

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和7年度 研究分担報告書
分析法及び試験法の開発に関する研究

カシアガム中のアントラキノンの分析手法に関する研究
分担研究者 大槻 崇 日本大学 生物資源科学部 食品開発学科 准教授

研究要旨 本研究では、既存添加物の成分規格試験法の効率化及び精度向上を目的とし、成分規格が未制定であるカシアガムを対象に、成分規格におけるアントラキノン分析法の確立に関する検討を行った。今年度は昨年度に引きつづき、前処理法の改良、特に、有害試薬の使用低減の観点から、抽出溶媒として規定されているクロロホルムに代わる抽出溶媒(ジクロロメタン、酢酸エチル)の適用性を添加回収試験により評価した。その結果、各溶媒を単独で用いた場合、酢酸エチルではアロエエモジンの回収率が著しく低く、ジクロロメタンではフィシオンの回収率が相対的に低値を示すとともに、一部の測定対象物質でRSDが増大することが確認された。そこでジクロロメタンで抽出後、酢酸エチルで抽出し、各有機層を統合せずに個別に濃縮して試験溶液を調製する段階抽出法を考案した。本抽出法により、カシアガム中のアントラキノン類を良好な真度及び精度をもって抽出可能であることが実証され、JECFA規格の基準値(0.5 mg/kg)に適用可能かつクロロホルムを使用しない前処理法が確立された。

A. 研究目的

カシアガムは既存添加物名簿収載品目リストに収載されている既存添加物の一つであり、増粘安定剤として食品産業において広く使用されている¹。一方、本添加物は食品衛生法第13条の規定により告示される「食品、添加物等の規格基準」における成分規格が未制定であり、現状では日本食品添加物協会が作成した第5版既存添加物自主規格に準拠して製造された製品が流通している²。近年、既存添加物の品質確保及び食の安全性向上を目的として、個々の既存添加物に関する成分規格の設定並びに食品添加物公定書への収載が進められており、カシアガムについても規格基準の策定及び食品添加物公定書への収載に向けた検討が行われている。

カシアガムの基原・製法・本質について、既存添加物名簿収載品目リストには「マメ科エビスグサモドキ(*Cassia tora* LINNE)の種子の胚乳部を粉砕して得られたものである。主成分は多

糖類である。」と記載されている¹。しかし、基原植物の種子由来不純物としてアントラキノン類が含まれ得ることが知られており、製造工程によっては製品中にアントラキノン類が微量残留する可能性がある。実際、JECFAの化学・技術評価(Chemical and Technical Assessment; CTA)では、カシア種子中のアントラキノン類が主要な懸念不純物であること及び精製工程によりアントラキノン類が低減されることが示されている³。このような毒性が懸念される化合物を含有し得る食品添加物については、安全性確保の観点から、適切な残留基準値の設定とそれを担保し得る分析法の整備が不可欠である。

FAO/WHO 食品添加物専門家会議(JECFA)におけるカシアガムの規格では、アントラキノン類(エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸、フィシオン)の総含有量を 0.5 mg/kg 以下と規定している⁴(図 1)。同規格の試験法では、アントラキノン類をクロロホルムで抽出し、

内標準物質としてダントロン(1,8-dihydroxyanthraquinone; 1,8-DAQ)を用いる HPLC 法により定量し、フォトダイオードアレイ検出器を用いて 435 nm で検出することとされている⁴。したがって、国内規格の策定に向けては、当該基準値(0.5 mg/kg)を確実に評価可能な分析法の確立が重要な課題となる。

一方、国内規格の策定に向けた過年度の検討において、JECFA 法は前処理及び HPLC 条件に課題を有することが明らかとなり、既報^{5,6}も参考に改良に向けた検討を進めてきた。未検討の課題としては、前処理で用いられるクロロホルムの使用が挙げられる。クロロホルムは、作業者の安全性及び環境負荷の観点から、代替溶媒への変更を検討することが重要である。そこで本研究では、カシアガム中のアントラキノン類分析法の確立を目的とし、JECFA 規格の分析法を基盤とした前処理工程の改良を検討した。具体的には、有害試薬の使用低減の観点から代替抽出溶媒(ジクロロメタン、酢酸エチル等)の適用性を評価し、JECFA 規格の基準値(0.5 mg/kg)に適用可能な前処理法の確立について検討した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

カシアガム(管理番号:C2395)は国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部よりご供与いただいた。エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸、フィシオンは、東京化成工業(株)製を用いた。ダントロン(1,8-DAQ)は、富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。その他の溶媒は高速液体クロマトグラフィー用または特級を用いた。

B-2) 装置

分析用 HPLC ポンプ: LC-20AD(高压グラジエント)、オートサンプラ: SIL-20A、カラム恒温槽: CTO-20AC、多波長検出器: SPD-M20A、脱気装置: DGU-20A3R、システムコントローラ: CBM-20A、分析データ処理システム: LabSolutions((株)島津製作所製)。

マイクロ天秤: BM-20((株)エー・アンド・デイ

製)

セミマイクロ天秤: AUW220D 及び AP125WD((株)島津製作所製)

遠心分離機: 5220(久保田商事(株)製)及び MiniSpin(エッペンドルフ製)

オープン: DR-22(ヤマト科学(株)製)

B-3) JECFA 法における前処理法の改良

B-3-1) 試験溶液の調製(1)(抽出溶媒としてクロロホルムまたはジクロロメタンを単独で使用する場合)

