

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分析手法に関する研究

～ラカンカ抽出物のモグロシドV分析法～

分担研究者 大槻 崇 日本大学 生物資源科学部 食品生命学科 専任講師

研究要旨 本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、 ^1H -qNMRおよび ^1H -qNMRとLCを組み合わせた相対モル感度（RMS）法のラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量分析への適用性について検討した。3種のラカンカ抽出物を対象に検討を行った結果、 ^1H -qNMRでは、類縁物質のシグナルとの不分離によるものと考えられる含量値の増大が確認され、前処理等の更なる検討が必要であることが明らかとなった。一方、RMS法では、カフェインを定量用標品として選択し、得られたカフェインに対するモグロシドVのRMS（0.122）からラカンカ抽出物中のモグロシドVの含量を正確かつ安価に定量できることが判明した。

A. 研究目的

日本では食品添加物の安全性や品質を確保する目的で、食品添加物の性状、含量（純度）などの成分規格や食品添加物を使用できる食品の種類、使用量などの使用基準等が設定され、第8版食品添加物公定書に記載されている。また、既存添加物365品目（枝番込み382品目、ただし、香辛料抽出物を1品目とする）のうち、217品目の規格については、第9版食品添加物公定書に収載される予定である。この食品添加物の成分規格には、原則として含量とその分析法が定められており、同分析ではLC等が使用されることが多い。このような分析では測定対象化合物と同一かつ純度が正確な標準物質が必要であるが、計量学的に妥当な手順によって純度が算出された認証標準物質は非常に少ない¹⁾。このため、LC等の相対定量法では、試薬メーカーの標準品が一般的に利用されている。しかし、この純度は自社規格により保証されたもの、すなわち計量学的に正確とは言えず、結果として定量値の信頼性が損なわれる可能性を否定できない。また、天然由来成分の場合、定量用標

品が販売されていないまたは販売されていたとしてもコストの面から供給が中止される可能性も考えられる。このように、食品添加物特に既存添加物を対象とした場合、製品の品質の保証の観点から、このような問題を克服でき、かつ分析技術の進歩を考慮した信頼性の高い規格試験法の確立が急務と考えられる。

近年、国際単位系（SI）へのトレーサビリティが確保された絶対定量法として定量NMR（quantitative NMR；qNMR）が注目を集めている^{2,3)}。qNMRのうち、 ^1H NMRを利用したqNMR（ ^1H -qNMR）は、定量性が確保された測定条件を用いる事で、2つの化合物間のシグナル面積強度比が「各化合物のモル濃度×各置換基上の水素数」に比例する原理を利用した定量法である。NMRは原子核を対象に測定を行っているため、これら2つの化合物は同一の化学構造である必要はない。従って、計量学的に正確な純度が付与された認証標準物質のようなSIへのトレーサビリティが確保された標品を内標準物質として用いることにより、内標準物質と測定対象化合物のシグナル面積強度比、水素数、秤量濃

度の関係から、様々な測定対象化合物の含量や純度を求めることが可能である。このような定量値の計量計測トレーサビリティを確保した¹H-qNMRは、AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal reference material) とも呼ばれている。また、本法は試料を正確に秤量して溶媒に溶解させるのみで測定が可能であることや使用する溶媒量は1検体あたり2 mL以下であることなど、他の分析法に比べ迅速性や環境負荷の低減の面でも格段に優れている。さらに、混合物分析においては、¹H NMR上で測定対象物質と夾雑物質のシグナルが十分に分離されていれば、煩雑なクリーンアップや誘導体化等の前処理は不要となり、迅速かつ簡便な絶対定量が可能と考えられる。このように、本法は極めて汎用性の高い分析法であり、得られる定量値の信頼性、国際整合性も確保されていると言える。このような特徴から、¹H-qNMRは、残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬などの純度分析^{4,5,6)}、生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析^{7,8,9)}へ利用されている。そこで本研究は、既存添加物の成分規格試験法の向上を目指した研究の一環として、ラカンカ抽出物を対象とし、その主成分であるモグロシドVの定量分析における¹H-qNMRの有効性に関する検討を行った。また、¹H-qNMRとクロマトグラフィーを組み合わせた測定対象物質と同一の定量用標品を必要としないクロマトグラフィー(相対モル感度法)を用いたラカンカ抽出物中のモグロシドV(図1)の定量に関して併せて検討した。

B. 研究方法

B-1) 試薬等

3種のラカンカ抽出物のうち、サンナチュレM30 (Lot.170526-01) (試料1) およびサンナチュレM50 (Lot.170621-01) (試料2) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社よりご供与いただいた。ラカンカ抽出物(羅漢果精製物) (Lot.G20030116) はサラヤ株式会社製(試料3)を用いた。モグロシドVは、和光純薬工業株式会社製標準品(Lot.TWM3866)を用いた。2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate-*d*₆ sodium salt (DSS-*d*₆) は和光純薬工業株式会社

製標準物質 (Cat. No.044-31671, Lot.No.ECL6585, 純度 92.3%, 拡張不確かさ: 0.8%) を用いた。重水 (D₂O) は関東化学製を用いた。その他溶媒は高速液体クロマトグラフィー用または特級を用いた。

試液は以下のように調製した。

¹H-qNMR 標準溶液: DSS-*d*₆ 標準物質 8 mg を精密に量り, DMSO-*d*₆ 40 g を加え ¹H-qNMR 標準溶液とした。¹H-qNMR 標準溶液の DSS-*d*₆ 濃度 (0.2166 mg/g または 0.2165mg/g) は, DSS-*d*₆ の純度値 (92.3%) および秤量値より算出した。

B-2) 装置

核磁気共鳴装置 (NMR): ECA500 (プロトン共鳴周波数 500 MHz) (日本電子株式会社製)

高速液体クロマトグラフィー (LC): LC-10AD システム (ポンプ: LC-10AD, 低圧グラジエントユニット: FCV-10AL, 恒温槽: CTO-10AS, 紫外可視分光検出器: SPD-10AV, デガッサー: DGU-12A, データ処理装置: LabSolutions) (島津製作所製) および Prominence システム (オートサンプラー: SIL-20A, 送液ポンプ: LC-20AD, カラムオーブン: CTO-10AS, 多波長検出器: SPD-M20A, データ処理装置: LabSolutions) (株式会社島津製作所製) にデガッサーとして AG-34 (株式会社フロム製) を接続したもの

はかり: BM-20 (株式会社エー・アンド・デイ製)

B-3) ¹H-qNMR によるモグロシドVの定量

B-3-1) ¹H-qNMR によるモグロシドV標準品の純度測定

モグロシドV 標準品約 10 mg を精密に量り, ¹H-qNMR 標準溶液 1 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し, 表 1 に示す条件を用い ¹H-qNMR 測定を行った。DSS-*d*₆ のシグナル面積強度を 9.000 としたときのモグロシドV に由来する特定基のシグナル面積強度, 分子量, 濃度等を下記の式に代入し, モグロシドV 標準品の純度 (%) を算出した。

$$\text{Purity (\%)} = \frac{I_{\text{sample}}/H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}}/H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}}/W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}}/C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし、 I_{sample} =モグロシド V の特定基のシグナル面積強度、 I_{std} =内標準物質のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.000)、 H_{sample} =モグロシド V の特定基の水素数、 H_{std} =内標準物質の特定基の水素数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3=9$)、 M_{sample} =モグロシド V の分子量、 M_{std} =内標準物質の分子量 (DSS- d_6 : 224.36)、 W_{sample} =モグロシド V の秤取量 (mg)、 C_{std} = ^1H -qNMR 標準溶液の DSS- d_6 濃度

なお、qNMR の化学シフト値は、DSS- d_6 のプロトンシグナルを基準 (δ 0 ppm) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。また、データの解析は、フーリエ変換から含量の算出までを自動処理できる Alice 2 for qNMR “ピュアリティ” (日本電子 (株)) を用いた。

B-3-2) ^1H -qNMR による各ラカンカ抽出中のモグロシド V の定量

3 種のラカンカ抽出物のうち、試料 1 及び試料 3 は 50 mg、試料 2 は 20 mg を精密に量り、 ^1H -qNMR 標準溶液 1 g を入れ超音波処理により溶解したものを試験溶液とした。

