

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年度～平成31年度(令和元年度) 総合分担研究報告書

qNMR を用いた既存添加物の分析手法に関する研究

～<sup>1</sup>H-qNMR および相対モル感度を用いた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ならびに試験法が未設定である既存添加物の分析法の確立を目的に、ラカンカ抽出物、酵素処理ナリンジンを対象に検討を行った。まず、ラカンカ抽出物では、主成分であるモグロシドVの定量では、<sup>1</sup>H-qNMRとLCを組み合わせた相対モル感度(RMS)法によりカフェインからモグロシドVの含量を正確かつ安価に定量できることが明らかとなった。また、酵素処理ナリンジンでは、RMS法により、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。さらに、グルコアミラーゼによる前処理を伴う方法により、ナリンジンおよびNaringin-Gの含量およびα-グルコシル残基量から正確な酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体の含量の算出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<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<sup>1</sup>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<sup>1</sup>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<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、ラカンカ抽出物および酵素処理ナリンジンを対象に、<sup>1</sup>H-qNMR および<sup>1</sup>H-qNMR とクロマトグラフィーを組み合わせた相対モル感度 (RMS) 法等を用いた分析法の確立について検討した。

## B. 研究方法

### B-1) 試薬等

3 種のラカンカ抽出物のうち、サンナチュレ M30 (Lot.170526-01) (試料 1) およびサンナチュレ M50 (Lot.170621-01) (試料 2) は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社よりご供与いただいた。ラカンカ抽出物 (羅漢果精製物) (Lot.G20030116) はサラヤ株式会社製 (試料 3) を用いた。モグロシド V は、和光純薬工業株式会社製標準品 (Lot.TWM3866) を用いた。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。D-グルコース定量用発色試薬は富士フイルム和光純薬 (株) 製グルコース CII-テストワコーを使用した。

2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate-*d*<sub>6</sub> sodium salt (DSS-*d*<sub>6</sub>) は和光純薬工業株式会社製標準物質 (Cat. No.044-31671, Lot.No.ECL6585, 純度 92.3%, 拡張不確かさ : 0.8%) を用いた。重水 (D<sub>2</sub>O) は関東化学製を用いた。その他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。

試液は以下のように調製した。

<sup>1</sup>H-qNMR 標準溶液 : DSS-*d*<sub>6</sub> 標準物質 8 mg を精密に量り、DMSO-*d*<sub>6</sub> 40 g を加え<sup>1</sup>H-qNMR 標準溶液とした。<sup>1</sup>H-qNMR 標準溶液の DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度 (0.2166 mg/g または 0.2165mg/g) は、DSS-*d*<sub>6</sub> の純度値 (92.3%) および秤量値より算出した。

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

核磁気共鳴装置 (NMR) : ECA500 (プロトン共鳴周波数 500 MHz) (日本電子株式会社製)

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)。

分取用 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) <sup>1</sup>H-qNMR によるモグロシド V の定量

#### B-3-1) <sup>1</sup>H-qNMR によるモグロシド V 標準品の純度測定

モグロシド V 標準品約 10 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 としたときのモグロシド V 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、モグロシド V 標準品の純度 (%) 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、 $I_{\text{sample}}$ =モグロシド V 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- $d_6$ : 9.000)、 $H_{\text{sample}}$ =モグロシド V 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- $d_6$ :  $\text{CH}_3 \times 3 = 9$ )、 $M_{\text{sample}}$ =モグロシド V の分子量、 $M_{\text{std}}$ =内標準物質の分子量 (DSS- $d_6$ : 224.36)、 $W_{\text{sample}}$ =モグロシド V の秤取量 (mg)、 $C_{\text{std}}$ = $^1\text{H}$ -qNMR 標準溶液の DSS- $d_6$  濃度

なお、qNMR の化学シフト値は、DSS- $d_6$  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-3-2) $^1\text{H}$ -qNMR による各ラカンカ抽出中のモグロシド V の定量

3 種のラカンカ抽出物のうち、試料 1 及び試料 3 は 50 mg、試料 2 は 20 mg を精密に量り、 $^1\text{H}$ -qNMR 標準溶液 1 g を入れ超音波処理により溶解したものを試験溶液とした。

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  $^1\text{H}$ -qNMR 測定を行った。DSS- $d_6$  のシグナル面積強度を 9.000 としたときの試料中のモグロシド V 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、各ラカンカ抽出中のモグロシド V 含量 (%) を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし、 $I_{\text{sample}}$ =試料中のモグロシド V の特定基のシグナル面積強度、 $I_{\text{std}}$ =内標準のシグナル面積強度 (DSS- $d_6$ : 9.000)、 $H_{\text{sample}}$ =試料中のモグロシド V 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- $d_6$ :  $\text{CH}_3 \times 3 = 9$ )、 $M_{\text{sample}}$ =試料中のモグロシド V の分子量 (1287.43)、 $M_{\text{std}}$ =内標準物質の分子量 (DSS- $d_6$ : 224.36)、 $W_{\text{sample}}$ =試

料中の秤取量 (mg)、 $C_{\text{std}}$ = $^1\text{H}$ -qNMR 標準溶液の DSS- $d_6$  濃度

### B-3-3) LC による各ラカンカ抽出中のモグロシド V の定量

3 種のラカンカ抽出物のうち、サンナチュレ M30 及び試料 3 は 50 mg、試料 2 は 20 mg を精密に量り、水を加え超音波処理により溶解したものを試験溶液とした (抽出物濃度: 1 mg/mL)。この試験溶液を以下の LC 条件にて分析した。

カラム: Develosil ODS-UG-5 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 250 mm, 野村化学株式会社製)、カラム温度: 40 $^\circ\text{C}$ 、検出波長: 210 nm、流速: 1.0 mL/min、溶離液 A: 水、溶離液 B: アセトニトリル、グラジエント条件: 0 min (5%B)  $\rightarrow$  35 min (40%B)  $\rightarrow$  35.01 min (100%B)  $\rightarrow$  40 min (100%B)  $\rightarrow$  40.01 min (5%B)  $\rightarrow$  50 min (5%B)、注入量: 10  $\mu\text{L}$

なお、検量線用標準溶液は以下のように作成した。すなわち、モグロシド V 標準品 5 mg を精密に量り、5 mL 容メスフラスコに入れ、水を加えて正確に 5 mL とし検量線用標準溶液①とした (モグロシド V 濃度: 1.0 mg/mL)。検量線用標準溶液①を水にて公比 2 で段階希釈したものを検量線用標準溶液②、③および④とした (モグロシド V 濃度: 0.5, 0.25 および 0.13 mg/mL)。

調製した試験溶液を上記に示した条件で LC にて分析し、得られたピーク面積と検量線によって得られた試験溶液中のモグロシド V 濃度 (mg/mL) を求め、次式によって試料中のモグロシド V 含量 (%) を算出した。

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

ただし、 $C$  は試験溶液中のモグロシド V 濃度 (mg/mL)、 $V$  は試験溶液の量 (mL)、 $W$  は試料の採取量 (mg)、 $P$  はモグロシド V 標準品の

純度 (%) である。

#### B-4) 相対モル感度 (RMS) を利用した LC によるモグロシド V の定量

##### B-4-1) <sup>1</sup>H-qNMR によるモグロシド V 標準品およびカフェインの純度測定

モグロシド V 標準品については、B-3-1 の項に示した。カフェインについては、約 10 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 としたときのカフェイン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、カフェインの純度 (%) 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、 $I_{\text{sample}}$  = カフェイン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)、 $H_{\text{sample}}$  = カフェインの特定基の水素数、 $H_{\text{std}}$  = 内標準物質の特定基の水素数 (DSS-*d*<sub>6</sub>:CH<sub>3</sub>×3=9)、 $M_{\text{sample}}$  = カフェインの分子量 (194.19)、 $M_{\text{std}}$  = 内標準物質の分子量 (DSS-*d*<sub>6</sub> : 224.36)、 $W_{\text{sample}}$  = カフェインの秤取量 (mg)、 $C_{\text{std}}$  = <sup>1</sup>H-qNMR 標準溶液の DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度

##### B-4-2) カフェインに対するモグロシド V の RMS の算出

各濃度のカフェイン (0.319×10<sup>-3</sup> mol/L, 0.639×10<sup>-3</sup> mol/L および 2.56×10<sup>-3</sup> mol/L) に対する 6 濃度 (0.058×10<sup>-3</sup>, 0.116×10<sup>-3</sup>, 0.232×10<sup>-3</sup>, 0.464×10<sup>-3</sup>, 0.928×10<sup>-3</sup> および 1.86×10<sup>-3</sup> mol/L) のモグロシド V を含む水溶液を調製し、試験溶液とした。この溶液を以下の LC 条件にて分析した。

カラム : Develosil ODS-UG-5 (5 μm, 4.6×250 mm, 野村化学株式会社製)、カラム温度 : 40°C、検出波長 : 210 nm、流速 : 1.0 mL/min、溶離液 A : 0.1%ギ酸、溶離液 B : 0.1%ギ酸含有アセトニトリル、グラジエント条件 : 0 min

(5%B) → 35 min (40%B) → 35.01 min  
(100%B) → 40 min (100%B) → 40.01 min  
(5%B) → 50 min (5%B), 注入量 : 5 μL

モグロシド V およびカフェインのモル濃度比 (モグロシド V のモル濃度 / カフェインのモル濃度) から物質比 (モル比)、LC 分析におけるモグロシド V およびカフェインのピーク面積比 (モグロシド V のピーク面積 / カフェインのピーク面積) から応答比 (吸光度比) を算出し、応答比および物質比の比 (応答比 / 物質比) からカフェインに対するモグロシド V の RMS を算出した。

##### B-4-3) RMS を用いたラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

3 種のラカンカ抽出物のうち、試料 1 及び試料 3 は 50 mg、試料 2 は 20 mg を精密に量り、水を加え超音波処理により溶解したものを試験溶液とした (抽出物濃度 : 1 mg/mL)。この試験溶液を B-4-2 に示した LC 条件にて分析し、得られたピーク面積とカフェインより作成した検量線によって得られた試験溶液中のモグロシド V 濃度 (μg/mL) を求め、次式によって試料中のモグロシド V 含量 (%) を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \text{RMS} \times \frac{C \times V}{W} \times \frac{P}{100} \times 100$$

ただし、RMS はカフェインに対するモグロシド V (0.122)、C は試験溶液中のモグロシド V 濃度 (mg/mL)、V は試験溶液の量 (mL)、W は試料の採取量 (mg)、P はカフェインの純度 (%) である。

##### B-5) 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-5-1) 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、 $\alpha$ -Glycosyl naringin (**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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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-5-2)  $^1$ 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,  $^1$ 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  $^1$ 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),  $C_{\text{std}}$ = $^1$ 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-5-3) 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,  $^1$ 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 $^{\circ}$ 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-5-4) ナリンジンに対する糖転位ナリンジン類の RMS の算出

B-5-3 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-5-5) 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  $\mu$ m) 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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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  $\mu$ mol/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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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  $\mu$ mol/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  $\times$  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 20vol%アセトニトリル, 注入量: 10  $\mu$ L

