

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：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 規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、 ^1H -qNMR法(定量 ^1H -NMR法)が試験法として適用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。28年度は「クローブ抽出物」の適用条件の確認と、「ベニバナ赤色素」、「ベニバナ黄色素」の規格試験法への適用の可能性の検討を行った。「クローブ抽出物」ではeugenolの定量条件が既存測定条件であるHPLC法と矛盾なく測定できることを確認した。「ベニバナ赤色素」では、定量用標準品が手に入らないことから、まずその単離精製から行い、赤色の化合物であるcarthaminの単離と ^1H -qNMR法に応用可能な溶媒の選択、HPLCでの測定条件を確立した。「ベニバナ黄色素」も黄色の本体とされるsafflor yellow類の個々の化合物の標準品が手に入らないことから、単離精製を行った。

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りうる。

28年度の研究では既存添加物である「クローブ抽出物」の品質評価方法としてeugenol (Fig. 1)の定量が ^1H -qNMR法で可能で、既存測定条件であるHPLC法と矛盾なく測定できることを確認した。また、「ベニバナ赤色素」「ベニバナ黄色素」も成分定量的方法が確立されておらず、規格基準が決められていないことから、それぞれの色素本体の化

合物であるcarthamin (Fig. 2)とsafflor yellow類 (Fig. 3)を直接 ^1H -qNMR法で、あるいは標準品溶液を ^1H -qNMR法で定量したのちHPLC法で既存添加物の定量を行う方法で管理法が確立できるかの検討を行った。

B. 研究方法

1) ^1H -qNMR法を用いた「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、前年度の研究時に入手・使用したもので、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eugenolが含まれているというものであった。

Eugenol の ^1H -qNMR の測定は,前年度の研究結果より acetone- d_6 中での測定,内部標準として用いる認証標準物質としては 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- d_4 (1,4-BTMSB- d_4 , Fig. 4)を DMSO- d_6 溶液として用いる方法を確認している.今年度もこの方法を用いて定量を行った.

1-1) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

測定に利用した 1,4-BTMSB- d_4 は和光純薬の Trace Sure®規格のもの,acetone- d_6 と DMSO- d_6 はいずれも Isotec Inc. の 99.9 atom %D を用いた.NMR 測定管は和光純薬 HG タイプ (5 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.

1,4-BTMSB- d_4 はデシケーター中で overnight 乾燥させた.約 5 mg を精秤して 2.00 ml の DMSO- d_6 に溶かし内部標準用溶液とした.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- d_4 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- d_6 (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- d_4 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.

1-2) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Eugenol と「クローブ抽出物」の ^1H -NMR を測定し,eugenol の 6 位 H のシグナルが 6.33 ppm に現れることを確認した.Fig. 5, 6 にそれぞれのスペクトルを示した.測定条件は 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から,eugenol の 6 位 H のシグナルと 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB- d_4 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.

$$C_{\text{EU}} = \frac{I_{\text{EU}}}{I_{\text{B}}} \times C_{\text{B}} \quad (2)$$

ただし, C_{B} , C_{EU} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び eugenol のモル濃度 (mol/ml), I_{B} , I_{EU} はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び eugenol の水素 1 個あたりのシグナル面積.

1-3) HPLC を用いた「クローブ抽出物」中の eugenol の定量

HPLC はポンプとして JASCO JASCO PU-2089 を用い,YMC-Pack ODS-AL s-5 250 mm x 4.6 mm i.d.のカラムをカラムオープン Shimadzu CT0-20AC 中で 37 とし, H_2O : MeCN : MeOH = 50 : 40 : 10 の溶媒を流速 1.0 mL/min で溶出,JASCO MD-2010 を用いて 280 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った.

^1H -qNMR 法で定量した eugenol 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した.「クローブ抽出物」は,HPLC の展開溶媒で希釈し,その試料溶液を 10 μL 注入して定量を行った.

2) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

既存添加物の「ベニバナ赤色素」は「ベニバナの花から得られた,カルタミンを主成分とするものをいう.」と定義され,その本質は「ベニバナ (*Carthamus tinctorius* Linne) の花から得られた,カルタミンを主成分とするものである.デキストリン又は乳糖を含むことがある.」とされるもので,赤色の着色料として用いられる.市販の carthamin が主成分として市販されている試薬の NMR スペクトルを測定した場合,糖類に由来する巨大なシグナルが観測され,carthamin に由来する sp^2 領域のシグナルは極めて小さく,既存添加物同様で大部分がデキストリンなどの添

加物と考えられた。(Fig. 7)純度の高い carthamin は市販されていないため、まず、ある程度の純度とした標準品用の carthamin を単離して得るということから行い、得られた上で HPLC と ¹H-NMR による確認を行うことにした。

