

## 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し、トマトやトマト加工品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<sup>1, 2)</sup>。HPLCを用いる定量においては、他の主要なカロテノイドやクロロフィルの分離も可能であり、ホウレンソウ中カロテノイドや付録として柑橘およびミカンジュース中β-クリプトキサンチンの定量も併せて記載する。

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 $3450\%^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、ルテインの吸収係数は445 nmで $2250\%^{-1}\text{cm}^{-1}$ である<sup>3)</sup>。吸光光度法を用いる定量では、吸収係数を計算式に組込んで定量し、HPLCを用いる定量では、標準液の濃度確認に吸光度測定を実施することを基本とする。このように対応すれば、標準液の調製時に由来する定量値の変動を防ぐことができる。

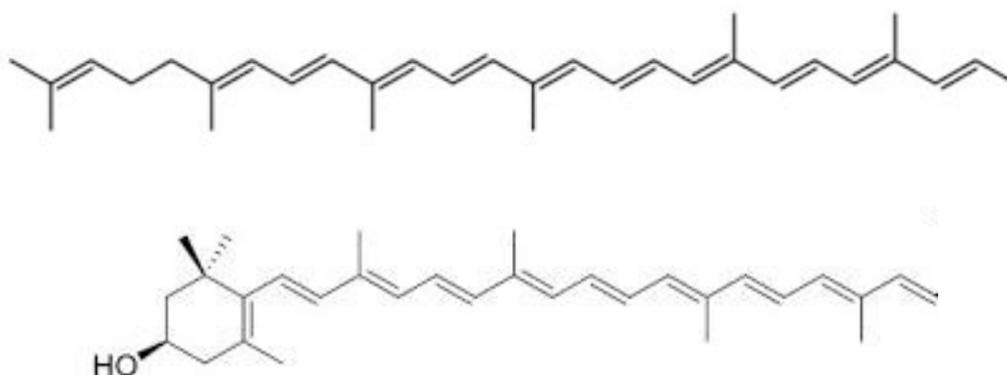


図-1 リコペン（上： $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ 、all-trans-lycopene、 $\psi, \psi$ -carotene）  
およびルテイン（下： $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$ ）の化学構造<sup>6)</sup>

### 【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（岩谷産業（株）製クラッシュミルサー、サイレントミルサーや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。加えて、トレーサブルな校正分銅（100g など）を用いて定期的に校正されていることが望ましい。）
- ・栓付褐色遠沈管（50mL 容量）（または 20mL ビーカー）
- ・ドラフト
- ・（ホモジナイザーまたは超音波処理装置：ミキサーにより十分に試料が破碎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
- ・マイクロパーテル
- ・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ザ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）：移動相調製用
- ・シリンジ（同上、抽出液を濾過する時にディスポーザ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）
- ・ディスポーザブルフィルター（孔径 0.2  $\mu$ 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）：使用時に吸光度を測定して濃度を確認すること。
- ・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 装置

- ・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、製品番号 25416-96) などリコペン標準液を分析時に分解ピークが検出されにくいもの。
- サンプルインジェクター (オートサンプラ等、注入量：10  $\mu$ 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・調製

##### 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、量り取る前に蓋を緩めて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でも一部を希釈せずにアセトンをブランクとして吸光度を測定 (容量の小さいセルを使用) 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)<sup>1, 2)</sup>
  - 1) ミキサーを使ってトマトを破碎する (未破碎の破片が残っていないか確認)。
  - 2) 破碎したトマト 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 5) と 4) の手順を繰り返す。ミクロスパーテルを用いて遠沈管内壁に付着した固形分を落とし、また、何回か抽出した後固まって破碎しやすくなった固形分を破碎する。
  - 6) 抽出溶媒により 100 mL とし、孔径 0.2  $\mu$ 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碎する（未破碎の破片が残っていないか確認）。
  - 2) 破碎したトマト 1.5 g を褐色遠沈管（50mL 容量）に量り取る。（または破碎したトマト 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、超音波処理をしても良い。
  - 4) 静置後、パスト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 5) と 4) の手順を繰り返す。
  - 6) 抽出溶媒により 100 mL（50mL）とし、孔径 0.2  $\mu$ m 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、8mg/100g 以下は希釈不要）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. トマト加工品中リコペンの抽出、吸光光度法によるリコペンの定量
- 1) トマトケチャップなど粘性が高い試料の場合は、抽出溶媒を加えても試料が非常に分散しにくいいため、抽出の初回のみ蒸留水を 1mL 程度添加した後に抽出溶媒を加え、後はプロトコール 1 または 2 の手順に従って実施してみる。
4. 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  $\mu$ m 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  $\mu$ L（目安）注入し、1 点検量線法により濃度を算出する（図 2 B）（1 点検量線による定量により吸光光度法による定量値と良く一致する場合が認められる<sup>8)</sup>。）。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。