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-5-6) 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-5-5 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  $\mu$ g/mL, Naringin-G: 0.85 ~ 68  $\mu$ g/mL, Naringin-2G: 0.86 ~ 68  $\mu$ g/mL, Naringin-3G: 1.4 ~ 114  $\mu$ g/mL, Naringin-4G: 1.3 ~ 108  $\mu$ g/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 ( $\mu$ g/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-5-7) 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、α-Glycosylnaringin、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-5-7-1) 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系吸着用樹脂 (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、B-5-3 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  $A_G$  並びに標準溶液のナリンジンまたは 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。

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-5-7-2) 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-5-7-1 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 ( $\mu\text{g}$ )、V は試験溶液の量 (50 mL)、W は試料の採取量 (mg) である。

### B-5-7-3) 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 (%)  
= ナリンゲニン含量 (%) +  $\alpha$ -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) $^1\text{H-qNMR}$ によるラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

#### C-1-1) $^1\text{H-qNMR}$ によるモグロシド V 標準品の定量

$^1\text{H-qNMR}$  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と言える。そこで、本法のモグロシド V 分析への適用性を明らかにするため、市販標準品について 3 併行で  $^1\text{H-qNMR}$  測定を行った。通常、 $^1\text{H-qNMR}$  では、定量性を確保した条件を用いる必要が

ある。代表的な測定条件を表 1 に示す。本研究では、この測定条件を用いて  $^1\text{H-qNMR}$  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。その結果、図 2 に示すように、 $^1\text{H-qNMR}$  測定により得られたモグロシド V の  $^1\text{H NMR}$  スペクトル上、 $\delta$  0.8~3.0 ppm 付近には、アグリコンに由来する飽和炭化水素のシグナル群、 $\delta$  3.2~5.0 ppm 付近には、糖部に由来する水素シグナル群がそれぞれ観察された。しかし、これらの領域に観察されたシグナル群は、分子内の他のシグナルと部分的または全体的に重なるため、定量における適切な積分範囲の設定が困難と考えられた。一方、 $\delta$  5.57 ppm に観察された 6 位に由来する水素シグナルは、他の分子内のシグナルと十分に分離されていたため、モグロシド V 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、92.1% と算出された。また、このシグナルから算出された定量値の相対標準偏差 (RSD) は 0.2% と良好であった。

#### C-1-2) $^1\text{H-qNMR}$ によるラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

ラカンカ抽出物 3 種について、 $^1\text{H-qNMR}$  によるモグロシド V の含量測定を行い ( $n=3$ )、得られた結果を LC 法 ( $n=3$ ) と比較した。なお、 $^1\text{H-qNMR}$  では、スペクトル上のモグロシド V 由来のシグナルと夾雑物のシグナルとの分離度などを考慮して、前項で示した  $\delta$  5.57 ppm (6 位) を用いてモグロシド V 含量を算出した。各ラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量を表 2、各抽出物の  $^1\text{H NMR}$  スペクトルを図 3~5、LC クロマトグラムを図 6~8 にそれぞれ示した。表 2 に示すように、 $^1\text{H-qNMR}$  から算出されたモグロシド V の含量値は、LC より得られた含量値と比較して 6~13% 程度高い結果となった。そこで、試料 2 を用いて 2 次元 NMR 測定 (HMBC, HMQC) を行い、分子内の炭素と 6 位の水素との相関を確認したところ、HMQC では、6 位の炭素シグナルのみ、HMBC では 2~3 結合離れたモグロシド V の



炭素との相関が観察されたものの、他の化合物に由来すると考えられる相関は観察されなかった。Chaturvedulaらは、ラカンカより調製したラカンカ抽出物（50 g中）には、モグロシド類としてモグロシドVのほかモグロシドIVa, モグロシドVIなど、モグロシドVと共通のアグリコン（モグロール, Mogrol）をもつものや11位のヒドロキシ基がオキソ基に置換した11-オキソ-モグロシドVなどが存在することを報告している<sup>15)</sup>。これらのアグリコンの化学構造を考慮すると、モグロシドVの6位の水素シグナルは他のモグロシド類の6位の水素シグナルと十分に分離できず、結果として定量値が過大になったものと推測された。

## C-2) RMSによるラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量

C-1-2で示したように、ラカンカ抽出物中のモグロシドVの定量において、他の類縁物質との分離度との兼ね合いから前処理を伴わない<sup>1</sup>H-qNMRでは定量が困難であることが確認された。そこで、この問題を解決する方法として、相対感度係数（Relative Response Factor, RRF）を用いた分析法に着目した。この方法は、基準物質に対する測定対象化合物のRRFが明らかな場合、基準物質を内標準物質として用い、基準物質および測定対象化合物の検出器における応答値とRRFの関係から、測定対象化合物と同一の定量用標品を必要としないクロマトグラフィーを利用した定量法である。最近では、<sup>1</sup>H-qNMRとクロマトグラフィーを組み合わせ、任意の検出器における化合物間の正確な相対モル感度（Relative Molar Sensitivity, RMS）から測定対象化合物を定量する方法が考案され、食品添加物等への定量に利用されている<sup>10-14)</sup>。そこで、本項ではこのRMS法による定量法のモグロシドV分析への適用性について検討を行った。

### C-2-1) モグロシドVおよびカフェインの<sup>1</sup>H-qNMR測定

モグロシドVは、220 nmより短波長側に吸

収極大を有することから、今回のRMS法における定量用標品として、短波長側に大きな吸収極大をもちかつ安価なカフェインを選択した。まず、RMSの算出に使用するモグロシドV標準品およびカフェイン（無水）（特級グレード）の純度を<sup>1</sup>H-qNMRにより算出した（n=3）。カフェインについては、図9に示すように、<sup>1</sup>H-qNMRスペクトル上、 $\delta$  3.0-3.9 ppmにメチル基に由来する3本のシグナル、 $\delta$  7.86 ppmには、8位の水素に由来するシグナルがそれぞれ検出された。このうち、 $\delta$  7.86 ppmのシグナルを定量用シグナルとして選択し、カフェインの純度を算出したところ、98.5%（RSD 0.6%）であることが判明した。モグロシドV標準品の純度については、C-1-1に記載したように92.1%（RSD 0.2%）であった。これらモグロシドVおよびカフェインの純度を考慮し、以下の検討を行った。

### C-2-2) カフェインに対するモグロシドVのRMSの算出

カフェインに対するモグロシドVのRMSを算出するため、3濃度（ $0.319 \times 10^{-3}$ ,  $0.639 \times 10^{-3}$  および  $2.56 \times 10^{-3}$  mol/L）のカフェインにおけるモグロシドVのRMSについて検討した。

なお、検討に使用したモグロシドVは6濃度（ $0.058 \times 10^{-3}$ ~ $1.86 \times 10^{-3}$  mol/L）とし、B-4-2に示すLC条件を用いて各濃度に調製したカフェイン・モグロシドV混液を分析し、各カフェイン濃度におけるRMSを算出した。表3、4および5に示すように、各カフェイン濃度より算出されたRMSの結果から、カフェインに対するモグロシドVのRMSは0.122であることが判明した。なお、モグロシドVは検討した濃度範囲において良好な直線性を示した。

次に、得られたRMS（0.122）の適用性を評価するため、各濃度のカフェインについて原点との一点検量線を作成し（図10）、6濃度のモグロシドVの面積値を代入しRMSを用いてモグロシド濃度を算出（計算値）し、秤量濃度（秤量値）と比較した。その結果、表6、7および8に示すように全濃度のモグロシドVの秤量値と計算値の差は6%以下であることが

確認された。

### C-2-3) RMS を用いたラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量

ラカンカ抽出物 3 種について、RMS によるモグロシド V の含量測定を行い (n=3)、モグロシド V 標準品を用いて作成した検量線より算出された含量と比較した。各ラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量を表 9、各抽出物の LC クロマトグラムを図 11~13 にそれぞれ示した。各濃度のカフェインを用いて算出された各ラカンカ抽出物中のモグロシド V の含量は、モグロシド V 標準品を用いて算出された含量と有意な差は認められなかった。以上より、カフェインを定量用標品とした RMS を用いた分析法は、ラカンカ抽出物中のモグロシド V の定量に有効と考えられた。

### C-3) 酵素処理ナリンジン中ナリンジンおよび糖転位ナリンジンの定量

#### C-3-1) 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 14 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 15 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  $\alpha$ -Glycosylnaringin (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 $\rightarrow$ 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 16)。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 17)。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<sup>-</sup>), Naringin-2G : 904 (M<sup>-</sup>), Naringin-3G :  $m/z$  1066 (M<sup>-</sup>), Naringin-4G : 1228 (M<sup>-</sup>)

ESI-MS (negative)

Naringin-G :  $m/z$  742 (M<sup>-</sup>), Naringin-2G : 904 (M<sup>-</sup>), Naringin-3G :  $m/z$  1066 (M<sup>-</sup>), Naringin-4G : 1228 (M<sup>-</sup>)

#### C-3-2) $^1\text{H}$ -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<sup>1</sup>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*<sub>6</sub>: δ 0 ppm) とし、δ 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 18 に示すように、<sup>1</sup>H NMR スペクトル上、δ 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、δ 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、δ 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、δ 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 10 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、δ 3.82 ppm にメトキシ基に由来するシグナル、δ 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)、δ 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 19)。これらのうち、δ 6.87 ppm のシグナルおよび δ 7.84 ppm のシグナルより純度を算出したところ、93.9% (δ 6.87 ppm) および 93.8% (δ 7.84 ppm) 結果となった。このうち、δ 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-3-3) 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 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 μmol/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 20 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 11 に示すように 1.23~1.24 であることが判明した。

### C-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

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 12 に示すように 0.994~1.00 であることが判明した。

### C-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

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 13 および表 14、各酵素処理ナリンジン製品の LC クロマトグラムは図 21 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等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 15）。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。

### C-3-6) ナリンジンおよび Naringin-G を標品とする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

前項でも示したように、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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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、図 22 および表 16 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、ラカンカ抽出物および酵素処理ナリンジンを対象とした<sup>1</sup>H-qNMR による定量および<sup>1</sup>H-qNMR と LC を組み合わせた相対モル感度（RMS）法を用いた定量法について検討を行った。

ラカンカ抽出物では、<sup>1</sup>H-qNMR 法において、得られた 3 種のラカンカ抽出物中のモグロシド V の含量値は、LC の含量値と比較して 6~13% 程度高い結果を示した。これは、定量に用いた 6 位の水素に由来するシグナルがモグロシド V の類縁物質に由来するシグナルと十分な分離が果たせていないことに起因すると考えられた。他のモグロシド V 由来のシグナルについても、分子内の他のシグナルや夾雑成分に由来するシグナルとの重なりが観察されたことから、前処理を伴わない本法によるモグロシド V の定量は困難であり、前処理等の

更なる検討が必要と考えられた。

一方、RMS法では、カフェインを定量用標品として、カフェインに対するモグロシドVのRMS(0.122)より算出されたモグロシドVの含量は、従来法(モグロシドVを定量用標品として用いた方法)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、ラカンカ抽出物中のモグロシドVの含量を正確かつ安価に定量できることが判明した。

酵素処理ナリンジンでは、RMS法において、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こと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。

また、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、ナリンジンに対するNaringin-GのRMS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 <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, 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 <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).
  15. Chaturvedula, V. S. S., Prakash, I.: Cucurbitane glycosides from *Siraitia grosvenorii*. J. Carbohydr. Chem., **30**, 16-26 (2011).

