トマトの色に関する研究

(第6報) カロチノイド色素の分離定量操作中における酸化防止

木村 進*・石谷孝佑*・梅田圭司*・津端一子*・高井順子*

Studies on Colour of Tomato

Part VI. Protection of carotenoids oxidation during T.L.C. procedure

SUSUMU KIMURA, TAKASUKE ISHITANI, KEIJI UMEDA, KAZUKO TSUBATA
and JUNKO TAKAI

The effects of antioxidants on carotenoid (lycopene) during T.L.C. procedure were studied.

In the course of T.L.C. procedure in the air, carotenoids were rapidly oxidized and discoloured. BHT was the most effective antioxidant for lycopene. Antioxidant was required to be present in solvent during T.L.C. procedure. Further satisfactory antioxidation effect was obtained provided all the procedures were worked out in nitrogen atmosphere. Optimum concentration of BHT for protection of lycopene oxidation was 1-2% in the solvent.

(Received Jun. 5, 1971)

動植物組織中からカロチノイド色素を抽出し、個々のカロチノイド色素を分離定量する場合、カラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、および薄層クロマトグラフィーが採用される。これらの手法の中で、分離能がすぐれ、分離操作が容易なことから薄層クロマトグラフィー（以下、TLCと略記）が多く使用されている。

カロチノイド色素は、一般に動植物組織から抽出され、純化されるほど酸素および光線（とくに紫外線）の影響によって酸化されやすくなる。トマト中のカロチノイド色素の80%以上を占めるリコピン（完熟の場合）は、これらのカロチノイドの色素の中でとくに酸化の著しいものであることが知られている。

TLCを用いる場合、吸着剤（シリカゲル、活性アルミナなど）の表面にカロチノイド色素が薄く付着しているような状態となり、酸化表面積が極端に拡大されるためにきわめてすみやかに酸化される。したがって、操作は窒素気流中で可及的暗所で行ない、操作中の酸化を極力さけているわけである。しかし、これらの環境条件が満足されないような場合には、操作中におけるカロチノイド色素の酸化はまぬがれない。

筆者らは、一定時間内に多数の試料について、TLCによるカロチノイド色素の分離定量を行なう場合を想定して、その迅速化と正確化を計る目的で、展開溶媒に酸化防止剤を添加し、TLC操作中におけるカロチノイド色素の酸化を防止する方法について検討を行なった。その結果、かなりの酸化防止効果がみられ、カロチノイド色素の分離定量操作の正確化を計る一助となることを認めたので報告する。

試料および実験方法

1. 試料の調製

トマトジュースを濾過して得たトマトパルプをメタノールで洗浄し、キサントフィルなどのメタノール可溶性部分を除去し、次にベンゼンにて残りのカロチノイド色素（約98%以上がリコピン）を抽出する。この抽出液を減圧濃縮し、メタノールで2~3回再結晶を行なったのちTLC用の試料とした。

2. 薄層クロマトグラフィー

前法により調製した試料を、ガラス板に0.2mmの厚さで塗布したシリカゲル（Kiesel gel G nach Stahl, Merck）薄層上にスポットしたのち、0.8%アセトン・

* 農林省食糧研究所（東京都江東区塩浜1の4の12）

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

石油エーテルで展開し、す早くリコピンのバンドのみをかき取り、これをベンゼンで抽出し、定容としたのち 487 nm の波長で比色定量を行なった。展開時の温度は、23~27°C、展開時間は約 15 分であった。なお、シリカゲル薄層は、105°C で 2 時間活性化処理を行なったものを使用した。

3. TLC 操作中のリコピンの酸化率の測定法

まず、シリカゲル薄層に一定量の試料をマイクロペットでスポットし、上法に従って展開分離したのち、リコピン部分を掻き取り残存量(A)を測定する。同時に薄層にスポットしたと同量の試料のリコピン量(B)を測定し、 $A/B \times 100$ により残存率を求め、酸化の指標とした。

結果および考察

1. トマトジュースのリコピン定量操作中におけるリコピンの安定性

トマトジュースのリコピンを他のカロチノイド色素から分離し定量するために TLC を使用する場合、この一連の操作中におけるリコピンの安定性は、Fig. 1 に概略を示すとおりである。

