

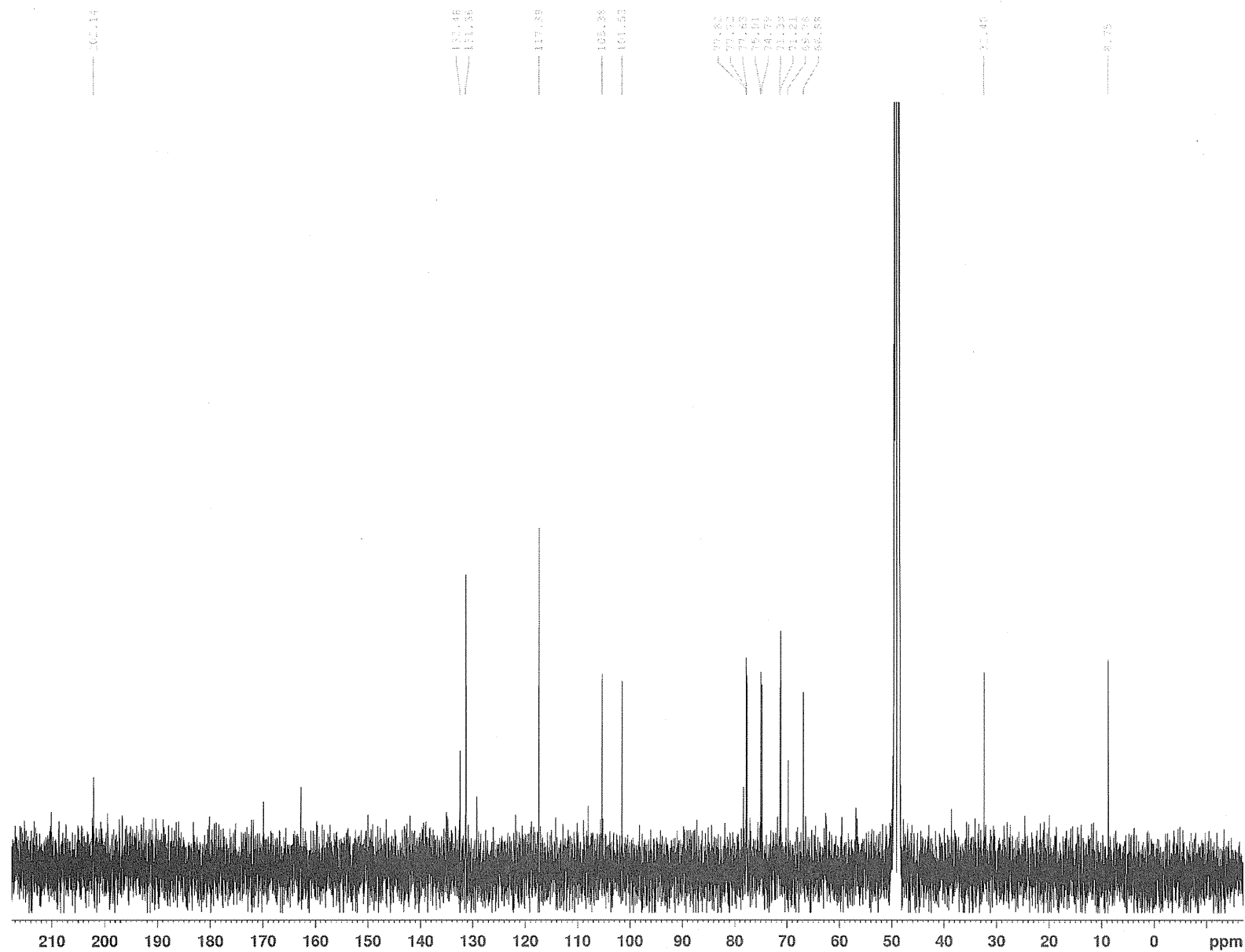


图 4. ^{13}C -NMR spectrum of PH-1 (12)

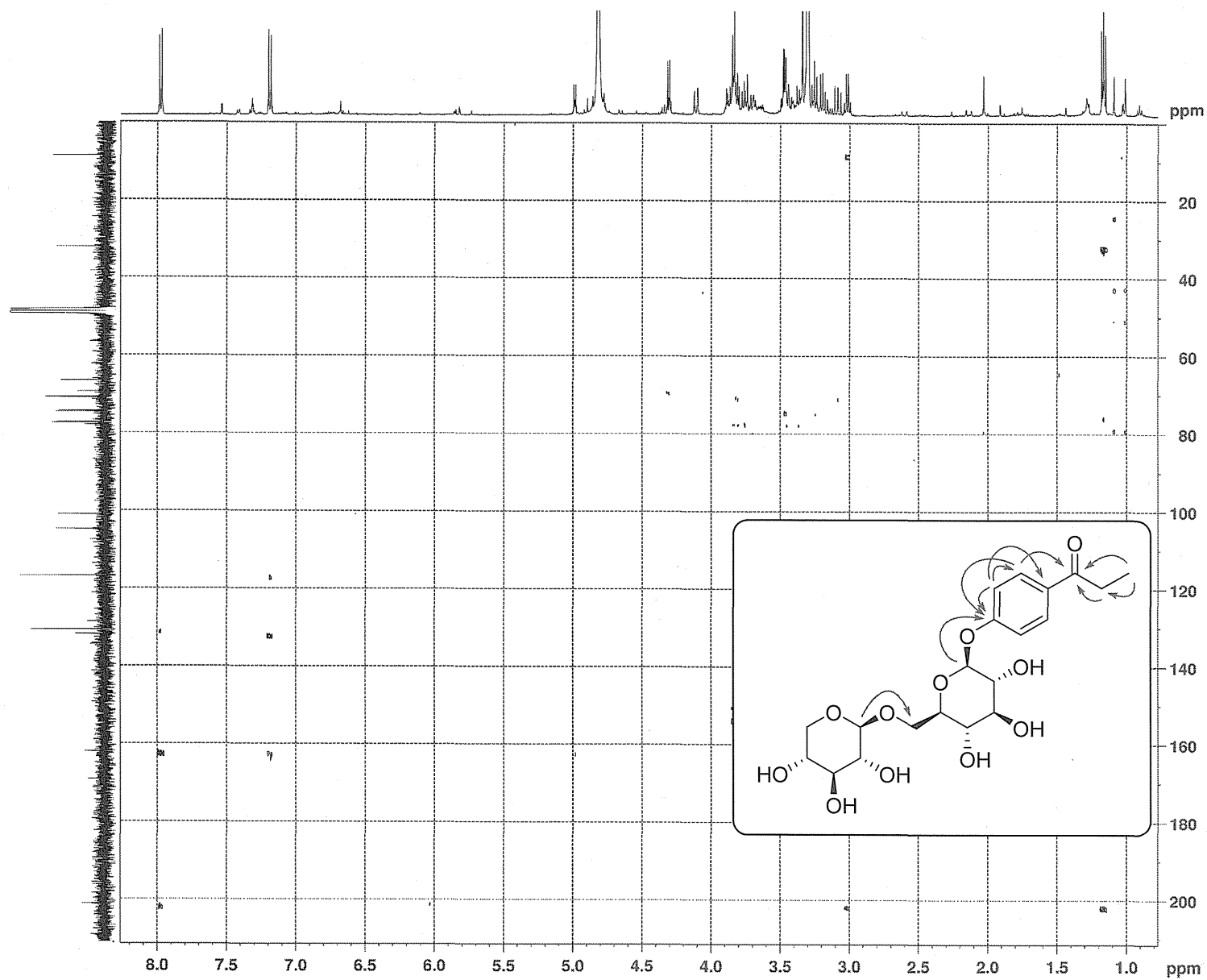


图 5. HMBC spectrum of PH-1 (12)

