

卵黄中の脂溶性ビタミン、カロテノイドの分析

江川 幸恵 ・ 馬場 強三

Analysis of the Fat-Soluble Vitamin and Carotenoids in Egg Yolk

Sachie EGAWA and Tsuyomi BABA

Key words : Egg yolk, Fat-soluble vitamin, Carotenoids

キーワード : 卵黄、脂溶性ビタミン、カロテノイド

はじめに

大村湾沿岸に繁茂するアナアオサを有効利用するため、鶏の飼料に添加する実験を行い、アオサを添加することによる卵質の付加価値を期待し、卵黄の成分検査を行った。β-カロテン、α-カロテン、クリプトキサンチン、ルテイン、ゼアキサンチンは、カロテノイドに分類される。カロテノイドの中には、β-カロテン、α-カロテン、クリプトキサンチンのように、体内でレチノール(ビタミン A)に変換されるものもある。また、ルテイン、ゼアキサンチンは眼病予防に効果があると言われている。特に、ルテインは強い抗酸化作用があり、がんの予防に関与しているとして注目されている成分である。今回、これらカロテノイドとレチノール、トコフェロール(ビタミン E)について、分析を行ったので、その分析法について報告する。

実験方法

1. 標準品及び試薬

標準品：パルミチン酸レチノール標準品(高速液体クロマトグラフ用)は和光純薬製、カロテン(β, α, γ, ζ, η, θ, ι, κ, λ, μ, ν, ξ, ο, π, ρ, σ, τ, υ, φ, χ, ψ, ω, 混合)は SIGMA 社製、トコフェロールは CALBIO CHEM 社製、ルテイン、ゼアキサンチン、クリプトキサンチンは DHI 社製を用いた。

試薬：ピロガロール、水酸化カリウム、塩化ナトリウム、酢酸エチル、n-ヘキサン、エタノール、酢酸、2-プロパノールは特級を用いた。また、移動相に用いる蒸留水、メタノール、クロロホルム、n-ヘキサンは HPLC 用を用いた。

2. 標準溶液の調整

(1)パルミチン酸レチノール約 400mg を試料と同様にけん化し、抽出した。溶媒留去後、レチノールを

2-プロパノール 100ml に溶解して標準原液とした。標準原液を 2-プロパノールで適宜希釈し、レチノール濃度で 2~3 μg/ml とし、この液について 325nm の吸光度を測定した。次式で希釈標準液のレチノール濃度を求めた。

$$\text{レチノール濃度}(\mu\text{g/ml}) = \frac{E \times 549}{100}$$

E : 希釈標準溶液の 325nm における吸光度
(対照 : 2-プロパノール・1cm セル)

(2)ルテイン、ゼアキサンチンの標準品は、エタノール溶液であったため、そのまま希釈して用いた。また、クリプトキサンチンについては、ヘキサン溶液であったため、エタノールに置換し、希釈して用いた。

(3)(β-, α-, γ-, ζ-, η-, θ-, ι-, κ-, λ-, μ-, ν-, ξ-, ο-, π-, ρ-, σ-, τ-, υ-, φ-, χ-, ψ-, ω-)カロテン混合標準品(1:2)3mg を少量のクロロホルムに溶解し、エタノールで 50ml とし、標準原液とした。

(4)(β-, α-, γ-, ζ-, η-, θ-, ι-, κ-, λ-, μ-, ν-, ξ-, ο-, π-, ρ-, σ-, τ-, υ-, φ-, χ-, ψ-, ω-)トコフェロールをそれぞれ 10mg ずつ量り、ヘキサンを加えて溶解して 50ml とし、標準原液とした。

2. 試験溶液の調製

レチノール、ルテイン、ゼアキサンチンの操作フローを図 1 に示す。また、β-カロテン、α-カロテン、クリプトキサンチンの操作フローを図 2 に、(β-, α-, γ-, ζ-, η-, θ-, ι-, κ-, λ-, μ-, ν-, ξ-, ο-, π-, ρ-, σ-, τ-, υ-, φ-, χ-, ψ-, ω-)トコフェロールの操作フローを図 3 に示す。

