

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

分析法及び試験法の開発に関する研究

～定量 NMR によるアントシアニンの純度評価～

研究分担者 西崎雄三 東洋大学 食環境科学部 食環境科学科 准教授

研究要旨 定量 NMR(qNMR)によるアントシアニンの絶対純度算出法について検討した。モデル試料として市販のシアニジン 3-グルコシド塩化物(Cy3G・Cl)を用い、まず測定溶媒の最適化を行った。最適化した条件下で市販 Cy3G・Cl 7 試薬の純度を qNMR により評価したところ、純度は 61.4%～93.7%と試薬間で大きく異なっていた。また、試薬ラベルに表示された HPLC 純度と一致するものではなく、いずれも qNMR 純度より高値に見積もられていた。各試薬を用いて HPLC 絶対検量線を作成したところ、検量線傾きのばらつきは RSD 15%であった。一方、qNMR 純度で補正した濃度に基づき再作成した絶対検量線では、傾きのばらつきは RSD 2%まで収束した。さらに、qNMR 以外の手法として、イオンクロマトグラフィーにより塩化物量を定量し Cy3G・Cl 純度へ換算する方法も検討した。しかし、本法は Cy3G⁺と Cl⁻が等量で存在する場合にのみ成立し、塩化物化過程で過剰の Cl⁻が残存すると純度を過大評価することが明らかとなった。以上より、qNMR はアントシアニンの正確な純度評価に有用な手法であることが示された。

A. 研究目的

アントシアニンは、アグリコン(母核)であるアントシアニジンに糖や有機酸が修飾された化合物の総称であり、フラボノイド系の植物色素に分類される。橙から赤、紫色の色調を呈し、食品添加物として広く利用されている。食品添加物公定書に収載されている「ブドウ果皮色素」、「ムラサキイモ色素」、「ムラサキトウモロコシ色素」、「赤キャベツ色素」の主成分はいずれもアントシアニンである。

アントシアニンの特徴は、溶液中の水素イオン濃度(pH)に依存して分子構造が変化し、それに伴い色調が変化する点にある。中性からアルカリ性条件では徐々に分解して退色するが、酸性条件下ではフラビリウムイオン型構造をとり、最も安定となる。そのため、市販標準品はフラビリウムイオン型(カチオン)に塩化物イオン(アニオン)が対イオンとして存在する塩化物として販売されている(図 1)。

しかしながら、これら市販標準品のラベルに記載されている純度は、クロマトグラフ法のピーク面積百分率に基づく相対純度であることが一般的であり、絶対純度が付与された標準品は流通していない。定量 NMR(qNMR)を用いた絶対純度評価法は確立された分析概念であるにもかかわらず、アントシアニンに適用された例は少なく、その測定条件や分析結果の妥当性について体系的な検証が行われていないことが一因と考えられる。

アントシアニンは pH に応じて多様な分子構造をとるため、qNMR による純度評価においては、測定溶媒を強酸性に調整し、アントシアニンを安定なフラビリウムイオン型へ完全にシフトさせることが不可欠である。そこで本研究では、モデル化合物としてシアニジン 3-グルコシド塩化物(Cy3G・Cl)を用い、アントシアニンの qNMR による絶対純度測定法の確立を目的とした。

B. 研究方法

B-1) 試薬

ジメチルスルホン(DMSO₂; Cat. No. 048-33271, 質量分率 99.9%), 重水(D₂O; Cat. No. 047-34243, D 99.8%), 重メタノール(methanol-*d*₄; Cat. No. 138-18703, D 99.8%), 重ジメチルスルホキシド(DMSO-*d*₆; Cat. No. 048-34251, D 99.9 %)は, 富士フイルム和光純薬工業(株)製を使用した. 重トリフルオロ酢酸(TFA-*d*; Cat. No. DLM-46-10×0.75, D 99.5%)はCIL 社製を使用した. その他の試薬は, 特級または高速液体クロマトグラフ用試薬を用いた.

B-2) NMR 測定溶媒の最適化

Cy3G・Cl(長良サイエンス(株))約 200 mg を精密に量り取り, 0.1% TFA 水溶液に溶解した. この試料液を固相カラム(C18 Sep-Pac Vac 20 cc, Cat. No. WAT036925, Waters 社製)に負荷し, 0.1% TFA 水溶液で洗浄後, 0.1% TFA 含有アセトニトリルで Cy3G を溶出した. 着色画分を 50 mL メスフラスコに回収し, 0.1% TFA 水溶液で定容した. 得られた溶液から Cy3G・Cl 5 mg に相当する液量を分取し, 遠心濃縮機により溶媒を留去した後, 使用時まで冷凍保存した.