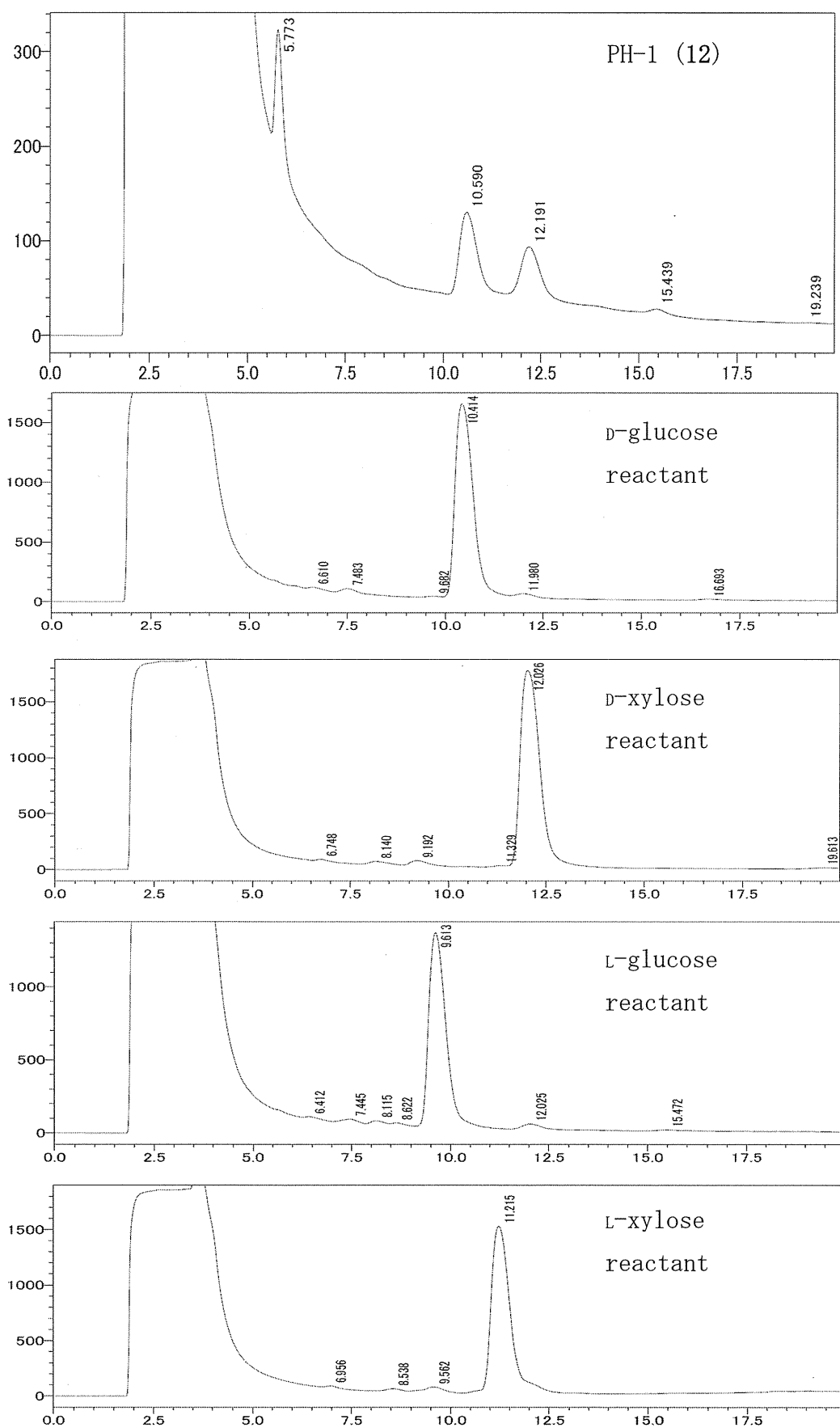


図 6-1. PH-1 (12) の糖の確認反応 (UV 254 nm)

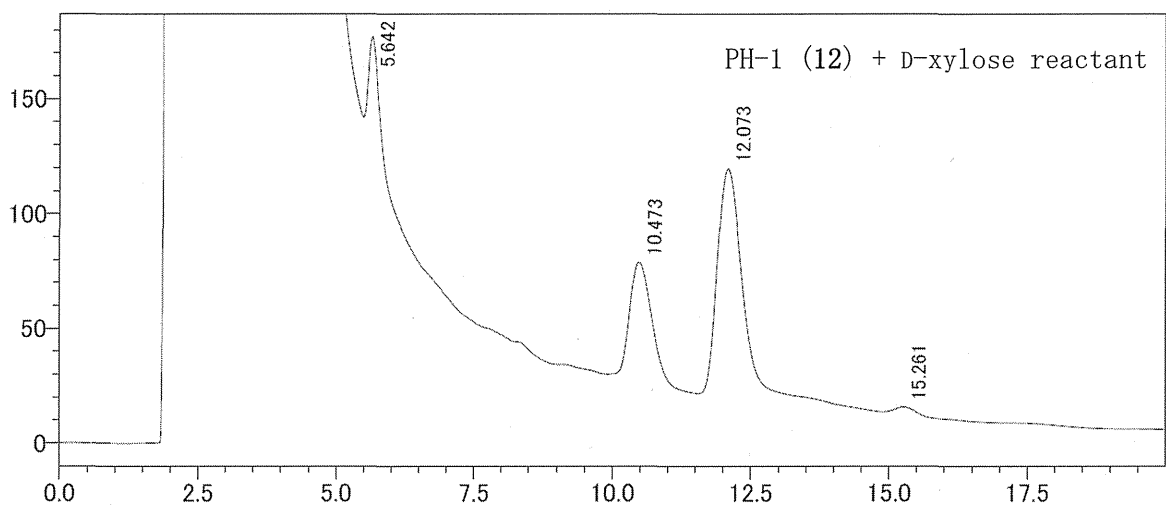
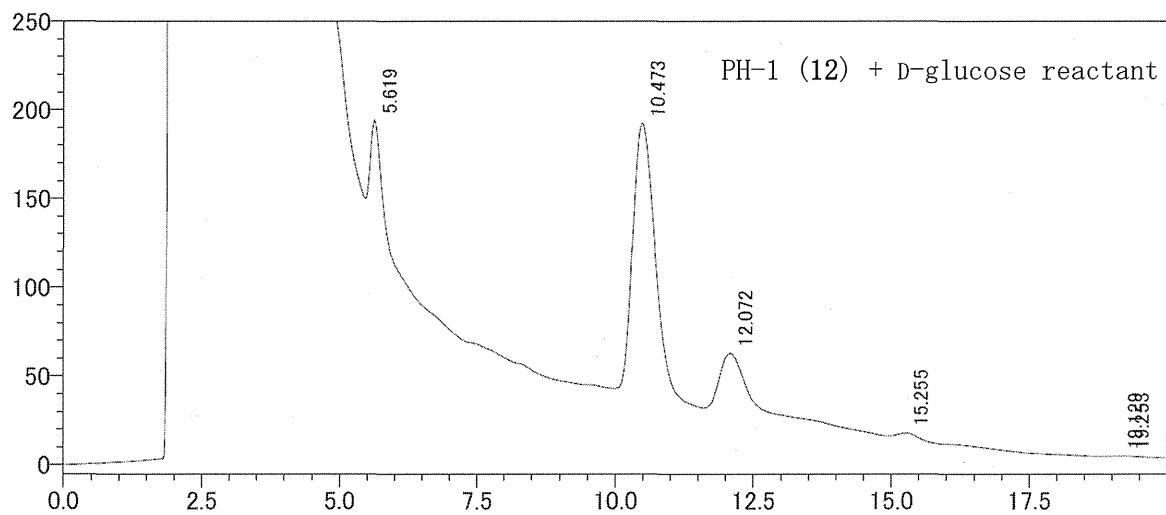


