

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29～31年度(令和元年) 総合分担研究報告書

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、 $^1\text{H}$ -qNMR法(定量 $^1\text{H}$ -NMR法)が試験法として適用可能であるか明らかにする目的で、「ベニバナ赤色素」、「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討した。「ベニバナ赤色素」では、赤色本体のcarthaminの $^1\text{H}$ -qNMR法を用いた定量と、その値付けをした溶液を用いてのHPLC定量を用いた実際の試料の定量の条件の検討を行った。また、 $^1\text{H}$ -qNMR法で純度を明らかにしたcarthaminのUVスペクトルを測定して吸光係数を算出した。「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、スターアニスではanisaldehydeを、クミンではcuminaldehydeを、フェヌグリークではtrigonellineを、それぞれ指標成分として $^1\text{H}$ -qNMRの測定条件を確立し、実際に $^1\text{H}$ -qNMR法を用いた定量が実施できることを確認した。コショウでのpiperineの $^1\text{H}$ -qNMR法での定量条件についても検討を行なった。

## A. 研究目的

$^1\text{H}$ -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 $^1\text{H}$ -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。

既存添加物である「ベニバナ赤色素」が成分定量の方法を確立されておらず、規格基準が決められていないことから、色素本体の化合物であるcarthamin(Fig. 1)を直接 $^1\text{H}$ -qNMR法で、あるいは標準品溶液を $^1\text{H}$ -qNMR法で定量したのちHPLC法で既存添加物の定量を行う方法で管理法が確立できるかの検討を行った。合わせて、 $^1\text{H}$ -qNMR法で純度を測定したcarthaminのUVスペクトルを測定して吸光係数の算出を試みた。吸光度からの絶対定量も可能になると考えられる。まず、これまでの文献値が、 $^1\text{H}$ -qNMR法による絶対定量で算出した吸光係数と一致する

かも検討した。これらを通じて、高純度での単離が難しく、試薬としても入手できないcarthaminの正確で簡便な定量法の確立を目指した。

「香辛料抽出物」も規格基準が決められていないが、そもそも多くの素材が材料として規定されていて、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。今回は素材に上げられているもののうち、生薬として市販されているものの抽出物を作成し、 $^1\text{H}$ -qNMR法での測定が可能かどうかの検討を行った。そのうちスターアニスでは、含有されるanisaldehyde(Fig. 2)を定量できる可能性があることから、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」について $^1\text{H}$ -qNMR法を用いたanisaldehydeの定量が適用できるかの検討を行うことにした。クミンの種子の抽出物のスペクトルでは、 $^1\text{H}$ -qNMRに適用できるシグナルが含有されるcuminaldehyde(Fig. 3)のもので、そのcuminaldehydeを定量できる可能性があることから、クミンを主な基原とする「香辛料抽出物」について $^1\text{H}$ -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。フェネグリーク種子に関して

は, trigonelline (Fig. 4)が指標成分になり  
うると考え, その定量方法に関しての検討を行  
なった. 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コショウの  
辛味成分でもある piperine (Fig. 5)の定量を  
 $^1\text{H-qNMR}$ 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BTMSB- $d_4$ (Fig. 6)は和光純薬の  
Trace Sure<sup>®</sup>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) 「ベニバナ赤色素」中のcarthaminの定量

既存添加物の「ベニバナ赤色素」は「ベニバ  
ナの花から得られた, カルタミンを主成分とす  
るものをいう。」と定義され, その本質は「ベニ  
バナ (*Carthamus tinctorius* Linne)の花から  
得られた, カルタミンを主成分とするものであ  
る. デキストリン又は乳糖を含むことがある。」  
とされるもので, 赤色の着色料として用いられ  
る. 純度の高いcarthaminは市販されていない  
ため, まず, 水上らの方法 [1]に従い, 市販既  
存添加物からのcarthaminの単離を行った. 得  
られたcarthaminの $^1\text{H-qNMR}$ の測定を行って純  
度を決定し, そのcarthaminをcarthamin標準  
品, またその $^1\text{H-qNMR}$ の測定を行った溶液を標  
準液として定量の基準とすることにした.

### B-3-a) $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの測定

単離したcarthamin約5 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1,4-BTMSB- $d_4$ (Fig. 6)の溶  
液(2.00 mg/mL, pyridine- $d_5$ ) 0.10 mLをNMR  
試料管にとり, 混和して $^1\text{H-qNMR}$ の測定に供し  
た. 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(Fig. 7)から, carthaminの  
16位Hのシグナル( $\delta$ 9.15 ppm)と0.00 ppmとし  
た1,4-BTMSB- $d_4$ のシグナルの面積を比較して,  
式1に従ってcarthaminの濃度を算出した.

$$C_{ca} = \frac{I_{ca}}{I_B} \times C_B \quad (1)$$

ただし,  $C_B$ ,  $C_{ca}$ はそれぞれ1,4-BTMSB- $d_4$   
及びcarthaminのモル濃度(mol/ml),  $I_B$ ,  
 $I_{ca}$ はそれぞれ1,4-BTMSB- $d_4$ 及び  
carthaminの水素1個あたりのシグナル  
面積.

### B-3-b) HPLCによるcarthaminの定量

市販添加物や生薬中のcarthamin含有量は極  
めて少ないことが推定されることから,  
carthaminの絶対定量では標準品溶液の値付け  
→標準品溶液を使ったHPLC分析という手順と  
った. HPLCの条件は, 昨年度までの研究で確立  
した条件で, カラムにYMC-Pack ODS-AL s-5 250  
mm x 4.6 mm i. d., 温度37°Cで, 溶媒として  
0.5%酢酸-MeOH溶液と0.5%酢酸水溶液のグラジ  
エント(0 min: 50:50→20 min 80:20)を流速  
1.0 ml/minで溶出し, 520 nmでの吸収で検出  
した.

$^1\text{H-qNMR}$ の測定に用いた溶液を5倍ずつ4段階  
に希釈し, それぞれから得られたクロマトグラ  
ム(Fig. 8)のピーク面積から, 検量線を作成し  
た.

各試料の調製は, 「ベニバナ赤色素」の場合は  
約5 mg, 生薬粉末では約100 mgを精秤し, こ  
れに溶媒(MeOH-水)1.0 mLを加えて超音波下  
30分で抽出, 遠沈後その上清をフィルター濾過  
し, HPLC用の溶液とした. 各クロマトグラムの

ピーク面積と検量線から各試料の carthamin の含有率を算出した。

### B-3-c) carthamin の吸光係数

吸光係数の書かれた文献値では EtOH 中 [2] と DMF 中 [3] で測定されているものが報告されている。定量 NMR 法での carthamin の定量 pyridine 中での測定で確立しているが、pyridine は塩基性であり、この溶液を EtOH または DMF で希釈してもポリフェノリックな carthamin の極大波長と吸光係数は pyridine の存在による pH の変化に敏感に反応して変化することが考えられる。ゆえに、定量 NMR 法での carthamin の定量が ethanol- $d_6$  と DMF- $d_7$  中でも可能かの検討をした。可能であれば、その時の溶液を元に希釈して UV スペクトルを測定して、極大吸収波長での吸光係数を求めることにした。UV スペクトルは 23°C で測定した。

### B-4) $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた「香辛料抽出物」中の成分定量

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。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。しかしながらどれかは用いられているはずで、特定の基原を用いているものごとに規格基準を策定することは可能である。そこで、生薬として流通している基原を中心に検討をすることにした。すなわち、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  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定して  $^1\text{H}$ -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。その中でスターアニスの抽出物のスペクトルで独立したシグナルが観測された。この独立シグナルがスターアニスに特徴的な精油成分である anisaldehyde のホルミル基由来のプロトンと容易に特定できたことから、まず、anisaldehyde の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの実施の条件検討と、スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde

の定量、さらに粉末生薬中の anisaldehyde の定量も合わせて行うことにした。

### B-4-a) 「香辛料抽出物」の基原から $^1\text{H}$ -qNMR 法が適用できる生薬のスクリーニング

「香辛料抽出物」の基原のうち、市販で入手が容易であった、ウコン、オールスパイス、カルダモン、クミン、ケシノミ、コショウ、コリアンダー、シナモン (桂皮)、ショウガ、スターアニス、タイム、ディル、トウガラシ、ナツメグ、フェネグリーク、ニンニクの 16 種類の MeOH 抽出物を作成し、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定した。すなわち、各粉末 100 mg に MeOH (1 mL) を加えて超音波下 30 分抽出を行い、遠沈してその上清を得た。この操作を 3 回繰り返し、集めた上清を濃縮乾固、これを methanol- $d_4$  に溶かして  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定した。

### B-4-b) $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いたスターアニス由来「香辛料抽出物」およびスターアニス種子中の anisaldehyde の定量

スターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」について  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた anisaldehyde の定量が適用できるかの検討を行うことにした。また、あわせて、生薬として入手できるスターアニス種子中の anisaldehyde の定量も行なった。

#### B-4-b-1) $^1\text{H}$ -qNMR 法に用いる試料の調製

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 2.00 ml の methanol- $d_4$  に溶かし内部標準用溶液とした。

Anisaldehyde 標準品を用いた  $^1\text{H}$ -qNMR は次のように行った。Anisaldehyde 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 anisaldehyde 標準品の製品を開封してそのまま用いた。anisaldehyde 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 1,4-BTMSB- $d_4$  溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して  $^1\text{H}$ -qNMR の測定に供した。

入手できた既存添加物「香辛料抽出物」のうち 4 種類は水蒸気蒸留で得られた水を含む液体であることから、乾燥などの特段の操作は行わず、

そのままを試験に供した。約 20 mg (20  $\mu$ L) を精秤して methanol- $d_4$  (1.00 mL)を加え、10 分間超音波下においたのち 3 分間遠沈し、わずかに存在する固形物を除去した。この上清 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB- $d_4$  溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して  $^1\text{H}$ -qNMR の測定に供した。

粉末で入手された既存添加物「香辛料抽出物」1 種と粉末生薬の場合は、まずこれらの粉末をシケータ中で一晩乾燥させた。これらの約 200mg を精秤して 1.00 mL の methanol- $d_4$  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 1,4-BTMSB- $d_4$  溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して  $^1\text{H}$ -qNMR の測定に供した。

#### B-4-b-2) $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの測定

Anisaldehyde とスターアニス由来の「香辛料抽出物」、スターアニス生薬粉末の  $^1\text{H}$ -NMR を測定し、anisaldehyde のホルミル基 H のシグナルが  $\delta$  9.82 ppm に現れることを確認した。 $^1\text{H}$ -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、anisaldehyde のホルミル基 H のシグナルと 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナルの面積を比較して、式 2 に従って anisaldehyde の濃度を算出した。

$$C_{\text{an}} = \frac{I_{\text{an}}}{I_{\text{B}}} \times C_{\text{B}} \quad (2)$$

ただし、 $C_{\text{B}}$ 、 $C_{\text{an}}$  はそれぞれ 1,4-BTMSB- $d_4$  及び anisaldehyde 1 のモル濃度 (mol/ml)、 $I_{\text{B}}$ 、 $I_{\text{an}}$  はそれぞれ 1,4-BTMSB- $d_4$  及び anisaldehyde の水素 1 個あたりのシグナル面積。

#### B-4-c) $^1\text{H}$ -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  $^1\text{H}$ -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  $^1\text{H}$ -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-4-c-1) $^1\text{H}$ -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- $d_6$  はデシケータ中で over night 乾燥させた。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  $^1\text{H}$ -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  $^1\text{H}$ -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晩乾燥させた。これらの約 100mg 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  $^1\text{H}$ -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-4-c-2) $^1\text{H}$ -qNMR スペクトルの測定

Cuminaldehyde とクミン種子粉末抽出液の  $^1\text{H}$ -NMR を測定し、cuminaldehyde のホルミル基 H のシグナルが  $\delta$  9.92 ppm に現れることを確認した。(Fig. 3)  $^1\text{H}$ -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。

$$C_{\text{ca}} = \frac{I_{\text{ca}}}{I_{\text{D}}} \times C_{\text{D}}$$

ただし、 $C_{\text{D}}$ 、 $C_{\text{ca}}$  はそれぞれ DSS- $d_6$  及び cuminaldehyde のモル濃度 (mol/ml)、 $I_{\text{D}}$ 、 $I_{\text{ca}}$  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-d) <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いたフェネグリーク種子中の trigonelline の定量

フェネグリークの種子粉末抽出液の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルで、<sup>1</sup>H-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. 15a) 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。

フェネグリークの種子 50 g を MeOH で抽出して 5.2g 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 1.45g 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 (CHCl<sub>3</sub>-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。この化合物の構造を解析した結果 (Table 5)、この化合物は trigonelline (Fig. 4) であると同定された。

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. 4) の 2 位のプロトンシグナルと特定できたことから、trigonelline の <sup>1</sup>H-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-4-d-1) <sup>1</sup>H-qNMR 法に用いる試料の調製

DSS-*d*<sub>6</sub> はデシケータ中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 1.00 ml の DMSO-*d*<sub>6</sub> 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*<sub>6</sub> に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した DSS-*d*<sub>6</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-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*<sub>6</sub> に溶かし、この溶液 0.50 mL と先に調製した DSS-*d*<sub>6</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-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*<sub>6</sub> (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*<sub>6</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-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 [4] 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-4-d-2) <sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>H-NMR を測定し、trigonelline (Fig. 4) 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. 15) <sup>1</sup>H-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*<sub>6</sub> 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*<sub>6</sub> 及び trigonelline のモル濃度 (mol/mL)、 $I_D$ 、 $I_T$  はそれぞれ DSS-*d*<sub>6</sub> 及び trigonelline の水素 1 個あたりのシグナル面積。

##### B-4-e) <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた piperine の定量

BTMSB-*d*<sub>4</sub> はデシケータ中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 1.00 mL の pyridine-*d*<sub>6</sub> 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 <sup>1</sup>H-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*<sub>6</sub> に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した BTMSB-*d*<sub>4</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。<sup>1</sup>H-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 7.31 ppm のシグナルと 0.00 ppm とした BTMSB-*d*<sub>4</sub> 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*<sub>4</sub> 及び piperine のモル濃度 (mol/mL)、 $I_B$ 、 $I_P$  はそれぞれ BTMSB-*d*<sub>4</sub> 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*<sub>6</sub> (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*<sub>4</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。

## C. 結果および考察

### C-1) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量

#### C-1-a) HPLC による carthamin の定量

これまでに確立した <sup>1</sup>H-qNMR 法を用い、単離した carthamin の純度を算出したところ、54.5±0.3% と算出された。この溶液を用いて順次希釈した溶液を用いて検量線を作成したところ、直線性のある検量線が得られた。

(Fig. 9)

各試料の調製は、「ベニバナ赤色素」または生薬粉末のからの抽出溶媒の検討を行った。MeOH-水の比率を 0%~100%まで 10%刻みで MeOH 濃度を変えた溶媒で抽出を行い、ピーク面積を比較した。その結果、80%MeOH-水の条件のときに抽出効率が最大となることがわかった。

