

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5年度～令和7年度 総合分担研究報告書

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

研究分担者 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の効率化及び精度向上を目的として、成分規格が未制定であるカシアガムを対象に、アントラキノン類分析法の確立について検討した。まず、参考とするJECFA規格におけるカシアガム中のアントラキノン類分析法の性能の検証により、加熱時間の短縮並びに抽出回数の見直しが必要であること、さらに液-液分配時のエマルジョンの生成や夾雑成分による妨害等に起因して、前処理法及びHPLC条件の改良・最適化が必要であることが明らかとなった。また、前処理における有害試薬の使用低減の観点からクロロホルムの代替となる溶媒を検討した結果、ジクロロメタン及び酢酸エチルの単独使用では化合物により回収率の低下等が認められた。そこで、ジクロロメタンによる抽出後に酢酸エチルで再抽出し、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。本法により、JECFA規格の残留基準値(0.5 mg/kg)付近のアントラキノン類の抽出に適用可能かつクロロホルムを使用しない前処理法を確立した。さらに、分析面では、¹H-qNMRに基づく相対モル感度(RMS)を用いる定量法として、正確な標準溶液濃度に基づく検量線の傾きの比から基準物質3種に対する測定対象物質5種のRMSを算出し、モデル溶液による検証に基づき、その正確性(妥当性)が判明した。以上より、JECFA規格におけるカシアガム中のアントラキノン類分析法の課題を改良した前処理法及びHPLC条件によるカシアガムの成分規格の策定に資する分析法を確立した。また、測定対象物質の定量用標品を必要としないRMSを用いたアントラキノン類分析法の有用性を実証した。

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制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碎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)。同規格の分析法(JECFA 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。しかし、JECFA 法を国内規格の試験法として適用するに当たっては、実試料への適用可能性等の検証が必要である。また、前処理で用い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、代替溶媒への転換を検討する必要がある。さらに、測定対象物質 5 種の定量用標品については、認証標準物質のような正確な純度が明示された標品の入手はできず、市販試薬をそのまま定量用標品として HPLC 分析に供した場合、定量値の信頼性を十分に担保できない。

定量用標品の入手及び定量値の正確性の問題を解決する方法の 1 つとして、近年、¹H-qNMR に基づく相対モル感度(Relative Molar Sensitivity : RMS)を用いた HPLC 法が注目を集めている⁵⁻⁸。本法は、測定対象物質及び測定対象物質とは異なる基準物質(代替定量用標品)との正確な RMS を明らかにすることにより、「基準物質」、「RMS」から測定対象物質の定量を可能とする方法である。また、RMS は、計量学的に正確な定量が可能である定量 ¹H-NMR(¹H-qNMR)に基づき算出されているため、本法により得られる定量値の信頼性も高いと考えられる。

以上の背景を踏まえ、本研究では、既存添加物の成分規格試験の効率化及び精度向上を

目的として、成分規格が未制定であるカシアガムを対象に、JECFA 法を基盤としたカシアガム中のアントラキノン類分析法の確立に関して検討した。具体的には、① JECFA 法の前処理及び HPLC 条件に関する課題の確認並びに改良、② クロロホルムを使用しない抽出法の確立を目指した代替溶媒の適用性評価、③ ¹H-qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の適用性の 3 点について検証した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

カシアガム(管理番号 : A105, A951, A952, C2052, C2393, C2394, 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ものを用いた。エモジン、アロエエモジン、レイン、クリソファン酸及び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-dihydroxyanthraquinone ; 1,8-DAQ)は富士フイルム和光純薬(株)製を用いた。カフェイン(Product No. 56396, 認証値 : 99.9%, 拡張不確かさ : 0.4%)及びメチルパラベン(Product No. 79721, 認証値 : 99.8%, 拡張不確かさ : 0.3%)はシグマアルドリッチ(株)製の認証標準物質を使用した。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(低圧グラジエントユニット内蔵型/高圧グラジエント), オートサンプラ : SIL-20A, カラム恒温槽 : CTO-10ASVP または CTO-20AC, 検出器 : 紫外可視分光検出器 SPD-10A または多波長検出器 SPD-M20A, システムコントローラ : CBM-20A, 分析データ処理システム : LabSolutions(以上(株)島津製作所製), 脱気装置 : AG-34((株)フロム製)または DGU-20A3R((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検証

B-3-1) 試験溶液の調製(1)

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)に従った(図 2)。

B-3-2) 試験溶液の調製(2)(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)

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 3)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、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 4)。

B-3-3) 試験溶液の調製(3)(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-液抽出を行った。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 5)。

B-3-4) 試験溶液の調製(4)(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 回繰り返す、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($10000\times g$, 2分, 20°C)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6)。

B-4) 試験溶液の HPLC 分析

実試料より調製した試験溶液について、次の測定条件1または2を用い分析を行った。

■ 測定条件1(JECFA法の条件)

カラム：Develosil ODS-UG-5 ($4.6\times 250\text{ mm}$, 粒子径 $5\text{ }\mu\text{m}$, 野村化学(株)), カラム温度： 40°C , 検出波長： 435 nm (アントラキノン類), 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 ($14\%\text{B}$) $\rightarrow 10\text{ min}$ ($14\%\text{B}$) $\rightarrow 15\text{ min}$ ($20\%\text{B}$) $\rightarrow 25\text{ min}$ ($20\%\text{B}$) $\rightarrow 55\text{ min}$ ($80\%\text{B}$) $\rightarrow 60\text{ min}$ ($100\%\text{B}$) $\rightarrow 65\text{ min}$ ($100\%\text{B}$) $\rightarrow 65.01\text{ min}$ ($14\%\text{B}$) $\rightarrow 75\text{ min}$ ($14\%\text{B}$) 【 60 min 以降はカラム洗浄及び平衡化】, 注入量： $20\text{ }\mu\text{L}$

■ 測定条件2(改良法の条件)

カラム：Unison UK-C18 ($4.6\times 250\text{ mm}$, 粒子径 $3\text{ }\mu\text{m}$, インタクト(株)), カラム温度： 40°C , 検出波長： 272 nm (カフェイン), 255 nm (MHB), 435 nm (アントラキノン類), 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 ($10\%\text{B}$) $\rightarrow 60\text{ min}$ ($100\%\text{B}$) $\rightarrow 65\text{ min}$ ($100\%\text{B}$) $\rightarrow 65.01\text{ min}$ ($10\%\text{B}$) $\rightarrow 75\text{ min}$ ($10\%\text{B}$) 【 60 min 以降はカラム洗浄及び平衡化】, 注入量： $20\text{ }\mu\text{L}$

B-5) $^1\text{H-qNMR}$ に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の確立

B-5-1) 基準物質(カフェイン, MHB 及び 1,8-DAQ)に対する測定対象物質 5 種の RMS の算出

エモジン, アロエエモジン, クリソファン酸,

レイン, フィシオン, 1,8-DAQ では, $^1\text{H-qNMR}$ により算出された純度値に基づき正確に量りとり, メタノールを加え調製したものを標準原液とした(濃度： $156\text{ }\mu\text{mol/L}$)。その後 $1\%\text{DMSO}$ 含有メタノールを用いて適宜希釈し, 各測定対象物質の標準溶液を調製した。各標準溶液の濃度範囲は $0.5\sim 15.6\text{ }\mu\text{mol/L}$ (6点濃度, 公比 2)である。

カフェインでは, カフェイン標準物質(認証標準物質)を認証値に基づき正確に量りとりし, $10\%\text{アセトニトリル}$ を用いて溶解し, 濃度 $156\text{ }\mu\text{mol/L}$ の溶液を標準原液とした。この原液について $10\%\text{アセトニトリル}$ を用いて適宜希釈を行い, カフェインの標準溶液を調製した。各標準溶液の濃度範囲は $0.125\sim 15.6\text{ }\mu\text{mol/L}$ (8点濃度, 公比 2)である。

メチルパラベンでは, メチルパラベン標準物質(認証標準物質)を認証値に基づき精密に秤量し, メタノールを用いて溶解し, 濃度 $156\text{ }\mu\text{mol/L}$ の溶液を標準原液とした。この原液についてメタノールを用いて適宜希釈を行い, MHB の標準溶液を調製した。各標準溶液の濃度範囲は $0.25\sim 15.6\text{ }\mu\text{mol/L}$ (7点濃度, 公比 2)である。

これら各種濃度の標準溶液については, 各化合物3セットずつ調製し, B-4に示した測定条件2によりそれぞれ分析した。各溶液のモル濃度を X 軸に, 検出器の応答値(ピーク面積値)を Y 軸にプロットし, Excel を用いて原点を通る($X:0, Y:0$)回帰直線を作成し, これを検量線とした。なお, 各溶液におけるクロマトグラム上のピークの S/N が 10 以上となる濃度範囲で検量線を作成した。その後, 得られた測定対象物質及び基準物質の検量線の検量線式の傾きの比(測定対象物質/基準物質)から各基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出した。

