

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30年度研究分担報告書

研究分担課題：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 教授

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、 ^1H -qNMR法(定量 ^1H -NMR法)が試験法として適用可能であるか可能性を検討した上で、適用の可能性のあるものに関して、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て研究を行なった。30年度も引き続き「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討とした。「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、 ^1H -qNMR法での定量が可能かの検討を行った。30年度は、クミン種子を原材料とした既存添加物の規格試験法へのアプローチとして、クミンの指標成分として適切であろう cuminaldehyde の ^1H -qNMR法を用いた定量の検討を行い、クミン種子の抽出物中に含まれる cuminaldehyde の ^1H -qNMR法を用いた定量法を確立した。また、フェヌグリークを原材料とした既存添加物の規格試験法へのアプローチとして、まず指標成分となる化合物探索を行ない、trigonelline が指標成分になりうることがわかった。

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。

30年度も既存添加物である「香辛料抽出物」に着目して研究を行った。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。規格基準は

定められていないが、そもそも多くの素材が材料として規定されているため、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。29年度には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 ^1H -NMRスペクトルを測定して ^1H -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。その中でクミンの種子とフェヌグリークの種子の抽出物のスペクトルで、 ^1H -qNMRに適用できるシグナルが観測されていた。クミン種子では、含有される cuminaldehyde (Fig. 1)を定量できる可能性があることから、30年度はクミンを主な基原とする「香辛料抽出物」について ^1H -qNMR法を用いた cuminaldehyde の定量が適用できるかの検討を行うことにした。一方、フェヌグリークの種子では、 ^1H -qNMR法が適用可能と思われる特徴的なシグナルを与える成分が不明であった。そこで、フェヌグリークの種子ではまずその成分の特定から検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試薬等

DSS- d_6 (Fig. 2)は和光純薬の Trace Sure®規格のものを用いた。Cuminaldehyde は東京化成のものを用いた。NMR 用溶媒の methanol- d_4 と dimethylsulfoxide (DMSO)- d_6 は Isotec Inc. のそれぞれ 99.8, 99.9 atom %D をを用いた。

B-2) 装置等

秤量には島津製作所の精密電子天秤 AUW120D 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。

B-3) ^1H -qNMR 法を用いたクミン種子中の cuminaldehyde の定量

今年度は、クミン種子抽出物で観測された独立したシグナルが、クミン種子に含有される特徴的な精油成分である cuminaldehyde のホルミル基プロトン由来と推定された。市販の cuminaldehyde の ^1H -NMR スペクトルと比較したところ、ホルミル基プロトンと特定できたことから、まず、cuminaldehyde の ^1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と、粉末生薬中の cuminaldehyde の定量を行うことにした。

B-3-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- d_6 約 5 mg を精秤して 2.00 mL の methanol- d_4 に溶かして内部標準用溶液とした。

Cuminaldehyde 標準品を用いた ^1H -qNMR は次のように行った。Cuminaldehyde 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 cuminaldehyde 標準品の製品を開封してそのまま用いた。cuminaldehyde 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 DSS- d_6 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。

クミン種子粉末は、まずデシケータ中で一晚乾燥させた。これらの約 100 mg を精秤して 1.00 mL の methanol- d_3 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 DSS- d_6 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。クミンから製造された既存添加物の「香辛料抽出物」は入手できず、既存添加物での試験ができなかった。

B-3-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Cuminaldehyde とクミン種子粉末抽出液の ^1H -NMR を測定し、cuminaldehyde のホルミル基 H のシグナルが 89.92 ppm に現れることを確認した (Fig. 3)。 ^1H -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、cuminaldehyde のホルミル基 H のシグナルと 0.00 ppm とした DSS- d_6 のシグナルの面積を比較して次式に従って cuminaldehyde の濃度を算出した。

$$C_{ca} = \frac{I_{ca}}{I_D} \times C_D$$

ただし、 C_D 、 C_{ca} はそれぞれ DSS- d_6 及び cuminaldehyde のモル濃度 (mol/mL)、 I_D 、 I_{ca} はそれぞれ DSS- d_6 及び cuminaldehyde の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-4) ^1H -qNMR 法を用いたフェヌグリーク中の成分定量のための指標成分の単離と同定

