

食品中のビキシン分析法*

古謝あゆ子, 照屋菜津子¹⁾, 大城直雅

Analysis of Bixin in Foods*

Ayuko KOJA, Natsuko TERUYA¹⁾ and Naomasa OSHIRO

要旨：アナトー色素の色素成分の一つであるビキシンについて食品群別試料を用いて分析法を検討した。油脂の多い食品群については、あらかじめ塩基性下でヘキサン脱脂後、窒素気流下でヘキサンを除去した。全試料から 1%NH₃・70% エタノールでビキシンを抽出、C18 カートリッジカラムで精製し、HPLC/DAD で測定を行った。ビキシンの群別食品試料における添加回収率は 78.1～92.0%となった。

Abstract : Analytical method of bixin, one of coloring components of annatto pigment, in market basket samples was studied. Bixin was extracted with 70% ethanol containing 1% NH₃. Prior to extraction, fatty samples treated with hexane to remove fat contents under basic condition. Remaining hexane in defatted portions were completely removed by N₂ gas stream. The extract was cleaned up with C18 cartridge-column and analyzed by HPLC/DAD. Recovery rates of bixin from market basket samples were 78.1-92.0%.

Key word : 食品添加物 food additive, 着色料 food coloring, ビキシン bixin, アナトー色素 annatto pigment, 液体クロマトグラフィー HPLC

I はじめに

アナトー色素は中南米のペニノキの種子を原料とする着色料で、国内では既存添加物として認められ、アイスクリームやチーズ、冷凍フライやソーセージなど様々な食品に使用されている。

アナトー色素の主な色素成分は、カロテノイドのビキシンおよびノルビキシンである。ノルビキシンについては、アルカリ塩として水に溶けやすくしたものが指定添加物「水溶性アナトー」として認められており、その分析法は厚生労働省監修による食品衛生検査指針¹⁾の中で、参照分析法として示されている。

当所ではこれまでノルビキシンの分析法について検討を行い、参照法のベンゼン分配の代わりに固相抽出を用いて精製を行うことで、ノルビキシンの回収率が向上すること、ノルビキシンには複数の異性体があり、クロマトグラム上に複数のピークが現れるため、正確な含量を求めするためには、それらすべてを測定する必要があるこ

と、ノルビキシンは抽出液中で分解や異性化が起りやすいため、試験操作を迅速に行う必要があることを報告してきた²⁾。一方、国内でビキシンの定量分析法に関する知見は少なく、食品中の含量についてもよくわかっていない。

今回、当所では、厚生労働省の「食品添加物一日摂取量」に参加してアナトー色素の一日摂取量調査を行い、その中でノルビキシンに関する知見をもとにビキシンの分析法を検討したので報告する。

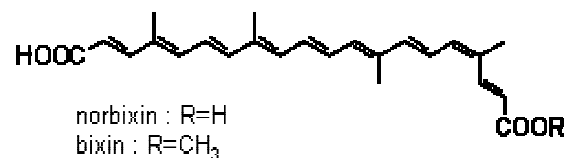


図 1. アナトー色素成分の構造式

1)現所属：沖縄県中部福祉保健所

*本研究は厚生労働省医薬局食品保健部食品添加物一日摂取量調査費によって実施した。

II 方法

1. 試薬および標準品

標準品のビキシンは国立医薬品食品衛生研究所の佐藤恭子博士に分与していただいたものを用いた。紫外可視分光光度計および HPLC を用いて純度を測定した結果、ビキシン標準品の純度は 83% で、約 2% のノルビキシンを含んでいた。ビキシンの純度測定には、Scotter et al.⁴⁾ の報告にあるクロロホルム中の比吸光度($\lambda_{max}=501nm$ において $E_{1cm}^{1\%}=2,773$)を用いた。

固相抽出カラムは Sep-Pak Vac C18(waters)を、固相抽出に用いた溶媒および HPLC の移動相には高速液体クロマトグラフ用を、その他の試薬類は特級を使用した。

