

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05430

研究課題名（和文）相対モル感度を利用した測定対象の定量用標品を必要としない食品関連成分分析法の確立

研究課題名（英文）Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of food components

研究代表者

大槻 崇 (OHTSUKI, Takashi)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：30401011

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：LCを用いた食品成分分析における定量用標品の問題など食品の品質や安全性を評価・保証する上で解決すべき問題を克服するため、¹H-qNMRに基づく計量学的に正確な相対モル感度（RMS）を用いた測定対象の定量用標品を必要としない食品関連成分分析法（RMS法）の確立について検討した。主にイソフラボン12種などについて検討し、基準物質に対する各測定対象物質の計量学的に正確なRMSが判明した。また、加工食品を対象とした分析において、RMS法と従来法に測定対象の定量値に大きな違いは無く、分析精度も良好であった。以上より、本法は測定対象の定量用標品を必要としないイソフラボン等の分析法として有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、基準物質とRMSを用いた分析法（RMS法）は、食品のような複雑な混合物中の特定成分について、その定量用標品を使わずに正確に定量できるとともに分析コストの低減化につながることを実証された。また、使用する分析装置や従来法の測定条件の大きな変更は必要とせずRMS法の適用が可能であることから、加工食品中の食品成分の分析のみならず、食品素材の品質の評価、医薬品等の血中濃度測定などにも応用可能と考える。このように、本研究成果は食品、医薬品分野におけるLC分析法の簡便化、低コスト化、精度向上に向けた基礎的データとしても利用可能と考える。

研究成果の概要（英文）：To address the challenges associated with assessing and guaranteeing the quality and safety of food products, we have devised a method for analyzing isoflavones in food using relative molar sensitivity (RMS) computed using ¹H-qNMR, which is highly accurate from a metrological standpoint. First, the RMS values were determined for each analyte to ensure metrological correctness. In addition, there was no significant difference between the RMS and conventional methods in the quantitative analysis of processed foods containing the analyte. Moreover, the analysis was precise and accurate. Considering these findings, the RMS method is deemed a practical technique for determining the analyte with precision in processed foods.

研究分野：食品分析

キーワード：¹H-qNMR Food analysis

1. 研究開始当初の背景

食品の機能性や安全性に対する消費者の関心は非常に高く、食品中の様々な成分や有害汚染物質に対する分析法が開発・利用されている。これらの定量分析では、HPLCを使用することが多いが、一般的に使用される紫外可視分光検出器や多波長検出器の検出原理は測定対象固有のモル吸光係数に依存しているため、定量には測定対象と同一かつ純度が正確な定量用標品が必要である。しかし、食品関連成分は多様であり、定量用標品の入手が商業的に困難な場合や、入手できたとしても価格や純度に問題があることが多い。この標品の入手に関する制約が、食品関連成分の正確な分析や分析法の確立において大きなボトルネックとなっている。食品関連成分の分析は、前述した定量用標品の問題のほかにも、試料によっては煩雑な前処理や低回収率などの問題に直面することが多く、現状では食品関連成分に対する有用な定量分析法が完全に確立されているとは言いがたい。このような従来の分析法の限界は、食品の品質や安全性を評価・保証する上で解決しなければならない大きな課題である。

2. 研究の目的

上記で示した問題を克服するため、「¹H-qNMRに基づく計量学的に正確な相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity : RMS)」を用いた分析法 (RMS 法) に着目した。本法は、図 1 に示すように、「測定対象」と「測定対象とは異なる基準物質 (内標準物質)」との間の正確な相対モル感度 (モル吸光係数比) を明らかにすることにより、「基準物質」と「RMS」から測定対象の定量を可能とする方法である。すなわち、この RMS が明確になれば、理論上、「1つの基準物質 (代替定量用標品) からあらゆる測定対象の定量が可能」と言える。それゆえ、本法を食品分析へ応用すれば、食品の品質や安全性の評価などにおける定量値の信頼性は大きく向上し、消費者の健康と安全の一層の確保に大きく貢献できると考えられる。そこで、本研究では RMS を用いた食品中の食品関連成分分析法の確立について検討した。本報告書では、大豆イソフラボン類 (図 2) を対象とした検討について詳述する。

