

高速液体クロマトグラフィーによる 市販野菜ジュース中カロテン類の同時定量

A Simultaneous Determination Method of Carotenoid in Commercial Vegetable Juice by High Performance Liquid Chromatography

三田陽子*¹、本間啓子*²、馬渡一浩*³、坂井良輔*⁴

要旨

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法の分析条件として、固定相に逆相系カラムのC18カラム、移動相にアセトニトリル/エタノール (70:30 v/v) を使い、流速1ml/分、カラム温度30°C、検出波長450nmにすると、3種類のカロテノイド (リコペン・ α -カロテン・ β -カロテン) の標準溶液が同時測定できる。この方法を緑黄色野菜のカロテノイド分析に適用するため、市販野菜ジュースで前処理条件を検討した。その結果、抽出にヘキサン/エタノール (80:20 v/v) を使い、ヘキサン層をアセトニトリル/エタノール (50:50 v/v) で希釈すればよいことがわかった。この条件で処理したジュースのHPLC分析を行ったところ、ジュース中の3種類のカロテノイドを分離・定量することができた。このことから、簡便な前処理操作により短時間で野菜ジュース中のカロテノイド分析が可能であることがわかった。

キーワード：野菜ジュース(vegetable juice) / カロテノイド(carotenoid) /
高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography)

はじめに

食品中の色素成分の代表的なものに、水溶性色素のポリフェノールと脂溶性色素のカロテノイドがある。ポリフェノールには赤ブドウや茶葉などに多いアントシアニン、カテキンなどが、カロテノイドには人参やトマトなど緑黄色野菜に豊富なカロテンやリコペンなどがある。我々は緑黄色野菜中のカロテノイドを簡便に分析する方法を確立

したいと考えている。しかし、カロテノイドは水に不溶である上に化学的に不安定なため、分析には試料のけん化や有機溶媒による抽出など煩雑な前処理操作が必要である^{1,2)}。また、リコペンとカロテンでは抽出法と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の分析条件が異なっており、別々に分析する必要がある^{3,4)}。さらにカロテノイドはポリフェノールに比べ、分析法、分析例ともに報告が少ない。

最近我々は固定相に逆相系カラムのC18カラム、移動相にアセトニトリル/エタノール (70:30v/v) を使い、流速1ml/分、カラム温度30°C、検出波長450nmとすることで、3種類のカロテノイド (リコペン、 α -カロテン、 β -カロテン) の標準溶液をHPLCで再現性よく同時に測定でき、定量できることを見出した⁵⁾。

今回我々は緑黄色野菜のカロテノイド分析に適用するための前段階として、液状食品の野菜

*1 MITA, Yoko
北陸学院大学短期大学部 食物栄養学科

*2 HOMMA, Keiko
金沢大学 医薬保健研究域保健学系

*3 MAWATARI, Kazuhiro
金沢大学 医薬保健研究域保健学系

*4 SAKAI, Ryosuke
北陸学院大学短期大学部 食物栄養学科
食品学

ジュースを用いて前処理条件と分析を検討した。

方 法

1) 試 料

市販の紙パック入りまたは缶入り野菜ジュース数種を使用した。

2) 試 薬

アセトニトリル、エタノール、ヘキサンは和光純薬特級を、水は超純水 (Milli Q、ミリポア社) を用いた。

3) HPLC 分析

HPLCは送液ポンプにL-6200とL-6000(日立)、カラムオープンにL-5030(日立)、検出器にDAD L-4500(日立)及びUV8000(東ソー)、データ処理・記録装置にD-6100とD-2500(日立)を使用した。固定相に逆相系カラム(COSMOSIL C18-MS-II、ナカライテスク)、移動相にはアセトニトリルとエタノールを用い、流速は1ml/分で行った。これらの分析条件を図1にまとめた。

結果と考察

1) 野菜ジュースの前処理法

食品中のカロテノイドをHPLCで分析するためには、有機溶媒で抽出し、蒸発乾固し移動相へ再溶解するという前処理操作が必要である^{2,4,6)}。そこで、まず有機溶媒による抽出方法について、野菜ジュース数種を用いて検討した。

