

Fig. 3 Structure of genipocyanin G1, the blue pigment that was produced by the reaction between genipin and glycine (Gly)

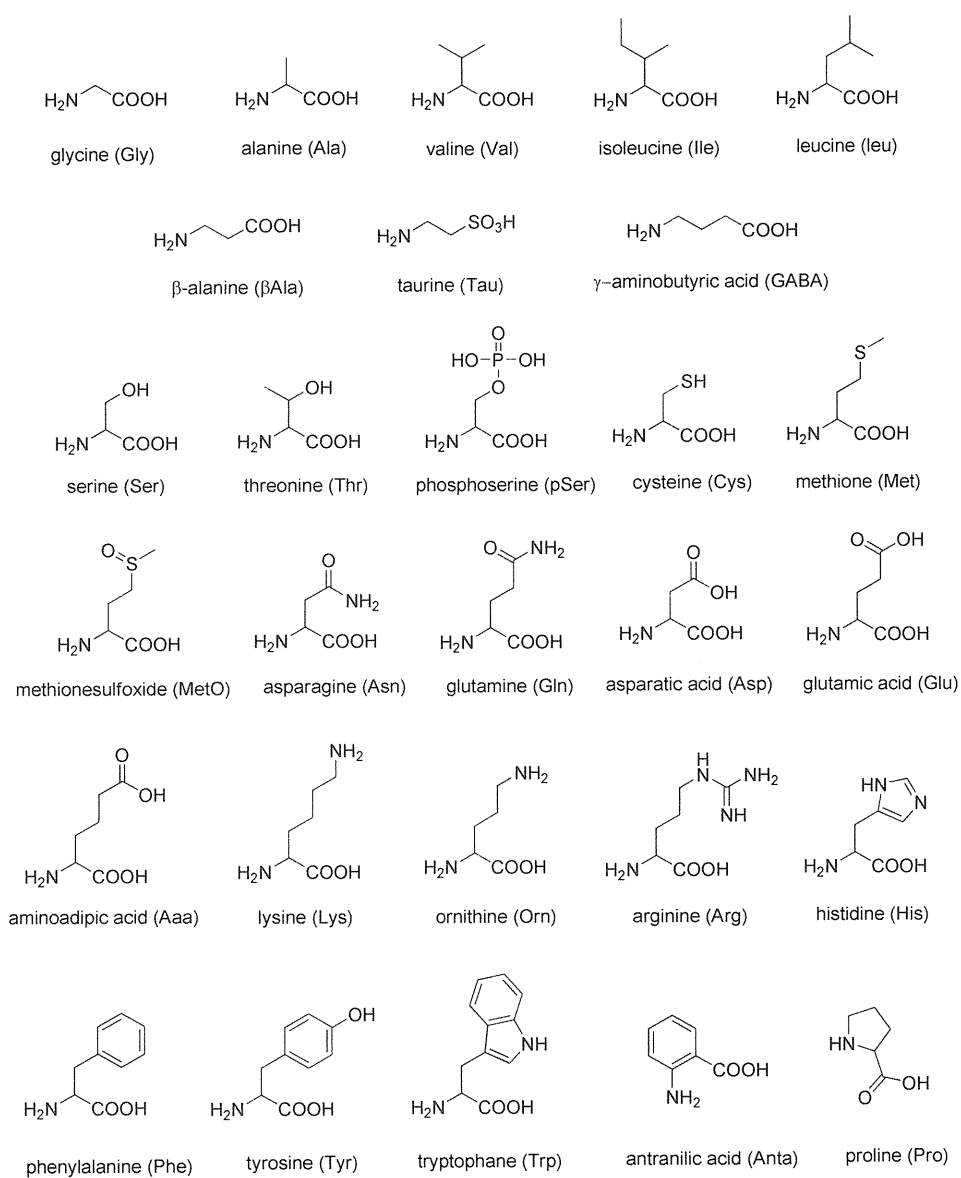


Fig. 4. Structures of 28 amino acids (20 usual and 8 unusual amino acids) provided for this study

