

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、 ^1H -qNMR法(定量 ^1H -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。令和4年度も引き続き「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討とした。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、令和4年度はその中からコショウ種子、オールスパイス種子、フェネル、バニラ、ケイヒ、ローズマリーをピックアップしそれぞれ ^1H -qNMR法での定量が可能かの検討を行った。コショウ種子ではpiperine, オールスパイスではeugenol, フェネルではanethole, バニラではvanilline, ethylvanillin, ケイヒではcinnamaldehyde, ローズマリーではrosemarinic acidを指標成分に ^1H -qNMR法を用いた定量の検討を行い、それぞれの含有率の定量が ^1H -qNMR法で可能であることを示した。この時、同じ成分が指標成分となる類似生薬についても検討を行い、piperineを含むヒハツ、anetholeを含むダイウイキョウとアニスでもそれぞれの含有率の定量が ^1H -qNMR法で可能であることを示した。また、ケイヒ以外では既存のHPLC法との同等性を確認できた。一方、ケイヒの精油成分cinnamaldehydeの定量において、HPLCでのクロマトグラムが安定せず、その要因の検討を行った。Methanolとcinnamaldehydeを共存させておくとcinnamaldehydeのアルデヒド基のシグナル強度が経時的に減少し、Methanolが反応してアセタールが生成することを示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

^1H -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 ^1H -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4年度も引き続き既存添加物である「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。規格基準を決めるには素材ごとに基準物質を定めて基準の策定をしていく必要がある。特に、基準物質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、正確な純度を得にくいいため、その正確な純度を得るには ^1H -qNMR法が適していると考えられる。

令和2年度はコショウについて、piperine (Fig. 1)の ^1H -qNMR法での定量の検討と、従来法であるHPLC法と同等の結果が得られるかについての検討を行なった。あわせて、同じくpiperineを特徴的な成分として含有するヒハツの種子中のpiperineの定量も検討した。さらに、オールスパイス中のeugenol (Fig. 2)についても ^1H -

qNMR法を適用した定量が可能であることを示すことを目的として、同様に研究を進めることとした。

令和3年度はその中から香辛料抽出物以外にもローズマリーとして既存添加物名簿に名前が上がっているローズマリーをピックアップし、rosmarinic acid (Fig. 3)が主要成分となると考えて、ローズマリーの葉に含まれる rosmarinic acid の定量方法の検討をおこなった。また、精油成分の含有量が要点となる素材のうち、既存添加物ではシナモンとして収載され、生薬としても重要なケイヒでは cinnamaldehyde (Fig. 4)が指標成分になりうると考え、この cinnamaldehyde の ¹H-qNMR 法を適用した定量方法に関しての検討を行なった。このときあわせて行った cinnamaldehyde の HPLC での定量で結果にばらつきが大きいという状況が観察された。その要因が溶液中でのアルデヒド基に対する反応が起こっているのではないかと推定し、安定性についての確認も行った。

令和4年度はフェンネルとバニラに着目した。フェンネルでは, anethole (Fig. 5)が主要成分となると考えて、生薬ウイキョウ中の anethole の定量方法の検討をおこなった。あわせて anethole が主要な精油成分になると考えられる類似生薬のダイウイキョウとアニスについても検討した。また、バニラでは vanilline 及び ethylvanilline (Fig. 6)が指標成分になりうると考え、生薬バニラに含有されるこの2つの化合物の定量方法に関しての検討を行なった。あわせて食品添加物として販売されているバニラオイル、バニラエッセンスについても vanilline 及び ethylvanilline の定量を行った。

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. 7)及び 1,4-bis(trimethylsilyl)-benzene-*d*₄ (BTMSB-*d*₄, Fig. 7)はいずれも和光純薬の Trace Sure®規格のものを用いた。NMR 測定用溶媒の acetone-*d*₆, acetonitril-*d*₃, dimethylsulfoxide (DMSO)-*d*₆, methanol-*d*₄,

pyridine-*d*₅はそれぞれ Isotec Inc.の 99.9, 99.0, 99.9, 99.8, 99.5 atom %D を用いた。Piperine は富士フィルム和光純薬の生化学用試薬を、cinnamaldehyde は富士フィルム和光純薬局方生薬試験用を、eugenol は富士フィルム和光純薬1級試薬を、rosmarinic acid は富士フィルム和光純薬の生化学用試薬を、cinnamaldehyde は東京化成 trans-cinnamaldehyde (試薬 A), 富士フィルム和光純の(*E*)-cinnamaldehyde 薬局方生薬試験用(試薬 B)と cinnamaldehyde 和光特級(試薬 C)を用いた。Anethole, vanillin, は東京化成から、ethylvanillin 富士フィルム和光純薬から購入の試薬を用いた。コショウ種子, ヒハツ種子およびオールスパイスはそれぞれ市販されている粉末, ローズマリーは, スパイスとして市販されているローズマリー葉の粉末および乾燥生薬を, ケイヒはスパイスとして市販されている粉末と切断生薬を, それぞれ購入した。ウイキョウは生薬として, ダイウイキョウ, アニスは, 食品として市販されている果実を購入して用いた。切断生薬または前傾生薬として購入したものは粉末化して用いた。また, 生薬バニラ, バニラオイル, バニラエッセンスも市販されているものを用いた。既存添加物として流通している水溶性ローズマリー抽出物および非水溶性ローズマリー抽出物も国立医薬品食品衛生研究所に保管中のものの供与を受けた。

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 法を用いたコショウ種子中およびヒハツ種子中 piperine の定量

令和元年度の研究でコショウ種子およびヒハツ種子の抽出物で観測された独立したシグナルが、含有される piperine (Fig. 1) の 3 位のプロトンシグナルと特定できたことから、まず、piperine の ¹H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と、粉末生薬中の piperine 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

1,4-BTMSB-*d*₄ はデシケーター中で over night 乾燥させた。約 5 mg を精秤して 2.00 ml の pyridine-*d*₅ に溶かして内部標準用溶液とした。

piperine 標準品はデシケーター中で一晩乾燥させ、約 10 mg を精秤して 1.00 mL の pyridine-*d*₅ に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB-*d*₄ 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ¹H-qNMR の測定に供した。コショウ種子およびヒハツ種子粉末中の piperine の測定は、乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して pyridine-*d*₅ (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 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB-*d*₄ 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ¹H-qNMR の測定に供した。

B-3-b) ¹H-qNMR スペクトルの測定

piperine とコショウ種子およびヒハツ種子の抽出液の ¹H-NMR を測定し、piperine (Fig. 1) の 3 位のプロトンシグナルが 7.52 ppm に現れることを確認した。(Fig. 8) ¹H-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、piperine の 3 位のシグナルと 0.00 ppm とした 1,4-BTMSB-*d*₄ 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 piperine の濃度を算出した。

$$C_P = \frac{I_P}{I_B} \times C_B$$

ただし、 C_B 、 C_P はそれぞれ 1,4-BTMSB-*d*₄ 及び piperine のモル濃度 (mol/mL)、 I_B 、 I_P はそれぞれ 1,4-BTMSB-*d*₄ 及び piperine の水素 1 個あたりの

シグナル面積。

B-3-c) HPLC を用いたコショウ種子中およびヒハツ種子中 piperine の定量

HPLC は Cosmosil 5C18-AR-II 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い、40°C で MeOH : H₂O の系で初期条件 70 : 30 → 25 min で 90 : 10 というグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、342 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. 9)

¹H-qNMR 法で定量した piperine 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 7) それぞれの生薬試料は、¹H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で希釈し、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 piperine のピーク的面積からその定量を行った。(Fig. 10)

B-4)¹H-qNMR 法を用いたオールスパイス中の eugenol の定量

香辛料抽出物の原材料であるオールスパイスについて、その種子の粉末の抽出物の ¹H-qNMR スペクトルから、オールスパイスの重要な精油成分である eugenol (Fig. 2) の 6 位のプロトンシグナルが独立して観測できることがわかった。よって、このシグナルを利用した ¹H-qNMR スペクトルの実施について検討した。また、HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-4-a) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

平成 28 年度の研究で報告したクローブ抽出物中の eugenol の定量¹⁾ では acetone-*d*₆ 中での測定を行っていたが、オールスパイス種子では methanol-*d*₄ 中で測定したスペクトルの方が eugenol の 6 位プロトンのシグナルがより独立して観測されたことや溶媒の揮発性が methanol-*d*₄ の方が低く取り扱い中の濃度変化をより少なくできると考えたことから methanol-*d*₄ を用いて抽出、測定することにした。

内部標準としては methanol-*d*₄ に易溶な DSS-*d*₆ を用いた。DSS-*d*₆ はデシケーター中で over night 乾燥させたのち、約 5 mg を精秤して 1.00 ml の DMSO-*d*₆ に溶かして内部標準用溶液とした。eugenol 標準品も液体のため特に処理をせず約 10 mg を精秤して methanol-*d*₄ 1.00 mL に溶かし

た。この溶液 0.50 mL と、先に調製した DSS- d_6 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ^1H -qNMR の測定に供した。(Fig. 11) オールスパイス種子末中の eugenol の測定は、乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して methanol- d_4 (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 0.50 mL と、先に調製した methanol- d_4 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して ^1H -qNMR の測定に供した。

B-4-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Eugenol とオールスパイス種子末抽出液の ^1H -NMR を測定し、eugenol (Fig. 2) の 6 位のプロトンシグナルが 5.93 ppm に現れることを確認した。(Fig. 11) ^1H -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。

$$C_E = \frac{I_E}{I_B} \times C_B$$

ただし、 C_B 、 C_E はそれぞれ 1,4-BTMSB- d_4 及び piperine のモル濃度 (mol/mL)、 I_B 、 I_E はそれぞれ DSS- d_6 及び piperine の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-4-c) HPLC を用いた eugenol の定量

HPLC は Cosmosil 5C18-MS-II 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い、40°C で MeOH : H₂O の系で初期条件 50 : 50 → 20 min で 90 : 10 というグラジエント、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. 12)

^1H -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. 13) それぞれの生薬試料は、 ^1H -qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で希釈し、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 eugenol のピークの面積からその定量を行った。(Fig. 12)

B-5) ^1H -qNMR 法を用いたローズマリー葉中および既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

まず、rosmarinic acid の ^1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と、生薬中あるいは既存添加物中の 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-5-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 methanol- d_4 に溶かして内部標準用溶液とした。

Rosmarinic acid 標準品はデシケーター中で一晩乾燥させ、約 5 mg を精秤して 2.50 mL の内部標準用溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

ローズマリー葉粉末中および既存添加物中の rosmarinic acid の測定用試料の調製は、次のように行った。乾燥させた粉末生薬または既存添加物試料の約 100mg を精秤して acetone (1.00 mL) に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清をとって濃縮乾固した。この操作を 3 回繰り返した。集めた抽出物に内部標準用溶液 (1.00 mL) を加えて完全に溶解したのち、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。

B-5-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Rosmarinic acid とローズマリー葉粉末中および既存添加物の水溶性の抽出液の ^1H -NMR を測定し、rosmarinic acid (Fig. 3) の 8 位のプロトンシグナルが 6.25 ppm に現れることを確認した。(Fig. 14) ^1H -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 3 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 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-5-c) HPLC を用いたローズマリー葉中および既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

HPLC は YMC-Triart C18 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い, 40°C で MeCN : 0.1% リン酸- H_2O の 20 : 80, 流速 1.0 mL/min で溶出, 330 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. 15)

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. 16) それぞれの生薬試料は, 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 μ L 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.

B-6) 1H -qNMR 法を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

まず, cinnamaldehyde (Fig. 4) の 1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と, ケイヒ中の cinnamaldehyde 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-6-a) 1H -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- d_6 約 10 mg を精秤して 20.00 ml の methanol- d_4 に溶かした内部標準溶液を調製した.

各試薬の cinnamaldehyde は液体であるため特に前処理は行わず, 各約 5 mg を精秤して 1.00 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 qNMR の測定に供した.

