

**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を目指して、現状、成分規格が未設定である酵素処理ナリンジンを対象に、その成分規格（案）における定量法の確立に関する検討を行った。今年度は、昨年度に引き続き、<sup>1</sup>H-qNMR に基づく相対モル感度（RMS）を用いたシングルリファレンス HPLC 法の当該分析への応用に関する検討を実施し、基準物質である 4-ヒドロキシ安息香酸メチル及びカフェインに対するナリンゲニン 7-O-グルコシドの RMS が 1.13（MHB）、1.87（カフェイン、検出波長 274 nm）、0.87（カフェイン、検出波長 205 nm）であることが明らかとなった。また、成分規格試験法（案）における前処理時のグルコアミラーゼ及び  $\alpha$ -グルコシダーゼを用いた酵素加水分解の反応効率について検討した結果、規定された反応時間、各酵素の添加量に問題は無いと考えられた。

## A. 研究目的

酵素処理ナリンジンは、既存添加物名簿収載品目リストに記載されている既存添加物の 1 つであり、苦味料等として、チューイングガムや清涼飲料水のアクセントとして使用される<sup>1</sup>。この食品添加物は、食品衛生法第 11 条第 1 項の定めにより告示される「食品、添加物等の規格基準」に基づく成分規格が制定されておらず、現在は、日本食品添加物協会が作成した第 4 版既存添加物自主規格<sup>2</sup>に基づいて製造、使用、流通している。一方で、平成 7 年以降、既存添加物の安全性確保を求める国会の附帯決議も踏まえ、既存添加物については、その品質を確保し、食の安全に寄与するため、個々の成分規格を設定した上、食品添加物公定書への収載が進められており、この酵素処理ナリンジンに関して「食品、添加物等の規格基準」の策定及び食品添加物公定書への収載に向けた検討が進められている。このうち、成分規格（案）に関して、「本品を乾燥物換算したものは、総ナリンゲニン配糖体として 30.0%以上を含む」とされており、この総ナリンゲニン配糖体含量は、酵

素処理ナリンジンのグルコアミラーゼ及び  $\alpha$ -グルコシダーゼ処理後の「ナリンジン」、「モノグルコシルナリンジン」、「ナリンゲニン 7-O-グルコシド」及び「遊離する  $\alpha$ -グルコシル残基」の各含量の合計値から算出することが規定されている。現在、分担研究者は、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、この酵素処理ナリンジンの規格試験法における <sup>1</sup>H-qNMR に基づく相対モル感度（Relative Molar Sensitivity : RMS）を用いたシングルリファレンス HPLC 法<sup>3-5</sup>の応用に関する検討をすすめている。これまでに、基準物質に対するナリンジン及びモノグルコシルナリンジンの RMS を明確にするとともに実試料を用い検討において、シングルリファレンス HPLC 法と従来法で前処理後のナリンジン及びモノグルコシルナリンジンの含量に大きな違いは認められず、この RMS を用いることにより、シングルリファレンス HPLC 法からこれら 2 種の正確な定量が可能であることを明らかにした。今年度は、シングルリファレンス HPLC 法の応用に関する検討の一環として、基準物質に対す

るナリンゲニン 7-O-グルコシドの RMS について検討した。

また、成分規格試験法（案）に規定されている前処理におけるグルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼを用いた酵素加水分解の反応効率について併せて検討した。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

酵素処理ナリンジン（食品添加物製品）（管理番号：C2204）、グルコアミラーゼ（アミログルコシダーゼ，SIGMA 社製，Cat.No. 10113-1G，力価：103 U/mg（表示値））、 $\alpha$ -グルコシダーゼ（トランスグルコシダーゼ L「アマノ」S，Lot.No.TGUS1152301LS，力価：317000 U/mg（提供情報））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、Acros Organics 社製の一般試薬（Cat.No. 10236-47-2，Lot No.A0407598）、ナリンゲニン 7-O-グルコシドは、Extrasynthese 社製の一般試薬（Cat.No.1160S，Batch: 07，ID：0507/0）、4-ヒドロキシ安息香酸メチル（メチルパラベン，MHB）は、シグマアルドリッチ（株）製の認証標準物質（Cat. No. 99-79-3，Lot No. BCBX5970，認証値：99.8%，拡張不確かさ：0.3%）、カフェインはシグマアルドリッチ（株）製の認証標準物質（Cat. No. 58-08-2，Lot No. BCCC1661，認証値：99.9%，拡張不確かさ：0.2%）をそれぞれ用いた。2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate- $d_6$  sodium salt（DSS- $d_6$ ）は富士フィルム和光純薬（株）製の認証標準物質（Code. No044-31671，Lot.No.ESH6525，認証値：92.3%，拡張不確かさ：0.8%）を用いた。重ジメチルスルホキシド（DMSO- $d_6$ ）は関東化学（株）製を用いた。D-グルコース定量用発色試薬は富士フィルム和光純薬（株）製グルコース CII-テストワコーを使用した。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）製）

分析用 HPLC ポンプ：LC-20AD（低圧グラジエントユニット内蔵）、オートサンプラ：SIL-20AC，カラム恒温槽：CTO-10AS<sub>VP</sub>，多波長検出器：SPD-M10A<sub>VP</sub>，システムコントローラ：CBM-20A<sub>lite</sub>，分析データ処理システム：LabSolutions（以上（株）島津製作所製），脱気装置：AG-34（（株）フロム製）。

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) 相対モル感度（RMS）を用いたシングルリファレンス HPLC 法によるナリンゲニン 7-O-グルコシドの定量

