

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31年度(令和元年)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 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。31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。31年度は、フェネグreek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、フェネグreekの指標成分として適切であろう trigonelline の ^1H -qNMR法を用いた定量の検討を行い、フェネグreek種子の抽出物中に含まれる trigonelline の ^1H -qNMR法を用いた定量法を確立した。また、コショウ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、まず指標成分となりうる化合物 piperine が ^1H -qNMR法の指標成分になりうるかの検討を行なった。

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。

31年度も引き続き既存添加物である「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。基原が多様な上、用部も明確には書かれておらず、規格基準は定められていない既存添加物である。企画基準を決めるには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

20種類の粉末生薬のMeOH抽出物の ^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。31年度はその中からフェネグreek種子に関して trigonelline (Fig. 1)が指標成分になりうると考え、その定量方法に関する検討を行なった。また、31年度はコショウ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コショウの辛味成分でもある piperine (Fig. 2)の定量を ^1H -qNMRでも適用できるか否かについても検討を行なった。

B. 研究方法

B-1) 試薬等

DSS- d_6 と1,4-BTMSB- d_4 (Fig. 3)は和光純薬のTrace Sure®規格のものを用いた。NMR測定用溶媒の dimethylsulfoxide (DMSO)- d_6 , methano- d_4 , pyridine- d_5 , chloroform- d はそれぞれ Isotec Inc. の99.9, 99.8, 99.5, 99.8 atom %Dを用いた。抽出用の methanol は HPLC グレードのものを用いた。Piperine は和光純薬の生化学用試薬を用い

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 法を用いたフェネグリーク種子中の trigonelline の定量

30 年度の実験では、フェネグリーク種子抽出物で観測された独立したシグナルが、フェネグリーク種子に含有される trigonelline (Fig. 1) の 2 位のプロトンシグナルと特定できたことから、まず、trigonelline の ¹H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と、粉末生薬中の trigonelline 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 はデシケーター中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 1.00 ml の DMSO-*d*₆ に溶かして内部標準用溶液とした。

Trigonelline 標準品としてはフェネグリーク種子から単離したものを用いた。デシケータ中で一晩乾燥させた。約 5 mg を精秤して 1.00 mL の DMSO-*d*₆ 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。

フェネグリーク種子粉末中の trigonelline の抽出は 2 通りの方法で行なった。方法 1 として、まず粉末をデシケータ中で一晩乾燥させた。これらの約 100 mg を精秤して methanol (1.0 mL) に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清を取り出した。この操作をさらに 2 回繰り返し、集めた methanol 抽出液を濃縮乾固した。この抽出物を 1.00 mL の DMSO-*d*₆ に溶かし、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。方法 2 として、乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して DMSO-*d*₆

(1.00 mL) に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、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。方法 2 は操作の簡便化が可能かの検討のため行なった。

ところで、フェネグリーク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はできなかった。一方、コーヒーの種子（いわゆるコーヒー豆）にも trigonelline が含まれている[1]ことから、コーヒーの種子についても同様の実験を試みた。

B-3-b) ¹H-qNMR スペクトルの測定

trigonelline とフェネグリーク種子粉末抽出液の ¹H-NMR を測定し、trigonelline (Fig. 1) の 2 位のプロトンシグナルが 9.16 ppm に現れることを確認した。(Fig. 4) 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、trigonelline の 2 位のシグナルと 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 trigonelline の濃度を算出した。

$$C_T = \frac{I_T}{I_D} \times C_D$$

ただし、 C_D 、 C_T はそれぞれ DSS-*d*₆ 及び trigonelline のモル濃度(mol/mL)、 I_D 、 I_T はそれぞれ DSS-*d*₆ 及び trigonelline の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-4) ¹H-qNMR 法を用いた piperine の定量

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 1.00 mL の pyridine-*d*₅ に溶かして内部標準用溶液とした。