2-1) Carthamin の単離

水上らの方法 (Chem, Pharm. Bull., 61(12), 1264-1268(2013)) に従い、市販既存添加物からの carthamin の単離を行った。すなわち、「ベニバナ赤色素」を MeOH 中で攪拌、濾過後、濾液の溶媒を留去、得られた残渣を ODS を担体としたオープンカラム (MeOH-水 = 60:40) で分離をし、TLC 上で 1 spot の状態の carthamin を単離した。

2-2) Carthamin の HPLC 分析法の確立

市販添加物中の carthamin 含有量が極めて少ないことが推定されることから、carthamin の絶対定量では標準品溶液の値付け 標準品溶液を使った HPLC 分析という手順を念頭に、carthamin の HPLC 分析の条件の確立をおこなった。

HPLC はポンプとして JASCO PU-2089 を用い、YMC-Pack ODS-AL s-5 250 mm x 4.6 mm i. d. のカラムをカラムオープン Shimadzu CTO-20AC 中で 37 とし、0.5%酢酸-MeOH 溶液 : 0.5%酢酸水溶液 1.0 ml/min のグラジエント (0 min: 50:50 20 min 80:20) で溶出、JASCO MD-2010 を用いて 520 nm における吸光度で化合物の検出を行うという分析条件を作った。

3) 「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

既存添加物の「ベニバナ黄色素」は「ベニバナの花から得られた、サフライエロー類を主成分とするものをいう。」と定義され、その本質は「ベニバナ (Carthamus tinctorius Linne) の花から得られた、サフライエロー類を主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」とされるもので、黄色の着色料として用いられる。「ベニバナ黄色素」も「ベニバナ赤色

素」と同様で、実際に購入できた製品は、NMR スペクトルは糖類に由来する巨大なシグナルが観測され、safflor yellow に由来する sp²領域のシグナルは極めて小さい。(Fig. 8) 純度の高い safflor yellow 類も販売されていない。極めて簡便に純度の高い safflor yellow を得ることができるとされる方法 (Indian Patent, IN 183773 A1 20000408, (2000)) が文献上にあったことから、ある程度の純度の標準品用の safflor yellow 類を得るべく、生薬コウカからの分離精製を行うことにした。

3-1) Safflor yellow 類の分離精製

生薬コウカ (35 g) を MeOH で 2 回抽出したのち乾燥させた。その乾燥物を水 300 mL で 2 回抽出、得られた水溶液を凍結乾燥し、凍結乾燥物を MeOH に懸濁、不溶物 (5.06 g) を濾取した。文献上ではこれが高純度の safflor yellow と記されていたが、TLC 上ではスミアーな状態に近い多くのスポットが確認された。さらに、ODS カラムクロマトグラフィーなどを用いて精製を進めている。

C. 研究結果

1) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量

昨年度確立した内部標準を DMSO-*d*₆ 溶液として加えて測定する方法で、eugenol の 6 位 H シグナル (6.33 ppm) 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されず、このプロトコールで eugenol が測定できることを改めて確認した。(Fig. 5,6)

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」の eugenol の含有率は 26.56%、28.81% だった。

次に、HPLC での定量では、今回の条件で eugenol が 280 nm において良好なピークとして検出できることを確認した。(Fig. 9) ¹H-qNMR 法を用いて求められた純度をもとに eugenol 溶液を順次希釈し HPLC のピーク面積を求めて検量線を作成した。その検量線も

極めて良い直線性を示した。(Fig. 10)
この検量線から算出した HPLC 法での「クローブ抽出物」中の eugenol の定量値を Table 2 に示した。

2) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

Carthamin の単離では, 研究方法の操作で「ベニバナ赤色素」に相当する製品から TLC 上で 1 spot の状態の carthamin を単離することができた。その NMR スペクトル (Fig. 11) を先の文献と比較して carthamin であることを確認した。

また, HPLC の条件検討では, 酢酸を添加した MeOH- 水のグラジエントの条件で, carthamin が良好なピークを与えることを確認した。(Fig. 12)

3) 「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

文献記載の方法で生薬コウカから safflor yellow 類の単離を試みたが, 純度が低いと思われる粉末が得られたのみであった。

D. 考察

1) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量

前年度に確立した ^1H -qNMR による eugenol の定量法で, 試料の eugenol を含む試料は acetone- d_6 に溶解し, 認証標準物質の 1,4-BTMSB- d_4 は DMSO- d_6 に 2.5 mg/mL で溶解し, 両者を 5 : 1 で混合して測定に供するという方法で問題なく簡便に eugenol の 6 位 H のシグナル面積の測定ができた。よって, この測定法が利用できることを改めて確認した。

