

食品中の脂溶性成分分析環境の構築

佐野一成・山本展久・徳田正樹

食品産業担当

A Study of Analysis for Lipophilic Food Components

Kazunari SAN0, Nobuhisa Yamamoto, Masaki TOKUDA

Food Industry Section

要 旨

食品中の脂溶性成分の定量分析についての技術習得を目的として、食品からの脂溶性成分の抽出、LC によるカロテノイド分析に取り組んだ。極性が比較的高い遊離キサントフィル類の分析には LC-MS 分析も適用可能な C18 カラムを、カロテノイド全般の評価には C30 カラムを用いることが適当と考えられる。複雑な組成の分析試料では、エステル型キサントフィルの個別定量は容易ではないため、けん化等により遊離型に変換する必要が認められた。

1. はじめに

食品の表示をめぐるのは、平成 27 年に食品表示法／食品表示基準が施行された。これにより、成分表示が義務化されるとともに、科学的根拠に基づいて食品の効果・効能の標榜が可能になる機能性表示食品が新たに規定された。食品に機能性を表示するためには、関与成分の同定と定量分析が必須となっており、県内食品関連企業による機能性表示食品開発を支援するためには、様々な機能性関与成分の分析技術を蓄積し、分析環境を整備することが求められる。

これまで、食品成分分析として有機酸や糖類、ポリフェノール等の水溶性成分の研究・分析に取り組んできたが、当センターにおける脂溶性成分の分離・定量に関する知見は少ない。そこで今回、機能性関与成分として注目されているカロテノイドや脂溶性ビタミン類分析のための知見の蓄積、環境の構築に取り組んだ。

2. 方 法

2.1 抽出液の調製

新鮮物重量 1g 相当量の乾燥粉末をガラス製 50ml 遠沈管(A)に秤取する。抽出溶媒 10ml を加えてホモジナイザーで十分に均質化する。抽出溶媒 5ml でシャフトを洗浄後、さらに少量の抽出溶媒で洗浄して洗液を合わせる。遠沈管の試料を冷却遠心機で遠心分離 (5℃, 3,000rpm, 10min) し、上澄を別のガラス製遠沈管(B)に分取する。残渣に先のシャフトの洗液を加えて懸濁し、

遠心分離して上澄を遠沈管(B)に合わせる。残渣に n-ヘキサン 15ml を加えて懸濁し、再度遠心分離して上澄を遠沈管(B)に合わせる。遠沈管(B)の抽出液を混合したのち、NaCl 飽和水溶液 15ml を加えて混合、遠心分離して水層を除去する。再度 NaCl 飽和水溶液 15ml を加えて混合、遠心分離したのち、有機溶媒層を梨型フラスコに移し、ロータリーエバポレータで溶媒を留去する。留去後、n-ヘキサンで溶解し定容する。

2.2 けん化処理

ネジロ試験管に抽出液 1ml を採り、等量の 5% NaOH/90% EtOH-水を加えたのち、試験管内を窒素置換して密栓後よく混合する。室温で一夜置いたのち、2ml の飽和 NaCl 水溶液を加えて混合し、遠心分離して水層を除去する。飽和 NaCl 水溶液による洗浄を繰り返し、有機溶媒層を別の試験管に移して遠心エバポレータで留去する。残留物を n-ヘキサンで溶解し定容する。以上の操作はできるだけ光を当てないよう褐色容器等を用いて行う。

2.3 LC 分析

Waters ACQUITY UPLC-PDA システムに、Table 1 のカラムを付して LC 分析を行った。グラジエント条件は Table 2 及び 3 のとおり。クロマトグラムの解析は MassLynx4.1 ソフトウェアにより行った。

Table 1 使用カラム一覧

| | 名称 | メーカー | 粒子径(μm), 直径*長さ (mm) |
|-----|----------------------|--------|-------------------------------------|
| C18 | ACQUITY UPLC BEH-C18 | Waters | 1.8, 2.1*100 |
| | ACQUITY UPLC HSS-T3 | Waters | 1.8, 2.1*150 |
| | ACQUITY UPLC CSH-C18 | Waters | 1.8, 2.1*150 |
| C30 | Develosil C30-UG3 | 野村化学 | 3.0, 3.0*150 |
| | YMC Carotenoid | YMC | 3.0, 3.0*150 |

