

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 —2020年度—*

仲真弘樹・當間一晃・佐久川さつき・大城聡子・泉水由美子**・古謝あゆ子

Studies on Daily Intake of Annatto Pigments by Market Basket Method (FY2020)*

Hiroki NAKAMA, Kazuki TOUMA, Satsuki SAKUGAWA, Akiko OSHIRO, Yumiko IZUMI**and Ayuko KOJA

要旨: 国立医薬品食品衛生研究所及び8つの地方衛生研究所の共同研究「食品添加物の一日摂取量調査」の一環として、アナトー色素の主な色素成分であるノルビキシンとビキシンの調査を行った。マーケットバスケット試料を調査した結果、一日摂取量はノルビキシンが0.0038 mg/人、ビキシンが0 mg/人となった。

Abstract: Daily intakes of norbixin and bixin, the major components of annatto pigment, were studied as a part of the collaborative researches, "studies on daily intakes of food additives", performed by the National Institute of Health Sciences and eight local institutes of public health in fiscal year 2020. The market basket samples were analyzed and the daily intakes of norbixin and bixin were estimated as 0.0038 and 0 mg/day, respectively.

Key words: 食品添加物, Food additive, 着色料, Food coloring, ノルビキシン, Norbixin, ビキシン, Bixin, アナトー色素, Annatto pigment, マーケットバスケット方式, Market basket method, 一日摂取量, Daily intake

I はじめに

マーケットバスケット方式による食品添加物の一日摂取量調査は厚生省食品化学課、国立衛生試験所大阪支所が中心となって1981年度から継続実施されており、2000年度から2年間の中断を経た後、2002年度より、厚生労働省食品保健部基準課の事業として国立医薬品食品衛生研究所（以下、「国立衛研」という。）及び6つの地方衛生研究所が参加して再開された。2006年度に食品リストに特定保健用食品が追加されたが、2010年度に廃止され、現行の食品リストになった。2020年度は国立衛研と8つの地方衛生研究所が参加して行われた。

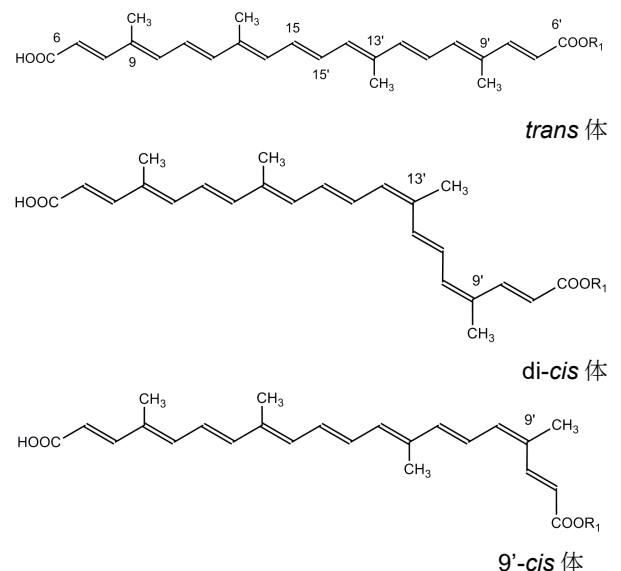
2020年度は20歳以上の成人を対象として、一日摂取量調査を実施し、沖縄県は着色料であるアナトー色素の分析を担当した。

アナトー色素はベニノキ *Bixa orellana* の種子の被覆物から得られる色素であり、主成分はカロテノイドの一種であるノルビキシンおよびビキシンである。これら2種の物質の構造を図1に示す。アナトー色素は国内で既存添加物として用いられており、ノルビキシンのナトリウム塩およびカリウム塩が指定添加物「水溶性アナトー」としても用いられている。

ビキシンおよびノルビキシンは多数の異性体を持つが、市販のアナトー色素粉末はほぼ9'-cis体のみであり、

添加食品中からは *trans* 体, *di-cis* 体が検出されている(命名, 同定は Scotter¹⁾ らによる)。また, これらは測定の出出過程で異性化, 分解することがわかっている^{2,3)}。

本報ではノルビキシンとビキシンの国内の20歳以上の成人の一日摂取量について、当研究所で分析した結果を報告する。



R₁=H : ノルビキシン

R₁=CH₃ : ビキシン

図1. アナトー色素成分の構造式.