測定時には室温に戻し, 各種重溶媒 1.0 mL に溶解し, そのうち 0.6 mL を NMR 試料管に充填した. 得られた qNMR スペクトルの外観及び算出純度値を比較し, 最適測定溶媒を選定した. 検討した溶媒は表 1 の通りである.

B-3) qNMR 測定

NMR 装置には日本電子製 JNM-ECZ600R/S1(¹H 共鳴周波数 600.1723 MHz)を用いた.

測定は外部標準法 qNMR(EC-qNMR)により実施した. 外部標準には DMSO₂ を用い, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL の 3 濃度を調製した. DMSO₂ 約 2.0 mg を重溶媒 2.0 mL に溶解して 1.0 mg/mL 溶液を調製し, 段階希釈により他の濃度を得た. 各外部標準溶液 0.6 mL を NMR 試料管に充填した.

Cy3G・Cl 試料及び外部標準溶液を 25°C で 5

分間平衡化した後, シム調整及び ¹H/¹³C チューニング&マッチング(T&M)を行った. 続いてパルス幅アレイ測定を実施し, 非線形最小二乗フィッティングにより各試料の 90°パルス幅(pw90)を校正した. 校正 pw90 を反映させた条件下で qNMR 測定を行った. 測定条件は以下のとおりである.

- ・照射中心: 5 ppm
- ・観測幅: 15 ppm
- ・取込み時間: 4.5 s
- ・遅延時間: 60 s
- ・積算回数: 8
- ・ダミースキャン: 2
- ・サンプル回転: なし
- ・¹³C デカップリング: MPF8(取込み時間のみ)

FID は窓関数を適用せず, ゼロフィルによりデータポイント数を 4 倍に拡張した. フーリエ変換後, 位相及びベースライン補正を行い, ¹H NMR スペクトルを得た. シグナルを自動積分し, Cy3G・Cl の 4 位プロトン及び DMSO₂ のメチル基シグナルを用いて絶対純度を算出した.

$Molar\ Conc._A =$

$Molar\ Conc._C \times S_A/S_C \times H_C/H_A \times PW90_A/PW90_C$

式 1

下付き A: 分析種(Cy3G・Cl), 下付き C: 外部標準(EC, DMSO₂)

B-4) qNMR 用基準物質の安定性確認

DMSO₂(または DSS-*d*₆) 1 mg を精密に量り取り, 5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1) 1 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を取り, NMR 試料管に移して qNMR 測定を行った. 得られた DMSO₂ (または DSS-*d*₆) のシグナル積分値を以下の式 2 に代入して, 1 プロトンあたりの感度係数を算出した. qNMR 測定は 3 回繰り返し, 3 日間にわたって実施した.

$Response\ Factor = S_A \times PW90_A/H_A/Conc._A$

式 2

B-5) Cy3G・Cl 市販試薬の純度測定

5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)を用

いて EC-qNMR で純度測定することとした。

あらかじめ試料、試薬、容器を秤量環境になじませるため、秤量操作の1時間前に秤量環境に静置した。試料約 5 mg を精密に量り取り、重溶媒 1.0 mL を加えて溶解させたものを NMR 用試料液とした。

B-8) イオンクロマトグラフィー電気伝導度検出(IC-CD)分析

NMR 用試料液の残りから Eppendorf Multipette を用いて 0.1 mL を正確に量り取り、100 mL メスフラスコに入れ、超純水で定容し、IC-CD 測定用試料液とした。

塩化物イオン標準液(1000 ppm)を Eppendorf Multipette を用いて 1.0 mL 正確に量り取り、500 mL メスフラスコに入れ、超純水で定容し、2000 ng/mL 検量線用標準液とした。順次、超純水を用いて 1:1 希釈を繰り返し、1000, 500, 250, 125 ng/mL 標準液を調製した。試料液及び標準液は定容後速やかにプラスチック製専用バイアルに共液洗いして移し、以下の条件に従って分析を行った。

装置:電気伝導度検出器イオンクロマトグラフ(Dionex™ Integriion™ RFIC, Thermo Scientific 製), トラップカラム: Dionex™ IonPac™ ATC-HC 500, 溶離液ジェネレーターカートリッジ: Dionex™ EGC 500 KOH Cartridge, カラム: Dionex™ IonPac™ AS17-C RFIC™(2 mm×250 mm), サプレッサー: Dionex™ DRS 600(2 mm), カラム温度: 35°C, 流速: 0.25 mL/min, 注入量: 25 µL (フルループ注入), サンプラー温度: 10°C, 分離条件: KOH 1 mM (0-3 min)→12 mM (10 min)→35 mM (14-20 min), サプレッサー電流: 22 mA, Cl⁻検量線濃度: 125, 250, 500, 1000, 2000 ng/mL。

