

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和7年度 研究分担報告書
既存添加物の成分組成に関する研究

～既存添加物の基準策定のための ^1H -qNMR を用いた成分定量～

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、 ^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7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した。既存添加物の「コリアンダーオイル」中の linalol の定量をコリアンダー種子、食用の種子の粉末中の定量と併せて行った。また、「香辛料抽出物」由来の既存添加物「セロリーシードオイル」の指標成分として butylphthalide を選択し、原料となるセロリ種子、香粧品用のセロリシードオイルと併せてその含有率の ^1H -qNMR 法での定量を検討した。

A. 研究目的

^1H -qNMR 法は、SI トレ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 ^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。それゆえ、既存添加物「香辛料抽出物」の原料の規格試験法として、定量 NMR (^1H -qNMR)法が適切あるいは適用可能なものがあるかの検討を行っている。令和7年度も引き続き既存添加物

「香辛料抽出物」に着目し、「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討した。

「香辛料抽出物」の一つである「コリアンダーオイル」中の linalol (Fig. 1)の定量を、コリアンダー種子、食用の種子の粉末中の定量と併せて行った。また、同じく「香辛料抽出物」の一つである「セロリーシードオイル」の指標成分として butylphthalide (Fig. 2)を選択し、原料となるセロリ種子、香粧品用のセロリーシードオイルと併せて、 ^1H -qNMR 法を用いてその含有率の定量を検討した。

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 1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_4 (BTMSB- d_4 , Fig. 3)は富士フィルム和光純薬の Trace Sure®規格のものをを用いた。NMR 測定用溶媒の acetone- d_6 は Cambridge Isotope Laboratories

Inc.の 99.9 atom %D を用いた。Linalol と butylphthalide はどちらも東京化成から購入の試薬を用いた。コリアンダーオイル(管理番号 C2300)とセロリシードオイル(管理番号 C2304)は 2023 年 8 月に国立医薬品食品衛生研究所より供与を受けたものを用いた。コリアンダー種子は食用として市販されている製品 2 種を, セロリ種子はセロリ栽培用として園芸店で市販されているもの 2 種と食用として市販されているもの 2 種を, セロリシードオイルのもう 1 種の試料は香粧品用として市販されているものを, それぞれ 2025 年 4 月に購入し, 用いた。

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。試料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-ECZL600 を使用した。HPLC は, ポンプとして JASCO PU-4180, カラムオーブンに 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 法を用いたコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalol の定量

まず, linalol の ^1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と, 試料中の ^1H -qNMR 法による linalol 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

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。

Linalol 標準品とコリアンダーオイルは, 約 10 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。

市販のコリアンダー種子は粉末化して用いた。粉末化した種子及び粉末を購入した試料は, 約 100 mg 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-3-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, linalol (Fig. 1) の 2 位のオレフィンプロトンシグナルが 5.66 ppm に現れることを確認した (Fig. 4)。 ^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, linalol の 2 位のプロトンシグナルと 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 linalol の濃度を算出した。

$$C_I = (I_I / I_B) \times C_B$$

ただし, C_B , C_I はそれぞれ BTMSB- d_4 及び linalol のモル濃度 (mol/mL), I_B , I_I はそれぞれ BTMSB- d_4 及び linalol の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-3-c) HPLC を用いたコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalol の定量

HPLC は YMC-Triart C18 s-5 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い、40°C で MeCN : 0.1%リン酸-H₂O = 55 : 45, 注入量 10 µL, 流速 1.0 mL/min で溶出, 210 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. 5 a)

¹H-qNMR 法で定量した linalol 標準品の溶液を適宜段階希釈した液を標準液として検量線を作成した. (Fig. 6) 試料溶液として, ¹H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 10 倍に希釈した液を用いた. 試料溶液のクロマトグラムの linalol のピーク面積と検量線の関係から, 試料中の linalol を定量した. (Fig. 5)

B-4) ¹H-qNMR 法を用いたセロリシードオイル及びセロリ種子中の butylphthride の定量

セロリシードオイルに多く含まれる成分として limonen が文献的¹⁾に示されている. しかしながら香辛料抽出物のセロリシードオイル (以下, C2304) の ¹H-NMR スペクトルでは, 特徴的なシグナルがどの化合物に由来するかすぐに予測を立てることが困難であった. C2304 の TLC を展開したところ, 比較的是っきりとした UV 吸収を持つスポットが見られたことから, このスポットを示す化合物の単離同定するところから着手した.

