

博士論文

シングルリファレンス HPLC 法の開発研究  
：既存添加物・健康食品の品質分析への応用

**(Development study of single reference HPLC  
method for the application of quality evaluation of  
natural food additives and healthy foods.)**

2021 年 3 月

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

高橋 未来

立命館大学審査博士論文

シングルリファレンス HPLC 法の開発研究  
：既存添加物・健康食品の品質分析への応用

(Development study of single reference HPLC  
method for the application of quality evaluation of  
natural food additives and healthy foods.)

2021 年 3 月  
March 2021

立命館大学大学院薬学研究科  
薬学専攻博士課程

Doctoral Program in Pharmacy  
Graduate School of Pharmacy  
Ritsumeikan University

高橋 未来  
TAKAHASHI Miki

研究指導教員：井之上 浩一 教授  
Supervisor : Professor INOUE Koichi

## 目次

序論	1
<b>第1章 ベニコウジ黄色素の成分規格の検討</b>	
第1節 序	3
第2節 実験材料及び方法	
1-2-1 試薬	5
1-2-2 分析対象物質	5
1-2-3 装置	6
1-2-4 ベニコウジ黄色素の確認試験	6
1-2-5 HPLC 分析条件	7
1-2-6 HSCCC を用いた XA および XB の単離精製の検討	7
1-2-7 qNMR による XA および XB の絶対量の評価	8
1-2-8 RMS を用いた XA および XB の SR-HPLC 定量法の構築	9
第3節 実験結果及び考察	
1-3-1 ベニコウジ黄色素の確認試験	11
1-3-2 XA および XB の HPLC 分離検討	12
1-3-3 HSCCC を用いた XA および XB の単離精製の検討	14
1-3-4 qNMR による XA および XB の絶対量の評価	19
1-3-5 HPLC による XA および XB の RMS 算出	22
1-3-6 RMS を用いたベニコウジ黄色素中の XA および XB の定量分析	23
第4節 小括	26
<b>第2章 ゴマ油不けん化物の成分規格の検討</b>	
第1節 序	27
第2節 実験材料及び方法	
2-2-1 試薬	29
2-2-2 分析対象物質	29
2-2-3 装置	30
2-2-4 HPLC 分析条件	30
2-2-5 SR のデザイン	31
2-2-6 qNMR によるゴマリグナン類の絶対評価	31
2-2-7 RMS を用いたゴマリグナン類の SR-HPLC 定量法の構築	32
第3節 実験結果及び考察	
2-3-1 ゴマリグナン類の HPLC 分析条件の検討	33
2-3-2 SR のデザイン	36

2-3-3	qNMR によるゴマリグナン類の絶対量の評価	38
2-3-4	RMS を用いたゴマ関連製品中のゴマリグナン類の定量分析	40
第 4 節	小括	52
<b>第 3 章 <u>チャ抽出物の成分規格の検討</u></b>		
第 1 節	序	53
第 2 節	実験材料及び方法	
3-2-1	試薬	55
3-2-2	分析対象物質	55
3-2-3	装置	56
3-2-4	チャ抽出物の確認試験	56
3-2-5	HPLC の測定条件	56
3-2-6	qNMR によるカテキン類の絶対評価	57
3-2-7	RMS を用いたカテキン類の SR-HPLC 定量法の構築	57
第 3 節	実験結果及び考察	
3-3-1	チャ抽出物の確認試験	59
3-3-2	カテキン類の HPLC 条件の検討	60
3-3-3	カテキン類の SR 選択の検討	65
3-3-4	qNMR によるカテキン類および SR の絶対評価	66
3-3-5	HPLC によるカテキン類の RMS の算出	70
3-3-6	RMS を用いたチャ抽出物および茶試料中のカテキン類の定量分析	71
第 4 節	小括	75
	総括	76
	参考文献	79
	謝辞	84

## 序論

既存添加物とは、国内において、古くから天然添加物として使用実績が認められている食品添加物である。例えば、既存添加物として、ターメリック色素（着色料）、アラビアガム（増粘安定剤）や酵素分解リンゴ抽出物（酸化防止剤）などがある。現在、既存添加物は、食品添加物公定書により成分規定されており、定義、確認試験、純度試験または定量法などが記載されている<sup>1)</sup>。それゆえに、既存添加物の主要な成分を同定し、その含量を正確かつ簡便に分析することは、食品の安全性や品質を向上する上で重要である。

既存添加物の分析法としては、これまで液体クロマトグラフィー（Liquid Chromatography, LC）、ガスクロマトグラフィー（Gas Chromatography, GC）、核磁気共鳴法（Nuclear Magnetic Resonance, NMR）、液体クロマトグラフィー質量分析計（Liquid Chromatography-Mass spectrometry, LC-MS）などが用いられてきた。特に、信頼性が高く汎用的な分離分析法である、高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）を用いた報告例が多い<sup>2-4)</sup>。しかしながら、HPLC 定量法は、必ず分析対象物質の検量線が必要である。つまり、検量線のための標準品が入手できない、高額であるまたは汎用性に欠ける場合、HPLC を用いて化合物を定量することができない。

そのため、これまでの既存添加物の成分規格では、薄層クロマトグラフィー（Thin-Layer Chromatography, TLC）を用いた定性試験や色彩の濃さを示す色価により、既存添加物を評価してきた<sup>1)</sup>。そこで、分析対象物質を定量するための標準品を必要としない新たな定量法が開発されている。その方法は、NMR を HPLC とオンライン上で組み合わせた定量法である<sup>5-6)</sup>。この定量法は、トレーサブルな内標準物質と分析対象物質のシグナル比により定量する方法である。しかしながら、このオンラインシステムでは、移動相に重水素化溶媒を使用するため、ランニングコストが高く、広く普及するには困難である。そこで、最近では、NMR のみを用いて定量する<sup>1</sup>H-定量 NMR（Quantitative nuclear magnetic resonance, qNMR）が注目されている<sup>7-8)</sup>。この手法も分析対象物質の標準品を入手できない場合も定量可能であるが、複数の成分を含む粗サンプルを測定する場合、分析対象物質のプロトンシグナルが他の類似した化学構造をもつシグナルと重なり、正確に定量することができないという欠点がある。

そこで、本研究では、qNMR と HPLC をオフラインで組み合わせることにより、分析対象物質に対する対応量標準品（Single Reference, SR）に値付けした値（相対モル感度, Relative Molar Sensitivity, RMS）を用いた新たな HPLC 定量法を開発することとした。本技術をシングルリファレンス HPLC 定量法（SR-HPLC 定量法）と定義した。先行研究において、Nishizaki らは、4-ヒドロキシ安息香酸を SR としたジャマイカカシヤ抽出物の抽出物中のクアシンとネオクアシン、カフェ

インを SR としたコチニール色素の主成分であるカルミン酸の SR-HPLC 定量法を構築している。そのとき、クアシン類では 1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン- $d_4$  (1,4-BTMSB- $d_4$ )、カルミン酸では 2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸ナトリウム- $d_6$  (DSS- $d_6$ ) を qNMR 用標準物質として用いていた<sup>9-10)</sup>。なお、この RMS の考え方は、GC と HPLC を用いた多環芳香族炭化水素の定量分析のための認証標準物質にも応用された<sup>11)</sup>。SR は、qNMR や LC の内部標準物質として使用され、様々なサンプル中の各分析対象物質の RMS を推定する。これらの値は、qNMR と HPLC におけるシグナル比とモル比から計算ことが可能である。実際に分析対象物質の濃度を求める際は、RMS、HPLC クロマトグラム上の SR に対するピーク面積比、SR の添加濃度を用いることで決定する。この RMS を用いたアプローチを用いることで、分析対象物質の標準品を用いずに既存添加物を評価する試験法を提案することができる。なお、本研究では、ベニコウジ黄色素、ゴマ油不けん化物およびチャ抽出物の SR-HPLC 定量法の構築を試みた。

## 第 1 章 ベニコウジ黄色素の成分規格の検討

### 第 1 節 序

子囊菌類ベニコウジカビ (*Monascus purpureus*) は赤色や黄色などの天然着色料の原料であり、アジア圏を中心に使用されている。ベニコウジカビの主成分はアンカフラビン類やモナスコルブリン類などの遊離色素類である。これら遊離色素類は、単体では水に不溶であるが、培地に含まれているペプチドやタンパク質と複合体を形成することにより水に対する溶解性が向上する<sup>12)</sup>。現在、ベニコウジ黄色素 (*Monascus Yellow*, MY) は既存添加物として国内で使用されており、その主成分はキサントモナシン A (Xanthomonasin A, XA) とキサントモナシン B (Xanthomonasin B, XB) である (Fig. 1)。これらの成分は水やエタノールに容易に溶解するため、漬物、ケーキやキャンディーなどの加工食品に広く使用されている。また、ベニコウジ黄色素の薬理作用として変異原性や細胞毒性を抑制することが報告されている<sup>13-15)</sup>。さらに、キサントモナシン類はマウスにおいて 12-O-テトラデカノイルフェノール-13-アセテートによる炎症を阻害すると言われている<sup>16)</sup>。上記で記載したように、国内では、ベニコウジ黄色素は既存添加物として利用されているが、食品添加物公定書における評価法には、TLC (366 nm) を用いた黄色成分の確認試験と色価のみであり、明確な主成分を定量する方法となっていない<sup>1)</sup>。したがって、ベニコウジ黄色素の安全性や品質を、正確かつ簡便に評価することができる分析法を開発する必要がある。

これまでの研究において、ベニコウジカビの分析法として、クロマトグラフィー、MS、NMR などが報告されている<sup>17-19)</sup>。また、Shi らは、pH-sensitive UV-Vis absorption により、簡便に色彩を評価する方法を示しており<sup>20)</sup>、Watanabe は、ミセル動電クロマトグラフィー (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC) を用いて、ベニコウジ色素の分解物である 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4, 3-b]indole (Trp-P-2 (NHOH)) をモニタリングしている<sup>21)</sup>。一方で、培地に添加するアミノ酸の種類により、ベニコウジカビから生産される色素成分が異なることを示す研究報告もある<sup>22)</sup>。しかしながら、XA および XB の高純度かつ安価な標準品を入手することが困難なためであるため、ベニコウジ黄色素中の XA および XB を HPLC 分析する方法は、ほとんど報告されていない。したがって、ベニコウジ黄色素の HPLC 定量法を広く普及するためには、ベニコウジ黄色素中の XA および XB の SR-HPLC 定量法が有効であると考えた。しかしながら、SR-HPLC 定量法を開発するためには、XA および XB の単離成分が必要である。そこで、本研究では、高速向流クロマトグラフィー (High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) を用いて、ベニコウジ黄色素から XA および XB を単離

精製することを試みた。HSCCC は液-液分配を原理とした液体クロマトグラフィーであり、天然物のような複雑な物質から化合物を効率よく単離精製できる手法である<sup>23-27)</sup>。この単離精製法の特徴は、固定相に固定充填剤を用いないため、カラムと不可逆的な相互作用を起こさず、全ての成分を回収することができる。Inoue らは、ベニバナ黄色素の主成分であるサフロミン A およびサフロミン B を HSCCC により単離精製した際、HPLC では検出されない他の黄色成分を発見している<sup>28)</sup>。このように、HSCCC は食品添加物から様々な主要成分を単離精製しており、先行研究にてベニコウジ黄色素から XA および XB が単離精製されている<sup>29)</sup>。以上より、本研究では、RMS と HSCCC の 2 つの分析技術を融合させ、新たなベニコウジ黄色素の評価法を構築することにより、簡便かつ信頼性のある食品添加物の安全性と品質評価を目指した。

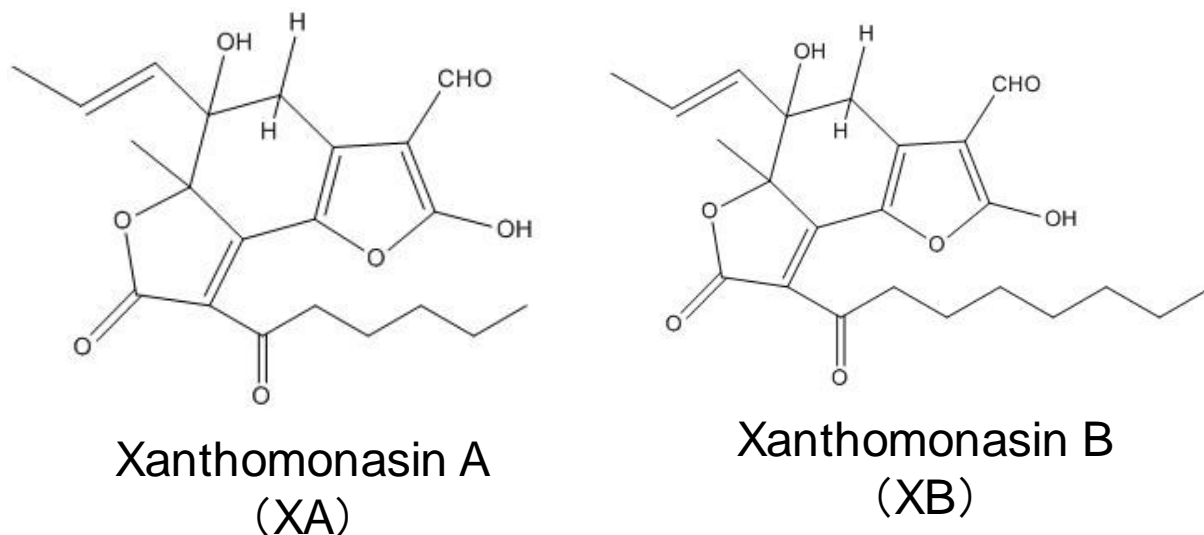


Fig. 1 Structures of XA and XB.



## 第 2 節 実験材料及び方法

### 1-2-1 試薬

試薬名	メーカー
<i>n</i> -ヘキサン	富士フイルム和光純薬社製
アセトニトリル	富士フイルム和光純薬社製
酢酸エチル	富士フイルム和光純薬社製
メタノール	富士フイルム和光純薬社製
ギ酸 (FA, LC/MS 用, 約 99%)	富士フイルム和光純薬社製
重メタノール (CD <sub>3</sub> OD, 99.8%)	Merck KGaA 社製
超純水	PURELAB flex5 system (ELGA 社製) を用いて得た。

有機溶媒については、移動相の用途で用いる場合は LC-MS グレード、その他の用途で用いる場合は特級グレードを用いた。また、試料の希釈溶媒として、メタノール/水 (70/30, v/v) 混液を用いた。

### 1-2-2 分析対象物質

試薬名	メーカー
ベニコウジ黄色素 (液状)	三栄源エフ・エフ・アイ社製
カルバゾクロム (Carbazochrome, CBZ)	富士フイルム和光純薬社製
1,4-BTMSB- <i>d</i> <sub>4</sub>	富士フイルム和光純薬社製

### 1-2-3 装置

電子天秤	METTLER ML303/52	METTLER 社製
遠心分離機	Himac CF15RN	日立工機社製
ロータリー エバポレーター	N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000	東京理化工機社製
遠心 エバポレーター	CVE-3110/UT-1000	東京理化工機社製
ボルテックス	MIXER UZUSIO VTX-3000L	LMS 社製
HPLC	LC-20AD pump, SIL-20AC autosampler, CBM-20A controller, SPD-M20A detector, CTO-10AS column oven	島津製作所社製
qNMR	JNM ECA 600 MHz spectrometer	日本電子社製
LC	ACQUITY ultraperformance liquid chromatograph	Waters 社製
MS/MS	Xevo™ TQD triple quadrupole-mass spectrometer	Waters 社製
HSCCC	Easy-Prep CCC	クツワ産業社製
分取 HPLC	PU 714M LC pump, UV 702 detector, SC 762 system controller and PLC 761 fraction collector	GL Science 社製

### 1-2-4 ベニコウジ黄色素の確認試験<sup>1)</sup>

- (1) 本品に表示量から、色価 70 に換算して 1 g に相当する量を取り、エタノール 100 mL を加えて溶かした液は、黄色を呈し、緑色の蛍光を発する。
- (2) 本品の表示量から、色価 70 に換算して 1 g に相当する量を取り、水 5 mL を加えて溶かし、さらに水酸化ナトリウム溶液 (1→25) 1 mL を加えて振り混ぜるとき、赤褐色に変わる。
- (3) 本品の表示量から、色価 70 に換算して 1 g に相当する量を取り、水 5 mL を加えて溶かし、さらに硫酸 0.1 mL を加えて振り混ぜるとき、黄色褐色の濁りを生ずる。
- (4) 本品を 50vol%エタノールに溶かした液は、波長 458-468 nm に極大吸収部がある。

### 1-2-5 HPLC 分析条件

カラム : TSKGEL ODS-100V column (4.6×150 mm, 3.0 μm : 東ソー社製)

カラム温度 : 40°C

流速 : 1.0 mL/min

移動相 : 0.1vol%ギ酸 (Solvent A) /0.1vol%ギ酸メタノール (Solvent B)

アイソクラティック条件 : A/B=30/70 (v/v) (10 分間)

注入量: 10 μL

検出波長 : 200-550 nm (モニタリング波長 : 460 nm)

### 1-2-6 HSCCC を用いた XA および XB の単離精製の検討

#### **【XA および XB の二相溶媒系の検討】**

ベニコウジ黄色素製剤 20 μL をマイクロチューブに加え、濃縮乾固 (60°C、15 分間) した。その後、残渣に各組成のヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1vol%ギ酸混液の上層および下層それぞれ 0.5 mL ずつ加え、再溶解した。その上層および下層それぞれ 50 μL を採り、濃縮乾固 (60°C、1 時間) した。そして、残渣にメタノール/水 (70/30, v/v) 混液 100 μL で再溶解し、HPLC で分析し、分配係数 (K) および分離係数 (α) を算出した。

$$\text{分配係数 (K)} = \frac{\text{固定相(上層)における XA もしくは XB のピーク面積}}{\text{移動相(下層)における XA もしくは XB のピーク面積}}$$

$$\text{分離係数 } (\alpha) = \frac{K_m}{K_n}$$

$$* K_m > K_n$$

#### **【HSCCC の分離条件】**

二相溶媒系 : ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1vol%ギ酸  
(1/5/1/5, v/v/v/v) 混液

流速 : 1.5 mL/min

固定相の保持率 : 76%

カラム容量 : 350 mL

カラム回転数 : 1000 rpm

分離部 : Type-J コイル

固定相/移動相：上層/下層

まず、二相溶媒系を室温で平衡化したのち、上層と下層をそれぞれ回収し、超音波でしばらく脱気し、上層を固定相として HSCCC のチューブに満たした。

次に、ベニコウジ黄色素 150 mg を濃縮乾固し、メタノールを加え、攪拌し、0.8  $\mu\text{m}$  フィルターに通した。その試料溶液をエバポレーターで濃縮乾固した後、二層溶媒系の上層および下層をそれぞれ 2 mL 加え、再溶解した。そして、固定相が保持されたときに、ベニコウジ黄色素の抽出液を HSCCC カラムに注入した。分取した試料をエバポレーターで濃縮乾固した後、メタノール/水 (70/30, v/v) 混液 100  $\mu\text{L}$  で再溶解し、HPLC で分析した。

### 【MS および MS/MS 測定条件】

Detected ion mode: Electrospray ionization (ESI) source in positive mode

Capillary voltage: 2.0 kV

Extractor voltage : 3.0 V

RF lens voltage : 2.5 V

Source temperature : 150°C

Cone gas flows : 50 L/h

Desolvation gas flows : 800 L/h

MS scan range :  $m/z$  50-700

Daughters ion scan range :  $m/z$  50-450

Cone voltage : 25 V

Collision energy : 15 eV

### 1-2-7 qNMR による XA および XB の絶対量の評価

#### 【qNMR の分析条件】

qNMR reference solution : 0.2 mg/mL 1,4-BTMSB- $d_4$  in  $\text{CD}_3\text{OD}$

Spectral width : -5-15 ppm

Data points : 60,000

Flip angle : 90°

Pulse delay : 60 s

Scans : 8-16 times

Probe : Room temperature

Software : Purity Pro qNMR ANALYSIS Software (日本電子社製)

### 【0.2 mg/mL 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> のキャリブレーション】

フタル酸ジエチル (DEP) 1.0 mg を精密に量りとり、CD<sub>3</sub>OD (qNMR 用標準液) 1.0 mL を加えて溶かした。1.0 mL 溶解液のうち 0.6 mL を NMR 管に移し、<sup>1</sup>H-NMR 測定した。なお、qNMR 用標準液中の 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> の濃度は、DEP の NMR シグナル δH7.47 ppm と 7.36 ppm (DEP の芳香環由来 4H) に対する 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> の NMR シグナル δH0.00 ppm (18H) の割合を計算した。

### 【qNMR による XA および XB の絶対評価 (内標準法)】

HSCCC で単離した XA および XB に 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 含有 CD<sub>3</sub>OD 1.0 mL を加え溶解した。その後、1.0 mL 溶解液のうち 0.8 mL を NMR 管に移し、qNMR により測定した。なお、qNMR による定量値の計算式を下記に示した。試料溶液を調製する際に量り採る分析対象物質の質量、分析対象物質のモル質量、純度 (含量) および qNMR の定量条件下における信号面積を、それぞれ  $W_A$  (g)、 $M_A$  (g/mol)、 $P_A$  (kg/kg) および  $I_A$  とした。また、qNMR 用内標準物質に関しても同様に、 $W_R$  (g)、 $M_R$  (g/mol)、 $P_R$  (kg/kg) および  $I_R$  とした。

$$P_A = \left(\frac{H_R}{H_A}\right) \left(\frac{I_A}{I_R}\right) \left(\frac{M_A}{M_R}\right) \left(\frac{W_R}{W_A}\right) P_R$$

### 1-2-8 RMS を用いた XA および XB の SR-HPLC 定量法の構築

#### 【絶対検量線による XA、XB および CBZ (SR) の RMS 算出】

qNMR で絶対定量した XA、XB および SR である CBZ をメタノール/水 (70/30, v/v) 混液により希釈して、検量線用の HPLC 標準溶液を調製した。ちなみに、CBZ はキサントモナシン類と同様に黄色の吸収波長を示すため、SR として選択した。今回、絶対検量線の範囲を XA では 0-177 μmol/L、XB では 0-126 μmol/L と設定し、それぞれの RMS を求めた。まず、RMS を求めるとき、ランベルト・ベールの法則の用いる (下記の式)。なお、吸光度 ( $R$ ) は、吸光係数 ( $\epsilon$ )、濃度 ( $C$ ) および層長 ( $l$ ) で表される。

$$R = \epsilon \times C \times l$$

ここで、層長  $l$  は SR、XA および XB において同じ値であると仮定した。

$$\frac{R_{\text{analyte}}}{(\epsilon_{\text{analyte}} \times C_{\text{analyte}})} = \frac{R_{\text{SR}}}{(\epsilon_{\text{SR}} \times C_{\text{SR}})}$$

$$\left(\frac{\varepsilon_{\text{analyte}}}{\varepsilon_{\text{SR}}}\right) \times C_{\text{analyte}} = \left(\frac{R_{\text{analyte}}}{R_{\text{SR}}}\right) \times C_{\text{SR}}$$

それぞれの原点を通過する検量線を作成すると、吸光係数比 ( $\varepsilon_{\text{analyte}}/\varepsilon_{\text{SR}}$ ) は下記の計算式で求められた。

$$\frac{\varepsilon_{\text{analyte}}}{\varepsilon_{\text{SR}}} = \left(\frac{R_{\text{analyte}}}{R_{\text{SR}}}\right) \times \left(\frac{C_{\text{SR}}}{C_{\text{analyte}}}\right) = \text{RMS}$$

上記より、XA および XB の RMS を絶対検量線の傾きの比より算出した。なお、0  $\mu\text{mol/L}$  のピーク面積は検量線の原点とした。

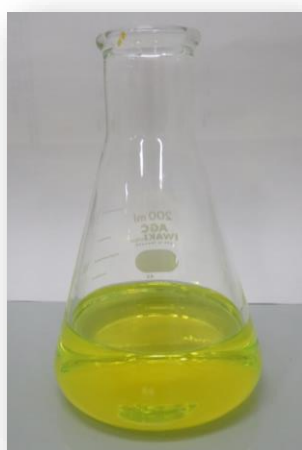
#### 【ベニコウジ黄色素中の XA および XB の SR-HPLC 定量分析】

算出した RMS を用いて、ベニコウジ黄色素に含まれる XA および XB を定量分析した。そのとき、HSCCC で単離精製した XA および XB を用いて、絶対検量線を作成し、SR-HPLC による定量値と比較した。さらに、異なる HPLC 分析条件（分析カラム、移動相の組成および SR 濃度）において SR-HPLC 定量法を実施し、再現性や堅固性を評価した。試料は 4 種類のベニコウジ黄色素製剤を用いて、各試料 0.1 mL にメタノールを加えて溶解し、100 mL に定容した。さらに、メタノール/水 (70/30, v/v) 混液を用いて 10 倍希釈し、5.0、7.5 および 15.0  $\mu\text{mol/L}$  に希釈されるように CBZ を添加し、HPLC 分析を実施した。

### 第 3 節 実験結果及び考察

#### 1-3-1 ベニコウジ黄色素の確認試験

ベニコウジ黄色素は、三栄源エフ・エフ・アイ社製のものを用いた。そこで、公定法に記載されている確認試験を実施した<sup>1)</sup>。その結果、本研究で用いたベニコウジ黄色素は、現在の規格基準に従うことを確認できた (Fig. 2-4)。

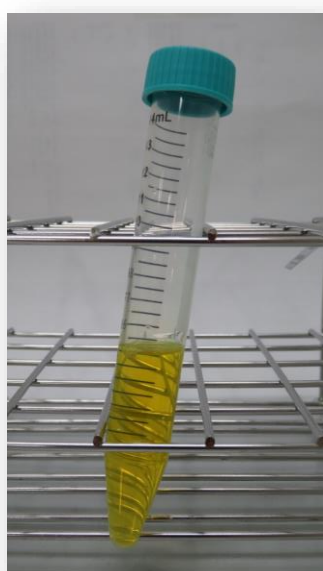


Yellow



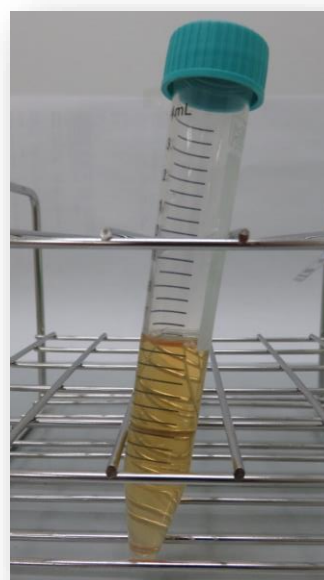
Fluorescent green

Fig. 2 Identification test (1) .



Yellow

NaOH



Reddish brown

Fig. 3 Identification test (2) .

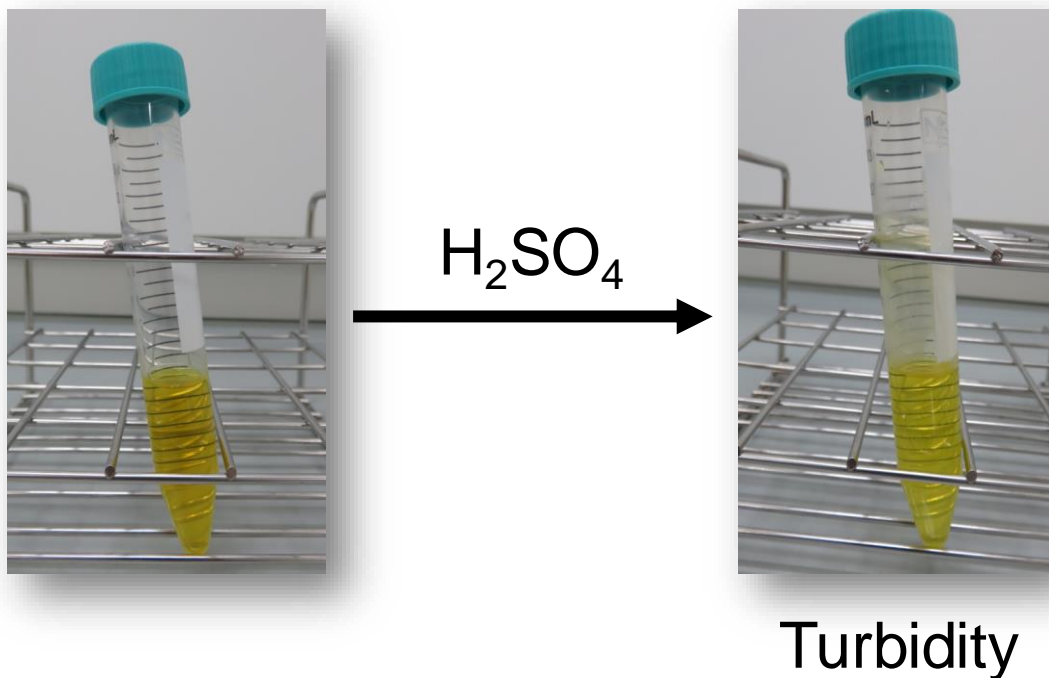


Fig. 4 Identification test (3) .

### 1-3-2 XA および XB の HPLC 分離検討

#### **【フォトダイオードアレイ (Photodiode Array Detector, PDA) 検出器における検出波長の検討】**

先行研究において、ベニコウジ黄色素中の XA および XB の HPLC 分析法が構築されていたため、その分析法に準じることとした<sup>29)</sup>。ゆえに、移動相は 0.1vol% ギ酸と 0.1vol% ギ酸メタノール、カラムは TSKgel ODS-100V (東ソー社製) を用いた。また、XA および XB の紫外可視吸収スペクトルを Fig. 5 に示した。その結果、いずれも吸収極大波長が 463 nm であったため、460 nm をモニタリングすることとした。



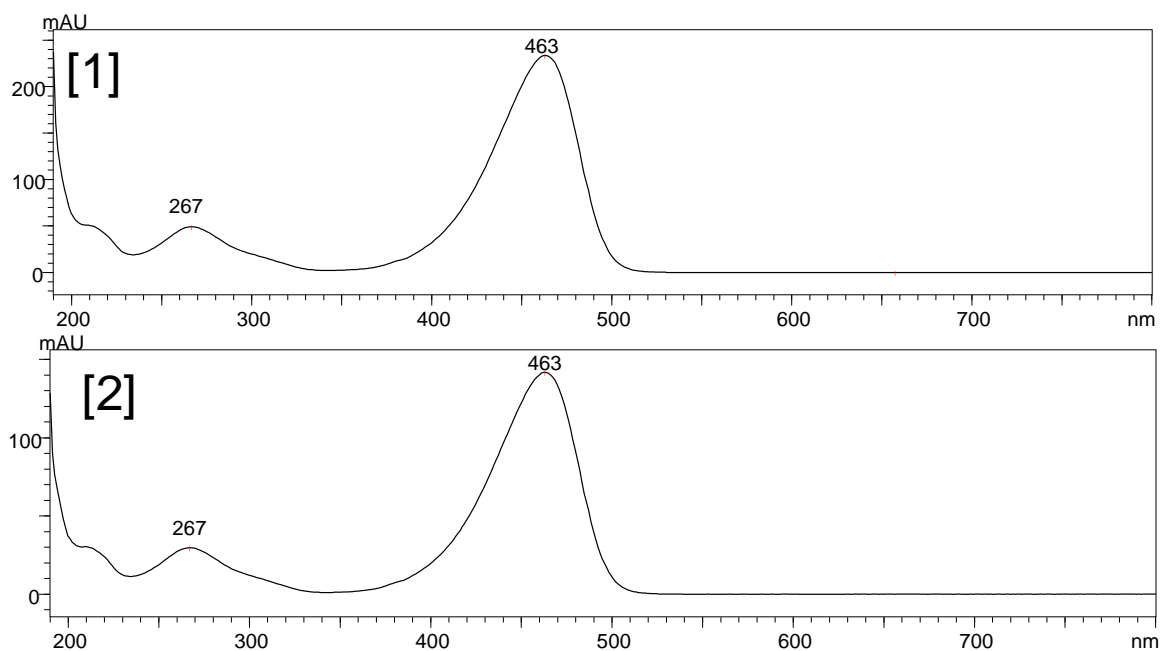


Fig. 5 PDA spectra of XA and XB (200-800 nm) .

