

～¹H-qNMRに基づく相対モル感度を用いた酵素処理ナリンジンの分析手法に関する研究～
分担研究者 大槻 崇 日本大学 生物資源科学部 食品生命学科 専任講師

研究要旨 本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度の向上を目指して、現在、成分規格が未設定である酵素処理ナリンジンを対象にその成分規格における定量法の確立に関する検討を行った。今年度は、¹H-qNMRに基づく相対モル感度（RMS）の正確性や測定対象物質並びにHPLC分析における基準物質（代替定量用標品）の検出波長の報告例との整合性を考慮し、RMSを用いたシングルリファレンスHPLC法の性能を評価した。その結果、実試料を用い検討において、シングルリファレンスHPLC法と従来法で前処理後の測定対象物質2種の含量に大きな違いは認められなかった。従って、本検討で算出した各基準物質の測定対象物質2種に対するRMSを用いることにより、シングルリファレンスHPLC法からこれら2種の正確な定量が可能であることが判明した。

A. 研究目的

酵素処理ナリンジンは、既存添加物名簿収載品目リストに記載されている既存添加物の1つであり、苦味料等として、チューイングガムや清涼飲料水のアクセントとして使用される¹。この食品添加物は、食品衛生法第11条第1項の定めにより告示される「食品、添加物等の規格基準」に基づく成分規格が制定されておらず、現在は、日本食品添加物協会が作成した第4版既存添加物自主規格²に基づいて製造、使用、流通している。一方で、平成7年以降、既存添加物の安全性確保を求める国会の附帯決議も踏まえ、既存添加物については、その品質を確保し、食の安全に寄与するため、個々の成分規格を設定した上、食品添加物公定書への収載が進められており、この酵素処理ナリンジンも「食品、添加物等の規格基準」の策定および第10版食品添加物公定書への収載に向けた検討が進められている。このうち、成分規格に関して、第4版既存添加物自主規格では「本品を乾燥物換算したものは、総ナリンゲニン配糖体として30.0%以上を含む」とされており、公的な

成分規格においてもこれを踏襲すると考えられる。その場合、この規格の適合性を判定するため、「総ナリンゲニン配糖体」の定量法の確立が必要となる。この定量法の確立にあたっては、酵素処理ナリンジンと類似した添加物であり「食品、添加物等の規格基準」が既に設定されている酵素処理ヘスペリジンの定量法³が参考になるものと考えられる。すなわち、酵素処理ヘスペリジンの成分規格は、「本品を乾燥したものは、総ヘスペレチン配糖体として30.0%以上を含む。」とされており、この総ヘスペレチン配糖体量は、酵素処理ヘスペリジンのグルコアミラーゼ処理により得られる「ヘスペリジン」、「 α -モノグルコシルヘスペリジン」および「遊離する α -グルコシル残基」の合計値から算出している。この定量の考え方は酵素処理ナリンジンにおける「総ナリンゲニン配糖体」含量の算出に適用可能と考えられるが、この場合の測定対象となりHPLCで分析が必要なナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンのうち、 α -モノグルコシルナリンジンはその定量用標品が市販されていないため、通常の絶対

検量線法では定量が困難である。また、ナリンジンの市販試薬はナリンジン水和物として販売されており、正確な純度は明示されていないのが現状である。そのため、ナリンジン市販試薬をそのまま定量用標品としてHPLC分析に供した場合、定量値の信頼性は保証できず、現在、これらの問題点について解決が望まれている。このような定量用標品の入手および定量値の正確性の問題を解決する方法の1つとして、近年、¹H-qNMRに基づく相対モル感度 (Relative Molar Sensitivity : RMS) を用いたシングルリファレンス HPLC 法が注目を集めている^{4,6}。これは、測定対象物質および測定対象物質とは異なる基準物質 (代替定量用標品) との正確な RMS を明らかにすることにより、「基準物質」、「RMS」および「測定対象物質と基準物質の分子量比」から測定対象物質の定量を可能とする方法である。また、RMS は、計量学的に正確な定量が可能である定量¹H-NMR (¹H-qNMR) に基づき算出されているため、シングルリファレンス HPLC 法より得られる定量値の信頼性も高いと言える。これまでに、分担研究者は、既存添加物の成分規格試験法の向上を目指した研究の一環として、酵素処理ナリンジンの規格試験法の確立に関する検討を継続的に実施しているが、本研究では、RMS の正確性や HPLC 分析における測定対象物質並びに基準物質の検出波長の整合⁷などを考慮し、グルコアミラーゼ処理により得られるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量分析における¹H-qNMRに基づくシングルリファレンス HPLC 法の性能を評価した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

酵素処理ナリンジン (食品添加物製品) (名称: 糖転位ナリンジン<管理番号 A-172>) は国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部よりご供与いただいた。ナリンジンは、Acros Organics 社製 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No.A0407598), シグマアルドリッチ (株) 製 (Cat.No.10236-47-2, Lot No. BCCB6611), 東

