

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

既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の分離

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

研究要旨 前年度までの研究において、カンゾウ油性抽出物製品には、主要成分以外にも抗酸化活性寄与率が比較的高い成分が存在することが強く示唆され、ODS カラムを用いた分取 HPLC による 2 段階の分離及び分離画分の抗酸化活性測定を行い、活性画分の探索研究を行ってきた。今年度は、これまでの分離により抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 7 画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 8 画分につき、ODS とは異なる分離特性を有するカラムを用いてさらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。本研究により、各カンゾウ油性抽出物製品の活性ピークを分離・特定することができた。

協力研究者

受田浩之 高知大学教育研究部
島村智子 高知大学教育研究部
石附京子 国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

天然由来の酸化防止剤である既存添加物カンゾウ油性抽出物は、食品添加物公定書未収載品目であり、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である。しかし、本抽出物製品の抗酸化活性寄与成分について、規格作成に十分な情報が得られていない。

前年度までの研究^{1, 2)}において、カンゾウ油性抽出物製品には、主要成分以外にも抗酸化活性寄与率が比較的高い成分が存在することが強く示唆され、ODS カラムを用いた分取 HPLC による 2 段階の分離及び分離画分の活性測定を行い、活性画分の探索研究を行ってきた。

本研究では、これまでの分離で抗酸化活性が認められた *Glycyrrhiza inflata* 由来製品の 7 画分

及び *Glycyrrhiza glabra* 由来製品の 8 画分につき、ODS とは異なる分離特性を有するカラムを用いてさらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。

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* 由来と記載有り、褐色粉末)、KZ34 (*G. glabra* 由来と記載有り、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。

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

試験管、またはサンプリングチューブに試料

溶液 200 μ L と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μ 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。吸光度測定ブランクスには 99.5% エタノール 1.2 mL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 800 μ 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。

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

B-4. 試料溶液の調製

食品添加物製品 KZ01, KZ34 は、昨年度の分離²⁾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、3 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 3 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, SPD-M10AVP, CTO-10A, FRC-10A.

LC 条件 カラム: Cosmosil π NAP (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m, Nacalai tesque 製, ナフチルエチル基結合型, フェニルカラムより強い π - π 相互作用により構造類似化合物を分離する特性を有する), カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 移動相: 0.05% ギ酸含有アセトニトリル(MeCN)又は 0.05% ギ酸含有メタノール(MeOH)(isocratic), 流速: 1 mL/min, 注入量: 25 $\sim$ 125 μ L ($\times$ 2 $\sim$ 8 回), 検出: 200 $\sim$ 500 nm. なお, 3 段階目 HPLC 分離時の各試料の移動相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。なお, 以下の記載における KZ01 Frc. 11-(22)の様な表記は, 製品 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 22 番目の画分を表している。いずれの画分も製品相当で計 20 mg 分を分取した。

製品 KZ01 Frc. 11-(22) (36% MeOH, 35 $\sim$ 70 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ e の 5 画分), Frc. 28-(29) (29% MeCN, 65 $\sim$ 100 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ d の 4 画分), Frc. 31-(11) (30% MeCN, 60 $\sim$ 95 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ f の 6 画分), Frc. 34-(11) (34% MeCN, 50 $\sim$ 85 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ f の 6 画分), Frc. 34-(15) (35% MeCN, 40 $\sim$ 75 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ d の 4 画分), Frc. 37 & 38-(34) (35% MeCN, 60 $\sim$ 95 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ f の 6 画分), Frc. 37 & 38-(38) (35% MeCN, 20 $\sim$ 40, 60 $\sim$ 70 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ h の 8 画分)。

製品 KZ34 Frc. 11-(22) (36% MeOH, 35 $\sim$ 70 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ e の 5 画分), Frc. 25-(25) (27% MeCN, 65 $\sim$ 100 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ f の 6 画分), Frc. 25-(28) (27% MeCN, 65 $\sim$ 100 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ d の 4 画分), Frc. 32-(22) (30% MeCN, 73 $\sim$ 108 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ e の 5 画分), Frc. 37-(22) (35% MeCN, 60 $\sim$ 95 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ d の 4 画分), Frc. 44 & 45-(21) (41% MeCN, 40 $\sim$ 75 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ d の 4 画分), Frc. 44 & 45-(29) (44% MeCN, 45 $\sim$ 80 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ d の 4 画分), Frc. 52-(24) (48% MeCN, 40 $\sim$ 75 分を 0.5 mL ごと分画 $\rightarrow$ a $\sim$ f の 6 画分)。

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 2 段階目の HPLC 分画物の内, 抗酸化活性が認められた Frc. 11-(22), Frc. 28-(29), Frc. 31-(11), Frc. 34-(11), Frc. 34-(15), Frc. 37 & 38-(34)及び Frc. 37 & 38-(38)につき, さらに 3 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 2 段階目の HPLC 分離で UV 検出された主ピークの殆どは, 3 段階目の HPLC 分離でも主ピークとして検出され, 抗酸

化活性もこれらピーク画分に認められた。ただし、Frc. 37 & 38-(38)のみは、3 段階目の HPLC 分離でピークが分かれ、比較的小さいピークの見られた f 画分で最も抗酸化活性が高かった(図 1, A)。

KZ34 (*G. glabra* 由来) の 2 段階目の HPLC 分画物の内、抗酸化活性が認められた Frc. 11-(22), Frc. 25-(25), Frc. 25-(28), Frc. 32-(22), Frc. 37-(22), Frc. 44 & 45-(21), Frc. 44 & 45-(29)及び Frc. 52-(24) につき、さらに 3 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 2 段階目の HPLC 分離で UV 検出された主ピークの殆どは、3 段階目の HPLC 分離でも主ピークとして検出され、抗酸化活性もこれらピークに認められた。ただし、Frc. 25-(25)及び Frc. 32-(22) では、2 段階目分離の活性画分の主ピークが、3 段階目の分離では分かれ、ODS とは異なる分離特性を有するカラムを用いることで活性ピークを分離・特定することができた(図 1, B 及び C)。

表 1 は、抗酸化活性の認められた画分と活性ピークについてまとめたものである。表中右欄に化合物名を記載し、灰色の網がけをした活性ピークは、市販標品あるいは単離標品により成分を同定できたものである。化合物名の記載があっても網がけの無い活性ピークは、MS 及び UV スペクトルより活性成分を推定したものである。化合物の記載が無く網がけの無い活性ピークは成分未同定であり、構造解析のための多量分取を現在進めている。

