

キーウィフルーツに含まれる糖の分析

大槻 耕三・河端 信・田口 邦子

Analysis of Sugar in Kiwifruit

KOZO OHTSUKI, MAKOTO KAWABATA and KUNIKO TAGUCHI

Analyses of free, reducing sugars in kiwifruit were carried out by anion-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) and gel-permeation HPLC. 2-Cyano acetamide was used as a post-column labeling reagent for a sensitive detection of sugars.

Successful separation of sugars and unknown reducing sugars was achieved by the anion-exchange (Diaion CA08S)-boric acid chromatographic method. The gel-permeation HPLC (Shodex S-801) was also useful for the analyses of complex, sugar mixture such as kiwifruit juice.

(Received July 31, 1984)

I. 緒 言

キーウィフルーツ (chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*) は中国原産の果物であるが、近年までニュージーランドで主に品種改良や多量栽培されてきたものである。最近、米国カリフォルニア州、フランス国、日本に於ても大規模に栽培されるようになってきた。特に日本に於ては、キーウィフルーツの単価が現在のところ高価であるため、ミカンの代替品として有望視されている。

キーウィフルーツに含まれる成分や、熟成中の成分変化についてなどの報告が最近なされてきている。前者には、チオール系プロテアーゼのアクチニジンに関するもの^{1) 2)}、グルタチオンやシステインに関するもの³⁾、糖や有機酸に関するもの⁴⁾、などがあり、後者には糖、デンプン、有機酸、遊離アミノ酸に関するもの^{5) 6)}、ペクチンなどに関するもの⁷⁾などがある。我々は前報⁸⁾に於て、キーウィフルーツ中の無機成分の定性、定量、遊離アミノ酸および総アミノ酸の定量を行ったが、本研究に於ては遊離状の糖を分析するために、種々の分析方法を比較検討したのでここに報告す

る。遊離状の糖を分析するには、以前はペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーが行われてきたが、これらの方法は、簡便ではあるが、定量性に問題があり、また微量成分などや未知物質の検出には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に比較し有利とは言えない。本報告では HPLC を用いてキーウィフルーツ中の糖を分析したが、分離カラムとしてアニオン交換樹脂 (Diaion CK08S, 溶離液としてホウ酸バッファーを用いる。) またはカチオン交換樹脂 (Shodex S-801, 溶離液として蒸留水を用いる。) を使用した。もう一種類のカラムとして Lichrosorb-NH₂ などのポーラスシリカ-NH₂ (溶離液として 70~85%アセトニトリル水溶液を用いる。) を使う方法もあるが今回は使用しなかった。これらの分離方法を 2~3 種併用して同一試料を分析すると、糖の溶出パターンがそれぞれの方法で異なるから、糖の同定をより確実にこなえる利点がある。また糖の検出方法についてであるが、ペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーでは種々の発色法が用いられているが、HPLC では、これらの方法がほとんど利用できず、高感度の屈折計を用いる方法か、糖の還元性を利用して発色さ

せる方法⁹⁾や蛍光を出させる方法^{10) 11)}である。今回の報告では昔から糖の定量に利用されている3・5-ジニトロサリチル酸法¹²⁾と2-cyano acetamide¹¹⁾を用いて還元糖を定量する方法を使用した。

II. 実験材料および方法

(1) 実験材料

今回の実験で使用したキーウィフルーツはニュージーランドから輸入されたヘイワード種と、和歌山県の有田で栽培されたヘイワード種である。ニュージーランド産のものは完熟した状態で、有田産のものは未熟の状態です。いずれも1983年11月に購入した。また有田産の一

部のものは室温に1ヶ月保存し追熟させた。

(2) 試料の調製法

キーウィフルーツの皮をむきジューサー（日立製作所製 VA-656G 型）によって可食部をジュースにする。このジュースをトミー社製 RB-181 型遠心分離機で $9,000 \times g$ 、30分間遠心分離し、上澄液を得る。この液をさらにメンブランフィルター（東洋沔紙社製、TM-2P, $0.45 \mu m$ のポアサイズ）で沔過し、沔液を分析に用いるが、分析直前まで冷凍庫に保存する。

