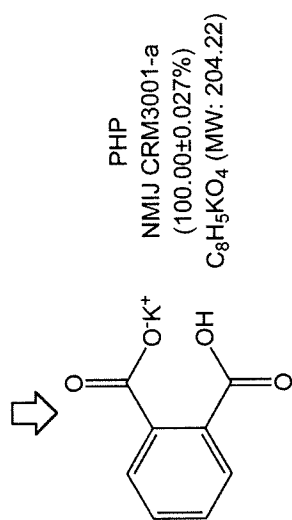


International System of Units (SI)



Step 1 ↓ Calibration using qNMR

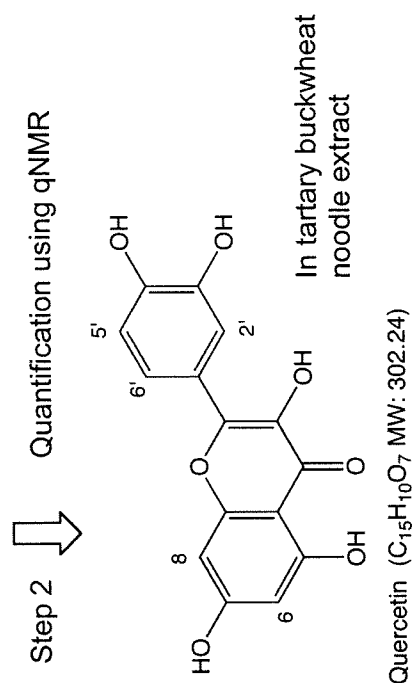
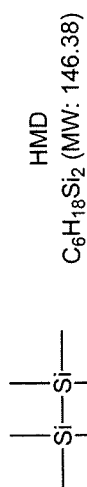


Fig.2 Strategy of SI-traceable absolute quantification based on qNMR.

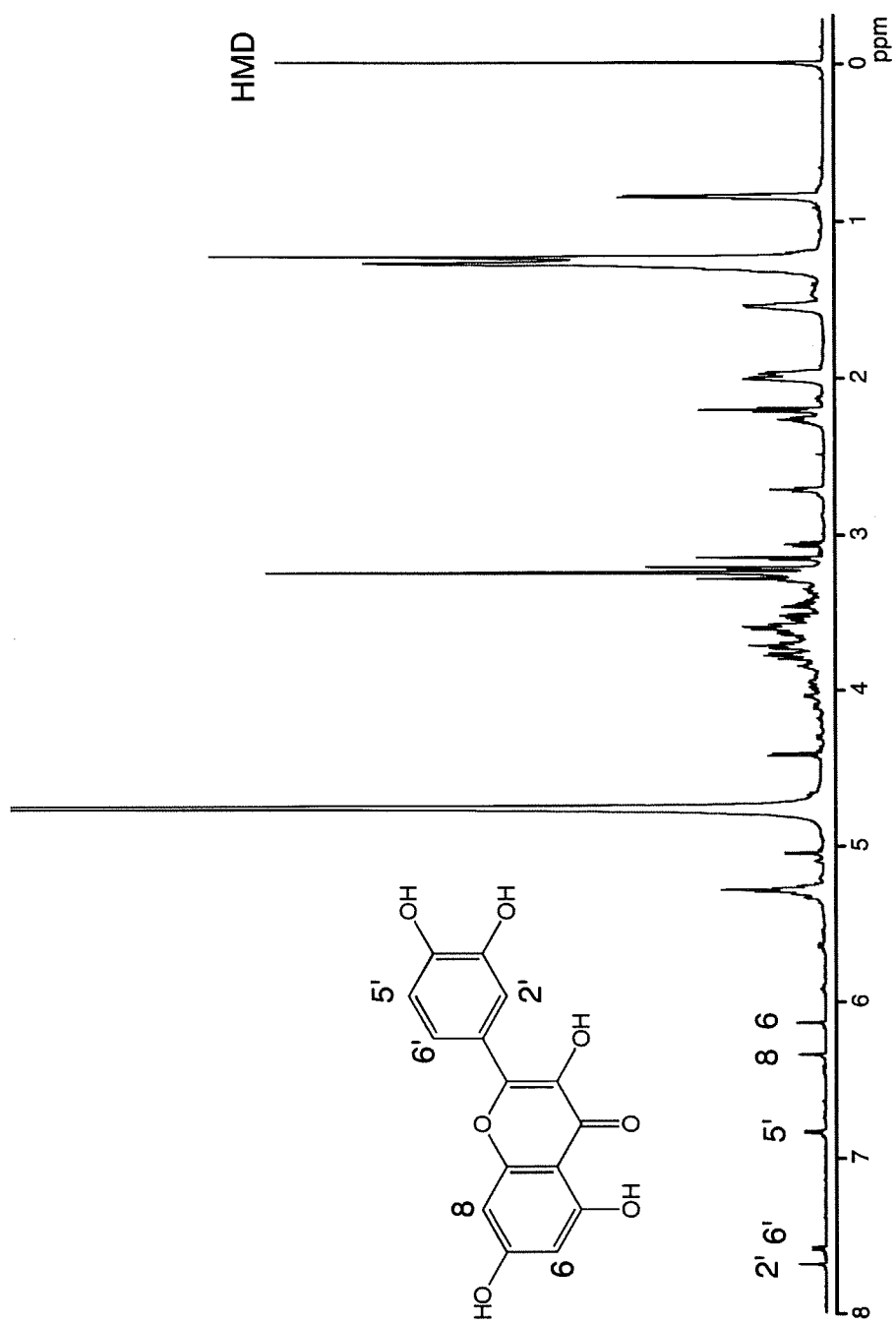


Fig. 3 ¹H NMR spectra of tartary buckwheat noodle extract. The ¹H chemical shift were shown as the δ scale in ppm, relative to HMD (hexamethylidisilane) ($\delta = 0.00$ ppm).