B-5-2) RMS の正確性の評価

フィシオン以外の各アントラキノン類の標準原液(濃度： $156\text{ }\mu\text{mol/L}$)及び別途調製したフィシオン溶液(濃度： $31.2\text{ }\mu\text{mol/L}$)を用い, これらを適宜採取し, メタノールを用いて希釈し

たモデル溶液 A (各測定対象物質の濃度：約 8 ～9 $\mu\text{mol/L}$) 及びモデル溶液 B (各測定対象物質の濃度：1.0 $\mu\text{mol/L}$) を調製し、RMS の正確性の評価に使用した。

C. 結果及び考察

C-1) JECFA 法における前処理法の検証

C-1-1) 現行法による実試料の分析

JECFA 法で規定されている HPLC 条件(B-4 の項、測定条件 1)について、実試料の分析において適用可能かについて検証した。まず、図 2 の調製法のうち試料採取量を 800 mg として試験溶液を調製し、HPLC に供した。その結果、図 7 に示すように、すべての試料において、アントラキノン類が溶出する 40～50 分に広範なブロードなピークが観察された。従って、現行法では、カシアガム中のアントラキノン類の正確な定量が困難であることが確認された。なお、多波長検出器が接続された HPLC で別途分析し、検出波長の変更による定量の可能性を検討したが、200～600 nm の波長範囲では、このブロードなピークに由来する夾雑成分の影響により、測定対象物質の定量が可能な検出波長を見いだすことはできなかった。

C-1-2) 加熱時間の検証

広範なブロードなピークが観察された要因として、前処理における加熱(103℃, 3.5 時間)が挙げられた。加熱前と加熱後の試料溶液の色を比較すると、加熱後では褐色に変化していた。この色やクロマトグラムの形状を考慮すると、加熱によりカシアガム中の成分を由来とするメイラード反応によるポリマーの生成が予想された。そこで、加熱時間と広範なブロードなピークの関連性を評価するため、前処理における加熱時間の検証を行った。すなわち、加熱時間を 1 時間、2 時間、3.5 時間、5 時間としてそれぞれ試験溶液を調製し HPLC に供した。なお、本検討では、試料として C2052 を用い、試料採取量は規定どおり 4 g とした。その結果、図 8 に示すように、加熱時間が短いほど、ブロードなピークは小さくなる傾向が認められた。なお、加熱時間を 0 時間とすることも考えたが、増粘

安定剤であるカシアガムは水分を含むとゼリー状なり、これを液体化するには最低でも 1 時間の加熱が必要であった。このように、HPLC 分析における広範なブロードなピークの低減並びに実試料の性状等を考慮し、加熱時間は 1 時間が適切であることが判明した。

C-1-3) カシアガム中のアントラキノン類の抽出効率の検証

次に試料の加熱時間を変更(3.5 時間から 1 時間)したことによるカシアガム中のアントラキノン類の抽出効率を検証するため、添加回収試験を行った。なお、試料として A105(試料採取量 4 g)を用い、添加濃度は JECFA 規格における含有上限値(0.5 mg/kg)の 10 倍(5 mg/kg)で検討した。その結果、表 1 に示すように、回収率が 70% を下回る化合物が複数認められた。そこで、抽出回数を 3 回へ変更し、試料として A951(試料採取量 4 g)を用いて検討したところ(図 9)、表 2 に示すように、n=1 の結果ではあるが、すべての化合物において、回収率が向上することが確認された。従って、測定対象物質の抽出効率を考慮し、抽出回数の変更の必要性が認められた。

C-1-2) エマルジョンの低減に向けた検証

上記の検証において、抽出操作(液-液分配)にて、エマルジョンが生成し、上層と下層(クロロホルム層)の分離を著しく遅延させ、分析効率を低下させることも明らかとなった。そこで、上記の検証にて使用した試料とは異なる 3 種の試料(①C2393, ②C2394, ③C2395)の試料を用いて液-液分配を行ったところ、同様に安定なエマルジョンが生成し、24 時間の静置後も層分離は達成されなかった(図 10)。この問題を解決するため、遠心分離操作(400×g, 5 分, 20℃)を適用したところ、上層と下層(クロロホルム層)の完全な二層分離が達成され、その有効性が実証された(図 10)。

C-2) HPLC 条件の検証

カシアガム 3 種(①C2393, ②C2394, ③C2395)を用いて、JECFA 法で規定されている HPLC 条件(B-4 の項、測定条件 1)の実試料の分析におけ

る適用性を検証した。検証実験では、図 3 に示す前処理法により調製した各試料溶液に、測定対象物質 5 種(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)を終濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加し、HPLC 分析を行った。その結果、図 11 に示すように、すべての試料において、測定対象物質の一部のピークの近傍に試料由来の内在性成分(夾雑成分)のピークが検出され、十分なベースライン分離が得られないことが判明した。この分離不良を改善するため、① カラムを粒子径が 3 μm である Unison UK-C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm)へ変更、② グラジエント条件の変更など溶離条件の最適化を行った(B-4 の項、測定条件 2)。最適化した条件下で、カシアガム 3 種(① C2393, ② C2394, ③ C2395)の試験溶液及び測定対象物質 5 種の混合標準溶液を分析した。その結果、図 12 に示すように、すべての試料において、測定対象物質 5 種と夾雑成分との間のベースライン分離に問題がないことが確認された。以上より、実試料における測定対象物質 5 種の分析において、JECFA 法の HPLC 条件からの変更が必要であることが明らかとなった。

C-3) 前処理におけるクロロホルムに代わる抽出溶媒の検討

C-3-1) 各抽出溶媒を単独で使用情况の抽出効率の検討

B-3-2 及び B-3-3 の項に示した操作手順に準じ、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 3 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 成分はいずれも回収率 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-3-2) 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情况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情况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-3-4 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 13 に示す。また、表 4 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 14、添加回収試験の結果を表 5 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 6 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。

C-4) ^1H -qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の確立

C-4-1) 基準物質(カフェイン、MHB 及び 1,8-DAQ)に対する測定対象物質 5 種の RMS の算出

^1H -qNMR に基づく RMS を用いたアントラキノン分析法の確立について検討した。正確な RMS の算出にあたり、測定対象物質の市販試薬の正確な純度を明らかにすることは非常に重要である。そこで、これらの純度を明らかにするため、表 7 に示す測定条件による ^1H -qNMR 測定を実施した。なお、エモジン、アロエエモジン、レイン及び 1-8 DAQ では、3 種の外部標準を用いた外部標準法、クリソファン酸及びフィシオンでは、1,4-BTMSB- d_4 を用いた内標準法により、各試薬の純度をそれぞれ算出した。その結果、エモジン、アロエエモジン、クリソファン酸、レイン、1-8 DAQ の純度は、それぞれ、99.9%、97.2%、98.3%、85.8%、95.5%と判明した。また、フィシオンは 98.1%であることが明らかとなった。

次に、基準物質に対する測定対象物質 5 種の

RMS を算出するため、各検体の $^1\text{H-qNMR}$ による純度に基づいて調製された測定対象物質 5 種及び 1,8-DAQ 並びに認証書に記載の認証値(純度値)に基づき調製されたカフェイン及び MHB 標準溶液を用いて、改良した HPLC 条件(B-4 の項, 測定条件 2)より多波長検出器が接続された HPLC で分析した(図 12, 15-17). その後、得られたデータに基づき原点を通る各検量線を作成し、その検量線式の傾きの比(測定対象物質/基準物質)から基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出した. まず、各検量線の直線性を評価したところ、測定対象物質 5 種及び基準物質 3 種の全ての検体の検量線の決定係数は 0.999 ~1.000 と良好であることが確認された. 各測定対象物質及び基準物質の代表的な検量線を図 18 及び図 19 に示す. 化合物ごとに 3 併行の検量線の傾きの平均値を算出したところ、エモジンは 13026 (検出波長: 435 nm), アロエエモジンは 13521 (検出波長: 435 nm), レインは 15669 (検出波長: 435 nm), クリソファン酸は 13260 (検出波長: 435 nm), フィシオンは 14254 (検出波長: 435 nm), カフェインは 11808 (検出波長: 272 nm), メチルパラベン は 18511 (検出波長: 255 nm), 1,8-DAQ は 12296 (検出波長: 435 nm) であることが判明した. これらの検量線の傾きの相対標準偏差は 0.1~2.4% であり、検量線の決定係数(直線性)とあわせて評価すると、これらの検量線の傾きは RMS の算出に適用可能であることが明らかとなった. そこで、得られたこれらのデータより、基準物質に対する測定対象物質の RMS を算出したところ、表 8 に示す値であることが明らかとなった.