図 6-2. PH-1 (12) の糖の確認反応 (254 nm, 標品反応物との重ね打ち)

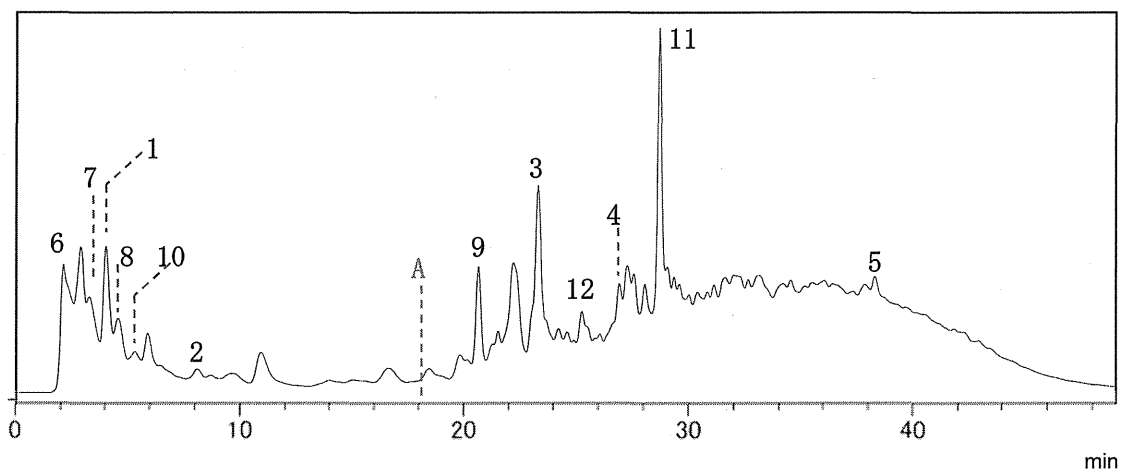


図 7. モウソウチク抽出物製品の HPLC クロマトグラム (UV 280 nm)

- 1: 5-hydroxymethyl-2-furfural, 2: 4-hydroxybenzoic acid, 3: *p*-coumaric acid
 4: *trans*-ferulic acid, 5: *N,N'*-diferuloylputrescine, 6: β -arbutin, 7: tachioside
 8: isotachioside, 9: 3,4'-dihydroxypropiophenone 3-*O*-glucoside

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）

既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究

平成26年度分担研究報告書

分担研究課題：既存添加物の有効成分に関する研究

～既存添加物ジャマイカカссия抽出物と天然香料クワッシャ中におけるクアシン、
ネオクアシンの新規定量分析法の検討～

分担研究者 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

要旨 既存添加物「ジャマイカカссия抽出物」と天然香料「クワッシャ」は、クアシンとネオクアシンを主成分とする添加物である。クアシンとネオクアシンの定量用標準品は市販されていないため、添加物製品中のクアシンとネオクアシンの正確な含有量の算出は困難である。本研究では、qNMR と HPLC を併用することで、HPLC を用いた定量分析条件下において、安価で入手容易な市販試薬 4-hydroxybenzoic acid に対するクアシン及びネオクアシンのモル吸光係数比を算出し、クアシンとネオクアシンの定量用標準品を使用しない HPLC による簡便な新規定量法を確立し、その有用性を示したので報告する。本方法は、測定対象化合物の定量用標準品の供給が困難な化合物に対して幅広く応用が期待できる。

協力研究者

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

石附京子 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

ジャマイカカссия抽出物は、既存添加物名簿¹⁾に記載されている天然苦味料の1つであり、ニガキ科ジャマイカカссия (*Quassia excelsa* Swartz) の幹枝又は樹皮より、水で抽出して得られたもので、その主成分はクアシン (quassin) 及びネオクアシン (neoquassin) である (Fig.1)。また、天然香料基原物質集²⁾に記載されているクワッシャは、ニガキ科のジャマイカカссия、ニガキ (*Picrasma quassioides* Bennet) 又はアメリカニガキ (*Quassia amara* Linne) を原料とする香料として使用されており、その主成分は quassin 及び neoquassin である。既存添加物の品質や安全性確保の観点から、添加物中に含まれる成分を正確に定量することは重要である。しかし quassin 及び neoquassin の定量用標準試薬

は市販されていない。そこで、安価で入手容易な 4-hydroxybenzoic acid (4HBA) を quassin 及び neoquassin の定量用標準品として代用し、定量 NMR (qNMR) と HPLC を併用することで算出した、HPLC 分析条件下における 4HBA に対する quassin, neoquassin のモル吸光係数比を適用することで、測定対象化合物の定量用標準品を必要としない簡便な定量法を検討した。また規格設定のための基礎的な情報を得るために、ジャマイカカссия抽出物製品とクワッシャ製品の成分組成について比較分析を行なったので、あわせて報告する。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

ジャマイカカссия抽出物製品 (Jamaica quassia extract, 2 社 3 製品；製品 A~C；褐色粉末) と天然香料クワッシャ製品 (Quassia；製品 D；褐色粉末) は、一般社団法人日本食品添加物協会を通じて入手した。

Quassin 及び neoquassin の 4HBA に対するモル吸光係数比は、ナカライテスク (株) 製のクアシン試薬 (アメリカニガキ (*Quassia amara* Linne) からの精製品 (quassin 及び neoquassin の混合物)) と東京化成工業 (株) 製の 4HBA (Cat.No.H0207, Lot.No.44CWL-ST) を用いた。

定量 NMR (qNMR) 基準物質には、1,4-BTMSB- d_4 標準物質 (Cat.No.024-17031, Lot.No.DCL1923, 純度 $99.8 \pm 0.2\%$, 和光純薬工業 (株) 製) を用いた。qNMR 測定用溶媒として重メタノール (methanol- d_4) (Isotec 社製) を用いた。1,4-BTMSB- d_4 標準物質含有 methanol- d_4 溶液の濃度は、高純度フタル酸ジエチル (diethyl phthalate : DEP) (品番 NMIJ CRM 4022-b, 純度 $99.8 \pm 0.09\%$, (独) 産業技術総合研究所製) を用いて校正した。

4-Methoxy-1-vinyl- β -carboline (MVC) , 4,9-dimethoxy-1-vinyl- β -carboline (DMVC) は、名古屋市衛生研究所を通じて入手した。その他の試薬はすべて市販特級品あるいは HPLC 用を用いた。

2. 装 置

各種分析データの取得には、以下の装置を使用した。

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS): Waters 製 ACQUITY UPLC/SQD system.