*本研究は「食品等試験検査費（厚生労働省）食品添加物一日摂取量調査等研究」によって実施した。

**現所属：沖縄県保健医療部衛生薬務課

II 方法

1. 参加機関

国立衛研, 札幌市衛生研究所, 仙台市衛生研究所, 東京都健康安全研究センター, 千葉県衛生研究所, 広島県立総合技術研究所保健環境センター, 香川県環境保健研究センター, 長崎市保健環境試験所, 沖縄県衛生環境研究所

2. 試料

混合群試料の調製は, 独立行政法人国立健康・栄養研究所のデータに基づき, 国立衛研が作成した食品別リストを元に行った。使用した食品数は 189, 製品の総数は 286 で, これを表 1 に示した 7 つの食品群に分類した。各群の食品は, 東京都健康安全研究センター, 千葉県衛生研究所と広島県立総合技術研究所保健環境センターを除く 6 機関が地元で購入し, それぞれの食品の規定量を採取して 1 群はそのまま, 2~7 群は同量の水を加えて, ミキサーで食品群ごとに混合均一化した後, プラスチック容器に小分けし, -20℃で保存した。また, 試料購入の際, 表示に調査対象項目がある製品については, 混合群試料とは別に個別に購入して担当機関に送付した。当研究所では個別に購入した製品の分析は担当しなかった。

表 1. 食品群の分類とその数。

| 食品群 | 食品数 | 品目数 |
|------------|-----|-----|
| 1 群 調味嗜好飲料 | 41 | 63 |
| 2 群 穀類 | 27 | 40 |
| 3 群 いも類 | 7 | 13 |
| 豆類 | 16 | 18 |
| 種実類 | 5 | 5 |
| 4 群 魚介類 | 12 | 18 |
| 肉類 | 4 | 8 |
| 卵類 | 1 | 3 |
| 5 群 油脂類 | 9 | 11 |
| 乳類 | 14 | 26 |
| 6 群 砂糖類 | 4 | 4 |
| 菓子類 | 23 | 51 |
| 7 群 果実類 | 3 | 3 |
| 野菜類 | 20 | 20 |
| 海藻類 | 3 | 3 |
| 総計 | 189 | 286 |

3. 試薬および器具等

(1) 標準品

標準品には, 国立衛研から譲渡を受けたノルビキシン

(ダイワ化成社製) 及びビキシン (三栄源エフ・エフ・アイ社製) の食品添加物原体を用いた。

ノルビキシン及びビキシンの標準品粉末について, 国立衛研に定量 NMR (qNMR) での純度測定を依頼したところ, ノルビキシンの純度は 51.3%, ビキシンは 85.5% であることが分かった。なお, 標準品の純度は 100% と仮定して調製等を行い, 最後に補正計算を行った。

(2) その他試薬等

アセトニトリル及び蒸留水は, 富士フィルム和光純薬社製高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用を使用し, トリフルオロ酢酸 (TFA) は関東化学社製及び富士フィルム和光純薬社製 HPLC 用を使用した。その他の試薬については試薬特級品を用いた。また, 固相抽出カラムは Waters 製 Sep-Pak Vac 3 cc C18 (500 mg) を, 測定機器に供す前の試験液のろ過には THOMSON 製フィルターバイアル PVDF 0.45 μm を用いた。

4. 分析法

(1) ノルビキシン及びビキシン標準溶液の調製

ノルビキシンを 1%NH₃・70%エタノール及びビキシンを 1%NH₃・70%メタノールに溶解し, 1000 μg/mL の標準原液をそれぞれ調製した。これらの標準原液をそれぞれ同量混合し, 添加回収用標準溶液は 1%NH₃・70%エタノール, 検量線用標準液は 0.001 mol/L TFA・メタノール溶液で希釈して用いた。なお, ビキシンは 1%NH₃・70%エタノール中でエステル交換により, 徐々にエチルエステル化するため⁴⁾, 添加回収用溶液は 1 週間ごとに再調製した。また, 標準原液及び各種標準溶液については -20℃以下で保存した。

(2) 分析法

抽出操作は既報⁵⁾を参考に, 若干の変更を加えて行い, HPLC/PDA により定量試験を行った。分析方法のフローチャートを図 2 に, HPLC の分析条件を表 2 に, アナト一色素成分のクロマトグラムを図 3 に示す。

(3) 構造異性体

ビキシン, ノルビキシンは, HPLC クロマトグラム上において, 構造の違いにより *trans* 体, *di-cis* 体, *9-cis* 体の 3 本のピークが現れる (図 3)。これら構造異性体のピークはそれぞれ吸収極大波長が若干異なるが, 既報⁴⁾では測定波長を 454nm に固定し, ノルビキシンについては, 下記の式によりピーク面積の補正を行っている。本試験も同様に定量を行った。