そこで、「ベニバナ赤色素」、生薬粉末を精秤し、これらに 80%MeOH-水 (1.0 mL) を加えて抽出して調製した試料の測定を行ったところ、「ベニバナ赤色素」の carthamin 含有率は 0.31%、生薬粉末は 0.22% と算出された。

このように、<sup>1</sup>H-qNMR による単離した carthamin の定量を行うことにより、高純度でない試料でも容易に濃度の標準物質とすることができるとわかった。またそれを基準に HPLC で検量線を作成することで、微量のサンプルであっても容易に正確な定量ができる方法を確立した。また、HPLC 用サンプルの調製において、最も抽出効率の良い溶媒条件 (80% MeOH-水) も見つけることができた。今の所、入手できた「ベニバナ赤色素」が 1 ロットだけのため、さらに試料を集めて検証したい。

#### C-1-b) Carthamin の吸光係数

Carthamin の吸光係数は EtOH 中と DMF 中で測定されているものが報告されていることから、ethanol-*d*<sub>6</sub> と DMF-*d*<sub>7</sub> 中での <sup>1</sup>H-qNMR を試みた。単離して得た carthamin 標準品 5 mg を秤量してそれぞれの溶媒 1 mL に溶解しようとしたが、全ては溶解しなかった。また、上清を取って <sup>1</sup>H-NMR を測定したが、carthamin の 16 位 H のシグナルを十分な大きさで観測することができず、これらの溶媒では <sup>1</sup>H-qNMR 法を適用するに足る十分な溶解度がないことがわかった。

そこで、まず carthamin 標準品をこれまでと同様に pyridine-*d*<sub>6</sub> 中で <sup>1</sup>H-qNMR を測定して純度を算出、同じロットの carthamin 標準品の EtOH 中、DMF 中での UV スペクトルの測定を行って吸光係数を算出することにした。すなわち、carthamin 標準品を約 5 mg を精秤して pyridine-*d*<sub>6</sub> (1.00 mL) に溶解し <sup>1</sup>H-qNMR の測定に用いた。その結果、まず、このとき標準とした carthamin の純度は <sup>1</sup>H-qNMR の測定より 44.1% と算出された。この標準品を用いて UV スペクトル測定に供する DMF 及び EtOH 溶液を調製し UV スペクトルの測定をした。(Fig. 10, 11) また、<sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した溶液を通常のスเปクトル用 pyridine で 1000 倍に希釈して pyridine 中での carthamin の UV スペクトルの測定をした。(Fig. 12) 測定の結果、それぞ

れのモル吸光係数は DMF :  $1.21 \times 10^5$  ( $\lambda_{\max} = 530$ ), EtOH :  $1.19 \times 10^5$  ( $\lambda_{\max} = 513$ ), Pyridine :  $1.48 \times 10^5$  ( $\lambda_{\max} = 540$ ) と算出された. (Table 2) Pyridine 中の値は今回初めて測定したもののだが, DMF 中の値は文献値の 1.3 倍, EtOH 中は 2.4 倍と, いずれも文献値よりも大きい値となった. これは, 先行研究における測定の際, 純度を大きく見積もっていたために起こったこととも考えられる. 再結晶を行って得た化合物の純度は 100% に近いものであるが, HPLC で精製したものの場合, 1 ピークを単離したつもりでもバックグラウンドの夾雑物が無視されたり, 乾燥が十分でなかったりして純度が実は十分ではないことがある. また, carthamin の場合, 熱や光に不安定でもあるので, 保存中の分解ということもある. 精製の仕方, 保存の仕方などで純度を高く見積もる要因は多くあり,  $^1\text{H}$ -qNMR 法が確立されていなかった当時では検証の方法はほぼない状態であったので, 先行研究における吸光係数は小さく算出されていると考えられる.

$^1\text{H}$ -qNMR 法での定量値から正確な吸光係数を算出できたことで, 吸光度から濃度を算出することができるようになり, 不安定な carthamin の簡便な定量に大きく貢献できるものと考えられる.

## C-2) $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた「香辛料抽出物」中の成分定量

### C-2-a) 「香辛料抽出物」の基原から $^1\text{H}$ -qNMR 法が適用できる生薬のスクリーニング

研究方法の項で述べたように「香辛料抽出物」の基原のうちの 16 種類の MeOH 抽出物を作成し,  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定した結果, スターアニスのスペクトルで,  $^1\text{H}$ -qNMR が適用できる独立したシグナルが 9.82 ppm に観測された. (Fig. 13A) そのスペクトルを市販の anisaldehyde のスペクトルと比較したところ一致したので, 9.82 ppm のシグナルは anisaldehyde のホルミル基の H のものと特定した. (Fig. 13B)

### C-2-b) スターアニス及びスターアニス由来の「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の定量

Anisaldehyde 標準品中の anisaldehyde の定

量を  $^1\text{H}$ -qNMR 法でおこなった結果,  $94.96 \pm 1.02\%$  と見積もられた.

次に「香辛料抽出物」のうちスターアニスを基原とするとされるもので入手できた 5 サンプルの  $^1\text{H}$ -qNMR 測定を試みた. そのうち 2 サンプルは anisaldehyde のホルミル基 H に由来するシグナルが観測されなかった. 3 サンプルについて定量を行った結果, それぞれ含有率が 1.40%, 0.24%, 0.76% となった. これらの標準偏差は 0.07% で, 含有率が 1% を切る状態になると無視できない数字であった. スターアニスの生薬粉末中の anisaldehyde の定量では, これまでに 2 サンプルについて  $^1\text{H}$ -qNMR 法を用いた定量を実施し,  $0.62 \pm 0.03\%$ ,  $0.32 \pm 0.04\%$  という結果を得た. 以上の結果は Table 3 に示した.

Anisaldehyde 標準品中の含有率 94.96% 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. メーカーでの純度測定が GC によるものなので, その時の検出器で検出できない夾雑物が無視されて高く見積もられたか, 開封後の水蒸気の混入などで純度が下がったかなどが要因と考えられる.

「香辛料抽出物」のうち anisaldehyde が検出できない (ホルミル基 H のシグナルがない) のがあった. Anisaldehyde が含まなくても用途として成り立つのかもしれないが, スターアニスが主ではなく, 使われていたとしてもごくわずかしかが使われていない「香辛料抽出物」なのではないかと考えられた. また今回, そのような実情を明らかにできたと思われる.

一方, シグナルを検出, 定量が可能であった「香辛料抽出物」は 0.24~1.4% という含有率だった. これらの標準偏差は 0.07% で, 含有率が 1% を切る状態になると無視できない幅の数字であった. また, 生薬粉末も 0.32~0.62% という含有率だった. いずれも非常に小さな値で, 品質管理という観点から数値のばらつきを考えると, NMR 測定時の溶液濃度を高める工夫の余地があると考えられた.