試料のメタノール洗浄までの段階では、リコピンは、組織中のパルプ質などに吸着していると考えられ、かな

Fig. 1. Stability of lycopene during the analytical procedures

Analytical procedure	Lycopene Stability	
Sample (Tomato juice)	O	Stable in plant tissue
Washing with methanol	O	
Extraction with benzene	X	Relatively stable in benzene solution. Unstable in light.
Concentration	X	
Spotting on plate	XX	Unstable because of extended surface area. (10-15 sec.) (about 15 min.)
Development	X	
Scratching and extraction	XXX	Highly unstable.
Measurement	X	

Table 1. Stability of lycopene in benzene solution.

Storage conditions	Relative retention (%)			
	0 time	10 hr.	22 hr.	1 week
25°C 100 lux	100	96	88	—
25°C Dark	100	100	97	—
3°C Dark	100	100	100	94

Table 2. The stability of lycopene spotted on silica gel thin layer

		Optical density	Relative retention (%)
Chromatoplate left after spotting.	standing 0 time	0.199	100.0
	1 min	0.198	99.5
	5 min	0.143	71.9
	10 min	0.075	39.5

り安定であるが、ベンゼンで抽出し、溶液の状態になると光(紫外線)による酸化促進を受けやすくなる。Table 1 は、放置条件の相異によるリコピンのベンゼン溶液の安定性の比較であるが、低温暗所ではかなり安定であった。

濃縮は、温度 40~50°C の減圧下で短時間に行なうので、酸素との接触は少なく、比較的安定である。

試料のスポット操作は、通常 10~15 秒程度の短時間なので、この間の酸化は非常に少ない(1%以下)と考えられる。Table 2 は、空気中における試料プロット後の放置時間とリコピンの残存率を示したものである。スポット後、室温暗所に 5 分間放置すると約 30% の分解がみられ、溶媒の揮散後急速に酸化が進むことがわかる。

TLC の操作中、展開後掻き取り、抽出の操作に移る過程において、最もリコピンは酸化を受けやすい。なぜならば、リコピン分子がシリカゲル微細粒子(10~40 μ)の表面に薄く付着した状態にあると考えられ、酸化表面積は異常に拡大されているからである。顕微鏡観察の結果では、約 500 倍に拡大してもリコピンの結晶は認められず、シリカゲル粒子が全体に黄橙色を帯びた状態になっていた。スポットした際に、わずかにガラス板との接触面に 1~3 μ 程度の結晶が付着しているのが観察された。この観察からも、空気との接触面積が非常に拡大されていることがわかり、リコピンがきわめて不安定な状態にあることがうかがえる。

スポット、展開、掻き取り、抽出、定容および測定の間、空気中で操作した場合のリコピンの酸化は約 20% であった。

2. TLC によるカロチノイドの分離定量の際の酸化防止剤の検索

化学的な酸化防止方法として、酸化防止剤を直接展開溶媒中に添加する方法と、展開後に酸化防止剤を間接添加する方法³⁾が考えられるが、前者は、操作上簡単で作用時間も長く、効果がより期待できるとして、この方法について検討を行なった。

使用する酸化防止剤は、酸化効果が高かつカロチノ

イド色素の定量値に影響を与えない物質であることが望まれる。この検索に使用した酸化防止剤は、食品用酸化防止剤および、トコフェロール類縁化合物 8 種 (Table 3), ゴム・プラスチック用酸化防止剤 12 種 (Table 4), 計 20 種である。

酸化防止効果の判定は、上記の各酸化防止剤を 1% 濃

Table 3. Antioxidants (I)

BHT	3,5 Di-tert. butyl-4 hydroxy toluene
BHA	3 tert. butyl-4 hydroxy anisole
NDGA	Nordihydro guaiaretic acid
EM	Natural tocopherol mixture
α -T	dl- α Tocopherol (n-3)
VEP 1	n=0
VEP 2	n=1
VEP 3	n=2
Vitamine E precursor

Table 4. Antioxidants (II)

