

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

～qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究～

研究分担者 永津明人 金城学院大学薬学部 教授

**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、 $^1\text{H}$ -qNMR法(定量 $^1\text{H}$ -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2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、「香辛料抽出物」の基原に上がっているもののうち、生薬として市販されているものの抽出物を作成し、 $^1\text{H}$ -qNMR法での定量が可能かの検討を行った。令和2年度は、コショウ種子、ケイヒ、オールスパイス種子を原材料とした既存添加物の規格試験法へのアプローチとして、コショウ種子の指標成分として適切であろう piperine、ケイヒの指標成分として適切であろう cinnamaldehyde、オールスパイス種子の指標成分として適切であろう eugenol の $^1\text{H}$ -qNMR法を用いた定量の検討を行い、各抽出物中に含まれるそれぞれ piperine、cinnamaldehyde、eugenolが $^1\text{H}$ -qNMR法で定量可能であることを示した。また、既存のHPLC法との同等性を確認することで、 $^1\text{H}$ -qNMR法がHPLC法に代わりうる定量法であり、規格基準の策定に応用できる可能性を示した。

## A. 研究目的

$^1\text{H}$ -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。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対して、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 $^1\text{H}$ -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2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。また、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。そのため、その正確な純度を得るには $^1\text{H}$ -qNMR法が適していると考えられる。そこで29年度には揮発性成分が主成分と考えられる20種類の粉末生薬のMeOH抽出物の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを測定して、 $^1\text{H}$ -qNMR法に適用できる独立したシグナルを持つスペクトルを与えると判断できるものを選抜した。これまでにその中からスターアニス中の anisaldehyde、クミン中の cuminaldehyde、フェネグreek中の trigonelline が指標成分になりうることを考え、その定量方法に関する検討を行なった。令和2年度は、前年度に $^1\text{H}$ -qNMR法に適用が可能と確認したコショウについて、piperine (Fig. 1)の $^1\text{H}$ -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、ケイヒ中の cinnamaldehyde (Fig. 2), スターアニス中の eugenol (Fig. 3)についても <sup>1</sup>H-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。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

<sup>1</sup>H-qNMR 測定時の内部標準物質として用いる 3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt-*d*<sub>6</sub> (DSS-*d*<sub>6</sub>, Fig. 4)と 1,4-Bis(trimethylsilyl)-benzene-*d*<sub>4</sub> (1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>, Fig. 4)は和光純薬の Trace Sure®規格のものを用いた。NMR 測定用溶媒の dimethylsulfoxide (DMSO)-*d*<sub>6</sub>, methanol-*d*<sub>4</sub>, pyridine-*d*<sub>5</sub>はそれぞれ Isotec Inc.の 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 級試薬を用いた。コショウ種子およびヒハツ種子は、スパイスとして市販されている粉末を令和 2 年 4 月に購入した。ケイヒは、スパイスとして市販されている粉末を令和 1 年 10 月に購入したものと、切断生薬として令和 2 年 4 月に購入したものを実験前に粉末化して使用した。オールスパイスは、スパイスとして市販されている粉末 2 種類を令和 2 年 10 月に購入して使用した。

**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。分注操作で用いる電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x を使用した。超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S で、遠沈操作は遠心器 TOMY PMC-060 を用いた。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-2089, カラムオープンに Shimadzu CTO-20AC を、検出器はフォトダイオードアレイ検出器 JASCO MD-2010 を用いて行った。

### B-3)<sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>H-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) <sup>1</sup>H-qNMR 法に用いる試料の調製

1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>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*<sub>5</sub>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晚乾燥させ、約 10 mg を精秤して 1.00mL の pyridine-*d*<sub>5</sub>に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-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*<sub>5</sub> (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*<sub>4</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。

#### B-3-b) <sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>H-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. 5) <sup>1</sup>H-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*<sub>4</sub> 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*<sub>B</sub>, *C*<sub>P</sub>はそれぞれ 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>及び piperine のモル濃度(mol/mL), *I*<sub>B</sub>, *I*<sub>P</sub>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 : H<sub>2</sub>O 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. 6)

<sup>1</sup>H-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、H-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 10μL 注入して得られたクロマトグラムの piperine のピークの面積からその定量を行った。(Fig. 6)

### B-4)<sup>1</sup>H-qNMR 法を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

香辛料抽出物の原材料であるケイヒについて、その粉末の抽出物の<sup>1</sup>H-qNMR スペクトルから、ケイヒの重要な精油成分である cinnamaldehyde (Fig. 2)のアルデヒド基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<sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの実施について、抽出と測定に用いる溶媒を検討し、粉末生薬中の 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-4-a) <sup>1</sup>H-qNMR 法に用いる試料の調製

