逆相高速液体クロマトグラフィー法によるカロテン類の同時定量法

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 本間, 啓子, 西谷, 真希, 三田, 陽子, 馬渡, 一浩, 中島, 廣志 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/32063

短　報

金大医保つるま保健学会誌 Vol. 36(1)
27～31　2012

逆相高速液体クロマトグラフィー法による カロテン類の同時定量法

本間　啓子　　西谷　真希*　　三田　陽子**　　馬渡　一浩　　中島　廣志

Key words

carotenes, lycopene, α-carotene, β-carotene, reversed phase high performance liqid chromatography

はじめに

カロテノイドは天然に存在する色素で基本骨格$C_{40}H_{56}$を持つ化合物の誘導体である。炭素と水素のみで出来ているものをカロテン類、それ以外の原子を含むものはキサントフィル類という。この基本骨格はイソプレノイドが８個結合したもので、カロテン類は両端に位置する環構造の違いから分類される（図１）。リコペンは両端に開環構造のψ環のみを持ち、α-カロテンは両端に閉環構造のβ環とε環を、β-カロテンは両端にβ環のみを持つ。また、カロテン類は分子中に共役二重結合があるため可視部（400 nm～550 nm）に１～３個の吸収極大波長[1]を示し黄色ないし赤色を呈する。

近年食物中に含まれる成分のうち、三大栄養素・ビタミン・ミネラル以外で人の健康保持増進に役立つ機能性成分に大きな関心が寄せられている。特に、カテキン・アントシアニンなどのポリフェノール類、リコペン・カロテンなどのカロテノイドが注目されている[2]。ポリフェノール類は強力な抗酸化作用を持ち、体内の活性酸素を除去することで様々な疾病を予防することがわかってきた。同様に、カロテノイドも酸素ラジカル除去による抗酸化作用と酸化的ストレスの抑制作用が注目されている。カロテノイドの摂取量と癌・目の老化・神経性疾患など様々な病気のリスク減少との間には強い相関関係があるとの研究が多く報告されている[2-5]。特にリコペンは動物実験で心臓血管系疾患・日光による紅斑誘発・前立腺癌の発生を抑える等の報告が多数有り、近年大きな関心を集めている[4]。

これらの機能性成分のうちポリフェノール類は水溶性であるため比較的分析がしやすく、多くの分析法が確立されている。一方、カロテノイドは水に不溶であるため、有機溶媒による抽出操作が必要である。加えて化学的に不安定な性質と、前処理操作が必要であることから、分析法、分析例ともに報告は少ない[6-8]。さらに、通常カロテノイドの分析は、リコペンとカロテンで抽出法と高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の分析条件も異なっている[1,2,8]。カロテノイドの分析は近年では逆相HPLC法が用いられることが多く、固定相にC18やC30を用い、移動相にカロテンではクロロホルムとメタノールの混合液、リコペンではメタノールとテトラヒドロフランおよびアセトニトリルの混合液等が使用されている。しかし、クロロホルムは環境への負荷が大きく、テトラヒドロフランは過酸化物を生成するという問題がある。したがって、これらの溶媒を用いない比較的簡単なリコペン、α-カロテン、β-カロテンの同

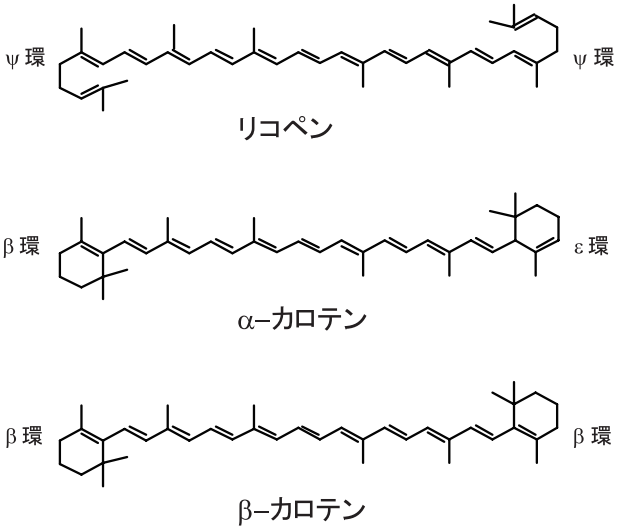

図１．カロテン類の構造

金沢大学医薬保健研究域保健学系
*　金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻医療科学領域博士前期課程
** 北陸学院大学短期大学部食物栄養学科

