

4) カンキツのカロテノイド分析

果樹研究所 生駒 吉識, 松本 光

はじめに

カンキツ類の果皮や果肉のオレンジ色はカロテノイドによるものであり、外観の向上等の品質面で重要な成分となっている。また、カンキツ果実に含まれる β -クリプトキサンチン等の一部のカロテノイドには、ビタミン A 効力があること、近年の動物実験等の結果で発がん抑制効果が示唆されている現状から、栄養・機能性の側面からも重要成分の 1 つとなっている。一般的にカンキツ果実は、多くの植物組織の中でも、最もカロテノイド組成が複雑な組織の 1 つとされており、分析の際には、含有される種々のカロテノイドを可能な限り厳密に分離する必要がある。さらに、カロテノイドは、抽出中に構造変化を起こす場合があることが知られており、このような変化を避けるのに適切な抽出溶媒の選択や抽出条件の設定が必要となる。

本項では、著者らがルーチン分析で使用しているカンキツカロテノイドの抽出・分析技術について述べる。

準備するもの

1. 実験器具

- ・ トールビーカー (200ml)
- ・ ポリトロン
- ・ グラスフィルター (11G3)
- ・ 吸引ろ過装置 (バリテール吸引鐘にアスピレーターもしくはダイアフラムポンプをつないだもの)
- ・ 分液ロート
- ・ ビーカー (500ml)
- ・ ねじ口瓶 (蓋のパッキンはテフロン被覆したものを使用)
- ・ なす型フラスコ
- ・ ロータリーエバポレーター
- ・ パスツールピペット
- ・ ガラス製注射筒
- ・ メスフラスコ (5ml)
- ・ シリンジフィルター (有機溶媒用, 孔径: 0.2 μ m)
- ・ サンプル瓶 (茶色ガラス製, 蓋のパッキンはテフロン被覆したものを使用)

- ・ pH 試験紙
- ・ 窒素ガスのボンベ

2. 試薬

1) 抽出用試薬

- ・ 40%メタノール
- ・ 炭酸水酸化マグネシウム
- ・ BHT 含有ジエチルエーテル・メタノール混液 (7:3) 容量比で、ジエチルエーテルが 7 に対してメタノールを 3 になる混液を作成後、0.1%の濃度になるように BHT (Buthylated Hydroxytoluene) を添加する。
- ・ セライト 545 (関東化学) 懸濁液 セライト 545 をねじ口瓶等に入れ、ほぼ同量の水を入れてよくかき混ぜる。静置しておくときセライト 545 は沈殿するが、使用直前に転倒混和する。
- ・ 飽和食塩水
- ・ 20%水酸化カリウム・メタノール溶液 水酸化カリウムを 20%になるようにメタノールに溶解する。
- ・ 無水硫酸ナトリウム
- ・ BHT 含有 TBME・メタノール混液 容量比で、TBME (*t*-Buthyl Methyl Ether, HPLC 用) が 1 に対してメタノール (HPLC 用) を 1 になる混液を作成後、0.1%の濃度になるように BHT (Buthylated Hydroxytoluene) を添加する。

上記の試薬のグレードは明記していないものについては、特級を使用する。水は超純水を使用する。

2) HPLC 分析用試薬

- ・ 水 (超純水)
- ・ メタノール (HPLC 用)
- ・ TBME (*t*-Buthyl Methyl Ether, HPLC 用)

3) カロテノイド分析用標準品

- ・ β -カロテン (和光, 高速液体クロマトグラフ用)
- ・ α -カロテン (和光, 高速液体クロマトグラフ用)
- ・ ルテイン (和光, 0.4~2.5mg/l エタノール溶液)
- ・ ビオラキサニン (和光, 0.4~2.5mg/l エタノール溶液, 本品は All-trans ビオラ

キササンチン)

- ・ゼアキササンチン (和光, 0.4~2.5mg/l エタノール溶液)
- ・β-クリプトキササンチン (フナコシ)
- ・リコペン (フナコシ)

