

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年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～¹³C-CP/MAS-NMRによるキトサンの脱アセチル化度の測定～

研究分担者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究要旨 キトサンの脱アセチル化度はその物性に大きな影響を与えることから、品質を制御するための重要な指標であると考えられる。そこで、食品添加物として流通しているキトサンの脱アセチル化度を前処理無しで固体のまま直接測定する方法として¹³C-CP/MAS-NMRによる方法を検討した。種々の条件検討を行い、CP/MAS条件を最適化し、測定した結果、測定条件を一定にすることによって固体NMRにより、脱アセチル化度を直接測定することができた。また、ポリビニル硫酸カリウムを用いた滴定法による結果と固体NMRにより得られた結果を比較したところ、ほぼ同じ結果となった。以上のことから、いずれの方法においても脱アセチル化度が測定できていることが確認できた。

研究協力者

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 研究員

中島馨 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 研究員

増本直子 国立医薬品食品衛生研究所

食品添加物部 主任研究官

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

A. 研究目的

既存添加物「キトサン」は基原・製法・本質として「キチン」を、温時～熱時水酸化ナトリウム水溶液で脱アセチル化したもので、D-グルコサミンの多量体からなる。」とされている。また、「キトサン」の原料となる既存添加物「キチン」の基原・製法・本質には、「エビ、カニ等甲殻類の甲殻又はイカの甲を、室温時～温時酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去した後、温時～熱時弱アルカリ性水溶液でタンパク質を除去したもので、N-アセチル-D-グルコサミンの多量体からなる。」と記載されている(消食表第 375号)。公的な成分規格がいずれも設定されておらず、早急な対応が要求されている。

基原・製法・本質に示されたとおり、「キトサン」は、「キチン」を脱アセチル化したものであり、その脱アセチル化度はおよそ 70%とされている。よって、「キトサン」は、グルコサミン(GU)とアセチルグルコサミン (AGU)から構成される多量体である(Fig. 1)。脱アセチル化度は大きく物性に影響を与えるため、品質評価のための重要な指標と考えられる。

キトサンの脱アセチル化度を測定する方法としてポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)によるコロイド滴定が知られている。本法は GU のアミノ基が酸性下でポリカチオンとなり、PVS-K のポリアニオンが強いクーロン引力で、瞬時にポリオンコンプレックスを形成することに基づいている。原理的に、本法によりキトサンの脱アセチル化度が精確に測定可能であると考えられるが、それを裏付ける方法がない。

そこで本研究では、固体 NMR により「キトサン」の分析を試みた。固体 NMR は固体試料をそのまま測定することが可能で前処理の必要がなく、得られた NMR スペクトルより試料の構造あるいは組成を直接観察することができる。PVS-K による滴定法と固体 NMR による定量値を比較し、PVS-K による滴定法で「キトサ

ン」の脱アセチル化度が精確に測定でき、公的な成分規格の試験法として検討に値するかどうか確認したので報告する。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

キチンは国内で入手可能な試薬 7 製品(CN1-7)及び別に入手した食品添加物原料 1 製品(CN8), キトサンは食品添加物 5 製品(CS1-5)を試料として用いた(Table 1). これら製品をそのまま測定に供したが, CN8 については, NMR 試料管に詰めやすいようにはさみで細かく刻んで用いた. また, 本研究において以下の試薬等を試験に用いた. 0.0025 mol/L ポリビニル硫酸カリウム溶液(N/400 PVS-K 溶液)(富士フィルム和光純薬, 164-21655, LOT.PTF7686, $(C_2H_3KO_4S)_n = (162.20)_n$, 《管理番号 21-78c》), トルイジンブルー指示薬溶液(0.1g トルイジンブルー/100mL 水溶液)(富士フィルム和光純薬, 205-05811, LOT.PTH7553, 《管理番号 21-77c》), 超純水(Puric o). 《 》内は当研究室の管理番号を示す.

B-2) 固体 NMR 測定

固体 NMR 測定には, JNM-ECA400 装置(JEOL)を, 測定ソフトには Delta Ver.5.2, 解析には Ver.5.3 を使用した.

試料を 4 mm 固体 NMR 試料管に詰め, 室温条件下, 1H , ^{13}C の 2 つの核種を測定した. ^{13}C 化学シフト値は, テトラメチルシランからの外部基準として, 固体アダマンタンのメチンピーク(高磁場側)を 29.5 ppm に設定した. 1H は native scale で化学シフト値を表した. シグナル帰属は文献値¹⁻³⁾との比較により行った. 基本的な測定パラメータとパルスシーケンスを Table 2, Fig. 2 に示す.

B-2-1) 定量方法 (計算方法)

CP/MAS (Cross Polarization / Magic Angle Spinning)法で固体 NMR を測定するとき, 検出感度を優先していることから, 定量性に乏しいが, 同一条件で測定すればシグナル強度比は一定に測定できる. よって, 試薬キチンが完全に

アセチル化されていると仮定し, これを基準として, キトサン中の AGU 含量を相対的に求めることができる.

Fig. 3 のようにキチン由来の単独シグナル a の積分値を A, キチン+キトサンの混成シグナル b の積分値を B とする. B のうち分離はできないがキチン由来の成分の積分値を $B_{\text{キチン}}$, キトサン由来の積分値を $B_{\text{キトサン}}$ とした場合(簡略化のため核数は 1 とする), 溶液 qNMR ではスペクトル上の各シグナルの積分値は核数とモル濃度に比例するため, $A=B_{\text{キチン}}$ が成立し, 試料中の AGU 含量は

$$\begin{aligned} \text{AGU 含量(mol\%)} &= B_{\text{キチン}} / B * 100 \\ &= A / B * 100 \end{aligned}$$

で求められる. しかし, CP/MAS 法で測定した NMR スペクトルの場合, 各シグナルの積分値は測定対象の核の周囲の他の核, MAS 回転数の影響を受け, 核数とモル濃度に比例関係が成立しないことが多く, $A=B_{\text{キチン}}$ が通常成立しない. そこで, キチン試薬製品を基準物質としてそのシグナル感度比を用いて補正する方法を用いた. 同一条件で測定した基準物質のシグナル a の積分値を A_{ref} , シグナル b の積分値を B_{ref} とすると, 試料中の $B_{\text{キチン}} = A / (A_{\text{ref}} / B_{\text{ref}})$ で補正されるので,

$$\begin{aligned} \text{AGU 含量(mol\%)} &= B_{\text{キチン}} / B * 100 \\ &= (A / (A_{\text{ref}} / B_{\text{ref}})) / B * 100 \\ &= (A / B) / (A_{\text{ref}} / B_{\text{ref}}) * 100 \end{aligned}$$

の関係式より AGU のモルベースの含量が求められる. さらに, AGU と GU のユニット分子量から,

$$\begin{aligned} \text{AGU 含量(wt\%)} &= \text{AGU 含量(mol\%)} * 203 / [\text{AGU 含量(mol\%)} * 203 + (100 - \text{AGU 含量(mol\%)} * 203) * 161] * 100 \end{aligned}$$

と重量ベースの含量に換算することができる. また, 脱アセチル化度は,

$$\begin{aligned} \text{脱アセチル化度(mol\%)} &= \text{GU 含量(mol\%)} \\ &= 100 - \text{AGU 含量(mol\%)} \end{aligned}$$

で求めることができる。

ただし、シグナルが十分に分離しないため、積分比(A/B)を求めるキチン単独シグナル a に CH₃ または C=O を、混成シグナル b に C1, (C3,C4,C5) または (C2,C6) 領域をあてはめ、組み合わせを変えて計 6 つの積分比(A/B, 記号 r1~r6)を求めた。なお、複数炭素領域の積分値は炭素数で割って比を求めた。

$$\begin{aligned} r1 &: \text{CH}_3/\text{C1} \\ r2 &: \text{CH}_3/((\text{C3},\text{C4},\text{C5})/3) \\ r3 &: \text{CH}_3/((\text{C2},\text{C6})/2) \\ r4 &: \text{C}=\text{O}/\text{C1} \\ r5 &: \text{C}=\text{O}/((\text{C3},\text{C4},\text{C5})/3) \\ r6 &: \text{C}=\text{O}/((\text{C2},\text{C6})/2) \end{aligned}$$

以上、基準物質と試料の 6 個の積分比からそれぞれ AGU 含量を求め、平均値を試料の AGU 含量とした。

B-2-2) 緩和時間の確認

測定パラメータの最適化のため、試薬キチンと食品添加物キトサンの ¹H の縦緩和時間 T_{1H} を Saturation Recovery(SR)(飽和回復)法で、試薬キチンの ¹³C の縦緩和時間 T_{1C} を Torchia(トーチヤ)法で測定した。SR 法は、最初に磁化を飽和させ、その回復を観測することで緩和時間を求める方法(Fig. 2e)である。Torchia 法は、交差分極を利用した反復回転法スペクトルと CP/MAS スペクトルの差スペクトルを測定することによって緩和時間を測定する方法(Fig. 2c)で、CP により待ち時間を短縮することができる。