### C-2-c) クミン種子中の cuminaldehyde の定量

Cuminaldehyde 標準品中の cuminaldehyde の定量を  $^1\text{H}$ -qNMR 法でおこなった結果,  $92.3 \pm$

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  $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量を実施し、 $0.36 \pm 0.02\% \sim 1.84 \pm 0.06\%$  という結果を得た。以上の結果は Table 2 に示した。

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  $0.36 \sim 1.84\%$  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-d) 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  $^1\text{H-qNMR}$  法でおこなった結果、 $71.3 \pm 0.3\%$  と見積もられた。

生薬粉末中の trigonelline の  $^1\text{H-qNMR}$  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  $0.39 \pm 0.03\%$ 、コーヒー種子中では  $0.27 \pm 0.02\%$  と  $0.39 \pm 0.04\%$ 、方法 2 ではフェネグreek 種子中の trigonelline が  $0.38 \pm 0.00\%$ 、コーヒー種子中では  $0.29 \pm 0.02\%$  と  $0.39 \pm 0.01\%$  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、 $0.36 \pm 0.01\%$  という結果が得られた。

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、 $^1\text{H-qNMR}$  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。

#### C-2-e) $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた piperine の定量

Piperine (Fig. 5) 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*<sub>6</sub> 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  $\alpha$  位のオレフィンプロトンシグナル [5] 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。(Fig. 15) 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。

Piperine の定量では、試薬としての piperine を  $^1\text{H-qNMR}$  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、 $^1\text{H-qNMR}$  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) 「ベニバナ赤色素」中の carthamin の定量では、<sup>1</sup>H-qNMR 法で値付けされた標準の carthamin の溶液を用いて HPLC の検量線を作成、微量の含有率の carthamin を HPLC にて正確に定量する方法を確立した。<sup>1</sup>H-qNMR 法による carthamin の定量は、昨年までの研究で確立した方法で、認証標準物質の 1,4-BTMSB-d<sub>4</sub> を内部標準として用い、pyridine-d<sub>5</sub> 溶液と carthamin の溶液を混合して <sup>1</sup>H-qNMR を測定し、carthamin の 16 位 H のシグナル(δ 9.15 ppm) を積分値から算出する方法を有効に活用した。また、<sup>1</sup>H-qNMR 法で値付けされた試料をもとに carthamin の各種溶媒での吸光係数の検証をすることができた。

2) 「香辛料抽出物」のうちスターアニスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の anisaldehyde の <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量では、anisaldehyde の <sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。しかしながら、入手した既存添加物試料では含有率が低く、<sup>1</sup>H-qNMR 法を用いた定量が適用できる下限付近であることがわかった。揮発性の成分でもあることからあまり工程数を増やすことができないが、測定溶液濃度を高める工夫の余地があると考えられた。

3) 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 <sup>1</sup>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。

4) フェネ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を示す化合物が trigonelline で、そのシグナルは 2 位プロトン(DMSO-d<sub>6</sub> 中で 9.16 ppm)のものであると帰属した。フェネグリーク種子粉末中の trigonelline の定量条件を確立した。「香辛料抽出物」のうちフェネグリークを主な基原とする「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 <sup>1</sup>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。

5) 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<sub>5</sub> 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. 参考資料

- [1] Mizukami ら, *Chem. Pharm. Bull.*, **61**(12), 1264-1268 (2013).
- [2] Kazuma ら, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 1588-1599 (2000).
- [3] Morimoto ら, *Jpn. J. Food Chem.*, **5**(2), 236-238 (1998).
- [4] Wu, T-S. ら, *Chem. Pharm. Bull.*, **53**(3), 347-349 (2005).
- [5] Sakpakdeejaroen I. ら, *J. Health Res.*, **23**(2), 71-76 (2009).

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tanaka R, Inagaki R, Sugimoto N, Akiyama H, Nagatsu A: Application of a quantitative <sup>1</sup>H-NMR (<sup>1</sup>H-qNMR) method for the determination of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis semen, *J. Nat. Med.*, **71**(1), 315-320 (2017).
- 2) Fukaya S, Yoshioka H, Nagatsu A: The Kampo formula “Juzen-taiho-to” exerts protective effects on ethanol-induced liver injury in mice, *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**(3), 105-112 (2018).
- 3) 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).

### 2. 学会発表

- 1) 深谷菜, 吉岡弘毅, 市丸嘉, 三浦伸彦, 永津明人, 野々垣 常正, 「アセトアミノフェンと四塩化炭素の併用による複合毒性の影響」フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー, P-071, 2017 年 9 月 (仙台)
- 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, 杉本直樹, 佐藤恭子,  
「定量NMR(<sup>1</sup>H-qNMR)を応用した生薬コウカ中の  
carthamin の定量」, 日本薬学会第 138 年会,  
27PA-am205, 2018 年 3 月 (金沢)

3) 藤原裕未, 三輪真子, 本間篤, 永津明人,  
「カエデ属植物に含まれるアントシアニン化  
合物とその機能性」, 日本薬学会第 138 年会,  
27PA-am264, 2018 年 3 月 (金沢)

4) 神谷万里子, 木村匡男, 森健, 山岸由佳,  
三嶋廣繁, 永津明人, 野々垣常正, 池田義明  
「Tradescantia 属植物抽出液による  
pseudomonas aeruginosa 標準株の増殖とバイ  
オフィーム形成に及ぼす影響」, 日本薬学会第  
138 年会, 26PA-pm110S, 2018 年 3 月 (金沢)

5) 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(<sup>1</sup>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 年 6 月  
(横浜)

6) 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 年 6 月 (名  
古屋)

7) 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 年 9 月 (広島)

8) 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 年 10 月 (静  
岡)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

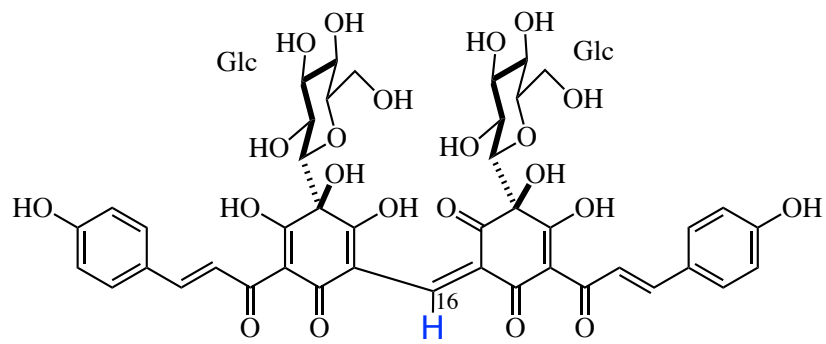


Fig. 1 Carthamin の構造

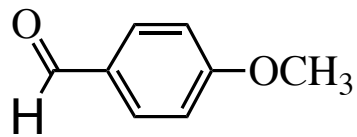


Fig. 2 Anisaldehyde の構造

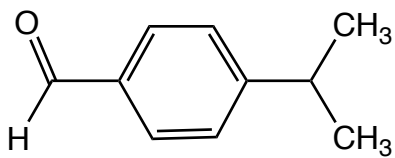


Fig. 3 Cuminaldehyde の構造

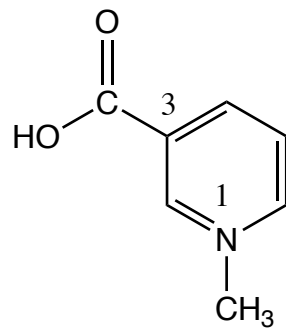


Fig. 4 trigonelline の構造

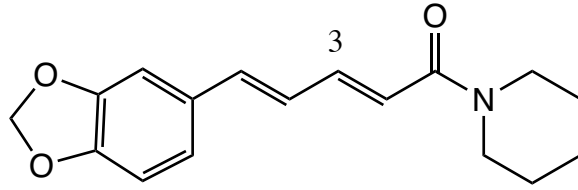


Fig. 5 piperine の構造

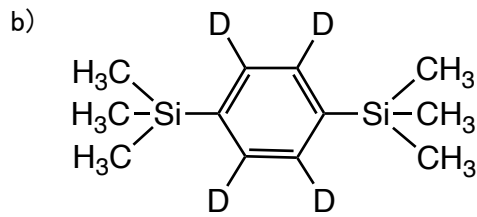
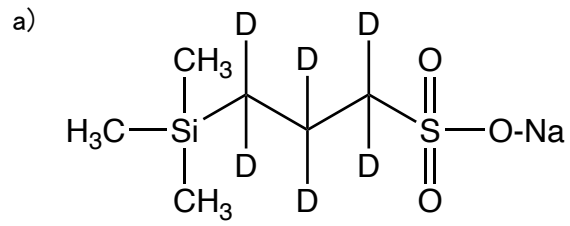


