

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28年度研究分担報告書

研究分担課題： Relative response factor を用いた HPLC/PDA による  
カワラヨモギ抽出物中のカピリン定量法の開発

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 室長

要旨 カワラヨモギ抽出物中の有効成分カピリンのHPLC/PDA定量法について検討した。カピリンの定量用標準品は市販されていないため、HPLC/PDA分析条件下におけるカピリン定量用内標準物質を設定することとした。PDA検出器における感度は化合物ごとに固有であるため、内標準物質に対するカピリンの相対感度係数 (Relative Response Factor: RRF) を求め、定量計算に適用する必要がある。そこで、本研究では定量用内標準物質としてヘプチルパラベンを選択し、<sup>1</sup>H-qNMRとHPLC/PDAを組合せて、ヘプチルパラベンに対するカピリンのRRFを算出した。HPLC/PDAにより測定し、ヘプチルパラベンに対するRRFを適用して添加物中のカピリン含量を算出したところ、カピリン標準品の検量線（純度値適用）から算出した含量と殆ど差はなかった（0.002%以下）。RRFを適用した定量法は、カピリンの定量用標準品を必要とせず、カワラヨモギ抽出物の規格試験法として有用であることが明らかとなった。

研究協力者

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所  
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

既存添加物カワラヨモギ抽出物は、既存添加物名簿<sup>1)</sup>に記載されている保存料の1つで、その定義は、『カワラヨモギの全草から得られた、カピリンを主成分とするものをいう。』と記載されている (Fig. 1)。また、既存添加物名簿収載品目リスト<sup>2)</sup>の基原・製法・本質には、『キク科カワラヨモギ (*Artemisia capillaris* THUNB.) の全草より、室温時エタノール若しくは含水エタノールで抽出して得られたもの、又は水蒸気蒸留して得られたものである。有効成分はカピリン等である。』と記載されている。カワラヨモギ抽出物は、食品添加物公定書<sup>3)</sup>未収載であるため、有効成分カピリンの定量法を規定した成分規格案を作成する必要がある。カピリンの定量法としては、HPLC/PDAによる分析が有用と考えられる。しかし、PDA検出器における感

度は、化合物ごとに固有であるため、純度既知のカピリン標準品を設定する必要があるが、カピリンの標準品は市販されていない。この問題を解決するために、別の化合物の標準品をカピリンの定量用内標準物質として設定し、カピリンの標準品を必要としない定量法を確立することを考案した。そこで本研究では、定量用内標準物質に適した化合物を探索し、HPLC/PDA分析条件下での候補化合物ヘプチルパラベン (Fig. 1) に対するカピリンの正確な相対感度係数 (Relative response factor (RRF)) を、定量 NMR (<sup>1</sup>H-qNMR) を応用して算出した。また、得られた RRF を適用し、カピリン標準品を必要としない定量法を検討した。

B. 研究方法

B-1. 試料

カワラヨモギ抽出物製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した A 社製品 1 (暗褐色)、製品 2 (黄褐色) 及び製品 3 (黄褐色) 計 3 製品を用いた (Table 1)。

## B - 2 . 試薬

A 社標品 (非売品) である  $^1\text{H}$ -qNMR 純度 99.5% のカピリン単離・精製品は, 日本食品添加物協会を通じて入手し, カピリン標準品として使用した.

ヘプチルパラベン試薬は 4 社 (a~d 社) 計 4 製品を購入して用いた.

NMR 測定用重溶媒は重メタノール (MeOH- $d_4$ ) (Isotec 社, 型番 151947) を用いた.  $^1\text{H}$ -qNMR 基準物質は 1,4-BTMSB- $d_4$  (1,4-bis(trimethylsilyl) benzene- $d_4$ ) (和光純薬工業 (株), 99.8 ± 0.5%, 型番 024-17031) およびフタル酸ジエチル (DEP) (国立研究開発法人 産業技術総合研究所, 99.98 ± 0.01%, 型番 639-10081) を用いた.

上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品あるいは HPLC 用を使用した.

