

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和6年度研究分担報告書

既存添加物の成分組成に関する研究

～既存添加物の基準策定のための ^1H -qNMR を用いた成分定量～

研究分担者 永津明人 金城学院大学薬学部 教授

研究要旨 規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、 ^1H -qNMR 法(定量 ^1H -NMR 法)が試験法として適用可能であるか可能性を検討した上で、適用の可能性のあるものに関して、実際に適用する場合の測定条件の確立、あるいはそれを応用した正確な定量法の検討を目的として研究を行なった。令和6年度も引き続き「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討とした。まず、令和5年度の研究においてバジル中の *rosmarinic acid* の定量を行った際、市販の食用バジルにおいて *rosmarinic acid* がほぼ含有されないものもあることを明らかとした。*rosmarinic acid* の有無の差異が何に起因するかも確認が必要であるため、令和6年度は品種の異なるバジルを栽培し、それぞれを茎と葉に分け、それぞれの *rosmarinic acid* の定量を行った。また、「香辛料抽出物」由来の既存添加物「ブラックペッパーオイル」の指標成分として β -caryophyllene を選択し、その含有率の定量が ^1H -qNMR 法で可能であることを確認した。

A. 研究目的

^1H -qNMR 法は、SI トレ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の存在が HPLC 法などの従来法では必須であるのにたいして、それらがなくても絶対定量が可能であることから、標準品が手に入りにくい天然物の定量に好適な測定法である。すなわち、対象物質の ^1H -NMR スペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となりうる。それゆえ、既存添加物「香辛料抽出物」の原料生薬成分の規格試験法として、定量 NMR (^1H -qNMR)法が

適切あるいは適用可能なものがあるかの検討を行っている。令和6年度も引き続き既存添加物である「香辛料抽出物」に着目して研究を行った。

令和5年度の研究において、バジル中の *rosmarinic acid* (Fig. 1)の定量を行った際、市販の食用バジルにおいて *rosmarinic acid* がほぼ含有されないものもあることを明らかとした。既存添加物「香辛料抽出物」の基原の一つであるバジルでの *rosmarinic acid* の有無の差異が何に起因するかも確認が必要であるため、令和6年度は品種の異なるバジルを栽培、収穫し、それぞれを茎と葉に分け、それぞれの *rosmarinic acid* の定量を行った。

さらに、コショウ由来の食品添加物の一つであるブラックペッパーオイルについて、規格基準策定の基礎研究として、指標成分とし

て β -caryophyllene (Fig. 2)を選択し、その定量が可能か否かの検討を行った。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

^1H -qNMR 測定時の内部標準物質として用いる sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonate- d_6 (DSS- d_6 , Fig. 3)及び 1,4-bis(trimethylsilyl)-benzene- d_4 (BTMSB- d_4 , Fig. 3)はいずれも富士フィルム和光純薬の Trace Sure®規格のものをを用いた。NMR 測定用溶媒の methanol- d_4 , acetone- d_6 , はそれぞれ Isotec Inc. の 99.8, 99.9 atom %D をを用いた。Rosmarinic acid と β -caryophyllene はどちらも東京化成及び富士フィルム和光純薬から購入の試薬を用いた。スイートバジル, スイートタイバジル, ブッシュバジル, イタリアンラージリーフバジル, ジェノババジル(Fig. 4)の各品種は種子を日野春ハーブガーデンより 2024 年 4 月に購入し金城学院大学薬用植物園に 4 月中旬に播種, 6 月 20 日ごろに収穫して乾燥後, 葉と茎に分け粉末化した。市販バジル末は 2024 年 4 月にお互いに異なる製品を購入し, 用いた。ブラックペッパーオイルは 2023 年 8 月に国立医薬品食品衛生研究所より供与を受けたもの(管理番号 C2302)を用いた。コショウ粉末は 2024 年 4 月に市販のものを購入した。

B-2) 装置等

秤量には島津製作所の精密電子天秤 AUW120D をを用いた。生薬の粉末化には大阪ケミカル WB-1, 分注操作の電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x, 超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S, 遠沈操作は遠心器 AS One Mini Centrifuge をそれぞれ用

