

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）  
既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究  
(H29-食品-一般-007)

平成29年度研究分担報告書

qNMR 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

**研究要旨** 規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、 $^1\text{H}$ -qNMR 法(定量  $^1\text{H}$ -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。適用の可能性があるものに関して、実際に適用する場合の測定条件の確立、あるいはそれを応用した正確な定量法の検討を目的とした。29年度は「ベニバナ赤色素」、「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討した。「ベニバナ赤色素」では、これまでの研究で赤色本体の carthamin の  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた定量条件と、その値付けをした溶液を用いての HPLC 定量条件の確立までできていたことから、それらを用いた実際の試料の定量の条件の検討を行った。また、 $^1\text{H}$ -qNMR 法で純度を明らかにした carthamin の UV スペクトルを測定して吸光係数を算出し、これまでの文献値よりも吸光係数は大きいという結果を得た。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、「香辛料抽出物」の基原に上がっているもののうち、生薬として市販されているものの抽出物を作成し、 $^1\text{H}$ -qNMR 法での定量が可能かの検討を行った。そのうちスターアニスでは、含有される anisaldehyde を定量できる可能性がわかったことから、これを基準に品質管理ができると考え、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」について  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた anisaldehyde 定量を検討し、測定可能であることを明らかとした。

#### A. 研究目的

$^1\text{H}$ -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  $^1\text{H}$ -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。

29年度の研究では既存添加物である「ベニバナ赤色素」が成分定量の方法を確立されておらず、規格基準が決められていないことから、色素本体の化合物である carthamin(Fig.

1)を直接  $^1\text{H}$ -qNMR 法で、あるいは標準品溶液を  $^1\text{H}$ -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。合わせて、 $^1\text{H}$ -qNMR 法で純度を測定した carthamin の UV スペクトルを測定して吸光係数の算出を試みた。吸光度からの絶対定量も可能になると考えられる。まず、これまでの文献値が、 $^1\text{H}$ -qNMR 法による絶対定量で算出した吸光係数と一致するかも検討した。これらを通じて、高純度での単離が難しく、試薬としても入手できない carthamin の正確で簡便な定量法の確立を目指した。

「香辛料抽出物」も規格基準が決められていないが、そもそも多くの素材が材料として規定されていて、その素材ごとに基準物質を定めて基準の策定をしていく必要がある。今

回は素材に上げられているもののうち、生薬として市販されているものの抽出物を作成し、<sup>1</sup>H-qNMR法での測定が可能かどうかの検討を行った。そのうち、スターアニスで、含有される anisaldehyde (Fig. 2) を定量できる可能性があることから、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」について <sup>1</sup>H-qNMR法を用いた anisaldehyde の定量が適用できるかの検討を行うことにした。

## B. 研究方法

### B-1) 試薬等

1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> は和光純薬の Trace Sure®規格のものを用いた。Anisaldehyde は和光純薬の試薬特級のものを用いた。NMR 用溶媒の pyridine-*d*<sub>5</sub> は Isotec Inc. の 99.5 atom %D を、ethanol-*d*<sub>6</sub> は Isotec Inc. の 99.5 atom %D を、DMF-*d*<sub>7</sub> は東京化成の 99.5 atom %D を用いた。UV スペクトル測定時の溶媒の EtOH は和光純薬、DMF は東京化成、pyridine はナカライテスクのそれぞれスペクトル用のものを用いた。HPLC 用溶媒の MeOH は和光純薬の HPLC 用のものを用いた。その他の溶媒はいずれも試薬特級のものを用いた。

### B-2) 装置等

秤量には島津製作所の精密電子天秤 AYW120D を用いた。分注操作で用いる電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x を使用した。超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S で、遠沈操作は遠心器 TOMY PMC-060 を用いた。NMR 装置は日本電子 JNM-ECA500 を使用した。HPLC はポンプとして JASCO PU-2089、カラムオーブンに Shimadzu CTO-20AC を、検出器は JASCO MD-2010 を用いて行った。UV スペクトル測定は JASCO UV-530 を用いた。

### B-3) 「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。純度の高い carthamin は市販されていないため、まず、水上らの方法(参考文献[1])に従い、市販既存添加物からの carthamin の単離を行った。得られた carthamin の <sup>1</sup>H-qNMR の測定を行って純度を決定し、その carthamin を carthamin 標準品、またその <sup>1</sup>H-qNMR の測定を行った溶液を標準液として定量の基準とすることにした。

### B-3-a) <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの測定

単離した carthamin 約 5 mg を精秤して 1.00 ml の pyridine-*d*<sub>5</sub> に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> (Fig. 3) の溶液 (2.00 mg/mL, pyridine-*d*<sub>5</sub>) 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。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 (Fig. 4) から、carthamin の 16 位 H のシグナル (δ 9.15 ppm) と 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> のシグナルの面積を比較して、式 1 に従って carthamin の濃度を算出した。

$$C_{ca} = \frac{I_{ca}}{I_B} \times C_B \quad (1)$$

ただし、 $C_B$ 、 $C_{ca}$  はそれぞれ 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 及び carthamin のモル濃度 (mol/ml)、 $I_B$ 、 $I_{ca}$  はそれぞれ 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 及び carthamin の水素 1 個あたりのシグナル面積。

### B-3-b) HPLC による carthamin の定量

市販添加物や生薬中の carthamin 含有量は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 分析という手順とった。HPLC の条件は、昨年度までの研究で確立した条件で、カラムに YMC-Pack ODS-AL s-5 250 mm x 4.6 mm i.d., 温度 37°C で、溶媒として 0.5% 酢酸-MeOH 溶液と 0.5% 酢酸水溶液のグラジエント (0 min: 50:50→20

min 80:20)を流速 1.0 ml/min で溶出し、520 nm での吸収で検出した。

$^1\text{H-qNMR}$  の測定に用いた溶液を 5 倍ずつ 4 段階に希釈し、それぞれから得られたクロマトグラム(Fig. 5)のピーク面積から、検量線を作成した。