この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し、表 1 に示す条件を用い ^1H -qNMR 測定を行った。DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.000 としたときの試料中のモグロシド V に由来する特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、各ラカンカ抽出中のモグロシド V 含量 (%) を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \frac{I_{\text{sample}}/H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}}/H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}}/W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}}/C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし、 I_{sample} =試料中のモグロシド V の特定基のシグナル面積強度、 I_{std} =内標準のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.000)、 H_{sample} =試料中のモグロシド V の特定基の水素数、 H_{std} =内標準物質の特定基の水素数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3=9$)、 M_{sample} =試料中のモグロシド V の分子量 (1287.43)、 M_{std} =内標準物質の分子量 (DSS- d_6 : 224.36)、 W_{sample} =試

料中の秤取量 (mg)、 C_{std} = ^1H -qNMR 標準溶液の DSS- d_6 濃度

B-3-3) LC による各ラカンカ抽出中のモグロシド V の定量

3 種のラカンカ抽出物のうち、サンナチュレ M30 及び試料 3 は 50 mg、試料 2 は 20 mg を精密に量り、水を加え超音波処理により溶解したものを試験溶液とした (抽出物濃度: 1 mg/mL)。この試験溶液を以下の LC 条件にて分析した。

カラム: Develosil ODS-UG-5 (5 μm , 4.6 \times 250 mm, 野村化学株式会社製)、カラム温度: 40 $^\circ\text{C}$ 、検出波長: 210 nm、流速: 1.0 mL/min、溶離液 A: 水、溶離液 B: アセトニトリル、グラジエント条件: 0 min (5%B) \rightarrow 35 min (40%B) \rightarrow 35.01 min (100%B) \rightarrow 40 min (100%B) \rightarrow 40.01 min (5%B) \rightarrow 50 min (5%B)、注入量: 10 μL

なお、検量線用標準溶液は以下のように作成した。すなわち、モグロシド V 標準品 5 mg を精密に量り、5 mL 容メスフラスコに入れ、水を加えて正確に 5 mL とし検量線用標準溶液①とした (モグロシド V 濃度: 1.0 mg/mL)。検量線用標準溶液①を水にて公比 2 で段階希釈したものを検量線用標準溶液②、③および④とした (モグロシド V 濃度: 0.5, 0.25 および 0.13 mg/mL)。

調製した試験溶液を上記に示した条件で LC にて分析し、得られたピーク面積と検量線によって得られた試験溶液中のモグロシド V 濃度 (mg/mL) を求め、次式によって試料中のモグロシド V 含量 (%) を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \frac{C \times V}{W} \times \frac{P}{100} \times 100$$

ただし、C は試験溶液中のモグロシド V 濃度 (mg/mL)、V は試験溶液の量 (mL)、W は試料の採取量 (mg)、P はモグロシド V 標準品の

純度 (%) である。

B-4) 相対モル感度 (RMS) を利用した LC によるモグロシド V の定量

B-4-1) ¹H-qNMR によるモグロシド V 標準品およびカフェインの純度測定

モグロシド V 標準品については、B-3-1 の項に示した。カフェインについては、約 10 mg を精密に量り、¹H-qNMR 標準溶液 1 g に溶解した。この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し、表 1 に示す条件を用い ¹H-qNMR 測定を行った。DSS-*d*₆ のシグナル面積強度を 9.000 としたときのカフェインに由来する特定基のシグナル面積強度、分子量、濃度等を下記の式に代入し、カフェインの純度 (%) を算出した。

$$\text{Purity (\%)} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし、 I_{sample} = カフェインの特定基のシグナル面積強度、 I_{std} = 内標準物質のシグナル面積強度 (DSS-*d*₆: 9.000)、 H_{sample} = カフェインの特定基の水素数、 H_{std} = 内標準物質の特定基の水素数 (DSS-*d*₆: CH₃×3=9)、 M_{sample} = カフェインの分子量 (194.19)、 M_{std} = 内標準物質の分子量 (DSS-*d*₆: 224.36)、 W_{sample} = カフェインの秤取量 (mg)、 C_{std} = ¹H-qNMR 標準溶液の DSS-*d*₆ 濃度

B-4-2) カフェインに対するモグロシド V の RMS の算出

各濃度のカフェイン (0.319×10⁻³ mol/L, 0.639×10⁻³ mol/L および 2.56×10⁻³ mol/L) に対する 6 濃度 (0.058×10⁻³, 0.116×10⁻³, 0.232×10⁻³, 0.464×10⁻³, 0.928×10⁻³ および 1.86×10⁻³ mol/L) のモグロシド V を含む水溶液を調製し、試験溶液とした。この溶液を以下の LC 条件にて分析した。

カラム: Develosil ODS-UG-5 (5 μm, 4.6×250 mm, 野村化学株式会社製), カラム温度: 40℃, 検出波長: 210 nm, 流速: 1.0 mL/min, 溶離液 A: 0.1%ギ酸, 溶離液 B: 0.1%ギ酸含有アセトニトリル, グラジエント条件: 0 min

(5%B) → 35 min (40%B) → 35.01 min
(100%B) → 40 min (100%B) → 40.01 min
(5%B) → 50 min (5%B), 注入量: 5 μL

モグロシド V およびカフェインのモル濃度比 (モグロシド V のモル濃度 / カフェインのモル濃度) から物質質量比 (モル比), LC 分析におけるモグロシド V およびカフェインのピーク面積比 (モグロシド V のピーク面積 / カフェインのピーク面積) から応答比 (吸光度比) を算出し、応答比および物質質量比の比 (応答比 / 物質質量比) からカフェインに対するモグロシド V の RMS を算出した。

B-4-3) RMS を用いたラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

3 種のラカンカ抽出物のうち、試料 1 及び試料 3 は 50 mg, 試料 2 は 20 mg を精密に量り、水を加え超音波処理により溶解したものを試験溶液とした (抽出物濃度: 1 mg/mL)。この試験溶液を B-4-2 に示した LC 条件にて分析し、得られたピーク面積とカフェインより作成した検量線によって得られた試験溶液中のモグロシド V 濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中のモグロシド V 含量 (%) を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \text{RMS} \times \frac{C \times V}{W} \times \frac{P}{100} \times 100$$

ただし、RMS はカフェインに対するモグロシド V (0.122)、C は試験溶液中のモグロシド V 濃度 (mg/mL)、V は試験溶液の量 (mL)、W は試料の採取量 (mg)、P はカフェインの純度 (%) である。

C. 結果及び考察

C-1) ¹H-qNMR によるラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

C-1-1) ¹H-qNMR によるモグロシド V 標準品の定量

¹H-qNMRは、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度とモル濃度の関係から、測定対象化合物の濃度を絶対定量することが可能である。また、計量計測トレーサビリティが確保された標準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が大幅に向上した方法と言える。そこで、本法のモグロシドV分析への適用性を明らかにするため、市販標準品について3併行で¹H-qNMR測定を行った。通常、¹H-qNMRでは、定量性を確保した条件を用いる必要がある。代表的な測定条件を表1に示す。本研究では、この測定条件を用いて¹H-qNMRを行った。なお、化学シフト値は、内標準物質のメチルプロトンシグナルを基準(DSS-*d*₆: δ 0 ppm)とし、δ値をppm単位で表した。その結果、図2に示すように、¹H-qNMR測定により得られたモグロシドVの¹H NMRスペクトル上、δ 0.8~3.0 ppm付近には、アグリコンに由来する飽和炭化水素のシグナル群、δ 3.2~5.0 ppm付近には、糖部に由来する水素シグナル群がそれぞれ観察された。しかし、これらの領域に観察されたシグナル群は、分子内の他のシグナルと部分的または全体的に重なるため、定量における適切な積分範囲の設定が困難と考えられた。一方、δ 5.57 ppmに観察された6位に由来する水素シグナルは、他の分子内のシグナルと十分に分離されていたため、モグロシドVの定量用シグナルとして適当と考えられた。そこで、このシグナルより純度を算出したところ、92.1%と算出された。また、このシグナルから算出された定量値の相対標準偏差(RSD)は0.2%と良好であった。

C-1-2) ¹H-qNMRによるラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量

ラカンカ抽出物3種について、¹H-qNMRによるモグロシドVの含量測定を行い(n=3)、得られた結果をLC法(n=3)と比較した。なお、¹H-qNMRでは、スペクトル上のモグロシドV由来のシグナルと夾雑物のシグナルとの分離度などを考慮して、前項で示したδ 5.57 ppm(6位)を用いてモグロシドV含量を算出

