

試験法及び分析法の開発

～酵素処理ナリンジン及びヒマワリ種子抽出物の規格試験法の確立に関する検討～

分担研究者 大槻 崇 日本大学生物資源科学部 食品生命学科 准教授

**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、精度の向上ならびに試験法が未設定である既存添加物の分析法の確立を目的に、酵素処理ナリンジンおよびヒマワリ種子抽出物を対象に検討を行った。酵素処理ナリンジンの検討では、<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ジン、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンおよびナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSを明らかにするとともに、実試料を用いた検討によりシングルリファレンスHPLC法から測定対象物質の正確な定量が可能であることが判明した。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。

ヒマワリ種子抽出物の検討では、DPPHを用いた抽出物製品の抗酸化性を指標とした定量法では、試料採取量を変更する必要ことで、精油除去ウイキョウ抽出物（酸化防止剤）における確認試験法（案）で採用されている方法を準用可能であることが判明した。また、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸が含まれていることを確認するためのHPLC分析法については、確認試験法（案）で規定されている測定条件のうち、移動相の組成比を変更する必要があることが明らかとなった。なお、ヒマワリ種子抽出物1製品を分析したところ、有効成分とされているイソクロロゲン酸は検出されず、主要成分であるクロロゲン酸類およびカフェ酸の抗酸化性への寄与率は86.6%であることが明らかとなった。

## 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収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 $^1\text{H-qNMR}$ 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。そこで、本研究では RMS の正確性や HPLC 分析における測定対象物質並びに基準物質の検出波長の整合<sup>7</sup>などを考慮し、グルコアミラーゼ処理により得られるナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンおよびナリンゲニン 7-*O*-グルコシドの定量分析における $^1\text{H-qNMR}$ に基づくシングルリファレンス HPLC 法の性能を評価した。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。

一方で、ヒマワリ種子抽出物は天然系の酸化防止剤として利用されている既存添加物であり、既存添加物名簿収載品目リスト注釈書では、基原・製法・本質において「キク科ヒマワリ (*Helianthus annuus* LINNE) の種子又は種子の搾油相より、熱時水又は含水エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸<sup>9</sup>である。」と記載されている<sup>8</sup>。現在、この添加物について、食品添加物公定書への収載へ向けて、成分規格や使用基準等の策定が進められている。そこで、規格試験法 (確認試験法) の確立、最適化に向けた検討として、① DPPH を用いた抽出物製品の抗酸化性を指標とした定量法および②抽出物製品にイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸が含まれていることを確認するための HPLC 分析法に関する検討を実施した。さらに、ヒマワリ種子抽出物に含まれる主要成分を明らかにし、これらの成分のヒマワリ種子抽出物における抗酸化性への活性寄与率を求め、当該添加物の定義の適格性を評価した。

## 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) (名称: 糖転位ナリンジン A-172 および管理番号: 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)), ヒマワリ種子抽出物 (Code: A1091, LOT: 160223) 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 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No.A0407598), シグマアルドリッチ (株) 製 (Cat.No.10236-47-2, Lot No. BCCB6611), 東京化成工業 (株) 製 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No.IFV8M-OC), 富士フィルム和光純薬 (株) 製 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No. LKE0701 および SKN5454) を用いた。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 (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*<sub>6</sub> sodium salt (DSS-*d*<sub>6</sub>) は富士フィルム和光純薬 (株) 標準物質 (Cat. No.284664-85-3, Lot.No.KCF6177, 認証値: 92.4%, 拡張不確かさ: 0.5%) を用いた。重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*<sub>6</sub>) は関東化学 (株) 製または Eurisotop 社製を用いた。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。5-*O*-カフェオイルキナ酸は東京化成工業製 (Cat.No. C0181, Lot.LFDJC-BW), 3-*O*-カフェオイルキナ酸は東京化成工業製 (Cat.No. N1155, Lot.CGLVE-Y2), 4-*O*-カフェオイルキナ酸は長良サイエンス株式会社製 (Code.NS430202, Lot.0002), カフェ酸は富士フィルム和光純薬工業製 (Cat.No. 040-

20982, Lot.SDE2297) を使用した. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) は富士フィルム和光純薬工業製 (Cat.No. 047-04051, Lot.KWM6401) を使用した. 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetrathylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は東京化成工業製 (Cat.No. H0726, Lot.CYPYL-JS) 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 HPLC① ポンプ : LC-20AD (低压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-1010AS<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-20Alite, 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).

分析用 HPLC② ポンプ : LC-10AD<sub>VP</sub> (低压グラジエントユニット内蔵), オートサンプラ : SIL-10AP, カラム恒温槽 : CTO-10AS<sub>VP</sub>, 紫外可視分光検出器 : SPD-10A<sub>VP</sub>, システムコントローラ : CBM-20A, 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).

分取用 HPLC ポンプ : LC-10AD, 低压グラジエントユニット : FCV-10AL, オートサンプラ : SIL-20A, カラム恒温槽 : CTO-10AS<sub>VP</sub>, 紫外可視分光検出器 : SPD-10AV<sub>VP</sub> : システムコントローラ : SCL-10A<sub>VP</sub>, フラクシオンコレクタ : FRC-10A, 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 および AP125WD ((株) 島津製作所製)

## 【酵素処理ナリンジン】

B-3) 相対モル感度 (RMS) を利用したシングルリファレンス LC 法によるナリンジンおよび  $\alpha$

## ーモノグルコシルナリンジンの定量

### B-3-1) $\alpha$ ーモノグルコシルナリンジンの単離

$\alpha$ ーモノグルコシルナリンジンは定量用標品や試薬が市販されていないため, 酵素処理ナリンジン (食品添加物製品) より調製することとした. すなわち, 本品約 4 g について分取 HPLC 条件 1 を用いて分画を行い (図 1), 得られた Fr.A について, 分取 HPLC 条件 2 を用いてさらに分画を行い, Fr.A-1 より  $\alpha$ ーモノグルコシルナリンジン (24.2 mg) を単離した (図 2).

#### ・分取 HPLC 条件 1

カラム : Develosil ODS-UG-5 (10 × 250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m, 野村化学株式会社製), カラム温度 : 45°C, 検出波長 : 283 nm, 流速 : 3.0 mL/min, 移動相 : 水 / アセトニトリル混液 (85 : 15)

#### ・分取 HPLC 条件 2

カラム : Develosil ODS-UG-5 (4.6 × 250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m, 野村化学 (株) 製), カラム温度 : 40°C, 検出波長 : 283 nm, 流速 : 1.0 mL/min, 移動相 : 水 / アセトニトリル混液 (85 : 15)

### B-3-2) <sup>1</sup>H-qNMR によるナリンジンおよび $\alpha$ ーモノグルコシルナリンジンの純度測定

4 メーカーのナリンジン試薬は約 10 mg,  $\alpha$ ーモノグルコシルナリンジン約 5 mg を精密に量り, それぞれサンプル管に入れた. 別に DSS-*d*<sub>6</sub> 約 5 mg を精密に量り, 先程のサンプル管に入れた後, DMSO-*d*<sub>6</sub> 約 1 g に溶解し <sup>1</sup>H-qNMR 用試験溶液とした. 各測定対象物質につき 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 <sup>1</sup>H-qNMR 測定を行った. DSS-*d*<sub>6</sub> 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-3-3) 基準物質 (MHB およびカフェイン) に対するナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの RMS の算出

ナリンジン、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンでは各  $^1\text{H-qNMR}$  用試験溶液を濃度が約 500  $\mu\text{mol/L}$  となるように 20 mL 容メスフラスコへ必要量を入れ、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 で希釈を行い、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 およびカフェインでは、認証標準表に記載の純度を考慮し、MHB およ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 (ナリンジンおよび  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン),

255 nm (MHB), カフェイン (205 および 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、シンメトリ係数が 0.8~1.8 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および基準物質の検量線の検量線式の傾き (モル吸光係数) 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-3-4) ナリンジンに対する $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの RMS の算出

B-3-3 の項に示した各試料の回帰直線の傾きを基に、ナリンジンに対する  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの RMS を算出した。

### B-3-5) グルコアミラーゼを用いた酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体含量の定量

「酵素処理ヘスペリジン」の定量法<sup>5)</sup>を参考に試験溶液等の調製を行い、グルコアミラーゼ処理後のナリンジン、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンおよび  $\alpha$ -グルコシル残基量を定量し、その合計から総ナリンゲニン配糖体の含量を求めた。

#### B-3-5-1) シングルリファレンス HPLC 法を用いたグルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの定量

乾燥した酵素処理ナリンジン (食品添加物製品) 1 g を精密に量り取り、水 100 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) にこの溶液を注ぎ、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、

50%エタノール 200mL を 1 分間に 2.5 mL 以下の速さで流し、吸着画分を溶出させた。この溶出液を濃縮して全量を約 40 mL とし、この液にグルコアミラーゼ 10000 単位を約 3 g 添加した後、振とうしながら 55 °C で約 30 分放置した。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 3 mL を正確に量り、0.1%酢酸含有 20%アセトニトリル（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-3-3 に示した HPLC 条件で分析した。

各試験溶液中のナリンジンおよび  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンのピーク面積値を別に作成した基準物質の検量線式に代入し、試験溶液中のナリンジンおよび  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) を求め、次の式より各測定対象物質の含量を算出した。

ナリンジンまたは  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン含量 (%) =

$$= \frac{(C \times M) \times V}{W \times 10^6} \times \frac{50}{3} \times 100$$

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,  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン = 742.70)

$10^6$  : 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)

なお、別にナリンジンおよび  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンについて、従来法用の検量線を作成し、RMS 法の比較対照とした。

### B-3-5-2) グルコアミラーゼ処理後の $\alpha$ -グルコシル残基量の定量

B-3-5-1 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 3 mL 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。別に空試験を行い、補正した。ただし、空試験溶液は、水約 40 mL にグルコアミラーゼ 10000 単位を添加し、55°C で 30 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, 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  $\alpha$ -グルコシル残基量を算出した。

$$\text{Content (\%)} = \frac{C \times V}{W \times 1000} \times \frac{162}{180} \times 100$$

ただし、

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

V : 試験溶液の量 (50 mL)

W : 試料の採取量 (mg) である。

### B-3-5-3) 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 (%)

= グルコアミラーゼ処理後のナリンゲニン配糖体 (ナリンジン +  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン) (%) + グルコアミラーゼ処理により遊離した  $\alpha$ -グルコシル残基量 (%)

### B-4) 相対モル感度 (RMS) を利用したシングルリファレンス LC 法によるナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの定量

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-4-1) <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*<sub>6</sub> 約 5 mg を精密に量り、先程のサンプル管に入れた後、DMSO-*d*<sub>6</sub> 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*<sub>6</sub> 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*<sub>6</sub>: 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*<sub>6</sub>: CH<sub>3</sub> × 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*<sub>6</sub>: 224.36)  
 $W_{\text{sample}}$  = 測定対象物質の秤取量 (mg)  
 $C_{\text{std}}$  = <sup>1</sup>H-qNMR 標準溶液の DSS-*d*<sub>6</sub> 濃度

なお、<sup>1</sup>H-qNMR の化学シフト値は、DSS-*d*<sub>6</sub> のプロトンシグナルを基準 (δ 0 ppm) とし、δ 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-4-2) 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 μmol/L となるようにナリンゲニン 7-O-グルコシドの各 <sup>1</sup>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 μmol/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 μmol/L ~ 約 500 μmol/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 μm, 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 μL

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-4-3) 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-4-3-1) 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

処理ナリンジン溶液を注ぎ、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 200mL を1分間に2.5 mL以下の速さで流し、吸着画分を溶出させた。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-4-2に示したHPLC条件で分析した。

