

報文

HPLCによるヒト血清カロテノイドの分析

和田 孝¹、伊藤伸一¹、湯浅義三¹、眞岡孝至^{2,*}¹ (社) 京都微生物研究所 (〒607-8646 京都市山科区上花山久保町 16-2)² (財) 生産開発科学研究所 (〒606-0805 京都市左京区下鴨森本町 15)

*著者連絡先 E-mail: maoka@inbox.kyoto-inet.or.jp

(受取日: 2006年11月20日、受理日: 2007年1月15日)

要旨: ヒト血清に含まれるカロテノイドのHPLCによる分析方法について検討した。まずヒト血清中に含まれるすべてのカロテノイドが35分以内に溶出し、lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene および lycopene の主要な6成分とそれらの *cis* 異性体が十分に分離される条件について検討した。その結果、カラムに Vydac RP18 (201TP54) を、溶離液として [メタノール/テトラヒドロフラン (95:5)] / 水 (99:1) (体積比) を用いる系 (システム1) で良好な結果が得られた。本システムは操作がシンプルで短時間に多くの検体を分析できるため、住民検診や疫学調査などのルーチン分析に適する。次にシステム1で十分に分離されなかった astaxanthin や ϵ, ϵ -carotene-3,3'-dione などのキサントフィル類の分析に適した系を検討した。Inertsil ODS-P をカラムにメタノール/テトラヒドロフラン/水からなる2種の溶離液 (溶離液Aと溶離液B) をグラジエントさせる系 (システム2) で lutein の微量代謝物を含めて分析できる良好な結果が得られた。

キーワード: カロテノイド、血清、HPLC

1. はじめに

カロテノイドは微生物、植物、動物界に広く分布する赤、橙、黄色を呈する天然色素で、天然には700種以上の存在が知られている[1, 2]。カロテノイドは炭素と水素原子からのみ構成されるカロテン類と分子内に酸素原子を含むキサントフィル類に分類される。ヒトは体内でカロテノイドを生合成する事はできないので、体内に存在するカロテノイドはすべて経口で摂取されたものに由来している。カロテノイドのヒトに対する生理的機能として β -carotene など β -end group を持つ一部のカロテノイドがビタミンAの前駆体 (プロビタミンA) である事が古くから知られていた。しかし、lutein な

ど食物中に広く存在するキサントフィル類の機能については長い間不明であった。1980年代の始めに、緑黄色野菜の摂取が発がんのリスクを軽減する事が多くの疫学調査によって明らかにされ[3, 4]、その結果、緑黄色野菜や果物などに含まれるカロテノイド、特に lutein、zeaxanthin、 β -cryptoxanthin などのキサントフィル類の発がん予防効果が注目されるようになった。さらに、カロテノイドは強い抗酸化活性を示す事から、活性酸素やフリーラジカルに起因する様々な生活習慣病に対する予防効果に関心が持たれている[5]。

微生物、植物や動物に含まれるカロテノイドの研究は古くから行われていた。一方、ヒトの

血液や組織に含まれるカロテノイドの研究は血液や組織のサンプルが微量にしか得られないため、その分析には高感度の HPLC などの分析機器が必要であり 1980 年代以降になりいくつかの報告が出されるようになった。1983 年に Nelis と De Leenheer [6] はオクタデシルシラン (ODS) をカラムに用いる HPLC によりヒトの血清中には lutein、zeaxanthin、 β -cryptoxanthin、 α -carotene、 β -carotene、および lycopene の 6 種のカロテノイドが存在する事を初めて明らかにした。それ以来、ヒトの血清、血漿、組織などに含まれるカロテノイドの分析が様々な系による HPLC によって行われている [7-15]。その結果、ヒトの血液、肝臓、副腎、睾丸、卵巣、皮膚、脂肪組織などには主に β -carotene、 α -carotene、lycopene、lutein、zeaxanthin、 β -cryptoxanthin の 6 種のカロテノイドが含まれこれらで総カロテノイドの 90% 以上を占める事が明らかになった [7-15]。さらに Khachik らは食物中に存在するカロテノイドとそれを摂取したヒトの血漿 [13, 14]、血清 [14] および母乳 [15] に含まれるカロテノイドについて詳細な検討を行った。その結果、ヒトが日常摂取する食物中には 50 種あまりのカロテノイドが含まれており、それを食べたヒトの血液中には食物から吸収された 21 種類のカロテノイドに加えて、ヒトの体内で lutein や zeaxanthin から代謝変換された ϵ, ϵ -carotene-3,3'-dione、3-hydroxy- β, ϵ -caroten-3'-one、3-hydroxy- ϵ, ϵ -caroten-3'-one などの代謝生成物が存在する事を報告している。

カロテノイドのがんや生活習慣病の予防効果について、様々な動物実験や培養細胞を用いた研究が行われ多くの成果が出ている [5]。しかし、ヒトでの効果を検証するためには疫学的研究が欠かせない [16-18]。疫学的研究では緑黄色野菜や果物などの食習慣の調査と共にヒトの血液 (血清、血漿) に含まれる上記 6 種の

