

モクズガニの総アスタキサンチンの定量方法の検討

－ アスタキサンチンの抽出方法およびヒドロキシ型アスタキサンチンへの変換方法について －

Investigation of a Method for Quantification of Total Astaxanthins contained in the Japanese Mitten Crab

－ Regarding an Extraction Method of Astaxanthins and a Conversion Method to Hydroxyl Form of Astaxanthins －

溝井 健太^{1,2)}・山口 太一²⁾・高橋 正人³⁾・小濱 剛²⁾

Kenta MIZOI^{1,2)}, Taichi YAMAGUCHI²⁾, Masato TAKAHASHI³⁾
and Takeshi KOHAMA²⁾

モクズガニ *Eriocheir japonica* の体色は青黒色を呈しているが、茹でることで astaxanthin (astx) に由来する赤色を呈する。本稿では、モクズガニに含まれる astx の定量における問題点を解決し、効率的な総 astx 定量方法の確立を目的に検討をおこなった。その問題点はモクズガニからの astx の抽出方法、およびヒドロキシ型 astx への変換方法である。本検討の結果、甲殻類に用いられる従来の方法とは異なり、脱灰処理を省き、加熱処理をおこなうことでヒドロキシ型の astx を簡便に抽出、定量することができたため、モクズガニにおける効率的な総 astx 定量方法が確立された。

1. 緒言

モクズガニ (*Eriocheir japonica*) はイワガニ科モクズ

連絡先：山口太一 tyamaguchi@cis.ac.jp

1) 高崎健康福祉大学薬学部

Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare

2) 千葉科学大学危機管理学部環境危機管理学科

Department of Environmental Risk and Crisis Management,
Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science

3) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2018年10月2日受付, 2018年12月25日受理)

ガニ属に分類されるカニの一種であり、北海道から八重山諸島まで、日本全域の河川に棲息する。本種は体液（血リンパ）浸透圧調節能力を有し、河口付近で交尾産卵した後、孵化したゾエア幼生は塩分のある河口や海域で育ち、稚ガニとなって川を遡ることから、通し回遊をおこなうことが知られている¹⁾。モクズガニの体色は青黒色を呈しているが、茹でることで astaxanthin (以下 astx) に由来する鮮やかな赤色を呈することが知られている。

Astx は強い抗酸化作用を有しており、一重項酸素クエンチ作用²⁾をはじめ、脂質過酸化抑制作用³⁾、ヒドロキシラジカル消去作用⁴⁾などが報告されている。一方、体色は水産分野において、市場価値に影響する重要な要素の1つである。Astx は飼料添加物として養殖マダイの体色改善のために用いられており、その効果が報告され

てきた⁵⁻⁷⁾。さらに近年、チュウゴクモクズガニをはじめ⁸⁾、楊貴妃メダカ⁹⁾やエンゼルフィッシュ¹⁰⁾などで、astxを給餌した際の体色評価について報告されるなど、水産生物の体色に対する関心が高まっている。しかし、モクズガニの体色とastx含量の関係は未だ明らかになっていない。

Astxの定量においては、楊貴妃メダカなどの魚類において報告例があるが、モクズガニに関しては報告例がない。なお、モクズガニのastx定量にこれまでの方法を用いると、大きく二つの問題が生じる。一つ目は、モクズガニのような甲殻類は硬い甲羅に覆われているため、ホモジナイズ後に抽出する必要があり、ホモジナイズや脱灰処理などを適切におこなわなければ、全てのastxを抽出できない可能性がある。二つ目は、astxには図1に示すようなヒドロキシ型astxの他にエステル型astxなども数多く存在しているため¹¹⁾、モクズガニに含まれる総astxを定量するにはすべてのエステル型astxをヒドロキシ型astxへと変換する必要がある。

本稿はモクズガニにおける効率的なastx定量方法の確立を目的とし、モクズガニからのastx抽出方法ならびに抽出液に含まれるすべてのエステル型astxをヒドロキシ型astxに変換する方法について検討した。

2. 方法

2. 1 使用した溶液の調整およびHPLC条件

Astx定量のためのサンプル調製ならびにHPLC測定条件は、大井らの報告¹²⁾を参考におこなった。

2. 1. 1 酵素溶液

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオールを500 mLビーカーに量り、精製水約250 mLを加えて溶解した。これに希塩酸を加えてpH 7.0に調整した後、水を加えて500 mLとし、0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝液とした。次に、コレステロールエステラーゼ (富士フィルム和光純薬, 大阪, 日本) の濃度が4 units/mLとなるように0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝液で溶解した。

