

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）

既存添加物の品質確保のための評価手法に関する研究

(H29-食品-一般-007)

平成30年度研究分担報告書

既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究

～カキ色素の成分研究～

研究分担者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

**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情報の集積を目的に検討を行った。これまでの検討から、HPLCで明瞭なピークが検出されないことが示唆されていることから、若干のピークが認められた*n*-ブタノール分画物について、カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し試みた。しかし、いずれの充填剤に対しても親和性を認めず、単一の化合物は得られなかった。粗分画物の<sup>1</sup>H-NMRの測定結果から、カキ色素には*trans-p-coumaric acid*が含まれることが推定され、HPLCによる標品との直接比較から同化合物の存在を明らかにした。一方で、カキの果実にはフラボノイドや縮合型タンニンの含有が報告されているため、それらの含有を予測して検討していたが、本製品についてマグネシウム-塩酸反応（フラボノイドの定性試験）及び*n*-ブタノール-塩酸反応（縮合型タンニンの定性試験）を行ったところ、いずれも呈色反応を示さなかった。また、<sup>13</sup>C-NMRの長時間測定においても、縮合型タンニンに特徴的なカテキンユニット由来のシグナルを認めなかったことから、カキ色素の本質は既存添加物名簿に記載されているフラボノイドやタンニンに由来するものではなく、それらは加工の過程において分解されていることが示唆された。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 准教授

## 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<sup>1)</sup>。これまでカキ色素について、カキの果実に含まれるフラボ

ノイドや縮合型タンニンの含有を予測して含有成分について検討してきた。製品エキスの分離精製を何度と繰り返し、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、再現性のある単一のピークを得ることが困難であることが示唆された。そこで本研究では、カキ色素について、さらに製品中の含有成分を精査することを目的に検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1) 試料及び試薬

試料となるカキ色素製品 (Lot No. H26K041, A960) 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, SEPABEADS SP850 (三菱化学), YMC gel ODS-AQ (ワイエムシー), Develosil Lop ODS (野村化学), Cosmosil 75C18-PREP (ナカライテスク), カラムクロマト C18 75A (GL サイエンス), 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。

## B-2) 装置及び測定条件

逆相 HPLC は, 検出器: SPD-20A, ポンプ: LC-20AT (島津製作所), カラム: L-column ODS L-C18 (5  $\mu$ m,  $\phi$  2.1 $\times$ 150 mm) (化学物質評価研究機構), 流速: 0.2 mL/min, 測定波長: 280 nm, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 移動相: 0.01 M リン酸緩衝液: アセトニトリル (85:15) を使用した。

NMR は, Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン) ( $^1$ H-NMR: 500MHz,  $^{13}$ C-NMR: 126 MHz) を使用した。

UV は, Shimadzu UVmini-1240 (島津製作所) を使用した。

## B-3) 分離精製

カキ色素製品 (47 g) を水に溶解させた後, 酢酸エチル (EtOAc), *n*-ブタノール (BuOH) (各 3 L) で順次分配し, EtOAc 分画物 (129.4 mg), *n*-BuOH 分画物 (773.6 mg), 水分画物 (45.38 g) を得た。そのうち, *n*-BuOH 分画物 (703.6 mg) について, 各種カラムクロマトグラフィーによる分離, 精製を行った。

*n*-BuOH 分画物 (703.6 mg) について, 様々の充填剤 (YMC gel ODS-AQ, SEPABEADS SP850, Develosil Lop ODS, Cosmosil 75C18-PREP, CHROMATOREX ODS, カラムクロマト C18 75A) を使用してカラムクロマトグラフィーを繰り返し行ったが, 単一な化合物を単離するには至らなかった。得られたフラクションのうち, *n*-BuOH 分画物を YMC gel ODS-AQ カラムクロマトグラフィーにより得られた水溶出部をさらに CHROMATOREX ODS カラムクロマトグラ

フィーに付し, 分画物 A (0.5 mg) を得た。本分画物について,  $^1$ H-NMR 測定の結果, 混合物が確認されたが, 芳香族領域に *trans-p*-coumaric acid に対応するシグナルが観察されたため, HPLC による標品との直接比較を行った結果, 同画分には *trans-p*-coumaric acid<sup>2)</sup> が含まれることが示された。

