

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和2年度～令和4年度 総合分担研究報告書

「試験法及び分析法の開発」及び「既存添加物の有効成分の解明」

～外部標準法定量 NMR の自動測定スクリプトの開発及び

ニガヨモギ抽出物と乾留抽出物添加物の成分分析～

研究分担者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官

研究要旨 既存添加物の品質向上に資する研究として、1) 試験法及び分析法の開発及び 2) 既存添加物の有効成分の解明を実施した。

1) 近年、試験に用いる試料や試薬の絶対純度の把握が重要視されていることを考慮し、誰もが簡便に純度測定できる分析法として外部標準法定量NMR（EC-qNMR）が挙げられた。しかしながら、EC-qNMRで正確な純度を算出するためには、qNMR測定の前に90°パルス幅（pw90）を校正する必要があるため、試料が複数ある場合、分析者はNMR装置の前に拘束されることになる。本研究ではこの問題を解消するために、EC-qNMRを完全自動化するスクリプトを開発した。本研究成果は、あらゆる分野における分析結果の信頼性向上が期待される。今後は本スクリプトの社会実装を進める予定である。

2) 天然苦味料であるニガヨモギ抽出物及び乾留抽出物添加物である木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物の成分分析を実施した。ニガヨモギ抽出物に対してLC/MS分析を実施した。ニガヨモギ抽出物は、苦味成分としてabsinthin, anabsin及びanabsinthinを含んでいた。その他の成分としてフラボノイドであるartemetin, またリグナンであるyangambin, epiyangambin, diayangambin, sesartemin, episesartemin A, episesartemin B及びdiasarteminの7成分が確認された。木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物に対してGC/MS分析を実施した。これら乾留物は、原料の熱分解に由来するカルボニル化合物、フラン類、ピラン類、フェノール類及び含窒素化合物を含んでいた。これらの成分について、添加物製品中の含量を算出したところ、最大で0.5%、合算で1～4%程度と微量であった。これらの品目は全て、第9版食品添加物公定書（以下、公定書）に未収載であるため、公的な成分規格の設定が急務となっている。したがって、本研究成果は成分規格を設定に資する根拠データといえる。今後は、本研究成果を添加物事業者と共有し、具体的な成分規格案の作成を進める予定である。

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
加藤菜帆 日本大学
吉村弘伸 日本電子（株）
松熊伸也 日本電子（株）
朝倉克夫 日本電子（株）
末松孝子 日本電子（株）
中島馨 国立医薬品食品衛生研究所
増本直子 国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

1) 近年、試験に用いる試料や試薬の絶対純度の把握が重要視されている。誰もが簡便に絶対純度を算出できる手法として外部標準法定量NMR（EC-qNMR）が挙げられた。しかしながら、EC-qNMRで正確な純度を算出するためには、qNMR測定の前に90°パルス幅（pw90）を校正する必要があるため、試料が複数ある場合、分析者はNMR装置の前に拘束されることになる。この問題を解消するために、本研

究は EC-qNMR 測定を完全自動化するスクリプトを開発することとした。

2) 食品添加物公定書に未収載の既存添加物¹⁾については、成分規格案作成のための根拠データの集積が必要不可欠である。本研究では、ニガヨモギ抽出物及び乾留抽出物添加物である木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物を対象に、LC/MS 及び GC/MS による成分分析を実施することとした。

B. 研究方法

1) 日本電子と共同で自動測定スクリプトを作成し、国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）の3台の NMR 装置（すべて ¹H の共鳴周波数が 600 MHz）にインストールし、動作確認を行った。また、認証標準物質 DSS-d₆（Cat No 044-31671, 92.4%）及びマレイン酸

（MA, Cat No 135-17951, 99.9%）を用いて、自動測定スクリプトで得られる EC-qNMR の定量精度を確認した。

プローブの応答能を示す Q 値は、以下の式 (1) から算出した。

$$Q \text{ value} = S \times pw90 / H / \text{Molar Conc.} \quad (1)$$

S, absolute integral value; pw90, 90° pulse width; H, number of protons; Molar Conc., concentration (mol/L).

2) 日本食品添加物協会を通じて入手したニガヨモギ抽出物、木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物を試料として用いた。LC/MS 分析は、Waters 社製 ACQUITY UPLC-Xevo G2 Qtof を用いて、主要成分の精密質量 MS を明らかにし、成分を同定した。GC/MS 分析は、7890B GC system（アジレント・テクノロジー製）及び JMS-Q1500GC（日本電子製）を用いた。また、定量分析における標準品は、試薬会社から購入したものを使用した。

LC/MS 分析

装置、ACQUITY UPLC H-CLASS（Waters 社製）及び Xevo G2 QToF（Waters 社製）；カラム、ACQUITY UPLC BEH C18（2.1×100 mm, 1.7µm, Waters 社製）；カラム温度、40°C；A

液、10%メタノール水溶液；B液、メタノール；グラジエント、0.0 min（60：40）→20.0 min（60：40）→50 min（30：70）→60 min（0：100）；流速、0.2 mL/min；測定波長、210 nm；注入量、2 µL；ソース温度、120°C；脱溶媒温度、450 °C；脱溶媒ガス流量、800 L/hr；コーンガス流量、50 L/hr；キャピラリー電圧、2.5 kV；コーン電圧、30 V；走査範囲、m/z 100～1000；イオン化モード、ESI（pos.）。GC/MS 分析

装置、7890B GC system（アジレント・テクノロジー製）及び JMS-Q1500GC（JEOL 製）；カラム、DB-5MS（30 m×0.25 mm, 膜厚 0.25 µm, アジレント・テクノロジー製）；昇温条件、30°C（5分間保持）→Δ10°C/min→300°C（5分間保持）；注入口温度、250°C；キャリアーガス、He；流量、1.0 mL/min；スプリット比、20：1；注入量、1 µL；Q-Pole 温度、100°C；イオン源温度、230°C；トランスファーライン温度、250°C；イオン化法、EI；scan モード、m/z 20～400；SIM モード。

