# LC-MS/MSを用いた醤油および植物性食品中のニコチアナミンの定量分析

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	山口,仁美
発行元	日本醸造協会
巻/号	108巻10号
掲載ページ	p. 716-723
発行年月	2013年10月

## 農林水産省農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat



# LC-MS/MS を用いた醤油および植物性食品中のニコチアナミンの定量分析

ニコチアナミンは高等植物に広く存在する非タンパク質構成アミノ酸である。近年、ニコチアナミンの抗高血圧作用が報告されており、食品に含まれるニコチアナミンの健康作用が期待され、様々な植物性食品における含量が報告されている。しかし、これまでの分析法には、醤油中ニコチアナミンを測定する上で問題があった。そこで、著者はマルチモード ODS カラムの Scherzo SW-C18 を用いる高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)による、醤油およびその他の植物性食品のニコチアナミン分析法を確立したので、解説いただいた。今回示した分析法は、複雑なマトリックス(夾雑成分)の中から、イオン性で高極性の微量な機能性成分を、汎用的な手法で選択的かつ高感度に分析することを可能にしたものであり、食品中の他の機能性成分や危害要因の分析に、今後、この手法を応用できるので、ご一読いただきたい。

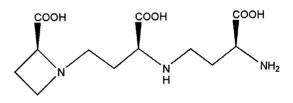
# 山口仁美

### はじめに

近年、食品研究は大きく発展し、従来の栄養(一次 機能), 嗜好性(二次機能)に加え, 生体調節機能 (三次機能) に関する研究が活発に行われている。食 品の生体調節機能に関する研究の成果は、生活習慣病 などの疾病リスク低減に貢献することが期待されてい る<sup>1)</sup>。また、食の安全・安心に対する社会的関心は依 然として高く、食品添加物、残留農薬やその他の有害 化学物質(危害要因)などが厳しく監視されており、 近年では加熱加工などの食品製造工程において、意図 せず生成する有害化学物質も注目されている<sup>2)</sup>。これ らの機能性研究や危害要因監視において、微量成分の 定量分析は不可欠の技術である。しかし、食品試料の 種類は非常に多く, 分析対象化合物も多数存在するが, 分析法が統一された例は少ない。実際の分析の際には, 多くの文献から何らかの方法を選択するか、新たな方 法を検討しているのが現状である。

食品の構成成分は多種多様であり、食品中微量成分 分析の際には、試料マトリックス(夾雑成分)による 妨害がしばしば問題となる。マトリックス存在下における目的成分の高感度で選択的な測定において、クロマトグラフィーと質量分析法を組み合わせた方法は大きな役割を果たしている。しかし、この方法を用いてもマトリックスの影響を完全に排除することは難しく、適切な前処理やその他の手法(標準添加法、内部標準法など)が欠かせない場合が多い。

今回は、食塩、糖、アミノ酸、有機酸のようなマトリックスを高濃度に含む醤油において、従来は分析が難しかった微量成分であるニコチアナミンを、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いて測定したので報告する。



Nicotianamine

第1図 ニコチアナミンの構造式

Determination of Nicotianamine in Soy Sauce and Other Plant-Based Foods by LC-MS/MS Hitomi Yamaguchi (Research and Development Division, Kikkoman Corporation)

# 1. ニコチアナミンの植物における存在意義と食品機能性への関与

ニコチアナミン(第1図)は非タンパク質構成アミノ酸である。1971年にタバコ葉より初めて単離され $^{3}$ 、その後、広く高等植物に存在していることが明らかとなり $^{45}$ 、近年では糸状菌からも検出された $^{6}$ 。金属イオンに対してキレート作用を示し、植物体内の金属輸送に必須な分子と考えられている $^{n}$ 。また、イネ、ムギ、トウモロコシなどのイネ科植物においては、ムギネ酸類(土壌中の鉄を可溶化して吸収するために、根から分泌されるキレート物質)の生合成中間体としても重要視されている $^{n}$ 。さらに、ニコチアナミン生合成を強化することにより種子中の鉄含有量を高めたイネが作出され、鉄欠乏性貧血症に対する効果が期待されている $^{8}$ 。