フェヌグリークの種子粉末抽出液の ^1H -NMR スペクトルで、 ^1H -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 (Fig. 4A) が、これを示す化合物が不明であった。そこでまず、この化合物の単離と同定を行なった。

フェヌグリークの種子 50 g を MeOH で抽出して 5.2 g の抽出物を得た。この抽出物を *n*-hexane と 80% MeOH-水で分配し、80% MeOH-水画分を乾固後、*n*-BuOH と水で分配し、それぞれを乾固して *n*-BuOH 画分 2.81 g、水画

分 1.45 g を得た。この水画分うちの 500 mg を順相シリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH-水=6:4:1) を用いて分画, さらに逆相 ODS カラムクロマトグラフィー (MeOH-水=4:1) で分画したところ, 目的のシグナルを持つ化合物を 35.5 mg 得た。

C. 結果及び考察

C-1) 実験結果

C-1-a) クミン種子中の cuminaldehyde の定量

Cuminaldehyde 標準品中の cuminaldehyde の定量を ¹H-qNMR 法でおこなった結果, 92.3±1.4% と見積もられた。

クミン種子の生薬粉末中の cuminaldehyde の定量では, 4 サンプルについて ¹H-qNMR 法を用いた定量を実施し, 0.36±0.02%~1.84±0.06% という結果を得た。以上の結果は Table 2 に示した。

C-1-b) フェヌグリーク中の成分定量のための指標成分の単離と同定

単離された化合物の ¹H-qNMR スペクトル (methanol-d₄ 中) を Fig. 4B に示した。目標としていた 9.19 ppm のシグナルが観測され, 8.7 ppm に二重線と思われるシグナルが重なり合って 2 種類, 8.05 ppm に三重線, 4.21 ppm にメチル基と思われるシグナルが観測され, 非常に単純な化合物であることが推定された。8.7 ppm 付近のシグナルが近接して解析しにくいことから溶媒を DMSO-d₆ に変えて測定したところ, 各シグナルが分離された (Fig. 4C)。この状態で ¹³C-NMR スペクトル (Fig. 5), 2次元 NMR スペクトル (Fig. 6) を測定したところ Table 3 に示すような化学シフト値, HMBC 相関などが見られたことから, この化合物を trigonelline と決定した (Fig. 7)。文献値の ¹H-NMR スペクトルもよく一致した [1]。各炭素, 水素の帰属は Table 3 に示した。

C-2) 考察

C-2-a) クミン種子中の cuminaldehyde の定量

Cuminaldehyde 標準品中の含有率 92.3% 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。精油成分ということで, メーカーでの純度測定が GC でなされており, 検出できない夾雑物が無視されて高く見積もられていると考えられる。また, 開封後の水蒸気の混入や若干の揮発などで純度が下がったかなども要因と考えられ, 従来法での精油成分の定量の難しさと, 定量 NMR 法の優位性を示すデータと考えられる。

生薬粉末に含まれる cuminaldehyde は 0.36~1.84% という含有率で品目によって幅が広がった。購入時期がバラバラで, 含有量が一番少ないクミン粉末は購入後 1 年以上のものであったこと, さらに cuminaldehyde が精油であることから, 粉末化してからの時間経過により成分が揮散したことに起因することも考えられた。

