柑橘のカロチノイドに関する研究

(第1報) TLC によるカロチノイドグループの系統的な分離法

梅 田 圭 司*・川 嶋 浩 二*

Studies on Citrus Carotenoids

Part I. Systematic separation of carotenoid groups
by thin layer chromatography

KEIJI UMEDA and KOJI KAWASHIMA

The systematic separation of carotenoid groups depended on hydroxy gr. and epoxide gr. by TLC has been studied.

Saponified orange (Unshiu) peel pigment mixture was developed on an aluminium oxide-Kieselgur (1:1) with pet. ether-acetone-methanol (110:5:2) and separated into nine groups. These carotenoid groups were identified by absorption spectrum, furanoxide formation and HCl coloring test as hydrocarbon, monol, monol monoepoxide, diol, diol monoepoxide I, diol diepoxide I, diol monoepoxide II, diol diepoxide II and polyol.

By means of TLC method the adequate sample applied on the plate (20×20 cm) was about 0.1 mg of total carotenoid and the average recovery was estimated as 95%. All procedure of TLC method from spotting to OD measurement was taken 45-50 minutes.

Large quantitative separation of carotenoids mixture was carried out by partition chromatography on a silica gel column (2×5 cm) and obtained five fractions less than three hours procedure. The components of these fractions were identified as I: hydrocarbon, II: monol+monol monoepoxide, III: diol, IV: diol monoepoxide+diol diepoxide and V: polyol. The adequate samples applied on this column were 0.25-0.5 mg of total carotenoid and the recovery was estimated as 95.5%.

(Received Sep. 17, 1970)

一般に柑橘と呼ばれるものの果皮、果肉には 30 以上のカロチノイドが含まれており、分離、分析が困難である。たとえば、CURL, BAILEY ら^{1,2)}は、パレンシアオレンジジュース中のカロチノイドの分離に、100 本および 200 本の 2 系統のカウンターカレントによって全カロチノイドを 6 グループに分離し、これをさらに magnesia-diatomaceous (1:1) のカラムで細分している。また、YOKOYAMA, VANDERCOOK ら³⁾は、レモンの果皮、果肉のカロチノイドの分離に、silicagel カラム (1.2×100 cm) で 3 グループに分け、これを magnesia-hyflo supercel または magnesia-microcel カラム (1.2×20 cm) で細分している。しかし、いずれの方法もはん雑な手数と時間がかかり、多量の試料または迅速な分析には適しない。

これに対し TLC (Thin Layer Chromatography) 法は操作が簡単で迅速な分析に適し、かつ分離能がすぐれている。ただ操作中に注意しなければカロチノイドの酸化、異性化をおこすこと、サンプル量が限定されるので大量処理ができないことなどが欠点である。これまでも TLC によるカロチノイドの分離は行なわれているが⁴⁻⁸⁾、いずれも 2~3 の既知カロチノイド、または微生物の特定カロチノイドの分離、精製を目的にしたもので、柑橘のように数多いカロチノイドを含む試料の系統的分離には用いられていない。

われわれは柑橘の品種、熟度、着色といった事柄とカロチノイドとの関連を調べるために、カロチノイドをその分子内の水酸基、エポキシイドの数によって系統的に

* 農林省食糧研究所 (東京都江東区塩浜 1-4-12)

Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry. Koto-ku, Tokyo.

分離する方法を検討した。ここでは、各カロチノイドグループの迅速な定量に TLC を用い、ほぼその目的を達したので報告する。またカラムを用いた量的な試料の分離をこころみため、TLC 法との比較検討を行なった。

実験方法

1. 試料

樹上で完熟した温州ミカン (*Citrus Unshiu* var. YAKUSHIJI) を農林省園芸試験場興津支場で採取し、これを凍結し (-20°C)、翌日水に漬け氷膜で覆い、これをポリエチレンで包装し分析に供するまでフリーザー中 (-20°C) に貯蔵した。