一方、近年ではニコチアナミンの抗高血圧作用が注 目されている。アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) は、アンジオテンシンIから血圧上昇作用を有するア ンジオテンシンⅡへの変換を促進する酵素であり、血 圧調節機構において重要な役割を果たしているが、ニ コチアナミンは ACE 阻害作用を示す <sup>9~11)</sup>。 さらに、 アンジオテンシンIによって誘導される血管収縮を阻 害し<sup>12)</sup>, ラット経口投与<sup>9,10,13)</sup>およびマウス胃内投与<sup>14)</sup> で血圧降下作用を示す。最近では、ラットの長期記憶 改善効果も報告されている 150。これらの結果から、食 品に含まれるニコチアナミンの健康作用が期待されて おり、様々な植物性食品における含有量が報告されて いる 15~19)。醤油においても、以前よりニコチアナミン の存在が報告されていたが 9,10), 分析が困難であった ため、正確な含有量は長い間不明であった。最近にな って. 醤油および醤油様大豆発酵調味料の各1検体に ついて、ニコチアナミン含有量が報告された(それぞ れ13 および133μg/mL)<sup>20)</sup>。この結果から、醤油はそ の種類によって、ニコチアナミン含有量がかなり異な っていることが予想された。そこで、各種醤油におけ るニコチアナミン含有量の調査を開始した。

#### 2. 従来のニコチアナミン分析法の問題点

ニコチアナミンはイオン性の高極性化合物であるため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で汎用される逆相カラム(ODS カラムなど)でほとんど保持さ

れない。そこで、これまでの HPLC 分析においては、 アミノ酸分析計 45.10,13) を使用するか、イオン交換クロ マトグラフィー、あるいは逆相イオンペアクロマトグ ラフィー(逆相カラムでイオンペア試薬を用いること によりイオン性化合物を保持・分離する手法) により ニコチアナミンを保持・分離した後に、オルトフタル アルデヒドを用いて蛍光誘導体化し検出する手法が用 いられてきた14.16~19.21.22)。この際、前処理として、イオ ン交換樹脂を用いてクリーンアップ(夾雑成分の除 去)を行う場合もある5,15~19)。また、あらかじめオル トフタルアルデヒドを用いてニコチアナミンを蛍光誘 導体化しておき、逆相カラムで保持・分離することも 行われる<sup>23)</sup>。最近では、ニコチアナミンの高感度測定 のため、9-フルオレニルメチルクロロホルメート 24~26) あるいは 6- アミノキノリル -N- ヒドロキシスクシンイ ミジルカルバメート 27.28)を用いて誘導体化した後に、 ODS カラムで保持・分離し質量分析計で検出する方法 が報告されている。誘導体化することなくニコチアナ ミンを測定した例としては、逆相イオンペアクロマト グラフィー 20)や、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC, 逆相では保持が小さく分離が困難な高極性化 合物の分析に有効な手法) 1529) で保持・分離, あるい はODSカラムにわずかに保持30)させた後に、質量分 析計で検出した報告がある。

しかし、これらの方法は、醤油中ニコチアナミンの 分析には適していない。醤油は食塩、アミノ酸 有機 酸などを多く含むため、イオン交換樹脂をクリーンア ップに用いるのは難しい。また、アミノ酸分析計を用 いたニコチアナミンの HPLC 分析は、醤油中の多量 のアミノ酸により妨害される。従って、醤油中のニコ チアナミンを, 前処理なしで分析するためには、液体 クロマトグラフィー - 質量分析法(LC-MS)に比べ てより選択性の高い LC-MS/MS が適していると考え られる。その際、ODSカラムを用いると、ニコチア ナミンはほとんど保持されずに溶出するが、醤油中の 食塩や他の極性化合物も同時に溶出し、定量が妨害さ れ、質量分析計にダメージを与える。ニコチアナミン を ODS カラムに保持させるために、イオンペア試薬 を用いた例200もあるが、イオンペア試薬がバックグ ラウンドとして分析装置内に残るという欠点がある。 また. ニコチアナミンは HILIC カラムに保持される が、HILIC- 質量分析法の検出限界は 0.6µg/mL<sup>29)</sup>とあ

