

**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 (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。昨年に引き続き、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、本年度は、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*-C<sub>9</sub>及び*n*-C<sub>11</sub>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

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<sup>1)</sup>。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性がある (図1)<sup>2)</sup>。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2) 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、類似した極大吸収波長をもつものをデザインすることが望まれる<sup>3,4)</sup>。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

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）、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。

### 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) 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-4) 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 1）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 の範囲で二相溶媒系を決定した。

分配係数（K）

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

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-5) 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 3)。

## 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<sup>2)</sup>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-2) HSCCC 単離精製

C-1 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 5)。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一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 6 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 7)。

### C-3) SR デザイン

C-2 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*-C<sub>9</sub>、Bx には *n*-C<sub>11</sub> を用いることとした (図 8)。次に、NBx、Bx、*n*-C<sub>9</sub>、*n*-C<sub>11</sub> の検量線を作成した結果、相関係数 0.997 以上となった (図 9)。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、アナト一色素における 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一色素の分離分析法が構築できると考える。

## E. 参考文献

- 1) 第9版食品添加物公定書, 厚生労働省 (2017).
- 2) 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)
- 3) 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)

- 4) 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) 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

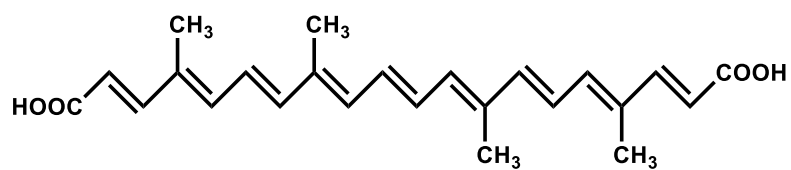
なし

### 2-3. 単行本

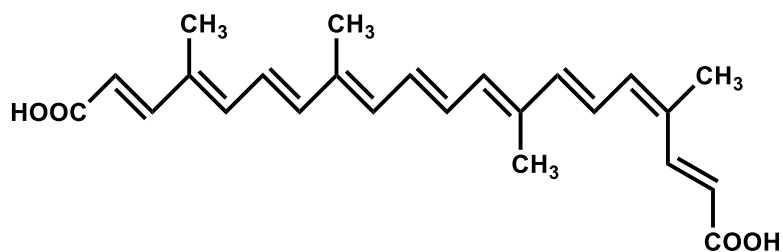
なし

## G. 知的財産権の出願. 登録状況

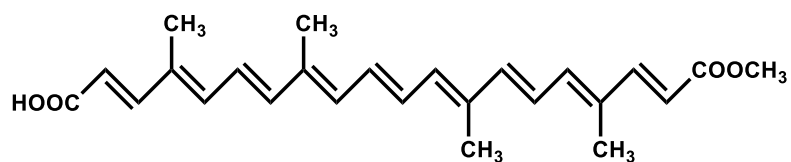
なし



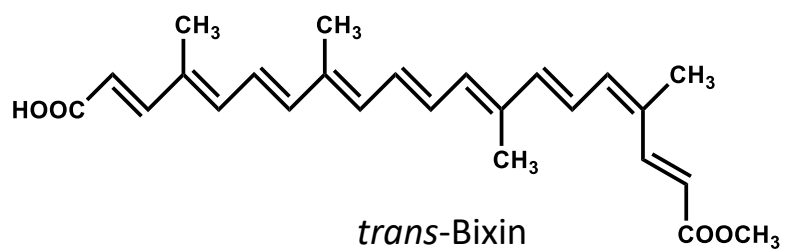
*cis*-Norbixin



*trans*-Norbixin



*cis*-Bixin



*trans*-Bixin

図 1. 分析対象物質の構造式 (幾何異性体)