[1] XA, [2] XB

#### 【移動相組成比の検討】

ベニコウジ黄色素中の XA および XB を分離分析するために、複数のアイソクラティック条件により測定し、最適な HPLC 分離条件を検討した。そのときの HPLC クロマトグラムを Fig. 6 に示した。その結果、キサントモナシン類の分離度、ピーク形状および分析時間により、0.1vol%ギ酸/0.1vol%ギ酸メタノール (30/70, v/v) が最適であると考えられた。XA は保持時間 3.5 分、XB は保持時間 5.8 分にピークが確認された。

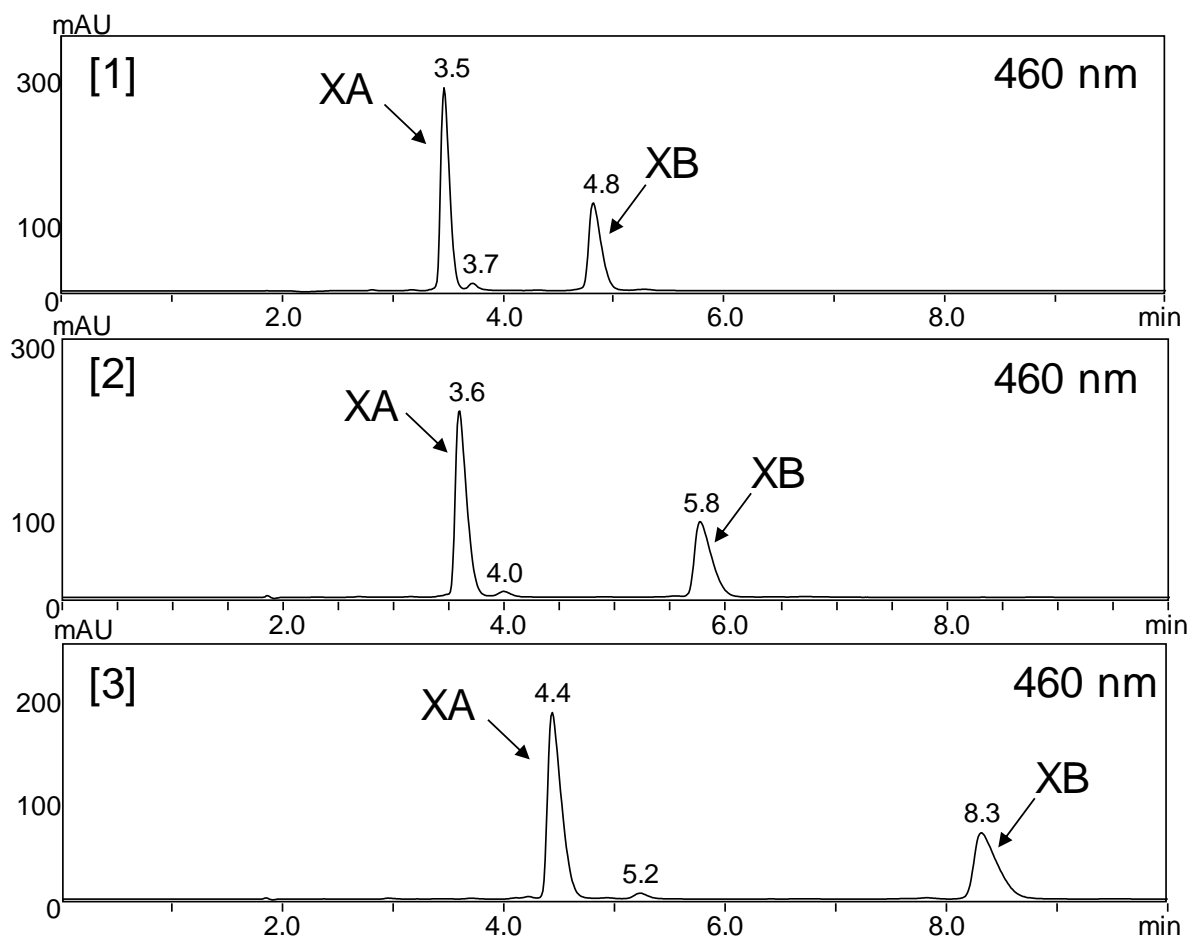


Fig. 6 HPLC chromatograms of MY

(A : 0.1vol% FA in water、B : 0.1vol% FA in methanol) .

[1] A/B : 25/75 (v/v) , [2] A/B : 30/70 (v/v) , [3] A/B : 35/65 (v/v)

### 1-3-3 HSCCC を用いた XA および XB の単離精製の検討

#### 【XA および XB の二相溶媒系の検討】

決定した HPLC 分析条件下で、HSCCC で用いる二相溶媒系を検討した。本研究では、二相溶媒系にヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1vol%ギ酸混液を用いて、各組成比における XA および XB の分配係数 ( $K$ ) および分離係数 ( $\alpha$ ) を Table 1 に示した。なお、最適な二相溶媒系を決定する際は、 $K$  が 1 に近い、かつ  $\alpha$  が大きい値を選択する。Table 1 より、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1vol%ギ酸 (1/5/1/5, v/v/v/v) 混液が最も良好であったため、XA および XB の最適な二相溶媒系として用いることとした。

Table 1 The partition coefficient ratios ( $K$ ) of separation factor ( $\alpha$ ) .

Hexane/ethyl acetate /methanol/0.1vol% FA in water (v/v/v/v)	Partition coefficient ( $K$ ) $\pm$ SD		Separation factor( $\alpha$ ) $\pm$ SD
	XA	XB	
5/5/5/5	N.D.	N.D.	N.D.
4/5/4/5	N.D.	0.06 ( $\pm$ 0.00)	N.D.
3/5/3/5	0.01 ( $\pm$ 0.00)	0.05 ( $\pm$ 0.01)	3.52 ( $\pm$ 0.05)
2/5/2/5	0.09 ( $\pm$ 0.01)	0.43 ( $\pm$ 0.02)	4.78 ( $\pm$ 0.08)
1/5/1/5	0.33 ( $\pm$ 0.03)	2.02 ( $\pm$ 0.14)	6.05 ( $\pm$ 0.14)
0/5/0/5	0.72 ( $\pm$ 0.09)	9.55 ( $\pm$ 0.70)	6.33 ( $\pm$ 0.20)

n=3

最適な二相溶媒系を用いて、HSCCC カラムに上層を保持した結果、その保持率は 76%であった。また、ベニコウジ黄色素の HSCCC クロマトグラムを Fig. 7 に示した。その結果、2つのメインピーク (Fraction A および B) が検出され、分析時間は計 450 分であった。これら Fraction A および B を回収し、HPLC で分析し、保持時間を確認した (Fig. 8)。さらに、分取物を LC-MS/MS を用いて化合物の推定を行った。その結果、分取物の MS スペクトルでは、いずれもキサントモンシン類の  $[M+H]^+$  (Fraction A :  $m/z$  389, Fraction B :  $m/z$  417) および  $[M+Na]^+$  (Fraction A :  $m/z$  411, Fraction B :  $m/z$  439) が観察された (Fig. 9)。さらに、各分取物の  $[M+H]^+$  イオンをプレカーサーイオンと設定したとき、Daughters Scan により、それぞれのフラグメントイオンが得られた (Fig. 10)。以上の結果より、Fraction A は XA、Fraction B は XB であることが推定された。

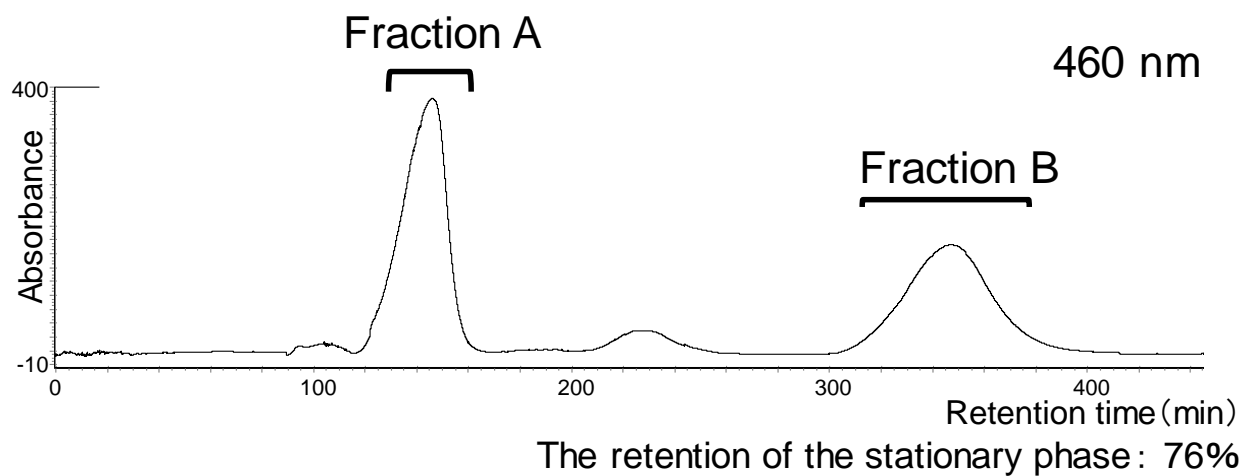


Fig. 7 HSCCC chromatogram of MY.

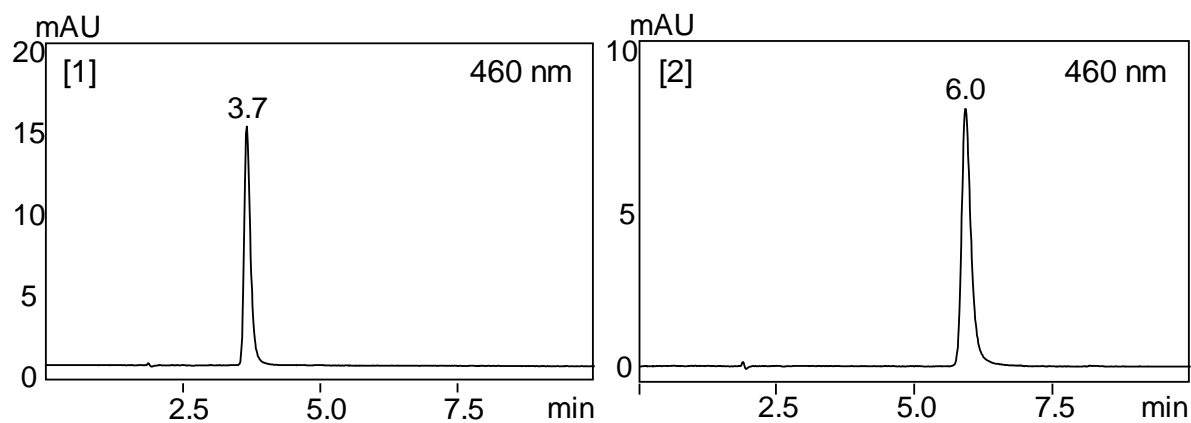


Fig. 8 HPLC chromatograms purified from MY.

[1] Fraction A, [2] Fraction B

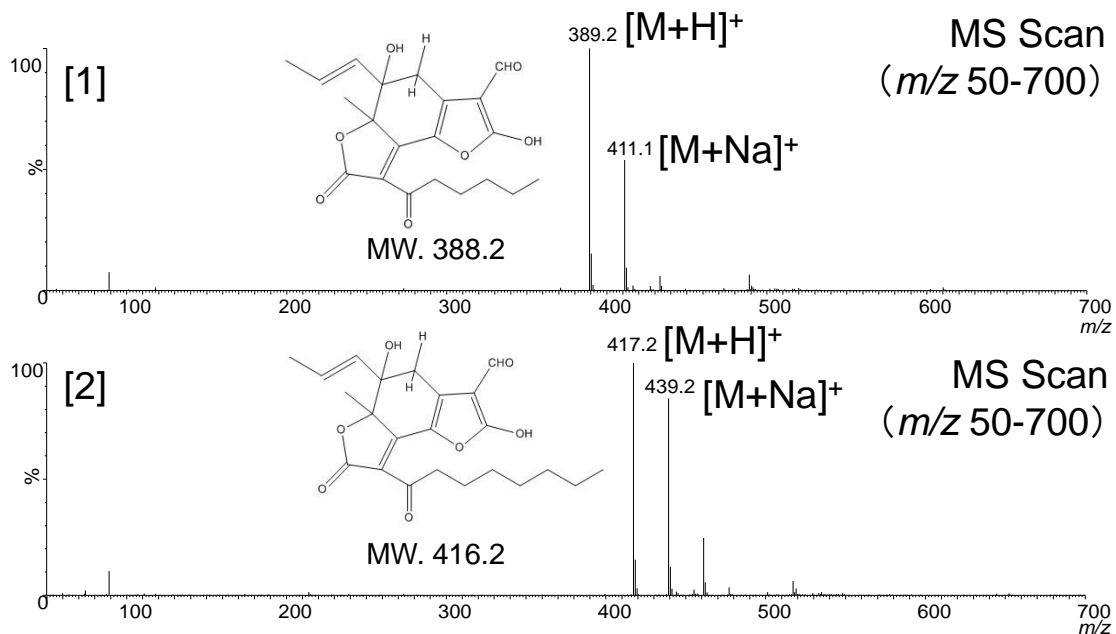


Fig. 9 MS spectra of purified from MY in MS scan.

[1] Fraction A, [2] Fraction B

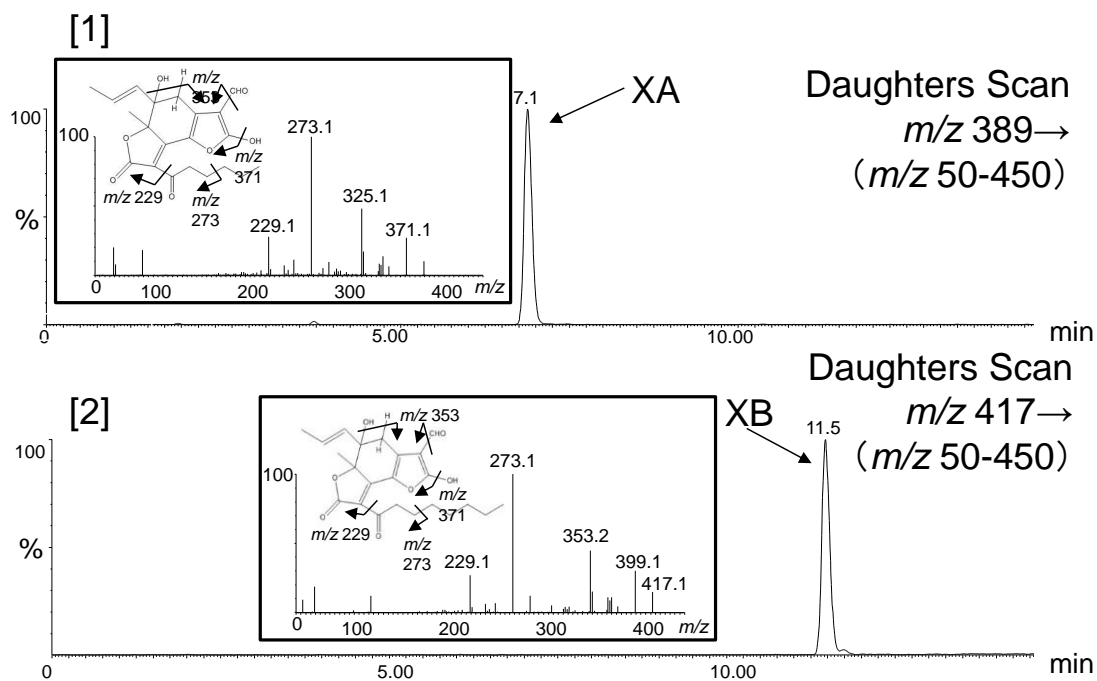


Fig. 10 MS/MS chromatograms and spectra of purified from MY in daughters scan.

[1] Fraction A, [2] Fraction B

さらに、HSCCC の単離精製するとき、200-250 分に検出された微量成分を分取し、Fraction A-B と同様に、HPLC および LC-MS/MS を用いて分析した結果、この化合物は XA の構造異性体の可能性が高いと考えられた (Fig. 11-12)。

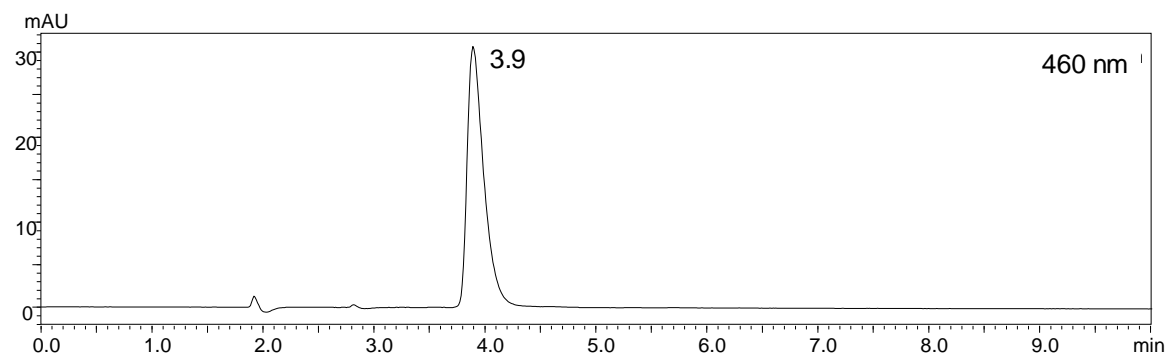


Fig. 11 HPLC chromatogram of XA isomer.

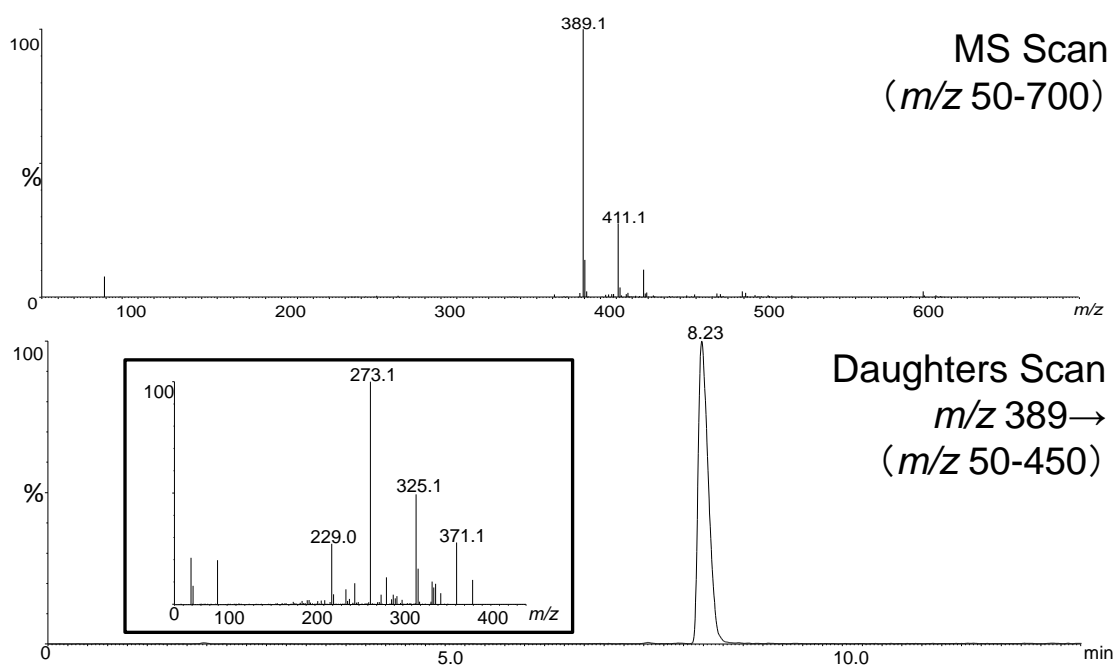


Fig. 12 MS spectrum and MS/MS chromatogram and spectrum of XA isomer.

### 1-3-4 qNMRによるXAおよびXBの絶対量の評価

本研究では 1,4-BTMSB- $d_4$  (qNMR 用の標準物質) を DEP によるキャリブレーションした結果、0.182 mg/mL であった。そして、単離精製した XA および XB の qNMR スペクトルを Fig. 13 に示した。1,4-BTMSB- $d_4$  は 0.2 ppm、XA および XB は 5.5 ppm に観察されたシグナルを用いて絶対定量した。その結果、1,4-BTMSB- $d_4$  の量は 0.149 mg (0.182 mg/mL×0.8 mL) であったため、NMR 管 (0.8 mL) に含まれる XA および XB の量は、XA は  $2.94\pm 0.018$  mg (n=3)、XB は  $1.40\pm 0.040$  mg (n=3) であると求めた。その計算式を下記に示した (I: シグナル面積、H: プロトン数、M: 分子量)。さらに、二次元 NMR スペクトルにより、Fraciton A が XA、Fraction B が XB であると構造同定できた (Fig. 14-15)。

$$\left(\frac{0.15 \text{ mg}}{M_{BTMSB}}\right) \left(\frac{I_{XA/XB}}{H_{XA/XB}}\right) \left(\frac{H_{BTMSB}}{I_{BTMSB}}\right) M_{XA/XB}$$

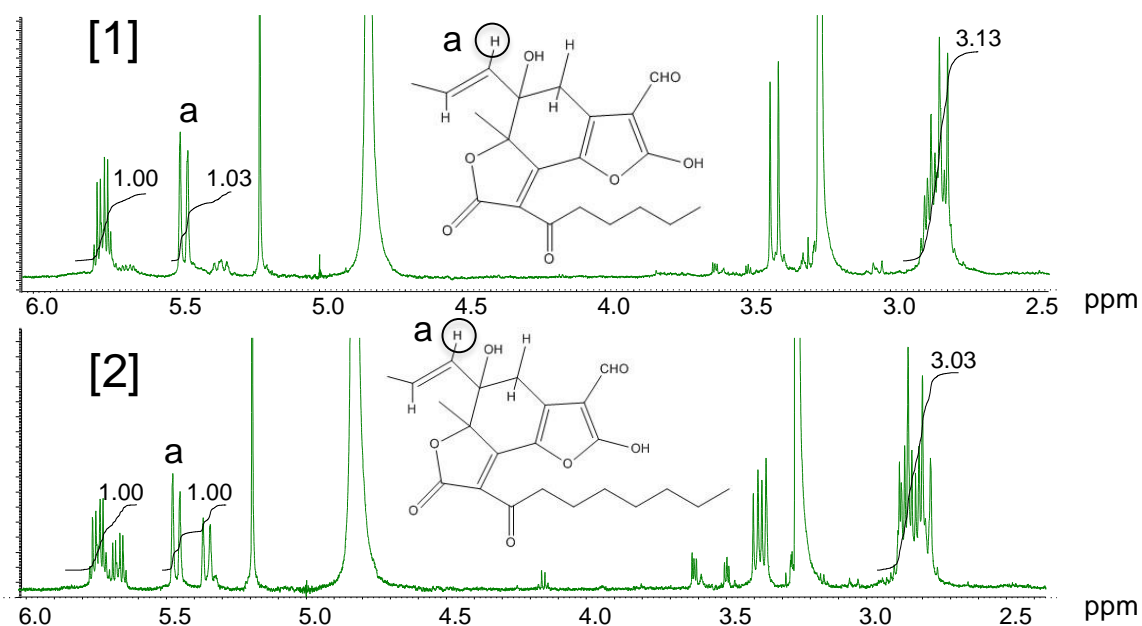
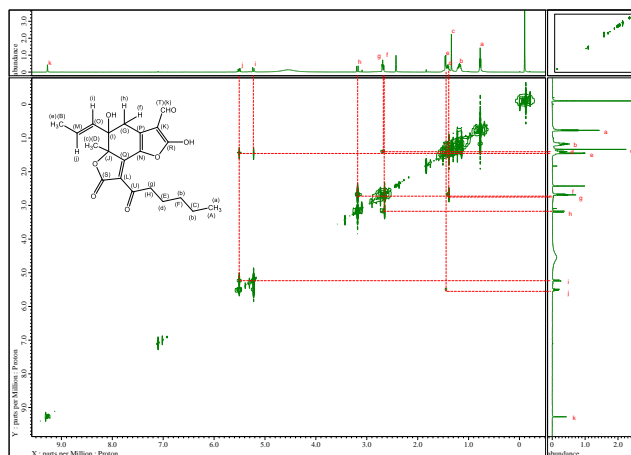


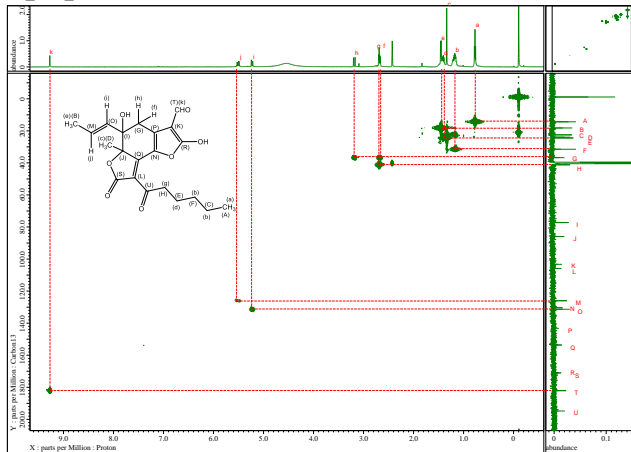
Fig. 13 qNMR spectra of XA and XB purified from MY.

[1] XA, [2] XB

[1]



[2]



[3]

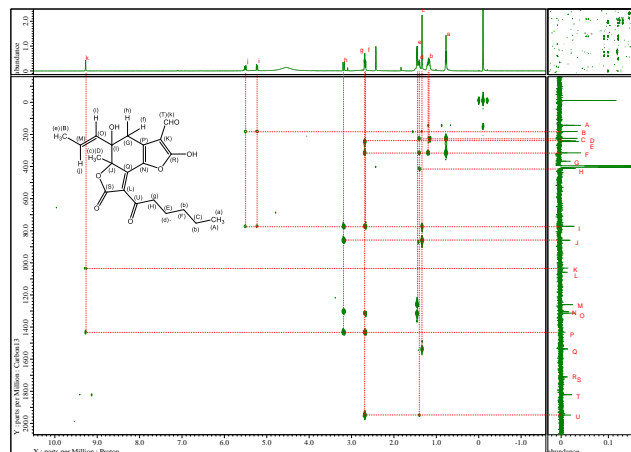
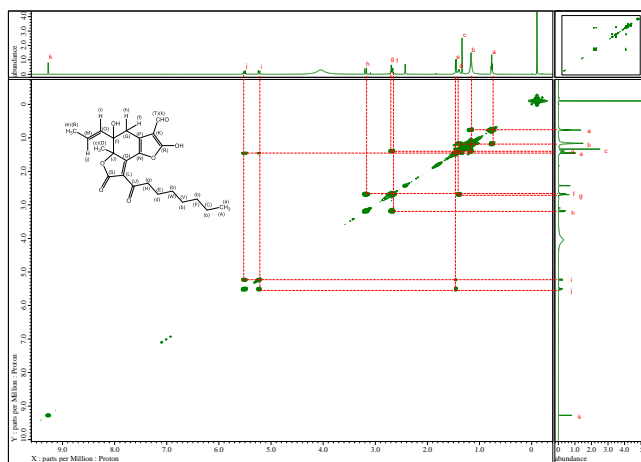


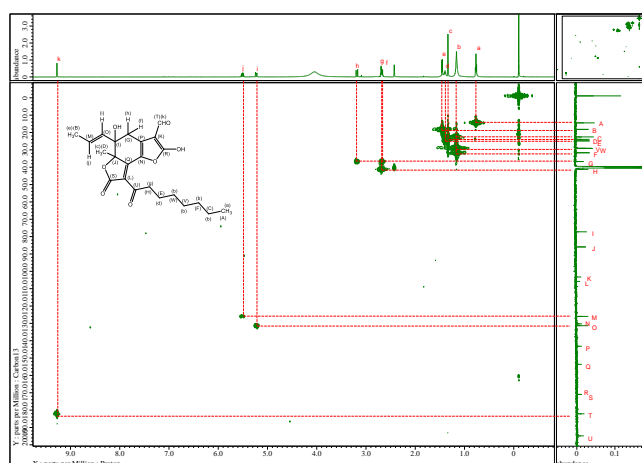
Fig. 14 2D-NMR spectra of XA.  
[1] COSY, [2] HMQC, [3] HMBC



[1]



[2]



[3]

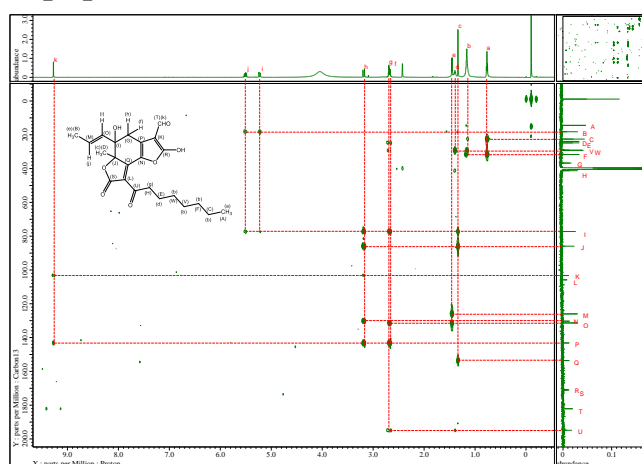


Fig. 15 2D-NMR spectra of XB.  
[1] COSY, [2] HMQC, [3] HMBC

### 1-3-5 HPLCによるXAおよびXBのRMSの算出

NMR 管の試料溶液を用いて HPLC 用標準溶液を調製し、絶対検量線を作成した (Fig. 16)。また、本研究では、キサントモナシン類と吸収波長が類似している、かつ LC 分離が良好である CBZ を SR として採用した。CBZ は試薬メーカーから入手できる安価かつ安定な化合物である。XA、XB および CBZ の絶対検量線を作成して RMS を算出した結果、XA の RMS は、8.85 (range : 0-11.1  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2 = 0.999$ )、8.68 (range : 13.3-44.2  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2 = 0.999$ )、8.73 (range : 53.0-177  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2 = 0.999$ ) および 8.73 (range : 0-177  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2 = 0.999$ ) であった。XB の RMS は 15.0 (range : 0-7.94  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2 = 0.999$ )、14.7 (range : 9.45-31.5  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2 = 0.998$ )、14.4 (range : 37.8-126  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2 = 0.999$ ) および 15.0 (range : 0-126  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2 = 0.999$ ) であった。したがって、全ての検量線の範囲における XA および XB の RMS 平均値は、それぞれ  $8.75 \pm 0.07$  および  $14.8 \pm 0.26$  であった。

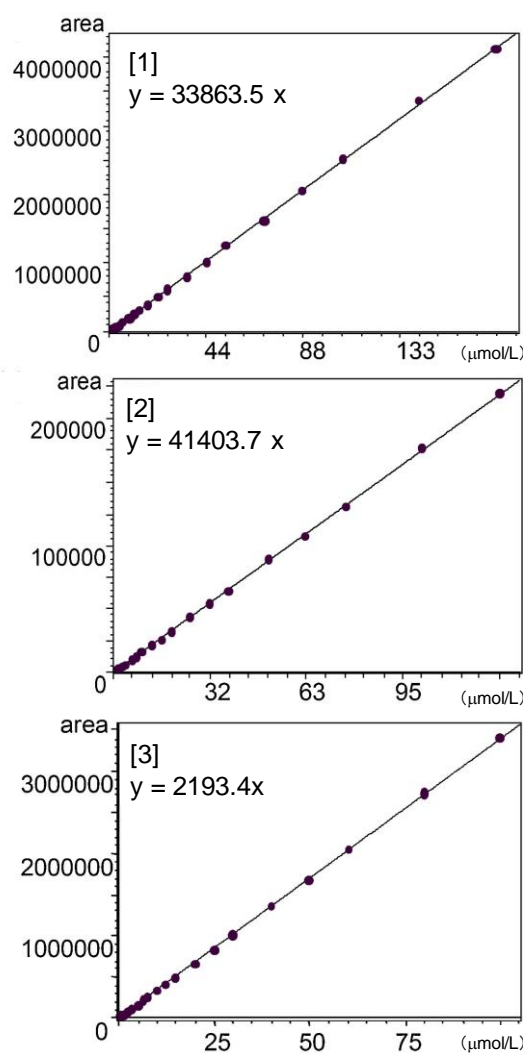


Fig. 16 Calibration curves of XA, XB and SR using HPLC (460 nm) .

