

原 著

ベニバナ花弁に含まれる赤色素カルタミンの分析

長岡 一郎, 笠原 義正

Quantitative Analysis of Carthamin from Flower Petals
of *Carthamus tinctorius* L. Using HPLC

by Ichiro NAGAOKA and Yoshimasa KASAHARA

Though several methods have been reported for the determination of carthamin including the petal of *Carthamus tinctorius*, there are no suitable one.

Therefore the investigation was carried out to clarify the method of determination for carthamin.

The test samples were extracted with acidic solution pH4~5 and the extracts were refined using a solid-phase extraction cartridge before high performance liquid chromatography (HPLC). The test samples were successfully resolved by HPLC using an ODS column after pretreatment.

The contents of carthamin of fresh flower was 16~25mg/100g and dry flower (Ranka) was 83mg/100g and dry flower for dyeing (Benimochi) was 236mg/100g.

Key Words : ベニバナ *Carthamus tinctorius* L., 固相抽出 solid-phase extraction,
高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography (HPLC),
カルタミン carthamin

I はじめに

ベニバナの花弁は古くから染色の原料や婦人病に対する生薬として利用されてきた。近年は、その色素が天然添加物として食品加工にも利用され、すでに商品化されているものもある。これらのベニバナ色素には水に溶けやすい黄色素と水に溶けにくい赤色素の2種類があり、各々個別に利用されているが、ベニバナは主に紅染め及び口紅の原料として使用されていたため、赤色をイメージされる場合が多い。しかし、ベニバナ特有の赤色素(カルタミン)の定量法はまだ確立されておらず、食品添加物として比色による相対的評価や色価による評価などが検討されているにすぎない^{1,2)}。この方法は、特有波長の吸光度を指標にしているものの、単一物質の測定ではないので妨害要因も多く、重量法に比べて誤差を生じると考えられる。定性に関しては、薄層クロマトグラフィーを用いる方法や吸光度を指標にする方法が検討されている³⁾。

そこで、今回ベニバナの管状花や乾燥した乱花等に含まれるカルタミンについて、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて定量を行うために、前処理の方法を含めて検討したので報告する。

II 実験方法

1 試料

ベニバナ(生)の管状花(花弁)は山形県河北町および山形県立農業試験場で栽培されたもの、乱花は山形県白鷹町で栽培、調製されたもの、紅もちは山形県高島町で栽培、調製されたものを用いた。

山形県立農業試験場で栽培されたものは、播種日は1区を4月20日、2区を5月2日とした。採取日は1区を7月8日(1期)、7月13日(2期)、7月19日(3期)の3段階に、2区は7月13日(1期)、7月19日(2期)に行い5試料とした。

2 試薬等

標準品のベニバナ赤色素カルタミンは山形大学工学部物質化学工学科 小野寺準一教授に御供与いただいた。

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用メタノール及び酢酸(試薬特級)及び α 、 β 、 γ -シクロデキストリンは関東化学株式会社製を、フナセルSF粉末(結晶セルロース)はフナコシ株式会社製を、炭酸ナトリウム(試薬特級)、ポリアミドB-O、メタノール(試薬特級)、エタノール(試薬特級)、アセトン(試薬特級)、アセトニトリル(残留農薬用)、ピリジン(試薬特級)は和光純薬工業株式会社製を使用した。固相抽出用Sep-Pak Vac PS-2(担体量500mg)、Sep-Pak Vac C₁₈(担体量500mg)、Sep-Pak Plus PS-2、