C. 結果及び考察

1) pw90 校正は、EC-qNMR を精度よく実施するための重要な手順である。pw90 は、プローブを最適化した状態で実施する必要があり、すなわち、チューニング及びマッチング

（T&M）を実行した後に pw90 を校正する必要がある。一般に pw90 の校正には、緩和時間 T₁ の影響が小さい pw360 付近をアレイ測定し、手動でヌルポイントを探す方法が一般的だが、この方法は、EC-qNMR の完全自動化という本研究の目的から脱線しているため、採用しないこととした。そこで、Kurimoto らが報告したカーブフィッティングによるパルス幅校正法（MUSASHI）を採用することとした²⁾。具体的には、pw90～pw450 をアレイ測定した後、分光計が各パルス幅におけるシグナル強度をプロットし、正弦曲線とのフィッティングを行うことで、自動的に pw90 が校正するようにした。アレイ測定時は、オフレゾナンス効果による正弦曲線の歪みを除去するため、任意のシグナルを照射中心として設定す

る必要がある。理論的には、どのシグナルを照射中心として設定しても、得られる pw90 は同じである。そこで、分光計がアレイ測定時の照射中心を簡単に選択できるようにするため、アレイ測定前に Scout scan (1 スキャンの ^1H 測定) を実行させて、このときに得られるスペクトル上の、最も S/N の大きいシグナルが照射中心となるように、スクリプトを開発することとした。

pw90 校正の際に実行される、Scout scan 及びアレイ測定の両パルスシーケンスについて、測定条件の検討を行うこととした。Scout scan では、 ^1H 核の共鳴周波数領域を網羅できるように、照射中心を 5 ppm、観測幅を 25 ppm (データクリップ後 20 ppm) とした。データポイント数は 16,384 とし、積算回数は 1 回に設定した。これらの測定条件は、オペレーターが変更できない固定のパラメーターとした。また、 ^{13}C デカップリングの有無は、Scout scan の S/N の大きいシグナルを見つけるという目的と関係がなく、また ^{13}C デカップリング時の熱の発生をなくするため、常に OFF となるよう固定した。上記測定条件下での FID 取り込み時間 (AQ) は、400MHz、600MHz 及び 800MHz の装置でそれぞれ 1.64 sec、1.09 sec 及び 0.82 sec である。一部のシグナルでは、FID が減衰しきらないと想定されるため、FID の処理として、窓関数は台形関数のみを適用することとした。

アレイ測定では、照射中心は Scout scan で選択された最も S/N の大きいシグナル、観測幅 1.25 kHz (データクリップ後 1 kHz) とした。データポイント数は 1,024 とし、積算回数は各 1 回に設定した。熱の発生により、アレイ測定後に描かれる正弦曲線が歪む可能性があるため、 ^{13}C デカップリングは常に OFF とした。これらの測定条件は、Scout scan と同様に、固定のパラメーターとした。このときの AQ は、磁場に関係なく 0.82 sec となり、窓関数は Scout scan と同様に、台形関数のみの適用とした。遅延時間や変化させるパルス幅はオペレーターが任意に変更できるように設定した (図 1)。

開発した自動測定スクリプトの動作確認を実施した。pw90 校正の前後両方でチューニングを重複して実行するという不具合が確認されたが、複数の Job メソッドを組み合わせることでこの問題を回避し、適切な測定手順に従った EC-qNMR の完全自動化が可能となった。自動測定スクリプトを利用した際の EC-qNMR の定量精度は、プローブの応答能である DSS- d_6 及び MA の Q 値をモニタリングすることで算出した。装置によっては RSD が 2.5% となる場合もあったが、測定回数を増やし、これらの平均を採用すると、正確な絶対純度が算出できると期待できた。本研究で開発したスクリプトを利用することで、既存添加物の成分規格作成に関する研究業務の迅速化が期待できる。

2) ニガヨモギ抽出物 3 製品について LC/MS 分析を実施したところ、**1**~**11** の主要なピークが観察された(図 2)。これらの PDA スペクトル及び MS スペクトルは試料間で一致した。このことから、成分 **1**~**11** はニガヨモギに共通した成分と考えられた。また、A650 と C2232 の入手年は、それぞれ 2005 年と 2021 年であるが、クロマトパターンに大きな差異がなかったことから、2005 年から現在にかけて、ニガヨモギ抽出物の基原・製法・本質は変わっていないが支持された。

LC/MS 分析で得られた m/z の値から成分 **1**~**11** の同定を試みた。

成分 **1** は m/z 519.2721 を与えた。元素組成分析の結果、分子式として $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{Na}$ が考えられ、観測された m/z は absinthin $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6$ の $[\text{M}+\text{Na}]^+$ に相当する分子イオンと考えられた。別に absinthin 標品を用いて、保持時間、PDA スペクトル及び MS スペクトルの比較を行ったところ、すべて一致し、成分 **1** を absinthin と同定した。

成分 **2** は m/z 535.2667 を与えた。元素組成分析の結果、分子式として $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}$ が考えられた。観測された m/z は anabsin $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_7$ の $[\text{M}+\text{Na}]^+$ に相当する分子イオンと考えられた。

成分 **3** は m/z 519.2721 を与えた。元素組成分

析の結果、分子式として $C_{30}H_{40}O_6Na$ が考えられた。観測された m/z は anabsinthin $C_{30}H_{40}O_6$ の $[M+Na]^+$ に相当する分子イオンと考えられた。

