

野菜のカロテノイド分析法

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 伊藤秀和

【はじめに】

野菜に含まれるカロテノイドで機能性成分として重要なものは、トマトに含まれるリコペンやホウレンソウに含まれるルテイン等が挙げられる。カロテノイドの抽出法に関してはジエチルエーテル：メタノール7：3（体積比）を使用する事例を説明する。トマト中リコペンに関しては、前述の抽出溶媒中のリコペンを簡便迅速法（吸光光度法）または高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により定量する方法を説明する^{1, 2)}。この抽出法はホウレンソウ中カロテノイドの抽出にも適用できる。HPLCを用いる定量においては、主要なカロテノイドの分離も併せて記載する。

リコペンおよびルテインの化学構造と分子式を図1に示した。リコペンの吸収係数は472 nmで $3450 \text{ \%}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、ルテインの吸収係数は445 nmで $2250 \text{ \%}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である³⁾。

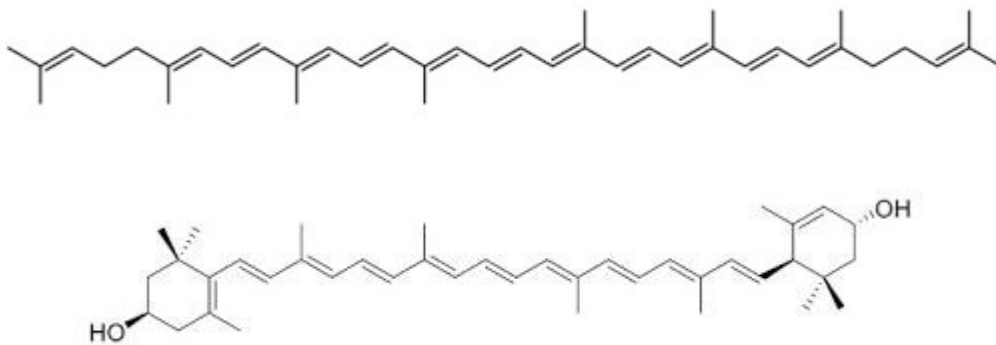


図-1 リコペン（上： $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ 、all-trans-lycopene、 ψ, ψ -carotene）
およびルテイン（下： $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$ ）の化学構造⁶⁾

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

1)抽出・吸光光度法用

- ・メスシリンダー
- ・試薬瓶（抽出溶媒を保存）
- ・家庭用ミキサー（切れ味の良いチタン刃のものが望ましい）
- ・計量スプーン（2.5cc 位のもの）
- ・量り（0.1 mg 単位で表示可能で、再現性が0.1 mg 以下の機種をお勧めする。）
- ・栓付褐色遠沈管（50mL 容量）（または20mL ビーカー）
- ・ドラフト
- ・（ホモジナイザー：ミキサーにより十分に試料が破砕される場合は使用しなくても可）

- ・ピペット
- ・パスツールピペット
- ・褐色メスフラスコ（50、100mL 等）
- ・シリンジ（1～2.5mL 容量、抽出液を濾過する時にディスポーサブルフィルターを装着して使用）
- ・5mL 蓋付き褐色バイアル（濾過した抽出液を 2 倍希釈して吸光度測定まで保存、抽出液を希釈せずに定量する時は不要。）
- ・蓋付き石英セル（光路長 10 mm）
- ・可視分光光度計（抽出液の 505 nm の吸光度を測定）

2) HPLC 用

- ・メスフラスコ（1L 等）：移動相調整用
- ・シリンジ（同上、抽出液を濾過する時にディスポーサブルフィルターを装着して使用）
- ・高速液体クロマトグラフィー（HPLC）装置（下記 3 を参照）

2. 試薬

1) 抽出用試薬

- ・ジエチルエーテル（特級、抗酸化剤 BHT を約 3 ppm 含む）
- ・メタノール（特級）
- ・ディスポーサブルフィルター（孔径 0.2 μ m、ジエチルエーテル、メタノール、アセトン、n-ヘキサンが使用可能なもの、例：ジーエルサイエンス（株）製 GL クロマトディスク非水系）