$^1$ H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O+CD<sub>3</sub>OD (2:1))  $\delta$  7.48 (2H, *J*=7.5 MHz, H-2, 6), 7.31 (1H, *J*=15 MHz, H-8), 6.86 (2H, *J*=7.5 MHz, H-3, 5), 6.34 (1H, d, *J*=15 MHz, H-7)。

## B-4) カキ色素の分析

### (1) ブタノール-塩酸反応

カキ色素に *n*-BuOH と塩酸 (19:1) の混合溶液を 1 mL 加え, 90 $^{\circ}$ C で 2 時間加熱を行い, 得られた反応液の紅色領域 (600~750 nm) 付近の吸収を確認した。

### (2) マグネシウム-塩酸反応

カキ色素水溶液 (1 mg/mL) にマグネシウムリボン 1 片と塩酸 数滴加え, 色の変化を観察した。

## C. 結果及び考察

### C-1) 分離精製

HPLC で若干のピークが認められたカキ色素の *n*-BuOH 分画物について, 種々のカラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し試みたが, いずれの充填剤に対しても親和性を認めず, 単一な化合物は得られなかった。しかし, 粗分画物の  $^1$ H-NMR の測定結果から, カキ色素には *trans-p*-coumaric acid が含まれることが推定され, HPLC による標品との直接比較から同化合物の存在を明らかにした (図 1)。

### C-2) NMR 測定

カキの果実には縮合型タンニンやフラボノイドの含有が知られているため<sup>3)</sup>, 本色素の構成成分としてそれらの存在を確認する目的で, カキ色素自体の NMR 測定を行った。 $^1$ H-NMR を測定した結果, 供試したカキ色素には縮合型タンニンに特徴的な A 環及び B

環に由来する芳香族領域（約 6~8 ppm）のブロードなシグナルが観察されなかった（図 2）。さらに  $^{13}\text{C}$ -NMR を測定した結果、縮合型タンニンに特徴的なシグナル<sup>4)</sup>は観察されなかった（図 3）。よって、供試したカキ色素に縮合型タンニンは主に含有していないことが示唆された。

### C-3) 定性反応

NMR 測定の結果から、カキ色素には縮合型タンニンの含有が主に認められないことが示唆された。そこで、縮合型タンニンの存在を確認する目的で、縮合型タンニンの定性試験である *n*-ブタノール-塩酸反応を行った。その結果、カキ色素は本試験では紅色を呈さず、吸光度測定においても 600~750 nm 付近に吸収は観察されなかった（図 4）。

さらに、既存添加物名簿においてカキ色素は「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をいう」と記載されている。そのため、フラボノイドの定性反応試験であるマグネシウム-塩酸反応を行い、カキ色素中のフラボノイドの含有について確認を行った。その結果、カキ色素は本試験で呈色を認めず、フラボノイドはほとんど存在しないことが示された（図 5）。

### D. 結論

既存添加物カキ色素について、カラムクロマトグラフィーによる分離、精製を繰り返し実施したが、いずれの充填剤を用いても、単一な化合物は得られなかった。しかし、分離したフラクションから、カキ色素には *trans-p*-coumaric acid が含まれることが示唆され、HPLC による標品との比較から同化合物の存在を明らかにした。本製品について、*n*-ブタノール-塩酸反応、マグネシウム-塩酸反応を試験した結果、いずれも呈色は観察されなかった。また  $^1\text{H}$ 及び $^{13}\text{C}$ -NMR測定を行った結果、フラボノイドや縮合型タンニン由来のシグナルはほとんど観察されず、それゆえ、カキ色素の本質は既存添加物名簿に記載されているフラボノイドではなく、別の化合物で

あることが示唆された。カキ色素の着色は、アミノ酸と糖によって生成したメラノイジンの可能性も考えられる。今後、その本質を明らかにするためのさらなる検討が必要である。

### E. 参考文献

- 1) 厚生省告示第 120 号 (1996) “既存添加物名簿” 平成 8 年 4 月 16 日。
- 2) SDBSWeb. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. <http://sdbb.db.asist.go.jp>
- 3) 奥田拓男編 “最新生薬学” 東京、廣川書店、2007、p. 203.
- 4) Ito H, Kobayashi E, Takamatsu Y, Li S-H, Hatano T, Sakagami H, Kusawa K, Satoh K, Sugita D, Shimura S, Itoh Y, Yoshida T (2000) Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines. *Chem Pharm Bull* **48**: 687-693.

