

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07822

研究課題名（和文）測定対象の標準物質を必要としない定量NMRを用いた食品関連成分分析法の確立

研究課題名（英文）Development of quantification method using quantitative NMR for the food component

研究代表者

大槻 崇 (OHTSUKI, Takashi)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：30401011

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：食品の品質や安全性の評価に関する定量値の質の保証が国内外で重要な課題となっており、様々な食品関連成分に対する信頼性の高い分析法の開発が望まれている。本研究では、食品成分を対象に測定対象の標品を必要としない¹H-qNMRによる食品関連成分分析法の確立を検討した。その結果、アクテオシドについて、食品や食品素材中の含量を精確に測定可能な分析法を確立した。また、アクテオシドおよびペダリインを対象に¹H-qNMRに基づくモル吸光係数比を用いた分析法についても検討し、本法は従来法と同等の精度でゴマ若葉粉末や加工食品に含まれるこれら2成分の定量が可能と判明した。

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、¹H-qNMRを用いた分析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精確に定量できるとともに前処理の簡便化、分析時間の短縮につながることを実証され、食品素材や食薬資源の品質、同等性の評価等にも適用可能と予想された。また、モル吸光係数比を用いた分析法は、¹H-qNMRと同程度に正確な定量を汎用的なHPLCにより可能とし、定量用標品がない天然成分などの含量評価法としても利用が可能である。これは、新たな食品素材の開発、未利用または低利用な生物資源の有効性の解明、新しい機能性成分や創薬原型分子の発見に大きく貢献できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The quality assurance of quantitative values for evaluating food quality and safety has become an important issue in Japan and abroad, and the development of reliable analytical methods for various food-related components is desired. This study investigated establishing a method for analyzing food-related components by ¹H-qNMR, which does not require a calibrant for the analyte.

As a result, we established an analytical method that can accurately measure the content of acteosides in foods and food materials using ¹H-qNMR. An analytical method using the molar absorption coefficient ratio based on ¹H-qNMR was also investigated for acteoside and pedaline. It was found that this method can quantify these two components in young sesame leaf powder and processed foods with the same accuracy as the conventional method.

研究分野：食品科学

キーワード：定量NMR アクテオシド ペダリイン

1. 研究開始当初の背景

食品の機能性や安全性への消費者の関心は非常に高く、食品中の様々な成分、有害汚染物質などを対象とした分析法が開発、利用されている。これらの定量分析では、試料を精製した後、GC、LC、LC-MSなどの機器を用いることが多いが、定量には測定対象と同一かつ純度が正確な標準物質が必要である。しかし、計量学的に妥当な手順によって純度が算出された認証標準物質は非常に少ない。このため、GC、LCなどの相対定量法では、試薬メーカーの標準品が一般的に利用されている。しかし、この純度は自社規格により保証されたもの、すなわち計量学的に正確とは言えず、結果として定量値の信頼性が損なわれる可能性を否定できない。また、食品関連成分の多くは、標準物質が無く、正確な定量が不可能な場合も多い。さらに、標準物質の問題のほかにも、試料によっては煩雑な前処理、低回収率、マトリクス効果などの問題に直面するケースも多く、現状、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いえない。こうした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

これらの問題を解決する方法として、定量NMRの利用が有効と考えられた。定量NMRはその測定原理から、1つの認証標準物質を利用することで様々な測定対象の国家標準へとつながる定量値を得ることができ、定量値の信頼性の向上に大きく貢献できる定量分析法として注目を集めている。また、定量NMRは食品関連成分の定量において表1に示す特徴、利点を有していると考えられる。

それゆえ、定量NMR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飛躍的に向上し、消費者の健康と安全の一層の確保に大きく貢献できる。