カロテノイドの血中濃度を知る事は重要である。疫学的研究では住民検診などの際に集められた多数の血液サンプルからこれらのカロテノイドを迅速に再現性良く分析する必要がある。そこでこの研究目的に合ったシンプルで迅速かつ再現性と安定性の高い分析方法を検討した。

また、近年 lutein や astaxanthin などのキサントフィル類の生理作用が注目されサプリメントとしても服用されている。サプリメントとして服用したキサントフィル類の体内動態を知るとは製品の安全性、有効性を検証する上で重要である。特に lutein は、ヒト体内で ϵ, ϵ -carotene-3,3'-dione、3-hydroxy- β, ϵ -caroten-3'-one、3-hydroxy- ϵ, ϵ -caroten-3'-one などに代謝されるので lutein の体内動態を知るにはこれらの代謝産物もあわせて分析する必要がある [13-15]。また astaxanthin はカロテノイドのなかでも特に強力な抗酸化作用を持つ化合物 [19] でガンや生活習慣病予防のため注目されているがヒト体内の動態はあまり明らかになっていない。そこでこれらのキサントフィル類の分析に適した系の検討も行った。本論文ではこれらのカロテノイドの HPLC による分析方法の開発と日本人の血液に含まれるカロテノイドについて検討した結果について報告する。

2. 実験方法

2.1. 分析機器

高速液体クロマトグラフはオートサンプラー、ポンプ、カラムオープン、デガッサー、紫外-可視部 (UV-Vis) 検出器から構成される HP-1100 シリーズ HPLC システム (Hewlett-Packard 社) を用いた。クロマトグラムは 480 nm の波長をモニターした。フォトダイオードアレー (PDA) 検出器によるカロテノイドの UV-Vis スペクトルの測定は本システムに SPD-M10AVP フォトダイオードアレー検

出器（島津製作所）を接続し、250 nm から 600 nm の吸光スペクトルを測定した。

2.2. 試薬

メタノール、テトラヒドロフラン、エタノールおよびクロロホルムは HPLC 用試薬（和光純薬）を、ヘキサンは残留農薬 PCB 試験用試薬（和光純薬）を、2,6-ジブチルヒドロキシトルエンは特級試薬（和光純薬）を、水は水道水を NANO Pure II（Barnstead 社）を用いて精製したものをを用いた。

2.3. クロマトグラフィーの条件

システム 1 : カラムに Vydac RP18 (201TP54) 5 μ m (4.6 i.d. \times 250 mm) (Hesperia 社) を、溶離液に [メタノール/テトラヒドロフラン (95:5)] / 水 (99:1) (体積比) をそれぞれ用い、カラム温度 20°C、溶離液の流速 0.8 mL/min で分析を行った。

システム 2 : カラムに Inertsil ODS-P 5 μ m (4.6 i.d. \times 250 mm) (ジーエルサイエンス社) を用いカラム温度 25°C、溶離液の流速 1 mL/min で分析を行った。溶離液は溶離液 A [メタノール/テトラヒドロフラン (95:5)] / 水 (95:5) (体積比) と溶離液 B [メタノール/テトラヒドロフラン (95:5)] / 水 (99:1) (体積比) を以下の条件で混合して用いた。溶離液のグラジエント ; 0 分から 38 分まで A 液のみ、38 分から 43 分まで A 液 100% から B 液 100% へリニアグラジエント、43 分から 80 分 B 液のみ。

2.4. 血液サンプル

成人男子から採血した血液をサンプルとして用いた。また、血液中の astaxanthin の分析は astaxanthin を 1 mg 含有する市販のサプリメント (*Haematococcus* 抽出物) を 1 カプセル服用した成人男子の血液を服用後 2 時間おきに 10 時間後まで経時的に採血したものをサンプル

に用いた。いずれの場合も 10 mL の血液を採取し 15 分間放置した後 2,500 rpm (1,220 \times g) で 5 分間遠心分離して血清を得た。この血清をカロテノイド分析に供した。なお、ヒト血液の扱いについてはヘルシンキ宣言の精神に沿って行った。

2.5. ヒト血清からカロテノイドの抽出

ヒト血清 300 μ L に水 1 mL と内部標準物質 (β -apo-8'-carotenal) 0.25 μ g および 2,6-ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を 50 μ g 含有するエタノール 1 mL を加え混和した後、ヘキサン 5 mL を加え 20 分間振とうした。その後 3,000 rpm (1,464 \times g) で 10 分間遠心分離して得られたヘキサン層 4 mL を窒素気流下で溶媒を留去して乾固した。これにクロロホルム/エタノール (1:19) 混液 100 μ L を加え溶解しその 40 μ L を HPLC に供した。なお、血清は -80°C で保存した。