#### B-3-1) <sup>1</sup>H-qNMR によるナリンゲニン 7-O-グルコシドの純度測定

ナリンゲニン 7-O-グルコシド約 10 mg を精密に量り、サンプル管に入れた。別に DSS- $d_6$  約 5 mg を精密に量り、先程のサンプル管に入れた後、DMSO- $d_6$  約 1 g に溶解し <sup>1</sup>H-qNMR 用試験溶液とした。3 併行で試験溶液を調製し、この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し、表 1 に示す条件を用いて <sup>1</sup>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、濃度等を次の式に代入し、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、

$I_{\text{sample}}$  = 測定対象物質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)

$H_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の特定基の水素数

$H_{\text{std}}$  = 内標準物質の特定基の水素数 (DSS- $d_6$ :  $\text{CH}_3 \times 3 = 9$ )

$M_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の分子量

$M_{\text{std}}$ =内標準物質の分子量 (DSS- $d_6$  : 224.36)

$W_{\text{sample}}$ =測定対象物質の秤取量 (mg)

$C_{\text{std}}$ = $^1\text{H-qNMR}$  標準溶液の DSS- $d_6$  濃度

なお、 $^1\text{H-qNMR}$  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、Delta (Ver.5.3.0) (日本電子 (株)) を用いた。

### B-3-2) 基準物質 (MHB 及びカフェイン) に対するナリンゲニン 7-O-グルコシドの RMS の算出

ナリンゲニン 7-O-グルコシドでは、溶液濃度が約 500  $\mu\text{mol/L}$  となるようにナリンゲニン 7-O-グルコシドの各  $^1\text{H-qNMR}$  用試験溶液を 20 mL 容メスフラスコへ必要量入れ、20%アセトニトリルを加え調製した。その後、20%アセトニトリルを用いて公比 2 で順次希釈し、約 1.0~500  $\mu\text{mol/L}$  の間で 10 濃度の HPLC 用試験溶液を作製した。

MHB 及びカフェインでは、認証値 (純度) を考慮し、MHB 及びカフェインを正確に量りとり、約 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ~約 500  $\mu\text{mol/L}$  の間で 10 点の濃度の HPLC 用試験溶液 (溶媒 : 20%アセトニトリル) を各試料 3 併行で作製した。

作製された各試験溶液について、次の HPLC 条件で分析した。

カラム : Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ , ナカライテスク (株) 製), カラム温度 : 40°C, 検出波長 : 283 nm (ナリンゲニン 7-O-グルコシド), 255 nm (MHB), カフェイン (205 及び 274 nm), 流速 : 1.0 mL/min, 移動相 : 水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 注入量 : 10  $\mu\text{L}$

各溶液のモル濃度を X 軸に、検出器の応答値 (ピーク面積値) を Y 軸にプロットし、Excel を用いて原点を通る (X : 0, Y : 0) 回帰直線を作成し、これを検量線とした。なお、各溶液におけるクロマトグラム上のピークの S/N が 10 以上となる濃度範囲で検量線を作成した。

得られた測定対象物質及び基準物質の検量線の検量線式の傾きの比 (測定対象物質/基準

物質) から基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出した。

### B-4) 酵素処理ナリンゲン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の定量における酵素処理の反応効率の検討

#### B-4-1) 酵素処理後のナリンゲニン配糖体 (ナリンゲン, モノグルコシルナリンゲン, ナリンゲニン 7-O-グルコシド) の量

105°C で 3 時間乾燥させた酵素処理ナリンゲン 0.5 g を精密に量り、水 50 mL に溶解させた。その後、アクリル酸エステル系吸着用樹脂 (アンバーライト XAD7HP) 50 mL が充填されたガラス管 (内径 約 2.5 cm, 長さ : 55 cm) に酵素処理ナリンゲン溶液を注ぎ、1 分間に 2.5 mL 以下の速さで流出させた後、水 250 mL で洗浄した。次に、80%エタノール 200 mL を 1 分間に 2.5 mL 以下の速さで流し、吸着面分を溶出させた。この溶出液を濃縮して全量を約 40 mL とした後、この液 20 mL にグルコアミラーゼ 2500 単位及び  $\alpha$ -グルコシダーゼ 30000 単位を添加し、55 °C で 60 分間放置した。さらに 95 °C で 30 分加熱した後、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 A 液 5 mL を正確に量り、水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1) (移動相) を加え正確に 50 mL とし、HPLC 用試験溶液とした。この HPLC 用試験溶液を B-3-2 に示した HPLC 条件で分析した。

各試験溶液中のナリンゲンについて、そのピーク面積値を別に作成したナリンゲン ( $^1\text{H-qNMR}$  により求められた純度に基づく標準溶液を使用。ナリンゲン純度 : 85.2%) の検量線式に代入し、試験溶液中のナリンゲン濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) を求め、次の式より試料中の含量を算出した。

ナリンゲンの量 (%) =

$$= \frac{(C \times M) \times V}{W \times 10^6} \times \frac{50}{5} \times 100$$

ただし、

C : HPLC 用試験溶液中の測定対象物質の濃度 [ $\mu\text{mol/L}$ ]

V : 試験溶液の量 [L] (0.05 L)

M : 測定対象物質の分子量 (ナリンジン=580.54)

$10^6$  : 試料の秤量値の単位 [g] から [ $\mu\text{g}$ ] への単位の変換係数

W : 試料の摂取量 (g)

試験溶液中のモノグルコシルナリンジン及びナリンゲニン 7-O-グルコシドについては、そのピーク面積値を上記のナリンジン標準溶液の検量線式に代入し、 $^1\text{H-qNMR}$  に基づく各 RMS (モノグルコシルナリンジン/ナリンジン=1.07, ナリンゲニン 7-O-グルコシド/ナリンジン=0.98) を用いて試験溶液中のモノグルコシルナリンジンまたはナリンゲニン 7-O-グルコシド濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) を求め、次の式より試料中の含量を算出した。

モノグルコシルナリンジンまたはナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%) =

$$= \frac{(C \times M) \times V}{W \times 10^6} \times \frac{50}{5} \times 100$$

ただし、

C : HPLC 用試験溶液中の測定対象物質の濃度 [ $\mu\text{mol/L}$ ]

V : 試験溶液の量 [L] (0.05 L)

M : 測定対象物質の分子量 (モノグルコシルナリンジン=742.70, ナリンゲニン 7-O-グルコシド=434.40)

$10^6$  : 試料の秤量値の単位 [g] から [ $\mu\text{g}$ ] への単位の変換係数

W : 試料の摂取量 (g)

#### B-4-2) 酵素処理後の $\alpha$ -グルコシル残基の量

B-4-1 の項で得られた A 液 20  $\mu\text{L}$  を量り、D-グルコース定量用発色試液 3mL 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  $\mu\text{L}$  を用いて試験溶液と同様に

操作した液を用いた。また、別に空試験を行い、補正した。ただし、空試験溶液は、水約 20 mL にグルコアミラーゼ 2500 単位及び  $\alpha$ -グルコシダーゼ 30000 単位を添加し、55°C で 60 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、各濃度のグルコース標準溶液 (0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL, 5.0 mg/mL) について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  $\alpha$ -グルコシル残基の量を算出した。

$$\begin{aligned} & \alpha\text{-グルコシル残基の量 (\%)} \\ &= \frac{C \times 100}{W \times 1000} \times \frac{162}{180} \times 100 \end{aligned}$$

ただし、

C : 試験溶液 1 mL あたりの D (+) -グルコースの量 ( $\mu\text{g}$ )

W : 試料の採取量 (mg) である。

#### B-4-3) 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 (%)

= 酵素処理後のナリンゲニン配糖体 (ナリンジン, モノグルコシルナリンジン, ナリンゲニン 7-O-グルコシド) の量 (%) + 酵素処理により遊離した  $\alpha$ -グルコシル残基の量 (%)

### C. 結果及び考察

C-1) 相対モル感度 (RMS) を用いたシングルリファレンス HPLC 法によるナリンゲニン 7-O-グルコシドの定量

C-1-1)  $^1\text{H-qNMR}$  によるナリンゲニン 7-O-グルコシドの純度測定

正確な RMS の算出にあたり、測定対象物質

の一般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、この純度を明らかにするため、<sup>1</sup>H-qNMRを用いることとした。<sup>1</sup>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、測定対象物質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て、一般試薬のナリンゲニン7-O-グルコシドについて<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。図1に示すように、<sup>1</sup>H NMRスペクトル上、δ 2.70~5.60 ppmにアグリコン(ナリンゲニン)の2位、3位及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 7.28 ppmに観察されたナリンゲニンの2'位及び6'位の水素に由来するシグナルは、他の分子内並びに夾雑成分に由来するシグナルと十分に分離されていたため、ナリンゲニン7-O-グルコシド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3併行で調製されたナリンゲニン7-O-グルコシド試薬の純度を算出したところ、90.5 ± 0.5%であることが判明した。

#### C-1-2) 基準物質(MHB及びカフェイン)に対するナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSの算出

基準物質に対するナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSを算出するため、<sup>1</sup>H-qNMRによる純度に基づいて調製されたナリンゲニン7-O-グルコシド試験溶液並びに認証値(純度)に基づき調製されたMHB及びカフェイン試験溶液を用いて、B-3-2に示すHPLC条件よりPDA検出器が接続されたHPLCで分析を行った(図2)。そして、得られた原点を通る各検量線の検量線式の傾きの比(測定対象物質/基準物質)から基準物質に対する測定対象物質のRMSを算出し

た。まず、各検量線の直線性を評価したところ、ナリンゲニン7-O-グルコシド、MHB、カフェインの全ての検体の検量線の決定係数は0.9991~1.00と良好であることが確認された(なお、MHB及びカフェインについては、昨年度の報告書で報告済みである)。ナリンゲニン7-O-グルコシド及び基準物質の代表的な検量線を図3に示す。以上の結果より、これらの検量線はRMSの算出に利用可能と判明した。

そこで、化合物ごとに3併行の検量線の傾きの平均値を算出したところ、ナリンゲニン7-O-グルコシドでは10047(検出波長:283 nm)、MHBでは8931(検出波長:255 nm)、カフェイン:5388(検出波長:274 nm)及び11598(検出波長:205 nm)であることが判明した(MHB及びカフェインについては、昨年度の報告書で報告済みである)。得られたこれらのデータより、基準物質に対するナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSを算出したところ、表2に示す値であることが判明した。

#### C-2) 酵素処理ナリンゲニン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の定量における酵素処理の反応効率の検討

成分規格試験法(案)における総ナリンゲニン配糖体含量は、酵素処理ナリンゲニンのグルコアミラーゼ(500~2500単位)及びα-グルコシダーゼ(15000~30000単位)処理後の「ナリンゲニンの量」、「モノグルコシルナリンゲニンの量」、「ナリンゲニン7-O-グルコシドの量」及び「遊離するα-グルコシル残基の量」の合計値から求めることが規定されている。この成分規格試験法(案)における検証を他機関が実施したところ、酵素処理ナリンゲニン製品1種(C2204)において、①総ナリンゲニン配糖体含量が30.0%を下まわること及び②定量値の再現性が良好ではないことが判明した。この原因として、酵素処理ナリンゲニン類の酵素加水分解反応が十分ではないことが示唆されたことから、本研究では、酵素加水分解の反応条件の最適化に向け、反応時間及び酵素の添加量の両面で、その反応効率を検証した。なお、前処理において、アクリル

