HPLC-電気化学検出法による野菜・果物中の ビタミンCの定量に関する検討

佐藤 陽子¹⁾, 中西 朋子¹⁾, 瀧 優子¹⁾
梅垣 敬三¹⁾

¹⁾ (独)国立健康・栄養研究所情報センター

Analysis of Vitamin C in Vegetables and Fruits by HPLC with Electrochemical Detection

Yoko Sato¹, Tomoko Nakanishi¹, Yuko Taki¹ and Keizo Umegaki¹

¹National Institute of Health and Nutrition

The content of vitamin C in 17 kinds of vegetables and fruits was analyzed by two different high-performance liquid chromatographic (HPLC) methods, one with electrochemical detection (HPLC-ECD), and the other with visible absorption detection (hydrazine/HPLC-VIS). The data and usability were compared between these two methods. The value for total vitamin C (ascorbic acid + dehydroascorbic acid) by HPLC-ECD was comparable to that by hydrazine/HPLC-VIS, and significant correlation was obtained ($r = 0.984$, $p < 0.01$). When compared to the hydrazine/HPLC-VIS method, HPLC-ECD required fewer steps for the analysis and a shorter analytical time, gave a higher specificity for ascorbic acid, and could be applied for the analysis of both ascorbic acid and dehydroascorbic acid. These results show the superiority of the HPLC-ECD method for a vitamin C analysis of vegetables and fruits.

Jpn. J. Nutr. Diet., **67** (6) 318~322 (2009)

Key words: vitamin C, electrochemical detection, vegetable and fruit

緒 言

壊血病予防因子として発見されたビタミンCは、その抗酸化性から、むしろ心疾患¹⁾、動脈硬化²⁾、がん³⁾、子癇前症⁴⁾など、様々な疾病予防のビタミンとして注目されるようになってきている。また、コラーゲンの生成⁵⁾や鉄の吸収⁶⁾を促進する因子としても知られている。このようなことからビタミンCは、いわゆるサプリメント類に汎用され、大規模な市場が形成されている⁷⁾。さらに、ビタミンCは、従来から食品添加物(酸化防止剤、膨張剤、強化剤)としても広汎に利用されている。ちなみに、通常ビタミンCは、還元型のアスコルビン酸(AsA)を指すが、酸化型のデヒドロアスコルビン酸(DAsA)も体内で速やかにAsAへ変換されることからビタミンC効力をもつと考えられている⁸⁾。

ビタミンCは非常に不安定で⁹⁾、食品の保存、調理や加工状態によってその含有量が著しく低下するという特徴をもっている¹⁰⁾。ビタミンCの多彩な作用を明らかにす

るためには、その摂取量を正確に評価することが重要であり、そのためには生鮮食品から加工食品にまで広汎に含まれているビタミンC含量の簡便で迅速かつ高感度な測定方法が求められる。

一般に食品中のビタミンCの定量にはヒドラジン/HPLC-可視吸光検出(VIS, visible absorption detection)法(ヒドラジン/HPLC-VIS法)が用いられ、五訂増補日本食品標準成分表でも採用されている。この方法は、AsAをインドフェノール色素で全てDAsAに酸化し、その後の加水分解により生ずる2,3-ジケト-L-グルロン酸に硫酸酸性下で2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを反応させ、生成した安定な赤色のオサゾンで定量することで総ビタミンC(AsA+DAsA)を定量するものである¹¹⁾。ヒドラジン/HPLC-VIS法は、オサゾン形成や形成したオサゾンの抽出のための操作が煩雑で、操作ステップが多く、HPLC用の試料調製に長時間を要するという難点がある。

一方で、血漿などの生体試料中のビタミンC測定には、

キーワード: ビタミンC, 電気化学検出器, 野菜と果物

(連絡先: 佐藤陽子 〒162-8636 東京都新宿区戸山1-23-1 (独)国立健康・栄養研究所情報センター健康食品情報プロジェクト
電話 03-3203-5721 FAX 03-3202-3278 E-mail satoyoko@nih.go.jp)

