

流量 ビキシンの保持時間が 25～30 分付近になるように調整する。

定量法(色価測定法) 本品を精密に量り、テトラヒドロフラン 10mL を加えて溶かし、アセトンを加えて正確に 100mL とする。その 1mL を正確に量り、アセトンを加えて正確に 100mL とし、検液とする。色価測定法により次の操作条件で試験を行う。又、色価を 309 で除してビキシン含量を求める。

操作条件

測定溶媒 アセトン

測定波長 波長 482～490nm の極大吸収部

試薬・試液

塩化第一スズ・塩酸試液 塩化スズ(II) 10g を量り、塩酸を加えて溶かして 100mL とする。密栓して保存する。

ノルビキシシ $C_{24}H_{28}O_4$ (検討事項)

含量 70%以上

性状 本品は、濃い黄みの赤色の粉末である。

確認試験 (1) 本品 5.0mg を水酸化カリウム水溶液(1→200)に溶かし正確に 25mL とし、これを A 液とする。A 液 1mL を正確に量り、水酸化カリウム水溶液(1→200)を加えて正確に 50mL とした液は、448～456nm および 476～484nm に極大吸収部を認める。

純度試験 A 液 20 μ L を量り、次の操作条件に従い液体クロマトグラフィーを行い、クロマトグラムの全ピークに対する主ピークの面積比を求める。ただし、面積測定範囲は、主ピークの保持時間の 2 倍までとする。

操作条件

検出器 可視部吸収検出器(測定波長 460nm)

カラム 内径 4.6mm, 長さ 250mm のステンレス管

カラム充てん剤 5 μ m の化学結合型オクタデシルシラン

カラム温度 40℃

移動相 アセトニトリル/酢酸(1→50)混液(65 : 35)

流量 ノルビキシシの保持時間が約 10 分となるように調整する。

ビキシシ $C_{25}H_{30}O_4$ (検討事項)

含量 80%以上

性状 本品は、濃い赤色の結晶性の粉末である。

確認試験 (1)本品 5.0 mg をアセトンに溶かし正確に 25mL とし、これを A 液とする。A 液 1mL に、アセトンを加えて正確に 50mL とした液は、452～460nm および 482～490nm に極大吸収部を認める。

定量法 A 液 20 μ L を量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い、クロマトグラムの全ピークに対する主ピークの面積比を求める。ただし、面積測定範囲は、主ピークの保持時間の 2 倍までとする。

操作条件

検出器 可視部吸収検出器(測定波長 460nm)

カラム 内径 4.6mm, 長さ 250mm のステンレス管

カラム充てん剤 5 μ m の化学結合型オクタデシルシラン

カラム温度 40℃

移動相 アセトニトリル/酢酸(1→50)混液(65 : 35)