ケイヒは市販の食品用(ケイヒ末 A)の粉末はそのまま, 切断生薬として入手したケイヒは粉末化して用いた(ケイヒ末 B, C). 粉末中の cinnamaldehyde の測定用試料の調製は, 次のように行った. 乾燥させた粉末生薬の約 100 mg を精秤して内部標準用溶液 (1.00 mL) に懸濁し, 超音波下 30 分抽出を行い, 遠沈し, その上清をとって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.

B-6-b) 1H -qNMR スペクトルの測定

Cinnamaldehyde とケイヒ末の抽出液の 1H -NMR を測定し, cinnamaldehyde (Fig. 4) のアルデヒド基のプロトンシグナルが 9.65 ppm に現れることを確認した. (Fig. 17) 1H -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, cinnamaldehyde のアルデヒド基のシグナルと 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 cinnamaldehyde の濃度を算出した.

$$C_C = (I_C / I_D) \times C_D$$

ただし, C_D , C_C はそれぞれ DSS- d_6 及び cinnamaldehyde のモル濃度(mol/mL), I_D , I_C はそれぞれ DSS- d_6 及び cinnamaldehyde の水素 1 個あたりのシグナル面積.

また, 試薬の cinnamaldehyde のうち, 試薬 A の溶液を内部標準溶液で順次希釈し, 各希釈液の 1H -qNMR スペクトルを測定して, 検量線を作成した.

また添加回収実験を次のように行なった. ケイヒ末 C 約 100 mg を精秤し, cinnamaldehyde (試薬 A) 約 5 mg を精秤して内部標準用溶液 (1.00 mL) に溶解した溶液 1.00 mL に懸濁し, 超音波下 30 分抽出, 遠沈した. その上清をとって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. この時の積分値(X)と, ケイヒ末 C 約 100 mg を内部標準用溶液 (1.00 mL) から同様に試料を調製して 1H -qNMR の測定した時の積分値(Y), cinnamaldehyde (試薬 A) 約 5 mg を精秤して内部標準用溶液 (1.00 mL) に溶解した溶液から調製した試料の 1H -qNMR 測定から得られた積分値(Z)から, 次式に従って添加回収率を算出した.

$$\text{添加回収率} = [X / (Y + Z)] \times 100 (\%)$$

B-6-c) HPLC を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

HPLC は COSMOSIL 5C18-MS-IIあるいは COSMOSIL 5C18-AR-IIのそれぞれ 4.6 ID × 250 mm のカラムを用い、40°Cで MeCN-H₂O または MeOH-H₂O の溶媒系で初期条件 40 : 60 → 20 min に 55 : 45 → 25 min に 90 : 10 というグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、280 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。

¹H-qNMR 法で定量した試薬の cinnamaldehyde うち、試薬 A の溶液を標準液として検量線を作成することを試みたが、結果で述べるように cinnamaldehyde のピークの形が時間経過とともに崩れてくる現象が観察された。(Fig. 18) 他の試薬でも同様であったため、HPLC における定量は断念した。

B-6-d)¹H-qNMR 法を用いた溶液中の cinnamaldehyde の安定性の確認

Cinnamaldehyde (Fig.4)が HPLC で用いる溶媒に安定なのかの確認のため、cinnamaldehyde を methanol-*d*₄, acetonitril-*d*₃, それぞれと D₂O との混合溶媒中で保存しながら ¹H-qNMR での cinnamaldehyde のアルデヒド基のシグナルを用いて定量を行うことにした。

DSS-*d*₆ 約 10 mg を精秤して 20.00 ml の methanol-*d*₄ に溶かした内部標準溶液、および BTMSB-*d*₄ 約 10 mg を精秤して 20.00 ml の acetonitril-*d*₃ に溶かした内部標準溶液を調製した。さらに、両方の標準溶液と D₂O をそれぞれ 6 : 4 の割合で混合した、methanol-*d*₄-D₂O の混合溶液、acetonitril-*d*₃-D₂O の混合溶液を調製した。

Cinnamaldehyde は約 5 mg を精秤して 1.00 mL のそれぞれ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 を Table 1 に示した条件で測定し、DSS-*d*₆ または BTMSB-*d*₄ のメチル基プロトンのシグナルの積分値に対する cinnamaldehyde (Fig. 4) のアルデヒド基のプロトンシグナル(9.65 ppm) の積分値を経時的に測定した。

B-7)¹H-qNMR 法を用いたウイキョウ、ダイウイキョウ、アニス中の anethole の定量

まず、anethole の ¹H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と、生薬中の anethole 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-7-a)¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

BTMSB-*d*₄ 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 acetone-*d*₆ に溶かして内部標準溶液とした。

Anethole 標準品は、約 25 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 qNMR の測定に供した。

ウイキョウ、ダイウイキョウ、アニスの各果実中の anethole の測定用試料の調製は、次のように行った。各果実を粉末化したのち、乾燥させた粉末生薬の約 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、¹H-qNMR の測定に供した。

B-7-b)¹H-qNMR スペクトルの測定

Anethole と各生薬粉末の抽出液の ¹H-NMR を測定し、anethole (Fig. 1) の 7 位のプロトンシグナルが 6.1 ppm に現れることを確認した。(Fig. 19) ¹H-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、anethole の 7 位のシグナルと 0.00 ppm とした BTMSB-*d*₄ 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 anethole の濃度を算出した。

$$C_A = (I_A / I_B) \times C_B$$

ただし、C_B、C_A はそれぞれ BTMSB-*d*₄ 及び anethole のモル濃度(mol/mL)、I_B、I_A はそれぞれ BTMSB-*d*₄ 及び anethole の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-7-c) HPLC を用いたウイキョウ、ダイウイキョウ、アニス中の anethole の定量

HPLC は Cosmosil 5C8-MS 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, 250 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.⁹⁾(Fig. 20)

¹H-qNMR 法で定量した anethole 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した. (Fig. 21)それぞれの生薬試料は, 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 μ L 注入して得られたクロマトグラム of anethole のピークの面積からその定量を行った.

B-8)¹H-qNMR 法を用いた生薬バニラ, バニラエッセンス, バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin の定量

まず, vanillin 及び ethylvanillin(Fig. 6)の ¹H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と, 生薬中あるいはバニラエッセンス, バニラオイル中の量化合物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-8-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.

vanillin 及び ethylvanillin 標準品は, 約 5 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 qNMR の測定に供した.

生薬バニラの測定用試料の調製は, 次のように行った. 生薬をハサミで細断したのち, 約 100mg を精秤して内部標準溶液 (1.00 mL) に懸濁し, 超音波下 60 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. バニラエッセンス, バニラオイルは液体であるため, 約 100mg を精秤して内部標準溶液 (1.00 mL) に溶解したのち, 念のため遠沈し, 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.

B-8-b) ¹H-qNMR スペクトルの測定

各試料から調製した測定試料の ¹H-NMR を測定し, vanilline 及び ethylvanillin (Fig. 6) のアルデヒド基のプロトンシグナルがそれぞれ 9.78

ppm, 9.80 ppm に現れることを確認した. (Fig. 22) 両者を混合すると極めて近接はしていたが, シャープなシグナルで, 別個に積分値を測定することができた. ¹H-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, vanilline 及び ethylvanillin のアルデヒド基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 vanilline 及び ethylvanillin の濃度を算出した.

$$C_v = (I_v / I_D) \times C_D$$

ただし, C_D, C_V はそれぞれ DSS-*d*₆ 及び vanilline または ethylvanillin のモル濃度 (mol/mL), I_D, I_V はそれぞれ DSS-*d*₆ 及び vanilline または ethylvanillin の水素 1 個あたりのシグナル面積.

B-8-c) HPLC を用いた生薬バニラ, バニラエッセンス, バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin 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 (0 min)→80 : 20 (17 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. 23)

¹H-qNMR 法で定量した vanilline 及び ethylvanillin 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した. (Fig. 24) 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 μ L 注入して得られたクロマトグラムの vanilline 及び ethylvanillin 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) コショウ種子中およびヒハツ種子中 piperine の定量

Piperine 標準品中の piperine の定量を ¹H-qNMR 法でおこなった結果, 83.0 \pm 0.0% と見積もられ, 試薬の純度表示よりも 10% 以上小さな値とな

った。コショウ種子およびヒハツ種子粉末中の piperine の $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いた定量では、コショウ種子 $3.10\pm 0.09\%$ 、ヒハツ種子中では $3.10\pm 0.19\%$ という結果を得た。(Table 2) HPLC で piperine 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。この検量線からコショウ種子およびヒハツ種子粉末の piperine の含有率を算出したところ、ヒハツ種子中では $2.96\pm 0.03\%$ という結果を得られ、 $^1\text{H-qNMR}$ 法での数値よりやや小さめではあるもののほぼ同じ値であることが確認でき、 $^1\text{H-qNMR}$ 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。一方、コショウ種子に関しては、 $2.19\pm 0.07\%$ となり、 $^1\text{H-qNMR}$ 法での測定値より小さな数値となった。現在、この数値が正しい数値か、 $^1\text{H-qNMR}$ 法と大きく異なる要因は何かの確認をしている。

C-2) オールスパイス中の eugenol の定量

Eugenol 標準品中の eugenol の定量を $^1\text{H-qNMR}$ 法でおこなった結果、 $94.0\pm 0.0\%$ と見積もられ、この試薬に関しては純度表示に近い値となった。

オールスパイス末 2 試料中の eugenol を $^1\text{H-qNMR}$ 法を用いて定量したところ、試料 1 では $3.14\pm 0.11\%$ 、試料 2 では $2.46\pm 0.13\%$ となった。いずれもばらつきがあまり多くない結果だった。(Table 3) 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。また、オールスパイス末の抽出液のクロマトグラムでは 9.5 分付近の eugenol のピークの近くに小さなピークが散見されるものの定量には支障のない状況であった。(Fig. 12) HPLC における 2 試料中の eugenol の含有率を算出したところ、試料 1 では $3.75\pm 0.67\%$ 、試料 2 では $2.67\pm 0.16\%$ となった。いずれも $^1\text{H-qNMR}$ 法での数値に近い値ではあったものの、やや大きめの数値となり、ばらつきも大きめであった。このように、オールスパイス中の eugenol の定量においては $^1\text{H-qNMR}$ 法は HPLC 法より安定的な測定が可能で、HPLC 法の代わりにとり得る方法である可能性を示した。

C-3) ローズマリー葉中および既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

rosmarinic acid 標準品中の rosmarinic acid の定量を $^1\text{H-qNMR}$ 法でおこなった結果、 $89.2\pm 1.0\%$ と見積もられ、試薬の純度表示(96% 以上)よりも小さな値となった。

非水溶性ローズマリー抽出物では rosmarinic acid のシグナルは観測できなかったため、この試料での検討は行わなかった。ローズマリー葉中および既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid では、抽出溶媒を acetone, methanol, ethylacetate, DMSO, chloroform, pyridine で検討、測定溶媒を(DMSO)- d_6 , methanol- d_4 , pyridine- d_5 , acetone- d_4 で検討した。その結果、ローズマリー葉の粉末および水溶性ローズマリー抽出物では、rosmarinic acid のシグナルが観測され、そのシグナルの大きさから、抽出効率という点では各抽出溶媒で大きな違いは見られなかったものの、acetone 抽出を行うと 8-H 周辺で観測されるシグナルが少なくなり、さらに測定を methanol- d_4 で行うと 8-H の付近の小さなシグナルも 8-H から離れて観測される状況となった。よって、この acetone で抽出→methanol- d_4 で測定という組み合わせにして行うことにした。 $^1\text{H-qNMR}$ 測定の結果、ローズマリー葉の粉末中の rosmarinic acid 含有率は $0.35\pm 0.03\%$ 、水溶性ローズマリー抽出物中では $0.60\pm 0.11\%$ という結果を得た。(Table 4) 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。この検量線からローズマリー葉中および既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の含有率を算出したところ、ローズマリー葉中では $0.34\pm 0.03\%$ 、水溶性ローズマリー抽出物中では $0.60\pm 0.13\%$ という結果が得られ、 $^1\text{H-qNMR}$ 法での数値に極めて近似した値が得られた。 $^1\text{H-qNMR}$ 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。

