

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）  
食品添加物の試験法の検討及び摂取量に基づく安全性確保に向けた研究  
令和5年度分担研究報告書

卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究

ーピーク高さ法によるナリンジンの qNMR 解析ー

研究分担者 西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨 NMR スペクトル上で 2*S* 体と 2*R* 体の光学異性体が重なり合うナリンジンをモデルとして、ピーク高さ法による異性体比算出と純度算出の結果を評価した。ピーク高さ法から算出した異性体比は、参照値と相対誤差が 0.3~3.7%であり、参照値と大きく乖離することはなかった。他方、絶対純度においては、全ての試料において参照値に対して 50%程度低い純度値であった。この原因として、比較するプロトンピークの半値幅の違いが考えられた。異性体比算出においては、異性体間で同一のプロトンピークを比較したため、両ピークの半値幅はほぼ等しく、参照値と同等の結果が得られた。しかし、純度算出においては、qNMR 用内部標準のプロトンピークに対して、ナリンジンのプロトンピークが幅広であったため、純度が過小評価されていた。NMR ピーク高さ法は、プロトンが重なりあうことの多い卓上 NMR の解析手法として有用と考えられるが、計算で比較し合うプロトンピークは半値幅の近いしいものを選択する必要がある。

A. 研究目的

定量 NMR (qNMR) は、我が国の食品、医薬品の品質に関する公定法を収載した、食品添加物公定書及び日本薬局方の中で、定量用標準品の規格試験として採用されている。NMR 装置は、<sup>1</sup>H 共鳴周波数が 400 MHz 以上の高磁場 NMR を用いることとされている。しかし、これらの装置は大型のものであり、導入費及びヘリウム充填の維持費が高く、すべての分析機関が高磁場 NMR を常設しているわけではない。そのため、NMR 用いた試験が実施できる機関は限定される。

NMR は高い定性能と定量能を兼ね備

えている。NMR 装置の普及が進むことで、定量用標準品だけでなく、食品添加物の各条品目の規格試験への応用が期待される。最近では、国内外で卓上 NMR の開発が進んでおり、これは LC/MS や GC/MS と同程度のコストで導入が可能である。さらに、ヘリウム充填が不要なため、将来的にはすべての分析機関に少なくとも NMR 1 台が設置されるほど普及するだろうと考えられる。そこで本研究では、卓上 NMR を用いた規格試験の開発に関する研究として、ピーク高さ法についての検討を行う。

一般に、qNMR スペクトルの解析方法

には積分法が用いられる。積分法は、定量対象のプロトンのピーク面積を積分する手法である。ただし、積分法から正確な定量分析結果を得るためには、定量対象のプロトンピークが他のプロトンピークと十分に離れていなければならない。一方、ピーク高さ法の場合、重なり合うプロトンのピークトップが離れていれば、それぞれの高さを比較することで、正確な分離定量が期待できる。本解析手法は、プロトンが重なることの多い卓上 NMR において有用な解析手法と考えられる。しかしながら、ピーク高さ法の定量精度に関する報告は少ない。そこで本研究ではナリンジンをモデル化合物として、ピーク高さ法の精度を検証することとした。

ナリンジンは、アグリコンの 2 位に不斉中心を持つため、NMR スペクトル上には、2*S* 体と 2*R* 体からなる 2 種のジアステレオマーが観測される (図 1)。両者のプロトンは非常に近い位置に共鳴を示すため、<sup>1</sup>H 共鳴周波数 600 MHz の NMR 装置を用いても、積分法で両異性体を分離定量することは困難である (図 2)。そこで、2*S*-ナリンジンと 2*R*-ナリンジンの混合物を試料とし、NMR ピーク高さ法から算出した異性体比と純度の結果について、別にキラルクロマトグラフィーや積分 qNMR で求めた参照値の結果と比較し、NMR ピーク高さ法の精度を評価したので報告する。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

