

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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

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

分析対象分析対象物質分析対象物質とは異なる物質を基準とし、その相対モル感度 (relative molar sensitivity, RMS) を利用する定量法 (RMS 法) が、様々な天然物中の成分の測定に用いられている。UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法では、1) RMS 決定時に必要な分析対象と同一の物質の入手も困難な場合がある、2) 基準物質と分析対象物質の測定波長が異なる場合、装置間差が大きくなる、といった課題がある。本研究では、これら二つの課題について、1) クロロゲン酸類など同一の発色団を持つ化合物群の RMS を求め、法則性はないか、2) PDA 検出器のスペクトル検出特性を調査することで、測定波長の違いによる装置間差の要因の手がかりはないか、を調査した。

A. 研究目的

近年、標準物質の入手が困難な物質の定量において、代わりに他の物質を基準として設定 (基準物質) し、それに対する分析対象物質の相対モル感度 (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、基準物質に対する分析対象物質の 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。ひとたび一定の分析条件下での RMS 値が決定すれば、分析者は同一分析条件にて分析する限りは、この RMS 値を適用可能であるため、分析対象物質と同一の物質の定量用標品を用意する必要はない。

RMS 法の発展は、標準物質の入手が困難な天然物を取り扱う分野における成分の定量に大きく貢献している。その一方で、いくつかの課題もあり、例えば以下のようなものが挙げられ

る。

1) RMS 算出時には、試薬グレード、純度は問わないものの分析対象物質そのものが必要である。しかし、類似構造の物質は容易に入手可能でも分析対象物質の市販試薬が存在し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こと。

2) 現在、最も RMS 法の報告が多い検出器の一つであるフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器において、基準物質及び分析対象物質それぞれの吸収極大波長 (λ_{max}) が一致しない場合は、一致する場合と比較して装置間差が大きいこと (装置間差低減のため、RMS は二つの物質の λ_{max} で測定することが多い)。

本研究では、これらの課題解決のため、令和5～6年度の2年間で、類似構造をもつ物質において、基準物質を同一にした際の RMS 値にどのような法則性があるかを調べた。また、令和7年度には、PDA 検出器を用いた場合に、分析対象物質と λ_{max} が異なる基準物質を用いた定量法で装置間差に影響する要因を探索することを目的とし、PDA 検出器の特性を調査した。

液を調製し HPLC 用試料溶液とした。

B-3-2) 定量 NMR による純度測定条件

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)，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。

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

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

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

条件 1) MK-4, MK-7 及び K₁

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)。

条件 2) クロロゲン酸類

カラム：Wakopak Ultra C18-5 (4.6 × 250 mm, 5 μm)，カラム温度：40°C，移動相 A：0.1%ギ酸水溶液，移動相 B：0.1%ギ酸アセトニトリル溶液，移動相条件：0-15 min (90 : 10) → 15-30 min (90 : 10 → 50 : 50) → 30-45 min (90 : 10)，流速：1.0 mL/min，注入量：10 μL，PDA 検出器：190 nm-800 nm (定量用検出波長 325 nm)。

B-3-4) RMS の決定

各試薬(物質)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物質について作成した。分析対象物質の絶対検量線の傾きを，基準物質の絶対検量線の傾きで除し，RMS を求めた。なお，MK-4, MK-7 及び K₁の基準物質は D4HB，クロロゲン酸類の基準物質は CA である。

B-4) PDA 検出器の吸収スペクトル特性調査

B-4-1) 試験液調製

以下 2 種の試験液を調製した。

カフェイン溶液：12.2 mg/L になるよう試薬をとり，超純水に溶解させた。この溶液を相対濃度 1.0 とし，これに加えて，相対濃度 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 2.0, 及び 3.0 となるよう超純水にて希釈または調製した。なお，本研究で用いたカフェイン溶液の吸収極大は 273 nm であった。

3 色素混合液：黄色 4 号，赤色 2 号及び青色 1 号を一つの容器にはかりとり，超純水にて溶解させ混合液とした。混合液においては，それぞれの化合物濃度が，10.0 mg/L, 15.0 mg/L, 及び 4.1 mg/mL となるように調製し，このものを相対濃度 1.0 とした。この濃度を基準とし，相対濃度 1.0 のほか，相対濃度 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 2.0, 及び 3.0 となるような混合液を，超純水にて希釈または調製した。なお，本研究で用いた 3 色素混合液の吸収極大は 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm であった。

B-4-2) 測定方法及び条件

図 1 に示す装置構成で測定を実施した。レオダインには 2 mL のサンプルループを接続した。測定条件は以下のとおり

HPLC-PDA

測定波長：190～700nm または 190～510 nm

(装置のスペックによる)

移動相：超純水

流速：1.0 mL/min

セル音調：なし(実験室温度)

分光光度計

測定波長：190～900 nm

波長記録間隔：0.5 nm

B-4-3) 測定手順

B-4-1) に示す試料液は測定当日調製し、表 1 に示す装置での測定はすべて同一日に実施した。分光光度計は、測定の 1 時間前に起動させ、安定化させた。各試験液は超純水を対照として用い、各濃度について 2 回ずつ測定しデータを得た。

HPLC-PDA は、最低でも測定の 1 時間前に PDA 検出器のランプを起動させ、超純水を 1.0 mL/min 送液させた。試験液をマニュアルインジェクション用のシリンジに 6～7 mL とり、サンプリング内を試験液でしっかり満たした。HPLC-PDA の測定は手動により開始し、開始 1 分後に試験液を流路に注入した。これを、1 試験液につき濃度ごとに 2 回ずつ実施した。HPLC-PDA で得られたデータはすべて CSV 形式に変換し解析した。