過年度の検討に基づき、JECFA Monographs におけるカシアガム規格で規定されているアントラキノン類分析法の試験溶液の調製手順(Sample preparation)(図 2)を一部改変して用いた。すなわち、試料 4.0 g を正確に量りとり、2 mol/L 硫酸 100 mL を加えて軽く振り混ぜた後、103℃で 1 時間加熱した。室温まで冷却後、内容物を分液ろう斗に移し、クロロホルム 100 mL を加えて液液分配を行った。静置後、生じたエマルションを低減するため、全量を 50 mL 容遠沈管に分注して遠心分離(400×g, 5 分, 20℃)を行い、下層(クロロホルム層)を採取した。上層に再度クロロホルムを加え、同様の抽出操作をさらに二回繰り返した後、得られたすべての下層(クロロホルム層)を合わせて減圧下で溶媒を留去した。残留物にメタノールを加え超音波処理し、不溶物を遠心分離(10000×g, 2 分, 20℃)により除去した後、上清をメタノールで 2 mL に定容したものを試験溶液とした。なお、ジクロロメタンを抽出溶媒として使用する場合は、上記の記述のクロロホルムをジクロロメタンに置き換え、同様の抽出操作を行った(図 3)。

B-3-2) 試験溶液の調製(2)(抽出溶媒として酢酸エチルを単独で使用する場合)

試験溶液の調製は、前項 B-3-1 の操作手順に準じて行った。ただし、抽出溶媒をクロロホルム(比重約 1.48 g/mL, 20℃)から酢酸エチル(比重約 0.90, 20℃)に変更したことに伴い、有機層が下層から上層となるため、抽出操作を以下のとおり変更した。すなわち、試料 4.0 g を正確に量りとり、2 mol/L 硫酸 100 mL を加えて軽く振り

混ぜた後、103℃で1時間加熱した。室温まで冷却後、内容物を分液ろう斗に移し、酢酸エチル 100 mL を加えて液液分配を行った。静置後、生じたエマルジョンを低減するため、全量を 50 mL 容遠沈管に分注して遠心分離(400×g, 5分, 20℃)を行い、上層(酢酸エチル層)を採取した。下層に再度酢酸エチルを加え、同様の抽出操作をさらに二回繰り返した後、得られたすべての上層(酢酸エチル層)を合わせて減圧下で溶媒を留去した。残留物にメタノールを加え超音波処理し、不溶物を遠心分離(10000×g, 2分, 20℃)により除去した後、上清をメタノールで 2 mL に定容したものを試験溶液とした(図 4)。

B-3-3) 試験溶液の調製(3)(抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用する場合)

抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを併用する場合、ジクロロメタン、次いで酢酸エチルの順で段階的に液液分配を行い、各溶媒による抽出液は統合せず、それぞれ独立した試験溶液として調製した。すなわち、試料 4.0 g を正確に量りとり、2 mol/L 硫酸 100 mL を加えて軽く振り混ぜた後、103℃で1時間加熱した。室温まで冷却後、内容物を分液ろう斗に移し、ジクロロメタン 100 mL を加えて液液分配を行った。静置後、生じたエマルジョンを解消するため、全量を 50 mL 容遠沈管に分注して遠心分離(400×g, 5分, 20℃)を行い、下層(ジクロロメタン層)を採取した。上層に再度ジクロロメタンを加え、同様の抽出操作をさらに1回繰り返し、得られたすべての下層(ジクロロメタン層)を合わせて減圧下で溶媒を濃縮した。残留物にメタノールを加え超音波処理し、不溶物を遠心分離(10000×g, 2分, 20℃)により除去した後、上清をメタノールで 2 mL に定容し、これを試験溶液 1 とした。

次に、ジクロロメタンによる液液分配後の上層について、酢酸エチル 100 mL を加えて液液分配を行った。静置後、生じたエマルジョンを解消するため、全量を 50 mL 容遠沈管に分注して遠心分離(400×g, 5分, 20℃)を行い、上層(酢酸エチル層)を採取した。下層に再度酢酸エチル

を加え、同様の抽出操作をさらに1回繰り返し、得られたすべての上層(酢酸エチル層)を合わせて減圧下で溶媒を濃縮した。残留物にメタノールを加え超音波処理し、不溶物を遠心分離(10000×g, 2分, 20℃)により除去した後、上清をメタノールで 2 mL に定容し、これを試験溶液 2 とした(図 5)。

B-3-4) 試験溶液の HPLC 分析

調製した試験溶液について、次の測定条件を用い HPLC 分析を行った。

カラム：Unison UK-C18 (4.6×250 mm, 粒子径 3 µm, インタクト(株))、カラム温度：40℃、検出波長：435 nm、流速：1.0 mL/min、移動相 A：0.1 % トリフルオロ酢酸水溶液、移動相 B：アセトニトリル、グラジエント条件：0 min(10%B)→60 min(100%B)→65 min(100%B)→65.01 min(10%B)→75 min(10%B)

【60 min 以降はカラム洗浄及び平衡化】、注入量：20 µL

C. 結果及び考察

昨年度までの検討において、JECFA 法で規定されている前処理では、加熱時間の短縮(3.5 時間から1時間)、抽出回数の増加(1回から3回)、遠心分離操作の追加(エマルジョンの解消)の必要性が明らかとなった(図 6)。今年度は、有害試験薬の使用低減の観点から、JECFA 法で規定されている抽出溶媒クロロホルムの代替溶媒を検討することを目的とし、ジクロロメタン及び酢酸エチルを候補溶媒として、その性能を添加回収試験より評価した。

C-1)各抽出溶媒を単独で使した場合の抽出効率の検討

B-3-1 及び B-3-2 の操作手順に準じ、測定対象物質 5 種(アロエエモジン、レイン、エモジン、クリソファン酸、フィシオン)及び JECFA 法では内標準物質として規定されている 1,8-DAQ を、カシアガム製品に添加し、添加回収試験(n=3)を行った。添加濃度は、JECFA 規格におけるアントラキノン類の残留上限値(0.5 mg/kg)の 10 倍に相当する濃度(5 mg/kg)で検討した。なお、