酸エステル系吸着用樹脂による複数回のカラム精製により得られる各溶出液 (40 mL) は、すべて混ぜ合わせ、均一にした後、その 20 mL を採取し酵素加水分解反応に供した。また、反応時間については、成分規格試験法 (案) で示された 60 分に加え、90 分、120 分、グルコアミラーゼ及び  $\alpha$ -グルコシダーゼの添加量を規定量の最大量で酵素加水分解を行い、① 酵素処理後のナリンゲニン配糖体の量、② 酵素処理後の  $\alpha$ -グルコシル残基の量及び③ 総ナリンゲニン配糖体含量を算出した。各試験溶液のクロマトグラムを図 4 に示す。その結果、表 3 に示すように、反応時間の違いにより、①、②、③に大きな違いは認められなかった。そこで、グルコアミラーゼ及び  $\alpha$ -グルコシダーゼの添加量を規定量の最大量の 2 倍として同様の検討を行った。各試験溶液のクロマトグラムを図 4 に示す。表 4 に示すように、反応時間の違いにより、各種含量に大きな差はなく、また、表 3 に示す定量値とほぼ同等の結果であった。なお、これらのクロマトグラムを確認すると、保持時間が 5~6.5 分付近に、グルコシルナリンジン類と考えられるピークが検出されたが (付録 1)、これらは S/N が 10 またはそれを下まわっており、ナリンゲニン配糖体の定量値に影響は及ぼさないものと考えられた。また、検討したすべての試験溶液では、ナリンゲニン 7-O-グルコシドの量は定量下限 (S/N 10) である 0.1% 以下であった (表 3, 表 4, 付録 1)。

#### 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、昨年度に引き続き、酵素処理ナリンジンの規格試験法における  $^1\text{H-qNMR}$  に基づく RMS を用いたシングルリファレンス HPLC 法の応用に関する検討を行った。その結果、測定対象物質であるナリンゲニン 7-O-グルコシドの MHB 及びカフェインに対する RMS が明らかとなるとともに、昨年度の結果を含めて、成分規格試験法 (案) における測定対象物質 3 種の基準物質に対する RMS が明確となった。また、成分

規格試験法 (案) におけるグルコアミラーゼ及び  $\alpha$ -グルコシダーゼによる酵素加水分解反応の最適化に向け、その反応効率を検証した。その結果、反応時間及び添加する酵素量ともに規定値の 2 倍としても、定量値に大きな違いは認められなかった。なお、本研究において使用した酵素処理ナリンジン製品

(C2204) の総ナリンゲニン配糖体含量は、規格値を満たしていない。この原因は不明ではあるが、前処理におけるカラム精製時の洗浄液へのナリンジン配糖体の溶出は認められないこと (図 4) から、この操作での損失はないものといえる。また、酵素処理後の試験溶液に残存するグルコシルナリンジン類の含量は非常に少ないこと (付録 1)、ナリンゲニン 7-O-グルコシドの量は定量下限である 0.1% 以下であること並びに他機関の検証における総ナリンゲニン配糖体含量と本研究で明らかにした各種反応条件における同含量は近似したことを考え合わせると、成分規格試験法 (案) において規定されている酵素加水分解の反応条件について、反応時間、酵素添加量には問題はないものと考えられた。

#### E. 参考文献

- 1) 食品添加物事典, 日高徹, 湯川宗昭編著. 東京, 食品化学新聞社 (2001)
- 2) 第 4 版 既存添加物自主規格, 日本食品添加物協会 (2008)
- 3) Nishizaki Y, Masumoto N, Yokota A, Mikawa T, Nakashima 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 Addit. Contam.*, **2018**; 35: 838-847.
- 4) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K.: Single reference quantitative analysis of xanthomonasin A and B in *Monascus yellow colorant* using high-performance liquid chromatography with relative molar sensitivity based on high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **2018**; 1555:

45-52.

- 5) Masumoto N, Nishizaki Y, Maruyama T, Igarashi Y, Nakajima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K: Determination of perillaldehyde in perilla herbs using relative molar sensitivity to single-reference diphenyl sulfone. *J. Nat. Med.*, **2019**; *73*: 566-576.

## F. 研究業績

### 1. 学会発表等

- 1) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: Single-reference HPLC 法によるアントシアニンの定量に関する研究、日本食品化学学会 第27回学術大会、2021年6月10日-11日、川崎市産業振興会館 (神奈川)
- 2) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いたアントシアニ

ンの定量に関する研究、日本食品科学工学会 第68回大会、2022年8月24日-26日、東京農業大学 (東京)

- 3) 酒井有希, 大槻崇・松藤寛: 相対モル感度 (RMS) を用いたアントシアニンの定量に関する研究、第3回日本定量 NMR 研究会、2021年12月3, 7日、Web開催

### 2. 論文発表等

- 1) Ohtsuki T, Friesen JB, Chen SN, McAlpine JB, Pauli GF: Selective Preparation and High Dynamic-Range Analysis of Cannabinoids in "CBD Oil" and Other Cannabis sativa Preparations. *J. Nat. Prod.*, in press. (doi: 10.1021/acs.jnatprod.1c00976.)