成分 4~6 はいずれも m/z 469.1821 を与えた。分子式として $C_{24}H_{30}O_8Na$ 、また互いに異性体と考えられたことから、観測された m/z は $C_{24}H_{30}O_8$ の $[M+Na]^+$ に相当する分子イオン、すなわち、yangambin, epiyangambin 及び diayangambin と考えられた。

成分 7~10 は m/z 453.1529 を与えた。分子式として $C_{23}H_{26}O_8Na$ 、また互いに異性体と考えられたことから、観測された m/z は $C_{23}H_{26}O_8$ の $[M+Na]^+$ に相当する分子イオン、すなわち sesartemin, episesartemin A, episesartemin B 及び diasesartemin と考えられた。このうち、Sesartemin はニガヨモギから単離された報告があり³⁾、すべての成分がニガヨモギ属で報告されている⁴⁾。

成分 11 は m/z 411.1055 を与えた。元素組成分析の結果、分子式として $C_{20}H_{21}O_8$ が考えられ、観測された m/z は artemetin $C_{20}H_{20}O_8$ の $[M+H]^+$ に相当する分子イオンと考えられた。別に、この成分を単離・精製して NMR に付したところ、artemetin に由来する 1H シグナルを確認できたことから、成分 11 を artemetin と同定した。

以上の同定及び推定の結果から、ニガヨモギ抽出物はセスキテルペンラクトンである absinthin, anabsin 及び anabsinthin を含んでおり、これらが本抽出物の本質、すなわち苦味成分であり、成分規格試験の指標成分として有用と考えられた。その他の成分としてはフラボノイドである artemetin, またリグナンである yangambin, epiyangambin, diayangambin, sesartemin, episesartemin A, episesartemin B 及び diasesartemin の 7 成分が確認された (図 3)。

標品が市販されている苦味成分 absinthin を本抽出物の指標成分として、HPLC 分析及び TLC 分析を検討した。HPLC 分析では、absinthin の絶対検量線が良好な直線性を示すことから、成分規格試験の定量法及び確認試験としての運用が期待できたが、別に absinthin

標品の規格化が必要であり、その際、absinthin 標品の価格や絶対純度について考慮する必要があった。TLC 分析では順相条件及び逆相条件について検討した。両条件とも absinthin の濃度に比例した明瞭なスポットが確認できたことから、標品を用いずとも Rf 値を規定することにより、absinthin の確認試験を設定できると考えられた (図 4)。本研究成果をもとにニガヨモギ抽出物の成分規格試験の作成を進めていくこととした。

乾留抽出物添加物について GC/MS による成分分析を実施したところ、クロマトグラム上に多数のピークが観察された。これらの MS スペクトルについて、NIST ライブラリと照合した結果、原料の熱分解に由来するカルボニル化合物、フラン類、ピラン類、フェノール類及び含窒素化合物の存在が示唆された。これら熱分解物の標準品を用意し (表 1)、保持時間及び MS スペクトルの一致を確認し、同定を行った。同定した 36 化合物について、SIM 測定による定量分析を行うこととした。SIM 測定では測定対象の数が多いため、2 つの MS メソッドを用意した (method-A 及び B) (図 5)。1 ピークあたりのポイント数を確保するため、定量イオンのみをモニタリングすることとした (表 1)。標準液各 5 濃度の検量線は、二次曲線で作成した。次に添加物試料 6 製品を測定し、得られた SIM スペクトルのピーク面積から定量を行った。定量結果を表 2 に示した。表中 ND は、SIM でピークが認められなかったもの、under は検量線の範囲外 (濃度レベル 10 以下) を表す。含量は最大で 0.5% 程度 (TD1 中のカフェイン)、合算で 1~4% 程度と微量であった。

D. 結論

既存添加物の品質向上を念頭に、分析法の開発として、EC-qNMR 自動測定スクリプトの開発に取り組んだ。既存添加物で扱う成分は希少なものが多く、これらの試薬又は標品は一般的に高価である。EC-qNMR の場合、その試料液は、純度測定の基準となる内部標準物質の添加による汚染もなく、純度又は含量測

定後、濃度既知の標準液として検量線の作成に利用できるのも魅力的である。今後は、EC-qNMRの社会実装に取り組んでいく予定である。

既存添加物の有効成分の解明として、食品添加物公定書未収載の既存添加物：ニガヨモギ抽出物、木酢液、チャ乾留物、モウソウチク乾留物を対象に、LC/MSやGC/MSによる成分分析を実施した。いずれも国内で流通している添加物製品を試料として用いていることから、本研究成果は、これらの成分規格案を作成する際の有益な根拠データとなる。今後は添加物事業者と協議して、具体的な成分規格案の作成を進めていく。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第120号(1996)“既存添加物名簿”平成8年4月16日
- 2) Kurimoto T, Asakura K, Yamasaki C, Nemoto N: MUSASHI: NMR Pulse Width Determination Method by Nonlinear Least Square Curve Fitting. *Chem. Lett.* 2005; 34, 540–541.
- 3) Tulake, A., Jiang, Y., Tu, PF. Nine lignans from *Artemisia absinthium* L. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 360–363 (2012).
- 4) Ickovski, J.D., Pavlović, J.Lj. Mitić, M.N., Palić, I.R., Kostić, D.A., Petrović, G.M., Stojanović, G.S. Furofuran lignans of *Artemisia* genus: Isolation, biosynthesis and biological activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 85(5), 575–600 (2020).

