

2 青汁製品中のビタミン K の含有量

青汁製品中のビタミンKの分析

(平成17年9月21日受理)

坂牧成恵*1,† 中里光男*2 松本ひろ子*1 萩野賀世*1
安田和男*2 永山敏廣*1

Determination of Vitamin K in Aojiru (Green Juice) Products by HPLC

Narue SAKAMAKI*1,†, Mitsuo NAKAZATO*2, Hiroko MATSUMOTO*1,
Kayo HAGINO*1, Kazuo YASUDA*2 and Toshihiro NAGAYAMA*1

(*1 Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023, Japan; *2 Tokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan; † Corresponding author)

A survey of vitamin K contents was carried out on 41 aojiru products and 10 vegetable juice products that were purchased from local markets. Aojiru is a health food made from green vegetables such as kale, ashitaba, mulberry leaf, barley grass and the like. The products are usually provided in various forms, such as frozen, powder and tablet.

Vitamin K in samples was extracted with *n*-hexane, and separated on a C18 column with methanol-ethanol (95:5). After separation, vitamin K was converted to the hydroquinone form on a reduction column and determined with a fluorescence detector at λ_{ex} 240 nm and λ_{em} 430 nm.

The contents of vitamin K₁ (phylloquinone) in frozen samples ($n=8$), powder samples ($n=26$) and tablet samples ($n=7$) were 90-190, 410-3,300, and 640-3,100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respectively, and that in vegetable juice ($n=10$) was 1-12 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. Vitamin K₂ (menaquinone) was not detected. The daily intake of vitamin K from aojiru products was estimated to be 99-380, 20-250 and 27-210 $\mu\text{g}/\text{day}$ for frozen, powder and tablet types, respectively. These results suggest that patients prescribed warfarin should take care about their intake of vitamin K from aojiru products.

(Received September 21, 2005)

Key words: 青汁 aojiru; ビタミンK vitamin K; フィロキノロン phylloquinone; ケール kale; 大麦若葉 barley grass; モロヘイヤ tossa jute; 明日葉 ashitaba; 桑葉 mulberry leaf; ワーファリン warfarin; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

はじめに

近年、食と健康に対する関心が非常に高まっており、最近ではサプリメントやハーブなどの機能性を持った健康食品に注目が集まっている^{1)~3)}。なかでも青汁製品は、ビタミンやミネラルなどの各種栄養素を補う健康食品として人気が高く、スーパーマーケットやドラッグストア、通信販売などで容易に入手できることから、多くの人に利用されている。青汁製品の原料はケール、大麦若葉、モロヘイヤおよび桑葉など緑色の濃い植物であり、これらには特にビタミンKが多く含まれていることが知られている。ビタミンKは、血液中のプロトロンビンなどの血液凝固因子の産生にかかわるビタミンであり、緑黄色野菜など植物にK₁が、納豆など発酵食品にK₂が存在する。ビタミンK

には、抗血液凝固薬のワーファリンとの拮抗作用が認められており、薬剤の添付文書⁴⁾中にも薬剤投与時にはビタミンK高含有食品の摂取を控えるよう注意喚起がなされている。しかし、健康食品として加工されたさまざまな形態の青汁製品中のビタミンKについては、その含有実態は明らかになっておらず、製品の包装にもビタミンK含有量は表記されていないことがほとんどである。そこで、市販されている粉末・粒状および冷凍の青汁製品について、ビタミンKの分析を行い、含有実態を調査し、その結果から実際の一日当たり摂取量の推定を行った。また、野菜ジュースについても分析を行ったので、併せて報告する。

実験方法

1. 試料

平成16年4~10月に東京都内のドラッグストア、スー

⁴⁾ http://www2.cisai.co.jp/di2/doc/pdf/WF_T_Pl.pdf

† 連絡先

*1 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科: 〒190-0023 東京都立川市柴崎町3-16-25

*2 東京都健康安全研究センター: 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

Table 1. Raw Materials of Aojiru Products

Sample	No. of samples	Materials
Frozen type	8	Kaie
Powder type	26	Kaie, Ashitaba, Mulberry leaf, Barley grass, <i>Maccha</i> (powdered green tea), Seaweeds
Tablet type	7	Kale, Barley grass, Tossa jute, Seaweeds
Vegetable juice	10	Tomato, Spinach, Carrot, Kale, Celery, Tossa jute, Broccoli and others

