

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658125

研究課題名(和文)そのまま食品分析を実現する¹H-NMR-DOSY法の構築研究課題名(英文)Study on the analytical assay system using ¹H-NMR-DOSY method for food quality

研究代表者

松井 利郎 (Toshiro, Matsui)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20238942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DOSY法による多成分共存下での食品成分の“そのまま”分析法の確立を試みた(= ¹H-qNMR-DOSY法)。分析対象成分はグルコース並びにスクロースとした。また、磁場内で同一の拡散性を与えるcellobiose等を外部基準物質として決定した。最適DOSY測定条件下での0.05-0.3 T/m磁場こう配下においてグルコース及びスクロースのプロトンシグナル比と濃度の間に高い相関関係が認められた。構築したNMR-DOSY法をもとに実試料の測定を行ったところ、食品分析用Fキットで得られた値と良好に一致し、本測定法が前処理を行うことなく簡便かつそのまま食品分析できる方法であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：DOSY-¹H-NMR method was applied for quantitative food analysis for the first time. The target food components are (d)-glucose and sucrose, and target protons are anomeric C1 proton. Under the optimized DOSY measurement conditions including T1 and 90 pulsed width, both sugars were successfully and separately monitored on the 2D-DOSY spectra with a gradient field of 0.05-0.3 T/m. With the aid of internal standard with the same diffusion behavior in the magnetic field, a good relationship between the ratio of proton signal against that of internal standard and the concentration was obtained. The limit of detection was >0.5 g/L for both sugars. The established DOSY-¹H-NMR method provided reliable results that their contents in commercially available beverages were in good agreement with those with F-kit method. Taken together, the proposed method would be useful for food analysis as non-destructive assay.

研究分野：食品分析学

キーワード：NMR法 DOSY分析 非破壊分析 糖定量

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) NMR 法は分子の構造解析のために使用され、定性的評価が主流であった。

(2) 定量分析への応用に関しては $^1\text{H-NMR}$ 法が適用可能であったが、きょう雑成分が存在医する場合、対象プロトンのみを選択的に分離・検出することは困難であった。従って、非破壊的に NMR 法を食品分析のために適用 (そのまま分析) した例は皆無であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、

(1) ^1H を定量対象核種として、DOSY(Diffusion-ordered spectroscopy)- $^1\text{H-NMR}$ 法の食品成分分析法としての適用性を検討した。すなわち、多成分混合系から各成分の磁場勾配下での異なる拡散性 (拡散係数、 D) を利用し、2次元測定後の分離 $^1\text{H-sliced NMR}$ スペクトルを抽出することに定量を試みた。

(2) 対象食品成分として、飲料中に存在する主要糖類 (グルコース及びスクロース) を選択し、前処理なしでの直接的な NMR 測定による定量分析を試みた。

3. 研究の方法

(1) NMR 測定

D-(+)-グルコース及びスクロースはナカライテスク社製を用いた。外部基準物質は DSS-d6 (98.0 atom%、サンタクルーズバイオテクノロジー社製) とし、NMR 用サンプルチューブは内径 5 mm のものを、内標準物質封印用として同径のキャピラリーチューブ (日本精密科学社製) を用いた。なお、すべての希釈は D2O (99.8 atom%、アクロス社製) を用いて行った。NMR 測定は、400MHz-NMR 装置 (日本電子製) を用いて実施した。主な測定パラメータは以下の通りである。

緩和時間: 30 sec

Scan: 16

Diffusion 時間: 0.1sec

磁場こう配パルス: 0.05 - 0.3 T/m

アルゴリズム: SPLMOD

(2) Fキット及び HPLC 分析

市販飲料 (オレンジジュース、グレープフルーツ、スポーツ飲料など) 中に含まれる糖類の分析は、市販食品用測定キットである F-kit (グルコース、スクロース測定用) を用いた酵素法により行った。また、HPLC 分析は、示差屈折 (RI) -HPLC 法により行った。カラム: Cosmosil Sugar-D (4.6*250 mm、ナカライテスク社製) 溶離液: 75%CH₃CN、流速: 1.0 ml/min、温度: 35