各試料の調製は、「ベニバナ赤色素」の場合は約 5 mg、生薬粉末では約 100 mg を精秤し、これに溶媒 (MeOH-水) 1.0 mL を加えて超音波下 30 分で抽出、遠沈後その上清をフィルター濾過し、HPLC 用の溶液とした。各クロマトグラムのピーク面積と検量線から各試料の carthamin の含有率を算出した。

### B-3-c) carthamin の吸光係数

吸光係数の書かれた文献値では EtOH 中(参考文献[2])と DMF 中(参考文献[3])で測定されているものが報告されている。定量 NMR 法での carthamin の定量 pyridine 中での測定で確立しているが、pyridine は塩基性であり、この溶液を EtOH または DMF で希釈してもポリフェノリックな carthamin の極大波長と吸光係数は pyridine の存在による pH の変化に敏感に反応して変化することが考えられる。ゆえに、定量 NMR 法での carthamin の定量が ethanol- $d_6$  と DMF- $d_7$  中でも可能かの検討をした。可能であれば、その時の溶液を元に希釈して UV スペクトルを測定して、極大吸収波長での吸光係数を求めることにした。UV スペクトルは 23°C で測定した。

### B-4) $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた「香辛料抽出物」中の成分定量

既存添加物の「香辛料抽出物」は、アサノミ以下 73 種類の植物から「抽出しまたはこれを水蒸気蒸留して得られたもの」とされている。多様な基原が含まれており、かつどの部位を用いたかも決められていないという、つかみどころのない基原の既存添加物である。しかしながらどれかは用いられているはずで、特定の基原を用いているものごとに規格基準を策定することは可能である。そこで、生薬として流通している基原を中心に検討をすることにした。すなわち、生薬として入

手できた 20 種類の粉末生薬の MeOH 抽出物を作成し、それぞれの  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定して  $^1\text{H-qNMR}$  に適用できる独立したシグナルを持つスペクトルを与えるものを選抜した。その中でスターアニスの抽出物のスペクトルで独立したシグナルが観測された。この独立シグナルがスターアニスに特徴的な精油成分である anisaldehyde のホルミル基由来のプロトンと容易に特定できたことから、まず、anisaldehyde の  $^1\text{H-qNMR}$  スペクトルの実施の条件検討と、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の定量、さらに粉末生薬中の anisaldehyde の定量も合わせて行うことにした。

### B-4-a) 「香辛料抽出物」の基原から $^1\text{H-qNMR}$ 法が適用できる生薬のスクリーニング

「香辛料抽出物」の基原のうち、市販で入手が容易であった、ウコン、オールスパイス、カルダモン、クミン、ケシノミ、コショウ、コリアンダー、シナモン(桂皮)、ショウガ、スターアニス、タイム、ディル、トウガラシ、ナツメグ、フェネグリーク、ニンニクの 16 種類の MeOH 抽出物を作成し、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定した。すなわち、各粉末 100 mg に MeOH (1 mL) を加えて超音波下 30 分抽出を行い、遠沈してその上清を得た。この操作を 3 回繰り返し、集めた上清を濃縮乾固、これを methanol- $d_4$  に溶かして  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定した。

### B-4-b) $^1\text{H-qNMR}$ 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 methanol- $d_4$  に溶かし内部標準用溶液とした。

Anisaldehyde 標準品を用いた  $^1\text{H-qNMR}$  は次のように行った。Anisaldehyde 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 anisaldehyde 標準品の製品を開封してそのまま用いた。anisaldehyde 標準品を約 5 mg を精秤して 1.00 ml の methanol- $d_4$  に溶かした。この溶液 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  $^1\text{H-qNMR}$  の測定に供した。

入手できた既存添加物「香辛料抽出物」のうち 4 種類は水蒸気蒸留で得られた水を含む液体であることから、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 20 mg (20  $\mu\text{L}$ ) を精秤して methanol- $d_4$  (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  $^1\text{H-qNMR}$  の測定に供した。

粉末で入手された既存添加物「香辛料抽出物」1 種と粉末生薬の場合は、まずこれらの粉末をシケータ中で一晩乾燥させた。これらの約 200mg を精秤して 1.00 mL の methanol- $d_4$  に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈した。その上清 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  $^1\text{H-qNMR}$  の測定に供した。

#### B-4-c) $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの測定

Anisaldehyde とスターアニス由来の「香辛料抽出物」、スターアニス生薬粉末の  $^1\text{H-NMR}$  を測定し、anisaldehyde のホルミル基 H のシグナルが  $\delta 9.82$  ppm に現れることを確認した。 $^1\text{H-qNMR}$  スペクトルの測定条件は 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、anisaldehyde のホルミル基 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 anisaldehyde の濃度を算出した。

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

ただし、 $C_{\text{B}}$ 、 $C_{\text{an}}$  はそれぞれ 1,4-BTMSB- $d_4$  及び anisaldehyde 1 のモル濃度 (mol/mL)、 $I_{\text{B}}$ 、 $I_{\text{an}}$  はそれぞれ 1,4-BTMSB- $d_4$  及び anisaldehyde の水素 1 個あたりのシグナル面積。

## C. 結果及び考察

### C-1) 実験結果

#### C-1-a) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

##### C-1-a-1) HPLC による carthamin の定量

これまでに確立した  $^1\text{H-qNMR}$  法を用い、単離した carthamin の純度を算出したところ、 $54.5 \pm 0.3\%$  と算出された。この溶液を用いて順次希釈した溶液を用いて検量線を作成したところ、直線性のある検量線が得られた。

(Fig. 6)