B-2-3) ¹³C-CP/MAS 測定条件の検討

試料回転数、コンタクトタイム、待ち時間、積分回数を検討し、定量用の条件は、Table 2 の ¹³C-CP/MAS 測定条件に決定した。

B-2-4) キチンの ¹³C-CP/MAS 測定

メーカーの異なる試薬 CN1~7 と添加物原料 CN8 のキチンを測定・積分し、繰り返し測定時のばらつき、試料間差があるかどうかを調べた。

B-2-5) キトサン中の AGU 含量、脱アセチル化度の測定

キチン CN1 を基準物質とし、¹³C-CP/MAS スペクトルの積分比 (r1~r6) よりキトサン CS1~5 の AGU 含量と脱アセチル化度を求めた。

B-2-6) 混合試料による混合組成と AGU 含量の確認

¹³C-CP/MAS 測定により、AGU 含量が精確に測定できているかどうか確認するため、キチン CN1 とキトサン CS1 をモル比で 2:1, 1:1, 1:2 混合し、¹³C-CP/MAS 測定を行い、混合組成と算出した AGU 含量が一致するかどうかを調べた。

B-3) 滴定による NH₂ 基の定量

試料約 0.5 g を精密に量り、5 vol%酢酸約 90 mL で 100 mL メスフラスコに洗い込み、室温で一晩放置した、均一なゾル状になっているのを確認し、5 vol%酢酸で 100 mL に定容した。この液 1.0 mL を 50 mL 三角フラスコに分注し、水 30 mL とトルイジンブルー指示薬溶液(TB) 0.1 mL を加えたものを検液とした。検液をスターラーでかく拌しながら、ポリビニル硫酸カリウム溶液(N/400 = 0.0025 mol/L)(PVS-K)で滴定し、検液の色が 10 秒以上赤紫色を保持した点を終点とした(秤量 n3×測定 3 回)。別に 5 vol%酢酸 1 mL に水 30 mL と TB 0.1 mL を加えたものをブランク液(n3)とし、同様に滴定を行った。

次式により NH₂ 基の含量 = GU 含量(mol%)を計算した。

検液中の GU の質量(g):

$$X = 1/400 \times f \times (v-v') / 1000 \times 161$$

検液中の AGU の質量(g):

$$Y = w/100 - X$$

乾燥試料中の NH₂ 基の含量 = GU 含量 (mol%)
= $(X/161) / (X/161 + Y/203) \times 100$

v: 検液の PVS-K 滴定量 (mL)

v': ブランク液の VS-K 滴定量 (mL) (n3 平均)

f: PVS-K のファクター

w: 試料採取量 (g)

161: GU のモル質量

203: AGU のモル質量

ここから、AGU 含量 (mol%) = 100 - GU 含量 (mol%)

C. 結果及び考察

C-1) 固体 NMR と溶液 NMR の違い

固体 NMR は固体試料を溶媒に溶解する必要がないため、難溶性の物質や溶解させることにより構造が変化する物質をそのまま測定することが可能である。測定できる核種は溶液 NMR と同様である。固体測定用の NMR プローブ及び NMR 試料管を用いて固体試料を NMR 試料管に均一に密に詰め測定する。

溶液 NMR では平均化される化学シフト異方性と双極子相互作用が固体 NMR では平均化されずシグナルの線幅が広がるため、固体 NMR ではシグナルの分離能及び検出感度を向上させるための技法が用いられる。固体試料を詰めた NMR 試料管を B₀ 磁場方向に対して 54.7° の角度 (マジック角) に傾けて 4~120kHz で高速回転させる。この技法は MAS (Magic Angle Spinning) と呼ばれ、化学シフトの異方性と双極子-双極子相互作用を平均化する。また、MAS で平均化しきれない双極子-双極子相互作用などを除くために高出力デカップリングが併用される。さらに励起のために DP (Direct Polarization) 又は CP (Cross Polarization) という方法と組み合わせられて用いられる。DP/MAS ではシグナル面積強度比から各成分の比率を算出することが可能だが CP と比べ感度が低く、長時間の測定が必要である。一方、CP/MAS は磁気回転比の大きい核、すなわち、感度の高い核 (¹H, ¹⁹F 等) から磁気回転比の小さい核、すなわち、感度の低い核 (¹³C 等) への分極移動を利用して測定する手法であり、分子運動性が低く、且

つ、磁気回転比の高い核と低い核の空間的距離が近い試料の場合、高感度で測定できる。よって、本研究では、CP/MAS を用いることにした。

C-2) キチン、キトサンの緩和時間の確認

Table 2 の条件でキチンとキトサンの ¹H の縦緩和時間 T_{1H} を SR 法で、¹³C の縦緩和時間 T_{1C} をキチン CN1 についてのみ、Torchia 法で測定した。Fig. 4 にはキチン CN1 の T_{1H} 測定のカブフィットティングを例として示した。¹H スペクトルは H-H 双極子相互作用のため広幅化してしまい 3.5 ppm に 1 本のシグナルしか観察されなかったため、T_{1H} はこのシグナルに対してのみ測定した。キチン CN1~8 及びキトサン CS1~4 について測定した結果、キチン及びキトサンの T_{1H} は最長でも 2.4 s であった。シグナルを飽和させないためには、12 s 以上の繰り返し時間が適当であるが、同一条件で測定する限り、積算効率を優先し多少短くしても定量結果に影響を与えないと考えられた。

次に、キチン CN1 の ¹³C の縦緩和時間 T_{1C} を Torchia 法で測定した結果を Fig. 5, Table 3 に示した。C6 及び CH₃ 位の T_{1C} は比較的短かく運動性が高いと推定された。一方、その他の T_{1C} は長く、C1 位が最長で約 100 s であった。従って、定量性を確保した測定方法 (DP/MAS で繰り返し待ち時間を T_{1C} の 5 倍以上に設定する必要あり) を適用することは現実的ではないと判断できた。よって、キトサン中の AGU 含量の測定には CP/MAS が妥当であると確認できた。

C-3) ¹³C-CP/MAS 測定条件、解析条件の検討

処理条件をまず統一し、再現性や感度を考察した後、測定条件を検討し定量条件を決定した。

C-3-1) ウィンドウ関数

信号面積の精確さを保持し、且つ不要なノイズを除くため、

指数関数 (BF=20Hz) × 台形関数 (0,0,20,60%) で処理を統一した。その後、

ゼロフィリング × 4 倍 → フーリエ変換 → 位相補正 → ベースライン補正 → (波形分離) → 積

分

の順に処理を進めることに統一した。

なお、ベースラインは測定対象のシグナルの積分範囲以外に補正点を設定し補正した。波形分離関数のローレンツ／ガウス混合比は解析ソフト Delta により、シグナルごとにオートで最適化した。Fig. 6 には、キチンとキトサンの FID (緑色)とウィンドウ関数(茶色)を示した。

C-3-2) 積分

得られたキチンとキトサンの ^{13}C -NMR スペクトルを比較したところ、キチンにのみ由来する独立したシグナルは C=O と CH_3 のみであった。両者の母核のアミノ糖部分のスペクトルを比較すると、各シグナルはほぼ同じケミカルシフトで検出された(Fig. 7)。キチンに比べるとキトサンは C1, C2 及び C3 位が低磁場シフトし、C3 と C5 位が重なっており、また全体的に各シグナルが幅広く観察された。このため、積分範囲は、C=O, C1, (C3,C4,C5), (C2,C6), CH_3 の 5 領域に分けることにした。

C-3-5)において、シグナルの積分値の算出方法を示すが、実測スペクトルをベースラインから垂直分割してそのまま積分する方法と波形分離後に積分する方法で求めた(Fig. 8)。

C-3-3) MAS 回転数

200 ppm にわたる化学シフト異方性を消去し、スピニングサイドバンド(SSB)の影響がなく測定を行うには、 ^{13}C -100 MHz 装置では 20 kHz 以上で NMR 試料管を回転させる必要がある。しかし、試料管のサイズ、材質、測定温度により回転数に限界があり、今回用いた装置は 18 kHz が限界である。Fig. 9 には MAS 回転数を 15 kHz と 7 kHz として測定したキチン CN1 のスペクトルを示した。どちらも C=O シグナルに対してスピニングサイドバンド(SSB)が観察されており、15 kHz では CH_3 シグナルと、7 kHz では C1 シグナルと重なることが確認された。15 kHz で測定した場合においても化学シフト異方性は完全に消去できないため、メインシグナルから離れた小さな SSB 強度が観察される。C=O の積分

