

β-アポ-8'-カロテナールの純度試験（副成色素）に関する検討

古庄紀子, 建部千絵, 久保田浩樹, 多田敦子, 穂山浩, 佐藤恭子[#]

Study on the test method of subsidiary colors in the β-apo-8'-carotenal food additive

Noriko Furusho, Chiye Tatebe, Hiroki Kubota, Atsuko Tada,
Hiroshi Akiyama, Kyoko Sato[#]

β-Apo-8'-carotenal is a carotenoid with an aldehyde group and is used worldwide as a food colorant. To establish the Japanese specification of β-apo-8'-carotenal as a food additive, we examined the HPLC method for the determining the subsidiary colors in β-apo-8'-carotenal, based on the specification by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). We developed an HPLC method for determination of subsidiary colors in a β-apo-8'-carotenal product, using improved HPLC conditions and an endcapped hexadecylamidopropylsilylated silica gel column. The results show that the subsidiary colors in a β-apo-8'-carotenal product, which include β-carotene, can be detected based on the appropriate peak shape and determined within 45 min on the HPLC chromatogram. The total amount of subsidiary colors in the product was 1.0 %, which is less than the maximum level (3 %) specified by JECFA. The HPLC method developed in this study to analyze the subsidiary colors in β-apo-8'-carotenal was adopted as the test method for the specification of β-apo-8'-carotenal which was designated as a food additive in Japan in 2014.

Keywords: β-apo-8'-carotenal, subsidiary colors, HPLC, colorant, food additive

1. 緒言

β-アポ-8'-カロテナール (Fig. 1) は、アルデヒド基を有するカロテノイドであり、天然には緑黄色野菜や果物などに微量ではあるが存在する¹⁾。また、β-カロテンがビタミンAに代謝される経路における中間代謝物の一つとして知られている²⁾。米国では、製造バッチごとの検定証明書の取得が不要な着色料として認められており、その使用基準は、固形及び半固形食品では1ポンド (約0.45kg) あたり、液状食品では1パイント (約0.47 L) あたり、15mgを超えない範囲と規定されている³⁾。欧州連合 (European Union : EU) では、β-アポ-8'-カロテナール単独もしくは他の特定の着色料との組み合わせ

で食品の種類ごとに使用基準が定められており⁴⁾、固形及び半固形食品では50～500mg/kg、液状食品では100～200mg/Lと上限が規定され、プロセスチーズ、菓子、アイスクリーム、スープ、ワインなどの色づけに使用されている⁴⁾。

β-アポ-8'-カロテナールは、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : JECFA) で安全性が評価されており、かつ、米国及びEU諸国等で使用が広く認められており、国際的に汎用性が高いと考えられる食品添加物 (国際汎用添加物) の一つである。国際汎用添加物については、国が主体的に指定に向けた検討を行うこととされていることから、β-アポ-8'-カロテナールのJECFAにおける

[#] To whom correspondence should be addressed:
Kyoko Sato; Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9484; Fax: +81-3-3700-6950; E-mail: ksato@nihs.go.jp

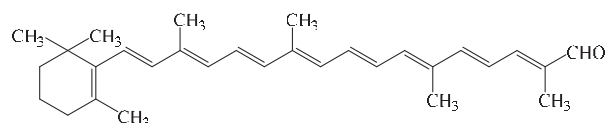


Fig. 1. Structure of β-apo-8'-carotenal

規格(JECFA規格)⁵⁾を参考に成分規格案を検討した。成分規格の純度試験の設定において、「副成色素」の試験を検証したところ、ピーク形状や分析時間等に問題点があり、JECFA規格からの変更が必要であった。そこで、本研究では、JECFA規格に記載されている方法を参考にして、β-アポ-8'-カロテナールの成分規格の「副成色素」分析法を開発した。本検討結果は、2014年6月18日に告示されたβ-アポ-8'-カロテナールの成分規格の基礎データとした⁶⁾。