流量 ビキシシの保持時間が約 20 分となるように調整する。

規格対比表及び規格設定根拠

1.成分規格名：水溶性アナトール、アナトール色素

2.規格対比表

項目	第8版食品添加物 品添加物 公定量(案)		第9版食品添加物 公定量(案)		EU 57th-IECFA(2005)		JECFA 57th-IECFA(2005)		第4版 既存添加物自主 規格		
	水溶性アナトール	水溶性アナトール色素	水溶性アナトール色素	アナトール色素	ANNATTO EXTRACT (ALKALI-PROCESSED NORBIXIN, ACID-PRECIPI-TATED)	ANNATTO EXTRACT (ALKALI-PROCESSED NORBIXIN, ACID-PRECIPI-TATED)	ANNATTO EXTRACT (SOLVENT-NORBIXIN)	ANNATTO EXTRACT (AQUEOUS-PROCESSED NORBIXIN)	ANNATTO EXTRACT (SOLVENT-NORBIXIN)	ANNATTO EXTRACT	ANNATTO EXTRACT
名称	水溶性アナトール	水溶性アナトール色素	水溶性アナトール色素	アナトール色素	ANNATTO EXTRACT (ALKALI-PROCESSED NORBIXIN, ACID-PRECIPI-TATED)	ANNATTO EXTRACT (ALKALI-PROCESSED NORBIXIN, ACID-PRECIPI-TATED)	ANNATTO EXTRACT (SOLVENT-NORBIXIN)	ANNATTO EXTRACT (AQUEOUS-PROCESSED NORBIXIN)	ANNATTO EXTRACT (SOLVENT-NORBIXIN)	ANNATTO EXTRACT	ANNATTO EXTRACT
別名	-	-	-	-	L. Orange, CI (1975) 75120 (Natural Orange 4), INS 160b(i)	L. Orange, CI (1975) 75120 (Natural Orange 4), INS 160b(i)	L. Orange, CI (1975) 75120 (Natural Orange 4)	L. Orange, CI (1975) 75120 (Natural Orange 4), INS 160b(i)	L. Orange, CI (1975) 75120 (Natural Orange 4), INS 160b(i)	-	-
分子式・構造式記載	$C_{24}H_{28}O_4$	$C_{24}H_{28}O_4$	$C_{24}H_{28}O_4$	$C_{24}H_{28}O_4$	$C_{24}H_{28}O_4$, $C_{24}H_{28}K_2O_4$, $C_{24}H_{28}Na_2O_4$ 構造式ノルビキシン及びNa若しくはK塩	$C_{24}H_{28}O_4$, $C_{24}H_{28}K_2O_4$, $C_{24}H_{28}Na_2O_4$ 構造式ノルビキシン及びNa若しくはK塩	$C_{24}H_{28}O_4$, $C_{24}H_{28}Na_2O_4$	$C_{24}H_{28}O_4$ 構造式ノルビキシン	$C_{24}H_{28}O_4$, $C_{24}H_{28}Na_2O_4$	-	-
含量(色価)	ノルビキシンとして 100~125%を含む	ノルビキシンとして 90~125%を含む	ノルビキシンとして 15%以上(ノルビキシンとして) EIO%以上(重量1%=EIO%として)	ノルビキシンとして 25%以上(ノルビキシンとして) EIO%以上(重量1%=EIO%として)	35%以上(ノルビキシンとして) EIO%以上(重量1%=EIO%として)	35%以上(ノルビキシンとして) EIO%以上(重量1%=EIO%として)	0.1%以上(ノルビキシンとして)	25%以上(ノルビキシンとして)	75%以上(ノルビキシンとして)	EIO%以上(重量1%=EIO%として)	EIO%以上(重量1%=EIO%として)
性状	赤褐～褐色の粉末、塊、液体又はペースト状の物質で、わずかに特異なにおいがある。	赤褐～褐色の粉末、塊、液体又はペースト状の物質で、わずかに特異なにおいがある。	赤褐～暗褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なにおいがある。	赤褐～暗褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なにおいがある。	Dark red-brown to red-purple powder	Dark red-brown to red-purple powder	Dark red-brown to red-purple powder	Dark red-brown to red-purple powder	Dark red-brown to red-purple powder	Reddish-brown powder, suspension or solution	Reddish-brown powder, suspension or solution
確認試験	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
溶解性	-	水に不溶、水酸化カリウム(1→200)を20mlを加えたとき黄～橙黄色を呈す	水に不溶	水に不溶、エタノールに可溶、エタノールに僅かに溶ける	アルカリ水に可溶、エタノールに僅かに溶ける	アルカリ水に可溶、エタノールに僅かに溶ける	アルカリ水に可溶、エタノールに僅かに溶ける	水に不溶、エタノールに僅かに溶ける	水に不溶、エタノールに僅かに溶ける	-	-
水/NN-ジメチルホルムアミド/新鹼液(50:50:1)の色調	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	黄～だいだいい色を呈する

3. 規格設定の根拠

①定義は、作成要領に従い、既存添加物リストの定義及び基原・製法・本質に準じて設定した。

②含量（色価）は、市場調査を実施し「ノルビキシンは、15%（含量1%＝色価（ $E_{1cm}^{10\%}$ ）287として）

以上で、表示量の90～120%を含む。」、「ビキシンは、10%（含量1%＝色価（ $E_{1cm}^{10\%}$ ）309として）

以上で、その表示の90～120%を含む。」と決定した。

③性状は、市場流通している原体の性状を調査し決定した。また、作成要領に従いにおきの表現を統一した。

④確認試験

(1)、(2)、(3)は、アナトー色素の性質を利用し確認試験とした。

(3) 極大吸収波長においては実態調査を行い、極大吸収部の範囲を設定した。

⑤純度試験

(1) J E C F A規格に準じ設定した。

(2) 公定書の一般的な規格に準じ設定した。

(3) J E C F A規格に準じ設定した。

(4) J E C F A規格に準じ設定した。

ビキシンの純度試験(4)において第4版自主規格において（カロテノイド含量15.0%に換算）となっていたがこれは間違いで（ビキシン含量10%に換算）と変更した。

⑥定量法（色価測定法） 一般試験法に基づき設定した。

以上

第9版食品添加物公定書新規収載「アナトー色素」、及び「水溶性アナトー」規格に関する件

1. アナトー色素の概要

アナトーは中南米原産で、現在、ペルー、エクアドル、ブラジル、メキシコ、チリ、ケニアなど広く熱帯・亜熱帯地方で栽培されている。中南米ではアチオテと呼ばれ、種子を鍋に入れて炒め、その油に野菜や肉を入れて煮込むというアチオテ料理が日常よく食べられている。乾燥種子の収穫量は、世界全体で約15,000トンであり、その内色素の原料として使用されているのは約7,000トンと言われている。着色料としての使用量は、カロテノイド系色素の中でもトップ3に入り、世界的には含量15%として約500MT、日本では含量15%物で約40MTの市場と予想される。

アナトー色素は、世界中で許可されており、欧米では古くからチーズの着色に用いられ、チーズカラーの別名がある程である。一般的な用途として、パン粉、ソフトクリームのコーンカップ、チーズ、バター、マーガリン、練りウニ、アイスクリーム、蒲鉾、菓子類、タレ、畜産製品(ウインナーソーセージ)など幅広く使用される。

アナトー色素の成分はビキシン及びノルビキシンであり、ビキシンは油溶性であるので食用油脂に溶かしたもの、ペースト状のもの、そのまま微粉末にしたもの等の商品があり油性食品に使われている。ノルビキシンは水に懸濁したもの、乳化剤を用いて水に分散させたもの、粉末等の製品が流通されている。