各試料の調製は、「ベニバナ赤色素」または生薬粉末のからの抽出溶媒の検討を行った。MeOH-水の比率を 0%~100%まで 10%刻みで MeOH 濃度を変えた溶媒で抽出を行い、ピーク面積を比較した。その結果、80% MeOH-水の条件のときに抽出効率が最大となることがわかった。そこで、「ベニバナ赤色素」、生薬粉末を精秤し、これらに 80% MeOH-水 (1.0 mL) を加えて抽出して調製した試料の測定を行ったところ、「ベニバナ赤色素」の carthamin 含有率は 0.31%、生薬粉末は 0.22% と算出された。

##### C-1-a-2) Carthamin の吸光係数

Carthamin の吸光係数は EtOH 中と DMF 中で測定されているものが報告されていることから、ethanol- $d_6$  と DMF- $d_7$  中での  $^1\text{H-qNMR}$  を試みた。単離して得た carthamin 標準品 5 mg を秤量してそれぞれの溶媒 1 mL に溶解しようとしたが、全ては溶解しなかった。また、上清を取って  $^1\text{H-NMR}$  を測定したが、carthamin の 16 位 H のシグナルを十分な大きさで観測することができず、これらの溶媒では  $^1\text{H-qNMR}$  法を適用するに足る十分な溶解度がないことがわかった。

そこで、まず carthamin 標準品をこれまでと同様に pyridine- $d_5$  中で  $^1\text{H-qNMR}$  を測定して純度を算出、同じロットの carthamin 標準品の EtOH 中、DMF 中での UV スペクトルの測定を行って吸光係数を算出することにした。すなわち、carthamin 標準品を約 5 mg を精秤して pyridine- $d_5$  (1.00 mL) に溶解し  $^1\text{H-qNMR}$  の測定に用いた。その結果、まず、このとき標準とした carthamin の純度は  $^1\text{H-qNMR}$  の測定より 44.1% と算出された。この

標準品を用いて UV スペクトル測定に供する DMF 及び EtOH 溶液を調製し UV スペクトルの測定をした。(Fig. 7, 8) また,  $^1\text{H-qNMR}$  の測定に供した溶液を通常のスเปクトル用 pyridine で 1000 倍に希釈して pyridine 中での carthamin の UV スペクトルの測定をした。

(Fig. 9) 測定の結果, それぞれのモル吸光係数は DMF :  $1.21 \times 10^5$  ( $\lambda_{\text{max}} = 530$ ), EtOH :  $1.19 \times 10^5$  ( $\lambda_{\text{max}} = 513$ ), Pyridine :  $1.48 \times 10^5$  ( $\lambda_{\text{max}} = 540$ ) と算出された。(Table 2) Pyridine 中の値は今回初めて測定したものだが, DMF 中の値は文献値の 1.3 倍, EtOH 中は 2.4 倍と, いずれも文献値よりも大きい値となった。

### C-1-b) $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた「香辛料抽出物」中の成分定量

#### C-1-b-1) 「香辛料抽出物」の基原から $^1\text{H-qNMR}$ 法が適用できる生薬のスクリーニング

研究方法の項で述べたように「香辛料抽出物」の基原のうちの 16 種類の MeOH 抽出物を作成し,  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定した結果, スターアニスのスペクトルで,  $^1\text{H-qNMR}$  が適用できる独立したシグナルが 9.82 ppm に観測された。(Fig. 10A) そのスペクトルを市販の anisaldehyde のスペクトルと比較したところ一致したので, 9.82 ppm のシグナルは anisaldehyde のホルミル基の H のものと特定した。(Fig. 10B)

#### C-1-b-2) スターアニス及びスターアニス由来の「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の定量

Anisaldehyde 標準品中の anisaldehyde の定量を  $^1\text{H-qNMR}$  法でおこなった結果,  $94.96 \pm 1.02\%$  と見積もられた。

次に「香辛料抽出物」のうちスターアニスを基原とするとされるもので入手できた 5 サンプルの  $^1\text{H-qNMR}$  測定を試みた。そのうち 2 サンプルは anisaldehyde のホルミル基 H に由来するシグナルが観測されなかった。3 サンプルについて定量を行った結果, それぞれ含有率が 1.40%, 0.24%, 0.76% となった。これらの標準偏差は 0.07% で, 含有率が 1%

を切る状態になると無視できない数字であった。スターアニスの生薬粉末中の anisaldehyde の定量では, これまでに 2 サンプルについて  $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量を実施し,  $0.62 \pm 0.03\%$ ,  $0.32 \pm 0.04\%$  という結果を得た。以上の結果は Table 3 に示した。

## C-2) 考察

### C-2-a) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

$^1\text{H-qNMR}$  による単離した carthamin の定量を行うことにより, 高純度でない試料でも容易に濃度の標準物質とすることができることがわかった。またそれを基準に HPLC で検量線を作成することで, 微量のサンプルであっても容易に正確な定量ができる方法を確立した。また, HPLC 用サンプルの調製において, 最も抽出効率の良い溶媒条件 (80% MeOH-水) も見つけることができた。今の所, 入手できた「ベニバナ赤色素」が 1 ロットだけのため, さらに試料を集めて検証したい。

また,  $^1\text{H-qNMR}$  法で定量した carthamin を用いて吸光係数を算出することもできた。この吸光係数はこれまでの報告のある数値よりも大きかった。(Table 2) これは, 先行研究における測定の際, 純度を大きく見積もっていたために起こったこととも考えられる。再結晶を行って得た化合物の純度は 100% に近いものであるが, HPLC で精製したものの場合, 1 ピークを単離したつもりでもバックグラウンドの夾雑物が無視されたり, 乾燥が十分でなかったりして純度が実は十分ではないことがある。また, carthamin の場合, 熱や光に不安定でもあるので, 保存中の分解ということもある。精製の仕方, 保存の仕方でも純度を高く見積もる要因は多くあり,  $^1\text{H-qNMR}$  法が確立されていなかった当時では検証の方法はほぼない状態であったので, 先行研究における吸光係数は小さく算出されていると考えられる。

