

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26～28年度分担総合研究報告書

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。26～28年度の間で「ヤマモモ抽出物」「グルコサミン」「クローブ抽出物」「ベニバナ赤色素」「ベニバナ黄色素」に関する適用条件を探索した。「ヤマモモ抽出物」中のmyricitrinの純度は、認証標準物質としてPHP、仲介物質としてHMDを用い、methanol- d_4 中で測定したスペクトルの6位または8位の水素シグナル面積から測定可能であることを示した。「グルコサミン」中のglucosamineの純度は、DSS- d_6 を直接内部標準として用い、 D_2O 中で測定したスペクトルの2つのアノマーの2位の水素シグナル面積の和から測定可能であることを示した。「クローブ抽出物」中のeugenolの定量では、「クローブ抽出物」のacetone- d_6 懸濁液上清に認証標準物質である1,4-BTMSB- d_4 のDMSO- d_6 溶液を加えて測定し、1,4-BTMSB- d_4 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。「ベニバナ赤色素」「ベニバナ黄色素」では、定量用標準品が手に入らないことから、まずそれらの本体であるcarthaminおよびsafflor yellow類の個々の化合物の単離精製から行っている。

A. 研究目的

qHNMR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。

本研究では、既存添加物のうち、規格基準が決められていない「ヤマモモ抽出物」「グルコサミン」「クローブ抽出物」を選択し、それぞれの主成分であるmyricitrin (Fig. 1)、glucosamine (Fig.

2)、eugenol (Fig. 3)の定量にqHNMR法を応用し、その定量法の確立を試みた。さらに「ベニバナ赤色素」「ベニバナ黄色素」についてもそれぞれの色素本体の化合物であるcarthamin (Fig. 4)とsafflor yellow類 (Fig. 5)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う目的で、その準備に当たる標準品となりうる化合物の単離を行った。

B. 研究方法

1) 「ヤマモモ抽出物」中のmyricitrin含有量の定量

「ヤマモモ抽出物」は、ヤマモモ (*Myrica rubra* Siebold *et* Zuccarini)の果実、樹皮または葉から抽

出して得られたもので、主成分は myricitrin であるとされている。主に酸化防止剤として用いられる既存添加物である。

今回用いた「ヤマモモ抽出物」は myricitrin 含量が高くほとんどメタノールに溶けるため、そのまま methanol- d_4 の qHNMR 用標準液を加えて溶解させたもので myricitrin の定量を行なうことにした。

1-1) qHNMR 用標準液の調製と hexamethyldisilane (HMD)濃度の決定

定量の基点となる認証標準物質はいくつか市販されているが、その $^1\text{H-NMR}$ におけるシグナルは測定対象の化合物のシグナルなどと重なり合うことが多い。そのため、報告のある方法でも 0 ppm 付近にシグナルを持つ hexamethyldisilane (HMD, Fig. 6)を仲介物質として測定している。今回もこの HMD を仲介物質として測定することにした。HMD 5.00 mg を methanol- d_4 に溶解して 20.0 ml としたものを qHNMR 用標準液(0.200 mg/ml)とした。この溶液 0.50 ml を認証標準物質 potassium hydrogen phthalate (PHP, Fig. 6) 12.00 mg を含む methanol- d_4 溶液 2.00 ml に加え、この混合溶液 0.60 ml を NMR 試料管にとり、qHNMR 用試料とした。7.57 ppm 及び 7.72 ppm 付近の PHP のシグナル面積と 0 ppm の HMD のシグナル面積を比較することにより(Fig. 7A),式 1 に従って qHNMR 用標準液中の HMD の濃度を決定した。NMR の測定条件については後述する。

$$C_{\text{HMD}} = 4 \times \frac{I_{\text{HMD}}}{I_{\text{PHP}}} \times C_{\text{PHP}} \quad (1)$$

ただし、 C_{HMD} , C_{PHP} はそれぞれ HMD 及び PHP のモル濃度(mol/ml), I_{HMD} , I_{ALK} はそれぞれ HMD の 6 個のメチル基及び PHP の芳香族水素 1 個あたりのシグナル面積。

1-2) qHNMR 法に用いる試料の調製

市販の「ヤマモモ抽出物」は減圧されたデシケーター中で over night 乾燥させた。

その後、約 5 mg を精秤して 1.00 ml の qHNMR 用標準液に溶かし、この溶液 0.60 ml を NMR 試料管にとったものを用いて qHNMR の測定に供した。

1-3) qHNMR スペクトルの測定

$^1\text{H-NMR}$ を測定し、myricitrin の水素シグナルが δ 0.95~6.94 ppm に現れることを確認した。Fig. 7B にそれぞれのスペクトルを示した。qHNMR は Table 1 に示した条件で測定した。前述の qHNMR 用標準液の HMD 濃度の算出のための測定も同じ条件で行なった。積算回数は、HMD 濃度の算出のための測定、および「ヤマモモ抽出物」の試料の測定では 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、myricitrin の水素シグナルと δ 0.04 ppm の HMD のシグナルの面積を比較して、式 2 に従って myricitrin の濃度を算出した。

$$C_{\text{MYR}} = \frac{I_{\text{MYR}}}{I_{\text{HMD}}} \times C_{\text{HMD}} \quad (2)$$

ただし、 C_{HMD} , C_{MYR} はそれぞれ HMD 及び myricitrin のモル濃度(mol/ml), I_{HMD} , I_{MYR} はそれぞれ HMD の 6 個のメチル基及び myricitrin 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) 「グルコサミン」中の glucosamine 含有量の定量

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。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定したところ、「グルコサミン」中の成分はほぼ glucosamine であると推定された。その glucosamine 定量にあたり、まず $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて glucosamine の各位置の水素シグナルが 2 ヶ所に別れて現れるということが判明した。これは、glucosamine の、それぞれのアノマーがある割合で平衡となって存在するからと考えられた。(Fig. 2) また、それぞれのアノマーの存在比はちょっとした

