

研究要旨

1) ウコン色素の定量評価の基礎検討：ウコン色素は「第9版 食品添加物公定書」に記載されており、ウコン (*Curcuma longa* L.) の根茎から得られたクルクミンを主成分とするものであると定義されている。確認試験にはTLC、色価と極大吸収部の記述があるのみで、明確な成分は記載されていない。そこで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてウコン色素の主成分を明確にし、簡便かつ汎用性のある定量法を開発する必要がある。そこで、本研究では、分析対象物質の標準品を必要としない定量法「シングルリファレンス (SR) -HPLC定量法」を新たに構築した。高純度な主成分の入手法には高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いた。また、ウコン色素のSRはクルクミンから合成デザインすることにより検出器の感度差や保持時間の影響を最小限にした。単離したクルクミノイドを、定量NMRに基づいた定量値を用いて相対モル感度 (RMS) を算出した。実際に、ウコン色素をSR-HPLC定量法で分析した結果、従来の絶対検量線法と同等の定量性を示し、SRの濃度や他社装置に変更しても再現性に影響しなかった。

2) シタン色素の成分規格の検討：シタン色素 (Sandalwood Red) は日本食品添加物協会「第4版 既存添加物自主規格」に記載されており、シタン (*Pterocarpus santalinus* L.) の幹枝から得られたサンタリンを主成分とするものと定義されている。確認試験には色価と極大吸収部の記述があるのみで、明確な成分は記載されていない。昨年度に高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) を用いてサンタリンAおよびBの単離精製を行なった結果、高純度のサンタリンA (SA) およびサンタリンB (SB) が得られたが、同時に未知の色素成分も獲得することができた。そして、この成分をHPLCで測定したが検出感度が低かったため、再解析を行なった。HSCCCやHPLCの測定条件について再検討したが、分析は困難であると判断した。そこで、TLCによる分析を行い、その結果、シタン色素に含まれる成分のRf値を求めることができた。今後さらに成分解析を進めていくために、成分の再評価とHSCCCによる単離精製の検討を合わせて進めていくこととする。

3) DPPH法を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価：1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH)法は抗酸化能の評価法として、一般試験法の規格化が期待されている。本手法は、96ウェルを用いた吸光度測定 (検出波長：517 nm) によりトロロックス (基準物質) と相対的に抗酸化能を評価する (トロロックス等価活性値, TEAC) ため、簡便かつ迅速な試験法が可能となる。しかしながら、規格化に向けた妥当性評価が十分に検討されていないため、本年度では抗酸化能測定キットの内容に基づいて、実験手技や実験環境を軸にDPPH法の再現性や汎用性を評価することとした。没食子酸 (酸化防止剤) を用いて試薬や調製溶媒を変更してDPPH法を実施した結果、いずれもバラつきの少なくTEACを得ることができた。しかしながら、様々な既存添加物に応用した際、低極性の化合物に関して試験溶液が白濁し、正常にDPPH法を実施することが困難であった。

それゆえに、使用溶媒による溶解性を検討し、既存添加物への適応性を拡大することが求められる。さらに、マニュアルの簡易化や明確さにもさらに改良することにより、その汎用性も増すと考えられる。

4) アナトー色素の定量評価の基礎検討

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 (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。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NBx及びBx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NBx及びBx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、令和3年度では、NBx及びBx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NBx又はBxが検出された。問題点としてHPLCの絶対検量線では、幾何異性体などの問題より、信頼ある分析法は困難と考えた。そこで、令和4年度は令和3年度に引き続き、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た結果、市販されるNBxで純度が91.1%であり、Bxの混入が確認された。そこで、NBxのHSCCC単離精製を検討した。2相溶媒系として、*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水 (8/2/5/5, V/V/V/V)を用いて実施した。これらによって、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、*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。今後の課題としては、*trans*体の精製とRMS算出などが挙げられる。

研究協力者

高橋未来 立命館大学薬学部 助教

布目真梨 立命館大学薬学部 助教

1) ウコン色素の定量評価の基礎検討

A. 研究目的

ウコン色素は、「第9版 食品添加物公定書」(以下、公定書)において、ウコン (*Crucuma longa* L.) の根茎から得られたクルクミンを主成分とするものである。食用油脂を含むことがあると定義されている。¹⁾ ウコン色素は、抗炎症作用、抗酸化作用または抗がん作用などの様々な薬理作用があるため、クルクミノイドは注目されている機能性成分といえる²⁻⁴⁾。しかしながら、公定法におけるウコン色素の定量法では薄

層クロマトグラフィーが規定されており、類似色素との区別が困難である。これまで、クルクミノイドの分析法として、高速薄層クロマトグラフィー (HPTLC)⁵⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁶⁻⁸⁾、質量分析 (MS)⁹⁻¹¹⁾ などが報告されている。しかしながら、クルクミノイドの信頼性かつ高純度な標準品は高価格であるため、市販の標準品を入手することは容易ではない。先行研究において、ウコン色素にはクルクミン (CI)、デメトキシクルクミン (CII) およびビスデメトキシクルクミン (CIII) が主要成分であり、高速向流クロマトグラフィー (High Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) により、これらクルクミノイドが単離精製されている (図1)¹²⁾。HSCCCは二相溶媒系を用いる液液分配を原理とした液体クロマトグラフ

ィーであり、効率的かつ網羅的な単離精製法である。HSCCCは特殊な機器を用いるため、汎用性が乏しい。そこで、本研究では、HSCCCで得られたクルクミノイドに対する対応量標準品 (Single Reference, SR) に値付けした値 (相対モル感度, Relative Molar Sensitivity, RMS) を用いた SR-HPLC 定量法を開発することとした。ウコン色素から CI~CIII を安価に獲得し、化学・物理的性質の類似性を考慮した SR を化学合成によりデザインする。そして、SR に基づいて RMS を値付けすることにより、迅速かつ完全に定量値を求めることができる。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

ウコン色素は、ターメリック色素 (三栄源エフエフアイ社製, 粉末), クルクミン GS (ダイワ化成社製, 液状) およびクルクミン S (保土谷化学工業社製, 液状) を購入し、用いた。

n-ヘキサン, アセトニトリル, クロロホルム, メタノール, 1,4-BTMSB-*d*₆, クルクミン標準品, ヨードメタン, アセトン, 炭酸カリウムおよびギ酸 (LC/MS 用, 約 99%) は富士フイルム和光純薬社製を用いた。重アセトンはメルク社製を用いた。また、超純水は PURELAB flex5 system (ELGA 社製) を用いて得た。試料の希釈溶媒として、アセトニトリル/水 (50/50, *V/V*) 混液を用いた。

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
ロータリーエバポレーター: 東京理化器械社製 N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000
凍結乾燥機: 東京理化器械社製 FDU-1200
HPLC 装置: 島津製作所社製 LC-20AD/SIL-20AC/RF-10AXL/CBM-20A/SPD-M20A/CTO-10AS, 日立ハイテクサイエンス社 Chromaster 5160 / 5280 / 5310 / 5430, Waters 社製 Acquity UPLC H-Class

MS 装置: Waters 社製 Xevo TQD

HSCCC 装置: クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge), GL サイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761
定量 NMR (¹H-qNMR) 装置: JEOL 社製 ECA600

B-3) LC 分離分析

先行研究より、ウコン色素はメタノールで溶解し、希釈溶媒を用いて調製した。移動相には、0.1vol% ギ酸水溶液 (A) /0.1vol% ギ酸アセトニトリル (B) を使用し、A/B: 50/50 をアイソクラティック条件により、20 分の分析を行った¹²⁾。カラム: TSKgel ODS-100V column (4.6×150 mm, 5 μm, 東ソー社製)
カラム温度: 40°C
流速: 1.0 mL/min
検出波長: 405 nm
注入量: 10 μL

B-4) HSCCC の分離分析

まず、三栄源エフエフアイ社製のウコン色素にメタノール 20 mL を加え、高速振とう (1,000 rpm, 10 min) することにより抽出した。その後、遠心分離 (10,000 rpm, 10 分) し、上清を回収した。この操作を 2 回繰り返した。上清を濃縮乾固し、二相溶媒系の上層/下層 (50/50, *V/V*) 混液に溶解したものを注入試料とした。二相溶媒系は、ヘキサン/クロロホルム/メタノール/水溶液 (5/10/7.5/2.5, *V/V/V/V*) を用いた。分離部は、Type-J コイルを用い、遠心スピードを 1000 rpm とした。また、コイル容量は、350 mL であり、固定相には、上層を充填した。移動相には下層を用い、流速 1.5 mL/min で送液した。分取した試料は、島津製作所社製の HPLC を用いて確認し、最終的に獲得したクルクミノイドを凍結乾燥した。

B-5) クルクミノイドの SR 合成デザイン

クルクミン標準品 500 mg にヨードメタン 4.0mL を加え、テトラメチルクルクミンを合成した。触媒として、炭酸カリウム 500 mg, アセトン 15 mL を用いた。なお、合成した SR を

島津製作所社製 HPLC と MS により同定および純度評価した。

B-7) ¹H-qNMR による単離したクルクミン類と SR の絶対定量

10 mg CI~CIII を重アセトン 1.0 mL に溶解した。また、10 mg SSR を重アセトン 2.0 mL に溶解した。1.0 mL 溶解液のうち 0.6 mL を NMR 管に移し、qNMR で外部標準法により定量した。

Data points : 60,000

Flip angle : 90°

Pulse delay : 60 s

Scans : 16 times

Probe : room temperature

Software : JEOL 社製 Purity Pro qNMR

ANALYSIS Software

B-8) クルクミン類の RMS 算出

qNMR 管中の CI~CIII および SR を、希釈溶媒により HPLC 標準溶液を調製した。qNMR の定量結果を用いて、絶対検量線の範囲は、0~100 μmol/L と設定し、RMS を求めた。まず、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) および層長 (l) で表される。

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

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

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

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

上記より、CI~CIII の RMS を、SR に対する CI~CIII の絶対検量線の傾きの比より算出した。なお、0 μmol/L のピーク面積は検量線の原点と

した。また、今回の研究では、3 日間それぞれ RMS を算出し、再現性を確認した。

B-9) SR-HPLC 法を用いたウコン色素中のクルクミン類の定量

RMS に基づいて 3 製品のウコン色素を SR-HPLC 法で定量し、従来の絶対検量線法による定量結果と比較した。クルクミン GS (ダイワ化成社製) およびクルクミン W (保土谷化学工業社製) は原液を希釈溶媒により調製した。また、ターメリック色素 (三栄源エフエフアイ社製) は試料 0.5 g をメタノール 10 mL で抽出し、希釈溶媒で調製した。なお、絶対検量線による定量は、qNMR 試料液を希釈溶媒により調製した。さらに、異なる HPLC 装置における SR-HPLC 定量法の再現性を検証するため、健康食品およびサプリメント (A~E) を用いて、島津製作所社製、Waters 社製および日立ハイテクサイエンス社製の HPLC 装置で CI~CIII を RMS に基づき定量した。

C. 結果及び考察

C-1) LC 分離分析

先行研究により、移動相は 0.1vol%ギ酸水溶液と 0.1vol%ギ酸アセトニトリルを用いて、最適な分析カラムを検討した¹²⁾。使用したカラムは東ソー社製 TSKgel ODS-80Ts および TSKgel ODS-100V カラムであり、どのカラムサイズも内径 4.6×長さ 150 mm、粒子径は 5 μm であった。HPLC クロマトグラムピーク形状や分離度を比較した結果、TSKgel ODS-100V を採用することとした (図 2)。

C-2) HSCCC の単離分析

二相溶媒系ヘキサン/クロロホルム/メタノール/水溶液 (5/10/7.5/2.5, V/V/V/V) を用いて、メタノール抽出したウコン色素を HSCCC で単離精製した。図 3 にウコン色素の HSCCC クロマトグラムを示した。その結果、固定相における上層の保持率は 50%であり、3 つの主要なピークが確認された (Fraction 2~4)。なお、分析時間は 450 分であった。これら分取物の MS スペ

クトルでは、いずれもクルクミノイドの[M-H]⁺ (Fraction 2 : m/z 367, Fraction 3 : m/z 337, Fraction 4 : m/z 307) が観察された (図 4)。さらに、HPLC で測定した結果、いずれも単一ピークであった (図 5)。また、Fraction 1 および HSCCC カラム内の固定相の HPLC クロマトグラムを図 6 に示した。その結果、どちらにも CI~CIII がほとんど残っていないことが確認された。以上より、ウコン色素 (15.5 g) から CI は 146.6 mg (収率 : 0.94%)、CII は 98.3 mg (収率 : 0.64%) および CIII は 141.7 mg (収率 : 0.91%) を入手することができた。

C-4) クルクミン類の SR 合成デザイン

分析対象物質の最適な SR の条件は、分析対象物質に類似した吸収極大波長を持つこと、物理的に安定であること、分析対象物質と十分な LC 分離が可能であること、高純度および安価であることである。そこで、本研究では、比較的安価に入手可能である CI を用いて、SR の合成デザイン (アルキル化) を検討した (図 7)。生成物を MS や NMR を用いて同定した結果、テトラメチルクルクミンであった (図 8)。この SR をウコン色素に添加して HPLC で測定すると、CI~CIII と良好な分離で検出された (図 9)。以上より、本研究で合成デザインされた SR は、RMS を用いたクルクミノイドの HPLC 定量法に適応可能であると考えた。

C-5) ¹H-qNMR による単離したクルクミン類と SR の絶対定量

本研究では、qNMR 用標準物質として、1,4-BTMSB-*d*₄ を用いた。1,4-BTMSB-*d*₄ の純度 (99.8%) に基づいて、単離した CI~CIII と SR を qNMR により定量した。それらの qNMR スペクトルを図 10 に示した。その結果、CI は 21.5 mmol/L、CII は 25.6 mmol/L、CIII は 20.3 mmol/L および SR は 19.1 mmol/L であった。

C-6) クルクミン類の RMS 算出

単離した CI~CIII と SR の NMR 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 μmol/L)、図 11 に示した。さらに、検量線の様々な濃度幅において RMS を 3 日間連続で検量線を作成することにより RMS 算出した。CI~CIII の RMS の平均値±RSD%を求めた結果、CI は 8.9±1.2、CII は 9.6±0.9 および CIII は 8.9±2.0 であった。以上より、本研究では、検量線の濃度幅や日間の影響を受けずに、高精度かつ堅固な RMS を算出することができたといえる。

C-7) SR-HPLC 法を用いたウコン色素中のクルクミン類の定量

算出した CI~CIII のクルクミノイドの RMS に基づいて、各メーカーのウコン色素を SR-HPLC 定量法で分析した。なお、添加する SR 濃度は、25 μmol/L、50 μmol/L および 100 μmol/L とした。そのときの HPLC クロマトグラムを図 12 に示した。その結果、今回の研究で合成デザインした SR はウコン色素中の成分に影響なくピークを検出することができた。そして、各 SR 濃度における CI~CIII の定量値を表 1 にまとめた。なお、CI~CIII の qNMR 試料液を用いて、絶対検量線法による定量値も算出した。その結果、どのウコン色素においても、従来の絶対検量線と同等の定量値を示した。さらに、健康食品およびサプリメント (A~E) を島津製作所社製、Waters 社製および日立ハイテクサイエンス社製の HPLC 装置で SR-HPLC 定量分析を行った。各 HPLC 装置の健康食品およびサプリメントの HPLC クロマトグラムを図 13~15 に示し、定量結果を図 16 にまとめた。その結果、島津製作所社製の HPLC 装置で RMS を算出した場合、他社の HPLC 装置においても、本手法は適応可能であると考えられた。

D. 結論

本研究では、既存添加物ウコン色素に含まれる CI~CIII の SR-HPLC 定量法を構築した。まず、標準品が入手困難である CI~CIII を HSCCC により単離精製した結果、それぞれ高純度な単一成分を得ることができた。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、再現性の保証されたRMSを算出できた。それらのRMSを用いて流通しているウコン色素中のCI~CIIIを定量した結果、絶対検量線法とほぼ同じ定量値を示し、他社のHPLC装置で定量を実施しても大きな誤差は確認されなかった。以上より、本分析法を用いることにより、ウコン色素中の主成分を迅速かつ簡便に定量可能であり、その値は堅固かつ信頼性のあるといえる。今後は、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) Ramsewak R. S, Dewitt D. L, Nair M. G.: Cytotoxicity antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumin 1-3 from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*, **2000**; 7: 303-308.
- 3) Menon V. P, Sudheer A. R: Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2007**; 595: 105-125.
- 4) Maheshwari R. K, Singh A. K, Gaddipati J, Srimal R. C: Multiple biological activities of curcumin. *Life Sci.*, **2006**; 78: 2081-2087.
- 5) Ansari M. J, Ahmad S, Kohli K, Ali J, Khar R. K: Stability indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**; 39: 132-138.
- 6) Jayaprakasha G. K, Jagan Mohan Rao L, Sakariah K. K: Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**; 50: 3668-3672.
- 7) Heath D. D, Pruitt M. A, Brenner D. E, Rock C. L: Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography, **2003**; for Application of Food Analysis. AOAC 2021 Virtual Midyear Meeting (2021.3.19) (Online)
- 8) Gonzalez M, Gallego M, Valcarcel M: Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid-phase extraction system. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**; 51: 2121-2129.
- 9) Inoue K, Hamasaki S, Yoshimura Y, Yamada M, Nakamura M, Ito Y, Nakazawa H: Validation of LC/electrospray-MS for determination of major curcuminoids in foods. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **2003**; 26: 53-62.
- 10) Liu A, Lou H, Zhao, L, Fan P: Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**; 40: 720-727.
- 11) Jiang H, Somogyi A, Jacobsen N. E, Timmermann B. N, Gang D. R: Analysis of curcuminoids by positive and negative electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**; 20: 1001-1012.
- 12) Inoue K, Nomura C, Ito S, Nagatsu M, Hino T, Oka H: Purification of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin by High-Speed Countercurrent chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**; 56: 9328-9336.

