

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

分析法及び試験法の開発に関する研究

～定量 NMR によるアントシアニンの純度評価～

研究分担者 西崎雄三 東洋大学 食環境科学部 食環境科学科 准教授

研究要旨 定量 NMR (qNMR)によるアントシアニンの絶対純度算出法について検討した。試薬会社から販売されているシアニジン 3-グルコシド塩化物(Cy3G・Cl)をモデル試料として、強酸性測定溶媒中での qNMR 用基準物質：DMSO₂と DSS-*d*₆の安定性、Cy3G・Clの濃度依存性、および内部標準法 qNMR (IC-qNMR)と外部標準法 qNMR (EC-qNMR)の比較を行った。DMSO₂と DSS-*d*₆は、検討した強酸性測定溶媒中で安定であり、qNMR における基準物質として使用できることを確認できた。Cy3G・Clの濃度依存性については、20 mg/mLを超える場合において完全に溶解していない可能性が示唆された。強酸性条件下での安定性が確認された DMSO₂と DSS-*d*₆を基準物質に用いて、適切なアントシアニン濃度で IC-qNMR と EC-qNMR を実施した結果、両手法から得られた結果は標準偏差の範囲内で一致していた。以上の結果から、本研究では Cy3G・Clの正確な絶対純度を算出できたことが示された。

A. 研究目的

アントシアニンは、フラボノイド系の植物色素であり、アグリコン(母核)であるアントシアニジンに糖や有機酸が修飾された化合物の総称である。一般に、橙から赤、紫色の色彩を呈し、食品添加物としても利用されている。食品添加物公定書に収載されている「ブドウ果皮色素」、「ムラサキイモ色素」、「ムラサキトウモロコシ色素」、「赤キャベツ色素」の主成分はアントシアニンである。

アントシアニンの特徴の一つは、溶液中の水素イオン濃度(pH)に依存して色が変わることである。これは、アントシアニジンの分子構造が pH によって変化するためである。中性からアルカリ性にかけては徐々に分解して退色するが、酸性ではフラビリウムイオン型の構造をとり、最も安定となる。そのため、アントシアニンの標準品は、フラビリウムイオン型(カチオン)に対して塩素イオン(アニオン)を反応させた塩化物の形で販売されている(図 1)。

これらの標準品のラベルに記載されている

純度は、クロマトグラフ法によるピーク面積百分率で算出された相対純度であることが多く、絶対純度が付与された標準品は市販されていない。そこで、本研究では、定量 NMR (qNMR)を用いたアントシアニンの絶対純度測定法の確立を目指すこととした。

アントシアニンは溶液の pH に応じてさまざまな分子構造をとるため、qNMR による純度評価を行う際には、測定溶媒を強酸性にし、アントシアニンを安定なフラビリウムイオン型に完全にシフトさせることが重要である。昨年度は、モデル化合物としてアントシアニンの一種であるシアニジン 3-グルコシド塩化物(Cy3G・Cl)を用いて、重溶媒の種類と酸濃度の組み合わせにおける定量値の関係を調査した。その結果、測定溶媒に酸を添加するだけでなく、添加した酸が溶媒中で解離するための一定量の重水の添加も重要であることが明らかになった。そして、5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)が、Cy3G・Cl にとって最適な測定溶媒であることを見出した。

今年度は、5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)を用いた場合の qNMR 用基準物質の安

定性, および qNMR 測定における Cy3G・Cl の濃度依存性について検討した. さらに, 内部標準法 qNMR (IC-qNMR) と外部標準法 qNMR (EC-qNMR) を用いた場合に, Cy3G・Cl の純度測定結果に差が生じるかを評価したので, ここに報告する.

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

アントシアニンは, 長良サイエンス(株)製の Cy3G・Chloride (Cy3G・Cl) を用いた.