食品添加物として販売されているナリンジン 4 製品 (A93、A 社製 ; A94、B 社

製 ; A173-1 及び A174-1、C 社製) は、日本食品添加物協会を通じて入手した。ナリンジンの 2*S* 体及び 2*R* 体の標準品は、(株) 長良サイエンスから購入した (2*S*-ナリンジン、Code No. NS153102 ; 2*R*-ナリンジン、Code No. NS153202)。メタノール (Cat No. 25183-2B) 及びジメチルスルホキシド (DMSO) (Cat No. 10378-00) は関東化学 (株) から購入した。エタノール (Cat No. 052-03343)、ヘキサン (Cat No. 080-03423)、重水素化メタノール (Cat No. 138-18703、以下、重メタノール) 及び認証標準物質 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> (Cat No. 024-17031、認証値 99.9%) は、富士フィルム和光純薬 (株) から購入した。

### B-2) 装置及び器具

NMR は、日本電子 (株) 製 JNM-ECZ600R/S1 (<sup>1</sup>H 共鳴周波数 600 MHz) を用いた。解析ソフトウェアは、MestReNova software、v14.2.1 (Mestrelab Research) を用いた。卓上 NMR は、Magritek 社製 SpinSolve60 (<sup>1</sup>H 共鳴周波数 60 MHz) を用いた。高速液体クロマトグラフは、(株) 島津製作所製 Prominence series (オートサンプラー : SIL-20AC、送液ポンプ : LC20AD、カラムオーブン : CTO-20AC、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 : SPD-M20A) を用いた。遠心エバポレーターは、EZ-2 (Genevac 製) を用いた。凍結乾燥機は FDL-2000 (EYELA 東京理化学器械株式会社製) を用いた。ウルトラマイクロ天秤は XP2U (Mettler toledo 社製) を用い、マイクロ天秤は、BM-252 ((株) エー・アンド・デイ社製) を用いた。電動ピペッターは Multipette®E3 (eppendorf 社) を用いた。

### B-3) NMR 測定

ウルトラマイクロ天秤を用いて、2*S*-ナリンジンまたは 2*R*-ナリンジン約 10 mg を量りとり、バイアルに移した。そこに、電動ピペッターを用いて、重メタノール 1.0 mL を加え、溶解させた液を NMR 用試料液とした。この NMR 用試料液 0.6 mL を NMR 用試験管に移した後、NMR 測定に付した。

### B-4) キラル HPLC 測定

マイクロ天秤を用いて、ナリンジン (A94) 約 30 mg を精密に量りとり、バイアルに移した。そこに、電動ピペッターを用いて、エタノール 30 mL 加え、溶解させた液を HPLC 用試料液とし、9 本の 10 mL バイアルに 3 mL ずつ分注した。分注した HPLC 試料液を、常温または冷蔵で、0・1・3・6・24 時間静置させた後、HPLC 測定を行い、ナリンジンの異性体比を算出した。メタノールと DMSO に溶解させた HPLC 用試料液についても、同様の検討を行った。ただし、メタノールと DMSO に溶解させた HPLC 用試料液は、移動相（ヘキサン/エタノール混液 (6:4)）との親和性が低いため、エタノールに置換した後に HPLC 分析を行うこととした。具体的には、メタノールは遠心エバポレーターを用いて、DMSO は凍結乾燥機を用いて、溶媒を完全に留去させた後、エタノール 3 mL を加えて再溶解し、HPLC 分析に付した。

#### キラル HPLC 条件

試料：1 mg/ml、カラム：CHIRALCEL OD-H (4.6 mm×250 mm、5µm、ダイセル社製)、カラム温度：40°C、流速：0.4 mL/min、測定時間：40 分、移動相：ヘキ

サン/エタノール混液 (6:4)、検出波長：282 nm

HPLC 用試料液の調製方法について最適化した後、ナリンジン 4 製品について分析を行った。ウルトラマイクロ天秤を用いて、約 10mg を精密に量りとり、バイアルに入れた。そこに、電動ピペッターを用いて量り取ったエタノール 10mL を 30 mL バイアルに加えて溶解させ、試料液とした。試料液を HPLC 用バイアルに移し替え、HPLC 分析に付した。