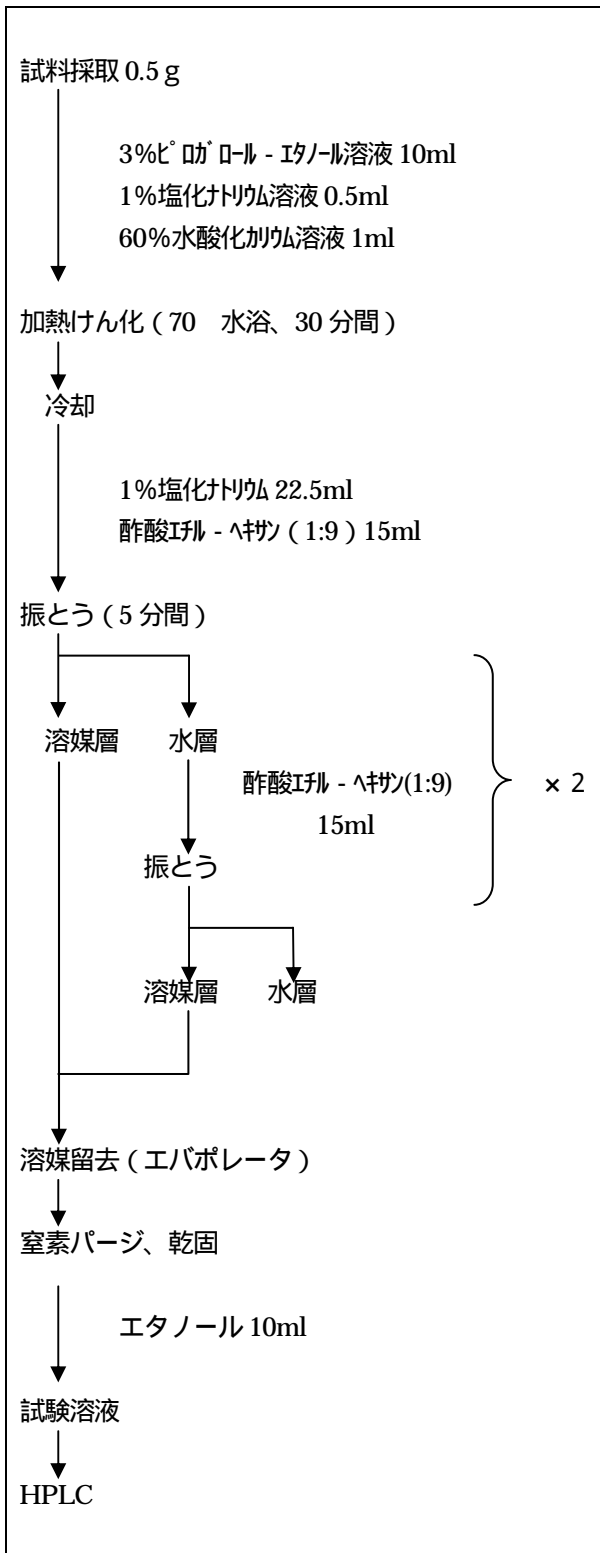


図1 レチノール、ルテイン、ゼアキサントンの操作フロー

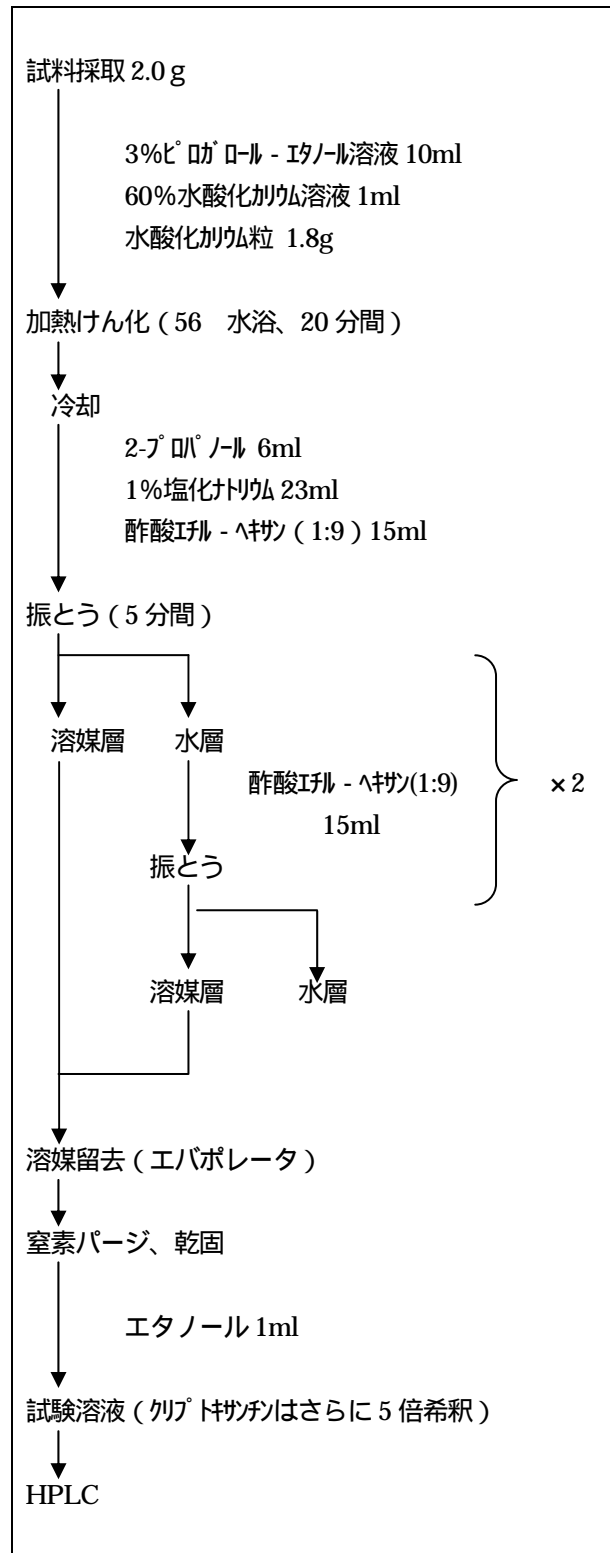


図2 β-カロテン、α-カロテン、クリプトキサントンの操作フロー

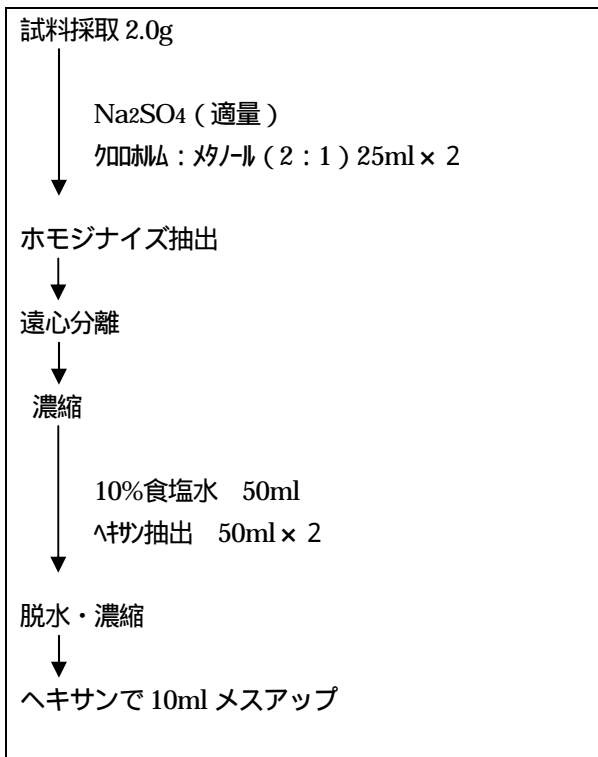


図3 トコフェロールの操作フロー

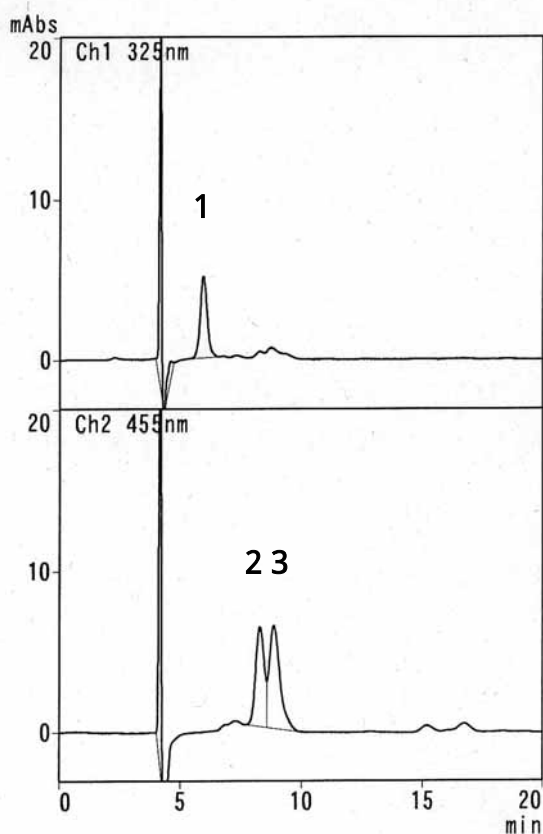


図4 卵黄サンプル

- 1. レチノール
- 2. ルテイン
- 3. ゼアキサンチン

3. 装置及び測定条件

表1に示す。