## G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

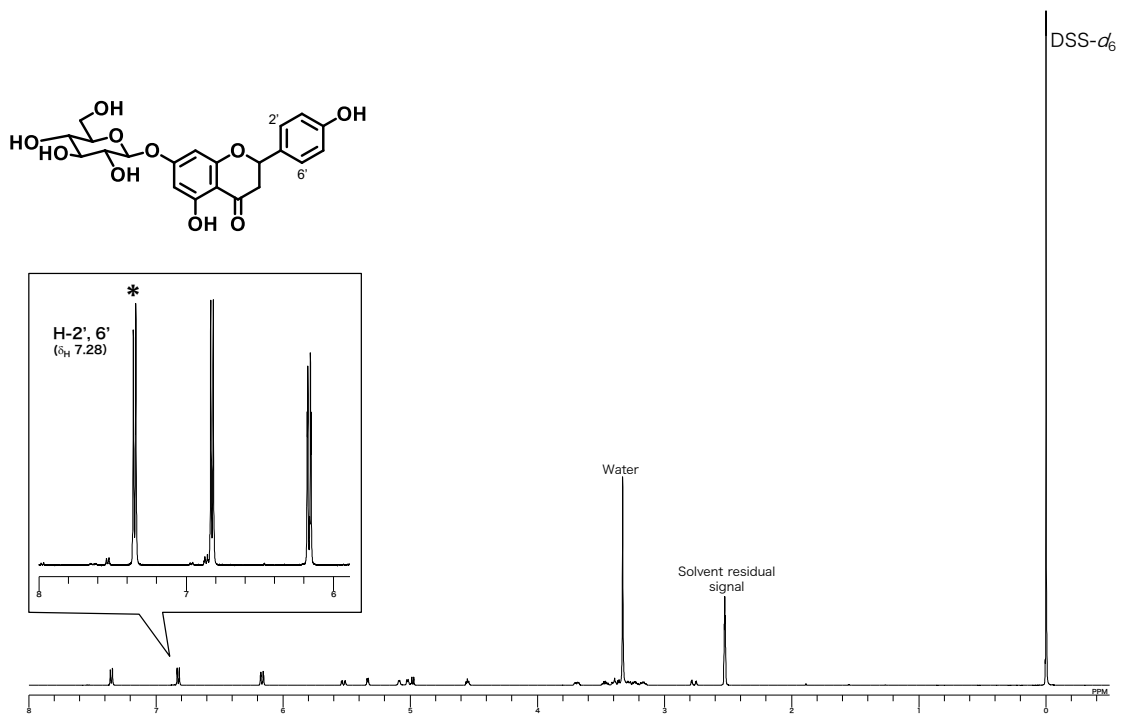


図1 ナリゲニン 7-O-グルコシドの化学構造及び $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル  
 測定溶媒：DMSO- $d_6$ , \*：定量用シグナル (H-2' and H-6')



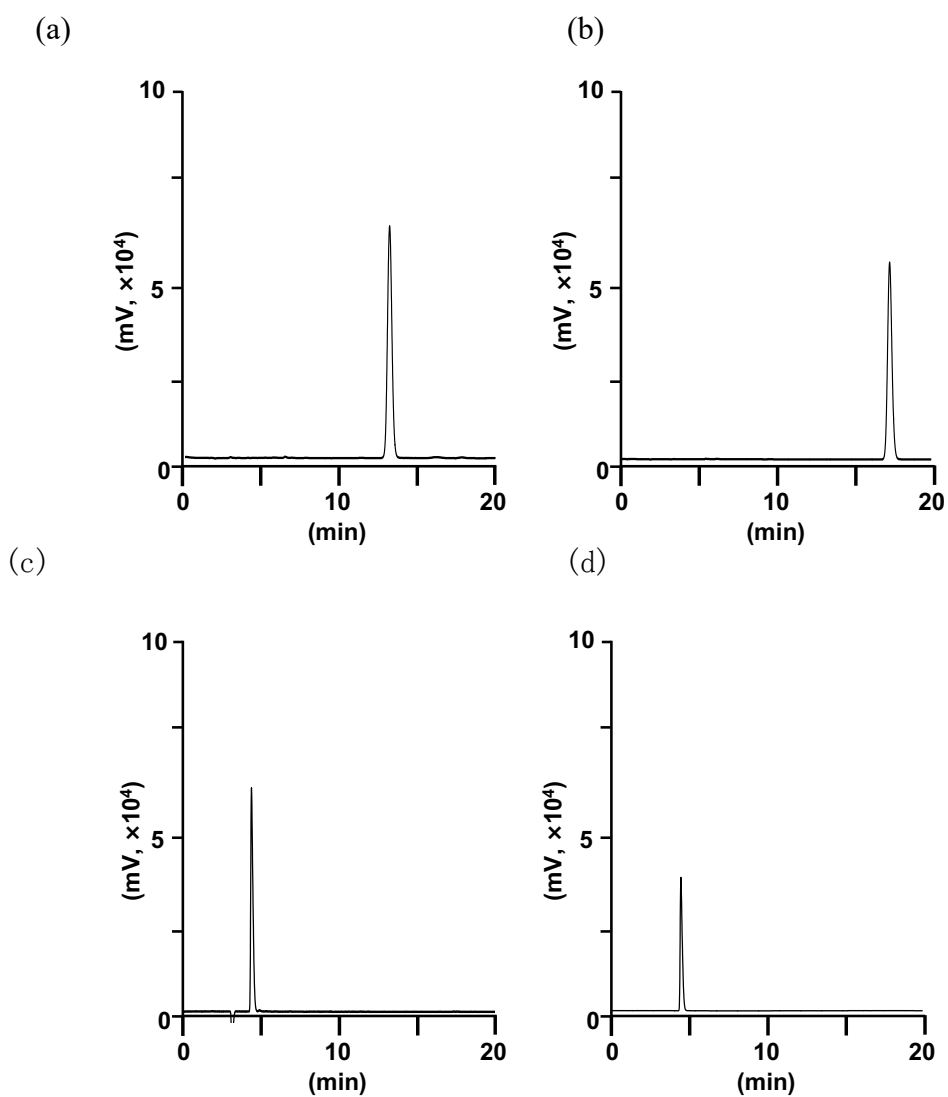


図2 ナリングニン 7-*O*-グルコシド (a), MHB (b), カフェイン (c 及び d) の HPLC クロマトグラム

HPLC 条件

カラム：COSMASIL 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) (株) ナカライテスク製, カラム温度：40 °C,  
 検出波長：283 nm (ナリングニン 7-*O*-グルコシド(a)), 255 nm (MHB (b)), 274 nm (カフェイン (c)), 205 nm (カ  
 フェイン (d)), 移動相：水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流速：1.0 mL/min