クミン由来の「香辛料抽出物」が入手できずに今回測定できなかった。今後何らかの手立てを用いて入手を試みたい。

C-2-b) フェヌグリーク中の成分定量のための指標成分の単離と同定

フェヌグリークに特徴的なシグナルが, trigonelline の 2 位プロトンのもので特定することができ, trigonelline がフェヌグリーク含有の「香辛料抽出物」の規格基準策定の指標成分として活用できる見込みがあった。ところで, trigonelline はコーヒーの生豆に含有されていると報告はある [1]。そこで, コーヒーの生豆粉末の MeOH 抽出物の ¹H-qNMR スペクトルも測定した。フェヌグリークと比較して芳香族領域のシグナルが多いことから, ¹H-qNMR スペクトルで十分に判別できると考えられた (Fig. 8)。

よって, この後, 単離した trigonelline を標準物質としてフェヌグリーク種子中とフェヌグリーク由来の「香辛料抽出物」に含まれる trigonelline の定量に 9.16 ppm に観測される 2 位のプロトンシグナルを測定シグナルとして ¹H-qNMR 法を適用できるかの試験を行う。

D. 結論

1) クミン粉末中の cuminaldehyde の定量条件を確立した。「香辛料抽出物」のうちクミンを主な基原とする「香辛料抽出物」中の規格基準を策定する場合の指標成分として cuminaldehyde を対象とし、その $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。

2) フェヌグリークの抽出物の NMR スペクトルにおいて特徴的で定量 NMR 法適用可能なシグナル示す化合物が trigonelline で、そのシグナルは 2 位プロトン(DMSO- d_6 中で 9.16 ppm)のものであると帰属した。「香辛料抽出物」のうちフェヌグリークを主な基原とする「香辛料抽出物」では、この水素を用いた定量 NMR 法で trigonelline の定量を行うことで、規格基準の策定ができる可能性を示した。

E. 参考文献

[1] Wu, T-S. ら, *Chem, Pharm. Bull.*, **53**(3), 347-349 (2005).

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Fukaya, Shiori; Yoshioka, Hiroki; Nagatsu, Akito, The Kampo formula “Juzen-taiho-to” exerts protective

effects on ethanol-induced liver injury in mice, *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**(3), 105-112 (2018).

2. 学会発表

1) 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, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 「定量 NMR($^1\text{H-qNMR}$)を応用したベニバナ赤色色素・carthamin の定量」, 第 17 回新規素材探索研究会セミナー, P26, (2018.6)(横浜市).

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, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 「定量 NMR 法を応用したベニバナ赤色色素 carthamin の吸光係数の検証」, 第 64 回日本薬学会東海支部大会, H-7S, (2018.6)(名古屋市).

3) 藤原裕未, 本間篤史, 永津明人, 「カエデ属植物の遺伝子鑑別法の開発」, 日本生薬学会第 65 年会, 1P-87, (2018.9)(広島市).