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

$$\text{ナリンジンの量 (\%)} = \frac{(C \times M) \times V}{W \times 10^6} \times \frac{50}{5} \times 100$$

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、<sup>1</sup>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-4-3-2) 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 (μg)

W：試料の採取量 (mg) である。

#### B-4-3-3) 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 α-グルコシル残基の量 (%)

### 【ヒマワリ種子抽出物】

#### B-5) ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性に関する検討

DPPH ラジカル消去活性は、精油除去ウイキョウ抽出物 (用途：酸化防止剤) の成分規格 (案) にて示されている方法に準じて行った。

#### B-5-1) DPPH 溶液の調製

DPPH 17 mg を秤量し、エタノール (99.5) に溶解後、200 mL に定容したものを DPPH 溶液とした (濃度：0.2 mmol/L)。DPPH 溶液は、調製直後から 1 時間程度までは時間とともに吸光度が低下することが知られている。そこで、遮光して 2 時間放置し、吸光度が安定してから DPPH ラジカル消去活性の測定に使用した。

#### B-5-2) DPPH ラジカル消去率の算出

ヒマワリ種子抽出物 10, 20, 30, 40 および 50 mg をそれぞれ精密に量りとり、水を加えて 20 mL としたものを試料溶液①～⑤ (濃度：0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/mL) とした。な

お、これら試料溶液は、1 濃度あたり 3 併行で作製した。調製された各試料溶液 0.5 mL を試験管に入れ、100 mM Tris-HCl buffer

(pH7.4) 2.0 mL を加えて混合した。DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 2.5 mL を加え、直ちに攪拌した後、暗所に 30 分間放置したものを試験溶液とし、吸光度 (波長：517 nm) を測定した。

試料溶液添加時の吸光度を  $A_s$ 、試料溶液の代わりにエタノール (99.5) を添加した際の吸光度を  $A_c$  とし、次の計算式からヒマワリ種子抽出物試料溶液の各濃度における DPPH ラジカル消去率 (%) を求めた。

DPPH ラジカル消去率 (%)

$$= \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100$$

#### B-5-3) ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性 (IC<sub>50</sub>) の算出

1 つの標準液群 (濃度：0.5, 1.0, 1.5, 2.0 および 2.5 mg/mL) の各試料濃度 (x) に対する DPPH ラジカル消去率 (y) をプロットし、回帰直線 ( $y = ax + b$ ) を作成した。これらを標準液群ごと (計 3 種) に作成し、得られた各回帰式の y に 50 を代入したときの x (試料濃度) の平均値を DPPH ラジカル消去活性 (IC<sub>50</sub>, μg/mL) とした。

#### B-6) HPLC による確認試験法の確立に向けたヒマワリ種子抽出物分析における測定条件の検討

ヒマワリ種子抽出物の成分規格 (案) に示されている方法に準じて行った。すなわち、ヒマワリ種子抽出物 10 mg を精密に量り、0.1% ギ酸を加え、溶解し、1 mL に定容したものを試験溶液とした (濃度：10 mg/mL)。この試験溶液を以下に示す条件で HPLC 分析を行った。

### 【HPLC 条件】

カラム：ナカライテスク (株) 製 COSMOSIL 5C18-MS-II, ナカライテスク (株) 製 COSMOSIL 5C18-AR-II, 関東化学 (株) 製 Separar C18G,



STAR 製 Mightysil RP-18 GP II (すべて内径：4.6 mm, 長さ：250 mm, 粒子径：5 μm), 移動相：0.1%ギ酸/メタノール=75/25, 流速：1.0 mL/min, カラム温度：40°C, 検出波長：320 nm, 注入量：10 μL

#### B-7) ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要成分の寄与率の検討

ヒマワリ種子抽出物の抗酸化性に対する中の主要な含有成分(クロロゲン酸, カフェ酸, 4-O-カフェオイルキナ酸, 3-O-カフェオイルキナ酸)の寄与率を算出するため, 「4成分およびヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去活性」, 「4成分およびヒマワリ種子抽出物のトロロックス等価活性 (TEAC)」および「ヒマワリ種子抽出物中の4成分の含量 (%)」をそれぞれ求めた。

#### B-7-1) ヒマワリ種子抽出物中の各主要成分の含量 (%)

##### B-7-1-1) ヒマワリ種子抽出物の試験溶液の調製

ヒマワリ種子抽出物 10 mg を精密に量り, 0.1%ギ酸を加え, 溶解し, 10 mL に定容したものを試験溶液とした (濃度：1 mg/mL)。

##### B-7-1-2) クロロゲン酸検量線用標準溶液の調製

本化合物を精密に量りとり, 0.1%ギ酸で完全に溶解したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 μg/mL, 濃度は<sup>1</sup>H-qNMRに基づく)。この溶液を公比 2 で 0.1%ギ酸を用いて希釈し, 検量線用標準溶液②～⑤とした (濃度：100, 50, 25, 12.5 μg/mL)。

##### B-7-1-3) カフェ酸検量線用標準溶液の調製

本化合物を精密に量りとり, 10%メタノールで完全に溶解したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：120 μg/mL, 濃度は<sup>1</sup>H-qNMRに基づく)。この溶液を公比 2 で 10%メタノールを用いて希釈し, 検量線用標準溶液②～⑤とした (濃度：60, 30, 15, 7.5 μg/mL)。

##### B-7-1-4) 3-O-カフェオイルキナ酸検量線用標準

#### 溶液の調製

<sup>1</sup>H-qNMR により濃度を求めた標準原液 (50 mg/mL in DMSO-*d*<sub>6</sub>) を 40 μL 採り, 0.1%ギ酸を加え 10 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 μg/mL)。この溶液を公比 2 で 0.1%ギ酸を用いて希釈し, 検量線用標準溶液②～⑤とした (濃度：100, 50, 25, 12.5 μg/mL)。

#### B-7-1-5) 4-O-カフェオイルキナ酸検量線用標準溶液の調製

<sup>1</sup>H-qNMR により濃度を求めた標準原液 (5 mg/mL in DMSO-*d*<sub>6</sub>) を 80 μL 採り, 0.1%ギ酸を加え 2 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 μg/mL)。この溶液を公比 2 で 0.1%ギ酸を用いて希釈し, 検量線用標準溶液②～⑤とした (濃度：100, 50, 25, 12.5 μg/mL)。

#### B-7-1-6) ヒマワリ種子抽出物中の各主要成分の含量 (mg/g) の算出

得られたヒマワリ種子抽出物中の各主要成分のピーク面積を, 該当する標準溶液の検量線式に代入し試験溶液中の濃度 (C) を求め, 以下の計算式からヒマワリ種子抽出物中の各主要の含量 (mg/g) を求めた

各主要成分の含量 (mg/g)

$$= \frac{C \times V}{W}$$

C: 試験溶液の指標成分の濃度 (μg/mL)

V: 試験溶液の液量 (mL)

W: ヒマワリ種子抽出物の秤取量 (mg)

#### B-7-2) ヒマワリ種子抽出物および各指標成分の DPPH ラジカル消去活性

DPPH 溶液の調製は B-5-1, ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去率の算出 (%) は B-5-2 に示す手順でそれぞれ行った。

#### B-7-2-1) 各主要成分の DPPH ラジカル消去率の算出 (%)

クロロゲン酸は, 当該化合物 10 mg を精密に量り, 0.1%ギ酸を加えて 50 mL としたもの

(200 µg/mL) から希釈し、試料溶液①～④ (濃度：5, 10, 20, 40 µg/mL) とした。これらの溶液は定量用試薬の <sup>1</sup>H-qNMR の結果に基づき調製した。

カフェ酸では、試薬の <sup>1</sup>H-qNMR の結果に基づき当該化合物を精密に量り、10%メタノールを加えて完全に溶解したもの (濃度：120 µg/mL) から希釈し、試料溶液①～④ (濃度：3, 6, 12, 24 µg/mL) とした。

3-O-カフェオイルキナ酸では、<sup>1</sup>H-qNMR 用試験溶液 (50 mg/mL in DMSO-*d*<sub>6</sub>) を 20 µL 採り、0.1%ギ酸を加え 5 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 µg/mL) から希釈し、試料溶液①～④ (濃度：10, 20, 40, 50 µg/mL) とした。

4-O-カフェオイルキナ酸では、<sup>1</sup>H-qNMR 用試験溶液 (5 mg/mL in DMSO-*d*<sub>6</sub>) を 80 µL 採り、0.1%ギ酸を加え 2 mL に定容したものを検量線用標準溶液①とした (濃度：200 µg/mL) から希釈し、試料溶液①～④ (濃度：10, 20, 40, 50 µg/mL) とした。

トロロックスでは、本化合物 20mg を正確に量り、エタノール (99.5) を加えて 100 mL としたものを (200µg/mL) から希釈し、試料溶液①～⑤ (濃度：25, 50, 80, 100µg/mL) とした。

なお、各化合物の試料溶液は、1 濃度あたり 3 併行で調製した。調製された各試料溶液 0.5 mL を試験管に入れ、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 2.0 mL を加えて混合した。DPPH 試液 (0.2 mmol/L) 2.5 mL を加え、直ちに攪拌した後、暗所に 30 分間放置したものを試験溶液とし、吸光度 (波長：517 nm) を測定した。

試料溶液添加時の吸光度を *A*<sub>s</sub>、試料溶液の代わりにエタノール (99.5) を添加した際の吸光度を *A*<sub>c</sub> とし、B-5-2 で示した計算式から各試料溶液の濃度毎の DPPH ラジカル消去率 (%) を求めた。

#### B-7-2-2) DPPH ラジカル消去活性 (IC<sub>50</sub>) の算出

B-5-2-1 で調製した各化合物およびヒマワリ種子抽出物の試料溶液を用い、B-3-3 と同様の

方法により DPPH ラジカル消去活性 (IC<sub>50</sub>, µg/mL) を求めた。

#### B-7-2-3) トロロックス等価活性 (TEAC) の算出

文献報告に従い、次の計算式から、各主要成分の TEAC をそれぞれ求めた。

各主要成分の TEAC (µgTE/µg)

$$= \frac{\text{トロロックスの IC}_{50}}{\text{測定対象の IC}_{50}}$$

#### B-7-3) 各主要成分のヒマワリ種子抽出物の抗酸化性に対する寄与率の算出

B-7-1 および B-7-2 で求められた各データに基づき、次の式により各成分の寄与率をそれぞれ算出した。

寄与率 (%)

$$= \frac{\text{成分の TEAC} \times \text{抽出物中の含量 (\%)}}{\text{ヒマワリ種子抽出物の TEAC}}$$

### C. 結果及び考察

#### 【酵素処理ナリンジン】

##### C-1) α-モノグルコシルナリンジンの単離

RMS の算出にあたり、商業的に入手が困難な α-モノグルコシルナリンジンについて、酵素処理ナリンジン (食品添加物製品) より単離することとした。すなわち、酵素処理ナリンジン 4 g について分取 HPLC による分画を行い (図 1)、α-モノグルコシルナリンジンおよびナリンジンが集約している Fr.A についてさらに LC による分画を行い、Fr.A-1 より α-モノグルコシルナリンジンを単離した (図 2)。なお、単離した当該化合物は、以前に当研究室で単離した α-モノグルコシルナリンジンとの直接比較により、その化学構造が同定された。