B-9) 高速液体クロマトグラフィーフォトダイオードアレイ検出(LC-PDA)分析

NMR 用試料液の残りから Eppendorf Multipette を用いて 0.1 mL を正確に量り取り、20 mL メスフラスコに入れ、5%ギ酸/5%ギ酸含有アセトニトリル混液(9:1)で定容した(200倍希釈)。順次、5%ギ酸/5%ギ酸含有アセトニトリ

ル混液(9:1)を用いて 1:1 希釈を行い、400 倍、800 倍希釈液を調製し、LC/PDA 測定用試料液とした。以下の条件に従って分析を行った。

装置: ACQUITY UPLC-PDA システム(Waters 社製), カラム: ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm×100 mm, 1.7 µm), 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40 °C, 移動相: 5%ギ酸/5%ギ酸含有アセトニトリル, 分離条件: 95:5 (0-1 min)→60:40 (10 min)→20:80 (12 min)→95:5 (12.1-15 min), 注入量: 2 µL, 測定波長: 520 nm。

C. 結果及び考察

C-1) 測定溶媒の最適化

表 1 に示す条件で EC-qNMR を実施し、Cy3G・Cl の絶対純度を算出した。あわせて、各 NMR 試料の pw90 及び T&M 時の ¹H 核反射値をプロットした。

条件 1~4 (D₂O)

D₂O 溶媒では、TFA-*d* 濃度の増加に伴い pw90 が顕著に延長した (図 2)。これは、D₂O 中で TFA-*d* が解離し、重水素イオン濃度が増加したことによる影響と考えられる。この条件下では、Cy3G はフラビリウムイオン型として存在し、他の構造に由来するシグナルは観察されなかった。

しかしながら、TFA-*d* 濃度の増加に伴い Cy3G・Cl の絶対純度は低下する傾向を示した。その要因として、試料中のイオン濃度上昇により導電性が増加し、T&M の精度が低下した可能性が考えられる。実際に、TFA-*d* 10%添加試料では T&M 反射値が約 300 であったのに対し、TFA-*d* を含まない外部標準(DMSO₂)では約 10 であった。すなわち、pw90 を校正しても、試料と外部標準間の環境差を十分に補正できていないと考えられた。

条件 1' ~4' (D₂O)

以上の結果を踏まえ、外部標準側にも Cy3G・Cl 試料と同濃度の TFA-*d* を添加して EC-qNMR を実施した。その結果、すべての条件において Cy3G・Cl 純度は約 91~93%と安定して算出された (図 2)。

条件 5~8 (methanol-*d*₄)

methanol-*d*₄ 溶媒では、TFA-*d* 添加による

pw90 の延長は D₂O ほど顕著ではなかった (図 3). TFA-*d* 無添加条件では, 6~7 ppm 付近にフラビリウムイオン型とは異なる構造由来のシグナルが観察された. 酸添加によりこれらのシグナルは消失したものの, 4 位近傍に微小シグナルが残存した. このシグナルを除外して純度を算出すると, Cy3G・Cl 純度は約 84~92%であった.

条件 9~12 (methanol-*d*₄ / D₂O (9 : 1, v/v))

methanol-*d*₄ に D₂O を 9 : 1 で混合した溶媒を検討した. D₂O の存在により TFA-*d* の解離が促進されると考えられる. その結果, 条件 5~8 で観察された 4 位近傍の微小シグナルは消失し, Cy3G はフラビリウムイオン型へ完全にシフトしたと判断された. 純度も全体として約 1%向上した (図 3).

条件 13~16 (DMSO-*d*₆)

DMSO-*d*₆ では, TFA-*d* 添加による pw90 延長は D₂O ほど顕著ではなかった (図 4). TFA-*d* 無添加条件では複雑なスペクトルを示したが, 酸添加により徐々にフラビリウムイオン型へ収束した. しかし, TFA-*d* 10%添加条件でも完全な収束は得られず, 純度は低値を示した.

条件 17~20 (DMSO-*d*₆ / D₂O (9 : 1, v/v))

DMSO-*d*₆ に D₂O を添加した条件を検討したが, TFA-*d* 10%添加でも完全なフラビリウムイオン型へのシフトは達成されなかった. ただし, 条件 13~16 と比較すると純度は約 5~10%向上した (図 4).

以上の結果より, アントシアニンの正確な定量には, 測定溶媒中の酸が十分に解離するための一定量の D₂O を含んでいることが重要であった. 推奨測定溶媒としては, アントシアニンのアグリコンも溶解可能な 5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)が挙げられた.

