

Table 1 カラメルI, II, IIIおよびIVの違い

和名	カラメルI	カラメルII	カラメルIII	カラメルIV
英名	Caramel I (plain)	Caramel II (caustic sulfite process)	Caramel III (ammonia process)	Caramel IV (sulfite ammonia process)
定義	本品は、でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物を、熱処理して得られたもの、又は酸若しくはアルカリを加えて熱処理して得られたもので、亜硫酸化合物及びアンモニウム化合物を使用していないものである。	本品は、でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物に、亜硫酸化合物を加えて、又はこれに酸若しくはアルカリを加えて熱処理して得られたもので、アンモニウム化合物を使用していないものである。	本品は、でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物に、アンモニウム化合物を加えて、又はこれに酸若しくはアルカリを加えて熱処理して得られたもので、亜硫酸化合物を使用していないものである。	本品は、でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物に、亜硫酸化合物及びアンモニウム化合物を加えて、又はこれに酸若しくはアルカリを加えて熱処理して得られたものである。
性状	本品は、暗褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、においがいか又ははわずかに特異なおいがあり、味がいか又ははわずかに特異な味がある。	本品は、暗褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、においがいか又ははわずかに特異なおいがあり、味がいか又ははわずかに特異な味がある。	本品は、暗褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、においがいか又ははわずかに特異なおいがあり、味がいか又ははわずかに特異な味がある。	本品は、暗褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、においがいか又ははわずかに特異なおいがあり、味がいか又ははわずかに特異な味がある。
純度試験				
重金属	Pbとして25 µg/g以下(2.0g, 第2法, 比較液鉛 標準液 5.0 ml)	Pbとして25 µg/g以下(2.0g, 第2法, 比較液鉛 標準液 5.0 ml)	Pbとして25 µg/g以下(2.0g, 第2法, 比較液鉛 標準液 5.0 ml)	Pbとして25 µg/g以下(2.0g, 第2法, 比較液鉛 標準液 5.0 ml)
鉛	Pbとして2.0 µg/g以下(5.0 g, 第1法)	Pbとして2.0 µg/g以下(5.0 g, 第1法)	Pbとして2.0 µg/g以下(5.0 g, 第1法)	Pbとして2.0 µg/g以下(5.0 g, 第1法)
ヒ素	As ₂ O ₃ として1.0 µg/g以下(2.0 g, 第3法, 装置B)	As ₂ O ₃ として1.0 µg/g以下(2.0 g, 第3法, 装置B)	As ₂ O ₃ として1.0 µg/g以下(2.0 g, 第3法, 装置B)	As ₂ O ₃ として1.0 µg/g以下(2.0 g, 第3法, 装置B)
固形物含量	55%以上	65%以上	53%以上	40%以上
アンモニウム性窒素	— ^{a)}	— ^{a)}	0.4%以下(固形物換算)	2.8%以下(固形物換算)
総硫黄	0.3%以下(固形物換算)	2.5%以下(固形物換算)	0.3%以下(固形物換算)	10.0%以下(固形物換算)
総窒素	4.0%以下(固形物換算)	0.2%以下(固形物換算)	6.8%以下(固形物換算)	7.5%以下(固形物換算)
二酸化硫黄		0.2%以下(固形物換算)		0.5%以下(固形物換算)
4-メチルイミダゾール(4-Mel)	不検出	— ^{a)}	0.30 mg/g以下(固形物換算)	1.0 mg/g以下(固形物換算)
2-アセチル-4-テトラヒドロキシプロピルイミダゾール(THI)	— ^{a)}	— ^{a)}	40 µg/g以下(固形物換算)	— ^{a)}
国内流通実態	○	×	○	○

a) 試験項目無し

Table 2.カラメル色素市販製品情報および試料調製濃度

グループ		No.	品名	Lot.	原料糖類	性状	濃度値(mg/mL)	グループ	No.	品名	Lot.	原料糖類	性状	濃度値(mg/mL)
I		1	カラメル-1	Lot. A	砂糖	粉末	16.2093	III	27	カラメルIII-1	Lot. A	ブドウ糖	粉末	16.8321
		2		Lot. B			16.5537		28		Lot. B			16.3000
		3		Lot. C			15.5065		29		Lot. C			15.8391
		4	カラメル-2	Lot. A	ブドウ糖	粉末	15.1893		30	カラメルIII-2	Lot. A	ブドウ糖	液状	17.4092
		5		Lot. B			17.9111		31		Lot. B			15.8175
		6		Lot. C			16.5951		32		Lot. C			14.2700
	7	カラメル-3	Lot. A	砂糖	粉末	19.3064	33		カラメルIII-3	Lot. A	ブドウ糖	粉末	14.0356	
	8		Lot. B			16.0104	34			Lot. B			16.1387	
	9		Lot. C			17.6611	35			Lot. C			18.5962	
	10	カラメル-4	Lot. A	ブドウ糖	液状	15.3346	36		カラメルIII-4	Lot. A	ブドウ糖	液状	18.3605	
	11		Lot. B			21.7483	37			Lot. B			15.9203	
	12		Lot. C			14.6323	38			Lot. C			21.1979	
	13	カラメル-5	Lot. A	砂糖	粉末	15.4536	39		カラメルIV-1	Lot. A	ブドウ糖	液状	24.0708	
	14		Lot. B			14.4729	40			Lot. B			16.1931	
	15		Lot. C			14.8643	41			Lot. C			15.0668	
	16	カラメル-6	Lot. A	ブドウ糖+糖蜜	粉末	17.4552	42		カラメルIV-2	Lot. A	ブドウ糖	液状	21.9744	
	17		Lot. B			16.0816	43			Lot. B			21.4998	
	18		Lot. C			19.2464	44			Lot. C			14.4708	
19	カラメル-7	Lot. A	糖蜜	液状	18.9199	45	カラメルIV-3	Lot. A	ブドウ糖	液状	19.5366			
20		Lot. B			18.3957	46		Lot. B			20.1472			
21		Lot. C			18.6392	47		Lot. C			22.7121			
22	カラメル-8	Lot. A	砂糖	粉末	19.2330	48	カラメルIV-4	Lot. A	ブドウ糖	粉末	16.9390			
23		Lot. B			15.9100	49		Lot. B			20.4514			
24	カラメル-9	Lot. A	ブドウ糖	液状	23.8933	50		Lot. C			15.7344			
25		Lot. B			22.7585	51	カラメルIV-5	Lot. A	ブドウ糖	液状	17.7584			
26		Lot. C			16.3366	52		Lot. B			15.7610			
						53		Lot. C			20.6292			
						54	カラメルIV-6	Lot. A	ブドウ糖	液状	15.8922			
						55	カラメルIV-7	Lot. A	ブドウ糖	液状	19.5669			
						56		Lot. B			23.0005			

