HPLC による生乳中メラトニンの定量

江越加州生[§], 岡 輝美, 山下浩子

久留米信愛女学院短期大学

Quantitative Analysis of Melatonin in Raw Milk by HPLC

Kazuo Egoshi[§], Terumi Oka and Hiroko Yamashita

Kurume Shin-Ai Women's College, 2278-1, Miimachi, Kurume, Fukuoka 839-8508

We report results of quantitative analysis using a precolumn derivatization method for melatonin extracted from raw milk. The extraction method is described as follows.

The raw milk, obtained from 43-month-old Holstein cows, was incubated with papain at 45°C for 30 minutes. The enzyme reaction was stopped by the addition of trichloro acetic acid and then the reaction mixture centrifuged. The melatonin in the supernatant was extracted with chloroform, after which, the chloroform layer was washed with water and evaporated to dryness. For the derivatization of melatonin, 150 µL of aqueous 2 mol/L Na₂CO₃, 100 µL 100 mmol/L H₂O₂, 50 µL 1 mmol/L CuSO₄, and 700 µL water were added to the residue, and the mixture was then heated in water (94–96°C) for 6 minutes. The melatonin derivative was extracted with ethyl acetate, evaporated to dryness, dissolved in aqueous 15% (v/v) CH₃CN, and then subjected to HPLC analysis. When standard melatonin was added to raw milk, the recovery rate was 85.3±7.3% (mean S.D. n=5). The 43-month-old Holstein cows were milked at noon and night, on January, February, and March 2006. In January, melatonin content in raw milk was determined to be 5.7 pg/mL in diurnal milk and 42.3 pg/mL in nocturnal milk. In February and March, melatonin content in nocturnal milk decreased to 22.3 and 14.8 pg/mL, respectively. These results suggest that the present method is suitable for determination of melatonin contained in raw milk.

(Received Aug. 21, 2006 ; Accepted Dec. 7, 2006)

Keywords : melatonin, raw milk, HPLC**キーワード :** メラトニン, 生乳, 高速液体クロマトグラフィー

牛乳は良質のタンパク質やカルシウムを含み、乳幼児から高齢者に至るまで飲用したい食品であるが、近年、消費量の低下が言われている。一方、食品に含まれる機能成分への関心が高まる中、生乳にメラトニン (MEL) が存在することが報告されている¹⁾。MEL は、脊椎動物の松果体から分泌されるホルモンで、その血中濃度は夜間に極大となり昼間では低値となる顕著な概日リズムを示し²⁾、健康人に対する催眠作用³⁾や抗酸化作用⁴⁾が確認されている。MEL の定量は、松果体、血液及び唾液では HPLC^{5)~10)}や放射性免疫検定法¹¹⁾ (RIA) により可能であるが、生乳では RIA による報告¹⁾のみである。MEL の機能性に着目した乳加工品開発を進展させるには、日常業務で頻繁に使用される HPLC を用いた生乳中 MEL 定量法の確立が求められる。

本稿では、MEL の蛍光誘導体化法^{6)~10)}を利用し、生乳中 MEL の定量方法を確立したので報告する。

実 験 方 法

1. 試 料

43 月齢 (2006 年 1 月現在) のホルスタイン種乳牛 1 頭より、昼間 (12:00) 及び夜間 (0:00) に搾乳した。なお、搾乳時期は 2006 年 1, 2 及び 3 月で夜間の搾乳は暗闇の中で行った。これらの生乳は 4°C に保存し、それぞれ 24 時間以内に試験を行った。

2. 試 薬

MEL (生化学用)、パパイン (EC3.4.22.2)、キモシン (EC 3.4.23.4)、蒸留水は和光純薬工業 (株) 製を使用した。L-システイン、トリクロロ酢酸、クロロホルム、酢酸エチル、炭酸ナトリウム、硫酸銅、過酸化水素及び HPLC の移動相に用いたアセトニトリルは和光純薬工業 (株) 製の特級を使用した。

3. HPLC 分析条件および装置

MEL 誘導体の測定は Tomita 等の方法⁸⁾を若干改変し、Fig. 2 に示す条件で行った。高速液体クロマトグラフは、

〒839-8508 福岡県久留米市御井町 2278-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), kegoshi@kurume-shinai.ac.jp

(株)日立製作所製の L-6000 型のポンプに Waters 社製の蛍光検出器 474 型を接続し、データ処理は (株)日立製作所製のインテグレーター D-2500 を用いた。また、試料注入口から検出器までのステンレスパイプの内径は 0.1 mm のものを用いた。この条件では MEL 誘導体のピークは、保持時間約 18 分に認められた。