2. 公定規格の必要性

JECFA、EU、米国その他の国々では、既に公定規格が整備されていますが、日本では、水溶性アナトー(指定添加物、アナトー色素(ノルビキシン)のアルカリ製剤)が第8版食品添加物公定書規格に収載され、アナトー色素(ビキシン・ノルビキシン)は第4版既存添加物自主規格として運用されています。世界中で、流通量も多く広く使われているにも係らず、公定規格がないことは、日本のメーカーとして品質を維持する上で障害となります。特に純度試験の水銀についてはメーカーの自主管理として確認をしている状況です。

アナトー色素の JECFA 規格動向

アナトー色素の JECFA 規格の動向については、第61回 FAO/WHO 合同専門委員会(JECFA)食品添加物会議(2003年6月10日~19日 ローマ)が開催され、アナトー色素に関する審議結果がまとめられた。アナトー色素を製法別に6つのタイプ(B~Gタイプ)に分類し、それぞれについての毒性再評価を踏まえた暫定ADI値が再設定され、次いで、第67回の会議(2006年6月20日~29日 ローマ)で最終のADIが決定された。

規格に関しては2006年の第67回 JECFA 会議で、アナトー色素の6つの分類に対する規格が公表されたが、2007年暫定規格であったビキシン規格(Dタイプ)が、流通実態が無いことか

ら削除され5規格（ノルビキシン3、ビキシン2規格）となった。（表1）

尚、アナトー色素を製法別に6つのタイプについては別途説明する。

また、2007年4月に中国で開催された第39回コーデックス食品添加物部会（Joint FAO/WHO Codex Committee on Food Additives: CCFA）でアナトー色素のINS番号設定の議論がされ、（表2）のように提案された。

ADIに関する要点は、ADIはビキシンで0-12 mg/kg bw/day、ノルビキシンおよびそのナトリウム・カリウム塩で0-0.6 mg/kg bw/day。いずれも2003年に再設定された暫定ADIを上回り、またそれ以前の旧ADI値0.065 mg/kg bw/dayから10~200倍近い許容量として認められた。JECFAによる評価は、2003年の暫定値で設定された製法ごとに分類した6種類の個別評価から、色素主成分であるビキシン・ノルビキシンの2種に大別したものに変更された。

ビキシンでは、92%を含む抽出物をオスのラットに給餌した90日間試験から得られた1日あたりのNOEL（無影響量）1,311 mg/kg bw/dayに基づき安全係数100を適用したことで、ADIが0-12 mg/kg bw/dayと設定された。また、ノルビキシンも同様に91.6%の含有物でラット90日試験を行い、1日あたりNOEL（無影響量）69 mg/kg bw/dayに基づきノルビキシンおよびそのナトリウムおよびカリウム塩に対するグループADIを0-0.6 mg/kg bw/dayと規定し、色素含量を補正し、安全係数100を適用した。

一般的にビキシン・ノルビキシンのADIの差は、成分構造や体内吸収性の違いなどに由来するとみられている。

※アナトー色素を製法別に6つのタイプについて

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES Sixty-first meeting Rome, 10-19 June 2003 において分類された。（別紙1、2）

各々の製法とわが国における公定書の位置づけについて以下に示す。

表1 アナトー色素規格(第67回JECFA提案規格)

タイプ	製法	規格の位置づけ (日本)	備考
Annatto extract (solvent-extracted bixin) - "Annatto B"	溶媒抽出→精製→結晶化	第4版自主規格→ 第9版新規設定予定 (ビキシン)	85%以上(ビキシンとして) ノルビキシン:総色素の 2.5%以下
Annatto extract (solvent-extracted norbixin) - "Annatto C"	溶媒抽出→結晶化→鹼化→加熱して加水分解→酸性化ノルビキシンの沈殿→沈殿物を精製→粉末	第4版自主規格→ 第9版新規設定予定 (ノルビキシン)	85%以上(ノルビキシンとして)

Annatto extract (oil-processed bixin suspension) -"Annatto D"	加熱した植物油中で種子を擦りつぶして抽出 オイルサスペンション、溶媒は使用しない。	設定なし	2006 年の第 67 回 JECFA 会議 削除 10%以上(ビキシンとして)
Annatto extract (aqueous-processed bixin) -"Annatto E"	冷アルカリ溶液中で擦りつぶして抽出→酸性下ビキシンの沈殿→ろ過→精製→粉碎	第 4 版自主規格→ 第 9 版新規設定予定 (ビキシン)	25%以上(ビキシンとして) ノルビキシン:総色素の 7% 以下
Annatto extract (alkali-processed norbixin) -"Annatto F"	冷アルカリ溶液中で擦りつぶして抽出→更にアルカリを加えて加熱して加水分解→酸性下ノルビキシンの沈殿→ろ過→精製→粉碎	第 4 版自主規格→ 第 9 版新規設定予定 (ノルビキシン)	35%以上(ノルビキシンとして)
Annatto extract (alkali-processed norbixin, not acid-precipitated) -"Annatto G"	冷アルカリ溶液中で擦りつぶして抽出→更にアルカリを加えて加熱して加水分解→精製→ろ過→凍結乾燥	第 8 版食品添加物公定書 「水溶性アナトー」	15%以上(ノルビキシンとして)