核磁気共鳴装置 (NMR): オートサンプラー付 JNM-ECA 600 (日本電子 (株) 製, 600 MHz). NMR のシフト値は、methanol- d_4 の溶媒ピークを基準シグナル (3.30 ppm) として、 δ 値を ppm 単位で表した。

3. LC/MS による添加物試料の成分分析

添加物製品 (A~D) をメタノールで 10 mg/mL に調製したものを終濃度が 35%メタノール

ールになるように水で希釈し、この溶液を 0.2 μ m メンブレンフィルターでろ過したものを LC/MS 用試験溶液とした。

LC 条件: カラム, XTerra MS C18 (2.1 mm i.d. $\times$ 150 mm, 3.5 μ m, Waters 製); カラム温度, 40°C; 移動相, 10 mM ギ酸アンモニウム含有水: 10 mM ギ酸アンモニウム含有メタノール = 65:35 (0 min) $\rightarrow$ 20:80 (25 min); 注入量, 5 μ L; 流速, 0.2 mL/min; PDA 検出器, 200~500 nm; 検出波長, 255 nm.

MS 条件: キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 30 V (ESI-positive); ソース温度, 120°C; 脱溶媒温度, 350°C; 脱溶媒ガス流量, 600 L/hr; コーンガス, 50 L/hr; スキャン範囲, m/z = 100~1000.

4. qNMR による添加物試料中の quassin 及び neoquassin 含有量測定

qNMR による各添加物試料中の quassin と neoquassin の含有量測定 (w/w%) では、正確に量り取った各試料 (50~70 mg) を、あらかじめ認証標準物質である DEP を用いて校正をかけた 1,4-BTMSB- d_4 0.20 mg/mL を含む methanol- d_4 1 mL に溶解し、その液 600 μ L を NMR 試験管に封入したものを測定用試料溶液とした。この測定用試料溶液を qNMR に付し、1,4-BTMSB- d_4 のプロトンシグナル面積 (0.24 ppm, 18H, s), 分子量, 濃度, quassin 及び neoquassin に由来するそれぞれの 3 位プロトンシグナル面積 (5.52 ppm, 1H, d, J = 2.50 Hz : quassin, 5.48 ppm, 1H, d, J = 2.50 Hz : neoquassin), 分子量から, quassin 及び neoquassin の含有量 (濃度) を算出した³⁾。qNMR 測定は 3 回行い平均を求めた。

分析条件: Probe, 5 mm broadband autotune probe; Flip angle, 90°; Sample spin, No spin; Pulse delay,

60s ; Scan, 16 ; probe temperature, 22~25°C

5. 4HBA に対する quassin 及び neoquassin のモル吸光係数比の算出

ナカライテスク (株) 製のクアシン試薬 (quassin 及び neoquassin の混合物) と 4HBA を合計で約 10 mg となるよう、重量比でおよそ 3 : 1~10 : 1 で秤量し混合したものを 4 検体調製し、methanol-*d*₄ に溶解した後 qNMR に付し、¹H-NMR スペクトルを測定した。4HBA の 2, 6 位プロトンシグナル (7.86 ppm, 2H, d, *J* = 8.75 Hz) と 3, 5 位のプロトンシグナル (6.80 ppm, 2H, d, *J* = 8.75 Hz) の平均面積と、quassin の 3 位 (5.52 ppm, 1H, d, *J* = 2.50 Hz) と 7 位 (4.41 ppm, 1H, t, *J* = 2.75 Hz) のプロトンシグナルの平均面積、そして neoquassin の 3 位 (5.48 ppm, 1H, d, *J* = 2.50 Hz) と 16 位 (5.32 ppm, d, *J* = 2.75 Hz : H-16 α , 4.75 ppm, dd, *J* = 2.00, 9.75 Hz : H-16 β) のプロトンシグナルの平均面積から 4HBA に対する quassin, neoquassin のモル比 = M を算出した³⁾。qNMR 測定は 6 回行なった。

分析条件 : Probe, 5 mm broadband autotune probe ;

Flip angle, 90° ; Sample spin, No spin ; Pulse delay, 60s ; Scan, 16 ; probe temperature, 22~25°C.

次に NMR 試験管から試料を取り出し、水で希釈したものを逆相 HPLC で分析した。ピーク面積から、4HBA に対する quassin, neoquassin の吸光度比 = S を算出し、モル吸光係数比 = S/M を求めた。HPLC 分析は、各試料につき 3 回行なった。

分析条件 : カラム, 4 社製品の ODS (C₁₈) カラム (Cosmosil 5C₁₈-MSII (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μ m, ナカライテスク (株) 製), DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μ m, ダイソー (株) 製), XTerra MS C18 (4.6 mm i.d. ×

150 mm, 3.5 μ m, Waters 製), L-Column2 ODS (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 μ m, 化学物質評価機構)) ; カラム温度, 40°C ; 移動相, 0.1%ギ酸入り水 : 0.1%ギ酸入りメタノール = 65 : 35 (0 min) → 20 : 80 (25 min) ; 注入量, 10 μ L ; 流速, 0.1 mL/min (L-Column2 ODS) 又は 0.5 mL/min (Cosmosil 5C₁₈-MSII, DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP, XTerra MS C18) ; PDA 検出器, 200~500 nm ; 検出波長, 255 nm.

6. HPLC による添加物試料の quassin 及び neoquassin 含有量測定

HPLC による各試料中の quassin と neoquassin の定量は、正確に量り取った各試料 (5~10 mg) を、4HBA 39.8 μ g/mL 含有の初期移動相 20 mL に溶解し、分析装置に導入して行った。測定は 3 回行った。

LC 条件 : カラム, Cosmosil 5C₁₈-MSII ; 0.1%ギ酸含有水 : 0.1%ギ酸含有メタノール = 65 : 35 (0 min) → 20 : 80 (25 min) ; 注入量, 10 μ L ; 流速, 0.3 mL/min ; PDA 検出器, 200~500 nm ; 検出波長, 255 nm.

C. 研究結果および考察

1. ジャマイカカシヤ抽出物製品と天然香料クワッシャ製品の成分比較

測定対象物質とは別の、一つの内標準物質を用いた HPLC による定量分析法を確立する上で、その予備検討として、ジャマイカカシヤ抽出物 3 製品と天然香料クワッシャ 1 製品を LC/MS 分析装置に付した結果を Fig. 2 に示した。杉本らの報告と同じく⁴⁾、4 製品において 255 nm に極大吸収波長を示す成分 II, III が顕著に確認された (Fig. 3b, c)。MS スペクトルにおいて成分 II, III は、各々 *m/z* = 389[M+H]⁺, 391[M+H]⁺ の値を示したことから、成分 II を quassin, 成分

