

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）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の成分規格に関する研究

～アナトー色素の定量評価の基礎検討～

研究分担者 井之上浩一 立命館大学薬学部 臨床分析化学研究室 教授

**研究要旨** アナトー色素は、第9版食品添加物公定書においてベニノキ (*Bixa orellana* L.) の種子の被覆物から得られたものであり、ノルビキシンを主成分とするもの及びビキシンを主成分とするものと定義されている。確認試験では、逆相系高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定し、標準液のノルビキシン及びビキシンのピークの保持時間と一致することにより評価している。しかしながら、定量法では、逆相系HPLCではなく、色価測定法によりノルビキシン及びビキシンの含量を求めている。そのため、HPLCを用いた正確かつ汎用性のある定量法を開発する必要がある。そこで、本年度では、ノルビキシン及びビキシンの分析法の構築を試みた。その結果、分析時間10分にて良好な分離及びピーク形状を示す最適な条件を決定することができた。さらに、検出波長460 nmにおいて絶対検量線を作成した結果、定量限界が0.06 ppmと高感度に定量可能であることも確認できた。また、本条件を用いて6種類のアナトー色素関連製剤を分析した。その結果、いずれの製剤もノルビキシン又はビキシンが検出された。

研究協力者

高橋未来 立命館大学薬学部 助教

## A. 研究目的

アナトー色素 (Annatto Extract) は第9版食品添加物公定書 (以下、公定書) において、ベニノキ (*Bixa orellana* L.) の種子の被覆物から得られたものである。なお、ノルビキシン (Norbixin, NBx) を主成分とするもの及びビキシン (Bixin, Bx) 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定義されている<sup>1)</sup>。なお、ノルビキシン及びビキシンの構造式を図1に示した。アナトー色素は黄～黄みのオレンジ色の天然カロテノイド色素であり、バターやチーズなどの高脂肪乳製品、スナック、アイスクリーム、菓子類やソフトドリンクなどの食品に対して着色料として用いられている<sup>2,4)</sup>。アナトー色素にはカロテノイド (ノルビキシン及びビキシン) だけでなく、フェノール化合物 (ケルセチン及び

ルチン等) も含まれており、いずれもフリーラジカルの消去作用による抗酸化能が報告されている<sup>5)</sup>。そのため、アナトー色素は抗炎症、心血管疾患、白内障や黄斑変性症などの様々な慢性変性疾患における発症リスクの抑制に関与していると言われている<sup>5)</sup>。しかしながら、アナトー色素の主成分であるノルビキシン及びビキシンは物理的な環境要因 (光、温度、空気、pH) による影響を受けやすいことが報告されている<sup>6)</sup>。それゆえに、ノルビキシン及びビキシンの成分規格を設定し、天然着色料として品質を確保していくことが求められる。

アナトー色素中のノルビキシン及びビキシンは、これまで高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を中心に紫外可視吸光度計 (UV-Vis)、フォトダイオードアレイ (PDA) 及び質量分析 (MS) などの検出器と組み合わせた分析法が開発されてきた<sup>5)</sup>。現在、公定法における確認試験では、本品を逆相系 HPLC によ

り測定し、標準液のノルビキシン及びビキシンのピークの保持時間と一致することにより評価している<sup>リ</sup>。しかしながら、定量法では、逆相系 HPLC ではなく、色価測定法によりノルビキシン及びビキシンの含量を求めている。ゆえに、本規格において、正確なノルビキシン及びビキシンの定量分析や純度評価が十分に実施されていない。以上より、本年度では、ノルビキシン及びビキシンの逆相系 HPLC を基盤とした汎用性かつ高精度な定量分析法の構築及び MS スペクトルによる成分解析など基礎検討することとした。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

アナトー色素製剤は、ノルビキシン (A 社製; 粉末)、ビキシン (A 社製; 粉末) アナトー色素 B (水溶性アナトー, B 社製; 液状)、アナトー色素 C (水溶性アナトー, C 社製; 液状)、アナトー色素 D (水溶性アナトー, D 社製; 液状) 及びアナトー色素 E (水溶性アナトー, E 社製; 液状) を入手した。なお、水溶性アナトーはノルビキシンをアルカリ処理したアルカリ塩 (カリウム塩, ナトリウム塩) であるため、指定添加物として規格基準が定められている。

アセトニトリル (HPLC 用)、アセトン (特級)、メタノール (HPLC 用)、ギ酸 (LC/MS 用, 約 99%) 及び酢酸 (LC/MS 用, 約 99%) は富士フイルム和光純薬社製を用いた。ジメチルスルホキシド (DMSO) はナカライテスク社製を用いた。超純水は PURELAB flex5 system (ELGA 社製) を用いて得た。

### B-2) 装置

電子天秤: メトラー製 METTLER ML303/52  
遠心分離機: 日立工機社製 Himac CF15RN  
HPLC 装置: 島津製作所社製 HPLC-20AD/SIL-20AC/RF-10AXL/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS

LC-MS 装置: Waters 社製 Acquity H Class/PDA e $\lambda$ /Xevo TQD

### B-2) 確認試験 (第 9 版食品添加物公定書)

#### ノルビキシン

- (1) 本品の表示量から、ノルビキシン含量 15% に換算して 0.1 g に相当する量を量り、水 50 mL を加えて振り混ぜて溶解性を確認した。
- (2) 本品を水酸化カリウム (1 $\rightarrow$ 200) に溶かした液の極大吸収部を確認した

#### ビキシン

- (1) 本品の表示量から、ビキシン含量 25% に換算して 40 mg に相当する量を量り、水 50 mL を加えて振り混ぜて溶解性を確認した。
- (2) 本品をアセトンに溶かした液の極大吸収部を確認した。

### B-3) HPLC 分離分析

粉末の対象試料は DMSO により溶解し、メタノール/水 (90/10, V/V) 混液を用いて希釈した。移動相には、0.1 vol% 酢酸メタノール/0.1 vol% 酢酸水溶液を使用し、90/10 をアイソクラティック条件により、10 分の分析を行った。

カラム: TSKgel ODS-100Z column (4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m, 東ソー社製)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 1.0 mL/min

検出波長: 460 nm

注入量: 10  $\mu$ L

### B-4) LC-MS によるスペクトル解析

Ion mode: ESI (+)

Capillary voltage: 2.0 kV

Extractor voltage: 3.0 V

RF lens voltage: 2.5 V

Source temperature: 150 $^{\circ}$ C

Desolvation temperature: 400 $^{\circ}$ C

Cone/desolvation gas flows: 50/800 L/hr

MS scan range:  $m/z$  200 to 500

Daughter scan range :  $m/z$  50 to 500

Cone voltage : 10-40 V

Collision energy : 10-40 eV

## C. 結果及び考察

### C-1) 確認試験

国内で流通しているアナトー色素を用いて、第 9 版食品添加物公定書の確認試験を実施した。実試料を調製し、確認試験を実施した結果、いずれのアナトー色素製品も規格基準に従うことが確認できた。

- (1) 本品に水 50 mL を加えて振り混ぜた結果、いずれもほとんど溶けなかった (図 2)。
- (2) いずれも検液は橙色の色彩を示した。規格基準においてビキシンは波長 452~460 nm 及び 482~490 nm, ノルビキシンは波長 448~456 nm 及び 476~484 nm に極大吸収部が確認された (図 3)。

### C-2) HPLC の単離分析

ノルビキシン及びビキシンは低極性な化合物であると考えられるため、溶解性を確認した。メタノール, アセトニトリル, アセトン, DMSO 及び水を用いた結果, DMSO が最も容易に溶解した。なお, メタノール及びアセトンにおいても溶解したが, 完全溶解することは困難であった (図 4)。そのため, DMSO を標準原液の溶媒として用いて, 最終的な移動相の組成比であるメタノール/水 (90/10, V/V) 混液を希釈液として用いることとした。また, 保土谷工業社製の水分散性アナトー及び水溶性アナトーに関する溶解試験を実施した結果, 水分散性アナトー色素ではエタノール, メタノール, アセトニトリル及びアセトンにおいて不溶解物が生じた (図 5)。水溶性アナトー色素ではエタノール, アセトニトリル及びアセトンにおいて不溶解物が生じた (図 6)。