DSS- d_6 (Cat. No. 044-31671, 質量分率 92.3%) ジメチルスルホン(DMSO₂; Cat. No. 048-33271, 質量分率 99.9%), 重水(D₂O; Cat. No. 047-34243, D 99.8%), 重メタノール(methanol- d_4 ; Cat. No. 138-18703, D 99.8%) は, 富士フイルム和光純薬工業(株)製のものを使用した. 重トリフルオロ酢酸(TFA- d ; Cat No. DLM-46-10×0.75, D 99.5%) は CIL 社から購入した. その他の試薬は, 特級または高速液体クロマトグラフ用を使用した.

B-2) NMR 装置

NMR 装置は日本電子製 JNM-ECZ600R/S1 (¹H 共鳴周波数 600.1723 MHz) を用いた.

B-3) qNMR 測定

qNMR 測定では, NMR 試料ごとに 90°パルス幅(pw90)を校正し, この校正值を測定条件に反映させた. 具体的な測定手順は以下の通りである: NMR 試料をプローブに挿入し, 25°C で 5 分間平衡化させた. シムを自動調整し, ¹H および ¹³C に対するプローブのチューニング&マッチング(T&M)を取った後, パルス幅を変化させるアレイ測定を行った. アレイ測定データに対して, 非線形最小二乗法によるカーブフィッティングを行い, NMR 試料毎に pw90 を校正した. 校正した pw90 を, 以下の qNMR 測定条件に反映させた.¹⁾

- 照射中心: 5 ppm
- 観測幅: 15 ppm
- 取込み時間: 4.5 秒
- 遅延時間: 60 秒

- 積算回数: 8 回
- ダミースキャン: 2 回
- サンプル回転: なし
- ¹³C デカップリング: MPF8 (取込み時間のみ)

得られた FID に対して, 窓関数の設定を外し, ゼロフィルでポイント数を 4 倍に増やした後, フーリエ変換を行った. 次に, 位相とベースラインを補正して定量用の ¹H-NMR スペクトルとした. このスペクトル上のシグナルに対して自動積分を行い, 式 1 を用いて Cy3G・Cl の絶対純度を算出した.

$$\text{Molar Conc.}_A =$$

$$\text{Molar Conc.}_C \times S_A/S_C \times H_C/H_A \times PW90_A/PW90_C$$

式 1

下付き A: 分析種(Cy3G・Cl), 下付き C: qNMR 基準物質(DMSO₂ と DSS- d_6).

Cy3G・Cl は 4 位, DMSO₂ および DSS- d_6 はメチル基のシグナルを定量対象とした.

B-4) DMSO₂ と DSS- d_6 の安定性

DMSO₂ (または DSS- d_6) 1 mg を精密に量り取り, 5% TFA- d 含有重メタノール/重水(9:1) 1 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を取り, NMR 試料管に移して qNMR 測定を行った. 得られた DMSO₂ (または DSS- d_6) のシグナル積分値を以下の式 2 に代入して, 1 プロトンあたりの感度係数を算出した. qNMR 測定は 3 回繰り返し, 3 日間にわたって実施した.

$$\text{Response Factor} = S_A \times PW90_A/H_A/\text{Conc.}_A$$

式 2

B-5) Cy3G・Cl の濃度依存性

Cy3G・Cl を 5, 10, 20, 40 mg それぞれ精密に量り取り, 5% TFA- d 含有重メタノール/重水(9:1) 1 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を取り, NMR 試料管に移して qNMR 測定を行った. qNMR 用の外部標準(EC: 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL) は以下の手順で調製した. まず, DMSO₂ を約 2.0 mg 精密に量り取り, 5% TFA- d 含有重メタノール/重水(9:1) 2.0 mL に溶解し, 1 mg/mL の EC を調製した. 次に, 1 mg/mL の EC 1.0 mL を精密に量り取り, 5%

TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1) 1.0 mL を加えて、0.5 mg/mL の EC とした。同様に、0.5 mg/mL の EC を希釈して、0.25 mg/mL の EC を調製した。3 濃度の外部標準 0.6 mL をそれぞれ NMR 試料管に移し、qNMR 測定を行った。

