

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～既存添加物オリゴガラクトuron酸の分析法の検討～

研究分担者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

**研究要旨** 既存添加物「オリゴガラクトuron酸」(oGA)の成分規格設定に必要な基礎情報を得る目的で、市場より入手できた1製品について、<sup>1</sup>H qNMR 及び HPLC により成分分析及び内容物の定量を行った。<sup>1</sup>H qNMR により、本製品は主にモノ、ジ及びトリガラクトuron酸(mGA, dGA, tGA)より構成され Glu が含まれるものであることがわかった。「オリゴガラクトuron酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトuron酸の 1~9 量体の混合物からなる。」とされているが、今回の試験によれば、「・・・ガラクトuron酸 1~3 量体の混合物からなる。」に修正すべきと考えられた。<sup>1</sup>H qNMR により定量用標品として用いる市販試薬の mGA, dGA, tGA について純度を求めた結果、いずれの試薬も 70%~80%程度であり、定量用標品として用いるには十分に高い純度を持つものはなかった。また、<sup>1</sup>H qNMR 及び HPLC により添加物製品 oGA 中の各成分を直接定量したところ、3種の合計が約 30%であった。別にカルバゾール-硫酸法により定量したところ、mGA として 43.4%と算出され、HPLC 又は <sup>1</sup>H qNMR で求めた値と 10%程度異なった。カルバゾール-硫酸法では、反応する成分全てが mGA として求められることから、<sup>1</sup>H qNMR 又は HPLC ではピーク又はシグナルとして検出されず定量できない成分も合算されていると考えられた。いずれにしても、mGA, dGA 及び tGA の純度既知の定量用標品の供給は困難であると考えられるので、成分規格に適用できる試験法は、現状ではカルバゾール-硫酸法以外に選択肢はないと考えられる。

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

中島馨 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部

とされている。「オリゴガラクトuron酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトuron酸の 1~9 量体の混合物からなる。」とされている。一方、「オリゴガラクトuron酸」と関連あるいは類似品目としては、既存添加物「ペクチン」及び「ペクチン分解物」があり、第9版食品添加物公定書に成分規格がそれぞれ既に収載されている。「ペクチン」の成分規格において、「本品は、かんきつ類、リンゴ等から得られた、部分的にメチルエステル化されたポリガラクトuron酸等の水溶性多糖類を成分とするものである。ショ糖、ブドウ糖、乳糖又はデキストリンを含むことがある。」と定義されて

A. 研究目的

既存添加物「オリゴガラクトuron酸」は、現在、第9版食品添加物公定書に成分規格が未収載の品目の一つであり、その品質及び化学的安全性を確保するために成分規格の設定が急務

いる。一方、「ペクチン分解物」は、「本品は、ペクチン(サトウダイコン(*Beta vulgaris* L. var. *rapa* Dum.), ヒマワリ(*Helianthus annuus* L.), アマダイダイ(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), グレープフルーツ(*Citrus* × *paradisi* Macfad.), ライム(*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle), レモン(*Citrus limon* (L.) Burm. f.)又はリンゴ(*Malus pumila* Mill.)から、水若しくは酸性水溶液で抽出したものから得られたもの又はこれをアルカリ性水溶液若しくは酵素で分解したものから得られたメチル化ポリガラクトロン酸等の多糖類を成分とするものをいう。)を酵素で分解して得られた、ガラクトロン酸を主成分とするものである。」と定義されている(galacturonic acid = ガラクチュロン酸又はガラクトロン酸であり、現在は後者の呼称が一般的である。). すなわち、「ペクチン」がポリガラクトロン酸、「ペクチン分解物」がガラクトロン酸から主に構成され、「オリゴガラクトロン酸」はその中間のオリゴマーから構成される添加物であると推定される。しかしながら、「オリゴガラクトロン酸」の食品添加物として流通している製品の実態がつかめなかったため、本品の成分組成に関する情報を得ることができなかった。

そこで本研究では、食品添加物として流通している「オリゴガラクトロン酸」を入手し、その成分組成の分析を試みたので報告する。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

オリゴガラクトロン酸は国内で入手した食品添加物 1 製品(液体)(oGA) <C2218>を試料として用いた。また、比較試料として、食品添加物として流通しているペクチン 1 製品(PT) <A108>及びペクチン分解物 3 製品(PD1, PD2, PD3) <A38, A446, A558>を用いた。

また、本研究において以下の試薬等を試験に用いた。D(+)-ガラクトロン酸一水和物(Wako, 326-50341, Lot: AWP0789) <09-38a>, D-ガラクトロン酸(ChromaDex, ASB-00007026-250, Lot: 00007026-474) <22100020>, D(+)-ガラクトロン酸一水和物(Supelco, 92478-25mg, Lot: BCCD9630) <22100019>, ジガラクトロン酸

(Sigma, D4288, Lot: SLBT8808) <22100017>, トリガラクトロン酸(Sigma, T7407, Lot: SLBJ2704V) <22100018>,  $\alpha$ -D-グルコース(Aldrich, 特級, 07-0680-2-25G-J, Lot: U1830) <05-03b>, DSS- $d_6$  標準物質(富士フイルム和光, TraceSure, 040-31671, Lot: APL6177, 純度(質量分率)92.4%) <23-39c>, 重水(D<sub>2</sub>O)(ISOTEC, NMR用, 151882-1KG, Lot: SZ1188) <08-99a>, リン酸二水素ナトリウム二水和物(SIGMA, JIS 特級, 28-3790-5, Lot: A2344) <03-35a>, カルバゾール(Wako, 035-01192, Lot: CDG0771) <04-51b>, 硫酸(Wako, 192-04696, Lot: TWP1706) <13-20b>, 四ほう酸ナトリウム十水和物(Wako, 194-01415, Lot: ASF2531) <2T93>, エタノール(99.5)(富士フイルム和光, 052-03343, Lot: ESR3705) <22000009>. 水はオルガノ製超純水製造装置ピューリックωにより製造された超純水を用いた。なお、<>は当部管理番号を示す。

### B-2) <sup>1</sup>H qNMR による試薬純度測定及び添加物製品中の各成分の定量

ガラクトロン酸(mGA), ジガラクトロン酸(dGA), トリガラクトロン酸(tGA)及びグルコース(Glu)の純度を<sup>1</sup>H qNMRにより求めた。装置はJNM-ECA600 (JEOL 製)を用い、試料濃度約10 mg/mLになるようにD<sub>2</sub>Oに溶解し、DSS- $d_6$ をqNMR基準物質として定量条件で測定した。シグナルの化学シフト値は、DSS- $d_6$ を基準(0 ppm)とし、各シグナルは各種2D-NMR測定により帰属した。

添加物製品(oGA)中の各成分の含量を直接<sup>1</sup>H qNMRにより測定した。すなわち、先に測定した試薬 mGA, dGA, tGA 及び Glu に由来するシグナルの化学シフト値との比較、又は標準添加(mGA, Glu)により添加物製品(oGA)中の各成分のシグナルを帰属し、mGA, dGA, tGA 及び Glu の含量を算出した。

### B-3) HPLC による添加物製品中の各成分の定量

B-2)の<sup>1</sup>H qNMR測定に用いたmGA, dGA及びtGAの溶液(約10 mg/mL)を水で2.5, 1.25, 0.25, 0.125 mg/mLに希釈し、絶対検量線用標準液と

した。なお、それぞれの標準液の濃度は  $^1\text{H}$  qNMR で求めた純度値で補正したものをを用いた。添加物製品(oGA) 約 1 g を精密に量りとり、100 mL に水で定容した後、0.45  $\mu\text{m}$  メンブランフィルターを通したものを検液とした。絶対検量線法により各成分の定量を行った。また、同データを用い、重合度(Dp)を計算した。

HPLC 条件：装置，HPLCprominence シリーズ (LC-20AT/SPD-20A/SIL-20AC/CBM-20A/CTO-20AC)(島津製作所製); カラム, Shodex NH2-P50 4E (4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); カラム温度, 40°C; 移動相, 0.3 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 流速, 0.8 mL/min; 検出波長, UV 210 nm; 注入量, 10  $\mu\text{L}$ 。

$$Dp = \frac{(A_{mGA} + A_{dGA} \times 2 + A_{tGA} \times 3)}{(A_{mGA} + A_{dGA} + A_{tGA})}$$

ただし、Dp：重合度、A：ピーク面積。

#### B-4) カルバゾール-硫酸法による定量

添加物製品(oGA)中のオリゴガラクトン酸の含量をガラクトン酸濃度として求めた。すなわち、第9版食品添加物公定書収載の「ペクチン分解物」の成分規格の定量法に倣い、カルバゾール硫酸法により定量した。以下に、ペクチン分解物の規格を引用する。本品をオリゴガラクトン酸製品とし、乾燥物換算のみ除外し定量した。

『定量法 本品約 1 g を精密に量り、水に溶かして正確に 100 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とし、試料液とする。試験管に四ホウ酸ナトリウム・硫酸試液 5 mL を正確にとって氷冷し、試料液 1 mL を正確に加え、試験管に蓋をして水浴中で 10 分間加熱した後、直ちに氷上で 5 分間冷却する。この液にカルバゾール・エタノール試液 0.2 mL を加えて水浴中で 15 分間加熱し、氷上で 5 分間冷却して検液とする。別に定量用ガラクトン酸を無水物として、0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL 及び 0.2 mg/mL となるよう水に溶かし、検液の調製と同様に操作し、標準液とする。検液と各標準液の 530 nm における吸光度を測定する。標準液の吸光度から検量線を作成する。