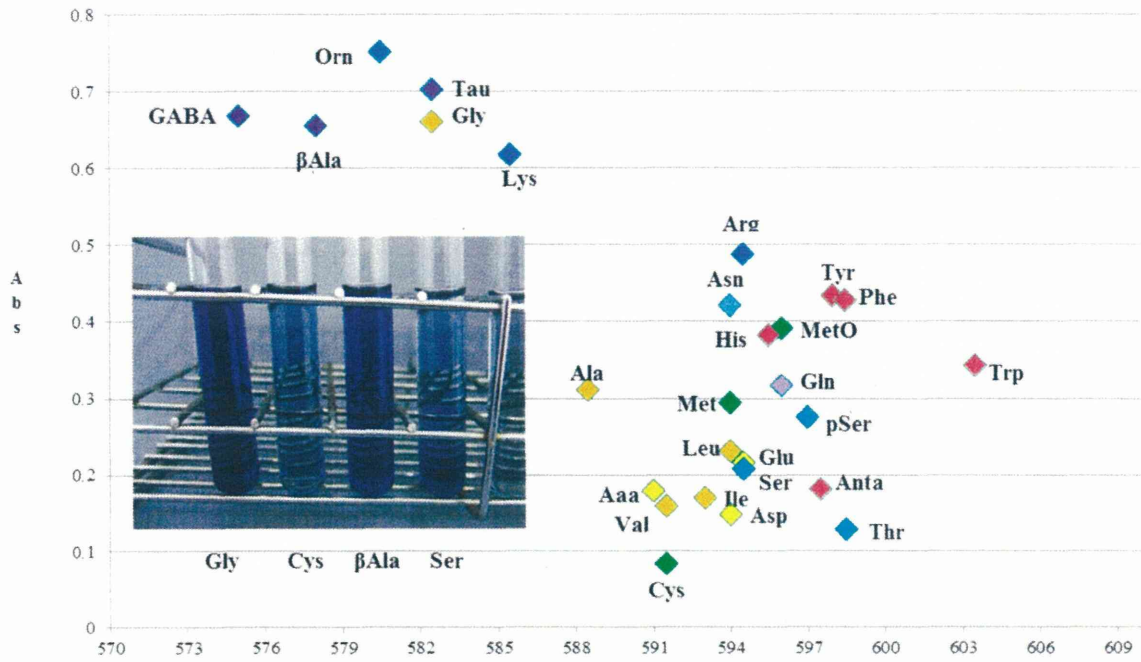


Fig. 5 ゲニピンとアミノ酸 27 種の反応生成物の極大吸収波長（横軸）とその吸光度

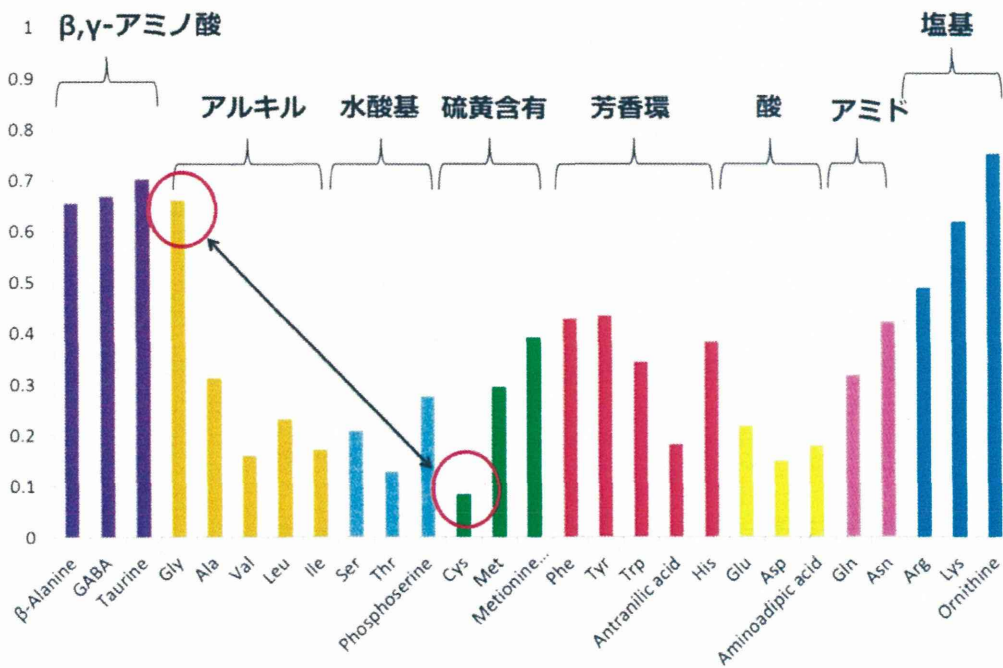


Fig. 6: ゲニピンとアミノ酸 27 種の反応生成物の極大吸収波長における吸光度の比較

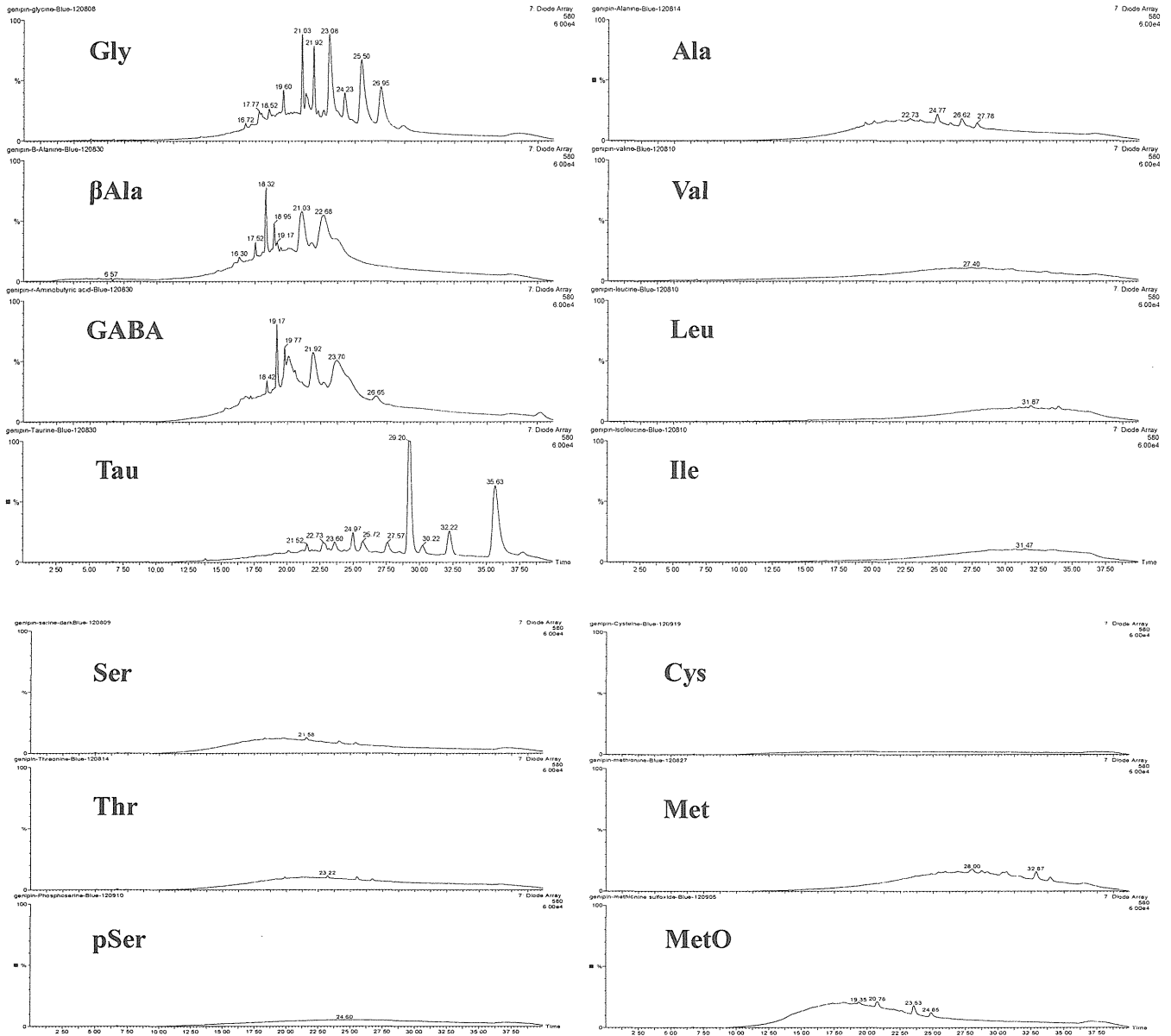


Fig. 7-1 ゲニピンとアミノ酸 27 種の反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 580 nm)

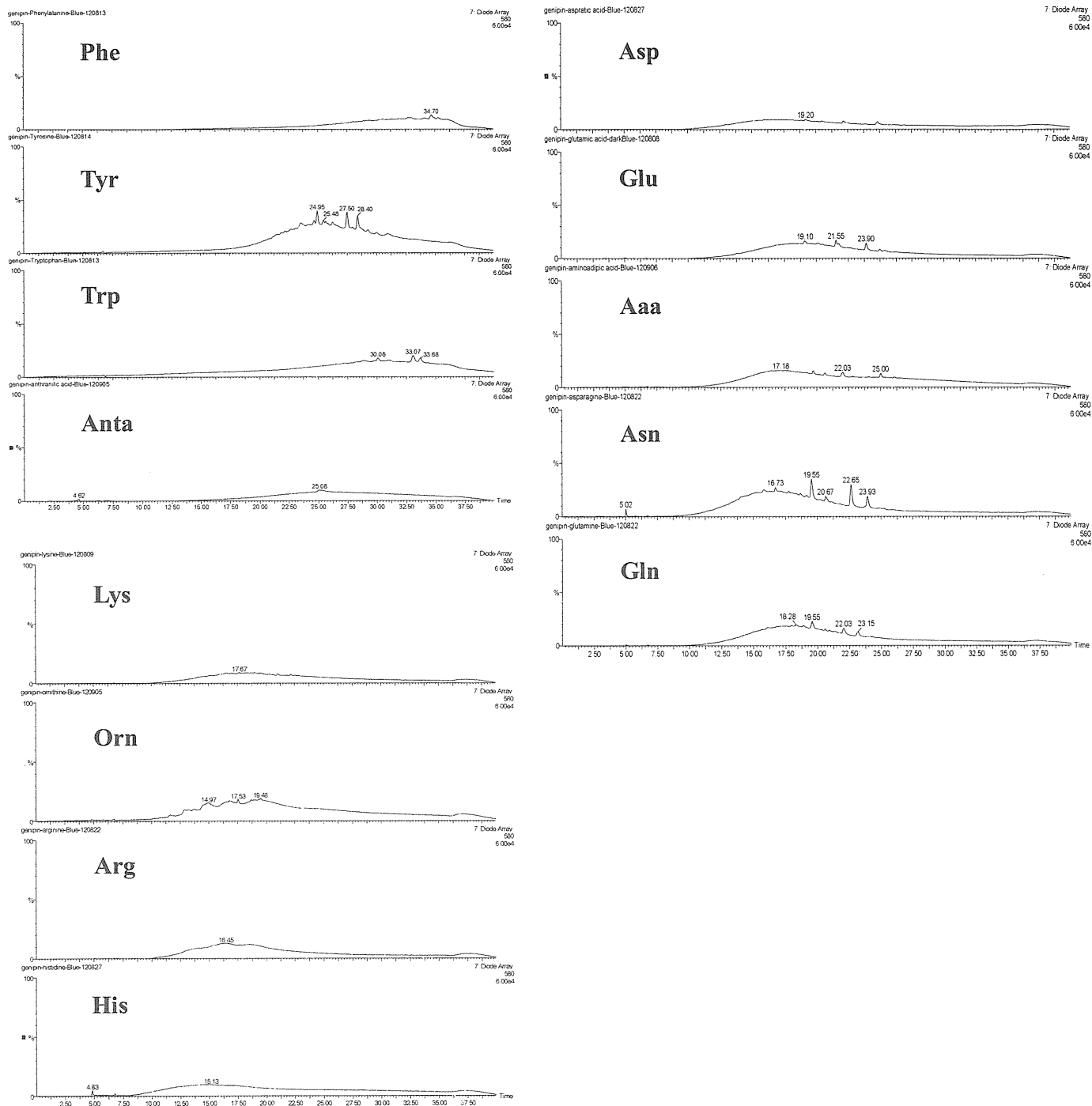


Fig. 7-2 ゲニピンとアミノ酸 27 種の反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 580 nm)