Fig. 6 定量用の認証標準物質  
a) DSS-*d*<sub>6</sub>, b) 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>

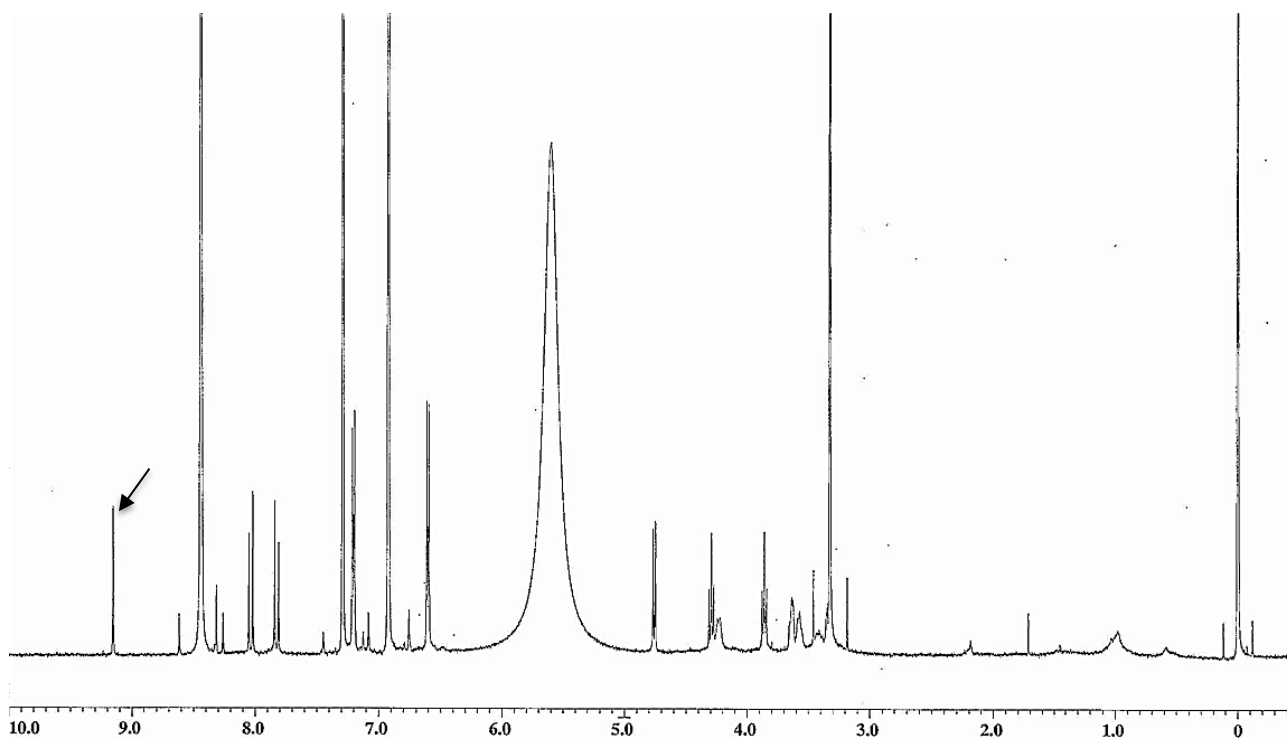


Fig. 7 単離した carthamin の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (pyridine- $d_5$ , 500 MHz)  
矢印のシグナルが carthamin の 16 位 H のシグナル ( $\delta$  9.15 ppm)

