

ハウレンソウルテインの分析方法

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 石川(高野) 祐子

【はじめに】

ルテインは、陸上に生育する植物の葉緑体に共通して含まれる主要なカロテノイドの一種である。 $C_{40}H_{56}O_2$ の分子式(図1)で表され、水酸基を有することからキサントフィルに分類される。高い抗酸化能を持ち、一重項酸素消去活性を示す(一重項酸素消去活性: Singlet oxygen absorption capacity: SOAC 値: $73.8 \text{ mol/L } \alpha$ -トコフェロール相対値¹⁾)ことが知られている。食品中では、トウモロコシや緑黄色野菜のケールやハウレンソウ、果物ではキウイフルーツやブドウに多く含まれ²⁾、近年、視覚機能に関する主観的評価の一部や、白内障や加齢黄斑変性³⁾などの眼病予防に有効であるとされている。

ハウレンソウに含まれるルテインの定量分析は、分析委託機関をはじめ国立研究開発法人⁴⁾、大学、地方公設試等においても実施されているが、平成28年12月現在でも公定法は定められておらず、分析を担当する機関によって手法が異なることから、定量した結果を相互比較することは難しい。

平成27年4月に施行された機能性表示食品制度において、農産物のような生鮮食品についても機能性表示が認められるようになった。そこで、生鮮食品であるハウレンソウにおいても機能性表示に向けた取り組みが進んでいるが、科学的根拠に基づいた機能性を表示するには、ハウレンソウを用いた臨床試験もしくはシステムティックレビュー⁵⁾による評価と、機能性関与成分の定量分析方法、さらに成分濃度の個体差を濃度範囲として明らかにしておく⁶⁾ことが必要である。そのため、ハウレンソウの機能性関与成分であるルテインについても妥当性確認^{*}された分析方法の確立が望まれている。

ハウレンソウの機能性表示にかかるルテインの定量分析法としては、「平成27年度農林水産業の革新的技術展開事業」(農林水産省)により岩手・宮城の両県で取り組まれた「ハウレンソウ等のルテインの機能性表示に向けた実証研究」においてレチノール分析の公定法を参考に確立された方法が広く利用されていることから、このルテイン分析法を元に、2018年度内には独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)において、分析方法の統一と室間共同試験による妥当性確認が行われる予定である。

本稿では、この実証研究により確立されたルテイン分析方法⁷⁾を記載する。

(*妥当性確認とは: その分析方法に基づき誰がどこで測定しても、結果が一定の範囲内に収まることを実証すること⁸⁾(農林水産省消費安全技術センターHPより)

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- ・高速液体クロマトグラフ装置(紫外可視部吸収検出器およびカラムオーブンを有するもの。オートサンプラーがあれば望ましい。)
- ・食品用ミキサーまたはフードプロセッサー(液体・ペースト状の試料を取り扱えるもの)
- ・電子天秤
- ・振とう器(50ml遠心チューブが固定できる温調機能付振とう器が望ましい)
- ・ロータリーエバポレーターまたは遠心エバポレーター
- ・褐色ナス型フラスコ、遠心エバポレーターを使用する場合は、褐色ガラス遠沈管

- 50ml 遠心チューブ（ポリプロピレン製やガラス製など）
（GLサイエンス社、ポリプロピレン製分解チューブ DigiTUBEs 50ml 用、8520-50204 ラックロック機能 キャップ 付が推奨されている）
- HPLC 試料濾過用フィルター：0.45 μm 以下の孔径、フィルターサイズは 4mm もしくは、13~15mm。水系（PVDF 膜など）、あるいは YMC Duo-Filter のように水系/非水系のどちらでも利用できるもので、ルアーロックタイプの接続が使いやすい
- 吸光分光光度計
- 保護メガネ、手袋（アルカリ溶液を使用するため、保護用具は必須）

2. 試薬

- 1) ルテイン：分析用標品（ChromaDex, Inc.（和光純薬工業(株)取り扱い）など）
- 2) ピロガロール（特級）
- 3) 水酸化カリウム（特級）
- 4) 塩化ナトリウム（特級）
- 5) 酢酸エチル（特級）
- 6) n-ヘキサン（特級）
- 7) エタノール（特級）
- 8) メタノール（高速液体クロマトグラフ用）
- 9) アセトニトリル（高速液体クロマトグラフ用）
- 10) 2-プロパノール（高速液体クロマトグラフ用）