した。各ラカンカ抽出物中のモグロシドV含量を表2、各抽出物の¹H NMRスペクトルを図3~5、LCクロマトグラムを図6~8にそれぞれ示した。表2に示すように、¹H-qNMRから算出されたモグロシドVの含量値は、LCより得られた含量値と比較して6~13%程度高い結果となった。そこで、試料2を用いて2次元NMR測定(HMBC, HMQC)を行い、分子内の炭素と6位の水素との相関を確認したところ、HMQCでは、6位の炭素シグナルのみ、HMBCでは2~3結合離れたモグロシドVの炭素との相関が観察されたものの、他の化合物に由来すると考えられる相関は観察されなかった。Chaturvedulaらは、ラカンカより調製したラカンカ抽出物(50 g中)には、モグロシド類としてモグロシドVのほかモグロシド□a、モグロシド□など、モグロシドVと共通のアグリコン(モグロール, Mogrol)をもつものや11位のヒドロキシ基がオキソ基に置換した11-オキソ-モグロシド□などが存在することを報告している¹⁰⁾。これらのアグリコンの化学構造を考慮すると、モグロシドVの6位の水素シグナルは他のモグロシド類の6位の水素シグナルと十分に分離できず、結果として定量値が過大になったものと推測された。

C-2) RMSによるラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量

C-1-2で示したように、ラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量において、他の類縁物質との分離度との兼ね合いから前処理を伴わない¹H-qNMRでは定量が困難であることが確認された。そこで、この問題を解決する方法として、相対感度係数(Relative Response Factor, RRF)を用いた分析法¹¹⁾に着目した。この方法は、基準物質に対する測定対象化合物のRRFが明らかな場合、基準物質を内標準物質として用い、基準物質および測定対象化合物の検出器における応答値とRRFの関係から、測定対象化合物と同一の定量用標品を必要としないクロマトグラフィーを利用した定量法である。最近では、¹H-qNMRとクロマト

グラフィーを組み合わせ、任意の検出器における化合物間の正確な相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity, RMS) から測定対象化合物を定量する方法が考案され、食品添加物等への定量に利用されている^{12,13)}。そこで、本項ではこの RMS 法による定量法のモグロシド V 分析への適用性について検討を行った。

C-2-1) モグロシド V およびカフェインの ¹H-qNMR 測定

モグロシド V は、220 nm より短波長側に吸収極大を有することから、今回の RMS 法における定量用標品として、短波長側に大きな吸収極大をもちかつ安価なカフェインを選択した。まず、RMS の算出に使用するモグロシド V 標準品およびカフェイン (無水) (特級グレード) の純度を ¹H-qNMR により算出した (n=3)。カフェインについては、図 9 に示すように、¹H-qNMR スペクトル上、 δ 3.0-3.9 ppm にメチル基に由来する 3 本のシグナル、 δ 7.86 ppm には、8 位の水素に由来するシグナルがそれぞれ検出された。このうち、 δ 7.86 ppm のシグナルを定量用シグナルとして選択し、カフェインの純度を算出したところ、98.5% (RSD 0.6%) であることが判明した。モグロシド V 標準品の純度については、C-1-1 に記載したように 92.1% (RSD 0.2%) であった。これらモグロシド V およびカフェインの純度を考慮し、以下の検討を行った。

C-2-2) カフェインに対するモグロシド V の RMS の算出

カフェインに対するモグロシド V の RMS を算出するため、3 濃度 (0.319×10^{-3} , 0.639×10^{-3} および 2.56×10^{-3} mol/L) のカフェインにおけるモグロシド V の RMS について検討した。なお、検討に使用したモグロシド V は 6 濃度 ($0.058 \times 10^{-3} \sim 1.86 \times 10^{-3}$ mol/L) とし、B-4-2 に示す LC 条件を用いて各濃度に調製したカフェイン・モグロシド V 混液を分析し、各カフェイン濃度における RMS を算出した。表 3, 4 および 5 に示すように、各カフェイン濃度より算出された RMS の結果から、カフェインに

対するモグロシド V の RMS は 0.122 であることが判明した。なお、モグロシド V は検討した濃度範囲において良好な直線性を示した。

次に、得られた RMS (0.122) の適用性を評価するため、各濃度のカフェインについて原点との一点検量線を作成し (図 10)、6 濃度のモグロシド V の面積値を代入し RMS を用いてモグロシド濃度を算出 (計算値) し、秤量濃度 (秤量値) と比較した。その結果、表 6, 7 および 8 に示すように全濃度のモグロシド V の秤量値と計算値の差は 6% 以下であることが確認された。

C-2-3) RMS を用いたラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

ラカンカ抽出物 3 種について、RMS によるモグロシド V の含量測定を行い (n=3)、モグロシド V 標準品を用いて作成した検量線より算出された含量と比較した。各ラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量を表 9、各抽出物の LC クロマトグラムを図 11~13 にそれぞれ示した。各濃度のカフェインを用いて算出された各ラカンカ抽出物中のモグロシド V の含量は、モグロシド V 標準品を用いて算出された含量と有意な差は認められなかった。以上より、カフェインを定量用標品とした RMS を用いた分析法は、ラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量に有効と考えられた。

D. 結論

本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、ラカンカ抽出物中のモグロシド V を対象とした ¹H-qNMR による定量および ¹H-qNMR と LC を組み合わせた相対モル感度 (RMS) 法を用いた定量法について検討を行った。¹H-qNMR では、得られた 3 種のラカンカ抽出物中のモグロシド V の含量値は、LC の含量値と比較して 6~13% 程度高い結果を示した。これは、定量に用いた 6 位の水素に由来するシグナルがモグロシド V の類縁物質に由来するシグナルと十分な分離が果たせていないことに起因すると考えられた。他のモグロシド V 由来のシグ

ナルについても、分子内の他のシグナルや夾雑成分に由来するシグナルとの重なりが観察されたことから、前処理を伴わない本法によるモグロシドVの定量は困難であり、前処理等の更なる検討が必要と考えられた。

一方、RMSを用いた方法では、カフェインを定量用標品として、カフェインに対するモグロシドVのRMS(0.122)より算出されたモグロシドVの含量は、従来法(モグロシドVを定量用標品として用いた方法)より得られた含量と有意な差は認められなかった。従って、今回求められたRMSを用いることにより、ラカンカ抽出物中のモグロシドVの含量を正確かつ安価に定量できることが判明した。

E. 参考文献

1. Zeleny, R.; Schimmel, H. *TrAC*, **33**, 107-116 (2012).
2. Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hira, T. *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
3. Uchiyama, N., Masada, S., Hosoe, J., Hakamatsuka, T., Goda, Y.: Determination of absolute purities of commercial agents used for quantification of functional substances by quantitative NMR analysis. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **24**, 125-130 (2017).
4. Tahara, M., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Tada, A., Kubota, R., Shimizu, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Nakazawa, H., Nishimura, T. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, **16**, 28-33 (2009).
5. Hosoe, J., Sugimoto, N., Goda, Y.: Trial study to determine absolute purities of chemical reagents used as reference standards in the Japanese Pharmacopoeia. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **41**, 960-970 (2010).
6. Tada, A., Takahashi, K., Ishizuki, K.; Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Tahara, M., Akiyama, T., Ito, Y., Yamazaki, T., Akiyama, H., Kawamura, Y., *Chem Pharm Bull.*, **61**, 33-38 (2013).
7. Tanaka, R., Hasebe, Y., Nagatsu, A. *J. Nat. Med.*, **68**, 630-635 (2014).
8. Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H.: Quantitative determination of carthamin in *Carthamus Red* by ¹H-NMR Spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 1264-1268 (2013).
9. Tada, A., Takahashi, K., Sugimoto, N., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Ishizuki, K., Nishimura, T., Yamazaki, T., Kawamura, Y.: Absolute quantitation of quercetin and the glycosides in natural food additives by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **51**, 205-212 (2010).
10. Chaturvedula, V. S. S., Prakash, I.: Cucurbitane glycosides from *Siraitia grosvenorii*. *J. Carbohydr. Chem.*, **30**, 16-26 (2011).
11. Kitamaki, Y., Saito, N., Yamazaki, T., Otsuka, S., Nakamura, S., Nishizaki, Y., Sugimoto, N., Numata, M., Ihara, T.: Determination of PAHs in solution with a single reference standard by a combination of ¹H quantitative NMR spectroscopy and chromatography. *Anal. Chem.*, **89**, 6963-6968 (2017).
12. Nishizaki, Y., Sato-Masumoto, N., Nakanishi, A., Hashizume, Y., Tandia, M., Yamazaki, T., Kuroe, M., Numata, M., Ihara, T., Sugimoto, N., Sato, K.: Determination of hesperidin and Monoglucosylhesperidin contents in processed foods using relative molar sensitivity based on ¹H-quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **59**, 1-10 (2018).
13. Nishizaki, Y., Tada, A., Ishizuki, K., Ito, Y., Onoda, A., Sugimoto, N., Akiyama, H.: Development of a novel method for quantifying quassin and neoquassin in *Jamaica quassia* extracts using the molar absorption

coefficient ratio. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **56**, 185-193 (2015).

