

201327004A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	天倉 吉章	松山大学
	水上 元	名古屋市立大学大学院
	受田 浩之	高知大学
	松井 利郎	九州大学大学院
	石川 洋哉	福岡女子大学

平成26(2014)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告書

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究	----- 1
---------------------------	---------

研究代表者: 穂山浩

### II. 分担研究報告書

#### 1. 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

1.1. 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究	----- 9
----------------------------	---------

研究協力者: 日本食品添加物協会

#### 2. 既存添加物の含有成分解析に関する研究

2.1. 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明	----- 15
------------------------------	----------

研究協力者: 多田敦子

研究分担者: 受田浩之

研究協力者: 島村智子

研究協力者: 石附京子

研究協力者: 杉本直樹

2.2. ゲンチアナ抽出物の成分研究	----- 25
--------------------	----------

研究分担者: 天倉吉章

協力研究者: 好村守生

#### 3. 既存添加物の成分規格試験法の検討

3.1. 定量NMR法の既存添加物と天然抽出物への適用に関する研究	----- 39
-----------------------------------	----------

研究分担者: 水上元

4. 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究	
4.1. 酸化防止剤力価評価におけるDPPH法の複数機関による評価・データの再解析	----- 45
研究分担者: 受田浩之	
研究協力者: 松井利郎	
研究協力者: 石川洋哉	
研究協力者: 島村智子	
研究協力者: 柏木丈拵	
4.2. 酸化防止剤の併用効果の解析に関する研究	----- 53
研究分担者: 松井利郎	
研究分担者: 石川洋哉	
研究協力者: 受田浩之	
4.3. 酸化防止剤力価評価におけるDPPH法と各種測定法との相関性に関する研究	----- 61
研究分担者: 石川洋哉	
研究分担者: 松井利郎	
研究協力者: 受田浩之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 69

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

研究代表者 穠山浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部長

研究要旨

(1) 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

第 9 版食品添加物公定書に未収載の既存添加物の中から、第 10 版公定書の作成に備え検証規格の作成を実施した。

(2) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) ゲンチアナ抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、本抽出物製品中の含有成分についての検討を行っている。今年度、新たに 7 種の既知化合物 [vanillic acid, gentisin, isogentisin, 6'-O-glucosylgentiopicroside, gentisin 7-O-primeveroside, isogentisin 3-O-primeveroside, swertiajaposide D] とともに 1 種の新規化合物 (GL-1 と仮称) を単離し、その構造を明らかにした。また、本製品の詳細な成分精査の結果、既報で有効成分として知られている amarogentin は HPLC 分析においてマイナー成分として検出されるのみであった。

2) 抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 5 活性画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 6 活性画分につき、さらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。この内、3 種の抗酸化活性画分につき、UPLC/TOF-MS を用いて、活性に重なるピークとカンゾウからの単離標品との詳細な比較検討を行い、それぞれ licochalcone B、licochalcone D、hispaglabridin A であることを明らかにした。

(3) 既存添加物の成分規格試験法の検討

既存添加物中の指標成分の定量分析への定量 NMR 法の適用について検討した。カンゾウ抽出物中の甘味成分である glycyrrhizic acid について、市販標準品の純度を qNMR 法によって評価するとともに、カンゾウ抽出物中の含量測定を試みた。

(4) 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

1) 既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価標準法としての DPPH 法の適用性を検討するために、4 種類の既存添加物と Trolox を分析試料として用い、14 か所の試験機関による評価研究を行った。DPPH 法の改良プロトコルを用いた複数機関による評価研究では、同一試験機関内での再現性が極めて高いことが判明した。

2) DPPH 法においてカテコール・ピロガロール構造がいずれも相乗効果の発現に重要な因子となっており、相乗効果の程度はカテコール類の方がピロガロール類より高くなることが示された。

3) DPPH 法でアセトニトリル系の活性測定を試み、カテコール化合物の活性値の低下が著しいことが判明し、水／エタノール系でのカテコール構造の再生が DPPH 法での活性値の増加の直接的原因であることが示唆された。また DPPH 法と WST-1 法の活性値を比較検証し、両者の活性値に高い相関は得られなかったが活性傾向は類似していることが判明した。キサランチンオキシダーゼの阻害効果が WST-1 法の活性値に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

## 研究分担者

天倉 吉章	松山大学薬学部 教授
水上 元	名古屋市立大学大学院薬学研究科教授
受田 浩之	高知大学教育研究部自然科学系生命環境医学部門 教授
松井 利郎	九州大学大学院農学研究院 教授
石川 洋哉	福岡女子大学国際文理学部 准教授

## 研究協力者

上田 要一	日本食品添加物協会 専務理事
村田 義文	日本食品添加物協会 常務理事
杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所 室長
伊藤 裕才	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
多田 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
石附 京子	国立医薬品食品衛生研究所
秋山 卓美	国立医薬品食品衛生研究所 室長
好村 守生	松山大学薬学部 講師
山上 沙織	松山大学薬学部 助手
島村 智子	高知大学教育研究部自然科学系生命環境医学部門 准教授
柏木 丈拡	高知大学教育研究部自然科学系生命環境医学部門 准教授

## A. 研究目的

既存添加物 365 品目のうち、国の成分規格設定済は第 8 版食品添加物公定書までで約 130 品目にとどまっている。第 9 版公定書に新規収載が期待される約 90 品目（約 60 品目の酵素を含む）を除くと、まだ約 140 品目の成分規格が未設定である。規格設定が困難な品目が残ったと言える。これまでに我々は厚生労働科学研究において、成分規格設定に必要な基礎情報を得るために、有効性と基原の確認を行いながら有効成分の解明と有効性評価試験法の開発に取り組んできた。

