

キウイフルーツ果実に含まれるクロロフィルおよびカロテノイドの高速液体クロマトグラフィーによる同時分析

山下 友香、大田 忠親、西山 一朗

Simultaneous Analysis of Chlorophylls and Carotenoids in Fruit of Kiwifruit by High-Performance Liquid Chromatography

Yuka YAMASHITA Tadachika OOTA Ichiro NISHIYAMA

緒言

わが国におけるキウイフルーツの栽培は1970年代に始まり、以来カンキツ産地を中心にその栽培面積を増大し、1990年までは生産量の急激な増加が認められた¹⁾。しかし最近では、消費量の減少によって生産過剰の傾向となり、それに伴って価格の低迷を来している。そのため、生食以外の利用法として、ドライフルーツ、ワイン、ジャムなどへの加工が試みられる一方、品種改良により高品質果実を育成する努力もなされている。

従来の経済栽培品種は、ほぼ‘ヘイワード’のみに限られていたが、この品種は、大玉で極めて日持ち性に優れる長所をもつ反面、糖度がやや低く酸度が高いことや、追熟が困難であること、果肉色がやや薄いという欠点も有している。これらの欠点を改良すべく、最近では、高糖度の‘ホート16A’（ゼスプリ・ゴールド）や、濃緑色の果肉色と高糖度を特色とする‘香緑’、糖酸のバランスに優れ食味のよい‘讚緑’、小型で毛茸を欠き、極めて高い糖度を有する‘香粹’などの特徴的な品種が開発・販売されている。

キウイフルーツ果実の特徴としては、ビタミンC含量が高いことや日持ちのよさに加え、果物としては特異なエメラルドグリーンとも称される果肉色が挙げられる。この果肉色は、緑色色素であるクロロフィル類と、黄色色素であるルテインやβ-カロテンなどのカロテノイド類に起因することが知られている。キウイフルーツ果実の品質を評価するためにも、またその高品質化や品種改良を行うための指標としても、これらの色素を分析する技術が必要とさ

れる。

渡辺ら²⁾および McGhie and Ainge³⁾は、キウイフルーツ果肉に含まれる色素の分析について報告しているが、それらの方法は色素の抽出、転溶、脱水、濃縮乾固等の操作を要するため、色素の回収率に懸念が残る。また試料調製が煩雑で長時間を要するため、多検体を分析するには不向きであり、また、調製中に色素が分解や化学変化を生じる危険性も大きい。これに対し満田ら⁴⁾は、野菜のカロテノイドおよびクロロフィルの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析において、試料調製の簡便化を図った改良法を報告している。本研究では、この試料調製法ならびに分析法がキウイフルーツ果実でも応用可能であることを確認し、また、その測定条件を検討することにより、若干の改良を加えたので報告する。

2. 実験方法

実験材料

キウイフルーツは市販のニュージーランド産‘ヘイワード’の適熟果実を用いた。キウイフルーツ果実の硬度は、果実硬度計（藤原製作所）の円錐型針頭を用いて、果実赤道部2箇所につき、果皮上から測定した。硬度1.0~1.5 kgを示す果実を適熟期果実と判定し供試した。

試薬

HPLC用の有機溶媒としては、和光のHPLCグレードの試薬を用いた。色素標準品としては、クロ

ロフィル a (シグマ)、クロロフィル b (シグマ)、ルテイン (シグマ)、 β -カロテン (フルカ) を用いた。その他の試薬は、特級を使用した。

試料の調製

果実を剥皮した後、果肉をフードプロセッサー (Cuisinart DLC-8) でホモジナイズした。そのホモジネート 5g を乳鉢にとり、冷アセトン 5ml と石英砂を加えて色素を抽出し、ガラスフィルターによるろ過を行った。残渣を乳鉢に戻し、再び 5ml の冷アセトンを加え、抽出操作を繰り返した。同様の抽出操作を更に 2 回繰り返した後、ろ過液を合わせ、冷アセトンを加えて 25ml に定容した。この抽出液を遠心分離 (10,000×g、1 分間、2℃) し、得られた上清を試料として HPLC 分析に供した。色素の化学変化を最小限にするため、上記の操作はできる限り速やかに行った。

なお、色素の安定性に対する pH の影響を調べる実験では、果肉 100g あたり 2g の Na_2CO_3 を加えた後にホモジナイズを行い、そのホモジネート 5.1g を用いて上記と同様に試料の調製を行った。