B-4-a) C2304 中の化合物の単離同定

C2304 (約 100 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane-ethylacetate = 4 : 1) で分離した. *n*-Hexane-ethylacetate = 4 : 1 で展開した TLC で *R*_f = 0.4 付近に UV 吸収が見ら

れた画分を集めて濃縮乾固した. 得られた化合物の各種 NMR スペクトルを測定したところ butylphthlide と推定され, 市販試薬の butylphthlide と ¹H-NMR スペクトルが一致したことから, この化合物を butylphthlide と同定した. (Fig. 7) また, butylphthlide の ¹H-NMR スペクトル (CDCl₃ 中) と C2304 のそれを比較したところ, 7.3~7.9 ppm で一致するシグナルが独立して観測されることから, この butylphthlide を指標成分にできる可能性が示された. ところで, ¹H-qNMR の測定の際に CDCl₃ を用いると, 溶媒の密度が大きいため固形試料の抽出時に遠沈して上清を得るという操作が成り立たなくなる. そこで, 溶媒を acetone-*d*₆ として C2304 の ¹H-NMR スペクトルを測定したところ, butylphthlide の芳香族プロトン 4 種類は 7.3~7.6 ppm にそれぞれ独立したシグナルとして観測され, ¹H-qNMR 法での定量が可能と判断された. (Fig. 8 a,b)

B-4-b) 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.

Butylphthlide 試薬は, 約 10 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 ¹H-qNMR の測定に供した.

C2304 と香粧品用のセロリシードオイル (以下, 香粧品オイル) は約 20 mg を精秤して内部標準溶液に溶かして 2.00 mL とし, この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり ¹H-qNMR の測定に供した. セロリ種子は粉末化してデシケーター中で乾燥させたのち, 約 100

mg 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-4-c) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Butylphthlide 試薬と C2304 とセロリ種子末の抽出液の ^1H -qNMR を測定したところ、芳香族水素のシグナル (4-H: 7.42 ppm, 5-H: 7.52 ppm, 6-H: 7.35 ppm, 7-H: 7.58 ppm) が独立して観測された。(Fig. 8) 積分値は、butylphthlide 試薬とセロリ種子末の抽出液のスペクトルではどのシグナルもほぼ同じ値を示したが、C2304 では 7.35 ppm のシグナル方のシグナルの約 1.3 倍となっており、他のシグナルとの重なりが推定された。一方、香粧品オイル試料の ^1H -qNMR を測定したところ、5-H と 7-H は他のシグナルとオーバーラップしていた。4-H と 6-H は独立したシグナルでほぼ同じ値の積分値を示したが、この濃度において s/n は 7 程度で非常に低く、定量は困難であると判断された。以上を勘案し、積分値が取りやすく、値のばらつきが一番小さかった一番低磁場側の 7-H (7.58 ppm) シグナルを用いて定量することにした。

^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、butylphthlide 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 butylphthlide の濃度を算出した。

$$C_P = (I_P / I_B) \times C_B$$

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

B-4-d) HPLC を用いたセロリシードオイル及びセロリ種子中の butylphthlide の定量

HPLC は YMC-Triart C18 s-5 250 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 = 0 min 50 : 50 $\rightarrow$ 30 min 70 : 30, 注入量 10 μL , 流速 1.0 mL/min で溶出, 274 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 butylphthlide 標準品の溶液を適宜段階希釈した液を標準液として検量線を作成した。(Fig.10) セロリシードオイルの試料溶液は、 ^1H -qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 5 倍に希釈、セロリ種子の試料溶液では同様に 10 倍に希釈したものをを用いた。それぞれの試料溶液のクロマトグラムの butylphthlide のピークの面積と検量線の関係から butylphthlide の含量を求めた。(Fig. 9)

C. 結果及び考察

C-1) コリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalol の定量

^1H -qNMR を用いて測定した試薬中の linalol の含有率は 89.47% だった。またコリアンダーオイル中の含有率は 69.33%, 種子中の 2 試料は 0.15 と 0.17% であった。(Table 2) HPLC での測定結果でも同様の数値が観測された。いずれの試料でも ^1H -qNMR のスペクトルにおいて 2-H のシグナルが独立して綺麗に観測され、積分値も取りやすい状況であったことから、 ^1H -qNMR 法による linalol

の定量がコリアンダーオイルなどコリアンダー関連製品の品質管理に有効である可能性が示された。

C-2) セロリシードオイル及びセロリ種子中の butylphthlide の定量

^1H -qNMR 法において, butylphthlide の 7-H のシグナルの積分値を用いて各試料の含有率を算出した。試薬中の含有率は 89.86%だった。セロリシードオイル(C2304)中の含有率は 2.14%, 種子中の 4 試料のうち, 栽培用は 0.24 と 0.10%, 食品用のものは 0.50 と 0.38%であった。(Table 3) いずれのスペクトルでも s/n は 100 程度以上が確保され, 定量に十分なシグナル強度が示された。HPLC での測定結果でも同様の数値が観測された。

香粧品オイル試料では, butylphthlide の 4-H または 6-H のシグナルの積分値を用いて定量することも不可能ではなかったが, 今回の条件では十分な s/n は得られなかった。なお, Table 3 には 6-H のシグナルから仮に算出した含有率を記載した。HPLC から求めた含有率よりも小さな値となった。