2.6. カロテノイド標品

β -carotene、lutein、lycopene、および astaxanthin は Sigma Aldrich 社から、zeaxanthin と β -cryptoxanthin は フナコシ から、 β -apo-8'-carotenal は Fluka 社から購入した物をそれぞれ用いた。 α -carotene はライオン社から供与されたものをを用いた。 ϵ,ϵ -carotene-3,3'-dione、3-hydroxy- ϵ,ϵ -caroten-3'-one と 3-hydroxy- β,ϵ -caroten-3'-one は鶏卵から [20]、それぞれ抽出、分離した。anhydrolutein I と anhydrolutein II は lutein の脱水反応 [21] により調製した。9-*cis* および 13-*cis*-lycopene は all-*trans*-lycopene をヘキサン溶液中でヨウ素触媒下、光異性化させて調製した。これら自家調製したカロテノイドの構造と純度は、UV-Vis、electron ionization (EI)-MS と ^1H NMR などにより確認した [22, 23]。

Table 1. HPLC peak identification of carotenoids in human serum

Peak No.	Retention time	Peak identification	Absorption maxima (nm)	r
System 1				
1		mixture of minor xanthophylls		
2	6.6	lutein	425, 446, 476	0.9922
3	7.4	zeaxanthin	450, 478	0.9951
4	8.6	anhydrolutein I	425, 446, 476	
5	9.4	anhydrolutein II	425, 446, 476	
6	11.0	β -cryptoxanthin	450, 478	0.9978
I. S.	12.0	8'-apo- β -carotenal	458	
7	15.8	α -carotene	425, 446, 476	0.9956
8	18.3	β -carotene	450, 478	0.9929
9	20.0	phytoene and phytofluene	286, 295 and 325, 342, 360	
10	21.2	ζ -carotene	320, 400, 425	
11	25.5	γ -carotene	438, 462, 492	
12	27.6	lycopene	445, 474, 502	0.9929
13	29.5	9- <i>cis</i> -lycopene	360, 441, 467, 497	
14	31.3	13- <i>cis</i> -lycopene	360, 435, 465, 490	
System 2				
1	9.7	astaxanthin	470	0.9995
2	12.3	ϵ,ϵ -carotene-3,3'-dione	423, 438, 468	
3	16.0	3-hydroxy- ϵ,ϵ -caroten-3'-one	423, 438, 468	
4	17.5	3-hydroxy- β,ϵ -caroten-3'-one	425, 446, 476	
5	19.4	lutein	425, 446, 476	0.9979
6	21.1	zeaxanthin	450, 478	0.9998
7	31.0	anhydrolutein I	425, 446, 476	
8	34.2	anhydrolutein II	425, 446, 476	
I. S.	36.5	8'-apo- β -carotenal	458	
9	39.0	unidentified	450, 470	
10	44.0	unidentified	450, 470	
11	40.5	α -cryptoxanthin	425, 446, 476	
12	49.5	β -cryptoxanthin	450, 478	0.9998
13	57.0	unidentified	450, 478	
14	67.0	α -carotene	425, 446, 476	0.9994
15	71.6	β -carotene	450, 478	0.9992