B-6) IC-qNMR と EC-qNMR の比較

Cy3G・Cl を 5 mg, DSS-*d*₆ を 1 mg 精密に量り取り、5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1) 1 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を取り、NMR 試料管に移して qNMR 測定を行い、Cy3G・Cl の純度を算出した(IC-qNMR)。また、「B-5) Cy3G・Cl の濃度依存性」に記載した手順に従い、別途、外部標準(EC : 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL)を調製して qNMR 測定を行い、Cy3G・Cl の純度を算出した(EC-qNMR)。

C. 結果および考察

C-1) 酸性条件下における qNMR 用基準物質 : DMSO₂ と DSS-*d*₆ の安定性

現在、試薬会社からさまざまな qNMR 用基準物質が販売されており、それぞれの基準物質について、重溶媒に対する溶解性や安定性が公開されている。しかし、酸性条件下での安定性については明らかではない。本研究ではアントシアニン測定溶媒として、酸性に傾けた 5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1) を使用するため、この測定溶媒中における qNMR 用基準物質の安定性について調査する必要がある。重メタノールおよび重水に溶解可能な qNMR 用基準物質として、DMSO₂ と DSS-*d*₆ が適していることから、これらの 5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1)における安定性を調査した。

DMSO₂ および DSS-*d*₆ の安定性は、qNMR によって確認した。具体的には、両物質の 1 プロトン当たりの感度係数を 3 日間にわたり記録した。その結果、DMSO₂ および DSS-*d*₆ のいずれにおいても、分解物のシグナルはスペクトル上に観察されず、感度係数は 1%以内の範囲で安定していることが確認された(図 2)。以上の結果から、DMSO₂ および DSS-*d*₆ は、酸性に傾

けたアントシアニン測定溶媒中でも安定であると結論付けた。

C-2) アントシアニン qNMR の濃度依存性

アントシアニンは色素化合物であるため、NMR 試料を調製する際に、アントシアニンが測定溶媒に完全に溶解しているかどうかを目視で確認することが難しい。そこで、Cy3G・Cl を 5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9:1, v/v)に溶解し、5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL の濃度となるように調製して、それぞれ EC-qNMR で純度を測定した。その結果、20 mg/mL を超える濃度では Cy3G・Cl が完全に溶解していない可能性が示唆された(表 1)。本研究では、Cy3G・Cl のみを対象としているが、アントシアニンの分子種によっては、NMR 測定溶媒への溶解性が大きく異なることが予想される。したがって、アントシアニンをはじめとする色素化合物について qNMR 測定を行う際には、試料の濃度を複数調製して純度を測定し、それらの純度測定結果の一致を確認することで、アントシアニンが完全に溶解していることを確認することが重要であると考えられる。

C-3) IC-qNMR と EC-qNMR の純度測定結果の比較

最後に、IC-qNMR と EC-qNMR によるアントシアニンの純度測定結果を比較した。今回使用した 5%TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1) の測定溶媒では、DMSO₂ および DSS-*d*₆ が安定であることが確認されているため、外部標準には DMSO₂ を、内部標準には DSS-*d*₆ を用いた。また、アントシアニンである Cy3G・Cl の調製濃度は、「C-2) アントシアニン qNMR の濃度依存性」の結果に従い、5 mg/mL とした。EC-qNMR で得られた Cy3G・Cl の純度は $92.7 \pm 0.9\%$ 、IC-qNMR では $93.5 \pm 0.4\%$ であった(表 2)。EC-qNMR の結果は標準偏差(SD)の範囲内で IC-qNMR の結果と一致していたため、IC-qNMR と EC-qNMR で得られる純度測定結果は一致していると結論付けた。

D. 結論

本研究は Cy3G・Cl をモデル化合物として、アントシアニンの qNMR 純度測定法を確立するための検討を行った。強酸性条件のアントシアニン測定溶媒(5% TFA-*d* 含有重メタノール／重水(9 : 1))中で、qNMR 基準物質である DMSO₂ および DSS-*d*₆ の安定性を確認した結果、両物質は分解せず、感度係数も安定していた。これにより、酸性条件下でも基準物質として使用可能であることが示された。Cy3G・Cl の濃度依存性については、20 mg/mL を超える場合には完全に溶解していない可能性が示唆されたため、5 mg/mL が最適な濃度であると判断された。IC-qNMR および EC-qNMR による Cy3G・Cl の純度測定結果は、標準偏差の範囲内で一致していた。以上の結果から、酸性条件下でも DMSO₂ および DSS-*d*₆ を IC または EC として使用し、適切なアントシアニン濃度で qNMR 測定を行うことで、正確なアントシアニン純度を求められることを明らかにした。本研究成果は、アントシアニンをはじめとする天然由来色素の絶対定量法を確立する上で、重要な知見となる。

