

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分析手法に関する研究  
～相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法に関する研究～  
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、<sup>1</sup>H-qNMRとLCを組み合わせた相対モル感度（RMS）法の酵素処理ナリンジン中のナリンジンおよび主要な糖転位ナリンジン類（ナリンジンのグルコースの3位にグルコースが $\alpha$ -1,4結合で順次1～4個結合した化合物）の定量への適用性について検討した。ナリンジンおよび4-ヒドロキシ安息香酸メチルを定量用標品として選択し、得られたナリンジンまたは4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対する主ナリンゲニン配糖体のRMS（ナリンジン：0.994～1.00，4-ヒドロキシ安息香酸メチル：1.23～1.24）から酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび主要な糖転位ナリンジン類の含量を各測定対象を標品とする絶対検量線法と絶対検量線法と同程度に正確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9版食品添加物公定書に記載されている。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<sup>1)</sup>。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<sup>2,3)</sup>。qNMRのうち、<sup>1</sup>H-NMRを利用したqNMR（<sup>1</sup>H-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  $^1\text{H}$ -qNMR は、AQARI (Accurate QuAntitative NMR with Internal reference material) と呼ばれ、残留農薬試験用標品や日本薬局方試薬などの純度分析<sup>4,5,6)</sup>、生薬や既存添加物中の主要成分の含量分析<sup>7,8,9)</sup>へ利用されている。また、最近では、計量計測トレーサビリティを確保した  $^1\text{H}$ -qNMR と汎用性、普及性、分離性能が高いクロマトグラフィー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相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity, RMS) を用いた分析法 (RMS 法) が考案され、食品や食品添加物などの分析へ利用されている<sup>10-14)</sup>。

そこで本研究では、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、今年度は酵素処理ナリンジン中のナリンジン (図 1) および糖転位ナリンジン類の定量分析における RMS 法の適用性について検討した。

## B. 研究方法

### B-1) 試薬・試液等

酵素処理ナリンジン製品 (試料 1 : A172, 試料 2 : C2010) は国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部よりご供与いただいた。ナリンジンは、シグマアルドリッチ株式会社製 (Cat.No.71162-25G) を用いた。4-ヒドロキシ安息香酸メチルは、東京化成株式会社製 (Cat.No.H0216) を用いた。2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- $d_6$  sodium salt (DSS- $d_6$ ) は富士フィルム和光純薬 (株) 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。重ジメチルスルホキシド (DMSO- $d_6$ ) は関東化学 (株) 製を用いた。その他の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。

なお、試液は以下のように調製した。

$^1\text{H}$ -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  $^1\text{H}$ -qNMR 標準溶液とした。 $^1\text{H}$ -qNMR 標準溶液の DSS- $d_6$  濃度 (0.1999 mg/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) 製)

分析用 HPLC : 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, カラム恒温槽 : CTO-10AS, 紫外可視分光検出器 : SPD-10AV, 脱気装置 : DGU-12A, データ処理装置 : LabSolutions) ((株) 島津製作所製)。

分析用 HPLC : (株) 東ソー製 LC システム (ポンプ : CCPS, システムコントローラー : SC-8020, 脱気装置 : SD-8022) に紫外可視分光検出器 (SPD-10A, (株) 島津製作所製) およびカラム恒温槽 (CTO-6A, (株) 島津製作所製) を接続したもの。

マイクロ天秤 : BM-20 ((株) エー・アンド・デイ製)

セミマイクロ天秤 : AUW220D ((株) 島津製作所製)

### B-3) 相対モル感度 (RMS) を利用した HPLC によるナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の定量

#### B-3-1) 糖転位ナリンジン類の分画

試料 1 (A172) 4 g について分取 HPLC 条件 1 による分画を行い、Fr.A から Fr.H を得た。得られた画分のうち、Fr.D から Fr.H について、分取 HPLC 条件 2 による精製を行い、Fr.F, Fr.G および Fr.H より  $\alpha$ -Glycosyl naringin (Naringenin 7-*O*-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-G**, 8.4 mg), Fr.F より Naringenin 7-*O*-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-2G**, 15 mg), Fr.E より Naringenin 7-*O*-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-3G**, 9.0 mg) およ

び Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-4G**, 7.6 mg) をそれぞれ単離した。また、別途試料 2 (C-2010) 0.8 g について分取 HPLC 条件 1 および 2 による分画を行い、 $\alpha$ -Glycosylnaringin (**Naringin-G**) を 13.4 mg 単離した。

・分取 HPLC 条件 1

カラム：Develosil ODS-UG-5 (10  $\times$  250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m 野村化学株式会社製), カラム温度: 45°C, 検出波長: 280 nm, 流速: 5.0 mL/min, 溶離液: 20vol%アセトニトリル

・分取 HPLC 条件 2

カラム：Develosil ODS-UG-5 (4.6  $\times$  250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m, 野村化学 (株) 製), カラム温度: 45°C, 検出波長: 280 nm, 流速: 1.0 mL/min, 溶離液: 20vol%アセトニトリル

**B-3-2) <sup>1</sup>H-qNMR によるナリンジン, 糖転位ナリンジン類および 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの純度測定**

Naringin-3G は 7.6 mg, Naringin-4G は 9.0 mg, ナリンジン, Naringin-G, Naringin-2G は 10 mg, ナリンジンおよび 4-ヒドロキシ安息香酸メチルは 15 mg を精密に量り, <sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>H-qNMR 測定を行った。DSS-*d*<sub>6</sub> のシグナル面積強度を 9.000 としたときの各化合物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, 各試料の含量 (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,  $I_{\text{sample}}$  = 測定対象の特定基のシグナル面積強度,  $I_{\text{std}}$  = 内標準物質のシグナル面積強度 (DSS-*d*<sub>6</sub> : 9.000),  $H_{\text{sample}}$  = 測定対象の特

定基の水素数,  $H_{\text{std}}$  = 内標準物質の特定基の水素数 (DSS-*d*<sub>6</sub>:CH<sub>3</sub> $\times$ 3=9),  $M_{\text{sample}}$  = 測定対象の分子量,  $M_{\text{std}}$  = 内標準物質の分子量 (DSS-*d*<sub>6</sub> : 224.36),  $W_{\text{sample}}$  = 測定対象の秤取量 (mg),  $C_{\text{std}}$  = <sup>1</sup>H-qNMR 標準溶液の DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度

なお, qNMR の化学シフト値は, DSS-*d*<sub>6</sub> のプロトンシグナルを基準 ( $\delta$  0 ppm) とし,  $\delta$  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-3-3) 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の RMS の算出**