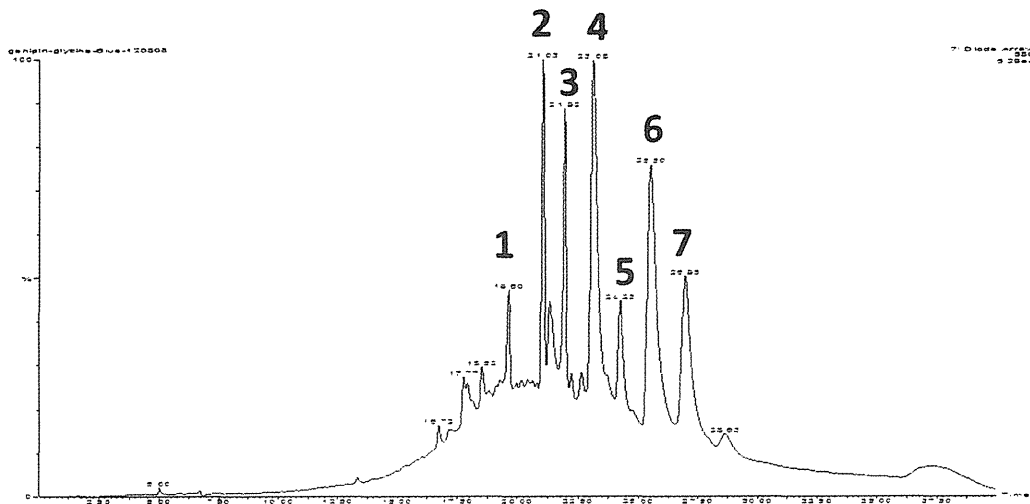


Fig. 8 ゲニピンと Gly の反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 580 nm)

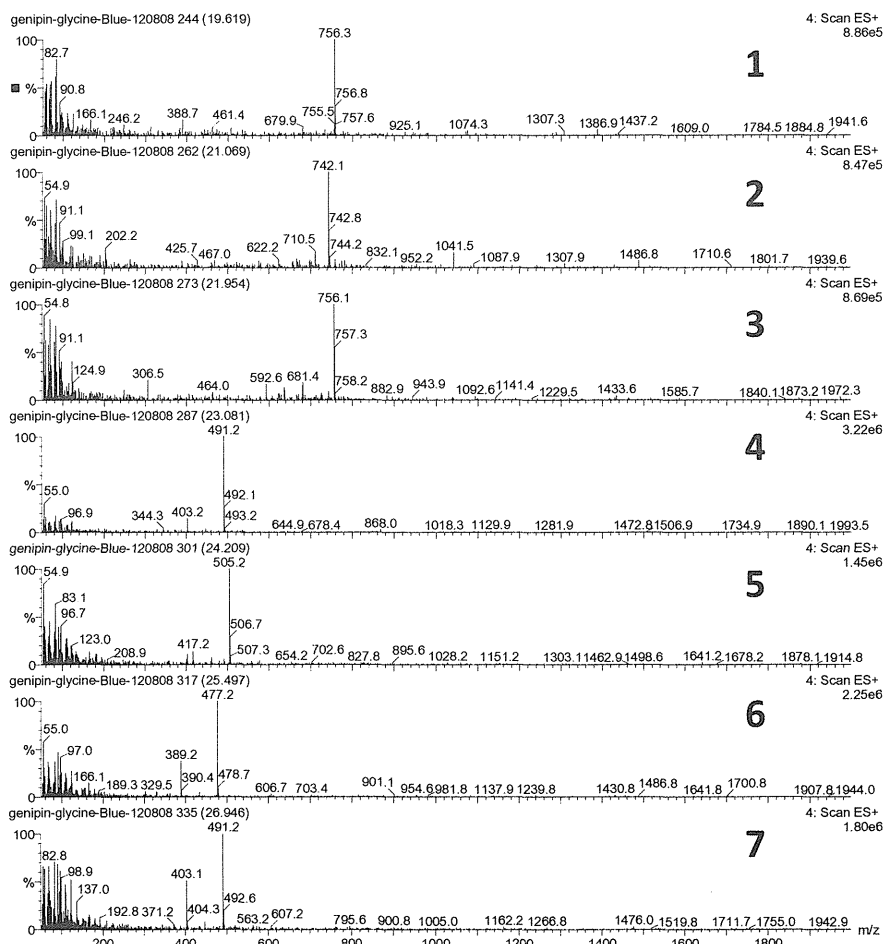


Fig. 9 Fig. 8 の各ピークにおける陰イオンモードの ESI-MS スペクトル

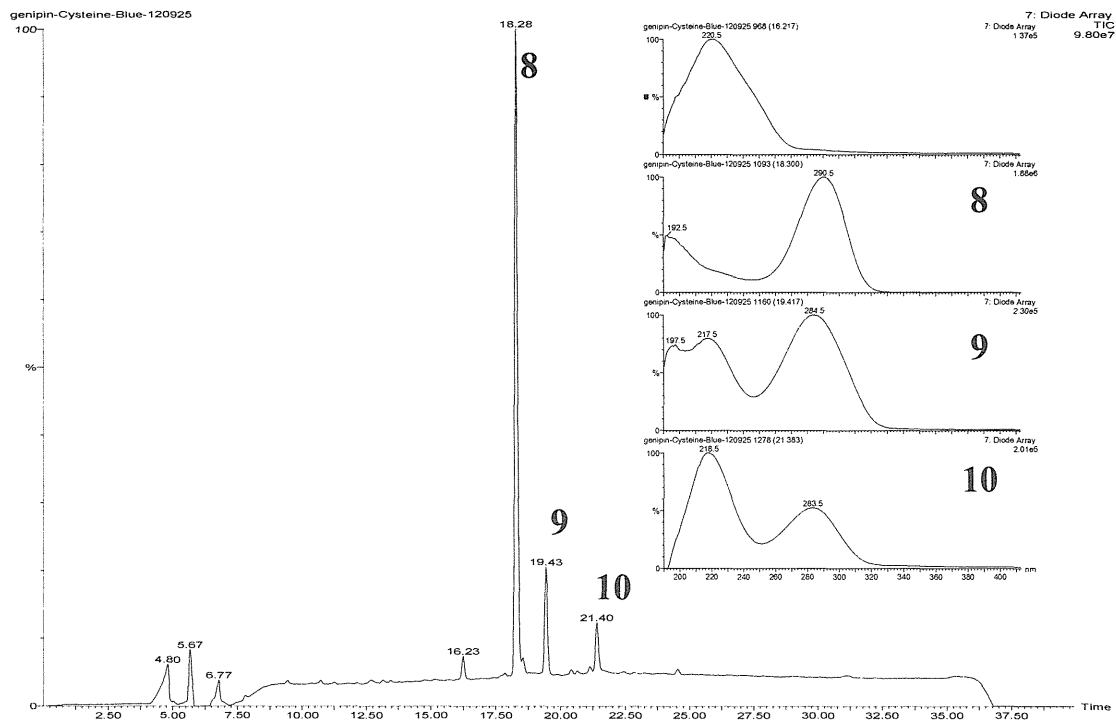


Fig. 10 ゲニピン/Cys の反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 210 nm)

