

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に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5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

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。本年度は「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。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、その中からクローブ関連製品とバジルの成分含有量評価が $^1\text{H-qNMR}$ 法で可能かどうかを検討した。クローブ関連製品の検討では、指標成分として適切であろう eugenol の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量の検討を行い、クローブの基原となる生薬のチョウジ、クローブ関連の既存添加物製品であるクローブ香料、クローブ抽出物の eugenol の含有率の定量が $^1\text{H-qNMR}$ 法で可能であることを示し、既存の HPLC 法との同等性を確認できた。また、クローブと同じく eugenol を主な精油成分とするオールスパイスについても同様に定量が $^1\text{H-qNMR}$ 法で可能である確認できた。バジルについては、当初精油成分の定量を目指したが、rosmarinic acid が指標成分として適切と考え、 $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量の検討を行い、市販の食用バジルにおいて rosmarinic acid の定量が $^1\text{H-qNMR}$ 法で可能であることを示すと同時に、rosmarinic acid がほぼ含有されないものもあることを明らかにした。

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。^{1,2)}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 $^1\text{H-NMR}$ 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。

令和5年度は「香辛料抽出物」に着目して研究を行った。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。基原が多様な上、用部も明確には書かれておらず、規格基準は定められていない既存添加物である(なお、令和6年2月公示された第10版食品添加物公定書において香辛料抽出物の定義に基原及び使用部位が示された。)。規格基準を決めるには素材ごとに品質評価のための指標成分又は有効成分を定めて基準の策定をしていく必要がある。特に、指標成分が精油成分である場合、たとえ市販標準物質があっても揮発性であるがゆえにその純度が変化しやすく、香辛料抽出物中の正確な含量を得にくいため、その正確な含量を得るには $^1\text{H-qNMR}$ 法が適していると考えられる。本年は、香辛料植物の中からクローブと

オールスパイス，バジルに着目した．クローブとオールスパイスでは，**eugenol** (Fig. 1)が主要成分となると考えて，生薬クローブとクローブ関連の既存添加物製品であるクローブ香料，クローブ抽出物の **eugenol** の定量方法の検討をおこなった．また，クローブ同様に **eugenol** が主な精油成分であるオールスパイス中でも同様に定量可能かの検討をおこなった．バジルでは，当初精油成分の定量を目指したが，¹H-qNMR 法の実施に適する精油成分のシグナルを見出すことが困難であった代わりに **rosmarinic acid** (Fig. 2)が比較的容易に定量できることがわかったため，**rosmarinic acid** を指標成分とした定量方法の検討を行なった．

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)は富士フィルム和光純薬の Trace Sure®規格のものを用いた．NMR 測定用溶媒の dimethylsulfoxide (DMSO)-*d*₆, methanol-*d*₄, はそれぞれ Isotec Inc.の 99.9, 99.8 atom %D を用いた．**eugenol** は富士フィルム和光純薬から，**rosmarinic acid** は東京化成および富士フィルム和光純薬から購入の試薬を用いた．チョウジは生薬として 2023 年 5 月に購入したもの，チョウジ末，オールスパイス末は，食品として市販されている果実を 2023 年 8 月に購入したものを用いた．クローブ香料は 2023 年 8 月に，クローブ抽出物は 2015 年 8 月にそれぞれ国立医薬品食品衛生研究所より供与を受けたものを用いた．バジルのうち栽培品は 2023 年 4 月に実験者の家庭菜園からえたもの，市販バジル末は 2023 年 4 月にお互いに異なる製造者製を購入し，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．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，カラムオープンに 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 を用いた．

B-3)¹H-qNMR 法を用いたチョウジ，クローブ末，クローブ香料，クローブ抽出物，オールスパイス末中の **eugenol** の定量

まず，**eugenol** 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 **eugenol** の定量を行うことにした．また，HPLC 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用いた．約 10 mg を精秤して 20.00 ml の DMSO-*d*₆ に溶かして内部標準溶液とした．

Eugenol 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 ¹H-qNMR の測定に供した．

Eugenol 測定用試料の調製は，次のように行った．生薬のチョウジは粉末化したのち用いた．粉末生薬と市販のクローブ末，オールスパイス末は，デシケータ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．クローブ抽出物は約 10 mg を精秤して内部標準溶液 (3.00 mL) に懸濁し，以下同様に遠沈，上清を濾過，濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり，¹H-qNMR の測定に供した．クローブ香料は約 10 mg を精秤して内部標準溶液 (3.00 mL) に溶解して 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