パーマーケット,あるいは通信販売により入手した市販の青汁製品41検体および野菜ジュース10検体を試料として用いた。各製品の主な原材料をTable 1に示した。また、生のケール、明日葉、モロヘイヤおよび桑葉についても試料とした。

2. 試薬

ビタミンK₁およびビタミンK₂標準原液: フィロキノ (ビタミンK₁) 標準品 (和光純薬(株)製, HPLC用)、メナキノ-4 (ビタミンK₂) 標準品 (和光純薬(株)製, HPLC用) それぞれ10 mgを精密に量り、エタノールに溶解して全量を各100 mLとした。この標準原液1 mLはビタミンK₁およびビタミンK₂を各100 μg含む。

その他の試薬はHPLC用を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ: Agilent Technologies 社製 1100 series, 送液ポンプ, デガッサー, 恒温槽, オートサンプラー, フォトダイオードアレイ検出器, 蛍光検出器およびデータ処理装置から構成するシステムを用いた。

4. HPLC測定条件

分離カラム: CAPCELL PAK C₁₈ UG120 (5 μm, 4.6 mm i.d.×150 mm, 資生堂(株)製); 還元カラム: RC-10 (4.0 mm i.d.×15 mm, 資生堂(株)製); 移動相: メタノール-エタノール(95:5); 流速: 1.0 mL/min; カラム温度: 40°C; 検出波長: Ex: 240 nm, Em: 430 nm; 注入量: 20 μL

5. 試験溶液の調製

1) 粒状青汁製品および粉末青汁製品からの抽出: 五訂日本食品標準成分表分析マニュアル⁴⁾(以下、分析マニュアルと略す)の「ビタミンK—緑茶紅茶」の項に改良を加えて行った。すなわち、粒状製品は乳鉢で粉碎した後、粉末製品はそのまま、その0.5 gを褐色遠沈管にひょう量し、*n*-ヘキサン20 mLを用いて10分間の超音波抽出を行い、1,660×g (3,000 rpm)にて10分間遠心分離を行った。残さにはさらに*n*-ヘキサン20 mLを加えて抽出操作を行い、*n*-ヘキサン層を合わせ、50 mLにメスアップしたものを抽出液とした。次いで正確にこの2 mLを褐色遠沈管に採り、エバポレーターで溶媒を減圧留去した後、残留物にエタノール2 mLを加えて溶解し、0.45 μm フィルターでろ過したものをHPLC試験溶液とした。

2) 冷凍青汁製品および野菜ジュースからの抽出: 分析マニュアルの「ビタミンK—野菜ジュース」の項に改良を加えて行った。すなわち、冷凍製品は解凍後よく混和し、野菜ジュースは混和した後、その10 gを褐色遠沈管に量り取り、エタノール20 mLを加え10分間超音波処理後、褐色分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン60 mLを加え10分間振とう抽出を行った。*n*-ヘキサン層全量を褐色ナスフラスコに移し、エバポレーターで*n*-ヘキサンを減圧留去し、以下同様にHPLC試験溶液を調製した。

3) 原料植物からの抽出: ケール、モロヘイヤ、明日葉および桑葉からの抽出は、分析マニュアルの「ビタミンK—野菜」の項に従った。すなわち、75% 2-プロパノールでホモジナイズ後、*n*-ヘキサンを用いて抽出し、以下同様にHPLC試験溶液の調製を行った。

なお、抽出操作は褐色のガラス器具を用い、遮光条件下で行った。

6. 検量線

ビタミンK₁およびビタミンK₂標準原液をエタノールで希釈し、50, 100, 250, 500, 750, 1,000 ng/mLの混合標準溶液を調製し、その20 μLをHPLC装置に付し、ピーク面積法により検量線を作成した。