HPLC においては, ^1H -qNMR で値付けをした eugenol 標準品溶液を用いた定量が可能であることも確認できた。また, 「クローブ抽出物」中の eugenol の定量値が ^1H -qNMR における定量値と HPLC の定量値との比較では, HPLC の値がやや低かったが, ほぼ一致していることから, ^1H -qNMR が既存の定量法に置き換えることのできる簡便な手段であることを確

認できた。同時に, 万が一, 測定試料の ^1H -NMR スペクトルで eugenol の 6 位 H にオーバーラップするシグナルがある場合, ^1H -qNMR によって標準溶液の純度の値付けを行い, その標準溶液を用いて HPLC 法による定量をすることで, 間接的な絶対定量が可能なることも確認できた。

^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 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ことを改めて確認した。

2) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

まだ定量方法の確立には至っていないが, 標準試料の単離方法を確立できた。標準試料として正確に秤量できるだけの物質の確保を行っている。

定量方法の確立に先立って HPLC の条件設定を行ったが, carthamin のピークを良好に検出できる条件を見つけることができたので, 少なくとも ^1H -qNMR による標準品溶液の値付け その標準溶液を基準とした HPLC 分析というプロトコールの実施に目処をつけたと言える。Carthamin 標準溶液の ^1H -qNMR による値付けは先行例があるので, 純度が極めて低く ^1H -qNMR では直接定量が困難な試料での定量も目処をつけた。

3) 「ベニバナ黄色素」中の safflor yellow 類の定量

操作が簡便すぎることから, 花卉に含まれる糖類などがまだ多く残っていることが考えられる。現在精製途上で単離には至っていない。Safflor yellow 類には Fig.3 に示したように幾つかの化合物があるので, どの化合物を定量の対象とすべきかについても, 今後考える必要がある。

E. 結論

1) 「クローブ抽出物」中の eugenol 定量では, 認証標準物質の 1,4-BTMSB- d_4 を内部標準として用い, この DMSO- d_6 溶液を測定試料の acetone- d_6 溶液とを混合して NMR を測定

し, eugenol の6位Hのシグナル(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. この数値は, 既存の定量法である HPLC 法と良い一致を示した. これらのことから ¹H-qNMR 法が, 既存の方法に変わりうる, 簡便で迅速な「クローブ抽出物」の品質管理法になりうることを示すことができた.

2) 「ベニバナ赤色素」の本体である carthamin の HPLC 定量条件の設定ができたため, ¹H-qNMR では定量が困難な場合の代替手段として標準溶液の値付け HPLC 法を用いた定量という組み合わせでの絶対定量法の確立の目処をつけた. Carthamin の標準試料の測定に関しては先行例もあることから, 引き続き, 実際に ¹H-qNMR で「ベニバナ赤色素」が定量可能か, 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量には HPLC との組み合わせが必要かについて検討を行う.

3) 「ベニバナ黄色素」に関しては, 個々の safflor yellow 類の単離を引き続き行い, それぞれの ¹H-NMR スペクトルにおいて, 独立したシグナルが得られるか, すなわち, ¹H-qNMR の実施が可能かの確認をとりあえずの目標とする.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka, Rie; Shibata, Hikari; Sugimoto, Naoki; Akiyama, Hiroshi; Nagatsu, Akito
Application of a quantitative ¹H-NMR method for the determination of paeonol in Moutan cortex, Hachimijiogan and Keishibukuryogan
Journal of Natural Medicines (2016), **70**(4), 797-802.

2) Tanaka, Rie; Inagaki, Risa; Sugimoto, Naoki; Akiyama, Hiroshi; Nagatsu, Akito
Application of a quantitative ¹H-NMR (¹H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen, *Journal of Natural Medicines* (2017), **71**(1), 315-320.

2. 学会発表

1) 永津明人「定量 NMR を用いた生薬の分析」
日本生薬学会第 63 年会, 1A-SY1-2, 2016 年 9 月 (富山)

2) 藤原裕未, 水野舞, 永津明人, 杉本直樹, 西崎雄三, 多田敦子, 穠山浩「定量 NMR による生薬チヨウジ中の eugenol の定量」
日本生薬学会第 63 年会, 2P-09, 2016 年 9 月 (富山)

3) 永津明人, 加藤志保里, 山田紗由美, 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穠山浩
「定量 NMR を用いたグルコサミンの定量法の確立」
日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, D-34, 2016 年 10 月 (岐阜)

4) 藤原裕未, 田中理恵, 杉本直樹, 西崎雄三, 穠山浩, 永津明人「定量 NMR を利用した生薬成分の定量」
第 45 回生薬分析シンポジウム, 2016 年 11 月 (大阪)