HPLC 分析

上記の方法にて調製した試料 10 μ l を、ハイパー 250-4リクロスフェア 100 RP-18 (5 μ m) カラム (メルク) を装着した高速液体クロマトグラフ (日立 L-2000 シリーズ) に注入し、色素の分析を行った。検出器は L-2420 型 UV-VIS 検出器 (日立) を、またクロマトグラムの解析には D-2500 型データ処理装置 (日立) を用いた。

溶出条件は、Taylor と McDowell⁵⁾ の方法に準じた。すなわち、移動相の初期条件をアセトニトリル：水 (9：1) とし、試料注入後 20 分間で酢酸エチルの濃度を直線的に 50% まで高めるグラジエント溶出を行った。またこの変法として、試料注入後 15 分間で、酢酸エチルの濃度を 60% に高める方法も検討した。流速は 1.5ml/min とし、検出器では 430、440、445 あるいは 450 nm における吸光度をモニターした。

各色素の濃度は、それぞれの標準品を用いて検量線を作成し定量した。

3. 実験結果と考察

溶出条件の検討

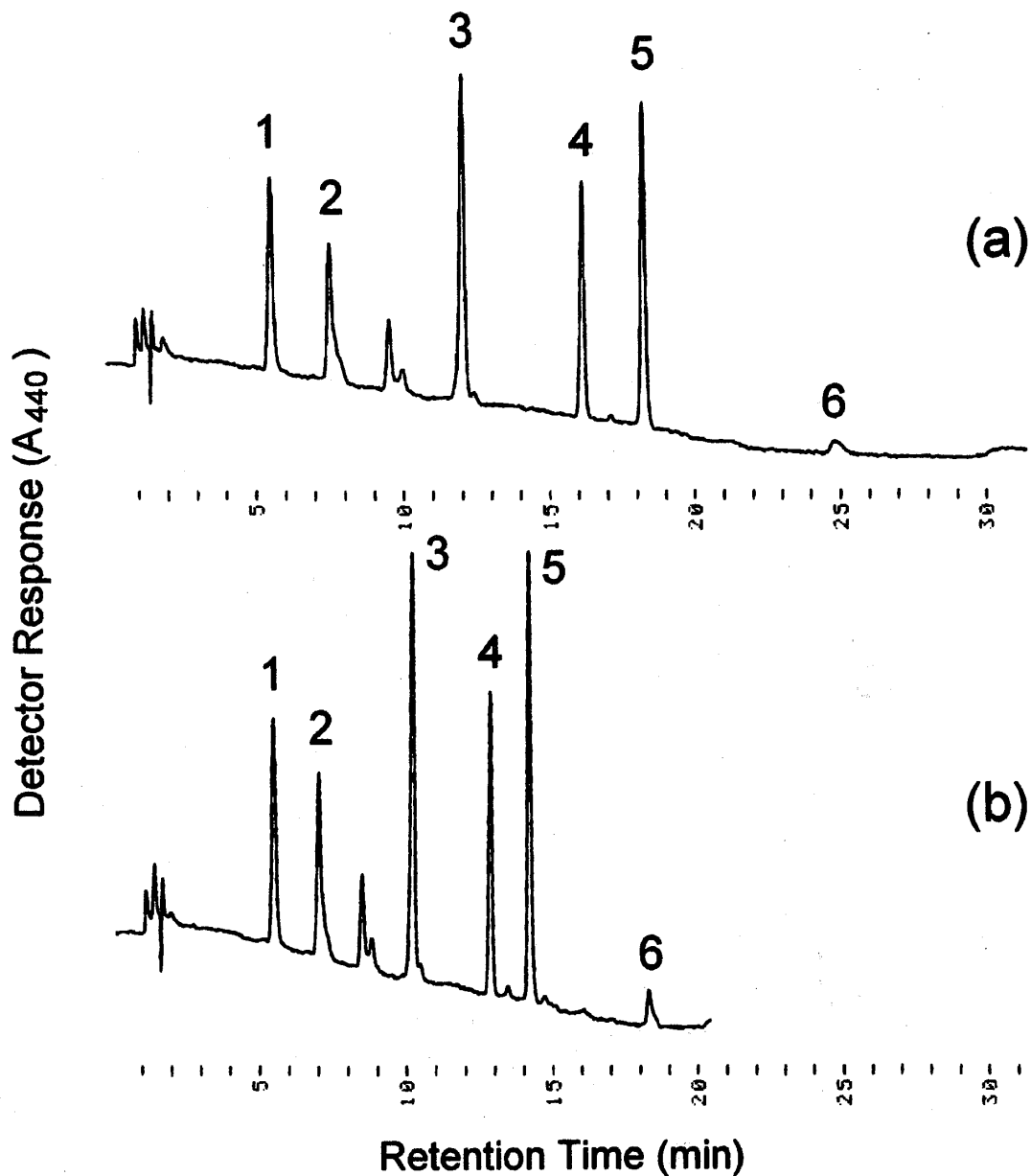
キウイフルーツ果肉より満田ら⁴⁾の方法に準じて抽出した色素を、Taylor と McDowell⁵⁾の方法により HPLC 分析した結果を、第 1 図 (a) に示した。この結果より、ネオキササンチン (ピーク 1)、ピオラキササンチン (ピーク 2)、ルテイン (ピーク 3) などのカロテノイド類や、クロロフィル a (ピーク 5) および b (ピーク 4) が、明瞭なピークとして検出されることが示された。一方 β -カロテン (ピーク 6) は、小さくブロードなピークとして検出することができたが、その検出感度は低く、改善が必要であった。また、1 回の分析に 30 分間を要することも、多検体の分析を行うには問題があるものと考えられた。そこで、より急勾配のグラジエント溶出を試みたところ、第 1 図 (b) のクロマトグラムが得られた。この溶出法では、 β -カロテン (ピーク 6) がシャープなピークとして認められ、また各色素のピークが相互に重複することなく、良好な分離を示した。また、1 回の分析に要する時間を 20 分間に短縮することができた。この結果より、以後の分析はすべてこの溶出条件で行うこととした。

