研究ノート

¹H-NMR メタボローム解析を用いた玄米米糠麴の品質評価

堀江裕紀子¹, 根本英幸^{1*}, 藤田 仁¹, 池川繁男², 熊木康裕^{3,4},
大西裕季³, 久米田博之^{3,4}, 出村 誠^{3,4}, 相沢智康^{3,4}

¹ 株式会社コーケン

² 株式会社玄米酵素

³ 北海道大学生命科学院

⁴ 北海道大学・GI-CoRE ソフトマター GS

Studies on the Quality Control of Fermented Brown Rice and Rice Bran with *Aspergillus oryzae* by Metabolome Analysis Using ¹H-NMR

Yukiko Horie¹, Hideyuki Nemoto^{1*}, Jin Fujita¹, Shigeo Ikegawa², Yasuhiro Kumaki^{3,4},
Yuki Ohnishi³, Hiroyuki Kumeta^{3,4}, Makoto Demura^{3,4} and Tomoyasu Aizawa^{3,4}

¹ Koken Co., Ltd., Nakagoya 329, Tobetsu-Cho, Ishikari, Hokkaido 061-0211

² Genmai Koso Co., Ltd., Kita 12, Nishi 1, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 001-0012

³ Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Kita 10, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0808

⁴ Global Station for Soft Matter, Global Inst. for Collaborative Research and Education,
Hokkaido University, Kita 10, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0808

Fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA) is a processed food prepared from brown rice and rice bran. Although FBRA α -amylase activity is monitored as an indicator of fermentation, the evaluation of FBRA quality remains insufficient. We non-targetedly compared metabolite profiles in accepted FBRA, defective FBRA, and unfermented materials using ¹H-NMR coupled with principal component analysis (PCA). Accepted FBRA was clearly separated from defective FBRA and unfermented materials. We also compared twenty-five accepted FBRA samples, where PCA showed that plotting of accepted FBRA results in dispersion that is unbiased toward different production dates and different fermentation apparatuses. These results indicated that accepted FBRA is manufactured with a consistent quality. (Received May 14, 2018; Accepted Nov. 29, 2018)

Keywords : ¹H-NMR, metabolomics analysis, FBRA, *Aspergillus oryzae*, quality control

キーワード : ¹H-NMR, メタボローム解析, 玄米米糠麴, 麴菌, 品質評価

玄米米糠麴 (Fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae*: FBRA) は、玄米と米糠を黄麹菌によって発酵させ、玄米の乏しい消化能の改善と米糠に豊富に含まれる栄養成分の手軽な摂取を可能とした栄養補助食品である。これまで FBRA は、ラットやマウスなどの実験動物や培養細胞レベルで、抗発がん作用^{1)~10)}、プレバイオティクス作用¹¹⁾、抗炎症作用^{12)~14)} など多様な作用を有することが示されている。これらの多様な機能性は、FBRA の原料である糠や胚芽に由来する成分に加えて、黄麹菌による発酵によって生産される新規の成分が複合的に作用しているものと考えられている。しかし、FBRA の機能性に関連した含有成分は未だ充分明らかにされていない^{15)~17)}。固体培

養における発酵の適否は麹菌の破精込み (種付けした麹菌の胞子が発芽繁殖して米粒の中心部に菌糸が生育して行く程度) によって判断される。しかしながら、米粒の中心部に菌糸が生育した破精込みにおける菌体量の測定は容易ではない。Oda らは米麴の菌体量と、菌体外に分泌される α -アミラーゼ活性値が比例することを示している¹⁸⁾ ことから、これまで FBRA は食品の一般検査の他に黄麹菌が分泌する α -アミラーゼ活性を発酵の指標として用いられてきた。しかし、FBRA は農産物原料を固体発酵しているため含有成分のばらつきが懸念され、科学的な品質の安定性評価が必要である。

近年、網羅的解析法の進歩発展により、ガスクロマトグ

¹ 〒061-0211 北海道石狩郡当別町中小屋 329, ² 〒001-0012 札幌市北区北 12 条西 1-1-7, ³ 〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8