野菜ジュースはリコペンがトマトに、 α -カロテン、 β -カロテンが人参に、ポリフェノールのアントシアニンは紫キャベツや赤ブドウに多く含まれていることから、トマトジュース、人参

カラム C18(COSMOSIL C18-MS-II)
 移動相 アセトニトリル/エタノール
 (70:30 v/v)
 流速 1 min/分
 カラム温度 30°C
 検出波長 450 nm

図1 HPLC分析条件

ジュース、紫キャベツや赤ブドウの入った野菜果物ミックスジュースを使用した。

抽出溶媒にヘキサンとエタノールを用い、エタノール濃度を0~50%と変えて野菜ジュース中のカロテノイドのヘキサン層への移行の程度を調べて図2に結果を示した。

エタノール濃度が0%すなわちヘキサンのみではカロテノイドの抽出はできなかった。エタノールの割合を増やすとカロテノイドのヘキサン層への移行が見られた。同時にエタノールの割合が多いと下層(水層)が多くなり上層(ヘキサン層)の液量が減少し、効率の良いカロテノイドの回収が困難となった。またリコペンは疎水性が大きいため、エタノール濃度が高いとリコペンの抽出効率が悪くなった。一方、アントシアニンは、この条件では下層の水層に残りヘキサン層へ抽出されず、カロテノイドと分離できることがわかった。

これらのことから、今回の抽出にはヘキサン/エタノールの割合が80:20の溶媒を使用することにした。

次に、ヘキサン/エタノール(80:20v/v)を抽出溶媒としてHPLC分析のための抽出液を調製した。野菜ジュース100 μ lをマイクロテストチューブにとり、ヘキサン/エタノール(80:20v/v)を900 μ l加え、1分間振とう後、遠心分離(6000回転、1分間)を行った。上層(ヘキサン層)から600 μ lを別のチューブに取り、残った下層にヘキサン/エタノール(80:20v/v)を400 μ l加え、再び1分振とう後、遠心分離(6000回転、1分間)を行い、上層400 μ lを先の抽出液に加え、1000 μ lの抽出液を得た。この時、下層は色素がほとんど抽出され無色となり、ジュース中のカロ

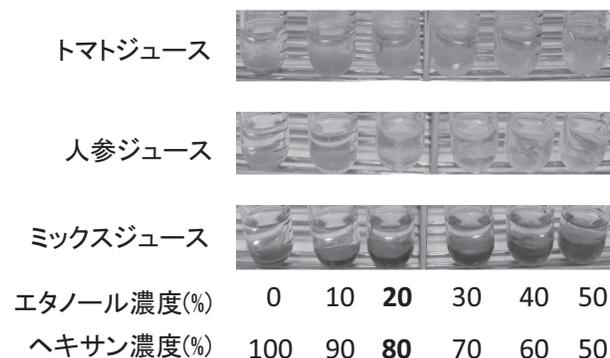


図2 市販野菜ジュース中のカロテノイドの抽出

テノイドをほぼ抽出できることがわかった。

次に抽出液についてHPLC分析を行なった。図3に野菜ジュースのヘキサン/エタノール(80:20v/v)抽出液とカロテノイド標準品混合液の分析結果を示した。カロテノイド標準品としてリコペン、 α -カロテン、 β -カロテンを用いて図1の条件でHPLC分析を行なったところ、リコペンで約9分、 α -カロテンで約15分、 β -カロテンで約16分にピークが認められた(図3(A))。人参ジュースのカロテノイドを抽出後、HPLC分析した結果(図3(B))は溶出時間14~17分にかけて幅広い2峰性のピークが認められた。カロテノイド標準品の分析と比べたところ、 α -カロテンと β -カロテンの分離が不十分で、これは抽出溶媒のヘキサンと移動相のアセトニトリルが混じらないことによると考えられた。通常は抽出液の溶媒を一旦蒸発させた後、移動相に再溶解する方法がとられるが、今回はこの操作を省くことで前処理の簡便化を試みた。抽出後のヘキサン層をアセトニトリル/エタノール(50:50v/v)で希釈し、HPLC分析を行った。その結果、抽出液をアセ

