

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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

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する一環として、「香辛料抽出物」に着目して検討した。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、令和5～7年度はそこからクローブ関連製品、バジル関連製品、「ブラックペッパーオイル」およびコショウ関連製品、「コリアンダーオイル」とコリアンダー種子関連製品、「セロリーシードオイル」とセロリ種子関連製品の成分含有量評価を ^1H -qNMR 法で可能かの検討を行った。クローブ関連製品の検討では、指標成分として適切と考えられる *eugenol* の定量を行い、クローブの基原となる生薬のチョウジ、クローブ関連の既存添加物製品である「クローブ香料」、「クローブ抽出物」の *eugenol* の含有率の定量が ^1H -qNMR 法で可能であることを示し、既存の HPLC 法との同等性を確認できた。また、クローブと同じく *eugenol* を主な精油成分とするオールスパイスについても同様に ^1H -qNMR 法での定量が可能であることを確認した。バジル関連製品について、当初精油成分の定量を目指したが、*rosmarinic acid* が指標成分として適切と考え、市販の食用バジルにおいて *rosmarinic acid* の定量が ^1H -qNMR 法を用いて可能であることを示すと同時に、品種の異なるバジルの茎と葉のそれぞれの *rosmarinic acid* の含有率も確認し、製品中の *rosmarinic acid* の含有率の差異が用部の由来に依る可能性についても確認した。既存添加物の「コリアンダーオイル」とコリアンダー種子関連製品に関しては、その主な含有成分の *linalol* の定量 ^1H -qNMR 法で可能であることを確認した。さらに、既存添加物「セロリーシードオイル」とセロリ種子関連製品での検討では、指標成分として *butylphthalide* を選択し、原料となるセロリ種子と併せてその含有率の ^1H -qNMR 法での定量が可能であることを確認した。

A. 研究目的

^1H -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。^{1,2)} 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。そこで、既存添加物「香辛料抽出物」の基原の成分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た。

その「香辛料抽出物」中から、令和5年度はクローブとオールスパイスに着目した。クローブとオールスパイスでは、eugenol (Fig. 1)が主要成分となると考えて、生薬クローブとクローブ関連の既存添加物製品である「クローブ香料」、「クローブ抽出物」のeugenolの定量方法の検討をおこなった。また、クローブ同様にeugenolが主な精油成分であるオールスパイス中でも同様に定量可能かの検討をおこなった。また、令和5～6年度にかけてバジルについて検討をした。当初、精油成分の定量を目指したが、¹H-qNMR法の実施に適する精油成分のシグナルを見出すことが困難であった代わりに rosmarinic acid (Fig. 2)が比較的容易に定量できることがわかったため、rosmarinic acid を指標成分とした定量方法の検討を行なった。この際に、市販の食用バジルで rosmarinic acid の含有率に大きな差異があることがわかり、その差異が何に起因するか の解明を目的に吸う品種のバジルを栽培し、茎と葉に用部を分けてそれぞれにおける rosmarinic acid の含有率の検討を行った。さらに、令和6年度にはコショウ由来の食品添加物の一つである「ブラックペッパーオイル」について、指標成分として β-caryophyllene (Fig. 3)を選択し、その定量が可能か否かの検討を行った。令和7年度には「コリアンダーオイル」中の linalol (Fig. 4)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」の既存添加物の一つである「セロリシードオイル」の指標成分として butylphthalide (Fig. 5)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、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) 試薬及び試料

¹H-qNMR 測定時の内部標準物質として用いる sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonate-*d*₆ (DSS-*d*₆, Fig. 6) 及び 1,4-bis(trimethylsilyl)-benzene-*d*₄ (BTMSB-*d*₄, Fig. 6)はいずれも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 dimethylsulfoxide (DMSO)-*d*₆, methanol-*d*₄はそれぞれ Isotec Inc.の 99.9, 99.8 atom %D を acetone-*d*₆ は Isotec Inc. (令和6年度) または Cambridge Isotope Laboratories Inc. (令和7年度) の 99.9 atom %D を用いた。Eugenol は富士フィルム和光純薬から、β-caryophyllene は東京化成および富士フィルム和光純薬の2社から、linalol と butylphthalide は東京化成から、それぞれ購入した。

既存添加物の「クローブ抽出物」(管理番号 A1083)は2015年8月に、「クローブ香料」(管理番号 C2301), 「ブラックペッパーオイル」(管理番号 C2302), 「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、それぞれ国立医薬品食品衛生研究所より供与を受けたものをを用いた。

チョウジは生薬として2023年5月に購入したもの、チョウジ末、オールスパイス末は、食品として市販されている果実を2023年8月に購入したものをを用いた。バジルについては、スイートバジル、スイートタイバジル、ブッシュバジル、イタリアンラージリーフバジル、ジェノババジル (Fig. 7)の各品種の種子を日野春ハーブガーデンより2024年4月に購入し金城学院大学薬用植物園に4月中旬に播種、6月20日ごろに収穫して乾燥後、葉と茎に分け粉末化した。

市販バジル末は 2024 年 4 月にお互いに異なる製品を購入し、用いた。コショウ粉末は 2024 年 4 月に市販のものを購入した。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、市販のセロリーシードオイルとして香粧品用オイルを、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。生薬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 ECZL600（令和 7 年度）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 μ m ϕ 13 mm を用いた。

B-3) ^1H -qNMR 法に用いる内部標準液の調製と ^1H -qNMR の測定条件

内部標準として用いる BTMSB- d_4 または DSS- d_6 はデシケータ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 の重溶媒に溶かして内部標準溶液とした。

^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、測定対象化合物の対象となるシグナルと 0.00 ppm とした内部標準物質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 eugenol の濃度を算出した。

$$C_S = (I_S / I_R) \times C_R$$

ただし、 C_R 、 C_S はそれぞれ内部標準物質及び測定対象化合物のモル濃度(mol/mL)、 I_R 、 I_S はそれぞれ内部標準物質及び測定対象化合物の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-4) ^1H -qNMR 法を用いたチョウジ、クローブ末、「クローブ香料」、「クローブ抽出物」、オールスパイス末中の eugenol の定量

まず、eugenol 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 eugenol 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) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として DSS- d_6 の DMSO- d_6 溶液を用いた。Eugenol 標準品は、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。

Eugenol 測定用試料の調製は、次のように行った。生薬のチョウジは粉末化したのち用いた。粉末生薬と市販のクローブ末、オールスパイス末は、デシケータ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ろ過し、ろ液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。クローブ抽出物は約 10 mg を精秤して内部標準溶液(3.00 mL)に懸濁し、以下同様に遠沈、上清をろ過、ろ液から 0.600 mL を

NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。
「クローブ香料」は約 10 mg を精秤して内部標準溶液(3.00 mL)に溶解して 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。

B-4-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Eugenol と各生薬粉末の抽出液の ^1H -NMR を測定し、eugenol (Fig. 1)の 6 位のプロトンシグナルが 6.5 ppm 付近に現れることを確認した。(Fig. 8) 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_6 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 eugenol の濃度を算出した。

B-4-c) HPLC を用いたチョウジ、クローブ末、「クローブ香料」、「クローブ抽出物」、オールスパイス末中の eugenol の定量

HPLC は Cosmosil 5C8-MS-II 250 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い、40°Cで MeOH : H₂O = 75 : 25 (0 min)→90 : 10 (24 min)のグラジエント、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. 9)

^1H -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. 10)それぞれの試料は、 ^1H -qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 20 倍に希釈し、その試料溶液を 10 μL 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。

B-5) ^1H -qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

まず、rosmarinic acid 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 rosmarinic acid 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-5-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として DSS- d_6 の methanol- d_4 溶液を用いた。

Rosmarinic acid 標準品は、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。

粉末化した栽培バジルの葉、茎あるいは市販バジル末の測定用試料の調製は、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ろ過し、ろ液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。

B-5-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、rosmarinic acid (Fig. 2)の 7'位のプロトンシグナルがそれぞれ 7.54 ppm に現れることを確認した。(Fig. 11) 測定によって得られたスペクトルから、rosmarinic acid の 7'位のプロトンシグナルと 0.00 ppm とした DSS- d_6 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 rosmarinic acid の濃度を算出した。

B-5-c) HPLC を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

HPLC は YMC-Triart C18 s-5 150 mm x 4.6 mm i.d.のカラムを用い、40°Cで MeCN : 0.1%リン酸水溶液 = 20 : 80、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)

^1H -qNMR 法で定量した rosmarinic acid 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 13) それぞれの試料は、 ^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、その試料溶液を 10 μL 注入して得られたクロマトグラムの rosmarinic acid のピークの面積からその定量を行った。