Eugenol と各生薬粉末の抽出液の $^1\text{H-NMR}$ を測定し、eugenol (Fig. 1)の6位のプロトンシグナルが6.5 ppm付近に現れることを確認した。(Fig. 4) $^1\text{H-qNMR}$ 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、eugenolの6位のシグナルと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eugenolの濃度を算出した。

$$C_E = (I_E / I_D) \times C_D$$

ただし、 C_D 、 C_E はそれぞれDSS- d_6 及びeugenolのモル濃度(mol/mL)、 I_D 、 I_E はそれぞれDSS- d_6 及びeugenolの水素1個あたりのシグナル面積。

B-3-c) HPLC を用いたチョウジ、クローブ末、クローブ香料、クローブ抽出物、オールスパイス末中の eugenol の定量

HPLCはCosmosil 5C8-MS-II 250 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い、40°CでMeOH : H₂O = 75 : 25 (0 min)→90 : 10 (24 min)のグラジエント、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。(Fig. 5)

$^1\text{H-qNMR}$ 法で定量したeugenol標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 6)それぞれの試料は、 $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの測定溶液をHPLCの展開溶媒で20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中のeugenolのピークの面積からその定量を行った。

B-4) $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

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

B-4-a) $^1\text{H-qNMR}$ 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 $^1\text{H-qNMR}$ の測定に供した。

栽培バジルは採集した葉を乾燥後、粉末化した。粉末化したバジルあるいは市販バジル末の測定用試料の調製は、約100mg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、 $^1\text{H-qNMR}$ の測定に供した。

B-4-b) $^1\text{H-qNMR}$ スペクトルの測定

各試料から調製した測定試料の $^1\text{H-NMR}$ を測定し、rosmarinic acid (Fig. 2)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. 7) $^1\text{H-qNMR}$ 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、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-4-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-H₂O = 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。(Fig. 8)

^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。(Fig. 9) 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。

C. 結果及び考察

C-1) ^1H -qNMR 法を用いたチョウジ、クローブ末、クローブ香料、クローブ抽出物、オールスパイス末中の eugenol の定量

Eugenol 標準品中の eugenol の定量を ^1H -qNMR 法でおこなった結果、97.34%と見積もられ、試薬の純度表示にほぼ沿ったものだった。

各生薬粉末から調製した試料で ^1H -NMR を測定したところ、 $\text{DMSO-}d_6$ 中で6位プロトンシグナルが独立して観測されたことから $\text{DMSO-}d_6$ を溶媒として ^1H -qNMR の測定をすることにした。 ^1H -qNMR 測定の結果、生薬チョウジ中の eugenol 含有率は $13.01\pm 0.32\%$ 、市販クローブ末では 8.11~14.83%、市販オールスパイス末では 2.14~2.67%という結果を得た。(Table 2) 市販クローブ末のうち、含有率の高いものは生薬と同等であったので、少ない方は品質が劣るか粉末化してからの時間が長いかなどの相違があるものと考えられた。既存添加物のクローブ香料の eugenol 含有率は 81.58%で試薬ほどではないが高い eugenol 含有率であった。クローブ抽出物は 31.93%で、製品のラベル表示 38%より低かった。HPLC で eugenol の検量線を作成したところ、良好な相関の検量線を得ることができた。この検量線から各試料中の eugenol の含有率を算出したところ、 ^1H -qNMR 法での数値に極めて近似した値が得られた。お互いにそれぞれの試料の定量値のばらつきも極めて小さく、 ^1H -qNMR 法が HPLC の代わりにとり得る方法であることが確認できた。

C-2) ^1H -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

2 種類の rosmarinic acid 試薬中の化合物の定量を ^1H -qNMR 法でおこなった結果、それぞれ 90.13%、93.09%と見積もられ、試薬の純度表示よりも小さな値だった。バジル末中の rosmarinic acid の ^1H -qNMR 法を用いた定量では、栽培品と市販粉末のうち 1 試料での含有率がそれぞれ 1.55、0.31%だったのに対し、市販粉末 3 試料では rosmarinic acid のシグナルを見つけないことができなかった。(Fig. 7, Table 3)