値としては SSB も含める必要があることから、左右の SSB の面積が同じと仮定し、低磁場側の面積の 2 倍を主シグナルに加え、高磁場側の SSB が含まれると推察される領域から、低磁場側と同じ面積を差し引くことで補正するという方法もある。一方で、MAS 回転数 15 kHz では、観察される SSB の強度は非常に弱いため、測定対象シグナルと重複していたとしても積分値に殆ど影響しないと考えられる。また、常に同一条件で測定するとき、SSB により増減する積分値は常に一定であると考えられる。よって、MAS 回転数は 15 kHz とし、SSB の影響を無視し、補正を行わないこととした。

C-3-4) コンタクトタイム

すべてのシグナルを感度よく測定するコンタクトタイムを設定するため、その値を 1~5 ms の範囲で比較した。キチン CN1 についてコンタクトタイムを変えたときの各シグナル強度の変化を Fig. 10 に示したが、2 ms のとき最大となり、3 ms 以上で感度が低下する傾向が観察された。この結果より、コンタクトタイムを 2 ms として測定することとした。なお、キチン CN1-8 及びキトサン CS1-4 を用いて確認したが、この傾向は変わらなかった。

C-3-5) 繰り返し待ち時間と積算回数

CP/MAS の繰り返し待ち時間は $T_{1H} \times 1.2$ 倍程度のとき積算効率が良い。しかし、シグナルを飽和させないためには T_{1H} の 5 倍以上を確保する必要があるとされている。C-2)で示したようにキチン CN1-8 及びキトサン CS1-4 を用いて T_{1H} を確認し、最長の T_{1H} が 2.4 s であることから、その 5 倍の 12 s 以上が繰り返し待ち時間として理想的であると考えられた。ただし、別に基準物質を用いて同一条件で測定しシグナル感度比を用いて補正するならば、再現性が確保され繰り返し待ち時間を T_{1H} の 5 倍とする必要は無いと考えられる。そこで繰り返し待ち時間を 5 s と 15 s で測定し、得られるシグナル面積の変化を観察した。

キチン CN1-7 について、繰り返し待ち時間 5

s と 15 s で測定をし、CH₃の面積を 1.000 としたときの C=O, C1, (C3, C4, C5), (C2, C6)領域のシグナル面積を求めた。各試料について、各領域のシグナル面積比(15 s の面積/5 s の面積)を計算した結果を Table 4 に示す。Fig. 8 に示すように、(a) キチン CN1 を垂直分割して積分した場合、(b) 波形分離を行ってから積分した場合の計算結果を Table 4a 及び Table 4b に示した。キチン CN1-7 間の積分方法によるばらつきを比べてみると、(a)の積分方法では、積分領域間のばらつきは、2.2~4.3%、試料間のばらつきは、3.1~6.6%であった。一方、(b)の波形分離後の積分では、積分領域間が 0.5~2.5%、試料間が 1.2~2.8%と波形分離してから積分し面積を求めた方が繰り返し待ち時間の違いによるばらつきが小さかった。S/N が悪いときやシグナル同士の重なりが大きいときは、波形分離した方がベースラインのノイズやシグナル同士の重なり部分をうまく処理でき、積分範囲の設定も容易と考えられた。よって、波形分離したシグナル積分面積値を使用することとした。

繰り返し待ち時間 5 s と 15 s での各積分領域の面積比(15 s の面積/5 s の面積)は、ほぼ 1 を示し同一領域でほぼ一定であったことから、繰り返し待ち時間 5 s とし積算効率を優先しても問題がないと判断した。よって、繰り返し待ち時間 5 s で測定し、キチン CN1 の C1 位の S/N(シグナル幅約 20 ppm に対して、ノイズ幅 20 ppm で計算)が 120 を超える 3000 回(測定時間約 4 時間)を定量時の積算回数に設定した。

C-4) ¹³C-CP/MAS スペクトルの比較

C-3-3)から C-3-5)の検討により、定量時の測定条件は Table 1 の ¹³C-CP/MAS 欄に示す通りとし、スペクトル上に観察されるシグナルを波形分離して解析を行うこととした。

Fig. 11 にはキチン CN1-8 (a-h)及びキトサン CS1-5 (i-m)から得られたスペクトルを示した。キチンには α 及び β の結晶形があり、自然界に圧倒的に多く見られるカニ・エビ由来の α -キチンは、*N*-アセチルグルコサミンの極性を交互に配列した逆平行鎖構造をとり、一方、イカの甲

に存在する β -キチンは方向がそろった平行鎖構造をとるとされている⁴⁾。試験に供したキチンのうち、エビ・カニ由来と明らかな試料は CN1, CN2, CN7 (Fig. 11 a), b), g))であり、ほぼ同一のスペクトルを示し、 α -キチンのスペクトルとも一致した。一方、イカ由来のキチン CN8 は、C3, C5 シグナルが重複する点等、 β -キチンのスペクトルの特徴が観察された(Fig. 11 h))。

また、キトサンのうち、試料 CS2 は特にアセチル基に由来する CH₃, C=O のシグナルが他の 4 検体に比べると小さく観察されたが、いずれの検体もアセチル基に由来するシグナルが検出され、いずれのキトサンも脱アセチル化度が 100%ではないことがスペクトルより推察された。

一般的に脱アセチル化度が 50%以下をキチンと呼び、50%以上をキトサンというが、今回測定したキチン及びキトサンの試料のアセチル基のシグナル強度を比較すると明らかにキトサンの強度が小さく、脱アセチル化度が 50%以上であることが推察された。

C-5) キチン基準物質の設定

LC や GC の標品の設定と同じく、¹³C-CP/MAS NMR においても信頼性の高い定量結果を得るためには、可能な限り純度が高く品質の安定したものを基準物質として設定する必要がある。また、同一の基準物質を用い、同一の測定・解析条件でシグナル積分比を求めなければならない。

キチンの CN1-3 を繰り返し 10 回ずつ測定し、積分比 r1~r6 をプロットし、ばらつきを調べた (Fig. 12a-c)。10 回測定の繰り返しのばらつきは、CN1 で 2.8%以内、CN2 で 2.2%以内、CN3 で 1.7%以内であり、また、CH₃よりも C=O が分子になった積分比の方が値が小さくばらつきが大きい傾向にあった。Fig. 12d には、CN1-3 の積分比の平均(各 n=10)と他 5 試料 CN4-8 の積分比(各 n=1)をプロットしたが、CN1-7 の 7 試料間の差は最大でも 3.4%であり大きな差ではないが、CN1 だけが CH₃ が分子の積分比(r1, r2, r3)は他よりも高かった。また、イカ由来の CN8 の積分

比 r1~r6 は他の試料とは若干異なっていた。よって、CN8 を除く CN1-7 はほぼ同等の品質を持つと考え、このうち最も安価に試薬として入手できる CN1 を基準物質として用いることとした。

C-6) キトサンの AGU 含量、脱アセチル化度の測定

キチン CN1 を基準物質とし、n=10 測定の平均の感度比を基準にキトサンの AGU 含量及び脱アセチル化度(各 n1 測定)を算出した(Table 5)。その結果、AGU 含量は試料によって異なり、4~22%であった。Fig. 11i~m にキトサン試料 CS1-5 のスペクトルを示したが、CS1, CS3, CS4 及び CS5 のスペクトルパターンはほぼ等しいが、CS2 のアセチル基のシグナル強度は他と比べて小さく、すなわち、AGU 含量が低く、脱アセチル化度が高かった。また、キトサンのシグナルがブロードで S/N が低いことから、シグナル積分比 (r1~r6) 間のばらつきが 5~10% と大きく、定量結果のばらつきの原因となったと考えられた。

C-7) キチン/キトサン混合試料による確認

C-6)において、キチンを基準物質として感度比補正し、キトサンの AGU 含量を求めた。この方法は、AGU と GU の含量に比例してシグナルが検出されることを前提条件としている。キチンとキトサンを一定量混合した試料を調製しそれを定量し、この前提条件が正しいかどうかを確認した。

粉末状で固体のまま均一に混合しやすい性状の製品であったキチン CN1 とキトサン CS1 を試料として用いた。キチン(CN1)及びキトサン CS1 をモル比で 1:0, 2:1, 1:1, 1:2, 0:1, すなわち、キチンの含量として 100%, 66.6%, 50%, 33.3%, 0%に混合し、¹³C-CP/MAS 測定を行い、混合組成と定量値の関係を調べた。