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 西崎雄三，石附京子，増本直子，杉本直樹，佐藤恭子：精油除去ウイキョウ抽出物の成分規格作成に向けた基礎的検討。日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表)
- 2) 中島馨，増本直子，西崎雄三，石附京子，杉本直樹，佐藤恭子：既存添加物「カラシ

抽出物」および「セイヨウワサビ抽出物」に含まれるイソチオシアン酸アシル定量法の改良。日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表)

- 3) 西崎雄三，石附京子，中島馨，増本直子，末松孝子，杉本直樹，佐藤恭子：¹³C-CP/MASを用いた食品添加物キトサンの脱アセチル化度の測定。第2回日本定量NMR研究会年会(2020.12.4)(神奈川)
- 4) 石附京子，建部千絵，西崎雄三，窪崎敦隆，多田敦子，杉本直樹，佐藤恭子：外部標準法qNMRの自動化スクリプトの作成。第2回日本定量NMR研究会年会(2020.12.4)(神奈川)
- 5) 高橋未来，高木映里，西崎雄三，杉本直樹，佐藤恭子，井之上浩一：シングルリファレンスHPLCによるクルクミン類の定量法の検討。第2回日本定量NMR研究会年会(2020.12.4)(神奈川)
- 6) 西崎雄三，石附京子，杉本直樹，佐藤恭子：食品添加物中の窒素定量分析~燃烧法vsケルダール法~。食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web))。
- 7) 建部千絵，藤原由美子，長久保直也，増本直子，西崎雄三，石附京子，久保田浩樹，杉本直樹，多田敦子，佐藤恭子：相対モル感度を用いた食用タール色素中の6,6'-オキシビス(2-ナフトレンスルホン酸)二ナトリウムの定量法の検討。食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web))。
- 8) 高木映里，高橋未来，増本直子，西崎雄三，杉本直樹，佐藤恭子，井之上浩一：高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析。食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web))。
- 9) 日置冬子，多田敦子，西崎雄三，古庄紀子，石附京子，久保田浩樹，建部千絵，杉本直樹，佐藤恭子：食品添加物ジフェノコナゾールの規格試験法の検討及び異性体組成分析。食品化学学会第27回総会・学術大会(2021.6.10)(川崎市(Web))。
- 10) 長井理夏子，内倉崇，好村守生，増本直子，西崎雄三，杉本直樹，佐藤恭子，天倉吉章：既存添加物ショウガ抽出物の成分解析。第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日

本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
(2021.10.23-24)(松山市).

- 11) 加藤菜帆, 西崎雄三, 増本直子, 石附京子, 中島馨, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子, 天然苦味料ニガヨモギ抽出物の成分規格作成を目的とした基礎的検討, 日本食品化学会 第28回総会・学術大会, 2022年5月19日
 - 12) 西崎雄三, 建部千絵, 石附京子, 増本直子, 吉田久美, 杉本直樹, 佐藤恭子, 外部標準法定量NMR (EC-qNMR) によるアントシアニンの純度測定, 日本食品化学会 第28回総会・学術大会, 2022年5月19日
 - 13) 中島馨, 増本直子, 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: りんごに含まれるクロロゲン酸類の相対モル感度を用いた定量法の確立. 本食品化学会 第28回総会・学術大会, 2022年5月19日
 - 14) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹: 既存添加物: 乾留抽出物製品のPAHs定量分析法の開発と実態調査. 第59回全国衛生化学技術協議会年会 (2022.10.31) (川崎市)
 - 15) 西崎雄三, 石附京子, 吉村弘伸, 松熊伸也, 朝倉克夫, 末松孝子, 杉本直樹: Q値を指標にした外部標準法定量NMR(EC-qNMR)の測定自動化とその定量精度について. 第61回NMR討論会(2022.11.8) (高知市)
 - 16) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 乾留抽出により得られる既存添加物の成分比較 (木酢液・チャ乾留物・モウソウチク乾留物). 日本食品衛生学会第118回学術講演会 (2022.11.11) (長崎市)
 - 17) 都築明日香, 西崎雄三, 増本直子, 鈴木俊宏, 兎川忠晴, 杉本直樹: 外部標準法定量NMR (EC-qNMR): 試料間でレシーバーゲインが異なるときの補正について. 第4回日本定量NMR研究会年会 (2022.12.16) (東京)
 - 18) 吉成知也, 関根葵, 小林直樹, 西崎雄三, 杉本直樹, 工藤由起子, 渡辺麻衣子: MALDI-ToF MSを用いた既存添加物酵素の基原生物の同定手法に関する研究. 日本農芸化学会2023年度大会 (2023.3) (オンライン開催)
2. 論文発表等
 - 2-1. 原著論文
 - 1) Nishizaki Y, Ishizuki K, Masumoto N, Tada A, Sugimoto N, Sato K: HPLC determination of quercetin using relative molar sensitivity to methylparaben as a single reference. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 2020; 27(2): 42-52.
 - 2) Miura T, Sugimoto N, Bhavaraju S, Yamazaki T, Nishizaki Y, Liu Y, Bzhelyansky A, Amezcua C, Ray J, Zailer E, Diehl B, Gallo V, Todisco S, Ofuji K, Fujita K, Higano T, Geletneky C, Hausler T, Singh N, Yamamoto K, Kato T, Sawa R, Watanabe R, Iwamoto Y, Goda Y: Collaborative study to validate purity determination by ¹H quantitative NMR spectroscopy by using internal calibration methodology. *Chem. Pharm. Bull.*, 2020; 68(9):868-878.
 - 3) Ohtsuki T, Matsuoka K, Fujii Y, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Matsufuji H: Development of an HPLC method with relative molar sensitivity based on ¹H-qNMR to determine acteoside and pedalin in dried sesame leaf powders and processed foods. *PLoS ONE.*, 2020; e0243175:1-12.
 - 4) 酒井有希, 増本直子, 西崎雄三, 大槻崇, 松藤寛, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度を用いた single-reference HPLC法が定量値に影響を及ぼす要因の検討と機能性表示食品中のルテイン定量への応用. *日本食品化学学会誌*, 2020; 27(3): 123-134.
 - 5) 西崎雄三, 石附京子, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 既存添加物である精油除去ウイキョウ抽出物中に含まれる主成分の抗酸化能評価. *日本食品化学学会誌*, 2020; 27(3): 164-172.
 - 6) Masumoto N, Ishizuki K, Nishizaki Y, Ohtsuki T, Kuroe M, Yamazaki T, Numata M, Matsufuji H, Sugimoto N, Sato K: Determination of mogroside V in luohanguo extract for daily quality control operation

