

ホウレンソウに含まれる β -カロテンの分光光度計を用いた簡便定量法[†]

永田 雅靖

(平成20年9月2日受理)

A Simple Spectrophotometric Method for the Estimation of
 β -Carotene Content in Spinach Acetone Extracts

Masayasu Nagata

I 緒 言

野菜には β -カロテンをはじめとするカロテノイドが豊富に含まれている。近年、カロテノイドが生活習慣病の予防など多面的な健康維持機能を示すことが明らかになり、社会的な関心も高い (World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research Food, 2007)。これらカロテノイド類縁体の分析には、高速液体クロマトグラフィー・質量分析計 (LC-MS) など高精度、高感度な同定・定量法が用いられるようになってきた (Matsumotoら, 2007)。その一方で、野菜の品種育成や栽培管理、品質評価など、短時間に多点数を処理可能なカロテノイドの簡便定量法の開発が望まれてきた。

著者らは、クロロフィル *a* とクロロフィル *b* の可視吸収スペクトルの違いを利用して、色素抽出液の特定波長の吸光度から、それぞれの濃度を算出するクロロフィル定量法 (Arnon, 1949) の原理を拡張、高精度化して、トマト果実のクロロフィルとリコペン濃度の同時簡便定量法 (永田ら, 1992) および、ニンジンに含まれる α -カロテン、 β -カロテンおよびリコペンの簡便定量法を開発してきた (永田ら, 2007)。これらの方法は、一般的な分光光度計を用い、分析試料として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析用に調製した色素抽出液が利用可能で、短時間に多点数の分析が可能である。永田ら (1992) のリコペン定量法は、色素高含有トマト系統の育成 (石井ら, 1999) や、栽培時の果実品質の評価 (Sakamotoら, 1999) 等に用いられている。

吸光度を用いたクロロフィルの定量法に関しては、これまでも様々な報告がなされてきた (Arnon, 1949; Inskeepら, 1985; Porraら, 1989) が、これらの方法をホウレンソウの β -カロテン濃度の簡便定量に適用した報告はない。従来、ホウレンソウの β -カロテン濃度を求めるためにはHPLCを用いて1検体に20~40分の分析時間が必要であったが、今回、分光光度計を用いて1分程度で簡便定量できる方法を開発したので報告する。

II 材料および方法

ホウレンソウ (*Spinacea oleracea* L., 品種'アイクル' (協和種苗), 'おかめ' (タキイ種苗)) は、野菜茶業研究所 (安濃) の圃場で、慣行条件により栽培した。ホウレンソウは、秋から春にかけて順次播種し、3月18日から5月26日まで収穫時期を変えて葉色の異なる試料を得た。分析試料は、根および基部を除去した可食部全体および、茎のみ、葉のみの区を設け、5 mm程度に細切してよく混合し、3 gを50 mLのプラスチック遠心管に秤取して、分析まで -30°C で保存した ($n=28$)。色素の抽出は、3 gの試料からアセトンを用いて残渣に色が無くなるまで繰り返し行い (満田ら, 2002)、100 mLに定容した。抽出液の遠心上清をHPLC (Shimadzu LC-10A, 東ソー TSK gel ODS 120T (4.6 mm ID x 250 mm), メタノール 1.0 mL/min, 日立ハイテクノロジー Diode Array Detector L-7455, 350-750 nm) によりクロロフィルとカロテノイドの濃度を測定した (永田ら, 2007)。また、分光光度計 (日立計測器サービス

〒514-2392 三重県津市安濃町草生360

野菜・茶の食味食感・安全性研究チーム

† 本報告の一部は、平成16年度園芸学会秋季大会で発表した。

GeneSpec III)により350~750nmの可視吸収スペクトルを測定し、 β -カロテン濃度推定式の検討に用いた。

アセトンおよびメタノールは、和光純薬の試薬特級を用いた。色素標品は、 β -カロテン、クロロフィル*a* (クロレラ由来) とクロロフィル*b* (クロレラ由来) のいずれも和光純薬のものを用いた。