時定量法の確立が必要とされている。リコペン分析用の移動相のメタノールとテトラヒドロフランおよびアセトニトリル混合液からテトラヒドロフランだけを除くと移動相の疎水性が低下しカロテンが析出しやすくなる[2)]。そこで今回我々はメタノールとアセトニトリル混合液より疎水性の大きいエタノールとアセトニトリル混合液を用いて移動相の改良を試みた。また、この移動相と安価なC18カラムを用いることで、3種類の標準物質がHPLC法で同時分析が可能であるかどうかを検討した。その結果、定量性および再現性の良いHPLC分析条件を見出したので報告する。

実験方法

1．試　　薬

アセトニトリル、エタノール、ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）は和光純薬特級を使用した。実験に使用した3種類のカロテノイド（α-カロテン、β-カロテン、リコペン）は和光純薬製を用い、テトラヒドロフラン（和光純薬、特級）に約100 ng/20 μLになるように溶解し、移動相で1/4に希釈し、20 μLをHPLCに注入し分析した。

カロテン類は二重結合が多く酸化されやすいため溶解液と希釈液には酸化防止剤のBHTを最終濃度が1.2 mMになるように添加して用いた。

2．HPLC分析

HPLCは送液ポンプにL-6200（日立）、L-6000（日立）、カラムオーブンにL-5030（日立）、フォトダイオードアレイ検出器にDAD L-4500（日立）およびUV8000（東ソー）、データ処理・記憶装置にD-6100（日立）とD-2500（日立）を使用した。

固定相は逆相系カラムのCOSMOSIL C-18-MS-Ⅱ（ナカライテスク）を使用した。移動相はアセトニトリルとエタノールの混合液を用い流速1 mL/分で分析した。

アセトニトリルとエタノールの混合比は2台の送液ポンプの流速を変化させることでエタノールの割合を10：90（10v/v%）から50：50（50v/v%）の間で変えて実験した。たとえば、エタノールが10v/v%の時はアセトニトリル送液ポンプの流速を0.9 mL/分、エタノール送液ポンプの流速を0.1 mL/分とし流速の合計が1.0 mL/分となるように設定した。

また、カラムの温度はカラムオーブンの設定温度を20～50℃の間で5℃ずつ変えて分析した。

溶出液の吸収スペクトルを測定波長200～700 nmの範囲で0.8秒毎に30分間記録し、測定後に解析した。測定中のクロマトグラムは400～500 nmで10 nmずつ変えてモニタリングした。

結果と考察

1）モニタリング波長の設定

3種類のカロテンの吸収は400～500 nmにかけて存在し吸収極大波長はそれぞれ異なる。そこで、検出波長を400 nmから500 nmの間で10 nmずつ変えて測定した。溶出パターンにおける3種類のカロテンのピークの大きさを検討したところ、同一濃度で3種類のピークの高さがほぼ同じになる波長は450 nmであることがわかった。そこで以後の分析にはモニタリング波長として450 nmを用いた。

2）ピークの同定

移動相にアセトニトリルとエタノールの混合液を用い、リコペン、α-カロテン、β-カロテンの混合溶液を分析したところ、3本の大きなピークが認められた（図2）。3種類のカロテンを単独で分析した場合には1本の主なピークのみが認められた。そこで混合液のピークの溶出時間からピークの同定を行った。その結果、リコペン、α-カロテン、β-カロテンの順に溶出することがわかった。このことは