## B - 3 . RRF の算出

ヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF は以下の式 (1) から求めた.

式 (1)

$$RRF = \frac{S_{Hep}}{S_{Cap}} \times \frac{H_{Cap}}{H_{Hep}} \times \frac{M_{Hep}}{M_{Cap}} \times \frac{A_{Cap}}{A_{Hep}}$$

$S$ , プロトンシグナルの積分値;  $H$ ,  $S$  に由来するプロトン数;  $M$ , 分子量;  $A$ , ピーク面積; Cap, カピリン; Hep, ヘプチルパラベン.

カピリンとヘプチルパラベンの秤量比が約 1 : 5, 2 : 7, 2 : 10 (合計約 6 mg, 9 mg, 12 mg) になるように秤量した 3 検体に 1.0 mL の MeOH- $d_4$  を加えて溶解した. これらの各溶液 0.6 mL をそれぞれ NMR 試験管に封入したものを RRF 算出用試料液とし, Table 2 に示した  $^1\text{H}$ -qNMR 条件に付した. カピリンとヘプチルパラベンに由来するプロトンシグナルの積分値 ( $S$ ) (カピリン: H-2 + H-6, H-3 + H-5, H-4; ヘプチルパラベン: H-2 + H-6, H-3 + H-5) を求め (Fig. 2), 由来するプロトン数 ( $H$ ) と共に, 式 1 に代入した.

次に  $^1\text{H}$ -qNMR に付した RRF 算出用試料液 10  $\mu\text{L}$  を HPLC/PDA 分析条件下の移動相を用いて, 6.5 mL で希釈し, Table 3 に示した HPLC/PDA 分

析条件に付した. クロマトグラム上に観察されたカピリンおよびヘプチルパラベンのピーク面積 ( $A$ ) を求め, 式 1 に代入した.

## B - 4 . RRF を適用した HPLC/PDA による定量

製品 1~3 と B - 5 .  $^1\text{H}$ -qNMR による純度測定により値付けされた a~d 社のヘプチルパラベン試薬を, 製品はセミマイクロ天秤 (BM-252, (株) AND 製) を, ヘプチルパラベンはウルトラマイクロ天秤 (XP2U, METTLER TOLEDO 社製) を用いて精密に量りとり, Table 4 に示す量で混合した (調製各  $n=1$ ). この混合試料を移動相 (水: アセトニトリル: ギ酸 = 500 : 500 : 1) を用いて 100 mL に定容し, HPLC/PDA 分析用試料液とした. HPLC/PDA 分析用試料液は, Table 3 に示した HPLC/PDA 分析条件に付した. なお, カラムは Inertsil ODS-4 (2.1 × 150 mm, 3  $\mu\text{m}$ , GL science) のみを用いた. カピリンの含量は, 以下の式 (2) から求めた.

式 (2)

$$Cont(\text{wt}\%) = \frac{W_{Hep}}{W_{Sample}} \times \frac{A_{Cap}}{A_{Hep}} \times \frac{1}{RRF} \times \frac{P_{Hep}}{100}$$

$W$ , 採取量;  $A$ , ピーク面積;  $RRF$ , 1.31;  $P$ , 純度; Cap, カピリン; Sample, 添加物製品.

## B - 5 . $^1\text{H}$ -qNMR による純度測定

### B - 5 - 1 . $^1\text{H}$ -qNMR 標準液調製

$^1\text{H}$ -qNMR 基準物質 1,4-BTMSB- $d_4$  約 10 mg を精密に量り, MeOH- $d_4$  を用いて 50 mL に定容したものを  $^1\text{H}$ -qNMR 標準液とした. また, 認証標準物質フタル酸ジエチル (DEP) を用い, 測定用に調製した  $^1\text{H}$ -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 - 5 - 2 . ヘプチルパラベンの純度測定