C. 結果及び考察

C-1) RMS 法における類似構造間での法則性の調査

本研究では、1) 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分析対象とした RMS 値及び 2) クロロゲン酸類を分析対象とした RMS 値を算出し、類似構造間で RMS 値にどのような変化があるか調査した。本研究で対象とした物質の構造式を図 2 及び図 3 に示す。1) の分析対象物質では、ナフトキノン骨格に由来する UV 吸収帯とナフトキノンに結合した側鎖の二重結合に由来する UV 吸収帯が存在すると考えられる。MK-4、MK-7 及び K₁ において、側鎖の構造は様々であるが、ナフトキノン骨格は共通しているため、この骨格のみに由来する UV 吸収帯を測定波長として設定すれば、同一の基準物質に対する RMS は同一になることが予想された。2 台の HPLC-PDA にて、基準物質 D4HB に対する MK-4、MK-7 及び K₁ の RMS を求めたところ、いずれも 1.06 であった。このと

き、分析対象物質の測定波長は、ナフトキノン骨格に由来する 247 nm とした。ナフトキノン骨格をもつビタミン K 類は、本研究で対象とした化合物以外にも側鎖の異なる十数種類存在する。本研究により、側鎖が異なってもナフトキノン骨格由来の UV 吸収帯に影響する発色団がほかに存在しなければ、すべて同一の RMS で定量可能であることが示唆された。

では、同一の発色団の数が増えたら、単純に RMS は 2 倍になるのか？これを調べるために、2) のクロロゲン酸類を対象とした実験を行った。クロロゲン酸類は、キナ酸にカフェ酸などのケイ皮酸誘導体が結合した化合物群である。カフェ酸を基準物質として得られた RMS を表 2 に示す。

キナ酸に一つカフェ酸が結合したモノカフェオイルキナ酸(CQA)のうち、結合位置だけが異なる 3CQA、4CQA 及び 5CQA の RMS はそれぞれ 1.123、1.115 及び 1.115 であり、ほぼ同じであった。キナ酸に一つフェルラ酸が結合し FQA のうち、結合位置だけが異なる 3FQA、4FQA 及び 5FQA の RMS はそれぞれ 1.246、1.262 及び 1.502 であった。4FQA 及び 5FQA はモノカフェオイルキナ酸同様、ほぼ同じ RMS であったが、3FQA のみ大きな値となった。3FQA のみ大きな値である理由は不明であるが、ケイ皮酸誘導体のキナ酸への結合数が一つである場合、ケイ皮酸誘導体の化合物種が同じであれば、同一の RMS を用いても定量値への影響はせいぜい 1%程度と考えられた。

一方、5CQA の RMS に対する CQA 及び FQA (3FQA を除く) の RMS の比を算出したところ、FQA は CQA よりも 10%程度大きな値であった。フェルラ酸はカフェ酸の 3 位の水酸基がメトキシル基となった構造である。基準物質と 4FQA 及び 5FQA は溶出時の移動相条件が異なるため、CQA と 4FQA 及び 5FQA の RMS の違いは構造もしくは溶媒による深色効果／淡色効果によるものと推測された。クロマトグラフィーの分析条件にもよるが、ケイ皮酸誘導体の種類が異なる場合、この構造が発色団であることから、同一の RMS と見なす前に一考が必

要である。

キナ酸にカフェ酸が二つ結合した diCQA のうち、3,4-diCQA、3,5-diCQA 及び 4,5-diCQA の RMS はそれぞれ 2.175、2.268 及び 2.151 であった。5CQA の RMS に対するこれらの RMS の比はそれぞれ 1.95、2.03 及び 1.93 であった。発色団のカフェ酸の数が単純に 2 倍に増えると RMS も 2 倍になると予想していたが、3,4-diCQA および 4,5-diCQA では 1.9 倍程度とわずかに小さな値となった。分子内に立体障害があると ϵ は低下することが知られている¹⁾。3,4-diCQA および 4,5-diCQA の二つのカフェ酸はキナ酸の隣り合った炭素に結合しており、二つのカフェ酸が隣り合っていない 3,5-diCQA と比較して立体障害の影響があるのではと考えられた。溶媒系は異なるが 5CQA と 4,5-diCQA のモル吸光係数を比較した報告があり、4,5-diCQA は 5CQA の 1.9 倍程度という結果とも矛盾がなかった²⁾。

キナ酸にカフェ酸とフェルラ酸が一つずつ結合した FCQA のうち、本研究で単離精製した F_CQAF2、F_CQAF5 及び F_CQAF7 の RMS はそれぞれ 2.274、2.429 及び 2.398 であった。diCQA 同様、立体障害がもっとも小さいと思われる 3 位及び 5 位にケイ皮酸誘導体が結合した F_CQAF5 が最も大きい値を示したが、その RMS は diCQA よりも 10% 程大きく、FQA の RMS を 2 倍にした値(仮に 4FQA の 2 倍の 2.26)よりも 4% 程小さかった。これは、CQA の RMS が FQA の RMS より小さいことが影響していると考えられた。

以上の結果から、クロロゲン酸類の場合、立体障害等の影響もあり、発色団であるケイ皮酸誘導体の数が増えたからといって、その RMS が単純に 2 倍などになるとは限らないことが示された。しかし、キナ酸にケイ皮酸誘導体の一つであれば、その位置異性体はほぼ同一の RMS であること、ケイ皮酸誘導体が 2 つだから RMS も 2 倍にしたとしても定量値への影響は 10% 程度であることが示唆された。