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Tatebe C, Ohtsuki T, Fujita T, Nishiyama K, Itoh S, Sugimoto N, Kubota H, Tada A, Sato K, Akiyama, H: Determination of Starting Materials, Intermediates, and Subsidiary Colors in the Color Additive Food Red No. 106 (Sulforhodamine B) using High-Performance Liquid Chromatography. *Food Chem.* **2017**; *237*: 733-742.

2. 学会発表

- 1) 大槻崇, 鈴木一平, 建部千絵, 久保田浩樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: $^1\text{H-qNMR}$ を用いた食品中のサッカリンナトリウムの分析法の確立. 食品化学学会 (2017.6).

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

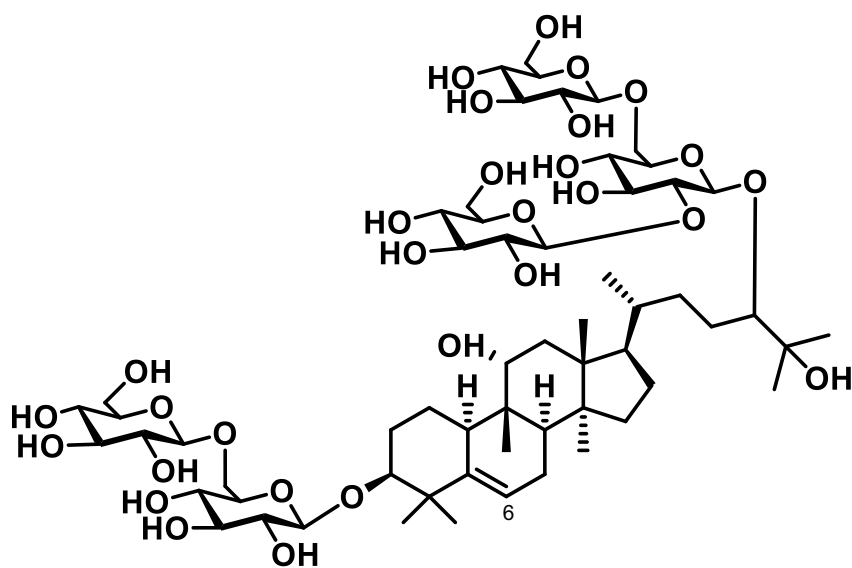


図 1 モグロシド V の化学構造

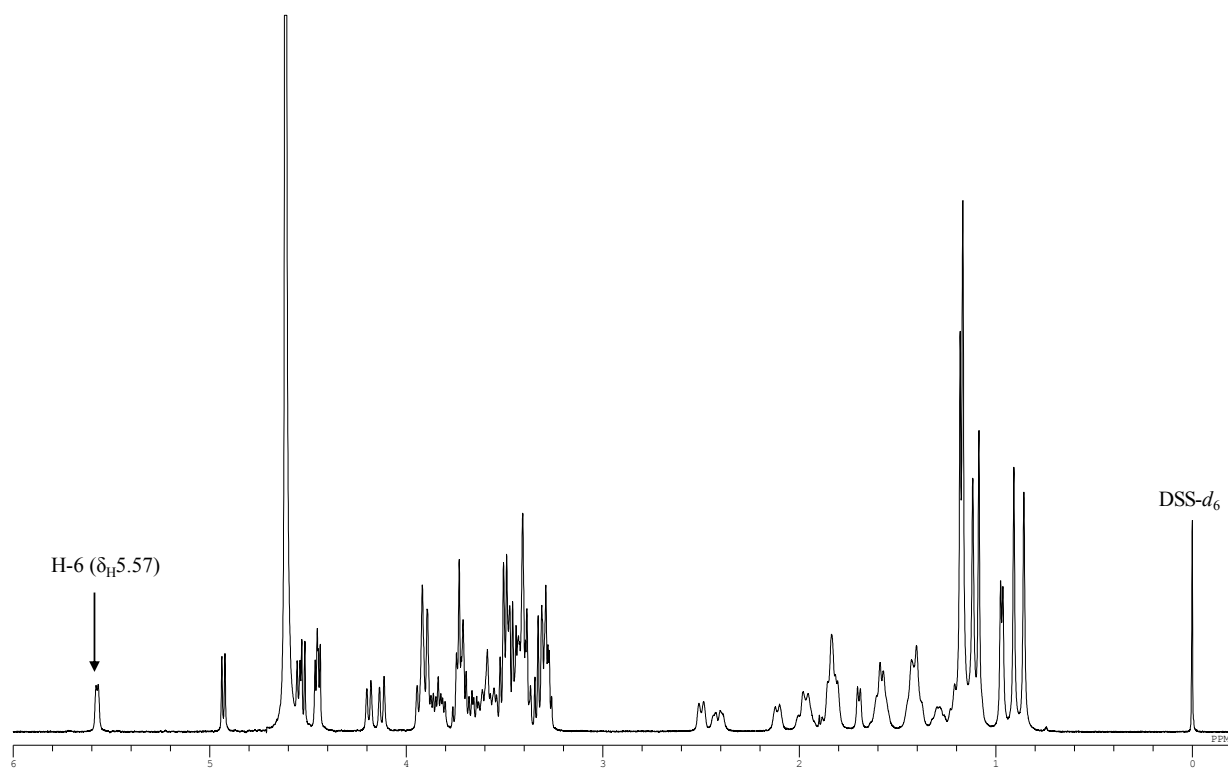


図 2 モグロシド V の ^1H -qNMR スペクトル

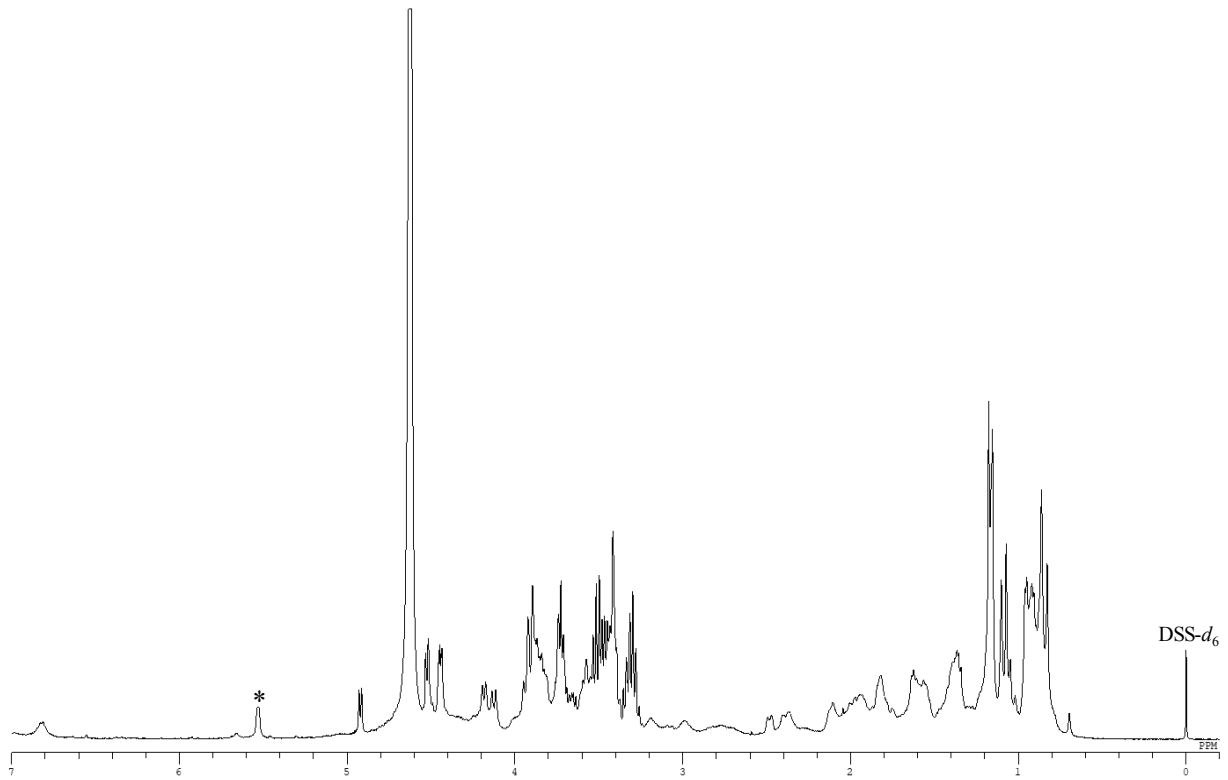


図3 試料1の ^1H -qNMR スペクトル
* : 定量用シグナル

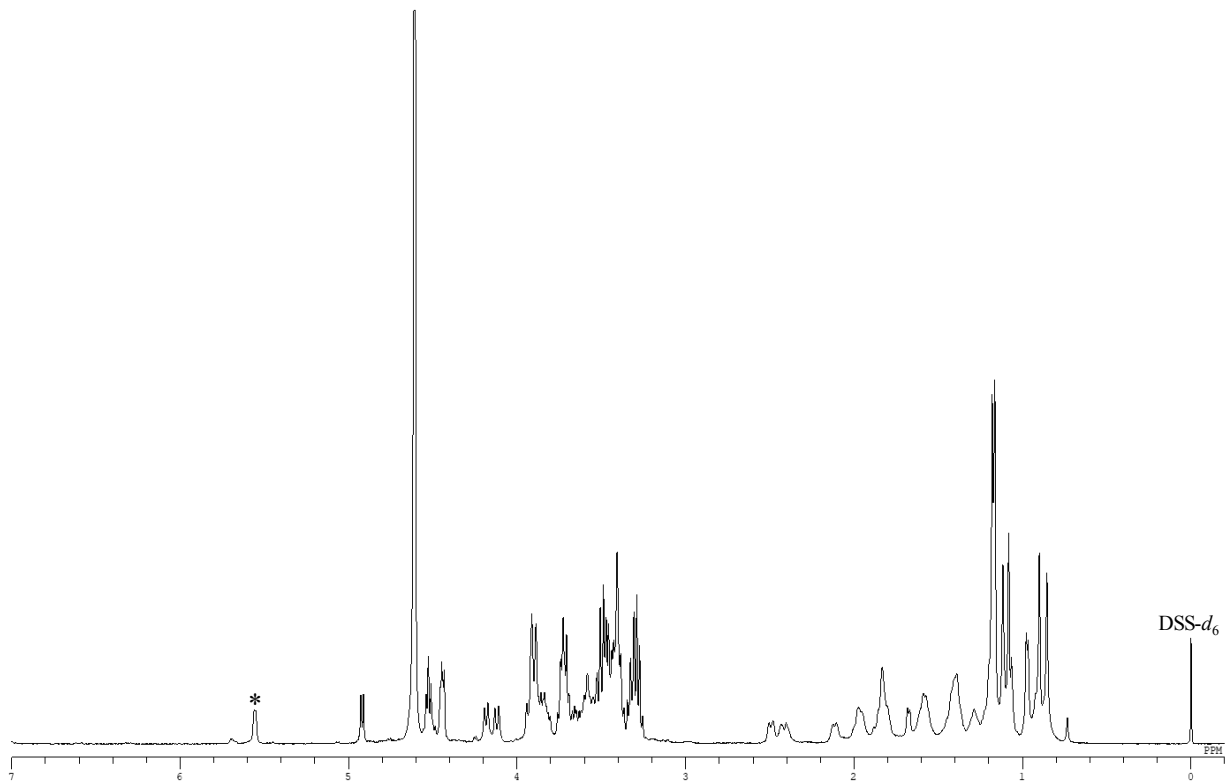


図4 試料2の ^1H -qNMR スペクトル
* : 定量用シグナル

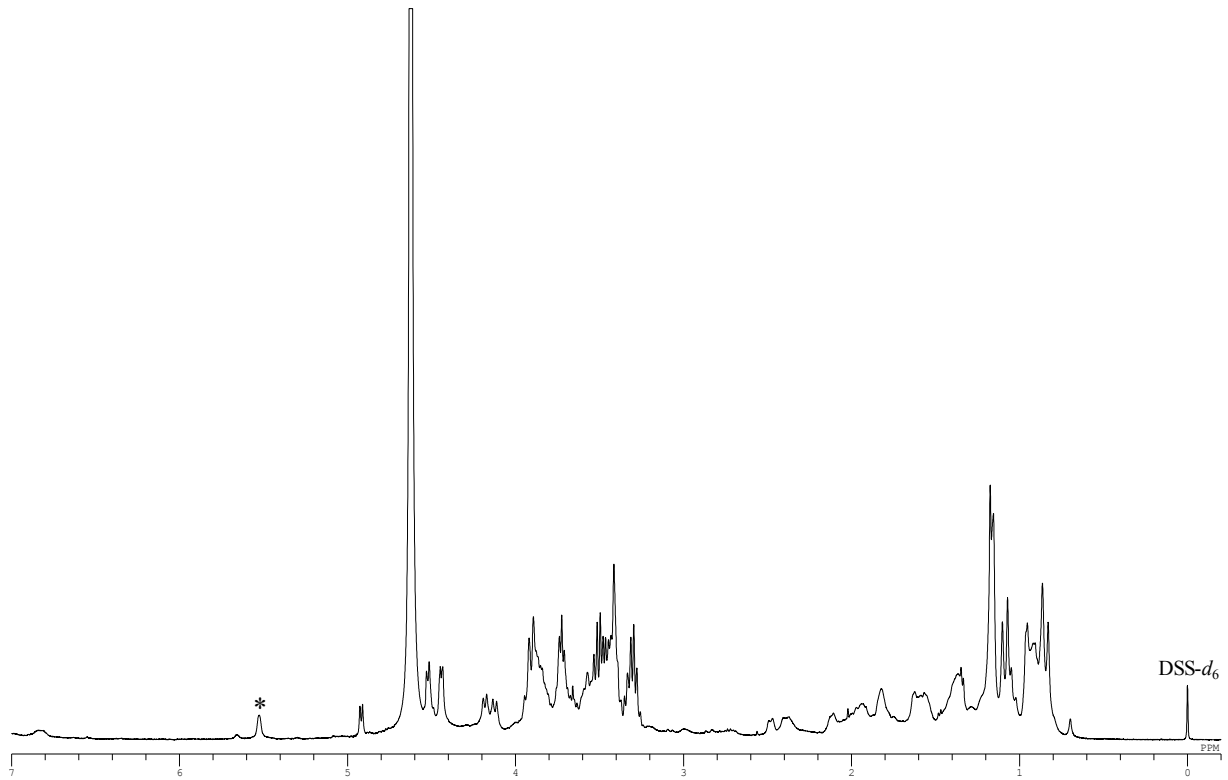