ノルビアナトー及びビキシンの紫外可視吸収スペクトルによる極大吸収波長を確認した。確認試験 (2) におけるスペクトルより, いずれも 460 nm 付近にて吸収極大波長が確認され

たため, 定量及び定性分析する際のモニタリング波長として設定することとした (図 3) しながら, アナトー色素製剤の色素成分以外もモニタリングするため, 254 nm も設定することとした。

ノルビキシン及びビキシンの逆相系 HPLC の分離分析について検討した。まず, 移動相条件 (アイソクラティック) を比較した。まず, 有機溶媒系についてメタノール又はアセトニトリルを用いた際の保持時間や不純物ピークとの分離や汎用性を考慮した結果, メタノールを用いることとした (図 7)。次いで, 移動相に添加する酢酸濃度を検討した。ノルビキシン及びビキシンは酸性物質であること, メタノールはギ酸と反応してしまうことより, 酢酸を移動相に添加することとした。酢酸濃度を 0 vol%, 0.1 vol% 及び 0.5 vol% を用いてノルビキシン及びビキシンのピーク形状 (シンメトリー係数及び理論段数) や分離度を比較した (表 1)。その結果, 0 vol% ではノルビキシン及びビキシンのピークが完全分離しなかった。0.1 vol% 及び 0.5 vol% では, ピーク形状や分離に関して大きな差が見られなかったが, カラムへの負担や水溶性アナトー色素は酸性領域にて析出する可能性があることを考え, 0.1 vol% が最適であると考えた。

次いで, 逆相系 HPLC カラムを検討した。東ソー社製の TSKgel ODS-100V, TSKgel ODS-100Z 及び TSKgel ODS-80Ts においても同様にピーク形状や分離を比較した。なお, いずれのカラムはサイズ 4.6 mm×150 cm, 粒子系 5  $\mu$ m に統一し, 同じ移動相を用いた。各カラムにおけるノルビキシン及びビキシン標準品の HPLC クロマトグラムを図 8 に示した。その結果, TSKgel ODS-100Z が最も夾雑ピークと分離・ピーク形状が良好であった。以上より, 最適化したノルビキシン及びビキシン標準品の HPLC クロマトグラムを図 9 (460 nm 検出) 及び図 10 (254 nm 検出) に示した。

本条件により, 定量限界 (LOQ) から 10 ppm までのノルビキシン及びビキシンの絶対検量線を作成し, 図 11 に示した。絶対検量線

法において、相関係数 ( $r^2$ ) は 0.999 以上の良好な直線性を示し、いずれも LOQ は 0.063 ppm 及び検出限界 (LOD) は 0.031 ppm であった。本手法により、国内に流通しているアナトー色素製剤の HPLC クロマトグラムを図 12 (460 nm 検出) 及び図 13 (254 nm 検出) に示した。なお、図 13 より、不純物とノルビキシン及びビキシンの良好な分離を示し、アナトー色素 (粉末又は水分散性) よりも水溶性アナトーの方では不純物ピークが小さいという特徴がみられた。

### C-3) LC-MS によるスペクトル解析

さらに、アナトー色素製剤中のノルビキシン及びビキシンを高精度に同定するために、質量分析装置 (MS) を用いたスペクトル情報を収集した。本研究では、HPLC と同様の移動相条件において、Waters 社製の直接的に MS へ繋げることによりスペクトル解析を実施した。MS scan モードにおいて、ビキシン  $m/z$  395 ( $[M+H]^+$ ) 及びノルビキシン  $m/z$  381 ( $[M+H]^+$ ) が最も強度が高く観察された (図 14)。そのため、それらをプリカーサーイオンとして設定した。なお、ESI (-) モードでは検出ピークが確認されなかった。次いで、Daughters scan モードにより、MS/MS スペクトルを確認した (図 15)。その結果、ノルビキシン及びビキシン由来の特異的な MS/MS スペクトル  $m/z$  145 が得られた。さらに、ノルビキシン及びビキシン標準品やアナトー色素製剤における不純物ピークの MS スペクトルを確認した (図 16)。その結果、不純物 I 及び II はノルビキシン、不純物 III 及び IV はビキシンの分子イオンが検出したため、これら不純物はノルビキシン又はビキシンのシス-トランス異性体の可能性が示唆された。これらスペクトル情報をもとに、各アナトー色素製剤中の Daughters scan 結果、いずれの製剤もノルビキシン又はビキシン標準品と同様のモニタリングイオンにおいてピークが検出され、より確実な含有成分の同定が可能となったといえる (図 17 及び図 18)。

### D. 結論

本研究では、アナトー色素におけるノルビキシン及びビキシンの HPLC 分析法の基礎検討及び MS スペクトル解析を実施した。その結果、分析時間 10 分で、良好なピーク形状及び分離を可能とする最適な条件を決定することができた。今後は、ノルビキシン及びビキシンの効率的に単離精製し、迅速かつ簡便な HPLC 定量法を構築していく。

### E. 参考文献

- (1) 第 9 版食品添加物公定書, 厚生労働省 (2017).
- (2) Lancaster FE, Lawrence JF: High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, alpha- and beta-bixin, and alpha- and beta-norbixin, and the determination of carminic acid in foods. *J. Chromatogr. A*, 732, 394–98 (1996).
- (3) Scotter MJ, Castle L, Honeybone, CA Nelson C: Method development and analysis of retail foods for annatto food colouring material. *Food Addit. Contam.*, 19, 205–22 (2002).
- (4) Scotter MJ, Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR: Characterization of the principal HPLC colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Food Addit. Contam.*, 11, 301–15 (1994).
- (5) Chisté RC, Yamashita F, Gozzo FC, Mercadante AZ: Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *J. Chromatogr. A*, 1218, 57–63 (2011).
- (6) Noppe H, Abuin Martinez S, Verheyden K, Van Loco J, Companyo Beltran R, De Brabander HF: Determination of bixin and norbixin in meat using liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Addit. Contam. Part A*, 26, 17–24 (2009).

なし

## F. 研究業績

### 1. 学会発表等

- (1) 高木映里, 高橋未来, 増本直子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: 高速向流クロマトグラフィーによる既存添加物シタン色素の成分解析. 日本食品化学学会第 27 回総会・学術大会(2021.8.31) [誌上開催].

### 2-1. 論文発表等

- (1) Takahashi M, 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. *Chem. Pharm. Bull.*, 70, 25–31 (2022).