検液中のガラクトン酸濃度を検量線から求め、更に乾燥物換算を行う。』

### C. 結果及び考察

#### C-1) $^1\text{H}$ qNMR 測定

mGA, dGA, tGA, Glu の構造式と  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを Fig. 1, 2 に示した。ピラノースは他の糖とグルコシド結合していない 1 位の  $\alpha$  及び  $\beta$  異性体が存在する。 $\alpha$  及び  $\beta$  異性体のプロトンシグナルが観察される複雑なスペクトルとなる。 $^1\text{H}$  qNMR において各シグナルの帰属情報は正確に定量するために必須であることから、2D NMR (COSY)測定により可能な限り帰属した(Fig. 2)。

mGA のプロトンシグナルは、Fig. 2a に示すとおり、 $\alpha 1 \sim \alpha 5$  位、 $\beta 1 \sim \beta 5$  位のいずれもほぼ独立していたが、 $\beta 4$  と  $\beta 5$  位のシグナルの近傍に不純物が重なっていた。不純物を除くよう積分範囲を狭め、定量した結果を Table 1a に示した(調製 n=1, 測定 n3)。 $\alpha$  及び  $\beta$  異性体由来するシグナルから算出した  $\alpha$  及び  $\beta$  異性体それぞれの含量値はほぼ同じであったことから、1 位から 5 位のシグナルより算出した値を平均し、両異性体の含量を合算した 78.05% を mGA 純度とした。試験に用いた試薬が一水和物とされているものがあること、食品添加物公定書の試薬の項には「D-ガラクトン酸、定量用」の化学式が一水和物で表されていることを考慮し、一水和物で再計算した場合は 85.29% となった。したがって、試薬の mGA の純度は、無水物換算で 78.05% であり、純度が低いことがわかった。(ただし、二水和物換算で 92.54%、酸水和物換算で 99.78% となることから、mGA は実際には三水和物として流通している可能性がある。)

dGA, tGA は、2D NMR (COSY)スペクトルによると、Fig. 1 に示した構造式のように 2 環目以降は  $\alpha$  結合していることがわかった。Table 1b, 1c には重複したシグナルも含めたすべての計算結果を表示したが、この中から独立したシグナルを選択し、dGA は  $\alpha 1, \alpha 3, \alpha 4, \beta 2, \beta 4$  を、tGA は  $\alpha 1, \beta 4, \beta 5$  を定量シグナルとして含量を算出し、 $\alpha$  及び  $\beta$  異性体の含量の平均

を合算して純度としたところ、dGAは69.84%、tGAは73.50%であった。

Gluも同様にして純度を算出したところ、99.50%であった(Table 1d)。

次に、mGA, dGA, tGA, Gluのシグナル帰属情報を元に、oGA製品中の各成分の含量を<sup>1</sup>H qNMRにより算出した。まず、oGA製品に観察されるシグナルを帰属する必要があるが、Fig. 2からわかるように、3.4~4.0 ppm付近のシグナルは重複しており帰属は不可能であった。このため、1位のプロトンシグナルのみ帰属することとした。ガラクトuron酸類はそれ自身が酸であるため、調製濃度、成分組成によりpHが変化し、それぞれのシグナルの化学シフトが移動してしまう場合がある。そのためGlu及びmGAのシグナルについてはそれぞれを標準添加することによって強度が増すシグナルを確認することによって帰属した(Fig. 3)。dGA及びtGAのシグナルについては、それぞれのスペクトルとの比較により推測した。

その結果、Fig. 3aのoGAスペクトルでは、Glu 1位(5.22, 4.64 ppm), mGA 1位(5.28, 4.56 ppm), dGA+tGA 1位(5.31, 4.61 ppm), dGA 1'位(5.08 ppm), tGA 1'又は1"位(5.10又は5.05 ppm)と帰属した。なお、oGAのシグナルには4.8 ppm付近に巨大な水シグナルが観察されたことから、液体試料ではかなりの量の水分を含むと推定された。Fig. 3dの水シグナルの近傍には3本のシグナルが見えているが、mGAを添加することによってpHが変化したことによりdGA, tGAの5', 5"位のシグナルがシフトして観察されたものと考えられた。

Fig. 4の○□△×でマークしたシグナルを定量に用いた。それぞれのシグナル積分値から添加物製品(oGA)中の成分の含量を求めた結果(調製n=1, 測定n=1), mGA 5.26%, dGA 8.58%, tGA 17.3%で3種の合計が31.1%であった。一方で、Gluが10.3%とかなりの量含まれることがわかった。「オリゴガラクトuron酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトuron酸の1~9量体の混合物からなる。」とされ

ており、Gluが含まれるとは記載されていない。基原・製法・本質のこの記載中の「ペクチン」は既存添加物のペクチンを指す。第9版食品添加物公定書の「ペクチン」の成分規格によれば、「本品は、かんきつ類、リンゴ等から得られた、部分的にメチルエステル化されたポリガラクトuron酸等の水溶性多糖類を成分とするものである。ショ糖、ブドウ糖、乳糖又はデキストリンを含むことがある。」と定義されている。したがって、ショ糖、ブドウ糖、乳糖又はデキストリンを含んだ「ペクチン」を原料としてを製造したとすれば、「オリゴガラクトuron酸」製品<C2218>にGluが含まれているとの説明ができる。

そこで、「オリゴガラクトuron酸」製品の原料であるとされる「ペクチン」製品<A108>、「ペクチン」を原料として製造される「ペクチン分解物」製品<A38>の<sup>1</sup>H qNMRスペクトルを比較した(Fig. 5)。その結果、これら3製品からはGlu由来のシグナルが検出された。「ペクチン」製品<A108>及び「ペクチン分解物」製品<A38>のスペクトルからはGluに由来するシグナル以外にガラクトuron酸あるいは重合体に由来するシグナルが観察されなかったことから、両者はGluで殆ど構成される製品であると考えられた。

## C-2) HPLCによる添加物製品中の各成分の定量

### C-2-1) HPLC条件

Fig. 6a~dは、当部が保有する3つの異なるロットのShodex NH2-P50 4E (4.6 x 250 mm, 5 µm)カラムを用いて測定したHPLCクロマトグラムである。同一条件下(a), b), d)は流速0.8 mL/min, c)のみ流速1 mL/min)で測定したものであるが、カラムのロットによりmGA, dGA, tGAの保持時間に差が観察された。比較に用いた3ロットは購入後からの使用時間が異なり、d)は新品のカラムであるd)が一番保持時間が長かった。今回用いたアミノカラムは劣化が早いため、a)及びb)のカラムが多少劣化しており保持時間が短くなったと考えられる。したがって、仮にHPLCでの各成分の確認又は定量を規格化する

とすれば、カラムの使用中の劣化による保持時間の短縮化と夾雑物との分離を考慮すると、例えば、「mGA のピークが 5 min に検出されるように流速を調整する。」等の分析条件の規定が必要であると思われる。

今回の分析結果では、新品のカラムを用いた Fig. 6d では保持時間 40 分に 4 量体らしきピークが観察されたが、3 量体の tGA までしかはっきりと観察されなかった。また、4 量体以上の標品の入手は困難であるため、それが 4 量体であるかどうかの確認はできなかった。以上のことから、既存添加物「オリゴガラクトン酸」の基原・製法・本質には「ガラクトン酸の 1~9 量体の混合物からなる」とされているが、HPLC の結果から、今回入手した oGA 製品はガラクトン酸の 3 量体までで構成されているものと判断された。

次に、HPLC による定量値から重合度を計算した。積分ベースラインをどのように設定するかによって変化するが、ベースラインの盛り上がりを取り捨てて、ピークの立ち上がりから終わりをピークとしたとき、oGA 製品の重合度(Dp)は 2.33 となった。

<sup>1</sup>H qNMR による分析結果(C-1))では、oGA 製品中に Glu が 10%程度含まれることが確認されている。この Glu が mGA, dGA, tGA のピーク面積の測定に影響しないかどうかを確認するため、同一条件下で標準添加した Glu を測定した。その結果、Fig. 7 に示すように、Glu はかなり高濃度でないと検出されず、また、その保持時間はインジェクションショックと重なる 3.3 分であったことから、Glu の存在は HPLC による mGA, dGA, tGA の分析に影響しないことが確認された。

### C-2-2) 検量線

C-1) <sup>1</sup>H qNMR 測定に用いた mGA, dGA, tGA の D<sub>2</sub>O 溶液をそれぞれ水で希釈して絶対検量線作成用標準液とし、HPLC に付した(Fig. 8)。なお、新品のカラム Shodex NH2-P50 4E (4.6 x 250 mm, 5 μm) <LCc404>を試験に使用した。

<sup>1</sup>H qNMR により試薬の純度が 80%以下であることが既に明らかであったが、HPLC クロマ

トグラム上でも、不純物のピークが検出された。mGA は 5.7 分にピークが検出されたが、その後 20 分付近にもピークが検出された。dGA は 8.2 分にピークが検出されたが、6 分付近にピークが観察された。tGA は 14.7 分に検出され、クロマトグラム上に殆ど不純物のピークが観察されなかった。いずれにしても、これらを混合し 3 種混合標準液とする不純物が各成分のピークと重なり面積が変化するため、それぞれ単品について絶対検量線作成用標準液を調製し、それらを測定し(調製 n=1, 測定 n=3), <sup>1</sup>H qNMR で求めた純度で補正した濃度とピーク面積から絶対検量線を作成した(Fig. 9)。mGA が重合し dGA, tGA となると分子量も 2 倍, 3 倍になるため、同じ重量濃度での吸光度はほぼ同じになると予想される。この予想通り、これら 3 化合物の重量濃度と吸光度(ピーク面積)の傾きはほぼ同じとなった。傾きが多少異なった理由としては、<sup>1</sup>H qNMR により求めた dGA 及び tGA の純度が正確に測定できていない可能性があげられる。mGA と異なり、dGA, tGA では定量に用いたシグナルにより算出された純度値にばらつきが観察され、これは不純物が定量シグナルに重なっているためと推定される。

