

表1 ムラサキヤマイモ成分のピーク情報および同定

Peak	RT (min)	λ_{\max}	MS (<i>m/z</i>)	Molecular formula	MS/MS (<i>m/z</i>)	Compound
1	17.86	515, 330, 285	1141.3219	C ₅₀ H ₆₁ O ₃₀	979, 611, 287	unknown
2	18.46	525, 330, 285	979.2689	C ₄₄ H ₅₁ O ₂₅	817, 449, 287	Alatanin E
3	21.29	525, 330, 285	979.2689	C ₄₄ H ₅₁ O ₂₅	449, 287	
4	22.04	530, 330, 295	1509.431	C ₆₇ H ₈₁ O ₃₉	1222, 817, 449, 287	Alatanin A
5	23.1	530, 330, 285	817.2159	C ₃₈ H ₄₁ O ₂₀	817, 449, 287*	Alatanin C
			1347.3785	C ₆₁ H ₇₁ O ₃₄		Alatanin B
6	24.09	530, 330, 285	787.2065	C ₃₇ H ₃₉ O ₁₉	416, 287	Alatanin G
7	25.3	535, 330, 290	1185.3269	C ₅₅ H ₆₁ O ₂₉	817, 655, 217	Alatanin D
8	26	530, 330, 385	831.2327	C ₃₉ H ₄₃ O ₂₀	301	Alatanin F

表2 ムラサキイモ成分のピーク情報および同定

Peak	RT (min)	λ_{\max}	MS (<i>m/z</i>)	Molecular formula	MS/MS	Compound
1	13.05	515, 280	773.212	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₁	611, 449, 287	cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside
2	15.35	515, 325	787.2285	C ₃₄ H ₄₃ O ₂₁	625, 436, 301	peonidin 3-sophoroside-5-glucoside
3	19.02	520, 320, 285	893.2336	C ₄₀ H ₄₅ O ₂₃	731, 449, 287	cyanidin 3- <i>p</i> -hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside
4	19.87	520, 325, 285	935.2441	C ₄₂ H ₄₇ O ₂₄	773, 499, 287	cyanidin 3-(6"-caffeoylsophoroside)-5-glucoside
5	21.48	515, 325, 280	907.249	C ₄₁ H ₄₇ O ₂₃	745, 463, 301	peonidin 3- <i>p</i> -hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside
6	22.23	515, 330, 275	949.2596	C ₄₃ H ₄₉ O ₂₄	787, 463, 301	peonidin 3-(6"-caffeoylsophoroside)-5-glucoside
7	23.12	525, 330, 280	949.2595	C ₄₃ H ₄₉ O ₂₄	787, 449, 287	cyanidin 3-feruloylsophoroside-5-glucoside
8	25.34	520, 330	963.2745	C ₄₄ H ₅₁ O ₂₄	801, 463, 301	peonidin 3-feruloylsophoroside-5-glucoside
9	26.68	525, 325, 285	933.2637	C ₄₃ H ₄₉ O ₂₃	771, 433, 271	pelargonidin 3-feruloylsophoroside-5-glucoside
10	27.36	530, 325, 295	1097.2751	C ₅₁ H ₅₃ O ₂₇	935, 449, 287	cyanidin 3-(6",6"-dicafeoylsophoroside)-5-glucoside
11	27.9	525, 330, 300	949.2595	C ₄₃ H ₄₉ O ₂₄	787, 463, 301	peonidin 3-caffeoylsophoroside-5-glucoside
12	29.04	530, 330, 280	1111.2903	C ₅₀ H ₅₃ O ₂₆	949, 463, 301	peonidin 3-dicafeoylsophoroside-5-glucoside
13	30.55	530, 330, 295	1125.3064	C ₅₃ H ₅₇ O ₂₇	963, 463, 301	peonidin 3-caffeoyl-feruloylsophoroside-5-glucoside
14	31.31	525, 325, 295	1095.2974	C ₅₂ H ₅₅ O ₂₆	933, 583, 433	pelargonidin 3-caffeoyl- <i>p</i> -coumaroylsophoroside-5-glucoside

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）
平成27年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物ゴマ油不けん化物の成分規格の検討

研究分担者 井之上 浩一 立命館大学薬学部 准教授

要旨 日本食品添加物協会「既存添加物自主規格（第4版）」に記載されているゴマ油不けん化物の成分規格作成のため、主成分解析および確認試験の検討を実施した。ゴマ油不けん化物は、国内流通品などを用いて、新たな確認試験の規格案を検討した。現行の自主規格案では、順相系LCによるピーク面積から確認試験を行っている。そこで、本研究では、汎用性のある逆相系LCを用いて、主成分とするセサモリンに加えて、セサミンおよびセサモールの一斉分析法を構築した。検出波長には、紫外可視スペクトルから判断して、290 nmに設定した。各種移動相を検討した結果、15分以内に分析することができた。検出限界は0.02～0.04 ppmおよび定量限界は0.08～0.15 ppmとなった。本手法を用いて、ゴマ油不けん化物の定量を行ったところ、セサモリン：9.4 mg/g、セサミン：12.8 mg/gおよびセサモールは不検出であった。更に、質量分析への直接導入も可能であり、マススペクトルから同定解析にも応用することができた。以上より、今後、自主規格案と比較して、本手法の有用性などを検討することと結論付けられる。

A. 研究目的

日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」（以下、4版自主規格）に規格されているゴマ油不けん化物（Sesame Seed Oil Unsaponified Matter）は、ゴマ（*Sesamum indicum* Linné）の種子から得られた、セサモリンを主成分とするものである¹⁾。確認試験では、本品を直接順相系液体クロマトグラフィー（LC）により測定し、保持時間8～23分間に認められる5本以上のピーク評価を行っている。しかしながら、条件にはセサミンの保持時間を12分に流速を調整する以外は、具体的な主成分の同定や定量分析は実施されていない。その規格は、「5本以上検出されるピークのうち、最大ピーク面積を100とするとき、その他の4本のピーク面積比はいずれも30以上である」としている。つまり、複数のピークは面積比で主成分（セサモリン）に対して、30%以上の異なる物質含有を認めている。本自主規格案では、

正確なセサモリンの評価は実施されておらず、具体的な定量や純度確認ではない。さらに、順相系LCとして移動相にヘキサン/酢酸エチルを用いているため、廃液処理などの観点からも汎用性に欠け、さらなる改良が必要と考えられる。そこで、本研究では、セサモリンやセサミンの分析法を基盤に逆相系LCの検討を実施することとした。

現在までに既存添加物ゴマ油不けん化物としての分析法などについての報告は殆どない。そのうえ、食品添加物公定書にも記載事項されていない。その一方で、ゴマ油（Sesame Seed Oil）に関しては、抗酸化活性評価を含めて、多くの研究報告がある^{2, 3)}。本総説では、ゴマ油中には抗酸化活性評価を示すリグナン（Lignan）として、セサミン、セサモリンおよびセサモールが含有している（6.5～17.3 g/kg オイル）と報告している²⁾。その中でもセサミンとセサモリンは、最も多く含有しており、その含有量については、0.7～8.85 g/kg および0.2～4.8 g/kg