本研究では、(1) 国の成分規格が設定されていない既存添加物約 140 品目について、今後の成分規格作成の技術的実現性を調査研究する。それにより、既存添加物の今後の成分規格作成の優先順序を判断する。(2) 今後規格設定する価値があり、かつ技術的に可能と考えられる品目については、含有成分の解析と基原（製造原料）確認及び成分規格試験法の検討を進める。(3) 規格試験として抗酸化活性測定法の導入が必要なものは、含有成分の分離分析ができない酸化防止剤製品である。それらの品目を対象にして、DPPH 法、WST-1 法などの抗酸化活性測定法を用いた酸化防止剤の規格試験法素案を作成する。

## B. 研究方法

(1) 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

平成25年度は、これまでの検討により規格として整備が進み、国の成分規格に移行が可能と思われる既存添加物を対象に検証用の規格を作成し、併せて検証のための試料収集を行った。

(2) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

以下の条件に該当する品目を検討対象候補として、含有成分の解析、品質評価に有効な指標成分の検討を行う。国の成分規格が設定されている品目についても、成分規格の改善が必要と考えられる場合には検討対象候補とする。研究成果を規格試験法開発と成分本質の定義設定などに反映させる。今年度は、ゲンチアナ抽出物の含有成分分析

とカンゾウ油性抽出物中の抗酸化活性成分の分析を検討した。

### (3) 既存添加物の成分規格試験法の検討

国の成分規格が未設定な品目のうちで成分規格を設定する価値があると考えられる品目であり、かつ品質確保の指標となる成分（主有効成分、不純物など）が明らかになっている品目については、有効成分の規格試験法を検討する。

今年度は、カンゾウ抽出物中の glycyrrhizic acid の定量 NMR による分析を試みた。

### (4) 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

成分規格試験法に利用できる抗酸化活性標準操作法を確立することをめざして、以下の3項目の検討を行う。

#### 1. DPPH 法による酸化防止剤評価方法の確立

既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価標準法としての DPPH 法の適用性を検討するために、4種類の既存添加物と Trolox を分析試料として用い、14か所の試験機関による評価研究を行った。

#### 2. 抗酸化活性メカニズムの解析

Median effect analysis を用いて、各種酸化防止剤の併用効果の解析を試みた。本年度は、特にチオール化合物（グルタチオン、システイン）と各種抗酸化物（15種）の併用効果の解析を行った。

#### 3. DPPH 法と各種測定法との相関性に関する研究

DPPH 法での溶媒効果を明らかにするために、アセトニトリル系での活性測定を試み、水/エタノール系での活性値と比較した。また DPPH 法と WST-1 法の活性値を比較検証した。

#### 倫理面への配慮

特になし

## C. 研究結果

(1) 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

#### 1) 成分規格の検討

既存添加物 365 品目中、第 8 版食品添加物公定書

に記載されている 128 品目と第 9 版食品添加物公定書に記載される予定の 87 品目を除いた 150 品目から 168 規格及び一般飲食物添加物 23 品目について第 10 版公定書に向けて成分規格の検証用規格の作成検討を行った。更に、第 5 版自主規格への収載を目指して自主規格の検討を行った。

#### 2) 検証用成分規格の作成と試料の収集

既存添加物 150 品目 168 規格及び一般飲食物添加物 23 品目から既存添加物 27 規格と一般飲食物添加物 8 規格の合計 35 規格について成分規格検証用の規格案を作成した。作成した規格の部会別規格数を表にまとめた。

#### 3) 第 5 版自主規格案の作成

第 9 版食品添加物公定書後に残ると考えられる既存添加物から、更に検証用規格を作成したものを除き、第 5 版自主規格の作成を検討した。本年度は成分規格案を作成するために必要な情報がある程度集まった 27 規格を作成した。また、第 4 版自主規格にあったものの中で、今回の見直しに際し情報が得られず、見直しが出来なかった 25 規格については暫定規格とした。作成した規格及び暫定規格を部会毎に収載した。

#### (2) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) ゲンチアナ抽出物製品をメタノールに溶解させて HPLC 分析を行った結果、また、液-液分配による分画物を調製し、得られた各エキス（n-ヘキサン、酢酸エチル、n-ブタノール、水分画物）についての HPLC 分析を行った。さらに、今回の成分精査で得られた各化合物を標品として同条件で分析比較を行った結果、本添加物製品中の主成分は gentiopicoside (7)、loganic acid (8)、sweroside (9) の 3 成分であることが明らかとなった。一方、既報で有効成分として知られる amarogentin はマイナー成分として検出された。

2) カンゾウ油性抽出物の UPLC/TOF-MS による抗酸化活性画分の主ピーク成分の解析

2 段階目の HPLC 分画画分の内、抗酸化活性が強く認められた画分について、活性に重なる主ピ

ークの UPLC/TOF-MS 測定を行った。2 段階目の HPLC 分画で抗酸化活性が強かった画分について、活性に重なる主ピークを UPLC/TOF-MS で分析し、分子式を推定した。文献で報告のあるカンゾウ成分を調べ、カンゾウからの単離標品を入手した。入手した単離標品と活性画分の主ピークにつき、保持時間、精密質量、UV スペクトルを比較した。

KZ01-frc11-⑦と KZ34-frc11-⑦の各主ピーク化合物は、UPLC/TOF-MS により、いずれも  $m/z$  287.0926 (pos.), 285.0782 (neg.) であると判明し、 $C_{16}H_{14}O_5$  のプロトン付加分子イオンの理論値  $m/z$  287.0919 [ $C_{16}H_{14}O_5+H$ ]<sup>+</sup> および脱プロトン分子イオンの理論値  $m/z$  285.0763 [ $C_{16}H_{14}O_5-H$ ] とミリマスオーダーで一致し、これら化合物の組成式を  $C_{16}H_{14}O_5$  と推定した。次に、この分子式を持つカンゾウ由来の単離標品として licochalcone B を入手し、UPLC/TOF-MS で測定した。その結果、UV、MS スペクトル、精密質量、保持時間がいずれも一致したため、KZ01 及び KZ34 の各 frc11-⑦の主ピーク化合物は licochalcone B と判明した。

