

食品中の脂溶性成分分析環境の構築（第2報）

佐野一成・松田貴志・松田みゆき・山本展久

食品産業担当

A Study of Analysis for Lipophilic Food Components (2nd Report)

Kazunari SANÔ · Takashi MATSUDA, Miyuki MATSUDA · Nobuhisa YAMAMOTO

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。標準物質を用いた添加回収試験、同一試料からの抽出の再現性等を評価し、測定試料の調製は十分な精度で実施できることを確認した。キサントフィルの分析にはさらに改善が必要であるが、機能性表示食品の関与成分として届出されているカロテノイド等をはじめとした分析ニーズに対応するための環境を構築し、技術を蓄積できた。

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。

昨年度より、脂溶性成分の分離・定量のモデルとして、機能性関与成分として注目されているカロテノイド分析のための知見の蓄積、環境の構築に取り組んでおり、今年度は遊離型キサントフィルの分析について検討を継続した。

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。テトラヒドロフラン (THF) 10ml を加えてホモジナイザーで十分に均質化する。THF 5ml でシャフトを洗浄後、さらに少量の THF 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。以上の操作及び後述の試料前処理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。

2.2 けん化処理

ネジロ試験管に抽出液を採り、減圧乾固後、1ml のジエチルエーテル (0.05mg/ml BHT 含有) に溶解した。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。室温で一晩置いたのち、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 2 回繰り返す。有機溶媒層を別の試験管に移し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。

2.3 酵素処理

ネジロ試験管に抽出液を採り、減圧乾固後、1ml のアセトン (0.05mg/ml BHT 含有) に溶解した。0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH9.0) を 1.05ml、同緩衝液に溶解したコレステロールエステルゼ溶液 (100 unit/ml) を 0.15ml 添加し、試験管内を窒素置換して密栓後よく混合する。37℃で一晩置いたのち、各 2ml の n-ヘキサン及び飽和 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 2 回繰り返し返し、有機溶媒層を別の試験管に移し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。

2.4 LC 分析

Waters Alliance e2695 システムと Jasco MD-4015 PDA 検出器を用い、YMC-C30 Carotenoid カラム (φ3mm x 150mm, 3μm) を付して LC 分析を行った。測定データの取得及び解析は Jasco ChromNAV ソフトウェアにより行った。分析条件は Table 1 のとおり。

Table 1 LC 分析条件

溶離液 A	水
溶離液 B	メタノール
溶離液 C	MTBE (メチル <i>tert</i> -ブチルエーテル)
グラジエント条件	0.0 - 3.0 min ; A:4/B:86/C:10
	3.0 - 60.0 min ; A:4/C:10→90
	60.0 - 68.0 min ; A:4/B:6/C:90
流速	0.35 ml/min
カラム温度	30°C
検出波長範囲	350 - 600nm

3. 結果と考察

3.1 抽出操作の検討

抽出操作の確認のため、添加回収試験を行った。β-カロテン及び trans-beta-apo-8'-carotenal (TBAC) を均質化前に添加し、標準的な操作による損失を評価したところ、β-カロテンの回収率は 97%、TBAC の回収率は 88%程度であった。

また、抽出後のけん化処理、酵素処理についても同様に添加回収試験を行ったところ、けん化の場合に TBAC の回収率がやや低く、酵素処理の場合に β-カロテンの回収率が大幅に低くなった。分析対象の成分によって前処理法を適切に選択することが必要である。

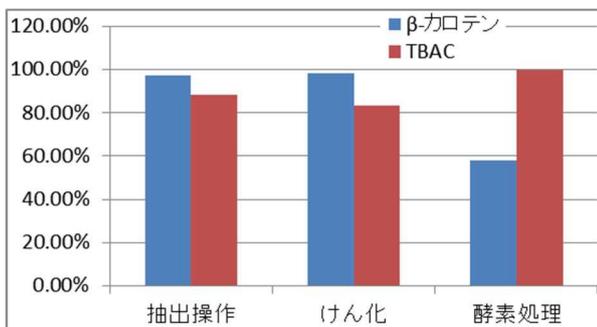


Fig. 1 カロテノイド添加回収試験の結果

3.2 カロテノイドの LC 分析条件の検討

前報では 2 溶媒系の高圧混合グラジエントの UPLC シ

ステムを用いたが、今回は 4 溶媒系の低圧混合グラジエントの HPLC システムを用いた。前報のシステムでは揮発性の高い溶媒を事前に混合調整する必要があるため、溶媒の組成が変動し、ピーク溶出時間が変動する可能性が高かったが、システムの変更により純溶媒を任意に混合することが可能となり、ピーク溶出時間の再現性が向上した。ただし、特に遊離キサントフィル等が溶出するグラジエント初期のピークは溶出時間の変動がみられるため、カラムの平衡化時間を長くとる必要がある。

PDA 検出器を使用した本システムでは、ピーク溶出時間とともに吸収スペクトルも成分同定のパラメータとすることができ、標準物質の分析結果から構築したデータベースにより誤検出の排除、成分の同定が可能となった。