条件の相違で変化する可能性も考えられた。そこで、両アノマー分子中の同じ位置の水素シグナルの積分値の和から算出することにした。候補として1位または2位の水素シグナルが挙げられる。これらシグナルが独立して観測される溶媒の検討を行った。Methanol- d_4 , pyridine- d_5 , DMSO- d_6 , DMSO- d_6 とD₂Oの混合溶媒、D₂Oをそれぞれ溶媒として「グルコサミン」の¹H-NMRスペクトルを比較したところ、D₂O中で1位、2位の水素シグナルが他のシグナルと良好に分離することがわかり、好適であることがわかった。(Fig. 8) また、認証標準物質としては、水溶性でシグナルの化学シフト値が0 ppm付近にある3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid- d_6 sodium salt (DSS- d_6 , Fig. 6)を用いた。「グルコサミン」のD₂O溶液とDSS- d_6 のD₂O溶液を混合して定量することにした。

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- d_6 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- d_6 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- d_6 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。

2-2) 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. 8)から、glucosamineの2位Hのシグナル(δ2.89 ppm [Fig. 8のBのシグナル]とδ3.18 ppm [Fig. 8のCのシグナル])とDSS- d_6 のシグナルの面積を比較して、式3に従ってglucosamineの濃度を算出した。

$$C_{\text{GLA}} = \frac{I_{\text{GLA}}}{I_{\text{DSS}}} \times C_{\text{DSS}} \quad (3)$$

ただし、 C_{DSS} , C_{GLA} はそれぞれDSS- d_6 及びglucosamineのモル濃度(mol/ml)、 I_{DSS} , I_{GLA} はそれぞれDSS- d_6 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。

3) 「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- d_6 中での測定が適当と考えられた。(Fig. 9) 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- d_4 (1,4-BTMSB- d_4 , Fig. 6)を用いることにした。ところでこの1,4-BTMSB- d_4 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- d_6 溶液として調製し用いることにした。

3-1) ¹H-qNMR法に用いる試料の調製

1,4-BTMSB- d_4 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- d_6 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と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- d_6 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- d_6 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- 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。

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 ($\phi 5$ 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。

3-2) ^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 $\delta 6.33$ ppm に現れることを確認した。(Fig. 9 の A のシグナル) また, 「クローブ抽出物」においても eugenol の 6 位 H のシグナルが独立して観測されることを確認した。(Fig. 10) 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 4 に従って eugenol の濃度を算出した。

$$C_{\text{EU}} = \frac{I_{\text{EU}}}{I_{\text{B}}} \times C_{\text{B}} \quad (4)$$

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。

3-3) HPLC を用いた「クローブ抽出物」中の eugenol の定量

^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する目的で HPLC を用いた「クローブ抽出物」中の eugenol の定量も行った。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°C とし, $\text{H}_2\text{O} : \text{MeCN} : \text{MeOH} = 50 : 40 : 10$ 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。

4) 「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. 11) 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。

4-1) 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。

4-2) 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。

5)「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 sp^2 領域のシグナルは極めて小さい。(Fig. 12) 純度の高い safflor yellow 類も販売されていない。極めて簡単に純度の高い safflor yellow を得ることができる方法(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。

5-1) 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)「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の定量

今回,2 ロットの試料についての測定を行った。測定の結果を Table 2 に示した。Fig. 7B のスペクトルでの a~h のシグナルそれぞれについて定量値を示した。積分値をとったシグナルごとで多少のばらつきが見られ,また,2 試料で共通して大きめの値が算出されるシグナルと小さめの値が算出されるシグナルがあるという特徴も示唆された。YM 4 は 85%程度,YM 7 は 87%程度の純度であることがわかった。

2)「グルコサミン」中の glucosamine の定量

内部標準の認証標準物質 DSS- d_6 のシグナルは他のシグナルが全くない 0 ppm 付近に現れ,定量に用いた 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. 8) 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 3 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 ($C_6H_{13}NO_5$, 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 ($C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$, 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 3)

3) 「クローブ抽出物」中の eugenol の定量

まず、「クローブ抽出物」の acetone- d_6 中で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- d_6 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. 10) 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。

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 4)

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. 13) ^1H -qNMR 法を用いて求められた純度をもとに eugenol 標準品の溶液を順次希釈し 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. 14)

両法の比較に用いた「クローブ抽出物」の eugenol の含有率は 26.56%, 28.81% だったが、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 の定量値はそれぞれ 24.94%, 26.20% だった。(Table 5)

4) 「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. 15) を水上らの文献と比較して 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. 16)

5) 「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) 「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の定量

「ヤマモモ抽出物」においては、観測されたシグナルを精査すると、ベースライン上にも雑音が少なく、比較的シャープなシグナルとして観測される myricitrin の 6 位、8 位のシグナル (Fig. 7 の b, c のシグナル) の積分値を定量時の算出に用いるのが好適ではないかと考えられる。今後、今回の各シグナル間での定量値の違いが、常にこの傾向であるのか否か、それぞれのシグナルの積分値のばらつきを、同じ試料の繰り返し測定で見極めるとともに、多種の試料の測定でも確認する必要があると思われる。

2) 「グルコサミン」中の glucosamine の定量

「グルコサミン」においては、得られたスペクトルを精査すると、1 位の水素のシグナルのうち β アノマーの 1 位と帰属される水素 (δ 4.82 ppm) が D_2O の残留水素のシグナルの裾に若干重なっている可能性が観察された。このため、2 位の水素シグナル (δ 2.89 ppm と δ 3.18 ppm, Fig. 8 の B, C) の面積の和を純度算出に用いた方がよいと考えられる。「グルコサミン」中の 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体化が、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。

3) 「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. 10) 検量線も極めてよい直線性を示し、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。ストックの際に溶媒が揮発して濃度が変化しないよう、難揮発性の DMSO に溶解した、1,4-BTMSB- d_4 はカタログ上で DMSO に難溶と表記されているが、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、 $^1\text{H-qNMR}$ 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も実現できた。また、eugenol は揮発性の精油で標準品の純度が変化しやすいことから、そのような化合物でも $^1\text{H-qNMR}$ を用いれば絶対定量が可能になることを示すことができた。