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

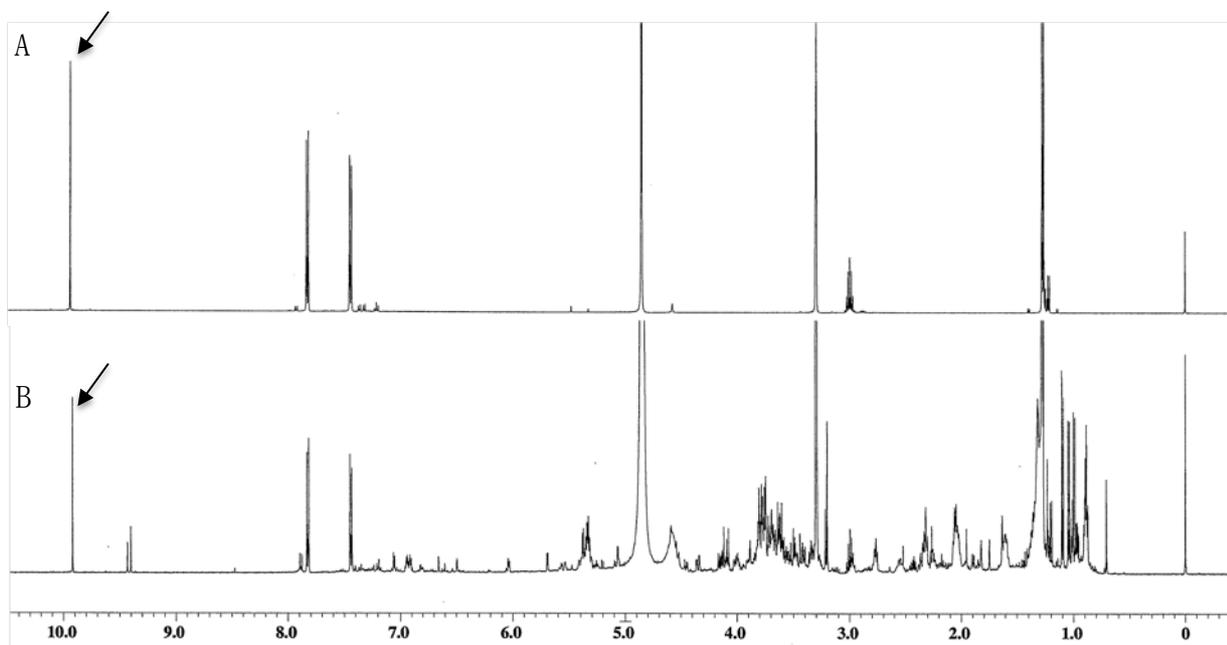


Fig. 3 Cuminaldehyde 標準品(A)とクミン粉末(B)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (methanol- d_3 , 500 MHz)
矢印のシグナルが cuminaldehyde のアルデヒド基の H シグナル (δ 9.92 ppm)