D. 結論

前年度までの分離で抗酸化活性を示した *Glycyrrhiza inflata* 由来のカンゾウ油性抽出物製品の 7 画分及び *Glycyrrhiza glabra* 由来のカンゾウ油性抽出物製品の 8 画分につき、ODS とは異

なる分離特性を有するカラムを用いてさらに HPLC による分離・分画を行い、抗酸化活性測定を行った。殆どの画分では、2 段階目の HPLC 分離で認められた主ピークが 3 段階目の HPLC 分離でも主ピークとして検出され、抗酸化活性もこれらピークに認められた。2 段階目 HPLC 分離活性画分の内、一部は 3 段階目の HPLC 分離でピークが分かれ、ODS とは異なる分離特性を有するカラムを用いることで抗酸化活性ピークを分離・特定できた。

現在、未同定の抗酸化活性成分については、構造解析のための多量分取をさらに進めている。

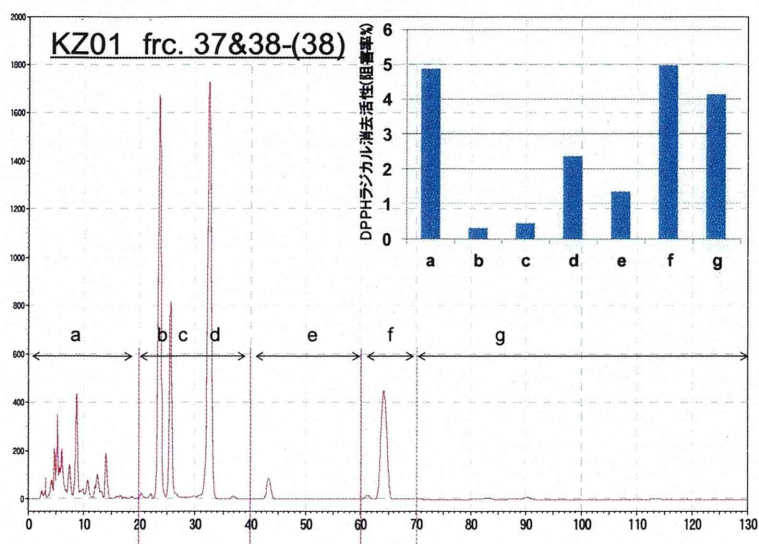
E. 参考文献

- 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価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)
- 2) 多田敦子, 受田浩之, 島村智子, 石附京子, 杉本直樹 既存添加物カンゾウ油性抽出物の抗酸化成分の解明, 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 15-23 (2014)

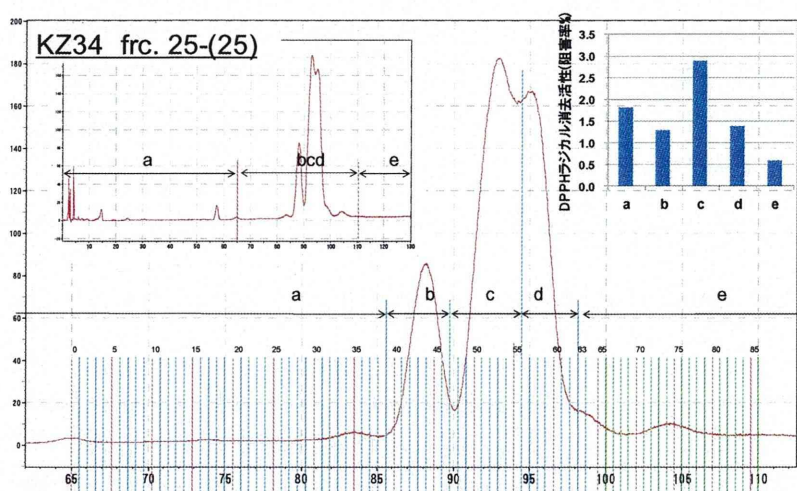
F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

A) 製品 KZ01 Frc. 37&38- (38)



B) 製品 KZ34 Frc. 25- (25)



C) 製品 KZ34 Frc. 32- (22)

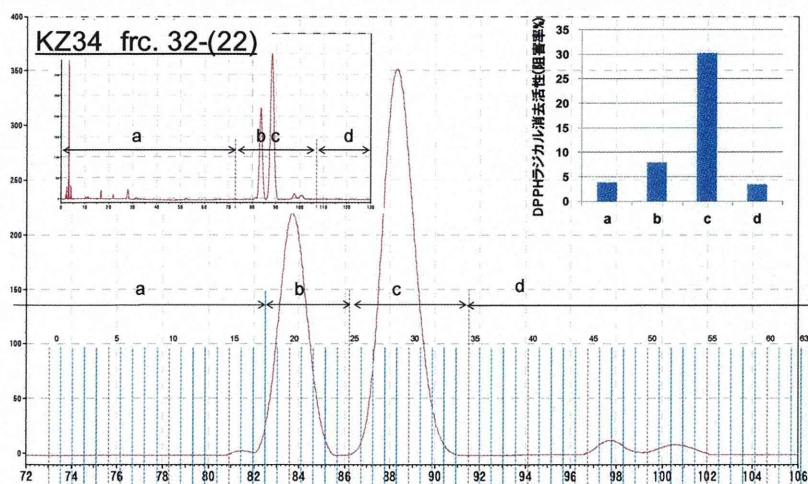


図1 3段階目 HPLC 分離時のクロマトグラム (UV 200~500 nm) と DPPH ラジカル消去活性

表 1 カンゾウ油性抽出物製品から分離した抗酸化活性ピーク

分取画分	分子式	MW	化合物
カンゾウ油性抽出物製品 KZ01 (<i>G. inflata</i> 由来)			
11-(22)-b	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286	Licochalcone B
28-(29)-b	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	354	Licochalcone D
31-(11)-c	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	354	-
34-(11)-d	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338	Licochalcone C
34-(15)-b	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338	Licochalcone A
37&38-(34)-b	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	324	Glabridin
37&38-(38)-f	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336	Glabrone
分取画分	分子式		化合物
カンゾウ油性抽出物製品 KZ34 (<i>G. glabra</i> 由来)			
11-(22)-b	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286	Licochalcone B
25-(25)-c	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	370	-
25-(28)-b	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	358	-
32-(22)-c	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	322	-
37-(22)-b	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	324	Glabridin
44&45-(21)-b	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	354	-
44&45-(29)-b	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	394	Kanzonol X
52-(24)-c	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	392	Hispaglabridin A