I.S. : internal standard; r : correlation coefficient of calibration data

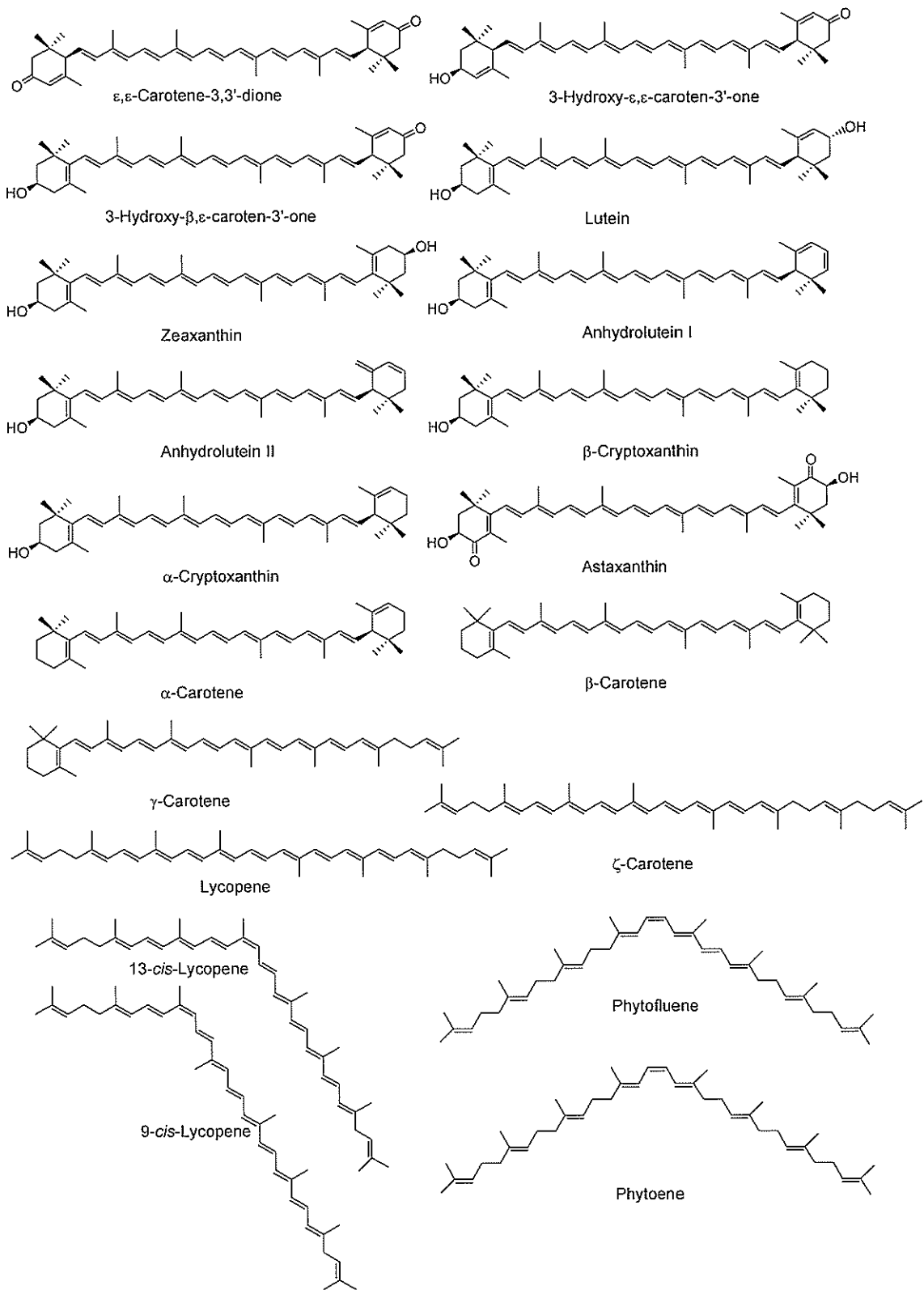


Fig. 1. Structure of carotenoids identified in human serum.

2.7. カロテノイドの同定

各 HPLC ピークの同定は標品とのリテンションタイムの比較および PDA 検出 UV-Vis スペクトルによった。各ピークのカロテノイドの同定結果と UV-Vis スペクトルによる吸収極大波長を Table 1 に、同定されたカロテノイドの構造を Fig. 1 に、それぞれ示した。

2.8. カロテノイドの定量

α -carotene、 β -carotene、lycopene、 β -cryptoxanthin、lutein、zeaxanthin、および astaxanthin については、8 - 2600 ng/mL の濃度範囲で 480 nm の吸収波長のピーク面積から検量線を作成した、これらのカロテノイドのキャリブレーションデータの相関係数を Table 1 に示した。自家調製した標品 ϵ,ϵ -carotene-3,3'-dione、3-hydroxy- ϵ,ϵ -caroten-3'-one、3-hydroxy- β,ϵ -caroten-3'-one、anhydrolutein I、および anhydrolutein II については天秤で精密な秤量をするサンプル量が得られなかったため文献に記載されている吸光係数 [21, 23] をもとに lutein の検量線から換算して定量した。

3. 結果および考察

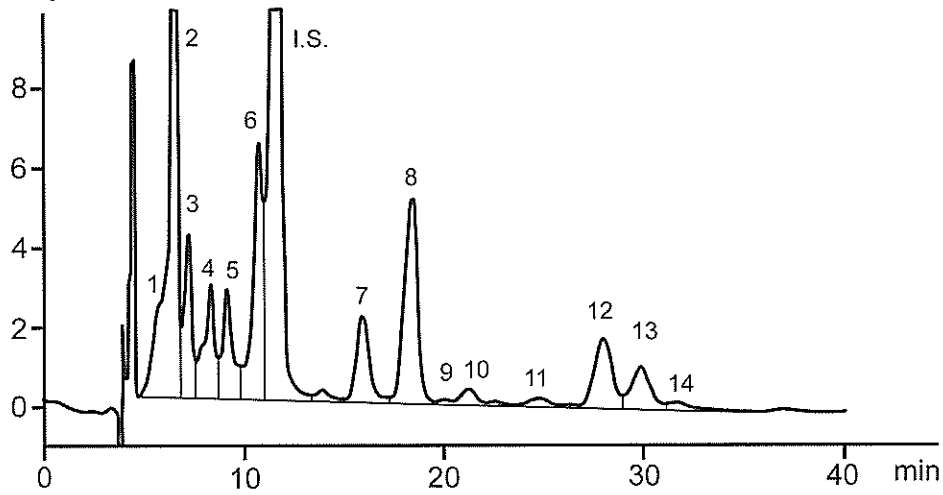
3.1. クロマトグラフィーの条件設定とカロテノイドの同定および定量

ヒト血清中に含まれるすべてのカロテノイドが 35 分以内に溶出し、lutein、zeaxanthin、 β -cryptoxanthin、 α -carotene、 β -carotene、および lycopene の主要な 6 成分が十分に分離される条件について検討した。すでに Craft らは、カラムに Vydac RP18 を使い、メタノールをベースにした溶媒にテトラヒドロフラン、クロロホルム、アセトニトリル、酢酸エチルなどを添加した系で、上記 6 種の分離条件を検討し、メタノール/テトラヒドロフラン (96:4) (体積比) で良好な結果を得た事を報告している [9]。しかしこの系では lutein と zeaxanthin、および