C-4-2) RMS の正確性の評価

得られた RMS の正確性を評価するため、測定対象物質 5 種(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)をそれぞれ約 8~9 $\mu\text{mol/L}$ を含むモデル溶液 A 及びそれぞれ約 1 $\mu\text{mol/L}$ を含むモデル溶液 B を各 3 セットずつ調製し、HPLC に供し(図 20)、RMS 法及び従来定量法の 1 つである絶対検量線法により得られる定量値と比較した. その結果、表 9 及び表 10 に示すように、基準物質の異なる RMS 法

と絶対検量線法にて得られた定量値はほぼ同等であった. また RSD は最大で 5.5% と精度も良好であった. 以上の結果より、基準物質及びそれに対応する RMS は正確であり、RMS 法から測定対象物質 5 種の正確な定量が可能であることが明らかとなった.

D. 結論

本研究では、成分規格が未制定であるカシアガムについて、国内規格の策定及び食品添加物公定書への収載に資することを目的に、JECFA 規格の分析法(JECFA 法)を基盤とした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、①JECFA 法の前処理及び HPLC 条件に関する課題の確認並びに改良、②クロロホルムを使用しない抽出法の確立を目指した代替溶媒の適用性評価、③ $^1\text{H-qNMR}$ に基づく相対モル感度(RMS)を用いた定量法の適用性について検討した.

まず、① JECFA 法の前処理及び HPLC 条件に関する課題の確認並びに改良に関しては、JECFA 法の性能評価により、前処理工程において加熱時間の短縮並びに抽出回数の変更が必要であることが明らかとなった. また、液-液分配におけるエマルジョン形成に起因する二層分離の遅延が確認され、遠心分離操作の導入が分離効率の改善に有効であることが実証された. さらに、実試料においては測定対象物質のピーク近傍に夾雑成分が観察される場合があり、JECFA 法の HPLC 条件では測定対象物質と夾雑成分の分離が不十分となり得ることが示唆された. この点については、粒子径 3 μm のカラムを採用し、グラジエント条件を最適化することにより、高分離能を有する分析条件が確立された.

②クロロホルムを使用しない抽出法の確立を目指した代替溶媒の適用性評価については、代替抽出溶媒としてジクロロメタン及び酢酸エチルを検討した. その結果、両溶媒の単独使用では化合物により回収率の低下や RSD の増大が認められたため、ジクロロメタン抽出後に酢酸エチルで再抽出する段階抽出法を考案した. 本段階抽出法では、各有機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操作が、特にアロエエモジンの定量における真度及び精度の確保に不可欠であることが確認された。本法は、添加濃度 5 mg/kg において回収率 90%以上、RSD 4.8%以下を示し、JECFA 規格の残留上限値(0.5 mg/kg)相当の添加濃度においても回収率 78%以上、RSD 3.2%以下であり、当該濃度域に適用可能なクロロホルム不使用の前処理法として有効性が実証された。

③ ¹H-qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いた定量法の適用性については、正確な標準溶液の濃度に基づいて作成した各検量線式の傾きの比(測定対象物質の傾き/基準物質の傾き)より、基準物質 3 種に対する測定対象物質 5 種の各 RMS が明らかとなった。これらの RMS の正確性は、モデル溶液を用いた検証により実証され、本手法が測定対象物質 5 種の効率的かつ信頼性の高い定量に資することが示された。

以上より、本研究で確立した前処理(エマルジョン対策を含む JECFA 法の改良)及び HPLC 条件(測定条件の最適化)を組み合わせた方法は、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分析可能であり、成分規格の策定に資する分析法として有用であることが明らかとなった。また、クロロホルムを使用しない段階抽出法や RMS に基づく定量法を活用することにより、作業者の安全性及び環境負荷の低減を図りつつ、分析の効率化及び信頼性向上に貢献できると考えられた。

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) Iwasaki D, Kanazawa M, Kawamoto F, Araho D, Murakami T, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N: A new single-reference quantitative method using liquid chromatography with relative molar sensitivity based on ¹H-qNMR for khellactone esters from *Peucedanum japonicum* root extract. Food Chemistry, 2023; 427: 136647.
- 6) Takahashi M, Morimoto K, Nishizaki Y, Masumoto N, Sugimoto N, Sato K, Inoue K: Study on the synthesis of methylated reference and their application in the quantity of curcuminoids using single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2022; 70: 25-31.
- 7) Koyama K, Sasako H, Higashi Y, Ichikawa H, Nagoya A, Hirao T: Quantitative analysis of bisacurone in turmeric by HPLC using relative molar sensitivity. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2022; 63: 202-209.
- 8) Masumoto N, Ishizuki K, Nishizaki Y, Ohtsuki T, Kuroe M, Yamazaki T, Numata M, Matsufuji H, Sugimoto N, Sato K: Determination of mogroside V in luohanguo extract for daily quality control operation using relative molar sensitivity to single-reference caffeine. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2021; 69: 18-25.

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)
 - 12) 大槻崇, 神谷彩音, 中山優希, 黄奕, 松下美由紀, 森川悟, 松藤寛, TDM 対象薬など医薬品 6 種の血中濃度測定における相対モル感度に基づくシングルリファレンス HPLC 法の応用, 第 6 回日本定量 NMR 研究会年会, 2024 年 11 月 (東京)
 - 13) 大槻崇, 馬場萌加, 二見櫻子, 黄奕, 遠藤悠平, 金子剣伸, 松藤寛, ^1H -qNMR に基づく相対モル感度(RMS)を用いた大豆イソフラボン類分析法の確立, 日本食品化学学会第 30 回総会・学術大会, 2024 年 5 月 (東京)
 - 14) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, ^1H -定量 NMR に基づいた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニン定量について, 第 5 回日本定量 NMR 研究会年会, 2023 年 12 月 (神奈川)
 - 15) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 定量 NMR に基づいた相対モル感度を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニンの定量について, 食品科学工学会第 70 回大会, 2023 年 8 月 (京都)
 - 16) 3) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 相対モル感度(RMS)を用いた Single-reference HPLC 法による健康食品中のアントシアニン定量法の開発, AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会, 2023 年 7 月 (東京)
 - 17) 加藤菜帆, 大槻崇, 松藤寛, 健康食品中のアントシアニン定量における相対モル感度(RMS)を用いた Single-reference HPLC 法の適用について, 日本食品化学学会 第 29 回学術大会, 2023 年 6 月 (富山)

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.
- 3) Ohtsuki T, Huang Y, Kamiya A, Nakayama Y, Matsushita M, Morikawa S, Matsufuji H: Development of an HPLC method using relative molar sensitivity for the measurement of blood concentrations of nine pharmaceutical compounds. Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences, 2024; 10: 35.
- 4) Fuji Y, Uchida K, Akashi T, Ohtsuki T, Matsufuji H, Hirai Y M: Molecular identification of UDP-sugar-dependent glycosyltransferase and acyltransferase involved in the phenylethanoid glycoside biosynthesis induced by methyl jasmonate in *Sesamum indicum* L. Plant and Cell Physiology, 2023; 64: 716-728.