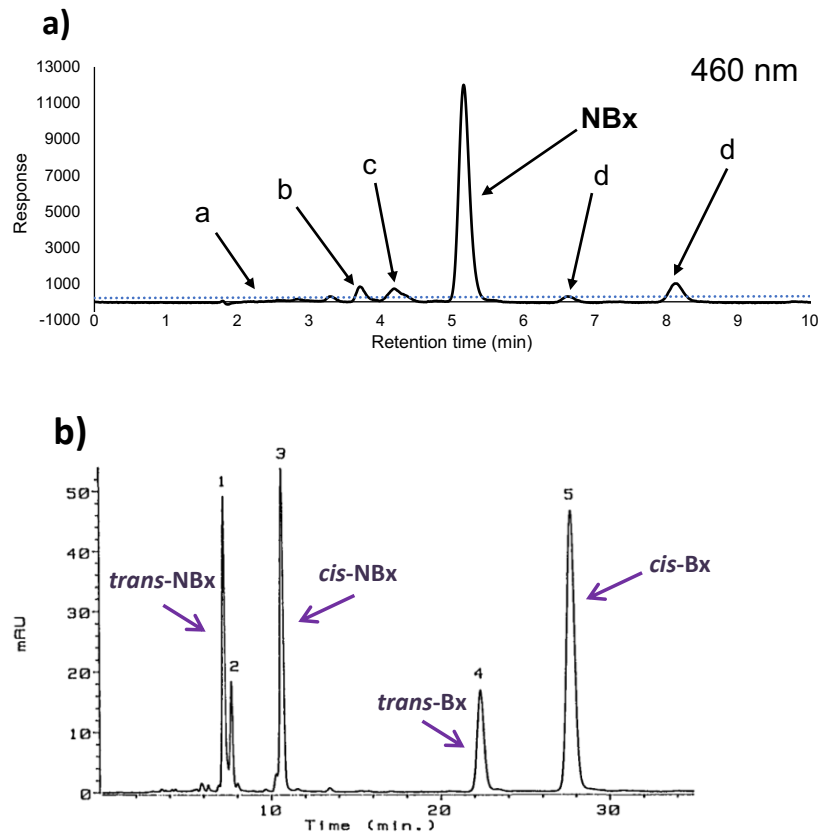


図 2. 幾何異性体 NBx 及び Bx の HPLC クロマトグラム

a) 令和 3 年度報告

b) 既報<sup>2)</sup>の報告

表 1. HSCCC の 2 相溶媒の検討項目

	<i>n</i> -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

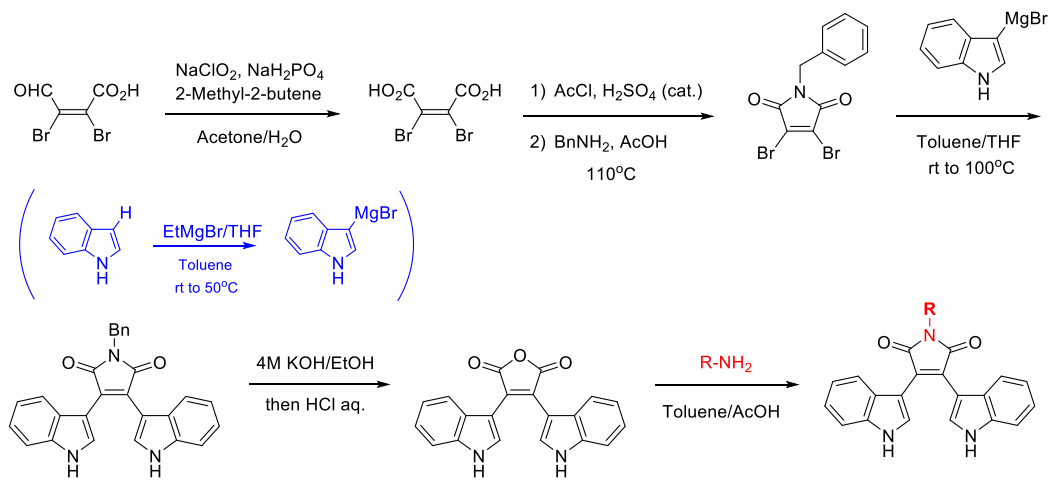


図 3. SR デザインの合成経路



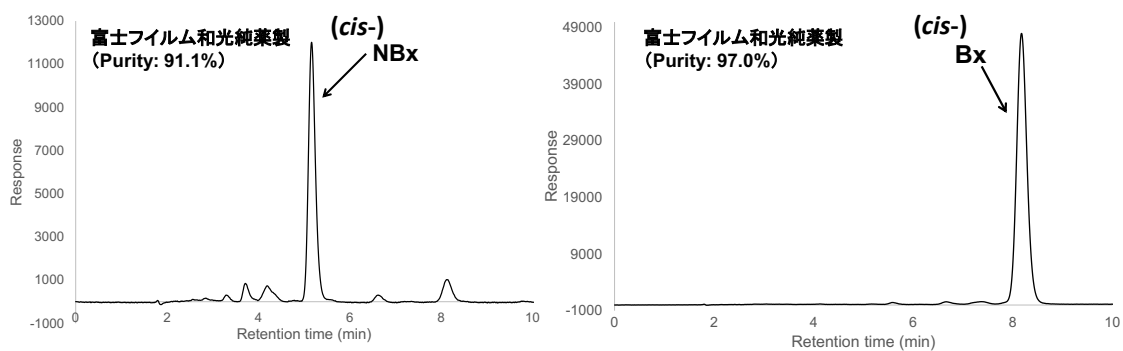


