

3. プベール酸 (PA) 標品の構造確認

小林製薬から入手したプベール酸 (PA) の単離品及び北里大学から入手した PA の合成品について、以下の条件で NMR 及び UHPLC/HRMS を実施し、それらの標品が PA であることを確認した。PA の構造式を図 1 に示す。

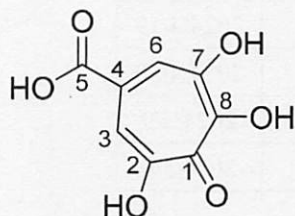


図 1. プベール酸 (PA) の構造式 ($C_8H_6O_6$, モル質量: 198.13 g/mol)

A. 試料調製

標品 B1 及び B2 各 2 mg に acetone- d_6 を加えて溶解させたところ、溶解残りが認められたため、それぞれ上清を NMR 用 PA 標準溶液とした。別に、B1 及び B2 各 2 mg を DMSO- d_6 に 1 mL を加えたところ、全て溶解したため、この溶液を NMR 用 PA 標準溶液とした。各 NMR 試料溶液 0.1 mL を 1.49 mL の 75% (v/v) メタノールで希釈し、UHPLC/HRMS 用 PA 標準溶液とした。

B. 結果

各 NMR 用 PA 標準溶液について、 1H -NMR, ^{13}C -NMR, 1H - 1H COSY, 1H - ^{13}C HMQC, 1H - ^{13}C HMBC を測定した。得られた NMR スペクトルを【別添 1】に示す。Acetone のメチルピークを 1H : 2.04 ppm, ^{13}C : 29.8 ppm, DMSO のメチルピークを 1H : 2.49 ppm, ^{13}C : 39.5 ppm に合わせ、それぞれ解析を行った結果、表 3 の結果を得た。既報^{*1} の acetone- d_6 中の PA の 1H -NMR 及び ^{13}C -NMR における化学シフト値と比較を行い、ほぼ一致した。

表 3. NMR 用 PA 標準溶液の分析結果及び論文値との化学シフトの比較

| | 論文値 ^{*1} Acetone- d_6 | | B1 Acetone- d_6 | | B2 Acetone- d_6 | | B1 DMSO- d_6 | | B2 DMSO- d_6 | |
|----------|-------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| | ^{13}C NMR δC (ppm) | 1H NMR δH (ppm) | ^{13}C NMR δC (ppm) | 1H NMR δH (ppm) | ^{13}C NMR δC (ppm) | 1H NMR δH (ppm) | ^{13}C NMR δC (ppm) | 1H NMR δH (ppm) | ^{13}C NMR δC (ppm) | 1H NMR δH (ppm) |
| Position | δC (ppm) | δH (ppm) | δC (ppm) | δH (ppm) | δC (ppm) | δH (ppm) | δC (ppm) | δH (ppm) | δC (ppm) | δH (ppm) |
| 1, 8 | 159.5 | | 159.4 | | 159.4 | | 159.0 | | 158.9 | |
| 2, 7 | 155.5 | | 155.5 | | 155.5 | | 154.6 | 3.35 (brs) | 154.6 | 3.31 (brs) |
| 3, 6 | 119.3 | 7.94 (s) | 119.3 | 7.94 (s) | 119.3 | 7.94 (s) | 117.9 | 7.71 (s) | 117.9 | 7.71 (s) |
| 4 | 128.3 | | 128.4 | | 128.4 | | 126.5 | | 126.5 | |
| 5 | 167.5 | | 167.4 | | 167.4 | | 167.4 | 10.16 (brs) | 167.3 | 10.16 (brs) |

*1 Goh Sennari, et al. Chemical Communications 63, <https://doi.org/10.1039/C4CC03134B> (2014)

また、UHPLC/HRMS 用 PA 標準溶液について UHPLC/HRMS 分析を行った結果、図 2 に示したように、保持時間 1.5 min にピークを示し、その MS スペクトルは Positive mode で m/z 199.0236 であった。PA の水素付加体 ($C_8H_7O_6$) の exact mass は 199.0237 であり、これとよく一致していた。NMR 及び UHPLC/HRMS の結果から、標品 B1 及び B2 が PA であることを確認した。

さらに、4 章で取りあつかう「紅麴コレステヘルプ」中に含まれるプベルル酸 (PA) の定性分析の予備検討として、検体 A1 についても UHPLC/HRMS 分析を行ったところ、同じ保持時間に同じ MS スペクトルを示すピークを認めたことから、検体 A1 についても PA が含まれると考えられた。

