

## マタタビ属果実に対する還元型ビタミンC簡易測定法 (RQフレックスシステム)の適用性

西山 一郎 大田 忠 親

Application of RQflex method for the rapid measurement of ascorbic acid  
in the fruit of *Actinidia* species

Ichiro NISHIYAMA Tadachika OOTA

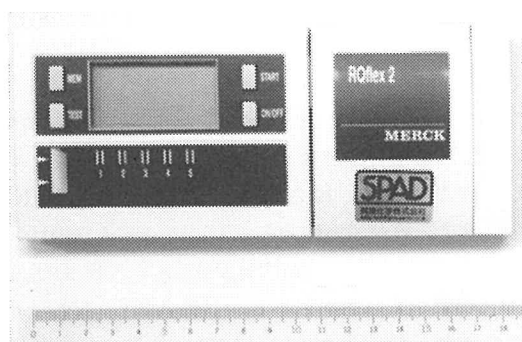
### 1. 緒言

キウイフルーツやサルナシなどのマタタビ属果実は、ビタミンCを豊富に含むことが知られている。ビタミンCは、ビタミンとしてコラーゲン合成やカルニチン合成に関与するばかりではなく、抗酸化性物質としても重要な機能性成分である<sup>1)</sup>。そのため果実中のビタミンC濃度は、その食品機能に関わる重要な要素であるとともに、消費者が果実を購入する際のわかりやすい指標ともなりうる。果実中のビタミンC濃度は品種・系統によっても大きく異なり<sup>2,3)</sup>、また日照や土質・施肥等の栽培条件、果実の熟度などによって影響を受けるため、果実の品質管理のためには、その簡便で正確な測定法が望

まれる。

果実などのビタミンC濃度を測定する方法としては、インドフェノール滴定法、ヒドラジン比色法、フェニレンジアミン蛍光法、アスコルビン酸酸化酵素法、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法などがある<sup>4)</sup>。これらに加えて最近では、リフレクトクォント (RQ) フレックスシステム (Merck 社、第1図) と呼ばれる簡易測定法も用いられるようになった。この測定法は、試験紙を試料液に浸し、その変色を反射式光度計で読み取ることにより、アスコルビン酸 (還元型ビタミンC) を測定する方法である。この RQ フレックス法は、1回の測定に15秒程度しか要さないこと、大型の測定機器や熟練を要さないこと、比較的低コストであること、測定器が小型 (第1図) で持ち運び可能であるため、圃場などの野外での測定も可能なことなど、多くの利点を有しており、上記の品質管理の目的には最適な測定法であると考えられる。しかしその反面、どの程度の精度でどのような試料に適用可能であるかという情報は乏しく、得られた測定値の信頼性の評価は、課題として残されている。

本研究では、キウイフルーツ、サルナシ、シマサルナシ果実について、その果実内アスコルビン酸濃度を RQ フレックス法と HPLC 法とで測定し、簡易測定法の精度について検討を行った。



第1図 RQフレックスシステム測定器本体および試験紙

試験紙を試料液に2秒間浸した後、その変色を測定器で測定することにより、アスコルビン酸 (還元型ビタミンC) 濃度を15秒間で測定することができる。

### 2. 実験方法

#### 実験材料

実験に用いたマタタビ属果実の品種・系統一覧を、第1表に示した。国産の果実は、香川県農業試験場

表1 実験に用いたマタタビ属果実の品種・系統一覧

品種・系統名	種	入手先	n
<u>緑色系キウイフルーツ</u>			
ハイワード		府中分場 <sup>1)</sup>	3
ブルーノ		府中分場	3
香緑	<i>A. deliciosa</i>	府中分場	3
讚緑		府中分場	3
アボット		城北ファーム	6
エルムウッド		澤登キウイ園	3
<u>黄色系キウイフルーツ</u>			
ゴールドキング		府中分場	2
さぬきゴールド		府中分場	9
レインボーレッド	<i>A. chinensis</i>	小林農園	3
小林39		小林農園	2
ホート16A		青果店	4
<u>サルナシ</u>			
信山		府中分場	3
香粹		府中分場	6
一才		府中分場	3
光香		府中分場	3
平野系	<i>A. arguta</i>	府中分場	3
月山系		府中分場	3
島根系		府中分場	4
長野系		府中分場	4
高知系		府中分場	4
<u>シマサルナシ</u>			
淡路系	<i>A. rufa</i>	府中分場	3
長野系		府中分場	3