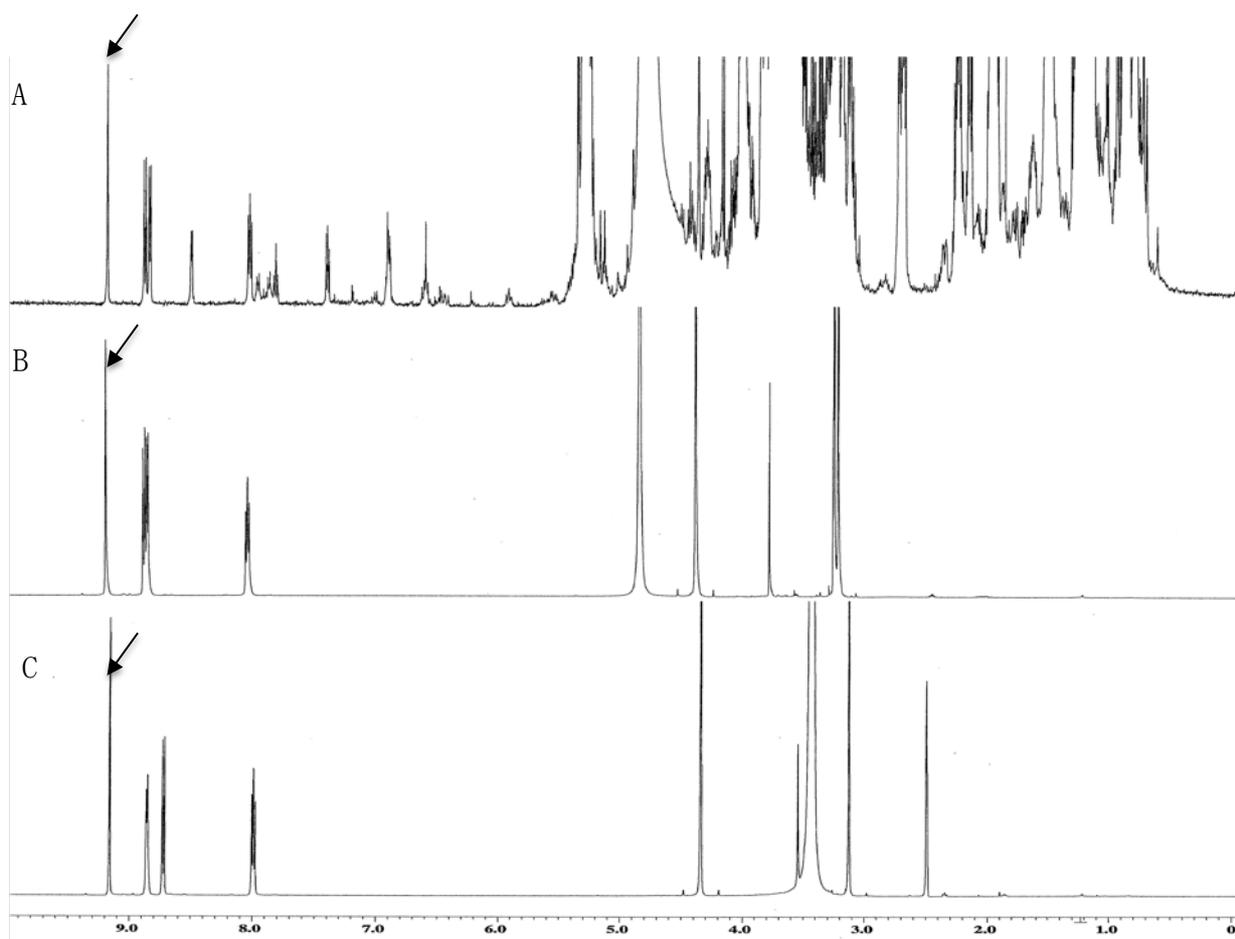


Fig. 4 フェヌグリーク粉末の MeOH 抽出物(in methanol- d_3 , A)と単離した trigonelline の methanol- d_3 中 (B)と DMSO- d_6 中(C)の ^1H -NMR スペクトル (500 MHz)
 矢印のシグナルが trigonelline の 2 位の H シグナル

