

## 博士論文要旨

### 論文題名：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

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

タカハシ ミキ

高橋 未来

既存添加物は、古くから日本で使用されている天然添加物であり、健康増進作用を持つ様々な成分が含まれている。そのため、これらの成分は既存添加物だけでなく、医薬品、健康食品やサプリメントとして広く利用されている。既存添加物に含まれる主成分を定量評価するために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた公定法では、信頼性のある高純度な標準品が不可欠である。しかしながら、高純度かつ低価格な標準品を、試薬メーカーから入手することは困難である。そこで、本研究では、既存添加物の主成分を正確に定量するために、相対モル感度 (RMS) によるシングルリファレンス (SR) を用いた HPLC 分析法の開発をすることとした。

まず、内部標準として用いる SR を流通品から選択 (または合成デザイン) し、定量 NMR 法 (qNMR) により絶対評価をする。その後、HPLC を用いて絶対検量線を作成し、SR に対する分析対象物質の傾きの比により RMS を算出する。それにより、分析対象物質の RMS に基づいて、HPLC クロマトグラム上のピーク面積比により、間接的に分析対象物質を定量することができる。本研究では、ベニコウジ黄色素中のキサントモナシン A および B (第 1 章)、ゴマ油不けん化物中のセサミン、セサモリン、エピセサミンおよびセサモールのゴマリグナン類 (第 2 章)、チャ抽出物中のカテキン、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カテキン類 (第 3 章) に対する SR-HPLC 定量法を開発し、既存添加物だけでなく食品や健康食品を用いて定量的な検討を試みた。

その結果、RMS に基づいた SR-HPLC 定量法により求めた定量値は、従来の絶対検量線と同等の値を示した。さらに、異なる分析条件 (分析カラムおよび移動相) においても、その再現性や精度は良好であった。以上より、本手法は分析対象物質の標準品を入手不可能な場合においても、簡便かつ信頼性の高い定量法であるため、既存添加物の試験法として期待できるといえる。

## Abstract of Doctoral Dissertation

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

Doctoral Program in Pharmacy  
Graduate School of Pharmacy  
Ritsumeikan University

タカハシ ミキ

TAKAHASHI Miki

Natural food additives have been used in Japan since long ago. They are elaborated with various chemicals that have useful, effective and biological activities for the medicine, health food, supplement and others. In order to evaluate main chemicals in natural food additives, high-pure references such as standards are needed for the official method based on high performance liquid chromatography (HPLC). However, it is difficult to obtain these pure and low-cost reference standards in common reagent's company. In this study, the useful and effective HPLC method was developed based on relative molar sensitivity (RMS) with single reference (SR) technique for the simultaneous determination of various chemicals regarding to food additives.

Firstly, SR standard for internal calibration is designed, found (or synthesized) and evaluated by proton quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR). Then, RMS values of targeted chemicals regarding to food additives are calculated by the slope ratio of accurate calibration curves between SR and analytes. Based on RMS values of targeted chemicals, the indirect concentration of analyte can be quantitated by these peaks in HPLC chromatogram. The SR-HPLC method was applied for the evaluation of xanthomonasin A and B in *Monascus* yellow colorant (chapter 1), sesamin, sesamol, episesamin and sesamol in sesame oil, health foods, and food additives (chapter 2), and catechins in tea samples (chapter 3).

As a result, the quantitative values obtained by SR-HPLC method with RMS were identical to standard absolute calibration. In addition, SR quantification of analyte was reproducible and accurate using different analytical conditions (analytical column and mobile phase). In conclusion, the SR-HPLC method could be used to analyze the main components and impurities substances in natural food additives for safety and quality assessment.