

HPLCによる食品中のカロテノイド9種の同時分析

Simultaneous analysis of 9 carotenoids in foods by HPLC

腰塚 はるか
Haruka Koshitsuka

大妻女子大学大学院 人間文化研究科 人間生活科学専攻 修士課程

キーワード：カロテノイド, HPLC, 健康食品

Key words : Carotenoid, HPLC, Health foods

1. 研究目的

動植物により合成される脂溶性色素カロテノイドは、強い抗酸化力を有し、健康食品素材や着色料として広く使用されている。機能性表示食品として眼の健康維持や睡眠の質改善のほか、認知機能改善や紫外線対策等の届出が近年新たに受理されている。

カロテノイドの同時分析では、構造異性体であるルテインとゼアキサントシンの分離が困難であることから、C30カラムや特殊な移動相により分離されている。そこで、分離カラムに最も汎用されているODSカラムを用い、移動相にテトラヒドロフラン (THF)、アセトニトリル、メタノール及び水を用いたHPLCによる食品中のカロテノイド9種 (フコキサントシン、アスタキサントシン、ゼアキサントシン、ルテイン、カンタキサントシン、 β -クリプトキサントシン、リコピン、 α -カロテン、 β -カロテン) の同時分析法を構築し、市販健康食品に含まれるカロテノイドの実態調査を実施した。さらに、サケの加熱調理時におけるアスタキサントシンの安定性について調べた。

2. 研究実施内容

1 試料

カロテノイドを含む機能性表示食品6種 (A社のアスタキサントシン、 β -カロテン、ルテイン、B社のルテイン+アスタキサントシン、C社のルテイン、D社の β -カロテン)、スーパーマーケットで購入した塩銀鮭 (2切) を用いた。

試料の調製 (サケ) は次のように行った。生サケおよび魚焼きグリルで7分間焼いたサケを1切ずつ用意し、a.背、b.腹、c.血合い、d.皮をそれぞれ包丁にて細かく切り、均一化した。

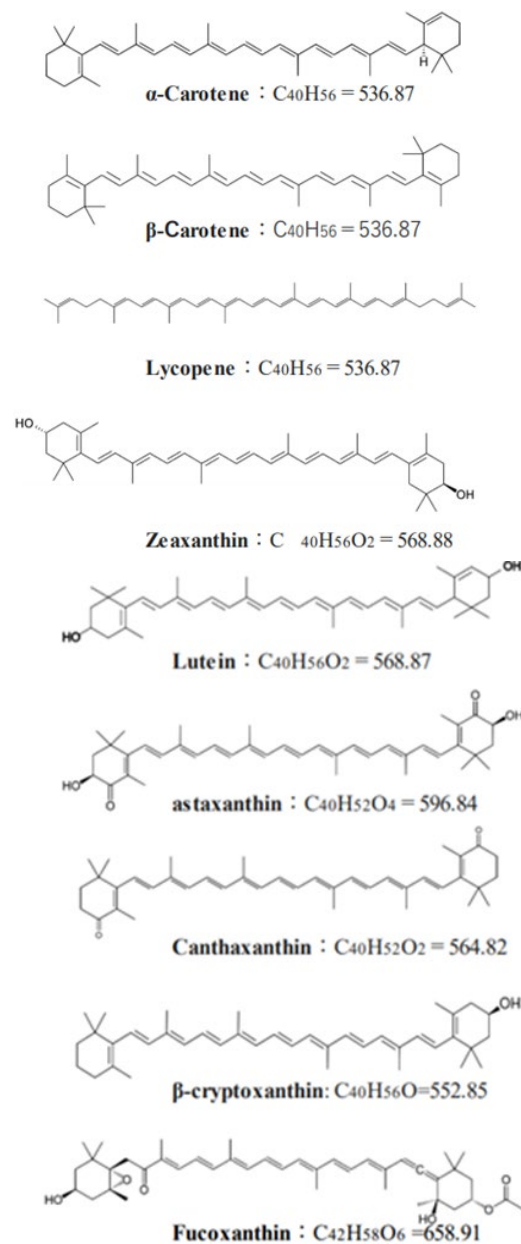


図1. カロテノイドの構造式

2 試薬

標準品として、フコキサンチン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、ルテイン、カンタキサンチン、β-クリプトキサンチン、リコピン、α-カロテン、β-カロテンを用いた。