4-ヒドロキシ安息香酸メチル, ナリンジン, 酵素処理ナリンジン類 (Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G) について, <sup>1</sup>H-qNMR により算出された含量 (純度) に基づく次の濃度範囲 (ナリンジン: 1.3 ~ 105  $\mu$ mol/L, Naringin-G : 1.1 ~ 91  $\mu$ mol/L, Naringin-2G : 0.9 ~ 76  $\mu$ mol/L, Naringin-3G : 1.3 ~ 107  $\mu$ mol/L, Naringin-4G : 1.1 ~ 88  $\mu$ mol/L, 4-ヒドロキシ安息香酸 : 5.8 ~ 93  $\mu$ mol/L) で 9 ~ 10 点濃度の溶液 (溶媒: 20vol%アセトニトリル) をそれぞれ調製し, これらの溶液を以下の HPLC 条件にて分析した。

カラム：Develosil ODS-UG-5 (4.6  $\times$  250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m, 野村化学 (株) 製), カラム温度: 45°C, 検出波長: 280 nm (ナリンジンおよび糖転位ナリンジン), 254 nm (4-ヒドロキシ安息香酸メチル), 流速: 0.9 mL/min, 溶離液: 0.1vol%ギ酸含有 20vol%アセトニトリル, 注入量: 10  $\mu$ L

原点を通る各試料の回帰直線の傾き (モル吸光係数) を算出し, 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジンおよび酵素処理ナリンジン類の回帰直線の傾きの比 (ナリンジンまたは酵素処理ナリンジン類の傾き / 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの傾き) から 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジンおよび酵素処理ナリンジン類の RMS を算出した。

#### B-3-4) ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS の算出

B-3-3 の項に示した各試料の回帰直線の傾き（モル吸光係数）を基に，ナリンジンに対する酵素処理ナリンジンの RMS を算出した。

#### B-3-5) RMS を用いた酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジンの定量

試料約 10 mg を精密に量り，水を加え超音波で溶解し正確に 10 mL とした後，メンブランフィルター（孔径 0.45 μm）でろ過したものを試験溶液とした。標準溶液は，4-ヒドロキシ安息香酸メチルおよびナリンジンについて調製した。4-ヒドロキシ安息香酸メチル（純度：93.8%）では，本品 15 mg を精密に量り，20vol%アセトニトリルを加え 100 mL としたものを標準原液①とした（濃度：140 μg/mL）。標準原液①1 mL を正確にとり，20vol%アセトニトリルを加え 10 mL とした（濃度：14 μg/mL）後，この溶液 3 mL を正確にとり 20vol%アセトニトリルを加え 5 mL としたものを標準溶液①とした（0.0084 mg/mL, 55 μmol/L）。ナリンジン（純度：81.1%）では，本品 15 mg を精密に量り，20vol%アセトニトリルを加え 100 mL としたものを標準原液②とした（濃度：122 μg/mL）。標準原液②10 mL を正確にとり，20vol%アセトニトリルを加え 20 mL とした（濃度：61 μg/mL）後，この溶液 5 mL を正確にとり 20vol%アセトニトリルを加え 10 mL としたものを標準溶液②とした（0.0031 mg/mL, 53 μmol/L）。これら試験溶液および標準溶液①または②を以下の HPLC 条件にて分析した。

カラム：Develosil ODS-UG-5（4.6×250 mm，粒子径 5 μm，野村化学（株）製），カラム温度：45°C，検出波長：280 nm（ナリンジンおよび糖転位ナリンジン），254 nm（4-ヒドロキシ安息香酸メチル），流速：0.9 mL/min，溶離液：0.1vol%ギ酸 20vol%アセトニトリル，注入量：10 μL

得られた試験溶液中のナリンジンおよび

糖転位ナリンジンのピーク面積  $A_{\text{Sample}}$  及び標準溶液中の4-ヒドロキシ安息香酸メチルまたはナリンジンのピーク面積  $A_{\text{Ref}}$  から，次式により含量を求めた。

$$\text{Content (\%)} = \frac{C_{\text{REF}}}{C_{\text{T}}} \times \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Ref}}} \times \frac{M_{\text{Sample}}}{M_{\text{Ref}}} \times \frac{1}{\text{RMS}} \times 100$$

ただし， $C_{\text{T}}$  は試験溶液 1 mL あたりの試料の量（mg）， $C_{\text{REF}}$  は標準溶液①または②1 mL あたりの4-ヒドロキシ安息香酸メチルまたは定量ナリンジンの量（mg）， $M_{\text{Sample}}$  は測定対象の分子量， $M_{\text{Ref}}$  は定量用標品（4-ヒドロキシ安息香酸メチル：152.15，ナリンジン：580.54）の分子量，RMS：4-ヒドロキシ安息香酸メチルまたはナリンジンに対する測定対象の相対モル感度である。

#### B-3-6) 測定対象の絶対検量線法による酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジンの定量

試験溶液および HPLC 条件は，B-3-5 の項に示す方法に従った。なお，糖転位ナリンジン類の検量線用標準溶液は，各試料の含量（純度）に基づく次の濃度範囲（ナリンジン：0.76～61 μg/mL，Naringin-G：0.85～68 μg/mL，Naringin-2G：0.86～68 μg/mL，Naringin-3G：1.4～114 μg/mL，Naringin-4G：1.3～108 μg/mL）で9～10点濃度の溶液（溶媒：20vol%アセトニトリル）をそれぞれ調製した。

調製した試験溶液を分析し，ピーク面積と検量線によって得られた試験溶液中のナリンジンおよび各糖転位ナリンジン濃度（μg/mL）を求め，次式によって試料中の各糖転位ナリンジン含量（%）を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \frac{C \times W}{W \times 1000} \times 100$$

ただし，C は試験溶液 1 mL あたりの測定対象の量（μg），V は試験溶液の量（mL），W は試料の採取量（mg）である。

### B-3-7) グルコアミラーゼを用いた酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の定量

食品添加物公定書に記載されている酵素処理ヘスペリジンの定量法を参考にナリンジン、 $\alpha$ -Glycosylnaringin、 $\alpha$ -グルコシル残基量を定量し、その合計から総ナリンゲニン配糖体の含量 (%) を求めた。

