

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7008963号
(P7008963)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和4年1月14日(2022.1.14)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N	33/82	(2006.01)	G 0 1 N	33/82
G 0 1 N	33/02	(2006.01)	G 0 1 N	33/02
A 6 1 K	36/23	(2006.01)	A 6 1 K	36/23
A 6 1 K	36/81	(2006.01)	A 6 1 K	36/81
A 6 1 K	36/48	(2006.01)	A 6 1 K	36/48

請求項の数 8 (全62頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-544057(P2018-544057)
 (86)(22)出願日 平成29年2月27日(2017.2.27)
 (65)公表番号 特表2019-515247(P2019-515247 A)
 (43)公表日 令和1年6月6日(2019.6.6)
 (86)国際出願番号 PCT/CA2017/050254
 (87)国際公開番号 WO2017/143460
 (87)国際公開日 平成29年8月31日(2017.8.31)
 審査請求日 令和2年2月27日(2020.2.27)
 (31)優先権主張番号 62/299,737
 (32)優先日 平成28年2月25日(2016.2.25)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)

(73)特許権者 517375761
 アビバジェン インコーポレイテッド
 カナダ国 ケー1エー 0アール6 オン
 タリオ, オタワ, サセックス ドライブ
 1 0 0
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 植物または微生物由来カロテノイドー酸素コポリマーの組成物、それを同定、定量および生成する方法ならびにその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

カロテノイドー酸素コポリマーを含む生成物を調製する方法であって、

(a) カロテノイドを含む供給源であって、

(i) 細菌、酵母、真菌、もしくは藻類から選択される微生物源、または

(ii) ニンジン、トマト、アルファルファ、スピルリナ、バラの実、甘唐辛子、チリペッパー、パプリカ、サツマイモ、ケール、ホウレンソウ、海藻、ウィートグラス、マリーゴールド、moringa oleifera、および赤ヤシ油から選択される食用植物源、から選択される供給源を、酸化重合条件下で加工し、前記カロテノイドー酸素コポリマーを含む混合物を形成すること

(b) 前記混合物を少なくとも一つの極性有機溶媒と合わせ、前記カロテノイドー酸素コポリマーを含む溶液を形成すること

(c) 前記溶液に無極性溶媒を添加し、前記カロテノイドー酸素コポリマーを含む沈殿物を形成すること、および

(d) 前記沈殿物を単離し、前記カロテノイドー酸素コポリマーを含む前記生成物を形成すること

を含む方法。

【請求項2】

前記酸化重合条件が、空気または酸素への曝露、および、乾燥、粉末化、熱、光への曝露の増大、酸素の分圧 (ppO₂)、温度の上昇、または酸化を促進させるその他の因子の

1つまたは複数から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記酸化重合条件が、乾燥および粉末化、ならびに空気または酸素への曝露である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記無極性溶媒が低分子量炭化水素である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記低分子量炭化水素がヘキサン、ペンタン、またはヘプタンである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

カロテノイドを含む前記供給源がニンジンまたはトマトから選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

工程(a)の加工により、前記混合物中に $1 \sim 1000 \mu\text{g/g}$ 湿重量または $10 \sim 1000 \mu\text{g/g}$ 乾燥重量のカロテノイド-酸素コポリマーが提供される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記極性有機溶媒が、酢酸エチル、酢酸ブチル、またはメタノールである、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、カロテノイド-酸素コポリマーの組成物、植物源または微生物源のような自然食品源などの天然源からカロテノイド-酸素コポリマーを同定および定量する方法、ならびに前記組成物を生成する方法に関する。本発明はまた、動物およびヒトの健康全般を維持し増進させ、または動物もしくはヒトの免疫応答もしくは免疫性を強化するなど、様々な使用のために、カロテノイド-酸素コポリマーの有効量を含む組成物も企図する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

様々な健康上の利益は、食餌カロテノイドに起因する¹⁻³。 α -および β -カロテンと β -クリプトキサンチンとを含む、いくつかのプロビタミンAカロテノイドは、それらのビタミンA活性に関連した利益を提供する⁴。しかし、プロビタミンAカロテノイドと、ビタミンAに変換することができないその他のカロテノイドとの両方の、その他の非ビタミンAの利益は、説明することが容易でない⁵⁻⁷。

【0003】

カロテノイドは、植物によって合成された、黄、橙、および赤色の色素である。純粋に炭化水素であるカロテンと、1個または数個の酸素原子で置換されたカロテンであるキサントフィルと呼ばれる2つのクラスで構成される、600種を超える公知のカロテノイドがある。 β -カロテンおよびリコペン、一般的なカロテンの例であり、それに対してルテイン、ゼアキサンチン、およびカンタキサンチンは、キサントフィルの一般的な例である。北米における食餌で最も一般的なカロテノイドは、 α -カロテン、 β -カロテン、 β -クリプトキサンチン、ルテイン、ゼアキサンチン、およびリコペンである。

【0004】

全てのカロテノイドは、8個のイソプレン単位から形成され、各カロテノイド分子は、40個の炭素原子を含有する。構造的に、カロテノイドは、環によって一端または両端が終結することもあるポリエン炭化水素鎖の形をとる。非置換 β -イオノン環(β -カロテン、 α -カロテン、 β -クリプトキサンチン、および γ -カロテンを含む)を含有するカロテノイドは、ビタミンA活性を有する(レチナールに変換できることを意味する)。対照的に、ルテイン、ゼアキサンチン、カプサンチン、カンタキサンチン、およびリコペンに

10

20

30

40

50

は、ビタミンA活性がない。

【0005】

従来、非ビタミンA活性は、しばしば抗酸化剤としての、カロテノイド自体の作用に帰するとされている^{8～10}。しかし最近の研究は、少なくとも発がんの阻害に関し、抗酸化剤の役割に対して疑いをかけており、その他のメカニズムの働きを指摘している^{11、12}。

【0006】

酸素の添加は、高度に不飽和である化合物の自発的酸化において本質的に好まれることが、長い間公知であったが¹⁵、カロテノイドの酸化重合の主要な関与および有意性は、本発明者らの報告の前は驚くべきことに見逃されていた^{13、14}（米国特許第5,475,006号；米国特許第7,132,458号；米国特許第8,211,461号；米国特許出願公開第2011-0217244号；米国特許出願公開第2013-0131183号；および米国特許出願公開第2013-0156816号も参照）。さらに、β-カロテンと、溶媒中の酸素とのならびに類似して形成された完全酸化リコペンの自発的反応によって得られる、完全に酸化されたβ-カロテン組成物（OxBCと呼ばれ、Avivagen Inc.のOx-C-beta（商標）ブランド製品における活性成分である）による研究は、ポリマー画分が、先天的免疫機能を刺激し強化し¹⁴ならびに炎症プロセスを制限する¹⁶能力を含む免疫活性の、原因であること¹⁴を明らかにしてきた。β-カロテンおよびリコペン以外のカロテノイドは、このタイプの免疫学的に活性なポリマーの供給源として、これまで研究されていない。

さらに、β-カロテンを含むカロテノイド、特にβ-カロテンの遍在性と、それらの公知の食品加工中に失われ易い性質により^{17、18}、酸化、特に共重合が食品中で自然に生ずるのか否かおよびどの程度まで生ずるのか、ならびにこの損失の原因となり得るのかが、不明瞭である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】米国特許第5,475,006号明細書

米国特許第7,132,458号明細書

米国特許第8,211,461号明細書

米国特許出願公開第2011-0217244号明細書

米国特許出願公開第2013-0131183号明細書

米国特許出願公開第2013-0156816号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

発明の要旨

カロテノイド酸化生成物自体が有益な性質を有するのか、例えば非ビタミンAの健康上の利益を有するのか否か、かつ／または、それは、そのような利益を有する親カロテノイドおよびその抗酸化作用であるのか否かを決定することが求められている。さらに、動物の飼料、動物およびヒトの栄養補助食品、ならびに動物およびヒトの健康を増進することができる食品などの、製品を開発することが求められている。さらに、天然源（食品源、植物、または微生物など）から酸化カロテノイド生成物を開発するために、酸化カロテノイド生成物の供給源を同定することが求められている。さらに、そのような酸化カロテノイド生成物の経済的な供給源、およびそれを生成するための方法を、見出すことが求められている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一部の実施形態では、本発明者らは驚くべきことに、食用植物源（例えば、植物またはその部分、果実、および野菜）および微生物などであってカロテノイド-酸素コポ

10

20

30

40

50

リマーの良好な供給源である、天然源を同定した。さらに、本発明者らは、一部の実施形態では、カロテノイドー酸素コポリマーの組成物と天然カロテノイド源からの生成物とを、驚くべきことに生成することができた。

【0010】

一部の実施形態では、前記天然源は、非ビタミンAカロテノイドに関連した健康上の利益のために使用することができる。一部の実施形態では、植物源および微生物は、加工中に好気性条件下で、カロテノイドー酸素コポリマーとの生成物をもたらすことができる、高レベルのカロテノイドを含む。一部の他の実施形態では、非加工植物源または微生物は、カロテノイドー酸素コポリマーを有していてもよく、直接使用することができ、またはカロテノイドー酸素コポリマー成分を単離する（またはカロテノイドー酸素コポリマーを含む成分を単離する）だけでなく一部の実施形態では得られる生成物のカロテノイドー酸素コポリマー含量を高められるようにも加工することができる。このように一部の実施形態では、本発明の方法は、単離されたまたは精製されたカロテノイドから開始することなく、むしろ天然源などのカロテノイドに富む出発生成物を得、*in situ*でカロテノイドを酸化することによって、有益な効果を発揮するカロテノイド酸素コポリマーを含む生成物をもたらす。一部の実施形態では、出発生成物は既に、カロテノイドー酸素コポリマーに富む。

【0011】

一部の実施形態では、本発明者らは、天然源からの新しいカロテノイドー酸素コポリマーを含む生成物と、それを生成する方法とを開発した。一部の他の実施形態では、本発明の方法は、所望の量のカロテノイドー酸素コポリマーを有する一貫した様式で、生成物の生成を可能にする。前記生成物には、動物およびヒトの健康を増進するなど、本明細書で述べる使用に関して利点がある。生成物を生成する能力には一貫して、規制上および消費製品の両方の観点からも利点がある。したがって本発明は、一部の実施形態において、一貫したレベルのカロテノイドー酸素コポリマーを含む生成物を提供する。

【0012】

一部の他の実施形態では、本発明者らは、前記天然源中のカロテノイドー酸素コポリマーのレベル／濃度を高め、組成物および生成物をもたらすための方法を開発した。本発明の一部の他の態様では、方法は、カロテノイドー酸素コポリマー生成の可能性が高まるようカロテノイドのレベルを増大させるのに、遺伝子改変された植物または微生物を使用することを含む。一部の他の態様では、本発明は、酸化重合の条件下で天然源を加工すること、そして極性溶媒抽出および無極性溶媒沈殿の1つまたは複数のサイクルを通してコポリマーを含む画分（単数または複数）を回収することにより、加工された天然源生成物中のカロテノイドー酸素コポリマーの、得られる濃度を高めるための方法を提供する。

【0013】

さらに、従来技術のO x B Cの組成物とは異なり、一部の他の実施形態では、本発明者らは、カロテノイドー酸素コポリマーを含む生成物であってノルイソプレノイド分解生成物ではないものを単離および／または開発することができた。一部の実施形態では、本発明の組成物および生成物の活性成分は、カロテノイドー酸素コポリマーである。一部の他の実施形態では、前記組成物および生成物は、ノルイソプレノイド分解生成物を含まない。

【0014】

一部の他の実施形態では、本発明の生成物は、カロテノイドー酸素コポリマーに加え、カロテノイドおよび不完全に酸化されたカロテノイドを含んでいてもよい。別の実施形態では、生成物は、他の酸化された非カロテノイド生成物を含んでいてもよく、前記組成物は、使用される天然源に依存する。一部の他の実施形態では、生成物が粉末である。

【0015】

ある特定の態様では、本発明は、カロテノイドー酸素コポリマーの供給源を同定する方法であって、下記を含む方法を提供する：

(a) カロテノイドを含有する供給源を選択することであり、一実施形態では、前記供給源が、食用植物源、または細菌、酵母菌、および藻類を含むがこれらに限定されない微生物

10

20

30

40

50

物源であること。一実施例では、供給源は、カロテノイドのレベルが高まるように遺伝子改変され、例えばゴールデンライスおよび M37W-P h3 コーン、ならびに遺伝子改変された微生物、例えば酵母、または「Plant carotenoids: genomics meets multi-gene engineering」Current Opinion in Plant Biology 2014 年、19 巻：111～117 頁の G. Guilianio により記載されるものである 54；

(b) 酸素への曝露、酸素に曝露される表面積の増加、酸素の分圧 ($p p O_2$) および／または温度の上昇、あるいは供給源中に存在するカロテノイドー酸素コポリマーのレベルを高める様式など、酸化重合条件下で供給源を加工すること；および

(c) カロテノイドー酸素コポリマーの供給源であるか否かを決定するために、前記加工された供給源からカロテノイドー酸素コポリマーを直接単離するもしくは同定することによって、かつ／または前記加工された供給源からカロテノイドー酸素コポリマーの指示物質を単離するもしくは同定することによって、カロテノイドー酸素コポリマーの量を定量すること。一部の実施形態では、供給源は、酸化によって、1～1000 $\mu g/g$ 湿重量または 10～10,000 $\mu g/g$ 乾燥重量と同量のカロテノイドー酸素コポリマーを提供し得る、出発量のカロテノイドを有する。一部の実施形態では、10～10,000 $\mu g/g$ 乾燥重量など、所望のカロテノイドー酸素コポリマーレベルをもたらす供給源が選択される。

【0016】

さらに一部の他の実施形態では、植物源は、ニンジン、トマト、アルファルファ、スピルリナ、バラの実、甘唐辛子、チリペッパー、パプリカ、サツマイモ、ケール、ホウレンソウ、海藻、ウィートグラス、マリーゴールド 44～48、*moringa oleifera* 49～52、および赤ヤシ油からなる群から選択される。別の実施形態では、供給源は、粉末、例えばニンジン粉末、トマト粉末、スピルリナ粉末、バラの実粉末、パプリカ粉末、海藻粉末、およびウィートグラス粉末である、植物製品である。

【0017】

一部の実施形態では、微生物源は、細菌、酵母、真菌、および藻類、例えばスピルリナ 44 と、その遺伝子改変された形であってカロテノイドー酸素コポリマーの収率が高まるようにカロテノイドレベルを増大させたものからなる群から選択される。一部のさらなる実施形態では、微生物が、下記の種：藻類：スピルリナ、*Dunaliella*、*Haematococcus*、*Murielopsis*。真菌：*Blakeslea trispora*。酵母：*Xanthophyllomyces dendrorhous*、*Rhodotorula glutinis*。細菌：*Sphingomonas* からなる群から選択される。

【0018】

一部の実施形態では、カロテノイドは、非置換 β -イオノン環構造を有し、指示物質はゲロン酸である。別の実施形態では、非置換 β -イオノン環構造を持つカロテノイドは： β -クリプトキサンチン； α -カロテン； γ -カロテン；および β -カロテンの 1 種または複数から選択され、あるいは別の実施形態では β -カロテンである。

【0019】

一部の他の実施形態では、カロテノイドは、ビタミン A を形成しない、またはビタミン A 活性を持たないものから選択され、例えばカロテノイドは、リコペン、ルテイン、ゼアキサンチン、カプサンチン、およびカンタキサンチンから選択される。

【0020】

一部の実施形態では、カロテノイドー酸素コポリマーの存在に関する指示物質は、下記の通りである：(i) β -クリプトキサンチン； α -カロテン； β -カロテン、および γ -カロテンのカロテノイドー酸素コポリマーに関しては、ゲロン酸；(ii) リコペンおよび γ -カロテンのカロテノイドー酸素コポリマーに関してはゲラン酸；(iii) ルテイン、ゼアキサンチン、およびカプサンチンのカロテノイドー酸素コポリマーに関しては、4-ヒドロキシゲロン酸および／またはそのラクトン；および (iv) カンタキサンチンのカロテノイドー酸素コポリマーに関しては 2,2-ジメチルグルタル酸およびその無水

10

20

30

40

50

物。一部の実施形態では、本発明は、そのそれぞれの指示物質を検出することによって（単離、標識、メチルエステル化、またはその他の手段を通して）、前述のカロテノイドー酸素コポリマーの存在を決定する方法を提供する。一部の実施形態では、前記指示物質の量を定量し、前記量を、カロテノイドー酸素コポリマーの量に相関させることによって前記カロテノイドー酸素コポリマーの存在を定量するのに、前記指示物質を使用することができる。

【0021】

一部の実施形態では、酸化重合条件は、空気または酸素への曝露、および、乾燥、粉末化、熱、光への曝露の増大、酸素の分圧（ $p p O_2$ ）および／または温度の上昇、あるいは酸化を促進させるその他の因子の1つまたは複数から選択される。別の実施形態では、カロテノイドー酸素コポリマーの単離は、1つまたは複数の溶媒抽出／沈殿サイクルを含む。ある特定の実施形態では、抽出用の溶媒は、酢酸エチルまたは酢酸ブチルなどの極性有機溶媒である。本発明の他の態様では、沈殿は、ヘキサン、ペンタン、またはヘプタンなどの無極性溶媒を使用して、一部の実施形態ではヘキサンを使用して実行される。

【0022】

一部の他の実施形態では、同定する方法は：元素分析、GC-MS、GPC、およびFTIRの1つまたは複数から選択される。

【0023】

一部の他の態様では、本発明は、下記を含む、カロテノイドー酸素コポリマーを含有する生成物を調製する方法を提供する：

（a）カロテノイドを含有する、または一部の実施形態ではカロテノイドに富む天然源、例えば微生物、または食用植物源、酵母、真菌、藻類、もしくは細菌を得ること。一部の実施形態では、天然源は、先に述べた植物および微生物から選択される；および

（b）前記供給源を、酸化重合条件下で加工すること。一部の実施形態では、前記条件は、空気または酸素への曝露、および、乾燥、粉末化、熱、光への曝露の増大、酸素の分圧（ $p p O_2$ ）および／または温度の上昇、あるいは酸化および／または存在するカロテノイドー酸素コポリマーのレベルを高める条件を促進させるその他の因子の1つまたは複数から選択される。

【0024】

さらに一部の他の実施形態では、本発明は、上記（b）から得られた生成物を、極性有機溶媒の1つまたは複数のサイクル、例えば酢酸エチル抽出／無極性溶媒沈殿、例えばヘキサン、ペンタン、またはヘプタン、あるいは一実施形態ではヘキサンに供すること、そしてそれからカロテノイドー酸素コポリマー含有画分を回収することによって、カロテノイドー酸素コポリマー生成物を単離するための方法を提供する。一実施形態では、プロセスで使用される溶媒は、一般に安全と認められる（GRAS）ものから選択され得る。抽出／沈殿サイクルは、酸化プロセス中に形成された可能性のあるカロテノイド分解生成物を含有しない、カロテノイドー酸素コポリマー生成物をもたらす。