F. 研究業績

1. 学会発表等

- 1) 高橋未来, 高木映里, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 井之上浩一: シングルリファレンスHPLCによるクルクミン類の定量法の検討. 第2回日本定量NMR研究会 (2020.12.4)(川崎市)
- 2) Takahashi M.: Single Reference HPLC Approach for Application of Food Analysis. AOAC 2021 Virtual Midyear Meeting (2021.3.19) (Online)

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Takahashi M, Nishizaki Y, Maruyama T,

Sugimoto N, Kyoko S, Inoue K: Quantification of tea - derived catechins without the requirement for respective calibration curves by single reference liquid chromatography based on relative molar sensitivity. *J. Sci. Food Agric.*, **2020** DOI 10.1002/jsfa.11013

2-2. 総説

なし
2-3. 単行本
なし

G. 知的財産権の出願. 登録状況
なし

2) シタン色素の成分規格の検討

A. 研究目的

シタン色素 (Sandalwood Red) は「第4版 既存添加物自主規格」において、シタン (*Pterocarpus santalinus* Linné) の幹枝から得られたサンタリンを主成分とするものと定義されている。¹³⁾ シタンは樹木の芯材が赤紫褐色と美しく、とても固い木であり、お餅の着色や染料、楽器に用いられている。シタンにはフラボノイド、テルペノイド、フェノール化合物、サポニンなどの成分が含まれていると言われている。また、シタン色素の主成分であるサンタリン A (SA) およびサンタリン B (SB) は、抗糖尿病作用、抗酸化作用や肝臓保護作用が報告されている。そしてインドでは、皮膚疾患、黄疸、創傷治癒の外用薬として用いられていたことも報告されている。¹⁴⁾ また、人工皮膚の着色の技術も開発されている。¹⁵⁾

現在のシタン色素の確認試験では、色価や極大吸収波長により評価されている。しかしながら、主成分である SA および SB の定量用標準品が存在しておらず、入手不可能であるため、SA および SB の定量分析は困難である。

昨年度は、高速向流クロマトグラフィー (High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC) を用いてシタン色素から SA 及び SB の単離精製を行い、同時に未知の色素成分(Fr.1) も獲得することができた。しかし、この成分は検出感が低かった。

ゆえに、HSCCC を用いて再びシタン色素の主成分評価を行い、HPLC 及び TLC を用いて分析条件の検討を行うこととした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

シタン色素は、粉末のジーエスインターナショナル社製<B140>と液状の三栄源エフエフアイ社製<C2012>を用いた。なお、<>内は国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部の管理番号を示す。

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

ロータリーエバポレーター：東京理化工学社製

N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000

薄層板：Merck 社製 Silica gel 60 F₂₅₄

HPLC 装置：日立ハイテクサイエンス社製

Chromaster 5160 / 5280 / 5310 / 5430

MS 装置：Waters 社製 Xevo TQD

HSCCC 装置：クツワ産業社製 Easy-Prep CCC (multi-layer coil planet centrifuge), GL サイエンス社製 PU714M LC/UV702/SC762/PLC761

B-2) シタン色素の LC 分離分析

対象試料はメタノールで調製した。移動相には、0.1% ギ酸水溶液 (A) / 0.1% ギ酸メタノール (B) を使用し、A/B : 45/55 をアイソクラティック条件により、30 分間の分析を行った。

カラム：X Bridge C18 (5 µm, 4.6×150 mm, Waters 社製)

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

検出波長：200-540 nm

注入量：10 µL

移動相：0.1% ギ酸水溶液 (A) / 0.1% ギ酸メタノール (B)

アイソクラティック条件：A/B : 45/55 (0 min) →45/55 (20 min) →5/95 (20.1 min) →5/95 (25 min) →45/55 (25.1 min) →45/55 (30 min)

B-3) シタン色素の HSCCC の分離分析

対象試料にはジーエスインターナショナル社製から獲得した Fr.1 を用い、上層および下層混合溶液 (50/50, V/V) に溶解した。二相溶媒系は、メチル *t*-ブチルエーテル/アセトニトリル/水溶液 (4/1/5, V/V/V) を用いた。分離部は、Type-J コイルを用い、遠心スピードを 1000 rpm とした。また、コイル容量は、75 mL であり、固定相には、上層を充填した。移動相には下層を用い、流速 1.0 mL/min で送液した。

B-4) シタン色素の TLC の分離分析

対象試料はシタン色素、単離精製によって獲得した SA, SB, Fr.1 とし、メタノールで調製した。展開溶媒には酢酸エチル：メタノール(9:1)を用い、自然光および 254 nm でスポットを確認した。

C. 結果及び考察

C-1) シタン色素の LC 分離分析

昨年度のシタン色素の HSCCC による単離で獲得した Fr.1 についての追加検討を行った。

まず始めに、HPLC にて測定条件の検討として、検出波長及び濃度の検討を行った。

赤色色素に関する文献を参考にして、検出波長 535 nm, 500 nm, 480 nm, 254 nm で測定し、ピーク強度を比較した。その結果の HPLC クロマトグラムを図 1 に示した。最もピーク強度が大きかったのは 500 nm であったため、従来通りの 500 nm で検出を行うこととした。

また、試料濃度によるピーク強度の変化の確認を行った。Fr.1 166 mg をメタノール 10 mL に溶解したものを基準溶液としてメタノールで希釈を行い、10 倍希釈、100 倍希釈、1000 倍希釈溶液を作成し、測定を行った。その結果の HPLC クロマトグラムを図 2 に示した。これより、希釈を行うことでピーク強度が小さくなったため、希釈をせずに測定を行うこととした。

以上の検討により、測定条件を決定し、Fr.1 を測定した結果、その結果、5.8 min と 8.2min にピークを検出した。(図 3)

C-2) シタン色素の HSCCC の分離分析

HSCCC による単離を再度実施するにあたり、二層溶媒の再検討を行った。その結果、メチル *t*-ブチルエーテル/アセトニトリル/水溶液 (4/1/5, V/V/V) を採用した。

Fr.1 の HSCCC による単離を実施した。二層溶媒にはメチル *t*-ブチルエーテル/アセトニトリル/水溶液 (4/1/5, V/V/V) を用いた。なお、固定相の保持率は 47 % であり、分析時間は 150 分であった。HSCCC クロマトグラム (図 4) より、明確なピークは検出されず、また、上層に赤い成分が多く残り、分取することができなかった。

以上の結果より、HPLC および HSCCC による Fr.1 の分析は困難であると考えたため、TLC を用いて検討することとした。

C-3) シタン色素の TLC の分離分析

薄層版に Silica gel 60 F₂₅₄ を用いて展開溶媒の検討を行った結果、酢酸エチル:メタノール(9:1) で分離を行うことができた (図 5)。また、スポットの R_f 値を求め、表 1 に示した。この結果より、Fr.1, SA および SB の R_f 値を求めることができた。またシタン色素中にも同成分が含まれていることを確認することができたが、一方でスポット 1-5 のように、上記の成分以外のスポットも観察された。

D. 結論

本研究では、既存添加物シタン色素に含まれる、HPLC での検出が困難である Fr.1 を TLC によって分析することができた。しかし、同時にシタン色素には Fr.1, SA, SB 以外の成分が含まれていることが確認できた。今後は、シタン色素の成分の再評価と、主成分解析を行うために SA 及び SB の更なる単離精製が必要であると考えられる。

E. 参考文献

- 13) 日本食品添加物協会；第4版 既存添加物自主規格 平成20年10月13日発行
- 14) Bulle S, Reddyvari H, Nallanchakravarthula V, Vaddi DR; Therapeutic Potential of Pterocarpus santalinus L.: An Update. *Pharmacognosy*, 43-9 (2016)
- 15) レアル.ダルマントン,パトリック.皮膚の人工的着色のためのサンタリン又はサンタル人工的着色のためのサンタリン又はサンタルビンを含有する組成物. 特表 2000-513015. 2000-10-0

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
2-1. 論文
なし
2-2. 総説

なし

2-3. 単行本

なし

3) DPPH法を用いた酸化防止剤の抗酸化能評価法の妥当性評価

A. 研究目的

既存添加物の規格基準について、これまで有効成分や構成成分の同定、各成分の分析法の開発をすることにより、成分規格試験を設定してきた¹⁶⁾。しかしながら、酸化防止剤として使用されている既存添加物では、様々な成分が抗酸化能に関与しているため、既存添加物中の全ての抗酸化物質を同定及び分析法を開発することは困難である。それゆえに、抗酸化能を持つ既存添加物に関して、主成分などの成分解析だけでなく、酸化防止剤としての抗酸化能の一般試験法化の設定が求められている。そこで、本年度では、高い再現性かつ汎用性のある抗酸化能測定法として、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH) 法の基礎検討を試みた。

DPPH は紫色の安定なラジカル化合物であり、抗酸化物質により還元されることにより無色に変化する(図7)。そのため、DPPH法はラジカルの消去活性を利用した簡便な抗酸化能の評価法として様々な分野で用いられている。さらに、DPPH法は吸光度測定(検出波長:517nm)により実施されるため、マイクロプレートを用いた簡便かつ迅速な多検体の測定も可能である。しかしながら、DPPH法による抗酸化能は50%阻害濃度(IC₅₀)により評価されるが、その値の再現性の乏しさが課題として挙げられていた。そこで、既報において、トロロックスを基準物質として補正したトロロックス等価活性値(Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC)によるDPPH法が報告されている¹⁷⁾。さらに、DPPH法によるTEAC評価法はキット化(抗酸化能測定キット)されており、異なる試験機関における測定誤差がさらに少なくなると期待されている。そこで、本研究では、抗酸化能測定キットの手順や同封されている試薬類を用いて様々な既存添加物に応用することにより、その抗酸化能の再現性や適応性を評価することとした。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

抗酸化能測定キット(DPPH Antioxidant Assay Kit)は同仁化学社製を用い、DPPH試薬、トロロックス標準品及びアッセイバッファーがキットに同封されていたものを用いた。チャ抽出物、ターメリック色素、赤キャベツ色素、クチナシ黄色素、ベニバナ赤色素及びマリーゴールド色素は三栄源エフ・エフ・アイ社製を用いた。DPPHはCayman Chemical社製を用いた。没食子酸水物、トロロックス標準品、エタノール(特級)、メタノール(HPLC用)、アセトニトリル(HPLC用)及びアセトン(特級)は富士フィ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。また、超純水はPURELAB flex 5 system(ELGA社製)で精製したものを使用した。0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)は、株式会社ニッポン・ジーン製1M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)を用いて調製した。

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
吸光度計：コロナ電気株式会社製コロナマルチグレーティングマイクロプレートリーダーSH9000Lab

B-2) DPPH ラジカル消去活性試験法

試料が溶解可能である溶媒にてストック溶液を調製し、攪拌及び遠心分離(3,000 rpm, 5分)した後、上清を測定試料として用いた。また、トロロックス溶液及びDPPH溶液は、エタノールで溶解及び希釈することにより調製した。そして、96穴マイクロプレートに既存添加物又は80, 60, 40, 0 µg/mLの各濃度に希釈したトロロックス溶液20 µL, 0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)80 µL, 0.2 mM DPPH溶液100 µLを加え、暗室でインキュベート(25℃, 30分間)した。本溶液を吸光度計(コロナ電気株式会社製コロナマルチグレーティングマイクロプレートリーダーSH9000Lab)により517nmの吸光度を測定した。さらに、ラジカル消去率を以下の式で求め

た。

$$\text{ラジカル消去率 (\%)} = (A_{cs} - A_s) / A_{cs} \times 100$$

A_{cs}: 試料ブランク吸光度

A_s: 試料吸光度

B-3) TEAC 算出

試料及びトロロックス溶液をエタノールで希釈し、検量線を作成した。また、50%のラジカル消去率を含む範囲で、回帰直線を引き、算出された直線式より、IC₅₀となる濃度を求めた。3回の操作により、TEACの平均値及び標準偏差(S.D.)を算出した。

$$\text{TEAC} = \text{Trolox の IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{試料の IC}_{50} (\mu\text{g/mL})$$

C. 結果及び考察

まず、抗酸化能測定キット試薬と自ら調製した試薬の両方を用いて、酸化防止剤である没食子酸のTEACを確認した(表2)。その結果、全て調製した試薬を用いた場合においてもキット試薬と同等な抗酸化能を測定できる(RSD 3.3%以下)ことを確認した。以上より、それ以降のDPPH法の検討に関して調製した試薬を用いることとした。

次に、7種類の既存添加物を用いて、DPPH法による抗酸化能を評価した。これら試料を没食子酸と同様に、DPPHラジカル消去活性試験法を実施し、TEACを算出した結果を表3にまとめた。その結果、没食子酸及びチャ抽出物のTEACはそれぞれ3.70及び2.78であったが、ターメリック色素及び赤キャベツ色素のTEACは0.016及び0.013であり、ほとんど抗酸化能が確認されなかった。さらに、マリーゴールド色素、クチナシ黄色素及びベニバナ赤色素では、ウェル内の試験溶液が白濁し、正常に吸光度を測定することができなかった。これら既存添加物がDPPH法の測定が困難であった要因は、使用する溶媒への溶解性が低かったためであると考えられる。マリーゴールド色素、クチナシ黄色素及びベニバナ赤色素の溶解試験を実施した際、エタノール、メタノール、アセトン、アセ

トニトリル及び水に溶解せず、いずれもDMSOのみ溶解可能であった(図8)。そのため、既存添加物の試料溶液をウェルに入れ、他の試薬を添加した後、白濁してしまい、IC₅₀が算出できなかった。このように、抗酸化能測定キットの手順では、実試料の希釈溶媒がエタノールであったため、没食子酸を用いて他の溶媒におけるTEACと比較した。比較溶媒は、水、エタノール、メタノール及びDMSOを用いた。各溶媒におけるTEACを図9に示した。その結果、没食子酸では、いずれの溶媒を用いて希釈してもTEACの結果に影響しない(RSD; 6.5%)が、極性の低い化合物の場合は溶解性が影響することが判明した。そのため、DPPH法は極性が高いもしくは中程度の化合物に適応可能であると考えられる。

次に、実験者間におけるDPPH法の測定結果の誤差を評価した。本研究では、DPPH法の一般試験法としての標準化を検討しているため、実験室環境下における複数の実験者によるDPPH法の再現性を調査した。3名の実験者(実験者A~C)に対して、キットに同封している手順書を確認し、没食子酸のDPPHラジカル消去活性試験法を実施し、TEACを算出した。次いで、実験者A~Cに、手順内容を図示化したプロトコール(図10)を確認してもらい、同様に没食子酸のDPPH法を実施した(図11)。その結果、実験者A及びBにおいて、1回目及び2回目のTEACはほとんど同じであった。それらに対して、実験者Cは、1回目では他の実験者とTEACが大きく異なっていたが、2回目のTEACは殆ど同等の値が得られた。2回目における全実験者によるTEACのRSDは10%以下であり、良好な再現性がみられた。これらの結果より、実験環境下における高い再現性を得るために、簡易かつ明確なマニュアルの工夫が必要であると考えられる。

D. 結論

本研究では、既存添加物における酸化防止剤の抗酸化能評価法としてDPPH法の適応を目指して、再現性や汎用性など基礎検討した。その

結果，極性の高い又は中程度の化合物であれば，適応可能であり，その再現性も高かった．更なる適応拡大のために，使用溶媒による溶解性の検討が必要であると考えられる．さらに，異なる実験者における再現性の比較した結果，簡潔なマニュアルの作成をすることにより，実験者間の誤差を軽減することが可能であった．

E. 参考文献

- 16) 第9版食品添加物公定書，厚生労働省(2017).
- 17) Shimamura T, Sumikura Y, Yamazaki T, Tada A, Kashiwagi T, Ishikawa H, Matsui T, Sugimoto N, Akiyama H, Ukeda H, Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives - inter-laboratory evaluation study. *Anal. Sci.* 30, 717-721 (2014).