### C-2-3) 定量

Fig. 9 の mGA, dGA, tGA の検量線を用い、添加物製品 oGA 中の各成分の含量を求めた(調製 n=3, 測定各 n=1)(Table 2a)。その結果、mGA 5.25%, dGA 8.81%, tGA 17.8%で合算すると 31.8%となった(Table 2b①)。この結果は <sup>1</sup>H qNMR による定量結果とよく一致した(Fig. 4)。

### C-2-4) 定量用標品(市販試薬)について

今回、絶対検量線の作成に用いた定量用標品(市販試薬)は、mGA が約 8,000 円/5g, dGA が約 45,000 円/25mg, tGA が約 40,000 円/25mg であり、mGA 以外は非常に高価である。また、C-1) <sup>1</sup>H qNMR 測定で示したようにそれぞれの純度は 70%~80%程度であった。mGA の純度については <sup>1</sup>H qNMR によりシグナル毎にばらつきの小さい値を示したため信頼性が高いと考えられるが、dGA 及び tGA についてはシグナル毎

に大きなばらつきが観察されたことから  $^1\text{H}$  qNMR による純度には疑問が残る。すなわち、mGA, dGA, tGA の絶対検量線を用いてそれぞれの定量値を求め、それらを合算しても dGA 及び tGA の純度の信頼性が低い以上、添加物製品 oGA 中の成分が精確に求められているとはいえない。例えば、dGA 及び tGA の絶対検量線の傾きを mGA の傾きから分子量換算すると、Fig. 9 の分子量換算の傾きのセルに示したように、実測の傾きよりも大きくなる。更に、その値で定量した場合、それぞれの含量は dGA が 8.40%、tGA が 15.29%、合計 28.94% となる (Table 2b②)。更に簡略化して mGA の絶対検量線だけを用いて、mGA としての含量を求めた場合、dGA が 8.01%、tGA が 14.35%、合計 27.60% となる (Table 2b③)。

また、mGA の純度についても問題が残る。一水和物として 100% (無水物として 91.51%) と思って絶対検量線を作成する場合、 $^1\text{H}$  qNMR で純度を求めた後に、無水物として 78.05% として定量する場合には、定量値が大きく変わってしまう。更に、Table 2b④に示したように、無水物 91.51% と仮定し、3 成分を mGA 換算した定量値は、mGA が 6.15%、dGA が 9.39%、tGA が 16.82%、合計 32.37% となり、 $^1\text{H}$  qNMR で各定量用標品の純度を求めて補正して求めた Table 2b①に近い値となった。しかしながら、この結果は様々な偶然が重なり合っただけに過ぎないため、純度の問題が解決されない。

更に、メーカー間の試薬の純度、吸湿の程度に違いがあるか確認する必要がある。このため、mGA の試薬として Wako 社製その他、ChromaDex 社製と Supelco 社製について、 $^1\text{H}$  qNMR により純度を求めた。保管中の吸湿をキャンセルするため、乾燥してから秤量することにした。

第 9 版食品添加物公定書の乾燥減量を確認したところ、ペクチンが 12.0% 以下 (105°C, 2 時間)、ペクチン分解物が 70% 以下 (105°C, 3 時間) とされていたため、これを参考に mGA を 105°C, 3 時間乾燥したところ、褐色に焦げた (Fig. 10)。念のため、焦げた mGA について  $^1\text{H}$  qNMR を測定したところ、mGA のシグナルが小さくなり、別にシグナルが増えていることが確認された

(Fig. 11c)。更に、残存する mGA のシグナルより含量を算出したところ、 $\alpha$  及び  $\beta$  異性体の合計で約 10% 程度に低下しており、このことから 105°C, 3 時間乾燥は、mGA を分解することがわかった (Table 3c)。

そこで、乾燥なし (室温保管の状態) での純度 (Table 3a) と、室温でシリカゲルデシケーター内、24 時間乾燥後の純度 (Table 3b) を  $^1\text{H}$  qNMR により求めた。mGA の 3 社の試薬の純度に大きな違いは見られず、デシケーター内で乾燥しても純度が低下しなかったことから、通常の保管状態の各社の試薬を標品として用いても大きな差が生じないと考えられた。

以上のことから、市販試薬の mGA を標品として HPLC 法による 1 点検量でも比較的ばらつきの少ない一定の値を算出できると予想され、オリゴガラクトuron酸の品質管理には利用できると考えられる。ただし、dGA 及び tGA の同定のために両者の試薬は必要である。

### C-3) カルバゾール-硫酸法による定量

第 9 版食品添加物公定書のペクチン分解物の定量法を参考に、カルバゾール-硫酸法によるガラクトuron酸の定量を検討した。

まず、mGA, dGA, tGA, Glu の検量線を作成した。すなわち、それぞれの市販試薬を標品として用い、乾燥なし、 $^1\text{H}$  qNMR による濃度補正なしで、mGA (無水物として) 0.01~0.2 mg/mL の 7 段階 (n=3)、dGA 及び tGA が 0.01~0.05 mg/mL の 5 段階 (n=1)、Glu が 0.02~0.4 mg/mL の 5 段階 (n=3) の溶液を調製し、反応操作を行い標準液とし、波長 530 nm で吸光度を測定した。対照液に超純水を用い、超純水を用いて同様に反応させた液を blank とした。Fig. 12a は mGA (無水物として) 0.01~0.2 mg/mL の全濃度から作成した検量線であるが、最大濃度の吸光度が 3 以上となった。第 9 版食品添加物公定書の一般試験法の「17.紫外可視吸光度測定法」によると、『溶液の濃度は、単光束吸光度法で測定を行う場合には、測定で得た吸光度が 0.2~0.7 の範囲、複光束吸光度法で測定を行う場合には、0.4~1.4 の範囲となるものが適当で、…』とされており、これを考慮し mGA 検量線の濃度範

囲は 0.05 mg/mL 以下が適当であると判断した。Fig. 12b は、mGA(無水物として)が $\sim$ 0.05 mg/mL、dGA 及び tGA が $\sim$ 0.06 mg/mL の検量線であるが、ほぼ同じ傾きの良好な直線を示した。したがって、試料中にオリゴマーが混在していても、mGA(無水物として)の検量線を用いて定量値を算出しても問題ないと考えられた。ただし、カルバゾール-硫酸法は、糖から生成したフルフラール及びその誘導体とカルバゾールが反応して発色することを原理としていることから、mGA、dGA 及び tGA のようなカルボキシル基を持つuron酸を特異的に検出するものではない。Fig. 12c には Glu の検量線を示したが、検量線の傾きが mGA に比べて 6 分の 1 であることからわかるとおり、Glu の重量当たりの呈色は mGA に比べて小さいが濃度依存的に呈色することが明らかである。したがって、製品中に Glu 等の糖類が含まれる場合は、その量に応じて mGA の定量値が大きく見積もられると考えられる。

次に、添加物製品 oGA の試料液(0.1 mg/mL)を反応操作し、検液の吸光度を測定した。Fig. 12b の mGA(無水物として)の検量線(0 $\sim$ 0.05 mg/mL)を用い、mGA 濃度を求めた。その結果、添加物製品 oGA 中の mGA 濃度は 43.4%と算出された(Table 4)。この結果は、HPLC による定量値 32.37% (Table 2b④)と比べるとかなり大きく、添加物製品 oGA 中の Glu やその他の不純物が寄与していると考えられる。

Table 4b には、添加物製品(oGA)試料液(0.1 mg/mL)中に Glu を 0.04, 0.10, 0.20 mg/mL 添加したとき、カルバゾール-硫酸法で得られる mGA としての定量値がどのように変化するか調べたものである。Glu 添加量と算出した含量をプロットすると、Glu 添加量に比例して含量が増加していることがわかる。添加物製品 oGA の  $^1\text{H}$  qNMR により、製品中に Glu が約 10%存在すると算出されている。このことを考慮すると添加物製品(oGA)試料液(0.1 mg/mL)中には、Glu が 0.01 mg/mL 相当含まれることになる。Fig. 12c の Glu の検量線から、吸光度が 0.078 上乘せされており、これは試料中の mGA 含量に換算すると約 2%多く見積もられていることになる

が、これだけで定量値の増大を説明できない。4 量体以上の HPLC 上にピークとして検出できないオリゴマーや Glu 以外のきょう雑物が発色している可能性があるが、これ以上の情報を得ることができなかった。

#### D. 結論

既存添加物「オリゴガラクトuron酸」の成分規格案を設定するために、入手できた添加物製品 oGA 中の成分組成を確認した。 $^1\text{H}$  qNMR により、本製品は主に mGA, dGA, tGA より構成され Glu が含まれるものであることがわかった。したがって、「オリゴガラクトuron酸」は、既存添加物収載品目リストの基原・製法・本質に「「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクトuron酸の 1 $\sim$ 9 量体の混合物からなる。」とされているが、今回試験に供した添加物製品 oGA によれば、「・・・ガラクトuron酸 1 $\sim$ 3 量体の混合物からなる。」に修正すべきと考えられた。