Table 3 qNMR instrument and the conditions

Spectrometer	JNM-ECA600 (JEOL)
Probe	5 mm broadband autotune probe
¹³ C decoupling	Multi pulse decoupling with Phase and Frequency switching (MPF-8)
Spectral width	- 5 to 15 ppm
Data points	64000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s (>5*T ₁)
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temp.	22-25°C
qNMR reference material	DSS- <i>d</i> ₆
Primary reference material	Potassium hydrogen phthalate (PHP)
Window function	-

Table 4.2. 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール(THI), 2-メチルイミダゾール(2-MeI)および4-メチルイミダゾール(4-MeI)の試験情報(第8版食品添加物公定書)

試験	2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール(THI)	2-メチルイミダゾール(2-MeI)	4-メチルイミダゾール(4-MeI)
組成式	$C_8H_{14}N_2O_2$	$C_4H_6N_2$	$C_4H_6N_2$
性状	本品は、灰白色の結晶又は結晶性の粉末で、メタノール又はエタノールに溶けやすく、水にやや溶けにくい。	本品は、白〜淡黄色の結晶又は結晶性の粉末で、わずかに特異なにおいがある。水、エタノール、酢酸エチル、アセトンに溶け、吸湿性がある。	本品は、淡黄色の結晶又は結晶性の粉末で、わずかに特異なにおいがある。水、エタノール、アセトン又はクロロホルムに溶けやすく、吸湿性がある。
含量		本品は、2-メチルイミダゾール($C_4H_6N_2$) 98%以上を含む。	本品は、4-メチルイミダゾール($C_4H_6N_2$) 97%以上を含む。
融点	234~236°C	267~268°C	262~264°C
純度試験	本品10.0 mgをカルボニル基除去メタノール100 mlに溶かし、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール以外のピークを認めない。	本品約0.2 gを精密に量り、非水滴定用酢酸50 mlを加えて溶かし、0.1 mol/L過塩素酸液で滴定する。終点の確認は、電位差計を用いる。別に空試験を行い補正する。	本品約0.2 gを精密に量り、非水滴定用酢酸50 mlを加えて溶かし、0.1 mol/L過塩素酸液で滴定する。終点の確認は、電位差計を用いる。別に空試験を行い補正する。
操作条件	検出器 紫外吸光度計(測定波長 280 nm) カラム 充てん剤 5 μ mの液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲル カラム管 内径4.6 mm, 長さ15 cmのステレンレス管 移動相 0.2w/v%リン酸/メタノール混液(45 : 60) 流量 0.6ml/分	0.1 mol/L過塩素酸液1 ml = 8.211 mg $C_4H_6N_2$	0.1 mol/L過塩素酸液1 ml = 8.211 mg $C_4H_6N_2$

Table 5 Absolute purities of THI standards estimated by qNMR

THI standard	Target Signals and Purities (%)				
	5-H	1'-H	2-Ac	AV	SD
	7.62 ppm	5.27 ppm	2.62 ppm		
THI-0	95.1	94.9	96.7	95.6	1.0
THI-1	92.3	95.1	92.7	93.4	1.5
THI-2	93.7	92.7	94.1	93.5	0.7

Table 6 Absolute purities of 2-MeI and 4-MeI reagents estimated by qNMR

Reagent	Target Signals and Purities (%)					
	2-H	4, 5-H	5-H	2-Me	4-Me	SD
	8.52 ppm	7.28 ppm	7.16 ppm	2.61 ppm	2.32 ppm	
2-MeI		97.6		98.1		0.4
4-MeI	91.3		93.3		95.1	1.9

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 22 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

- qNMR によるステビオシドおよびレバウジオシド A 標準品の純度測定法の検討 -

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

研究協力者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究協力者 石附京子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨

定量 NMR (quantitative NMR: qNMR)の応用例として、既存添加物ステビア抽出物の主成分であるステビオシドおよびレバウジオシド A の各種標準品の絶対純度測定法の検討を行った。qNMR 基準物質として、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、そのメチル基と各測定化合物に特有な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。その結果、製品により純度の違いが認められ、5 製品のステビオシド標準品の純度は 92.0~97.7%，5 製品のレバウジオシド A 標準品の純度は 94.7~96.6%であった。3 試行における相対標準偏差は 0.2~1.1%と良好であった。qNMR は、1 測定が比較的短時間であり、かつ、分離操作を行うことなく絶対定量できる点で、各種標準品中の絶対純度測定法としても有望であることが示された。

A. 研究目的

ステビア抽出物^{1,2)}は、日本では以前より使用されてきたが、2008 年 FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会(JECFA)での規格設定や FDA による GRAS 承認以降、その認可国が拡大しつつある。主甘味成分のステビオール配糖体 (Fig. 1) の定量には、ステビオシド標準品あるいはレバウジオシド A 標準品を用い、クロマトグラフ法でのピーク面積と分子量比をもとに 4~9 種のステビオール配糖体の含有量を求め、その総量を算出する方法が採用されている。しかし、現時点ではその規格値や分析法は国により異なる。さらに、規格への合否を決める標準品も日・米・欧で異なり、得られた定

量値が、実際の含有量を正確に示しているかは定かでない。すなわち、定量に用いる標準品が異なり、その純度値が異なれば、得られる定量値には大きな差が生じる。そのため、標準品の正確な純度値 (絶対純度) を求めることが必要となる。そこで本研究では、NMR を用いた定量法(quantitative NMR: qNMR)^{3~8)}を応用し、ステビオシドおよびレバウジオシド A 標準品の絶対純度測定法の検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料および試薬

ステビオシド(STD)標準品 4 社 5 製品 (STD-A~E, Table 1) およびレバウジオシド

A(RBDA)標準品 3 社 5 製品(RBDA-A,C~F, Table 1)は各試薬メーカーより購入したものをを用いた。なお、各製品の付帯情報を 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国際単位系(SI)に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ピリジン(pyridine-*d*₅)(Isotec 社製)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%±0.01%)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 JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子(株)製)。qNMR のケミカルシフト値は、pyridine-*d*₅ のプロトンシグナルを基準シグナル(7.55 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

qNMR 基準物質 1,4-BTMSB-*d*₄ 約 20 mg を精密に量り、pyridine-*d*₅ 100 mL に定容したものを qNMR 用標準液とした。ステビオシド標準品、レバウジオシド A 標準品 5 mg を用い、D₂O, DMSO-*d*₆, acetone-*d*₆, methanol-*d*₄ および pyridine-*d*₅ への溶解性を確認したところ、methanol-*d*₄ への溶解には 5 mL を要したが、DMSO-*d*₆ および pyridine-*d*₅ には 1 mL に容易に溶けた。また、3 種の溶媒で NMR

シグナルの選択性は、pyridine-*d*₅ で最も良好であったため、NMR 溶媒として用いた。また、認証標準物質フタル酸ジエチル(DEP) (NMIJ CRM 4022-b)を用い、測定用に調製した qNMR 標準液中の 1,4-BTMSB-*d*₄ 濃度を随時確認して使用した。

B-3-b. qNMR によるステビオシドおよびレバウジオシド A 標準品の純度測定

ステビオシド標準品およびレバウジオシド A 標準品は、乾燥(105°C, 2時間)させた後、それぞれ約 15 mg を精密に量り、予め調製した qNMR 用標準液 0.75 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 用に最適化した NMR 測定条件 (Table 2) で測定した。得られた qNMR データを解析ソフト(ALICE2 for qNMR, 日本電子)に入力し、¹H-NMR における 1,4-BTMSB-*d*₄ のプロトンシグナル積分値とステビオシドまたはレバウジオシド A に由来するそれぞれの特定プロトンシグナル積分値の比を基に、各種標準品製品中のステビオシドまたはレバウジオシド A の純度を算出した。

C. 結果及び考察

C-1. 定量用シグナルの選別

まず、ステビオシドおよびレバウジオシド A の ¹H-NMR スペクトルを他のステビオール配糖体と比較し、各測定化合物に特有なプロトンシグナル(ステビオシド: 2.71 ppm および 5.68 ppm, レバウジオシド A: 2.65 ppm および 5.31 ppm)を選択した (Fig. 2)。

C-2. qNMR によるステビオシドおよびレバウジオシド A 標準品の定量精度の確認

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⁹⁾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。

Fig. 3 に、ステビオシド標準品(STD-A)およびレバウジオシド A 標準品(RBDA-C)を、それぞれ今回の測定濃度領域の 15~35 mg/mL で定量した結果を(試料調製 n=2)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 により算出したステビオシド標準品(STD-A)およびレバウジオシド A 標準品(RBDA-C)の 1 mL 当たりの各定量値を mg で示した。その結果、試薬に一定の割合で含まれているステビオシド、レバウジオシド A の量と、qNMR の定量値が、上記濃度範囲でよく比例することが確認できた。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 によるステビオシド標準品およびレバウジオシド A 標準品の純度の測定

ステビオシド標準品およびレバウジオシド A 標準品につき、選択した特有なプロトンシグナルと qNMR 基準物質の 1,4-BTMSB-*d*₄ のメチル基とのシグナル積分値比から各標準品の純度を算出した。その結果、製品により純度の違いが認められ、5 製品のステビオシド標準品の純度は 92.0~97.7 % (Fig. 4)、5 製品のレバウジオシド A 標準品の純度は 94.7~96.6 % (Fig. 5) であった。