2. カロチノイドの抽出

全カロチノイドの抽出およびけん化は基本的には、CURL¹⁾の方法を用い、下記のように行なった。ミカンの果皮 50~100 g を取り秤量後、無色の flavedo をカミソリで除去し、果皮表面の着色部分のみを細片にし、これに試料を覆う程度の 40% (v/v) メタノールと少量 (ca. 1 g) の炭酸マグネシウムを加え攪拌したのち 30 分間暗所に放置した。これを試料と ほぼ等量の海砂 (15~20 mesh) とともにモーターに移し磨砕した。

磨砕した試料は、あらかじめ celite 545 を約 1 cm 厚に敷いたグラスフィルター (G2 または G3) 上に 40% メタノールとともに洗い移し、続いて 40% メタノールで滲液が透明になるまで洗滌した。残渣を着色がなくなるまでアセトンで抽出し、このアセトン溶液を減圧下 60°C 以下でロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮液にエーテルを加え、分液ロートに洗い移し、カロチノイドをエーテル層に移し、水で洗滌後、エーテル溶液を減圧下で濃縮した。

こうして得られたカロチノイドのエーテル溶液 (20~50 ml) にほぼ等量の 20% (w/v) 苛性カリメタノール溶液を加え、窒素ガスを吹込んだのち、冷蔵庫で 1 晩けん化した。けん化溶液は分液ロートに移し、エーテル層は食塩水を加えエマルジョン化を防ぎながら水で十分洗滌して、芒硝を加えて少なくとも 1 時間放置して脱水した。このエーテル溶液を一定容とし、以後の実験試料とした。

3. 全カロチノイドの定量

一定容にしたカロチノイドのエーテル溶液をさらにエーテルで稀釈し、451 m μ での吸光度が 0.2~0.5 の範囲に入るようにして吸光度を測定し、全カロチノイド量を β -carotene 相当量として算出した。 β -carotene は石油エーテル中で $E_{cm}^{1\%} = 2505$ であるが⁹⁾、われわれが

再結を繰り返して精製した β -carotene を用いエーテル中で測定した結果は $E_{cm}^{1\%} = 2500.2$ となり、両溶媒中での $E_{cm}^{1\%}$ はほとんど差がなかった。

そこで、エーテル中での最大吸収 451 m μ における β -carotene の $E_{cm}^{1\%}$ を 2500 とし計算式をたてると下記のようになった。

$$y = 0.4x \quad \begin{array}{l} y: \beta\text{-carotene mg\%} \\ x: \text{OD (451 m}\mu\text{)} \end{array}$$

つまり、この式で最終稀釈エーテル溶液中の全カロチノイド含量を β -carotene 相当の mg% とし算出できる。

4. TLC による分離

吸着剤は Kieselgur-Aluminiumoxide (1:1, Merk) で、20×20 cm のプレートに厚さ 0.25 mm にひいた。一定容にしたカロチノイドのエーテル溶液を 1 部とり、窒素ガス気流中で濃縮したものを、キャピラリーでプレート上に線状にスポットした。展開剤は、石油エーテル-メタノール-アセトン (110:2:5) で、暗所で 20~30 分間展開させた。カロチノイドのスポット量は、 β -carotene 相当量として 0.1 mg 程度が適当であった。

展開槽から取り出すと、直ちに各バンドをスパチュラで削り落とし、溶出管に入れてエーテルを注入し、5~25 ml のメスフラスコに溶出させた。溶出管は径 12 mm 程度、長さ 10 cm ぐらいのガラス管の下部をしぼり、脱脂綿を入れてフィルターとし、管の上部は広げておく。吸着力が強くエーテルのみでは溶出しがたいカロチノイドは、若干のメタノールの添加で溶出させた。

メスフラスコに溶出させた各カロチノイドグループは、エーテルで一定容として直ちに 451 m μ での吸光度を測定し、全カロチノイドに対するパーセンテージを算出した。