いた。NMR 装置は 日本電子 JNM-ECA500 を使用した。HPLC は, ポンプとして JASCO PU-4180, カラムオーブンに Shimadzu CTO-20AC, 検出器はフォトダイオードアレイ検出器 JASCO MD-4010 を用いた。メンブランフィルターは Cosmonice Filter W 0.45 μm ϕ 13 mm をを用いた。

B-3) ^1H -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

まず, rosmarinic acid の ^1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と, 試料中の ^1H -qNMR 法による rosmarinic acid の定量を行うことにした。また, HPLC をを用いた定量との比較も行うことにした。

B-3-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- d_6 はデシケーター中で保管乾燥させたものをを用いた。約 10 mg を精秤して 20.00 mL の methanol- d_4 に 溶かして内部標準溶液とした。

Rosmarinic acid 標準品は, 約 10 mg を精秤して 5.00 mL の内部標準溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

粉末化した栽培バジルの葉, 茎あるいは市販バジル末の測定用試料の調製は, 約 100 mg を精秤して内部標準溶液 (1.00 mL)に懸濁し, 超音波下 30 分抽出を行い, 遠沈し, その上清をメンブランフィルターを用いて濾過し, 濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり, ^1H -qNMR の測定に供した。

B-3-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

各試料から調製した測定試料の ^1H -NMR を測定し, rosmarinic acid (Fig. 1)の 7'位のプロ

トンシグナルがそれぞれ 7.54 ppm に現れることを確認した(Fig. 5). ^1H -qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した. 積算回数は 8 回とした. 測定によって得られたスペクトルから, rosmarinic acid の 7'位のプロトンシグナルと 0.00 ppm とした DSS- d_6 のメチル基プロトンのシグナルの面積を比較して次式に従って rosmarinic acid の濃度を算出した.

$$C_R = (I_R / I_D) \times C_D$$

ただし, C_D , C_R はそれぞれ DSS- d_6 及び rosmarinic acid のモル濃度(mol/mL), I_D , I_R はそれぞれ DSS- d_6 及び rosmarinic acid の水素 1 個あたりのシグナル面積.

B-3-c) HPLC を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

HPLC は YMC-Triart C18 s-5 150 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い, 40°Cで MeCN : 0.1%リン酸- H_2O = 20 : 80, 流速 1.0 mL/min で溶出, 275 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った.

^1H -qNMR 法で定量した rosmarinic acid 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した. それぞれの試料は, ^1H -qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 10 倍に希釈し, その試料溶液を 10 μL 注入して得られたクロマトグラムの rosmarinic acid のピークの面積からその定量を行った.

B-4) ^1H -qNMR 法を用いたブラックペッパーオイル及びコショウ末中の β -caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイルにある程度含まれ

る成分として, α -pinene, limonene, β -caryophyllene (Fig. 2)が文献的に示されている. これらのスペクトルとブラックペッパーオイルのスペクトルを比較したところ, acetone- d_6 溶液の測定において β -caryophyllene のシグナルが独立して観測されたことから, 試料中の ^1H -qNMR 法による β -caryophyllene の定量を同重溶媒で実施した.

B-4-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

BTMSB- d_4 はデシケーター中で保管乾燥させたものを用いた. 約 10 mg を精秤して 20.00 mL の acetone- d_6 に溶かして内部標準溶液とした.

β -caryophyllene 試薬とブラックペッパーオイルは, 約 10 mg を精秤して 5.00 mL の内部標準溶液に溶かした. この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり ^1H -qNMR の測定に供した.

コショウ末は, デシケーター中で乾燥させたのち約 100 mg を精秤して内部標準溶液 (1.00 mL)に懸濁し, 超音波下 30 分抽出を行い, 遠沈し, その上清をメンブランフィルターを用いて濾過し, 濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり, ^1H -qNMR の測定に供した.