一方、水溶性ローズマリーでは両測定法ともに測定値に対するばらつきが大きいと考えることもできる。特に $^1\text{H-qNMR}$ 法でのばらつきの大きさは、8-H のシグナルの裾に小さなシグナルが存在するようにも見えるため、このシグ

ナルと積分値の取り方との関係で、人為的なばらつきが出やすい状況になっているとも考えられる。Rosmarinic acid に関しては、標準品の rosmarinic acid 溶液を ^1H -qNMR 法で値づけをして、その溶液を基に HPLC で定量するという方法が確立されている。^{3,4)} ^1H -qNMR 法を用いての水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の直接の定量も不可能ではないが、精密さという観点からは HPLC の利用の方が優位であると考えられた。

C-4) ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

Cinnamaldehyde 試薬 A, B, C 中の cinnamaldehyde の定量を ^1H -qNMR 法でおこなった結果、それぞれ $99.43 \pm 2.57\%$, $92.04 \pm 1.03\%$, $97.94 \pm 1.17\%$ と見積もられた。ケイヒ末 A, B, C 中の cinnamaldehyde の ^1H -qNMR 法を用いた定量では、それぞれ $3.46 \pm 0.04\%$, $2.39 \pm 0.06\%$, $2.72 \pm 0.04\%$ と見積もられた。(Table 5) ^1H -qNMR 法を用いることの信頼性の確認のため、積分値と濃度の相関、添加回収率、定量の限界についての確認も行った。Fig. 9 に示すように、積分値と濃度との間には極めて良い相関があることが確認できた。添加回収実験の結果、添加回収率は 96.3% で、極めて良好な回収率だった。また、濃度を変えながら純度測定を行った結果、 0.1 mg/mL 程度の濃度までは誤差 1% 程度に抑えられていることがわかった。故に 0.1 mg/mL 程度の濃度までは ^1H -qNMR 法で測定が可能であることがわかった。

次に、HPLC で cinnamaldehyde の測定を試みたが、上述のように cinnamaldehyde のピークの形が時間経過とともに崩れてくる現象が観察された。Cinnamaldehyde を MeOH-H₂O または CH₃CN-H₂O に希釈して inject するが、MeOH-H₂O 系の溶媒で展開するとメインのピークの後に分離しきれない形で小さな緩やかなピークが連なり始める状態となり、CH₃CN-H₂O 系の溶媒で展開すると、メインのピークに鋭い小さなピークがついてくるという形になった。(Fig. 18) 溶液として保存している過程または展開中に cinnamaldehyde が変化していることを示唆していた。

そこで、溶液中の cinnamaldehyde の安定性の確認するために、DSS-*d*₆ または BTMSB-*d*₄ のメチル基プロトンのシグナルの積分値を基準として、試料調製直後 (0 日目) の cinnamaldehyde のアルデヒド基のプロトンシグナル (9.65 ppm) の積分値 100 として経時的に測定した。その結果、methanol-*d*₄ 中では数日のうちにアルデヒド基のシグナルが大きく減少することがわかった。(Fig. 25) 他の溶媒では比較的安定であることもわかった。このことから、前年の cinnamaldehyde の定量において HPLC の測定値やクロマトグラムが安定しなかったのは測定溶媒や溶液の希釈に methanol-*d*₄ やメタノールを使用していたことに起因すると考えられた。アルデヒド基とアルコールが存在するとアセタールを生じる可能性は高く、この結果は cinnamaldehyde のアルデヒド基にメタノールが反応したものと強く示唆された。一方、水が共存するとその変化が抑制されている可能性もあることがわかった。しかしながら、水が存在すると液性によってはヘミアセタールや水和物を生成する可能性があることも示唆しており、アルデヒド基が存在する化合物の定量にはアルコール性の溶媒や含水溶媒は避けた方が安全であることもわかった。今回の研究では、 ^1H -qNMR を methanol-*d*₄ で実施していたが、こちらの値は大きなばらつきがなかった。これは、試料調製直後に測定していたため、目に見える量の反応の進行がなかったからと考えられる。

C-5) ^1H -qNMR 法を用いたウイキョウ、ダイウイキョウ、アニス中の anethole の定量

Anethole 標準品中の anethole の定量を ^1H -qNMR 法でおこなった結果、 98.12 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、acetone-*d*₆ 中で 7 位プロトンシグナルが独立して観測されたことから acetone-*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、生薬ウイキョウ中の anethole 含有率は $0.54 \pm 0.02\%$ 、ダイウイキョウでは、古い試料 (ダイウイキョウ A) が 2.02% 、新しい試料 (ダイウイキョウ B~D) $5.48 \sim 7.32\%$ 、

アニスでは 1.14~1.33%という結果を得た。

(Table 6) HPLC で anethole 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 anethole 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。

また、常識的なことではあるが、古い試料のダイウイキョウの anethole の含有率が新しいものの半分程度ということから、精油成分が大切な生薬はやはり新しさが大切であることも確認できた。

C-6) ¹H-qNMR 法を用いた生薬バニラ、バニラエッセンス、バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin の定量

Vanillin 及び ethylvanillin 標準品中のそれぞれの化合物の定量を ¹H-qNMR 法でおこなった結果、それぞれ 96.78%, 99.30%と見積もられ、試薬の純度表示にほぼ沿ったものだった。生薬バニラ A, B 中の vanillin 及び ethylvanillin の ¹H-qNMR 法を用いた定量では、vanillin が 0.42~0.44%, ethylvanillin がその 10 分の 1 程度である 0.039~0.045%と見積もられた。(Table 7) またバニラエッセンスでは vanillin が 0.77%の含有率で ethylvanillin は検出できず、バニラオイルでは vanillin が 0.65%, ethylvanillin 0.64%でほぼ等量含有されていることがわかった。また、vanillin と ethylvanillin の同時定量が可能であることも確認した。

次に、HPLC で vanillin 及び ethylvanillin の測定を試みた。HPLC で vanillin 及び ethylvanillin の検量線を作成したところ、両者とも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、vanillin は ¹H-qNMR 法での数値に極めて近似した値が得られたものの、生薬バニラ由来の試料 vanillin の定量に適した濃度の試料溶液では ethylvanillin の定量が困難であった。極めてよく似た化合物なので、HPLC でも同時定量が可能かと思われたが、今回の研究では不可能だ

った。

D. 結論

1) コショウ種子中の piperine の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。コショウを主な基原とする「香辛料抽出物」中の規格基準を策定する場合の指標成分として piperine を対象として、その ¹H-qNMR 法を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。あわせてヒハツ種子中の piperine の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件も確立した。

2) オールスパイス中の eugenol の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。オールスパイスを主な基原とする「香辛料抽出物」中の規格基準を策定する場合の指標成分として eugenol を対象として、その ¹H-qNMR 法を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。

3) ローズマリー葉中、および既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。

4) ケイヒ中の cinnamaldehyde の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。この過程で、HPLC を用いた cinnamaldehyde の定量時に cinnamaldehyde が不安定であるかことを示唆する現象が観察され、定量の信頼性という観点でも ¹H-qNMR 法が cinnamaldehyde の定量において優れた方法であることが示された。一方、ケイヒの重要な精油成分である cinnamaldehyde は methanol-*d*₄ 中で減少することが示された。アセタールが生成すると推定され、アルデヒド基のある化合物の定量時にアルコールを用いない方が安全であることがわかった。

5) ウイキョウ、ダイウイキョウ、アニス中の anethole の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。

6) 生薬バニラ、バニラエッセンス、バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立し、また、vanillin と ethylvanillin の同時定量が可能であることも確認した。

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* **16**, 28-33 (2009).
- 2) 厚生労働省, 第 18 改正日本薬局方, pp2623 (2021).
- 3) 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) 既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究 (H26-食品-一般-001) 平成 28 年度研究分担報告書 (2017).
- 4) Naoko Masumoto, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato. *日本食品化学学会誌*, **25**(2), 105-113(2018).
- 5) Yuzo Nishizaki, Naoko Masumoto, Kaori Nakajima, Kyoko Ishizuki, Taichi Yamazaki, Miho Kuroe, Masahiko Numata, Toshihide Ihara, Atsuko Tada, Naoki Sugimoto and Kyoko Sato, *Food Additives & Contaminants, Part A*, **36**(2), 203-211 (2019).
- 6) Muthanna J. Mohammed *Journal of Pharmacy Research*, **2**(5), 915-919 (2009).

F. 研究業績

1. 学会発表等

1-1. 学会

- 1) 定量NMR (^1H -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量～オールスパイス中のeugenolおよびケイヒ中のcinnamaldehydeの定量～, 加納優奈, 今川真由香, 福本帆花, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, *日本薬学会第142年会*(2022年3月, 名古屋).
- 2) 定量NMR(^1H -qNMR)を用いた生薬中の精油

成分の定量～ウイキョウおよび類似生薬中のanetholeの定量～, 二村佳音, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, *日本薬学会第143年会* (2023年3月, 札幌) .

- 3) 定量NMR (^1H -qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量～バニラおよびバニラ香料中のvanillinおよびethylvanillinの定量～, 二村佳音, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, *日本薬学会第143年会* (2023年3月, 札幌) .

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Fujiwara, Yumi; Miwa, Mako; Nagatsu, Akito; Honma, Atsushi: Identification of Maple Anthocyanin and its Antiproliferative Activity against LLC, T47D and C3H10T1/2 Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **21**(7), 894-901(2021).
- 2) Bayrakceken G Z, Dogan Z, Saracoglu I, Picot L, Nagatsu A, Basaran A A: Food plant with antioxidant, tyrosinase inhibitory and antimelanoma activity: Prunus mahaleb L.: *Food Bioscience*, **48**, 101804 (2022).

2-2. 総説

- 1) 永津明人, 生薬・薬用植物の技術と市場, 第7章「定量NMR(^1H -qNMR)法による生薬成分の分析～生薬キョウニン, トウニン, ウバイに含まれる amygdalin の定量を例に～」, p.71-78, シーエムシー出版, 共著(分担執筆), 東京(2020).