4. 生乳からの MEL 抽出および MEL 誘導体の生成

生乳 50 mL にパパイン 100 mg 及び L-システイン 10 mg を加え、45℃ で 30 分間マグネチックスターラーで攪拌した。これに、1 g/mL のトリクロロ酢酸水溶液 1.5 mL を加え酵素反応を止め、4℃、5000 rpm で 20 分間遠心分離を行った。上清を濾過し (東洋濾紙 No. 7)、濾液 20 mL を 50 mL 容遠心管に入れ、これにクロロホルム 20 mL を加え 30 秒間激しく上下に振とうした。この振とう操作により濾液とクロロホルムの乳化が認められたので、遠心分離 (4℃、5000 rpm、5 分間) を行った。同様の操作をさらに 2 回繰り返す。クロロホルム層を 100 mL 容の供栓付試験管に集めた。次に、クロロホルム層に蒸留水 30 mL を加え 10 秒間上下に緩やかに振とうした。この操作は合計 2 回行い、その後クロロホルム層を減圧下 45℃ で乾固させた。乾固物に蒸留水 700 μ L、濃度 2 mol/L の炭酸ナトリウム水溶液 150 μ L、1 mmol/L の硫酸銅水溶液 50 μ L 及び 100 mmol/L 過酸化水素水 100 μ L を加え溶解させ、その内の 800 μ L を 10 mL 容供栓付遠心管に入れ、94~96℃ の水浴中で 6 分間加熱した。遠心管の口はラップをかぶせ輪ゴムで強く締めた。反応後氷水中で冷却し、酢酸エチル 5

mL を加え 30 秒間激しく上下に振とうした。この操作をさらに 2 回繰り返す。酢酸エチル層を集めた。酢酸エチル層の減圧乾固物を 15% (v/v) アセトニトリル水溶液 400 μ L に溶解し、孔径 0.22 μ m のメンブランフィルターで濾過後一定量を HPLC で分析した。

実験結果および考察

1. MEL 誘導体の生成反応条件

MEL を過酸化水素存在下アルカリ性で加熱して生成する誘導体 *N*-[6-methoxy-4-oxo-1,4-dihydro-quinolin-3-yl] acetamide (6-MOQMA)⁹⁾ は、蛍光検出器付 HPLC による最小検出量が 500 amol (S/N=5) と報告されている⁶⁾。この方法に従い、MEL 水溶液に炭酸ナトリウム (添加濃度: 300 mmol/L) 及び過酸化水素 (添加濃度: 10 mmol/L) を加え 100℃ のオーブンで 30 分間加熱し、反応液を本 HPLC 条件で測定すると保持時間約 18 分に MEL 誘導体のピークが検出された。

本試験では、上記反応液に硫酸銅を添加し加熱は水浴中で行った。まず、MEL 誘導体生成に及ぼす反応時間、温度、炭酸ナトリウム及び過酸化水素濃度の影響について調べた (Fig. 1-A, B, C, D)。Fig. 1-A の試験は次のように行った。即ち、2 mL 容のネジ口サンプル管に反応液 1 mL を入れ蓋をきつく締め、94~96℃ の水浴中で一定時間反応させ氷水中で冷却後 5 μ L を HPLC で分析し、各反応液から検出された MEL 誘導体のピーク高をプロットした。なお、反応液の MEL 濃度は 3650 pg/mL とし、炭酸ナトリウム

Fig. 1 Effect of reaction time, temperature, Na₂CO₃ and H₂O₂ concentration on the fluorescence intensity for melatonin derivative

A : reaction time, B : temperature, C : Na₂CO₃ conc., D : H₂O₂ conc.

は 300 mmol/L, 過酸化水素 10 mmol/L, 硫酸銅 50 μ mol/L とした。各プロットの変動係数は 2.9% であり, 反応時間 3~15 分で生成する MEL 誘導体の蛍光強度に顕著な差は認められなかった。次に, Fig. 1-A の反応液と同じ組成で加熱時間を 6 分間として, 反応温度の影響を調べた (Fig. 1-B)。温度 0 及び 22°C における反応液からは MEL 誘導体のピークは認められなかったが, 温度 95°C では MEL 誘導体の蛍光強度は最高に達した。以降の試験では, 温度 94~96°C の水浴中で 6 分間加熱することにした。次に, Fig. 1-A の反応液と同じ組成で, 炭酸ナトリウム及び過酸化水素濃度の影響を調べた。反応液の炭酸ナトリウム濃度 20 mmol/L で MEL 誘導体の蛍光強度は最高に達し, 400 mmol/L では若干減少した (Fig. 1-C)。また, 過酸化水素濃度 10 mmol/L で蛍光強度はほぼ最高に達した (Fig. 1-D)。