### B-5) qNMR 測定

内部標準である 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> 約 1 mg 及びナリンジン約 10 mg を精密に量りとり、バイアルに入れ、重メタノール 1.0 mL を加え溶解させ、qNMR 用試料液とした。qNMR 用試料液 0.6 mL を NMR 用試験管に移し、qNMR 測定に付した。得られた qNMR スペクトルをピーク高さ法と積分法で解析し、ナリンジンの異性体比と純度（両異性体合算純度）をそれぞれ算出した。

純度算出では下記の式に従って計算した。

$$P_s = \frac{A_A}{A_{IC}} \times \frac{H_{IC}}{H_A} \times \frac{M_A}{M_{IC}} \times \frac{W_{IC}}{W_s} \times P_{IC}$$

ここで、*A*、面積；*H*、プロトン数；*M*、分子量 (g/mol)；*W*、秤量値 (mg)；*P*、絶対純度 (%)；*A*、分析種 (ナリンジン)；*IC*、内部標準物質 (1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>)；*s*、試料。

#### qNMR 測定条件

パルス幅：90°、照射中心：5 ppm、観測幅：20 ppm、取り込み時間：4 秒、遅延時間：60 秒、積算回数：8 回、<sup>13</sup>C 核デカップリング：あり、測定温度：25°C。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

## C. 結果及び考察

### C-1) 各種溶媒におけるナリンジンの異性化について

ナリンジンは果実の成熟や pH、温度によって異性体比が変動することが知られている<sup>1)</sup>。本研究の試料溶液中においてもナリンジンの異性体比が測定中に変動することが懸念された。そこで、各種溶媒に溶解させたナリンジンの異性体比 (2*S*/2*R* 比) について、キラル HPLC を用いてモニタリングすることとした (図 3)。

図 4 より、DMSO 溶媒を用いて常温でナリンジンを静置させると、時間の経過とともに 2*R* 体から 2*S* 体への異性化が進み、異性体比は変動した。試料調製直後では異性体比が 0.85 であったが、24 時間後には 0.99 にまで変動していた。なお、この変動は 24 時間以降も続くと思われるが、先行研究では、試料によって適切な異性体比が存在すると報告しており、最終的には異性体比の変動も止まると考えられる<sup>2)</sup>。一方、冷蔵でナリンジンを静置させると、DMSO が凝固し、異性体比は変動しなかった。同様に、エタノールやメタノールに溶解させた試料においても、静置させる温度に関係なく、異性体比はほとんど変動しなかった。以上のことから、本研究では、キラル HPLC 測定の前試料調製はエタノールを用いることとし、qNMR 測定では重メタノールを用

いることとした。

### C-2) ピーク高さ法に用いるプロトンの選定

ナリンジンを NMR 分析すると、スペクトル上には 2*S* 体と 2*R* 体のプロトンが重なった状態で観測される (図 2)。そこで、両者の標準品を NMR 分析し、それぞれを分離定量できるプロトンピークを選定することとした。

図 5 に示す通り、Rha-H1 及び Glc-H1 においては、2*S* 体と 2*R* 体それぞれのピークトップを識別することができた。以降のピーク高さ法による解析では、Rha-H1 及び Glc-H1 を用いることとした。

### C-3) 異性体比の算出：ピーク高さ法 vs. キラル HPLC

重メタノールに溶解させたナリンジン 4 製品 (A93、A94、A173 及び A174) を qNMR 測定に付し、ピーク高さ法から異性体比 (2*S*/2*R* 比) を算出した。計算に用いた Rha-H1 と Glc-H1 のピークは図 6 にアスタリスクで示す。

