 試料.

B-3-3) HPLC 分析

HPLC 測定条件は以下の通り.
 カラム: Wakopak Ultra C18-5 (4.6 × 150 mm, 5 µm), カラム温度: 40°C, オートサンプラー温度: 室温, 移動相: メタノール, 流速: 1.0 mL/min, 注入量: 10 µL, 検出波長: 256 nm (D4HB), 247 nm (K₁, MK-4 及び MK-7).

B-3-4) RMS の決定

各試薬(化合物)について, B-3-2)にて得られた純度を用いて検量線用標準液濃度(µmol/mL)を補正した. これらの濃度を横軸に, B-3-3)で得られたピーク面積を縦軸にとった絶対検量線を各化合物について作成した. K₁, MK-4 及び MK-7 (分析種)の絶対検量線の傾き

を, D4HB (基準物質)の絶対検量線の傾きでそれぞれ除し, RMS を求めた.

B-4) 「メナキノン(抽出物)」中の MK-4 定量

B-4-1) HPLC 用検液調製

「メナキノン(抽出物)」5 mg 及び BHA 10mg を精秤し, 褐色バイアルに入れ, MeOH 1 mL を正確に加え溶解させた. 別に, D4HB 5 mg を精密に量りとり, 同様に MeOH 1 mL に溶解させた. これらの溶液について, 各溶液につき 5 点(約 0.0105~0.25 mg/mL)の濃度となるよう MeOH にて希釈し, HPLC 用検液とした.

B-4-2) 検量線用標準溶液調製

MK-4 試薬 5mg 及び BHA 10mg を精秤し, 褐色バイアルに入れ, MeOH 1 mL を正確に加え溶解させた. この溶液について, 各溶液につき 5 点(約 0.0105~0.25 mg/mL)の濃度となるよう MeOH にて希釈し, 検量線用標準溶液とした.

B-4-3) RMS 法による定量

D4HB に対する MK-4 の RMS を用い, 以下の式に従い, 「メナキノン(抽出物)」の HPLC 用検液中に含まれる MK-4 のモル濃度(mol/L)を算出した. このとき, D4HB の純度として, B-3-2)で $^1\text{H-qNMR}$ によって算出した値を用いた.

$$C_{\text{ana}}[\text{mol/L}] = \frac{A_{\text{ana}}}{A_{\text{ref}}} \times \frac{1}{\text{RMS}} \times C_{\text{ref}} \quad (3)$$

ここから, 次式により「メナキノン(抽出物)」中に含まれる MK-4 の含量を求めた.

$$\text{Cont.}_{\text{ana}} [\%] = C_{\text{ana}} \times DF \times \frac{M_{\text{ana}}}{W_{\text{ext}}} \times 100 \quad (4)$$

ここで, Cont.は含量(%), DF は希釈倍率, M はモル質量(g/mol), W は秤取量(mg), ext は「メナキノン(抽出物)」.

B-4-4) 絶対検量線法による定量

B-4-2)で調製した MK-4 試薬の検量線用標準溶液のクロマトグラムから MK-4 のピーク面積を求め, 横軸に MK-4 のモル濃度(mol/L), 縦軸にピーク面積をとった検量線を作成した.

このとき, 検量線用標準溶液のモル濃度は, MK-4 試薬の純度を 100%とみなした場合と, $^1\text{H-qNMR}$ にて測定した純度を用いて補正を行った場合の2種を想定し, 検量線を作成した. 一方, 「メナキノン(抽出物)」の HPLC 用検液のクロマトグラムから, MK-4 のピークを同定し, そのピーク面積を求めた. 先述の 2 種の検量線を用いて「メナキノン(抽出物)」の HPLC 用検液中に含まれる MK-4 のモル濃度(mol/L)を算出した.

B-5) 還元カラムの使用による RMS 値の推定

B-5-1) 標準溶液調製

K₁ 試薬 2 mg, BHA 4 mg をそれぞれ正確に秤量し, MeOH 2 mL を正確に加えて溶解させた. この溶液 1.5 mL をとり, MeOH を用いて 10 mL に定容し, K₁ 標準液とした. また, D4HB 2 mg を正確に秤量し, MeOH 2 mL を正確に加えて溶解させた. この溶液 1.5 mL について K₁ 標準液と同様に操作し, D4HB 標準液とした.

B-5-2) HPLC 分析

HPLC 測定条件は B-3-3) で示した通り. ただし, 還元カラムである大阪ソーダ製 RC-10 (4.0 mm I.D. × 15 mm, 粒子径 5 μm) をポストカラムとして接続した. B-5-1) で調製した溶液について, まず還元カラムを接続して実施し還元カラムを用いたデータを取得した後, 還元カラムを外し移動相により約 1 時間平衡化させ, ベースラインの安定を確認して還元カラムなしのデータを測定した.

B-5-3) RMS 値の推定

還元カラムを用いた場合の RMS は以下式(5)により推定した. 還元カラムの有無により変化するのは K₁ 標準液中の K₁ のピーク面積のみであったため, 還元カラムを用いなかった場合に対する還元カラムを用いた場合の K₁ のピーク面積比を算出し, B-3-4) で求めた RMS を式(5)により補正した.

$$\text{RMS}^{\text{RC}} \cong \text{RMS} \times \frac{A_{\text{ana}}^{\text{RC}}/A_{\text{ana}}}{A_{\text{ref}}^{\text{RC}}/A_{\text{ref}}} \quad (5)$$

ここで, RC は還元カラム.

