

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成28年度分担研究報告書

分担研究課題：既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究
分担研究者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

既存添加物 カキ色素の成分研究

要旨 既存添加物名簿記載のカキ色素は、「カキノキ科カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) の果実を発酵後、焙焼したものより、温時含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はフラボノイドである。赤褐色を呈する」とされる。本研究では、カキ色素の品質規格作成のための化学的検討として、本製品の含有成分の解明を行っており、昨年度は予備検討として本製品をHPLC分析し、数ピークの検出について報告している。本年度はそれら成分の詳細を明らかにする目的で、製品エキスの分離精製を繰り返し、HPLCでほぼ1ピークのフラクションを得ることができたが、機器分析により構造解析を試みたところ、夾雑物が認められさらなる精製を計画中である。一方、本製品には構造不特定の縮合型タンニン類が含まれることが示唆されたことから、高分子領域の分子量についてGPCにより測定した。その結果、重量平均分子量約20万であることが明らかとなった。今後これらの構造的特徴についても検討を要する。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 講師

A. 研究目的

既存添加物名簿記載のカキ色素は、「カキの果実から得られた、フラボノイドを主成分とするもの」とされ、着色料として用いられる。また、その基原・製法・本質は、「カキノキ科カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) の果実を発酵後、焙焼したものより、温時含水エタノールで抽出して得られたもの、又は温時弱アルカリ性水溶液で抽出し、中和して得られたものである。主色素はフラボノイドである。赤褐色を呈する」とされる。既存添加物の多くは植物抽出物であり、多数の成分が含まれているため、その品質管理には詳細な成分解析に基づいた規格作成が必要である。カキ色素については製品の詳細な分析に関する報告はなく、検討対象の一つとしてあげられる。そこで本研究では、カキ色素

製品中の含有成分を精査することによる品質規格作成のための基礎的な化学データの集積を目的に検討を行い、昨年度はHPLCにおいて複数のピークとともに縮合型タンニンと考えられるブロードピークを確認している。これら結果を踏まえ、今年度はそれらの単離精製を試みた。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

試料となるカキ色素製品は日本食品添加物協会を通じて入手した。分離、精製にはカラム充填剤として Diaion HP-20 (三菱化学)、Sephadex LH-20 (GEヘルスケア・ジャパン)、MCI-gel CHP-20P (三菱化学)、Chromatorex ODS (富士シリシア化学) を用いた。その他試薬はすべて特級または高速液体クロマトグラフィー用を使用した。

2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は Shimadzu LC-10Avp システム

(島津製作所)を使用した。測定条件は以下のとおり。カラム: YMC-pack ODS AQ-3C2(2.0 I.D. × 150 mm)(ワイエムシィ)、カラム温度: 40、流速: 0.25 mL/min、測定波長: 280 nm、試料注入量: 3 μL、移動相: (A) 0.01 M H₃PO₄; 0.01 M KH₂PO₄ (1: 1) 及び(B)メタノール[濃度勾配条件: 0→30 min (B: 0→50%)、30→50 min (B: 50→60%)、50→75 min (B: 0%)]。GPCの測定条件は以下のとおり。カラム: TSK-gel Super AW4000 (6.0 I.D.×150 mm)(東ソー)、カラム温度: 35、流速: 0.3 mL/min、測定波長: 280 nm、移動相: *N,N*-dimethylformamide + 3M HCOONH₄ (0.5%)、標品: ポリスチレン (PS) 標準試料 (Shodex)。

3. 分離精製

カキ色素製品に蒸留水を加えて溶解させた後、酢酸エチル、*n*-ブタノールを順次加えて分配し、各分画物を得た。そのうち水分画物について Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、さらに MCI-gel CHP-20P、Chromatorex ODS を用いて分離精製を試みた。