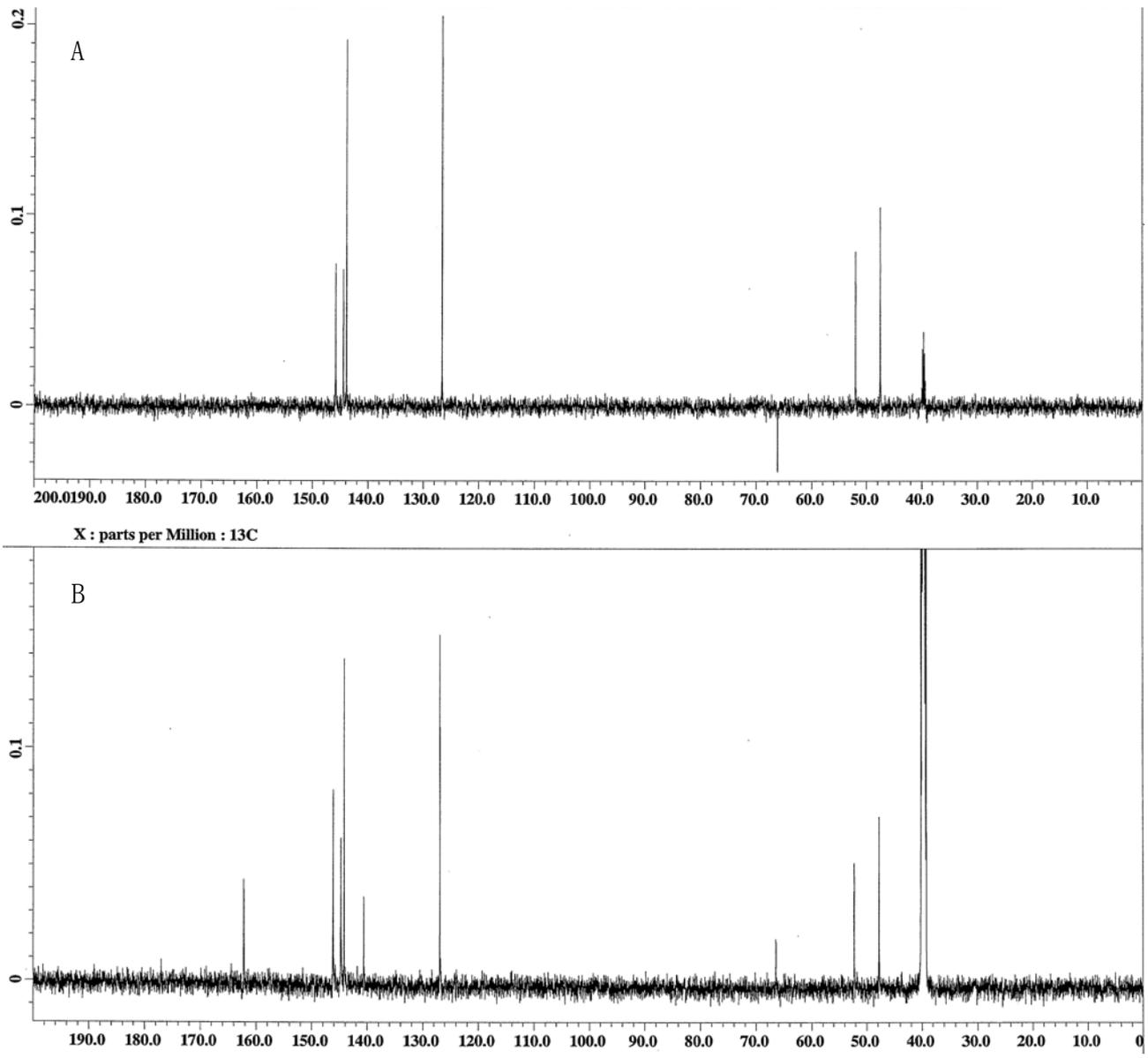


Fig. 5 Trigonelline の ^{13}C -NMR スペクトル ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz)
DEPT135 (A)と完全デカップリング (B)