⁴ 〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8

*連絡先 (Corresponding author), nemoto@genmaikoso.co.jp

ラフィー (GC)-質量分析法 (MS), 液体クロマトグラフィー (LC)-MS, キャピラリー電気泳動 (CE)-MS, 核磁気共鳴 (NMR) 法などによるメタボローム解析が食品の真正評価や品質管理に幅広く利用されている。なかでも NMR 法は必ずしも成分同定を必要とせず, スペクトルデータ全体を使ったプロファイリングから試料の特性を区別できるという利点を有し, 品質評価法として威力を発揮している^{19)~20)}。

そこで今回, ¹H-NMR によるメタボローム解析法の利点に着目し, 本法を用いて FBRA の品質を評価した。

1. 実験方法

(1) 試料と試薬

¹H-NMR 測定用試料として, 未発酵原料は米糠 (品種不分別) と玄米 (北海道産なつぼし, または北海道産きらら 397) を 9:1 の重量比で混ぜ合わせた試料を 5 検体用いた。FBRA は上述の試料と黄麹菌 (樋口松之助商店製) で 5 台の発酵機を用いて岩崎らの発酵法²¹⁾ を改良した方法で発酵した。品質基準の適合品として, α -アミラーゼ活性が 3000 Units/g 以上の FBRA を発酵機毎に 5 検体, 合計 25 検体用いた。また, α -アミラーゼ活性が 2500 Units/g 以下を示した不適合品として, 2 号機から 2 検体, 5 号機から 1 検体, 計 3 検体を採取し用いた。FBRA の α -アミラーゼ活性は国税庁の所定分析法²²⁾ にしたがって測定した。NMR 測定用の重水 (99.90%D) および内部標準物質としての 3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (DSS) はユーリソトップ製を用いた。リン酸緩衝溶液調製用のリン酸水素二ナトリウム十二水和物および無水リン酸二水素ナトリウムは和光純薬工業製を用いた。

(2) 未発酵原料と FBRA の抽出成分の ¹H-NMR 測定および主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA)

i) 試料の調製

試料は -80℃ のフリーザーにて保存し, 抽出直前に室温に戻してから使用した。抽出溶媒は, 重水で調製した内部標準 DSS (1.0 mM) を予め含むリン酸緩衝溶液 (0.1 M, pH = 6.9) を用いた。抽出は, 粉末試料約 100 mg にリン酸緩衝溶液 (1.0 mL) を加えて 30 分間 4℃ で高速振とう器 CM-1000 型 (EYELA 製, 1800 rpm) で振とうして行った。試料の抽出液を 10 分間遠心分離 (18000×g, 4℃) し, その上清 600 μ L を NMR 試料管 (ϕ 5 mm) に封入した。

ii) ¹H-NMR 測定とそのデータ化および PCA

NMR 装置は AVANCE III HD 600 (Bruker 製, 600 MHz) を用い, パルスシーケンスをシングルパルス法 (フリップ角 45°) として DANTE 事前飽和により水の信号を抑制した。データ取り込み時間は 1.45 秒, 緩和待ち時間は 5.0 秒, 観測幅は 15 ppm (11.26 KHz), 積算回数 64 回および 25℃ で ¹H-NMR を測定した。得られた ¹H-NMR スペクトルは 0 ppm から 10 ppm の範囲を 0.04 ppm 毎に 250 のバケット

に分割し, そのうち 4.68 ppm から 4.88 ppm の領域を除く 245 のバケットについて積分を行った。バケット積分値は DSS のピーク (0 ppm) を 1 として規格化した。こうして得られたバケット積分値に対して Pareto スケーリングを行った後に PCA を行った。その結果スコアプロットにおいて明確なクラスター形成が見られた場合には, 顕著なローディングスコアを示したバケットに対してターゲットプロファイリングにより化合物の同定と定量を行った。バケット積分とターゲットプロファイリングには Chenomx NMR Suite Professional (ver. 8.3, Chenomx 製), PCA には SIMCA (ver. 14.0, Umetrix 製) を用いた。