B-4-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

β -caryophyllene 試薬とブラックペッパーオイルとコショウ末の抽出液の ^1H -NMR を測定し, 試薬とブラックペッパーオイルでは β -caryophyllene (Fig. 2)の 5 位のプロトンシグナルが 5.04 ppm 付近に現れることを確認した (Fig. 6). コショウ末の抽出液ではこのシグナルは観測できなかった. ^1H -qNMR スペクトル

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、 β -caryophyllene の 5 位のシグナルと 0.00 ppm とした BTMSB- d_4 のメチル基プロトンのシグナルの面積を比較して次式に従って β -caryophyllene の濃度を算出した。

$$C_C = (I_C / I_B) \times C_B$$

ただし、 C_B 、 C_C はそれぞれ BTMSB- d_4 及び β -caryophyllene のモル濃度 (mol/mL)、 I_D 、 I_E はそれぞれ BTMSB- d_4 及び β -caryophyllene の水素 1 個あたりのシグナル面積。

C. 結果及び考察

C-1) ^1H -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

改めて ^1H -qNMR を用いて測定した市販バジル末中の rosmarinic acid の含有率は 2 製品ではそれぞれ 1.51% と 0.70% であったが、2 製品ではシグナルが観測されず、測定不能だった。栽培した 5 品種では、葉における含有率が 0.83~1.90% であったのに対して、茎では 4 品種でシグナルを観測できず、比較的葉での含有率が大きかった 1 品種でわずかに含有されている程度であった HPLC での測定結果でも同様のことが確認された。バジル由来の製品の rosmarinic acid の定量が ^1H -qNMR を用いても容易に行えることは昨年にも実証済みであるが、rosmarinic acid の有無がバジル各品種のどの部分を用いているかの判断材料になることがわかった (Fig. 5, Table 2)。

C-2) ^1H -qNMR 法を用いたブラックペッパ

ーオイル及びコショウ末中の β -caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイル中の β -caryophyllene を ^1H -qNMR を用いて測定できることがわかった (Fig. 6, Table 3)。ただし、スペクトル中でシグナルが混んでいる領域であることから、精密な測定という観点ではあまり精度の高いものではないと考えられた。原料となるコショウ中の β -caryophyllene は測定ができず、製品の管理の手段としては活用の余地があるものの原料の管理として β -caryophyllene を指標とすることはできないと考えられた。

D. 結論

D-1) ^1H -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

- 1) 令和 6 年度の結果と合わせて、バジル由来の製品中の rosmarinic acid の ^1H -qNMR を用いた定量条件を確立することができた。
- 2) バジル由来の製品中の rosmarinic acid の有無によって、バジルの葉を用いた茎を用いたかが明らかとできることがわかった。

D-2) ^1H -qNMR 法を用いたブラックペッパーオイル及びコショウ末中の β -caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイル中の β -caryophyllene を ^1H -qNMR を用いて測定できることがわかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表等

2-1. 学会

- 1) 森本深麗, 永津明人, 西崎雄三, 阿部裕, 増本直子, 杉本直樹: ^1H -qNMR 法を用いたクローブ由来既存添加物及びチョウジ末、オールスパイス末中の eugenol の定量. 日本生薬学会第 70 回年会(2024.9).
- 2) 瀬川ひかり, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人, 「定量 NMR (^1H -qNMR) を用いたバジル (*Ocimum basilicum* L.) 中の rosmarinic acid の定量」, 日本薬学会第 145 年会(2025.3).

- 1) 永津明人: 生薬等の品質管理での定量 NMR 法 (^1H -qNMR) の利用. 2024 年度分子研異分野技術交流セミナー(第 3 回)(2024.7).
- 2) 永津明人: 生薬の品質評価について. 令和 6 年度日本アロマセラピー学会中部北陸地方会・清水薬剤師会(2024.9).

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)
なし

2-2. 講演等

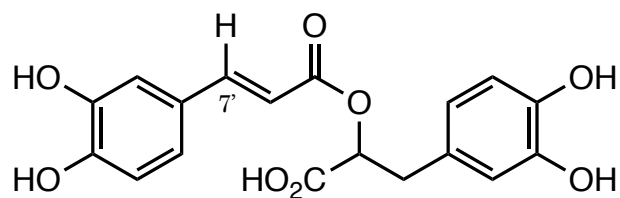


Fig. 1 Rosmarinic acid の構造

7'位のプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン.