まり高感度ではなく、醤油をそのまま分析試料とするには感度不十分と考えられる。なぜなら、醤油は、LC-MS(/MS)におけるマトリックス効果(マトリックスの影響で目的成分の感度が変動する現象)を回避するために、少なくとも100倍以上の希釈を必要とするが、ニコチアナミン含有量が13μg/mLの醤油を100倍希釈すると検出限界を下回るからである。また、ニコチアナミンの誘導体化を行う場合は、醤油の成分組成により誘導体化効率が変動する恐れがあるため、内部標準物質が必要であるが、適切な化合物(安定同位体標識ニコチアナミン)は現在のところ市販されていない。

以上のように, 既存の分析法では, 醤油中のニコチアナミンを測定するには問題が多いため, 新たな分析法を以下に検討した。

# 3. 醤油中ニコチアナミン分析に用いるカラムの 選択

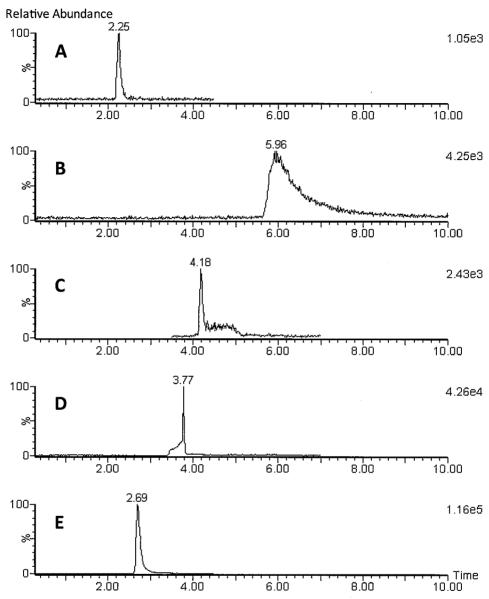
前述のように、ニコチアナミンはイオン性の高極性 化合物であるため、ODS カラムにほとんど保持され ない。そこで、ODS以外の4種類のカラムを検討し た。検討には HILIC カラムとして Unison UK-Amino (Imtakt) を、マルチモードODSカラムとして Scherzo SS-C18, SM-C18, SW-18 (Imtakt) を使用 した。これら3種のマルチモードODSカラムは、 ODS リガンドに加え、アニオンリガンドとカチオン リガンドが導入されており、それぞれ異なるイオン交 換能を有している。ODSカラム (CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG Ⅱ, 資生堂) と上記 4 種のカラムを用いて, ニコチアナミン標準液を LC-MS/MS で分析した場合 の代表的なクロマトグラムを第2図に示した。ニコチ アナミンは ODS カラムではほとんど保持されなかっ た。UK-Amino, SS-C18, SM-C18 においては保持さ れたが、いずれもピーク形状が悪く、定量の再現性も 低かった。SW-C18 においては、ニコチアナミンは ODSよりはやや強く保持され、また他の3種に比べ ると弱く保持されており、ピーク形状、定量の再現性 ともに良好であった。また、他のカラムと比較して高 い感度が得られたため、クリーンアップを行わず、醤 油を高倍率で希釈して LC-MS/MS に導入することが 可能となった。さらに、SW-C18ではODSカラムと 異なり、食塩が Na<sup>+</sup>と Cl<sup>-</sup>に分かれて保持され、ニコ チアナミンより後に溶出した。以上の結果より、醤油 中ニコチアナミン分析には Scherzo SW-C18 を用いる こととした。