同様に、KZ01-frc28-⑥の主ピーク化合物は、UPLC/TOF-MS により  $C_{21}H_{22}O_5$  と推定され、さらにカンゾウからの licochalcone D 単離標品との UV、MS スペクトル、精密質量、保持時間の比較を行い、licochalcone D と判明した。KZ01-frc31-④の主ピーク化合物は、同じ分子式と推定されたが、UV スペクトルが異なり、licochalcone D とは異なる物質であった。また、KZ34-frc52-④の主ピーク化合物は UPLC/TOF-MS により  $C_{25}H_{28}O_4$  と推定され、さらにカンゾウからの hispaglabridin A 単離標品との UV、MS スペクトル、精密質量、保持時間の比較を行い、hispaglabridin A と判明した。

### (3) 既存添加物の成分規格試験法の検討

1) qHNMR 法による純度評価を行った glycyrrhizic acid 試薬について、0.200 mg/ml 溶液を作成し、その 10 ml を用いて HPLC で分析した時の glycyrrhizic acid に相当するピークの面積と qHNMR 法によって求めた純度の相関性を

検討した。その結果、両者は高い相関性を示していた。カンゾウ抽出物中の glycyrrhizic acid 含量を qHNMR 法を用いて直接測定することを試みた。医薬品製造原料として用いられるカンゾウ抽出物では glycyrrhizic acid の H12 由来のシグナルが明瞭に分離したピークとして観察され、これを利用した定量が可能であった。

### (4) 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

1) チャ抽出物、ブドウ種子抽出物、エンジュ抽出物、 $d$ - $\alpha$ -トコフェロールの  $IC_{50}$  に関する検証では、エンジュ抽出物の結果のうち、1つの試験機関 L が外れ値と判断された。これは当該試験機関の  $IC_{50}$  の平均値が他と比較して大きいことが原因であった。4つの酸化防止剤に関する室内再現相対標準偏差 ( $RSD_I$ ) は 2.2-2.9%、室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) は 3.1-11% となった。TEAC に関する室内再現相対標準偏差 ( $RSD_I$ ) は 2.1-2.5%、室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) は 3.7-9.3% となった。

2) グルタチオン・システインいずれとの併用時も、フェルラ酸、ケンフェロール以外の 13 種の抗酸化物との組合せで高い相乗効果が確認された。また、供試した濃度範囲によって効果が異なり、より高濃度域において CI 値が小さくなる傾向、すなわち高濃度域で大きな相乗効果を発現することが確認された。相乗効果を示した化合物群は、いずれも分子内にカテコールあるいはピロガロール構造を有していることが明らかになった。

3) DPPH 法での溶媒効果を明らかにするために、アセトニトリル系での活性測定を試み、水/エタノール系での活性値と比較した。その結果、アセトニトリル系では、カテコール化合物の活性値の低下が著しいことが判明し、水/エタノール系でのカテコール構造の再生が DPPH 法での活性値の増加の直接的原因である可能性が強く示唆された。続いて、DPPH 法と WST-1 法

の活性値を比較検証したところ、両者の活性値に高い相関は得られなかったが活性傾向は類似していることが判明した。さらに、キサントンオキシダーゼの阻害効果が WST-1 法の活性値に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

#### D. 考察

##### (1) 既存添加物の成分規格作成の技術的実現性に関する調査

本年度は、既存添加物及び一般飲食物添加物の中から第10版食品添加物公定書収載をめざし35規格の検証用規格を作成した。この35規格については検証のための試料の収集も併せて行った。今後、検証結果を踏まえ、更に規格の完成に向けて検討を進める。また、更に検証を実施する品目を増やすための検討を進める。

残された既存添加物及び一般飲食物添加物については第5版自主規格の作成を目指して検討を行った。このうち27品目は成分規格案の作成ができたが、第4版自主規格に収載したものの中から25品目については見直しに対し、全く情報の収集ができなかった。このためこれらの規格は暫定規格とした。今後必要な情報を得るためにさらなる工夫が必要であると共に、流通実態の有無についても見極める必要がある。

現段階において、未だ104品目について必要な情報の収集が出来ていない。平成26年度では、第10版食品添加物公定書収載を目指して更に検証用の規格を作成し試料の収集を進めると共に、既存添加物の自主規格の整備と改良に関する検討を継続する。

##### (2) 既存添加物の含有成分解析に関する研究

1) 今回の成分精査の結果、キサントン類、キサントン配糖体、イリドイド配糖体を単離するとともに、1種の新規化合物を単離し、その構造を明らかにした。また、HPLCを用いた成分分析において、本製品中の主成分は gentiopicroside、loganic acid、swerosideであることを明らかにした。一方、有効成分として報告されている amarogentin は、本製品中には微量しか含まれて

いなかった。amarogentin は、ゲンチアナ末（局方品）から調製した各種抽出エキス中にも微量しか検出されなかったことから、このことは調製方法に起因するものではないと考えられる。

2) 3種の抗酸化活性画分につき、UPLC/TOF-MSを用いて、活性に重なるピークとカンゾウからの単離標品との詳細な比較検討を行い、それぞれ licochalcone B、licochalcone D、hispaglabridin A であることを明らかにした。