(3) 分析装置

主に日本分光社製トライローター型高速液体クロマ

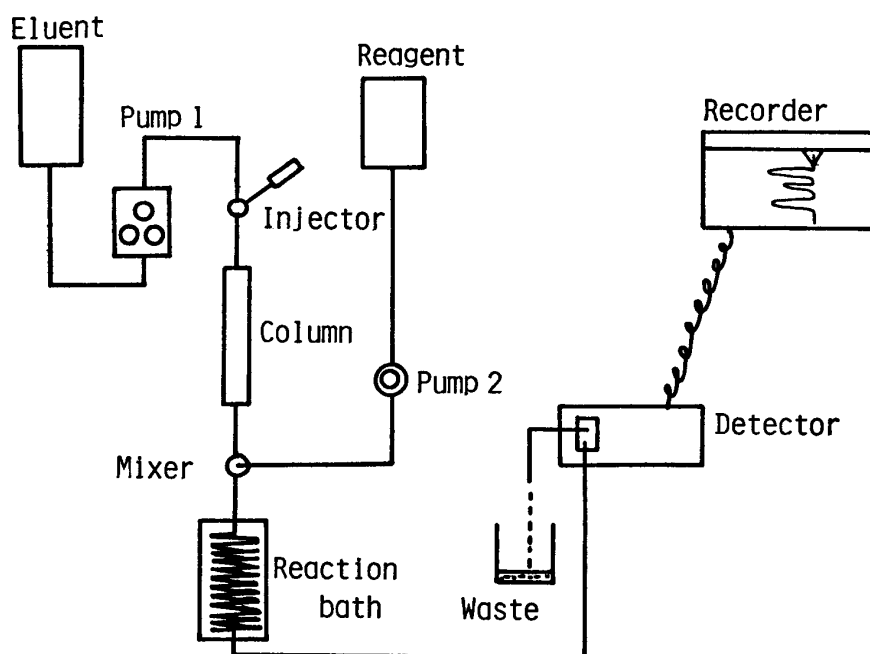


Fig. 1. Flow Diagram of HPLC for Sugar Analyses.

Pump 1, JASCO Tri Rotar at a flow rate of 0.8 ml/min. Column, Diaion CA08S (Mitsubishi Chem. Ind. LTD, $4.6 \text{ mm}\phi \times 25 \text{ cm}$, at 55°C) or Shodex S-801 (Showa Denko LTD, $8 \text{ mm}\phi \times 50 \text{ cm}$, at room temperature); eluent, 0.5 M borate, pH 8.7, for Diaion CK08S or distilled water for Shodex S-801. Mixer, Kyowa Seimitsu Co. T-joint. Reagent, 1% 2-cyano acetamide in 0.3 M borate, pH 10.

Pump 2, Atto Perista mini-pump with $1 \text{ mm}\phi$ i.d. silicon tube. Reaction bath, $0.5 \text{ mm}\phi$ i.d. $\times 10 \text{ m}$ Teflon tube in boiling water. Detector, JASCO UVIDEC-100-II at 280 nm. Recorder, Ohkura desktop recorder DR-1S.

トグラフで Fig. 1 のように組み立てた。分離カラムがダイアイオン CA08S ($11 \mu m$ の粒子, $4.6 \text{ mm}\phi \times 25 \text{ cm}$, 55°C) の時は溶離液は 0.5M ホウ酸バッファー, pH 8.7 を使用し, Shodex S-801 ($8 \text{ mm}\phi \times 50 \text{ cm}$, 室温) の時は溶離液は蒸留水を使用した。発色用の試薬は 1% ジニトロサリチル酸¹²⁾又は 1% 2-cyanoacetamide¹¹⁾を用いた。その他の条件は Fig. 1 に示す。反応槽は 100°C の沸とう水と $0.5 \text{ mm}\phi \times 10 \text{ m}$ のテフロン

チューブである。2-cyanoacetamide の場合は 383 nm の蛍光を検出するのであるが、今回は 280 nm の吸収でもって検出した。検出器は日本分光社製 UVIDEC-100-II で行ない大倉社製デスクトップ記録計 DR-1S に記録させた。試薬送液用のポンプはアトー社製ペリスタミニポンプを用い、シリコンチューブ（内径 $1 \text{ mm}\phi$ ）を使用した。溶離液と試薬とが混合される部位には協和精密社製のステンレスT型ジョイントを用いた。

III. 結果および考察

(1) 発色試薬について

以前は比較的時間のかかる糖分析液体クロマトグラフィーにはアニリン酢酸ーリン酸試薬¹³⁾が使用されていたが、これらの試薬は最近の高速型の分析には適当でない。もちろん濃硫酸を使用する古典的な発色法も、非還元糖を検出できるという利点はあるが、やはり適当でない。近年になって、還元糖を高感度に検出する方法が開発されてきた^{10) 11)}。