## 4. 醤油中ニコチアナミン分析法の確立

初めに、第1表の測定条件により、ニコチアナミン標準液を用いて検量線を作成した。検量線は0.5~100ng/mLの範囲で直線性を示した( $r^2$ =0.9996, n=6)。ニコチアナミンの保持時間は2.68~2.70分の範囲内(平均2.69分,相対標準偏差(RSD)は0.20%)であった。シグナルノイズ比(S/N)に基づき,検出限界を0.5ng/mL(S/N は定量トランジションで10 および確認トランジションで3)、定量下限を1.0ng/mL(同15 および5)と設定した。今回得られた検出限界と定量下限は、最近報告されたニコチアナミン高感度測定法(それぞれ0.48ng/mL と1.0ng/mL)2610 に匹敵する。定量トランジションのピーク面積に対する確認トランジションの相対強度は299%(RSD は5.09%)であり、この結果から相対強度の許容範囲を292 ± 7%と設定した。

ニコチアナミンは弱酸性以上の pH で金属キレート 剤として働くことが知られている  $^{7}$ 。そこで,LC-MS/MS 注入試料に共存する金属イオン( $Fe^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Cu^{2+}$ )の影響を,ニコチアナミン標準液を用いて調べた。その結果,金属イオンの非存在下および存在下でニコチアナミンのピーク面積に違いは見られず,測定への影響はないことが示された。

食品試料の分析においては、しばしばマトリックス 効果(多くの場合、イオン化促進による感度上昇)が 観察されたため、絶対検量線法は用いなかった。内部 標準法を実施するためには、内部標準物質が必要であるが、適切な化合物(安定同位体標識ニコチアナミン)の入手は現在のところ難しい。そこで、標準添加法を採用した。すなわち、未知試料に既知濃度の標準ニコチアナミンを添加して検量線の系列を用意し、測定結果をプロットして標準添加検量線を作成し、未知試料のニコチアナミン濃度を定量した。その際、標準添加検量線の直線性(r²>0.995)、および無添加試料における確認トランジションの相対強度(29±7%以内)を確認した。ニコチアナミン標準液を用いて標準添加法を行い、検出限界と定量下限をそれぞれ 0.5ng/mL および 1.0ng/mL に設定した。第3図は実



第2図 異なる種類のカラムを用いて得られた標準ニコチアナミンの SRM クロマトグラム (m/z) 304 → 185) の比較

試料における標準添加検量線の例であり、いずれも良好な直線性を示した。

実試料を用いて、ニコチアナミンの添加回収試験を 実施した。醬油(サンプル A、ニコチアナミン添加 量は 5、10、 $20\mu g/g$ )、トマトジュース(サンプル A、 同  $10\mu g/g$ ), 豆乳 (サンプル A, 同  $40\mu g/g$ ) を用いた。1 日に 3 回, および 3 日間で 6 回の繰り返し測定において, 添加回収率は  $97\sim103\%$  (RSD は  $2.3\sim9.5\%$ ), および  $92\sim106\%$  (RSD は  $6.4\sim9.9\%$ ) であり,良好な結果が得られた。

### 第1表 LC-MS/MS によるニコチアナミンの測定条件

LC-MS/MS 装置:Acquity UPLC/Quattro micro API(Waters) カラム:Scherzo SW-C18 150mm × 3mm i.d., 3um (Imtakt)

カラム温度:35℃ 流速:0.3mL/min

移動相 A:0.01% (v/v) 酢酸-水

移動相 B: 150 mmol/L 酢酸アンモニウム - 水 / アセトニトリル(30:70) グラジエント:0-10 min, 0-100%B; 10-25min, 100% B; 25.1-40min, 0%B

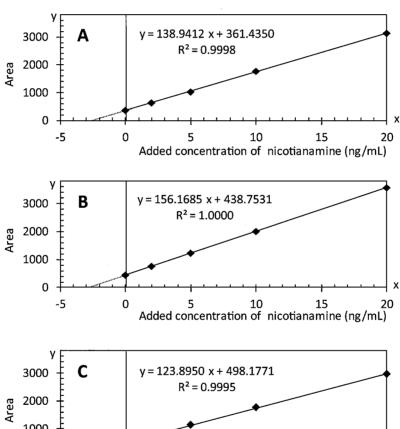
サンプル希釈溶媒: 0.1% (v/v) 酢酸-水

注入量:5μL

イオン化: ESI positive

SRM トランジション:定量: m/z 304 → 185, 確認: m/z 304 → 114

SRM: selected reaction monitoring.