5. カラムクロマトグラフィー

吸着剤は 110°C で 2 時間活性化したシリカゲル (WAKOGEL C-200) を $\phi 20 \times 50$ mm になるように、石油エーテルを用いて湿式法でカラムにつめた。試料は温州ミカンとトマトの抽出カロチノイド混合物で、全カロチノイド量として約 0.25 mg を 5 ml エーテル溶液として上部に吸着させた。

展開剤は石油エーテル基剤として、メタノール、アセトン濃度を高めながら溶出させた。溶出液は 5 ml のメスシリンダーで分取し、直ちに 450 m μ (石油エーテル中での β -carotene の最大吸収) で吸光度を測定した。

6. 各カロチノイドグループの同定

これまでの研究によって個々のカロチノイドの性状はかなり明らかになっており¹⁰⁻¹⁴⁾、結晶化するまでもな

く、個々のカロチノイドまたはカロチノイドグループの吸着層に対する吸着能, authentic carotenoid との比較, 自記分光光度計による吸収曲線, 官能基の定性, 定量試験で同定できる。

epoxide は CURL ら¹⁴⁾の方法に従い, 塩酸テストで epoxide の数を, クエン酸テストで 5,6- または 5,8-epoxide の判定を行なった。

以上の全試験を通して試薬は全て市販特級を, エーテルは 1I に対し還元鉄約 10 g を加えて再溜したもの, 石油エーテルは b. p. 30~60°C のものを用いた。

結果および考察

1. TLC による分離および同定

Fig. 1 に示したように, この条件下では 10 本のバンドに分離される。参照のために展開した authentic carotenoid は, 市販 β -carotene, トマトからの lycopene, 柿からの cryptoranthin, 卵黄からの lutein である。これらの位置より, F₁ は β -carotene と lycopene と同グループで, 炭素と水素からのみ構成される

Fig. 1. Thin Layer Chromatography of Carotenoid of Citrus Unshiu Peel

Plate	20 × 20 cm	0.25 mm
Absorbent	Aluminium oxide	1
	Kieselgur G	1
Developer	Pet. ether	110
	Acetone	5
	Methanol	2
Authentic Carotenoid		
A:	β -carotene	
B:	lycopene	
C:	cryptoranthin	
D:	lutein	

hydrocarbon group (以下 gr. に省略) である。F₂ は水酸基の 1 コ入った cryptoxanthin に一致し, monol gr. である。F₅ は水酸基の 2 コ入った lutein の位置と一致しており diol gr. である。

これまでの柑橘のカロチノイドの研究結果では^{2,3,12,15-21)}, 一般に柑橘類に含まれるおもなカロチノイドは全て β -carotene または α -carotene を基本型として, これに水酸基, 5,6-epoxide または 5,8-epoxide (furanoxide 型) の酸素の入ったものである。SUBBARAYAN ら²²⁾によると, このようなカロチノイドの aluminium oxide に対する吸着能は, まず水酸基の数によって左右され, 水酸基の多いものほど吸着力が強く, 水酸基が同様ならば epoxide の多いものほど, また 5,6-epoxide よりも 5,8-epoxide が入った方が吸着力は強い。この aluminium oxide に対する吸着能は, ヘキサン-メタノール水溶液系に対する各カロチノイドの分配係数と一致している。

温州ミカンのカロチノイドも一般柑橘のカロチノイドと同型と考えるなら, Fig. 1 に示された吸着能からさらに各カロチノイドグループの推定が可能である。F₄ は monol monoepoxide, F₈ は diol monoepoxide, F₁₀ は Polyol で F₇₋₉ に diol diepoxide が入っているはずである。

epoxide は塩酸と反応して青色または緑色を呈するが, 呈色の濃淡は epoxide が 2 コあるか 1 ではっきり区別できる。

また, 5,6-epoxide はクエン酸によって, 5,8-epoxide に変化するとともにカロチノイドの極大吸収を約

Fig. 2. Furanoxide Transformation of 5,6-Epoxy with Acid

- (I) (3,3'-dihydroxy-5,6,5',6'-diepoxy- β -carotene)
 λ_{max} , 483, 453, 428, (in benzene)
 (II) (3,3'-dihydroxy-5,6,5',8'-diepoxy- β -carotene)
 λ_{max} , 461, 433, 408, (in benzene)
 (III) (3,3'-dihydroxy-5,8,5',8'-diepoxy- β -carotene)
 λ_{max} , 436, 410, 377, (in benzene)