HPLC においては、 $^1\text{H-qNMR}$ 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 $^1\text{H-qNMR}$ における定量値と HPLC の定量値との比較では、HPLC での値がやや低かったが、ほぼ一致していることから (Table 5)、 $^1\text{H-qNMR}$ 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。また、 $^1\text{H-qNMR}$ 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

が可能なことも確認できた。

4) 「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 $^1\text{H-qNMR}$ 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ルの実施に目処をつけたと言える。Carthamin 標準溶液の $^1\text{H-qNMR}$ による値付けは先行例があるので、純度が極めて低く $^1\text{H-qNMR}$ では直接定量が困難な試料での定量も目処をつけた。

5) 「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) 「ヤマモモ抽出物」では、methanol- d_4 中、認証標準物質として PHP を用い、仲介物質として HMD を介することで、myricitrin の 6 位または 8 位の水素シグナル面積から含有される myricitrin の定量が可能であることを示した。

2) 「グルコサミン」では、 D_2O 中、認証標準物質の DSS- d_6 を直接内部標準として用い、glucosamine の 2 つの配座異性体の 2 位の水素シグナル ($\delta 2.89$ ppm と $\delta 3.18$ ppm) の面積の和から、含有される glucosamine の定量が可能であることを示した。

3) 「クローブ抽出物」中の eugenol の定量では、認証標準物質の DSS- d_6 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 (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。また, 定量値は, HPLC 法と良い一致を示したことから ^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。

4) 「ベニバナ赤色素」では, その色素本体である carthamin の単離と 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。

5) 「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次のとりあえずの目標とする。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka, Rie; Nitta, Akane; Nagatsu, Akito
Application of a quantitative ^1H -NMR method for the determination of amigdalinal in *Persica semen*, *Armeniaca semen* and *Mume fructus*
Journal of Natural Medicines (2014), **68**(1), 225-230.

2) Tanaka, Rie; Hasebe, Yuko; Nagatsu, Akito
Application of a quantitative ^1H -NMR method for the determination of gentiopicroside in *Gentianae radix* and *Gentianae scabrae radix*
Journal of Natural Medicines (2014), **68**(3), 630-635.

3) 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.

4) 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) 藤原裕未, 大岩 硯, 長坂 泉紀, 永津 明人
「qHNMR 法を用いたカシュー中の anacardic acid の定量」日本生薬学会第 62 年会, 2P-13, 2015 年 9 月 (岐阜)

2) 藤原裕未, 田中理恵, 永津明人
「qHNMR 法による生薬シャゼンシ (車前子) 中のゲニポシド酸の定量」日本生薬学会第 61 年会, 2P-67, 2014 年 9 月 (福岡)

3) 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)

4) 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 による生薬チョウジ中の eugenol の定量」日本生薬学会第 63 年会, 2P-09, 2016 年 9 月 (富山)

5) 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)

6) 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

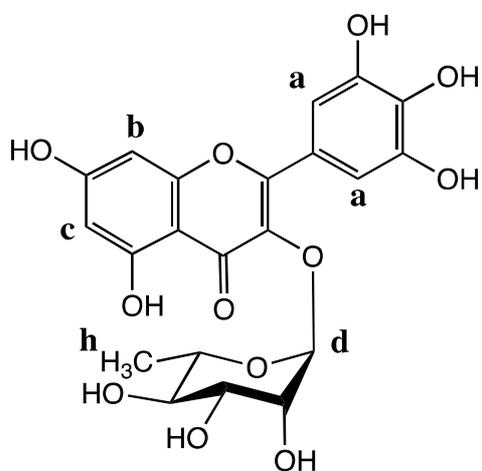


Fig. 1 myricitrin の構造

a,b,c,d,h は Fig. 4 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの対応するシグナルの水素

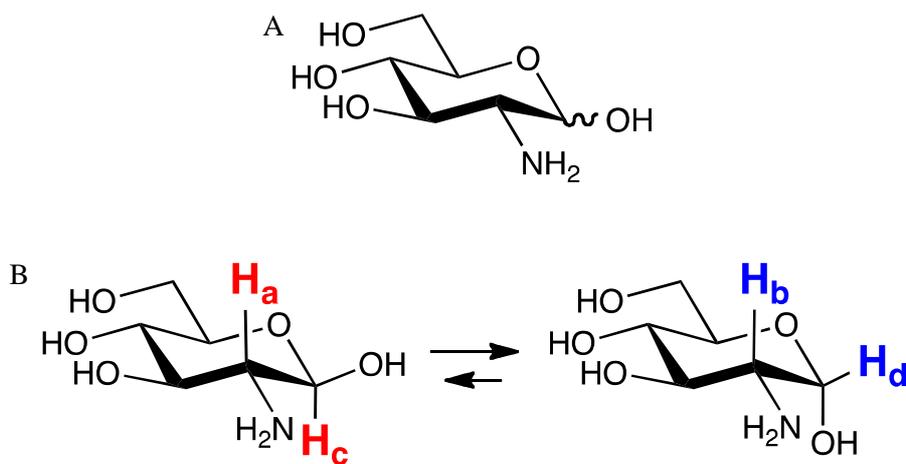


Fig. 2 glucosamine の構造

A: 一般式,

B: アノマーと アノマーの平衡.