以上のように, ^1H -qNMR 法による butylphthlide の定量がセロリシードオイルなどセロリ種子関連製品の品質管理に有効である可能性が示された。一方, 含有率が 1% を切るような低含油率のオイル(液体)製品での定量は困難であることもわかった。

D. 結論

D-1) ^1H -qNMR法をコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalol の定量

香辛料抽出物コリアンダーオイルをはじめとしたコリアンダー種子由来の製品中の linalol の含有率を, ^1H -qNMR 法を利用し, 溶

媒として acetone- d_6 , linalol の 2-H の積分値を用いて定量できることを確認した。

D-2) ^1H -qNMR法を用いたセロリシードオイル及びセロリ種子中の butylphthlide の定量
香辛料抽出物セロリシードオイルをはじめとしたセロリ種子由来製品中の butylphthlide の含有率を, ^1H -qNMR 法を利用し, 溶媒として acetone- d_6 , butylphthlide の 7-H の積分値を用いて定量できることを確認した。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Bacanak H, Dogan Z, Akkol E K, Nagatsu A, Saracoglu I, Bioactive Metabolites from Aerial Parts of *Plantago indica* L.: Structural Elucidation and Integrated In Vitro/In Vivo Assessment of Anti-Inflammatory and Wound-Healing Efficacy, *Plants*, **15**(1), 141 (2026).

2. 学会発表等

2-1. 学会

- 1) 梶本りおん, 宮崎真奈, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部 裕, 杉本直樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR)を用いた生薬バニラ及びバニラ香料中の vanillin, ethylvanillin 及び *p*-hydroxybenzaldehyde の定量, 日本食品化学学会第 31 回総会・学術大会 (2025.6) .
- 2) 瀬川ひかり, 永津明人, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹: 定量 NMR 法を用いたブラックペッパーオイル中の β -Caryophyllene の定量. 日本生薬学会第 71 回年会 (2025.9).
- 3) 梶本りおん, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直

樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR)を用いたコリアンダーオイル及びコリアンダー種子中の linalool の定量, 日本薬学会第 146 年会 (2026.3).

2-2. 講演等

なし

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

なし

I. 参考文献

- 1) Zorga J, Kunicka-Styczynska A, Gruska R, Smigielski K, Ultrasound-Assisted Hydrodistillation of Essential Oil from Celery Seeds (*Apium graveolens* L.) and Its Biological and Aroma Profiles, *Molecules*, **25**, 5322 (2020)

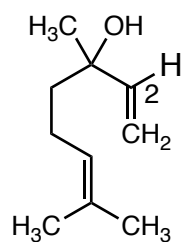


Fig. 1 Linalol の構造

2 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.

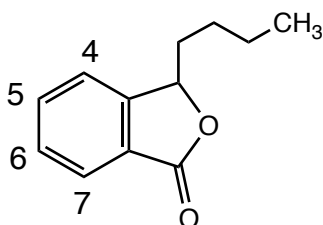


Fig. 2 Butylphthalide の構造

7 位のプロトンが ^1H -qNMR 法において積分値を測定したプロトン.

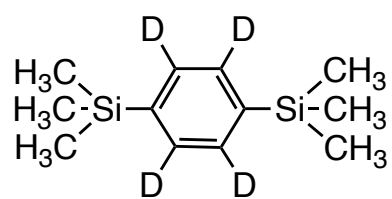


Fig. 3 定量用の認証標準物質 (BTMSB- d_4)