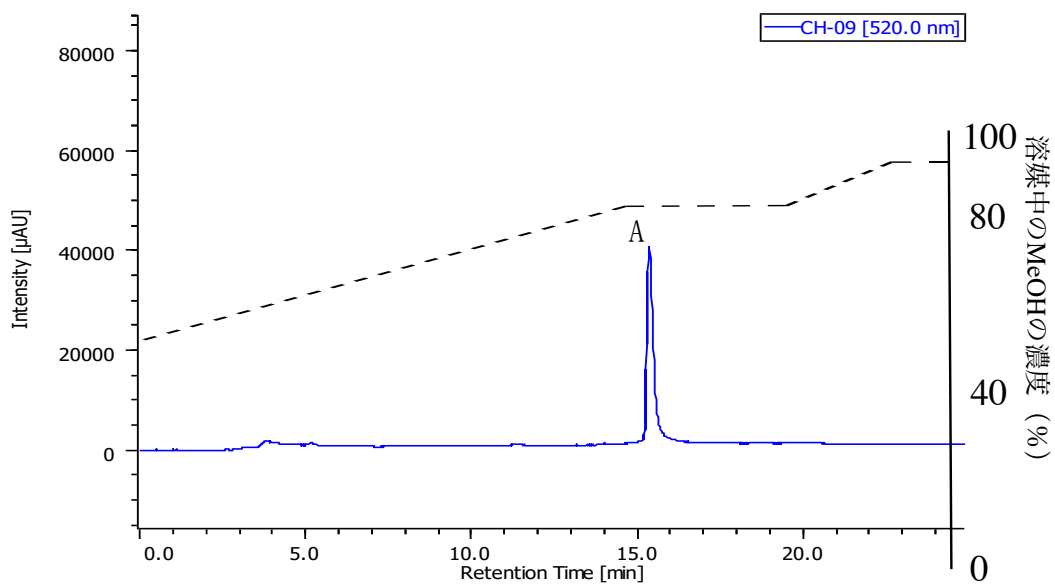


Fig.8 標準とした Carthamin の HPLC クロマトグラム  
 A: 検出波長 520 nm における carthamin のピーク

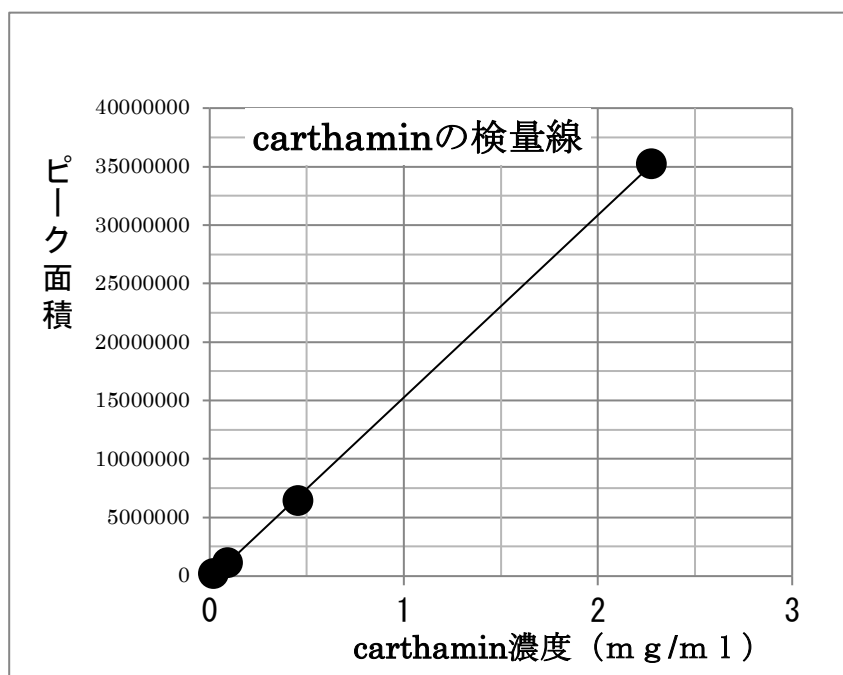


Fig.9 Carthamin の HPLC クロマトグラムにおける検量線

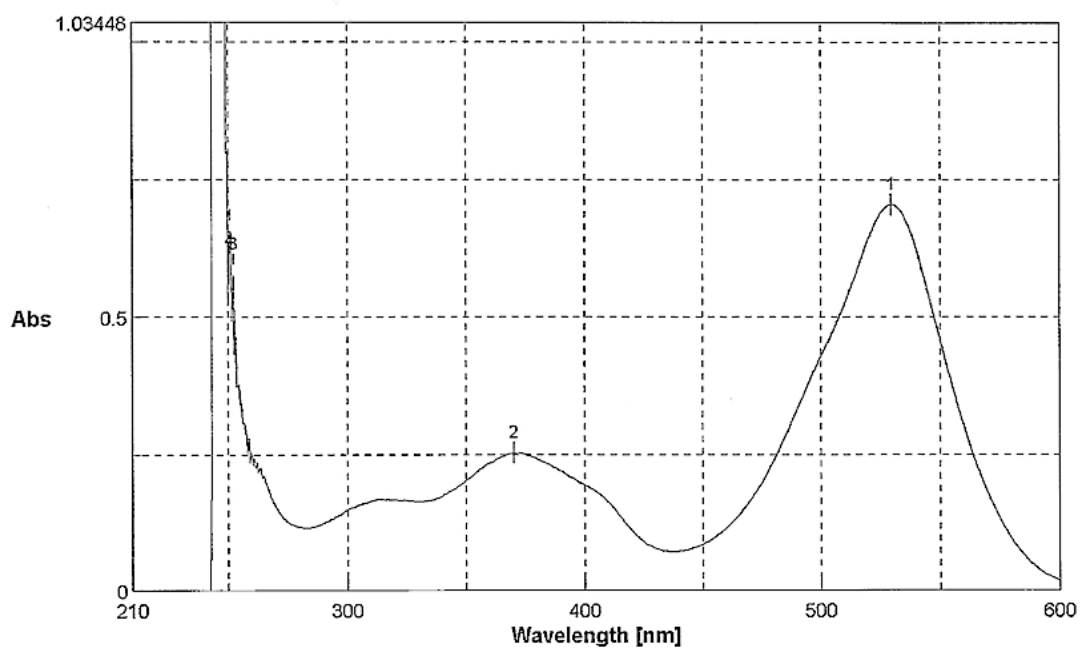


Fig. 10 DMF 中で測定した carthamin の UV スペクトル ( $c = 5.80 \times 10^{-6}$  mol/L)

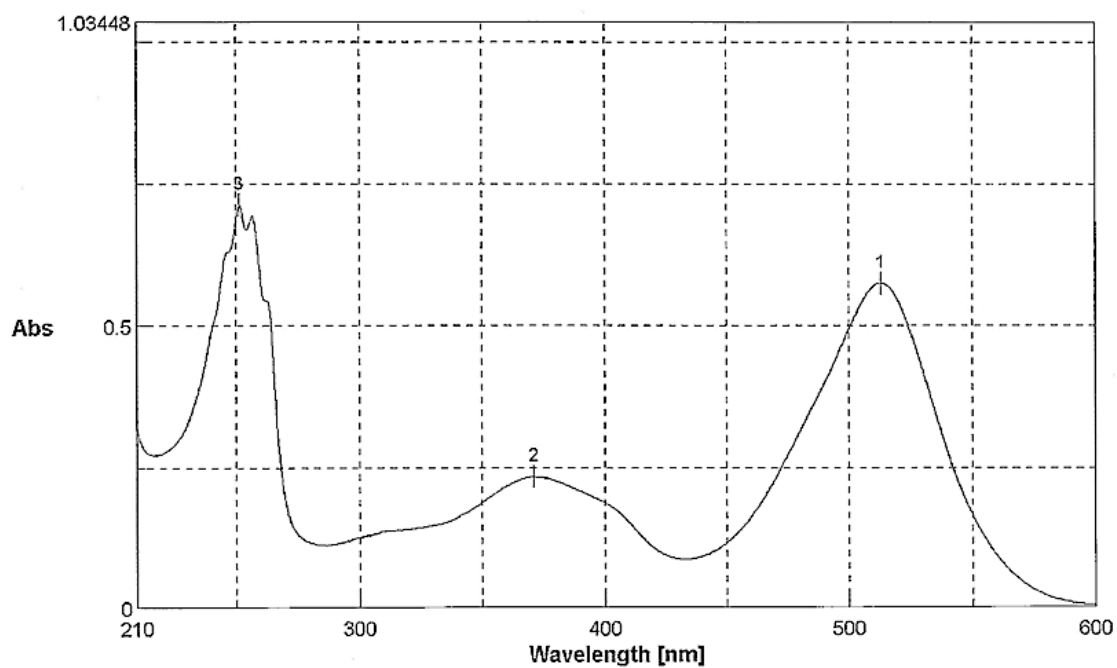


Fig. 11 EtOH 中で測定した carthamin の UV スペクトル ( $c = 4.82 \times 10^{-6}$  mol/L)

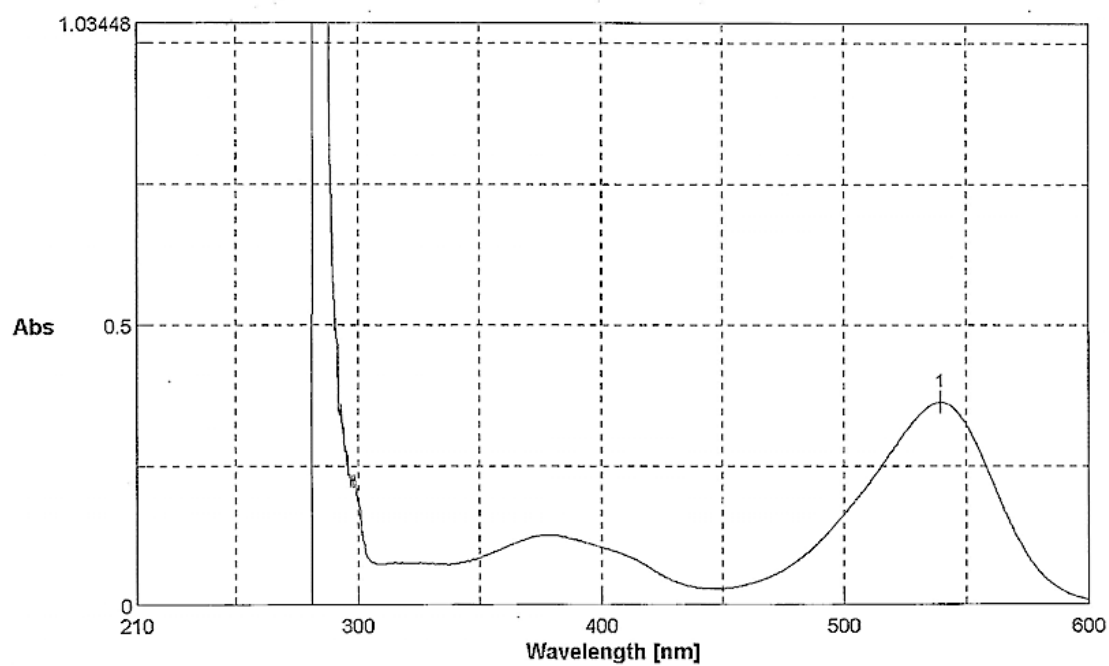


Fig. 12 Pyridine 中で測定した carthamin の UV スペクトル ( $c = 2.41 \times 10^{-6}$  mol/L)



