

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）

既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究

(23KA1012)

令和5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

既存添加物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、ノルビキシン (NBx) を主成分とするもの及びビキシン (Bx) を主成分とするもの」と定義されている。第10版食品添加物公定書の改定において、アナトー色素（ノルビキシン）及びアナトー色素（ビキシン）に成分規格が二つに分離され、括弧内の成分を主に含むものとされたが、成分規格に本質的な変更はない。主成分の定量分析にはHPLCの絶対検量線法が有効と考えられるが、幾何異性体の存在等の問題より、信頼ある分析法は困難である。定量用標品は*cis*体が主であり、*trans*体がわずかに混在していることが確認された。*trans*体の精製は非常に煩雑かつ一度の精製で得られる量が少ないことが課題となった。そこで、本年度は、*trans*体を合成することとし、これまでに合成したSRと合わせて、SR-HPLC法を目指した検討を実施した。HPLCによる分離分析を検討し、得られたNBx及びBxを混合した溶液とデザインしたSRの保持時間などを確認した結果、SR候補物質としてn-C₉及びn-C₁₁が有効と考えられた。つぎに、NBx, Bx, SR候補物質の検量線を作成した結果、相関係数0.997以上と良好な結果を得ることができた。

研究協力者

布目真梨 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 NBx 及び Bx と定義されている¹⁾。また、第10版食品添加物公定書の改定において、アナトー色素（ノルビキシン）及びアナトー色素（ビキシン）に成分規格が二つに分離され、括弧内の成分を主に含むものとされたが、成分規格に本質的な変更はない²⁾。我々はこれまで公定書による規格試験、高速液体クロマト

グラフィー (HPLC) 分析、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 定性を実施した。その中で、NBx 及び Bx の安定性や異性化などの問題点が挙げられた。つまり、これらを指標とする絶対検量線法による定量分析は、信頼性に欠けるため、新たな分析法の開発が必要であると判断した。Scotter らの報告では、アナトーの主成分である NBx 及び Bx はそれぞれ *trans*-/*cis*-体が存在しており、それぞれを測り分ける必要がある (図1)³⁾。幾何異性体は、一般的に逆相系 ODS で分離可能である。そのため、図2に示す HPLC 分析で検出された未知ピークは幾何異性体と推定される。一方で、これら NBx 及び Bx 幾何異性体の定量要標品は入手できない。そこで、高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いた NBx 及び Bx 幾何異性体の単離精製をこれまで検討したが、HSCCC により不純物質の



除去は可能であったが、幾何異性体の分離は非常に困難であった。そこで本年度は、*trans*-NBx 及び *trans*-Bx を合成することとした。また、それらの状況を考慮して、相対モル感度係数 (RMS) を用いた Single Reference (SR) HPLC の開発へ繋げることにした。SR-HPLC を開発するにあたり、これまで本研究班での検討の結果、類似した最大吸収波長をもつものをデザインすることが望まれる^{4,5)}。そこで、本研究では、新たな赤色領域に特化した SR をデザインした。今回提案する SR は、アナトーを含めて、天然キストカロテノイド色素に拡大できるものと思われる。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

NBx 及び Bx 試薬製品は、富士フイルム和光純薬社製を用いた。アナトー色素製剤は、ノルビキシシ (三栄源エフ・エフ・アイ社製；粉末) を用いた。

アセトニトリル (HPLC 用)、アセトン (特級)、メタノール (HPLC 用)、DSS-*d*₆ 標準品、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。超純水は PURELAB flex5 system (ELGA 社製) を用いて得た。ジメチルスルフォキシド-*d*₆ (DMSO-*d*₆) はシグマアルドリッチ社製を用いた。

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
マイクロ天秤：島津製作所社製 AUW120D
NMR 装置：JEOL 社製 ECZL-600

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% 酢酸水溶液/0.1 vol% 酢酸メタノールを使用し、10/90 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 (4.6×150 mm, 5 µm, 東ソー社製)
カラム温度：40℃
流速：1.0 mL/min
検出波長：460 nm
注入量：10 µL

B-4) SR デザイン

国立医薬品食品衛生研究所有機化学部との共同により、SR 候補化合物を検討した。すなわち、極大吸収波長 450～500 nm で検出できる化合物の合成を検討した (図 3)。

B-5) ¹H-qNMR による *trans/cis*-NBx, Bx 及び SR の絶対定量

DSS-*d*₆ 標準品を 10 mg を DMSO-*d*₆ に溶解し、これを希釈溶媒とした。測定対象化合物 10 mg を希釈溶媒にて 2 mL または 3 mL に溶解し、そのうちの 0.5 mL を NMR 試験管に移し、¹H-qNMR で内標準法により定量した。

Data points : 60,000
Flip angle : 90°
Pulse delay : 60 s
Scans : 8 times
Probe : 25℃
Software : JEOL 社製 Purity Pro qNMR ANALYSIS Software