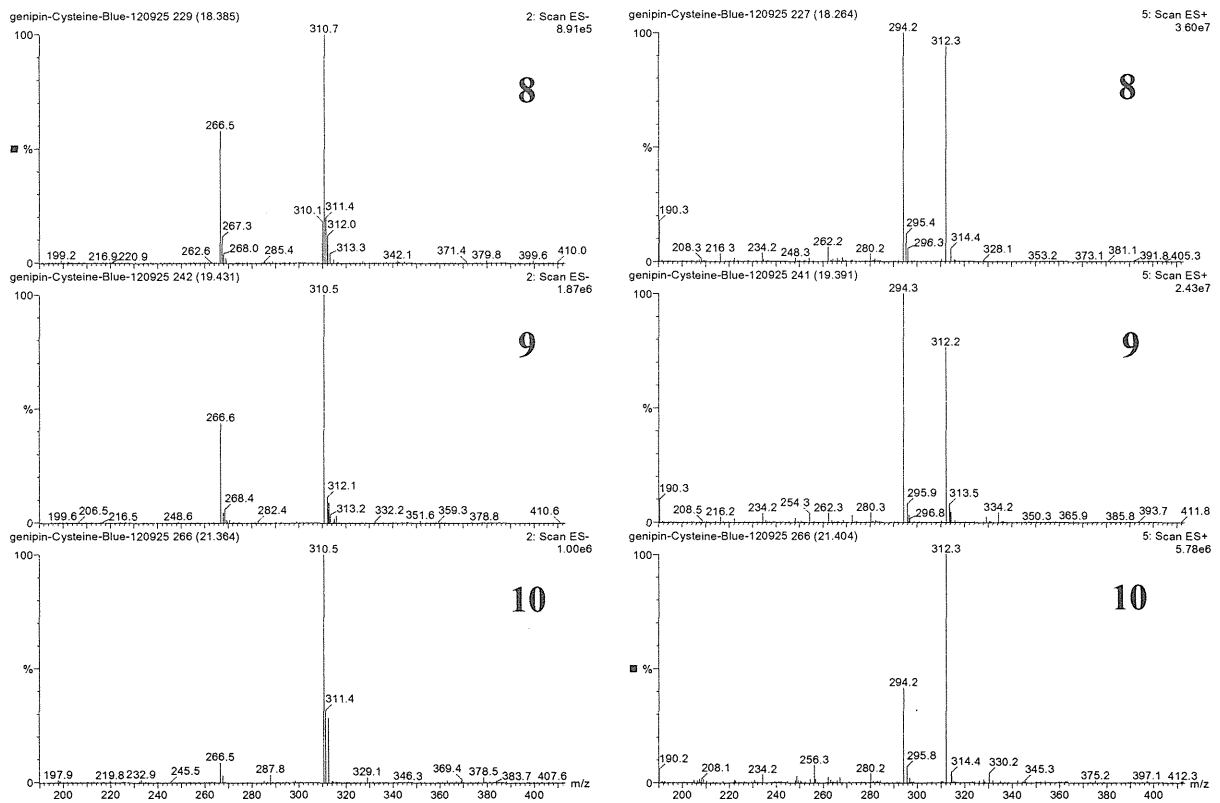


Fig. 11 Fig.10 における各ピークの陰イオン (左) および正イオン (右) ESI-MS スペクトル

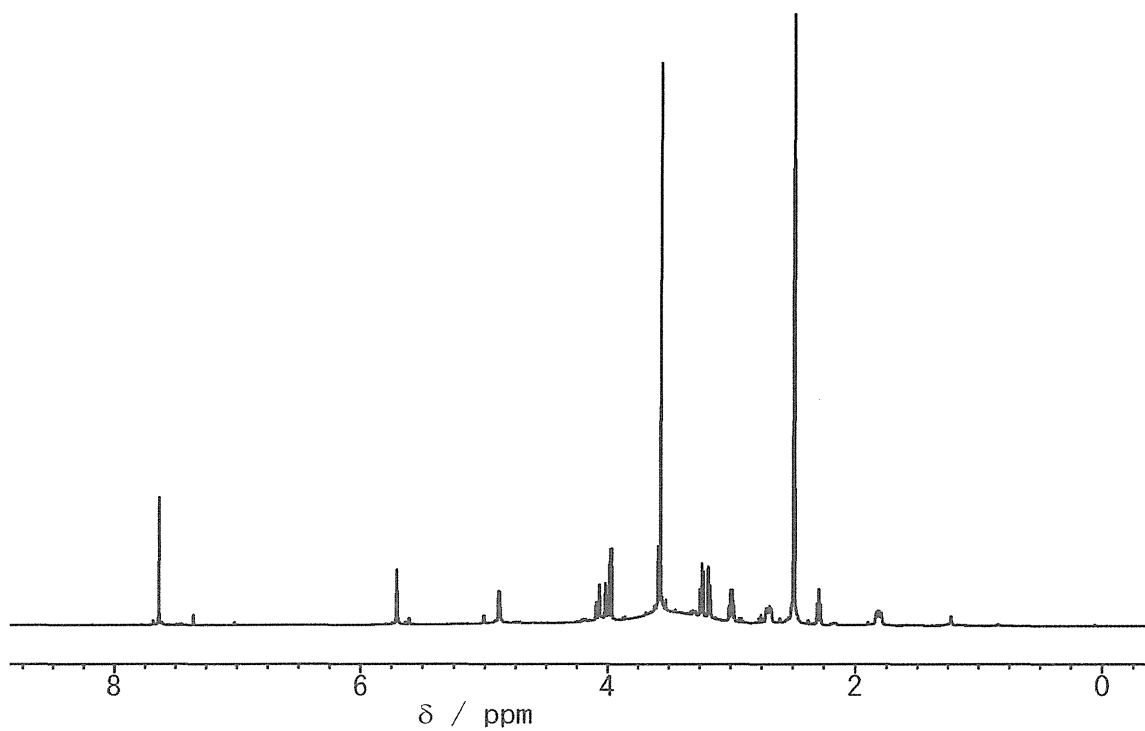


Fig. 12 ゲニピン/Cys から得られた反応生成物(8)の ^1H -NMR spectrum (DMSO- d_6)

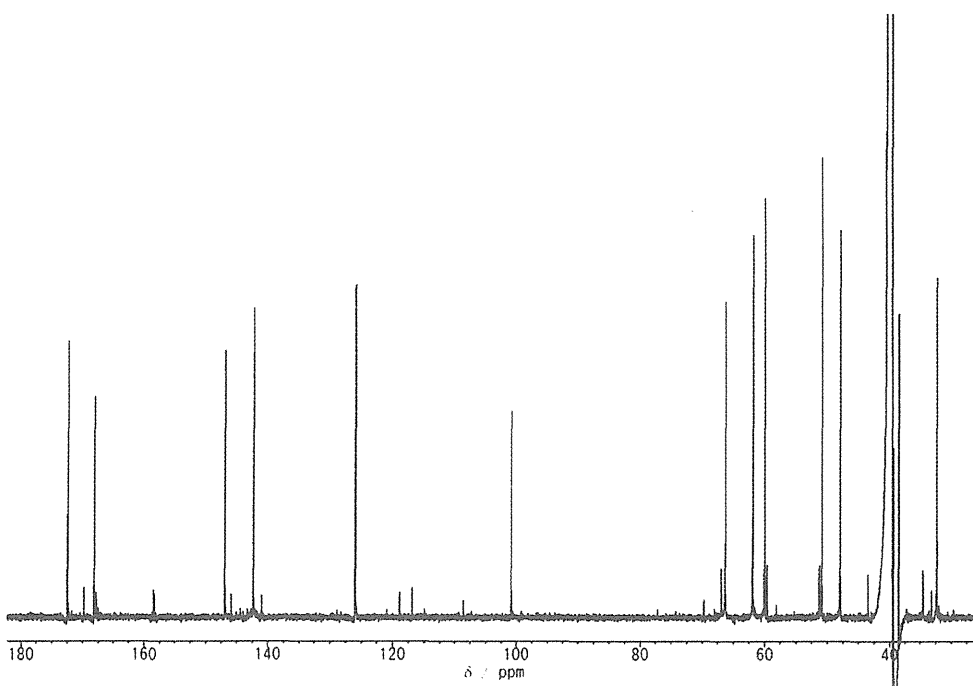


Fig. 13 ゲニピン/Cys から得られた反応生成物(8)の ^{13}C -NMR spectrum (DMSO- d_6)