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
～粘度測定法に関する検討～

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 物質の粘度を測定する手法として、様々な粘度計が存在する。食品添加物公定書において粘度測定法は、毛細管粘度計法（第1法）と回転粘度計法（第2法）が規定されている。一方、日本工業規格（JIS）における粘度測定法としては、細管粘度計、落球粘度計、共軸二重円筒形回転粘度計、単一円筒形回転粘度計、円すい－平板形回転粘度計の他、近年、振動粘度計が追加されている。本報告では、食品添加物公定書、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JIS、JCSS等における粘度測定法を調査し、比較整理したので報告する。また、JISにおける振動粘度計の原理と各測定計との相違について調べ、考察したので報告する。

協力研究者

杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所
田邊思帆里 国立医薬品食品衛生研究所
佐藤恭子 国立医薬品食品衛生研究所
建部千絵 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

食品添加物公定書の一般試験法には、食品添加物の有効性の評価手法として、「色価測定法」＝着色料の色素濃度を測定する方法、「粘度測定法」＝増粘剤等の動粘度及び（絶対）粘度を測定する方法が収載されている。また、食品添加物の指定においては、ヒトへの安全性だけでなく、食品への有効性が科学的に評価されている必要がある。近年、食のグローバル化によって、国内外からの食品添加物の指定要請が増加しており、これに伴い、様々な方法による有効性データが提出され、これらを客観的且つ迅速に評価する体制が必要になると予想される。したがって、我が国の食品添加物公定書の一般試験法に収載された方法以外について調査を開始し、様々な方法の同等性、適用

可能性等を検討する必要がある。

本研究では、食品添加物公定書の一般試験法に収載される「粘度測定法」について、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JCSS等における方法との比較・整理、また、JISの粘度測定法として近年追記された振動粘度計の原理と他の測定計との相違について確認した。更に、食品添加物公定書の一般試験法への適用可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

第8版食品添加物公定書と、第十六改正日本薬局方¹⁾、JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) の Combined Compendium of Food Additive Specifications、USP (The U. S. Pharmacopeial Convention) の FCC9 (Food Chemicals Codex, Ninth Edition)、日本工業規格 液体の粘度測定方法 JIS Z 8803: 2011、JCSS 技術的要求事項適用指針 登録に係る区分：粘度 校正手法の区分の呼称：粘度標準液、粘度計（第6版）、日本工業規格 粘度計校正用標準液

JIS Z 8809: 2011 等における粘度測定手法を比較検討した。

C. 研究結果

1) 第 8 版公定書における粘度測定法

第 8 版食品添加物公定書において粘度測定法が適用される品目は、以下の 6 品目である。

既存添加物：加工ユーケマ藻類、精製カラギナン、フクロノリ抽出物、プルラン
指定添加物：シリコーン樹脂、メチルセルロース

(なお、2014 年 6 月に指定添加物ポリビニルピロリドンが告示され、第 9 版食品添加物公定書に収載される予定である。)

第 8 版公定書の一般試験法の粘度測定法には、毛細管粘度計法（第 1 法）と回転粘度計法（第 2 法）が規定されている。上記品目のうち、加工ユーケマ藻類と精製カラギナン、フクロノリ抽出物に関しては純度試験項目として粘度を粘度測定法の第 2 法（回転粘度計測定法）により測定することとなっている。プルランとメチルセルロースに関しては純度試験項目として動粘度を、シリコーン樹脂については抽出シリコーン油の動粘度を粘度測定法の第 1 法（毛細管粘度計法）により測定することとなっている。

第 8 版公定書における毛細管粘度計法（第 1 法）は、ニュートン液体の動粘度を測定する方法としてウベローデ型粘度計を用いることとされている。これは一定体積の液体が毛細管を通して流下する

のに要する時間 t (s) を測定し、粘度計に固有の定数である K (mm^2/s^2) (粘度計定数) を乗じて動粘度 ν (mm^2/s) を求めるものである(式 1)。

$$\nu = K t \quad (\text{式 1})$$

第 8 版公定書における回転粘度計法（第 2 法）は、ニュートン液体又は非ニュートン液体に対して液体中を一定の角速度で回転するローターに作用する力（トルク）をバネのねじれ度で検出し、粘度 ($\text{mPa} \cdot \text{s}$) に換算する方法としてブルックフィールド型粘度計を用いることになっている。

2) 動粘度及び粘度の単位

動粘度の単位は SI 単位で表記すると mm^2/s 、CGS 単位系で表記すると cSt (centistokes、センチストークス) であり、粘度の単位は SI 単位で表記すると $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 、CGS 単位系で表記すると cp (センチポアズ) となる。ここで、 1 poise (ポアズ) $= 0.1 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ であり、 stokes (ストークス) $= \text{poise}$ (ポアズ) /density (密度) の関係がある。

3) 薬局方における粘度測定法

第十六改正日本薬局方¹⁾においては、粘度測定法として第 1 法 毛細管粘度計法、第 2 法 回転粘度計法が設定されている。なお、第十六改正日本薬局方¹⁾における粘度測定法の第 1 法 毛細管粘度計法の項目では動粘度から粘度 η を式 2 により算出することとなっている。

$$\eta = \nu \rho = K t \rho \quad \rho: \text{その温度における}$$

液体の密度 (g/mL) (式 2)

European Pharmacopoeia (EP, 欧州薬局方) 8.0 ²⁾においては、Capillary viscometer method と Rotating viscometer method が、United States Pharmacopoeia (USP, 米国薬局方)の stage 6 harmonization notice ³⁾においては、Capillary methods と Rotational methods が各条に記載されている。

4) 日本工業規格における粘度測定法

日本工業規格 (JIS) Z 8803: 2011⁴⁾によれば、液体の粘度測定方法として、細管粘度計、落球粘度計、共軸二重円筒形回転粘度計、単一円筒形回転粘度計、円すいー平板形回転粘度計、振動粘度計による粘度測定方法が採用されている。振動粘度計による粘度測定方法は、JIS Z8803: 2011 で新たに採用された測定方法である。また、JCSS (Japan Calibration Service System)の技術的要求事項適用指針 登録に係る区分: 粘度 校正手法の区分の呼称: 粘度標準液、粘度計 (第 6 版)⁵⁾によると、常用参照標準及び実用標準の具備条件として、細管式粘度校正装置、粘度計校正用標準液⁶⁾及び粘度校正液、細管粘度計、回転粘度計、振動粘度計について記載されている。