[1]XA, [2] XB, [3]CBZ (SR)

### 1-3-6 RMS を用いたベニコウジ黄色素中の XA および XB の定量分析

RMS を用いた SR-HPLC 定量法の再現性および精度を評価するため、5 種類のカラムおよび移動相の組成比 (Table 2) を用いて、ベニコウジ黄色素中の XA および XB を定量分析した。それぞれのベニコウジ黄色素の HPLC クロマトグラムを Fig. 17 に示した。その結果、SR-HPLC 定量法において、XA および XB の定量値は、RMS、SR の添加濃度、HPLC クロマトグラム上のピーク面積比を用いて簡単に算出できた。三栄源エフ・エフ・アイ社製のベニコウジ黄色素中の XA および XB を 5 種類のカラムと移動相において定量分析した (Table 3)。さらに、SR の添加濃度は、5.0、7.5 および 15.0  $\mu\text{mol/L}$  を用いた。その結果、XA の平均濃度は、9.2  $\mu\text{mol/g}$  (RSD% : 2.8%、n=45)、XB の平均濃度は、3.2  $\mu\text{mol/g}$  (RSD% : 3.7%、n=45) であった。

Table 2 HPLC condition such as mobile phase and column for the validation of RMS values for the determination of XA and XB in MY.

Mobile phase	Column		
Solvent A/B 0.1vol% FA in water/methanol Ratio (A/B)	Product name	Brand	Size
30/70	TSKgel ODS-100V	Tosoh, Tokyo, Japan	4.6 × 150 mm (5.0 $\mu\text{m}$ )
20/80	Xbridge C18	Waters, Milford, MA	4.6 × 150 mm (5.0 $\mu\text{m}$ )
15/85	Inertsil ODS-2	GL Science, Tokyo, Japan	4.6 × 150 mm (5.0 $\mu\text{m}$ )
20/80	YMC-Pack Pro C18 RS	YMC, Tokyo, Japan	4.6 × 150 mm (5.0 $\mu\text{m}$ )
90/10 (0 min)→10/90 (10 min) →5/95 (10.1 min)→5/95 (15 min)	KINETEX	Phenomenex, Tokyo, Japan	4.6 × 150 mm (5.0 $\mu\text{m}$ )

Column temperature: 40°C

Flow rate: 1.0 mL/min

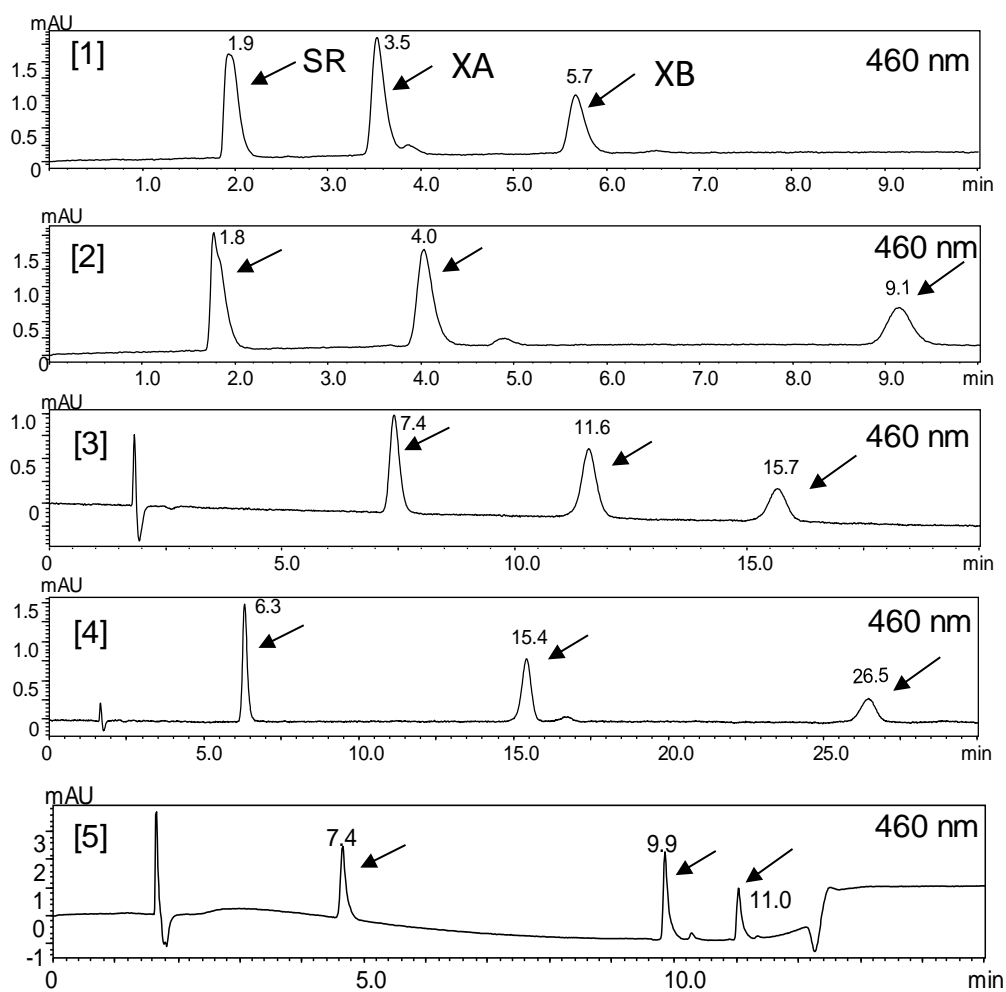


Fig. 17 HPLC chromatograms of MY between different HPLC conditions.

[1] TSKgel ODS-100V (Tosoh, Co.)

[2] XBridge C18 (Waters, Co.)

[3] Inertsil ODS-2 (GL Science, Co.)

[4] YMC-Pack Pro C18 RS (YMC, Co.)

[5] KINETEX (Phenomenex, Co.)

Table 3 Concentrations of XA and XB in MY based on the SR-HPLC method using RMS.

HPL condition (Column) Mobile phase A: 0.1vol% FA in water Mobile phase B: 0.1vol% FA in methanol	SR standard Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	XA concentration ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\pm$ SD	XB concentration ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\pm$ SD
TSKgel ODS-100V (Tosoh) A/B: 30/70 (v/v)	5.0	9.1 $\pm$ 0.10	3.3 $\pm$ 0.04
	7.5	9.3 $\pm$ 0.12	3.3 $\pm$ 0.06
	15	9.1 $\pm$ 0.04	3.3 $\pm$ 0.03
XBridge C18 (Waters) A/B: 20/80 (v/v)	5.0	8.8 $\pm$ 0.05	3.0 $\pm$ 0.08
	7.5	9.0 $\pm$ 0.09	3.2 $\pm$ 0.01
	15	8.9 $\pm$ 0.10	3.1 $\pm$ 0.01
Inertsil ODS-2 (GL Science) A/B: 15/85 (v/v)	5.0	9.1 $\pm$ 0.07	3.1 $\pm$ 0.03
	7.5	9.4 $\pm$ 0.09	3.3 $\pm$ 0.07
	15	9.2 $\pm$ 0.08	3.2 $\pm$ 0.03
YMC-Pack Pro C18 RS (YMC) A/B: 20/80 (v/v)	5.0	9.0 $\pm$ 0.18	3.3 $\pm$ 0.09
	7.5	9.2 $\pm$ 0.12	3.3 $\pm$ 0.06
	15	9.2 $\pm$ 0.03	3.3 $\pm$ 0.05
KINETEX(phenomenex) A/B: 90/10(0 min) $\rightarrow$ 10/90(10 min) $\rightarrow$ 5/95(10.1 min) $\rightarrow$ 5/95(15 min)	5.0	9.8 $\pm$ 0.15	3.3 $\pm$ 0.07
	7.5	9.4 $\pm$ 0.06	3.2 $\pm$ 0.03
	15	9.1 $\pm$ 0.04	3.1 $\pm$ 0.03

n=3

次いで、HSCCC で単離精製した XA および XB を用いて、絶対検量線法による定量値を SR-HPLC 法と比較した (Table 4)。また、SR を添加した各ベニコウジ黄色素の HPLC クロマトグラムを Fig. 18 に示した。その結果、RMS に基づく XA および XB の定量値は、従来の絶対検量線法による定量値とほぼ同等であった。

Table 4 Concentrations of XA and XB in four MY samples based on the HPLC method using RMS and standard absolute calibration method.

Sample	RMS method		Absolute calibration method	
	XA ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\pm$ SD	XB ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\pm$ SD	XA ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\pm$ SD	XB ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\pm$ SD
A	9.7 $\pm$ 0.02	3.1 $\pm$ 0.01	9.7 $\pm$ 0.04	3.3 $\pm$ 0.02
B	19.9 $\pm$ 0.10	6.9 $\pm$ 0.03	20.4 $\pm$ 0.03	6.9 $\pm$ 0.01
C	9.5 $\pm$ 0.05	3.1 $\pm$ 0.04	9.9 $\pm$ 0.02	3.2 $\pm$ 0.01
D	10.0 $\pm$ 0.09	3.3 $\pm$ 0.04	10.3 $\pm$ 0.08	3.3 $\pm$ 0.01

n=3

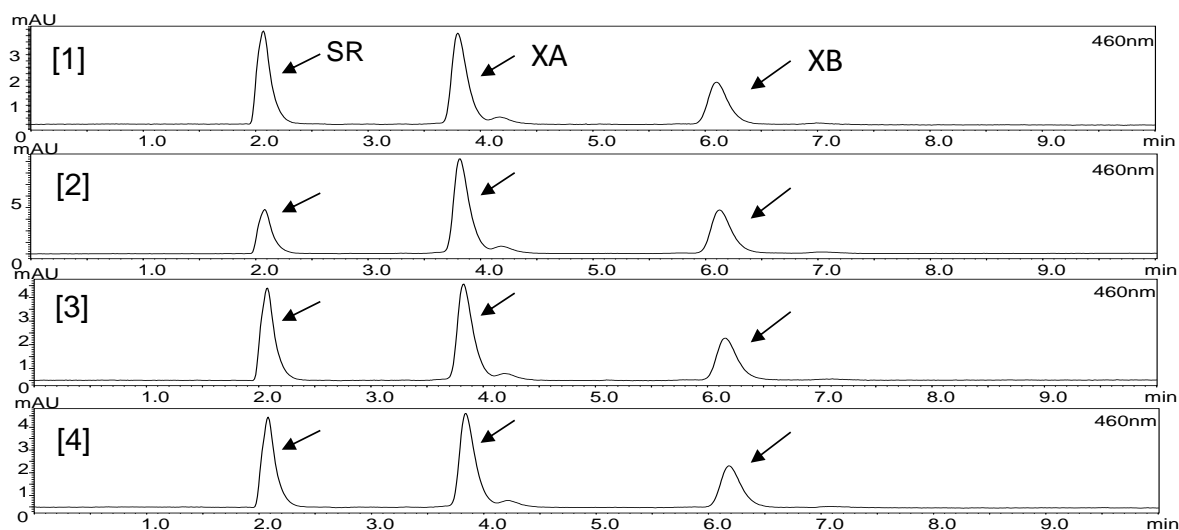


Fig. 18 Chromatograms of XA and XB in MY based HPLC method using RMS  
Chromatograms of four MY samples in Table 4.

#### 第4節 小括

本章では、HSCCC を用いたベニコウジ黄色素から XA および XB の単離精製、qNMR による絶対評価、RMS の算出に基づく SR-HPLC 定量法を初めて構築した。これまでは、食品添加物中の主成分を正確に定量するために、それぞれの定量用標準品が不可欠であり、必ず入手しなければいけなかった。しかしながら、本手法を用いることにより、ベニコウジ黄色素中の XA および XB を、検量線を作成せずに、SR を添加することにより、それぞれを定量分析することができた。さらに、その分析結果は、従来の絶対検量線法による定量値とほぼ一致し、1つの HPLC クロマトグラムを用いることで再現性のある定量値を得ることができた。ゆえに、RMS を用いた簡便かつ迅速な XA および XB の SR-HPLC 法を開発することができたといえる<sup>30)</sup>。

## 第2章 ゴマ油不けん化物の成分規格の検討

### 第1節 序

ゴマ油不けん化物 (Sesame seed oil unsaponified matter, SSOUM) は、アジア諸国における伝統的な酸化防止剤であり、国内では既存添加物に分類されている。しかしながら、これまでゴマ油不けん化物に関する分析法は、ほとんど報告されていない。さらに、食品添加物公定書の試験法も規定されていない。その一方、はゴマ油 (Sesame seed oil) に関しては、分析手法や抗酸化活性評価などの多くの研究報告がある<sup>31-32)</sup>。そのため、ゴマ油不けん化物に含まれる主要成分は、ゴマ油に含まれるセサミン、セサモリンやセサモールなどのゴマリグナン類であると考えられる<sup>33-36)</sup>。

これらゴマリグナン類は、様々な生理活性を持つと言われている。例えば、セサミンは抗がん作用、抗炎症作用または抗酸化活性などが報告されており<sup>32, 37-38)</sup>、セサミンは HeLa 細胞の増殖・遊走を抑制し、IRE1 $\alpha$ /JNK 経路を介して小胞体ストレスを介したアポトーシスを誘導するという報告もある<sup>39)</sup>。また、セサモリンは Raji 細胞により抗がん作用が示されている<sup>40)</sup>。さらに、これらゴマリグナン類としては、ヒトに対して抗アミロイド凝集、抗炎症、抗酸化などの様々な生理活性を示すため、今後の薬理学研究において期待されている<sup>41-42)</sup>。

これまでの研究では、ゴマ油中にセサミンとセサモリンの含有量はともに 6.5-17.3 mg/g であると報告されているが、セサモールの含有量は約 0.1 mg/g であり、他のゴマリグナン類と比べて少量である<sup>43-47)</sup>。なお、セサモールは、ゴマ油を加熱したとき、セサモリンがセサモールに変換することにより得られる<sup>48)</sup>。このように、各ゴマリグナン類の含有量は様々な要因により変化することが報告されているため、これらゴマリグナン類の網羅的な定量法が求められている。これまで、主要なゴマリグナン類 (セサミン、セサモリン、エピセサミンおよびセサモール) の分析法として、TLC、GC、順相系 LC などが報告されている<sup>49-51)</sup>。また、最近では、逆相系 LC を用いたゴマ油中のセサモール、セサミン、セサモリンの定量法が開発されている<sup>52)</sup>。

しかしながら、ゴマリグナン類の HPLC 分析法における問題は、安価かつ信頼性の高い標準品が流通していないことである。ゆえに、セサミンおよびセサモリンは、これまでゴマの種子またはゴマ油からアルミナカラム、Macroporous 樹脂、逆相系クロマトグラフ、Saponification/Crystallization 混合法を用いて単離精製することにより、高純度のゴマリグナン類を確保してきた<sup>53-55)</sup>。さらに、向流遠心クロマトグラフィーもしくは HSCCC を用いて、二相溶媒系によるゴマリグナン類を単離精製している<sup>56-57)</sup>。これらの方法は、ゴマリグナン類を効率的に単離精

製する有用な方法であり、今後の応用が期待されている。しかしながら、高純度のゴマリグナン類の標準品は高価であり、一般的に市販されていないため、ゴマ関連製品の HPLC への適用に限りがある。

以上より、本研究では、ゴマ油、ゴマ関連健康食品およびゴマ油不けん化物に含まれるセサミン、セサモリン、エピセサミンおよびセサモールを対象とした RMS による SR-HPLC 定量法を構築することとした。さらに、本章では、より具体的に SR の選択を検討した。前章で述べたように、最適な SR を選ぶためには、分析対象物質と吸収極大波長が同じかそれに近いこと、物性が安定であること、クロマトグラフィー上で完全分離が可能であること、高純度であることが求められる。しかしながら、これら全ての条件を満たす SR を探索することは困難である。そこで、本研究では、SR-HPLC 定量法を用いてゴマリグナン類を一斉分析できるように、SR を合成デザインすることとした (Fig. 19)。つまり、ゴマリグナン類の共通骨格 (1,3-ベンゾジオキソール骨格) をもとに、安価なセサモールをアルキル化で修飾することにより SR を合成デザインすることとした。

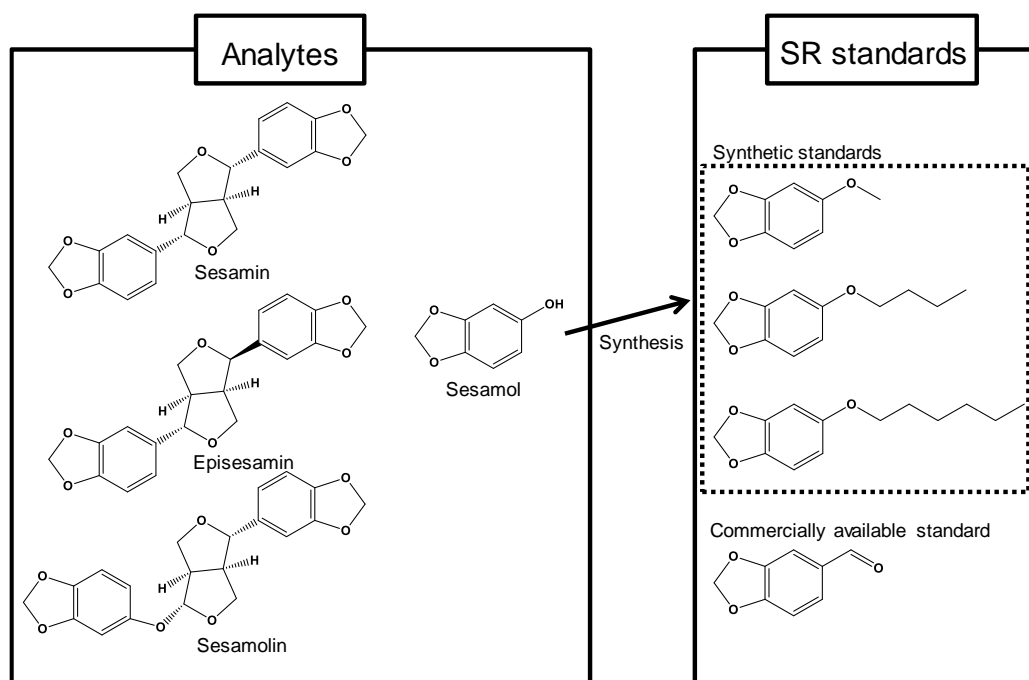


Fig. 19 Targeted analytes and SR standards based on molecular framework such 1,3-benzodioxole.



## 第 2 節 実験材料及び方法

### 2-2-1 試薬

試薬名	メーカー
アセトニトリル	富士フイルム和光純薬社製
メタノール	富士フイルム和光純薬社製
ギ酸 (FA, LC/MS 用, 約 99%)	富士フイルム和光純薬社製
ヨードメタン	富士フイルム和光純薬社製
1-ブロモブタン	富士フイルム和光純薬社製
1-ブロモヘキサン	富士フイルム和光純薬社製
アセトン	ナカライテスク社製
炭酸カリウム	ナカライテスク社製
重水素化クロロホルム (CDCl <sub>3</sub> )	Merck KGaA 社製
超純水	PURELAB flex5 system (ELGA 社製) を用いて得た。

有機溶媒については、移動相の用途で用いる場合は LC-MS グレード、その他の用途で用いる場合は特級グレードを用いた。また、Stock solution の溶媒として、アセトニトリル/メタノール (50/50, v/v) 混液、混合標準品の希釈溶媒として 20vol% 水含有アセトニトリル/メタノール (50/50, v/v) 混液を用いた。

### 2-2-2 分析対象物質

試薬名	メーカー
セサミン	富士フイルム和光純薬社製
セサモール	富士フイルム和光純薬社製
エピセサミン	長良サイエンス社製
セサモリン	長良サイエンス社製
ゴマ油不けん化物	長岡香料社製
ピペロナル	富士フイルム和光純薬社製
1,4-BTMSB- <i>d</i> <sub>4</sub>	富士フイルム和光純薬社製

### 2-2-3 装置

電子天秤	METTLER ML303/52	METTLER 社製
遠心分離機	Himac CF15RN	日立工機社製
ロータリー エバポレーター	N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000	東京理化工機社製
ボルテックス	MIXER UZUSIO VTX-3000L	LMS 社製
HPLC	LC-20AD pump, SIL-20AC autosampler, CBM-20A controller, SPD-M20A detector, CTO-10AS column oven	島津製作所社製
qNMR	JNM ECA 600 MHz spectrometer	日本電子社製

### 2-2-4 HPLC 分析条件

カラム : TSKGEL ODS-100V column (4.6×150 mm, 3.0 μm : 東ソー社製)

カラム温度 : 40°C

流速 : 1.0 mL/min

移動相 : 0.1vol% ギ酸 (Solvent A) / 0.1vol% ギ酸アセトニトリル (Solvent B)

アイソクラティック条件 : A/B=55/45 (v/v) (10 分間)

注入量: 10 μL

検出波長 : 200-550 nm (モニタリング波長 : 290 nm)

## 2-2-5 SR のデザイン

### 【セサモールのメチル誘導体の有機合成】

ナスフラスコに、セサモール 1.4 g (10 mmol) とヨードメタン 3.9 g (10 mmol) を加えた。次いで、アセトン 150 mL と炭酸カリウム 4.8 g (35 mmol) を加え、24 時間還流した。反応物を TLC でスポットを確認した。このとき、展開溶媒は、ヘキサン/酢酸エチル=90/10 (v/v) 混液を用いた。その後、生成物を  $^1\text{H-NMR}$  で測定し、化合物の同定を実施した。

### 【セサモールのブチル誘導体の有機合成】

ナスフラスコに、セサモール 1.4 g (10 mmol) と 1-ブロモブタン 2.1 g (15 mmol) を加えた。次いで、アセトン 150 mL と炭酸カリウム 4.8 g (35 mmol) を加え、24 時間還流した。反応物を TLC でスポットを確認した。このとき、展開溶媒は、ヘキサン/酢酸エチル=90/10 (v/v) 混液を用いた。その後、生成物を  $^1\text{H-NMR}$  で測定し、化合物の同定を実施した。

### 【セサモールのヘキシル誘導体の有機合成】

ナスフラスコに、セサモール 1.4 g (10 mmol) と 1-ブロモヘキサン 1.7 g (10 mmol) を加えた。次いで、アセトン 150 mL と炭酸カリウム 4.8 g (35 mmol) を加え、24 時間還流した。反応物を TLC でスポットを確認した。このとき、展開溶媒は、ヘキサン/酢酸エチル=90/10 (v/v) 混液を用いた。その後、生成物を  $^1\text{H-NMR}$  で測定し、化合物の同定を実施した。

## 2-2-6 qNMR によるゴマリグナン類の絶対評価

### 【 $^1\text{H-NMR}$ の分析条件】

qNMR reference solution : 0.2 mg/mL 1,4-BTMSB- $d_4$  in  $\text{CD}_3\text{OD}$

Spectral width : -5-15 ppm

Data points : 60,000

Flip angle :  $90^\circ$

Pulse delay : 60 s

Scans : 8-16 times

Probe : Room temperature

Software : Purity Pro qNMR ANALYSIS Software (日本電子社製)

### 【qNMRによるゴマリグナン類の絶対評価（内標準法）】

各ゴマリグナン類、SR（ピペロナル、セサモールのメチル誘導体、ブチル誘導体およびヘキシル誘導体）をそれぞれ 3 mg と 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 1 mg を CD<sub>3</sub>OD 1.0 mL に溶解した。1.0 mL 溶解液のうち 0.6 mL を NMR 管に移し、qNMR により測定した。qNMR による定量値の計算式は前章に示したとおりである。

### 2-2-7 RMS を用いたゴマリグナン類の SR-HPLC 定量法の構築

#### 【絶対検量線によるゴマリグナン類および SR の RMS 算出】

NMR 管中の各ゴマリグナン類、ピペロナル、セサモールのメチル誘導体、ブチル誘導体およびヘキシル誘導体を 20vol% 水含有アセトニトリル/メタノール（50/50, v/v）混液により希釈して、HPLC 標準溶液を調製した。qNMR の定量結果を用いて、絶対検量線の範囲は、0-100 μmol/L と設定し、RMS を求めた。まず、RMS を算出するとき、ランベルト・ベールの法則の式を下記のように式変形する。なお、吸光度（*R*）は、吸光係数（ $\epsilon$ ）、濃度（*C*）および層長（*l*）で表される。

$$R = \epsilon \times C \times l$$

ここで、層長 *l* はゴマリグナン類および SR において同じ値であると仮定した。

$$\frac{R_{analyte}}{(\epsilon_{analyte} \times C_{analyte})} = \frac{R_{SR}}{(\epsilon_{SR} \times C_{SR})}$$
$$\left(\frac{\epsilon_{analyte}}{\epsilon_{SR}}\right) \times C_{analyte} = \left(\frac{R_{analyte}}{R_{SR}}\right) \times C_{SR}$$

それぞれの原点を通過する検量線を作成すると、吸光係数比（ $\epsilon_{analyte}/\epsilon_{SR}$ ）は下記の計算式で求めた。

$$\frac{\epsilon_{analyte}}{\epsilon_{SR}} = \left(\frac{R_{analyte}}{R_{SR}}\right) \times \left(\frac{C_{SR}}{C_{analyte}}\right) = \text{RMS}$$

上記より、各ゴマリグナン類の RMS を絶対検量線の傾きの比より算出した。なお、0 μmol/L のピーク面積は検量線の原点とした。

### 【RMSを用いたゴマリグナン類のSR-HPLC定量法】

算出したRMSに基づいて、SR添加濃度およびHPLCクロマトグラムのピーク面積比を用いて、ゴマリグナン類を一斉定量した。本章では、実試料としてゴマ油、ゴマ健康食品およびゴマ油不けん化物を使用した。そして、異なるHPLC分析条件（分析カラム、移動相の組成およびSR濃度）においてSR-HPLC定量法を実施し、再現性や堅固性を評価した。さらに、SR-HPLC定量法と絶対検量線法で得られたそれぞれの定量値を比較した。

## 第3節 実験結果及び考察

### 2-3-1 ゴマリグナン類のHPLC分析条件の検討

#### 【PDAにおける検出波長の検討】

先行研究において、ゴマ油不けん化物中のゴマリグナン類のHPLC分析法が構築されていたため、その分析法に準じることとした<sup>25)</sup>。ゆえに、移動相は0.1vol%ギ酸と0.1vol%ギ酸アセトニトリル、カラムはTSKgel ODS-100V（東ソー社製）を選択した。また、各ゴマリグナン類の紫外可視吸収スペクトルをFig. 20に示した。その結果、いずれも吸収極大波長が286-297 nmであったため、290 nmをモニタリングすることとした。

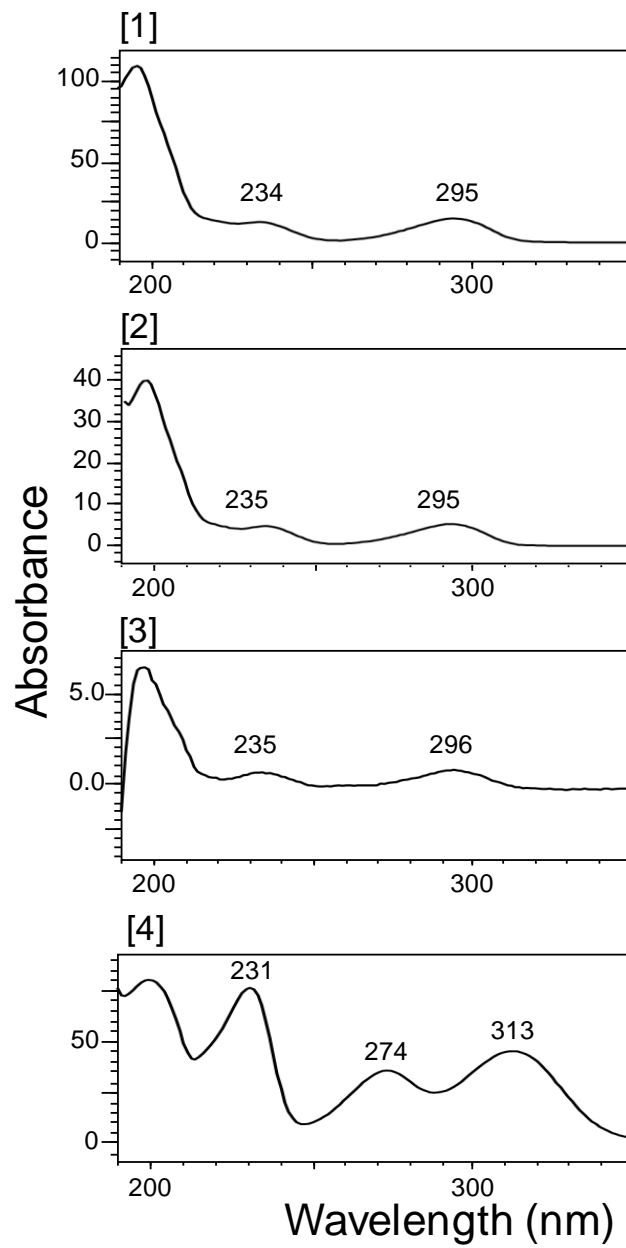


Fig. 20 PDA spectra of sesame lignans (180-400 nm) .  
 [1] Sesamol, [2] Sesamin, [3] Episesamin, [4] Sesamolin

### 【移動相組成比の検討】

ゴマ油不けん化物中のゴマリグナン類を LC 分離するために、複数のアイソクラティック条件により測定し、最適な HPLC 分離条件を検討した。各アイソクラティック条件におけるゴマリグナン類標準品の HPLC クロマトグラムを Fig. 21 に示した。その結果、ゴマリグナン類の分離度、ピーク形状および分析時間により、0.1vol%ギ酸/0.1vol%ギ酸アセトニトリル (50/50, v/v) が最適であった。セサモールの保持時間は 3.2 分、セサミンの保持時間は 13.7 分、エピセサミンの保持時間は 16.8 分およびセサモリンの保持時間は 18.0 分であった。

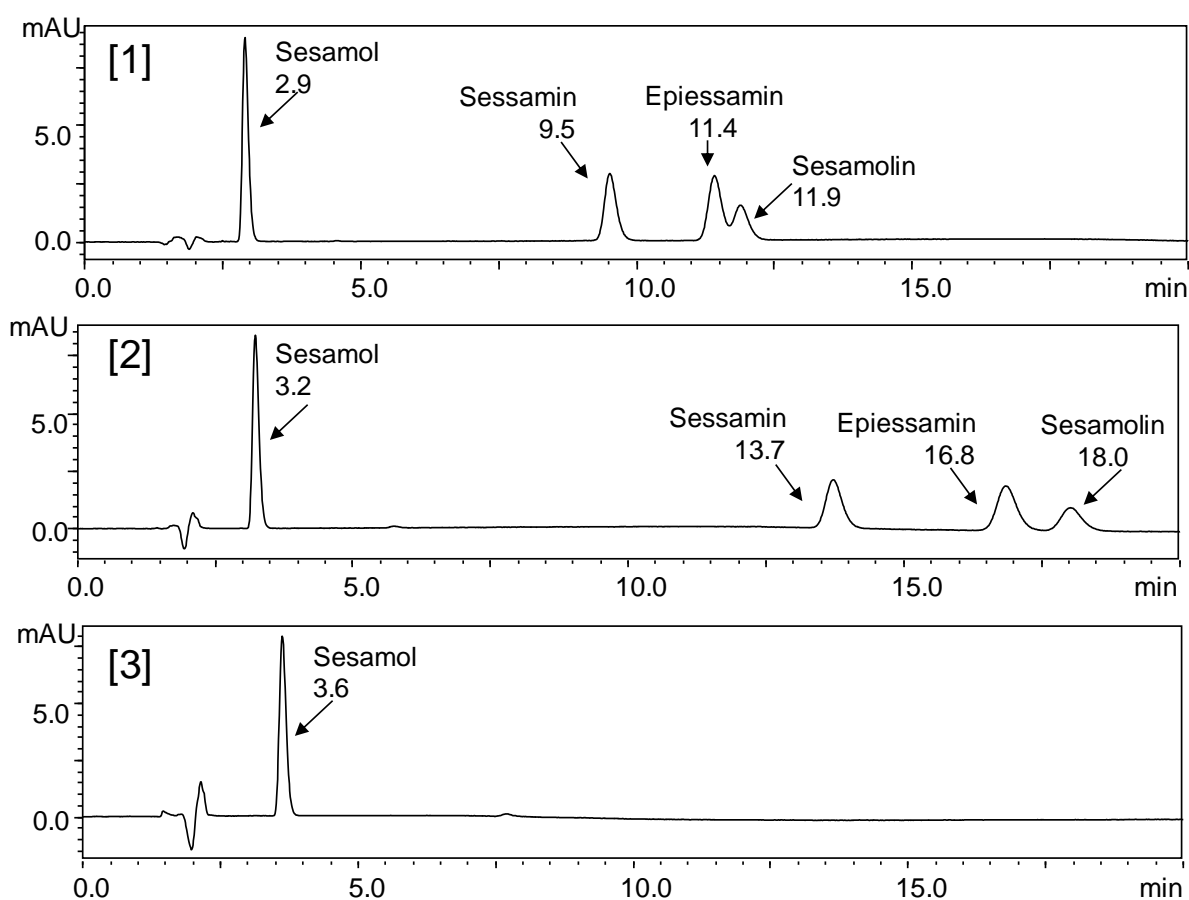


Fig. 21 HPLC chromatograms of sesame lignans standard using TSKgel-ODS-100V column (A : 0.1vol% FA in water、B : 0.1vol% FA in methanol) .  
[1] A/B : 45/55 (v/v) , [2] A/B : 50/50 (v/v) , [3] A/B : 55/45 (v/v)

### 2-3-2 SR のデザイン

SR-HPLC 法の課題は、分析対象物質の最適な SR を選択することが困難であることである。最適な SR の条件は、分析対象物質に類似した吸収極大波長を持つこと、物理的に安定であること、分析対象物質と十分な LC 分離が可能であること、高純度および安価であることである。前章では、キサントモナシン類に対して CBZ を SR として採用した。CBZ は、吸収波長と保持時間がキサントモナシン類と近く、十分に分離可能であった。しかしながら、CBZ の吸収極大波長 364 nm は、キサントモナシン類の吸収極大波長 463 nm と差異を生じており、理想的な SR ではなかったと考えられる。そこで、本章では、RMS を用いた HPLC 定量法による様々なゴマ製品中のセサモール、セサミン、エピセサミンおよびセサモリンの一斉分析を目的とした SR 合成デザインを検討した。これらゴマリグナン類は 1,3-ベンゾオキソールを共通骨格として持つ。ゆえに、1,3-ベンゾオキソールの構造に基づいて、安価かつシンプルな構造であるセサモールをアルキル化により誘導体化した。その結果、セサモールのメチル、ブチル、ヘキシル誘導体を容易に合成することができ、いずれも吸収極大波長が分析対象物質と同じ値を示した (Fig. 22)。デザインした SR の NMR スペクトルを Table 5 に示した。さらに、それら SR に加えて、ピペロナール (流通品) も同じ 1,3-ベンゾオキソール構造を持つ物質であった。ゆえに、4 つの SR 化合物の吸収スペクトルを Fig. 22 に示した。ゴマリグナン類の吸収極大波長は 285-295 nm の範囲に存在しており、SR の吸収極大波長はそれらとほぼ一致した。以上より、これら SR は、RMS を用いたゴマリグナン類の HPLC 定量法において適応可能であると考えた。

Table 5 NMR spectra of the synthetic SR standards.