##### (3) 既存添加物の成分規格試験法の検討

製品について、第16改正日本薬局方に収載された HPLC 法を用いて glycyrrhizic acid 含量を定量したところ、qHNMR 法による値とは必ずしも一致せず、後者による定量値が高くなる傾向を示した。

##### (4) 天然酸化防止剤の抗酸化活性規格試験法開発に関する研究

室内再現相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) の値は IC<sub>50</sub> と TEAC 共に 3.0% 以下であったことから、本 DPPH 法による分析は同一試験機関内の再現性が極めて高いことが判明した。

カテコール・ピロガロール構造がいずれも相乗効果の発現に重要な因子となっており、相乗効果の程度はカテコール類>ピロガロール類となることが示された。上述の通り、抗酸化物間での相乗効果には、抗酸化物の再生効果が大きく関わっていると推測される。今回の実験結果は、それを強く支持するものであった。

溶媒効果においてアセトニトリル系ではカテコールの再生反応の抑制に起因すると考えられる活性値の低下が顕著に現れる結果となった。この結果から DPPH 法での反応系における溶媒の役割と各種抗酸化物の反応特性が明らかとなり、抗酸化物のカテコール・ピロガロール構造の重要性をあらためて確認することができた。WST-1 法ではキサントンオキシダーゼの作用が引き金となってスーパーオキシドが生じる反応を利用するため、キサントンオキシダーゼの阻害は結果として WST-1 試薬の発色を低下させ、見かけ上活性値を増大させるものと推察していた。しかしながら、高いキサントンオキシダーゼ阻害活性を示したケルセチ



ンなどは、本 WST-1 法では期待されるよりも総じて低い活性値を示した。キサントキシンオキシダーゼの阻害効果が WST-1 法の活性値に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

## 結論

第 9 版食品添加物公定書に未収載の既存添加物の中から、第 10 版公定書の作成に備え検証規格の作成を実施した。

ゲンチアナ抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、本抽出物製品中の含有成分についての検討を行っている。今年度、新たに7種の既知化合物とともに1種の新規化合物を単離し、その構造を明らかにした。また既報で有効成分として知られている amarogentin は HPLC 分析においてマイナー成分として検出されるのみであった。

抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来のカンゾウ油性抽出物製品の5活性画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来のカンゾウ油性抽出物製品の6活性画分につき、さらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。この内、3種の抗酸化活性画分につき、UPLC/TOF-MS を用いて、活性に重なるピークとカンゾウからの単離標品との詳細な比較検討を行い、それぞれ licochalcone B、licochalcone D、hispaglabridin A であることを明らかにした。

*Glycyrrhizic acid* の 12 位の水素由来のシグナルを用いて市販の *glycyrrhizic acid* 試薬の純度を評価できた。同じプロトンシグナルを用いて、カンゾウ抽出物製品中の *glycyrrhizic acid* 含量を直接定量することを試みたが、夾雑物に由来するシグナルやベースラインのゆがみによって正確な定量は困難であることがわかった。qHNMR 法によって純度評価を行った *glycyrrhizic acid* 標準品を用いる HPLC 法による定量が望ましいものと思われる。

DPPH 法は既存添加物に分類される酸化防止剤の力価評価の標準法として適用可能であると判断した。チオール化合物と各種抗酸化物との併用効果を、Median effect analysis を用いて解析したところ、チオール化合物との併用時にカテコール・ピ

ロガロール構造を有する抗酸化物が大きな相乗効果を発現することが明らかになった。各種抗酸化物の反応特性に及ぼす溶媒効果を検証した結果、水/エタノール溶媒中ではカテコール・ピロガロール構造の再生反応が生じ、活性値が増加する傾向になることが確認された。続いて、DPPH 法と WST-1 法の活性相関を検討した結果、両者の相関は高くないものの類似した活性傾向を示すことが明らかになった。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) A. Tada, K. Ishizuki, J. Iwamura, H. Mikami, Y. Hirao, I. Fujita, T. Yamazaki, H. Akiyama and Y. Kawamura Improvement of the Assay Method for Steviol Glycosides in the JECFA Specifications; American Journal of Analytical Chemistry, 4, 190-196 (2013)
- 2) Bang, T. H., Suhara, H., Doi, K., Ishikawa, H., Fukami, K., Parajuli, G. P., Katakura, Y., Yamashita, S., Watanabe, K., Adhikari, M. K., Manandhar, H. K., Kondo, R., Shimizu, K., Wild Mushroom in Nepal: Some potential Candidates as Antioxidant and ACE Inhibition Sources, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, in press (2014)
- 3) 山内良子, 深水さやか, 小浜友紀子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穂山 浩, 松井利郎, 石川洋哉. 酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH および ABTS ラジカル消去能評価法の特長比較. 日本食品保蔵科学会誌, 2014 (印刷中)

### 2. 学会発表

#### 2. 学会発表

- 1) 多田敦子, 石附京子, 末松孝子, 有福和紀, 伊藤裕才, 大槻 崇, 大月典子, 吉松嘉代, 川原信夫, 山崎 壮, 杉本直樹, 穂山 浩. カンゾ

ウ油性抽出物の成分組成に基づく解析. 食品化学学会第 19 回総会・学術大会 (2013.8)

- 2) 多田 敦子, 石附 京子, 島村 智子, 受田 浩之, 深井 俊夫, 山崎 壮, 杉本 直樹, 穠山 浩. 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性要因と寄与率. 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)
- 3) 好村 守生, 天倉 吉章, 吉田 隆志, 多田敦子, 伊藤 裕才, 杉本 直樹, 山崎 壮, 穠山 浩. 既存添加物「ゲンチアナ抽出物」の成分研究. 日本生薬学会第 60 回年会 (2013.9)
- 4) 山元涼子, 藤田睦, 山内良子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穠山浩, 松井利郎, 石川洋哉. Median effect analysis によるチオール化合物と各種抗酸化物の第 50 回化学関連支部合同大会 (2013.7)
- 5) 山内良子, 小浜友紀子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穠山 浩, 松井利郎, 石川洋哉. 酸化防止剤評価における各種抗酸化測定法の相関. 第 62 回日本食品保蔵科学学会大会 (2013.6)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