3 試行における相対標準偏差は 0.2 %~1.1 % と良好であり、これら標準品試料の純度測定に対しても qNMR が十分に適用可能であることが示された。

結果の内容としては、標準品 B(99.0+% (HPLC)(乾燥後))の qNMR 測定純度と比較し、標準品 C および E の純度は、4% 近く低かった。したがって、標準品 B を用いた場合より、標準品 C および E を用いた場合では、測定対象試料の定量値がより大きい値に算出されてしまうものと懸念された。

D. 結論

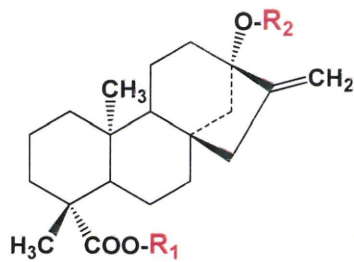
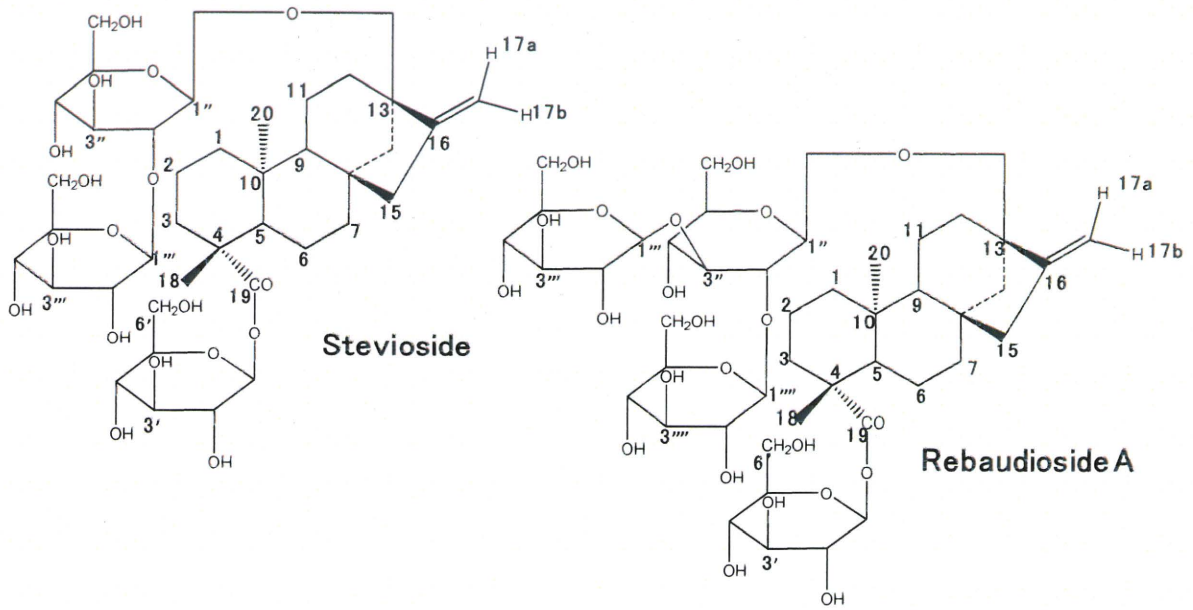
ステビオシドおよびレバウジオシド A の ¹H-NMR スペクトルを他のステビオール配糖体と比較し、各測定化合物に特有なプロトンシグナルを選択し、これらプロトンシグナルと qNMR 基準物質の 1,4-BTMSB-*d*₄ のメチル基とのシグナル積分値比から各標準品の純度を算出した。qNMR 測定の結果、ステビオシド標準品 5 製品の純度は 92.0~97.7 %、レバウジオシド A 標準品 5 製品の純度は 94.7~96.6 % であった。3 試行における相対標準偏差は 0.2~1.1% と良好であった。

qNMR は、1 測定が比較的短時間であり、かつ、分離操作を行うことなく絶対定量できる点で、各種標準品中の絶対純度測定法としても有望と考えられる。

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) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **51**, 205-212 (2010).
2. 学会発表
- 1) 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 石附京子, 末松孝子, 有福和紀, 西村哲治, 山崎 壮, 河村葉子, ステビオシドおよびレバウジオシドA標準品のNMRによる純度測定法の検討, 第100回日本食品衛生学会学術講演会, 2010. 9 (熊本)
- 2) 多田敦子, 石附京子, 岩村淳一, 三上博久, 平尾美子, 岡 順子, 楠本美紀, 山名未早希, 藤田 功, 山崎 壮, 河村葉子, ステビオール配糖体9種の分析法の検討, 第100回日本食品衛生学会学術講演会, 2010. 9 (熊本)



Compound	R ₁	R ₂	MW
Stevioside	Glcβ-	Glc(β1-2)Glcβ-	804.9
Rebaudioside A	Glcβ-	Glc(β1-2)Glcβ- Glc(β1-3)↓	967.0
Rebaudioside B	H-	Glc(β1-2)Glcβ- Glc(β1-3)↓	804.9
Rebaudioside C	Glcβ-	Rha(β1-2)Glcβ- Glc(β1-3)↓	951.0
Rebaudioside D	Glc(β1-2)Glcβ-	Glc(β1-2)Glcβ- Glc(β1-3)↓	1129.2
Rebaudioside F	Glcβ-	Xyl(β1-2)Glcβ- Glc(β1-3)↓	937.0
Steviolbioside	H-	Glc(β1-2)Glcβ-	642.7
Dulcoside A	Glcβ-	Rha(β1-2)Glcβ-	788.9
Rubusoside	Glcβ-	Glcβ-	642.7
Steviol	H-	H-	318.5

