

令和元年6月24日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15496

研究課題名(和文) qNMRに基づく相対感度係数を利用した新しい食品品質評価法の確立

研究課題名(英文) Development of analytical method for quality assesment of food using response factors based on qNMR

研究代表者

西崎 雄三 (Nishizaki, Yuzo)

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部・研究員

研究者番号：50745172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：定量NMR(qNMR)を利用して、クロマトグラフィー条件下における「代替標品に対する分析種の相対モル感度(Relative Molar Sensitivity; RMS)」を決定する方法について検討を行った。このRMSを利用して、分析種の定量用標品不要なクロマトグラフィー(以下、RMS法)を天然添加物や加工食品に応用した。RMS法で得られる分析種の定量値は、qNMRや従来法である絶対検量線法で得た定量値と良好に一致した。RMS法は、分析種の定量用標品が入手できない場合の正確なクロマトグラフィーとして期待できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

定量用標品の入手が困難、安定性に懸念があるといった理由から、試料中の含量モニタリングが困難であった分析種の定量への展開が期待できた。

1種類の基準物質に対する、さまざまな分析種のRMSを蓄積すれば、それぞれの定量用標品を用意することなく、正確な一斉分析法が構築可能である。さらに、選択した基準物質、RMS、RMS算出時のクロマトグラフィー条件の情報を周知すれば、公的な試験法としての運用が期待できた。

研究成果の概要(英文)：Using quantitative NMR (qNMR), relative molar sensitivity (RMS) of an analyte to a substitute reference material (S-RM) under defined chromatographic conditions was determined. The RMS value was applied to chromatographic quantitation for natural food additives and processed foods. The quantitative values obtained from the chromatography using S-RM (internal calibrant) and its RMS value agreed with those obtained via qNMR or calibration curve method.

研究分野：環境・衛生系薬学

キーワード：相対感度係数 相対モル感度 定量用標品 基準物質 クロマトグラフィー 定量NMR

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

食品中の機能性成分、食品添加物、残留農薬などの有機化合物の含量は、食品の品質評価における重要な値の一つとして扱われる。多くの場合、試料となる食品の抽出物は、複数の成分が共存したものである。したがって、定量法には、分離分析に優れたクロマトグラフィーが広く利用されている。クロマトグラフィーによる定量分析には検出器として UV や MS などが用いられる。これらの検出器は化合物それぞれが持つ物性値を検出するものであることから、検出器の応答性は化合物毎に異なる。よって、分析者は対象化合物の標品を用意することに加えて、その標品の純度についても考量する必要がある。すなわち、定量結果の信頼性を確保するためには、分析の対象となる化合物 1 つ 1 つに対して、純度が明らかな定量用標品を入手して絶対検量線を作成し、検出器の感度を純度で校正することが本来必要である。しかし、現実には分析種の定量用標品が市販されておらず、入手できないことがある。

2. 研究の目的

食品の品質評価の指標となる化合物は多岐にわたる。これらの定量用標品を個別に開発して、分析者に供給することは、多大なコストと時間が強いられる。この状況を打開するために、本研究では、食品の品質評価の指標となる化合物の特性値を 1 つの基準物質（代替定量用標品）に置き換え、必要となる定量用標品の数を集約する方法を検討する。具体的には、定量核磁気共鳴 (qNMR) 法を応用して、クロマトグラフィー条件下における、物質質量（単位モル）あたりの代替定量用標品に対する分析種の感度比（Relative Molar Sensitivity: RMS）を決定する。そして、この RMS を定量用標品の拡充が遅れている天然添加物のクロマトグラフィーに展開し、分析種の定量用標品を必要としない定量分析法（以下、RMS 法とする）の開発および RMS 法の妥当性評価を実施する。

3. 研究の方法

(1) 代替定量用標品に対する RMS の決定

RMS は、図 1 に示す手順で決定した。STEP1：代替定量用標品と分析種の混合液を調製する、STEP2：<sup>1</sup>H-qNMR を用いて、混合液中の代替定量用標品と分析種のモル比を算出する、STEP3：クロマトグラフィーを用いて、混合液中の代替定量用標品と分析種の応答比を算出する、STEP4：応答比をモル比で除す。代替定量用標品には、試薬会社から認証標準物質が市販されているものを選択した。