B-6) ^1H -qNMR 法を用いた「ブラックペッパーオイル」およびコショウ末中の β -caryophyllene の定量

ブラックペッパーオイルにある程度含まれる成分として、 α -pinene, limonene, β -caryophyllene (Fig. 3)が文献的に示されている。これらのスペクトルと「ブラックペッパーオイル」のスペクトルを比較したところ、acetone- d_6 中での測定で β -caryophyllene のシグナルが厳しい条件ながらも独立して観測されたことから、試料中の ^1H -qNMR 法による β -caryophyllene の定量を行うことにした。

B-6-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として BTMSB- d_4 の acetone- d_6 溶液を用いた。

β -caryophyllene 試薬と「ブラックペッパーオイル」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 ^1H -qNMR の測定に供した。

コショウ末は、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ろ過し、ろ液か 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。

B-6-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

β -caryophyllene 試薬と「ブラックペッパーオイル」とコショウ末の抽出液の ^1H -NMR を測定し、試薬とブラックペッパーオイルでは β -caryophyllene (Fig. 3)の 5 位のプロトンシグナルが 5.04 ppm 付近に現れることを確認した。(Fig. 14) 測定によって得られたスペクトルから、 β -caryophyllene の 5 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 β -caryophyllene の濃度を算出した。コショウ末の抽出液ではこのシグナルは観測できず、定量はできなかった。

B-7) ^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-7-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として BTMSB- d_4 の acetone- d_6 溶液を用いた。

Linalol 標準品と既存添加物の「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 ^1H -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ろ過し、ろ液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、 ^1H -qNMR の測定に供した。

B-7-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. 4)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. 15). 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.

B-7-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%リン酸水溶液=55:45, 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. 16)

¹H-qNMR 法で定量した linalol 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した. (Fig. 6)それぞれの試料は, 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, その試料溶液を 10 µL を inject して得られたクロマトグラムの linalol のピークの面積から, その定量を行った. (Fig. 17)

B-8) 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

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³⁾に示されている. しかしながら既存添加物の「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-8-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. 18) 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. 19a,b)

B-8-b) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

内部標準溶液として BTMSB-*d*₄の acetone-*d*₆溶液を用いた.

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ろ過し, ろ液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり, ^1H -qNMR の測定に供した.

B-8-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. 19) 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 6-H のシグナルの積分値が, 4-H, 5-H, 7-H 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, 香粧品のオイル試料の ^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芳香族プロトンである 7-H シグナル (7.58 ppm) を用いて定量することにした.

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 butylphthlide の濃度を算出した.

B-8-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% リン酸水溶液 = 0 min 50 : 50 $\rightarrow$ 30 min 70 : 30, 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. 20)

^1H -qNMR 法で定量した butylphthlide 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した. (Fig. 21) それぞれの試料は, ^1H -qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒でセロリシードオイルの試料では 5 倍に希釈, セロリ種子の試料では 10 倍に希釈, その試料溶液を 10 μL 注入して得られたクロマトグラムの butylphthlide のピークの面積からその定量を行った. (Fig. 20)

C. 結果及び考察

C-1) ^1H -qNMR 法を用いたチョウジ, クローブ末, 「クローブ香料」, 「クローブ抽出物」, オールスパイス末中の eugenol の定量

Eugenol 標準品中の eugenol の定量を ^1H -qNMR 法でおこなった結果, 97.34% と見積もられ, 試薬の純度表示にほぼ沿ったものだった.

各生薬粉末から調製した試料で ^1H -NMR を測定したところ, DMSO- d_6 中で 6 位プロトンシグナルが独立して観測されたことから DMSO- d_6 を溶媒として ^1H -qNMR の測定をすることにした. ^1H -qNMR 測定の結果, 生薬チョウジ中の eugenol 含有率は $13.01 \pm 0.32\%$, 市販クローブ末では 8.11~14.83%, 市販オールスパイス末では

2.14～2.67%という結果を得た。(Table 2) 市販クローブ末のうち、含有率の高いものは生薬と同等であったので、少ない方は品質が劣るか粉末化してからの時間が長いかなどの相違があるものと考えられた。既存添加物の「クローブ香料」の eugenol 含有率は 81.58%で試薬ほどではないが高い eugenol 含有率であった。「クローブ抽出物」は 31.93%で、製品のラベル表示 38%より低かった。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。この検量線から各試料中の eugenol の含有率を算出したところ、¹H-qNMR 法での数値に極めて近似した値が得られた。お互いにそれぞれの試料の定量値のばらつきも極めて小さく、¹H-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。

C-2) ¹H-qNMR 法を用いたバジル中の rosmarinic acid の定量

¹H-qNMR を用いて測定した市販バジル末中の rosmarinic acid の含有率は 2 製品ではそれぞれ 1.51%と 0.70%であったが、2 製品ではシグナルが観測されず、測定不能だった。栽培した 5 品種では、葉における含有率が 0.83～1.90%であったのに対して、茎では 4 品種でシグナルを観測できず、比較的葉での含有率が大きかった 1 品種でわずかに(0.14%)含有されている程度であった。HPLC での測定結果でも同様のことが確認された。このようにバジル由来の製品の rosmarinic acid の定量が ¹H-qNMR を用いても容易に行えることがわかった。また、rosmarinic acid の有無からバジル製品が植物体のどの部分を用いているかを判別する手段になりうることもわかった。(Fig. 11, Table 3)

C-3) ¹H-qNMR 法を用いた「ブラックペッパーオイル」およびコショウ末中の β-caryophyllene の定量

「ブラックペッパーオイル」中の β-caryophyllene を ¹H-qNMR を用いて 1.55%で測定が可能ながわかった。(Fig. 14, Table 4) ただし、スペクトル中でシグナルが混んでいる領域であることから、精密な測定という観点ではあまり精度の高いものではないと考えられた。原料となるコショウ中の β-caryophyllene は測定ができず、製品の管理的手段としては活用の余地があるものの原料の管理として β-caryophyllene を指標とすることはできないと考えられた。

C-4) 「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。また既存添加物の「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 5) 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-5) 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。既存添加物の「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 6) 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.

香粧品のセロリシードオイルでは, 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 6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

1) 生薬チョウジ, クローブ末, 既存添加物の「クローブ香料」, 「クローブ抽出物」, オールスパイス末中のeugenolの ^1H -qNMR法を用いた定量条件を確立した.

2) バジル由来の製品中のrosmarinic acidの ^1H -qNMRを用いた定量条件を確立することができた. また, バジル由来の製品中のrosmarinic acidの有無によって, バジルの葉を用いた茎を用いたかが明らかとできることがわかった.

3) 既存添加物「ブラックペッパーオイル」中の β -caryophylleneを ^1H -qNMRを用いて測定できることがわかった.

4) 既存添加物「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.

5) 既存添加物「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) Bayrakceken G Z, Saracoglu I, Nagatsu A, Yilmaz M A, Basaran A A: Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from *Prunus mahaleb* L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 2023; **310**: 116378.
- 2) 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*, 2026; **15**(1): 141.

2. 学会発表等

2-1. 学会

- 1) Merve Sensoy, Vahap Murat Kutluay, Akito Nagatsu, Iclal Saracoglu: Isoflavonoids from *Vuralia turcica* (Kit Tan, Vural & Kucukoduk) Uysal & Ertugrul. 日本薬学会第144年会(2024.3).
- 2) Merve Sensoy, Yasin Genc, Hilal Erdem, Iclal Saracoglu, Akito Nagatsu: Comparative quantitative determination studies of acteoside in

Plantago subulata L. with ^1H -qNMR technique.

第70回日本薬学会東海支部総会・大会
(2024.7).

- 3) 永津明人, 森本深麗, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹: ^1H -qNMR法を用いたクローブ由来既存添加物およびチョウジ末, オールスパイス末中のeugenolの定量. 日本生薬学会第70回年会(2024.9).
- 4) 瀬川ひかり, 伊藤遥菜, 西崎雄三, 阿部裕, 杉本直樹, 永津明人: 定量 NMR (^1H -qNMR) を用いたバジル(*Ocimum basilicum* L.)中のrosmarinic acid の定量. 日本薬学会第145年会(2025.3).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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

- 1) 永津明人: 生薬等の品質管理での定量 NMR 法 (^1H -qNMR) の利用. 2024 年度分子研異分野技術交流セミナー(第3回) (2024.7).
- 2) 永津明人: 生薬の品質評価について. 和6年度日本アロマセラピー学会中部北陸地方会・清水薬剤師会(2024.9).

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) Tahara M, Sugimoto N, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara, T, Yoshida Y, Tada A, Kubota R, Shimizu K, Yamazaki T, Tanamoto K, Nakazawa H, Nishimura T: Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR. *Jpn J Food Chem. Safety* 2009; 16: 28-33.
- 2) 厚生労働省, 第18改正日本薬局方, pp2623 (2021).
- 3) 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*, 2020; 25: 5322.