なお, 5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)における, qNMR 用基準物質 : DMSO₂ と DSS-*d*₆ の安定性について検討したが, いずれも分解物のシグナルはスペクトル上に観察されず, また感度係数は 1%以内の範囲で安定であった (図 5).

C-2) Cy3G・Cl 試薬の qNMR 及び IC-CD 純度

アントシアニンを qNMR 測定するための推奨溶媒として, 5%TFA-*d* 含有重メタノール/重水(9:1)を用い, 市販 Cy3G・Cl 7 試薬の純度評価を実施した. その結果, Cy3G・Cl 7 試薬の qNMR 純度値は 61.4%~93.7%と製造元により大きく異なっていた(表 2). なお, 試薬 1, 3, 5, 7 については HPLC 純度値がラベル表示されていたが, いずれの試薬においても qNMR 純度値と HPLC 純度値は一致しなかった.

次に, IC-CD を用いて Cy3G・Cl 中の Cl⁻ 含量を定量し(図 6), この Cl⁻ 含量を Cy3G・Cl として換算した含量(以下, IC-CD 純度)を表 2 に示した. その結果, 試薬 2~4 及び 7 については qNMR 純度と IC-CD 純度との間に良好な一致が確認できた. 一方, 試薬 1 及び 6 では, IC-CD 純度値が qNMR 純度値よりもそれぞれ 14.7%, 69.3%高い値を示した. 一般に, アントシアニン試薬はフラビリウムイオン型で精製された後に塩化物化されるが, これらの試薬では塩化物化の過程において過剰の Cl⁻ が残存した可能性が考えられた. すなわち, Cl⁻ 含量に基づく換算値が実際の Cy3G 含量を過大評価している可能性がある. また, 試薬 5 については IC-CD 純度値が 2.0%と著しく低値であった. 本試薬は塩化物として市販されているものの, Cl⁻ がほとんど検出されなかったことから, 実際には十分に塩化物化されておらず, フラビリウムイオン型のまま, あるいは別形態で存在している可能性が示唆された.

C-3) Cy3G・Cl 試薬の LC-PDA 絶対検量線

LC-PDA における絶対検量線の傾きを求めたところ(図 7), 試薬間の検量線傾きのばらつきは RSD 14.9%であった(表 3). これらの傾きに対して先に算出した qNMR 純度値で補正を行った結果, 試薬間の検量線傾きのばらつきは RSD 2.1%と大幅に収束した. 以上のことから, qNMR によりアントシアニンの純度値が正確に求められていることが強く支持された.

D. 結論

qNMR によるアントシアニンの純度測定法の

確立を目的として、アントシアニン測定溶媒を最適化し、続いて市販の Cy3G・Cl 試薬を対象に qNMR を実施した。Cy3G・Cl 試薬は試薬間で純度に明確な差が認められ、その純度差は LC/PDA における絶対検量線傾きの差と良好な相関を示した。すなわち、qNMRにより算出した絶対純度を用いることで、アントシアニン試薬間に存在する品質差を補正可能であることが示された。また、IC-CDを用いた塩化物量に基づく換算法は過剰 Cl-の影響を受け、純度を過大評価する場合があった。

以上より、アントシアニンの正確な純度評価には qNMR による絶対定量が最も信頼性の高い手法であると結論づけられる。さらに、本研究で確立した純度評価法は、アントシアニンを主成分とする添加物製品の HPLC 成分規格試験及び RMS 法の構築に有用な基礎資料となるものである。

E. 文献

- 1) Nishizaki Y, Lankin D. C, Chen S, Pauli G. F, Analytical Chemistry 2021; 93 (5): 2733-2741.

F. 研究発表 学会発表

- 1) 石附京子, 西崎雄三, 増本直子, 嶋田典基, 吉田久美, 阿部裕, 杉本直樹: 定量 NMR によるアントシアニンの純度測定～測定溶媒の最適化～, 第 29 回日本食品化学学会 (2023.6).
- 2) 西崎雄三, 石附京子, 杉本直樹: ¹H スピン

情報に基づいたクロロゲン酸類のデジタルリファレンススタンダード(dRS)の作成, 第 30 回日本食品化学学会 (2024.5).

- 3) Yuzo Nishizaki, A Case Study on Validation of External Calibration qNMR (EC-qNMR), qNMR summit 2025 (2025.6).
- 4) 西川拓海, 阿部裕, 杉本直樹, 西崎雄三: 卓上 NMR を用いた ¹H スピン情報に基づく qNMR によるカラシ抽出物の定量法の検討, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会 (2025.11)

論文発表

- 1) Nishizaki Y, Sugimoto N, Miura T, Asakura K, Suematsu T, Korhonen S-P, Lehtivarjo J, Niemitz M, Pauli G. F: Quantum Mechanical Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Enables Digital Reference Standards at All Magnetic Fields and Enhances qNMR Sustainability. Analytical Chemistry, 2024; 96(24): 9790-9798.
- 2) 西崎雄三, 鳥海栄輔, 中西資, 石附京子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 燃焼法による食品添加物中の窒素定量分析. 日本食品化学学会誌, 2024; 31(1) 31-34.