$^1\text{H-qNMR}$  法での定量値から正確な吸光係数を算出できたことで, 吸光度から濃度を算出できるようになり, 不安定な carthamin の簡便な定量に大きく貢献できる

ものと考ええる。

今回の結果は単離した carthamin の 1 ロットでの測定の結果であるため、このあと数回追試を重ね、現在の算出値が正しいか、ばらつきがないかなどの検証を行う。

### C-2-b) 「香辛料抽出物」のうちスターアニスを基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量

Anisaldehyde 標準品中の含有率 94.96% はメーカーのラベルに書かれている 97% 以上という数字より若干小さな値となった。メーカーでの純度測定が GC によるものなので、その時の検出器で検出できない夾雑物が無視されて高く見積もられたか、開封後の水蒸気の混入などで純度が下がったかなどが要因と考えられる。

「香辛料抽出物」のうち anisaldehyde が検出できない（ホルミル基 H のシグナルがない）ものがあつた。Anisaldehyde が含まれなくても用途として成り立つのかもしれないが、スターアニスが主ではなく、使われていたとしてもごくわずかしき使われていない「香辛料抽出物」なのではないかと考えられた。また今回、そのような実情を明らかにできたと思われる。

一方、シグナルを検出、定量が可能であつた「香辛料抽出物」は 0.24~1.4% という含有率だつた。これらの標準偏差は 0.07% で、含有率が 1% を切る状態になると無視できない幅の数字であつた。また、生薬粉末も 0.32~0.62% という含有率だつた。いずれも非常に小さな値で、品質管理という観点から数値のばらつきを考えると、NMR 測定時の溶液濃度を高める工夫の余地があると考えられた。

### D. 結論

1) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量では、 $^1\text{H-qNMR}$  法で値付けされた標準の carthamin の溶液を用いて HPLC の検量線を作成、微量の含有率の carthamin を HPLC にて正確に定量する方法を確立した。 $^1\text{H-qNMR}$  法による carthamin の定量は、昨年までの研究で確立した方法で、認証標準物質の

1,4-BTMSB- $d_4$  を内部標準として用い、pyridine- $d_5$  溶液と carthamin の溶液を混合して  $^1\text{H-qNMR}$  を測定し、carthamin の 16 位 H のシグナル ( $\delta$  9.15 ppm) を積分値から算出する方法を有効に活用した。また、 $^1\text{H-qNMR}$  法で値付けされた試料をもとに carthamin の各種溶媒での吸光係数の検証をすることができた。

2) 「香辛料抽出物」のうちスターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の  $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量では、anisaldehyde の  $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量条件を確立した。しかしながら、入手した既存添加物試料では含有率が低く、 $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量が適用できる下限付近であることがわかつた。揮発性の成分でもあることからあまり工程数を増やすことができないが、測定溶液濃度を高める工夫の余地があると考えられた。

### E. 参考文献

- [1] Mizukami ら, *Chem. Pharm. Bull.*, **61**(12), 1264-1268 (2013).
- [2] Kazuma ら, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 1588-1599 (2000).
- [3] Morimoto ら, *Jpn. J. Food Chem.*, **5**(2), 236-238 (1998).

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Tanaka, Rie; Inagaki, Risa; Sugimoto, Naoki; Akiyama, Hiroshi; Nagatsu, Akito, Application of a quantitative  $^1\text{H-NMR}$  ( $^1\text{H-qNMR}$ ) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen, *J. Nat. Med.* (2017), **71**(1), 315-320.
- 2) Fukaya, Shiori; Yoshioka, Hiroki; Nagatsu, Akito; Nonogaki, Tsunemasa; Okano, Tadahiro; Onosaka, Satomi; Miura, Nobuhiko, Non-toxic Level of Acetaminophen Potentiates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice, *Biol. Pharm. Bull.* (2017), **40**(9), 1590-1594.

## 2. 学会発表

1) 深谷栞, 吉岡弘毅, 市丸嘉, 三浦伸彦, 永津明人, 野々垣常正, 「アセトアミノフェンと四塩化炭素の併用による複合毒性の影響」フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー, P-071, 2017年9月(仙台)

2) 森美保菜, 寺倉理央奈, 間瀬貴巳, 藤原裕未, 永津明人, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 「定量 NMR(<sup>1</sup>H-qNMR)を応用した生薬コウカ中の carthamin の定量」, 日本薬学会第 138 年会, 27PA-am205, 2018年3月(金沢)

3) 藤原裕未, 三輪真子, 本間篤, 永津明人, 「カエデ属植物に含まれるアントシアニン化合物とその機能性」, 日本薬学会第 138 年会, 27PA-am264, 2018年3月(金沢)

4) 神谷万里子, 木村匡男, 森健, 山岸由佳, 三嶋廣繁, 永津明人, 野々垣常正, 池田義明 「Tradescantia 属植物抽出液による pseudomonas aeruginosa 標準株の増殖とバイオフィルム形成に及ぼす影響」, 日本薬学会第 138 年会, 26PA-pm110S, 2018年3月(金沢)