III を neoquassin (16 位立体異性体混合物) と同定した。また先行研究において多田らは、ジャマイカカッシア抽出物製品には、quassin 及び neoquassin の他に、11-dihydro-12-norneoquassin, canthin-6-one, 4-methoxy-1-vinyl- β -carboline (MVC), 4,9-dimethoxy-1-vinyl- β -carboline (DMVC) (Fig.1) の副成分が含まれていることを明らかにしている⁵⁾。各添加物製品の LC クロマトグラフを拡大してみると、成分 I, IV が確認できた (Fig.2)。成分 I, IV は、MS スペクトルにおいて各々 $m/z = 379[M+H]^+$, $221[M+H]^+$ の値を示したこと、そして多田らの報告と同様な PDA スペクトル形状 (Fig.3a, d) を示したことから、成分 I を 11-dihydro-12-norneoquassin, 成分 IV を canthin-6-one と推定した。MVC, DMVC については、各添加物製品中の HPLC クロマトグラム上において顕著なピークは検出されなかったが、 $m/z = 225[M+H]^+$ (MVC), $255[M+H]^+$ (DMVC) についての抽出クロマトグラム上に、両者の標品と保持時間 (16.59 min : MVC, 22.37 min : DMVC) が一致するピークが確認されたことから (Fig. 4), 各添加物製品中に MVC, DMVC が極微量含まれていることが確認された。

また、製品中に含まれる成分について $^1\text{H-NMR}$ から得られるスペクトル情報も参考に検討した。各製品 (A~D) と試薬クアシンを methanol- d_4 に溶解し、NMR 測定を行なった結果を Fig. 5 に示す。各添加物製品の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで認められる主なシグナルのシフト値は、試薬クアシンに酷似しており、すなわち、含有主成分は、quassin と neoquassin であることが確認された。また HPLC を用いた定量分析を行なう際に、今回検出された 4 つの成分は、quassin と neoquassin の総ピーク面積に対して、

50 分の 1 未満であり、quassin と neoquassin の定量値に大きな影響を与えないと判断した。

2. qNMR と HPLC を併用した 4HBA に対する quassin 及び neoquassin のモル吸光係数比の算出

$^1\text{H-NMR}$ スペクトル上において、quassin 及び neoquassin は低磁場側にシグナルを有さない (Fig.5)。このことから、一般に低磁場側のみにシグナルを示す芳香族有機酸が、quassin, neoquassin の内標準物質として好ましいと考えた。そこで、4HBA を試薬クアシンと混合したものを 4 検体調製し、それぞれ qNMR を行なった。その結果、4HBA 由来の H-2 と H-6 に由来する 1 つのシグナル、H-3 と H-5 に由来する 1 つのシグナル、quassin の H-3, H-7 シグナル、そして neoquassin の H-3, H-16 (H-16 α , H-16 β) シグナルの分離は良好であった (Fig.6)。そのため、これらのシグナル面積値を用いて、qNMR 測定試料中の 4HBA に対する quassin, neoquassin のモル比 = M を算出した (Table 1)。

次に測定後の qNMR 試料を希釈し、4 製品のカラムを用いて逆相 HPLC に付した。移動相に 0.1% 酢酸含有水を A 液、0.1% 酢酸含有メタノールを B 液として、B 液が 25 分間で 35% から 80% になる直線勾配にしたところ、HPLC のクロマトグラフ上において、4HBA と quassin 及び neoquassin の分離は良好であった (Fig.7)。また、4HBA は分析時における極大吸収波長が 255 nm を示し (Fig. 3e), quassin (1), neoquassin (2) も同じく 255 nm に極大吸収波長を示した。そこで 255 nm における各々のピーク面積から吸光度比 = S を算出することにした。この得られた値 S を、上記のモル比 = M で割り、4HBA に対する quassin, neoquassin のモル吸光係数比 = S/M を求めた (Table 2)。またカラム製品間にお

ける差異を検討したところ、quassin/4HBA の相対標準偏差 (RSD (%)) は 0.83~2.09 , neoquassin/4HBA の RSD (%) は 0.50~0.98 であったため、カラム間の差は許容範囲と判断した。そして、定められた分析条件下において、一般的な ODS カラムを用いた際の quassin/4HBA 及び neoquassin/4HBA のモル吸光係数比 =S/M は、それぞれ 0.84, 0.85 であることが明らかとなった (Table 2)。

3. qNMR と HPLC によるジャマイカカシヤ抽出物製品と天然香料クワッシャ製品中における quassin 及び neoquassin の定量

ジャマイカカシヤ抽出物 3 製品と天然香料クワッシャ 1 製品の成分解析から得られた情報より、quassin, neoquassin 以外の成分は非常に微量であると示唆されたことから、添加物製品を直接 qNMR を用いて、quassin 及び neoquassin を定量することが可能だと判断した。qNMR 測定では、添加物製品中の夾雑物の影響が見られない quassin 及び neoquassin の H-3 シグナルを定量対象シグナルとした (Fig.5)。1,4-BTMSB- d_4 のプロトンシグナル面積、分子量、濃度等、quassin と neoquassin に由来するそれぞれの 3 位プロトンシグナル面積、分子量から quassin 及び neoquassin の含量を算出した。その結果、ジャマイカカシヤ抽出物 3 製品における quassin 及び neoquassin の含有量は、12.78~14.72%及び 39.45~40.96%であった (Table 3)。天然香料クワッシャ 1 製品における quassin 及び neoquassin の含有量は 14.72%及び 40.96%であり、ジャマイカカシヤ抽出物製品の濃度とほぼ同じであった。qNMR 測定での RSD (%)は、0.26~1.31 であった。

次に、我々が考案した 4HBA に対する quassin 及び neoquassin のモル吸光係数比を適用した

HPLC による製品中の quassin 及び neoquassin の含有量を測定した。まず、内標準物質として使用する 4HBA 標準試薬の正確な純度を qNMR を用いて算出したところ、純度は 100.43%, RSD (%) は 0.16 であった。そこで本研究では、4HBA の純度を 100%と設定した。次いで、4HBA 39.8 $\mu\text{g/mL}$ を含む初期移動相に添加物製品を溶解した液 10 μL を HPLC に付し、各測定において 4HBA のピーク面積を実際に注入した 4HBA のモル数で校正をかけて、各添加物製品中の quassin 及び neoquassin 濃度を 4HBA 相当モル数として算出した後、前項で求めた各化合物の 4HBA に対するモル吸光係数比 0.84 及び 0.85 を用いて補正計算することで、quassin 及び neoquassin を定量した。その結果、Table 3 に示すように、添加物製品中の quassin 及び neoquassin 濃度は、12.15~14.19% 及び 39.24~41.73%であり、RSD (%) は 0.12~0.42 であった。さらに、qNMR から得られた quassin 及び neoquassin 濃度との差異はほとんど確認されず、4HBA とのモル吸光係数比を考慮した HPLC による quassin, neoquassin の定量法は有効であると判断した。

D. 結 論

本報告では、ジャマイカカシヤ抽出物製品と天然香料クワッシャにおける成分組成の差異について検討した結果、両製品に含まれる成分組成は酷似していることが明らかとなった。さらに、ジャマイカカシヤ抽出物の公的規格作成に向けた quassin, neoquassin の定量法の確立のための検討を行った。安価で手に入りやすい 4HBA 試薬を定量用標準試薬として用い、qNMR により得られた 4HBA の純度値、及び NMR と HPLC の併用により求めた 4HBA に対する quassin, neoquassin のモル吸光係数比を適

用することで、簡易に quassin 及び neoquassin を定量することが可能であることを示せた。本方法は、測定対象化合物の標品の供給が困難な他の天然添加物に対しても、幅広く応用が期待できる。

D. 参考文献

1. 厚生省生活衛生局長通知 "別添 1 既存添加物名簿収載品目リスト" (平成 8 年 5 月 23 日). 衛化第 56 号 (1996).
2. 日本香料工業会食品香料委員会編 "天然香料基原物質の解説". 食品化学新聞社. 174-175 (1999).
3. 大槻崇. qHNMR の食品添加物分析への応用. 化学と生物. 52. 622-626 (2014).
4. Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Analysis of constituents in Jamaica quassia extract, a natural bittering agent. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 44, 328-331 (2003).
5. Tada, A., Sugimoto, N., Sato, K., Akiyama, T., Asanomo, M., Yun, Y.S., Yamazaki, T., Tanamoto, K. Examination of original plant of

Jamaica quassia extract, a natural bittering agent, based on composition of the constituents. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 50, 16-21 (2009).

