

## 研究ノート

## ヒト血清カロテノイドの Ultra Performance Liquid Chromatography による迅速分析

中嶋貴司<sup>1</sup>、和田 孝<sup>1</sup>、樽井直子<sup>1</sup>、伊藤伸一<sup>1</sup>、湯浅義三<sup>1</sup>、眞岡孝至<sup>2,\*</sup><sup>1</sup> (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)<sup>2</sup> (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@mbox.kyoto-inet.or.jp

(受取日 : 2008 年 1 月 23 日、受理日 : 2008 年 2 月 9 日)

要旨 : ヒト血清に含まれるカロテノイドについて、迅速で高感度な分析方法を検討した。微小粒子 (1.7  $\mu\text{m}$  径) を持つ充填剤を用いる高速液体クロマトグラフシステム、Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC<sup>TM</sup>) により、13 成分のカロテノイドを 10 分以内にベースライン分離する事ができた。さらに検出器に ESI MS、およびフォトダイオードアレー UV-Vis スペクトルを組み合わせる事により、カロテノイドのオンライン同定が可能となった。なお、本方法で得られたカロテノイドの定量結果は従来の HPLC 法の結果と良好な相関を示した。

キーワード : カロテノイド、血清、UPLC、ESI MS

## 1. はじめに

カロテノイドはがんや生活習慣病の予防効果で注目されている[1]。ヒトにおけるカロテノイドの効果を検証する上で疫学的研究は重要であり、ヒト血液中に含まれるカロテノイドの分析は疫学的研究の上で重要な手段である[2-4]。我々はヒト血液中のカロテノイドの分析方法について検討している。前報ではヒト血液中のカロテノイドの HPLC 分析について報告した[5]。しかしこの方法では一回の分析に 30-60 分程度かかることから、さらに短時間でしかも高感度な分析ができる方法の開発が望まれた。

近年、微小粒子 (1.7  $\mu\text{m}$  径) 充填剤を用いる HPLC システム、Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC<sup>TM</sup>) が開発された。この方法は従来の 5  $\mu\text{m}$  径の充填剤を用いる HPLC に比べ、より高い分離能と感度が得られ

るので、分析時間の短縮とサンプルの微量化が可能になる。この事から UPLC は血液中の医薬品微量代謝産物の分析等に用いられている[6]。そこで、我々はこの UPLC システムを用いる血液中のカロテノイドの迅速分析方法について検討した。さらに検出系として、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) MS、およびフォトダイオードアレー (PDA) UV-Vis スペクトルを組み合わせた結果についても報告する。

## 2. 実験方法

## 2.1. 分析機器

高速液体クロマトグラフは、ACQUITY UPLC<sup>®</sup>システム (Waters 社) に Quattro Premier XE タンデムマス検出器を接続した。クロマトグラムは 452 nm の波長をモニターした。PDA 検出器による UV-Vis スペクトルの測定は 190 nm から 500 nm の吸光スペクトルを測定した。

マススペクトルはキャピラリー電圧 3.0 kV、コロナ電圧 3.0  $\mu$ A、脱溶媒ガス 800 L/hr (350°C)、コーンガス 50 L/hr、イオン源ヒーター 120°C、ESI モードで測定した。

## 2.2. 試薬

アセトニトリル、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用いた。

## 2.3. クロマトグラフィーの条件

カラムに Acquity UPLC BEH Shield RP18 1.7  $\mu$ m (2.1 i.d.  $\times$  150 mm) (Waters 社) を用いた。溶離液に水/アセトニトリル (15:85) (体積比) を用いた。カラム温度は 40°C、溶離液の流速は 0.4 mL/min で分析を行った。

## 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。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

前報[5]に従い調製した。すなわちヒト血清 300  $\mu$ L に水 1 mL と内部標準物質 ( $\beta$ -apo-8'-carotenal) 0.25  $\mu$ g、および 2,6-ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を 50  $\mu$ 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  $\mu$ L を加え溶解し、その 4  $\mu$ L を HPLC に供した。