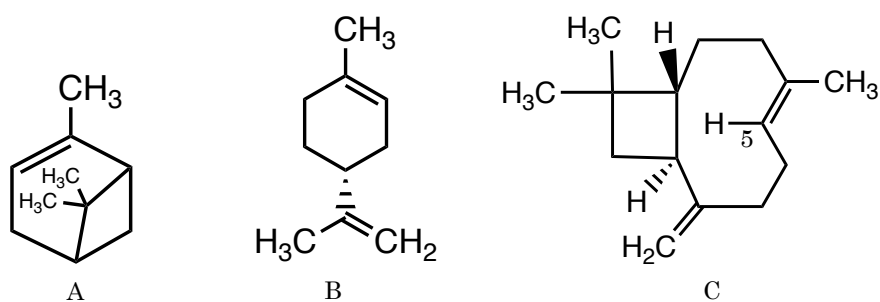


Fig. 2 α -Pinene (A), limonene (B), β -caryophyllene (C)の構造

β -Caryophyllene (C) の5 位のプロトンが ^1H -qNMR 法において積分値を測定したプロトン.

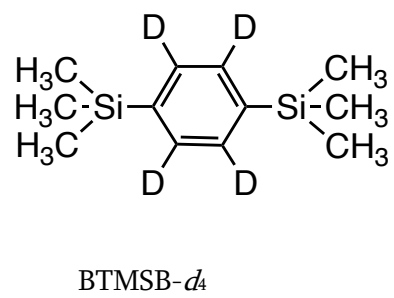
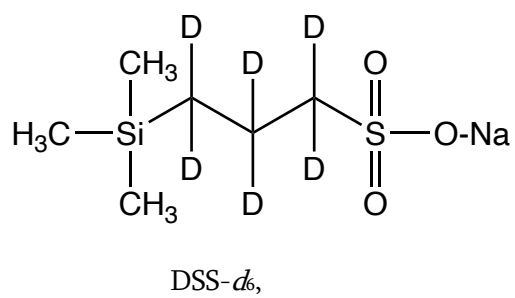