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

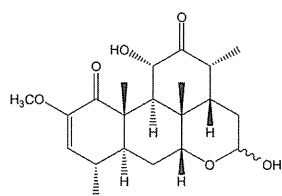
西崎雄三, 多田敦子, 伊藤裕才, 大槻崇, 杉本直樹, 穂山浩, qNMR と HPLC を併用した天然苦味料ジャマイカカッシア抽出物中のクアシン及びネオクアシンの新規定量法の開発, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 (神戸)

G. 知的財産権の出願, 登録状況

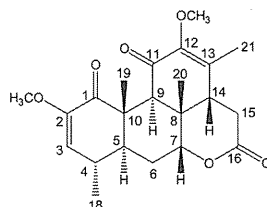
なし

H. 健康危機情報

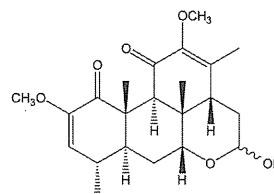
なし



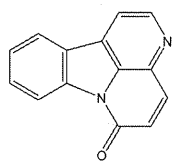
11-Dihydro-12-norneoquassin (I)
MW:378, C₂₁H₃₀O₆



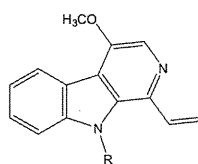
Quassin (II)
MW:380, C₂₂H₂₈O₆



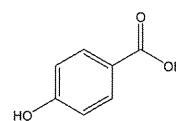
Neoquassin (III)
MW:390, C₂₂H₃₀O₆



Canthin-6-one (IV)
MW:220, C₁₄H₈N₂O



4-Methoxy-1-vinyl-β-carboline (MVC)
R=H MW:224, C₁₄H₁₂N₂O
4,9-Dimethoxy-1-vinyl-β-carboline (DMVC)
R=OCH₃ MW:254, C₁₅H₁₄N₂O₂



4-Hydroxybenzoic acid
MW:138, C₇H₆O₃

Fig.1. Structure of constituents of Jamaica quassia extract and 4-hydroxybenzoic acid.

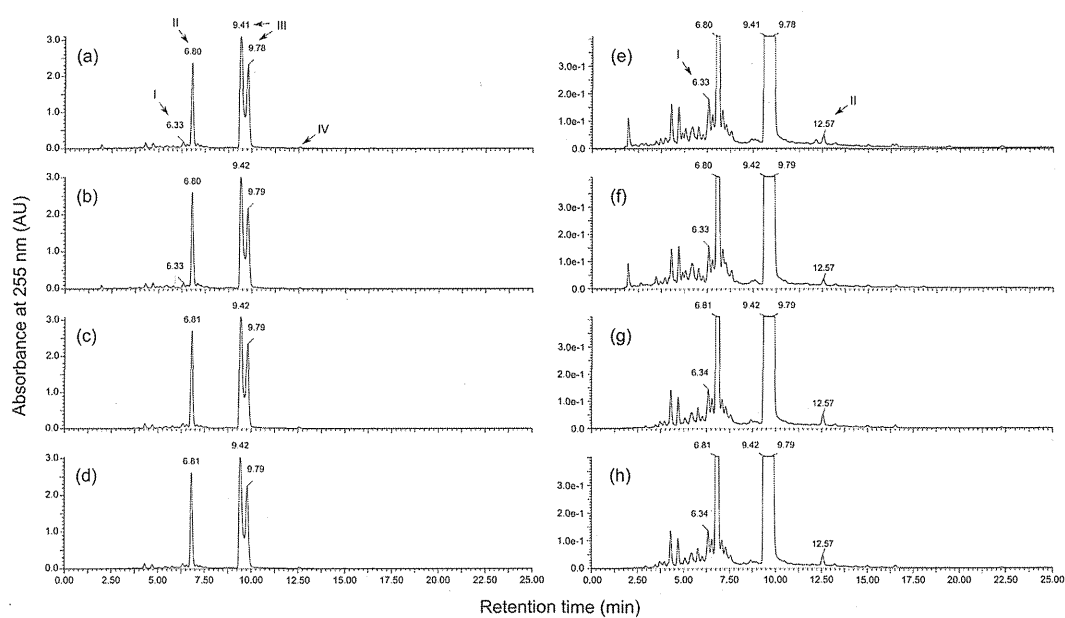


Fig.2. HPLC chromatograms of three jamaica quassia extracts and quassia. (a), product A; (b), product B; (c), product C; (d), product D. (e) to (h), magnified chromatograms of (a) to (d), respectively. I, 11-dihydro-12-norneoquassin; II, quassin; III, neoquassin; IV, canthin-6-one. AU, absorbance unit.

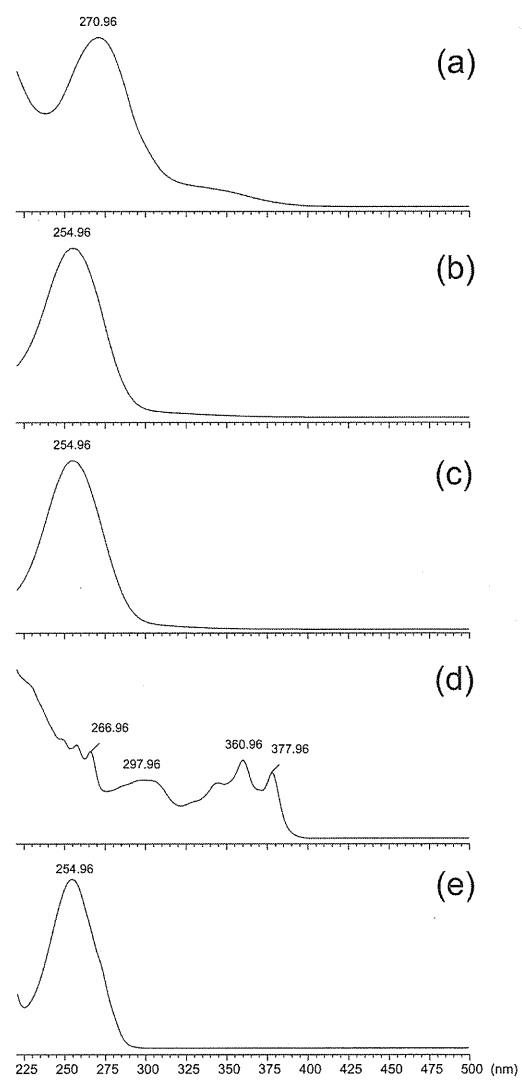


Fig.3. PDA spectra of 11-dihydro-12-norneoquassin (a), quassin (b), neoquassin (c), canthin-6-one (d) and 4-hydroxybenzoic acid (e).