<sup>1)</sup> 香川県農業試験場府中分場

府中分場、埼玉県所沢市の城北ファーム、東京都国立市の澤登キウイ園、静岡県庵原郡の小林農園から入手した。ニュージーランド産の‘ホート16A’果実は、東京都内の青果店にて購入し供試した。いずれも追熟後の適熟期果実を実験に供した。

### 試薬

HPLC グレードのメタノールおよび標準アスコルビン酸は、和光から購入した。その他の試薬は特級を使用した。

### 試料の調製およびビタミンCの定量

果実を剥皮し、得られた可食部を実験に供した。アスコルビン酸の抽出ならびに HPLC 装置を用いたアスコルビン酸の定量は、既報<sup>3)</sup>に従って行った。RQ フレックス法によるアスコルビン酸の定量は、機器の使用説明書に従って行った。アスコルビン酸

の酸化を最小限にするため、抽出操作は低温下で可能な限り速やかに行った。

### 3. 実験結果と考察

#### RQ フレックス値と HPLC 値との相関

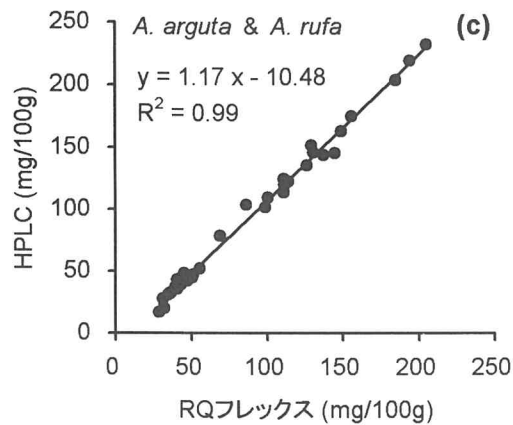
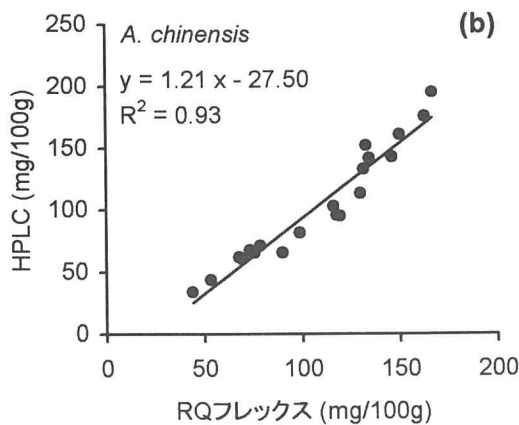
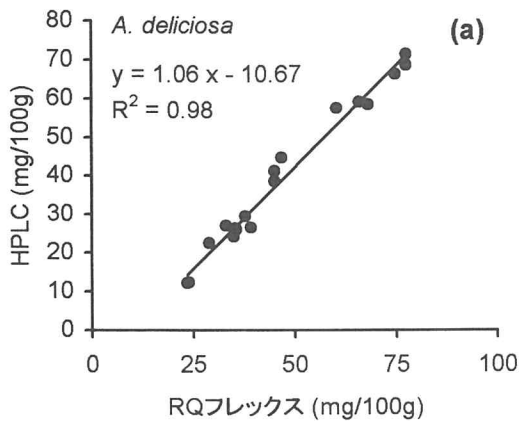
RQ フレックス法ならびに HPLC 法によって測定したアスコルビン酸濃度の相関関係を第2図に示した。緑色系キウイフルーツ (a)、黄色系キウイフルーツ (b) およびサルナシ、シマサルナシ (c) のいずれにおいても、両数値間に正の相関が認められた。特に緑色系キウイフルーツ (a) とサルナシ、シマサルナシ (c) においては高い相関関係が認められ、それぞれの R<sup>2</sup>値は0.98および0.99であった (第2図)。黄色系キウイフルーツ (b) については、R<sup>2</sup>値が緑色系キウイフルーツやサルナシ、シマサルナシと比較して若干小さく、0.93であった (第2図)。

以上の結果より、キウイフルーツやサルナシ、シマサルナシ等のマタタビ属果実においても、RQ フレックス法によって果実内アスコルビン酸含量の多寡を判定することが可能であると考えられた。