### 2-2. 総説

なし

### 2-3. 単行本

## G. 知的財産権の出願. 登録状況

なし

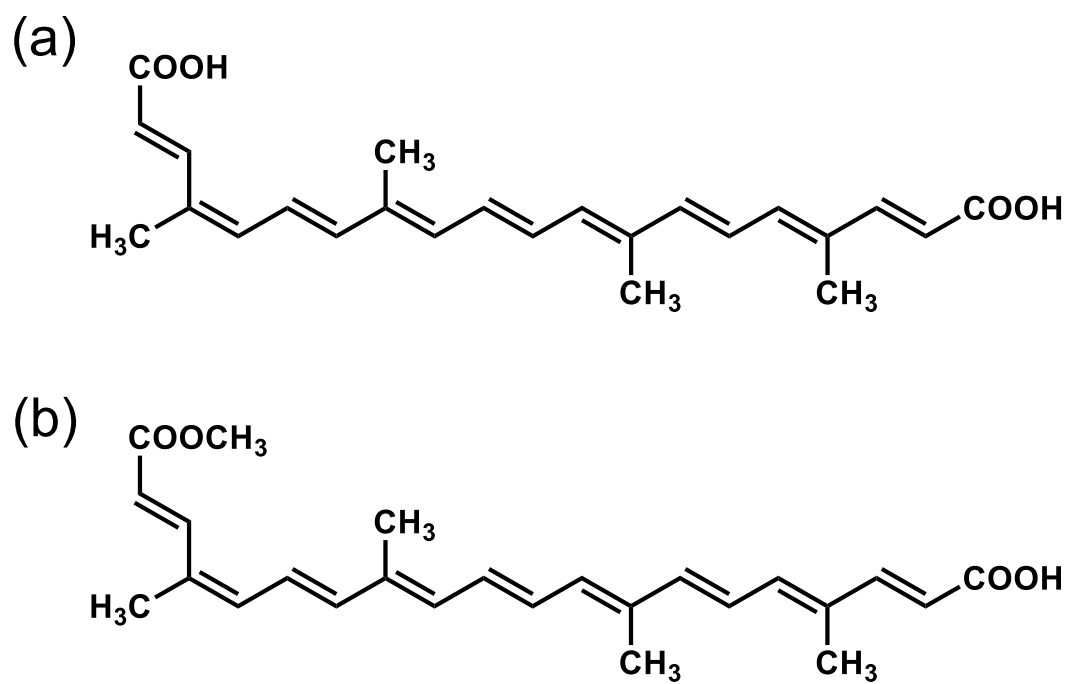


図 1. 分析対象物質の構造式  
(a) ノルビキシン, (b) ビキシン

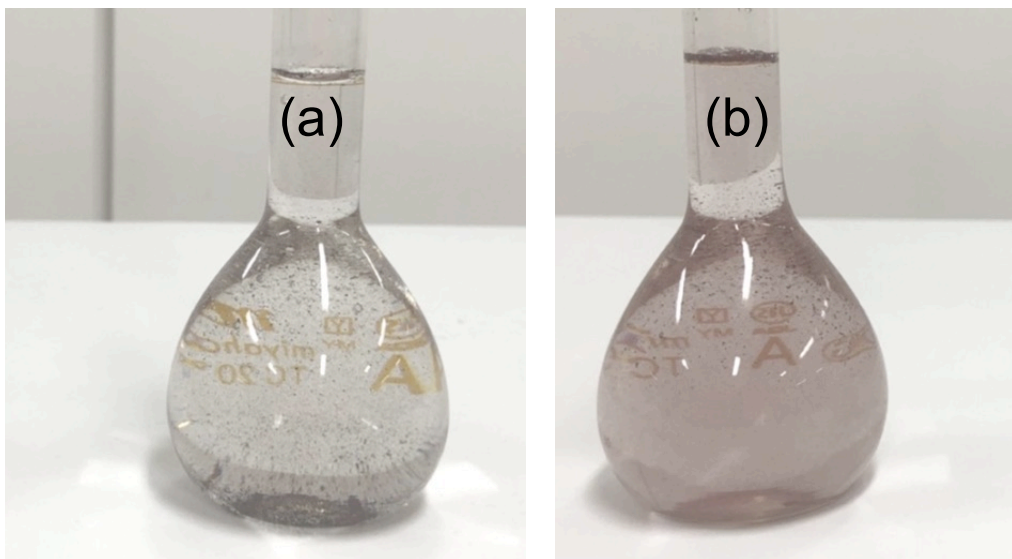


図 2. A 社製ノルビキシソおよびビキシソの確認試験 (1)  
 (a) ノルビキシソ, (b) ビキシソ

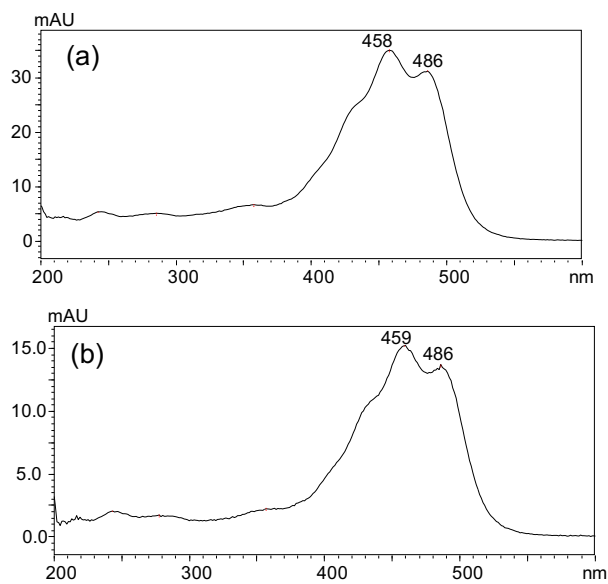


図 3. A 社製ノルビキシソおよびビキシソの確認試験 (2)  
 (a) ノルビキシソ, (b) ビキシソ

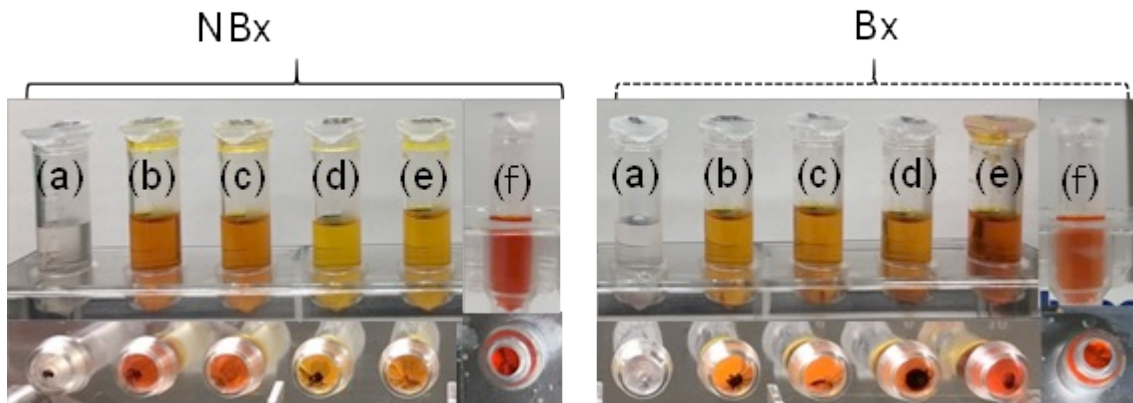


図 4. ノルビキシン及びビキシン標準品の溶解性試験

(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

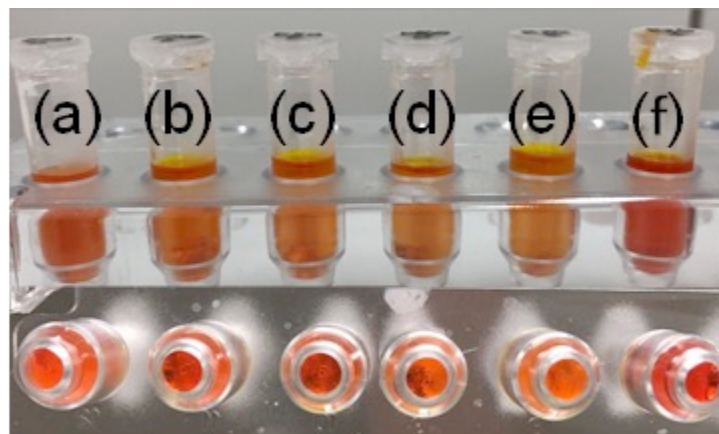


図 5. 水分散性アナトー（アンナット EXG）の溶解性試験

(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

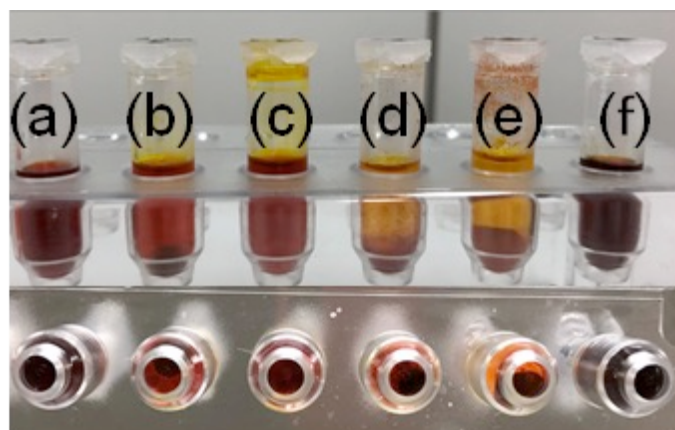


図 6. 水溶性アナトー（アンナット A-200）の溶解性試験

(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO



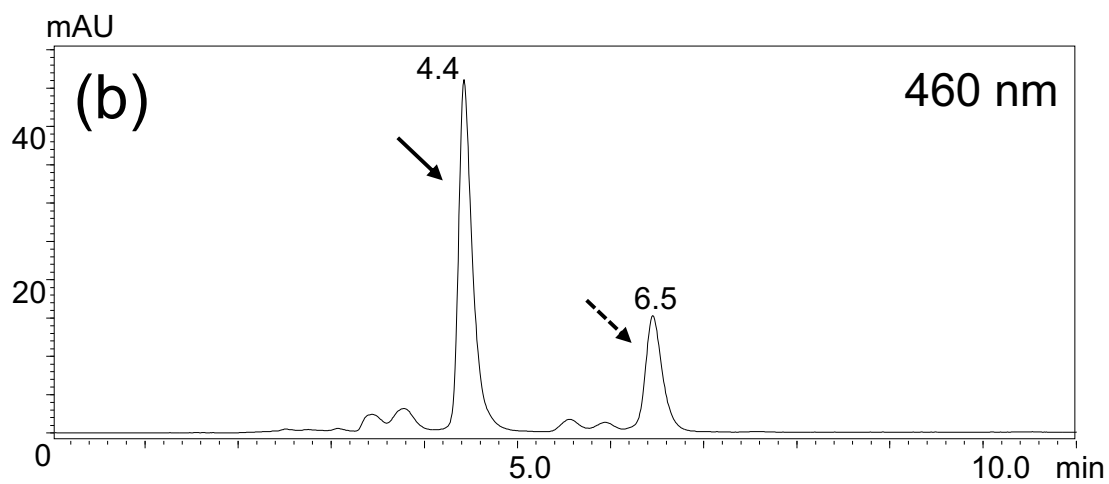
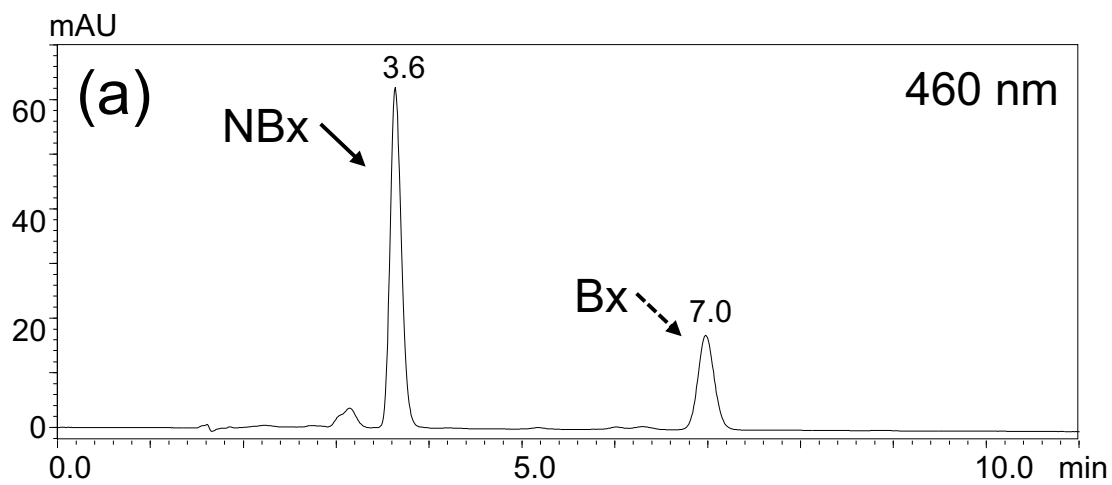


図 7. ノルビキシシ及びビキシシ混合標準品を用いた移動相溶媒の検討

(a) 0.1 vol%酢酸アセトニトリル/0.1 vol%酢酸水溶液 (80/20, V/V)

(b) 0.1 vol%酢酸メタノール/0.1 vol%酢酸水溶液 (90/10, V/V)

表 1. ノルビキシン及びビキシン混合標準品を用いた  
移動相中の酢酸濃度の検討 (n=3)

移動相	酢酸 濃度(vol%)	シンメトリー係数		理論段数		分離度
		Bx	NBx	Bx	NBx	
メタノール/水溶液 (90/10, V/V)	0	-	-	-	-	0.72 (3.5)
	0.1	1.14 (1.9)	1.23 (2.6)	5081 (0.5)	3848 (0.8)	6.85 (0.6)
	0.5	1.12 (2.0)	1.24 (3.0)	5084 (1.2)	3765 (0.7)	6.62 (2.8)

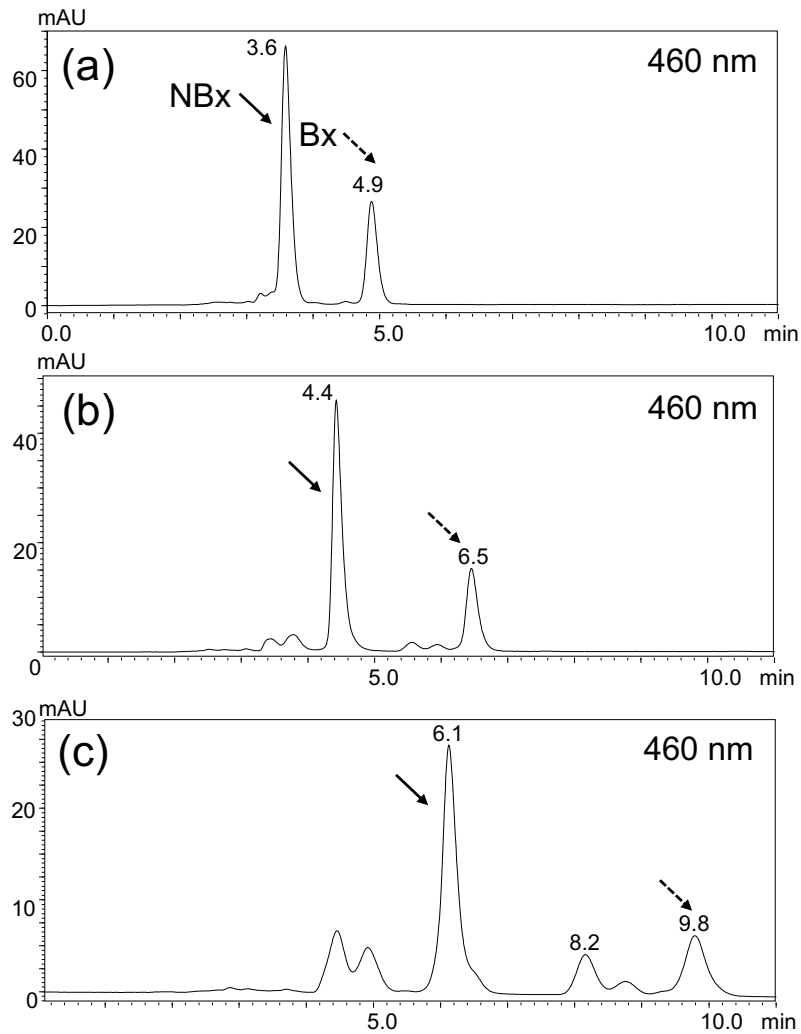


図 8. ノルビキシン及びビキシン混合標準品を用いた分析カラムの検討

- (a) TSKgel ODS-100V (サイズ 4.6 mm×150 mm, 粒子径 5.0 μm)
- (b) TSKgel ODS-100Z (サイズ 4.6 mm×150 mm, 粒子径 5.0 μm)
- (c) TSKgel ODS-80Ts (サイズ 4.6 mm×150 mm, 粒子径 5.0 μm)