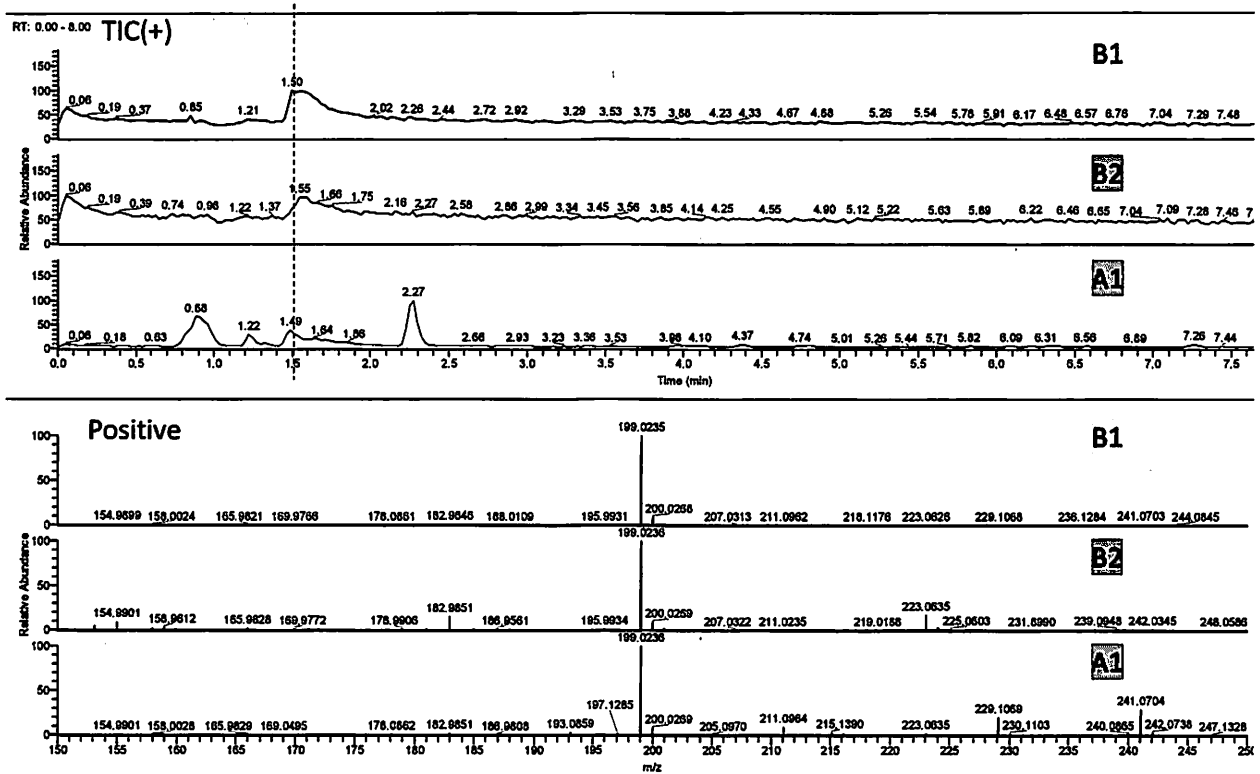


図 2. UHPLC/HRMS 用 PA 標準溶液及び検体 A1 の UHPLC/HRMS 分析結果

4. 「紅麴コレステヘルプ」中に含まれるプベルル酸 (PA) の分析

小林製菓から入手した検体について、PA が含有されているか否か、またその含有量について調査するため、PA の定性分析及び簡易定量分析を行った。

A. LC/UV 分析による検体中の PA の定性分析

2024 年 4 月 1 日までに入手した「紅麴コレステヘルプ」検体 (A1-A24) の試料溶液 (75% (v/v) メタノール抽出) と 3 章の項 A で調製した UHPLC/HRMS 用 PA 標準溶液について、LC/UV 分析を実施した。得られたクロマトグラム例を図 3 に、PA の UV スペクトルを図 4 に示す。得られた全てのクロマトグラムは【別添 2】に示す。PA が含有されると予想された検体全てから PA が検出され、その他の検体からは PA は検出されなかった。