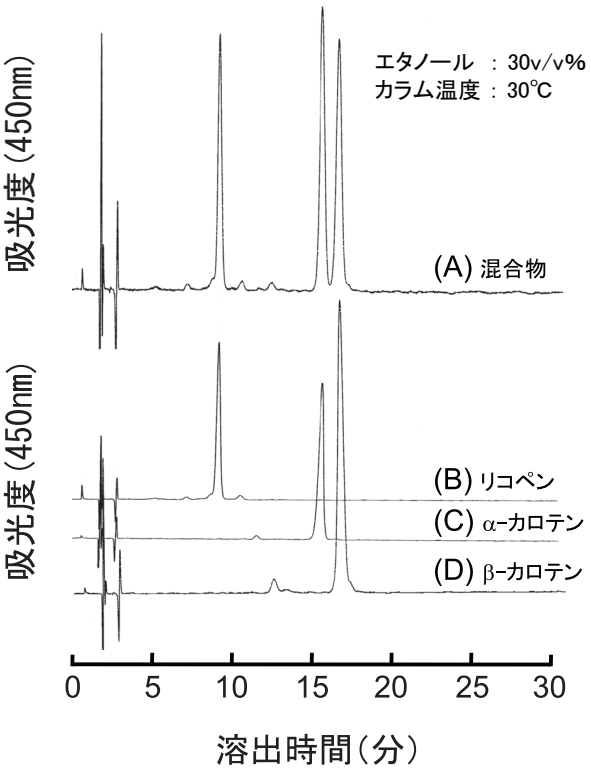

図2．HPLCピークの同定

リコペン19 ng/μL，α-カロテン23 ng/μL，β-カロテン24 ng/μL

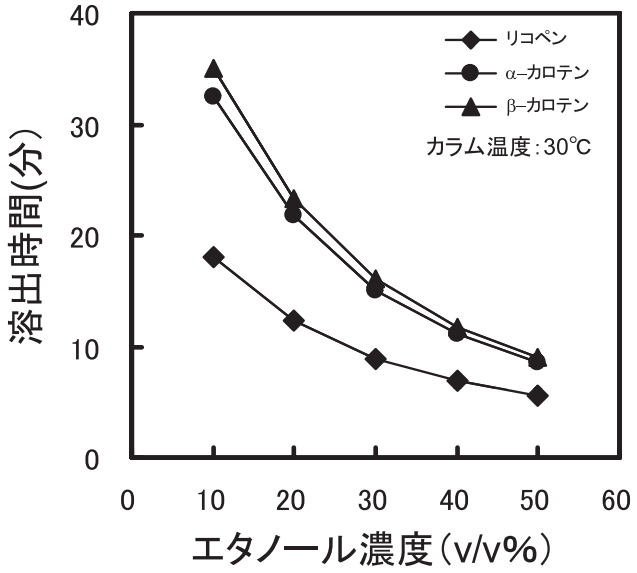

図３．移動相中のエタノール濃度と溶出時間との関係

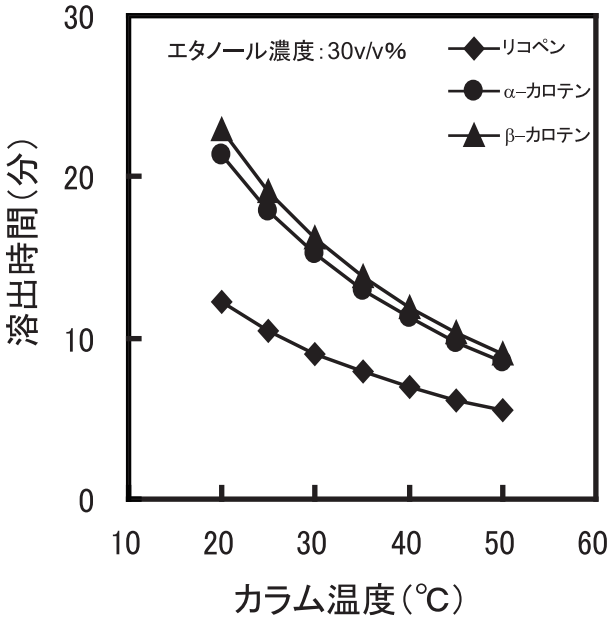

図４．カラム温度と溶出時間との関係

回収したピークの吸収スペクトルの比較から確かめられた。

溶出時間はリコペンが約９分、α-カロテンが約15分、β-カロテンが約16分であった（図２）。リコペンは両端がψ環という開環構造を有する。一方、α-カロテンは、β環とε環、β-カロテンはβ環が２個の閉環構造である（図１）。リコペンがα-カロテンやβ-カロテンより溶出時間が著しく早いのはリコペンのψ環が開環構造であるために固定相のC18との相互作用が弱いためであると考えられる。α-カロテンのε環、β-カロテンのβ環では環内の二重結合の位置が異なり、α-カロテンとβ-カロテンの溶出時間の違いとなったと考えられる。

リコペンのように両端の２つの環が開環構造の方がα-カロテンやβ-カロテンのように両端の２つの環が閉環構造をとるよりC18との相互作用が弱いなら一方だけが開環構造を持つカロテンの溶出時間はリコペンとα-カロテンやβ-カロテンの間になると考えられる。α-カロテンとβ-カロテンの前駆体のγ-カロテンはβ環とψ環を持ち緑黄色野菜に微量存在する[9]。そこで、γ-カロテンをこの条件で分析することでカロテノイドの構造と溶出時間との関係がさらに明らかになると考えられる。