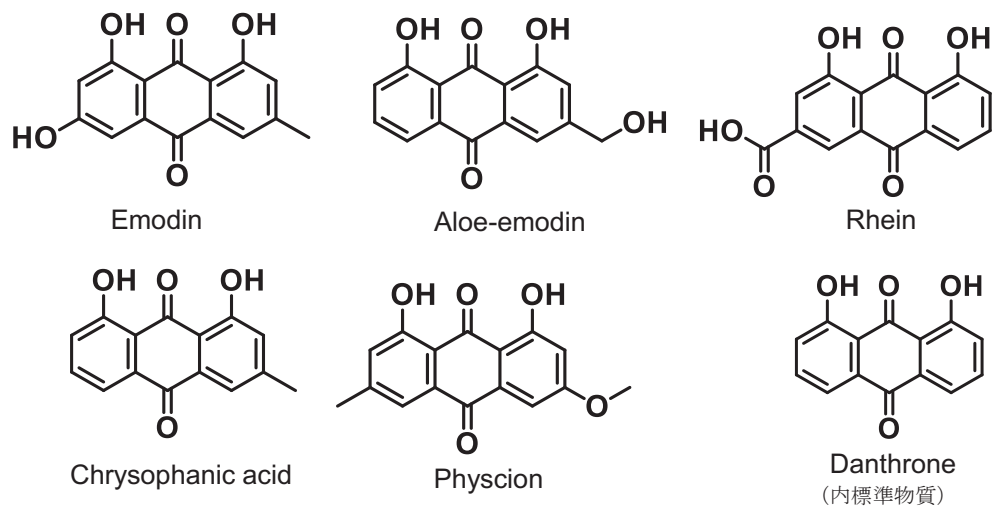


図1 JECFA 規格で規定されている分析法の測定対象物質(5種)及び内標準物質の化学構造

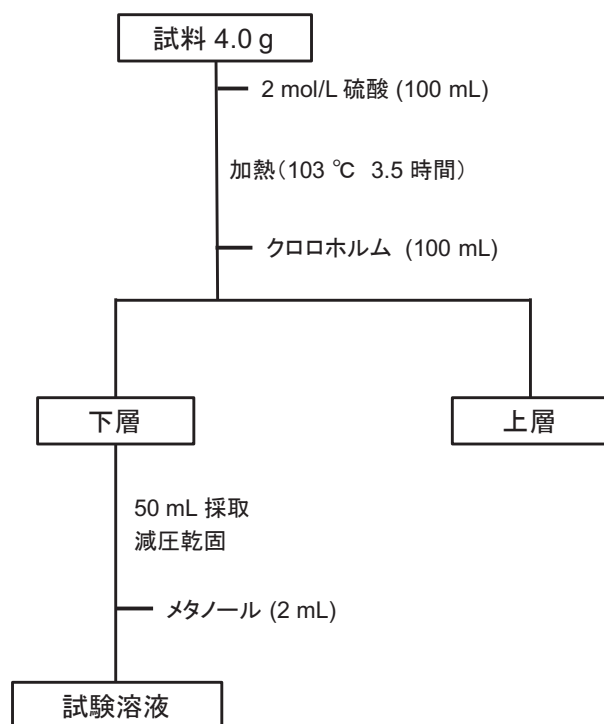


図2 JECFA Monographs におけるカシアガム規格で規定されているアントラキノン類分析法の試験溶液の調製法

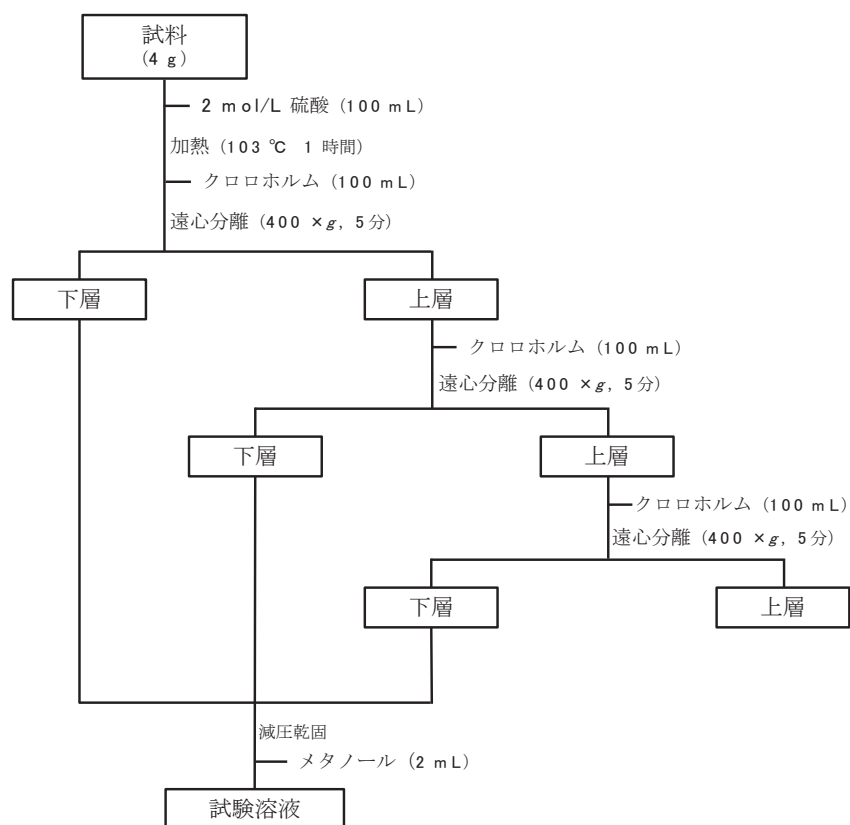


図3 試験溶液の調製法(抽出溶媒としてクロロホルムを単独で使用する場合)

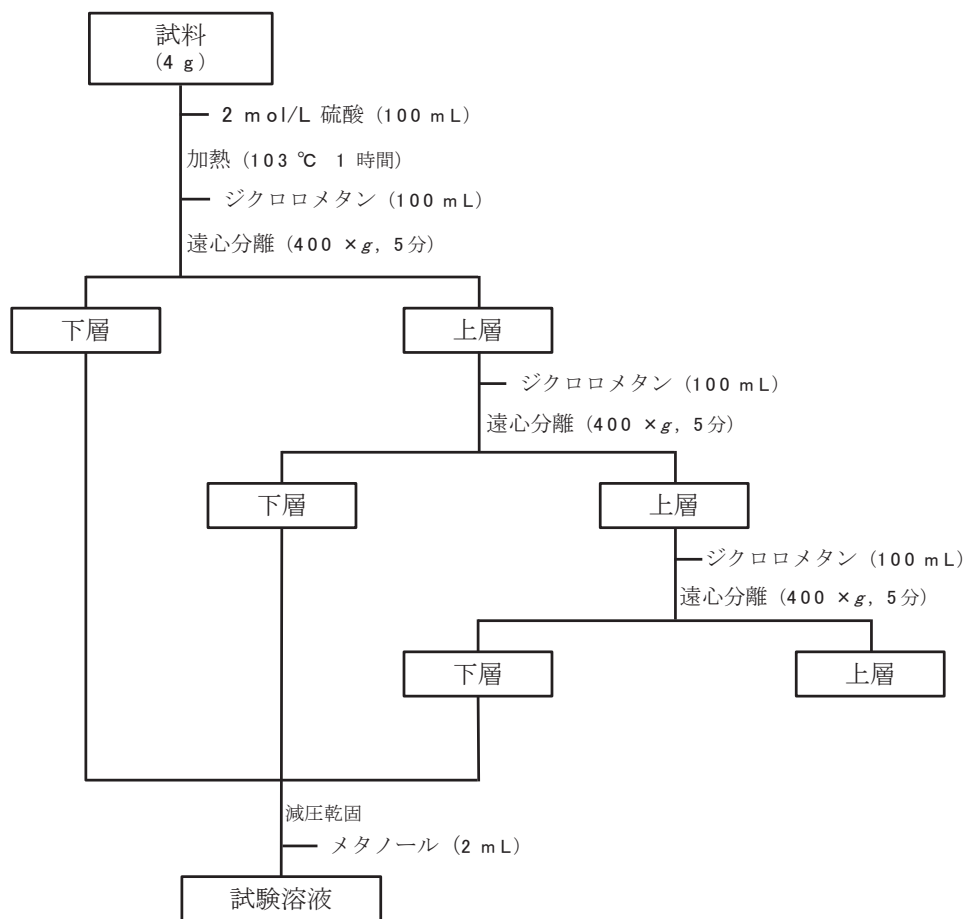


図 4 試験溶液の調製法(抽出溶媒としてジクロロメタンを単独で使用する場合)

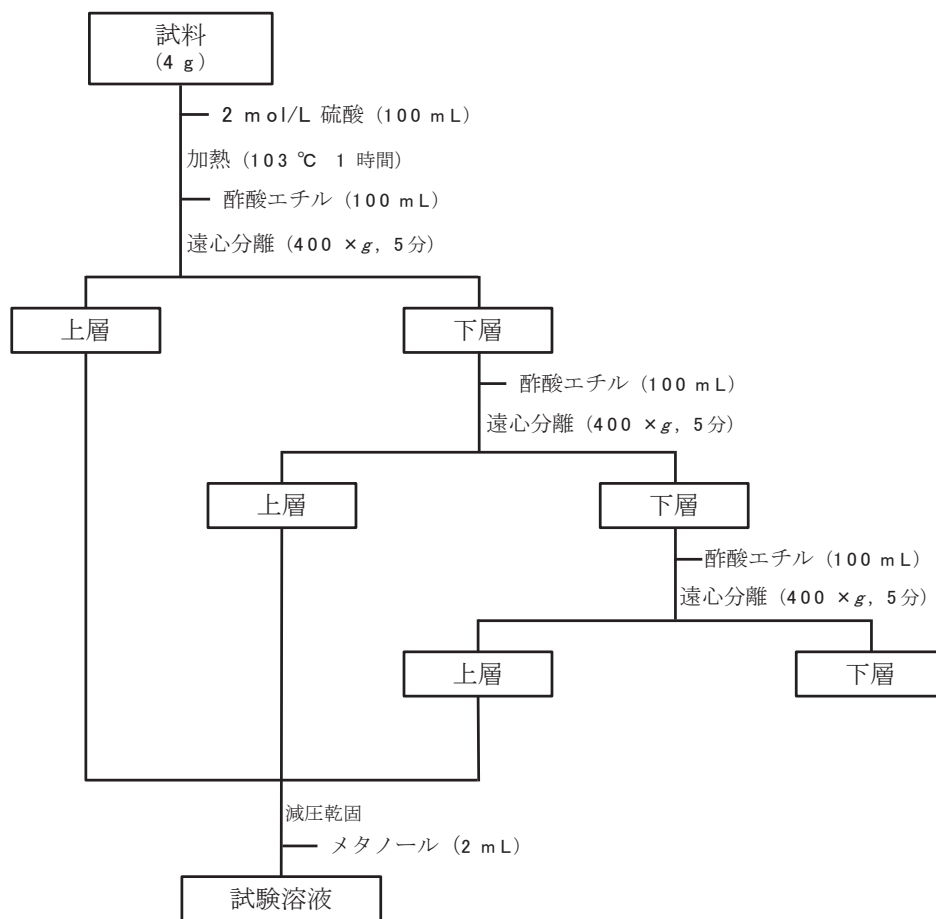


図5 試験溶液の調製法(抽出溶媒として酢酸エチルを単独で使用する場合)