京化成工業 (株) 製 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No.IFV8M-OC), 富士フイルム和光純薬 (株) 製 (Cat.No. 10236-47-2, Lot No. LKE0701 および SKN5454) を用いた。4-ヒドロキシ安息香酸メチル (MHB) は、シグマアルドリッチ (株) 製の認証標準物質 (Cat. No. 99-79-3, Lot No. BCBX5970, 認証値: 99.8 %, 拡張不確かさ: 0.3%), カフェインはシグマアルドリッチ (株) 製の認証標準物質 (Cat. No. 58-08-2, Lot No. BCCC1661, 認証値: 99.9 %, 拡張不確かさ: 0.2%) をそれぞれ用いた。2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate-*d*₆ sodium salt (DSS-*d*₆) は富士フイルム和光純薬 (株) 標準物質 (Cat. No.284664-85-3, Lot.No.KCF6177, 認証値: 92.4%, 拡張不確かさ: 0.5%) を用いた。重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*₆) は関東化学 (株) 製を用いた。D-グルコース定量用発色試薬は富士フイルム和光純薬 (株) 製グルコース CII-テストワコーを使用した。その他の溶媒は高速液体クロマトグラフィー用または特級を用いた。

B-2) 装置

核磁気共鳴装置 (NMR): ECA500 (プロトン共鳴周波数 500 MHz) (日本電子 (株) 製)

分析用 HPLC ポンプ: LC-20AD (低圧グラジエントユニット内蔵), オートサンプラ: SIL-20AC, カラム恒温槽: CTO-1010AS_{VP}, 多波長検出器: SPD-M10A_{VP}, システムコントローラ: CBM-20Alite, 分析データ処理システム: LabSolutions (以上 (株) 島津製作所製), 脱気装置: AG-34 ((株) フロム製)。

分取用 HPLC ポンプ: LC-10AD, 低圧グラジエントユニット: FCV-10AL, オートサンプラ: SIL-20A, カラム恒温槽: CTO-10AS_{VP}, 紫外可視分光検出器: SPD-10AV_{VP}: システムコントローラ: SCL-10A_{VP}, フラクシオンコレクタ: FRC-10A, 分析データ処理システム: LabSolutions (以上 (株) 島津製作所製), 脱気装置: AG-34 ((株) フロム製)。

マイクロ天秤: BM-20 ((株) エー・アンド・デイ製)

セミマイクロ天秤：AUW220D（（株）島津製作所製）

B-3) 相対モル感度 (RMS) を利用したシングルリファレンス LC 法によるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量

B-3-1) α -モノグルコシルナリンジンの単離

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

・分取 HPLC 条件 1

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

・分取 HPLC 条件 2

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

B-3-2) $^1\text{H-qNMR}$ によるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの純度測定

4 メーカーのナリンジン試薬は約 10 mg， α -モノグルコシルナリンジン約 5 mg を精密に量り，それぞれサンプル管に入れた。別に DSS- d_6 約 5 mg を精密に量り，先程のサンプル管に入れた後，DMSO- d_6 約 1 g に溶解し $^1\text{H-qNMR}$ 用試験溶液とした。各測定対象物質につき 3 併行で試験溶液を調製し，この溶液を外径 5 mm の NMR 試料管に入れ密閉し，表 1 に示す条件を用い $^1\text{H-qNMR}$ 測定を行った。DSS- d_6 のシグナル面積強度を 9.000 としたときの各化合物に

由来する特定基のシグナル面積強度，分子量，濃度等を次の式に代入し，各試料の含量（純度，%）を算出した。

$$\text{Purity (\%)} = \frac{I_{\text{sample}} / H_{\text{sample}}}{I_{\text{std}} / H_{\text{std}}} \times \frac{M_{\text{sample}} / W_{\text{sample}}}{M_{\text{std}} / C_{\text{std}}} \times 100$$

ただし，

I_{sample} = 測定対象物質の特定基のシグナル面積強度
 I_{std} = 内標準物質のシグナル面積強度 (DSS- d_6 : 9.000)

H_{sample} = 測定対象物質の特定基の水素数
 H_{std} = 内標準物質の特定基の水素数 (DSS- d_6 : $\text{CH}_3 \times 3 = 9$)

M_{sample} = 測定対象物質の分子量

M_{std} = 内標準物質の分子量 (DSS- d_6 : 224.36)

W_{sample} = 測定対象物質の秤取量 (mg)

C_{std} = $^1\text{H-qNMR}$ 標準溶液の DSS- d_6 濃度

なお， $^1\text{H-qNMR}$ の化学シフト値は，DSS- d_6 のプロトンシグナルを基準 (δ 0 ppm) とし， δ 値を ppm 単位で表した。また，データの解析は，Delta (Ver.5.3.0) (日本電子 (株)) を用いた。

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

ナリンジン， α -モノグルコシルナリンジンでは各 $^1\text{H-qNMR}$ 用試験溶液を濃度が約 500 $\mu\text{mol/L}$ となるように 20 mL 容メスフラスコへ必要量を入れ，20%アセトニトリルを加え調製した。その後 20%アセトニトリルを用いて公比 2 で希釈を行い，約 1.0~500 $\mu\text{mol/L}$ の間で 10 濃度の HPLC 用試験溶液を作製した。