B-6) RMS 算出

¹H-qNMR の定量結果を用いて、絶対検量線の範囲は 0～100 mg/L と設定し、RMS を求めた。

RMS を算出するとき、ランベルト・ベールの法則の式を下記のように式変形した。なお、吸光度 (*R*) は、吸光係数 (ϵ)、濃度 (*C*) 及び層長 (*l*) で表される。

$$R = \epsilon \times C \times l$$

$$\frac{R_{\text{analyte}}}{(\varepsilon_{\text{analyte}} \times C_{\text{analyte}})} = \frac{R_{\text{SR}}}{(\varepsilon_{\text{SR}} \times C_{\text{SR}})}$$

$$\left(\frac{\varepsilon_{\text{analyte}}}{\varepsilon_{\text{SR}}}\right) \times C_{\text{analyte}} = \left(\frac{R_{\text{analyte}}}{R_{\text{SR}}}\right) \times C_{\text{SR}}$$

$$\frac{\varepsilon_{\text{analyte}}}{\varepsilon_{\text{SR}}} = \left(\frac{R_{\text{analyte}}}{R_{\text{SR}}}\right) \times \left(\frac{C_{\text{SR}}}{C_{\text{analyte}}}\right) = \text{RMS}$$

上記より、NBx 及び Bx の RMS を、SR に対する NBx 及び Bx の絶対検量線の傾きの比より算出した。なお、0 $\mu\text{mol/L}$ のピーク面積は検量線の原点とした。

C. 結果及び考察

C-1) HPLC 分離分析の検討

国内で市販される NBx 及び Bx の HPLC 分離分析を令和 3 年度の報告に従い、測定を実施した。その結果、図 4 の HPLC クロマトグラムが得られた。ピーク面積からその純度は、NBx で 91.1% 及び Bx で 97.0% となった。また、既報³⁾の HPLC クロマトグラムと比較して、いずれも *cis* 体と考えられた。また、今回の HPLC 分離分析から、NBx/Bx 混合溶液を調製し、HPLC 定量分析を行ってしまうと、NBx 標品に混入する Bx により過剰評価してしまう恐れが考えられた。さらに、本標品は、100 mg が 3~4 万円と高額であり、汎用性に欠ける。さらに、今後、既存添加物の状態（温度、pH など）により、幾何異性化の可能性も否定できない。つまり、従来の標準品を用いた絶対検量線法では正確な定量評価が困難であることが分かった。

C-2) SR デザイン

NBx/Bx 混合溶液を用いて、デザインした SR の評価を行うこととした。HPLC（検出波長：460 nm）により、デザインした 6 種類の SR 及び NBx/Bx 混合溶液を用いて比較を行った結果、NBx と Bx の不純物を考慮して、n-C₁₁を用いることとした（図 5）。次に、NBx, Bx, n-C₁₁の

検量線を作成した結果、相関係数 0.999 以上となった（図 6）。¹H-qNMR で純度を算出し、RMS を求めることが可能となった。

C-3) ¹H-qNMR による合成した *trans*-NBx, Bx 及び SR の絶対定量

本研究では、¹H-qNMR 用標準物質として、DSS-*d*₆を用いた。DSS-*d*₆の純度（92.4%）に基づいて、NBx, Bx 及び n-C₁₁を¹H-qNMRにより定量し、純度を計算した。それらの¹H-qNMRスペクトルを図 7 に示した。その結果、*cis*-NBx は 68.9%, *cis*-Bx は 97.2%, *trans*-NBx は 15.5%, *trans*-Bx は 41.9%, n-C₁₁ は 94.1%であった。

C-4) RMS 算出

NBx 及び Bx と n-C₁₁ の NMR 試験管の試料溶液を用いて、HPLC 用標準溶液を調製し、絶対検量線を作成し（原点通過、0~100 mg/L）、図 8 に示した。さらに、本検量線より n-C₁₁ に対する各分析対象物質の RMS を算出した結果、*cis*-NBx は 13.7, *cis*-Bx は 11.5, *trans*-NBx は 13.9, *trans*-Bx は 10.2 であった。

D. 結論

本研究では、アナトー色素における NBx 及び Bx の SR-HPLC 定量法を構築した。まず、標準品が入手困難である *trans*-NBx 及び *trans*-Bx さらに SR を合成し得ることができた。そして、qNMR により絶対定量を行い、その定量値に基づいて検量線を作成した結果、RMS を算出できた。今後はそれらの RMS を用いて流通しているアナトー色素中の NBx 及び Bx を定量を行い、絶対検量線法とほぼ同じ定量値との比較を行う。また、様々な条件下（研究室間、日間、カラムなど）における定量値の再現性を確認することが必要であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) 第 9 版食品添加物公定書，厚生労働省（2017）。

- 2) 第 10 版食品添加物公定書，厚生労働省 (2024).
- 3) Scotter MJ, Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Food Addit. Contam.* 11, 301-315. (1994)
- 4) 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. *Chem. Pharm. Bull.* 70, 25-31. (2022)
- 5) Takahashi, M., Nishizaki, Y., Morimoto, K., Sugimoto, N., Sato, K., Inoue, K. Design of synthetic single reference standards for the simultaneous determination of sesamin, sesamol, episesamin, and sesamol by HPLC using relative molar sensitivity. *Sep. Sci. Plus* 1, 498-505 (2018)

G. 知的財産権の出願、登録状況
なし

F. 研究業績

1. 学会発表等

- (1) 中森洋紀、布目真梨、辻巖一郎、出水庸介、増本直子、永津明人、杉本直樹、井之上浩一：デザイン Single reference-HPLC 法によるアナトー色素のビキシン及びノルビキシンの分析．AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第 26 回年次大会(2023.7.14) [東京].