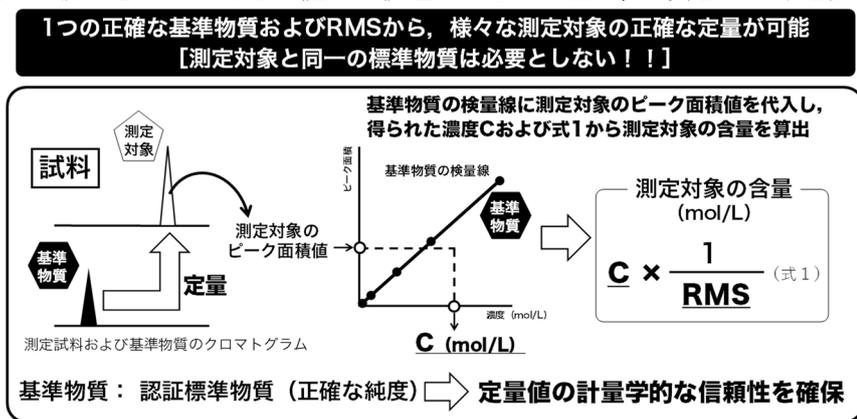


図 1 相対モル感度 (RMS) を用いた分析法の概略

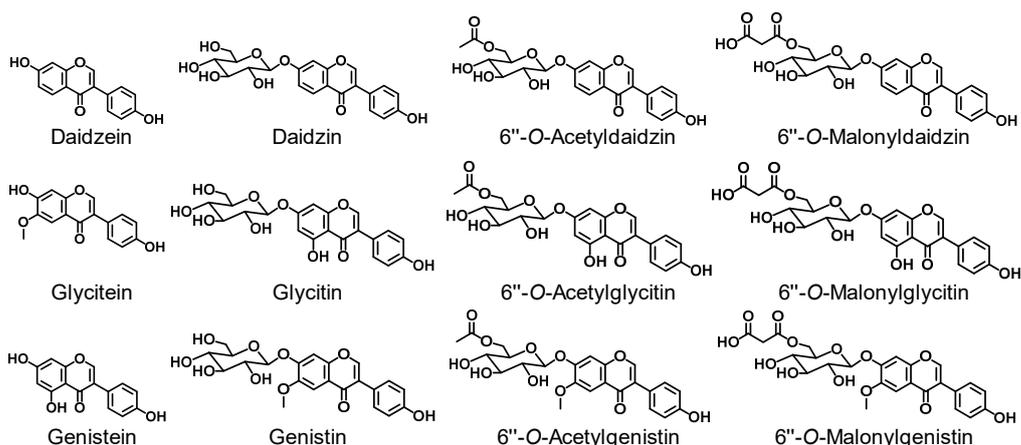


図 2 測定対象物質の化学構造

3. 研究の方法

(1) 基準物質に対する測定対象の相対モル感度 (RMS) の算出

基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出するため、各測定対象物質 (大豆イソフラボン 12 種) および基準物質の ¹H-qNMR または認証値からの絶対純度に基づき標準溶液を調製した。なお、基準物質は認証標準物質であるカフェインを使用した。これらの標準溶液を HPLC (検出

器：多波長検出器，検出波長：255 nm（大豆イソフラボン 12 種），カフェイン 273 nm）に供し，測定対象物質および基準物質ごとに 3 併行の検量線の傾きの平均値を求め，基準物質に対する各測定対象物質の RMS を算出した．なお，HPLC 条件は，「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取扱いに関する指針について（平成 18 年 8 月 23 日付け食安発第 08230001 号）」に記載の方法を一部変更して使用した．

(2) RMS 法と従来法による加工食品中の各測定対象物質の含量の比較

加工食品などに含まれる大豆イソフラボン類の定量における前処理は，「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取扱いに関する指針について（平成 18 年 8 月 23 日付け食安発第 08230001 号）」に従い試験溶液を調製し，RMS を求めた際に使用した HPLC 条件により分析を行い，定量値を算出した．