平成25年度 既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

— 既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

日本食品添加物協会

# 研究報告書

平成25年度 既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

## —既存添加物の成分規格の設定に関する調査研究—

業務受託者	上田 要一	所属	日本食品添加物協会	役職	専務理事
研究者	村田 義文	所属	日本食品添加物協会	役職	常務理事

### [はじめに]

既存添加物365品目中、成分規格の定められているものは、128品目(130規格)にすぎず、約240品目(約250規格)については、未設定の状況にある。第9版食品添加物公定書は87品目(87規格)が収載される予定であるが、なお、約150品目(約160規格)が未設定の状況で残る。

当協会は、これまでも既存添加物の食品添加物公定書への新規収載を目標に、自主規格の策定を進めてきた。

平成20年度は、第8版食品添加物公定書の公表を機に、既存添加物等の自主規格案の策定・蓄積結果の集大成及び既収載規格の見直しを実施し、「第4版既存添加物自主規格」を刊行し、既収載の142品目(既存添加物123品目及び一般飲食物添加物19品目)に加えて78品目を新規収載した。

また、既存添加物について自主規格案の策定検討及び見直し検討を推進してきた。

しかしながら、国の成分規格が設定されていない既存添加物については、

- ・業界自主規格がない、またはあっても質が不十分
- ・添加物としての有効性と有効成分自体が不明確
- ・食品添加物としての流通実態が不明確
- ・正しい基原の原材料が使用されていることの確認が不十分

といった品目が多いことが指摘されている。これまでは、国が業界自主規格を技術的に検証した上で国の成分規格として整備してきた。今後も上述の約150品目については、規格設定が困難な品目が残ったと言えるが着実な成分規格の作成が必要である。一方、今後の第10版食品添加物公定書の作成に向けて、現在の自主規格から規格の検証作業を進める必要がある。そこで、第10版公定書に向けた検証作業のための規格作成および第5版自主規格に向けた成分規格作成の調査研究を行うこととした。

本年度は、第9版食品添加物公定書に未収載の既存添加物の中から、第10版公定書の作成に備え検証規格の作成を実施した。また、第5版自主規格案の作成を進めた。

## 研究結果の概要と考察

### 1. 研究方法

#### (1) 既存添加物の第10版公定書に向けた検証用規格の作成

平成25年度は、これまでの検討により規格として整備が進み、国の成分規格に移行が可能と思われる既存添加物を対象に検証用の規格を作成し、併せて検証のための試料収集を行った。

##### ① 調査対象とする添加物

本年度は表1に示した35品目について調査を行った。

② 調査内容

検証用の成分規格の作成、および検証用資料の収集。

(2) 既存添加物の第5版自主規格に向けた成分規格の検討

成分規格が設定可能なものから、前項の検証用とできなかった品目について自主規格案を作成した。

① 調査対象とする添加物

表2に示した、第4版自主規格成分規格未設定のもの又は再整備をしたものを合わせて27品目について成分規格案を作成した

② 調査内容

成分規格案、規格設定の根拠(海外規格を含む各種規格との対比)

2. 調査研究者

これら評価・検討を行った自主規格専門委員会、規格専門委員会及び部会担当のメンバーは別紙に記したとおりである。

3. 研究結果の概要

(1) 成分規格の検討

既存添加物365品目中、第8版食品添加物公定書に記載されている128品目と第9版食品添加物公定書に記載される予定の87品目を除いた150品目から168規格及び一般飲食物添加物23品目について第10版公定書に向けて成分規格の検証用規格の作成検討を行った。更に、第5版自主規格への掲載を目指して自主規格の検討を行った。

検討の状況を部会別及び品目別の表にまとめた。

(2) 検証用成分規格の作成と試料の収集

① 成分規格検証用規格案作成品目

前記既存添加物150品目168規格及び一般飲食物添加物23品目から既存添加物27規格と一般飲食物添加物8規格の合計35規格について成分規格検証用の規格案を作成した。作成した規格の部会別規格数を表にまとめた。

部会	分野	規格数(一般飲食物添加物)
第1部会	甘味料	1
第2部会	着色料	11(8)
第3部会	保存料・日持向上剤	5
第4部会	増粘安定剤	3
第5部会	酸化防止剤・ビタミン	1
第6部会	ガムベース・光沢剤	2
第7部会	酵素	1
第9部会	調味料・苦味料	2
第10部会	乳化剤	1
第13部会	製造用剤・ミネラル	8

② 成分規格案(部会別)

各品目の成分規格案は第9版食品添加物公定書に準ずる形で作成し、部会別に整理して掲載した。

(3) 第5版自主規格案の作成

第9版食品添加物公定書後に残ると考えられる既存添加物から、更に検証用規格を作成したものを除き、第5版自主規格の作成を検討した。

本年度は成分規格案を作成するために必要な情報がある程度集まった27規格を作成した。また、第4版自主規格にあったものの中で、今回の見直しに際し情報が得られず、見直しが出来なかった25規格については暫定規格とした。

作成した規格及び暫定規格を部会毎に収載した。

#### 4. 考察

本年度は、既存添加物及び一般飲食物添加物の中から第10版食品添加物公定書収載をめざし35規格の検証用規格を作成した。この35規格については検証のための試料の収集も併せて行った。今後、検証結果を踏まえ、更に規格の完成に向けて検討を進める。また、更に検証を実施する品目を増やすための検討を進める。