【0025】

一部の実施形態では、本発明は、本発明の方法により単離されたカロテノイドー酸素コポリマーと、任意選択で適切な賦形剤とを含む組成物を含む。一部の他の実施形態では、本発明は、カロテノイドー酸素コポリマー、または本発明に準じて開発されたカロテノイドー酸素コポリマーを含有する生成物もしくは組成物を含む、動物の飼料または動物の飼料用の栄養補助食品を提供する。一部の実施形態では、生成物は、天然から供給される（例えば、果実もしくは野菜などの植物などの食品から、または藻類、真菌（酵母など）、もしくは細菌などの微生物から）。さらに一部の他の実施形態では、本発明は、カロテノイドー酸素コポリマーを含む栄養補給食品もしくは栄養補助食品もしくは食品、または、ヒトもしくは動物が使用するために本発明の方法に準じて開発されたカロテノイドー酸素コポリマーを含有する生成物もしくは組成物を提供する。

【0026】

一部の他の実施形態では、本発明は、食品源または栄養補助食品（植物由来食品または栄

10

20

30

40

50

養補助食品など)などの供給源中の、カロテノイドー酸素コポリマーを増強するための方法であって、カロテノイドー酸素コポリマーおよび／または画分を含むコポリマーの形成および／または単離が強化されるように、酸化条件下で前記食品源または栄養補助食品を加工するステップを含む方法を提供する。

【0027】

一部の他の実施形態では、本発明は：先天性免疫を高め、炎症を制限しもしくは低減させ、免疫系の機能を高め、疾患に抵抗する動物の能力を高め、疾患から回復しもしくは克服し、または健康状態を維持することの1つまたは複数から選択されるものなど、動物およびヒトの健康、および／または動物の免疫性が増強されるような、カロテノイドー酸素コポリマーおよびそれを含む組成物の使用を提供する。一部の実施形態では、カロテノイドの供給源は、食品または植物またはその他の供給源である。ある特定の実施形態では、前記酸化カロテノイド生成物を含む、強化されたニンジン粉末またはトマト粉末は、家畜用の動物の飼料に直接使用することができ(例えば、飼料1トン中、合成由来の例えばO x B C 2 p p mに一致させるのに、ニンジン粉末2~4 k g)、または前記天然源由来の「純粋な」単離された酸化カロテノイドポリマー生成物は、イヌまたはネコの咀嚼栄養補助食品に使用することができる。

【0028】

さらに、一部の他の態様では、本発明は、先天性免疫機能を刺激し高めかつ慢性炎症を制限する生成物を提供する。さらに、食物由来コポリマーである本発明の酸化カロテノイドは、有機溶媒中ではなく食物そのものの環境内のカロテノイドのブレンドから形成される。次いで得られた混合コポリマーは、粉末の形で使用することができ、または食物用栄養補助食品および化粧品を含む使用のために溶媒抽出／沈殿によって多かれ少なかれ純粋な形で単離することができる。

【0029】

本発明の追加の態様および利点は、以下に続く説明を考慮すれば明らかである。しかし、詳細な記述および特定の実施例は、本発明の好ましい実施形態を示すが、本発明の精神および範囲内での様々な変更および修正がこの詳細な記述から当業者に明らかにされることになるので、単なる例示として与えられることを理解すべきである。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

カロテノイドー酸素コポリマーの供給源を同定する方法であって、

(a) カロテノイドを含有する食用植物源または微生物源を選択すること、

(b) 酸化重合条件下で前記供給源を加工すること、および

(c) カロテノイドー酸素コポリマーの供給源であるか否かを決定するために、前記加工された供給源から前記カロテノイドー酸素コポリマーを直接単離するもしくは同定することによって、かつ／または前記加工された供給源から前記カロテノイドー酸素コポリマーの指示物質を単離するもしくは同定することによって、前記カロテノイドー酸素コポリマーの量を定量すること

を含む方法。

(項目2)

前記供給源が、酸化によって、1~1000 μg / g 湿重量または10~10,000 μg / g 乾燥重量と同量のカロテノイドー酸素コポリマーを提供し得る、出発量のカロテノイドを有する、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記酸化重合条件が、空気または酸素への曝露、および、乾燥、粉末化、熱、光への曝露の増大、酸素の分圧(p p O₂)の上昇または酸化を促進させるその他の因子の1つまたは複数から選択される、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

前記カロテノイドー酸素コポリマーの単離が、少なくとも1つの極性有機溶媒抽出／無極性溶媒沈殿サイクルを含む、項目1から3のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5)

前記溶媒が、一般に安全と認められる (G R A S) 溶媒から選択される、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記極性有機溶媒が酢酸エチルであり、前記無極性溶媒がヘキサンである、項目 4 または 5 に記載の方法。

(項目 7)

前記同定する方法が、元素分析、G C - M S、G P C、および F T I R の 1 つまたは複数から選択される、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

前記食用植物源が、植物もしくはその部分、種子、果実、または野菜である、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

前記食用植物源が、ニンジン、トマト、アルファルファ、スピルリナ、バラの実、甘唐辛子、チリペッパー、パプリカ、サツマイモ、ケール、ホウレンソウ、海藻、ウィートグラス、マリーゴールド、*moringa oleifera*、および赤ヤシ油からなる群から選択される、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

前記カロテノイドが β -イオノン環構造を有し、前記指示物質がゲロン酸である、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 11)

前記カロテノイドが、ルテイン、カプサンチン、またはゼアキサンチンであり、前記指示物質が、4-ヒドロキシゲロン酸またはそのラクトンである、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 12)

前記カロテノイドがルテインまたはゼアキサンチンである、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記カロテノイドがリコペンまたは γ -カロテンであり、前記指示物質がゲラン酸である、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 14)

前記カロテノイドがカンタキサンチンであり、前記指示物質が、2, 2-ジメチルグルタル酸またはその無水物である、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 15)

植物、藻類、真菌、種子、または微生物からなる群から選択される天然源から入手可能なカロテノイド-酸素コポリマーの量を増強する方法であって、

(a) カロテノイド生成を増強するために、前記天然源を遺伝子改変すること、および／または

(b) 前記天然源を、酸化重合条件下で加工することを含む方法。

(項目 16)

カロテノイド-酸素コポリマーを含む生成物を調製する方法であって、

(a) カロテノイドを含む食用植物源または微生物源を得ること、および

(b) 前記供給源を、酸化重合条件下で加工することを含む方法。

(項目 17)

前記酸化重合条件が、空気または酸素への曝露、および、乾燥、粉末化、熱、光への曝露の増大、酸素の分圧 (p p O₂)、温度の上昇、または酸化を促進させるその他の因子の 1 つまたは複数から選択される、項目 15 または 16 に記載の方法。

(項目 18)

項目 15 から 17 のいずれか一項に記載の方法を使用して得られた前記生成物を、1 つま

10

20

30

40

50

たは複数の溶媒抽出／沈殿サイクルに供すること、そしてそこから前記カロテノイドー酸素コポリマー含有画分を回収することによって、前記カロテノイドー酸素コポリマー生成物を単離する方法。

(項目 1 9)

少なくとも 1 つの極性有機溶媒抽出／無極性溶媒沈殿サイクルにおいて、前記溶媒が、一般に安全と認められる (G R A S) 溶媒から選択される、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記極性有機溶媒が酢酸エチルであり、前記無極性溶媒が低分子量炭化水素である、項目 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記低分子量炭化水素がヘキサンである、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記食用植物源が、植物もしくはその部分、種子、果実、または野菜である、項目 1 6 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記食用植物源が、ニンジン、トマト、アルファルファ、スピルリナ、バラの実、甘唐辛子、チリペッパー、パプリカ、サツマイモ、ケール、ホウレンソウ、海藻、ウィートグラス、マリーゴールド、*moringa oleifera*、および赤ヤシ油からなる群から選択される、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

項目 1 8 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法を使用して調製される生成物。

(項目 2 5)

抽出／沈殿サイクル後に回収された前記生成物が、カロテノイド分解生成物を含まない、項目 2 4 に記載の生成物。

(項目 2 6)

項目 1 5 から 2 3 のいずれか一項に従い調製されたカロテノイドー酸素ポリマーを含む生成物と、適切な賦形剤とを含む、組成物。

(項目 2 7)

項目 1 5 から 2 3 のいずれか一項に従い単離された前記カロテノイドー酸素コポリマー生成物と、適切な賦形剤とを含む、組成物。

(項目 2 8)

項目 1 5 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法によって調製された前記カロテノイドー酸素コポリマーを含む生成物を含む、動物飼料または動物飼料用栄養補助食品。

(項目 2 9)

項目 1 5 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法によって調製されたカロテノイドー酸素コポリマーを含む生成物を含む、栄養補給食品または栄養補助食品。

(項目 3 0)

カロテノイドを含む食品または栄養補助食品中の、カロテノイドー酸素コポリマーを増強するための方法であって、前記食品または栄養補助食品に、項目 2 4 または 2 5 に記載のカロテノイドー酸素コポリマー生成物を添加するステップを含む方法。

(項目 3 1)

動物の免疫性を高めるための、項目 2 4 または 2 5 に記載のカロテノイドー酸素コポリマー生成物の使用。

(項目 3 2)

動物の健康を増進させるための、項目 2 4 または 2 5 に記載の生成物を使用する単離されたカロテノイドー酸素コポリマーの有効量の使用。

(項目 3 3)

前記動物の健康の増進が、先天性免疫を高め、抗炎症性を高め、免疫系の機能を高め、疾患に抵抗する動物の能力を高め、疾患から回復しもしくは克服し、または健康状態を維持することの、1 つまたは複数から選択される、項目 3 2 に記載の使用。

10

20

30

40

50

(項目 3 4)

前記動物がヒトである、項目 3 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の使用。

(項目 3 5)

項目 1 5 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法を使用して調製された、項目 3 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の使用のために一貫した所望量のカロテノイド酸素コポリマーを有する生成物。

(項目 3 6)

ノルイソプレノイド副生成物を含まない、自然を供給源とする O x P V A 組成物。

(項目 3 7)

ノルイソプレノイド副生成物を含まない、自然を供給源とする O x C a r 組成物。

10

(項目 3 8)

酸化重合条件下でカロテノイドを含む天然源を加工すること、それを 1 つまたは複数の溶媒抽出／沈殿サイクルに供すること、それから前記カロテノイドー酸素コポリマー含有画分を回収することから誘導された、項目 3 6 または 3 7 に記載の組成物。

(項目 3 9)

前記天然源が、カロテノイド生成が増強されるように遺伝子改変されている、項目 3 8 に記載の組成物。

【図面の簡単な説明】【0030】

【図 1】図 1 は、β-カロテンと有機溶媒中の分子状酸素との自発的反応が、主としてβ-カロテンー酸素コポリマーを、大部分馴染みのある短鎖ノルイソプレノイド化合物と一緒に発生させる、カロテノイドの酸化重合のモデルを示す。β-カロテンの完全酸化は、高度に再現性があり、分子状酸素をほぼ 8 モル当量消費し、それに付随して最終生成物、O x B C の重量が約 3 0 % 増加する。リコペン、ルテイン、およびカンタキサンチンを含むカロテノイドの他の例は、酸化重合が、約 6 0 0 の構成要素から構成されるカロテノイド族に共通した一般的現象であることを示す非常に類似した様式で振る舞う。このモデル反応は、植物由来食品中に存在するカロテノイドおよび関連物質が類似の反応を受けて類似の生成物を与えるか否かを決定するための、基礎として使用される。

20

【0031】

【図 2 A】図 2 A は、プロビタミン A (P V A) カロテノイドの酸化重合が、炭素骨格の二重の酸化的開裂により、少量の生成物としてゲロン酸 (G A) を発生させることを示す。2 個の共役β-イオン環を持つβ-カロテンは、分子当たり 2 つの G A をもたらすことができる。G A は、β-カロテン、α-カロテン、γ-カロテン、およびβ-クリプトキサンチンから発生したノルイソプレノイド生成物で最も豊富にあり、1 個のβ-イオン環がそれぞれ、分子当たりただ 1 つの G A をもたらすことができる。

30

【0032】

【図 2 B C D】図 2 B は、非プロビタミン A カロテノイドリコペンの酸化重合が、炭素骨格の酸化的開裂により、少量の生成物としてゲラン酸を発生させることを示す。一部の実施形態では、リコペンは、分子当たり 2 つのゲラン酸をもたらし得るが、γ-カロテンは、1 つのみ発生させることができる。ゲラン酸は、γ-カロテンの指示物質とすることもできることに、留意すべきである。図 2 C は、非プロビタミン A カロテノイドであるルテインの酸化重合が、4-ヒドロキシゲロン酸および／またはそのラク톤を発生させることを示す。これは、ゼアキサンチンおよびカプサンチンのカロテノイドー酸素コポリマーに関する指示物質でもある。図 2 D は、非プロビタミン A であるカンタキサンチンの酸化重合が、2, 2-ジメチルグルタル酸およびその無水物を発生させることを示す。

40

【0033】

【図 2 E】図 2 E は、リコペン、γ-カロテン、ルテイン、ゼアキサンチン、カプサンチン、およびカンタキサンチンの化学構造を示す。

【0034】

【図 3】図 3 は、G A と G A - d 6 メチルエステルとの G C - M S 強度比、I / I 6 を、

50

2種の化合物の量の既知の比、 m/m_6 に対してプロットした、典型的な校正曲線である。

【0035】

【図4】図4は、SIMモードで記録されたニンジンジュース試料のゲロン酸分析の、GC-MSクロマトグラムである。シグナルは、GA-d₆ (A、 $m/z = 160$) および GA (B、 $m/z = 154$) の、メチルエステルのものである。

【0036】

【図5】図5は、SIMモードで記録された生のトマトの試料の、ゲロン酸分析のGC-MSクロマトグラムである。GA-d₆ (A、 $m/z = 160$) および GA (B、 $m/z = 154$) の、メチルエステルのシグナルが示される。

【0037】

【図6】図6は、走査モードで記録された、ニンジンジュース (上) および生のトマト (下) の試料のゲロン酸分析のGC-MSクロマトグラムを示す。GA-d₆ (A) および GA (B) のメチルエステルに関する保持時間は、それぞれ7.43および7.46分である。

【0038】

【図7】図7は、ニンジンおよびトマト粉末の抽出物の逐次溶媒沈殿によって単離された、ポリマー画分のFTIRスペクトルを示す。上から順に：ニンジン粉末#1を、完全酸化β-カロテン (OxBC) と比較し、トマト粉末を、完全酸化リコペン (OxLyC) と比較する。

【0039】

【図8】図8は、OxBCポリマー (実線) と比較した、抽出されたニンジン粉末#1 (点線) から得られた沈殿画分の、メタノール溶媒におけるUV-Visスペクトルを示す。

【0040】

【図9】図9は、OxBCポリマー (実線) の場合と比較した、抽出されたニンジン粉末#1 (点線) から得られた3×沈殿画分のGPCを示す。UV吸光度を220~400nmでモニタした。注入された量は、両方の試料に関して200μgであった。7.7分でのOxBCポリマーに関するメジアンMWは、約700~800Daである (Burtonら13)。

【0041】

【図10】図10は、250℃のGCインジェクタポートで熱分解した後の、OxBCポリマー (下) および抽出されたニンジン粉末#2から得られた沈殿した画分 (上) の、GC-MSクロマトグラムを示す。他に示さない限り、GC-MSライブラリに対して50%よりも大きい一致で同定された化合物は、1: β-シクロシトラール; 2: β-ホモシクロシトラール (2-(2, 6, 6-トリメチルシクロヘキサ-1-エニル) アセトアルデヒド); 3: 4, 8-ジメチルノナ-1, 7-ジエン-4-オール (38~47%一致); 4: 5, 6-エポキシβ-イオノン; 5: ジヒドロアクチニジオリド; 6: 4-オキソβ-イオノンである。上部トレースのピーク7は、α-イオノンとして同定される (40%一致)。

【0042】

【図11AB】図11は、(A) ニンジン粉末#2、(B) トマト粉末、(C) トマトの搾りかす、(D) バラの実の粉末、(E) 天日乾燥したアルファルファ、(F) ダルス海藻粉末、(G) ウィートグラス粉末、および (H) パプリカの、酢酸エチル抽出物から単離されたヘキサン沈殿固形分のポリマーの性質を例示する、GPCクロマトグラムを示す。

【図11CD】図11は、(A) ニンジン粉末#2、(B) トマト粉末、(C) トマトの搾りかす、(D) バラの実の粉末、(E) 天日乾燥したアルファルファ、(F) ダルス海藻粉末、(G) ウィートグラス粉末、および (H) パプリカの、酢酸エチル抽出物から単離されたヘキサン沈殿固形分のポリマーの性質を例示する、GPCクロマトグラムを示す。

【図11EF】図11は、(A) ニンジン粉末#2、(B) トマト粉末、(C) トマトの搾りかす、(D) バラの実の粉末、(E) 天日乾燥したアルファルファ、(F) ダルス海藻粉末、(G) ウィートグラス粉末、および (H) パプリカの、酢酸エチル抽出物から単

10

20

30

40

50

離されたヘキサン沈殿固形分のポリマーの性質を例示する、GPCクロマトグラムを示す。

【図11GH】図11は、(A)ニンジン粉末#2、(B)トマト粉末、(C)トマトの搾りかす、(D)バラの実の粉末、(E)天日乾燥したアルファルファ、(F)ダルス海藻粉末、(G)ウィートグラス粉末、および(H)パプリカの、酢酸エチル抽出物から単離されたヘキサン沈殿固形分のポリマーの性質を例示する、GPCクロマトグラムを示す。

【0043】

【図12】図12は、完全酸化(A)リコペン(OxLyc)、(B)ルテイン(OPxLut)、および(C)カンタキサンチン(OxCan)の、酢酸エチル溶液からヘキサン沈殿によって単離されたポリマー画分の、GPCを示す。

【0044】

【図13】図13は、(上から順に)：ニンジン粉末#2、トマトの搾りかす、バラの実の粉末、天日乾燥したアルファルファ、ウィートグラス粉末、ダルス海藻粉末、およびパプリカの、酢酸エチル抽出物から単離されたヘキサン沈殿ポリマー固形分の、FTIRスペクトルを示す。

【0045】

【図14】図14は、完全酸化カンタキサンチン(OxCan)およびルテイン(OPxLut)の、FTIRスペクトルを示す。

【0046】

【図15AB】図15Aは、ゲラン酸メチル(化合物A)を得るための、Me₃OB₄Fによるゲラン酸のエステル化に関する反応スキームを示し；15Bは、重水素で標識されたゲラン酸の、提案された合成を示し；15Cは、Me₃OB₄Fでエステル化した、トマト粉末抽出物およびOxLyc低MW画分のGCクロマトグラムであり、化合物Aは、その質量スペクトルによって同定される。保持時間の差は、分析実行条件の少しの差の結果である。

【0047】

【図15C】図15Aは、ゲラン酸メチル(化合物A)を得るための、Me₃OB₄Fによるゲラン酸のエステル化に関する反応スキームを示し；15Bは、重水素で標識されたゲラン酸の、提案された合成を示し；15Cは、Me₃OB₄Fでエステル化した、トマト粉末抽出物およびOxLyc低MW画分のGCクロマトグラムであり、化合物Aは、その質量スペクトルによって同定される。保持時間の差は、分析実行条件の少しの差の結果である。