4. カキ色素の HPLC 及び GPC 分析

カキ色素製品を水に溶解させ、上記条件で HPLC 及び GPC 分析を行った。また、分離した各分画物についても同条件で分析を行った。

C.D 研究結果・考察

1. 化合物の分離精製

カキ色素製品 (47.4 g) に蒸留水 1 L を加えて溶解させた後、酢酸エチル (1 L × 3)、*n*-ブタノール (1 L × 3) で順次分配を行い、各分画物 [酢酸エチル分画物 (129.4 mg)、*n*-ブタノール分画物 (773.6 mg)、水分画物 (45.4 g)] を得た。得られた水分画物のうち 20 g を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、8 画分を得た (図 1)。このうち、Fr. 38-52 (1.0 g) について、さらに MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィーに付し、8 画分を得た (図 2a)。さらにこのうち、Fr. 8 (47.2 mg) について、Chromatorex ODS カラムクロマトグラフィーに付し、6 画分を得た (図 2b)。得られた 1 画分 (Fr. 13-17 (9.7 mg)) について、¹H-NMR を測定したところ、

高磁場側に夾雑物由来と思われるシグナルが観察され (図 3)、さらに精製が必要であることが示唆された。

2. GPC 分析

カキ色素製品中成分の分子量分布について、GPCにより検討した結果、重量平均分子量約20万であった (図4)。今後これらの構造的特徴について検討が必要である。

E. 結論

カキ色素の品質規格作成に供する化学的検討として、製品中の成分精査を行った。HPLC でほぼ1ピークのフラクションを得ることができたが、機器分析による構造解析を行ったところ夾雑物が認められ、今後さらなる精製を計画する。一方、本製品には構造不特定の縮合型タンニン類が豊富に含まれることが示唆されたことから、高分子領域の分子量についてGPCにより測定したところ、重量平均分子量約20万であることが明らかとなった。今後これらの構造的特徴についても検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