##### C-2) <sup>1</sup>H-qNMR によるナリンジンおよび α-モノグルコシルナリンジンの純度測定

正確な RMS の算出にあたり、測定対象物質

の市販試薬や単離品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、これらの純度を明らかにするため、 $^1\text{H-qNMR}$ を用いることとした。 $^1\text{H-qNMR}$ 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ナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンについて $^1\text{H-qNMR}$ 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- $d_6$ :  $\delta$  0 ppm)とし、 $\delta$ 値をppm単位で表した。図3および4に示すように、 $^1\text{H NMR}$ スペクトル上、 $\delta$  1.18 ppm付近にラムノースのメチル基に由来するシグナル、 $\delta$  2.70~5.60 ppmにアグリコン(ナリンゲニン)の2位、3位および糖部に由来するシグナル、 $\delta$  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、 $\delta$  7.36 ppmに観察されたナリンゲニンの2'位および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、ナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン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4メーカーのナリンジン試薬および単離した $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの純度を算出したところ、各検体(1~3)の純度は表2に示す結果であることが判明した。

### C-3) 基準物質(MHBおよびカフェイン)に対するナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンのRMSの算出

基準物質に対するナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンのRMSを算出するため、各検体の $^1\text{H-qNMR}$ による純度に基づいて調製されたナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン標準溶液並びに認証書に記載の認証値(純度値)に基づき調製されたMHBおよび

カフェイン標準溶液を用いて、B-3-3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5)。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、ナリンジン、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン、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。各測定対象物質および基準物質の代表的な検量線を図6に示す。以上の結果より、これらの検量線はRMSの算出に利用可能であることが明らかとなった。

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、ナリンジンでは10284(4メーカー(n=3)の平均値)(検出波長: 283 nm)、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンは11042(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)、11598(検出波長: 205 nm)であることが判明した。得られたこれらのデータより、基準物質に対するナリンジン、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンのRMSを算出したところ、表3に示す値であることが判明した。

### C-4) シングルリファレンスHPLC法を用いたグルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの定量および総ナリンゲニン配糖体含量の算出

次に、算出したRMSの妥当性を評価するため、酵素処理ナリンジン製品を用いて、常法に従いグルコアミラーゼ処理により得られたHPLC用試験溶液を用いて、酵素処理ナリンジンのグルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの含量について各基準物質およびRMSを用いたシングルリファレンスHPLC法で算出し、各測定対象物質を定量用標品とした絶対検量線法(従来法)により算出された含量と比較した。試験溶液のクロマトグラムを図7に示す。その結果、シングルリファレンスHPLC法においては、表4に示すように基準物質の違いによりナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリン

ジン含量に大きな違いは認められなかった。また、シングルリファレンス HPLC 法により得られた各測定対象物質の定量値は、各測定対象物質の標品を用いた絶対検量線法（従来法）の結果と大きな違いは認められなかった。また、シングルリファレンス HPLC 法の RSD は、すべてのデータにおいて 1.2%以下と良好であった。以上の結果より、各基準物質を定量用標品としたシングルリファレンス HPLC 法は、グルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの定量に有効と考えられた。なお、グルコアミラーゼ処理により遊離する $\alpha$ -グルコシル残基量を別途定量し、上記の結果と合算して求めた総ナリンゲン配糖体量について、表 5 にそれぞれ示した。

### C-5) 相対モル感度 (RMS) を用いたシングルリファレンス HPLC 法によるナリンゲン 7-O-グルコシドの定量

#### C-5-1) $^1\text{H}$ -qNMR によるナリンゲン 7-O-グルコシドの純度測定

表 1 に示す測定条件を用いて、一般試薬のナリンゲン 7-O-グルコシドについて  $^1\text{H}$ -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- $d_6$ :  $\delta$  0 ppm) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。図 8 に示すように、 $^1\text{H}$  NMR スペクトル上、 $\delta$  2.70~5.60 ppm にアグリコン (ナリンゲン) の 2 位、3 位及び糖部に由来するシグナル、 $\delta$  6.00~7.50 ppm にアグリコン (ナリンゲン) 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、 $\delta$  7.28 ppm に観察されたナリンゲンの 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ン 7-O-グルコシド試薬の純度を算出したところ、 $90.5 \pm 0.5\%$  であることが判明した。

#### C-5-2) 基準物質 (MHB 及びカフェイン) に対するナリンゲン 7-O-グルコシドの RMS の算出

基準物質に対するナリンゲン 7-O-グルコシドの RMS を算出するため、 $^1\text{H}$ -qNMR による純度に基づいて調製されたナリンゲン 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-4-2 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 9)。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。ナリンゲン 7-O-グルコシド及び基準物質の代表的な検量線を図 10 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。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ン 7-O-グルコシドの RMS を算出したところ、表 6 に示す値であることが判明した。

### C-6) 酵素処理ナリンゲン製品中の総ナリンゲ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

C-4 で示した方法とは異なるが、成分規格試験法 (案) における総ナリンゲン配糖体含量は、酵素処理ナリンジンのグルコアミラーゼ (500~2500 単位) 及び $\alpha$ -グルコシダーゼ (15000~30000 単位) 処理後の「ナリンジンの量」、「モノグルコシルナリンジンの量」、「ナリンゲン 7-O-グルコシドの量」及び「遊離する $\alpha$ -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、酵素処理ナリンゲン製品 1 種 (C2204) において、① 総ナリンゲン配糖体含量が 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 11 に示す。その結果、表 7 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 11 に示す。表 8 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 7 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、グルコシルナリンゲ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 7, 表 8, 付録 1)。

### 【ヒマワリ種子抽出物】

#### C-7) ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル

#### 消去活性に関する検討

ヒマワリ種子抽出物の成分規格 (案) における確認試験法として、精油除去ウイキョウ抽出物 (酸化防止剤) における確認試験法 (案) で採用されている DPPH 法を参考に、その適用性を検討した。

まず、各種濃度のヒマワリ種子抽出物試験溶液 (濃度 : 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 および 2.5 mg/mL) を用いて、DPPH 法の測定手順および直線性を評価した。その結果、図 12 に示すように、ヒマワリ種子抽出物の検討した試験溶液の濃度において、濃度とその DPPH ラジカル消去活性には良好な直線性が認められ (決定係数 : 0.9975)、検討した濃度範囲であれば、DPPH ラジカル消去活性を適切に評価できることが明らかとなった。なお、この回帰直線から求められる DPPH ラジカル消去活性 ( $IC_{50}$ ) は、約 2 mg/mL であることが確認された。確認試験法を規定する場合、活性値がおおよそ 50%となる濃度を試験溶液濃度とすると、今回のヒマワリ種子抽出物製品の結果より、測定で用いる試料の秤取量は 40 mg (40 mg (秤量値) / 20 mL (試料溶液量)) が適切と考えられた。

#### C-8) HPLC による確認試験法の確立に向けたヒマワリ種子抽出物分析における測定条件の検討

次に、ヒマワリ種子抽出物の成分規格 (案) において、指標成分が当該添加物に含まれていることを確認するために、HPLC を用いた確認試験法が規定される予定である。そこで、この確認試験法 (案) で規定されている測定条件の適用性を評価するため、4 種のカラムを使用してヒマワリ種子抽出物製品を分析した。その結果、図 13 に示すように、5 分以降に溶出される主要な 4 種のピークが確認された。ただし、2 種のカラム (Separar C18G および Mightysil RP-18 GP II) において、ピーク 2 および 3 の分離度が 0.75 以下であることが確認された。そこで、移動相 (0.1%ギ酸/メタノール) の組成比を 75/25 から 80/20 に変更し再度分析を行った。その結果、図 14 に示すようにすべてのカラムにおいて、ピーク 2 および 3 の分離度が 1.5 以上であり、

またヒマワリ種子抽出物に含まれる主要な4成分すべてが良好に分離されることが確認された。以上の結果より、確認試験法(案)で示されている測定条件のうち、移動相(0.1%ギ酸/メタノール)の組成比を75/25から80/20へ変更する必要があると考えられた。

### C-9) ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要成分の寄与率の検討

次に、ヒマワリ種子抽出物の成分規格

(案)と実試料の整合性やヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要成分の寄与率<sup>9-10</sup>を明らかにするための検討を行った。

まず、B-7-1-1に示すヒマワリ種子抽出物試験溶液について、C-8で示す0.1%ギ酸/メタノール=80/20を移動相とするHPLC条件を用いて分析したところ、図15に示すようにクロマトグラムが得られ、定量用標品との直接比較により、ピーク1が3-O-カフェオイルキナ酸、ピーク2がクロロゲン酸、ピーク3が4-O-カフェオイルキナ酸、ピーク4がカフェ酸であることが確認された。なお、保持時間3分のピークについては測定の度に面積値が大きく変動することから、単一の成分ではない可能性があると考えられた。また、成分規格(案)で示されているイソクロロゲン酸については、当該試料では検出されなかった。

そこで、これら4成分を対象に、ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する寄与率を求めることとした。寄与率の算出に当たり、①4成分およびヒマワリ種子抽出物のDPPHラジカル消去活性、②4成分およびヒマワリ種子抽出物のトロロックス等価活性(TEAC)および③ヒマワリ種子抽出物中の4成分の含量(%)について検討を行った。4成分およびヒマワリ種子抽出物のDPPHラジカル消去活性を図16および表9に、4成分の検量線を図17に、4成分およびヒマワリ種子抽出物のトロロックス等価活性(TEAC)を表10、ヒマワリ種子抽出物中の4成分の含量(%)を表11にそれぞれ示した。そこでこれらの結果に基づいて、ヒマワリ種子抽出物中の抗酸化性に対する主要な4種の成分の寄与率を求めたところ、含量の多い順に

クロロゲン酸は41.2%、4-O-カフェオイルキナ酸は18.8%、3-O-カフェオイルキナ酸は16.8%、カフェ酸は9.8%であることが判明し、これら4種の寄与率の合計は86.6%であった。

### 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、精度の向上ならびに試験法が未設定である既存添加物の分析法の確立を目的に、酵素処理ナリンジンおよびヒマワリ種子抽出物を対象に検討を行った。酵素処理ナリンジンの検討では、<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ギン、 $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンおよびナリンゲニン7-O-グルコシドのRMSを明らかにした。また、実試料を用いた検討において、シングルリファレンスHPLC法により得られたナリンギンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの定量値は従来法と大きな違いは認められなかった。従って、今回求められた各基準物質に対する測定対象物質のRMSを用いたシングルリファレンスHPLC法より、酵素処理ナリンジン中の総ナリンゲニン配糖体量を求める際に必要なナリンギンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの含量を正確に定量可能であることが判明した。さらに、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、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

ヒマワリ種子抽出物では、本研究では、既存添加物の成分規格(案)の最適化を目指して、ヒマワリ種子抽出物を対象に検討を行った。その結果、DPPHラジカル消去活性を指標とする確認試験法においては、精油除去ウイキョウ抽出物の成分規格(案)で示されている方法をおおよそ準用可能ではあるが、試料秤取量は40 mgが適切と考えられた。また、HPLCによる確認試験法においては、ヒマワリ種子抽出物の成分規格(案)で示されているHPLC条件のうち、移動相を0.1%ギ酸/メタノール=80/20へ変更する必要があると考えられた。さらに、食品添加物製品1種の分析を行ったところ、主要成分はクロロゲン酸、4-O-カフェオイルキナ酸、3-O-カフェオイルキナ酸およびカフェ酸であることが判明し、これらの抽出物の抗酸化性に対する寄与率は86.6%であることが明らかとなった。今回はヒマワリ種子抽出物1製品のみでの検討ではあるものの、成分規格(案)に示されているイソクロロゲン酸類は検出されなかったこと、一方でカフェ酸が検出され、この化合物も抗酸化性に寄与することから、今後、他の製品についても検討を行い、成分規格(案)の記載の最適化を進めていく必要があると考えられた。

#### 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) 第9版食品添加物公定書, 厚生労働省(2017).
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Nakanishi, A., Hashizume, Y., Tandia, M., Yamazaki, T., Kuroe, M., Numata, M., Ihara, T., Sugimoto, N., Sato, K.: Determination of hesperidin and Monoglucosylhesperidin contents in processed foods using relative molar sensitivity based on <sup>1</sup>H-quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **2018**; 59: 1-10.
- 8) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書, 日本食品添加物協会技術委員会 (1999)
- 9) Matsufuji T, Chino M, Yamagata K, Yamazaki T. Antioxidant compounds and their contribution to total antioxidant capacity in rosemary extracts, natural antioxidants. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, **2010**; 17: 164-170.
- 10) Shimamura T, Ito Y, Kubo Y, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Yamazaki T, Tada A, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H. Relationship between catechin content and antioxidant capacity in natural food additive tea extract. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, **2017**; 24: 10-15.