B-6) ひきわり納豆中のビタミン K 定量

B-6-1) 前処理

試料 4.1322 g を乳鉢に量りとり、超純水 2 mL、海砂適量、MeOH 10 mL を加え、乳棒で磨砕し、吸引ろ過によりろ液を得た。残留物を乳鉢に戻し、MeOH を 10 mL 加え、磨砕し吸引ろ過によりろ液を得た。この操作をさらに 2 回以上繰り返してろ液を得た。得られたろ液を合わせ、10 g/L クエン酸水和物溶液 10 mL、ヘキサン-酢酸エチル溶液 (9:1 v/v) 15 mL を加えた。この液を 5 分間振り混ぜ、3000 rpm にて 5 分間遠心分離し、有機溶媒層を褐色ナスフラスコに分取した。水層にヘキサン-酢酸エチル混液 (9:1 v/v) 15 mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返した。全有機溶媒層を合わせ、溶媒を減圧留去し、残留物^{H1}を得た。これに、ヘキサン 10 mL を加えて溶解させ、シリカゲルカラム(ガラス製クロマトグラフ管(上部 ϕ 25×100 mm, 下部 ϕ 10×200 mm(コック下部 50mm))にカラムクロマトグラム用シリカゲル 60 (球状)(中性), ϕ 75 μ m を充填したもの)に添加した。さらにヘキサン 10 mL を加えた後、ヘキサン-ジエチルエーテル混液(85:15 v/v) 90 mL を加え、溶出液を採集し、減圧留去ののち残留物^{H2}を得た。残留物^{H2}を MeOH にて溶解させ 1 mL に定容し、試料溶液^{HN}とした。

B-6-2) 標準溶液の調製

MK-7 試薬 2 mg 及び BHA 4mg をそれぞれ正確に秤量し、MeOH 2 mL を精確に加え、溶解させた。この溶液 1.5 mL をとり、MeOH を用いて 10 mL に定容し、MK-7 標準液とした。別に、D4HB 2mg を精密に量りとり、MeOH 2 mL を正確に加え、溶解させた。この溶液 1.5 mL をとり、MeOH を用いて 10 mL に定容し、D4HB 標準液とした。

B-6-3) MK-7 含量の算出

試料溶液^{HN}及び MK-7 標準液を B-5-2) に示す HPLC 条件でそれぞれ測定した。得られた両者のクロマトグラムから、試料溶液^{HN}及び MK-7 標準液中の MK-7 のピーク面積を求め

た。

C. 結果及び考察

C-1) RMS 決定のための条件検討

C-1-1) HPLC 条件検討及び基準物質の選定

食品添加物公定書収載の「メナキノン(抽出物)」の成分規格を参考に、分析条件を検討した。成分規格では試料調製に用いる溶媒はエタノール(99.5)，移動相はメタノールが用いられている。各分析種の試薬から調製した溶液を測定したところ、分析種の溶解性が確認されたメタノールを、試料調製溶媒及び HPLC 測定における移動相として採用した。

次に検出波長を検討した。本研究の目的のひとつとして、ビタミン K の共通構造(ナフトキノン骨格)に由来し、かつ側鎖に存在する二重結合の吸収波長の影響を受けない $\lambda_{\max}$ を検出波長とすれば、この骨格をもつ他のビタミン K 類でも同一の RMS を用いた定量が可能ではないか、という仮説の検証がある。分析種 3 種の UV 吸収スペクトルを確認したところ、 $\lambda_{\max}$ をはじめとしたスペクトル形状が一致したため、分析種の K₁、MK-4 及び MK-7 は同じ検出波長での定量が可能であると推察された。勝井ら¹⁾の報告によると、3 位の側鎖を持たないビタミン K₃ は、アセトニトリル/水混液(1:1)中で 242.0~246.0, 251.0~255.0, 261.0~265.0 及び 327.0~331.0 nm に $\lambda_{\max}$ が観察されている。このことから、図 1 に示すスペクトル中の $\lambda_{\max}$ のうち、報告¹⁾に近似する 246~247, 266~267 及び 329~331 nm はビタミン K のナフトキノン骨格に由来する波長であると考えられた。そのため、以上 3 カ所のいずれかを検出波長とすることとし、基準物質の選定結果により本 RMS 法の検出波長を決定することとした。

基準物質には、先述の $\lambda_{\max}$ と近い $\lambda_{\max}$ をもつ等、基準物質に求められる条件²⁾を満たすものを探索した。その結果、移動相をメタノールとしたときでも十分にカラムに保持され、256 nm に $\lambda_{\max}$ をもつ D4HB が基準物質として適切であると判断した。D4HB は市販試薬でも高純度であり安価かつ安定な化合物である。以上より、RMS の決定及び RMS 法においては基