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

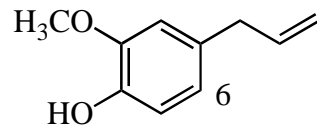


Fig. 1 Eugenol の構造

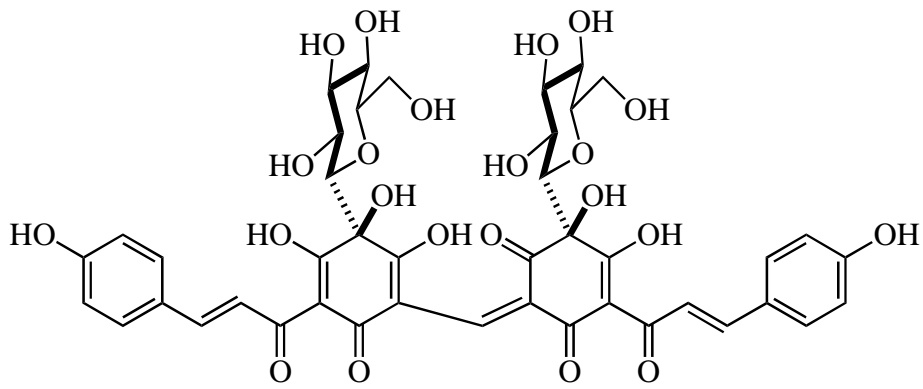


Fig. 2 Carthamin の構造

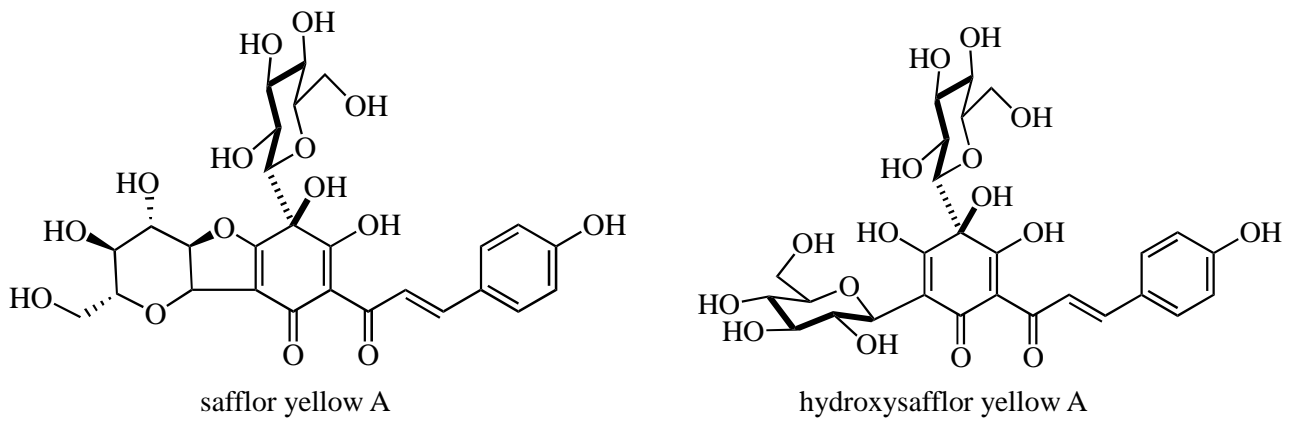


Fig. 3 Safflor yellow 類の構造

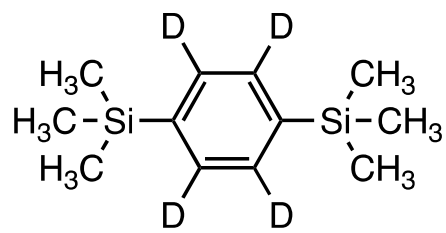


Fig. 4 1,4-(Bis(trimethylsilyl)benzene-d₄) (1,4-BTMSB-d₄)の構造