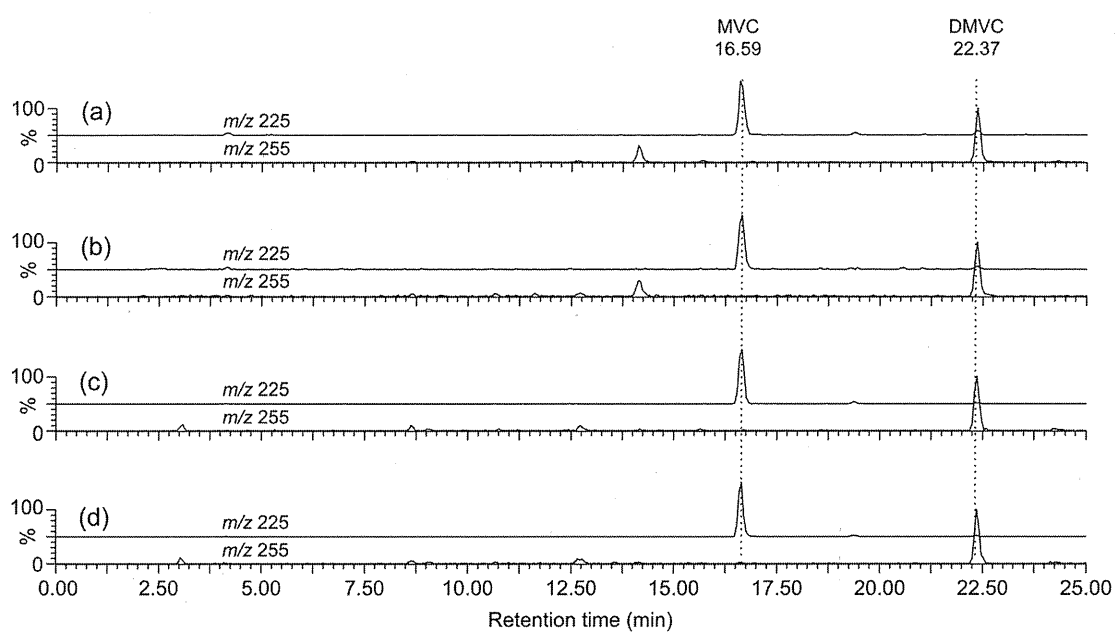


Fig.4. MS chromatograms monitored at m/z 225 and 255 of product A, B, C and D. (a), product A; (b), product B; (c), product C; (d), product D.

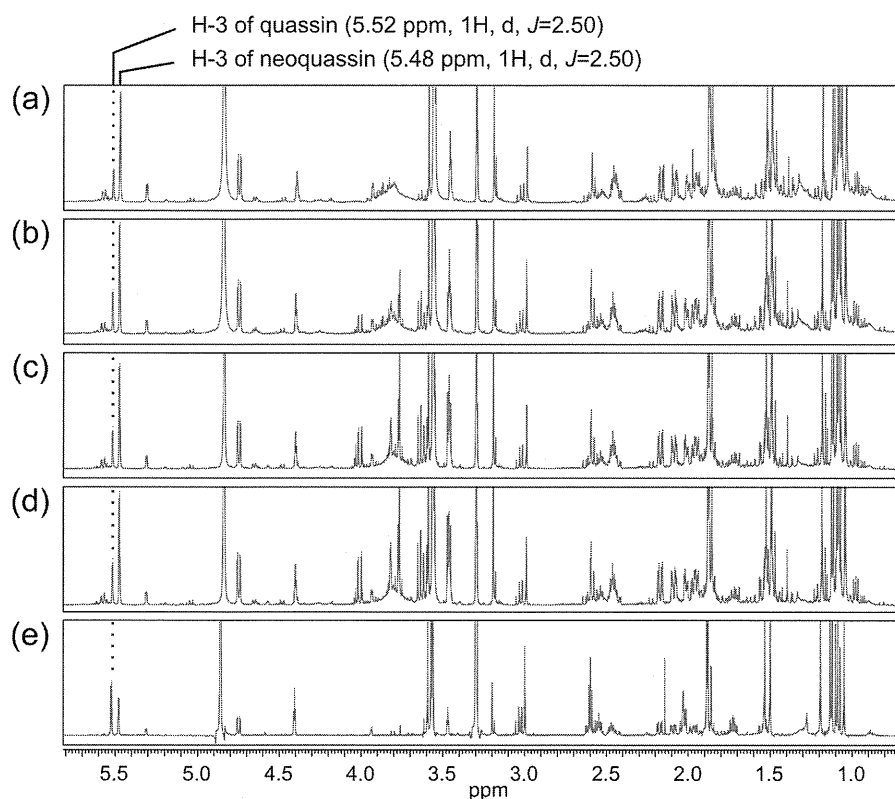


Fig.5. ^1H -NMR spectra of four food additives. (a) product A; (b) product B; (c) product C; (d) product D; (e) quassin standard reagent (mixture of quassin and neoquassin). Signals at 5.48 ppm and 5.52 ppm were used for calculation of quassin and neoquassin.

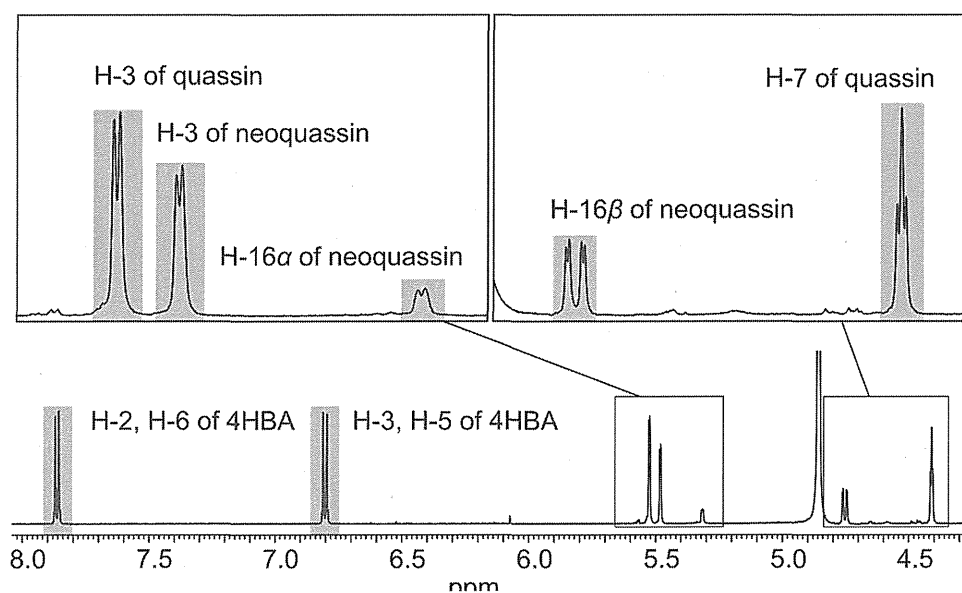


Fig.6. ^1H -NMR spectra of mixture of 4HBA and quassin standard reagent.