## F. 研究発表

### 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 年 3 月, 千葉市)
2. 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)
3. 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

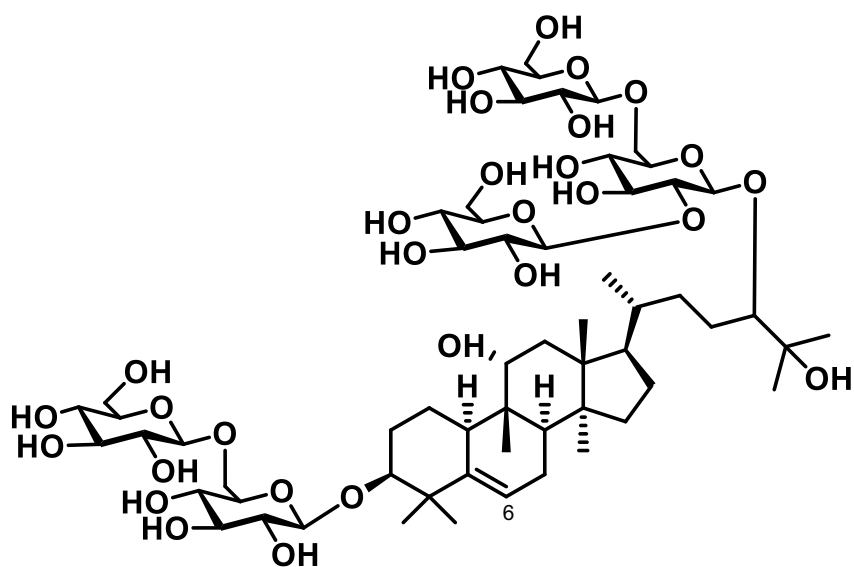


図1 モグロシドVの化学構造

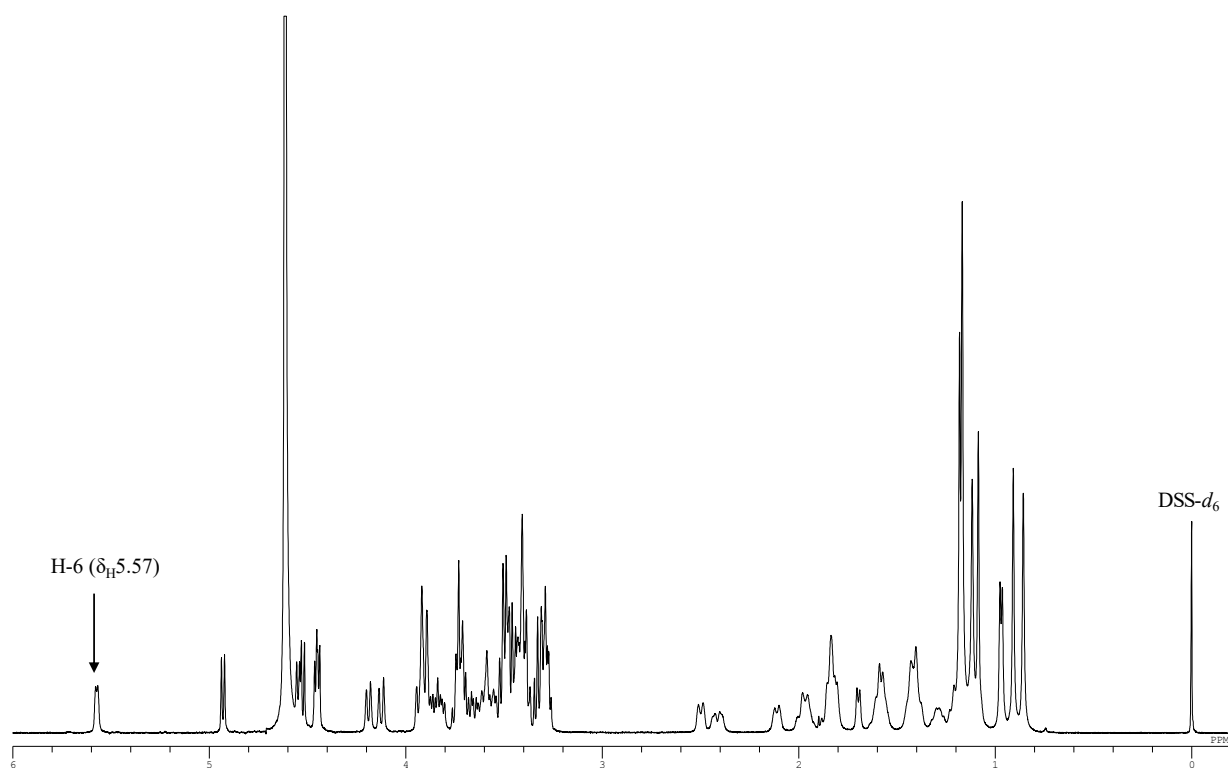


図2 モグロシドVの<sup>1</sup>H-qNMR スペクトル

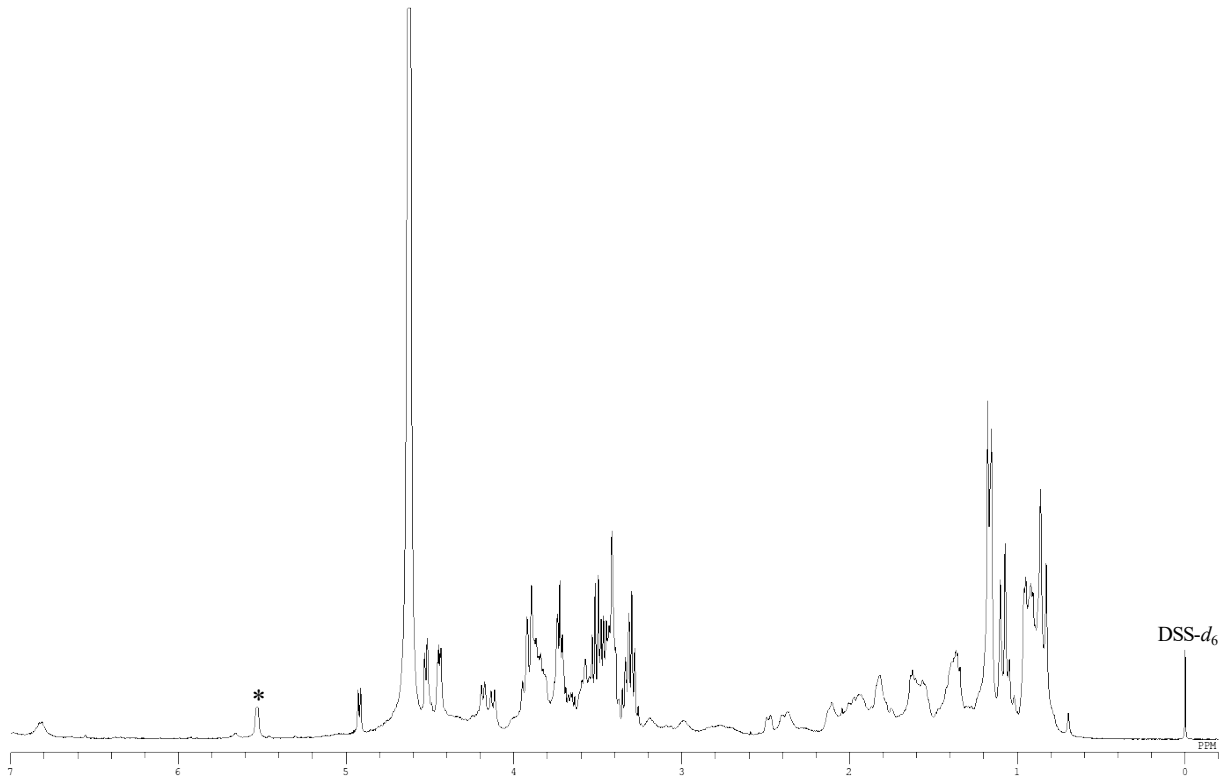


図3 ラカンカ抽出物（試料1）の $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル  
\*：定量用シグナル

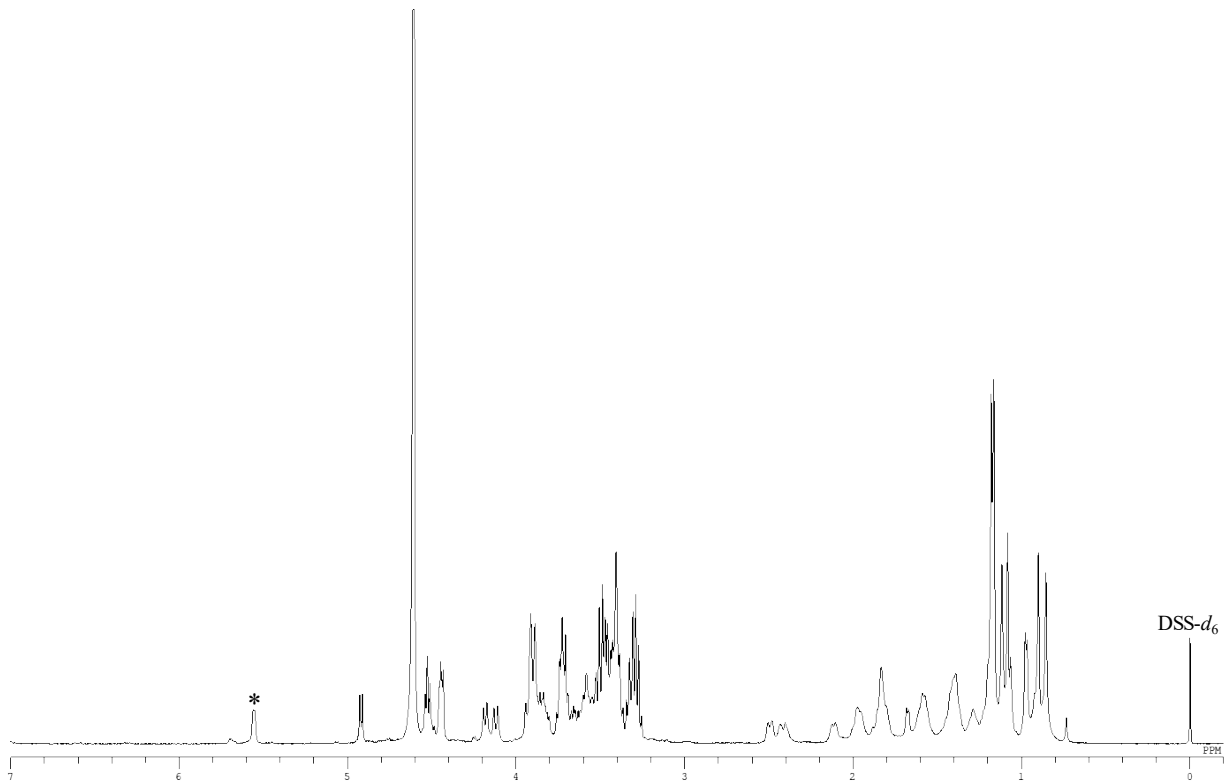


図4 ラカンカ抽出物（試料2）の $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル  
\*：定量用シグナル