次に、HPLC で rosmarinic acid の測定を試みた。HPLC で rosmarinic acid の検量線を作成したところ、良好な相関の検量線を得ることができた。この検量線から各試料中のそれぞれの含有率を算出したところ、rosmarinic acid は ^1H -qNMR 法で定量された試料ではそれぞれの数値に近似した値が得られた。一方、 ^1H -qNMR のスペクトルで rosmarinic acid のシグナルがわからなかった試料に関しては、1 試料では rosmarinic acid のピークは全く見られず、2 試料は rosmarinic acid の保持時間付近にピーク面積の測定ができない程度のベースラインからの小さな膨らみが観測される程度だった。極めて濃い抽出液を作れば、これらの試料の場合は HPLC での定量なら可能ということかもしれない。しかしながら、シソ科の植物であるバジルが rosmarinic acid をほぼ含まないということには疑問があり、含有量に極端な差があるということから、市販のバジル末の基原という、定量以外の別の問題が生じている可能性がある。

D. 結論

1) 生薬チョウジ、クローブ末、クローブ香料、クローブ抽出物、オールスパイス末中の eugenol の ^1H -qNMR 法を用いた定量条件を確立した。

2) バジル末中の rosmarinic acid の ^1H -qNMR 法を用いた定量条件を確立した。また、製品による rosmarinic acid の含有量が極端に異なることから市販のバジル末の基原に疑問が出る結果となった。

E. 参考文献

- 1) 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, *Jpn J Food Chem Safety*. 2009; 16: 28-33 (2009).
- 2) 厚生労働省, 第 18 改正日本薬局方, pp2623 (2021).

F. 研究業績

1. 学会発表等

1-1. 学会

- 1) Sensoy M, Kutluay V M, Nagatsu A, Saracoglu I: Isoflavonoids from *Vuralia turcica* (Kit Tan, Vural & Kucukoduk) Uysal & Ertugrul, *日本薬学会第144年会* (2024年3月, 横浜)

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Bayrakceken G Z, Saracoglu I, Nagatsu A, Yilmaz M A, Basaran A A: Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from *Prunus mahaleb* L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 2023; 310: 116378.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