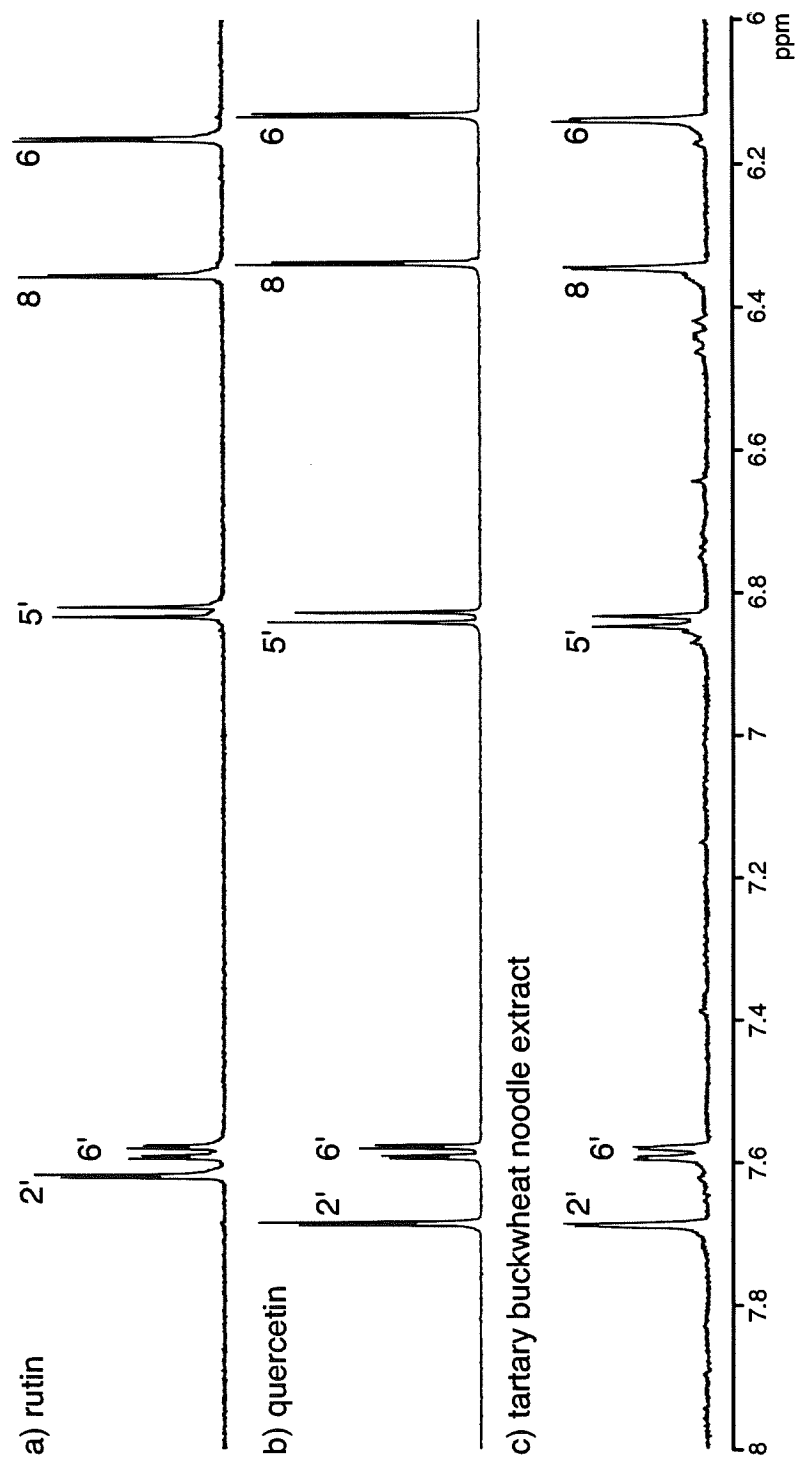


Fig. 4 qNMR spectra of rutin, quercetin and tartary buckwheat noodle extract. a) rutin (quercetin 3-O- β -rutinoside ($C_{27}H_{30}O_{16}$, MW: 610.52)), b) quercetin, c) tartary buckwheat noodle extract. The ¹H chemical shift were shown as the δ scale in ppm, relative to HMD (hexamethyldisilane) ($\delta = 0.00$ ppm). The signals at δ 7.70 ppm and δ 0.00 ppm were used as the target and reference signals for the quantification.

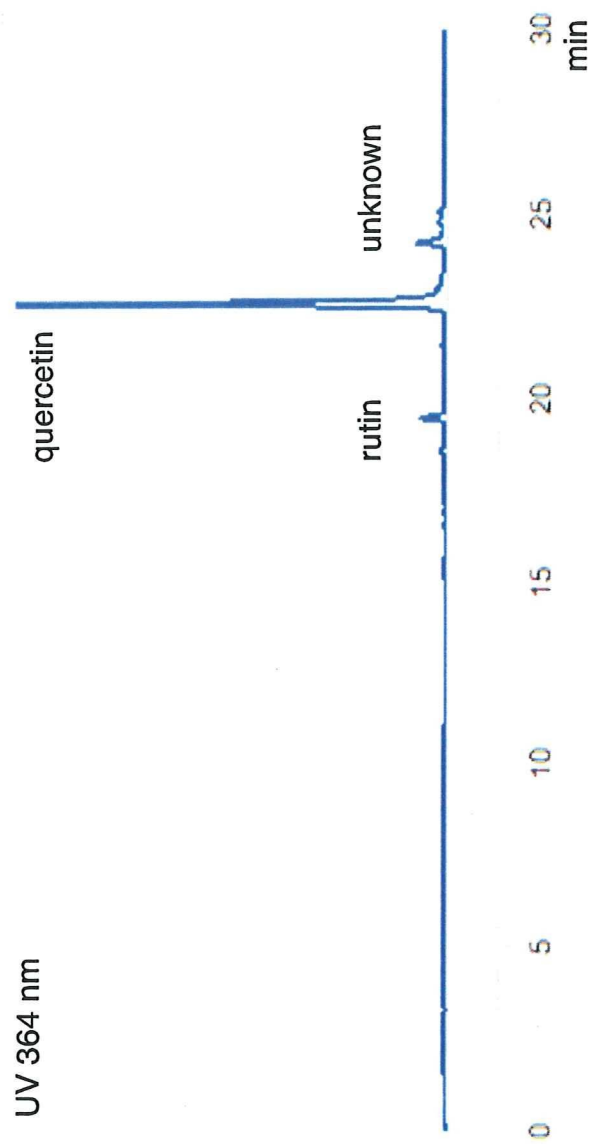


Fig. 5 LC profile of methanol extract from tartary buckwheat noodle LC conditions are described in the experimental section.

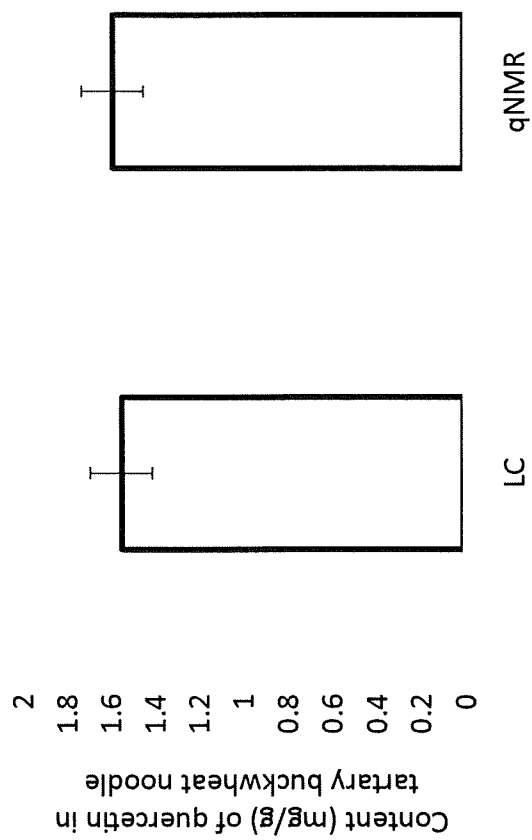


Fig. 6 Comparison of the quantitative values obtained by LC and qNMR. LC quantification was carried out using the absolute calibration method, and the purity of quercetin reagent as reference was corrected to 92.8% by qNMR. Error bar means SD (n = 3).