G. 知的財産権の出願, 登録状況 なし

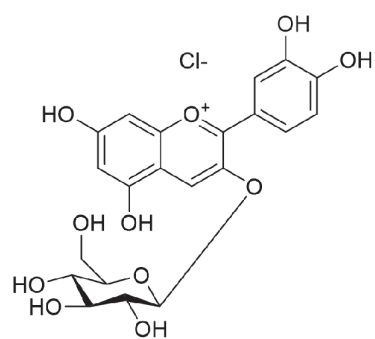


图1 Cy3G-Cl.

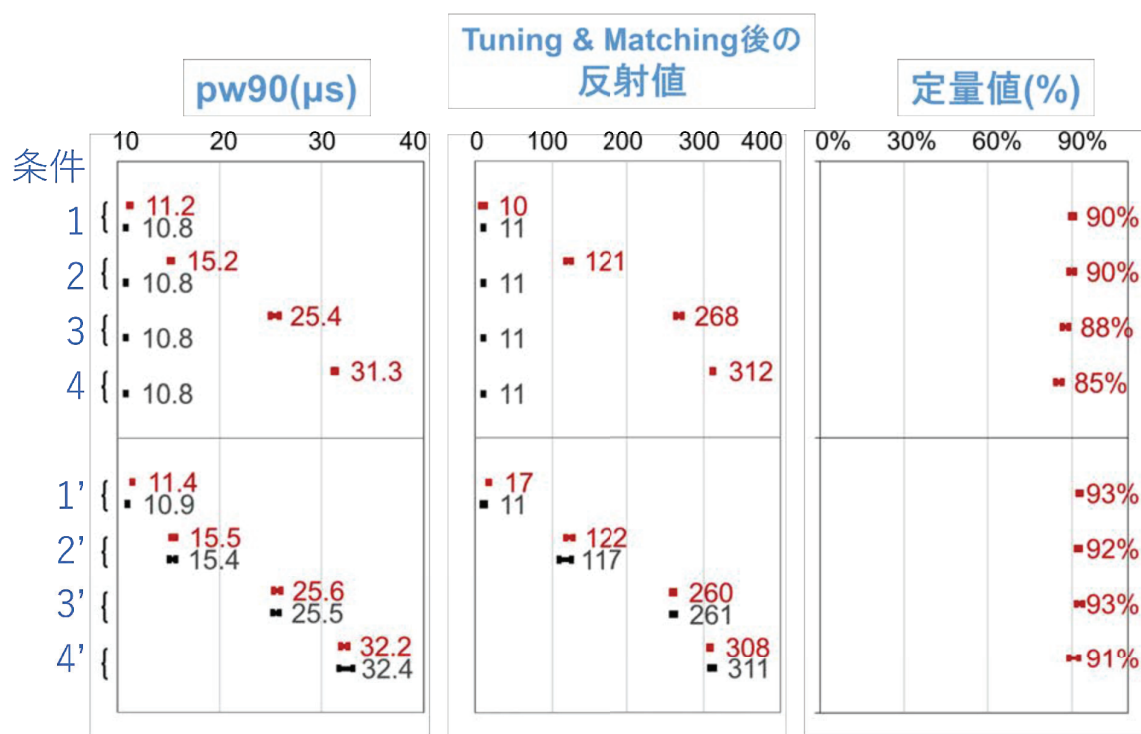


図2 EC-qNMRを条件1～4及び1～4'で実施した際のpw90, T&Mの反射値及びCy3G・Clの絶対純度.
黒のプロットは外部標準のデータ.