3. 結果と考察

3.1 抽出溶媒の検討

カロテノイドの抽出に用いる溶媒として、MeOH、アセトン、THF、MeOH/アセトン、MeOH/THF、アセトン/THF、MeOH/クロロホルム(2:1)を検討した。MeOH/クロロホルム以外の混合溶媒の混合比率は 1:1 とした。MeOH 及び MeOH 混合溶媒では、他の溶媒を用いた場合に比べて抽出回数を多く要する傾向が見られた。また、アセトン抽出物と THF 抽出物の LC 分析結果を比較したところ、THF 抽出の方がより多くの成分が検出されたため、当面の検討には THF を抽出溶媒として用いることとした。抽出溶媒の最適化は別途実施する。

分取した有機溶媒層の洗浄に水を用いると試料によっては水層にカロテノイドによると思われる着色が生じるため、飽和 NaCl 水溶液を用いた。

3.2 カロテノイドの LC 分析条件の検討

3.2.1 C18 系カラムの検討

各主成分の分析に汎用される ODS カラムによる分析を実施した。分析条件は Table 2 のとおり。分析例を Fig.1 に示したように、キサントフィル類を含む極性が比較的高いのはシャープなピークとして分離されていた。一方、極性の低いカロテン類については、溶出力が不十分であったり、ピークがブロードになったりという傾向が見られたため、これらの成分の分析にはより強い(極性の低い)溶離液への変更かグラジエント条件の調整が必要になる。

Table 2 C18 カラムによる分析条件

| | |
|----------|---------------------------|
| 溶離液 A | 85% MeCN/水 |
| 溶離液 B | 35% MeOH / 65% MeCN |
| グラジエント条件 | 0.0 - 1.5 min ; 0% B |
| | 1.5 - 12.0 min ; 0-100% B |
| | 12.0 - 20.0 min ; 100% B |
| 流速 | 0.3 ml/min |
| 検出波長範囲 | 350 - 600nm |

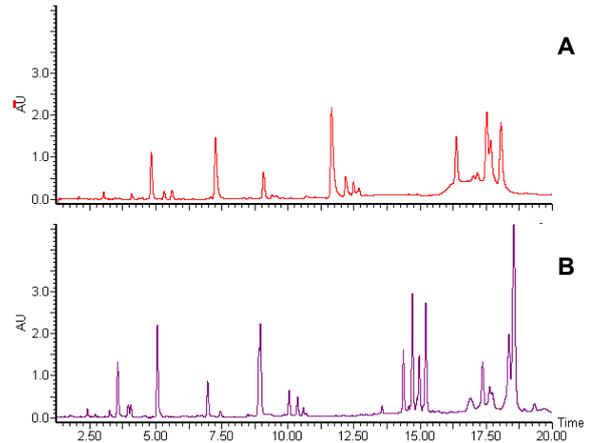


Fig.1 C18 カラムによる分析例

(レッドサラダ, A:HSS T3, B:CSH C18)

3.2.2 C30 系カラムの検討

カロテノイド分析用カラムとして市販されている C30 カラムによる分析を実施した。同じ溶出条件(Table 3)で分析を実施したところ、Develosil C30 と YMC Carotenoid で極性が比較液高い成分の溶出挙動がとくに異なっていた(Fig. 2、3)。

C30 系カラムでも C30 官能基(トリアコンチル基)の基材への結合様式が異なっており、この差が影響していると考えられる。C30 系カラムについては、カロテノイド分析の実績も豊富な YMC Carotenoid カラムが選択さ

Table 3 C30 カラムによる分析条件

| | |
|----------|-----------------------------|
| 溶離液 A | MeOH / MTBE / 水 (81/15/4) |
| 溶離液 B | MeOH / MTBE / 水 (7/90/3) |
| グラジエント条件 | 0.0 - 5.0 min ; 0-7.5% B |
| | 5.0 - 40.0 min ; 7.5-100% B |
| | 12.0 - 20.0 min ; 100% B |
| 流速 | 0.3 ml/min |
| 検出波長範囲 | 350 - 600nm |