Table 1. Instruments and acquisition parameters

Spectrometer	JNM-ECA (600 MHz) (JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	- 5 - 15 ppm
Data points	32000
Auto filter	On (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s ($>5 \cdot T_1$)
Scan	8 times
Sample spin	No spin
Probe temperature	30 °C
Solvent	Methanol- d_4
qNMR reference material	HMD
Primary standard material	Potassium hydrogen phthalate (PHP) (NMIJ CRM3001a)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発

平成 21 年度分担研究報告書

定量 NMR 法による既存添加物の定量に関する研究

— 定量 NMR によるクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量 —

研究分担者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

研究協力者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部 第三室長

研究協力者 高橋加奈 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨 本研究では定量 NMR (quantitative NMR: qNMR) の応用例として、既存添加物ルチン（抽出物）、ルチン酵素分解物およびクエルセチンの各原体製品中のルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチン、さらにこれら化合物の市販試薬について、絶対定量を行った。qNMR 基準物質として、今回新たに、計量学的に正確に値付けられた 1,4-ビストリメチルシリルベンゼン- d_4 (1,4-BTMSB- d_4) を用い、そのメチル基と測定化合物の各 2' 位のプロトンシグナルとの面積比から含量を算出し、迅速かつ簡便な 1 段階の qNMR 測定を行った。市販試薬および添加物製品の定量値は 77.3 %~98.2 % であり、相対標準偏差は 0.02 %~1.1 % と良好であった。以上の結果、qNMR により、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンを、HPLC などの分離操作を行うことなく、かつ、測定化合物と同一の標準品を参照せずに定量できることを見出した。

A. 研究目的

天然由来の既存添加物には、クエルセチンおよびクエルセチン配糖体を含有する種々の品目がある。この内、既存添加物クエルセチンはクエルセチンを主成分とし、既存添加物ルチン（抽出物）および既存添加物ルチン酵素分解物は、それぞれクエルセチン配糖体のルチンおよびイソクエルシトリンを主成分とする品目で、いずれも酸化防止剤として用いられる。既存添加物ルチン（抽出物）およびルチン酵素分解物は、それぞれ既存添加物名簿¹⁾において、「アズキの全草、エンジュのつぼみ若しくは花又はソバの全草から得られた、ルチン(rutin)を主成分とするものをいう」および「ルチン（抽出物）から得られた、イソクエルシトリン(isoquercitrin)を主成分とするものをいう」と定義されており、ルチン酵素分解物およびルチン（抽出物）の内、実際に市場で流通している「エンジュ抽出物」のみが、食品添加物公定書

に記載されている²⁾。現在、食品添加物公定書では、これらの品目のルチンおよびイソクエルシトリンの定量法として、それぞれ定量用ルチンを用いた HPLC ピーク面積からの算出法、および定量用ルチンとの吸光度比からの算出法が規定されている。一方、既存添加物クエルセチンは、食品添加物公定書には未記載であり、業界の自主規格³⁾にのみ収載されており、クエルセチンの定量法として、酢酸試液添加後の吸光度による算出法が規定されている。これらの方法は、実用的には問題なく品質規格試験として十分有用な方法であると考えられるものの、各化合物の絶対量の算出が必要とされる場合には、いくつかの課題がある。例えば、ルチンとイソクエルシトリンの定量用標準品として用いられる定量用ルチンには、計量学的に正確な純度を値付けられた定量用標準品は市場に流通していないため、ルチン 3 水和物として各社がそれぞれに HPLC の面積百分率等から純

度付けした市販試薬が用いられる。よって、HPLC で検出できない不純物は純度値に反映されないため、各社製品の純度値にはばらつきが予想される。またルチン同様、イソクエルシトリンおよびクエルセチンについても定量用標準品を用いた HPLC 等での定量法の採用が期待されるが、イソクエルシトリン市販試薬には不純物としてクエルセチンを含んでいるものが、また、クエルセチン試薬には X 水和物として市販されているものがあり、純度値に信頼性がなく、正確な純度を値付けられた定量用標準品は市場に流通していない。

そこで本研究では、これらクエルセチンおよびその配糖体の絶対量を求める新たな方法として、NMRを用いた定量法(quantitative NMR (qNMR))^{4~9)}の応用を試みた。現在、我々は、国際単位系(SI)に基づく計量トレーサビリティが確保された新たな絶対定量分析法の一つとして、qNMRの開発を行っている。qNMRは、純度値が明らかな他の化合物を基準物質(内標準物質)とし、あらゆる測定対象の有機化合物の純度あるいは含量を迅速に求めることが可能な方法であり、個々の測定対象の化合物の定量用標準品を必要としない絶対定量法である。

本研究では、qNMRの更なる応用範囲の拡充を目的に、天然由来の既存添加物ルチン(抽出物)、ルチン酵素分解物およびクエルセチンにそれぞれ含有される化合物、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの含量(純度)測定を行うと共に、これら3種の化合物の市販試薬製品の含量(純度)測定を行った。その結果、qNMRにより、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの定量値を、分離操作を行うことなく、個別に、かつ測定対象の化合物と同一の標準品を必要とせずに、計量学的に正確に求められることを見出した。

B. 研究方法

B-1. 試料および試薬

ルチン三水和物市販試薬 7 製品(試料 1~

7)、イソクエルシトリン市販試薬 3 製品(試料 12~14)およびクエルセチン水和物市販試薬 4 製品(試料 17~20)は各試薬メーカーより購入したものをを用いた。既存添加物ルチン(抽出物) 4 製品(試料 8~11)、既存添加物ルチン酵素分解物 2 製品(試料 15, 16)および既存添加物クエルセチン 2 製品(試料 21, 22)は、日本食品添加物協会より供与していただいたものをを用いた。なお、試料 1~22 の付帯情報を Table 1 に示した。

有機溶媒可溶の qNMR 基準物質として、(独)産業技術総合研究所により SI トレーサブルな分析法により特性値(純度)付けされた 1,4-BTMSB- d_4 標準物質 (1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_4) (和光純薬工業(株), Cods No. 021-16441, Lot. 081204: 純度 99.8%±0.2%)を用いた。qNMR 測定用重溶媒として重メタノール (methanol- d_4) (Isotec 製)を用いた。高純度フタル酸ジエチル(diethyl phthalate: DEP) (認証標準物質 (certified reference material: CRM) (品番 NMIJ CRM 4022-b: 純度 99.98%±0.09%)は(独)産業技術総合研究所製を用いた。

B-2. 装置

各種分析データの取得には、以下の機器を用いた。

核磁気共鳴装置(NMR): オートサンプラー付き JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子(株)製)。qNMR のケミカルシフト値は、methanol- d_4 のプロトンシグナルを基準シグナル(3.30 ppm)とし、 δ 値を ppm 単位で表した。

B-3. qNMR による分析

B-3-a. qNMR 標準液調製

1,4-BTMSB- d_4 約 20 mg を精密に量り取り、methanol- d_4 100 mL に定容し、qNMR 標準液とした。qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB- d_4 の濃度を、1,4-BTMSB- d_4 の精確な秤量値と予め値付けさ

れた SI トレーサブルな純度 (99.8%±0.2%) から算出した。

B-3-b. qNMRによる市販試薬および既存添加物製品の純度測定

ルチン三水和物市販試薬, イソクエルシトリン市販試薬, 既存添加物ルチン (抽出物), および既存添加物ルチン酵素分解物はそれぞれ約 20 mg を精密に量り取り, 予め調製した qNMR 用標準液 2.0 mL に溶解した。クエルセチン市販試薬, 既存添加物クエルセチンはそれぞれ約 20 mg を精密に量り取り, 予め調製した qNMR 用標準液 4.0 mL に溶解した。これらの各溶液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し, 1,4-BTMSB- d_4 のプロトンシグナル強度面積, クエルセチンまたはクエルセチン配糖体由来するそれぞれの特定プロトンシグナルの相対強度面積, 分子量, 濃度等を式(1)に代入し, 市販試薬および既存添加物製品のクエルセチンまたはクエルセチン配糖体 (QG) 純度 (含量) (w/w%) を算出した。

$$P_{QG} = \frac{I_{QG} / H_{QG}}{I_{BTMSB} / H_{BTMSB}} \times \frac{M_{QG} / W_{QG}}{M_{BTMSB} / W_{BTMSB}} \times 100$$