2-1. 論文発表等

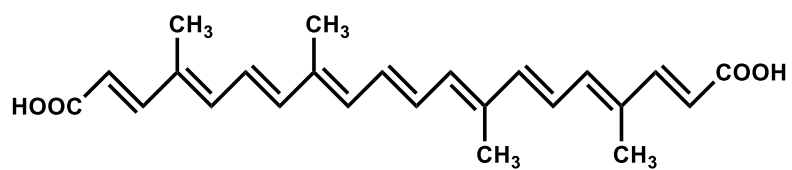
なし

2-2. 総説

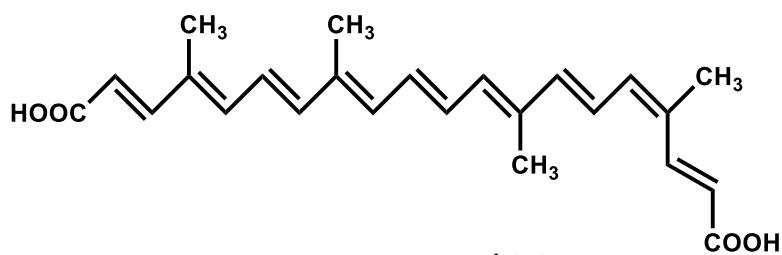
なし

2-3. 単行本

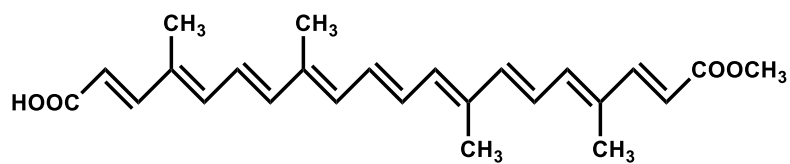
なし



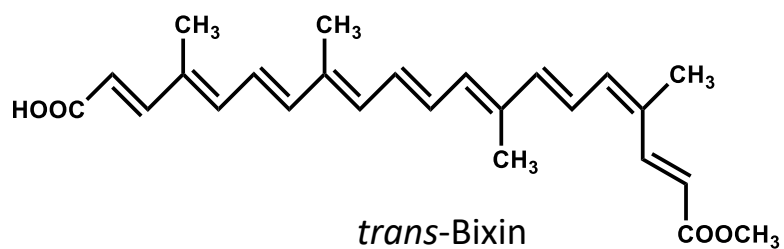
cis-Norbixin



trans-Norbixin



cis-Bixin



trans-Bixin

図 1. 分析対象物質の構造式（幾何異性体）

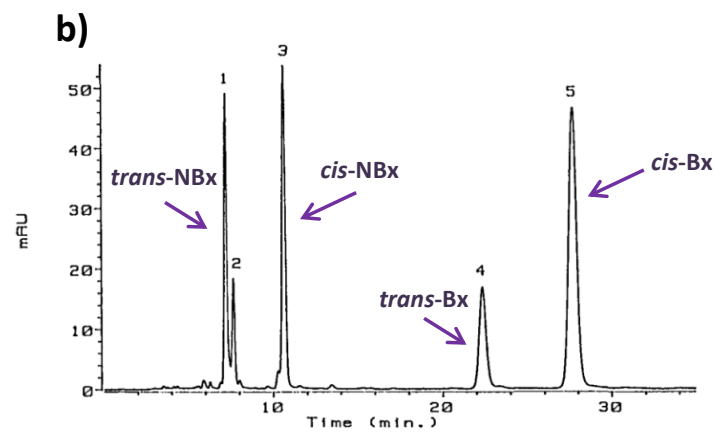
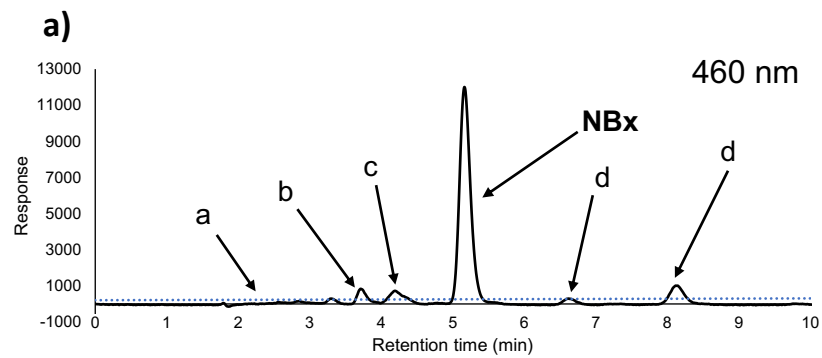