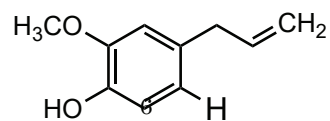


Fig. 1 Eugenol の構造

6 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

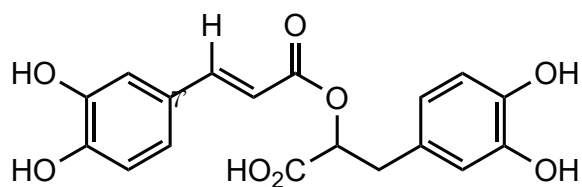


Fig. 2 rosmarinic acid の構造

7' 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

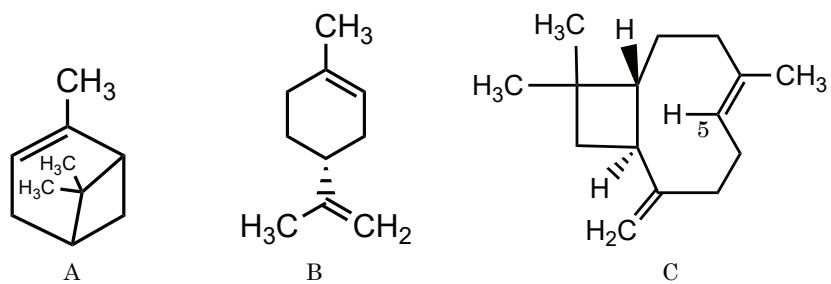


Fig. 3 α -Pinene (A), limonene (B), β -caryophyllene (C) の構造

β -Caryophyllene (C) の 5 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.

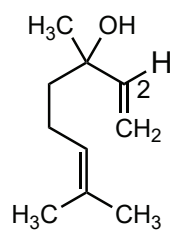


Fig. 4 Linalol の構造

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.

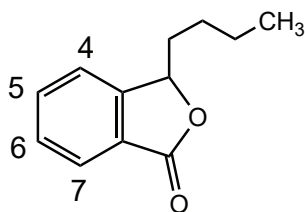
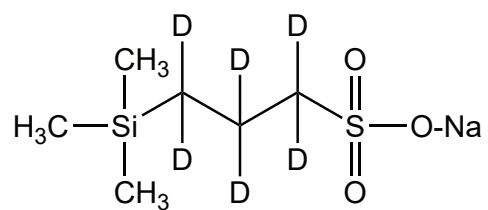
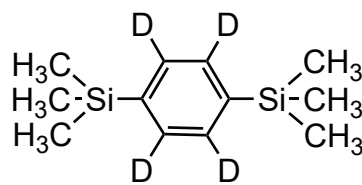


Fig. 5 Butylphthalide の構造

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.



DSS- d_6 ,



BTMSB- d_4

Fig. 6 定量用の認証標準物質



(e)



Fig. 7 栽培して試料とした各品種のバジル

それぞれスイートバジル (a), スイートタイバジル (b), ブッシュバジル (c), イタリアンラージリーフバジル (d), ジェノババジル (e) .

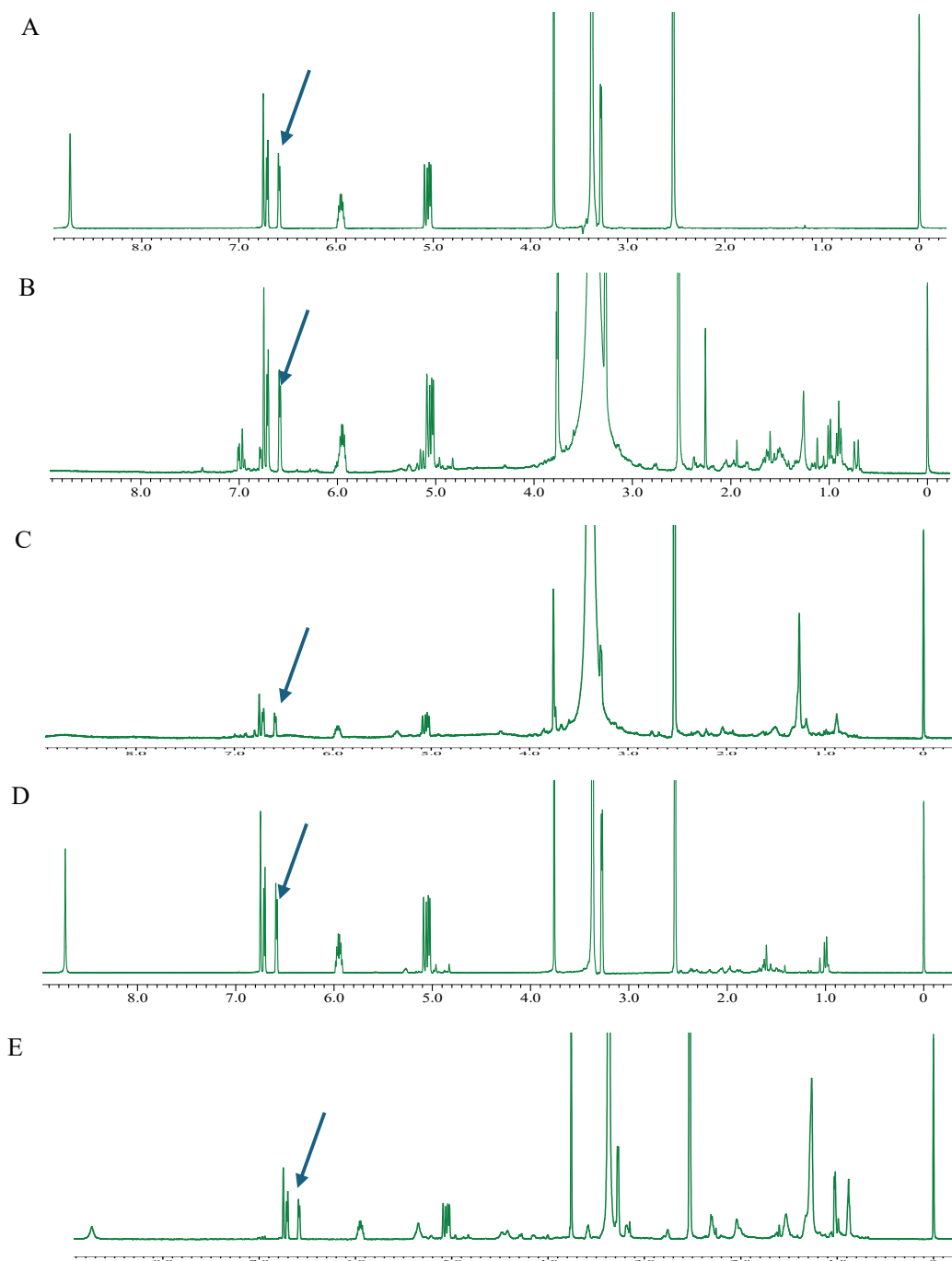


Fig. 8 Eugenol 試薬(A), 市販クローブ粉末(B), 市販オールスパイス粉末(C) , 「クローブ香料」及び「クローブ抽出物」(D)の ^1H -qNMR スペクトル (in $\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz)
矢印は 6 位の水素のシグナル