2) HPLC 分析用試薬

- ・リコペン等標準液（和光純薬工業（株）取扱い DHI Institute of water and environment 製）
- ・Sigma Aldrich（シグマ・アルドリッチ）製トマト由来リコペン標準試薬（1 mg (L9879)、上記 DHI 製リコペン標準液を使用する場合は不要）
- ・アセトン（特級）
- ・（n-ヘキサン（特級）：DHI 製のリコペン標準液を使用する場合は不要）
- ・高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用メタノール
- ・酢酸アンモニウム（特級）

3. HPLC

- ・インラインデガッサー
- ・HPLC 用ポンプ（1 ポンプ）
- ・カラム：関東化学（株） Mightysil RP-18GP（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、製造番号 25416-96）
- ・サンプルインジェクター（オートサンプラ等、注入量：10 μ L（目安））
- ・カラム温度：25 度（室温）
- ・移動相流速：1.0 mL/min（アイソクラティック分析）
- ・検出波長：450 nm
- ・記録計（インテグレーター）

4. 調合・調整

1) 抽出液

- ・ジエチルエーテル：メタノール 7 : 3 (v/v (体積比))

例えば、ジエチルエーテル 700 mL とメタノール 300 mL を別々にメスシリンダーで測り取り混合する。

2) HPLC 用試薬

- ・アセトン：n-ヘキサン 4 : 6 (v/v (体積比))

リコペン標準試薬を溶かすために使用する。上記 4.1) に準じて調製する。DHI 製リコペン標準液を使用する場合は不要。

- ・0.01% (w/v) 酢酸アンモニウムを含むメタノール

HPLC の移動相として使用する。1 L 調整する場合は、酢酸アンモニウム 100mg を少量の HPLC 用メタノールに溶解して 1 L のメスフラスコに移し、HPLC 用メタノールで 1 L にする。酢酸アンモニウムは吸湿し易いので、少量を冷蔵し、量り取る前にデシケーター中に少しの間保存することをお勧めする。

- ・リコペン標準液

シグマ・アルドリッチ製試薬 1 mg (L9879) を上記アセトン：n-ヘキサン 4 : 6 (v/v (体積比)) に溶解し、100mL メスフラスコで定容とする。さらに 10 倍希釈し、472 nm の吸光度を測定することにより純度を確認する。吸光度測定時のブランクはアセトン：n-ヘキサン 4 : 6 とする。DHI 製リコペン標準液を使用する場合は不要であるが、希釈せずに吸光度を測定し純度を確認しておく。

【プロトコール】

1. トマト中リコペンの抽出、吸光光度法によるリコペンの定量 (原法)^{1、2)}

- 1) ミキサーを使ってトマトを破砕する (未粉砕の破片が残っていないか確認)。
- 2) 破砕したトマト 3 g を褐色遠沈管 (50mL 容量) に量り取る。
- 3) 抽出溶媒 35 mL を褐色遠沈管に加え、ホモジナイザーを使って攪拌する。
- 4) 静置後、ピペットを使って抽出液を褐色のメスフラスコに移す。
- 5) 抽出溶媒 15 mL を遠沈管に加え、抽出液が無色になる (果肉が白くなる) まで 3) と 4) の手順を繰り返す。
- 6) 抽出溶媒により 100 mL に調整後、孔径 0.2 μ m のディスポーザブルフィルターで抽出液を濾過する。
- 7) ろ過した抽出液を 2 倍希釈し、蓋付きセルを使用して 505 nm の吸光度を測定 (目安として 0.05~0.8 の範囲) する。
- 8) 吸光度と試料重を計算式 (図 2 A) にあてはめて定量値を算出する。

2. トマト中リコペンの抽出、吸光光度法によるリコペンの定量 (サンプリング量が原法の 1/2 以下、操作法の改良版)

- 1) ミキサーを使ってトマトを破砕する (未粉砕の破片が残っていないか確認)。
- 2) 破砕したトマト 1.5 g を褐色遠沈管 (50mL 容量) に量り取る。 (または破砕したトマト 0.75 g を 20mL ビーカーに量り取る。以下カッコ内の要領で遂行可能)
- 3) 抽出溶媒 15 mL (10 mL) を褐色遠沈管に加える。