結果および考察

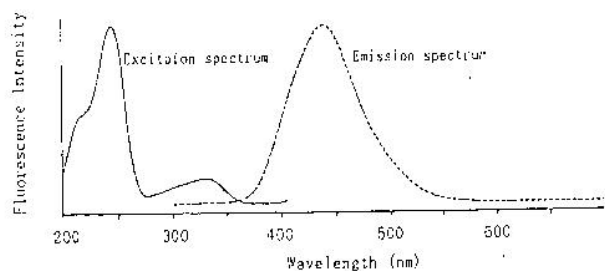
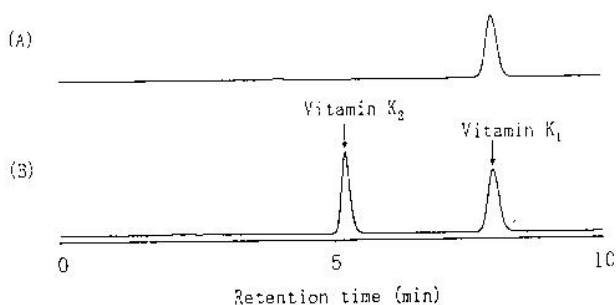
1. 抽出法の検討

粉末製品および液状製品は、分析マニュアルに従ってエタノール-*n*-ヘキサンを抽出溶媒として用いた。分析マニュアルでは抽出の際ホモジナイズ処理を行っているが、この抽出操作を簡略化するために、抽出法の検討を行った。試料には粉末製品を用いて、ホモジナイズ抽出、振とう抽出および超音波処理による抽出について比較を行った。その結果、いずれもほぼ同等の結果が得られたことから、操作がより簡便な超音波処理による方法を抽出法として採用した。

また、クリーンアップについては、分析マニュアルではSep-Pak SilicaあるいはシリカゲルTLCを用いているが、HPLCクロマトグラム上のビタミンKのピーク付近に妨害ピークが見られないこと、クリーンアップ前後でのピーク形状に差が見られないことから、カートリッジカラムあるいはTLCによる精製操作を省略した。

2. HPLC条件の検討

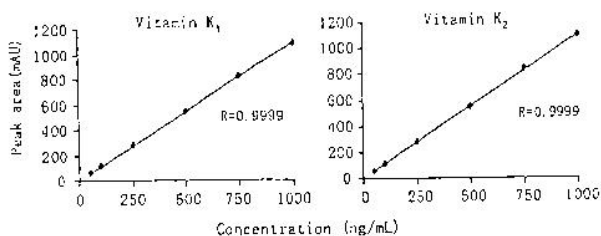
ビタミンKのHPLC分析には、ODSカラムで分離したビタミンKを還元カラムである白金黒カラムに通して接触還元し、ハイドロキノ型として蛍光検出するという方法が一般的である。Fig. 1にビタミンK₁標準品の励起および蛍光スペクトルを示した。ビタミンK₁の極大励起波長は240 nm付近にあるが、食品衛生検査指針⁵⁾および分析マニュアル⁴⁾では、励起波長に320 nmが用いられている。この理由としてキセノンランプはその特性上低波長域のエネルギー値が低く、十分な感度が得られないため、長波長領域に励起波長が設定されたと推察される。一方、

Fig. 1. Fluorescence spectra of vitamin K₁Fig. 2. HPLC chromatograms of vitamin K₁ and K₂

Operating conditions: CAPCELL PAK C₁₈ UG:20 (4.6 mm i.d.×150 mm) column, RC-10 (4.0 mm i.d.×15 mm) column, mobile phase methanol-ethanol (95:5), column temperature 40°C, flow rate 1.0 mL/min, detection wavelength excitation 240 nm emission 430 nm, injection volume 20 μ L

(A) Sample solution (Aojiru)

(B) 250 ng/mL standard solution

Fig. 3. Calibration curves of vitamin K₁ and K₂

Indykら⁶⁾は励起波長 243 nm, 蛍光波長 430 nm の条件で, Tikkanenら⁷⁾は励起波長 238 nm, 蛍光波長 425 nm で, それぞれビタミンKを測定している。そこで今回は改めて励起条件について検討した。Fig. 1 の励起および蛍光スペクトルから, 励起波長を 240 nm とし, 蛍光波長を 430 nm とし HPLC 分析を行った。その結果, 励起波長を 320 nm に設定した場合より約 7 倍, 感度が向上することが判明し, それに伴って注入量も分析マニュアル記載の 50 μ L を 20 μ L に減らすことが可能となった。Fig. 2 に HPLC クロマトグラムを示した。検量線は Fig. 3 に示したように 50~1,000 ng/mL の範囲で良好な直線性を示した ($r=0.9999$)。

3. 添加回収試験

市販の液状青汁および野菜ジュースにビタミンK₁およびビタミンK₂それぞれ 100 μ g/100 g に相当する量を添加し, 本法に従って添加回収試験を行った。回収率 ($n=5$)