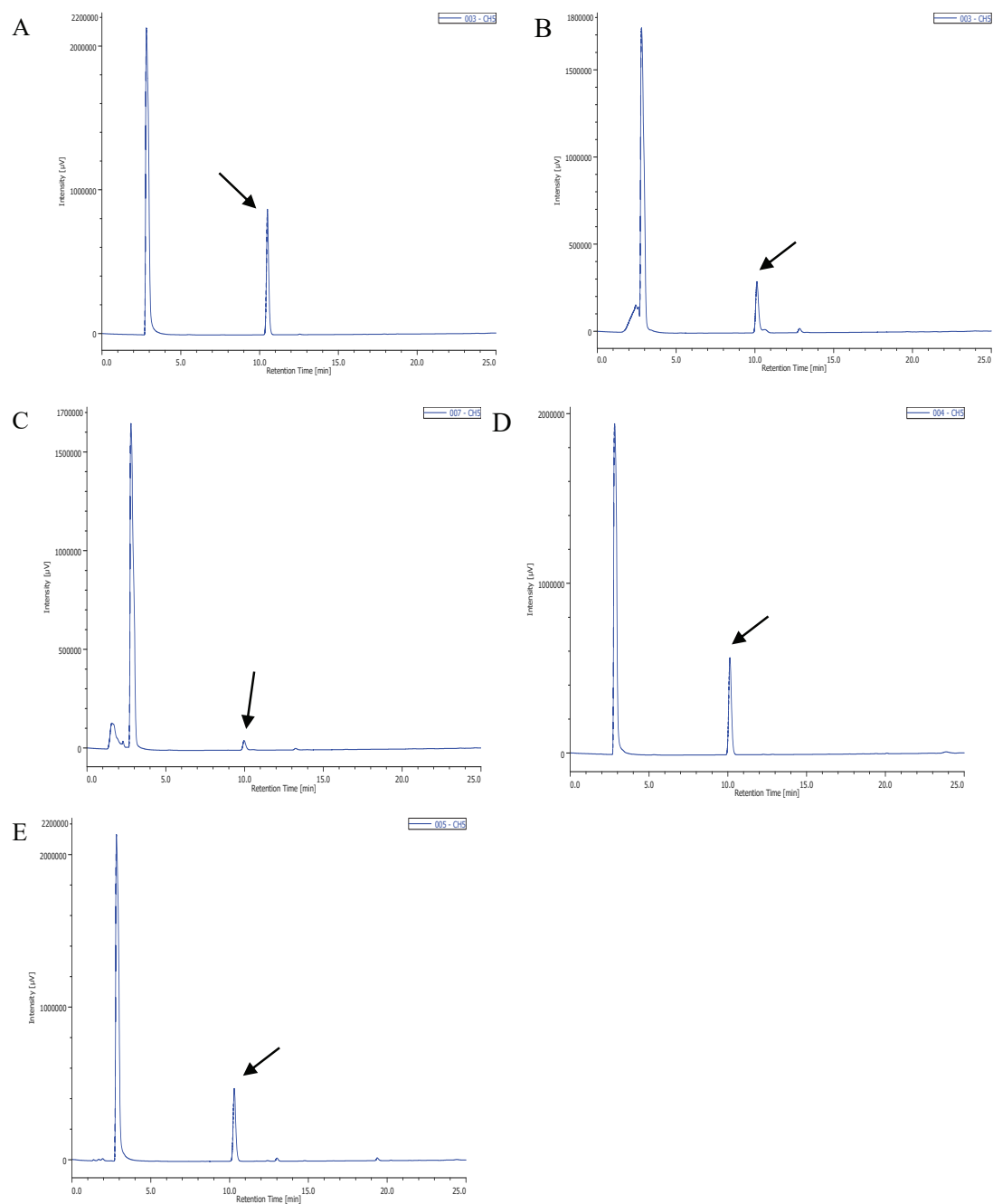


Fig. 9 Eugenol 試薬(A), 市販クローブ粉末(B), 市販オールスパイス粉末(C) , 「クローブ香料」(D)及び「クローブ抽出物」(E)の
縦軸はピーク強度, 横軸は保持時間 (min) , 矢印は eugenol のピーク.

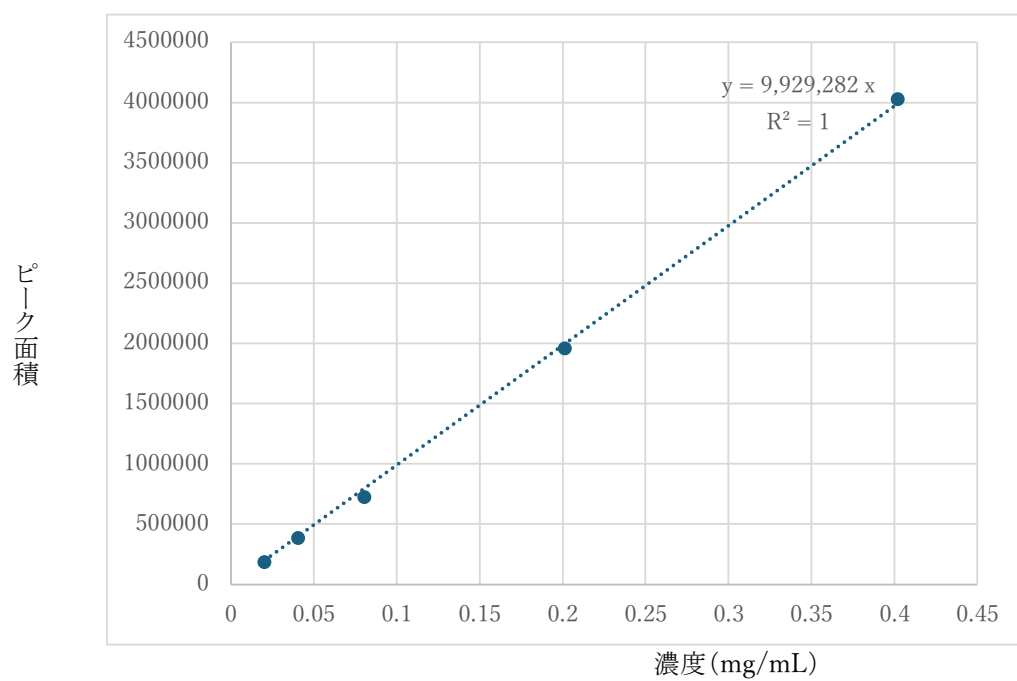


Fig. 10 HPLC における eugenol の検量線

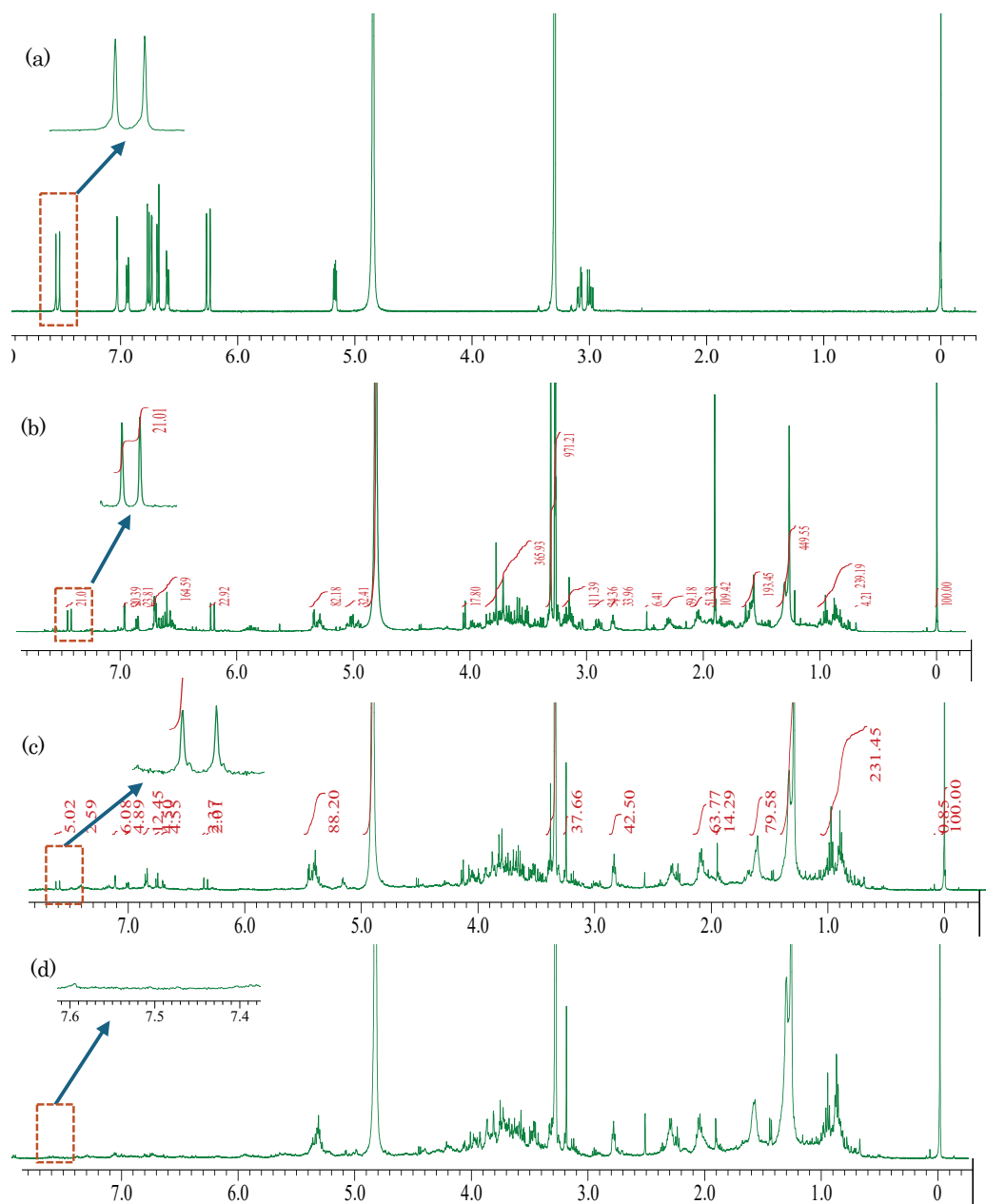


Fig. 11 Rosemarinic acid 試薬 A (a), スイートバジル葉 (b)と市販バジル末 A (c), C (d)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4 , 500 MHz)

拡大図のシグナルが 7' 位のプロトンシグナル.