#### B-3-7-1) ナリンジンおよび Naringin-G の定量

乾燥した製品約 1 g を精密に量り、水 100 mL に溶解した。この溶液をアクリル酸エステル吸着用樹脂（アンバーライト XAD-7HP）50 mL を充填した内径約 25 mm のガラス管に注ぎ、1 分間に 2.5 mL の速さで流出させた後、水 250 mL で洗浄した。次に、50vol% エタノール 200 mL を 1 分間に 2.5 mL の速さで流し、吸着画分を溶出させた。この溶出液を濃縮して全量を約 40 mL とした後、グルコアミラーゼ 10000 単位を添加し 55°C で正確に 30 分間放置した。さらに、95°C で 30 分間加熱した後、室温まで冷却し水を加えて正確に 50 mL とし、A 液とした。この液 3 mL を正確に量り、20vol% アセトニトリルを加えて正確に 50 mL とし、試験溶液とした。別に乾燥した定量用 Naringin-G 約 10 mg を精密に量り、20vol% アセトニトリルに溶かして正確に 10 mL とし、標準溶液とした。試験溶液および標準溶液をそれぞれ 10  $\mu$ L ずつ量り、B-3-3 の項で示した HPLC 条件にて分析した。試験溶液のナリンジン及び Naringin-G のピーク面積  $A_N$  及び  $A_G$  並びに標準溶液の Naringin-G のピーク面積  $A_R$  を測定し、次式によりナリンジン及び Naringin-G の含量を算出した。

ナリンジン含量：

$$\text{Content (\%)} = \frac{C_G}{W} \times \frac{A_N}{A_R} \times \frac{50}{10} \times \frac{50}{3} \times \frac{580.53}{742.68} \times 100$$

Naringin-G 含量：

$$\text{Content (\%)} = \frac{C_G}{W} \times \frac{A_G}{A_R} \times \frac{50}{10} \times \frac{50}{3} \times 100$$

ただし、W は試料採取量 (g)、 $C_G$  は定量用 Naringin-G の採取量 (g) である。

#### B-3-7-2) グルコアミラーゼ処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基量の定量

B-3-7-1 の項で得られた A 液 20  $\mu$ L を量り、D-グルコース定量用発色試液 3 mL を正確に加えて振り混ぜた後、37°C で正確に 5 分間放置した。室温まで冷却したものを試験溶液とし、波長 505 nm における吸光度を測定した。対照には、水 20  $\mu$ L を用いて試験溶液と同様に操作した液を用いた。別に空試験を行い、補正した。ただし、空試験溶液は、水約 40 mL にグルコアミラーゼ 10000 単位を添加し、55°C で 30 分間放置した後、95°C で約 30 分間加熱した。室温まで冷却した後、水を加えて正確に 50 mL とし、空試験溶液を試験溶液と同様に操作して吸光度を測定した。別に D (+) -グルコース標準溶液（濃度 0.5, 1, 2, 5 mg/mL）を調製した。これらの標準溶液については、試験溶液と同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作成した。この検量線と補正した検液の吸光度から試験溶液中の D (+) -グルコース濃度を求め、次式によりグルコアミラーゼ処理により遊離する  $\alpha$ -グルコシル残基量を求めた。

$$\text{Content (\%)} = \frac{C \times V}{W \times 1000} \times \frac{162}{180} \times 100$$

ただし、C は試験溶液 1 mL あたりの D (+) -グルコースの量 ( $\mu$ g)、V は試験溶液の量 (50 mL)、W は試料の採取量 (mg) である。

#### B-3-7-3)

##### 総ナリンゲニン配糖体含量の算出

次の計算式により、総ナリンゲニン配糖体の含量を求めた。

総ナリンゲニン配糖体含量 (%)  
= ナリンゲン含量 (%) +  $\alpha$ -Glycosyl  
naringin 含量 (%) + グルコアミラーゼ処理  
により遊離した  $\alpha$ -グルコシル残基量  
(%)

## C. 結果及び考察

### C-1) 糖転位ナリンジン類の分画

酵素処理ナリンジンは、ナリンジンにシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase) を作用させ、ナリンジンに様々な長鎖をもつ  $\alpha$ -1,4-glucan 鎖 (ポリマルトース) を付加して水溶性を高めた食品添加物であり、苦味料として利用されている。本研究では、酵素処理ナリンジン中のナリンジンや糖転位ナリンジンの定量分析における RMS 法の適用性を明らかにするため、RMS の算出に必要な糖転位ナリンジン類の単離を試みた。まず、酵素処理ナリンジン (試料 1 : A172, 試料 2 : C-2010) を HPLC で分析したところ、図 1 に示すクロマトグラムが得られた。そこで、Peak D (Fr.D), E (Fr.E), F (Fr.F), G (Fr.G) および H (Fr.H) を分画の対象とし、分取 HPLC による分画を行った。その結果、図 2 に示すように、試料 4 g を用いた分画では、Fr.F, Fr.G および Fr.H より  $\alpha$ -Glycosyl naringin (Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-G**, 8.4 mg), Fr.F より Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-2G**, 15 mg), Fr.E より Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-3G**, 9.0 mg) および Naringenin 7-O-[ $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)}- $\beta$ -D-glucopyranoside] (**Naringin-4G**, 7.6 mg) をそれぞれ単離した (図 3)。なお、

本分画より Naringin (4.8 mg) を併せて単離した。また、試料 2 (C-2010) 0.8 g を用いた分画から、Naringin-G を 13.3 mg を単離した (図 4)。なお、これらの化学構造は質量分析 (ESI, negative) および NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC) (Data not shown) より同定した。

ESI-MS (negative)

Naringin-G :  $m/z$  742 ( $M^-$ ), Naringin-2G : 904 ( $M^-$ ), Naringin-3G :  $m/z$  1066 ( $M^-$ ),

Naringin-4G : 1228 ( $M^-$ )

### C-2) $^1\text{H}$ -qNMR によるナリンジン、糖転位ナリンジン類および 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの純度測定

ナリンジン、糖転位ナリンジン類は、280 nm および 340 nm 付近に吸収極大をもつ化合物である。これらの吸収極大や文献<sup>13)</sup>を参考に、今回の RMS 法における定量用標品として 4-ヒドロキシ安息香酸メチルを選択した。また、ナリンジンを定量用標品とする RMS 法による糖転位ナリンジン類の定量について併せて検討した。まず、正確な RMS の算出にあたり、単離した化合物や市販試薬の正確な純度を明らかにすることは非常に重要である。そこで、これらの純度を明らかにするため、 $^1\text{H}$ -qNMR を用いることとした。 $^1\text{H}$ -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である。そこで、表 1 に示す測定条件を用いナリンジン、糖転位ナリンジン類および 4-ヒドロキシ安息香酸メチルについて  $^1\text{H}$ -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- $d_6$ :  $\delta$  0 ppm) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。ナリンジンおよび糖転位ナリンジンでは、図 5 に示すように、 $^1\text{H}$  NMR スペクトル上、 $\delta$  1.18 ppm 付

