

# 水信号消去-<sup>1</sup>H 核定量 NMR 法による食品成分の簡易・迅速定量

松本 健志\*, 渡辺 惣汰\*, 八木 潤\*, 野口 大\*

Simple and rapid quantitative analysis of food components by <sup>1</sup>H quantitative NMR with water suppression

MATSUMOTO Tsuyoshi\*, WATANABE Sota\*, YAGI Jun\* and NOGUCHI Hiroshi\*

\*Tokyo Customs Laboratory 2-7-11 Aomi, Koto-ku, Tokyo, 135-8615 Japan

<sup>1</sup>H quantitative NMR (<sup>1</sup>H qNMR) is an accurate quantitative analysis method which is used for measuring purity of high purity organic materials that contains almost no impurity. Generally, it is difficult to accurately determine the components of food containing large amounts of water and many components by <sup>1</sup>H qNMR. In this study, acetic acid content in four gingers and two umeboshis, sucrose, glucose and ethanol contents in four fruit juices were measured by <sup>1</sup>H qNMR with water suppression, without complex pretreatment during preparations of NMR test sample tubes. Presaturation method and water suppression enhanced through T<sub>1</sub> effect (WET) method were used as water suppression, and three certified reference materials (dimethyl sulfone, maleic acid and calcium formate) were used as reference standards for qNMR. <sup>1</sup>H qNMR with WET showed small relative standard deviation (RSD) under 1.1% and a good recovery rate of 97.6-101.4%. As a result of comparison with conventional methods (Acetic acid, sucrose and glucose were measured by HPLC method, ethanol was measured by distillation-vibration type densitometer method), it was found that measurements by <sup>1</sup>H qNMR with WET were basically in agreement with measurements by conventional methods.

## 1. 緒 言

<sup>1</sup>H 核定量核磁気共鳴分光法 (<sup>1</sup>H qNMR) は、静磁場に置かれた物質の水素核に特有の周波数を有するラジオ波を照射することで共鳴（核スピンが低エネルギー状態から高エネルギー状態に遷移すること）を起こし、それに伴うラジオ波の吸収現象を利用した定量分析の手法で、2018年1月に日本産業規格の通則(JIS K 0138)に収載された<sup>1)</sup>。

<sup>1</sup>H qNMR は、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC 法) やガスクロマトグラフ法 (GC 法) 等のクロマトグラフ法と比較して、(1) 分析対象成分の標準品が不要である、(2) 検量線の作成が不要な一次標準比率法（物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測る方法）であり迅速性に優れる、(3) qNMR 用基準物質に認証標準物質 (Certified reference material) を用いることで国際単位系 (SI) にトレーサブルな信頼性の高い定量が可能である、等の利点がある<sup>2)</sup>ため、例えばクロマトグラフ法で使用する標準物質の純度測定（値付け）に用いられている。

一方で、<sup>1</sup>H qNMR による定量には、(a) クロマトグラフ法のようにカラムを用いて分析対象成分とそれ以外の成分（夾雑物）を分離することができないため、定量に用いる信号（以下、「定量用信号」という）と夾雑物の信号が重なりやすい、(b) 試料が多量の水を含有する場合、水由來の巨大な信号（以下、「水信号」という）によって定量用信号が覆い隠されることがある、また、(c) 水信号によ

って定量用信号の増幅が抑制され、定量用信号の S/N 比が低くなる、等の問題がある<sup>2,3)</sup>ため、多くの夾雑物と水を含有する食品試料の分析に <sup>1</sup>H qNMR を用いることは困難である。これらの問題の対処法として、前処理によって夾雑物及び水を除去するという方法がある<sup>2)</sup>が、通常、このような前処理には多大な労力と時間を要する上に、分析対象成分の損失や変性の危険も伴う（前処理としては、例えば、液液抽出により分析対象成分を水系から有機溶媒系に定量的に移した後に濃縮・乾固する、分配係数が水側に偏っている分析対象成分であれば水系のまま直接濃縮・乾固する等がある）。

前処理の代替方法として、夾雑物由来の信号に対しては減算及び分割処理によって定量用信号から取り除く方法、水に対してはパルステクニックにより水信号を選択的に消去する手法（以下、「水信号消去法」という）が有効と考えられるが、これらにより信号強度の定量性が損なわれる可能性があり<sup>4,5,10)</sup>、また、その程度も定かではない。

本研究では、水や夾雑物を除去するための煩雑な前処理を行わない抽出・混合・遠心分離のみの簡単な調製方法を採用し、水信号消去法を組み込んだ <sup>1</sup>H qNMR（以下、「水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR」という）により、食品成分の定量が可能か検討した。水信号消去法としては、90° パルスによる励起とその後に続く信号の取り込みの前に、溶媒信号に対して弱い電磁波を数秒間連続的に照射して、溶媒信号を事前に飽和させて観測不能にする手法である Presaturation<sup>4,6,7)</sup>と、選択励起パルス (CHESS パルス) と勾配磁場パルス (PFG) を組み合わせた手法で、CHESS パルスによる溶媒

信号の選択励起と PFG による位相ずらしを 4 回繰り返すことで溶媒信号を消去する Water suppression Enhanced through T<sub>1</sub> effect 法 (WET<sup>6,8)</sup> の二つの手法を検討した (以下, これらの水信号消去法と <sup>1</sup>H qNMR の組み合わせをそれぞれ, 「Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR」及び「WET-<sup>1</sup>H qNMR」と表記する). qNMR 用基準物質には 3 種類の認証標準物質 (CRM) を用い, 試料調製の簡便化のため, 事前にこれらの重水溶液を調製し, 使用した. 試料及び分析対象成分は, 塩蔵及び調製野菜 (6 種) 中の酢酸並びに果汁飲料 (4 種) 中のスクロース, グルコース及びエタノールとし, 複数調製における繰返し性, 添加回収試験による定量性の確認を行った. また, HPLC 法等の別の手法による定量も併行して行い, 水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR による測定値と比較した. これらの試験により, 特に WET-<sup>1</sup>H qNMR において良好な結果が得られたので報告する.

## 2. 実験

### 2.1 試料

#### 2.1.1 塩蔵及び調製野菜 (酢酸用)

以下の試料を細断して試験に供した.

塩蔵しょうが	2 種 (輸入品)
調製しょうが	2 種 (市販品)
調製梅	2 種 (市販品)

#### 2.1.2 果汁飲料 (スクロース, グルコース, エタノール用)

以下の試料にエタノールを約 0.5 % (体積分率) 添加したものを作試験に供した.

グレープジュース	1 種 (市販品)
アップルジュース	1 種 (市販品)
オレンジジュース	1 種 (市販品)
グレープフルーツジュース	1 種 (市販品)

### 2.2 試薬

#### 2.2.1 認証標準物質 (qNMR 用基準物質)

SIGMA-ALDRICH 社から <sup>1</sup>H qNMR 用の認証標準物質として販売されている製品群 (TraceCERT®) の中から, 水に溶解し, かつ一重線を与える以下の物質を選択して使用した.

ジメチルスルホン	(99.82±0.18 %)
マレイン酸	(99.98±0.13 %, 99.94±0.15 %)
ギ酸カルシウム	(99.58±0.21 %)

#### 2.2.2 その他試薬等

重水 (ISOTEC/SIGMA-ALDRICH 社製, 重水素化率: 99.9 atom %)

酢酸 (純正化学社製, 試薬特級)

エタノール 99.5 (関東化学社製, 鹿 1 級, モレキュラーシーブを加えて保管し, 使用直前に遠心分離して用いた.)

スクロース (旧和光純薬社製, 試薬特級)

D(+) - グルコース (旧和光純薬社製, 試薬特級, 40 °C で 4 時間減圧乾燥して用いた.)

モレキュラーシーブ 3A 1/16 (関東化学社製)

### 2.3 測定装置

#### 2.3.1 NMR

装置本体: JNM-ECZ400S (日本電子社製, 400 MHz)

プローブ: 5 mm FG/RO デジタルオートチューンプローブ (日本電子社製)

#### 2.3.2 HPLC

Agilent 1200 Series (Agilent Technologies 社製)

#### 2.3.3 振動式密度計

DMA 4500 (Anton Paar 社製)

### 2.4 水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR の測定条件, 解析条件及び計算式

#### 2.4.1 主な測定条件

観測スペクトル幅 : -5-15 ppm を含む 40 ppm

デジタル分解能 : 0.25 Hz (Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR)  
0.30 Hz (WET-<sup>1</sup>H qNMR)

観測中心 : 4.67 ppm

試料管スピン : OFF

フリップ角 : 90 °

取り込み時間 : 4.0 s (Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR)  
3.2 s (WET-<sup>1</sup>H qNMR)

<sup>13</sup>C デカップリング : OFF

ダミースキャン : 2 回

積算回数 : 8 回

繰返し待ち時間 : 120 s

温度 : 20-30 °C (室温, 温度調整なし.)