表 2 第 39 回コーデックス食品添加物部会 (CCFA) 提案された INS NUMBER

INS NUMBER(従来)	COMPOUND
160b	Annatto, Bixin, Norbixin
第 39 回 CCFA(案) INS NUMBER	COMPOUND
160b	Annatto Extracts
160b(i)	Annatto Extracts, Bixin-based
160b(ii)	Annatto Extracts, Norbixin-based

3. アナトー色素の公定規格の経緯

アナトー色素については、その主成分は、ベニの木の種子に含まれる油溶性のビキシンとアルカリ性水溶液で抽出し、加水分解し中和して得られたノルビキシンの 2 成分で、既存添加物とされております。

この抽出により得られるノルビキシンのアルカリ塩 (カリウムまたはナトリウム塩) ノルビキシンカリウム、及びノルビキシンナトリウムは食品衛生法上化学的合成品に該当するところから、昭和 43 年 (1968) 3 月 8 日食品添加物に指定されました。成分規格の告示では、本来この 2 成分での規格化が適当であったのですが、これら塩類は、水に易溶なことから「水溶性

アナトー」の名称が付されて規格が定められました。

一方、ビキシン、ノルビキシンの規格はアナトー色素として第3版自主規格、第4版自主規格に収載し運用しておりましたが、公定規格に無く、第8版食品添加物公定書(2008年8月)新規収載時(2005年)に検討いただきました。しかしながら、JECFAの規格がまだ公表にされていなかったことから、第9版食品添加物公定書への収載として見送りされております。

3. 規格設定について

アナトー色素(水溶性アナトーも含む)の規格化については、第9版食品添加物公定書新規収載及び水溶性アナトーの規格変更を実施するに当たり、国際調和の観点からJECFA規格に沿って規格基準を進めることといたしました。アナトー色素は、その製法が5つのタイプに分類されることからJECFAにおいてそれぞれ規格設定がされました。しかしながら、成分としては、ビキシン、ノルビキシン、ノルビキシンNa,K(アルカリ塩)となります。規格対比表参照(別紙3)。

以下に設定根拠についてご説明いたします。

<規格設定説明>

【新規収載 アナトー色素(ビキシン・ノルビキシン)】

○名称については、「アナトー色素」とし成分である「ビキシン」と「ノルビキシン」に対してそれぞれ規格を設定いたしました。

〔第9版食品添加物公定書では、カンゾウ抽出物 組成物・精製物の事例に準じます。〕

○定義については、主名称のアナトー色素の次に掲載し、その後成分分類規格といたしました。内容については、基原・製法・本質を参考とし設定いたしました。

「本品は、ベニノキ(*Bixa orellana* Linné)の種子の被覆物から得られたもので、ノルビキシンを主成分とするものとビキシンを主成分とするものがあり、それぞれをノルビキシン及びビキシンと称する。」

ノルビキシン規格に関して

○ 含量(色価)については、JECFA規格で3規格設定〔ノルビキシン3規格 Annatto Cタイプ Annatto extracts(solvent-extracted norbixin)、Annatto Fタイプ Annatto extracts(alkali-processed norbixin, acid-precipitated)、Annatto extract (alkali-processed norbixin, not acid-precipitated) - "Annatto G"〕を統合し、15%を最低含量といたしました。

第3版既存添加物自主規格においては、カロテノイド3.0%以上と設定し、第8版公定書および第4版既存添加物自主規格作成時において、JECFA規格を参考とし業界として15%以上と設定いたしました。1つの理由として精製度の低いもの、また、ノルビキシンが退色し含量低下し易いことも考慮しました。

「本品は、ノルビキシン(C₂₄H₂₈O₄)が15%(含量1%＝色価(E_{1cm}^{10%})287として)以上で、表示量の90～120%を含む。」

- 性状については、JECFA 規格に準じました。

実態調査を実施し、第3版および第4版既存添加物自主規格作成時に設定いたしました。

「本品は、赤褐～暗褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なおいがある。」

確認試験

- 確認試験については、確認試験 (1)においてノルビキシンが水に不溶で、アルカリ性で溶解する性質で確認する。本規格をビキシン、水溶性アナトーに入れることで色素の性質により確認することができるため全てに導入いたしました。

- ・ ノルビキシン:水に不溶、アルカリ性で可溶
- ・ ビキシン:油性であることから水に不溶
- ・ 水溶性アナトー:水に可溶

「(1) 本品の表示量から、ノルビキシン含量15%に換算して0.1gに相当する量を量り、水50mLを加えて振り混ぜるとき、ほとんど溶けない。」

- 確認試験(2)は、HPLC(液体クロマトグラフィー)により定性としてノルビキシンを確認する。本試験については試薬として和光純薬(株)から標品を取り扱っていることから導入いたしました。(別紙3)

JECFA 規格においては TLC(薄層クロマトグラフィー)法が設定されていますが、今回の新規収載にあたり定性分析として HPLC(液体クロマトグラフィー)法をノルビキシン、ビキシン、水溶性アナトーに導入いたしました。