2. 実験結果および考察

(1) 未発酵原料と FBRA 適合品の PCA

FBRA は玄米と米糠の混合物を黄麹菌で発酵させて生産される。このため, 発酵によって生産されるコウジ酸などの代謝物や各種加水分解酵素の作用を受けて生成する低分子化合物が原料成分とは大きく異なるものと考えられる。そこで, 未発酵原料 5 検体と FBRA 25 検体より調製した試料溶液の ¹H-NMR スペクトルを測定し, PCA を行った (図 1a)。その結果, 未発酵原料と FBRA は第 1 主成分で明確な 2 つのクラスターに分かれた。PCA のローディングプロット (図 1b) の第 1 主成分の正の方向に最も大きく寄与するバケットは 3.82 ppm であり, スクロース由来のプロトンシグナルであると同定された。同様に, 負の方向に寄与するバケットは 3.62 ppm および 3.78 ppm であり, グリセロール由来のプロトンシグナルであると同定された。Chenomx NMR Suite Professional を使用して定量した値を表 1 に示した。¹H-NMR スペクトルでも, 未発酵原料 (図 1c) にはスクロースが, FBRA (図 1d) にはグリセロールのシグナルが確認された。コメはデンプンを貯蔵物質としているが, 植物は光合成の産物としてスクロースを合成することが知られている。黄麹菌はエネルギーとして消費しやすいスクロースをデンプンに先んじて消費することから, 未発酵原料に多く含まれ, 発酵することにより減少すると考えられる。一方, 黄麹菌が生産するリパーゼは米糠に含まれる中性脂肪を分解してグリセロールを遊離する。これらが未発酵原料と FBRA を異なるクラスターに分ける最大の要因となっているものと考えられた。

(2) FBRA の適合品と不適合品の PCA

α -アミラーゼ活性が 3000 Units/g 以上の FBRA 適合品 (25 検体) と 2500 Units/g 以下の FBRA 不適合品 (3 検体) の ¹H-NMR スペクトルを用いて PCA を行った (図 2a)。PCA では第 1 主成分の寄与率は 72.6% で, 第 1 主成分により FBRA の適合品と不適合品が明確な異なるクラスターを形成することが示された。さらに, ローディングプロット (図 2b) では第 1 主成分の正方向に最も寄与するプロトンシグナル (3.70, 3.74, 3.82, 3.86 ppm) はグルコース由来のシグナルであり, アノマー位のプロトンシグナル

(4.62, 4.66, 5.22 ppm) も正の方向に寄与していた。バケット積分値では他成分との重なりが考えられるが、Chenomx NMR Suite Professional でのピーク分離と同定により、グルコース由来のシグナルが寄与していることが明確に確認された。負の方向に寄与するシグナル (1.26, 1.30 ppm) は脂質由来のシグナルであった。Chenomx NMR Suite Professional によるグルコースの定量結果を表 2 に示した。グルコースの寄与が大きいことが示されたので、 ^1H -NMR スペクトルでも、FBRA 適合品 (図 2c) と FBRA 不適合品 (図 2d) を他成分のシグナルが重ならないグルコースに由来するアノマー位のプロトンシグナルや、3.44 ppm 付近のシグナルで簡易に評価できることが示された。一般に黄麹菌の発酵不良の一因として、グルコースの蓄積による α -アミラーゼの発現抑制 (カタボライトリプレッション) が知られている²³⁾。 α -アミラーゼ活性が低かった FBRA は発酵中に何らかの理由でグルコースが多い環境を生じた結果、発現が抑制されたものと推察される。また、FBRA 適合品には脂質が多く検出されることがわかり、これらが主要要因となってクラスターが分かれたものと推測され、FBRA の適合品と不適合品は明確に区別する

ことが可能であることがわかった。

(3) 発酵機別の FBRA の PCA

次に、FBRA の適合品で PCA を行った。FBRA は製麴の工程を自動化した発酵機を用いて製造されているが、生産工程の条件が各発酵機によって僅かに異なるものと思われる。このため、異なる発酵機によって生産される FBRA は α -アミラーゼ活性が適合基準に到達しても、その含有成分には差を生じる可能性がある。そこで、FBRA25 検体の ^1H -NMR スペクトルを PCA で発酵機別に評価した (図 3)。その結果、第 1 主成分と第 2 主成分で全体の 71.7% を示し、発酵機によって明確なクラスター形成は認められなかった。これらの結果は、発酵機による生産条件の違いは