#### 2.4.2 Presaturation の条件

照射中心 : 4.67 ppm

照射時間 : 1.5 s

#### 2.4.3 WET の条件

WET パルス波形 : SEDUCE

PFG 照射時間 : 2 ms

PFG 強度 : 0.144 T/m

PFG 波形 : SQUARE

PFG 回復時間 : 0.5 ms

#### 2.4.4 解析条件

解析ソフトウェア : Delta v5.1.3 (日本電子社製)

窓関数処理 : なし

ゼロフィリング : 2 倍

位相補正 : マニュアル法

ベースライン補正 : マニュアル法

積分 : マニュアル法

化学シフト値の基準 : ギ酸カルシウム (8.2 ppm)

#### 2.4.5 計算式

$$P_a = (I_a / I_{rf}) \times (H_{rf} / H_a) \times (M_a / M_{rf}) \times (W_{rf} / W_{sample}) \times P_{rf} \quad (\text{Eq.1})$$

ここで,

$P$  : 含有量 (g/100g)

$I$  : 信号強度

$H$  : 水素数 (官能基の水素の数)

$M$  : モル質量 (g/mol)

$W$  : 質量  
 $a$  : 分析対象成分  
 $sample$  : 試料  
 $rf$  : qNMR 用基準物質  
 を意味する。

事前に 3 種類の認証標準物質 ( $rf1, rf2, rf3$  とする) の重水溶液 (CRM 溶液) を調製し、定量に用いたため、CRM 溶液の調製時における質量を  $w$ 、試料溶液調製時の CRM 溶液の質量を  $W_{CRM\text{溶液}}$  とすると、例えば  $W_{rf1}$  は

$$W_{rf1} = W_{rf1} / (W_{rf1} + W_{rf2} + W_{rf3} + WD20) \times W_{CRM\text{溶液}}$$

で算出される。本研究で用いた物質のモル質量、水素数等の情報を Table1 に示す。

Table 1 Information about substance for  $^1\text{H}$  qNMR analysis.

Substance	Formula	MW (g/mol)	Proton type	Number of H
Dimethyl sulfone	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$	94.13	$\text{CH}_3 \times 2$	6
Maleic acid	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	116.07	$\text{HC}=\text{CH}$	2
Calcium formate	$\text{C}_2\text{H}_2\text{CaO}_4$	130.11	$(\text{HCOO}) \times 2$	2
Acetic acid	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	60.06	$\text{CH}_3$	3
Sucrose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	342.30	Anomeric $\text{H}$	1
Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180.16	Anomeric $\text{H}$	1
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	46.07	$\text{CH}_3$	3

## 2.5 認証標準物質の重水溶液 (CRM 溶液) の調製

3 種類の認証標準物質 (CRM) の信号強度が概ね揃うように、ジメチルスルホン約 64 mg、マレイン酸約 118 mg 及びギ酸カルシウム約 131 mg をはかりとり、重水 4 mL に溶解した。冷暗室に保管し、概ね 2 週間を目途に使い切った。

## 2.6 塩蔵及び調製野菜中の酢酸

### 2.6.1 水信号消去- $^1\text{H}$ qNMR による酢酸の定量

#### 2.6.1.1 試料の定量

試料約 1 g 及び CRM 溶液 160  $\mu\text{L}$  を 15 mL 容遠沈管にはかりとり、重水 5 mL を加えてよく混合した後、遠心分離して得られた上澄液 600  $\mu\text{L}$  を 5 mm NMR 試料管 (シゲミ社製、EC-57) に移して密栓した。この調製を 1 試料につき 3 回行った。Presaturation- $^1\text{H}$  qNMR 及び WET- $^1\text{H}$  qNMR ともに、非連続で 3 回繰返し測定を行った。

#### 2.6.1.2 添加回収試験

試料 100 g 当たり約 0.5 g の酢酸を添加したものを添加回収試験用の検体とし、検体約 0.5 g 及び CRM 溶液 160  $\mu\text{L}$  を 15 mL 容遠沈管にはかりとり、重水 3 mL を加えてよく混合した後、遠心分離して得られた上澄液 600  $\mu\text{L}$  を NMR 試料管に移して密栓した。この調製を 1 検体につき 3 回行った。Presaturation- $^1\text{H}$  qNMR 及び WET- $^1\text{H}$  qNMR ともに、非連続で 3 回繰返し測定を行った後、次式により回収率 (%) を算出した。

回収率 (%) = (試料 100 g 当たりに換算した添加回収試験用検体中の酢酸含有量 - 試料 100 g 当たりの試料中の酢酸含有量) / 試料 100 g 当たりの酢酸添加量  $\times 100$  (Eq.2)

### 2.6.2 HPLC による酢酸の定量

#### 2.6.2.1 検液調製と測定

税関内における常法に準じて調製し、内標準法で定量を行った (5 点検量)。すなわち、試料 10-12 g 程度をビーカーにはかりとり、酒石酸 1 g 及び塩化ナトリウム 40 g の入った 500 mL 容二口丸底フラスコに水 50 mL で移し入れた。内標準としてこはく酸を加えた 500 mL 容メスフラスコを受器とし、標線の近くに達するまで水蒸気蒸留を行った後、水で定容し、フィルターろ過 (0.45  $\mu\text{m}$ ) したものを 3 つの HPLC 用バイアルに分注した。この調製を 1 試料につき 3 回を行い、検量線用標準液 (5 点  $\times$  4 回) と試料検液 (3 調製  $\times$  3 回) の測定を行った。

#### 2.6.2.2 測定条件

カラム : SecurityGuard AQ C18 (内径 3.0 mm  $\times$  長さ 4.0 mm) + Synergi 4  $\mu\text{m}$  Hydro-RP80  $\text{\AA}$  (内径 4.6 mm  $\times$  長さ 250 mm, 粒径 4  $\mu\text{m}$ ) (いずれも Phenomenex 社製)

カラム温度 : 40 °C  
 移動相 : 20 mM リン酸二水素カリウム水溶液 (リン酸二水素カリウム 5.46 g をはかりとり、水で 2000 mL 容メスフラスコに移し入れ、リン酸 1.2 mL を加えた後に水で定容。)  
 流速 : 0.6 mL/min  
 注入量 : 20  $\mu\text{L}$   
 検出器 : DAD (210 nm)  
 測定時間 : 60 - 90 min

## 2.7 果汁飲料中のスクロース、グルコース及びエタノールの定量

### 2.7.1 水信号消去- $^1\text{H}$ qNMR による定量

#### 2.7.1.1 試料の定量

試料 640  $\mu\text{L}$  及び CRM 溶液 160  $\mu\text{L}$  を 1.5 mL エッペンチューブにはかりとり、よく混合した後、遠心分離して得られた上澄液 600  $\mu\text{L}$  を NMR 試料管に移して密栓した。この調製を 1 試料につき 3 回行った。Presaturation- $^1\text{H}$  qNMR 及び WET- $^1\text{H}$  qNMR ともに、非連続で 3 回繰返し測定を行った。

#### 2.7.1.2 添加回収試験

試料にスクロース、グルコース及びエタノールを添加したものを添加回収試験用の検体とし、検体 640  $\mu\text{L}$  及び CRM 溶液 160  $\mu\text{L}$  を 1.5 mL エッペンチューブにはかりとり、よく混合した後、遠心分離して得られた上澄液 600  $\mu\text{L}$  を NMR 試料管に移して密栓した。この調製を 1 検体につき 3 回行った。Presaturation- $^1\text{H}$  qNMR 及び WET- $^1\text{H}$  qNMR ともに、非連続で 3 回繰返し測定を行った後、酢酸の式 (Eq.2) と同様に回収率 (%) を算出した。

### 2.7.2 HPLC によるスクロース及びグルコースの定量

#### 2.7.2.1 検液調製と測定

税関分析法 No. 108 「菓子類のショ糖分の定量分析法」に準じて調製し、絶対検量線法でスクロース及びグルコースの定量を行った (5 点検量)。なお、同分析法にはグルコースの定量法は記載されていないが、糖類の汎用的な分析条件であるため、グルコースも併せて定量した。すなわち、試料をビーカーにはかりとり、水で 100 mL 容メスフラスコに移し入れて定容した後、フィルターろ過 (0.45  $\mu\text{m}$ ) したものを 3 つの HPLC 用バイアルに分注した。

この調製を 1 試料につき 3 回行い、検量線用標準液（5 点×4 回）と試料検液（3 調製×3 回）の測定を行った。

### 2.7.2.2 測定条件

カラム：Asahipak NH2P-50G 4A (内径 4.6 mm×長さ 10 mm, 粒径 5  $\mu$ m)+Asahipak NH2P-50 4E (内径 4.6 mm×長さ 250 mm, 粒径 5  $\mu$ m) (いずれも昭和電工社製)