## 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

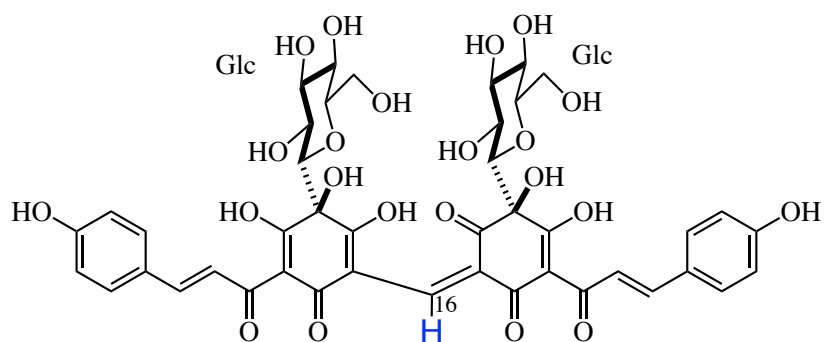


Fig. 1 Carthamin の構造

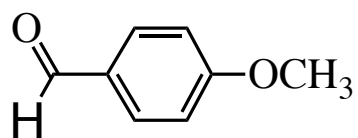


Fig. 2 Anisaldehyde の構造

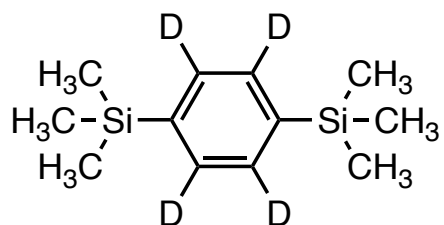


Fig. 3 1,4-(Bis(trimethylsilyl)benzene-d, (1,4-BTMSB-d.)の構造



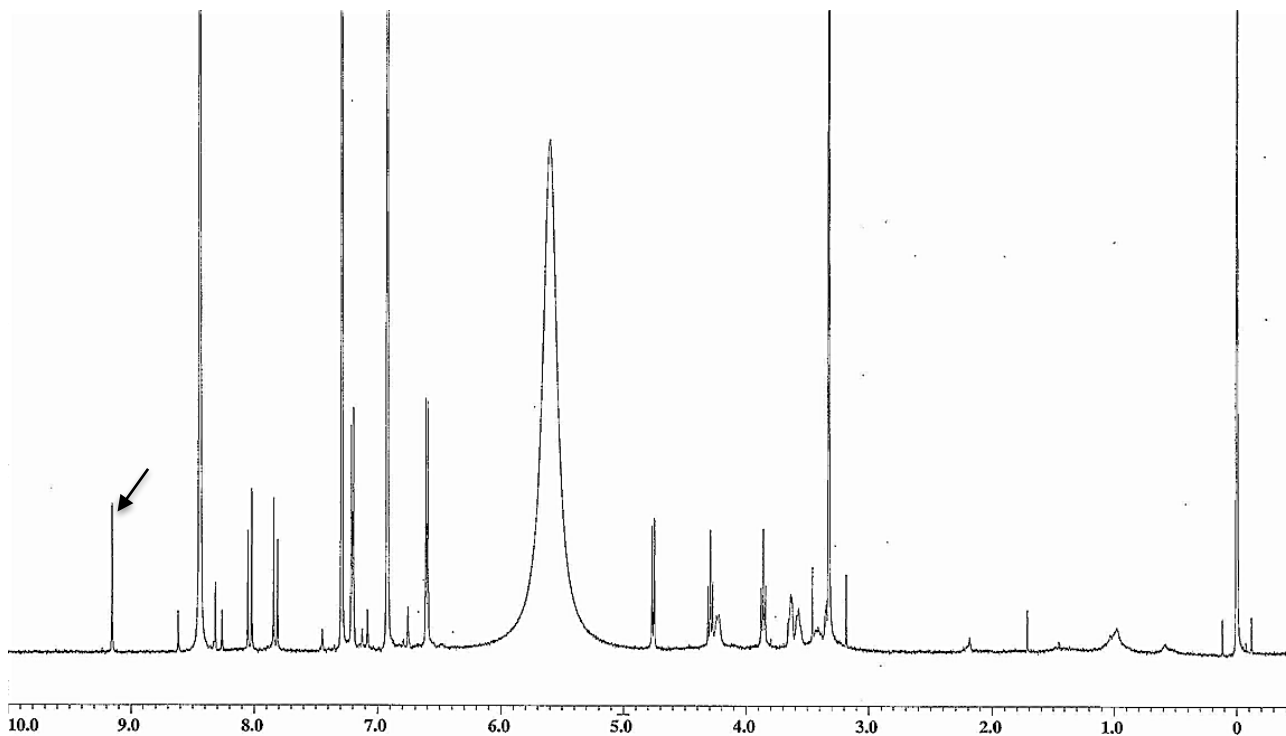


Fig. 4 単離した carthamin の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (pyridine- $d_5$ , 500 MHz)  
矢印のシグナルが carthamin の 16 位 H のシグナル ( $\delta$  9.15 ppm)