別に、エタノールに溶解させたナリンジン 4 製品はキラル HPLC 測定に付し、異性体比を算出し、NMR ピーク高さ法から求めた異性体比と比較した (表 1)。

その結果、Rha-H1 のピーク高さから求めた異性体比は、4 製品全てにおいて、キラル HPLC との相対誤差 0.3~1.8% であった。また、バラつきは 0.0~0.5% と小さく、高い精度で解析可能と思われた。同様に、Glc-H1 は相対誤差 2.8~3.7%、バラつきは 0.2~0.9% と Rha-H1 よりも若干の開きやバラつきが確認されたが、キラル HPLC の結果と大きく乖離することはなかった。

なお、Rha-H1 と Glc-H1 以外のプロトンピークについては、複数のスピン-スピン結合相互作用を受けており、プロトン形状が複雑であった。すなわち、ピークの割れが多く、2*S* 体と 2*R* 体の識別が困難であった。このことから、ピーク高さ法を用いて異性体比を算出する際は、両異性体を識別しやすいピーク割れの少ないプロトンを用いることが望ましい。

#### C-4) 純度の算出：ピーク高さ法 vs. 積分法

認証標準物質 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> を内部標準として、qNMR によりナリンジン 4 製品の絶対純度を求めることとした。qNMR 測定によって得られたスペクトルを、積分法とピーク高さ法の 2 つの方法で解析し、2*S* 体と 2*R* 体の合算純度を算出した。

結果を表 2 に示す。積分法では、Rha-H1 から求めた純度の方が、Glc-H1 よりも 2% 程度高い値を示す傾向にあった。積分法で Rha-H1 及び Glc-H1 から求めた純度は、最も値の高いもので A93 の 92.0 及び 94.2%、低いもので A173 の 80.2 及び 81.5%であった。

続いて、ピーク高さ法で 4 製品の純度を算出することとした。計算に用いた 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>、Rha-H1 と Glc-H1 のピークは図 6 にアスタリスクで示す。ピーク高さから求めた 4 製品の純度は、総じて積分法で求めた純度より 50%程度低い結果となった (表 2)。

この原因の一つとして、内部標準である 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> と、Rha-H1 又は Glc-H1 との半値幅の違いが考えられた。

図 6 は、比較のため同一シフト幅

(0.06ppm) でそれぞれのピークを表示したものである。1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> の半値幅が狭くシャープな形状をしているが、このピークに対してナリンジンの Rha-H1 / Glc-H1 のピークは幅広であり、結果として、純度が過小評価されたと考えた。

#### C-5) 卓上 NMR の検討

プロトンが重なることの多い卓上 NMR においても、ピークトップが離れていれば、ピーク高さ法を用いて分離分析が可能である。そこで、先の qNMR で用いた試料を <sup>1</sup>H 共鳴周波数 60 MHz 卓上 NMR に付し、スペクトルを確認した (図 7)。

60MHz の卓上 NMR では、ナリンジンのプロトンが想定以上に重なり合い、600 MHz で識別可能であった Rha-H1 及び Glc-H1 のピークトップですら、解析することが困難であった。

#### D. 結論

NMR スペクトル上で、2 種の立体異性体に由来するプロトンが重なり合うナリンジンをモデルにして、NMR ピーク高さ法による異性体の分離分析を検討した。

ピーク高さ法が半値幅の影響を強く受けることは明らかである。「C-4) 純度の算出：ピーク高さ法 vs. 積分法」で示した通り、半値幅の異なるピーク同士 (1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub> vs. ナリンジンの Rha-H1 又は Glc-H1) を計算に用いると、本来の値と大きく乖離した結果が導かれるので注意が必要である。一方、「C-3) 異性体比の算出：ピーク高さ法 vs. キラル HPLC」で示した通り、ピーク高さ法で異性体比を算出した際の結果は参照値と大きく乖離