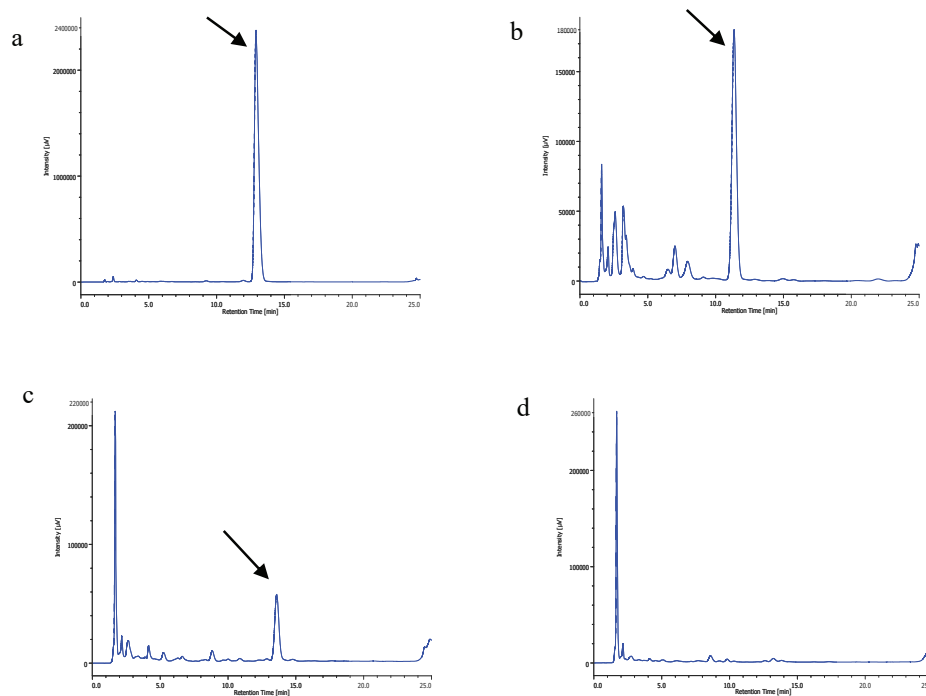


Fig. 12 Rosemarinic acid 試薬(a), スイートバジル葉(b)と市販バジル末 A (c), C (d)の各試料の HPLC クロマトグラム.

縦軸はピーク強度, 横軸は保持時間 (min), 矢印が rosmarinic acid のピーク

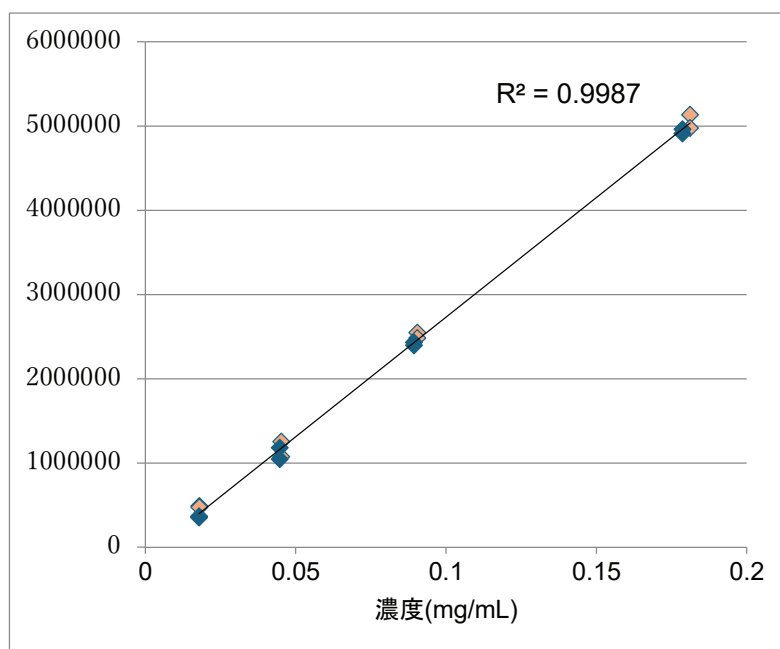


Fig. 13 HPLC における rosmarinic acid の検量線

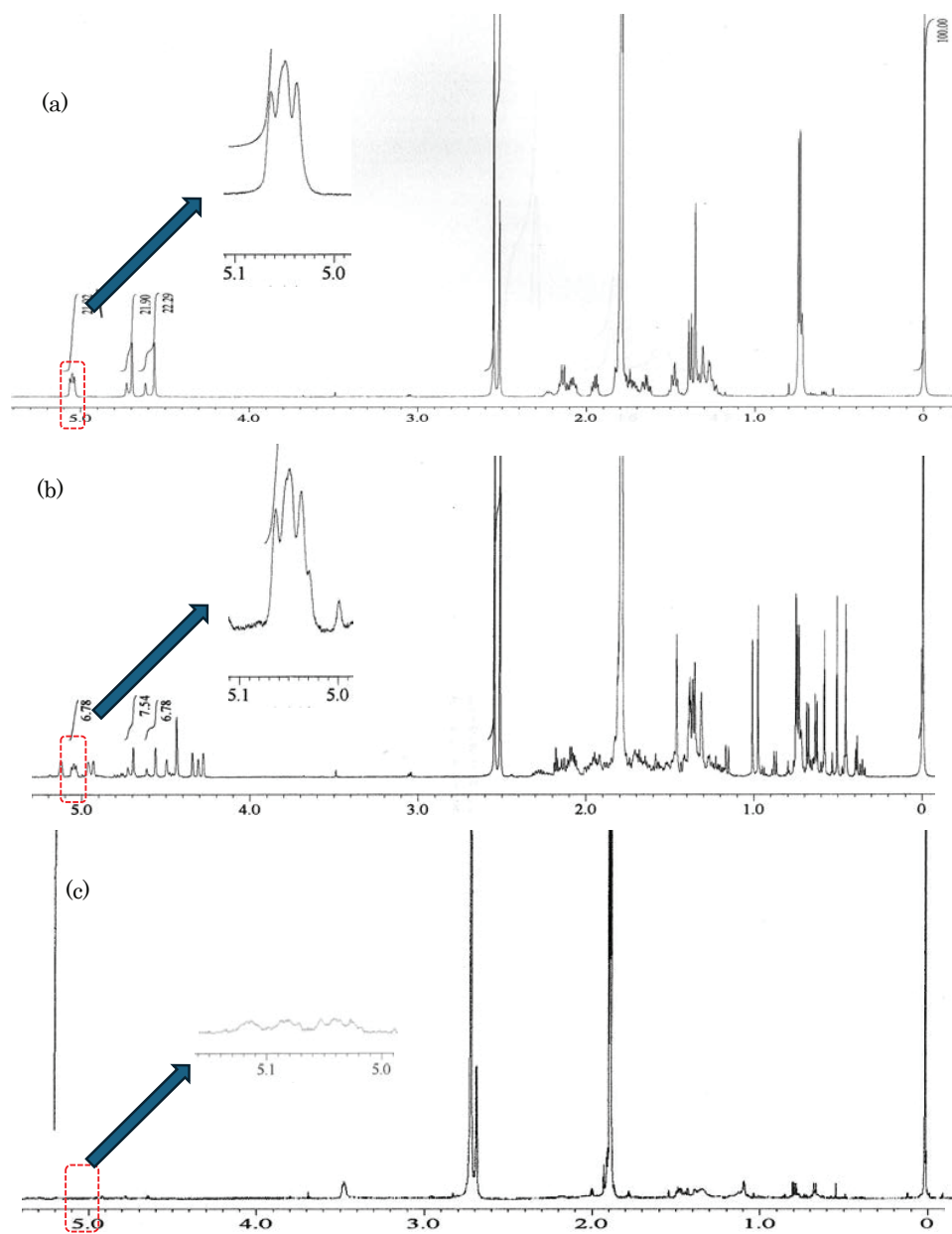


Fig. 14 β -Caryophyllene 試薬 A (a), 「ブラックペッパーオイル」 (b)とコショウ末の各試料 (c)の ^1H -qNMR スペクトル (in $\text{acetone-}d_6$, 500 MHz)

拡大図のシグナルが 5 位のプロトンシグナル.