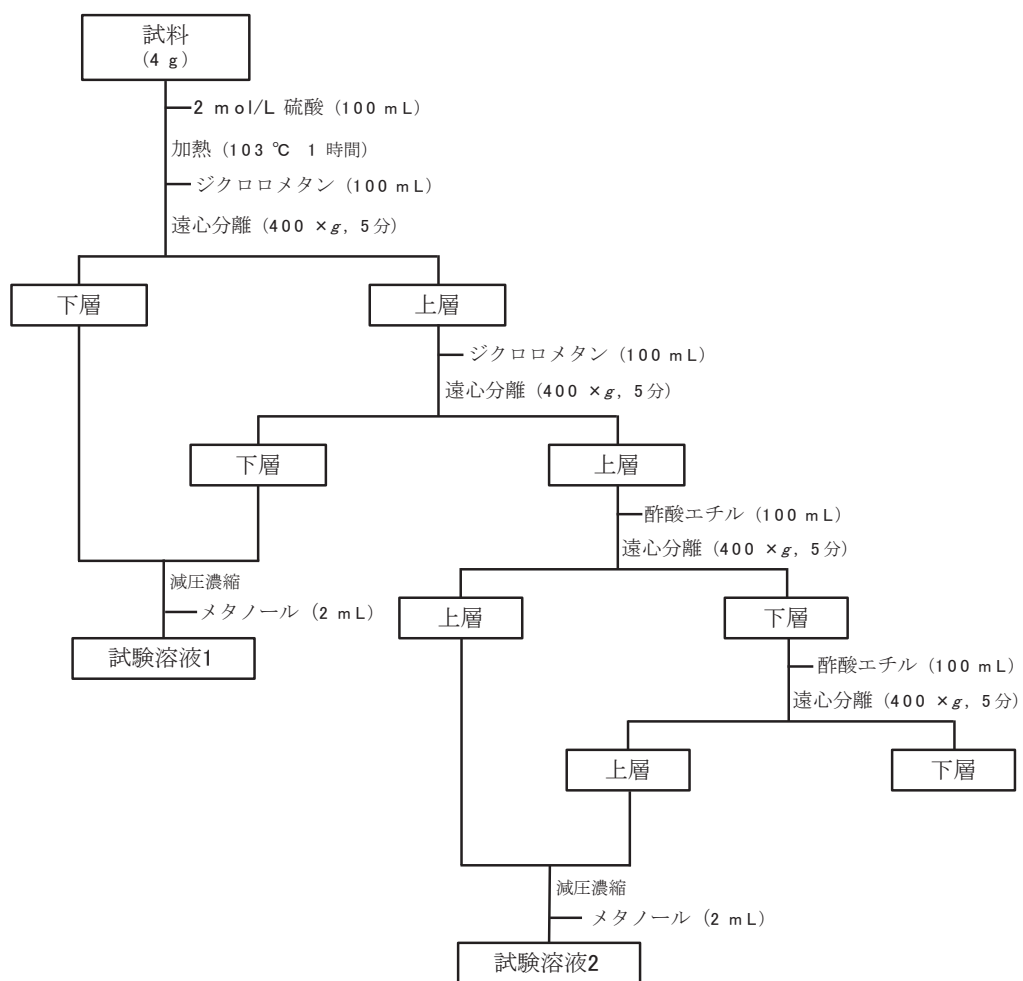


図 6 試験溶液の調製法

(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)