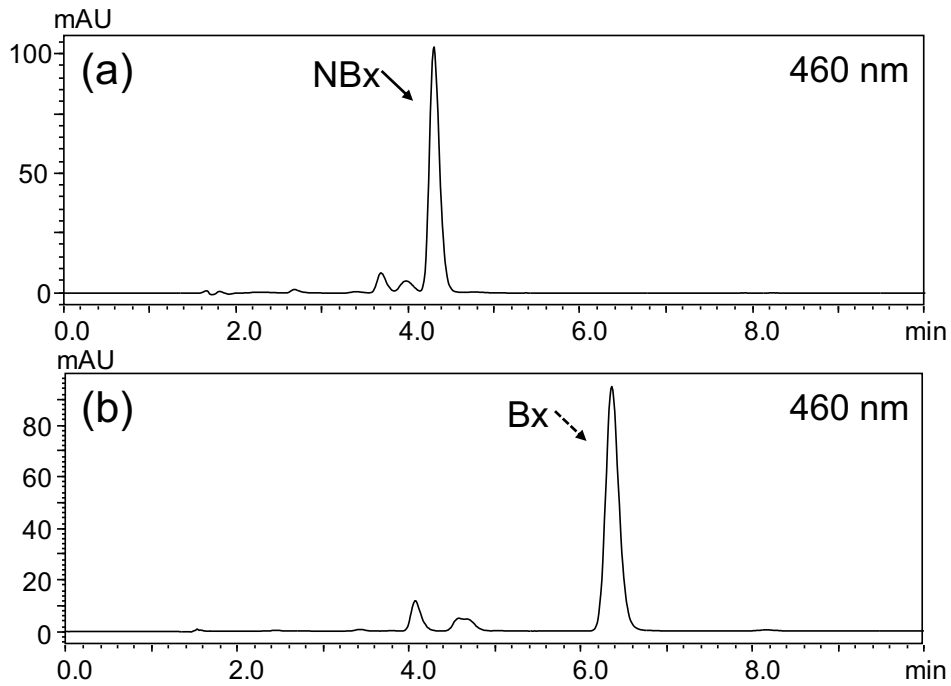


図 9. ノルビキシン又はビキシン標準品の HPLC クロマトグラム (検出波長 460 nm)

(a) ノルビキシン, (b) ビキシン

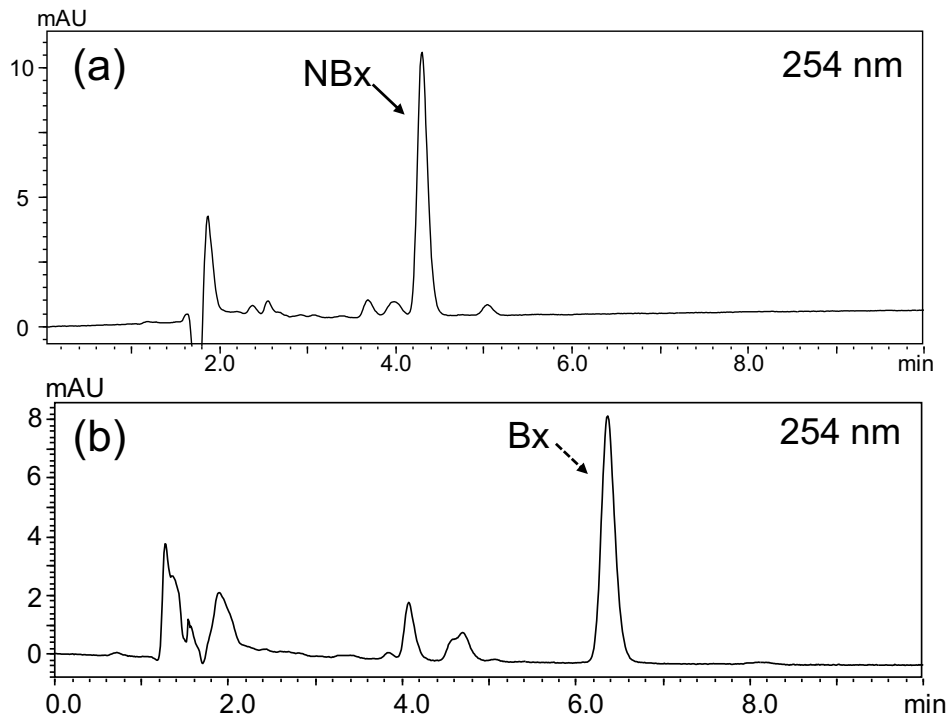


図 10. ノルビキシン又はビキシン標準品の HPLC クロマトグラム (検出波長 254 nm)

(a) ノルビキシン, (b) ビキシン

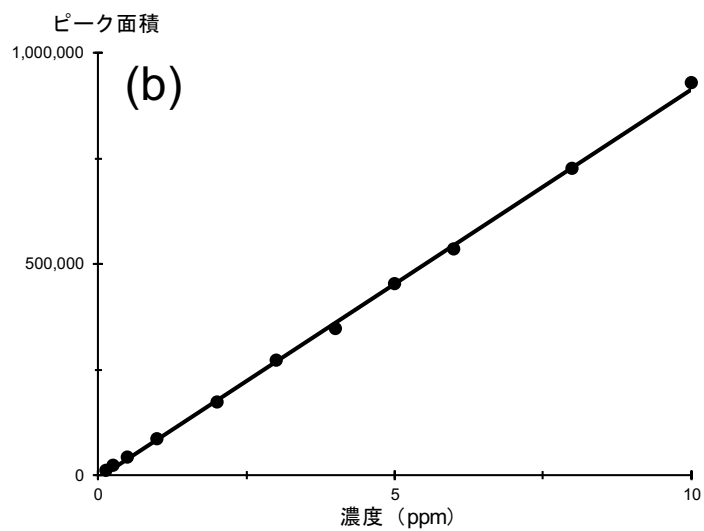
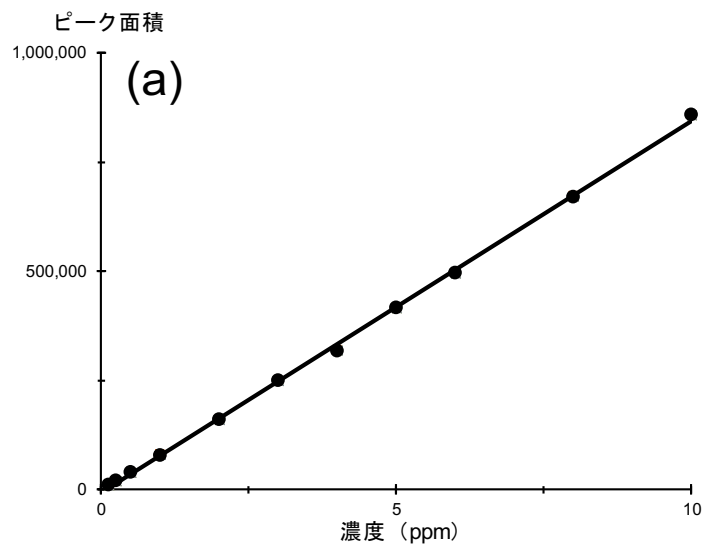


図 11. ノルビキシン及びビキシンの絶対検量線 (LOQ~10 ppm)  
 (a) ノルビキシン ( $y = 085108x - 7656$ , 相関係数 0.999, LOQ = 0.063 ppm)  
 (b) ビキシン ( $y = 85108x - 76556$ , 相関係数 0.999, LOQ = 0.063 ppm)