図 2. 幾何異性体 NBx 及び Bx の HPLC クロマトグラム

a) 令和 3 年度報告

b) 既報³⁾の報告

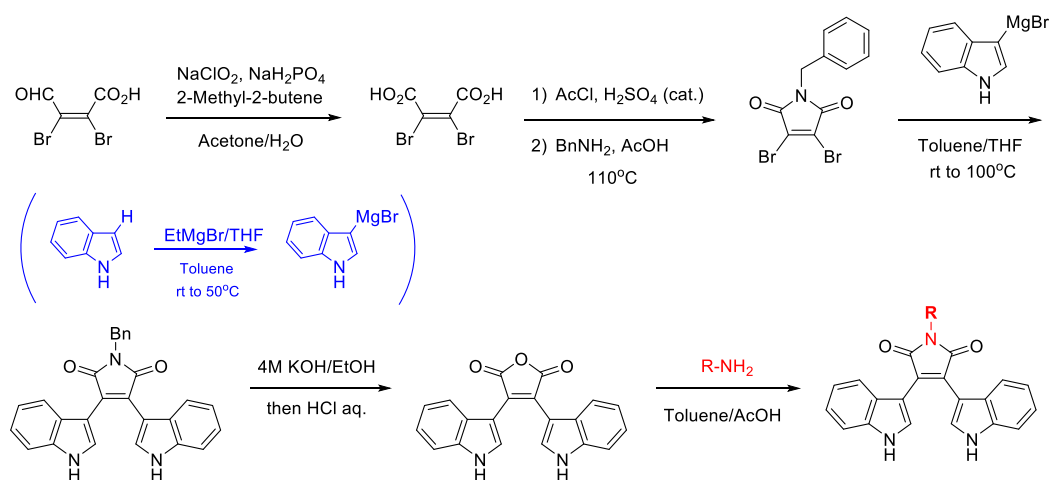


図 3. SR デザインの合成経路

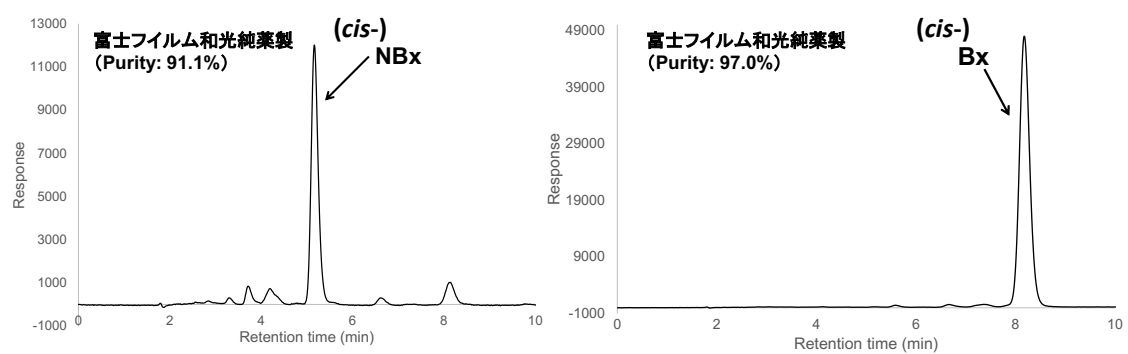


図 4. NBx 及び Bx 標準溶液の HPLC クロマトグラム

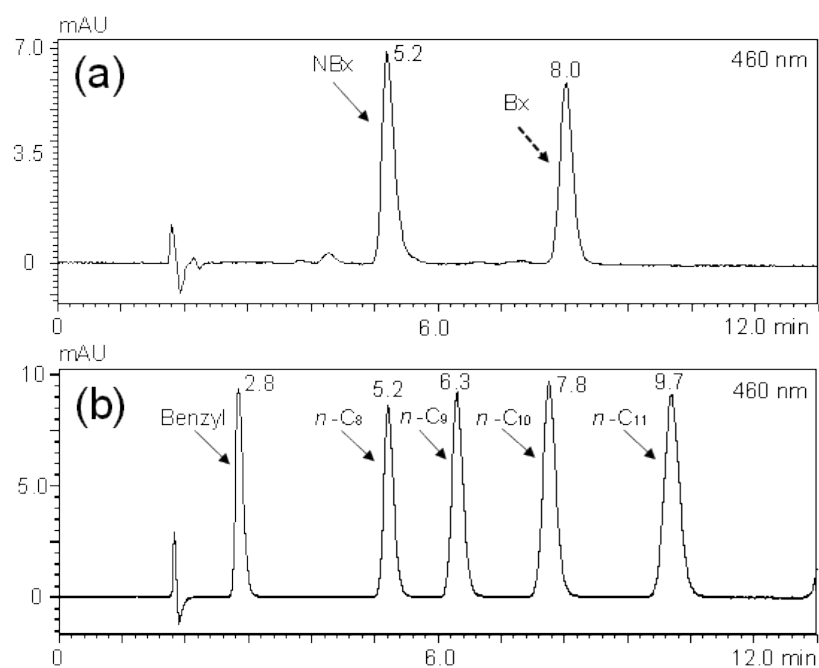


図 5. NBx/Bx 混合溶液及び SR 候補の HPLC クロマトグラム

(a) NBx/Bx 混合溶液