Glc: glucose, Rha: rhamnose, Xyl: xylose

Fig. 1 ステビオール配糖体の構造

Table 1 測定対象としたステビオシド(STD)標準品
およびレバウジオシドA(RBDA)標準品

標準品	試薬会社	試薬会社 記載含量
STD-A	I	-
STD-B	I	99.0 + % (HPLC)(乾燥後)
STD-D	II	>98.0% (HPLC)
STD-C	III	not dry 0.97 mg/mg
STD-E	IV	98.4 % (HPLC)
RBDA-A	I	-
RBDA-C	I	99.0 + % (HPLC)(乾燥後)
RBDA-D	III	not dry 0.969 mg/mg
RBDA-E	IV	-
RBDA-F	IV	96.8 % (HPLC)

Table 2. 装置及び測定条件

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 ($>5 \cdot T_1$)
Scan times	16
Sample spin	no spin
Probe temperature	25 °C
Solvent	Pyridine- d_5
qNMR reference material	1,4-BTMSB- d_4
CRM (for calibration)	Diethyl phthalate (DEP)(NMIJ CRM4022-b)

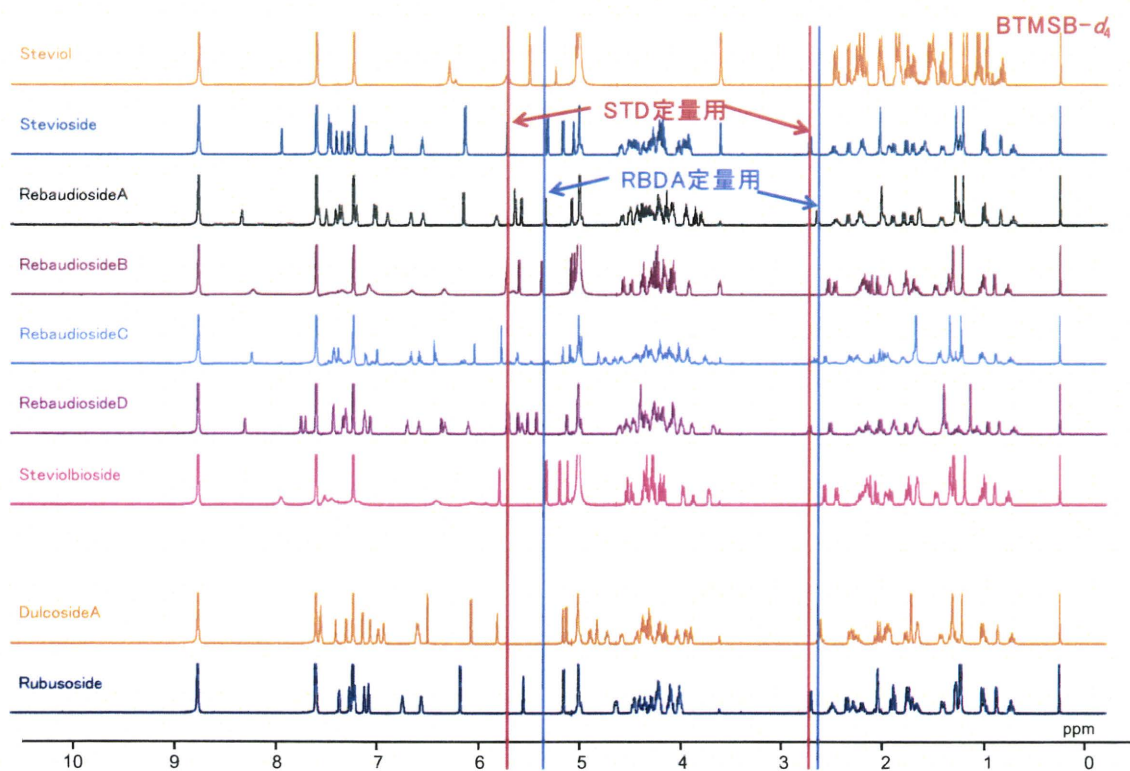


Fig. 2 NMRシフト値の比較と定量用シグナルの選択 (in pyridine- d_5)