単回帰分析は、Excel 2003 (マイクロソフト) の分析ツール (回帰分析) で行った。

III 結 果

HPLCによる予備的な分析により、ホウレンソウに含まれる主な色素は、クロロフィル*a*、クロロフィル*b*、 β -カロテン、ルテインであることが判明した。そこで、クロロフィルは*a*と*b*、カロテノイドは β -カロテンを代表として、3成分系に単純化したモデルにより推定式を検討した。即ち、3つの色素標品の可視吸収スペクトルを測定し (Fig.1)、クロロフィル*a*の吸収極大波長における吸収係数 (1%, 1 cm) を1020、クロロフィル*b*の吸収極大波長における吸収係数を575と置き (Anonymous, 1984)、さらに、 β -カロテンの453nmにおける吸収係数2592 (大谷ら, 1980) から、クロロフィルとの重なりが少ない極大吸収波長479nmの吸収係数2306を算出した。Table 1 に示すそれぞれの色素に特徴的な極大吸収波長 (479nm, 645nm, 663nm) における標準化した吸収係数 (1%, 1 cm) を用いて、各波長における吸光度と色素濃度 (%) の関係式 (Eq.(1)~(3)) を導いた。

$$A_{479} = 33 C_{Chla} + 206 C_{Chlb} + 2306 C_{\beta Car} \cdots \text{Eq. (1)}$$

$$A_{645} = 218 C_{Chla} + 575 C_{Chlb} + 3 C_{\beta Car} \cdots \text{Eq. (2)}$$

$$A_{663} = 1020 C_{Chla} + 85 C_{Chlb} + 4 C_{\beta Car} \cdots \text{Eq. (3)}$$

ただし、 A_{479} 、 A_{645} 、 A_{663} はそれぞれ479, 645, 663nmにおける吸光度である。 C_{Chla} 、 C_{Chlb} 、 $C_{\beta Car}$ はそれぞれク

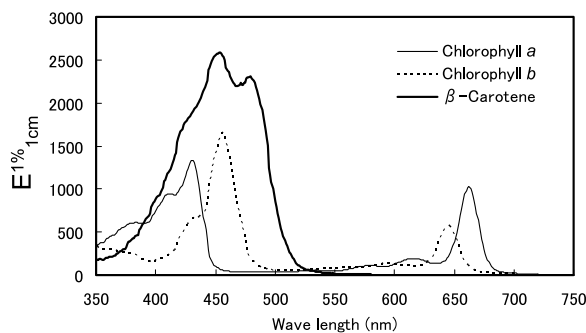


Fig.1 Calculated absorption spectra (1%, 1cm) of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and β -carotene in acetone.

Table.1 Absorption coefficients of three pigments.

Pigments	Absorption coefficient ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$)		
	479 nm ^a	645 nm ^a	663 nm ^a
Chlorophyll <i>a</i>	33	218	1020
Chlorophyll <i>b</i>	206	575	85
β -Carotene	2306	3	4

^a β -Carotene, chlorophyll *b* and chlorophyll *a* have absorption maxima at 479, 645 and 663 nm.

ロロフィル*a*、クロロフィル*b*、 β -カロテンの濃度 (%) である。

これらの式を β -カロテンの濃度について整理・変形し、濃度の単位をmg/Lにそろえると、 β -カロテン濃度の理論値はEq. (4)により求めることができる。

$$\beta\text{-Carotene (mg/L)} = 4.338A_{479} - 1.5835A_{645} + 0.1980A_{663} \cdots \text{Eq. (4)}$$

この式に、実際のアセトン抽出物 (n=28) の吸光度を代入して計算するとともに、同じ試料のHPLC分析値との関係をプロットするとFig.2のようになった。Eq.(4)で計算される β -カロテン濃度の理論値には、 β -カロテン以外にもルテインやフラボノイド等の色素が含まれているために、実際の β -カロテン濃度よりも高い値になったと考えられた。ただし、相関係数が $r=0.992$ と非常に高いため、Eq.(4)を傾きと切片で補正することにより、精度の高い β -カロテン濃度推定式を得ることが可能と推察し、補正係数を加味したEq.(5)を導いた。

$$\beta\text{-Carotene (mg/L)} = 0.854A_{479} - 0.312A_{645} + 0.039A_{663} - 0.005 \cdots \text{Eq. (5)}$$

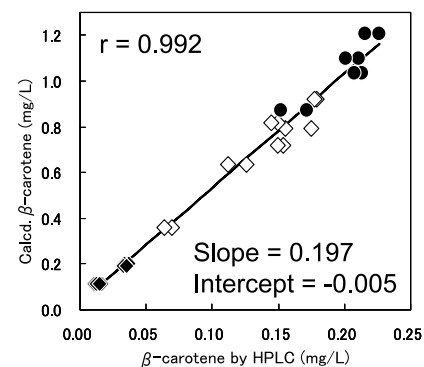


Fig.2 Scatter plots and correlation of calculated β -carotene concentration with the Eq.(4) versus measured concentration by HPLC. ●, Leaf; ◆, Stem; ◇, Whole plant (edible part).