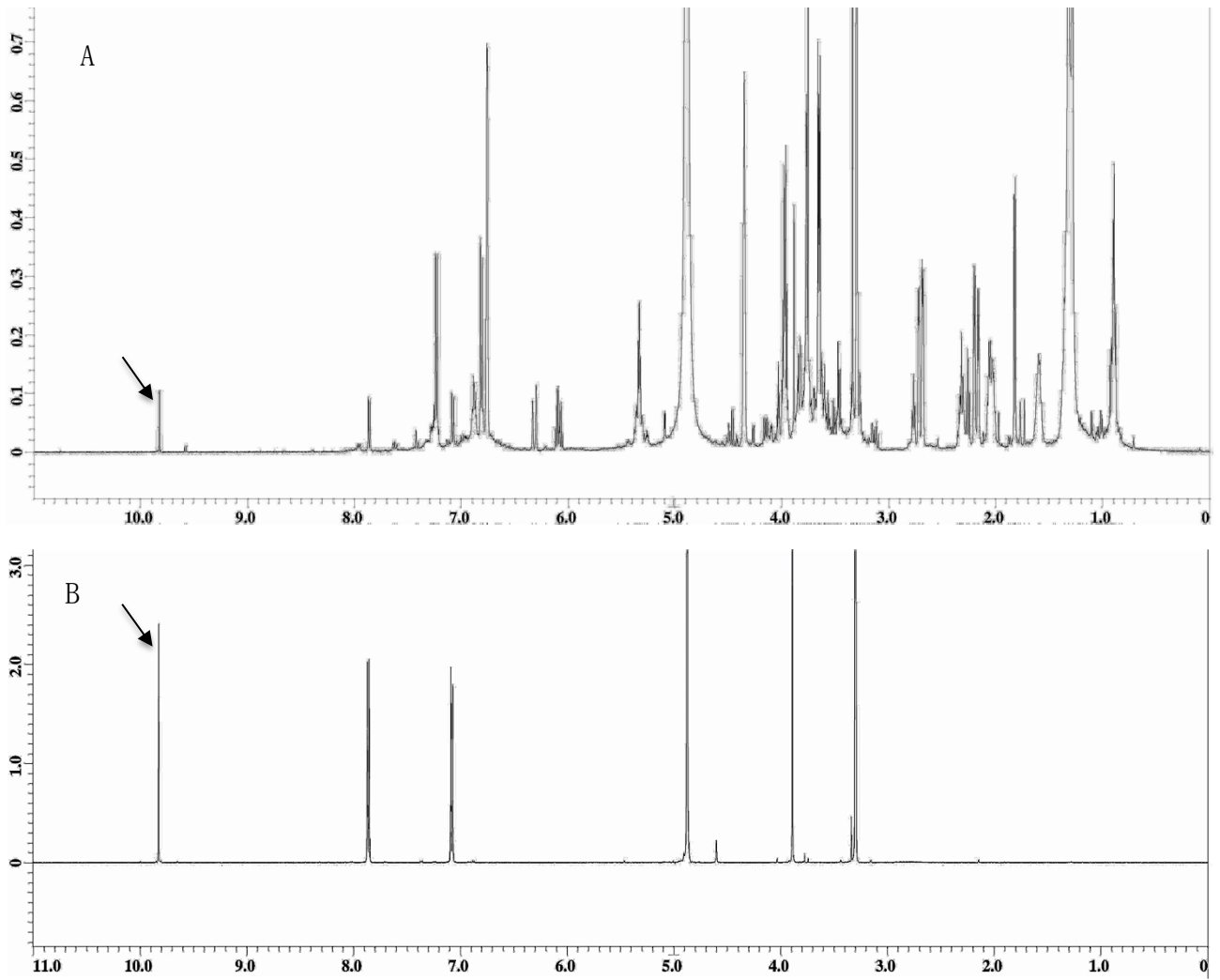


Fig. 13 スターアニス粉末の MeOH 抽出物(A)と anisaldehyde (B) の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル  
 矢印のシグナルが anisaldehyde のホルミル基 H のシグナル (δ9.82 ppm)

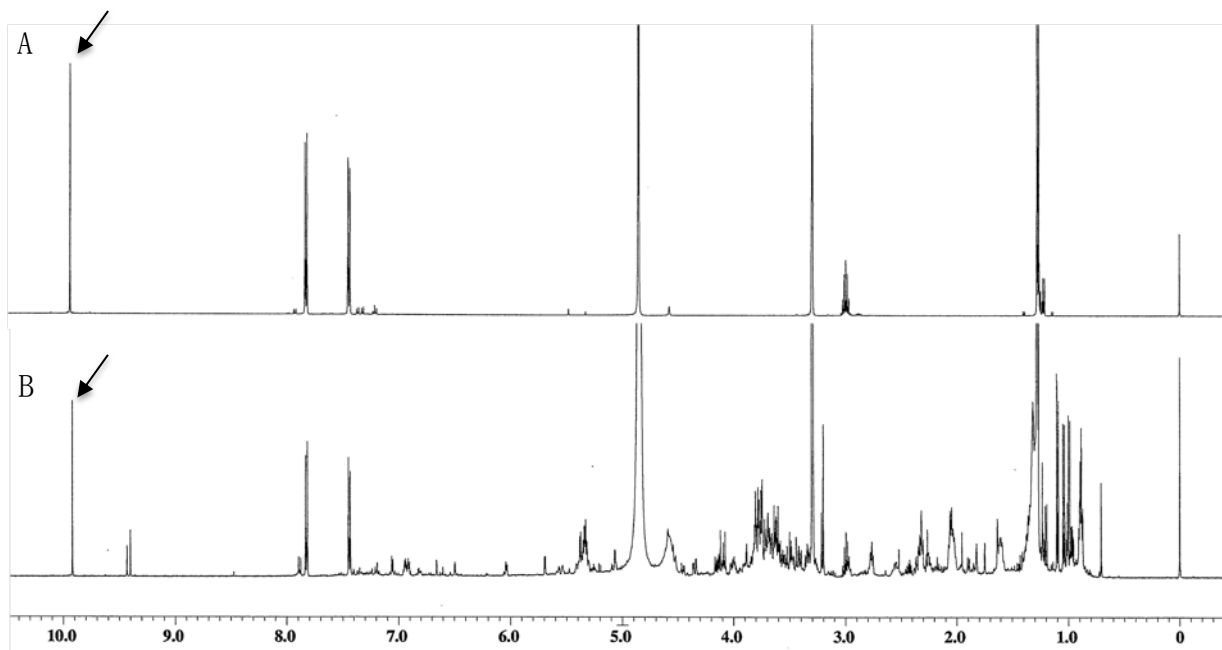


Fig. 14 Cuminaldehyde 標準品(A)とクミン粉末(B)の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (methanol-*d*<sub>3</sub>, 500 MHz)  
矢印のシグナルが cuminaldehyde のアルデヒド基の H シグナル (δ 9.92 ppm)