NS-6	2,2'-Methylene bis (4-methyl-6-tert. butyl phenol)
MB	Mercapto benzimidazole
WSP	2,2'-Dihydroxy-3,3'di (α -methyl cyclohexyl) 5,5'-dimethyl diphenyl methane
4-BBM	4,4'-Butylidene bis (6-tert. butyl-3-methyl phenol)
2-BBM	2,2'-Butylidene bis (6-tert. butyl-3-methyl phenol)
DP	N,N'-Diphenyl-p-phenylene diamine
RD	Polymerized 2,2,4-trimethyl-1,3-dihydro quinoline
D	Phenyl β -naphthylamine
P	Mixture of DP and D (DP : D=1 : 2)
F	N,N'-Di- β -naphthyl-p-phenylene diamine
I-565	6-(4-hydroxy-3,5-di-tert. butyl anilino) 2,4-bis (n-octylthio) 1,3,5 triazin
I-1010	Tetrakis [methylene bis (3,5-di-tert. butyl-4-hydroxy hydrocinnamate)] methane

度になるように添加した展開溶媒で展開し、溶媒蒸発後トコフェロール類縁化合物および食品用酸化防止剤の場合には 1 時間、ゴム・プラスチック用酸化防止剤の場合には 20 分室温 (25~27°C) 暗所に開放状態で放置し、この間の酸化防止効果、すなわちリコピンの残存率で示した。

この結果、Fig. 2, Fig. 3 に示すように BHT と MB が比較的高い効果を示したのでさらにこの両者について確認実験を行なった。Table 5 に示すように、BHT が

Fig. 2. Effects of antioxidants on lycopene oxidation (I) Tocopherols and their derivatives, antioxidants for food

Fig. 3. Effect of antioxidants on lycopene oxidation (II) Antioxidants for rubber and plastics

Table 5. Antioxidative effects of BHT and MB on lycopene

	BHT (1%)		MB (1%)		no addition	
	Optical density	Relative retention	Optical density	Relative retention	Optical density	Relative retention
Immediate scratching after development	0.256	100.0%	0.251	100.0%	0.254	100.0%
20 min. after	0.225	87.9	0.187	74.5	0.125	49.2
40 min. after	0.212	82.8	0.154	61.4	0.068	26.8

最も効果のあることが認められたので、以後の実験には BHT のみを使用した。

トコフェロール類縁化合物は、添加濃度を減らすと効果が高まる傾向がみられたが、BHT の効果までには至らなかった。

3. TLC 操作中におけるリコピンの酸化防止

薄層にリコピンの濃縮ベンゼン溶液をスポットし、直ちに展開槽に挿入し、0.8% アセトン・石油エーテルにて展開を開始するが、この場合、全操作を窒素気流中で行なわなければ 20% 程度のリコピンの酸化がみられる。また、通常行なわれているような窒素気流中では十分な効果はみられないようである。

BHT を酸化防止の目的で展開溶媒に添加しておく、展開および抜き取り、抽出操作中のリコピンの酸化をかなり防止することが可能である。BHT 0.1% 添加では 16~7%, 1.0% 添加では 6~7% 程度の酸化にとどめることができ、さらに 2.0% の添加では 3% 程度と、ほぼ酸化防止の目的を達成できることが認められた。また酸化防止剤添加と窒素ガス置換を併用すれば、ほぼ完全な酸化防止効果が得られ、正確な分析ができるものと考えられる。

4. 展開終了後におけるリコピンの酸化とその防止効果

展開後ただちに溶媒をドライヤーにより 30 秒間冷風を吹きつけることによって除去し、その後空气中に放置された場合にリコピンがどのように酸化されていくかを

Fig. 4. The time of standing after development and lycopene retention

Table 6. Effects of time of standing and BHT concentration on lycopene retention

		Relative retention (%)
After removal of solvent	no addition	100.0
Standing for 30 min.	no addition	57.7
	BHT 0.1%	82.2
	BHT 0.5%	92.0
Standing for 2 hrs.	no addition	3.9
	BHT 0.1%	49.8
	BHT 0.5%	63.4
	BHT 1.0%	72.6
Standing for 3 hrs.	BHT 0.5%	23.9
	BHT 1.0%	49.0
	BHT 2.0%	70.6

検討した結果は Fig. 4 のごとくで、溶媒蒸発後のリコピンの酸化は、きわめてすみやかに進行することを示している。この場合に、BHT を展開溶媒に 1% 濃度で添加しておいたものは、あきらかに酸化を防止することが認められた。さらに、BHT 添加と窒素ガス置換を併用すると酸化防止効果は高まり、1 時間、室温暗所で数%の酸化にとどまった。