(b) SR 候補の混合溶液

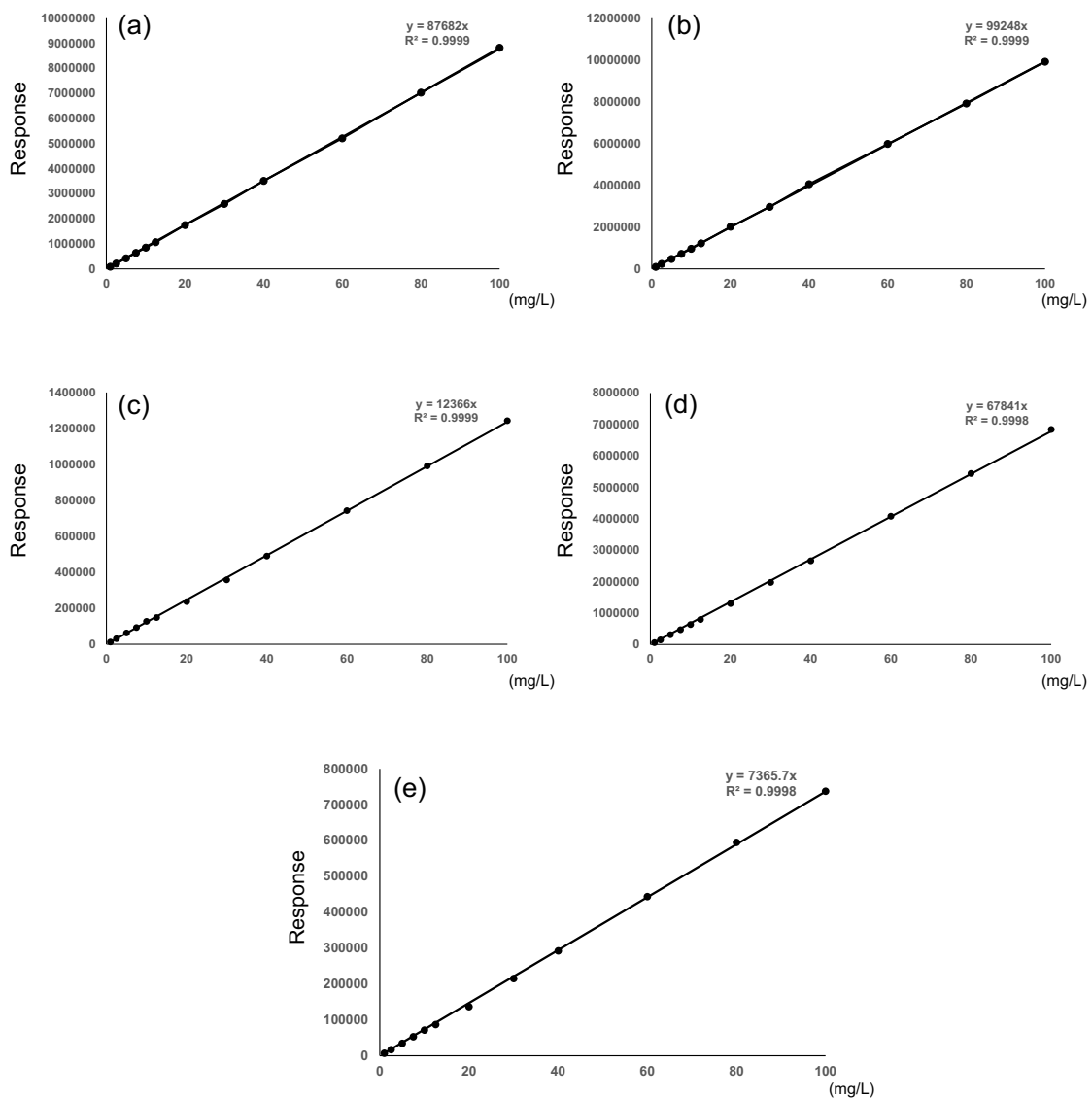


図 6. NBx, Bx,及び n-C₁₁ の検量線

(a) *cis*-NBx ($y = 87682x$, 相関係数 0.999)

(b) *cis*-Bx ($y = 99248x$, 相関係数 0.999)

(c) *trans*-NBx ($y = 12366x$, 相関係数 0.999)

(d) *trans*-Bx ($y = 67841x$, 相関係数 0.999)

(e) n-C₁₁ ($y = 7365.7x$, 相関係数 0.999)