2. 1. 2 内標準溶液

15 mL遠沈管に*trans*- β -apo-8'-carotenal (Sigma-Aldrich, MO, USA) を10 mg量り取り、アセトンを加えて10 mLとした (1 mg/mL)。この7.5 mLを200 mLメスフラスコに移した。室温で15分間放置した後、アセトンでメスアップした。

2. 1. 3 HPLC定量測定条件

HPLC解析にはLC solution (島津, 京都, 日本) を用いた。ポンプはLC-10AT, オートサンプラーはSIL-20A, カラムオープンはCTO-10AS VP, 検出器はSPD-20AUV/VIS, システムコントローラーはSCL-10AVPを用いた。カラムはYMC-Carotenoid TMS 5 μ m (4.6 \times 250 mm, YMC, 京都, 日本), 流量は1.0 mL/min, カラム温度は25 $^{\circ}$ C, 検出波長は474 nm, サンプル注入量は20 μ Lで測定した。移動溶媒Aはメタノール:t-ブチルメチルエーテル:1%リン酸水溶液 (81:15:4) を, 移動溶媒Bはメタノール:t-ブチルメチルエーテル:1%リン酸水

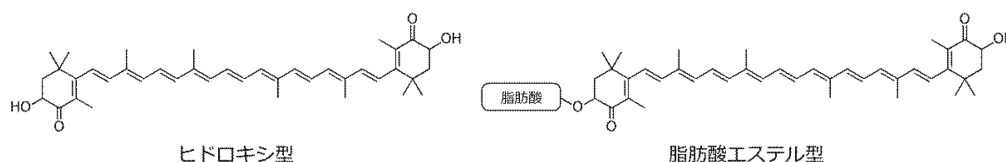


図1 天然に存在するastx類

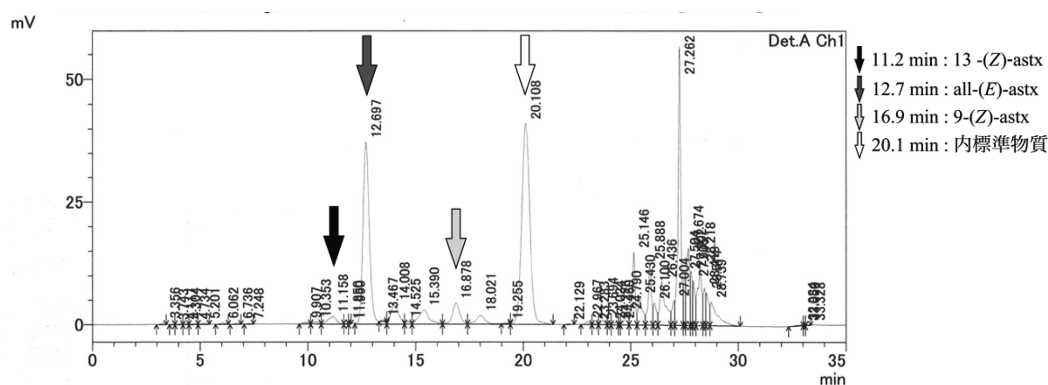


図2 HPLCクロマトグラム

溶液 (16 : 80 : 4) を用いて、表1に従っておこなった。また総astxの定量は、標品のアスタキサンチン (関東化学, 東京, 日本) と内標準溶液より検量線を作成し、内標準法に従って、図2に示したように13-(Z)-astx ($t_R = 11.2$ min) およびall-(E)-astx ($t_R = 12.7$ min), 9-(Z)-astx ($t_R = 16.9$ min), 内標準物質 ($t_R = 20.1$ min) の検出面積より式 (1) に従って算出した。

$$\text{Total astx} = \text{astx}_{(13-Z)} + \text{astx}_{(\text{all-E})} + \text{astx}_{(9-Z)} \dots \dots \dots (1)$$

表1 移動溶媒のタイムテーブル

時間 (分)	移動溶媒 A (%)	移動溶媒 B (%)
0	100	0
15	85	15
23	0	100
27	0	100
27.1	100	0
35	100	0