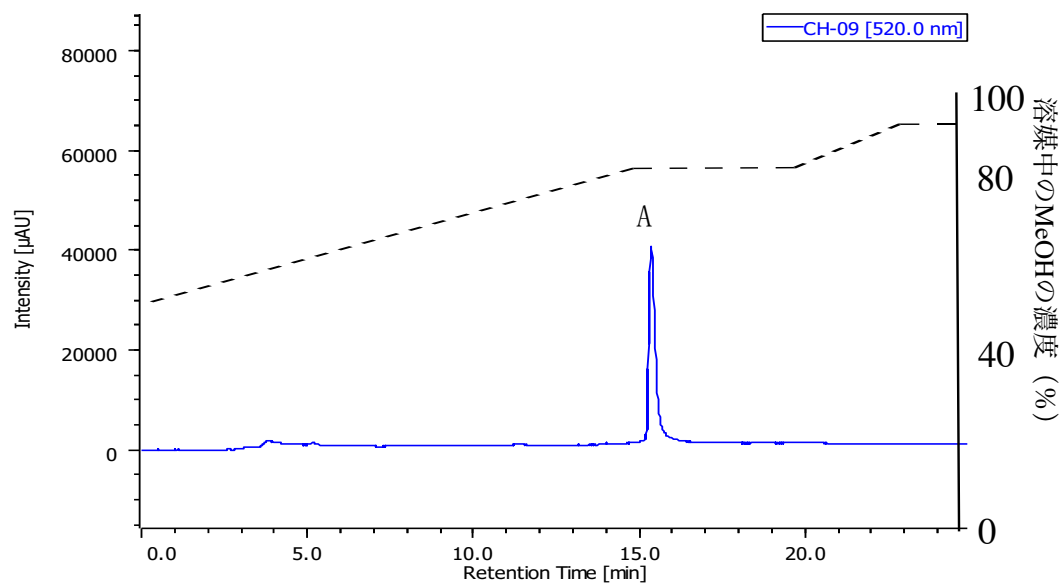


Fig.5 標準とした Carthamin の HPLC クロマトグラム

A: 検出波長 520 nm における carthamin のピーク

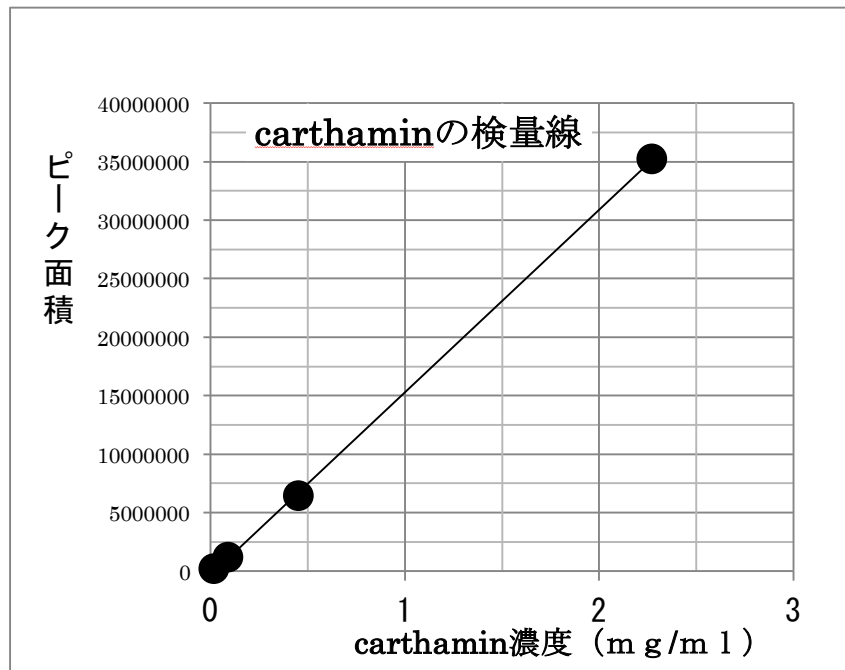


Fig. 6 Carthamin の HPLC クロマトグラムにおける検量線

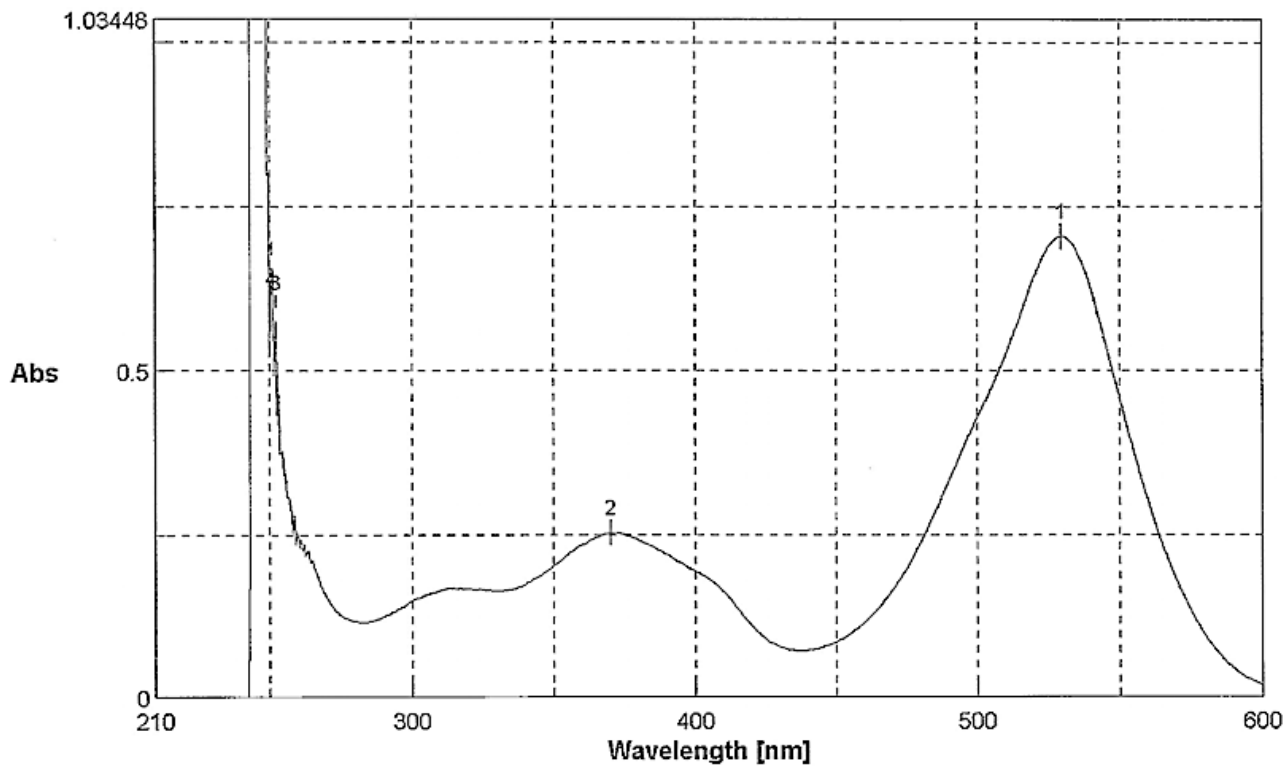


Fig. 7 DMF 中で測定した carthamin の UV スペクトル ( $c = 5.80 \times 10^{-6}$  mol/L)