と報告されている⁴⁾。その一方で、セサモールは比較的含有量 (50~100 mg/kg) とされている。これら、リグナンの含有量に関しては、様々な要因で変化することが報告されており (図 1), 正確な活性かつ定量的な評価を行わなければならないことも示している²⁾。ゴマ油不けん化物が添加物として利用される場合は、抗酸化作用が期待される。つまり、抗酸化作用を示すリグナン類の一斉分析は必須と考えられる。

一方、分析化学的手法は、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、順相系 LC などによるゴマ油中のセサミンおよびセサモリンが報告されている⁵⁻⁷⁾。汎用的な逆相系 LC によるリグナン類の一斉分析に関しては、殆ど報告されていない。更に、既存添加物としてのゴマ油不けん化物に適用できる報告例は見つからない。そこで、本研究では、ゴマ油成分の主な抗酸化物質リグナンとされるセサミン、セサモリンおよびセサモール (図 2) の一斉分析を目指し、ゴマ油不けん化物の確認試験として妥当であるか検討を実施する。

B. 研究方法

ゴマ油不けん化物は長岡香料社製 (B478) を用いた。セサモールおよびセサミンは、和光純薬社製を用いた。セサモリンは、長良サイエンス社製を使用した。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

LC 装置：Waters 社製 Acquity H Class/PDAe λ

MS 装置：Waters 社製 Xevo TQD

LC による分離分析：対象試料はアセトニトリル/メタノール混液 (50/50, V/V) により調製した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液 (A) /アセトニトリル (B) を使用し、A/B：80/20 を 1 分間維持し、その後、15 分にて A/B：2/98 のグラジエント分析を行った。

カラム：TSKgel ODS-100V column (2.0×150 mm, 3 μ m, 東ソー社製)

カラム温度：40°C

流速：0.2 mL/min

検出波長：200-400 nm (定量：290 nm)

注入量：5 μ L

MS 装置：測定条件は、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI：ポジティブモード) で行った。

Capillary voltage: 2.0 kV

Extractor voltage: 3 V

RF lens voltage: 2.5 V

Source temperature: 150°C

Desolvation temperature: 400°C

Cone/desolvation gas flows: 50/800 L/hr

MS/daughter scan ranges: m/z 50 to 400

Cone voltage: 15-20 V

Collision energy: 15-25 eV

C. 研究結果

ゴマ油不けん化物は、脂溶性と想定されるため、逆相系 LC に利用される溶媒系の溶解性について調査した。その結果、図 3 に示すように、アセトニトリルおよびメタノールに対する溶解性が異なることが判明した。そこで、本研究では、いずれもアセトニトリル/メタノール混液 (50/50, V/V) を用いることで、対象試料すべてに溶解できることが判明した。

ゴマ油不けん化物中のセサモール、セサミン、セサモリンの紫外可視吸光光度における極大吸収波長を調べた。その際のスペクトルを図 4 に示す。いずれも、290 nm 付近で吸収極大波長 (セサモール λ_{\max} = 296 nm, セサミン λ_{\max} = 286 nm, セサモリン λ_{\max} = 289 nm) が観察され、定量などの評価に用いることとした。本設定波長により、逆相系 LC の各種パラメータを用いて、条件検討を実施した (表 1)。その結果、セサモールのシンメトリー係数は僅かに低値を示し、他の値は殆ど同等であった。その際の逆相系 LC のクロマトグラムを図 5 に示す。いずれも、15 分以内に良好なピークを得ることができた。そのため、移動相には汎用性を考慮して、0.1% ギ酸水/アセトニトリル混合液を用いることとした。本最適条件において、検出限界 (LOD) および定量限界 (LOQ) は、セサモール (LOD: 0.04 ppm, LOQ: 0.15 ppm), セサミン (LOD: 0.02 ppm, LOQ: 0.08 ppm) およびセサモリン (LOD: 0.04 ppm, LOQ: 0.15 ppm) となった。各検量線にお

いても、LOQ～5 ppm の範囲において、相関係数 (r) 0.999 以上を示した (図 6)。本手法を用いて、ゴマ油不けん化物の 50 倍希釈 (希釈溶媒：アセトニトリル/メタノール, 50/50) のクロマトグラムを図 7 に示す。その際の定量値は、セサモール：不検出 (7.5 mg/kg 以下)、セサミン (12.8 g/kg) およびセサモリン (9.4 g/kg) となった。本結果は、既報²⁾にあるゴマ油中の濃度よりも高含有存在していることが判明した。

本分析法は、逆相系 LC を用いているため、直接 MS に導入することも可能である。MS によるスペクトル情報があることで、飛躍的に同定能が向上する。そのため、本研究では、ESI-ポジティブモードを採用して、スペクトル解析を実施した。LC/MS には、逆相系 LC 条件をそのまま利用した。ESI-ポジティブモードにおいて、セサモール m/z 139、セサミン m/z 337 およびセサモリン m/z 233 が最も強度が高く検出された。それらをプレカーサーイオンとして採用し、プロダクトイオンスキャンにより、MS スペクトルを得た。その結果および構造からの推定フラグメントを図 8 に示す。いずれも、特異的なスペクトルを得ることができ、化合物同定に有益な情報を得ることができた。本手法を用いて、実際に検出されたゴマ油不けん化物からのピーク同定を試みた。その結果、標準溶液と同じスペクトルが検出され、確実な化合物の同定が達成できた (図 9)。本結果より、順相系 LC では実施することができなかった MS による情報も同時に入手できる逆相系 LC の構築が達成できたものと判断できる。

D. 考察

本研究では、ゴマ油不けん化物の新たな確認試験法の基礎的な検討を実施した。試験法としては、逆相系 LC により、検出波長を 290 nm に設定して、セサモール、セサミンおよびセサモリンを分析するものである。本結果より、いずれもゴマ油不けん化物からの測定が可能であり、定量も達成できた。また、確実な同定を目指して直接 MS 分析することもでき、有効な MS スペクトルを得ることができた。以上より、今

後は本手法と自主規格案を比較する必要もあり、様々な流通品や製品にも汎用できることを示す必要がある。

E. 結論

本結果より、既存添加物ゴマ油不けん化物の自主規格案について、主成分も含めて再検討する必要性が挙げられる。そのためには、今後、他の流通品も含めて、自主規格案との比較検討を進める必要があると結論付けた。本結果からの改善点は下記に示す。

定義 (原案)：本品は、ゴマ (*Sesamum indicum* Linné) の種子から得られた、セサモリンを主成分とするものである。

定義 (改善案)：本品は、ゴマ (*Sesamum indicum* Linné) の種子から得られた、セサミンおよびセサモリンを主成分とするものである。

確認試験 (原案)：順相系 LC によるピーク面積からの算出方法 (試料は 10 μ L を量り、直接注入する)