は青汁ではビタミンK₁ 98.5 \pm 1.31%, ビタミンK₂ 95.6 \pm 1.20% であり, 野菜ジュースではビタミンK₁ 98.4 \pm 1.74%, ビタミンK₂ 97.5 \pm 1.87% であった。また, 粉末青汁に 2,000 μ g/100 g に相当する量のビタミンK₁およびビタミンK₂をそれぞれ添加し, 本法に従って添加回収試験を行ったところ, 回収率 ($n=5$) はビタミンK₁ 100 \pm 0.89%, ビタミンK₂ 96.5 \pm 0.95% であり, いずれも良好な結果が得られた。

4. 市販製品中のビタミンK含有量および一日摂取量調査

市販青汁 41 製品についてビタミンKの分析を行ったところ, すべての製品からビタミンK₁を検出した。しかし, 微生物の代謝生成物で納豆, チーズなどに多く含まれるビタミンK₂は, 全く検出されなかった。青汁製品のビタミンK₁含有量を Table 2 に, 製品に記載されている一日当たりの喫食量をもとに算出した一日当たりの摂取量を Table 3 に示した。

冷凍青汁 (解凍後は液状) 8 製品はケールのみを原料としており, これらを分析したところ, 90~190 μ g/100 g, 平均 140 μ g/100 g のビタミンK₁を検出し, 製品からの一日当たりのビタミンK摂取量は 99~380 μ g, 平均 220 μ g と算出された。粉末 26 製品は, 原料にケール, 大麦若葉, 明日葉, 桑葉, 抹茶などのさまざまなバリエーションがあり, 製品中のビタミンK₁含有量は 410~3,300 μ g/100 g (平均 2,100 μ g/100 g) であり, 製品により数値に 8 倍の開きが見られた。一日当たりの摂取量は 20~250 μ g (平均 120 μ g) と推定された。また, 粒状 7 製品は, ケール, 大麦若葉, モロヘイヤ, 海藻などを原料とした製品であり, 640~3,100 μ g/100 g (同 1,500 μ g/100 g) のビタミンK₁を含有し, 一日当たりの摂取量は 27~210 μ g (同 150 μ g) と推定された。粉末, 粒状製品いずれもビタミンK₁含有量が冷凍製品に比べ平均値で 10~15 倍ほど高い値を示したが, これは水分含量の違いによるものと考えられた。

Table 2. Contents of Vitamin K₁ in Aojiru Products

Sample	Content of vitamin K ₁ (μ g/100 g)	
	Range	Mean \pm S.D.
Frozen type	90-190	140 \pm 41
Powder type	410-3,300	2,100 \pm 870
Tablet type	640-3,100	1,500 \pm 760
Vegetable juice	1-12	4 \pm 3

Table 3. Daily Intakes of Vitamin K₁ in Aojiru Products

Sample	Vitamin K ₁ (μ g/day)	
	Range	Mean \pm S.D.
Frozen type	99-380	220 \pm 91
Powder type	20-250	120 \pm 71
Tablet type	27-210	150 \pm 59
Vegetable juice	2-24	9 \pm 7

これらを原料別に見ると、モロヘイヤ、桑葉および明日葉を主原料とした製品でビタミンK₁含量が高値を示す傾向が見られた。比較のため、生のケール、桑葉、モロヘイヤおよび明日葉のビタミンKを分析した。その結果、ケール 480 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (五訂日本食品標準成分表⁹⁾では 210 $\mu\text{g}/100\text{g}$)、桑葉 1,300 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (成分表には未収載)、モロヘイヤ 540 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (同 640 $\mu\text{g}/100\text{g}$)、明日葉 480 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (同 500 $\mu\text{g}/100\text{g}$) であった。原料のビタミンK含有量が、加工された青汁製品のビタミンKの含有量に反映しているものと考えられた。

一日当たりの摂取量で比較すると、粉末および粒状製品は一日の喫食目安量が少量 (2~12 g) であるため、冷凍製品 (一日当たり 90~180 g) より低い値となった。また比較のため、緑色を呈する野菜ジュースおよびトマトや人参などが主な原料となっている野菜ジュース 10 製品について分析を行ったところ、1~12 $\mu\text{g}/100\text{g}$ のビタミンK₁を検出した。野菜ジュース 1パックあるいは1回当たりの摂取量は 200~250 mL であり、その量からビタミンK摂取量を算出すると、2~24 μg 程度となり、寄与率としては低値であった。