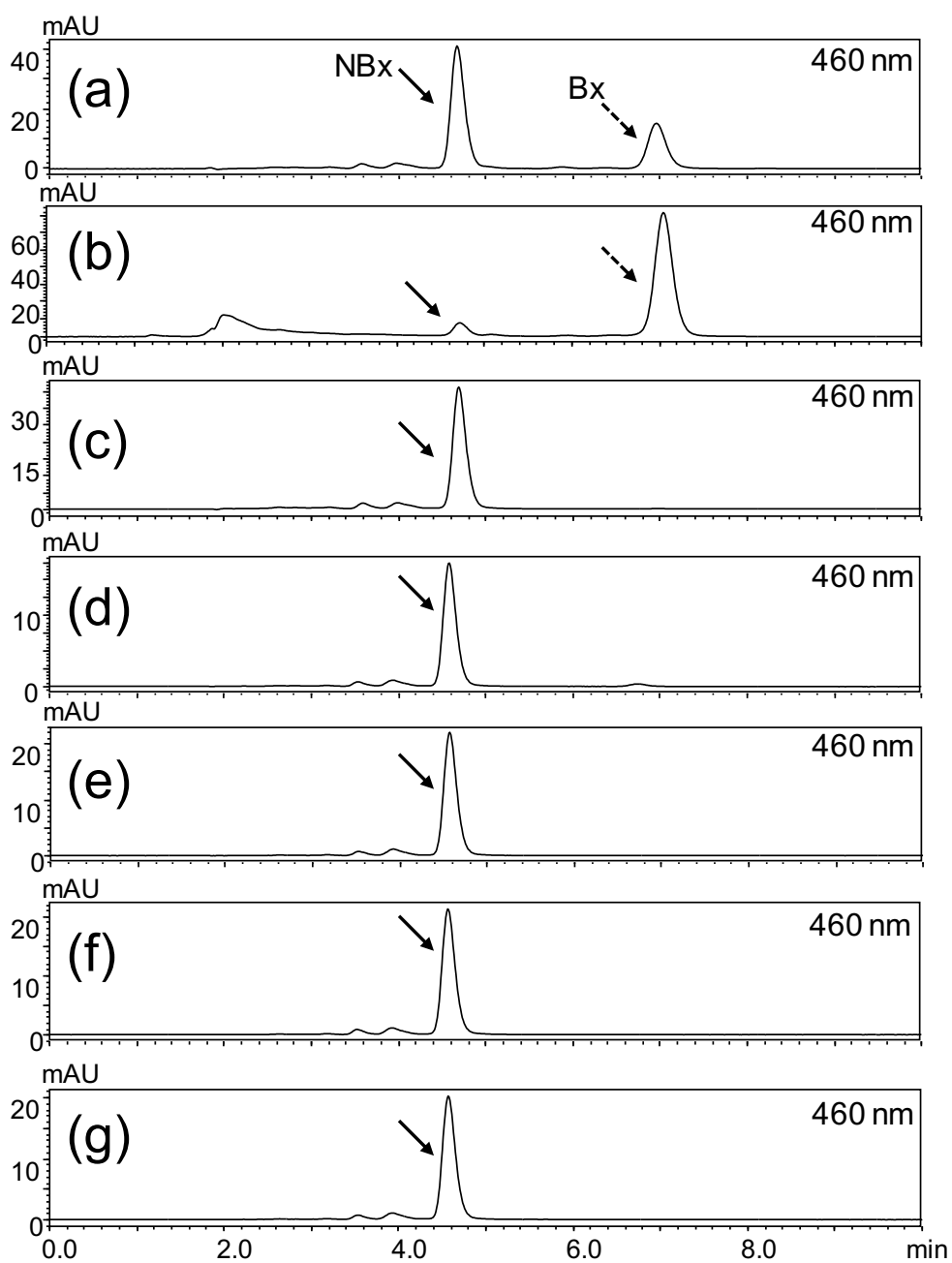


図 12. アナトー色素製剤の HPLC クロマトグラム (検出波長 460 nm)

(a) 10 ppm ノルビキシン及びビキシン混合標準品 (b) ビキシン (A社製) (c) ノルビキシン (A社製) (d) アナトー色素 (B社製) (e) アナトー色素 (C社製) (f) アナトー色素 (D社製) (g) アナトー色素 (E社製)

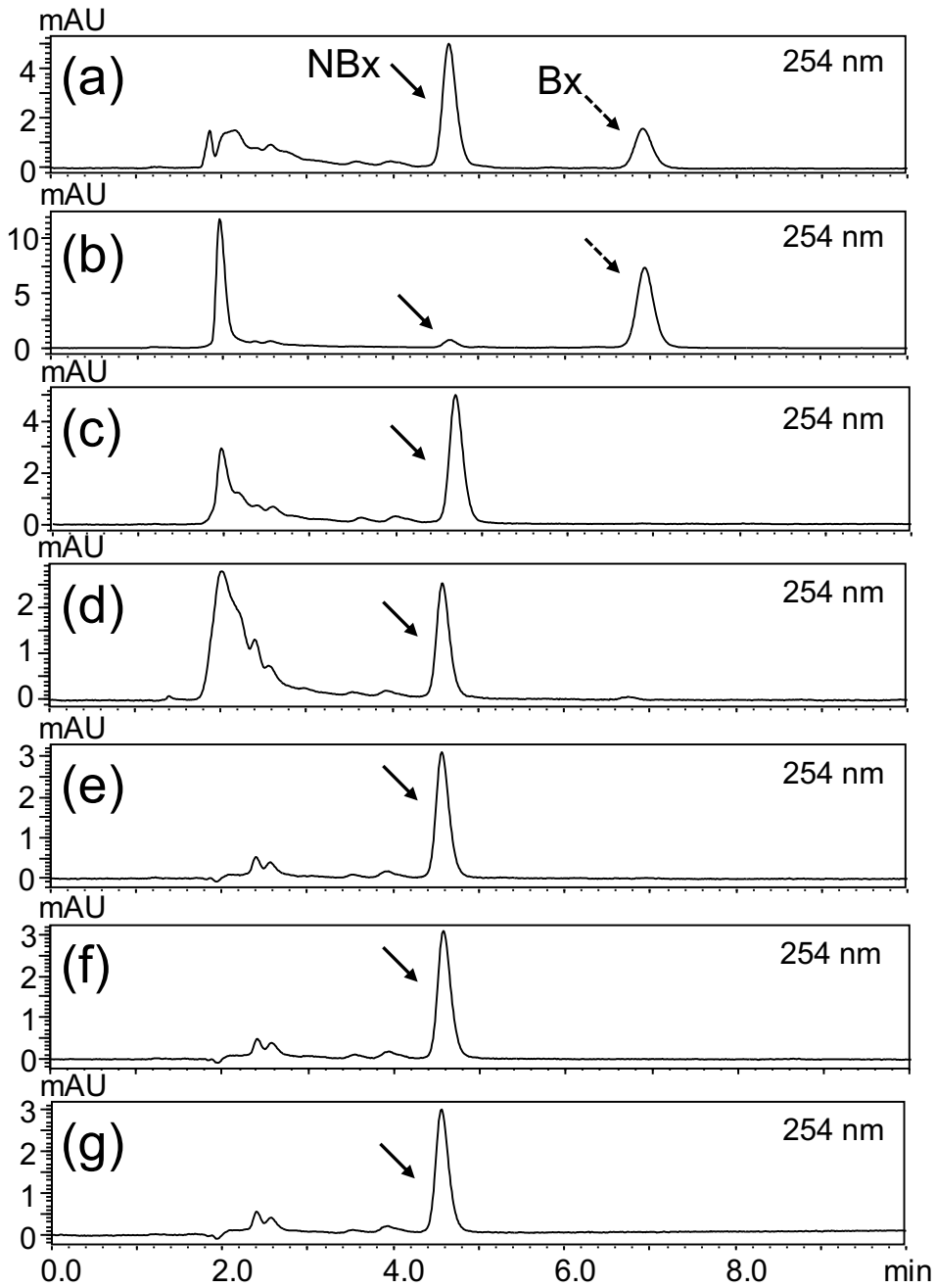


図 13. アナトー色素製剤の HPLC クロマトグラム (検出波長 254 nm)