このような背景から、本研究では定量NMRによる食品中の食品関連成分分析法の確立に関する検討を行った。

表1 食品関連成分の定量におけるqNMRの特徴と利点

	特徴	利点 (従来法との比較)
1	検出手法が化合物の物性値 (吸光や蛍光など) に依存しない	1つの認証標準物質で様々な化合物の正確な絶対定量が可能
2	○ 検量線不要 ○ 少ない前処理で夾雑物の影響を受けずに定量が可能	○ 分析の迅速化, 簡便化 ○ 使用溶媒量の減少
3	試料を密封状態で測定	装置等の汚染, 感度低下の防止 (検出部の汚染, カラムの劣化なし)

3. 研究の方法

(1) 食品関連物質のスペクトルパターン情報などの収集および¹H-qNMRの適用性の評価

本研究では、¹H-NMRによる定量NMR (¹H-qNMR)を使用した。¹H-qNMRによる精密な定量には①測定対象の定量に用いるシグナルが、食品中の夾雑物のシグナルと完全に分離していること、②測定対象が重水素化溶媒 (重溶媒) に完全に溶解していることが必須である。そこで、食品成分を対象に、様々な重溶媒を用いて¹H-NMR測定を行いスペクトルパターン情報 (各シグナルの化学シフト, 分離度, S/Nなど) や重溶媒への溶解性データをもとに、¹H-qNMRへ適用可能と考えられる化合物の選別および最適な測定溶媒の選定を行った。

また、選別された化合物の¹H-qNMR測定を行い、①測定条件の最適化 (パルス遅延時間, 積算回数など)、②精密な定量結果を得るための最適なシグナルの決定、③決定したシグナルより得られる定量値の再現性を評価し、選別された化合物の¹H-qNMRの適用性を評価した。

(2) 食品関連成分の分析法の確立

¹H-qNMRに適用可能と判断された化合物について、各化合物の分析法の確立に向け、前処理法の検討、分析法の妥当性確認などを行った。

また、定量値の正確性に優れた分析法である¹H-qNMRと分解能や汎用性に優れた分析法であるLCを組み合わせたモル吸光係数比を用いた食品関連成分の定量法に関する検討を併せて実施した。この方法は、「測定対象」と「測定対象とは異なる認証標準物質」(基準物質)との間の

正確なモル吸光係数比を明らかにすることにより、「基準物質」、「モル吸光係数比」から測定対象の定量を可能とする方法である。そこで、基準物質と測定対象の混合液を用いて LC および $^1\text{H-qNMR}$ より求めたモル比および吸光係数比から認証標準物質に対する測定対象の計量学的に正確なモル吸光係数比を算出した。さらに、これらの結果を基に、本法による各化合物の分析法の確立に向け、前処理法の検討、分析法の妥当性確認などを行った。

4. 研究成果

(1) 食品関連物質のスペクトルパターン情報などの収集および $^1\text{H-qNMR}$ の適用性の評価

食品関連成分を中心に $^1\text{H-qNMR}$ のスペクトルパターン情報の収集を行い、測定対象に由来するシグナルの多重度やシグナル間の分離度などを基に $^1\text{H-qNMR}$ に適用可能な成分の選抜を行った。また、カフェイン、バニリン酸、3,4-ジヒドロキシけい皮酸、アクテオシドなど選抜された成分の $^1\text{H-qNMR}$ 測定における照射パルス遅延時間、積算回数など各種測定パラメータの最適化を実施した。

(2) 食品関連成分の分析法の確立

① $^1\text{H-qNMR}$ による食品関連成分の分析法の確立

(1) の検討において選抜された成分のうち、ポリフェノールの一種であるアクテオシドを対象に、ゴマ若葉粉末および加工食品中のアクテオシド分析法の確立に関する検討を行った。試験溶液の調製として、まず、試料を正確に秤量し $^1\text{H-qNMR}$ 用標準溶液を添加した後、超音波処理および遠心分離を行った。得られた上清を $^1\text{H-qNMR}$ に供し、アクテオシド含量を算出した。代表的な $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルとして、図 1 にゴマ若葉粉末のデータを示す。また、各 $^1\text{H-qNMR}$ 用試験溶液を希釈した溶液を別途調製し、これらを LC で分析した。その結果、検討した全ての試料において、 $^1\text{H-qNMR}$ と LC により求められたアクテオシド含量には大きな違いは認められず、 $^1\text{H-qNMR}$ は LC と同等の真度、精度でゴマ若葉粉末および加工食品中のアクテオシドの定量が可能と判明した。