準物質に D4HB を選択し、基準物質の検出波長は 256 nm、分析種の検出波長はこれに近い 247 nm とすることとした。

なお、分析種は溶媒中で経時変化の懸念があることから、安定性を保持するために BHA を酸化防止剤として添加することとした。

C-1-2) HPLC 検量線の濃度範囲の検討

基準物質である D4HB 及び各分析種の、RMS 決定時の濃度範囲を検討した。クロマトグラムにおける各ピークが S/N 比 50 以上³⁾となり、 $R^2=0.999$ 以上と良好な直線性を示した 9.6~250 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で、RMS 決定用の検量線を作成することとした。

C-1-3) ^1H -qNMR 条件の検討

NMR 測定に用いる重溶媒を決定するため、その溶解性を様々な溶媒を用いて検討した結果、基準物質は $\text{MeOH-}d_4$ 、分析種は $\text{THF-}d_8$ に溶解させることとした。

定量用シグナルは、他のピークと重ならず、安定した純度を算出可能なものを探索した。以下、本研究で定量に用いたシグナルを、1,4-BTMSB- d_4 標準物質の ^1H シグナルを基準シグナル(δ 0ppm)とした化学シフトで表記する。
D4HB: H-12' (δ 4.0ppm, 2H), H-3, 5 (δ 6.5ppm, 2H), H-2, 6 (δ 7.6ppm, 2H). (図 2)
K₁, MK-4 及び MK-7: (δ 3.1ppm, 2H)(K₁, MK-4 では H-16', MK-7 では H-28') (図 3)

C-2) 基準物質に対する分析種の RMS 決定

各試薬について ^1H -qNMR により純度を測定したところ、基準物質である D4HB の純度は $98.08 \pm 0.36\%$ 、K₁ 試薬は $98.34 \pm 0.21\%$ 、MK-4 試薬は $98.26 \pm 0.16\%$ 、MK-7 試薬は $98.35 \pm 0.43\%$ であった。得られた純度を用いて、B-3-1) で調製した HPLC 用試料溶液の純度を補正し、B-3-3) に示す条件で 2 台の HPLC を用いて分析に供した。得られたクロマトグラムから、横軸に各物質のモル濃度、縦軸にピーク面積値をとった検量線を作成した。得られた検量線の傾きの比から求めた RMS を表 2 に示す。各分析種の RMS は装置 A ではすべて 1.08、

装置 B ではすべて 1.05 であった。K₁、MK-4、MK-7 で同装置内では同一の RMS が得られたため、ナフトキノン骨格を持つビタミン K では、側鎖長が変わっても同一の RMS での定量が可能だと考えられた。以降の定量では、両装置の平均である 1.06 をビタミン K の RMS とした。

C-3) 「メナキノン(抽出物)」中の MK-4 定量

既存添加物の市場流通品である「メナキノン(抽出物)」中の MK-4 定量を、絶対検量線法と本研究で確立した RMS 法により行った(表 3)。絶対検量線法の定量値は、検量線作成時に MK-4 試薬の純度を 100% と仮定した場合と、 ^1H -qNMR により決定した試薬純度で補正した場合の 2 パターンで算出した。補正なしの前者では 99.4~99.7% であり、補正ありの後者の場合は MK-4 含量が 1.7% 小さくなった。後者の方が試薬純度を考慮しているため真の MK-4 含量に近いと考えられるが、MK-4 試薬が高純度であったため大きな差はなかった。

次に RMS 法により「メナキノン(抽出物)」中の MK-4 含量を定量した。基準物質である D4HB の純度を ^1H -qNMR で決定した 98.08% とし、RMS 値を 1.06 として定量しところ、装置 A では 99.9%、装置 B では 97.7% であった。装置間差は 2.2% 程度と、絶対検量線法と比較して大きな値となった。

一方、両手法の RSD% を比較したところ、絶対検量線法では MK-4 試薬の純度補正の有無に関わらず 1.2~1.3% であったのに対し、RMS 法では 0.1~0.2 と小さかった。これは、絶対検量線法の標品である MK-4 試薬は光に弱く不安定な試薬であるため、標準液を工事調製する必要があるため調製差が大きくなったことが可能性のひとつとして挙げられる。RMS 法の基準物質である D4HB は安定性が高く、高濃度のストック溶液を作製して定量に用いても分解等が見られず定量値に影響を与えなかった。

以上より、「メナキノン(抽出物)」に関しては RMS 法の方が絶対検量線法と比較して定量値の装置間差が大きかったが、不安定な

MK-4 試薬を標品とする必要がないため併行精度に優れていた。MK-4 試薬の価格や扱いづらさを考慮すると、本研究で確立した RMS 法は定量の正確性を大きく損なうほどではなく、品質管理という目的で厳密な精度を求めないのであれば、絶対検量線法の代替法として十分運用可能であると考えられた。

C-4) 還元カラムの使用による RMS 値の推定

食品中のビタミン K 等、少量のものを定量する場合、還元カラムを用いた検量線法が一般的である⁴⁾。ここでいう還元カラムは、触媒還元方式でキノン体をハイドロキノン体に高収率で変換するキノン誘導体化カラムである⁵⁾。そのため、還元カラムを使用すると、ピーク面積の比が変化し、本研究で求めた RMS は適用不可である。そこで、還元カラムの有無により、RMS 値にどのような影響を与えるか検討した。

