

## ルテイン含有飲料のルテインの定量法

## ①装置

高速液体クロマトグラフ

紫外可視分光光度計

## ②標準溶液の調製

ルテイン試薬 (LUTEIN Reference 0306 S, EXTRASYNTHESE) 約 4 mg を dl- $\alpha$ -トコフェロール及びブチルヒドロキシトルエン各々 0.05 g/L 含有のアセトンに溶解し、100 mL 容全量フラスコに移し入れて定容し標準原液とする。

標準原液の一部を取り、溶媒を留去し窒素ガスで乾固させた後、ルテイン濃度 1~2  $\mu$ g/mL 程度となるように一定量のエタノールに溶解し、濃度算出用溶液とする。

以下、2 法によりルテイン標準原液の濃度を算出する。

**第一次標準物質 HPLC 法**

濃度算出用溶液及びルテイン標準液 (DHI Institute of Water and Environment, 以下 DHI 社) を下記条件の HPLC に供し、以下の式によりルテイン標準原液濃度を算出する。

## &lt;高速液体クロマトグラフ操作条件&gt;

- ・検出器：紫外可視検出器
- ・測定波長：445 nm
- ・カラム：YMC Carotenoid (粒径 5  $\mu$ m, 内径 4.6 mm×長さ 250 mm, 株式会社ワイエムシイ)
- ・カラム温度：40  $^{\circ}$ C
- ・移動相：メタノール及び水の混液 (96:4)
- ・流量：1.0 mL/min
- ・注入量：30  $\mu$ L

$$\text{ルテイン標準原液濃度 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{AreaS}}{\text{AreaD}} \times \text{DHI 社ルテイン濃度}^*1 (\mu\text{g/mL}) \times N$$

AreaD : DHI 社総ピーク面積

AreaS : 濃度算出用溶液の trans ルテインピーク面積

N : 希釈率

\*1：当該品の「CERTIFICATE OF ANALYSIS」における「Concentration」の値

ルテイン濃度算出方法：吸光光度法\*2

吸光係数： $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2550$

測定波長：445 nm

対照：エタノール

\*2：出典

Edited by S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura and S. W. Wright, *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, UNESCO Publishing, 2005.

#### 吸光光度法

濃度算出用溶液の 445 nm における吸光度を測定し、ルテインの吸光係数： $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2550$ \*3 を用いて濃度を求め、これよりルテイン標準原液濃度を算出する。

$$\text{ルテイン標準原液濃度 } (\mu\text{g/mL}) = \frac{A}{2550} \times 10000 \times N$$

A：吸光度(445 nm)

N：希釈率

\*3：出典

・ Edited by J. Christopher Bauernfeind, *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*, ACADEMIC PRESS, United States of America, 1981, p. 903.

・ Edited by Paul Karrer and Ernst Jucker, *Carotenoids*, Elsevier, 1950.

・ Yokoyama Henry, Vandercook Carl E., *Citrus Carotenoids. I. Comparison of Carotenoids of Mature-Green and Yellow Lemons*, *Journal of Food Science*, 32(1), p. 42-48, (1967).

・ Strain, H. H., *LEAF XANTHOPHYLLS*, *American Association for the Advancement of Science*, 83(2149), p. 241-242, (1936).

・ Kleinig, H., Egger, K., *CAROTENOIDS OF Vaucheriales Vaucheria ad Botrydium (Xanthophyceae)*, *Zeitschrift für Naturforschung. Teil B*, 22, p. 868-872, (1967).

第一次標準物質 HPLC 法と吸光光度法によって算出したルテイン標準原液濃度を比較し、過大評価を避けるため濃度が低い方法を採用する。

ルテイン標準原液の濃度決定に採用した方法

第一次標準物質 HPLC 法

吸光光度法

標準原液の一部を取り、溶媒を留去し窒素ガスで乾固させた後、ヘキサン及びアセトンの混液（81:19）に溶解、希釈してルテイン濃度 0.01~3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の溶液を調製する。

### ③試験溶液の調製

試料約 2 g を 100 mL 容白色全量フラスコに精密に量りとり、ピロガロール 2 g を加え、ルテックスミキサーでよく混合する。HAET 混液\*<sup>4</sup> 40 mL を加えて振り混ぜ、エタノールで 100 mL に定容し、超音波槽中に 10 分間放置した後一夜暗所に静置する。この溶液 10 mL を 100 mL 容なす形フラスコに入れ、イオン交換水 1 mL、HAET 混液（1 g/L ブチルヒドロキシトルエン含有）20 mL 及び 400 g/L 水酸化カリウム-メタノール溶液 4 mL を加え、56  $^{\circ}\text{C}$  の水浴中で 30 分間加熱してけん化する。冷却後 300 mL 容分液漏斗に移し、HAET 混液（1 g/L ブチルヒドロキシトルエン含有）30 mL 及び 30 g/L 無水硫酸ナトリウム溶液 40 mL を加え、振とう抽出する。水層を別の 300 mL 容分液漏斗に移し、HAET 混液（1 g/L ブチルヒドロキシトルエン含有）30 mL を加え振とう抽出する。全有機溶媒層を 300 mL 容分液漏斗に合わせ、30 g/L 塩化ナトリウム溶液 50 mL を加えて振とうし、水層を捨てる。さらにイオン交換水 50 mL を加えて振とうし、水層を捨てる操作を数回繰り返す。有機溶媒層を 100 mL 容なす形フラスコに取り、溶媒を減圧留去後ヘキサン及びアセトンの混液（81:19）8 mL を加えて残渣を溶解し、試験溶液とする。

\*4 HAET 混液：ヘキサン、アセトン、エタノール及びトルエンの混液（10:7:6:7）

### ④測定

下記の高速液体クロマトグラフ操作条件で、ルテイン標準溶液及び試験溶液のクロマトグラムを得る。

#### <高速液体クロマトグラフ操作条件>

- ・検出器：紫外可視検出器
- ・測定波長：450 nm
- ・カラム：Luna Silica (2)（粒径 3  $\mu\text{m}$ ，内径 4.6 mm×長さ 150 mm，Phenomenex）
- ・カラム温度：30  $^{\circ}\text{C}$
- ・移動相：ヘキサン及びアセトンの混液（82:18）
- ・流量：1.2 mL/min
- ・注入量：30  $\mu\text{L}$

## ⑤ルテイン含有量の計算方法

ルテイン濃度とピーク面積との関係を表す検量線を作成し、検量線から試験溶液中のルテイン濃度を算出し、下式により含量を求める。

$$\text{含量 (mg/100g)} = C \times V \times N \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W}$$

C：試験溶液中のルテインの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

V：定容量 (mL)

N：希釈率

W：試料採取量 (g)

## 分析方法の名称について

本資料においては分析方法の名称が「ルテイン含有飲料のルテインの定量法」となっておりますが、この分析方法を用いて、届出食品である「Dole Handy Charge Berry Mix（ドール ハンディチャージ ベリーミックス）180g」中のルテインを定量・定性いたします。