4. 研究成果

(1) DOSY- $^1\text{H-NMR}$ 測定条件の最適化

まず、DOSY 分離のための NMR 測定条件の最適化を図った。対象は単糖であるグルコースを用いた。磁場こう配下での分析対象成分の

固有の拡散係数 (D 値) をもとに 2次元分離するためには、対象とするプロトンの 90° パルス値の設定と立て緩和時間 (T_1) の設定が必須となる。グルコースの場合、測定対象とするプロトンとして及びアノメリックプロトンが最適であるが、水溶液系において独立したシグナルが観測できる $-C_1$ プロトン (5.21 ppm) を対象とした。その結果、最適 90° パルス幅として $10.13 \mu\text{sec}$ 、最適 T_1 値として 2.989 sec が得られた。

本条件を基本パラメータとして DOSY-NMR 分析を行ったところ、図 1 に示したように 2次元 DOSY スペクトル上に、独立した固有の D 値 ($5.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{sec}$) を有するグルコース (並びに本研究で用いた外部標準物質 D-グルクロン酸の $-C_1$ プロトン, 5.25 ppm) のスライスデータを得ることができた。さらにグルコース濃度 20 g/L までの濃度範囲において高い直線性が得られ ($R^2=0.9998$)、本法での定量限界は 0.5 g/L であると判断された。

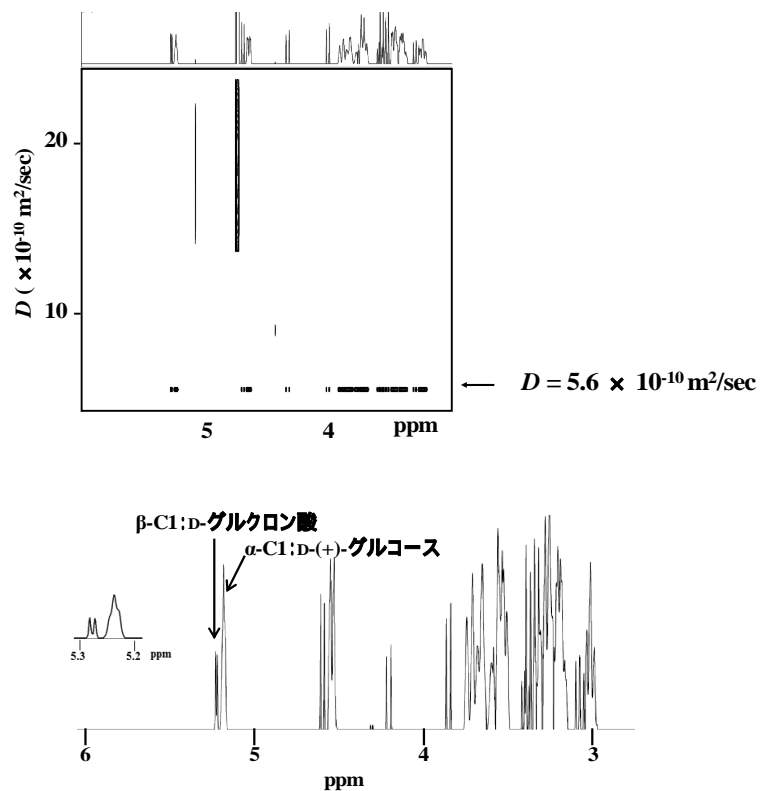


図1 グルコースの DOSY- $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (A) とそのスライスデータ (B)

(2) DOSY- $^1\text{H-NMR}$ 法による市販飲料中のグルコースの定量

市販飲料中のグルコースを前処理することなしに本法に適用し、定量分析を実施することを目的として、3種の市販飲料 (オレンジジュース、アップルジュース、グレープジュース) に対してグルコースの添加回収試験 (添加量: 0, 25, 50 g/L) を実施した。その結果、いずれの飲料においても本法での回収率は 94.7-107% であり、また相対標準偏差

は 1.2-5.7%であった。従って、本法は実際の飲料測定においても極めて簡便かつ再現性と正確性を有していることが実証された。なお、各飲料での検出限界は >0.4 g/Lであった。

そこで、キャピラリー管に封印した D-グルクロン酸を外部基準物質 (50.0 g/L) として DOSY-NMR 測定を行ったところ、図 2 に示すように、いずれの市販飲料においても前処理なしに対象とするグルコース C1 プロトンの独立した検出が達成できた。