MHB およびカフェインでは，認証標準表に記載の純度を考慮し，MHB およびカフェインを正確に量りとり，約 1.0 $\mu\text{mol/L}$ ~ 約 500 $\mu\text{mol/L}$ の間で 10 点の濃度の HPLC 用試験溶液（溶媒：20%アセトニトリル）を各試料 3 併行で作製した。

作製された各試験溶液について，次の HPLC 条件で分析した。

カラム：Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6×250 mm, 粒子径 5 μm, ナカライテスク (株) 製), カラム温度：40°C, 検出波長：283 nm (ナリンジンおよびα-モノグルコシルナリンジン), 255 nm (MHB), カフェイン (205 および 274 nm), 流速：1.0 mL/min, 移動相：水/アセトニトリル/酢酸混液 (8000 : 2000 : 1), 注入量：10 μL

各溶液のモル濃度を X 軸に, 検出器の応答値 (ピーク面積値) を Y 軸にプロットし, Excel を用いて原点を通る (X : 0, Y : 0) 回帰直線を作成し, これを検量線とした. なお, 各溶液におけるクロマトグラム上のピークの S/N が 10 以上, シンメトリ係数が 0.8~1.8 となる濃度範囲で検量線を作成した.

得られた測定対象物質および基準物質の検量線の検量線式の傾き (モル吸光係数) の比 (測定対象物質/基準物質) から基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出した.

B-3-4) ナリンジンに対する α-モノグルコシルナリンジンの RMS の算出

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

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

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

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

乾燥した酵素処理ナリンジン (食品添加物製

品) 1 g を精密に量り取り, 水 100 mL に溶解させた. その後, アクリル酸エステル系吸着用樹脂 (アンバーライト XAD7HP) 50 mL が充填されたガラス管 (内径 約 2.5 cm, 長さ : 55 cm) にこの溶液を注ぎ, 1 分間に 2.5 mL 以下の速さで流出させた後, 水 250 mL で洗浄した. 次に, 50%エタノール 200mL を 1 分間に 2.5 mL 以下の速さで流し, 吸着画分を溶出させた. この溶出液を濃縮して全量を約 40 mL とし, この液にグルコアミラーゼ 10000 単位を約 3 g 添加した後, 振とうしながら 55 °C で約 30 分放置した. さらに 95 °C で 30 分加熱した後, 室温まで冷却し, 水を加えて正確に 50 mL とし, A 液とした. この A 液 3 mL を正確に量り, 0.1%酢酸含有 20%アセトニトリル (移動相) を加え正確に 50 mL とし, HPLC 用試験溶液とした. この HPLC 用試験溶液を B-3-3 に示した HPLC 条件で分析した.

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

ナリンジンまたは α-モノグルコシルナリンジン含量 (%) =

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

ただし,

C : HPLC 用試験溶液中の測定対象物質の濃度 [μmol/L]

V : 試験溶液の量 [L] (0.05 L)

M : 測定対象物質の分子量 (ナリンジン = 580.54, α-モノグルコシルナリンジン = 742.70)

10⁶ : 試料の秤量値の単位 [g] から [μg] への単位の変換係数

W : 試料の摂取量 (g)

なお, 別にナリンジンおよび α-モノグル

コシルナリンジンについて、従来法用の検量線を作成し、RMS法の比較対照とした。

B-3-5-2) グルコアミラーゼ処理後の α -グルコシル残基量の定量

B-3-5-1の項で得られたA液20 μ Lを量り、D-グルコース定量用発色試液3mLを正確に加えて振り混ぜた後、37°Cで正確に5分間放置した。室温まで冷却したものを試験溶液とし、波長505nmにおける吸光度を測定した。対照には、水20 μ Lを用いて試験溶液と同様に操作した液を用いた。別に空試験を行い、補正した。ただし、空試験溶液は、水約40mLにグルコアミラーゼ10000単位を添加し、55°Cで30分間放置した後、95°Cで約30分間加熱した。室温まで冷却した後、水を加えて正確に50mLとし、空試験溶液を試験溶液と同様に操作して吸光度を測定した。別に、各濃度のグルコース標準溶液(0.5mg/mL, 1.0mg/mL, 2.0mg/mL, 5.0mg/mL)について試験溶液と同様に操作して吸光度を測定し、検量線を作成した。この検量線と補正した検液の吸光度から試験溶液中のD(+)-グルコース濃度を求め、次式によりグルコアミラーゼ処理により遊離する α -グルコシル残基量を算出した。

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

ただし、

C: 試験溶液1mLあたりのD(+)-グルコースの量(μ g)

V: 試験溶液の量(50mL)

W: 試料の採取量(mg)である。

B-3-5-3) 総ナリンゲニン配糖体含量の算出

次の計算式により、総ナリンゲニン配糖体の含量を求めた。

総ナリンゲニン配糖体含量(%)