混合均一化した試料2g (加水試料(2~7群)は4g)

+1%NH₃・70%エタノール 1 mL
 +ヘキサン 5 mL
 ボルテックス (3秒)
 遠心分離 (3000 rpm, 10分)
 ヘキサン層をピペットで除去

5群試料のみ

残留物

N₂気流下でヘキサン除去 (10分)

+1%BHT・メタノール 1 mL

+1%NH₃・70%エタノール 6 mL

ホモジナイズ (3分)

遠心分離 (3000 rpm, 10分)

3回行う※

※固形物が少量であれば6 mL、8 mLの2回。
 7群混合試料は氷上等で冷却しながら操作を行う。

上澄み液

蒸留水で20 mLに定容

5 mL分取

蒸留水 15 mL

C18カートリッジカラム

(あらかじめメタノール及び蒸留水 5 mL
 ずつでコンディショニング)

蒸留水 10 mL で洗浄

0.001 mol/L TFA・メタノール 4.5 mL で溶出

(5群混合試料はメタノール 4.5 mL で溶出)

溶出液 (0.001 mol/L TFA・メタノールで正確に5 mLとする)

フィルターバイアル(PVDF 0.45 μm)を用いてろ過

HPLC/PDA (アセトニトリル・0.01mol/L TFA (7:3))

図 2. アナトー色素分析法.

表 2. HPLC の測定条件.

機種 : SHIMADZU NexeraX2 series

PDA 検出器 : SPD-M30A

カラム : TSK-gel ODS-80Ts

(TOSOH, 5 μm, φ4.6×150 mm)

移動相 : アセトニトリル・0.01 mol/L TFA (7:3)

カラム温度 : 40°C 流速 : 1 mL/min

注入量 : 10 μl 測定波長 : 190 - 700 nm

定量波長 : 454 nm

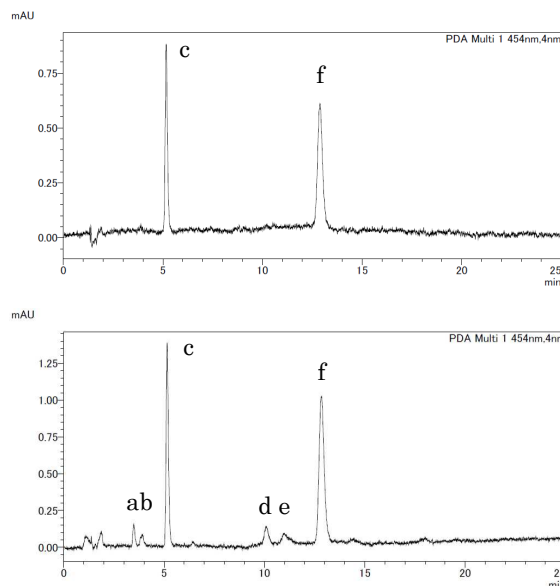


図 3. アナトー色素成分の HPLC クロマトグラム.

上 : 標準液(ノルビキシン 0.051 μg/mL, ビキシン 0.086 μg/mL)

下 : 添加回収試料 (3 群試料)

(添加濃度 : ノルビキシン 1.03 μg/g, ビキシン 1.71 μg/g)

a : *trans*-norbixin, b : *di-cis*-norbixin, c : 9'-*cis*-norbixin,

d : *trans*-bixin, e : *di-cis*-bixin, f : 9'-*cis*-bixin.

全ノルビキシンのピーク面積

$$= a \times 1.1 + b \times 0.96 + c$$

a : *trans* 体のピーク面積, b : *di-cis* 体のピーク面積

c : 9-*cis* 体のピーク面積

また、ビキシンについては *di-cis* 体の詳細なスペクトルが得られていないため、各ピーク (d, e, f) の面積値を総和して全ビキシンの面積値と見なし、定量を行った。

(4) 添加回収試験

各機関の混合群試料から、アナトー色素成分が極力含まれていない試料を食品群ごとに1つずつ選び、ノルビキシンおよびビキシンの濃度がそれぞれ標準品粉末の状態では 2 μg/g (純度計算後はノルビキシン 1.03 μg/g, ビキシン 1.71 μg/g) になるように添加し、添加回収試験を行った (n=3)。

III 結果および考察

1. 5 群試料の分析法について

5 群試料の添加回収試験において、固相カラム精製を行った際に、0.001 mol/L TFA・メタノール溶液 4.5mL で溶出した後の固相カラムに若干の色残りが見受けられ、ノルビキシン回収率が 60%以下となった。平成 30 年度の調査⁵⁾でも同様の現象が見られ、メタノール溶液で溶出することで回収率が改善したと報告されている。