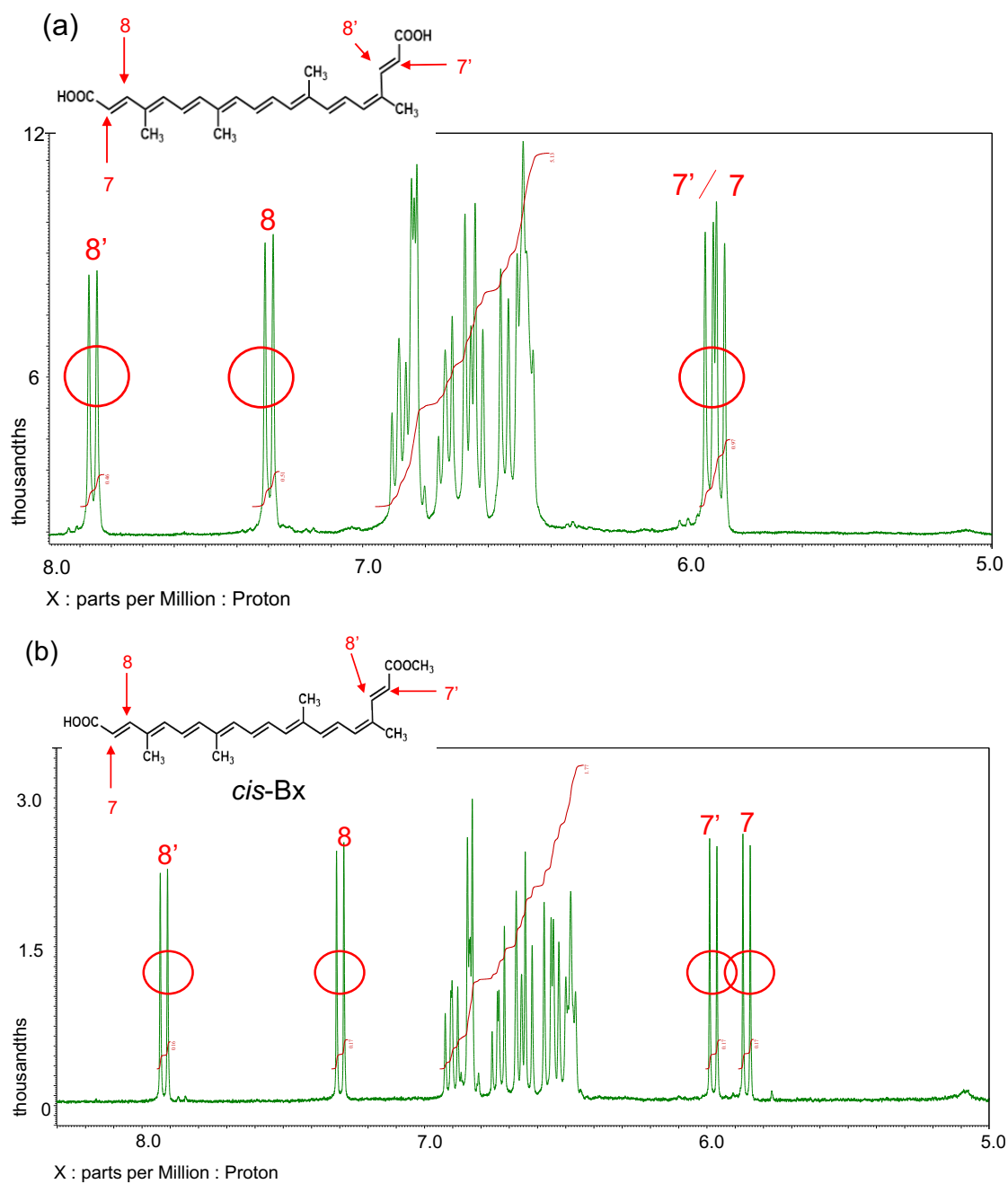


図 7. *cis/trans*-Bx/NBx 及び *n*-C₁₁ の qNMR スペクトル (その 1)