最も抽出効率の良い溶媒を検討した。ケイヒ末 100 mg を NMR の測定に利用する、DMSO- $d_6$ , methanol- $d_4$ , pyridine- $d_5$ , CDCl<sub>3</sub> に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈操作をしたところ、CDCl<sub>3</sub> 中では粉末が沈殿せず、上清を得ることができなかった。上清が得られた3種の溶媒でアルデヒド基の積分値を比較したところ DMSO- $d_6$  で抽出したものが最も大きく観測されたことから、DMSO- $d_6$  を用いて抽出、測定することにした。

内部標準としては DMSO- $d_6$  にも易溶な 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。

Cinnamaldehyde 標準品は液体のため特に処理をせず約 10 mg を精秤して DMSO- $d_6$  1.00mL 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<sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。(Fig. 8) ケイヒ末中の cinnamaldehyde の測定は、乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して DMSO- $d_6$  (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 DSS- $d_6$  溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して<sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。

#### B-4-b) <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの測定

Cinnamaldehyde とケイヒ末抽出液の<sup>1</sup>H-NMR を測定し、cinnamaldehyde (Fig. 2)のアルデヒド基のプロトンシグナルが 9.69 ppm に現れることを確認した。(Fig. 8) <sup>1</sup>H-qNMR スペクトルの測定条件は Table1 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 のアルデヒド基プロトンのシグナルと 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 cinnamaldehyde の濃度を算出した。

$$C_C = \frac{I_C}{I_D} \times C_D$$

ただし、 $C_D$ ,  $C_C$  はそれぞれ 1,4-BTMSB- $d_4$  及び piperine のモル濃度(mol/mL),  $I_D$ ,  $I_C$  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 cinnamaldehyde 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 : H<sub>2</sub>O の系で初期条件 40 : 60 → 20 min で 70 : 30 というグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、254 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)

<sup>1</sup>H-qNMR 法で定量した cinnamaldehyde 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 10) それぞれの生薬試料は、H-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 $\mu$ L 注入して得られたクロマトグラムの cinnamaldehyde のピークの面積からその定量を行った。(Fig. 9)

### B-5)<sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>H-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. 3) 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 <sup>1</sup>H-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-5-a) <sup>1</sup>H-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<sup>1)</sup> では acetone-*d*<sub>6</sub> 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*<sub>4</sub> 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*<sub>4</sub> 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*<sub>4</sub> 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*<sub>4</sub> に易溶な DSS-*d*<sub>6</sub> を用いた。DSS-*d*<sub>6</sub> 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*<sub>6</sub> 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*<sub>4</sub> 1.00mL に溶かした。この溶液 0.50 mL と、先に調製した DSS-*d*<sub>6</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。(Fig. 11) オールスパイス種子末中の cinnamaldehyde の測定は、乾燥させた粉末生薬約 100mg を精秤して methanol-*d*<sub>4</sub> (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*<sub>4</sub> 溶液 0.10 mL を NMR 試料管にとり、混和して <sup>1</sup>H-qNMR の測定に供した。

#### B-5-b) <sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>H-NMR を測定し、eugenol (Fig. 3) 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) <sup>1</sup>H-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*<sub>6</sub> 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*<sub>4</sub> 及び piperine のモル濃度 (mol/mL)、 $I_B$ 、 $I_E$  はそれぞれ DSS-*d*<sub>6</sub> 及び piperine の水素 1 個あたりのシグナル面積。

#### B-5-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 : H<sub>2</sub>O 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)

<sup>1</sup>H-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、<sup>1</sup>H-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 $\mu$ L 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)

## 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 <sup>1</sup>H-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 <sup>1</sup>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) ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

Cinnamaldehyde 標準品中の cinnamaldehyde の定量を  $^1\text{H-qNMR}$  法でおこなった結果、 $83.3 \pm 0.0\%$  と見積もられ、これも試薬の純度表示よりも 10% 以上小さな値となった。揮発性の試薬なので保存中の純度変化と考えられた。

ケイヒ末中の cinnamaldehyde の  $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量では、生薬のケイヒ末として入手した試料 1 では  $5.66 \pm 0.13\%$  となった一方、食品のシナモン末として入手した試料 2 では  $0.73 \pm 0.06\%$  となった。(Table 3) HPLC で cinnamaldehyde 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。ケイヒ末の抽出液の HPLC におけるクロマトグラムでは、保持時間が 8 分、11 分、14 分付近に大きなピークが観測された。(Fig. 9) この内、14 分のピークが標準品の保持時間と一致することから、このピークの面積をもって cinnamaldehyde の含有率を求めた。2 種類の試料の含有率を算出したところ、試料 1 では  $5.36 \pm 0.20\%$ 、試料 2 では  $0.66 \pm 0.04\%$  となった。(Table 3) いずれの試料でも  $^1\text{H-qNMR}$  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、ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量においても  $^1\text{H-qNMR}$  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。試料 2 で cinnamaldehyde の含有率が試料 1 に比べ低かった点については、医薬品扱いの商品と食品として扱われるものの差もあるが、試料 2 が購入後