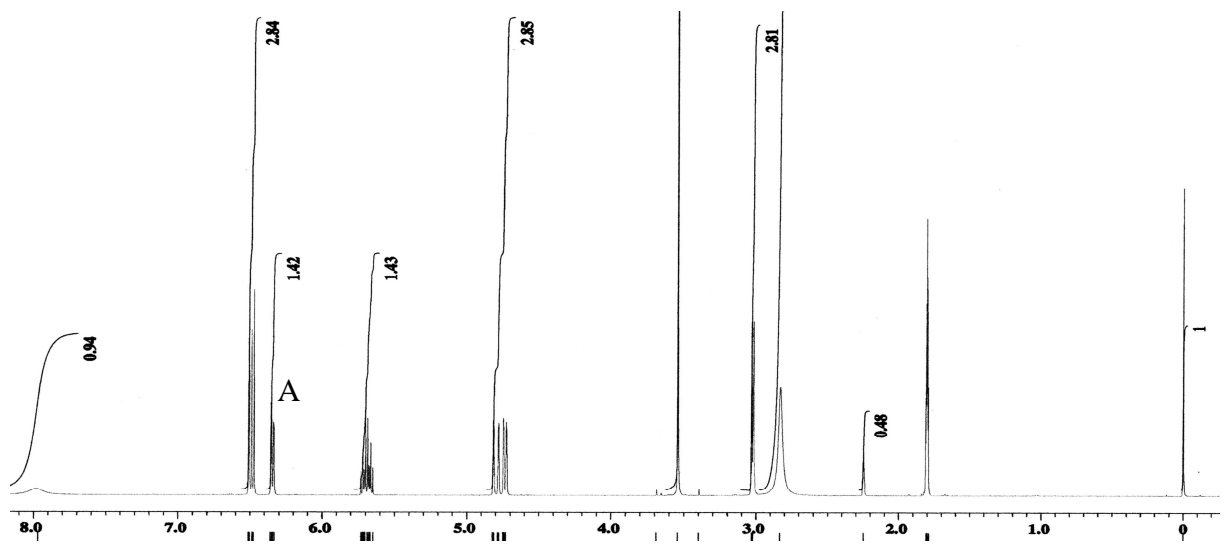


Fig. 5 Eugenol の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (acetone- d_6 , 500 MHz)

A: eugenol の 6 位 H のシグナル

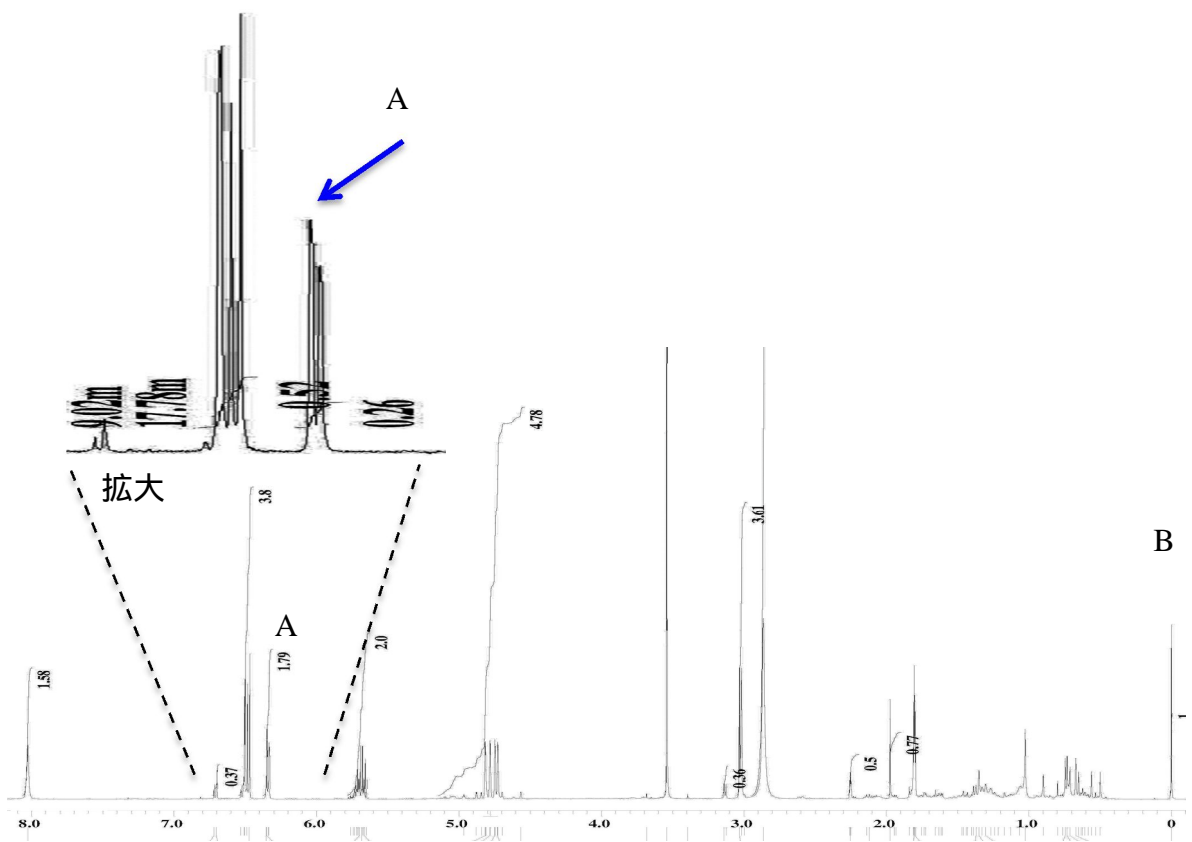


Fig. 6 「クローブ抽出物」の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (acetone- d_6 , 500 MHz)