R<sup>2</sup> = 0.9995

1000

0

5

1000

1000

Added concentration of nicotianamine (ng/mL)

第3図 標準添加検量線の例

(A) こいくち醤油 A, (B) トマトジュース A, (C) 豆乳 A。x 切片の絶対値が, LC-MS/MS 注入試料中のニコチアナミン濃度である。

第2表 異なる分析法によるニコチアナミン測定結果の比較

	LC-MS/MS <sup>a</sup>			アミノ酸分析計り		
試料	ニコチアナミン (μg/g)	RSD (%)	n	ニコチアナミン (μg/g)	RSD (%)	n
トマトジュース A	14	4.3	7	14	1.2	3
ニンジンジュース	7.1	6.2	3	7.7	1.7	3
リンゴジュース A	1.1	1.6	3	1.3	3.8	3
ブドウジュース A	3.6	6.3	3	4.4	3.7	3
パイナップルジュース A	3.5	7.9	3	3.4	0.9	3
モモジュース	9.5	10.1	3	11	3.5	3
豆乳 A	79	5.0	7	78	1.0	3

<sup>&</sup>quot;第1表の方法。

 $^{6}$ L-8900 アミノ酸分析計(日立ハイテクノロジーズ),生体液分析条件。ニコチアナミンの検出限界 (S/N が 3 を示す濃度)は  $0.3\mu g/mL$  であった。醤油の場合は多量のバリン(こいくち醤油での含有量は約 3.4mg/g)がニコチアナミンの前に溶出し,測定の妨害となった。

いくつかの食品試料について、今回の分析法で得られた測定結果を、アミノ酸分析計によるものと比較したところ、両者はよく一致していた(第2表)。以上のことから、今回のニコチアナミン分析法は適切に確立されていることが示された。

# 5. 醤油およびその他の植物性食品のニコチアナミン含有量の測定

市販の醤油、野菜ジュース、果物ジュース、豆乳、 ペットボトル茶飲料のニコチアナミン分析結果を第3 表に示した。こいくち醤油、減塩醤油、うすくち醤油 (いずれも大豆と小麦の原料配合比はほぼ同等) のニ コチアナミン含有量は, 6.0~54μg/g であり, 今回調 **査した食品のなかでも高い部類に属していた。いくつ** かのこいくち醤油の分析値は既報 9,10,20) に類似してい た。また、たまり醤油(大豆が主原料)では  $71\mu g/g$ , しろ醤油(小麦が主原料)では0.31µg/gであり、大 豆タンパク質酸加水分解液から作られた化学醤油にお いては、ニコチアナミンは検出されなかった。ニコチ アナミンは大豆に高濃度に含まれており10,18)、小麦か らは検出されないことが報告されている<sup>10)</sup>。また. 大豆タンパク質は、その製造工程でニコチアナミンを 含む水溶性画分が除去されている。よって、醤油中ニ コチアナミン含有量は、原料における含有量をある程 度反映しているものと推測された。

今回得られたトマトジュースと豆乳のニコチアナミン分析結果は、既報<sup>15,16)</sup>に類似していた。今回調査した食品のなかでは、ニコチアナミン含有量は豆乳で最も高く、次に多くの醤油とトマトジュースで高かった。また、ペットボトル茶飲料などにおける低濃度のニコ

チアナミン含有量も測定することができ,再現性も良好であった。

#### おわりに

植物における重要な金属キレート剤として知られており、近年、抗高血圧作用についても注目されているニコチアナミンについて、マルチモード ODS カラムを用いた LC-MS/MS による新たな高感度分析法を確立した。本方法においては、誘導体化試薬、イオンペア試薬、クリーンアップ操作のいずれも不要である。これにより、食塩、糖、アミノ酸、有機酸のようなマトリックスを高濃度に含む醤油において、従来は分析が難しかったイオン性の高極性微量成分であるニコチアナミンを、簡便に分析することが可能となった。この方法を用いて、食品の健康作用を明らかにするという観点から、醤油やその他の植物性食品のニコチアナミン含有量を調査した。醤油のニコチアナミン含有量はその種類によって異なっており、最大で71μg/mLとかなり高い値であった。