Ha~Hd は Fig. 8 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの対応するシグナルの水素

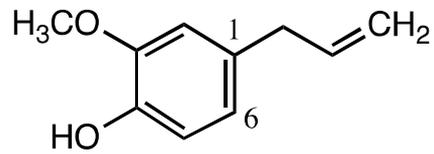


Fig. 3 Eugenolの構造

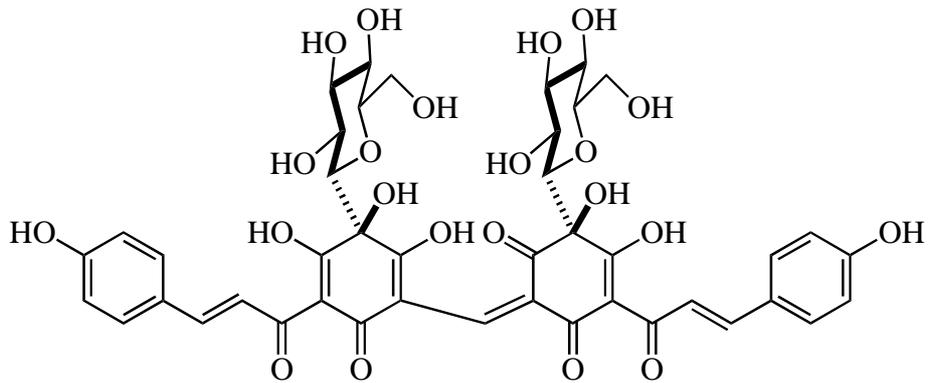


Fig. 4 Carthaminの構造

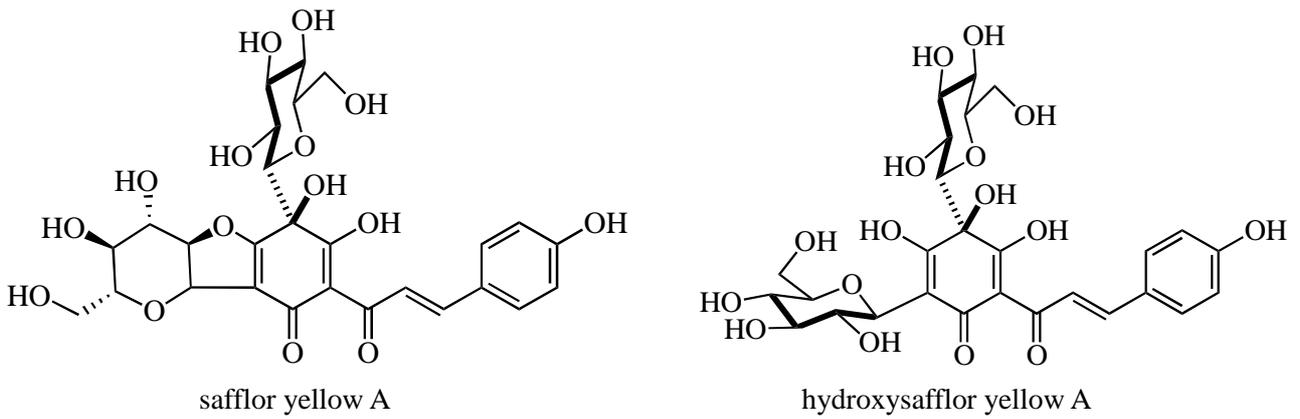
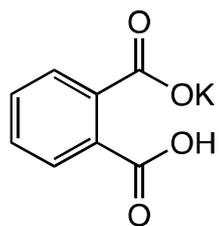
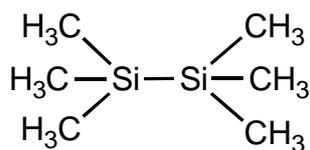


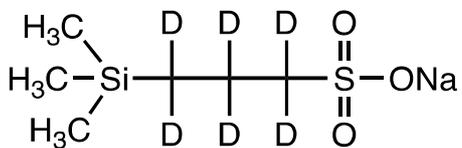
Fig. 5 Safflor yellow 類の構造



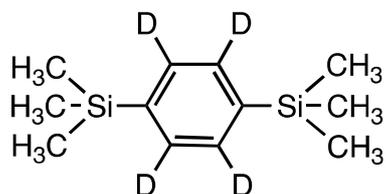
Potassium hydrogen phthalate (PHP)



Hexamethyldisilane (HMD)



3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid- d_6 sodium salt
(DSS- d_6)



1,4-(Bistrimethylsilyl)benzene- d_4
(1,4-BTMSB- d_4)