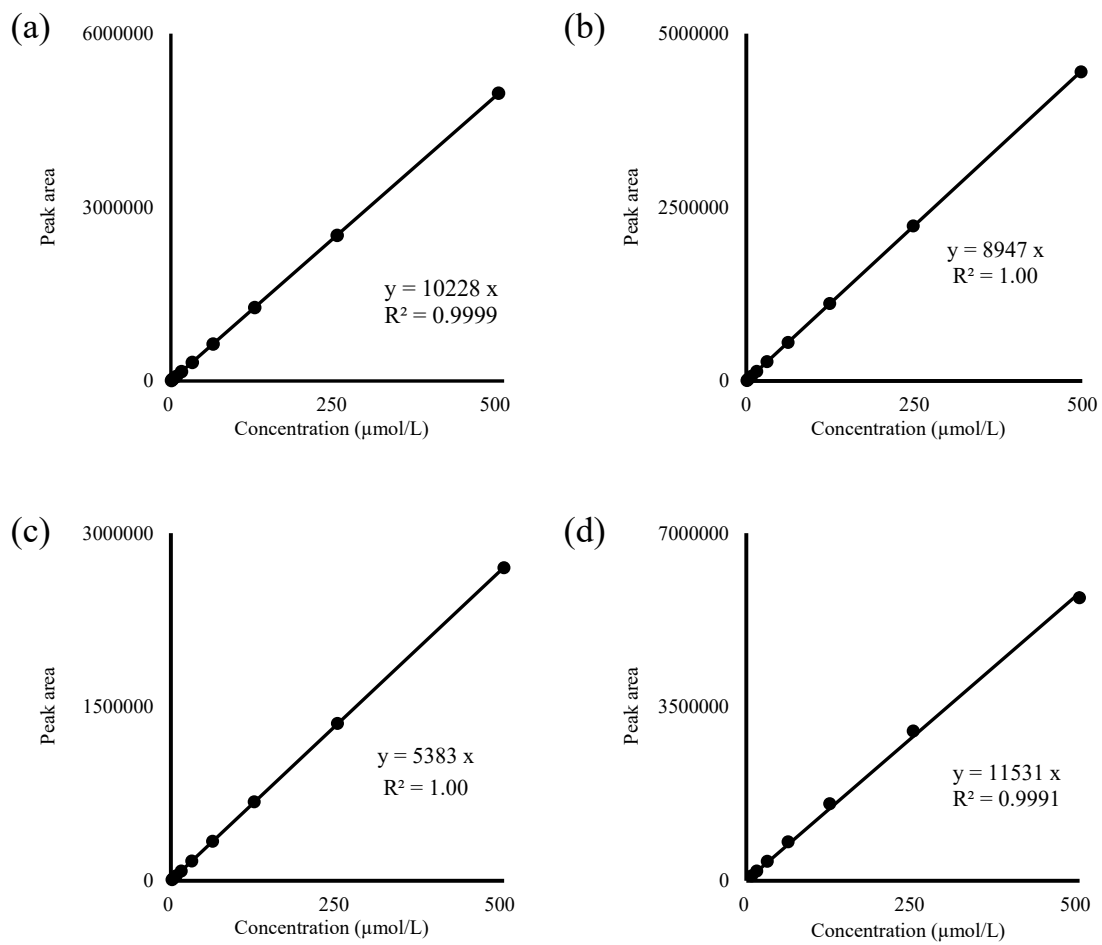


図3 ナリゲニン7-O-グルコシド (a), MHB (b), カフェイン (c及びd) の代表的な検量線

(c) : 274 nm のデータより作成した検量線, (d) : 205 nm のデータより作成した検量線

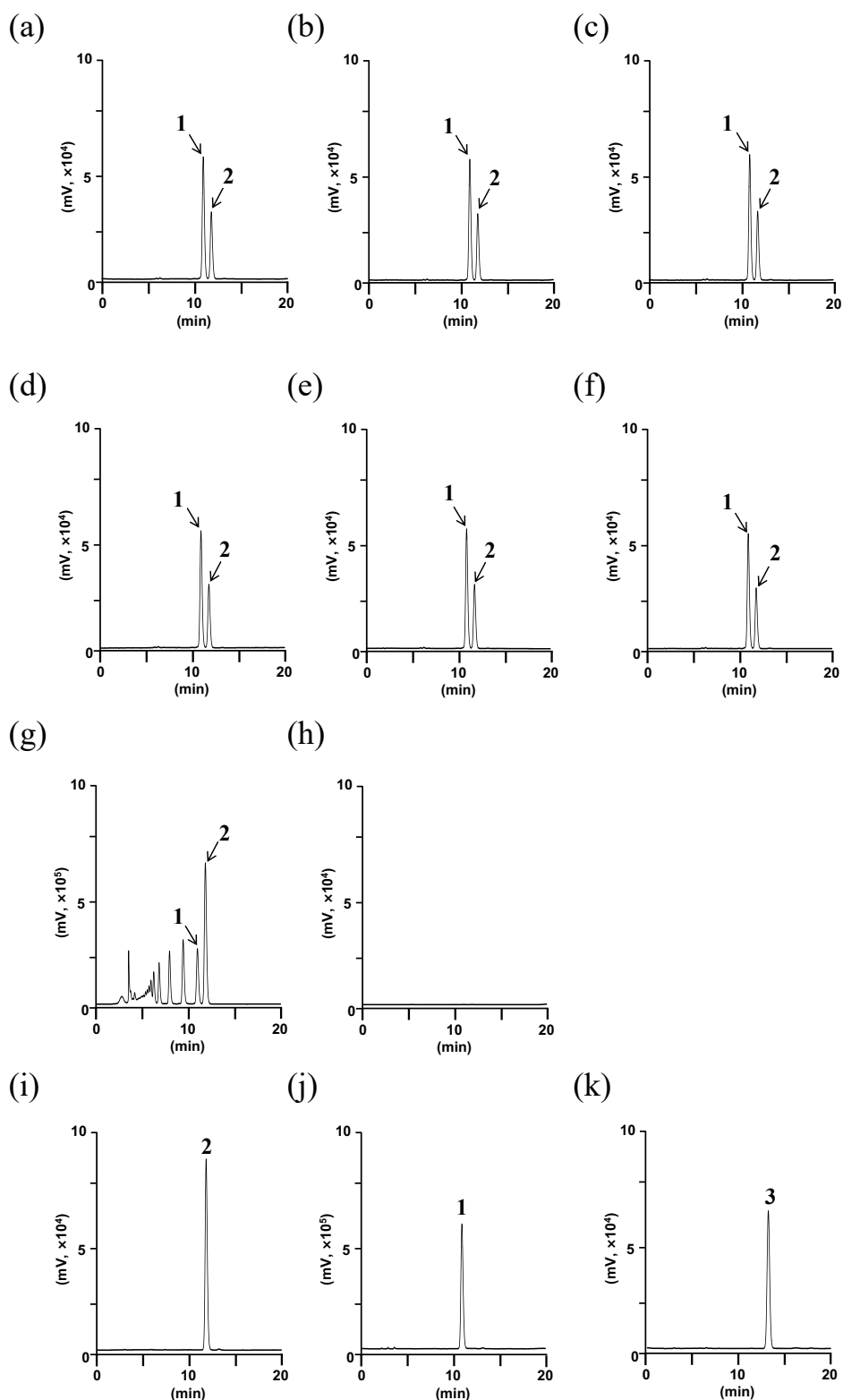


図4 各試験溶液及び標準溶液のHPLCクロマトグラム

1. モノグルコシルナリンジン, 2. ナリンジン, 3. ナリンゲニン7-O-グルコシド

HPLC条件

カラム: COSMASIL 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) (株)ナカライテスク製, カラム温度: 40 °C,  
 検出波長: 283 nm, 移動相: 水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流速: 1.0 mL/min

○ 図 4 のクロマトグラムについて

酵素		
	反応時間	添加量
(a)	60	規定量の最大量
(b)	90	規定量の最大量
(c)	120	規定量の最大量
(d)	60	規定量の最大量の 2 倍
(e)	90	規定量の最大量の 2 倍
(f)	120	規定量の最大量の 2 倍
(g)	溶出液 (酵素未処理)	
(h)	洗浄液 (酵素処理)	
(i)	ナリンジン	
(j)	モノグルコシルナリンジン	
(k)	ナリンゲニン 7-O-グルコシド	

表 1 ナリンジン及び  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの純度測定における  
 $^1\text{H}$ -qNMR 条件

---

装置	JEOL ECA 500 spectrometer
スペクトル幅	15 ppm (-2.5–12.5 ppm)
データポイント数	32768
オートフィルター	on (eight times)
取り込み期間	4.37 秒
フリップ角	90°
取り込み待ち時間	60 秒
スキャン回数	8
スピニング	off
$^{13}\text{C}$ デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

---

表 2 各基準物質に対するナリンゲニン 7-*O*-グルコシドの RMS

	基準物質		
	MHB	カフェイン	
		検出波長 274 nm	検出波長 205 nm
ナリンゲニン 7- <i>O</i> -グルコシド	1.13	1.87	0.87

表 3 酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)  
 酵素の添加量：規定値の最大量 (グルコアミラーゼ：2500 単位,  $\alpha$ -グルコシダーゼ：30000 単位)

	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.3	0.1	3.3	0.01	3.4	0.03
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	7.1	0.2	7	0.02	7.2	0.1
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	10.5	0.3	10.2	0.02	10.6	0.1
酵素処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基の量 (%)	14.7	0.5	14.5	0.6	14.0	0.3
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	25.2	0.3	24.7	0.6	24.6	0.4

定量では,  $^1\text{H-qNMR}$  の結果に基づいて調製されたナリンジン標準溶液を使用した  
 (純度：85.2%)

表 4 酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)