3. 調合・調製

- 1) ルテイン分析用標品：ルテイン分析用標品は、試薬瓶開封後すぐに全量をエタノールに溶解し、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整、褐色ガラスバイアル等に分注したものを標準原液として-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。標準原液は、使用時にエタノールで 0.1 から 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で 3 点以上の濃度に調整し（例：0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）各々 445nm の吸光度を測定する。次式で希釈標準液のルテイン濃度を求め、濃度補正を行う。
ルテイン濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $A \div 2550 \times 10000$

A：希釈標準溶液の 445nm における吸光度（対象：エタノール 1cm セル）

2550：ルテインのエタノール溶液の吸光係数

- 2) 3%(w/v)ピロガロール・エタノール溶液：試料破碎用
エタノール 100ml に対し、3 g のピロガロールを溶解する。用時調製。
- 3) 60%(w/v)水酸化カリウム溶液：試料ケン化用
超純水 100ml に対し、60 g の水酸化カリウムを溶解する。溶解時発熱するので注意。アルカリ溶液のため、皮膚についたり、目に入ったりしないよう、保護器具を使うこと。
- 4) 1%(w/v)塩化ナトリウム溶液：試料抽出用
超純水 100ml に対し、1 g の塩化ナトリウムを溶解する。
- 5) 1:9(v/v)酢酸エチル-n-ヘキサン混液：試料抽出用
- 6) HPLC 分析条件
 - カラム：逆相型 C30 カラム及びガードカラム

(例：野村化学 Develosil XGC-30M 5 μ m 4.6 \times 250mm または 3 μ m 4.6 \times 150mm など)

- ・カラム温度：40℃
- ・移動相 (アイソクラティック)：アセトニトリル：メタノール(3:2 v/v)
(注：ピーク分離が悪い場合、アセトニトリルの割合を増やすと改善される)
- ・移動相流速：1ml/min
- ・検出波長：450nm
- ・注入量：20 μ l
- ・その他：測定中、適宜 2-プロパノール-メタノール (4:1 v/v) を 30 分程度送液し、カラムを洗浄することが望ましい。

【プロトコール】

1. ホウレンソウ試料のサンプリング

ルテインを関与成分とするホウレンソウの機能性表示を行うためには、最初に述べたように、加工食品に比べ成分濃度の個体差が大きいため、成分濃度に個体差があることを前提として、適切な表示を行うための科学的な対応が求められる。そのため、表示を行おうとする食品を特徴づける要因を具体的に組み合わせ (品種、栽培地 (生産者)、栽培方法、出荷期間など)、表示使用とする食品の代表となる根拠を持った試料をサンプリングする必要があるため、前述の「農林水産技術会議事務局、農林水産物の機能性表示に向けた技術的対応について」⁶⁾を参照すること。

ホウレンソウ試料の採取については、岩手県・宮城県の方法としては、1 棟のハウスまたは 1 圃場から 3 株を 1 群として 3 群をかたよりなく採取するとしている。群馬県では 1 処理区につき 10 株以上⁹⁾という報告がある。いずれにおいても、ハウスや圃場、処理区を代表できるような試料のサンプリングが必要になるが、分析点数を鑑み、株を縦方向に分割するなどの縮分処理を行い、均質化をはかることが望ましい。

2. 試料の採取と前処理

1) 試料の採取

ホウレンソウ試料は、根や枯れた葉、下葉等を取り除き、通常の出荷形態と同じように調製する。分析時までには乾燥を防ぎ、低温で保管することが望ましい。また、すぐに分析ができない場合には、-20℃以下の冷凍状態で保存する。

2) 試料の均質化

a. 生もしくは凍結ホウレンソウ試料を 1cm 程度に細かく包丁で刻み、均質になるようよく混合した後、25 g をとり、フードプロセッサーでペースト状に破碎する。

b. 生もしくは凍結ホウレンソウ試料を 1cm 程度に細かく包丁で刻み、均質になるようよく混合した後、25 g をとり、3 倍容量以上の 3%(w/v)ピロガロール・エタノールを加え、総重量を測定後、ミキサーで液状に破碎する。

いずれの方法でも良いとしているが、ピロガロール・エタノール処理の方が破碎しやすい。

3. ルテインのケン化処理と抽出

1) ケン化処理

a の試料約 0.5g または b の試料約 1ml (よく転倒混合した後に取る) を 50ml 遠心チューブに量り取り、10ml の 3%(w/v)ピロガロール・エタノールと 1ml の 60%(w/v)水酸化カリウム溶液を加え、攪拌しながら 60℃で 15 分加熱する。