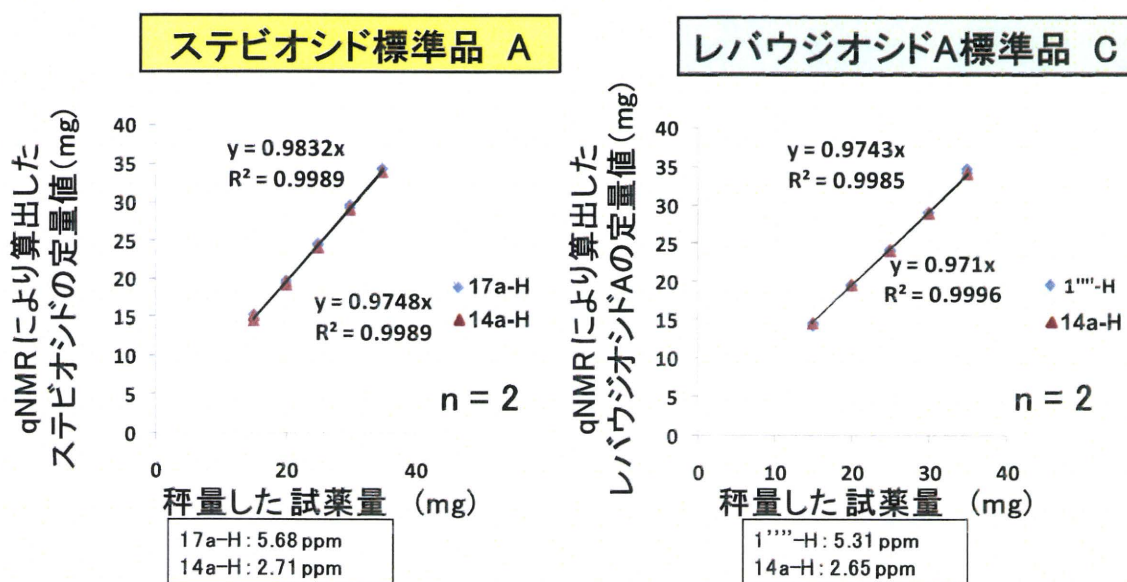


Fig. 3 qNMRによる定量性の確認: 秤量値と定量値の関係

Reagent	[17a]			[14a]			Average([17a], [14a])		
	Purity(%)	SD	CV(%)	Purity(%)	SD	CV(%)	Purity(%)	SD	CV(%)
STD-A	97.9	1.0	1.0	97.5	1.1	1.1	97.7	1.0	1.1
STD-B	95.8	0.3	0.3	95.6	0.3	0.3	95.7	0.3	0.3
STD-D	95.4	0.3	0.3	96.5	0.5	0.5	95.9	0.4	0.4
STD-C	92.1	0.8	0.8	91.8	0.2	0.3	92.0	0.5	0.5
STD-E	92.2	0.9	1.0	91.9	0.6	0.6	92.0	0.7	0.8

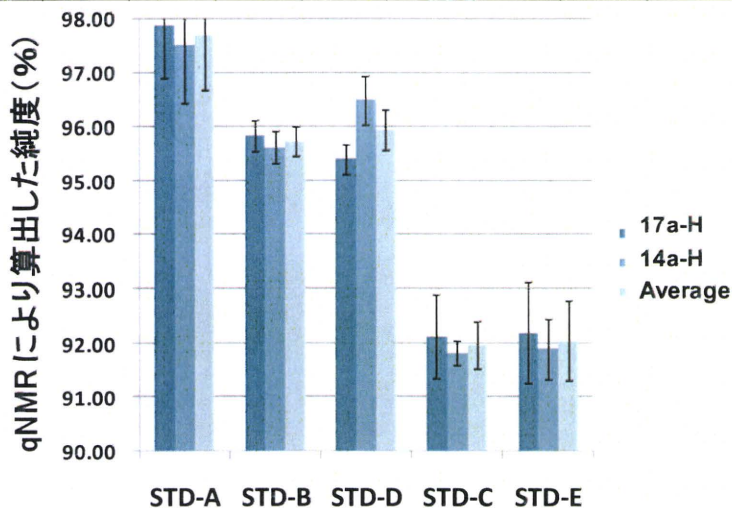


Fig. 4 qNMRによるステビオイド標準品の定量結果

Reagent	[1'''']			[14a]			Average([1''''], [14a])		
	Purity(%)	SD	CV(%)	Purity(%)	SD	CV(%)	Purity(%)	SD	CV(%)
RBDA-A	96.4	0.2	0.2	96.2	0.4	0.4	96.3	0.3	0.3
RBDA-C	97.0	0.1	0.1	96.2	0.4	0.4	96.6	0.2	0.2
RBDA-D	94.9	0.5	0.6	95.1	0.6	0.7	95.0	0.6	0.6
RBDA-E	94.5	0.7	0.7	94.8	0.6	0.6	94.6	0.7	0.7
RBDA-F	94.8	0.5	0.5	95.0	0.4	0.4	94.9	0.4	0.4

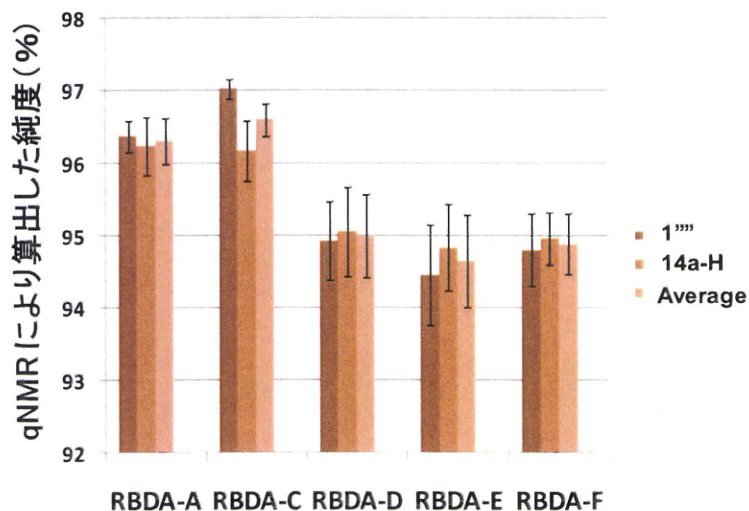


Fig. 5 qNMRによるレバウジオシドA標準品の定量結果

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

既存添加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。食品着色料として用いられる既存添加物「ベニバナ赤色素」に含まれるcarthaminのH-16に由来する δ 9.34 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bisphenol Aの δ 1.62 ppmのシグナル強度と関連づけることによって定量する方法を確立した。定量NMR用標準品として最近市販された1,4-bis(trimethylsilyl)benzene (BTMSB)は、 δ 0.5 ppm付近のシグナルが存在する製品があり、すべての製品で基準物質として用いることはできなかった。