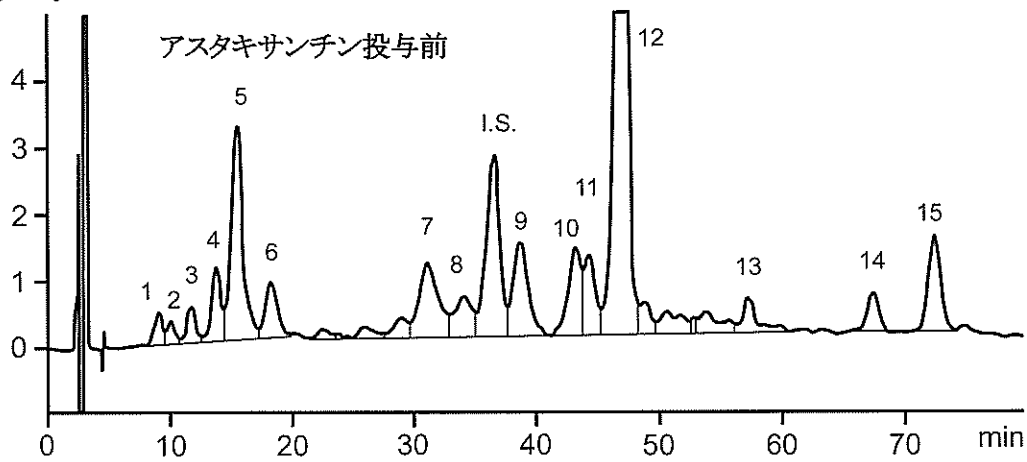
lycopene とその幾何異性体の分離が充分でなく、さらに我々が内部標準として用いる β -apo-8'-carotenal と β -cryptoxanthin のピークもオーバーラップした。そこで我々はこの溶媒系の改良を試みた。その結果、水を添加することによりこれらの成分の分離が改良された。すなわち、カラムに Vydac RP18 (201TP54) を、溶離液として [メタノール/テトラヒドロフラン (95:5)] / 水 (99:1) (体積比) を用いる系 (システム 1) で Fig. 2a に示す良好な結果が得られた。キサントフィル類は 15 分までに溶出し lutein (リテンションタイム 6.6 分)、zeaxanthin (7.4 分) および β -cryptoxanthin (11.0 分) に加えて anhydrolutein I (8.6 分)、anhydrolutein II (9.4 分) も検出する事ができた。しかし、このシステムでは微量キサントフィル成分である ϵ,ϵ -carotene-3,3'-dione、3-hydroxy- β,ϵ -caroten-3'-one および 3-hydroxy- ϵ,ϵ -caroten-3'-one はともに 5-6 分で溶出し、それぞれを分離する事はできなかった。また astaxanthin も同様に 5 分で溶出した。

一方、カロテン類は 16 分から 30 分で溶出し、それぞれのピークはベースライン分離していた。標品とのリテンションタイムの比較および PDA 検出 UV-Vis のスペクトルから α -carotene (15.8 分)、 β -carotene (18.3 分)、 ζ -carotene (21.2 分)、 γ -carotene (25.5 分)、lycopene (27.6 分)、9-*cis*-lycopene (29.5 分)、13-*cis*-lycopene (31.3 分) をそれぞれ同定する事ができた。なお可視光の 480 nm では検出できないが PDA 検出 UV-Vis スペクトルから 286 nm と 342 nm にそれぞれ吸収極大を持つ phytoene と phytofuluene (20.0 分) の存在が確認された。今まで lycopene は *all-trans* 体のみを定量している場合が多かったが [12]、今回 *all-trans* 体とそれぞれの *cis* 異性体を分離定量する事ができた。Holloway らは食物中に存在する lycopene の 84% は *all-trans* 体であるが、ヒト