図 4. NBx 及び Bx 標準溶液の HPLC クロマトグラム

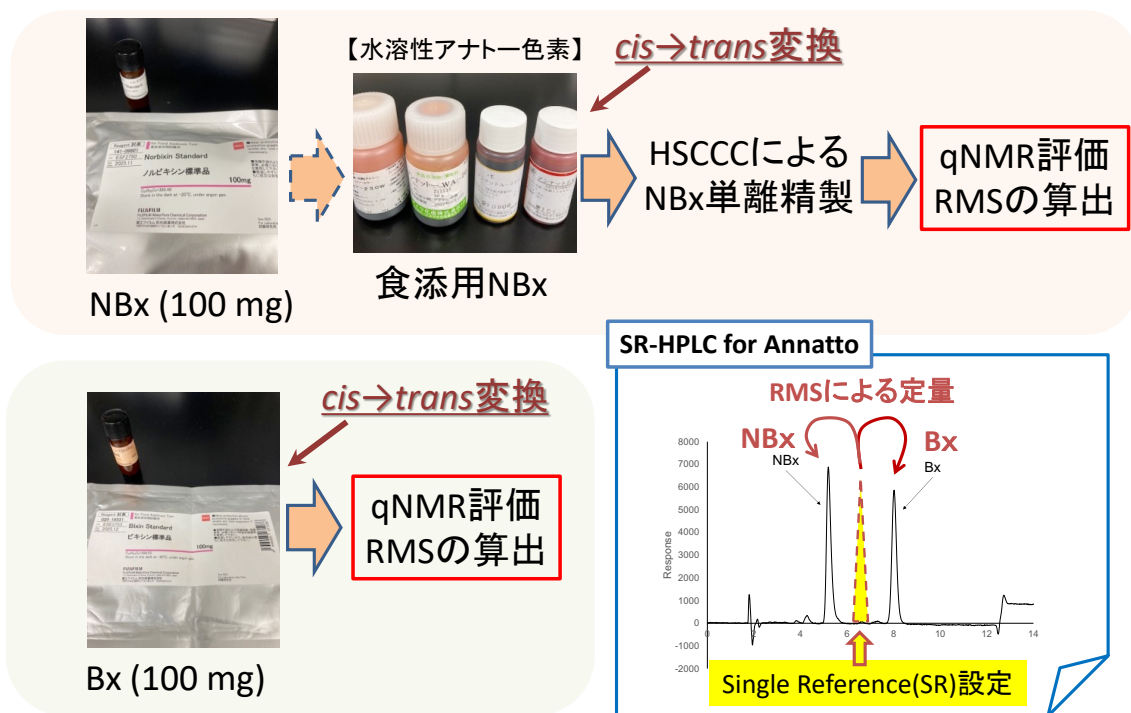


図 5. SR-HPLC によるアナトー色素の分析アプローチ

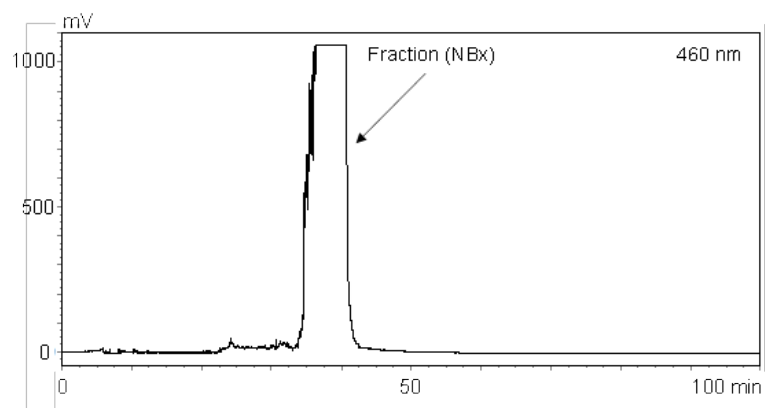


図 6. NBx の HSCCC クロマトグラム

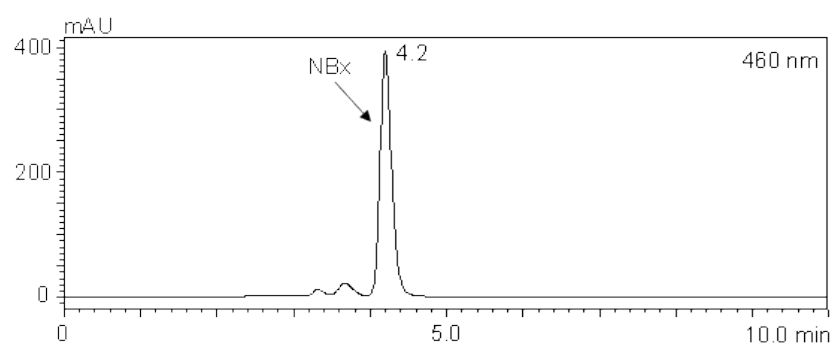


図 7. HSCCC 分画 (NBx) の HPLC クロマトグラム

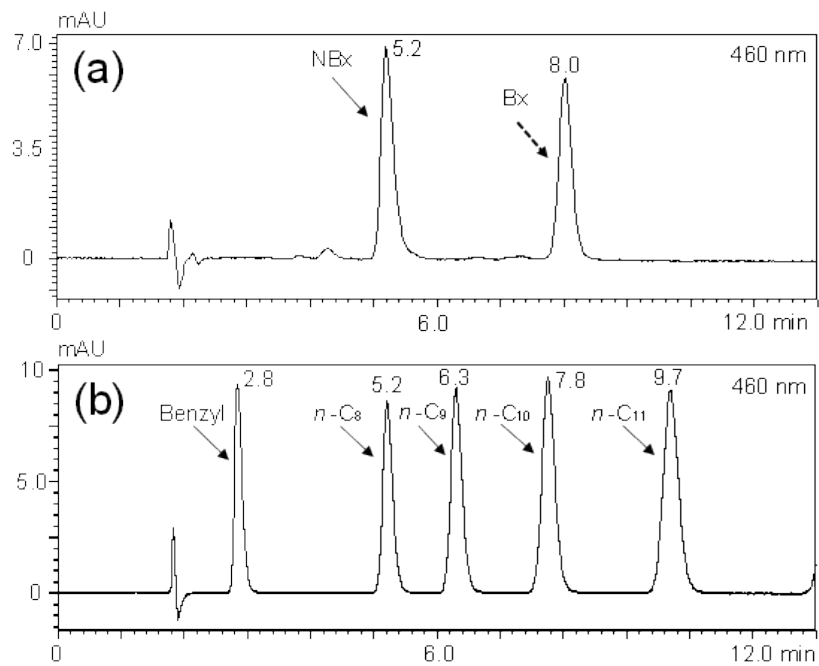