4 社 4 製品 (粉末状) のヘプチルパラベンを, それぞれ約 5.0 mg となるように精密に量りとり, B - 5 - 1 項で調製した  $^1\text{H}$ -qNMR 標準液各 1.0 mL を加えて溶解した (調製各  $n=1$ ). これらの各溶液 0.6 mL をそれぞれ NMR 試験管に封入したものを  $^1\text{H}$ -qNMR 用試料溶液とし, Table 2 に示した  $^1\text{H}$ -qNMR 条件に付した (測定各  $n=$

3).  $^1\text{H}$ -qNMR における 1,4-BTMSB- $d_4$  のプロトンシグナル積分値とヘプチルパラベンに由来する特定プロトンシグナル積分値の比を基に、各  $^1\text{H}$ -qNMR 用試料溶液中のヘプチルパラベンの純度を算出した。

## C. 結果及び考察

### C-1. カピリン定量用内標準物質の選択

HPLC/PDA 分析条件下におけるカピリン定量用内標準物質を選択した。定量用内標準物質としては、安価でコンスタントに入手可能で、試薬メーカーが記載する純度値と  $^1\text{H}$ -qNMR での純度値に大きな差がないと予想されるものを考慮して、Table 5 に示す計 13 種の市販試薬を候補に挙げた。これらの市販試薬を、Table 3 に示した HPLC/PDA 分析条件に付し、得られた HPLC クロマトグラムを、カワラヨモギ抽出物のそれと比較したところ、ヘプチルパラベンはカワラヨモギ抽出物中のカピリンおよび夾雑物との分離が良好であった (Fig. 3)。

次に、ヘプチルパラベンの市販試薬がカピリンの定量用内標準物質として適しているのか検証を行なった。4 社 4 製品のヘプチルパラベンの市販試薬を  $^1\text{H}$ -qNMR に付し、得られた純度値を各試薬のラベルに記載されている純度値と比較したところ、4 製品全てにおいて  $^1\text{H}$ -qNMR での純度値とラベル記載の純度値に大きな差がなく (1.4% 未満) (Table 6)、このことから、市販のヘプチルパラベンを購入して用いれば、メーカー間純度の差や表示純度との差をあまり気にせずに定量用内標準物質として使用できることが明らかとなった。

### C-2. ヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF の算出

ヘプチルパラベンとカピリンを混合した RRF 算出用試料液を  $^1\text{H}$ -qNMR に付したところ、ヘプチルパラベンに由来する H-2 + H-6 および H-3 + H-5 の 2 つのプロトンシグナルは、カピリンの H-2 + H-6、H-4 および H-3 + H-5 の 3 つのプロトンシグナルと良好に分離しており (Fig. 2)、これらのプロトンシグナルから相対積分値を算出した後、各シグナルが由来するプロトン

数で除し、ヘプチルパラベンに対するカピリンのモル比の平均を求め、式 1 に代入した。各 RRF 算出用試料液中の平均モル比の値の相対標準偏差 (RSD) は 0.56% 以下であり良好であった (Table 7)。

次に RRF 算出用試料液を移動相で希釈し HPLC/PDA に付した。ヘプチルパラベンおよびカピリンの極大吸収波長は、256 nm および 284 nm を示したため、ヘプチルパラベンのピーク面積を 256 nm で求め、カピリンのピーク面積は 284 nm で求めることにした (Fig. 4)。ピーク面積は、3 社 3 製品のカラムを用いて求め、式 1 に代入することでヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF を算出した (Table 8)。3 社 3 製品のカラム (各カラム測定  $n=3$ ) での平均 RRF は 1.31、RSD 1.25% であり、カラムの影響を受けにくい堅牢な値であることが明らかとなった。したがって、RRF を適用したカピリン定量法には、ヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF 値として 1.31 を用いることとした。

### C-3. RRF を適用した HPLC/PDA によるカピリンの定量

ヘプチルパラベンと製品 1~3 を精密に秤量 (Table 4) した HPLC/PDA 分析用試料液を HPLC/PDA に付し、カワラヨモギ抽出物製品中のカピリンの定量を行なった。秤量値およびピーク面積を求め、式 2 に代入することでカピリンの含量を算出した。また、算出された含量について、昨年度報告された<sup>4)</sup>、カピリン標準品 (非売品) の検量線 ( $^1\text{H}$ -qNMR 純度で校正) から算出された含量と比較し、本研究で定めた RRF の評価を行なった (Table 9)。両定量法で算出された含量は、概ね一致しており、その差は 0.002% 以下であったため、本法で用いた RRF 値が適切であるものと判断された。