Fig. 6 各種基準物質の構造

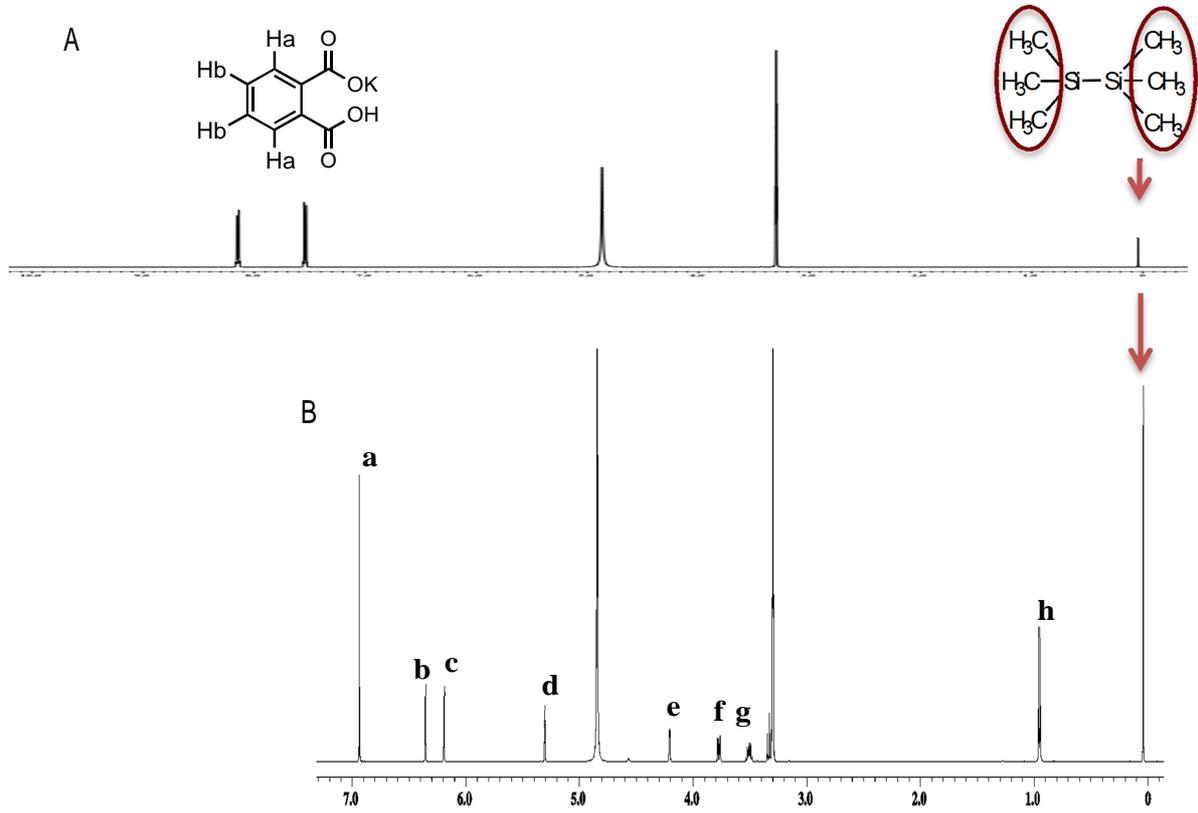


Fig. 7 「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin 定量時に測定された $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
 A: qHNMR 用標準液に溶解した PHP のスペクトル.
 B: qHNMR 用標準液に溶解した「ヤマモモ抽出物」のスペクトル.
 a~h は myricitrin 由来のシグナル.

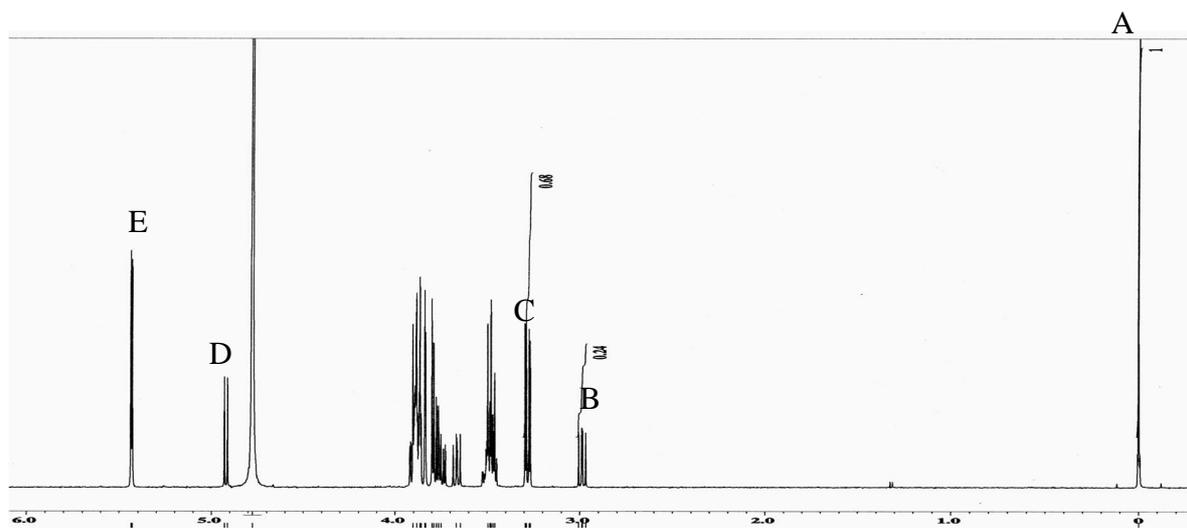


Fig. 8 Glucosamine の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (D_2O , 500 MHz)

A : $\text{DSS-}d_6$ のメチル基のシグナル, B : Fig. 2 の H_a のシグナル

C : Fig. 2 の H_b のシグナル, D : Fig. 2 の H_c のシグナル

E : Fig. 2 の H_d のシグナル

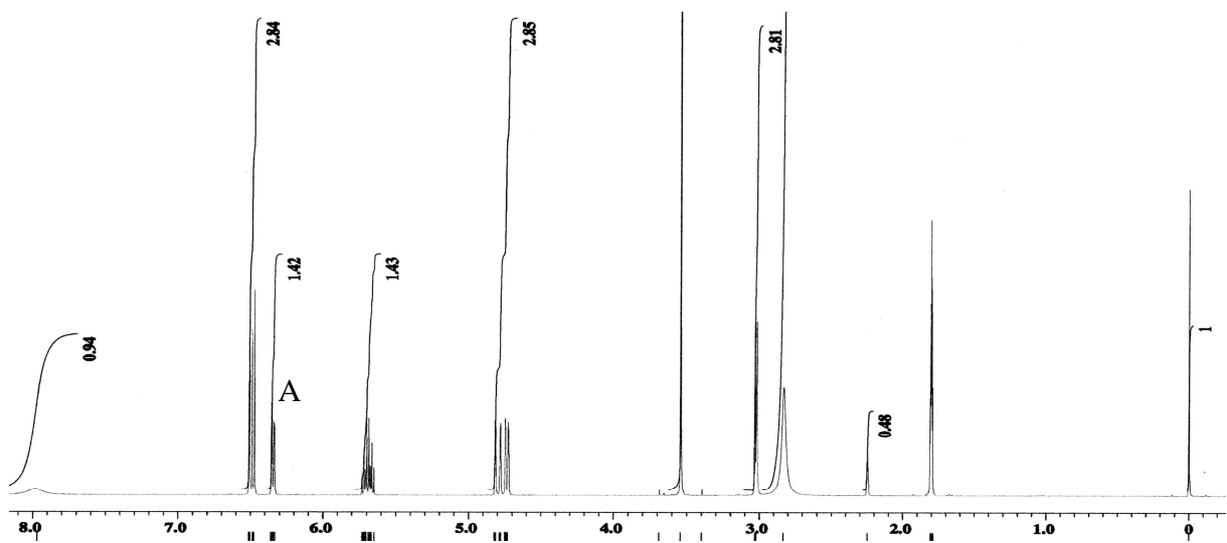


Fig. 9 Eugenol の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (acetone- d_6 , 500 MHz)