確認試験 (改善案)：逆相系 LC によるセサモール、セサミンおよびセサモリンの同時定量法 (試料は適時、アセトニトリル/メタノール混合液 (50/50, V/V) にて希釈して注入する)

規格基準 (原案)：保持時間 8～23 分間の 5 本以上のピーク面積において、最も大きなピーク面積よりも 30%大きい 4 本のピークを認める。

規格基準 (改善案)：セサミンおよびセサモリンの含有率を提示する。さらに、セサモールは含まれない (もしくは規定の含有率以下とする)。

F. 研究発表

1. 論文発表

平成 27 年度は特になし。

2. 学会発表

高橋未来, 井之上浩一, 西崎雄三, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 穂山 浩; 逆相系 HPLC による既存添加物・ゴマ油不けん化物の成分規格

の検討。日本薬学会第136年会（横浜）2016年
3月26日～29日

G. 知的財産権の出願，登録状況
特になし

H. 健康危機情報
特になし

I. 参考文献

- 1) 日本食品添加物協会；第4版 既存添加物自主規格 平成20年10月13日発行
- 2) Wan Y, Li H, Fu G, Chen X, Chen F, Xie M; J. Sci. Food Agric. 95, 2571-2578. (2015).
- 3) Mahendra Kumar C, Singh SA; J. Food Sci. Technol. 52, 2934-2941. (2015).
- 4) Tashiro T, Fukuda Y, Osawa T, Namiki M; J. Am. Oil Chem. Soc, 67, 508-511. (1990).
- 5) Sukumar D, Arimboor R, Arumughan C; J. Pharm. Biomed. Anal. 47, 795-801. (2008).
- 6) Yamaguchi K, Kurata S; Bunseki Kagaku 54, 1091-1100. (2005).
- 7) Górnas P, Siger A, Pugajeva I, Segliņa D; Food Addit. Contam. Part A 31, 567-573. (2014).

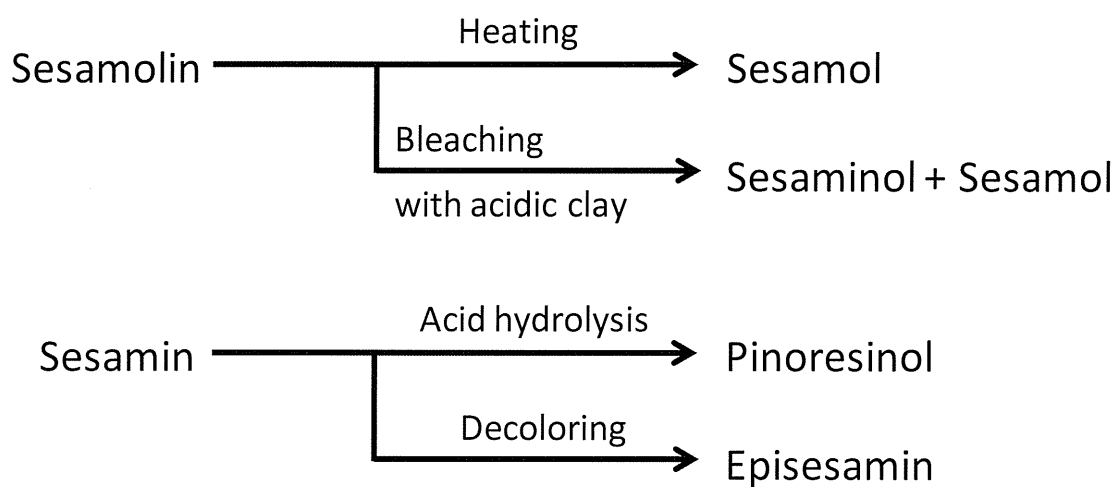


図1 セサモリンおよびセサミンの分解挙動について²⁾

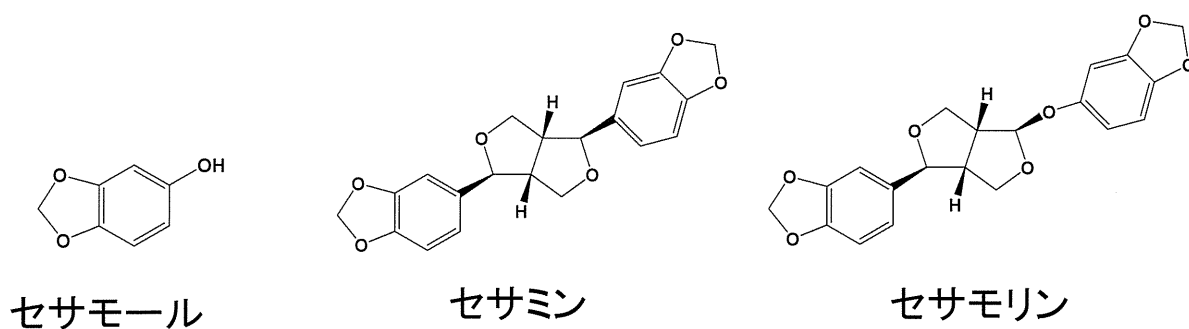
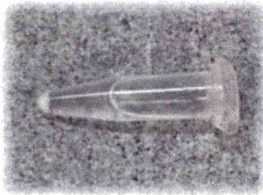


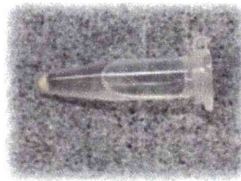
図2 分析対象（セサモール、セサミン、セサモリン）の構造式

溶解性について

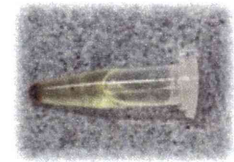
	アセトニトリル	メタノール
セサモール	○	○
セサミン	○	×
セサモリン	○	×
ゴマ油不けん化物	×	○



セサミン
(メタノール溶解)



セサモリン
(メタノール溶解)



ゴマ油不けん化物
(アセトニトリル溶解)