#### F. 研究発表

1. 学会発表等

- 1) 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純度評価. 日本食品科学工学会令和3年度関東支部大会, 2021年3月 (オンライン)
- 2) 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, 川崎市産業振興会館 (神奈川県)
- 3) 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, 東京農業大学 (東京)
- 4) 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, Web 開催
- 5) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について, 日本食品科学工学会第 69 回大会, 2022 年 8 月
- 6) 黄奕, 大槻崇, 森川悟, 松藤寛, 治療薬物モニタリング (薬物濃度測定) における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用, 第 4 回日本定量 NMR 研究会年会, 2022 年 12 月
- 7) 岡庭寛昂, 池上美音, 宮下采佳, 大槻崇, 松藤寛, 長田和実, 中西祐輔, 高橋恭子, 酪酸が腸管上皮バリアへ与える影響, 日本農芸化学会 2023 年度大会, 2023 年 3 月
- 2) Ohtsuki T., Friesen J.B., Chen S.N., McAlpine J.B., Pauli G.F.: 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

## 2. 論文発表等

- 1) Ohtsuki T, Matsuoka K, Fuji Y, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Matsufuji H.: Development of an HPLC method with relative molar sensitivity based on <sup>1</sup>H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. *PLOS ONE.*, **2020**; *15*: e0243175.



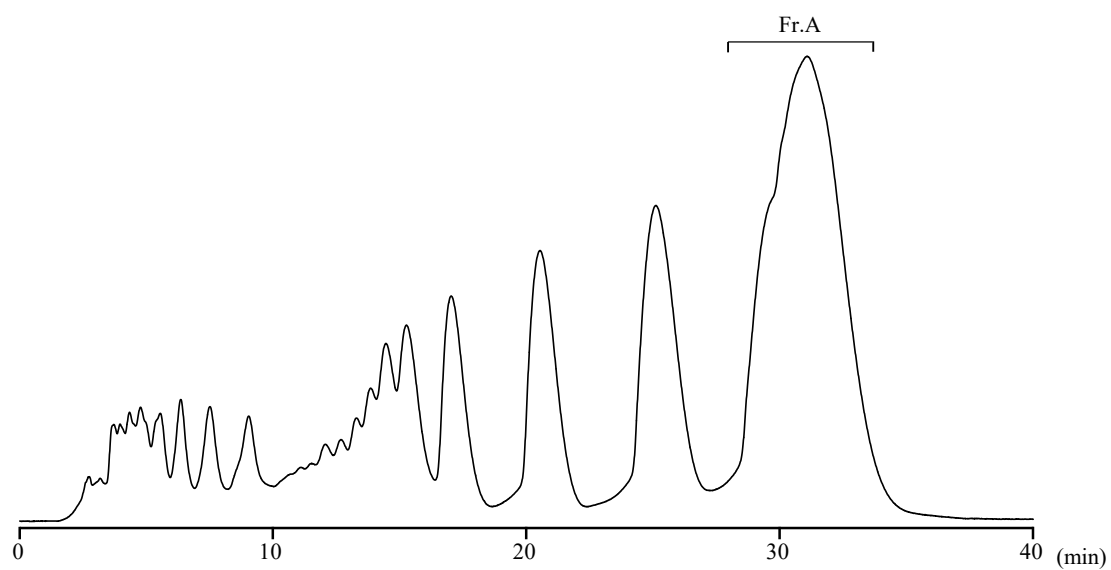


図1 酵素処理ナリンジン（食品添加物製品）のHPLCクロマトグラム（分取）

HPLC条件（分取HPLC条件1）

カラム：Develosil ODS-UG-5（10×250 mm，粒子径5 μm，野村化学株式会社製），カラム温度：45°C，  
検出波長：283 nm，流速：3.0 mL/min，溶離液：15%アセトニトリル

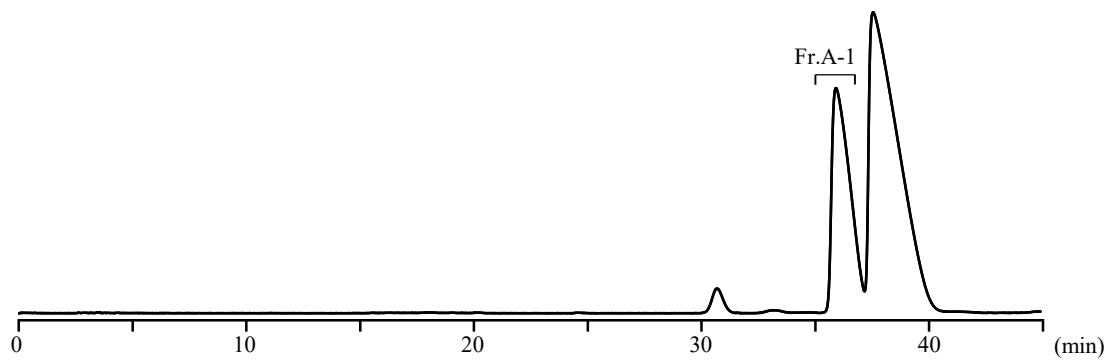


図2 Fr.AのHPLCクロマトグラム(分取)

HPLC条件(分取HPLC条件2)

カラム: Develosil ODS-UG-5 (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm, 野村化学(株)製), カラム温度: 40°C,  
検出波長: 283 nm, 流速: 1.0 mL/min, 溶離液: 15%アセトニトリル

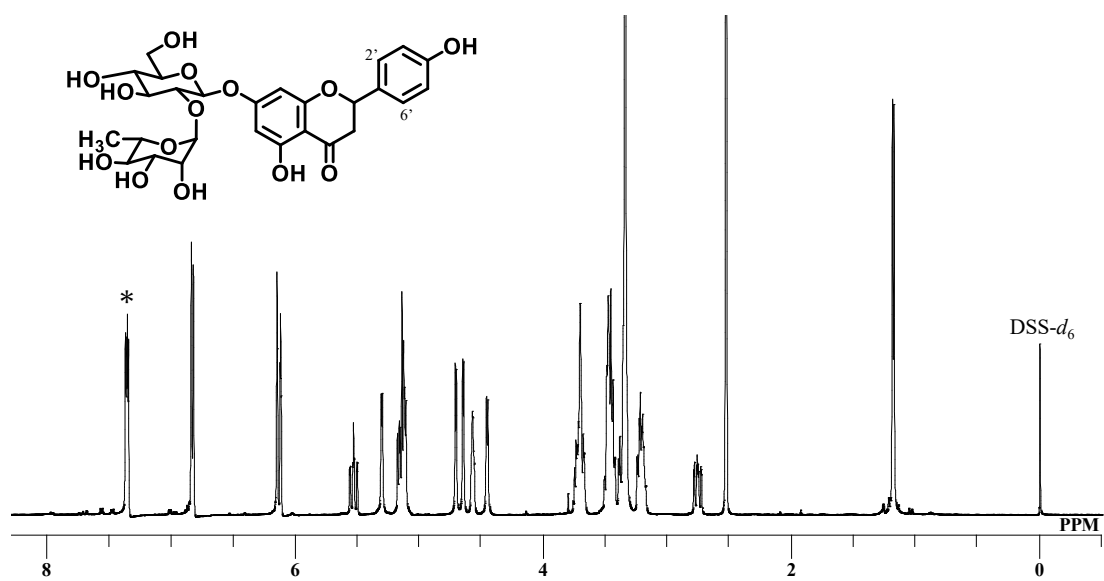


図3 ナリンジンの化学構造および<sup>1</sup>H-qNMR スペクトル

測定溶媒：DMSO-*d*<sub>6</sub>, \*：定量用シグナル (H-2' and H-6')

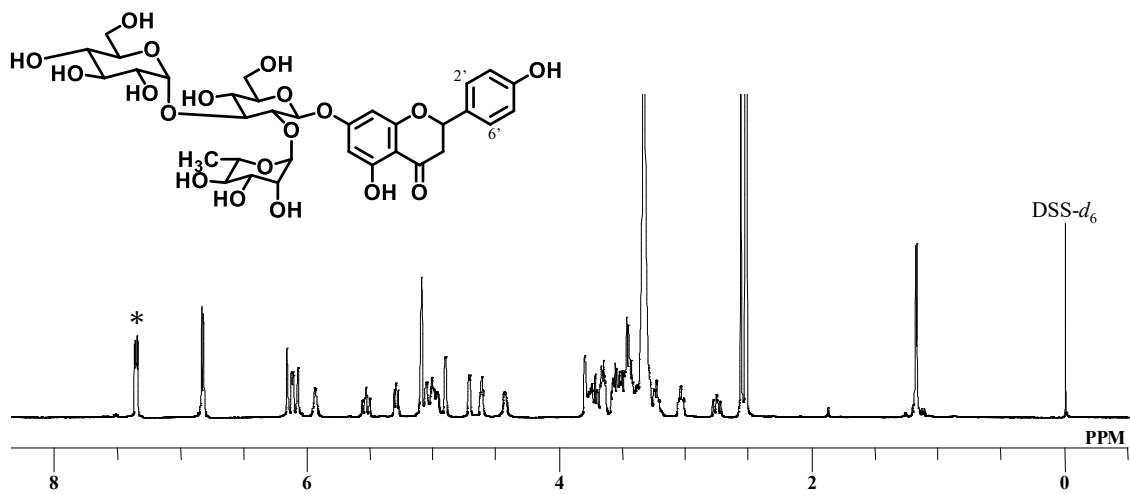


図4  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの化学構造および $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル  
 測定溶媒: DMSO- $d_6$ , \*: 定量用シグナル (H-2' and H-6')