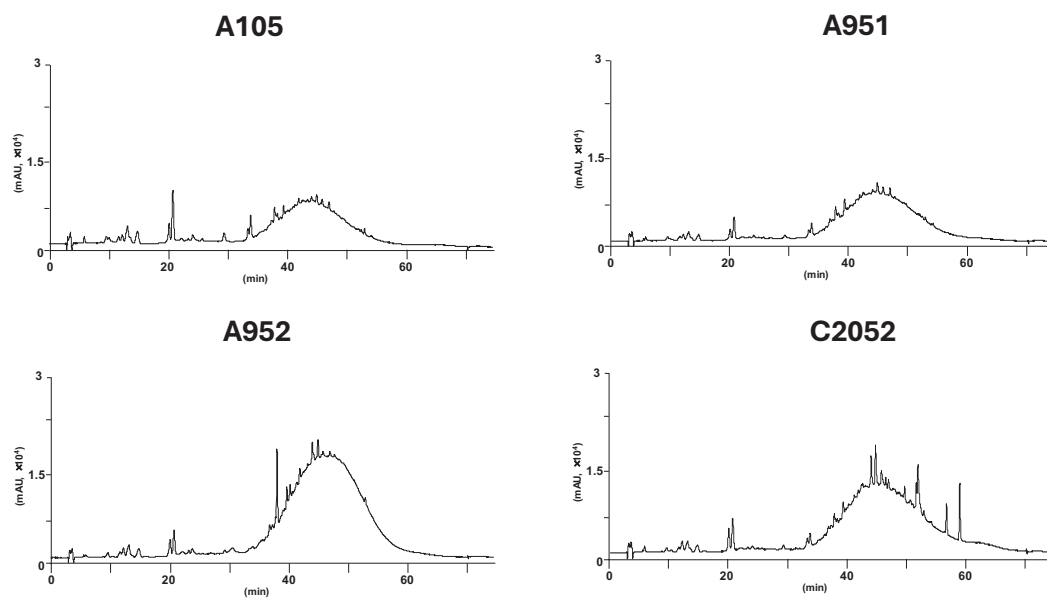


図 7 カシアガム製品 4 種のクロマトグラム

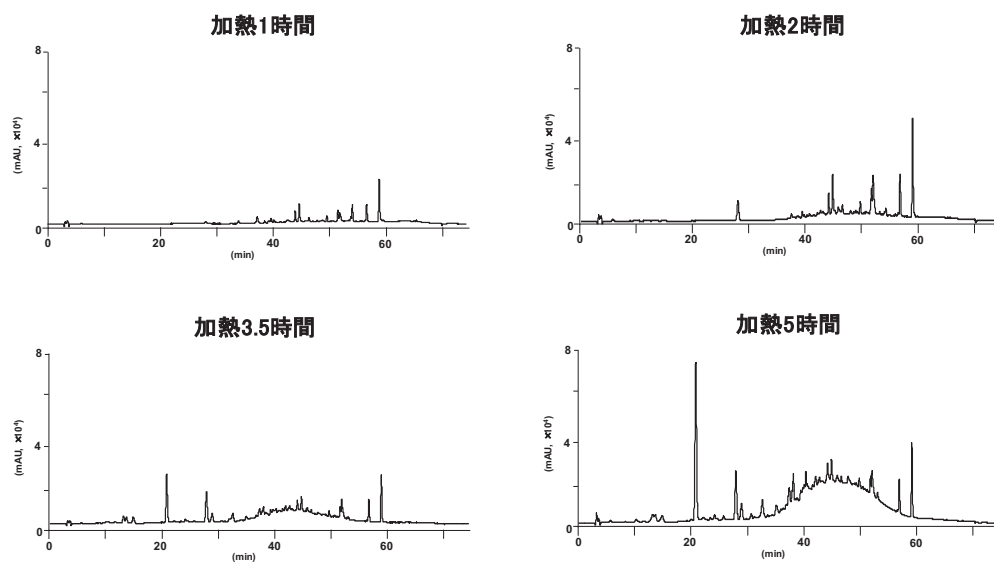


図 8 加熱時間の異なる各試験溶液のクロマトグラム

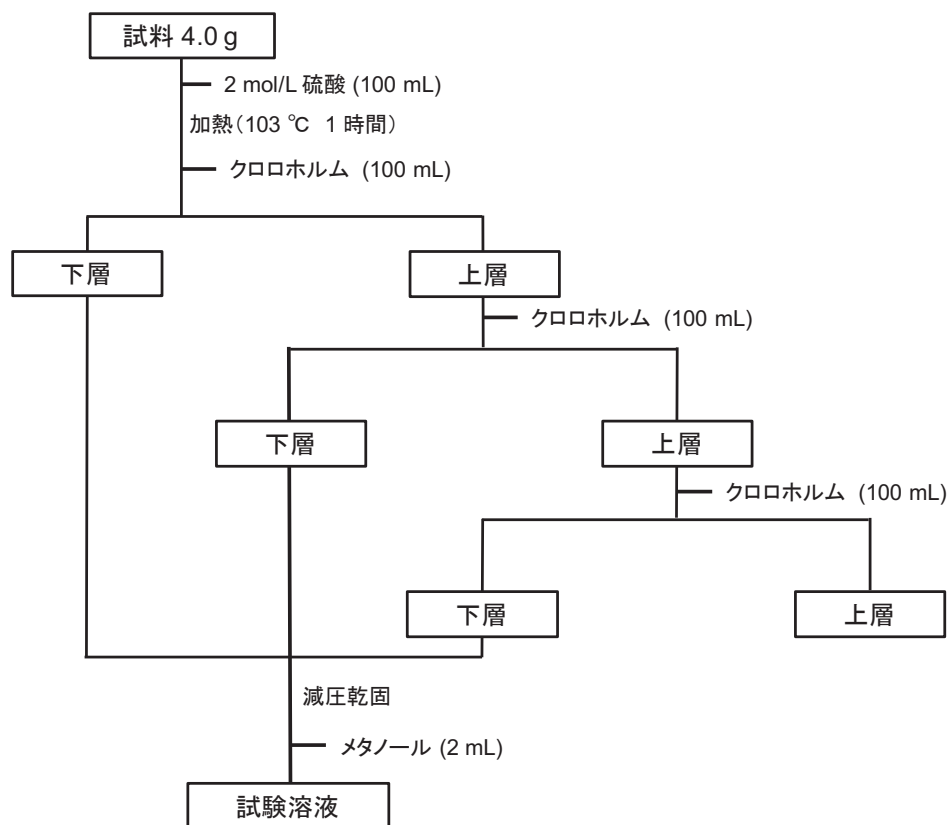
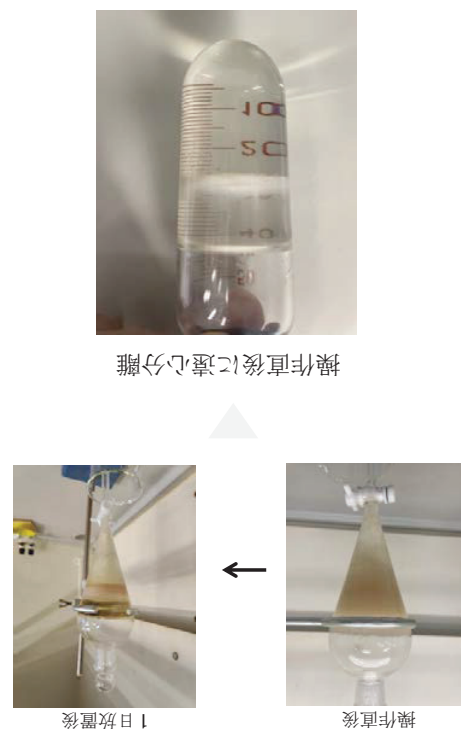


図 9 抽出回数を変更した試験溶液の調製法

図 10 液-液分配によるエマルジョンの生成並びに遠心分離の効果



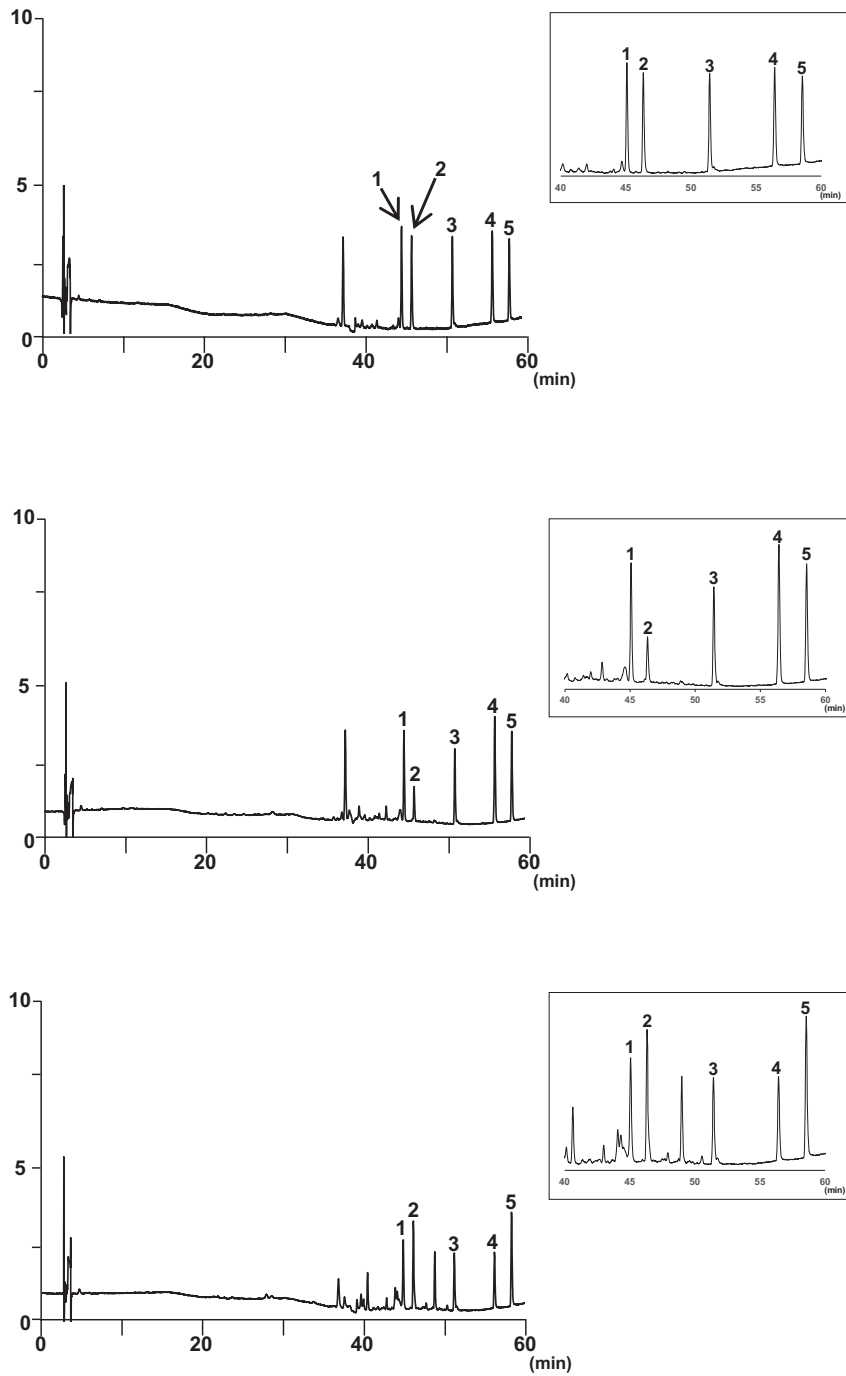


図 11 測定対象物質 5 種を添加した各カシアガム試験溶液のクロマトグラム
(測定条件 1)