## D. 結論

本研究では、カワラヨモギ抽出物の有効成分であるカピリンの定量法を検討した。本研究で算出されたヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF を適用して HPLC/PDA によるカワラ

ヨモギ抽出物中のカピリンの定量を行なった。算出された定量値は、純度 99.5%のカピリンの量値と殆ど差はなく(0.002%以下)、検量線から求めた値を真値とすると、RRFを用いた定量法の真度は91~94%であった。本研究において確立したRRFを適用した定量法は、カピリンの定量用標準品を必要とせず、カワラヨモギ抽出物の規格試験法として有用であることが明らかとなった。

#### E. 参考文献

- 1) 厚生省告示第120号(1996)“既存添加物名簿”平成8年4月16日。
- 2) 消費者庁次長通知“食品衛生法に基づく添加物の表示等について、別添1 既存添加物名簿収載品目リスト”平成22年10月20日、消食

単離・精製標品の検量線から直接算出された定

表第377号(2010)

- 3) 厚生労働省“第8版食品添加物公定書”2007。
- 4) 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保促進研究事業)、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、平成27年度分担研究報告書「既存添加物カワラヨモギ抽出物の乾燥減量試験法とqNMRを応用した定量法の開発」

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

Table 1 カワラヨモギ抽出物試料情報

	製造元	状態	色
製品 1	A 社 Lot. 1	液体	暗褐色
製品 2	A 社 Lot. 2	液体	黄褐色
製品 3	A 社 Lot. 3	液体	黄褐色

Table 2 qNMR 測定条件

Spectrometer	ECZ600 (JEOL Ltd)
Spectral width	- 5 ~ 15 ppm
Data points	48014
Auto filter	on
Flip angle	90°
Pluse delay	60 s
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	25°C
Solvent	MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>
Reference material	1,4-BTMSB- <i>d</i> <sub>4</sub>

Table 3 HPLC/PDA 分析条件

装置	Alliance 2695 separation module-2996 photodiode array (Waters)
カラム	Inertsil ODS-4 (2.1 × 150 mm , 3 μm , GL science) Atlantis dC18 (2.1 × 150 mm , 3 μm , Waters) TSKgel ODS-80TsQA (2.0 × 150 mm , 5 μm , TOSOH)
移動相	水 : アセトニトリル : ギ酸 = 500 : 500 : 1
カラム温度	40°C
流速	0.15 mL/min
PDA	190-600 nm
検出波長	カピリン : 284 nm ; ヘプチルパラベン : 256 nm
注入量	10 μL

Table 4 HPLC/PDA 分析用試料液中の製品とヘプチルパラベンの採取量 (mg)

製品 1	製品 2	製品 3	ヘプチルパラベン
122.2			0.4919
	1803.3		2.3904
		950.2	1.9311

Table 5 カピリン定量法の検討に用いた内標準物質候補市販試薬

試薬名	保持時間	製造元
4-ヒドロキシ安息香酸	3.2 min	東京化成工業, Cat No.99-96-7, Lot No.44CWL-ST
メチルパラベン	4.7 min	和光純薬工業, Cat No.99-76-3, Lot No. STN0409
エチルパラベン	5.6 min	和光純薬工業, Cat No.120-47-8, Lot No. SDK4955
プロピルパラベン	7.3 min	東京化成工業, Cat No.94-13-3, Lot No.AJ01
ブチルパラベン	9.8 min	和光純薬工業, Cat No.94-26-8, Lot No. SDP7282
アミルパラベン	13.9 min	東京化成工業, Cat No.6521-29-5, Lot No.FIF01
ヘキシルパラベン	20.1 min	東京化成工業, Cat No.1083-27-8, Lot No.PCX01
ヘプチルパラベン	31.5 min	和光純薬工業, Cat No.1085-12-7, Lot No. KPG0950
イソプロピルパラベン	7.0 min	東京化成工業, Cat No.4191-73-5, Lot No.GH01
イソブチルパラベン	10.0 min	東京化成工業, Cat No.4247-02-3, Lot No.AU01
ベンジルパラベン	10.0 min	東京化成工業, Cat No.94-18-8, Lot No.PCX01
4-ピフェニルカルボン酸メチル	26.1 min	和光純薬工業, Cat No.720-75-2, Lot No. KPK0210
安息香酸 2-ナフチル	46.2 min	和光純薬工業, Cat No.93-44-7, Lot No. TLH0334