- 4) 静置後、パストツールピペットを使って抽出液を 100mL (50mL) の褐色メスフラスコに移す。
- 5) 抽出溶媒 8 mL (5 mL) を遠沈管に加え、抽出液が無色になる (果肉が白くなる) まで 3) と 4) の手順を繰り返す。
- 6) 抽出溶媒により 100 mL (50mL) に調整後、孔径 0.2 μm のディスポーサブルフィルターで抽出液を濾過する。
- 7) 蓋付きセルを使用して 505 nm の吸光度を測定 (目安として 0.05~0.8 の範囲、高濃度試料以外は希釈不要) する。
- 8) 吸光度と試料重を計算式 (図 2 A) にあてはめて定量値を算出する。

3. HPLC を用いるリコペンの定量

- 1) 一定容量にした抽出液を孔径 0.2 μm のディスポーサブルフィルターで濾過する。
(上記 1. または 2. (6) でディスポーサブルフィルターを用いて濾過する時に HPLC 用バイアルにもろ液を採取すると良い。)
- 2) 移動相は予め超音波 (超音波洗浄器) を使って短時間脱気し静置すると良い。
- 3) 抽出液または標準液を HPLC に 10 μL (目安) 注入し、1 点検量線法により濃度を算出する (図 2 B)。図 3 にリコペン標準液およびトマト抽出液のクロマトグラムを示した。予め、標準液の測定により 1 点検量線が適用できるピーク面積値の範囲を確認しておくことをお勧めする。

A) 吸光度法 (トマト果実 100g 中リコペン含有量 (mg))

$$= 0.1 \times (505\text{nm の吸光度} / 0.315) \times (100 / \text{試料重}) \times \text{希釈倍率}$$
 * 使用したメスフラスコが 100mL の場合 (50mL の場合は 0.1 を 0.05 とする。)

B) HPLC 法 (トマト果実 100g 中リコペン含有量 (mg))

$$= \text{HPLC に注入した標準液のリコペン量} (\mu\text{g}) \times \text{標準液の純度}$$

$$\times \text{トマトのピーク面積値} / \text{標準液のピーク面積値}$$

$$\times \text{メスフラスコの容量} (\mu\text{L}) / \text{トマト抽出液の注入量} (\mu\text{L}) \times 100 / \text{試料重} (\text{g})$$

$$\times 1 / 1000$$

図-2 リコペン定量の計算式

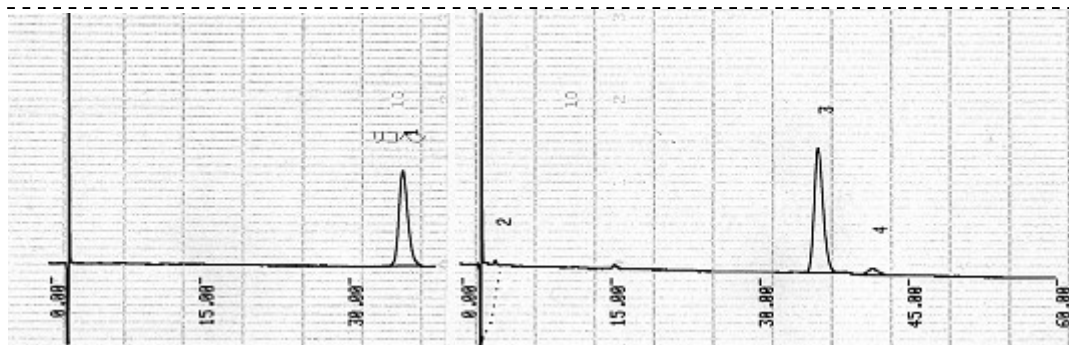


図-3 リコペン標準液(左)およびトマト抽出液(右)の HPLC クロマトグラム
(トマト抽出液 3, 4 のピークはそれぞれリコペン、 β -カロテン)