- (1)

ただし, W_{BTMSB} , W_{QG} = BTMSB- d_4 および QG の濃度 (mg/mL), M_{BTMSB} , M_{QG} = 1,4-BTMSB- d_4 および QG の分子量 (1,4-BTMSB- d_4 = $C_{12}H_{18}D_4Si_2$ (MW 226.50), rutin (as anhydrate) = $C_{27}H_{30}O_{16}$ (MW 610.52), isoquercitrin = $C_{21}H_{20}O_{12}$ (MW 464.38) および quercetin (as anhydrate) = $C_{15}H_{10}O_7$ (MW 302.24)), I_{BTMSB} , I_{QG} = BTMSB- d_4 および QG の特定基のシグナル強度面積, H_{BTMSB} , H_{QG} = 1,4-BTMSB- d_4 および QG の特定基のプロトン数 (1,4-BTMSB- d_4 = $CH_3 \times 6$, QG = $PhH \times 1$), P_{QG} = QG の純度 (含量) (w/w%)。

B-3-c. qNMR 測定条件および解析処理

qNMR 測定条件の基本情報は Table 2 に示した。得られた FID データは, フーリエ変換 (Window 関数: exponential function BF = 0.12

Hz, zero filling = 1, trapezoidal function T1 = T2 = 0, T3 = 90, T4 = 100) および自動位相調整を行い, 1,4-BTMSB- d_4 および特定シグナルの積分値を求め, 1,4-BTMSB- d_4 およびクエルセチンまたはクエルセチン配糖体 (QG) の濃度 (mg/mL), 分子量, 特定基のプロトン数等の化合物情報と共に式(1)に代入し, 純度 (含量) (w/w%) を算出した。本研究では, フーリエ変換から純度 (含量) (w/w%) の算出までを自動処理できる定量解析ソフトウェア (日本電子 (株) 開発中) を用いてデータの解析を行った。

C. 結果及び考察

C-1. 定量用シグナルの選別

qNMR による定量分析では, 各シグナル面積の定量性を厳密に確保することが不可欠であるため, 既報^{8,9)}に従い, Table 2 に示す測定条件を設定した。また, 計量学的に正確に値付けられた qNMR 基準物質が存在しなかったため, 既報^{7,8)}では, 2段階方式による SI トレーサビリティの確保を余儀なくされていたが, 今回の研究では Fig. 1 に示す 1段階方式を実現した。すなわち, 有機溶媒に可溶性な 1,4-BTMSB- d_4 について計量学的に正確に値付けを行ったものを qNMR 基準物質として新たに用いた。このことによって, 1,4-BTMSB- d_4 を一次標準として測定対象化合物の qNMR 測定を行う 1段階方式が実現され, qNMR の利便性が大幅に拡張した。なお, 今回の研究では, 得られる分析値の信頼性の確保を念頭に置き, 測定用に調製した qNMR 標準液については, 計量学的に妥当な手順によって値付けされ, 計量学的トレーサビリティが保証された認証標準物質 (CRM) の一つである DEP を用い, 1,4-BTMSB- d_4 濃度を随時確認して⁸⁾使用した。

Fig. 2 には, qNMR 基準物質として 1,4-BTMSB- d_4 を 0.1943 mg/mL 含む qNMR 標準液に試薬ルチン三水和物 (試料 1) (Fig. 2, A, a), 試薬イソクエルシトリン (試料 12) (Fig. 2, B, b) およびクエルセチン二水和物 (試料 19)

(Fig. 2, C, c) を, それぞれ 16.02 mg/mL, 15.34 mg/mL, 7.79 mg/mL 溶解した場合のスペクトルを例として示した. δ 0.23 ppm に 1,4-BTMSB- d_4 のメチル基が観察された. qNMR の定量用シグナルとしては, シグナルが十分に分離していること, 他の不純物のシグナルと重ならないことが要求される. そこで, 3種の化合物のアグリコンであるクエルセチン部分のプロトンシグナルのシフト値を比較したところ, 6, 8, 5' および 6' 位とのシグナルは, それぞれ, δ 6.14 ppm, δ 6.36 ppm, δ 6.86 ppm, δ 7.61 ppm に検出され, いずれも 3種の化合物で相互に重なった. B環 2' 位のプロトンのみは, 3種の化合物でそれぞれシフト値が異なり, 分離操作を行うことなく別々に検出できたため, この 2' 位のシグナル, すなわち, ルチンは 7.64 ppm, イソクエルシトリンは 7.68 ppm, クエルセチンは 7.71 ppm のシグナルを定量用シグナルとし, qNMR 基準物質の 1,4-BTMSB- d_4 とのシグナル面積比を測定し, 式(1)に代入して定量値を求めた.

C-2. qNMR によるルチン, イソクエルシトリンおよびクエルセチンの定量精度の確認
qNMR において, 試料濃度と試料中に含まれる測定対象化合物の qNMR 定量値との間に直線関係が成り立つことは, 既に報告¹⁰⁾されているが, 本研究においても, 内標準物質である qNMR 基準物質を一定濃度にした時に, 両者の間に直線関係が成り立つかを確認した. ルチン, イソクエルシトリンおよびクエルセチンそれぞれの試薬を用い, 今回の qNMR 測定濃度領域における定量精度を調べた. Fig. 3 の(A)および(B)に, 試薬ルチン三水和物(試料 1) および試薬イソクエルシトリン(試料 12)を, それぞれ今回の測定濃度領域の 5~15 mg/mL で定量した結果を(試料調製 n=2), Fig. 3 の(C)には, クエルセチン二水和物(試料 19)を 2.5~7.5 mg/mL で定量した結果(試料調製 n=2)を示した. 横軸には qNMR 標準液 1 mL に対して秤

量した試薬量を mg で示し, 縦軸には qNMR により算出したルチン(三水和物換算), イソクエルシトリンおよびクエルセチン(二水和物換算)の 1 mL 当たりの各定量値を mg で示した. その結果, 試料の秤量値と qNMR による定量値との間に高い相関があることが確認された. すなわち, 試薬に一定の割合で含まれているルチン, イソクエルシトリンおよびクエルセチンの絶対量と qNMR の定量値が非常に精度良く求められることが明らかとなった. したがって, 今回の測定濃度領域において, qNMR により, 測定対象化合物ごとの定量用標準品および検量線を必要とすることなく, qNMR 基準物質 1,4-BTMSB- d_4 を内部標準とした 1 点濃度のみの測定で精度よく定量できることが示された.

C-3. qNMR によるルチン, イソクエルシトリンおよびクエルセチンの絶対定量

Table 3, Table 4 および Table 5 に, それぞれルチン, イソクエルシトリンおよびクエルセチンの定量結果を, 3回の試料調製の平均で示した. 試薬ルチン三水和物 7 製品は無水物純度として 71.0%~90.2% \pm 0.05%~1.0% および三水和物純度として 77.3%~98.2% \pm 0.06%~1.1%, 試薬イソクエルシトリン 3 製品は 80.1%~94.8% \pm 0.1%~0.7%, および試薬クエルセチン 4 製品は, クエルセチン無水物純度として 86.0%~92.9% \pm 0.02%~1.0%であった. 既存添加物製品を qNMR で測定した結果, ルチン(抽出物) 4 製品のルチンの純度は無水物として 86.6%~89.0% \pm 0.2%~0.7% および三水和物として 94.3%~96.9% \pm 0.2%~0.8%, ルチン酵素分解物 2 製品のイソクエルシトリンの純度は 85.4% \pm 0.3% および 87.9% \pm 0.4%, クエルセチン 2 製品のクエルセチンの純度は無水物として 87.3% \pm 0.5% および 88.3% \pm 0.9%であった. 既存添加物試料の相対標準偏差は 0.2%~1.0%と良好であり, これらの既存添加物試料の定量に対しても qNMR が十分に適用可能であることが示された.