残された既存添加物及び一般飲食物添加物については第5版自主規格の作成を目指して検討を行った。このうち27品目は成分規格案の作成ができたが、第4版自主規格に収載したものの中から25品目については見直しに対し、全く情報の収集ができなかった。このためこれらの規格は暫定規格とした。今後必要な情報を得るためにさらなる工夫が必要であると共に、流通実態の有無についても見極める必要がある。

現段階において、未だ104品目について必要な情報の収集が出来ていない。平成26年度では、第10版食品添加物公定書収載を目指して更に検証用の規格を作成し試料の収集を進めると共に、既存添加物の自主規格の整備と改良に関する検討を継続する。

本年度の調査研究に際しては、国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の穂山先生をはじめとする諸先生方には多大なるご指導をいただいた。この場をお借りし心より感謝申しあげる次第である。

以上

## 別紙

## 調査研究者名簿

	氏名	企業名
技術委員長	村田義文	日本食品添加物協会
自主規格専門委員長、部会長・部会担当	伊藤秀行	理研ビタミン株式会社
規格専門委員長	斎藤知明	MCフードスペシャリティーズ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山本正次	丸善製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島光一	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	西宮隆	株式会社タイショーテクノス
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	大本俊郎	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	橋本成久	太陽化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	山田裕之	DSP五協フード&ケミカル株式
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	植田実木生	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	増田哲也	エーザイフード・ケミカル株式会
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	尾崎史浩	株式会社ロッテ
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	卯津羅健作	ナガセケムテックス株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小川知成	天野エンザイム株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	岩間保憲	扶桑化学工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	香村正徳	味の素株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	廣田佳卓	花王株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	小野茂一	大宮糧食工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	坂井昭浩	オルガノフードテック株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	村上和也	富田製薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	深尾正	日本新薬株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	関谷史子	高砂香料工業株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	稲井隆之	長谷川香料株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	阿部貴宏	三菱化学株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	田中正剛	ダイワ化成株式会社
自主規格・規格専門委員、部会長・部会担当	中島敏貴	上野製薬株式会社
技術委員	大橋篤志	小川香料株式会社
技術委員	岡本隆広	エーザイフード・ケミカル株式会
技術委員	佐藤祐一	太陽化学株式会社
技術委員	義平邦周	三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
技術顧問	山田隆	日本食品添加物協会
技術顧問	高橋仁一	日本食品添加物協会

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質評価と規格試験法の開発に関する研究

平成 25 年度分担研究報告書

既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明

研究協力者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官  
研究協力者 受田浩之 高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 教授  
研究協力者 島村智子 高知大学教育研究部総合科学系生命環境医学部門 准教授  
研究協力者 石附京子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部  
研究協力者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 室長

研究要旨 前年度の研究において、カンゾウ油性抽出物の主要成分による全体の抗酸化力価への寄与率は低いことが明らかとなった。また、HPLC による分離・分画後、各画分の活性測定を行った結果、他の抗酸化成分の存在が強く示唆された。そこで今年度は、抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 5 活性画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 6 活性画分につき、さらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。この内、3 種の抗酸化活性画分につき、UPLC/TOF-MS を用いて、活性に重なるピークとカンゾウからの単離標品との詳細な比較検討を行い、それぞれ licochalcone B、licochalcone D、hispaglabridin A であることを明らかにした。

#### A. 研究目的

既存添加物カンゾウ油性抽出物は、天然由来の酸化防止剤である。食品添加物公定書未収載品目であり、今後、規格作成を行う上で、有効成分（抗酸化活性成分）に関する詳細な情報が必要とされている。しかし、カンゾウの抗酸化活性成分として glabridin や licochalcone A は知られているが、本抽出物製品中の両物質及び他の物質の抗酸化活性寄与率のみならず、本抽出物製品自体の抗酸化力価も評価されておらず、規格作成に十分な情報が無い。

前年度の研究<sup>1)</sup>において、カンゾウ油性抽出物の主要成分による全体の抗酸化力価への寄与率は低いことが明らかとなった。また、HPLC による分離・分画後、各画分の活性測定を行った結果、他の抗酸化成分の存在が強く示唆された。

そこで本研究では、抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 5 活性画分及び

*Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 6 活性画分につき、さらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。また、3 種の抗酸化活性画分につき、UPLC/MS を用い、活性に重なるピークの詳細な解析を行った。

#### B. 研究方法

##### B-1. 試料

日本食品添加物協会を通じて供与されたカンゾウ油性抽出物 2 製品 KZ01 (*G. inflata* 由来と記載、褐色粉末)、KZ34 (*G. glabra* 由来と記載、褐色塊) を使用した。

##### B-2. 試薬

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は Aldrich 製の試薬を使用した。また、DPPH は Sigma 社製の試薬を使用し



た。カンゾウ成分単離標品としては、横浜薬科大学(深井教授)より供与されたものを使用し、NMRにより構造を確認して用いた(図1)。

NMR測定用重溶媒にはメタノール- $d_4$ 、アセトン- $d_6$ 、クロロホルム- $d$ (Isotec社製)を用いた。

上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品あるいはHPLC用を使用した。

### B-3. DPPHラジカル消去活性測定

#### 1) DPPHラジカル消去活性測定手順

試験管、またはサンプリングチューブに試料溶液 200  $\mu$ L と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800  $\mu$ L を添加して混合し、そこに DPPH 溶液 1 mL を加え、直ちに試験管ミキサーで 10 秒間攪拌した。その後、室温暗所にて静置した。DPPH 溶液の添加から正確に 30 分後に 517 nm の吸光度を測定した。吸光度測定のパラック溶液には 99.5% エタノール 1.2 mL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800  $\mu$ L の混合液を用いた。