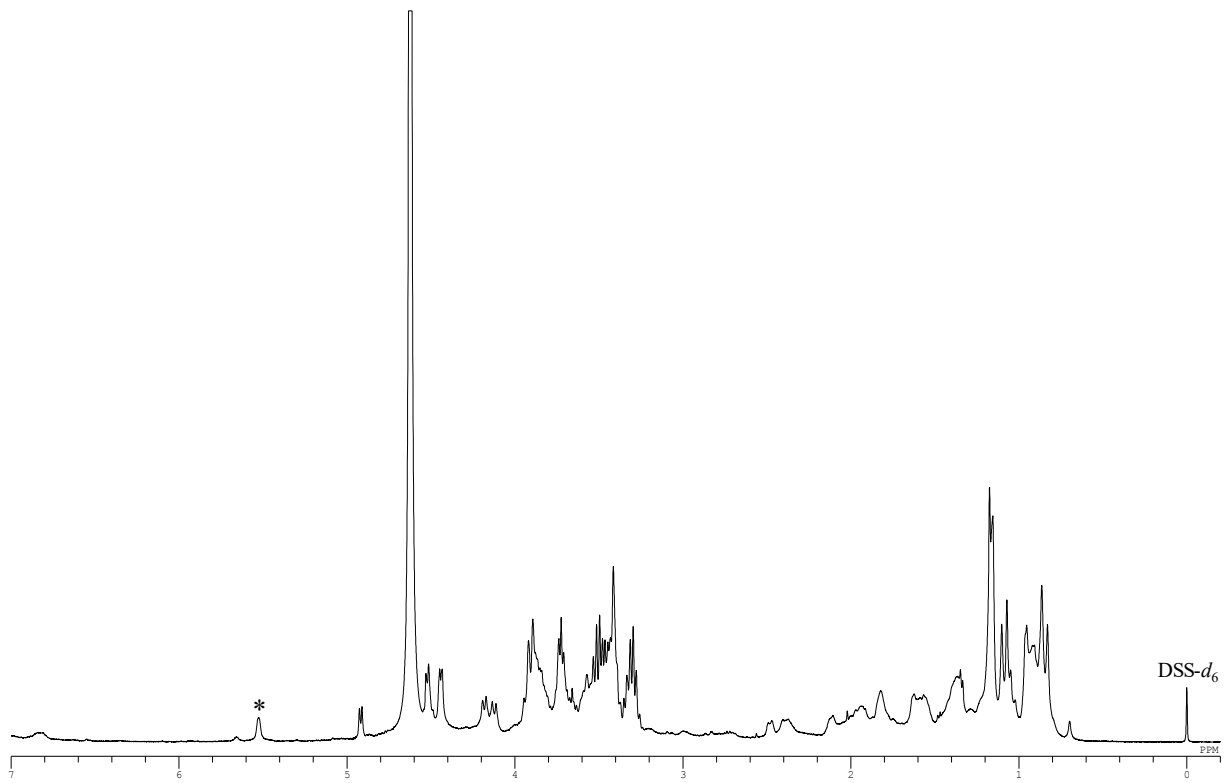


図5 ラカンカ抽出物（試料3）の $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル  
\*：定量用シグナル