(a) System 1



(b) System 2



(c) System 2

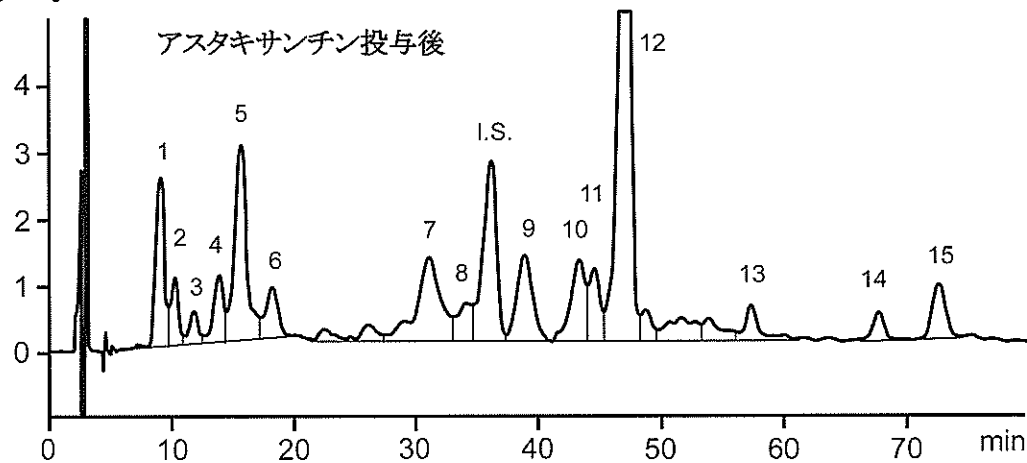


Fig. 2. Typical chromatograms of serum carotenoid using system 1 (a) and system 2 (b and c). Chromatograms of serums before and after oral administration of astaxanthin are exhibited in b and c, respectively. Conditions and peak identifications are described in the text and Table 1.

血漿中には *all-trans* 体は 40-45% しか存在せず *5-cis*, *9-cis*, *13-cis* などの *cis* 体が多く存在する事を見出し、ヒトが lycopene を吸収する過程で *cis* 異性化が起こる事を示唆している[24]。また van Breemen らは、ヒトの前立腺では *all-trans* 体に比べて *cis* 体の蓄積が多いことから、*cis*-lycopene の機能に注目している[25]。これらのことからヒト血液中の lycopene 含量を評価する場合には *all-trans* 体のみならず *cis* 異性体も含めて考慮する必要がある。

血液中の主要なカロテノイド成分である α -carotene、 β -carotene、lycopene、 β -cryptoxanthin、lutein、および zeaxanthin についてこのシステムで検量線を作成した。これらの化合物の検量線は Table 1 に示すごとく、8 - 2600 ng/mL の濃度範囲で良好な直線性（相関係数 $r = 0.9922 - 0.9978$ ）を示した。

このシステムは 35 分以内にすべてのカロテノイドが溶出し、さらに単一の溶離液を用いているのでベースラインやリテンションタイムが安定しており、40 分間隔で繰り返しサンプルを分析する事ができる。いままで報告されている血液カロテノイドの分析系[12]では一回の分析に 60 分以上を要するものが殆んどであったので、このシステムでは分析時間の短縮を図ることができる。このため本システムは住民検診や疫学調査などで得られる多量のサンプル分析に適している。

次にシステム 1 で十分に分離されなかった astaxanthin や ϵ,ϵ -carotene-3,3'-dione などの分析に適した系を検討した。上述の Vydac RP18 カラムでは種々の溶媒系を用いて検討したが、astaxanthin と ϵ,ϵ -carotene-3,3'-dione を十分に分離することができなかった。そこで Inertsil ODS-P をカラムに用い溶媒系を検討した。その結果、メタノール/テトラヒドロフラン/水からなる 2 種の溶離液（溶離液 A と溶離液 B）を 2.3. 節に示した系でグラジエントさせるシステム

2 で、良好な結果が得られた (Fig. 2b)。このシステムでは lutein や zeaxanthin などのジヒドロキシキサントフィル類は 20 分までに、 β -cryptoxanthin などのモノヒドロキシキサントフィル類は 40-50 分に溶出した。標品とのリテンションタイムの比較および各ピークの PDA 検出 UV-Vis スペクトルによって、 ϵ,ϵ -carotene-3,3'-dione (12.3 分)、3-hydroxy- ϵ,ϵ -caroten-3'-one (16.0 分)、3-hydroxy- β,ϵ -caroten-3'-one (17.5 分)、lutein (19.4 分)、zeaxanthin (21.1 分)、anhydrolutein I (31.0 分)、anhydrolutein II (34.2 分)、 α -cryptoxanthin (40.5 分)、 β -cryptoxanthin (49.5 分)、 α -carotene (67.0 分)、および β -carotene (71.6 分) を同定できた。これらのうちで ϵ,ϵ -carotene-3,3'-dione、3-hydroxy- ϵ,ϵ -caroten-3'-one、3-hydroxy- β,ϵ -caroten-3'-one、anhydrolutein I、anhydrolutein II、および α -cryptoxanthin の 6 種は今回日本人の血液中から始めて検出された成分である。 ϵ,ϵ -carotene-3,3'-dione、3-hydroxy- ϵ,ϵ -caroten-3'-one、3-hydroxy- β,ϵ -caroten-3'-one、anhydrolutein I、anhydrolutein II の 5 種は、Khachik らにより lutein のヒト体内での代謝物として報告されていた化合物である[13-15, 21, 26]。これらは今まで標品が入手できにくい事や、HPLC での分離が不十分な事により未同定成分として扱われていた。今後 lutein の体内動態を詳細に検討するうえで重要な化合物である。このシステムではキサントフィル類の分離が良好であり微量成分まで検出することができた。しかし、lycopene は 90 分以内には溶出しなかった。

astaxanthin を 1 mg 含有するサプリメントを 1 カプセル服用した 4 時間後に採血した血清のクロマトグラムを Fig. 2c に示した。astaxanthin は 9.7 分に溶出し他のカロテノイドとは完全に分離していた。なお、本システムにおいても α -carotene、 β -carotene、 β -cryptoxanthin、lutein、zeaxanthin、および astaxanthin の検量線は良好