Methyl derivate of sesamol	$\delta$ 3.7 (s, 3H), 5.9 (s, 2H), 6.3 (d, 1H), 6.5 (s, 1H), 6.7 (d, 1H)
Butyl derivate of sesamol	$\delta$ 0.9 (t, 3H), 1.4 (quin, 2H), 1.7 (quin, 2H), 3.9 (t, 2H), 5.9 (s, 2H), 6.3 (d, 1H), 6.5 (s, 1H), 6.7 (d, 1H)
Hexyl derivate of sesamol	$\delta$ 0.9 (t, 3H), 1.3-1.7 (m, 12H), 3.9 (t, 2H), 5.9 (s, 2H), 6.3 (d, 1H), 6.5 (s, 1H), 6.7 (d, 1H)



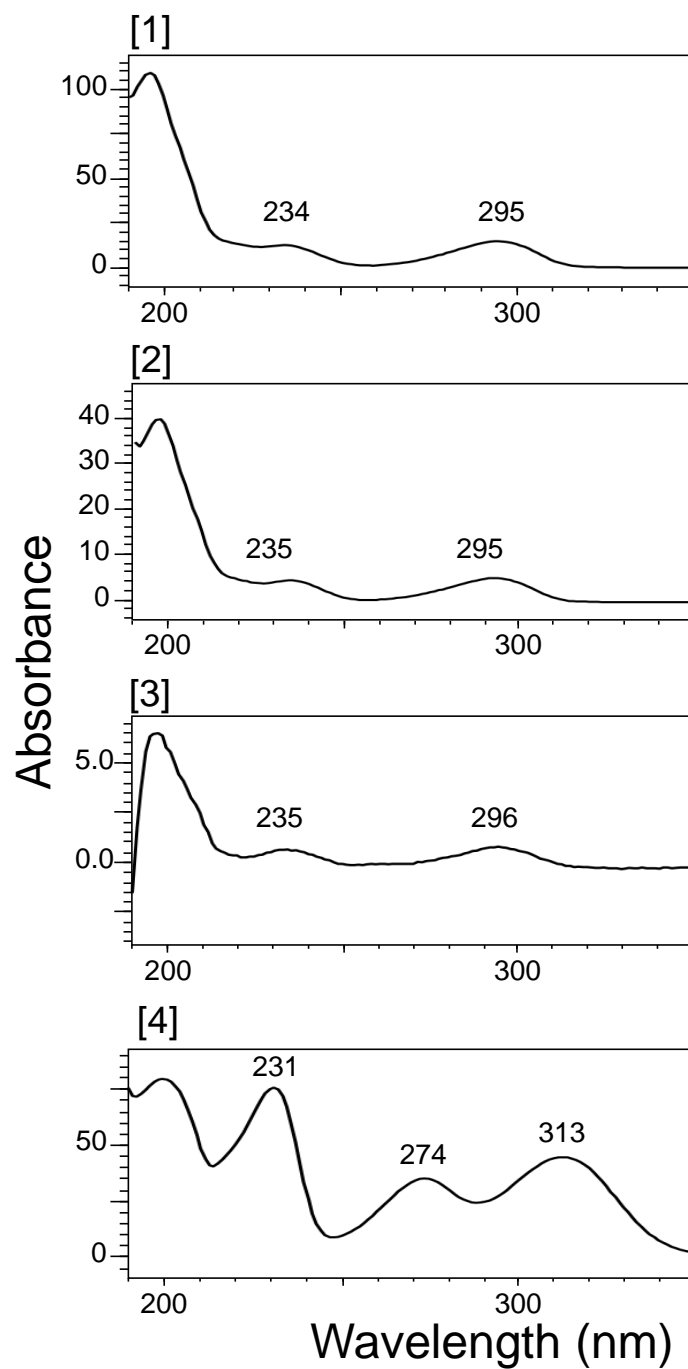


Fig. 22 PDA spectra of SR standards (180-400 nm) .  
 [1] Methyl derivate of sesamol, [2] Butyl derivate of sesamol,  
 [3] Hexyl derivate of sesamol, [4] Piperonal

### 2-3-3 qNMRによるゴマリグナン類の絶対量の評価

本研究では、qNMR用標準物質として、1,4-BTMSB- $d_4$ を用いた。1,4-BTMSB- $d_4$ の純度(99.8%)に基づいて、ゴマリグナン類とSRをqNMRにより定量した。各ゴマリグナン類およびSRのqNMRスペクトルをFig. 23-24に示した。その結果、セサモールは $98.5\% \pm 0.2$  (n=3)、セサミンは $99.4\% \pm 0.2$ 、エピセサミンは $99.2\% \pm 0.5$ 、セサモリンは $98.5\% \pm 0.2$ であった。セサモールのメチル誘導体は $97.3\% \pm 0.3$ 、ブチル誘導体は $98.1\% \pm 0.2$ 、ヘキシル誘導体は $97.7\% \pm 0.4$ 、ピペロナールは $98.6\% \pm 0.1$ であった (Table 6)。

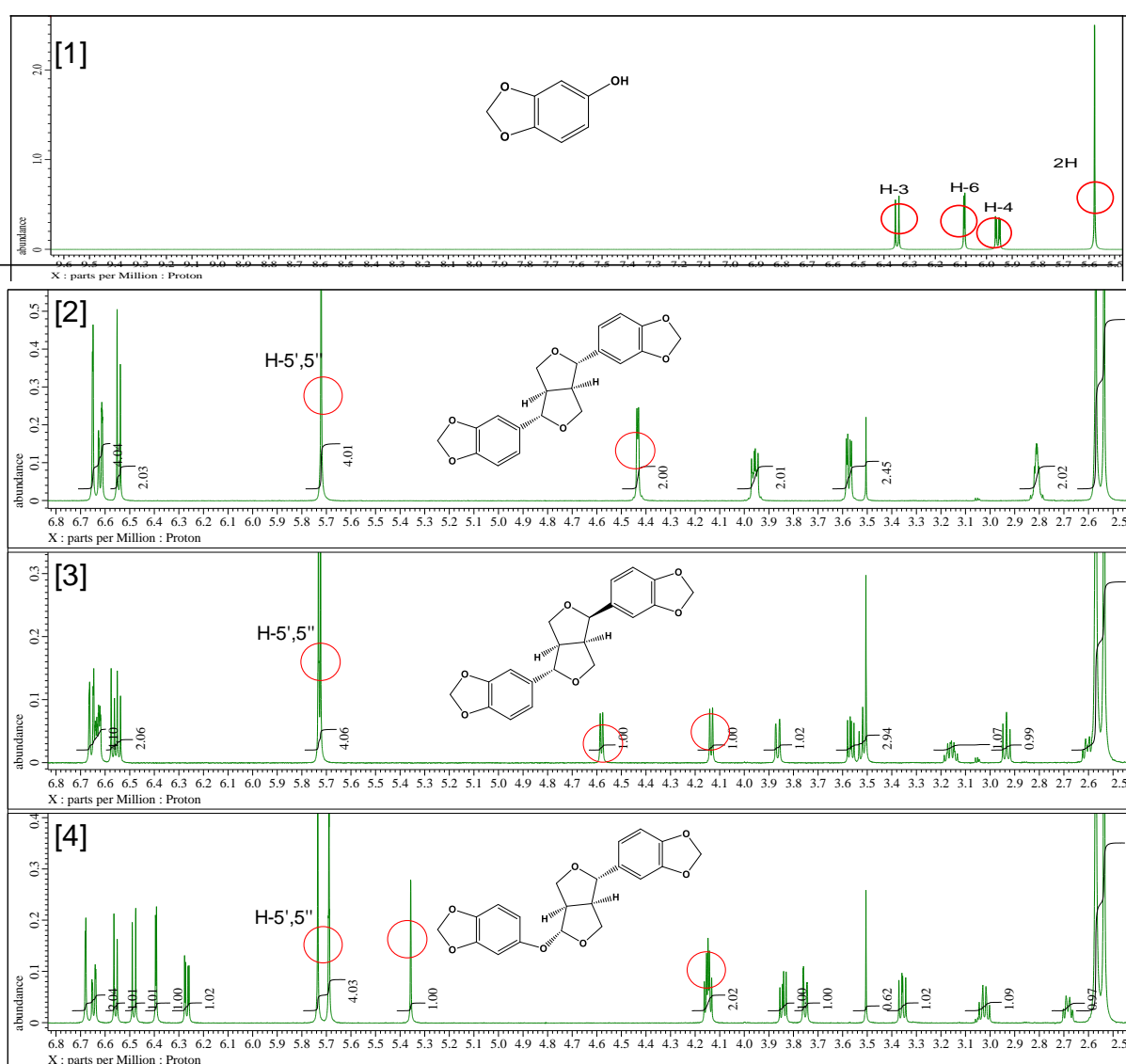


Fig. 23 qNMR spectra of sesame lignans.

[1] Sesamol, [2] Sesamin, [3] Episesamin, [4] Sesamolin

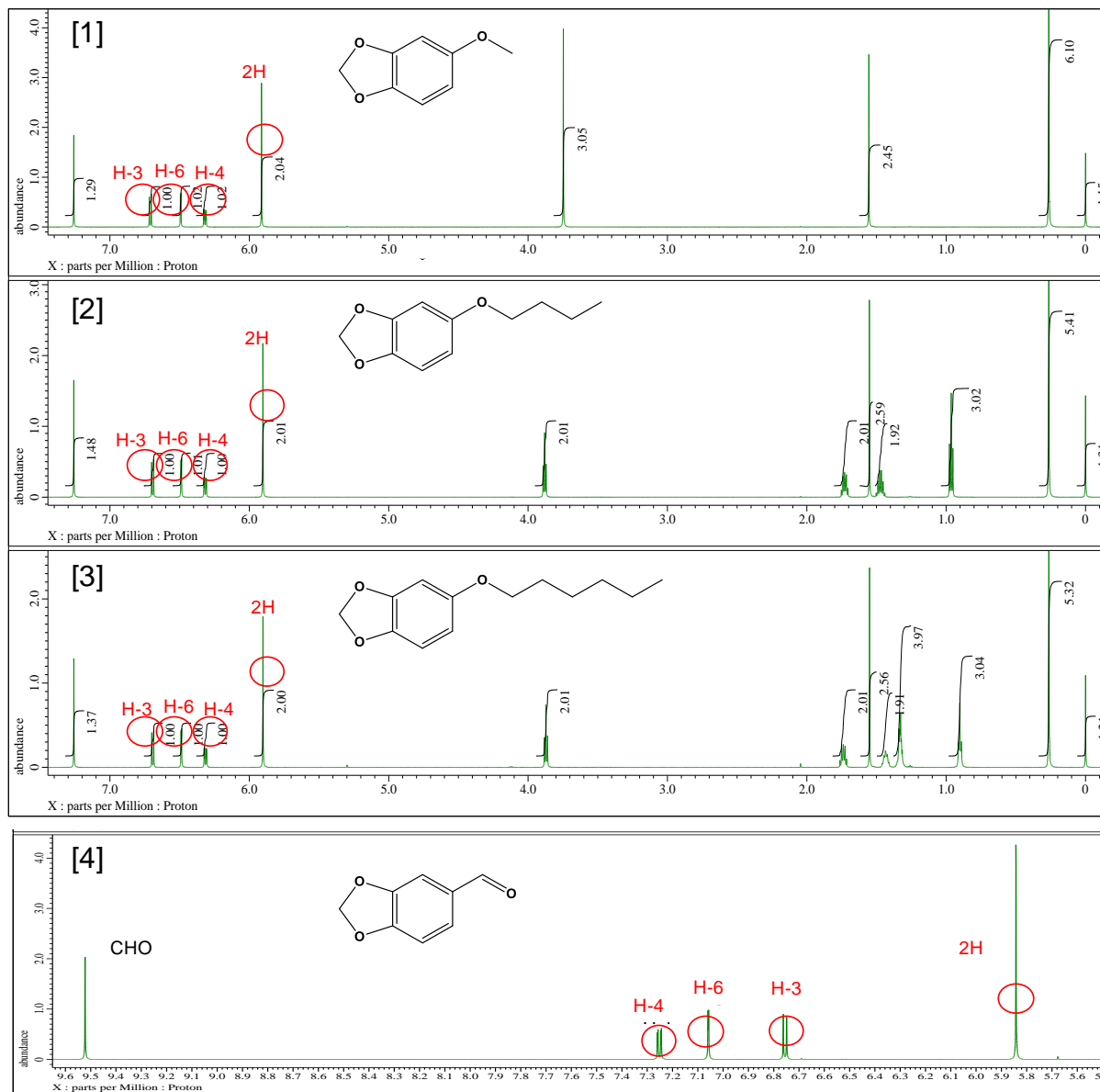


Fig. 24 qNMR spectra of SR.

[1] Methyl derivate of sesamol, [2] Butyl derivate of sesamol,

[3] Hexyl derivate of sesamol, [4] Piperonal

Table 6 Purity evaluation by qNMR.

		Content%
Single reference	Piperonal	98.6 ± 0.1
	Methyl derivative of sesamol	97.3 ± 0.3
	Buthyl derivative of sesamol	98.1 ± 0.2
	Hexyl derivative of sesamol	97.7 ± 0.4
Sesame lignans	Sesamol	98.5 ± 0.2
	Sesamin	99.4 ± 0.2
	Epiesamin	99.2 ± 0.5
	Sesamolin	98.5 ± 0.2

n=3

#### 2-3-4 RMS を用いたゴマ関連製品中のゴマリグナン類の定量分析

##### 【絶対検量線によるゴマリグナン類および SR の RMS 算出】

最適化した分析条件を用いて、ゴマリグナン類と SR を HPLC 分析した。そのときの、ゴマリグナン類の混合標準品および SR の HPLC クロマトグラムを Fig. 25 に示した。その結果、これらの HPLC 条件において、分析対象物質のゴマリグナン類と SR の全て完全分離することができた。しかしながら、セサモールのヘキシル誘導体は、保持時間が長く（90.2 分）、分析時間（30 分間）に適さなかったため、ヘキシル誘導体を SR として除外することとした。

次いで、ゴマリグナン類と SR の NMR 管の試料溶液を用いて、HPLC 用標準溶液を調製し、絶対検量線を作成した。その結果、セサモールの絶対検量線の傾きは  $y = 1729.9 x$  ( $r^2 = 0.999$ )、セサミンの絶対検量線の傾きは  $y = 3660.3 x$  ( $r^2 = 0.999$ )、エピセサミンの絶対検量線の傾きは  $y = 3618.8 x$  ( $r^2 = 0.999$ ) およびセサモリンの絶対検量線の傾きは  $y = 3673.1 x$  ( $r^2 = 0.999$ ) であった (Fig. 26)。セサモールのメチル誘導体の絶対検量線の傾きは  $y = 1883.1 x$  ( $r^2 = 0.999$ )、ブチル誘導体の絶対検量線の傾きは  $y = 2380.6 x$  ( $r^2 = 0.999$ ) およびピペロナルの絶対検量線の傾きは  $y = 2380.6 x$  ( $r^2 = 0.999$ ) であった (Fig. 27)。SR に対する各ゴマリグナン類の絶対検量線の傾き比を算出することにより、RMS を求めた (Table 7)。そして、RMS の平均値を用いて、ゴマリグナン類の SR-HPLC 定量法を実行することとした。

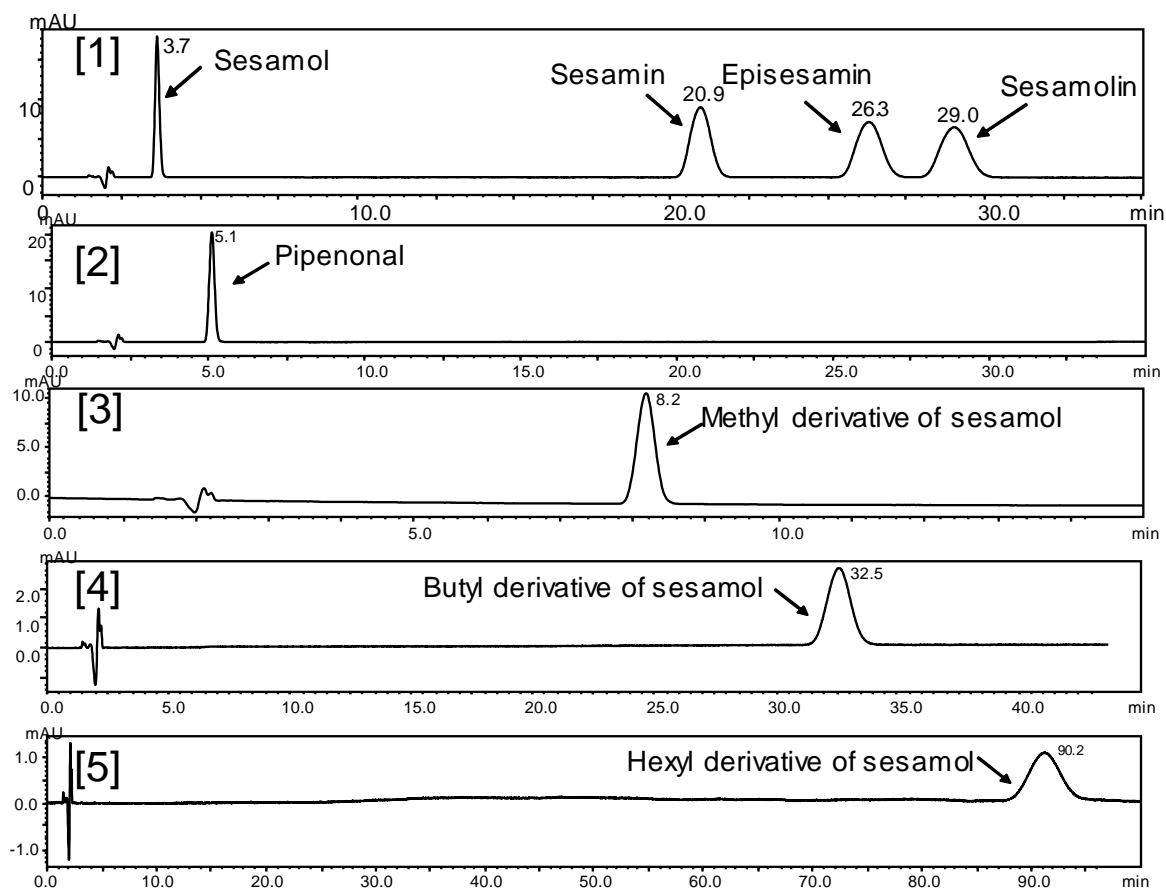


Fig. 25 HPLC chromatograms of the targeted analytes and SR standards solutions.

[1] Mixed analytes solution of sesame lignans.

[2] Piperonal

[3] Methyl derivate of sesamol

[4] Butyl derivate of sesamol

[5] Hexyl derivate of sesamol

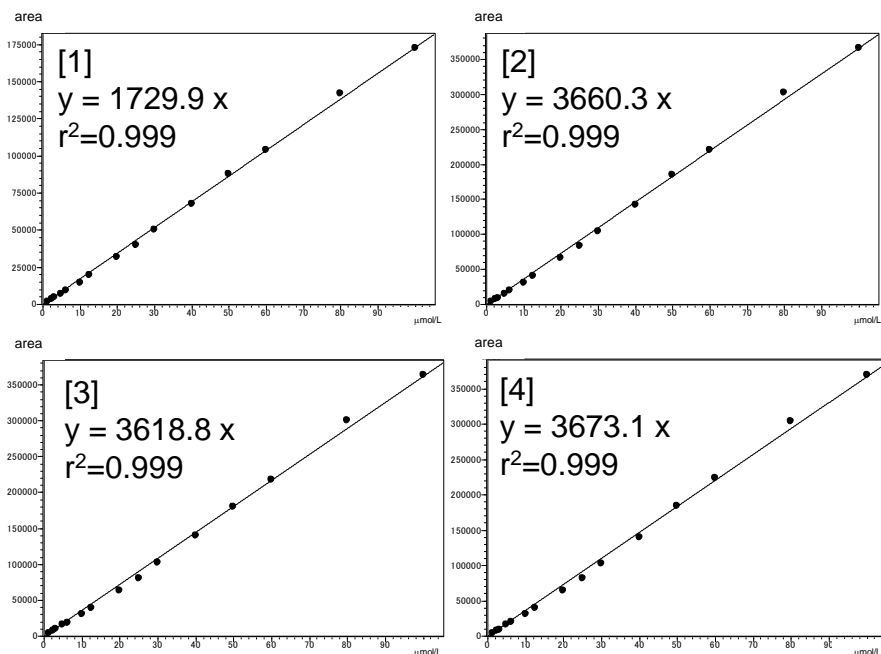


Fig. 26 Calibration curves of sesame lignans using the HPLC method.  
[1] Sesamol, [2] Sesamin, [3] Episesamin, [4] Sesamolin

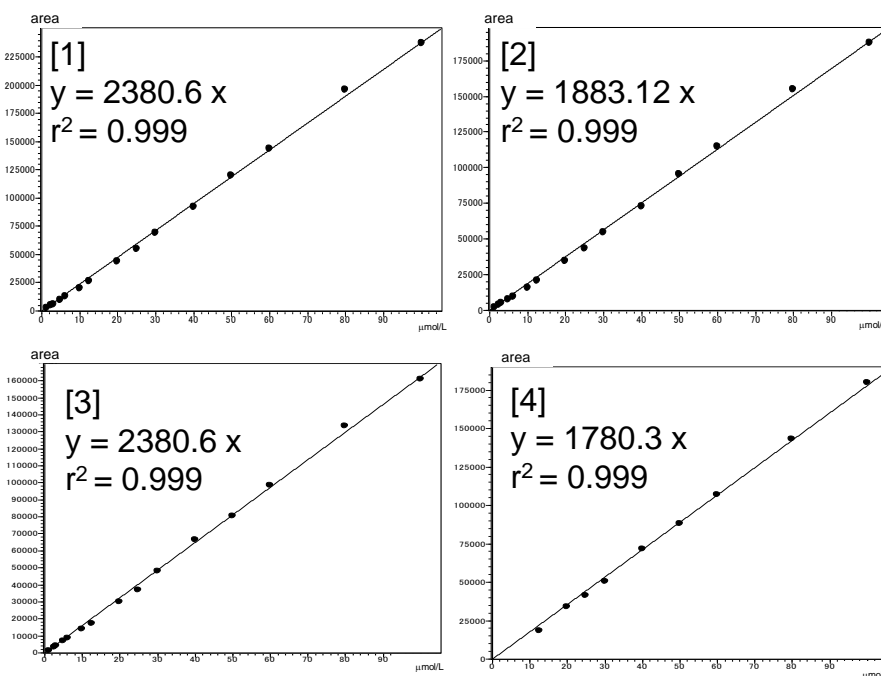


Fig. 27 Calibration curves of single reference using the HPLC method.  
[1] Piperonal, [2] Methyl derivate of sesamol,  
[3] Butyl derivate of sesamol, [4] Hexyl derivate of sesamol

Table 7 RMS values of sesame lignans.

SR	Sesame lignans	RMS			Average±SD
		0-12.5 mmol/L	20-100 mmol/L	0-100 mmol/L	
Piperonal	Sesamol	0.74	0.73	0.73	0.73±0.01
	Sesamin	1.55	1.54	1.54	1.54±0.01
	Episesamin	1.54	1.52	1.52	1.53±0.01
	Sesamolin	1.56	1.54	1.54	1.55±0.01
Methyl derivative of sesamol	Sesamol	0.94	0.92	0.92	0.93±0.01
	Sesamin	1.97	1.94	1.94	1.95±0.02
	Episesamin	1.97	1.92	1.92	1.94±0.03
	Sesamolin	1.99	1.95	1.95	1.96±0.02
Butyl derivative of sesamol	Sesamol	1.06	1.07	1.07	1.07±0.01
	Sesamin	2.23	2.25	2.25	2.25±0.01
	Episesamin	2.23	2.23	2.23	2.23±0.00
	Sesamolin	2.25	2.26	2.26	2.26±0.01
Hexyl derivative of sesamol	Sesamol	N.D.	0.47	N.D.	N.D.
	Sesamin	N.D.	1.00	N.D.	N.D.
	Episesamin	N.D.	0.99	N.D.	N.D.
	Sesamolin	N.D.	1.00	N.D.	N.D.

### 【RMS を用いたゴマリグナン類の SR-HPLC 定量法】

RMS を用いた SR-HPLC 法の信頼性と再現性を評価するために、ゴマ油、ゴマ健康食品およびゴマ油不けん化物に含まれるゴマリグナン類を定量分析した (Table 8)。その結果、セサミン、エピセサミンおよびセサモリンに関して絶対検量線法と同等の定量値を示したが、セサモールはゴマ製品から検出されなかった。そこで、ゴマ油を 100°C で 10 時間加熱し SR-HPLC でセサモールを定量した結果、2.5±0.1 mmol/L (標準絶対法)、2.4±0.1 mmol/L (SR: セサモールのメチル誘導体)、2.5±0.1 mmol/L (SR: セサモールのブチル誘導体)、2.4±0.1 mmol/L (SR: ピペロナル) であり、これも絶対検量線による定量値とほぼ同等であった (Table 9)。ゆえに、セサモールのメチル誘導体、セサモールのブチル誘導体、またはピペロナルを SR として使用することにより、ゴマ製品中のセサモール、セサミン、エピセサミン、およびセサモリンの検量線を作成せずに、1 つの HPLC クロマトグラムにて定量することができた。さらに、その定量値は十分に再現性および高精度であることも確認できた。

次に、様々な HPLC 条件の検証と有用性を確認するために、Table 2 で示した 5 種類のカラム（東ソー社製 TSK-GEL ODS-100 V、Waters 社製 Xbridge C18、GL Science 社製 Inertsil ODS-2、YMC 社製 YMC-Pack Pro C18 RS、Phenomex 社製 KINETEX）と移動相を用いて、ゴマ製品中のゴマリグナン類を定量分析した（Table 9）。それぞれの分析カラムにおける SR-HPLC 法に基づく HPLC クロマトグラムを Fig. 28-33 に示した。SR（25、50 または 100  $\mu\text{mol/L}$ ）を用いた場合の定量結果とその再現性を検討した。その結果、ゴマ油中のセサミンおよびセサモリンの平均濃度および再現性は 17.2 mmol/L および 6.3mmol/L（RSD：4.5% および 4.9%）、ゴマ健康食品中のセサミンおよびエピセサミンの平均濃度および再現性は 23.1 mmol/L および 22.7 mmol/L（RSD：4.1% および 4.2%）、ゴマ油不けん化物中のセサミンおよびセサモリン平均濃度および再現性は 42.9 mmol/L および 17.8 mmol/L（RSD：3.9% および 3.9%）であった（Table 10）。また、加熱したゴマ油中のセサモールの平均濃度と再現性は 22.8 mmol/L（RSD：6.0%）であった（Table 10）。

Table 8 Concentrations of sesame lignans in sesame oil, sesame health food and SSOUM based on the HPLC method using RMS and standard absolute calibration method.

		Absolute calibration method mmol/L $\pm$ SD	RMS method		
			Piperonal mmol/L $\pm$ SD	Methyl derivative mmol/L $\pm$ SD	Butyl derivative mmol/L $\pm$ SD
Sesam oil	Sesamin	15.7 $\pm$ 0.12	15.9 $\pm$ 0.21	16.9 $\pm$ 0.28	14.7 $\pm$ 0.16
	Sesamolin	5.7 $\pm$ 0.14	5.9 $\pm$ 0.15	6.3 $\pm$ 0.18	5.5 $\pm$ 0.16
Sesame health food	Sesamin	21.4 $\pm$ 0.03	21.9 $\pm$ 0.31	22.5 $\pm$ 0.42	21.1 $\pm$ 0.23
	Episesamin	21.0 $\pm$ 0.07	21.8 $\pm$ 0.32	22.3 $\pm$ 0.45	20.9 $\pm$ 0.26
SSOUM	Sesamin	42.7 $\pm$ 1.05	42.2 $\pm$ 0.55	44.1 $\pm$ 0.77	44.9 $\pm$ 0.88
	Sesamolin	17.6 $\pm$ 0.15	17.7 $\pm$ 0.29	18.5 $\pm$ 0.25	18.9 $\pm$ 0.22

n=3



Table 9 Concentrations of sesamol in heated sesame oil based on the HPLC method using RMS and standard absolute calibration method.