平成 14 年度の国民栄養調査⁹⁾では、一般の成人では食事から一日当たり約 270 μg のビタミンKを摂取するという結果が報告されている。今回調査した青汁製品を喫食した場合、そのほぼ半数の製品において、上述した一日摂取量と同程度のビタミンKが摂取されるということが、本調査結果より推定された。

齋木ら¹⁰⁾はワーファリン服用患者におけるビタミンK含有製剤の投与指針として、ビタミンK摂取量が 250 $\mu\text{g}/\text{day}$ を超える場合にはその投与を避けるべきであるとしており、澤田ら¹¹⁾は一日 25 μg 程度の少量のビタミンK₁摂取によっても影響が現れるとしている。ワーファリン服用者の場合、納豆や緑黄色野菜などの食事からのビタミンK摂取を避けるよう注意を払っていても、青汁製品の喫食がワーファリンの投薬効果に影響を与える可能性が明らかとなった。

まとめ

市販青汁 41 製品について、ビタミンKの分析を行い、製品中の含有量と一日摂取量を調査した。青汁製品は *n*-ヘキサンを用いて抽出を行い、HPLC 試験溶液とした。ビタミンKは ODS カラムで分離した後、白金黒カラムで還元して得られる蛍光 (励起波長 240 nm, 蛍光波長 430 nm) により測定した。その結果、すべての製品からビタミンK₁を検出し、K₂は全く検出されなかった。青汁製品中のビタミンK含有量は、冷凍製品は 90~190 $\mu\text{g}/$

100 g, 粉末製品は 410~3,300 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 粒状製品は 640~3,100 $\mu\text{g}/100\text{g}$ であり、各種青汁製品を喫食した場合、一日当たり 20~380 μg のビタミンKが喫食されるものと推定された。以上の結果よりワーファリン服用者の場合、青汁製品の喫食が投薬効果に影響を与える可能性があることが明らかとなった。

なお、本報告の一部は日本食品衛生学会第 88 回学術講演会 (2004 年 11 月, 広島) において発表した。

文 献

- 1) Japan Supplement Association (NPO), "Supplement's Bible", Tokyo, Shougakukan, 2002. (ISBN4-09-103138-2)
- 2) 財団法人日本健康・栄養食品協会, "JHFA マーク健康補助食品ガイド 2004", 東京, 2004.
- 3) Saokuhinkagakushinbunsha, Trends in the Market for Dietary Supplement and Health Ingredients. Shokuhin To Kaihatsu (food processing and ingredients), 40 (3), 16-47, 2005.
- 4) 財団法人日本食品分析センター編, "五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説" 東京, 中央法規出版, 2002, p.150-159. (ISBN4-8058-4348-9)
- 5) Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, "Shokuhin Eisei Kensa Shishin Rikagakuhin", Tokyo, Japan Food Hygiene Association, 2005, p.133-145.
- 6) Indyk, H. E., Woolard, D. C., Determination of vitamin K in milk and infant formulas by liquid chromatography: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 83, 121-130 (2000).
- 7) Koivu-Tikkanen, T. J., Ollilainen, V., Piironen, V. I., Determination of phyloquinone and menaquinones in animal products with fluorescence detection after post-column reduction with metallic zinc. J. Agric. Food Chem., 48, 6,325-6,331 (2000).
- 8) Resources Council, Science and Technology Agency, Japan "Standard table of food composition in Japan, Fifth revised edition -2000-", (ISBN4-17-311721-3)
- 9) Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, "The National Nutrition Survey in Japan, 2002", Tokyo, Dai-ichi-shuppan, 2004.
- 10) Saiki, A., Nakamura, T., Masada, M., Administration guideline of the vitamin K contained preparation for the Warfarin dosing patient. Iyaku Journal (Medicine and Drug Journal), 39, 2,072-2,079 (2003).
- 11) Sawada, Y., Sata, H., Egashira, A., Ohtani, H., Interaction between drug and food. 55 II. Failure of the treatment which occurs in the encounter of drug and food and favorite food. 4. Drug invalidates the action of vitamin. a) Drug and food, favorite food, health; food and nutriment containing vitamin K. Iyaku Journal (Medicine and Drug Journal), 40, 1,279-1,289 (2004).