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

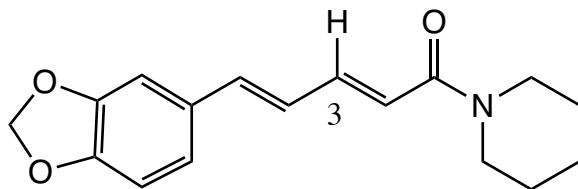


Fig. 1 Piperine の構造

3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

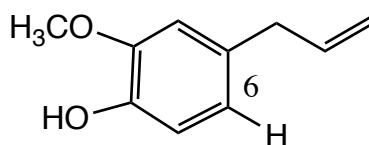


Fig. 2 Eugenol の構造

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

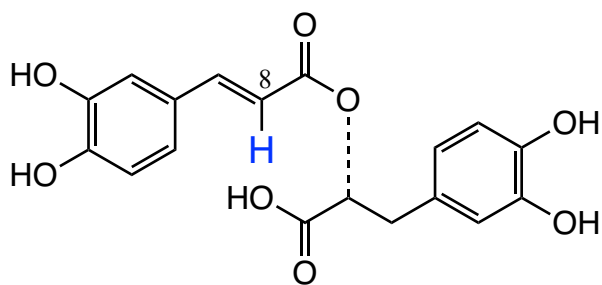


Fig. 3 Rosmarinic acid の構造

8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

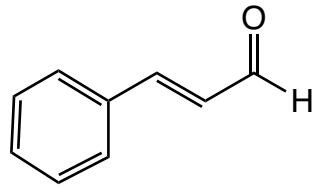


Fig. 4 Cinnamaldehyde の構造

アルデヒド基のプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

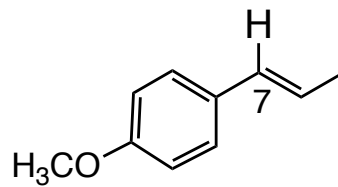


Fig. 5 Anethole の構造

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

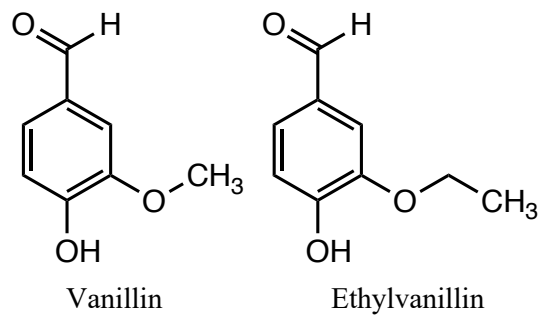
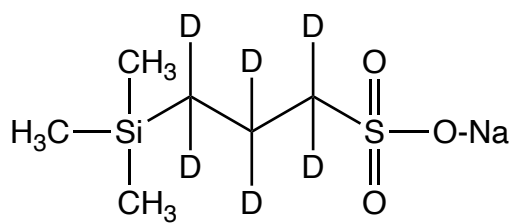
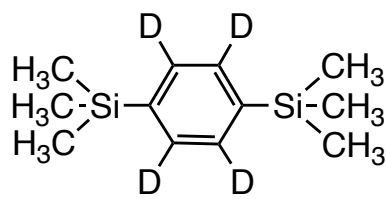


Fig. 6 Vanillin と ethylvanillin の構造

アルデヒド基のプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン



DSS-*d*₆,



BTMSB-*d*₄

Fig. 7 定量用の認証標準物質

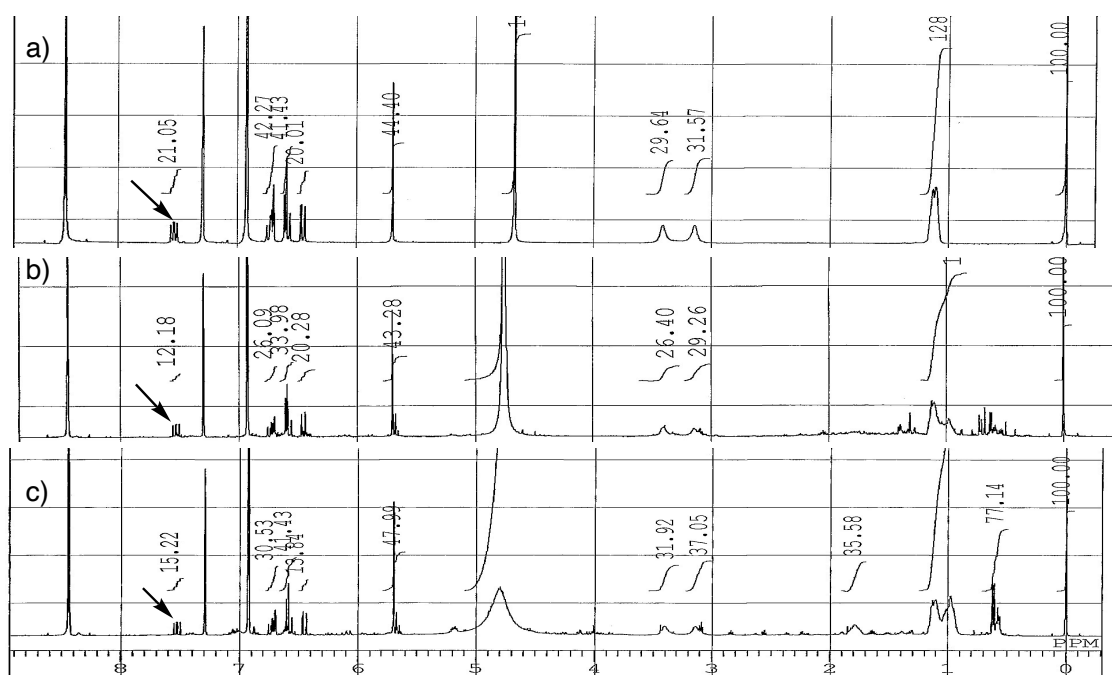


Fig. 8 a) piperine 標準試薬と b) コショウ種子抽出物と c) ヒハツ種子抽出物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (in $\text{pyridine-}d_5$) 矢印は piperine の 3 位プロトンのシグナル.

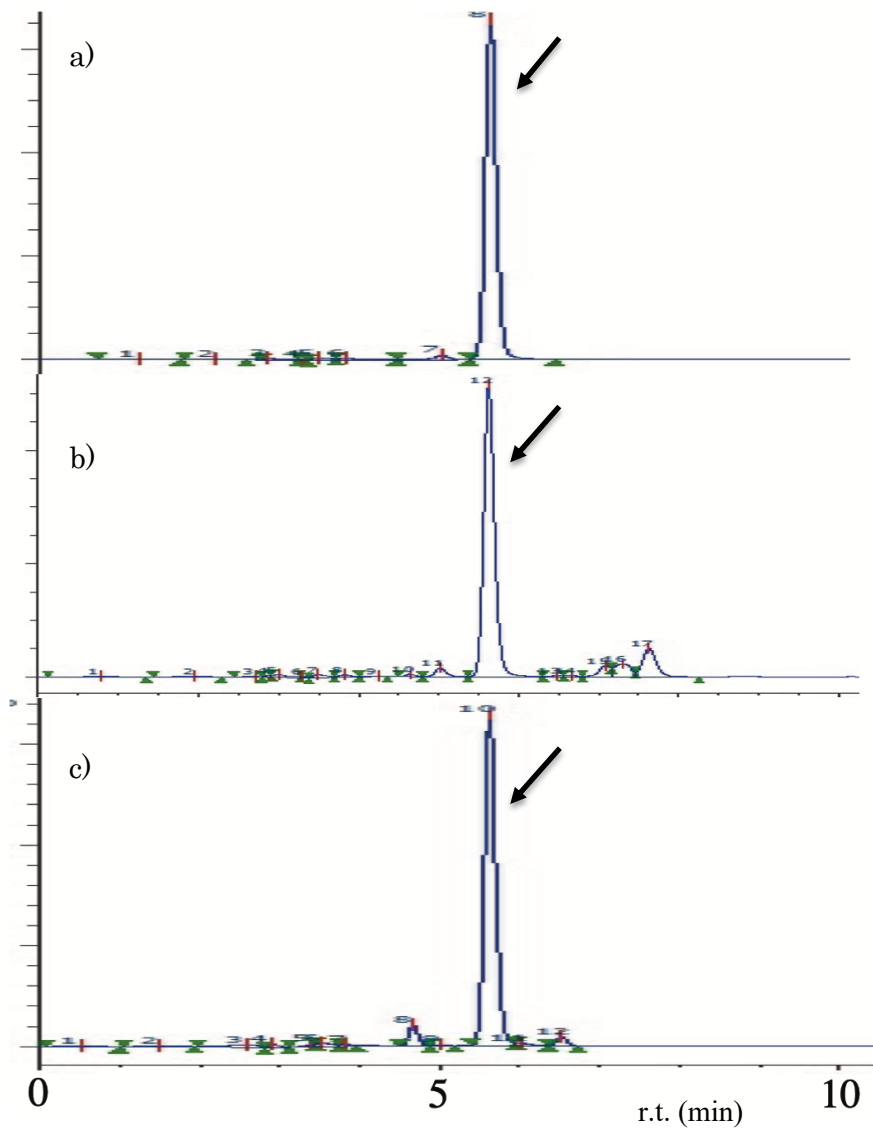


Fig. 9 a) piperine 標準試薬と b) コショウ種子抽出物と c) ヒハツ種子抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は piperine のピーク.

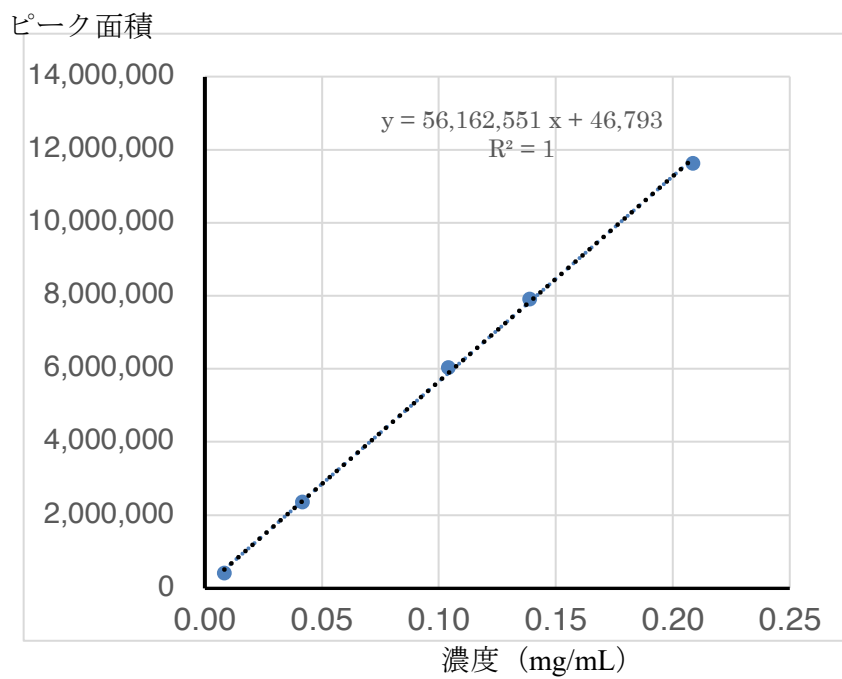


Fig. 10 HPLCにおける piperine の検量線

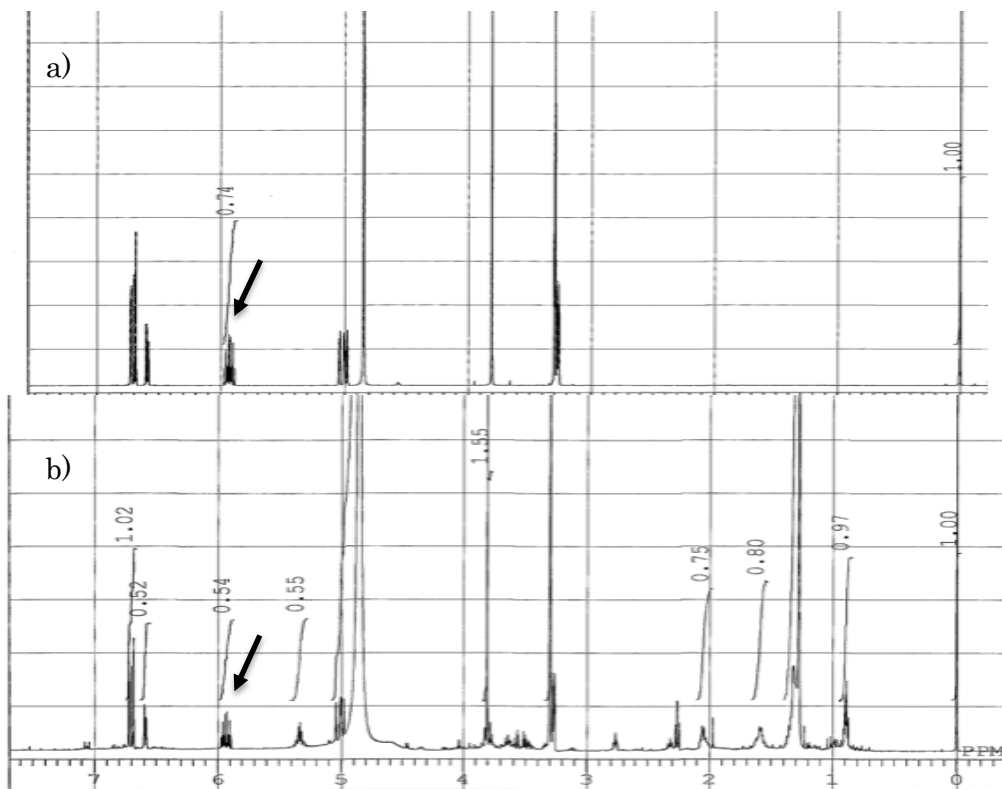


Fig. 11 a) eugenol 標準試薬と b) オールスパイス末抽出物の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4) 矢印は eugenol の 6 位プロトンのシグナル.