C-2) PDA 検出器の吸収スペクトル特性調査

本研究における試験液の測定は、すべて表 1 に示す分光光度計及び HPLC-PDA にて実施した。なお、分光光度計は表 1 に示す 1 台を、HPLC-PDA は表 1 に示す 6 台(メーカーは 5 社、装置 A~F、ただし装置 D 及び E は、同一メーカーで装置構成もほぼ同一)を用いた。

本研究では、分光光度計測定により得られる吸収スペクトルが真、すなわち「標準スペクトル」と仮定して、各 PDA 装置における吸収スペクトルと比較した。装置間比較に用いる試験液の吸収スペクトルの波長は、各試験液の吸収極大から選択した。各試験液における「相対濃度 1.0」は、分光光度計で得られた吸収極大波長(273 nm、418 nm、522 nm、及び 629 nm)における分光光度計での吸光度が 0.6AU となる濃度と定義した。

HPLC-PDA での測定において、試験液を分析したときに得られるクロマトグラムを図 4 (A) に示す。PDA 検出器のフローセルが完全に試験液で満たされると、クロマトグラム上では飽和したピークが観察される。飽和したピークの中央付近では、移動相の流れはあるものの常に同一濃度の溶液が満ちていると考えられるため、分光光度計のセルによる測定と同等の状態であると見なすことが可能である。各試験液の代表的な吸収スペクトルを図 4 (B)(C) に示す。

C-2-1) 各検出器の直線性

まず、検出器によって直線性に特徴があるかを確認するため、各試験液の吸収スペクトルから各測定波長(273 nm、418 nm、522 nm、及び 629 nm)における吸光度を得た。試験液の相対濃度を横軸に、分光光度計または PDA 検出器の吸光度を縦軸にとった検量線を図 5 に示す。分光光度計では、273 nm、418 nm、522 nm、及び 629 nm のすべての波長において、濃度 0.10~3.0 の範囲で良好な直線性を示した。PDA 検出器は、装置 A、B 及び C は、分光光度計同様 4 波長すべてにおいて濃度 0.10~3.0 の範囲で良好な直線性を示した。装置 D 及び E では、273 nm で測定した場合は濃度 0.10~3.0 の範囲で良好な直線性を示した。しかし、418 nm、522 nm、及

び 629 nm の 3 波長における吸光度は、濃度 0.10～2.0 の範囲では直線性が見られたものの、濃度 3.0 で極端に大きな値を示し、濃度 0.10～3.0 の範囲での直線性は不良であった。装置 F でも、273 nm および 418 nm の吸光度は、装置 D 及び E と同様に低濃度域では直線性が認められたものの、濃度が高くなるにつれて低濃度域で作成した直線の外挿から逸脱し、濃度 0.10～3.0 の範囲における直線性は不良であった。

想定より極端に大きな吸光度を示した装置 D における濃度 3.0 の 3 色素混合液の吸収スペクトルを、分光光度計のものと重ねたところ(図 6)、直線性の確認に用いた測定波長において、装置 D では分光光度計と比較して信号強度(吸光度)が増強されていることが明らかとなった。

吸光度は、Lambert-Beer の理論上、溶液中の物質濃度に比例するため、入射光強度が一定である場合、高濃度溶液になるほど光の吸収が大きくなり、透過光強度は低下する。装置 D～F でみられた高濃度域における吸光度の増強は、微弱な透過光を検出するための何らかの機能が検出器に搭載されていることが示唆された。また、直線性が不良であった領域が、装置 D、E(同メーカー)では高波長側、装置 F では低波長側と異なっていた。どの装置も光源に重水素ランプとタングステンランプの二つを搭載しており、装置 D、E はタングステンランプ、装置 F は重水素ランプの影響がある領域でそれぞれ直線性が不良であったと思われる。

C-2-2) 分光光度計における吸光度を基準としたときの各 PDA 検出器の実測値比較

次に、いずれの装置 A～F(PDA 検出器)においても良好な直線性があった濃度範囲 0.1～1.0 での 4 波長(273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm)における各装置の吸光度が、分光光度計にて得られた吸光度と比較してどのように異なっているかを調査した。分光光度計における吸光度を 1 としたときの各装置の吸光度比を算出したところ、差が大きい装置で 15%程度であった。また、同一装置であっても、分光光度計との吸光度比の大小パターンは波長ごとに異なっ

おり、一見して法則性を見いだすことが困難であった。そこで、同じく濃度範囲 0.10～1.0 を対象とし、分光光度計における吸光度を 1 としたときの各装置の吸光度を、同一装置内において検出波長ごとに比較しどのように異なるか調査した(図 7)。その結果、装置 A～F のすべてにおいて、分光光度計に対する吸光度比の濃度による遷移パターンが、273 nm で測定したときと、418 nm, 522 nm, または 629 nm で測定したときの 2 つのパターンに大別された。先述の通り、どの装置も光源に重水素ランプとタングステンランプの二つを搭載しており、380～400nm 付近でこの二つのランプを切り替えている。切り替え手法は、メーカーごとにそれぞれ多少の違いはあると思われるが、装置 D 及び E は同一メーカーの異なる個体であるため光学系はほぼ同一と見なせるが、分光光度計に対する吸光度比は装置 D・E 間で大きく異なっている。このため、分光光度計との吸光度比の差には、光源ランプの違い(消耗度等を含む)が大きく寄与すると考えられた。しかし、同一の光源ランプ種である場合でも、測定波長によって分光光度計に対する吸光度比は一定ではなかった。さらに、分光光度計に対する吸光度比を装置 B と C とで比較すると、装置 B では $418\text{ nm} > 522\text{ nm} > 629\text{ nm}$ の順に吸光度比が小さくなるが、装置 C では $522\text{ nm} > 418\text{ nm} > 629\text{ nm}$ の順に小さくなっており、同一の光源ランプ種内でも装置間で必ずしも同様の強度比とはならなかった。これは、濃度に対する検出器の応答値をとった検量線の傾きが装置間で逆転することを示しており、検量線の傾きの比で求められる RMS 値への影響が大きいことが示唆された。