Fig. 1 に結果を示していないが, 別試験で MEL 誘導体生成に及ぼす硫酸銅濃度の影響を調べた。即ち, Fig. 1-A で使用した反応液の硫酸銅濃度を 50, 100 及び 200 μ mol/L とし, それぞれ 94~96°C の水浴中で 6 分間加熱し生成する MEL 誘導体のピーク高を調べた。ピーク高より計算された変動係数は 2.8% であり, この濃度範囲において生成する MEL 誘導体の蛍光強度に顕著な差は認められなかった。

以上の結果から, MEL 誘導体生成反応条件は, 炭酸ナトリウム濃度 300 mmol/L, 過酸化水素 10 mmol/L, 硫酸銅 50 μ mol/L で, 94~96°C の水浴中で 6 分間加熱することとした。この条件で生成する MEL 誘導体の蛍光強度は, 反応液に硫酸銅無添加で 100°C のオーブンで 30 分間加熱した場合よりも 1.8 倍程度高くなった。銅が MEL 誘導体生成反応の触媒として作用し, 反応時間が短縮し蛍光強度が高まったと考えられるが, 詳細については更なる検討が必要である。

次に, 本反応条件の再現性を調べる目的で 8 回繰り返し試験を行った結果, 変動係数は 2.3% であった。また, 反応液を氷水中に 5 時間放置し 3 回測定した結果, 変動係数は 0.3% でピーク高の変化ほとんど認められなかった。この反応条件で生成した MEL 誘導体の HPLC クロマトグラム (MEL 22.4 pg 相当量) を Fig. 2 に示した。

2. 検量線および検出限界・定量限界

MEL 濃度を 112, 560, 1120, 2240 及び 3360 pg/mL とし, それぞれより調製した反応液 20 μ L を HPLC で分析した。これらの濃度範囲において, MEL 濃度と MEL 誘導体のピーク面積及びピーク高との相関係数は共に 0.999 で直線性が認められ, 良好な定量分析が可能であると考えられた。定量は近接ピークの影響を受けにくいピーク高で絶対検量線法により行った。次に, MEL 濃度 73 pg/mL とし, それより調製した MEL 誘導体を 10 回分析し (注入量: 10 μ L), そのピーク高の標準偏差の 3 倍を検出限界, 10 倍を定量限界とした。その結果, 検出限界は 10 pg/mL, 定量限界

Fig. 2 HPLC chromatographic profile of the melatonin derivative

The peak of melatonin derivative (melatonin=22.4 pg) is indicated by an arrow. The separation and detection conditions are as follows: column, TSKgel ODS-80Ts (i.d. 4.6 mm $\times$ 250 mm); guard column, TSK guard-gel ODS-80Ts (i.d. 3.2 mm $\times$ 15 mm); Temperature, 40°C; mobile phase, 50 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 7.0)/acetonitrile (0 min: 87/13 $\rightarrow$ 25 min: 82/18, v/v); flow rate, 0.6 mL/min; detection, fluorometry (ex. 245 nm, em. 380 nm).

は 35 pg/mL となった。

3. 試料の前処理および HPLC 分析

ラット松果体の MEL は⁸⁾, 松果体のメタノール抽出物を誘導体化処理後酢酸エチルで抽出し, 蛍光検出器付 HPLC により定量されている。生乳を同様に処理し, HPLC で分析したところ妨害ピークが多く定量不可能であった。

そこで, 試料の前処理方法について次のように検討した。即ち, パパインまたはキモシンで酵素処理した生乳あるいは直接トリクロロ酢酸を加え除タンパクした生乳について, それぞれ乳中の MEL をクロロホルムで抽出・誘導体化後, 更に酢酸エチルで抽出して HPLC で分析した。ホルスタイン種乳牛より, 2 月の昼間及び夜間に搾乳した生乳をそれぞれ, パパインで酵素処理し HPLC で分析したときのクロマトグラムを Fig. 3 (A, B) に示した。共に, 保持時間約 18 分に MEL 誘導体のピークが検出され, 妨害ピークもなく良好な定量分析が可能であった。一方, 生乳をキモシンで酵素処理した場合や直接トリクロロ酢酸で除タンパクした場合においても MEL 誘導体の分離は良好で

Fig. 3 HPLC chromatographic profiles of the melatonin derivative from raw milk

A : diurnal milk, B : nocturnal milk.