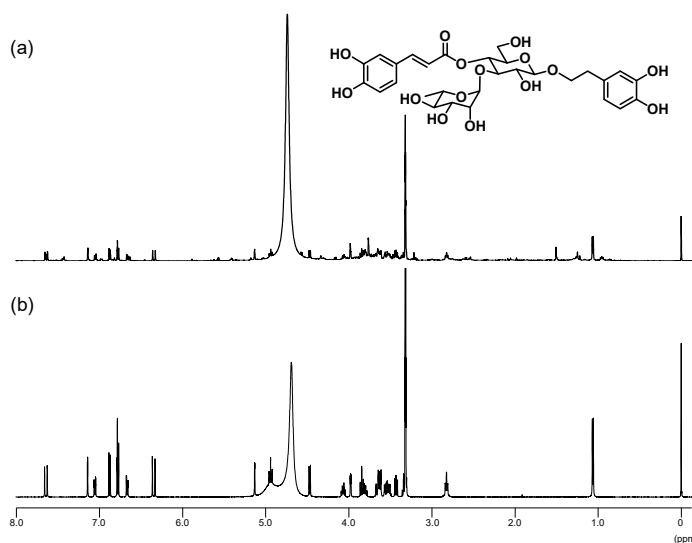


図 1 アクテオシドの化学構造とゴマ若葉粉末 (a)、アクテオシド (b) の $^1\text{H-qNMR}$ スペクトル

② $^1\text{H-qNMR}$ に基づくモル吸光係数比を用いた食品関連成分分析法の確立

$^1\text{H-qNMR}$ の食品分析への更なる適用の拡大を目指して、 $^1\text{H-qNMR}$ と LC を組み合わせたモル吸光係数比を用いた食品関連成分分析法の確立について併せて検討した。本法の検討に当たっては、(1) の検討で選抜された成分のうち、アクテオシドおよびポリフェノールの一種であるペダリインを測定対象とした。また、4-ヒドロキシ安息香酸メチル (MHB) を基準物質として選択した。 $^1\text{H-qNMR}$ および LC 分析により得られたモル量およびピーク面積から MHB に対する各測定対象物質のモル吸光係数比を算出したところ、アクテオシドのモル吸光係数比は 0.727、ペダリインのモル吸光係数比は 2.25 であることが判明した。次に、算出したモル吸光係数比の正確性を評価するため、実試料を用いた検討を行った。すなわち、ゴマ若葉粉末および加工食品 (青汁粉末) 5 検体を試料として選択し、本法により測定対象の含量を算出し、従来の絶対検量線法 (従来法: 測定対象物質の定量用標品を使用。その純度は $^1\text{H-qNMR}$ により算出) より得られた含量と比較した。図 2 および図 3 に各試料および MHB のクロマトグラムを示す。

その結果, 表 2 に示すように, すべての測定対象において, 検討した全試料で両法から得られる含量に有意な差は認められなかった. 従って, これらのモル吸光係数比を用いることにより, 本法は従来法と同等の精度で加工食品中等のアクテオシドおよびペダリインの定量が可能であることが明らかとなった.