	Absolute calibration method mmol/L $\pm$ SD	RMS method		
		Piperonal mmol/L $\pm$ SD	Methyl derivative mmol/L $\pm$ SD	Butyl derivative mmol/L $\pm$ SD
Sesamol	2.5 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1

n=3

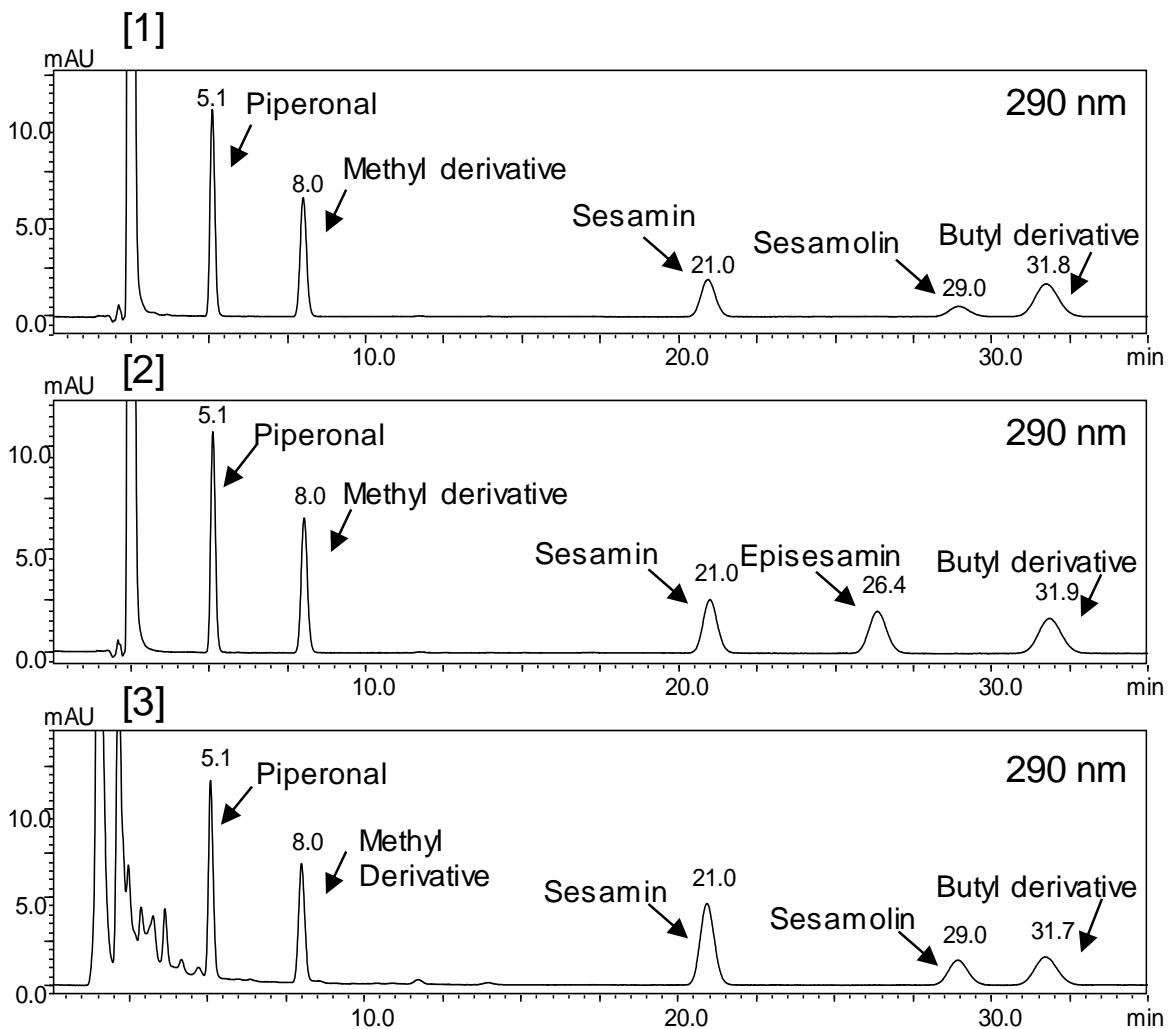


Fig. 28 HPLC Chromatograms of sesame lignans and SR standards in sesame sample based on the HPLC method with RMS by TSKgel ODS-100V.

[1] Sesame oil, [2] Sesame health food, [3] SSOUM

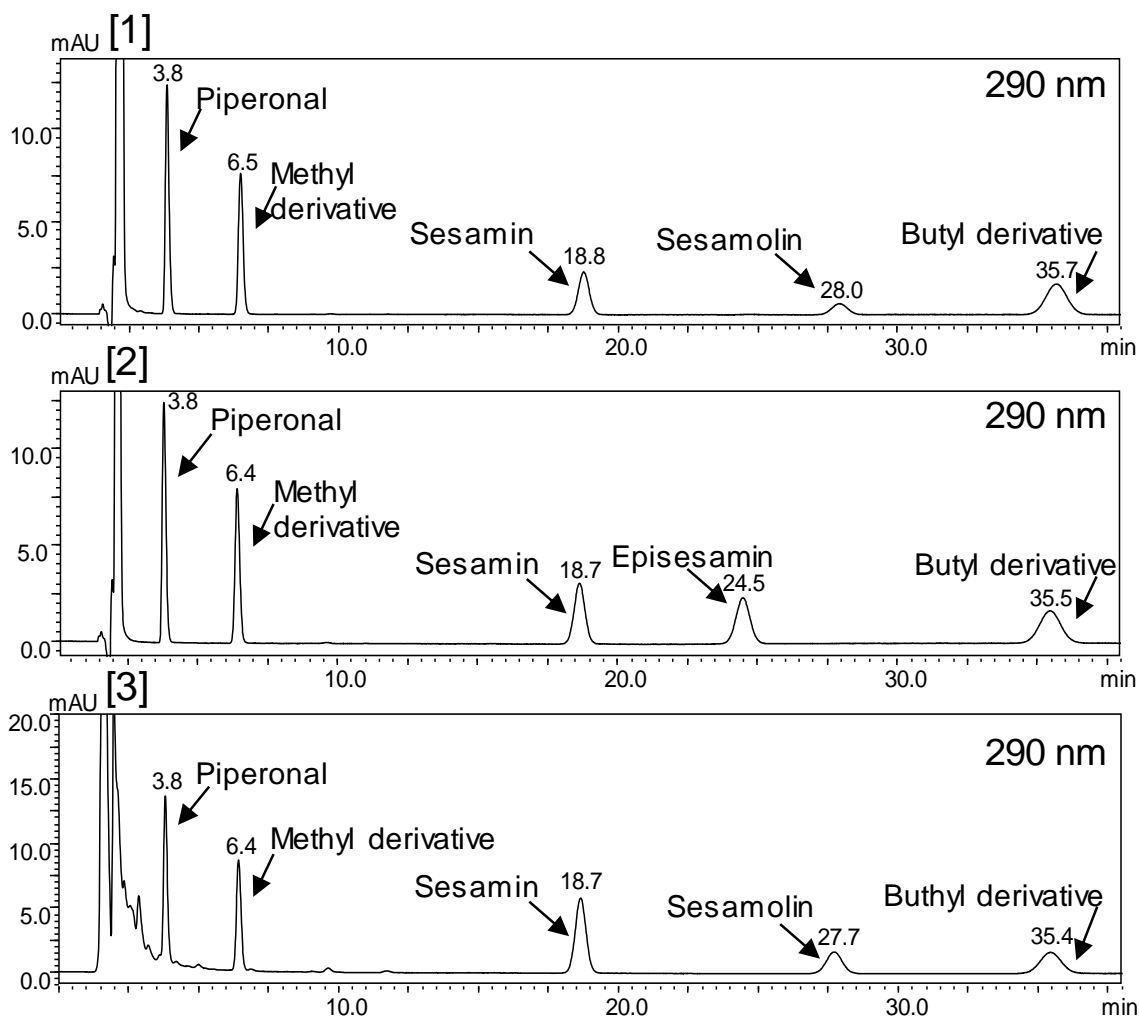


Fig. 29 HPLC Chromatograms of sesame lignans and SR standards in sesame sample based on the HPLC method with RMS by Xbridge C18 column.

[1] Sesame oil, [2] Sesame health food, [3] SSOUM

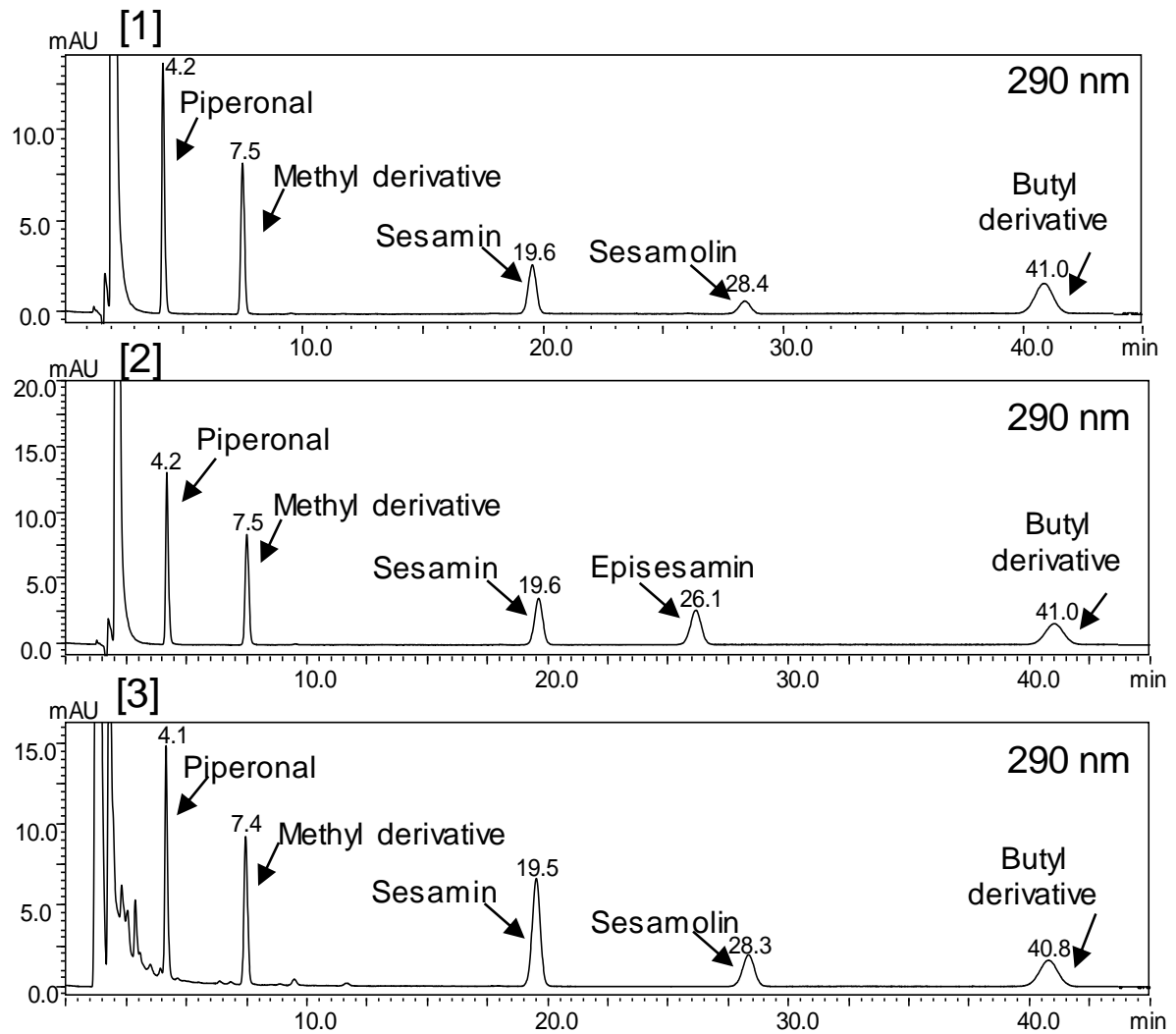


Fig. 30 HPLC Chromatograms of sesame lignans and SR standards in sesame sample based on the HPLC method with RMS by YMC-Pack Pro C18 RS column.

[1] Sesame oil, [2] Sesame health food, [3] SSOUM

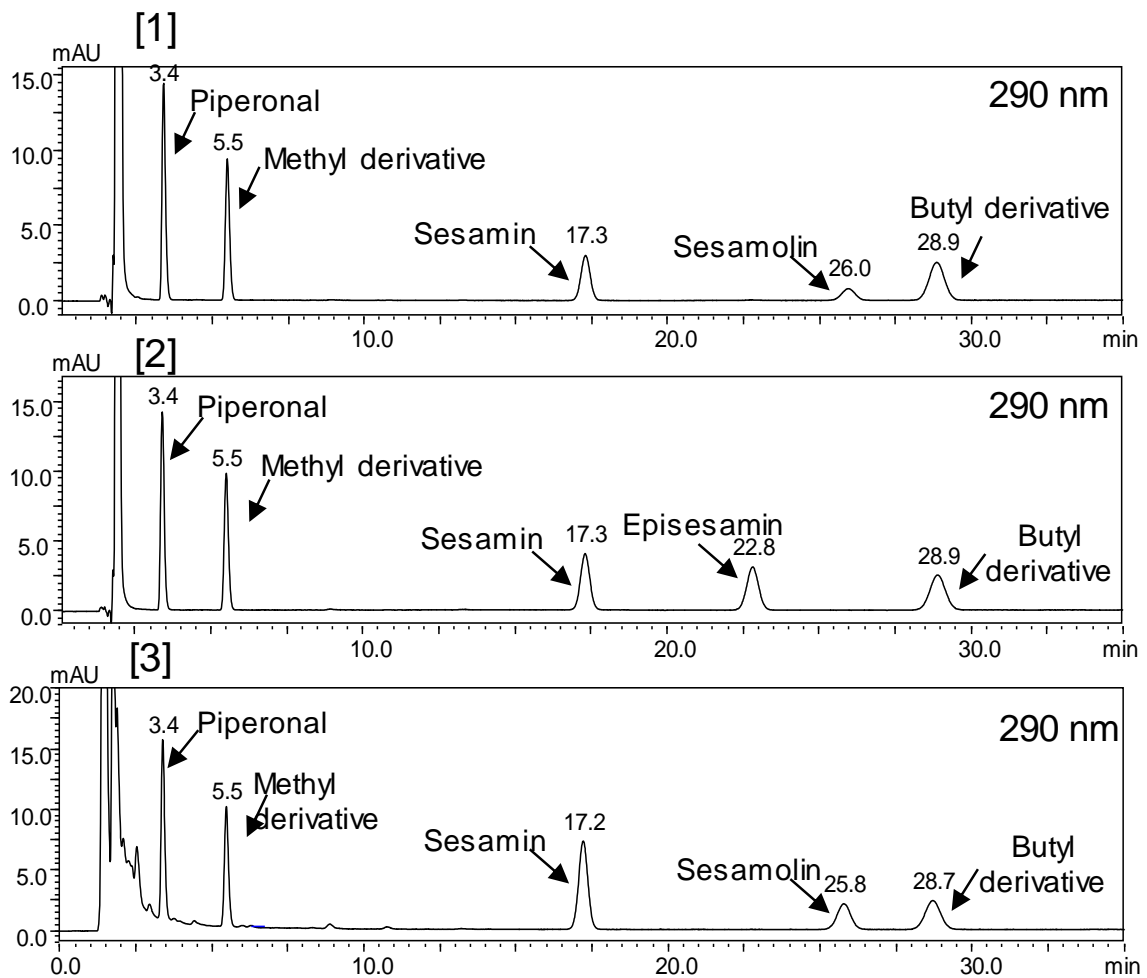


Fig. 31 HPLC Chromatograms of sesame lignans and SR standards in sesame sample based on the HPLC method with RMS by KINETEX column.

[1] Sesame oil, [2] Sesame health food, [3] SSOUM

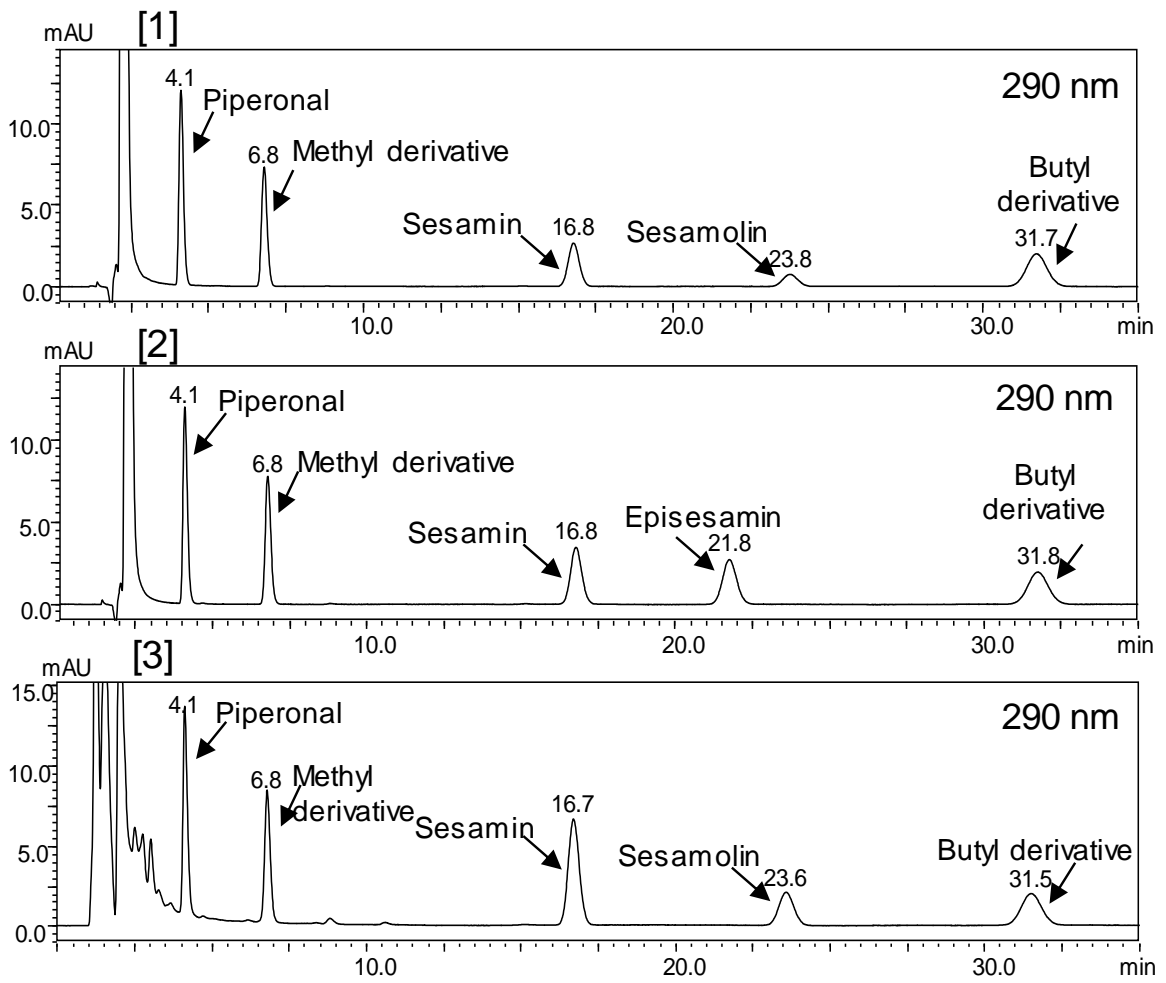


Fig. 32 HPLC Chromatograms of sesame lignans and SR standards in sesame sample based on the HPLC method with RMS by Inertsil ODS-2 column.

[1] Sesame oil, [2] Sesame health food, [3] SSOUM

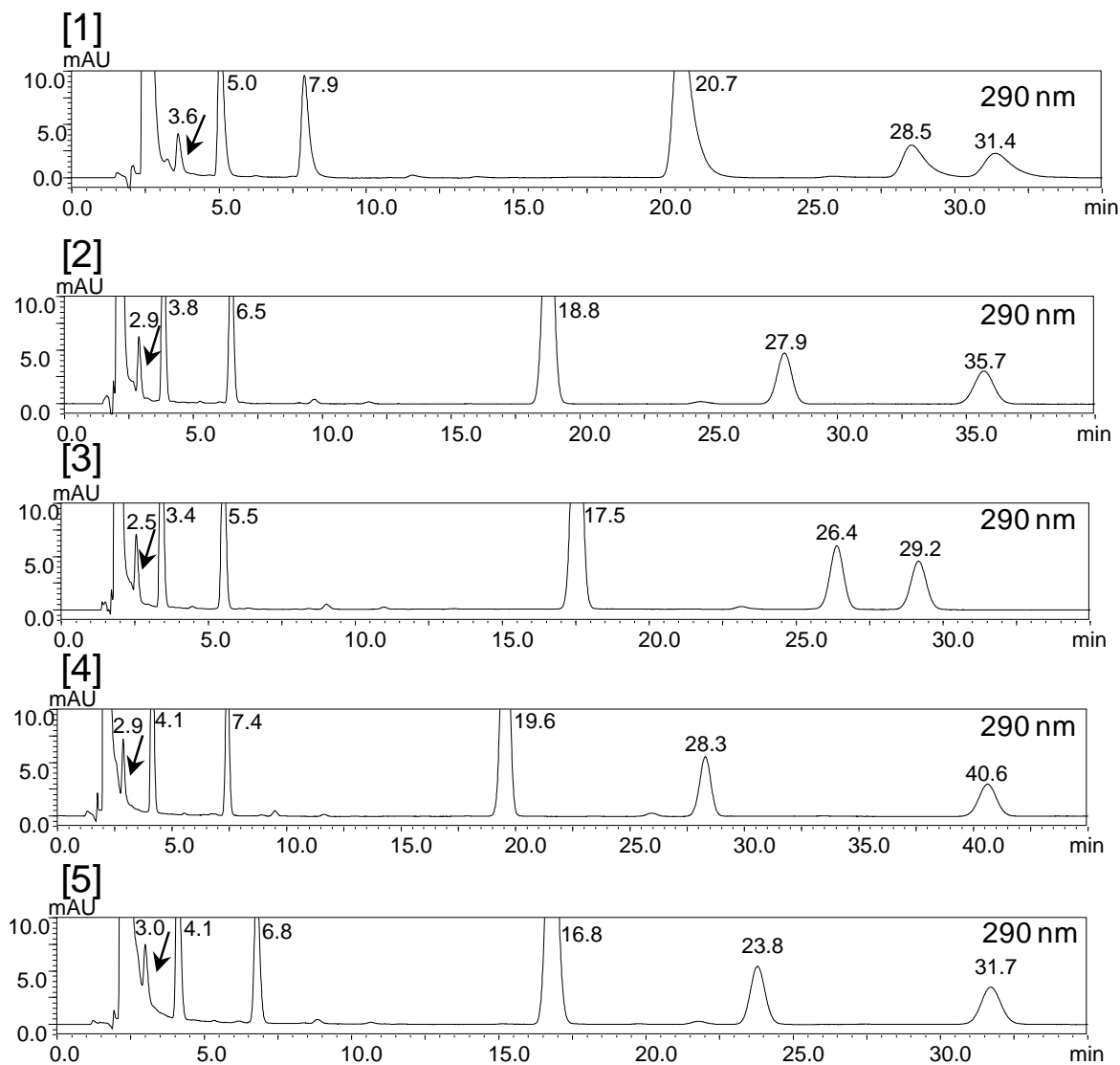


Fig. 33 HPLC chromatograms of sesamol and three SR standards in sesame oil by heating at 100°C for 10 hrs.

[1] TSKgel ODS-100V (Tosoh, Co.)

[2] XBridge C18 (Waters, Co.)

[3] YMC-Pack Pro C18 RS (YMC, Co.)

[4] KINETEX (Phenomenex, Co.)

[5] Inertsil ODS-2 (GL Science, Co.)

Table 10 Concentrations of the targeted analytes in sesame products using five different columns and mobile phase ratio.

HPLC condition	SR standards	SR standard Added levels (µmol/L)	Sesame oil		Sesame health food		SSOUM		Heated sesame oil	
			Sesamin	Sesamol	Sesamin	Episesamin	Sesamin	Sesamol	Sesamol	
			(mmol/L ± SD)	(mmol/L ± SD)	(mmol/L ± SD)	(mmol/L ± SD)	(mmol/L ± SD)	(mmol/L ± SD)	(mmol/L ± SD)	(mmol/L ± SD)
TSKgel ODS-100V [Tosoh, Co.] A/B = 55/45 (v/v)	Methyl derivative	25	17.5 ± 0.14	6.1 ± 0.82	23.5 ± 0.00	23.4 ± 0.30	46.0 ± 1.13	19.3 ± 0.21	24.5 ± 0.30	
		50	18.1 ± 0.35	6.6 ± 0.25	23.1 ± 0.29	22.8 ± 0.40	41.4 ± 0.80	17.7 ± 0.06	23.9 ± 0.55	
		100	17.4 ± 0.15	6.2 ± 0.26	22.4 ± 0.61	21.8 ± 0.59	43.2 ± 0.29	18.0 ± 0.12	24.4 ± 0.31	
	Butyl derivative	25	17.0 ± 1.00	5.9 ± 0.49	22.0 ± 0.15	21.9 ± 0.23	43.5 ± 1.13	18.2 ± 0.50	26.4 ± 0.70	
		50	15.8 ± 0.10	5.9 ± 0.15	21.7 ± 0.17	21.3 ± 0.29	41.4 ± 0.80	16.7 ± 0.17	24.9 ± 0.42	
		100	16.2 ± 0.17	5.8 ± 0.20	22.5 ± 0.21	21.9 ± 0.21	41.8 ± 0.64	17.5 ± 0.23	25.5 ± 0.65	
	Piperonal	25	17.5 ± 0.14	6.2 ± 0.84	24.4 ± 0.10	24.4 ± 0.25	42.1 ± 1.21	17.7 ± 0.29	23.4 ± 0.17	
		50	17.8 ± 0.20	6.6 ± 0.20	24.2 ± 0.23	23.7 ± 0.29	41.8 ± 0.50	17.1 ± 0.12	23.6 ± 0.31	
		100	17.0 ± 0.20	6.0 ± 0.25	22.4 ± 0.47	21.9 ± 0.47	42.4 ± 0.40	17.7 ± 0.06	24.4 ± 0.21	
	Xbridge C18 [Waters, Co.] A/B: 60/40 (v/v)	Methyl derivative	25	17.7 ± 0.33	6.6 ± 0.16	23.7 ± 0.19	23.4 ± 0.21	43.7 ± 0.49	17.9 ± 0.34	23.1 ± 0.17
			50	18.2 ± 0.31	6.6 ± 0.26	23.0 ± 0.24	22.6 ± 0.34	40.7 ± 0.43	16.9 ± 0.41	22.9 ± 0.36
			100	17.1 ± 0.16	6.3 ± 0.04	22.4 ± 0.58	22.0 ± 0.46	43.0 ± 0.14	17.5 ± 0.42	24.0 ± 0.32
Butyl derivative		25	16.2 ± 0.24	6.0 ± 0.13	22.2 ± 0.34	21.9 ± 0.26	43.7 ± 0.17	17.9 ± 0.21	23.5 ± 0.15	
		50	16.0 ± 0.11	5.8 ± 0.18	21.3 ± 0.22	21.0 ± 0.31	41.4 ± 0.51	17.3 ± 0.48	22.6 ± 0.26	
		100	16.0 ± 0.04	5.9 ± 0.03	22.2 ± 0.13	21.8 ± 0.25	41.3 ± 0.13	16.8 ± 0.40	23.3 ± 0.26	
Piperonal		25	17.6 ± 0.24	6.5 ± 0.15	24.4 ± 0.26	24.1 ± 0.33	47.5 ± 0.23	19.5 ± 0.26	23.7 ± 0.21	
		50	17.8 ± 0.17	6.4 ± 0.22	23.7 ± 0.20	23.3 ± 0.30	44.9 ± 0.51	18.7 ± 0.50	23.3 ± 0.32	
		100	16.7 ± 0.10	6.1 ± 0.03	22.3 ± 0.49	21.9 ± 0.37	44.1 ± 0.23	18.0 ± 0.50	23.8 ± 0.32	
YMC-Pack Pro C18 RS [YMC, Co.] A/B = 55/45 (v/v)		Methyl derivative	25	17.8 ± 0.05	6.7 ± 0.08	24.3 ± 0.64	23.9 ± 0.76	44.7 ± 0.31	18.3 ± 0.17	22.2 ± 0.12
			50	18.3 ± 0.11	6.8 ± 0.05	23.7 ± 0.06	23.4 ± 0.18	41.0 ± 0.82	16.9 ± 0.42	22.1 ± 0.12
			100	17.5 ± 0.14	6.3 ± 0.48	22.8 ± 0.52	22.3 ± 0.55	42.7 ± 0.78	17.8 ± 0.69	23.8 ± 0.10
	Butyl derivative	25	16.0 ± 0.34	6.1 ± 0.19	22.6 ± 0.26	22.2 ± 0.29	44.4 ± 0.19	18.2 ± 0.02	22.9 ± 0.59	
		50	16.0 ± 0.03	6.0 ± 0.03	22.0 ± 0.11	21.8 ± 0.22	41.4 ± 0.18	17.1 ± 0.22	22.2 ± 0.44	
		100	16.3 ± 0.10	5.9 ± 0.37	22.5 ± 0.13	22.0 ± 0.22	41.5 ± 0.74	17.3 ± 0.64	23.5 ± 0.36	
	Piperonal	25	17.9 ± 0.04	6.8 ± 0.07	25.2 ± 0.42	24.8 ± 0.52	46.5 ± 1.07	19.1 ± 0.48	22.7 ± 0.10	
		50	18.0 ± 0.13	6.7 ± 0.01	24.6 ± 0.07	24.4 ± 0.19	44.0 ± 0.99	18.6 ± 0.56	22.5 ± 0.06	
		100	17.2 ± 0.11	6.2 ± 0.46	22.8 ± 0.48	22.3 ± 0.50	43.4 ± 0.67	18.1 ± 0.65	23.7 ± 0.12	
	KINETEX [Phenomenex, Co.] A/B = 55/45 (v/v)	Methyl derivative	25	17.7 ± 0.10	6.4 ± 0.02	23.9 ± 0.24	23.4 ± 0.37	45.6 ± 0.12	19.0 ± 0.19	21.5 ± 0.17
			50	18.2 ± 0.11	6.7 ± 0.08	23.5 ± 0.16	22.9 ± 0.19	41.5 ± 0.65	17.2 ± 0.28	22.3 ± 0.10
			100	17.3 ± 0.21	6.3 ± 0.06	22.8 ± 0.23	22.4 ± 0.31	44.0 ± 0.43	18.2 ± 0.24	23.3 ± 0.42
Butyl derivative		25	16.4 ± 0.18	5.9 ± 0.03	22.9 ± 0.17	21.7 ± 0.06	44.6 ± 0.07	18.6 ± 0.21	22.3 ± 0.35	
		50	16.0 ± 0.11	5.9 ± 0.09	21.7 ± 0.17	21.3 ± 0.17	41.2 ± 0.28	17.1 ± 0.18	22.0 ± 0.12	
		100	16.2 ± 0.16	5.9 ± 0.01	22.7 ± 0.18	22.3 ± 0.05	41.5 ± 0.07	17.2 ± 0.07	22.8 ± 0.26	
Piperonal		25	17.7 ± 0.04	6.4 ± 0.05	24.6 ± 0.24	24.1 ± 0.45	41.3 ± 0.46	17.2 ± 0.22	22.0 ± 0.21	
		50	17.8 ± 0.10	6.6 ± 0.08	24.2 ± 0.11	23.7 ± 0.16	41.8 ± 0.48	17.4 ± 0.23	22.5 ± 0.10	
		100	16.9 ± 0.19	6.1 ± 0.05	22.7 ± 0.13	23.3 ± 0.21	42.7 ± 0.38	17.7 ± 0.21	23.1 ± 0.40	
Inertsil ODS-2 [GL Science, Co.] A/B = 60/40 (v/v)		Methyl derivative	25	17.8 ± 0.12	6.6 ± 0.21	23.4 ± 0.15	22.9 ± 0.12	44.6 ± 0.70	18.5 ± 0.28	20.1 ± 0.31
			50	18.5 ± 0.12	6.7 ± 0.12	23.2 ± 0.45	22.9 ± 0.42	41.2 ± 0.17	17.2 ± 0.02	20.5 ± 0.46
			100	17.4 ± 0.12	6.3 ± 0.26	22.1 ± 0.48	21.7 ± 0.45	43.2 ± 0.64	18.0 ± 0.20	21.6 ± 0.49
	Butyl derivative	25	16.3 ± 0.21	6.1 ± 0.17	22.4 ± 0.41	22.0 ± 0.56	44.6 ± 0.24	18.6 ± 0.14	20.6 ± 0.06	
		50	16.3 ± 0.21	5.9 ± 0.20	22.2 ± 0.40	21.8 ± 0.28	40.6 ± 0.15	17.0 ± 0.12	20.8 ± 0.40	
		100	16.5 ± 0.06	6.0 ± 0.21	22.4 ± 0.15	22.2 ± 0.16	41.4 ± 0.25	17.3 ± 0.11	21.2 ± 0.35	
	Piperonal	25	17.7 ± 0.12	6.6 ± 0.20	24.4 ± 0.10	23.9 ± 0.12	41.2 ± 0.39	17.2 ± 0.22	20.3 ± 0.32	
		50	18.2 ± 0.06	6.6 ± 0.10	24.2 ± 0.38	23.8 ± 0.35	42.2 ± 0.46	17.7 ± 0.19	20.6 ± 0.23	
		100	17.1 ± 0.12	6.2 ± 0.26	22.2 ± 0.37	22.0 ± 0.35	42.2 ± 0.32	17.6 ± 0.08	21.4 ± 0.25	