の約 1 年という時間が経っている点が大きいものと考えられた。

### C-3) 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 4) 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。

### D. 結論

1) コショウ種子中の piperine の  $^1\text{H-qNMR}$  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  $^1\text{H-qNMR}$  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  $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量条件も確立した。

2) ケイヒ中の cinnamaldehyde の  $^1\text{H-qNMR}$  法を用いた定量条件を確立した。ケイヒあるいはシナモンを主な基原とする「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 cinnamaldehyde を対象として、その  $^1\text{H-qNMR}$  法

を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。

3) オールスパイス中のeugenolの<sup>1</sup>H-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<sup>1</sup>H-qNMR法を用いた定量で規格を定められる可能性を示した。

#### E. 参考文献

- 1) 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）。

#### F. 研究業績

1. 学会発表等  
なし

#### 2. 論文発表等

##### 2-1. 論文

- 1) Fujiwara Y, Miwa M, Nagatsu A, Honma A: Identification of Maple Anthocyanin and Its Antiproliferative Activity against LLC, T47D and C3H10T1/2 Cells. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, **2020**, *21*: 894-901.

##### 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(<sup>1</sup>H-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

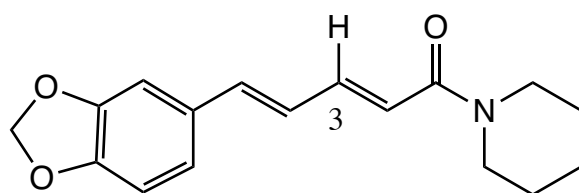


Fig. 1 piperine の構造

3 位の H と書かれたプロトンが  $^1\text{H}$ -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

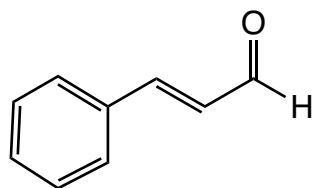


Fig. 2 cinnamaldehyde の構造

アルデヒド基の H と書かれたプロトンが  $^1\text{H}$ -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

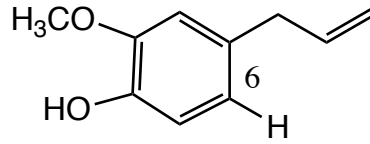


Fig. 3 eugenol の構造

6 位の H と書かれたプロトンが  $^1\text{H}$ -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

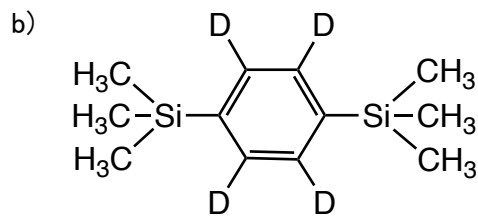
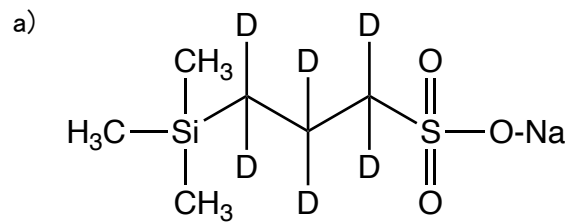


