葉菜類の食品化学的研究(第2報)

Food-Chemical Studies on Leafy Vegetables (II)

カロチンの定量 Determination of Carotene

(昭和 42 年 11 月 27 日 受理)

田代 豊雄 中塚 昌子
(Toyoo Tashiro) (Masako Nakatsuka)

Carotene in leafy vegetables could be determined accurately when it was separated from other color substances by paper chromatography and all the analytical procedures (extraction, fractionation, filtration, etc.) were carried out in a stream of inactive gas and under feeble light. The contents of carotene in spinach, Tsuruna, Taisai and lettuce were determined by this method.

緒 言

食品中のカロチノイドの定性、定量にあたって、従来は、これらの色素の分離にはカラムクロマトグラフィーによる方法^{1)~3)}が多くおこなわれてきた。カラムによる分離は操作が複雑で、長時間を要し、空気に触れる機会も多く、また光による影響も大きくなり、分解による損失量が多いと考えられる。そこで筆者らはカロチンの単離は、操作が簡単で、微量の試料で可能なペーパークロマトグラフィーを利用し、葉菜類のカロチンの定量方法を検討した。

実験方法

1. 実験材料および装置

試料：実験に使用した葉菜類はほうれんそう、つるな、たいさい、レタスであり、カロチンの定量にあたっては晴天の日の午前10時前後に採取し、ただちに供試した。

なおペーパーおよびカラムクロマトグラフィーの操作中のカロチンの損失量を知るために、その試料として結晶 β -カロチン(合成品、片山化学製)を用いた。

試薬：アセトン、n-ヘキサン、石油エーテル、ベンゼンの溶媒は特級品を必要に応じ再蒸りゅうして用いた。

濾紙：ペーパークロマトグラフィーの濾紙は東洋濾紙 No. 50 (40×2cm) のストリップをあらかじめ展開溶媒にて洗浄し、水洗し、乾燥したものを用いた。

吸着剤：カラムクロマトグラフィーの吸着剤のうち、乳糖は100°Cで、炭酸カルシウムは130°Cで2時間乾燥

し乳糖で磨砕したものを、活性アルミナ(200~300メッシュ)は100°Cで2時間乾燥したものを使用した。

窒素ガス密閉操作箱：実験操作中に、カロチンの大気による酸化を避けるために、第1図のごとき密閉箱を作り、これに窒素ガスを充てんし、カロチンの抽出、濾過、濾紙への点付、乾燥、その他の実験操作を可能な限りこの箱の中でおこなった。

またペーパークロマトグラフィーの展開はシリンダー内の空気を窒素ガスにて置換した後におこなった。なおすべての実験操作は、光による影響を避けるために、暗室の弱光のもとでおこなった。

分光光度計：吸光度の測定は日立製 EPU-2A 型の光度計を使用した。

第1図 窒素ガス密閉操作箱

2. カロチンの抽出

葉菜類 2～3 g をとり、アセトン 1ml、エチルアルコール 1ml および少量の石英砂を加えて、乳鉢で充分磨砕した。これにアセトンを加え、残渣が無色になるまで抽出を繰り返えし、抽出液を濾過し、アセトンにて 10～25ml に定容にした。

なお別にヘキサンにて抽出を試みたが、不完全であった。

3. ペーパークロマトグラフィーによるカロチンの分離

前記のカロチン抽出液の 0.15～0.3ml を注射型毛细管（最少目盛 0.01 ml）にて濾紙ストリップの下端から 5 cm の位置に点付し、乾燥後、昇昇法によりクロマトグラフィーをおこなった。展開溶媒にベンゼンおよび石油エーテルを用いた。各溶媒による単独の展開とともに、ベンゼンで一度展開（一次展開）させ、乾燥後、続いて同じ方向にもう一度石油エーテルで展開（二次展開）さす重複展開もおこなった。

一次をベンゼン、二次を石油エーテルで展開したクロマトグラムの最先端部に分離した黄色部を切りとり、さらに約 2 mm の幅に細切し、ヘキサン 5ml で色素を抽出した。この抽出液について 370～530m μ の吸光度を測定し、カロチンの定性をおこなった。