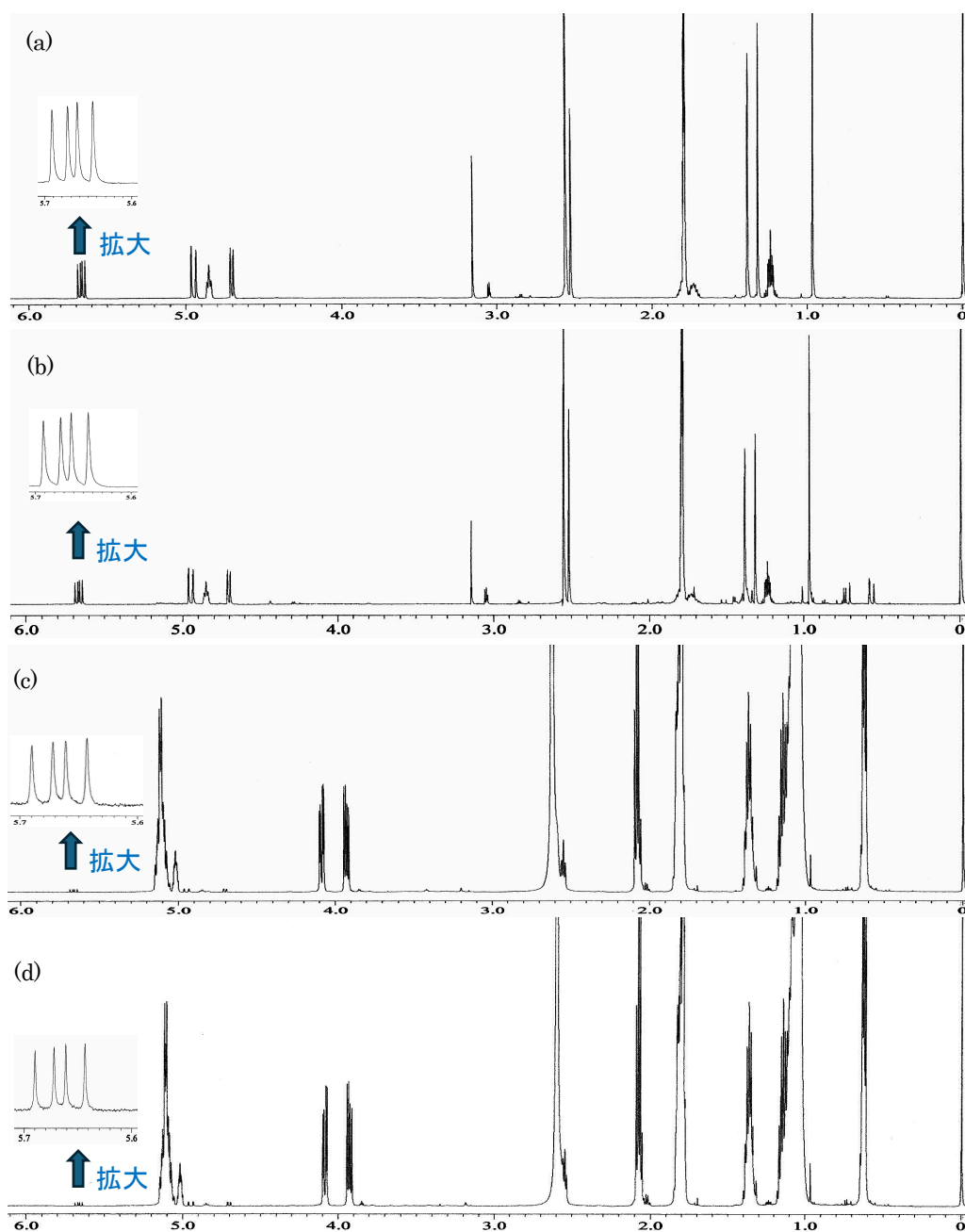


Fig. 4 Linalol 試薬, 既存添加物のコリアンダーオイル (b)と市販コリアンダー種子 A (c), B (d)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 600 MHz)
 拡大図のシグナルが2位のプロトンシグナル.