Fig. 4 定量用の認証標準物質

a) DSS- $d_6$ , b) 1,4-BTMSB- $d_4$



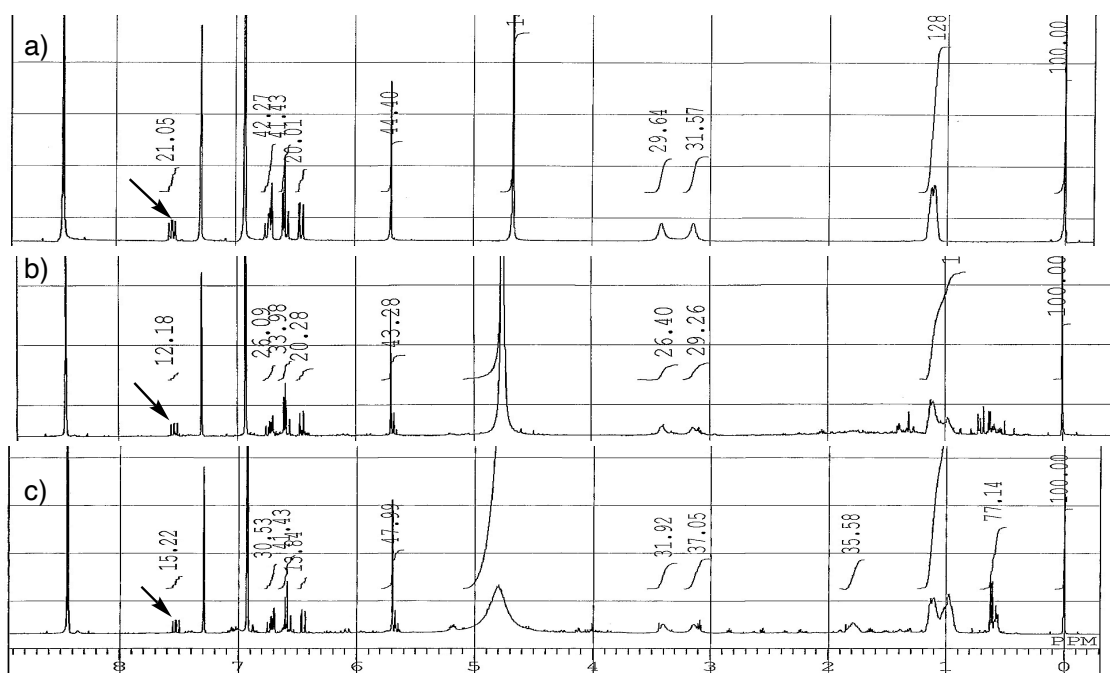


Fig. 5 a) piperine 標準試薬と b) コシヨウ種子抽出物と c) ヒハツ種子抽出物の  $^1\text{H}$ -qNMR スペクトル (in  $\text{pyridine-}d_5$ ) 矢印は piperine の 3 位プロトンのシグナル.

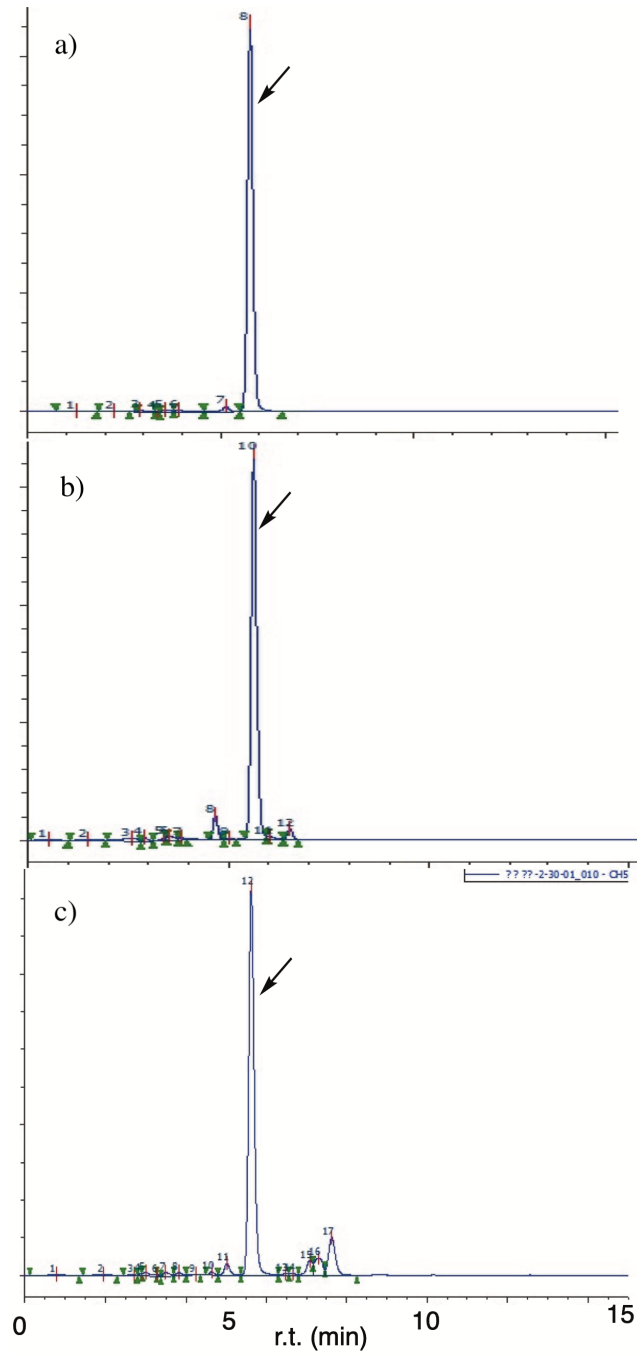


Fig. 6 a) piperine 標準試薬と b) コショウ種子抽出物と c) ヒハツ種子抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は piperine のピーク.