H. 健康危機情報

なし

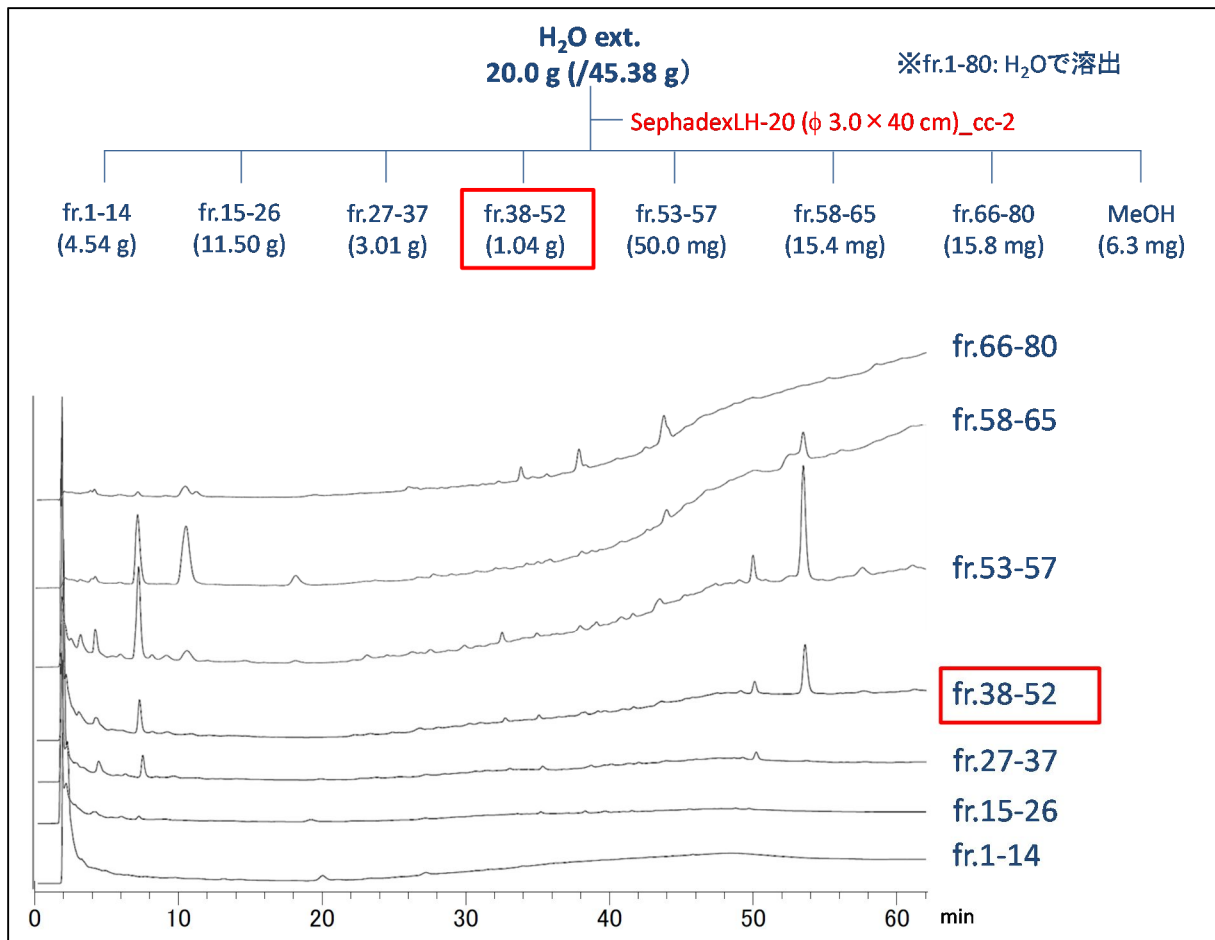


図 1. 水分画物の分離精製 1