【0048】

【図16】図16は、空気中に静置し光に曝露したときの、脱水したニンジン中のβ-カロテンに、付随する損失がある、ゲロン酸の形成を示すグラフである。時間0での測定は、新たに脱水したニンジンピューレを使用して、その後の時点では、トレイ上に薄く延ばしかつ空気および光に曝露した、乾燥ニンジン粉末で測定した。

【0049】

【図17】図17は、ニンジンピューレ、1日目(A)；脱水したニンジンピューレ、0日目(B)；ニンジン粉末、0日目(C)；およびニンジン粉末、21日目(D)の、グレースケール写真(目視比較)である。カラーでは、(A)および(B)で橙の様々な濃淡があり、これらは(C)よりも濃く、(C)が(D)よりも濃い。

【0050】

【図18】図18は、ニンジン粉末試料の、空気への曝露を制限した効果の、グレースケール写真(目視比較)であり：(A)試料は、脱水したニンジンチップをコーヒブレードミルで粉碎し、次いでジャー内に4週間と6日間密封することによって調製し(色は、橙であった)；(B)試料は、乾燥ニンジンピューレを食品プロセッサブレードで粉末化し、コーヒバーミルで粉碎し、次いで空気に1週間と6日間曝露することによって調製した(色は、褐色であった)。

【0051】

【図19AB】図19は、ルテイン、ゼアキサンチン、およびカプサンチンの自動酸化の

10

20

30

40

50

低分子量マーカを示し：19Aは、その親ラクトンと Me_3OBF_4 との反応による、ゲロン酸4,5-ジデヒドロメチル（化合物B）の形成を示し；19Bは、重水素標識マーカ、4-ヒドロキシゲロン酸-d₆のラクトンの、1つの可能性ある合成を示し；19Cは、ダルス粉末抽出物およびOxLutの低MW画分の、 Me_3OBF_4 でエステル化したもののGCクロマトグラムを示し、化合物Bの保持時間は7.32分で示される。共通の質量スペクトルイオンは、 $m/z = 184$ (M⁺)、152、125、109、83、81、69、55、43を含む。

【0052】

【図19C】図19は、ルテイン、ゼアキサントシン、およびカプサントシンの自動酸化の低分子量マーカを示し：19Aは、その親ラクトンと Me_3OBF_4 との反応による、ゲロン酸4,5-ジデヒドロメチル（化合物B）の形成を示し；19Bは、重水素標識マーカ、4-ヒドロキシゲロン酸-d₆のラクトンの、1つの可能性ある合成を示し；19Cは、ダルス粉末抽出物およびOxLutの低MW画分の、 Me_3OBF_4 でエステル化したもののGCクロマトグラムを示し、化合物Bの保持時間は7.32分で示される。共通の質量スペクトルイオンは、 $m/z = 184$ (M⁺)、152、125、109、83、81、69、55、43を含む。

【0053】

【図20】図20は、カンタキサントシンの自動酸化の低分子量マーカを示し：20(A)は、2,2-ジメチルグルタル酸からその無水物およびそのジメチルエステル（化合物C）への変換を示し；20(B)は、イソ酪酸-d₆出発材料からの、重水素標識マーカ、2,2-ジメチルグルタル酸の1つの可能性ある合成を示す。

【発明を実施するための形態】

【0054】

発明の詳細な説明

定義／略称

使用される略称：BHT、ブチル化ヒドロキシトルエン（2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール）；GA、ゲロン酸；OxBC、完全酸化β-カロテン；OxLyc、完全酸化リコペン；OxLut、完全酸化ルテイン；OxCan、完全酸化カンタキサントシン；OxPVA、酸化プロビタミンAカロテノイド；PVA、プロビタミンAカロテノイド；SPE、固相抽出。

【0055】

「動物」は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ウシ、家禽、および魚を含むがこれらに限定されない、任意の動物を意味する。

【0056】

「十分な量」または「有効量」は、健康を改善するのに必要とされる、例えば先天性免疫機能を刺激し炎症プロセスを制限することも含めて免疫系の機能を高め、疾患に抵抗する能力を高め、疾患から回復しもしくは克服し、健康状態を維持し、関節可動性を増大させ、活動レベルを上昇させ、または被覆品質を改善するのに必要とされる、酸化的に変換されたカロテノイドもしくはカロテノイド-酸素ポリマーまたはその分画成分の量を意味する。本発明の方法を実施するのに使用される本発明の組成物の有効量は、投与の様式、動物のタイプ、体重、および動物の健康全般に応じて様々である。最終的には、主治医または獣医師が、適切な量および投薬レジメンを決定することになる。そのような量を、「十分な量」または「有効量」と呼ぶ。

【0057】

本明細書で使用される「カロテノイド」は、植物、藻類、細菌、およびある特定の動物、例えば鳥類および甲殻類に見出すことができる、テルペノイド群の天然に存在する色素を指す。カロテノイドには、炭化水素（即ち、酸素がない）であるカロテン、およびそれらの酸素化誘導体（即ち、キサントフィル）が含まれるが、これらに限定するものではない。カロテノイドの例には、リコペン；α-カロテン；γ-カロテン；β-カロテン；エキネノン；イソゼアキサントシン；カンタキサントシン；シトラナキサントシン；β-アポ-8'-

10

20

30

40

50

カロテン酸エチルエステル；ヒドロキシカロテノイド、例えばアロキサンチン、アポカロテノール、アスタセン、アスタキサンチン、カプサンチン、カプソルビン、カロテンジオール、カロテントリオール、カロテノール、クリプトキサンチン、 β -クリプトキサンチン、デカプレノキサンチン、エピルテイン、フコキサンチン、ヒドロキシカロテノン、ヒドロキシエキネノン、ヒドロキシリコペン、ルテイン、リコキサンチン、ニューロスポリン、フィトエン、フィトフルオエン、ロドピン、スフェロイデン、トルレン、ビオラキサンチン、およびゼアキサンチンと；カルボン酸カロテノイド、例えばアポカロテン酸、 β -アポ-8'-カロテン酸、アザフリン、ビキシシ、カルボキシルカロテン、クロセチン、ジアポカロテン酸、ニューロスポラキサンチン、ノルビキシシ、およびリコペン酸が含まれる。

10

【0058】

本明細書で使用される「カロテノイド-酸素コポリマー」、「カロテノイドコポリマー」、および「ポリマー」は、分子状酸素との自発的反応によって、その反応性二重結合で完全に酸化された不飽和化合物であるカロテノイドであって、主生成物としてカロテノイドと酸素とのコポリマーをもたらす、かつ任意の付随するノルイソプレノイド副生成物を含まないか、またはこの副生成物から分離され、かつ単離される、カロテノイドを指す。

【0059】

本明細書で使用される「含む (comprising)」は、「含む (including)」および「含有する」と同義であり、包括的で制約がなく、追加の列挙されていない要素または方法ステップを排除しない。

20

【0060】

本明細書で使用される「からなる」は、制約があり、均等物の原理の支配下にあり、特許請求の範囲で指定されていないいかなる要素、ステップ、または成分も含まない。

【0061】

「免疫系の機能を高め、疾患に抵抗する能力を高め、疾患から回復もしくは克服し、または健康状態を維持する」ことは、疾患を引き起こす抗原、ウイルス、細菌、または様々なストレスに曝露した後に動物の健康を評価することを含むがこれらに限定されない多くの方法で評価することができ、曝露後に疾患に罹らずまたは疾患から回復する能力を、対照動物と比較する。

【0062】

本明細書で使用される「完全酸化カロテノイド」は、分子状酸素との自発的反応によって、その反応性二重結合で完全に酸化されている不飽和化合物であるカロテノイドであって、カロテノイドと酸素とのコポリマーと、ノルイソプレノイド分解生成物との混合物をもたらすものを指す。

30

【0063】

本明細書で使用される「GA」は、ゲロン酸を指す。

【0064】

本明細書で使用される「天然」または「天然源」は、植物源（植物もしくはその部分であって、その部分には、種子、葉、および幹を含めてもよいがこれらに限定するものではないもの、果実、または野菜が含まれる）または微生物を指す。「天然生成物」または「天然を供給源とする生成物」は、天然源を加工することから誘導された生成物を指す。

40

【0065】

「プロビタミンAカロテノイド」は、即ち α -、 β -、および γ -カロテン、ならびに β -クリプトキサンチンを含むがこれらに限定することのない、酸化によってビタミンAに変換することができるようなカロテノイドを指す。

【0066】

「OxBC」は、約85重量%の β -カロテン-酸素コポリマーと約15%のノルイソプレノイドと呼ばれる低分子量分解生成物とを含む、純粋な β -カロテンの酸素との自発的反応の合成生成物である完全酸化カロテノイド組成物である。純粋なカロテノイドから誘導されたその他のカロテノイド酸素コポリマー組成物は、同様に示され、例えば完全酸化

50

ルテインに関してはO x L u t、完全酸化リコペンに関してはO x L y c、または完全酸化カンタキサンチンに関してはO x C a nである。

【0067】

「O x P V A」は、他の残留生成物（即ち、カロテノイドー酸素コポリマーおよびその他の酸素化副生成物）を含み得る、1種または複数の完全酸化プロビタミンAカロテノイド（「P V A」）を含む、カロテノイドー酸素コポリマー組成物である。実施例2などの実施例を参照すると、それは、存在する、推定全プロビタミンAカロテノイドー酸化コポリマーに言及している。「O x C a r」は、プロビタミンAがその他の残留生成物（即ち、カロテノイドー酸素コポリマーおよびその他の酸素化副生成物）を含む可能性があってもなくても、1種または複数の完全酸化カロテノイドを含む、カロテノイドー酸素コポリマー組成物を指す。一部の実施形態では、O x P V AおよびO x C a rは、ノルイソプレノイドを含んでいてもよい。

10

【0068】

説明

【0069】

高度不飽和化合物は、酸化中に優先的に重合することが長く公知であるが、カロテノイド酸化における重合の支配および有意性は、本発明者らの研究以前は驚くべきことに見逃されてきた。重要なのは、β-カロテンー酸素コポリマーが、先天性免疫機能を刺激することおよび炎症プロセスを制限することを含む免疫学的活性を示すことである。予測される非ビタミンA免疫学的活性を持つ、本明細書に開示されるカロテノイドー酸素コポリマーを含有する食品（植物源など）の、本発明者らの発見には、ヒトおよび動物の栄養を含む重要な健康上の示唆がある。例えば、本明細書に記述される一実施例では、ニンジン粉末（元来β-カロテンに富む）から単離された化合物の化学的性質は、元素分析、GPC、IR、GC-MS熱分解、およびUVデータをO x B Cから得られたデータと比較することによって確認した。その他の乾燥食品から同じ様式で単離された化合物の元素分析、IR、およびGPCデータは、それらの酸素-コポリマーの性質を裏付けた。

20

【0070】

そのようなコポリマーの有意なレベルを見出すことは、抗酸化作用に対して、親カロテノイドの酸化生成物に関わるメカニズムが非ビタミンAの健康上の利益に起因することを示す。その酸化的損失により親カロテノイド活性と言われるものの潜在的な減少ではなく、本発明者らは本明細書に、ポリマー化合物に変換されたカロテノイドが、以前は認識されなかった有益な免疫学的潜在性を有することを開示する。この主張は、百万分率（ppm）の低いO x B Cが補われた食餌を使用した家畜およびペットにおける研究で本発明者らが観察した、健康上の利益によって裏付けされる。本明細書では、カロテノイドの非ビタミンAの利益に起因するようなコポリマーの、天然源の対応物に関する食品（乾燥食品など）において首尾良くなされた調査を、開示する。一実施形態では、カロテノイドー酸素コポリマー（単数または複数）を含む生成物は、単離されたまたは合成カロテノイドとは対照的に、in situでカロテノイドに富む生成物から作製される。

30

【0071】

β-カロテンー酸素コポリマーは、新鮮な食品での低い十億分率（ppb）から乾燥食品での百万分率（ppm）まで、約千倍の範囲を包含するレベルで、ニンジン、トマト、サツマイモ、パプリカ、バラの実、海藻、アルファルファ、およびミルクを含む一般的な新鮮または乾燥した食品中で生じる。一部の乾燥食品から単離されたコポリマーは、千分率レベルに達し—これは当初のカロテノイドレベルに匹敵するものである。補われたβ-カロテンー酸素コポリマーのin vivo生物活性は、百万分率レベルで既に文書化されており、ある特定の食品がそのような活性を有することを示唆している。

40

【0072】

本発明者らは最近、純粋なβ-カロテンおよびその他のカロテノイドが酸化して免疫学的に活性な非ビタミンA生成物を形成するという、新規な発見を報告した13、14。この発見は、この非ビタミンA活性が、ビタミンA活性と全く同じように、カロテノイドの従

50

来の酸化変換を必要とすることを示唆する。重要なのは、自発的反応が、主としてカロテノイド-酸素コポリマー化合物が形成されるように、ならびに少量の通常のほとんど馴染みのあるノルイソプレノイド分解生成物が形成されるように、酸素を添加することによって特徴付けられることである（図1）¹³。本発明者らは、カロテノイド-酸素コポリマーの天然源を同定する方法を開発するために、β-カロテン-酸素コポリマー（約85%w/w）およびノルイソプレノイド化合物（約15%）から構成される（図1）¹³高度に再現性ある生成物（OxBC）をもたらす、溶液中のβ-カロテンのモデル酸化のこの詳細な理解を使用する。

【0073】

食品マトリックス中のカロテノイド-酸素コポリマーは、任意の直接化学または生化学測定を容易に行うことができ難いので、本発明者らは、酸化およびポリマー形成の程度を決定するのに指示物質／マーカーを使用する新規な間接的手法を開発した。これらは図2に示されており、（i）：ゲロン酸は、β-クリプトキサンチン；α-カロテン；β-カロテン、およびγ-カロテンのカロテノイド-酸素コポリマーに関するマーカーであり；（ii）ゲラン酸は、リコペンおよびγ-カロテンのカロテノイド-酸素コポリマーに関するマーカーであり；（iii）4-ヒドロキシゲロン酸および／またはそのラク톤は、ルテイン、ゼアキサンチン、およびカプサンチンのカロテノイド-酸素コポリマーに関するマーカーであり；（iv）2,2-ジメチルグルタル酸およびその無水物は、カンタキサンチンのカロテノイド-酸素コポリマーに関するマーカーである。

【0074】

例としてゲロン酸を挙げると、カロテノイド-酸素コポリマーの存在を定量することができる。コポリマー生成物は、モデル酸化の過程の全体を通して優勢であり（≥80%）、最終的な取込みはほぼ8モル当量の酸素に相当するが、GA、最も豊富なノルイソプレノイド生成物¹³は、全反応生成物重量の1~3%で連続的に形成される（参考文献13の図8参照）。したがって、GAに関する平均値が全生成物重量の約2%であるとする、酸化生成物の量は、およそ50倍高いと推定することができ、これがコポリマーの優勢度であるとすれば、約50：1のポリマー：GAの比になる。しかし実際の比は、その近似的な性質が与えられたとすれば、25：1から100：1の間であり得る。

【0075】

カロテノイドが天然に存在する、即ちある特定の植物源、例えば果実および野菜、ならびにある特定の微生物（藻類、真菌、および細菌）という、さらにより複雑な環境内で、酸化および関連ある反応生成物を見出し得るという本発明者らの発見は、複雑な微小環境、ならびに生物材料中の多くのその他の潜在的に反応性のある化合物、即ち初期カロテノイド酸化反応を、種々の生成物の結果をもたらす無数の他の経路に逸らす化合物に鑑みて、明らかではなくまたは予測可能ではなかった。

【0076】

そのような天然源から単離された本発明のカロテノイド-酸素コポリマー生成物（単数または複数）は、OxBC、またはその他の純粋なカロテノイドの完全酸化から得られた生成物（例えば、それぞれリコペン、ルテイン、およびカンタキサンチンからのOxLyc、OxLut、またはOxCan）と同じではなく、それは後者が低分子量化合物も含むからである（本明細書では、食品由来生成物からのポリマーの単離プロセスによって除去される）。一部の実施形態では、天然源生成物はしばしば、1種または複数の未反応のカロテノイドも依然として含む。例えば、天然源生成物は、純粋なカロテノイドから誘導されたOxBCと比較したニンジン粉末GCMs熱分解クロマトグラムを示す図10に示されるように、重合反応中に組み込まれるようになったその他の化合物を含んでいてもよい。そのような一部の実施形態では、本発明は、天然源から誘導されたそれぞれのカロテノイド-酸素コポリマー成分を含む、OxPVAまたはOxCAR組成物を提供する。一部の実施形態では、前記組成物は、ノルイソプレノイド副生成物を含まない。

【0077】

別の実施形態では、本発明は、カロテノイド-酸素コポリマーを含む天然源から生成物を

10

20

30

40

50

調製する方法を提供する。一実施形態では、方法は、G R A S 溶媒を使用することを含む。別の実施形態では、方法は、酢酸エチル、G R A S 溶媒で、乾燥食品源を抽出することを含み、このステップは、全てではなくともほとんどのβ-カロテン-酸素コポリマーを溶解することになり、次いでその他のより多くの可溶性化合物を含まないコポリマー化合物を、無極性溶媒を慎重に添加しながらゆっくり沈殿させる。一般に、本発明の抽出／沈殿プロセスは、ポリマーを溶解する最小量の溶媒を必要とし、次いで例えば無極性溶媒を1滴ずつ添加してポリマーを溶液から沈殿させ、次いでそれを濾過または遠心分離によって収集する。本発明の一態様では、乾燥植物由来食品からこのように単離されたカロテノイド-酸素コポリマー生成物は、その他の予想される低分子量カロテノイド分解生成物（例えば、β-カロテン酸化分解化合物を含有することが予測される生成物中のゲロン酸など、上述の指示物質を含む）を含有しない。このことは、後続の溶媒沈殿精製なしにそのような生成物を含む、純粋なカロテノイド源から誘導された完全酸化カロテノイド（O x B C、O x L y c、O x L u t、またはO x C a nなど）とは全く異なる。カロテノイド-酸素コポリマーの存在を評価するための間接的方法。

概説

【0078】

本発明は、プロビタミンAカロテノイドなどのカロテノイドの酸化重合の、間接的な低分子量マーカーの使用を開示し、例えばβ-カロテンコポリマーの約2%のゲロン酸を使用して、その潜在的な供給源中のカロテノイド-酸素コポリマーの量を評価することができる。本発明は、その他の低分子量マーカーを、リコペン、ルテイン、ゼアキサンチン、およびカンタキサンチンを含むその他の選択されたカロテノイドの酸化重合の指示物質として使用できることも開示する。