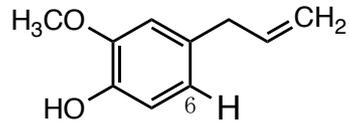


Fig. 1 Eugenol の構造

6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

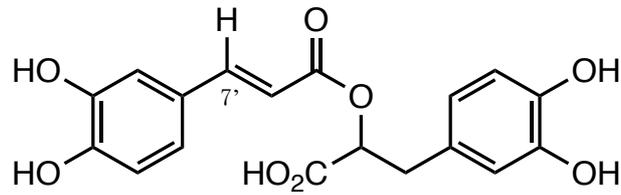


Fig. 2 rosmarinic acid の構造

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

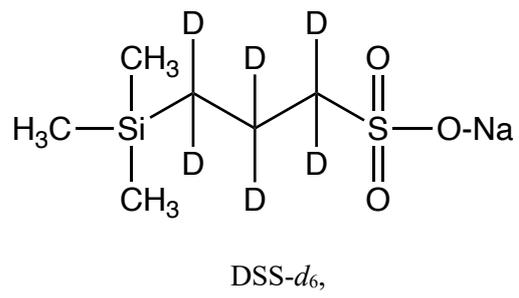


Fig. 3 定量用の認証標準物質

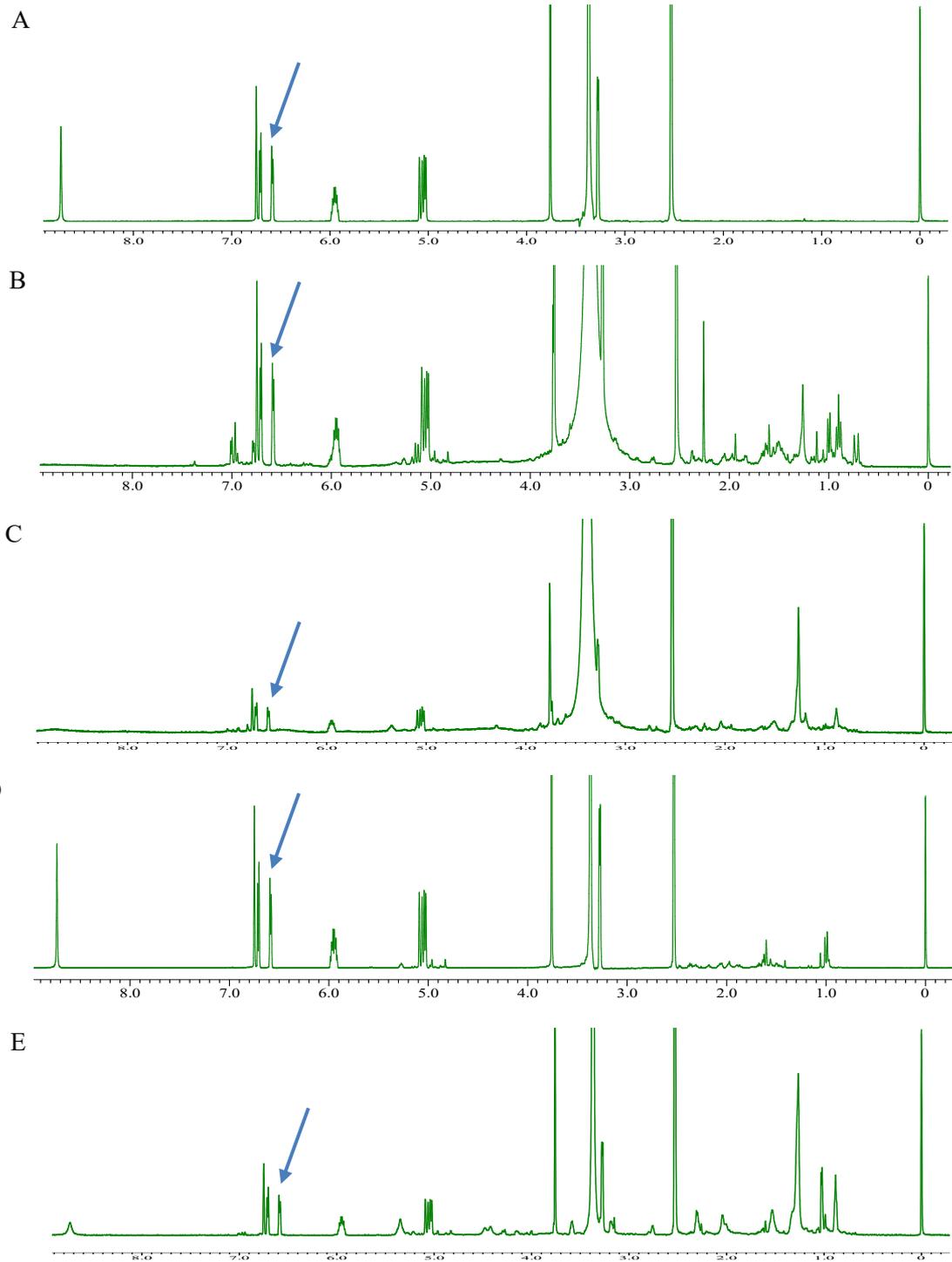


Fig. 4 Eugenol 試薬(A), 市販クローブ粉末(B), 市販オールスパイス粉末(C), クローブ香料及びクローブ抽出物(D)の ¹H-qNMR スペクトル (in DMSO-*d*₆, 600 MHz)
 矢印は 6 位の水素のシグナル