## 2.6. カロテノイド標品

前報[5]と同じく  $\beta$ -carotene、lutein、および lycopene は Sigma Aldrich 社から、zeaxanthin と  $\beta$ -cryptoxanthin は フナコシ から、 $\beta$ -apo-8'-carotenal は Fluka 社 から購入した。 $\alpha$ -carotene はライオン社から供与された物を用いた。 $\epsilon$ , $\epsilon$ -carotene-3,3'-dione、3-hydroxy- $\epsilon$ , $\epsilon$ -caroten-3'-one、および 3-hydroxy- $\beta$ , $\epsilon$ -caroten-3'-one は鶏卵から分離した。anhydrolutein I と anhydrolutein II は lutein の脱水反応により調製した。

## 2.7. カロテノイドの同定

各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 検出による UV-Vis スペクトル、および ESI MS 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、ESI MS で検出された分子量関連イオンを 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

$\alpha$ -carotene、 $\beta$ -carotene、lycopene、 $\beta$ -cryptoxanthin、lutein、および zaxanthin については、8 - 2600 ng/mL の濃度範囲で 452 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 (r) は 0.9922 から 0.9979 の範囲であった。

## 3. 結果および考察

Acquity UPLC BEH Shield RP18 をカラムに水/アセトニトリル (15:85) を溶離液に用いる UPLC により、Fig. 2 に示したように血清中に

Table 1. HPLC peak identification of carotenoids in human serum

Peak No.	Retention time	Peak identification	Absorption maxima (nm)	ESI MS $m/z$ (M+H) <sup>+</sup>
1	2.66	$\epsilon,\epsilon$ -carotene-3,3'-dione	420, 443, 471	n.d.
2	2.84	3-hydroxy- $\epsilon,\epsilon$ -caroten-3'-one	420, 443, 471	n.d.
3	2.90	3-hydroxy- $\beta,\epsilon$ -caroten-3'-one	425, 448, 476	n.d.
4	3.05	lutein	425, 448, 476	569
5	3.12	zeaxanthin	455, 478	569
6	4.18	anhydrolutein I	425, 448, 476	n.d.
7	4.25	anhydrolutein II	425, 448, 476	n.d.
8	4.67	$\alpha$ -cryptoxanthin	425, 448, 476	n.d.
19	4.79	$\beta$ -cryptoxanthin	455, 478	553
10	4.96	$\beta$ -cryptoxanthin cis	450, 478	n.d.
11	5.55	lycopene	445, 478, 502	537
12	6.40	$\alpha$ -carotene	425, 448, 476	537
13	6.54	$\beta$ -carotene	455, 478	537