上記の標準品については、標準曲線作成時には TBME・メタノール混液 (1:1) に溶解して使用する。

- ・フィトエン, ζ-カロテン, 9-cis ビオラキササンチン これらのカロテノイドの標準品は購入できないが、カンキツに多量に見出されるカロテノイドであるため、熟したウンシュウミカン果皮から分取して標準品とする。フィトエン及び 9-cis ビオラキササンチンは、後で説明する HPLC 法の Method A を用いて分取する。ζ-カロテンは Method B を用いて分取する。秤量できる程度まで大量に分取するのは困難であるので、分取したものの吸光度を測定し、比吸光係数(林孝三編, 植物色素参照)から濃度を求め、標準曲線作成のための試料とする。

3. HPLC

- ・3液グラジュエント溶出が可能なシステム
- ・検出器はフォトダイオードアレイを装着
- ・カラムは YMC Carotenoid (4.6×250mm)

プロトコール

1. 抽出

- 1) 約 50ml の 40%メタノールをトールビーカー (200ml) に入れ, 0.3~0.5g (抽出する組織の重量の 10 分の 1 量とする) の炭酸水酸化マグネシウムを投入する。
- 2) 上記の溶液に抽出する組織を投入する (果肉では 5g, 果皮では 3g が普通)。
- 3) 15 分程度室温に放置後, ポリトロンで組織を粉砕する (粉砕にはさほど時間がかからず, 1~数分程度)。ポリトロンの歯には, 粉砕後の組織が付着するが, この組織は 40%メタノールでトールビーカー内に洗い落とす (粉砕された組織にカロテノイドが存在するので, この操作は確実にやり, 全量トールビーカーに移すように心がける)。
- 4) バリテール吸引鐘 (ろ液の回収用にトールビーカーを内部に置いておく) 上に取り付けたグラスフィルターにセライト 545 懸濁液を投入する。投入後減圧し水を除去する。減圧後, セライト 545 が 5mm 程度の厚さでグラスフィルター上への

るようにする。厚さがたりない場合には、セライト 545 懸濁液の投入と減圧を繰り返す。終了したらろ液回収用のトールビーカーを取り出し、ろ液を捨てる。その後再度、トールビーカーをバリテール吸引鐘内に置く。

- 5) セライト 545 がのったガラスフィルターに、粉碎された組織が懸濁する 40%メタノールを投入する。40%メタノールが入っていたトールビーカーには、粉碎された組織が残るので、40%メタノールでガラスフィルター上に洗い落とす。その後減圧し、吸引ろ過する。
- 6) 約 50ml の 40%メタノールをガラスフィルター上に入れ、吸引ろ過する(ガラスフィルター上の粉碎組織に残存する 40%メタノール可溶性物質を除去するため)。
- 7) ろ液が入っているバリテール吸引鐘内のトールビーカーを取り出す。新しいトールビーカーをバリテール吸引鐘内に置く。
- 8) グラスフィルター上に BHT 含有ジエチルエーテル・メタノール混液を 10~20ml 入れる(カロテノイドが抽出される)。その後吸引ろ過する(抽出されたカロテノイドがろ液となり、バリテール吸引鐘内のトールビーカーに移行する。吸引ろ過の際、ろ液が落ちにくい場合には、粉碎組織をガラス棒でかき混ぜる)。
- 9) BHT 含有ジエチルエーテル・メタノール混液の投入と吸引ろ過を、粉碎組織の色が無くなるまで繰り返す(通常、繰り返し回数は 2~3 回程度)。
- 10) バリテール吸引鐘内のトールビーカーを取り出し、ろ液を分液ロートに移す。ろ液はトールビーカー内に残るので、BHT 含有ジエチルエーテル・メタノール混液を用いて、トールビーカー内のろ液を分液ロート内に洗い落とす。
- 11) ろ液の入った分液ロートに飽和食塩水を約 50ml 入れる。
- 12) 穏やかに混合し、しばらく静置する(静置している間に食塩が著しく析出する場合には、純水を約 50ml 入れ、再度、混合・静置する)。
- 13) 水相(下)とジエチルエーテル相(上)が分離したら、ビーカー(500ml)で受けながら、水相を排出する。
- 14) 飽和食塩水の投入から水相(下)の排出までの操作を、さらに 2 回繰り返す。
- 15) 最後の水相(下)の排出が終わったのち、ジエチルエーテル相をトールビーカーで受けながら、分液ロートから出す。
- 16) ジエチルエーテル相をいれたトールビーカーに、10~20g 程度の無水硫酸ナトリウムを入れ、30 分程度静置する。
- 17) トールビーカー内のジエチルエーテル相をなす型フラスコに移す(トールビーカー内に残ったジエチルエーテル相はジエチルエーテルを用いて、なす型フラスコに洗い落とす)。
- 18) ロータリーエバポレーターにジエチルエーテル相を入れたなす型フラスコを付け、