## 第4節 小括

本章では、ゴマ製品中のセサモール、セサミン、エピセサミンおよびセサモリンの同時に定量のために、SR のデザイン、 $^1\text{H}$ -qNMR による絶対評価および RMS 算出に基づく SR-HPLC 法を達成した<sup>58)</sup>。つまり、この定量法は、RMS を用いることにより、分析対象物質の検量線を作成せずに、1つの HPLC クロマトグラムを用いて定量することができる。さらに、その定量値はセサモールのメチル誘導体、ブチル誘導体およびピペロナールのいずれも SR として使用しても十分な精度であった。さらに、SR-HPLC 定量法は、様々な HPLC 条件下においても、定量値の再現性が良好であったため、既存添加物の安全性や品質評価に利用できると考えられる。



## 第3章 チャ抽出物の成分規格の検討

### 第1節 序

チャ抽出物 (Tea Extract) は、アジア諸国で使用されている天然の酸化防止剤であり、水産加工品、食肉加工品や飲料など幅広く食品に用いられている。チャ抽出物の主成分はカテキン類であり、カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレートなどが存在している (Fig. 34)。これらカテキン類は、機能性食品成分として世界的に注目されている成分である。例えば、茶由来のカテキン類の摂取により、神経変性疾患、前立腺癌、ミトコンドリア疾患、各種循環器疾患などの治療に有効であることが報告されている<sup>59-63)</sup>。さらに、最近の研究では、カテキン類が体内において炎症性カスケード、酸化損傷、細胞転写や形質導入などのシステムに作用すると言われている<sup>64)</sup>。このように、カテキン類は生体内で様々な生理活性を持つため、カテキン類の簡便かつ信頼性のある一斉分析法が重要視されている。

これまでに報告されているカテキン類の分析法は、LC、GC、TLC、バイオセンシング、化学発光または NMR などである<sup>65)</sup>。特に、紫外可視分光 (Ultraviolet Detector, UV) 検出器を用いた逆相 LC 法は簡便で使いやすいという理由から、多数の研究報告がある。1976年に Goto らは、LC-UV 法を用いることにより 8 種類のカテキン類の分離を成功している<sup>66)</sup>。さらに、1998年に 6 種類のカテキン類とカフェインの分離を目的としたカラム選択と移動相組成の検討結果も報告されている<sup>67)</sup>。最近では、カテキン類の LC-MS 法も注目されている<sup>68-69)</sup>。上記のように、LC-UV 法は簡便で、複数のカテキン類を同時に定量できるという利点がある。しかしながら、安価で信頼性の高いカテキン類の標準品は市販されていない。ゆえに、主要なカテキン類 8 種類の標準品を全て入手し、ルーチン分析することは困難である。そこで、本研究では、これまでの SR-HPLC 定量法の報告例の中で、最多のカテキン類 8 種類 (カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレート) を分析対象とした。さらに、これまでの章では PDA を検出器として用いてきたが、今回のカテキン類の SR-HPLC 定量法の構築では、より感度および特異性の高い蛍光検出器 (Fluorescent Detector, FL) の導入も試みた。本章では、複数の検出器を用いた新たなカテキン類 8 種類の SR-HPLC 一斉定量法を開発し、チャ抽出物や様々な茶試料の定量分析に応用することとした。

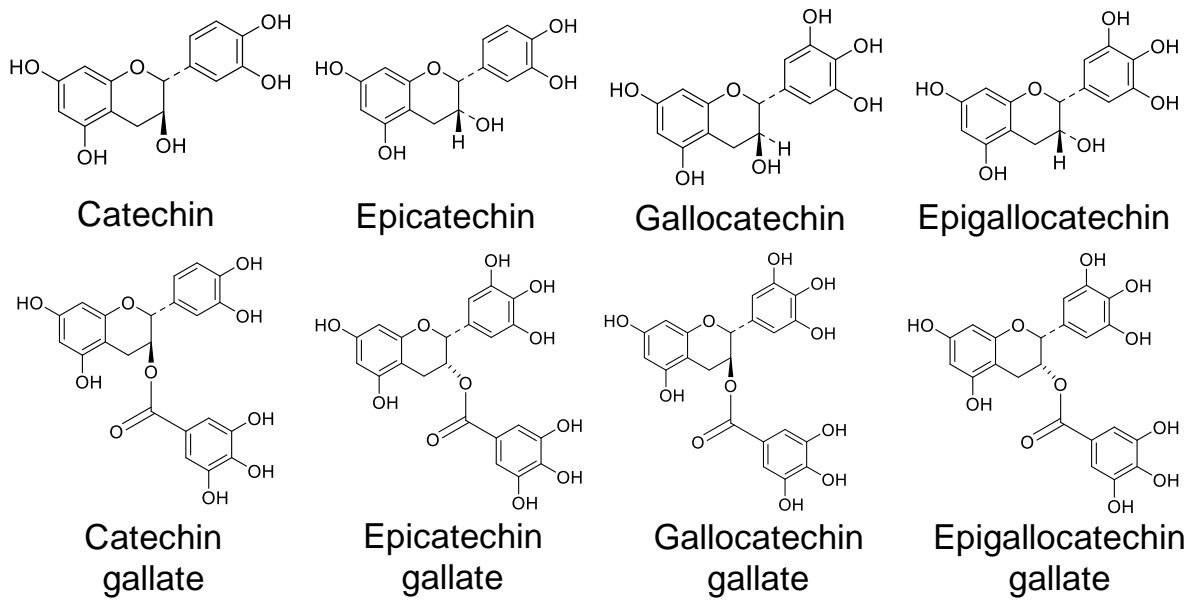


Fig. 34 Chemical structures of targeted catechins.

## 第 2 節 実験材料及び方法

### 3-2-1 試薬

試薬名	メーカー
メタノール	富士フイルム和光純薬社製
ギ酸 (FA, LC/MS 用, 約 99%)	富士フイルム和光純薬社製
重水素化クロロホルム (CDCl <sub>3</sub> )	Merck KGaA 社製
アセトン- <i>d</i> <sub>6</sub>	富士フイルム和光純薬社製
超純水	PURELAB flex5 system (ELGA 社製) を用いて得た。

有機溶媒については、移動相の用途で用いる場合は LC-MS グレード、その他の用途で用いる場合は特級グレードを用いた。また、Stock solution の溶媒として、メタノール、混合標準品の希釈溶媒としてメタノール/水 (50/50, v/v) 混液を用いた。

### 3-2-2 分析対象物質

試薬名	メーカー
(+)-カテキン (Catechin, C)	東京化成株式会社
(-)-エピカテキン (Epicatechin, EC)	東京化成株式会社
(-)-エピガロカテキン (Epigallocatechin, EGC)	東京化成株式会社
(-)-エピカテキンガレート (Epicatechin gallate, Eg)	東京化成株式会社
(-)-エピガロカテキンガレート (Epigallocatechin gallate, EGCg)	東京化成株式会社
(-)-ガロカテキン (Gallocatechin, GC)	東京化成株式会社
(-)-カテキンガレート (Catechin gallate, Cg)	東京化成株式会社製
(-)-ガロカテキンガレート (Gallocatechin gallate, GCg)	東京化成株式会社製
チャ抽出物 (粉状)	三永源エフ・エフ・アイ社製
ジメチルベンゼン (1,2-Dimethylbenzene, DMB)	東京化成株式会社製
ジメトキシフェノール (2,6-Dimethoxyphenol, DMP)	東京化成株式会社製
セサモール (Sesamol, SM)	富士フイルム和光純薬社製
1,4-BTMSB- <i>d</i> <sub>4</sub>	富士フイルム和光純薬社製

### 3-2-3 装置

電子天秤	METTLER ML303/52	METTLER 社製
遠心分離機	Himac CF15RN	日立工機社製
ロータリー エバポレーター	N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000	東京理化工機社製
ボルテックス	MIXER UZUSIO VTX-3000L	LMS 社製
HPLC	LC-20AD pump, SIL-20AC autosampler, CBM-20A controller, SPD-M20A detector, CTO-10AS column oven	島津製作所社製
qNMR	JNM ECA 600 MHz spectrometer	日本電子社製

### 3-2-4 チャ抽出物の確認試験<sup>1)</sup>

- (1) 本品 0.1 g を 50vol%エタノール 10 mL に溶かし、この溶液に塩化第二鉄溶液 (1→50) 2-3 滴を加えるとき、黒紫色を呈する。
- (2) 本品の水溶液は波長 265-280 nm に極大吸収部がある。

### 3-2-5 HPLC の測定条件

カラム : TSKGEL ODS-100Z column (4.6×150 mm, 5.0 μm : 東ソー社製)

カラム温度 : 40°C

流速 : 1.0 mL/min

移動相 : 0.1vol% ギ酸 (Solvent A) / 0.1vol% ギ酸メタノール (Solvent B)

グラジエント条件 : 0-4 min (A/B : 80/20, v/v)

→30 min (A/B : 60/40, v/v)

→30-35 min (A/B : 5/95, v/v)

→35.1-40 min (A/B : 80/20, v/v)

注入量: 10 μL

PDA 検出波長 : 200-550 nm (モニタリング波長 : 280 nm)

FL 検出波長 : 励起波長 (Excitation, Ex) : 280 nm

蛍光波長 (Emission, Em) : 310 nm

### 3-2-6 qNMRによるカテキン類の絶対評価

#### 【qNMRの分析条件】

qNMR reference solution : 0.2 mg/mL 1,4-BTMSB- $d_4$  in CD<sub>3</sub>OD

Spectral width : -5-15 ppm

Data points : 60,000

Flip angle : 90°

Pulse delay : 60 s

Scans : 8-16 times

Probe : room temperature

Software : Purity Pro qNMR ANALYSIS Software (日本電子社製)

#### 【qNMRによるカテキン類の絶対評価 (内標準法)】

1,4-BTMSB- $d_4$  10 mg を 50 mL のアセトン- $d_6$  に溶解して qNMR 標準溶液を調製した。フタル酸ジエチル (DEP) 3.0 mg を正確に秤量し、qNMR 標準溶液 1.5 mL に溶解し、得られた試料溶液の 0.6 mL を NMR 管に移した。qNMR 標準溶液中の 1,4-BTMSB- $d_4$  の濃度は、 $\delta$ H 0.00 ppm (1,4-BTMSB- $d_4$  の 18H) のシグナル面積と、 $\delta$ H 7.47 および 7.36 ppm (DEP 芳香環の 4H) のシグナル面積の比から算出した。1,4-BTMSB- $d_4$  を含む校正済み qNMR 標準溶液 1.5 mL にカテキン類、SM、DMB、DMP の 7.0 mg を溶解した。この溶液の 0.6 mL を NMR 管に封入した。

### 3-2-7 RMS を用いたカテキン類の SR-HPLC 定量法の構築

#### 【絶対検量線によるカテキン類および SR の RMS 算出】

NMR 管内の試料溶液のうち、0.5 mL のカテキン類、SM、DMP および DMB をメタノール/水 (50/50、v/v) 混液により HPLC 用標準溶液を調製して、カテキン類の RMS を算出した。まず、RMS を算出するとき、ランベルト・ベールの法則の式を下記のように式変形した。なお、吸光度 ( $R$ ) は、吸光係数 ( $\varepsilon$ )、濃度 ( $C$ ) および層長 ( $l$ ) で表される。

$$R = \varepsilon \times C \times l$$

ここで、層長  $l$  はカテキン類および SR において同じ値であると仮定した。

$$\frac{R_{analyte}}{(\varepsilon_{analyte} \times C_{analyte})} = \frac{R_{SR}}{(\varepsilon_{SR} \times C_{SR})}$$

$$\left(\frac{\varepsilon_{analyte}}{\varepsilon_{SR}}\right) \times C_{analyte} = \left(\frac{R_{analyte}}{R_{SR}}\right) \times C_{SR}$$

それぞれの原点を通過する検量線を作成すると、吸光係数比 ( $\varepsilon_{analyte}/\varepsilon_{SR}$ ) は下記の計算式で求められた。

$$\frac{\varepsilon_{analyte}}{\varepsilon_{SR}} = \left(\frac{R_{analyte}}{R_{SR}}\right) \times \left(\frac{C_{SR}}{C_{analyte}}\right) = \text{RMS}$$

上記より、各カテキン類の RMS を絶対検量線の傾きの比より算出した。なお、0 mg/L のピーク面積は検量線の原点とした。

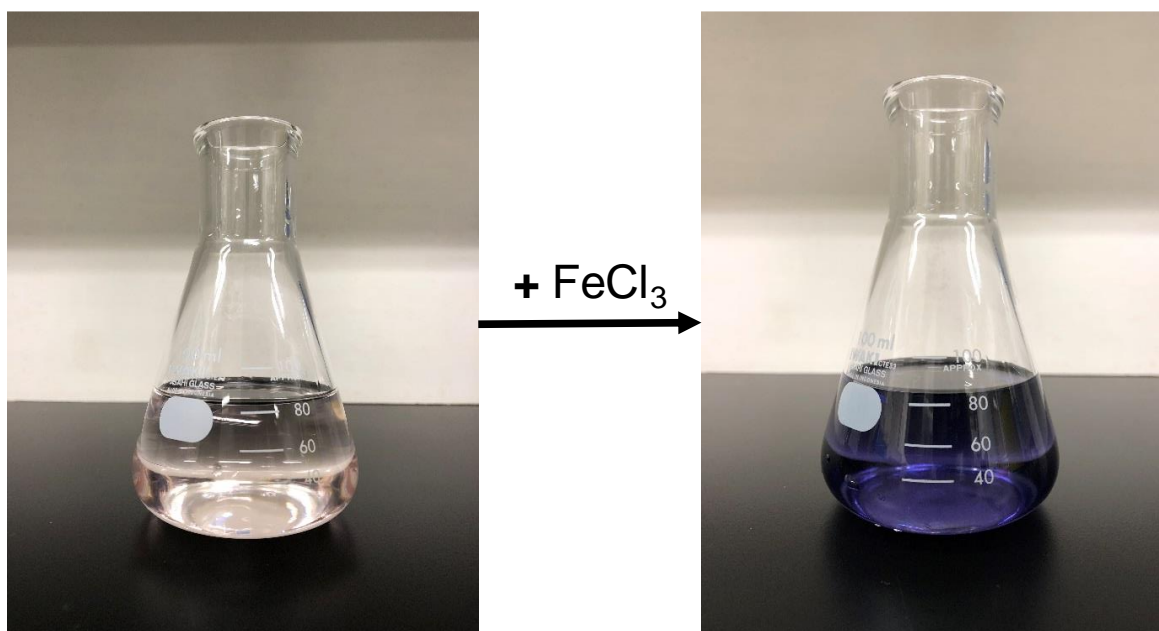
#### 【RMS を用いた茶試料中のカテキン類の SR-HPLC 定量法】

算出した RMS を用いて、最適な LC 条件にて、茶試料中のカテキン類を定量した。本章では、実試料としてチャ抽出物、緑茶、烏龍茶、ほうじ茶、玄米茶およびジャスミン茶を用いた。チャ抽出物の前処理方法は、チャ抽出物 10 mg を精秤し、メタノールで溶解し、10 mL にメスアップした (1 mg/mL)。そのメタノール溶液をメタノール/水 (50/50, v/v) 混液で 50 倍希釈した。一方、茶試料は滋賀県内のスーパーマーケットで購入したペットボトル飲料を用いた。ペットボトル飲料の原液を 0.80 mm フィルターに通して、メタノール/水 (50/50, v/v) 混液で 2 倍希釈 (烏龍茶、紅茶、ほうじ茶および玄米茶) もしくは 5 倍希釈 (緑茶およびジャスミン茶) した。そして、絶対検量線法を用いて得られた定量値と SR-HPLC 法の定量値を比較した。

## 第 3 節 実験結果及び考察

### 3-3-1 チャ抽出物の確認試験

チャ抽出物は、三栄源エフ・エフ・アイ社製のものを用いた。そこで、自主規格の確認試験を実施した<sup>1)</sup>。その結果、本研究で用いたチャ抽出物、現在の規格基準に従うことを確認できた (Fig. 35)。



50vol% Ethanol

Fig. 35 Identification test (1) .

### 3-3-2 カテキン類の HPLC 条件の検討

#### 【PDA における検出波長の検討】

各カテキン類の紫外可視吸収スペクトルを Fig. 36 に示した。その結果、いずれも吸収極大波長が 268-278 nm であったため、280 nm をモニタリングすることとした。

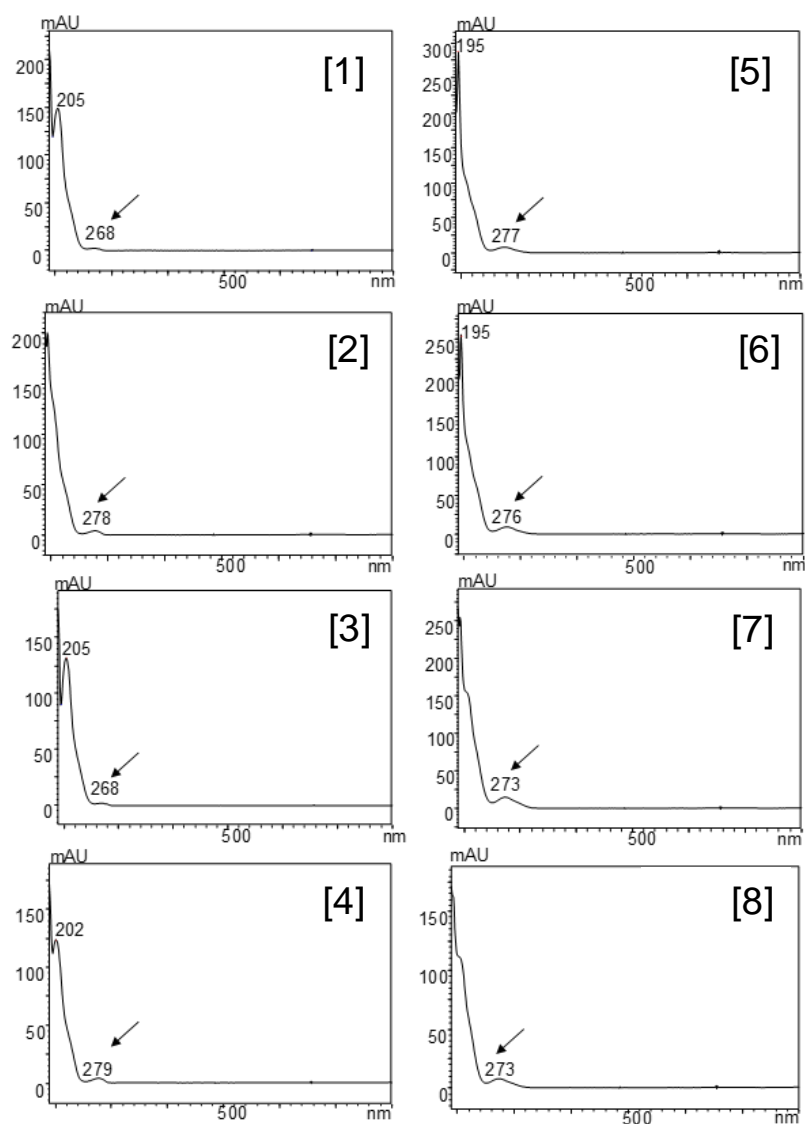


Fig. 36 PDA spectra of catechins standards.

[1] C, [2] EC, [3] GC, [4] EGC, [5] Cg, [6] ECg, [7] GCg, [8] EGCg

Concentration of catechins standards : 1.0 mg/mL



### 【分析カラムおよび移動相の検討】

カテキン類を分離分析するために、同じ移動相組成の条件下で、最適な分析カラムを検討した。そのときの HPLC クロマトグラムを Fig. 37 に示した。今回、東ソー社製の TSKgel ODS-100Z カラムと TSKgel ODS-100V カラムを検討した。どちらもカラムサイズは 4.6×150 mm であった。その結果、TSKgel ODS-100V では EC と EGCg の分離が困難であったが、TSKgel ODS-100Z はどのカテキン類も良好なピークが確認された。

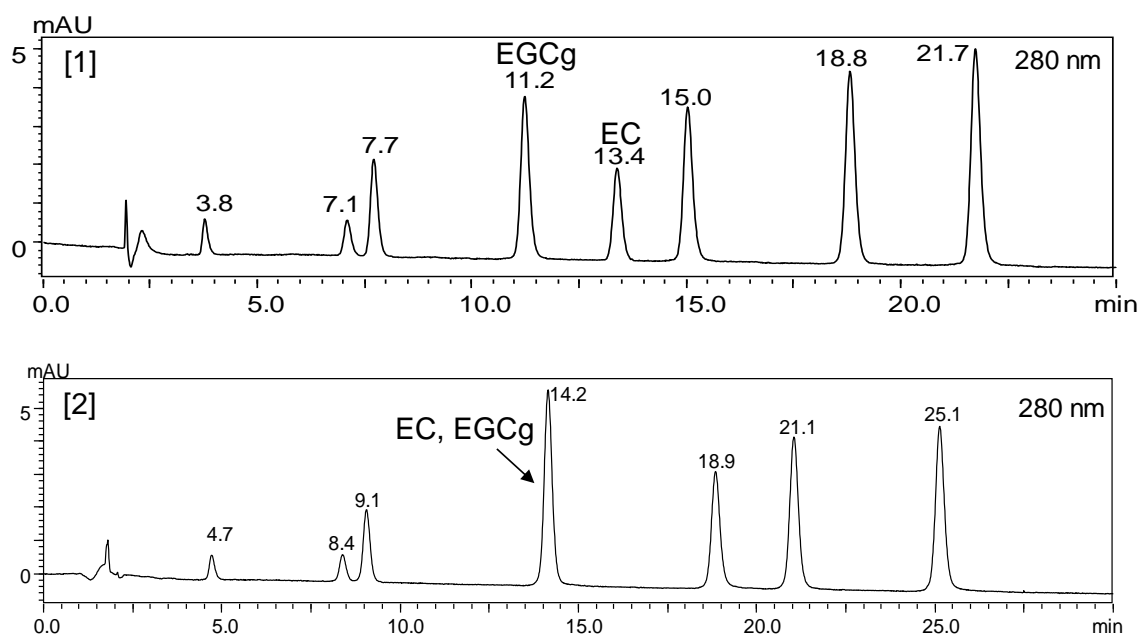


Fig. 37 HPLC chromatograms of catechins using defferent columns.

[1] TSKgel ODS-100Z (Tosoh, Co.) , [2] TSKgel ODS-100V (Tosoh, Co.)

また、今回の移動相組成ではグラジエント条件を採用している。そこで、アイソクラティック条件におけるカテキン類の分離分析も検討した。移動相は、A 液に 0.1vol%ギ酸、B 液に 0.1vol%ギ酸メタノールを用いており、各組成比における HPLC クロマトグラムを Fig. 38 に示した。その結果、どの移動相条件においても、最適なピーク分離や分析時間が確認されなかった。ゆえに、本研究では、グラジエント条件にてカテキン類を分析することとした。

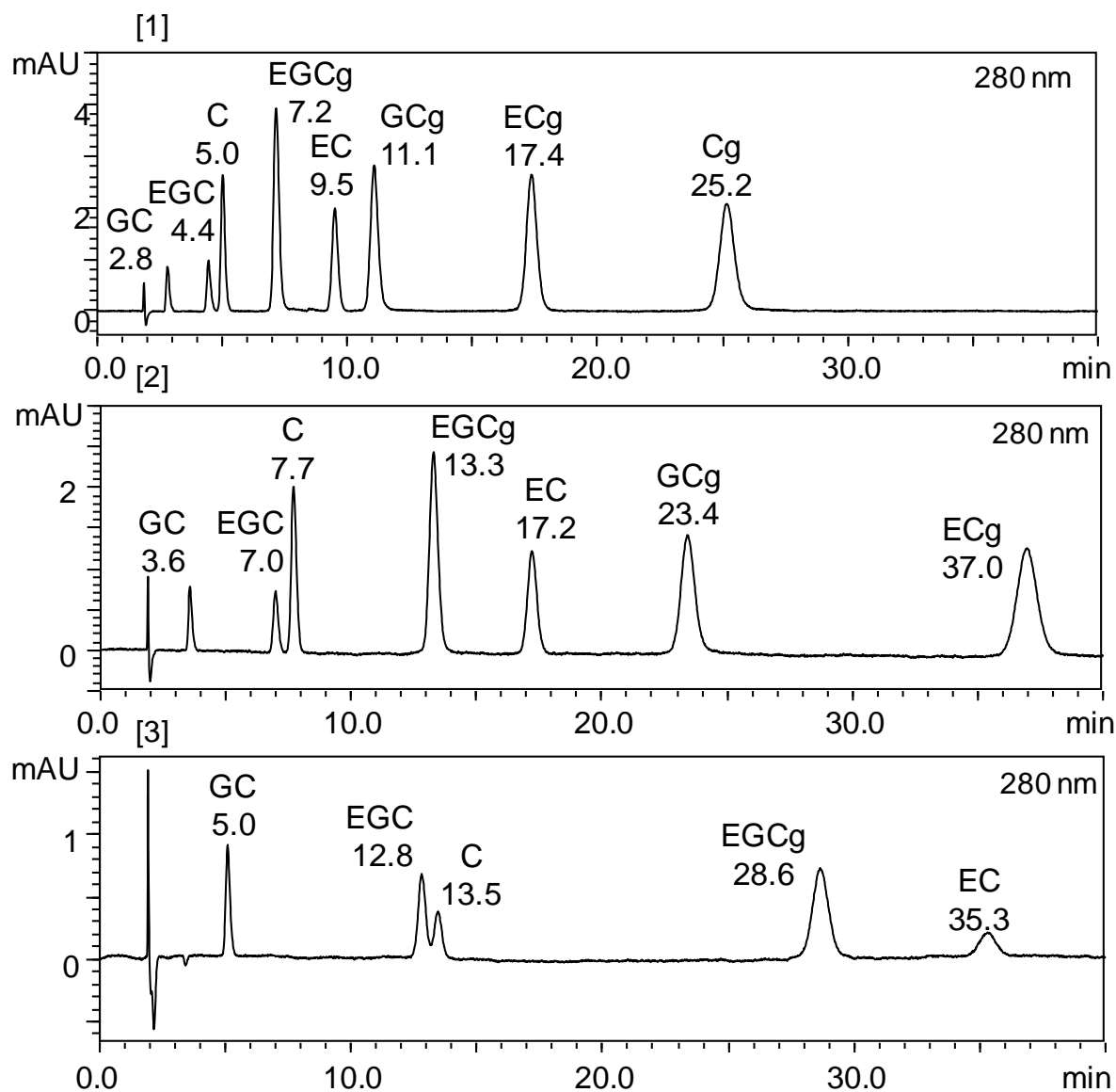


Fig. 38 HPLC chromatograms of catechins standard using TSKgel-ODS-100Z column  
 (A : 0.1vol% FA in water, B : 0.1vol% FA in methanol) .

[1] A/B : 45/55 (v/v) , [2] A/B : 50/50 (v/v) , [3] A/B : 55/45 (v/v)

【カテキン類のバリデーション】

最適化した分析条件を用いて、カテキン類のそれぞれの絶対検量線を検討した結果を Fig. 39 に示した (LOQ-10 mg/mL)。検出限界 (Limit of Detection, LOD)、定量限界 (Limit of Quantitation, LOQ)、検量線範囲および直線性を Table 11 に示した。なお、LOD はシグナル/ノイズ比 (S/N) = 3 の濃度、LOQ は S/N=10 の濃度である。

Table 11 Validation of catechins.

PDA				
Analytes	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Calibration range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Linearity ( $r^2$ )
GC	1.00	2.00	10	0.996
EGC	0.30	1.00	10	1.000
C	0.30	1.00	10	1.000
EGCg	0.15	0.30	10	1.000
EC	0.50	1.00	10	1.000
GCg	0.15	0.30	10	1.000
ECg	0.15	0.30	10	1.000
Cg	0.15	0.30	10	1.000

FL				
Analytes	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Calibration range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Linearity ( $r^2$ )
C	0.05	0.10	10	0.999
EC	0.05	0.10	10	0.999

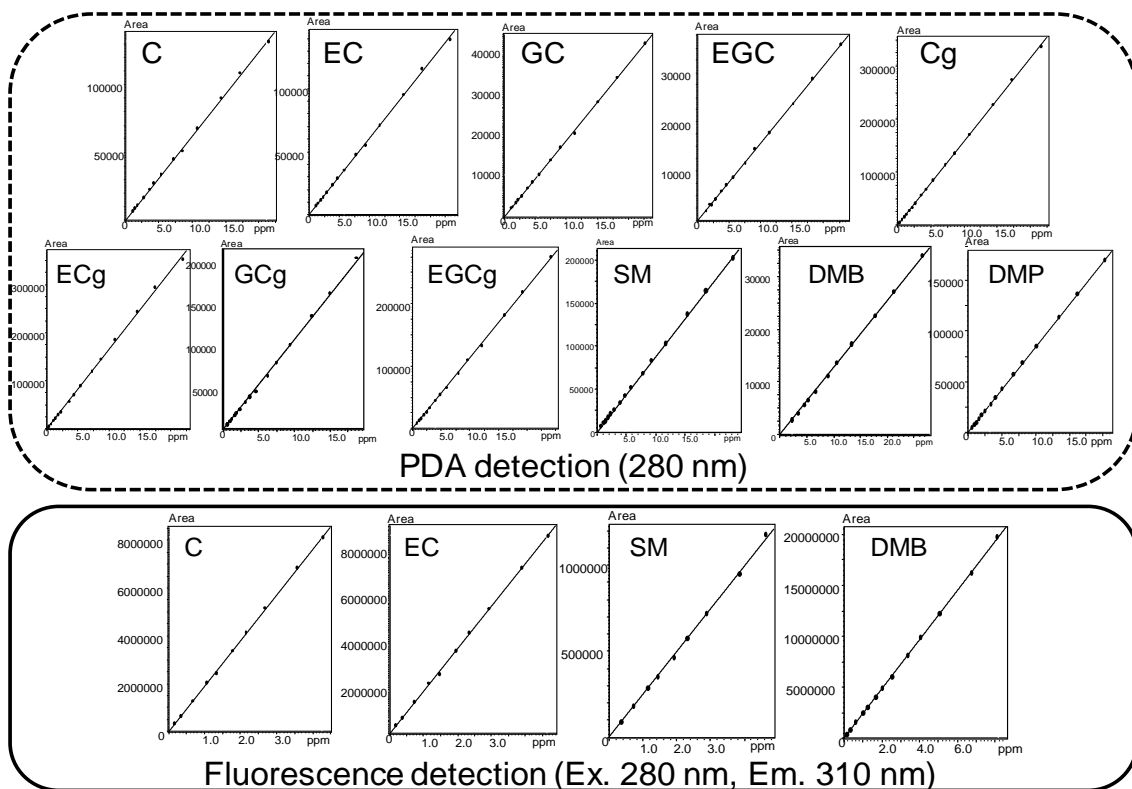


Fig. 39 Calibration curves of catechin and SR standards in PDA and FL.