入手した5種類の製品のcarthamin含量は0.17~6.59%であった。BTMSBと重なるシグナルが存在しなかった3種の製品では、基準物質としてHMDを用いた場合とBTMSBを用いた場合で定量値にほとんど差はなかった。

A. 研究目的

$^1\text{H-NMR}$ における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。また、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 $^1\text{H-NMR}$ 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、以下のような利点を有している。

(1) $^1\text{H-NMR}$ 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。

(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。

(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、既存添加物中の指標成分の定

量への応用を目的とし、「ベニバナ赤色素」中の赤色素成分carthaminの¹H-NMRを利用する定量法を確立することを目的として研究を実施した。

B. 研究材料と方法

化合物

認証標準物質であるbisphenol A (NMIJ CRM 4030 A) および定量NMR用基準物質1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-*d*₆ (BTMSB) は和光純薬から購入した。その他の試薬は、すべて市販品を用いた。

「ベニバナ赤色素」

国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部から提供されたものを用いた (表1)。

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) 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pyridine-*d*₅ 50mLに溶解したものをqHNMR reference stock solutionとして用いた。Bisphenol A 10.00 mgをqHNMR reference stock solution 1.00 mLに溶解し、¹H-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のメチル基水素に由来するδ 1.62 ppmのシグナル強度との比から、qHNMR reference stock solutionに含まれるHMDの量を求めた。

1,4-BTMSB溶液の作製

1,4-BTMSB 10.00mgをpyridine-*d*₅ 10.0 mLに溶解し、さらにその1.00 mLにpyridine-*d*₅ 4.00 mLを加えて、1,4-BTMSBの0.2 mg/mL溶液を調製した。

「ベニバナ赤色素」中のcarthaminの定量

「ベニバナ赤色素」150.0 mgまたは1.000 gにmethanol 約1 mL または7 mLを加えて室温で30分間、超音波抽出した。抽出液を1500rpmで3分間遠心分離することにより上清を得た。この操作を3回繰り返す、上清を合わせて減圧濃縮した。得られた抽出物を1.00 mLのqHNMR用標準液に溶かしたものをNMR測定用試料とした。測定用試料0.600 mLにmetanaol-*d*₄ 30.0 μLを加えてNMRを測定した。

C. 結果と考察

1. 「ベニバナ赤色素」の¹H-NMRスペクトル

5種類の「ベニバナ赤色素」製品のメタノール抽出物について¹H-NMRスペクトルをHMDを基準物質として測定した。製品が濃い赤紫色を呈する3つの製品 (Sample A、Sample C、Sample E) では20mgからの抽出法でcarthaminの16位のプロトンに由来するシグナルがδ 9.34ppmに明瞭に観察されたが、桃色を呈する2つの製品 (Sample B、Sample D) ではシグナルが認められなかった。そこで、これらの製品では1.0gから抽出することとした。また、2つの製品 (Sample A、Sample E) ではHMDを基準としたときにδ 0.16~0.26 ppm付近に複数のシグナルが存在し、定量NMR用基準物質として市販されているBTMSBのシグナルと重なることがわ

かった(図1)。したがって、基準物質としては、bisphenol Aで濃度を校正したHMDを用いることとした。

Satoらによって「ベニバナ赤色素」の微量成分として単離・同定されたcarthamin hydroxyethyl etherの16位のプロトンに由来する δ 9.43 ppmのシグナルは検出されなかった。

2. qHNMRによる「ベニバナ赤色素」中のcarthamin含量の定量

Carthaminの16位のプロトンに由来する δ 9.34 ppmのシングレットシグナルと認証標準物質であるPHPを基準として濃度を校正したHMDのシグナル強度を比較することにより、「ベニバナ赤色素」中のcarthamin含量を測定した(表2)。色価のわかっている3つの製品では、各製品のcarthamin含量は製品の色価とおおむね一致しており、濃赤紫色を示す製品では2.1~6.6%、桃色を示す製品では1.0gからの抽出が必要であった製品では0.2~0.4%であった。

NMR基準物質として定量NMR用標準物質BTMSBを用いることの出来た製品について、その定量値をHMDを用いた場合と比較した(表2)。その結果、両者の間にほとんど差はなかった。

D. 結論

既存添加物「ベニバナ赤色素」の主要色素成分であるcarthaminの含有量をqHNMR法を用いて定量した。本研究は、qHNMR法が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、既存添加物の品質管理法として優れた特質を持っていることを示すものである。一方、シグナルの検出には一般に1 mM程度の濃度が必要であり、この感度の低さがqHNMR法の欠点である。「ベニバナ赤色素」の場合でも含有量の低い製品では1回の測定に1g程度の材料が必要であり、その検出限界は概ね0.1%程度であると推定される。

最近になって市販された定量NMR用基準物質BTMSBは認証標準物質による濃度の補正が必要でないために便利であるが、今回の例で示されたように試料由来のシグナルと重なる場合があり、その使用には注意が必要である。

E. 引用文献

- 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ニンオキシソンの品質管理、*日本食品化学会雑誌* **16**, 28-33 (2010).
- 2) Sato, K., Sugimoto, N., Ohta, M., Yamazaki, T., Maitani, T., Tanamoto, K.: Structure determination of minor red pigment in carthamus red colorant isolated by preparative LC/MS, *Food Additives and Contaminants*, **20**, 1015-1012 (2003).