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
2. 論文発表等
2-1. 論文
なし
- 2-2. 総説
なし
- 2-3. 単行本
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

4) アナトー色素の定量評価の基礎検討

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¹⁸⁾。令和 3 年度において, 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では, 信頼性に欠けるため, 新たな分析法が求められると考えた。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 12)¹⁹⁾。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, 令和 3 年度に報告した HPLC 分析で検出された未知ピーク (図 13) は幾何異性体と推定される。一方で, これら NBx 及び Bx 幾何異性体の標準品は入手できない。そこで, 本年度では, 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検討することとした。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^{20,21)}。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

アナトー色素製剤は, NBx (A 社製; 粉末), Bx (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 NBx 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。

NBx 及び Bx 標準品は, 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, ノルビキシン (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), 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

B-3) 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→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-4) 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°C

流速：1.0 mL/min

検出波長：460 nm

注入量：10 μL

B-5) 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°C

Desolvation temperature：400°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

B-6) HSCCC 単離精製

HSCCC 装置：easy-Prepccc (多層コイルプラネット) (クツワ産業社製)

分取システム：PU714MLC pump, UV702 detector, SC762 system controller, PLC761 fraction collector (GL Science 社製)

HSCCC 条件

二相溶媒系：*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/水 (8/2/5/5, V/V/V/V)

分離部：Type-J コイル (コイル容量：350 mL)

遠心スピード：1000 rpm

流速：3.0 mL/min

NBx の DMSO 溶解液 10 μL をチューブに加えて濃縮乾固 (60°C, 30 分間) した。その後、残渣に各組成比 (表 5) のヘキサン/酢酸エチル/メタノール/超純水の混合液の上層および下層をそれぞれ 0.5 mL ずつ加えて再溶解した。その上層および下層をそれぞれ 100 μL 採り、濃縮乾固 (60°C, 1 時間) した。そして、残渣にメタノール/超純水 (90/10, v/v) 混液 100 μL で再溶解して、HPLC で分析して分配係数 (K) を以下の式を用いて求めた。0.5 ≤ K ≤ 2.0 の範囲で二層溶媒系を決定した。

分配係数 (K)

$$= \frac{\text{固定相(上層)における NBx のピーク面積}}{\text{移動相(下層)における NBx のピーク面積}}$$

決定した二相溶媒系より、HSCCC による対象物質の単離精製を行った。二相溶媒の上層を固定相、下層を移動相として用いた。まず、上層をコイルカラムに充填した後、HSCCC を 1000 rpm で回転させて、下層を流速 1.0 mL で流した。次いで、色素を濃縮乾固したものを下層 5 mL で溶解して、カラムに注入した。そして、HSCCC/UV (検出波長：460 nm) にて検出されたピークをそれぞれ分取した。分取した成分をエバポレーターで濃縮乾固後、メタノール/超純水 (90/10, v/v) 混液で再溶解して、HPLC (検出波長：460 nm) で分析した。

B-7) 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る化合物を検討した。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 14)。

B. 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 15)。
- (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 Bx は波長 452~460 nm 及び 482~490 nm, NBx は波長 448~456 nm 及び 476~484 nm に極大吸収部が確認された (図 16)。

C-2) HPLC の分離分析の検討

NBx 及び Bx 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 17)。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 18)。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 19)。

ノルビアアナトー及び Bx 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 16) しかしながら、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。NBx 及び Bx 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などを考慮した結果、メタノールを用いることとした (図 20)。次いで、移動相に添加する酢酸濃度を検討した。NBx 及び Bx 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 NBx 及び Bx 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 4)。その結果、0 vol% では NBx 及び Bx 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 µm に統一し、同じ移動相を用いた。各カラムにおける NBx 及び Bx 標準品の HPLC クロマトグラムを図 21 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 NBx 及び Bx 標準品の HPLC クロマトグラムを図 22 (460 nm 検出) 及び図 23 (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 NBx 及び Bx の絶対検量線を作成し、図 24 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 25 (460 nm 検出) 及び図 26 (254 nm 検出) に示した。なお、図 26 より、不純物と NBx 及び Bx は良好な分離を示し、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。

以上の結果を踏まえ、測定を実施したところ、図 27 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¹⁹⁾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 標準品に混入する Bx により過剰評価してしまう恐れが考えられた。さらに、本標準品は、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-3) LC-MS によるスペクトル解析

アナトー色素製剤中の NBx 及び Bx 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、Bx m/z 395 ($[M+H]^+$) 及び NBx m/z 381 ($[M+H]^+$) が最も強度が高く観察された (図 28)。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 29)。その結果、NBx 及び Bx 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、NBx 及び Bx 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 30)。その結果、不純物 I 及び II は NBx、不純物 III 及び IV は Bx の分子イオンが検出したため、これら不純物は NBx 又は Bx の *trans*-/*cis*-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 NBx 又は Bx 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 31 及び図 32)。

C-4) HSCCC 単離精製

C-2 から、従来の HPLC 法による定量分析が困難と分かったため、新たな RMS を用いた定量アプローチを考案した (図 33)。HPLC の結果より、NBx に関して Bx などの不純物が存在していることが分かる。そこで、まずは NBx に対して HSCCC を用いた単離精製を実施することとした。NBx 標準品は高額であるうえ、溶解性に優れない。そこで、本研究では、食品添加物の水溶性アナトー色素を用いることとした。初めに、NBx 及び不純物質の分配係数を求めた結果、*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/超純水 (8/2/5/5, V/V/V/V) 混合溶液を採用した。次いで、採用した二層溶媒を用いた HSCCC 分析の結果を示した。またこのときの保持率は 86% であり、分析時間は 100 分で行った。図 34 より、明確なピークが見られた画分を分取した。分取した画分を HPLC (検出波長：460 nm) で分析を行った (図 35)。

C-5) SR デザイン

C-4 から得た 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、NBx には *n*-C₉、Bx には *n*-C₁₁ を用いることとした (図 36)。次に、NBx、Bx、*n*-C₉、*n*-C₁₁ の検量線を作成した結果、相関係数 0.997 以上となった (図 37)。次に、qNMR で純度を算出し、RMS を求めることが可能となった。

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 分析法に関する開発検討を実施した。その結果、いずれも良好な結果を得ることができた。しかしながら、以下の検討項目が今後必要と考える。

- *trans*-NBx 及び Bx の合成と純度評価
- SR 及び分析対象の純度評価と RMS 算出
- SR の大量合成と供給

以上を解決することで、正確かつ信頼性のあるアナトー色素の分離分析法が構築できると考える。

E. 参考文献

- 18) 第9版食品添加物公定書, 厚生労働省 (2017).
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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)

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) 中森洋紀, 布目真梨, 辻巖一郎, 出水庸介, 増本直子, 杉本直樹, 井之上浩一: デザインSR-HPLC法によるアナトー色素の定量評価の構築. 日本食品衛生学会第118回学術講演会(2022.11.10-11) [長崎].

2-1. 論文発表等

特になし

2-2. 総説

なし

2-3. 単行本

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

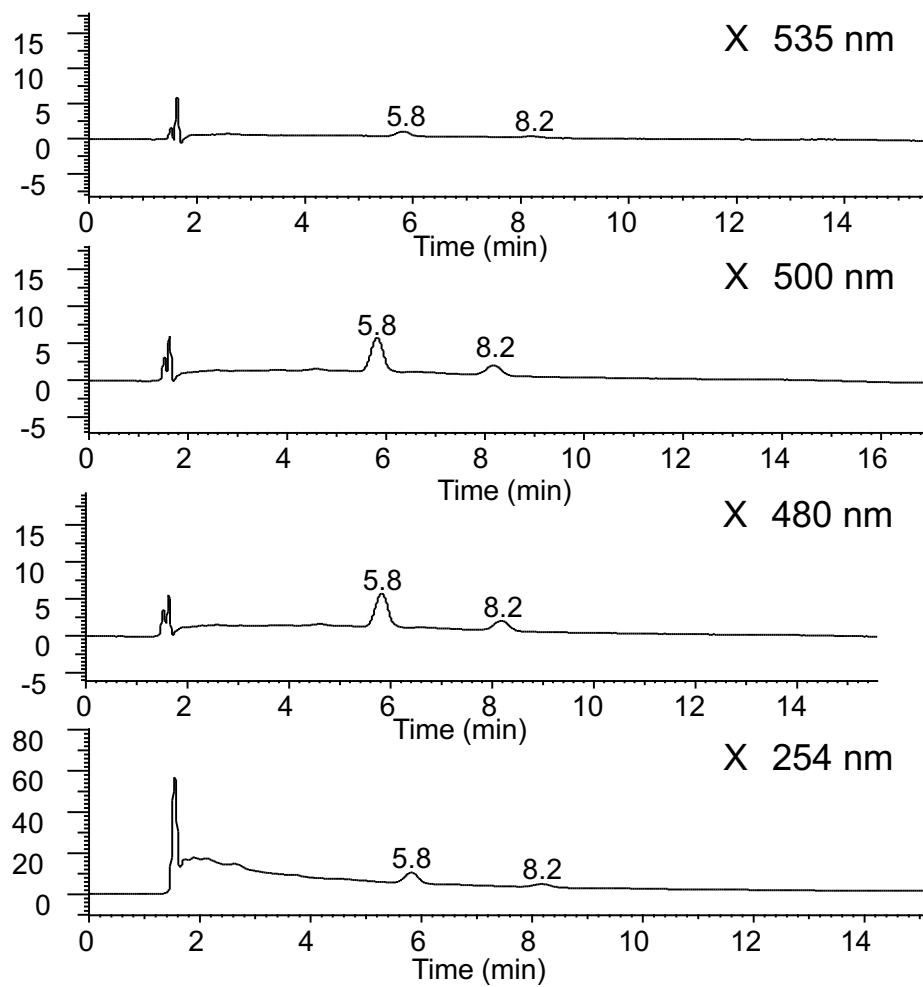


図1 シタン色素の HPLC クロマトグラム (検出波長)

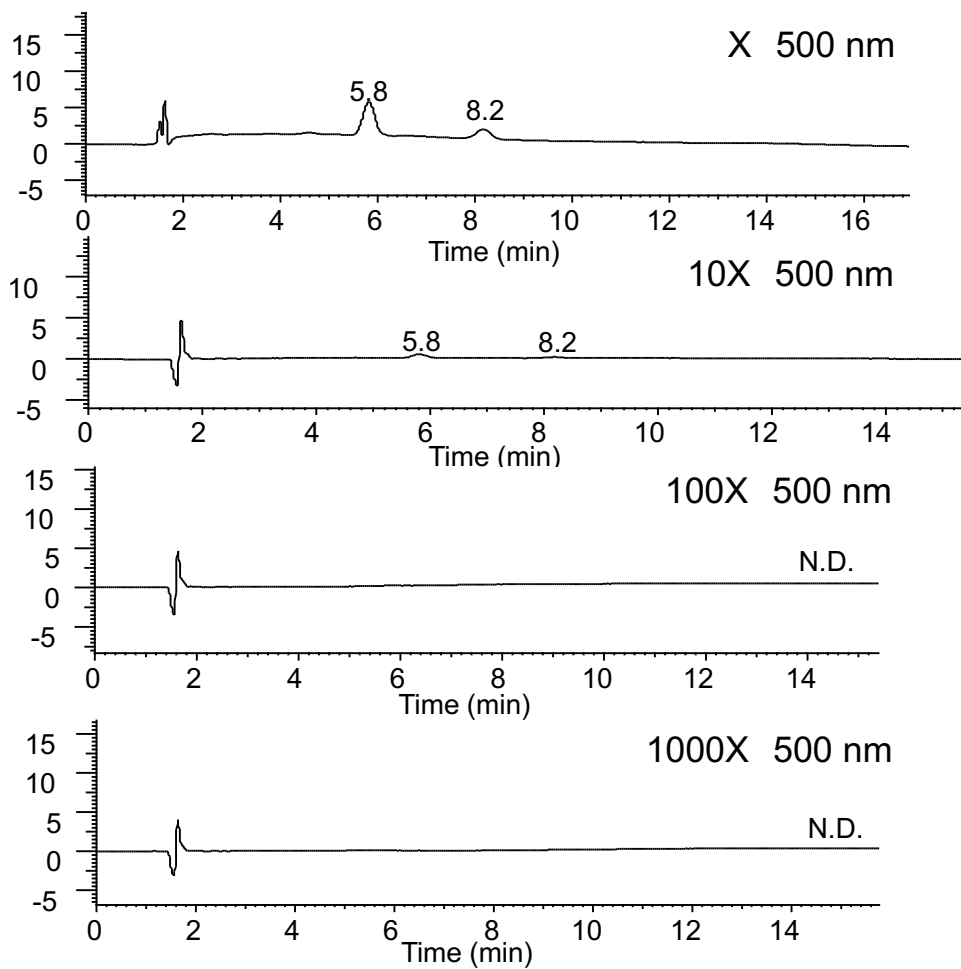


図2 シタン色素の HPLC クロマトグラム (試料濃度)