- using relative molar sensitivity to single-reference caffeine. *Chem. Pharm. Bull.*, 2021; 69(1):18-25.
- 7) Nishizaki Y, Lankin D, Chen SN, Pauli G: Accurate and precise external calibration enhances the versatility of quantitative NMR (qNMR). *Anal. Chem.*, 2021; 93(5):2733-2741.
- 8) Kuroe M, Numata M, Masumoto N, Nishizaki Y, Sugimoto N, Itoh N: Use of relative molar sensitivity as a specific value for evaluating heptaoxyethylene dodecyl ether concentrations in methanol solution. *Anal. Chem.*, 2021; 37: 917-919.
- 9) Takahashi M, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Quantification of tea-derived catechins without the requirement for respective calibration curves by single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *J. Sci. Food Agric.*, 2020; DOI 10.1002/jsfa.11013
- 10) 増本直子, 西崎雄三, 中島馨, 杉本直樹, 佐藤恭子: 相対モル感度に基づくシングルリファレンス GC 法及び HPLC 法によるカラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物中のイソチオシアン酸アリルの定量. *食衛誌*, 2021; 62(3): 73-78.
- 11) Takahashi M, Morimoto K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Study on the synthesis of methylated reference and their application in the quantity of curcuminoids using single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *Chem. Pharm. Bull.*, 2022; 70(1): 25-31.
- 2-2. 総説
- 1) 西崎雄三: qNMR に基づく相対モル感度を利用したクロマトグラフィーによる定量分析. *日本食品衛生学雑誌*, 2022 6 月;63(3), J51-J53.
- 2) 西崎雄三: 外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ. *ぶんせき*, 2022 12 月;12, 498-503.
- 2-3. 単行本
- 1) Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: "Comprehensive Natural Products III", Volume 7; New Methods in Natural Products Chemistry, 7.04 Application of ¹H-quantitative NMR From the Viewpoint of Regulatory Science, Elsevier. Netherland, pp.50-60 (2020).
- G. 知的財産権の出願. 登録状況
なし

return_data_to_screen	<input checked="" type="checkbox"/>
filename_part2	qh
calculate_proton_90	<input checked="" type="checkbox"/>
start90	1.1[us]
end90	42[us]
step90	4.5[us]
calc90_relax_delay	10[s]
force_tune	<input checked="" type="checkbox"/>
autogain	<input type="checkbox"/>
receiver_gain	30
scans	8
dummy_scans	4
x_angle	90[deg]
x_offset	5[ppm]
x_sweep	20[ppm]
data_points	65536
relaxation_delay	30[s]
inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>
decoupling	<input checked="" type="checkbox"/>
decoupler_offset	70[ppm]
decoupler_modulation	MPF8
spinner_frequency	15[Hz]
spinner_state	SPIN OFF
turn_off_spin	<input checked="" type="checkbox"/>

図 1 開発したスクリプトで編集できる測定条件

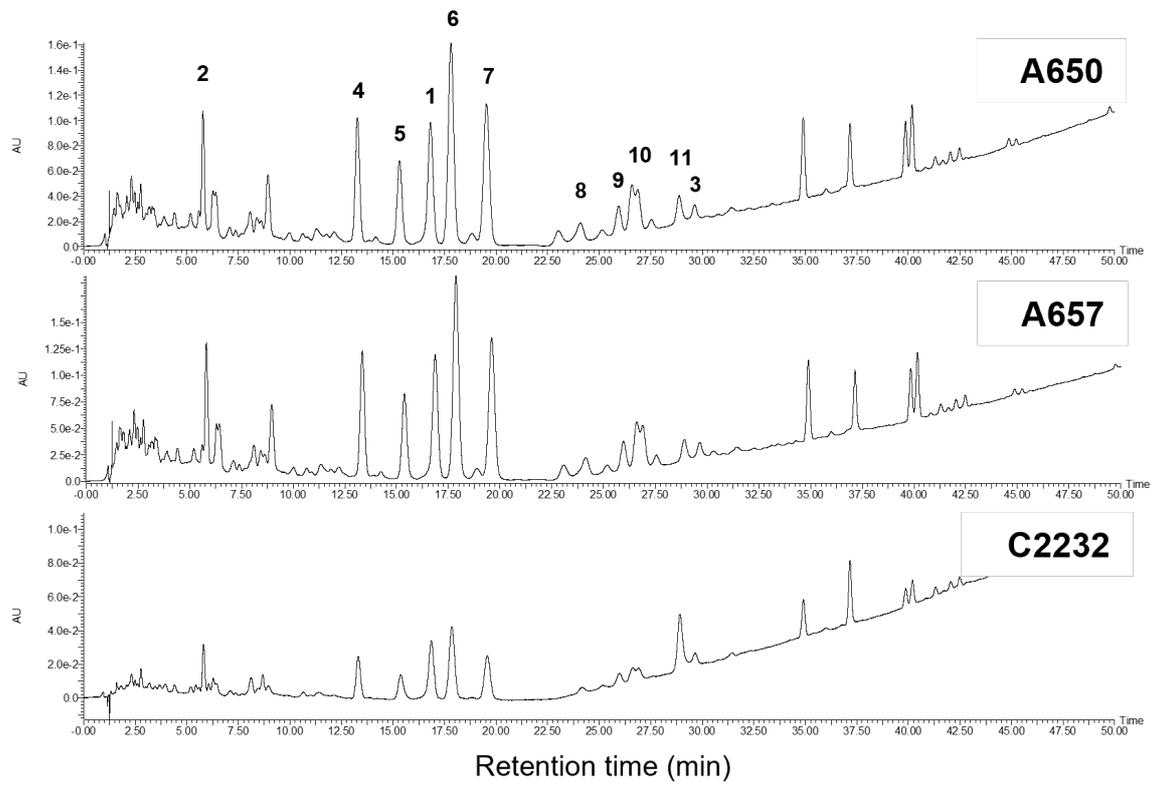


図2 ニガヨモギ抽出物 HPLC クロマトグラム (210 nm)