醤油の1人1日当たりの摂取量は17.5gであり<sup>31)</sup>, 醤油から摂取するニコチアナミン量だけでは、抗高血 圧作用を期待するには不十分だと考えられる。しかし、 豆乳、トマトジュースなどにもニコチアナミンが高濃 度に含まれていた。よって、様々な食品のニコチアナ ミン含有量を測定することは、食事全体から摂取され るニコチアナミンの、抗高血圧作用やその他の健康作 用への寄与を明らかにするうえで有用だと考えられる。 また、今回、醤油において示した分析法は、複雑なマ トリックスの中から、イオン性で高極性の微量な機能 性成分を、汎用的な手法で選択的かつ高感度に分析す

第3表 植物性食品のニコチアナミン含有量

		ニコチアナミン	RSD	
		(μg/g)	(%)	n
こいくち醤油	Α	13	5.4	7
	В	6.0	8.1	3
	С	19	3.4	3
	D	30	2.3	3
	Ε	18	4.2	3
	F	25	5.5	3
	G	22	10.7	3
	Η	18	7.9	3
	Ι	48	5.1	3
	J	54	5.3	3
減塩醤油	Α	17	6.9	3
	В	23	2.8	3
	С	25	8.4	3
うすくち醤油	Α	17	5.6	3
	В	13	8.9	3
	С	8.9	9.1	3
	D	17	7.9	3
	Ε	10	2.3	3
たまり醤油		71	9.4	3
しろ醤油		0.31	10.3	3
大豆タンパク質酸加水分解液から作られた化学醤油		< 0.25	-	3
トマトジュース	Α	14	4.3	7
	В	18	2.3	3
	С	14	5.4	3
ニンジンジュース		7.1	6.2	3
リンゴジュース	Α	1.1	1.6	3
	В	1.2	8.5	3
ブドウジュース	Α	3.6	6.3	3
	В	4.6	8.3	3
パイナップルジュース	Α	3.5	7.9	3
	В	4.3	7.7	3
グレープフルーツジュース		2.4	8.1	3
ピンクグレープフルーツジュース		1.9	6.8	3
オレンジジュース		0.40	12.5	3
温州ミカンジュース		0.59	5.1	3
モモジュース		9.5	10.1	3
豆乳	Α	79	5.0	7
	В	84	3.0	3
	С	77	5.3	3
ペットボトル緑茶		0.25	5.3	3
ペットボトルウーロン茶		0.18	1.2	3
ペットボトル紅茶		0.69	4.9	3_

RSD: relative standard deviation.

ることを可能にしたものである。今後この手法を応用 し、食品中の他の機能性成分や危害要因の分析を行っ ていきたいと考えている。

なお, 本稿は, 拙稿 [dx.doi.org/10.1021/jf3035868 ¦ J. Agric. Food Chem., 2012, 60 (40), 10000 -10006] をもとに執筆したものである。

〈キッコーマン(株)研究開発〉

# 文 献

1) 文部科学省:科学技術·学術審議会 資源調査

分科会 (第19回) 配付資料 参考資料 5 「平成20年度新たな健康の維持増進に関わる食品成分等に対するニーズ調査 成果報告書」(平成21年3月)

http://www.mext.go.jp/b\_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/shiryo/attach/1287304.htm 2013.6.1 アクセス

2) 農林水産省:「有害化学物質含有実態調査 結 果データ集 (平成 15 ~ 22 年度)」(平成 24 年 10 月)