表 1 未発酵原料および FBRA に含まれるスクロースとグリセロールの定量結果

	未発酵原料 (mM)	FBRA (mM)
スクロース	49.22 $\pm$ 4.51	ND
グリセロール	14.79 $\pm$ 5.09	76.05 $\pm$ 10.71

* ND: 不検出 (mean $\pm$ SD)

図 1 未発酵原料と FBRA の PCA と ^1H -NMR スペクトル

a 未発酵原料と FBRA の ^1H -NMR スペクトルによる PCA スコアプロット

b PCA ローディングプロット

黒はスクロース、グレーはグリセロール由来のプロットを示した。数値はプロットの化学シフトを示した。

図 1 (続き)

c 未発酵原料の代表的な ^1H -NMR スペクトルの拡大図 (3.15-5.60 ppm) 矢印はスクロースの帰属であり、構成糖のグルコースとフルクトース (') を示した。

d FBRA の代表的な ^1H -NMR スペクトルの拡大図 (3.15-5.60 ppm) 矢印はグリセロールの帰属を示した。

FBRA の成分プロファイルには大きな影響を与えることは少ないことを示したものと考えられる。

(4) 製造日別の FBRA 適合品の PCA

米糠や玄米に含まれている成分は、原材料である稲の品種、産地、収穫時期や保存状態によって質的・量的に異なる²⁴⁾²⁵⁾。さらに原料の米糠は品種を分別していないため、FBRA の品質は製造した日に用いられる米糠や玄米の品質に依存して変化する可能性がある。そこで、最終製品である FBRA の成分プロファイルが原料成分によって影響

される可能性を検証するため、先に解析した FBRA 25 検体の PCA を製造日ごとにプロットし直した (図 4)。その結果、製造日 C にのみ他とは異なるクラスターを形成する傾向が見られたものの、年間を通して明確なクラスターは認められなかった。これらの結果は、発酵原料である糠や玄米の保存条件や保存期間は FBRA の含有成分に大きな影響を与えることは少ないことを示しているものと考えられる。

(5) まとめ

FBRA の品質を評価する手法の一つとして、 ^1H -NMR によるメタボローム解析を行った。 ^1H -NMR によって得られたシグナルパターンを用いた PCA により、FBRA は発酵の原材料や不適合品とは明確な識別が可能である事が示唆され、その識別に関与する成分も明らかにされた。また、FBRA 成分は発酵機や製造日による成分の変化は ^1H -NMR によっても識別できず、均質であることが示された。 ^1H -NMR によるノンターゲット分析によって、FBRA がある一定の品質で製造されていることを示した。

表 2 適合品および不適合品におけるグルコースの定量結果

	適合品 (mM)	不適合品 (mM)
グルコース	14.96 ± 3.69	47.72 ± 16.69
(mean $\pm$ SD)		

a

b

図 2 FBRA 適合品と不適合品の PCA と ^1H -NMR スペクトルa FBRA 適合品と不適合品の ^1H -NMR スペクトルによる PCA スコアプロット

b PCA ローディングプロット

黒はグルコース、グレーは脂質由来のプロットを示した。数値は寄与の高いグルコース由来の化学シフトとアノマー位の化学シフトを示した。

c

d

図 2 (続き)

c FBRA 適合品の代表的な ^1H -NMR スペクトルの拡大図 (3.15–5.60 ppm)

矢印はグルコースの帰属を示した.

d FBRA 不適合品の代表的な ^1H -NMR スペクトルの拡大図 (3.15–5.60 ppm)

矢印はグルコースの帰属を示した.