図5 試料3の¹H-qNMR スペクトル
* : 定量用シグナル

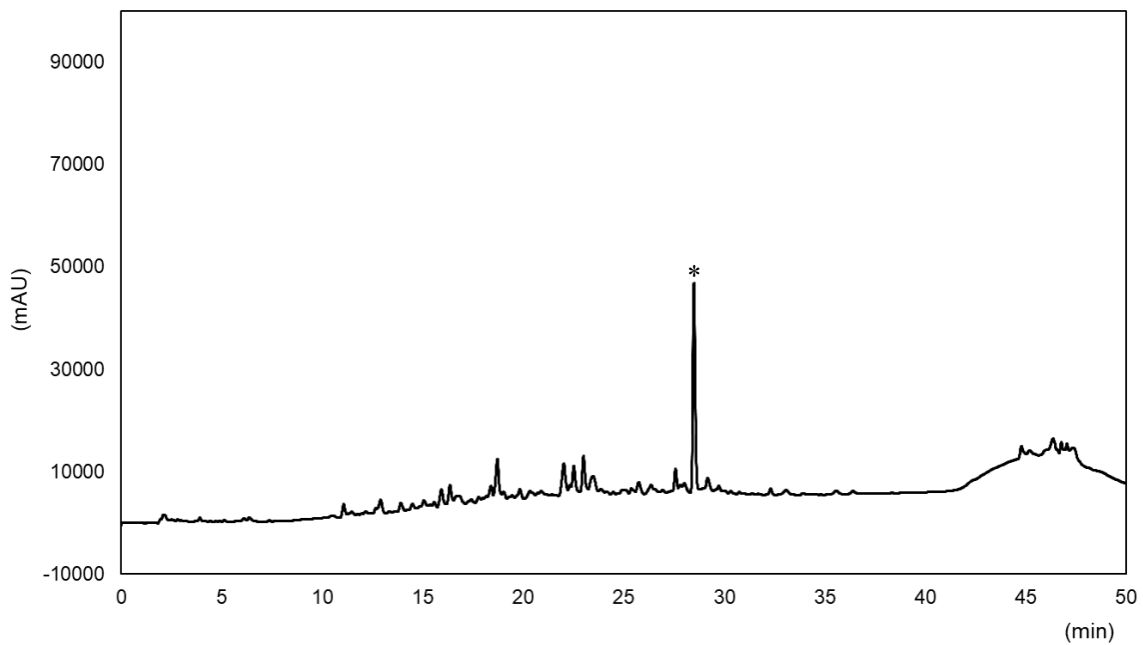


図6 試料1のLCクロマトグラム
* : モグロシドV

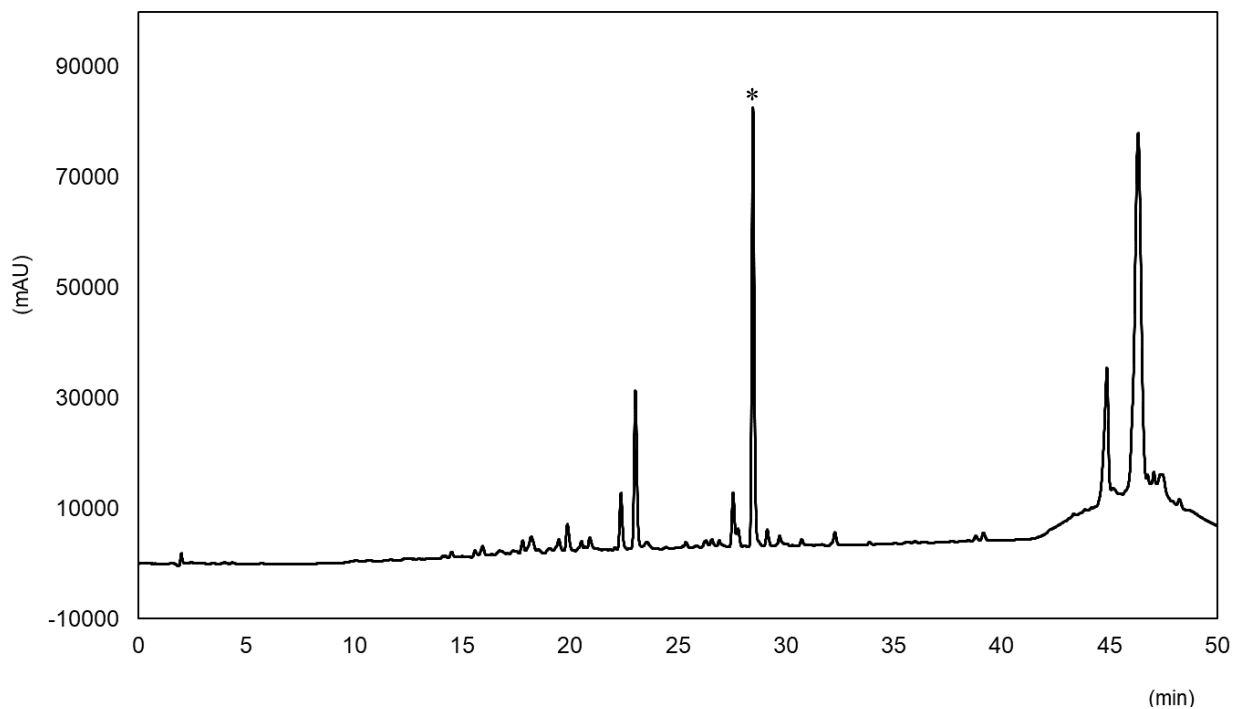


図7 試料2のLCクロマトグラム

* : モグロシドV

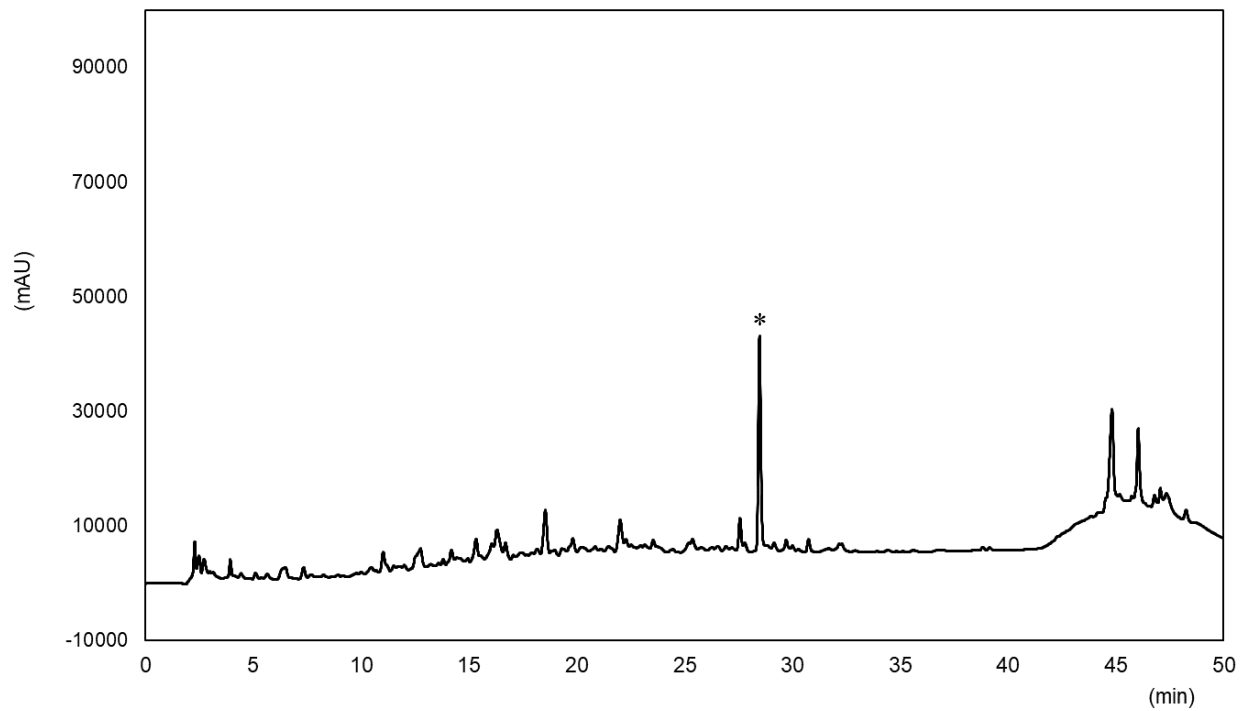


図8 試料3のLCクロマトグラム

* : モグロシドV

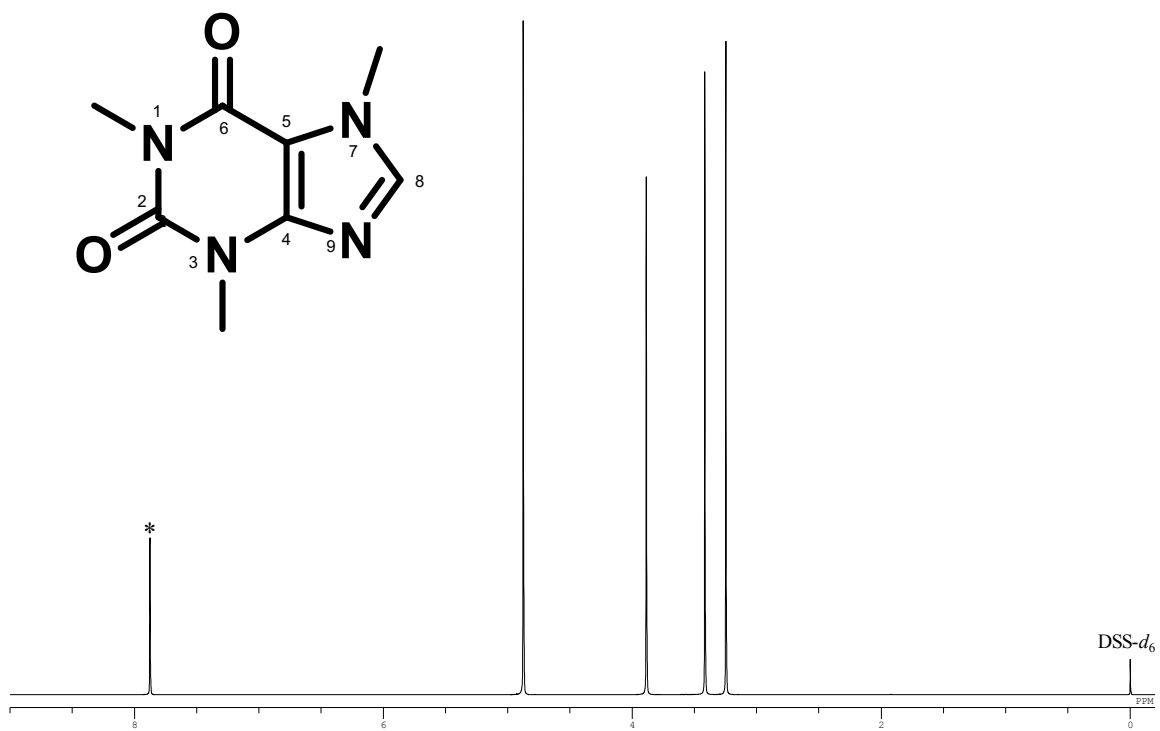


図9 カフェインの化学構造および¹H-qNMR スペクトル
* : 定量用シグナル

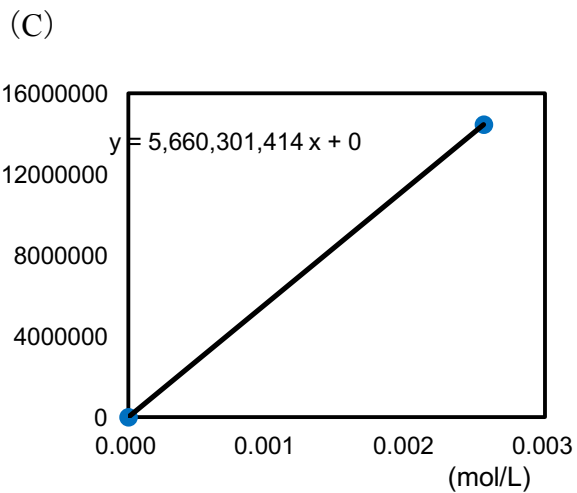
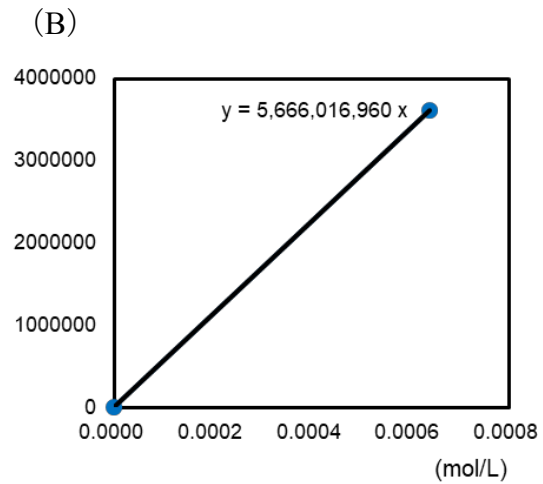
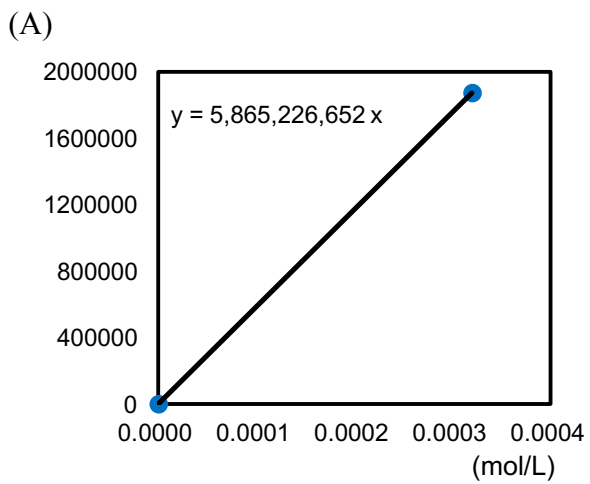