本報告では先に発色試薬としてジニトロサリチル酸¹²⁾を用いる方法を Fig. 1 の装置で検討してみた。この試薬は Shodex S-801 のカラムと溶離に蒸留水を用いた系では還元糖の発色反応は起るが、検出感度が後に述べる 2-シアノアセトアミド法に比べ 100分の 1 から 500分の 1 ぐらいで大へん悪い。さらにホウ酸バッファーとアニオン交換樹脂 Diaion CA08S を用いる糖分析系では糖の発色反応が全く起らず、糖の検出試薬として不適当であることが明らかとなった。そこで本研究では以後、発色試薬として 1% 2-シアノアセトアミド-0.3M ホウ酸バッファー、pH 10 を使用した。

(2) 試薬反応の条件

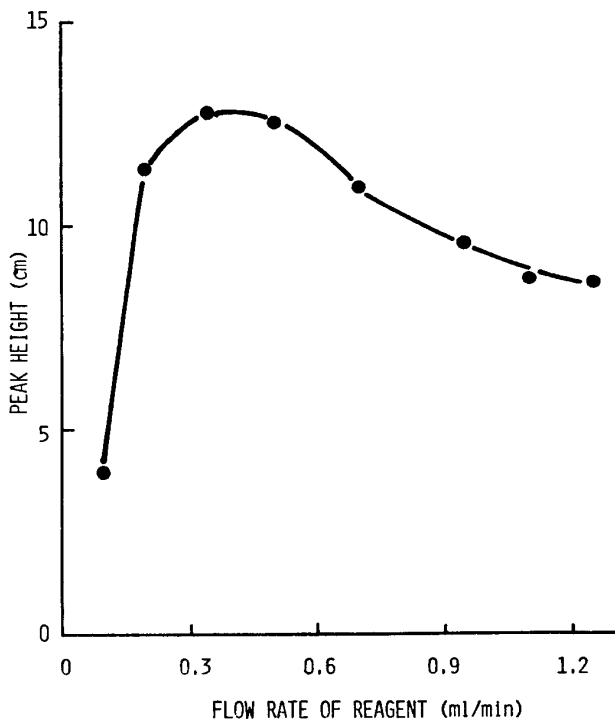


Fig. 2. Relation between Peak Height and Flow Rate of Reagent. Column, Shodex S-801. Sample, 10 μg of lactose. Eluent, distilled water. Reagent, 1% α-cyano acetamide in 0.3 M borate, pH 10.

最適の検出感度を得るためには、2-シアノアセトアミドとカラム溶出液との混合比を色々とかえて見た。カラム溶出液の流速は Shodex S-801 の場合も Diaion CA08S の場合も 0.8 ml/min と固定して使用しているため、試薬の流速をかえ、ラクトースを一定量カラムにサンプリングして、このピークの高さを測定したのが Fig. 2 である。この結果から 0.3~0.5 ml/min ぐらいの流速で検出感度が最大となりしかも台形をなしているから少しの流速変化でもピーク高が変動を受け難いことを示している。この結果から、以後の実験は、試薬流速を 0.4 ml/min と固定した。

(2) 分離用カラムの選択について

糖はお互いに化学構造が酷似しているため、これらを別々に分離することは非常に困難である。しかし、立体的な異性体はホウ酸イオンとの複合体を形成させることにより、アニオン交換樹脂で分離可能となる。この方法によって分離したのが Fig. 3 である。糖の分子量の大きさや液体中での性質の差で分離したのが、Shodex S-801 を用いるゲルパーミエーションクロマトグラフ法で、Fig. 4 にその分離結果を示す。Fig. 3 と Fig. 4 を比べると、Fig. 3 の方がはるかに多くの糖を分離することができることがわかる。ここには示していないが、Fig. 4 ではかさなり合う糖が多い。しかし Fig. 4 の分離法はだいたいにおいて、分子量の大きい糖から溶出されてくることが知られているので、Fig. 3 の結果と併用して結果の解析を行なうと、利用価値はでてくる。実際キーウィジュースの試料を多量にサンプリングすると、Fig. 4 の結果からは比較的少量の糖は検出しにくいですが、Fig. 3 のクロマトグラムから色々の種類の糖が確認でき、分離能力が高いことがわかる。

(4) キーウィフルーツ中の遊離糖の定性・定量

前述の(3)の結果から、キーウィフルーツジュース中の各種の糖の分析をホウ酸アニオン交換樹脂 (Diaion CK08S) 系によって行って見た。その結果は Fig. 3 (b), (c) および Table 1 に示す。キーウィフルーツ中の糖としては蔗糖、グルコース、フラクトースがよく知られているものであるが⁴⁾、Fig. 3 からはさらにガラクトース、微量のキシロースが、ニュージーランド産のキーウィフルーツにはさらに保持時間 5.5 分の所に未知の糖が見られる。Fig. 4 の (b), (c) から、保持時間 10.5~11 分に出ている未知ピークはマルトース (保持時間 13 分) ではなく、しかし、このカラムでは大体に於て 2 糖類が溶出される位置である。またこの 2-シ