HPLC-電気化学検出 (ECD, electrochemical detection) 法 (HPLC-ECD 法) が利用されている^{12~14)}。この方法は、AsA の高い電気化学的性質を利用して ECD により直接検出する方法で、酸化型の DAsA もジチオトレイトール (DTT) により AsA に還元処理して測定できる。この方法は HPLC 用の試料調製に誘導体化等の操作が不要なことから、測定が非常に迅速で簡便かつ高感度であるという利点がある。これまで HPLC-ECD 法は血漿などの生体試料の分析には多く適用されてきたが、食品に適用した報告は少なく、野菜や果物を試料としたビタミン C の分析において本法をヒドラジン/HPLC-VIS 法と比較した報告も認められない。そこで、本研究では17種類の野菜や果物のビタミン C を HPLC-ECD 法とヒドラジン/HPLC-VIS 法により測定し、その定量値や操作性、簡便性を比較検討した。

方 法

1. 試 薬

AsA 標準品は国立医薬品食品衛生研究所標準品、塩化

ドデシルトリメチルアンモニウムは関東化学製、他の試薬ならびに HPLC に利用した溶媒は全て和光純薬工業製の特級試薬もしくは高速液体クロマトグラフィー用を使用した。

2. 試料の調整

試料として、五訂増補日本食品標準成分表を参考にビタミン C 含有量が異なると考えられる野菜・果物・芋17種を選択し、じゃがいも (男爵)、ごぼう、かいわれ大根、チンゲンサイ、菜の花、にがうり、にんじん、ピーマン (緑)、ピーマン (赤)、ブロッコリー、ほうれん草、アボカド、いちご、いよかん、キウイフルーツ、バナナ、りんご (ふじ) をマーケットから購入した。

試料は細切した後、その 3-5 g を乳鉢にはかり取り、5 % メタリン酸溶液とケイ砂を加え摩砕抽出し、5 % メタリン酸溶液で容量 50 ml のメスフラスコに洗い込み定容した。この一部を 1,500 xg で10分間遠心分離した。この上清を HPLC 用の試料溶液とした。

総ビタミン C を、五訂増補日本食品標準成分表に用い

図1 ヒドラジン/HPLC-VIS 法ならびに HPLC-ECD 法によるビタミン C の測定操作

AsA : アスコルビン酸 (Ascorbic acid)

V.C : ビタミン C

られているヒドラジン/HPLC-VIS 法¹¹⁾、既報の HPLC-ECD 法¹²⁾にて、また、AsA を HPLC-ECD 法にて測定した。ヒドラジン/HPLC-VIS 法ならびに HPLC-ECD 法の分析操作の概略は図 1 に示した通りである。なお、HPLC-ECD 法における AsA 測定は、先に調製した HPLC 用試料溶液を AsA 濃度が約 0.1–1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように適宜希釈し、その 2 μl を HPLC に注入した。また、総ビタミン C 測定は、HPLC 用試料溶液を 5 % メタリン酸で適宜希釈し、その 100 μl に対して 50 μl の 10 mM DTT 溶液 (2M K_2HPO_4 と 20 mM DTT の等量混液) を加えて混和し、室温で 5 分間放置して DAsA を AsA に還元処理した後、25% メタリン酸溶液 50 μl を加えてメタリン酸濃度を 5 % に調整し、その 2 μl を HPLC に注入した。

3. HPLC の条件

ヒドラジン/HPLC-VIS 法では、HPLC システムに島津製作所製 LC10AD、カラムにセンシュー科学 Silica-2150-N (100) (6 mm $\times$ 150 mm) を用い、移動相は酢酸・*n*-ヘキサン・酢酸エチル混液 (1:4:5 v/v/v)、流速は 1.5 ml/min、カラム温度は 40°C、検出波長は 495 nm、注入量は 20 μl とした。HPLC-ECD 法では HPLC システムに資生堂社製 HPLC システム SI-1、カラムに資生堂カプセルパック C18 (UG120, 4.6 $\times$ 100 mm) を用い、移動相は 200 μM EDTA 及び 500 μM 塩化 *n*-ドデシルトリメチルアンモニウム含有 200 mM リン酸-リン酸カリウム緩衝液 (pH 3.0)、流速は 0.9 ml/min、ECD 加電圧は +350

mV (Ag/AgCl)、温度は室温、試料の注入量は 2 μl とした。

4. 測定値の比較

測定は 3–5 回行い、測定値が変動係数 10% 未満であることを確認し、平均値と標準偏差、変動係数を算出した。総ビタミン C の測定値については、ピアソンの相関係数および回帰分析にて測定方法による関係を検討した。解析には統計ソフト SPSS 15.0J for Windows を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果と考察