図3 分析対象標準品および試料の溶解性について

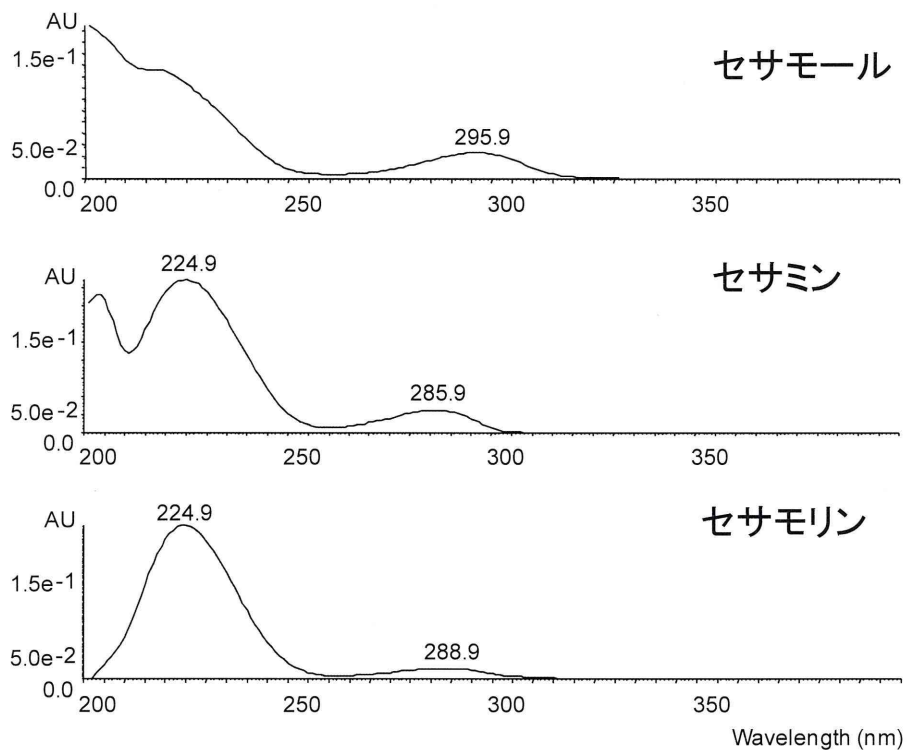


図4 セサモール、セサミン、セサモリンの紫外可視吸光スペクトル

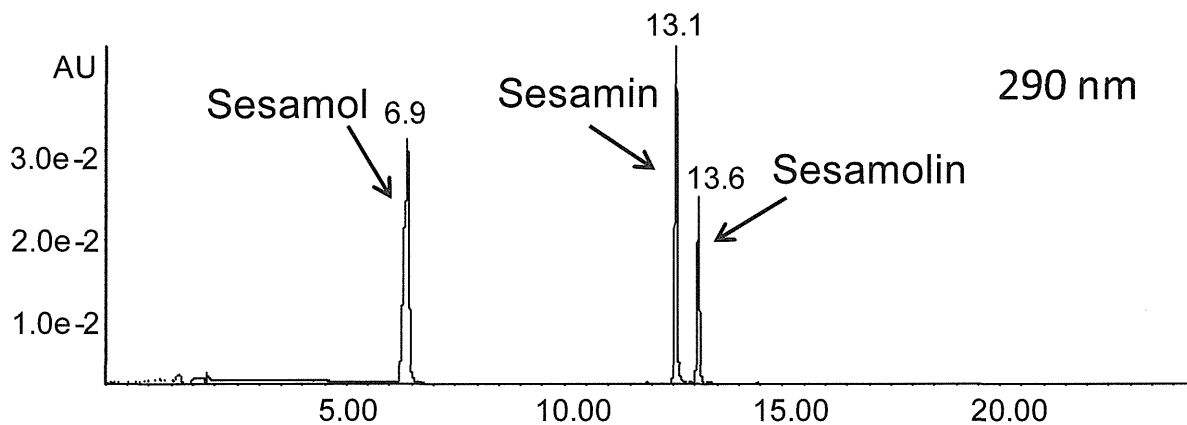


図5 逆相系 LC によるセサモール、セサミン、セサモリンのクロマトグラム
濃度：10 ppm 混合溶液

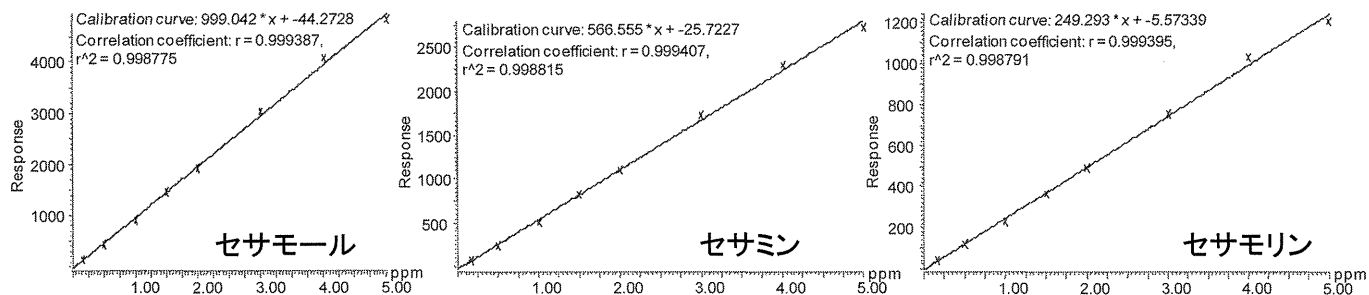


図6 セサモール、セサミン、セサモリンの検量線 (LOQ~5 ppm)

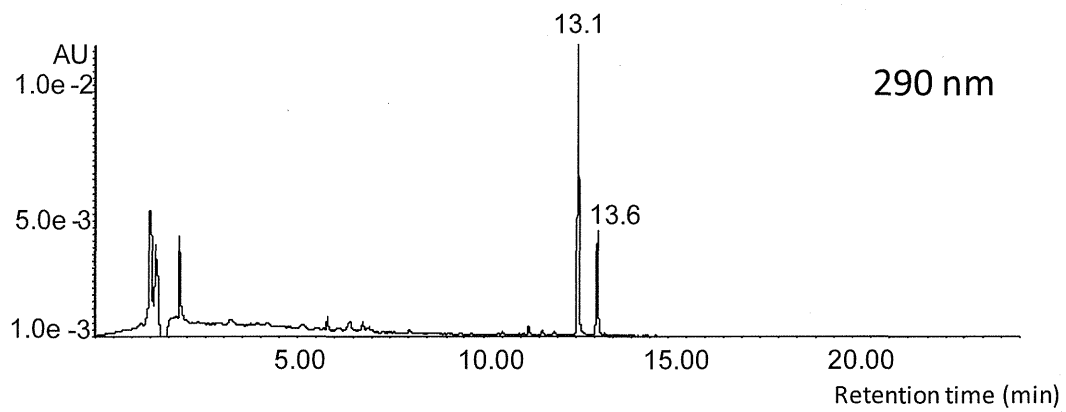
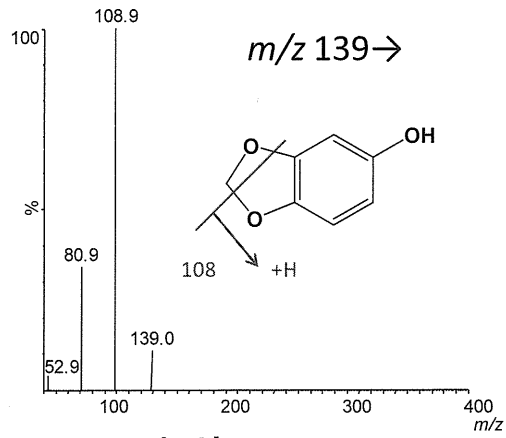
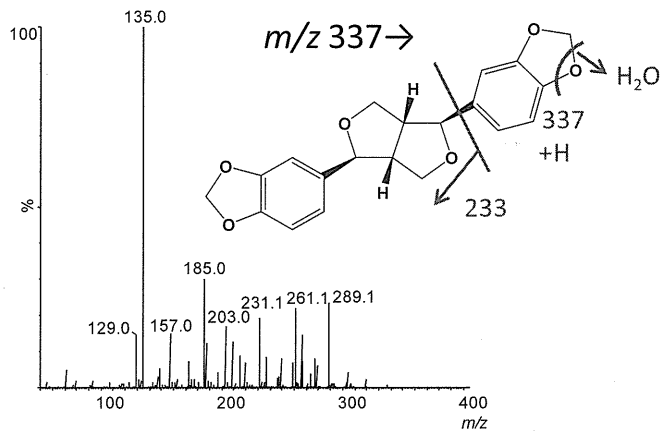