¹³C-CP/MAS スペクトルを測定し、波形処理を行った後、シグナル積分比(r1~r6)より定量値を算出した。キチン CN1 の n=10 測定の平均の感度比を基準として各混合試料の AGU 含量を求

めた(Fig. 13)。その結果、混合組成と求められた AGU 含量に比例関係が認められた。キトサン CS1 の AGU 含量が 17.7 mol%と先に求めたが(Table 5)、キチン 0%のときの値はこの値に一致し、キチン 100%のときの値が 100mol%を示し、キチンとキトサンの混合試料の AGU 含量は混合比に比例した。よって、¹³C-CP/MAS 測定の感度比補正による定量がうまく機能していると判断できた。

C-8) 滴定による脱アセチル化度の測定

キトサンの公的な成分規格の設定を検討しているところであるが、その中で、脱アセチル化度は一定の品質・性質を担保する上で重要であると考え、脱アセチル化度 70.0%以上と規定し、B-3)に示した滴定法を採用する方向で調整している。滴定法は、試料中の GU の-NH₂基を滴定して GU 含量を求め、残りを AGU と見なすものである。一方、今回検討した固体 NMR 法は、AGU 含量を求め、残りを GU と見なすものとなっている。すなわち、直接的に定量する対象がことになっているが、いずれも正しく測定できていれば、求められる脱アセチル化度は一致するはずである。

Table 6 には、滴定法と今回検討した固体 NMR (¹³C-CP/MAS)によって求めたキトサン(CS1-4)の脱アセチル化度を示した。両法により求めた各試料の脱アセチル化度を比較すると 3~5%程度の差でほぼ同じ値を示し、いずれの試料においても滴定法が大きめの値を示した。滴定法では、試料中に存在する-NH₂基を測定していることから、GU 以外の-NH₂基を合算して測定している可能性があると考えられた。

D. 結論

現在、既存添加物「キチン」及び「キトサン」の成分規格の作成のため、それに設定する項目及び試験法を検討しているところである。「キチン」はアセチルグルコサミン(AGU)から、「キトサン」はグルコサミン(GU)とアセチルグルコサミン(AGU)から構成された多量体である。脱アセチル化の割合によって、物性が大きく変

化することから、両者を区別、あるいは品質を確保するための指標となると考えられる。「キトサン」の脱アセチル化度を測定する方法としてポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)によるコロイド滴定が知られている。本法を脱アセチル化度の試験法に設定して問題はないと考えられるが、正しい値を算出できているか確認した例はない。そこで、 ^{13}C -CP/MAS-NMRにより、脱アセチル化度を求める方法を検討した。その結果、測定条件を最適化することによって試料を前処理することなく脱アセチル化度を直接測定することができた。ポリビニル硫酸カリウム(PVS-K)を用いた滴定法による結果と固体NMRにより得られた結果を比較したところ、ほぼ同じ結果を示したことから、いずれの方法においても脱アセチル化度が測定できていることが確認できた。 ^{13}C -CP/MAS-NMRによる方法は、試料を前処理することなく測定可能である点において優れているが、高価なNMR装置を用いる必要があり、現時点では実用性は低い。一方、滴定法は操作が若干複雑であるが特別な装置を必要としない点において優れている。今回、原理の異なる二つの測定法においてほぼ同様な結果が算出されたことから、「キトサン」の脱アセチル化度の試験法として滴定法を設定しても問題ないと判断できた。

E. 参考文献

- 1) M.L. Duarte, M.C. Ferreira, M.R. Marvão, J. Rocha: Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* 2001, 28(5), 359-363.
 - 2) L. Heux, J. Brugnerotto, J. Desbrières, M.-F. Versali, M. Rinaudo: Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* 2000, 1(4), 746-751.
 - 3) H. Kono: Two-dimensional magic angle spinning NMR investigation of naturally occurring chitins: precise ^1H and ^{13}C resonance assignment of alpha- and beta-chitin. *Biopolymers* 2004, 75(3), 255-263.
 - 4) 桜井謙資, キチン・キトサンの構造, SEN-I GAKKAISHI(繊維と工業), 1990, 46(12), 553-557.
- #### F. 研究業績
1. 学会発表等
 - 1-1. 学会
 - 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)(誌上開催).
 - 2) 寺澤陸, 本多亘, 榊原みなみ, 長谷川文哉, 豊島智三, 石田康行, 堤内要, 猪飼誉友, 石橋諒, 箕川剛, 古屋浩太, 森本隆司, 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 岡尚男: 固体NMRと熱分解GC-MSを用いたクチナシ青色素の構造解析. 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) 多田敦子, 日置冬子, 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 *dl*- α -トコフェロールの色調と純度について. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表).
 - 4) 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」に含まれるイソ治安酸アリル定量法の改良. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上発表).
 - 5) 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リル定量法の改良. 日本食品化学学会第26回総会・学術大会(2020.5.28)(誌上開催).
 - 6) 渡辺麻衣子, 青木渉, 渡辺雅樹, 寺島淳, 小西良子, 近藤一成, 工藤由紀子: CO1遺伝子塩基配列における挿入/欠失パターンおよび系統解析に基づく日本国内に分布する *Entoloma sarcopum* とその近縁種の食用および毒キノコの識別. 日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会(2020.11.24-2020.12.8)(Web).

- 7) 堤内要, 寺澤陸, 本多亘, 榊原みなみ, 長谷川文哉, 豊島智三, 石田康行, 猪飼誉友, 石橋諒, 古屋浩太, 森本隆司, 石附京子, 西崎雄三, 増本直子³⁾, 杉本直樹, 佐藤恭子, 岡尚男: 量子化学計算を用いたクチナシ青色素の分子構造に関する研究. 日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会(2020.11.24-2020.12.8)(Web).
- 8) 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: 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(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター).
- 9) 石附京子, 建部千絵, 西崎雄三, 窪崎敦隆, 多々敦子, 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(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター).
- 10) 内山奈穂子, 細江潤子, 杉本直樹, 石附京子, 小出達夫, 村林美香, 宮下尚人, 小林謙吾, 藤峰慶徳, 横瀬俊幸, 大藤克也, 清水仁, 長谷部隆, 浅井由美, 江奈英里, 菊池純子, 清田浩平, 藤田和弘, 牧野吉伸, 八十歩直子, 山田裕子, 岩本芳明, 三浦亨, 水井浩司, 朝倉克夫, 末松孝子, 小浜亜以, 後藤隆志, 安田万寿, 上田知彦, 合田幸広: ³¹P-qNMRの検討(1) シクロホスファミド水和物の絶対純度の測定. 第2回日本定量NMR研究会年(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター).
- 11) 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(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター).
- 12) 坂口裕子, 高橋未来, 西崎雄三, 高木映里, 橋本誠, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一, 一川暢宏: 相対モル感度に基づくカルバマゼピンとフェニトインのシングルリファレンスHPLC定量法の構築と基礎検討. 日本薬学会第141年会(2021.3.26-3.29)(広島国際会議場他).
- 1) 杉本直樹: 定量に用いる相対モル感度(RMS)の求め方. 第2回日本定量NMR研究会年(2020.12.4)(LiSE川崎生命科学・環境研究センター, 約70名).
- 2) Sugimoto N: Measurement of relative molar sensitivity using the combination of qNMR and chromatography from the viewpoint of regulatory science. Virtual workshop, Emerging Technologies: Quantitative NMR and digital data-overview and perspectives. (2020.11.19)(USP on-line, 約120名).
- 3) Sugimoto N: Virtual Roundtable Panelist. Emerging Technologies: Quantitative NMR and digital data-overview and perspectives. (2020.11.19)(USP on-line, 約120名).