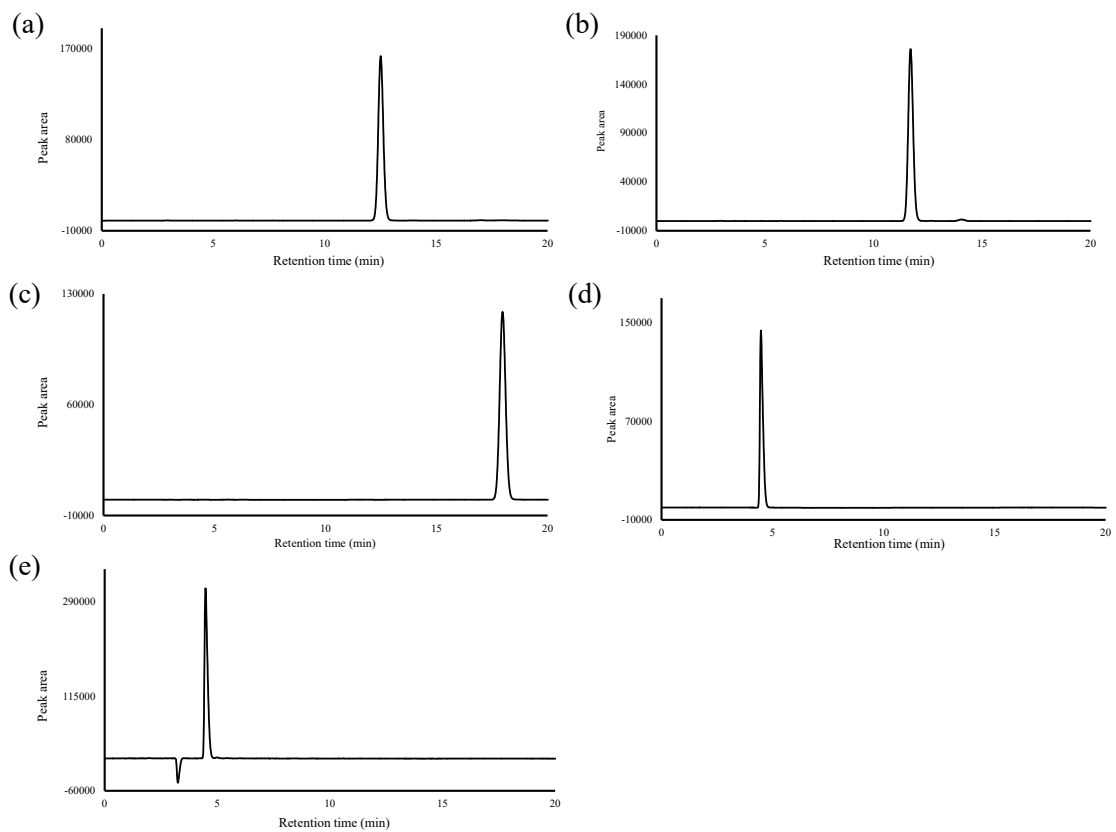


図5 ナリンジン (a),  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン (b), MHB (c), カフェイン (dおよびe) の HPLC クロマトグラム

HPLC 条件

カラム : COSMASIL 5C18-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5  $\mu$ m) ( (株) ナカライテスク製 ), カラム  
 温度 : 40  $^{\circ}$ C, 検出波長 : 283 nm (ナリンジン(a)および  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン (b)), 255 nm (MHB (c)), 274  
 nm (カフェイン (d)), 205 nm (カフェイン (e)), 移動相 : 水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 流  
 速 : 1.0 mL/min

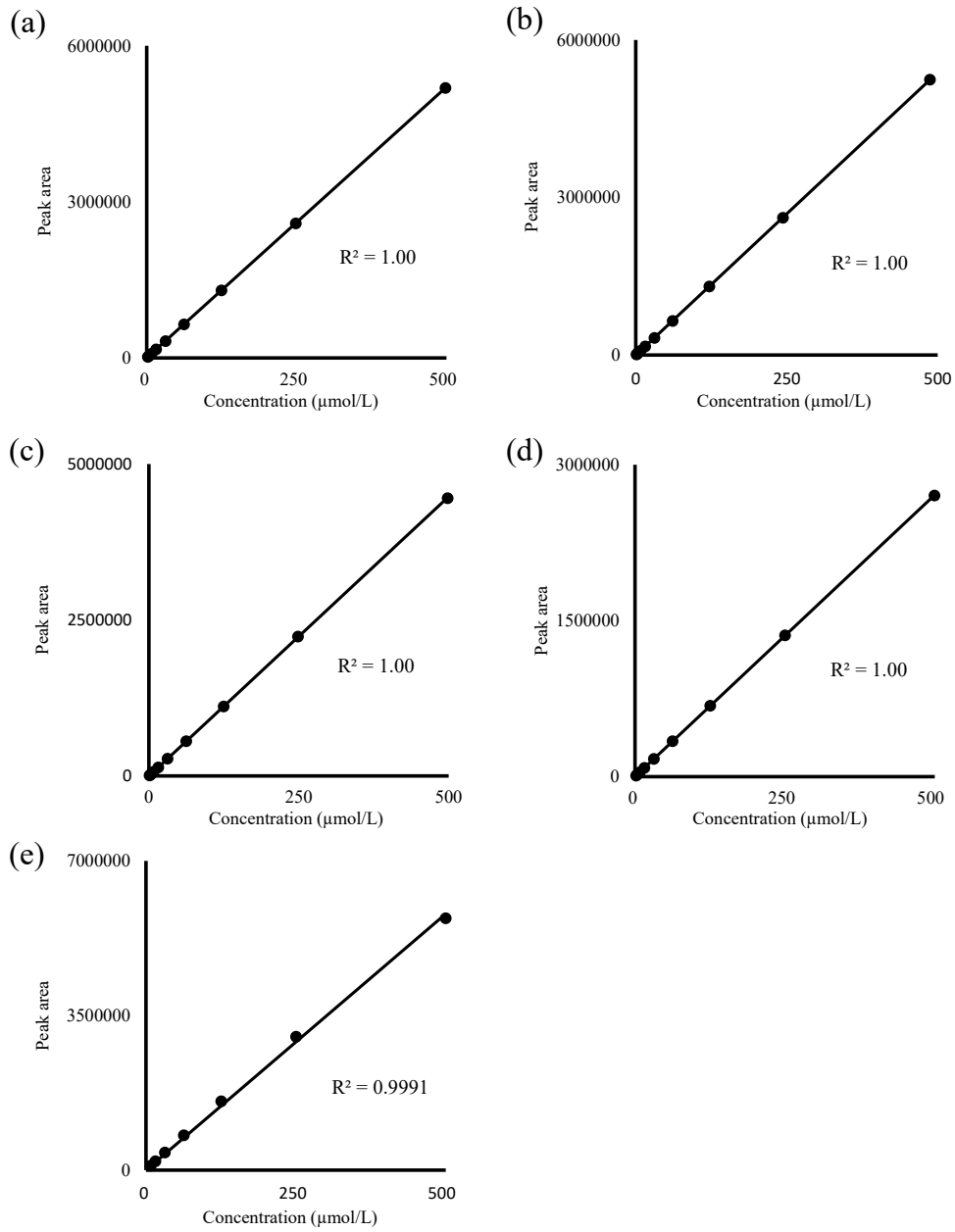


図6 ナリンジン (a), α-モノグルコシルナリンジン (b), MHB (c), カフェイン (dおよびe) の代表的な検量線

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

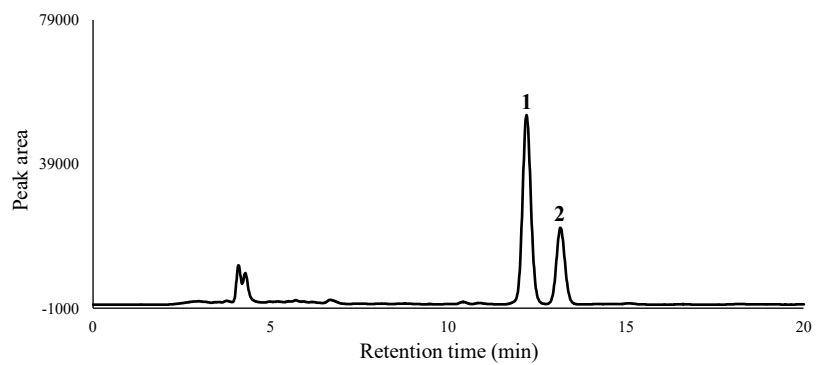


図7 試験溶液の HPLC クロマトグラム

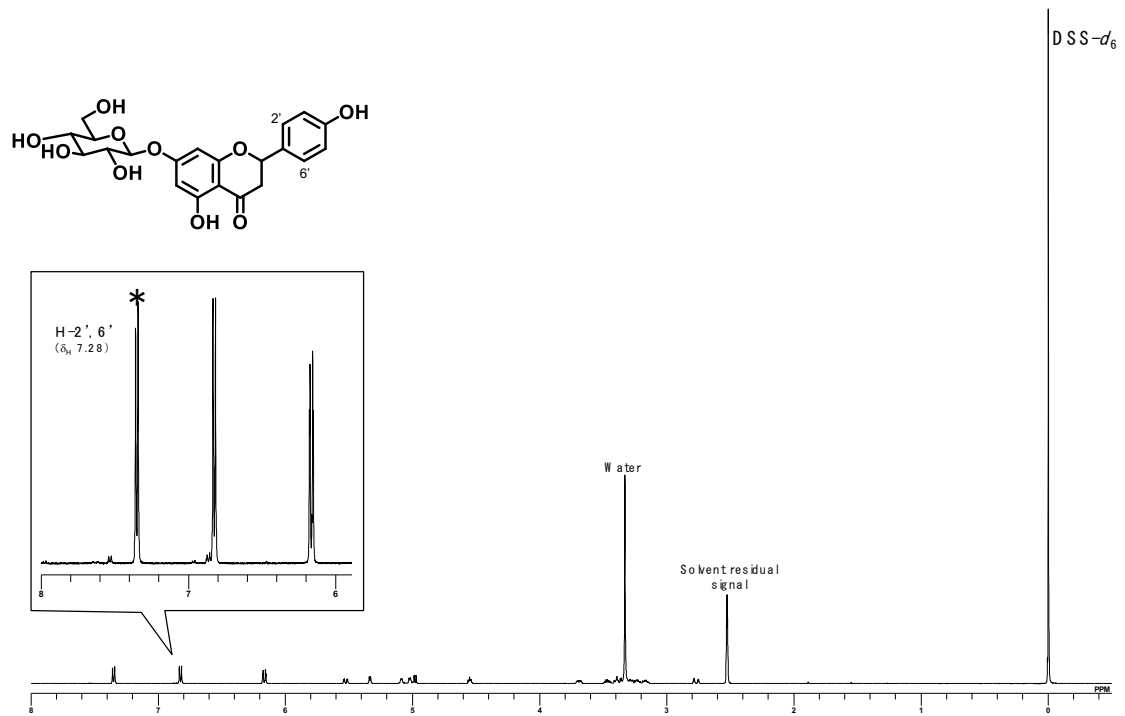


図 8 ナリンゲニン 7-O-グルコシドの化学構造及び  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル

測定溶媒 : DMSO- $d_6$ , \* : 定量用シグナル (H-2' and H-6')