K₁ 標準液を B-5-2) に示す条件で HPLC 測定を行ったところ、ポストカラムとして還元カラムを用いることにより、保持時間が 13.98 min から 14.19 min へと 0.21 min 遅くなった(図 4)。また、ピーク面積は大きくなり、UV 吸収スペクトルは変化した。ナフトキノン骨格由来と考えられる $\lambda_{\max}$ は 244 nm のみとなった(図 5)。

還元カラムの使用により化合物が変化するものの、キノン体をもつ分析対象成分がすべてハイドロキノン体に変換されると想定すると、還元カラムの使用前後のピーク面積の比は理論上一定であることが予想される。そこで、本研究で求めた RMS に一定の係数をかけることで、還元カラムを接続した場合に求められる RMS と一致することが考えられた。K₁ 標準液中の K₁ の還元カラムの有無による比の平均は 2.15 であったため、式(5)に従いこれと RMS(1.06)を用い、還元カラムを用いた場合の RMS と予想される値である RMS^{RC} は 2.28 であった。他方、K₁ 標準液及び D4HB 標準液を、還元カラムを接続した状態で測定し、原点をとる一点検量線の傾きの比から RMS を算出したところ、2.32 であり、1.7%のズレであ

った。これは、化合物の変化により $\lambda_{\max}$ が 3 nm ズレたことや、RMS^{RC} の算出に 2 台の装置の平均値を使用したことが考えられる。しかし、装置間差や定量値の精度を考慮すると、推定値は十分使用可能と判断された。

C-5) 還元カラムを用いたひきわり納豆中の MK-7 定量

B-6-1)及び B-6-2)に記載の方法で調製した MK-7 標準液と試料溶液^{HN}を B-5-2) に示す条件で HPLC にて分析したところ、保持時間 35.11 min 付近に MK-7 と思われるピークが検出された(図 6)。このピークの UV 吸収スペクトルは、K₁ 標準液で検討したときと同様であった(図 7)。試料溶液^{HN}のクロマトグラムでは、K₁ 標準液分析時と同様、還元カラムの使用により、ピーク面積が大きくなるピークが複数見られた。

MK-7 について、ポストカラムとして還元カラムを用いたときの RMS は、本研究の結果と構造を考慮すると、K₁ の RMS^{RC} と同一であると考えられる。そこで、ひきわり納豆中の MK-7 含量を、還元カラムを用い、絶対検量線法と推定 RMS である RMS^{RC} を用いた RMS 法で実施した。その結果、絶対検量線法では 60 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、RMS^{RC} を用いた RMS 法では 53 $\mu\text{g}/100\text{g}$ であった。定量値として 10%の差があるが、本測定は調製回数が 1 であり、より詳細な検討が必要であると思われる。

D. 結論

本研究では、既存添加物「メナキノン(抽出物)」の有効成分である MK-4 の定量法について、光に弱く分解しやすい標品を用いない RMS 法の確立を試み、代替法として実用可能か検討した。さらに、同一の発色団を持つ K₁ (医薬品名「フィトナジオン」)や、MK-4 同様に栄養上重要視される MK-7 をはじめとしたほかのビタミン K でも、同一の RMS 値で定量可能か検証した。基準物質として D4HB を用いた系を確立した結果、このものに対するビタミン K 類の RMS は一律 1.06 であった。標品を用いた絶対検量線法とも比較したところ、

数%のばらつきはみられるものの、品質モニタリング等に用いる程度の精度であれば十分運用可能であることが示された。

他方、食品中のビタミン K 含量の定量を、ポストカラムとして還元カラムを用いて実施した。還元カラムの有無により検出されたピーク面積は変化するが、その比は一定となるため、還元カラムを用いない場合の RMS から予測可能であることが示唆された。これは、標品が入手困難な化合物であっても、還元カラム等で変化させて得られる場合、RMS を推定することが可能であることを示唆している。

E. 参考文献

- 1) 勝井五一郎, 府川秀明, 木島静正, 松本晃, 富山忠, 平内三政, 藤本恭子, 末木一夫, 山本大介, 小高要, 富田仁, 木村真一, 美濃真: フィロキノノンオキシド, メナキノノン-4 オキシド及びメナジオンの高速液体クロマトグラフィー用標準品の作製: 脂溶性ビタミン総合研究委員会生体試料中のビタミン K 類の HPLC による標準的定量法の作製小委員会. ビタミン, 1991; 65 (10): 481-488.
- b) 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹: 食品分析の信頼性確保における定量 NMR に基づく相対モル感度の役割—分析種の定量用標品不要なクロマトグラフィーの開発. FFI ジャーナル, 2019; 224 (2): 123-130.
- c) 酒井有希, 増本直子, 西崎雄三, 大槻崇, 松

藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた single-reference HPLC 法が定量値に影響を及ぼす 要因の検討と機能性表示食品中のルテイン定量への応用. 日本食品化学学会誌, 2020; 27 (3): 123-134.