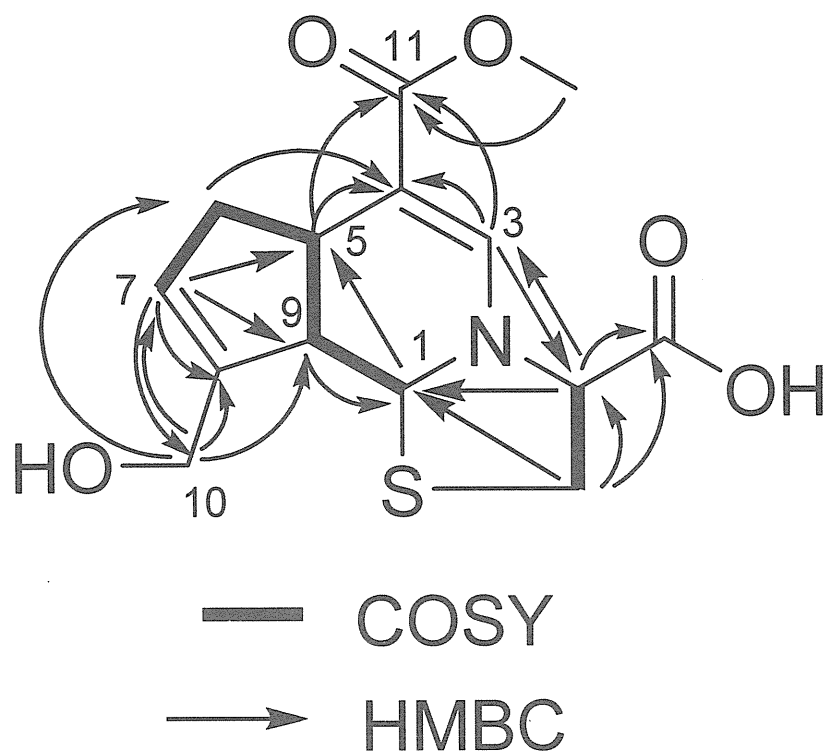


Fig. 14 ゲニピン/Cys から得られた反応生成物(8)の COSY 相関(太線)および HMBC 相関 (→)

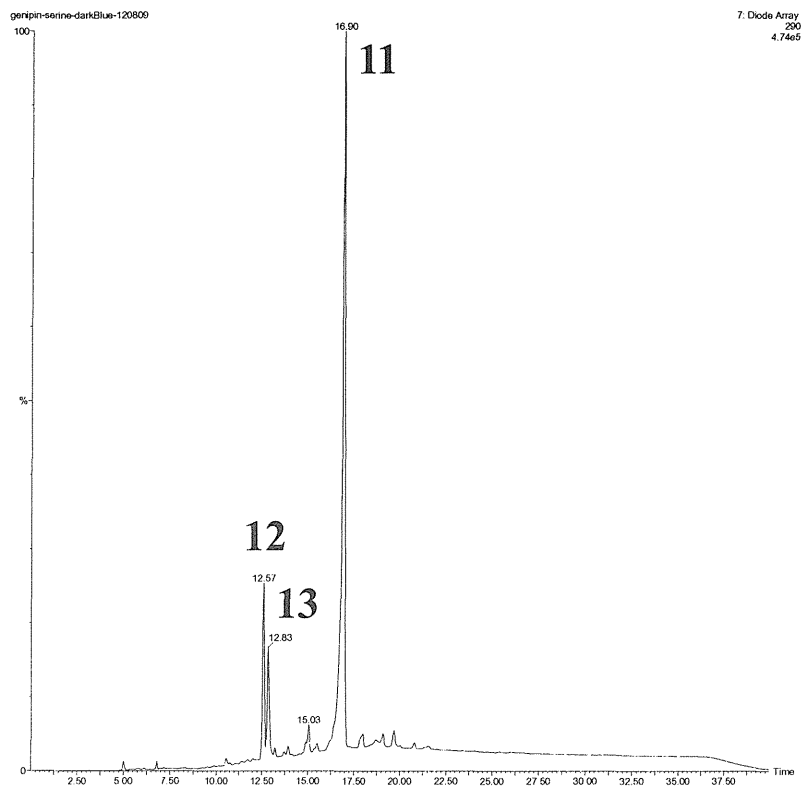


Fig. 15 ゲニピン/Ser の反応生成物の逆相 HPLC クロマトチャート (検出 210 nm)

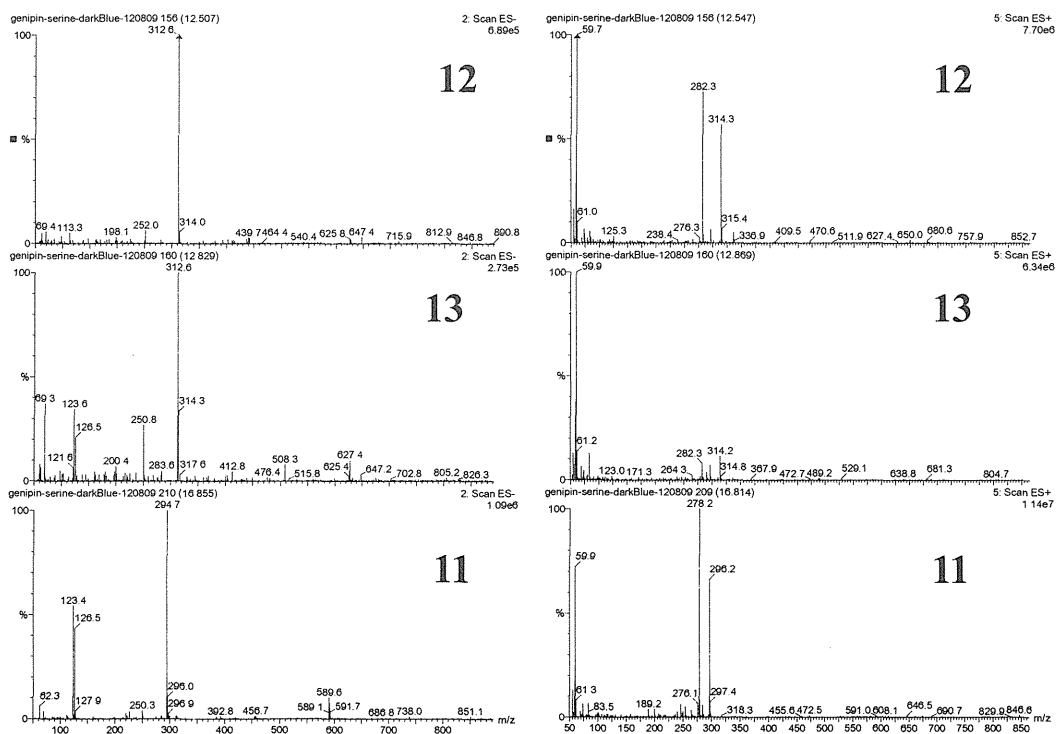


Fig. 16 Fig.15 における各ピークの陰イオン (左) および正イオン (右) ESI-MS スペクトル

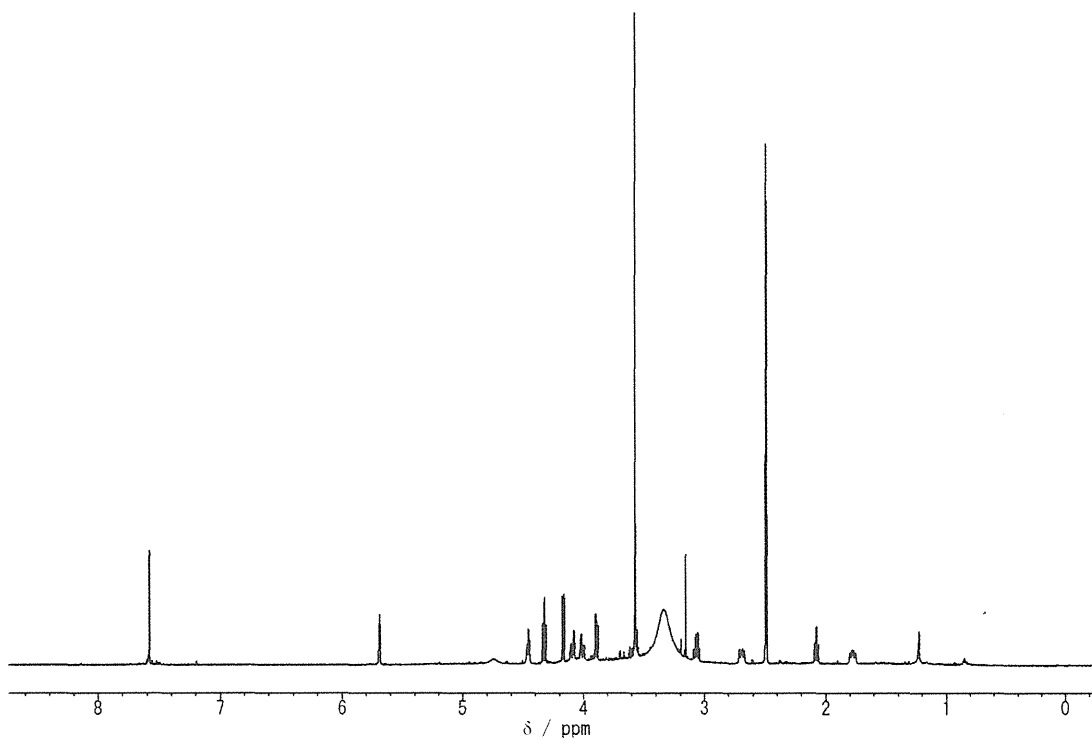


Fig. 17 ゲニピン/Ser から得られた反応生成物(11)の ^1H -NMR spectrum (DMSO- d_6)