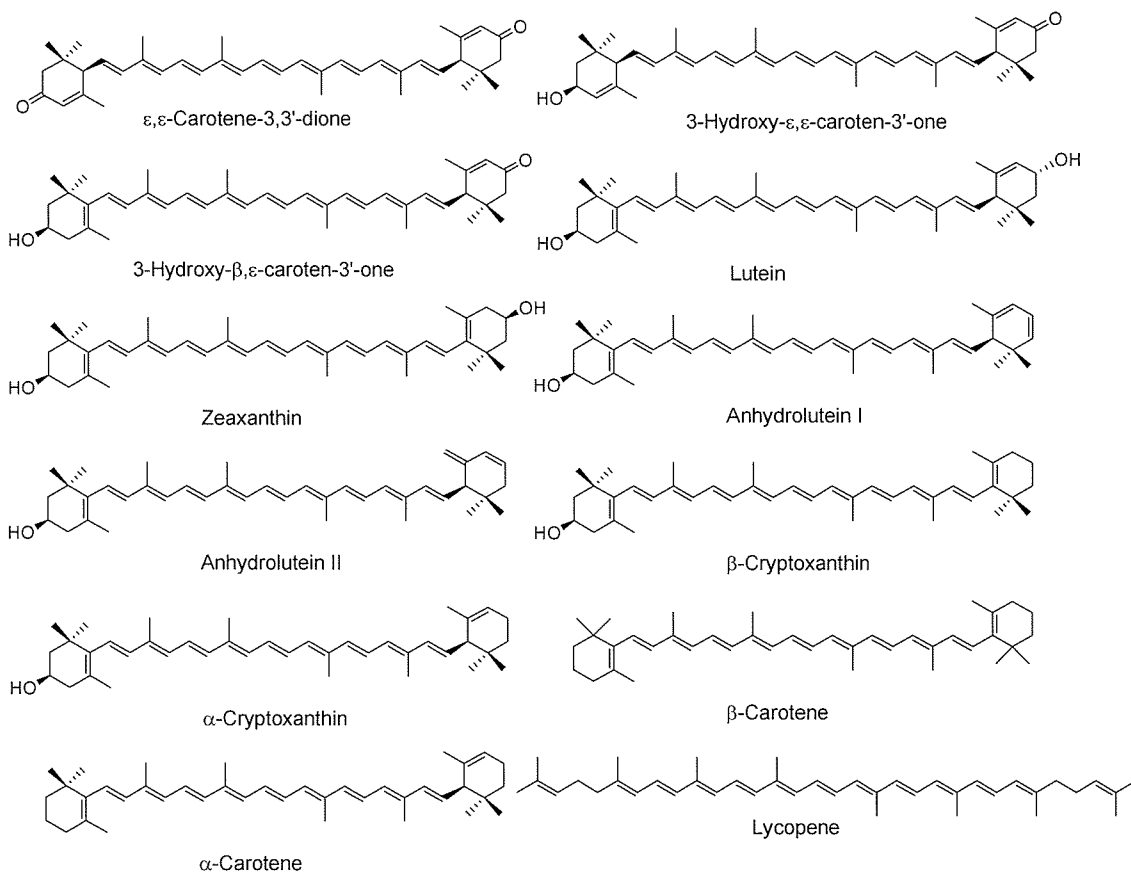


Fig. 1. Structure of carotenoids identified in human serum.

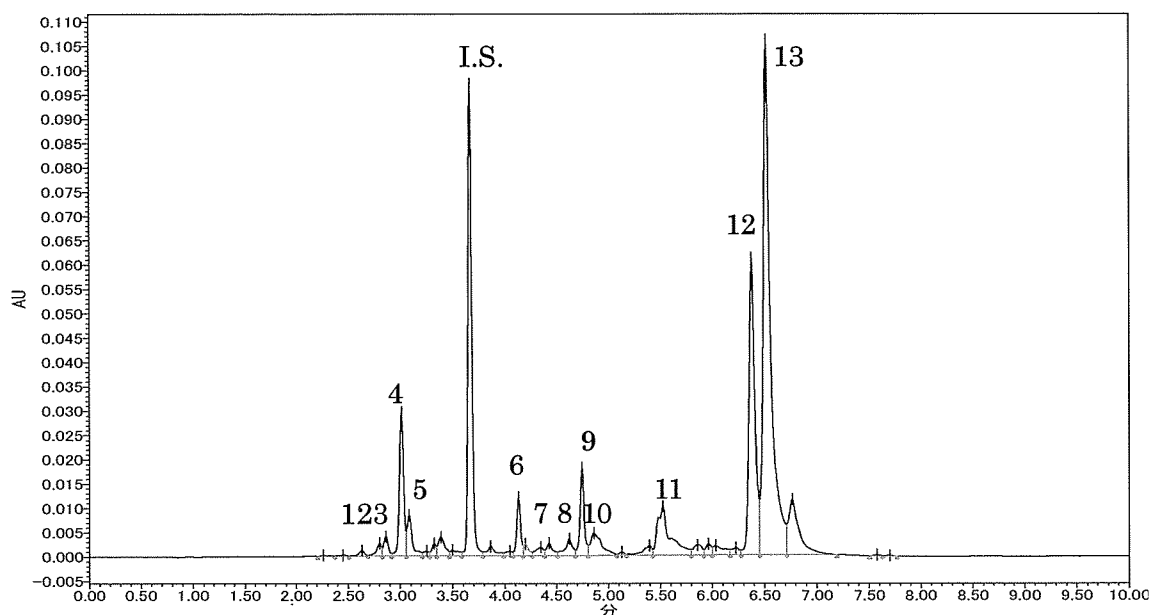


Fig. 2. Typical chromatograms of human serum carotenoid using UPLC system. Conditions and peak identifications are described in the text and Table 1. I.S. Internal standard.