- d) 食品成分データベース(日本食品標準成分表 2020 年版(八訂)対応), 文部科学省
<<https://fooddb.mext.go.jp/search.html>>
閲覧日: 2025 年 2 月 27 日
- e) HPLC カラム 還元カラム CQ-R, HPLC provided by OSAKA SODA
<https://sub.osaka-soda.co.jp/HPLC/column/cq_manual.html>
閲覧日: 2023 年 1 月 4 日

F. 研究発表

1. 論文発表
該当無し
2. 学会発表
1) 中島馨, 増本直子, 阿部裕, 杉本直樹: 相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討〜クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係〜. 第 120 回日本食品衛生学会 学術講演会(2024.11).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

表1 本研究に用いた試薬

試薬名	略称	メーカー	製造番号	Lot. No.
メナキノン-4 標準品	MK-4 試薬	富士フイルム和光 純薬(株)	136-16641	AWP5790, ESM2660
メナキノン-7 標準品	MK-7 試薬	富士フイルム和光 純薬(株)	133-14331	DLL3967
日本薬局方フィトナジ オン標準品	K _I 試薬	(一財) 医薬品医療 機器レギュラトリ ーサイエンス財団	1127000021	PHY02A
4-ヒドロキシ安息香酸 ドデシル	D4HB	東京化成工業(株)	H0352	NQIKJ-PS
3- <i>tert</i> -ブチル-4-ヒドロ キシアニソール	BHA	東京化成工業(株)	B0723	W28ME-NG
メタノール- <i>d</i> ₄	MeOH- <i>d</i> ₄	MERCK(株)	1.06028.00252	S5831128 116
テトラヒドロフラン- <i>d</i> ₈	THF- <i>d</i> ₈	関東化学(株)	40064-43	
クエン酸一水和物	–	関東化学(株)	07380-01	602H1916
海砂 425~850 μm(20~35 mesh)	–	富士フイルム和光 純薬(株)	196-08175	–

表2 フィトナジオンまたはメナキノン類の基準物質に対する相対モル感度(RMS)

	装置A			装置B		
	K1	MK-4	MK-7	K1	MK-4	MK-7
RMS平均(n=3)	1.08	1.08	1.08	1.05	1.05	1.05
RSD%	0.98	1.78	0.69	1.25	1.86	0.51
同装置内RMS平均	1.08			1.05		

表3 「メナキノン(抽出物)」中 MK-4 含量

装置A

	絶対検量線法		RMS法	
	純度補正(○)	純度補正(×)	RMS1.08	RMS1.06(平均)
含量平均%(n=3)	97.9	99.7	98.0	99.9
RSD%	1.2	1.2	0.2	0.2

装置B

	絶対検量線法		RMS法	
	純度補正(○)	純度補正(×)	RMS1.05	RMS1.06(平均)
含量平均%(n=3)	97.7	99.4	98.6	97.7
RSD%	1.3	1.3	0.1	0.1