アセトニトリルおよびメタノールは富士フィルム和光純薬株式会社製の HPLC 用、アセトンおよび THF は同社製の試薬特級品を用いた。

3 装置

HPLC 装置, UV-Vis 検出器は Agilent 社製のものを用いた。

4 試験溶液の調製

市販健康食品カプセル：試料 1 粒を THF10mL に溶解し、試験溶液とした。

サケ：試料 5g にアセトン 20mL を加えてホモジナイズ後、遠心分離 (3500rpm,10min) し、上清を試験溶液とした。

5 HPLC 測定条件

分離カラムには L-column2 ODS

(2.1×150mm,3μm) を用い、カラム温度 40°C、流速 0.25mL/min、検出波長 450nm、注入量 5μL で分析した。移動相は①A=アセトニトリル、B=メタノール、C=水、D=THF の 4 液または②A=アセトニトリル/メタノール/THF(3:6:1)、B=水/THF(1:1) の 2 液を用いたグラジエント溶出法を採用した(表 1,2)。

表 1. HPLC 条件(4 液)

LC conditions				
Column	L-column2 ODS (2.1 x 150mm), 3μm			
Flow-rate	0.25 mL/min			
Column temp.	40°C			
Injection size	5μL			
Eluent	Gradient	A = MeCN B = MeOH C = water D = THF		
Time (min)	A(%)	B(%)	C(%)	D(%)
0	0	45	25	30
10	0	45	25	30
15	45	45	0	10
35	45	45	0	10

表 2. HPLC 条件(2 液)

LC conditions		
Column	L-column2 ODS (2.1 x 150mm), 3μm	
Flow-rate	0.25 mL/min	
Column temp.	40°C	
Injection size	5μL	
Eluent	Gradient	A = MeCN/MeOH/THF(3:6:1) B = THF/water(1:1)
Time (min)	A(%)	B(%)
0	50	50
10	50	50
15	100	0
35	100	0

6 結果

ルテインとゼアキサンチンは構造が酷似しており、ODS カラムを用いた一般的な条件では分離が困難であった。そこで、THF を用いたグラジエント条件を検討した結果、表 1・2 に示した条件で 4 液・2 液とも良好な分離が得られた (図 2, 3)。ピーク 5 とベースラインの変動及び THF 100% 使用の問題から、以降の分析には 2 液グラジエントを採用した。

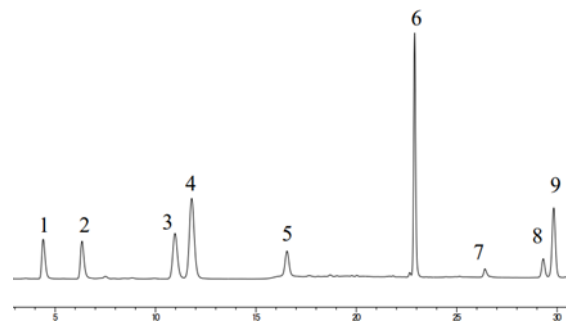


図 2. カロテノイドの HPLC クロマトグラム(4 液)

(1: フコキサンチン, 2: アスタキサンチン, 3: ゼアキサンチン, 4: ルテイン, 5: カンタキサンチン, 6: β-クリプトキサンチン, 7: リコピン, 8: α-カロテン, 9: β-カロテン)

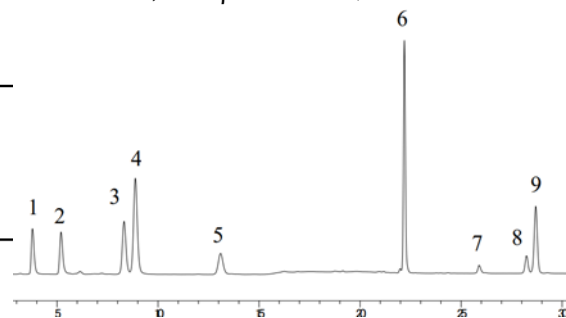


図 3. カロテノイドの HPLC クロマトグラム(2 液)
(1~9: 同上)

溶解性及び抽出効率を考慮して抽出溶媒を検討した結果、市販健康食品カプセルでは THF>アセトン>メタノール、サケでは THF≒アセトン>アセトニトリル>メタノールの順に優れていた。そこで、抽出溶媒として健康食品カプセルでは THF、サケではアセトンを用いることにした。