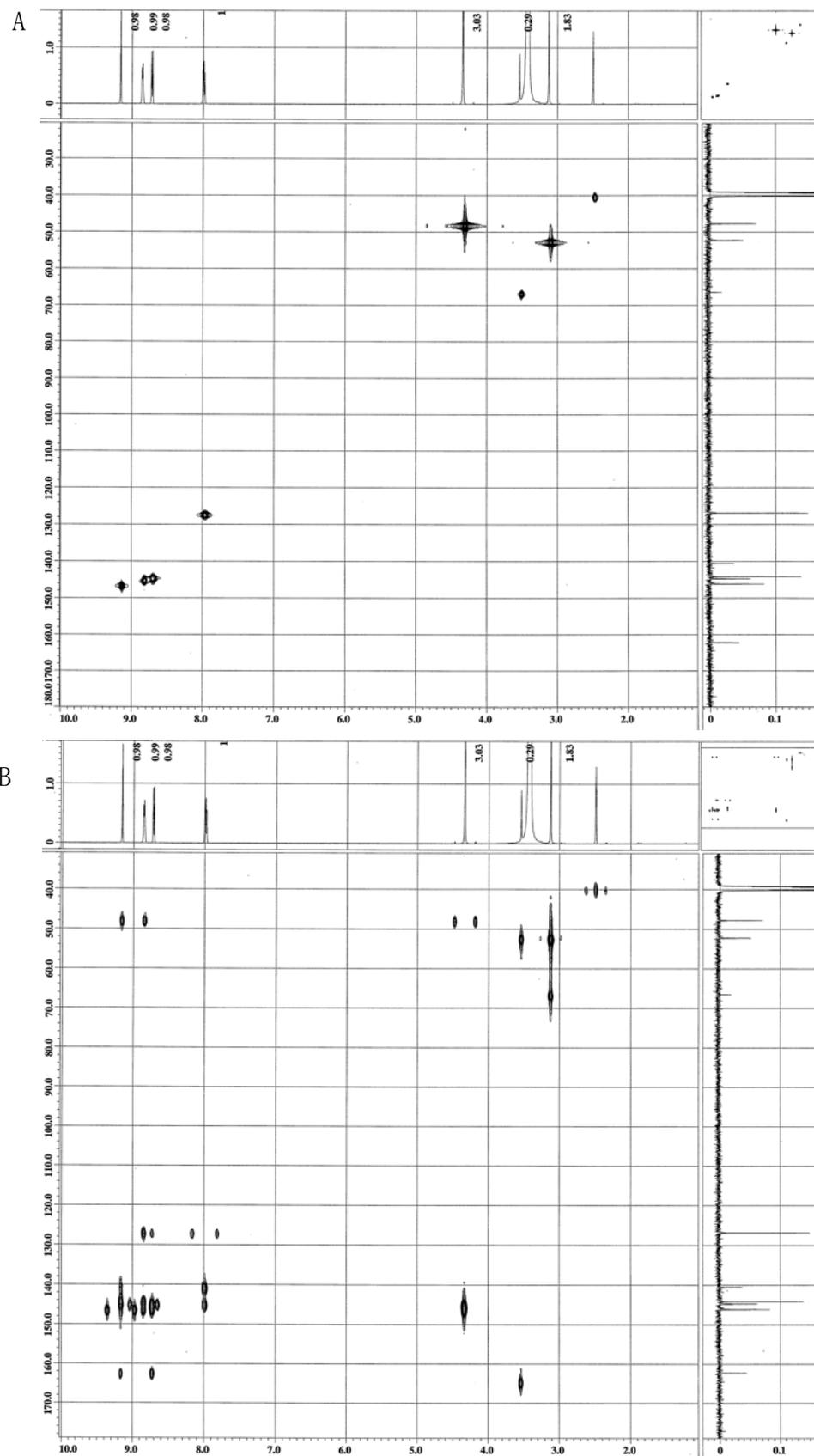


Fig. 6 Trigonelline の HMQC (A) と HMBC (B) のスペクトル (DMSO-*d*₆, 500 MHz)