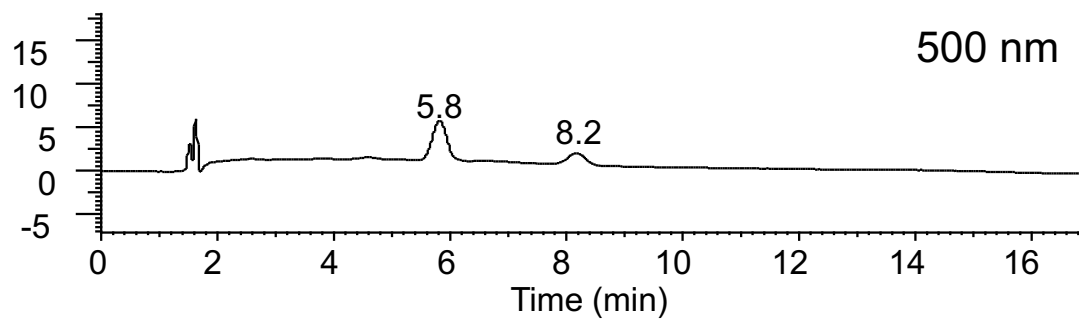


図3 シタン色素の HPLC クロマトグラム

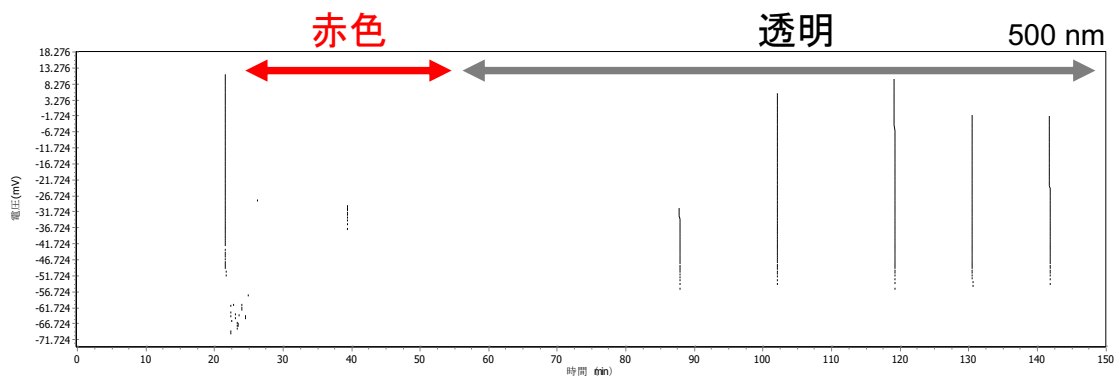


図4 シタン色素の HSCCC クロマトグラム

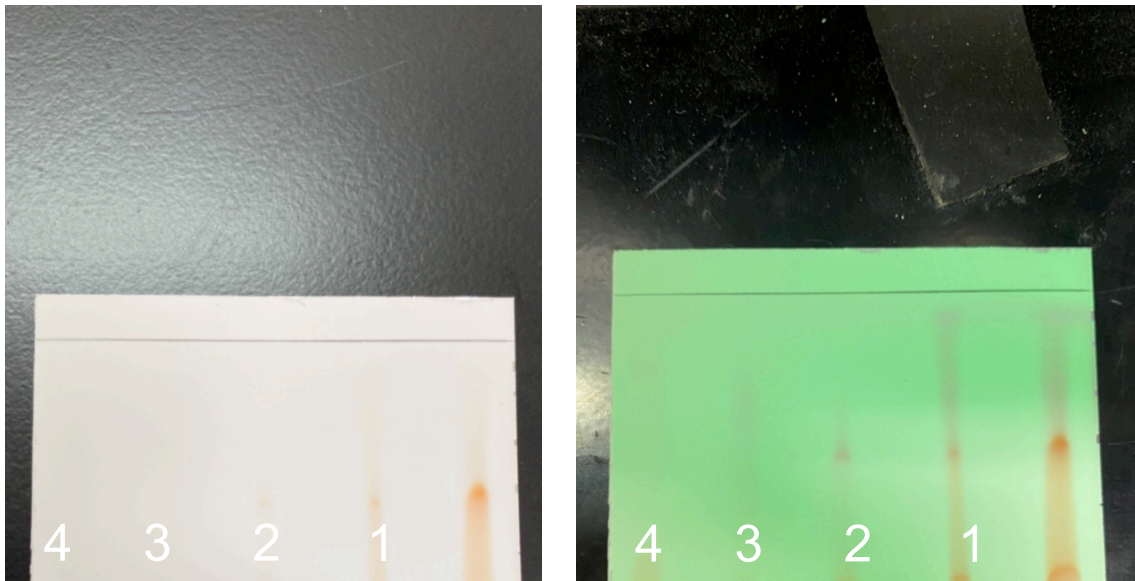


図5 TLC 展開結果 (左 : 自然光, 右 : 254 nm)
 1 : シタン色素 2 : Fr.1 3 : SA 4 : SB

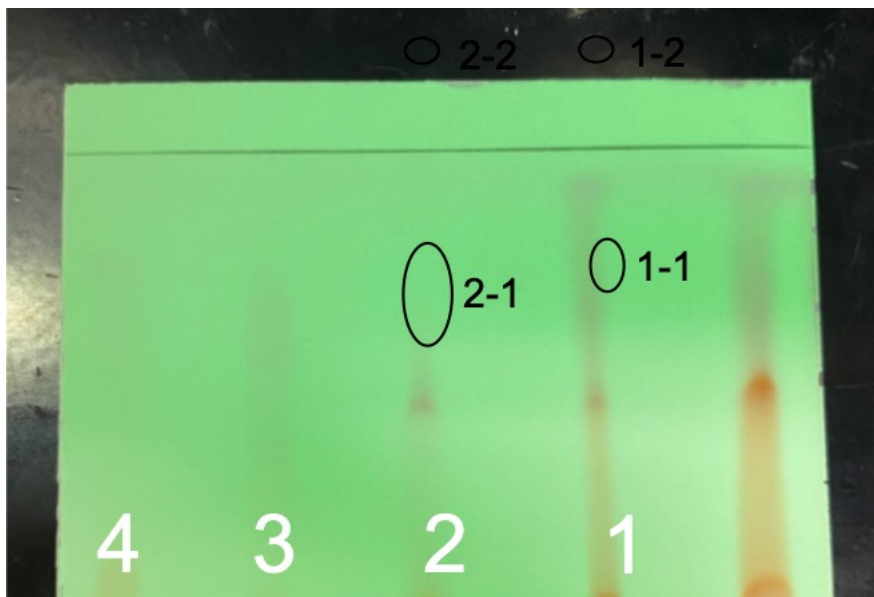


図6 スポット番号

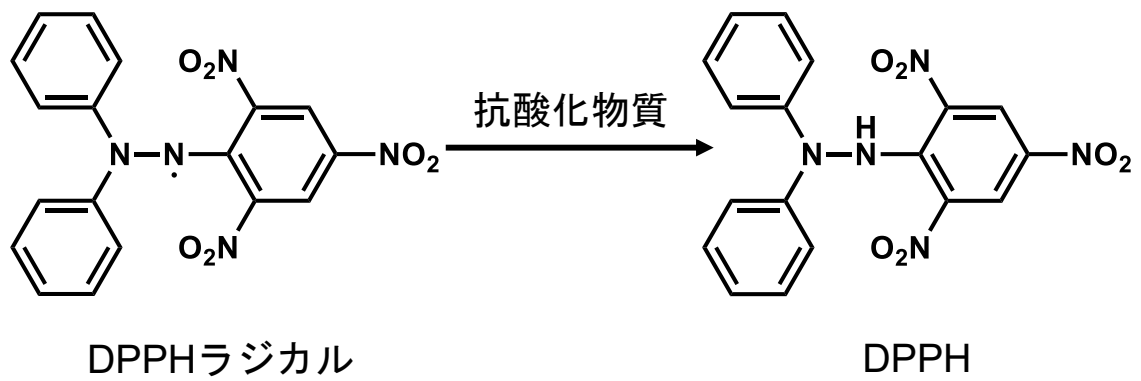
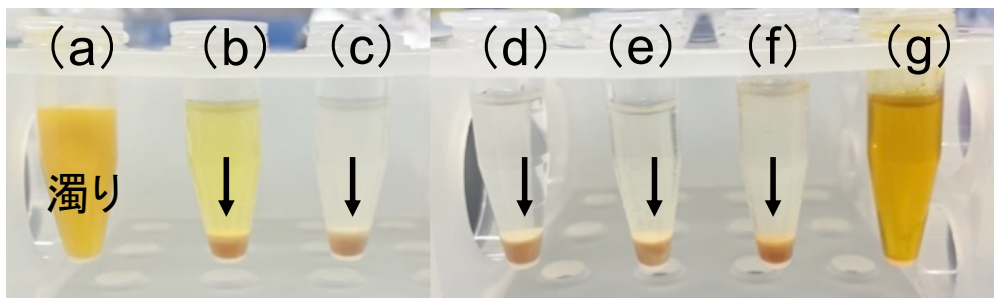
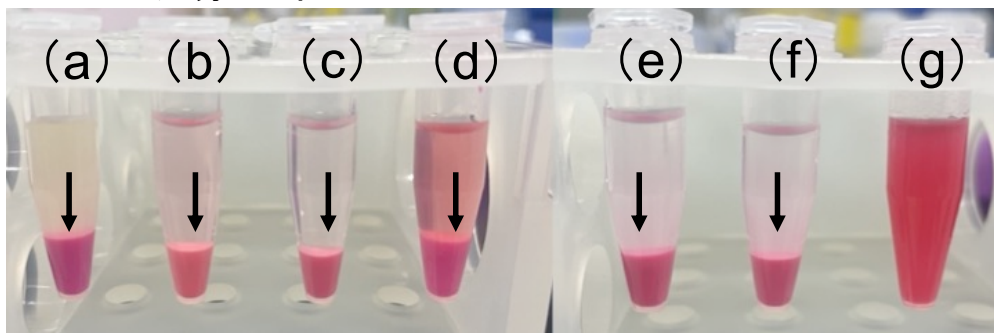


図 7. DPPH 法の反応式

マリーゴールド色素



ベニバナ赤色素



クチナシ黄色素

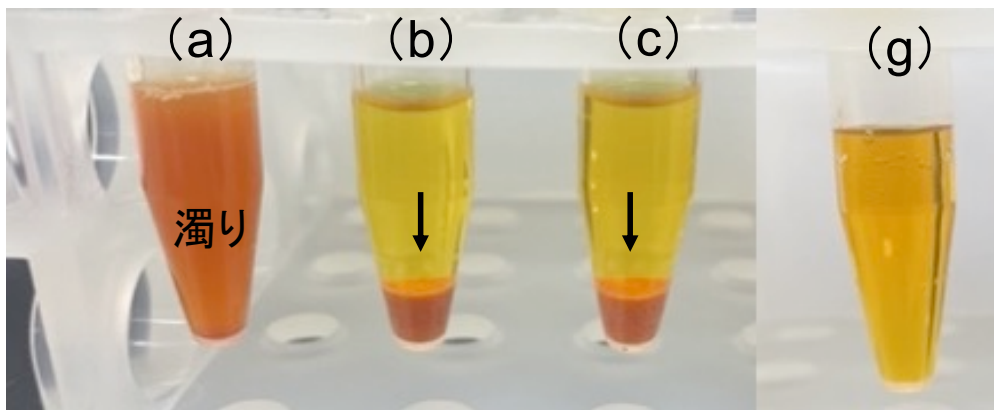


図 8. マリーゴールド色素, ベニバナ赤色素及びクチナシ黄色素の溶解試験
(a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d) ジクロロメタン, (e) アセトン,
(f) アセトニトリル, (g) DMSO

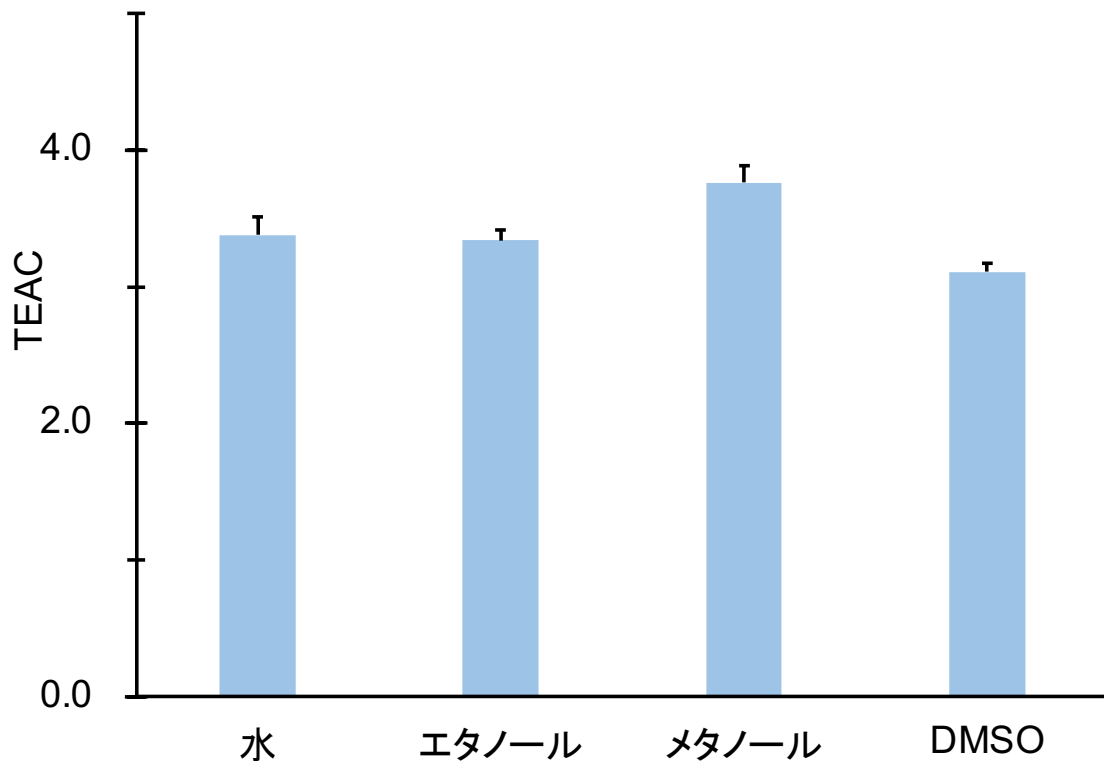
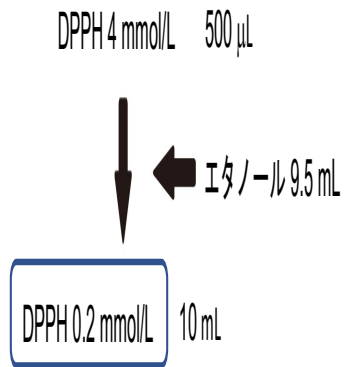


図9. 各溶媒を用いて溶解及び希釈した際の没食子酸の TEAC (n=3)

DPPH



Trolox

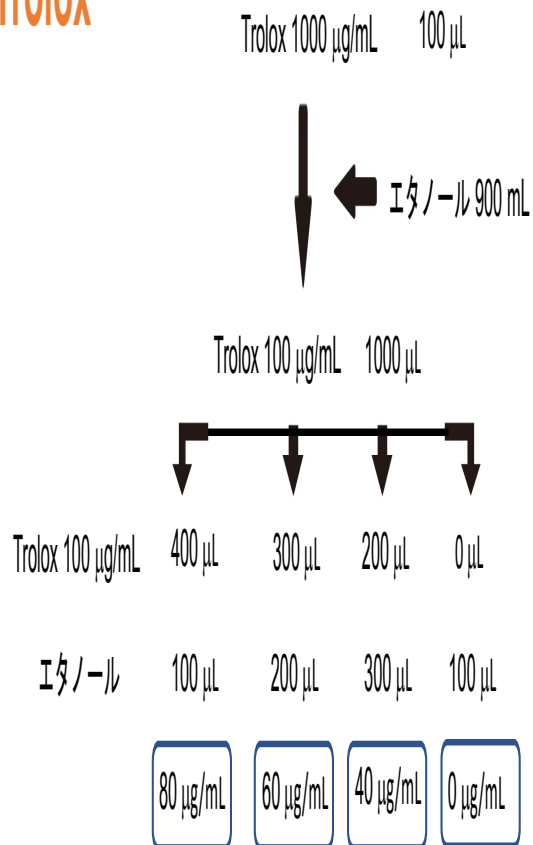


図 10. 実験者が DPPH 法を実施する際に渡したマニュアル

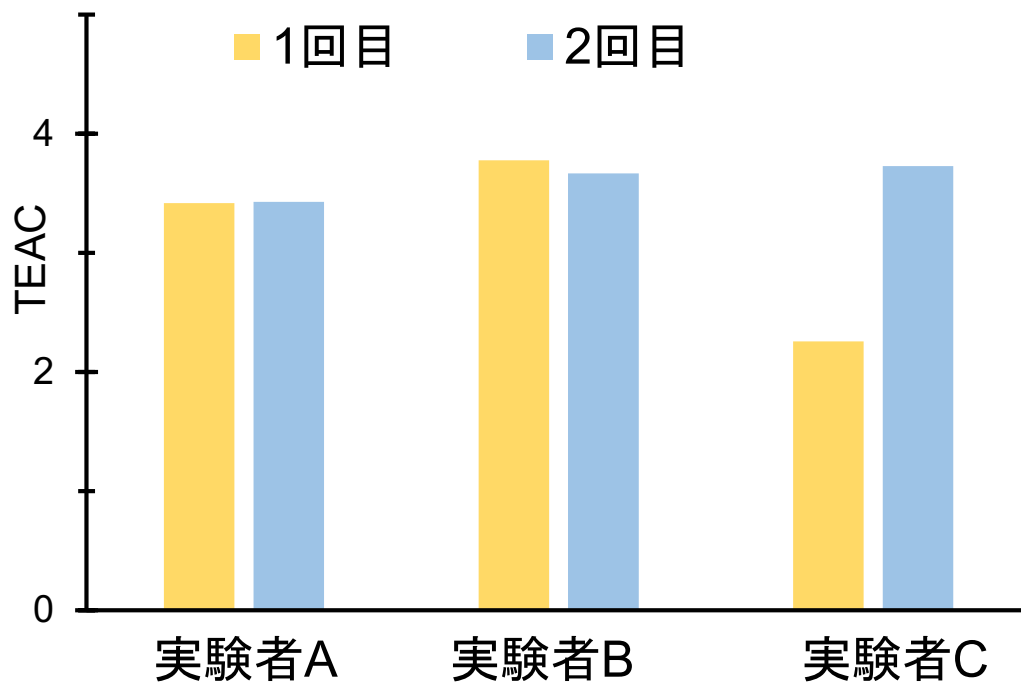
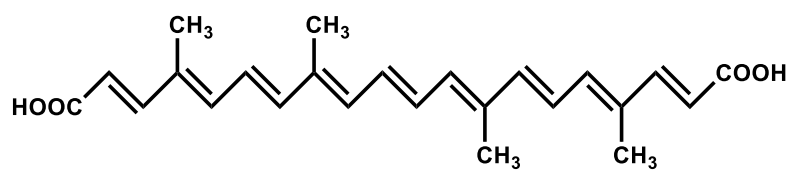
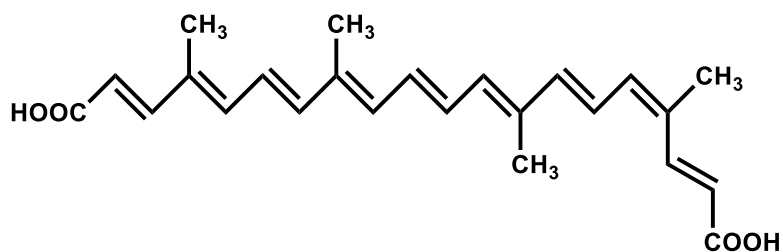