することはなかった。これは、異性体間で半値幅がほぼ同じプロトンピーク同士を比較していたためである。

また、ピーク高さ法を卓上 NMR に適用する際、化合物が複雑である場合に、スペクトル上のプロトンピークの由来を識別することが困難となる可能性があることから、この点に留意する必要がある。

以上の点を考慮すれば、ピーク高さ法を用いた NMR 試験を、特に異性体比の確認に応用することが可能と考えられた。

#### E. 参考文献

- 1) Wistuba, D., Trapp, O., Gel-Moreto, N., Galensa, R., Schuring, V. *Anal. Chem.* (2006) 78, 3424-3433.
- 2) Caccamese, S., Bianca, S., Santo, D. *J. Agric. Food. Chem.* (2007) 55, 3816-3822.

#### F. 研究業績

##### 学会発表等

- 1) 加藤千穂、西崎雄三、大槻崇、松藤寛、阿部裕、多田敦子、杉本直樹：qNMR におけるピーク高さ法の検討：naringin の場合、第 5 回日本定量 NMR 研究会年会 (2023.12) (川崎市)

##### 論文発表等

なし

#### G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

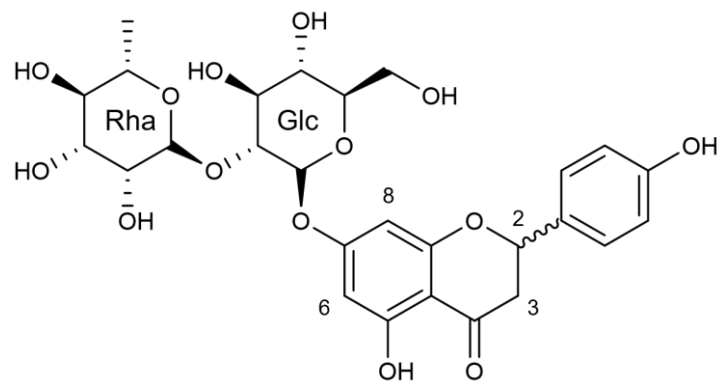


図1 ナリンジンの化学構造  
2位に不斉中心を持つ。

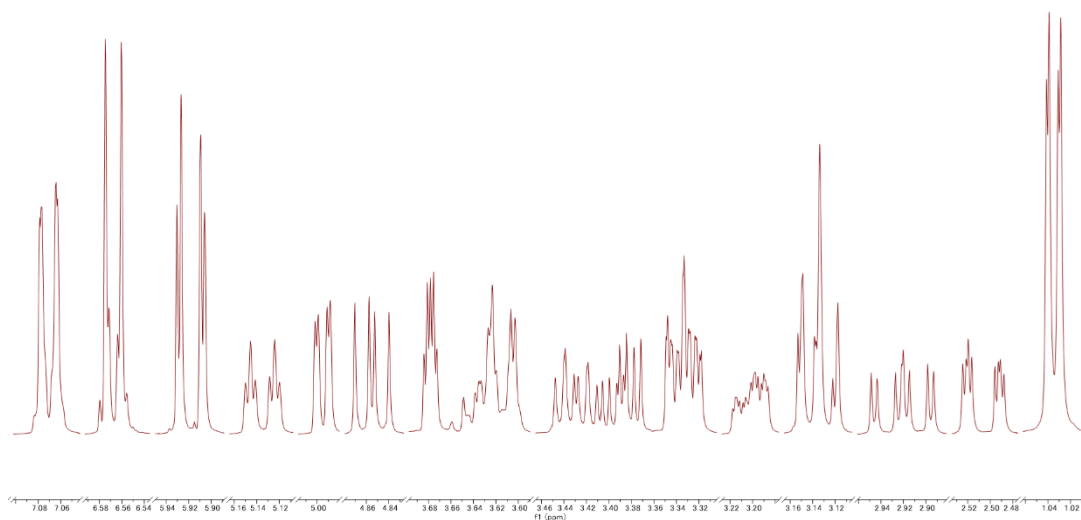


図2 ナリンジン (2*S*体及び2*R*体) の混合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル  
600 MHzのNMR装置を用いて測定した。