- A) 吸光光度法（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））  
=  $\text{HPLC に注入した標準液のリコペン量} (\mu\text{g}) \times \text{標準液の純度}$   
 $\times \text{トマトのピーク面積値} / \text{標準液のピーク面積値}$   
 $\times \text{メスフラスコの容量} (\mu\text{L}) / \text{トマト抽出液の注入量} (\mu\text{L}) \times 100 / \text{試料重} (\text{g})$

×1/1000

図-2 リコペン定量の計算式

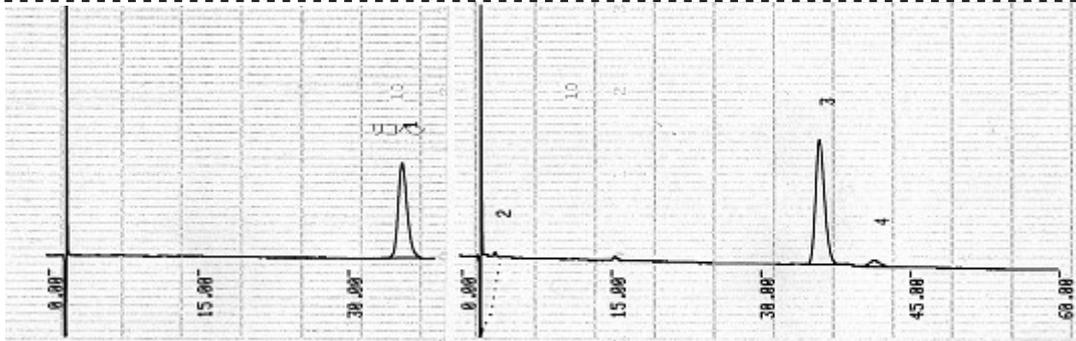


図-3 リコペン標準液(左)およびトマト抽出液(右)のHPLCクロマトグラム  
(トマト抽出液3,4のピークはそれぞれリコペン、β-カロテン)

### 【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<sup>1, 2)</sup>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、ミキサーは試料がある一定以上の重量(容量)がないと破碎できない(ミキサーの刃が試料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。また、抽出時の試料採取量が少ないと抽出効率が若干低下する可能性がある。

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75mgを精秤して抽出し

た結果である（トマト生果ミキサー破砕物 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
ミキサー破砕(1.5g)	8.44 ± 0.53
凍結乾燥	8.76 ± 0.09
ミキサー破砕後凍結乾燥	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、パスツ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、パスツ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 でパスツ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<sup>4)</sup>。光合成生物では、脂質類に対してカロテノイド含量が多いので、ケン化不要である<sup>1 2)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。ホウレンソウを冷凍するとミキサーを用いて破砕しやすく、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 ≧ 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  $\mu$ 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、ピオラキサンチン、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、 $\beta$ -クリプトキサンチン（RT は 12 分位）、リコペン（RT は 35 分位）、 $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -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<sup>4)</sup>。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。

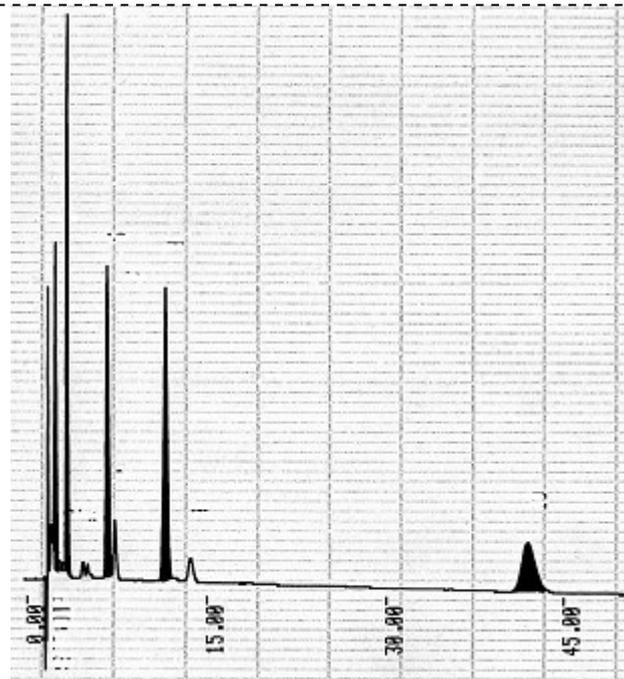


図-4 ホウレンソウの HPLC クロマトグラム  
 (抽出溶媒はアセトン、黒塗りしたピークは右から順にβ-カロテン、クロロフィル a、クロロフィル b、ルテイン、ビオラキサンチン)