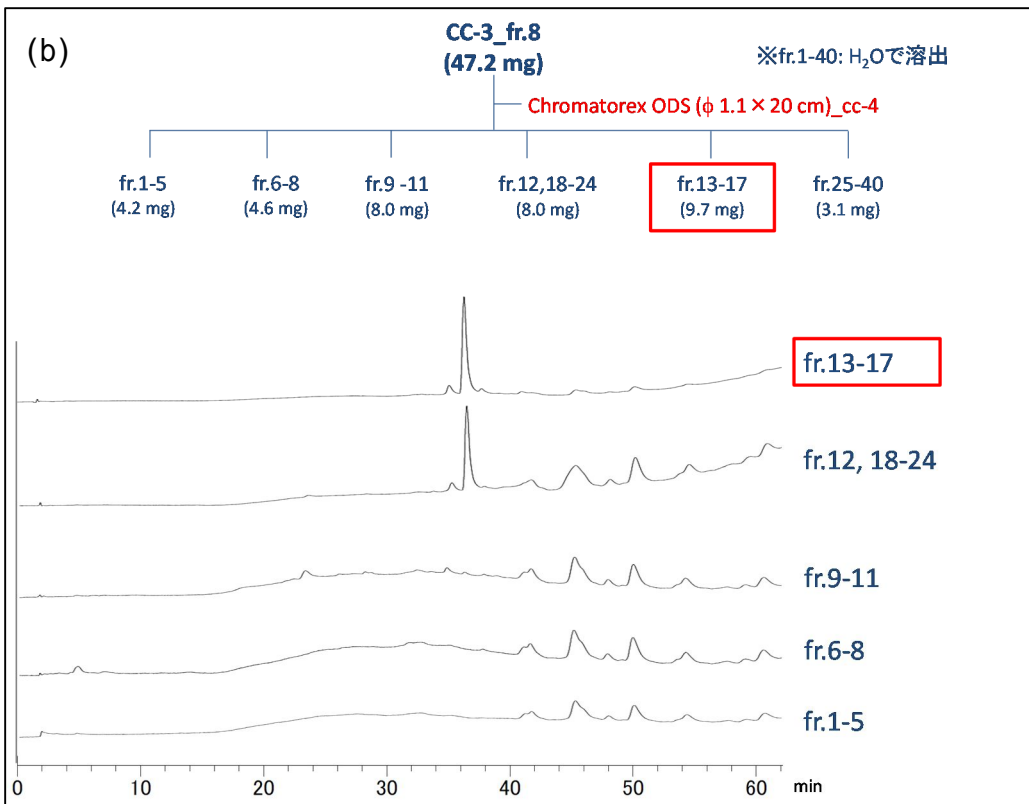
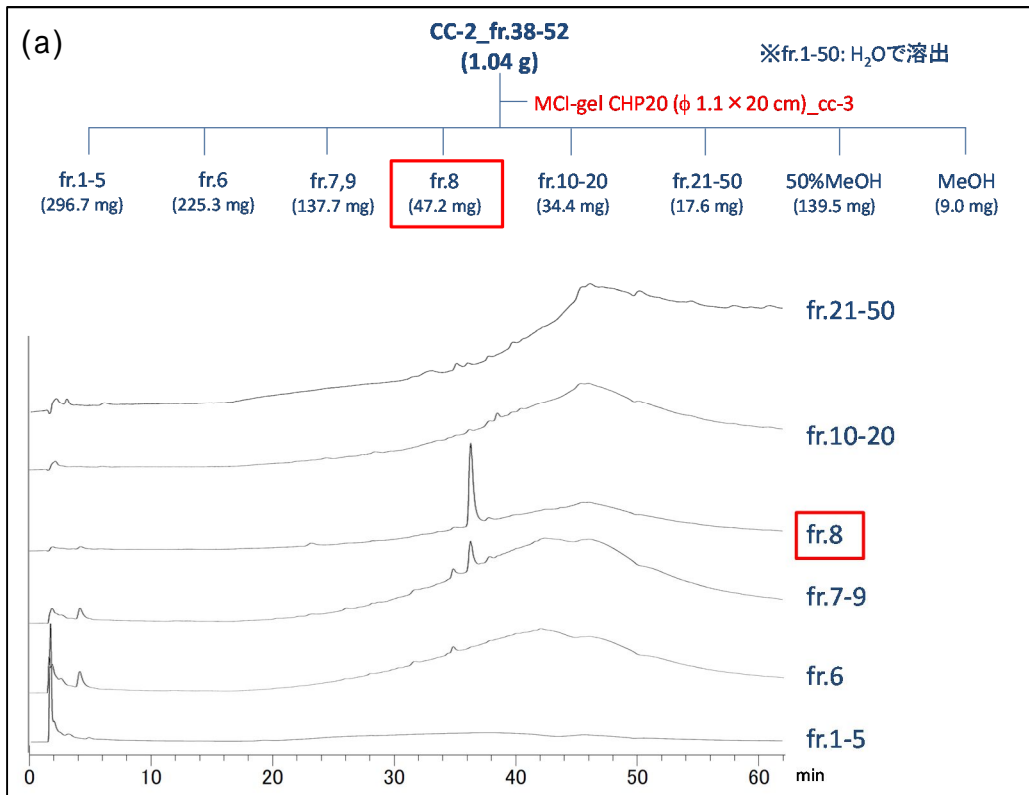