【0079】

G Aは、生鮮食品、例えばニンジンジュースおよび生のトマトであって、酸化が最小限に抑えられることが期待されるものから、酸素の分圧（p p O₂）または温度の上昇、脱水、粉碎、粉末化、および光への曝露を含む偶然の酸化を引き起こし易いプロセスによって乾燥させた食品に及ぶ、様々な食品で測定された。G Aの決定は、同定されたG Aに富む食品中の、カロテノイド-酸素コポリマー化合物を単離するための有用な指針であり、ゲロン酸レベルが高い食品源（乾燥）を、固体酸素コポリマー化合物の抽出および単離のための候補として選択した。即ち、カロテノイド酸化は、天然源中で生じていた。さらにゲロン酸のレベルは、乾燥を通した酸素への曝露を増大させおよび影響を受ける表面積を増大させる、プロセスに供される食品源中で非常に高いことがわかった。このことは、その他のカロテノイド-酸素コポリマーおよびそれらの指示物質と同様である。

方法

【0080】

本明細書では、本発明者らは、ゲロン酸およびカロテノイド-酸素コポリマー生成物が、プロビタミンAカロテノイドなどのカロテノイドを含有する植物ベースの食品中で、特に加工された食品中で、天然に存在することを示した。さらに本発明者らは、本明細書で、G Aが、これら食品中のβ-カロテンおよびその他のプロビタミンAカロテノイドの酸化の特定の指示物質であることを示した。G Aが天然に存在することに関する以前の報告が多少ある25、26。G Aは、ある特定のノルイソプレノイド化合物、例えばβ-シクロシトラールの酸化によって実験室で作製することができるが、植物において、これらの化合物は、それ自体がカロテノイド酸化に由来する可能性がある。しかし動物由来の生成物では、G Aは、食餌を含むいくつかの供給源から、およびビタミンAの酸化から得ることが可能である。同様に本発明者らは、その他のカロテノイド-酸素コポリマーの存在に関する低分子量指示物質の有用性に関する類似の発見をした。

【0081】

モデルとしてβ-カロテンの酸化¹³を使用することにより、本発明者らは本明細書で、食品中のG Aをβ-カロテン-酸素コポリマー形成に相関させる方法を開発した。実質的な量のカロテノイド-酸素コポリマーを、試験をした全ての食品で最高濃度のG Aを有す

るニンジン粉末から単離した。ニンジン粉末#1は、ニンジン粉末#2のGAの2倍を有しており、コポリマーの量のほぼ2倍をもたらした。ニンジン粉末抽出物から単離した化合物の化学的アイデンティティは、GPC、元素分析、IR、およびUV-Vis分光法、およびGC-MS熱分解を組み合わせた証拠によって確立され、β-カロテン-酸素コポリマーが主として存在することを強く指摘している。

【0082】

GAは、α-カロテン、β-カロテン、γ-カロテン、およびβ-クリプトキサンチンを含む、その親カロテノイドがβ-イオノン環基を有するプロビタミンAカロテノイド-酸素コポリマーの、間接的マーカーとして使用され得るが、その他の間接的マーカーが、ルテイン、ゼアキサンチン、カプサンチン、リコペン、γ-カロテン、またはカンタキサンチンなど、同じまたはその他のカロテノイドに使用することができる。例えば、一実施形態では、4-ヒドロキシゲロン酸またはそのラク톤を、ルテイン、ゼアキサンチン、またはカプサンチンの間接的マーカーとして使用することができる。別の実施形態では、ゲラン酸を、リコペンまたはγ-カロテンの間接的マーカーとして使用することができる。別の実施形態では、2,2-ジメチルグルタル酸またはその無水物を、カンタキサンチンの間接的マーカーとして使用することができる。他の実施形態では、これらのマーカーのエステル（メチルエステルなど）および／または標識形態（重水素標識など）を、化学分析を容易にするのに使用することができる。

【0083】

したがって一部の実施形態では、本発明は、供給源中のカロテノイド-酸素コポリマーの存在を決定するための方法であって：

（a）供給源中に存在することが公知である純粋なカロテノイドを酸化すること、そして得られたカロテノイド-酸素コポリマー（付加生成物）と指示物質（反応の開裂生成物）との比を決定すること、そして時間、温度、圧力、供給源、出発材料の量、および酸素への曝露から選択される1つまたは複数の条件下で開裂生成物に対するカロテノイド-酸素コポリマーの校正曲線を作成すること；

（b）酸化条件下で供給源を加工すること、そして得られる指示物質（反応の開裂生成物）の量を同定および／または定量すること；および

（c）カロテノイド-酸素コポリマーのその存在または欠如を明らかにし、かつ／または源供給源中の、得られるカロテノイド-酸素コポリマーの量を決定するために、（b）の結果と、（a）の下で開発された校正曲線とを使用することを含む方法を提供する。

【0084】

一部の実施形態では、完全酸化によって類似のレベルのカロテノイド-酸素コポリマーに変換され得る、1~1000百万分率（ppm）の湿重量または10~10,000ppmの乾燥重量のカロテノイドを含む供給源が、選択される。

【0085】

一部の実施形態では、カロテノイドがβ-イオノン環を有する。別の実施形態では、カロテノイドは：α-カロテン、γ-カロテン、β-カロテン、およびβ-クリプトキサンチンからなる群から選択される。一部の実施形態では、カロテノイドがβ-イオノン環基を有する場合、指示物質がゲロン酸である。一部の実施形態では、カロテノイドは、ルテイン、ゼアキサンチン、カプサンチン、リコペン、γ-カロテン、およびカンタキサンチンからなる群から選択され、そのそれぞれの指示物質は、上述の通りである。

【0086】

一部の他の実施形態では、供給源は、ニンジン、トマト、アルファルファ、スピルリナ、バラの実、甘唐辛子、チリペッパー、パプリカ、サツマイモ、ケール、ホウレンソウ、海藻、ウィートグラス、マリーゴールド45~48、moringa oleifera 49~52、および赤ヤシ油からなる群から選択される。別の実施形態では、供給源は粉末形態である。別の実施形態では、供給源はトマトの搾りかすである。別の実施形態では、供給源は微生物である。

カロテノイドー酸素コポリマー生成物の単離

【0087】

大量のカロテノイドー酸素コポリマーを、 β -カロテン以外のカロテノイド（例えば、リコペン、ルテイン、およびカプサンチン）が豊富なその他の乾燥食品からも単離した。これらの食品には、トマト粉末、バラの実粉末、パプリカ、天日乾燥したアルファルファ、およびウィートグラス粉末が含まれる。

【0088】

ポリマー化合物の構成は、それらが形成される環境によってある程度まで修正されることが予測される。酸化の偶発的性質、反応部位の複雑さおよび多様性、ならびにその他の反応性化合物の存在は、均質有機溶媒中での純粋な個々のカロテノイド（例えば、 β -カロテン、リコペン、ルテイン、カンタキサンチン）の高度に再現性ある酸化の場合とは異な

10

【0089】

食品から単離された生成物のGPCからの分子量プロファイルは、確かに、個々の代表的なカロテノイドの酸化の場合と比べて複雑さを示す。食品化合物のほとんどの実験式は、個々のカロテノイドの酸化から得られたコポリマーの場合よりも多くの水素が存在することを示し、飽和炭化水素成分を含むいくらかの化合物が少量存在することを示唆している。また、少量の窒素含有成分も存在し、ニンジン抽出物の熱分解は、OxBCポリマーで

20

【0090】

いくつかの乾燥食品では、コポリマーのレベルは、親カロテノイド、例えばニンジンおよびトマトの粉末における、当初のレベルに匹敵する。

【0091】

したがって、一実施形態では、本発明は、追加の酸素化カロテノイド生成物を、カロテノイドを含む供給源から単離する方法を提供する。

【0092】

一部の実施形態では、カロテノイドー酸素コポリマーの純度および量は、加工中の抽出／沈殿サイクルの数によって、所望のレベルに調節することができる。一実施形態では、本発明は、既知のレベルのカロテノイドー酸素コポリマーを持つ生成物が生成されるように、酸化を通して、既知のレベルのカロテノイドを持つ供給源を選択することができ、かつ／または既知の量のカロテノイドー酸素コポリマーもしくはその既知の量を含む組成物であって所望のその他の賦形剤もしくは食品を含んだもの、例えば既知の量のカロテノイドー酸素コポリマーを持つ栄養補助食品として、動物飼料の栄養補助食品に組み込んで、もしくは栄養補助食品として、またはヒトの食事もしくは栄養補助食品源に組み込んで、もしくはそのような食事もしくは栄養補助食品として、スパイス、パン、加工肉製品、スープ、およびその他の食品を含むがこれらに限定されないものを添加することによって、一貫した所望の量のカロテノイドー酸素コポリマーを持つ組成物を生成する方法を提供する。

30

カロテノイドー酸素コポリマーの使用

【0093】

OxBC（ β -カロテンー酸素コポリマー）化合物が、有益な非ビタミンA免疫活性を有する14、16という本発明者らの発見は、食品中のカロテノイドー酸素コポリマーの対応物が、有意な健康上の示唆を持つ生物活性を与えることになるという予測に繋がる。OxBCは、ブタ27、家禽、イヌ、および魚において、百万分率の食餌レベルで、実証された健康上の利益を有する。ヒトでは、カロテノイドー酸素コポリマーは、果実および野菜の消費に関連した有益な健康上の効果に寄与する可能性がある5。果実または野菜の消化中に解放された、酸化プロセスから得られる食餌カロテノイドのin situ酸化も、少なくとも部分的に、栄養補助食品からの β -カロテンと比較して、食品中の β -カロテンのビタミンA活性がばらつきがあり、数倍低いことの原因であり得る4、28。 β -カロテンの酸化分解および認識される活性の損失は、実際に、コポリマー形成を通した

40

50

免疫学的活性の利益と考えられる。

【0094】

リコペンは、 β -カロテンよりも、活性コポリマー生成物の形成をさらになお受け易いことに気付くと13、14、リコペン-酸素コポリマー形成は、トマト加工中に生ずるリコペンの有意な損失を伴う可能性がある29。前立腺発がんのラットモデルでは、リコペン単独ではなくトマト粉末が発がんを阻害した30。筆者は、この発見が、「トマト生成物は、リコペンに加えて前立腺発がんを修正する化合物を含有する」ことを示唆すると結論付けた。リコペン-酸素コポリマーは、表および図で本明細書で文書化されるように（表3および4と図7および11）、トマト粉末中に存在し、それらは他の加工トマト製品中に存在する可能性がある。

10

【0095】

β -カロテン中に存在する線形共役二重結合の拡張系は、全てのカロテノイドに共通し、したがって他のカロテノイドは、分子状酸素とのそれらの自発的反応において同様に振る舞うことになると予測され、プロビタミンAカロテノイド（ α -、 β -、および γ -カロテンと、 β -クリプトキサンチン）と、ビタミンAに変換できないより多くのカロテノイドとの両方の、非ビタミンAの作用を説明することができる。

【0096】

一部の態様における本発明は、供給源中のカロテノイド-酸素コポリマーの量を増強し、かつ／または供給源に既知の一貫した量のカロテノイド-酸素コポリマーを持たせて、上述の健康全般および免疫性を増強するなどの所望の結果が実現されるように既知の有効量までの一貫した投与を容易にするのを可能にする。

20

【0097】

さらに本発明は、一部の態様において、供給源として単離されたカロテノイドから出発することなく *in situ* で生成物を含むカロテノイド-酸素コポリマーを生成し、結果的に得られる動物およびヒトの健康上の利益を有する一貫したレベルのカロテノイド-酸素コポリマーを含む生成物を提供することを可能にする。

【実施例】

【0098】

（実施例1）

材料および方法

30

材料

GA、GA-d6、および完全に酸化された β -カロテン（OxBC）、リコペン（OxLyc）、およびカンタキサンチン（OxCan）の調製について、記述してきた13。この研究では、完全に酸化されたルテイン（OxLut）を含む完全に酸化されたカロテノイドを、以下に述べるように68~70℃で調製した。SPEカートリッジは、Waters（Oasis MAX；500mg収着剤、6mL容量）から得た。シリカゲル（40~63 μ m）は、Silicycle Inc.（Quebec City, QC Canada）から購入し、シリカゲルTLCプレートは、Sigma-Aldrichから購入した。

設備

40

【0099】

GC-MSを、5975B VL質量選択検出器を備えたAgilent Technologies 6890N GCで行った。GCは、HP 5カラム、30m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 μ mを備えていた。測定条件：初期圧力17psi、一定流1.0mL/分；注入温度250℃；初期炉内温度50℃、1分間、温度上昇20℃/分から280℃、保持時間2.5分。機器を、SIMモードで使用して、イオンm/z=154および160をモニタした。（注記：トマト粉末および赤ヤシ油の場合、2つの異なる温度プログラムを使用した。プログラム1（トマト粉末）：開始50℃、上昇8℃/分で210℃まで、次いで上昇20℃/分で280℃まで、および保持2.5分。プログラム2（赤ヤシ油）：開始50℃、上昇10℃/分で210℃まで、次いで上昇20℃/分で280℃まで、

50

および保持 2.5 分。)

【0100】

OxBC および OxLyc に関する FTIR スペクトルを、KBr ペレットまたは NaCl ディスクを使用する Varian 660-IR 分光計で得、被膜を、試料のクロロホルム溶液から流延する (1 滴は約 50 mg/mL)。その他全ての試料の FTIR スペクトルを、減衰した全反射率 (ダイヤモンド表面) に関して Smart iTR 付属品を備えた Thermo 6700 FTIR 分光計を使用して得た。

【0101】

GPC クロマトグラムは、ダイオードアレイ検出器および 7.8 × 300 mm Jordi Flash Gel 500A GPC カラム (5 μm 粒度; Jordi Labs LLC, Bellingham, MA 02019 USA) を備えた HP 1090 HPLC 装置を使用して得た。試料を溶解し、THF で、1 mL/分 で 14 分間溶出した。

【0102】

UV-Vis スペクトルは、1 cm の経路長の石英セルを使用した Hewlett Packard 8452 ダイオードアレイ分光光度計で、メタノール中で記録した。

【0103】

元素分析は、Canadian Microanalytical Service Ltd.、Delta, BC, Canada により行った。

食品試料

【0104】

他に述べない限り、全ての試料は、地元で購入した (Ottawa, Ontario, Canada)。ニンジンジュース、乾燥デーツ、ホモゲナイズ牛乳 (3.25% 乳脂肪)、全脂乳粉 (3.25% 乳脂肪)、およびイエローコーンフラワーは、食料品店で買った。新鮮なレッドトマトは、農産物市場で購入した。天日乾燥したアルファルファはペットショップで買い、スピルリナ粉末は健康食料品店から購入した。ニンジン粉末 #1、パプリカ、および *echinacea purpurea* の根の粉末は、Monterey Bay Spice Co. (Watsonville, CA) から購入した。バラの実の粉末は、Coesam S.A. (Santiago, Chile) から購入し、クランベリーの粉末は Atoka Cranberries Inc. (Manseau, Quebec) から購入した。蜂蜜および蜂花粉は、Dutchman's Gold Inc. (Carlisle, Ontario) から購入した。ニンジン粉末 #2 (空気乾燥)、トマト粉末 (空気乾燥)、サツマイモ粉末 #1 および #2 (それぞれ、空気乾燥およびドラム乾燥) は、North Bay Trading Co. (Brule, WI) から買った。トマトの搾りかすは、LaBudde Group Inc. (Grafton, WI) から得た。ダルス海藻粉末は、Z Natural Foods (West Palm Beach, FL) から購入し、海苔フレークは、Global Maxlink Inc. (Antelope, CA) から得た。赤ヤシ油は、Well.ca (Guelph, Ontario) から購入した。全卵粉およびウィートグラス粉末は、Bulkfoods.com (Toledo, Ohio) から買った。玄米粉は、Yupik.ca (Montreal, QC) から購入した。

68 ~ 70 °C での完全酸化カロテノイドの調製

【0105】

材料。β-カロテン、リコペン、ルテイン、およびカンタキサンチンを、Allied Biotech Corp (Taiwan) から得た。

【0106】

OxBC の調製。β-カロテン (80 g) を、攪拌棒、還流凝縮器、O₂ 入口 (ガラス管) と、必要に応じて温度をモニタし調節するよう加熱マントルに接続された温度プローブとを備えた、3 つ口フラスコに入れた。酢酸エチル (2 L) を添加し、O₂ を通気し、混合物を攪拌し、68 °C に加熱した。66 時間後、試料の吸光度は、約 10 g/L で 1 mm のキュベットを使用して、380 nm で 0.36 と測定され、反応が終了したことが示さ

10

20

30

40

50

れる13。反応を停止し、透明な薄橙色の液体を室温に冷却し、2個の1 L丸底フラスコに分けた。溶媒を、圧力30 mmHgに下げて40℃でロータリーエバポレーターで除去し、得られたシロップを10時間減圧乾燥することにより、OxBCとして粘着性の橙色の固体(106.9 g)を得た。

【0107】

OxLycの調製。リコペン(817 mg)を、攪拌棒、還流凝縮器、およびO₂入口(Pasteurピペット)を備えた、3つ口フラスコに入れた。酢酸エチル(20.4 mL)を添加し、O₂を通気し、攪拌混合物を、68℃で油浴内に下げた。21時間後、反応を停止し、僅かに濁った黄色の液体を室温に冷却した。濾過した試料の吸光度は、約1.0 g/Lで、1 cmのキュベット中、380 nmで0.272と測定された。濁った黄色の液体を遠心分離にかけ、上澄みをデカントし、固体残留物を酢酸エチルで(2×3 mL)濯ぎ/遠心分離にかけ、毎回上澄みをデカントした。固体残留物を4時間減圧乾燥することにより、淡黄色の薄片状の固体(38 mg)が得られた。合わせた上澄み液を、50 mLの丸底フラスコに移し、溶媒を、圧力を30 mmHgに下げて40℃のロータリーエバポレーターで除去した。残留物を、減圧ポンプに移し、4時間乾燥することにより、OxLycとして泡状の黄色い固体(1.036 g)が得られた。

【0108】

OxLutの調製。ルテイン(1.00 g)を、攪拌棒、還流凝縮器、およびO₂入口(Pasteurピペット)を備えた3つ口フラスコに入れた。酢酸エチル(25 mL)を添加し、O₂を通気させ、攪拌混合物を70℃の油浴内に下げた。18時間45分後、沈殿物が黄色の溶液中に観察され、反応を停止させ、室温に冷却した。冷却後、より多くの沈殿物が溶液から沈殿した。濾過した試料の吸光度は、約0.4 g/Lの1 cmキュベットで、380 nmで0.0712と測定された。混合物を遠心分離し、上澄みを、0.45 μmのTeflonシリンジフィルタに通して濾過して、わずかな微細な薄片を除去した。固体画分を、酢酸エチルで濯ぎ(2×3 mL)、遠心分離し、毎回液体をデカントした。固体を減圧乾燥することにより、薄褐色の粉末(105.8 mg)が得られた。液体画分を合わせ、圧力を30 mmHgに下げて溶媒を40℃で蒸発させ、その後、減圧ポンプ上で3時間乾燥することにより、OxLutとして黄色の泡状の固体(1.143 g)が得られた。