次に、 $^1\text{H}$  qNMR 及び HPLC による各成分の定量を試みた。 $^1\text{H}$  qNMR により定量用標品として用いる市販試薬の mGA, dGA, tGA について純度を求めた結果、いずれの試薬も 70% $\sim$ 80%程度であり、定量用標品として用いるには十分に高い純度を持つものはなかった。また、 $^1\text{H}$  qNMR により添加物製品 oGA 中の各成分を直接定量したところ、mGA 5.26%, dGA 8.58%, tGA 17.3%で 3 種の合計が 31.1%であった。更に、 $^1\text{H}$  qNMR により純度を算出した市販試薬を定量用標品として絶対検量線法により、各成分の含量を求めた。その結果、3 種の合計が 31.84%であり  $^1\text{H}$  qNMR による直接定量の結果と一致した。ただし、dGA 及び tGA の試薬の  $^1\text{H}$  qNMR ではシグナルにより定量値のばらつきがあり、正確に純度を算出できているかどうかは不明である。

一方、カルバゾール-硫酸法で添加物製品 oGA 中の含量を mGA として求めたところ、43.4%と算出され、HPLC 又は  $^1\text{H}$  qNMR で求めた値と 10%程度異なった。カルバゾール-硫酸法では、反応する成分全てが mGA として求められることから、HPLC 又は  $^1\text{H}$  qNMR ではピーク又はシ

グナルとして検出されず定量できない成分も合算されていると考えられる。

いずれにしても、mGA, dGA 及び tGA の純度既知の定量用標品の供給は困難であると考えられるので、成分規格に適用できる試験法は、現状ではカルバゾール-硫酸法以外に選択肢はないと思われる。

## E. 参考文献

- 1) 古谷貞治, 箴島豊: ペクチンの比色定量. 九州大学農学部学藝雑誌, 22(1), 35-44 (1965).

## F. 研究業績

### 1. 学会発表等

#### 1-1. 学会

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物中の窒素定量分析~燃焼法 vs ケルダール法~. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
- 2) 建部千絵, 藤原由美子, 長久保直也, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 久保田浩樹, 杉本直樹, 多田敦子, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた食用タール色素中の 6, 6'-オキシピス(2-ナフトレンスルホン酸) ニナトリウム の定量法の検討. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
- 3) 高木映里, 高橋未来, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
- 4) 日置冬子, 多田敦子, 西崎雄三, 古庄紀子, 石附京子, 久保田浩樹, 建部千絵, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物ジフェノコナゾールの規格試験法の検討及び異性体組成分析. 食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10) (川崎市(Web)).
- 5) 長井理夏子, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章: 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析. 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(2021.10.23-24) (松山市).
- 6) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji T,

Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Miura T, Iwamoto Y, Yoshiaki Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Absolute determination of an organophosphorus pharmaceutical, auranofin, using quantitative <sup>31</sup>P-NMR. The 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2021)(2021.8.29-9.1)(Kyoto).

- 7) 内山奈穂子, 細江潤子, 石附京子, 杉本直樹, 丸山剛史, 浅野龍二, 三浦亨, 岩本芳明, 末松孝子, 小松功典, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 定量NMRを用いた日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした生薬等の定量指標成分アミグダリン及びアルブチンの絶対純度の測定. 日本生薬学会第67回年会(2021.9.19-20) (東京Web).
- 8) 長井理夏子, 内倉崇, 好村守生, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天倉吉章, 既存添加物ショウガ抽出物の成分解析, 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(2021.11.8-21) (Web).
- 9) 廣瀬昌平, 渡辺麻衣子, 多田敦子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 工藤由起子: 第9版食品添加物公定書における微生物限度試験法の大腸菌試験に関する検討, 第57回全国衛生化学技術協議会年会(2021.11.25-26) (Web).
- 10) 多田敦子, 堀江正一, 内山陽介, 栗田史子, 中村理奈, 杉浦潤, 井原紗弥香, 櫻井光, 久保田浩樹, 建部千絵, 寺見祥子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(令和2年度), 第57回全国衛生化学技術協議会年会(2021.11.25-26) (Web).

#### 1-2. シンポジウム等

- 1) 杉本直樹: LC/MSを用いた定量分析における課題と解決事例2021~定量のものさしである標準物質について~. 日本質量分析総合討論会(2021.5.21) (Web).

### 2. 論文発表等

#### 2-1. 論文

- 1) Miura T, Sugimoto N, Bhavaraju S, Yamazaki T, Nishizaki Y, Liu Y, Bzhelyansky A, Amezcua C, Joseph Ray, Zailer E, Diehl B, Gallo V, Todisco S, Ofuji K, Fujita K, Higano



- K, Geletneky C, Hausler T, Singh N, Yamamoto K, Kato T, Sawa R, Watanabe R, Iwamoto Y, Goda Y: Collaborative Study to Validate Purity Determination by  $^1\text{H}$  quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull.* 2020; 68: 868-878. Tsutumiuchi K, Toyoshima T, Hasegawa F, Terasawa R, Honda W, Sakakibara M, Ishida Y, Ikai Y, Ishibashi R, Furuya K, Morimoto T, Ishizuki K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Oka H: Molecular Structure of Gardenia Blue Pigments by Reaction of Genipin with Benzylamine and Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.*, 69, 3904-3911 (2021).
- 2) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度に基づくシングルリファレンス GC 法および HPLC 法によるカラシ抽出物およびセイヨウワサビ抽出物中のイソチオシアン酸アリルの定量. *食衛誌*, 62, 73-78 (2021).
- 3) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Miyashita N, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Yasobu N, Iwamoto Y, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Muto H, Kohama A, Goto T, Yasuda M, Ueda T, Goda Y: Purity Determination of Cyclophosphamide Hydrate by Quantitative  $^{31}\text{P}$ -NMR and Method Validation. *Chem. Pharm. Bull.*, 69 (7), 630-638 (2021).
- 4)
- G. 知的財産権の出願. 登録状況**  
なし