A: eugenol の 6 位 H のシグナル, B: 1,4-BTMSB- d_6 のメチル基のシグナル

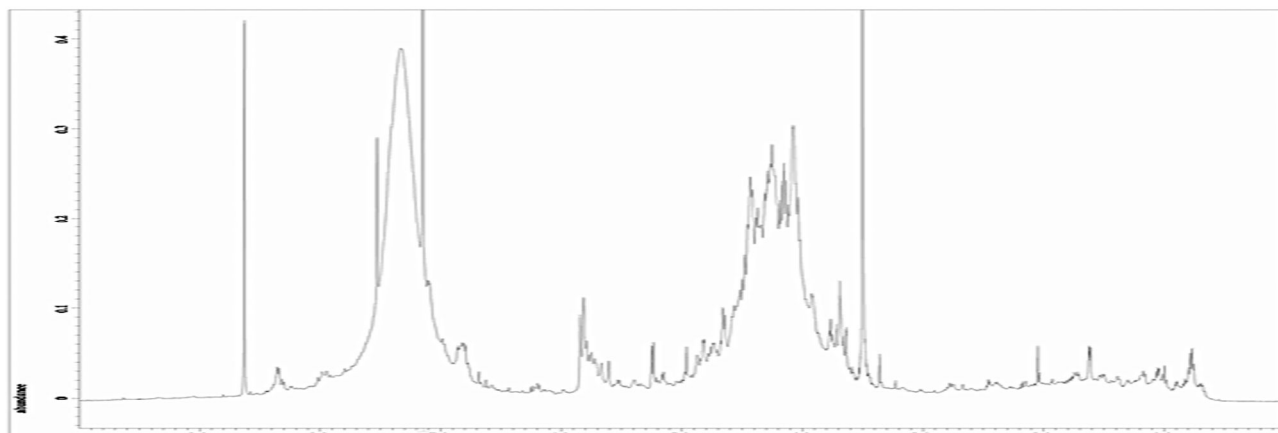


Fig. 7 主成分 carthamin として市販の色素の ^1H -NMR スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

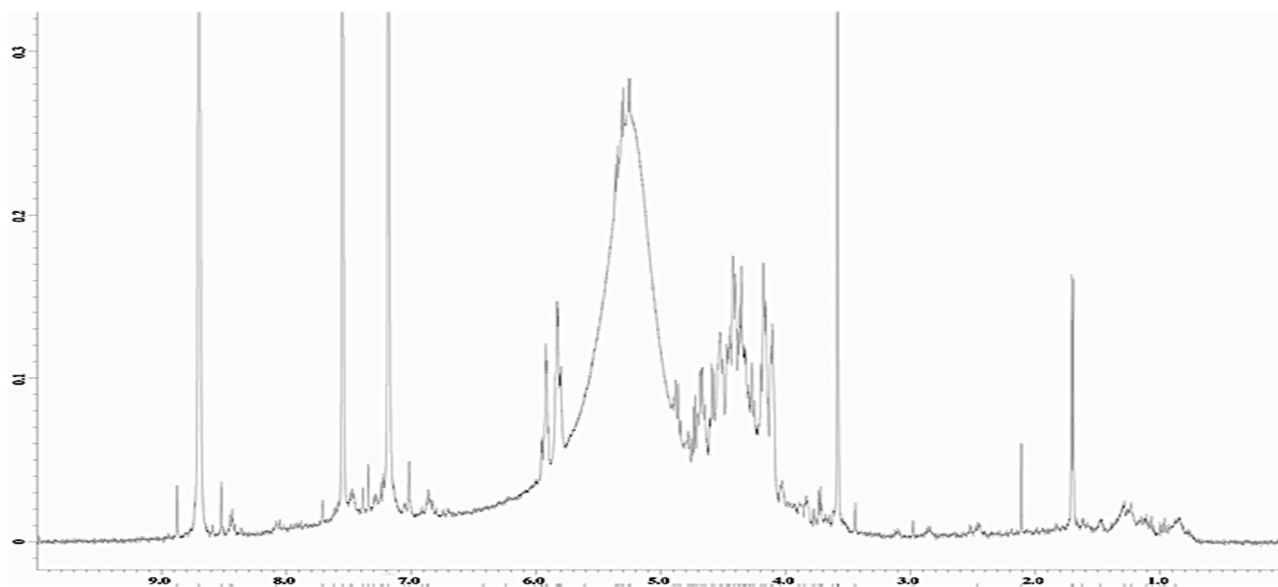


Fig. 8 「ベニバナ黄色素」の ^1H -NMR スペクトル(pyridine- d_5 , 500 MHz)