15 m μ 短波長側に移動する。この場合2コの 5,6-epoxide があれば、極大吸収の移動は約 30 m μ になる。Fig. 2 には、1例として violaxanthin と luteoxanthin が、クエン酸によって auroxanthin に変化することを示した。

Fig. 3~Fig. 6 は、各カロチノイドグループのクエン酸テストの結果である。Fig. 3 には F₁, F₃, F₄ を示したが、このうち F₁, F₃ はクエン酸によって全く変化しない。F₁ は hydrocarbon gr. であるが、 β -carotene, lycopene はほとんど含まれず、吸収曲線よりそのおもなカロチノイドは ζ -carotene と無色の phytofluene である。F₃ は cryptoxanthin をおもなカロチノイドとする monol gr. である。また、ここには示さなかったが F₂ はクエン酸によって変化せず、かつ F₃ に近接した微量成分で、極大吸収が F₃ よりも 3 m μ 短波長側にあることから cis-cryptoxanthin を主成分とする monol gr. であろう。F₄ はクエン酸処理で極大吸収が約 15~20 m μ 短波長に移動し、酸処理前の吸収曲線が F₃ とほ

ぼ一致していることから cryptoxanthin 5,6-epoxide を主成分とする monol monoepoxide gr. である。

Fig. 4 には F₅, F₆ を示した。F₅ はクエン酸処理で変化なく、lutein, zeaxanthin といった diol gr. である。F₆ はクエン酸処理で極大吸収が 15~20 m μ 短波長に移動し、塩酸処理で淡緑色の着色を示し、5,6-epoxide の1コ含まれた diol monoepoxide gr. である。ベンゼン中での極大吸収は 485, 465, (435), であり anthraxanthin が主成分と考えられる。

Fig. 3. Absorption Spectrum of Hydrocarbon, Monol and Monol monoepoxide of citrus Unshiu Peel

Solid line: Ether-Methanol (1:1)
Dotted line: Ether-2% Citric acid/Methanol (1:1)

Fig. 4. Absorption Spectrum of Diol and Diol monoepoxide Groups of Citrus Unshiu Peel

Solid line: Et₂O-MeOH (1:1)
Dotted line: Et₂O-2% Citric acid/MeOH (1:1)

Fig. 5. Absorption Spectrum of Diol depoxide I and Diol monoepoxide II of Citrus Unshiu Peel

Solid line: Et₂O-MeOH (1:1)
Dotted line: Et₂O-2% Citric acid/MeOH (1:1)

Fig. 5 には F_7 , F_8 を示した。 F_7 はクエン酸処理で極大吸収が $30\sim40\text{ m}\mu$ 短波長側に移動し、塩酸処理では濃青緑色を呈することから、5,6,5',6'-diepoxide である。またベンゼン中での極大吸収が 482, 452, 428 にあり violaxanthin が主成分の diol diepoxide gr. である。 F_8 は量的にも少なく、 F_7 のバンドとのキレが悪い。クエン酸処理で極大吸収が $15\sim20\text{ m}\mu$ 短波長側に移動し、塩酸処理で淡緑色になること、またベンゼン中での極大吸収が F_8 の極大吸収よりも $3\sim5\text{ m}\mu$ 短波長側にあることから *cis*-anthraxanthin を主成分とする diol monoepoxide である。