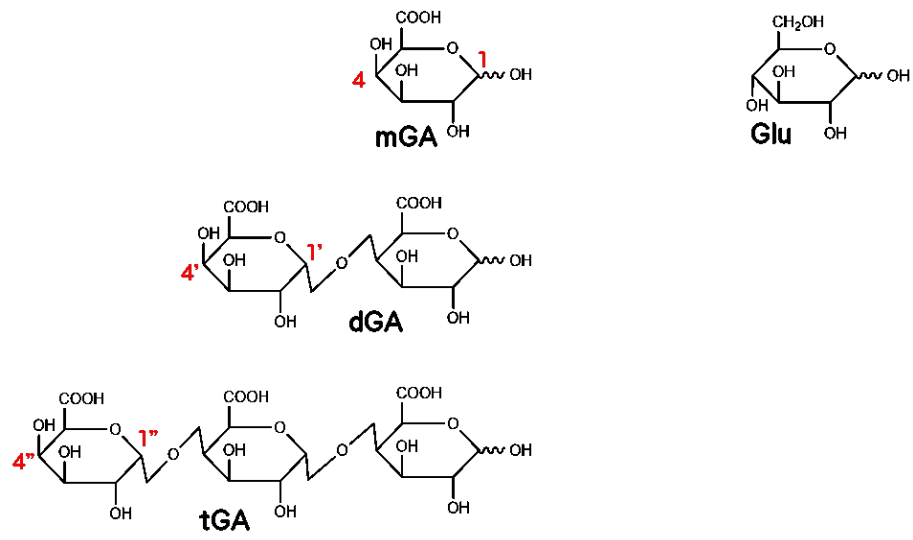


Fig. 1 ガラクツロン酸(mGA), ジガラクトロン酸(dGA), トリガラクトロン酸(tGA)及びグルコース(Glu)の構造式

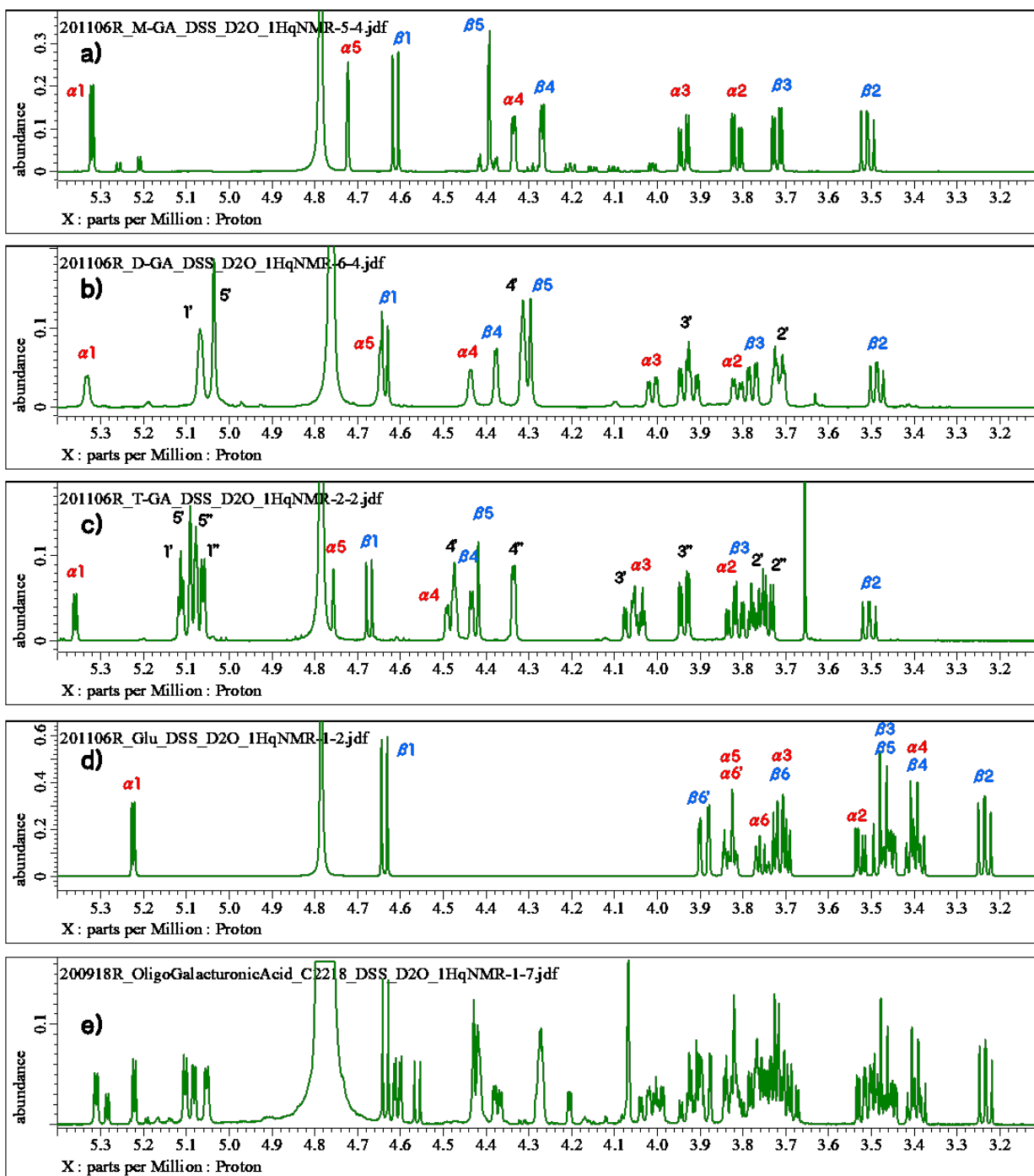


Fig. 2  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in  $\text{D}_2\text{O}$ )

a) mGA (Wako) 10 mg/mL, b) dGA 10 mg/mL, c) tGA 10 mg/mL, d) Glu 13 mg/mL, e) oGA 40 mg/mL

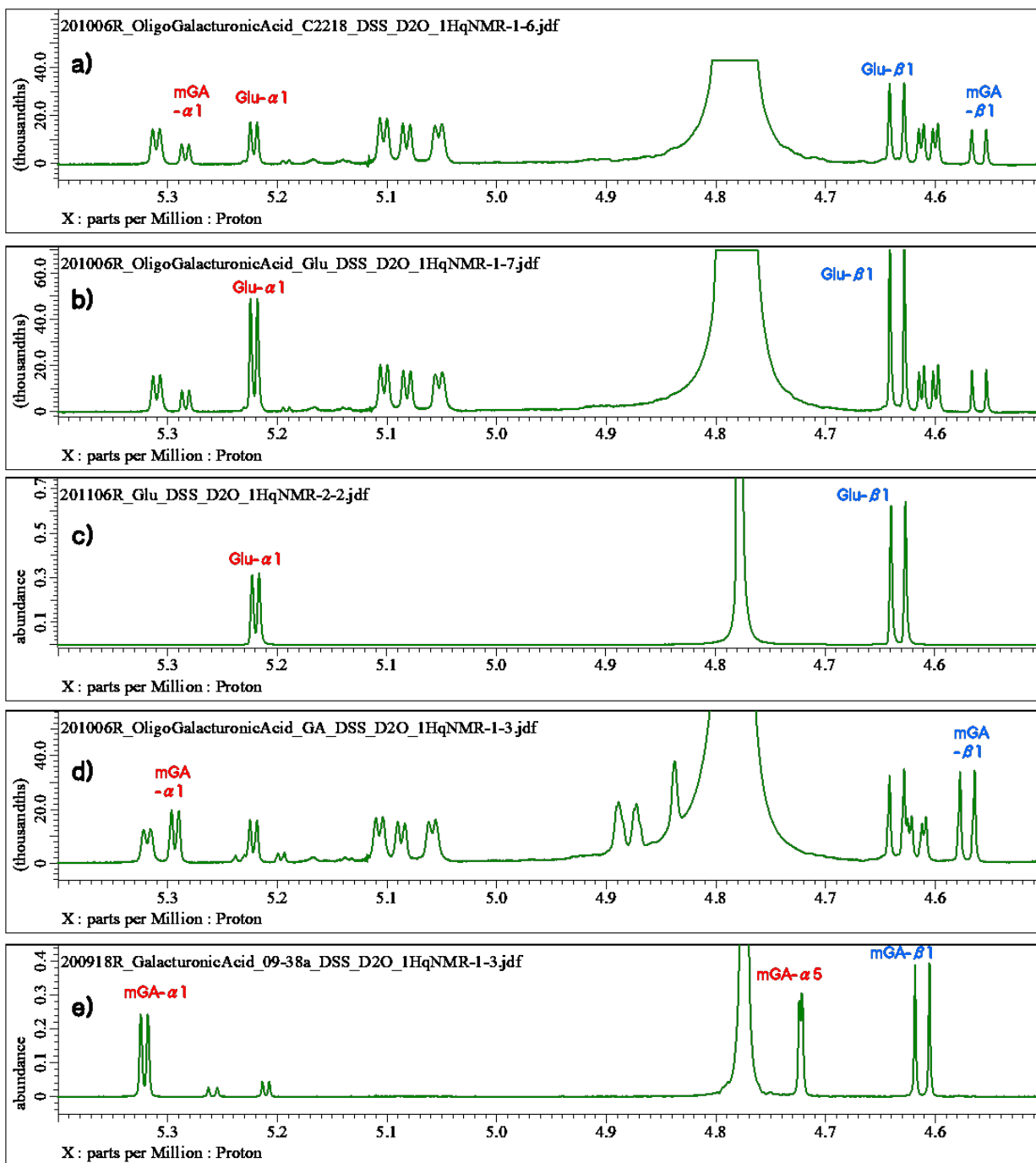
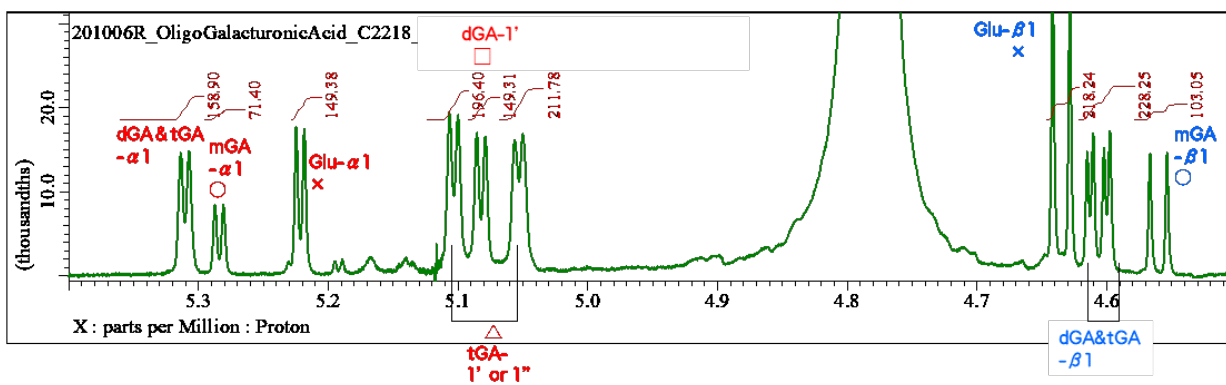


Fig. 3 添加物製品oGAに試薬Glu又はmGAを添加した $^1\text{H}$  qNMRスペクトル(in  $\text{D}_2\text{O}$ )  
 a) oGA, b) oGA+Glu, c) Glu, d) oGA+mGA, e) mGA



	X(ppm)	Integral		MW			含量(wt%)	合計(m+d+t)
dGA&tGA- $\alpha$ 1	5.31	158.90		DSS	224.36			
mGA- $\alpha$ 1	5.28	71.40 ○		Glu	180.16	○	mGA	5.26
Glu- $\alpha$ 1	5.22	149.38 ×		mGA	194.14	□	dGA	8.58
tGA-1' or 1''	5.10	196.40 △		dGA	370.26	△	tGA	17.31
dGA-1'	5.08	149.31 □		tGA	546.39	×	Glu	10.28
tGA-1' or 1''	5.05	211.78 △						
Glu- $\beta$ 1	4.64	218.24 ×			秤量値(mg)	純度(%)		
dGA&tGA- $\beta$ 1	4.61	228.25		DSS	1.2992	92.4		
mGA- $\beta$ 1	4.56	103.05 ○		oGA	310.16			
DSS	0.00	100.00		D2O	8mL			