D. 結論

以上本研究では、我々が開発を行っている定量 NMR (quantitative NMR: qNMR) の応用例として、既存添加物ルチン (抽出物)、ルチン酵素分解物およびクエルセチン原体中の、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの絶対定量を行うと共に、これら 3 種の市販試薬製品について絶対定量を行った。qNMR 基準物質として、SI トレーサブルな分析法により純度付けされた 1,4-ビストリメチルシリルベンゼン- d_4 (1,4-BTMSB- d_4) を用い、基準物質のメチル基と、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの各 2' 位のプロトンシグナル面積比より、含量または純度を算出した。市販試薬試料および既存添加物試料の定量値はそれぞれ 77.3 %~98.2 % および 85.4 %~96.9 %、相対標準偏差はそれぞれ 0.02 %~1.1 % および 0.2 %~1.0 % と良好であった。以上の結果、qNMR により、ルチン、イソクエルシトリンおよびクエルセチンの定量値を、分離操作を行うことなく個別に、かつ測定対象の化合物と同一の標準品を必要とせずに、計量学的に正確に求められることを見出した。1,4-BTMSB- d_4 を用いることによって、1 段階の qNMR 測定で迅速かつ簡便な絶対定量を可能とした。qNMR は、既存添加物中の各種成分の絶対定量法、あるいは各定量用標準品の正確な純度測定法だけでなく、定量性を伴った参照スペクトルとしても非常に有用な方法と考えられる。

E. 参考文献

- 1) 厚生省告示第 120 号 “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日 (1996)
- 2) 厚生労働省 “第 8 版食品添加物公定書” (2007)。
- 3) 日本食品添加物協会技術委員会自主規格専門委員会編 “第 4 版既存添加物自主規格” 東京、日本食品添加物協会 (2008)。
- 4) Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A.,

Maeda, T. Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis. *Metrologia*, **41**, 213-218 (2004).

- 5) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K.: Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of the oxyethylene group contents of polysorbates. *Food Add. Contam.*, **24**, 799-806 (2007).
- 6) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hirai, T.: A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
- 7) Ihara, T., Saito, T., Sugimoto, N.: Expansion of organic reference materials for the analysis of hazardous substances in foods and environments. -Realization of an efficient metrological traceability using the quantitative NMR method-. *Synthesiology*, **2**, 12-22 (2009).
- 8) Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, A., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamonoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Nihon Shokuhin Kagaku Kaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, **16**, 28-33 (2009).
- 9) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Ito, S., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T. Absolute quantification of carminic acid in

cochineal extract by quantitative NMR. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.), 51, 19-27 (2010).

- 10) Malz, F., Jancke, H. Validation of quantitative NMR. J. Pharmaceut. Biomed., 38, 813-823 (2005).

F. 研究発表

1. 論文発表

多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎 壮, 河村葉子, 定量 NMR に基づく既存添加物中のクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量, 食品衛生学雑誌, 2010 投稿中.

2. 学会発表

- 1) 多田敦子, 杉本直樹, 石附京子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 山崎 壮, 西村哲治, 棚元憲一, 河村葉子, NMRによる 既存添加物中の quercetin配糖体の定量, 日本食品化学学会第15回学術大会, 2009. 5 (東京)

- 2) Atsuko TADA, Naoki SUGIMOTO, Kana TAKAHASHI, Kyoko ISHIZUKI, Takako SUEMATSU, Kazunori ARIFUKU, Takeshi SAITO, Toshihide IHARA, Yuuichi YOSHIDA, Takeshi YAMAZAKI, Tetsuji NISHIMURA, Yoko KAWAMURA, Determination of the contents of quercetin glycosides in natural food additives by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy, AOACインターナショナル第123会年会, 2009. 9 (フィラデルフィア)

Table 1. Sample information of quercetin and quercetin glycosides reagents, and natural food additives

No.	Sample Type	Manufacturer
Rutin trihydrate		
1	Reagent (3H ₂ O)	Tokyo Chemical Industry, CAT No. R 035, Lot. AL02
2	Reagent (3H ₂ O)	Tokyo Chemical Industry, CAT No. R0035, Lot. SDLXE
3	Reagent (3H ₂ O)	*MPBiomedicals, CAT No. 102824, Lot. 5744E
4	Reagent (3H ₂ O)	*Alfa Aesar, CAT No. A13670, Lot. 10138396
5	Reagent (3H ₂ O)	**Alexis Biochemicals, CAT No. 460-028, Lot. L20108
6	Reagent (3H ₂ O)	***Sigma, CAT No. 84082, Lot. 1339877
7	Reagent (3H ₂ O)	***Fluka, CAT No. 78095, Lot. 1380505
Rutin(extract)		
8	Food additive	Company A
9	Food additive	Company B Lot. 1
10	Food additive	Company B Lot. 2
11	Food additive	Company C
Isoquercitrin		
12	Reagent	Kanto Chemical, CAT No. 20311-96, Lot. 903X1354
13	Reagent	***Fluka, CAT No. 17793, Lot. 1392631
14	Reagent	Tokiwa Phytochemical, CAT No. P2203, Lot. 20370903
Enzymatically decomposed rutin		
15	Food additive	Company B Lot. 1
16	Food additive	Company B Lot. 2
Quercetin		
17	Reagent (xH ₂ O)	Tokyo Chemical Industry, CAT No. P0042, Lot. GM01
18	Reagent (xH ₂ O)	Kanto Chemical, CAT No. 35030-40, Lot. 906W2148
19	Reagent (2H ₂ O)	Wako Pure Chemical Industries, CAT No. 173-00403, Lot. PE3352
20	Reagent (2H ₂ O)	Wako Pure Chemical Industries, CAT No. 177-00401, Lot. WAN0446
Quercetin		
21	Food additive	Company B
22	Food additive	Company C

*purchased from Wako Pure Chemical Industries Co. Ltd.
 ** purchased from Funakoshi, Co. Ltd.
 *** purchased from Sigma-Aldrich Co. Ltd.

Table 2. Instruments and acquisition parameters

Spectrometer	ECA600 (JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	-5 – 15 ppm
Data points	32000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s (>5*T ₁)
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	25 °C
Solvent	Methanol- <i>d</i> ₄
qNMR reference material	BTMSB- <i>d</i> ₄
CRM (for calibration)	Diethyl phthalate (DEP)(NMIJ CRM4022-b)

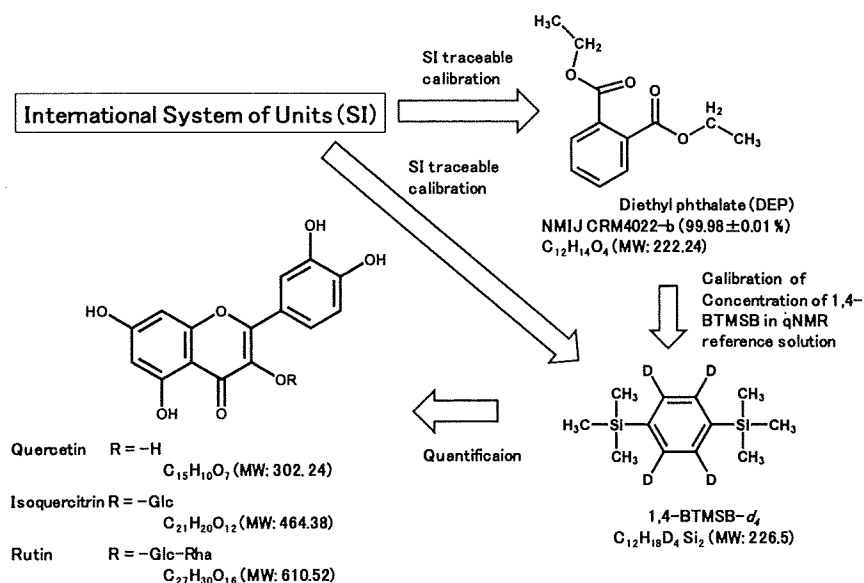


Fig. 1 Strategy of SI-traceable quantification based on qNMR.