2. 試料

試料は「食品添加物一日摂取量調査」で調製した食品群別試料(全 8 群, 1,8 群以外は当量の水を加えて混合)を用いた⁵⁾。内容は以下の通りである。1 群: 調味嗜好飲料, 2 群: 穀類, 3 群: いも類・豆類・種実類, 4 群: 魚介・肉類, 5 群: 油脂・乳類, 6 群: 砂糖類・菓子類, 7 群: 果実類・野菜・海草類, 8 群: 特定保健用食品

3. HPLC 条件

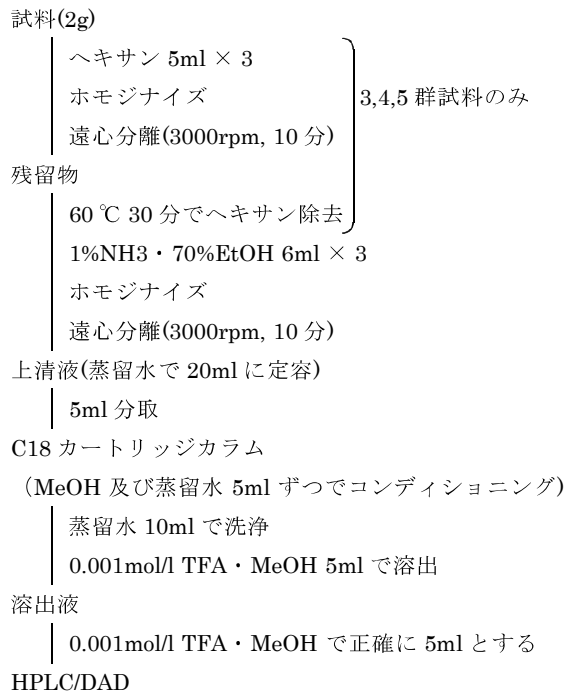


図 2. ノルビキシンの分析法

HPLC 測定条件は、ノルビキシンの分析条件を用いた。装置:Agilent 1100 series, カラム:TSK-DEL ODS 80Ts (TOSOH, 5 μ m, ϕ 4.6 × 150mm), 移動層:アセトニトリル-0.01mol/l トリフルオロ酢酸(7:3), カラム温度:室温, 流速:1ml/min, 注入量:10 μ l, 検出波長:454nm

4. 分析法の検討

各食品群別試料にビキシンを一定量加え、ノルビキシンの前処理(図 2)による添加回収試験を行い、回収率の低い試料に対して、要因とその対処法を検討した。脱脂抽出操作については異性化や分解を防ぐため、できるだけ短時間で行い、長時間中断する場合は抽出液を 4℃ 以下で保管した。

III 結果および考察

1. ビキシン構造異性体について

ノルビキシンおよびビキシンにはそれぞれ複数の構造異性体が存在し、HPLC クロマトグラム上で複数のピークが検出される⁶⁾。一方、今回用いたビキシン標準品について、HPLC で測定を行ったところ、ピークは 1 本だけであった。しかし、添加回収試験を行ったところ、HPLC 上のピークは 3 本に増加した(図 3)。ノルビキシンについては、標準品に含まれるものはほとんどが 9'-cis 体であるが、抽出操作中に、一部が trans 体, di-cis 体へ異性化することがわかっている⁶⁾。ビキシンの添加回収試験で得られた 3 本のピークの可視吸収スペクトルおよびクロマトグラムの溶出順位をノルビキシンや既報⁴⁾と比較することにより、これらのピークはそれぞれビキシンの trans 体, di-cis 体, 9'-cis 体であると推定した。