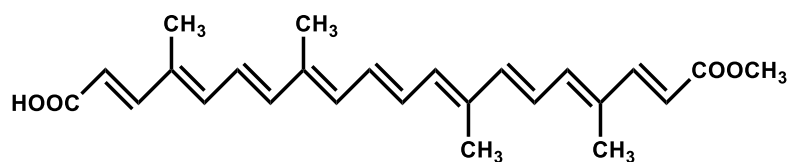
図 11. 実験者 A~C における没食子酸の TEAC
(黄色 : 1 回目, 青 : 2 回目)



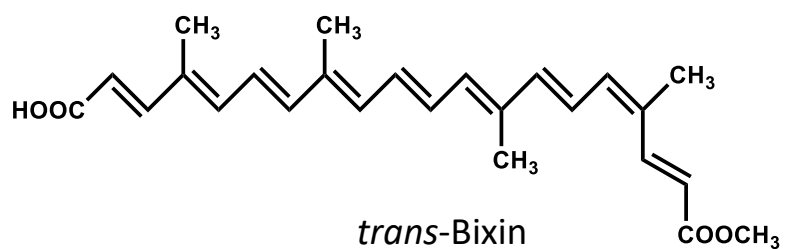
cis-Norbixin



trans-Norbixin



cis-Bixin



trans-Bixin

図 12. 分析対象物質の構造式 (幾何異性体)

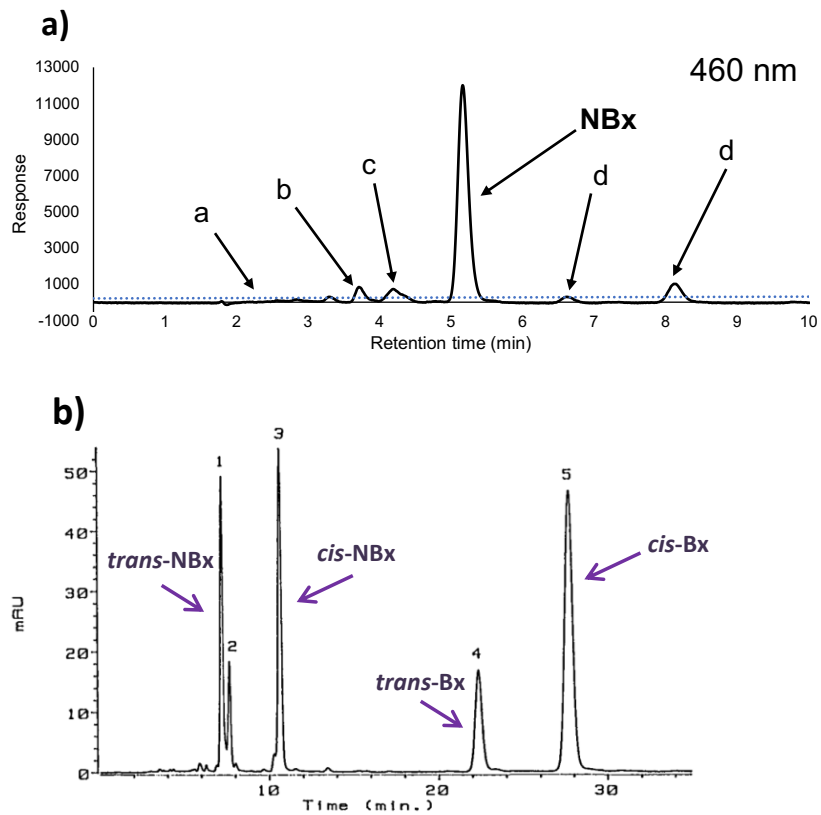


図 13. 幾何異性体 NBx 及び Bx の HPLC クロマトグラム

a) 令和 3 年度報告

b) 既報¹⁹⁾の報告

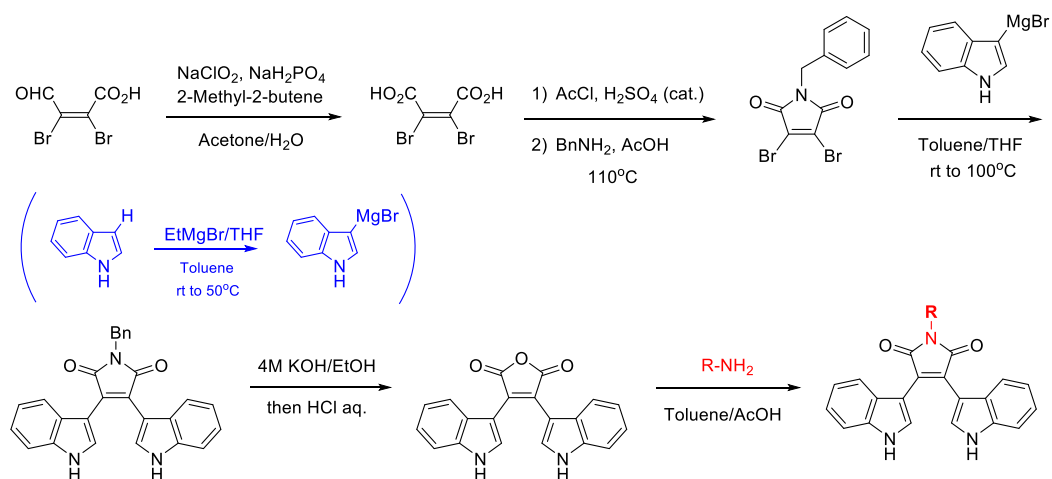


図 14. SR デザインの合成経路

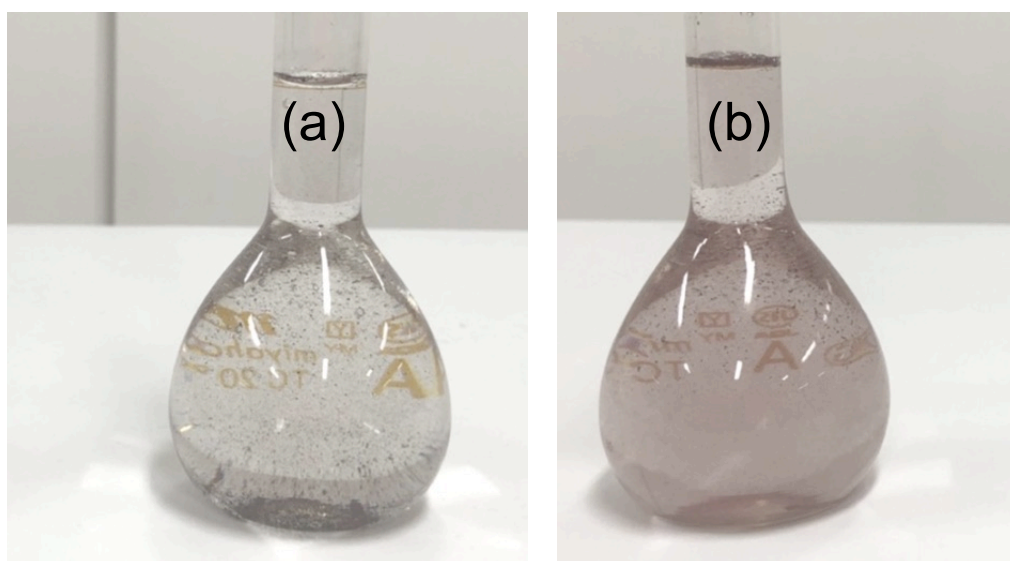


図 15. A 社製 NBx および Bx の確認試験 (1)

(a) NBx, (b) Bx

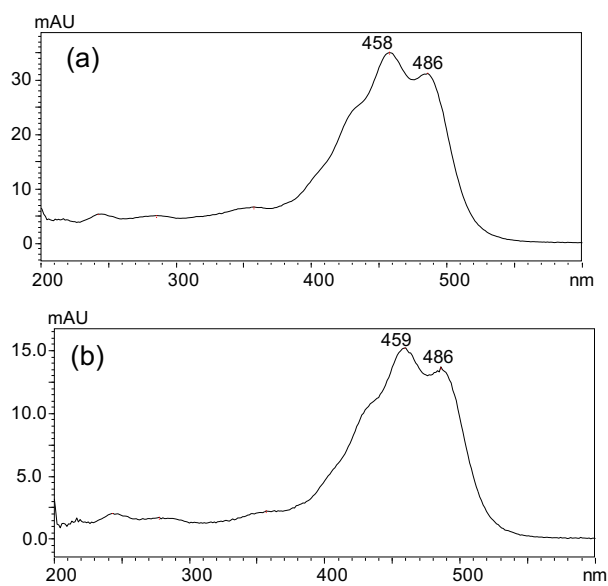


図 16. A 社製 NBx および Bx の確認試験 (2)

(a) NBx, (b) Bx

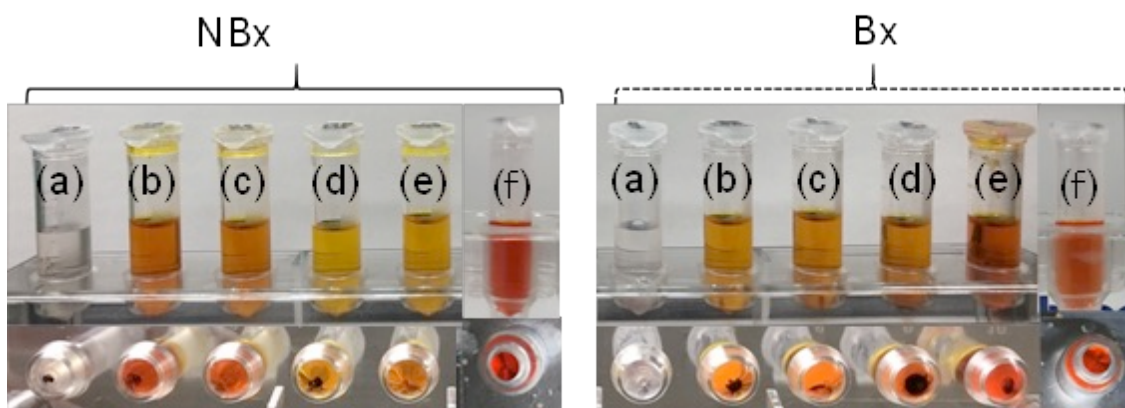


図 17. NBx 及び Bx 標準品の溶解性試験

(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

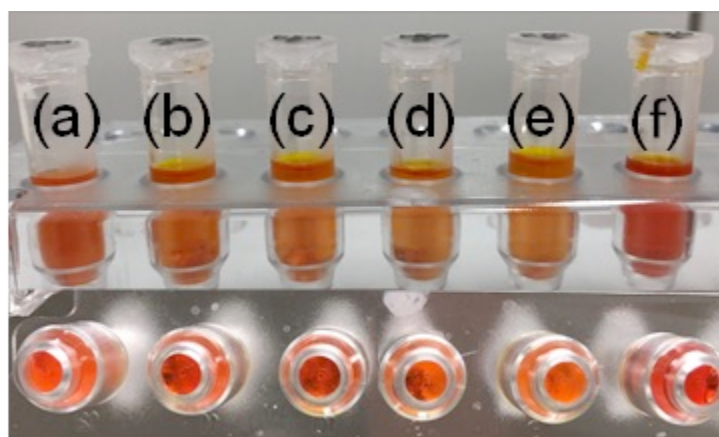


図 18. 水分散性アナトー（アンナット EXG）の溶解性試験
 (a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール, (d)アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

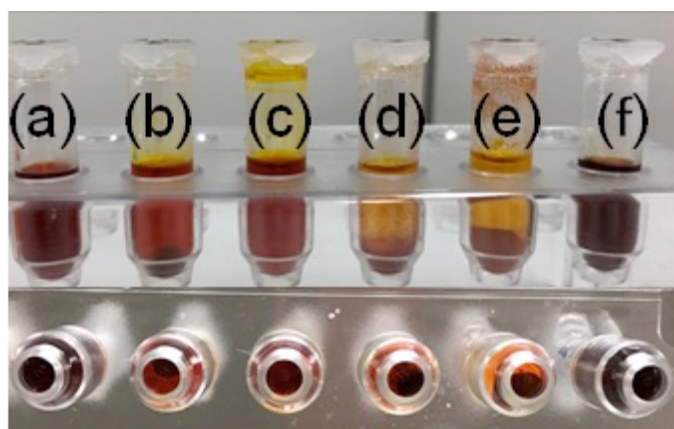


図 19. 水溶性アナトー（アンナット A-200）の溶解性試験
 (a) 水, (b) エタノール, (c) メタノール
 (d)アセトニトリル, (e) アセトン, (f) DMSO