4. 研究成果

(1) 基準物質に対する測定対象の相対モル感度（RMS）の算出

まず，各種濃度の測定対象物質および基準物質の標準溶液について，当該分析条件を用いて分析し（図 3），得られたピーク面積とモル濃度との関係から原点を通る検量線を作成した．その結果，各測定対象物質および基準物質の検量線式の傾き（3 併行の平均値）は，図 4 に示す値であることが判明した．また，これらの相対標準偏差（RSD）は，0.5%~2.6%と大きなばらつきは認められなかった．さらに，各検量線の決定係数は 0.9998~1.000 であり，すべての測定対象物質および基準物質で，検討した濃度範囲における直線性は良好であることが確認された．

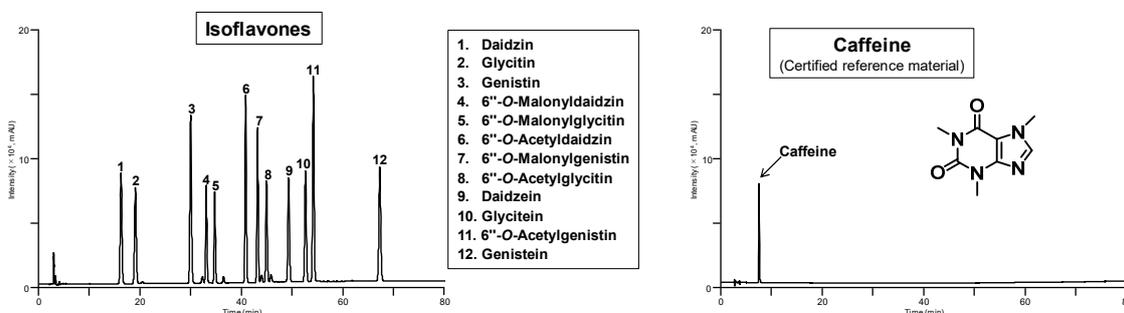


図 3 測定対象物質および基準物質のクロマトグラム

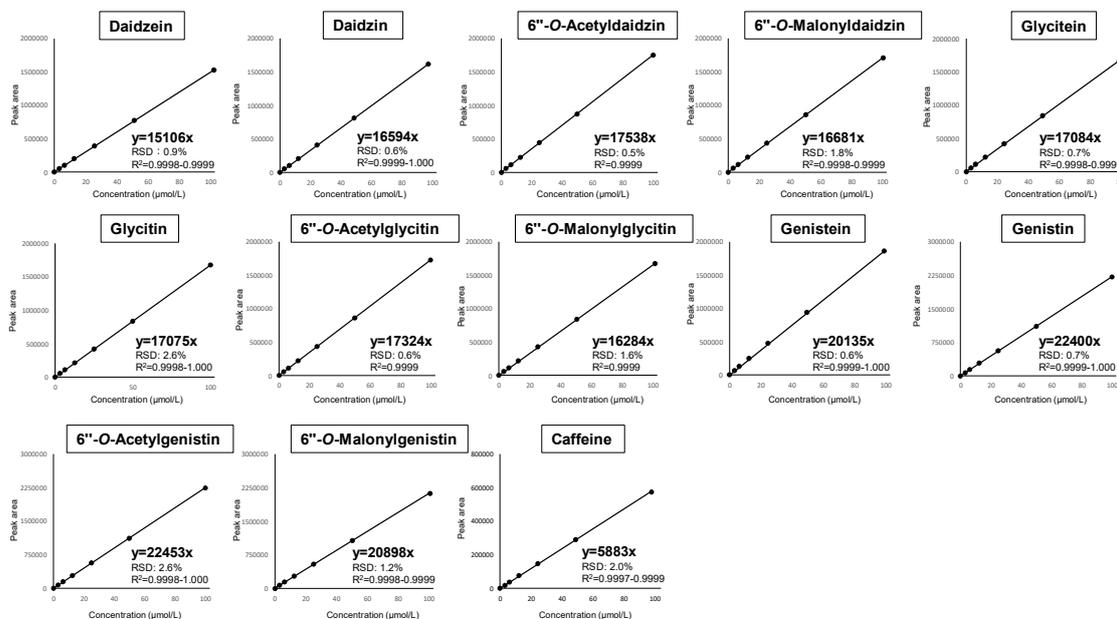


図 4 測定対象物質および基準物質の検量線

そこで，測定対象物質及び基準物質の検量線の傾きの値に基づき，傾きの比（測定対象物質/基準物質）より，基準物質に対する各測定対象物質の RMS を算出した結果，表 1 に示す値であることが確認された．