2. 実験方法

2.1 試料

β-アポ-8'-カロテナールは(一財)日本食品添加物協会を通じて入手した企業提供品(1社1製品)を用いた。

2.2 試薬

β-カロテン、テトラヒドロフラン、酢酸アンモニウム及びジブチルヒドロキシルエン(BHT)は和光純薬工業製特級品を、メタノール及びアセトニトリルはMerck社製液体クロマトグラフィー用グラジエントグレードを、2-プロパノール、エタノール及びギ酸は和光純薬工業製高速液体クロマトグラフ用を、*N*-エチルジイソプロピルアミンは関東化学(株)製を使用した。水は超純水製造装置(Millipore製Milli-Q[®] Gradient A10型)により精製した比抵抗値18.2MΩ・cm以上の純水を用いた。

2.3 装置

高速液体クロマトグラフは、Agilent製HPLCシステム1200 Infinityシリーズ(デガッサー:1260 Hi Pデガッサー、送液ユニット:1260 Bi ポンプ、カラムオープン:1290サーモスタット、フォトダイオードアレイ検出器:1260 DAD、オートサンプラー:1260 Hi P ALS、システムコントローラー:1260 TCC)を使用した。

紫外可視分光光度計は、日本分光(株)製分光光度計V-560型を用いた。

2.4 試料液等の調製

β-アポ-8'-カロテナール10mgを量り、0.025w/v% BHT含有テトラヒドロフランを加えて溶かし、更に0.025w/v% BHT含有テトラヒドロフランを加えて100mlとし、この溶液1mlを取り、エタノールを加えて10mlとした液を試料液とした。別に、β-カロテン10mgを量り、同様にβ-カロテン溶液を調製した。

2.5 HPLC測定条件

非エンドキャップ型ヘキサデシルアミドプロピルシリル化シリカゲル(HDAPS)カラムはSupelco(Sigma-Aldrich)社製Supelcosil[™] Suplex[™] pkb-100(内径4.6mm、長さ250mm、粒子径5μm;米国薬局方(United States Pharmacopeia(USP))カラムL68⁷⁾相当品)を、エンドキャップ型HDAPSカラムはAscentis[®] RP-Amide(内径4.6mm、長さ250mm、粒子径5μm;USPカラムL60⁷⁾相当品)を、高度エンドキャッピング法により残存シラノール基を抑えたオクタデシルシリル化シリカゲル(エンドキャップ型ODS)カラムは(一財)化学物質評価研究機構製L-Column2 ODS(内径4.6mm、長さ250mm、粒子径5μm)を用いた。

移動相は、以下の2つの条件で検討した。

移動相①:2-プロパノール20mlにBHT 50mgを加えて溶かし、*N*-エチルジイソプロピルアミン0.2ml、0.2w/v%酢酸アンモニウム25ml、アセトニトリル455ml及びメタノール450mlを加えて混合し、室温まで戻した後、更にメタノールを加えて1000mlとした。

移動相②:2-プロパノール20mlにBHT 50mgを加えて溶かし、*N*-エチルジイソプロピルアミン0.2ml、0.2w/v%酢酸アンモニウム25ml、ギ酸1ml、アセトニトリル455ml及びメタノール450mlを加えて混合し、室温まで戻した後、更にメタノールを加えて1000mlとした。

その他の分析条件は以下の通りとした。

カラム温度:30℃、流速:0.6~1.5ml/min、測定波長:463nm、試料注入量:10μl

3. 結果及び考察

3.1 JECFA規格試験法の確認

β-アポ-8'-カロテナールのJECFA規格では、純度試験の副成色素(Subsidiary colouring matters)として、総色素中のβ-アポ-8'-カロテナール以外の色素を3%以下⁵⁾と定めている。

JECFA規格の試験法(JECFA法)では、HPLC(面積百分率法)を用いていることから、JECFA規格に規定されている分析条件(移動相:移動相①、カラム:Supelcosil[™] Suplex[™] pkb-100(内径4.6mm、長さ250mm、粒子径5μm)、流速:0.6ml/min)を用いて試料液及びβ-カロテン溶液について分析を行った。その結果、β-アポ-8'-カロテナールの保持時間は約12分、β-カロテンの保持時間は約32分となり、β-カロテンのピークが、β-アポ-8'-カロテナールのテーリング上に重なることが確認された。両化合物の保持時間は、JECFA法に規定された保持時間(β-アポ-8'-カロテナールの保持時間は7~9分、β-カロテンの保持時間は17.85~22.95分)より遅かった。そこで、流速を0.6ml/minから0.8