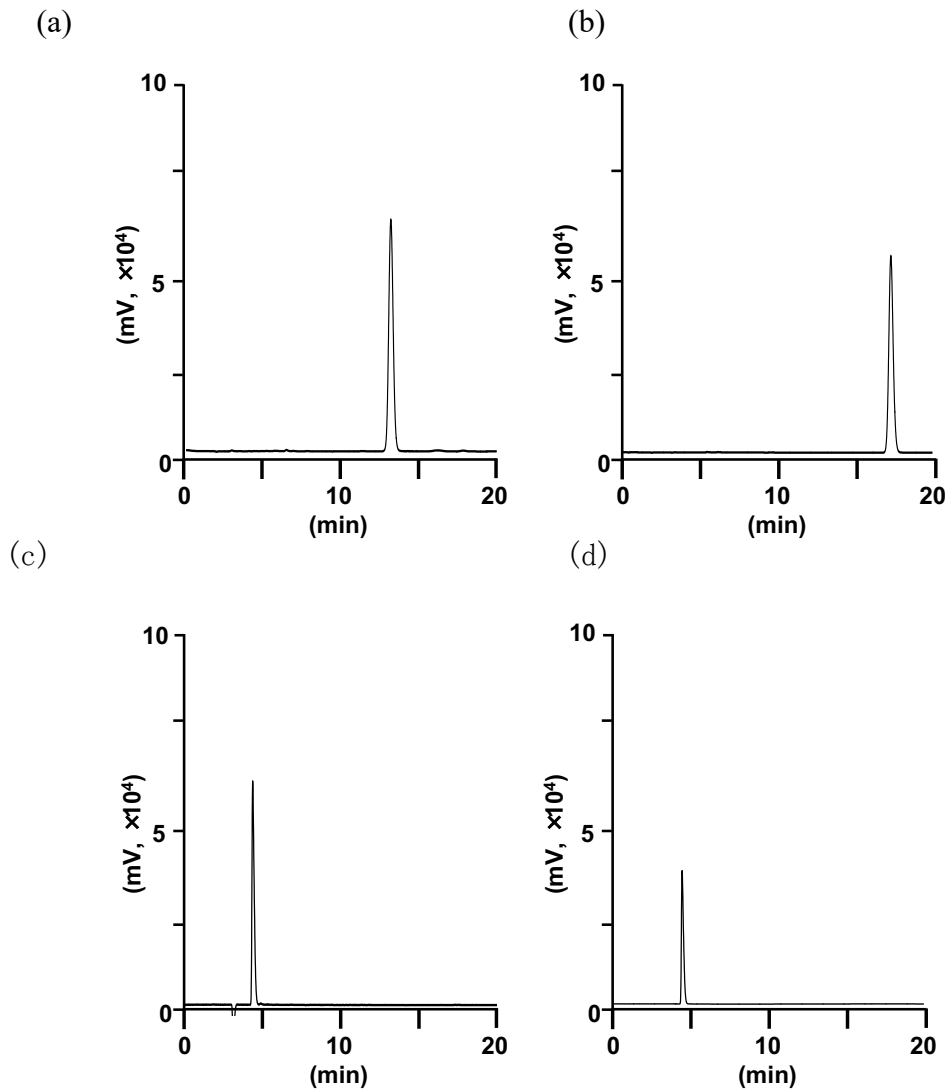


図9 ナリンゲニン 7-*O*-グルコシド (a), MHB (b), カフェイン (c及びd) の HPLC クロマトグラム

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 (ナリンゲニン 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

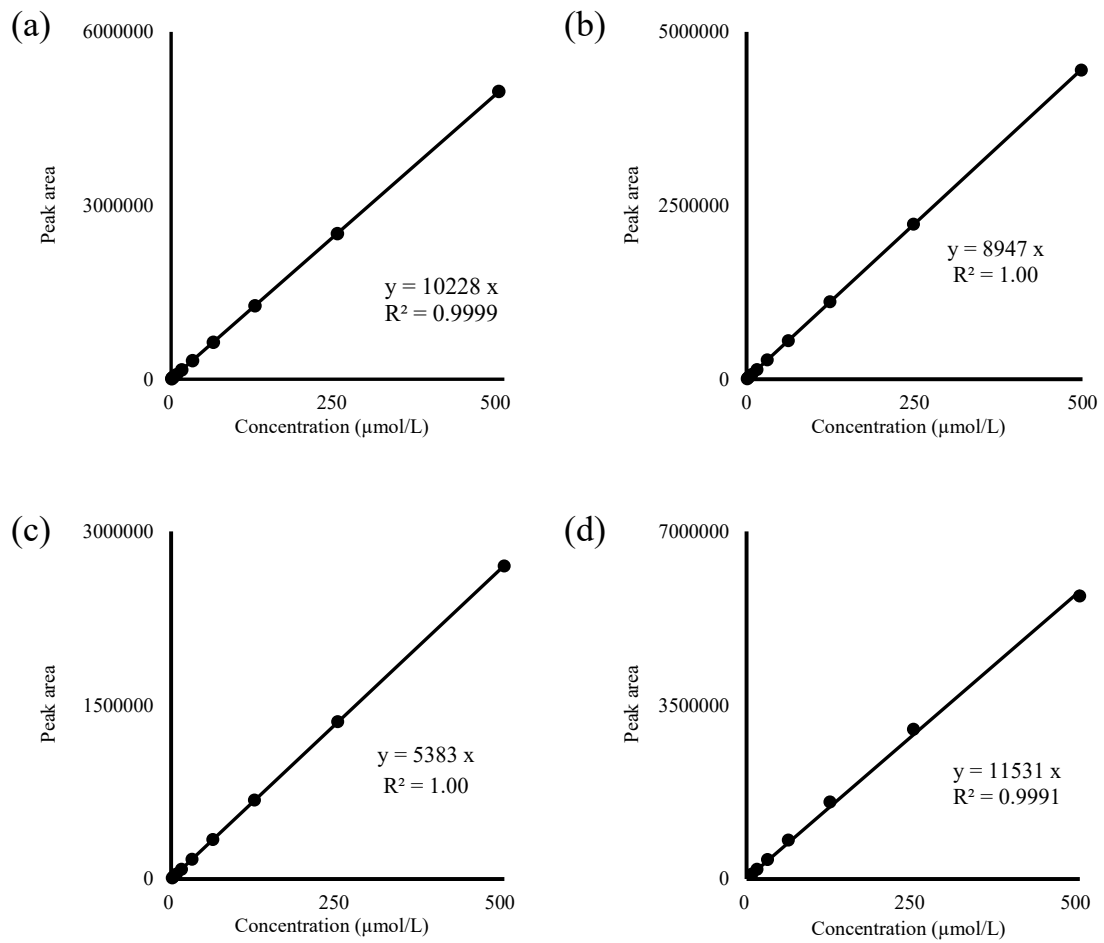


図 10 ナリンゲニン 7-O-グルコシド (a), MHB (b), カフェイン (c 及び d) の代表的な検量線

(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

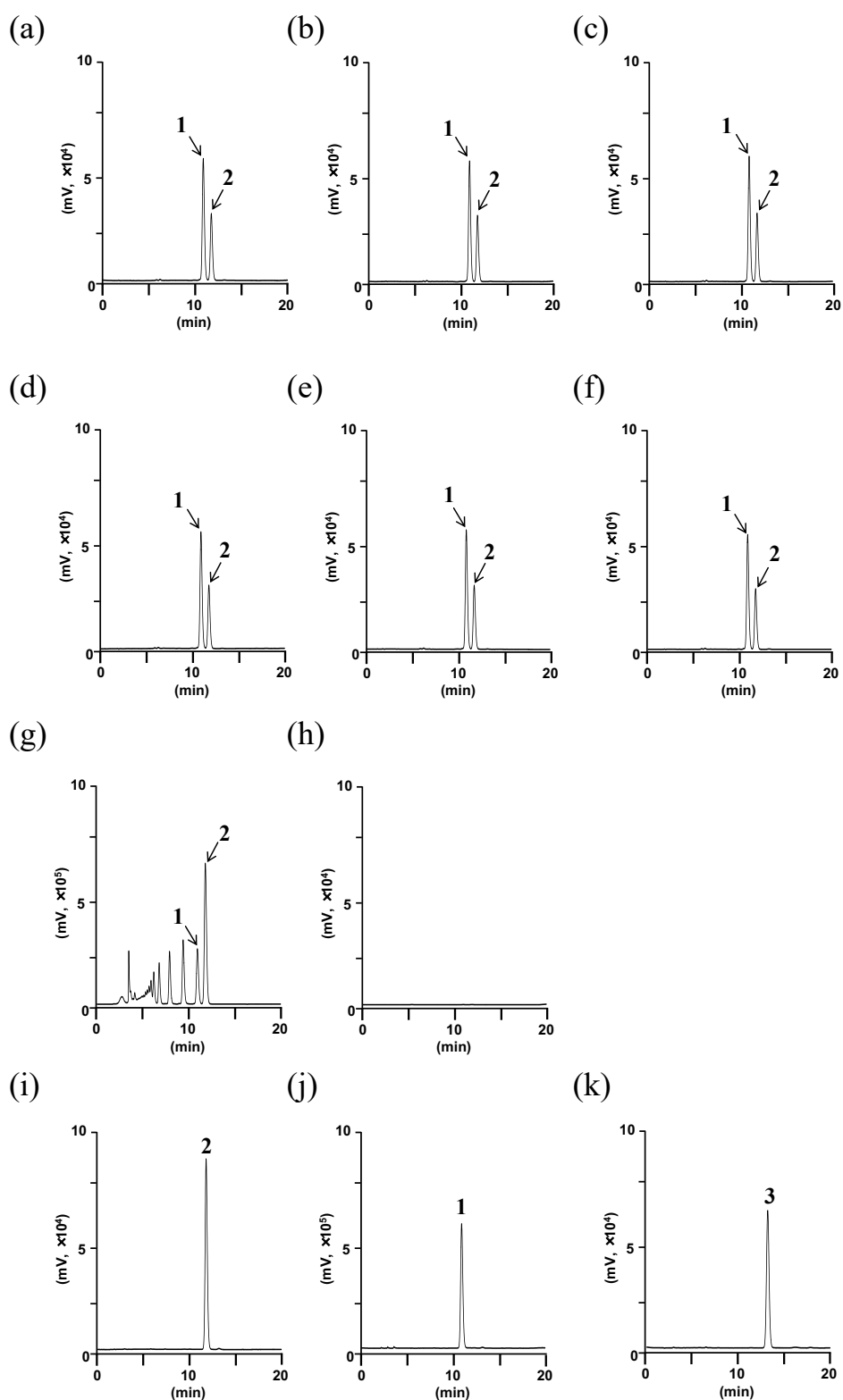


図 11 各試験溶液及び標準溶液の HPLC クロマトグラム

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 11 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	