表1 基準物質に対する各測定対象物質のRMS

Compound	RMS	Compound	RMS
Daidzein	2.57	6"-O-Acetylglycitin	2.94
Daidzin	2.82	6"-O-Malonylglycitin	2.77
6"-O-Acetyldaidzin	2.98	Genistein	3.42
6"-O-Malonyldaidzin	2.84	Genistin	3.81
Glycitein	2.90	6"-O-Acetylgenistin	3.82
Glycitin	2.90	6"-O-Malonylgenistin	3.55

(2) RMS法と従来法による加工食品中の各測定対象物質の含量の比較

次に、大豆イソフラボンを含有する加工食品5種(豆乳, 豆腐, きなこ, 味噌, 納豆) およびサプリメント2種を用いて, RMS法から得られる各測定対象の含量の妥当性を評価するために, 従来の定量法の一つである絶対検量線法より得られる定量値と比較した. その結果, 表2および図5に示すように, すべての試料において, 両法の各測定対象物質の定量値に大きな違いは認められなかった.

表2 RMS法および従来法より算出された各測定対象物質の含量の比較 (n=3)

Sample	Compound	RMS method		Conventional method	
		Content (mg/kg)	RSD (%)	Content (mg/kg)	RSD (%)
Soy milk	Daidzin	53.4	0.1	54.1	0.1
	Genistin	92.4	0.2	92.5	0.2
	6"-O-Malonyldaidzin	42.3	0.3	42.3	0.3
	6"-O-Acetyldaidzin	8.0	0.5	8.0	0.5
	6"-O-Malonylgenistin	91.5	0.2	91.4	0.2
	Daidzein	3.6	0.7	3.6	0.7
	6"-O-Acetylgenistin	7.5	2.1	7.5	2.1
	Genistein	91.5	0.2	91.4	0.2
Tofu	Daidzin	114.4	2.4	114.3	2.4
	Genistin	107.6	2.7	107.7	2.7
	6"-O-Malonyldaidzin	88.7	3.0	88.8	3.0
	6"-O-Malonylgenistin	103.9	3.3	103.8	3.3
	Daidzein	21.4	3.6	21.5	3.6
	Genistein	17.3	4.3	17.3	4.3
Soybean flour	Daidzin	114.4	2.4	114.3	2.4
	Genistin	107.6	2.7	107.7	2.7
	6"-O-Acetyldaidzin	88.7	3.0	88.8	3.0
	Daidzein	103.9	3.3	103.8	3.3
	6"-O-Acetylgenistin	21.4	3.6	21.5	3.6
	Genistein	17.3	4.3	17.3	4.3
Miso	Daidzin	14.3	7.5	14.3	7.5
	6"-O-Malonyldaidzin	39.3	7.6	39.3	7.6
	6"-O-Malonylglycitin	10.7	4.9	10.7	4.9
	6"-O-Malonylgenistin	19.1	6.0	19.1	6.0
	Daidzein	31.5	7.1	31.5	7.1
	Genistein	32.9	6.5	32.9	6.5
Fermented soybeans	Daidzin	222.4	2.5	221.3	2.5
	Glycitin	29.7	2.4	29.7	2.4
	Genistin	217.0	2.8	217.1	2.8
	Genistein	10.5	0.9	10.5	0.9
Supplement (Commercial product 1)	Daidzin	13.8	1.1	13.7	1.1
	Glycitin	5.0	0.7	5.0	0.7
Supplement (Commercial product 2)	Genistin	2.8	1.3	2.9	1.3
	Daidzein	53.0	1.0	53.3	1.0
	Glycitein	21.1	0.02	21.1	0.02
	Genistein	10.8	0.4	10.8	0.4
	Daidzein	32.6	1.1	32.8	1.1
	Genistein	38.9	0.1	38.9	0.1