３）移動相中のエタノール濃度

移動相に含まれるエタノールの溶出時間への影響を調べるためにエタノールの割合を10v/v％から50v/v％に変化させ、リコペン、α-カロテン、β-カロテンの混合溶液をHPLC分析した。図３にエタノール濃度と３種類のカロテンの溶出時間の関係を示した。エタノール濃度が高くなると３種類のカロテンとも溶出時間は短縮したが、溶出順序は変わらなかった。エタノール濃度が30v/v％までは各々のピークは分離したが、40v/v％以上ではα-カロテンとβ-カロテンのピークが重なり分離が不十分となった。ピークの分離状態と分析時間を考慮し、移動相中のエタノール濃度は30v/v％が適切であると考え、移動相は以後の実験ではアセトニトリル送液ポンプの流速を0.7 mL/分、エタノール送液ポンプの流速を0.3 mL/分として行った。

４）カラム温度

カラム温度の分離への影響を調べるためにカラムオーブンの温度設定を20 ℃から50 ℃の間で変化させHPLC分析した。図４にカラム温度と３種類のカロテンの溶出時間の関係を示した。カラム温度が高くなるにしたがって３種類とも溶出時間は短縮したが、溶出順序は変わらなかった。カラム温度が35 ℃まではそれぞれのピークは分離した。40 ℃以上ではα-カロテンとβ-カロテンのピークに重なりが認められ、分離が不十分であることがわかった。３種類のカロテンの分離が可能で分析時間が20分以内となる30 ℃が最も適切であると考え、以後の実験は30 ℃で行った。