回収率及び相対標準偏差(RSD)は $n=3$ の測定結果に基づき算出した。その結果を表 1 に示す。

クロロホルムを用いた場合、アロエエモジンの回収率は 87.4%(RSD : 1.1%), レインは 84.1%(RSD : 3.2%), エモジンは 83.7%(RSD : 2.9%), 1,8-DAQ は 82.8%(RSD : 0.7%), クリソファン酸は 76.8%(RSD : 0.7%)であり、これら 5 化合物はいずれも回収率が 70%以上を満たした。一方、フィシオンは 67.4%(RSD : 2.8%)にとどまり、回収率が 70%を下回った。したがって、JECFA 法で規定されているクロロホルムを用いる条件ではフィシオンの回収率が他の化合物に比べ低下することが示された。

ジクロロメタンを用いた場合、すべての化合物で回収率 70%以上を示したものの、フィシオンは 73.1%と他の化合物と比較して低値であった。また、アロエエモジンや 1,8-DAQ では RSD が 6%を超え、クロロホルムを用いた場合と比較してばらつきが増大する傾向が認められた。

酢酸エチルを用いた場合、アロエエモジンを除く 5 種の化合物は良好な回収率及び併行精度を示した。一方、アロエエモジンは回収率が 41.7%, RSD が 22.3%と著しく低く、真度及び精度の観点から問題が認められた。以上より、代替溶媒の選定にあたっては、(i) 酢酸エチルを用いた条件にて、低回収かつ高い RSD を示したアロエエモジンについて回収率の向上と精度の改善を図ること、(ii) ジクロロメタンを用いた条件にて、相対的に低回収であったフィシオンの回収率を改善すること、(iii) ジクロロメタンを用いた条件にて、ジクロロメタンを抽出溶媒とした場合に一部測定対象物質で認められたばらつき(RSD)の低減をすべて満たすよう、操作条件のさらなる最適化が必要であることが示唆された。

C-2) ジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用した場合の抽出効率の検討

前項での検討により、抽出溶媒として酢酸エチルを単独で使用した場合にはアロエエモジンの回収率が著しく低く、ジクロロメタンを単独で使用した場合にはフィシオンの回収率が相対的に低値を示すとともに、一部の測定対象

物質で RSD が増大することが問題として確認された。これらの問題を解決するため、ジクロロメタンと酢酸エチルを段階的に使用する抽出法について、添加回収試験によりその妥当性を評価した。なお、カシアガム製品へのアントラキノン類の添加濃度は、前項と同様に 5 mg/kg とし、B-3-3 の操作手順に従い各試験溶液を調製した。試験溶液 1 及び試験溶液 2 のクロマトグラムを図 7 に示す。また、表 2 に示すように、各化合物の回収率及び RSD は、アロエエモジンは 92.2%(RSD : 2.2%), レインは 90.2%(RSD : 2.1%), エモジンは 94.3%(RSD : 1.8%), 1,8-DAQ は 96.4%(RSD : 2.4%), クリソファン酸は 95.1%(RSD : 3.6%), フィシオンは 90.0%(RSD : 4.8%)であり、検討したすべての化合物において回収率は 90%以上、RSD が 4.8%以下と真度、精度ともに良好であることが判明した。

本段階抽出法は、測定対象物質の物性差(極性など)により、有機相への分配挙動が化合物ごとに異なる点に着目した操作である。すなわち、まずジクロロメタンによって比較的疎水性が高くジクロロメタン層へ移行しやすい化合物を優先的に回収し、その後、ジクロロメタン抽出後も水層に残存する化合物を、酢酸エチルによる再抽出で回収することにより、単独溶媒では回収が不十分となりやすい化合物を補完的に抽出できる点が本法の特徴である。以上より、ジクロロメタン及び酢酸エチルの段階的な抽出は、酢酸エチルの単独使用で問題となったアロエエモジンの低回収率及び精度の低下並びにジクロロメタンの単独使用で問題となったフィシオンの相対的な回収率の低下及び一部化合物におけるばらつき増大を同時に改善できることが示された。

次に、各アントラキノン類を JECFA 規格における残留上限値(0.5 mg/kg)で添加したカシアガム製品を用い、本段階抽出法の妥当性をさらに評価した。試験溶液 1 及び試験溶液 2 のクロマトグラムを図 8、添加回収試験の結果を表 2 に示す。アロエエモジンの回収率は 78.0%(RSD:2.9%), レインは 85.6%(RSD:3.2%), エモジンは 84.1%(RSD : 2.1%), 1,8-DAQ は 88.5%(RSD : 2.5%), クリソファン酸は

88.6%(RSD : 0.6%), フィシオンは 81.5%(RSD : 3.2%)であり, 検討したすべての化合物において回収率 78%以上, RSD 3.2%以下と, 真度及び併行精度ともに良好であることが判明した. 以上の結果から, 本段階抽出法は JECFA 規格における残留上限値相当の濃度を含む試料においても, アントラキノン類を良好な精度で抽出可能であることが明らかとなった.

なお, 本段階抽出法では, ジクロロメタン層及び酢酸エチル層から得られた抽出溶液は統合せずに減圧濃縮し, 試験溶液を調製した後, HPLC 分析に供した. この操作の根拠として, 両溶媒の抽出液を統合して減圧濃縮し試験溶液を調製した場合, 表 3 に示すようにアロエエモジンの回収率が 43.2%に大幅に低下し, また, RSD も 27.8%と著しく増大することが確認されたことが挙げられる. この回収率の低下及び RSD の増大は, 抽出溶液の統合や濃縮過程における何らかの影響により損失を受けることに起因するものと推察される. したがって, 本段階抽出法の適用にあたっては, 各有機層からそれぞれ独立した試験溶液を調製することが, 分析精度の確保の点で, 不可欠であることが確認された.