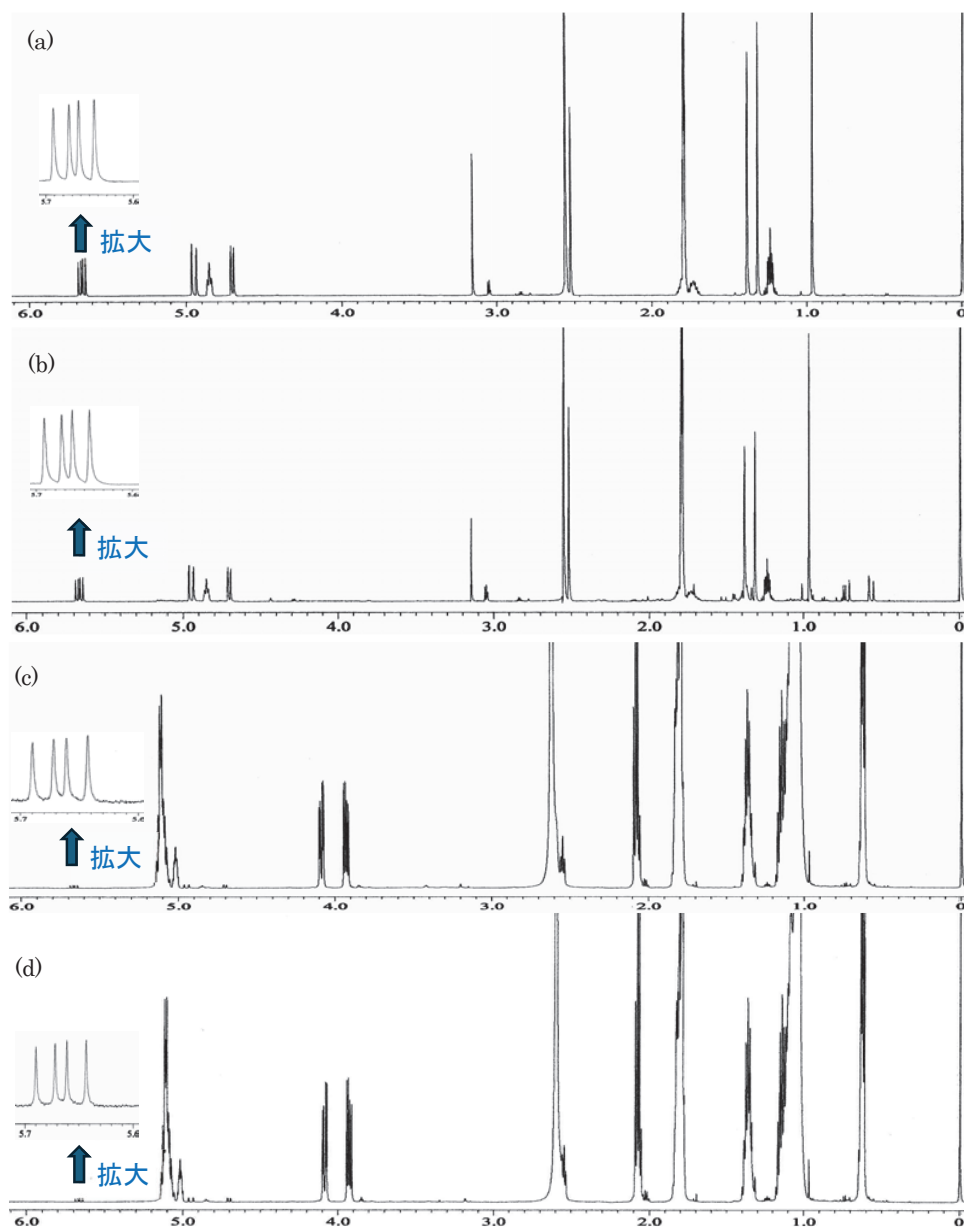


Fig. 15 Linalol 試薬, 既存添加物の「コリアンダーオイル」 (b)と市販コリアンダー種子 A (c), B (d)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 600 MHz)

拡大図のシグナルが 2 位のプロトンシグナル.

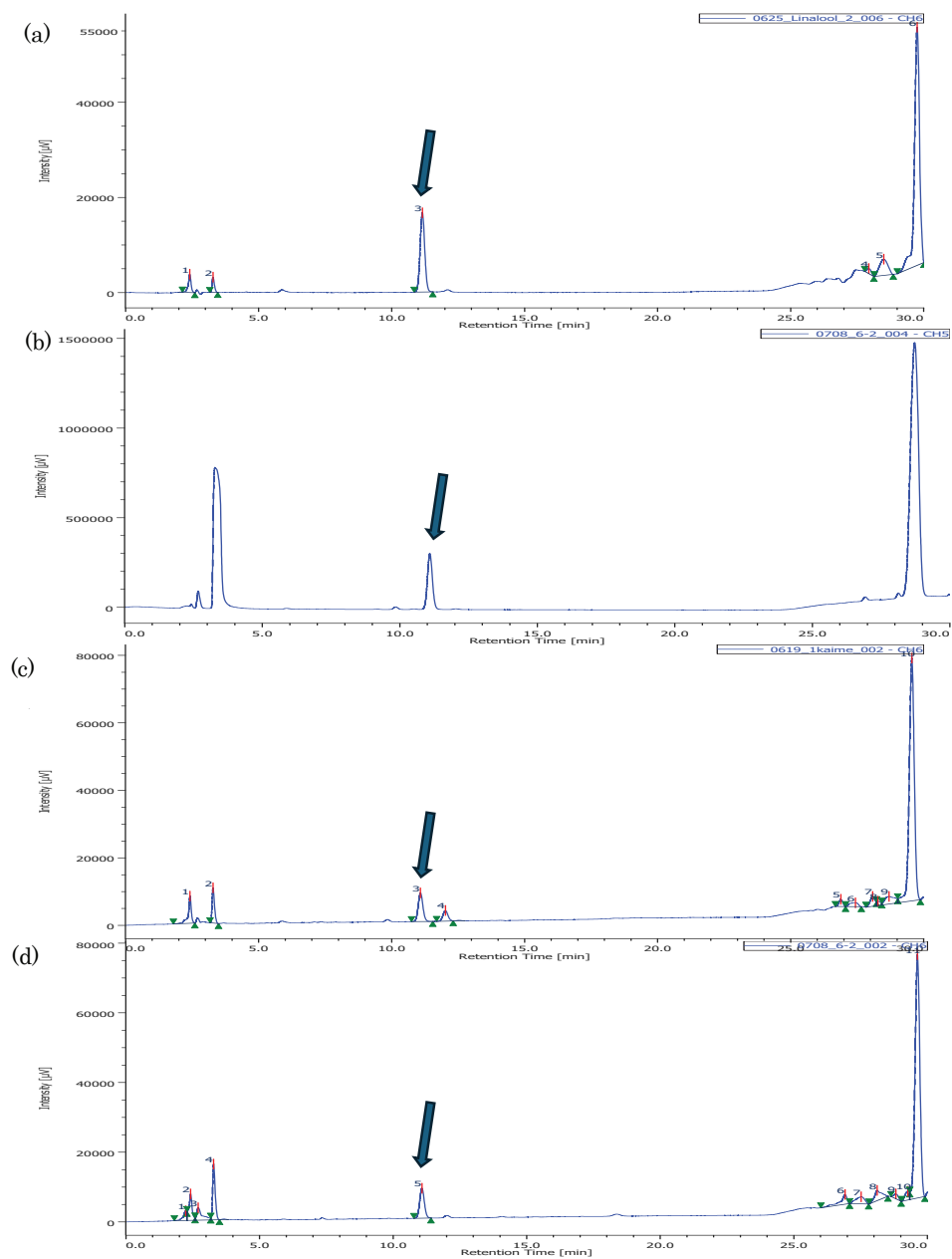


Fig. 16 Linalol 試薬，既存添加物の「コリアンダーオイル」 (b)と市販コリアンダー種子 A (c), B (d)の各試料の HPLC クロマトグラム