(a) *cis*-NBx (b) *cis*-Bx

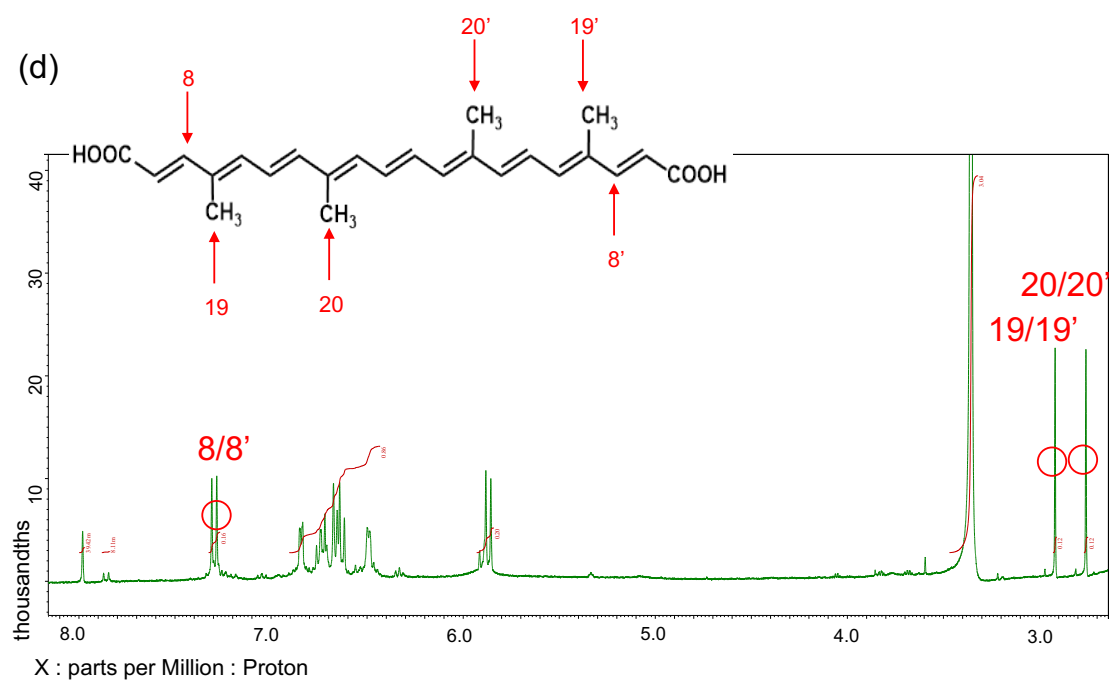
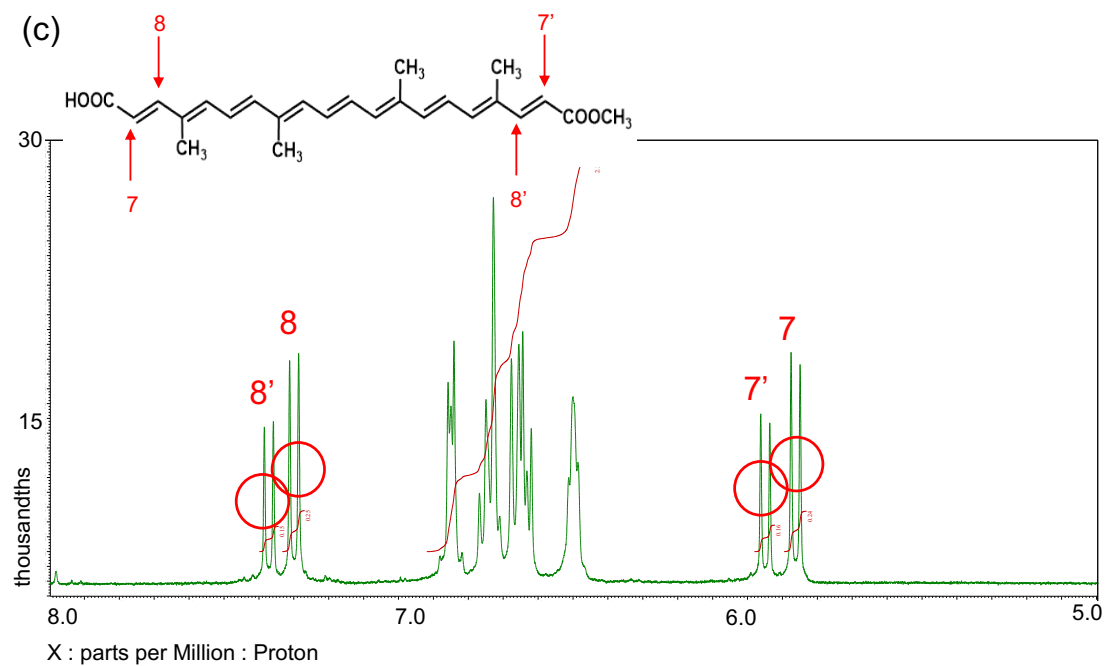


図 7. *cis/trans*-Bx/NBx 及び *n*-C₁₁ の qNMR スペクトル (その 2)

(c) *trans*-NBx (d) *trans*-Bx

(e)