### 3-3-3 カテキン類の SR 選択の検討

次に、カテキン類に最適な SR を選定した。前章で述べたように、SR を選ぶ際は、分析対象物質と同一波長であり、分析対象物との分離性が良好で、安価な化合物である。ゆえに、本章においても、分析対象物質であるカテキンをアルキル化により合成デザインすることとした。しかしながら、カテキンのメチル誘導体は、LC 条件にて遅い保持時間 (39.1 分) を示した (Fig. 40)。これは、カテキンのフラボノイド構造がカラムの C18 ポリマーと強く相互作用しているため、同じ保持時間で特定の官能基を変化させることは困難と考えられる。ゆえに、このようなフラボノイド構造を分離するためには、SM、DMP および DMB の 3 つの SR を検討することが最適であると考えた (Fig. 41) その結果、SM (保持時間 14 分)、DMP (20 分)、DMB (29 分) を含む SR を用いて、HPLC 条件下でカテキン類と共に分離可能であった (Fig. 41)。

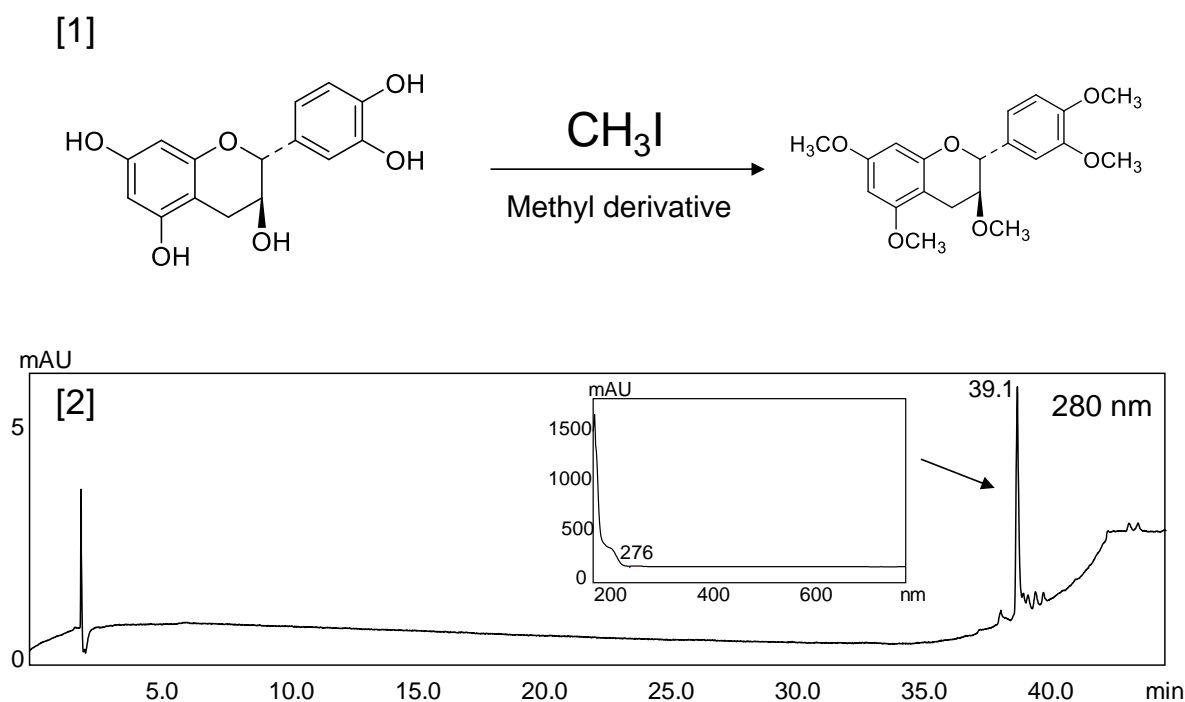


Fig.40 Methylation reaction to retain the key structure of catechins [1] and LC chromatogram of methylated compound [2].

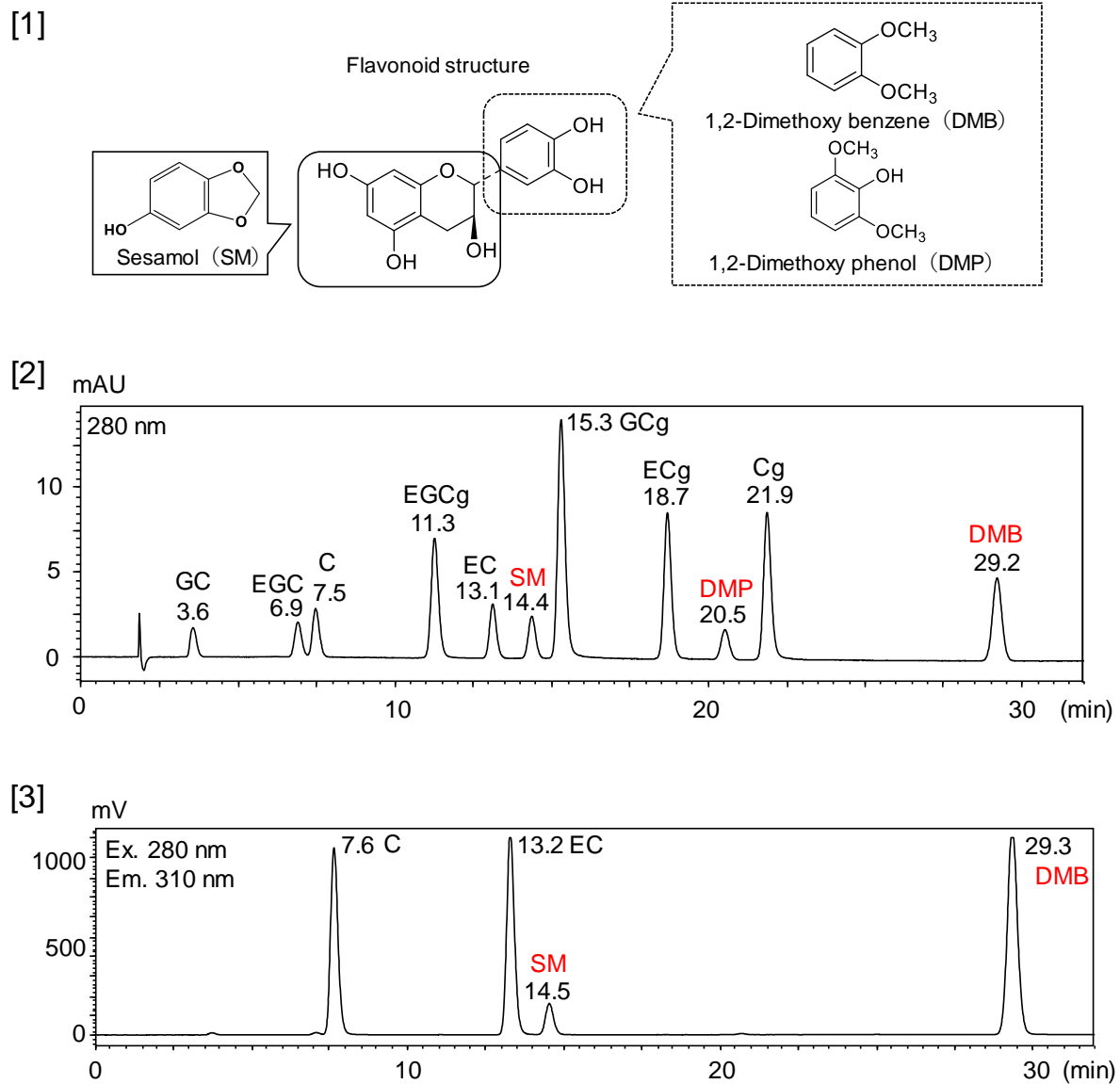


Fig. 41 Three SR standards based on flavonoids [1] and LC chromatograms with PDA, [2] and fluorescence (of Ex. 280 nm, Em. 310 nm, [3] of tea-derived catechins and SR (red color).

### 3-3-4 qNMR によるカテキン類および SR の絶対評価

最適なカテキン類の SR 選択した後、qNMR を用いてカテキン類と SR を絶対評価した。それらの qNMR スペクトルを Fig. 42-44 に示した。その結果、カテキン類では GC (87.0%)、EGC (93.3%)、C (94.1%)、EGCg (94.6%)、EC (100.3%)、GCg (86.1%)、ECg (97.7%)、Cg (93.7%) であった。さらに、SR では SM (100.3%)、DMP (100.0%)、DMB (99.3%) であった。なお、いずれも絶対評価の再現性は RSD < 1.0% (n=3) であり、良好な値であった。

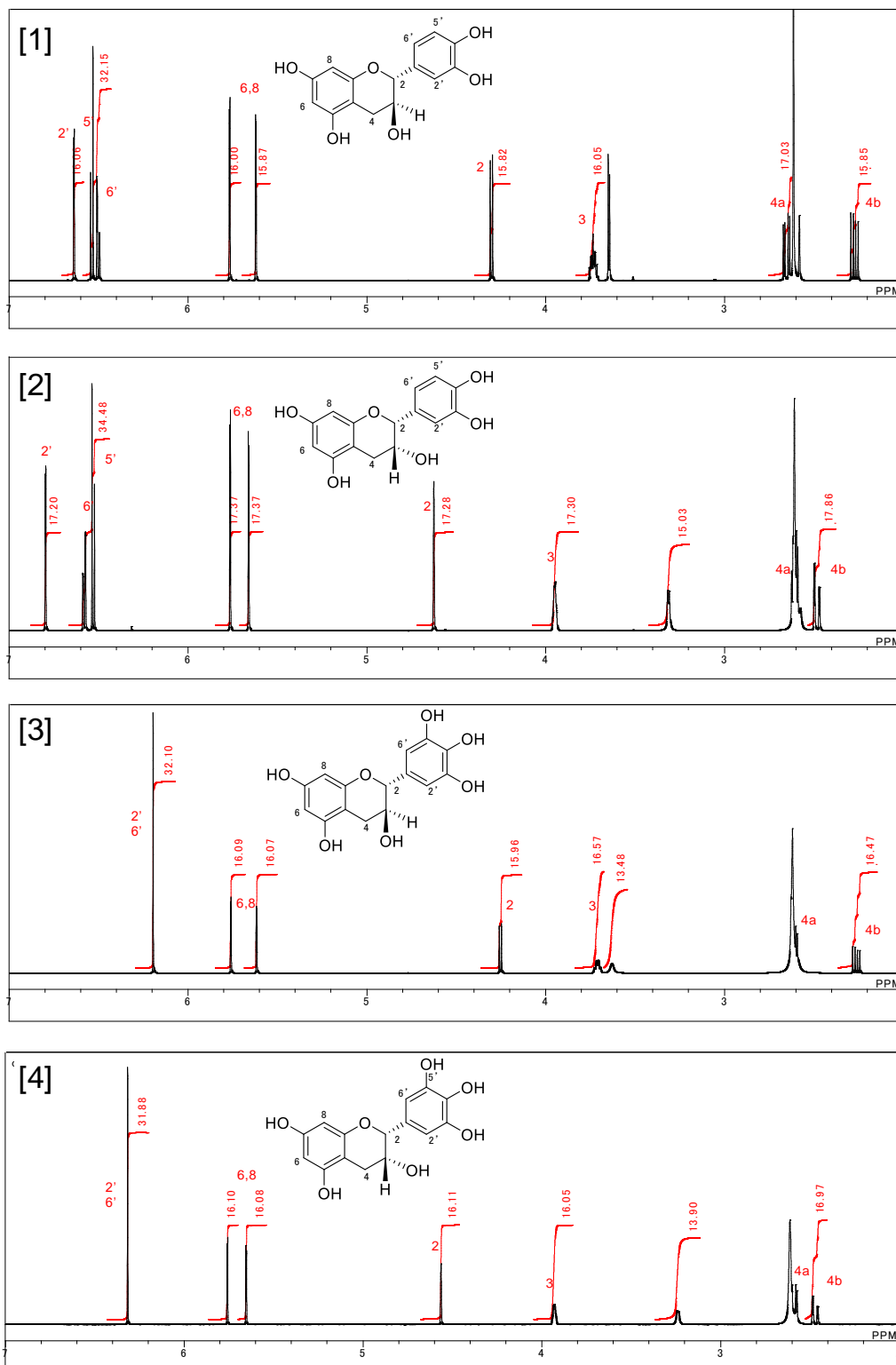


Fig. 42 qNMR spectra of catechins standards.

[1] C, [2] EC, [3] GC, [4] EGC

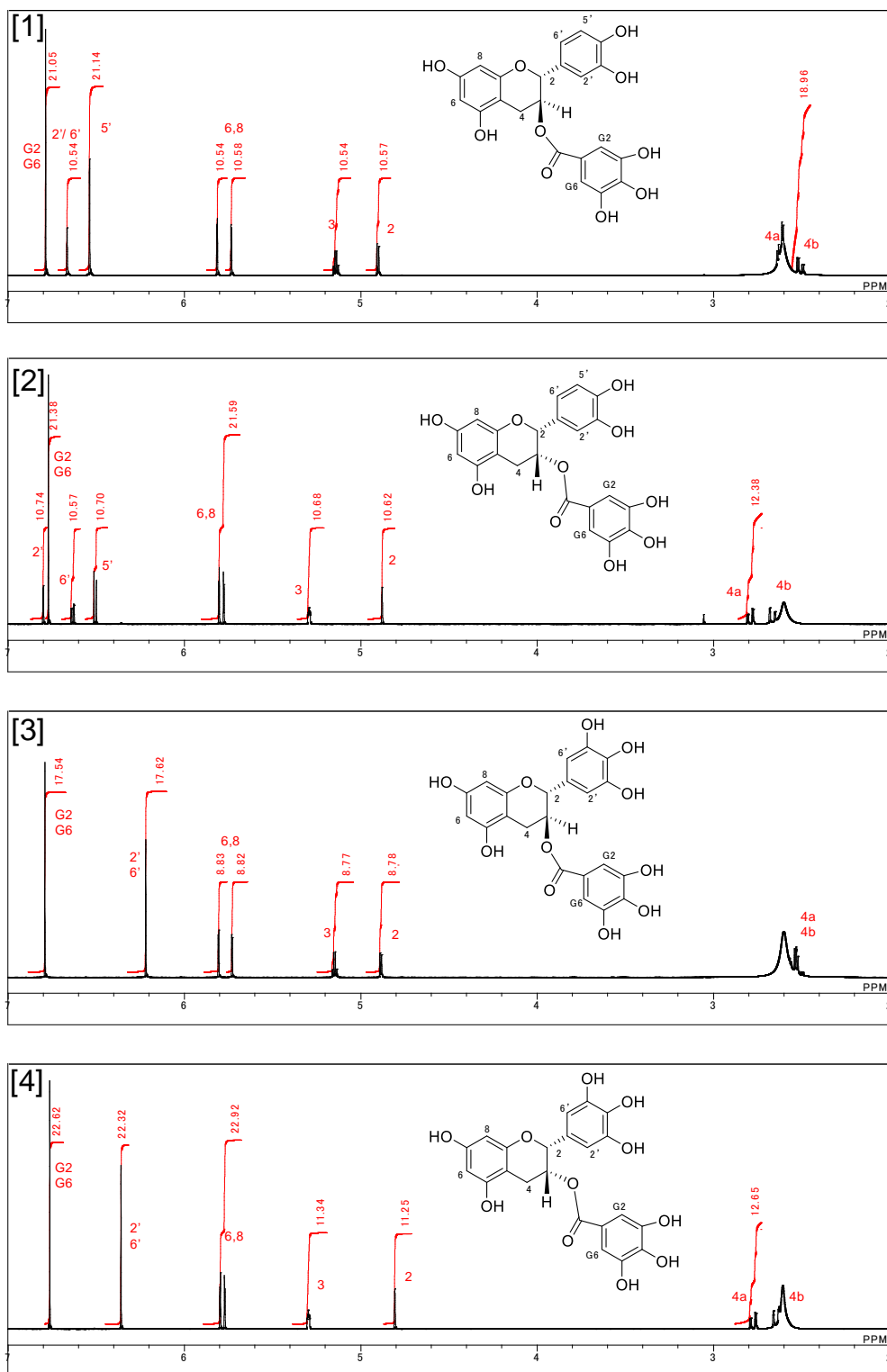


Fig. 43 qNMR spectra of catechins standards.  
 [1] Cg, [2] ECg, [3] GCg, [4] EGCg



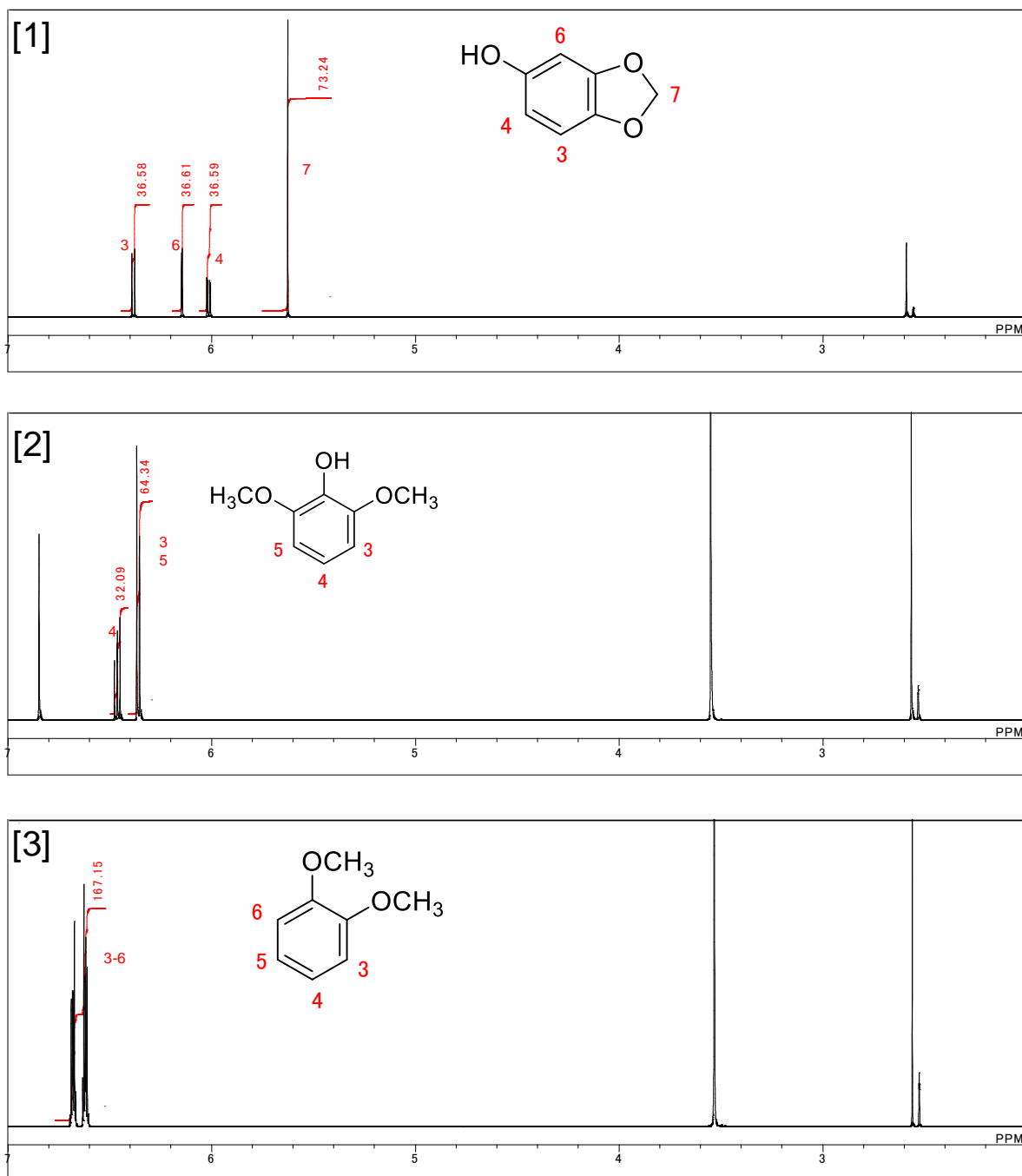


Fig. 44 qNMR spectra of SR standards.

[1] SM, [2] DMP, [3] DMB

### 3-3-5 HPLCによるカテキン類のRMSの算出

カテキン類とSRのNMR管内の試料液を用いて、HPLC用標準溶液を調製し、絶対検量線を作成した。そして、0-5 µg/mL、5-20 µg/mL、0-20 µg/mLの3つの濃度範囲における検量線の傾き比より、RMSを算出した (Table 12)。さらに、SMおよびDMBにおけるCおよびECのFL条件下のRMSは、それぞれ707.3、0.79、7512.5、0.77とであった。しかしながら、SMを用いたFL条件下のRMSは、発光モードと励起モードの両方で飽和した値であったため、これらの波長はCとECの定量に利用しなかった。

Table 12 RMS values of tea-derived catechins based on three SR standards such as SM, DMP and DMB.

Analytes	SR	RMS values based on various calibration ranges				RSD (%)
		0 to 5 µg/mL	5 to 20 µg/mL	0 to 20 µg/mL	Average	
GC	SM	4.64	4.61	4.61	4.62	0.3
	DMP	5.30	5.36	5.36	5.34	0.6
	DMB	0.64	0.67	0.67	0.66	1.7
EGC	SM	5.70	5.60	5.61	5.64	0.8
	DMP	5.30	5.36	5.36	5.34	0.6
	DMB	0.79	0.81	0.81	0.80	1.2
C	SM	1.41	1.42	1.42	1.41	0.2
	DMP	1.31	1.36	1.35	1.34	1.5
	DMB	0.20	0.21	0.20	0.20	2.2
EGCg	SM	0.80	0.78	0.78	0.79	1.5
	DMP	0.74	0.74	0.74	0.74	0.1
	DMB	0.11	0.11	0.11	0.11	0.6
EC	SM	1.45	1.45	1.45	1.45	0.1
	DMP	1.35	1.38	1.38	1.37	1.3
	DMB	0.20	0.21	0.21	0.21	1.9
GCg	SM	0.85	0.81	0.81	0.82	2.2
	DMP	0.79	0.78	0.78	0.78	0.8
	DMB	0.12	0.12	0.12	0.12	0.1
ECg	SM	0.56	0.53	0.53	0.54	2.2
	DMP	0.52	0.51	0.51	0.51	0.8
	DMB	0.08	0.08	0.08	0.08	0.1
Cg	SM	0.57	0.56	0.56	0.56	1.3
	DMP	0.53	0.53	0.53	0.53	0.1
	DMB	0.08	0.08	0.08	0.08	0.8

### 3-3-6 RMS を用いたチャ抽出物および茶試料中のカテキン類の定量分析

#### 【チャ抽出物】

RMS を用いた SR-HPLC 法の精度と再現性を検討するために、三栄源エフ・エフ・アイ社製のチャ抽出物中のカテキン類 (EGCg、ECg、EC) を PDA (280nm) と FL (Ex : 280nm、Em : 310nm) を用いて定量した。チャ抽出物の HPLC クロマトグラムを示した (Fig. 45)。また、3 種類の SR 添加濃度を用いたときのチャ抽出物中の EGCg および ECg の定量結果を Table 13 示した。その結果、EGCg は 811 g/kg、ECg は 24.0 g/kg、EC は 8.8 g/kg であり、RSD < 8.5% (n=3) と良好な再現性であった。

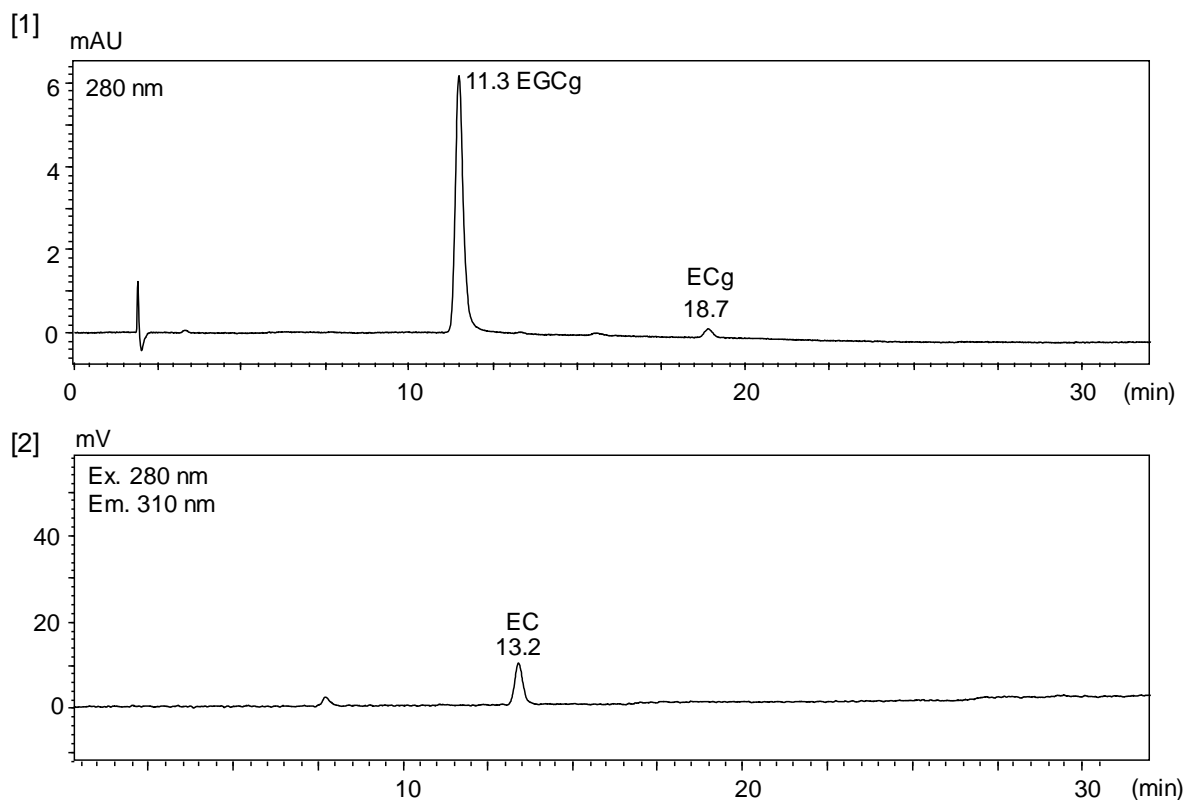


Fig. 45 HPLC chromatograms of EGCg and ECg in the tea extract.

[1] PDA, [2] FL

Table 13 Definite quantify of EGCg, ECg for PDA and EC for fluorescence by three concentration of SR standards (n=3) .

Analytes	Detector	Absolute quantify (g/kg)	RMS quantify (g/kg)									RSD (%)
			SM			DMP			DMB			
			2 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL	
EGCg	PDA	920	740	740	760	800	860	760	860	880	900	8.5
ECg	PDA	24.0	22	22	22	24	24	24	27	26	25	7.1
EC	FL	9.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.6	8.7	9.1	3.0

#### 【茶試料（ペットボトル飲料）】

本分析法を用いて、市販の緑茶、ウーロン茶、ジャスミン茶などの各茶試料中のカテキン類を定量分析した。各試料中のカテキン類の HPLC クロマトグラムを Fig. 46 に示した。その結果、GC (ウーロン茶、紅茶では不検出)、EGC、EGCg、GCg、ECg、Cg は PDA を用いて検出でき、C および EC は FL を用いて検出することができた。全ての茶試料の HPLC クロマトグラムにおいて、共通のピーク（保持時間：10.9-11.0 分）を示した。これは、標準品よりカフェインのピークであると同定した。本条件において、カフェインのピークは、カテキン類や SR のピークと完全分離しており影響いなかった。さらに、絶対検量線法と SR-HPLC 法に基づいて、茶試料中のカテキン類を定量した (Fig. 47-48)。その結果、SR-HPLC 法において、検量線を用いた方法と同等の定量値が得られた。しかしながら、いずれも茶試料において、SR-HPLC 法で求めた GCg の定量値が絶対検量線法で求めた GCg の定量値よりも高い傾向にあった。緑茶、玄米茶、ジャスミン茶中の GC の定量値に差があるのは、他のカテキン類と比べて HPLC クロマトグラムのピーク強度が低かったためであると考えられる。以上の結果から、カテキン類の一斉定量分析法として開発された、SR-HPLC 定量法は茶試料中のカテキン類の網羅的な定量に有効であることが明らかになった。

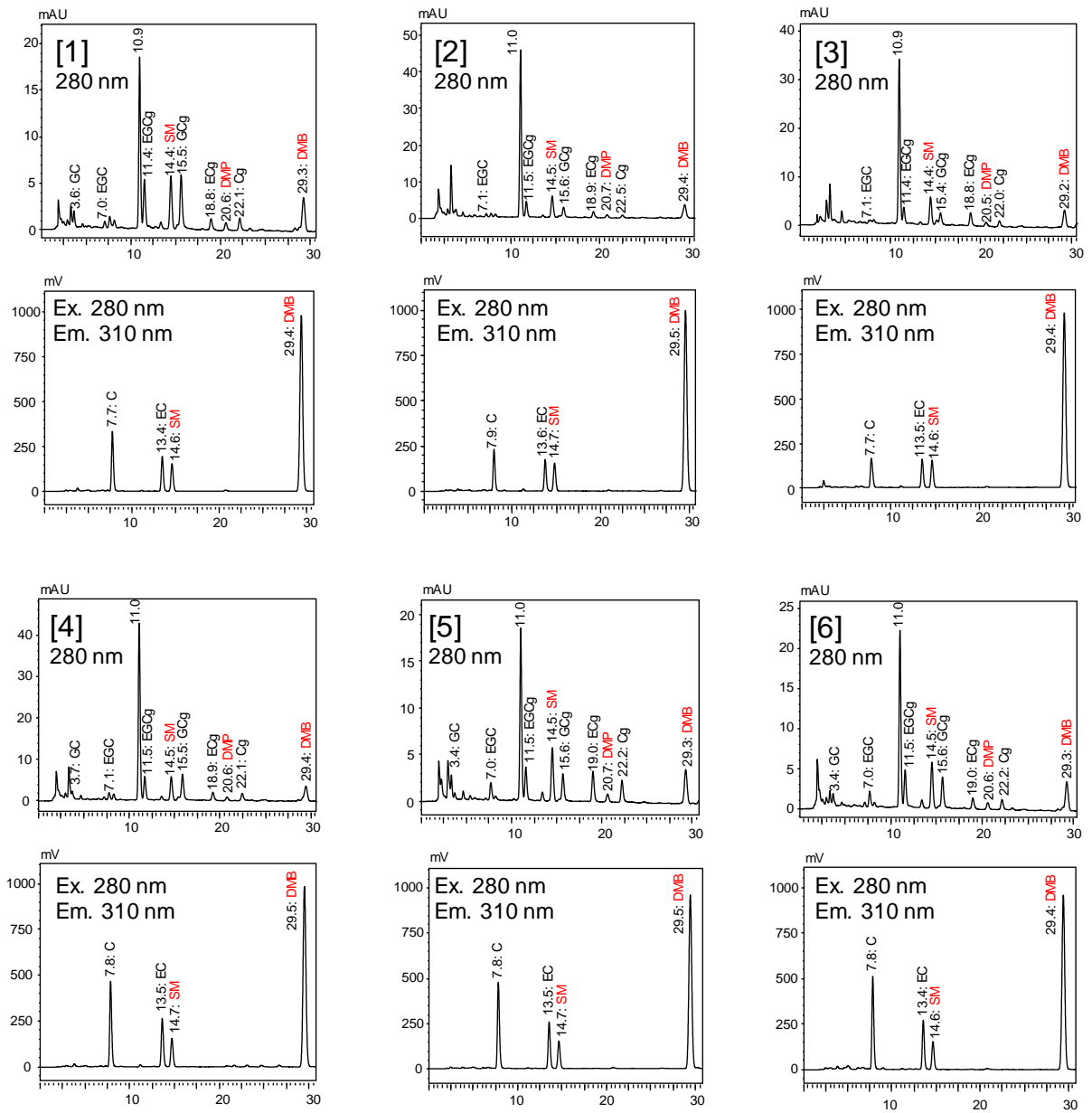


Fig. 46 HPLC chromatograms with PDA (upside) and fluorescence (downside) of tea-derived catechins and SR (red color) in tea samples.