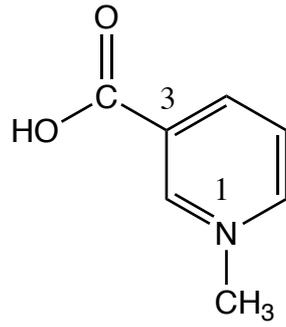


Fig. 7 trigonelline の構造

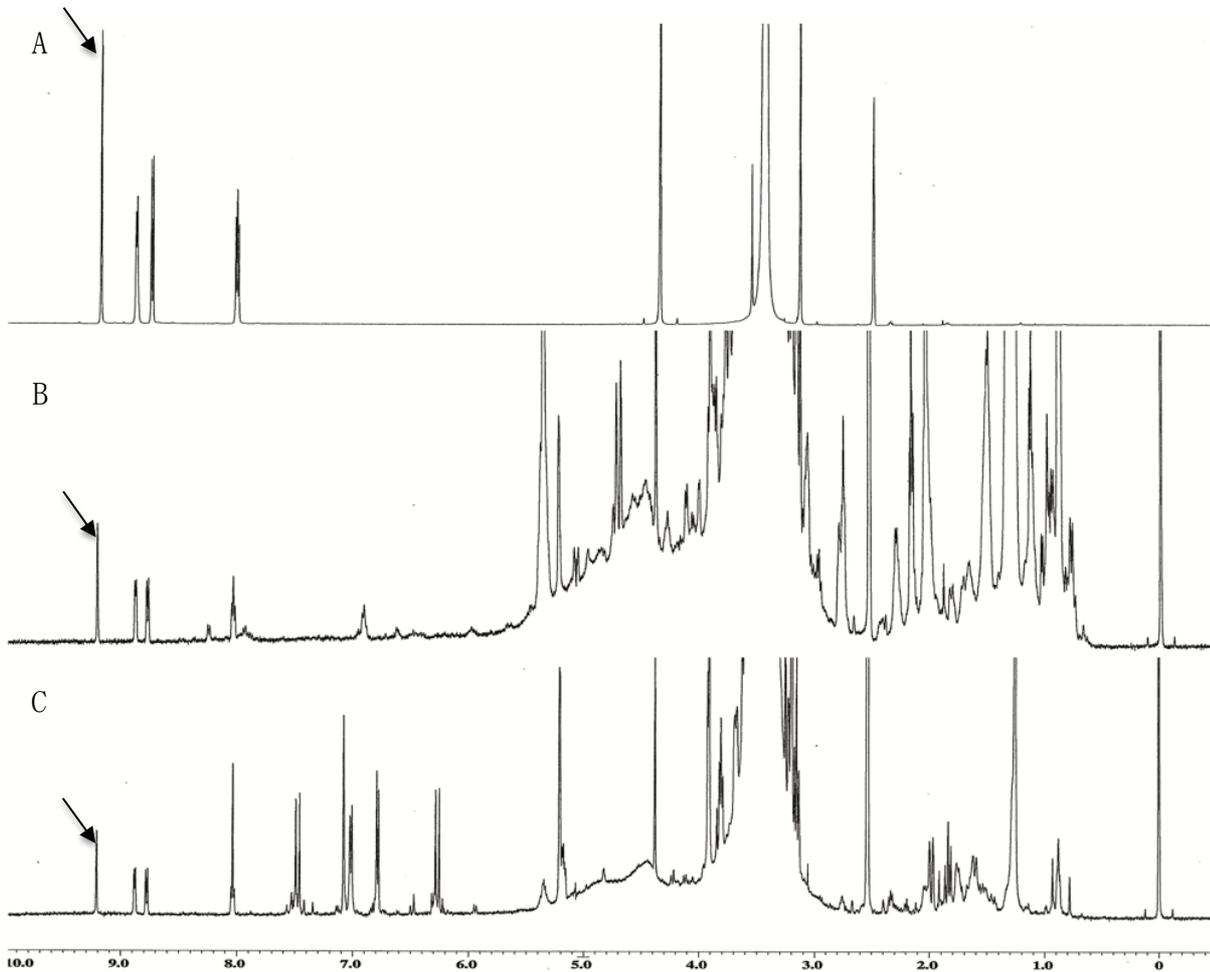


Fig. 8 単離した trigonelline (A), フェヌグリーク粉末の MeOH 抽出物(B)とコーヒー生豆粉末の MeOH 抽出物(C)の ¹H-NMR スペクトル (DMSO-*d*₆, 500 MHz)
矢印のシグナルが trigonelline の 2 位の H シグナル(δ 9.16 ppm)

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°C

Table 2 ^1H -qNMR 法で定量された cuminaldehyde の含有率

samples		含有率(%) \pm SD
cuminaldehyde 標準品	(n=3)	92.3 \pm 1.4
生薬粉末	A (n=3)	0.36 \pm 0.02
	B (n=3)	0.64 \pm 0.02
	C (n=4)	1.06 \pm 0.02
	D (n=3)	1.84 \pm 0.06

Table 3 単離した trigonelline の NMR スペクトルデータ

(in DMSO- d_6 , δ_C : 125 MHz, δ_H : 500 MHz)

No.	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	HMBC (H \rightarrow C)
2	146.1	9.16 (1H, br-s)	140.6, 144.7, 146.1, 162.3
3	140.6		
4	144.2	8.72 (1H, br-d, 7 Hz)	126.2, 144.7, 146.3, 162.3
5	126.9	7.95 (1H, t, 7 Hz)	140.6, 144.2
6	144.7	8.85 (1H, br-d, 7 Hz)	126.9, 144.2, 146.1
<i>N</i> -CH ₃	47.8	4.34 (3H, s)	144.7, 146.1
CO ₂ H	162.3		