図 10 カフェインの検量線

(A) 0.319×10^{-3} mol/L, (B) 0.639×10^{-3} mol/L, (C) 2.56×10^{-3} mol/L

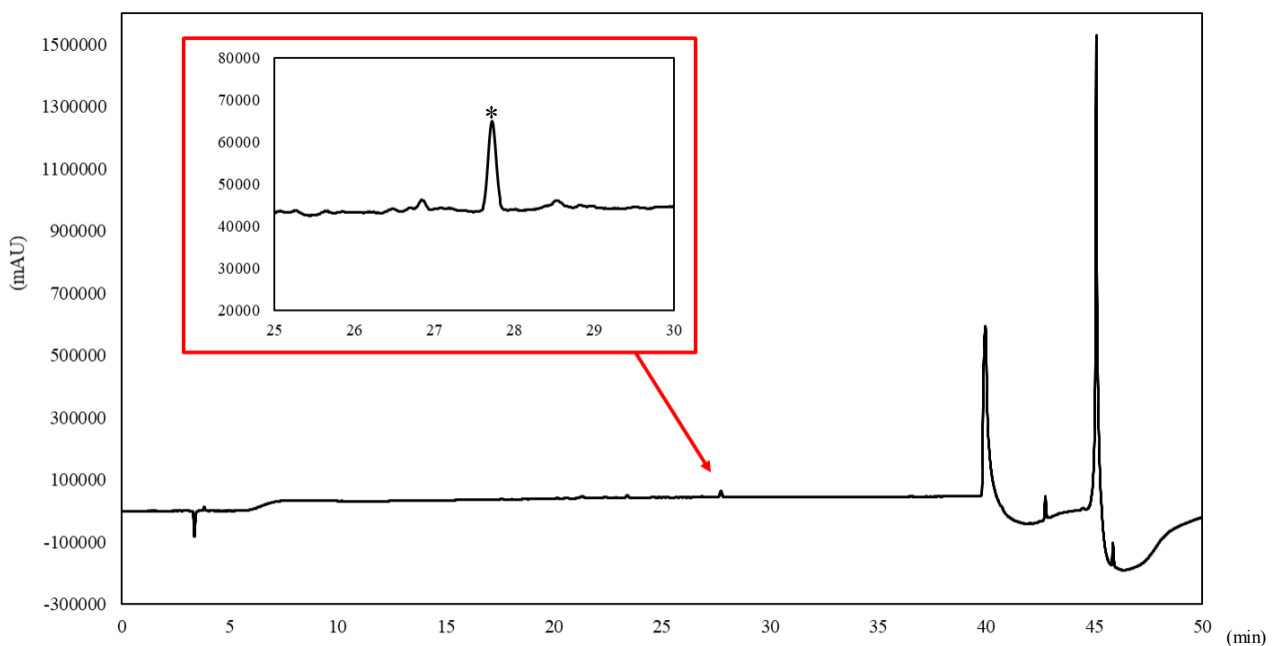


図 11 試料 1 の LC クロマトグラム

* : モグロシド V

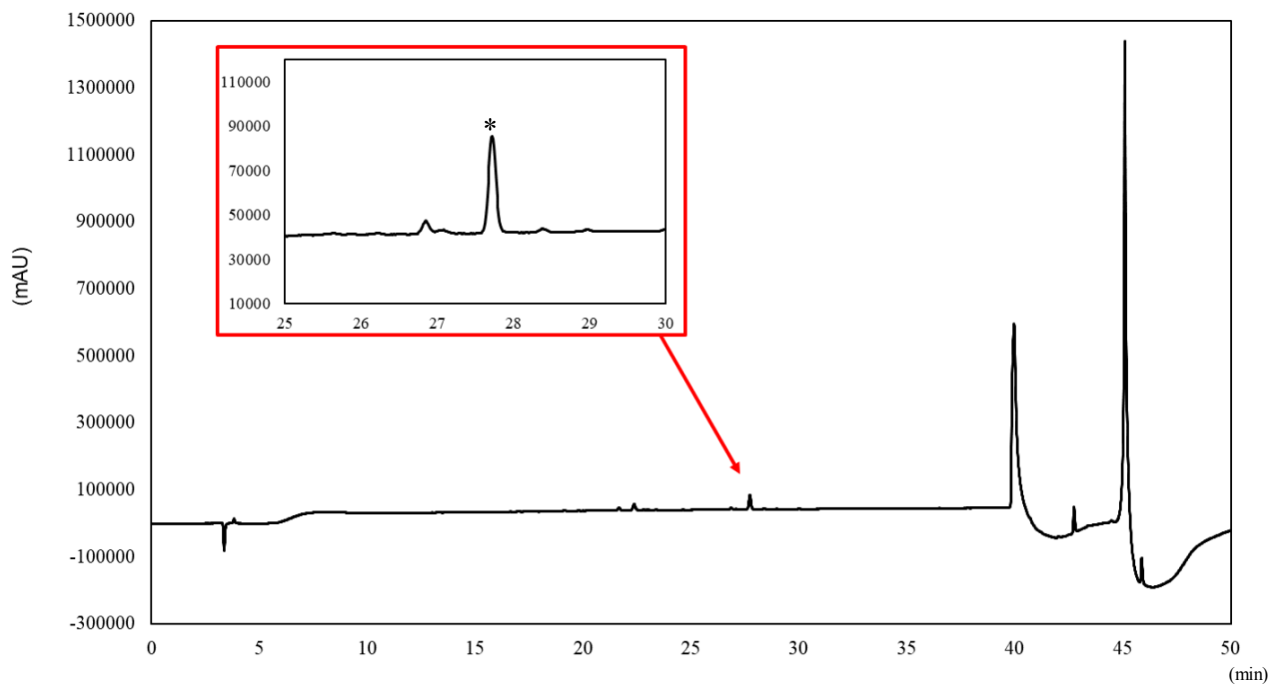


図 12 試料 2 の LC クロマトグラム

* : モグロシド V

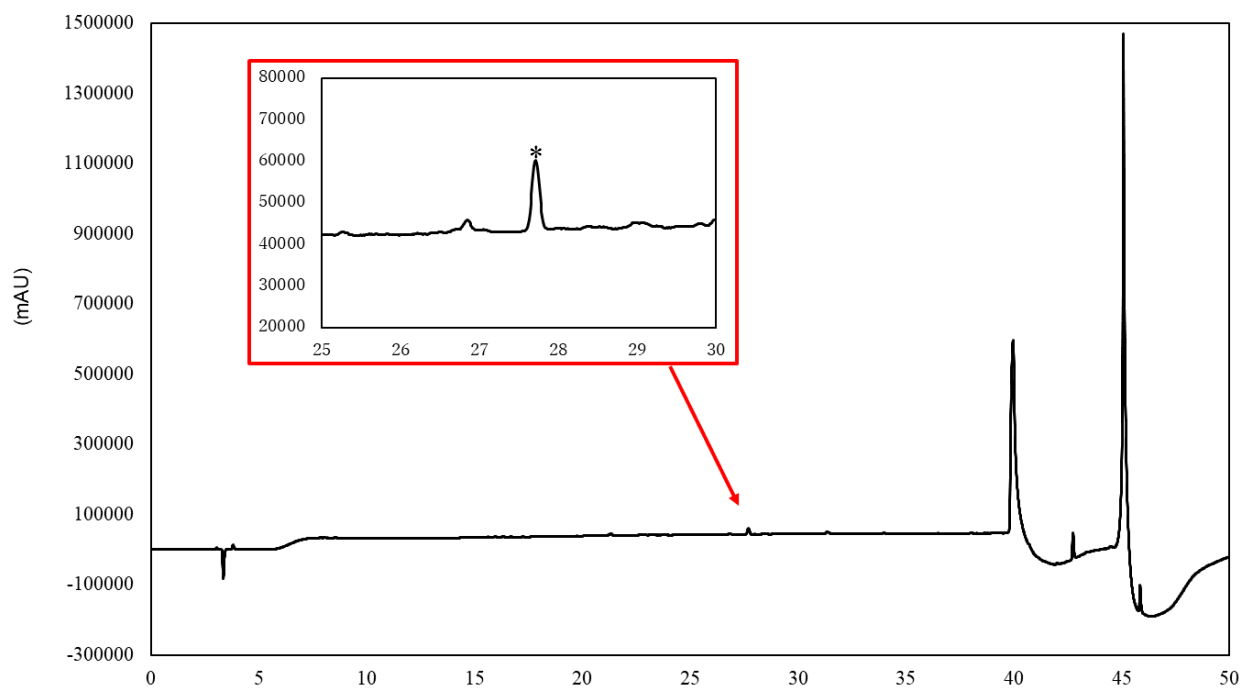


図 13 試料 3 の LC クロマトグラム

* : モグロシド V

表 1 ^1H -qNMR 測定条件

Spectrometer	JEOL ECA500 spectrometer
Probe	5 mm broadband autotune probe
Spectral width	17.5 ppm (-2.5 ~ 15 ppm)
Autofilter	on (eighttimes)
Acquisition time	4 s
Flip angle	90°
Relaxation delay	60 s
Number of scans	8
Spinning	off
^{13}C decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2 ^1H -qNMR および LC による 3 種のラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量の比較 (n=3)

試料	含量 (%)	
	^1H -qNMR	LC
1	33.7 ± 0.4	27.1 ± 0.3
2	62.2 ± 0.8	49.6 ± 1.5
3	33.2 ± 0.7	22.0 ± 0.8

表 3 カフェイン (0.319×10^{-3} mol/L) に対する各モグロシド V 濃度より算出されたの相対モル感度

カフェイン		モグロシド V		相対モル感度
モル濃度 (mol/L)	ピーク面積値	モル濃度 (mol/L)	ピーク面積値	
0.319×10^{-3}	1873307	0.0580×10^{-3}	39944	0.117
		0.116×10^{-3}	80798	0.119
		0.232×10^{-3}	166419	0.122
		0.464×10^{-3}	326601	0.120
		0.928×10^{-3}	649288	0.119
		1.86×10^{-3}	1247291	0.115
平均				0.119
標準偏差				0.0026

表 4 カフェイン (0.639×10^{-3} mol/L) に対する各モグロシド V 濃度より算出されたの相対モル感度

カフェイン		モグロシド V		相対モル感度
モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	
0.639×10^{-3}	3619362	0.0580×10^{-3}	39944	0.121
		0.116×10^{-3}	80798	0.123
		0.232×10^{-3}	166419	0.127
		0.464×10^{-3}	326601	0.124
		0.928×10^{-3}	649288	0.123
		1.86×10^{-3}	1247291	0.119