含まれるすべてのカロテノイドを 10 分以内に分離する事ができた。13 成分が分離され、標品とのリテンションタイムの比較、PDA スペクトルなどから、Table 1 に示すように 13 成分が同定された。血清カロテノイドの主要な 6 成分、lutein、zaxanthin、 $\beta$ -cryptoxanthin、lycopene、 $\alpha$ -carotene、 $\beta$ -carotene はいずれもベースライン分離していた。その他の成分の分離も良好であった。ヒト血清中には lutein の代謝産物である  $\epsilon,\epsilon$ -carotene-3,3'-dione、3-hydroxy- $\epsilon,\epsilon$ -caroten-3'-one、および 3-hydroxy- $\beta,\epsilon$ -caroten-3'-one が存在する。前報[5]で我々が開発した血清カロテノイドの汎用分析 HPLC システム (システム 1) では、これらの成分を分離することはできなかった。これらの成分を分離するための HPLC システム (システム 2) も開発したが、一回の分析に 90 分以上かかるという難点があった[5]。今回の UPLC システムではこれらの微量成分も分離定量でき、しかも 10 分以内にすべてのカロテノイドの分析が可能となった。

カロテノイドの同定には MS と UV-Vis スペクトルは重要である。カロテノイドは ESIMS

で分子量関連イオンとしてプロトン化分子 ( $M+H^+$ ) を与える事が知られている[7-9]。今回血清に含まれるカロテノイドの ESI MS を測定した結果、lycopene、 $\alpha$ -carotene、および  $\beta$ -carotene では  $m/z$  537 に、 $\beta$ -cryptoxanthin では  $m/z$  553 に、lutein と axanthin では  $m/z$  569 にそれぞれ  $M+H^+$  を観測する事ができ、それぞれの分子量情報が得られた。しかし  $\epsilon,\epsilon$ -carotene-3,3'-dione や 3-hydroxy- $\epsilon,\epsilon$ -caroten-3'-one など、上記のカロテノイドに比べて 1/10 以下の含量の微量成分では、バックグラウンドの脂質に由来するシグナルに妨害されてカロテノイドの分子量関連イオンを検出する事はできなかった。なおカロテノイドの分子量関連イオンの検出限界は ESI MS で数 ng であった。カロテノイドの含量が数 ng 以下になると共存する多量の脂質に由来するシグナルに妨害されて、カロテノイドのイオンを検出しにくくなった。一方カロテノイドが特徴的な吸収を示す 400 - 500 nm の可視部領域には、この吸収を妨害する物質が血清中には存在しないため、PDA による UV-Vis スペクトルでは 0.1 ng 程度まで

検出が可能であった。Fig. 3 に血清中で検出されたβ-carotene およびβ-cryptoxanthin の ESI MS と PDA 検出 UV-Vis スペクトルを示した。

先に報告した HPLC 法[5]と今回の UPLC で

の定量値の相関性を検討した。Fig. 4 に β-carotene と β-cryptoxanthin の定量値の相関を示した。両方法による定量値の相関係数 ( $r^2$ ) は約 0.99 であり良好な相関が認められた。