### F. 研究業績

1. 学会発表  
なし
2. 論文発表  
なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

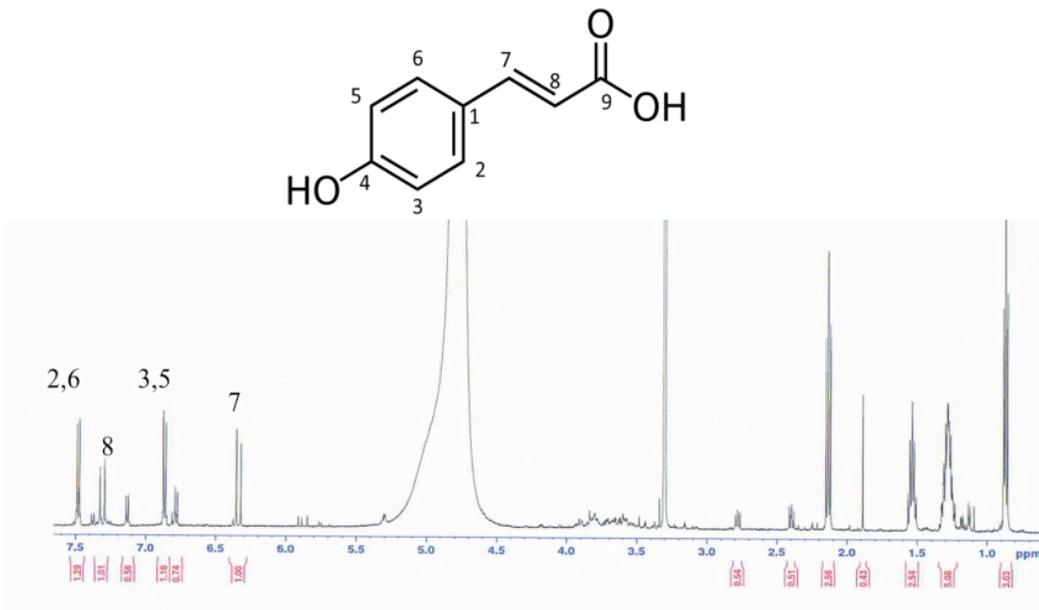


図 1. カキ色素由来の分画物 A の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (500 MHz, D<sub>2</sub>O + CD<sub>3</sub>OD (2:1))