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サンチ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サンチ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<sup>7)</sup>。また、移動相への酢酸アンモニウム<sup>8)</sup>の添加はカロテノイドの回収率が向上する<sup>7, 8)</sup>。

### 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<sup>9, 10)</sup>。これらの方法では抽出溶媒にアセトンを使用している。

### 付録【HPLC を用いる柑橘およびミカンジュース中β-クリプトキサンチン定量への応用】 <手順>

カロテノイドの抽出：柑橘可食部の破砕物またはミカンジュース 1.0g を精秤しジエチルエーテル：メタノール 7：3 で抽出後、25 mL とする。

カロテノイドのけん化（JAS0008 に準じて実施）：50 mL 遠沈管（できれば褐色ガラス製）に、抽出液 5mL、60%水酸化カリウム水溶液を 1mL 加える。

遠沈管を 70℃ に設定（実測 56℃）した恒温槽に入れ、5 分おきに遠沈管を振り混ぜ、30 分間加熱。

遠沈管を水道水で冷却。

遠沈管に 1%塩化ナトリウム水溶液 20 mL（JAS0003 では 2-プロパノール 5 mL も加えるが

加えず→PP製の遠沈管を使用した時に遠沈管内の液体容量が増加し、攪拌後蓋を開ける時に液体が飛散しやすい(ため)を加える。

ヘキサン：酢酸エチル 9：1 (v/v) 12 mLを加える。

ミキサーなどで激しく振とうし、遠心分離器で5分間遠心分離を行う。

上層を100ml容量のなす形フラスコに移す。

上記三つの操作を繰り返す。

ロータリーエバポレーターを用いて、有機溶媒を40℃以下で減圧留去し、窒素ガスを吹き付けて乾固させる。

ジエチルエーテル：メタノール 7：3で溶解後、10 (5) mL容量のメスフラスコを使用して10 (5) mLとする。

HPLC：上記「4. HPLCを用いるリコペンの定量」と同様に実施する。ただし、

① 被験液の注入量は20 μL程度までが目安(30 μL以上注入するとピーク割れが発生することがある。)

② クロマトグラムの取得時間はけん化なしの場合140～150分、ありの場合は45分が目安。

結果：柑橘およびミカンジュース中β-クリプトキサンチン含有量を表3に示した。

表-3 柑橘およびミカンジュース中β-クリプトキサンチン、β-カロテン含有量

試料	β-クリプトキサンチン			β-カロテン		
	けん化前	けん化後	遊離体	けん化前	けん化後	遊離体
	(mg/100g)	(mg/100g)	(%)	(mg/100g)	(mg/100g)	(%)
1,ミカンA	0.41	2.43	16.9	0.31	0.32	96.6
2,ミカンA	0.53	2.64	19.9	0.30	0.29	105.6
3,ミカンA	0.45	2.49	18.2	0.37	0.39	97.3
4,ミカンB	0.40	1.98	20.0	0.05	0.10	45.6
5,ミカンA	0.50	2.56	19.6	0.39	0.39	99.2
6,ミカンジュース1	0.17	1.21	14.3	0.07	0.09	85.8
7,ミカンC	0.55	2.72	20.3	0.09	0.09	100.9
8,ミカンC	0.44	1.85	23.8	0.05	0.12	41.4
9,ミカンジュース2	0.18	0.93	18.9	0.06	0.07	93.2
10,W Murcott	0.20	1.91	10.3	0.85	0.84	101.2
11,ミカンC	0.58	3.40	17.1	0.15	0.16	93.3
12,W Murcott	0.12	1.11	11.1	0.66	0.64	103.0

計算式：図2Bに準ずる。HPLCに注入した標準液のβ-クリプトキサンチン量をmgで計算する時は、計算式の最後の項(×1/1000、μgをmgに変換)は不要。

### 【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」<sup>8、11)</sup>や「トマトおよびトマト加工品中リコペンの迅速定量法」<sup>13)</sup>の開発の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した<sup>1、8)</sup>。

### 【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](http://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](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 $\alpha$ -、 $\beta$ -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、ハウレンソウに含まれる $\beta$ -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>
  - 12) カロテノイドの分析、高市真一、低温科学、67、347-353
  - 13) 伊藤秀和、阪中達幸、透過測定モードの可視分光法によるトマト破砕物及び加工品中リコペンの迅速定量、分析化学、68、513-517. (2019)