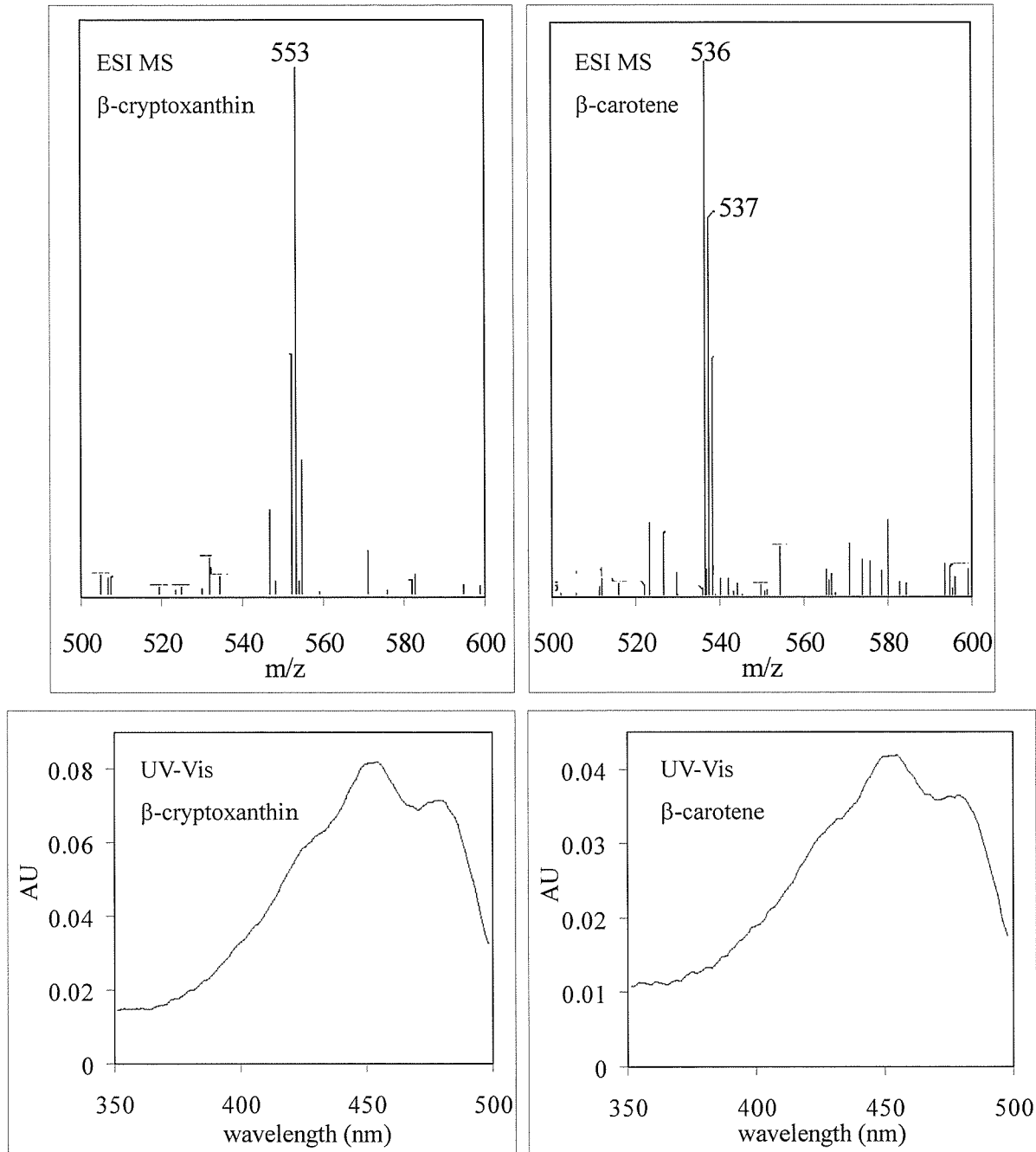


Fig. 3. ESI MS and UV-Vis spectrum of β-carotene and β-cryptoxanthin detected in serum. Molecular ion peak ( $M^+$ :  $m/z$  536) of β-carotene was also observed at high intensity in ESI MS.  $M^+$  was sometimes observed at high intensity with protonated molecule ( $M+H^+$ ) in ESI MS of carotenoid.

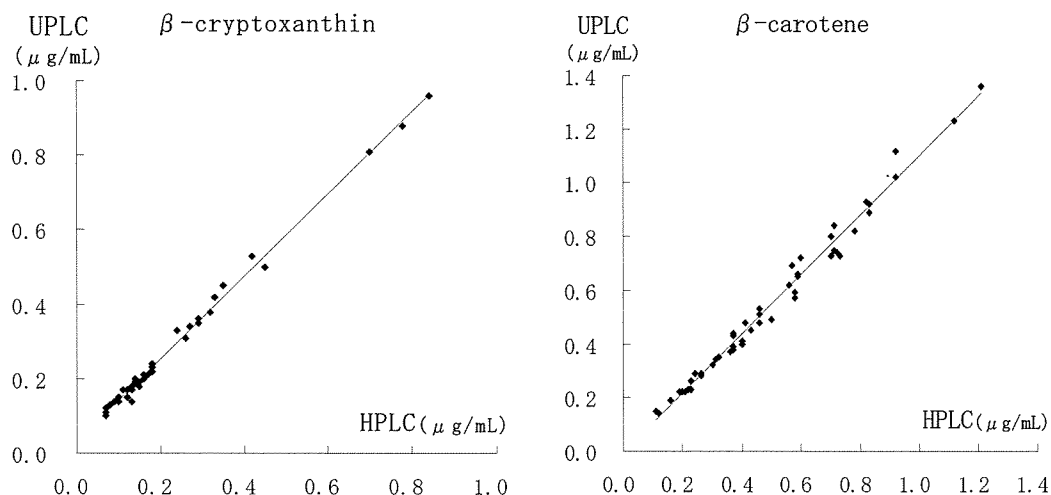


Fig. 4. Quantitative correlations between HPLC and UPLC methods.