1. JIS における粘度試験においては、振動粘度計による粘度測定方式の特徴として、応答が速く連続測定が可能であること、ダイナミックレンジが広く、低粘度から高粘度まで測定できること、比較的少量の液体

で測定できること、簡単な操作で測定できること、液体が流れている状態で測定できること、一般的な振動粘度計で測定される量は粘度×密度に比例した値であること、とされている。JCSS における振動粘度計の要件としては、振動子が受ける粘性抵抗 (粘度と密度の積に比例) を計る計測機器であることと安定した固有振動数を持つものであることとされている。

JIS によると振動粘度計による粘度測定方法の測定原理は、粘度 η 、密度 ρ の液体中に粘度検出部の表面積積分因子が S である振動片を入れて、一定の周波数のもとで駆動力を与えて振動させると、振動片は液体の粘性抵抗により、振動の振幅が液体の粘度に応じて変化することを利用するものである⁴⁾。振動粘度計には音叉によって平板を振動させるものと回転振動 (ねじれ) により検出するものがある⁴⁾。

また、日本の第 8 版食品添加物公定書には記載されていない落球粘度計による粘度測定方法の特徴として、JIS に比較的高粘度液の絶対粘度の測定が可能であることが記載されている。落球粘度計による粘度測定法の原理は、試料中に球を落下させて一定距離の落下時間を測定し、球の直径、密度、試料の密度、重力加速度と落下距離、管壁影響補正係数から試料の粘度を求めるものである。

2. JCSS の技術的要求事項適用指

針⁵⁾によれば、振動粘度計を校正する場合には、以下の条件を満たすこととなっている。

- a) 粘度計校正用標準液又は粘度校正液に記載されている粘度、動粘度、密度の校正実施温度と振動式粘度計を校正する温度に差がある場合には適切な粘度、密度補間式を決定する。補間式は JIS Z8809:2011⁷⁾の解説等を参照すること。
- b) 粘度を η 、動粘度を ν 、密度を ρ とすると、振動式粘度計の検出量は $\eta \rho$ に比例するので、必要に応じて適切な温度における密度値を決定して動粘度、粘度を校正することができる。

細管粘度計や回転粘度計と異なり、振動粘度計の検出値は $\eta \rho$ に比例するので、振動粘度計を用いて粘度又は動粘度を算出する場合には密度計により密度を値付けする必要がある。また、振動粘度計により粘度校正液又はニュートン液体を校正する場合には、必要に応じて国家計量標準にトレーサブルな方法で粘度校正液又はニュートン液体の密度を値付けして、粘度又は動粘度を求める必要がある⁵⁾。

5) 粘度測定法の整合性

第 8 版公定書、JECFA の Combined Compendium of Food Additive Specifications、USP の FCC における粘度測定法を比較すると以下の様になる。

FCC においては、日本の毛細管粘度計法

(第 1 法)に相当する手法として use of capillary tubes such as Ubbelohde, Ostwald, or Cannon-Fenske viscometer tubes となっており、回転粘度計法(第 2 法)に相当する手法として use of rotating spindle such as the Brookfield viscometer となっている。

JECFA では各条記載となっているが、Processed Eucheuma Seaweed (加工ユーケマ藻類)は Brookfield LVF viscometer を、Polydimethylsiloxane (シリコーン樹脂)は Ubbelohde suspended level viscometer を、Carrageenan (カラギナン)は Brookfield LVF or LVT viscometer を、Pullulan (プルラン)は Ubbelohde-type (falling-ball) viscometer を用いることになっている。すなわち、第 8 版公定書の一般試験法及び各条規格に記載の粘度測定法は、JECFA に準じた方法が採用されているといえる。ただし、プルランについては、JECFA では Ubbelohde-type (falling ball) viscometer となっており、これはウベローデ型(又は落球式)を用いるということのようである。

D. 考察

本報告で調査対象とした国外規格における粘度測定法には、JIS で採用されている振動粘度計による粘度測定法(音叉式、回転振動式)の記載は確認されなかった。すなわち、国内外において、一般的な粘度測定法として近年認知された方法が食品添加物の規格試験法に採用されている例はなかった。

食品添加物公定書の粘度測定法への導入を考える場合は、各種添加物品目にお

ける測定精度や適用性に関して予め十分に検討する必要がある。また、回転粘度計法と比較し同等性あるいは優位性が確保されることを吟味する必要がある。一方、簡便に測定する手法として振動粘度計の応用範囲は広いものと考えられることから、低粘度あるいは少量しか入手できない添加物品目等の粘性を簡便に確認する方法としての適用可能性も考えられる。ただし、これらの点についても予め検討が必要とされる。

なお、日本では動粘度と粘度を用語として区別しているが、JECFA の monograph では動粘度 (kinematic viscosity) と粘度 (absolute viscosity、dynamic viscosity) を共に viscosity として記載してあるので、国際比較する際には留意する必要があることが判明した。

E. 結論

食品添加物公定書における粘度測定法 (毛細管粘度計方式 (第 1 法) 及び回転粘度計方式 (第 2 法)) は、日本薬局方、JECFA、EU、FCC、JCSS 等における粘度測定法と概して類似していることが確認された。また、JIS に記載のある振動粘度計方式は、今回調査対象とした国内外の各種規格試験法に粘度測定法としての記載は確認されなかったが、その特徴から、低粘度あるいは少量しか入手できない添加物品目等での簡便な粘性確認への適用可能性は示唆された。ただし、食品添加物公定書への導入を考える場合は、対象品目における測定精度や適用性、毛細管粘度計法や回転粘度計法との同等性や優位性を吟味する必要がある。また、振動

粘度計による測定結果は、粘度×密度となり、毛細管粘度計方式や回転粘度計方式での測定結果である動粘度 (粘度/密度) や粘度とは異なる点に留意が必要であることが明らかとなった。

F. 参考資料

- 1) 第十六改正日本薬局方 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) 日本薬局方電子版
<http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/digital.html>
- 2) European Pharmacopoeia 8th edition
<https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-8th-edition-1563.html>
- 3) U.S. Pharmacopeial Convention, Notices of stage 6 harmonized text
<http://www.usp.org/usp-nf/official-text/stage-6>
- 4) 日本工業規格 液体の粘度測定方法 JIS Z 8803: 2011
<http://kikakurui.com/z8/Z8803-2011-01.html>
- 5) JCSS 技術的要求事項適用指針 登録に係る区分：粘度 校正手法の区分の呼称：粘度標準液、粘度計 (第 6 版)
<http://www.nite.go.jp/data/000054971.pdf>
- 6) 粘度の JCSS 校正事業者の認定取得について
https://www.nmij.jp/~nmijclub/fluidp/docimgs/fluidp_2012_7_1.pdf
- 7) 日本工業規格 粘度計校正用標準液 JIS Z 8809: 2011
<http://kikakurui.com/z8/Z8809-2011-01.html>