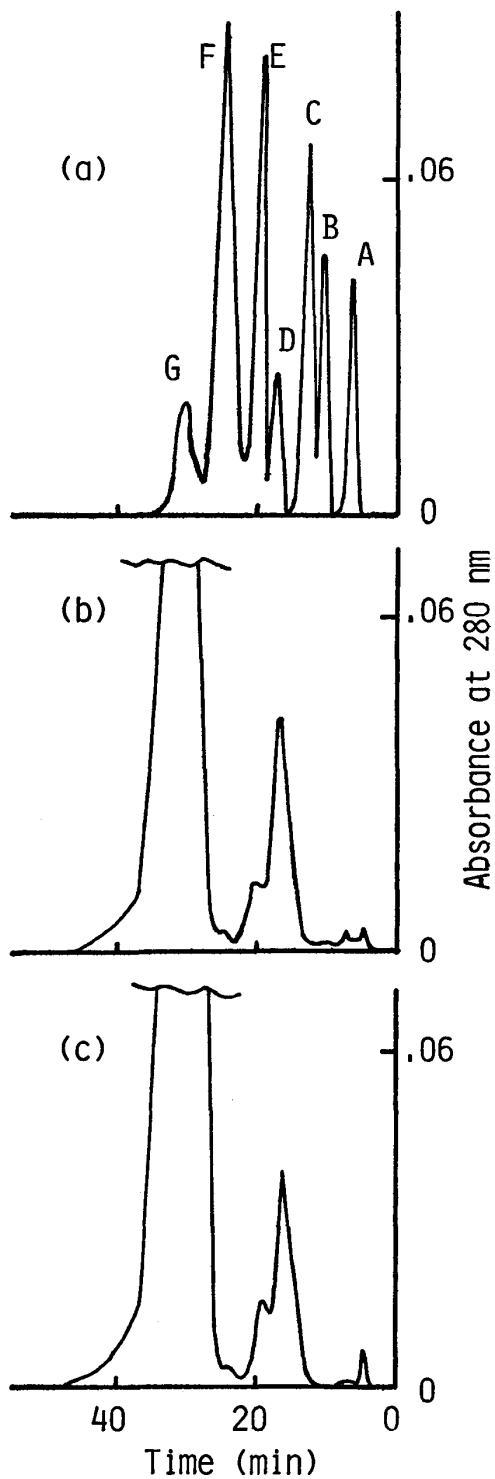


Fig. 3. Chromatograms of Standard Sugars and Kiwifruit Juice. Separated by the ion-exchange column (Diaion CK08S).

(a) Standard sugar; A, maltose; B, ribose; C, mannose; D, fructose; E, galactose; F, xylose; G, glucose; 10 μg of each sugar was applied except fructose (200 μg).

(b) Kiwifruit from Arita, 10 μl of the juice was applied on the column.

(c) Kiwifruit from New Zealand, 10 μl of the juice was applied.