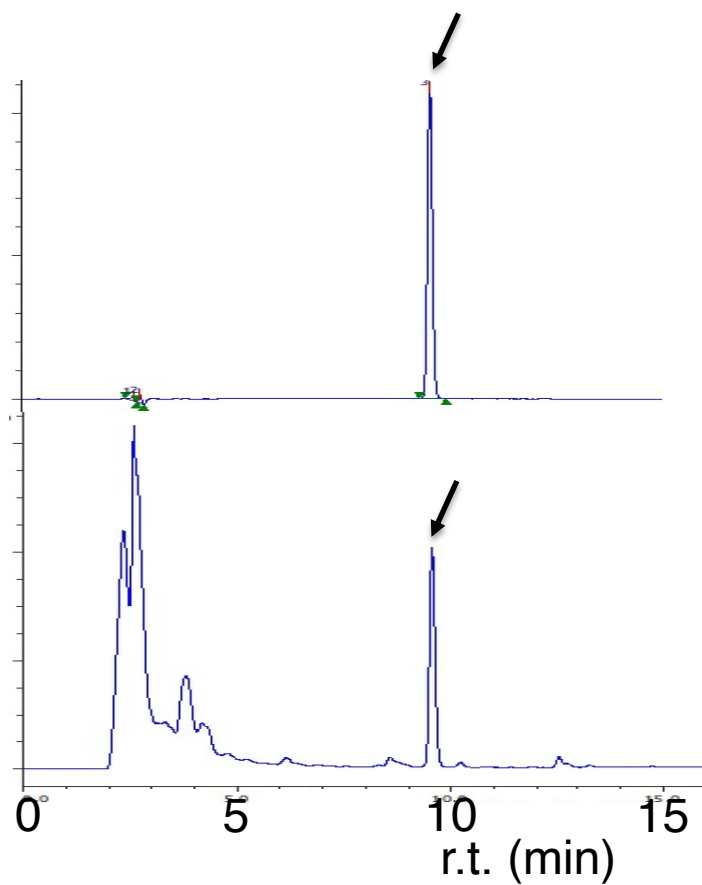


Fig. 12 a) eugenol 標準試薬と b) オールスパイス末抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は eugenol のピーク

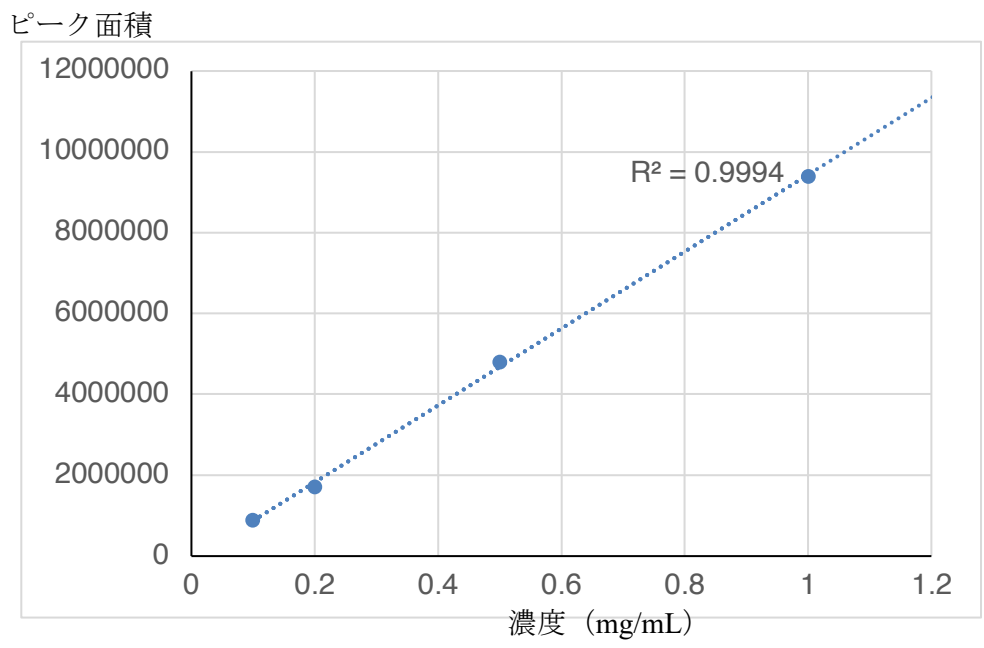


Fig. 13 HPLC における eugenol の検量線

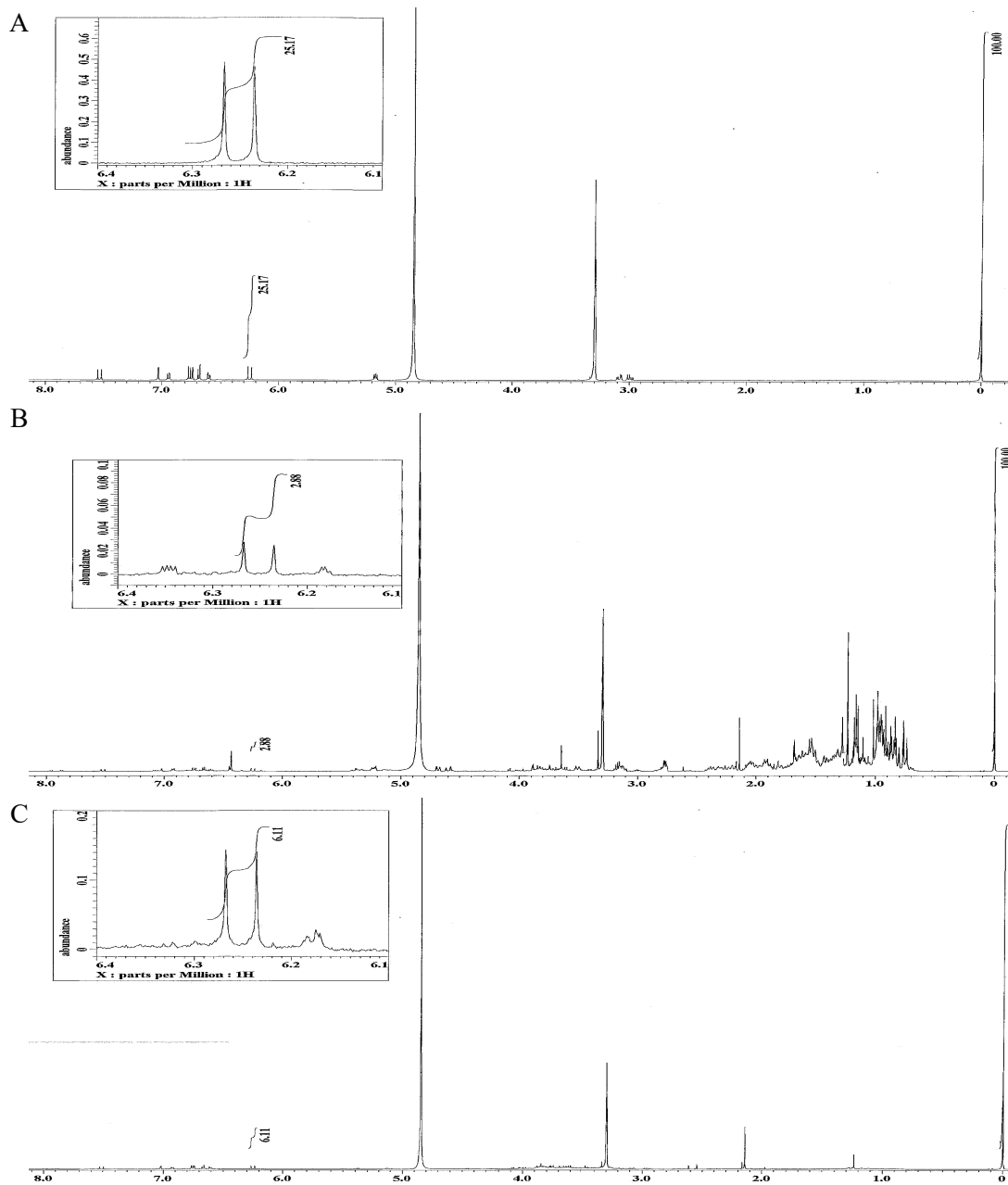


Fig. 14 Rosmarinic acid 試薬(A), ローズマリー葉(B)および既存添加物のローズマリー水性抽出物(C)の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4 , 500 MHz)
 拡大図は rosmarinic acid の 8-H のシグナル.

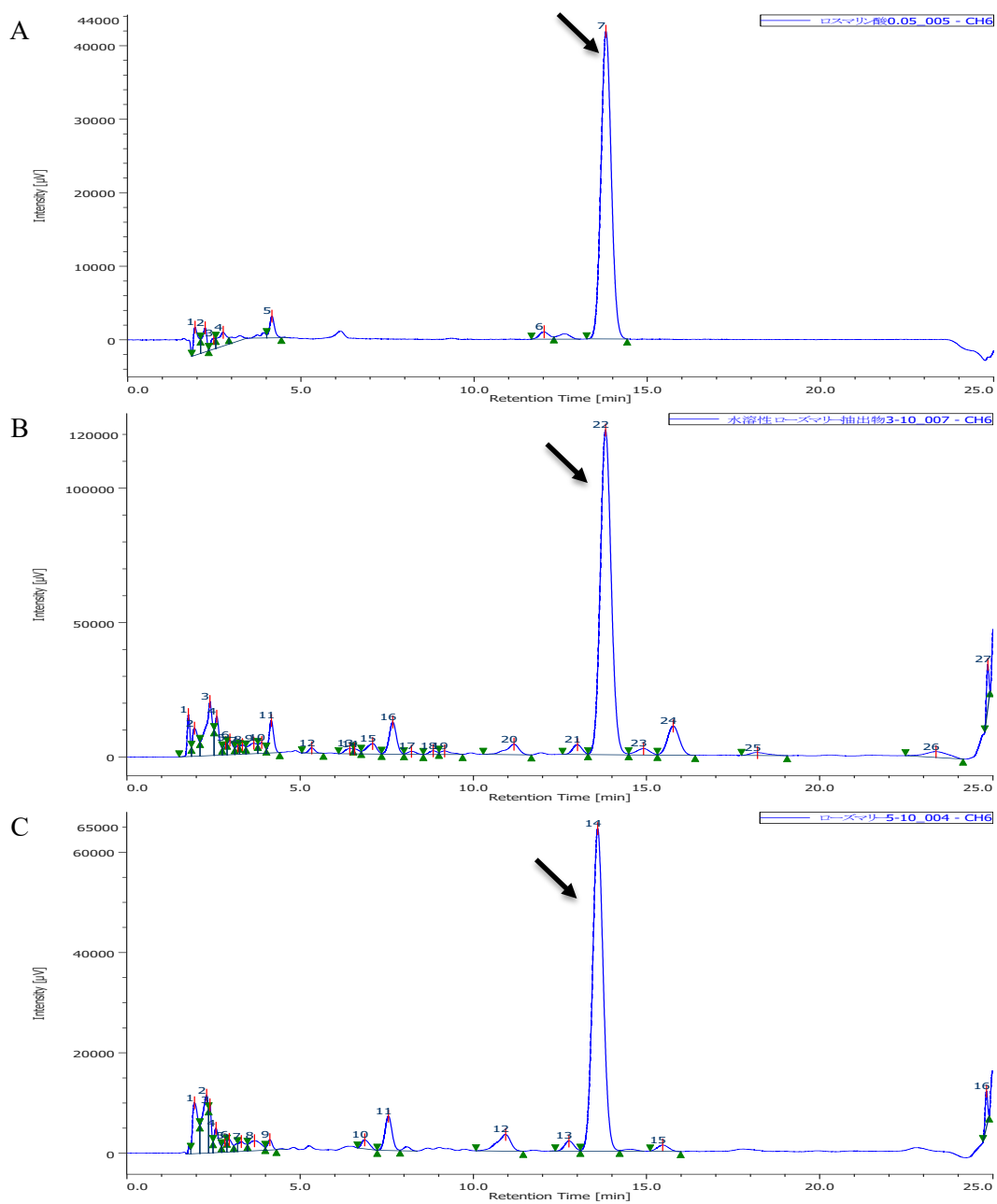


Fig. 15 Rosmarinic acid 試薬(A), ローズマリー葉(B)および既存添加物のローズマリー水性抽出物(C)の HPLC クロマトグラム
矢印は rosmarinic acid のピーク.