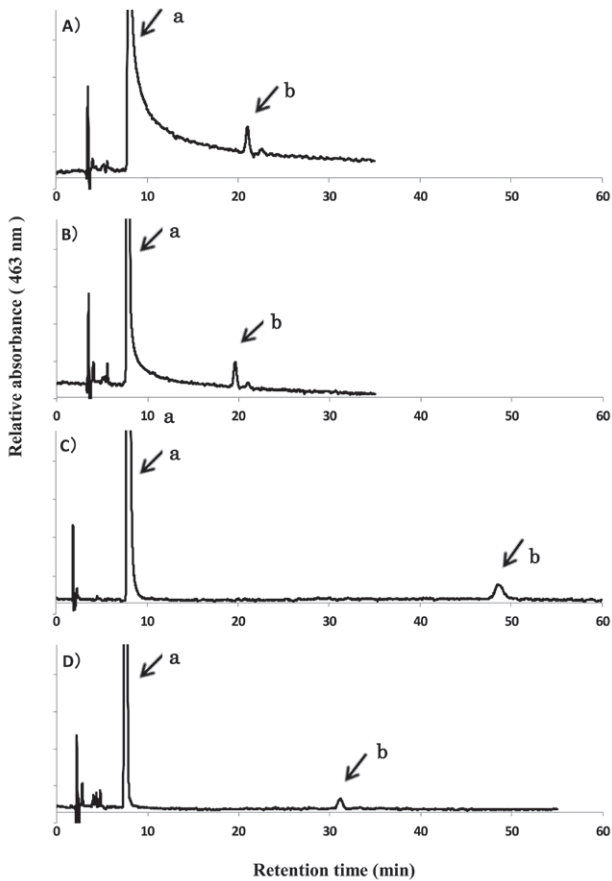


Fig. 2.

HPLC chromatograms of the β -apo-8'-carotenal sample solution using different HPLC methods for subsidiary colors

A) JECFA method at the 74th meeting in 2011

Mobile phase: mobile phase ① (without formic acid), column: SuplexTM pkb-100 (4.6mm i.d. \times 250mm, 5 μ m), column temperature: 30°C, flow rate: 0.8ml/min, detection wavelength: 463nm

B) Method using a mobile phase with formic acid

Mobile phase: mobile phase ② (with 0.1vol % formic acid), column: SuplexTM pkb-100 (4.6mm i.d. \times 250mm, 5 μ m), column temperature: 30°C, flow rate: 0.8ml/min, detection wavelength: 463nm

C) Method using an ODS column

Mobile phase: mobile phase ① (without formic acid), column: L-column2 ODS (4.6mm i.d. \times 250mm, 5 μ m), column temperature: 40°C, flow rate: 1.5ml/min, detection wavelength: 463nm

D) Method using an endcapped column

Mobile phase: mobile phase ① (without formic acid), column: Ascentis[®] RP-Amide (4.6mm i.d. \times 250mm, 5 μ m), column temperature: 30°C, flow rate: 1.2ml/min, detection wavelength: 463nm

a: β -Apo-8'-carotenal

b: β -Carotene

ml/minと変更したところ、 β -アポ-8'-カロテナールの保持時間は約9分、 β -カロテンの保持時間は約20分となり、JECFA法に記載の保持時間範囲になった。この分析条件における試料液の結果 (Fig. 2-A) を用い、検出波長463nmにおいて35分までに検出されるピークを対象 (総カロテノイド) とし、総カロテノイド中の β -アポ-8'-カロテナール以外のカロテノイドの量 (副成色素量) を面積百分率から求めたところ、平均5.2% (n=3) と、JECFA規格値上限⁵⁾の3%を超え、相対標準偏差も42%と高かった。これらの結果は、 β -アポ-8'-カロテナールのピークがテーリングし、 β -カロテンのピークがその上に重なったためと考えられ、分析法の変更が必要であると考えられた。 β -アポ-8'-カロテナール及び他のカロテノイドのHPLCを用いた分析法については様々な報告⁸⁻¹¹⁾がされているが、国際整合の観点から、JECFA規格法を基本とした分析条件の検討を行うこととした。