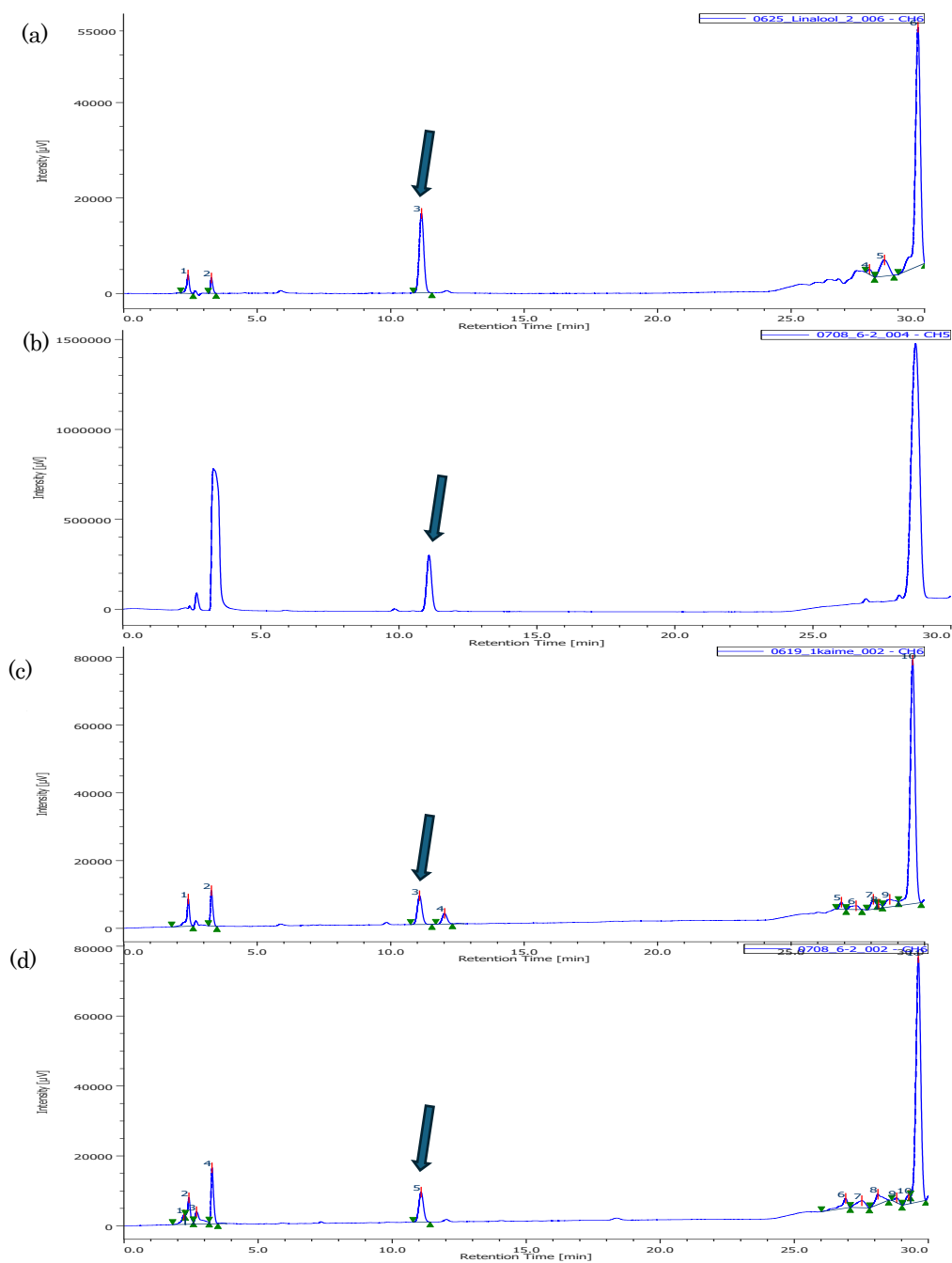


Fig. 5 Linalol 試薬, 既存添加物のコリアンダーオイル (b)と市販コリアンダー種子 A (c), B (d)の各試料の HPLC クロマトグラグラム