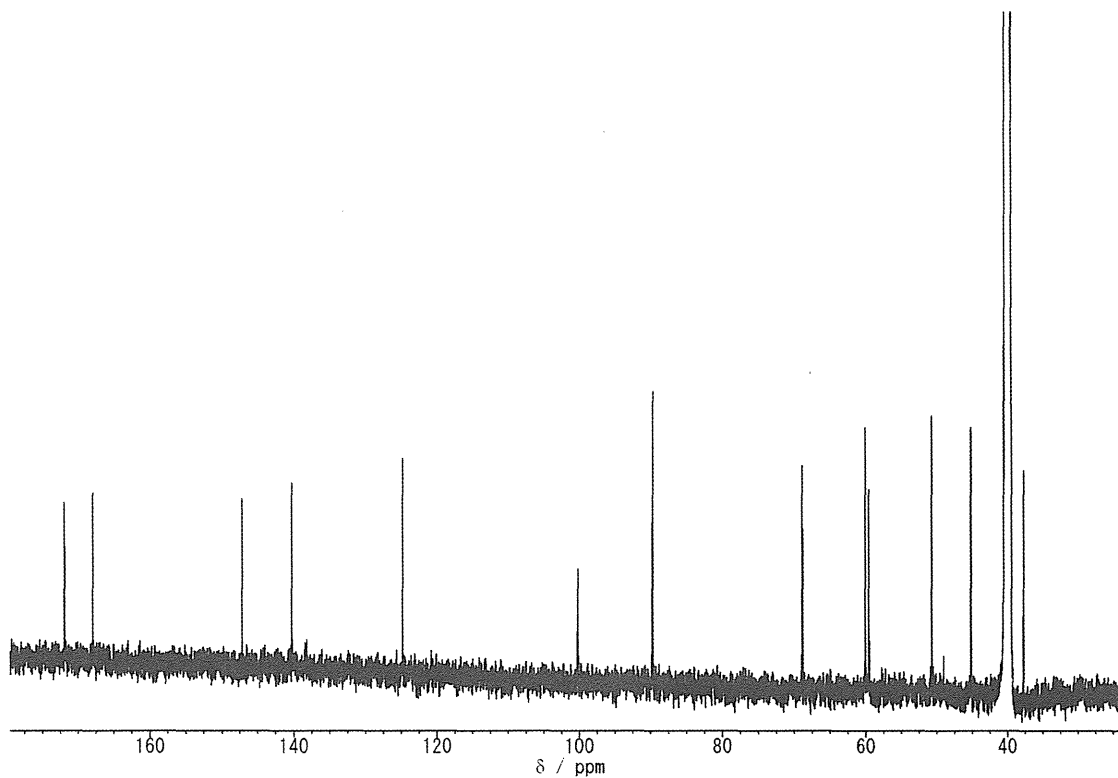
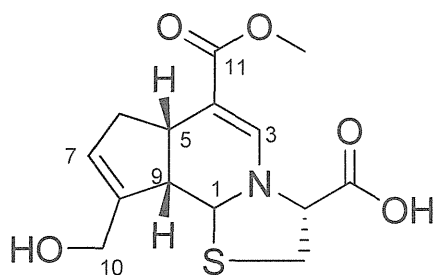


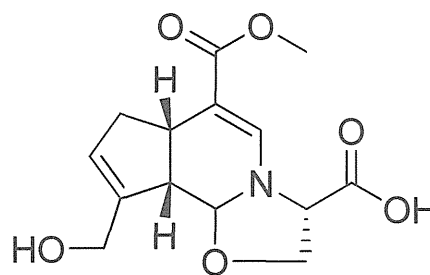
Fig. 18 ゲニピン/Ser から得られた反応生成物(11)の ^{13}C -NMR spectrum (DMSO- d_6)

Table.1 Chemical shifts of reaction products (8) and (11)

position	Genipin/Cys (8)		Genipin/Ser (11)	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
Genipin				
1	3.96 (d, 10.3)	61.9	4.16 (d, 8.2)	89.7
3	7.64 (s)	142.3	7.59 (s)	140.3
4		100.8		100.2
5	2.99 (q, 9.0)	38.2	3.06 (q, 9.0)	37.9
6	1.81 (brt, 12.7)	39.0	1.78 (brt, 12.7)	39.0
	2.69 (dd, 15.8, 8.2)		2.69 (dd, 15.8, 8.2)	
7	5.70 (s)	126.0	5.69 (s)	124.9
8		146.9		147.2
9	2.29 (t, 8.9)	47.9	2.07 (t, 8.2)	45.2
10	4.05 (d, 14.4)	60.0	4.01 (d, 13.5)	60.1
	4.05 (d, 14.4)		4.08 (d, 13.5)	
11		168.1		168.0
12-Me	3.55 (s)	50.8	3.55 (s)	50.8
Cys, Ser				
1		172.5		172.0
2	4.88 (dd, 6.9, 2.7)	66.1	4.46 (t, 6.9)	59.6
3	3.18 (dd, 11.0, 2.7)	32.2	3.90 (dd, 8.2, 6.2)	68.9
	3.23 (dd, 11.0, 6.9)		4.33 (t, 8.2)	

**8**

Chemical Formula: C₁₄H₁₇NO₅S
Exact Mass: 311.0827

**11**

Chemical Formula: C₁₄H₁₇NO₆
Exact Mass: 295.1056

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）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 23～25 年度分担総合研究報告書

既存添加物の含有成分解析に関する研究

分担研究者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

協力研究者 好村 守生 松山大学薬学部 講師

研究要旨

既存添加物名簿に記載されている製造用剤ブドウ果皮抽出物および苦味料等ゲンチアナ抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、製品中の含有成分について精査した。各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、ブドウ果皮抽出物から 13 種の化合物、ゲンチアナ抽出物から新規化合物 1 種を含む 17 種の化合物を単離、構造解析した。ブドウ果皮抽出物については縮合型タンニンオリゴマー画分の特性についても解析した。これら結果に基づき、各添加物製品含有成分について、化学的特徴を考察することができた。

研究成果の総括

A. 研究目的

既存添加物名簿収載品目リストに記載されている製造用剤として、ブドウ果皮抽出物の定義には、「アメリカブドウ又はブドウの果皮から得られた、ポリフェノールを主成分とするものをいう」とあり、基原・製法・本質には、「ブドウ科アメリカブドウ (*Vitis labrusca* Linne) 又はブドウ科ブドウ (*Vitis vinifera* Linne) のうち、生食用又は醸造用ブドウの甲州、シャルド若しくはリースリング種の果皮搾粕より、室温時又は微温時エタノールで抽出して得られたものである。主成分はポリフェノールである」と記されている。

一方、苦味料等のゲンチアナ抽出物は「リンドウ科ゲンチアナの根または根茎より、水またはエタノールで抽出して得られたもの」とされ、基原・製法・本質には、「リンドウ科ゲンチアナ (*Gentiana lutea* LINNE) の根又は根茎より、水又はエタノールで抽出して得られたものである。有効成分はゲンチオピクロシド (ゲンチオピクリン) 及びアマロゲンチンである」と記されている。既存添加物の多くは抽出物であり、複合成分の場合が多く、その品質管理のためには明確な成分分析を行い、それを踏まえた規格作成が必要である。そこで本研究では、これら添加物製品中の含有成分を精査することによる品質規格作成のための化学データの集積を目的とした検

討を行った。

B. 研究方法

ブドウ果皮抽出物, ゲンチアナ抽出物について, それぞれ液液分配および各種カラムクロマトグラフィー [YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20, Chromatorex ODS 等] による分離・精製を繰り返すことで化合物の単離を行った。単離した各化合物については, 順相および逆相 HPLC での標品との直接比較あるいは文献値との NMR, MS データ等の比較によって化合物の同定, 構造解析を行った。高分子画分の分析はゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により行った。