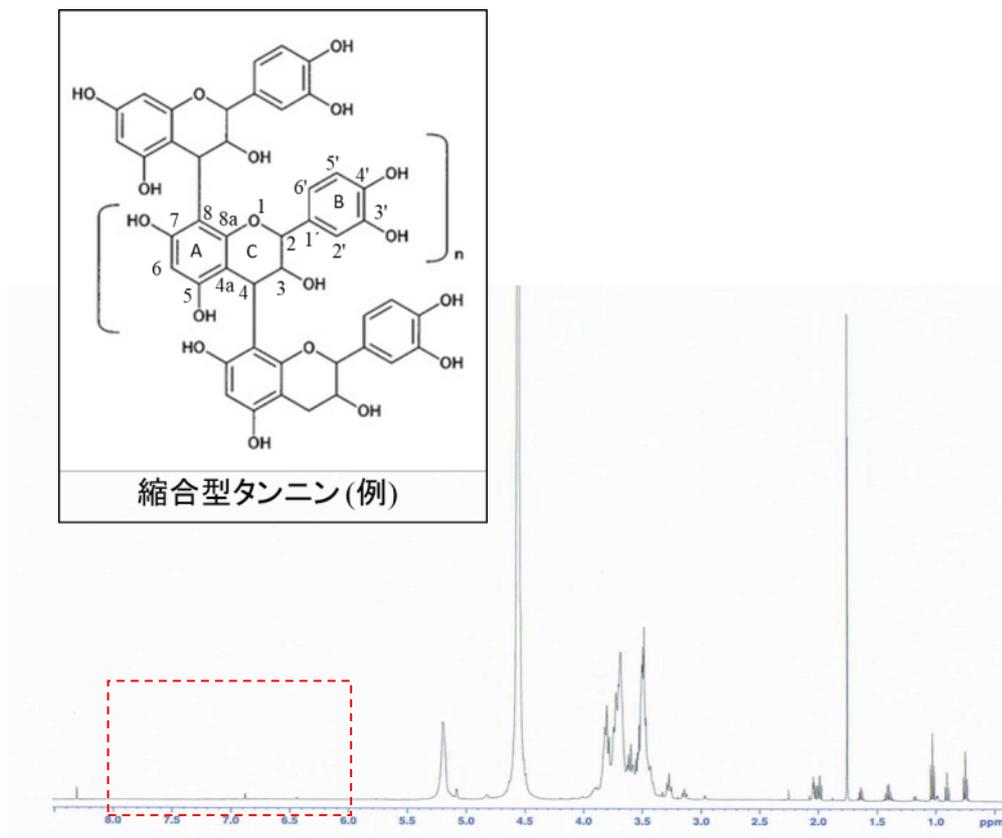


図 2. 供試したカキ色素の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (500 MHz, D<sub>2</sub>O + acetone-*d*<sub>6</sub> (2:1))