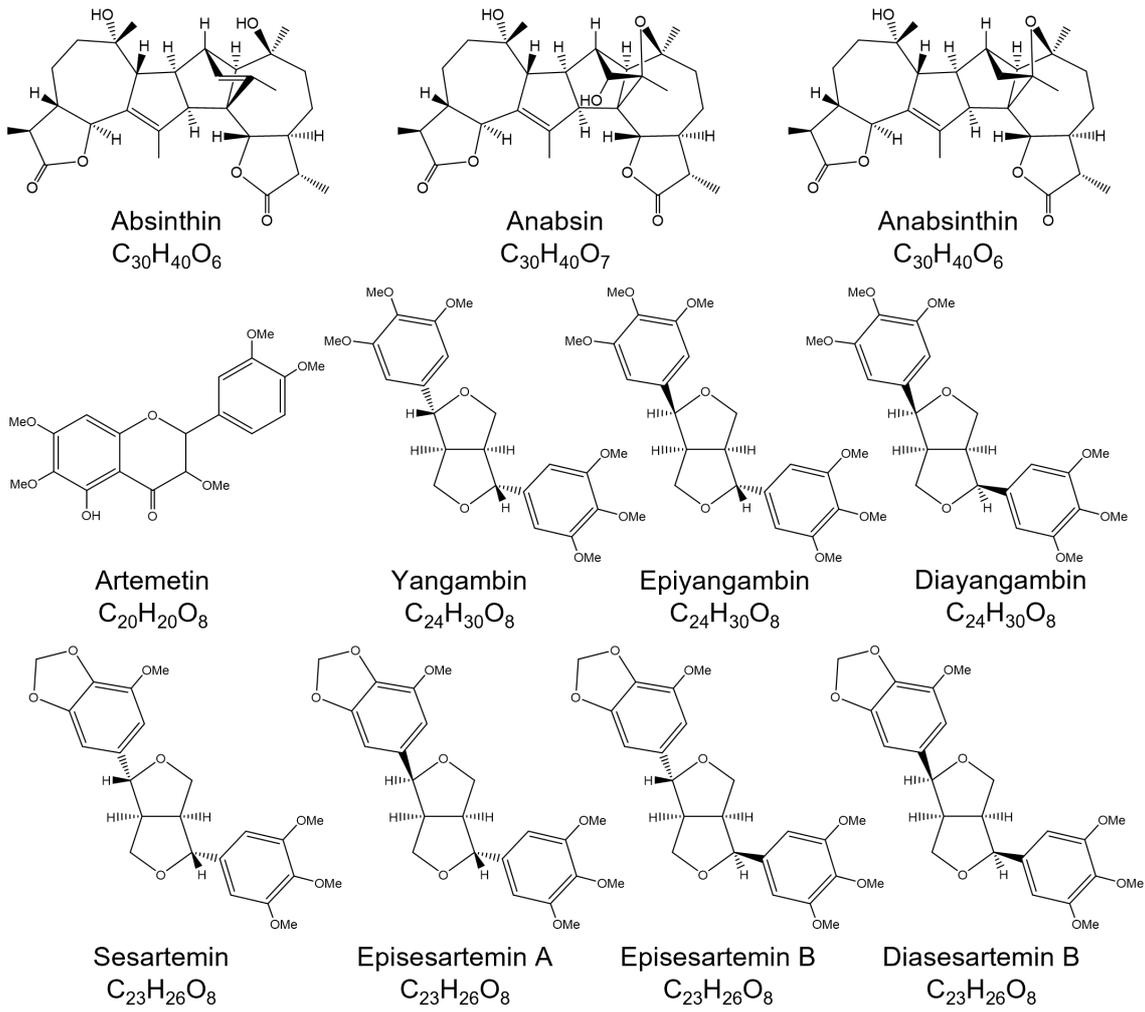


図3 ニガヨモギ抽出物中の主要成分

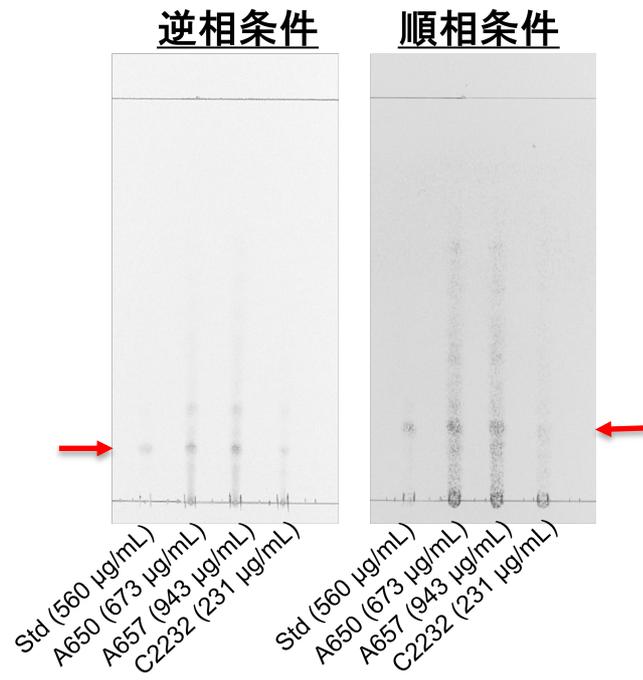
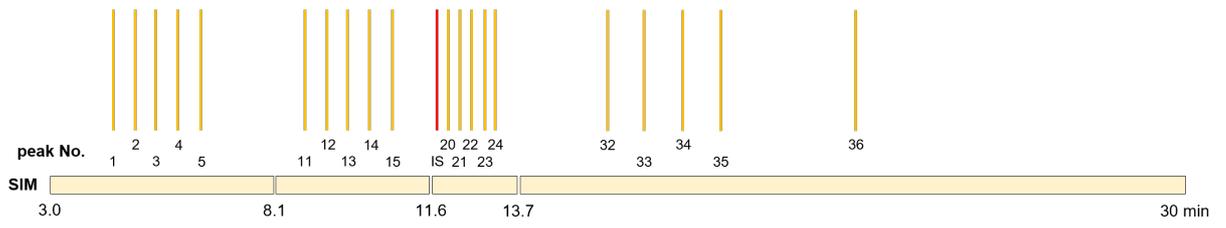


図4 逆相及び順相条件による absinthin の TLC 分析結果
逆相条件は Rf 値 0.14, 順相条件では Rf 値 0.19 に absinthin のスポットが確認された。試料に記載された濃度 ($\mu\text{g/mL}$) は absinthin の濃度。

method-A



method-B

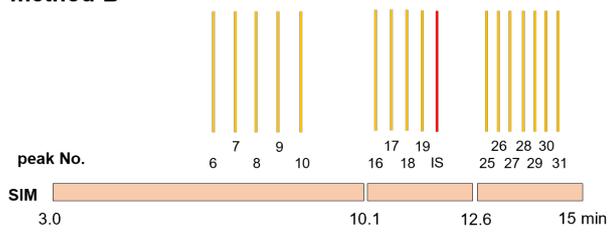


図 5. SIM測定メソッドの概略図

表1 本研究で用いた標準品の詳細

peak no.	化合物名	CAS No.	分子量	定量イオン	Rt (min)	当部管理番号	製品番号
1	ヒドロキシアセトン	[116-09-6]	74	74	3.46	22100041	SIGMA 138185
2	プロピオン酸	[79-09-4]	74	74	4.31	2T B	Wako 163-04726
3	アセトイン	[513-86-0]	88	88	4.49	2T 2LW	TCI H0225
4	プロピオン酸エチル	[105-37-3]	102	102	4.59	2T 23M	Wako 057-01693
5	シクロペンタノン	[120-92-3]	84	84	7.08	32000293	SIGMA C112402
6	<i>n</i> -酪酸	[107-92-6]	88	60	7.30	32000086	Wako 029-05393
7	酪酸エチル	[105-54-4]	116	71	7.48	2T 23N	Wako 052-00663
8	フルフラール	[98-01-1]	96	96	8.25	22100042	TCI F0073
9	2-シクロペンテン-1-オン	[930-30-3]	82	82	8.26	22100043	TCI C0794
10	フルフリルアルコール	[98-00-0]	98	98	8.88	2T 2E7	カライ 16426-92
11	アセトキシアセトン	[592-20-1]	116	43	9.22	22100044	Wako/Combi-Blocks QE-3101