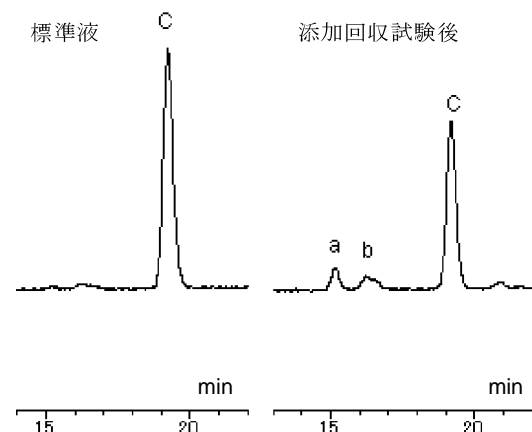


図 3. ビキシンの HPLC クロマトグラム

a: trans-bixin, b: di-cis-bixin, c: 9'-cis-bixin

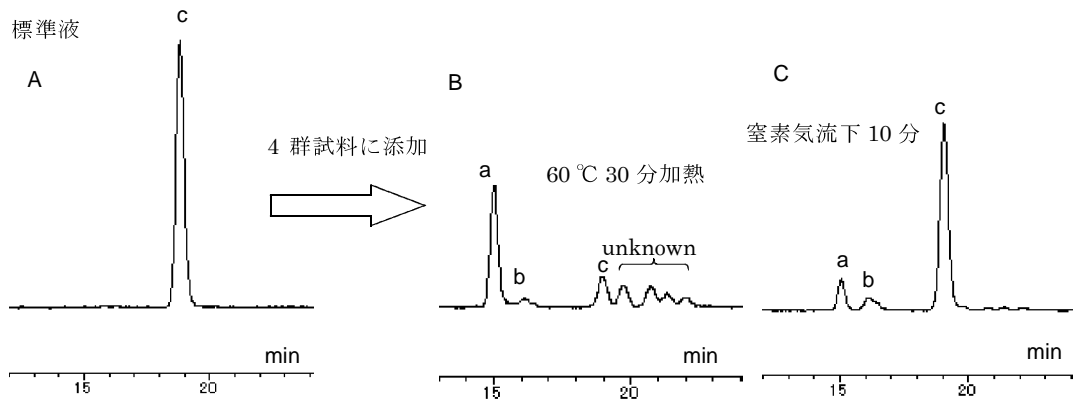


図 4. 4 群添加回収試験のヘキサン除去手法による回収結果の違い

a: *trans*-bixin、b: *di-cis*-bixin、c: *9'-cis*-bixin

なお、標準品中のビキシンは可視吸収スペクトルがほぼ *9'-cis* ノルビキシンの一致しており、*9'-cis* 体であることが確認された。

これらの異性体については立体構造の違いによる比吸光度の差は少ないものと考え、定量する際は3種のピーク面積の合計により、結果を算出した。

2. 分析法の検討

ビキシンの分析法について検討するため、まずノルビキシンの前処理でのビキシン回収率を調べたところ、ヘキサン脱脂を行わない 1,2,6,7,8 群では回収率が 78.1 ~ 92.0%と良好であったが、ヘキサン脱脂を行う 3 ~ 5 群では 0 ~ 24.5%と著しく低い値となった。ビキシンはノルビキシンのより極性が低いため、ヘキサンに移行しやすい。そこで、脱脂操作の前に 1%NH₃・70%エタノールを 1ml 加えて塩基性とし、ビキシンのヘキサンに対する溶出を抑えた。

また、試験操作中のヘキサン除去の際、加温により *9'-cis* ビキシンのピークが著しく減少し、異性体ピークや不明ピークが多数出現して、添加したビキシンの異性化や分解が起きていることが示唆された(図 4B)。そこで、ヘキサン脱脂後の残留ヘキサン除去の手法を加温(水浴中 60 °C 30 分)から窒素気流下(10 分間)に変更したところ、異性体ピークは減少し、不明ピークは見られなくなった(図 4C)。これらの試験法の変更により、添加回収率は 72.4 ~ 84.7%となり、大幅に改善された。

回収率が 72.4%と最も低くなった 3 群試料に対し、ヘキサン脱脂後の試料にビキシンを加えて添加回収試験を行ったところ、回収率は 94.0%となり、塩基性化でも 20%以上のビキシンがヘキサンに移行したことが示唆された。そこで、ヘキサン脱脂を従来の 3 回から 1 回に減