市販試薬の piperine を用いた ¹H-qNMR は次のように行った。Piperine をデシケータ中で一晩乾燥させたのち、約 10 mg を精秤して 1.00 mL の pyridine-*d*₅ に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した 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。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、piperine の 7.52 ppm のシグナルと 0.00 ppm とした BTMSB-*d*₄ のシグナルの面積を比較して次式に従って piperine の濃度を算出した。

$$C_P = \frac{I_P}{I_B} \times C_B$$

ただし、 C_B 、 C_P はそれぞれ BTMSB-*d*₄ 及び piperine のモル濃度(mol/mL)、 I_B 、 I_P はそれぞれ BTMSB-*d*₄ 及び piperine の水素 1 個あたりのシグナル面積。

コショウ種子粉末、ヒハツ種子粉末に含有される piperine の検出では、それぞれの乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して pyridine-*d*₅ (1.00 mL) に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清 0.50 mL と、先に調製した 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。

C. 結果及び考察

C-1) 実験結果

C-1-a) フェネグreek 種子中の trigonelline の定量

単離によって得られた trigonelline 標準品中の trigonelline の定量を ¹H-qNMR 法でおこなった結果、71.3±0.3% と見積もられた。

生薬粉末中の trigonelline の ¹H-qNMR 法を用いた定量では、フェネグreek 種子 1 サンプルとコーヒー種子 2 サンプルについて方法 1 と方法 2 を比較した。その結果、方法 1 ではフェネグreek 種子中の trigonelline が 0.39±0.03%、コーヒー種子中では 0.27±0.02% と 0.39±0.04%、方法 2 ではフェネグreek 種子中の trigonelline が 0.38±0.00%、コーヒー種子中では 0.29±0.02% と 0.39±0.01% という結果を得た。(Table 2) 方法 1 と 2 でほぼ同じ数値が得られた。方法 2 でフェネグreek 種子をもう 1 サンプル測定したところ、0.36±0.01% という結果が得られた。

C-1-b) ¹H-qNMR 法を用いた piperine の定量

Piperine (Fig. 2) の NMR を各種溶媒で測定したところ、いずれの溶媒でもいくつかのプロトン

シグナルが独立したシグナルとして観測された。その中でも、特に pyridine-*d*₅ 中で測定した場合、7.52 ppm に観測された 3 位にあたるカルボニル基β位のオレフィンプロトンシグナル [2] が piperine、コショウ種子粉末、ヒハツ種子粉末のいずれのスペクトルでも他のシグナルと離れて観測された。このシグナルを用いて定量を行った結果、市販の試薬の純度は 98.4% と見積もられた。

C-2) 考察

フェネグreek 種子を素材とする既存添加物での試験はできなかったが、フェネグreek 種子の抽出物での試験結果、trigonelline を指標としてフェネグreek 種子由来の品質の確認ができることがわかった。また、methanol で抽出した上清を集めて作成した抽出物で定量した方法 1 の結果と、DMSO で抽出した上清で定量した方法 2 の結果とがほぼ同じであったことから、より簡便な方法 2 でも十分定量が可能であることがわかった。HPLC との同等性については検討を始めたところであるので、今後、HPLC 法での結果との比較を確認し、¹H-qNMR 法が HPLC より簡便で同等の結果が得られる方法であることを確かめる。

Piperine の定量では、試薬としての piperine を ¹H-qNMR 法で定量できることは確認できた。生薬としてのコショウ粉末の抽出物の NMR を測定したところでは、piperine の 3 位シグナルを独立したシグナルとして観測することができた。また、既存添加物の素材ではないが、健康食品などに用いられる香辛料であるヒハツ種子の抽出物でも 3 位シグナルを独立したシグナルとして観測され、¹H-qNMR 法で定量可能であることが示唆された。いずれもまだ実験回数が足りないため、今後、ばらつきなどのチェックと、さらに HPLC との同等性について検討を行う予定である。

D. 結論

1) フェネグreek 種子粉末中の trigonelline の定量条件を確立した。「香辛料抽出物」のうちフェネグreek 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 trigonelline を対象として，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) コショウなどの辛味成分である piperine の定量が 3 位プロトン(pyridine- d_5 中で 7.52 ppm) を用いて可能であることを示した。コショウを基原とする「香辛料抽出物」の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).
- [2] Sakpakdeejaron, I. ら, *J. Health Res.*, **23**(2), 71-76 (2009).