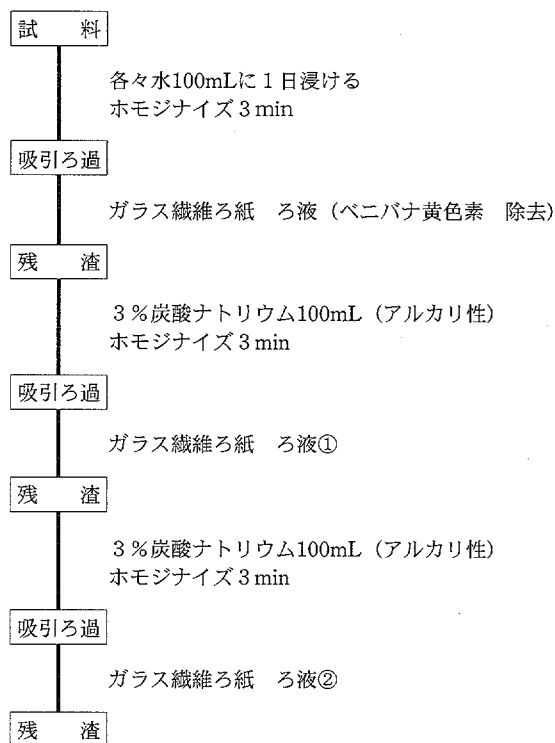


図1 カルタミンの抽出法

Oasis™HLBはWaters社製を使用した。

HPLC装置 ポンプ：PU-980, 検出器：UV-970, デガッサー：DG-980-50, オートサンプラー：AS-950, 低圧グラジエントユニット：LG-980-02, カラム切換バルブユニット：HV-992-01, UV/VIS多波長検出器：MD-915 (以上日本分光株)

使用カラム, Inertsil ODS-2 (150mm×4.6mm I.D., GL Sciences) の他にTSK-GEL ODS-80 TM (150mm×4.6mm I.D., TOSOH), Inertsil ODS-2 (250mm×4.6mm I.D., GL Sciences), Mightysil RP-18 (150mm×4.6mm I.D., 関東化学株), Crestpak C18S (150mm×4.6mm I.D., 日本分光株) を用い検討した。

3 試料溶液の調製

試料はベニバナ (生) の花卉 2g, 乱花 (乾燥) 1g, 紅もち (乾燥) 0.5gを用いた。はじめに各々の試料を100mLの水に約1日浸した後, 3分間ポリトロンで破碎混合し, ガラス繊維ろ紙で吸引ろ過し黄色素を除去した。次にベニバナ赤色素を抽出するため, 残渣にそれぞれ3%炭酸ナトリウム100mLを加えアルカリ性とし10分間放置後, 3分間ポリトロンで破碎混合し, ガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した。残渣は再度同様な操作で破碎混合し吸引ろ過した。これらのろ液を合わせ, 10mLをとり10%酢酸15mLを加えpH 4~5に調製した。次いで固

ろ液①, ②を合わせ, そのうち10mLに10%酢酸15mLを加えpH 4~5に調製

(固相抽出カラム：Sep-Pak Vac PS-2 (500mg))

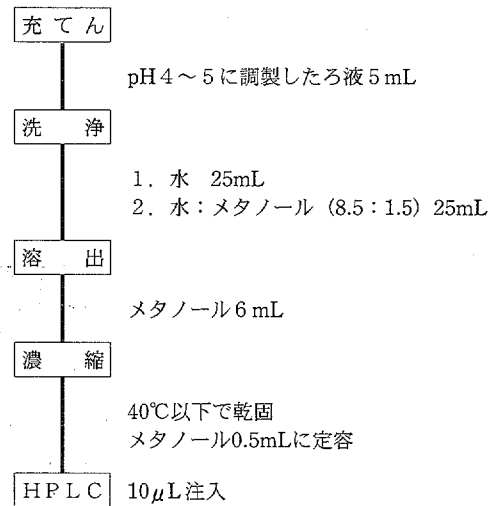


図2 固相抽出カラムによるクリーンアップ

相抽出用バキュームマニホールド (Waters社製) を使用し, Sep-Pak Vac PS-2によりクリーンアップを行った。(図1, 2)。

4 標準溶液の調製

カルタミン1.0mgを正確に量り, メタノール10mLに溶解して標準溶液とした。

5 測定条件

分析カラム：Inertsil ODS-2 (150mm×4.6mm I.D.), 測定波長：520nm, 流速：1.1mL/min, 移動相：メタノール：水：酢酸 (80：20：0.5), 注入量：10μL

III 実験結果及び考察

1 試料前処理の検討

抽出は, Kimら⁴⁾, 森岡ら⁵⁾の方法を参考にし, 試料を水100mLに1日浸す方法をとった。ここで破碎混合したベニバナの抽出試料をろ過する際には, 通常の紙のろ紙を用いると, ベニバナ赤色素がろ紙のセルロースに吸着されてしまうので, ガラス繊維ろ紙を用いた。