近にラムノースのメチル基に由来するシグナル、 $\delta$  2.70~5.60 ppm にアグリコン (ナリンゲニン) の 2 位, 3 位および糖部に由来するシグナル、 $\delta$  6.00~7.50 ppm にアグリコン (ナリンゲニン) に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのうち、 $\delta$  7.36 ppm に観察されたナリンゲニンの 2' 位および 6' 位の水素に由来するシグナルは、他の分子内のシグナルと十分に分離されていたため、ナリンジンおよび糖転位ナリンジン類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、これらの純度は表 2 に示す結果であることが判明した。

4-ヒドロキシ安息香酸メチルでは、 $\delta$  3.82 ppm にメトキシ基に由来するシグナル、 $\delta$  6.87 ppm に 3 位および 5 位の水素に由来するシグナル (水素数 2)、 $\delta$  7.84 ppm に 2 位および 6 位の水素に由来するシグナル (水素数 2) がそれぞれ観察された (図 6)。これらのうち、 $\delta$  6.87 ppm のシグナルおよび  $\delta$  7.84 ppm のシグナルより純度を算出したところ、93.9% ( $\delta$  6.87 ppm) および 93.8% ( $\delta$  7.84 ppm) 結果となった。このうち、 $\delta$  6.87 ppm より算出された純度 (93.8%) を 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの純度として採用した。

#### C-2-2) 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジン、糖転位ナリンジン類の RMS の算出

4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジン、糖転位ナリンジン類 (Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G) の RMS を検討するため、10 濃度 (5.8, 7.0, 9.3, 12, 23, 28, 46, 56, 74, 93  $\mu\text{mol/L}$ ) の 4-ヒドロキシ安息香酸メチル溶液、9 または 10 濃度のナリンジンおよび糖転位ナリンジン類溶液を B-3-3 に示す HPLC 条件を用いて分析し、得られた各回帰直線の傾きの比から RMS を算出した。図 7 に示すように、4-ヒドロキシ安息香酸メチル、ナリンジン、糖転位ナリンジン類の回帰直線の決定係数は 0.9997~0.9999 と良好であることが確認された。従っ

て、これらの回帰直線は RMS の算出に利用できると考えられた。そこで、各回帰直線の傾き (ナリンジン: 12795, Naringin-G: 12785, Naringin-2G: 12738, Naringin-3G: 12724, Naringin-4G: 12859, 4-ヒドロキシ安息香酸メチル: 10352) から 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジン、糖転位ナリンジン類の RMS を算出したところ、表 3 に示すように 1.23~1.24 であることが判明した。

#### C-2-3) ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS の算出

次に、ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS を検討した。C-2-2 の項で示した各回帰直線の傾きからナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS を算出したところ、表 4 に示すように 0.994~1.00 であることが判明した。

#### C-2-4) RMS を用いた酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジンの定量

酵素処理ナリンジン製品 2 種について、RMS によるナリンジンおよび糖転位ナリンジン (Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G) の含量測定を行い (n=3)、各測定対象を標品とした絶対検量線法により算出された含量と比較した。各酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジン含量を表 5 および表 6、各酵素処理ナリンジン製品の LC クロマトグラムは図 8 にそれぞれ示した。4-ヒドロキシ安息香酸メチルを定量用標品とした RMS により算出されたナリンジン、糖転位ナリンジン類 (Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G) の含量は各測定対象の標品を用いた絶対検量線法により算出された含量と有意な差は認められなかった。また、ナリンジンを定量用標品とした RMS により算出された糖転位ナリンジン類の含量についても、各測定対象の標品を用いた絶対検量線法により算出された含量と有意な差は認められなかった。

次に、食品添加物公定書において、酵素処理ヘスペリジン、酵素処理イソクエルシトリンの定量法で採用されている方法（従来法）に従って、酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量を算出し、先程示した4-ヒドロキシ安息香酸メチルを定量用標品とする RMS 法により求められたナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の含量の合算値と比較した。その結果、公定法により算出された総ナリンゲニン配糖体含量は試料 1 (A172) で 12.9%、試料 2 (C2010) で 29.3% であり、RMS 法により算出されたナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の合算値（試料 1 : 6.4%、試料 2 : 19.3%）より高い値を示した（表 7）。これは RMS の測定対象が Naringin-4G までであることに起因しており、それらより早く溶出する糖鎖長の長い糖転位ナリンジン類の各製品中の含量が両分析法の定量値の違いに大きく影響したものと考えられた。

#### 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、酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンおよび糖転位ナリンジン（Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G）を対象とした RMS 法による定量法について検討を行った。

測定対象とは異なる定量用標品（4-ヒドロキシ安息香酸メチル）に対するナリンジンおよび糖転位ナリンジンの RMS（1.23~1.24）により算出された各測定対象の含量は、従来法（各測定対象を標品とした絶対検量線法）より得られた含量と有意な差は認められなかった。同様に、ナリンジンに対する糖転位ナリンジンの RMS（0.994~1.00）により算出された糖転位ナリンジン含量は従来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、酵素処理ナリンジン製品中のナリンジンや糖転位ナリンジン（Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G）の含量を正確かつ安価に定量できることが判明

した。一方、酵素処理ナリンジン製品中の糖転位ナリンジンについては、Naringin-4G にさらに様々な鎖長のポリマルトースが付加した化合物が存在していることが明白であることから、どのくらいの糖鎖長をもつ糖転位ナリンジンまでを定量の対象とするかを明確にすることで、酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の算出における RMS 法の有効性が高まるものと考えられた。

#### 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 <sup>1</sup>H-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. Nishizaki, Y., Sato-Masumoto, N., Yokota, A., Mikawa, T., Nakanishi, K., Yamazaki, T., Kuroe, M., Numata, M., Ihara, T., Ito, Y., Sugimoto, N., Sato, K.: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. Food Additives and contaminants: Part A, **35**, 838-847 (2018).
  11. 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 <sup>1</sup>H-quantitative NMR. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **59**, 1-10 (2018).
  12. Takahashi, M., Nishizaki, Y., Morimoto, K., Sugimoto, N., Sato, K., Inoue, K.: Design of synthetic single reference standards for the simultaneous determination of sesamin, sesamol, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity. Separation Science plus, **1**, 498-505 (2018).
  13. 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 <sup>1</sup>H-quantitative NMR. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **59**, 1-10 (2018).
  14. 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**  
学会発表
1. 大槻崇, 松田美優, 松下明里, 小島豪, 松岡聖朗, 西崎雄三, 増本直子, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛: 日本薬学会第 139 年会(2019.3) (千葉市).
- G. 知的財産権の出願. 登録状況**  
なし