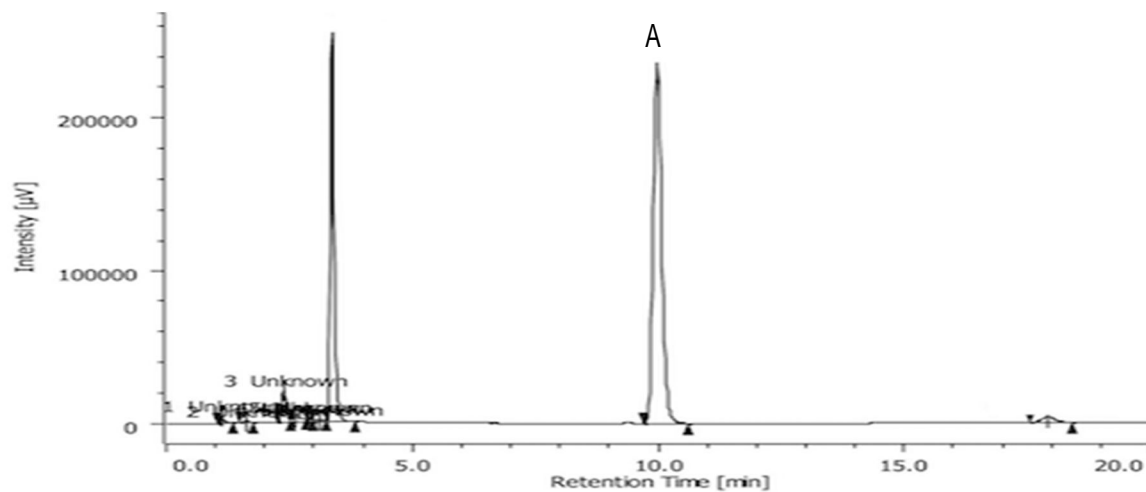


Fig. 9 Eugenol 標準品の HPLC クロマトグラム
A: eugenol のピーク

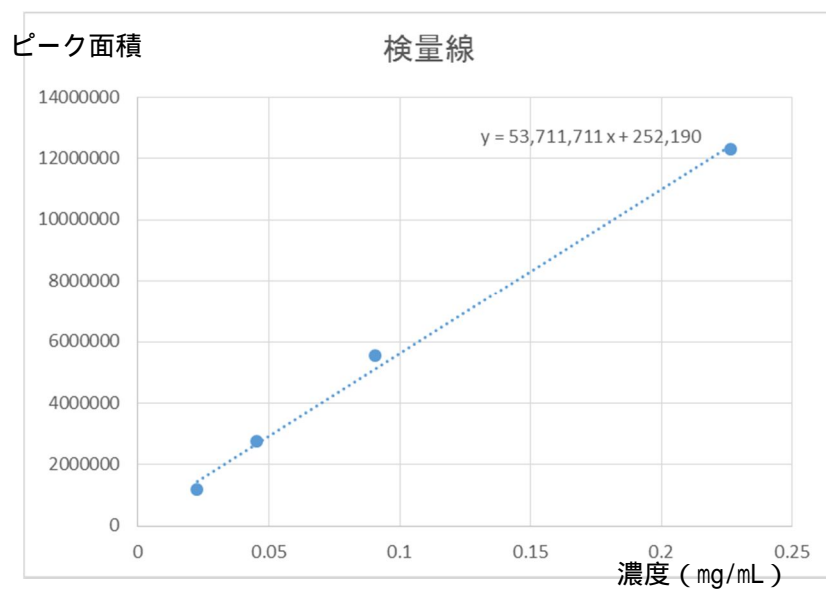


Fig. 10 Eugenol 標準品の HPLC におけるピーク面積から作成した検量線 ($r = 0.998$)