3.2 ギ酸を加えた移動相による分析法

JECFA法の移動相に0.1 vol%相当のギ酸を加えて分析を行うとピーク形状が良好になるという情報 (試料提供企業からの情報) があったため、0.1 vol%相当のギ酸を加え (移動相②)、流速0.8ml/minで分析を行ったところ、 β -アポ-8'-カロテナールのテーリングは幾分解消され、副成色素量も平均1.2% (n=3) とJECFA規格値上限⁵⁾の3%以下となった (Fig. 2-B)。しかし、酸を加えることによりカロテノイドの特有の波長での吸収が低下し、その影響は含有置換基により異なる¹²⁾ことから、ギ酸を含む移動相 (移動相②) 中ではカロテノイド間の吸光度比が移動相①の場合と異なる可能性が考えられた。そこで、JECFA法の移動相溶媒 (移動相①) 及びギ酸含有移動相溶媒 (移動相②) の各々に β -アポ-8'-カロテナールまたは β -カロテンを個々に2 μ g/mlの濃度で溶解した溶液について、紫外可視分光光度計を用いて、HPLC分析条件と同じ測定波長463nmにおける、 β -アポ-8'-カロテナールに対する β -カロテンの吸光度比の経時変化 (遮光、室温下) を調べた。その結果 (Fig. 3)、JECFA法の移動相溶媒 (移動相①, Fig. 3-A) では吸光度比がほぼ一定なのに対し、ギ酸含有移動相溶媒 (移動相②, Fig. 3-B) では、溶解5分後より吸光度比が減少した。 β -カロテンの保持時間は約20分であるため、分析中に β -アポ-8'-カロテナールに対する β -カロテンの量が減少し、副成色素量が低く算出される可能性があり、正確な副成色素量を求めることが困難と判断された。したがって、移動相にはギ酸を加えず、JECFA法記載通りのものを用いることとし、他の分析条件の変更を検討することとした。

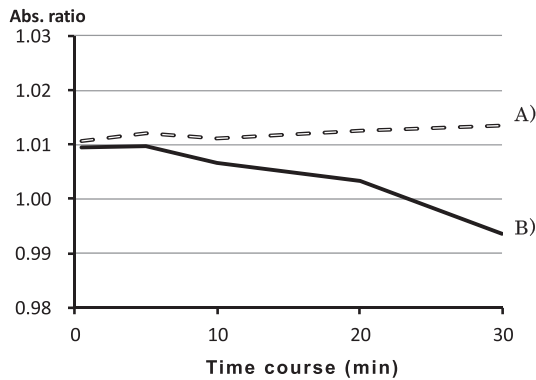


Fig. 3.

Ratio of absorbance at 463nm of β-carotene to that of β-apo-8'-carotenal in different mobile phases

A) Mobile phase ① (without formic acid)

B) Mobile phase ② (with 0.1vol% formic acid).

3.3 エンドキャップカラムによる分析法

JECFA法の分析条件及び流速を速くした条件 (Fig. 2-A) でテーリングが見られたのはβ-アポ-8'-カロテナールのピークのみであり、β-カロテンでは観察されなかった。JECFA法に規定されているカラムはシリカゲルにアルキルアミド基を化学結合させた際にエンドキャッピングを施していない。特定の化合物に限定してテーリングの症状が見られる場合、残存シラノール基に対する相互作用がテーリングの要因として考えられることから、今回の分析におけるβ-アポ-8'-カロテナールについても同様の事が懸念された。そこで、β-アポ-8'-カロテナールのテーリングを解消するため、分析用カラムをエンドキャップ型ODSカラムやエンドキャップ型HDAPSカラムに変更して再度検討を行った。

エンドキャップ型ODSカラム (L-Column2 ODS) を用い、JECFA法の分析条件を基本とし、流速を0.8ml/min、カラム温度を40℃に変更して分析したところ、β-アポ-8'-カロテナールのテーリングはほぼ解消されたが、その保持時間は約15分で、β-カロテンは試料注入後80分までに溶出されなかった。更に流速を1.5ml/minと速くしたところ (Fig. 2-C)、β-アポ-8'-カロテナールの保持時間は約8分となり、JECFA法記載の保持時間範囲となったが、β-カロテンは約48分と、溶出に時間を要した (Fig. 2-C)。更に移動相のメタノール/アセトニトリルの割合を変更して検討したが、β-カロテンの保持時間は顕著に短くならなかった。