Fig. 6 には F_9 と F_{10} を示した。 F_9 はクエン酸処理で極大吸収が $30\sim40\text{ m}\mu$ 短波長側へ移動し、塩酸処理で濃青緑色を呈すること、ベンゼン中での極大吸収が F_8 の極大吸収よりも $3\sim6\text{ m}\mu$ 短波長側にあることから *cis*-violaxanthin を主成分とする diol diepoxide gr. である。 F_{10} は2本のバンドに分かれることもあるが、いずれもベンゼン中の極大吸収は、478, 450, 430, 407, $385\text{ m}\mu$ にあり、クエン酸処理で極大吸収は $15\sim20\text{ m}\mu$ 短波長側に移動し、塩酸処理で淡緑色となるが、neo-xanthin その他の polyol gr. である。

以上の各カロチノイドの同定結果を Table 1 に示した。

2. TLC による各カロチノイドの定量精度と定量結果

TLC による定量に際してカロチノイドの酸化、分解による損失が考えられる。プレート上にスポットしてい

Fig. 6. Absorption Spectrum of Diol diepoxide II and Polyol of Citrus Unshiu Peel
Solid line: $\text{Et}_2\text{O}-\text{MeOH}$ (1:1)
Dotted line: $\text{Et}_2\text{O}-2\%$ Citric acid/ MeOH (1:1)

る間、展開中、溶出管に入れるまでの操作でどの程度の損失が生じるかを調べた。

温州ミカンのカロチノイド抽出液より、442.4, 288.0, 291.7, 156.2, 52.3, 24.8, 12.8 mg% のベンゼン溶液を作り、一定容量のキャピラリーで $20\times20\text{ cm}$ のプレートにスポットし、暗所に 15 秒, 3 分, 10 分放置してからスポット部を削り落してエーテルで溶出し、50 または 25 ml 定容にして吸光度を測定した。プレートにスポッ

Table 1. Identification of Carotenoid Groups of Citrus "Unshiu" Peel

Carotenoid Group	Adsorption Affinity on TLC	Shift by Citrate Test ($\text{m}\mu$)	Coloring by HCl Test	Number of -OH	Number of Epoxide
$F_1=\text{H}$	Weak	0	—	0	0
$F_2, F_3=\text{M}$		0	—	1	0
$F_4=\text{MM}$		15-20	+	1	1
$F_5=\text{D}$		0	—	2	0
$F_6=\text{DM1}$		15-20	+	2	1
$F_7=\text{DD2}$		30-40	≡	2	2
$F_8=\text{DM1}$		15-20	+	2	1
$F_9=\text{DD2}$		30-40	≡	2	2
$F_{10}=\text{P}$	Strong	15-20	+	>3	0-2

Abbreviation of Carotenoid Groups.

H : Hydrocarbon

M : Monol

MM : Monol-Monoepoxide (5-6)

D : Diol

DM1 : Diol-Monoepoxide (5-6)

DD1 : Diol-Diepoxide (5-6, 5'-6')

DM2 : Diol-Monoepoxide (5-6)

DD2 : Diol-Diepoxide (5-6, 5'-6')

P : Polyol

Table 2. Stability of Applied Sample on Plate and Recovery of Total Carotenoid in TLC Method.

Total Carotenoid used (r)	OD at 451m μ ¹⁾ (Recovery %)				
	Control	Time of stand still ²⁾			After the development ³⁾
		15 sec.	3 min	10 min	
96.0 (21.7 μ l $\times$ 442.4 mg%)	0.501 $\times$ 50	0.484 $\times$ 50 (96.6)	0.484 $\times$ 50 (96.6)	0.469 $\times$ 50 (93.6)	0.472 $\times$ 50 (94.2)
62.5 (21.7 μ l $\times$ 288.0 mg%)	0.325 $\times$ 50	0.319 $\times$ 50 (98.2)	0.314 $\times$ 50 (96.6)	0.310 $\times$ 50 (95.4)	0.310 $\times$ 50 (95.4)
56.2 (19.2 μ l $\times$ 291.7 mg%)	0.292 $\times$ 50	0.290 $\times$ 50 (99.3)	0.286 $\times$ 50 (98.2)	0.286 $\times$ 50 (97.9)	0.287 $\times$ 50 (98.2)
30.0 (19.2 μ l $\times$ 156.2 mg%)	0.314 $\times$ 25	0.316 $\times$ 25 (101.2)	0.320 $\times$ 25 (102.5)	0.297 $\times$ 25 (92.9)	0.304 $\times$ 25 (96.8)
8.0 (15.3 μ l $\times$ 52.3 mg%)	0.208 $\times$ 25	0.209 $\times$ 25 (100.4)	0.208 $\times$ 25 (100)	0.201 $\times$ 25 (96.6)	0.195 $\times$ 25 (93.7)
3.8 (15.3 μ l $\times$ 24.8 mg%)	0.097 $\times$ 25	0.099 $\times$ 25 (102)	0.095 $\times$ 25 (97.9)	0.102 $\times$ 25 (105.1)	0.088 $\times$ 25 (90.7)