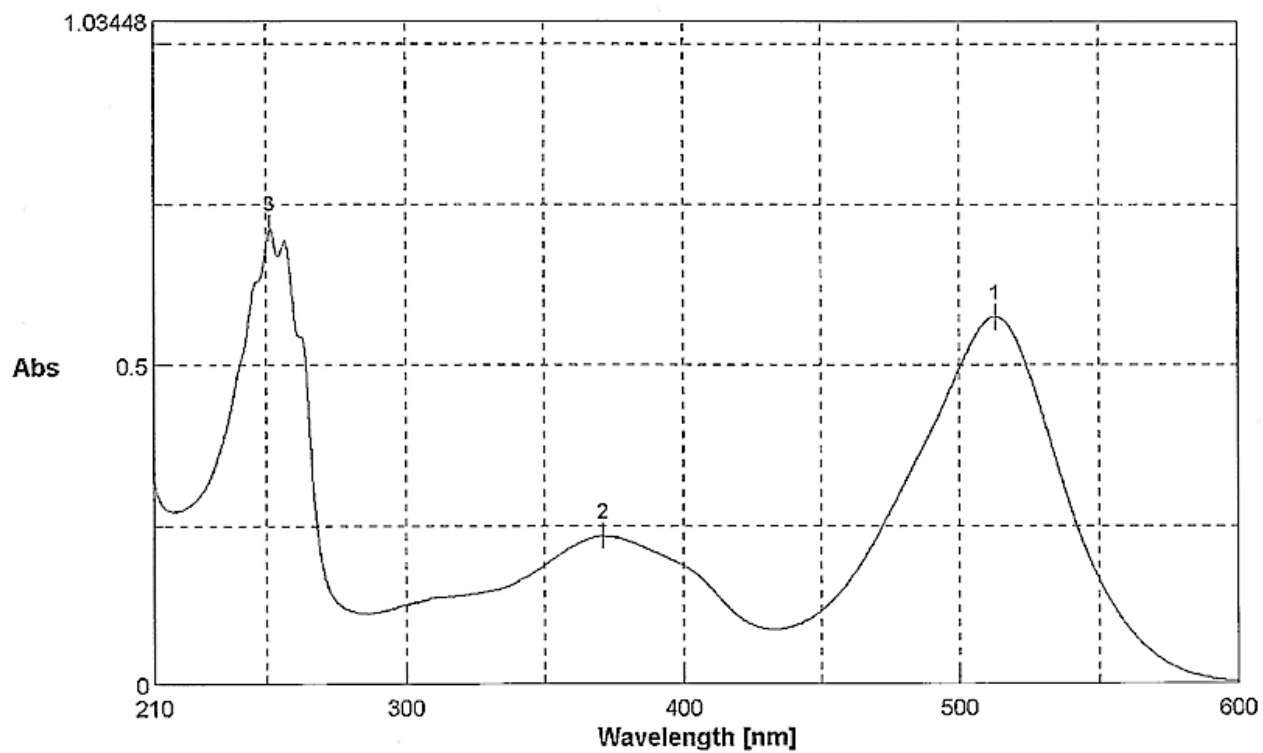


Fig. 8 EtOH 中で測定した carthamin の UV スペクトル ( $c = 4.82 \times 10^{-6}$  mol/L)

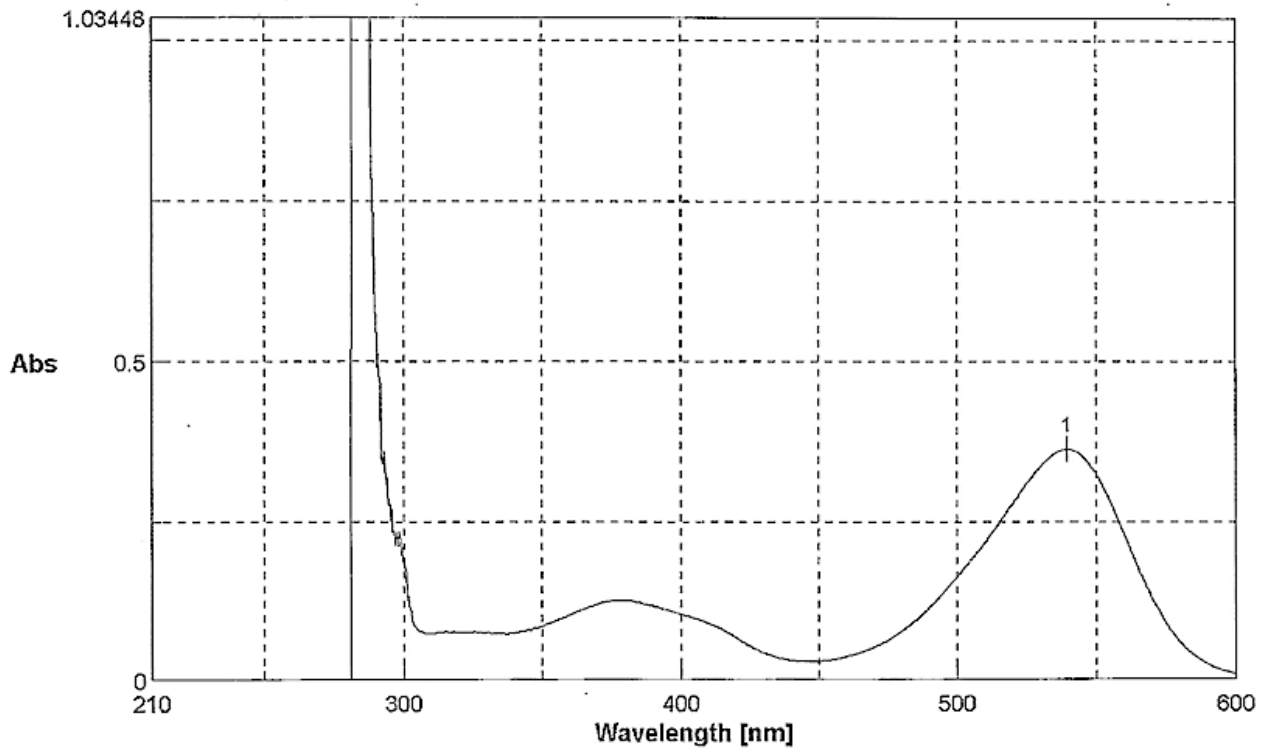


Fig. 9 Pyridine 中で測定した carthamin の UV スペクトル ( $c = 2.41 \times 10^{-6}$  mol/L)