D. 結論

本研究では, カシアガム中のアントラキノン類分析法の確立を目的として, JECFA 規格の分析法を基盤とした前処理法の改良を検討した. 具体的には, クロロホルムの代替抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを候補溶媒として選定し, 添加回収試験によりその適用性を評価した. その結果, 各溶媒を単独で使用した場合, 測定対象物質の一部において真度または精度の面で問題が認められた. これらの問題を解決するため, ジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用する抽出法(段階抽出法)を新たに考案し, 添加回収試験によってその妥当性を評価した. 添加濃度 5 mg/kg(JECFA 残留上限値の 10 倍相当)での検討において, 本段階抽出法により調製した試験溶液では, 検討した全 6 化合物(測定対象物質 5 種及び内標準物質 1 種)の回収率が 90%以上, RSD が 4.8%以下となり,

真度及び精度ともに良好であることが明らかとなった. さらに, JECFA 規格の残留上限値(0.5 mg/kg)相当の添加濃度での検討においても, 全化合物の回収率は 78%以上, RSD は 3.2%以下であり, 当該濃度域における良好な抽出性能が示された. また, 本段階抽出法の適用においては, ジクロロメタン層及び酢酸エチル層の抽出液を統合せずにそれぞれ独立して減圧濃縮し, 試験溶液を調製することが, アロエエモジンの定量における真度及び精度の確保のために不可欠であることが確認された. 以上より, 本段階抽出法は, クロロホルムを使用せず, カシアガム中のアントラキノン類を良好な真度及び精度をもって抽出が可能な有効な手法であることが実証された.

E. 文献

- 1) 既存添加物名簿収載品目リスト注解書, 日本食品添加物協会技術委員会編. 東京, 日本食品添加物協会(1999)
- 2) 第 5 版 既存添加物自主規格, 日本食品添加物協会技術委員会編. 東京, 日本食品添加物協会(2021)
- 3) Mahungu S M, Meyland I: CASSIA GUM Chemical and Technical Assessment (CTA). Submitted to JECFA (dossier dated 4 Dec 2008). 2008.
- 4) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA): Combined Compendium of Food Additive Specifications. FAO JECFA Monographs, 2018; 22: 15-21.
- 5) Genovese S, Tammara F, Menghini L, Carlucci G, Epifano F, Marcotullio M C: Comparison of three different extraction methods and HPLC determination of the anthraquinones aloemodine, emodine, rheine, chrysophanol and physcione in the bark of *Rhamnus alpinus* L. (Rhamnaceae). *Phytochemical Analysis*, 2010; 21: 261-267.
- 6) Locatelli M, Tammara F, Menghini L, Carlucci G, Epifano F, Genovese S: Anthraquinone profile and chemical fingerprint of *Rhamnus saxatilis* L. from Italy. *Phytochemistry Letters*,

2009; 2: 223-226.

F. 研究発表

F-1) 学会発表

F-1-1) 学会等

- 1) 大槻崇, ^1H -qNMR に基づく相対モル感度を用いた食品関連成分分析法の確立, 日本農芸化学会中部支部第 203 回例会シンポジウム, 2025 年 11 月(長野)
- 2) 岩崎大剛, 川本広明, 村上敏之, 大槻崇, 松藤寛, ブラックジンジャー由来 PMF の定量: 相対モル感度(RMS 法)の検討, ノビレチン・PMF 研究会第 8 回学術研究会, 2025 年 11 月(神奈川)
- 3) 多田敦子, 内山陽介, 栗田史子, 羽石奈穂子, 林真輝, 杉浦潤, 大槻崇, 河野敏己, 池野恵美, 建部千絵, 高田翔平, 黒原崇, 日置冬子, 久保田浩樹, 佐藤恭子, 杉本直樹, 食品中の食品添加物分析法改正に向けた検討(令和 6 年度), 第 62 回全国衛生化学技術協議会年会, 2025 年 11 月(群馬)
- 4) 山崎太一, Yang Liu, Carlos Amezcua, 大槻崇, 加藤毅, 神山和夫, 高岡信也, 水本俊行, 杉本直樹, 相対モル感度(RMS)を用いた定量分析法の国際規格(ISO)化のための国際共同試験, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会, 2025 年 11 月(埼玉)
- 5) 今岡美史, 高田翔平, 黒原崇, 藤原由美子, 建部千絵, 窪崎敦隆, 大槻崇, 多田敦子, 松藤寛, 杉本直樹, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会, 2025 年 11 月(埼玉)
- 6) 岩崎大剛, 川本広明, 村上敏之, 大槻崇, 松藤寛, ^1H -qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いたブラックジンジャー由来ポリメトキシフラボンの新規 LC 定量法, 第 7 回日本定量 NMR 研究会年会, 2025 年 11 月(埼玉)
- 7) 白男川晃成, 佐藤ななみ, 浪川幸己, 森山のん, 藤佑志郎, 山本将之, 大槻崇, 松藤寛, アクテオシドを高生産するゴマ品種及び栽培条件の探索, 第 40 回日本ゴマ科学大会, 2025 年 10 月(香川)
- 8) 大槻崇, 相対モル感度を用いたシングルリ

ファレンス LC 法による食品関連成分分析法の確立, 日本食品分析学会 令和 7 年度学術集会, 2025 年 09 月(東京)

- 9) 今岡美史, 高田翔平, 黒原崇, 藤原由美子, 建部千絵, 窪崎敦隆, 大槻崇, 多田敦子, 松藤寛, 杉本直樹, 食用タール色素不純物の合成と組成分析による品質評価, 日本食品分析学会 令和 7 年度学術集会, 2025 年 09 月(東京)
- 10) 黒原崇, 長谷川千紘, 今岡美史, 藤原由美子, 建部千絵, 高田翔平, 窪崎敦隆, 大槻崇, 松藤寛, 多田敦子, 杉本直樹, タール色素不純物 ESBSA 異性体の同定に向けた合成と分析, 第 11 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム, 2025 年 09 月(埼玉)
- 11) 白男川晃成, 佐藤ななみ, 浪川幸己, 森山のん, 藤佑志郎, 山本将之, 大槻崇, 松藤寛, 品種の異なるゴマの葉中ポリフェノールおよびイリドイドの分析, 日本食品化学学会 第 31 回学術大会, 2025 年 06 月(滋賀)

F-2) 論文発表

F-2-1) 論文等

- 1) Miura T, Liu Y, Bzhelyansky A, Ohtsuki T, Matsufuji H: Development of ^1H qNMR analytical procedure for purity determination of Imazosulfuron and 1,4-BTMSB- d_4 for ISO 17034 accreditation. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2024; qsaf099.
- 2) Masumoto N, Yamazaki T, Miura T, Nakajima K, Yamamoto K, Kato T, Minamoto N, Suematsu T, Sato Y, Nomura A, Akagi M, Ohtsuki T, Koyama K, Mizumoto T, Miyashita T, Kawashima S, Saito T, Sugimoto N: Development of a standard-free analytical quantitative method based on liquid chromatography using relative molar sensitivity for chlorogenic acid in apple juice. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2025; 73: 650-657.