この式で推定したβ-カロテン濃度とHPLC分析値との関係をFig.3に示す. 実測値と推定値の単回帰分析による相関係数は $r=0.992$ であった. 回帰の標準誤差, 即ち二乗平均平方根誤差 (Root Mean Square Error; RMSE)は0.0096mg/Lであり, 簡便定量法の推定式としては十分な精度を持つものと考えられた.

IV 考 察

この式を作成するために, 2品種のホウレンソウの葉, 茎および可食部全体を縮分した試料を用いた. β-カロテン含量は, 葉で高く, 次いで全体, 茎で少なかった (Fig.3). 異なる部位の試料を用いることで, 幅広い濃度の母集団が得られた. この母集団では部位が異なっても, 推定式で良い直線関係が得られたことから, 他のホウレンソウ品種や部位にも適用可能と考えられるが, 夏季に栽培した場合など, 品質特性が大きく異なる試料では, 推定式への適用度を別途確認しておく必要がある.

さらに, 今回分析したホウレンソウでは, 緑色の濃い試料ほどβ-カロテン含量も高い傾向が認められたことから, クロロフィル *a*, *b*とβ-カロテン, ルテイン含量の相関性を調べると, それぞれ非常に高いことがわかった (Table 2). このことは, β-カロテンやルテインなどのカロテノイドが, (1)クロロフィルの付随的な光捕集色素として働いていることや, (2)光捕集複合体の会合体形成に重要な役割を果たしていること, さらに, (3)光酸化障害から光合成装置を保護する働きをしていることなど (Malkinら,2005), 葉緑体中のクロロフィルとの存在比率が生理的に制御されていることが背景にあるものと推察される. ホウレンソウの貯蔵に伴うビタミン

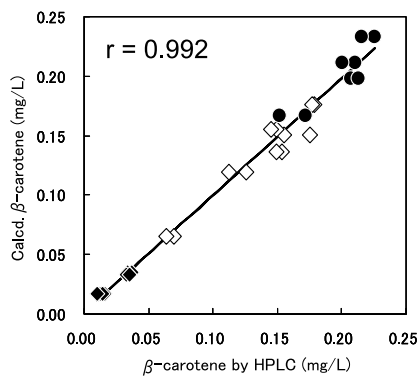


Fig.3 Scatter plots and correlation of calculated β-carotene concentration with the Eq.(5) versus measured concentration by HPLC. ●, Leaf; ◆, Stem; ◇, Whole plant (edible part).

Table.2 Correlation factor (r) of each pigment concentrations

	Chlorophyll <i>b</i>	β-Carotene	Lutein
Chlorophyll <i>a</i>	0.984	0.993	0.997
Chlorophyll <i>b</i>		0.975	0.988
β-Carotene			0.988

C含量の変化については, 日坂らをはじめとする多数の報告があるが (日坂ら, 1991), カロテノイド含量の変化については, 減少するという報告 (広部ら, 1956; Pandrangiら, 2004) と, ホウレンソウのベビーリーフではほとんど減少しなかった (Bergquistら, 2007) とする報告など数が少ない. 今後は, 貯蔵に伴うクロロフィルの分解とβ-カロテン含量等の変化を調べることで, 鮮度評価指標としての応用も期待できる.

今回開発した方法では, 色素抽出液における特定波長の吸光度から計算したクロロフィルの寄与分を可視吸収スペクトルから差し引いて, 残りの部分からカロテンの寄与分を計算することでβ-カロテン含量を高い精度で推測することができた. 今回, クロロフィル含量とβ-カロテンの含量が高い相関にあることが明らかになったことから, 今後は, クロロフィル含量の非破壊測定値からβ-カロテン含量の推定も可能になるものと推察された.

その一方で, クロロフィル *a*, *b*, β-カロテンにルテインを加えた4成分系で同様の濃度推定式を作成した場合には, β-カロテン濃度の推定精度が高くならなかった (データ省略). このことは, 実際の色素溶液と数式モデルとの乖離を示し, 手法としての限界を示すものと考えられた.

V 摘 要

クロロフィルとカロテノイドの可視吸収スペクトルの違いを利用して, ホウレンソウのアセトン抽出液の479, 645, 663nmにおける吸光度からβ-カロテン濃度を精度良く推定する簡便定量法を開発した. β-カロテン濃度の推定式, HPLC分析値との相関係数(r)および標準誤差(SE)は, 以下のとおりである.

$$\beta\text{-カロテン (mg/L)} = 0.854A_{479} - 0.312A_{645}$$

$$+ 0.039A_{663} - 0.005$$

$$(r = 0.992, SE = 0.0096\text{mg/L})$$

引用文献

- 1) Anonymous (1984): Chlorophyll in Plants. Official Method of Analysis, 14th ed., ed. by S. Williams (Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, USA) pp. 59-60.
- 2) Arnon, D. I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15.
- 3) Bergquist, S. A. M., U. E. Gertsson, L. Y. G. Nordmark and M. E. Olsson (2007): Ascorbic acid, carotenoids, and visual quality of baby spinach as affected by shade netting and postharvest storage. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8444-8451.
- 4) 日坂弘行・小倉長雄(1991): 貯蔵中のホウレンソウ部位別のアスコルビン酸含量の変化. 日食工誌, **38**, 41-43.
- 5) 広部りう・高木和男・増田富江・望月英男・小峰みえ子(1956): 貯蔵による野菜のビタミン含有量の変化について. 栄養と食糧, **9**, 180-184.
- 6) Inskeep, W. P., and P. R. Bloom (1985): Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethyl formamide and 80% acetone. *Plant Physiol.*, **77**, 483-485.
- 7) 石井孝典・由比進・沖村誠(1999): 高カロチノイドトマト系統の育成. 東北農業研究, **52**, 205-206.
- 8) Malkin, R. and K. Niyogi (2005): 光合成. 植物の生化学・分子生物学 (学会出版センター, 東京) pp. 515-566.
- 9) Matsumoto, H., Y. Ikoma, M. Kato, T. Kuniga, N. Nakajima and T. Yoshida (2007): Quantification of carotenoids in citrus fruit by LC-MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among citrus varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2356-2368.
- 10) 満田幸恵・新本洋士・小堀真珠子・津志田藤二郎(2002): 高速液体クロマトグラフィーによる野菜のカロテノイドおよびクロロフィルの同時分析. 日食科工誌, **49**, 500-506.
- 11) 永田雅靖・山下市二(1992): トマト果実に含まれるクロロフィルおよびカロテノイドの同時, 簡便定量法. 日食工誌, **39**, 925-928.
- 12) 永田雅靖・野口裕司・伊藤秀和・今西俊介・杉山慶太(2007): 普通種ニンジンと金時ニンジンの α -, β -カロテンおよびリコペンの簡易分別定量法. 日食科工誌, **54**, 351-355.
- 13) 大谷俊二・林孝三(1980): カロチノイド. 植物色素 (養賢堂, 東京) pp. 205-229.
- 14) Pandrangi, S. and L. E. LaBorde (2004): Retention of folate, carotenoids, and other quality characteristics in commercially packaged fresh spinach. *J. Food Sci.*, **69**, C702-C707.
- 15) Porra, R. J., W. A. Thompson and P. E. Kriedemann (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents; verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384-394.
- 16) Sakamoto, Y., S. Watanabe, T. Nakashima and K. Okano (1999): Effects of salinity at two ripening stages on the fruit quality of single-truss tomato grown in hydroponics. *J. Hort. Sci. Biotech.*, **74**, 690-693.
- 17) World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research Food (2007): Vegetables, fruits, pulses (legumes), nuts, seeds, herbs, spices. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective, The second expert report (American Institute for Cancer Research, Washington DC) pp. 75-115.

A Simple Spectrophotometric Method for the Estimation of β-Carotene Content in Spinach Acetone Extracts

Masayasu Nagata

Summary

A simple method for the estimation of β-carotene concentration in acetone extracts of spinach was newly developed. The principle of this method depended on the difference in visible absorption spectra of chlorophylls and carotenoids. The concentration of β-carotene can be obtained through the calculation with the absorbances at 479, 645 and 663 nm. The equation, the correlation coefficient between prediction and measurement (r), and the standard error (SE) are as follows.

$$\beta\text{-Carotene (mg/L)} = 0.854A_{479} - 0.312A_{645} + 0.039A_{663} - 0.005$$

($r=0.992$, SE = 0.0096mg/L)

Only an ordinary spectrophotometer is necessary to use this method, and it is easy enough to be used for many samples.