今回の調査でもメタノール溶液で溶出することでノルビキシンの回収率が 57.4%から 79.7%に改善した。ただし、メタノール溶出後の固相カラムにもわずかに色残りが見られることから、さらなる検討が必要だと考えられる。また、平成 30 年度は小児の摂取量を元に調製された試料を用いており、高嶺ら⁵⁾はこの現象の原因が、大量の乳成分の存在下及び酸性条件下で生じたメタノール不溶物質にノルビキシンの吸着したことによると考察している。しかし今回、成人の摂取量を元に調製された試料でも同様の現象が生じたことから、乳成分以外の原因がある可能性が示唆された。

2. 混合群試料の添加回収率, 定量限界値

ノルビキシンの 1 群~7 群の添加回収率は 75.9%~98.6%, ビキシンは 70.7%~85.0%で、概ね良好な結果であった (表 3)。

本分析法による検出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、ノルビキシンは 0.02 µg/g, ビキシンは 0.03 µg/g となった。経験的に食品分析分野で用いられる検量線の最小濃度により求めた定量限界値はノルビキシンの検出限界 0.1 µg/g, ビキシンの 0.2

µg/g となった。

3. 混合群試料測定結果

混合群試料について分析した結果、ノルビキシンは 2 機関の 7 群のみ定量限界以上で検出され、ビキシンはすべての食品群から検出されなかった。6 機関の混合群試料の測定結果の平均値を表 4 に示す。この試験結果から計算した成人 (20 歳以上) の一日総摂取量の平均値は、ノルビキシンの 0.0038 mg/人/日, ビキシンの 0 mg/人/日となった (表 5)。

4. 一日摂取量の推移

本調査では、過去 5 回成人を対象としたアナトー色素の摂取量調査を行っている^{2,4,6,7,8)}。今回を含めた 6 回の調査の混合群試料から求めた一日摂取量の推移を表 6 に示す。

ノルビキシンの一日摂取量については、過去の結果と比べ減少していた。混合群の食品群別のノルビキシンの一日摂取量 (表 5) を過去の報告と比較すると、過去の調査ではノルビキシンの 4 群, 5 群, 6 群及び 7 群試料から複数検出されているが、今回は 7 群試料のみ検出されており、7 群試料のみから算出した一日摂取量は概ね同程度であった。ビキシンについては 2007 年度以降はい

表 3. アナトー色素の添加回収率 (n=3).

| 成分名 | 1 群 調味嗜好 飲料 | 2 群 穀類 | 3 群 いも類・豆 類・種実類 | 4 群 魚介類・ 肉類・卵類 | 5 群 油脂類・ 乳類 | 6 群 砂糖類・ 菓子類 | 7 群 果実類・野菜 類・海藻類 |
|---------|-------------------|-----------|-----------------------|----------------------|-------------------|--------------------|------------------------|
| ノルビキシンの | 98.6% | 89.1% | 87.1% | 90.0% | 79.7% | 95.0% | 75.9% |
| ビキシンの | 84.3% | 85.0% | 79.2% | 80.2% | 71.8% | 81.1% | 70.7% |

表 4. 群別アナトー色素成分含有量 (各機関の試料の分析値の平均値).

| 成分名 | 1 群 調味嗜好 飲料 | 2 群 穀類 | 3 群 いも類・豆 類・種実類 | 4 群 魚介類・ 肉類・卵類 | 5 群 油脂類・ 乳類 | 6 群 砂糖類・ 菓子類 | 7 群 果実類・野菜 類・海藻類 | (µg/g) |
|---------|-------------------|-----------|-----------------------|----------------------|-------------------|--------------------|------------------------|--------|
| ノルビキシンの | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.16 | |
| ビキシンの | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

表 5. 群別アナトー色素成分一日摂取量.

| 成分名 | 1 群 調味嗜好 飲料 | 2 群 穀類 | 3 群 いも類・豆 類・種実類 | 4 群 魚介類・ 肉類・卵類 | 5 群 油脂類・ 乳類 | 6 群 砂糖類・ 菓子類 | 7 群 果実類・野菜 類・海藻類 | 総摂取量 | (mg/人/日) |
|---------|-------------------|-----------|-----------------------|----------------------|-------------------|--------------------|------------------------|--------|----------|
| ノルビキシンの | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0038 | 0.0038 | |
| ビキシンの | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