【0109】

OxCanの調製。カンタキサンチン(1.0021 g)を、攪拌棒、還流凝縮器、O₂入口(Pasteurピペット)を備えた3つ口フラスコに入れた。酢酸エチル(25 mL)を添加し、O₂を通気し、攪拌混合物を69℃の油浴内に下げた。71時間後、反応を停止させ、室温に冷却した。透明な黄色の溶液の吸光度は、約0.5 g/Lの1 cmキュベットで、380 nmで0.6308と測定された。溶液を、50 mLの丸底フラスコに移し、溶媒を、圧力を30 mmHgに下げて40℃のロータリーエバポレーターで除去し、ついで減圧ポンプ上で慎重に乾燥させ、固体材料を、フラスコを満たすのにちょうど十分になるよう膨張させた。減圧中で2時間45分後、OxCanとして泡状の黄色の固体(1.250 g)が得られた。

純粋なカロテノイドから得られた完全酸化カロテノイド化合物からのカロテノイド-酸素コポリマーの単離

【0110】

OxBCポリマー。OxBC(2.05 g)を酢酸エチル(5 mL)に溶解し、攪拌しながらヘキサン(50 mL)を滴下した。液体を、沈殿した固体からデカントし、これを最少量の酢酸エチルに溶解した。溶媒を、圧力を20 mmHgに下げ40℃のロータリーエバポレーターで除去し、次いで液体濃縮物を、減圧ポンプ上で1時間乾燥することにより、固体が得られた。得られた固体を、上述のようにさらに2回沈殿させることにより、OxBCポリマーが黄橙色の固体(1.076 g)として得られた。

【0111】

OxLycポリマー。OxLyc(826 mg)を酢酸エチル(1 mL)に溶解し、ヘキ

10

20

30

40

50

サン（50 mL）を攪拌しながら滴下した。添加終了から1時間後、液体を沈殿固体からデカントし、次いでヘキサン（3×3 mL）で濯いだ。残留物を減圧ポンプ上で1時間乾燥し、沈殿を、酢酸エチル／ヘキサンを使用してさらに2回繰り返した（1 mL／25 mL、次いで1 mL／10 mL）。固体材料を、最少量の酢酸エチルに溶解し、次いで減圧ポンプ上で3.5時間乾燥することにより、OxLy cポリマーが黄色の固体（700 mg）として得られた。

【0112】

OxLu tポリマー。OxLu t（836 mg）に、3：2の酢酸エチル：メタノール（5 mL）を添加し、混合物をほぼ完全に溶解した（いくらかの微細な薄片が存在した）。ヘキサン（50 mL）を攪拌しながら滴下し、数mLを添加した後に、濁った混合物は透明になり、完全に溶解した。残りのヘキサンの添加は、いくらかの材料を沈殿させた。添加終了後、混合物を15分間攪拌し、透明な黄色の液体が、濃い黄色がかった橙色のシロップの最上部に見えた。黄色の液体をデカントし、シロップを7×3 mLのヘキサンで濯いだ。シロップを酢酸エチル（3 mL）に溶解し、溶媒を、40℃で60 mmHgになるようロータリーエバポレーターで除去し、残留物を減圧ポンプ上で1.5時間乾燥することにより、脆い黄色の固体（585 mg）が得られた。固体を酢酸エチル（1 mL）に溶解し、ヘキサン（10 mL）を攪拌しながら滴下した。30分後、液体をデカントし、残留物をヘキサン（5×1.5 mL）で濯いだ。残留物を酢酸エチル（4 mL）に溶解し、次いで溶媒を、圧力を45 mmHgに下げて35℃のロータリーエバポレーターで除去し、残留物を減圧ポンプ上で45分間乾燥させることにより、脆い黄色の固体（567 mg）が得られた。沈殿を、酢酸エチル（1 mL）およびヘキサン（10 mL）を使用してさらに1回繰り返し、ヘキサンで濯いだ（5×1.5 mL）。残留物を減圧ポンプ上で2.5時間乾燥することにより、OxLu tポリマーが脆い黄色の固体（565 mg）として得られた。

【0113】

OxCa nポリマー。OxCa n（796 mg）を酢酸エチル（1 mL）に溶解し、ヘキサン（10 mL）を攪拌しながら滴下した。添加終了から1時間後、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ（3×1.5 mL）。残留物を減圧ポンプ上で1時間乾燥し、沈殿を上述のようにさらに2回繰り返した。固体を最少量の酢酸エチルに溶解し、次いで減圧ポンプ上で2時間乾燥することにより、OxCa nポリマーが黄色い固体（646 mg）として得られた。

（実施例2）

食品試料中のゲロン酸の分析、およびプロビタミンAカロテノイドー酸素コポリマー含量を推定するためのその使用

【0114】

一般的抽出手順。抽出中のカロテノイドの偶発的酸化を最小限に抑えるため、全ての有機溶媒は0.1%のBHTを含有しており、または代替として、等量を抽出直前に試料に添加した。食品試料を、抽出直前に、未加工の食品に関してはクロロホルムと、または乾燥食品に関しては水性アセトニトリルとのいずれかとの水性有機溶媒混合物中で均質化した。抽出は、下記の通り実施した：1）GA-d₆標準を試料の水性懸濁液に添加し、クロロホルムで多数回抽出し、またはアセトニトリルと多数回ブレンドし、濾過し；2）抽出物を合わせ、濃縮し、濃縮物を、クロロホルムおよび硫酸マグネシウムまたは硫酸ナトリウムと混合し、濾過し、濾液を水性KOHで処理して、カルボン酸を抽出し（2×）；3）合わせた水性KOH抽出物を、水性HClで酸性にして、カルボン酸を単離し、クロロホルムまたはジクロロメタンに抽出し；4）分離したクロロホルムまたはジクロロメタン画分を乾燥および蒸発させ；5）下記の手順によりテトラフルオロホウ酸トリメチルオキソニウムで残留物をエステル化する。

【0115】

テトラフルオロホウ酸トリメチルオキソニウムによる抽出物のエステル化。窒素の流れの下または回転蒸発による溶媒の蒸発後、残留物をメタノール（4.5 mL）に溶解した。

水性重炭酸ナトリウム溶液（1 M、1 mL）を添加し、その後、テトラフルオロホウ酸トリメチルオキシニウム（約0.3 g）を少量ずつ、1～5分にわたって添加した（pHは、固体重炭酸ナトリウムを添加することによって弱塩基性に維持した）。得られた混合物を室温で10分攪拌し、次いで水を添加し（4～9 mL）、生成物をジクロロメタンで抽出した（2×9 mL）。合わせたジクロロメタン抽出物を硫酸マグネシウム上で乾燥し、濾過し、溶媒を蒸発させてメチルエステルを得、これをアセトニトリルに取り込み、濾過し、GC-MS分析を行った。

【0116】

詳細な抽出手順。ニンジンジュース、ニンジン粉末、生のトマト、トマト粉末、トマトの搾りかす、デーツ、ミルク、粉ミルク、全卵粉、生のクランベリー、クランベリー粉末、バラの実の粉末、スピルリナ粉末、パプリカ粉末、サツマイモ粉末、ダルス粉末、海苔フレーク、天日乾燥アルファルファ、ウィートグラス粉末、および赤ヤシ油に関する詳細を、以下に提示する。

【0117】

ニンジンジュース。GAの精製および濃縮は、クロロホルムを使用して実現した。クロロホルム抽出物は、カロテノイドおよびカルボン酸を含む、物質の複合混合物を含有していた。画分中に存在する酸は、塩基性水溶液（pH 12～13；GAは、pH 12～13で水に可溶である）中に抽出し、抽出物の酸性化によって回収し、その後、クロロホルム中に再抽出した。陰イオン交換SPEカートリッジを使用する試みでは、GAの濃縮および精製ができなかった。

【0118】

GA-d₆（0.5 mLメタノール中2.9 μg）をニンジンジュース（約200 g）に添加し、クロロホルム（250 mL；0.1% BHT）と混合した。激しく2.5時間攪拌した後、エマルジョンを分液漏斗に移し、クロロホルム層を分離した。水性画分をクロロホルム（250 mL；0.1% BHT）で再び抽出し、クロロホルム抽出物を合わせ、MgSO₄上で乾燥し、セライトに通して濾過した。セライトおよびフィルタをクロロホルム（50 mL）で洗浄し、洗浄液を、合わせたクロロホルム溶液に添加した。合わせた抽出物および洗浄液は、回転蒸発により約100 mLに濃縮された透明な溶液を与えた。抽出物中に存在するカルボン酸を、水性KOH（0.032 M；2×100 mL）と共に15分間激しく攪拌し、合わせた水性抽出物（5%水性HCl）をpH 2.5に酸性化し、酸をクロロホルム中に抽出することによって（2×100 mL）、抽出した。溶媒を、回転蒸発によって、合わせたクロロホルム抽出物から除去し、残留物をエステル化した（段落【0096】に記述される手順に従いメチルエステルに変換した）。

【0119】

ニンジンジュース中のゲロン酸の存在に関する証拠の裏付けは、メチルエステルをその対応するセミカルバゾン誘導体に、ケト官能基を介して変換することにより得られた。GAメチルエステルを、単離したセミカルバゾン画分から再生し、GC-MSにより分析した。

【0120】

上記得られたエステルの混合物を、3：1のメタノール：水（4.5 mL）に溶解した。固体セミカルバジド塩酸塩（約0.15 g）を添加し、その後、固体酢酸ナトリウム（約0.15 g）を添加した。得られた懸濁液を短時間加熱還流し、室温に冷却し、ジクロロメタンで抽出し（2×9 mL）、溶媒を蒸発させた。残留物をクロロホルムで抽出し（5×1.5 mL）、合わせた抽出物を、シリカゲル（6 mL）の短いパッドに通した。シリカをクロロホルム（20 mL）で溶出し、セミカルバゾンをメタノール（15 mL）で溶出した。メタノールを蒸発させ、残留物をクロロホルム（9 mL）に溶解し、活性化MnO₂（0.3 g）を添加した。懸濁液を、室温で1時間激しく攪拌し、濾過し、濾過したMnO₂をクロロホルムで洗浄した（2×1.5 mL）。クロロホルム画分を合わせ、溶媒を回転蒸発により除去した。残留物をアセトニトリル（0.6 mL）に溶解し、濾過し、溶液をGC-MSによって分析した。

【0121】

ニンジン粉末#1および#2。蒸留水(25~30 mL)、アセトニトリル(125~150 mL)、BHT(約5~9 mg)、およびGA-d6(メタノール中15または30 μ g)を、400 mLビーカーに入っているニンジン粉末(約5.0 g)に添加した。混合物を、9,500 rpmで20~25分間均質化し、次いで焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過した。濾液を取り分け、固体残留物を、アセトニトリル/水(125~150 mL/25~30 mL)で、記述したように再び均質化した。混合物を濾過し、両方の濾液を合わせた。溶媒を蒸発させ、油状残留物をクロロホルム(20 mL)に再度溶解し、乾燥し(Na_2SO_4 ; 数分間にわたって橙色の液体が合体し、クロロホルムの上面に浮遊し、次いで乾燥剤上に吸着されるようになることに留意されたい)、綿に通して濾過した。フラスコおよびフィルタをクロロホルムで濯ぎ(4×5 mL)、濯ぎ液を濾液と合わせた。クロロホルムを水性KOH(約0.03 M; 25 mL)と共に5分間激しく攪拌し、次いで沈降させた。分液漏斗を使用して、クロロホルムの塊を除去し、残りを遠心分離によって除去した。水性層を取り分け、クロロホルム層を、水性KOH(0.03 M; 25 mL)で上述のように抽出した。水性層を合わせ、1 M HClでpH 1~2に酸性化し、クロロホルムで抽出した(2×20 mL)。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し(Na_2SO_4)、綿に通して濾過し、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0122】

生のトマト。GA-d6(メタノール中2.8 μ g)、水性HCl(1.5 mL、3.6 % v/v)およびクロロホルム(250 mL; 0.1 % BHT)を、小片に刻んだ新鮮なトマト(200~250 g)に添加した。混合物を均質化し、得られたペーストを、ガラス栓をしたフラスコに移し、クロロホルムで濯いで完全な移動を確実にした。暗所で一晩、2℃で静置後、懸濁液は2つの液体相を形成した。過剰な $\text{MgSO}_4/\text{NaCl}$ (1:1)を、分離した底部クロロホルム層に添加した。微細懸濁液が形成され、混合物をセライトに通して濾過した。セライトおよびフィルタをクロロホルムで洗浄し、合わせたクロロホルム溶液を約60 mLに濃縮した。カルボン酸を、水性KOH(0.1 M; 2×65 mL)と共に8分間、濃縮物を激しく攪拌することによって抽出した。黄色の懸濁液を含有する、合わせた水性抽出物を、ジクロロメタン/酢酸エチル(2:1、60 mL)で洗浄し、pH 2.3に酸性化(5 % HCl水溶液)した。カルボン酸をジクロロメタンで抽出し(2×50 mL)、抽出物を乾燥し(MgSO_4)、濾過した。溶媒を、回転蒸発により除去し、残留物をエステル化した。

【0123】

トマト粉末。約5.0 gのトマト粉末に、BHT(3~4 mg)、蒸留水(30 mL)、アセトニトリル(150 mL)、およびゲロン酸-d6(メタノール中6.2 μ g)を添加した。9500 RPMで25分間均質化し、次いで焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過した。固体残留物を、アセトニトリル/水(150 mL/30 mL)で上記のようにもう一度抽出し、濾液を合わせ、溶媒を蒸発させ、約2~3 mLの油を残した。クロロホルム(15 mL)を添加し、混合物を乾燥し(Na_2SO_4)、綿に通して濾過し、クロロホルムで濯いだ(4×4.5 mL)。合わせた濾液を、水性KOH(約0.03 M; 25 mL)と共に5分間激しく攪拌した。クロロホルムのほとんどを分液漏斗により除去し、残りを遠心分離によって分離した。水性層を収集し、クロロホルム層を、上述のように水性KOHでもう一度抽出した。水性層を合わせ、1 M HCl(約3 mL)で酸性化し、クロロホルム(2×20 mL)で抽出した。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し(Na_2SO_4)、濾過し、0.3~0.5 mLに濃縮した。液体を、乾燥シリカゲルのカラム(直径2 cm、長さ13.5 cm)に移し、 N_2 を通した。シリカを乾燥した後、カラムを、メタノール:酢酸エチル:ヘキサン(5:10:85)および N_2 圧力を使用して溶出し、約1.5分ごとに約10 mLの画分を収集した。画分18~25(黄色のバンド、およびゲロン酸による共スポットを含有する)を合わせ、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0124】

トマトの搾りかす。約25 gのトマトの搾りかすに、蒸留水(30 mL)、アセトニトリ

ル (150 mL)、BHT (2~4 mg)、および GA-d6 (メタノール中 2.5 μ g) を添加した。9500 rpm で 20 分間均質化し、次いで焼結ガラス Buchner 漏斗に通して濾過した。固体残留物を、アセトニトリル/水 (150/30 mL) でもう一度抽出し、濾液を合わせ、溶媒を蒸発させ、少量の油 (約 1~2 mL) を残した。油をクロロホルム (15 mL) に溶解し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濾過し、25 mL のクロロホルムで濯いだ。水性 KOH (約 0.03 M、25 mL) を添加し、5 分間激しく攪拌した。層を遠心分離によって分離し、クロロホルム層を、上述のように再び水性 KOH で抽出した。水性抽出物を合わせ、HCl (1 M、3 mL) で酸性化し、クロロホルムで抽出した (2×20 mL)。合わせた抽出物を乾燥し (Na_2SO_4)、濾過し、溶媒を蒸発させて 0.3~0.5 mL に減少させた。液体を、乾燥シリカゲルのカラム (直径 2 cm、長さ 13.5 cm) の上部に移し、 N_2 を通過させた。シリカを乾燥させた後、カラムを、メタノール:酢酸エチル:ヘキサン (5:10:85) および N_2 圧力を使用して溶出し、約 10 mL の画分を収集した。画分 16~26 (ゲロン酸による共スポット) を合わせ、溶媒を蒸発させた。残留物をエステル化し、エステルを、酢酸エチルの 4% ヘキサン溶液に溶解し、綿に通して濾過した。溶媒を蒸発させ、残留物を、最小量の、酢酸エチルの 4% ヘキサン溶液に溶解し、湿潤シリカゲルカラム (直径 0.5 cm、長さ 33 cm) 上に投入した。約 5 mL の画分を収集し、最初に酢酸エチルの 4% ヘキサン溶液で溶出し、画分 7 の後、酢酸エチルの 15% ヘキサン溶液に切り換えた。画分 11~17 (ゲロン酸メチルによる共スポット) を合わせ、溶媒を蒸発させ、残留物をアセトニトリルに溶解した。

【0125】

乾燥デーツ。GA-d6 (メタノール中 2.2 μ g)、アセトニトリル (200 mL; 0.1% BHT)、および NaCl (16 g) を、水 (HPLC 級、120 mL) を入れたビーカーに入っている乾燥デーツ (50~120 g) に添加した。混合物を約 8 分間均質化し (21, 500 rpm)、ペーストおよび淡黄色の溶液を得た。溶液をデカントし、ペーストを、アセトニトリルでさらに 2 回均質化し、上述のようにデカントした。合わせた溶液の回転蒸発により、黄色い油が得られた。油をクロロホルム (50 mL) で希釈し、 MgSO_4 (2~3 g) を激しく攪拌しながら添加した。得られた懸濁液を、ガラスウールに通して濾過し、その後、クロロホルム (50 mL) で濯いだ。合わせたクロロホルム画分を約 12 mL に濃縮し、水性 KOH (0.1 M; 12 mL) を添加し、カルボン酸を、8 分間激しく攪拌することによって抽出した。エマルジョンを得、遠心分離で 2 層に分離した。分離したクロロホルム層を以前のように KOH (0.1 M; 12 mL) で抽出した。水性抽出物を合わせ、pH 2.3 に酸性化し (5% HCl 水溶液)、カルボン酸をジクロロメタンで抽出した (2×20 mL)。ジクロロメタン抽出物を合わせ、乾燥し (MgSO_4)、ガラスウールに通して濾過し、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0126】

ミルク。GA-d6 (メタノール中 4.5 μ g)、NaCl (70 g)、およびアセトニトリル (300 mL) を、1 L ビーカーに入れたミルク (約 330 g) に添加し、混合物を 8 分間均質化した (21, 500 rpm)。均質化白色スラリーが形成された。冷蔵庫 (2°C) 内に一晚静置した後、2 層が形成された。底部の透明層を取り分けた。最上部の白色層を、アセトニトリル (400 mL) で均質化した。層の分離は速く、上部の透明層を収集した。透明液体の画分を合わせ、回転蒸発により濃縮し、油状の白色懸濁液を残し、クロロホルムで抽出し (3×7 mL)、乾燥し (Na_2SO_4)、ガラスウールに通して濾過した。フィルタをクロロホルム (5 mL) で濯ぎ、合わせた濾液を KOH 水溶液 (0.063 M; 25 mL) と共に 5 分間激しく攪拌した。エマルジョンが形成され、遠心分離で 2 層に分離した。分離したクロロホルム層を、水性 KOH と共に再び攪拌し、上述のように分離した。水性層を合わせ、3 M HCl で pH 約 2 に酸性化し、クロロホルムで抽出した (2×25 mL)。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し (Na_2SO_4)、濾過し、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0127】