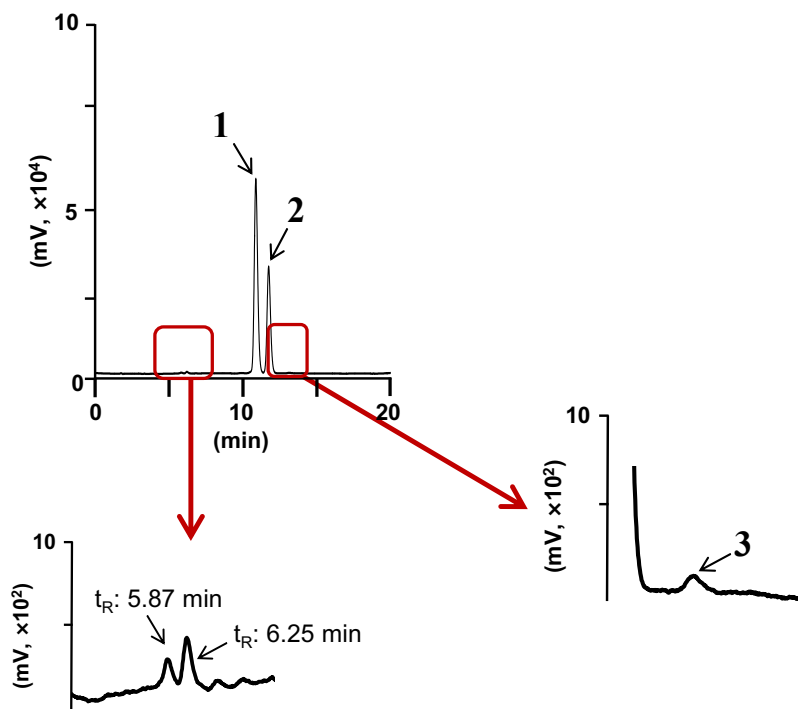
酵素の添加量：規定値の最大量の2倍 (グルコアミラーゼ：5000 単位,  $\alpha$ -グルコシダーゼ：60000 単位)

	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.2	0.1	3.1	0.03	3.2	0.2
酵素処理後のモノグルコシルナリンジンの量 (%)	7.0	0.1	6.8	0.1	7.1	0.3
酵素処理後のナリンゲニン7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン配糖体の量 (%)	10.2	0.2	9.9	0.2	10.3	0.5
酵素処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基の量 (%)	14.0	0.4	14.5	0.5	14.0	0.9
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	24.1	0.5	24.4	0.7	24.4	0.4

定量では、 $^1\text{H-qNMR}$  の結果に基づいて調製されたナリンジン標準溶液を使用した (純度：85.2%)

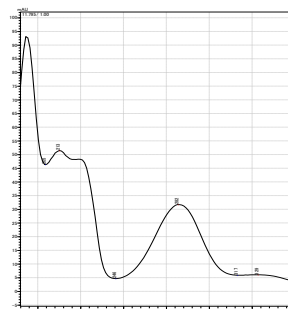
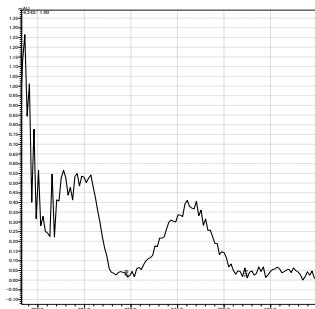


付録 1



$t_R$ : 6.25 minの化合物のUVスペクトル

ナリンジンのUVスペクトル



試験溶液(図 4 (a))の HPLC クロマトグラム, 拡大図等

1. モノグルコシルナリンジン, 2. ナリンジン, 3. ナリンゲニン 7-O-グルコシド

HPLC 条件

カラム : COSMASIL 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm) (株) ナカライテスク製, カラム温度 : 40 °C,  
 検出波長 : 283 nm, 移動相 : 水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流速 : 1.0 mL/min

付録 2

酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)

酵素の添加量：規定値の最大量 (グルコアミラーゼ：2500 単位,  $\alpha$ -グルコシダーゼ：30000 単位)

(ナリンジン定量用標品の純度を 100%として計算)

	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.9	0.1	3.8	0.01	3.9	0.04
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	8.4	0.2	8.2	0.03	8.5	0.1
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	12.3	0.3	12.0	0.04	12.4	0.1
酵素処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基の量 (%)	14.7	0.5	14.5	0.6	14.0	0.3
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	27	0.3	26.5	0.6	26.4	0.4

付録 3

酵素反応時間の違いによる検体 (C2204) 中の各種含量の比較 (n=3)

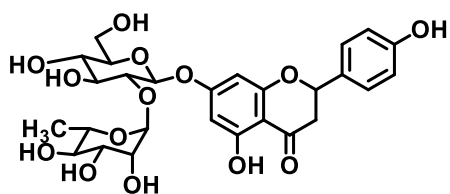
酵素の添加量：規定値の最大量の2倍 (グルコアミラーゼ：5000 単位,  $\alpha$ -グルコシダーゼ：60000 単位)

(ナリンジン定量用標品の純度を 100%として計算)

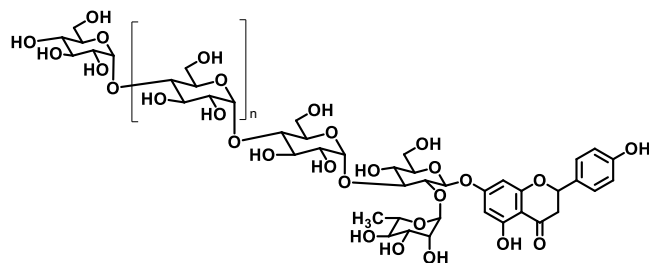
	酵素反応時間					
	60 min		90 min		120 min	
	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差
酵素処理後のナリンジンの量 (%)	3.8	0.1	3.7	0.04	3.8	0.2
酵素処理後のモノグルコシル ナリンジンの量 (%)	8.2	0.2	8.0	0.1	8.3	0.4
酵素処理後のナリンゲニン 7-O-グルコシドの量 (%)	<0.1		<0.1		<0.1	
酵素処理後のナリンゲニン 配糖体の量 (%)	12.0	0.3	11.7	0.2	12.1	0.6
酵素処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基の量 (%)	14.0	0.4	14.5	0.5	14.0	0.9
ナリンゲニン配糖体含量 (%)	26.6	0.3	26.1	0.8	26.2	0.6

付録 4

(a)



(b)



ナリンジン (a) 及びモノグルコシルナリンジン (b) の化学構造