=グルコアミラーゼ処理後のナリンゲニン配糖体(ナリンジン+ α -モノグルコシルナリンジン)(%) + グルコアミラーゼ処理により遊

離した α -グルコシル残基量(%)

C. 結果及び考察

C-1) α -モノグルコシルナリンジンの単離

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

C-2) $^1\text{H-qNMR}$ によるナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの純度測定

正確なRMSの算出にあたり、測定対象物質の市販試薬や単離品の正確な純度を明らかにすることは非常に重要である。そこで、これらの純度を明らかにするため、 $^1\text{H-qNMR}$ を用いることとした。 $^1\text{H-qNMR}$ は、スペクトル上に観察される標準物質と測定対象物質のシグナル面積強度とモル濃度の関係から、測定対象物質の濃度を絶対定量することが可能である。また、計量計測トレーサビリティが確保された標準物質を用いることにより、得られる定量値の信頼性が大幅に向上した方法である。そこで、表1に示す測定条件を用いてナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンについて $^1\text{H-qNMR}$ を行った。なお、化学シフト値は、内標準物質のメチルプロトンシグナルを基準(DSS- d_6 : δ 0ppm)とし、 δ 値をppm単位で表した。図3および4に示すように、 $^1\text{H NMR}$ スペクトル上、 δ 1.18ppm付近にラムノースのメチル基に由来するシグナル、 δ 2.70~5.60ppmにアグリコン(ナリンゲニン)の2位、3位および糖部に由来するシグナル、 δ 6.00~7.50ppmにアグリコン(ナリンゲニ

ン)に由来するシグナルがそれぞれ観察された。これらのうち、 δ 7.36 ppmに観察されたナリンゲニンの2'位および6'位の水素に由来するシグナルは、他の分子内並びに夾雑成分に由来するシグナルと十分に分離されていたため、ナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量用シグナルとして適当と考えられた。そこで、このシグナルより3併行で調製された4メーカーのナリンジン試薬および単離した α -モノグルコシルナリンジンの純度を算出したところ、各検体(1~3)の純度は表2に示す結果であることが判明した。

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

基準物質に対するナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの RMS を算出するため、各検体の¹H-qNMRによる純度に基づいて調製されたナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジン標準溶液並びに認証書に記載の認証値(純度値)に基づき調製されたMHBおよびカフェイン標準溶液を用いて、B-3-3に示すHPLC条件よりPDA検出器が接続されたHPLCで分析を行った(図5)。そして、得られた原点を通る各検量線の検量線式の傾きの比(測定対象物質/基準物質)から基準物質に対する測定対象物質のRMSを算出した。まず、各検量線の直線性を評価したところ、ナリンジン、 α -モノグルコシルナリンジン、MHB、カフェインの全ての検体の検量線の決定係数は0.9991~1.00と良好であることが確認された。各測定対象物質および基準物質の代表的な検量線を図6に示す。以上の結果より、これらの検量線はRMSの算出に利用可能であることが明らかとなった。

そこで、化合物ごとに3併行の検量線の傾きの平均値を算出したところ、ナリンジンでは10284(4メーカー(n=3の平均値)の平均値)(検出波長:283 nm)、 α -モノグルコシルナリンジンは11042(検出波長:283 nm)、MHBでは8931(検出波長:255 nm)、カフェイン:5388(検出波長:274 nm)、11598(検出波長:205 nm)

であることが判明した。得られたこれらのデータより、基準物質に対するナリンジン、 α -モノグルコシルナリンジンのRMSを算出したところ、表3に示す値であることが判明した。

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

次に、算出したRMSの妥当性を評価するため、酵素処理ナリンジン製品を用いて、常法に従いグルコアミラーゼ処理により得られたHPLC用試験溶液を用いて、酵素処理ナリンジンのグルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの含量について各基準物質およびRMSを用いたシングルリファレンスHPLC法で算出し、各測定対象物質を定量用標品とした絶対検量線法(従来法)により算出された含量と比較した。試験溶液のクロマトグラムを図7に示す。その結果、シングルリファレンスHPLC法においては、表4に示すように基準物質の違いによりナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジン含量に大きな違いは認められなかった。また、シングルリファレンスHPLC法により得られた各測定対象物質の定量値は、各測定対象物質の標品を用いた絶対検量線法(従来法)の結果と大きな違いは認められなかった。また、シングルリファレンスHPLC法のRSDは、すべてのデータにおいて1.2%以下と良好であった。以上の結果より、各基準物質を定量用標品としたシングルリファレンスHPLC法は、グルコアミラーゼ処理後のナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量に有効と考えられた。なお、グルコアミラーゼ処理により遊離する α -グルコシル残基量を別途定量し、上記の結果と合算して求めた総ナリンゲニン配糖体量について、表5にそれぞれ示した。

D. 結論

本研究では、既存添加物の成分規格試験法

の効率化及び精度の向上を目指して、¹H-qNMRに基づくRMSを用いたシングルリファレンスHPLC法による酵素処理ナリンジンの規格試験法の確立についての検討を行った。実試料を用いた検討において、シングルリファレンスHPLC法により得られたナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの定量値は従来法と大きな違いは認められなかった。従って、今回求められた各基準物質に対する測定対象物質のRMSを用いたシングルリファレンスHPLC法より、酵素処理ナリンジン中の総ナリンゲニン配糖体量を求める際に必要なナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの含量を正確に定量可能であることが判明した。