図 2. 水分画物の分離精製 2

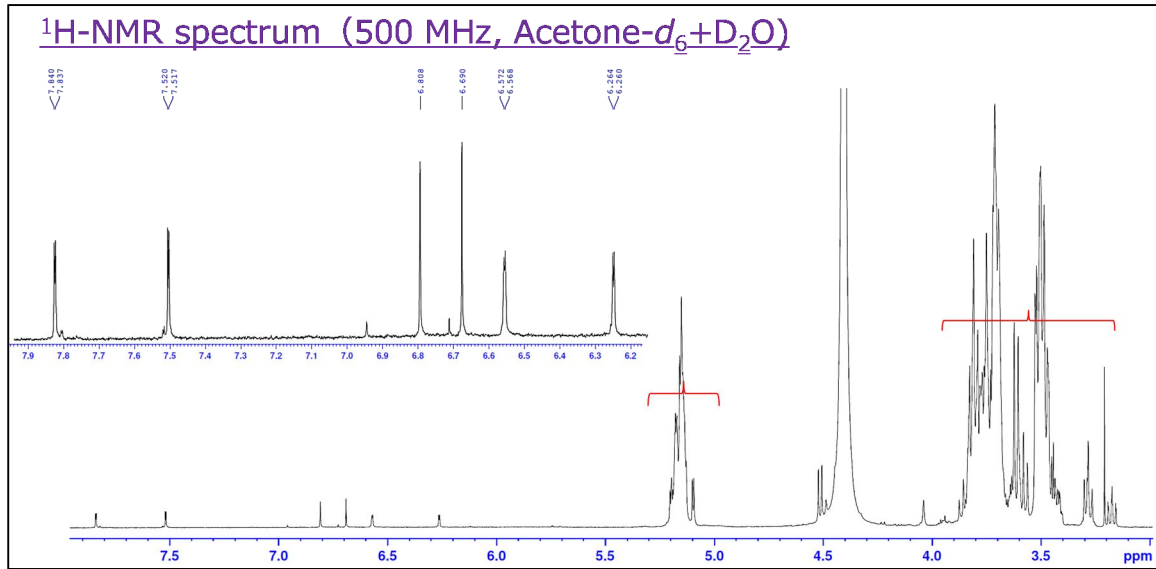


図 3. fr. 13-17 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

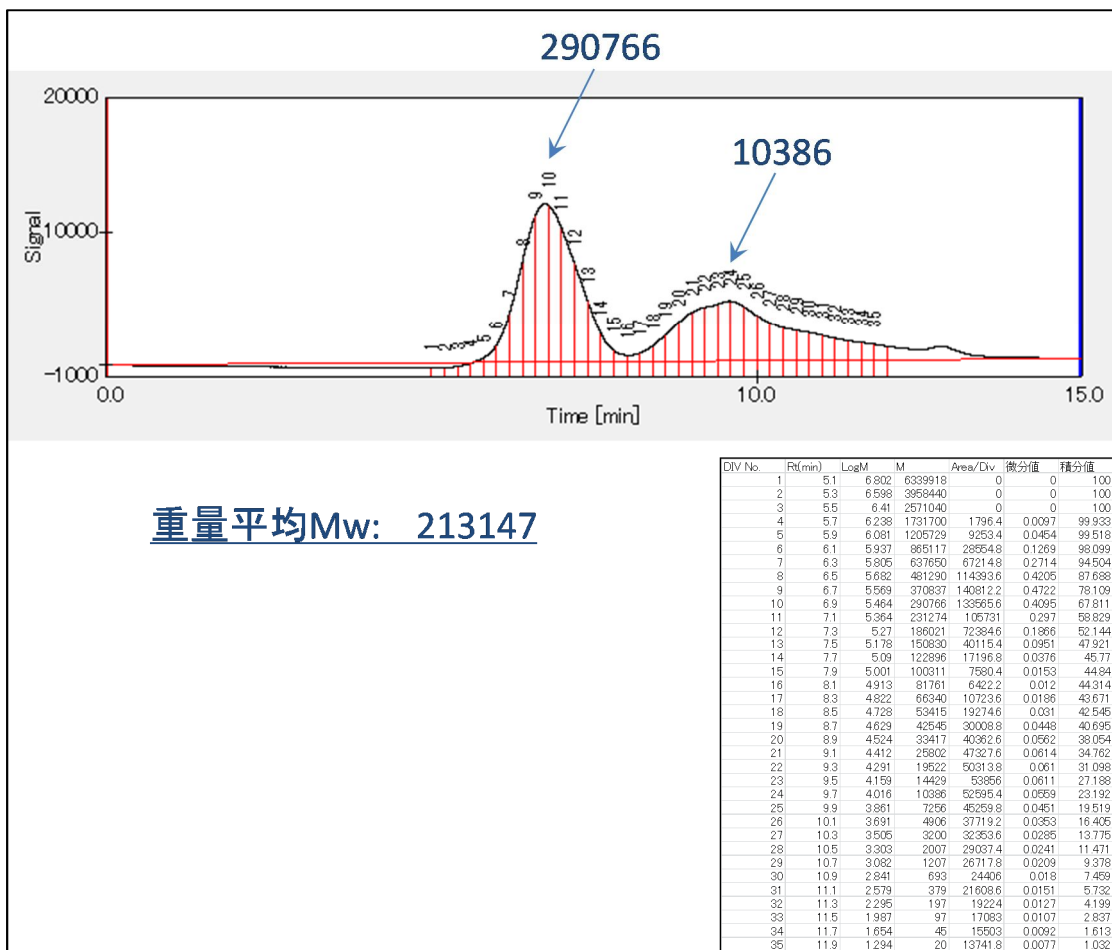


図 4. カキ色素の GPC 分析