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) 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, 164-172.
- 2) 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. *Analytical chemistry*. 2021; in press.
- 3) Uchiyama N, Hosoe J, Miura T, Sugimoto N, Ishizuki K, Yamada Y, Iwamoto Y, Suematsu T, Komatsu T, Maruyama T, Igarashi Y, Higano T, Shimada N, Goda Y: Determination of absolute purities of hygroscopic substances by quantitative NMR analysis for the standardization of quantitative reagents in the Japanese Pharmacopoeia (Part 2). *Chem. Pharm. Bull.* 2021; 69: 26-31.
- 4) Uchiyama N, Hosoe J, Sugimoto N, Ishizuki K, Koide T, Murabayashi M, Ono M, Kobayashi K, Fujimine Y, Yokose T, Ofuji K, Shimizu H, Hasebe T, Asai Y, Ena E, Kikuchi J, Kiyota K, Fujita K, Makino Y, Yasobu N, Ohara T, Yamada Y, Suzuki H, Miura T, Mizui K, Asakura K, Suematsu T, Kohama A, Goda Y: Absolute purity

1-2. シンポジウム等

- determination of a hygroscopic substance, indocyanine green, using quantitative NMR (qNMR). *Chem. Pharm. Bull.* 2021; 69: 118-123.
- 5) 内山奈穂子, 細江潤子, 三浦亨, 杉本直樹, 石附京子, 山田裕子, 岩本芳明, 末松孝子, 小松功典, 丸山剛史, 五十嵐靖, 日向野太郎, 嶋田典基, 合田幸広: 日本薬局方・定量用試薬の規格化を目的とした定量NMRを用いた吸湿性化合物の絶対純度の測定 (Part 1). *薬学雑誌*, 2020; 140 1063-1069.
- 6) 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: 42-52.
- 7) 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 ¹H-qNMR to determine acteoside and pedaliin in dried sesame leaf powders and processed foods. *PLoS ONE*, 2020; 15(12): e0243175.
- 8) Miura T, Sugimoto N, Bhavaraju S, Yamazaki T, Nishizaki Y, Liu Y, Bzhelyansky A, Amezcua C, Joseph Ray, Zailer E, Diehl B, Gallo V, Todisco S, Ofuji K, Fujita K, Higano K, 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: 868-878.
- 9) 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.
- 10) 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: 123-134.
- 2-2. 総説
- 1) Amakura Y, Yoshimura M, Sugimoto N, Akiyama H: Characterization of components in natural products for the evaluation of existing food additives in Japan. *Chem. Pharm. Bull.* 2021; 69: 11-17.
- 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

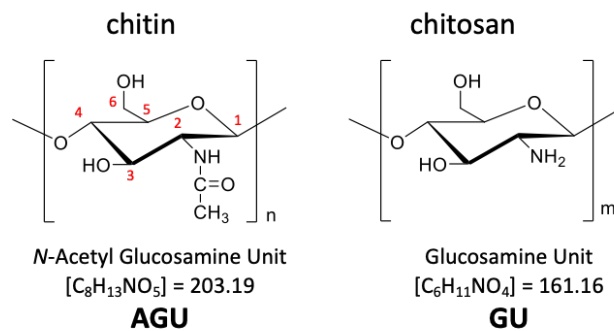


Fig.1 Structures of units of chitin and chitosan

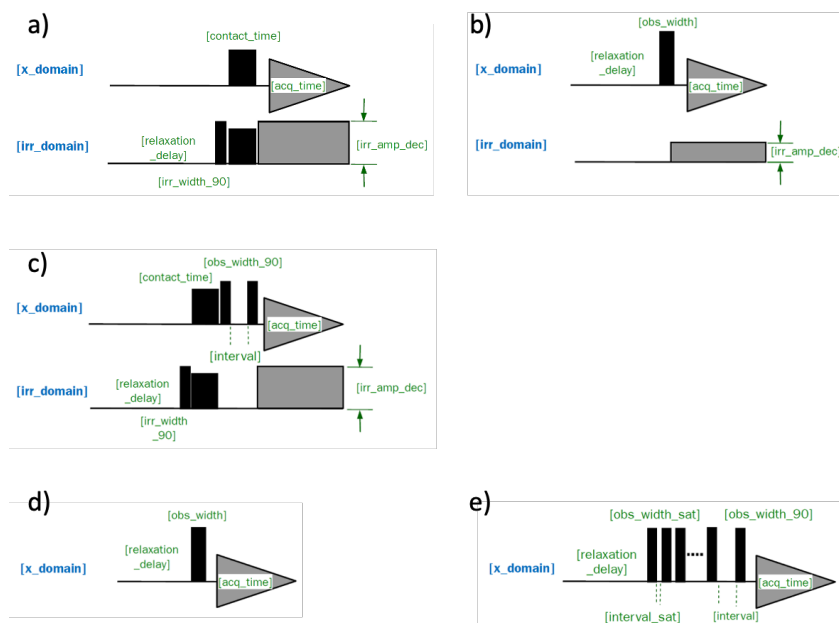


Fig. 2 Pulse sequences used for this study

a) CP/MAS (cpmas_advanced), b) DP/MAS (single_pulse_dec_solid),

c) $^{13}C-T_1$ (torchiat1_cpmas), d) 1H (single_pulse_solid), e) $^1H-T_1$

(saturation_recovery)

These refer to NMR user's manual of JNM-ECZ series (JEOL).

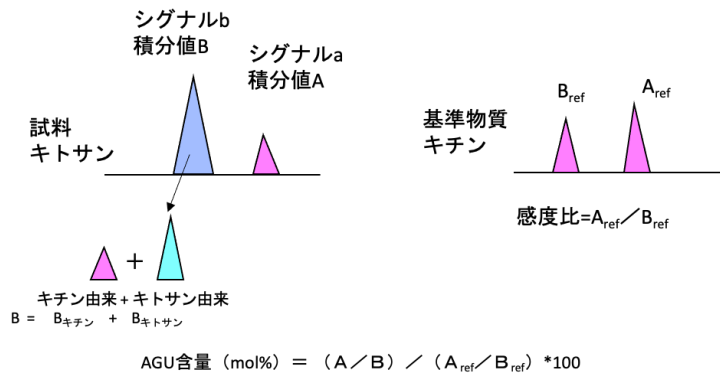


Fig. 3 基準物質のシグナル比で補正したAGU含量の求め方

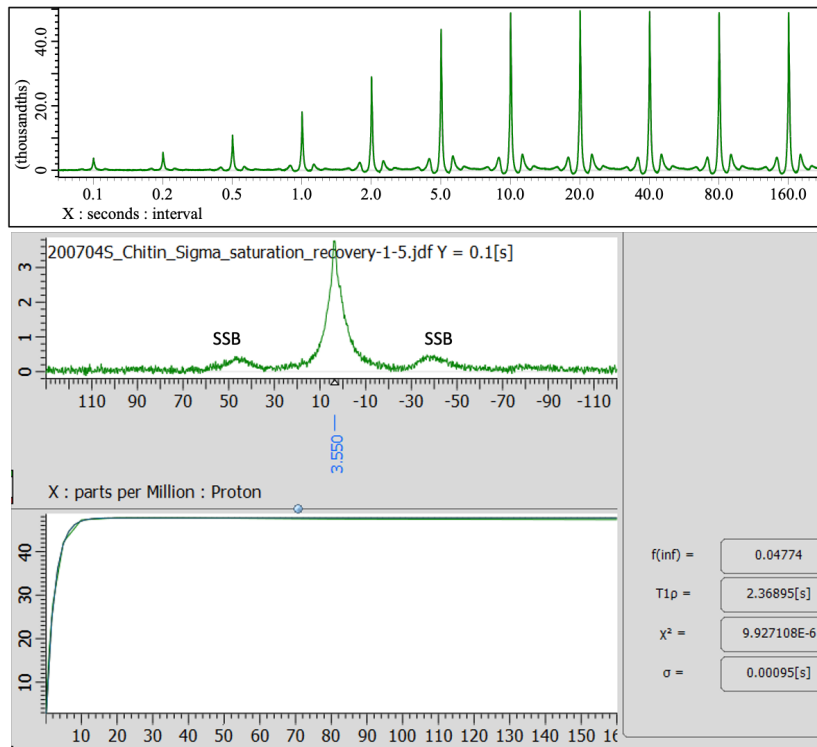


Fig. 4 キチン(CN1)のsaturation recovery法による T_{1H} 測定のカブ
 フィッティング結果
 intervalを0.1~160 sに変わって測定, 回転数15 kHz, 積算2回