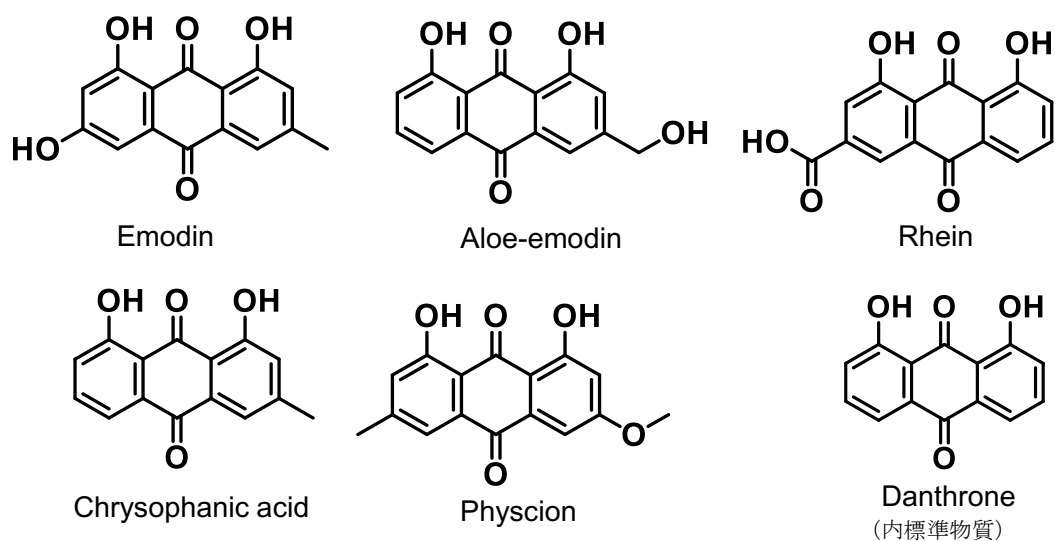


図1 JECFA 規格で規定されている分析法の測定対象物質(5 種)及び内標準物質の化学構造

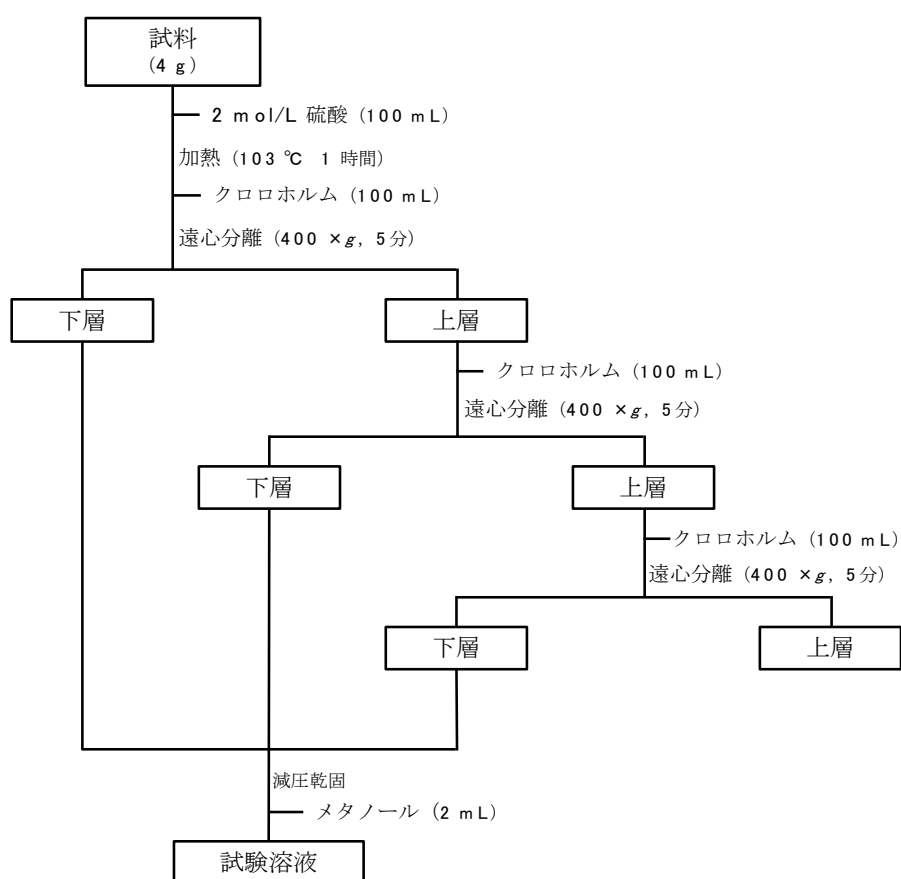


図2 試験溶液の調製法(抽出溶媒としてクロロホルムを単独で使用する場合)