#### RQ フレックス法の正確さ

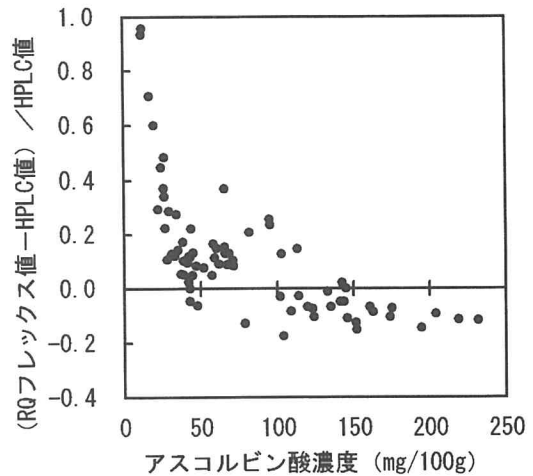
次に、RQ フレックス法によるアスコルビン酸の測定値が、どの程度正確であるかを確かめるため、RQ フレックス値と HPLC 値との差異とアスコルビン酸濃度との関連を調査した (第3図および第2表)。その結果、果実内アスコルビン酸濃度が低いほど HPLC 値と RQ フレックス値との乖離が大きくなる傾向が顕著であった。特にアスコルビン酸濃度が20 mg/100 g 以下の場合には、50 %以上もの誤差を生じる場合が認められた (第3図)。アスコルビン酸濃度が低い場合には、HPLC 値よりも RQ フレックス値が高い傾向を示し、逆にアスコルビン酸濃度が高い場合には RQ フレックス値よりも HPLC 値が高い傾向を示した (第3図)。果実内アスコルビン酸濃度が0.0~19.9 mg/100 g の場合には、誤差の平均値が82.8 %にも及んだ (第2表)。アスコルビン酸濃度20.0~39.9 mg/100 g の範囲では、誤差の平均値は21.8 %に減少し、また、40.0 mg/100 g 以上では、7~15 %程度の誤差に止まった。

以上の結果より、RQ フレックス法によるアスコ



第2図 RQフレックス法ならびにHPLC法によって測定した果実内アスコルビン酸濃度の相関

緑色系キウイフルーツ (a)、黄色系キウイフルーツ (b) およびサルナシ、シマサルナシ (c) 果実のアスコルビン酸濃度を、RQフレックス法ならびにHPLC法によって測定し、両者間の相関を調査した。いずれの試料においても、正の相関性が認められた。



第3図 RQフレックス法による測定値の正確さに対する果実内アスコルビン酸濃度の影響

果実内アスコルビン酸濃度が低いほど、RQフレックス法によって測定した値が高値を示す傾向が認められた。

表2 RQフレックス法による測定値の正確さに対する果実内アスコルビン酸濃度の影響

アスコルビン酸濃度 (mg / 100mg)	RQフレックス値 - HPLC値   HPLC値
0.0-232.0	0.196 ± 0.223
0.0-19.9	0.828 ± 0.150
20.0-39.9	0.218 ± 0.130
40.0-59.9	0.094 ± 0.057
60.0-79.9	0.143 ± 0.088
80.0-119.9	0.136 ± 0.084
120.0-159.9	0.069 ± 0.049
160.0-232.0	0.100 ± 0.026

ルビン酸濃度の測定値は、果実内アスコルビン酸濃度が40 mg/100 g 以上の場合には信頼性が高く、それ以下では信頼性に乏しいことが示された。今回の実験では、果肉10 g に対して20 ml のメタリン酸溶液を加えてアスコルビン酸を抽出しているが、希釈しない果汁そのもののアスコルビン酸濃度を測定すれば、果実内アスコルビン酸濃度が低い場合にも、信頼性の高い測定値が得られる可能性も考えられる。

現在、食品に含まれるアスコルビン酸の測定には、HPLC法が標準法として用いられている。しかしHPLC法による定量を行うためには、ポンプ、検

出器、カラム、データ処理装置等の大型で高価な装置と、高純度の HPLC 専用溶媒を要する。また、1 回の測定に最低でも 10 分間を要し、カラムの洗浄と平衡化まで含めると、測定に要する時間は 1 時間以上にも及ぶ。さらには、一般に試料の前処理のためにディスポーザブルフィルターカートリッジを用いることや、大量の廃液を生じることなど、環境負荷の観点からも問題がある。

これに対して、本実験で用いた RQ フレックス法では、比較的安価な装置を用いて、わずか 15 秒間で 1 回の測定を行うことができる。ウォーミングアップ等の時間も不要である。また、装置自体が非常に小型であることと、電源が乾電池であることから、圃場等の野外での測定にも適している。廃棄物も、小さな試験紙 1 枚を生じるのみである。以上の長所と、本実験で確認された RQ フレックス法の精度とを考慮すれば、この簡易測定法は、マタタビ属果実のアスコルビン酸濃度を評価するために有効な測定方法であると判断される。