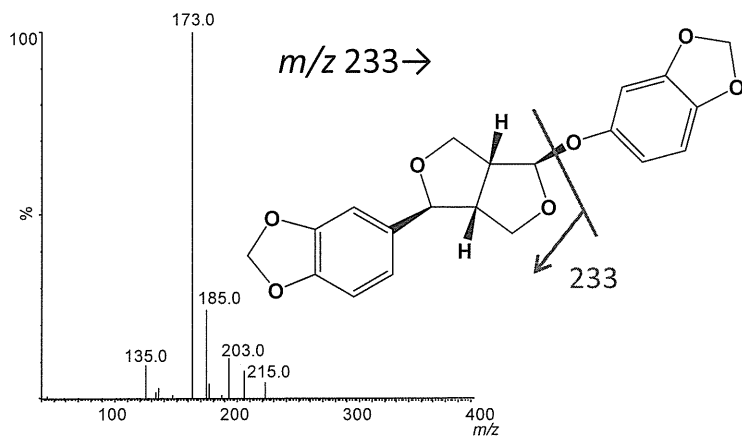
図7 逆相系 LC によるゴマ油不けん化物のクロマトグラム
セサミン (保持時間 13.1 分) 12.8 g/kg
セサモリン (保持時間 13.6 分) 9.4 g/kg



セサモール



セサミン



セサモリン

図8 セサモール、セサミン、セサモリンのMSスペクトル (ESI-ポジティブモード)

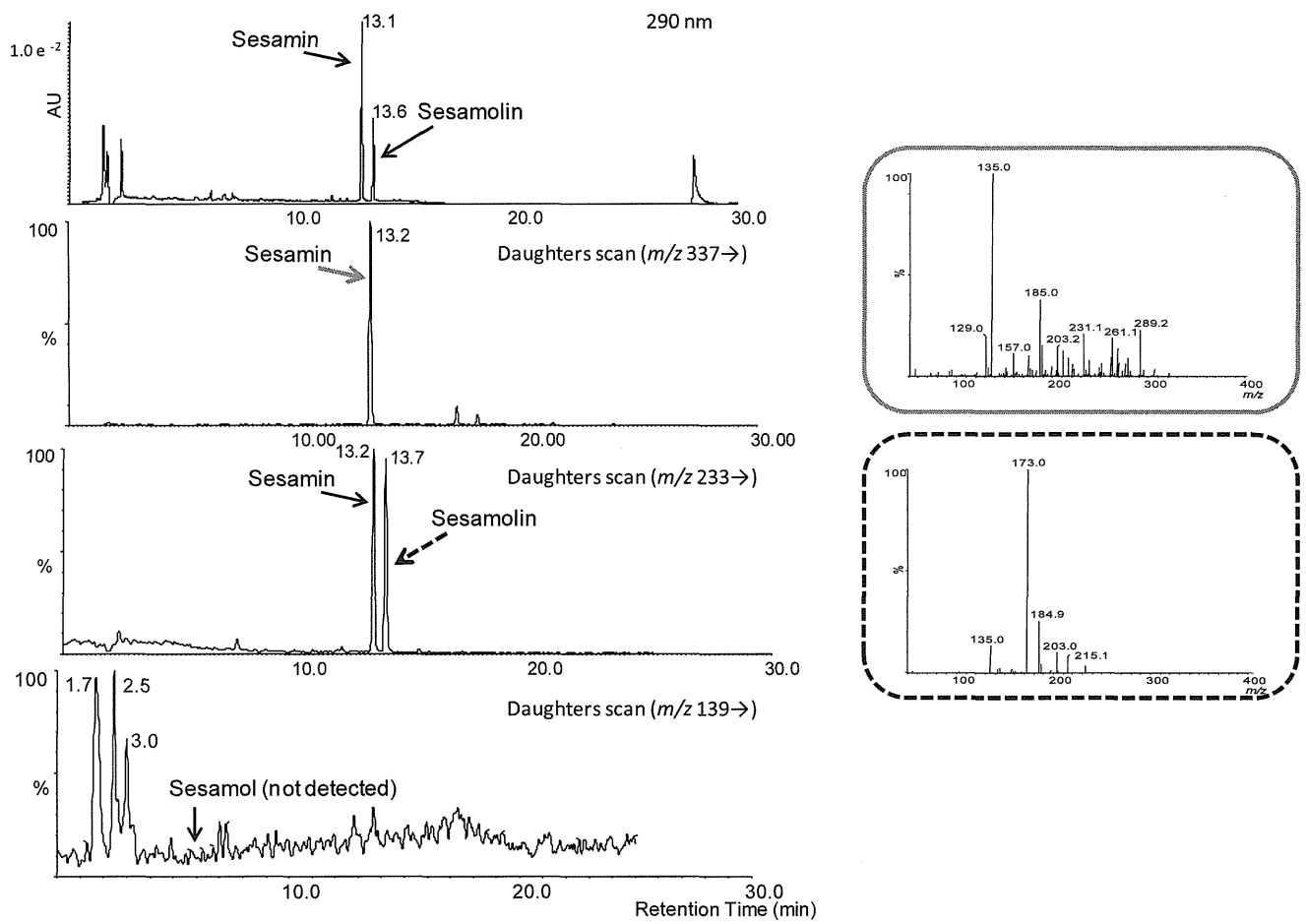


図9 ゴマ油不けん化物の LC/MS クロマトグラムおよびスペクトル

表 1 逆相系 LC による分析パラメータ

Mobile Phase	Concentration of FA (%)	S1	S2	S3	Rs	N
Water/Acetonitrile	0	0.63±0.02	1.08±0.06	1.03±0.06	4.38±0.21	270585.61±3244
	0.1	0.72±0.04	1.01±0.01	1.01±0.02	4.64±0.14	278057.79±143
	0.5	0.77±0.02	0.98±0.06	1.05±0.02	4.14±0.23	267973.57±281
Water/Methanol	0	0.62±0.01	1.07±0.05	1.06±0.07	3.63±0.01	272869.45±284
	0.1	0.63±0.01	1.20±0.01	1.24±0.05	3.84±0.05	286477.72±436
	0.5	0.69±0.01	1.30±0.09	1.14±0.05	3.74±0.04	276324.12±1429

(n=3)

S: シンメトリー係数(1: Sesamol, 2: Sesamin, 3: Sesamolin)