カラム温度：35 °C

移動相：アセトニトリル:水 = 75:25

流速：1.0 mL/min

注入量：12  $\mu$ L

検出器：RID (35 °C)

測定時間：20 min

### 2.7.3 蒸留一振動式密度計法によるアルコール分 (vol%) の定量

関税定率法別表第 22 類注 2 において、同表第 20 類から 22 類までのアルコール分とは「温度 20 °C におけるアルコールの容量分」と規定され、酒税法における定義とは温度が異なる。よって、国税庁所定分析法 3-4-A-2 の温度を「15 °C」から「20 °C」に、「第 2 表」を国際アルコール表 (OIML) の「Table Vb」(Alcoholic strength by volume as a function of the density at 20 °C) に読み替えて、試料中のアルコール分 (vol%, 20 °C) を定量した。すなわち、試料 100 mL を 20 °C においてメスフラスコに精確に採取し、これを 300 mL 容の丸底フラスコに水 30 mL で移し入れた。同じメスフラスコを受器として、メスフラスコの首部に達するまで蒸留した後、20 °C において水で原容に戻した。蒸留は 1 試料につき 1 回行い、留液の密度を振動式密度計により 3 回測定した。国際アルコール表の Table Vb の数値を直線補間して vol% に換算した。

### 2.7.4 アルコール濃度 (g/100g) の vol%(20°C)への換算 (NMR)

水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR で測定したアルコール濃度 (g/100 g) の vol%へ換算は、試料の密度 (20 °C) を振動式密度計により測定し、次式により行った<sup>9)</sup>。

$$P_{alcohol} (\text{vol}\%, 20 \text{ °C}) = P_{alcohol} (\text{g}/100\text{g}) \times (d_{sample} / 0.78924) \quad (\text{Eq.3})$$

ここで、

$P_{alcohol} (\text{vol}\%, 20 \text{ °C})$ ：アルコール分 (vol%, 20 °C)

$P_{alcohol} (\text{g}/100\text{g})$ ：アルコール濃度 (g/100g)

$d_{sample}$ ：試料の密度 (20 °C)

0.78924：エタノールの密度 (20 °C, 国際アルコール表より)

## 3. 結果及び考察

### 3.1 水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR による定量及び添加回収試験の結果

#### 3.1.1 積分範囲及び減算・分割処理について

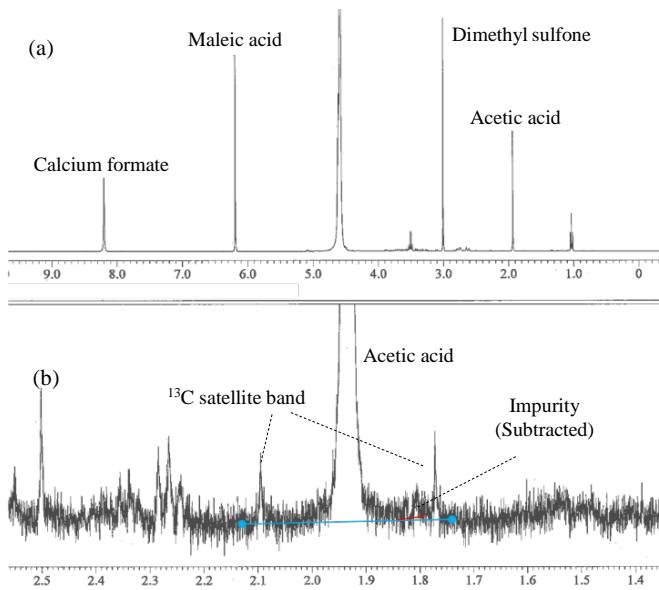
例えば試薬の値付けが目的の <sup>1</sup>H qNMR では、試料が高純度で分析対象成分が 1 物質であるため、定量用信号の化学シフト値の近くに夾雑物由来の信号が現れて定量が妨害されることは少ないと考えられる。そのため、例えば <sup>13</sup>C サテライトバンドの外側 30 Hz というように、広い積分範囲を取ることが可能であり、また推奨もされている<sup>10)</sup>。しかしながら本研究で用いた試料は食品であり、とりわけ果汁飲料では分析対象成分を 3 つ設定したため、全

ての定量用信号（全ての CRM + 全ての分析対象成分）において広範囲の積分を共通して取れた試料は皆無であった。特に分析対象成分の信号については、夾雑物由来の信号がやや重なった試料が多く、抽出・混合・遠心分離のみの簡易調製による水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR では精確な定量が困難であることがわかった。

定量用信号の近傍に夾雑物由来の信号が観測された場合の取り扱いに関しては、夾雑物の信号の数と重なり度合いがともに小さい場合は減算処理、すなわち、<sup>13</sup>C サテライトバンドを含む信号強度から夾雑物由来の信号強度を差し引く処理を行った（塩蔵しようが 2 種がこれに該当する。ただし、ジメチルスルホンは糖由来の信号が近接しており、広範囲の積分が行えなかつたため、定量には用いなかった）。夾雑物由来の信号数が多い、または定量用信号との重なり度合いが大きい場合は減算処理が困難であるため、分割処理、すなわち、夾雑物を含む広範囲の積分を行った後に定量用信号と夾雑物信号の谷間を垂直に切る処理を行い、夾雑物由来の信号を除去した。この処理により、定量用信号の裾部分が僅かに除かれることになるため、夾雑物の影響がないその他の信号についても同様に、信号の裾部分を垂直に分割して取り除いた（塩蔵しようが 2 種以外の試料がこれに該当する。この積分処理では、糖と近接していたジメチルスルホンの信号も定量に使用できた）。水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR スペクトルと積分範囲について、Fig. 1 (減算処理した塩蔵しようが A) 及び Fig. 2 (分割処理したアップルジュース) に例示した。

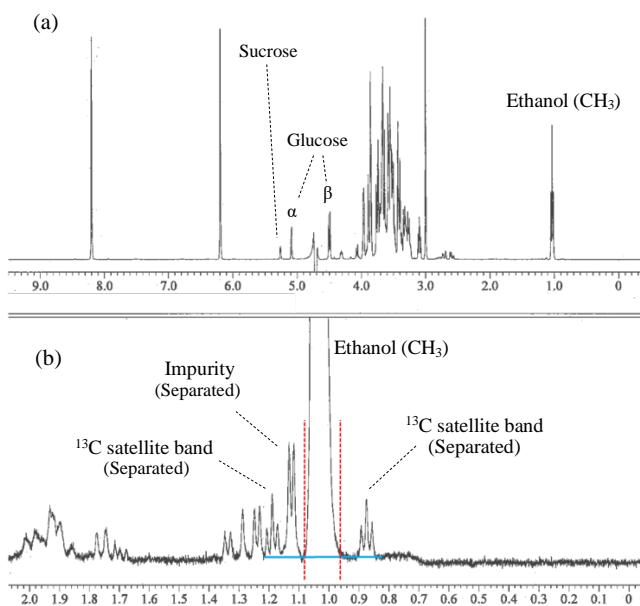
#### 3.1.2 水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR による塩蔵及び調製野菜中の酢酸の定量

水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR による塩蔵しようが及び調製野菜中の酢酸の定量及び添加回収試験の結果の詳細を Table 2 に、回収率をプロットした図を Fig.3 に示す。前述のとおり、塩蔵しようが 2 種ではジメチルスルホンの信号を定量に利用しなかつたため、この組み合わせについては繰返し性及び定量性の評価はできなかつたが、それ以外については、Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR の測定値の相対標準偏差 (n = 3, RSD(%)) が 0.06-0.63 %、回収率が 98.0-101.8 %、WET-<sup>1</sup>H qNMR の測定値の相対標準偏差が 0.10-0.42 %、回収率が 98.1-100.5 %であり、水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR は、水信号消去法及び qNMR 用基準物質によらず、高い繰返し性と定量性を示した。

Fig.1 Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR spectrum of ginger A.

(a) Whole spectrum.

(b) Integration of acetic acid signal. : Blue line shows whole integration about acetic acid, red line shows impurity integration for subtraction.

Fig.2 WET-<sup>1</sup>H qNMR spectrum of apple juice.

(a) Whole spectrum.

(b) Integration of ethanol signal. : Blue line shows whole integration about ethanol (1st step), red line shows separation of impurity signal (2nd step).