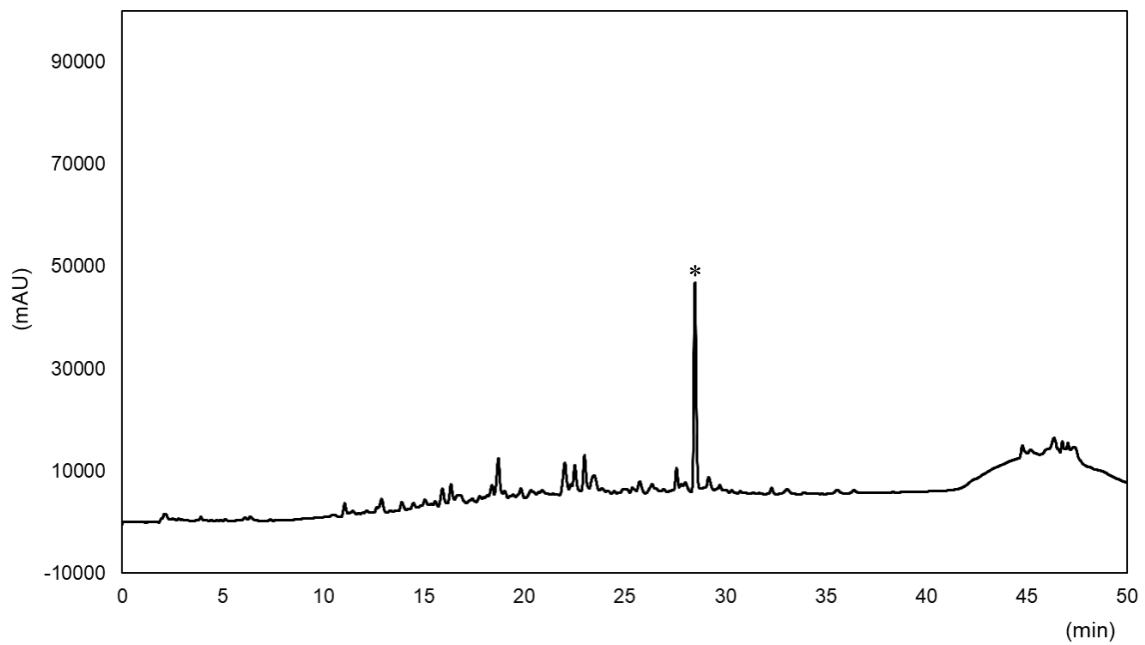


図6 ラカンカ抽出物（試料1）のLCクロマトグラム  
\*：モグロシドV

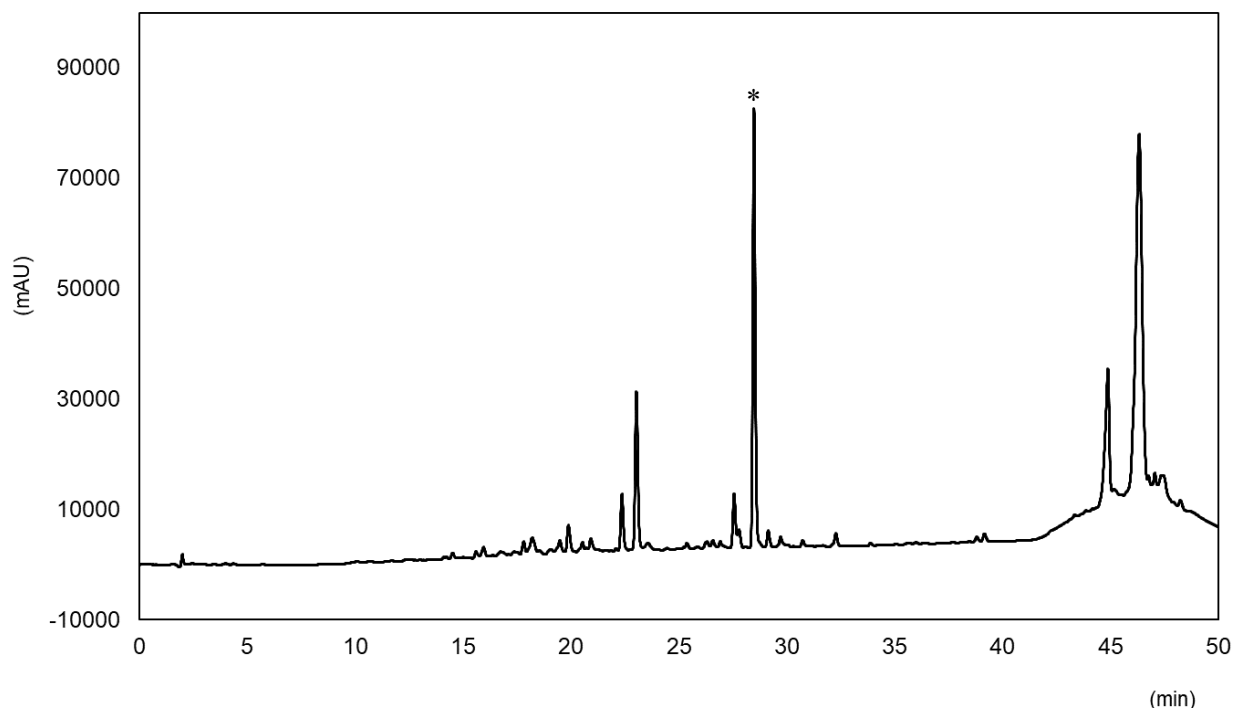


図7 ラカンカ抽出物（試料2）のLCクロマトグラム  
\*：モグロシドV

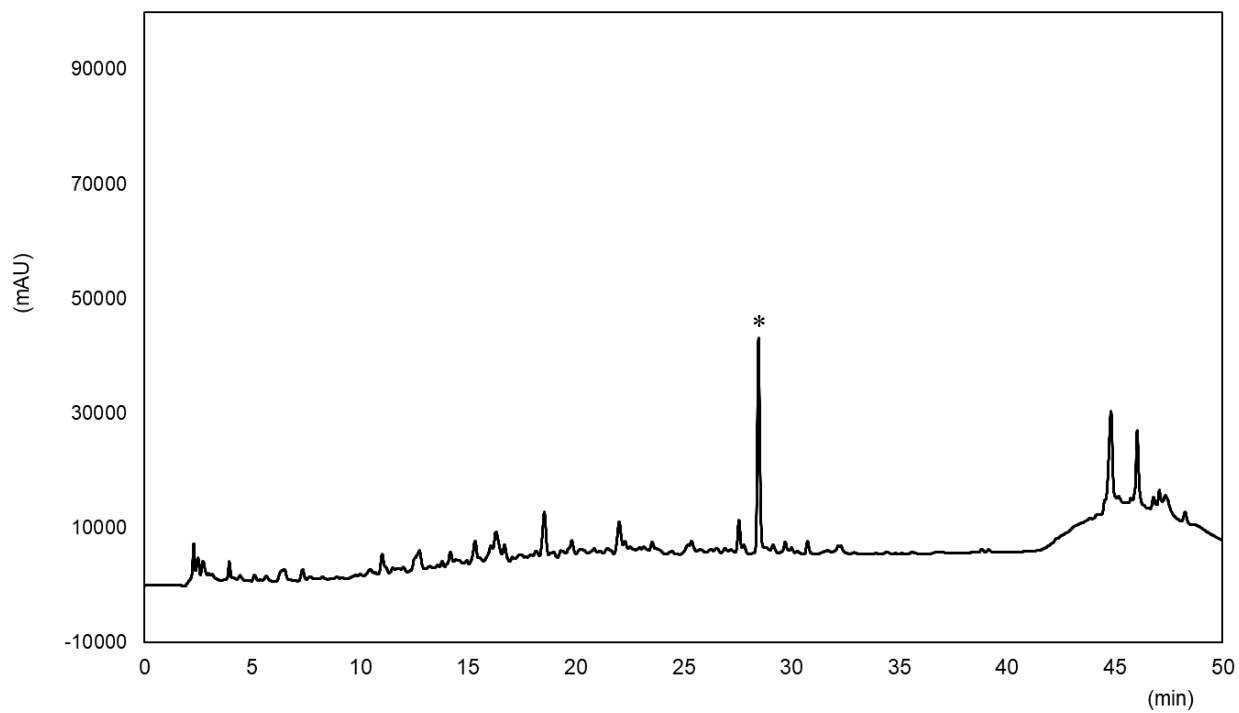


図8 ラカンカ抽出物（試料3）のLCクロマトグラム  
\*：モグロシドV

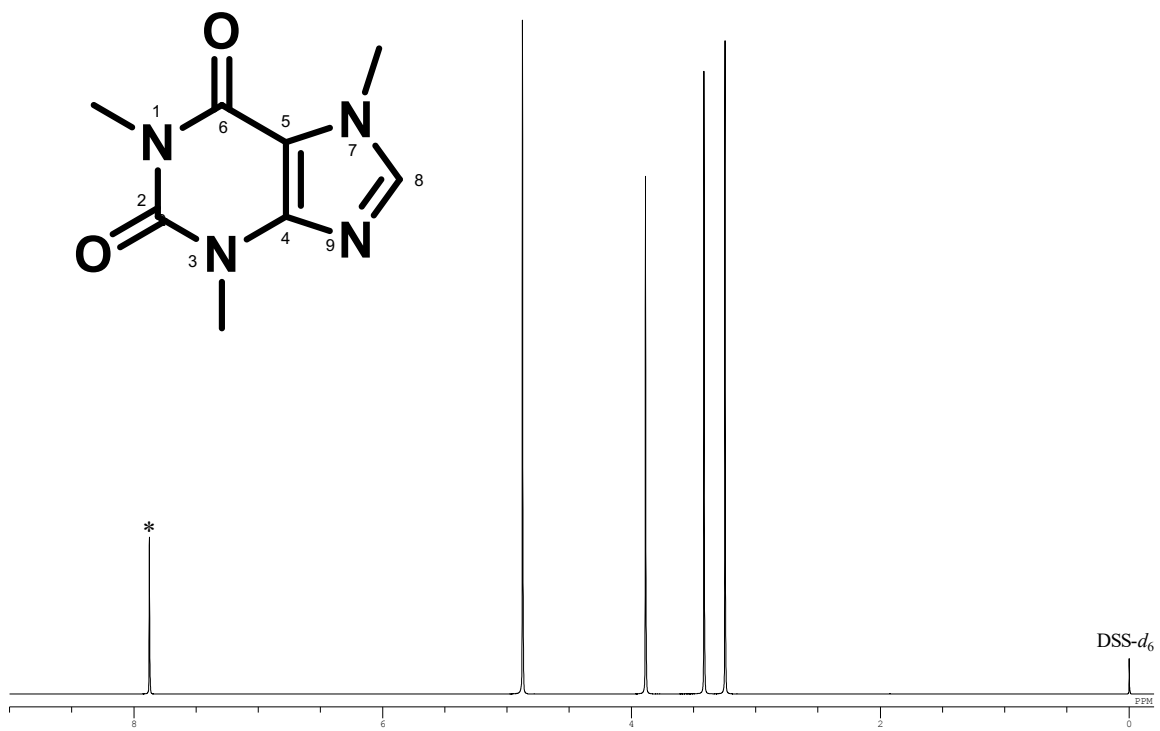


図9 カフェインの化学構造および<sup>1</sup>H-qNMR スペクトル  
\* : 定量用シグナル

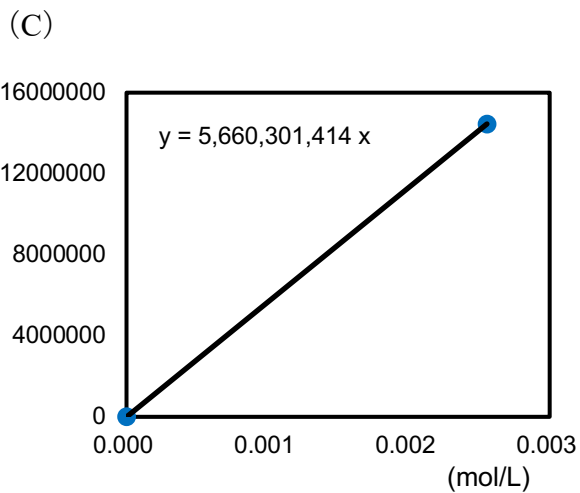
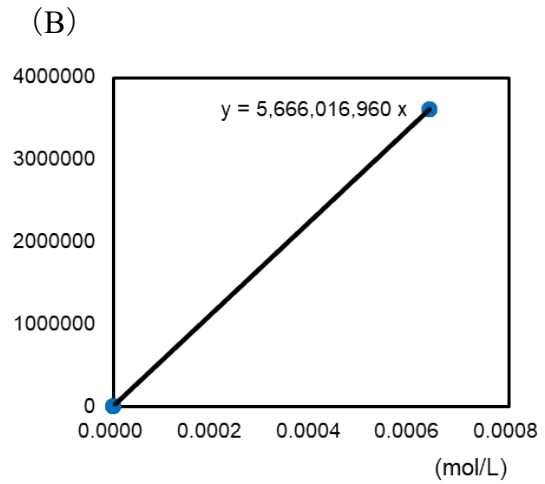
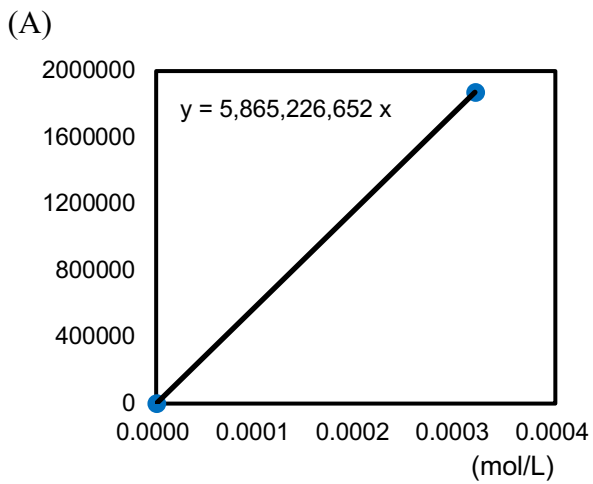


図 10 カフェインの検量線

(A)  $0.319 \times 10^{-3}$  mol/L, (B)  $0.639 \times 10^{-3}$  mol/L, (C)  $2.56 \times 10^{-3}$  mol/L