http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk\_

- analysis/survei/pdf/chem15-22.pdf 2013.6.1 アクセス
- 3) M. Noma, M. Noguchi and E. Tamaki: *Tetra-hedron Lett.*, 22, 2017-2020 (1971)
- 4) M. Noma and M. Noguchi: *Phytochemistry*, 15, 1701 1702 (1976)
- A. Rudolph, R. Becker, G. Scholz, Ž. Procházka,
   J. Toman, T. Macek and V. Herout : Biochem. Physiol. Pflanz., 180, 557-563 (1985)
- A. Trampczynska, C. Böttcher and S. Clemens: FEBS Lett., 580, 3173-3178 (2006)
- C. Curie, G. Cassin, D. Couch, F. Divol, K. Higuchi, M. Le Jean, J. Misson, A. Schikora, P. Czernic and S. Mari: Ann. Bot., 103, 1-11 (2009)
- J. I. Schroeder, E. Delhaize, W. B. Frommer, M. L. Guerinot, M. J. Harrison, L. Herrera-Estrella, T. Horie, L. V. Kochian, R. Munns,; N. K. Nishizawa, Y.-F. Tsay and D. Sanders: *Nature*, 497, 60-66 (2013)
- 9) E. Kinoshita, J. Yamakoshi and M. Kikuchi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1107-1110 (1993)
- 10) 木下恵美子, 山越 純, 菊地 護: 醸協, 89, 126-130 (1994)
- 11) A. Hayashi and K. Kimoto: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 53, 331-336 (2007)
- A. Hayashi and K. Kimoto : J. Nutr. Sci. Vitaminol., 56, 242-246 (2010)
- 13) T. Takenaka, T. Murayama, T. Furusho and Y. Takenaka: *Food Sci. Technol. Res.*, 15, 541-546 (2009)
- 14) 林あつみ,中山知子,村上和雄,青柳康夫,木 元幸一:日本栄養・食糧学会誌,58,315-321 (2005)
- 15) 高田 晃:浦上財団研究報告書 2011, 18, 24-30 (2011)
- 16) 林あつみ,中山知子,青柳康夫,木元幸一:食料工,52,154-159(2005)
- 17) 伊澤華子, 青柳康夫: 食科工, 53, 459-465 (2006)

- 18) 伊澤華子, 吉田 望, 白貝紀江, 青柳康夫: 食 科工, 55, 253-257 (2008)
- 19) 伊澤華子, 青柳康夫: 食科工, 59, 348-353 (2012)
- 20) T. Nakahara, A. Sano, H. Yamaguchi, K. Sugimoto, H. Chikata, E. Kinoshita and R. Uchida: J. Agric. Food Chem., 58, 821-827 (2010)
- 21) S. Shojima, N. K. Nishizawa and S. Mori: *Plant Cell Physiol.*, 30, 673-677 (1989)
- 22) G. Neumann, C. Haake and V. Römheld: *J. Plant Nutr.*, 22, 1389-1402 (1999)
- 23) M. Le Jean, A. Schikora, S. Mari, J. F. Briat and C. Curie: *Plant J.*, 44, 769-782 (2005)
- 24) Y. Wada, I. Yamaguchi, M. Takahashi, H. Nakanishi, S. Mori and N. K. Nishizawa : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 435-441 (2007)
- Y. Kakei, I. Yamaguchi, T. Kobayashi, M. Takahashi, H. Nakanishi, T. Yamakawa and N. K. Nishizawa: *Plant Cell Physiol.*, 50, 1988-1993 (2009)
- 26) H. Schmidt, C. Böttcher, A. Trampczynska and S. Clemens: *Anal. Bioanal. Chem.*, 399, 1355-1361 (2011)
- D. L. Callahan, S. D. Kolev, R. A. J. O'Hair, D.
   E. Salt and A. J. M. Baker: New Phytol., 176, 836-848 (2007)
- 28) A. A. T. Johnson, B. Kyriacou, D. L. Callahan, L. Carruthers, J. Stangoulis, E. Lombi and M. Tester: *PLoS ONE*, 6, e24476 DOI: 10.1371/journal.pone.0024476 (2011)
- 29) Y. Xuan, E. B. Scheuermann, A. R. Meda, H. Hayen, N. von Wirén and G. Weber: *J. Chromatogr.*, A, 1136, 73-81 (2006)
- M. Tsednee, Y.-W. Mak, Y.-R. Chen and K.-C.
   Yeh: New Phytol., 195, 951-961 (2012)
- 31) 厚生労働省: 国民健康・栄養調査(平成18年) http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou08/dl/02-01.pdf 2013.6.1 アクセス