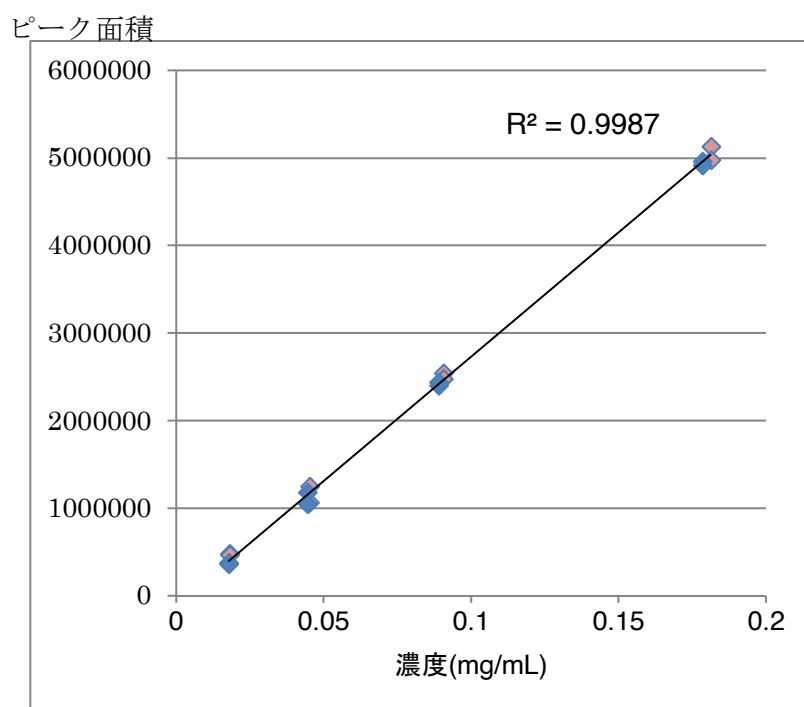


Fig. 16 HPLCにおける rosmarinic acid の検量線

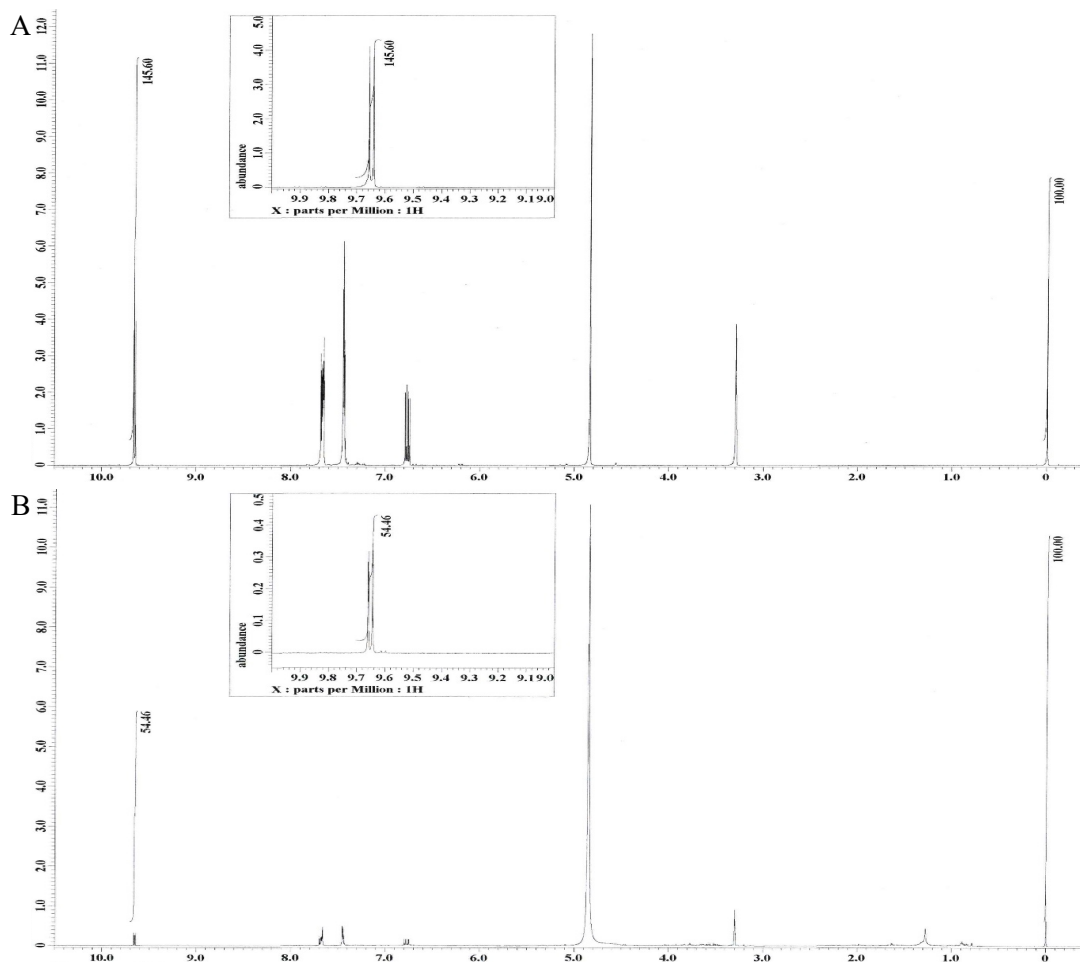


Fig. 17 Cinnamaldehyde 試薬 A (A)とケイヒ末 C (B)の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4 , 500 MHz)

拡大図は cinnamaldehyde のアルデヒド基プロトンのシグナル。

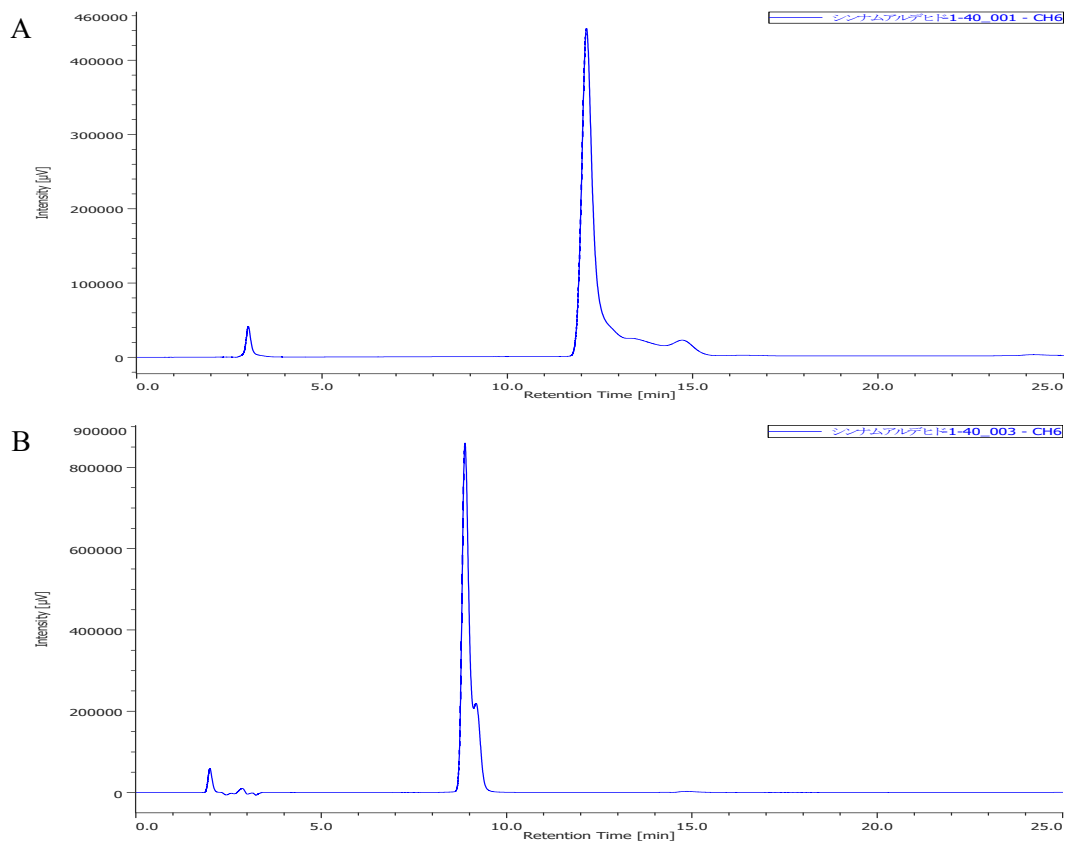


Fig. 18 Cinnamaldehyde 試薬の HPCL クロマトグラム

A は MeOH-H₂O 系の溶媒で展開したときのクロマトグラム, B は CH₃CN-H₂O 系の溶媒で展開したときのクロマトグラム.