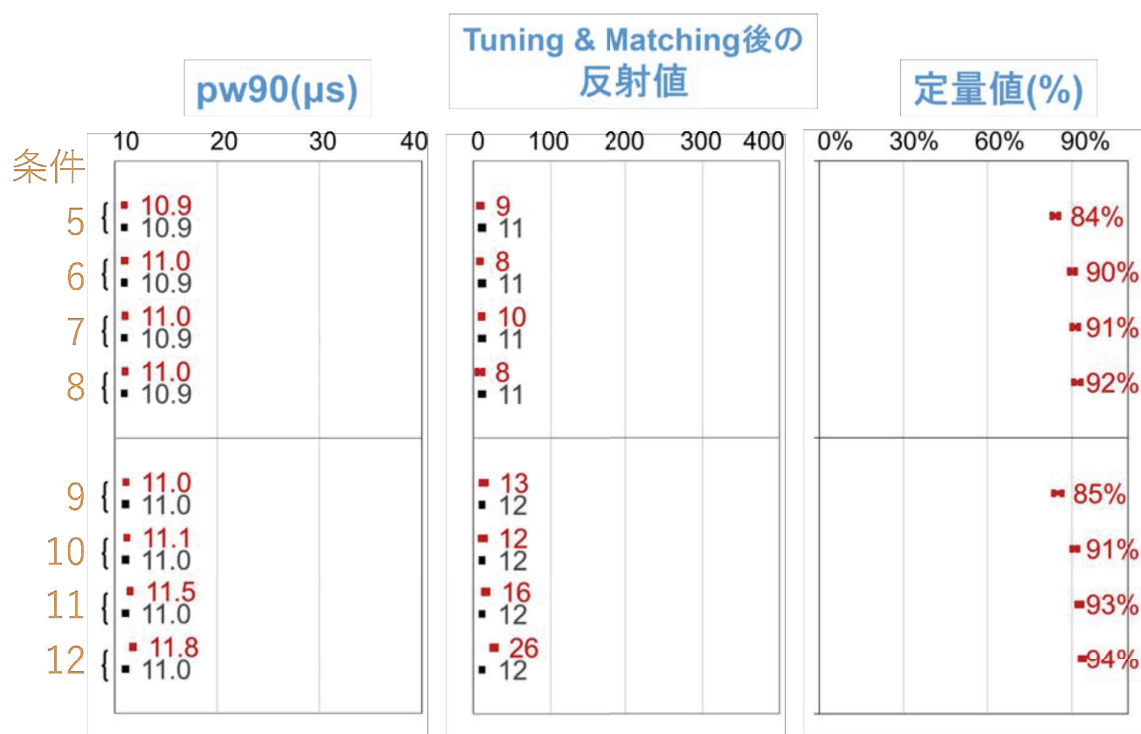


図3 EC-qNMRを条件5～12で実施した際のpw90, T&Mの反射値及びCy3G・Clの絶対純度.
黒のプロットは外部標準のデータ.