図 8. NBx/Bx 混合溶液及び SR 候補の HPLC クロマトグラム

(a) NBx/Bx 混合溶液

(b) SR 候補の混合溶液

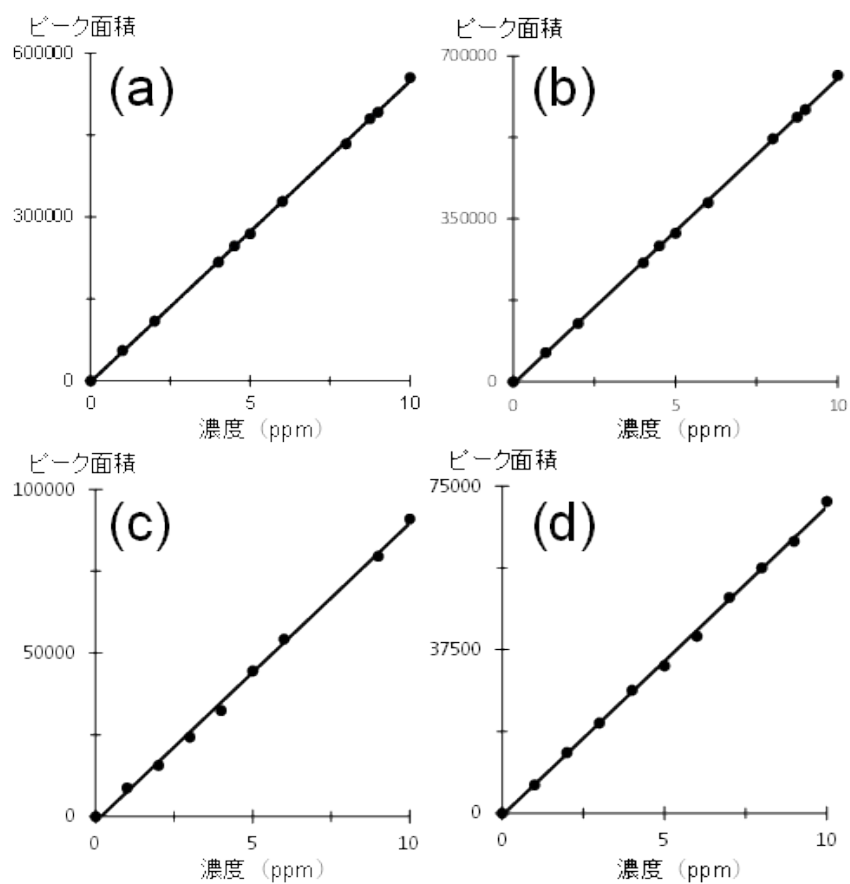


図 9. NBx, Bx,及び SR の検量線

(a) NBx ( $y = 54755x$ , 相関係数 0.999)

(b) Bx ( $y = 64989x$ , 相関係数 0.999)

(c) n-C<sub>9</sub> ( $y = 8893.3x$ , 相関係数 0.997)

(b) n-C<sub>11</sub> ( $y = 6995.9x$ , 相関係数 0.999)