Fig. 3 定量用の認証標準物質

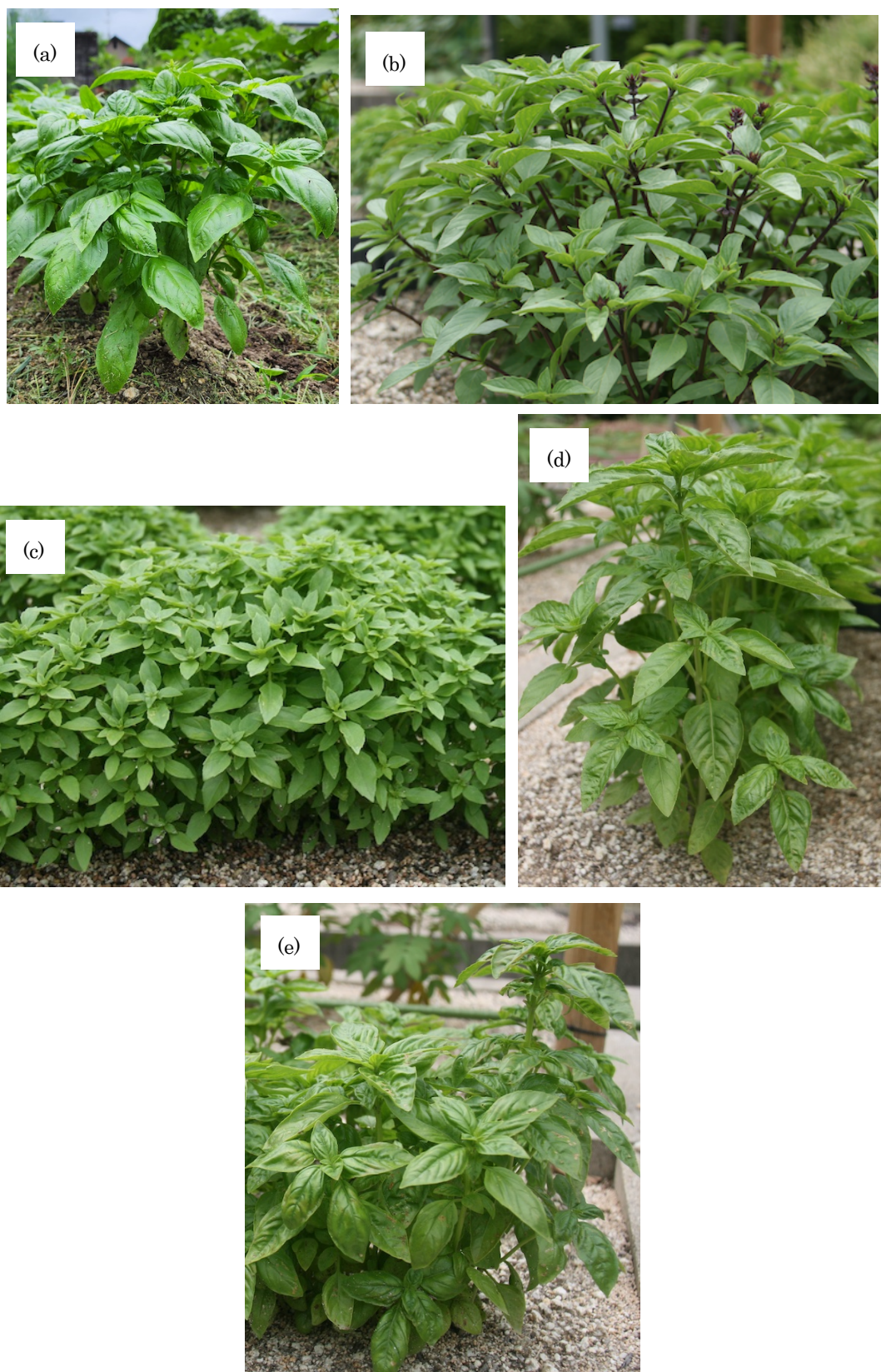


Fig. 4 栽培して試料とした各品種のバジル

それぞれスイートバジル (a), スイートタイバジル (b), ブッシュバジル (c), イタリアンラージリーフバジル (d), ジェノババジル (e) .