Rs: 分離度

N: 理論段数

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成27年度研究分担報告書

研究分担課題：NMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究

研究分担者 永津明人 金城学院大学薬学部

要旨 近年確立された¹H-qNMR法(定量¹H-NMR法)を既存添加物の規格試験法に適用が可能であるか明らかにする目的で研究を行った。すなわち、適用の可能性の有無の判断と、可能性があるものに関しては実際に適用する場合の測定条件の確立を目的とした。27年度は「グルコサミン」に関する測定条件の改良と、「クローブ抽出物」の適用条件を探索した。すなわち、「グルコサミン」ではglucosamine定量の際の認証標準物質をDSS-d₆に変更しての条件確立を、「クローブ抽出物」ではeugenolの定量条件の確立を行った。Glucosamine定量では昨年度確立したPHPを直接内部標準とする方法で、PHPをそのままDSS-d₆に置き換えることで対応可能であることを確認した。「クローブ抽出物」中のeugenolの定量では、「クローブ抽出物」のacetone-d₆懸濁液上清に認証標準物質である1,4-BTMSB-d₄のDMSO-d₆溶液を加えて測定し、1,4-BTMSB-d₄のトリメチルシリル基のシグナルとeugenolの2位のHシグナルのシグナル面積を比較することで定量可能であることを確認した。

A. 研究目的

¹H-qNMR法は、SIトレーサブルな認証標準物質を内部標準としてNMRスペクトルの測定することで、測定対象サンプルの絶対定量ができる方法である。対象化合物の標準品がなくても絶対定量が可能であることから、標準品が手に入りにくい天然物の定量に好適な測定法である。すなわち、対象物質の¹H-NMRスペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となる。

27年度の本研究では、昨年度に¹H-qNMR法での定量法の目処をつけた「グルコサミン」で、内部標準となる認証標準物質をより応用のきく化合物であるDSS-d₆に替えてglucosamine (Fig. 1)の定量が可能であるかの確認を行った。さらに、既存添加物である「クローブ抽出物」の品質評価方法として

eugenol (Fig. 2)の定量が¹H-qNMR法で可能かの検討を行った。

B. 研究方法

1) 「グルコサミン」中のglucosamine定量法の改良

既存添加物の「グルコサミン」は、「キチン」を塩酸で加水分解し、分離して得られたものである。成分はglucosamineで増粘安定剤、製造用剤として用いられるものである。昨年度の研究では、「グルコサミン」中の成分はほぼglucosamineであること、D₂O中で1位水酸基が α 、 β の両方の配座異性体の2位Hのシグナル面積の合計と認証標準物質であるpotassium hydrogen phthalate (PHP, Fig. 3)のベンゼン環上Hのシグナル面積とから定量が可能であることを確認している。今年度は、この方法の汎用性を高める目的で、内部標準に用いる認証標準物質をPHPからシグナルの化学シフト値が0 ppm付近にある

3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid-d₆ sodium salt (DSS-d₆, Fig. 4)に替えての適用の確認を行った。

1-1) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

市販の「グルコサミン」と DSS-d₆ は減圧されたデシケーター中で over night で乾燥させた。

「グルコサミン」約 15 mg を精秤して 1.50 ml の D₂O に溶かした溶液と、DSS-d₆ 約 8 mg を精秤して 1.50 ml の D₂O に溶かした溶液を調製した。この 2 つの溶液を 0.40 mL ずつ取って混合し、この溶液 0.60 ml を NMR 試料管にとったものを用いて ¹H-qNMR スペクトルの測定に供した。

測定に利用した DSS-d₆ は和光純薬の Trace Sure®規格のもの、D₂O は Isotec Inc. の 99.9 atom %D のもの、NMR 測定管は和光純薬 HG タイプ (φ5 mm) を用いた。秤量には精密電子天秤 AUW120D (島津製作所) を用いた。

1-2) ¹H-qNMR スペクトルの測定

¹H-qNMR は table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトル (Fig. 6) から、glucosamine の 2 位 H のシグナル (δ 2.89 ppm と δ 3.18 ppm) と DSS-d₆ のシグナルの面積を比較して、式 1 に従って glucosamine の濃度を算出した。

$$C_{\text{GLA}} = \frac{I_{\text{GLA}}}{I_{\text{DSS}}} \times C_{\text{DSS}} \quad (1)$$

ただし、C_{DSS}、C_{GLA} はそれぞれ DSS-d₆ 及び glucosamine のモル濃度 (mol/ml)、I_{DSS}、I_{GLA} はそれぞれ DSS-d₆ 及び glucosamine の水素 1 個あたりのシグナル面積。

各試料とも 3 検体ずつ調製して測定を行った。

2) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量

既存添加物の「クローブ抽出物」は、「フトモモ科 チョウジ (Syzygium aromaticum MERRILL et PERRY) のつぼみ、葉又は花より、エタノール又はアセトンで抽出して得られ

たもの、又は水蒸気蒸留により得られたものである。主成分はオイゲノール等である。」とされるもので、酸化防止剤として用いられる。今回用いた「クローブ抽出物」は水蒸気蒸留をした際の水とオレオレジンなどの炭化水素の乳濁液に精油として eugenol を含んでいるという状態のものであった。

まず、市販の eugenol 標準品の ¹H-NMR スペクトルを種々の溶媒で測定し、個々のシグナルが他のシグナルと良い分離を示す条件を検討した。溶解度なども加味し、acetone-d₆ 中での測定が適当と考えられた。一方、内部標準として用いる認証標準物質としては汎用性を考え、0 ppm 付近にシグナルが現れ、acetone など脂溶性の溶媒に可溶な 1,4-(bistrimethylsilyl)benzene-d₄ (1,4-BTMSB-d₄, Fig. 5) を用いることにした。ところでこの 1,4-BTMSB-d₄ の溶液だが、これを内部標準用溶液として調製する場合、測定に供する溶媒で調製することが望ましい。しかしながら、今回の測定用の溶媒は揮発性の高い acetone 溶液で、注意深く保存したとしても保存中の濃度変化のリスクがつきまとう。そこで、これを難揮発性溶媒である DMSO-d₆ 溶液として調製し用いることにした。

2-1) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

1,4-BTMSB-d₄ はデシケーター中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 2.00 ml の DMSO-d₆ に溶かし内部標準用溶液とした。まず、eugenol の水素のシグナル面積と量が比例関係にあるか検量線を作製した。すなわち、市販 eugenol 標準品 20 mg/mL の acetone-d₆ 溶液を調製したのち、これを段階希釈して 0.50、1.25、5.00 mg/mL の各 acetone-d₆ 溶液を調製した。Eugenol は揮発性成分でもあるので、減圧下での乾燥などは行わず、この eugenol 標準品の製品を開封してそのまま用いた。これらの溶液 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB-d₄ 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ¹H-qNMR の測定に供した。各試料とも 3 検体ずつ調製して測定を行った。

「クローブ抽出物」はもともと水を含むものであることから、乾燥などの特段の操作は行わず、そのままを試験に供した。約 10 mg を精秤して acetone-d₆ (1.00 mL) を加え、10 分間超音波下においたのち 3 分間遠沈し、わずかに存在する固形物を除去した。この上清 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB-d₄ 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ¹H-qNMR の測定に供した。各試料とも 5 検体ずつ調製して測定を行った。