C-2-3) 異なる二つの $\lambda_{\max}$ を測定波長として求めた RMS 値の装置間差の補正

RMS 法の定量値における装置間差を小さくするには、測定波長は基準物質及び分析対象物質の $\lambda_{\max}$ とすることが重要である。このとき、可能な限り分析対象物質と同一の $\lambda_{\max}$ をもつ物質を基準物質とし、その波長における応答量を用いる方が良いことが報告されている³⁾。こ

の理由としては、本研究結果からも明らかなように、同一試料を同様に測定した場合においても、測定装置及び波長によって、吸光度が大きく異なることが挙げられる。基準物質と分析対象物質を同一波長で測定すれば、このようなズレは相殺されるが、 $\lambda_{\max}$ が異なるとき、とくに紫外領域と可視領域のように使用するランプが異なる場合や波長差が大きい場合には、装置間でのズレの影響が大きくなると考えられる。

測定波長が同一であり同一試料を分析したとしても、そもそも複数の装置間で吸光度がばらつく、ということが、RMS 値の決定に測定波長が二つ必要である場合にその装置間差に大きく影響していると仮定すると、RMS 値の装置間差をある程度補正可能であると考えられた。そこで、既報の結果³⁾を用いて上記の仮定と補正方法を検証した。既報では、基準物質としてカフェイン(CAF)を設定し、これに対する分析対象物質 4-アミノカルミン酸(4-ACA)の RMS 値を決定した。このとき、2 種の RMS 値を求めており、一つは 4-ACA の検出波長をその $\lambda_{\max}$ の一つである 273 nm としたもの(以下、 $\text{RMS}^{273/273}$)、もう一つは同じく $\lambda_{\max}$ の一つである 525 nm としたもの(以下、 $\text{RMS}^{525/273}$)である。基準物質である CAF はどちらの場合もその $\lambda_{\max}$ である 273 nm で測定したため、 $\text{RMS}^{273/273}$ は検出波長が一つの場合、 $\text{RMS}^{525/273}$ は検出波長が二つの場合として単純に比較可能である。既報のうち、本研究と全く同一の PDA 検出器を用いて決定した RMS 値を抜粋し、表 3 に示す。表 3 から明らかなように、測定波長が 2 つある $\text{RMS}^{525/273}$ の装置間の RSD (%) は $\text{RMS}^{273/273}$ と比較して大きい。

RMS 法では、通常、どのようなメーカーの検出器でも適用可能な RMS 値を提示するが、その RMS 値は複数装置で算出した RMS の平均値であることが多い。このとき、RSD (%) が大きいほど、RMS 法によって得られる定量値がばらつく要因となる。そこで、RMS 値の装置間差の補正を、ある基準となるような検出器を想定することで試みた。基準となる検出器と分析者の検出器とで、どの程度の“差”があるか、すな

わち補正係数を求めることができれば、基準となる検出器における提示された RMS 値から、分析者自身の装置で得られるであろう補正 RMS 値を予測することが可能となる。

基準物質に対する分析対象物質の RMS 値を求める際に必要な、PDA 検出器から得られるデータは、基準物質及び分析対象物質の検出波長におけるクロマトグラムのピーク面積である。同一試料を分析したときのピーク面積値は吸光度に比例するため、2 台の装置におけるピーク面積比は、同一の試料を分析したときに得られる吸光度比にほぼ等しい。そのため、RMS を求めた検出器と実際に分析者が使用する検出器の吸光度比が、RMS 値の補正係数となる。本検討では、RMS 法にて提示される RMS が装置 A で求めた場合を想定し、装置 A に対する装置 B~D との補正係数を、273 nm と 522 nm のときの各装置の吸光度の実測値を用いて求めた(表 4)。装置 A を基準の検出器とする場合、 $\text{RMS}^{525/273}$ は 0.492 として定量法に示される。仮に、 $\text{RMS}^{525/273}$ が 0.516 であった装置 D を用いて、RMS 法(0.492 が RMS 値として提示されたもの)を実施した場合、得られる定量値に 4.9% の差が生じる可能性がある。各装置の実測値が真の $\text{RMS}^{525/273}$ の値であると仮定し、提示値(装置 A の値)との差(%)と、補正係数を用いて求めた補正值との差(%)をそれぞれ比較した(表 4)。その結果、差が広がった装置も縮んだ装置もあったが、最も大きな差が 4.9 から 3.5 へと 1.4 ポイント小さくなった。これは、得られる定量値の装置間のばらつきが小さくなることを示している。

D. 結論

本研究では、UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法の課題のうち、2 つに注目して実験を行った。