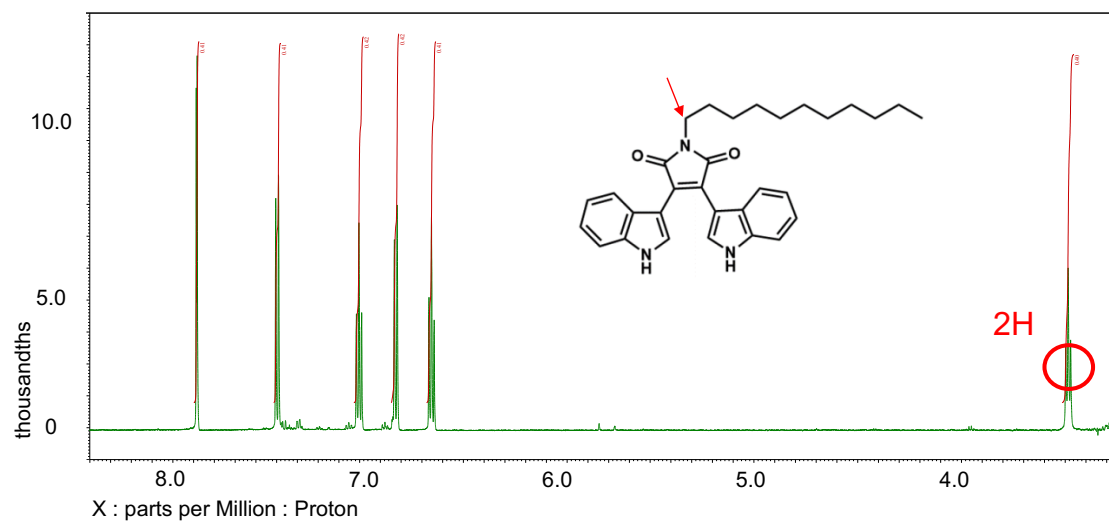


図 7. *cis/trans*-Bx/NBx 及び n-C₁₁ の qNMR スペクトル (その 3)

(e) n-C₁₁

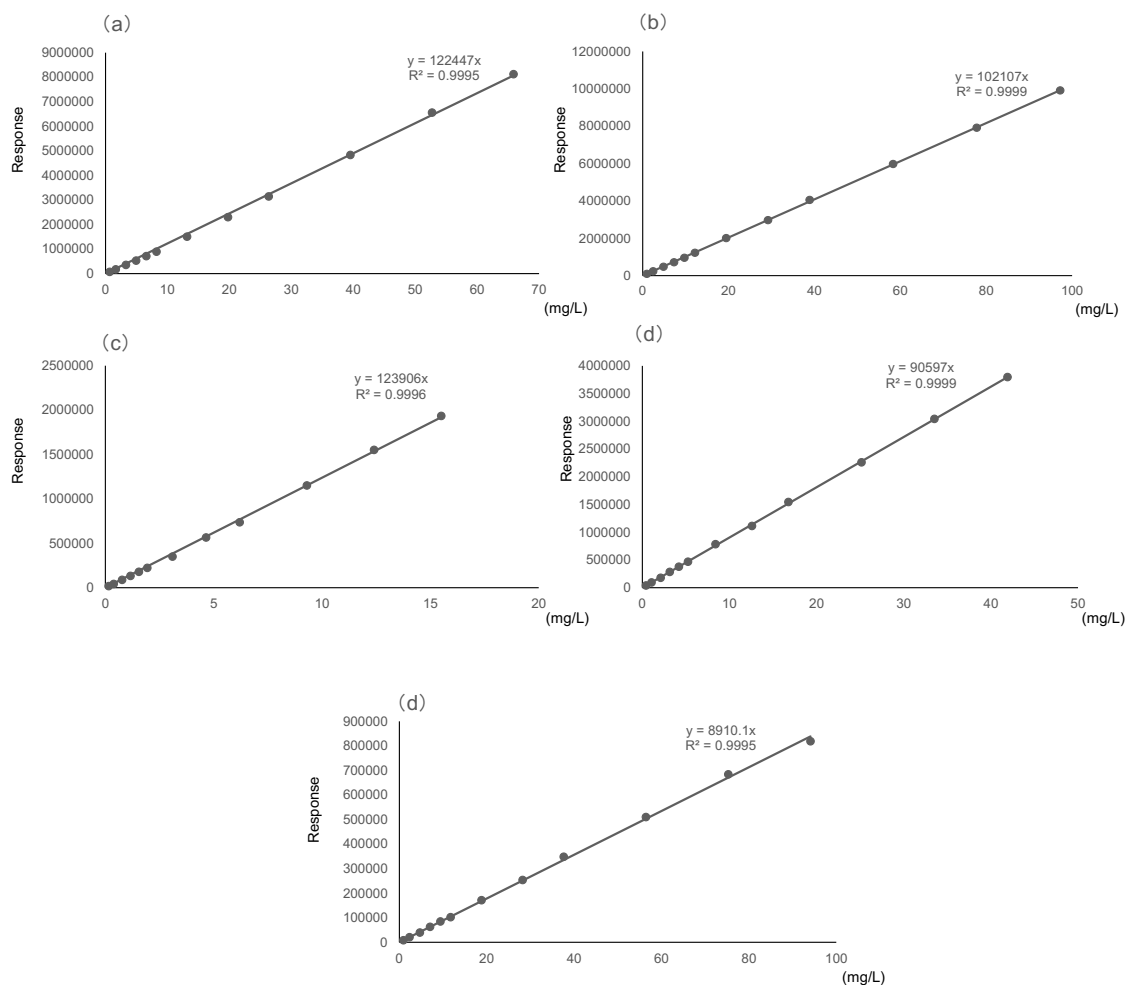


図 8. 純度補正後の NBx, Bx, 及び n-C₁₁ の検量線

- (a) *cis*-NBx ($y = 122447x$, 相関係数 0.999)
- (b) *cis*-Bx ($y = 102107x$, 相関係数 0.999)
- (c) *trans*-NBx ($y = 123906x$, 相関係数 0.999)
- (d) *trans*-Bx ($y = 90597x$, 相関係数 0.999)
- (e) n-C₁₁ ($y = 8910.1x$, 相関係数 0.999)