黄色素は水に溶けるが, 赤色素は水に不溶のため黄色素を水で抽出除去した花卉の残渣を用いた。赤色素を分離するには通常, 残渣を弱アルカリ性水溶液で抽出し, 酸で中和する際にセルロースパウダーを加え, これにベニバナ赤色素を吸着させた状態で分取する。小野寺らは赤色素抽出に炭酸ナトリウムと塩酸を使用していることから, これを参考に10%炭酸ナトリウムを用いたところ, 10%酢酸でろ液を弱酸性にするには多量の溶液が必要

であった。36%塩酸では4 mLのろ液に対して約0.7 mLの量で調製可能であったが、強酸によるカルタミンの分解が考えられるので、種々検討したところ3%炭酸ナトリウムと10%酢酸の組合せが適当であると判断した。また、10%酢酸を加えpHを4~5にしたのは、ベニバナの赤色素が弱酸性のときに最も発色されるからである。カルタミンの可視吸収スペクトルを見ると、520 nmに吸収極大が認められるが、図3に示したようにpHの違いで吸収強度が異なり、pH 5が最も強い吸収になることから裏付けられる。さらに、カルタミンの前駆物質をカルタミンに変換させる酵素の最適pH値が4~5であることも根拠の一つである⁶⁾。

次に、予試験として、セルロースに吸着したカルタミンを溶出させるためにメタノール、エタノール、アセトニトリル、アセトン、ピリジンの5つの溶媒を用いた。その結果、カルタミンはメタノール以外では溶出されなかった。しかし、メタノールでも満足する結果ではなかった。そこで、吸着に用いる担体の方を検討した。山形県工業技術センターの報告⁹⁾には、シクロデキストリンに赤色素が吸着されるという知見があったので、カルタミンの吸着を試みたが、残留する黄色素と同程度に吸着され、カルタミンの選択的溶出が難しく、この方法の適用は困難と考えられた。さらに、食品添加物のタール色素を吸着分離するためのポリアミドを用いたが十分には吸着されなかった。これらのことから、従来の方法では適切に分離精製ができないと考えた。そこで、水で抽出されるベニバナ黄色素の除去及び操作の簡便性を目的に前処理を再検討した。我々は、タンパク、塩類、糖類を除去しながらカルタミンを保持する逆相分配固相抽出用Sep-Pakが有用であると考えた。Sep-Pakの選定については、充填剤の種類としてC₁₈(オクタデシルシラン)、PS-2(スチレンジビニルベンゼン共重合体)、Oasis™HLB(オアシスポリマー)の3種類を検討した。その結果、Sep-Pak Vac C₁₈ではカルタミンが保持されず、Oasis™HLBでは残留したカルタミンと黄色素を分別することができなかった。PS-2を用いると少量残留している黄色素等を溶出する溶媒でもカルタミンは保持されたので、目的外物質の除去が可能であった。PS-2のコンディショニングでは、黄色素成分の溶出液として水-メタノール系の溶媒で検討した。水-メタノールの割合については、黄色部分が(8:2)で、赤色部分が(6:4)で溶出することを目視により検討し、最終的にはHPLCで確認して設定した。すなわち、水-メタノール(8:2)25 mLではカルタミンが固相抽出カラムPS-2に一部保持されず溶出した。水-メタノール(8.5:1.5)25 mLではカルタ

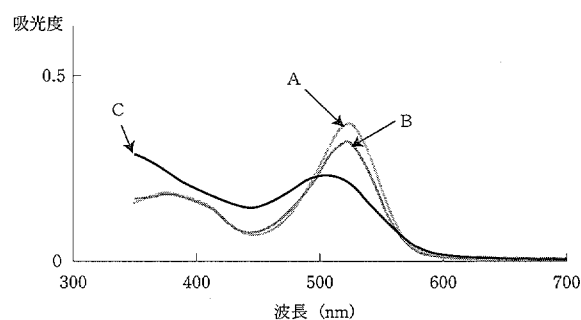


図3 pH 5, pH 7, pH 10のカルタミン紫外可視吸収スペクトル

—A: pH 5, —B: pH 7, —C: pH 10

ミンがPS-2に保持されたまま黄色素等を溶出することができた。そこで、水25 mL、水-メタノール(8.5:1.5)25 mLで黄色素等を分別除去し、次いで保持されているカルタミンをメタノール6 mLで溶出する方法を設定し、クリーンアップ操作とした。