2) 抽出

1%(w/v)塩化ナトリウム溶液 22.5ml、酢酸エチル-n-ヘキサン混液 (1:9 v/v) 15ml を加

え、室温で5分振とうし、遠心分離後上清を褐色ナス型フラスコまたは、褐色ガラス遠沈管に移す。

水層に酢酸エチル-n-ヘキサン混液(1:9 v/v) 15mlを加え抽出を繰り返す操作をさらに2回繰り返し、計3回抽出する。

3) 溶媒留去、測定試料の作成

抽出液の溶媒をロータリーエバポレーターを用いて、40℃で減圧留去する。あるいは、遠心エバポレーターを利用しても良い。溶媒粒去後、残留物にエタノールを加えて溶解し、メスフラスコを用いて10mlまたは50mlに定容し測定試料とする。測定試料は分析前に0.45µmのフィルターで濾過してから、20µlを高速液体クロマトグラフに注入し、ルテインのピーク面積を測定する。ルテイン標準液についても同様に測定し、検量線を作成する。

4. ルテイン含量の計算

試料中のルテイン含量については、以下の式を用いて計算する。

$$\text{ルテイン濃度(mg/100g)} = L \times V \times N \div W \times 100$$

L: 検量線より求めた試験溶液中のルテイン濃度(µg/ml)

V: 試験溶液量(ml)

N: 希釈倍率

W: 試料重量(使用した元の資料の重量)

【プロトコルのポイント・注意点】

- ルテインは酸化変性しやすいことから、抽出操作などの際には、直射光を避け、できるだけ弱光下でおこなうことが望ましい。また、抽出後は光や温度による異性化、酸素による酸化、重合、分解などを受けやすくなるので、速やかに分析すること。また、分析用標品のHPLC分析を行うと、購入直後であっても複数のピークが確認されたり、ピーク形状がゆがんだりする場合がある。その際には、3-2)の抽出操作を行うことにより、ルテインの分解物を除くことができる場合もある。また、分注して保存した分析用標品が保存中に劣化することもあるので、購入時や濃度補正を行う前にHPLC分析によるチェックを行うことが望ましい。
- 標準原液は褐色ガラスバイアル等に小分け(可能であれば窒素充填)して凍結保存し、開封したものは速やかに使い切りとすること。
- 標準原液は、希釈前に完全に室温に戻して、析出がないことを確認してから使用する(暗所で37℃、10分保温後に使用すると良い)。

【おわりに】

ハウレンソウのルテイン分析については、脂質類に対するカロテノイドの含量が高いことから、他の品目と異なりケン化処理を要しないという報告⁴⁾もある。しかし、脂質類の妨害が問題となる場合は、ケン化処理を行い、脂質を除くことが望ましい¹⁰⁾ことから、現在室間共同試験の準備を進めているプロトコルに従った。

ハウレンソウのルテイン分析法の検討に当たり、「ハウレンソウのルテイン機能性表示に向けた手引き」を参照させていただきました、宮城県農業・園芸総合研究所をはじめ各所に御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) K. Aizawa et. al, Development of Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Assay Method. 2. Measurements of the SOAC Values for Carotenoids and Food Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59 (8), pp 3717–3729
- 2) O. Sommerburg, J. Keunen, A. Bird, and F. J G M van Kuijk, Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes, *Br J Ophthalmol.* 82(8), 907–910(1998)
- 3) S. Fujimura, K. Ueda, Y. Nomura, Y. Yanagi, Preliminary analysis of the relationship between serum lutein and zeaxanthin levels and macular pigment optical density. *Clin Ophthalmol.* 10, 2149-2155. (2016)
- 4) 渡辺満、清水恒、ホウレンソウのカロテノイド組成と分析条件の検討、
www.naro.affrc.go.jp/org/tarc/to-noken/DB/DATA/065/065-199.pdf
- 5) 農研機構 機能性をもつ農林水産物・食品開発プロジェクト 農産物 9 品目の研究レビュー (届出様式作成例)http://www.naro.affrc.go.jp/project/f_foodpro/2016/063236.html
- 6) 農林水産技術会議事務局、農林水産物の機能性表示に向けた技術的対応について、
http://www.s.affrc.go.jp/docs/kinousei_pro/reference.htm
- 7) 宮城県農業・園芸総合研究所他、ホウレンソウのルテイン機能性表示に向けた手引き、25-31(2016)
- 8) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC)
http://www.famic.go.jp/technical_information/
- 9) 農林水産省食品総合研究所編、野菜の品質評価法 (IV)、P181(1985)
- 10) 高市真一、色素の分析-カロテノイドの分析、低温科学、67, 347-353(2009)