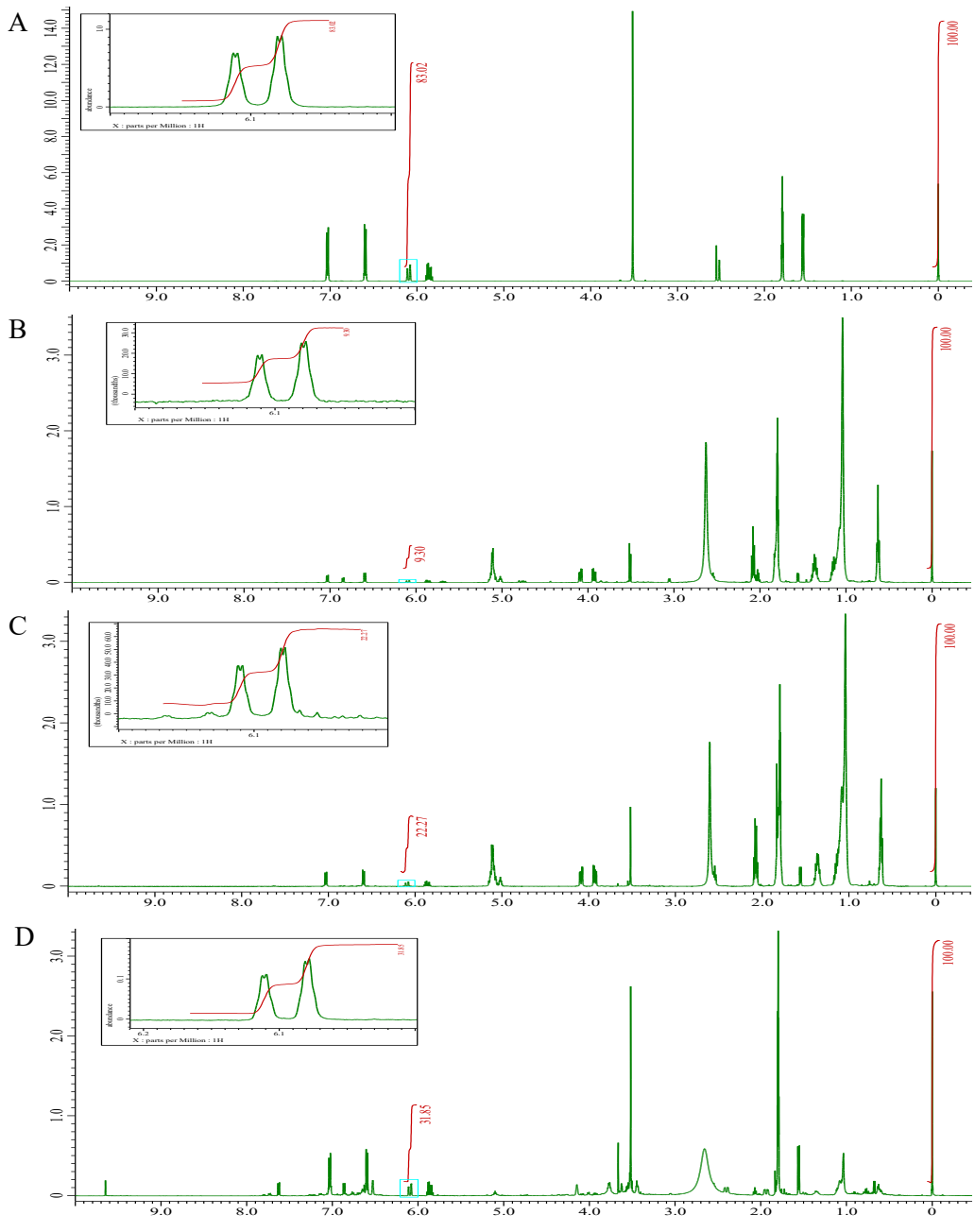
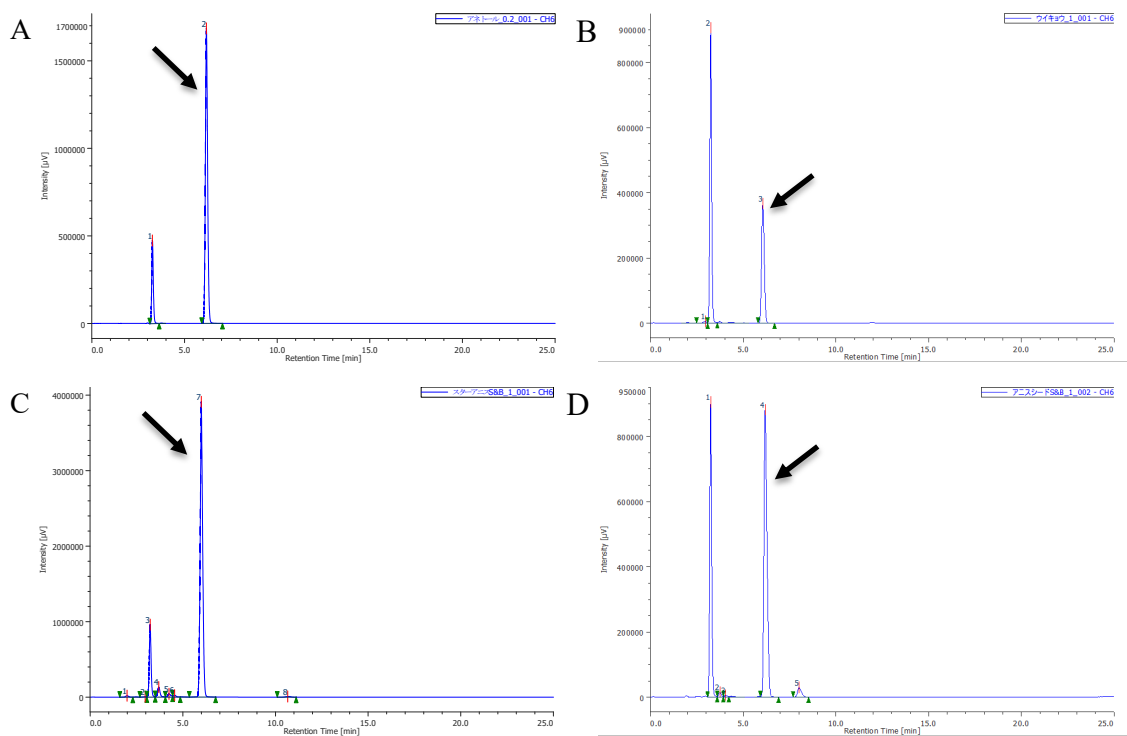


Fig. 19 Anethole 試薬(A), ウイキョウ(B), ダイウイキョウ(C) 及びアニス(D)の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 500 MHz)
 拡大図は anethole の 7-H のシグナル.



C

Fig. 20 Anethole 試薬(A), ウイキョウ(B), ダイウイキョウ(C) 及びアニス(D)の各試料の HPLC クロマトグラム
矢印は anethole のピーク.

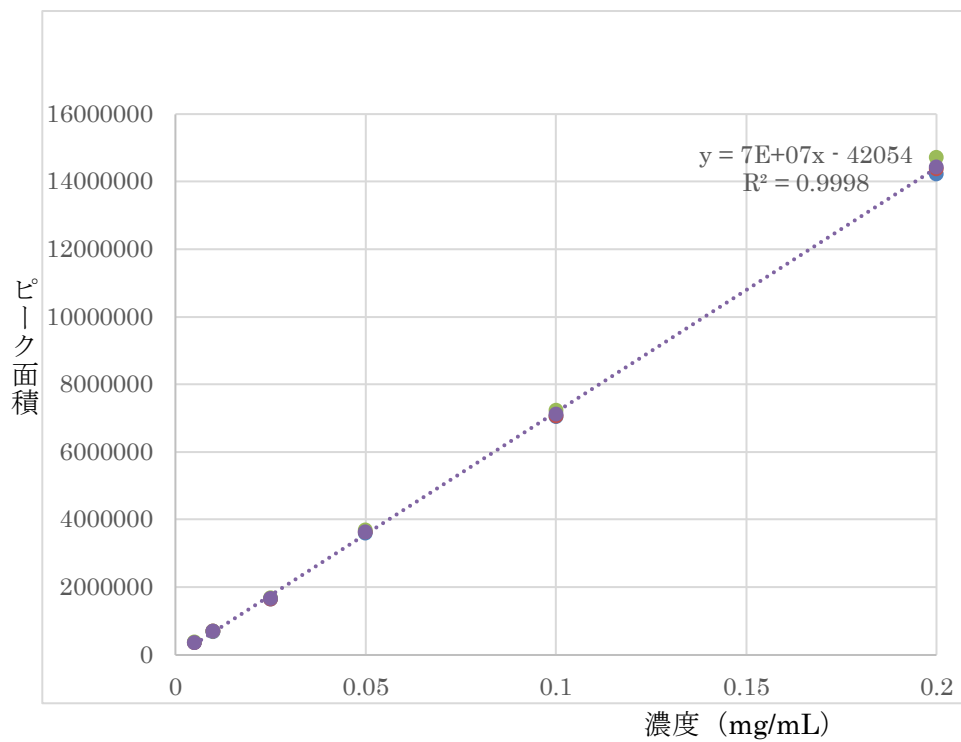


Fig.21 HPLCにおける anethole の検量線

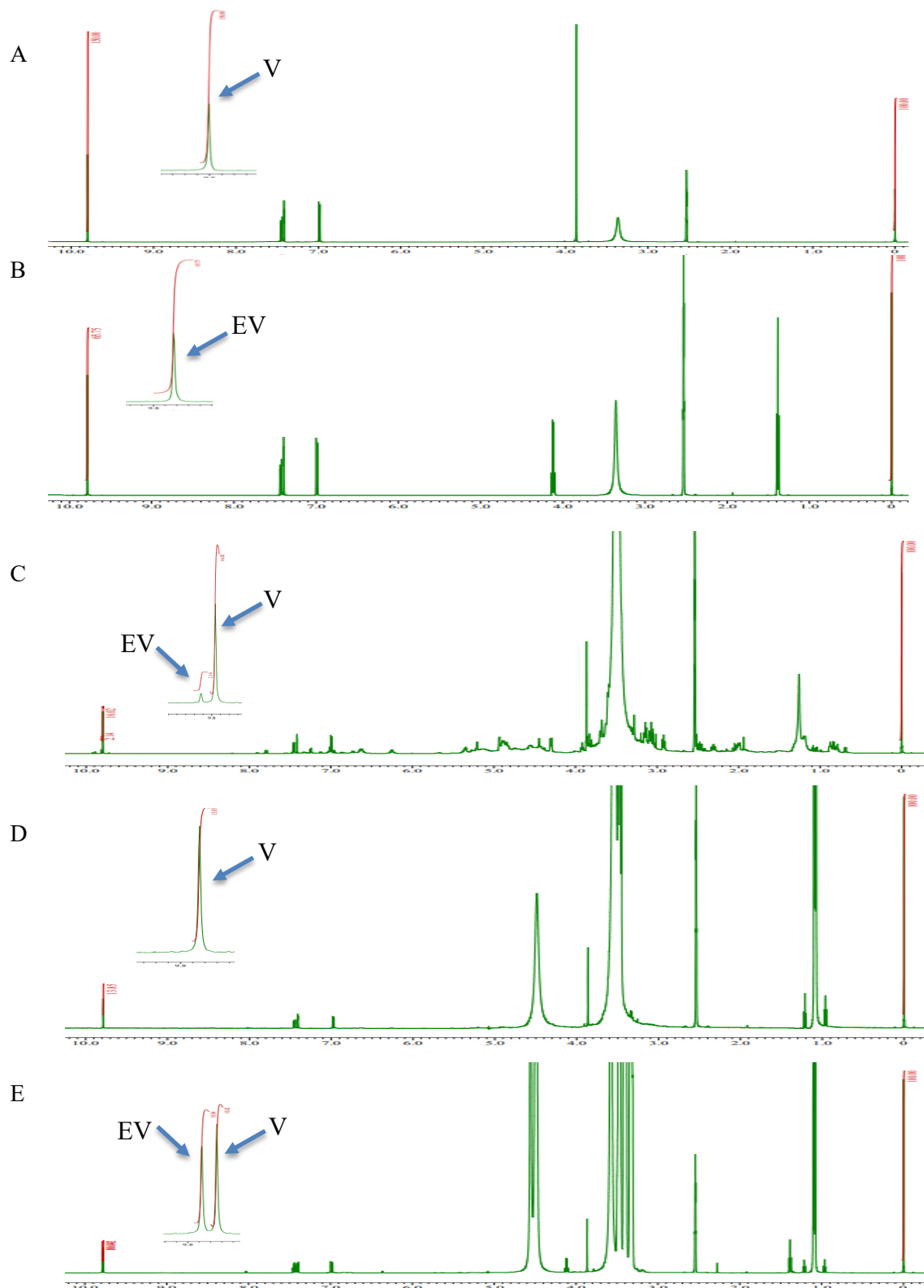


Fig. 22 Vanillin 試薬(A), ethylvanillin 試薬(B)と生薬バニラ(C), バニラエッセンス(D), バニラオイル(E)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in $\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz)