Fig. 4 添加物製品oGAの<sup>1</sup>H qNMRスペクトル(in D<sub>2</sub>O)と各成分の定量値

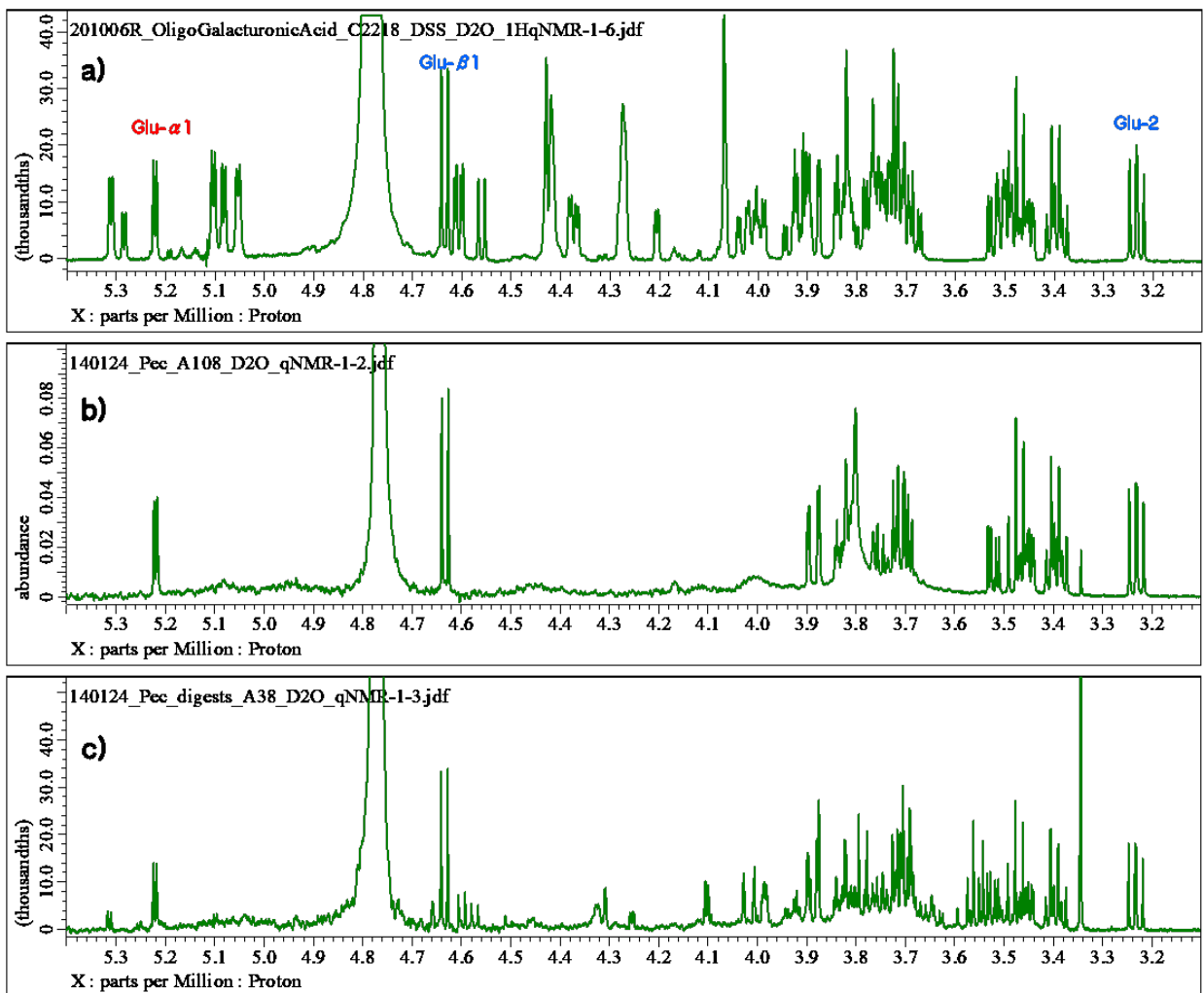


Fig. 5 ペクチン由来の添加物製品の $^1\text{H}$  qNMRスペクトル(in  $\text{D}_2\text{O}$ )の比較  
 a) オリゴガラクトン酸製品<C2218>, b) ペクチン製品<A108>, c) ペクチン分解物製品<A38>

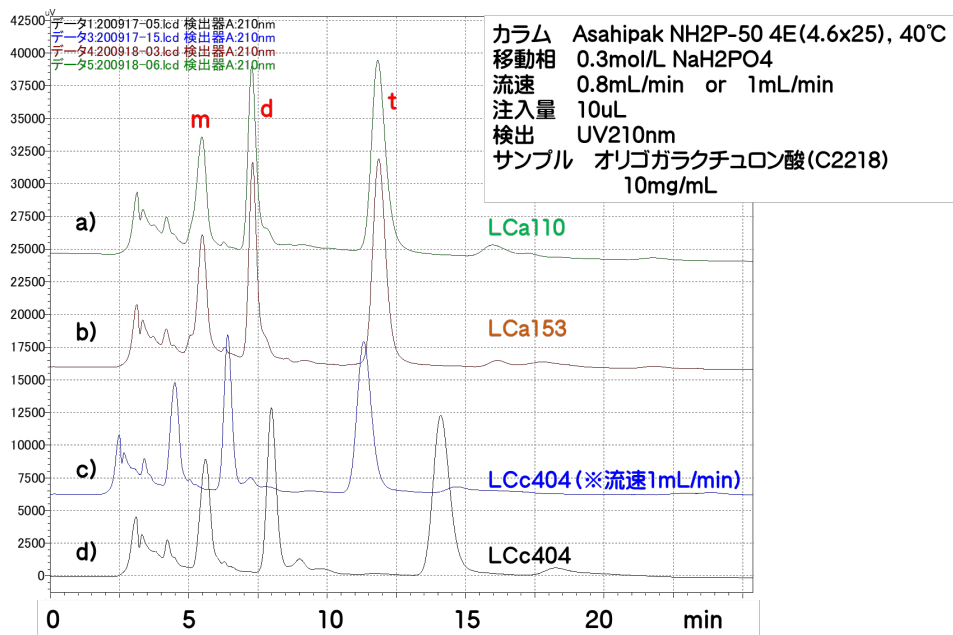


Fig. 6 異なるロットのカラムを用いたときのHPLCクロマトグラム

a) <LCa110>, b) <LCa153>, c) <LCc404> (※流速1 mL/min), d) <LCc404>.

カラム, Shodex NH2-P50 4E (4.6 x 250 mm, 5 μm); カラム温度, 40°C; 移動相, 0.3 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 流速, 0.8 mL/min; 検出波長, UV 210 nm; 注入量, 10 μL. ただし, <>内は当部カラム管理番号.

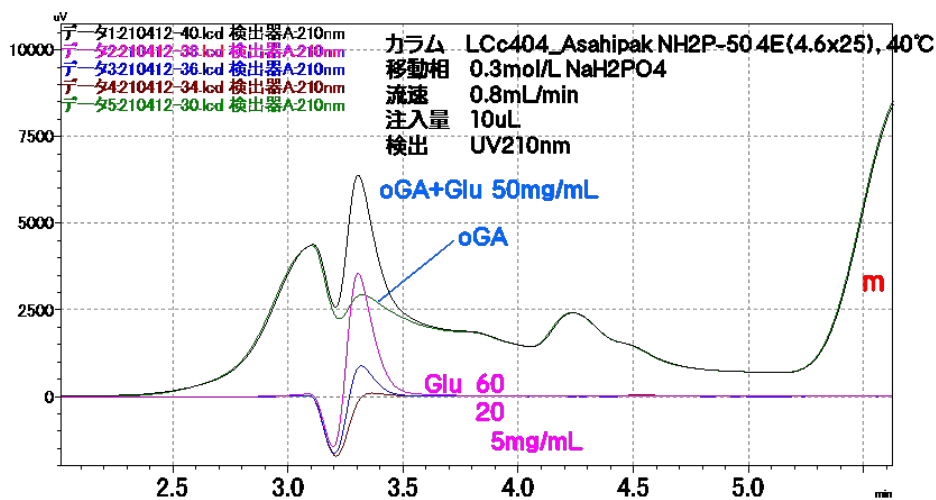


Fig. 7 添加物製品oGA及び試薬GluのHPLCクロマトグラム

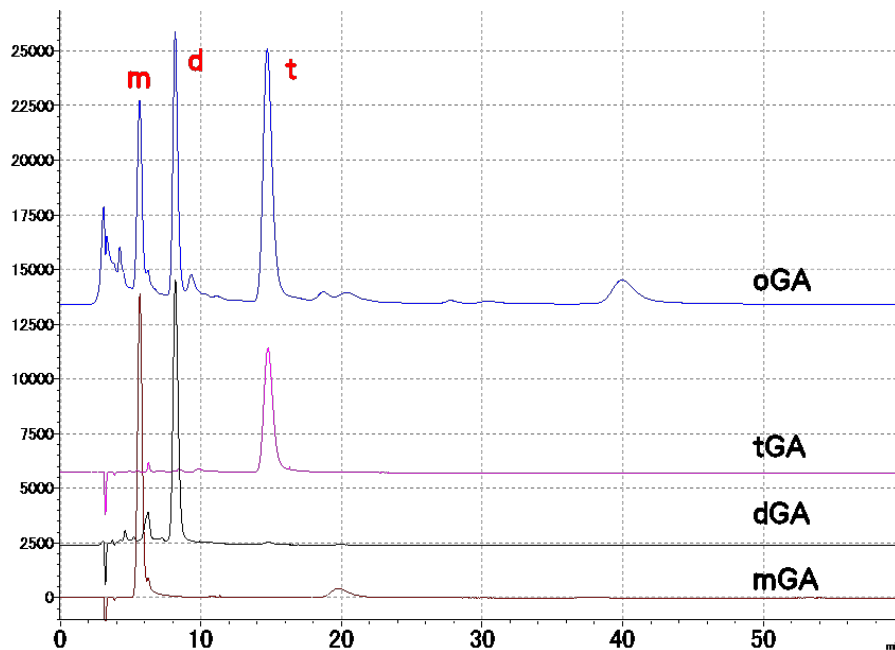
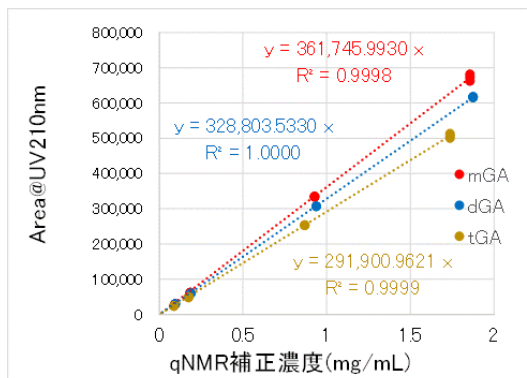