５）検量線と再現性

次に、今回検討したモニタリング波長、移動相の組成、カラム温度などの条件下での定量性と再現性について調べた。

まず、定量性を調べるためにリコペン、α-カロ

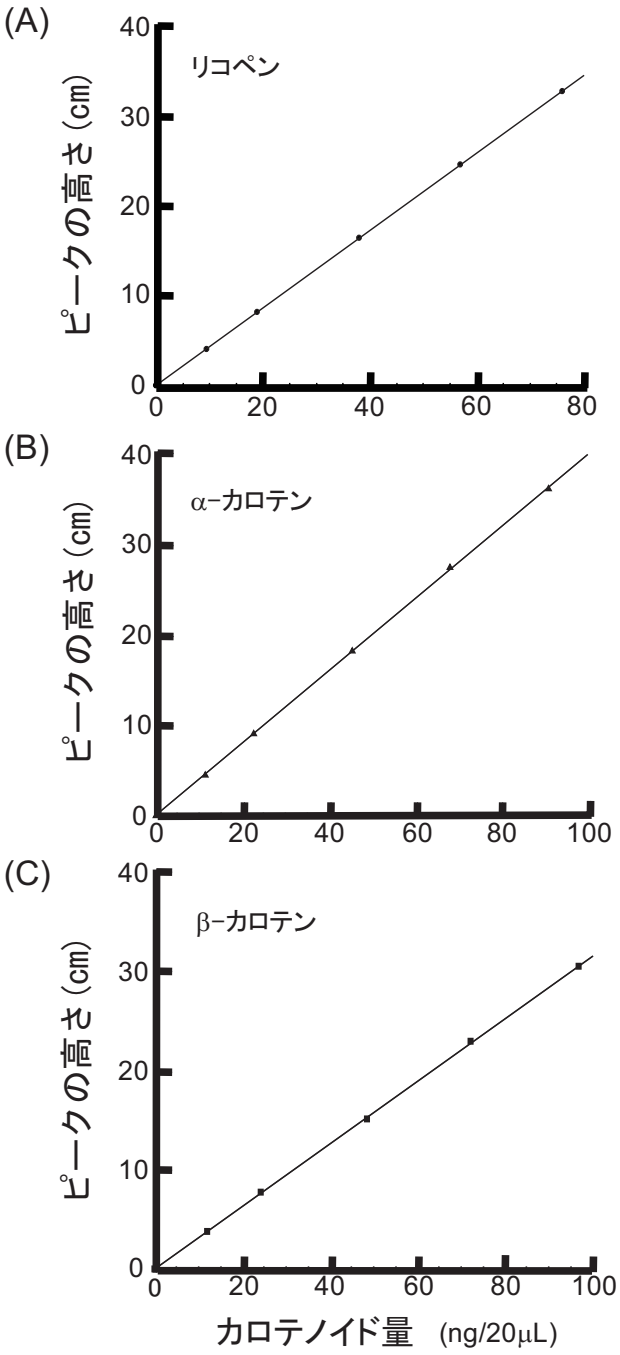

図５．リコペン、α-カロテン、β-カロテンの検量線
移動相：エタノール30v/v%
カラム温度：30℃

テン、β-カロテンの混合液を調整し、それぞれの分子吸光係数[1)]から濃度を求めたところ、リコペンが76 ng/20μL、α-カロテンが91 ng/20μL、β-カロテンが97 ng/20μLであった。この混合液を1/8、1/4、1/2、3/4に移動相で希釈し分析した。図５にカロテンの量を横軸にピークの高さを縦軸にとり、リコペン（図５A）、α-カロテン（図５B）、β-カロテン（図５C）の検量線を作成した。いずれの場合

表1. HPLCによるカロテノイド分析の同時再現性

(A)

	ピークの高さ　(cm)		
	リコペン	α-カロテン	β-カロテン
平 均 値	8.27	8.40	8.80
標準偏差	0.09	0.07	0.13
変動係数（%）	1.1	0.9	1.5

(B)

	溶出時間　(分)		
	リコペン	α-カロテン	β-カロテン
平 均 値	8.94	15.12	16.12
標準偏差	0.01	0.02	0.02
変動係数（%）	0.1	0.1	0.1

もカロテン量とピークの高さとの間には直線関係がありピークの高さから濃度を求めることが出来ることがわかった。

また、検出限界をノイズの高さの３倍に相当する高さと考えて見積もった。図２の溶出パターンで（B）のリコペンのピークの高さは実測で約14.2 cm/（19ng/20μL）で、1ng/20μLは約0.74 cmの高さに相当することがわかった。また、このときのベースラインの幅は約0.15 cmでリコペン濃度に換算すると0.2ng/20μLとなった。そこで、0.15 cmの３倍の0.45 cm以上のピークの高さなら検出可能であると考え、0.6 ng/20μLを検出限界とした。同様にしてピークの高さとベースラインの幅から、検出限界を求めたところ、α-カロテンは0.6 ng/20μL、β-カロテンは0.8 ng/20μLであった。

次に同時再現性を調べるためにリコペン、α-カロテン、β-カロテンの混合液を７回連続でHPLC分析した。各々のピークの高さ、溶出時間の実測値から、平均値、標準偏差および変動係数を調べた（表１）。リコペン、α-カロテン、β-カロテンのピークの高さの変動係数は0.9～1.5%、溶出時間の変動係数はどれも0.1%で3種類とも再現性の良いことがわかった。

ま と め

今回の実験からリコペン、α-カロテン、β-カロテンの標準溶液を逆相HPLCで分析する条件は固定相にC18カラム、移動相はアセトニトリルとエタノールの混合比を30v/v%とし、カラム温度30 ℃、流速1.0 mL/分、試料注入量20μL、モニタリング波長450 nmで分析し、ピークの高さから濃度を求めればよいことがわかった。さらに、この条件での定量性と再現性が良いことがわかった。

文　献

1）(社)日本食品科学工学会，食品分析研究会 共同編纂：新・食品分析法(Ⅱ)，光琳，pp 123-145，2006
2）食品機能性の科学　編集委員会　監修　西川研次郎：食品機能性の科学，産業技術サービスセンター，pp 72-122，pp 299-423，2008
3）Erdman Jr. J W, Ford N A, Lindshield B L : Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function?. Arch Biochem Biophys 483: 229-235, 2009
4）Nishino H, Murakoshi M, Tokuda H, et al. : Cancer prevention by carotenoids. Arch Biochem Biophys 483: 165-168, 2009
5）Olives Barba A I, et al: Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β-carotene in vegetables. Food Chemistry 95: 328-336, 2006
6）日本薬学会 編：衛生試験法・注解2010，金原出版，pp 230-232，2010
7）財団法人日本食品分析センター 編集：栄養成分表示のための成分分析のポイント，中央法規出版，pp 183-194，2007
8）安本教傳，竹内昌昭，安井明美，他 編集：五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル，建帛社，pp 79-87，2006
9）日本生化学会　編：細胞機能と代謝マップ，東京化学同人，pp 232-235，1997

A Simultaneous Determination Method of Carotenes by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Keiko Homma, Maki Nishitani*, Yoko Mita**, Kazuhiro Mawatari, Hiroshi Nakashima