A: eugenol の 6 位 H のシグナル

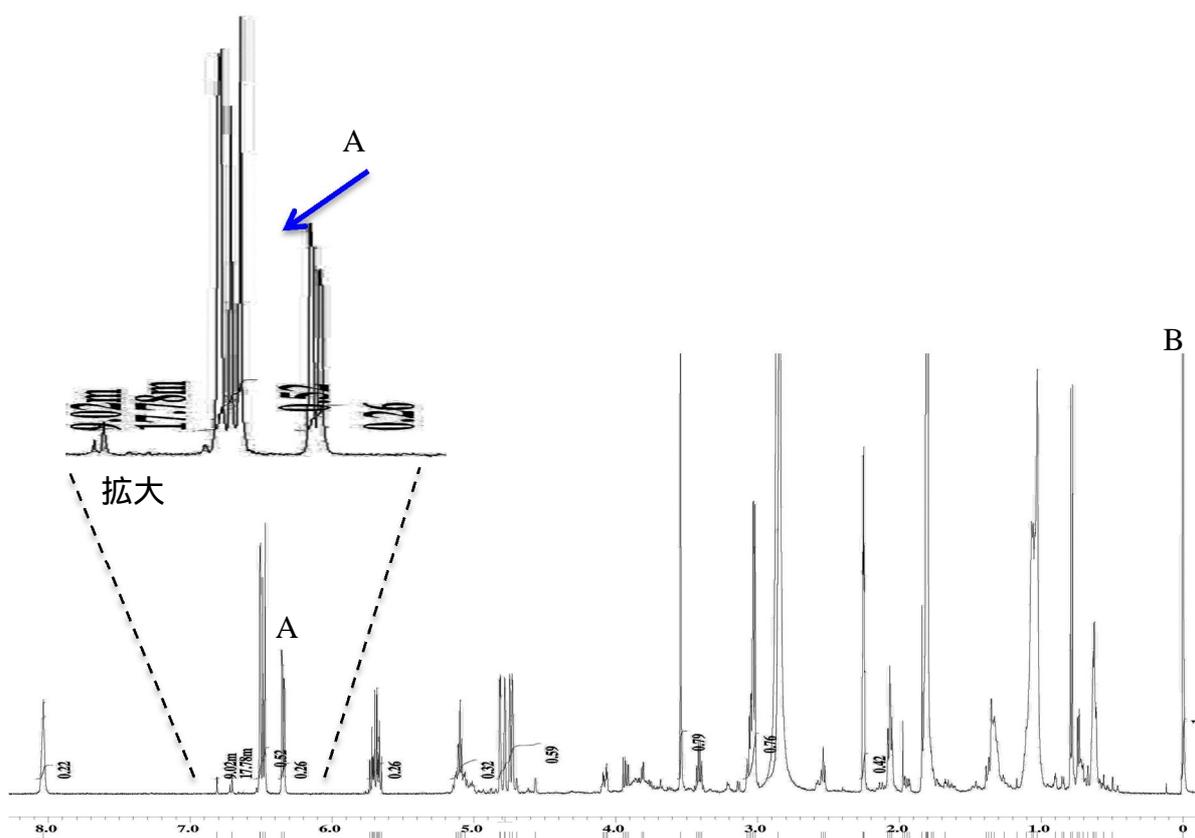


Fig. 10 「クローブ抽出物」の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (acetone- d_6 , 500 MHz)

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

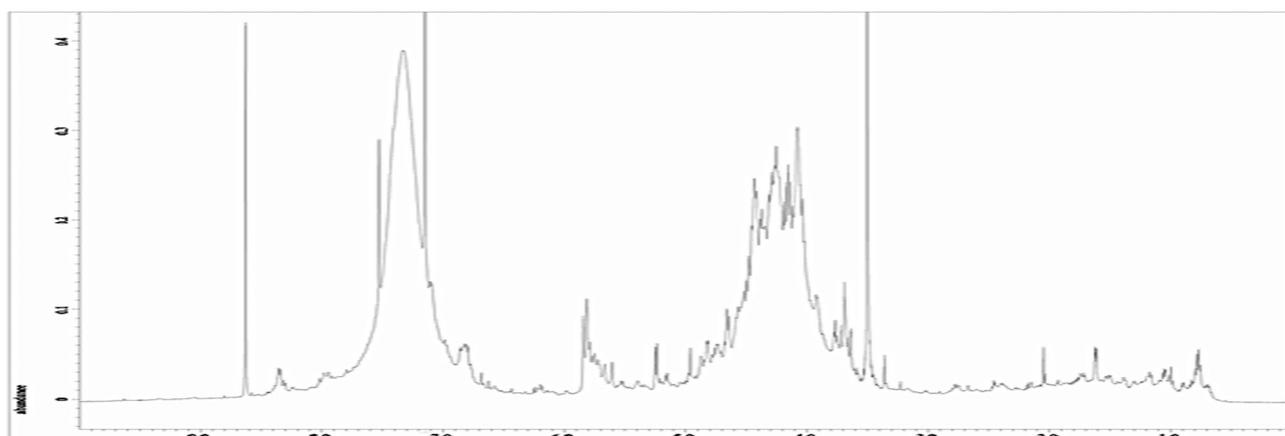


Fig. 11 主成分 carthamin として市販の色素の ^1H -NMR スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