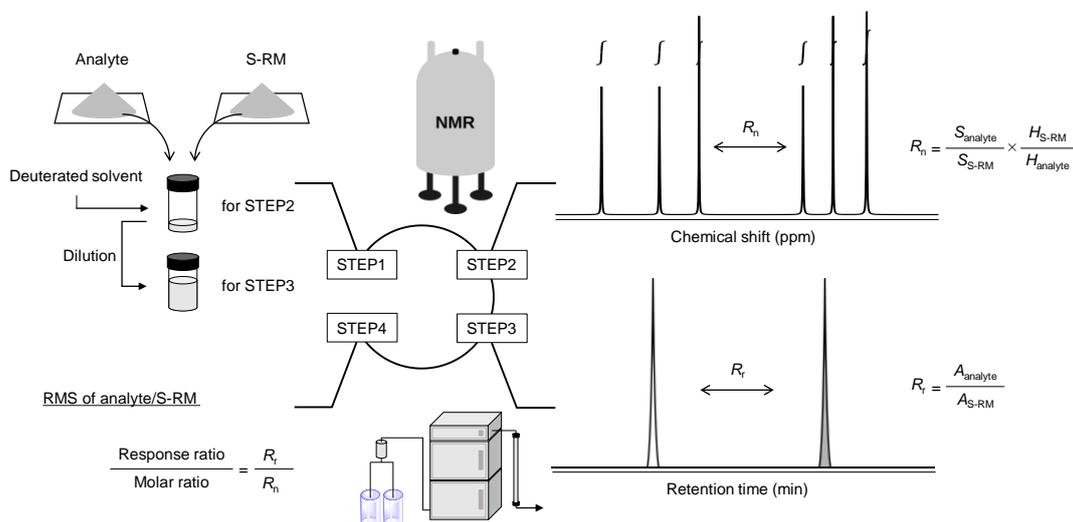


図 1 qNMR とクロマトグラフィーを組合わせた代替定量用標品に対する分析種の RMS 決定 Analyte, 分析種; S-RM, 代替定量用標品;  $R_n$ , モル比;  $R_r$ , 応答比。

(2) RMS 法による定量分析

RMS 法は、内標準法により実施した。すなわち、代替定量用標品を試料に添加したものを、クロマトグラフィーの検液として、式 (1) に基づいて試料中の分析種の含量 (Content, mass fraction) を求めた。

$$\text{Content} = A_A/A_{\text{S-RM}} \times M_A/M_{\text{S-RM}} \times 1/\text{RMS} \times \text{Conc. S-RM}/\text{Conc. S-sample} \quad \text{式 (1)}$$

ただし、A,クロマトグラフ上のピーク面積；M, 分子量；Conc, 検液中の濃度。下付き A, 分析種；下付き S-RM, 代替定量用標品；下付き Sample, 試料。

#### 4. 研究成果

##### (1) 2017 年度

天然添加物コチニール色素の主成分カルミン酸 (CA) を分析種、認証標準物質が市販されているカフェイン (CAF) を代替定量用標品とする、HPLC/PDA における RMS 法をモデルにして、主に RMS 値の HPLC 装置間差について検討した。具体的には、図 1 に示す STEP3 で、HPLC/PDA における応答比は、5 つの装置 (1 台は HPLC-UV) を用いて求め、そのバラつきを検討した。CA と CAF に共通する吸収極大波長 274nm を検出波長とした際、RMS 値の装置間差は相対標準偏差 (RSD) として 1.8% であった。一方、CAF の検出波長を 274nm、CA の検出波長を可視部の吸収極大波長 494nm にした際の RSD は 3.2% で、274nm だけを検出波長とした際の RSD より大きかった。この原因として、「2 波長間でのスペクトル検出特性が検出器ごとに異なる」ことが推察された。RMS を利用した HPLC/PDA を公的な分析法として展開する際、代替定量用標品は、分析種と同じ波長に極大吸収を示す物質を選択することが、試験機関間における分析値のバラつきを小さくするために重要であることを示した。

RMS 法を実際の試料となるコチニール色素 (11 試料) に対して応用した。CAF に対する CA と 4ACA の RMS は、測定波長を 274 nm に固定して算出したものを採用した。コチニール色素に CAF を内標準として添加したものを試料とした。また、確立した RMS 法の妥当性を考察するために、従来法である検量線法で求めた定量値と比較した。その結果、RMS 法で求めた CA の定量値は、検量線法で求めた CA の定量値とほぼ一致した (表 1)。さらに、11 試料中 3 試料に対して、異なる分析機関で異なるオペレーターによる RMS 法を実施した。その結果、3 試料とも、分析値の機関差は、問題になるレベルではなかった。

表1. RMS法と絶対検量線法によるコチニール色素中のカルミン酸の定量結果 (wt%)

Sample	RMS法		絶対検量線法*
	Lab A	Lab B	Lab A
B783	9.45%	-	9.34%
B785	69.8%	-	69.2%
B786	73.9%	-	73.3%
B787	77.3%	-	76.6%
B788	76.9%	-	76.3%
B789	77.3%	-	76.4%
B792	66.4%	66.0%	68.8%
B794	77.7%	-	76.6%
B795	79.0%	79.1%	78.3%
B796	74.5%	-	73.6%
B797	77.4%	77.8%	76.5%

\* 絶対検量線は、<sup>1</sup>H-qNMRでCAの純度を決定し、その純度を考慮して作成した。測定条件：カラム、Wakopak Ultra C18-5 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm)；カラム温度、40°C；移動相、水/メタノール/トリフルオロ酢酸混液 (600:400:1)；流速、CAFの保持時間が約5分となる流速；測定波長、274 nm。