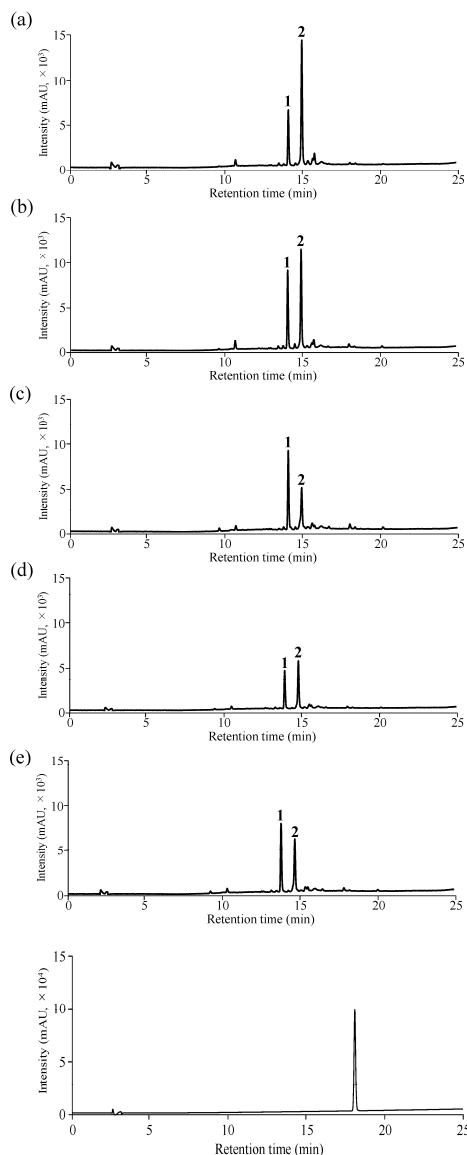


図 2 各試料の LC クロマトグラム

(a) ゴマ若葉乾燥粉末 1, (b) ゴマ若葉乾燥粉末 2, (c) ゴマ若葉乾燥粉末 3, (d) 加工食品 (青汁粉末) 1, (e) 加工食品 (青汁粉末) 2

Peak 1: アクテオシド (t_R : 14.1 min), Peak 2: ペダリイン (t_R : 15.0 min)

LC 条件

Column: Xbridge C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 移動相

A. 0.1 vol% ギ酸

B. アセトニトリル (0.1 vol% ギ酸含有)

グラジエント: 5%–55% solvent B from 0–25 min, 55%–100% solvent B (25.01–35 min), 流速: 1 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出波長: 340 nm

図 3 MHB の LC クロマトグラム

LC 条件

検出波長: 254 nm, その他の条件は図 2 と同じ

表 2 2 種の方法による試料中のアクテオシドおよびペダリイン含量の比較

Sample	Proposed method				Conventional method			
	Acteoside content (μg/kg)	RSD (%)	Pedaliin content (μg/kg)	RSD (%)	Acteoside content (μg/kg)	RSD (%)	Pedaliin content (μg/kg)	RSD (%)
Dried sesame leaf powder 1	125	1.5	9.9	0.3	126	1.5	10.0	0.2
Dried sesame leaf powder 2	76.5	1.3	10.7	3.3	77.5	1.3	10.8	3.2
Dried sesame leaf powder 3	13.9	3.2	2.6	1.5	14.2	3.1	2.6	1.5
Green juice powder 1	13.8	0.7	1.8	0.5	14.1	0.7	1.8	0.5
Green juice powder 2	12.5	0.3	2.4	0.2	12.8	0.7	2.4	0.2

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 1件）

1. 著者名 Ohtsuki Takashi, Matsuoka Kiyooki, Fuji Yushiro, Nishizaki Yuzo, Masumoto Naoko, Sugimoto Naoki, Sato Kyoko, Matsufuji Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of an HPLC method with relative molar sensitivity based on 1H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0243175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松岡聖朗, 大槻崇, 藤佑志郎, 松下明里, 松田美優, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛
2. 発表標題 1H-qNMR に基づく相対モル感度を用いたゴマ若葉抽出物等に含まれるアクテオシドの定量について
3. 学会等名 日本食品化学学会第25回総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡聖朗, 大槻崇, 石附京子, 藤佑志郎, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛
2. 発表標題 フラバノン配糖体定量分析への1H-qNMRに基づく相対モル感度法の応用
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大槻崇, 松田美優, 松下明里, 小島豪, 松岡聖朗, 西崎雄三, 増本直子, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛
2. 発表標題 1H-qNMRに基づく相対モル感度を用いたラカンカ抽出物中のモグロシドV分析法の確立
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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
---------	---------