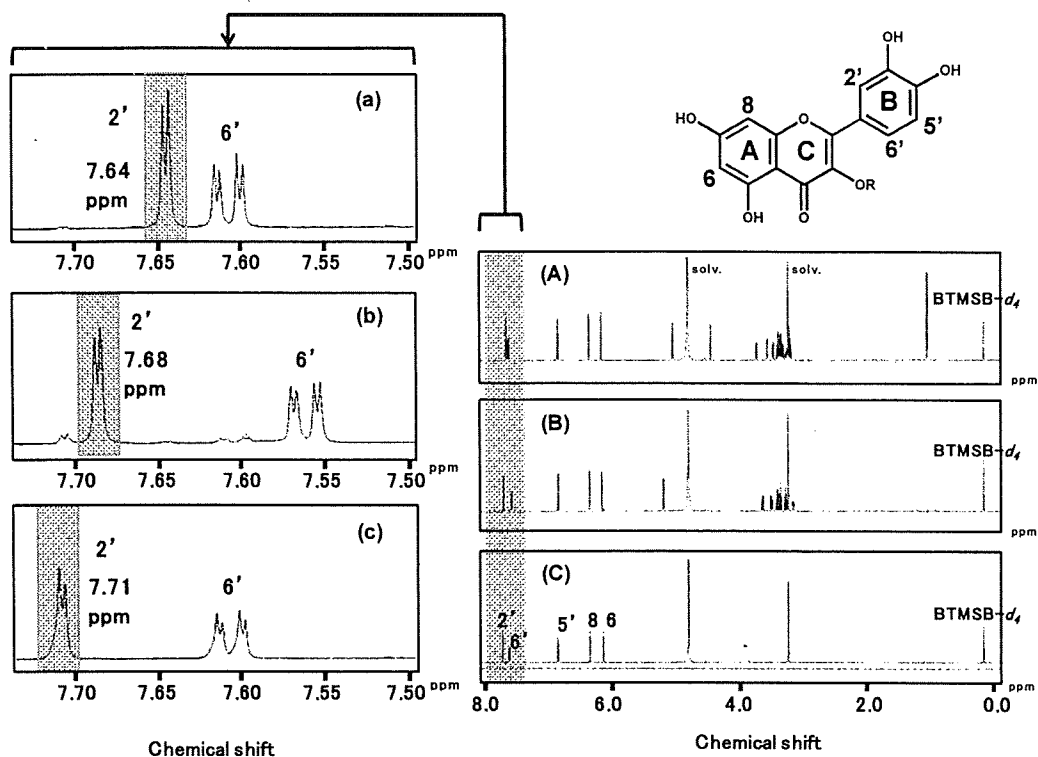


Fig. 2. qNMR Spectra of rutin (A), isoquercitrin (B) and quercetin (C)
 The spectra were obtained in qNMR solution (methanol- d_4) containing 1,4-BTMSB- d_4 . (a), (b) and (c) are magnified views of 7.49–7.74 ppm of (A), (B) and (C).

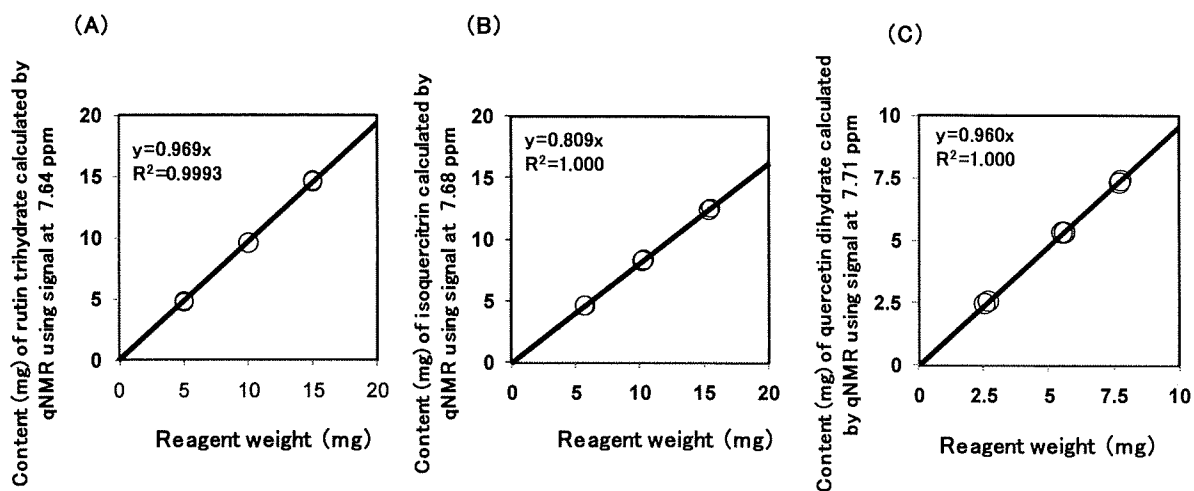


Fig. 3. Relationship between reagent weight and contents of quercetin or quercetin glycosides calculated by qNMR
 The ability to quantify the compounds, rutin trihydrate (A), isoquercitrin (B) and quercetin (C), within 5–15 mg/mL ((A), (B)) and 2.5–7.5 mg/mL (C) using qNMR, were investigated.

Table 3. Purity Measurements of rutin in the different reagents and rutin(extract) food additive products by qNMR

No.	Sample Type	Purity (%) [*] as anhydrate	Purity (%) [*] as rutin trihydrate	RSD (%) ^{**}
Rutin trihydrate				
1	Reagent (3H ₂ O)	88.8 ± 0.4	96.7 ± 0.4	0.4
2	Reagent (3H ₂ O)	90.2 ± 0.3	98.2 ± 0.4	0.4
3	Reagent (3H ₂ O)	71.0 ± 1.0	77.3 ± 1.1	1.4
4	Reagent (3H ₂ O)	83.4 ± 0.05	90.8 ± 0.06	0.06
5	Reagent (3H ₂ O)	82.3 ± 0.4	89.6 ± 0.4	0.5
6	Reagent (3H ₂ O)	83.9 ± 0.8	91.4 ± 0.9	1.0
7	Reagent (3H ₂ O)	83.2 ± 0.1	90.6 ± 0.1	0.1
Rutin (extract)				
8	Food additive	88.9 ± 0.7	96.8 ± 0.8	0.8
9	Food additive	88.2 ± 0.4	96.1 ± 0.4	0.5
10	Food additive	86.6 ± 0.2	94.3 ± 0.2	0.2
11	Food additive	89.0 ± 0.2	96.9 ± 0.2	0.2

^{*}AV ±SD, n=3, signals at 7.64 ppm were used for calculation.