減圧濃縮する。

- 19) 濃縮後、カロテノイドを約 10ml のジエチルエーテルに溶解し、ねじ口瓶に移す
(最初は、5ml 程度のジエチルエーテルに溶解し、ねじ口瓶に移す。なす型フラスコに残ったカロテノイドは、数回ジエチルエーテルで洗い、ねじ口瓶に洗い込む。洗い込みの量を含めてトータルでジエチルエーテルが約 10ml となるようにする)。
- 20) その後、10ml の 20%水酸化カリウム・メタノール溶液を投入し、さらに、窒素ガスを瓶内に入れた後、蓋をする。蓋をした後、軽く振る(蓋に溶液が付着すると後の操作が煩雑になるので、液を混ぜる際には蓋に着かないように注意する)。一晩室温で静置する。
- 21) ねじ口瓶に入っている溶液を分液ロートに移す。ねじ口瓶に残った溶液はジエチルエーテルで分液ロート内に洗い落とす。
- 22) 分液ロートにジエチルエーテルを約 50ml 入れる。
- 23) 分液ロートに飽和食塩水を約 50ml 入れる。
- 24) 穏やかに混合し、しばらく静置する(静置している間に不溶物が著しく析出する場合には、純水を約 50ml 入れ、再度、混合・静置する)。
- 25) 水相(下)とジエチルエーテル相(上)が分離したら、ビーカー(500ml)で受けながら、水相を排出する。
- 26) 飽和食塩水の投入から水相(下)の排出までの操作を、排出した水相の pH が中性になる(pH 試験紙で測定)まで繰り返す(通常、繰り返し回数は 2~3 回)。
- 27) 最後の水相(下)の排出が終わったのち、ジエチルエーテル相をトールビーカーで受けながら、分液ロートから出す。
- 28) ジエチルエーテル相をいれたトールビーカーに、10~20g 程度の無水硫酸ナトリウムを入れ、30 分程度静置する。
- 29) トールビーカー内のジエチルエーテル相をなす型フラスコに移す(トールビーカー内に残ったジエチルエーテル相はジエチルエーテルを用いて、なす型フラスコに洗い落とす)。
- 30) ロータリーエバポレーターにジエチルエーテル相を入れたなす型フラスコを付け、減圧濃縮する。
- 31) 濃縮後、カロテノイドを BHT 含有 TBME・メタノール混液に溶解し、5ml にメスフラスコで定容する(BHT 含有 TBME・メタノール混液は、メスフラスコの内壁を洗いながら約 1ml 加え、カロテノイドが溶解したらメスフラスコに移す。メスフラスコ内には、カロテノイドが残っているので、洗い込みのために、さらに BHT 含有 TBME・メタノール混液を約 1ml 加え、これをメスフラスコに移す。1ml の

BHT 含有 TBME・メタノール混液を用いた洗い込み作業は通常 2~3 回行う。洗い込みが完了したら、BHT 含有 TBME・メタノール混液を用いて 5ml に定容する。