アスコルビン酸は化学的に不安定な物質であり、重金属イオンや光の存在下で容易に酸化されて、デヒドロアスコルビン酸に変換することが知られている<sup>5,6)</sup>。このデヒドロアスコルビン酸自体はビタミン C 活性を示さないが、生体内において還元され、アスコルビン酸に戻る<sup>7)</sup>ため、デヒドロアスコルビン酸のビタミン C 活性はアスコルビン酸と等価とされている。一方、デヒドロアスコルビン酸がさらに酸化され、2,3-ジケトグルン酸になると、ビタミン C 活性は失われる<sup>8)</sup>。そのため、一般にビタミン C 濃度は、アスコルビン酸濃度とデヒドロアスコルビン酸濃度の和（総アスコルビン酸濃度）として表される。

筆者らはすでに、マタタビ属果実においては、総アスコルビン酸量の 7~64% をデヒドロアスコルビン酸が占めることを報告している<sup>9)</sup>。そのため、マタタビ属果実のビタミン C 活性を正確に評価するためには、アスコルビン酸のみならず、デヒドロアスコルビン酸量を測定することが望ましいと考えられる。本実験で用いた RQ フレックス法は、アスコルビン酸を測定するための方法であり、デヒドロアスコルビン酸を測定することはできない。もしもこの方法を改良して、デヒドロアスコルビン酸をも測定することができるようになれば、より有効な利

用が可能である。Lykkesfeldt は、デヒドロアスコルビン酸は Tris [2-carboxyethyl] phosphine により定量的にアスコルビン酸に還元され、しかも安定に存在することを報告している<sup>9)</sup>。このような酸性条件下でも安定に作用する還元剤によって試料を前処理することにより、デヒドロアスコルビン酸をアスコルビン酸に還元した後、RQ フレックス法により総アスコルビン酸を測定する方法を今後検討したい。

#### 4. 要約

キウイフルーツやサルナシなどのマタタビ属果実に含まれる主要な機能性成分であるアスコルビン酸を RQ フレックス法により測定し、HPLC 法による測定値と比較した。緑色系キウイフルーツ、黄色系キウイフルーツおよびサルナシ・シマサルナシ果実のいずれにおいても、RQ フレックス法による測定値と HPLC 法による測定値との間には強い正の相関性が認められた。果実内アスコルビン酸濃度が 40 mg/100 g 以上の場合には、RQ フレックス法による測定値の誤差は 7~15% 程度に止まったが、濃度が小さくなるにしたがって誤差が大きくなる傾向が認められた。RQ フレックス法は、わずか 15 秒間でアスコルビン酸濃度が測定できるため、簡易測定法として有効利用できるものと考えられた。

果実サンプルのご供与をいただきました香川県農業試験場府中分場の福田哲生氏ならびに小林農園の皆様へ感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) 日本ビタミン学会 (編) : ビタミンの事典 ビタミン C, 朝倉書店, 東京, pp. 354-388 (1996)
- 2) Ferguson, A. R.; MacRae, E. A. Vitamin C in Actinidia. *Acta Hort.*, 297, 481-488 (1991)
- 3) Nishiyama, I., Yamashita, Y., Yamanaka, M., Shimohashi, A., Fukuda, T and Oota, T. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other Actinidia species. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5472-5475 (2004)
- 4) (社) 日本食品科学工学会 新・食品分析法編

- 集委員会 (編) : 新・食品分析法 ビタミンC  
定量法, 光琳, 東京, pp. 439-454 (1996)
- 5) Angberg, M., Nystrom, C., and Castenson, S.  
Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies VII. Oxidation of ascorbic acid in aqueous solution. *Int. J. Pharm.*, 90, 19-33 (1993).
- 6) Bode, A. M., Cunningham, L. and Rose, R. C.  
Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high-pressure liquid chromatography. *Clin. Chem.*, 36, 1807-1809 (1990)
- 7) Wilson, J. X. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Lett.*, 527, 5-9 (2002)
- 8) Lewin, S. In *Vitamin C : Its Molecular Biology and Medical Potential*, Academic Press : New York, pp. 5-39 (1976)
- 9) Lykkesfeldt, J. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods : reliable reduction with Tris [2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride. *Anal. Biochem.*, 282, 89-93 (2000)