12	2-フリルメチルケトン	[1192-62-7]	110	95	10.16	22100045	SIGMA A16254
13	γ -ブチロラクトン	[96-48-0]	86	86	10.16	22100046	SIGMA B103608
14	アセトニルアセトン	[110-13-4]	114	99	10.55	22100047	TCI H0101
15	γ -バレロラクトン	[108-29-2]	100	56	11.05	22100048	TCI V0007
16	5-メチルフルフラール	[620-02-0]	110	110	11.27	22100049	SIGMA 137316
17	3-メチル-2(5H)-フラノン	[22122-36-7]	98	98	11.48	22100050	SIGMA 393509
18	2-焦性粘液酸メチル	[611-13-2]	126	126	11.54	22100051	SIGMA 129852
19	フェノール	[108-95-2]	94	94	11.62	04-58b	Wako 167-01022
20	ピロール-2-カルボキシア ルデヒド	[1003-29-8]	95	95	12.28	00-42a	TCI P1246
21	3-メチル-1,2-シクロペン タンジオン	[765-70-8]	112	112	12.49	22100052	SIGMA 178500
22	ベンジルアルコール	[100-51-6]	108	108	12.70	2T 2E0	カライ 04521-02
23	1-エチル-1H-ピロール-2-カ ルボキシア ルデヒド	[2167-14-8]	123	123	12.95	22100054	TCI E1416
24	<i>o</i> -クレゾール	[95-48-7]	108	108	12.99	32000310	TCI C0402
25	2-アセチルピロール	[1072-83-9]	109	109	13.20	22100055	TCI A0894
26	<i>m</i> -クレゾール	[108-39-4]	108	108	13.36	32000309	TCI C0401
27	2-フルアルデヒドジエチルア セタール	[13529-27-6]	170	125	13.38	22100056	TCI F0929
28	<i>o</i> -メトキシフェノール	[90-05-1]	124	124	13.60	04-60b	Wako 133-08302