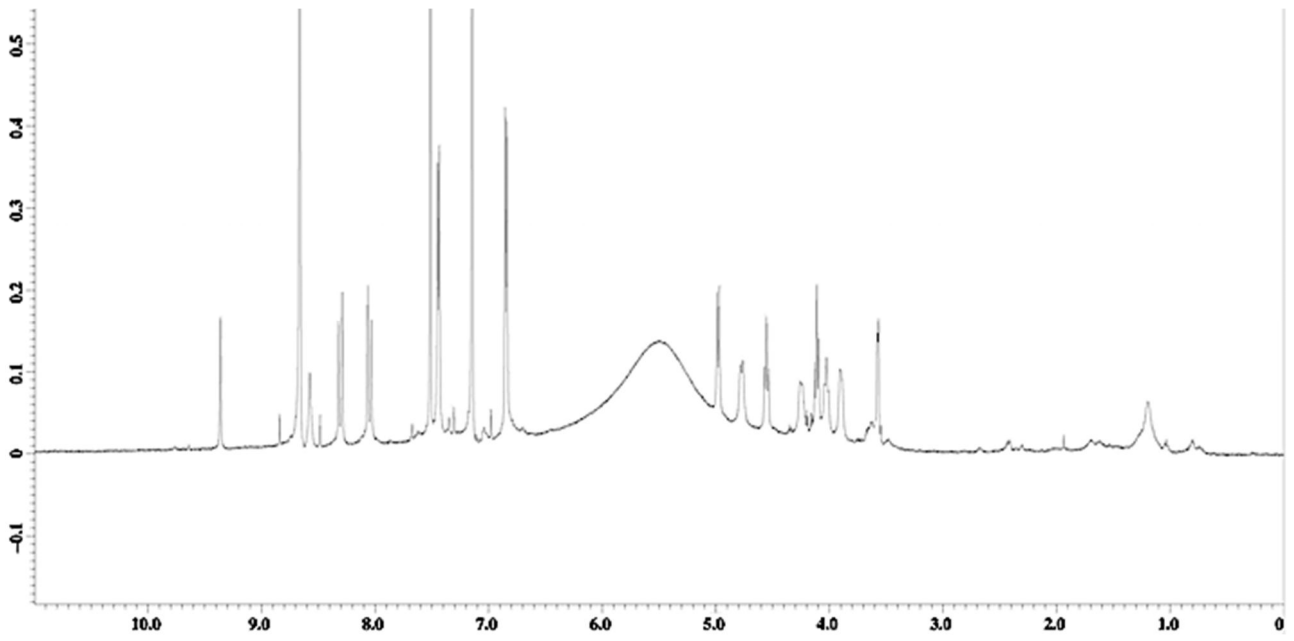


Fig. 11 単離した carthamin の ^1H -NMR スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

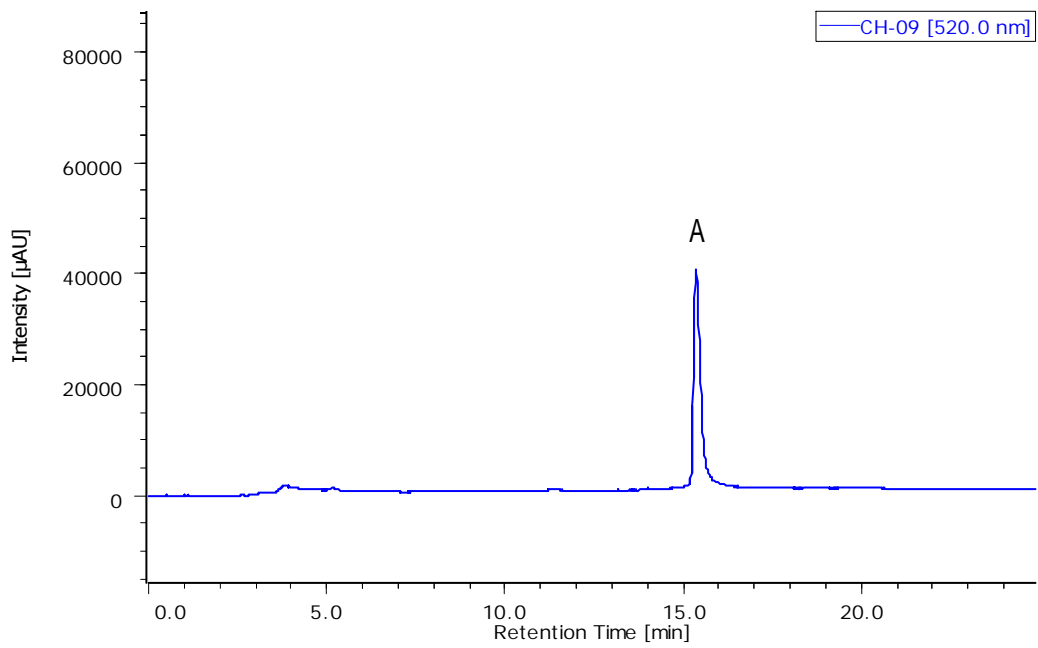


Fig.12 単離した carthamin の HPLC クロマトグラム
A: 検出波長 520 nm における carthamin のピーク

Table 1 ¹H-qNMR スペクトルの測定条件

分光計	日本電子 ECA500
観測範囲	-5 ~ 15 ppm
データポイント数	32000
フリップアングル	90°
パルス待ち時間	60 秒
積算回数	8 回
スピン	なし
プローブ温度	25

Table 2 ¹H-qNMR 法と HPLC 法で定量された eugenol の含有率

samples	含有率(%)	
	¹ H-qNMR	HPLC ^a
eugenol 標準品		
A	92.47	
クローブ抽出物		
B	26.56	24.94
C	28.81	26.20

^a ¹H-qNMR 法から得られた eugenol 標準品の含有率をもとに算出