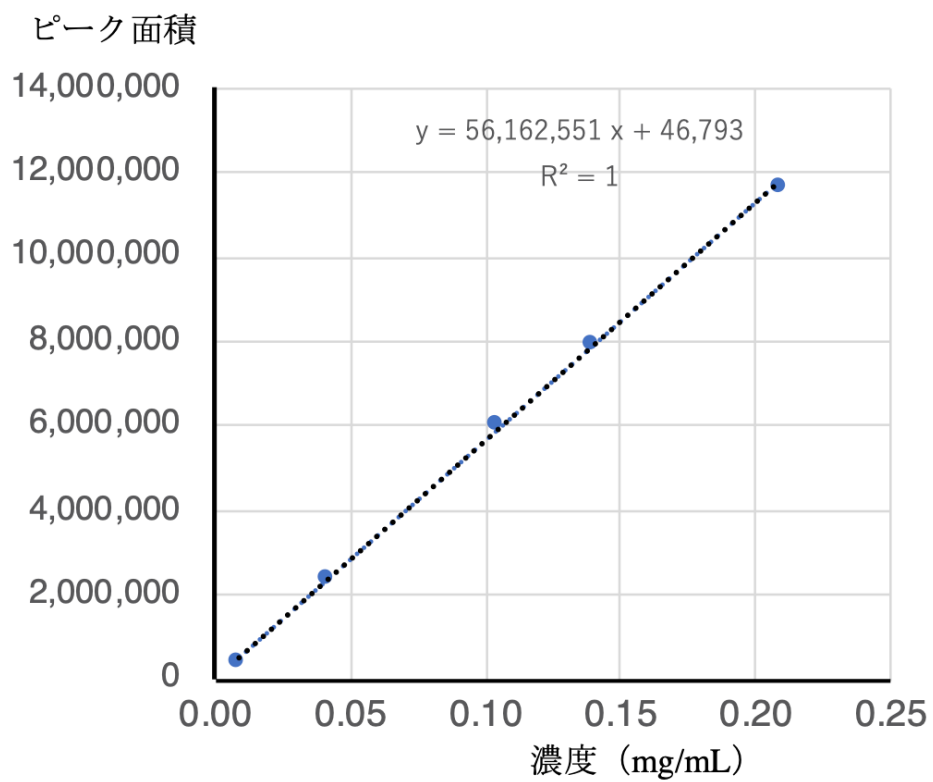


Fig. 7 HPLCにおける piperine の検量線

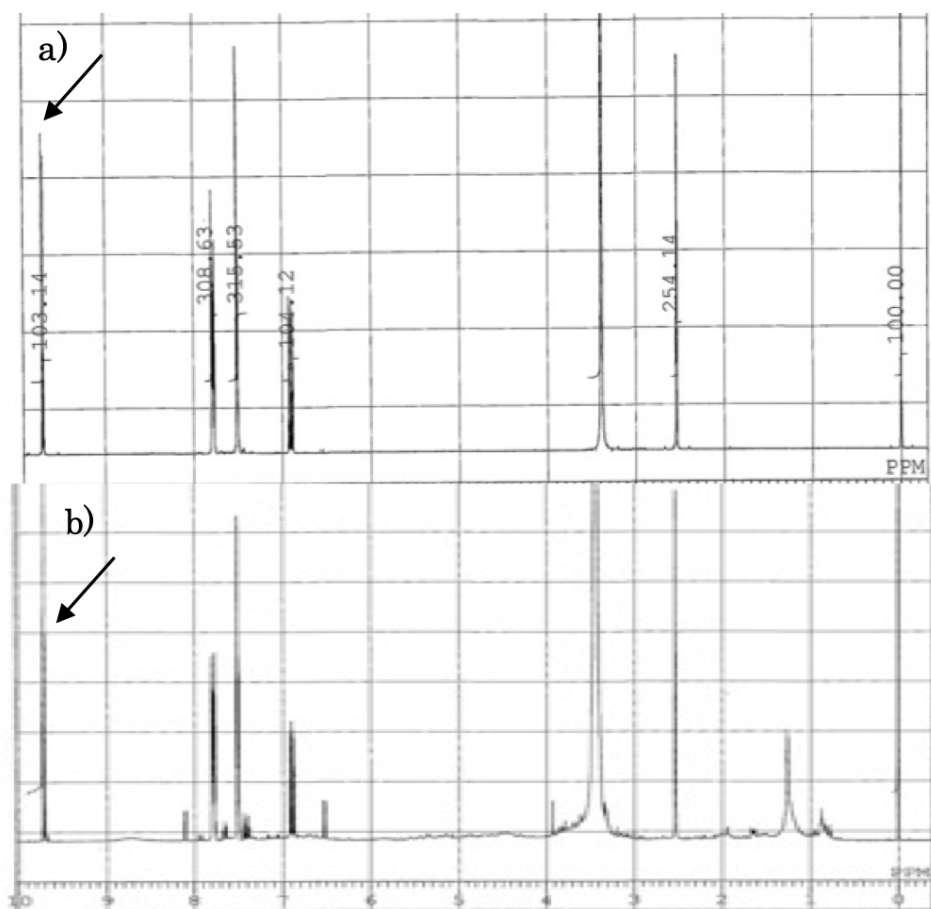


Fig. 8 a) cinnamaldehyde 標準試薬と b) ケイヒ末抽出物の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (in DMSO-*d*<sub>6</sub>) 矢印は cinnamaldehyde のアルデヒド基プロトンのシグナル.