1) Average of 5 times repeat.

2) Applied sample was stand still in the dark at room temperature.

3) After the development for 30 mins., all absorbent was scraped and eluted with ether.

Table 3. Quantitative Analysis of Carotenoid Group of Citrus Unshiu Peel

Carotenoid group	Percentage of each group for total carotenoids			
	1st	2nd	3rd	Average
F ₁ =H	1.8	1.1	1.4	1.4
F ₂ , F ₃ =M	31.3	30.8	31.2	31.0
F ₄ =MM	7.0	7.2	5.2	6.8
F ₅ =D	5.7	5.2	5.4	5.4
F ₆ =DM1	7.7	7.7	6.8	7.4
F ₇ (F ₈)=DD1, (DM2)*	24.1	24.9	24.8	24.6
F ₉ =DD ₂	19.2	20.5	20.3	20.0
F ₁₀ =P	3.2	2.9	3.4	3.2

(Total carotenoids 13.84 mg%)

* A small quantity of F₈ (DM₂) contains in main F₇ (DD1) fraction.

トするのに要する時間は、1分30秒～2分である。

次に上記と同様にスポットしたものを、直ちに常法どおりに展開してから、展開面を全て削り落としエーテルで溶出後、定容にして吸光度を測定した。

Table 2 は上記の試験を5回繰返して得た値の平均値である。数値は 451 m μ の吸光度で表わされており、カッコ内の数字はスポットしたものと同容量を試験と同条件下で定容にした際の吸光度に対するパーセンテージ、つまり回収率である。

この結果からわかるように、かなり薄い濃度でもスポットしたままならば10分ぐらい放置しても95%以上の回収率を示している。通常定量に用いる全カロチノイドの量は約100 γ 前後であり、スポット後展開し始めるまで10秒とはかからないので、この間の損失はほとんど無いものと見てよい。次に展開後の回収率をみると、30 γ 以上スポットしたものでは95%以上と考えてよい。

ここでは展開後、全展開面を削り落とし、これを集めて溶出しているが、実際には展開槽から出して、まだ溶剤が乾燥しない間に各バンドを削り落して、順次溶出しているわけで、時間的にもこの試験よりも短時間で処理されている。

以上のことより TLC による分離定量法の回収率は95%以上と考えている。

Table 3 は温州ミカンカロチノイドグループを TLC で3度繰返し測定した結果で、各グループの吸光度測定値より、直接全カロチノイドに対するパーセンテージとして算出した。分離同定の際 F₈ で表わされた DM₂ は量も少なく、F₇ の DD1 と近接しているので、プレートを削り取る際 DD1 が混入して定量値がフレるのを防ぐために、F₇ とともに定量した。こうした各カロチノイドグループ間のバンドのキレの悪さは、吸着剤の前処理、展開剤の組成変化などによって改善しなけれ

ばならない。

Table 3 で各カロチノイドグループの定量値をみると、やはり量的に少ないグループのフレが大きいい。しかし他のカロチノイド分離定量法が2種類以上の手法の組合せか、カラムによる2操作で行なっていることを考えると、1回の操作でこの程度の精度であれば定量用として十分使用できる。