Table 6 ヘプチルパラベン市販試薬の qNMR 純度値

	a 社	b 社	c 社	d 社
qNMR 純度 (%)	97.0 ± 3.3	96.6 ± 3.5	97.2 ± 3.4	97.4 ± 3.5
メーカー記載純度 (%)	97 (HPLC)	98 (HPLC)	98 (T)	98 (GC)

Table 7 RRF 算出用試料液中のヘプチルパラベンに対するカピリンの平均モル比

	*Average ± SD	RSD (%)
1 : 5	0.28 ± 0.00	0.47
2 : 7	0.41 ± 0.00	0.20
2 : 10	0.30 ± 0.00	0.56

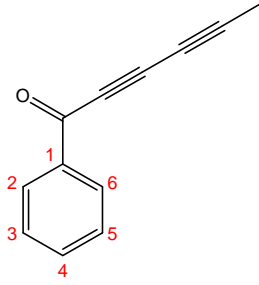
\*n = 3 .

Table 8 ヘプチルパラベンに対するカピリンの RRF

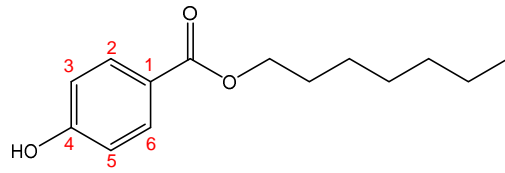
	1 : 5	2 : 7	2 : 10	Average	SD	RSD (%)
Inertsil ODS-4	1.32	1.30	1.32	1.31	0.01	1.11
Atlantis dC18	1.29	1.29	1.29	1.29	0.00	0.24
TSKgel ODS-80TsQA	1.32	1.30	1.32	1.31	0.01	1.11
Average	1.31	1.29	1.31	<b>1.31</b>		
SD	0.02	0.01	0.02		0.02	
RSD (%)	1.43	0.52	1.34			1.25

Table 9 添加物製品中のカピリン含量 (%)

		製品 1	製品 2	製品 3
RRF 法	平均	0.033	0.010	0.015
	SD	0.0008	0.0000	0.0001
	RSD (%)	2.3	0.1	0.5
検量線法	平均	0.035	0.011	0.016
	SD	0.0007	0.0001	0.0007
	RSD (%)	2.0	1.4	4.6