なお、既存添加物自主規格における成分規格では「本品を乾燥物換算したものは、総ナリンゲニン配糖体として30.0%以上を含む」と規定されているが、今回検討した酵素処理ナリンジン製品中の総ナリンゲニン配糖体量はこの規格値を満たしていない。本検討では、この自主規格に基づきグルコアミラーゼによる酵素処理（加水分解）を前処理法として用いたが、規定された方法では酵素加水分解が不十分であることが示唆され、今後、酵素処理として α -グルコシダーゼの併用や反応時間の変更など、前処理の改善に向けた検討が必要と考えられた。

E. 参考文献

- 1) 食品添加物事典, 日高徹, 湯川宗昭編著. 東京, 食品化学新聞社 (2001)
- 2) 第4版 既存添加物自主規格, 日本食品添加物協会 (2008)
- 3) 第9版食品添加物公定書, 厚生労働省(2017).
- 4) Nishizaki Y, Masumoto N, Yokota A, Mikawa T, Nakashima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Ito Y, Sugimoto N, Sato K.: HPLC/PDA determination of carminic acid and 4-aminocarminic acid using relative molar sensitivities with respect to caffeine. *Food Addit. Contam.*, **2018**; *35*: 838-847.

- 5) Takahashi M, Nishizaki Y, Sugimoto N, Sato K, Inoue K.: Single reference quantitative analysis of xanthomonasin A and B in *Monascus yellow colorant* using high-performance liquid chromatography with relative molar sensitivity based on high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **2018**; *1555*: 45-52.
- 6) Masumoto N, Nishizaki Y, Maruyama T, Igarashi Y, Nakajima K, Yamazaki T, Kuroe M, Numata M, Ihara T, Sugimoto N, Sato K.: Determination of perillaldehyde in perilla herbs using relative molar sensitivity to single-reference diphenyl sulfone. *J. Nat. Med.*, **2019**; *73*: 566-576.
- 7) Nakanishi, A., Hashizume, Y., Tandia, M., Yamazaki, T., Kuroe, M., Numata, M., Ihara, T., Sugimoto, N., Sato, K.: Determination of hesperidin and Monoglucosylhesperidin contents in processed foods using relative molar sensitivity based on ¹H-quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **2018**; *59*: 1-10.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 酒井有希, 大槻崇, 松藤寛: 相対モル感度(RMS)を用いたアントシアニンの純度評価. 日本食品科学工学会令和3年度関東支部大会 (2021.3.6) (オンライン)