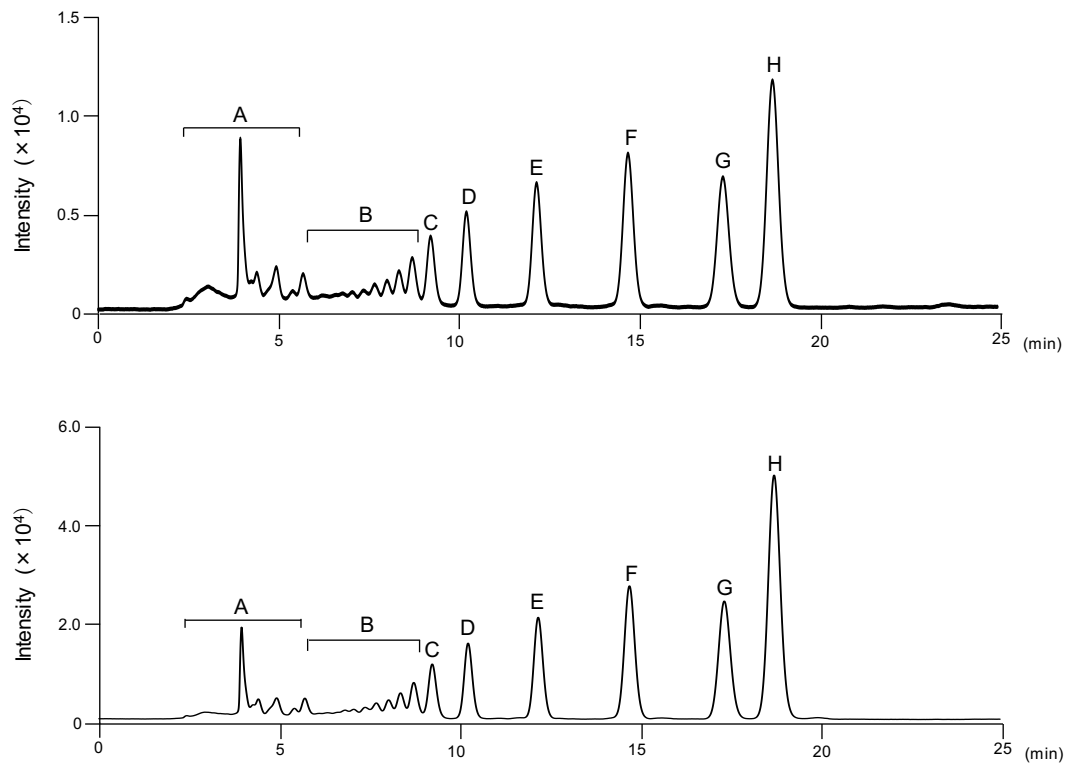


図1 酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム  
 上段：試料1 (A172)，下段：試料2 (C2010)