3. カラムによる分離と TLC 分離との比較

これまでのカロチノイド分離におけるカラムの使用法は、大量にある特定カロチノイドの分離精製または大まかなカロチノイドの分離に用いられてきた。しかし、柑橘のように多種類のカロチノイドを含むものを分離しようとする、 $\phi 1 \sim 2 \times 15 \sim 20$ cm もの長いカラムを用いなければならず、溶出時間も非常に長くなる。われわれも本 TLC 法採用前に、celite 545 と magnesium oxide また aluminium oxide (1:1) の $\phi 1 \times 15$ cm のカラムで柑橘のカロチノイドの分離をこころみたが、所用時間 10~14 時間で 10~12 フラクシヨンの分離にとまどった。しかし各フラクシヨンのバンドのキレが悪く、テーリングによって明確な分離が不可能であったので、結局はカラム法を放棄せざるをえなかった。

PURCELL²³⁾ はグレープフルーツの着色過程を silica-gel カラムで追っているが、この場合は、hydrocarbon, monol, diol+polyol の3フラクシヨに分けているにすぎない。また YOKOYAMA ら²⁾ はレモンの mature green 果と yellow 果のカロチノイドの比較のため PURCELL のカラム ($\phi 2 \times 100$ cm) で上記の3フラクシヨンに大別したのち、hydrocarbon は magnesium oxide-Hyflo super cel (1:1, $\phi 1.4 \times 20$ cm) で、monol は magnesium oxide-Hyflo super cel (1:2, $\phi 1.2 \times 20$ cm) で、Diol+Polyol は Microcel C ($\phi 1.2 \times 20$ cm) で 35 のカロチノイドに細分している。初めの3フラクシヨンの分離に少なくとも5時間、細分用のカラムでは恐らく10時間以上はかかっているはずであり、また含量 0.2% のカロチノイドまで含めて 35 に分離することが必要か、その精度がどの程度なものかは疑問である。

ここでカラム法を再検討したのは、TLC 法との競合ということではなく、特定カロチノイドグループを量的に短時間で得ることを目的としたものである。

Fig. 7 にカラムによる分離の結果を示した。カラムは $\phi 2 \times 5$ cm と短かくし、できるだけ短時間での処理、少なくとも3時間以内ということを目標にした。結果は 85 drops/min の溶出速度で、5フラクシヨンに分離し 165 分で全溶出を完了することができた。サンプル量は

Fig. 7. Column Chromatography of Carotenoids
Column: WAKOGEE-C-200, $\phi 2 \times 50$ mm, 85 drops/min
Sample: Tomato+Unshiu peel

Fig. 8. Comparison of Carotenoid Fractions Separated by Column Chromatography with the carotenoid group by TLC

約 0.25 mg 使用したが、この程度のカラム容量では 0.5 mg が限度であり、TLC 法によるプレート 5 枚分で、量的な分離法としてもそれほど有利な方法といえない。このように各カロチノイドグループの分離定量用としては、カラム法は TLC 法に劣るが、ある特定グループ、たとえば F₄ を取る場合に大容量のカラムを用い、始めからかなり極性の強い溶剤を用いて F₃ までは迅速に溶出させて F₄ を分取するといった方法に用いられるべきであろう。

Fig. 8 にカラム法で分離した各フラクシヨンを TLC 法によるカロチノイドグループに対比させた。カラム法

では各フラクションのキレが悪く、少量ではあるが前後のフラクションが混入するが、ここでは各フラクションの主要グループのみを示した。カラム法によるフラクション I は hydrocarbon, II は monol と monol monoepoxide, III は diol, IV は diol monoepoxide と diol diepoxide, V は polyol である。

また本カラム法による回収率は、O.D.=0.04 以上（はっきりと着色している）を集めた場合は、95.5%、各フラクションの中間の無色に近い溶出液まで含めると99.2%と算出された。