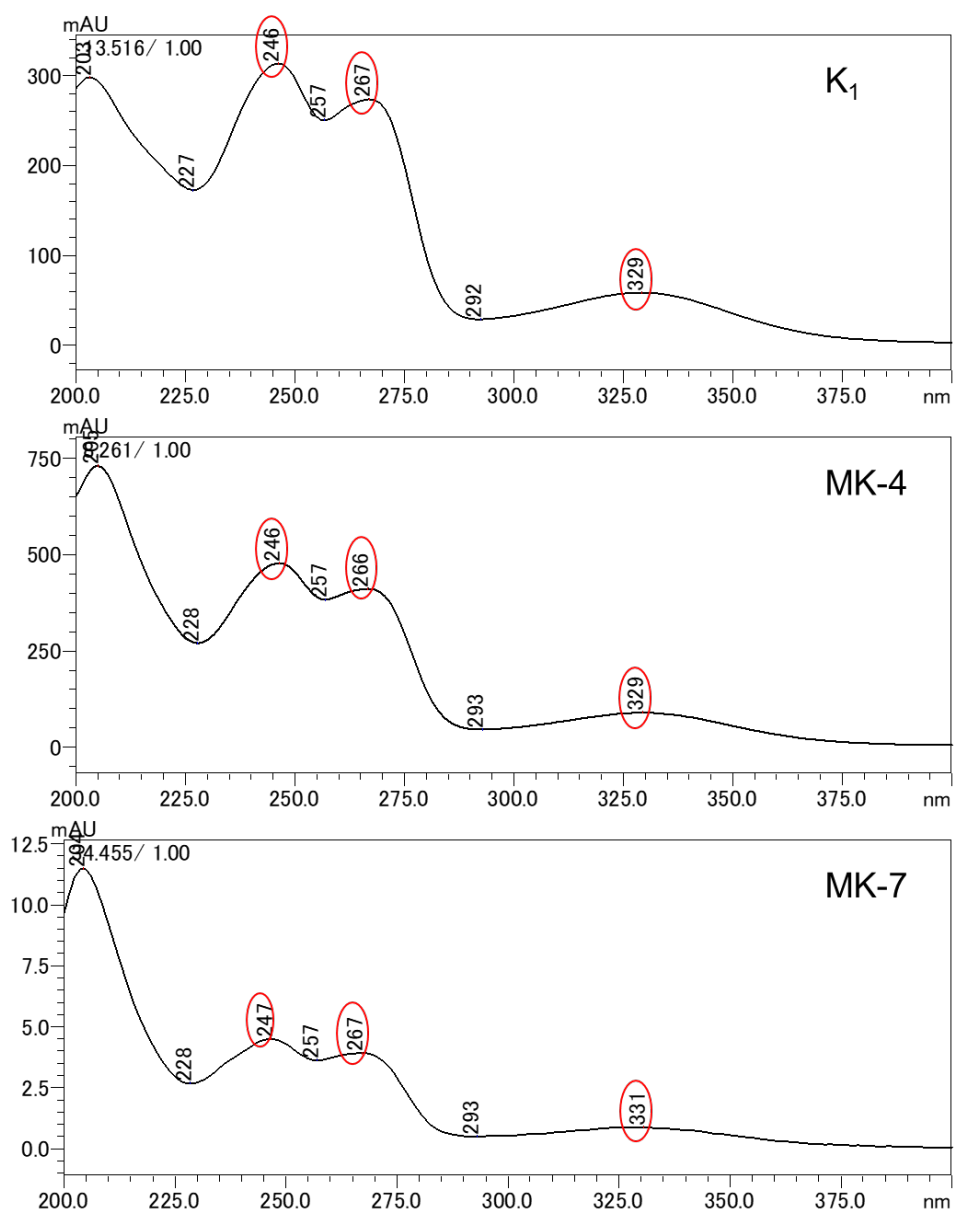


図1 「K₁, MK-4, MK-7のUV吸収スペクトル
赤丸は3つの分析種で共通かつナフトキノン骨格に由来すると考えられる $\lambda_{\max}$

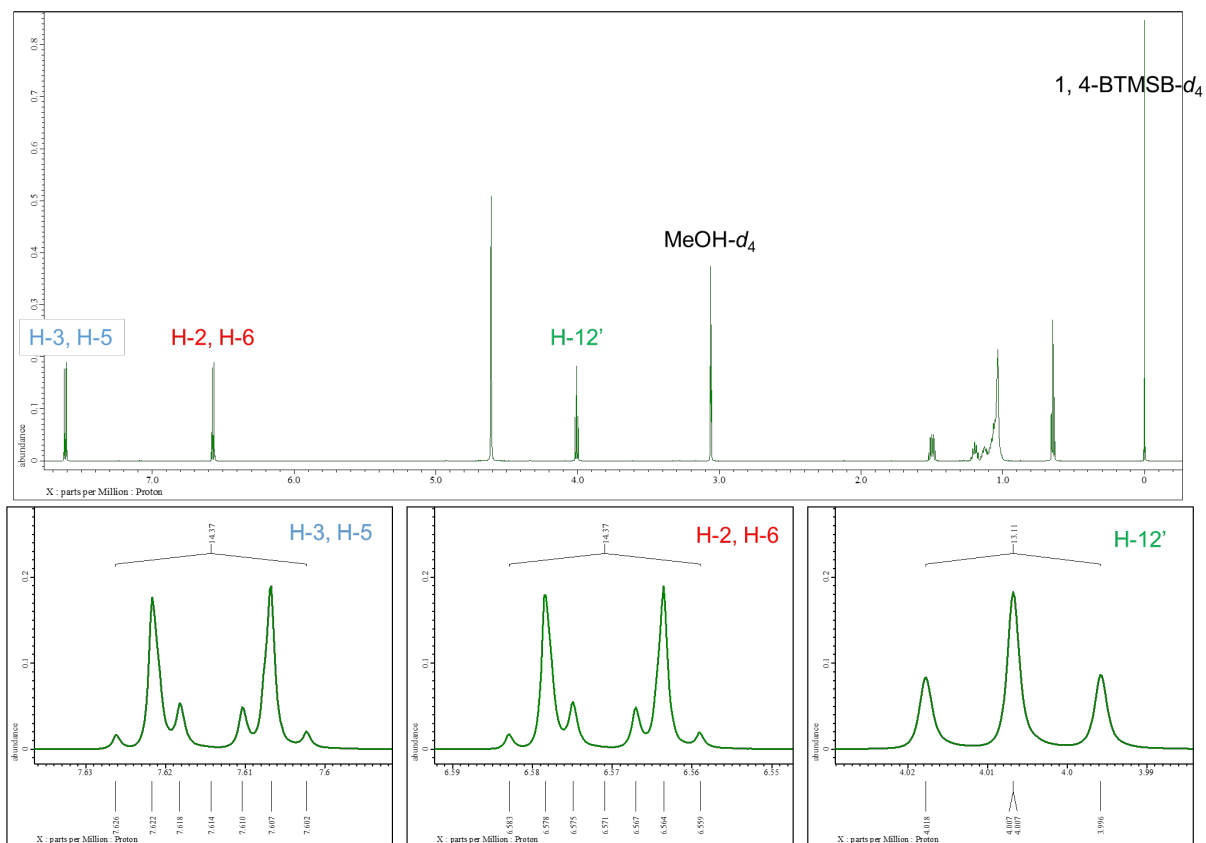
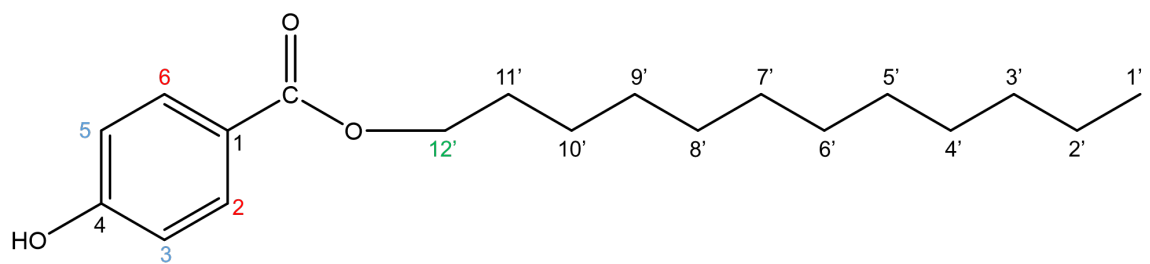