32) 定容後の溶液をシリンジフィルターを取り付けた注射筒にいれ、溶液をサンプル瓶押し出す。8 分目程度サンプル瓶内に溶液を充たし、窒素ガスを入れた後(溶媒の揮発を防ぐため、窒素ガスはあまり吹き付けない)、蓋をする。

33) 瓶詰めしたサンプルは HPLC による分析まで、-25℃で保存する。

2. HPLC 分析

カンキツのカロテノイドを、一度に分析することは難しい。このため、著者らは、1 つのサンプルについて、3 種の HPLC 分析を行っている。以下はそれぞれの分析法の概略である。尚、HPLC の取り扱いやグラジエントプログラム作成については、機器の使用説明書等を参照されたい。

1) Method A ビオラキサンチン, 9-cis ビオラキサンチン, ルテイン, フィトエン, β -クリプトキサンチン, α -カロテンを分析するのに最適な HPLC 法である。この方法では、 β -カロテンと ζ -カロテンが分離しない。また、ゼアキサンチンが未同定のピークと分離しない。

時間	0-30min	30-90min
メタノール	95%→95%	95%→6%
TBME	1%→1%	1%→90%
水	4%→4%	1%→4%

0-30min の間は表のとおり組成一定とする。30-90min の間に表のとおり溶離液組成を変化させる。尚、サンプルを連続して分析する場合には、分析終了の 90min 後から 20min 間、メタノール (95%)、TBME (1%)、水 (4%) の初期溶媒を流し、その後次のサンプルを注入することとする。検出波長は 452nm (ビオラキサンチン, 9-cis ビオラキサンチン, ルテイン, β -クリプトキサンチン, α -カロテン検出用) と 286nm (フィトエン検出用) とする。流量は 1 ml/min とする。

2) Method B β -カロテン, ζ -カロテンを分析するのに最適な HPLC 法である。この方法では、 ζ -カロテンの 3 種類の異性体が分離でき、それぞれの定量が可能である。

時間	0-60min
メタノール	50%→6%
TBME	46%→90%
水	4%→4%

0-60min の間に表のとおり溶離液組成を変化させる。尚、サンプルを連続して

分析する場合には、分析終了の 60min 後から 20min 間、メタノール (50%)、TBME (46%)、水 (4%) の初期溶媒を流し、その後次のサンプルを注入することとする。検出波長は 453nm (β-カロテン検出用) と 400nm (ζ-カロテン検出用) とする。流量は 1 ml/min とする。

3) Method C ゼアキササンチンを分析するのに最適な HPLC 法である。この方法では、未同定のピークとゼアキササンチンのピークとの分離が可能である。

時間	0-12min	12-20min	20-30min	30-50min
メタノール	90%→95%	95%→86%	86%→75%	75%→50%
TBME	5%→5%	5%→14%	14%→25%	25%→50%
水	5%→0%	0%→0%	0%→0%	0%→0%

0-12min, 12-20min, 20-30min, 30-50min のそれぞれの間に表のとおり溶離液組成を変化させる。尚、サンプルを連続して分析する場合には、分析終了の 50min 後から 20min 間、メタノール (90%)、TBME (5%)、水 (5%) の初期溶媒を流し、その後次のサンプルを注入することとする。検出波長は 452nm とする。流量は 1 ml/min とする。

プロトコールのポイント

カロテノイドの抽出には、ジエチルエーテル等の揮発性の高い溶媒を多量に使用する。このため、ドラフト内でほとんどの作業を行う必要がある。また、ジエチルエーテルをロータリーエバポレーターで濃縮する際には、蒸発したジエチルエーテルを十分に捕集しきれず、ダイアフラムポンプ等の減圧装置の排気口より排出されることがあるため、排気口にホースを接続し、ホースをドラフト内に引き込んで、実験室内にジエチルエーテルを充満させないように注意しなければならない。さらに、20%水酸化カリウム・メタノール溶液は皮膚についたり、目に入ったりすると危険なので、手袋の着用や防護メガネの使用を薦める。