X-axis showed the carotenoid content ( $\mu\text{g/ml}$ ) analyzed by HPLC. Y-axis showed the carotenoid content ( $\mu\text{g/ml}$ ) analyzed by UPLC. The correlation coefficient ( $r^2$ ) for  $\beta$ -carotene is 0.9948 and for  $\beta$ -cryptoxanthin is 0.9857.

#### 4. まとめ

UPLCにより血清中に含まれるすべてのカロテノイドを10分以内に分離する事ができた。血清中の主成分である $\alpha$ -carotene、 $\beta$ -carotene、lycopene、 $\beta$ -cryptoxanthin、lutein、zaxanthinについては、ESIMSによりプロトン化分子イオンを検出する事ができた。一方PDA検出ではすべてのカロテノイドのUV-Visスペクトルを得る事ができた。本方法は従来のHPLC法に比べ1/3以下の分析時間で、従来法を上回る分離度と感度で血清中のカロテノイドを分析できるため、住民検診や疫学調査など多量のサンプルの分析に適するものと考えられる。

#### 文献

1. Krinsky, N.I., Mayne, S.T., Sies, H. (Eds.), 2004, Carotenoids in Health and Disease, Marcel Dekker, New York.
2. Ito, Y., Ochiai, J., Sasaki, R., Suzuki, S., Kusuhara, Y., Morimitu, Y., Otani, M., Aoki, K., Serum concentrations of carotenoids, retinol, and  $\alpha$ -tocopherol in healthy persons

determined by high-performance liquid chromatography, *Clin. Chim. Acta*, **194**, 131-144 (1990).

3. 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).
4. 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  $\beta$ -cryptoxanthin, *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* **50**, 196-202 (2004).
5. 和田 孝、伊藤伸一、湯浅義三、眞岡孝至 HPLCによるヒト血清カロテノイドの分析, *食品・臨床栄養*, **2**, 15-26 (2007).
6. Waters ホームページ <http://www.waters.co.jp/product/uplc/nanoaquity.html>.
7. van Breemen, R.B., Huang, C.R., Tan, Y., Sander, L.C., Schilling, A.B., Liquid chromatography/mass spectrometry of

- carotenoids using atmospheric pressure chemical ionization, *J. Mass Spectrom.*, **31**, 975-981 (1996).
8. Clarke, P.A., Barner, K.A., Stain, J.R., Ibe, F.I., Shepherd, M.J., High performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry for the determination of carotenoids, *Rapid Comm. Mass Spec.*, **10**, 1781-1785 (1996).
9. van Breemen, R.B., Electrospray liquid chromatography-mass spectrometry of carotenoids, *Anal. Chem.*, **67**, 2004-2009 (1995).

### **Analysis of carotenoids in human serum by ultra performance liquid chromatography**

Takashi Nakajima<sup>1</sup>, Takashi Wada<sup>1</sup>, Naoko Tarui<sup>1</sup>, Shin-ichi Ito<sup>1</sup>, Yoshizoh Yuasa<sup>1</sup>, and Takashi Maoka<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Public Health and Environmental Chemistry, Kyoto Biseibutu Kenkyusho, Kitakazan-Kubo-cho 16-2, Yamashina-ku, Kyoto 607-8646, Japan

<sup>2</sup> 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@mbox.kyoto-inet.or.jp

(Received January 23, 2008; Accepted February 9, 2008)

#### ABSTRACT

Rapid and reliable method for the identification and quantification of carotenoids in human serum was investigated. Ultra performance liquid chromatography (UPLC<sup>TM</sup>) system using micro particle size column (1.7  $\mu\text{m}$ ) enabled the analysis of thirteen carotenoids within 10 min and gave good separation of major carotenoids such as lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and lycopene. Furthermore, on line detection of each carotenoid was accomplished by ESI MS and photodiode-array detected UV-Vis spectroscopy. The fixed-quantity results by previous HPLC and present UPLC methods showed good correlation.

Key words: carotenoid, serum, UPLC, ESI MS

責任編集者：織田昌幸