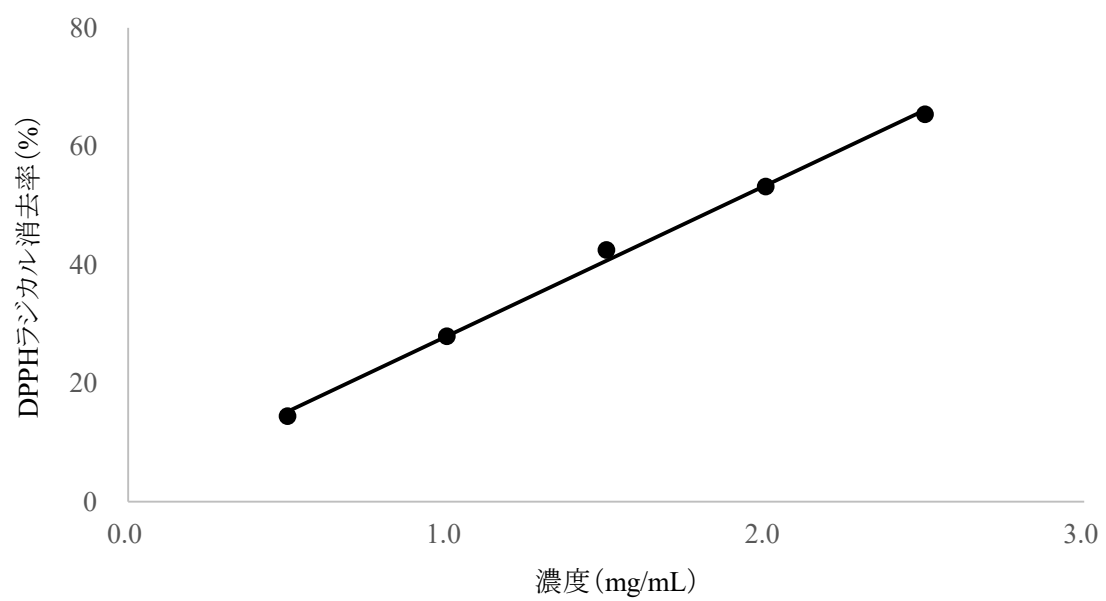


図 12 ヒマワリ種子抽出物の DPPH ラジカル消去率

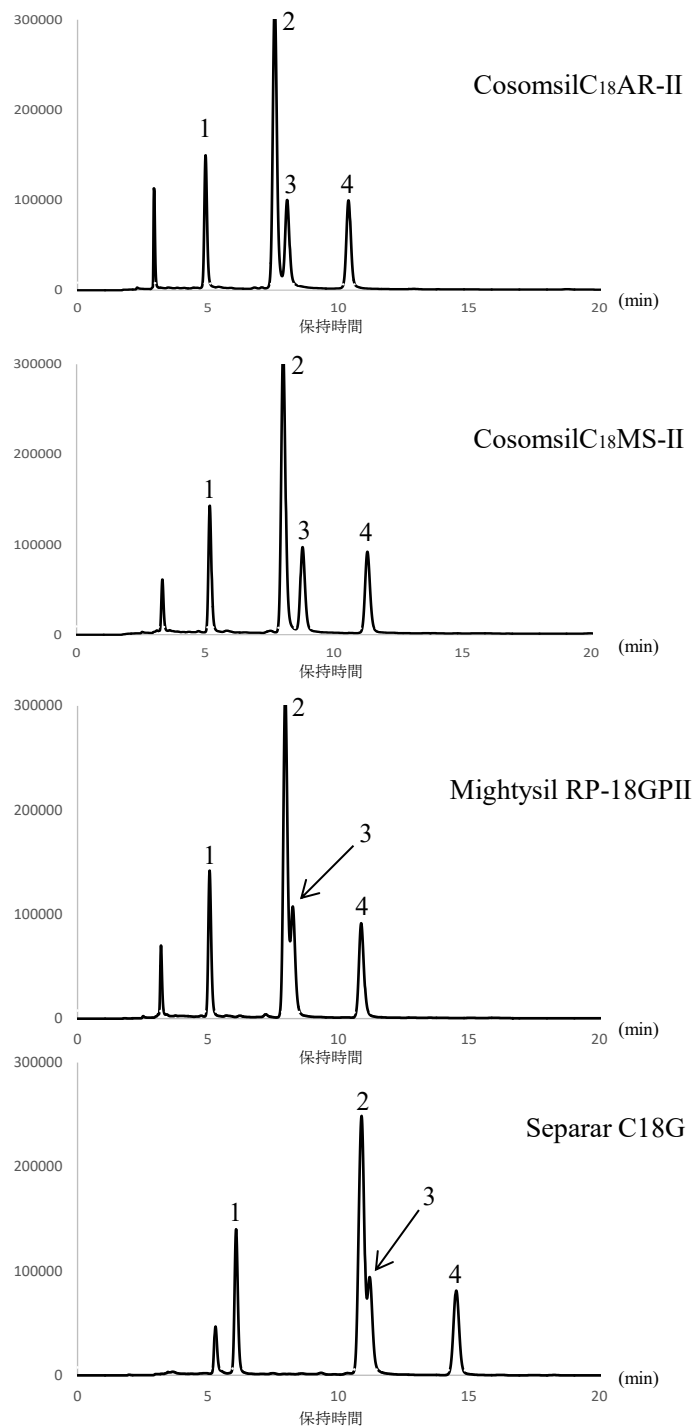


図 13 各種カラムにおけるヒマワリ種子抽出物製品のクロマトグラム

HPLC 条件

移動相：0.1%ギ酸/メタノール=75/25，流速：1.0 mL/min，カラム温度：40℃，検出波長：320 nm，注入量：10  $\mu$ L

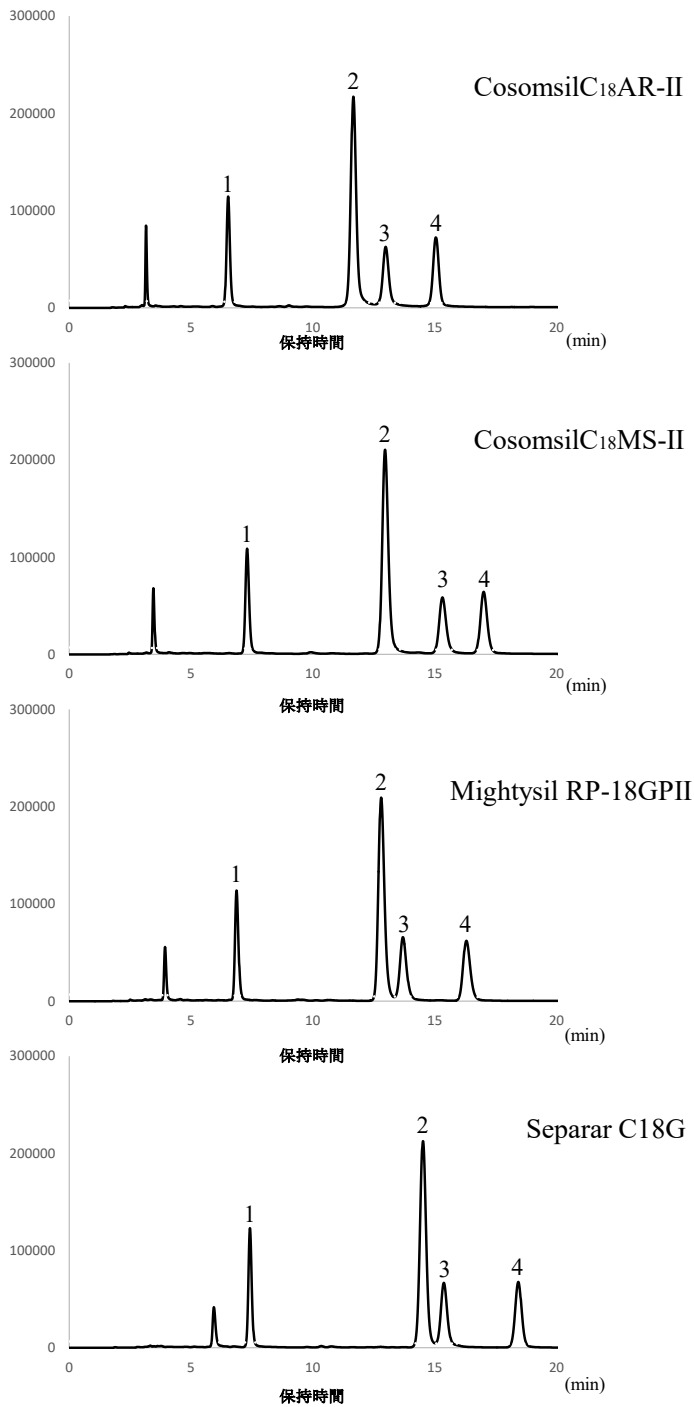


図 14 各種カラムにおけるヒマワリ種子抽出物製品のクロマトグラム

HPLC 条件

移動相：0.1%ギ酸/メタノール=80/20，流速：1.0 mL/min，カラム温度：40℃，検出波長：320 nm，注入量：10  $\mu$ L

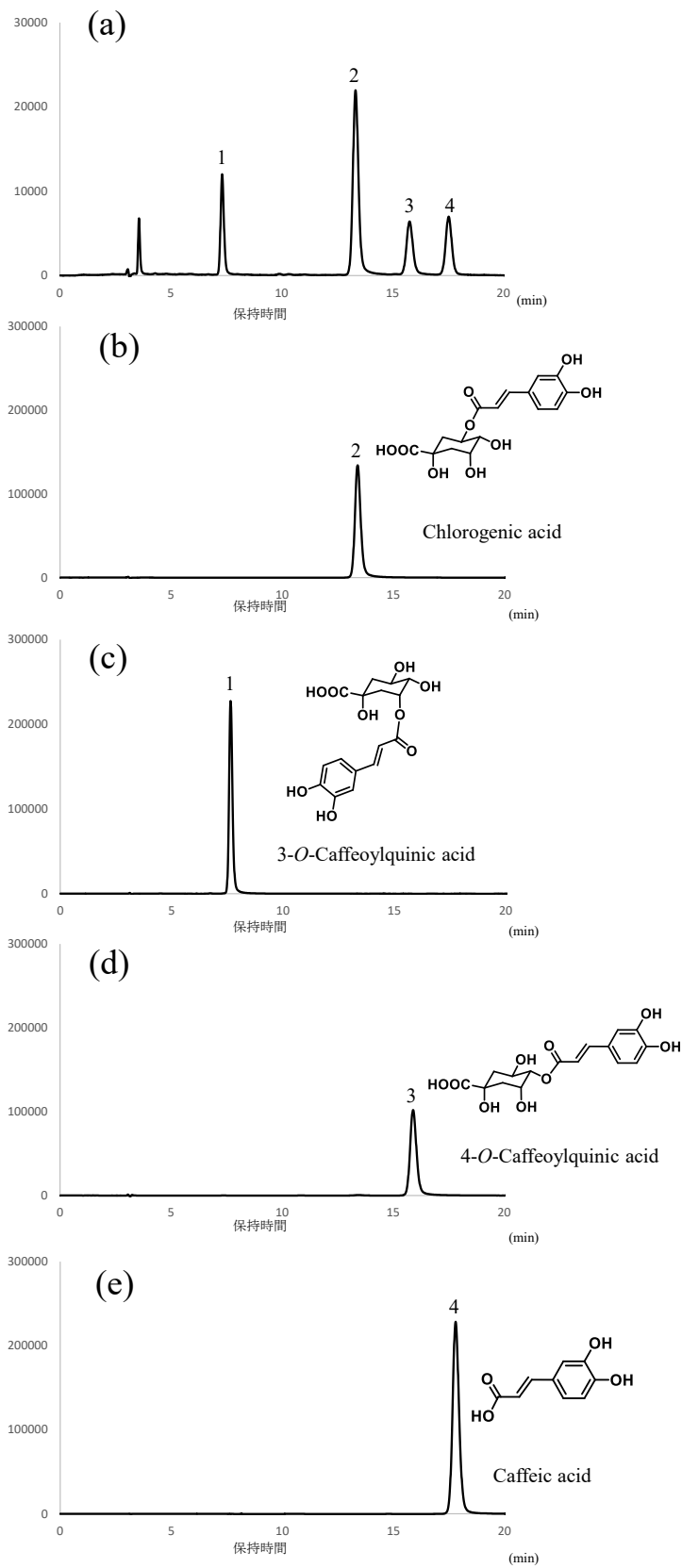


図 15 ヒマワリ種子抽出物 (a), クロロゲン酸 (b), 3-O-カフェオイルキナ酸 (c), 4-O-カフェオイルキナ酸 (d), カフェ酸 (e) のクロマトグラム