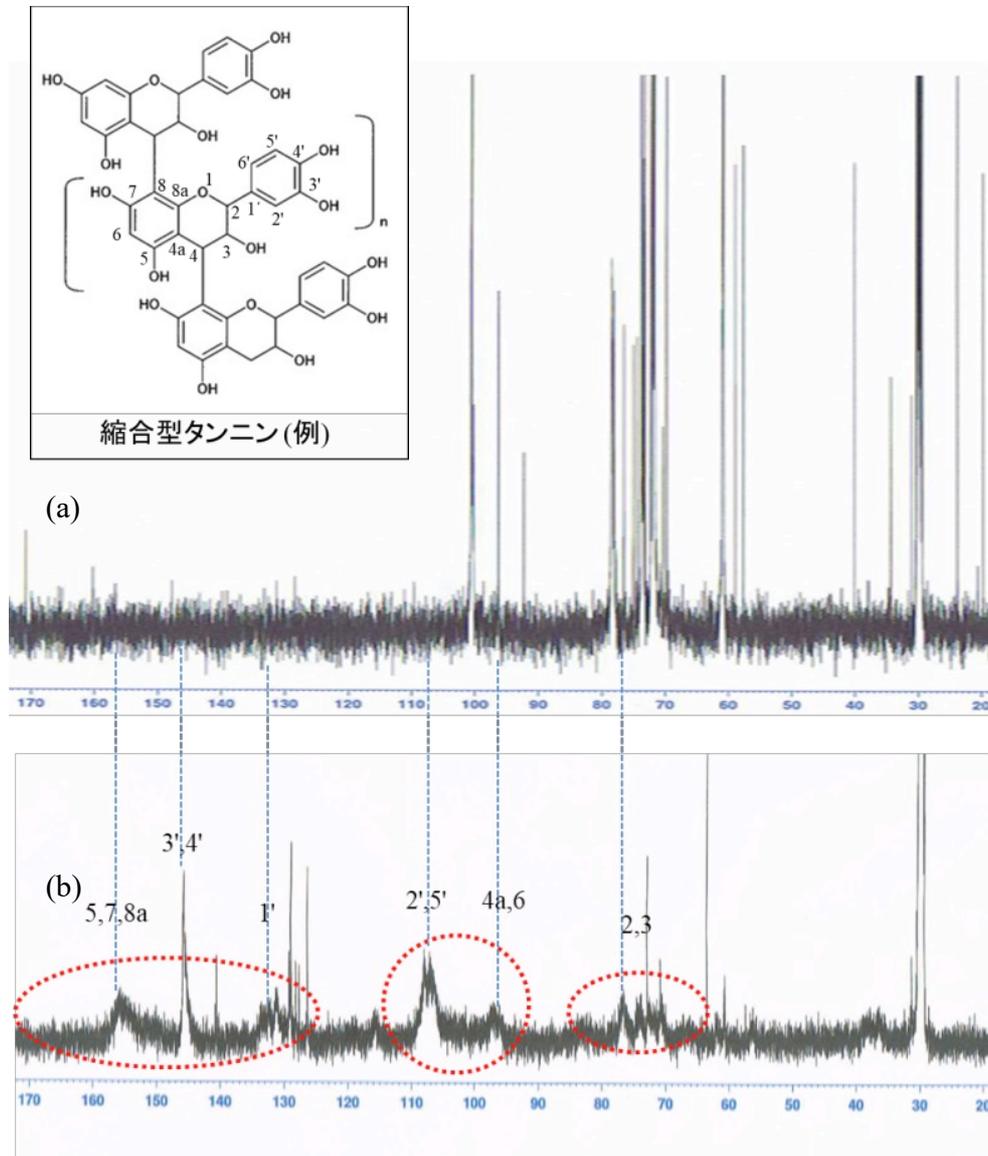


図3. 供試したカキ色素(a)と縮合型タンニン画分(例)(b)の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルの比較(126 MHz, D<sub>2</sub>O+acetone-*d*<sub>6</sub>(2:1))

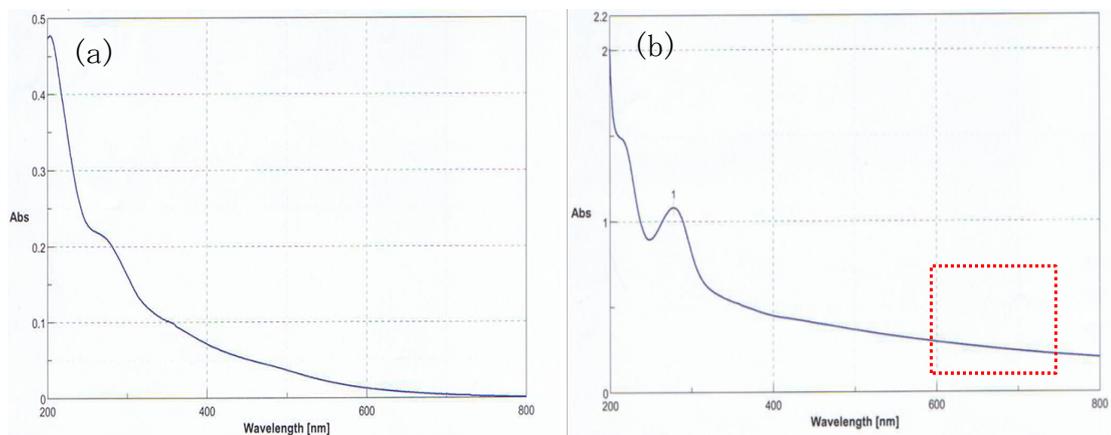


図 4. (a) カキ色素水溶液（反応前）と(b) ブタノール-塩酸反応後の吸収スペクトル

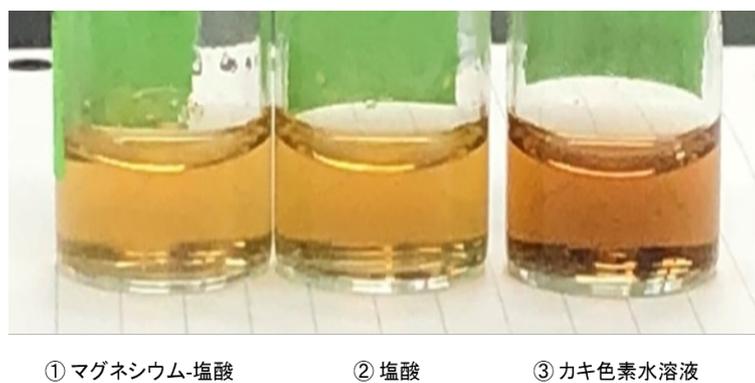


図 5. カキ色素のマグネシウム-塩酸反応

① マグネシウムリボン 1 片と塩酸（数滴）添加後、② 塩酸（数滴）添加後、③ カキ色素水溶液