### 3.1.3 水信号消去-<sup>1</sup>H qNMRによる果汁飲料中のスクロース、グルコース及びエタノールの定量

#### 3.1.3.1 表、図及びグルコースの測定値の算出について

水信号消去-<sup>1</sup>H qNMRによる果汁飲料中のスクロース、グルコース及びエタノールの定量及び添加回収試験の結果を Table 3 に示す。また、分析対象成分毎に回収率をプロットした図を Fig.4-1

～4-4 に示す。なお、グルコースは、分子動力学シミュレーションにより、水溶液中で  $\alpha$ -アノマー :  $\beta$ -アノマー = 38 : 62 の比率で平衡状態になっている<sup>11)</sup>とされ、<sup>1</sup>H qNMR スペクトルにおいても両アノマーに由来する信号が検出された。 $\beta$ -アノマーのアノメリックプロトン (4.5 ppm) は水信号 (4.7 ppm) に特に近接し、水信号消去の影響がより大きいことが推定されたため、 $\alpha$ -アノマーのアノメリックプロトン (5.1 ppm) の信号強度のみを定量に用いることが望ましいと考えられた。しかしながら、溶液中における実際のアノマー比が分子動力学に基づく平衡比率 (38 : 62) とは異なることもまた考えられた。そこで、グルコースについて、 $\alpha$ -アノマーのアノメリックプロトンの信号強度に 100/38 (=2.632) を乗じて算出した値と、 $\alpha$ -と  $\beta$ -の両アノマーのアノメリックプロトンの信号強度の和から算出した値の二つの測定値を比較した結果、前者の方がやや高い傾向が観察されたが、その差は水信号消去の手法間の差よりも小さかった。したがって、今後、グルコースの測定値についてどちらの信号強度を用いて算出した値であるかを分けて論じることはしない。

#### 3.1.3.2 Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR の結果

Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR は、測定値の相対標準偏差が最大で 1.18 % であり、複数調製における繰返し性は良好であった。

回収率については、100 % を大きく超えた場合も多く、特にグルコースでは 102.1-113.5 % と高い値を示した (Fig.4-3 及び 4-4 の左半分)。この原因は、前述のとおりアノメリックプロトンの信号強度が Presaturation の影響を受けたためと考えられる。また、マレイン酸の信号強度を用いて定量した場合に、スクロース及びエタノールの回収率が 105 % を超えた試料 (オレンジジュースとグレープフルーツジュース) と、100% 付近になった試料 (グレープジュースとアップルジュース) とに二分された (Fig.4-1 及び 4-2 の左から 2 列目)。回収率が高くなったオレンジジュースとグレープフルーツジュースでは、qNMR 用基準物質の相互評価において、マレイン酸の純度が認証値を大きく下回っていたことから、マレイン酸の信号強度が過小であったと考えられる。併行して測定した WET-<sup>1</sup>H qNMR ではマレイン酸の純度が認証値よりも大幅に過小評価されることはないことがわかったことから、Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR によるオレンジジュースとグレープフルーツジュースの測定では、Presaturation の条件設定が不適当であったおそれがある。今回の研究では、事前飽和時間を 1.5 秒に固定した上で、水信号が効率よく消えるように照射強度を調整して測定したが、例えは二元配置の分散分析により、定量用信号の信号強度が最大となるような最適化は行わなかった。このため、試料間で Presaturation の影響の大きな差異が現れたものと考えられる。

#### 3.1.3.3 WET-<sup>1</sup>H qNMR の結果

WET-<sup>1</sup>H qNMR は、測定値の相対標準偏差が最大で 1.05 % であり、Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR と同様に良好な繰返し性を有することが確認された。

回収率については、上記の Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR のように異常に高い回収率を示すことはなく、全てを含めて 97.6-101.4 % の狭い範囲に収まった。WET の条件設定は、Presaturation の場合と同様に水信号が効率よく消えるように選択励起パルスの強度を調整

したのみであるが、試料間で回収率に大きな差異が現れることはなかった。水信号消去の手法として、WET は Presaturation よりも選択性が高く水信号以外への影響が小さいため、WET-<sup>1</sup>H qNMR は Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR と比較して定量性が高く、安定して 100% に近い回収率が得られたと考えられる。このことは、測定条件の設定が容易であるとも言い換えられ、WET-<sup>1</sup>H qNMR は簡易・迅速定量により適した手法と考えられる。

### 3.2 別法との比較

#### 3.2.1 定量値の比較

水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR による測定値と、HPLC 法（酢酸、スクロース及びグルコース）及び蒸留-振動式密度計法（エタノール）による測定値の比較を Table 4（酢酸）、Table 5（スクロース及びグルコース）及び Table 6（エタノール）に示す。なお、エタノールは、蒸留-振動式密度計法と比較するために、水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR の測定値 (g/100g) を vol% (20 °C) へ換算した値を示した。また、比較を容易にするため、別法の測定値に対する相対値 (<sup>1</sup>H qNMR による測定値/別法による測定値) の一覧表を Table 7、相対値の範囲及び中央値をプロットした図を Fig.5 に示す。

酢酸は、Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR と WET-<sup>1</sup>H qNMR を合わせて相対値が 0.97-1.01 であり、測定値が別法と近似していると言えるが、分割処理によって夾雑物由来の信号を除去した試料においては、やや低い値を示す傾向が観察された。酢酸のメチル基の信号幅は、酸の解離状態によって変化し、酸性条件下では広くなるため、夾雑物の信号の分割処理によって積分範囲が狭くなると、本来信号強度に含まれるべき幅部分が僅かに除かれることになるため、その分、測定値が小さくなつたものと考えられる。

スクロースは、Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR と WET-<sup>1</sup>H qNMR を合わせて相対値が 0.99-1.03 であり、別法と近似した測定値であることが確認された。

グルコースは、Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR では相対値が 1.03-1.12 となり、測定値が別法よりも大きくなることがわかった。この原因是前述のとおりで、グルコースのアノメリックプロトンの信号強度が Presaturation による影響を受けたためと考えられる。一方で、WET-<sup>1</sup>H qNMR では相対値が 0.97-1.03 と別法と近似した結果が得られた。ただし、今回別法（HPLC 法）で用いたカラムは、官能基にアミノ基を持ち、親水性相互作用により糖類を分離するカラム（通称アミノカラム）であり、糖類の分析に汎用的に用いられるものではあるが、還元糖（グルコース）がカラムのアミノ基と反応して吸着するという問題が指摘されている<sup>12)</sup>ため、今後、酵素法等の別の手法による測定値とも比較する必要があると考えられる。

エタノールは、Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR と WET-<sup>1</sup>H qNMR を合わせて相対値が 1.01-1.04 であり、別法よりもやや高い値を示す傾向が観察された。水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR に起因する原因としては、エタノールと完全に重なっている夾雑物の信号が存在し、アルコール分が過大に評価されている可能性がある。別法（蒸留-振動式密度計法）に起因する原因としては、蒸留して得られた留液中に存在しているエタノール及び水以外の成分により、留液の密度がわずかに大きくなり、アルコール分が過小に評価されたことが考えられる。

#### 3.2.2 簡便性・迅速性について

酢酸における水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR では、手間と時間を要する水蒸気蒸留がなく、かつ測定時間も短い（水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR：積算 1 回に約 2 分 × ダミースキャンを含めて積算 10 回 = 20 分。HPLC 法：60-90 分）ため、調製及び測定に要する時間が別法よりも大幅に短縮された。

果汁飲料の水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR では、別法ではそれぞれ行う必要があった糖類とエタノールの定量が同時に実行でき、また、エタノールの定量において、蒸留及び 20 °C の定温における定容のいずれも不要であるため、別法よりも簡便で迅速性に優れていた。

## 4. 要 約

本研究では、抽出・混合・遠心分離のみの簡単な調製で、水信号消去を組み込んだ <sup>1</sup>H qNMR（水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR）により、塩蔵及び調製野菜中の酢酸、果汁飲料中のスクロース、グルコース及びエタノールの定量を行った。その結果、Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR では果汁飲料中のグルコースと一部試料中のスクロース及びエタノールを除き、WET-<sup>1</sup>H qNMR では全ての試料・分析対象成分・qNMR 用基準物質において、高い繰返し性と定量性を示した。水信号消去法と qNMR 用基準物質の組み合わせに関しては、「Presaturation 法-マレイン酸」の組み合わせは試料や測定条件によって回収率が大きくなる場合があり、それが生じやすいことが示唆された。また別法（酢酸、スクロース及びグルコースは HPLC 法、エタノールは蒸留-振動式密度計法）との比較では、Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR による果汁飲料中のグルコースを除き、水信号消去-<sup>1</sup>H qNMR は概ね別法と近似した測定値を示し、迅速性にも優れていた。

WET-<sup>1</sup>H qNMR は Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR よりも定量性が高く、測定条件の設定も容易で速やかに行えるため、定量性と迅速性のいずれにおいても、WET-<sup>1</sup>H qNMR の方が Presaturation-<sup>1</sup>H qNMR よりも優位であった。