らしたところ、回収率は 78.4%となった。さらに、Scotter et al.⁹⁾を参考にヘキサン洗浄後の残留物に 1%BHT・メタノール溶液を加えてビキシンの酸化を防いだところ、回収率は 85.9%となった。

最終的なビキシンの分析法を図 5 に示す。この方法で 4, 5 群についても添加回収試験を実施したところ、4 群については回収率が上昇したが、5 群については、脱

試料(2g)

- 1%NH₃・70%EtOH 1ml
 - ヘキサン 5ml
 - ホモジナイズ
 - 遠心分離(3000rpm, 10分)
- } 3,4,5 群試料のみ

残留物

- N₂ 気流下でヘキサン除去
- 1%BHT・MEOH 1ml
- 1%NH₃・70%EtOH 6ml × 3
- ホモジナイズ
- 遠心分離(3000rpm, 10分)

上清液(蒸留水で 20ml に定容)

5ml 分取

C18 カートリッジカラム

(MeOH 及び蒸留水 5ml ずつでコンディショニング)

- 蒸留水 10ml で洗浄
- 0.001mol/l TFA・MeOH 5ml で溶出

溶出液

- 0.001mol/l TFA・MeOH で正確に 5ml とする

HPLC/DAD

図 5. ビキシンの分析法

表1. ビキシンの添加回収率(n=3)

第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群	第8群	平均
調味嗜好飲料	穀類	いも・豆・種実類	魚介類肉類	油脂類乳類	砂糖類菓子類	果実・野菜・海藻類	特定保健用食品	
90.8	92.0	85.9	83.5	83.0	90.8	87.1	78.1	86.4

単位：%

表2. ノルビキシンの添加回収率(n=3)

	第3群	第4群	第5群
	いも・豆・種実類	魚介類肉類	油脂類乳類
従来法	75.9	73.1	78.7
ビキシンの脱脂法	85.9	87.5	83.6

単位：%

脂後の抽出液に濁りが見られ、回収率は 84.7%→ 83.0%と、わずかながら減少した。このことから、抽出液に濁りが見られる試料の場合には注意が必要であると思われる。

3. 添加回収率、定量下限値および検出下限値

各群別試料にビキシンの濃度がそれぞれ 16.6μg/g になるように添加したときのビキシンの添加回収率(n=3)を表 1 に示す。また、3～5 群試料にノルビキシンを添加し、ビキシンと同じ脱脂法を用いて添加回収試験を行った結果、添加回収率が従来法と比較して 10%程度上昇した(表 2)。このことから、ノルビキシンについても、従来法よりもこの試験法が優れており、ビキシンとの同時分析が可能なが確認された。

この方法によるビキシンの検出限界および定量限界を日本工業規格(JIS)高速液体クロマトグラフィー通則に従い、標準溶液の繰り返し注入により求めたところ、検出限界 0.12μg/g、定量限界 0.61μg/g となった(1.8 群はその 1/2 の濃度)。

4. ビキシン標準溶液の保存法について

ビキシン標準原液は 1%NH₃・70%エタノールで 1000μg/ml に調製して冷蔵保存し、用時希釈して用いたが、日が経つにつれ、加水分解によるノルビキシンの増大が見られた。さらに、HPLC 上で 9'-cis ビキシン(19min 付近)よりも遅い保持時間(28min 付近)にピークが現れ、日が経つにつれ、9'-cis ビキシンの減少とピークの増大が見られた。このピークの波形および極大吸収波長はほぼ 9'-cis ノルビキシンや 9'-cis ビキシンと重なっていた。

ビキシン、ノルビキシンの *trans* 体、*di-cis* 体は、9'-*cis* 体と比較して紫外可視吸収スペクトルの極大吸収波長が若干シフトするが、それぞれ同じ骨格を持つ異性体同士は波形が重なる傾向にある。そのため、このピークは 9'-*cis* 型構造を持つ、ビキシンやノルビキシンに類似した物質であることが示唆された(図 6、図 7)。