2 HPLC条件の検討

小野寺ら⁷⁾はHPLCを用い、水-メタノール-酢酸(70:30:0.5)の溶媒でカルタミンを分析していたので、これを参考にHPLC条件を検討した。はじめに酢酸を除いて溶出してみたが、ピークがブロードになったので、酢酸をそのまま使用しながら水-メタノールの比率を変えて、再現性、保持時間等を検討した。前処理にPS-2を用いたことにより、夾雑物のピークが少なく、カルタミンの保持時間を短くすることが可能となったので、水-メタノール-酢酸(80:20:0.5)の溶離液を使用することとした。

HPLCカラムは逆層系のカラム5種類を用い検討した。TSK-GEL ODS-80 TM, Mightysil RP-18, Crestpak C18Sの3種類は、テーリングでピークがブロードになったり、不純物のピークと重なり分離がうまくいかなかった。Inertsil ODS-2では20分以内でピークを分離することができた。このカラムを用いてカラム長15 cmと25 cmの長さの違いを比較すると分離は変わらなかったため保持時間の短いInertsil ODS-2(150 mm × 4.6 mm I.D.)を用いることにした。

3 ベニバナ(生)、乱花、紅もちのベニバナ赤色素の同定、定量

多波長検出器付HPLCにより保持時間及び可視部吸収スペクトルを用いて同定、定量した。カルタミンの標準品の吸収極大は520 nm、保持時間は11.3分であり、ベニバナ(生)、乱花、紅もちの試料のピークは標準品のそれとほぼ同じであった。図4にベニバナ赤色素の標準品及びベニバナ(生)から抽出したベニバナ赤色素のHPLC

クロマトグラムを示した。

カルタミンの定量は、生のペニバナ5検体、乱花1検体、紅もち1検体について行った。

生のペニバナは、播種時期及び採取場所を変えた1区1期～3期、2区1期～2期の5つに場合分けし栽培したものである。それらの含量を比較してみると生の花100gに対して1区1期では25.0mg、1区2期22.5mg、1区3期34.2mg、2区1期16.2mg、2区2期25.0mgとなり、開花初期より終期がカルタミン含量が多く、播種時期から開花までが長いほど花弁の生産量も多く、カルタミン含量も多いことが明らかとなった。(図5)。

また、紅もち、乱花、ペニバナ(生)のカルタミンの含量を比較すると、試料100gに対して紅もちが236.5mgと最も多く、乱花83.3mg、ペニバナ(生)34.1mgの順であった。しかし、生のペニバナ花弁と乾燥品の乱花、紅もちの含量を比較するのは適切でないので、生の花弁を40℃で6時間乾燥処理したものを比較すると、98.3mg/(乾燥重量100g)となり、乱花とほぼ同程度の含量になることが明らかとなった(図6)。以上のことからペニバナ赤色素カルタミンは、今回の抽出方法、前処理方法で、HPLCを用いて定量することが可能となった。しかし、純度の高いカルタミンの分取が難しいこともあって、御供与いただいたカルタミンの量では添加回収実験まではできなかった。また、カルタミンは光などの諸条件により分解すると考えられるので、これらの分解要因の検討も必要である。

なお、この研究は平成13年度新分野探索研究推進事業において山形県立農業試験場と共同研究を行ったものの一部である。

謝 辞

貴重な色素標品(カルタミン)を御供与いただいた山形大学工学部教授の小野寺準一先生及び東洋FCC株の柏木敏夫氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Morimoto, T., Kato, Y., Nakamura, M., Determination of the Content of Coloring Matter in Carthamus Red and Carthamus Yellow, Jpn J Food Chem 5, 236-238, 1998
- 2) 谷村顕雄, 第7版 食品添加物公定書解説書 廣川書店, 東京, PP.1241-1243, 1999
- 3) Hirokado, M., Kimura, K., Suzuki, K., Sadamasu, Y., Katsuki, Y., Yasuda, K., Nishijima, M., Detec-