## 文 献

- 1) JIS K 0138, 定量核磁気共鳴分光法通則（qNMR通則）（2018）
- 2) 「qNMRプライマリーガイド」ワーキング・グループ：“qNMRプライマリーガイド 基礎から実践まで”, P.141 (2015), 共立出版
- 3) 斎藤直樹:定量<sup>1</sup>H NMRによる高純度標準物質の新規なキャラクタリゼーション手法に関する研究(金沢大学大学院, 博士論文) (2019)

- 4) T.D.W.クラリッジ (訳:竹内敬人) : “有機化学のための高分解能NMRテクニック”, P.366 (2004), 講談社サイエンティフィク
- 5) 斎藤剛ら: 分析化学, **52**, 1029 (2003)
- 6) 竹内敬人, 加藤敏代: “よくある質問 NMR の基本”, P.124 (2012), 講談社サイエンティフィク
- 7) Andrew E. Derome (訳:竹内敬人, 野坂篤子) : “化学者のための最新 NMR 概説”, P.194 (1991), 化学同人
- 8) 川口謙ら: *CHROMATOGRAPHY*, **32**, 171 (2011)
- 9) 文部科学省科学技術・学術政策局政策課資源室監修, 安井明美ら編: “日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂) 分析マニュアル・解説”, P.230 (2016), 建帛社
- 10) 山崎太一ら: 分析化学, **61**, 963 (2012)
- 11) U. Schnupf et al.: *Carbohydrate Research*, 345, 503 (2010)
- 12) 日本ウォーターズ株式会社: アプリケーションノート “食品成分分析: 糖類の高分離高感度分析 –ACQUITY UPLC H-Class/QDa を用いた直接分析–”

Table 2 Results of determination and recovery experiments of acetic acid in four gingers and two umeboshis by <sup>1</sup>H qNMR with water suppression

Analyte	Water Suppression	Sample	Dealing with impurity signals	CRM : Dimethyl sulfone				CRM : Maleic acid				CRM : Calcium formate				
				Original sample		Added sample		Original sample		Added sample		Original sample		Added sample		
				Found (g/100g)	RSD (%)	Found (g/100g)	RSD (%)	Found (g/100g)	RSD (%)	Found (g/100g)	RSD (%)	Found (g/100g)	RSD (%)	Found (g/100g)	RSD (%)	
Ginger A (salted)	Subtracted	0.4930	Signal of dimethyl sulfone was not used.	0.4923	0.38	0.9160	0.39	98.2	0.4262	0.42	0.9147	0.44	98.1	0.4275	0.35	
Ginger B (salted)	Subtracted	0.4923	Signal of dimethyl sulfone was not used.	0.4923	0.38	0.9160	0.39	99.3	0.1017	0.12	1.515	0.14	98.9	1.0112	0.06	
Presaturation	Ginger C (preparation)	0.4978	0.4272	0.38	0.9160	0.39	98.2	0.4262	0.42	0.9147	0.44	98.1	0.4275	0.35		
Ginger D (preparation)	Separated	0.5038	1.0118	0.12	1.519	0.07	99.3	0.1017	0.12	1.515	0.14	98.9	1.0112	0.06		
Umeboshi A	Umeboshi B	0.5111	0.2528	0.54	0.7689	0.21	101.0	0.2566	0.53	0.7771	0.16	101.8	0.2522	0.55		
Acetic acid	Ginger A (salted)	0.5059	0.5731	0.15	1.081	0.63	100.4	0.5721	0.59	1.078	0.49	100.1	0.5672	0.06		
Ginger B (salted)	Subtracted	0.4930	Signal of dimethyl sulfone was not used.	0.4923	0.30	0.9161	0.24	98.2	0.4266	0.35	0.9148	0.28	98.1	0.1704	0.36	
Ginger C (preparation)	0.4978	0.4271	0.30	0.9161	0.24	98.2	0.4266	0.35	0.9148	0.28	98.1	0.6057	0.24	0.6640	0.14	
Ginger D (preparation)	Separated	0.5038	1.0119	0.11	1.518	0.16	99.0	1.0115	0.10	1.516	0.17	99.5	1.0115	0.20	1.099	0.32
Umeboshi A	Umeboshi B	0.5111	0.2572	0.26	0.7706	0.24	100.5	0.2567	0.32	0.7689	0.19	100.2	0.2564	0.22	0.7691	0.22
WET	Ginger A (salted)	0.5059	0.5749	0.18	1.083	0.38	100.5	0.5736	0.29	1.082	0.33	100.4	0.5709	0.28	1.079	0.37
															100.5	

Found (g/100 g) was the mean of three preparations.

Denominators of unit (g/100g) were all unified original samples of 100 g.

Recovery (%) was calculated as follows : Recovery (%) = (Measurements of added sample - Measurements of original sample) / Added value  $\times 100$ 

Value was shown in the text.

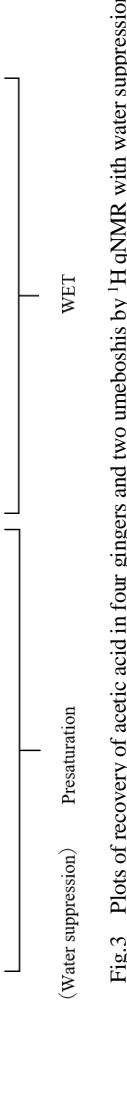
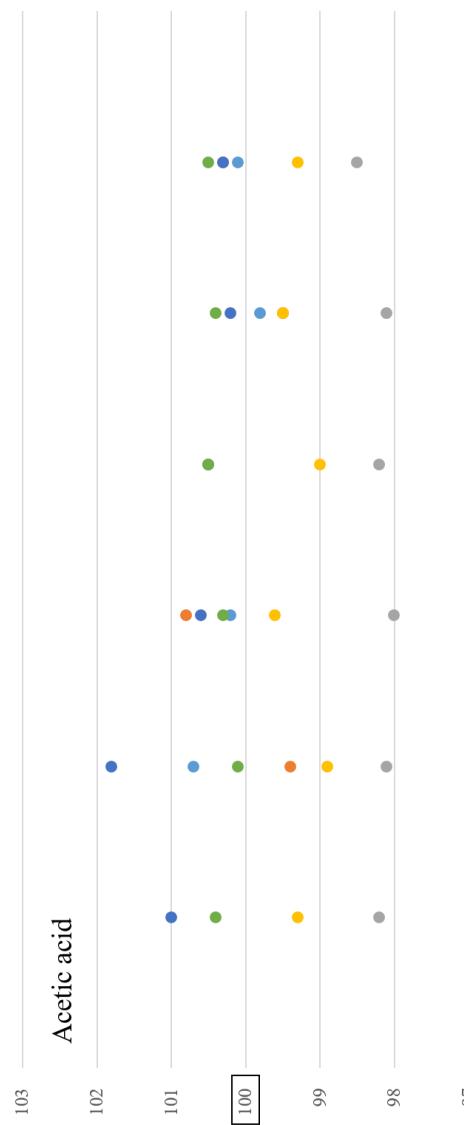
Fig.3 Plots of recovery of acetic acid in four gingers and two umeboshis by <sup>1</sup>H qNMR with water suppression

Table 3 Results of determination and recovery experiments of sucrose, glucose and ethanol in four fruit juices by  $^1\text{H}$  qNMR with water suppression