な直線性を示した。

3. 2. サンプルの保存中における安定性

疫学的研究などで集められたサンプルは血清の状態で凍結保存される。しかし、血清の凍結保存中におけるカロテノイドの安定性に関する知見は殆どない。そこで lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene および lycopene について採血直後と -80°C で1年間以上保存後の血清中のカロテノイド含量を HPLC システム 1 により比較した。その結果、採血直後と -80°C で1年4か月保存した血清中の lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene および lycopene の含量について特に変化は見られなかった。

4. まとめ

ヒト血清に含まれるカロテノイドの HPLC による分析方法について検討した。カラムに Vydac RP18 (201TP54) を、溶離液として[メタノール/テトラヒドロフラン (95:5)] / 水 (99:1) (体積比) を用いるシステム 1 は lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene および lycopene の主要な6成分とそれらの *cis* 異性体が充分に分離され40分間隔で繰り返しサンプルが分析できるため住民検診や疫学調査などのルーチン分析に適する。また Inertsil ODS-P をカラムにメタノール/テトラヒドロフラン/水からなる2種の溶離液(溶離液 A と溶離液 B) をグラジエントさせるシステム 2 は astaxanthin や ϵ, ϵ -carotene-3,3'-dione などのキサントフィル類の分析に適した系である。

今回、ヒト血清中に存在するカロテノイドについて分析方法の確立と成分分析についての基礎的な研究を行った。今後、これらの方法を用い、疫学的研究やカロテノイドのヒトに対する栄養学的研究に役立てて行きたい。

文献

1. Straub, O., *Key to Carotenoids* (Second Edition), Birkhäuser, Verlag, Basel (1987).
2. Britton, G., Liaenen-Jensen, S. Pfander, H. (Editors), *Carotenoids Hand book*, Birkhäuser, Verlag, Basel (2004).
3. Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D., Sporn, M. B., Can dietary beta-carotene materially reduced human cancer rate? *Nature*, **290**, 201-208 (1981).
4. Shekelle, R. B., Lepper, M., Liu, S., Oglesby, P., Shryock, A. M., Stamler, J., Dietary vitamin A and risk of cancer in the western electric study. *Lancet*, **2**, 1185-1190 (1981).
5. Ohigashi, H., Osawa, T., Terao, J., Watanabe, S., Yoshikawa, T., *Food Factors for Cancer Prevention*, Springer-Verlag, Tokyo (1997).
6. Nelis, H. J. C. F., DeLeenheer, A. P., Isocratic nonaqueous reversed-phased liquid chromatography of carotenoids. *Anal. Chem.*, **55**, 270-275 (1983).
7. Sowell, A., Hutt, D. L., Gunter, E. W., Driskell, W. J., Identification of *cis*-carotenoids in human sera analyzed by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatogr.*, **431**, 424-430 (1988).
8. Bieri, J. G., Brown, E. D., Smith Jr., J. C., Determination of individual carotenoids in human plasma by high performance liquid chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, **8**, 473-484 (1985).
9. Craft, N. E., Wise, S. A., Soares Jr., J. H., Optimization of an isocratic high-performance liquid chromatographic separation of carotenoids, *J. Chromatogr.*, **589**, 171-176 (1992).