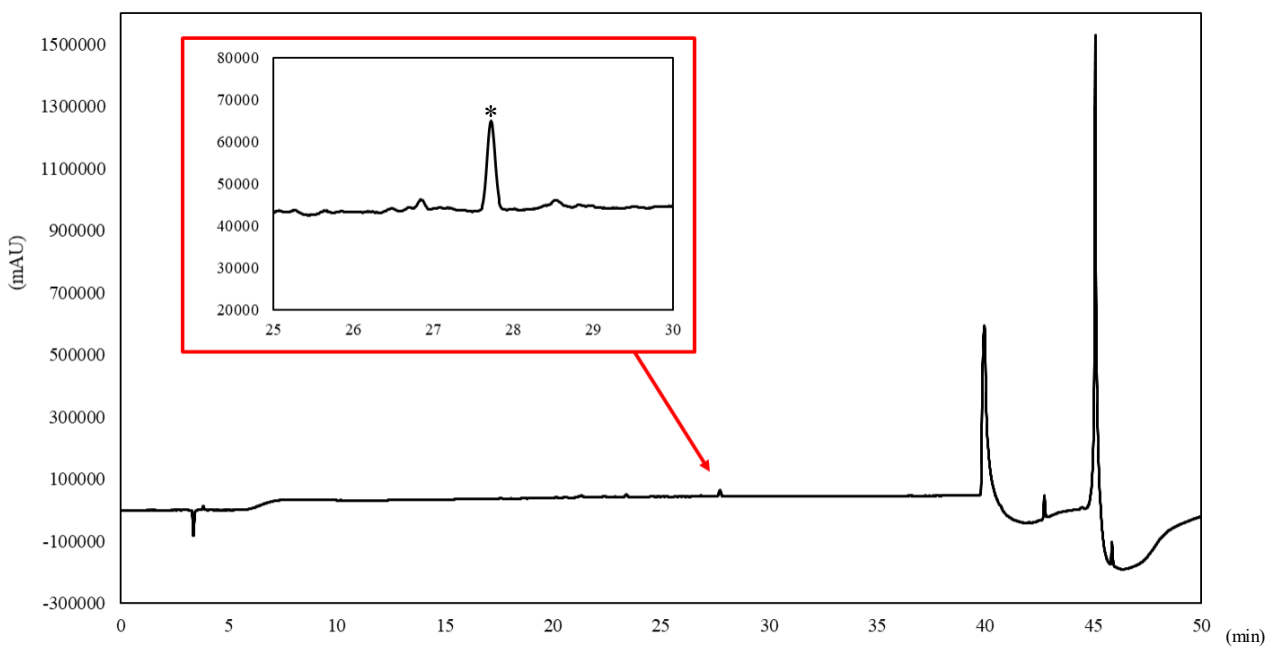


図 11 ラカンカ抽出物（試料 1）の LC クロマトグラム

\* : モグロシド V

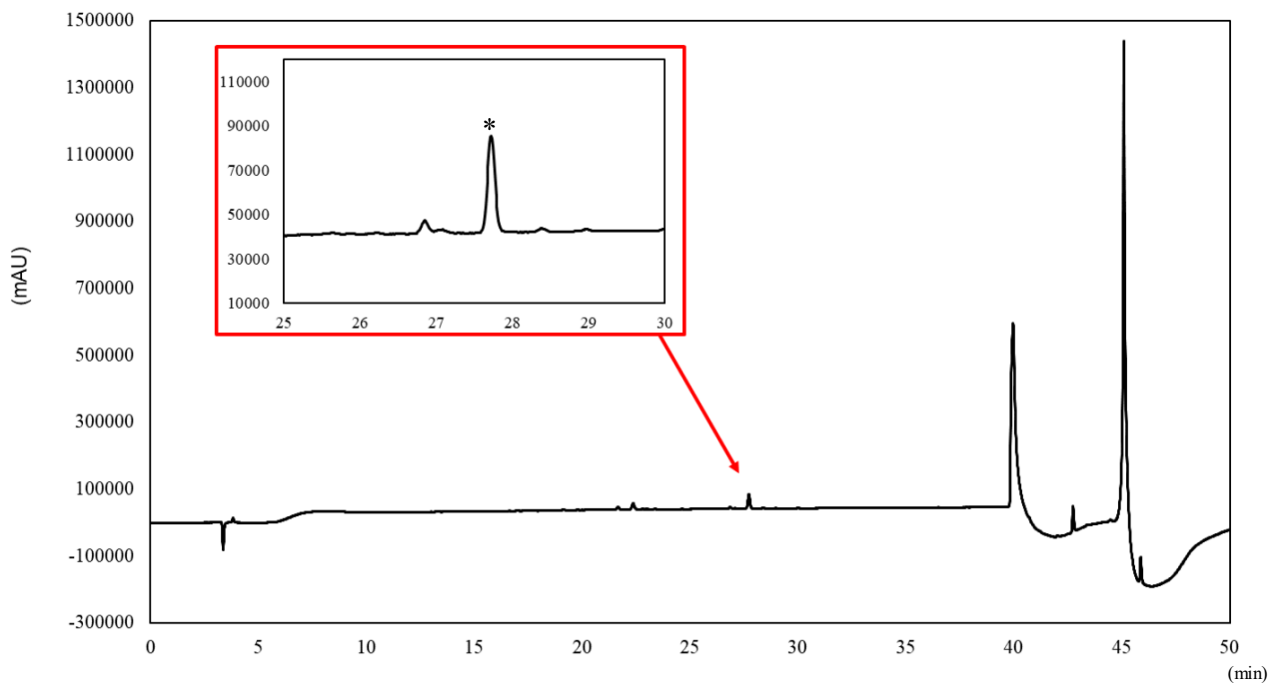


図 12 ラカンカ抽出物（試料 2）の LC クロマトグラム  
\* : モグロシド V

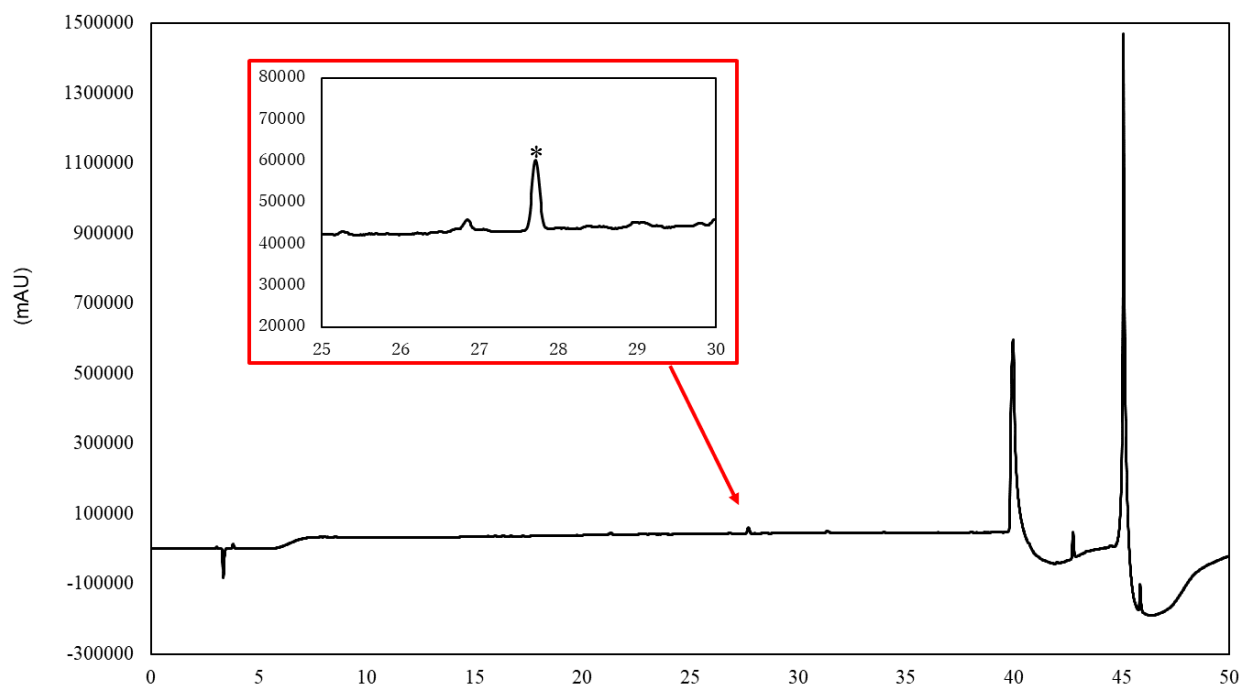


図 13 ラカンカ抽出物（試料 3）の LC クロマトグラム  
\* : モグロシド V

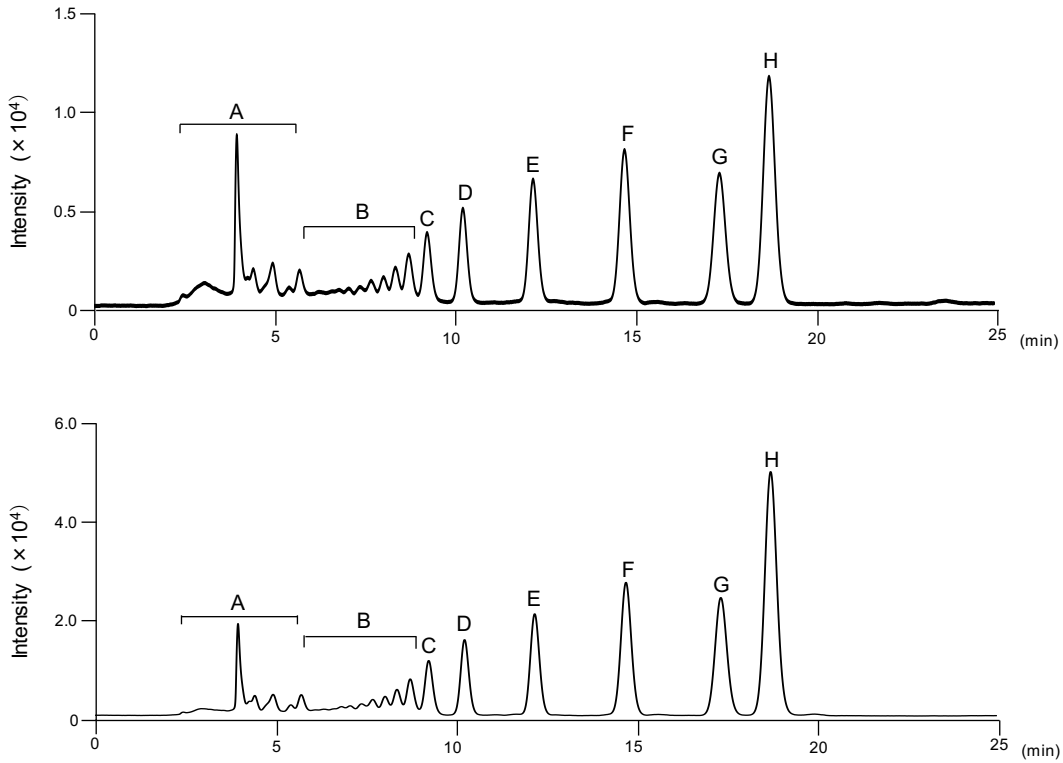


図 14 酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム  
 上段：試料 1 (A172)，下段：試料 2 (C2010)