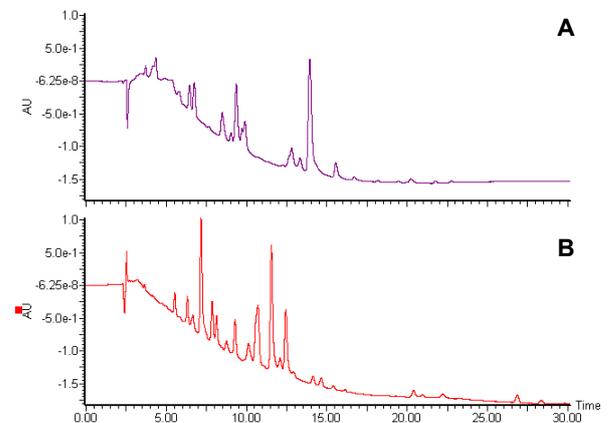


Fig. 2 C30 カラムによる分析例(1)

(レッドサラダ, A:Develosil C30-UG3, B:YMC Carotenoid)

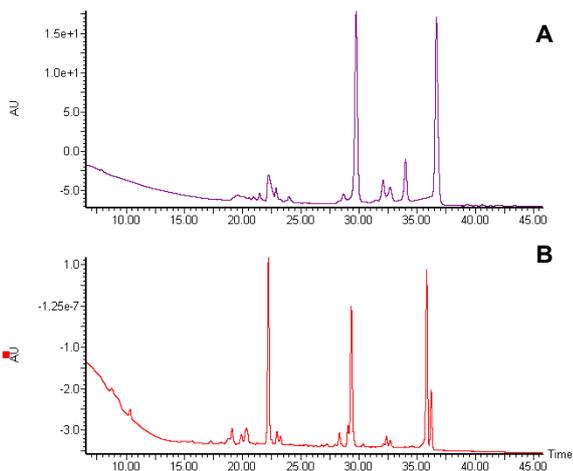


Fig. 3 C30 カラムによる分析例(2)

(ミニトマト, A:Develosil C30-UG3, B:YMC Carotenoid)

れる。また、今回は使用機材のカラムオープンのサイズによる制約から長さ 150mm のカラムを選択したが、汎用される長さ 250mm のカラムを用いることにより、分離能力の向上の余地が残される。

3.3 再現性確認試験

カロテノイドを含有する均質な試料として、市販のパプリカ乾燥粉末を用い、カロテノイド抽出の再現性確認を行った。並列で抽出を行った試料の主要なピーク面積を比較(Fig. 4, 5)したところ、各試料間の変動は±2%程度と見込まれ、十分な繰返し再現性と考えられた。

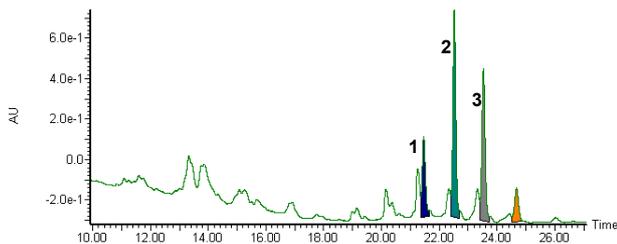


Fig. 4 パプリカ粉末の分析例

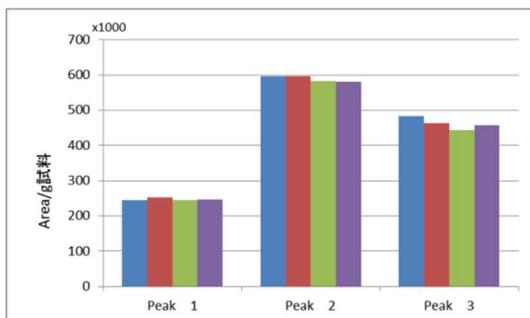


Fig. 5 再現性確認試験の結果

4. まとめ

食品中の脂溶性成分の分析のための知見の収集・技術の習得を目的として、カロテノイドを対象成分とした分析を実施し、抽出操作の繰返し精度やカラムの分離特性等について検討した。極性が高い遊離キサントフィル類の分析には C18 カラムの適用が可能であったが、カロテノイド全般の分析には C30 カラムを選択することになると思われる。エステル型キサントフィル類の個別分析は標準物質の入手等の面からも難しいため、けん化等により遊離型にして分析する必要がある、これらの条件についても検討を要する。

次年度は今年度見つけた改善点を調整しつつ、分析対象品目、成分を絞り込んで抽出法の詳細な検討と定量分析に取り組む予定。