【プロトコールのポイント・注意点】

1. 野菜中カロテノイドの抽出

- 1) 原法はトマト中リコペン抽出時にホモジナイザーを使用していた^{1、2)}が、家庭用ミキサー使用により細かく破碎されていればホモジナイザーの使用は省略可能である。ただし、ミキサーはある一定以上の重量（容量）がないと破碎できない（ミキサーの刃がサンプルに接触できない場合は破碎できない。刃がミキサーの底近くに設置してある程、少ない容量でも破碎可能である。）。重量が少ないため家庭用ミキサーで粉碎できない試料は、試料と抽出溶媒を 100mL 容量の栓付褐色遠沈管に入れて試料を粉碎する等をお勧めする。
- 2) 表 1 に示したように、0.75 g のサンプリングでも再現性の良い定量値を得ることは可能である。透明ビーカーを使用して抽出した場合でも栓付褐色遠沈管を使用した場合の定量値と有意差の無い定量値は得られるが、前者では時間経過とともに少しずつリコペンが分解しやすい可能性が示唆され、かつドラフト使用時の排気によりビーカー中液面より上の側面にカロテノイドが析出しやすいので、栓付褐色遠沈管の使用をお勧めする。

表-1 トマト（各 n=3）のリコペン定量値（吸光光度法）

50mL褐色遠沈管	20mLビーカー
6.42 ± 0.11	6.29 ± 0.23

- 3) 表 2 に示したように、ミキサー破碎したトマト試料のみならず、凍結乾燥したトマト試料も利用可能である。表 2 の結果はトマト凍結乾燥物 75 mg を精秤して抽出した結果である（トマト生果ミキサー破碎物 0.75 g をビーカー中で抽出する方法に準じて 50mL 栓付褐色遠沈管を使用。）。

表-2 トマトの試料形態別（各 n=3）のリコペン定量値

試料形態	平均値 ± 標準偏差 mg/100g
ミキサー破碎(1.5g)	8.44 ± 0.53
凍結乾燥	8.76 ± 0.09
ミキサー破碎後凍結乾燥	8.82 ± 0.09

- 4) 抽出液を採取して褐色メスフラスコに移すときは、パストゥールピペットを使用して試料由来の固形分をなるべく移さないようにする。このためには原法のプロトコール 1 よりもホモジナイザーを使用しないプロトコール 2 を採用し、パストゥールピペットの吸込口を容器の底に接触させて抽出液を採取する方が固形分は除きやすい。いずれも抽出液が澄んだ状態で抽出液のみを採取するようにする。プロトコール 2 でパストゥールピペットを使っても固形分を吸いやすい時は 5mL 程度抽出液を加えて抽出液が澄んだら採取する。
- 5) ホウレンソウのカロテノイド抽出において、ケン化処理は省略可能である⁴⁾。また、ケン化等の抽出・精製処理によりカロテノイドの回収率が低くなる場合は、定

量上、目的成分と同様の挙動を示す内部標準物質を利用して定量することをお勧めする⁵⁾。一般に、カロテノイドは精製が進むほど不安定になることがある⁶⁾。そこで、本稿ではなるべく少ない抽出・精製操作で定量出来る方法を紹介した。ホウレンソウを冷凍するとミキサーを用いて破碎しやすく、トマトと同様に抽出できる。ホウレンソウ中ルテインの抽出効率かつ安定性は、ジエチルエーテル：メタノール7:3 \geq アセトン $>$ エタノールの順が示唆された。

2. HPLC を用いるカロテノイドの定量

- 1) HPLC の配管は、金属製をお勧めする。ピーク (Peek) チューブはお勧めしない。また、アセトンを 50 または 100 μ L 程度 HPLC に注入しベースラインを確認してから試料抽出液や標準液を注入すると良い。
- 2) HPLC のクロマトグラム上で主要なカロテノイドやクロロフィル (色素) は、ビオラキサンチン、カプサンチン、ルテイン (リテンションタイム (RT) は 3.5 分位) ・ゼアキサンチン、クロロフィル b、クロロフィル a、 β -クリプトキサンチン (RT は 12 分位)、リコペン (RT は 35 分位)、 α -カロテン、 β -カロテンの順に溶出する。試料の注入間隔は 60 分位確保する。フィトエンが最後の方に溶出するが、紫外線による検出が必要である。リコペン標品の不純物または分解産物が検出される時はリテンションタイム 15 分位に観察される。ホウレンソウ中にはルテインが含まれるが、ゼアキサンチンはほとんど検出されない⁴⁾。ホウレンソウのアセトン抽出液のクロマトグラムを図 4 に示した。