測定に利用した 1,4-BTMSB-d₄ は和光純薬の Trace Sure®規格のもの、acetone-d₆ と DMSO-d₆ はいずれも Isotec Inc. の 99.9 atom %D を用いた。NMR 測定管と電子天秤は「グルコサミン」の試験のものと同じものを用いた。

2-2) ¹H-qNMR スペクトルの測定

¹H-NMR を測定し、eugenol の 6 位 H のシグナルが δ 6.33 ppm に現れることを確認した。Fig. 7 にそのスペクトルを示した。測定条件は glucosamine のときと同じもので、table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、eugenol の 6 位 H のシグナルと 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB-d₄ のシグナルの面積を比較して、式 2 に従って eugenol の濃度を算出した。

$$C_{EU} = \frac{I_{EU}}{I_B} \times C_B \quad (2)$$

ただし、C_B、C_{EU} はそれぞれ 1,4-BTMSB-d₄ 及び eugenol のモル濃度 (mol/ml)、I_B、I_{EU} はそれぞれ 1,4-BTMSB-d₄ 及び eugenol の水素 1 個あたりのシグナル面積。

C. 研究結果

1) 「グルコサミン」中の glucosamine 定量法の改良

内部標準の認証標準物質を DSS-d₆ に変えたことによる不都合はなく、DSS-d₆ のシグナルは他のシグナルが全くない 0 ppm 付近に現れ、以前から定量に用いていた 2 位 H も同じ

場所に独立して観測され、2 つの配座異性体の 2 位 H のシグナル面積の合計で問題なく測定ができることを確認した。(Fig. 6) これらを用いて入手した 5 種類の市場品の「グルコサミン」中の glucosamine の定量をおこない、その結果を table 2 に示した。表示に「グルコサミン」と書かれたものに関しては、glucosamine の分子量 (C₆H₁₃NO₅, MW: 179) で、塩酸塩とか書かれていたものは塩酸塩としての分子量 (C₆H₁₃NO₅ · HCl, MW: 215.5) と合せて含有率を算出した。いずれの試料も glucosamine としての含有率は 80% 程度であった。塩酸塩に関しては、塩の分子量で計算すると 95% 以上という数字となった。(Table 2)

2) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量

まず、「クローブ抽出物」の acetone-d₆ 中のスペクトルにおいて eugenol の 6 位 H の位置 (δ 6.33 ppm) には他のシグナルは観測されなかった。また、内部標準を DMSO-d₆ 溶液として加えて測定しても eugenol の 6 位 H シグナルは独立しており、「クローブ抽出物」のスペクトルにおいても他の夾雑物のシグナルとの重なりも観測できなかった。(Fig. 8) 検量線を作製した結果、少なくとも 0.5 ~ 20 mg/mL の間では極めて高い直線性が示された。(Fig. 9)

試料中の eugenol の含有量の測定では、まず、eugenol 標準品の純度を測定したところ 92% 程度であった。「クローブ抽出物」に関しては、いずれも eugenol の含有率が 30% 程度だった。(Table 3)

D. 考察

1) 「グルコサミン」中の glucosamine 定量法の改良

認証標準物質を DSS-d₆ に替えたことによる不都合はなく、むしろ DSS-d₆ のシグナルが 0 ppm であるので化学シフト値の基準にもでき、種々の操作がわかりやすくなったといえる。定量値に関して (Table 2)、glucosamine としての含有率は 80% 程度であったが、塩酸

塩とするとその純度は 95%以上と非常に高いものになる。塩酸塩の表記がなかった製品に関しても、塩酸塩として計算すれば 95~99%という純度になることから、これらも全て塩酸塩として流通しているものと推定される。

この条件での glucosamine での定量は極めて簡便である。Glucosamine は紫外吸収を持たない分子であるために HPLC で UV 検出器での検出がしにくく、HPLC を用いた分析をするには誘導體化か、検出の安定化に手間のかかる示差屈折計を用いる必要がある。この「グルコサミン」の glucosamine 純度の測定に関しては ^1H -qNMR 法が極めて有利な方法と考えられる。ところで、水という表面張力の強い溶媒を用いるため、細い NMR 試料管に測定溶液を注入するときするには、多少のコツが必要である。

2) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量

「クローブ抽出物」には eugenol 以外にもフェニルプロパンの精油成分が存在するので、芳香族領域は多くのシグナルの存在が懸念されたが、このシグナルが定量に好都合であることがわかった。(Fig. 8) 検量線も極めてよい直線性を示し(Fig. 9)、特に検量線を引くことなく定量ができることも確認ができた。

今回、操作の簡便のために予め認証標準物質の濃度既知の溶液を作っておき、測定の際に測定溶液に標準物質の溶液を一定量加えるという方法を考えた。しかしながら、eugenol の 6 位 H が独立したシグナルで観測された acetone- d_6 は揮発しやすい溶媒の一つである。標準物質の溶液を作り置きした場合、取りだすたびに容器の開閉があり、その間に揮発して濃度が変化してしまう懸念が大いにある。そこで、標準物質を溶解する溶媒を難揮発性溶媒である DMSO にすることを考えた。認証標準物質として用いた 1, 4-BTMSB- d_4 はカタログ上で DMSO に難溶と表記されている。しかしながら、実際に溶解すると今回用いた 2.5 mg/mL という濃度であれば十分に溶解することがわかった。また、

^1H -qNMR の測定時は acetone - DMSO = 5 : 1 という混合溶媒で実施することになる。これも測定の結果、この混合溶媒でも eugenol の 6 位 H が独立したシグナルで観測され、問題なくシグナル面積の測定ができた。よって、1, 4-BTMSB- d_4 を DMSO- d_6 溶液として用いることで操作の簡便化が実現できた。

測定の結果、まず市販の eugenol 標準品は純度 92%と表示(99.8%)よりも少ない数字となった。eugenol は精油ということもあって揮発性がある。そのため減圧下あるいは長時間の乾燥を行うと、純度以前に eugenol が失われてしまう懸念がある。そこで今回は、空気中から吸着したかもしれない水分を除く乾燥などの操作は省略した。そのために純度の測定値がこの標準品の純度の表示値より低く見積もられたのかもしれない。逆に、HPLC、GC では水分は検出できず、その分がないものとして純度が計算される。そのため 99.8%という値付けになって市販されているとも考えられる。