Analyte	Water Suppression	Sample	Dealing with impurity signals	CRM : Dimethyl sulfoxide						CRM : Maleic acid						CRM : Calcium formate					
				Original sample			Added sample			Original sample			Added sample			Original sample			Added sample		
				Found	RSD	(g/100g)	Found	RSD	(g/100g)	Found	RSD	(g/100g)	Found	RSD	(g/100g)	Found	RSD	(g/100g)	Found	RSD	(g/100g)
Sucrose	Presaturation	Grape juice	N.D.	1.926	0.08	0.8946	2.821	0.32	100.4	N.D.	—	1.896	0.04	98.4	N.D.	—	1.921	0.14	99.8		
		Apple juice	Separated	1.924	4.23	4.795	0.05	9.079	0.39	100.1	8.787	0.40	2.758	0.36	97.7	8.825	0.42	2.773	0.40	98.3	
		Orange juice	Separated	4.856	2.13	0.18	7.026	0.12	100.9	4.288	0.03	9.393	0.30	106.5	4.160	0.11	8.902	0.16	98.9		
		Grapefruit juice	Separated	4.856	2.13	0.18	7.026	0.12	100.9	2.162	0.35	7.299	0.25	105.8	2.090	0.13	6.910	0.06	99.3		
		WET	Grape juice	1.926	N.D.	—	1.929	0.56	100.2	N.D.	—	1.910	0.51	99.2	N.D.	—	1.927	0.54	100.1		
	Glucose (calculated by $\alpha$ anomeric proton $\times 100/38$ )	Apple juice	Separated	1.924	0.20	2.801	0.28	99.3	0.8839	0.28	2.777	0.29	98.3	0.8887	0.33	2.787	0.34	98.7			
		Orange juice	Separated	4.795	4.184	0.08	9.007	0.23	100.6	4.170	0.09	8.969	0.21	100.1	4.143	0.12	8.899	0.15	99.2		
		Grapefruit juice	Separated	4.856	2.103	0.10	6.967	0.28	100.2	2.098	0.09	6.960	0.18	100.1	2.085	0.05	6.908	0.21	99.3		
		Grape juice	Separated	4.795	5.575	0.12	10.75	0.06	107.9	5.484	0.11	10.54	0.03	105.5	5.560	0.27	10.69	0.10	106.9		
		Apple juice	Separated	4.805	3.052	0.06	8.193	0.18	107.0	3.997	0.07	8.011	0.2	104.3	2.998	0.17	8.054	0.31	105.0		
Ethanol	Presaturation	Orange juice	Separated	4.871	2.144	0.24	7.422	0.41	108.4	2.171	0.27	7.679	0.32	113.1	2.106	0.23	7.278	0.23	106.2		
		Grapefruit juice	Separated	4.874	2.621	1.17	7.886	0.19	108.0	2.661	0.73	8.192	0.06	113.5	2.573	1.18	7.756	0.20	106.3		
		WET	Grape juice	4.795	5.298	0.25	10.16	0.15	101.4	5.247	0.07	10.06	0.07	100.3	5.293	0.03	10.15	0.17	101.3		
		Apple juice	Separated	4.805	2.878	0.52	7.716	0.16	100.7	2.864	0.52	7.650	0.19	99.6	2.873	0.58	7.678	0.25	100.0		
		Orange juice	Separated	4.871	1.996	0.02	6.93	0.41	101.2	1.990	0.01	6.896	0.37	100.7	1.977	0.05	6.843	0.30	99.9		
	Glucose (calculated by both $\alpha$ and $\beta$ anomeric protons)	Grapefruit juice	Separated	4.874	2.457	0.69	7.370	0.14	100.8	2.451	0.68	7.363	0.13	100.8	2.436	0.71	7.307	0.15	100.0		
		Grape juice	Separated	4.795	5.491	0.28	10.51	0.18	104.7	5.402	0.22	10.31	0.10	102.3	5.477	0.43	10.45	0.16	103.7		
		Apple juice	Separated	4.805	3.039	0.05	8.068	0.19	104.7	2.985	0.06	7.888	0.24	102.1	2.998	0.07	7.931	0.31	102.7		
		Orange juice	Separated	4.871	2.082	0.35	7.268	0.35	106.5	2.109	0.38	7.520	0.27	111.1	2.046	0.34	7.126	0.12	104.3		
		Grapefruit juice	Separated	4.874	2.543	0.14	7.708	0.14	106.0	2.582	0.40	8.008	0.02	111.3	2.496	0.07	7.581	0.17	104.3		
WET	Presaturation	Grape juice	Separated	4.795	5.179	0.14	10.00	0.33	100.6	5.128	0.19	9.904	0.28	99.6	5.174	0.22	10.00	0.32	100.6		
		Apple juice	Separated	4.805	2.851	0.31	7.592	0.17	98.7	2.837	0.34	7.527	0.21	97.6	2.846	0.40	7.554	0.27	98.0		
		Orange juice	Separated	4.871	1.972	0.58	6.840	0.19	99.9	1.966	0.56	6.811	0.15	99.5	1.953	0.52	6.758	0.08	98.6		
		Grapefruit juice	Separated	4.874	2.405	1.05	7.254	0.10	99.5	2.399	1.03	7.247	0.13	99.5	2.385	1.06	7.193	0.13	98.6		
		WET	Grape juice	0.3819	0.4165	0.10	0.8024	0.05	101.0	0.4098	0.12	0.7868	0.04	98.7	0.4154	0.13	0.7975	0.07	100.1		
	Glucose (calculated by both $\alpha$ and $\beta$ anomeric protons)	Apple juice	Separated	0.3831	0.4005	0.08	0.7870	0.03	100.9	0.3934	0.04	0.7694	0.04	98.1	0.3951	0.07	0.7736	0.10	98.8		
		Orange juice	Separated	0.3676	0.4367	0.05	0.8109	0.42	101.8	0.4423	0.04	0.8390	0.32	107.9	0.4291	0.12	0.7951	0.21	99.6		
		Grapefruit juice	Separated	0.3939	0.4742	0.09	0.8710	0.06	100.7	0.4813	0.47	0.9049	0.22	107.5	0.4654	0.01	0.8565	0.05	99.3		
		WET	Grape juice	0.3819	0.4143	0.34	0.7971	0.10	100.2	0.4102	0.09	0.7891	0.03	99.2	0.4139	0.08	0.7964	0.13	100.2		
		Apple juice	Separated	0.3831	0.3982	0.10	0.7820	0.21	100.2	0.3963	0.07	0.7754	0.11	99.0	0.3975	0.04	0.7783	0.06	99.4		
Ethanol	Presaturation	Orange juice	Separated	0.3676	0.4367	0.07	0.8092	0.15	101.3	0.4353	0.10	0.8058	0.12	100.8	0.4325	0.14	0.7995	0.08	99.8		
		Grapefruit juice	Separated	0.3939	0.4713	0.19	0.8678	0.18	100.7	0.4702	0.11	0.8669	0.10	100.7	0.4673	0.13	0.8603	0.07	99.8		

Found (g/100 g) was the mean of three preparations.

Denominators of unit (g/100g) were all unified original samples of 100 g.

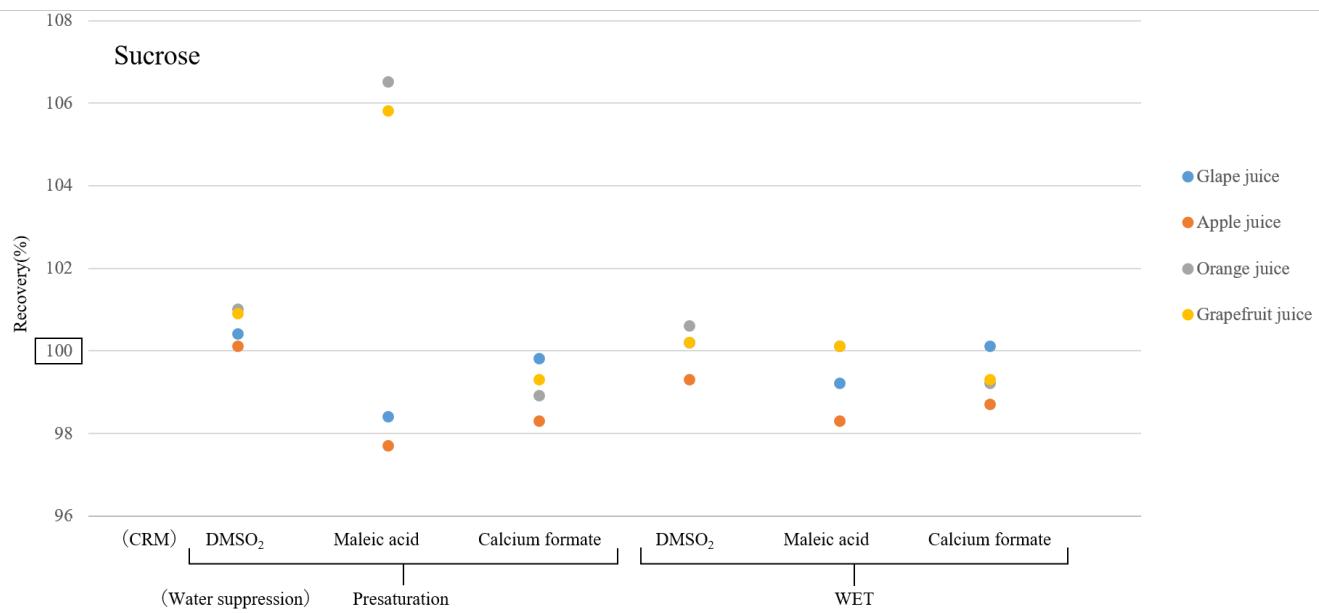
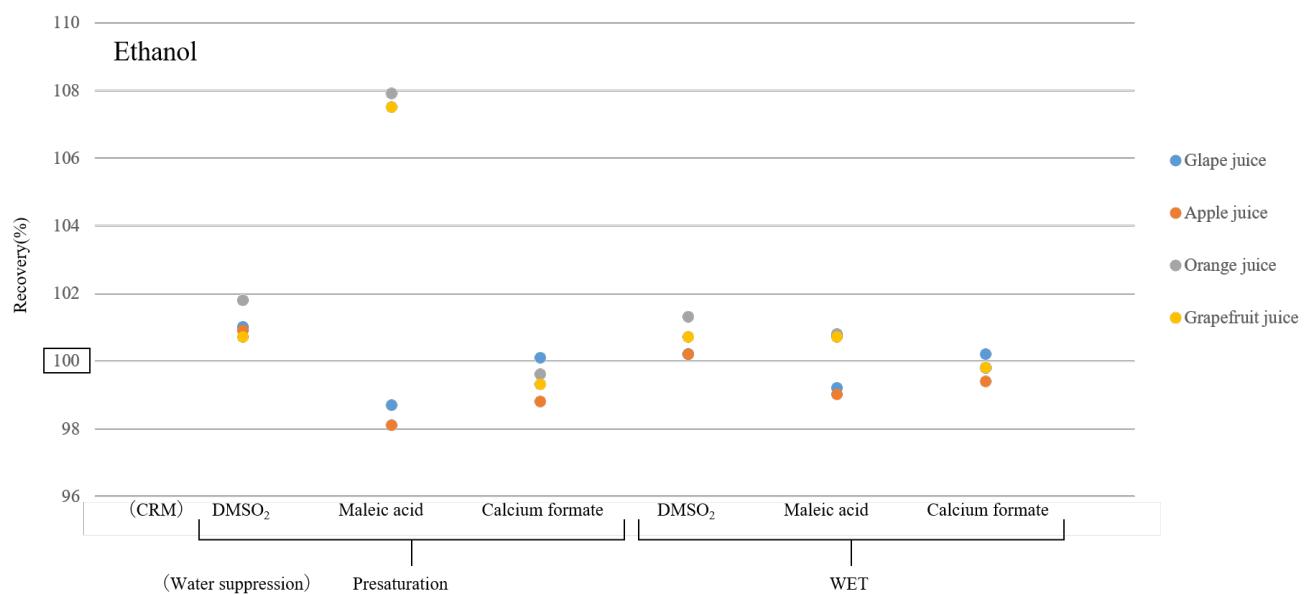
N.D. means "Not Detected".