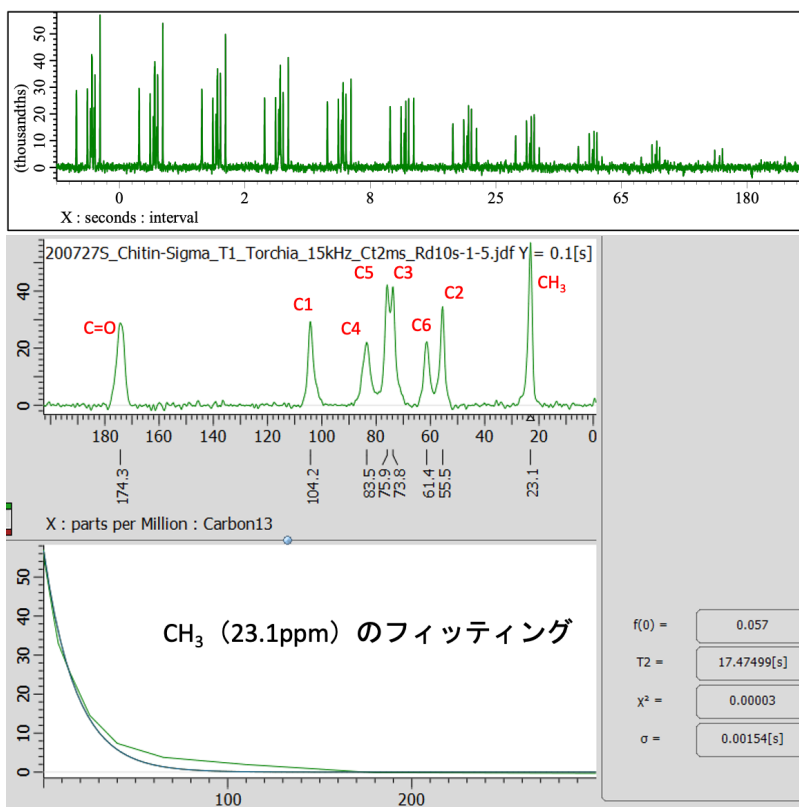
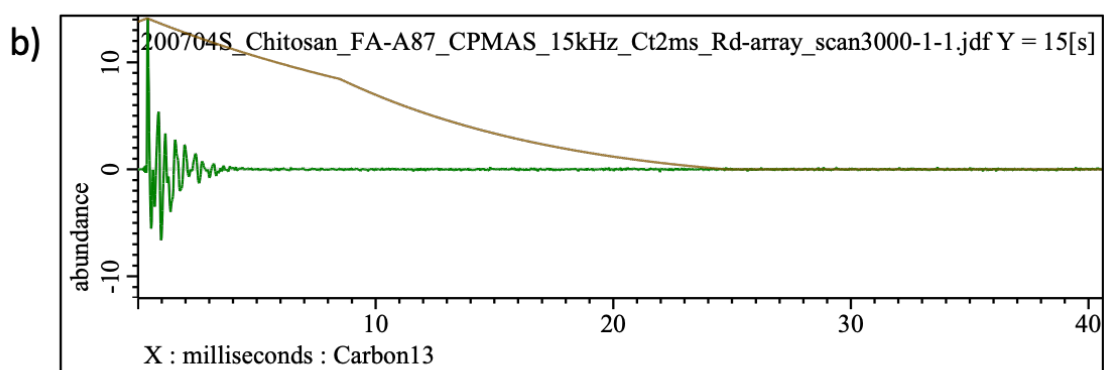
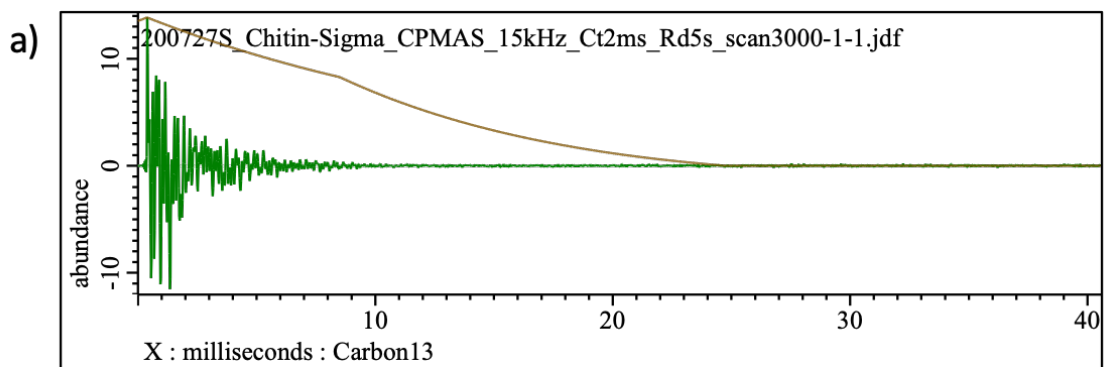


Fig. 5 キチン(CN1)のTorchia法による T_{1c} 測定のカブフィッティング結果
intervalを0.1~300 sに変えて測定, 回転数15 kHz, 積算110回



exp : 20.0[Hz] : 0.0[s]
 trapezoid3 : 0[%] : 20[%] : 60[%]
 zerofill : 4 : TRUE
 fft : 1 : TRUE : TRUE
 ppm

Fig. 6 ^{13}C -CP/MASのFIDとウィンドウ関数
 a) キチン試薬(CN1), b) キトサン食品添加物(CS1)

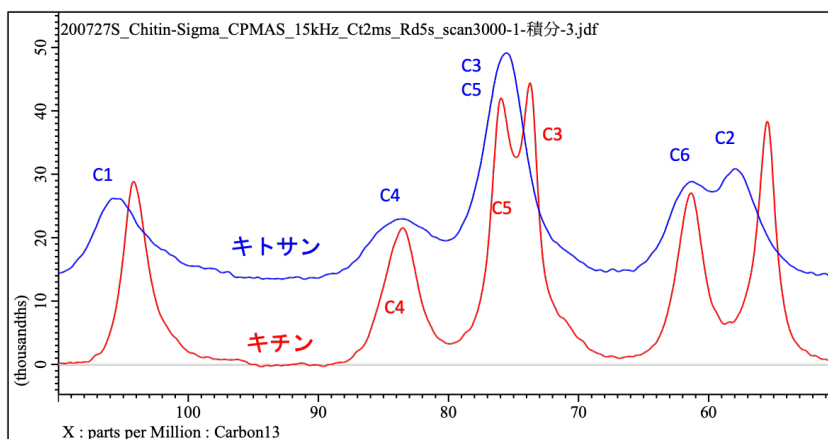


Fig. 7 キチン(CN1)とキトサン(CS3)の¹³C-CP/MASスペクトル(糖部分拡大)
 回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 待ち時間5 s, 積算3000回

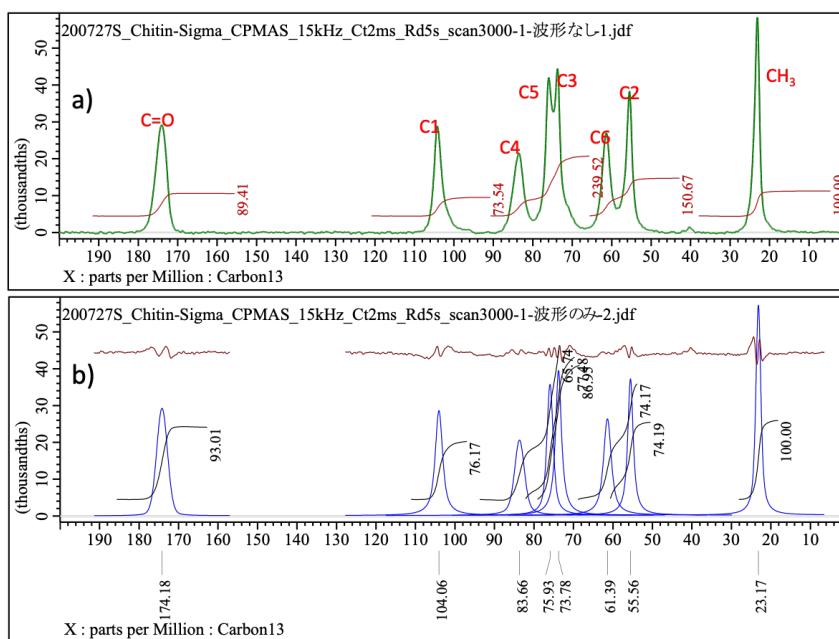


Fig. 8 キチン(CN1)の¹³C-CP/MASスペクトルの積分
 回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 待ち時間5 s, 積算3000回
 a)測定スペクトル(緑)を積分範囲ブロックごとにベースラインから垂直分割して積分, b)波形分離スペクトル(青)とその積分値と残差(赤)