The peak of melatonin derivative (=0.97 mL milk) is indicated by an arrow. The separation and detection conditions are the same as in Fig. 2.

あった。

移動相のアセトニトリル濃度を 15% にして分析した場合、MEL 誘導体と前後のピークとの重なりが認められたので、本試験では 13% から 18% (25 分後) に直線的に上昇させた。分析終了後は、50% アセトニトリルで 10 分間カラムを洗浄し脂溶性成分を溶出させた。

次に、Fig. 3 の保持時間約 18 分のピークが MEL 標準品由来の誘導体であることを確認するために、励起波長と検出波長を変化させ MEL 標準品由来の誘導体と比較した。その結果、生乳中に検出されたピークは、励起スペクトル及び発光スペクトル共に標準品と一致し、更に 6-MOQMA⁹⁾ と同じ挙動を示した。

4. 添加回収試験

昼間に搾乳した生乳 50 mL に MEL を 1120 pg 添加し回収率を調べた。生乳をパパインで酵素処理した場合の添加回収率は $85.3 \pm 7.3\%$ ($n=5$) で、生乳中の MEL 定量法として十分な精度を有すると考えられた。一方、生乳をキモシンで酵素処理した場合や直接トリクロロ酢酸で除タンパクした場合の添加回収率は、それぞれ $46.2 \pm 14.9\%$ ($n=7$) 及び $59.5 \pm 10.9\%$ ($n=6$) で、パパイン処理よりも低い回収率であった。

生乳をパパインで酵素処理後トリクロロ酢酸を加え遠心分離して得られる沈殿物量は、キモシン処理の 1/20 程度で、乳タンパク質はほとんど分解していると考えられた。試験管内で、MEL が α_1 -性グロブリンやアルブミンに結合することが報告されている¹²⁾。また、本試験で使用する常乳には α_1 -酸性グロブリンは含まれず、 α -ラクトアルブミンや血清アルブミンが 0.16% 含まれる¹³⁾。

パパインは¹⁴⁾一般に基質に対する特異性が低いことから、パパイン処理により生乳中のアルブミンが分解され、遊離の MEL が増え添加回収率が上昇したと推察された。

5. 生乳のメラトニン量

本法の実用性を確認する目的で、2006 年の 1、2 及び 3 月上旬に、昼間 (12:00) 及び夜間 (0:00) に搾乳した生乳の MEL 量を調べた。同一試料を 2 回 (1 月搾乳) または 3 回 (2、3 月搾乳) 処理し、結果を Table 1 に示した。夜間に搾乳した生乳 1 mL 中の MEL 量は、1 月は 42.3 pg、2 月が 22.3 pg、3 月が 14.8 pg で、昼間に搾乳した生乳では、それぞれ 5.7 pg、3.5 pg 及び 4.3 pg であった。

3 回試験した結果について変動係数をみると、昼間に搾乳した生乳では、変動係数は 20.0% (2 月搾乳) 及び 30.2% (3 月) で若干バラツキがみられたが、夜間の生乳では 5.4% (2 月) 及び 13.5% (3 月) で、比較的再現性の高い結果であると考えられた。なお、2 月の夜間に搾乳した生乳を 4°C の冷蔵庫に 1 ヶ月間放置後の MEL 量は 21.3 ± 1.4 pg/mL (同一試料を 3 回試験) で搾乳後 24 時間以内の結果とほぼ同じであった。

搾乳時期の日の出・日の入り時刻より、1 月の日照時間は 10.1 時間、2 月が 10.8 時間、3 月が 11.7 時間で、本試験に用いたホルスタイン種においては、夜間の乳中 MEL 量は日照時間が長くなるにつれて減少した。なお、日照時間と MEL 量の関係を明らかにするには、更にサンプル数を多くしたデータが必要である。

RIA による結果では¹⁾、夜間の生乳中の MEL 量は 26 ± 7 pg/mL (個体数=6) (搾乳時期/場所: 2 月/フィンランド, 日照時間: 10 時間) で、牛の種類や年齢、飼育条件及

Table 1 Melatonin concentrations in raw milk

	Melatonin (pg/mL milk)	
	Diurnal milk	Nocturnal milk
January 13, 2006	5.7*	42.3*
February 7, 2006	3.5±0.7**	22.3±1.2**
March 7, 2006	4.3±1.3**	14.8±2.0**

* Average of two determinations.