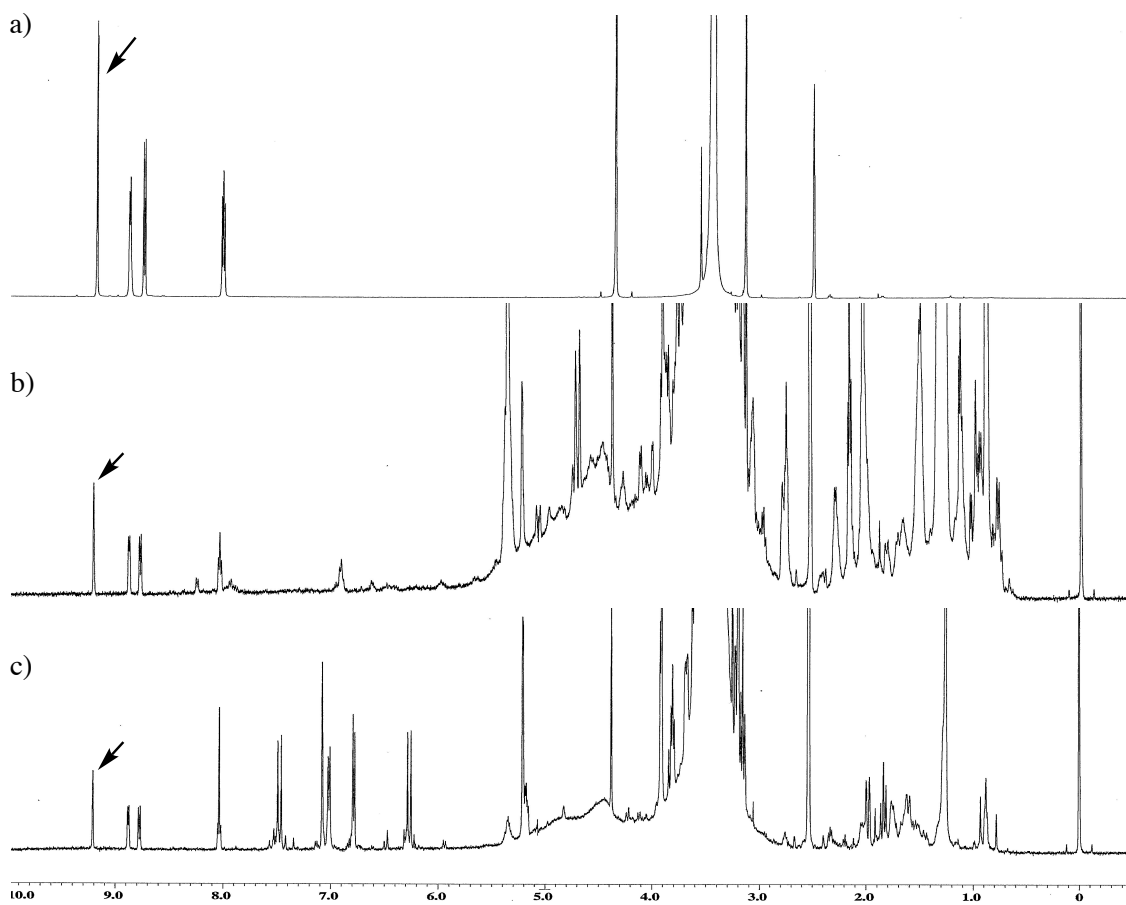


Fig. 15 a) trigonelline と b)フェネグリーク種子抽出物と c)コーヒー種子抽出物の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in  $\text{DMSO-}d_6$ )  
矢印は trigonelline の 2 位プロトンのシグナル.

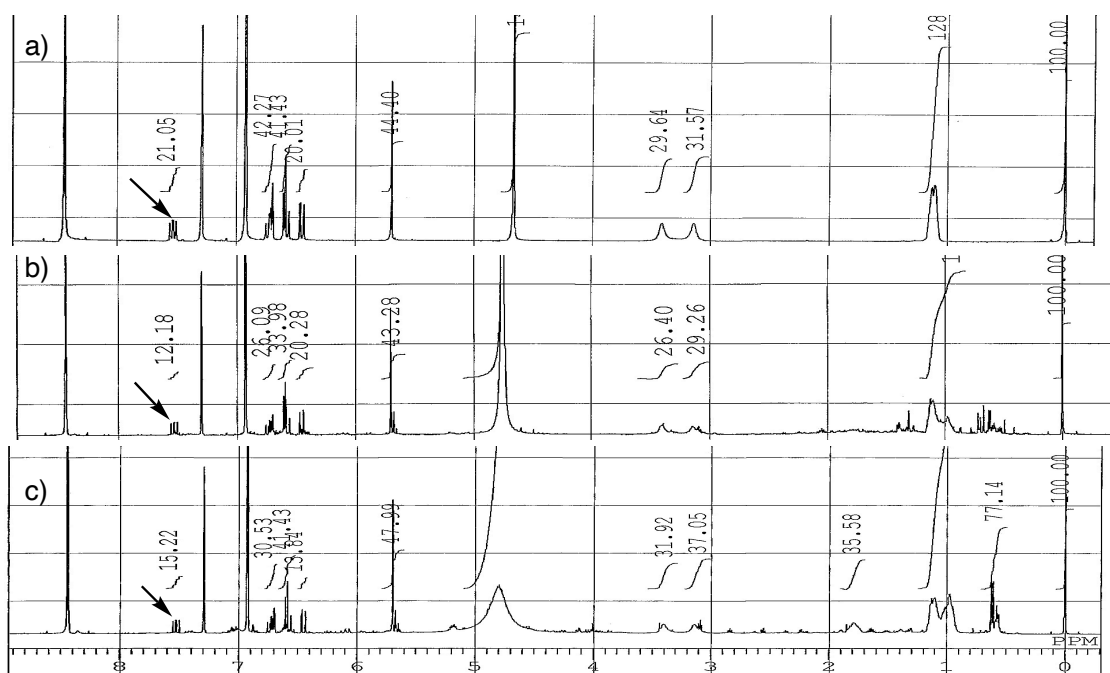


Fig. 16 a) piperine と b) コショウ種子抽出物 と c) ヒハツ種子抽出物の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in  $\text{pyridine-}d_5$ )

矢印は piperine の 3 位プロトンのシグナル.

Table 1 <sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>H-qNMR 法で純度決定した carthammin を用いて測定・算出したモル吸光係数

溶媒	今回の値 ( $\lambda_{\max}$ )	文献値 ( $\lambda_{\max}$ )
DMF	1.21 x10 <sup>5</sup> (530 nm)	9.04 x10 <sup>4</sup> (530 nm)
EtOH	1.19 x10 <sup>5</sup> (513 nm)	4.90 x10 <sup>4</sup> (515 nm)
Pyridine	1.48 x10 <sup>5</sup> (540 nm)	-

Table 3  $^1\text{H}$ -qNMR 法で定量された anisaldehyde の含有率

samples		含有率(%) $\pm$ SD
eugenol 標準品	(n=6)	94.96 $\pm$ 1.02
「香辛料抽出物」	A (n=5)	1.40 $\pm$ 0.07
	B* (n=3)	0.24 $\pm$ 0.06
	C (n=4)	0.43 $\pm$ 0.08
	D	ND <sup>#</sup>
	E	ND <sup>#</sup>
生薬粉末	F (n=5)	0.62 $\pm$ 0.03
	G (n=5)	0.32 $\pm$ 0.04

\* 「香辛料抽出物」 B は粉末の試料.

# ND : anisaldehyde のシグナルを検出できなかった.

Table 4  $^1\text{H}$ -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 5 単離した trigonelline の NMR スペクトルデータ

(in DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta_C$ : 125 MHz,  $\delta_H$ : 500 MHz)

No.	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	HMBC (H→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
N-CH <sub>3</sub>	47.8	4.34 (3H, s)	144.7, 146.1
CO <sub>2</sub> H	162.3		

Table 2 <sup>1</sup>H-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	