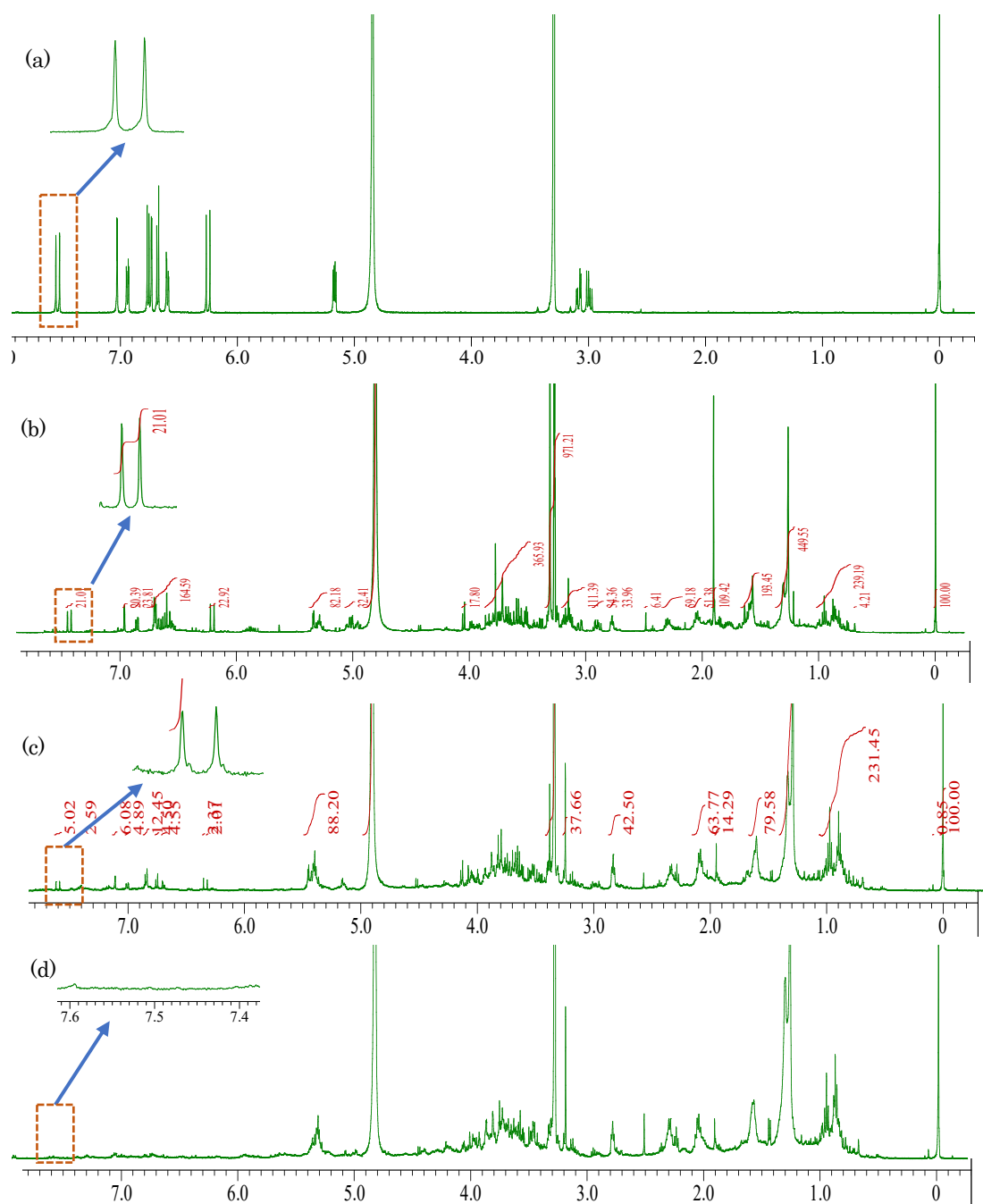


Fig. 5 Rosemarinic acid 試薬 A (a), スイートバジル葉 (b)と市販バジル末 A (c), C (d)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4 , 500 MHz)