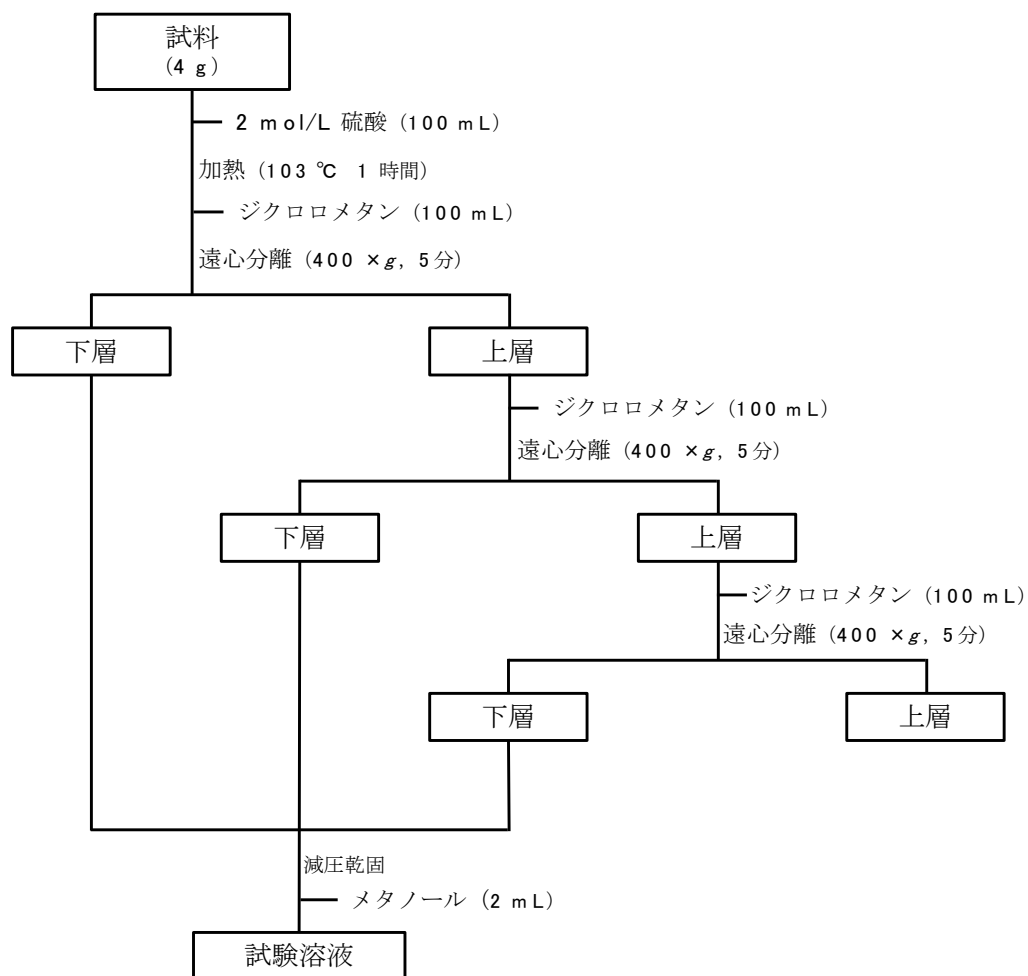


図3 試験溶液の調製法(抽出溶媒としてジクロロメタンを単独で使用する場合)

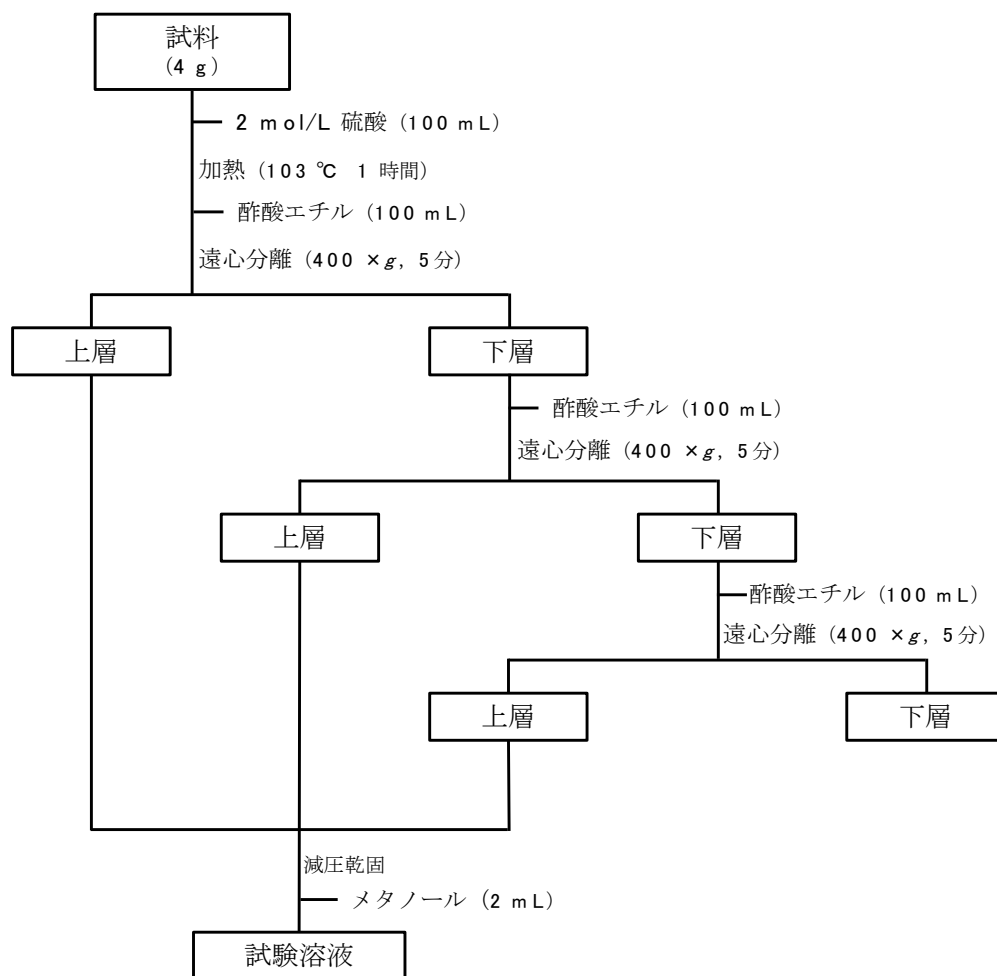


図 4 試験溶液の調製法(抽出溶媒として酢酸エチルを単独で使用する場合)