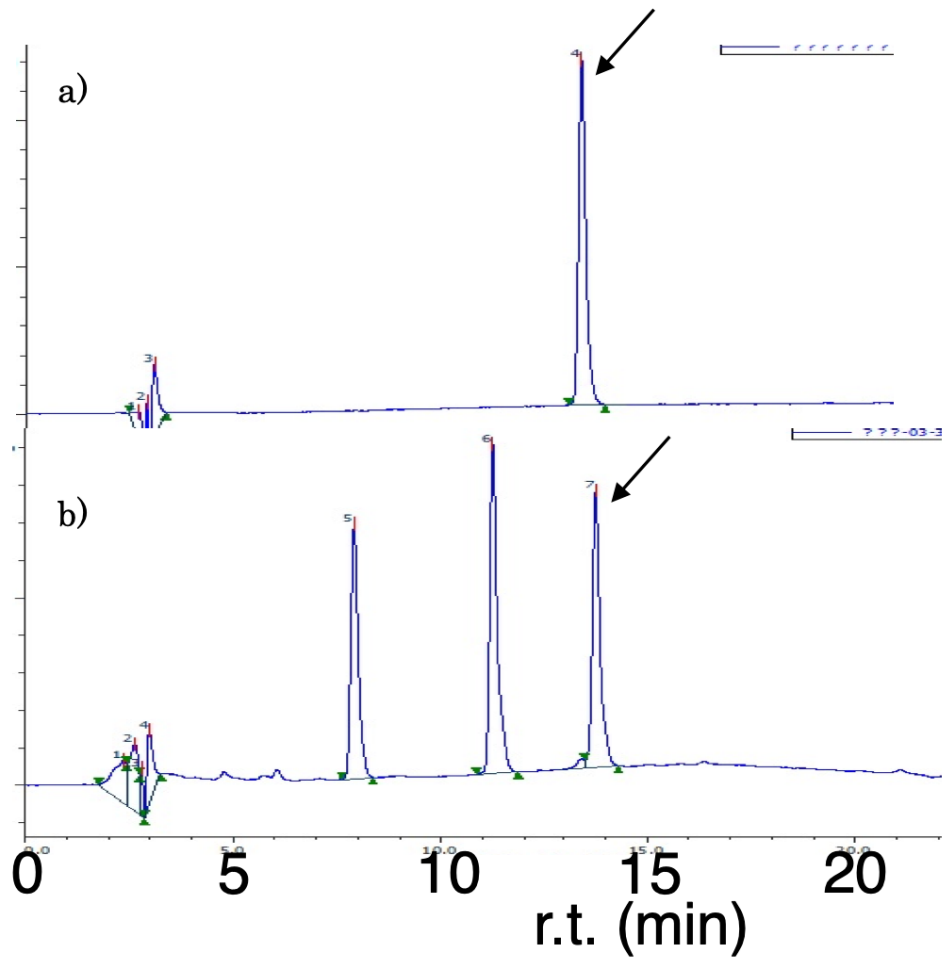


Fig. 9 a) cinnamaldehyde 標準試薬と b)ケイヒ末抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は cinnamaldehyde のピーク