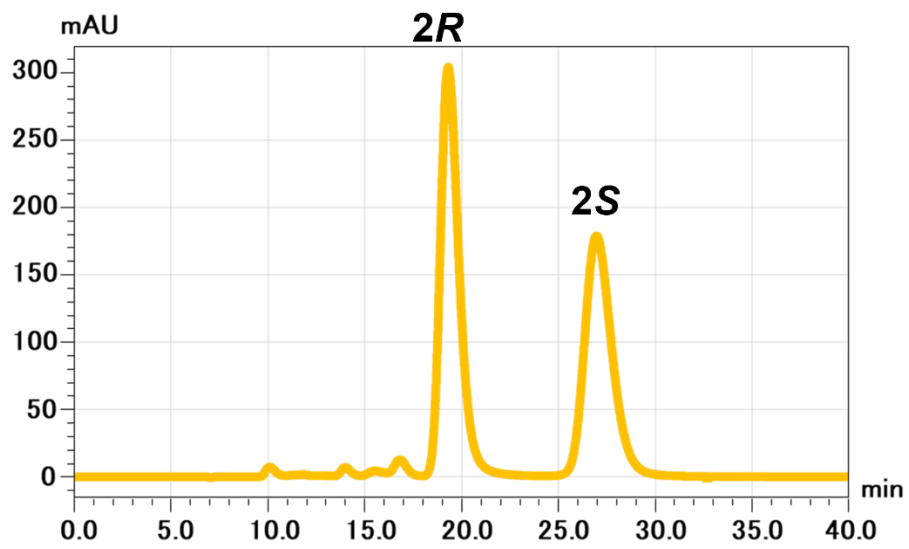


図3 キラル HPLC によるナリンジンの 2S 体と 2R 体の分離  
2S 体と 2R 体それぞれの標準品のクロマトグラムを比較し、ピークを同定した。

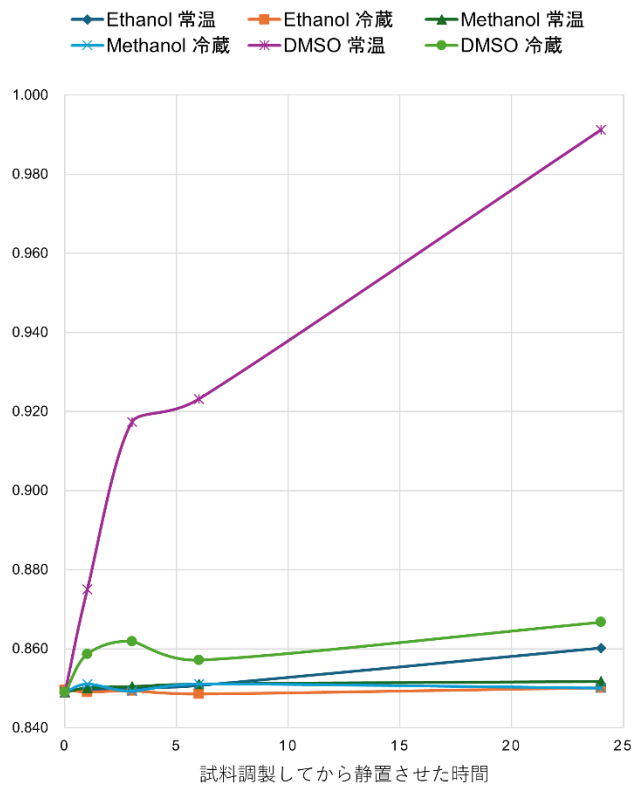


図4 各種溶媒下で静置させた際のナリンジンの異性体比 (2S/2R 比) の変動

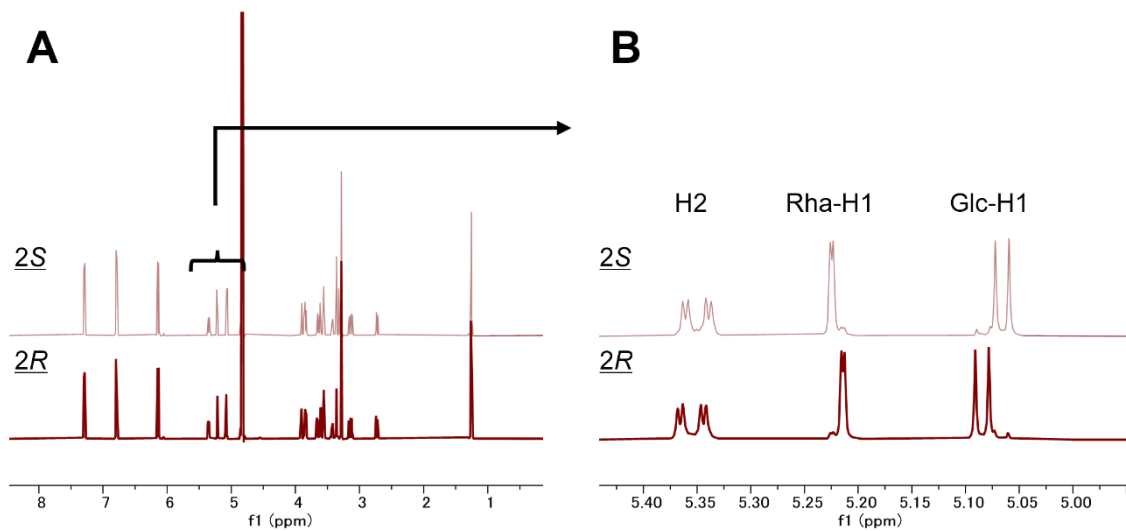


図5 ナリンジンの  $2S$  体及び  $2R$  体の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

