

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

～RMS を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法～

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、現在、成分規格試験が未設定である酵素処理ナリンジンを対象にその定量法の確立に関する検討を行った。酵素処理ナリンジンのグルコアミラーゼ処理により生成する成分のうち、 α -Glycosyl naringin (Naringin-G)とは市販の定量用試薬が存在しないものの、Naringin-Gとナリンジンの分子量比を係数として用いることにより、ナリンジンからNaringin-Gの定量が可能となることが明らかとなった。また、グルコアミラーゼ処理により生成するナリンジンおよびNaringin-Gの含量および α -グルコシル残基量を合算することにより、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正確な定量が可能であることが明らかとなった。

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。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^{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。また、最近では、計量計測トレーサビリティを確保した¹H-qNMRと汎用性、普及性、分離性能が高い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¹⁰⁻¹⁴⁾。

昨年度、著者は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法に関する検討を行い、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(図1)や α -Glycosyl naringin (Naringin-G)(図1)、Naringenin 7-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (Naringin-2G)、Naringenin 7-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (Naringin-3G) および Naringenin 7-O-[α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)}- β -D-glucopyranoside] (Naringin-4G) などの糖転位ナリンジンの含量を正確かつ安価に定量できることを明らかにした。一方で、酵素処理ナリンジン製品には 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確であることから、これらも含めた総ナリンゲニン配糖体の含量に関する定量法の確立が急務である。そこで今年度は、食品添加物公定書(第9版)に記載されている酵素処理ヘスペリジンの定量法に規定されているグルコアミラーゼを用いた定量法および昨年度の検討結果を参考に、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法に関する検討を実施した。

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(純度:81.1%,¹H-qNMRより算出)。Naringin-Gは、酵素処理ナリンジン製品から単離したものを用いた(純度:65.8%,¹H-qNMRより算出)。D-グルコース定量用発色試薬は富士フィルム和光純薬(株)製グルコースCII-テストワコーを使用した。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。

B-2) 装置

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)。

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) 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、 α -Glycosyl naringin (Naringin-G)、 α -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-3-1) ナリンジンおよび Naringin-G の定量

乾燥した製品約1gを精密に量り、水100mLに溶解した。この溶液をアクリル酸エステル系吸着用樹脂(アンバーライトXAD-7HP)50mLを充填した内径約25mmのガラス管に注ぎ、1分間に2.5mLの速さで流出させた後、水250mLで洗浄した。次に、50vol%エタノール200mLを1分間に2.5mL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40mL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ナリンジンおよび 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 μL ずつ量り、以下に示した 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% ギ酸含有 20vol% アセトニトリル, 注入量：10 μL

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 並びに標準溶液のナリンジンまたは Naringin-G のピーク面積 A_R を測定し (図 2), 次式によりナリンジン及び Naringin-G の含量を算出した。

① ナリンジンを定量用標品とする場合
ナリンジン含量：

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

Naringin-G 含量：

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

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。

② Naringin-G を標品とする場合

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-3-2) グルコアミラーゼ処理により遊離する α-グルコシル残基量の定量

B-3-1 の項で得られた A 液 20 μL 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 μL 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 (+)-グルコース約 1 g を精密に量り、水に溶かして正確に 100 mL とした。この液 5 mL, 10 mL, 20 mL および 30 mL を正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 100 mL としたものを標準溶液とした。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 α-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 (μg), V は試験溶液の量 (50 mL), W は試料の採取量 (mg) である。

B-3-3) 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。

$$\begin{aligned} & \text{総ナリンゲニン配糖体含量 (\%)} \\ & = \text{ナリンギン含量 (\%)} + \text{Naringin-G 含量} \\ & \quad (\%) + \text{グルコアミラーゼ処理により遊離した} \\ & \quad \alpha\text{-グルコシル残基量 (\%)} \end{aligned}$$

C. 結果及び考察

第9版食品添加物公定書における酵素処理ヘスペリジンの成分規格において, 総ヘスペレチン配糖体の含量の定量法としてグルコアミラーゼを用いた方法が規定されている。この方法では, 試料のグルコアミラーゼ処理後, ヘスペリジン, モノグルコシルヘスペリジン (Hesperidin-G) および遊離した α -グルコシル残基量をそれぞれ定量し, その合算値を総ヘスペレチン配糖体の含量としている。本研究では, この方法を参考に酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体の定量法の確立を試みることにした。なお, 総ヘスペレチン配糖体の定量においては, Hesperidin-Gのみを定量用標品として用いてヘスペリジンおよび Hesperidin-Gの含量を算出するよう規定されている。しかし, 酵素処理ナリンジンにおいて, Hesperidin-Gに該当する Naringin-Gは市販されていないことから, これを定量用標品とすることは困難である。一方で, ナリンジンは市販されており, 比較的安価であることから, 定量法標品として使用することには支障がないものと考えられた。そこで, 本検討では, B-3-1に示したように, ナリンジンを定量用標品としてナリンジンおよび Naringin-Gを算出する方法 (A法) と酵素処理ヘスペリジンの成分規格に則した Naringin-Gを定量法標品としてナリンジンおよび Naringin-Gを算出する方法 (B法) の2つの方法について検討し, それぞれから得られたナリンジンおよび Naringin-G含量と遊離した α -グルコシル残基量

を合算し, 両者の総ナリンゲニン配糖体含量を比較した。試料として, 酵素処理ナリンジン製品2種を用いて検討を行った結果, 表1に示すように, 両法より得られた総ナリンゲニン配糖体含量はほぼ同等であることが判明した。また, A法の総ナリンゲニン配糖体含量のRSDは3.1%以下と良好であった。

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の定量法について検討を行った。酵素処理ヘスペリジンの成分規格において規定されているグルコアミラーゼを用いた方法を参考として検討した提案法 (A法) は, 酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体の定量法として有用であることが判明した。また, この方法では Naringin-Gの定量を行う必要があるが, 含量の算出において Naringin-Gとナリンジンの分子量比を計算式に代入することにより, ナリンジンを定量用標品として Naringin-Gの定量が可能となることが明らかとなった。これは, 昨年度の検討において, ナリンジンに対する Naringin-Gの相対モル感度がほぼ1であることから妥当な結論と言える。なお, 今回の提案法 (A法) におけるグルコアミラーゼによる前処理は, 酵素処理ヘスペリジンの他に糖転位ルチン (抽出物) においても成分規格の定量法で採用されており, 汎用性の点においても優れていると言え, 本法の公的な規格試験法としての採用が期待される。

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. 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 ¹H-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, sesamolin, 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 ¹H-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).