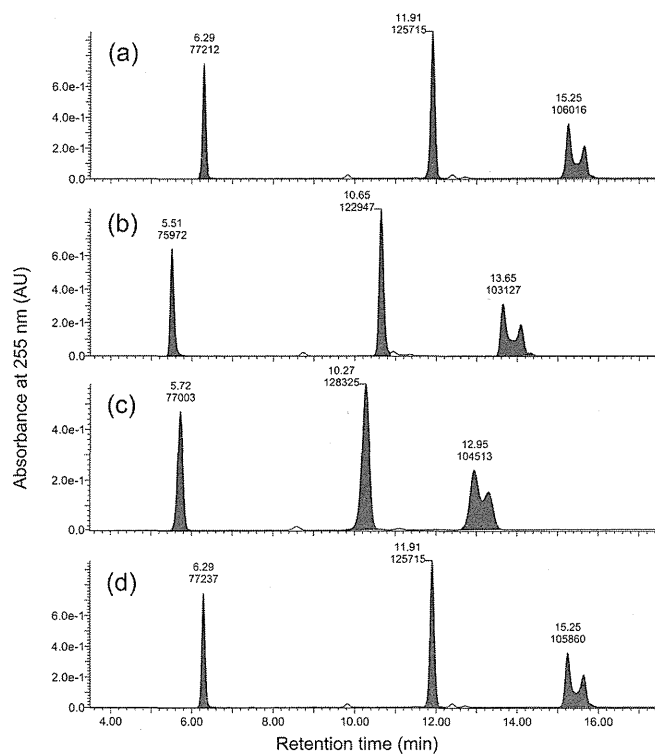


Fig.7. HPLC chromatogram of 4HBA and quassin standard reagent mixture using 4 columns. (a), Cosmosil 5C₁₈-MSII; (b), XTerra MS C18; (c), DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP, (d); L-Column2 ODS. Absorbance at 255 nm. AU, absorbance unit. Retention times and area values are shown at the peak top, respectively.

Table 1. Relative integral values and mole values in each test liquid containing 4HBA and quassin or neoquassin on qNMR spectra.

Integral value	4HBA		quassin		neoquassin	
	H-2 and H-6	H-3 and H-5	H-3	H-7	H-3	H-16 (H-16 α +H-16 β)
Test liquid 1	2.00	2.01 $\pm$ 0.00	2.06 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.01	1.63 $\pm$ 0.00	1.64 $\pm$ 0.04 (0.39 $\pm$ 0.00+1.25 $\pm$ 0.04)
Test liquid 2	2.00	2.01 $\pm$ 0.00	0.62 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.00	0.49 $\pm$ 0.00	0.52 $\pm$ 0.01 (0.14 $\pm$ 0.00+0.38 $\pm$ 0.01)
Test liquid 3	2.00	2.00 $\pm$ 0.00	0.62 $\pm$ 0.00	0.63 $\pm$ 0.00	0.51 $\pm$ 0.00	0.54 $\pm$ 0.02 (0.15 $\pm$ 0.00+0.39 $\pm$ 0.02)
Test liquid 4	2.00	2.00 $\pm$ 0.00	1.04 $\pm$ 0.01	1.05 $\pm$ 0.00	0.83 $\pm$ 0.00	0.87 $\pm$ 0.03 (0.25 $\pm$ 0.01+0.62 $\pm$ 0.03)
Mole value	4HBA		quassin		neoquassin	
	Average		Average		Average	
Test liquid 1	1.00		2.03		1.63	
Test liquid 2	1.00		0.61		0.51	
Test liquid 3	1.00		0.63		0.52	
Test liquid 4	1.00		1.05		0.85	

Integral values of signal observed at 7.86ppm which is derived from H-2 and H-6 of 4HBA in each test liquid were set as 2.00. All integral values are means of six independent determinations. Mole values of 4HBA in each test liquid were calculated from 7.86 ppm signal and 6.80 ppm signal (derived from H-3 and H-5), and set as 1.00.

Table 2. The molar absorption coefficient ratios (S/M) between 4HBA and quassin or neoquassin.

Molar ratios (M) of quassin/4HBA	Test liquid 1	Test liquid 2	Test liquid 3	Test liquid 4			
	2.03	0.61	0.63	1.05			
Column	Molar absorption coefficient ratios (S/M) (quassin/4HBA)				Average	SD	RSD (%)
COSMOSIL 5C ₁₈ -MSII	0.81	0.82	0.83	0.83	0.82	0.01	1.29
DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP	0.83	0.84	0.85	0.85	0.84	0.01	1.33
XTerra MS C ₁₈	0.81	0.84	0.84	0.84	0.83	0.01	1.62
L-Column2 ODS	0.84	0.83	0.87	0.86	0.85	0.02	2.00
Average	0.82	0.83	0.85	0.85	0.84		
SD	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02		
RSD (%)	1.88	0.83	2.09	1.63	1.96		
Molar ratios (M) of neoquassin/4HBA	Test liquid 1	Test liquid 2	Test liquid 3	Test liquid 4			
	1.63	0.51	0.52	0.85			
Column	Molar absorption coefficient ratios (S/M) (neoquassin/4HBA)				Average	SD	RSD (%)
COSMOSIL 5C ₁₈ -MSII	0.85	0.84	0.84	0.86	0.85	0.01	1.22
DAISOPAK SP-120-5-ODS-BP	0.84	0.83	0.84	0.86	0.84	0.01	1.61
XTerra MS C ₁₈	0.84	0.84	0.85	0.85	0.85	0.01	0.66
L-Column2 ODS	0.86	0.83	0.85	0.86	0.85	0.02	1.97
Average	0.85	0.83	0.84	0.86	0.85		
SD	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01		
RSD (%)	0.98	0.93	0.75	0.50	1.35		

All test liquids were subjected to HPLC, and absorption coefficient ratios (S) were calculated from the area of the HPLC chromatograms recorded at 255 nm. S was adopted as means of three determinations. S/M were calculated from division of S by M. Flow was set as 0.1 mL/min (L-Column 2 ODS) or 0.5 mL/min (other columns). RSD, relative standard deviation.

Table 3. Contents of quassin and neoquassin in food additive products using HPLC and qNMR.

Food additive	w/w (%)	HPLC		qNMR	
		quassin	neoquassin	quassin	neoquassin
Product A	Average (%)	12.15±0.01	41.57±0.07	12.78±0.04	40.59±0.12
	RSD (%)	0.12	0.17	0.30	0.30
Product B	Average (%)	13.95±0.03	39.24±0.07	13.99±0.15	39.45±0.22
	RSD (%)	0.22	0.18	1.08	0.55
Product C	Average (%)	14.13±0.06	41.68±0.18	14.40±0.04	40.75±0.10
	RSD (%)	0.42	0.42	0.29	0.26
Product D	Average (%)	14.19±0.01	41.73±0.03	14.72±0.19	40.96±0.20
	RSD (%)	0.09	0.07	1.31	0.48

Food additives (A, B, C and D) desolved in 35% methanol containing 0.1% formic acid and 4HBA were subjected to HPLC equipped with COSMOSIL 5C₁₈-MSII column. Flow rate, 0.3mL/min. Each area value were recorded at 255 nm and the contents of quassin and neoquassin were calculated using molar absorption coefficient rations for 4HBA. Food additives desolved in methanol-*d*₄ containing 1,4-BTMSB-*d*₄ were subjected to qNMR. Signals at 0.24 ppm (1,4-BTMSB-*d*₄), 5.52 ppm (H-3 of quassin) and 5.48 ppm (H-3 of neoquassin) were used for calculation. RSD, relative standard deviation.