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

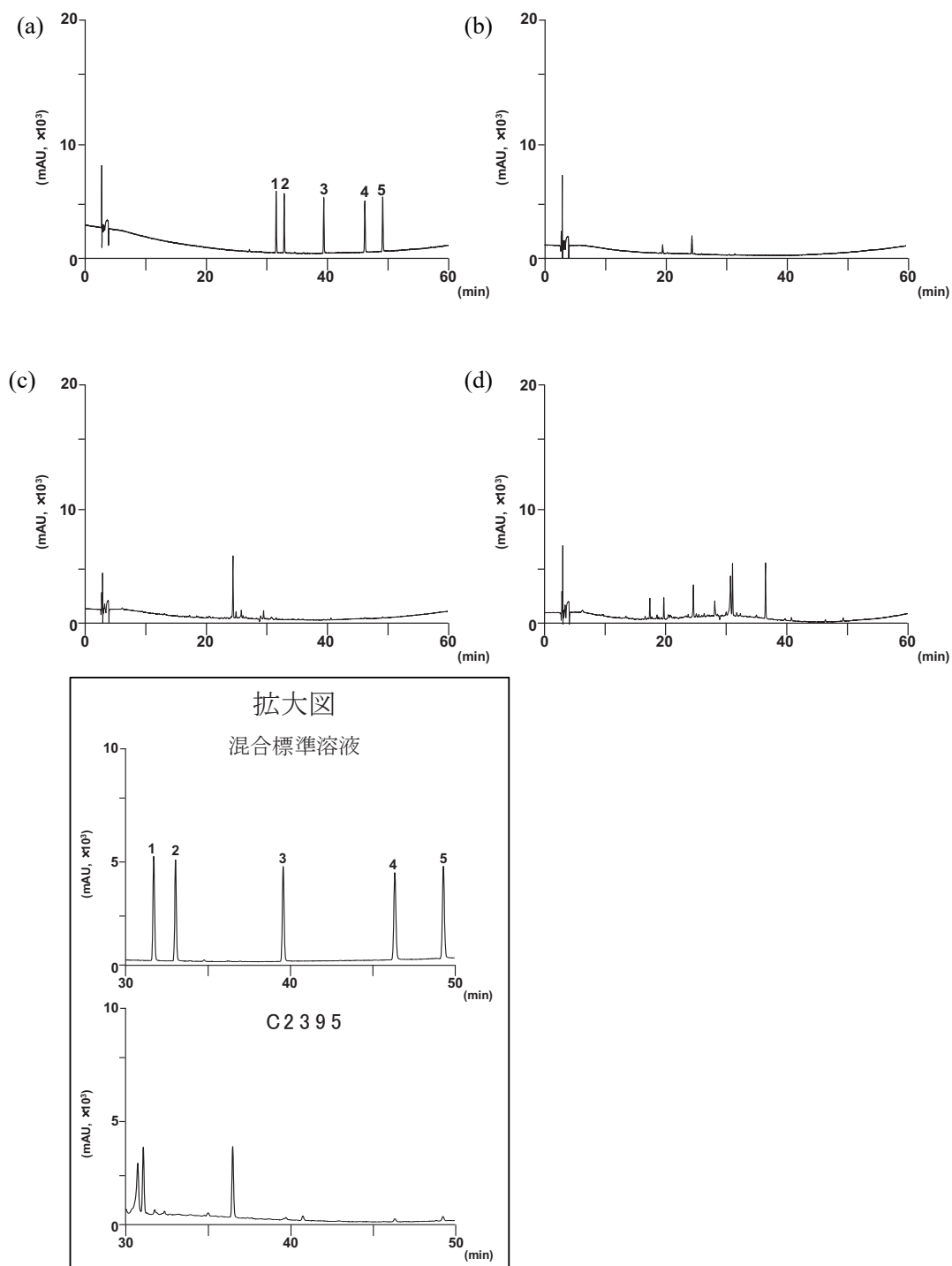


図 12 測定対象物質 5 種の混合標準溶液, 各カシアガム試験溶液及び測定対象物質

5 種を添加したカシアガム(C2395)試験溶液のクロマトグラム(測定条件 2)

(a) 混合標準溶液, (b) カシアガム(C2393), (c) カシアガム(C2394), (d) カシアガム(C2395),

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

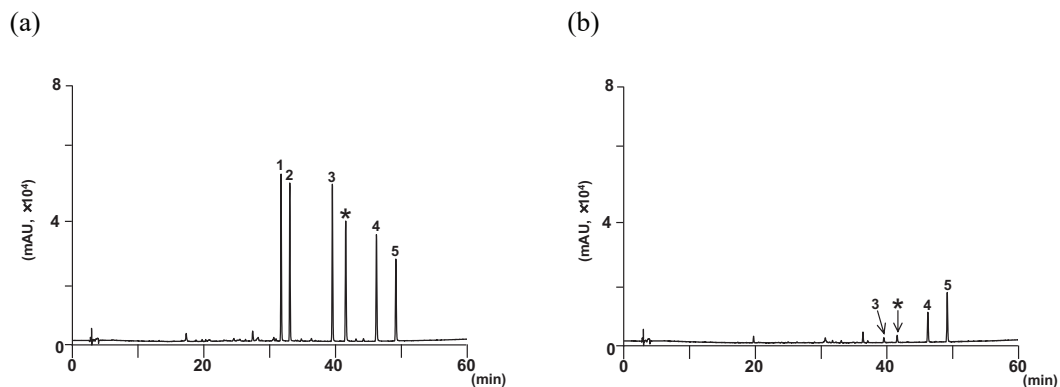


図 13 アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：5.0 mg/kg)より
段階抽出法により調製した試験溶液のクロマトグラム