(a) 10 ppm ノルビキシン及びビキシン混合標準品 (b) ビキシン (A 社製) (c) ノルビキシン (A 社製) (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製) (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

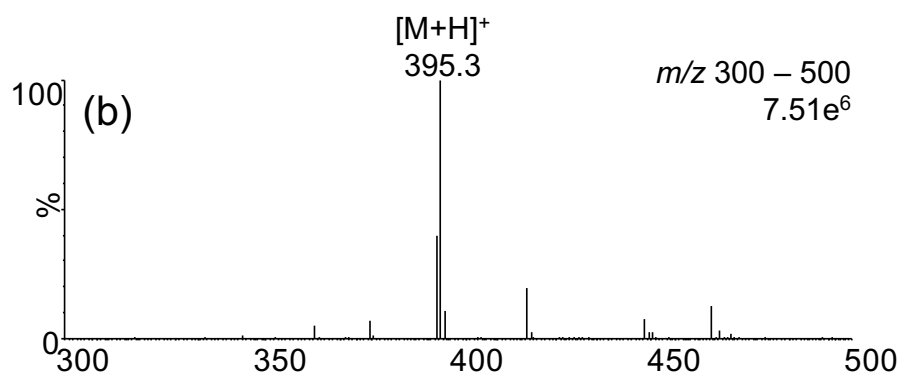
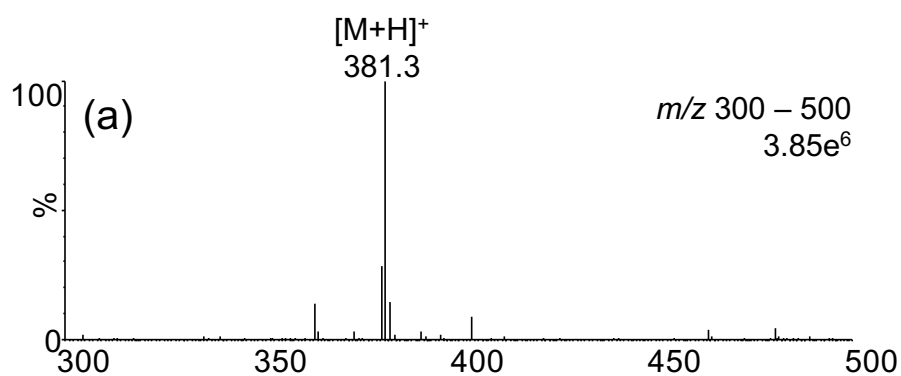


図 14. 標準品の MS スペクトル

(a) ノルビキシニン, (b) ビキシニン

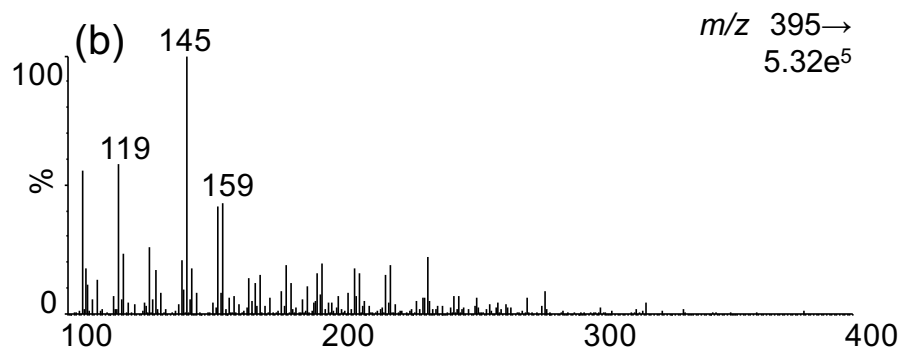
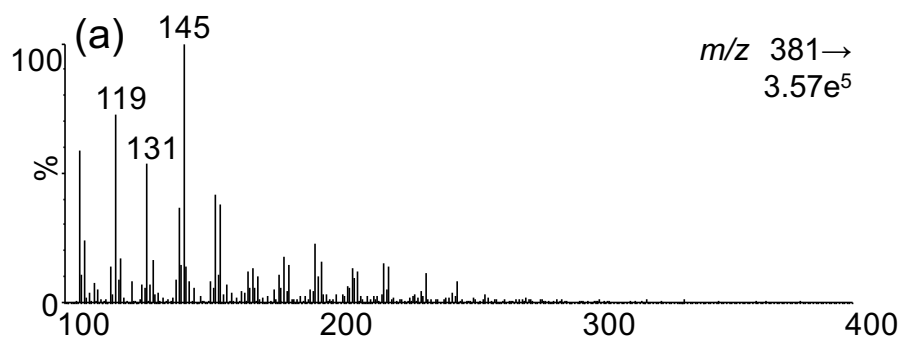


図 15. 標準品の MS/MS スペクトル

(a) ノルビキシニン, (b) ビキシニン

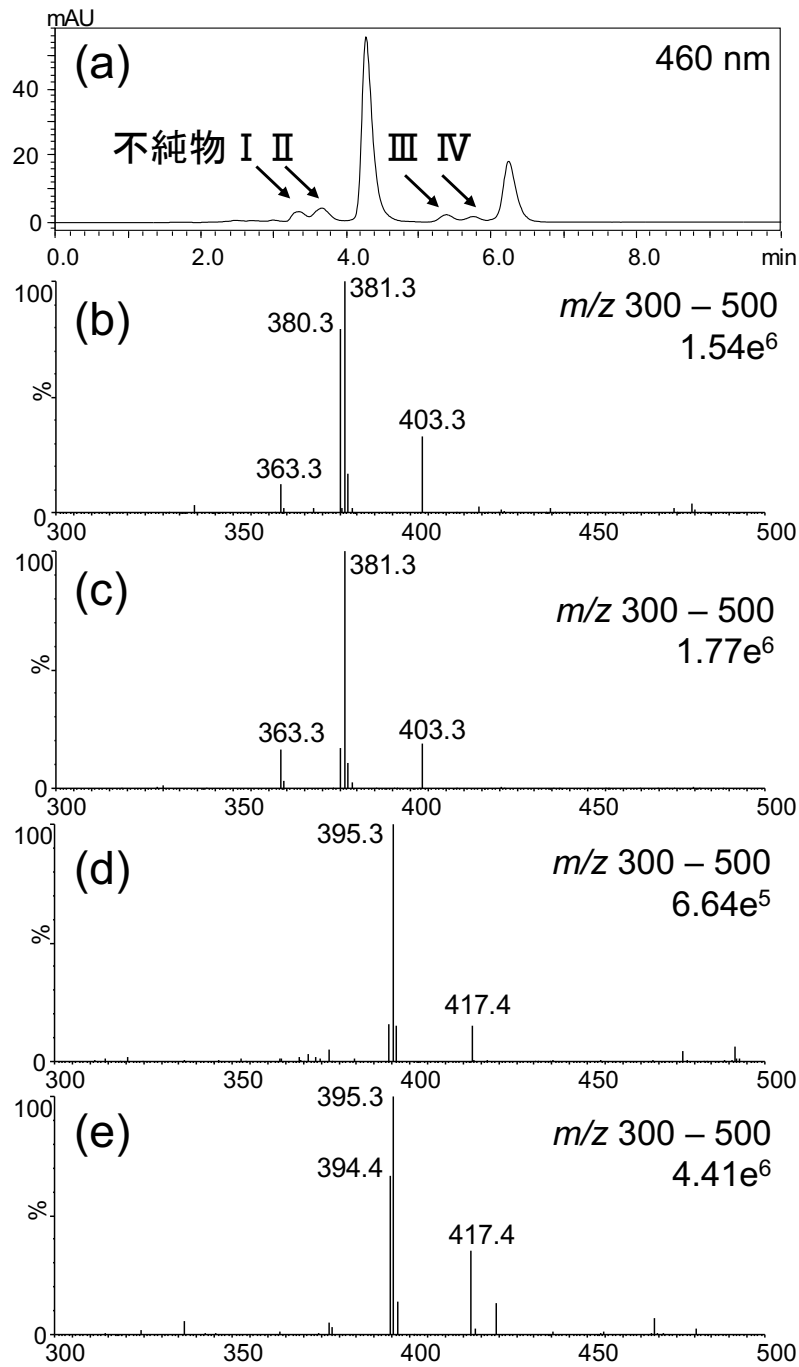


図 16. ノルビキシン及びビキシン混合標準品の HPLC クロマトグラム  
 (検出波長 460 nm) 及び不純物ピークの MS スペクトル  
 (a) 10 ppm ノルビキシン及びビキシン混合標準品  
 (b) 不純物 I, (c) 不純物 II, (d) 不純物 III, (e) 不純物 IV