2. 論文発表等

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

G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

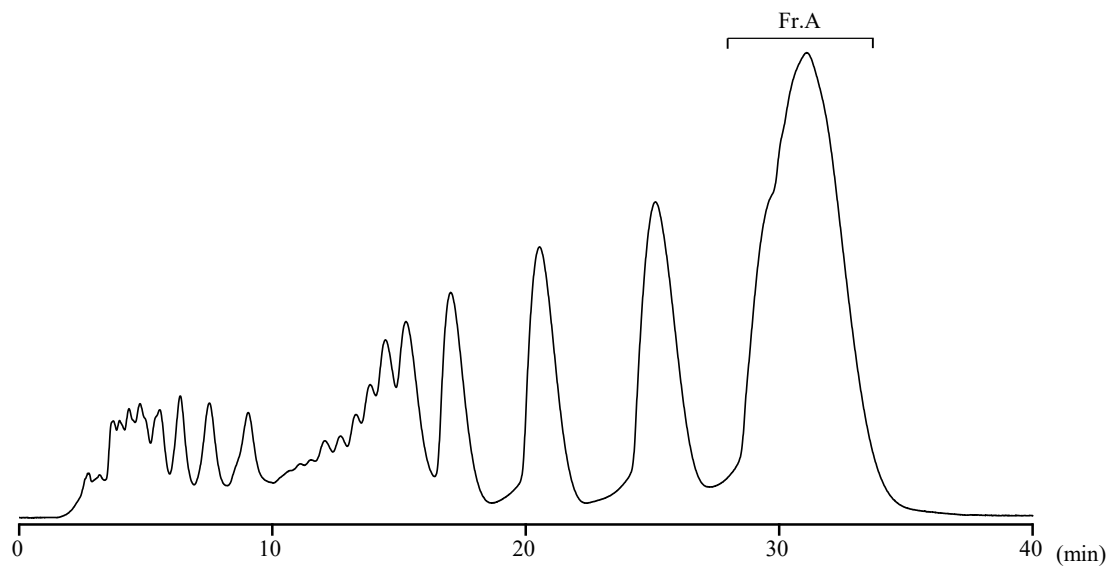


図1 酵素処理ナリンジン（食品添加物製品）のHPLCクロマトグラム（分取）

HPLC条件（分取HPLC条件1）

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

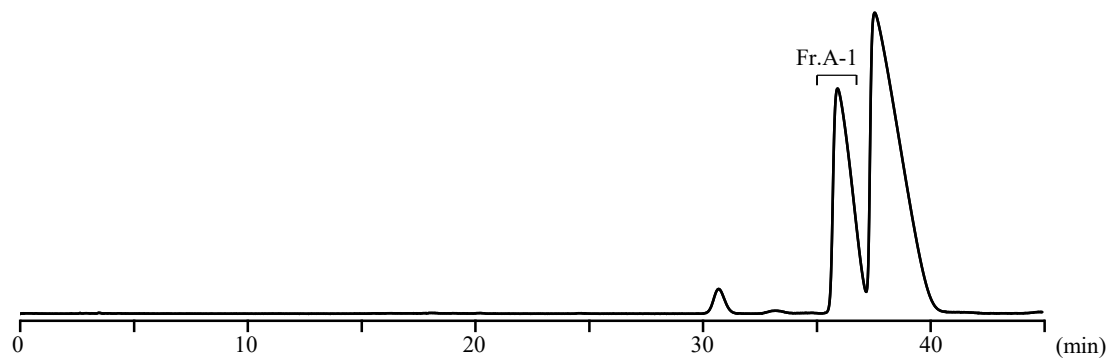


図2 Fr.AのHPLCクロマトグラム(分取)

HPLC条件(分取HPLC条件2)

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

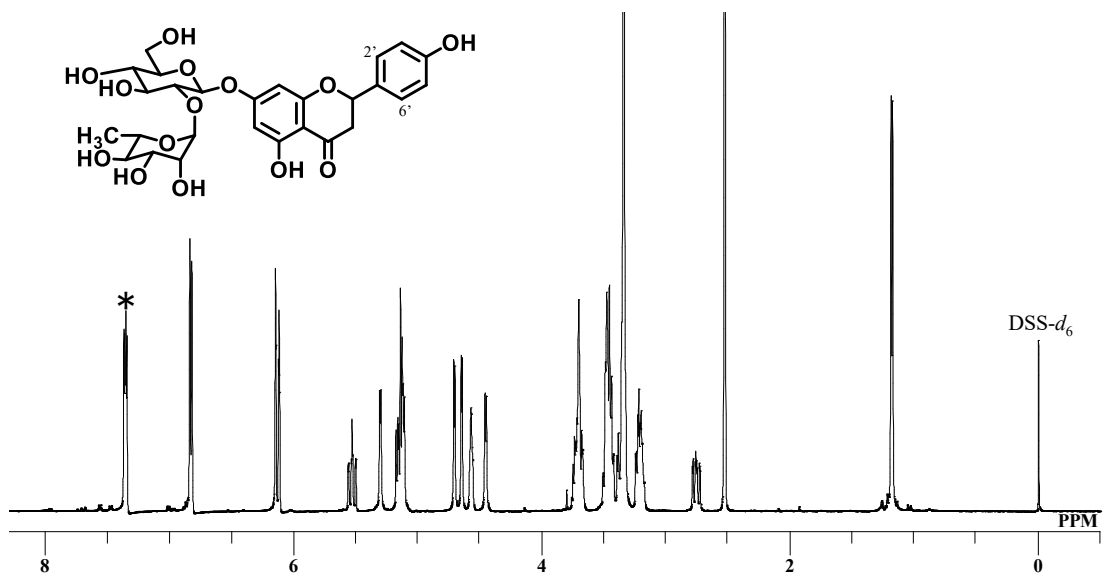


図3 ナリンジンの化学構造および¹H-qNMR スペクトル

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

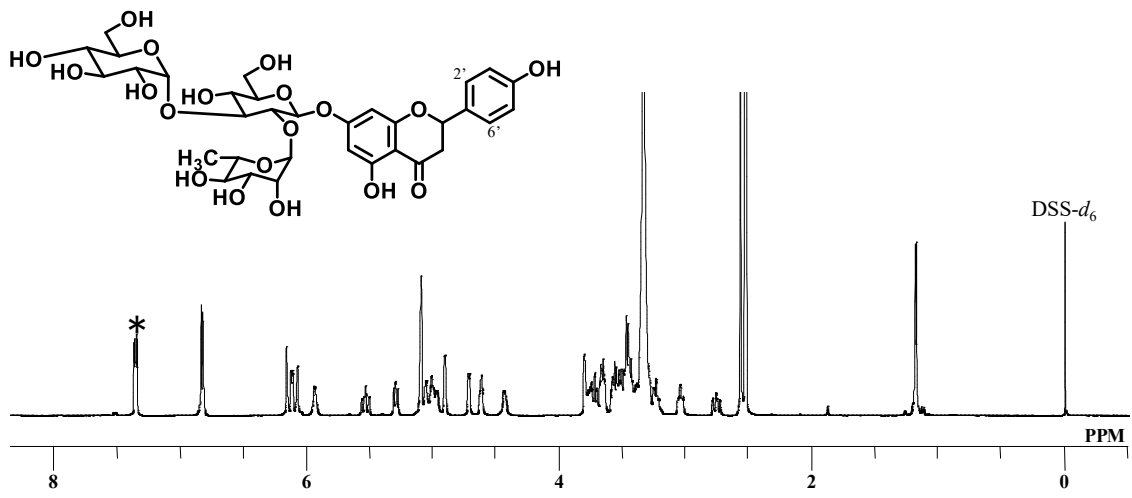


図4 α -モノグルコシルナリンジンの化学構造および $^1\text{H-qNMR}$ スペクトル
 測定溶媒: $\text{DMSO-}d_6$, *: 定量用シグナル (H-2' and H-6')