平均				0.123
標準偏差				0.0027

表 5 カフェイン (2.56×10^{-3} mol/L) に対する各モグロシド V 濃度より算出されたの相対モル感度

カフェイン		モグロシド V		相対モル感度
モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	
2.56×10^{-3}	14462844	0.0580×10^{-3}	39944	0.122
		0.116×10^{-3}	80798	0.123
		0.232×10^{-3}	166419	0.127
		0.464×10^{-3}	326601	0.124
		0.928×10^{-3}	649288	0.124
		1.86×10^{-3}	1247291	0.119
平均				0.123
標準偏差				0.0027

表 6 モグロシド V の濃度に関する秤量値と計算値の比較 (カフェイン濃度 0.319×10^{-3} mol/L)

モグロシド V 濃度 (mol/L)		Bias (%)
秤量値	計算値	
0.0580×10^{-3}	0.0561×10^{-3}	3.4
0.116×10^{-3}	0.113×10^{-3}	2.3
0.232×10^{-3}	0.233×10^{-3}	-0.6
0.464×10^{-3}	0.458×10^{-3}	1.3
0.928×10^{-3}	0.911×10^{-3}	1.9
1.86×10^{-3}	1.75×10^{-3}	5.7

表 7 モグロシド V 濃度に関する秤量値と計算値の比較 (カフェイン濃度 0.639×10^{-3} mol/L)

モグロシド V 濃度 (mol/L)		Bias (%)
秤量値	計算値	
0.0580×10^{-3}	0.0580×10^{-3}	0.01
0.116×10^{-3}	0.117×10^{-3}	-1.1
0.232×10^{-3}	0.242×10^{-3}	-4.2
0.464×10^{-3}	0.474×10^{-3}	-2.2
0.928×10^{-3}	0.943×10^{-3}	-1.6
1.86×10^{-3}	1.81×10^{-3}	2.4

表 8 モグロシド V 濃度に関する秤量値と計算値の比較 (カフェイン濃度 2.56×10^{-3} mol/L)

モグロシド V 濃度 (mol/L)		Bias (%)
秤量値	計算値	
0.0580×10^{-3}	0.0581×10^{-3}	-0.1
0.116×10^{-3}	0.117×10^{-3}	-1.2
0.232×10^{-3}	0.241×10^{-3}	-4.3
0.464×10^{-3}	0.475×10^{-3}	-2.3
0.928×10^{-3}	0.944×10^{-3}	-1.7
1.86×10^{-3}	1.81×10^{-3}	2.3

表 9 2 種の方法による各ラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量の比較 (n=3)

試料	相対モル感度法			絶対検量線法
	カフェイン濃度 (mol/L)			
	2.56×10^{-3}	0.639×10^{-3}	0.319×10^{-3}	
1	27.9	27.9	27.0	26.9
2	54.1	54.1	52.2	52.0
3	24.6	24.5	23.7	23.6