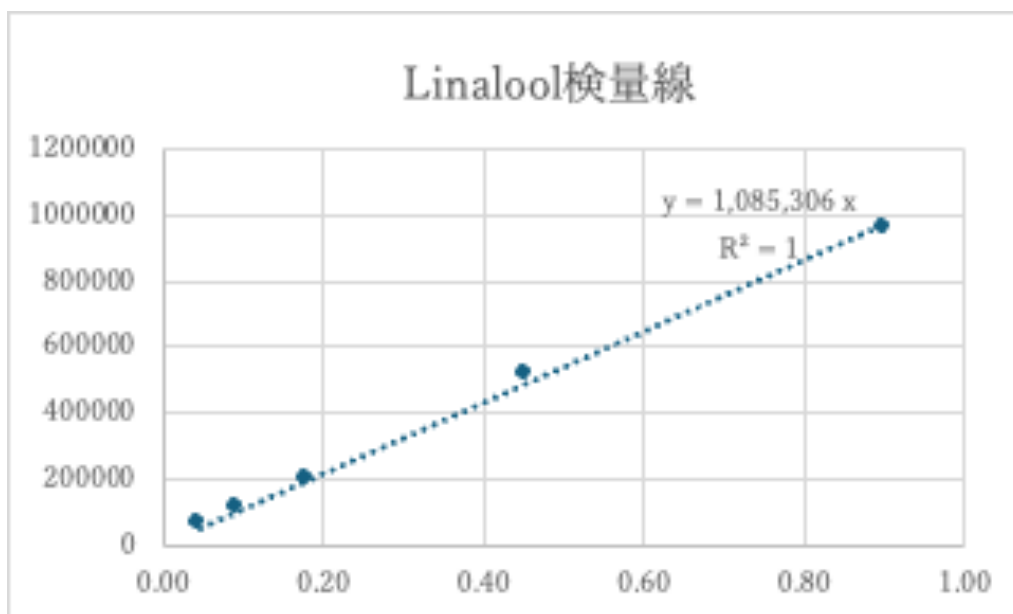


Fig. 6 HPLC における Linalol の検量線

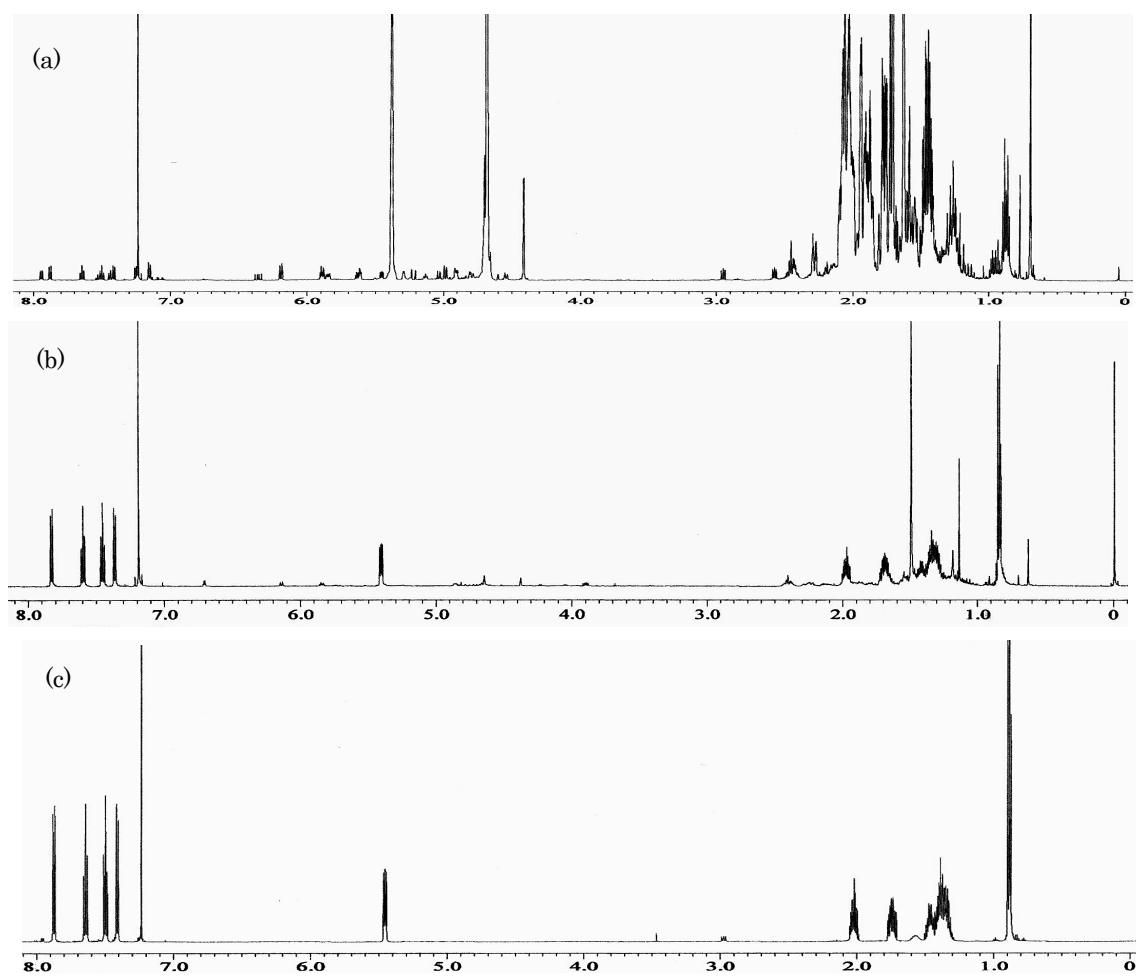


Fig. 8 既存添加物セロリシードオイル (a) , 単離された化合物(b) , Butylphthlide 試薬 (c), の ^1H -qNMR スペクトル (in CDCl_3 , 600 MHz)