1-01.html

G. 研究発表

1. 論文発表

平成 26 年度は特になし。

2. 学会発表

平成 26 年度は特になし。

H. 知的財産権の出願，登録状況
特になし。

I. 健康危機情報

知り得る限りでは特になし。

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

既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を応用した検討

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

研究要旨 天然由来の酸化防止剤である既存添加物クエルセチンは、食品添加物公定書未収載であり、成分規格案の作成を行う上で定量法の確立が必要である。そこで本研究では、¹H-NMR による定量 NMR(quantitative NMR: qNMR)を適用し、試薬や添加物の正確な quercetin 含量を求めることにより、既存添加物クエルセチンの定量法確立のための基礎的検討を行った。本研究により、既存添加物クエルセチンの成分規格作成に有用な基礎データを得ることができた。また、これらの結果より、標準試薬(qNMR 純度適用)を用いた LC/UV による quercetin の定量が最も適切であることが示唆された。

協力研究者

松田 諭 国立医薬品食品衛生研究所
河崎裕美 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
西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

既存添加物クエルセチンは、天然由来の酸化防止剤である。既存添加物名簿収載品目リスト¹⁾の基原・製法・本質には、「ルチン（抽出物）を、酵素又は酸性水溶液で加水分解して得られたものである。成分はクエルセチンである。」と記載されている。本品目は食品添加物公定書未収載であり、成分規格案の作成を行う上で定量法の確立が必要である。(社)日本食品添加物協会の第4版既存添加物自主規格(自主規格)のクエルセチンの規格には、quercetin 含量及び定量法が設定されている。定量法には紫外可視吸光度測定法が設定されており、標準試薬は用いず、試料の吸光度と吸光係数の関係式より含量を算出する。しかし、吸光係数の妥当性が検証されていないことや、試料中に混在する類縁物質を含めて検出すること等から、定量値

の信頼性が懸念される。また、quercetin 標準試薬を参照した定量法についても検討する必要性が考えられた。

そこで本研究では、¹H-NMR による定量 NMR(quantitative NMR:qNMR)を応用し、試薬や添加物の正確な quercetin 含量を求めることにより、既存添加物クエルセチンの定量法確立のための基礎的検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料・試薬

日本食品添加物協会を通じて供与された既存添加物クエルセチン2製品(FA-1及びFA-2)を使用した(表1)。Quercetin 試薬は表1に記載の5製品(QS-1～QS-5)を使用した。

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-2. 試験方法

1) qNMR による定量

表2に示す測定条件で行った。また、qNMR 用内標準物質には DSS-d₆(和光純薬工業, TraceSure®, 92.2%±0.3%)を使用した。NMR 測定用重溶媒には

メタノール- d_4 (Isotec 社製)を用いた。定量用シグナルの選択は既報²⁾に従った。

2) Quercetin の吸光度測定定量法の係数の算出

qNMR で算出される計量学的に正確な quercetin 含量と吸光度との関係から、正確な定量計算式の係数を求めた。得られる係数を用いて吸光度測定による定量を行った。

3) HPLC による定量法の検討

LC/UVを用いる quercetin 定量法について検討した。ODS カラム(Atlantis T3)を用い、移動相は 0.1% ギ酸及び 0.1%ギ酸入りアセトニトリルの溶媒グラジェントとした。また、LC/MS (条件：表 3)により quercetin 以外の化合物についても調べた。場合により標品として用いた quercetin 試薬の qNMR 純度値を適用した。

C. 研究結果及び考察

C-1. qNMR による定量

1) 乾燥減量の測定結果

自主規格には、「含量：本品を乾燥物換算したものは、クエルセチン($C_{15}H_{10}O_7$) 95.0%以上を含む。」と記載されている。そこで、まず各試料の乾燥減量を測定した。自主規格には、「乾燥減量：13.0%以下 (135℃, 2 時間)」と記載されている。この方法に従って乾燥減量を測定した。その結果、添加物 2 製品の乾燥減量は、2 水和物の場合の水和水の割合 (理論値 10.6%)と近い値を示した。自主規格の乾燥減量規格案に適合した。

2) qNMR による定量結果

図 1 に添加物クエルセチン 2 製品 (FA-1 及び FA-2) の 1H -NMR スペクトルを示す。また表 4 に各試料の qNMR による定量結果を示す。添加物 2 製品の含量(乾燥物換算)は、自主規格の含量規格案に適合した。試薬の乾燥物換算での含量は 92.04 ~98.36%と 6%以上の幅が認められ、これら試薬を定量用標品として用いる場合は絶対純度も考慮すべきと示唆された。

C-2. 吸光度測定による定量用係数の算出

自主規格には、「定量法：測定する吸光度が 0.3

~0.7 の範囲になるように、本品を精密に量り、エタノールを加えて溶かし、100 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、エタノール製酢酸試液を加えて正確に 100 mL とし、検液とする。エタノール製酢酸試液を対照とし、液層の長さ 1 cm で波長 370 nm における吸光度 A を測定し、次式により含量を求め、乾燥物換算を行う」と記載されている。

クエルセチン ($C_{15}H_{10}O_7$) の含量 (%)

$$= \frac{A \times 100 \times 10}{0.800 \times \text{試料の採取量(g)} \times (100-W)}$$

W: 試料の乾燥減量 (%)

自主規格記載の定量法では、係数 0.800 を計算式で用いているが、この係数が適切であることを確認した。LC/UV 分析で面積百分率がほぼ 100%であった試薬 QS-4 を用い、qNMR による純度値と吸光度値から、quercetin の吸光度測定による定量法の正確な係数を算出した。自主規格に記載の係数 0.800 (370 nm)に対し、今回算出された係数は、370 nm では 0.795 ± 0.015 、極大吸収波長 374 nm では 0.805 ± 0.009 であった。

C-3. 吸光度測定による定量

図 2 に吸光度測定法での quercetin の UV スペクトルを示す。 $\lambda_{\max}$ は 374 nm であり、自主規格の定量用波長 370 nm とは異なった。