「クローブ抽出物」は水を含む懸濁液状のものなので、そもそも乾燥ができない。また、濃縮乾固して固形物にしようとするとき精油である eugenol も失われてしまい、含有量がわからなくなる。そのため、「クローブ抽出物」を直接 acetone に溶解させ、わずかに出現する不溶物を遠沈して除去し、その上清を測定に供するという方法をとった。結果として eugenol 含有率は 30%程度であった。(Table 3) 「クローブ抽出物」の規格では eugenol を 20~50%含むとされているので、十分にその範囲に入っていた。しかしながら、試料 C は、eugenol の含有率が 38%とという規格書が添付されていた。この製品の製造者は純度を GC で測定していたが、今回の「標準品」のように、基準として用いた標準品の実際の純度が表示値より低ければ、表示に基づいて算出された測定値は実際の含有率より多く見積もられてしまう。試料 C の測定でもこのようなことがあったと考えられる。すなわち、標準品が不要な ^1H -qNMR 法は、このように揮発性で標準品の純度管理が難しい化合物の純度測定でも有用であり、eugenol

の定量を行う「クローブ抽出物」の品質管理でも極めて有効な手段であると考えられる。

E. 結論

1) 「グルコサミン」中の glucosamine 定量法の改良

認証標準物質の DSS-d₆ を内部標準として用い、重水中、glucosamine の2つの配座異性体の2位Hのシグナル (δ 2.89 ppm と δ 3.18 ppm) の面積の和を用いることで、¹H-qNMR法を用いた glucosamine の定量が簡便にできることがわかった。よって、¹H-qNMR法による「グルコサミン」の品質管理法が確立できた。

2) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量

認証標準物質の DSS-d₆ を内部標準として用い、この DMSO-d₆ 溶液を測定試料の acetone-d₆ 溶液とを混合して NMR を測定し、

eugenol の6位Hのシグナル (δ 6.33 ppm) を利用することで測定試料中の eugenol が定量できることがわかった。よって、¹H-qNMR法による「クローブ抽出物」の品質管理法が確立できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

現在のところなし

2. 学会発表

現在のところなし

G. 知的財産権の出願，登録状況

現在のところなし

H. 健康危機情報

特になし

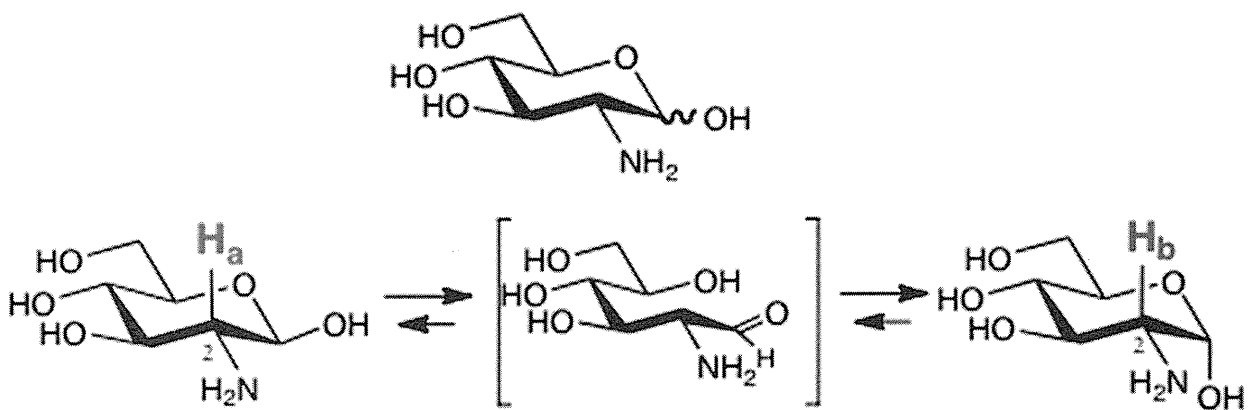


Fig. 1 Glucosamine の構造と 1 位水酸基 α -、 β -の配座異性体の平衡

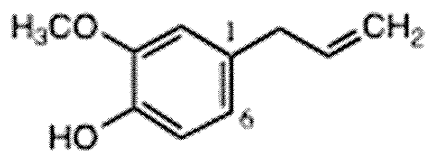


Fig. 2 Eugenol の構造

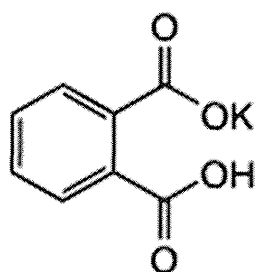


Fig. 3 Potassium hydrogen phthalate (PHP)の構造

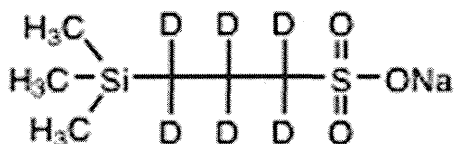


Fig. 4 3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid-d₆ sodium salt (DSS-d₆)の構造

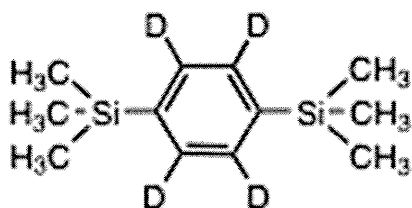


Fig. 5 1,4-(Bistrimethylsilyl)benzene-d₄ (1,4-BTMSB-d₄)の構造

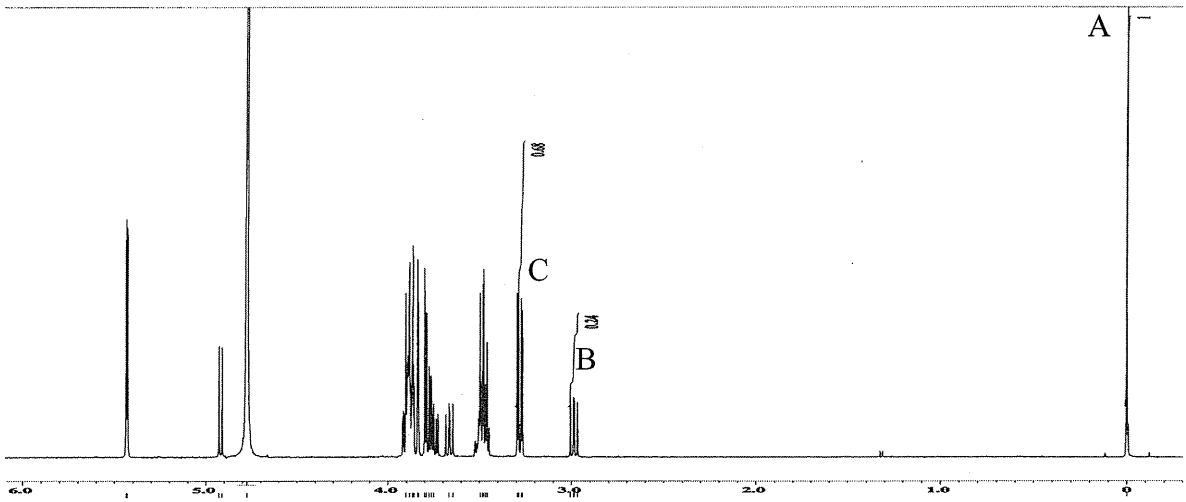


Fig. 6 Glucosamine の ^1H -NMR スペクトル (D_2O , 500 MHz)

A : DSS-d_6 のメチル基のシグナル、B : Fig. 1 の H_a のシグナル、
C : Fig. 1 の H_b のシグナル。