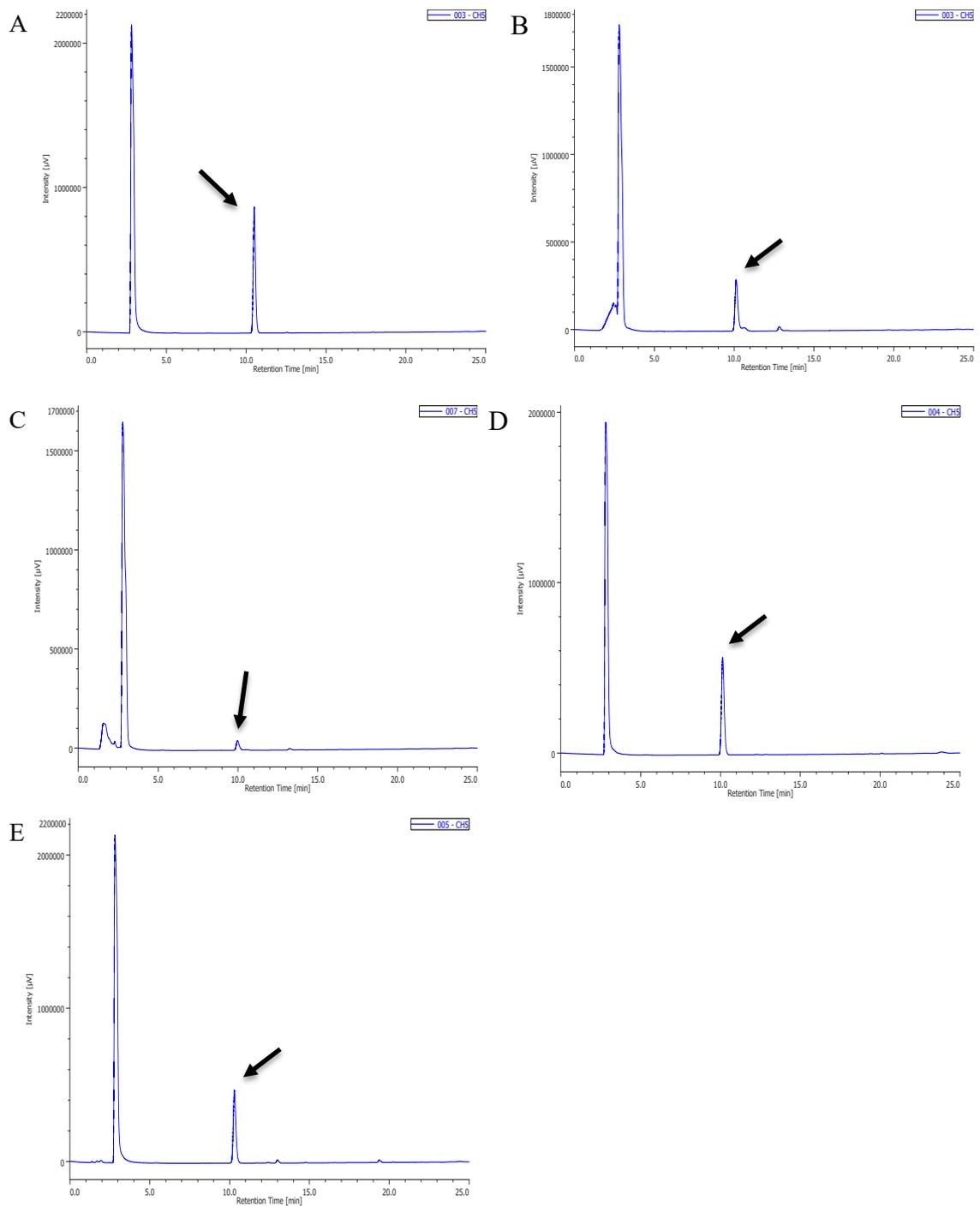


Fig. 5 Eugenol 試薬(A)，市販クローブ粉末(B)，市販オールスパイス粉末(C)，クローブ香料(D)及びクローブ抽出物(E)の HPLC クロマトグラム
縦軸はピーク強度，横軸は保持時間 (min) ，矢印は eugenol のピーク．