拡大図のシグナルが 7 位のプロトンシグナル。

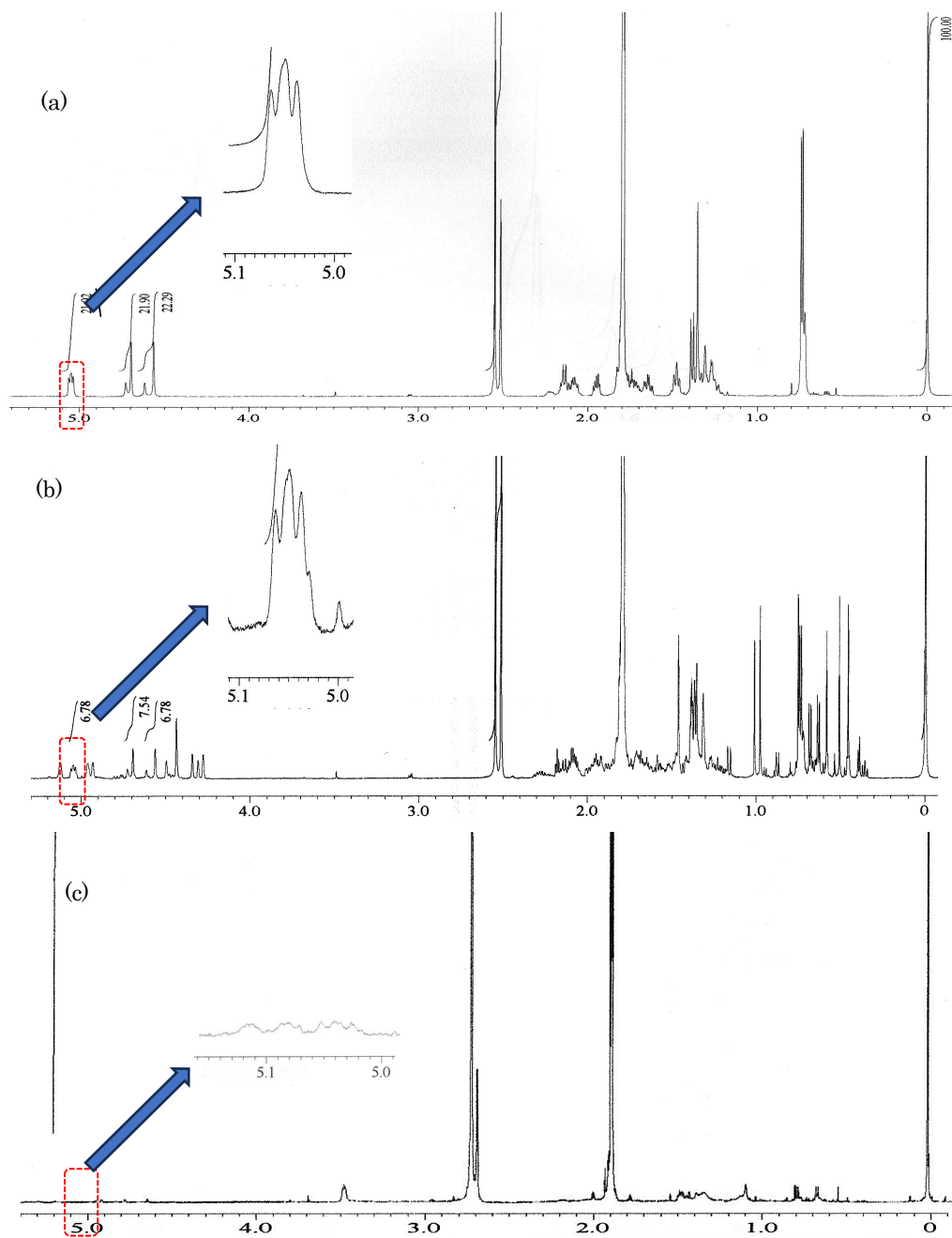


Fig. 6 β -Caryophyllene 試薬 A (a), ブラックペッパーオイル (b)とコショウ末の各試料 (c) の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 500 MHz)

拡大図のシグナルが 5 位のプロトンシグナル.

Table 1 ¹H-qNMR スペクトルの測定条件

分光計	日本電子 ECA500
観測範囲	-5 ~ 15 ppm
データポイント数	32000
フリップアングル	90°
パルス待ち時間	60 秒
積算回数	8 回
スピン	なし
プローブ温度	25°C

Table 2 Rosmarinic acid の含有率

	含有率(%)			
	¹ H-qNMR		HPLC	
rosmarinic acid 試薬 A (23TK-RA)	90.13	±0.14		
rosmarinic acid 試薬 B (24FW-RA)	93.09	±0.11		
スイートバジル葉 (24Oc-SB-L)	1.90	±0.03	1.80	±0.05
スイートバジル茎 (24Oc-SB-S)	0.14	±0.00	0.12	±0.00
スイートタイバジル葉 (24Oc-STB-L)	1.40	±0.05	1.15	±0.03
スイートタイバジル茎 (24Oc-STB-S)	ND		ND	
ブッシュバジル葉 (24Oc-BB-L)	1.08	±0.03	0.98	±0.03
ブッシュバジル茎 (24Oc-BB-S)	ND		ND	
イタリアンラージリーフバジル葉 (24Oc-ILB-L)	1.39	±0.03	1.29	±0.03
イタリアンラージリーフバジル茎 (24Oc-ILB-S)	ND		ND	
ジェノババジル葉 (24Oc-JB-L)	0.83	±0.01	0.69	±0.02
ジェノババジル茎 (24Oc-JB-S)	ND		ND	
市販バジル粉末 A (24ca-SB-SBp)	1.51	±0.01	1.39	±0.05
市販バジル粉末 B (24ca-SB-OBp)	0.70	±0.04	0.57	±0.02
市販バジル粉末 C (24ca-H-Bp)	ND		ND	
市販バジル粉末 D (24ca-G-Bp)	ND		ND	

Table 3 ^1H -qNMR を用いて測定した β -caryophyllene の含有率

	含有率(%)
β -caryophyllene 試薬 A (24TK-bca)	90.13 $\pm$ 0.14
β -caryophyllene 試薬 B (24FW-bca)	93.09 $\pm$ 0.11
ブラックペッパーオイル (C2302)	1.55 $\pm$ 0.047
コショウ末(24ca-BPp)	ND