3.3 実試料分析例

うんしゅうみかんの分析例を Fig. 2 に示す。抽出試料の分析(A)では複数のピークが検出されていたが、けん化(B)・酵素処理(C)により主要ピーク 1 つに集約された。このピークはβ-クリプトキサントニンと同定され、(A)で検出されたピークはこのエステル化成分と考えられた。β-クリプトキサントニンの含有量は約 1.1mg/100g で、日本食品標準成分表収載値 (1.7~1.9mg/100g) よりも低値となったが、完熟ではない個体を測定試料としたためと思われる。

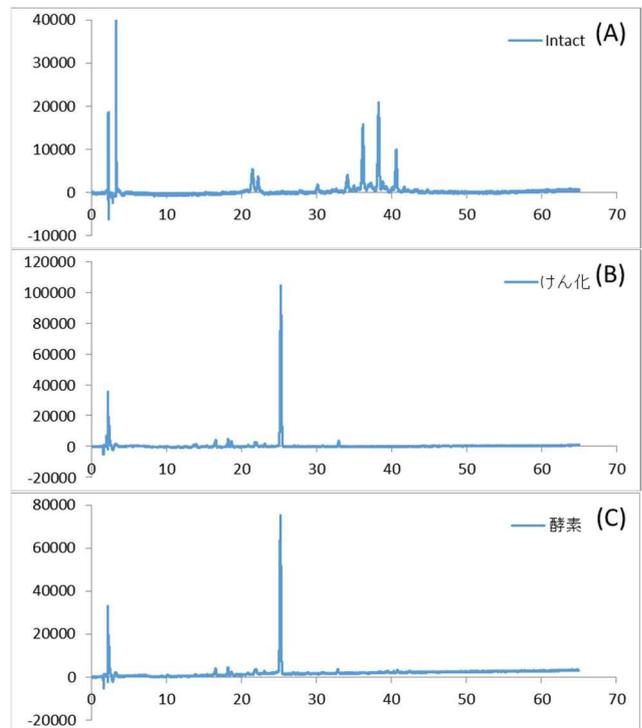


Fig. 2 実試料分析例 (うんしゅうみかん)

また、褐藻類に特有の成分として含有されるフコキサンチンの分析についても検討した。海藻類の分析例を

Fig. 3 に示した. ヒジキ原藻乾燥物, クロメ細切乾燥物について分析したところ, ヒジキでは含有量がかかなり低値であった一方, クロメでは 5mg/100g 程度の含有量となった. 褐藻類のフコキサンチン含有量を Table 2 に示したが, 乾物ではクロメの近縁種であるアラメを含む多くの褐藻類でフコキサンチンが検出されない中, 今回クロメで一定量が検出されており, 乾燥方法や保存方法等との関連を検討する必要があると思われる, 分析数を積み増す必要があると考えている.

値化に向けた取り組みに繋げていきたい.

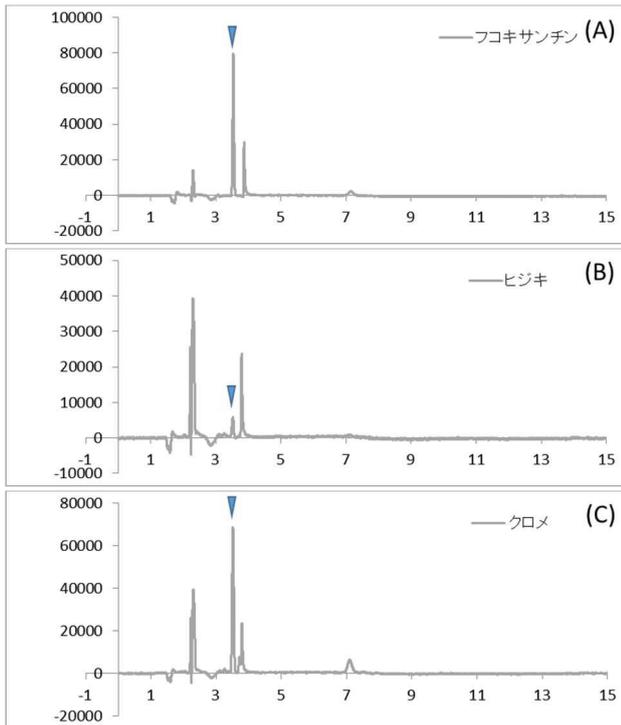


Fig. 3 実試料分析例 (褐藻類)

Table 2 褐藻類のフコキサンチン含有量 (g/100g)

	コンブ	ワカメ	アラメ	ホンダワラ	ヒジキ
生褐藻	19	11	7.5	6.5	2.2
乾物	2.2	8.4	ND	ND	ND

ND: 検出限界以下 (日本食品科学工学会誌 55-4 p. 194)

4. まとめ

標準物質を用いた添加回収試験, 同一試料からの抽出の再現性等を評価し, 測定試料の調製は十分な精度で実施できることを確認した. キサントフィルの分析にはさらに改善が必要であるが, 機能性表示食品の関与成分として届出されているカロテノイド等をはじめとした分析ニーズに対応するための環境を構築し, 技術を蓄積できたと考えられる. 今回の課題に付随して得られた知見・技術は脂溶性ビタミン等の分析にも応用可能であり, かんきつ類, 野菜類, 海藻, 椎茸などの県産品の高付加価値