図 2 D4HB の化学構造, ^1H -qNMR スペクトル及び定量用シグナル

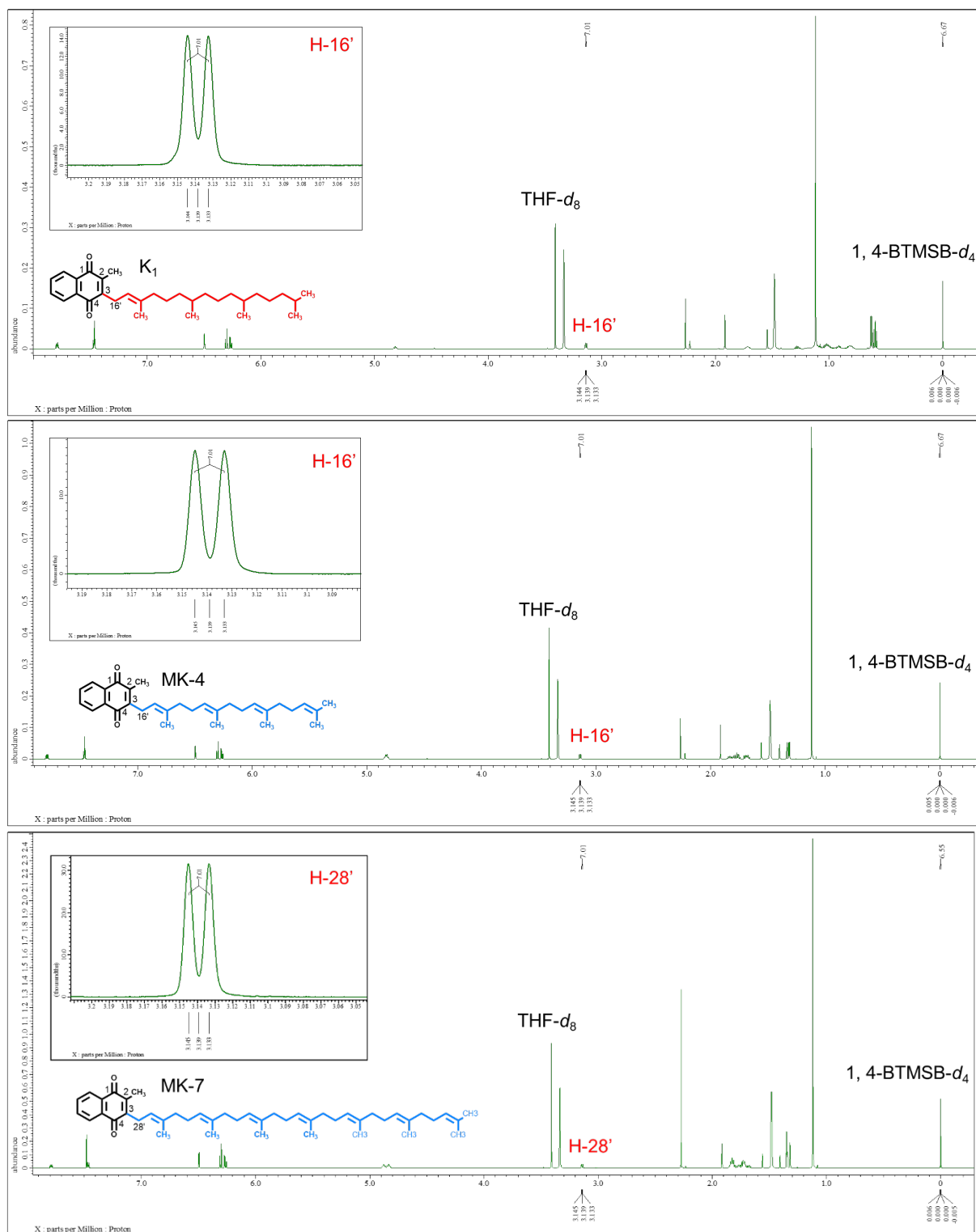


図3 分析種(K_1 , MK-4, MK7)の化学構造, ^1H -qNMR スペクトル及び定量用シグナル

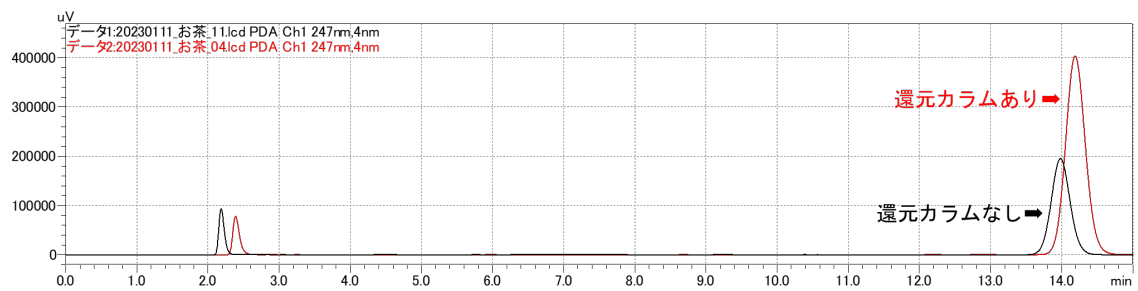


図4 還元カラムの有無による K₁ 標準液のクロマトグラム