^{**}RSD, relative standard deviation

Table 4. Purity Determination of isoquercitrin in the different reagents and enzymatically decomposed rutin food additive products by qNMR

No.	Sample Type	Purity (%) [*]	RSD (%) ^{**}
Isoquercitrin			
12	Reagent	80.9 ± 0.2	0.2
13	Reagent	80.1 ± 0.7	0.9
14	Reagent	94.8 ± 0.1	0.1
Enzymatically decomposed rutin			
15	Food additive	85.4 ± 0.3	0.3
16	Food additive	87.9 ± 0.4	0.5

^{*}AV ±SD, n=3, signals at 7.68 ppm were used for calculation.

^{**}RSD, relative standard deviation

Table 5. Purity Determination of quercetin in the different reagents and quercetin food additive products by qNMR

No.	Sample Type	Purity (%) [*] as anhydrate	Purity (%) [*] as quercetin dihydrate	RSD (%) ^{**}
Quercetin				
17	Reagent(xH ₂ O)	92.8 ± 0.02	-	0.03
18	Reagent(xH ₂ O)	92.9 ± 0.03	-	0.03
19	Reagent(2H ₂ O)	86.0 ± 1.0	96.2 ± 1.1	1.1
20	Reagent(2H ₂ O)	86.2 ± 0.3	96.5 ± 0.4	0.3
Quercetin				
21	Food additive	87.3 ± 0.5	97.7 ± 0.5	0.5
22	Food additive	88.3 ± 0.9	98.8 ± 1.0	1.0

^{*}AV ±SD, n=3, signals at 7.71 ppm were used for calculation.

^{**}RSD, relative standard deviation

分担研究課題 定量NMR法の既存添加物と天然抽出物への適用に関する研究

研究分担者 水上 元 名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授
研究協力者 永津明人 金城学院大学薬学部 教授

研究要旨 天然抽出物中の指標成分の定量分析への定量NMR法の適用について検討した。天然薬物であるビャクジュツ抽出物の品質管理のために使用される指標成分であるatractylonのH-12に由来する δ 7.00 ppmのシグナル強度を、NMR基準物質であるhexamethyldisilane (HMD) の δ 0 ppmのシグナルを介して認証標準物質であるpotassium hydrogen phthalateの δ 7.23 ppmおよび δ 8.20 ppmのシグナル強度と関連付けることによって、その絶対純度を決定することが可能であることを示した。同様に、オウレン抽出物の指標成分である3種のプロトベルベリンアルカロイド berberine, coptisine, palmatineの絶対純度の決定が可能であった。さらに、この方法を適用して、市販のプロトベルベリンアルカロイド試薬の評価するとともに、ビャクジュツおよびオウレン抽出物中でのこれら指標成分の定量法を確立した。

A. 研究目的

天然物抽出物に含まれる特徴的な化学成分（指標成分）の含量を測定することは、品質評価や品質管理のための極めて重要な手段である。現在、この目的のためには高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が広く用いられている。HPLC法による指標成分の定量は、広範な有機化合物に適用可能であること、その化合物の特性に応じて様々な検出法を用いることが出来ること、検出法によっては高い感度が得られることなどの利点を持っている。しかしながら、この方法では、検量線を作成するための標準品が必要である。多くの指標成分の市販品が増えてはいるがまだ少なく、基原天然物から単離精製

する必要がある。そのようにして調製した標準品はもとより、メーカーにより純度が記載された市販の標準品でも、それ自身の純度の決定はHPLC法が用いられることが多い。HPLC法ではUV検出器などで確認できるピーク面積比から純度が算出されるので、特定の検出法では確認できない不純物の影響を考慮できず、その純度には大きな誤差が存在していることが予測される。したがって、そのような標準品をもとに作成された検量線から求めた定量値も信頼性があるとはいえない。

一方、 $^1\text{H-NMR}$ では、シグナル面積比は分子中の個々の置換基上のプロトン数に比例しているとともに、一定の濃度の化合物のプロトン当たりのシグナル面積は、化合物の種類によらず

に一定である。したがって、濃度が既知の物質と濃度未知の試料の¹H-NMRを同時に測定することによって、そのシグナル面積比から未知試料の定量が可能になる。NMRを利用したこのような定量法は、qHNMR (proton-specific quantitative NMR) 法と呼ばれ農産物や食品の分野でも応用が進んでいる。

qHNMR法では純度既知の基準物質を内部標準として試料に混和して¹H-NMRを測定し、基準物質と標的物質の水素シグナルの積分値を比較することで定量を行う。この方法では、

(1) ¹H-NMRが測定できる試料を作製するだけで特別な前処理が必要なく、また対象化合物に応じた測定条件の検討も不要である。測定時間も1試料15分程度であるため、測定準備及び測定に要する時間は短時間で済む。また、

(2) クロマトグラフ法と異なり、検量線を作製する必要がないため、測定対象化合物の標準物質がなくても測定が可能である。更に、

(3) 溶媒や試料中の他の水素シグナルから独立したシグナルを有する化合物であれば複数の化合物も同時に測定が可能である。

本研究では、qHNMR法のこのような特徴に着目して、¹H-NMRを利用する指標成分の純度の評価及び天然抽出物中での含量の測定について検討した。まず、認証標準物質とNMR用基準物質および対象化合物の¹H-NMRスペクトルを測定することにより、対象化合物の絶対濃度を決定する方法を確立した。次に、この方法を適用して天然物から単離して得たatractylon標品の純度を決定し、さらにビャクジュツに含有されるatractylonの定量が可能であることを確認した。さらに、この方法が、市販のberberine alkaloidsの標準品の純度の決定と、黄连に含まれるberberine alkaloidsの分離定量に適用可能で

あることを示した。

B. 研究方法

化合物

Atractylonはビャクジュツから抽出し、カラムクロマトグラフィーによって精製した。認証標準物質であるpotassium hydrogen phosphate (NMIJ CRM 3001-a) は和光純薬から、日本薬局方標準品である塩化ベルベリンは、日本公定書協会からそれぞれ購入した。その他の試薬は、すべて市販品を用いた。

生薬

名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野に所蔵のものを用いた。

NMR装置と測定条件

¹H-NMRスペクトルの測定にはJEOL JNM-ECA500 (500 MHz) またはBruker AVance 600 (600 MHz) を用いた。NMRの測定は、杉本らの報告¹⁾に準じて行なった。

HMD濃度の測定

Hexamethyldisilane (HMD) の約10mgをmethanol-d₄ 50mLに溶解したものをqHNMR reference stock solutionとして用いた。Potassium hydrogen phthalate (PHP) 溶液 (6.00 mg/mL) 2 mLをqHNMR reference stock solution 0.5 mLに加え、NMRスペクトルを測定した。HMDに由来するδ 0 ppmのシグナル強度とPHPの芳香環水素に由来するδ 7.23 ppmおよびδ 8.20 ppmのシグナル強度の平均値との比から、qHNMR reference stock solutionに含まれるHMDの量を求めた。

HPLC分析条件

AtractylonのHPLCによる定量は既報の方法²⁾に従って行なった。プロトベルベリンアルカロイドのHPLCによる分析は日本薬局方収載の方法³⁾を用いて実施した。