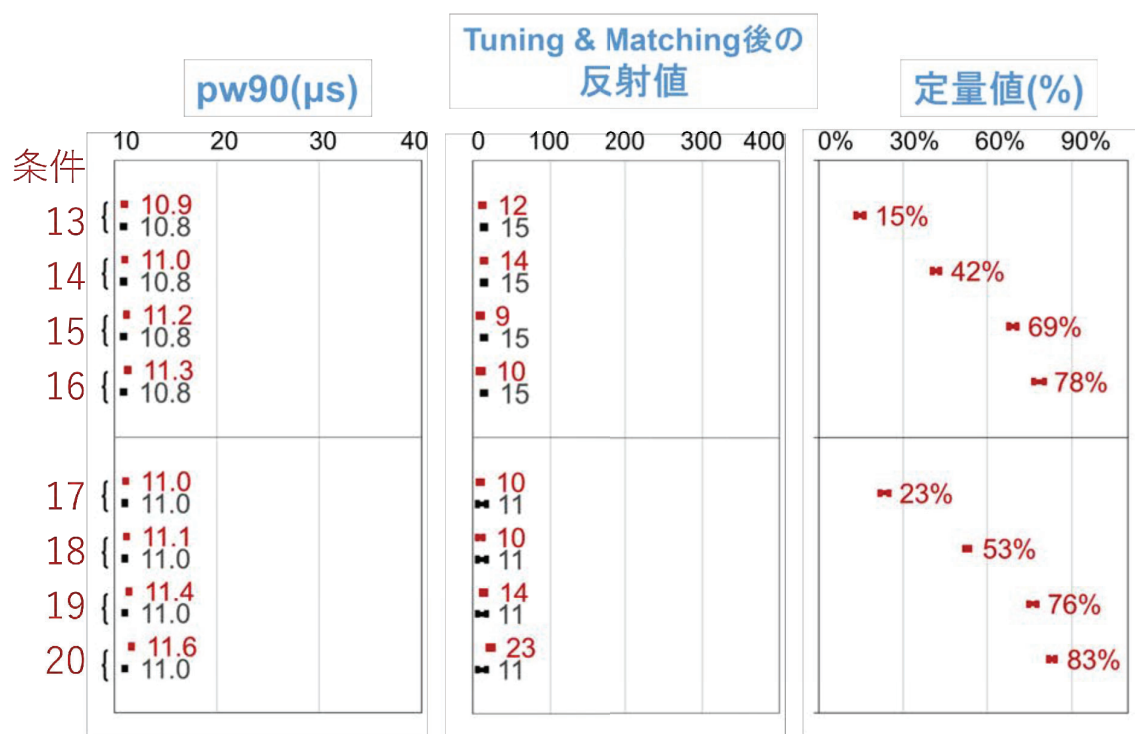


図4 EC-qNMRを条件13～20で実施した際のpw90，T&Mの反射値及びCy3G・Clの絶対純度．
黒のプロットは外部標準のデータ．

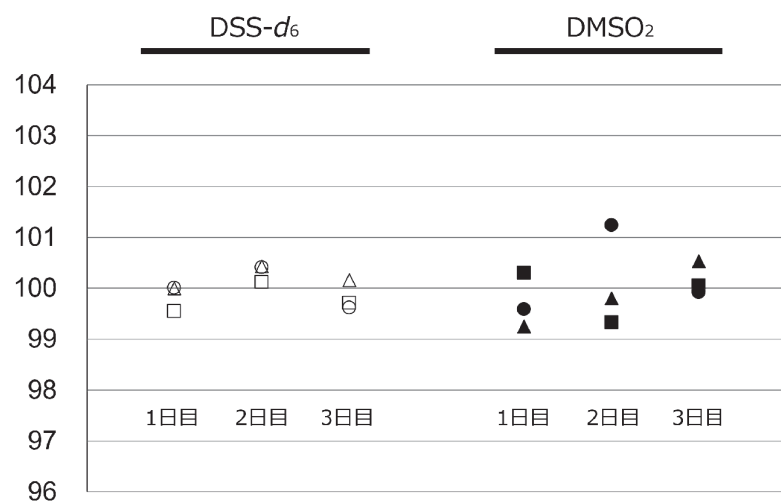


図5 5%TFA- d 含有重メタノール／重水(9 : 1, v/v)におけるDSS- d_6 とDMSO $_2$ の安定性
両物質の1プロトン当たりの感度係数を3日間にわたり記録した.