要 約

TLC によって温州ミカンのカロチノイドの系統的な分離法を検討した。

1) Alumina-Kiesel (1:1) を吸着層とし、石油エーテル-アセトン-メタノール (110:5:2) を展開剤とする TLC で、温州ミカンのカロチノイドを hydrocarbon, monol, monol monoepoxide, diol, diol monoepoxide, diol diepoxide, polyol などのグループに分離することができた。

2) サンプル量はプレート1枚 (20×20 cm) に対し 0.1 mg 程度が適量で、通常の定量の操作での回収率は約 95% であった。またサンプルをプレートにスポットしてから、各フラクションの吸光度測定まで要する操作時間は 45~50 分である。

3) 特定カロチノイドグループの大量分取を短時間でこなうため、シリカゲルカラム (φ2×5 cm) を用い、2時間 45 分で 5 フラクションを分離溶出した。フラクション I は hydrocarbon, II は monol+monol monoepoxide, III は diol, IV は diol monoepoxide+diol diepoxide, V は polyol であった。このカラムのサンプル容量は 0.25~0.5 mg で I~V フラクションを合わせたカロチノイドの回収率は 95.5% であった。

終りにこの試験に使用した試料を提供して下さった農林省園芸試験場、興津支場の西浦昌男氏、伊庭慶照氏その他の関係者に感謝の意を表します。

文 献

- 1) CURL, A. L.: *J. Agr. Food Chem.*, **1**, 456 (1953).
- 2) CURL, A. L. and BAILEY, G. F.: *J. Agr. Food Chem.*, **2**, 685 (1954).
- 3) YOKOYAMA, H. and VENDERCOOK, C. E.: *J. Food Sci.*, **32**, 42 (1967).
- 4) BOLLIGER, H. R.: *Dünnschichtschromatographie*, p. 217, Springer, Heiderberg. (1962).
- 5) STAHL, E., BOLLIGER, H. R. and LEHNERT, L.: *Carotine und Carotinoid*. vol. 9, p. 129, Steinkopff, Darmstadt, (1963).
- 6) DAVIES, B. H., JONES, D. and GOODWIN, T. W.: *Biochem. J.*, **87**, 326 (1963).
- 7) DEMOLE, E.: *J. Chromatog.*, **1**, 24 (1958).
- 8) DEMOLE, E.: *Chrom. Revs* **1**, 1 (1959).
- 9) GOODWIN, T. W.: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, (1965).
- 10) KARRER, P. and JUCKER, E.: *Carotenoids*, Elsevier, (1950).
- 11) ZECHMEISYER, L.: *Cis-Trans Isomeric Carotenoids Vitamins A and Arylpolyenes*, Springer-Verlag, (1962).
- 12) CURL, A. L.: *Food Res.*, **21**, 689 (1956).
- 13) CURL, A. L., and BAILEY, G. F.: *J. Food Sci.*, **30**, 426 (1965).
- 14) CURL, A. L., and BAILEY, G. F.: *J. Agr. Food Chem.*, **9**, 403 (1961).
- 15) CURL, A. L., and BAILEY, G. F.: *Food Res.*, **20**, 371 (1955).
- 16) CURL, A. L. and BAILEY, G. F.: *Food Res.*, **22**, 63 (1957).
- 17) CURL, A. L. and BAILEY, G. F.: *Food Res.*, **22**, 323 (1957).
- 18) CURL, A. L. and BAILEY, G. F.: *J. Agr. Food Chem.*, **5**, 605 (1957).
- 19) CURL, A. L. and BAILEY, G. F.: *J. Food Sci.*, **26**, 44 (1961).
- 20) CURL, A. L.: *J. Food Sci.*, **27**, 171 (1962).
- 21) KAHN, M. U. D. and MACKINNEY, G.: *Plant physiol.*, **28**, 550 (1953).
- 22) SUBBARAYAN, C., JUNGALWALA, F. B. and CAMA, H. R.: *Analytical Biochemistry*, **12**, 271 (1965).
- 23) PURCELL, A. E.: *Anal. Chem.*, **30**, 1049 (1958).

(1970年9月17日受理)