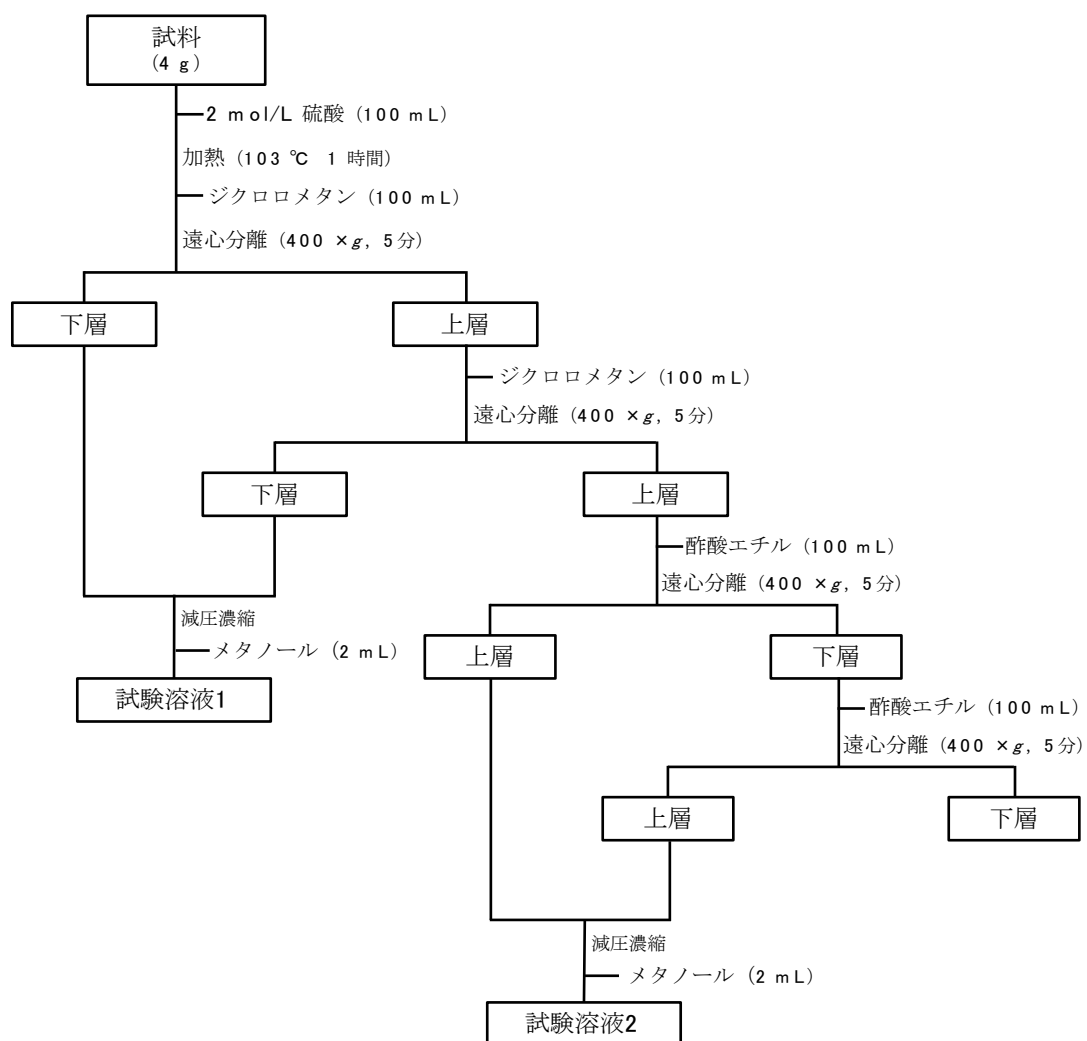


図5 試験溶液の調製法

(抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用する場合)