一つ目は、類似構造をもつ物質において、基準物質を同一にした際の RMS 値にどのような法則性があるかを検証した。

まず、同一の発色団を持つ K_1 (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。

次に、CA を基準物質としてクロロゲン酸類 12 化合物の RMS を求めた。CA を基準物質とした場合 CQA の RMS は概ね 1.12 であった。その他のクロロゲン酸類の RMS は、diCQA は CQA の約 2 倍、FQA は 1.1 倍、F+CQA は 2.1 倍程度であった。CQA 以外は単離精製が必要であったり、市販試薬があっても非常に高価であったりするものがほとんどである。本研究の結果から、同一の発色団をもつ化合物群において、一つの化合物の RMS が明らかであれば、発色団の位置や数が異なっている、他の化合物の RMS がある程度予測可能と考えられた。

二つ目の課題として、PDA 検出器を用いた場合に、分析対象物質と $\lambda_{\max}$ が異なる基準物質を用いた定量法で装置間差に影響する要因を探索することを目的とし、PDA 検出器の特性を調査した。PDA 検出器のスペクトル検出特性を調査するため、様々なメーカーの複数装置にて、同一試料の 273 nm, 418 nm, 522 nm, 629 nm における吸光度を測定し、分光光度計の値を基準として比較した。その結果、装置によって直線性の範囲が異なること、直線性が見られる範囲内であっても分光光度計の値からは最大で 15%ほどズレがある場合があること、分光光度計とのズレ方は波長や装置によって異なり一定ではないことなどが明らかとなった。とくに、光源としている重水素ランプとタングステンランプが切り替わると、基準とのズレ方に大きな変化が見られる傾向があった。

そこで、装置間差を小さくするために、RMS 法にて提示された RMS を求めた装置と分析者との装置との間での感度補正の方法の一つを提案した。具体的には、同一試料を両装置で分析した際の吸光度から補正係数を算出し、分析者の装置における補正 RMS を求めるものである。本補正の検討結果により、装置間差に PDA 検出器における波長ごとの感度差が大きく寄

与していることが裏付けられたといえる。

E. 参考文献

- 1) 脇田久伸, 増田勲, 藤原学, “可視・紫外線吸収スペクトル法および蛍光スペクトル法,” 著: 第二版 機器分析のてびき①, 化学同人, 1996, p. 131.
- 2) Kaeswurm J A H, Scharinger A, Teipel J, Buchweitz M: Absorption Coefficients of Phenolic Structures in Different Solvents Routinely Used for Experiments. *molecules*, 2021; 26: 4656. (doi: 10.3390/molecules26154656)
- 3) Nishizaki Y. *et al*, Food Additives & Contaminants: PART A, 35(5), 838–847 (2018).

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masumoto N, Ohno T, Suzuki T, Togawa T, Sugimoto N: Application of the relative molar sensitivity method using GC-FID to quantify safranal in saffron (*Crocus sativus* L.). *J. Nat. Med.*, 2023; 77: 829-838.
- 2) Masumoto N, Yamazaki T, Miura T, Nakajima K, Yamamoto K, Kato T, Minamoto N, Suematsu T, Sato Y, Nomura A, Akagi M, Ohtsuki T, Koyama K, Mizumoto T, Miyashita T, Kawashima S, Saito T, Sugimoto N: Development of a Standard-Free Analytical Quantitative Method based on Liquid Chromatography Using Relative Molar Sensitivity for Chlorogenic Acid in Apple Juice. *Chem. Pharm. Bull.*, 2025; 73(7): 650–657. DOI: 10.1248/cpb.c25-00129
- 3) 増本直子: 既存添加物の品質確保のための基礎研究. *食品衛生学雑誌*, 2025; 66: J-73-J-75.

2. 学会発表

- 1) 増本直子: 相対モル感度(RMS)を用いた定量法, 室間共同試験をしてみたら. 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会 (2023.12).
- 2) 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).

- 3) 増本直子：既存添加物の品質確保のための基礎
研究. 第 120 回日本食品衛生学会 学術講演会
(2024.11).

表 1 PDA 検出器の吸収スペクトル特性調査で用いた装置

	検出器の型番	メーカー
分光光度計	V-650	日本分光
HPLC-PDA	Series1200 G1315B	Agilent
	Ultimate3000 DAD	Thermo
	2996	Waters
	SPD-M20A	島津製作所
	MD-4010	日本分光

表 2 CAF に対する 4-ACA の RMS 値²⁾

検出器	RMS ^{525/273}	RMS ^{273/273}
装置 A	0.492	1.29
装置 B	0.475	1.27
装置 C ^{a)}	0.498	1.31
装置 C ^{a)}	0.491	1.30
装置 D ^{a)}	0.499	1.25
装置 D ^{a)}	0.516	1.29
RSD (%)	2.7	1.5

a) カラム構成が異なる

表 3 クロロゲン酸類のカフェ酸に対する相対モル感度(RMS)

CA に対する RMS				平均値 (SD)	5CQA の RMS に 対する 各クロロゲン酸類の RMS の比
LC 装置 1		LC 装置 2			
PDA 検出器	UV 検出器	UV 検出器			
5CQA	1.116	1.112	1.116	1.115 (0.002)	1.00
4CQA	1.117	1.113	1.115	1.115 (0.002)	1.00
3CQA	1.126	1.124	1.120	1.123 (0.003)	1.01
3,4-diCQA	2.175	2.171	2.179	2.175 (0.004)	1.95
3,5-diCQA	2.264	2.250	2.291	2.268 (0.021)	2.03
4,5-diCQA	2.140	2.132	2.180	2.151 (0.026)	1.93
5FQA	1.232	1.245	1.261	1.246 (0.015)	1.12
4FQA	1.252	1.264	1.269	1.262 (0.009)	1.13
3FQA	1.481	1.500	1.524	1.502 (0.022)	1.34
FCQA_F2	2.269	2.275	2.278	2.274 (0.005)	2.04
FCQA_F5	2.411	2.422	2.453	2.429 (0.022)	2.17
FCQA_F7	2.400	2.405	2.389	2.398 (0.008)	2.15