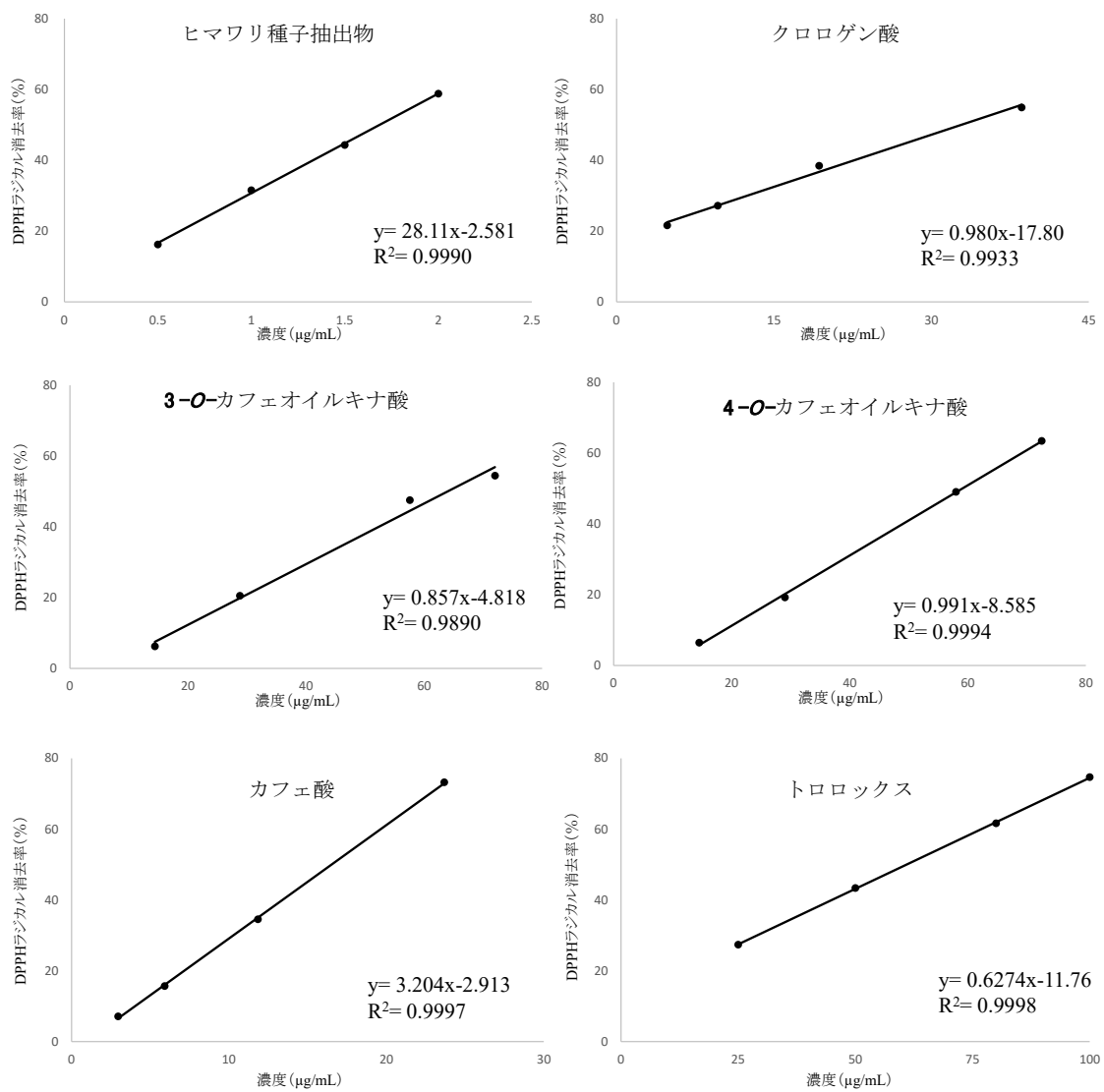


図 16 ヒマワリ種子抽出物および各成分の DPPH ラジカル消去活性

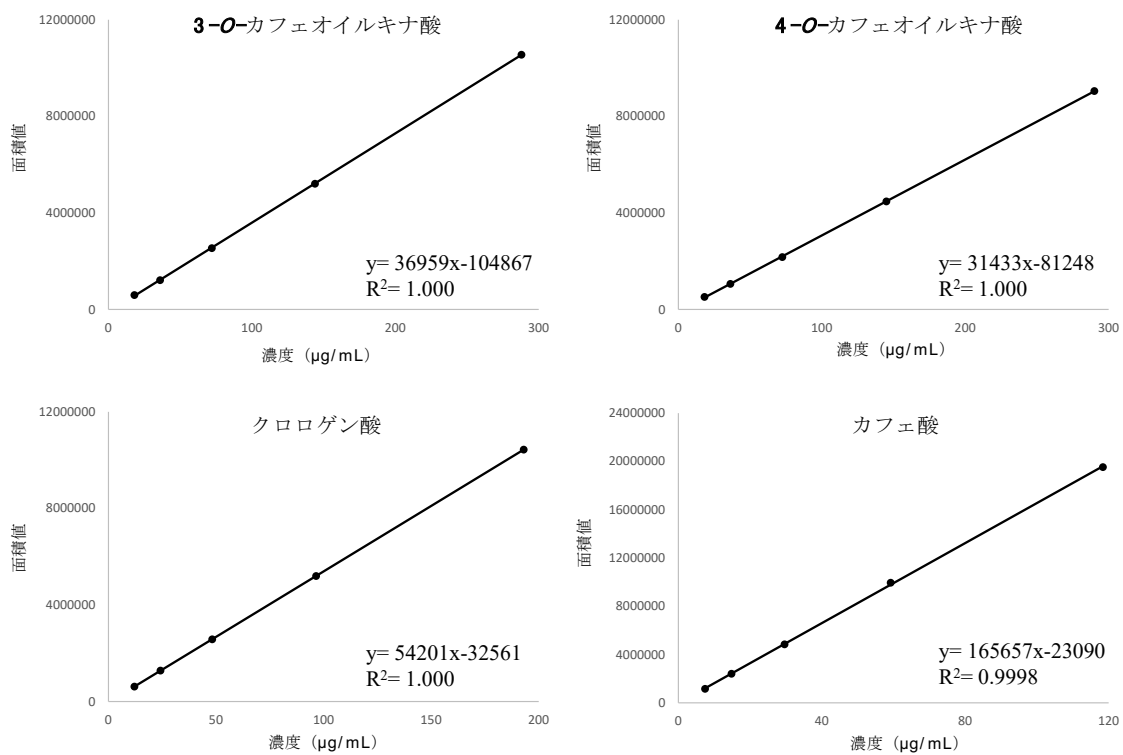


図 17 3-O-カフェオイルキナ酸, 4-O-カフェオイルキナ酸, クロロゲン酸, カフェ酸の代表的な検量線

表 1 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  $^1\text{H}$ -qNMR より算出されたナリンジンおよび  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの各検体の純度 (%)

	メーカー名	検体 1	検体 2	検体 3
ナリンジン	Acros Organics	91.9	92.7	83.7
	シグマ アルドリッチ	90.4	90.7	89.2
	東京化成工業	88.0	88.4	85.7
	富士フイルム 和光純薬	85.1	88.6	89.9
$\alpha$ -モノグルコシル ナリンジン	(単離品)	75.8	65.2	82.5

表 3 各基準物質に対するナリンジン,  $\alpha$ -モノグルコシルナリンジンの RMS

		基準物質			
		MHB	検出波長 274 nm	検出波長 205 nm	ナリンジン
測定対象物質	ナリンジン	1.15	1.91	0.89	-
	$\alpha$ -モノグルコシル ナリンジン	1.24	2.05	0.95	1.07

表4 シングルリファレンス HPLC 法および従来法におけるナリンジンおよび $\alpha$ -モノグルコシルナリンジン含量の比較

(a) 基準物質：MHB

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8

(b) 基準物質：カフェイン（検出波長：274 nm）

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8

(c) 基準物質：カフェイン（検出波長：205 nm）

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	5.0	0.8	4.9	0.8

(d) 基準物質：ナリンジン

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8

表 5 両法における総ナリンゲニン配糖体量の比較

(a) 基準物質：MHB

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8
$\alpha$ -グルコシル残基	5.6	1.4	5.6	1.4
総ナリンゲニン配糖体	12.2	1.1	12.2	1.1

(b) 基準物質：カフェイン（検出波長：274 nm）

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8
$\alpha$ -グルコシル残基	5.6	1.4	5.6	1.4
総ナリンゲニン配糖体	12.2	1.1	12.2	1.1

(c) 基準物質：カフェイン（検出波長：205 nm）

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	5.0	0.8	4.9	0.8
$\alpha$ -グルコシル残基	5.6	1.4	5.6	1.4
総ナリンゲニン配糖体	12.2	1.1	12.2	1.1

(d) 基準物質：ナリンジン

	シングルリファレンス HPLC 法		従来法	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
ナリンジン	1.7	1.2	1.7	1.2
$\alpha$ -モノグルコシルナリンジン	4.9	0.8	4.9	0.8
$\alpha$ -グルコシル残基	5.6	1.4	5.6	1.4
総ナリンゲニン配糖体	12.2	1.1	12.2	1.1

表 6 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 7 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 8 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%)

表 9 ヒマワリ種子抽出物および各成分の DPPH ラジカル消去活性 (n=3)

	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	RSD (%)
3- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	63.5	1.8
4- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	59.0	2.7
クロロゲン酸	32.9	3.2
カフェ酸	16.5	0.1
トロロックス	61.2	1.3
ヒマワリ種子抽出物	1713	1.7

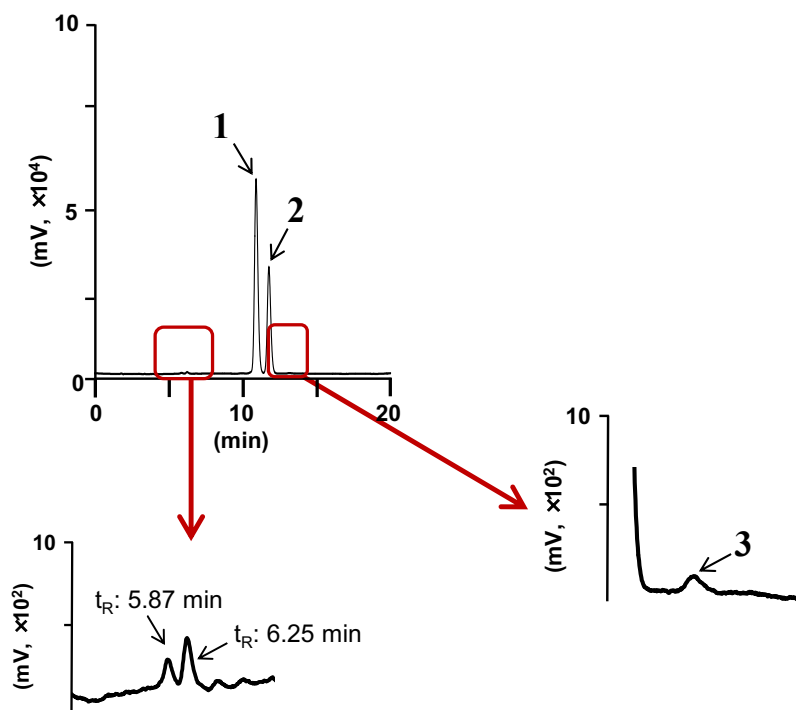
表 10 3-*O*-カフェオイルキナ酸, 4-*O*-カフェオイルキナ酸, クロロゲン酸, カフェ酸の TEAC

	TEAC
3- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	0.96
4- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	1.04
クロロゲン酸	1.86
カフェ酸	3.70

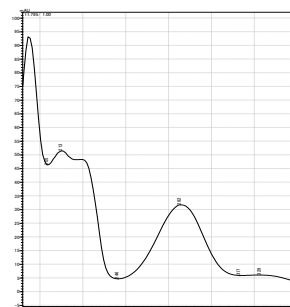
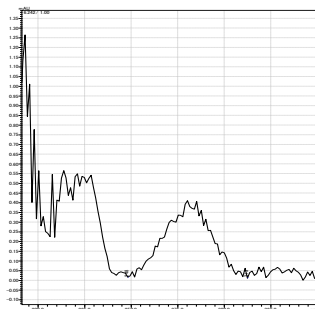
表 11 ヒマワリ種子抽出物に含まれる主要成分の含量 (%) (n=3)

	含量 (%)	RSD (%)
3- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	0.62	1.1
4- <i>O</i> -カフェオイルキナ酸	0.65	0.5
クロロゲン酸	0.79	0.4
カフェ酸	0.09	0.3

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