市販健康食品カプセルに含まれるカロテノイドの HPLC 分析を行った。標準溶液のクロマトグラムより、試料 1 粒中のカロテノイド含量を求めた結果を表 3 に示す。ルテイン、β-カロテンは概ね表示通りの値が検出された。一方、アスタキサンチンは検出されず、遊離体は含まれていないことがわかった。機能性表示食品は、企業が提示する方法で分析を行った場合、表示値より低い数値での検出は問題となる。本分析法は未だ最適とはいえず、今後改良していく必要がある。

表 3. 健康食品カプセル中のカロテノイド含量

名称	成分表示(1粒) (mg)	含量 (mg)	割合 (%)
アスタキサンチン (A社)	アスタキサンチン 5.4	0	0
ベータカロテン (A社)	β-カロテン 1.8	1.2	66.7
ルテイン(A社)	ルテイン 4.8	4.4	91.7
	β-カロテン 1	0.5	50
ルテイン(B社)	ルテイン 5	3.4	68
	アスタキサンチン 2	0	0
ブルーベリー× ルテイン(C社)	ルテイン 6	4	66.7
ブルーベリー (D社)	β-カロテン 1.95	2	102.6

サケの加熱調理時(7分間焼く)におけるアスタキサンチンの安定性を調べた結果を図 4~6 に示す。生サケと比べ、アスタキサンチン(*trans*)が 1~3 割減少し、*cis*-アスタキサンチンと推察されるピークが増加した。

アスタキサンチン

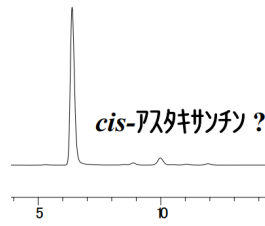


図 4. 生サケの HPLC クロマトグラム

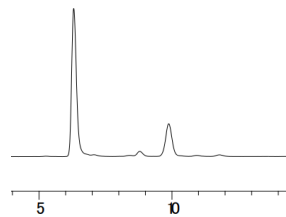


図 5. 焼きサケの HPLC クロマトグラム

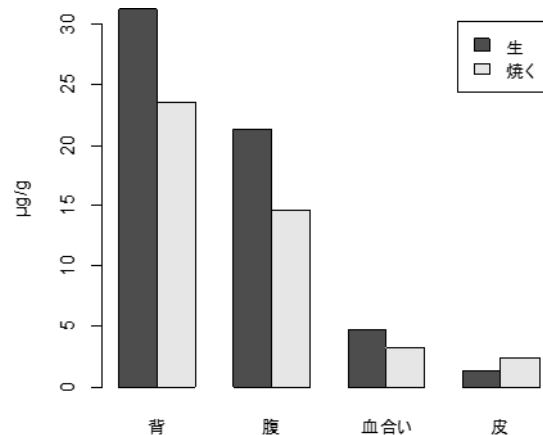


図 6. 加熱前後のサケ中の *trans*-アスタキサンチン含量

3.まとめと今後の課題

カロテノイド 9 種の同時分析法を構築し、市販健康食品に含まれるカロテノイドの実態調査を実施した。さらに、サケの加熱調理時におけるアスタキサンチンの安定性について調べた。

市販健康食品カプセルについて分析を行った結果、ルテイン、β-カロテンは概ね表示通りの値が検出された。一方、アスタキサンチンは、遊離体は含まれておらず、いずれもエステル体が含まれていると推察された。β-カロテンのエステル体等を対象としたケン化法ではアスタキサンチンが分解されることから、今後、酵素を用いたエステル分解を行い、定量する予定である。

サケの加熱調理時におけるアスタキサンチンの安定性を調べた結果、約 3 割が減少し、*cis* 体への

異性化が推察された。酸化による分解も考えられ、今後、LC-MS 等を用いて詳細に検討する予定である。

3. この助成による発表論文等

① 学会発表

- [1] 発表者名：腰塚 はるか，堀江正一
発表タイトル：
HPLC による食品中のカロテノイド9種の
同時分析
学会等名：
第116回日本食品衛生学会学術講演会
発表年月日：
令和2年11月24日（火）～
令和2年12月8日（火）
発表場所：WEB 開催

付記

本研究は、大妻女子大学人間生活文化研究所令和2年度大学院生研究助成(B)(DB2010)「HPLCによるスイセン毒の分析」より研究助成を受け行ったものである。