アルファルファ。天日乾燥したアルファルファを、電気式コーヒーグラインダを使用して粉末に粉碎した。試料（40 g）を1 Lビーカーに入れ、水（120 mL）を添加し、混合物を1時間静置して、アルファルファによる吸水を生じさせた。次いでアセトニトリル（550 mL）を添加し、その後、GA-d6（メタノール中140 μ g）およびBHT（約0.05 g）を添加した。混合物を8分間均質化し（21,500 rpm）、焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過した。固体残留物を、アセトニトリル／水（550 mL／140 mL）で再び均質化し、上述のように濾過した。合わせた緑色濾液を回転蒸発によって濃縮し、暗緑色の油を得た。油をクロロホルム（20 mL）中に溶解し、MgSO₄で乾燥し、ガラスウールに通して濾過し、クロロホルムでフラスコを濯ぎ（2×20 mL）、最後にフィルタをクロロホルム（5 mL）で濯いだ。合わせたクロロホルム濾液および洗浄液を、約25 mLに濃縮し、水性KOH（0.063 M；25 mL）と共に5分間激しく攪拌した。エマルジョンが形成され、遠心分離で2層に分離させた。分離したクロロホルム層を、KOH水溶液と共に、記述したように再び抽出し、水性層を合わせ、3 M HClでpH約2に酸性化した。酸性溶液をクロロホルムで抽出し（2×25 mL）、乾燥し（MgSO₄）、濾過し、溶媒を蒸発させた。残留物を、1：1のヘキサン／酢酸エチル（4.5 mL）に溶解し、シリカゲルカラム（2 cm×12 cm）に通し、同じ溶媒混合物で溶出した。無色の画分および緑色画分を収集し、その後、黄色い画分を収集した。溶媒を、黄色い画分から蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0128】

スピルリナ粉末。蒸留水（60 mL）、アセトニトリル（350 mL）、BHT（0.06 g）、およびGA-d6（メタノール中140 μ g）を、スピルリナ粉末（13.7 g）に添加した。懸濁液を21,500 rpmで8分間均質化し、焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過し、固体残留物を、アセトニトリル／水（250 mL／60 mL）で上述のように再び抽出した。濾液を合わせ、溶媒を回転蒸発により除去して、暗緑色の油を得た。油をクロロホルム（20 mL）に溶かした溶液を乾燥し（MgSO₄）、ガラスウールに通して濾過した。フラスコおよびフィルタを、クロロホルムで数回に分けて濯いだ。全ての濾液を合わせ、クロロホルムを蒸発させた。暗緑色の固体を得、1：1のヘキサン／酢酸エチル（4.5 mL）に溶解し、シリカゲルのカラム（2.4 cm×21 cm）上に投入した。カラムをヘキサン／酢酸エチル（1.05：1）で溶出した。最初は無色の溶出液であり、その後、黄色バンド、次いで暗緑色バンドが続いた。暗緑色バンドの約3／4を、画分1として収集した。残りの暗緑色バンドおよび黄色バンドを、橙色バンドが溶出し始めるまで、画分2として収集した。画分2からの溶媒を、N₂の流れの下で蒸発させ、残留物をクロロホルム（約23 mL）に溶解した。溶液を、水性KOH（0.063 M；25 mL）と共に5分間激しく攪拌し、得られたエマルジョンを遠心分離により分離した。水性層を取り分け、クロロホルム層を、上述のようにKOH水溶液（25 mL）で再び抽出した。両方の水性抽出物を合わせ、3 M HClでpH 1～2に酸性化し、クロロホルムで抽出した（2×25 mL）。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し（MgSO₄）、濾過し、溶媒を、N₂の流れの下で蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0129】

バラの実の粉末。蒸留水（30 mL）、アセトニトリル（150 mL）、BHT（約0.030 g）、およびGA-d6（メタノール中5.7 μ g）を、400 mLビーカーに入っているバラの実の粉末（約10 g）に添加した。混合物を、9,500 rpmで25分間均質化し、次いで焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過した。濾液を取り分け、固体残留物を、アセトニトリル／水（150 mL／30 mL）で上述のように再び均質化した。混合物を濾過し、両方の濾液を合わせた。溶媒を蒸発させ、油状残留物をクロロホルム（20 mL）に再度溶解し、乾燥し（Na₂SO₄）、ガラスウールに通して濾過した。フラスコおよびフィルタをクロロホルムで濯ぎ（3×10 mL）、濯ぎ液および濾液を合わせた。溶液を約25 mLに濃縮し、KOH（約0.03 M；25 mL）水溶液と共に5分間激しく攪拌した。懸濁液を、遠心分離によって層に分離し、水性層を取り分けた。水性KOHによるクロロホルム層の2回目の抽出を、上述のように実施し、水性層を遠

心分離によって分離した。水性層を合わせ、3 M HClでpH 1～2に酸性化し、クロロホルムで抽出した(2×20 mL)。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し(Na₂SO₄)、ガラスウールに通して濾過し、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0130】

新鮮なクランベリー。新鮮な丸ごとのクランベリー(601.33 g)を、アセトニトリル(0.01 mg/mL BHTを含有する700 mL)およびGA-d₆(メタノール中0.64 μg)が入っているビーカーに入れた。混合物を21500 RPMで20分間均質化し、ホモジナイザを周囲で慎重に移動させて、全てのベリーを潰した。得られたパルプをさらに25分ブレンドし、次いで粗い焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過した。固体残留物を、アセトニトリル(700 mL)および水(50 mL)で25分間均質化した。上述のように再び濾過し、溶媒を蒸発させて、赤紫色の油を得た。クロロホルム(100 mL)および水(10 mL)を添加し、混合物を40℃で攪拌して溶解した。Na₂SO₄(約250 g)を添加し、混合し、混合物を、綿に通して濾過し、クロロホルム(50 mL)で濯いだ。濾液を水性KOH(約0.03 Mを50 mL)と共に激しく攪拌し、次いで分液漏斗に移した。クロロホルムのほとんどを分離し、残りの液体を遠心分離した。水性層を取り分け、クロロホルム層を上述のようにもう一度抽出した。水性層を合わせ、水性HCl(1 M、約6 mL)で酸性化し、クロロホルムで抽出し(2×50 mL)、必要に応じて遠心分離して、層を分離した。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し(Na₂SO₄)、濾過し、約3 mLに濃縮し、乾燥シリカゲルのカラム(長さ13.5 cm×直径2 cm)の最上部に移した。N₂を強制的に通してシリカを乾燥し、カラムを、N₂圧力および5:10:85のメタノール:酢酸エチル:ヘキサンの溶媒系を使用して溶出し、約10 mLの画分を収集した。画分19～35(GAによる共スポット)を合わせ、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0131】

クランベリー粉末。蒸留水(30 mL)、アセトニトリル(150 mL)、BHT(約0.015 g)、およびGA-d₆(メタノール中0.75 μg)を、400 mLビーカーに入っているクランベリー粉末(約4.8 g)に添加した。混合物を、9,500 rpmで25分間均質化し、次いで焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過した。濾液を取り分け、固体残留物を、アセトニトリル/水(150 mL/30 mL)で上述のように再び均質化した。混合物を濾過し、両方の濾液を合わせた。溶媒を蒸発させ、残留物をクロロホルム(20 mL)に再度溶解し、乾燥し(Na₂SO₄)、ガラスウールに通して濾過した。フラスコおよびフィルタをクロロホルムで濯ぎ(4×5 mL)、濯ぎ液および濾液を合わせた。溶液を約25 mLに濃縮し、水性KOH(約0.03 M; 25 mL)と共に5分間激しく攪拌した。層を遠心分離によって分離し、水性層を取り分けた。KOH水溶液によるクロロホルム層の2回目の抽出を、上述のように実施し、水性層を遠心分離によって分離した。水性層を合わせ、3 M HClでpH約1に酸性化し、クロロホルムで抽出した(2×20 mL)。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し(Na₂SO₄)、綿に通して濾過し、溶媒を蒸発させた。残留物を約1 mLのメタノールに溶解し(注記:いくらかの微細な固体は溶解しないままである)、液体を、乾燥シリカゲルのカラム(2 cm×10 cm)の最上部に可能な限り均一に移し、カラムの壁をメタノール(0.2 mL)で濯いだ。N₂を強制的にカラムに通してシリカを乾燥させ、次いでカラムを、85/10/5のヘキサン/酢酸エチル/メタノール溶液で、約5 mL/分で溶出した。画分5 mLを収集し、ゲロン酸によるそれらの共スポットを合わせ、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0132】

パプリカ粉末。蒸留水(30 mL)、アセトニトリル(150 mL)、BHT(3～5 mg)、およびGA-d₆(メタノール中4.0 μg)を、400 mLビーカーに入っているパプリカ粉末(約5.0 g)に添加した。混合物を、9,500 rpmで25分間均質化し、次いで焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過した。濾液を取り分け、固体残留物を、アセトニトリル/水(150 mL/30 mL)で、記述したように再び均質化し

た。混合物を濾過し、両方の濾液を合わせた。溶媒を蒸発させ、油状の残留物をクロロホルム（15 mL）に再度溶解し、乾燥し（ Na_2SO_4 ）、綿に通して濾過した。フラスコおよびフィルタをクロロホルムで濯ぎ（ $4 \times 5 \text{ mL}$ ）、濯ぎ液および濾液を合わせた。溶液を、水性 KOH （約 0.03 M；25 mL）と共に 5 分間激しく攪拌し、混合物を遠心分離によって 2 層に分離した。分離したクロロホルム層を、水性 KOH （25 mL）で上述のように抽出した。水性層を合わせ、1 M HCl で pH 1～2 に酸性化し、クロロホルムで抽出した（ $2 \times 25 \text{ mL}$ ）。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し（ Na_2SO_4 ）、綿に通して濾過し、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0133】

サツマイモ粉末 # 1 および # 2。蒸留水（25 mL）、アセトニトリル（120 mL）、BHT（4～6 mg）、および GA-d_6 （メタノール中 $4.0 \mu\text{g}$ ）を、サツマイモ粉末（5～8 g）に添加した。混合物を、13,500 rpm で 25 分間均質化し、次いで焼結ガラス Buchner 漏斗に通して濾過した。固体を、アセトニトリル／水（120 / 25 mL）で、記述したように再び抽出し、濾液を合わせた。溶媒を、少量の油が残るまで（約 1～2 mL）ロータリーエバポレーター上で除去した。クロロホルム（12 mL）を添加して油を溶解し、混合物を Na_2SO_4 で乾燥した。綿に通して濾過し、クロロホルム（21 mL）で濯いだ。水性 KOH （約 0.03 M、25 mL）を、合わせた濾液に添加し、5 分間激しく攪拌した。水性層を分離し、クロロホルムを、上述のように水性 KOH で再び抽出した。合わせた水性抽出物を、水性 HCl （1 M、約 3 mL）で酸性化し、次いでクロロホルムで抽出した（ $2 \times 20 \text{ mL}$ ）。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し（ Na_2SO_4 ）、濾過し、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0134】

海藻（ダルス粉末、海苔フレーク）。約 5.0 g の海藻に、蒸留水（25 mL）、アセトニトリル（120 mL）、BHT（2～4 mg）、および GA-d_6 （メタノール中 $21 \mu\text{g}$ ）を添加した。9500 RPM で 20 分間均質化し、次いで焼結ガラス Buchner 漏斗に通して濾過した。固体残留物を、アセトニトリル／水（120 / 25 mL）で上述のように再び抽出し、濾液を合わせ、ロータリーエバポレーター上で濃縮して、約 1～2 mL の油を残した。クロロホルム（18 mL）を添加して混合物を溶解し、乾燥させ（ Na_2SO_4 ）、綿に通して濾過し、クロロホルム（約 22 mL）で濯いだ。水性 KOH （約 0.03 M、25 mL）で 5 分間激しく攪拌し、次いで遠心分離により分離した。水性層を収集し、クロロホルム層を上述のように再び水性 KOH で抽出した。合わせた水性抽出物を酸性化し（1 M HCl 、約 3 mL）、クロロホルムで抽出した（ $2 \times 20 \text{ mL}$ ）。合わせたクロロホルム抽出物を乾燥し（ Na_2SO_4 ）、濾過し、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

【0135】

ウィットグラス粉末。約 5.5 g のウィットグラス粉末に、 GA-d_6 （メタノール中 $10 \mu\text{g}$ ）、アセトニトリル（120 mL）、水（30 mL）、および BHT（約 3 mg）を添加した。混合物を 15 分間、6,500 rpm で均質化し、次いで粗い焼結ガラス Buchner 漏斗に通して濾過した。固体残留物を、アセトニトリル／水（120 mL / 30 mL）で上述のようにもう一度抽出し、濾液を合わせ、約 1～2 mL の緑色の油が残るまで溶媒を蒸発させた。クロロホルム（15 mL）を添加して油を溶解し、乾燥し（ Na_2SO_4 ）、濾過し、クロロホルム（25 mL）で濯いだ。合わせた濾液を水性 KOH （25 mL；約 0.03 M）で 5 分間激しく攪拌し、混合物を分液漏斗に移した。クロロホルムのほとんどを分離し、残りの液体を遠心分離した。クロロホルム層を、上述のように水性 KOH で再び抽出し、水性層を合わせ、水性 HCl （1 M、約 3 mL）で酸性化し、クロロホルムで抽出した（ $2 \times 20 \text{ mL}$ ）。合わせた抽出物を乾燥し（ Na_2SO_4 ）、濾過し、溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物をエステル化した。

【0136】

赤ヤシ油。赤ヤシ油（約 28.0 g）に、BHT（2～3 mg）、ヘキサン（20 mL）、およびゲロン酸-d₆（メタノール中 $2.0 \mu\text{g}$ ）を添加した。10 分間攪拌し、次い

でアセトニトリル（20 mL）を添加し、激しく5分撹拌した。層を分離し、アセトニトリル層（最上部）を収集した。ヘキサン（20 mL）と共に5分間激しく撹拌し、次いでアセトニトリル層（底部）を収集し、溶媒を蒸発させた。水性NH₃（5%、6 mL）および蒸留水（3 mL）を残留物に添加し、激しく撹拌して、濁った橙色の液体を得た。SPEカートリッジ（Waters Oasis MAX、6 cc/500 mg）を、メタノール（6 mL）、蒸留水（6 mL）、および水性NH₃（0.5%、4.5 mL）に順次通すことによって準備した。橙色の液体をカートリッジに通し、水性NH₃（0.5%、4.5 mL）、メタノール（9 mL）、および酸性メタノール（2% HCl、4.5 mL）で順次溶出した。酸性メタノール画分を収集し、固体NaHCO₃を添加し、泡立ちが止むまで撹拌し、混合物をエステル化した。

10

【0137】

粉ミルク。約105 gの全脂乳粉に、GA-d₆（メタノール中0.5 μg）、酢酸エチル（280 mL）、およびBHT（約3 mg）を添加した。混合物を20分間激しく撹拌し、次いで中間焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過した。固体残留物を、上述のように酢酸エチル（280 mL）でもう一度抽出し、合わせた濾液をロータリーエバポレーターで濃縮した。残留物をクロロホルム（15 mL）に溶解し、乾燥し（Na₂SO₄）、濾過し、クロロホルム（30 mL）で濯いだ。合わせた濾液を、水性KOH（25 mL；約0.03 M）と共に5分間激しく撹拌し、層を分離した。クロロホルム層を、上述のように水性KOHでもう一度抽出し、合わせた水性抽出物を水性HCl（1 M、約3 mL）で酸性化し、クロロホルムで抽出した（2×20 mL）。合わせた抽出物を乾燥し（Na₂SO₄）、濾過し、溶媒を蒸発させ、残留物をエステル化した。

20

【0138】

全卵粉。約25 gの全卵粉に、GA-d₆（メタノール中1~2 μg）、アセトニトリル（120 mL）、水（30 mL）、およびBHT（約3 mg）を添加した。混合物を13,500 RPMで10分間均質化し、次いで粗い焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過した。固体残留物を、アセトニトリル/水（120 mL/30 mL）でもう一度抽出し、濾液を合わせ、溶媒を、N₂の流れを一晩吹付けることによって蒸発させた（ロータリーエバポレーターの使用は、過剰な起泡によりできなかった）。クロロホルム（15 mL）を添加して残留物を溶解し、乾燥し（Na₂SO₄）、濾過し、クロロホルム（135 mL）で濯いだ。合わせた濾液を水性KOH（50 mL；約0.03 M）と共に5分間激しく撹拌し、次いでNaCl（5 g）を添加し、1分間撹拌し、混合物を分液漏斗に移した。クロロホルム層のほとんどを分離し、残りの液体を遠心分離した。クロロホルム層を、水性KOHで上述のようにもう一度抽出した。水性抽出物を合わせ、水性HCl（1 M、約6 mL）で酸性化し、クロロホルムで抽出した（2×25 mL）。合わせた抽出物を乾燥し（Na₂SO₄）、濾過し、溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物をエステル化した。

30

ゲロン酸分析

【0139】

GC-MS分析。内部標準としてヘキサ重水素化GA、GA-d₆を使用する、GC-MSをベースにしたアッセイを用いた¹³。較正を、各食品試料の分析の前に実施した。予測される試料レベル（1.5~38 μg/mL）に関連した強度でメタノール中に調製されたGAおよびGA-d₆のストック溶液を、較正試料が得られるように比（1:4から4:1）の範囲で合わせた。溶液を、20 mLのシンチレーションバイアル内で合わせた（全体積1.0~1.5 mL）後、以下に記述される手順に従って、それらをメタノールで4.5 mLに希釈し、テトラフルオロホウ酸トリメチルオキシニウムでエステル化した。窒素の流れの下でまたは回転蒸発によって溶媒を除去した後に得られたエステル化試料を、GC-MSによる分析のためにアセトニトリルに溶解した。SIMモードでの、GAおよびGA-d₆に関するそれぞれのイオンの存在量m/z=154および160の比較を、GAの較正および定量のために使用した。GAおよびGA-d₆メチルエステルの保持時間は、参照標準により決定した。較正曲線は、m/z=154および160イオン強

40

50

度の比、 I/I_6 を、GA および GA-d₆ 標準の対応する質量比、 m/m_6 に対してプロットすることにより作成した。データを、最小二乗解析によって方程式 (1) に当て嵌め、ただし a は勾配であり、b は y 切片である。

$$I/I_6 = a (m/m_6) + b \quad (1)$$

【0140】

食品試料中の GA の量、m は、方程式 1 を使用して、GA-d₆ の既知の量、m₆ を付加するために得られた試料の I/I_6 値と、校正曲線から得られた a および b の値とから計算した。典型的な校正曲線の例を、図 3 に提示する。

【0141】

食品試料中の、内因性 GA および添加された GA-d₆ メチルエステルのアイデンティティは、それらの GC 保持時間および質量スペクトルを、調製された標準と比較することによって確認された。GA メチルエステルの質量スペクトルは、GC-MS ライブラリに対して 90~93% の一致をもたらした。GA メチルエステルは、 $m/z = 154$ 、 129 、および 102 で強度のイオンを示す。これらのイオンはそれぞれ、親イオンの $[M^+ - \text{メタノール}]$ 、 $[M^+ - \text{MeC(O)CH}_2]$ 、 $[M^+ - \text{MeC(O)CH}_2\text{CHCH}_2]$ フラグメントに対応する。親分子イオンの相対強度 ($m/z = 186$; 2%) は、分析するには低過ぎた。イオン 129 (40%) および 102 (100%) は高強度を有するが、それらは、抽出された食品試料中のその他の化合物から発生したイオンによって干渉を受けることがわかった。しかしイオン 154 (約 20%) は、そのような干渉をまれにしか受けないことがわかり、したがって GA メチルエステルの測定をモニタするために選択された。同様に、イオン 160 は GA-d₆ メチルエステルに使用された。