表 5 に吸光度測定および qNMR による定量結果を示す。添加物 2 製品の含量(乾燥物換算)は、自主規格の含量規格案に適合した。また、吸光度測定法(各係数使用)と qNMR による直接定量とで quercetin 含量の差が 3%以上の試料もあった。傾向として、 $\lambda_{\max}$ 374 nm、係数 0.805 を用いる吸光度測定法で、qNMR による定量値との差が小さかった。

C-4. HPLC による定量法の検討

1) 類縁物質の同定

図 3 に FA-2 の LC/UV クロマトグラムを示す。LC/MS 分析での MS スペクトル及び UV スペクトルより、添加物中に混在する類縁物質 (図 3 のピーク b 及び c) は、それぞれ kaempferol 及び

isorhamnetin であると判明した。

2) LC/UV による定量

Quercetin 2 水和物試薬の内 qNMR 純度の高かった QS-2 を定量用標品として用い、上記類縁物質及び製造原料中の成分である rutin と quercetin とが分離する LC 条件で定量した。

図 4 に、定量値の比較 (qNMR と LC/UV) 結果を示す。標品の qNMR 純度を反映させた定量値は、qNMR による定量値と近く、差は 1.4%未満であった。標品の qNMR 純度を反映させない場合は、qNMR 定量値との差は大きく、2.9~4.6%であった。添加物 2 製品の含量(乾燥物換算)は、自主規格の含量規格案に適合した。

D. 結論

本研究では、¹H-NMR による定量 NMR(quantitative NMR:qNMR)を適用し、試薬や添加物の正確な quercetin 含量を求めることにより、既存添加物クエルセチンの定量法確立のための基礎的検討を行った。本研究により、既存添加物クエルセチンの成分規格作成に有用な基礎データを得ることができた。結果より、標準試薬(qNMR 純度適用)を用いた LC/UV による quercetin の定量が最も適切であることが示唆された。

E. 参考文献

- 1) 消費者庁次長通知“食品衛生法に基づく添加物の表示等について、別添 1 既存添加物名簿収載

品目リスト”平成 22 年 10 月 20 日、消食表第 377 号(2010)

- 2) 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎 壮, 河村葉子, 定量 NMR に基づく既存添加物中のクエルセチンおよびクエルセチン配糖体の絶対定量. *食衛誌*, 51, 205-212 (2010)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada, A., Ishizuki, K., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Akiyama, H., Method for the Determination of Natural Ester-Type Gum Bases Used as Food Additives via Direct Analysis of their Constituent Wax Esters Using High-Temperature GC/MS, *Food Science & Nutrition*, 2, 417-425 (2014)

- 2) 田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻崇, 多田敦子, 穂山浩, 合田幸広, 五十嵐良明, 定量 NMR による多環芳香族炭化水素市販試薬の純度決定. *環境科学会誌*, 27, 142-150 (2014)

2. 学会発表

- 1) 松田 諭, 多田敦子, 大槻 崇, 石附京子, 河崎裕美, 田原麻衣子, 杉本直樹, 穂山 浩, 既存添加物クエルセチンの定量法確立のための qNMR を用いた基礎的検討, 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014 年 12 月, 金沢)

表 1 試料・試薬情報

	Sample type	Manufacturer
Quercetin (extract)		
FA-1	Food additive	Company A
FA-2	Food additive	Company B
Quercetin		
QS-1	Reagent	Cayman Chemical Co., CAT No. 10005169, Lot. 0446386-10
Quercetin dihydrate		
QS-2	Reagent (2H ₂ O)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Cat No. 173-00403, Lot. PEE3352
QS-3	Reagent (2H ₂ O)	EXTRASYNTHÈSE, Cat No. 6151-25-3, Lot. 14021107
Quercetin hydrate		
QS-4	Reagent (xH ₂ O)	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., CAT No. P0042, Lot. GM01
QS-5	Reagent (xH ₂ O)	Kanto Chemical Co., Inc., CAT No. 35030-40, Lot. 112N2139

表 2 qNMR 測定条件

Spectrometer	ECA600 (JEOL Ltd.)
Spectral width	-5-15 ppm
Data points	64,000
Auto filter	on (8 times)
Flip angle	90°
Pulse delay	60 s ($>5 \cdot T_1$)
Scan times	8
Sample spin	no spin
Probe temperature	R.T.
Solvent	CD ₃ OD
qNMR reference material	DSS- <i>d</i> ₆

表 3 LC/MS 装置および測定条件

HPLC	Alliance 2695 (Waters Co.)
PDA	Alliance 2996 (Waters Co.)
MS	Quattro micro (Waters Co.)
Column	Atrantis T3, 3 μ m, 2.1 ϕ $\times$ 150 mm (Waters Co.)
Column temperature	40°C
Injection volume	10 μ L
Capillary voltage	3.0 kV
Cone voltage	30 V
Source temperature	110°C
Desolvation gas	350°C, 800 L/hr
Cone gas	30 L/hr
Flow rate	0.3 mL/min
Solvent A	0.1% formic acid
Solvent B	0.1% formic acid in CH ₃ CN

	0 min	15→20 min	20→30 min
Solvent A	90%	50%	90%
Solvent B	10%	50%	10%

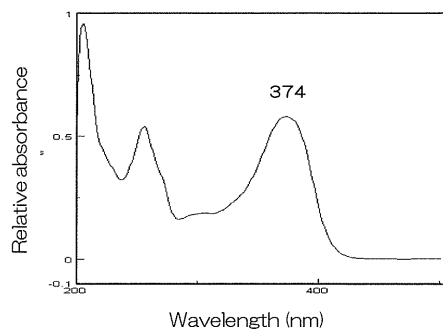


図2 吸光度測定法での quercetin の UV スペクトル

表5 吸光度測定および qNMR による定量

	qNMRによる含量(%)	吸光度測定による含量(%)		
		370 nm, 係数0.800	370 nm, 係数0.795	374 nm, 係数0.805
FA-1	95.9	96.3	96.9	95.8
FA-2	95.5	99.5	100.2	99.2
QS-1	92.0	93.6	94.2	93.6
QS-2	95.7	97.0	97.6	96.7
QS-3	92.7	93.9	94.5	93.3
QS-4	98.4	98.7	99.4	98.5
QS-5	95.3	96.9	97.6	96.8