また、エンドキャップ型HDAPSカラムを用い、JECFA法と同条件 (移動相①) で分析を行ったところ、β-アポ-8'-カロテナールのテーリングはほぼ解消され、保持時間は約15分、β-カロテンの保持時間は約62分となった。そこで、β-アポ-8'-カロテナールの保持時間を

7～9分にするため、流速を0.6ml/minから1.2ml/minと変更したところ (Fig. 2-D)、β-アポ-8'-カロテナールの保持時間は7.5分とJECFA法記載の保持時間範囲となり、また、β-カロテンの保持時間は31.1分とJECFA法に規定された保持時間より若干長いものの、改善が見られ、両化合物のピーク形状も問題が無く、良好なクロマトグラムが得られた (Fig. 2-D)。この条件で試料液を分析したところ、副成色素量は平均1.0% (n=3) とJECFAの規格値上限⁵⁾の3%以下であり、相対標準偏差は9.5%と比較的良好な結果が得られた。β-アポ-8'-カロテナールの副成色素分析法として良好に分析可能であることが示された。

4. まとめ

国際汎用添加物としてβ-アポ-8'-カロテナールの規格を設定するため、純度試験の中の副成色素試験の検討を行った。JECFA法では、シリカ担体の表面にアルキルアミド基を修飾させ、エンドキャッピングを施さない非エンドキャップ型HDAPSカラムを規定していたが、主成分であるβ-アポ-8'-カロテナールのテーリングが見られ、副成色素の量が規格値を超える結果となった。原因と考えられるピークのテーリングを解消することを目的として、JECFA法を基本とし、様々な検討を行った結果、JECFA法で規定していたタイプの担体にエンドキャッピングを施したエンドキャップ型HDAPSカラムを用いることで、ピーク形状や保持時間の問題が解消され、良好な結果が得られた。

本研究で得られた結果により、エンドキャップ型HDAPSカラムを用いたβ-アポ-8'-カロテナール中の副成色素量の分析法を確立した。確立した分析法は、β-アポ-8'-カロテナールの国内成分規格の純度試験に採用することが決定された⁶⁾。

引用文献

- 1) Mueller L, Boehm V: *Molecules* 2011;16:1055-69.
- 2) 高市真一, 三宅守, 富田純史: “カロテノイド—その多様性と生理活性—”, 裳華房, 東京, pp.69-70 (2006)
- 3) Electronic Code of Federal Regulations, Title 21, Chapter I, Subchapter A, Part 73, subpart A, § 73.90, β-Apo-8'-carotenal
http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=1f50be4a451f04ac26bb1e0919bce572&mc=true&node=se21.1.73_190&rgn=div8
- 4) The European Parliament and the Council of the EU: Official Journal of the European Communities, 1994; L237:13-29.
(<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/>

- ?uri=OJ:L:1994:237:TOC)
- 5) JECFA, "Compendium of Food Additive Specifications, Monograph 11", β -Apo-8'-carotenal, WHO/FAO, Rome, pp.21-4 (2011)
(http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph11/additive-111-m11.pdf)
 - 6) 食安発0618第1号, 食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件について (平成26年6月18日), 厚生労働省 (2014)
 - 7) USP, "United States Pharmacopeia 39", Chromatographic Columns, the United States Pharmacopeial Convention, Maryland, pp.2187-8 (2016)
 - 8) Brulc L, Simonovska B, Vovk I, Glavnik V: *J Chromatogr A*. 2013;1318:134-41.
 - 9) Mitrowska K, Vincent U, von Holst C: *J Chromatogr A*. 2012;1233:44-53.
 - 10) Breithaupt DE: *Food Chemistry* 2004;86:449-56.
 - 11) Scotter MJ, Castle L, Croucher JM, Olivier L: *Food Addit Contam.* 2003;20:115-26.
 - 12) Mortensen A, Skibsted LH: *J Agric Food Chem.* 2000;47:279-86.