表1 (続き) 本研究で用いた標準品の詳細

peak no.	化合物名	CAS No.	分子量	定量イオン	Rt (min)	当部管理番号	製品番号
29	3-ヒドロキシピリジン	[109-00-2]	95	95	13.80	05-89a	TCI H0331
30	マルトール	[118-71-8]	126	126	13.99	22-36c	ナコシ (取扱中止) SSX 6555
31	3-エチル-2-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン	[21835-01-8]	126	126	14.10	22100057	TCI E0792
32	<i>o</i> -エチルフェノール	[90-00-6]	122	122	14.39	32000101	TCI E0160
33	<i>p</i> -エチルフェノール	[123-07-9]	122	122	14.87	32000116	TCI E0159
34	2-メトキシ-4-メチルフェノール	[93-51-6]	138	138	15.29	22100058	SIGMA 302880
35	2-メトキシ-4-エチルフェノール	[2785-89-9]	152	152	16.56	22100059	TCI E0353
36	カフェイン	[58-08-2]	194	194	23.52	24-08c	SIGMA 56396
IS	デカン	[124-18-5]	142	142	12.09	04-42b	Wako 043-24992

表 2 GC/MS による添加物製剤中における原料熱分解物の含量

peak no.	化合物名	TD1		TD2		MD1		MD2		WV1		WV2	
		含量 (%)	RSD (%)										
1	ヒドロキシアセトン	0.17	1.70	0.05	1.87	0.44	2.03	0.71	4.79	0.60	1.85	0.87	1.70
2	プロピオン酸	0.06	4.50	0.01	4.70	0.12	2.49	0.62	4.11	0.47	4.28	0.58	2.70
3	アセトイン	0.04	1.88	0.00	8.65	0.04	1.76	0.05	2.57	0.06	0.42	0.04	1.63
4	プロピオン酸エチル	ND		ND		0.12	13.58	ND		ND		ND	
5	シクロペンタノン	ND		ND		0.02	3.08	0.02	2.29	ND		ND	
6	n-酪酸	ND		ND		0.02	2.62	0.09	0.59	0.10	1.47	0.14	1.90
7	酪酸エチル	ND		ND		0.02	3.09	ND		ND		ND	
8	フルフラール	0.12	1.16	0.01	2.17	0.24	0.41	0.11	1.54	0.01	3.75	0.01	6.25
9	2-シクロペンテン-1-オール	ND		ND		0.02	1.41	0.06	4.58	0.07	0.61	0.07	3.18
10	フルフリルアルコール	0.06	2.65	0.02	4.10	ND		ND		ND		ND	
11	アセトキシアセトン	0.02	1.59	under		under		0.04	2.93	0.01	0.90	0.01	1.88
12	2-フリルメチルケトン	0.01	5.11	under		0.02	8.30	0.06	4.64	0.02	1.38	0.03	2.81
13	γ-ブチロラクトン	0.03	5.23	0.01	2.23	0.02	2.79	0.36	1.17	0.19	3.53	0.27	3.40
14	アセトニルアセトン	ND		ND		under		0.02	2.34	0.03	1.85	0.03	2.99
15	γ-バレロラクトン	ND		ND		ND		0.01	2.57	0.02	3.01	0.03	1.07
16	5-メチルフルフラール	0.03	7.84	under		0.01	3.64	0.01	6.92	0.01	3.84	0.01	3.85
17	3-メチル-2(5H)-フラン	under		ND		under		0.05	6.96	0.04	4.12	0.06	9.47
18	2-無性粘液酸メチル	0.01	8.15	under		0.01	4.28	0.02	9.57	under		under	
19	フェノール	0.01	11.02	under		0.04	7.43	0.21	4.02	0.09	3.52	0.11	2.95
20	ピロール-2-カルボキシアルデヒド	0.02	2.24	under		ND		ND		ND		ND	
21	3-メチル-1,2-シクロペンタジオン	0.01	2.66	ND		0.01	3.32	0.25	6.01	0.09	7.69	0.12	6.05
22	ベンジルアルコール	0.01	3.34	under		ND		ND		ND		ND	
23	1-エチル-1H-ピロール-2-カルボキシアルデヒド	0.01	5.06	under		ND		ND		ND		ND	
24	o-クレゾール	ND		ND		0.01	5.92	0.02	5.73	0.02	2.32	0.03	5.23
25	2-アセチルピロール	0.02	10.35	0.01	6.36	ND		ND		ND		ND	
26	m-クレゾール	ND		ND		0.01	5.49	0.06	11.07	0.03	6.39	0.05	11.39
27	2-フルアルデヒドジエチルアセタール	ND		ND		under		ND		ND		ND	
28	o-メトキシフェノール	under		under		0.08	9.15	0.31	4.65	0.15	3.66	0.21	3.48

表 2 (続き) GC/MS による添加物製品中における原料熱分解物の含量

peak no.	化合物名	TDD1		TD2		MD1		MD2		WV1		WV2	
		含量 (%)	RSD (%)										
29	3-ヒドロキシピリジン	0.06	3.28	ND									
30	マルトール	0.03	4.46	0.01	8.39	ND		0.18	3.43	0.02	4.62	0.04	7.47
31	3-エチル-2-ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン	ND		ND		ND		0.13	1.98	0.02	2.85	0.03	7.34
32	<i>o</i> -エチルフェノール	ND		ND		under		0.00	3.86	under		under	
33	<i>p</i> -エチルフェノール	under		ND		0.01	4.49	0.10	9.50	0.01	3.13	0.01	3.71
34	2-メトキシ-4-メチルフェノール	under		ND		0.01	7.23	0.12	4.67	0.05	1.31	0.08	4.29
35	2-メトキシ-4-エチルフェノール	under		under		0.01	10.67	0.10	9.97	0.01	6.76	0.01	5.80
36	カフェイン	0.47	22.89	0.13	3.60	ND		ND		ND		ND	
	合計	1.19		0.25		1.25		3.70		2.13		2.83	