図 3 発酵機別にみた FBRA の PCA スコアプロット

図 4 製造時期別にみた FBRA の PCA スコアプロット

本研究を遂行するにあたり、北海道大学先端 NMR ファシリティに仲介の労をとって頂きました北海道大学大学院保健科学研究院の神繁樹博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Katayama, M., Yoshimi, N., Yamada, Y., Sakata, K., Kuno, T., Yoshida, K., Qiao, Z., Vihn, P.Q., Iwasaki, T., Kobayashi, H., and Mori, H. (2002). Preventive effect of fermented brown rice and rice bran against colon carcinogenesis in male F344 rats. *Oncol. Rep.*, **9**, 817-822.
- 2) Katayama, M., Sugie, S., Yoshimi, N., Yamada, Y., Sakata, K., Qiao, Z., Iwasaki, T., Kobayashi, H., and Mori, H. (2003). Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on diethylnitrosoamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Oncol. Rep.*, **10**, 875-880.
- 3) Kuno, T., Hirose, Y., Hata, K., Kato, K., Qiang, S.H., Kitaori, N., Hara, A., Iwasaki, T., Yoshimura, T., Wada, K., Kobayashi, H., and Mori, H. (2004). Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on *N*-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats. *Int. J. Oncol.*, **25**, 1809-1815.
- 4) Kuno, T., Hirose, Y., Yamada, Y., Hata, K., Qiang, S.H., Asano, N., Oyama, T., Zhi, H., Iwasaki, T., Kobayashi, H., and Mori, H. (2006). Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by fermented brown rice and rice bran. *Oncol. Rep.*, **15**, 533-538.
- 5) Long, N.K., Makita, H., Yamashita, T., Toida, M., Kato, K., Hatakeyama, D., and Shibata, T. (2007). Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats. *Oncol. Rep.*, **17**, 879-885.
- 6) Tomita, H., Kuno, T., Yamada, Y., Oyama, T., Asano, N., Miyazaki, Y., Baba, S., Taguchi, A., Hara, A., Iwasaki, T., Kobayashi, H., and Mori, H. (2008). Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Oncol. Rep.*, **19**, 11-15.
- 7) Phutthaphadoong, S., Yamada, Y., Hirata, A., Tomita, H., Taguchi, A., Hara, A., Limtrakul, P.N., Iwasaki, T., Kobayashi, H., and Mori, H. (2009). Chemopreventive effects of fermented brown rice and rice bran against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Oncol. Rep.*, **21**, 321-327.
- 8) Phutthaphadoong, S., Yamada, Y., Hirata, A., Tomita, H., Hara, A., Limtrakul, P., Iwasaki, T., Kobayashi, H., and Mori, H.