含量はいずれも乾燥物換算での値

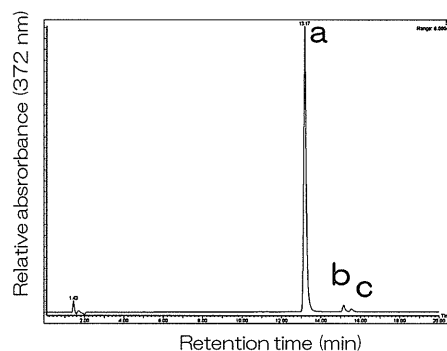


図3 FA-2 の LC/UV クロマトグラム

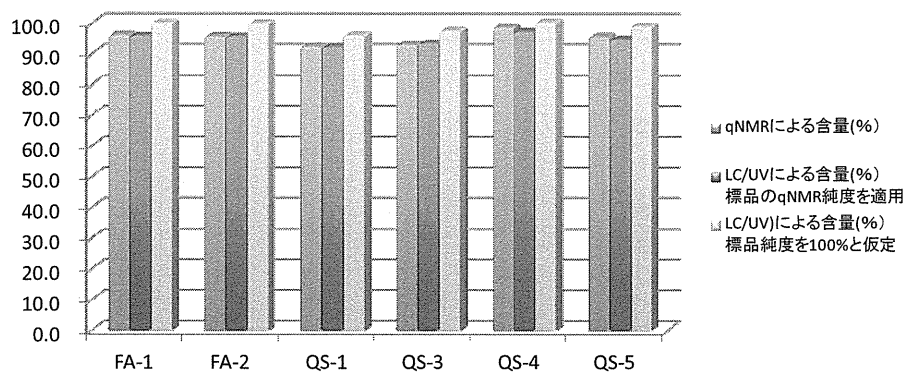
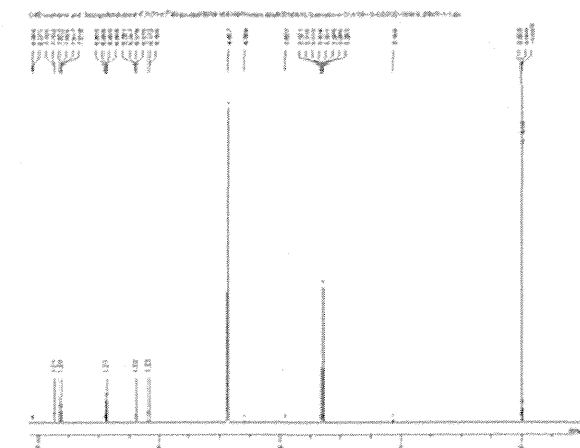
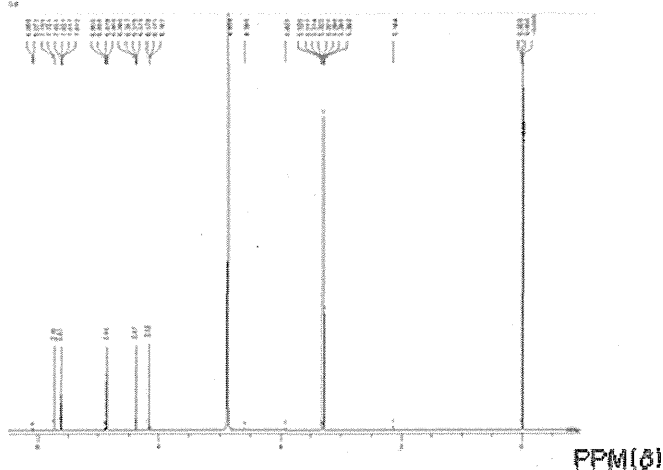


図4 定量値の比較 (qNMR と LC/UV)

FA-1



FA-2



Chemical shift

図1 既存添加物クエルセチンの¹H-NMR スペクトル

表4 qNMR による定量結果

		qNMRにより測定した含量(%)			
		乾燥減量考慮無し		乾燥物換算	RSD(%)
		無水物として	2水和物として	無水物として	
Quercetin (extract)					
FA-1	Food additive	85.9	96.1	95.9	0.9
FA-2	Food additive	85.5	95.7	95.5	0.4
Quercetin					
QS-1	Reagent	82.5	92.4	92.0	1.2
Quercetin dihydrate					
QS-2	Reagent (2H ₂ O)	85.7	95.9	95.7	0.5
QS-3	Reagent (2H ₂ O)	83.4	93.4	92.7	1.2
Quercetin hydrate					
QS-4	Reagent (xH ₂ O)	91.5	102.4	98.4	1.2
QS-5	Reagent (xH ₂ O)	88.1	98.6	95.3	0.9

いずれも試料液調製 n=3 につき測定した。

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
既存添加物の成分規格試験法の検討
～一般飲食物添加物「チコリ色素」の指標成分の探索～

分担研究者 杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

要旨 一般飲食物添加物「チコリ色素」の成分規格を設定するための基礎情報を得るために、中に指標成分となる特有の成分が含有されているかどうか検討した。チコリ色素製品をHPLCに付し、観察された化合物1及び2を単離精製し、NMRによりその化学構造を決定した。その結果、化合物1が5-(hydroxymethyl)furfural (HMF)、化合物2が4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methylfuran-3(2H)-oneであり、いずれもチコリ色素製品を製造する際、焙煎の過程において糖類が変性した生じた化合物であり、チコリ色素の指標成分としては不適當と考えられた。また、チコリ色素に特有な成分であるチコリ酸、加水分解後のカフェ酸を定量分析した結果、加水分解後のカフェ酸の有無がチコリ色素の確認に応用可能と考えられた。

協力研究者

多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所

①指定添加物

②既存添加物

③天然香料

④一般飲食物添加物

A. 研究目的

天然添加物は、平成 7 年（1995 年）に食品衛生法が改正されるまでは、有害でない限り一般の食品と同様の扱いであり、添加物としての法的規制を受けていなかった。平成 7 年の食品衛生法改正によって天然添加物にも指定制度が導入された際、その時点で流通実態（製造、販売、使用、輸入）のあった天然添加物（法的には「化学的合成品以外の添加物」といった。）を既存添加物、天然香料、一般飲食物添加物の 3 グループに分類した。これらは指定制度の適用除外として引き続き使用が認められた。