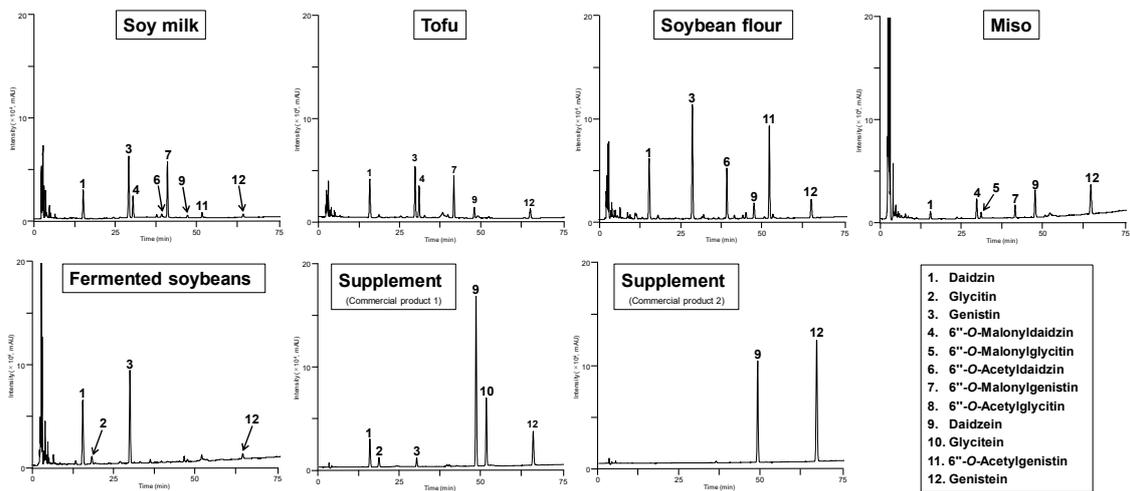


図5 各試料のクロマトグラム

以上の結果より、得られたRMSおよび基準物質を用いることにより、測定対象物質の定量用標品を用いずに、加工食品中の大豆イソフラボン類の含量を正確に定量できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Ohtsuki, J. Brent Friesen, Shao-Nong Chen, James B. McAlpine, Guido F. Pauli	4. 巻 85
2. 論文標題 Selective Preparation and High Dynamic-Range Analysis of Cannabinoids in "CBD Oil" and Other Cannabis sativa Preparations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 634-646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.1c00976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大槻崇、馬場萌加、二見櫻子、Yi Huang、遠藤悠平、金子剣伸、松藤寛
2. 発表標題 1H-qNMRに基づく相対モル感度（RMS）を用いた大豆イソフラボン類 分析法の確立
3. 学会等名 日本食品化学学会 第30回総会・学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 加藤菜帆、大槻崇、松藤寛
2. 発表標題 定量NMRに基づいた相対モル感度を用いたSingle-reference HPLC法による健康食品中のアントシアニンの定量について
3. 学会等名 日本食品科学工学会第69回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黄奕、大槻崇、森川悟、松藤寛
2. 発表標題 治療薬物モニタリング（薬物濃度測定）における相対モル感度に基づくシングルリファレンスHPLC法の応用
3. 学会等名 第4回日本定量NMR研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井有希、大槻崇、松藤寛
2. 発表標題 Single-reference HPLC法によるアントシアニンの定量に関する研究
3. 学会等名 日本食品化学学会 第27回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井有希、大槻崇、松藤寛
2. 発表標題 定量NMRに基づいた相対モル感度を用いたアントシアニンの定量に関する研究
3. 学会等名 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井有希、大槻崇、松藤寛
2. 発表標題 相対モル感度(RMS)を用いたアントシアニンの定量に関する研究
3. 学会等名 第3回日本定量NMR研究会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------