ヒドラジン/HPLC-VIS 法および HPLC-ECD 法にて得られたクロマトグラフでは、いずれの方法でも安定したビタミン C のピークが得られた。2 つの方法により 17 種類の野菜や果物中のビタミン C 含量を測定した結果を表 1 に示した。両方法の測定値は有意な相関を示し ($r = 0.984$, $p < 0.01$)、HPLC-ECD 法を Y 軸、ヒドラジン/HPLC-VIS 法を X 軸とした回帰直線の傾きは、図 2 に示したように 1.021 であった ($R^2 = 0.968$, $p < 0.01$)。この結果は、野菜や果物のビタミン C を HPLC-ECD 法で測定しても、その値は従来のヒドラジン/HPLC-VIS 法と同等であることを示している。HPLC-ECD 法では容易に AsA を測定できるが、今回測定した野菜や果物に含まれるビタミン C は大部分が AsA として存在していることが確認できた。この結果は、既報の報告ともよく一致した¹⁵⁾。

表 1 ヒドラジン/HPLC-VIS 法と HPLC-ECD 法による野菜と果物中のビタミン C 濃度の測定

試料	ヒドラジン/HPLC-VIS 法 total V.C (mg/100 g)		HPLC-ECD 法 AsA (mg/100 g)		HPLC-ECD 法 total V.C (mg/100 g)	
	mean $\pm$ S.D.	C.V. (%)	mean $\pm$ S.D.	C.V. (%)	mean $\pm$ S.D.	C.V. (%)
じゃがいも (男爵)	13 $\pm$ 1	7.6	13 $\pm$ 1	7.1	13 $\pm$ 0	3.0
ごぼう	3 $\pm$ 0	4.7	0 $\pm$ 0	8.7	1 $\pm$ 0	5.2
かいわれ大根	46 $\pm$ 1	1.6	52 $\pm$ 1	1.8	48 $\pm$ 3	5.7
チンゲンサイ	42 $\pm$ 1	2.2	42 $\pm$ 1	1.7	45 $\pm$ 2	4.9
菜の花	140 $\pm$ 4	2.7	151 $\pm$ 3	1.7	181 $\pm$ 14	7.9
にがうり	61 $\pm$ 5	7.6	71 $\pm$ 1	1.4	87 $\pm$ 7	7.8
にんじん	6 $\pm$ 0	2.4	2 $\pm$ 0	0.4	3 $\pm$ 0	4.8
ピーマン (緑)	104 $\pm$ 1	1.4	111 $\pm$ 5	4.8	101 $\pm$ 4	4.3
ピーマン (赤)	320 $\pm$ 13	4.2	298 $\pm$ 7	2.4	325 $\pm$ 27	8.2
ブロッコリー	160 $\pm$ 8	4.9	117 $\pm$ 3	2.7	131 $\pm$ 11	8.5
ほうれん草	114 $\pm$ 6	5.4	117 $\pm$ 4	3.8	137 $\pm$ 13	9.4
アボカド	5 $\pm$ 0	6.1	3 $\pm$ 0	8.7	6 $\pm$ 0	6.1
いちご	66 $\pm$ 1	1.7	80 $\pm$ 2	2.8	81 $\pm$ 6	6.9
いよかん	41 $\pm$ 1	2.3	47 $\pm$ 2	3.4	48 $\pm$ 3	7.1
キウイフルーツ	61 $\pm$ 2	2.5	54 $\pm$ 1	1.3	62 $\pm$ 3	4.4
バナナ	12 $\pm$ 0	2.3	6 $\pm$ 0	4.9	8 $\pm$ 1	6.5
りんご (ふじ)	9 $\pm$ 0	1.7	9 $\pm$ 0	4.1	10 $\pm$ 1	6.1

AsA : アスコルビン酸 (Ascorbic acid)

V.C : ビタミン C

値は 3–5 回測定した測定値の平均 $\pm$ 標準偏差を小数点以下 1 桁で四捨五入した。

図2 野菜と果物中のビタミンC含量の測定における HPLC-ECD 法とヒドラジン/HPLC-VIS 法の関連

尚、ほうれん草や赤ピーマンなど、測定結果が五訂増補日本食品標準成分表の値と大きく異なる食品があった。五訂増補日本食品標準成分表の値は年間を通じた全国的な平均値が示されているが、本研究では品種や作型、収穫時期、産地、個体差など天然物由来の変動要因を考慮していない。こうした違いが本研究の測定値が標準成分値と一致しない原因と考えられる。特に、ほうれん草のビタミンC含量は収穫時期による変動が大きく、冬季には高値を示す¹⁶⁻¹⁸⁾。また、じゃがいもについては冬季でやや低値を示すことが報告されている¹⁷⁾。本研究は冬季に行ったため、測定結果はこれらの報告と同様の傾向を示している。