10. Schuep, W., Hess, D., Schierle, J., in Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., (Editors) *Carotenoids, Volume 1A*, Birkhäuser, Verlag, Basel, pp. 261-264 (1995).
11. Su, Q., Rowley, K. G., O'Dea, K., Stability of individual carotenoids, retinal and tocopherols in human plasma during exposure to light and after extraction, *J. Chromatogr. B*, **729**, 191-198 (1999).
12. Su, Q., Rowley, K. G., Balazs, N. D. H., Carotenoids: separation methods applicable to biological samples, *J. Chromatogr. B*, **781**, 393-418 (2002).
13. Khachik, F., Beecher, G. R., Goli, M. B., Lusby, W. R., Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetable, and human plasma by high performance liquid chromatography, *Pure Appl. Chem.*, **63**, 71-80 (1991).
14. Khachik, F., Beecher, G. R., Goli, M. B., Lusby, W. R., Smith Jr., J. C., Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts and human plasma, *Anal. Chem.*, **64**, 2111-2122 (1991).
15. Khachik, F., Spangler, C. J., Smith Jr., J. C., Canfield, L. M., Steck, A., Pfander, H., Identification, quantification, and relative concentration of carotenoids and their metabolites in human milk and serum, *Anal. Chem.*, **69**, 1873-1881 (1997).
16. Ito, Y., Ochiai, J., Sasaki, R., Suzuki, S., Kusahara, Y., Morimitu, Y., Otani, M., Aoki, K., Serum concentrations of carotenoids, retinol, and α -tocopherol in healthy persons determined by high-performance liquid chromatography *Clin. Chim. Acta*, **194**, 131-144 (1990).
17. 伊藤宜則、清水弘之、吉村健清、橋本勉、早川武彦、篠原力雄、高塚直能、徳井教孝、笠松隆洋、鈴木康司、日本の地域住民における血清過酸化脂質値と血清カロテノイド値との関連性、*ビタミン*, **71**, 427-434 (1997).
18. Sugiura, M., Matumoto, H., Kato, M., Ikoma, Y., Yano, M. Nagao, I., Multiple linear regression analysis of the seasonal changes in the serum concentration of β -cryptoxanthin, *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* **50**, 196-202 (2004).
19. Miki, W., Biological functions and activities of animal carotenoids, *Pure Appl. Chem.*, **57**, 141-146 (1991).
20. Matsuno, T., Hirono, T., Ikuno, Y., Maoka, T., Shimizu, M., Komori, T., Isolation of three new carotenoids and proposed metabolic pathways of carotenoids in hen's egg yolk, *Comp. Biochem. Physiol.*, **84B**, 477-481 (1986).
21. Khachik, F., Englert, G., Beecher, G. R., Smith Jr., J. C., Isolation, structural elucidation, and partial synthesis of lutein dehydration products in extracts from human plasma, *J. Chromatogr. B*, **670**, 219-233 (1995).
22. Hengartner, U., Bernhard, K., Meyer, K., Englert, G., Synthesis, isolation, and NMR spectroscopic characterization of fourteen (Z)-isomers of lycopene and some acetylenic dihydro- and tetrahydrolycopenes. *Helv. Chim. Acta*, **75**, 1848-1865 (1992).
23. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., (Editors) *Carotenoids* Vol. 1B. Birkhäuser Verlag, Basel (1995).
24. Holloway, D. E., Yang, M., Paganga, G., Rice-Evans, C. A., Bramley, P. M., Isomerization of dietary lycopene during

- assimilation and transport in plasma, *Free Rad. Res.*, **32**, 93-102 (2000).
25. van Breemen, R. B., Xu, X., Viana, M. A., Chen, L., Stacewicz-Sapuntzaleis, M., Duncan, C., Bowen, P. E., Sharifi, R., Liquid chromatography-mass spectrometry of cis- and all-trans-lycopene in human serum and prostate tissue after dietary supplementation with tomato sauce, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2214-2219 (2002).
26. Khachik, F., Bernstein, P., Garvalho, D. L., Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, **38**, 1802-1811 (1997).

Analysis of carotenoids in human serum by high performance liquid chromatography

Takashi Wada¹, Shin-ichi Ito¹, Yoshizoh Yuasa¹, and Takashi Maoka^{2,*}

¹ Laboratory of Public Health and Environmental Chemistry, Kyoto Biseibutu Kenkyusho, Kitakazan-Kubo-Cho 16-2, Yamashina-Ku, Kyoto 607-8646, Japan

² Research Institute for Production Development, Shimogamo-Morimoto-Cho 15, Sakyo-ku, Kyoto 606-0805, Japan

*Correspondence should be addressed. Tel: +81-75-781-1107, Fax: +81-75-791-7659.

E-mail: maoka@mbx.kyoto-inet.or.jp

(Received November 20, 2006; Accepted January 15, 2007)

ABSTRACT

Simple and reliable methods for the identification and quantification of carotenoids in human serum by HPLC were developed. HPLC system 1, using [methanol/tetrahydrofuran (95:5)] /H₂O (99:1) (vol./vol.) as a mobile phase on Vydac RP18 (201TP54) column, enabled the elution of all carotenoids within 35 minutes and gave good separation of major carotenoids such as lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, α-carotene, β-carotene and lycopene including their *cis* isomers. Because of the advantages in assay time and elution condition, this system is suitable for the analyses of a large number of blood samples in a routine medical check and epidemiological studies. Calibration curves of these major carotenoids in system 1 were found to be linear over the required range (8 - 2600 ng/mL) with good correlation coefficients ($r = 0.9922 - 0.9979$). On the other hand, HPLC system 2, using a ternary components (methanol/tetrahydrofuran and H₂O) gradient elution on Inertsil ODS-P column, gave good separation for polar xanthophylls such as astaxanthin, ε,ε-carotene-3,3'-dione, 3-hydroxy-ε,ε-caroten-3'-one and 3-hydroxy-β,ε-caroten-3'-one. However, lycopene and its *cis* isomers could not be eluted within 90 min in this system. Calibration curves of carotenoids in system 2 were also found to be good linearity over the required range. This system is useful for the analysis of xanthophylls.

Key words: carotenoid, serum, HPLC

責任編集者：織田昌幸