結果及び考察

1. レチノール、ルテイン、ゼアキサンチン

けん化、抽出の操作は、「五訂 日本食品標準成分表分析マニュアルの解説」のレチノールの項に準じて行った。この操作により、レチノールと同時にルテインとゼアキサンチンも抽出することができた。HPLCの測定条件は、測定時間が長くなるとピークがブロードになることや、ルテインとゼアキサンチンの保持時間が近いことを考慮して、移動相を水:メタノール(2:98)とし、流量を0.5ml/minとした。また、レチノールはUV 325nmでも確認ができた。

2. α -カロテン、 β -カロテン、クリプトキサンチン

けん化、抽出の操作は、「五訂 日本食品標準成分表分析マニュアルの解説」の α -カロテン及び β -カロテンの項に準じて行った。 α -カロテン、 β -カロテンと同時にクリプトキサンチンも抽出することができた。卵黄中の α -カロテン、 β -カロテンの濃度が低かったため、クリプトキサンチンと同時に測定することが出来なかった。そのため、クリプトキサンチンは、 α -カロテン、 β -カロテンを測定した試験溶液を5倍希釈して測定した。HPLCの測定条件は、サンプルの測定時に455nmでは妨害ピークと重なっていたため、490nmで測定することとした。

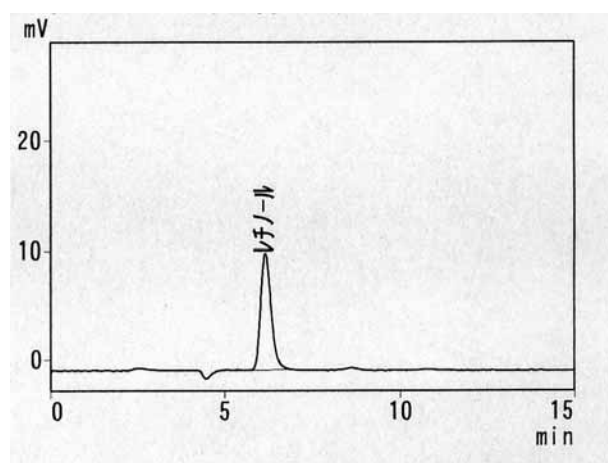


図5 レチノール標準品 0.5ppm
(励起波長 340nm、蛍光波長 460nm)