(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

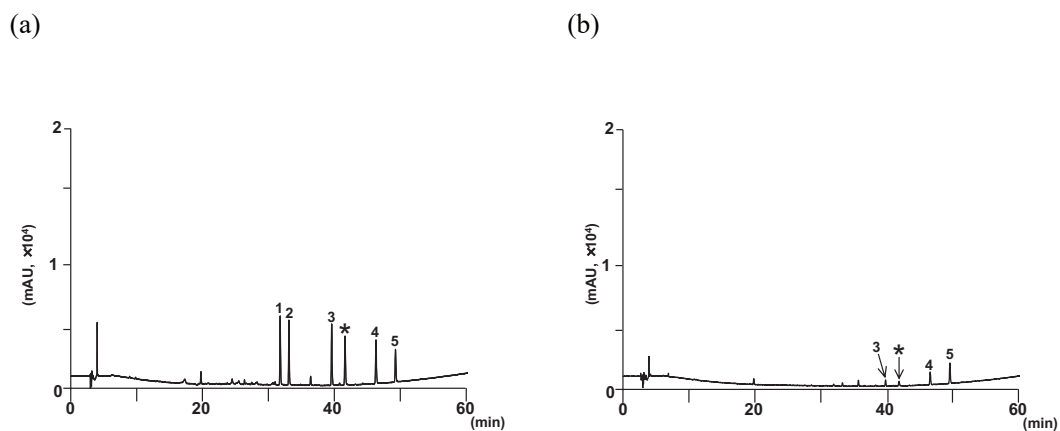


図 14 アントラキノン類が添加されたカシアガム(添加濃度：0.5 mg/kg)より
段階抽出法により調製した試験溶液のクロマトグラム

(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

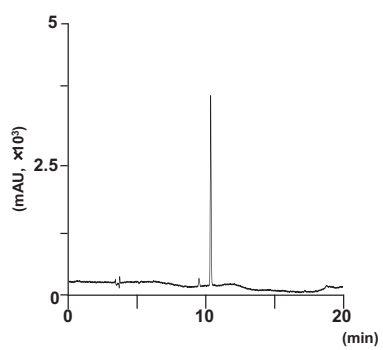


図 15 カフェインのクロマトグラム

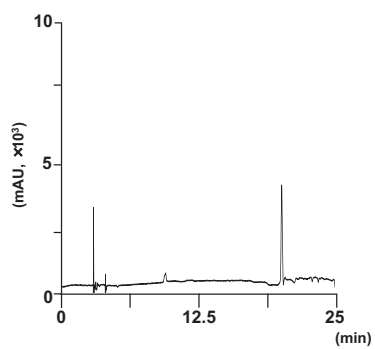


図 16 メチルパラベン(MHB)のクロマトグラム

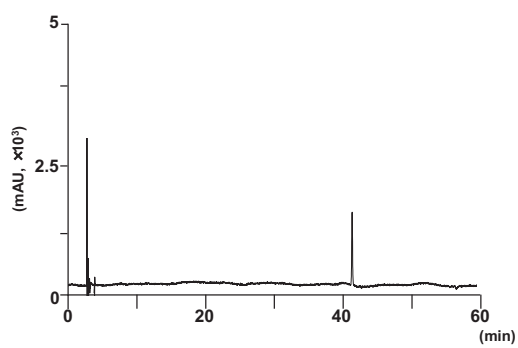


図 17 ダントロン(1,8-DAQ)のクロマトグラム

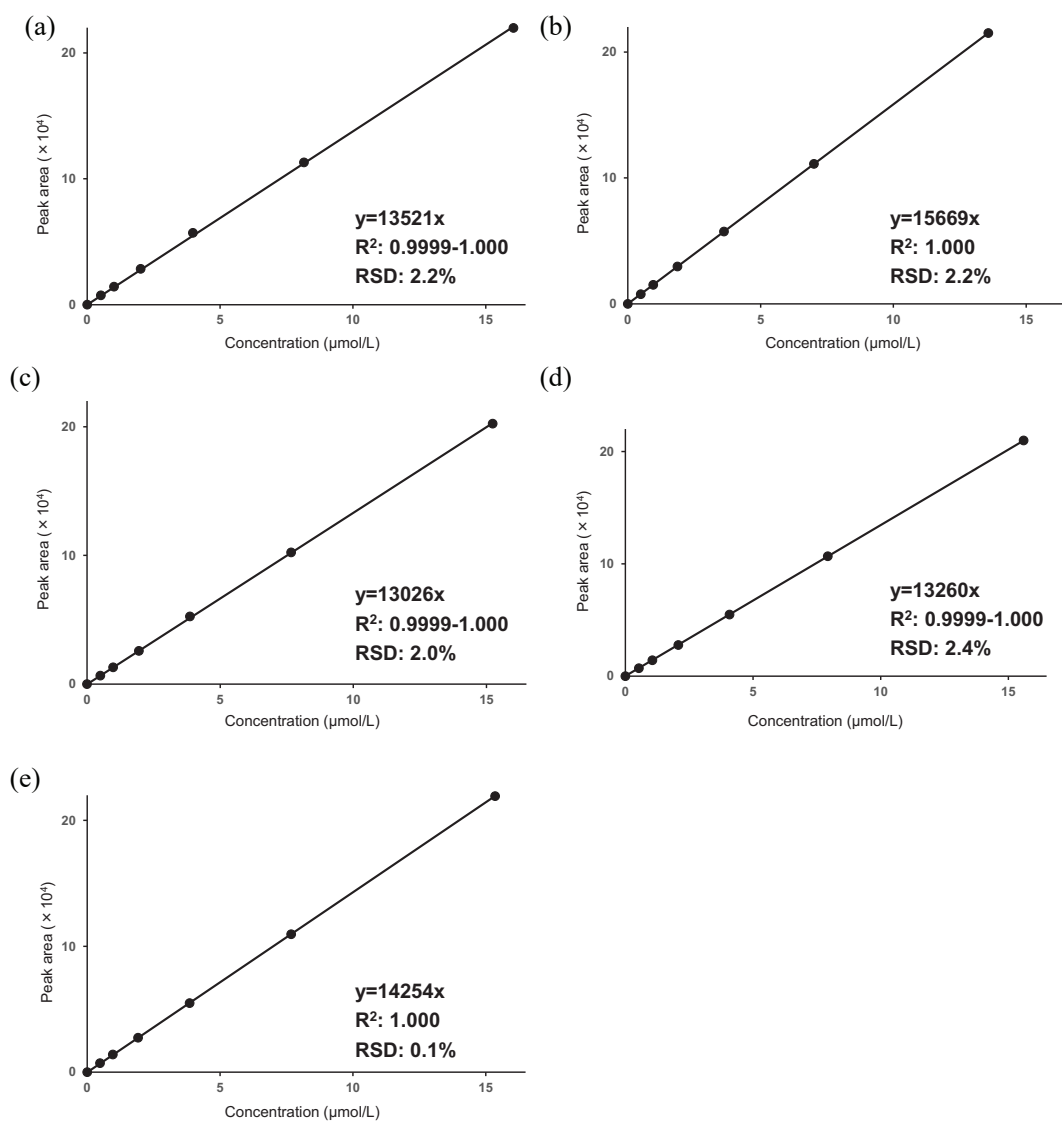


図 18 測定対象物質 5 種の検量線

(a) Aloe-emodin, (b) Rhein, (c) Emodin, (d) Chrysophanic acid, (e) Phycion

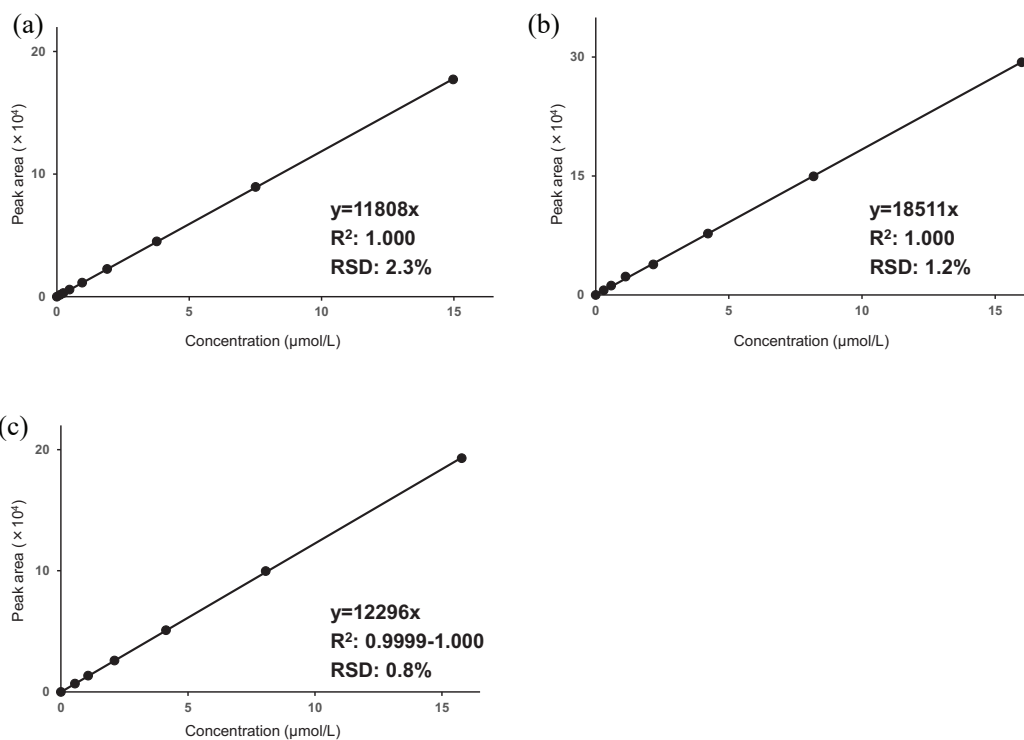


図 19 基準物質 3 種の検量線

(a) Caffeine, (b) Methylparaben, (c) 1,8-DAQ

表 1 測定対象物質 5 種及び 1,8-DAQ の回収率(n=4)

	Recovery (%)
Aloe-emodin	72.0
Rein	70.9
Emodin	48.8
1,8-DAQ	59.9
Chrysophanic acid	29.1
Physcion	12.2

表 2 抽出回数を変更した場合の測定対象物質 5 種及び 1,8-DAQ の回収率
(n=1)

	Recovery (%)
Aloe-emodin	90.2
Rein	94.1
Emodin	102.2
1,8-DAQ	100.1
Chrysophanic acid	92.6
Physcion	78.7

表 3 各抽出溶媒を単独で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)

	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 4 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 5 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 6 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)

表 7 ^1H -qNMR 測定条件

装置	JEOL ECA 500 spectrometer
スペクトル幅	20 ppm(-5 – 15 ppm)
データポイント数	65536
オートフィルター	on(eight times)
取り込み期間	6.55 秒
フリップ角	90°
取り込み待ち時間	60 秒
スキャン回数	8
スピニング	off
^{13}C デカップリング	Multi-pulse decoupling with phase and frequency switching(MPF-8)

表 8 各基準物質に対する測定対象物質の相対モル感度(RMS)

		Calibrant		
		Caffeine (y=11808x)	Methylparaben (y=18511x)	1,8-DAQ (y=12296x)
Analyte	Emodin (y=13026x)	1.10	0.70	1.06
	Aloe-emodin (y=13521x)	1.15	0.73	1.10
	Rein (y=15669x)	1.33	0.85	1.27
	Chrysophanic acid (y=13260x)	1.12	0.72	1.08
	Physcion (y=14254x)	1.21	0.77	1.16

表 9 RMS 法と従来法(絶対検量線法)によるモデル溶液 A の各測定対象物質の
含量の比較(n=3)

	RMS method						Conventional method	
	Calibrant (Caffeine)		Calibrant (Methylparaben)		Calibrant (1,8-DAQ)			
	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)
Emodin	8.7	2.2	8.6	2.2	8.4	2.2	8.5	2.2
Aloe-emodin	8.6	5.0	8.5	5.0	8.4	5.0	8.4	5.0
Rein	7.7	5.5	7.6	5.5	7.5	5.5	7.7	5.5
Chrysophanic acid	8.7	2.4	8.6	2.4	8.5	2.4	8.8	2.4
Physcion	8.5	1.0	8.3	1.0	8.2	1.0	8.3	1.0

表 10 RMS 法と従来法(絶対検量線法)によるモデル溶液 B の各測定対象物質の
含量の比較(n=3)

	RMS method						Conventional method	
	Calibrant (Caffeine)		Calibrant (Methylparaben)		Calibrant (1,8-DAQ)			
	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)	Content (μmol/L)	RSD (%)
Emodin	1.2	2.0	1.1	2.0	1.1	2.0	1.1	2.0
Aloe-emodin	1.1	3.4	1.1	3.4	1.1	3.4	1.1	3.4
Rein	1.0	2.6	1.0	2.7	1.0	2.6	1.0	2.7
Chrysophanic acid	1.2	2.1	1.1	2.1	1.1	2.1	1.2	2.1
Physcion	1.1	2.5	1.1	2.5	1.1	2.5	1.1	2.5