図1に示したように、ヒドラジン/HPLC-VIS法による総ビタミンCの測定では、メタリン酸による試料からのビタミンC抽出から、HPLC測定試料への調製までに、多くの操作ステップがある。HPLC測定試料の調製だけでも、加温・抽出に2時間30分を要する。一方、HPLC-ECD法によるAsAの測定は、メタリン酸による抽出試料を希釈するだけであり、総ビタミンCの測定の場合でも、メタリン酸による抽出液に10 mM ジチオトレイトール(DTT)を添加し、室温で5分間放置し、再度メタリン酸濃度を5%に調整するだけで分析できる。HPLC-ECD法の操作ステップが少ないことは、操作時に生ずる誤差を少なくすることにつながると考えられる。さらに、HPLCの分析時間について、ビタミンCの保持時間はHPLC-ECD法では約2分であったのに対し、ヒドラジン/HPLC-VIS法では約7分であったことから、1検体の分析に要する時間もHPLC-ECD法では極めて短いことがわかる。測定感度についても、ヒドラジン/HPLC-VIS法の検出限界は1 mg/100 g¹¹⁾であるのに対し、HPLC-ECD法は今回測定した結果0.03 mg/100 gであり、後者は前者の約30倍であった。測定検体にもよるが、変動係数

表2 ヒドラジン/HPLC-VIS法とHPLC-ECD法による野菜中ビタミンCの添加回収率(%)

	ヒドラジン/HPLC-VIS法	HPLC-ECD法
ほうれん草	100.3 ± 5.0	105.1 ± 6.0
にんじん	106.7 ± 8.7	99.0 ± 1.0

値は5回測定した結果の平均±標準偏差を小数点以下2桁で四捨五入した。

(C.V.)はヒドラジン/HPLC-VIS法が1.4-7.6%, HPLC-ECD法が3.0-9.4%であり、2つの方法に大きな違いはなく、また、ほうれん草、にんじんについて添加回収試験を実施したところ、表2に示したように両方法とも100%近くの良好な回収率を示した。以上の結果は、これまで生体試料の分析に利用されていたHPLC-ECD法が、野菜や果物を含めた多様な食品中のビタミンC分析にも優れた方法であることを示している。ただし、ECDは高感度分析ができるが、作用電極が汚れると測定感度が低下してしまうという欠点がある。そのため実際の分析に際しては、常に標準物質で機器の状況をチェックすることが必要と考えられる。また、HPLC-ECD法では総ビタミンC測定においてやや高値を示す特徴が認められた。この理由については明確ではないが、DAsAをAsAに還元する処理段階が関係していると考えられる。そのため、総ビタミンC測定の際には、標準AsAについても試料と同様に還元処理操作を必ず行う必要がある。

HPLC-ECD法によるビタミンCの分析は、既に血漿などの生体試料中のビタミンCの高感度分析法として実績がある。この手法が食品にも適していることは、食品中ならびにその食品の摂取後のビタミンCの生体における吸収などを同一方法で評価できることを意味しており、こうした研究への利用が期待できる。さらに、HPLC-ECD法は少量の試料中のAsAとDAsAを迅速かつ高感度に分析できるため、ビタミンCの調理損耗を検討するような実験にも適していると考えられる。本研究において、ビタミンC含量やその他の特徴が様々な試料を用いて検討したことから、他の食品への適用も十分可能と考えられるものの、検体によるC.V.の変動が若干大きいことから、今後、更に多くの分析データを蓄積していく必要がある。

ま と め

17種類の野菜や果物中の総ビタミンCをHPLC-電気化学検出法と、標準的に利用されているヒドラジン/HPLC-VIS法により測定し、方法の操作性や簡便性と測定値を比較し、下記の結果を得た。

1) HPLC-ECD法はヒドラジン/HPLC-VIS法に比べ、操作ステップが極めて少なく、還元型と酸化型の両者を

迅速，簡便に測定できた。

2) 総ビタミンCの分析結果は，HPLC-ECD 法においてもヒドラジン/HPLC-VIS 法と同様の値を得ることが出来，両値には有意な相関が認められた。

以上より，HPLC-ECD 法は従来のヒドラジン/HPLC-VIS 法よりも，野菜や果物のビタミンCをより迅速で簡便かつ高感度に分析する方法であり，ビタミンCの調理損耗や消化吸收の評価に適した方法であることが示唆された。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費（食品の安心・安全確保推進研究事業）によって行ったものであり，関係各位に感謝します。