「(2) 本品をノルビキシン 15%に換算し 0.01g 量り、N,N-ジメチルホルムアミド 25mL を加えて溶かした後、必要があれば遠心分離又はろ過し、アセトニトリル 25mL を加えて検液とする。検液 10 μL を量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、ノルビキシンは保持時間 5～10 分付近に主色素成分ピークを認め、ビキシンは保持時間 25～30 分付近に主色素成分ピークを認める。」

操作条件

検出器 可視吸光度計(測定波長 460nm)

カラム充てん剤 5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 4～5mm、長さ 15～30cm のステンレス管

カラム温度 35℃

移動相 アセトニトリル/酢酸(1→50)混液(65:35)

流量 ノルビキシンの保持時間が 5～10 分付近になるように調整する。」

○ 確認試験(3)は、ノルビキシンの極大吸収波長を測定し確認試験といたしました。JECFA規格では453,482nm付近表示であるが、食品添加物公定書において着色料は、第7版から範囲規定するように指導されていたことから、今回範囲指定を行ないました。

「(3)本品に水酸化カリウム溶液(1→200)を加えて溶かした液は、波長 448～456nm と波長 476～484nm に極大吸収部がある。」

純度試験

○ 純度試験については、JECFA規格に準じ設定した。

「水銀」については、公定書全般について見直しを実施する方向であるので、方向性に従い確認訂正を行なう。

また、残留溶媒基準については、今回各条に設定記載したが、第8版食品添加物公定書まではJECFA規格があるものに対しても各条での設定しないこととされていた。分析法についても収載検討はないことから、第8版食品添加物公定書に準じ設定しないこととし、製造基準(E)項に収載を希望する。

「(1) 鉛 Pbとして2.0 μg/g以下(5.0g, 第1法)

(2) ヒ素 As₂O₃として4.0 μg/g以下(0.50g, 第3法, 装置B)

(3) 水銀 Hgとして1.0 μg/g以下(略)」

定量法(色価測定法)

○ 定量法については、一般試験法色価測定法に準じ設定し、ノルビキシン含量については係数から求めることとした。

「本品を精密に量り、水酸化カリウム溶液(1→200)を加えて溶解し、正確に100mLとする。その1mLを正確に量り、水酸化カリウム溶液(1→200)を加えて正確に100mLとし、検液とする。色価測定法により次の操作条件で試験を行う。又、色価を287で除してノルビキシン含量を求める。」

操作条件

測定溶媒 水酸化カリウム溶液(1→200)

測定波長 波長476～484nmの極大吸収部」

ビキシン確認試験

○含量(色価)については、JECFA規格で2規格設定〔ビキシン2規格 **Annatto B** Annatto extracts(solvent-extracted bixin)、**Annatto E**Annatto extracts(aqueous-processed bixin)〕を統合し、10%を最低含量といたしました。

第3版既存添加物自主規格においては、カロテノイド3.0%以上と設定し、第8版公定書および第4版既存添加物自主規格作成時において、JECFA規格を参考とし業界として10%以上と設定いたしました。1つの理由として精製度の低いもの、また、ビキシンが退色し含量低

下しやすいことも考慮し設定いたしました。

「本品は、ビキシシ(C₂₅H₃₀O₄)が25%(含量1%=色価(E_{1cm}^{10%})309として)以上で、その表示の90~120%を含む。」

- 性状については、JECFA 規格に準じました。

実態調査を実施し、第3版および第4版既存添加物自主規格作成時に設定いたしました。

「本品は、赤褐～暗褐色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なおいがある。」

- 確認試験については、確認試験(1)においてビキシシが油性色素であることから水に不溶であることを確認する。本規格をノルビキシシ、水溶性アナトーに入れることで色素の性質により確認することができるため全てに導入いたしました。

- ・ノルビキシシ:水に不溶、アルカリ性で可溶
- ・ビキシシ:油性であることから水に不溶
- ・水溶性アナトー:水に可溶

「本品の表示量から、ビキシシ含量25%に換算して0.04gに相当する量を量り、水50mLを加えて振り混ぜるとき、ほとんど溶けない。」

- 確認試験(2)は、HPLC(液体クロマトグラフィー)により定性としてビキシシを確認する。本試験については試薬として和光純薬(株)から標品を取り扱っていることから導入した。(別紙3)

また、JECFA 規格においてはTLC(薄層クロマトグラフィー)法が設定されていますが、今回の新規収載にあたり定性分析としてHPLC(液体クロマトグラフィー)法をノルビキシシ、ビキシシ、水溶性アナトーに導入いたしました。

「(2) 本品の表示量から、ビキシシ25%に換算し0.02g量り、N,N-ジメチルホルムアミド25mLを加えて溶かした後、必要があれば遠心分離又はろ過し、その5mLを正確に量り、N,N-ジメチルホルムアミドを加えて25mLとし、アセトニトリル25mLを加えて検液とする。検液10μLを量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、ノルビキシシは保持時間5~10分付近に主色素成分ピークを認め、ビキシシは保持時間25~30分付近に主色素成分ピークを認める。」