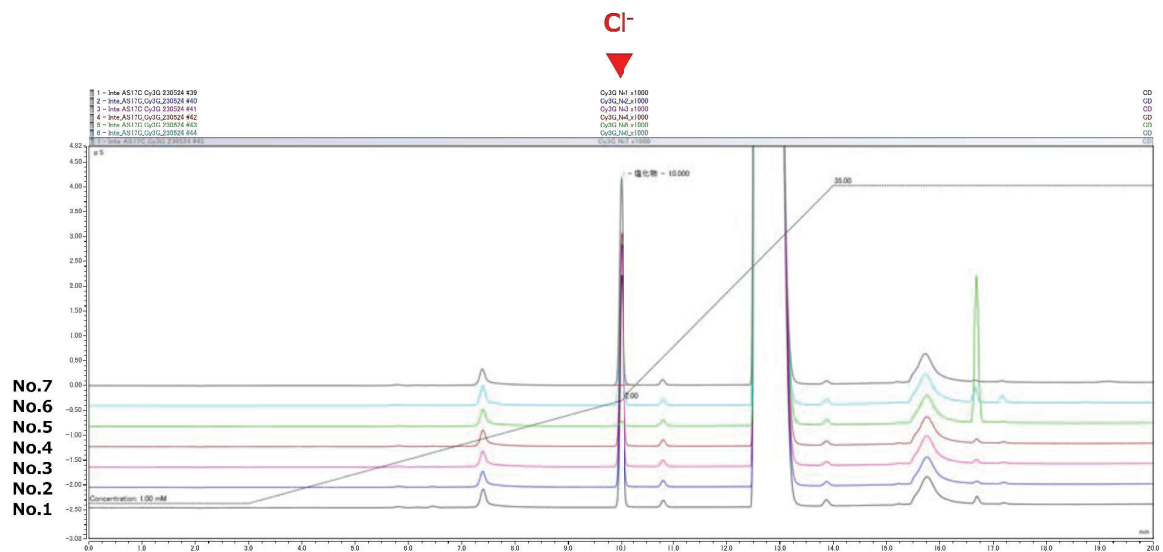


図6 IC-CDクロマトグラム

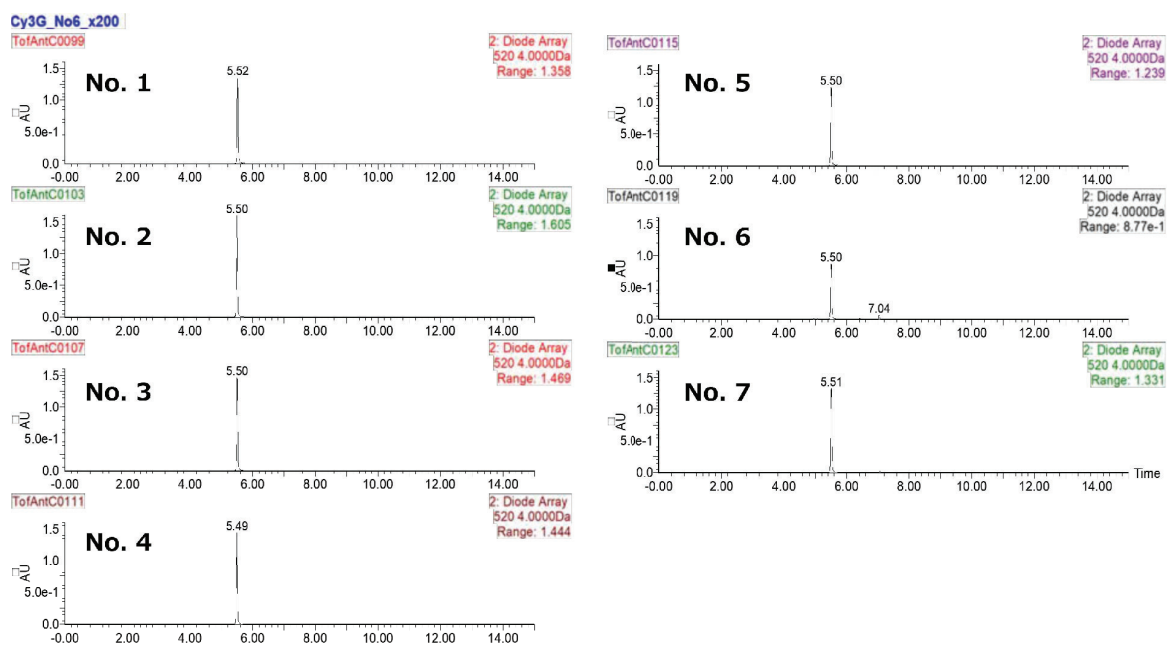


図7 LC-PDAクロマトグラム

表1. 検討する重溶媒×酸濃度

	重溶媒	TFA- <i>d</i> 濃度	
		DMSO ₂ (EC)	Cy3G·Cl (Analyte)
条件 1	D ₂ O	0%	0%
条件 2		0%	1%
条件 3		0%	5%
条件 4		0%	10%
条件 1'	D ₂ O	0%	0%
条件 2'		1%	1%
条件 3'		5%	5%
条件 4'		10%	10%
条件 5	methanol- <i>d</i> ₄	0%	0%
条件 6		0%	1%
条件 7		0%	5%
条件 8		0%	10%
条件 9	methanol- <i>d</i> ₄ /D ₂ O (9:1, v/v)	0%	0%
条件 10		0%	1%
条件 11		0%	5%
条件 12		0%	10%
条件 13	DMSO- <i>d</i> ₆	0%	0%
条件 14		0%	1%
条件 15		0%	5%
条件 16		0%	10%
条件 17	DMSO- <i>d</i> ₆ /D ₂ O (9:1, v/v)	0%	0%
条件 18		0%	1%
条件 19		0%	5%
条件 20		0%	10%

表 2 EC-qNMR 及び IC-CD から求めた Cy3G・Cl 純度						
試薬	ラベル	EC-qNMR		IC-CD		
		純度	RSD	純度※1	RSD	差※2
1	≥98% (HPLC)	90.1%	0.8%	103.3%	0.4%	14.7%
2	-	93.7%	0.9%	92.9%	0.1%	-0.8%
3	≥98% (HPLC)	92.6%	1.4%	92.5%	0.3%	-0.1%
4	-	93.1%	1.3%	93.0%	0.3%	-0.1%
5	>98% (HPLC)	76.7%	1.8%	2.0%	1.9%	-97.5%
6	-	61.4%	0.4%	103.9%	0.1%	69.3%
7	≥96% (HPLC)	92.4%	0.3%	92.6%	0.7%	0.2%

試料調製 1 回, 測定 3 回 (非連続) で実施した.

※1 Cy3G・Cl ($C_{21}H_{21}O_{11} \cdot Cl$) として換算した際の純度

※2 qNMR で求めた純度を基準とした場合の差

表3 Cy3G・ClのHPLC検量線の傾き			
試薬	絶対検量線の傾き		R ²
	qNMR補正無し	qNMR補正有り	
1	1052	1185	0.99997
2	1103	1188	0.99998
3	1105	1198	0.99998
4	1134	1223	0.99998
5	941	1241	0.99996
6	704	1165	0.99998
7	1079	1191	0.99998
RSD (%)	14.9%	2.1%	

縦軸をAU，横軸をCy3G・Cl濃度(μg/mL)とし，原点を通る検量線を作成した．