文 献

- 1) Arnaud, J., Bost, M., Vitoux, D., Labarere, J., Galan, P., Faure, H., Hercberg, S., Bordet, J.C., Roussel, A.M. and Chappuis, P.: Effect of low dose antioxidant vitamin and trace element supplementation on the urinary concentrations of thromboxane and prostacyclin metabolites, *J. Am. Coll. Nutr.*, **26**, 405–411 (2007)
- 2) Langlois, M., Duprez, D., Delanghe, J., De Buyzere, M. and Clement, D.L.: Serum vitamin C concentration is low in peripheral arterial disease and is associated with inflammation and severity of atherosclerosis, *Circulation.*, **103**, 1863–1868 (2001)
- 3) Negri, E., Franceschi, S., Bosetti, C., Levi, F., Conti, E., Parpinel, M. and La Vecchia, C.: Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer, *Int. J. Cancer.*, **86**, 122–127 (2000)
- 4) Chappell, L.C., Seed, P.T., Briley, A.L., Kelly, F.J., Lee, R., Hunt, B.J., Parmar, K., Bewley, S.J., Shennan, A.H., Steer, P.J. and Poston, L.: Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial, *Lancet.*, **354**, 810–816 (1999)
- 5) 日本ビタミン学会編：ビタミンの事典，pp. 374–375 (2000) 朝倉書店，東京
- 6) Fishman, S.M., Christian, P. and West, K.P.: The role of vitamins in the prevention and control of anaemia, *Public. Health. Nutr.*, **3**, 125–150 (2000)
- 7) 食品と開発編集部：ビタミンの最新市場動向，食品と開発，**43**, 51–59 (2008)
- 8) 辻村 卓，日笠志津，青野浩二，関 知子：ヒトにおけるデヒドロアスコルビン酸のビタミンC効力【I】経口負荷後の経時的ビタミンC尿中排泄，ビタミン，**80**, 281–285 (2006)
- 9) Austria, R., Semenzato, A. and Bettero, A.: Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15**, 795–801 (1997)
- 10) 吉田企世子：流通・保存・調理過程における食品中のビタミン・ミネラル含有量の変動，Food Style 21, **1**, 71–76 (1997)
- 11) 厚生労働省：食品衛生検査指針 理化学編，pp. 85–89 (2005) 社団法人 日本食品衛生協会，東京
- 12) 梅垣敬三，吉村美香，西牟田守，江指隆年：電気化学検出器を装着した高速液体クロマトグラフィーによる血漿ビタミンCの定量方法に関する検討，日本栄養・食糧学会誌，**52**, 107–111 (1999)
- 13) Koide, K., Zhang, X.M., Ohishi, K., Usami, Y., Hotta, Y. and Hiramitsu, T.: Ascorbic acid concentration in rabbit vitreous measured by microdialysis with HPLC-electrochemical detection before and after vitreous surgery, *Exp. Eye. Res.*, **82**, 868–873 (2006)
- 14) Dai, F., Yang, J.Y., Gu, P.F., Hou, Y. and Wu, C.F.: Effect of drug-induced ascorbic acid release in the striatum and the nucleus accumbens in hippocampus-lesioned rats, *Brain. Res.*, **1125**, 163–170 (2006)
- 15) Vanderslice, J.T. and Higgs, D.J.: Vitamin C content of foods: sample variability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 1323S–1327S (1991)
- 16) 山田(田村)千佳子，鈴木綾乃，根岸千絵，岩崎泰史，吉田企世子：ハウレンソウの収穫適期以降の生育過程における還元糖，アスコルビン酸，シュウ酸および硝酸含量の変動と食味との関係，日本栄養・食糧学会誌，**58**, 139–144 (2005)
- 17) 辻村 卓，小松原晴美，荒井京子，福田知子：出回り期が長い食用植物のビタミンおよびミネラル含有量の通年成分変化 [1]，ビタミン，**71**, 67–74 (1997)
- 18) 辻村 卓，日笠志津，荒井京子：出回り期が長い食用植物のビタミンおよびミネラル含有量の通年成分変化 [2]，ビタミン，**72**, 613–617 (1998)

(受付：平成21年1月15日，受理：平成21年4月18日)