試料溶液添加時の吸光度を  $A_s$ 、試料溶液の代わりに 99.5%エタノールを添加した際の吸光度を  $A_c$  とし、次の計算式から阻害率 (%) を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

#### 2) IC<sub>50</sub>の算出方法

各試料の IC<sub>50</sub> の算出は以下の手順に従って行った: ① 試料濃度 (x) に対して阻害率 (y) をプロットし、回帰直線 ( $y = ax + b$ ) を引いた。② 50% の阻害率を挟む 2 点を選び出し、その 2 点を通る回帰直線 ( $Y = AX + B$ ) を引いた。③ ②の回帰式の Y に 50 を代入した際の X (試料濃度) を求めた。④ 3 回の繰り返し測定で求められた③の値の平均値を求めた。これを試料の IC<sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) とした。

#### 3) Trolox 等価活性算出方法

試料の IC<sub>50</sub> が Trolox の IC<sub>50</sub> と同一の活性を有しているとみなし、各試料の DPPH ラジカル消去活性を Trolox 等価活性 (TEAC) で示すこととした。算出には以下の式を用いた。

TEAC =

$$\text{Trolox の IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{試料の IC}_{50} (\mu\text{g/mL})$$

### B-4. 試料溶液の調製

食品添加物製品 KZ01、KZ34 は、昨年度の報告<sup>1)</sup>で抗酸化活性が強かった HPLC 分取画分の液をそれぞれ集め、減圧濃縮し、以下の分取 HPLC 条件の移動相により再希釈して、2 段階目の分画に供した。

### B-5. カンゾウ油性抽出物の HPLC による分画

カンゾウ油性抽出物 (KZ01、KZ34) の HPLC による 2 段階目の分画は下記の条件で実施した。

**装置** 分取 HPLC (島津製作所製) : LC-10AD、SCL-10A VP、DGU-12A、SIL-10A、SPD-M10AVP、CTO-10A、FRC-10A。

**LC 条件** カラム : Inertsil ODS-3 (10 $\times$ 250 mm、5  $\mu$ m、GL Science 製)、カラム温度 : 35 $^{\circ}$ C、移動相 : 0.05% ギ酸を含むアセトニトリル (MeCN) 又は 0.05% ギ酸を含むメタノール (MeOH) (isocratic)、流速 : 5 mL/min、注入量 : 400  $\mu$ L、検出 : 200–500 nm。

なお、1 段階目の各 HPLC 分画物の 2 段階目 HPLC 分離時の移動相中の有機溶媒濃度と種類、及び分取条件はそれぞれ以下に示す。

KZ01 Frc. 11 (40% MeOH、15~55 分を 42 分画)、Frc. 28 (38% MeCN、20~55 分を 56 分画)、Frc. 31 (42% MeCN、25~55 分を 58 分画)、Frc. 34 (45% MeCN、25~55 分を 57 分画)、Frc. 37 & 38 (52% MeCN、10~30 分を 62 分画)

KZ34 Frc. 1 (40% MeOH、15~55 分を 42 分画) 1、Frc. 25 (35% MeCN、25~55 分を 48 分画)、Frc. 32 (42% MeCN、15~50 分を 37 分画)、Frc. 37 (45% MeCN、20~60 分を 42 分画)、Frc. 44 & 45 (54% MeCN、18~58 分を 63 分画)、Frc. 52 (60% MeCN、15~50 分を 37 分画)。

### B-6. UPLC/TOF-MS による分析方法

**装置** 高速液体クロマトグラフ/質量分析計

(LC/PDA/TOF-MS、Waters 社製) : ACQUITY H-CLASS、ACQUITY UPLC e- $\lambda$  PDA、XEVO-G2 QTOF

**LC 条件** カラム : ACQUITY UPLC BEH C18

(2.1 mm i.d.×50 mm、1.7 μm、Waters 社製)、流速：0.2 mL/min、カラム温度：35℃、移動相：0.05%ギ酸入り/アセトニトリル、注入量：1~10 μL、フォトダイオードアレイ検出器 (PDA)：200-500 nm  
**MS 条件** ソース温度 120℃、脱溶媒温度 450℃、脱溶媒ガス流量 800 L/hr、Cone ガス 50 L/hr、キャピラリー電圧 3.0 kV (ESI pos.)、2.5 kV (ESI neg.)、Cone 電圧 30 V、スキャン範囲  $m/z$  100~1200

### C. 研究結果及び考察

#### C-1. カンゾウ油性抽出物再分離画分の抗酸化活性(DPPH ラジカル消去活性)

KZ01 (*G. inflata* 由来) の 1 段階目の HPLC 分画物の内、抗酸化活性が認められた Fraction 11、28、31、34、37 & 38 につき、さらに 2 段階目の HPLC 分画を行い、抗酸化活性測定を行った。その結果 (図 2)、分取時の各活性画分には、UV 200-500 nm で検出可能なピークが認められた。

KZ34 (*G. glabra* 由来) の 1 段階目の HPLC 分画物の内、抗酸化活性が認められた Fraction 11、25、32、37、44 & 45、52 につき、さらに 2 段階目の HPLC 分画を行い、抗酸化活性測定を行った。その結果 (図 3)、分取時の各活性画分には、UV 210-500 nm で検出可能なピークが認められた。

#### C-2. UPLC/TOF-MS による抗酸化活性画分の主ピーク成分の解析

2 段階目の HPLC 分画画分の内、抗酸化活性が強く認められた画分について、活性に重なる主ピークの UPLC/TOF-MS 測定を行った (図 4、5、6)。なお、図中の記号 KZ01-frc11-⑦は KZ01 の第 1 段階分取の 11 番目の画分を第 2 段階分取で再分画した 7 番目の画分を表している。