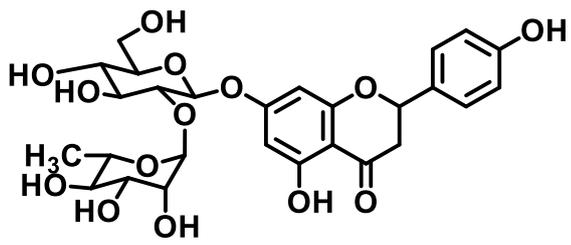
F. 研究業績

学会発表

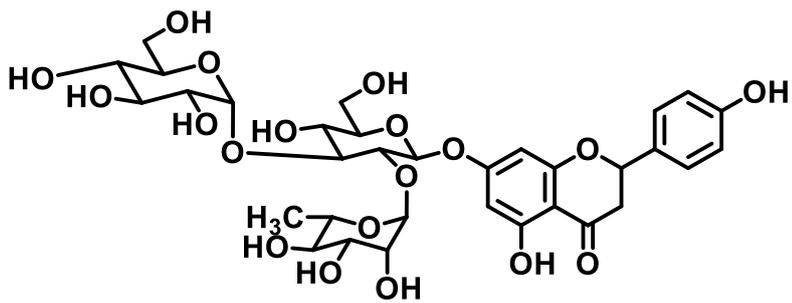
1. 松岡聖朗, 大槻崇, 藤裕志郎, 松下明里, 松田美優, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛, 食品化学学会第 25 回総会・学術大会 (2019.6.7)(松山市)
2. 松岡聖朗, 大槻崇, 石附京子, 藤佑志郎, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛: 日本食品科学工学会第 65 回大会 (2019.8.31) (札

幌市)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし



ナリンジン



α -Glycosylnaringin (Naringin-G)

図1 ナリンジンおよび Naringin-G の化学構造

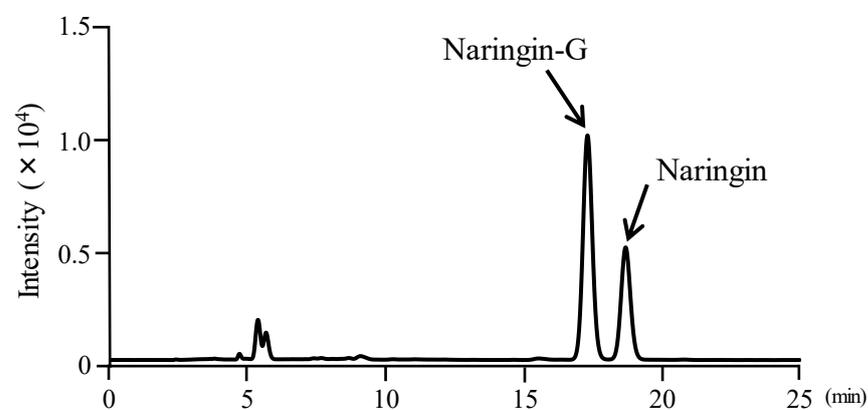
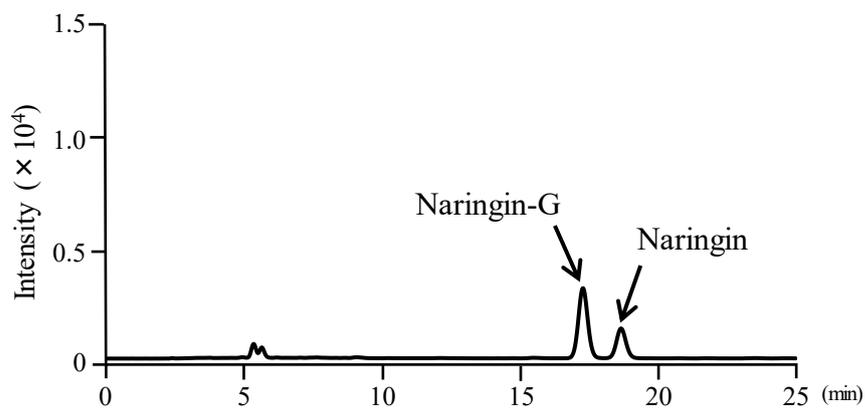


図2 グルコアミラーゼ処理後の酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム
 上段：試料1 (A172), 下段：試料2 (C2010)

表1 各試料中の総ナリンゲニン配糖体含量 (n=3)

	試料1(A172)				試料2(C2010)			
	A法		B法		A法		B法	
	Content (%)	RSD (%)						
ナリンジン	1.7	4.6	1.7	4.6	5.8	4.9	5.7	4.9
Naringin-G	5.2	1.6	5.2	1.6	14.1	2.1	14.0	2.1
α -グルコシル残基	6.0	3.2	6.0	3.2	12.5	3.4	12.5	3.4
総ナリンゲニン配糖体	12.9	1.9	12.9	2.1	32.3	3.1	32.2	3.7