【0142】

154 対 160 イオンの強度の比を、関連ある試料濃度の比に対してプロットすることにより、各食品試料ごとに作成された GA 対 GA-d₆ の GC-MS 校正曲線は、図 3 に示されるように、優れた線形応答をもたらした。

【0143】

ニンジンジュース。ニンジンジュース分析物の GC-MS クロマトグラムは、GA および GA-d₆ メチルエステルの明らかに区別可能なシグナルを示す。エステルの保持時間は、純粋な標準化合物の保持時間と比較することによって確認され、ゲロン酸メチルエステルに対するライブラリの一致は 90% であった。SIM モードで記録された分析物の GC-MS クロマトグラムは、GA および GA-d₆ メチルエステルの、明瞭な、分離したシグナルを示した (図 4)。シグナルを積分し、GA および GA-d₆ メチルエステルの強度の比 (I_0/I_6) を使用して、ニンジンジュース中の GA の濃度を、校正曲線 (例えば、図 3) から得た方程式 (1) のパラメータに関する値を使用して計算した。添加した GA-d₆ の平均回収率は、個別に測定した標準溶液の強度と比較したクロマトグラムにおける GA-d₆ シグナル強度に基づいて、89% (77~102% の範囲) であった。

【0144】

生のトマト。GA および GA-d₆ メチルエステルのシグナルは、生のトマトに関する GC-MS クロマトグラムで明らかに目に見えた。GA メチルエステルに対するライブラリの一致は、93% であった。SIM モードで記録された分析物の GC-MS クロマトグラムは、GA および GA-d₆ メチルエステルの、明瞭な、分離したシグナルを示した (図 5)。GA の平均濃度 ($1.5 \pm 0.9 \text{ ng/g}$; (表 1B)) は、ニンジンジュースの場合 ($12.6 \pm 0.8 \text{ ng/g}$; 表 1A) の約 10 分の 1 であり、トマト中に存在する β -カロテンのかなり低いレベルに一致していた (表 3)。トマトに関する GA 値の、より広いばらつきは、低レベルの GA と、分析方法の感度限界に起因する。

結果

食品試料中の GA の分析

【0145】

図 6 は、GA および GA-d₆ メチルエステルに関して明瞭な、区別可能なシグナルを示す、ニンジンジュースおよび生のトマトの分析物の GC-MS クロマトグラムを示す。エ

ステルのアイデンティティは、それらの保持時間を、ゲロン酸メチルエステルに対する質量スペクトライブラリの一致と一緒に、純粋な標準化合物の保持時間と比較することによって確認した¹⁹。

【0146】

ニンジンジュースの例をとると、SIMモードで記録された分析物のGC-MSクロマトグラムは、GAおよびGA-d₆メチルエステルの明瞭な、区別可能なシグナルを示した(図4)。シグナルを積分し、GAおよびGA-d₆メチルエステルの強度の比(I₀/I₆)を使用して、ニンジンジュース中のGAの濃度を、校正曲線から得た方程式1のパラメータに関する値を使用して計算した。

【0147】

GAの存在の、さらなる確認は、セミカルバゾン誘導体化を通して精製することにより、得られた。表1Aは、セミカルバゾン精製によって、試料1および2の両方に関する直接的方法の場合に、密接に類似した値が得られたことを示す。

【0148】

表1Aは、試料加工中の偶発的酸化を最小限に抑えるための、抗酸化保護の必要性も示す。添加される抗酸化剤がない場合、32時間加工された試料1は、8時間加工された試料2の場合よりも高いGA値を有していた。約0.1%のBHTを抽出溶媒に添加した結果、著しくかつ一貫して低いGA値が得られる(表1A、試料3~5)。また、BHTの存在下でセミカルバゾン誘導体化を介して得られたGA値は(表1、試料6)、試料3~5に関して直接得られた値に類似していた。

【0149】

様々な食品試料の分析は、広範にわたって変化するGA値を示す(表2)。乾燥したプロビタミンAに富む食品、特に粉末形態で分析されたもの(例えば、ニンジン、スピルリナ、海藻、アルファルファ、およびウィートグラス)に見られる、非常に高い値は、乾燥中にこれらの食品が空気、熱、および光に曝露されると、かなりのおよび様々な程度の偶発的β-カロテン酸化が引き起こされることを確認する。最高値は、ニンジンジュースに関する値の840倍で、ニンジン粉末#1に関して観察され、これは乾燥重量ベースで比較した場合、GAのほぼ100倍の富化に相当する。注目すべきは、受け取ったままのこの粉末が淡褐色であり、非常に低レベルのβ-カロテンであることを示しており、このことは、β-カロテンが検出可能性の限界を下回ることを示すUV測定によって確認された。明らかに、存在するβ-カロテンの全ては酸化されていた。

【0150】

第2の商用ニンジン粉末(#2)は、橙色であり、約120 μg/gのβ-カロテンを含有していた。したがってGAのレベルは実質的により低く、ニンジン粉末#1に関する値のほぼ半分である。

【0151】

生のトマトの場合、GAの濃度はニンジンジュースの場合の約10分の1であり、これはトマト中のβ-カロテンの、かなり低いレベルに一致している。生のクランベリー中のレベルも低く、この果実中のプロビタミンAカロテノイドの低レベルと矛盾しない。

【0152】

乾燥したスピルリナ、海藻、アルファルファ、およびウィートグラスは、高レベルのGAを示す。アルファルファは、動物飼料中のカロテノイドの重要な供給源であり、北米では牛乳の生成に使用される。したがって、ミルクおよび粉ミルク(それぞれ3.25%の乳脂肪)の試料を分析し、少量のGAを含有することがわかった。全卵粉、別の動物由来生成物は、乳製品よりも多くのGAを含有していた。

【0153】

それにも関わらず、赤ヤシ油、即ちビタミンEの存在によって酸化に対して自然に保護されるα-およびβ-カロテンが豊富な供給源は、適度な量のGAを含有する。

【0154】

そのいずれもβ-カロテンの公知の供給源ではないechinacea purple

10

20

30

40

50

aの根の粉末、蜂蜜、または蜂花粉では、GAが検出されなかった。イエローコーンフラワーまたは玄米粉に見出されたGAは、検出可能な量ではなかった。

プロビタミンAカロテノイド-酸素コポリマー含量の推定。

【0155】

本発明者らの早期モデルβ-カロテン酸化研究における、ポリマー形成に対するGA形成の程度を知ることにより、近似的推定は、主要なポリマーの全β-カロテン酸化生成物混合物のレベルで構成した。β-カロテンの酸化では、GAが、全生成物、OxBCのレベルのおよそ2%の割合で形成される¹³。食品中の全酸化生成物レベルを推定する際の第1の近似では、全てのGAがβ-カロテンから得られると仮定した。しかし、GAに変換することが可能なβ-イオノン環構造は、その他のプロビタミンAカロテノイド中に存在する(図2)。2個の環を備えたβ-カロテンは、分子当たり2つのGAを形成することができ、それに対して1個の環を備えたα-カロテン、γ-カロテン、およびβ-クリプトキサンチンは、分子当たりただ1つのGAを形成することができる。プロビタミンAカロテノイド(PVA)は、この研究で分析される食品試料中では測定しなかった。代わりに、文献出典を使用して、酸化プロビタミンAカロテノイドの全推定レベルと比較するための近似的公称値を得た(表2)。数個の試料において、少量のプロビタミンAカロテノイド(例えば、ニンジン中のα-カロテン)の1種または2種からのいくつかの寄与があるとすれば、推定される全酸化生成物は、各カロテノイドからの寄与の合計を表す用語OxPVAによって指定される。任意の環構造を欠くりコペン、即ちトマト中の主要なカロテノイドは、酸化されたときにGAを形成しないことが確認されたことに、留意されたい。

【0156】

各食品ごとのGA値から計算されたOxPVAの値を、表2に示す。生の食品中に当初存在し必要に応じて含水量が調節される、全プロビタミンAカロテノイド、PVAの、対応する推定レベルに対する、各食品ごとのOxPVA値の比較は、酸化によるカロテノイド損失のおよその推定を提示し、PVAのパーセンテージとして表され、即ちOxPVA/PVAである(表2、欄6)。

【0157】

OxPVA/PVAデータは、ニンジンジュースおよび生のトマトが、約1%という低レベルの酸化β-カロテンを有することを示す。著しい対照として、乾燥食品は、中程度から高度のパーセンテージレベルの酸化生成物を示す。PVAからOxPVAへの完全変換に関する上限値は、130%程度となり得る(OxBCは、β-カロテンの約1.3倍重い)。ニンジン粉末#1は、当初のカロテンの公称レベルの見掛けの55%の変換に相当する最高値を示すが、既に述べたように、この生成物中のβ-カロテンの実際のレベルは検出できなかった。したがって、実際のOxPVA/PVA値は、完全酸化変換に相当する130%に近くなるべきであり、このことは、想定されるOxPVA/GA比が50よりも高いものであるべきことを示唆している。

【0158】

スピルリナ粉末、海苔海藻フレーク、ダルス海藻粉末、天日乾燥アルファルファ、ウィートグラス粉末、およびサツマイモ粉末も、酸化生成物の比較的有意な供給源である。それにも関わらず、非常に高いレベルの残留β-カロテンを含むスピルリナ粉末は、公称の当初β-カロテンレベルの僅かに見掛け上1%の酸化変換率であっても、OxPVA源として顕著である。

【0159】

ほとんどの部分で、植物ベースの生成物に関するOxPVA/PVA値は、130%の限度内にある。例外は、クランベリー粉末および乾燥デーツである。本発明者らは、おそらくはクランベリー中の低レベルのβ-カロテンにより配合される、生の果実におけるβ-カロテンの実際のレベルの不確実さは、これらの推定の精度に影響を及ぼす因子として、GA決定の精度にも影響を及ぼすと考える。

【0160】

ミルクおよび全卵粉中の推定OxPVA/PVA値も、130%を大幅に超える。GAは

、動物生成物中のO x P V Aを予測可能ではないと考えられ、食餌源、例えばアルファルファの影響を受ける可能性があり、おそらくは内因性ビタミンAの酸化によって影響を受ける可能性がある。

(実施例3)

カロテノイド-酸素コポリマー化合物の直接単離

カロテノイド-酸素コポリマーを単離するための手順。

【0161】

一般に、BHT (0.05 mg/mL) を含有する酢酸エチルを食品粉末と混合し、混合物を一晩静置させた。翌日、スラリを焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過し、BHT (0.05 mg/mL) を含有する酢酸エチルで残留物を濯いだ。濾液を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮し、再び濾過し、溶媒を蒸発させた。最小量の極性溶媒 (酢酸エチルまたは酢酸エチル/メタノール) を使用して残留物を溶解し、その後、ヘキサンを慎重に添加することによって沈殿させた。上澄みをデカントし、残留物をヘキサンで濯ぎ、次いで酢酸エチルまたは酢酸エチル/メタノールに溶解した。溶液を必要に応じて濾過し、沈殿プロセスをさらに2回まで繰り返した。次いで最終生成物を減圧乾燥した。

【0162】

乾燥形態のニンジン、トマト、バラの実、パプリカ、ダルス海藻、アルファルファ、ウィートグラス、およびトマトの搾りかすに関する抽出の詳細な記述を、以下に提示する。

【0163】

ニンジン粉末#1。粉末(80 g)をフラスコに入れ、酢酸エチル(120 mL)と混合し、7時間攪拌し、3日間静置させた。混合物を、焼結ガラスに通して濾過し、酢酸エチルで濯いだ(2×90 mL)。溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物を酢酸エチル(2 mL)に溶解し、白色物質が沈殿する間、30分間静置させた。液体を、0.2 μmのシリンジフィルタ(酢酸エチルで濯ぐ)に通して濾過し、溶媒を蒸発させて、カラメル色の油(898 mg)を得た。油を酢酸エチル(1.2 mL)に溶解し、ヘキサン(50 mL)を攪拌しながら滴下した。添加終了後、30分間攪拌し、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ(2×3 mL)。残留物を酢酸エチルに溶解し、次いで溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、1時間減圧ポンプで乾燥して、78 mgの褐色固体を得た。

【0164】

固体を、類似の様式で調製された別の試料と合わせて、合計218 mgにした。固形分を酢酸エチル(1 mL)に溶解し、0.2 μmのシリンジフィルタに通して濾過し、ヘキサン(50 mL)を攪拌しながら滴下した。1時間後、液体をデカントし、沈殿物をヘキサンで濯いだ(3×1.5 mL)。固体を酢酸エチルに溶解し、次いで溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物を2時間減圧ポンプで乾燥して、195 mgの褐色固体を得た。

【0165】

固体(155 mg)を、酢酸エチル(0.5 mL)およびヘキサン(5 mL)から3回沈殿させ、ヘキサンで濯いだ(3×1.5 mL)。減圧ポンプで3時間乾燥することにより、139 mgの褐色固体が得られた。

【0166】

ニンジン粉末#2。粉末(502 g)を酢酸エチル(約450 mL、0.05 mg/mL BHT)で覆い、一晩(17時間)静置させた。これを3回に分けて、焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過し、それぞれ酢酸エチルで濯いだ(2×90 mL、0.05 mg/mL BHT)。濾液を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮し、約14 mLの溶液を残した。0.2 μmのシリンジフィルタに通して濾過し、酢酸エチルで濯いだ(3×3 mL、0.05 mg/mL BHT)。ロータリーエバポレーターで溶媒を蒸発させて、4.7292 gの暗赤色の油を得た。油を酢酸エチル(2 mL)で希釈し、ヘキサン(100 mL)を攪拌しながら滴下した。30分後、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ(3×3 mL)。固体を酢酸エチルに溶解し、次いで溶媒をロータリーエバポ

10

20

30

40

50

レーターで除去し、生成物を減圧ポンプで乾燥して、269 mgの粘性の赤みがかった橙色の油を得た。

【0167】

油を酢酸エチル(0.5 mL)に溶解し、ヘキサン(10 mL)を攪拌しながら滴下した。30分後、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ(3×1.5 mL)。残留物を酢酸エチルに溶解し、次いで溶媒を蒸発させ、生成物を減圧ポンプで45分間乾燥して、215 mgの固体を得た。

【0168】

固体を、酢酸エチル(0.5 mL)およびヘキサン(5 mL)からもう一度沈殿させ、残留物をヘキサンで濯いだ(3×1.5 mL)。生成物を減圧ポンプで2時間乾燥させて、203 mgの橙色の固体を得た。

【0169】

トマト粉末。粉末(154 g)を酢酸エチル(320 mL、0.05 mg/mL BHT)で覆い、一晚(17時間)静置させた。混合物を、焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過し、酢酸エチルで濯いだ(2×100 mL; 0.05 mg/mL BHT)。濾液を合わせ、濃縮し、約14 mLの溶液を残した。綿(3×3 mLの酢酸エチルで濯ぐ)に通して濾過し、約7 mLに濃縮し、0.2 μmのシリンジフィルタ(合計3 mLの酢酸エチルで少量ずつ濯いだ)に通して濾過した。溶媒の蒸発により、2.15 gの赤色の油が得られた。油を酢酸エチル(2.5 mL)に溶解し、ヘキサン(100 mL)を攪拌しながら添加した。30分後、液体をデカントし、固体沈殿物をヘキサンで濯いだ(3×3 mL)。沈殿物を酢酸エチル(15 mL)に溶解し、少量の不溶性白色物質を、濾紙(10 mLの酢酸エチルで濯いだ)に通した吸引濾過によって除去した。ロータリーエバポレーターでの溶媒の蒸発の後、減圧ポンプで1時間乾燥することにより、赤色固体(453 mg)が得られた。

【0170】

赤色固体を酢酸エチル(5 mL)に溶解した。少量の白色沈殿物は溶解できず、遠心分離によって除去した。溶媒を蒸発させ、残留物を酢酸エチル(1.3 mL)に再度溶解した。ヘキサン(13 mL)を攪拌しながら滴下し、30分後に液体をデカントし、沈殿物をヘキサンで濯いだ(3×1.5 mL)。沈殿物を酢酸エチルに溶解し(ゆっくりとしたプロセスであり、ロータリーエバポレーターの浴上で35~50℃に温まるのに1時間を要する)、次いで溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、減圧ポンプで2.5時間乾燥して、赤色固体(400 mg)が得られた。

【0171】

トマトの搾りかす。トマトの搾りかす(505 g)を酢酸エチル(約1.5 L; 0.05 mg/mL BHT)で覆い、一晚静置させた。4回に分けて焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過し、それぞれ酢酸エチルで濯いだ(3×80 mL、0.05 mg/mL BHT)。合わせた溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残油をN₂の流れの下で2時間乾燥して、65.28 gの赤色油を得た。攪拌しながらヘキサン(500 mL)を油に滴下し、混合物を一晚攪拌させた。朝、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ(5×4.5 mL)。沈殿物を酢酸エチル(9 mL)に溶解し、0.45 μmのシリンジフィルタに通して濾過し、酢酸エチルで濯いだ(4×3 mL)。溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物を減圧ポンプで乾燥することにより、832 mgの濃厚な樹脂様赤色油が得られた。

【0172】

油を酢酸エチル(2 mL)に溶解し、ヘキサン(40 mL)で沈殿させ、混合物を30分間攪拌させた。液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯ぎ(4×1.5 mL)、酢酸エチルに溶解した。溶媒を蒸発させ、残留物を減圧ポンプで乾燥させて、690 mgの赤色樹脂を得た。別の沈殿を、酢酸エチル(1.5 mL)およびヘキサン(15 mL)を使用して実施し、ヘキサンで沈殿物を濯いだ(4×1.5 mL)。溶媒の蒸発と、生成物を減圧ポンプで3時間乾燥させることにより、632 mgの赤色樹脂が得られた。

【0173】

樹脂を酢酸エチル（1 mL）に溶解し、0.2 μ mのシリンジフィルタに通して濾過し、合計で1 mLの酢酸エチルの少量ずつで濯いだ。ヘキサン（20 mL）を、合わせた濾液に滴下して、沈殿物を得た。液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ（4 $\times$ 1.5 mL）。減圧ポンプの残留物を乾燥することにより、509 mgの赤色固体が得られた。

【0174】

アルファルファ。天日乾燥したアルファルファを、コーヒーグラインダで約20秒間挽いて、粗く粉碎された材料（263 g）を得た。酢酸エチル（0.05 mg/mL BHT）で覆い、一晚静置させた。翌日、別々に4回に分けて焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過し、それぞれを酢酸エチルで濯いだ（2 $\times$ 150 mL；0.05 mg/mL BHT）。濾液を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮して約55 mLにし、0.45 μ mシリンジフィルタに通して濾過し、酢酸エチルで濯いだ（3 $\times$ 3 mL；0.05 mg/mL BHT）。溶媒の蒸発により、濃厚な暗緑色のゲル（3.68 g）が得られた。