2. 2 Astx抽出方法の検討

以下の方法を表2に示した。

2. 2. 1 方法1A

モクズガニの表面をウエスで軽く拭き取り、個体全体の重量 (w.w.) を測定した後、10 vol%塩酸300 mLに4時間浸漬し、混合物を減圧ろ過後、水洗した。さらに得られた固体を5 wt%水酸化ナトリウム水溶液に4時間浸漬し、混合物を減圧ろ過後、水洗した (脱灰処理)。得られた固体をホモジナイズし、72時間凍結乾燥後、重量 (d.w.) を測定した。1 gあたり10 mLのエタノールを添加し、50 °Cで3時間抽出した後、ろ過した。得られた抽出液を減圧下で濃縮し、再度アセトン 100 mL に溶解させ、ろ過した。これを減圧下で濃縮し、抽出液を得た。

2. 2. 2 方法1B

モクズガニの表面をウエスで軽く拭き取り、個体全体の重量 (w.w.) を測定した後、ホモジナイズし、72時間凍結乾燥した後、重量 (d.w.) を測定した。1 gあたり10 mLのエタノールを添加し、50 °Cで3時間抽出した後、ろ過した。得られた抽出液を減圧下で濃縮し、再度アセトン100 mLに溶解させ、ろ過した。これを減圧下で濃縮し、抽出液を得た。

2. 2. 3 方法1C

モクズガニの表面をウエスで軽く拭き取り、個体全体の重量 (w.w.) を測定した後、100 °Cで数分茹で、72時間凍結乾燥し、重量 (d.w.) を測定した。ホモジナイズの後、1 gあたり10 mLのエタノールを添加し、50 °Cで3時間抽出した後、ろ過した。これを減圧下で濃縮した後、再度アセトン100 mLに溶解させ、ろ過した。これを減圧下で濃縮し、抽出液を得た。

2. 2. 4 方法1D

モクズガニの表面をウエスで軽く拭き取り、個体全体の重量 (w.w.) を測定した後、72時間凍結乾燥し、重量 (d.w.) を測定した。1 gあたり10 mLのエタノールを添加し、50 °Cで3時間抽出した後、ろ過した。得られた抽出液を減圧下で濃縮し、再度アセトン100 mLに溶解させ、ろ過した。これを減圧下で濃縮し、抽出液を得た。

表2 Astx抽出方法

方法	脱灰処理	ホモジナイズ	加熱処理
1A	+	+	-
1B	-	+	-
1C	-	+	+
1D	-	-	-

+は操作をおこなった。-は操作をおこなわなかった。

2. 3 ヒドロキシ型astxへの変換方法の検討

方法1Cにより得られた抽出液を用いて以下の検討をおこなった。以下の方法を表3に示した。

2. 3. 1 方法2A

抽出液を100 mLメスフラスコに移した後、アセトンで正確に100 mLとした。この液を15 mL遠沈管に3 mL量りとり、内標準溶液1 mL加えた後、37 °Cで2分間加温した。酵素溶液3 mLを加え、37 °Cで静かに振とうさせつつ45-180分反応させた (方法2Aa-2Ad)。また対照として、酵素溶液の代わりに0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝液を加え、37 °Cで静かに180分振とうさせた (方法2Ae)。その後、各反応液に硫酸ナトリウム1 g、石油エーテル2 mLを加え、30秒間ボルテックスし、遠心分離 (890×g, 3分) した。別の遠沈管に硫酸ナトリウム1 g取り、エーテル層を移した。水層に石油エーテル2 mLを加え、30秒間ボルテックスし、遠心分離 (890×g, 3分) した。エーテル層を先のエーテル層と合わせた。このエーテル溶液をフィルターろ過し、HPLCで総astx量を測定した。

2. 3. 2 方法2B

抽出液を100 mLメスフラスコに移した後、アセトンで正確に100 mLとした。この液を15 mL遠沈管に3 mL量りとり、内標準溶液1 mL加えた後、フィルターろ過し、HPLCで総astx量を測定した。

表3 ヒドロキシ型astxへの変換方法

方法	酵素	反応時間 (分)
2Aa	+	45
2Ab	+	90
2Ac	+	135
2Ad	+	180
2Ae	-	180
2B	-	-

+は酵素溶液を加えた。-は酵素溶液を加えなかった。

3. 結果

3. 1 Astx抽出方法の検討

各検討につきモズカニ1個体を用いて抽出方法を検討したところ、表4に示す結果が得られた。はじめに脱灰処理の有無について比較した。脱灰処理をおこなったもの(検討1)のw.w.に対するd.w.の割合が19%であっ