展開、溶媒蒸発後の放置時間および、BHT 溶加濃度とリコピンの酸化程度との関係は Table 6 のごとくである。試料数が多い場合に 10~30 分放置されることもあることを想定すると、この場合に窒素気流中に放置しなくとも、展開溶媒に酸化防止剤 (BHT) を添加したものは、リコピンの酸化がわずかであることがわかった。溶媒蒸発後に 1 時間以上放置することはあり得ないが、極端に長い時間放置された場合の酸化程度は、Table 6 にみられるように、酸化防止剤の添加量を増加しても完全に酸化を防止することは不可能であった。

5. 酸化防止剤 (BHT) の最適添加濃度の検討

BHT を使用して酸化防止を行なう場合に、展開溶媒に添加する濃度はどの程度が望ましいかについて検討した結果は、Fig. 5 に示すごとくであった。すなわち、1.0% までの添加においては、添加量の増加とともに酸化防止効果も増加することが判然とみられるが、それ以上の添加濃度では、添加量が増加してもさほど酸化防止効果が向上しないことを示している。

また、添加濃度が 2.0% 以上の場合には、添加濃度の増加とともに R_f の変化がみられた。すなわち、薄層の吸着能に変化を与えることになり、カロチノイド色素の分離能が低下する現象がみられた。また、溶媒蒸発後 BHT の結晶が析出してくる現象もみられた。

Fig. 5. Antioxidative effects of BHT concentration on lycopene adsorbed on thin layer silica gel

したがって、BHT により酸化防止を行なう場合には、BHT の添加濃度は、溶媒に対し 2.0% 以下が望ましいと考えられる。

なお、BHT を添加した場合にカロチノイド色素の吸収波長に影響を与えるか否かについて検討する目的で、リコピンのベンゼン溶液に BHT を、1.0, 2.0, 3.0% 添加して自記分光光度計にて吸収曲線を測定した結果、可視部領域においては何ら影響を示さないことを認めた。

BHT は揮発性の化合物であるので、展開後も揮発して酸化防止効果を現わし、密べい容器中に放置した場合にはさらに酸化防止効果が高まることも認められた。

要 約

TLC によりカロチノイド色素を分離定量する場合に、操作中におけるカロチノイド色素の酸化防止の考慮を払わなければ、正確な定量値は得られない。試料数の少ない場合には、窒素気流中で迅速に注意深く操作することによりある程度酸化は防止し得るが、数多くの試料を取

り扱う場合もしくは、数種以上のカロチノイド色素を分離しようとする場合には、操作時間が長くなり、その間にカロチノイド色素の酸化が起ることが考えられる。筆者らは、TLC 操作を空気中に行なっても操作中におけるカロチノイド色素の酸化を最小限度にとどめるようにするための方法を検討してつぎのような結果を得た。

(1) TLC によりカロチノイド色素の分離操作を空気中に行なった場合には、カロチノイド色素(リコピン)の酸化は、きわめて迅速に進行する。

(2) TLC によるカロチノイド色素の分離操作を行なう場合、展開溶媒に添加する酸化防止剤として BHT が最も効果のあることを認めた。

(3) 酸化防止剤(BHT)をあらかじめ展開溶媒に添加しておくことによって、操作中のカロチノイド色素の酸化をかなりの程度防止できることを認めた。さらに、酸化防止剤添加と窒素ガス置換を併用することによって充分な酸化防止効果が得られることを認めた。

(4) カロチノイド色素の酸化防止のための BHT の添加濃度を検討した結果、1~2% 程度が適当であると考えられる。

終りに、本研究の推進のために試料を提供されたエーザイ株式会社、積水化学株式会社、武田薬品工業株式会社、千代田化学株式会社に謝意を表します。

なお、本研究の一部は、1968 年 11 月、日本農芸化学会関東支部大会にて発表したものである。

文 献

- 1) 木村 進：農産技研誌，3，203 (1956)。
 - 2) 木村 進：食品工誌，10，276 (1963)。
 - 3) 木村 進：食品工誌，13，95 (1966)。
- (1971 年 6 月 5 日受理)