4. カラムクロマトグラフィーによるカロチンの分離

炭酸カルシウムを石油エーテルと共に第 4 図の(A)のごとくガラス管に詰めた。前記の葉菜類のアセトン抽出液を窒素ガス気流中にて減圧乾燥し、乾固物を石油エーテルにて抽出し、この抽出物をカラムに流し、石油エーテルにて展開した。さらに続いてベンゼンにて二次的に展開した。

5. カロチンの定量

石油エーテルにて展開のペーパークロマトグラム上のカロチン部を切りとり、ヘキサン 5ml にて抽出し、この抽出液につき 451m μ の吸光度を測定した。次式から総カロチン量を β -カロチンとして算出した。

$$E = 2580 \cdot C$$

E : 吸光度測定値（セル幅 1cm）

C : 検液のカロチン濃度（%）

6. クロマトグラフィー過程中的カロチンの損失量

カロチンの分離のためのペーパークロマトグラフィーおよびカラムクロマトグラフィーの過程中的カロチンの損失量を知るために、市販の β -カロチンを用い、これらの操作後のカロチン回収率を調べた。

ペーパークロマトグラフィーの場合には、カロチン 10 mg をヘキサンにて溶解し、25ml に定容にした。さらにその 0.25ml をとり、ヘキサンにて 10ml の定容にき

積した。この 0.15ml をヘキサンにて 5ml に定容にした後、451m μ の吸光度を測定した。また別に前記のき釈液 0.15ml をクロマトグラフィー用の濾紙に点付し、実験 3 と同じ条件にて、石油エーテルにて展開し、また一次をベンゼン、二次を石油エーテルにても展開し、カロチン部を切りとりヘキサン 5ml にて抽出し、451m μ の吸光度を測定した。展開前後の両者の吸光度からカロチン回収率を算定した。

カラムクロマトグラフィーの場合には、カロチン 10mg をヘキサンにて 25ml に定容にし、その 1.5ml をとりヘキサンにて 25ml の定容にき積した。この 2ml をヘキサンにて 25ml に定容にした後、451m μ の吸光度を測定した。また一方では、き釈液 1～10ml を実験 4 と同じ条件の炭酸カルシウムのカラムに流入し、ヘキサンにて展開し、カロチンの溶出部を 25ml に定容にし、451m μ の吸光度を測定した。両者の吸光度からカロチン回収率を算定した。

第 2 図 葉菜類の脂溶性色素のペーパークロマトグラム

Y : 黄色, OY : 橙色, YG : 黄緑色, GB : 緑青色

実験結果および考察

1. 葉菜類のアセトン抽出液について、ペーパークロマトグラフィーをおこなった結果は第 2 図のごとくであった。

ベンゼンによる一次展開において、すべてのカロチノイド類は葉緑素と分離し、3つの黄色のスポットが現われた。また石油エーテルのみの展開では、溶媒の先端部に1つの濃厚な橙黄色色素のスポットが分離した。

ベンゼンにて一次展開後、さらに石油エーテルにて二次展開すると、一次展開図の最上部の黄色スポットの位置が移動した。

キサントフィル類は石油エーテルに不溶かあるいは難溶であるので石油エーテルによって展開移動する橙黄色のスポットの部分はカロチンであると推定される。

そこで、つるなの場合のこの色素をヘキサンにて抽出し、吸光曲線を測定した。その結果は第3図のごとくであった。すなわち、ヘキサンの溶媒では最大吸収が 425 m μ 、450m μ 、480m μ にあり、 β -カロチンの文献値とよく一致し、この橙黄色色素は β -カロチンと特定された。つるなに含まれるカロチンは大部分が β -カロチンであり、またほかの葉菜類についても同様の結果を得た。

第3図 つるなのカロチンの吸収曲線

2. 葉菜類のカロチンの分離をカラムクロマトグラフィーでおこなった結果は第4図のごとくであった。

石油エーテルによる色素の展開状態は図中の(B)のごとくで、カロチン部のみが流下した。この流出部を蒸発乾固後、ヘキサンにて一定容にし、451m μ の吸光度を測定すればカロチンの定量ができる。