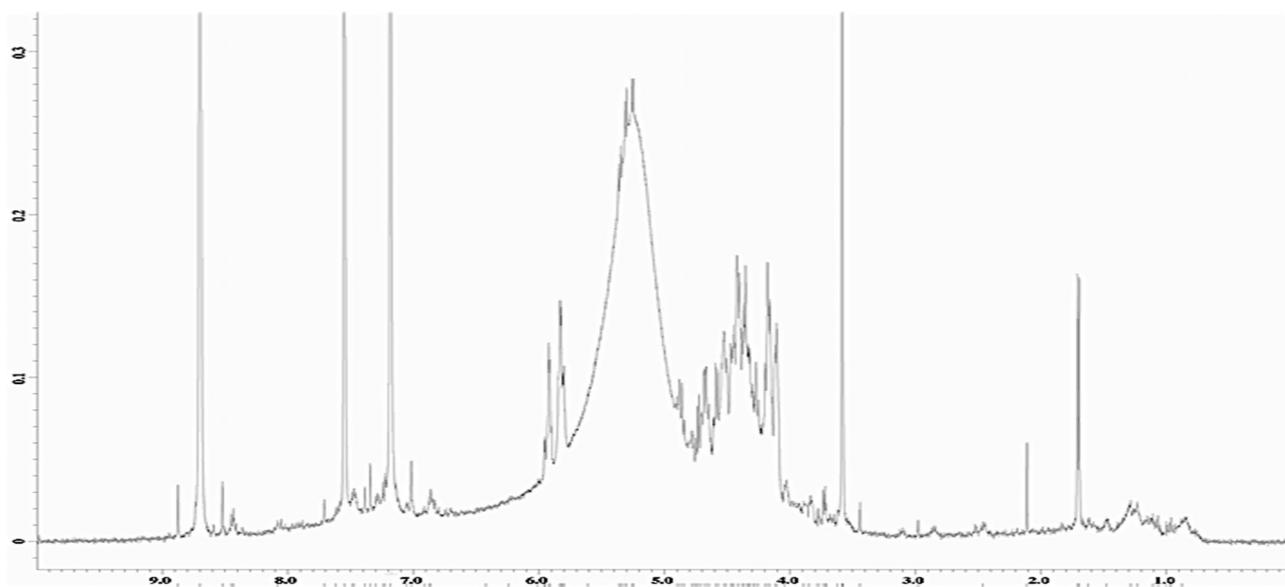


Fig. 12 「ベニバナ黄色素」の ^1H -NMR スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

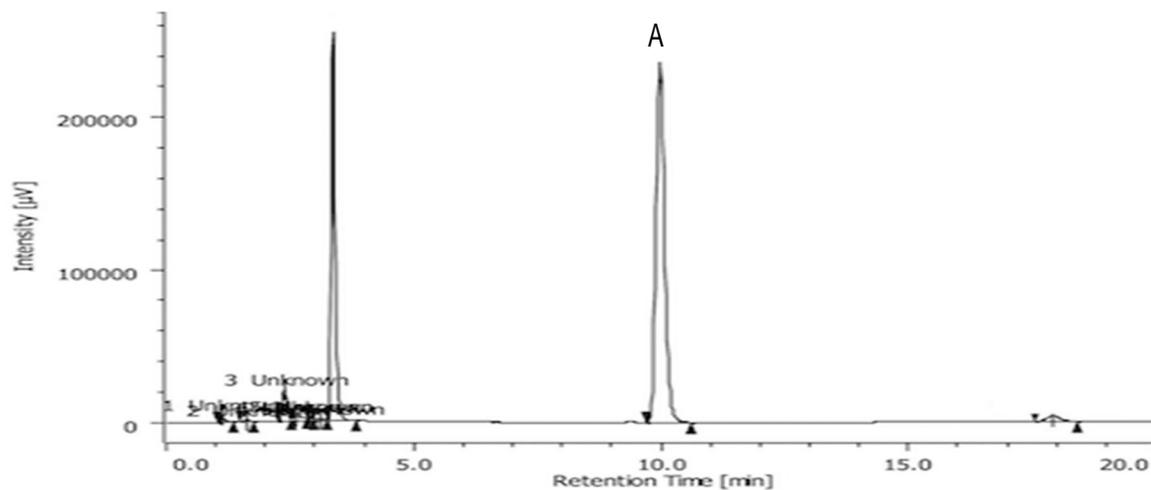


Fig. 13 Eugenol 標準品の HPLC クロマトグラム
A: eugenol のピーク

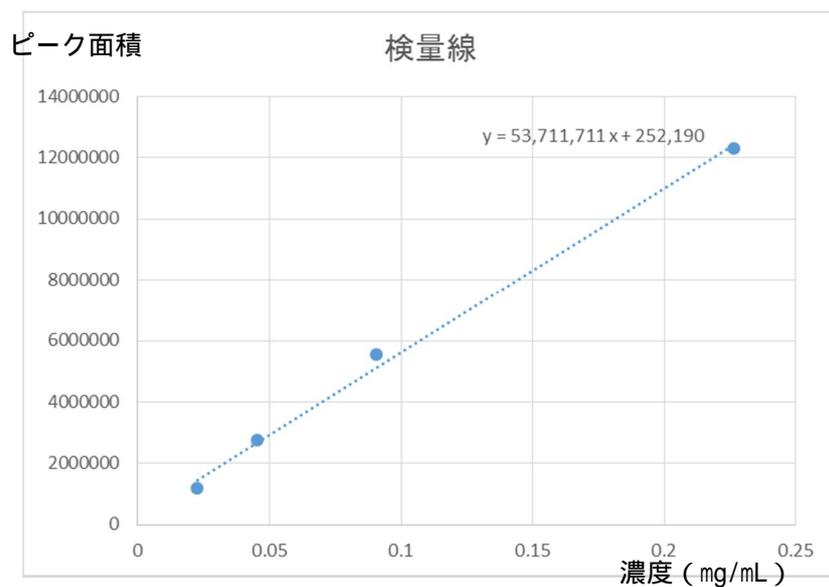


Fig. 14 Eugenol 標準品の HPLC におけるピーク面積から作成した検量線 ($r = 0.998$)