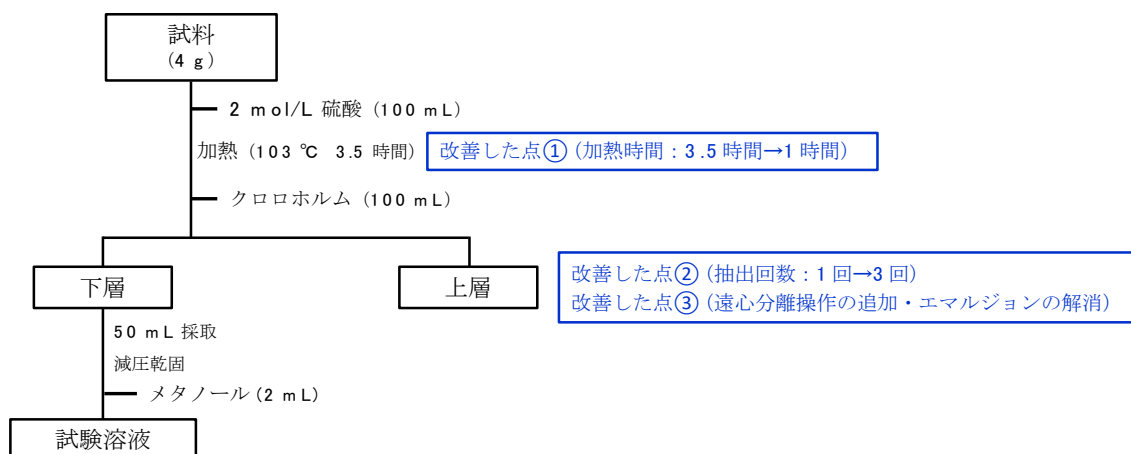


図 6 JECFA Monographs におけるカシアガム規格で規定されているアントラキノン類分析法の試験溶液の調製法並びに昨年度までの検討において改善した点

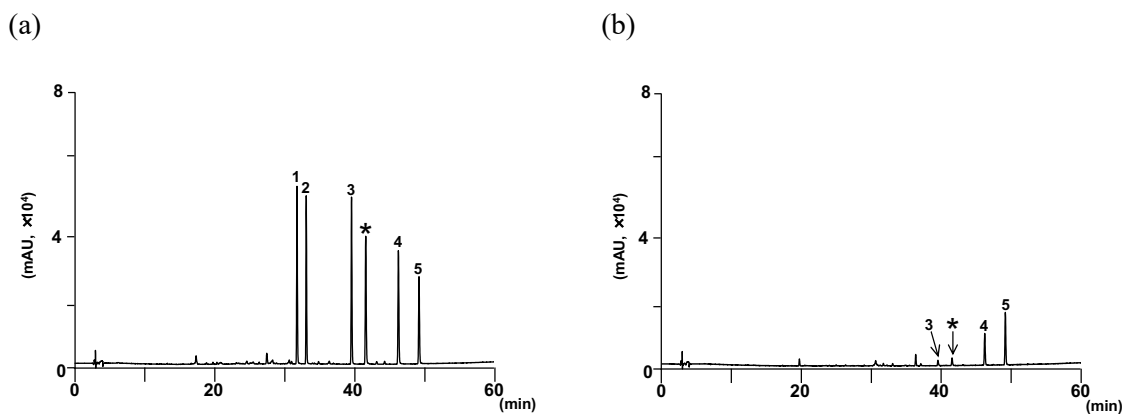


図 7 アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度 : 5.0 mg/kg)より段階抽出法により調製した試験溶液のクロマトグラム

(a) : 試験溶液 1(ジクロロメタン層由来), (b) : 試験溶液 2(酢酸エチル層由来)

1. Aloe-emodin, 2. Rhein, 3. Emodin, 4. Chrysophanic acid, 5. Physcion, * 1,8-DAQ

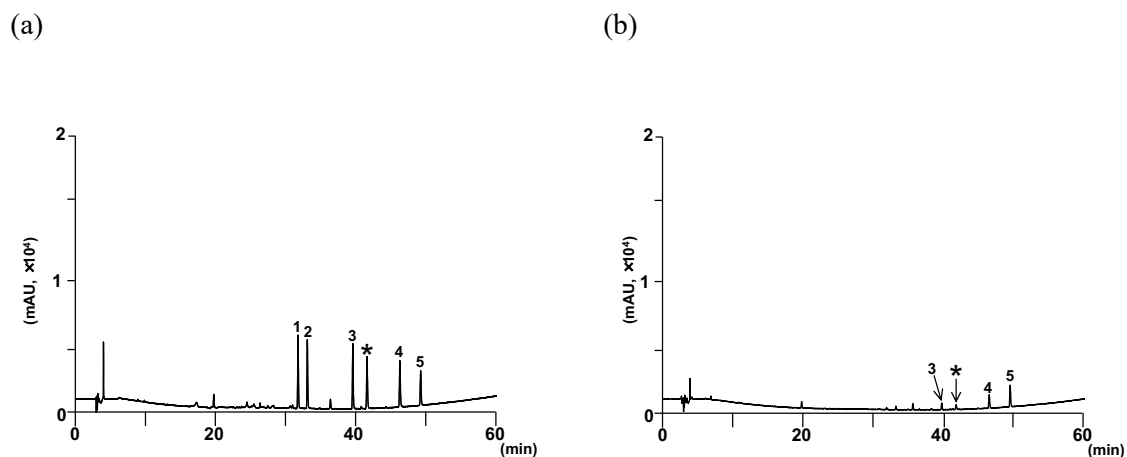


図 8 アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：0.5 mg/kg)より
段階抽出法により調製した試験溶液のクロマトグラム

(a)：試験溶液 1(ジクロロメタン層由来)，(b)：試験溶液 2(酢酸エチル層由来)

1. Aloe-emodin, 2. Rhein, 3. Emodin, 4. Chrysophanic acid, 5. Physcion, * 1,8-DAQ

表 1 各抽出溶媒を単独で使した場合のアントラキノン類の添加回収試験の
結果(n=3)

	Extraction solvent					
	Chloroform		Dichloromethane		Ethyl acetate	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Aloe-emodin	87.4	1.1	83.2	6.6	41.7	22.3
Rein	84.1	3.2	84.9	6.0	95.9	0.9
Emodin	83.7	2.9	88.2	3.4	96.5	1.6
1,8-DAQ	82.8	0.7	94.4	7.8	99.6	0.4
Chrysophanic acid	76.8	0.7	85.1	2.8	98.1	0.7
Physcion	67.4	2.8	73.1	5.6	94.6	1.9

試料：アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：5.0 mg/kg)

表2 ジクロロメタン及び酢酸エチルを段階的に使用した場合のアントラキノン類の添加回収試験の結果(n=3)

	0.5 mg/kg spiked		5.0 mg/kg spiked	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Aloe-emodin	78.0	2.9	92.2	2.2
Rein	85.6	3.2	90.2	2.1
Emodin	84.1	2.1	94.3	1.8
1,8-DAQ	88.5	2.5	96.4	2.4
Chrysophanic acid	88.6	0.6	95.1	3.6
Physcion	81.5	3.2	90.0	4.8

表3 ジクロロメタン層及び酢酸エチル層を統合して試験溶液を調製した場合のアントラキノン類の添加回収試験の結果(n=3)

	Recovery (%)	RSD (%)
Aloe-emodin	43.2	27.8
Rein	91.5	2.4
Emodin	93.2	2.1
1,8-DAQ	92.1	3.0
Chrysophanic acid	91.8	1.8
Physcion	85.6	3.9

試料：アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：0.5 mg/kg)