2 段階目の HPLC 分画で抗酸化活性が強かった画分について、活性に重なる主ピークを UPLC/TOF-MS で分析し、分子式を推定した。文献で報告のあるカンゾウ成分を調べ、カンゾウからの単離標品を入手した。入手した単離標品と活性画分の主ピークにつき、保持時間、精密質量、UV スペクトルを比較した。

図 4 に示すように、KZ01-frc11-⑦と KZ34-frc11-⑦の各主ピーク化合物は、T UPLC/TOF-MS により、いずれも  $m/z$  287.0926 (pos.)、285.0782 (neg.) であると判明し (図 4-a,b)、 $C_{16}H_{14}O_5$  のプロトン付加分子イオンの理論値  $m/z$  287.0919 [ $C_{16}H_{14}O_5+H$ ]<sup>+</sup> および脱プロトン分子イオンの理論値  $m/z$  285.0763 [ $C_{16}H_{14}O_5-H$ ] とミリマスオーダーで一致し、これら化合物の組成式を  $C_{16}H_{14}O_5$  と推定した。次に、この分子式を持つカンゾウ由来の単離標品として licochalcone B を入手し、UPLC/TOF-MS で測定した。その結果、UV、MS スペクトル、精密質量、保持時間がいずれも一致したため、KZ01 及び KZ34 の各 frc11-⑦の主ピーク化合物は licochalcone B と判明した (図 4)。

同様に、KZ01-frc28-⑥の主ピーク化合物は、UPLC/TOF-MS により  $C_{21}H_{22}O_5$  と推定され、さらにカンゾウからの licochalcone D 単離標品との UV、MS スペクトル、精密質量、保持時間の比較を行い、licochalcone D と判明した (図 5)。KZ01-frc31-④の主ピーク化合物は、同じ分子式と推定されたが、UV スペクトルが異なり、licochalcone D とは異なる物質であった (図 5)。

また、KZ34-frc52-④の主ピーク化合物は UPLC/TOF-MS により  $C_{25}H_{28}O_4$  と推定され、さらにカンゾウからの hispaglabridin A 単離標品との UV、MS スペクトル、精密質量、保持時間の比較を行い、hispaglabridin A と判明した (図 6)。

### D. 結論

抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来のカンゾウ油性抽出物製品の 5 活性画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来のカンゾウ油性抽出物製品の 6 活性画分につき、さらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。この内、3 種の抗酸化活性画分につき、UPLC/TOF-MS を用いて、活性に重なるピークとカンゾウからの単離標品との詳細な比較検討を行い、それぞれ licochalcone B、licochalcone D、hispaglabridin A であることを明らかにした。

## E. 参考文献

- 1) 受田浩之、島村智子、多田敦子、石附京子、柏木丈弘、松井利郎、石川洋哉 酸化防止剤力価評価における DPPH 法の室間共同試験、厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 既存添加物の品質評と規格試験法の開発に関する研究 平成 24 年度 総括・分担研究報告書 98-103 (2013)

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

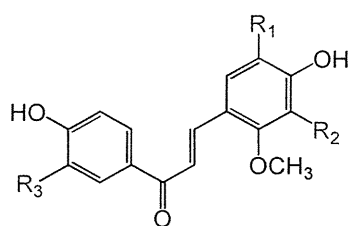
A. Tada, K. Ishizuki, J. Iwamura, H. Mikami, Y. Hirao, I. Fujita, T. Yamazaki, H. Akiyama and Y. Kawamura  
Improvement of the Assay Method for Steviol

Glycosides in the JECFA Specifications, American Journal of Analytical Chemistry, 4, 190-196 (2013)

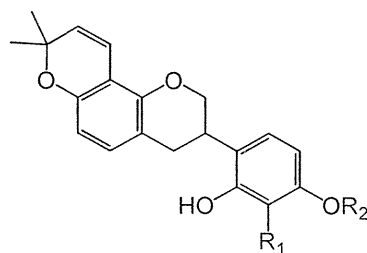
### 2. 学会発表

1) 多田敦子、石附京子、末松孝子、有福和紀、伊藤裕才、大槻 崇、大月典子、吉松嘉代、川原信夫、山崎 壮、杉本直樹、穂山 浩、カンゾウ油性抽出物の成分組成に基づく解析、食品化学学会第 19 回総会・学術大会 (2013 年 8 月、名古屋)

2) 多田 敦子、石附 京子、島村 智子、受田 浩之、深井 俊夫、山崎 壮、杉本 直樹、穂山 浩、既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化活性要因と寄与率、第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013 年 11 月、宜野湾)



Licochalcone A ( $R_1=C(CH_3)_2CH=CH_2$ ,  $R_2=R_3=H$ )  
 Licochalcone B ( $R_1=R_3=H$ ,  $R_2=OH$ )  
 Licochalcone D ( $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=CH_2CH=C(CH_3)_2$ )



Glabridin ( $R_1=R_2=H$ )  
 Hispaglabridin A ( $R_1=CH_2CH=C(CH_3)_2$ ,  $R_2=H$ )

化合物名	分子式	ExactMass	NMR重溶媒
licochalcone A (試薬)	$C_{21}H_{22}O_4$	338.1518	
glabridin (試薬)	$C_{20}H_{20}O_4$	324.1362	
licochalcone B	$C_{16}H_{14}O_5$	286.0841	アセトン- $d_6$
licochalcone D	$C_{21}H_{22}O_5$	354.1467	MeOH- $d_4$
hispaglabridin A	$C_{25}H_{28}O_4$	392.1988	$CDCl_3$

図1 市販標品 (licochalcone A、glabridin) 及び  
 カンゾウからの単離標品成分 (licochalcone B、licochalcone D、hispaglabridin A)