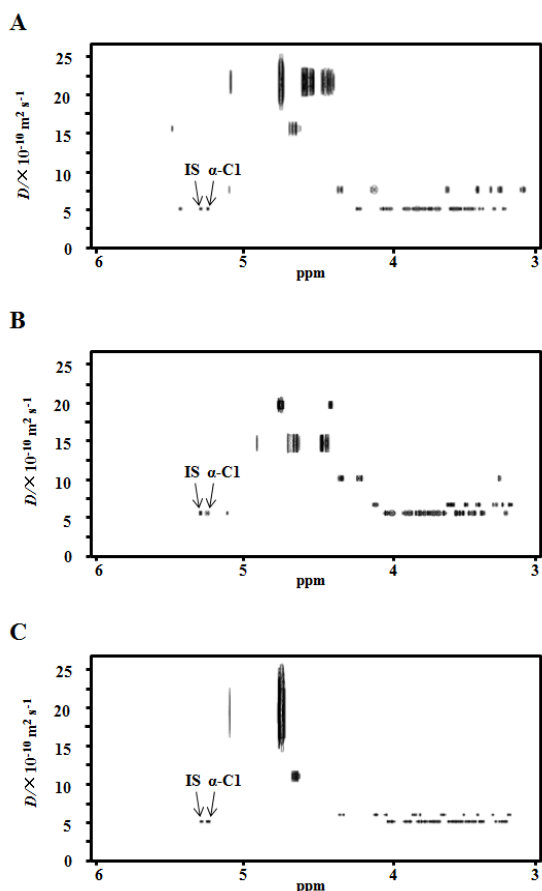


図 2 オレンジジュース(A)、アップルジュース(B)、グレープジュース(C)の DOSY-NMR スペクトル

本法によるグルコース定量の妥当性を明らかにするために、F キット並びに RI-HPLC 分析を実施した。その結果を表 1 に示す。表から明らかなように、DOSY-NMR 測定により得られたグルコース定量値 (オレンジジュース: 18.3 ± 1.0 g/L、アップルジュース: 26.3 ± 0.4 g/L、グレープジュース: 45.6 ± 0.6 g/L) は酵素法である F キット法により得られた値と有意差なくほぼ一致した。他方、RI-HPLC 法では高く見積もられる傾向にあった (ピークのテーリングによる過剰見積もり)。

従って、本 DOSY-NMR 法を用いると 30 分以内での非破壊定量分析が可能であることが初めて明らかとなった。

表 1 各種測定によるグルコース量の測定

サンプル	D-(+)-グルコース濃度 (g/L)		
	DOSY 法	酵素法	HPLC 法
オレンジジュース	18.3 ± 1.0^a	17.7 ± 0.8^a	21.5 ± 0.2^b
アップルジュース	26.3 ± 0.4^a	25.9 ± 0.4^a	29.7 ± 1.8^b
グレープジュース	45.6 ± 0.6^a	43.9 ± 1.2^a	54.5 ± 4.3^b

(3) DOSY-NMR 法のスクロース定量への応用
 主要食品成分であるスクロースについても DOSY-NMR 法の適用を試みた。なお、測定条件はグルコース測定と同様とした。但し、外部基準物質として、対象とするスクロース分子と同様の磁場拡散性を示すことが期待できるセロビオースを選択した (10.0 g/L)。定量対象となるプロトンピークは、スクロースではグルコピラノシル C1 プロトン (5.4 ppm)、セロビオースでは C1 プロトン (4.5 ppm) を選択した。なお、図 3 に示すように、両物質の D 値は 4.9×10^{-10} m²/sec であった。また、図 2 に示すように、最適化した DOSY 条件においてスクロースはグルコース並びにフルクトースが共存する系においても独立した 2 次元分離が達成されることが判明した。このことは、本法が個別分析法としてだけでなく、多成分同時定量法としても適用可能なことを強く示唆するものであった。

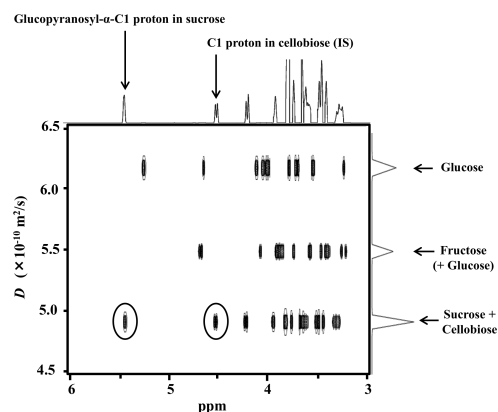


図 3 スクロースの DOSY-NMR 測定結果 (グルコース、フルクトース共存下)