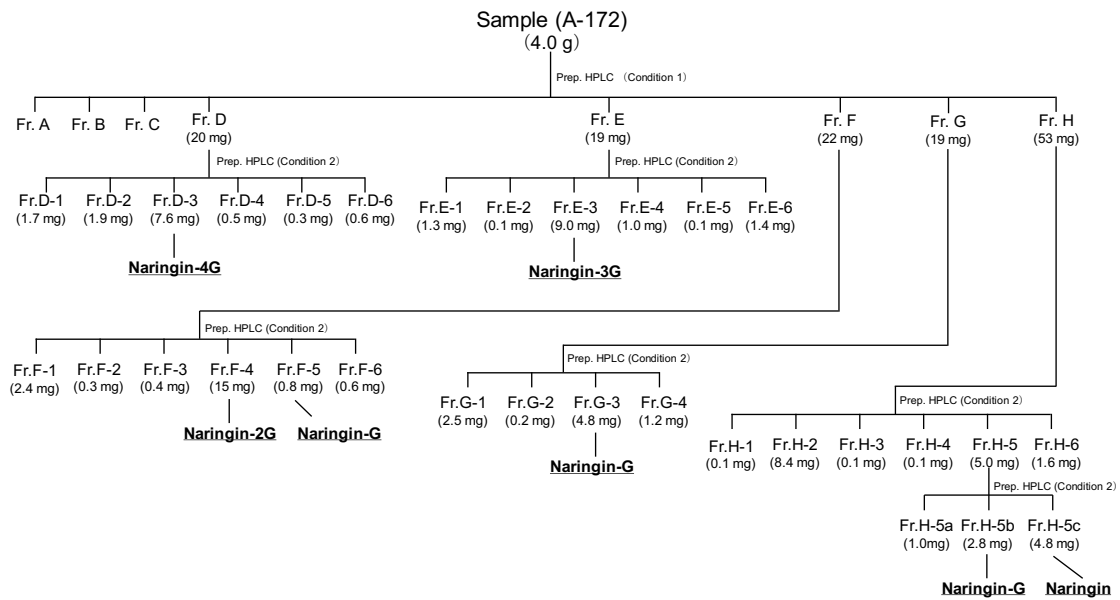


図2 酵素処理ナリンジン製品 (試料1：A172) からの糖転位ナリンジン類の単離

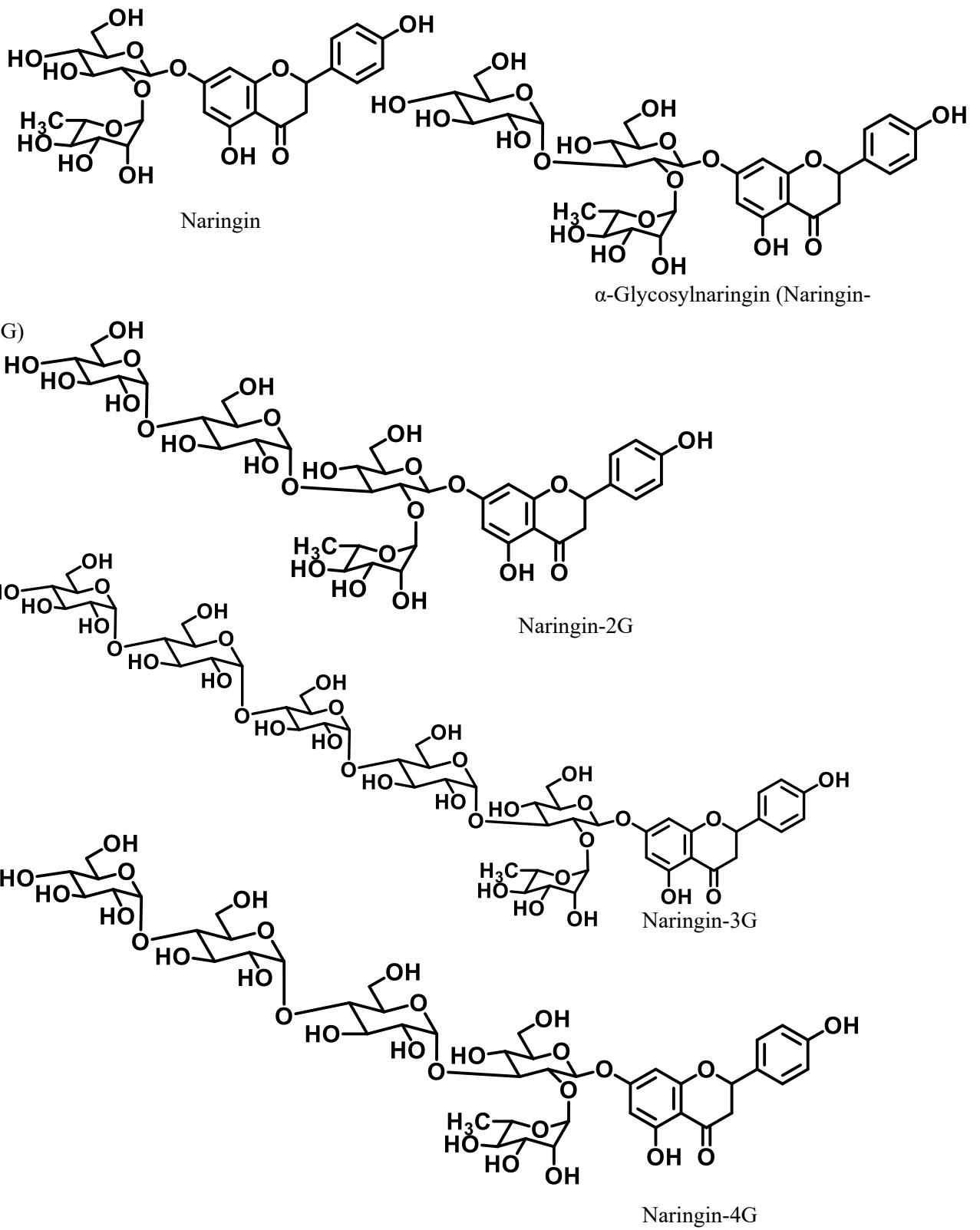


図3 ナリンジンおよび単離した糖転位ナリンジン類の化学構造

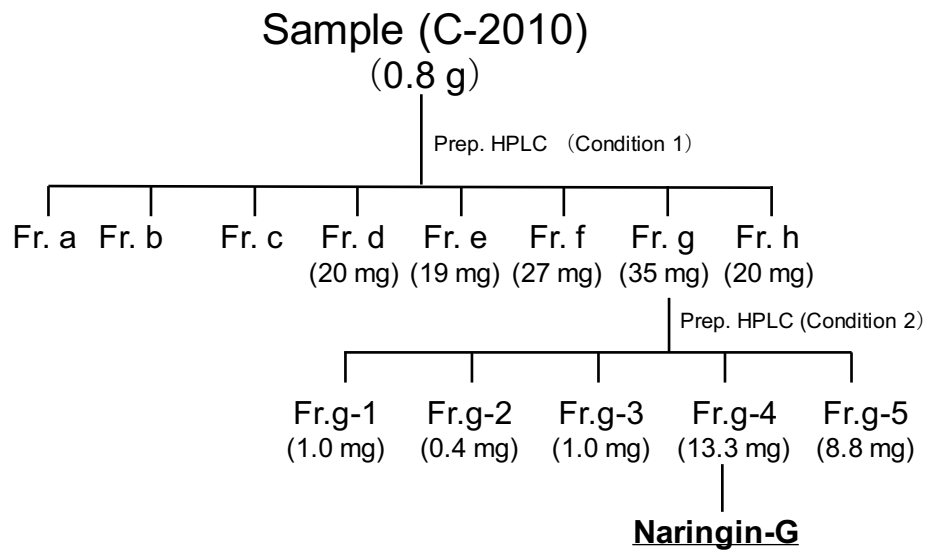


図4 酵素処理ナリンジン製品 (試料2 : C2010) からの  $\alpha$ -Glycosyl naringin (Naringin-G) の単離