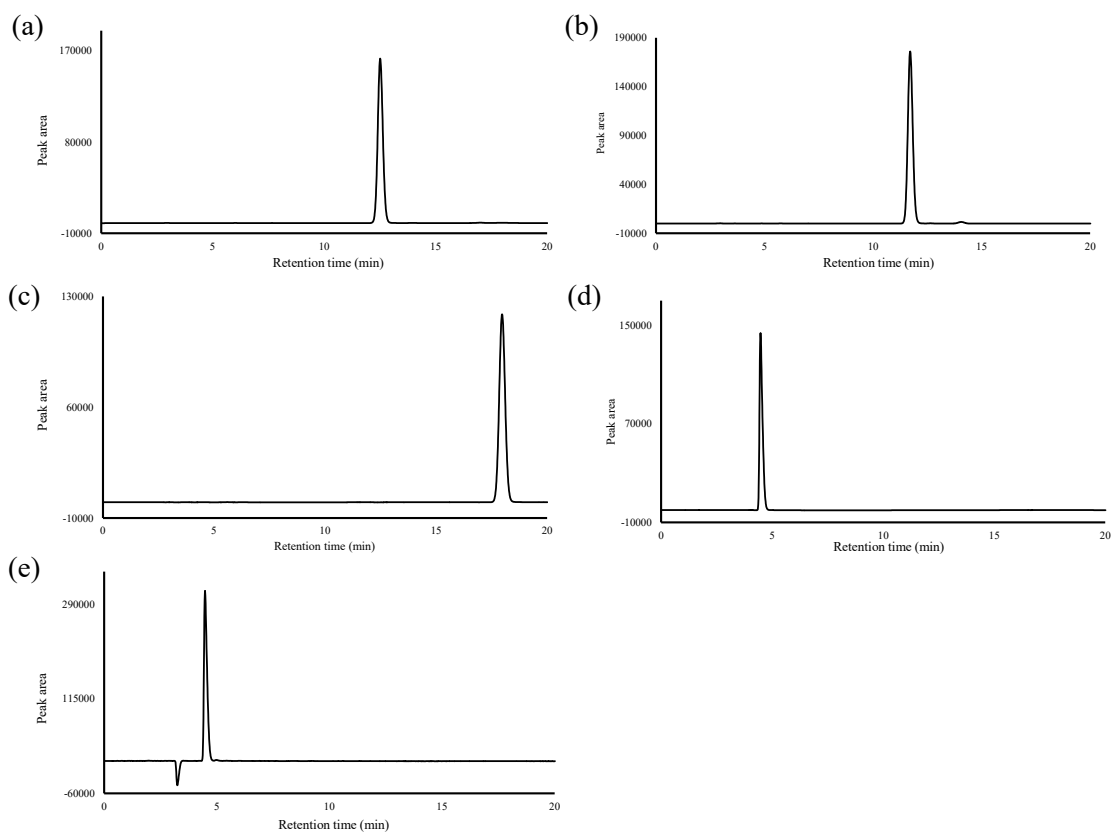


図5 ナリンジン (a), α -モノグルコシルナリンジン (b), MHB (c), カフェイン (dおよびe) の HPLC クロマトグラム

HPLC 条件

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

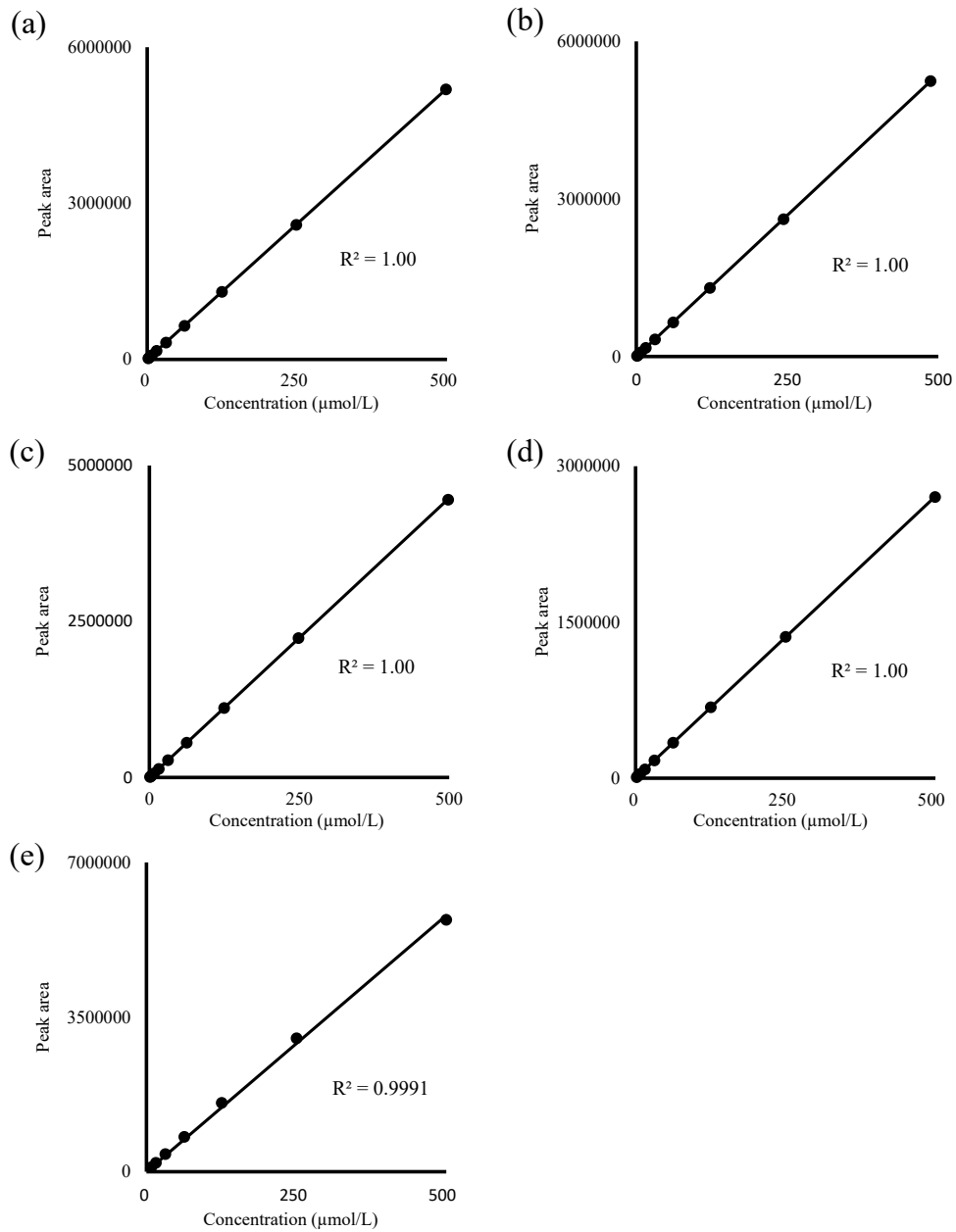


図6 ナリンジン (a), α -モノグルコシルナリンジン (b), MHB (c), カフェイン (dおよびe) の代表的な検量線

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

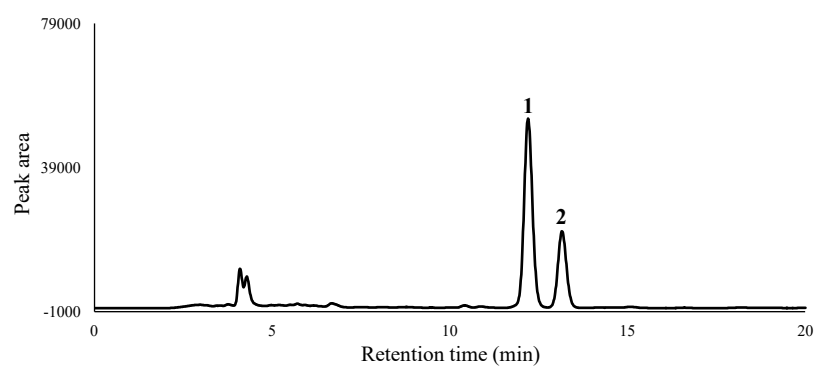


図7 試験溶液のHPLCクロマトグラム

表 1 ナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの純度測定における
 ^1H -qNMR 条件

装置	JEOL ECA 500 spectrometer
スペクトル幅	15 ppm (-2.5–12.5 ppm)
データポイント数	32768
オートフィルター	on (eight times)
取り込み期間	4.37 秒
フリップ角	90°
取り込み待ち時間	60 秒
スキャン回数	8
スピニング	off
^{13}C デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching (MPF-8)

表 2 ^1H -qNMR より算出されたナリンジンおよび α -モノグルコシルナリンジンの各検体の純度 (%)

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

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

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

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

(a) 基準物質：MHB

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

(b) 基準物質：カフェイン（検出波長：274 nm）

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

(c) 基準物質：カフェイン（検出波長：205 nm）

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

(d) 基準物質：ナリンジン

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

表 5 両法における総ナリンゲニン配糖体量の比較

(a) 基準物質：MHB

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

(b) 基準物質：カフェイン（検出波長：274 nm）

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

(c) 基準物質：カフェイン（検出波長：205 nm）

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

(d) 基準物質：ナリンジン

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