拡大図のシグナルは vanillin (矢印 V) と ethylvanillin (矢印 EV) のアルデヒド基プロトンのシグナル

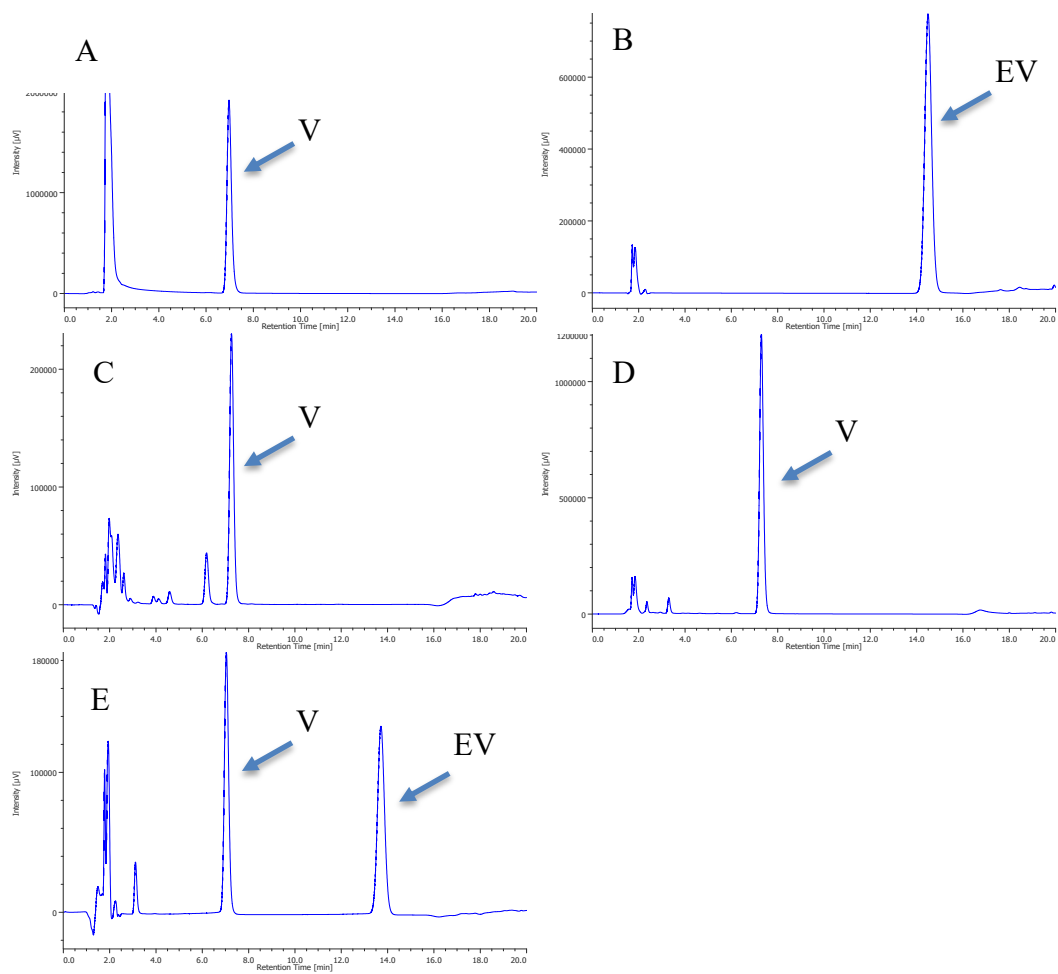


Fig. 23 Vanillin 試薬(A), ethylvanillin 試薬(B)と生薬バニラ(C), バニラエッセンス (D), バニラオイル(E)の各試料の HPLC クロマトグラム.

矢印 V と矢印 EV はそれぞれ vanillin と ethylvanillin のピーク

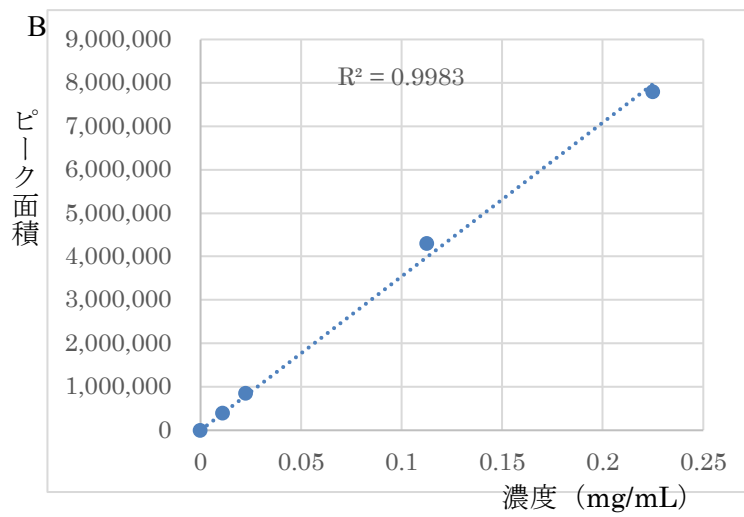
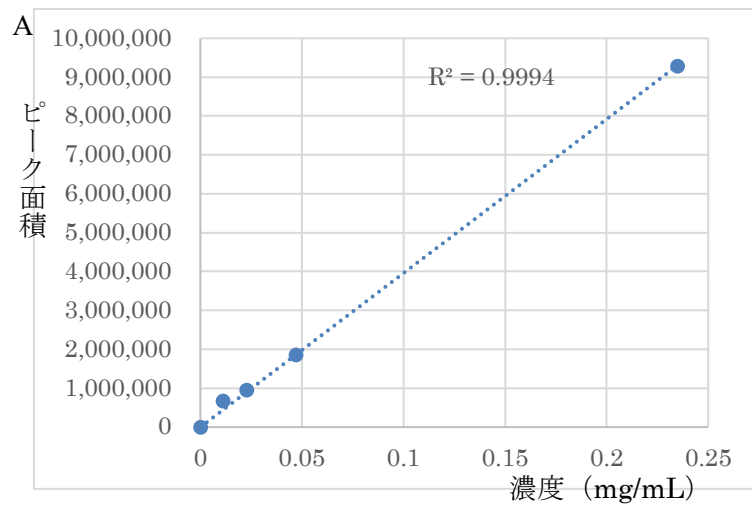


Fig.24 HPLCにおける vanillin (A)と ethylvanillin (B)の検量線

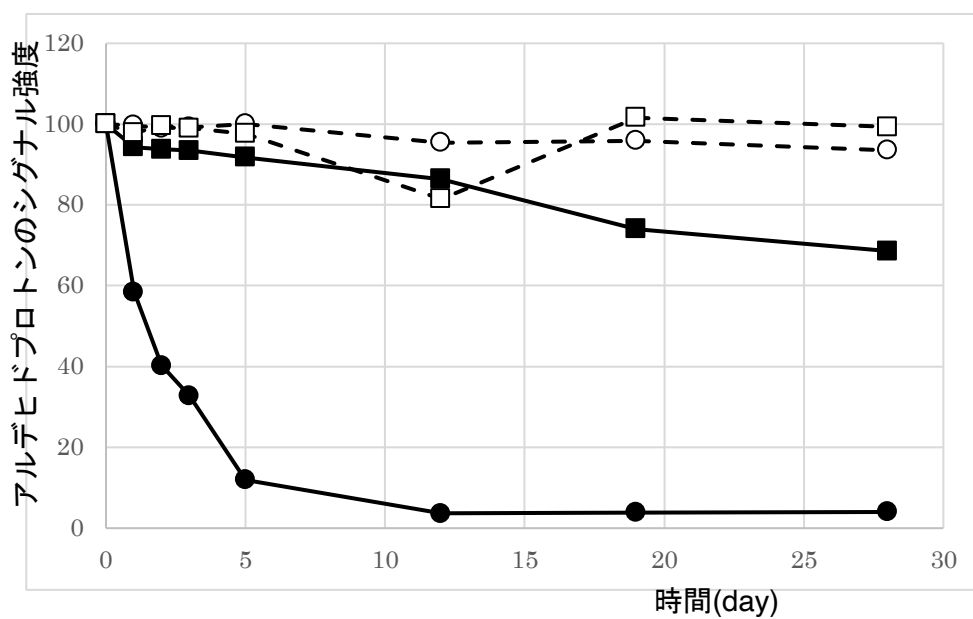


Fig.25 0日目を100としたときの cinnamaldehyde のアルデヒド基のプロトンシグナル積分値の変化

CD₃OD 中 (●, 実線) , CD₃CN 中 (■, 実線) CD₃OD-D₂O 中 (○, 点線)
 CD₃CN-D₂O 中 (□, 点線) で測定

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 Piperine 標準試薬, コショウ種子末とヒハツ種子末中の piperine の含有率

samples	¹ H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
piperine 標準品#	83.0	±0.00	(n = 3)			
コショウ	3.10	±0.09	(n = 3)	2.19	±0.07	(n = 3)
ヒハツ	3.10	±0.19	(n = 4)	2.96	±0.03	(n = 4)

試薬の純度表示は 95%

Table 3 Eugenol 標準試薬とオールスパイス末中の eugenol の含有率

samples	¹ H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
eugenol 標準品#	94.0	±0.00	(n = 3)			
オールスパイス末						
試料 1	3.14	±0.11	(n = 3)	3.75	±0.67	(n = 3)
試料 2	2.46	±0.13	(n = 3)	2.67	±0.16	(n = 3)

試薬の純度表示は 95+%

Table 4 Rosmarinic acid 試薬, ローズマリー葉中および既存添加物のローズマリー水性抽出物中の rosmarinic acid の含有率

samples	¹ H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
試薬#	89.18	±1.06	(n = 3)			
ローズマリー葉末	0.35	±0.03	(n = 3)	0.34	±0.03	(n = 3)
ローズマリー水性抽出物	0.60	±0.11	(n = 3)	0.60	±0.13	(n = 3)

試薬の純度表示は>96%

Table 5 Cinnamaldehyde 試薬とケイヒ末中の cinnamaldehyde の含有率

samples	試薬の表示純度	¹ H-qNMR での含有率(%)		
		平均±SEM		
Cinnamaldehyde 試薬 A	>98% (GC)	98.51	±0.10	(n = 3)
試薬 B	>98% (HPLC)	92.04	±1.03	(n = 3)
試薬 C	>98% (Capillary GC)	97.94	±1.17	(n = 3)
ケイヒ末 A		3.46	±0.04	(n = 3)
ケイヒ末 B		2.39	±0.06	(n = 3)
ケイヒ末 C		2.72	±0.04	(n = 3)

Table 6 Anethole 試薬, ウイキョウ, ダイウイキョウ, アニス中の anethole の含有率

samples	¹ H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
Anethole 試薬	98.12	±0.03	(n = 3)			
日本薬局方ウイキョウ	0.54	±0.02	(n = 3)	0.54	±0.03	(n = 3)
ダイウイキョウ A	2.02	±0.03	(n = 3)	1.96	±0.02	(n = 3)
ダイウイキョウ B	7.32	±0.15	(n = 3)	6.82	±0.09	(n = 3)
ダイウイキョウ C	5.48	±0.11	(n = 3)	5.42	±0.20	(n = 3)
ダイウイキョウ D	5.99	±0.11	(n = 3)	5.82	±0.14	(n = 3)
アニス A	1.33	±0.01	(n = 3)	1.45	±0.02	(n = 3)
アニス B	1.14	±0.02	(n = 3)	1.25	±0.01	(n = 3)

試薬の純度表示は>96%

Table 7 Vanillin 試薬, ethylvanillin 試薬, 生薬バニラ, バニラエッセンス, バニラオイル中の vanillin 及び ethylvanillin の含有率

samples	vanilline		ethylvanillin	
	¹ H-qNMR での含有率(%)	HPLC での含有率(%)	¹ H-qNMR での含有率(%)	HPLC での含有率(%)
	平均±SEM	平均±SEM	平均±SEM	平均±SEM
vanillin 試薬*	96.78	±0.09	n.d.	
ethylvanillin 試薬#	n.d.		99.30	±0.19
生薬バニラ A	0.44	±0.02	0.44	±0.03
生薬バニラ B	0.42	±0.01	0.42	±0.04
バニラエッセンス	0.77	±0.01	0.77	±0.01
バニラオイル	0.65	±0.02	0.72	±0.01
			0.64	±0.01
			0.59	±0.01

*試薬の純度表示は>98% #試薬の純度表示は>97%