Red letter means that recovery(%) was over 102%.

Blue letter means that recovery(%) was under 98%.

Glucose in water was an equilibrium of  $\alpha$ -anomer and  $\beta$ -anomer with ratio (%) = 38:62Recovery (%) was calculated as follows : Recovery(%) = (Measurements of added sample - Measurements of original sample) / Added value  $\times 100$ 

Value was shown in the text.

Fig.4-1 Plots of recovery of sucrose in four fruit juices by <sup>1</sup>H qNMR with water suppressionFig.4-2 Plots of recovery of ethanol in four fruit juices by <sup>1</sup>H qNMR with water suppression

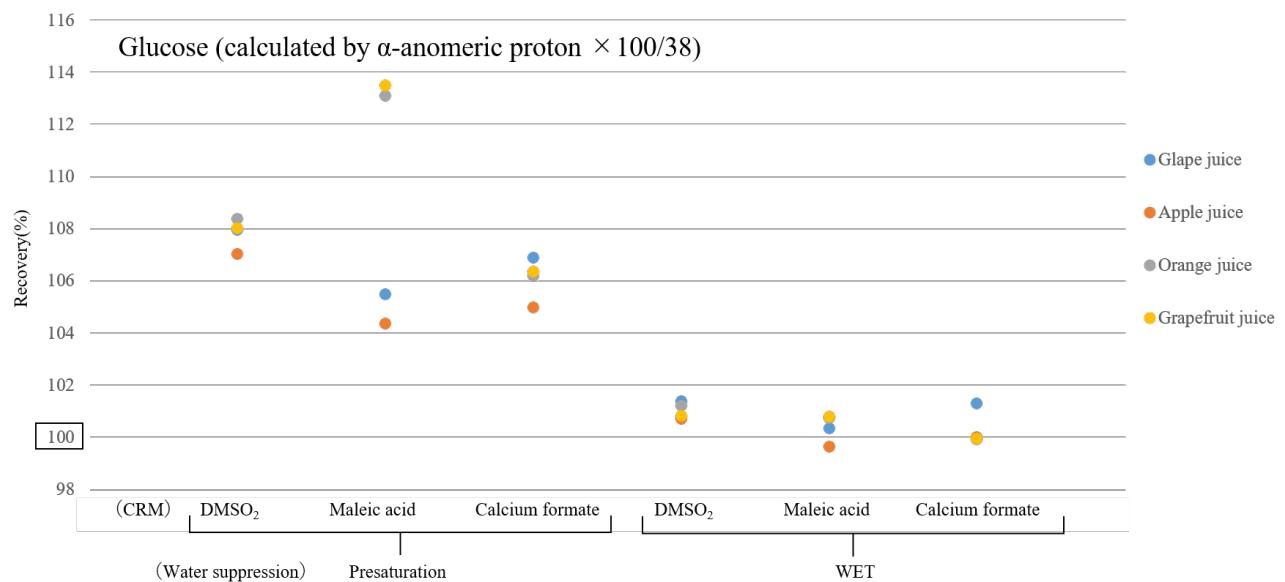


Fig.4-3 Plots of recovery of glucose calculated by  $\alpha$ -anomeric proton in four fruit juices by  $^1\text{H}$  qNMR with water suppression

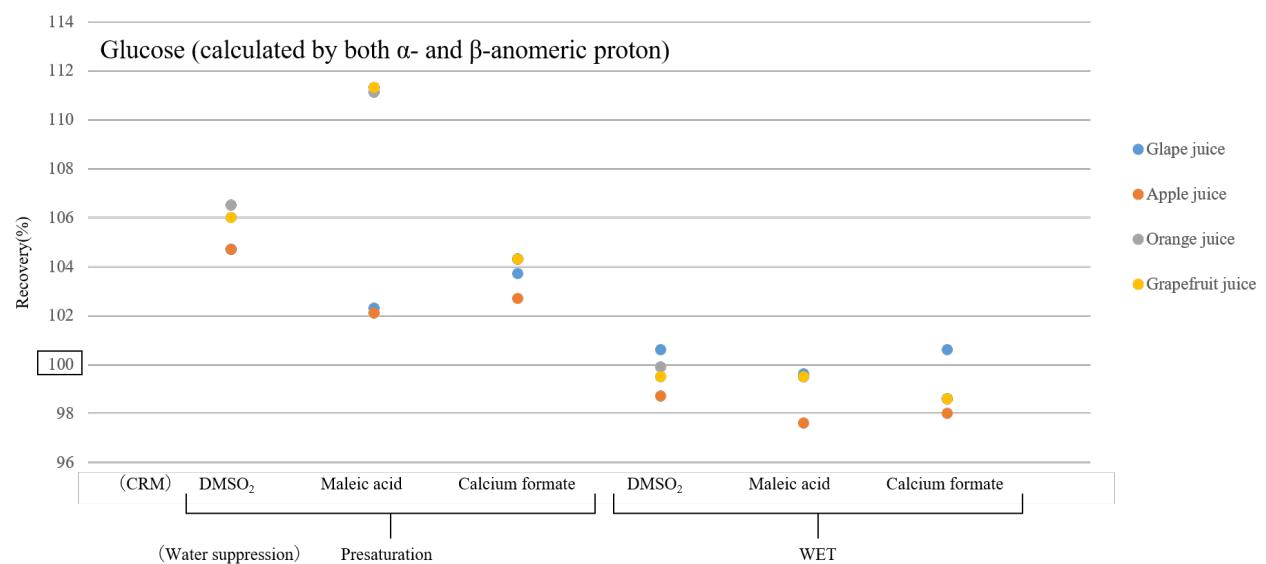


Fig.4-4 Plots of recovery of glucose calculated by both  $\alpha$ - and  $\beta$ -anomeric proton in four fruit juices by  $^1\text{H}$  qNMR with water suppression

Table 4 Acetic acid content (g/100g) in four gingers and two umeboshi measured by <sup>1</sup>H qNMR with water suppression and HPLC

Analyte	Sample	Acetic acid content (g / 100g)					
		<sup>1</sup> H qNMR with presaturation			<sup>1</sup> H qNMR with WET		
		Dimethyl sulfone	Maleic acid	Calcium formate	Dimethyl sulfone	Maleic acid	Calcium formate
	Ginger A (salted)	Not used	0.173	0.171	Not used	0.170	0.170
	Ginger B (salted)	Not used	0.606	0.609	Not used	0.604	0.606
	Ginger C (preparation)	0.427	0.426	0.428	0.427	0.428	0.438
	Ginger D (preparation)	1.02	1.02	1.01	1.02	1.01	1.03
	Umeboshi A	0.253	0.257	0.252	0.257	0.256	0.259
	Umeboshi B	0.573	0.572	0.567	0.575	0.574	0.582

Table 5 Sucrose and glucose contents (g/100g) in four fruit juices measured by <sup>1</sup>H qNMR with water suppression and HPLC