検出波長の検討

カロテノイド類およびクロロフィル類を同時分析するためには、これらの物質すべてを感度よく検出できる波長でモニターする必要がある。各色素の可視吸光スペクトル⁶⁾から、430~450 nm が適正な検出波長であることが示唆されたため、この範囲の各波長でモニターしたときのクロマトグラムを比較した (第 2 図)。この結果より、 β -カロテン (ピーク 6) を検出するためには、430~440 nm よりも 445~450 nm の方が高感度であることが示された。また、450 nm では、クロロフィル a (ピーク 5) の検出感度が著しく低下することも示された。以上の結果から、これらの色素を同時分析するためには、445 nm でモニターすることが適切であると判断された。そのため、以後の実験では検出波長を 445 nm とし、分析を行うこととした。

色素定量における Na_2CO_3 添加の効果

カロテノイドやクロロフィルは、酸処理によって容易に化学変化を起こすことが知られている⁶⁾。特



第1図 キウイフルーツ色素のHPLCクロマトグラム

溶出条件の相違によるクロマトグラムの比較を行った。移動相としては、I液（アセトニトリル：水＝9：1）およびII液（酢酸エチル）を用いた。

(a) 0-20分：I液100%→I液50%II液50%、20-30分：I液50%II液50%

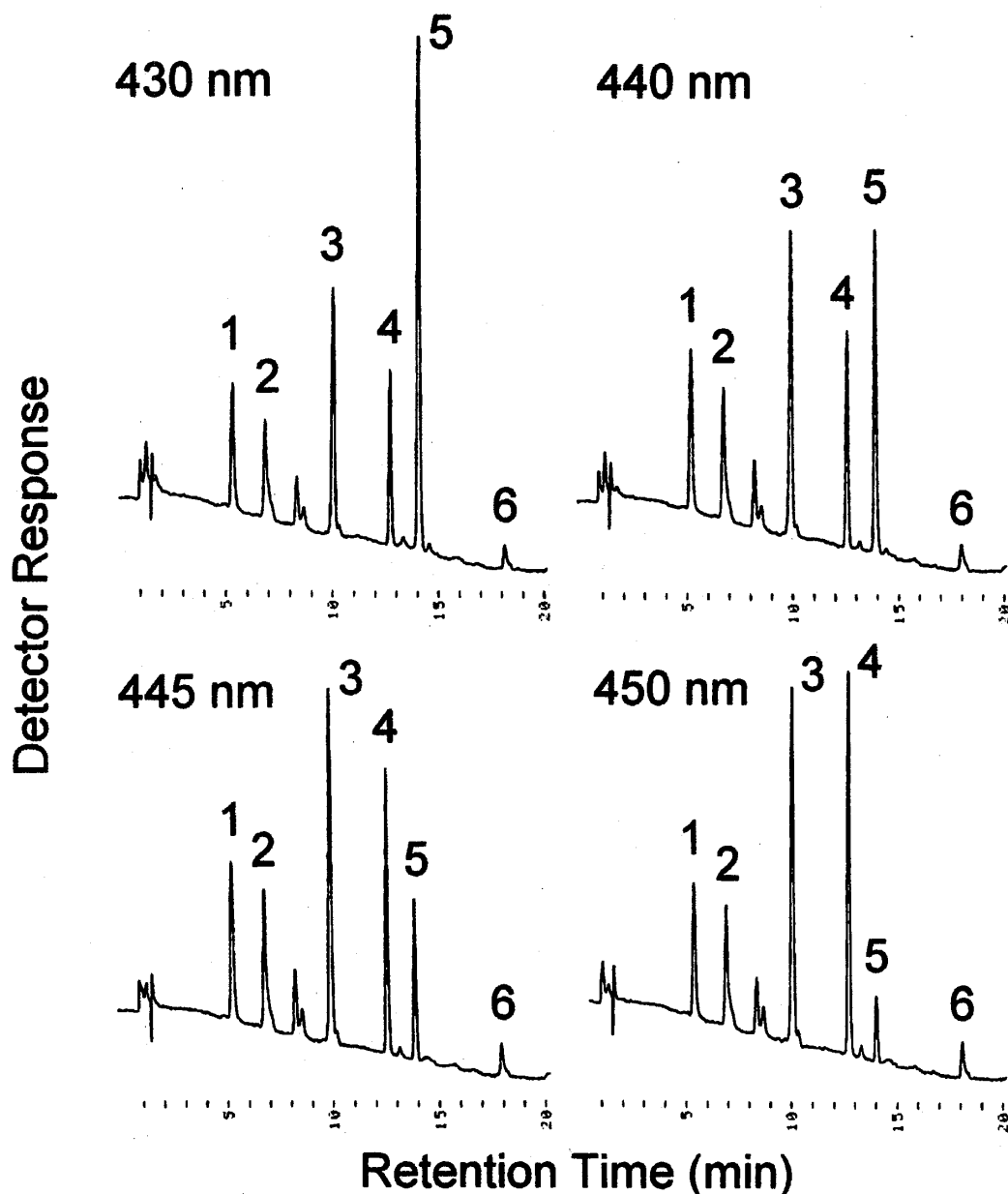
(b) 0-15分：I液100%→I液40%II液60%、15-20分：I液40%II液60%

1、ネオキサンチン；2、ピオラキサンチン；3、ルテイン；4、クロロフィルb；5、クロロフィルa；6、β-カロテン

にクロロフィルは、酸性溶液中では速やかにフェオフィチンに変換することが報告されている⁷⁾。キウイフルーツ果肉は、クエン酸やキナ酸などの有機酸を豊富に含むため、そのホモジネートは強い酸性を示す。そのため、抽出時に色素が酸性条件に暴露され、化学変化を来す可能性が考えられる。この化学変化を抑えるため、果肉をホモジナイズするとき

に Na_2CO_3 を添加して、その効果を調べた結果を第3図、第1表ならびに第2表に示した。

その結果、クロロフィルbを除くいずれの色素も、 Na_2CO_3 添加区では Na_2CO_3 無添加区と比較して、その濃度（あるいはピーク面積）が高値を示す傾向が認められた（第1表および第2表）。特にピオラキサンチン、ネオキサンチンおよびルテイン



第2図 異なる検出波長によるHPLCクロマトグラム

キウイフルーツ果肉より抽出した色素を、第1図(b)に示す溶出条件により分析した。図中に記した4種の波長による検出を試行し、そのクロマトグラムの比較を行った。ピーク番号については第1図脚注を参照。