- H. (2010). Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran (FBRA) on the inflammation-related colorectal carcinogenesis in ApcMin/+mice. *Oncol. Rep.*, **23**, 53–59.
- 9) Itoh, M., Nishibori, N., Sagara, T., Horie, Y., Motojima, A., and Morita, K. (2012). Extract of fermented brown rice induces apoptosis of human colorectal tumor cells by activating mitochondrial pathway. *Phytother. Res.*, **26**, 1661–1666.
- 10) Horie, Y., Nemoto, H., Itoh, M., Kosaka, H., and Morita, K. (2016). Fermented brown rice extract causes apoptotic death of human acute lymphoblastic leukemia cells via death receptor pathway. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **178**, 1599–1611.
- 11) Kataoka, K., Kibe, R., Kuwahara, T., Hagiwara, M., Arimochi, H., Iwasaki, T., Benno, Y., and Ohnishi, Y. (2007). Modifying effects of fermented brown rice on fecal microbiota in rats. *Anaerobe*, **13**, 220–227.
- 12) Kataoka, K., Ogasa, S., Kuwahara, T., Bando, Y., Hagiwara, M., Arimochi, H., Nakanishi, S., Iwasaki, T., and Ohnishi, Y. (2008). Inhibitory effects of fermented brown rice on induction of acute colitis by dextran sulfate sodium in rats. *Dig. Dis. Sci.*, **53**, 1601–1608.
- 13) Shibata, T., Nagayasu, H., Kitajo, H., Arisue, M., Yamashita, T., Hatakeyama, D., Iwasaki, T., and Kobayashi, H. (2006). Inhibitory effects of fermented brown rice and rice bran on the development of acute hepatitis in long-evans cinnamon rats. *Oncol. Rep.*, **15**, 869–874.
- 14) Onuma, K., Kanda, Y., Suzuki Ikeda, S., Sakaki, R., Nonomura, T., Kobayashi, M., Osaki, M., Shikanai, M., Kobayashi, H., and Okada, F. (2015). Fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae* (FBRA) prevents inflammation-related carcinogenesis in mice, through inhibition of inflammatory cell infiltration. *Nutr.*, **7**, 10237–10250.
- 15) Ogawa, S., Takafuji, K., Tsubuku, S., Horie, Y., Ikegawa, S., and Higashi, T. (2017). Isotope-coded derivatization based LC/ESI-MS/MS methods using a pair of novel reagents for quantification of hydroxycinnamic acids and hydroxybenzoic acids in fermented brown rice product. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **142**, 162–170.
- 16) Tanaka, K., Horie, Y., Nemoto, H., Kosaka, H., Jo, M., and Tezuka, T. (2017). Analysis of volatile constituents in fermented brown rice and rice bran by *Aspergillus oryzae* (FBRA). *J. Computer Aided Chem.*, **18**, 42–45.
- 17) Tanaka, K., Horie, Y., Nemoto, H., Kosaka, H., Jo, M., and Tezuka, T. (2017). Analysis of water-soluble constituents in fermented brown rice and rice bran by *Aspergillus oryzae* (FBRA). *J. Computer Aided Chem.*, **18**, 46–50.
- 18) Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., and Iwashta, K. (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *aspergillus oryzae* under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3448–3457.
- 19) Matsumoto, T., Anjiki, N., Arifuku, K., Kawahara, N., and Goda, Y. (2011). Metabolome analysis of setsucha (*thamnia vermicularis* ach.) products based on ¹H-NMR spectroscopy. *Jpn. J. Food Chem. Soc. (Nihon Syokuhinkagaku kaishi)*, **18**, 43–47 (松本輝樹, 安食菜穂子, 有福利和, 川原信夫, 合田幸広. 雪茶製品の¹H NMR メタボローム解析, 日本食品化学学会誌).
- 20) Sumitani, H., Sasai, M., and Ootsuka, T. (2014). Potential of food quality evolution by NMR-based metabolomics analysis. *Toyo Institute of Food Technol. (Toyo Syokuhin Kenkyujo Kenkyu Houkokusho)*, **30**, 27–30 (隅谷栄伸, 笹井実佐, 大塚貴子. NMR メタボローム解析手法による食品品質評価の可能性, 東洋食品研究所研究報告書).
- 21) 岩崎輝明 (2006). 未失活酵素強化組成物, 特許第 4132635 号, 10 月 24 日.
- 22) 五味勝也 (1993). 211 固体こうじ, 「第四回改正国税庁所定分析法注解」 第四回改正版, 注解編集委員会, (財団) 日本醸造協会, pp. 218–221.
- 23) Kato, M., Sekine, K., and Tsukagoshi, N. (1996). Sequence-specific binding sites in the taka-amylase A G2 promoter for the creA repressor mediating carbon catabolite repression. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1776–1779.
- 24) Hirayama, O. and Matsuda, H. (1973). Lipid components and distribution in brown rice. *Nihon Nogeikagaku kaishi*, **47**, 371–377 (平山 修, 松田英幸. 米の脂質成分と組織内分布, 農芸化学会誌).
- 25) Fukai, Y. and Karasawa, H. (1997). Investigation of changes in fatty acids contents of rice during storage by HPLC using 9-anthryldiazomethane. *Nihon shokuhinhouzokagaku kaishi*, **23**, 9–14 (深井洋一, 唐沢秀行. 高速液体クロマトグラフィー (9-アンスリルジアゾメタン化) による米貯蔵中の遊離脂肪酸の変化, 日本食品保蔵科学会誌).

(平成 30 年 5 月 14 日受付, 平成 30 年 11 月 29 日受理)