(4) DOSY-1H-NMR 法による市販飲料中のスクロースの定量

市販飲料中のスクロース定量について本法江御実施した。3 種の市販飲料 (オレンジジュース、パイナップルジュース、スポーツドリンク) に対してスクロースの添加回収試験 (添加量: $0, 40, 80$ g/L) を実施した。その結果、いずれの飲料においても本法での回収率は $98.4-105.3\%$ であり、また相対標準偏差は $1.3-5.7\%$ であった。従って、本法は実際の飲料でのスクロース測定においても

極めて簡便かつ再現性と正確性を有していることが実証された。

そこで、キャピラリー管に封印した D-グルクロン酸を外部基準物質 (10.0 g/L) として DOSY-NMR 測定を行ったところ、図 4 に示すように、いずれの市販飲料においても前処理なしに対象とするスクロース C1 プロトンの独立した検出が達成できた。

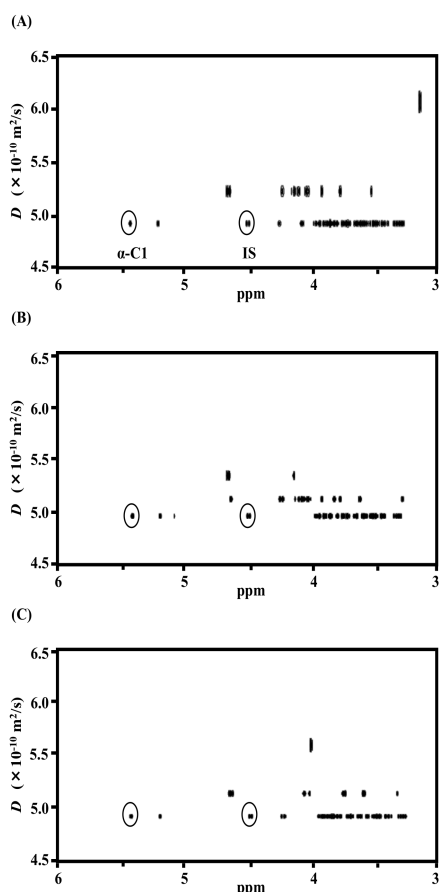


図 4 DOSY-NMR 法による各種飲料のスクロース分析

市販飲料中のスクロース定量結果は以下の通りである。

オレンジジュース : 36.1 ± 0.5 g/L

パイナップルジュース : $535. \pm 1.1$ g/L

スポーツドリンク : 24.7 ± 0.6 g/L

なお、本法による定量値は F キット法による定量値とほぼ一致する値であった。

以上より、本研究で構築した DOSY-1H-NMR 法は、前処理することなく非破壊で対象とする食品試料をそのまま分析することが可能であり、今後新たな食品分析法としての展開が大いに期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ruge Cao, Fusae Komura, Airi Nonaka, Takeshi Kato, Junji Fukumashi and Toshiro

Matsui: Quantitative analysis of D-(+)-glucose in fruit juices using diffusion ordered-¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Sci.*, **30(3)**, 383-388 (2014).

Ruge Cao, Airi Nonaka, Fusae Komura, Toshiro Matsui: Application of diffusion ordered-¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy to quantify sucrose in beverages. *Food Chem.*, **171(1)**, 8-12 (2015).

〔学会発表〕(計 4 件)

曹 汝 鶴、小村房恵、松井利郎 : Application of 1H-NMR-DOSY method to the quantification of glucose content in beverages. 第 49 回科学関連支部合同九州大会 (2012)

曹 汝 鶴、小村房恵、野中愛理、松井利郎 : Application of DOSY-NMR to quantify glucose in beverages. H24 年度日本食品科学工学会西日本支部大会 (2012)

曹 汝 鶴、野中愛理、小村英恵、松井利郎 : Application of diffusion ordered-nuclear magnetic resonance spectroscopy to quantify glucose and sucrose in some beverages, Asianalysis XII (2013)

野中愛理、曹 汝 鶴、小村英恵、松井利郎 : 1H-NMR-DOSY 法を用いた飲料中糖類の非破壊的定量法の構築, 第 61 回日本食品科学工学会大会 (2014)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/fooda>

nalysis/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 利郎 (MATSUI Toshiro)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：20238942

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：