H. 研究発表

(1) 論文発表

Hasada K, Yoshida T, Yamazaki T, Sugimoto N, Nishimura T, Nagatsu A, Mizukami H.: Application of ¹H-NMR spectroscopy to validation of berberine alkaloid reagents and to chemical evaluation of Coptidis Rhizoma, *Journal of Natural Medicines* **65**, 262-267 (2011).

(2) 学会発表

河野桂子、吉田貴光、杉本直樹、山崎壮、西村哲治、永津明人、水上元：qHNMR法による「ベニバナ赤色素」中のcarthaminの定量。日本食品化学学会第17回総会・学術大会、2011年5月 [発表予定]

J. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 供試した「ベニバナ赤色素」製品

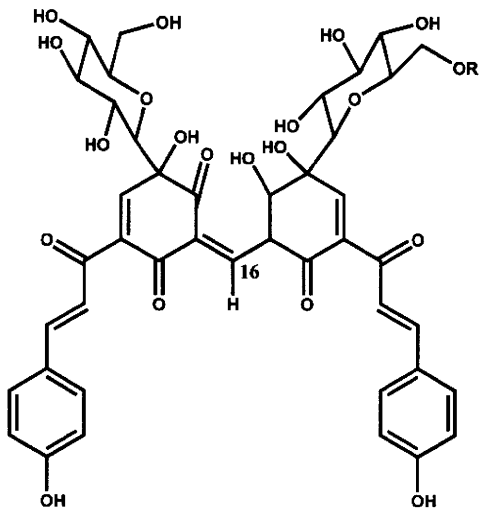
コード	性状	色価
Sample A	粉末	—
Sample B	粉末	—
Sample C	粉末	1375
Sample D	粉末	45.5
Sample E	粉末	743

表2 「ベニバナ赤色素」中のcarthamin含量

試料	Carthamin含量 (%) ^{a)} (HMDを基準として使用)	Carthamin含量 (%) ^{a)} (BTMSBを基準として使用)
Sample A	6.59 ± 0.21	nd ^{b)}
Sample B	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.05
Sample C	4.54 ± 0.36	4.64 ± 0.73
Sample D	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.10
Sample E	2.09 ± 0.01	nd ^{b)}

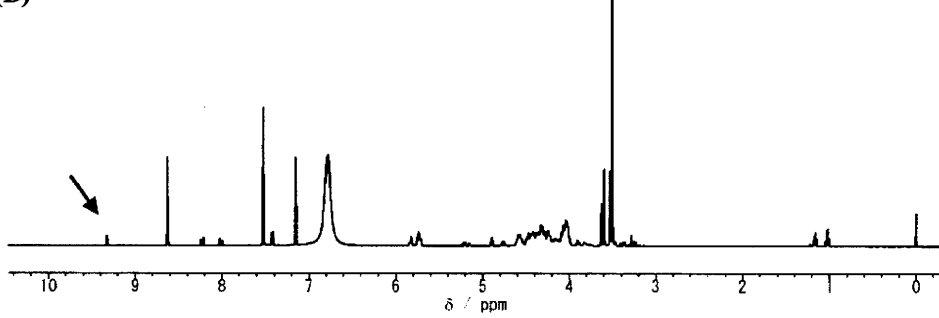
a) 平均値±標準偏差 (n=3) b) not determined.

(A)



R=H: Carthamin
R=CH₂CH₂OH: Carthamin hydroxyethyl ether

(B)



(C)

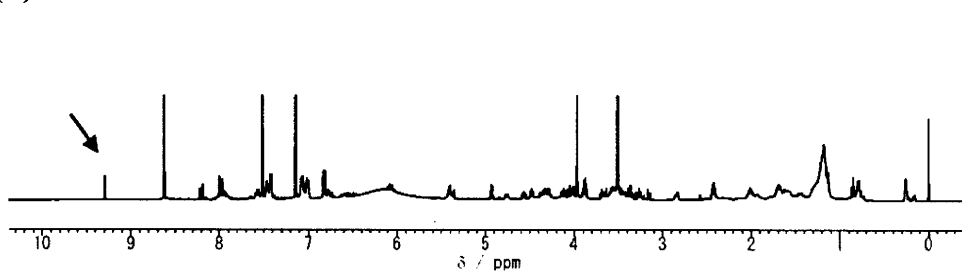


図1 (A) Carthaminの化学構造。(B) 「ベニバナ赤色素」 (Sample C) の¹H-NMRスペクトル。(C) 「ベニバナ赤色素」 (Sample A) の¹H-NMRスペクトル。矢印は、H-16由来のシングレットシグナル。

C. 既存添加物の基原確認試験法の開発

5. 既存添加物の成分と基原に関する研究

6. 食品用酵素の基原と確認試験法の開発に関する研究