F. 研究業績

- 1. 学会発表等

- 1) 水野沙稀, 藤原裕未, 内山奈穂子, 袴塚高志, 永津明人, 政田さやか: 機能性表示食品の品質評価に関する研究(5): イチョウ葉エキスに由来する機能性表示食品の崩壊性と溶出性について. 第 8 回食品薬学シンポジウム (2019.10.18.)(静岡)

2. 論文発表等

- 1) 政田さやか, 水野沙稀, 小谷彩加, 藤原裕未, 内山奈穂子, 袴塚高志, 永津明人 : ピペリン及びモノグルコシルヘスヘペリジンを機能性関与成分とする 機能性表示食品の製剤学的品質評価と溶出試験法の検討: *日食化誌*, **26**(3), 147-152 (2019).

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

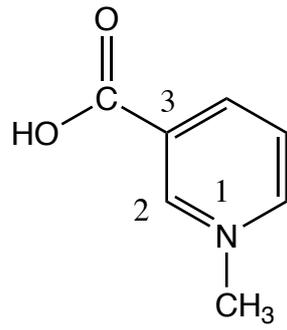


Fig. 1 trigonelline の構造

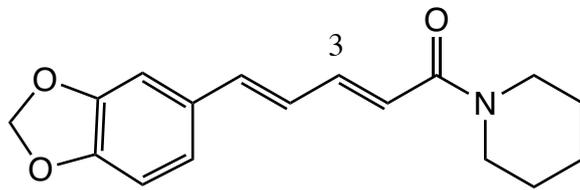


Fig. 2 piperine の構造

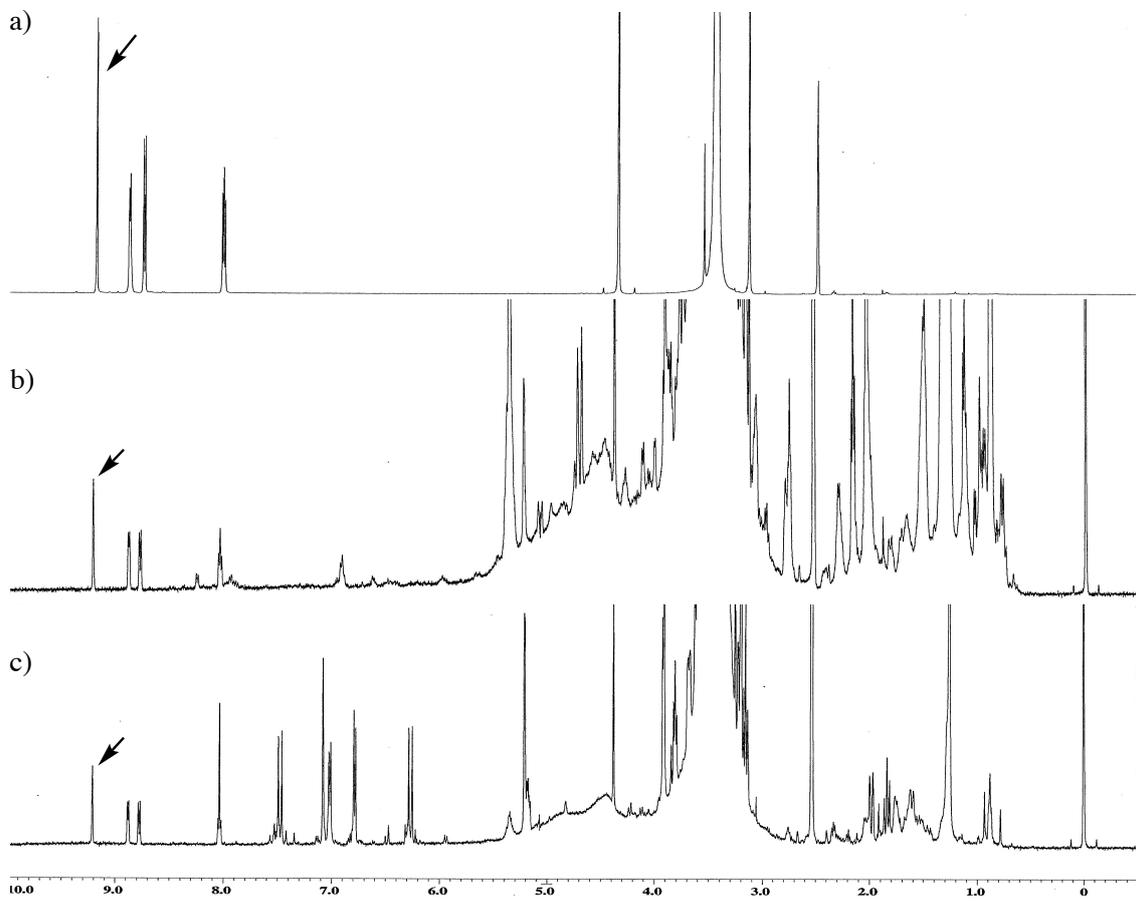