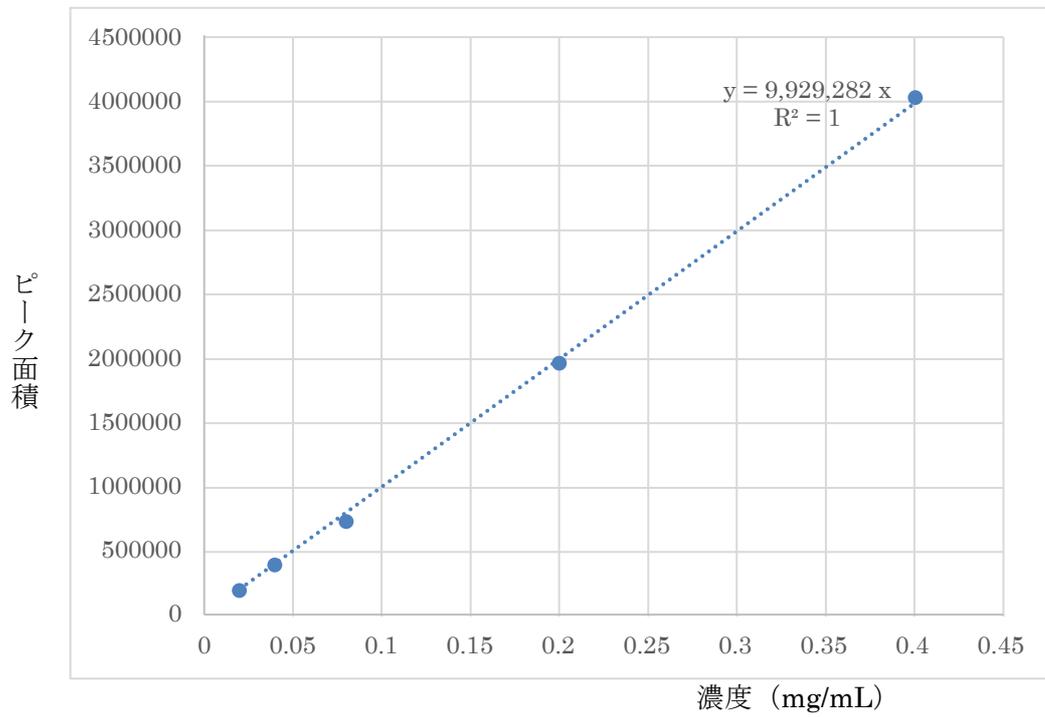


Fig. 6 HPLCにおける eugenol の検量線

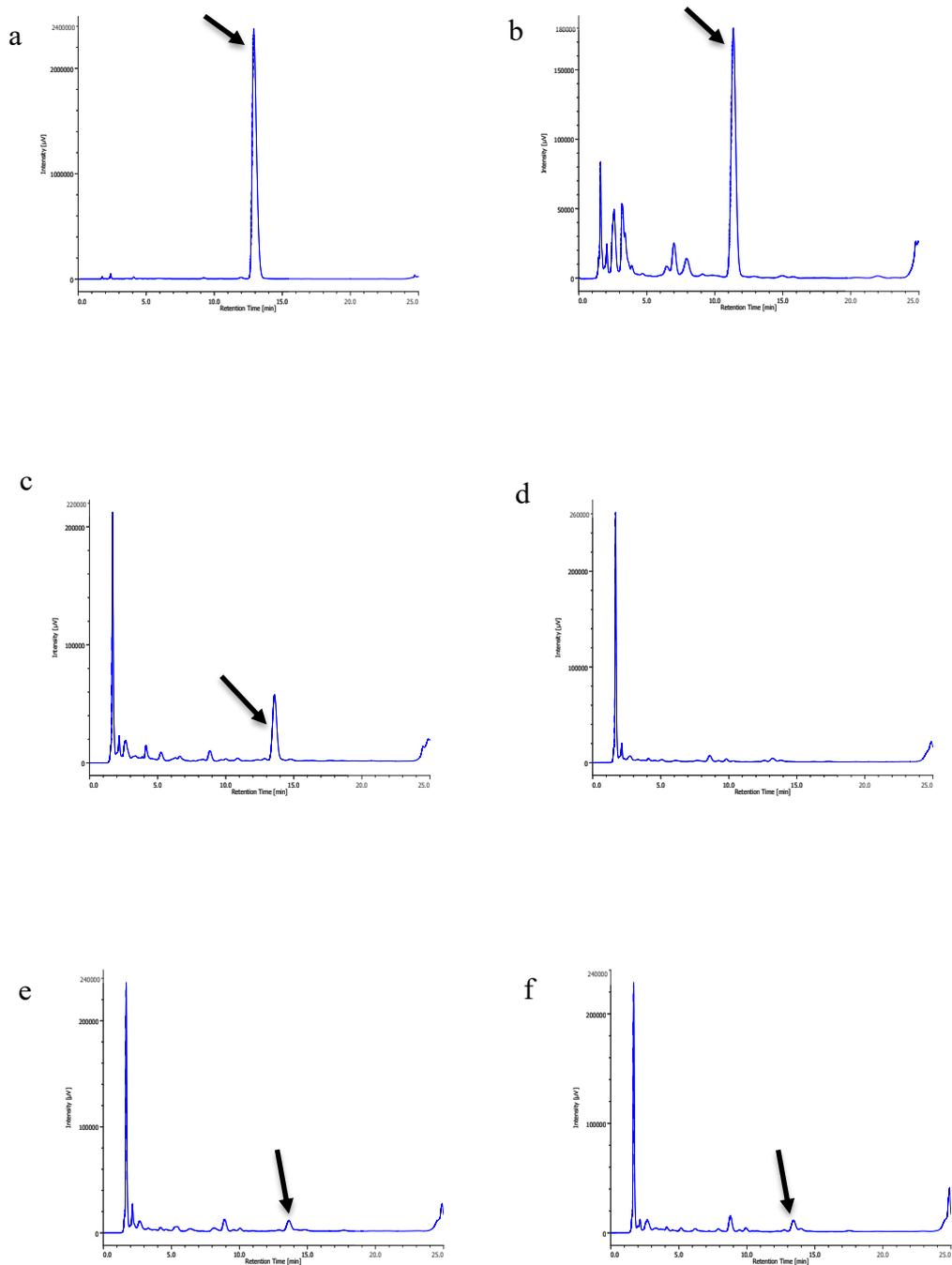


Fig. 8 Rosemarinic acid 試薬(a), 採集のバジル葉(b)と市販バジル末 A (c), B (d), C (e), D (f)の各試料の HPLC クロマトグラム.

縦軸はピーク強度, 横軸は保持時間 (min), 矢印が rosmarinic acid のピーク

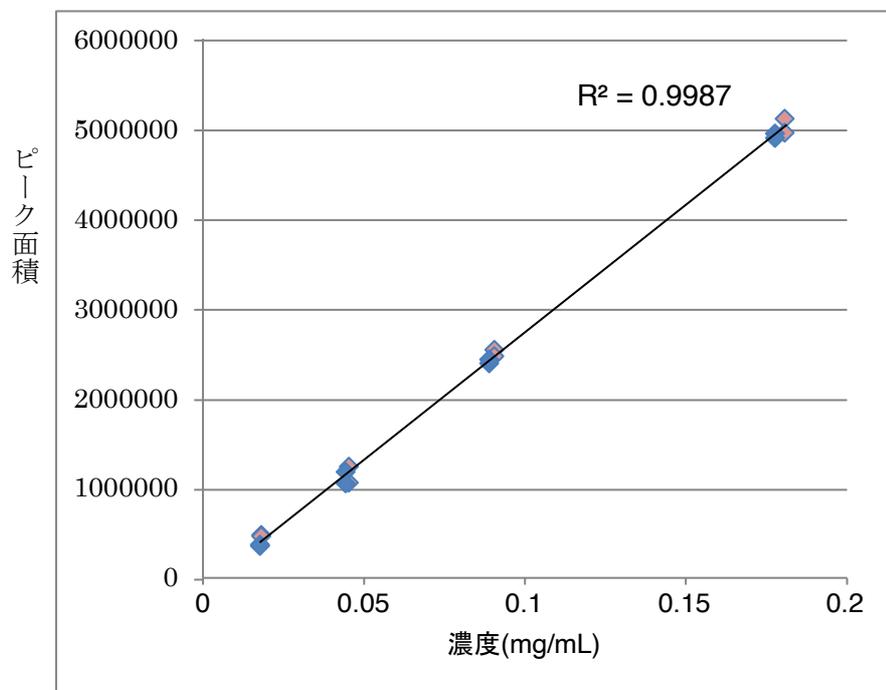


Fig.9 HPLCにおける rosmarinic acid の検量線

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 Eugenol の含有率

	含有率 (%)			
	¹ H-qNMR		HPLC	
eugenol 試薬	97.34	±0.29		
クローブ香料	84.55	±0.51	82.78	±0.01
クローブ抽出物	32.16	±0.49	31.67	±0.00
生薬チョウジ粉末	13.01	±0.26	12.58	±0.12
市販クローブ末 A	8.11	±0.14	7.56	±0.33
市販クローブ末 B	14.83	±0.35	14.20	±0.68
市販オールスパイス末 A	2.35	±0.36	2.28	±0.51
市販オールスパイス末 B	2.67	±0.10	2.40	±0.06

試薬の純度表示は>95%

Table 3 Rosmarinic acid の含有率

	含有率 (%)			
	¹ H-qNMR		HPLC	
rosmarinic acid 試薬 A	90.13	±0.14		
rosmarinic acid 試薬 B	93.09	±0.11		
栽培バジル葉粉末	1.55	±0.047	1.48	±0.077
市販バジル粉末 A	0.31	±0.033	0.24	±0.051
市販バジル粉末 B	ND		ND	
市販バジル粉末 C	ND		unmeasurable	
市販バジル粉末 D	ND		unmeasurable	

試薬の純度表示は>96% ND: not detected