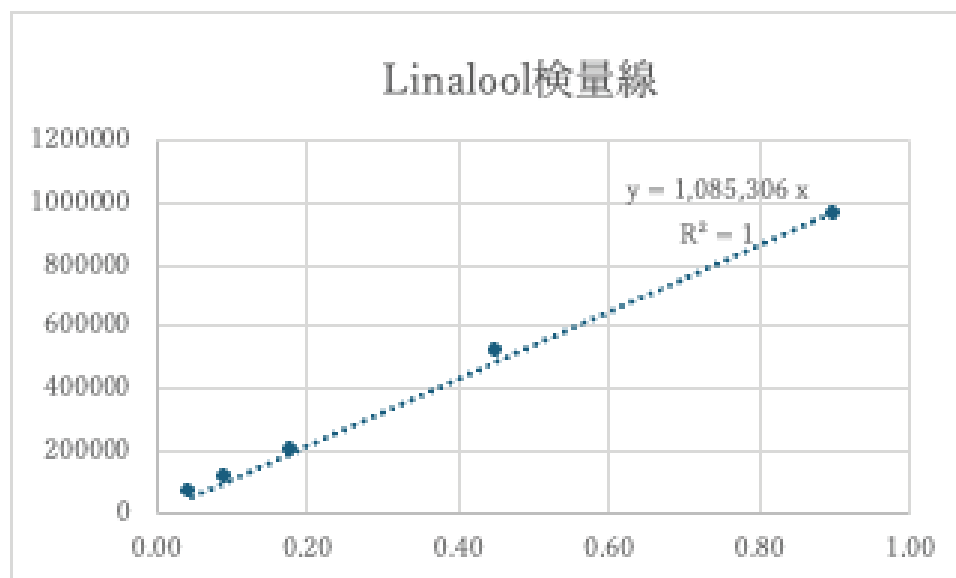


Fig. 17 HPLC における Linalol の検量線

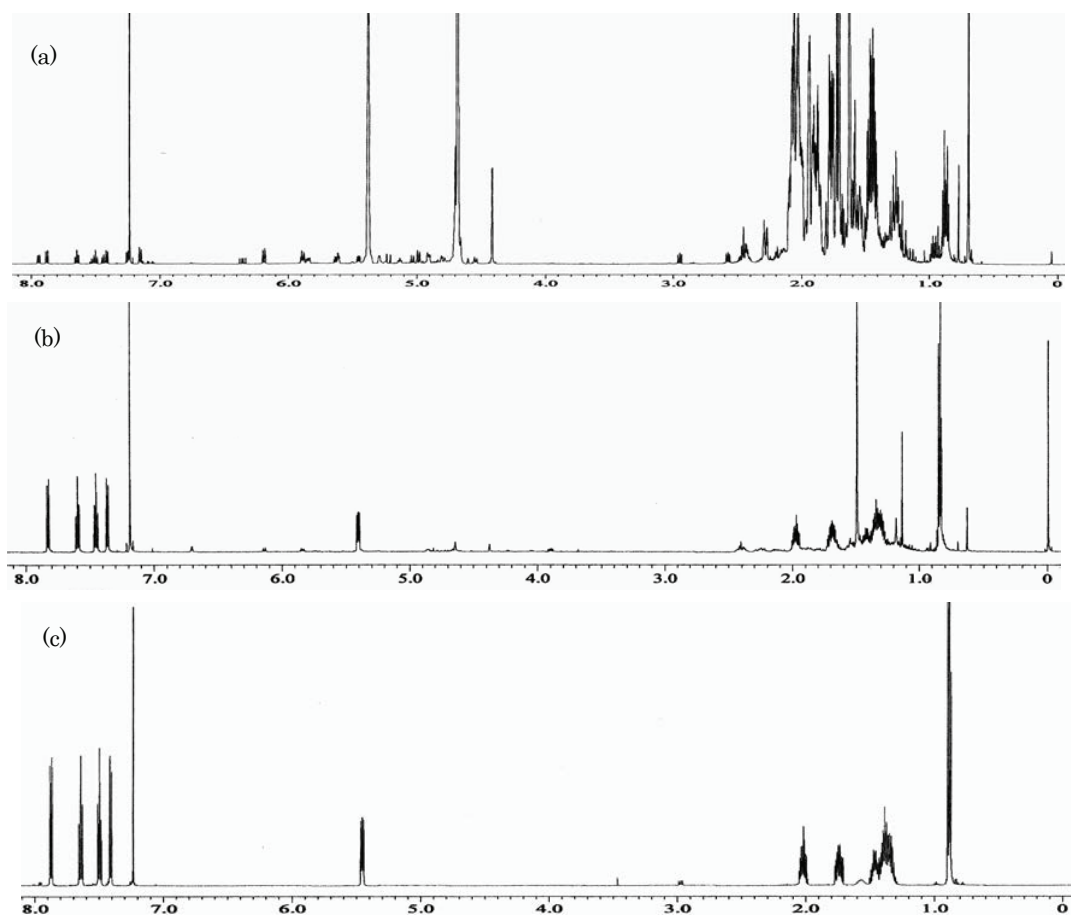


Fig. 18 既存添加物「セロリシードオイル」 (a) , 単離された化合物(b) , Butylphthlide 試薬 (c), の ^1H -qNMR スペクトル (in CDCl_3 , 600 MHz)

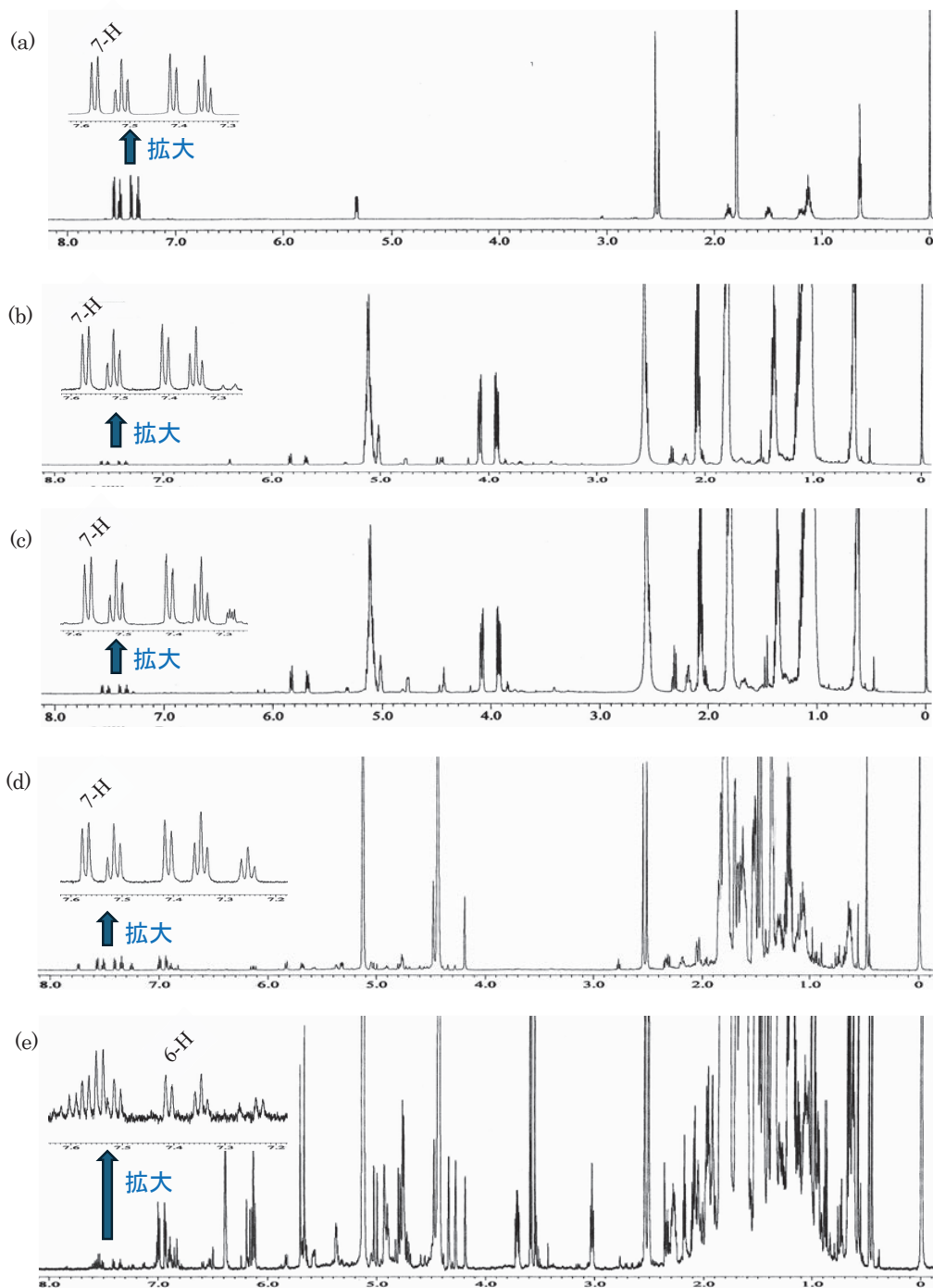


Fig. 19 Butylphthlide 試薬 (a), 既存添加物「セロリシードオイル」 (b), 栽培用セロリ種子試料 (c), 食用セロリ種子試料 (d), 香粧品用セロリシードオイル (e)の各試料の ^1H -qNMR スペクトル (in acetone- d_6 , 600 MHz)
 拡大図は芳香族のプロトンシグナル.