表1 装置および測定条件

	レチノール、ルテイン、ゼアキサチン	-カロテン、 β -カロテン、クリプトキサチン	(α -、 β -、 γ -、 δ -) トコフェロール
HPLC 装置	(株)島津製作所製 LC-10ADvp	(株)島津製作所製 LC-10ADvp	(株)島津製作所製 LC-10ATvp
カラム	Inertsil ODS-3V (4.6×150mm)	Inertsil ODS-3V (4.6×150mm)	Finepak SIL NH2-10 (4.6×250mm)
移動相	水：メタノール (2：98)	クロロホルム：メタノール (4：96) 50 μ g/ml のパルチン酸アスコルビル含有	n-ヘキサン：2-プロパノール：酢酸 (1000：6：5)
カラム温度	40	40	40
流速	0.5ml/min	1.0ml/min	1.2ml/min
測定波長	レチノール：F 340/460nm ルテイン、ゼアキサチン ：UV 455nm	UV 490nm	F 298/325nm

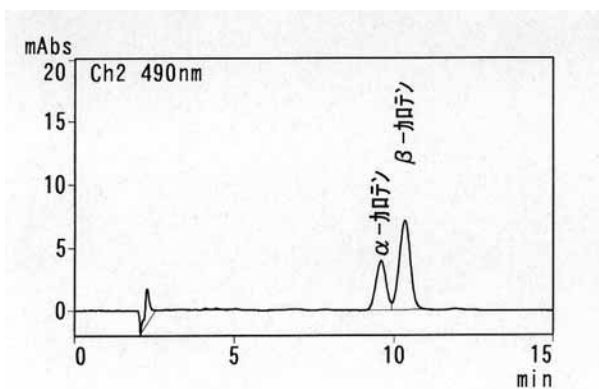


図6 α -カロテン 2ppm、 β -カロテン 4ppm 標準品

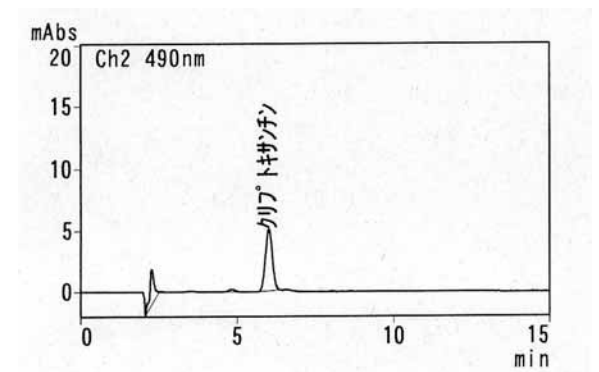


図7 クリプトキサチン標準品 0.85ppm

3. トコフェロール

卵黄からクロロホルム・メタノール混液で脂質を抽出し、けん化をせずに直接 HPLC で測定した。また、これによる卵黄成分からの妨害はなかった。

4. 添加回収試験

添加回収試験の結果を表2に示す。ルテイン、ゼアキサチン、クリプトキサチンについては、標準品の量が少なく高価であったためn=1しか行えなかった。レチノールとルテインの回収率が100%を超えて高めに出了が、その他のものは良好な結果であった。

表2 添加回収試験結果

	回収率 (%)
レチノール	120% (n=3)
ルテイン	118% (n=1)
ゼアキサチン	90% (n=1)
クリプトキサチン	86% (n=1)
α -カロテン	91% (n=3)
β -カロテン	85% (n=3)