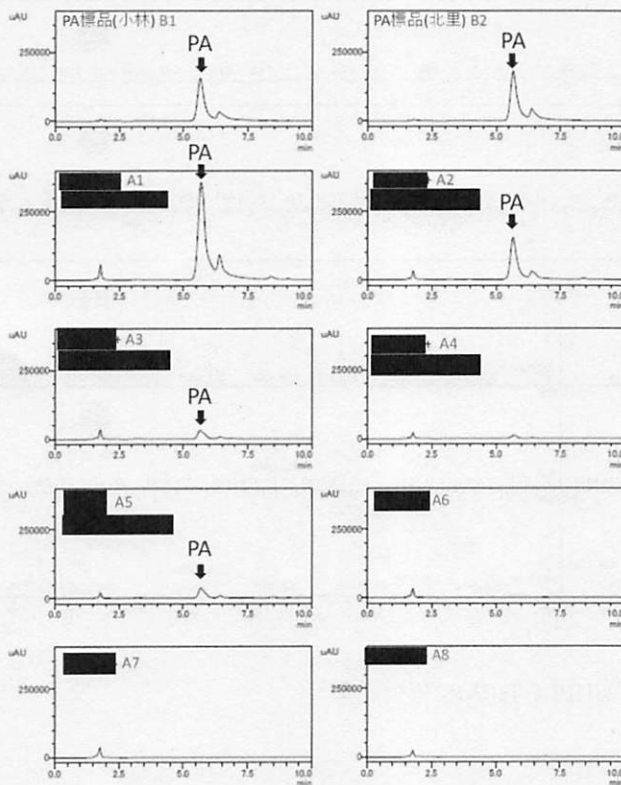


図 3. PA 標準溶液及び検体 (A1-A24) から得られた LC/UV クロマトグラム例

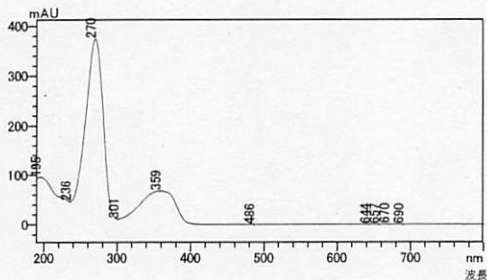


図 4. PA の UV スペクトル

B. LC/UV 分析による PA の簡易定量分析

本 LC/UV 条件では、PA を定量するのに十分なピーク形状は得られなかった。そこで、同分析条件による簡易的な PA 定量分析を行った。

i) 試料調製

試料調製には PA が検出された 10 検体 (A1-A5, A16, A26, A28, A31, A44) を用いた。50 mL 容量の遠沈管に各検体 100 mg を精密に量りとり、75% (v/v) メタノール 20 mL を正確に加えた。MULTI SHAKER MMS (東京理科器械) を用い、200 rpm で 50 分間振とうし、超音波抽出を 10 分間行ったのち、3000 rpm (ローター半径 10 cm) で 1 分間遠心分離した。その上清 2 mL を 0.45 μ m 孔のメンブレンフィルター (Ultrafree-CL, PTFE, Merck) にてろ過し、ろ液を試料溶液とした。

ii) 標準溶液の調製

PA 標品 B1 を 75% (v/v) メタノールで 7 濃度 (0.4, 2, 4, 20, 40, 80, 100 及び 200 μ g/mL) となるよう希釈し、それぞれ検量線用の標準溶液とした。

iii) 結果

各試料溶液及び標準溶液を LC/UV 分析した結果、表 4 の結果を得た。ほとんどの検体で、本分析で得られた PA 含量は小林製薬の報告と定量値が異なっていたものの、A1 が最も PA を含む検体であったことは小林製薬の報告と一致した。一方で、本分析条件では PA のピーク形状が不良なため、正確な定量には分析条件の再検討が必要と考えられた。

表 4. PA 含有検体の PA 簡易定量結果

| Sample No. | 製品種別 | PA 含量 (g/100g) (小林製薬報告) | PA 含量 (g/100g) (本分析) |
|------------|--------|----------------------------|-------------------------|
| A1 | 原料品ロット | ■■■■ | ■■■■ |
| A2 | 原料品ロット | ■■■■ | ■■■■ |
| A3 | 原料品ロット | ■■■■ | ■■■■ |
| A4 | 原料品ロット | ■■■■ | ■■■■ |
| A26 | 原料品ロット | ■■■■ | ■■■■ |
| A28 | 原料品ロット | ■■■■ | ■■■■ |
| A31 | 原料品ロット | ■■■■ | ■■■■ |
| A5 | 培養品ロット | ■■■■ | ■■■■ |
| A16 | 製品ロット | ■■■■ | ■■■■ |
| A44 | 製品ロット | ■■■■ | ■■■■ |