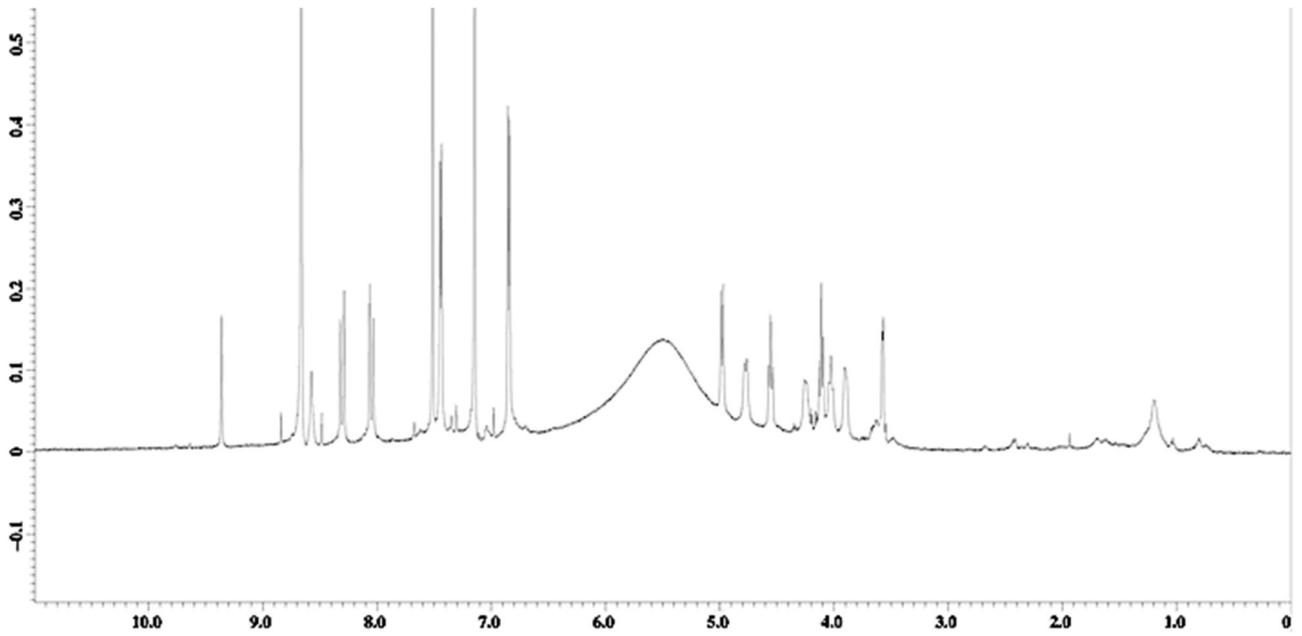


Fig. 15 単離した carthamin の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (pyridine- d_5 , 500 MHz)

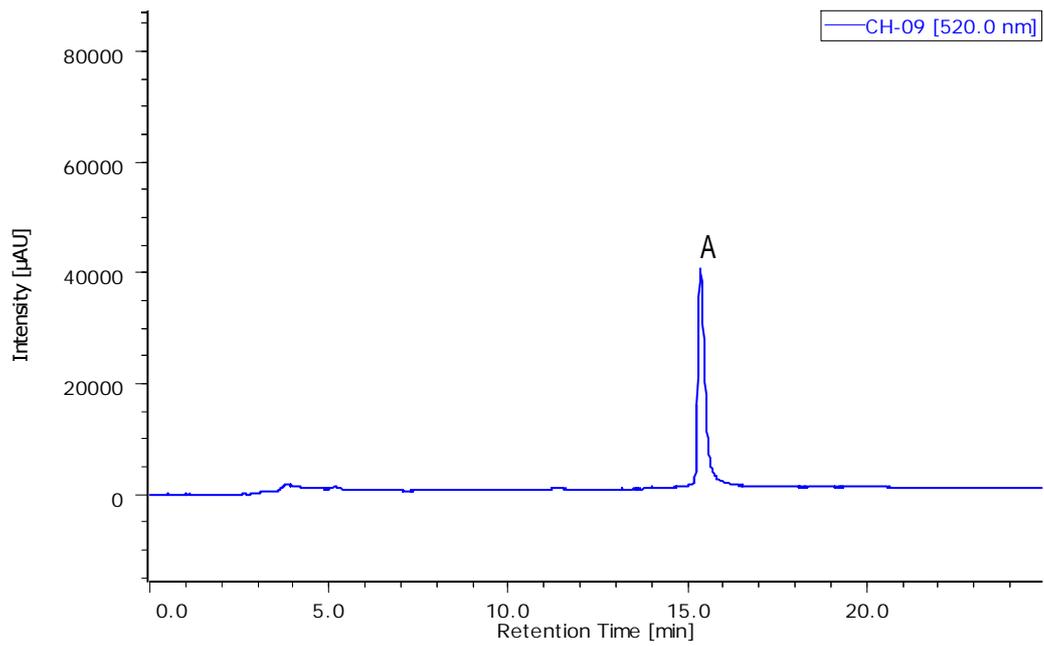


Fig.16 単離した carthamin の HPLC クロマトグラム
A: 検出波長 520 nm における carthamin のピーク

Table 1 qHNMR 法における装置と測定条件

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
溶媒	methanol- <i>d</i> ₄ (myricitrin) D ₂ O (glucosamine) Acetone- <i>d</i> ₆ (eugenol)

Table 2 qHNMR 法で各シグナルから算出される「ヤマモモ抽出物」中の myricitrin の純度 (平均 ± S.E., n = 3)

シグナル (ppm)	純度 (%)	
	YM7	YM4
a 6.94	86.61±0.57	82.09±5.18
b 6.35	88.05±3.27	84.05±4.38
c 6.19	86.83±2.45	85.96±2.90
d 5.31	88.92±3.34	86.38±4.50
e 4.21	88.97±1.49	85.99±4.10
f 3.77	88.29±1.24	84.60±4.02
g 3.50	83.09±3.39	81.05±3.65
h 0.95	87.28±1.11	82.24±3.39

Table 3 ¹H-qNMR 法から定量された「グルコサミン」中の glucosamine の含有率

試料	含有率 (%)		平均	
	グルコサミン ^{a)} として			塩酸塩 ^{b)} として
	平均±SEM (n=3)			
A	81.38	±2.21		
B	82.26	±1.46		
C	81.82	±1.28		
塩酸塩	79.21	±1.71	95.36	
塩酸塩粉碎品	81.00	±1.47	97.52	

^{a)} C₆H₁₃NO₅ : MW 179 としての算出

^{b)} C₆H₁₃NO₅ · HCl : MW 215.5 としての算出

Table 4 ¹H-qNMR 法で定量された eugenol の含有率

samples	含有率(%)		表示
	平均 ± SEM (n=5)		
eugenol 標準品			
A	92.47	± 1.31	99.8%
クローブ抽出物			
B	30.26	± 1.19	
C	30.47	± 1.55	38%

Table 5 ¹H-qNMR 法と HPLC 法で定量されたクローブ抽出物の eugenol の含有率

samples	含有率(%)	
	¹ H-qNMR	HPLC ^a
D	26.56	24.94
E	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