C. 研究結果および考察

製造用剤ブドウ果皮抽出物の品質規格作成のための化学的検討として, ブドウ果皮抽出物製品中の含有成分について精査した結果, 13 種の化合物 (tryptamine, syringic acid, vanillic acid, ethyl gallate catechin, epicatechin, luteoliflavan, quercetin, quercetin 3-O-glucuronide, myricetin 3-O-glucoside, procyanidin B-1, procyanidin B-2, procyanidin B-5 or 8) を単離することができた。また, ブドウ果皮抽出物製品中の縮合型タンニンオリゴマー画分について, GPC による平均分子量を求めた結果, 数平均分子量は 5999.6, 重量平均分子量は 21287.7 であった。プロシアニジン系タンニンが多く含まれることから, ブドウ果皮抽出物製品中のプロアントシアニジンの簡便測定法について検討したところ, バニリン, 硫酸を加えて呈色させ, 吸光度測定することで測定可能であることが

明らかとなった。この方法を適用し, catechin 換算で 2 製品を定量分析した結果, 約 60% の含有率が算出され, 測定可能であることが示唆された。

苦味料等ゲンチアナ抽出物の品質規格作成に供する化学的検討として, ゲンチアナ抽出物製品中の含有成分について精査した結果, 16 種の既知化合物 (anofinic acid, 2-methoxyanofinic acid, 5-hydroxymethyl-2-furfural, 2,3-dihydroxybenzoic acid, furan-2-carboxylic acid, loganic acid, gentiopicroside, isovitexin, sweroside, vanillic acid, gentisin, isogentisin, 6'-O-glucosylgentiopicroside, gentisin 7-O-primeveroside, isogentisin 3-O-primeveroside, swertiajaposide D) とともに, 1 種の新規化合物 (GL-1 と仮称) を単離, 構造解析した。また, 本製品溶液中で主検出されたのは gentiopicroside で, 次いで loganic acid, sweroside が認められた。一方, ゲンチアナ抽出物の有効成分としてされる amarogentin については, 微量しか検出されなかった。このことは, 調製方法による原因が考えられたため, 調製の条件を変えて検討した。その結果, いずれも amarogentin は微量のみの検出で, 調製方法の差異によるものではないことが考察された。

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

分担研究者 水上 元

名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 既存添加物中の有効成分の定量分析に定量NMR法（qHNMR法）を適用することを課題として研究を実施し、以下の成果を得た。（1）「ベニバナ赤色素」の色素成分carthaminの含量をqHNMR法によって直接定量する方法を確立した。本法を用いれば、carthamin標準品を必要とせずに、その含有量の絶対定量が可能である。（2）「ヤマモモ抽出物」の抗酸化成分myricitrinの市販試薬の純度をqHNMR法を用いて評価した。本法が、「ヤマモモ抽出物」中のmyricitrin含量の絶対定量に直接に応用できる可能性を示唆した。（3）「カンゾウ抽出物」の甘味成分glycyrrhizic acidの市販試薬の純度をqHNMR法を用いて評価した。本法を「カンゾウ抽出物」中のglycyrrhizic acidの絶対定量に直接に適用することは、夾雑シグナルの存在のために困難であった。

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。

$^1\text{H-NMR}$ 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) ^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。

(2) シグナル面積と濃度の関係は、化合物の種類によらずに一定であるので、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にqHNMR法を応用することを目的として実施し、以下の成果を得た。(1) 定量用標準品が入手できない「ベニバナ赤色素」の色素成分 carthamin について、qHNMR法を利用して標準品なしにその含有量の定量が可能であることを示した。(2) 「ヤマモモ抽出物」の抗酸化成分である myricitrin について、市販標準品の純度評価をqHNMR法を用いて実施するとともに、製品中の myricitrin 含量を直接定量することも可能であることを示した。(3) 「カンゾウ抽出物」の甘味成分 glycyrrhizic acid について、市販標準品の純度評価をqHNMR法を用いて実施した。「カンゾウ抽出物」では、夾雑シグナルの存在のために glycyrrhizic acid 含量を直接定量することは困難であった。

B. 研究材料と方法

試薬類

認証標準物質である potassium hydrogen phthalate (PHP, NMIJ CRM 3001-a) と bisphenol A (NMIJ CRM 4030 A) および定量NMR用基準物質である 1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_6 (1,4-

BTMSB) と 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- d_6 (DSS- d_6) はいずれも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」、 「ヤマモモ抽出物」 および 「カンゾウ抽出物」

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。

HMD濃度の測定

Hexamethyldisilane (HMD) の約10 mgを精確に秤取り、pyridine- d_5 50.0 mLに溶解したものを qHNMR reference stock solution として用いた。Bisphenol A 約10.0 mgを精秤し qHNMR reference stock solution 1.00 mLに溶解して、 ^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 (qHNMR用認証標準物質) 約25.0 mgを精確に秤取り、acetone- d_6 25.0 mLに溶解して、1,4-BTMSBの1.00 mg/mL溶液を調製した。

DSS- d_6 溶液の作成

DSS- d_6 (qHNMR用認証標準物質) 約25.0 mgを精確に秤取り、DMSO- d_6 50.0 mLに溶解して、DSS- d_6 の0.500 mg/mL溶液を調製した。

NMR装置と測定条件

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

「ベニバナ赤色素」中のcarthaminの定量

「ベニバナ赤色素」約150 mgまたは1.00 gを精秤し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回繰り返し、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0.6 mLにmethanol- d_4 30.0 μ Lを加えてNMRを測定した。

Myricitrin標準品の純度の検定

Myricitrinの約3.00 mgを正確に秤取り、1,4-BTMSB溶液1.00 mlに溶解した。この溶液の0.6 mlを用いてNMRを測定した。

「ヤマモモ抽出物」中のmyricitrin含量の測定

「ヤマモモ抽出物」約100 mgを正確に秤取り、BTMSB溶液1.00 mlに懸濁して10分間超音波抽出した。懸濁液を4 $^{\circ}$ C、10,000 x g で10分間遠心して得た上清0.6 mlのNMRを測定した。

Glycyrrhizic acid 市販試薬の純度の検定

Glycyrrhizic acidの約5.00 mgを正確に秤取り、DSS- d_6 (Wako TraceSure-grade) を0.500 mg/mlの濃度で含むDMSO- d_6 溶液の1.00 mlに溶解した。この溶液の0.6 mlを用いてNMRを測定した。

カンゾウ抽出物中のglycyrrhizic acidの定量

カンゾウ抽出物の約10.0 mgを正確に秤取り、glycyrrhizic acid標準品と同様にしてNMRを測定した。

HPLCによるglycyrrhizic acidの測定

Glycyrrhizic acid標準品約1.00mgを5.00 mlのエタノールに溶解したものを、HPLC用標準液とした。HPLC分析の条件は、第16改正日本薬局方所収の方法²⁾に従って行った。

C. 結果と考察

1. 「ベニバナ赤色素」のcarthamin含量の測定

「ベニバナ赤色素」の主色素成分である

carthaminは、その構造研究が行われ、¹H-NMRシグナルの帰属も報告³⁾されているが、精製されたcarthamin標品の入手が困難で、「ベニバナ赤色素」の品質は色価で規定されている。そこで、carthaminのH-16 (9.34ppm, singlet)、H-8,8' (8.21ppm, doublet) および H-9,9' 位 (8.03ppm, doublet) のシグナル³⁾を指標シグナル (図1) として、「ベニバナ赤色素 (sample C)」に含まれるcarthamin含量を測定した。

その結果、いずれのシグナルを用いた場合においても定量値にほとんど差はなく、他のシグナルと充分に分離していれば、どのようなプロトンに由来するシグナルでも使用可能であることが確認できた。

次に、carthaminのqHNMR法について、定量法のvalidationを行ったところ、連続した5回の測定におけるcarthaminのH16シグナルとNMR標準物質であるHMDのシグナルの面積比の変動係数は1.53%、測定の日内変動と日間変動はそれぞれ3.35%と2.46%、標準品添加実験における回収率は105%と、本法が高い精度を有することが明らかになった。