ピーク面積

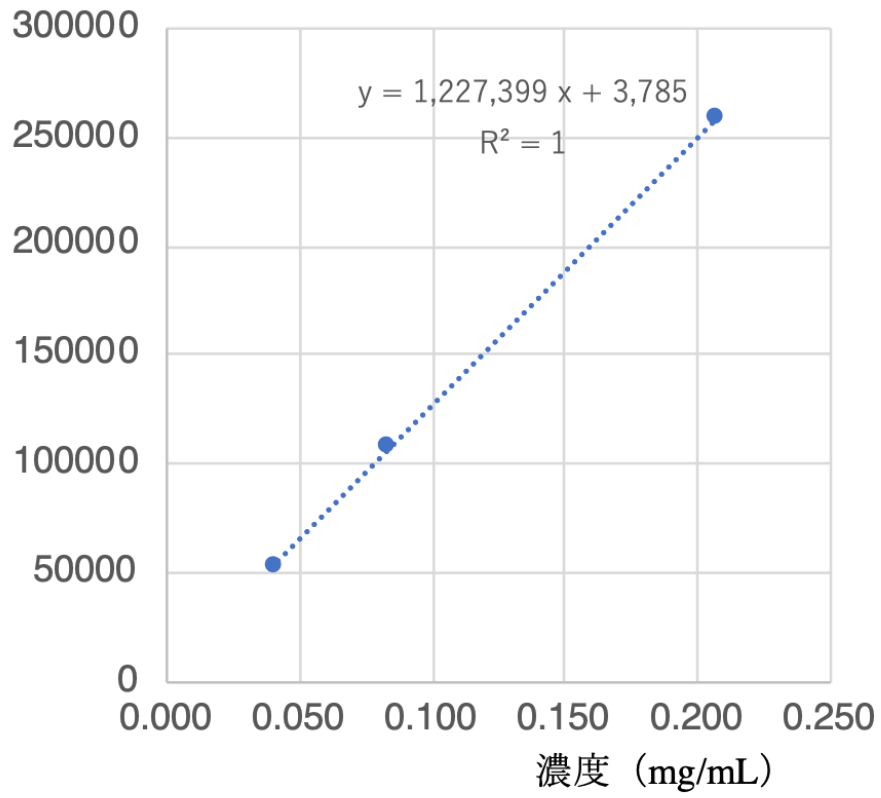


Fig. 10 HPLCにおける cinnamaldehyde の検量線

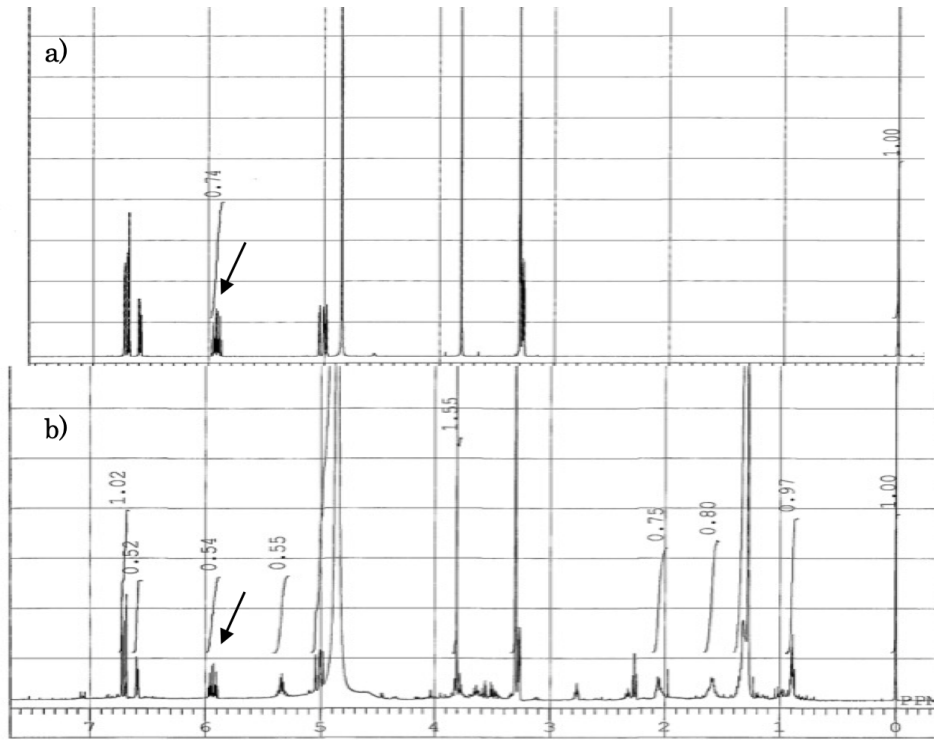


Fig. 11 a) eugenol 標準試薬と b) オールスパイス末抽出物の <sup>1</sup>H-qNMR スペクトル (in methanol-*d*<sub>4</sub>) 矢印は eugenol の 6 位プロトンのシグナル.