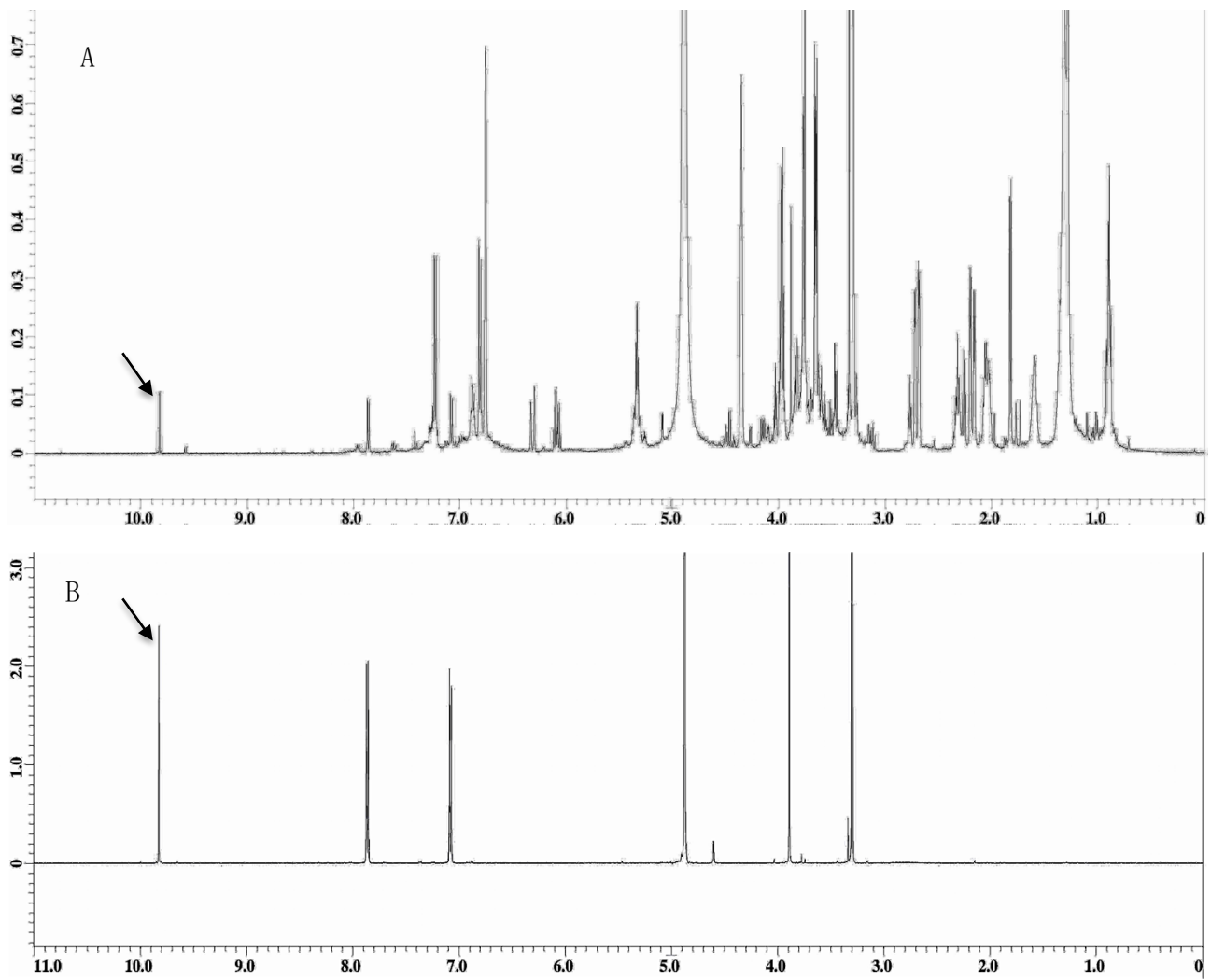


Fig. 10 スターアニス粉末の MeOH 抽出物(A)と anisaldehyde (B) の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル  
 矢印のシグナルが anisaldehyde のホルミル基 H のシグナル ( $\delta 9.82$  ppm)

Table 1 <sup>1</sup>H-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°C



Table 2  $^1\text{H}$ -qNMR 法で純度決定した carthammin を用いて測定・算出したモル吸光係数

溶媒	今回の値 ( $\lambda_{\text{max}}$ )	文献値 ( $\lambda_{\text{max}}$ )
DMF	$1.21 \times 10^5$ (530 nm)	$9.04 \times 10^4$ (530 nm)
EtOH	$1.19 \times 10^5$ (513 nm)	$4.90 \times 10^4$ (515 nm)
Pyridine	$1.48 \times 10^5$ (540 nm)	—

Table 3  $^1\text{H}$ -qNMR 法で定量された anisaldehyde の含有率

samples		含有率(%) $\pm$ SD
eugenol 標準品	(n=6)	94.96 $\pm$ 1.02
「香辛料抽出物」	A (n=5)	1.40 $\pm$ 0.07
	B* (n=3)	0.24 $\pm$ 0.06
	C (n=4)	0.43 $\pm$ 0.08
	D	ND <sup>#</sup>
	E	ND <sup>#</sup>
生薬粉末	F (n=5)	0.62 $\pm$ 0.03
	G (n=5)	0.32 $\pm$ 0.04

\* 「香辛料抽出物」 B は粉末の試料.

# ND : anisaldehyde のシグナルを検出できなかった.