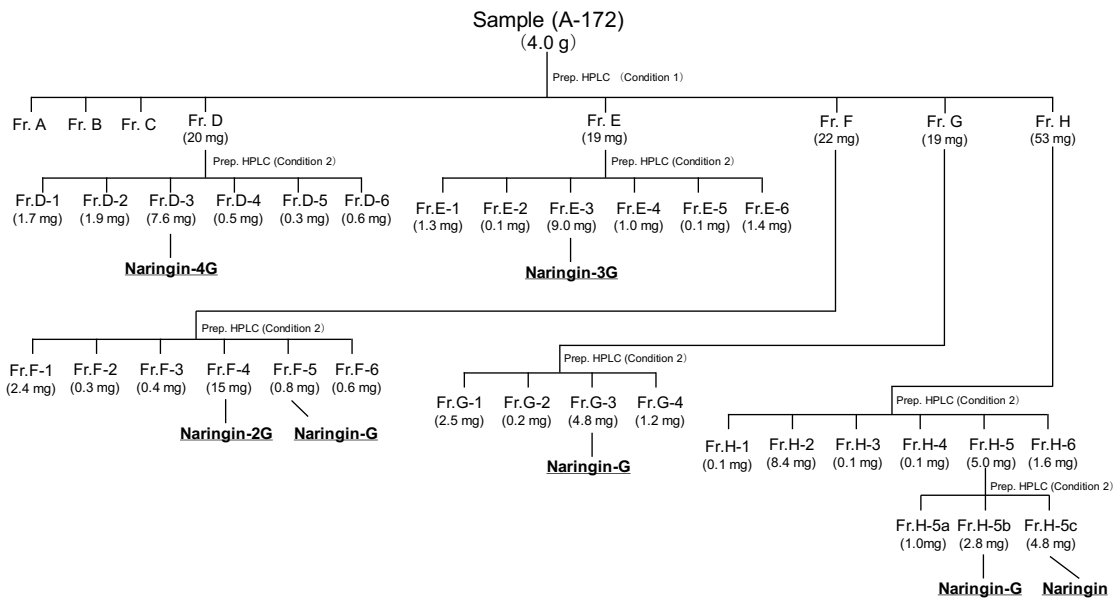


図 15 酵素処理ナリンジン製品 (試料 1 : A172) からの糖転位ナリンジン類の単離

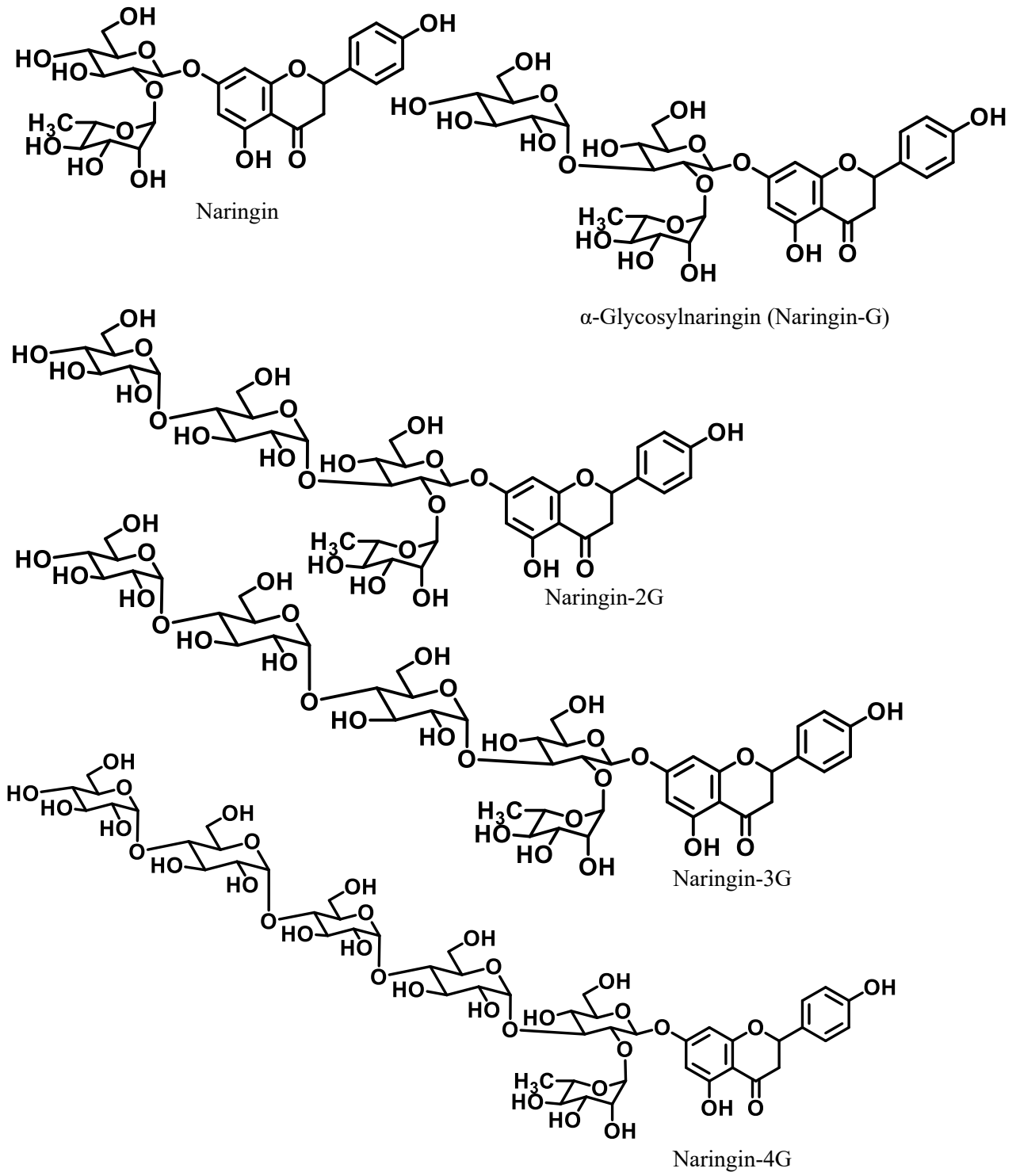


図 16 ナリンジンおよび単離した糖転位ナリンジン類の化学構造

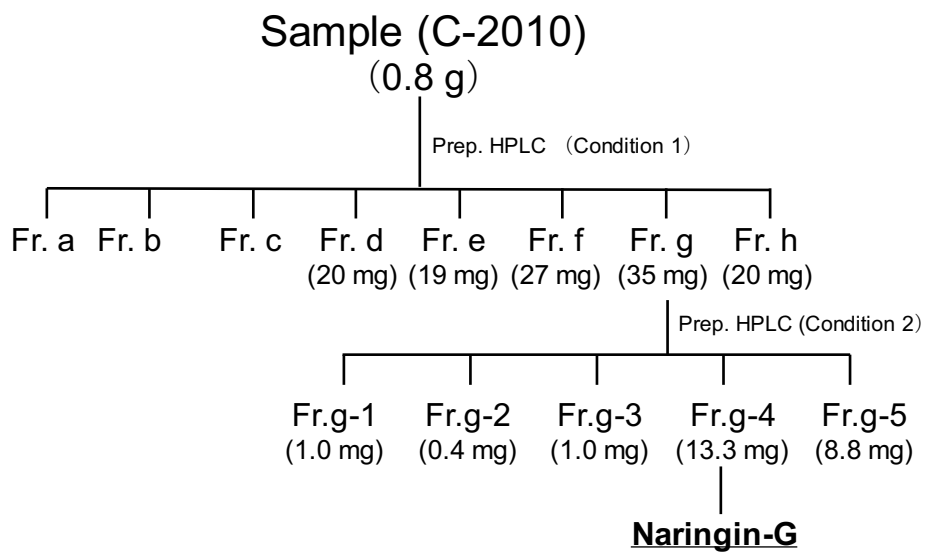


図 17 酵素処理ナリンジン製品（試料 2 : C2010）からの  $\alpha$ -Glycosyl naringin (Naringin-G) の単離



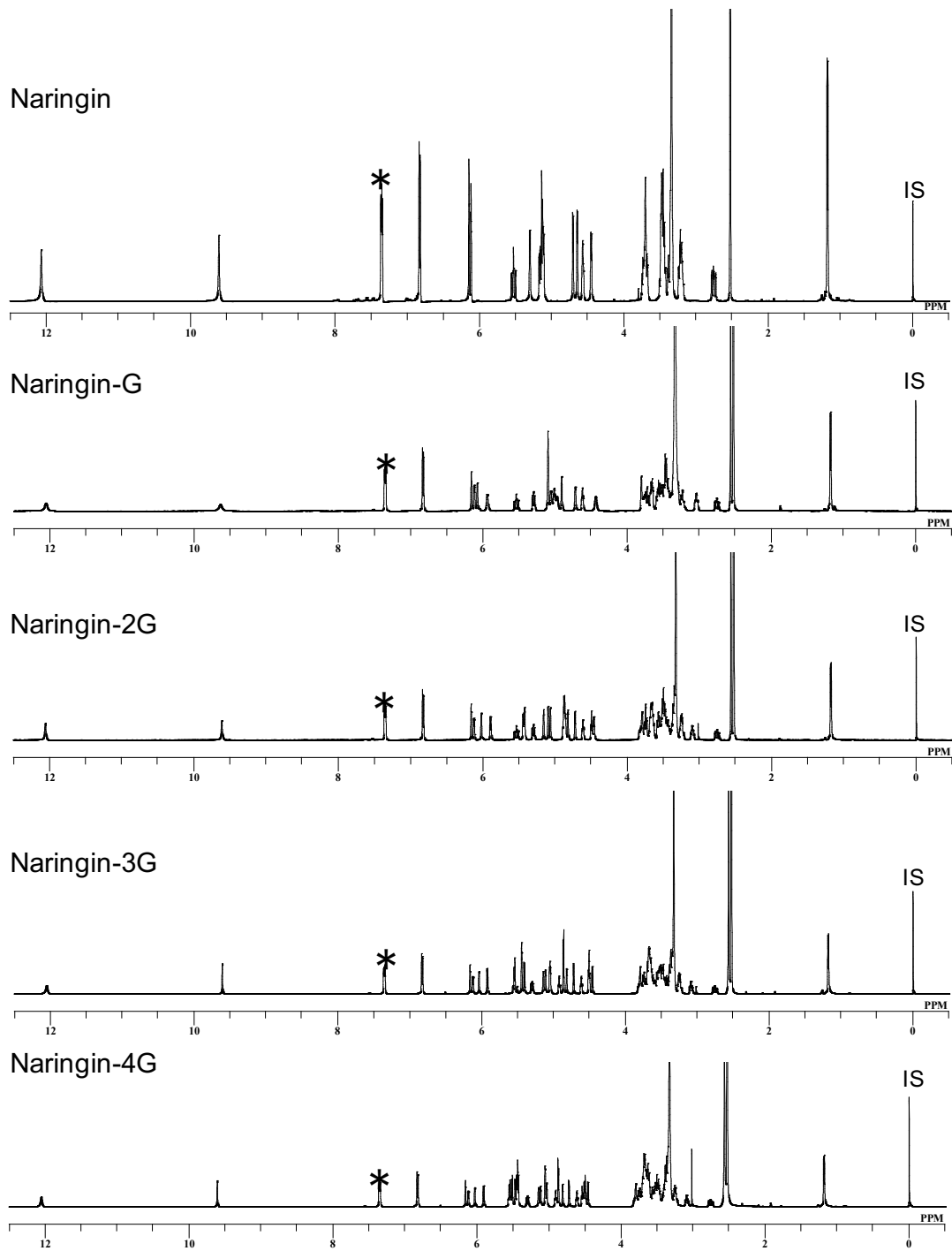


図 18 ナリンジンおよび糖転位ナリンジン類の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル  
 \* : 定量シグナル

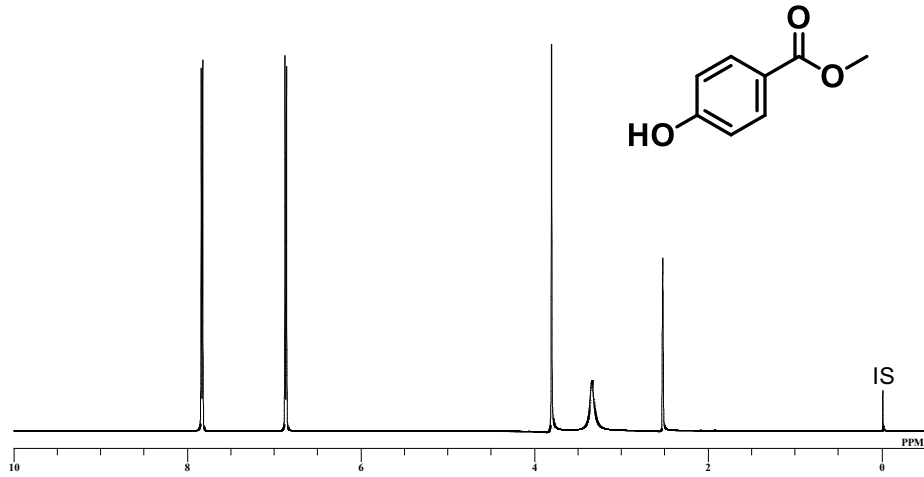


図 19 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの化学構造および<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