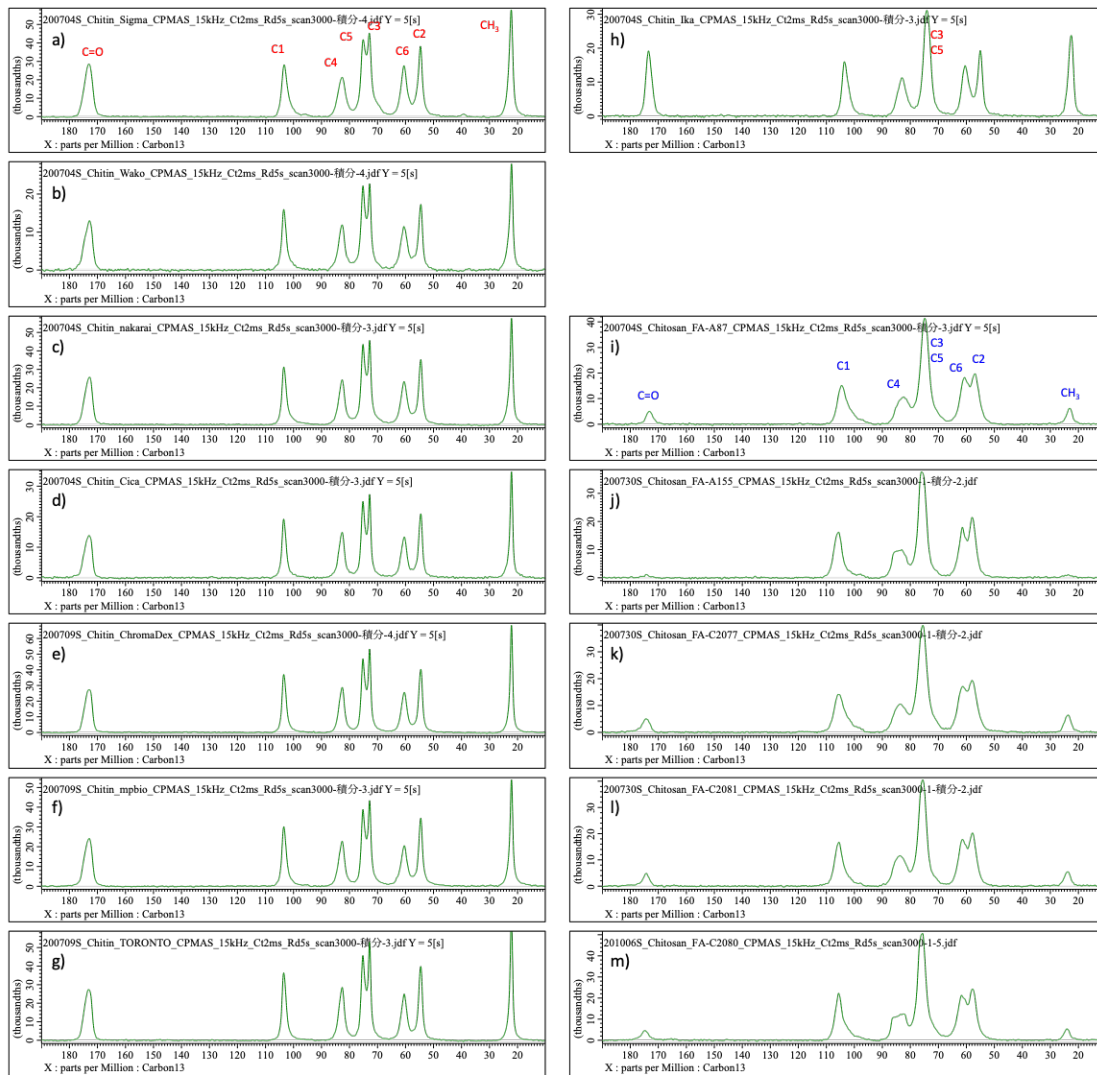


Fig. 11 キチン及びキトサン¹³C-CP/MASスペクトル

キチン: a) CN1, b) CN2, c) CN3, d) CN4, e) CN5, f) CN6, g) CN7, h) CN8.

キトサン: i) CS1, j) CS2, k) CS3, l) CS4, m) CS5

回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 待ち時間5 s, 積算3000回

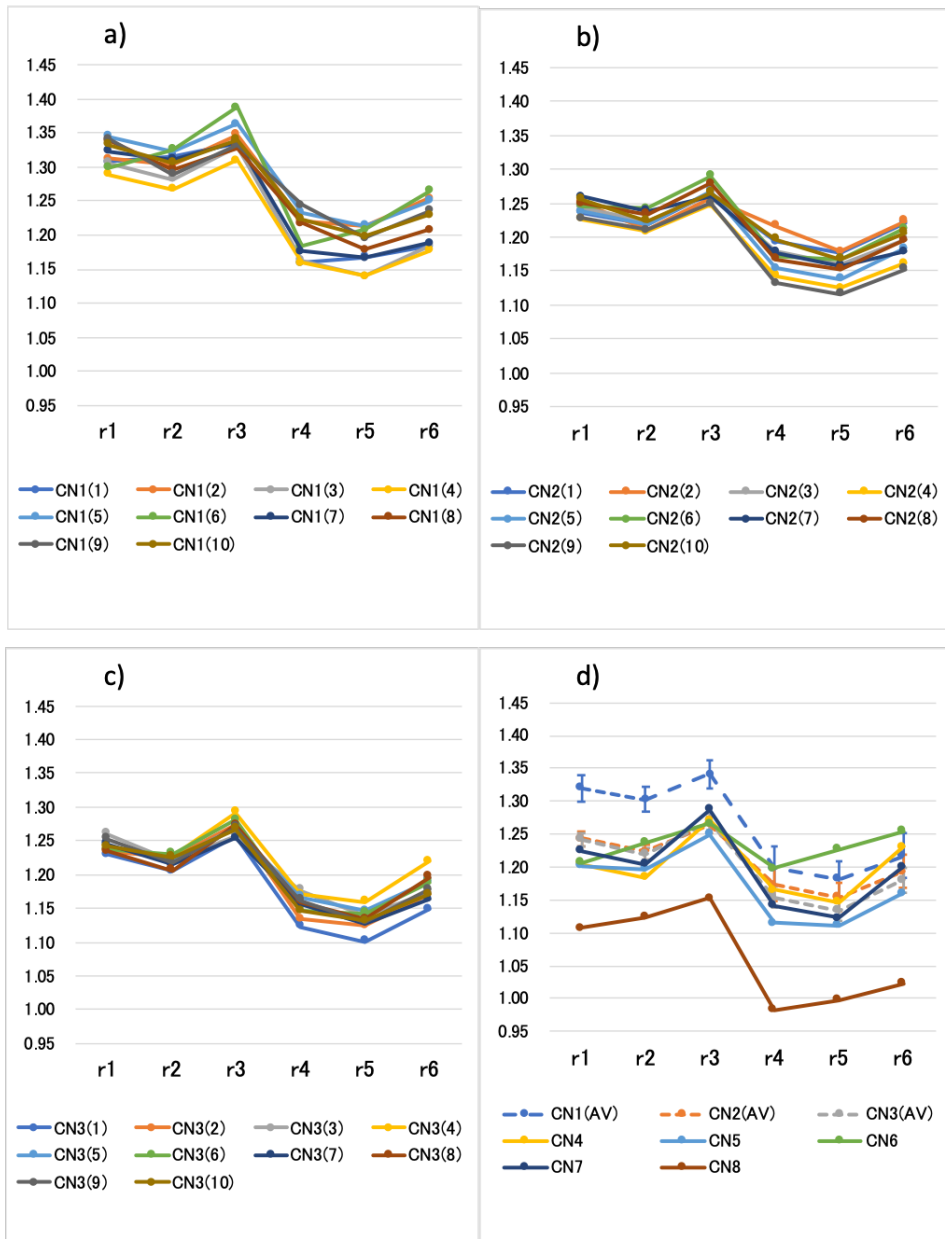


Fig. 12 ^{13}C -CP/MAS測定によるキッチンのシグナル面積比
a) CN1, b) CN2, c) CN3, d) CN1-8の比較(ただし, CN1-3はn=10のAV
回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 待ち時間5 s, 積算3000回,
繰り返し測定回数n=10

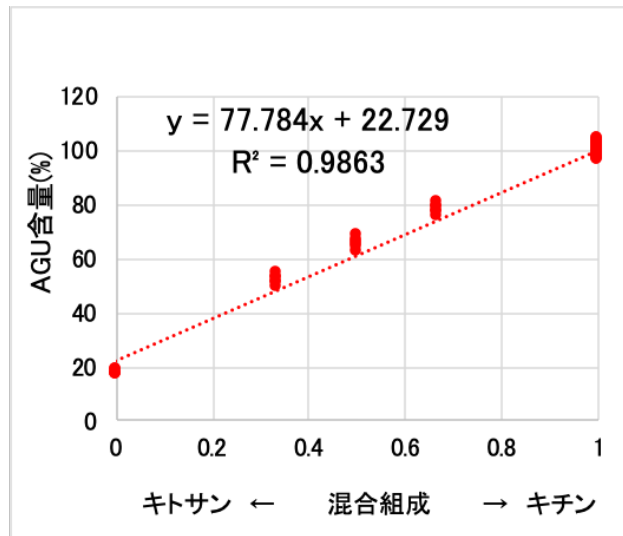


Fig. 13 キチン(CN1)とキトサン(CS1)の混合組成と¹³C-CP/MAS測定により求めたAGU含量の関係

Table 1 Sample information

Sample No.	Voucher code	Material	Grade	Origin
CN1	2T 31R	Chitin	Reagent	Shrimp
CN2	12000030	Chitin	Reagent	Crab
CN3	12000035	Chitin	Reagent	-
CN4	12000031	Chitin	Reagent	-
CN5	12000053	Chitin	Reagent	-
CN6	12000052	Chitin	Reagent	-
CN7	12000054	Chitin	Reagent	Shellfish
CN8	-	Chitin	Sample	Squid
CS1	A87	Chitosan	Food Additive	-
CS2	A155	Chitosan	Food Additive	-
CS3	C2077	Chitosan	Food Additive	Crab
CS4	C2081	Chitosan	Food Additive	-
CS5	C2080	Chitosan	Food Additive	Squid