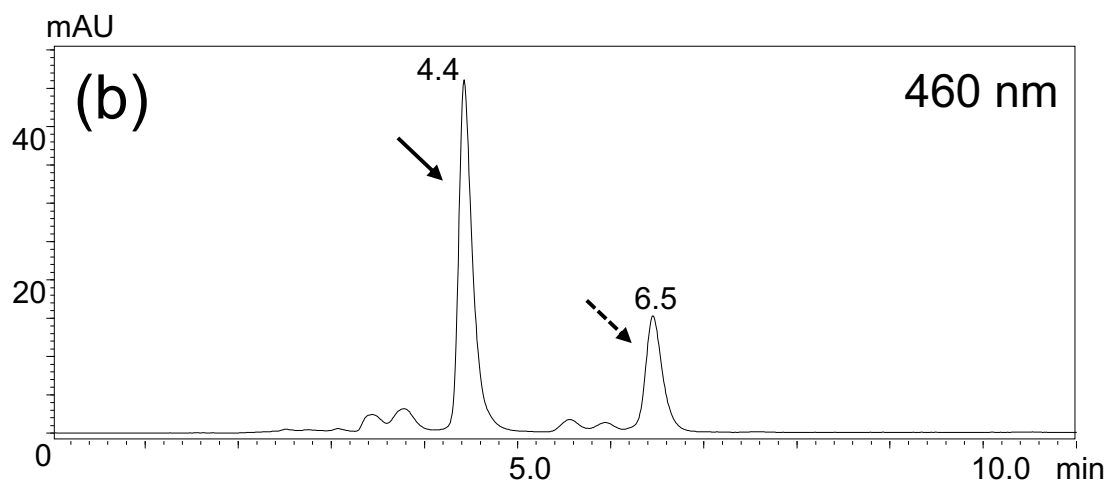
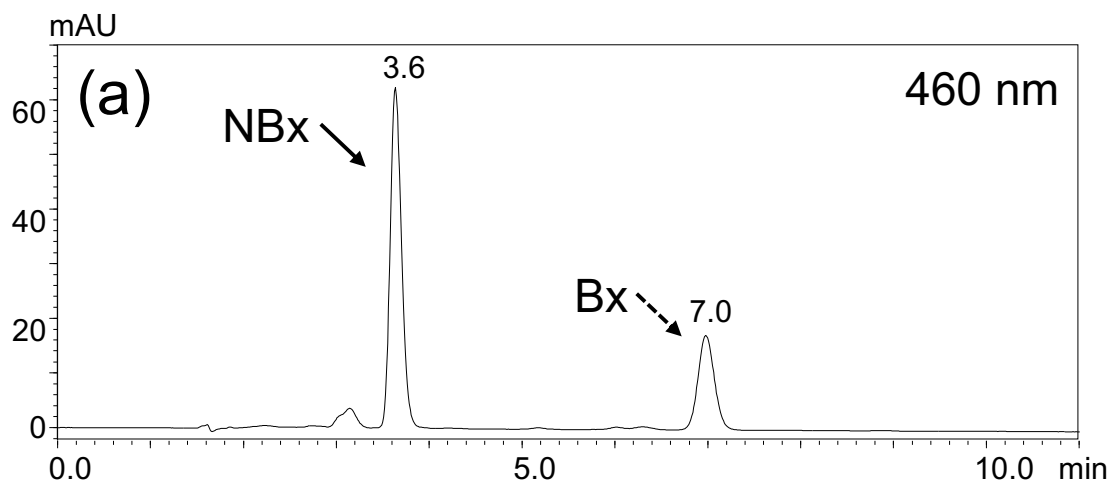


図 20. NBx 及び Bx 混合標準品を用いた移動相溶媒の検討
(a) 0.1 vol% 酢酸アセトニトリル/0.1 vol% 酢酸水溶液 (80/20, V/V)
(b) 0.1 vol% 酢酸メタノール/0.1 vol% 酢酸水溶液 (90/10, V/V)

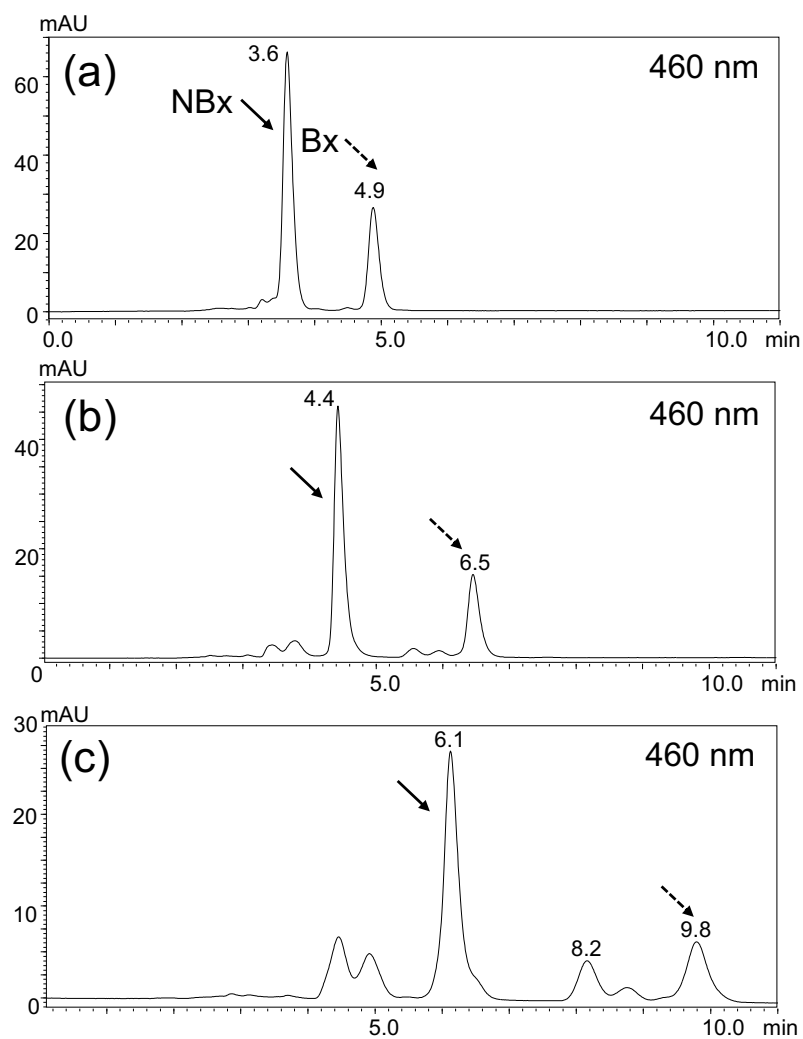


図 21. ノルビキシン及びビキシン混合標準品を用いた分析カラムの検討

(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)

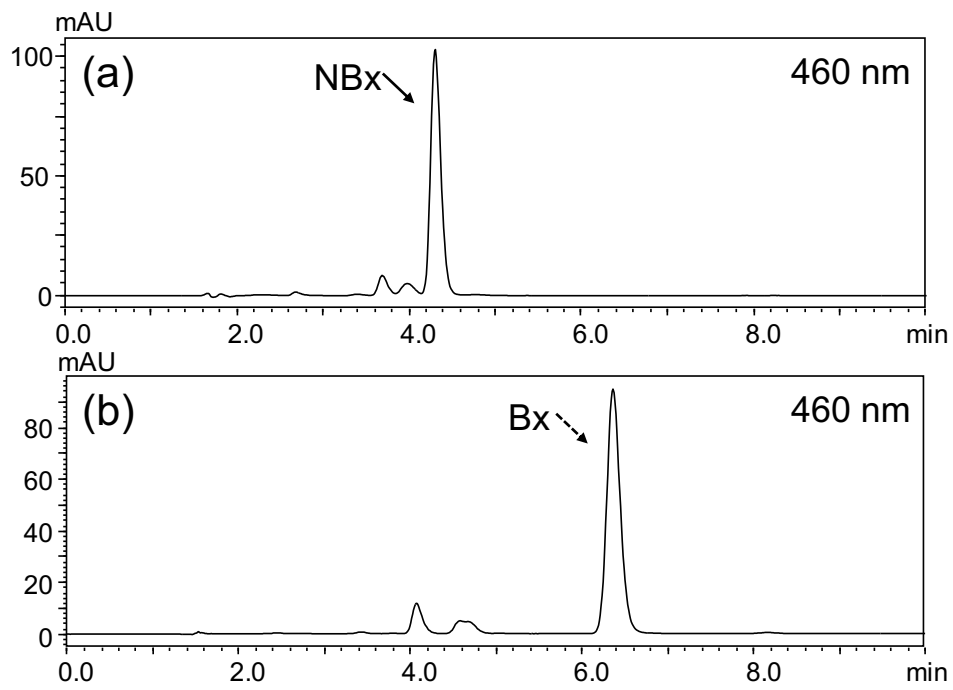


図 22. NBx 又は Bx 標準品の HPLC クロマトグラム (検出波長 460 nm)

(a) NBx, (b) Bx

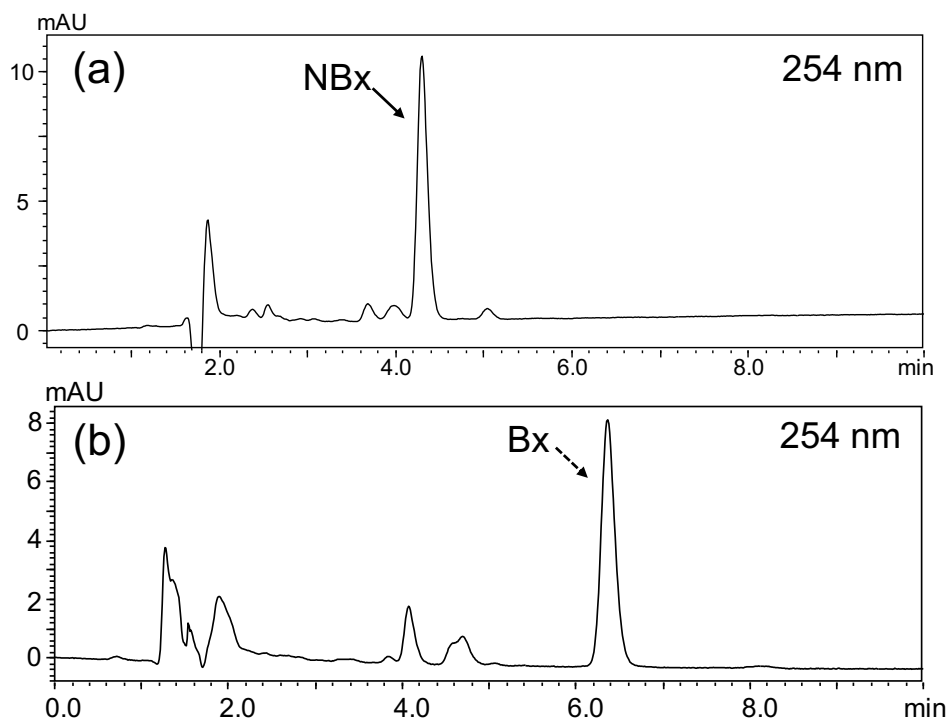


図 23. NBx 又は Bx 標準品の HPLC クロマトグラム (検出波長 254 nm)

(a) ノルビキシシシ, (b) ビキシシシ

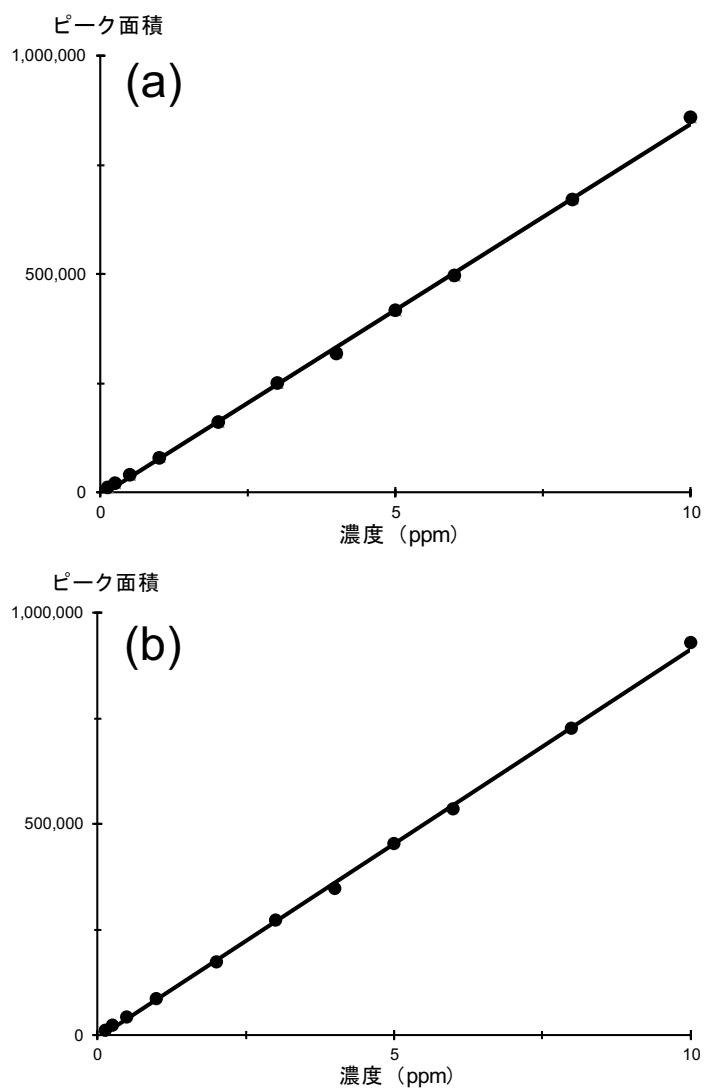


図 24. ノルビキシン及びビキシンの絶対検量線 (LOQ~10 ppm)
 (a)ノルビキシン ($y = 085108x - 7656$, 相関係数 0.999, LOQ = 0.063 ppm)
 (b) ビキシン ($y = 85108x - 76556$, 相関係数 0.999, LOQ = 0.063 ppm)

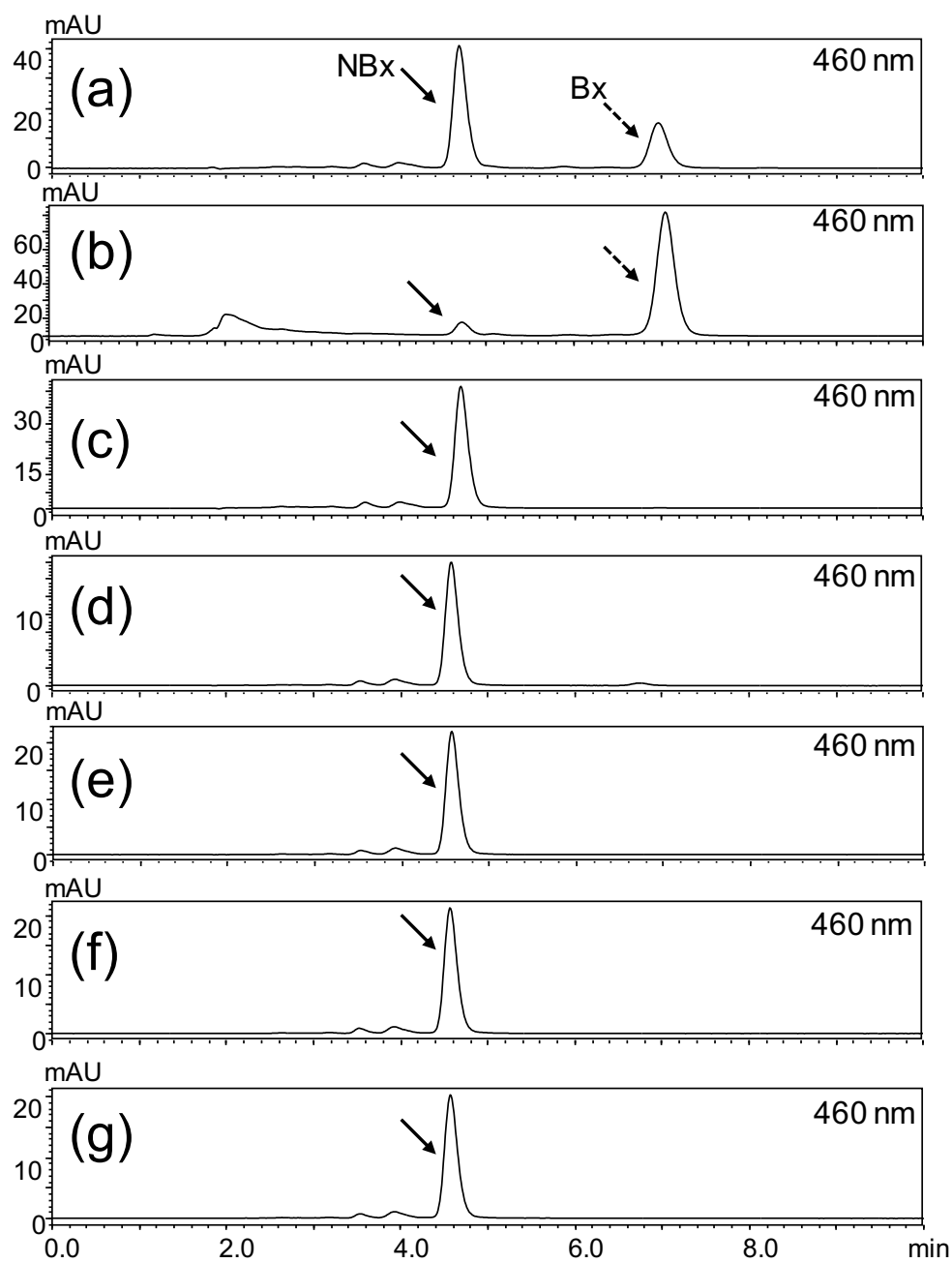


図 25. アナトー色素製剤の HPLC クロマトグラム (検出波長 460 nm)
 (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品 (b) Bx (A 社製) (c) NBx (A 社製)
 (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製)
 (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