本プロトコールでは、カロテノイドの抽出溶媒として、BHT 含有ジエチルエーテル・メタノール混液 (7:3) を使用しているが、ジエチルエーテルをアセトンに代えて、BHT 含有アセトン・メタノール混液 (7:3) として実験を行うことも可能である。但し、アセトンを使用した場合には一部のカロテノイドの構造変化が起こることがあることに注意が必要である (このプロトコールで紹介したカロテノイドについては、アセトンを使用しても構造変化が起こらない)。

エポキシ基を有するカロテノイド (ビオラキササンチン等) は、酸性条件になると容易に構造が変化する。カンキツの果肉には、多量のクエン酸が含有されるため、果肉の粉碎の過程で酸性にならないように注意が必要になる。本プロトコールでは、あら

はじめ 40%メタノールに炭酸水酸化マグネシウムを投入しており、その中で果肉を粉碎しているため、粉碎中に酸性条件下にさらされることはない（プロトコールどおりに実施すると、カンキツ果肉では問題ないことを確認している）。さらに、40%メタノールを吸引ろ過し、カロテノイドが存在する粉碎試料から速やかにクエン酸を除去するシステムとしている。

本プロトコールの Method A～C は、目安の条件である。紹介した YMC Carotenoid と同一のカラムを使用しても、カラムのロットや HPLC の装置が異なると、分離の精度が異なる。このため、Method A～C を参考にし、最適な溶出条件を設定することが望ましい。

後片付け

器具の洗浄等には、特別な配慮は必要ないが、グラスフィルターは目詰まりしやすいので、使用後は超音波洗浄機で十分に洗浄することが望ましい。また、廃液が多量に排出されるため、各機関のルールに従い、適切に分別し、廃液処理を怠らないことが重要である。

おわりに

本プロトコールでは、フォトダイオードアレイにより検出するシステムを紹介したが、この方法では、1 つの溶離条件でカンキツカロテノイドを十分に分離できないため、Method A～C の 3 種の方法を用いている。松本らは、最近、HPLC に質量分析計を連結しカンキツカロテノイドを一斉に分析するシステムを構築した。この方法は、本プロトコールで紹介した抽出法でカンキツカロテノイドを抽出し、Method C を基本とした溶離条件で分離したカロテノイドを質量分析計で測定するシステムとなっている。3 種の異なる溶離条件で分析する必要はなく、分析時間の短縮には有効である。

本プロトコールを用いて、既に大量のカンキツ試料を分析してきた。この結果は、現在流通しているカンキツ果実の栄養・機能性を考える上で重要な知見となっている。さらに、市場には出回っていないが、品種改良のために研究所に保存されている多様なカンキツ遺伝資源について、本プロトコールで分析した。その結果、 β -クリプトキサンチンはカンキツ属のうちでもミカン区（ウンシュウミカン、ポンカンの仲間）に属する品種で多く含有されるという知見が得られており、今後の品種改良の参考となる。

参考文献

- 1) 大谷俊二, 増訂植物色素, 林孝三編 (養賢堂) pp.205-229(1988).

- 2) Yano, M., Kato, M., Ikoma, Y., Kawasaki, A., Fukazawa, Y., Sugiura, M., Matsumoto, H., Oohara, Y., Nagao, A. and Ogawa, K., Quantitation of Carotenoids in Raw and Processed Fruits in Japan. *Food Sci. Technol. Res.*, **11**, 13-18 (2005).
- 3) Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H. and Yano, M., Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes during Maturation in Citrus Fruit. *Plant Physiol.* **134**, 824-837 (2004).
- 4) Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Kuniga, T., Nakajima, N. and Yoshida, T., Quantification of Carotenoids in Citrus Fruit by LC-MS and Comparison of Patterns of Seasonal Changes for Carotenoids among Citrus Varieties. *J. Agri. Food Chem.* **55**, 2356-2368 (2007).