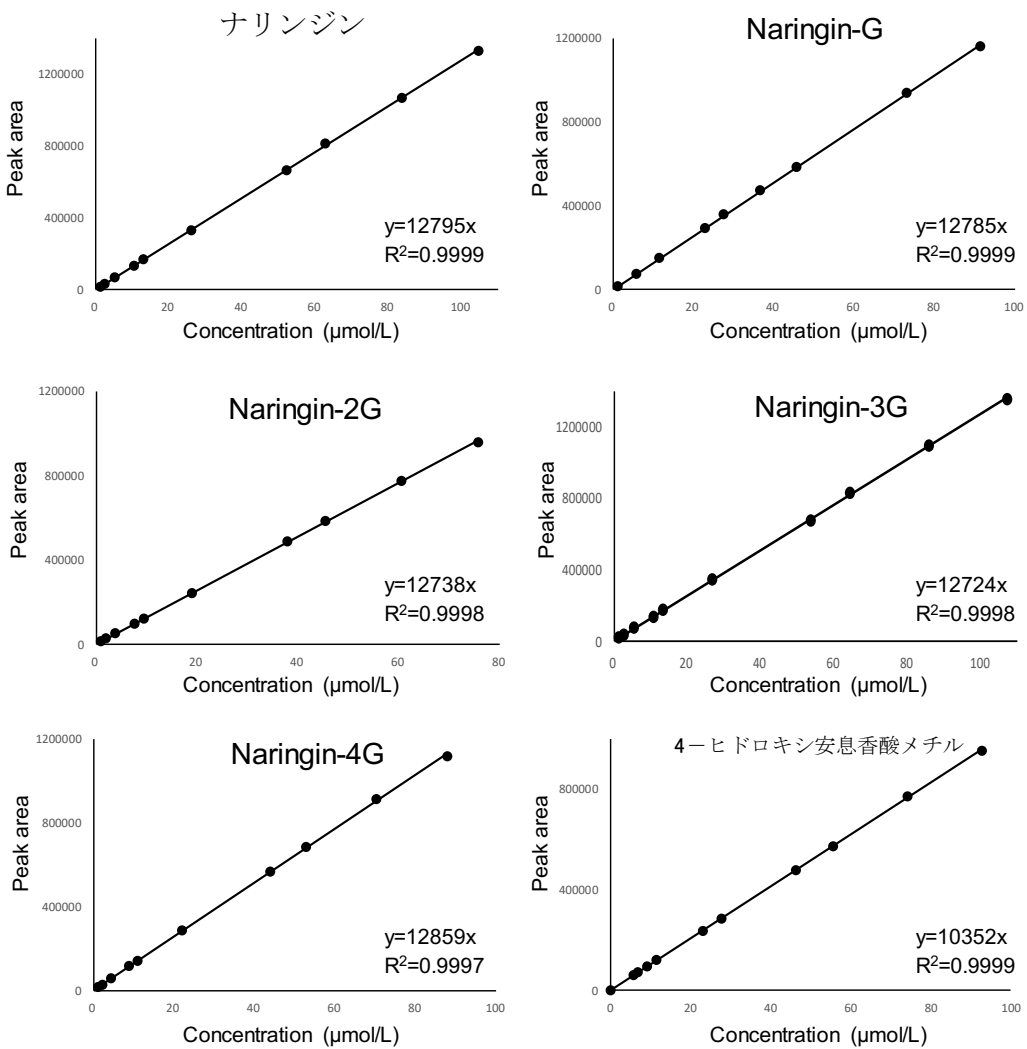


図 20 各測定対象および定量用標品の回帰直線

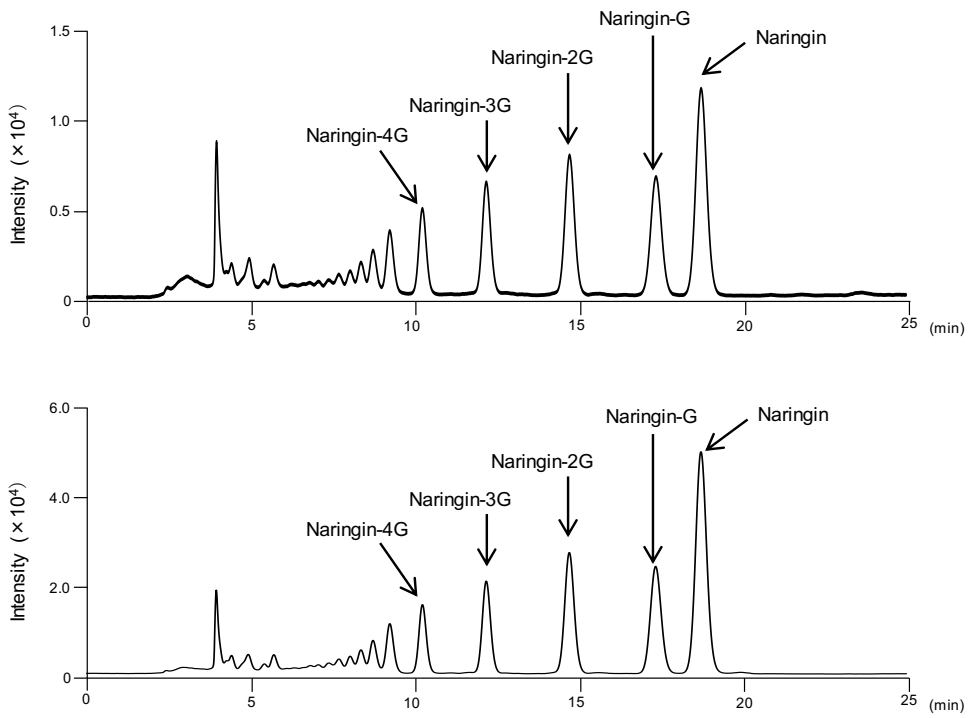


図 21 酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム

上段：試料 1 (A172)，下段：試料 2 (C2010)

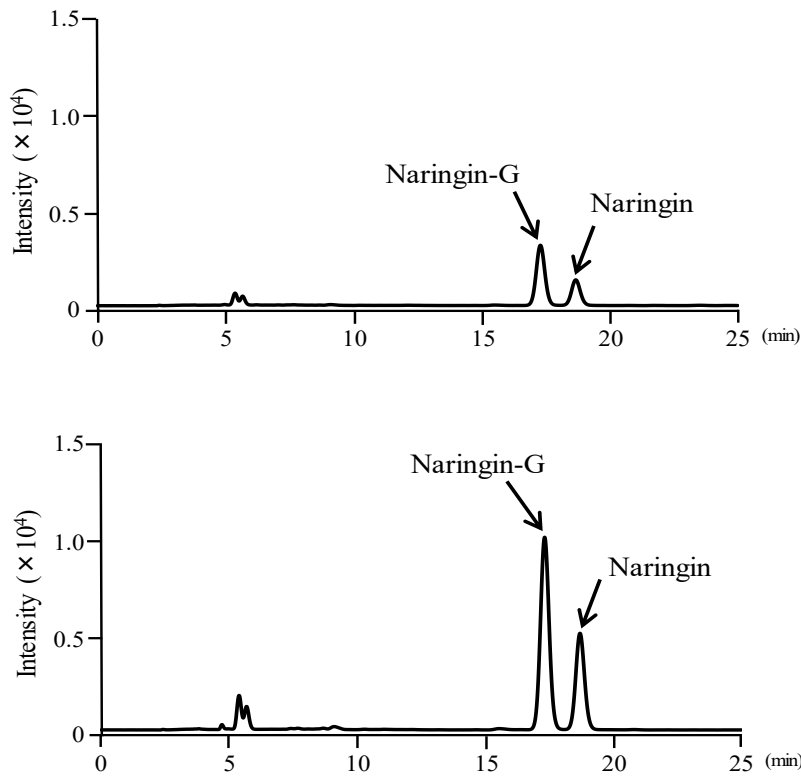


図 22 グルコアミラーゼ処理後の酵素処理ナリンジン製品のクロマトグラム

上段：試料 1 (A172)，下段：試料 2 (C2010)

表 1  $^1\text{H}$ -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
$^{13}\text{C}$ decoupling	multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2  $^1\text{H}$ -qNMR および LC による 3 種のラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量の比較 (n=3)

試料	含量 (%)	
	$^1\text{H}$ -qNMR	LC
1	33.7 ± 0.4	27.1 ± 0.3
2	62.2 ± 0.8	49.6 ± 1.5
3	33.2 ± 0.7	22.0 ± 0.8

表 3 カフェイン ( $0.319 \times 10^{-3}$  mol/L) に対する各モグロシド V 濃度より算出されたの相対モル感度

カフェイン		モグロシド V		相対モル感度
モル濃度 (mol/L)	ピーク面積値	モル濃度 (mol/L)	ピーク面積値	
$0.319 \times 10^{-3}$	1873307	$0.0580 \times 10^{-3}$	39944	0.117
		$0.116 \times 10^{-3}$	80798	0.119
		$0.232 \times 10^{-3}$	166419	0.122
		$0.464 \times 10^{-3}$	326601	0.120
		$0.928 \times 10^{-3}$	649288	0.119
		$1.86 \times 10^{-3}$	1247291	0.115
平均				0.119
標準偏差				0.0026

表 4 カフェイン ( $0.639 \times 10^{-3}$  mol/L) に対する各モグロシド V 濃度より算出されたの相対モル感度

カフェイン		モグロシド V		相対モル感度
モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	
$0.639 \times 10^{-3}$	3619362	$0.0580 \times 10^{-3}$	39944	0.121
		$0.116 \times 10^{-3}$	80798	0.123
		$0.232 \times 10^{-3}$	166419	0.127
		$0.464 \times 10^{-3}$	326601	0.124
		$0.928 \times 10^{-3}$	649288	0.123
		$1.86 \times 10^{-3}$	1247291	0.119
平均				0.123
標準偏差				0.0027

表 5 カフェイン ( $2.56 \times 10^{-3}$  mol/L) に対する各モグロシド V 濃度より算出されたの相対モル感度

カフェイン		モグロシド V		相対モル感度
モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	モル濃度(mol/L)	ピーク面積値	
$2.56 \times 10^{-3}$	14462844	$0.0580 \times 10^{-3}$	39944	0.122
		$0.116 \times 10^{-3}$	80798	0.123
		$0.232 \times 10^{-3}$	166419	0.127
		$0.464 \times 10^{-3}$	326601	0.124
		$0.928 \times 10^{-3}$	649288	0.124
		$1.86 \times 10^{-3}$	1247291	0.119
平均				0.123
標準偏差				0.0027

表 6 モグロシドVの濃度に関する秤量値と計算値の比較 (カフェイン濃度  $0.319 \times 10^{-3}$  mol/L)

モグロシドV濃度 (mol/L)		Bias (%)
秤量値	計算値	
$0.0580 \times 10^{-3}$	$0.0561 \times 10^{-3}$	3.4
$0.116 \times 10^{-3}$	$0.113 \times 10^{-3}$	2.3
$0.232 \times 10^{-3}$	$0.233 \times 10^{-3}$	-0.6
$0.464 \times 10^{-3}$	$0.458 \times 10^{-3}$	1.3
$0.928 \times 10^{-3}$	$0.911 \times 10^{-3}$	1.9
$1.86 \times 10^{-3}$	$1.75 \times 10^{-3}$	5.7

表 7 モグロシドV濃度に関する秤量値と計算値の比較 (カフェイン濃度  $0.639 \times 10^{-3}$  mol/L)

モグロシドV濃度 (mol/L)		Bias (%)
秤量値	計算値	
$0.0580 \times 10^{-3}$	$0.0580 \times 10^{-3}$	0.01
$0.116 \times 10^{-3}$	$0.117 \times 10^{-3}$	-1.1
$0.232 \times 10^{-3}$	$0.242 \times 10^{-3}$	-4.2
$0.464 \times 10^{-3}$	$0.474 \times 10^{-3}$	-2.2
$0.928 \times 10^{-3}$	$0.943 \times 10^{-3}$	-1.6
$1.86 \times 10^{-3}$	$1.81 \times 10^{-3}$	2.4

表 8 モグロシドV濃度に関する秤量値と計算値の比較 (カフェイン濃度  $2.56 \times 10^{-3}$  mol/L)

モグロシドV濃度 (mol/L)		Bias (%)
秤量値	計算値	
$0.0580 \times 10^{-3}$	$0.0581 \times 10^{-3}$	-0.1
$0.116 \times 10^{-3}$	$0.117 \times 10^{-3}$	-1.2
$0.232 \times 10^{-3}$	$0.241 \times 10^{-3}$	-4.3
$0.464 \times 10^{-3}$	$0.475 \times 10^{-3}$	-2.3
$0.928 \times 10^{-3}$	$0.944 \times 10^{-3}$	-1.7
$1.86 \times 10^{-3}$	$1.81 \times 10^{-3}$	2.3

表 9 2 種の方法による各ラカンカ抽出物中のモグロシド V 含量の比較 (n=3)

試料	相対モル感度法			絶対検量線法
	カフェイン濃度 (mol/L)			
	$2.56 \times 10^{-3}$	$0.639 \times 10^{-3}$	$0.319 \times 10^{-3}$	
1	27.9	27.9	27.0	26.9
2	54.1	54.1	52.2	52.0
3	24.6	24.5	23.7	23.6

表 10  $^1\text{H-qNMR}$  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 11 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 12 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 13 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 (%)
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 14 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 15 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	32.2

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.



表 16 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 (%)	Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)	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
$\alpha$ -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