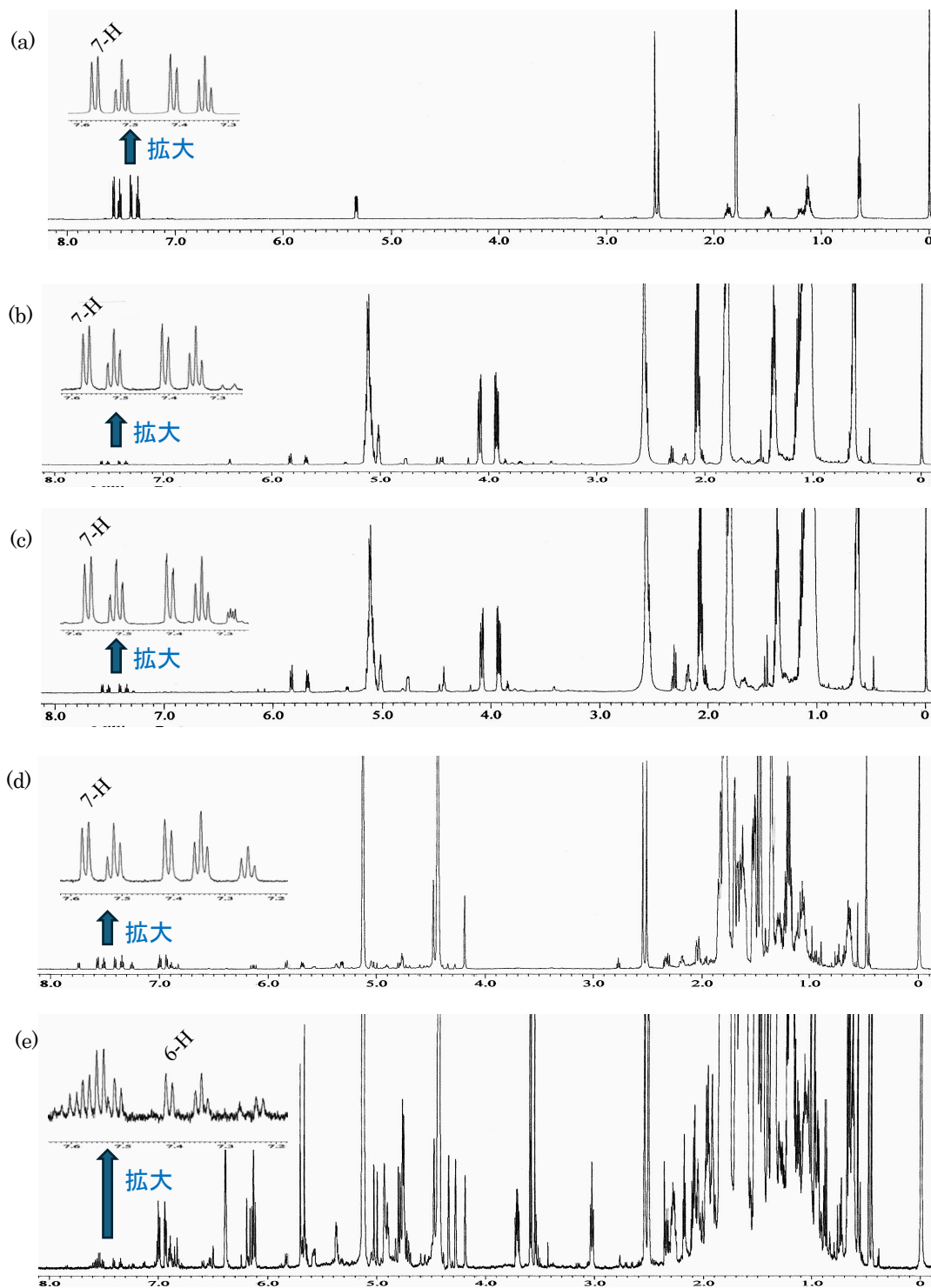


Fig. 8 Butylphthalide 試薬 (a), 既存添加物セロリシードオイル (b), 栽培用セロリ種子試料 (c), 食用セロリ種子試料 (d), 香粧品用セロリシードオイル (e)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 600 MHz)
 拡大図は芳香族のプロトンシグナル.