[1] Green tea, [2] Oolong, [3] Black,  
[4] Roasted green, [5] Brown rice, [6] Jasmine teas

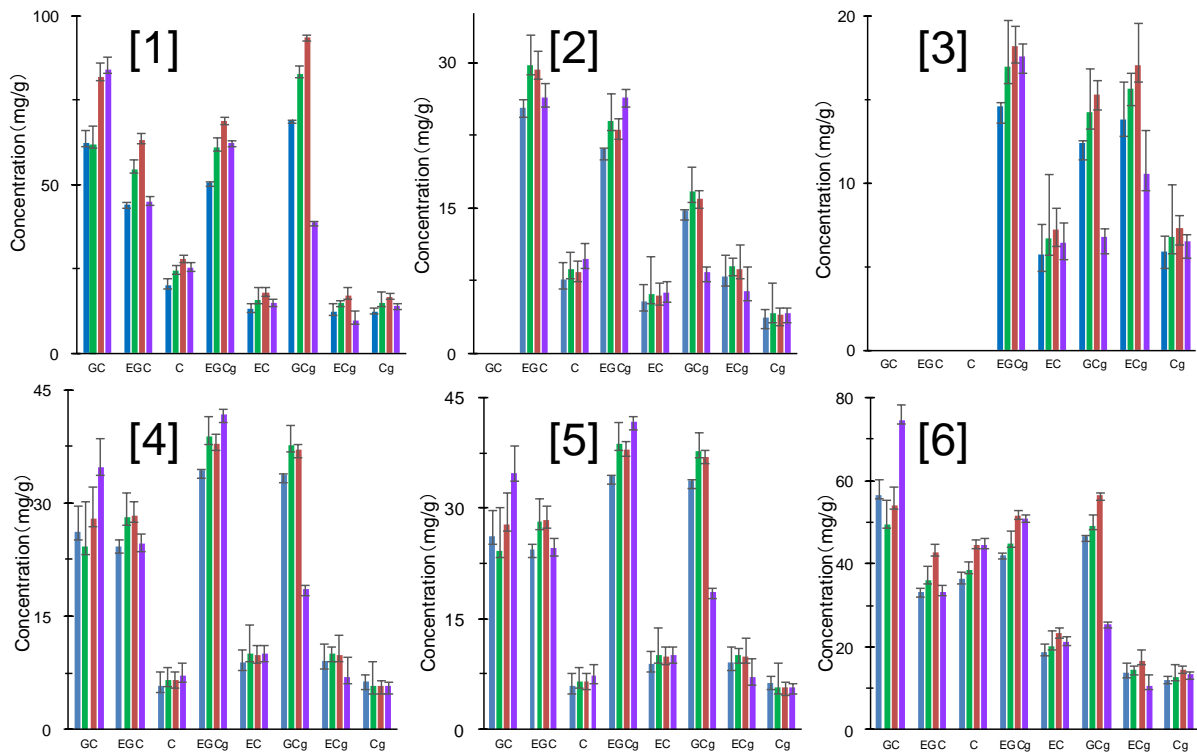


Fig. 47 Concentration levels (mg/L) of tea-derived catechins based on absolute calibration (violet) and three calibration (SM: blue, DMP: green, and DMB: red) in PDA.  
 [1] Green tea, [2] Oolong, [3] Black,  
 [4] Roasted green, [5] Brown rice, [6] Jasmine teas

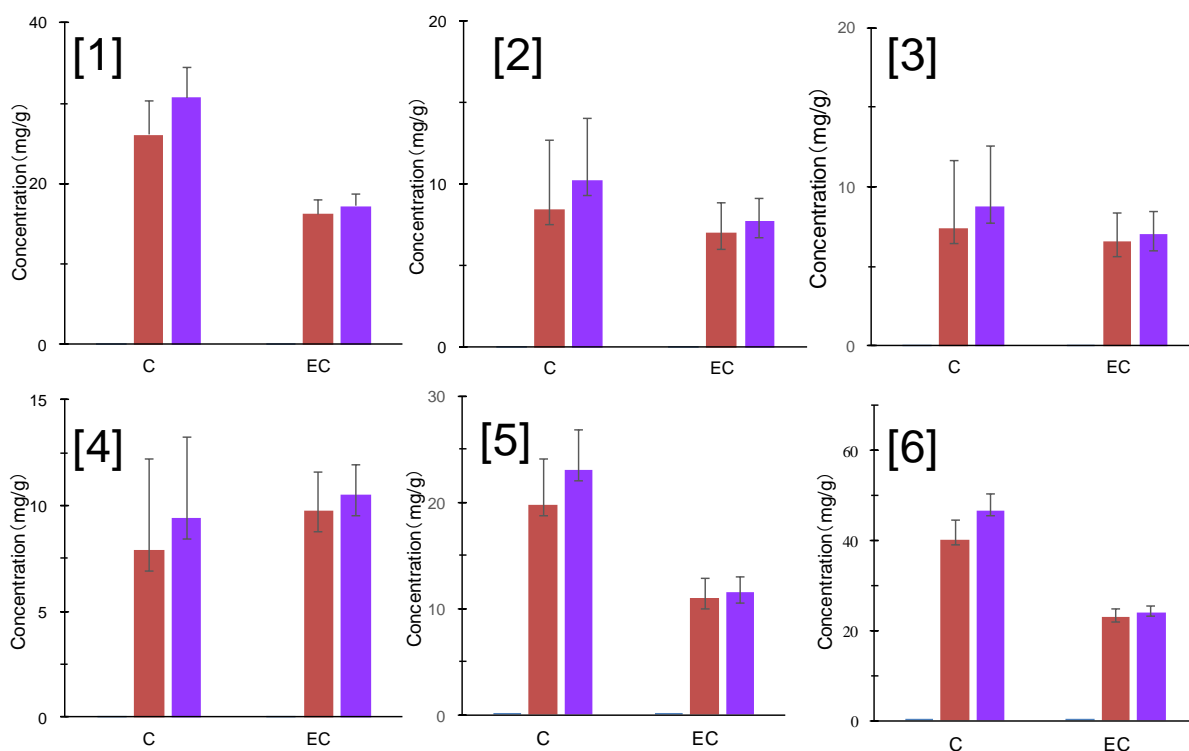


Fig. 48 Concentration levels (mg/L) of tea-derived catechins based on absolute calibration (violet) and three calibration (DMB: red) in FL.

[1] Green tea, [2] Oolong, [3] Black,  
[4] Roasted green, [5] Brown rice, [6] Jasmine teas

#### 第4節 小括

本章では、茶試料中のカテキン類（カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレート）の SR-HPLC 定量法を構築することにより、簡便かつ汎用性高い定量法を提案することとした。さらに、検出器として PDA だけでなく、より高感度かつ特異性の高い FL を用いて検討した。まず、カテキンの部分構造に着目し、SM、DMP および DMB を SR として選定した。そして、カテキン類および SR を qNMR により絶対評価し、HPLC を用いて RMS を算出した。算出した RMS を用いて、チャ抽出物および茶試料中におけるカテキン類の定量分析を実施した。その結果、どのカテキン類も絶対検量線法と同等の定量値が得られ、SR 添加濃度を変更しても定量値の変化はごく僅かであった。しかしながら、FL を用いて SR-HPLC 法を構築する際は、分析対象物質と蛍光強度が過剰に異なることを避ける必要があるといえる。以上より、本手法は分析対象物質の標準品を入手できなくても、正確に 8 種のカテキン類を定量可能であった。

## 総括

食品添加物とは、一般的に厚生労働大臣が指定した添加物（指定添加物）と長年使用されてきた天然添加物（既存添加物）などに大きく分類される。国内では、食品に使用許可のある食品添加物を指定するポジティブリストにより、その安全性を保証している。しかしながら、1995年の食品衛生法改正の後、既存添加物には法的規制が適応せず、逐一成分規格（主成分や不純物質の含有量）を実施し、基準値などを求めることになった。また、既存添加物の先には、「健康食品」の成分規格もあり、特に抗酸化などの生理活性を記すものは、迅速に規格試験を提示しなければならない。

現在、天然物や医薬品などの品質分析には、HPLCが汎用されている。HPLCの定量法は、主に内標準法、絶対検量線法及び標準添加法があるが、いずれも分析対象物質の標準品を入手する必要がある。つまり、HPLCの規格試験を構築するためには、標準品を安価かつ安定的に供給しなければならない。そこで、本研究では、容量分析法の概念（容量分析用標準液「ものさし」）をHPLCに応用できないかと考え、「HPLC定量分析用標準品（ものさし）であるSR」を用いた新たな定量法を構築することを試みた。物質の定量には、認証標準物質を利用する方法が最も信頼性が高いとされている。しかしながら、全ての分析対象物質における認証標準物質を入手することは不可能であり、一般的に国際単位系（SI）に基づくトレーサビリティが確立されている。qNMRは、シグナル積分値がプロトン数に比例することから、化合物の純度試験に利用されている。実際に、第十六改正日本薬局方（追補）にNMRを利用した生薬定量用試薬の評価が設定された。qNMRへ適用できる分析対象物質は、数mg程度であるため、単離精製においてHSCCCが最も適用できると考えられる。また、qNMRに基づく結果から、HPLC定量用標準品のシグナル積分の比率を算出し、物質質量比と吸光度比の関係から、RMSを求めることができる。RMSは物質固有値を示すことができ、HPLC定量分析用標準品の検量線から分析対象を定量できると思われる。本研究では、既存添加物であるベニコウジ黄色素、ゴマ油不けん化物およびチャ抽出物の主成分をターゲットとしたRMSによる新たなHPLC定量法の開発を目的とした。

第1章ではベニコウジ黄色素について検討した。ベニコウジ黄色素は天然の黄色着色料であり、国内において蒲鉾や沢庵などの着色目的に使用されている。ベニコウジ黄色素は、子囊菌類ベニコウジカビ（*Monascus purpureus*）の培養液から得られた、キサントモナシン類（XAおよびXB）を主成分とするものである。しかしながら、これらの検量線用の標準物質が入手できないため、XAおよびXBのHPLC定量法は食品添加物の規定に記載されていない。そこで、本研究では、RMSを用いて、ベニコウジ黄色素製品中のXAおよびXBのSR-HPLC定量分析を提案した。さらに、RMSを算出するためには、高純度なXAおよびXBを獲得し、



qNMR で絶対定量を行なう必要がある。そのため、HSCCC を利用して、ベニコウジ黄色素から XA および XB を単離精製することとした。HSCCC 分離には、二相溶媒系（ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/0.1vol%ギ酸, 1/5/1/5）混液を用いて XA 画分と XB 画分を分取し、各画分を HPLC によりモニタリングした。単離された XA および XB の含有量を求めるため、qNMR を行った。これらの試料溶液と SR である CBZ を用いて、HPLC の絶対検量線の傾き比（XA は 0-177  $\mu\text{mol/L}$ 、XB は 0-126  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2 > 0.998$ ）から XA および XB の RMS を算出した。その結果、CBZ に対する XA および XB の平均 RMS は、 $8.75 \pm 0.07$  および  $14.8 \pm 0.26$  であった。そして、ベニコウジ黄色素中の XA 及び XB の定量値は、RMS、ピーク面積及び試料中に添加した CBZ の含有量の 3 つの因子のみから決定することができる。計算の結果、XA の定量値は  $7.26 \mu\text{mol/g}$ 、XB の定量値は  $2.53 \mu\text{mol/g}$  であることがわかった。そして、RMS を用いた SR-HPLC 定量法の性能を絶対検量線法と比較した。以上より、今回開発した SR-HPLC 定量法は主成分の HSCCC による精製と qNMR 評価に基づき、XA および XB 標準物質を必要としない簡便かつ信頼性の高い定量が可能となった。

第 2 章では、ゴマ油不けん化物の検討を行った。ゴマ油不けん化物の主成分は、ゴマリグナン類である。そこで、本研究では、ゴマリグナン類（セサモール、セサミン、エピセサミンおよびセサモリン）の RMS を用いた一斉定量法を構築することとした。また、今回、分析対象物質であるゴマリグナン類に対する理想的な SR の合成デザインを検討した。どのゴマリグナン類は約 300 nm の吸収波長を持つ 1,3-ベンゾオキサソール骨格を示している。そこで、この構造を利用して、セサモールのメチル、ブチル、ヘキシル誘導体を合成した。それに加えて、同じ共通骨格を持つ市販品のピペロナルも SR として採用した。その後、qNMR でゴマリグナン類および SR 標準品の純度を評価した結果、97.0%以上の高い純度を示した。HPLC の絶対検量線の傾き比（0-100  $\mu\text{mol/L}$ 、 $r^2=0.999$ ）から各 SR に対するゴマリグナン類の RMS を算出した。なお、セサモールヘキシル誘導体は、分析条件適さなかったため、SR として除外した。ピペロナル、セサモールメチルおよびブチル誘導体に対するゴマリグナン類の平均 RMS は、 $15.5 \pm 0.13$  から  $18.7 \pm 0.35$  までの範囲であった。これらの RMS を用いて、ゴマ油、ゴマ健康食品、ゴマ油不けん化物中のゴマリグナン類の定量した結果、ゴマ油およびゴマ油不けん化物ではセサミンとセサモリン、ゴマ健康食品ではセサミンとエピセサミンが定量された。また、セサモールに関しては、ゴマ油を加熱することで検出が確認された。SR-HPLC 定量法の精度および再現性を絶対検量線法と比較したところ、残留評価値は 4%以下であり、ほとんど差がなかった。このように分析対象物質の化学構造に基づいた SR をデザインするという手法は、類似構造をもつ化合物の同時定量にも適用可能であるといえる。

第3章では、チャ抽出物について検討した。チャ抽出物の主成分は、カテキン類（カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレート）である。これらカテキン類は、予防医学において重要な天然物として広く知られており、様々な健康食品にも利用されている。カテキン類は HPLC を用いて分析することが多いが、検量線の複雑さや検量線に適したカテキン類の標準物質がないため、カテキン類の一斉定量分析法はごく僅かしか報告されていない。そこで、本研究では、RMS に基づく PDA および FL を用いた SR-HPLC 一斉定量法を開発した。カテキン類のフラボノイド骨格に注目し、3種類の SR（SR、DMP および DMB）を選択した。カテキン類および SR を HPLC で分析した結果、どれも良好な分離とピーク形状を確認できた。そして、カテキン類および SR の純度評価を qNMR により実施した結果、どの化合物も純度が 85%以上であり、その RSD%も 3%以下であった。HPLC の絶対検量線の傾き比（0-22.5 mg/L、 $r^2=0.999$ ）から各 SR に対するカテキン類の RMS を算出し、チャ抽出物中におけるカテキン類の定量分析を実施した。その結果、従来の絶対検量線法と同等の定量値が確認され、その再現性も良好であった。以上より、本手法は分析対象物質の標準品を入手できなくても、正確に 8 種のカテキン類を定量可能であるといえる。

ここまでの本研究成果から、RMS に基づく SR-HPLC 定量法は、既存添加物の成分規格において有用な手段であることが明らかとなった。この概念は、従来の標準品を用いた定量法の欠点を補い、安価な別の標準物質を用いた定量法を開発することで、既存添加物の主成分以外の様々な物質の定量分析に応用することができる。また、HSCCC を用いることで、標準品が存在しない物質に対して定量法を確立可能である。本研究で開発された定量法が試験法として採用され、食品添加物の品質と安全性に貢献できるとなることを期待する。

## 参考文献

- 1) 9th Edition Japan's Specifications and Standards for Food Additives Published by The Ministry of Health and Welfare (2017) [<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000135214.html>]
- 2) N. Sugimoto, K. Sato, T. Yamazaki, K. Tanamoto, Analysis of constituents in Jamaica quassia extract, a natural bittering agent. *Food Hyg. Saf. Sci.* (2003) 328-331
- 3) F.E. Lancaster, J.F.: Lawrence, Determination of annatto in high-fat dairy products, margarine and hard candy by solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography. *Food Addit.* 12 (1995) 9-19
- 4) T. Iso, N. Sugimoto, K. Sato, T. Yamazaki, K. Ishibashi, S. Shiomi, K. Tonamoto, Identification test of aloe extract from *Aloe arborescens*, a natural thickening stabilizer. *J. Food Chem.* 12 (2005) 23-27
- 5) D.A. Foley, J. Wang, B. Maranzano, M.T. Zell, B.L. Marquez, Y. Xiang, G.L. Reid, Online NMR and HPLC as a reaction monitoring platform for pharmaceutical process development. *Anal. Chem.* 85 (2013) 8928-8932.
- 6) M. Timmers, S. Urban, On-line (HPLC-NMR) and off-line phytochemical profiling of the Australian plant, *Lasiopetalum macrophyllum*. *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012) 551-560.
- 7) G.K. Webster, I. Marsden, C.A. Pommerening, C.M. Tyrakowski, B. Tobias, Determination of relative response factors for chromatographic investigations using NMR spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 1261-1265.
- 8) K. Karthikeyan, G.T. Arularasu, V. Murali, K.C. Pillai, Identification, isolation, characterization and response factor determination of process-related impurity in meprobamate drug substance. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 208-212.
- 9) Y. Nishizaki, A. Tada, K. Ishizuki, Y. Ito, A. Onoda, N. Sugimoto, H. Akiyama, Development of a novel method for quantifying quassin and neoquassin in Jamaica quassia extracts using the molar absorption coefficient ratio. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 56 (2015) 185-193.
- 10) Y. Nishizaki, N. Sato-Masumoto, A. Yokota, T. Mikawa, K. Nakashima, T. Yamazaki, M. Kuroe, M. Numata, T. Ihara, Y. Ito, N. Sugimoto, K. Sato, HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 35 (2018) 838-847.
- 11) Y. Kitamaki, N. Saito, T. Yamazaki, S. Otsuka, S. Nakamura, Y. Nishizaki, N. Sugimoto, M. Numata, T. Ihara, Determination of PAHs in Solution with a Single Reference Standard by a Combination of <sup>1</sup>H Quantitative NMR Spectroscopy and Chromatography. *Anal. Chem.* 89 (2017) 6963-6968.
- 12) S. Kumasaki, K. Nakanishi, E. Nishikawa, Ohashi M., Structure of monascorubin.

- Tetrahedron*, 18 (1962) 1171-1184
- 13) S. Iwaxa, N. Harada, T. Watanabe, N. Kotokawa, A. Yamamoto, H Hayashi, S.A. Kobayashi, Inhibitory effects of food-coloring agents derived from *Monascus* on the mutagenicity of heterocyclic amines. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3980-3984
  - 14) T. Akihisa, H. Tokuda, M. Kiyota, K Yasukawa, N. Sakamoto, T. Suzuki, J. Takayasu, H Nishino, Anti-tumor-iniating effects of monascin, an azaphilone pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice) . *Chem. Biodivers.* 2 (2005) 1305-1309
  - 15) N.W. Su, Y. L. Lee, M. H. Lee, C. Y. Ho, Ankaflavin from *Monascus*-fermented red ruce exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 1949-1954
  - 16) C.L. Lee, J.J. Wang, S.I. Kuo, T.M. Pan, *Monascus* fermentation of dioscorea from increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K and antiflammentation agent-monascin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 1254-1262
  - 17) D. Wild, G. Tóth, H.U. Humpf, New *monascus* metabolite isolated from red yeast rice (angkak, red koji). *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3999-4002.
  - 18) H. Jung, C. Kim, K. Kim, C.S. Shin, Color characteristics of *monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1302-1306.
  - 19) S. Campoy, A. Rumbero, J.F. Martín, P. Liras, Characterization of an hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (2006) 488-496.
  - 20) K. Shi, G. Chen, M. Pistozzi, F. Xia, Z. Wu, Improved analysis of *Monascus* pigments based on their pH-sensitive UV-Vis absorption and reactivity properties. *Food Addit. Contam. Part A* 33 (2016) 1396-1401
  - 21) T. Watanabe, S. Yamamoto, S. Nagai, S. Terabe, Separation and determination of *monascus* yellow pigments for food by micellar electrokinetic chromatography. *Anal. Sci.* 13 (1993) 571-575
  - 22) H. Jung, C. Kim, K. Kim, C.S. Shin, Color characteristics of *monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1302-1306.
  - 23) C. Chen, W.R. Folk, R. Lazo-Portugal, T.M. Finn, M. Knight, Isolation of sutherlandins A, B, C and D from *Sutherlandia frutescens* (L.) R. Br. by counter-current chromatography using spiral tubing support rotors. *J. Chromatogr. A* 1508 (2017) 7-15.
  - 24) Y. Li, L. Li, Y. Cui, S. Zhang, B. Sun, Separation and purification of polyphenols from red wine extracts using high speed counter current chromatography. *J.*

*Chromatogr. B* 1054 (2017) 105-113.

- 25) M. Takahashi, Y. Nishizaki, N. Sugimoto, H. Takeuchi, K. Nakagawa, H. Akiyama, K. Sato, K. Inoue, Determination and purification of sesamin and sesamolin in sesame seed oil unsaponified matter using reversed-phase liquid chromatography coupled with photodiode array and tandem mass spectrometry and high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 3898-3905.
- 26) K. Inoue, C. Tanada, H. Nishikawa, S. Matsuda, A. Tada, Y. Ito, J.Z. Min, K. Todoroki, N. Sugimoto, T. Toyo'oka, H. Akiyama, Evaluation of gardenia yellow using crocetin from alkaline hydrolysis based on ultra high performance liquid chromatography and high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3619-3624.
- 27) K. Inoue, E. Baba, T. Hino, H. Oka, A strategy for high-speed countercurrent chromatography purification of specific antioxidants from natural products based on on-line HPLC method with radical scavenging assay. *Food Chem.* 134 (2012) 2276-2282.
- 28) K. Inoue, C. Nomura, Y. Mizuno, Y. Yoshimi, K. Tsutsumiuchi, T. Hino, Separation of Major Safflowers from Carthamus Yellow using High - Speed Countercurrent Chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (2008) 1047-1059
- 29) K. Inoue, Y. Ito, Y. Hattori, K. Tsutsumiuchi, S. Ito, T. Hino, H. Oka, Efficient purification of xanthomonasin A and B from Monascus yellow colorant by high-speed countercurrent chromatography. *J. Food Chem. Safety* 17 (2010) 185-191.
- 30) M. Takahashi, Y. Nishizaki, N. Sugimoto, K. Sato, K. Inoue, Single reference quantitative analysis of xanthomonasin A and B in Monascus yellow colorant using high-performance liquid chromatography with relative molar sensitivity based on high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1555 (2018) 45-52.
- 31) Y. Wan, H. Li, G. Fu, X. Chen, F. Chen, M. Xie, The relationship of antioxidant components and antioxidant activity of sesame seed oil, *J. Sci. Food Agric.* 95 (2015) 2571-2578
- 32) C. Mahendra Kumar, S.A. Singh, Bioactive lignans from sesame (*Sesamum indicum* L.): evaluation of their antioxidant and antibacterial effects for food applications. *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 2934-2941.
- 33) S.S. Umesha, K.A. Naidu, Antioxidants and antioxidant enzymes status of rats fed on n - 3 PUFA rich Garden cress (*Lepidium Sativum* L) seed oil and its blended oils. *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 1993-2002
- 34) S. Ben Othman, N. Katsuno, Y. Kanamaru, T. Yabe, Water - soluble extracts from defatted sesame seed flour show antioxidant activity *in vitro*. *Food Chem.* 15 (2015) 306-314.
- 35) Y. Wan, H. Li, G. Fu, X. Chen, F. Chen, M. Xie, The relationship of antioxidant

- components and antioxidant activity of sesame seed oil. *J. Sci. Food Agric.* 95 (2015) 2571-2578.
- 36) H.M. Wang, K.C. Cheng, C.J. Lin, S.W. Hsu, W.C. Fang, T.F. Hsu, C.C. Chiu, H.W. Chang, C.H. Hsu, A.Y. Lee, Obtusilactone A and (-)-sesamin induce apoptosis in human lung cancer cells by inhibiting mitochondrial Lon protease and activating DNA damage checkpoints. *Cancer Sci.* 101 (2010) 2612-220.
  - 37) P. Kong, G. Chen, A. Jiang, Y. Wang, C. Song, J. Zhuang, C. Xi, G. Wang, Y. Ji, J. Yan, Sesamin inhibits IL-1 $\beta$ -stimulated inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes by activating Nrf2 signaling pathway. *Oncotarget.* 13 (2016) 83720-83726.
  - 38) H. Dou, S. Yang, Y. Hu, D. Xu, L. Liu, X. Li, Sesamin induces ER stress-mediated apoptosis and activates autophagy in cervical cancer cells. *Life Sci.* (2018) doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.003.
  - 39) J.H. Kim, J.K. Lee, Sesamol enhances NK cell lysis activity by increasing the expression of NKG2D ligands on Burkitt's lymphoma cells. *Int. Immunopharmacol.* 28 (2015) 977-984.
  - 40) L. Panzella, T. Eidenberger, A. Napolitano, Anti-Amyloid Aggregation Activity of Black Sesame Pigment: Toward a Novel Alzheimer's Disease Preventive Agent. *Molecules.* (2018) doi: 10.3390/molecules23030676.
  - 41) E. Hsu, S. Hsu, Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Sesame Oil on Atherosclerosis: A Descriptive Literature Review. *Cureus.* 9 (2017) e1438.
  - 42) S. Periasamy, C.T. Liu, S.P. Chien, Y.C. Chen, M.Y. Liu, Daily sesame oil supplementation mitigates ketoconazole-induced oxidative stress-mediated apoptosis and hepatic injury. *J. Nutr. Biochem.* 37 (2016) 67-75.
  - 43) N. Rangkadilok, N. Pholphana, C. Mahidol, W. Wongyai, K. Saengsooksree, S. Nookabkaew, Variation of sesamin, sesamol and tocopherols in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds and oil products in Thailand. *Food Chem.* 122 (2010) 724-730.
  - 44) W. Wu, The contents of lignans in commercial sesame oils of Taiwan and their changes during heating. *Food Chem.* 104 (2007) 341-344.
  - 45) G.S. Hemalatha, Ghafoorunissa; Lignans and tocopherols in Indian sesame cultivars. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 81 (2004) 467-470.
  - 46) Z. Feng, K. Gu, Composition, structure and physiological function of lignans in sesame seed. *China Oils Fats* 29 (2004) 56-59.
  - 47) T. Tashiro, Y. Fukuda, T. Osawa, M. Namiki, Oil and minor components of sesame (*Sesamum indicum* L) strains. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 67 (1990) 508-511.
  - 48) J. Wu, The introduction of natural antioxidants in sesame. *Food Ind.* 4 (2001) 11-15.

- 49) D. Sukumar, R. Arimboor, C. Arumughan, HPTLC fingerprinting and quantification of lignans as markers in sesame oil and its polyherbal formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 795-801.
- 50) K. Yamaguchi, S. Kurata, Accelerated separation of GC-amenable lipid classes in plant oils by countercurrent chromatography in the co-current mode. *Bunseki Kagaku* 54 (2005) 1091-1100.
- 51) P. Górnaś, A. Siger, I. Pugajeva, D. Segliņa, Sesamin and sesamol as unexpected contaminants in various cold-pressed plant oils: NP-HPLC/FLD/DAD and RP-UPLC-ESI/MS(n) study. *Food Addit. Contam.* 31 (2014) 567-573.
- 52) A.S. Bhatnagar, J. Hemavathy, A.G. Gopala Krishna, Development of a rapid method for determination of lignans content in sesame oil. *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 521-527.
- 53) H.L. Zhang, X.Q. Gan, Q.F. Fan, J.J. Yang, P. Zhang, H.B. Hu, Q.S. Song, Chemical constituents and anti-inflammatory activities of Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens*) bark extracts. *Sci. Rep.* 7 (2017) 45805.
- 54) R. Amarowicz, F. Shahidi, R.B. Pegg, Application of semipreparative RP-18 HPLC for the purification of sesamin and sesamol. *J. Food Lipids* 8 (2001) 85-94.
- 55) J.C. Zhou, D.W. Feng, G.S. Zheng, Extraction of sesamin from sesame oil using macroporous resin. *J. Food Eng.* 100 (2010) 289-293.
- 56) M.V. Reshma, C. Balachandran, C. Arumughan, A. Sunderasan, D. Sukumaran, S. Thomas, S.S. Saritha, Extraction, separation and characterization of sesame oil lignan for nutraceutical applications. *Food Chem.* 120 (2010) 1041-1046.
- 57) X. Wang, Y. Lin, Y. Geng, F. Li, D. Wang, Preparative separation and purification of sesamin and sesamol from sesame seeds by high-speed counter-current chromatography. *Cereal Chem.* 86 (2009) 23-25.
- 58) M. Takahashi, Y. Nishizaki, K. Morimoto, N. Sugimoto, K. Sato, K. Inoue, Design of synthetic single reference standards for the simultaneous determination of sesamin, sesamol, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity. *J. Sep. Sci.* 1 (2008) 1-8.
- 59) M. Pervin, K. Unno, T. Ohishi, H. Tanabe, N. Miyoshi, Y. Nakamura, Beneficial effects of green tea catechins on neurodegenerative diseases. *Molecules* 23 (2018) E1297
- 60) H.L. Schmidt, A. Garcia, A. Martins, P.B. Mellocarpes, F.P. Carpes, Green tea supplementation produces better neuroprotective effects than red and black tea in Alzheimer-like rat model. *Food Res. Int.* 100 (2017) 442-448.
- 61) V.S. Rogovskii, S.V. Popov, N.V. Sturov, N.L. Shimanovskii, The possibility of preventive and therapeutic use of green tea catechins in prostate cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 9 (2019) 1223-1231.

- 62) A.W. El-Hattab, A.M. Zarante, M. Almannai, F. Scaglia, Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Mol. Gene.t Metab.* 122 (1998) 1-9.
- 63) D.R. Mangels, E.R. Mohler, Catechins as potential mediators of cardiovascular health. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (2017) 757-763.
- 64) M.H. Farzaei, R. Bahramsoltani, Z. Abbasabadi, N. Braidy, S.M. Nabavi, Role of green tea catechins in prevention of age-related cognitive decline: pharmacological targets and clinical perspective. *J. Cell Physiol.* 234 (2019) 2447-2459.
- 65) J.J. Dalluge, B.C. Nelson, Determination of tea catechins. *J. Chromatogr. A* 881 (1998) 411-424 .
- 66) T. Goto, Y. Yoshida, M. Kiso, H. Nagashima, Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *J. Chromatogr. A* 749 (1996) 295-299.
- 67) J.J. Dalluge, B.C. Nelson, J.B. Thomas, L.C. Sander, Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 265-274.
- 68) P. Šilarová, L. Česlová, M. Meloun, Fast gradient HPLC/MS separation of phenolics in green tea to monitor their degradation. *Food Chem.* 237 (2017) 471-480.
- 69) C. Qi, G. Tianyang, Y. Jian, L. Renyi, W. Peng, W. Qiong, J. Shaotong, D. Yiyang, Microwave-assisted extraction combined with ultra-high-performance liquid chromatography and quadrupole/q-exactive high-resolution mass spectrometry for the determination of main flavor substances in green tea. *J. AOAC. Int.* 103 (2020) 428-432.

## 謝辞

このような研究の機会を賜り，また本研究を遂行するにあたり終始懇切なる御指導，御鞭撻を賜りました 井之上浩一 教授に心より深く感謝いたします。

本論文に関し，懇切丁寧なご指導と御助言を頂きました国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 佐藤恭子 先生，杉本直樹 先生，西崎雄三 先生、増本直子 先生、石附京子 先生に深く感謝の意を表します。

2021年 3月  
高橋 未来