た。一方、脱灰処理をおこなわなかったもの(検討2)の割合は30%となり、10ポイント以上高いことがわかった。次にホモジナイズの有無による抽出液の割合を比較した。ホモジナイズをおこなったもの(検討2, 5)のw.w.に対する抽出液の割合は、ホモジナイズをおこなわなかったもの(検討4, 6)の割合よりも、大きな値を示した。最後に加熱処理の有無による抽出液の割合を比較した。加熱処理をおこなったもの(検討3)のw.w.に対する抽出液の割合は、加熱処理をおこなっていないもの(検討2)の割合よりも、大きな値を示した。

3. 2 ヒドロキシ型astxへの変換方法の検討

すべてのエステル型astxをヒドロキシ型に変換するために、コレステロールエステラーゼによる加水分解の検討をおこなった。その結果を表5に示した。はじめに、酵素溶液を加え45分反応させたところ、1.1 mgのastxが得られた(検討1)。次に酵素反応が十分に進行したかを確認すべく、酵素反応時間を180分まで延長したが、得られたastx量にほとんど差がなかった(検討2-4)。また、酵素を加えなかったもの(検討5)についても1.4 mgのastxが得られ、酵素を加えたもの(検討1-4)と得られたastx量に差がなかった。最後に、酵素反応の操作をおこなわず(検討6)、抽出液と内標準溶液を混合し、フィルターろ過したものをそのままHPLCで測定したところ、32 mgのastxが得られた。

表4 異なる抽出処理による抽出液の割合

検討	方法	性別	w.w. (g)	d.w. (g)	抽出液 (g)	d.w./w.w. (%)	抽出液/w.w. (%)
1	1A	雄	121	23	0.85	19	0.7
2	1B	雄	168	50	1.7	30	1.0
3	1C	雄	194	64	3.4	33	1.8
4	1D	雄	90	29	0.6	32	0.7
5	1B	雌	112	36	1.8	32	1.6
6	1D	雌	59	19	0.7	32	1.2

方法1Aは脱灰処理ならびにホモジナイズをおこなった。方法1Bはホモジナイズのみをおこなった。方法1Cはホモジナイズならびに加熱処理をおこなった。方法1Dは脱灰処理、ホモジナイズならびに加熱処理をおこなわなかった。w.w.は検討前の重量。d.w.は凍結乾燥後の重量。

4. 考察

問題点の一つ目に、甲殻類から抽出液を得るためには適切な処理をおこなう必要がある。その問題点を解決するためにastx抽出方法の検討をおこなった(表4)。有田による報告¹³⁾では、カニからの抽出に脱灰処理をおこなっていたため、その報告を参考に脱灰処理をおこなった。脱灰処理をおこなわなかったもの(検討2-6)は、脱灰処理をおこなったもの(検討1)に対し、w.w.に対するd.w.の割合が10ポイント以上高かった。これは脱灰処理によってカニ殻のカルシウム等の無機成分が除去されたためだと考えられる。しかし、脱灰処理時にモクズガニ体内に存在する橙黄色の液状成分が塩酸や水酸化ナトリウム水溶液中へと多量に流出する様子が確認された。すなわち脱灰処理の際に抽出すべき成分が失われていることが考えられる。したがって、脱灰処理は抽出成分の流出が多く、操作も煩雑となる可能性が示唆された。一方、ホモジナイズをおこなったもの(検討2, 3, 5)は、ホモジナイズをおこなわなかったもの(検討4, 6)に対し、w.w.に対する抽出液の割合が高かった。したがって十分なホモジナイズが必要であることが示唆された。他方、astxは甲殻類の体内において、タンパク質と結合していることが報告されている¹⁴⁾。そのタンパク質は加熱処理によって変性し、astxとの結合が切れることが知られている。そこで加熱処理が抽出効率に影響するかについて検討した。加熱処理をおこなったもの(検討3)は、加熱処理をおこなわなかったもの(検討2)に対し、w.w.に対する抽出液の割合が高かった。すなわち、加熱処理をおこなうことで抽出効率が高くなることが示唆された。

以上より、モクズガニからのastx抽出においては、脱灰処理はおこなわず、加熱処理をおこない、抽出前にモクズガニを十分にホモジナイズした方が抽出効率が高くなることが明らかとなった。よって次の検討では、方法1Cから得られた抽出液を用いることとした。