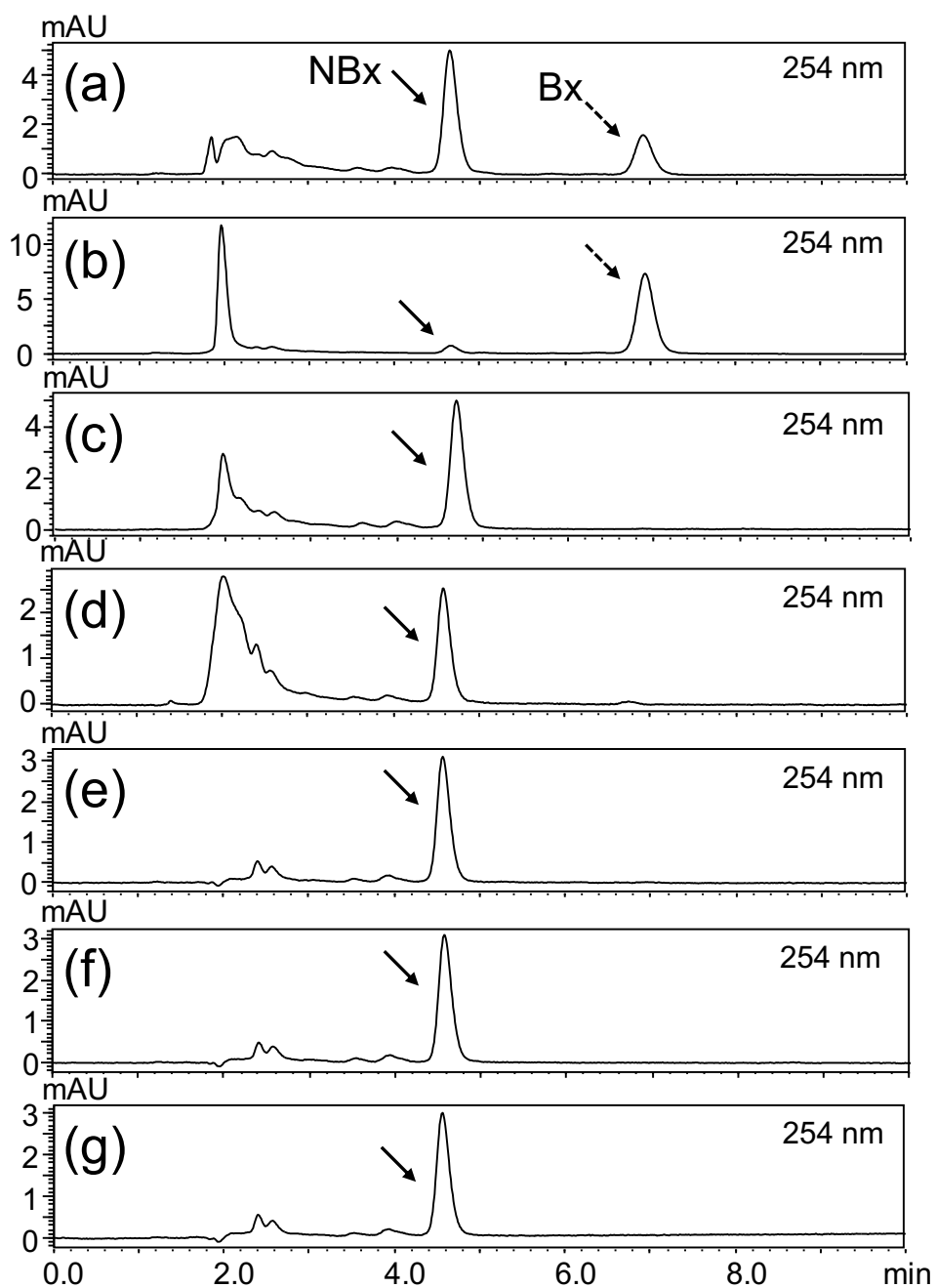


図 26. アナトー色素製剤の HPLC クロマトグラム (検出波長 254 nm)
 (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品 (b) Bx (A 社製) (c) Nbx (A 社製)
 (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製)
 (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

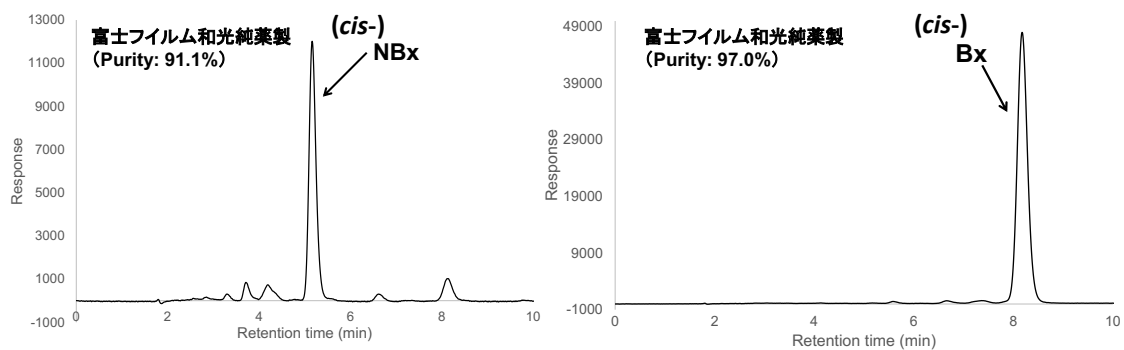


図 27. NBx 及び Bx 標準溶液の HPLC クロマトグラム

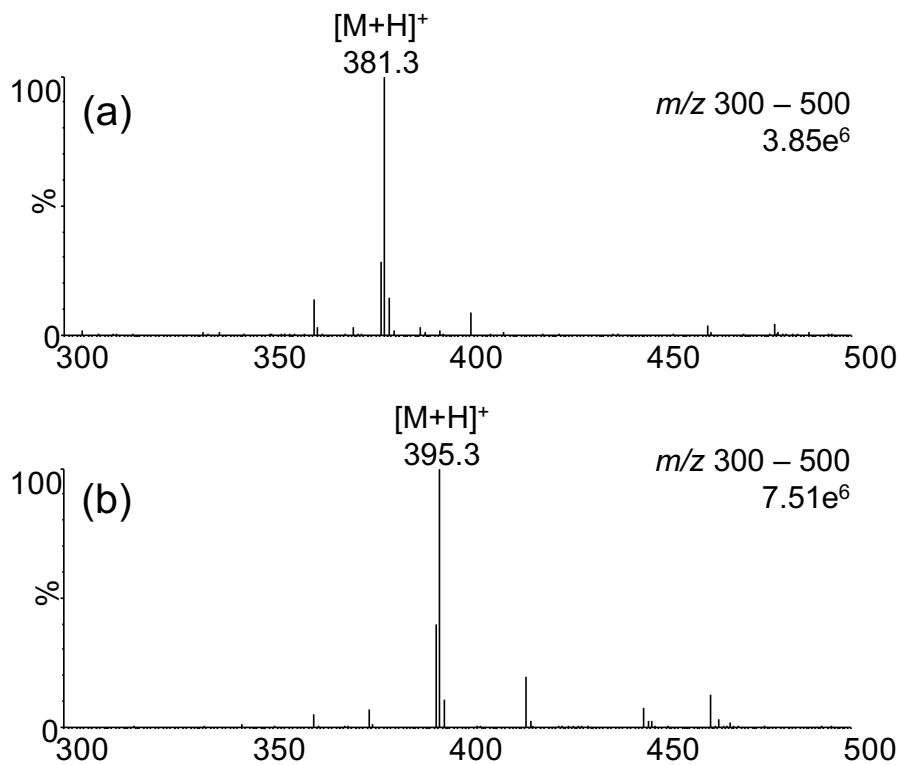


図 28. 標準品の MS スペクトル

(a) NBx, (b) Bx

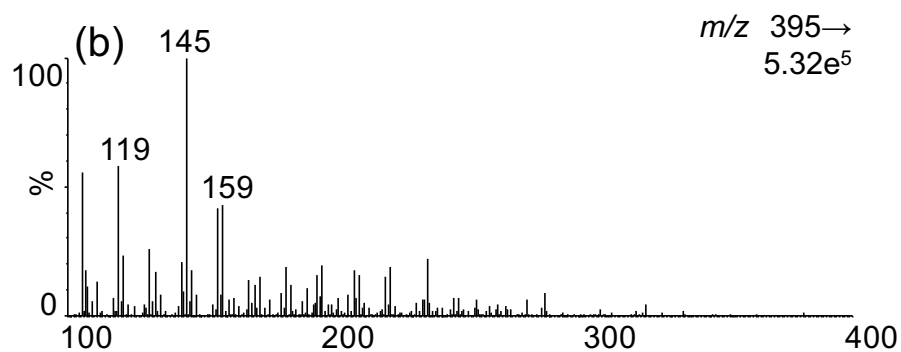
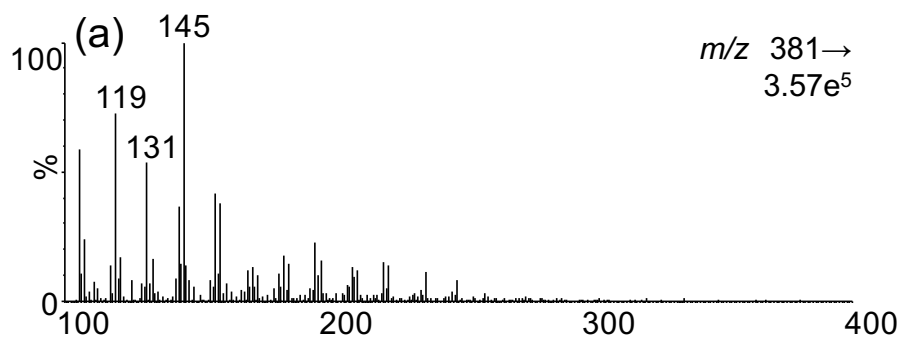


図 29.標準品の MS/MS スペクトル

(a) NBx, (b) Bx

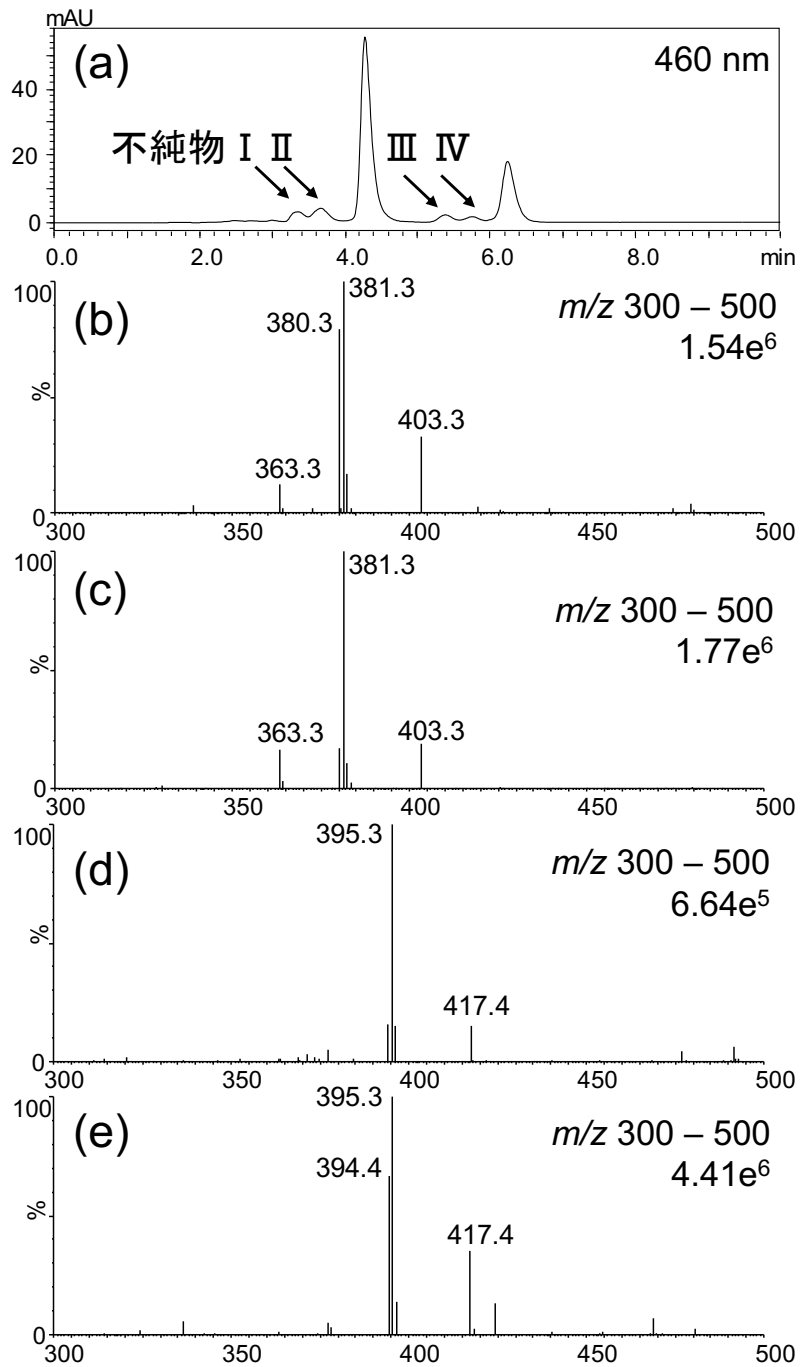


図 30. NBx 及び Bx 混合標準品の HPLC クロマトグラム
 (検出波長 460 nm) 及び不純物ピークの MS スペクトル
 (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品
 (b) 不純物I, (c) 不純物II, (d) 不純物III, (e) 不純物IV

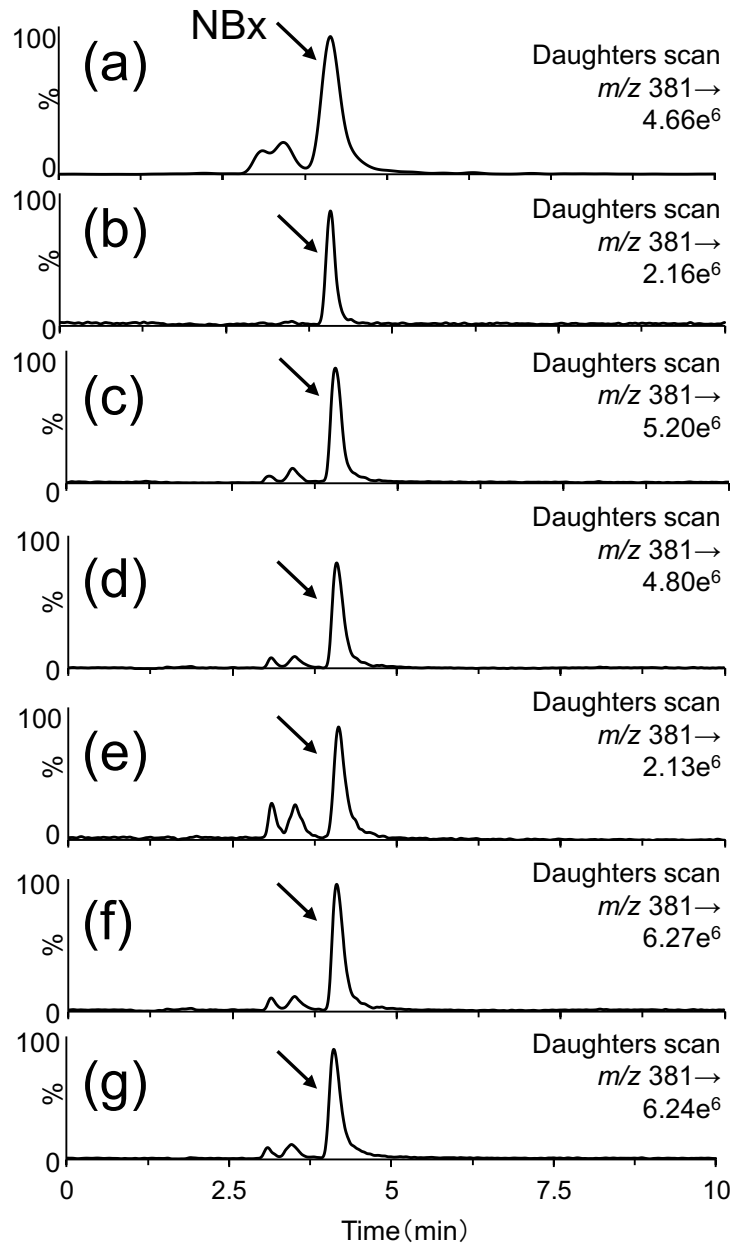


図 31. アナトー色素製剤を用いた NBx の Daughters scan

- (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品 (b) Bx (A 社製) (c) NBx (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)