E. 文献

- 1) Nishizaki Y, Lankin D. C, Chen S, Pauli G. F, Analytical Chemistry 2021; 93 (5): 2733-2741.

F. 研究発表

学会発表

- 1) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹 : ¹H スピン情報に基づいたクロロゲン酸類のデジタルリファレンススタンダード(dRS)の作成, 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会 (2024.5).

論文発表

- 1) Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen S-P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G. F: Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR

Sustainability. Analytical Chemistry, 2024; 96(24): 9790-9798.

- 2) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子 : 燃焼法による食品添加物中の窒素定量分析. 日本食品化学学会誌, 2024; 31(1) 31-34.

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

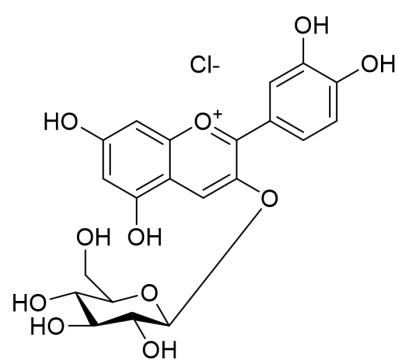


图1 Cy3G-Cl

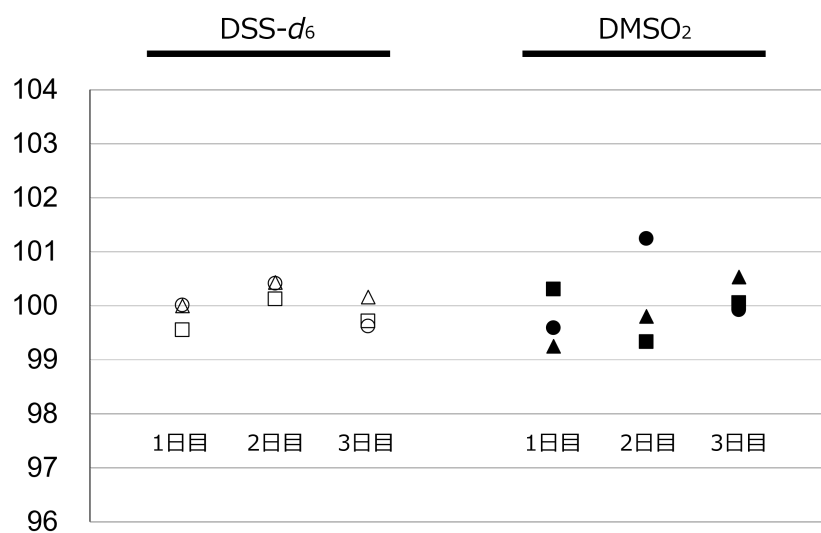


図2 5%TFA- d 含有重メタノール／重水(9 : 1, v/v)におけるDSS- d_6 とDMSO $_2$ の安定性

表1 アントシアニンqNMRの濃度依存性

5 mg/mL Cy3G・Cl	10 mg/mL Cy3G・Cl	20 mg/mL Cy3G・Cl	40 mg/mL Cy3G・Cl
93.5 ± 0.8%	93.6 ± 1.3%	91.0 ± 1.3%	86.4 ± 0.6%

表2 EC-qNMRとIC-qNMRから算出したCy3G・Clの絶対純度

	EC-qNMR	IC-qNMR
Day1	93.5 ± 0.4%	93.4 ± 0.2%
Day2	92.2 ± 0.8%	93.8 ± 0.2%
Day3	92.4 ± 0.8%	93.4 ± 0.5%
AVE	92.7 ± 0.9%	93.5 ± 0.4%