問題点の二つ目に、総astxを定量するにはすべてのエステル型astxをヒドロキシ型に変換する必要がある。その問題点を解決するために、ヒドロキシ型astxへの変換方法の検討をおこなった(表5)。小河原らは*Pseudomonas fluorescens*由来のコレステロールエステラーゼを用いることで、ヒドロキシ型astxの効率的な生成方法を報告した¹⁵⁾。その報告を参考に、モクズガニの抽出液において、コレステロールエステラーゼによる加水分解の検討をおこなった。酵素溶液を加えたもの(検討1-4)と、酵素溶液を加えなかったもの(検討5)について、得られたastxに差が確認されなかった。したがって、本検討に用いたモクズガニの抽出液にはエステル型のastxが含まれていなかった可能性が考えられる。すなわち、この抽出液は方法1Cより得られたものであり、その加熱処理によって、全てのエステル型astxが加水分解され、ヒドロキシ型astxに変換されたのだと考えられる。さらに酵素反応操作をおこなわなかった(検討6)検討では、得られたastx量が最も多かった。これは酵素反応処理をおこなう過程で、得られるべきastx量に損失が生じたためだと考えられる。したがって、モクズガニ抽出液からastxを定量する場合、抽出前に加熱処理をおこなうことで酵素反応処理をおこなわずに効率よくastxを定量できることが示唆された。

表5 酵素反応による総astxの定量

検討	方法	総 astx 量 (mg)
1	2Aa	1.1
2	2Ab	1.2
3	2Ac	0.9
4	2Ad	1.2
5	2Ae	1.4
6	2B	32

方法2Aaは酵素溶液を加え45分反応させた。方法2Abは酵素溶液を加え90分反応させた。方法2Acは酵素溶液を加え135分反応させた。方法2Adは酵素溶液を加え180分反応させた。方法2Aeは緩衝液を加え180分振とうした。方法2Bは酵素溶液も緩衝液も加えず振とうもおこなわなかった。

5. 結論

本稿では、モクズガニに含まれるastxの定量における問題点を解決し、効率的な総astx定量方法の確立を目的に検討をおこなった。問題点の一つ目のモクズガニからのastx抽出については、脱灰処理をおこなわず、凍結乾燥後にホモジナイズし抽出する方法は、astxの抽出に影響を与えないことが明らかとなった。問題点の二つ目のヒドロキシ型astxへの変換は、酵素反応の代わりに加熱処理をおこなうことでヒドロキシ型のastxへの変換を簡便におこなえることが明らかとなった。すなわち図3に示したように、甲殻類に用いられる従来の方法とは異なり、脱灰処理を省き、加熱処理をおこなうことでヒドロキシ型のastxを簡便に抽出、定量することができたため、モクズガニにおける効率的な総astx定量方法が確立できた。