そこで、入手した5つの「ベニバナ赤色素」製品についてqHNMR法によるcarthamin含量の測定を行い、carthaminの530nmにおける吸光係数⁴⁾をもとに吸光度から求めた定量値と比較した (表1)。両者は高い相関性を示したが、いずれのサンプルについても吸光係数に基づく方法で得た定量値の方が高くなった。これは、

(1) 吸光度の測定に用いられたcarthamin標準品の純度が低く、報告されている吸光係数が真の値よりも低いこと、および (2) 「ベニバナ赤色素」中に530nm付近に吸収を有する別の物質が存在していることによるものと考えられる。

2. qHNMR法によるmyricitrin試薬の純度の測定

「ヤマモモ抽出物」に含まれる抗酸化物質であるmyricitrinの市販試薬の純度をqHNMR法を用いて検定することを目的として研究を実施した。まず、myricitrinのNMRスペクトルを測定

したところ、H-2',6' (6.93ppm, singlet)、H-8 (6.37ppm, doublet)、H-6 (6.18ppm, doublet) のシグナルが明瞭に観察された(図2)。そこで、これらのプロトンシグナルを指標とし、qHNMR用の認証標準物質であるBTMSBを基準としてmyricitrin (Sample 1) の純度を求めた。用いるプロトン間で定量値にほとんど差はなかったため、以下の実験では最も低磁場に存在しているH-2',6'のプロトンを用いることとした。

3種の市販標準品の純度をqHNMR法によって決定した(表2)。各標準品の純度は88~90%の範囲にあり、カタログ記載の純度よりもかなり低いことが明らかになった。これは、表示純度がHPLCによって評価されているために用いた検出系によっては検出できなかつたり、カラムから溶出しない不純物が存在していることと、含まれている水分の評価が出来ないことによるものと考えられる。

次に食品添加物製品である「ヤマモモ抽出物」中のmyricitrin含量のqHNMRによる定量を試みたところ、 $29.2 \pm 0.29\%$ という値が得られた。

3. qHNMR法によるglycyrrhizic acid試薬の純度の検定

「カンゾウ抽出物」中の甘味成分であるglycyrrhizic acidの市販標準品の純度をqHNMR法を用いて評価した。まず、glycyrrhizic acidのNMRを測定したところ、H-9 (2.36ppm, singlet)、H-12 (5.42ppm, singlet)、H-1' (4.43ppm, doublet)、H-1'' (4.52ppm, doublet) のシグナル⁵⁾が明瞭に観察された。このうち、もっとも低磁場側に観測されるH-12シグナルを指標として用いることとした(図3)。

種々の供給元から入手した10種のglycyrrhizic acid試薬について、H-12由来のシグナルを指標として純度を測定した(表3)。その結果、その純度は62~89%の範囲にあり、特にカタログ上での純度が90%以上の試薬では、その提示純度と比較してqHNMR純度は低くなった。

qHNMR法による純度評価を行った

glycyrrhizic acid試薬について、0.200 mg/ml溶液を作成し、その10 μ lを用いてHPLCで分析した時のglycyrrhizic acidに相当するピークの面積とqHNMR法によって求めた純度の相関性を検討した(図4)。その結果、両者は高い相関性を示していた。

つぎに、「カンゾウ抽出物」中のglycyrrhizic acid含量をqHNMR法を用いて直接測定することを試みたが、他のシグナルと重なったり、ベースラインのゆがみが認められ、このシグナルを用いた定量は困難であると思われた。一方、これらの製品ではH-9に由来する2.36 ppmのシグナルは比較的明瞭に観察されたので、このシグナルを用いて、定量を行うことが可能であった。しかしながら、「カンゾウ抽出物」の3製品について、第16改正日本薬局方に収載されたHPLC法を用いてglycyrrhizic acid含量を定量したところ、qHNMR法による値とは必ずしも一致せず、後者による定量値が高くなる傾向を示した(表4)。

D. 結論

「ベニバナ赤色素」のcarthamin含量をqHNMR法を用いて直接測定する方法を確立した。本法を用いた定量値とcarthaminの報告されている吸光係数を用いる吸光度測定法による定量値はよく相関しているため、製品間での含量を相対的に比較するには、色価で充分であるように思われる。

「ヤマモモ抽出物」のmyricitrinの市販試薬の純度をqHNMR法を用いて評価した。製品中のmyricitrin含量を直接定量することも可能であったが、これについてはさらに多数の製品を用いた検証が必要である。

「カンゾウ抽出物」のglycyrrhizic acidの市販試薬の純度をqHNMR法を用いて評価できた。同じプロトンシグナルを用いて、カンゾウ抽出物製品中のglycyrrhizic acid含量を直接定量することを試みたが、夾雑物に由来するシグナルや

ベースラインのゆがみによって正確な定量は困難であることがわかった。

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) 第16改正日本薬局方、日本公定書協会、東京、p. 1474-1475、2011.
- 3) 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).
- 4) Morimoto, T., Kato, Y., Nakamura, M. Determination of the content of coloring Matter in Carthamus Red and Carthamus Yellow, *Japanese Journal of Food Chemistry*, **5**, 236-238 (1998).
- 5) Baltina, L. A., Kunert, O., Fatykhov, A. A., Kondratenko, R. M., Spirikhin, L. V., Baltina (Jr.), L. A., Galin, F. Z., Tolstikov, G. A., Haslinger, E.: High-resolution ^1H and ^{13}C NMR of glycyrrhizic acid and its esters, *Chemistry of Natural Compounds*, **41**, 432-435 (2005).

E. 研究発表

(1) 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19日、東京。

吉田貴光、河野桂子、杉本直樹、山崎 壮、西村哲治、永津明人、水上 元：定量NMR法による「ベニバナ赤色素」中のcarthaminの定量。日本薬学会東海支部大会、2011年6月7日、名古屋。

Yoshida, T., Hasada, K., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: Quantitative analysis of natural products by qNMR. Pytochemical Society of North America 50th Anniversary Meeting. December 13, 2011, Fairmont Orchid Hawaii.

(2) 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).

Nagatoshi, M., Terasaka, K., Nagatsu, A., Mizukami, H.: Iridoid-specific glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*, *Journal of Biological Chemistry* **286**, 32866-32874 (2011).

Nagatoshi, M., Terasaka, K., Owaki, M., Sota, M., Inukai, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: UGT75L6 and UGT94E5 mediate sequential glucosylation of crocetin to crocin in *Gardenia jasminoides*, *FEBS Letters* **586**, 1055-1061 (2012).

Asada, K., Salim, V., Masada-Atsumi, S., Edmunds, E., Nagatoshi, M., Terasaka, K., Mizukami, H., De Luca, V.: A 7-deoxyloganic acid glucosyltransferase contributes a key step in secologanin biosynthesis in Madagascar periwinkle, *The Plant Cell* **25**, 4123-4124 (2013).

Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F.,
Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T.,
Mizukami, H.: Quantitative determination of
carthamin in *Carthamus Red* by $^1\text{H-NMR}$
spectroscopy, *Chemical and Pharmaceutical*
Bulletin **61**, 1264-1268 (2013).

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 qHNMR法と吸光度測定法によって測定した「ベニバナ赤色素」中のcarthamin含量

	Carthamin含量 (%) ^{a)} (qHNMR法による定量値)	Carthamin含量 (%) ^{a)} (吸光度測定法 ^{b)} による定量値)
Sample A	13.6 ± 0.06	18.1 ± 0.61
Sample B	0.0913 ± 0.002	0.133 ± 0.004
Sample C	10.3 ± 0.01	14.1 ± 0.43
Sample D	0.261 ± 0.001	0.336 ± 0.03
Sample E	5.58 ± 0.07	7.45 ± 0.23

a) データはaverage ± standard deviation (n=3) で示した。

b) 吸光係数 (E1%¹=992 at 530 nm) を用いて測定した。

表2 qHNMR法によって測定したmyricitrin市販試薬の純度

Sample	名称	規格	qHNMRによる純度 (%) ^{a)}
Sample A	Myricitrin with HPLC	純度 >99% (HPLC)	89.9 ± 1.31
Sample B	Myricitrin	純度 >99% (HPLC)	87.8 ± 1.05
Sample C	Myricitrin analytical standard	Purity >95% (HPLC)	87.9 ± 0.48

a) データは、average ± standard deviation (n=3) で示した。