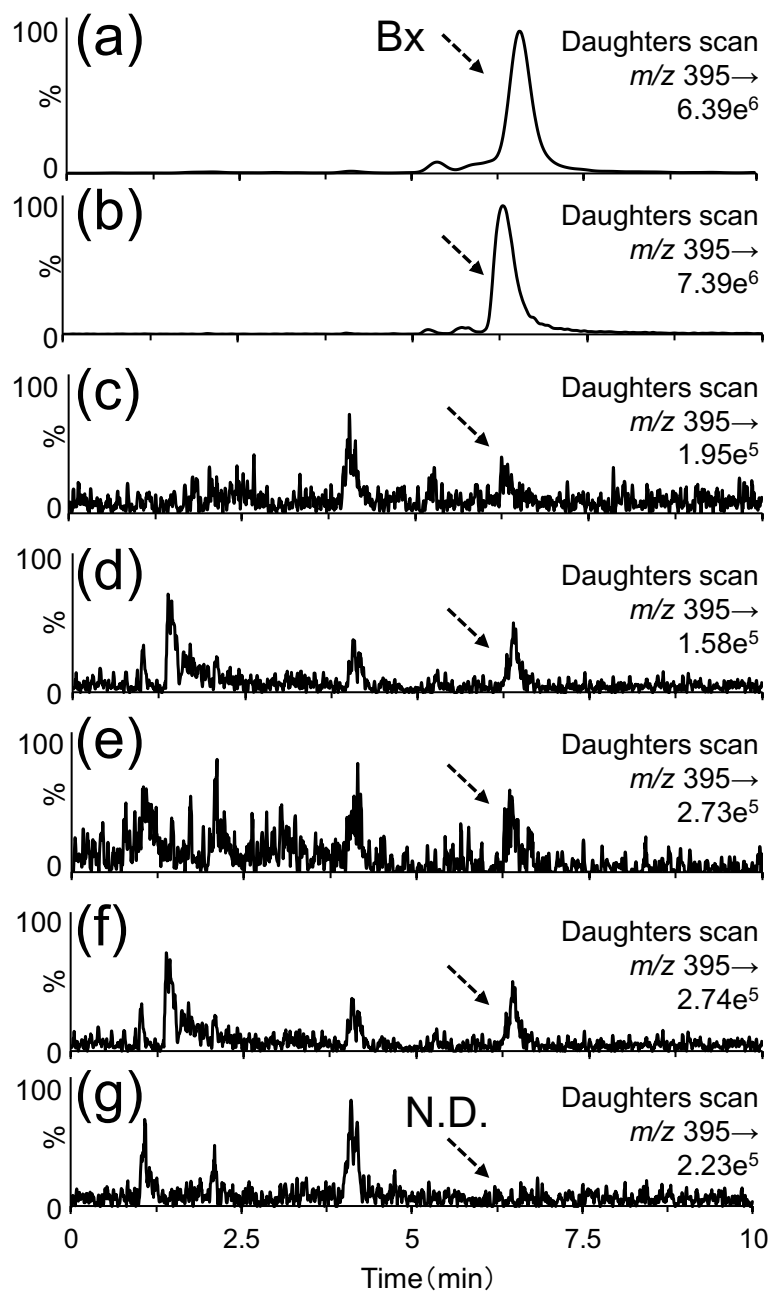


図 32. アナトー色素製剤を用いた NBx の Daughters scan
 (a) 10 ppm NBx 及び Bx 混合標準品 (b) Bx (A 社製) (c) NBx (A 社製)
 (d) アナトー色素 (B 社製) (e) アナトー色素 (C 社製)
 (f) アナトー色素 (D 社製) (g) アナトー色素 (E 社製)

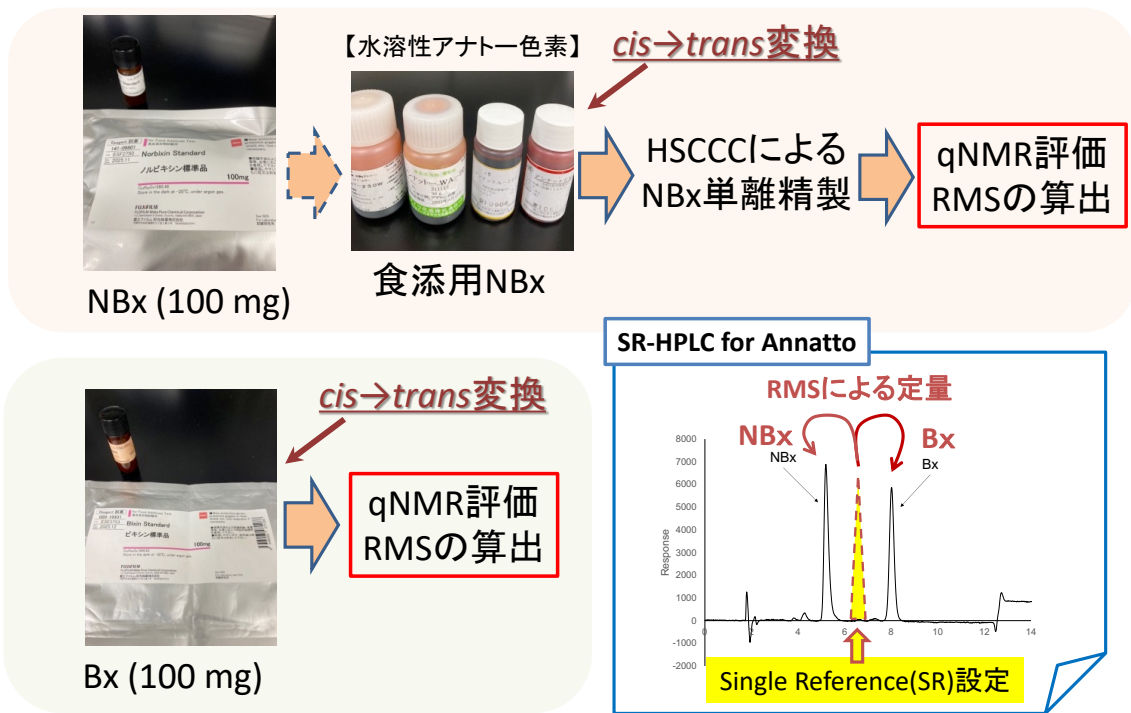


図 33. SR-HPLC によるアナトー色素の分析アプローチ

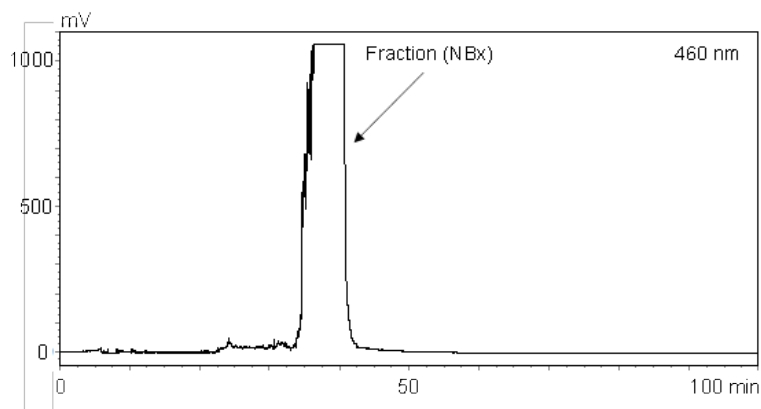


図 34. NBx の HSCCC クロマトグラム

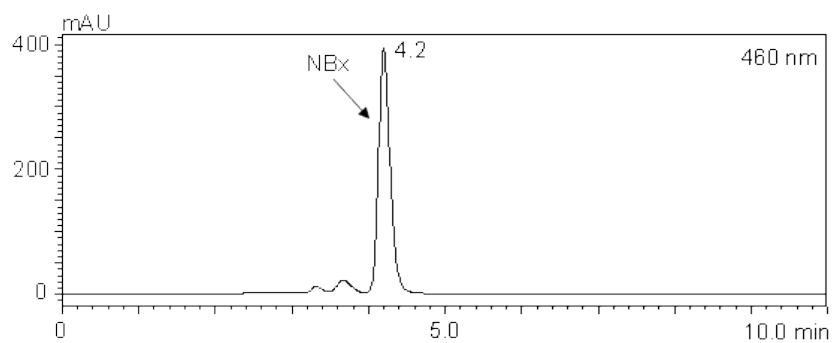


図 35. HSCCC 分画 (NBx) の HPLC クロマトグラム

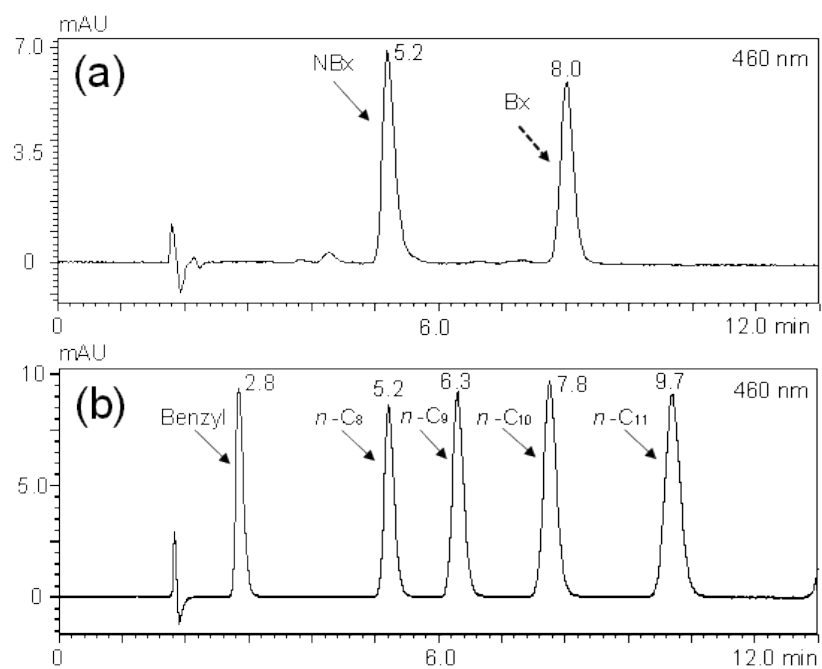


図 36. NBx/Bx 混合溶液及び SR 候補の HPLC クロマトグラム

(a) NBx/Bx 混合溶液

(b) SR 候補の混合溶液

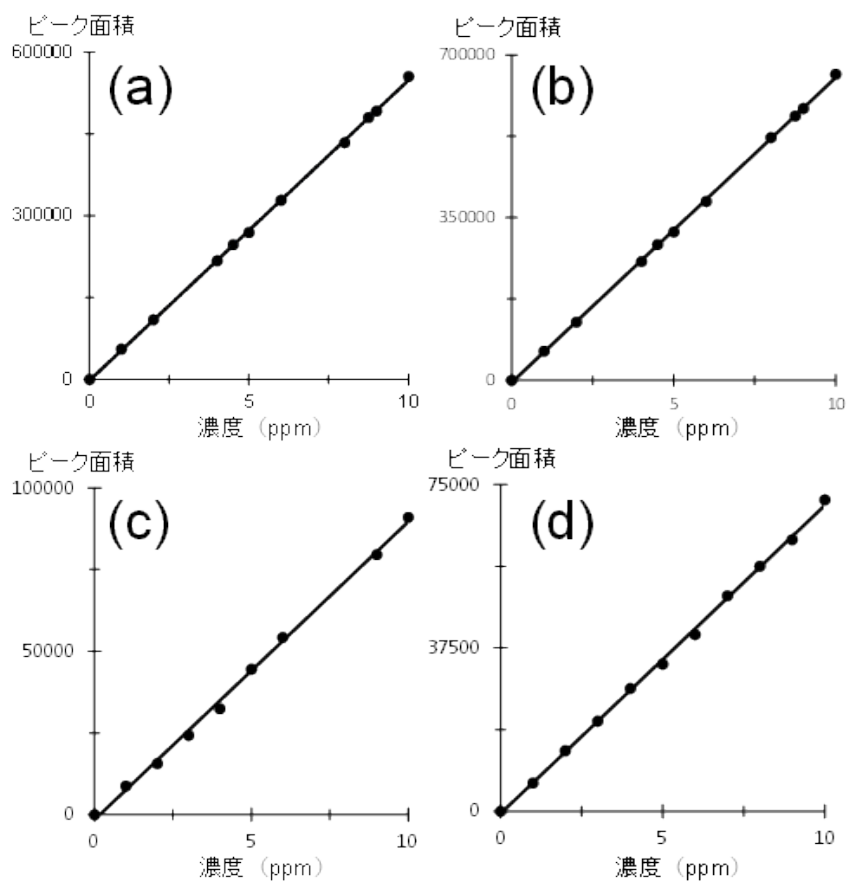


図 37. NB_x, B_x,及び SR の検量線

(a) NB_x ($y = 54755x$, 相関係数 0.999)

(b) B_x ($y = 64989x$, 相関係数 0.999)

(c) n-C₉ ($y = 8893.3x$, 相関係数 0.997)

(b) n-C₁₁ ($y = 6995.9x$, 相関係数 0.999)

表 1 Rf 値

サンプル名	a (cm)	b (cm)	Rf値(b/a)
1-1	4.05	1.00	0.25
1-2		2.85	0.70
1-3		3.00	0.74
1-4		3.35	0.82
1-5		3.85	0.95
2-1	4.10	0.90	0.22
2-2		2.90	0.71
3	4.10	2.95	0.72
4	4.10	3.40	0.83

表 2. 抗酸化能測定キットの各試薬を調製した場合の TEAC (n=3)

	試薬類			TEAC±S.D.
	トロロックス溶液	DPPH溶液	0.1M Tris-HCl緩衝液	
①	キット	キット	キット	3.42 ± 0.04
②	調製した試料	キット	キット	3.73 ± 0.05
③	キット	調製した試料	キット	3.63 ± 0.18
④	キット	キット	調製した試料	3.56 ± 0.09
⑤	調製した試料	調製した試料	調製した試料	3.67 ± 0.21

表 3. DPPH 法を用いた各既存添加物の TEAC (n=3)

試料	IC ₅₀ (μg/mL)	TEAC
没食子酸	18.6	3.70
チャ抽出物	24.8	2.78
ターメリック色素	4138	0.016
赤キャベツ色素	4903	0.013
マリーゴールド色素	-	-
クチナシ黄色素	-	-
ベニバナ赤色素	-	-

表 4. 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)

表 5. HSCCC の 2 相溶媒の検討項目

	n-ヘキサン	酢酸エチル	メタノール	超純水
↑ 無極性	10	0	5	5
	9	1	5	5
	8	2	5	5
	7	3	5	5
	6	4	5	5
	5	5	5	5
	4	5	4	5
	3	5	3	5
	2	5	2	5
	1	5	1	5
↓ 高極性	0	5	0	5