操作条件

検出器 可視吸光光度計(測定波長460nm)

カラム充てん剤 5μmの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 内径4~5mm、長さ15~30cmのステンレス管

カラム温度 35℃

移動相 アセトニトリル/酢酸(1→50)混液(65:35)

流量 ビキシシの保持時間が25~30分付近になるように調整する。」

○ 確認試験(3)は、ビキシンの極大吸収波長を測定し確認試験とした。
JECFA 規格では 453.482nm 付近表示であるが、食品添加物公定書において着色料は、第7版から範囲規定するように指導されていたことから、今回範囲指定を行なった。

「(3) 本品にアセトンを加えて溶かした液は、波長 452～460nm と波長 482～490nm に極大吸収部がある。」

純度試験

○ 「水銀」については、公定書全般について見直しを実施する方向であるので、方向性に従い確認訂正を行なう。

また、残留溶媒基準については、今回各条に設定記載したが、第8版食品添加物公定書まではJECFA 規格があるものに対しても各条での設定しないこととされていた。分析法についても収載検討はないことから、第8版食品添加物公定書に準じ設定しないこととし、製造基準(E)項に収載を希望する。

確認試験(4)のビキシンのノルビキシン含量の設定については JECFA 規格に準じ設定した。本件でのビキシンのノルビキシンの標準品については設定することとした。

「(1) 鉛 ノルビキシンの純度試験(1)を準用する。」

(2) ヒ素 ノルビキシンの純度試験(2)を準用する。」

(3) 水銀 ノルビキシンの純度試験(3)を準用する。」

(4) ノルビキシン 7%以下

本品を 0.02g 量り、N,N-ジメチルホルムアミド 25mL を加えて溶かした後、必要があれば遠心分離又はろ過し、その 5mL を正確に量り、N,N-ジメチルホルムアミドを加えて 25mL とし、アセトニトリル 25mL を加えて検液とする。別にノルビキシン 7%に換算し 0.02g 量り、以下検液の場合と同様に操作し、比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 10 μ L ずつ量り、次の条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、検液のノルビキシンのピーク高さは、比較液のノルビキシンのピーク高さを超えない。

操作条件

検出器 可視吸光度計(測定波長 460nm)

カラム充てん剤 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 4～5mm、長さ 15～30cm のステンレス管

カラム温度 35℃

移動相 アセトニトリル/酢酸(1→50)混液(65 : 35)

流量 ビキシンの保持時間が 25～30 分付近になるように調整する。」

定量法 (色価測定法)

○ 定量法については、一般試験法色価測定法に準じ設定し、ビキシン含量については係数から求めることとした。

「本品を精密に量り、テトラヒドロフラン 10mL を加えて溶かし、アセトンを加えて正確に 100mL とする。その 1mL を正確に量り、アセトンを加えて正確に 100mL とし、検液とする。色価測定法により次の操作条件で試験を行う。又、色価を 309 で除してビキシン含量を求める。」

操作条件

測定溶媒 アセトン

測定波長 波長 482～490nm の極大吸収部

【規格内容変更 水溶性アナトー】

JECFA 規格で〔ノルビキシン Annatto extracts(alkali-processed norbixin, not acid-precipitated)〕として規格化されている。これは、日本において「水溶性アナトー」として流通していることから分類分けされたもので、規格内容についてはノルビキシンと同様になっている。

○名称については、現状のまま「水溶性アナトー」とした。

○定義については、今回新規収載としてアナトー色素(ノルビキシン・ビキシン)が設定されることから成分名を具体的に記載することとした。

「本品は、ベニノキ(*Bixa orelana* Linné)の種子の赤色被覆物から加水分解を経て作られ、その色素成分は、ノルビキシンカリウム又はノルビキシンナトリウムである。」

水溶性アナトーの定義

規格設定の経緯に書きましたように、ノルビキシンカリウム、及びノルビキシンナトリウムは食品衛生法上化学的合成品に該当するところから、昭和 43 年(1968)3月8日食品添加物に指定されました。成分規格の告示では、本来この 2 成分での規格化が適当であったのですが、これら塩類は、水に易溶なことから「水溶性アナトー」の名称が付されて規格が定められました。

○含量(色価)については、第 8 版食品添加物公定書と JECFA 規格から 100～125%から下限値を JECFA に準じ変更いたしました。また、実際に実態調査を実施し下限値を変更すべきと判断いたしました。

「本品は、ノルビキシン($C_{24}H_{28}O_4=380.48$)として表示量の 90～125%を含む。」

○性状については、第 8 版食品添加物公定書から変更なし。JECFA 規格に準じました。

「本品は、赤褐～褐色の粉末、塊、液体又はペースト状の物質で、わずかに特異なおいがある。」

確認試験

○確認試験については、確認試験(1)において、第 8 版食品添加物公定書から試料採取量を増

やしました。これは、確認試験(2)を新たに HPLC 分析を入れることにより採取すべき(残留物)酸析出物を確保するために変更いたしました。

水溶性アナトーは、ノルビキシンをアルカリ溶解したものであることから、一旦酸性にすることによりノルビキシンを析出し、ノルビキシンの確認試験を実施する。

(i)は、極大吸収波長の確認。(ii)脱色反応による確認。

「(1) 本品 1g に水 40mL を加えて溶かし、硫酸(1→20) 4mL を加えて振り混ぜた後、ろ過する。ろ紙上の残留物を水 40mL ずつで 3 回洗う。」