謝辞

本研究は、平成28-32年度私立大学研究ブランディング事業「「フィッシュ・ファクトリー」システムの開発及び「大学発ブランド水産種」の生産」の助成に与った。

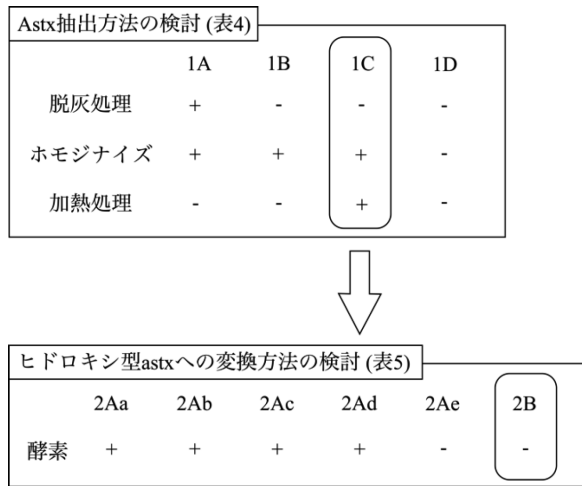


図3 本研究の概要

参考文献

- 1) 小林哲：通し回遊性甲殻類モクズガニ*Eriocheir japonica* (De Haan) の生態—回遊過程と河川環境. 生物科学, 51, 93-104, 1999.
- 2) Nishida Y, Yamashita E, Miki W : Quenching Activities of Common Hydrophilic and Lipophilic Antioxidants against Singlet Oxygen Using Chemiluminescence Detection System. Carotenoid Science, 11, 16-20, 2007.
- 3) 倉繁迪, 岡添陽子, 沖増英治, 安東由喜雄, 森将晏, 幹渉, 井上正康, 内海耕髓：フリーラジカルによる生体膜障害とアスタキサンチンによるその防止. Cyto-protection & biology, 7, 383-391, 1989.
- 4) Hama S, Uenishi S, Yamada A, Ohgita T, Tsuchiya H, Yamashita E, Kogure K : Scavenging of Hydroxyl Radicals in Aqueous Solution by Astaxanthin Encapsulated in Liposomes. Biol. Pharm. Bull., 35, 2238-2242, 2012.
- 5) Kurnia A, Satoh S, Kuramoto D, Hanzawa S : Effect of Different Astaxanthin Sources on Skin Pigmentation of Red Sea Bream (*Pagrus major*). Aquacult. Sci., 55, 441-447, 2007.
- 6) 四反田勝久, 鈴木弘, 中山寛, 水谷清, 飯田九州男, 中村元二, 熊井英水：合成アスタキサンチン給与によるマダイの体色改善. Aquacult. Sci., 35, 11-18, 1987.
- 7) 伊藤良仁, 釜田忠, 田中淑人, 鮫島宗雄：アスタキサンチンとアスタキサンチンパルミテートによるマダイの体色改善試験. Aquacult. Sci., 34, 77-80, 1986.
- 8) Long X, Wu X, Zhao L, Liu J, Cheng Y : Effects of Dietary Supplementation with *Haematococcus pluvialis* Cell Powder on Coloration, Ovarian Development and Antioxidation Capacity of Adult Female Chinese Mitten Crab, *Eriocheir sinensis*. Aquaculture, 473, 545-553, 2017.
- 9) 塩出雄亮, 中田和義：“楊貴妃メダカ”におけるカロテノイドについて. Aquacult. Sci., 65, 203-208, 2017.
- 10) Kouba A, Sales J, Sergejevová M, Kozák P, Masojídek J : Colour Intensity in Angelfish (*Pterophyllum scalare*) as Influenced by Dietary Microalgae Addition. J. Appl. Ichthyol., 29, 193-199, 2013.
- 11) Miao F, Lu D, Li Y, Zeng M : Characterization of Astaxanthin Esters in *Haematococcus pluvialis* by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. Anal. Biochem., 352, 176-181, 2006.
- 12) 大井友梨, 並木利文, 片田江道, 塚原寛樹, 北村晃利：パンの物性および色調に対するヘマトコッカス藻由来のアスタキサンチン添加の影響. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 56, 579-584, 2009.
- 13) 有福一郎：カニ殻からのアスタキサンチン抽出. 鳥取県産業技術センター研究報告, 16, 28-31, 2013.
- 14) Begum S, Cianci M, Durbeej B, Falklöf O, Hädener A, Helliwell J R, Helliwell M, Regan A C, Watt I F : On the Origin and Variation of Colors in Lobster Carapace. Phys. Chem. Chem. Phys., 17, 16723-16732, 2015.
- 15) 小河原雅子, 井野曜子, 吉田幹彦, 菱山隆, 五十嵐友二：健康食品中の総アスタキサンチンのHPLC定量法. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 57, 205-214, 2010.

Investigation of a Method for Quantification of Total Astaxanthins contained in the Japanese Mitten Crab

— Regarding an Extraction Method of Astaxanthins and a Conversion Method to Hydroxyl Form of Astaxanthins —

Kenta MIZOI^{1,2)}, Taichi YAMAGUCHI²⁾, Masato TAKAHASHI³⁾
and Takeshi KOHAMA²⁾

1) Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare

2) Department of Environmental Risk and Crisis Management, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science

3) Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

The body color of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* is a bluish black, and when boiled it becomes red. This hue comes from astaxanthin (astx). In this report, investigations were performed to solve problems in the quantification of astx contained within the Japanese mitten crab, with the aim of establishing an efficient quantification method for total astx. The problems were the extraction method of astx from the Japanese mitten crab, and the conversion method to hydroxyl form from ester form of astx. As a result of this study, unlike conventional methods used for crustaceans, omitting demineralization and performing boiling, it was possible to conveniently extract hydroxyl form of astx and then to quantify the amount of astx. Therefore, a method for efficient quantification of total astx from the Japanese mitten crab was established.