トニトリル/エタノールで3倍以上に希釈すると、ピークがシャープになり、分離が良くなることがわかった。図4に、人参ジュースの希釈しないものと5倍希釈したもののHPLCパターンを示す。

以後、ヘキサン/エタノール抽出液をアセトニトリル/エタノールで5倍希釈したものをHPLC用試料とした。

以上の結果から、図5に野菜ジュースの前処理操作をまとめた。

2) 野菜ジュースの分析例

市販の野菜ジュースから図5の前処理法で試料を調製し、図1のHPLC分析条件で分析し、本法の定量性を評価した。試料には、ジュースのパッケージに α -カロテンと β -カロテン含有量の範囲が記載してあるK社の野菜ジュースIおよびリコペン量の記載があるK社の野菜ジュースIIとトマトジュースを用い、分析した結果を図6に示した。

カロテノイド標準品のHPLC溶出時間と野菜ジュースのHPLC分析結果からカロテノイドの種

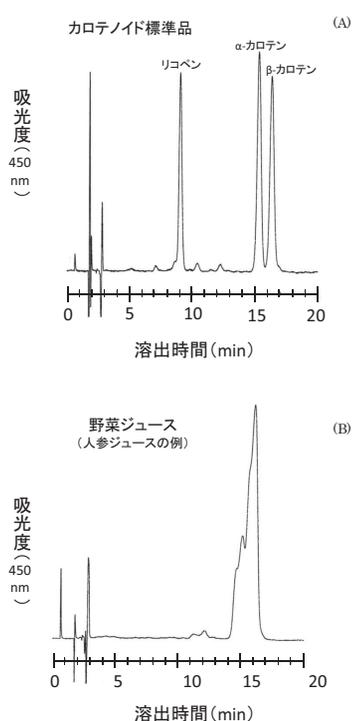


図3 カロテノイド標準品と市販野菜ジュースのHPLCパターン
(A) カロテノイド標準品 (B) 人参ジュースの例

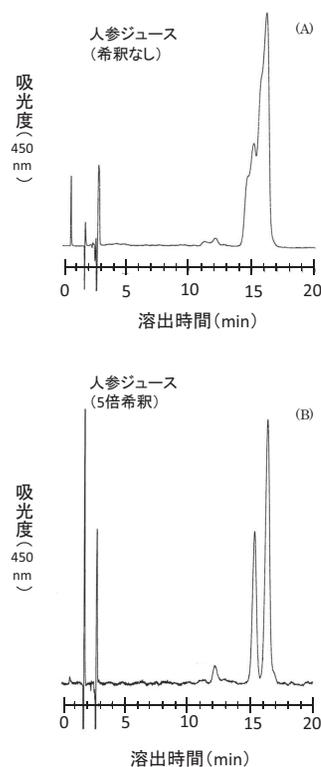


図4 市販人参ジュースのHPLCパターン
(A) 抽出液を希釈しないもの
(B) 抽出液を5倍希釈したもの

類を同定した。またカロテノイドの量とピークの高さが比例することから濃度を求めた⁵⁾。

野菜ジュース I を用いてカロテノイド抽出後 HPLC 分析をしたところ、15.2分と16.2分に2つのピークが認められカロテノイド標準品との比較から、それぞれ α -カロテンと β -カロテンであることがわかった(図6(A))。また、HPLC ピークの高さから α -カロテンと β -カロテン濃度を求めたところ、それぞれ15.1 $\mu\text{g/ml}$ と35.9 $\mu\text{g/ml}$ であった。パッケージの表示値範囲は α -カロテンが3.7 ~ 33 $\mu\text{g/ml}$ 、 β -カロテンが16 ~ 55 $\mu\text{g/ml}$ であり、測定値はパッケージの表示値の範囲内であった。

野菜ジュース II とトマトジュースを用いてカロテノイド抽出後 HPLC 分析をしたところ、それぞれ8.9分と9.0分にピークが認められカロテノイド標準品との比較から、リコペンであることがわかった(図6(B)(C))。野菜ジュース II とトマトジュースの HPLC ピークの高さからリコペン濃度はそれぞれ55.5 $\mu\text{g/ml}$ と116 $\mu\text{g/ml}$ であった。パッケージの表示値は、野菜ジュース II が58.4 $\mu\text{g/ml}$ 、トマトジュースが120 $\mu\text{g/ml}$ で、測定値