Table 2 Measurement parameters

JNM-ECZ400 (JEOL)				
装置	NM-84001HXM4 (4 mm CP/MAS probe)			
プローブ	NM-05420ST4 (Zirconia 4 mm tube)			
試料管	9.34T			
磁場強度	9.34T			
測定内容	¹³ C-CP/MAS	T _{1ρ} (Torchia法)	¹³ C-DP/MAS	T _{1H} (SR法)
観測核	¹³ C	¹³ C	¹³ C	¹ H
シーケンス名	cpmas_advancedjxp	TorchiaT1_cpmasjxp	single_pulse_decjxp	saturation_recoveryjxp
共鳴周波数	¹³ C 100MHz	¹³ C 100MHz	¹³ C 100MHz	¹ H 400MHz
観測中心	100ppm	100ppm	100ppm	5ppm
観測範囲	400ppm	400ppm	400ppm	100kHz
デジタルフィルタ	ON × 8	ON × 8	ON × 8	ON × 8
ポイント数	2048	2048	2048	1024
デジタル分解能	24.6 Hz	24.6 Hz	24.6 Hz	122Hz
取り込み時間	40.6ms	40.6ms	40.6ms	8.2ms
パルス幅	¹ H90° 3.18us	¹ H90° 3.18us	-	-
パルス幅	-	-	¹³ C90° 2.82us	¹ H90° 3.18us
コンタクトタイム	2ms	2ms	-	-
CPモード	RAMP-CP	RAMP-CP	-	-
¹ Hスピンロック強度	ca.55kHz	-	-	-
Obsスピンロック強度	¹³ C ca.70kHz	-	-	-
連続測定変数	-	0.1 - 300s (12pt)	-	0.1 - 160s (11pt)
待ち時間	5 s	10s	550s	0.1s
繰り返し時間	5.04s	15 - 310s	550s	0.2 - 160.1s
MAS回転数	15kHz	15kHz	15kHz	15kHz
積算回数	3,000	110	1,000	2
デカップリング	SPINAL64	TPPM	SPINAL64	-
デカップリングパワー	78.6kHz	78.6kHz	78.6kHz	-
測定温度	room temp.	room temp.	room temp.	room temp.
測定時間	4.2hour	26.6hour	153hour	11min

Table 3 キチン試薬(CN1)の $T_{1\rho}$

Position	Chemical shift [ppm]	$T_{1\rho}$ [s]
C=O	174.3	46
C1	104.2	101
C4	83.5	84
C5	75.9	33
C3	73.8	70
C6	61.4	1
C2	55.5	88
CH ₃	23.1	18

Table 4a ¹³C-CP/MAS測定における繰り返し待ち時間(5 s, 15 s)の影響

Sample No.	波形分離せずに積分した場合の積分比(15s/5s)のばらつき					積分領域間のばらつき		
	C=O	C1	C3-C5	C2,C6	CH ₃	AVR	STDEV	CV%
CN1	1.073	0.966	0.999	0.992	1.000	1.006	0.040	4.0
CN2	0.951	0.894	0.941	0.976	1.000	0.952	0.040	4.2
CN3	1.024	0.975	0.954	0.959	1.000	0.983	0.030	3.0
CN4	1.099	1.117	1.051	1.050	1.000	1.063	0.046	4.3
CN5	1.009	0.969	0.966	0.961	1.000	0.981	0.022	2.2
CN6	0.937	0.935	0.946	0.980	1.000	0.960	0.029	3.0
CN7	0.933	0.969	0.946	0.958	1.000	0.961	0.025	2.6
AVR	1.004	0.975	0.972	0.982	1.000			
STDEV	0.061	0.064	0.037	0.030	0.000			
CV%	6.1	6.6	3.8	3.1	0.0			

*測定条件: 回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 積分回数3000回

Table 4b ¹³C-CP/MAS測定における繰り返し待ち時間(5 s, 15 s)の影響

Sample No.	波形分離した場合の積分比(15s/5s)のばらつき					各積分領域間のばらつき		
	C=O	C1	C3-C5	C2,C6	CH ₃	AVR	STDEV	CV%
CN1	1.042	0.974	1.000	0.996	1.000	1.002	0.025	2.5
CN2	1.026	0.989	0.997	1.014	1.000	1.005	0.015	1.5
CN3	1.055	1.006	1.002	1.002	1.000	1.013	0.023	2.3
CN4	0.981	1.031	1.011	1.022	1.000	1.009	0.020	1.9
CN5	1.009	0.992	0.994	0.982	1.000	0.995	0.010	1.0
CN6	0.978	0.983	0.970	0.977	1.000	0.982	0.011	1.1
CN7	0.990	1.003	0.995	0.998	1.000	0.997	0.005	0.5
AVR	1.012	0.997	0.996	0.999	1.000			
STDEV	0.028	0.017	0.012	0.015	0.000			
CV%	2.8	1.7	1.2	1.5	0.0			

*測定条件: 回転数15 kHz, コンタクトタイム2 ms, 積分回数3000回

Table 5 ¹³C-CP/MAS測定によるキトサンの積分比, AGU含量(mol%), 脱アセチル化度(mol%)

Category	Sample No.	Ratio of integral						AVR	STDEV	CV(%)
		CH ₃ /C1	CH ₃ /[(C3,C4,C5)/3]	CH ₃ /[(C2,C6)/2]	C=O /C1	C=O /[(C3,C4,C5)/3]	C=O /[(C2,C6)/2]			
		r1	r2	r3	r4	r5	r6			
Chitin	CN1*	1.32	1.302	1.342	1.198	1.182	1.218	1.260	0.069	5.5
Chitosan	CS1	0.225	0.231	0.252	0.200	0.205	0.224	0.223	0.019	8.4
Chitosan	CS2	0.05	0.049	0.053	0.051	0.050	0.055	0.051	0.002	4.4
Chitosan	CS3	0.258	0.263	0.293	0.265	0.271	0.301	0.275	0.018	6.4
Chitosan	CS4	0.237	0.251	0.251	0.236	0.226	0.250	0.242	0.010	4.3
Chitosan	CS5	0.187	0.178	0.207	0.193	0.187	0.218	0.195	0.015	7.6
Convert to AGU content (mol%)										
Chitosan	CS1	17.1	17.7	18.8	16.7	17.3	18.4	17.7	0.8	4.5
Chitosan	CS2	3.8	3.8	4.0	4.3	4.3	4.5	4.1	0.3	7.1
Chitosan	CS3	19.5	20.2	21.8	22.2	22.9	24.7	21.9	1.9	8.6
Chitosan	CS4	17.9	17.4	18.7	19.7	19.1	20.5	18.9	1.1	6.1
Chitosan	CS5	13.9	13.7	15.4	16.1	15.8	17.9	15.5	1.6	10.0
Convert to deacetylation degree (mol%) (=100-AGU)										
Chitosan	CS1	82.9	82.3	81.2	83.3	82.7	81.6	82.3	0.8	1.0
Chitosan	CS2	96.2	96.2	96.0	95.7	95.7	95.5	95.9	0.3	0.3
Chitosan	CS3	80.5	79.8	78.2	77.8	77.1	75.3	78.1	1.9	2.4
Chitosan	CS4	82.1	82.6	81.3	80.3	80.9	79.5	81.1	1.1	1.4
Chitosan	CS5	86.1	86.3	84.6	83.9	84.2	82.1	84.5	1.6	1.8

* AV (n = 10)

待ち時間 5 s, 波形分離後積分

Table 6 キトサンの脱アセチル化度の比較

Sample No.	Titration		Solid NMR	
	AV (%)	CV(%)	AV (%)	CV(%)
CS1	86.48	0.36	82.32	0.98
CS2	99.53	1.15	95.90	0.30
CS3	84.44	0.84	78.11	2.41
CS4	86.63	1.81	81.11	1.42