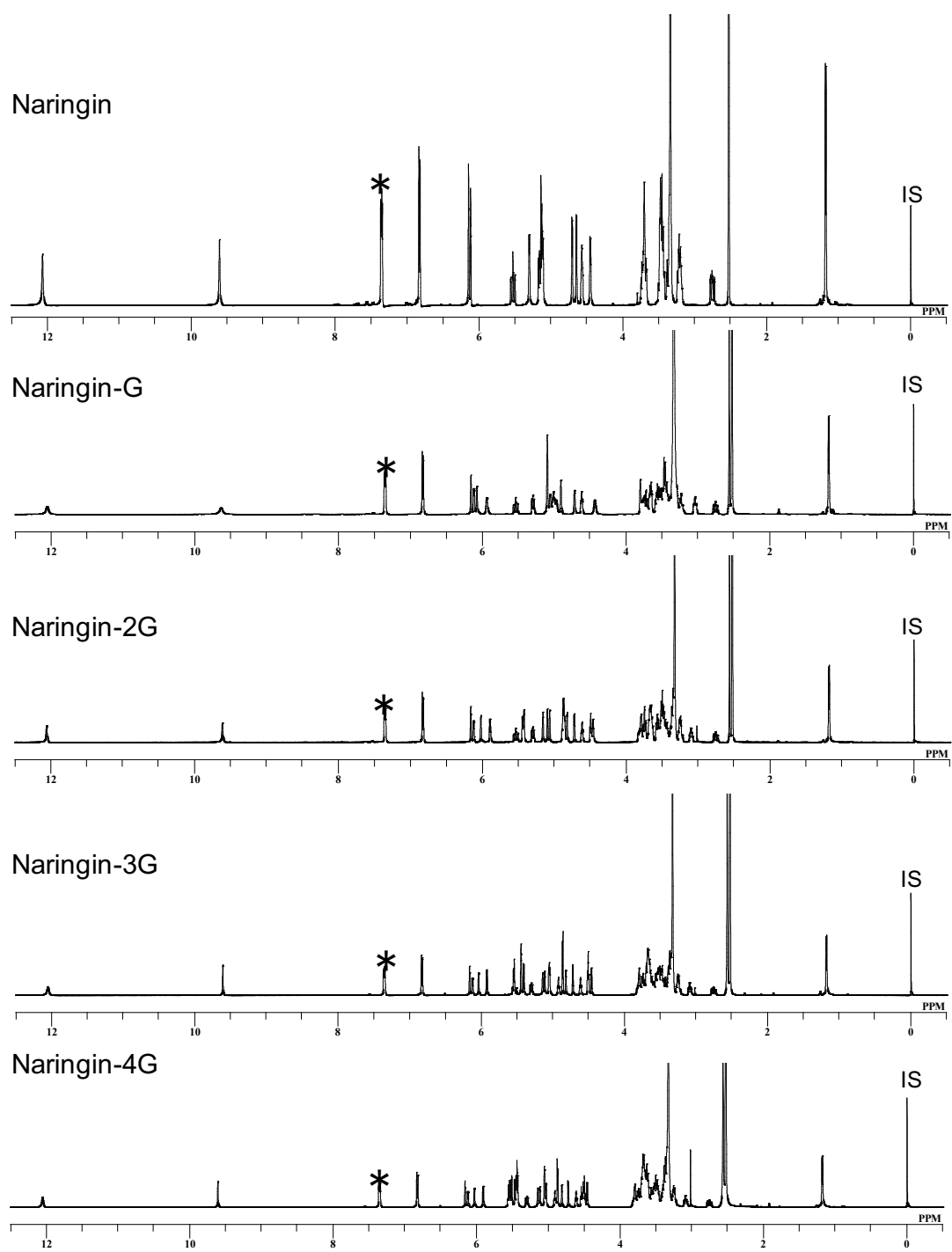


図5 ナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル  
\* : 定量シグナル

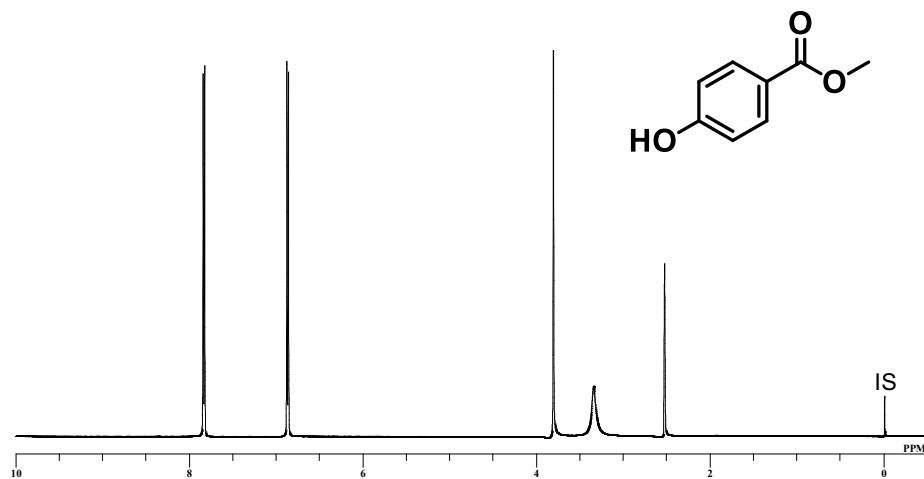


図 6 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの化学構造および<sup>1</sup>H-qNMR スペクトル