確認のため、LC/MS で測定したところ、このピークのマスマスペクトルに[M+H]⁺と思われる m/z 409 のピークが確認された(図 8 右)。ビキシンの[M+H]⁺は m/z 395 であり、確認されたピークとの差は 14amu であった。また、LC/MS 測定では移動相としてトリフルオロ酢酸より弱酸のギ酸を用いたため、HPLC クロマトグラム上でビキシンのピークがテーリングしたが、不明ピークもまたテーリングしており、カルボン酸構造が残っていることが示唆された(図 8 左)。従ってこれはビキシンのメチルエステル部が塩基性下で過剰のエタノールと反応し、エステル交換反応によってエチルエステル化したものであると思われた(図 9)。

確認のため、ピークが検出された標準原液を 1%NH₃・70%メタノールで 100 倍に希釈して一晩放置後に測定したところ、当該ピークの減少とビキシンのピークが増加が起り、エチルエステル体からメチルエステル体(ビキシン)に戻ることが確認された。従って、ビキシンを標準原液として保存する際には、溶媒および保存期間に注意が必要であると思われる。

< 謝辞 >

標準品をご提供くださいました国立医薬品食品衛生研究所の佐藤恭子博士に心より感謝いたします。

IV まとめ

既存添加物アナトー色素の色素成分の一つであるビキ

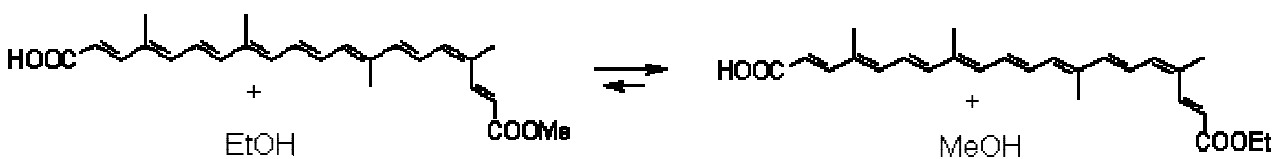


図 9. 1%NH₃・70%エタノール中のビキシンのエステル交換反応

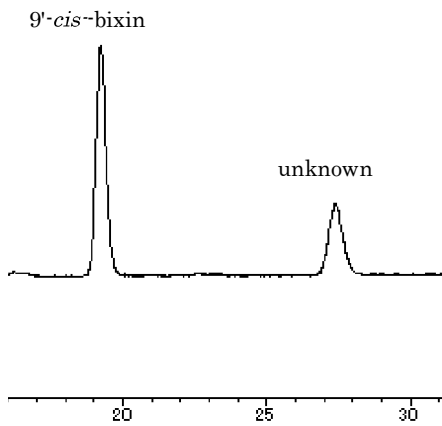


図 6. 1%NH₃・70%エタノール中で保存したビキシン標準液の HPLC クロマトグラム

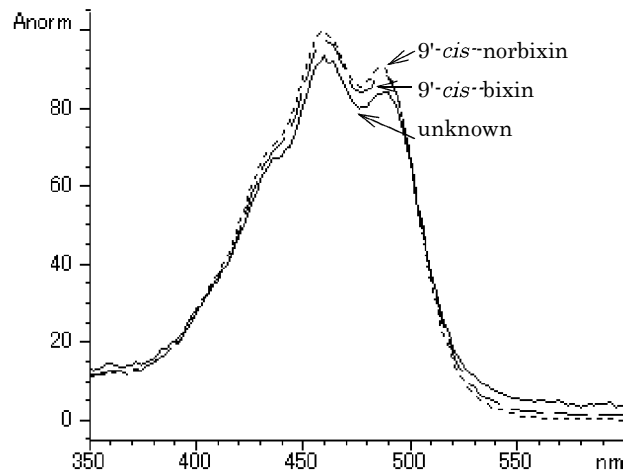


図 7. unknown、9'-cis ビキシン及び 9'-cis ノルビキシンの可視吸光スペクトル

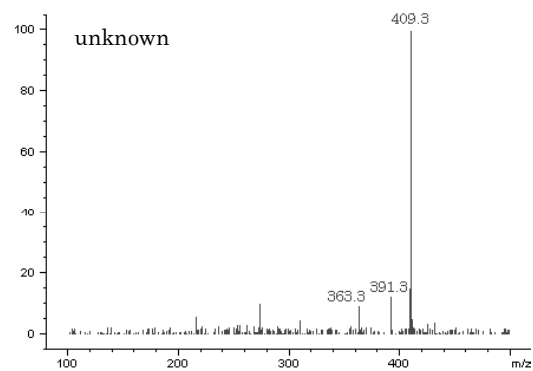
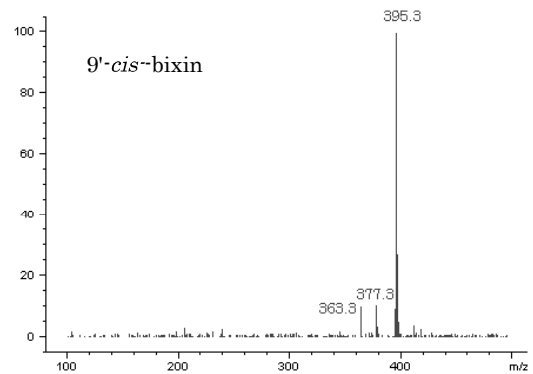
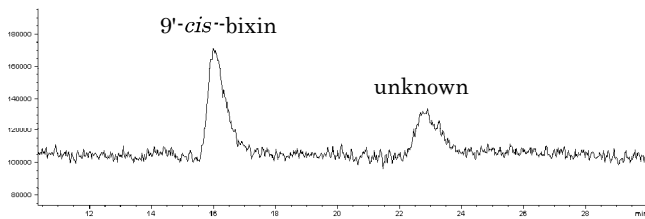