(i) 残留物の一部に水酸化ナトリウム(1→2500)を加えて溶かした液は、波長 452～456nm 及び 480～484nm 付近に吸収を認める。」

(ii) 残留物の一部をエタノール 10mL に溶かし、その 1 滴をろ紙上にスポットした後、風乾する。次に 5% 亜硝酸ナトリウム溶液 2～3 滴、続けて 0.5mol/L 硫酸 2～3 滴を滴下するとき、ろ紙上の黄色は脱色される。」

○ 確認試験(2)は、HPLC(液体クロマトグラフィー)により定性としてノルビキシンを確認する。本試験については試薬として和光純薬(株)から標品を取り扱っていることから導入した。(別紙 3)また、JECFA 規格においては TLC(薄層クロマトグラフィー)法が設定されていますが、今回の「アナトー色素」新規収載にあたり定性分析として HPLC(液体クロマトグラフィー)法をノルビキシン、ビキシン、水溶性アナトーに導入いたしました。

「(1)の残留物を約 0.01g 量り、N,N-ジメチルホルムアミド 25mL を加えて溶かした後、必要があれば遠心分離又はろ過し、アセトニトリル 25mL を加えて検液とする。検液 10μL を量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行うとき、ノルビキシンとして保持時間 5～10 分付近に主色素成分ピークを認める。」

操作条件

検出器 可視吸光度計(測定波長 460nm)

カラム充てん剤 5μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 4～5mm, 長さ 15～30cm のステンレス管

カラム温度 35℃

移動相 アセトニトリル/酢酸(1→50)混液(65 : 35)

流量 ノルビキシンの保持時間が 5～10 分付近になるように調整する。」

純度試験

○ 純度試験については、JECFA 規格に準じ設定した。ただし、純度試験(1)については、アルカリ強度の問題があるため、公定書第 8 版食品添加物公定書から変更なし。その他は、JECFA 規格に準じました。「水銀」については、原体であるノルビキシンの設定により製剤と解釈される「水溶性アナトー」に必要なことから設定しなかった。

「(1) 遊離アルカリ 本品 10g を量り、水 100mL を加えて振り混ぜ、1mol/L 塩酸 8mL を加えてよくかき混ぜ、30 分間放置した後、ろ過した液は pH7.0 以下である。」

(2) 鉛 Pbとして2.0 μg/g以下 (5.0g, 第1法)

(3) ヒ素 As₂O₃として4.0 μg/g以下 (0.50g, 第3法, 装置B)」

定量法 (色価測定法)

○ 定量法については、一般試験法色価測定法に準じ設定し、測定溶媒については、JECFA規格に準じ水酸化ナトリウムから水酸化カリウムに変更する。ノルビキシン含量については係数から求めることとした。

「本品を精密に量り、水酸化カリウム溶液 (1→200) を加えて溶解し、正確に 100ml とする。その 1 ml を正確に量り、水酸化カリウム溶液 (1→200) を加えて正確に 100ml とし、検液とする。色価測定法により次の操作条件で試験を行う。又、色価を 287 で除してノルビキシン含量を求める。」

操作条件

測定溶媒 水酸化カリウム溶液 (1→200)

測定波長 波長 476～484nm の極大吸収部

以 上

自主規格

研究年月日：2010年4月～2011年2月17日

研究者名：日本食品添加物協会 第二部会
 グリコ栄養食品株式会社
 三井製糖株式会社

既存添加物 着色料「カカオ色素」純度試験（3）の検証について

目的：

第四版自主規格 着色料「カカオ色素」純度試験(3)の測定方法と規格適合性の検証を行う。

第四版自主規格に記載されている残留溶媒試験法が第8版食品添加物公定書には記載されていないことから、各条に測定方法を記載するにあたり、残留溶媒試験法に基づく具体的な測定条件を精査するとともに、当該測定条件におけるカカオ色素の規格適合性を検証した。

規格：

純度試験（3）アセトン 30 μ g/g 以下(色価 50 に換算)

検討方法：

本品の表示量から、色価50に換算して1.00gに相当する量を10mLのメスフラスコに正確に量り、水を加えて溶かし、内標準溶液2mLを正確に加えた後、更に水を加えて10mLとし、試料液とする。グラフアイトカーボンミニカラム(500mg)にメタノール4mL、続いて水10mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに正確に1mLの試料液を注入し、流出液を5mLのメスフラスコにとる。次に、水を注ぎ、流出液の総量が5mLになるまでカカオ色素が溶出しないような速さで流し、得られた流出液を検液とする。別にアセトン0.15gを量り、水を加えて正確に100mLとする。この液1mLを正確に量り、水を加えて100mLとする。更にこの液2mLを正確に量り、内標準溶液2mLを正確に加えた後、水を加えて正確に50mLとし、比較液とする。ただし、エタノール2.5gを量り、水を加えて100mLとし、更にこの液1mLを量り、水を加えて100mLとし、内標準溶液とする。検液及び比較液をそれぞれ10.0 μ Lずつ量り、次の操作条件でガスクロマトグラフィーを行うとき、検液のエタノールのピーク面積に対するアセトンのピーク面積の比は、比較液のエタノールのピーク面積に対するアセトンのピーク面積の比を超えない。