表 6. 成人 (20 歳以上) におけるアナト一色素成分一日摂取量の推移. (mg/人/日)

| 食品添加物名 | 2003 ²⁾ | 2007 ⁴⁾ | 2010年 ⁶⁾ | 2012年 ⁷⁾ | 2016年 ⁸⁾ | 2020年 |
|--------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------|
| ノルビキシン | 0.016 | 0.024 | 0.015 | 0.016 | 0.010 | 0.0038 |
| ビキシン | 測定なし | 0.002 | -* | -* | -* | -* |

* : 混合群試料中の含有量が定量限界未満であるため摂取量が 0 mg になるもの

表 7. 成人 (20 歳以上) におけるアナト一色素成分一日摂取量と ADI との比較.

| 食品添加物名 | ADI (mg/kg 体重/日) | 一人当たりの一日摂取 許容量*1 (mg/人/日) | 一日摂取量 (mg/人/日) | 対 ADI 比*2 (%) |
|--------|---------------------|------------------------------|-------------------|------------------|
| ノルビキシン | 0-0.6 | 35.16 | 0.0038 | 0.01 |
| ビキシン | 0-12 | 703.2 | -*3 | -*3 |

*1 : ADI×58.6 (成人 (20 歳以上) の平均体重, kg)

*2 : 対 ADI 比 (%) = 一日摂取量 (mg/人/日) / 一人当たりの一日摂取許容量 (mg/人/日) ×100

*3 : 混合群試料中の含有量が定量限界未満であるため摂取量が 0 mg になるもの

いずれも混合群試料中の含有量が定量限界未満であった。

5. 一日摂取許容量 (ADI) との比較

ノルビキシンの ADI は、0.6 mg/kg 体重/日⁹⁾、ビキシンの ADI は 12 mg/kg 体重/日¹⁰⁾であり、体重 58.6 kg の成人に換算するとそれぞれ、35.16 mg/人/日、703.2 mg/人/日となる。そこで、今回の調査で求めた成人 (20 歳以上) におけるノルビキシン、ビキシンの一日摂取量について ADI と比較したところ (表 7)、いずれも ADI と比較して十分に低く、人の健康に影響を及ぼす量ではないと言える。

IV まとめ

マーケットバスケット調査における成人 (20 歳以上) のノルビキシン、ビキシンの一日摂取量は、混合群試料でノルビキシン 0.0038 mg/人/日、ビキシン 0 mg/人/日となった。得られた値はいずれも ADI と比較して十分に低いことから、人の健康に影響を及ぼす量ではないと言える。

V 参考文献

- 1) M. Scotter, (2009) The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additive and Contaminates*, Vol. 26, No. 8 : 1123-1145.
- 2) 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一色素の摂取量調査. 沖縄県衛生環境研究所報, 38 : 97-105.
- 3) 古謝あゆ子・照屋菜津子・大城直雅 (2008) 食品中のビキシン分析法. 沖縄県衛生環境研究所報, 42 : 79-84.
- 4) 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一色素の摂取量調査—平成 19 年度—. 沖縄県衛生環境研究所報, 42 : 173-182.
- 5) 高嶺朝典・古謝あゆ子 (2019) マーケットバスケット方式による小児のアナト一色素の摂取量調査—2018 年度—. 沖縄県衛生環境研究所報, 53 : 35-42.
- 6) 古謝あゆ子・玉城宏幸・佐久川さつき・國仲奈津子 (2011) マーケットバスケット方式によるアナト一色素の摂取量調査—成人を対象とした 2010 年度の分析—. 沖縄県衛生環境研究所報, 45 : 75-82.
- 7) 古謝あゆ子・國仲奈津子・佐久川さつき・真保栄陽子・仲間幸俊 (2013) マーケットバスケット方式によるアナト一色素の摂取量調査—2012 年度—. 沖縄県衛生環境研究所報, 47 : 87-94.
- 8) 平成 28 年度マーケットバスケット方式による保存料及び着色料の摂取量調査の結果について. 厚生労働省ホームページ (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuten/sesshu/index.html). 2021 年 7 月アクセス.
- 9) 指定添加物 (規則別表一) の JECFA による安全性評価. 日本食品化学研究振興財団ホームページ (<http://www.ffcr.or.jp/tenka/secure/jecfa.html>). 2021 年 7 月アクセス.
- 10) 既存添加物の JECFA による安全性評価. 日本食品化学研究振興財団ホームページ (<https://www.ffcr.or.jp/tenka/secure/jecfa2.html>). 2021 年 7 月アクセス.