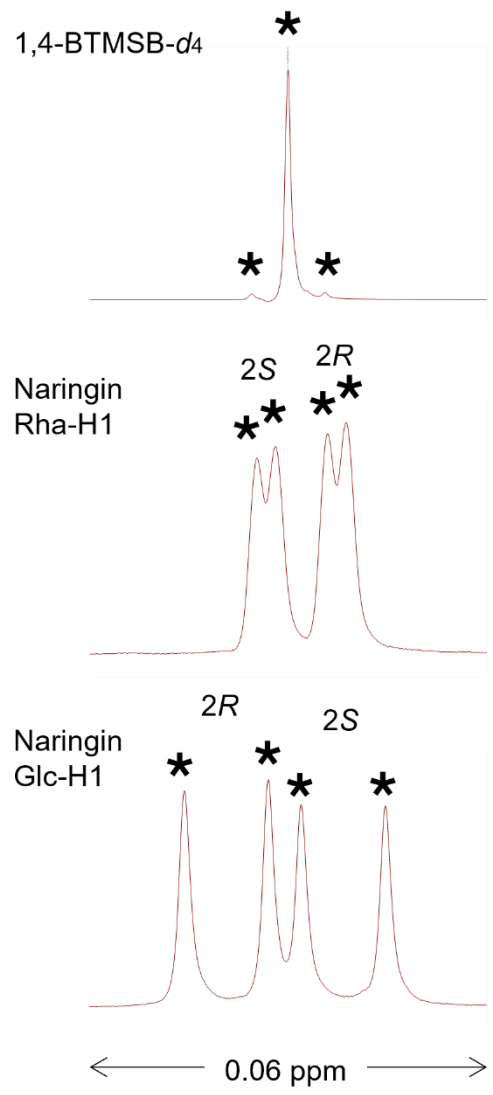


図6 解析に用いたプロトンピーク

プロトンがスピン-スピン結合によって分裂している場合、分裂したピークの高さをすべて計算し、合計した。

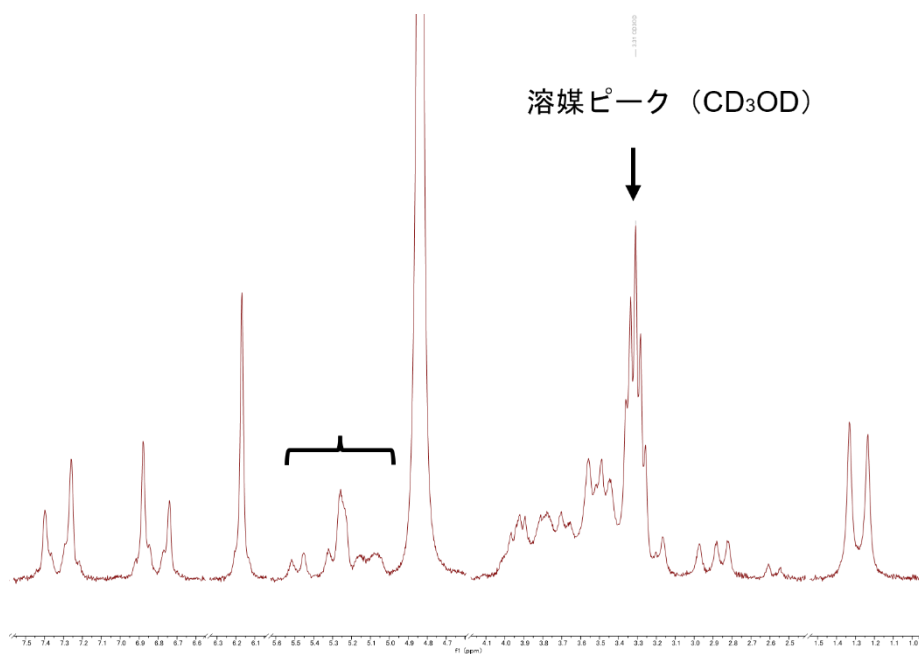


図7 卓上NMRを用いたナリンジン (A94) の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル  
中括弧 { } は、ナリンジンの H2、Rha-H1 及び Glc-H1 に相当する領域

表1 NMR ピーク高さ法によるナリンジン異性体比 (2*S*/2*R* 比) の算出

	A93		A94		A173		A174	
	Rha-H1	Glc-H1	Rha-H1	Glc-H1	Rha-H1	Glc-H1	Rha-H1	Glc-H1
(1) ピーク高さ法	0.893 ± 0.003	0.905 ± 0.008	0.864 ± 0.001	0.879 ± 0.002	0.861 ± 0.004	0.891 ± 0.002	0.939 ± 0.001	0.961 ± 0.002