##### (2) 2018 年度

ローズマリー抽出物の分析に RMS 法を展開した。ローズマリー抽出物は、シソ科マンネンロウ (*Rosmarinus officinalis* L.) から抽出して得られたものであり、酸化防止剤として使用される。主要な成分はカルノソール (Carnosol; CL) とカルノシン酸 (Carnosic acid; CAA) とされている。この 2 つの化合物のうち、CL は易分解性化合物である。また CL の試薬は試薬会社から入手できるが、絶対純度が保証された定量用標品は販売されていない。そこで、認証標準物質が試薬会社から販売されているジフェニルアミン (Diphenylamine; DPA) を代替定量用標品として、CL と CAA を分析種とする RMS 法の確立を検討した。クロマトグラフィーは HPLC/PDA を使い、検出波長は、DPA、CL、CAA に共通する吸収極大波長 284 nm の 1 波長に設定した (図 2)。DPA、CL、CAA を methanol-d<sub>4</sub> に溶解した混合液を調製し、図 1 に示した手順で RMS を決定した。HPLC 装置は 3 台使用した (図 1、STEP3)。DPA に対する CL の RMS<sub>CL/DPA</sub> が 0.111、DPA に対する CAA の RMS<sub>CAA/DPA</sub> が 0.0809、HPLC3 台から得られた RMS (正確には応答比) の RSD は、最大で 1.1% であった。したがって、RMS 法をローズマリー抽出物に適用した場合、

得られる定量値の試験機関間でのバラつきは 1.1%と見積もられた。従来法である検量線法から求めたローズマリー抽出物中の CL および CAA 含量を 100 としたとき、DPA を内標準とする RMS 法から得られた相対含量は 97~98 (CL)、101~103 (CA) であった (検量線は、qNMR で CL 試薬および CAA 試薬の純度を決定し、その純度を考量して作成した)。RMS 法は、その正確性はもちろん、定量用標品が入手できない場合のクロマトグラフィーとして運用が可能であった。したがって、代替定量用標品や分析条件の情報を共有することで、定量用標品供給不足の問題にとらわれることなく、RMS 法を公的な分析法として展開することが期待できた。

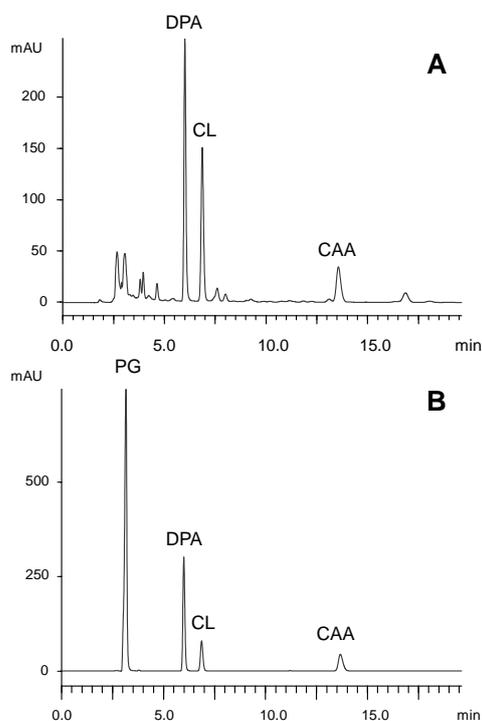


図 2. HPLC/PDA クロマトグラム

A、DPA を添加したローズマリー抽出物 (RMS 法の検液) ; B、RMS 算出用の混合液 (図 1、STEP3)。なおプロピルガレート (PG) は、RMS 算出時における CL の分解を防ぐために添加している。

測定条件：カラム、Wakopak Ultra C18-5 (250 mm × 4.6 mm, i.d., 5μm) ; カラム温度、30°C ; 移動相、水/アセトニトリル/メタノール/ギ酸 (200:400:400:1, v/v/v/v) ; 流速、DPA の保持時間が約 6 分となる流速 ; 測定波長、284 ± 4 nm。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

西崎雄三、増本直子、中西章仁、橋爪雄志、タンジャマハマドゥ、山崎太一、黒江美穂、沼田雅彦、井原俊英、杉本直樹、佐藤恭子、定量 NMR に基づく相対モル感度を利用した加工食品中のヘスペリジンおよびモノグルコシルヘスペリジンの定量、食品衛生学雑誌、査読有、59、2018、pp. 1-11

Nishizaki Y, Masumoto N, Yokota A, Mikawa T, Nakashima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Ito Y, Sugimoto N, Sato K, HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine, Food Addit. Contam. Part A, 査読有, 35, 2018, pp. 838-847

Nishizaki Y, Masumoto N, Nakajima K, Ishizuki K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Tada A, Sugimoto N, Sato K, Relative molar sensitivities of carnosol and carnosic acid with respect to diphenylamine allow accurate quantification of antioxidants in rosemary extract, Food Addit. Contam. Part A, 査読有, 36, 2019, pp. 203-211

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、査読有、224、2019、pp. 123-130

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 相対モル感度を利用した天然添加物ローズマリー抽出物中のカルノソールおよびカルノシン酸の定量分析、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会
- ② Development of a HPLC/PDA method for quantitative analysis of food components without the need for analytical standards, 254th American Chemistry Society National Meeting & Exposition

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。