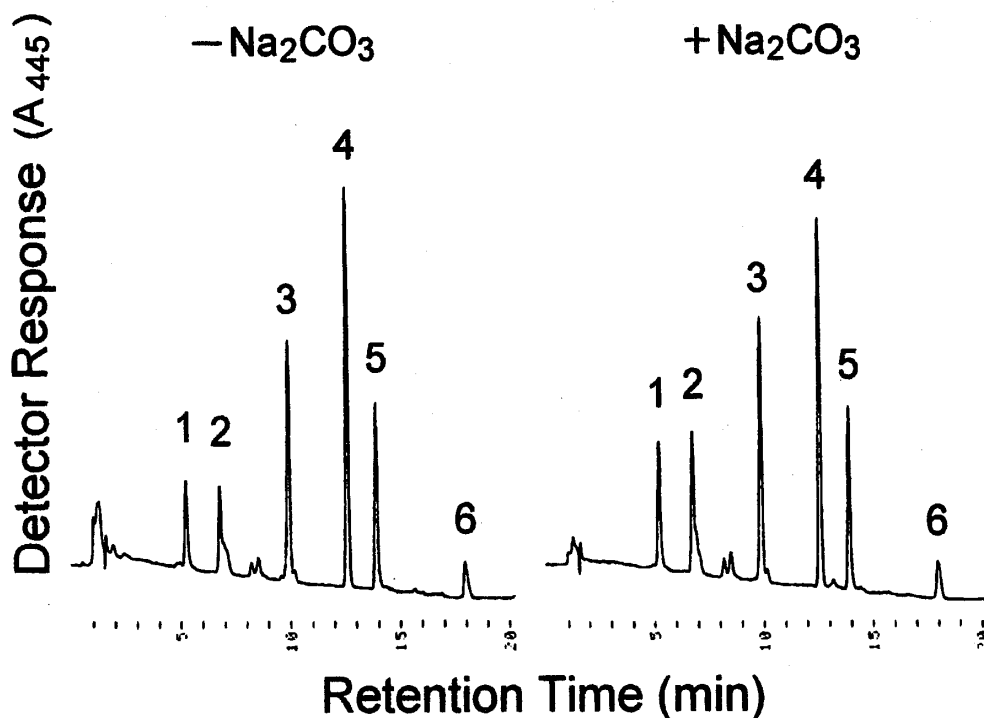
といったキサントフィル類において、その傾向が顕著であった(第1表および第2表)。これは、キウイフルーツ果肉に起因する酸により、色素が化学変化を来した結果だと推察される。なお、果肉ホモジネートのpHの平均値は、 Na_2CO_3 無添加の場合には3.53、 Na_2CO_3 添加の場合には8.42であった。

満田ら⁴⁾の報告では、ハウレンソウやシュンギク等の野菜の色素抽出時には、特に中和剤などを添加せずに試料調製を行っている。これらの野菜の有機酸含量は、それほど多くないため、そのまま抽出操

作を行っても特に問題はないものと推測される。これに対し、キウイフルーツ等の果実では、一般にその有機酸含量が豊富であるため、 Na_2CO_3 や CaCO_3 などのアルカリ処理が必要だと考えられる。

以上の結果を総合すると、本実験で決定したキウイフルーツ果肉のクロロフィルならびにカロテノイドの同時測定条件は、次のように要約される。

1. 果肉からの色素の抽出は、果肉に含まれる酸を中和するために Na_2CO_3 を添加した果肉ホモジネ



第3図 色素定量における Na_2CO_3 添加の効果

キウイフルーツ果肉をホモジナイズするとき、果肉100gあたり2gの Na_2CO_3 を添加した場合(+ Na_2CO_3)と添加しなかった場合(- Na_2CO_3)のクロマトグラムを比較した。第1図(b)に示す溶出条件によりHPLC分析を行い、また検出波長は445nmとした。ピーク番号については第1図脚注を参照。

第1表 ネオキサントインおよびビオラキサントインの分析における Na_2CO_3 添加の効果

Peak No.		Peak area*		a/b
		- Na_2CO_3 (a)	+ Na_2CO_3 (b)	
1	Neoxantin	18994	24726	0.77
2	Violaxantin	18417	29875	0.62

*平均値 (n=3)

第2表 ルテイン、クロロフィルおよび β -カロテンの定量における Na_2CO_3 添加の効果

Peak No.		Contents ($\mu\text{g}/100\text{g}$ flesh)*		a/b
		- Na_2CO_3 (a)	+ Na_2CO_3 (b)	
3	Lutein	370	398	0.93
4	Chlorophyll b	622	619	1.00
5	Chlorophyll a	1228	1275	0.96
4+5	Total Chlorophyll	1850	1894	0.98
6	β -Carotene	82	84	0.98

*平均値 (n=3)

ートから、冷アセトン抽出によって行い、得られた試料を前処理なくHPLC分析に供する。

2. HPLC分析は、 C_{18} 逆相カラムを用い、移動相の初期条件をアセトニトリル:水(9:1)とし、試料注入後15分間で酢酸エチルの濃度を直線的に60

%まで高めるグラジエント溶出を行う。検出器の波長は445nmとする。

この方法により、従来よりも試料調製に要する労力と時間が削減され、また、1回のHPLC分析に要する時間も短縮することができた。

本実験から求められた総クロロフィル含量は1894 $\mu\text{g}/100\text{g}$ であり、この値は Fuke *et al.*⁸⁾が報告している915-1305 $\mu\text{g}/100\text{g}$ や、McGhie and Ainge³⁾が報告している0.95 $\text{mg}/100\text{g}$ と比較すると、高い値であった。このような差異が生じた一つの原因としては、供試果実の栽培条件や追熟期間の差異が考えられる。Antognozzi *et al.*⁹⁾は、キウイフルーツ栽培時の日照条件や保存期間の違いにより、果実中クロロフィル含量が大きく変動することを報告している。また、他の原因としては、試料調製法の違いが考えられる。Fuke *et al.*⁸⁾および McGhie and Ainge³⁾の報告では、試料調製時にジエチルエーテルへの転溶やロータリーエバポレーターによる濃縮乾固を行っているため、回収率の低下が懸念される。実際、満田ら⁴⁾は、これらと類似の試料調製法を用いた場合、クロロフィルの回収率が20~30%低下することを報告している。一方、 β -カロテン含量は84 $\mu\text{g}/100\text{g}$ と算出されたが、この値は食品成分表(第5訂)に記載の値(66 $\mu\text{g}/100\text{g}$)と近似した。

今回の実験では、代表的な経済栽培品種である‘ヘイワード’についてのみ、測定を行ったが、同様の分析法は、キウイフルーツの他の品種や、キウイフルーツと近縁のサルナシ類でも、問題なく使用可能であることを確認している(西山等、発表準備中)。この同時分析法を用いることにより、今後、各色素含量の品種間差異や、保存や調理・加工に伴う変化等を検討する予定である。

4. 要約

キウイフルーツ果肉に含まれるクロロフィルならびにカロテノイドを、HPLC法によって同時分析するための条件を検討した。その結果、試料調製時にアルカリ処理を施すことにより、抽出操作中の色素の化学変化を抑制できることが示唆された。また、HPLC分析時の溶出条件を改善することにより、分析に要する時間を従来よりも短縮することができた。このときの検出波長を445 nmに設定することにより、各色素の検出を感度よく行うことが可能となった。この改良法は、試料の調製ならびに分析に要する時間が短いため、多数の試料を効率よく分析するために有効だと考えられる。

本研究を行うにあたり、有益な御助言をいただき

ました本学食物栄養科の下橋淳子教授に感謝いたします。

引用文献

- 1) 矢野昌充：日食保蔵誌, **29**, 51-55 (2003)
- 2) 渡辺慶一, 高橋文次郎：園学雑, **68**, 1038-1043 (1999)
- 3) McGhie, T. K. and Ainge, G. D. : *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 117-121 (2002)
- 4) 満田幸恵 他：日食科工誌, **49**, 500-506 (2002)
- 5) Taylor, S. H. and McDowell, I. J. : *J. Sci. Food Agric.*, **57**, 287-291 (1991)
- 6) 東尾久雄, 永田雅靖：カロテノイド, 「新・食品分析法」, (社)日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会 編, (光琳, 東京), pp. 639-647 (1996)
- 7) 石谷孝佑, クロロフィル成分と変色, 「食品の変色の化学」, 木村進 編著, (光琳, 東京), pp. 159-183 (1995)
- 8) Fuke, Y. *et al.* : *J. Food Sci.*, **50**, 1220-1223 (1985)
- 9) Antognozzi, E. *et al.* : *Acta Hort.*, **379**, 483-490 (1995)