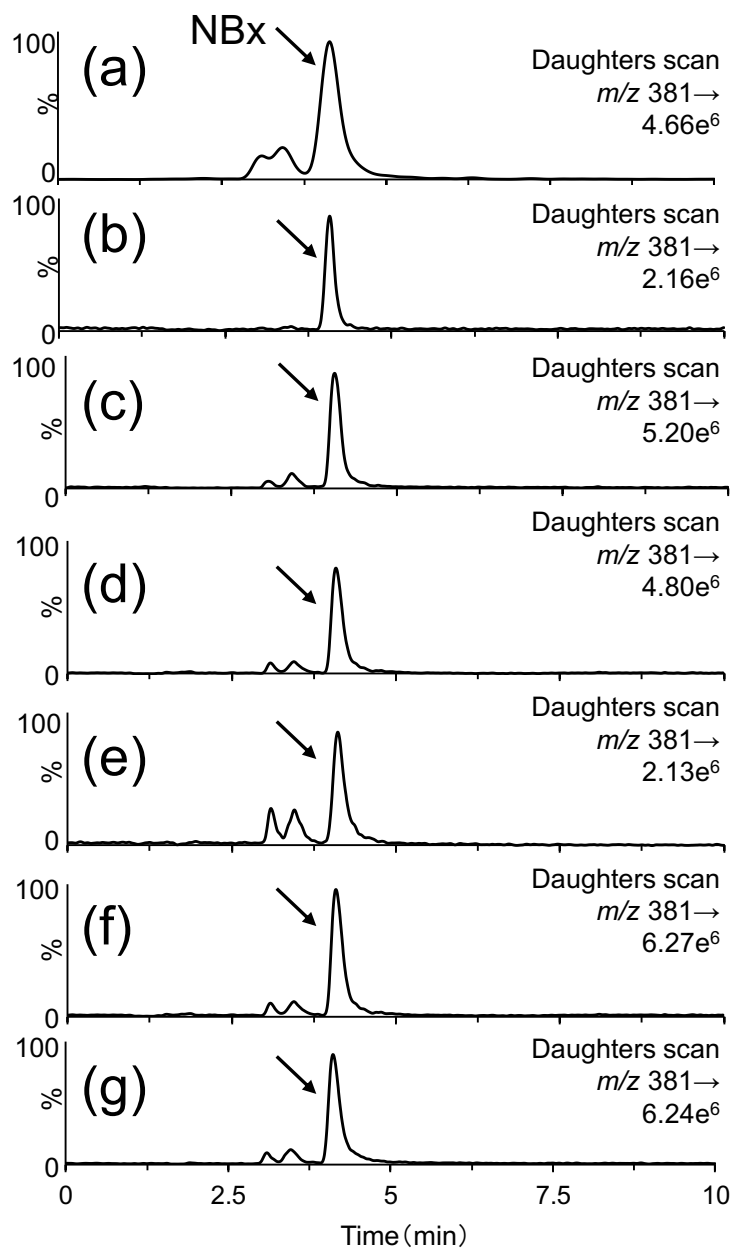


図 17. アナトー色素製剤を用いたノルビキシンの Daughters scan

(a) 10 ppm ノルビキシン及びビキシン混合標準品 (b) ビキシン (A 社製) (c) ノルビキシン (A 社製) (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製) (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

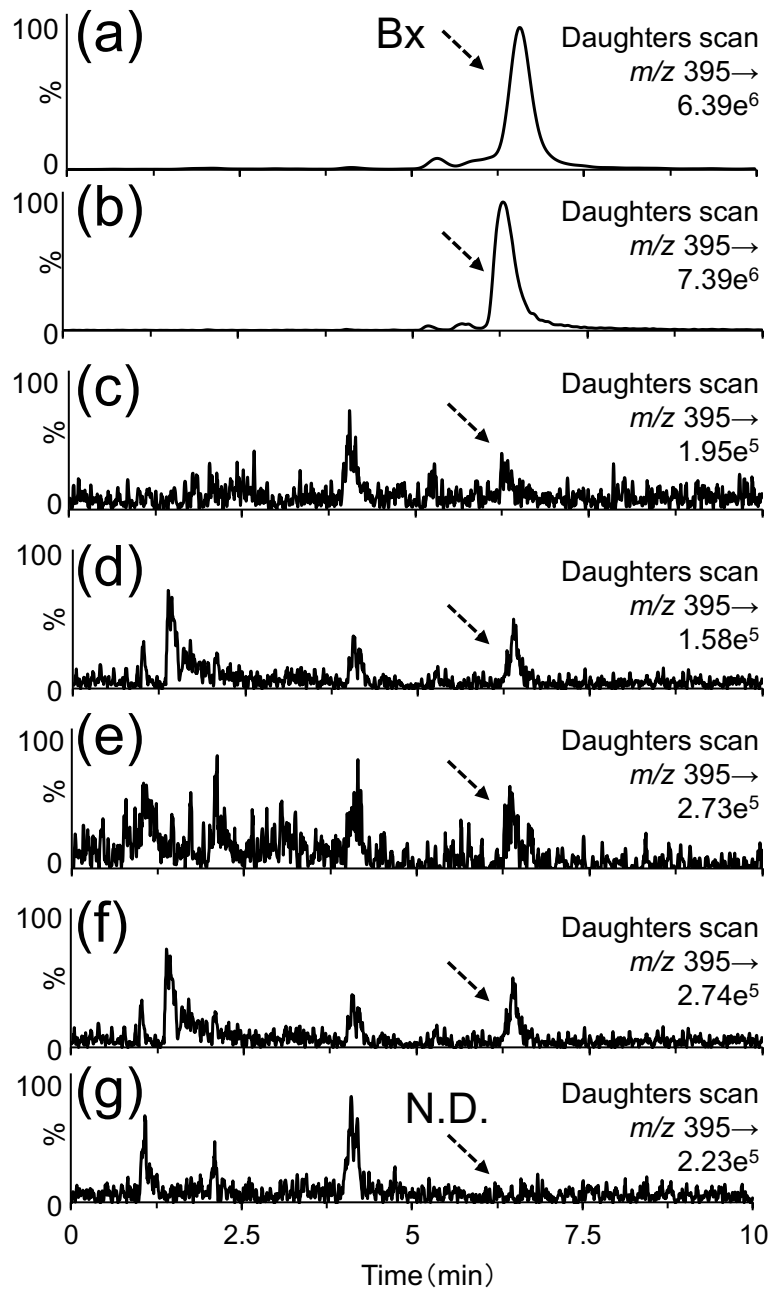


図 18. アナトー色素製剤を用いたノルビキシンの Daughters scan

(a) 10 ppm ノルビキシン及びビキシン混合標準品 (b) ビキシン (A 社製) (c) ノルビキシン (A 社製) (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製) (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)