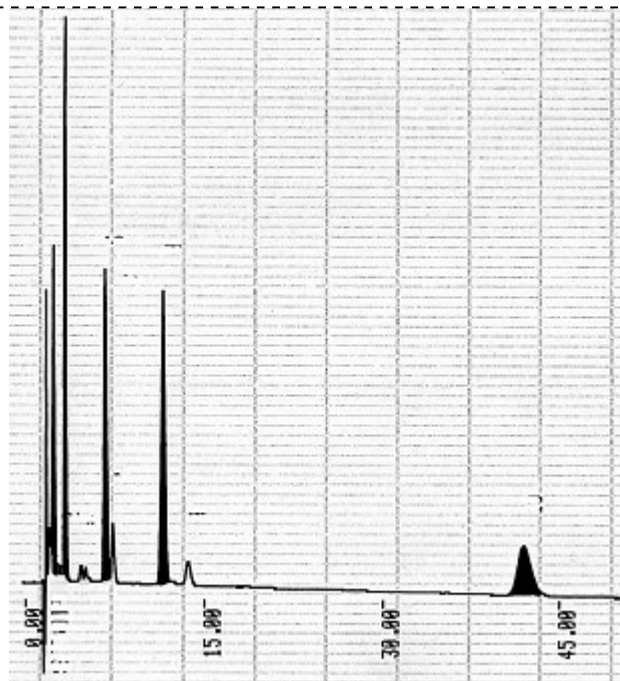


図-4 ホウレンソウの HPLC クロマトグラム
(抽出溶媒はアセトン、黒塗りしたピークは右から順に β -カロテン、クロロフィル a、クロロフィル b、ルテイン、ビオラキサンチン)

3) 通常、メタノールベースの移動相はアセトニトリルベースの移動相よりもカロテノイドの回収率が高い。モノメリック C18 カラムはカロテノイドの回収率が高いが、メタノールベースの移動相を用いてルテインとゼアキサントンのピークを分離することが難しい。ポリメリック C18 カラムはルテインとゼアキサントンのピークを分離できるが、カロテノイドの回収率はモノメリック C18 カラムよりも低い⁷⁾。また、移動相への酢酸アンモニウムの添加はカロテノイドの回収率が向上する^{7, 8)}。

3. その他

ニンジンやホウレンソウ中カロテノイドの簡便・迅速測定法も利用できる^{9, 10)}。これらの方法では抽出溶媒にアセトンを使用している。

【おわりに】

上述のように、HPLC を用いる主要なカロテノイドの定量において、「HPLC を用いれば必ず最も正しい定量値が得られる。」という先入観を持たないことをお勧めする。このような経緯から、「トマト中リコペンの非破壊計測法開発」^{8, 11)} 際には安定して精度良く定量出来る上記吸光光度法を採用した。吸光光度法と HPLC 法によるトマト中リコペン濃度は広い濃度範囲において良く一致する^{1, 8)}。

【参考文献】

- 1) 伊藤秀和、堀江秀樹、トマトリコペン抽出に適した溶媒の選択と迅速定量法への応用、野菜茶業研究所研究報告、8、165-173. (2009) (英文)
- 2) <http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/vegetea/2010/vegetea10-11.html>
- 3) Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. ed., Carotenoids handbook, p31, 133, Birkhauser Verlag, Basel/Boston/Berlin. (2004)
- 4) www.naro.affrc.go.jp/org/tarc/to-noken/DB/DATA/065/065-199.pdf
- 5) http://www.fmric.or.jp/ffd/ffmanual/100275-757_ikoma-matsumoto.pdf
- 6) 高市真一編集、カロテノイド-その多様性と生理活性-, p159, 222, 230, 裳華房 (2006)
- 7) Epler, K.S., Sander, L.C., Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. J. chromatography, 595, 89-101. (1992)
- 8) Ito, H., New ways to evaluate the quality of vegetables using instruments. JARQ, 48(2), 111-120. (2014)
- 9) 永田雅靖、野口裕司、伊藤秀和、今西俊介、杉山慶太、普通種ニンジンと金時ニンジンの α -, β -カロテンおよびリコペンの簡易分別定量法、日本食品科学工学会誌、54、351-355. (2007)
- 10) 永田雅靖、ホウレンソウに含まれる β -カロテンの分光光度計を用いた簡便定量法、野菜茶業研究所研究報告、8、1-5. (2009)
- 11) <http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/vegetea/2009/vegetea09-01.html>