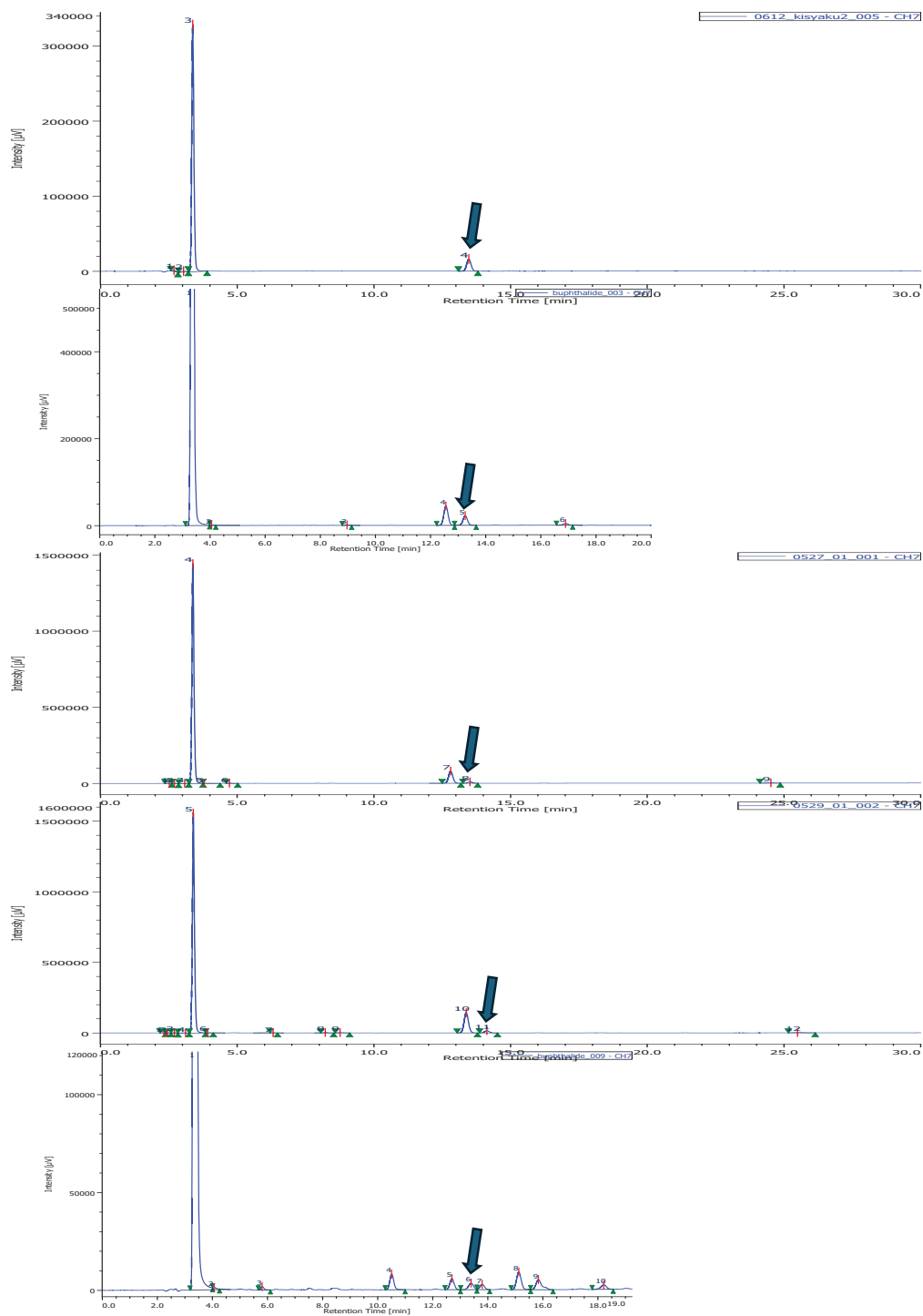


Fig. 20 Butylphthlide 試薬 (a), 既存添加物「セロリシードオイル」 (b), 栽培用セロリ種子試料 (c), 食用セロリ種子試料 (d), 香粧品用セロリシードオイル (e)の各試料の HPLC クロマトグラム
矢印の保持時間 13.3 分付近のピークが butylphthlide のピーク

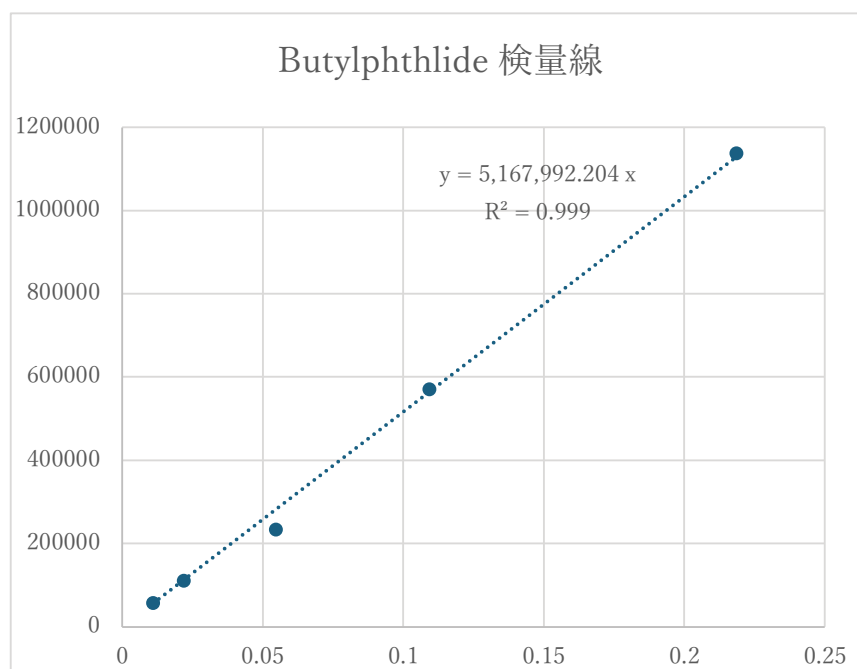


Fig. 21 HPLC における Butylphthlide の検量線

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 Eugenol の含有率

	含有率 (%)			
	¹ H-qNMR		HPLC	
eugenol 試薬	97.34	±0.29		
「クローブ香料」	84.55	±0.51	82.78	±0.01
「クローブ抽出物」	32.16	±0.49	31.67	±0.00
生薬チョウジ粉末	13.01	±0.26	12.58	±0.12
市販クローブ末 A	8.11	±0.14	7.56	±0.33
市販クローブ末 B	14.83	±0.35	14.20	±0.68
市販オールスパイス末 A	2.35	±0.36	2.28	±0.51
市販オールスパイス末 B	2.67	±0.10	2.40	±0.06

試薬の純度表示は>95%

Table 3 Rosmarinic acid の含有率

	含有率 (%)			
	¹ H-qNMR		HPLC	
rosmarinic acid 試薬 A (23TK-RA)	90.13	±0.14		
rosmarinic acid 試薬 B (24FW-RA)	93.09	±0.11		
スイートバジル葉 (24Oc-SB-L)	1.90	±0.03	1.80	±0.05
スイートバジル茎 (24Oc-SB-S)	0.14	±0.00	0.12	±0.00
スイートタイバジル葉 (24Oc-STB-L)	1.40	±0.05	1.15	±0.03
スイートタイバジル茎 (24Oc-STB-S)	ND		ND	
ブッシュバジル葉 (24Oc-BB-L)	1.08	±0.03	0.98	±0.03
ブッシュバジル茎 (24Oc-BB-S)	ND		ND	
イタリアンラージリーフバジル葉 (24Oc-ILB-L)	1.39	±0.03	1.29	±0.03
イタリアンラージリーフバジル茎 (24Oc-ILB-S)	ND		ND	
ジェノババジル葉 (24Oc-JB-L)	0.83	±0.01	0.69	±0.02
ジェノババジル茎 (24Oc-JB-S)	ND		ND	
市販バジル粉末 A (24ca-SB-SBp)	1.51	±0.01	1.39	±0.05
市販バジル粉末 B (24ca-SB-OBp)	0.70	±0.04	0.57	±0.02
市販バジル粉末 C (24ca-H-Bp)	ND		ND	
市販バジル粉末 D (24ca-G-Bp)	ND		ND	

Table 4 ^1H -qNMR を用いて測定した β -caryophyllene の含有率

	含有率 (%)	
β -caryophyllene 試薬 A (24TK-bca)	90.13	± 0.14
β -caryophyllene 試薬 B (24FW-bca)	93.09	± 0.11
「ブラックペッパーオイル」(C2302)	1.55	± 0.047
コショウ末(24ca-BPp)	ND	

Table 5 ^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 6 ^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 ±0.63	
「セロリシードオイル」 (既存添加物) (C2304)	2.14 ±0.03	2.28 ±0.01
セロリ種子 (栽培用) (CeSP-25T)	0.24 ±0.01	0.25 ±0.01
セロリ種子 (栽培用) (CeSP-25Sa)	0.10 ±0.00	0.11 ±0.00
セロリ種子 (食品) (CeSF-25Sb)	0.50 ±0.01	0.51 ±0.00
セロリ種子 (食品) (CeSF-25G)	0.38 ±0.02	0.39 ±0.01
セロリシードオイル (香粧品) (CO2504)	(0.28 ±0.06)	(0.36 ±0.02)