Fig. 4 a) trigonelline と b)フェネグreek種子抽出物と c)コーヒー種子抽出物の ^1H -qNMR スペクトル (in $\text{DMSO-}d_6$)

矢印は trigonelline の 2 位プロトンのシグナル.

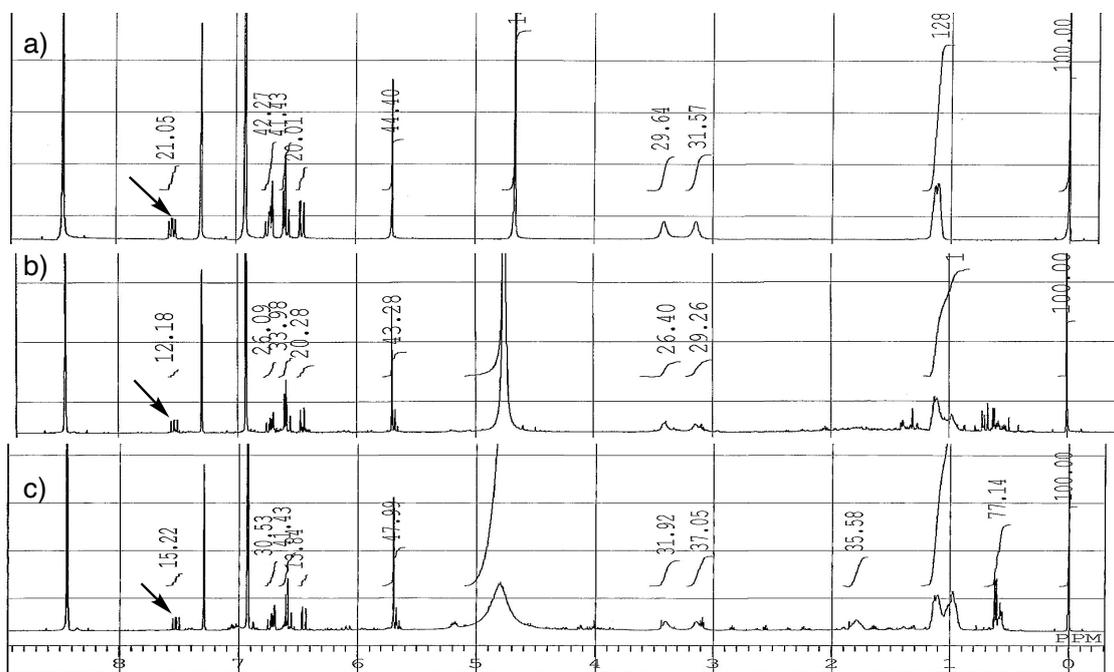


Fig. 4 a) piperine と b) コショウ種子抽出物と c) ヒハツ種子抽出物の ^1H -qNMR スペクトル (in $\text{pyridine-}d_5$)

矢印は piperine の 3 位プロトンのシグナル.

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 trigonelline の含有率

samples		含有率(%)±SD				
単離した trigonelline		(n=3)	71.3 ±0.3			
			方法 1		方法 2	
フェネグリーク種子粉末	1	(n=3)	0.39 ±0.03		0.38 ±0.00	
	2	(n=3)			0.36 ±0.01	
コーヒー種子粉末	1	(n=3)	0.27 ±0.02		0.29 ±0.02	
	2	(n=3)	0.39 ±0.04		0.39 ±0.01	