C. 結果と考察

1. 朮類生薬に含まれるattractylonの定量分析

Atractylon (Fig. 1A) はキク科の*Atractylodes japonica*または*A. ovata*を基原とする生薬のビャクジュツに含まれるセスキテルペンである。Atractylonには様々な薬理活性が報告されており、ビャクジュツの薬理活性を担う成分の一つであると考えられている。この化合物は、*A. lancea*または*A. chinensis*を基原とする蒼朮には通例含まれていないとされることから、朮類生薬の指標成分としても重要な成分である。これまで、ビャクジュツ中のattractylonの定量にはHPLC法が用いられてきたが、市販の標準物質も供給されておらず、また、attractylonは不安定な化合物で、容易に酸化されることが知られている。

ビャクジュツから単離したattractylonの¹H-NMRスペクトルを測定したところ、12位の水素シグナルは δ 7.00 ppmの位置に現れた (Fig.1B)。ビャクジュツの重メタノール抽出液の¹H-NMRスペクトルには、 δ 7.00 ppm付近には他のシグナルは認められなかった (Fig. 1C)。一方、ソウジュツの抽出液では¹H-NMRスペクトルのプロファイルは大きく異なっていた (Fig. 1D)。そこで、この水素シグナルを利用してattractylonの定量を試みた。0.16-10.5 mg/mlの範囲で測定したattractylonのH-12シグナル面積と

HMDのシグナル面積比から求めたattractylonの純度は $54.4 \pm 0.3\%$ であった。また、Atractylonの添加回収実験を行ったところ、qHNMR法の回収率は100.6%であった。

中国市場で入手し遺伝子鑑別によって基原植物を同定したビャクジュツ16試料と蒼朮30試料について、qHNMR法を用いてattractylon含量を定量した。その結果、全てのビャクジュツについてattractylonを検出し、その含量は1.37-23.3 mg/gであり、*A. ovata*と*A. japonica*由来の生薬のどちらも試料間のばらつきが大きいことが分かった。一方、蒼朮でも20試料中*A. chinensis*由来の3つのサンプルでattractylonが検出されたが、その含量はビャクジュツと比較して低く、1.93-3.88 mg/gであった。単離したattractylonを標準品として用いて0.02-1.05 mg/mlの範囲で検量線を作成し、HPLC法による定量を行い、その結果をqHNMR法と比較したところ、両者の相関係数は0.996、一次回帰直線の傾きは0.93となり、極めて高い相関性が得られた (Fig. 2)。これらの結果は、qHNMR法を用いるattractylonの定量法が対象化合物の標準品による検量線の作成や、生薬の重メタノール抽出以外のサンプルの前処理を必要としないこと、分析操作が単純でかつ長時間を要しないことなど、極めて優れた特性を持つ定量法であることを示している。

2. プロトベルベリンアルカロイド試薬の純度の検定と生薬の品質評価への応用

オウレンは、キンポウゲ科植物である*Coptis japonica* (日本産) または*C. chinensis* (中国産) の根茎を基原とする生薬であるプロトベルベリンアルカロイドであるberberine、palmatine、coptisineを生理活性成分として含有している。そのために、これらの成分が生薬分析用標準品

として市販され、HPLC法による品質評価や品質管理に用いられている。そこで、qHNMR法を用いてこれらの市販標準品の純度を検定するとともに、その分離定量を試みた。

Berberine、palmatine、coptisine標準品の¹H-NMRスペクトルを比較したところ、H-13に由来するシグナルが他のシグナルとの重なりが少ない低磁場側にシングレットで出現し、かつberberineでは δ 8.60 ppm、palmatineでは δ 8.71 ppm、coptisineでは δ 8.62 ppmであることから、これら3種のアルカロイドの識別が可能であることがわかった (Figure 3)。さらにオウレンのメタノール抽出液の¹H-NMRを直接測定した場合にも、これら3つのアルカロイドに由来するH-13のシグナルが分離して観察された。このことから、H-13に由来するシグナルを対象としてシグナル強度比をHMDと比較することにより、berberine alkaloidsの分離定量が可能であることが示された。

そこで、市販のberberine alkaloid試薬5試料と日本薬局方標準品の塩化ベルベリンの純度を検討した。H-13由来のシグナル強度をHMDのシグナル強度と比較してアルカロイドの純度を測定した。その結果、qHNMRで求めた純度は各標準品のカタログ記載の純度とは一致せず、一般にそれよりかなり低いことが明らかになった (Table 1)。

つぎに、オウレンのメタノール抽出物の¹H-NMRスペクトルを検討した。岐阜県産及び中国産のオウレンについて、各アルカロイドのH-13に由来するシグナルの面積を濃度既知の基準物質HMDの面積と比較することにより各アルカロイドの分離定量を行うことが可能であることを示した。

オウレン中のberberineの定量は、HPLCを利

用した方法が第十五改正日本薬局方に収載されている。そこで、この方法を用いて3種のberberine alkaloidsの定量を行い、qHNMR法で得られた結果と比較した。HPLC法とqHNMR法から得られた定量値はほぼ一致したことから、qHNMR法はオウレンに含まれるプロトベルベリンアルカロイドの定量に適用できることがわかった。

D. 結論

天然抽出物及びその指標成分の定量にqHNMR法が有効であることを示した。この方法を利用して生薬から単離して得たatractylonの純度を決定し、さらに朮類生薬に含有するatractylonの定量が可能であることを確認した。また、この方法が、市販のプロトベルベリンアルカロイド試薬の純度の決定と、オウレンに含まれるこれらのアルカロイドの分離定量に適用可能であることを示した。

qHNMR法は、認証標準物質と関連付けることにより化合物の絶対定量 (絶対純度の決定) が可能であること、検量線の作製が不要であり、測定対象化合物の標準品がなくても定量が可能であること、定量操作が特別な前処理なしに簡便に行えることなど、天然抽出物の品質管理法として優れた特質を持っていることを本研究は提示した。一方、シグナルの検出には0.16 mg/ml (1 mM) 程度の濃度が必要である。これはHPLC法に対して10倍程度濃い濃度領域であり、この感度の低さがqHNMR法の欠点である。指標成分が入手できる場合には、qHNMR法で純度を決定してからHPLC法のための検量線を作製することが有用な手法となりえるものと考えられる。

E. 参考文献

- 1) 田原麻衣子、杉本直樹、末松孝子、有福和紀、斉藤 剛、井原俊英、吉田雄一、多田敦子、久保田領志、清水久美子、山崎 壮、棚元憲一、中澤裕之、西村哲治：qNMRに基づく有機リン系農薬イソキサントキノンの品質管理、*日本食品化学会雑誌* **16**, 28-33 (2010).
- 2) Wan KT, Chen LG, Yang LL, Ke WM, Chang HC, Wang CC: Analysis of the sesquiterpenoids in processed *Atractylodes Rhizoma*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **55**, 50-56 (2007).
- 3) 第15改正日本薬局方 日本公定書協会 東京、pp.2187-2188、2006.

F. 研究発表

(1) 学会発表

吉田貴光、羽佐田桂子、牧野利明、永津明人、山崎 壮、杉本直樹、西村哲治、水上 元：qHNMRによるオウレン中のベルベリンアルカロイド類の定量、第38回生薬分析シンポジウム (2009年12月3日 大阪)

(2) 論文発表

Hasada K, Yoshida T, Yamazaki T, Sugimoto N, Nishimura T, Nagatsu A, Mizukami H.: Quantitative determination of atractylon in *Atractylodes Rhizoma* and *Atractylodes Lanceae Rhizoma* by ¹H-NMR spectroscopy, *Journal of Natural Medicines* **64**, 161-166 (2010).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし