

無支柱栽培トマトの加工適性に関する研究 (第4報)

トマト果実のカロチノイド定量法の検討

飯島 隆志・丸山 秀明*

信州大学農学部 食品化学研究室

トマト加工品の品質はその色調によって左右されると云っても過言はない。

トマト果実の色は未熟の段階では chlorophyll によって緑色を呈しているが、加工原料として使用される完熟トマトでは chlorophyll は存在せず、もし chlorophyll が存在すると製品の色調は暗色化してしまう。完熟トマト果実の色は carotenoids によって表現され、そのほかに僅かに flavonoids が存在する。

トマト果実の赤色は、深紅色のものは lycopene 含量が全 carotenoids の 85~90% を占め 8~12 mg/100 g の含量で、これに対し赤橙色のものは lycopene 含量の割合が 75~80% で、lycopene 以外の carotenoids は β -carotene が多く、そのほかに α -carotene, xanthophyll 類である^{1,2,3}。

色調の測定には光電光度計、分光光度計による一定波長に対する吸収および反射率の測定による光電的方法(Hunter color difference meter, Gardner color difference meter, Agtron, 日本電色色差計など)と、有機溶媒により carotenoids を抽出して、色素そのものを測定する化学的方法とがある^{4,5}。

前者の方法は、色調を総合的に把握できることと、数を多くこなすことができること、破壊せずにも測定ができることなどの利点があり、後者は色調の構成色素を個別的に把握することに利点があるが、分析法が複雑であることの欠点がある。

そこで化学的分析法の簡便でしかも妥当な方法の発見は、トマト工業関係の品質管理上、または研究上重要なことであろうと思われる。

Carotenoids のうち、lycopene は特に酸化され易く、退色がすみやかなために、市販品がなく、検量線作成のための純品の入手が容易でない。したがって、化学的分析による比色法には従来種々の方法がとられて来た。大別すると下記の3方法であろう。

1. 木村⁶(1956) など^{3,6,7}はその都度トマト果実から lycopene を抽出・単離して、検量線を作成して分析に供した。

2. ZECHMEISTER, CHLONOKY⁸ (1950) その他⁹は基準色素として azobenzene を用いその吸光度に値する各 carotenoid の量を求めている。

3. 一方最近の報告¹⁰によると既知の吸光係数を用いた定量方法が見られる。しかしこの数値はまちまちで確立されていない。

そこで本実験では、これら3つの方法を比較検討し、もっとも簡便で妥当な方法を見出そ

* 現 ヤクルト株式会社
昭和50年4月30日受理

うとしたもので、ここにその結果を報告する。

本実験施行にあたり、御支援を戴いた黒沢辰一助教授、中山昌明助教授、建石耕一教官および材料の提供を戴いた信州大学附属農学部農場の関係者に対し深甚な謝意を表す。また科学研究費によるものの一部であるのでこの関係者にも謝意を表す。

実 験 方 法

1. Lycopene の抽出^{10,11,12)}

信州大学農学部附属農場で栽培した無支柱栽培トマトから得た果汁をろ紙で吸引ろ過し、得た残渣1kgを5lの広口びんに入れ、1.3lのMeOHを加えて、激しく振とうし、2時間放置した。これを吸引ろ過して、残渣をMeOH、CCl₄混合溶液(1:1v/v)1.3lで20分間時々振とうしながら抽出し、吸引ろ過した。この抽出法を2回繰返し、下層の赤褐色を呈したCCl₄層を分取し、分液漏斗中でMeOHを水洗除去した。水洗は水1l、約20分を要した。

水洗後Na₂SO₄を加え一夜放置した。脱水した抽出液をろ過して、Na₂SO₄を除き、40°Cの湯浴上で減圧濃縮し、数mlの暗赤色残渣とした。さらにbenzene数mlを加え、残渣を溶解し、再び濃縮した。

この残渣を25ml benzeneに溶解し、50°Cの湯浴で加温し、完全に溶解したところへ、熱MeOH 15mlをスポイドで滴下、攪拌した。結晶が出はじめるが、これを室温まで冷やしてから、氷冷を2時間行った。この沈澱物を10,000 r. p. m. 15分間の遠沈処理で結晶を集めた。

この結晶を熱MeOHで洗浄し、ガラスフィルターでろ過し、再び熱MeOHで3回洗浄し、デシケーターで減圧乾燥した。結晶はニカワ状を呈し、収量は116mgであり、このm. p. は172~173°Cであった。顕微鏡によると長プリズム状結晶をなしていた。

2. Lycopene の精製^{11,12,13)}

Ca(OH)₂ 1kgを用いて30×8cmのカラムにつめ、前記1の操作で得た粗lycopeneの結晶をbenzeneとpet-etherの混合溶液(1:1v/v)100mlに溶解したものをカラムに注ぎ吸着させた。展開はpet-ether, acetone混合液(4:1v/v)を1.2l使用して行った。

展開後吸着柱を押し出し、lycopene層を切断してとり、2lのacetoneでlycopeneを溶出した。溶出液を500mlに減圧濃縮し、200mlのbenzeneを加えてlycopeneをbenzeneに移行せしめ、水洗してacetoneを除去、Na₂SO₄で乾燥した。乾燥したbenzene溶液をろ過してNa₂SO₄を除き、45~50°Cの湯浴中で減圧濃縮した。この残渣を10mlのbenzeneで溶解し、これに熱MeOH 15mlを攪拌しながら滴下し、生じた沈澱物を室温まで冷やしてから2時間氷冷した。

結晶を10,000 r. p. mで20分間遠沈し、上澄を捨て、熱MeOHで洗浄し、遠沈管のままデシケーターを用い、減圧下で乾燥した。結晶は暗赤色を呈し、m. p. は174~175°Cであった。

3. Lycopene の検量線の作成

以上の操作で精製した lycopene 9.3mgを秤量して pet-benzine で10倍に稀釈して自記分光光度計(日立124型)で吸光スペクトルを測定した。

さらにこの液を50ml定容フラスコにそれぞれ5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50mlをとり定容し, 吸光度を測定して検量線を作成した。測定波長は 445, 470, 475, 505nmであった。

4. Azobenzene の吸光度曲線の作成⁸⁾

試薬 azobenzene 145mgを秤量し, 96% EtOH で溶解して100mlに定容した。この溶液を5倍に稀釈して, 自記分光光度計で吸光スペクトルを測定した。

5. 吸光係数による吸光度曲線の作成

Lycopene, β -carotene をトマト果実から単離して吸収スペクトルを測定し, 各波長間における吸光度の比率を算術平均から求め, lycopene の 470nmにおける $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ を hexane 溶液で3450とし, β -carotene の 450nmにおける $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ を2505として¹⁰⁾, ZECHMEISTER, CHLONOKY⁸⁾によって, azobenzene 145mg/100ml に相当しているとしている lycopene 0.0078 mg/ml, β -carotene 0.0235mg/ml の吸光度を算出した。算出式は OKUBO et al. (1971)¹⁰⁾によったが, その式は表3, 4の備考らんに記した。

実験結果と考察

1. 単離 lycopene よりの検量線

実験方法1, 2に記したような方法でトマト果実から単離した lycopene の結晶から pet-benzine を溶液として, 濃度0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.4, 3.6, 4.0ppmについて, 445, 470, 475, 505 nm の波長における吸光度を測定した結果が表1に示すとおりであり, また 445, 470, 475nmの波長における検量線が図1に示すとおりであった。

2. Azobenzene の吸光度

Table. 1. Absorbance of pure lycopene isolated from tomato fruits in pet-benzine

Concentration (ppm)	Wave length			
	445 nm	470 nm	475 nm	505 nm
Absorbance (O.D)				
0.4	0.066	0.087	0.094	0.081
0.8	0.125	0.164	0.181	0.154
1.2	0.181	0.240	0.269	0.231
1.6	0.240	0.328	0.366	0.307
2.4	0.357	0.480	0.556	0.479
3.6	0.475	0.636	0.745	0.622
4.0	0.585	0.777	0.917	0.783

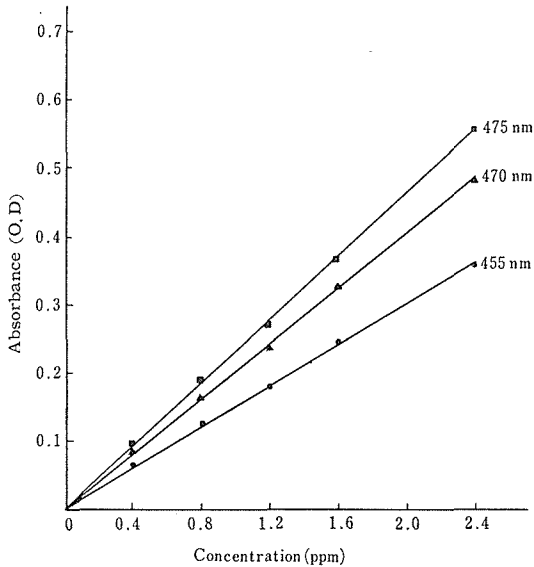


Fig. 1. Calibration curves of pure lycopene isolated from tomato fruits in pet-benzine

Table 2. Absorbance of azobenzene in ethanol

Wave length (nm)	Absorbance (O.D) of azobenzene 145mg in 96% EtOH 100ml
400	2.28
10	3.03
20	3.76
30	4.29
40	4.46
50	4.31
60	3.91
70	3.16
80	2.56
90	1.86
500	1.25
10	0.80
20	0.45
30	0.23
40	0.10

実験方法 4 に記したように、azobenzene 145mg を 96% EtOH で溶解し、100nm に定容し、この溶液を 5 倍に希釈して、自記分光光度計で吸光度を測定し 145mg/100ml 相当に換算した結果は表 2 に示すとおりであった。

3. 吸光係数による吸光度

実験方法 5 に記したように、lycopene の 470nm の $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ を hexane 溶液で 3450 とし、 β -carotene の 450nm における $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ を 2505 とし¹⁰⁾、azobenzene 145mg/100ml に相当すると報告されている⁸⁾ lycopene 0.0078mg/ml、 β -carotene 0.0235mg/ml の吸光度を算出した結果が表 3、表 4 のとおりであった。

4. 定量法の検討

各定量法による lycopene 0.0078 mg/ml、 β -carotene 0.0235 mg/ml に相当する吸光スペクトルをまとめた結果が図 2 である。

1) β -carotene

ZECHMEISTER, CHLONOKY (1950)⁸⁾ の azobenzene を利用する定量法では、 β -carotene の吸光度測定は 448nm で行っている。本実験結果によると、吸光係数より求めた 448nm の吸光度および azobenzene の吸光度は、それぞれ 5.9 および 4.5 を示し、ある程度の相異が見られ、430nm 付近で接近していた。

2) Lycopene

Azobenzene による定量法⁸⁾では 470nm の波長で吸光度測定を行っているが、470nm にお

Table 3. Absorbance of lycopene calculated from the extinction coefficient

	Wave length (nm)					
	444	454	470	489	502	510
Absorbance* (O.D)	0.395	0.345	0.588	0.318	0.540	0.450
	0.353	0.309	0.535	0.285	0.492	0.418
	0.465	0.405	0.705	0.375	0.648	0.522
	0.400	0.350	0.605	0.322	0.550	0.445
	0.612	0.550	0.842	0.508	0.808	0.683
	0.593	0.530	0.847	0.489	0.770	0.650
	0.405	0.365	0.578	0.335	0.518	0.455
	0.455	0.405	0.670	0.372	0.618	0.500
	0.420	0.375	0.622	0.349	0.565	0.460
Total	4.098	3.634	6.020	3.353	5.509	4.583
Total/6.020	0.6807	0.604	1	0.557	0.915	0.761
×2.691**	1.832	1.625	2.691	1.499	2.462	2.048

* Absorbance of pure lycopene 0.003mg/ml hexane.

** Absorbance of lycopene 0.0078mg/ml at 470nm wave length calculated from $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ =3450 in hexane.

The equation of calculation ;

$$E_y = \frac{X(\text{mg}) \times E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100}{F \times 1000}$$

E_y = value of O.D given at its wave length of maximal absorption when X mg of sample was dissolved in Y ml solvent.

F = magnification of dilution.

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = the extinction coefficient for lycopene.

X(mg) = content of lycopene.

ける吸光係数による吸光度， azobenzene， 結晶 lycopene の吸光度はそれぞれ， 2.7, 3.1, 2.0 とある程度の相異が認められた。

この場合480nmの波長において接近していた。

結晶から検量線を求める方法は， lycopene の場合は不安定のため純品が市販されていないので， その都度トマト果実から抽出する必要がある， その上純品であることを確認することは容易なことではない。したがって却ってその再現性が他の方法に比べて落ちる場合がある。

以上のことから基準色素に azobenzene を利用する方法も良いと思われるが， この場合はさらにその測定波長あるいは係数を検討する必要がある。

Table 4. Absorbance of β -carotene calculated from the extinction coefficient

	Wave length (nm)					
	400	430	450	466	478	500
Absorbance (O.D)	0.122	0.245	0.337	0.273	0.297	0.100
	0.118	0.335	0.460	0.370	0.405	0.130
	0.110	0.230	0.320	0.258	0.280	0.100
	0.250	0.515	0.712	0.580	0.630	0.210
	0.330	0.695	0.962	0.780	0.850	0.340
	0.095	0.180	0.237	0.190	0.205	0.066
Total	1.025	2.200	3.028	2.451	2.667	0.946
Total/3.028	0.3385	0.7266	1	0.8094	0.8808	0.3124
$\times 5.8868^{**}$	1.993	4.277	5.887	4.765	5.185	1.839

* Absorbance of pure β -carotene 0.004mg/ml hexane.

** Absorbance of β -carotene 0.0235 mg/ml at 450 nm wave length calculated from $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2505$ in hexane.

The equation of calculation ;

$$E_y = \frac{X(\text{mg}) \times E_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100}{F \times 1000}$$

The others are the same with those in Table 3.

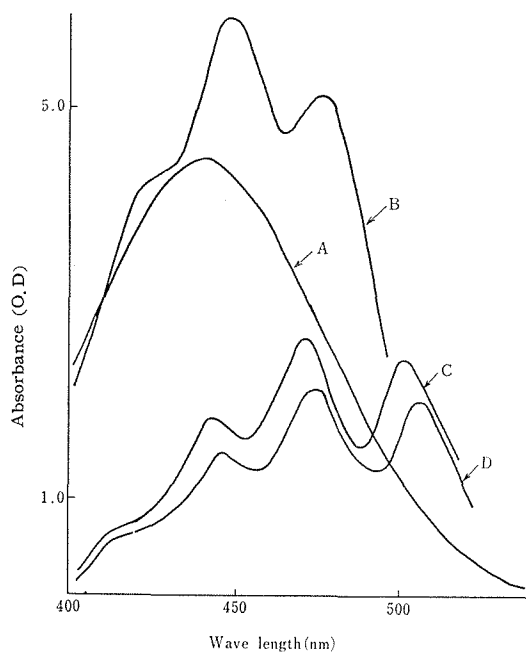


Fig. 2. Absorption spectra of tomato carotenoids in proportion to 145mg of azobenzene in 100ml of 96% EtOH
 A. Azobenzene 145mg in 96% EtOH 100ml. B. β -carotene 0.0235mg/ml hexane (calculated from the extinction coefficient). C. Lycopene 0.0078mg/ml hexane (calculated from the extinction coefficient). D. Isolated pure lycopene 0.0078mg ml in pet-benzine.

なお最良の方法は各色素の各溶液における吸光係数を確立しておいてこれを利用することであろう。

摘 要

トマト加工品では色調がもっともその品質を左右するので、この測定の簡便化・妥当化が必要である。色素の化学的定量法について、とくに lycopene の結晶は変化し易く、保存が利かないので市販品がなく、従来以下の方法が用いられて来た。

a. その都度トマト果実から各色素を抽出して結晶を作成し、これを基準物質として検量線を作成する方法。

b. 基準物質として安定な azobenzene を用いて検量線を作成する方法。

c. 各色素の各溶液における既知の吸光係数を利用する方法。

そこで本実験では、これら3方法の吸光スペクトルを比較し、トマト色素のもっとも簡便にして妥当な定量法の発見を試み、以下の結果を得た。

1. β -carotene については、従来利用されていた波長448nm 附近の3方法の吸光度にはある程度の相異が見られたが、430nm附近ではかなり接近していた。

2. Lycopene については、従来利用されていた波長470nm附近の吸光度では3方法の間にある程度の相異が見られたが480nm附近でかなり接近していた。

3. 以上により基準色素に azobenzene を利用する場合は、その測定波長或は係数を考慮する必要があるであろう。

4. 純品作成はその純品確認に困難性があり、簡便に定量するには azobenzene を基準色素として利用するのも良いが、最良の方法は各色素の各溶液における吸光係数を確立しておいて、これを利用する方法であろう。

文 献

- 1) A.G. HULME: The biochemistry of fruits and their products. (Academic press, London and New York) pp. 453~557 (1970).
- 2) 飯島隆志, 羽生田義夫, 重盛恭彦: 食品工学会要旨, 食品工誌, **15**, 16 (1969).
- 3) 木村 進: 昭和43秋季園芸学会シンポジウム要旨 104~105. (1968).
- 4) 飯島隆志: New food industry, **11** (3), 15~19 (1969). **11** (5), 1~7 (1969).
- 5) 木村 進: 農産技研誌, **3** (4), 200~202 (1956).
- 6) ———, 津端一子: 食品工学会要旨, 食品工誌 **16**, 16 (1969).
- 7) ———, 石谷孝佑, 梅田圭司, 津端一子, 高井順子: 食品工誌 **19** (7), 299~303 (1972).
- 8) ZECHMEISTER and CHLONOKY: Principles and practice of chromatography. (Chapman and Hall Ltd., London) pp. 116~117 (1950).
- 9) 高橋敏秋, 中山昌明: 園学雑 **27** (2), 116~119 (1958).
- 10) M. OKUBO, K. ISHII and K. UMEDA: Jap. Soc. Hort. Sci., **40** (1), 68~73 (1971).
- 11) A.J. MAYNARD: Methods in food analysis. (Academic Press, London and New York) pp. 188~192 (1970).
- 12) 京大農化: 新改版農芸化学実験書増補2巻(産園) pp. 778~780 (1972).
- 13) 京大食品工学: 食品工学実験書上(養賢堂) pp. 498~504 (1970).

Processing Adaptability of Determinate Type Tomato Varieties (4) On the Methods of Carotenoid Determination in Tomato Fruits

By Takashi IJIMA and Hideaki MARUYAMA

Laboratory of Food Chemistry, Fac. Agric., Shinshu Univ.

Summary

Color is the most important factor in tomato products. Therefore, some convenient methods of carotenoid determination in tomato fruits or products are necessary to be presented. Three methods for carotenoid determination have generally been used such as below. a. The method by using pure carotenoids separated from tomato fruits at each experiment for standard pigments. b. The method by using azobenzene for standard pigments. c. The method by using the absorbance calculated from the extinction coefficient previously reported. In the present study, the absorption spectra of carotenoid pigments obtained by above methods were compared with one another and tried to find more convenient method for determination of carotenoids.

The results obtained were shown as follows.

1. We found a pretty discrepancy among the absorbances of β -carotene at the wave length of 448nm by these three methods. On the contrary, we found a considerable contiguity among those at 430nm.

2. We found also a pretty discrepancy among the absorbances of lycopene at 470nm, however, we found a considerable contiguity among those at 480nm.

3. From these results, when azobenzene is used as standard pigment to make the calibration curve, the wave length for measurement or the coefficient for calculation requires further examination.

4. The confirmation of pure carotenoid pigments separated from tomato fruits has been thought to be difficult. The method by utilization of azobenzene as a standard pigment, therefore, is surely a good one, but we dare say that the best method is to make use of the extinction coefficients established.