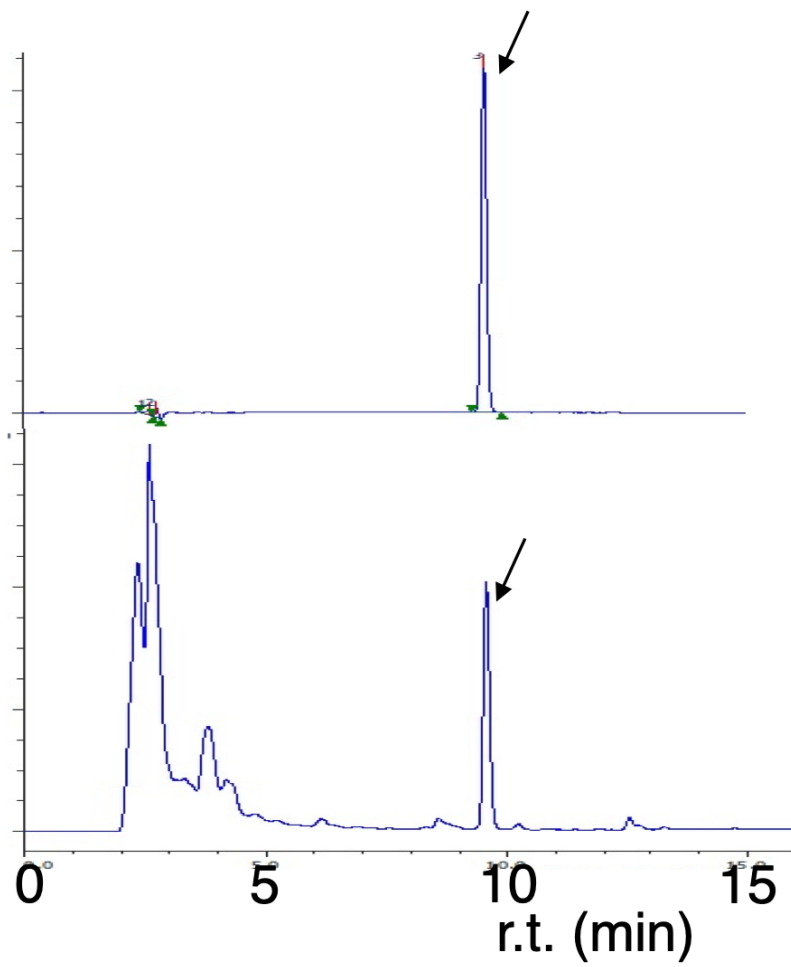


Fig. 12 a) eugenol 標準試薬と b) オールスパイス末抽出物の HPLC クロマトグラム 矢印は eugenol のピーク



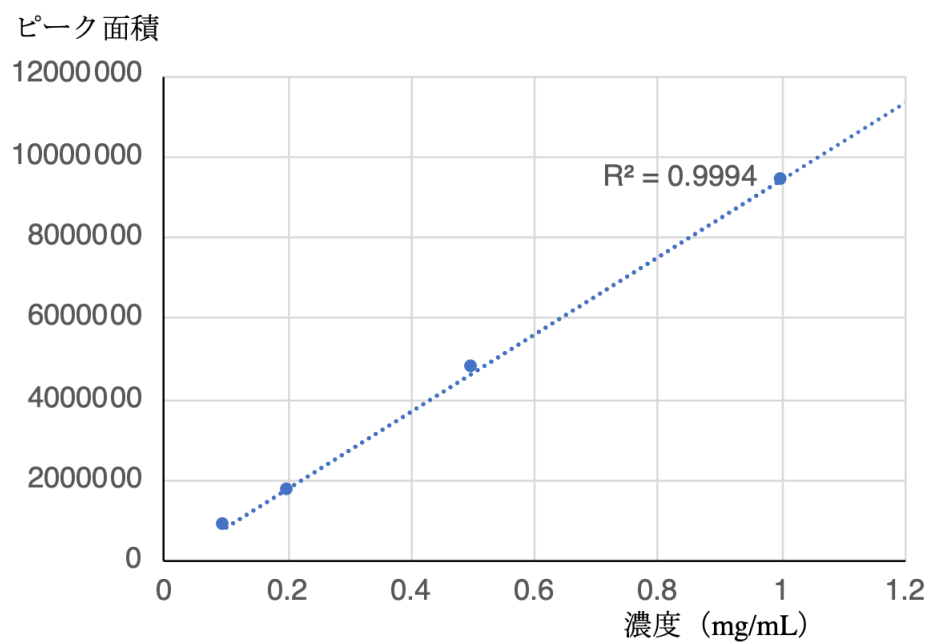


Fig. 13 HPLCにおける eugenol の検量線

Table 1 <sup>1</sup>H-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	<sup>1</sup> H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均	±SEM	(n)	平均	±SEM	(n)
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 Cinnamaldehyde 標準試薬とケイヒ末中の cinnamaldehyde の含有率

samples	<sup>1</sup> H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
cinnamaldehyde 標準品#	83.3	±0.00	(n = 3)			
ケイヒ末						
試料 1	5.61	±0.13	(n = 3)	5.36	±0.20	(n = 3)
試料 2	0.73	±0.06	(n = 3)	0.66	±0.04	(n = 3)

# 試薬の純度表示は>97%

Table 4 Eugenol 標準試薬とオールスパイス末中の eugenol の含有率

samples	<sup>1</sup> 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+%