操作条件

検出器 水素炎イオン化検出器

カラム充填剤 125～250 μ mのガスクロマトグラフィー用ポリスチレン-ジビニルベンゼン系多孔性樹脂

カラム管 内径3～4mm、長さ1～3mのガラス管又はステンレス管

カラム温度 120℃付近の一定温度

注入口温度 180℃付近

キャリアーガス 窒素

流量 アセトンの保持時間が9～11分になるように調整する。

結果：〔別紙 A〕 に示す。

カカオ色素の純度試験（3）アセトンの試験方法については、第四版自主規格に記載されている残留溶媒試験法が第8版食品添加物公定書には記載されていないことから、各条に測定方法を記載するにあたり、残留溶媒試験法に基づく具体的な測定条件を精査するとともに、当該測定条件におけるカカオ色素の規格適合性を検証した。

その結果、上記「検討方法」に記載した測定条件を定めるとともに、市場流通のカカオ色素製品について、当該規格への適合性を確認した。

以上

〔別紙 A〕

2011 年 2 月 15 日

三井製糖株式会社

第四版既存添加物自主規格「カカオ色素」の純度試験（3）の検証結果

【試料】

- 1；カカオ色素（LOT 220224-1 色価（10%、1cm）（520nm）＝101.8）
- 2；カカオ色素（LOT 220831-1 色価（10%、1cm）（520nm）＝99.2）
- 3；カカオ色素（LOT 230111-1 色価（10%、1cm）（520nm）＝101.8）

【試験方法】

『既存添加物 着色料「カカオ色素」確認試験、純度試験の検証について・検討方法』に記載した測定条件に順じた。

【結果】

下表にまとめた。

規格値 ($\mu\text{g/g}$ 色価 50 に換算)	試料 1 ($\mu\text{g/g}$ 色価 50 に換算)	試料 2 ($\mu\text{g/g}$ 色価 50 に換算)	試料 3 ($\mu\text{g/g}$ 色価 50 に換算)
限度内 (30 以下)	限度内 (5.6)	限度内 (8.5)	限度内 (5.9)

【まとめ】

純度試験（3）に適合していることを確認した。

以上

「第9版 食品添加物公定書」新規収載候補品目資料

1. 成分規格名(食品添加物名)

カカオ色素

2. 成分規格(案)概要

規格項目	規格概要
定義	本品は、カカオ(<i>Theobroma cacao</i> Linné)の種子(カカオ豆)から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。
色価	本品の色価($E_{1\text{cm}}^{10\%}$)は 50 以上で、その表示量の 90~120%を含む。
性状	本品は、帯赤褐~黒色の粉末、塊、ペースト又は液体で、わずかに特異なおいがある。
確認試験	
(1) 本品の表示量から、色価50に換算して0.2gに相当する量を量り、クエン酸緩衝液(pH7.0) 100mLを加えて溶かした液は、褐色を呈する。	
(2) 本品の表示量から、色価50に換算して0.4gに相当する量を量り、水を加えて100mLとし、この溶液5mLに塩酸2~3滴を加えて放置するとき、褐~暗褐色の沈殿を生じる	
(3) 本品の表示量から、色価50に換算して0.4gに相当する量を量り、水を加えて100mLとする。この溶液5mLに塩化鉄(III)溶液(1→10) 2~3滴を加えるとき、液は直ちに暗褐色に変わる。更に30分以上放置し、毎分3000回転で10分間遠心分離を行うとき、暗褐色の沈殿を生じる。	
(4) 本品の表示量から、色価 50 に換算して 0.4g に相当する量を量り、水酸化ナトリウム(1→250)溶液を加えて溶かし、正確に 100mL とする。この液 5mL に塩酸(9→1000) 10mL を加え、pH 試験紙などで酸性であることを確認し、更に塩化亜鉛試液(pH3.0) 0.1mL を加えて攪拌後、栓をして 50℃ で 20 分間加温する。この液を毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離を行うとき、帯黄褐~暗褐色の沈殿を生じる。	
純度試験	
(1) 鉛 Pb として	5.0 $\mu\text{g/g}$ 以下(2.0g, 第1法)
(2) ヒ素 As ₂ O ₃ として	4.0 $\mu\text{g/g}$ 以下(0.50g, 第3法, 装置 B)
(3) アセトン	30 $\mu\text{g/g}$ 以下(色価 50 に換算)

3. 成分規格(案)

別紙 1 のとおり

4. 国際規格等(JECFA、FCC、日局、局外規、外原規、薬添規、及び第4版既存添加物自主規格)の有無及び規格設定の根拠

別紙 2 のとおり

国際規格等:第4版既存添加物自主規格

5. 試験法検証作業完了項目

検証データ 別紙 3

6. 裏付け資料

未添付

7. 特性、溶解性、用途等

未添付

8. 特記事項

なし

以上