Analyte	Sample	Sucrose and glucose contents (g / 100g)					
		<sup>1</sup> H qNMR with presaturation			<sup>1</sup> H qNMR with WET		
		Dimethyl sulfone	Maleic acid	Calcium formate	Dimethyl sulfone	Maleic acid	Calcium formate
	Grape juice	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Apple juice	0.895	0.879	0.883	0.890	0.886	0.868
	Orange juice	4.23	4.23	4.16	4.18	4.17	4.15
	Grapefruit juice	2.13	2.13	2.16	2.09	2.10	2.09
	Grape juice	5.57	5.48	5.56	5.30	5.25	5.27
	Apple juice	3.05	3.00	3.00	2.88	2.86	2.89
	Orange juice	2.14	2.14	2.17	2.11	2.00	1.99
	Grapefruit juice	2.62	2.66	2.57	2.46	2.45	2.44
	Grape juice	5.49	5.40	5.48	5.18	5.13	5.17
	Apple juice	3.04	2.99	3.00	2.85	2.84	2.85
	Orange juice	2.08	2.11	2.05	1.97	1.97	1.95
	Grapefruit juice	2.54	2.58	2.50	2.40	2.40	2.38

Table 6 Ethanol content (vol%) in four fruit juices measured by <sup>1</sup>H qNMR with water suppression and distillation-vibration type densitometer method

Analyte	Sample	Ethanol content (vol%, 20 °C)					
		<sup>1</sup> H qNMR with presaturation			<sup>1</sup> H qNMR with WET		
		Dimethyl sulfone	Maleic acid	Calcium formate	Dimethyl sulfone	Maleic acid	Calcium formate
	Grape juice	0.552	0.543	0.550	0.549	0.543	0.548
	Apple juice	0.529	0.519	0.521	0.526	0.523	0.525
	Orange juice	0.578	0.586	0.568	0.578	0.576	0.573
	Grapefruit juice	0.622	0.632	0.611	0.619	0.617	0.613

Ethanol content (vol%, 20 °C) was calculated as follows : Ethanol content (vol%, 20 °C) = Ethanol content (g/100g) × density of sample (20 °C) / 0.78924

Table 7 Relative value of  $^1\text{H}$  qNMR with water suppression method against conventional methods

Analyte	Sample	Relative value ( $^1\text{H}$ -qNMR method / Conventional method)		
		$^1\text{H}$ qNMR with presaturation	$^1\text{H}$ qNMR with WET	
	Dimethylsulfone	Maleic acid	Calcium formate	
Ginger A (salted)	Not used	1.014	1.006	Not used
Ginger B (salted)	Not used	1.000	1.005	Not used
Ginger C (preparation)	<b>0.976</b>	<b>0.974</b>	<b>0.977</b>	<b>0.976</b>
Ginger D (preparation)	0.989	0.987	0.982	0.990
Umeboshi A	<b>0.976</b>	0.990	<b>0.973</b>	0.993
Umeboshi B	0.985	0.983	<b>0.975</b>	0.988
Grape juice	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Apple juice	<b>1.030</b>	1.012	1.016	<b>1.025</b>
Orange juice	1.020	<b>1.033</b>	1.002	1.007
Grapefruit juice	1.010	<b>1.025</b>	0.991	0.997
Glucose	<b>1.058</b>	<b>1.041</b>	<b>1.055</b>	1.006
Glape juice	<b>1.057</b>	<b>1.038</b>	<b>1.038</b>	0.996
Apple juice	<b>1.102</b>	<b>1.116</b>	<b>1.083</b>	<b>1.026</b>
Orange juice	<b>1.096</b>	<b>1.112</b>	<b>1.076</b>	<b>1.027</b>
Glucose (calculated by $\alpha$ -anomeric proton $\times 100/38$ )	<b>1.042</b>	<b>1.026</b>	<b>1.040</b>	0.983
Glape juice	<b>1.052</b>	<b>1.034</b>	<b>1.038</b>	0.987
Apple juice	<b>1.070</b>	<b>1.084</b>	<b>1.052</b>	1.014
Orange juice	<b>1.063</b>	<b>1.079</b>	<b>1.044</b>	1.005
Grapefruit juice				1.003
Glape juice	<b>1.042</b>	<b>1.025</b>	<b>1.038</b>	<b>1.036</b>
Apple juice	<b>1.025</b>	1.006	1.010	1.019
Orange juice	<b>1.027</b>	<b>1.041</b>	1.009	<b>1.027</b>
Grapefruit juice	<b>1.026</b>	<b>1.043</b>	1.008	<b>1.021</b>
Etanol				1.018
				1.012

Red letter means that relative value was over 1.02.

Blue letter means that relative value was under 0.98.

WET means that relative value was under 0.98. WET of sample (20 °C) / 0.78924

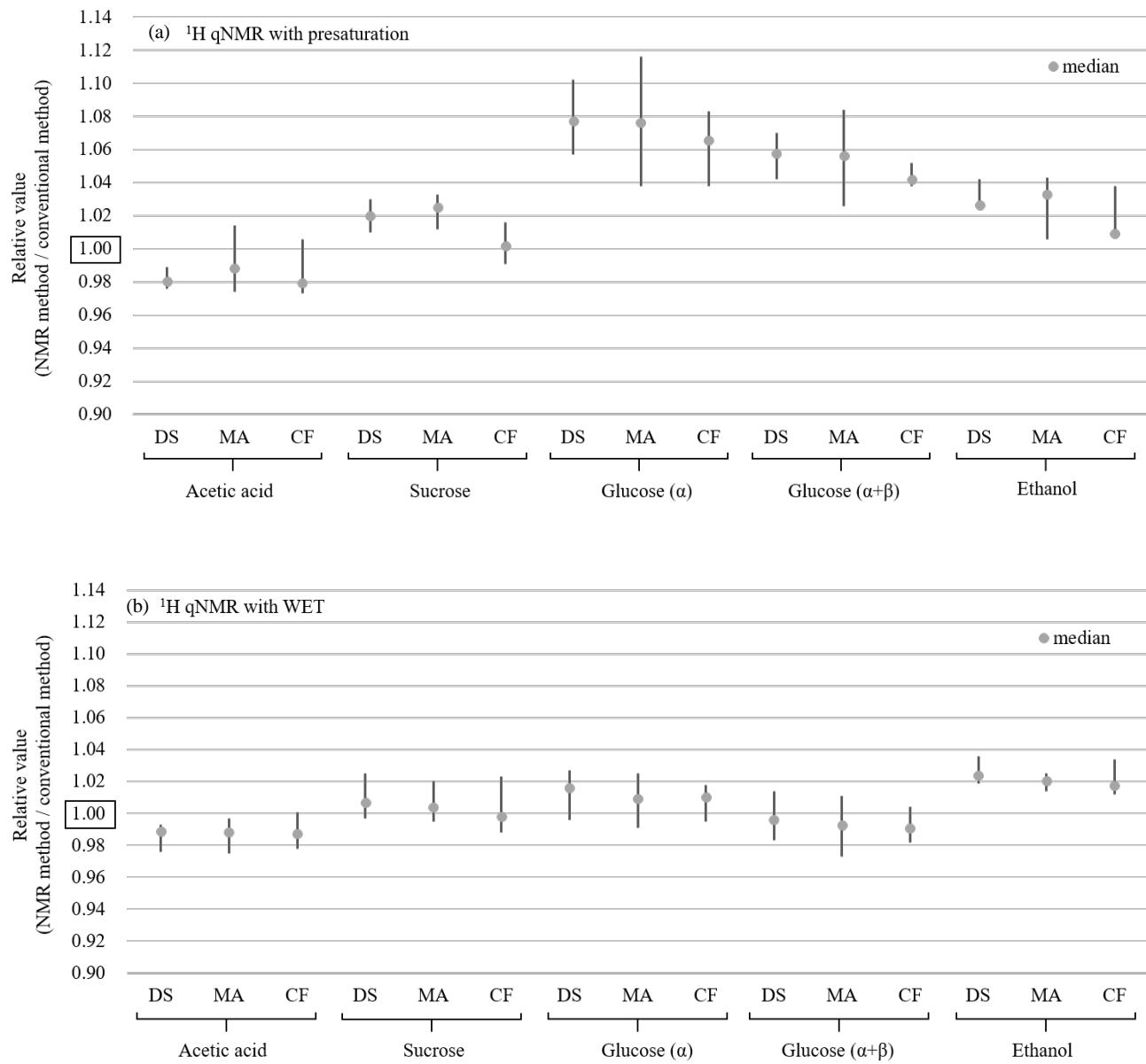


Fig 5 Range of relative value of (a) 1H qNMR with presaturation and (b) 1H qNMR with WET against conventional methods  
(DS : Dimethyl sulfone, MA : Maleic acid, CF : Calcium formate)