** Mean±S.D. of three determinations.

び搾乳方法が不明で直接の比較はできないが、Table 1 の 2 月の結果と近い値であった。

以上の結果より、本方法は生乳中のメラトニン定量に十分適用できると考えられた。

要 約

メラトニン (MEL) のプレカラム蛍光誘導体化法を利用し、生乳中 MEL の定量法を確立した。生乳をパパイニンで酵素処理後、MEL をクロロホルムで抽出した。抽出物中の MEL に過酸化水素存在下アルカリ性で硫酸銅を添加し、加熱・誘導体化後、酢酸エチルで抽出し蛍光検出器付 HPLC で定量分析した。生乳中 MEL の確認は、ピークの保持時間、励起スペクトル及び発光スペクトルの比較により行った。MEL 標準品を生乳に加えたときの添加回収率は $85.2 \pm 7.3\%$ ($n=5$) であった。

生乳を提供頂いた久留米市善導寺町森光力氏 (スローフード協会筑後平野) に謝意を表します。

文 献

- 1) Eriksson, L., Valtonen, M., Laitinen, J.T., Paananen, M. and Kaikkonen, M., Diurnal rhythm melatonin in bovine milk: Pharmacokinetics of exogenous melatonin in lactating cows and goats. *Acta. vet. scand.* **39**, 301-310 (1998).
- 2) 三池輝久, 山寺博史, メラトニンの生理作用, 内分泌への影響について, 「メラトニン研究の最近の進歩」, (星和書店, 東京), pp. 45 (2004).
- 3) Hughes, R.J. and Badia, P., Sleep-promoting and hypo-

thermic effects of day time melatonin administration in human. *Sleep*, **20**, 124-131 (1997).

- 4) Poeggeler, P., Saarela, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L. D., Manchester, L.C. and Barlow-Walden, L.R., Melatonin-a highly potent endogenous radical scabenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann. NY Acad.* **738**, 419-420 (1994).
- 5) 傳 正偉, 近藤 康, 岩崎信之, 加藤久典, 菅原邦生, 久保辰雄, ニワトリヒナ松果体中メラトニンの抽出法と高速液体クロマトグラフィーによる定量法, 日畜会報, **68**, 1154-1160 (1997).
- 6) Iinuma, F., Hamase, K., Matsubayashi, S., Takahashi, M., Watanabe and M., Zaitzu, K., Sensitive determination of melatonin by precolumn derivatization and reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr.* **835**, 67-72 (1999).
- 7) Hamase, K., Tomita, T., Kiyomizu, A. and Zaitzu, K., Determination of pineal melatonin by precolumn derivatization reversed-phase HPLC and its application to the study of circadian rhythm in rats and mice. *Anal. Biochem.* **279**, 106-110 (2000).
- 8) Tomita, T., Hamase, K., Hayashi, H. and Zaitzu, K., Atomic analysis of melatonin by precolumn derivatization reversed phase micro-HPLC. *Chromatography.* **22**, 41-44 (2001).
- 9) Tomita, T., Hamase, K., Hayashi, H., Fukuda, H., Hirano, J. and Zaitzu, K., Determination of endogenous melatonin in the individual pineal glands of inbred mice using precolumn oxidation reversed-phase micro-HPLC. *Anal. Biochem.* **316**, 154-161 (2003).
- 10) Hamase, K., Hirano, J., Kosai, Y., Tomita, T. and Zaitzu, K., A sensitive internal standard method for the determination of melatonin in mammals using pre-column oxidation reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr.* **811**, 237-241 (2004).
- 11) Valtonen, M., Laitinen, J.T., Eriksson, L., Renal melatonin excretion in sheep is enhanced by water diuresis. *J. Endocrinology.* **138**, 445-450 (1993).
- 12) Morin, D., Simon, N., Depres-Brummer, P., Levi, F., Tillement, J.P. and Urien, S., Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum. *Pharmacology*, **54**, 271-275 (1997).
- 13) 足立 達, 伊藤敏敏, 牛乳の成分, 「乳とその加工」, (建帛社, 東京), pp. 12, 44 (1992).
- 14) 五十嵐脩, 小林彰夫, 田村真八郎, 「丸善食品総合辞典」, pp. 859 (1998).

(平成 18 年 8 月 21 日受付, 平成 18 年 12 月 7 日受理)