Fig. 8 試薬mGA, dGA, tGAと添加物製品oGAのHPLCクロマトグラム  
 試料液の濃度：試薬, 約1 mg/mL; oGA, 10 mg/mL



採取量mg	9.5054		10.7335			9.4503
qNMR純度%	78.05		69.84			73.50
分子量→	194.14		370.26			546.39
qNMR検液濃度(mg/mL)→	7.4190		7.4963			6.9460
	mGA濃度 (mg/mL)	mGA	dGA濃度 (mg/mL)	dGA	tGA濃度 (mg/mL)	tGA
n1	0.093	28973	0.094	29685	0.087	24114
n1	0.185	62476	0.187	60038	0.174	49976
n1	0.927	335443	0.937	307426	0.868	254128
n1	1.855	681779	1.874	615144	1.736	512998
n2	0.093	28889	0.094	29386	0.087	24010
n2	0.185	62500	0.187	59708	0.174	48099
n2	0.927	334233	0.937	306353	0.868	253693
n2	1.855	672896	1.874	617687	1.736	507535
n3	0.093	29009	0.094	29688	0.087	24649
n3	0.185	62388	0.187	59770	0.174	48625
n3	0.927	332989	0.937	306845	0.868	252793
n3	1.855	662118	1.874	618327	1.736	500674
検量線の傾き→	<b>361746</b>		<b>328804</b>			<b>291901</b>
		分子量換算傾き→	344957			339367
試薬が一水和物100% と仮定した場合の傾き→	308535					

Fig. 9 mGA, dGA及びtGAの絶対検量線



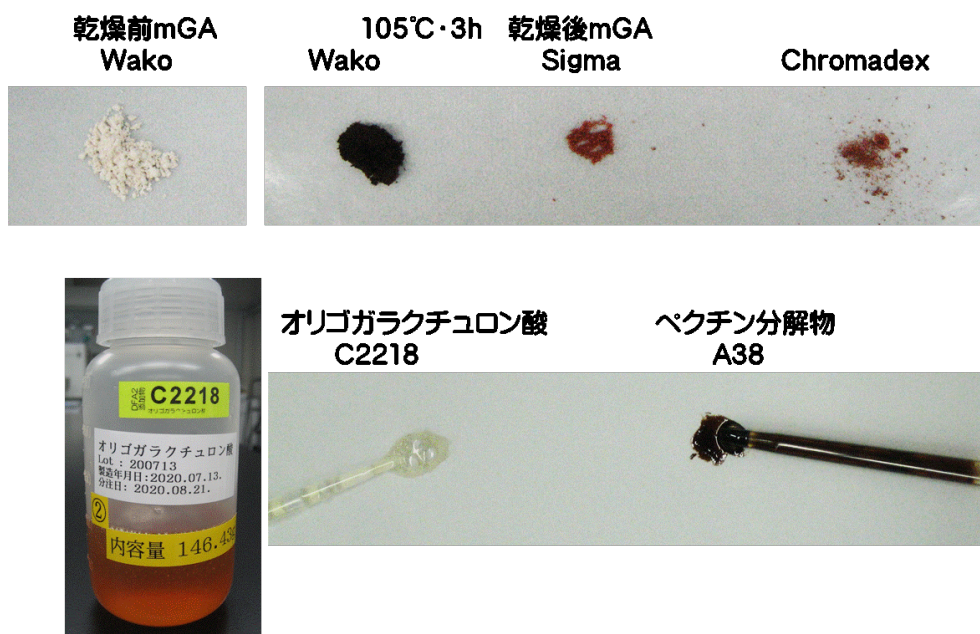


Fig. 10 乾燥前後の試薬mGA, 添加物製品oGA <C2218>及びペクチン分解物<A38>の外観の変化

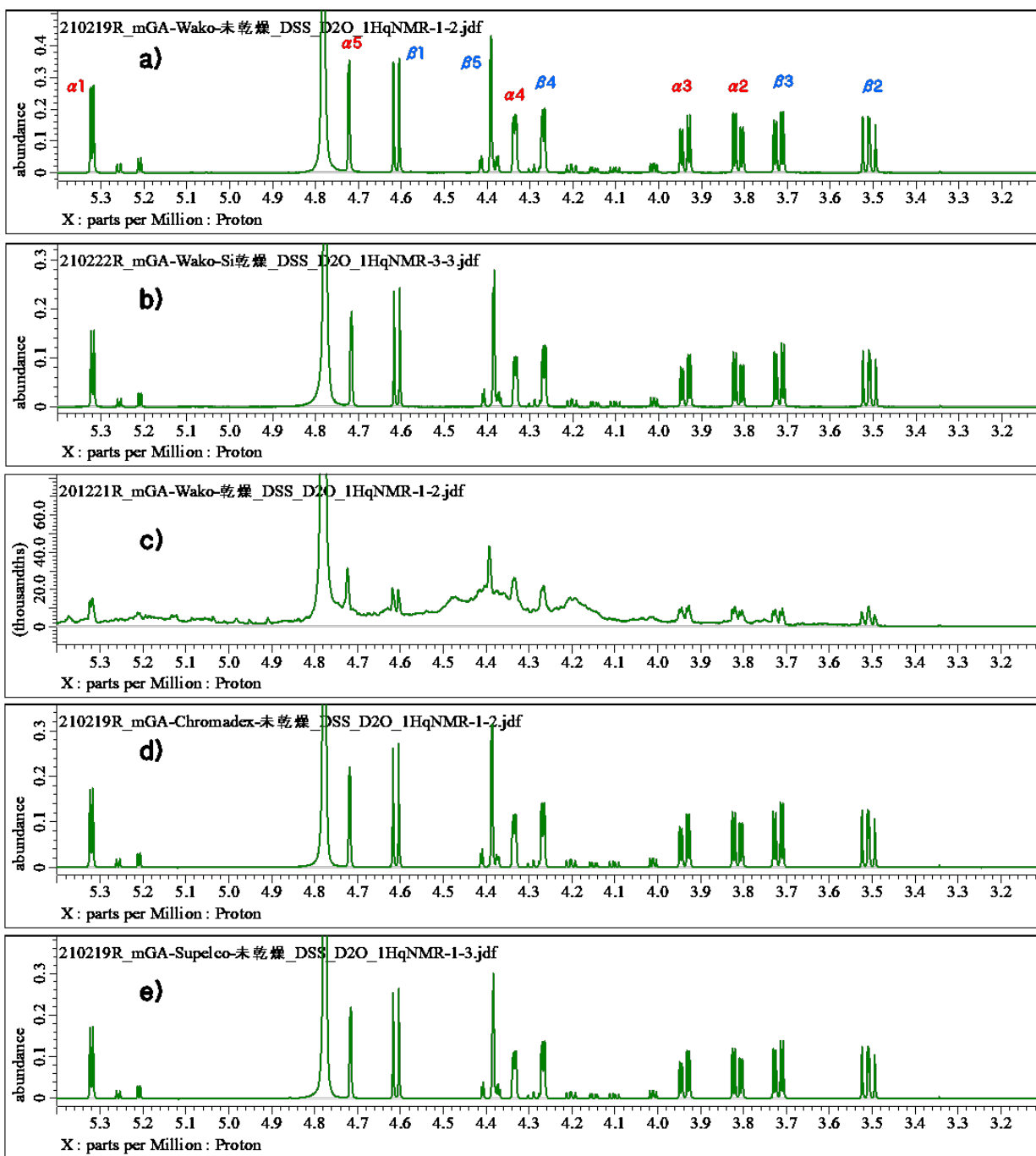
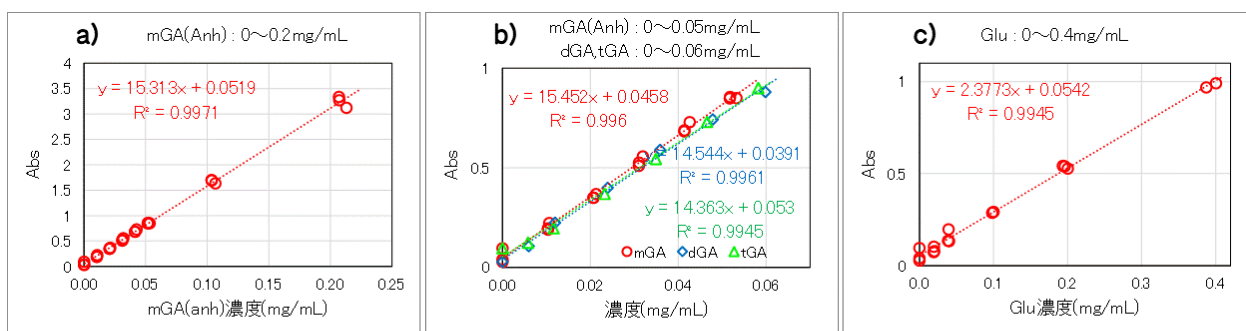