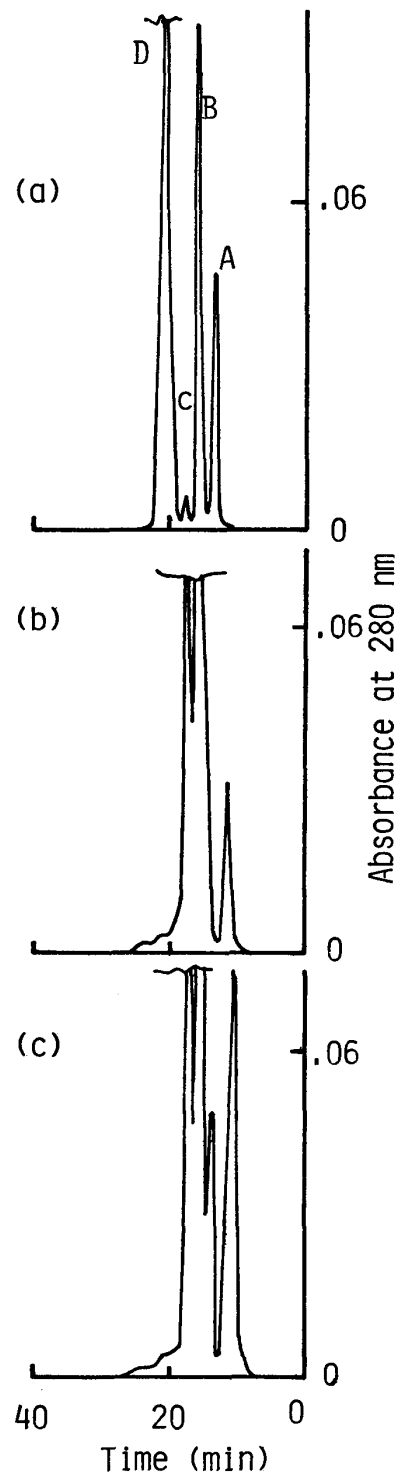


Fig. 4. Chromatograms of Standard Sugars and Kiwifruit Juice. Separated by the gel-permeation column (Shodex S-801).

(a) Standard sugar; A, maltose; B, glucose; C, fructose; D, ribose; 10 μg of each sugar was applied except ribose (50 μg).

(b) Kiwifruit from Arita, 10 μl of the juice was applied on the column.

(c) Kiwifruit from New Zealand, 10 μl of the juice was applied.

Table 1. Reducing Sugars in Kiwifruit

Sugar*	Glucose	Fructose	Galactose	Reducing Disaccharide**
Kiwifruit Hayward				
from Arita				
Immature	4.37%	4.55%	0.01%	0.66%
ripened for 1 mon. at room temperature.	4.83	5.57	0.01	2.10
from New Zealand				
ripened for 6 mon.	3.59	4.79	0.02	0.08

Analyzed by the ion-exchange chromatographic method described in Fig. 1 and Fig. 3.

* Free, reducing sugar in the edible fraction of kiwifruit.

** Analyzed by the gel-permeation chromatographic method described in Fig. 4.

アノアセトアミドは蔗糖を検出できないことから、上記未知ピークは蔗糖ではなく、還元性の2糖類であることがわかった。Table 1の右はしのカラムにはこの未知ピークの糖を定量したものである。溶出位置は一致しないが、標準としてマルトースを用いた。

Table 1のグルコース、フラクトース、ガラクトースの値は、Fig. 3の結果から計算したものである。

有田産のキーウィフルーツは追熟させることによりグルコースが増加していることがわかる。有田産のものとニュージーランド産のものは、同じヘイワード種であったためか、これら単糖の含有量は大体同じ位の値であった。

IV. 要 約

キーウィフルーツ中の還元性遊離糖の分析を高速液体クロマトグラフィーによって行った。2-シアノアセトアミドを用いる発色試薬で各種の還元糖は感度よく検出できた。分離カラムとしては、ホウ酸-アニオン交換樹脂を用いる系が多種の糖を分離できるのですぐれている。しかしゲルパーミエーション系のカラムも分子量的に分離できるので補助的に役立つものである。

本研究の一部は文部省、昭和58年度科学研究費補助金一般研究(c)によるものである。

本研究を進めるにあたり、生駒淑子氏、田岡栄里子氏、中畑登貴子氏の御協力を得たことを感謝致します。

(1984年7月31日受理)

参 考 文 献

- 1) M.A. McDowall, *Eur. J. Biochem.*, **14**, 214 (1970)
- 2) A. Carne, C.H. Moore, *Biochem. J.*, **173**, 73 (1978)
- 3) R. Saetre, D.L. Rabentein, *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 982 (1978)
- 4) D.A. Heatherbell, *J. Sci. Food. Agric.*, **26**, 815 (1975)
- 5) 福家洋子, 松岡博厚, *日本食品工業学会誌*, **29**, 642 (1982)
- 6) S. Matsumoto, T. Obara, B.S. Luh, *J. Food Sci.*, **48**, 607 (1983)
- 7) 福家洋子, 松岡博厚, *日本食品工業学会誌*, **31**, 31 (1984)
- 8) 大槻耕三, 河端 信, 田口邦子, *京府大学術報告, 理学・生活科学*, 第33号P.47 (1982)
- 9) K. Mopper, E.M. Gindler, *Anal. Biochem.*, **56**, 440 (1973)
- 10) T. Kato, T. Kinoshita, *Anal. Biochem.*, **106**, 238 (1980)
- 11) S. Honda, M. Takahashi, K. Takehi, S. Ganno, *Anal. Biochem.*, **113**, 130 (1980)
- 12) G.L. Miller, *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
- 13) E.F. Walborg, Jr., L.E. Kondo, *Anal. Biochem.*, **37**, 320 (1970)