表 4 装置 A の RMS 値を基準としたときの装置 B~C の補正 RMS 値

装置	吸光度 (相対濃度 0.25)		補正係数	RMS ^{525/273}		実測の RMS との差 (%)	
	522 nm	273 nm		実測値	補正值	提示値	補正值
A	0.144	0.149	1.00	0.492	0.492	-	-
B	0.144	0.149	1.00	0.475	0.492	-3.5	-3.5
C	0.147	0.151	1.01	0.498	0.496	1.2	0.5
				0.491	0.496	-0.2	-0.9
D	0.154	0.153	1.04	0.499	0.512	1.4	-2.6
				0.516	0.512	4.9	0.7

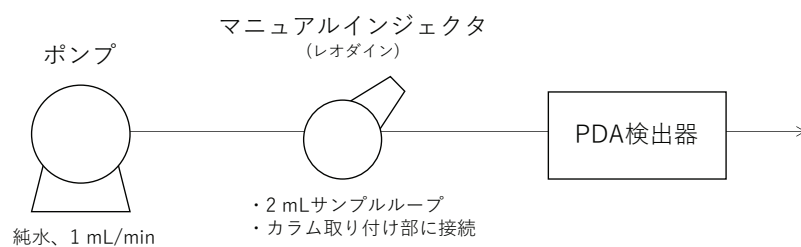


図1 PDA 検出器装置間差調査のための装置構成.