(2) キラル HPLC	0.880 ± 0.001		0.849 ± 0.002		0.859 ± 0.004		0.935 ± 0.001	
相対値 [(1)/(2)]	101.4%	102.8%	101.8%	103.6%	100.3%	103.7%	100.4%	102.8%

試料調製 1 回、測定 3 回で実施した。

表2 NMR ピーク高さ法によるナリンジンの絶対純度 (2*S* と 2*R* の合算純度) の算出

	A93		A94		A173		A174	
	Rha-H1	Glc-H1	Rha-H1	Glc-H1	Rha-H1	Glc-H1	Rha-H1	Glc-H1
(1) ピーク高さ法	42.2 ± 2.6	43.7 ± 2.3	44.2 ± 3.5	45.4 ± 2.7	33.6 ± 0.4	35.1 ± 0.1	45.2 ± 6.9	44.6 ± 5.1
(2) 積分法	94.2 ± 1.2	92.0 ± 1.1	92.3 ± 0.5	89.7 ± 0.6	81.5 ± 0.3	80.2 ± 0.8	90.9 ± 0.4	88.6 ± 1.0
相対値 [(1)/(2)]	44.8%	47.5%	47.9%	50.6%	41.2%	43.7%	49.7%	50.3%

試料調製 1 回、測定 3 回で実施した。