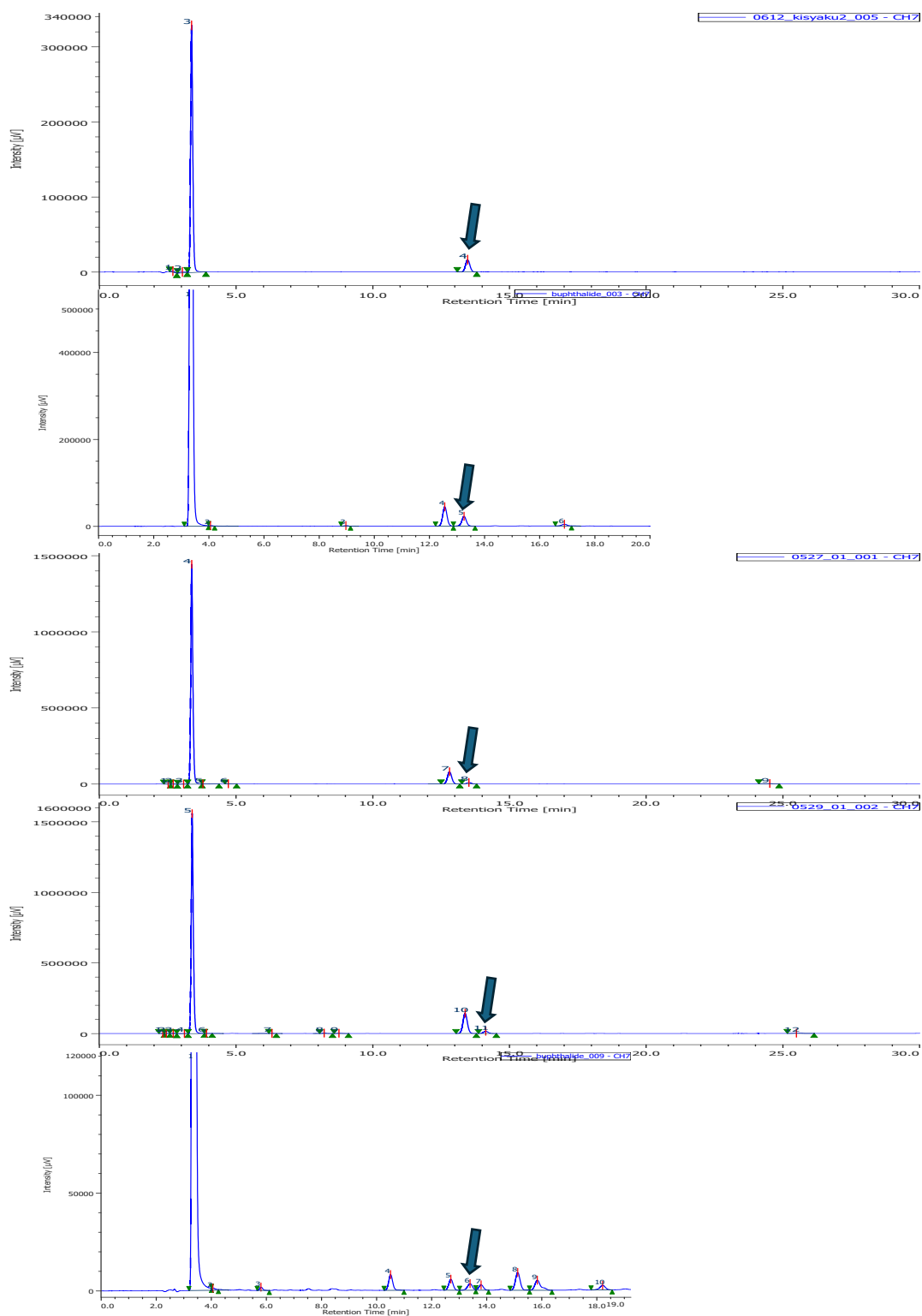


Fig. 9 Butylphthlide 試薬 (a), 既存添加物セロリシードオイル (b), 栽培用セロリ種子試料 (c), 食用セロリ種子試料 (d), 香粧品用セロリシードオイル (e)の各試料の HPLC クロマトグラム

矢印の保持時間 13.3 分付近のピークが butylphthlide のピーク

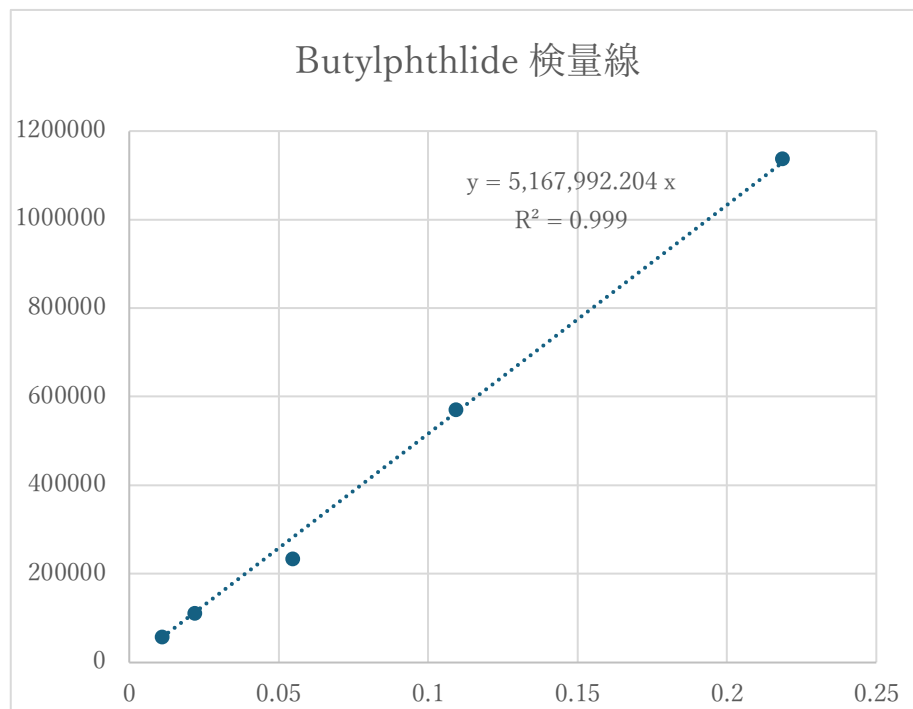


Fig. 10 HPLC における Butylphthlide の検量線

Table 1 ^1H -qNMR スペクトルの測定条件

分光計	日本電子 ECZL600
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 ^1H -qNMR 及び HPLC を用いて測定した linalol の含有率

	含有率 (%)	
	^1H -qNMR	HPLC
linalool 試薬	89.47 $\pm$ 1.45	
コリアンダーオイル (C2300)	69.33 $\pm$ 0.29	68.45 $\pm$ 2.78
市販コリアンダー種子(CoS-H)	0.17 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01
市販コリアンダー種子(CoS-Sb)	0.15 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.01

Table 3 ^1H -qNMR 及び HPLC を用いて測定した butylphthalide の含有率

	含有率(%)	
	^1H -qNMR	HPLC
Butylphthalide 試薬	89.86 $\pm$ 0.63	
セロリシードオイル (既存添加物) (C2304)	2.14 $\pm$ 0.03	2.28 $\pm$ 0.01
セロリ種子 (栽培用) (CeSP-25T)	0.24 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01
セロリ種子 (栽培用) (CeSP-25Sa)	0.10 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.00
セロリ種子 (食品) (CeSF-25Sb)	0.50 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.00
セロリ種子 (食品) (CeSF-25G)	0.38 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.01
セロリシードオイル (香粧品) (CO2504)	(0.28 $\pm$ 0.06)	(0.36 $\pm$ 0.02)