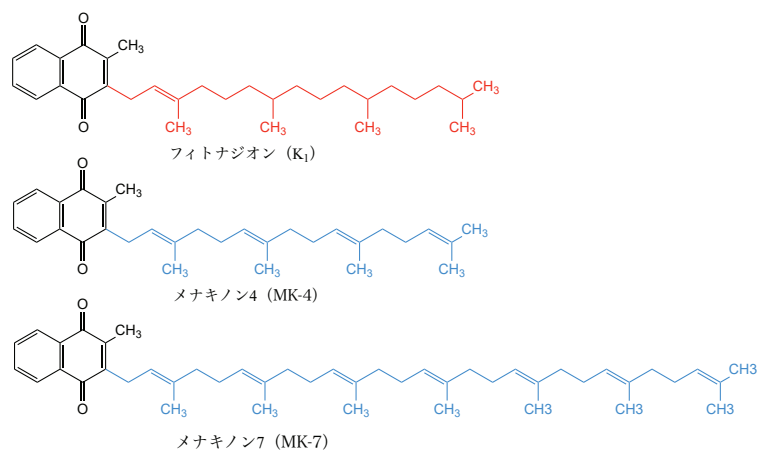


図2 本研究で D4HB に対する RMS を決定したメナキノン類及びフィトナジオン類の構造

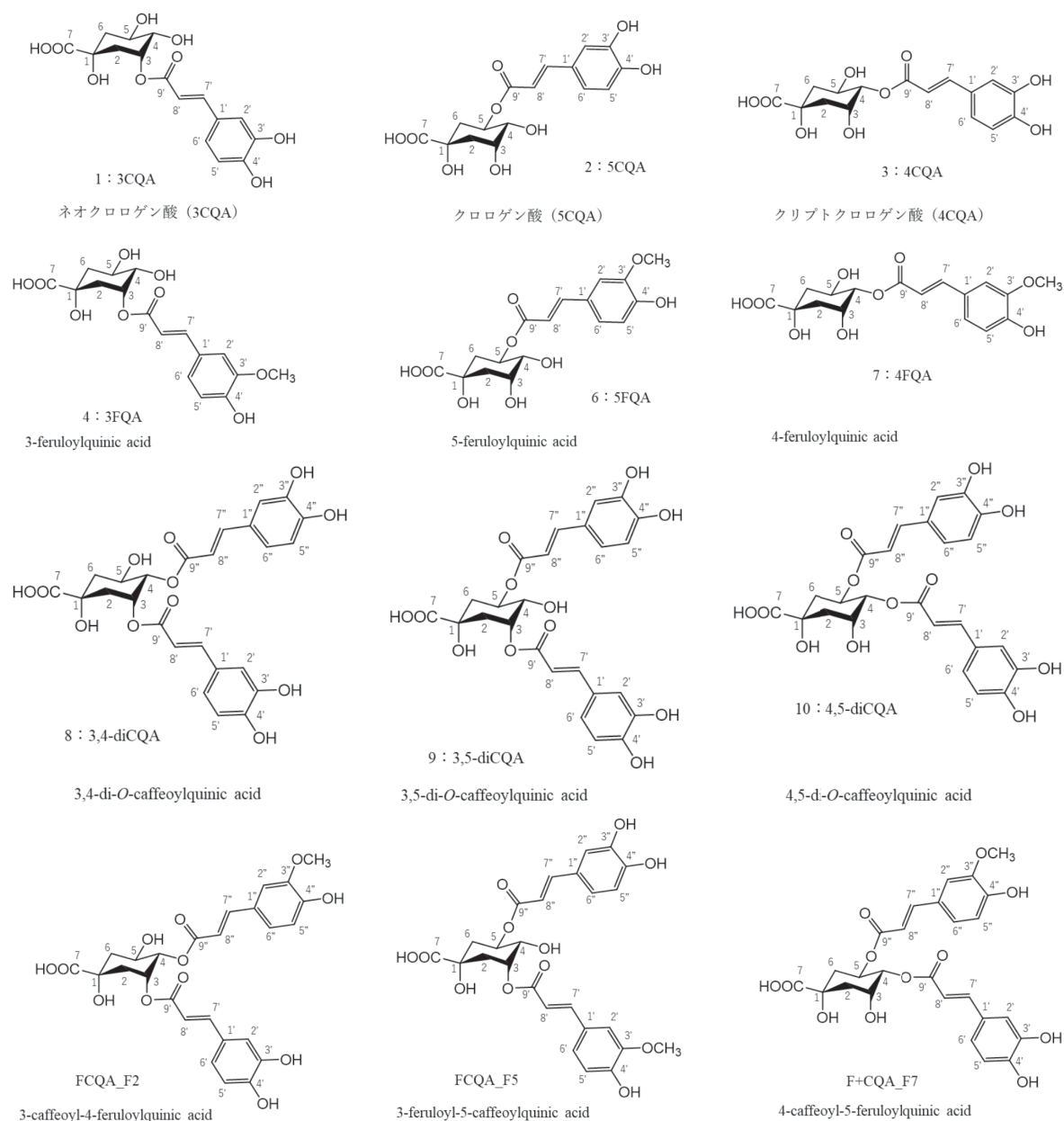


図 3 本研究でカフェ酸に対する RMS を決定したクロロゲン酸類の構造

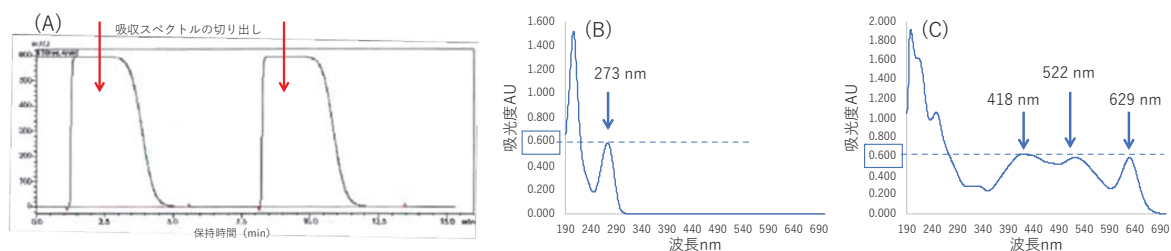


図 4 (A) HPLC-PDA クロマトグラム. ピークが飽和しているあいだは、フローセルが試験液で満たされていると見なし、赤矢印で示す保持時間付近の吸収スペクトルを切り出し、PDA 検出器における各試験液の吸収スペクトルを得た。

(B) 相対濃度 1.0 におけるカフェイン溶液及び(C) 相対濃度 1.0 における 3 色素混合液の代表的な吸収スペクトル. 吸収極大波長を矢印で、吸光度 0.6AU を点線で、それぞれ示している。