はパッケージの表示値とほぼ一致した。この結果は、図5の前処理法で非常に効率よくカロテノイドが抽出されること、かつ図1の HPLC 分析条件で野菜ジュース中の3種類のカロテノイドを分離・定量できることを示している。

本法は、用いる試料の量も少なく、前処理操作も簡便で、短時間でカロテノイドの同時分析・定量が可能であり、野菜ジュース製品の品質検査、品質管理への応用が可能であると考えられる。さらに今後は本法による緑黄色野菜中のカロテノイドの同時定量を検討し、分析法や分析結果を栄養士養成の場や食育、栄養指導など食に関する場へ活用したいと考えている。

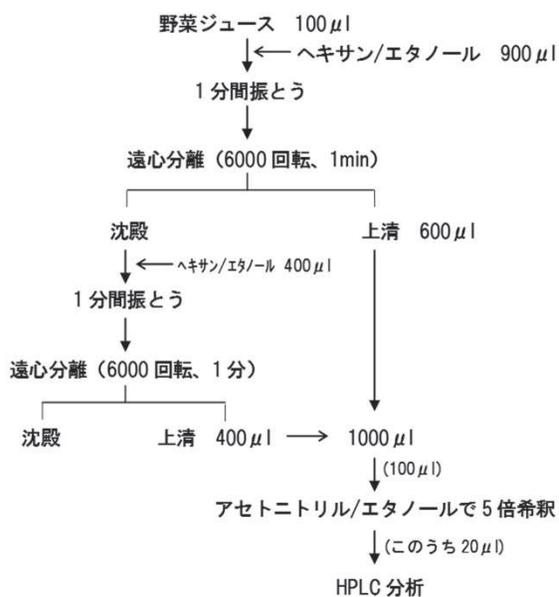


図5 野菜ジュースの前処理操作

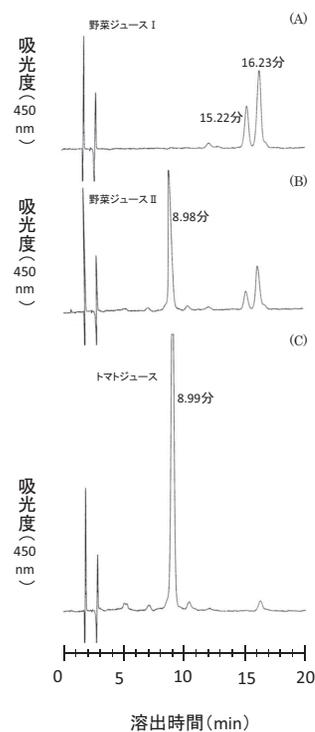


図6 市販野菜ジュースの HPLC パターン
(A) 野菜ジュース I (B) 野菜ジュース II
(C) トマトジュース

<文献>

- 1) 日本薬学会 編：衛生試験法・注解2010, 金原出版株式会社, 2010, pp.230-232
- 2) 財団法人日本食品分析センター 編集：栄養成分表示のための成分分析のポイント, 中央法規出版株式会社, 2007, pp.183-194
- 3) (社)日本食品科学工学会、食品分析研究会 共同編纂：新・食品分析法(Ⅱ), 株式会社光琳, 2006, pp.123-145
- 4) 厚生労働省 監修：食品衛生検査指針 理化学編 2005. 社団法人 日本食品衛生協会, 2005, pp.118-120
- 5) 本間啓子、西谷真希、三田陽子、馬渡一浩、中島廣志：逆相高速液体クロマトグラフィー法によるカロテン類の同時定量法, 金沢大学つるま保健学会誌 2012, 第36巻1号, pp.27-31
- 6) 安本教傳、竹内昌昭、安井明美、他 編集：五訂増補 日本食品標準成分表分析マニュアル, 建帛社, 2006, pp.79-87