Fig. 11 3社の試薬mGAの<sup>1</sup>H qNMRスペクトル(in D<sub>2</sub>O)

a) mGA (Wako) 乾燥なし, b) mGA (Wako) シリカゲルデシケータ乾燥, c) mGA (Wako) 105°C乾燥, d) mGA (ChromaDex) 乾燥なし, e) mGA (Supelco) 乾燥なし



mGA濃度(Anh) mg/mL	Abs @530.0 nm
0.00	0.028
0.00	0.0961
0.00	0.0405
0.0107	0.2225
0.0104	0.1899
0.0103	0.196
0.0213	0.3685
0.0207	0.3508
0.0207	0.3494
0.0320	0.5572
0.0311	0.526
0.0310	0.5105
0.0426	0.7291
0.0414	0.6883
0.0414	0.6828
0.0533	0.8502
0.0518	0.8562
0.0517	0.8488
0.1065	1.835
0.1036	1.6938
0.1035	1.7008
0.2130	3.1221
0.2071	3.2701
0.2069	3.3373

dGA濃度 mg/mL	Abs @530.0 nm
0.00	0.028
0.006	0.1063
0.012	0.224
0.024	0.3995
0.036	0.5903
0.048	0.7433
0.060	0.881

tGA濃度 mg/mL	Abs @530.0 nm
0.00	0.0961
0.006	0.1243
0.012	0.1964
0.023	0.3691
0.035	0.5446
0.047	0.731
0.058	0.9008

Glu濃度 mg/mL	Abs @530.0 nm
0.00	0.028
0.00	0.0961
0.00	0.0405
0.0196	0.1029
0.0194	0.0736
0.0200	0.0789
0.0392	0.197
0.0387	0.1359
0.0400	0.133
0.0881	0.2868
0.1001	0.2927
0.1962	0.5394
0.1936	0.542
0.2002	0.5278
0.3872	0.9686
0.4004	0.9907

Fig. 12 カルバズール-硫酸法による検量線

Table 1 <sup>1</sup>H qNMRにより求めた各試薬の純度(%)

a)

mGAとして		純度(wt%)					
peak	[ppm]	n1	n2	n3	AVR	STDEV	CV%
mGA- $\alpha$ 1	5.32	36.91	36.88	36.90	36.56	0.31	0.88
mGA- $\alpha$ 2	3.81	36.88	36.54	36.51			
mGA- $\alpha$ 3	3.93	36.60	36.55	36.40			
mGA- $\alpha$ 4	4.33	36.78	36.76	36.52			
mGA- $\alpha$ 5	4.72	36.15	36.01	36.04			
mGA- $\beta$ 1	4.61	41.97	42.02	41.97	41.49	0.52	1.24
mGA- $\beta$ 2	3.50	42.08	41.91	41.78			
mGA- $\beta$ 3	3.72	41.56	41.45	41.57			
mGA- $\beta$ 4	4.26	40.84	41.10	40.52			
mGA- $\beta$ 5	4.39	40.67	41.18	41.76			
合計 $\alpha+\beta$ (%)					78.05		
一水和物として(%)					85.29		

b)

dGAとして		純度(wt%)					
peak	[ppm]	n1	n2	n3	AVR	STDEV	CV%
dGA- $\alpha$ 1	5.33	28.17	28.35	28.35	29.74	1.28	4.29
dGA- $\alpha$ 3	4.01	30.01	30.63	30.55			
dGA- $\alpha$ 4	4.44	29.10	31.52	31.02			
dGA- $\beta$ 2	3.49	43.94	43.03	43.37	40.10	3.68	9.17
dGA- $\beta$ 4	4.38	36.78	36.82	36.65			
dGA-1'	5.07	68.53	72.13	65.01			
dGA-2'	3.71	73.82	74.57	74.00			
dGA-3'	3.93	73.81	74.18	74.12			
dGA-5'	5.04	75.59	78.23	67.25			
dGA- $\alpha$ 5, $\beta$ 1	4.64	72.89	73.81	70.86			
dGA- $\beta$ 5, 4'	4.33	120.24	120.21	120.90			
dGA- $\alpha$ 2, $\beta$ 3	3.80	70.98	73.14	71.32			
合計 $\alpha+\beta$ (%)					69.84		

c)

tGAとして		純度(wt%)					
peak	[ppm]	n1	n2	n3	AVR	STDEV	CV%
tGA- $\alpha$ 1	5.36	32.08	31.97	31.26	31.77	0.45	1.40
tGA- $\alpha$ 5	4.76	27.13	28.06	28.37			
tGA- $\beta$ 1	4.67	43.09	42.42	40.64			
tGA- $\beta$ 2	3.51	44.42	43.26	44.47			
tGA- $\beta$ 4, $\beta$ 5	4.43	41.56	41.90	41.73	41.73	0.17	0.40
tGA-1', 1'', 5', 5''	5.09	75.88	75.77	76.05			
tGA-2', 2''	3.75	74.75	74.35	77.13			
tGA-3''	3.94	77.04	77.06	76.38			
tGA-4''	4.34	78.14	75.82	79.36			
tGA- $\alpha$ 4, 4'	4.48	51.50	51.67	51.87			
tGA- $\alpha$ 3, 3'	4.05	55.17	54.79	55.37			
tGA- $\alpha$ 2, $\beta$ 3	3.81	70.92	70.49	75.18			
合計 $\alpha+\beta$ (%)					73.50		

d)

Gluとして		純度(wt%)					
peak	[ppm]	n1	n2	n3	AVR	STDEV	CV%
Glu- $\alpha$ 1	5.22	38.57	37.29	37.36	37.80	0.67	1.77
Glu- $\alpha$ 2	3.52	38.83	37.43	37.40			
Glu- $\alpha$ 5, $\alpha$ 6'	3.83	38.66	37.33	37.32			
Glu- $\beta$ 1	4.63	60.43	61.84	61.83	61.70	0.71	1.15
Glu- $\beta$ 2	3.23	60.93	62.25	62.28			
Glu- $\beta$ 3, $\beta$ 5	3.46	60.99	62.31	62.33			
Glu- $\beta$ 6'	3.89	60.78	62.15	62.23			
Glu- $\alpha$ 3, $\alpha$ 6, $\beta$ 6	3.73	46.09	45.66	45.66			
Glu- $\alpha$ 4, $\beta$ 4	3.39	99.58	99.54	99.52			
合計 $\alpha+\beta$ (%)					99.50		

※赤枠及び青枠内を平均し、合計値を純度とした。

※灰色網掛け部分はシグナルが混在していてH数の設定ができない領域。

Table 2 HPLCによる添加物製品oGA中のmGA, dGA及びtGAの定量結果

a)

サンプル定量…それぞれの検量線使用				検液中の濃度 (mg/mL)	試料採取量(g)	定量 (mL)	含量(%)	含量 n3平均
Rt(min)			area					
5.7	mGA	n1	188754	0.522	1.0069	100	5.2	5.25
		n2	206035	0.570	1.0800	100	5.3	
		n3	194714	0.538	1.0184	100	5.3	
8.2	dGA	n1	292646	0.890	1.0069	100	8.8	8.81
		n2	312539	0.951	1.0800	100	8.8	
		n3	294616	0.896	1.0184	100	8.8	
14.7	tGA	n1	521820	1.788	1.0069	100	17.8	17.78
		n2	561575	1.924	1.0800	100	17.8	
		n3	528339	1.810	1.0184	100	17.8	
							合計	31.84
	重合度	n1	2.33					
		n2	2.33					
		n3	2.33					

b)

	oGA製品中の含量(%)			合計
	mGA	dGA	tGA	
① qNMR補正あり それぞれの検量線使用	5.25	8.81	17.78	31.84
② qNMR補正あり mGAの傾きから、dGA、tGAの傾きを 分子量換算	5.25	8.40	15.29	28.94
③ qNMR補正あり mGAの検量線だけ使って定量	5.25	8.01	14.35	27.60
④ qNMR補正なし 試薬は一水和物100%と仮定し、 mGAの検量線だけで計算	6.15	9.39	16.82	32.37

- a) 各成分の絶対検量線を用いたときの定量(<sup>1</sup>H qNMRで濃度補正済み)  
 b) 定量に用いる絶対検量線を変えたときの定量値の変化

Table 3 3社の試薬mGAの乾燥前後の<sup>1</sup>H qNMRによる純度

		a) 乾燥なし			b) 室温・シリカゲルデシケーター乾燥			c) 105°C・3h乾燥		
		AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%	AVR	STDEV	CV%
Wako	α	37.75	1.24	3.28	36.71	0.74	2.03	4.43	0.32	7.27
	β	42.12	1.42	3.37	42.57	0.91	2.14	4.79	0.32	6.65
	α + β	<b>79.87</b>			<b>79.28</b>			<b>9.22</b>		
ChromaDex	α	38.11	0.87	2.29	37.97	0.87	2.29	3.54	0.60	16.89
	β	43.76	0.77	1.75	43.74	0.85	1.94	5.16	2.73	52.90
	α + β	<b>81.87</b>			<b>81.71</b>			<b>8.70</b>		
Supelco	α	38.06	1.03	2.70	37.77	1.13	2.99	5.21	0.55	10.63
	β	43.70	0.64	1.47	43.31	1.03	2.37	6.91	3.01	43.63
	α + β	<b>81.76</b>			<b>81.08</b>			<b>12.12</b>		

Table 4 添加物製品oGA中の含量(ガラクトロン酸(mGA)として)

**a)**

oGA秤量値(g)	Abs @530.0 nm	検液中のmGA 濃度(mg/mL)	mGA含量(%)	AVR/ STDEV/ CV%
1.098	0.7868	0.0480	43.68	43.35
0.9947	0.6933	0.0419	42.13	1.09
0.9924	0.7241	0.0439	44.24	2.5

**b)**

oGA秤量値(g)	Glu添加量 (mg/mL)	Abs @530.0 nm	検液中のmGA 濃度(mg/mL)	mGAとしての 含量(%)
0.9947	0.04	0.8119	0.0496	49.85
0.9924	0.04	0.8644	0.0530	53.38
0.9947	0.10	1.0107	0.0624	62.78
0.9924	0.10	1.0148	0.0627	63.19
0.9947	0.19	1.1776	0.0732	73.64
0.9924	0.20	1.2392	0.0772	77.82