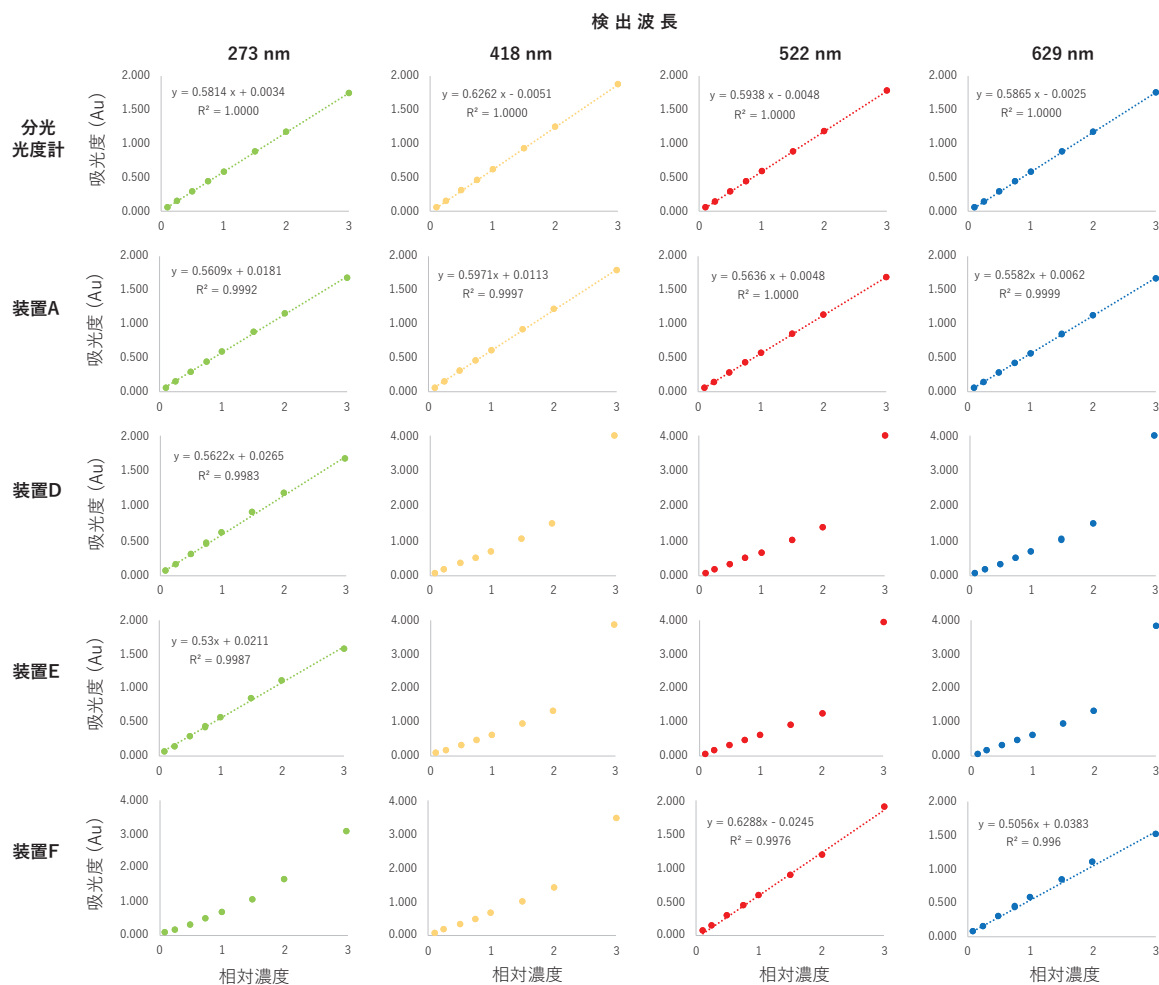


図 5 試験液の 273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm における相対濃度に対する吸光度. 装置 B, C は装置 A と同様の直線性を示したので割愛した。

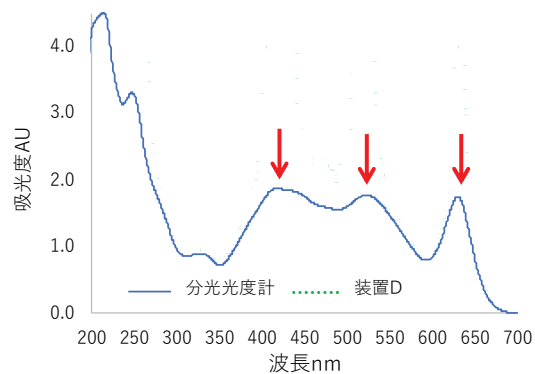


図 6 3 色素混合液(濃度 3.0)の吸光スペクトル. 分光光度計(—)及び装置 D(···)で測定したときのものを重ね書きした. 赤矢印で示す波長における吸光度を, 直線性の確認に用いた.

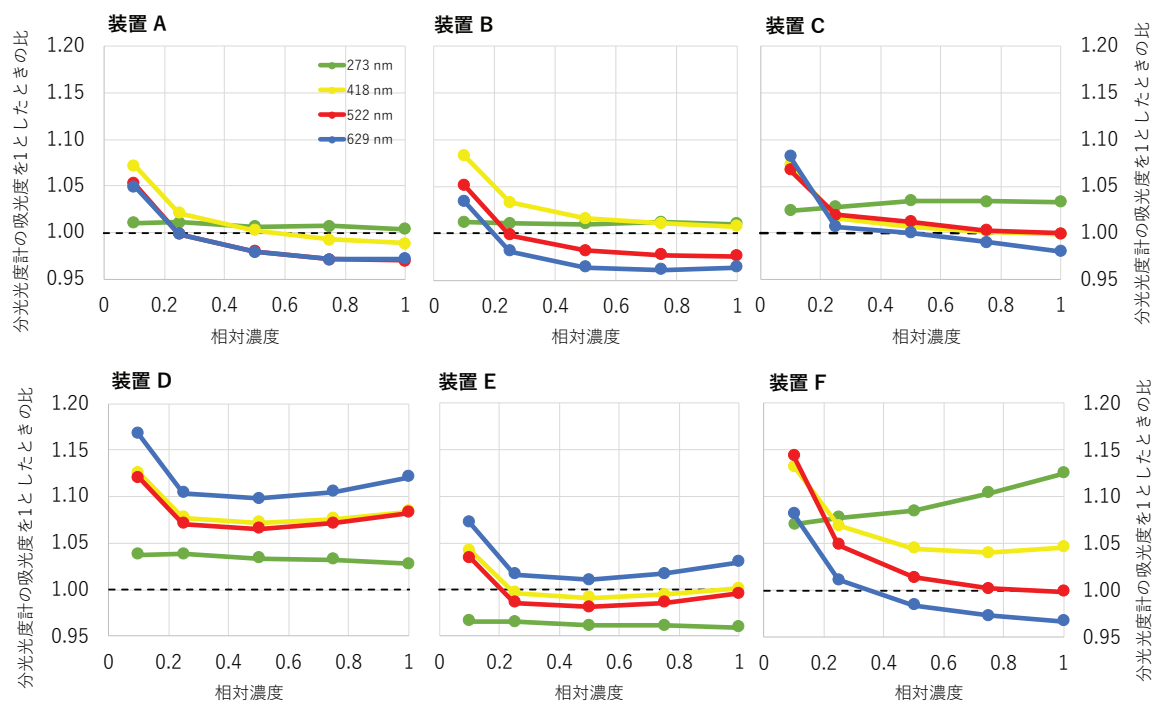


図 7 分光光度計の吸光度を 1 としたときの装置 A~F で得られた吸光度との比を, 同一装置内で検出波長をごとに比較した結果. 検出波長は, 緑色: 273 nm, 黄色: 418 nm, 赤色: 522 nm, 青色: 629 nm. 吸光度比が 1 (分光光度計と同一吸光度のライン) を黒色点線で示している.