さらに、(B)のカラムにベンゼンを二次的に展開すると、(C)のごとくそれぞれの色素が分離した。

第4図 つるなの脂溶性色素のカラムクロマトグラム

G: 緑色, Y: 黄色, OY: 橙色, Gr: 灰色

なお、吸着剤として炭酸カルシウム以外に、乳糖およびアルミナを用いて比較したが、色素の分離状態、流出速度などから炭酸カルシウムがもっとも適当であった。

3. 葉菜類のカロチンをペーパークロマトグラフィーにより分離し定量した結果を第1表に示した。

ほうれんそうにはカロチンが 5.2mg% 含まれ、硬葉の暗緑色のものにはさらに多かった。つるなの葉部には 3.0mg%以上含まれ、成長の盛んな5、6月頃に比較的に多かった。なお芽部には葉部に比べて少なかった。

第1表 葉菜類のカロチン含有量

試 料	採 取 月 日	試料 100 g中のカロチン量 (mg)	備 考
ほうれんそう	12 月 3 日	6.2*	* 硬 葉 日本食品標準成分表では 8,000 I. U. (4.8mg)
	12 " 6 "	5.2	
つ る な	5 " 24 "	3.3*	* 早春に出芽し、かなり生長しているもの ** 9~10月に新たに出芽したもの
	6 " 3 "	3.5*	
	10 " 18 "	2.9**	
	11 " 21 "	3.1**	
	8 " 1 "	2.6	標準成分表では 5,500 I. U. (3.3mg)
	12 " 20 "	2.9	
たいさい	10 " 7 "	2.0	標準成分表では 2,500 I. U. (1.5mg)
	12 " 9 "	4.2	
レ タ ス	5 " 31 "	2.2	* 硬葉にて食用に不向きのもの 標準成分表では 3,500 I. U. (2.1mg)
	8 " 2 "	7.8*	
	12 " 20 "	2.1	

栄 養 と 食 糧

たいさいの葉部には 4.2mg% 含まれていた。レタスでは真夏の硬葉部に多く 7.8mg% も含まれていたが、食するには多少かたい。軟葉には 2.2mg% であった。

4. 葉菜類のカロチンの定量にあたって、その過程にカロチンがどの程度損失するかを知るために、市販の β -カロチンを用いて、ペーパークロマトグラフィーおよびカラムクロマトグラフィーの操作後のカロチン回収率を調べた。その結果は第2表および第3表のごとくであった。

第2表 ペーパークロマトグラフィーにおけるカロチンの回収率

点 付 カロチン量 (a μ g/b ml)	展 開 溶 媒	展開時間 (分)	溶 出 カロチン 量 (μ g)	回 収 率 (%)
2.9 /0.15	石油エーテル	15	2.63	91
0.9 /0.15	"	"	0.86	96
1.46/0.15	一次 ベンゼン 二次 石油エーテル	一次 15 二次 15	1.35	93
0.88/0.15	"	"	0.84	96

第3表 カラムクロマトグラフィーにおけるカロチンの回収率

流 入 カロチン量 (a μ g/b ml)	展開時間 (分)	溶 出 カロチン 量 (μ g)	回 収 率 (%)
11.04/1	40	8.91	81
20/2	40	15.66	78
100/10	45	88.72	89

カロチンの汙紙への点付は濃度、量ともに葉菜類の試料の場合を基準にして、同じ条件でおこなうとともに、2〜3倍の濃度のものも用いた。ペーパークロマトグラフィー操作後のカロチン回収率は90%以上であった。

カラムクロマトグラフィーの場合のカロチン回収率は吸着剤の長さ、展開時間によって影響を受けるが、前記のカラムクロマトグラフィーの条件ではカロチン 100 μ g を含む溶液 10ml の展開で 90% 近くの回収率を得た。結局、ペーパークロマトグラフィーの場合のカロチン回収率はカラムクロマトグラフィーの場合よりは高かった。

要 約

葉菜類のカロチンの定量にあたって、カロチンの分離にペーパークロマトグラフィーを用い、カロチンの抽出、分離、そのほかの定量操作を不活性ガス気流中で弱光のもとでおこなえば、信頼度の高い測定値が得られることが分った。

この方法により、ほうれんそう、つるな、たいさい、レタスのカロチンを定量した。

文 献

- 1) J. B. Moster, F. W. Quackenbush, J. W. Porter: *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**, 287 (1952)
- 2) E. M. Bickoff, A. L. Livingston, G. F. Bailey, C. R. Thompson: *J. Agr. Food Chem.*, **2**, 563 (1954)
- 3) 木村進: 農産加工技術研究会誌, **3**, 18 (1956)

(愛媛大学教育学部食品化学研究室)