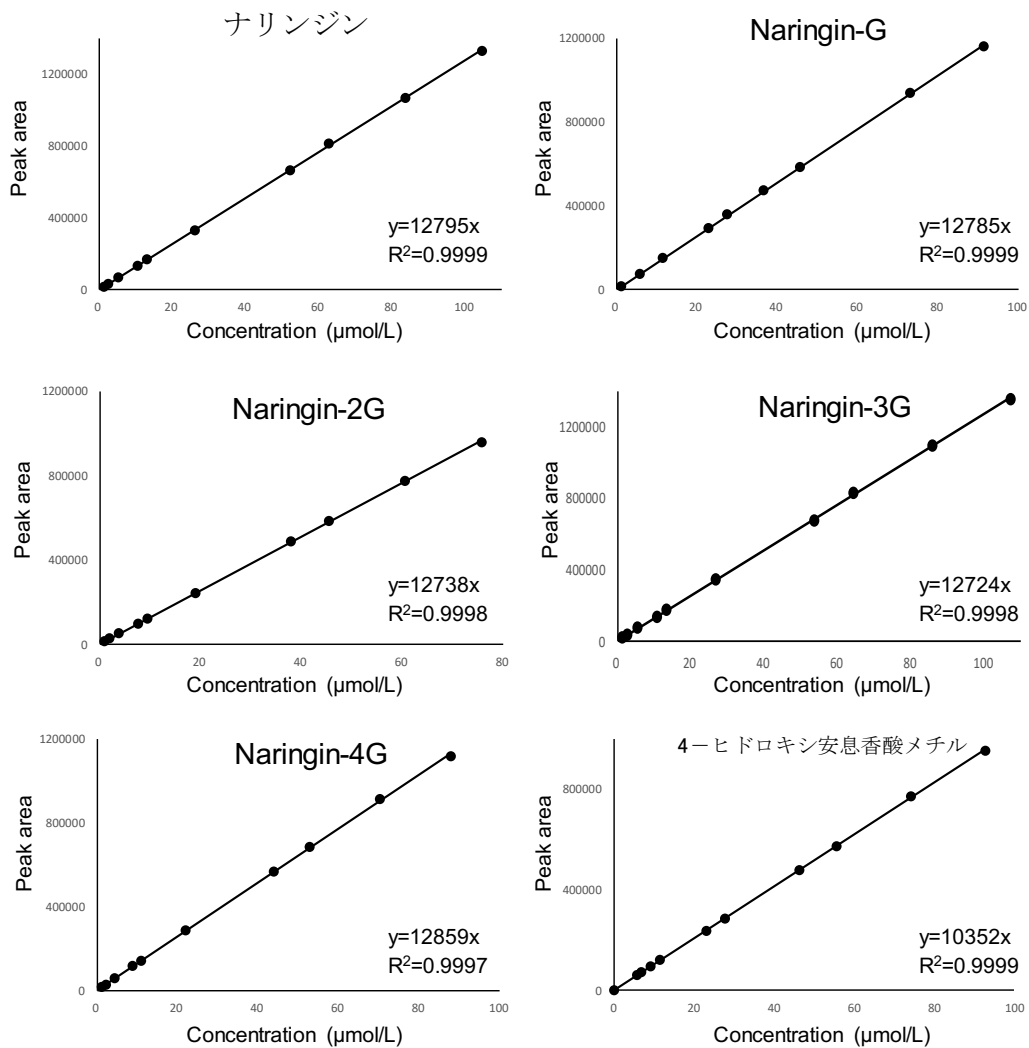


図 7 各測定対象および定量用標品の回帰直線

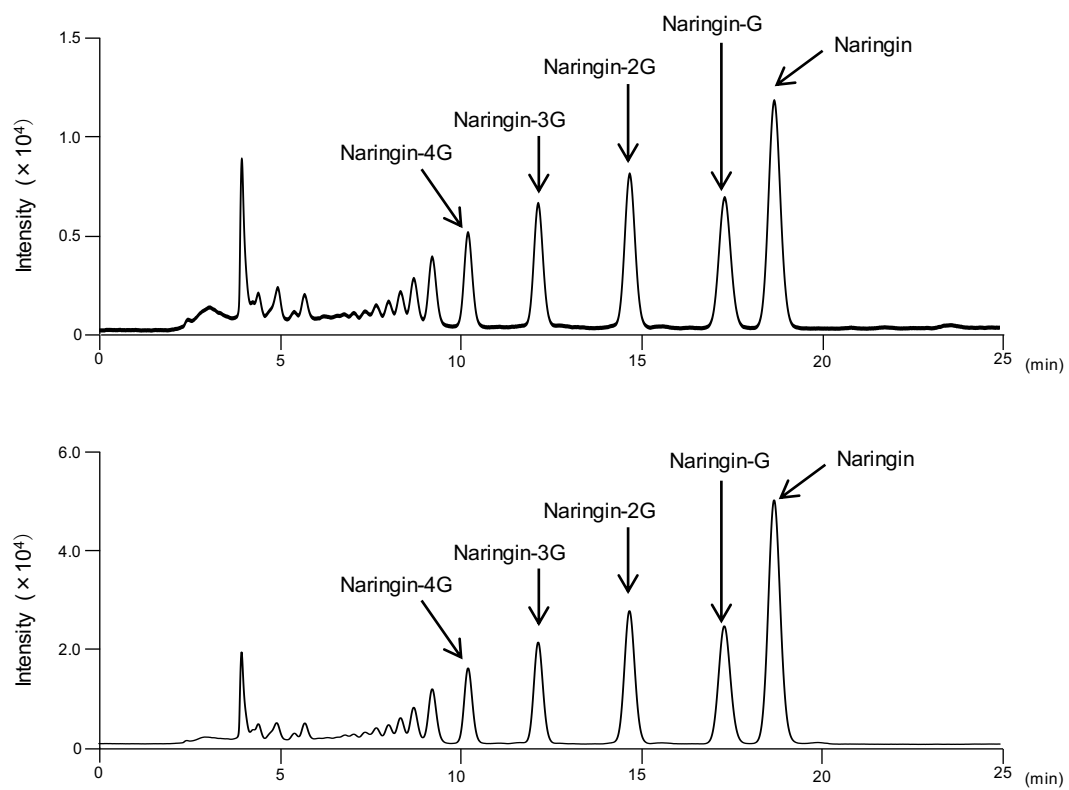


図 8 酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム

上段：試料 1 (A172), 下段：試料 2 (C2010)

表 1 <sup>1</sup>H-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
<sup>13</sup> C decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2 <sup>1</sup>H-qNMR より算出されたナリンジン, 糖転位ナリンジン類, 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの含量 (純度)

	含量 (%)
ナリンジン	81.1
Naringin-G	65.8
Naringin-2G	61.3
Naringin-3G	55.9
Naringin-4G	60.9
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	93.8



表3 4-ヒドロキシ安息香酸メチルに対するナリンジン，糖転位ナリンジン類の  
相対モル感度（RMS）

	RMS
ナリンジン	1.24
Naringin-G	1.24
Naringin-2G	1.23
Naringin-3G	1.23
Naringin-4G	1.24

表4 ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の相対モル感度（RMS）

	RMS
Naringin-G	0.999
Naringin-2G	0.995
Naringin-3G	0.994
Naringin-4G	1.00

表5 各分析手法による酵素処理ナリンジン製品（試料1：A172）中のナリンジン，  
糖転位ナリンジン含量の比較

	RMS法		RMS法		絶対検量線法	
	Standard: 4-ヒドロキシ安息香酸メチル		Standard: ナリンジン		Content (%)	RSD (%)
	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)
Naringin	1.6	0.1	-	-	1.6	0.2
Naringin-G	1.2	0.4	1.2	0.4	1.1	0.4
Naringin-2G	1.5	0.3	1.5	0.6	1.4	0.5
Naringin-3G	1.3	0.8	1.3	0.8	1.2	0.9
Naringin-4G	0.9	0.4	0.9	0.3	0.9	0.4

表 6 各分析手法による酵素処理ナリンジン製品（試料 2 : C2010）中のナリンジン、糖転位ナリンジン含量の比較

	RMS法		RMS法		絶対検量線法	
	Standard: 4-ヒドロキシ安息香酸メチル		Standard: ナリンジン			
	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)
Naringin	5.7	0.1	-	-	5.7	0.2
Naringin-G	3.5	0.9	3.5	0.9	3.5	1.0
Naringin-2G	4.2	1.0	4.2	0.9	4.2	1.0
Naringin-3G	3.4	1.0	3.4	1.0	3.4	1.0
Naringin-4G	2.5	1.0	2.5	1.2	2.5	1.1

表 7 RMS 法および従来法により算出された酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の比較

	RMS法 (%)	従来法 (%)
試料1	6.4	12.9
試料2	19.3	29.3

RMS 法の含量は、ナリンジンおよび糖転位ナリンジン（Naringin-G, Naringin-2G, Naringin-3G, Naringin-4G）含量の合算値である。