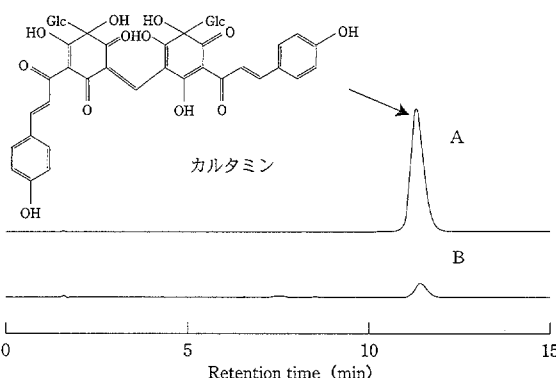


図4 カルタミンのHPLCクロマトグラム

A:カルタミン標準品 B:ペニバナ(生)花弁抽出カルタミン
HPLC条件 カラム: Inertsil ODS-2 (150mm×4.6mm I.D.),
注入量: 10μL, 測定波長: 520nm, 流速: 1.1mL/min,
移動相: メタノール: 水: 酢酸 (80: 20: 0.5)

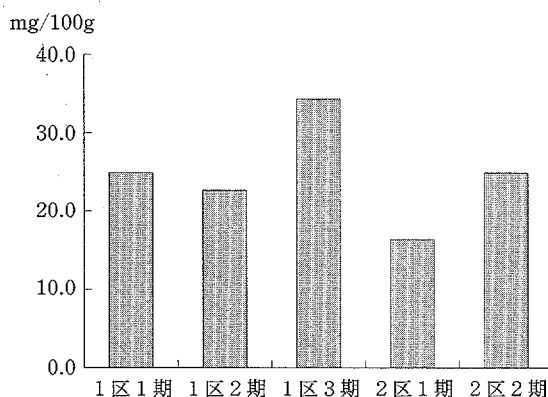


図5 ペニバナ(生)花弁のカルタミン含量

1区1期: 播種日	4月20日,	採取日	7月8日
1区2期: 播種日	4月20日,	採取日	7月13日
1区3期: 播種日	5月2日,	採取日	7月19日
2区1期: 播種日	5月2日,	採取日	7月13日
2区2期: 播種日	5月2日,	採取日	7月19日

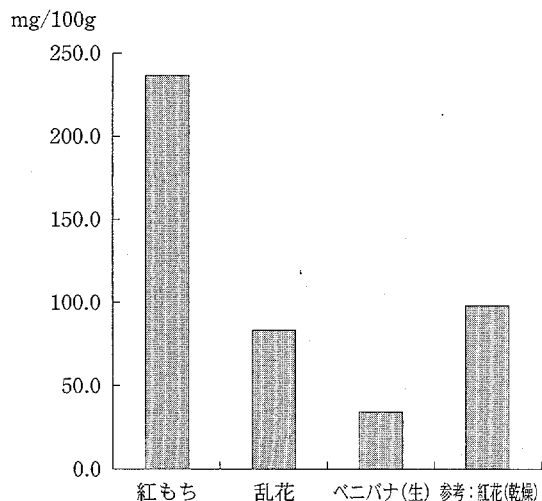


図6 紅もち、乱花、ペニバナ(生)花弁のカルタミン定量

- tion Method of Madder Color, Cochineal extract, Lac Color, Carthamus Yellow and Carthamus Red in Processed Foods by TLC, *J Food Hyg Soc Jpn* 40, 488-493, 1999
- 4) Kim, J.-B., Cho, M.-H., Hahn, T.-R., Paik, Y.-S., Efficient purification and chemical structure identification of carthamin from *Carthamus tinctorius*, *Agric Chem Biotech* 39, 501-505, 1996
- 5) 森岡裕人, 石塚健, 大場剛, 村川敬二, 木山英俊., 紅花色素の有効利用に関する研究, 山形県工業技術センター報告 18, 6-11, 1986
- 6) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., Hahn, T.-R., Enzymatic Conversion of Percarthamin to Carthamin by a Purified Enzyme from the Yellow Petals of Safflower, *J Agric Food Chem* 48, 3917-3921, 2000
- 7) Onodera, J., Kawamoto, K., Matsuba, S., Sato, S., Kojima, H., Obara, H., Biotransformation of Safflower Yellow B to Carthamin, A Coloring Matter of Safflower, *Chem Lett* 901-902, 1995