カピリン MW 168.19



ヘプチルパラベン MW 236.31

Fig. 1 カピリンとヘプチルパラベンの化学構造式

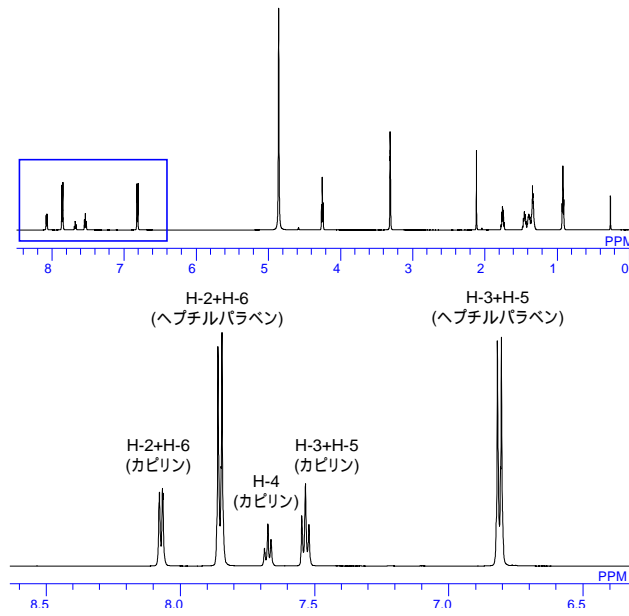


Fig. 2 RRF 算出用試料液のプロトン qNMR スペクトル

下段は、上段の枠を拡大したスペクトル。カピリンとヘプチルパラベンの重量比は約 2 : 7。

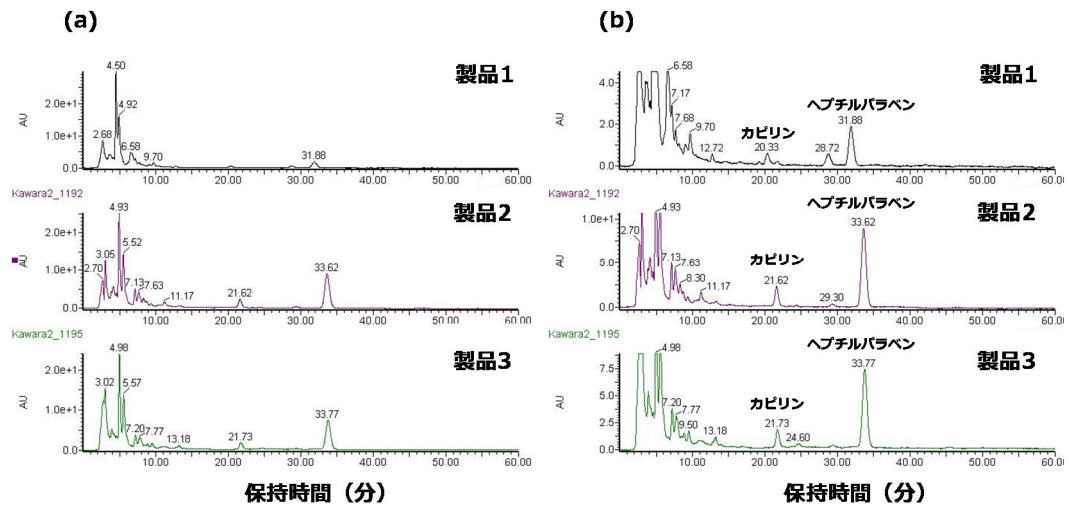


Fig. 3 ヘプチルパラベンとカワラヨモギ抽出物の HPLC/PDA クロマトグラム  
 (a) 190-600 nm における PDA クロマトグラム . (b) (a) の拡大図 .

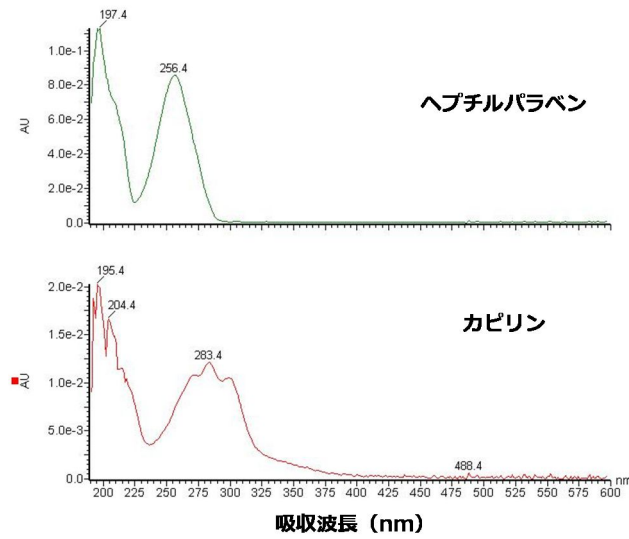


Fig. 4 ヘプチルパラベンとカピリンの UV 吸収スペクトル