このような歴史的経緯から、食品添加物は、法規制上次の 4 つに分類される。

指定添加物は指定制度に基づく添加物であり、国が有効性と安全性を審査した上で使用を許可しており、公的な成分規格がそれぞれ設定されている。一方、現在流通している既存添加物は国による事前の有効性・安全性審査を行った上で使用を認めたものではない。このため、既存添加物については、国の責任で安全性情報を収集して安全性を確認して公的な規格基準を設定することとなっている。しかし、指定添加物以外の添加物について公的な規格基準の設定は進んでいない。特に、一般飲食物添加物は一般に飲食される食品等の抽出物であることから安全性に問題がなく、早急な成分規格設定は

必要ないと考えられている。また、天然由来の既存添加物及び一般飲食物添加物は、ほとんどが天然物からの抽出物であり多成分からなる、我が国独自のものが多い、製品の成分が未解明なものが多い。したがって、天然添加物の成分規格設定には、不足している化学的データの収集が必要とされている。このような背景から、既存添加物 365 品目のうち約 210 品目、一般飲食物添加物 106 品目のうち 3 品目について規格設定されているのみである。

チコリは風味がコーヒーに似ていることから、古くから代用コーヒーとして知られている。効果としては、血糖降下作用、利尿降下、緩下作用などが報告されている。また、チコリの成分として、イヌリン、チコリ酸などが報告されている。

一方、一般飲食物添加物「チコリ色素」は、その基原・製法・本質が、「キク科キクニガナ (*Cichorium intybus* L.) の根を焙煎したものより、水で抽出して得られたものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある」と記載されている。一般飲食物添加物「チコリ色素」に関する公的な規格は設定されていないが、業界の自主規格には、以下のフェノール性水酸基の確認試験が設定されている。

<チコリ色素自主規格抜粋>

確認試験 (1) 本品の表示量から、色価 15 に換算して 1 g に相当する量を量り、クエン酸緩衝液(pH 7.0) 500 mL に溶かした液は、黄褐色を呈する。

(2) 本品の表示量から、色価 15 に換算して 1 g に相当する量を量り、水 100 mL

に溶かす。この液 10 mL に塩化鉄(III)溶液 (1→10) 1 mL を加えるとき、暗褐色を呈する。

(3) 本品の表示量から、色価 15 に換算して 1 g に相当する量を量り、水を加えて 500 mL に溶かす。この液 10 mL にバニリン試液 10 mL を加えるとき、褐色を呈する。

確認試験(2)及び(3)は、チコリ色素中のフェノール性水酸基をもつ化合物、カフェ酸やチコリ酸の存在を指標とした試験であると考えられる。しかし、一般飲食物添加物「チコリ色素」の成分組成についての報告はなく、自主規格の設定根拠については不明である。

そこで、本研究では、一般飲食物添加物「チコリ色素」中に指標成分となる特有の成分が含有されているかどうか検討したので報告する。

B. 方法

1) 試薬

水は、ミリQ SP standard (日本ミリポア)により精製して得られた超純水を用いた。各種溶媒は、特に断りのない限り関東化学または和光純薬より購入した試薬特級品を用いた。使用した溶媒名は、以下のように略した。メタノール: MeOH, アセトニトリル: CH₃CN, ギ酸: HCOOH。

薄層クロマトグラフィー(TLC)は、逆層として HPTLC RP-18WF254s Art.13124 (10×10cm, Merck)を用いた。TLC 上のスポットは、UV 検出器 (254 nm, 366 nm) により検出した。オープンカラムの担体としては、YMC GEL ODS-A (YMC),

Diaion HP-20 (日本錬水)を用いた.

NMR 用重溶媒は, D₂O (ISOTEC 151882), qNMR 用基準物質は, DSS-*d*₆ (sodium 3-(trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3-*d*₆-sulfonate) (Wako 044-31671, 純度 92.2%)を用いた.

試薬として, 5-ヒドロキシメチルフルフラール: 5-(hydroxymethyl)furfural (HMF) (SIGMA), チコリ酸: chicoric acid (Wako), カフェ酸: caffeic acid (関東化学)を用いた.

試料としてチコリ色素: チコリ色素 A 製品(粉末製品, O 社製, 当部整理番号 H26K035)を用いた.

2) 装置

各種機器データは, 次の機器を用いて測定した.

高速液体クロマトグラフィー(HPLC: high performance liquid chromatography)には, HPLC system (Alliance 2695; 2996 photodiode array detector (Waters 社製)), 液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS: liquid chromatograph/mass spectrometer)には, LC/MS system (Alliance 2695; 2996 photodiode array detector; micromass Quattro micro (Waters 社製)), 分取 HPLC には, UFLC system (LC-20A (Shimadzu 社製))を用いた.

核磁気共鳴スペクトル(NMR)には, ECA600 (JEOL 社製)を用いた. また, homonuclear shift correlation spectroscopy (COSY), heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC)及び heteronuclear multiple bonds correlation (HMBC)には磁場勾配システムを用いた. NMR のケミカルシフト値は, DSS-*d*₆ を内部標準とし, δ

値を ppm 単位で, 結合定数(*J* 値)を Hz 単位で表し, シグナルの多重度の記載は次の記号で表した. s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet

3) 実験方法

3-1) チコリ色素の LC/MS 分析

チコリ色素製品を H₂O に溶解させ, 10 mg/mL に調製したものを以下の条件の LC/MS に付し, 成分組成を確認した.

<LC/MS 条件>

LC 条件; カラム: Atlantis T3 (2.1×150 mm, 3 μ m, Waters), 移動相: CH₃CN: 0.1% HCOOH=3: 97→(45 min)→95: 5, 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 10 μ L, PDA 検出器: 190~600 nm, MS 条件; キャピラリー電圧: 3.0 kV (pos., neg.), コーン電圧: 20 V, 脱溶媒温度: 350°C, ソース温度: 120°C, 脱溶媒ガス流量: 400 L/hr, コーンガス: 50 L/hr, MS 検出器: ESI-MS scan mode (pos., neg.) *m/z* 100~1000.

また, LC/TOF-MS に付し, ピーク 1 及び 2 (化合物 1 及び 2)の精密質量を以下の条件で測定した.

<LC/TOF-MS 条件>

LC 条件; カラム: ACQUITY UPLC BEH (2.1 mm i.d.×50 mm, 1.7 μ m, Waters), 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40°C, 移動相: A = 0.1%ギ酸 aq., B = MeOH, gradient B 3% (0-1 min)→20% (6 min)→95% (7-12 min)→3% (12.1-15 min), フォトダイオードアレイ検出器(PDA): 210-600 nm,