図 8. 1%NH₃・70%エタノール中で保存したビキシン標準液の LC/MS クロマトグラム(左)およびマススペクトル(右)

装置:Agilent 1100 series, カラム:Cadenza CD-C18,(Imtakt, φ 2 × 150mm), 移動層:アセトニトリルー 0.1%ギ酸(7:3), カラム温度:室温, 流速:0.2ml/min, 注入量:5μl, イオン化法:ESI (positive), モード:SCAN, Fragmenter 電圧:125V

シンについて、分析法を検討した。ビキシンを食品群別試料に加え、ノルビキシン分析法で添加回収試験を行ったところ、一部試料で添加回収率が低くなったが、ヘキサン脱脂の回数を減らし、ヘキサン除去の手法を加熱から窒素気流下に変更することで、78.1～92.0%の良好な回収率が得られた。

V 参考文献

- 1) 厚生労働省監修(2003)水溶性アナトー。食品衛生検査指針食品添加物編, pp647-653.
- 2) 山城興博(1994)SepPakC18 カートリッジを用いた水溶性アナトーの分析法について。沖縄県衛生環境研究所報, 28 : 53-55.
- 3) 古謝あゆ子・玉那覇康二(2004)マーケットバスケット方式によるアナトー色素の摂取量調査。沖縄県衛生環境研究所報, 38 : 97-105.
- 4) M. J. Scotter, S. A. Thorpe, S. L. Reynolds, L. A. Wilson and P. R. Strutt(1994)Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. Food Add. Contam., 11(3):301-315.
- 5) 古謝あゆ子・照屋菜津子・佐久川さつき・大城直雅(2008)マーケットバスケット方式によるアナトー色素の摂取量調査—平成 19 年度—。沖縄県衛生環境研究所報, 42 : 173-182.
- 6) M. J. Scotter, L. Castle, C. A. Honeybone and C. Nelson (2002)Method development and analysis of retail foods for annatto food colouring material, 19(3):205-222.