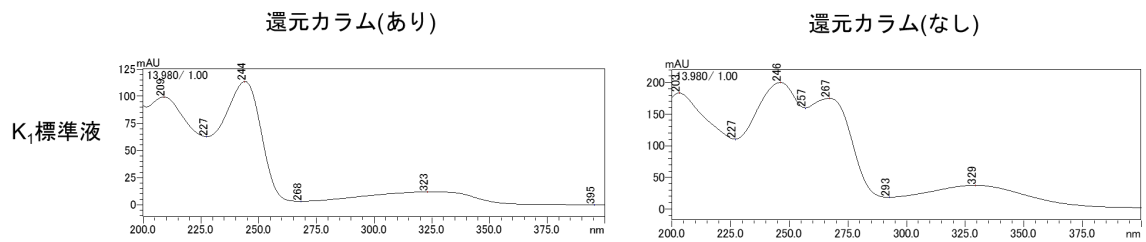


図5 K₁ 標準液中における K₁ スペクトルの還元カラムによる影響

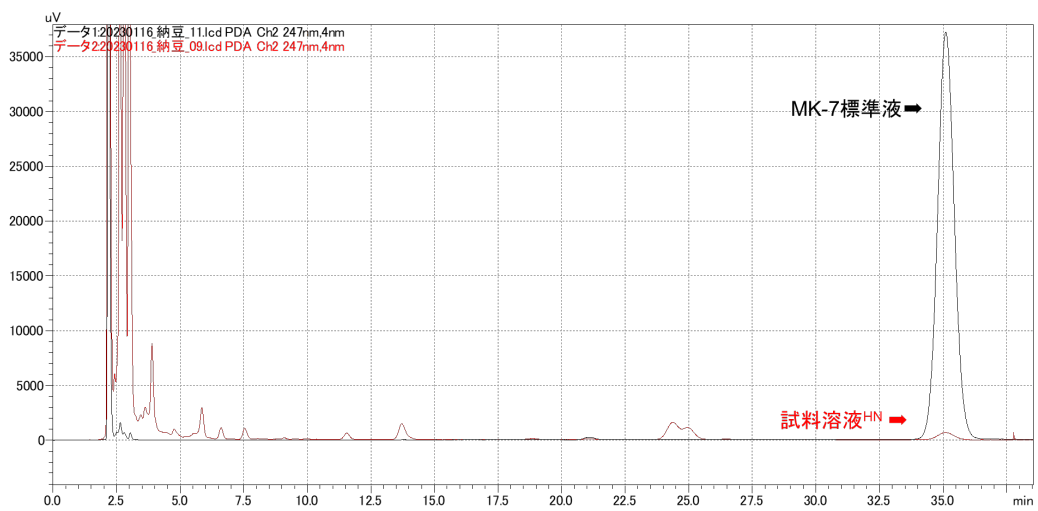


図6 MK-7 標準液及び試料溶液^{HN}のクロマトグラム

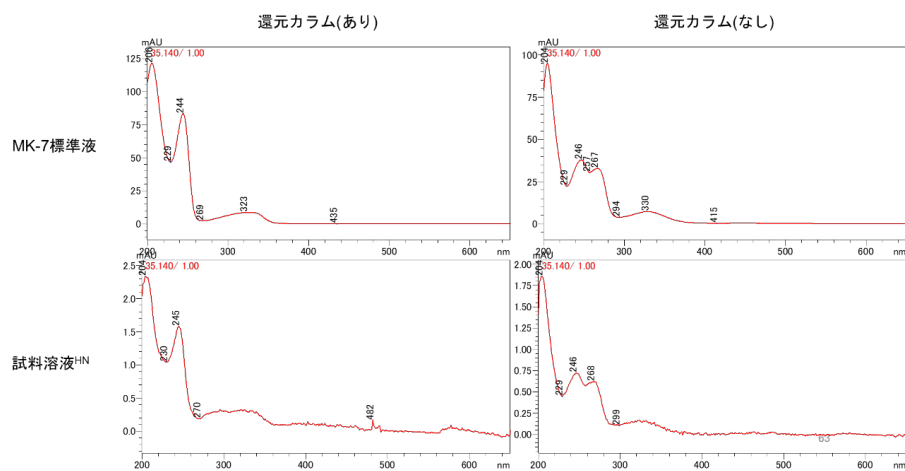


図7 MK-7 標準液及び試料溶液^{HN}の吸収スペクトル