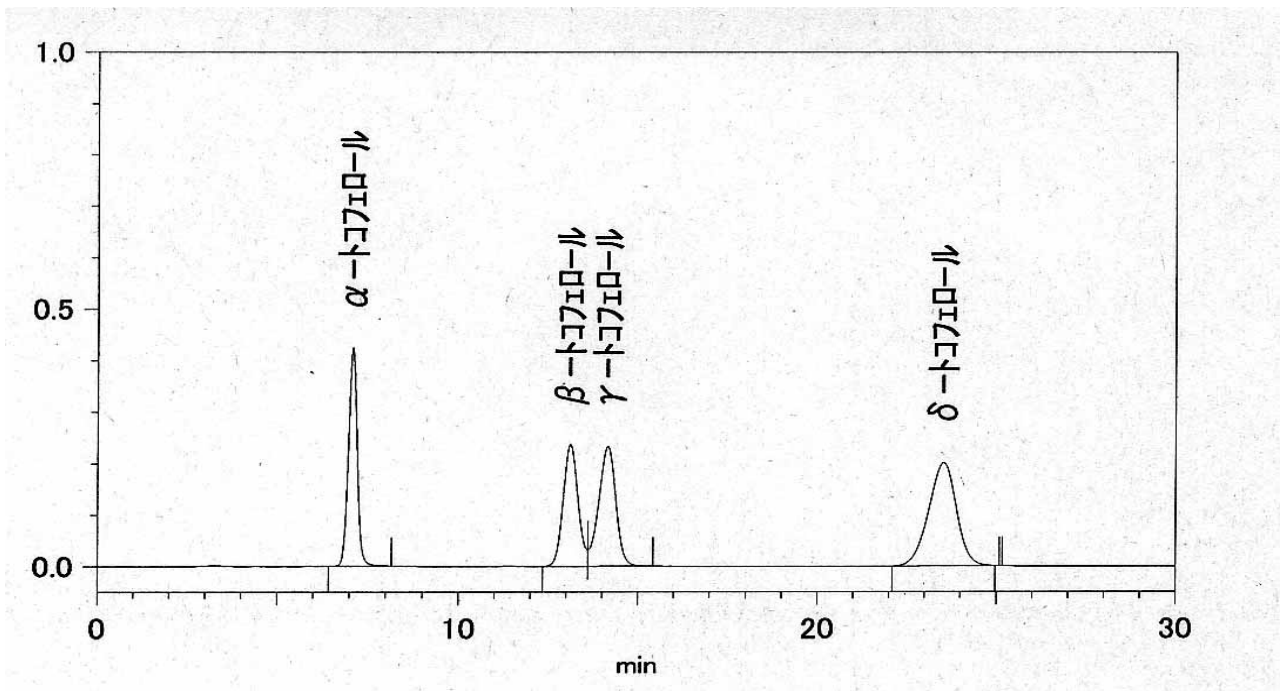


図8 トコフェロール標準品 各 10ppm

まとめ

今回、卵黄の成分検査を行うため、レチノール、ルテイン、ゼアキサンチン、クリプトキサンチン、 β -カロテン、 γ -カロテン、(α 、 β 、 γ 、 δ)トコフェロールについて測定を行った。卵黄は比較的操作しやすかったが、測定する食品によっては、精製操作が必要となってくる。最近、ビタミン類等と強化した機能性食品が多く、いろいろな種類の食品が出回っている。今後、そのような食品を検査する際に、今回検討した分析法を活用できると思われる。

参考文献

- 1) 財団法人日本食品分析センター編集；分析実務者が書いた 五訂 日本食品標準成分表分析マニュアルの解説
- 2) 社団法人日本食品衛生協会；食品衛生検査指針(理化学編) 1991、厚生省生活衛生局監修
- 3) 日本薬学会編；衛生試験法・注解 2000