10

【0175】

酢酸エチル（6.5 mL）をゲルに添加したが、完全には溶解しなかった。0.45 μ mのシリンジフィルタに通して再び濾過し、酢酸エチルで濯いだ（4 $\times$ 1 mL）。溶媒を蒸発させて、濃厚な暗緑色の油（3.39 g）を得た。

【0176】

油を酢酸エチル（6 mL）に溶解し、ヘキサン（250 mL）を攪拌しながら滴下した。添加終了後、攪拌を止め、混合物を一晚静置させた。朝、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ（4 $\times$ 3 mL）。固体を酢酸エチルに溶解し、次いで溶媒をロータリーエバポレーターで除去して、345.4 mgの濃厚な暗緑色の油を得た。

20

【0177】

油を酢酸エチル（2 mL）に溶解し、ヘキサン（50 mL）を攪拌しながら滴下した。30分後、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ（4 $\times$ 1.5 mL）。固体を酢酸エチル（3 mL）に溶解し、0.2 μ mのシリンジフィルタに通して濾過し、酢酸エチルで濯いだ（4 $\times$ 0.7 mL）。ロータリーエバポレーターで溶媒を蒸発させた後、減圧ポンプで30分間乾燥して、暗緑色の固体（292 mg）を得た。

【0178】

固体を酢酸エチル（1 mL）に溶解し、ヘキサン（10 mL）を攪拌しながら滴下した。30分後、液体をデカントし、固体残留物をヘキサンで濯いだ（3 $\times$ 1.5 mL）。残留物を酢酸エチル（2.5 mL）に溶解し、0.2 μ mのシリンジフィルタ（4 $\times$ 0.5 mLの酢酸エチルで濯いだ）に通して濾過した。合わせた溶媒を蒸発させ、残留物を減圧ポンプで3時間乾燥して、暗緑色の固体（257 mg）を得た。

30

【0179】

バラの実の粉末。粉末（405 g）を酢酸エチル（400 mL、0.05 mg/mL BHT）で覆い、一晚静置させた。朝、焼結ガラスBuchner漏斗に、2回に分けて通して濾過し、それぞれを酢酸エチルで濯いだ（2 $\times$ 100 mL、0.05 mg/mL BHT）。溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、酢酸エチル（40 mL）を残留物に添加した。攪拌から1.5時間後、いくつかの白色沈殿物が観察された。遠心分離によって除去し、管を酢酸エチル（合計で約8 mL）で濯いだ。液体画分を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮して約15 mLにした。より多くの沈殿物が観察され、上述のように遠心分離によって除去した。液体画分を合わせ、溶媒を蒸発させて、橙色の固体（2.53 g）を得た。酢酸エチル（15 mL）を添加し、混合物を一晚攪拌した。朝、いくつかの微細な白色沈殿物が見えた。ヘキサン（200 mL）を攪拌しながら滴下し、30分後、濁った混合物を、紙に通して吸引濾過し、ヘキサンで濯いだ（4 $\times$ 3 mL）。残留物を、40°Cの酢酸エチル：メタノール（1：1、4 mL）に溶解し、次いで溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物を減圧ポンプで一晩乾燥して、560 mgの橙色の固体を得た。

40

【0180】

50

パプリカ。パプリカ（232 g）を酢酸エチル（約300 mL；0.05 mg/mL BHT）で覆い、一晚静置させた。混合物を、焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過し、酢酸エチルで濯いだ（3×80 mL、0.05 mg/mL BHT）。濾液を合わせ、ロータリーエバポレーターで約30 mLに濃縮した。0.45 μmのシリンジフィルタ（3×3 mLの酢酸エチルで濯いだ）に通して濾過し、溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物を、N₂の流れの下で4.5時間乾燥して、暗赤色の油（25.7811 g）を得た。酢酸エチル（1 mL）を油に添加し、その後、攪拌しながらヘキサン（65 mL）を滴下した。1時間後、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ（4×3 mL）。酢酸エチル（10 mL）を残留物に添加したが完全には溶解しなかった；メタノール（3 mL）の添加により残留物を溶解させた。溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物を減圧ポンプで乾燥して、濃厚な赤色油（306 mg）を得た。

10

【0181】

油を酢酸エチル：メタノール（2：1、0.5 mL）に溶解し、ヘキサン（25 mL）を攪拌しながら滴下した。30分後、濃厚な赤色油が、最上部の透明な橙色の液体層とは別に、フラスコの底面および側面を被覆した。橙色の液体をピペットにより除去し、赤色油をヘキサンで2回濯いだ（6 mL + 3 mL）。赤色油を酢酸エチル：メタノール（2：1）に溶解し、溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物を減圧ポンプで乾燥した。溶媒が蒸発するにつれ、油はより濃厚になり、乾燥させるのがより難しくなった。さらなる乾燥は、樹脂の表面が乱れるようにN₂の流れを使用し、次いで泡立ちが止むまで約5分間穏やかに加熱しながら減圧ポンプ上に置くことによって、実現した。N₂の流れと減圧ポンピングとが交互になされる数サイクル後、樹脂を45～50℃の油浴に入れ、1時間減圧乾燥して、粘性の暗赤色の油（250 mg）を得た。

20

【0182】

ダルス海藻粉末。粉末（351 g）を酢酸エチル（約400 mL；0.05 mg/mL BHT）で覆い、一晚静置させた。朝、混合物を、2回に分けて、焼結ガラスBuchner漏斗に通して濾過し、それぞれを酢酸エチルで濯いだ（2×100 mL；0.05 mg/mL BHT）。濾液を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮して約9 mLに減少させた。1時間静置させた後、液体を、0.45 μmのシリンジフィルタに通して濾過し、酢酸エチルで濯いだ（3×1.5 mL）。濾液を合わせ、溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物を、N₂の流れの下で20分間乾燥させて、濃厚な暗緑色の油（1.79 g）を得た。

30

【0183】

油を酢酸エチル（1 mL）に溶解し、ヘキサン（50 mL）を攪拌しながら滴下した。1時間後、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ（4×1.5 mL）。残留物を酢酸エチルに溶解し、次いで溶媒を蒸発させ、残留物を減圧ポンプで45分間乾燥させて、暗緑色の粘性の油（339 mg）を得た。

【0184】

油を酢酸エチル（1 mL）に溶解し、ヘキサン（25 mL）を攪拌しながら滴下した。30分後、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ（3×1.5 mL）。残留物を酢酸エチルに溶解し、次いで溶媒を蒸発させ、生成物を減圧ポンプで1時間45分乾燥させて、暗緑色の固体（264 mg）を得た。

40

【0185】

3回目の沈殿を、酢酸エチル（1 mL）およびヘキサン（10 mL）を使用して以前のように実施し、ヘキサンで濯いだ（3×1.5 mL）。固体を酢酸エチルに溶解し、0.2 μmのシリンジフィルタに通して濾過した。溶媒を、N₂の流れの下で蒸発させ、残留物を減圧ポンプで1時間40分乾燥させて、暗緑色の固体（222 mg）を得た。

【0186】

ウィートグラス粉末。ウィートグラス粉末（401.09 g）を、1 Lビーカーに入っている酢酸エチル（700 mL、0.05 mg/mL BHTを含有）と混合し、アルミ箔で覆い、3日間静置させた。スラリーを、2回に分けて、粗い焼結ガラスBuchner漏

50

斗に通して濾過し、それぞれの分量を酢酸エチルで濯いだ（ $3 \times 70 \text{ mL}$ 、 0.05 mg/mL BHTを含有）。濾液を合わせ、溶媒をロータリーエバポレーターで除去して、暗緑色の高粘度の液体を得た。これを酢酸エチル（ 10 mL ）に溶解し、ヘキサン（ 500 mL ）を攪拌しながら滴下した。添加終了から1時間後、液体を紙に通して吸引濾過し、ヘキサンで濯いだ（ $4 \times 3 \text{ mL}$ ）。残留物を酢酸エチル（ 30 mL ）に溶解し、 $0.45 \mu\text{m}$ のシリンジフィルタに通して濾過し、酢酸エチル（ 3 mL ）で濯いだ。溶媒を蒸発させて、暗緑色の固体（ 599 mg ）を得た。酢酸エチル（ 8 mL ）を緑色固体に添加したが溶解せず、したがってメタノール（ 1 mL ）を添加し、混合物を溶解した。ヘキサン（ 90 mL ）を攪拌しながら滴下し、添加終了から1時間後、液体をデカントした。固体沈殿物をヘキサンで濯ぎ（ $4 \times 3 \text{ mL}$ ）、減圧ポンプで1時間乾燥させて、暗緑色の固体（ 409 mg ）を得た。固体を8：1の酢酸エチル：メタノール（ 2 mL ）に溶解し、ヘキサン（ 20 mL ）を攪拌しながら滴下した。添加終了から1時間後、液体をデカントし、残留物をヘキサンで濯いだ（ $4 \times 3 \text{ mL}$ ）。残留物を減圧ポンプで3時間乾燥させて、暗緑色の固体（ 371 mg ）を得た。

結果

ニンジン粉末からのカロテノイドー酸素コポリマー化合物の直接単離。

【0187】

ニンジン粉末中に存在するGAから推定された高レベルのOxPVAが与えられ（ニンジン粉末#1中、約 0.5 mg/g ）、またβ-カロテンからのOxBCポリマーが極性であり、無極性溶媒に不溶であることがわかっているため、溶媒沈殿によるカロテノイドー酸素コポリマー生成物の直接単離を試みた。事実、ニンジン粉末#1の酢酸エチル抽出物へのヘキサンの添加は、褐色沈殿物をもたらした。回収された固体を酢酸エチルに再溶解し、ヘキサンで再び沈殿させ、手順を繰り返すことにより、褐色の固体が得られ、この固体は約 0.7 mg/g で、推定されるOxPVAレベルの約1.4倍であり、GAベースの推定に関して予想される範囲内に十分含まれる（表2の単離されたポリマーおよびポリマー/OxPVAの欄を参照）。類似の比（1.6）がニンジン粉末#2に関して見出され、これに関するコポリマーの収量は、ニンジン粉末#1の場合の約半分であり、GAのそれぞれの相対量と一致した。単離された固体の大部分がカロテノイドー酸素コポリマー生成物から構成されることの確認は、元素組成、IR、UV-Vis、GPC、およびGC-MS熱分解データの、OxBCポリマーに関する対応データとの比較によって提供された。

【0188】

ニンジン粉末#1および#2の抽出物から単離された生成物の、炭素、水素、酸素、および窒素に関する元素分析は、それらが炭素、水素、および酸素のほぼ全体から構成されかつ微量の窒素を含むことを確認し、高レベルの酸素を特徴とした（約24%、表5）。β-カロテン（ $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ ）に関する分子式に対して計算された元素C、H、およびOの実験式を、表4に示す。ニンジン粉末#1および#2に関する結果、即ちそれぞれ $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{O}_{11}$ および $\text{C}_{40}\text{H}_{68}\text{O}_{11}$ は、各カロテン分子に対する、平均して約5～6個の O_2 分子の付加と一致している。この数は、OxBCポリマーまたは空気中の固体β-カロテンの酸化に関する、約7個の O_2 よりもいくらか少ない（表4）。これは反応条件における可能性ある相違であり、共役二重結合が1つ少ないα-カロテンの存在は、より少ない酸素分子との反応をもたらす。興味深いことに、ニンジン粉末の実験式は、*Lycopodium clavatum*から単離されたスポロポレニンの実験式と非常に類似している（表4）。スポロポレニンバイオポリマー、即ち花粉および孢子の保護外被の一体化成分は、カロテノイドー酸素共重合によって形成されることが提示されてきた20。

【0189】

ニンジン粉末抽出物のIRスペクトルは、OxBCの場合に対して高度な類似性を示す（図7）。既に本発明者らは、OxBCおよび*Lycopodium clavatum*スポロポレニンのIRスペクトルも、顕著に類似することを示した13。

【0190】

図8に示されるニンジン粉末抽出物のUV-Visスペクトルは、OxBCポリマーの場合と非常に類似している。両方のスペクトルは、約205nmでのピーク、ならびに約235および280nmでの2つのブロードなショルダーによって特徴付けられる。これらの吸収は、コポリマー中のカルボキシル（205nm）、 α 、 β -不飽和カルボニル21、22（235nm）、および共役ジエノン23（280nm）基の存在と一致している。これらの吸収の相対強度は、関連ある官能基の相対的存在度に応じて様々になり、図8に見られるような、OxBCとニンジン粉末#1との吸収プロファイルの小さい差を説明することができる。

【0191】

主要なポリマーOxBCのGPC分子量プロファイルについては、既に記述してきた13。ニンジン粉末抽出物のポリマーの性質は、図9に示されるGPCトレースに示される。OxBCポリマーに関する、上に重ねられたトレースの単一のブロードな対称ピークとの比較は、ニンジン粉末生成物がより複雑であることを示す。単一OxBCポリマーピークと広範に一致する2つのピークに加え、早期の溶出ブロードピークがあり、より大きい分子量のポリマー成分が存在することを示している。溶出時間に対する、ニンジン粉末GPCクロマトグラムのUV-Vis断面分析は、ピークを横切る一貫した均一性の程度が、本質的にはカロテノイド-酸素コポリマーで構成されることを示す。上述の、同じ全般的なUV-Visスペクトルプロファイルは、全体を通して明らかであり、表示される強度の変化は、ほとんどが235nmの吸収領域にあった（データは図示せず）。

【0192】

ニンジン粉末コポリマーの、より大きい分子量の拡がり、酸化が生ずるニンジンマトリックス環境の不均質な性質に起因した。OxBCを形成するための β -カロテンの酸化は、溶媒中に β -カロテンおよび酸素のみ含むのに対し、ニンジンマトリックス中での酸化は、追加の分子種（ α -カロテンを含む）の存在下で生じ、エマルジョン、ミセル、および膜を含むことができる不均質環境内で引き起こされるようである。エマルジョン中のラジカル自動酸化反応は、ラジカル-ラジカル終結が生ずる前に、より長い鎖長で進行することができ、その結果、より大きい分子量のポリマーが得られる。

【0193】

ニンジン粉末抽出物の、同定可能な低分子量生成物への熱分解も、化合物のカロテノイド-酸素コポリマーの性質を裏付ける。比較のため、OxBCポリマー画分（即ち、低MWノルイソプレノイドを差し引く）の、GC-MS機器の加熱インジェクタポートへの注入は、数多くの低MW化合物への迅速な熱分解をもたらし、そのいくつかは、保持時間、ならびに質量スペクトルと参照データベース情報との比較によって同定することができる。MSデータベース19に対して50%よりも良好な一致が見られる6種の化合物は、分解生成物において容易に同定された。これらには、周知のノルイソプレノイド、 β -シクロシトラール、ジヒドロアクチニジオリド、4-オキソ- β -イオノン、および5, 6-エポキシ- β -イオノンが含まれる（図10）。これらの生成物中の不飽和カルボニル基の存在は、それらおよび関連ある基が当初の前駆体コポリマー中に存在することを反映している。同じ6種の化合物は、ニンジン粉末#2のGC-MSにも存在する（図10）。 α -イオノンと同定された第7の生成物は、 α -カロテンコポリマーに由来するようである。その他の食品からのカロテノイド-酸素コポリマー化合物の単離

【0194】

かなりの量のポリマー材料を含有する固形分を、トマト粉末、トマトの搾りかす、バラの実の粉末、パプリカ、ダルス海藻粉末、天日乾燥アルファルファ、およびウィートグラス粉末の、酢酸エチル抽出物のヘキサン沈殿によって容易に単離した（表2の最後の2つの欄を参照）。元素分析は、化合物が、本質的に炭素、水素、および酸素から構成され、かつ少量の窒素（1~2%）を含み、高い含量の酸素（21~39%）を特徴とすることを確認した（表4および表5）。GPC分析は、化合物のポリマーの性質を確認し（図11）、酢酸エチル中の単一の純粋な候補のカロテノイドの酸化から得られたコポリマーと比較して、より複雑な性質を示す（図9および12）。対応するFTIRスペクトル（図7

および 13) は、互いに対してかつ完全酸化βカロテンおよびリコペン (図 7) ならびに完全酸化ルテインおよびカンタキサンチン (図 14) のスペクトルに対して、高度な類似性を示す。

【0195】

単離したポリマーの収量と、対応する推定された OxPVA レベルとの比較であって、表 2 でポリマー／OxPVA 比として計算された値は、ニンジン粉末に関する約 1 の値よりも何倍も大きい値を示す。このことは、千分率レベルで生成物が得られるように酸化重合にも関与する、リコペン、ルテイン、およびカプサンチンを含むその他のカロテノイドの豊富さを反映する (例えば、トマト、バラの実粉末、およびパプリカ)。

【0196】

トマト粉末の実施例では、リコペンが主要なカロテノイドである。既に報告されたように 13、リコペンは、β-カロテンよりもさらに迅速に酸素と反応し、より大きい分子量のコポリマーを、明らかにさらに多量に形成する。OxLyc に関する表 4 の実験式は、リコペン当たり平均して 7~8 個の O₂ が付加されることを示す。トマト粉末抽出物に対応するデータは、ニンジン粉末に比べて酸素 (7~8 個の O₂) の高い取込みを示し、C、H、O の実験式 (C₄₀H₆₂O₁₅) は *Lilium henryi* スポロポレニン (表 4) の場合に類似している。

【0197】

表 2 は、トマト粉末から単離されたポリマー生成物が、推定される OxPVA レベルを 100 倍よりも大きく超えることを示す。その他の汚染化合物が存在する可能性があるが、リコペンは、加工されたトマト生成物におけるそのような範囲でβ-カロテンを超えることができることが、公知である 24。OxLyc、OxBC、およびニンジン粉末コポリマーのスペクトルに対する IR スペクトルの高度な類似性 (図 7) は、汚染化合物のレベルが有意ではないことを示唆する。

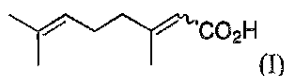
(実施例 4)

リコペンおよびγ-カロテンの自動酸化のマーカーとしてのゲラン酸

【0198】

この実施例は、ゲラン酸 (I) を、リコペンおよびγ-カロテンの自動酸化のマーカーとすることができることを示す。

【化 1】



【0199】

このマーカー化合物は、完全自動酸化リコペン (OxLyc) において同定されており、完全自動酸化γ-カロテン中に存在することも予測される。本発明者らは、この化合物を、溶媒沈殿によってポリマー画分を除去した後の OxLyc の低 MW 画分中で同定した。同定は GC-MS によって行い、質量スペクトルライブラリで 39% の一致が見出された。水性 Na₂CO₃ での抽出による OxLyc の酸画分の単離、およびその後の、水性 HCl による酸性化、次いでジエチルエーテルによる抽出と、GC-MS への注入は、80% の GC-MS ライブラリの一致をゲラン酸にもたらした。参照標準は Aldrich から購入して、GC-MS により構造を比較し確認した (87% のライブラリの一致)。Me₃OBf₄ による酸のエステル化は、ゲラン酸メチルをもたらし (図 15A 参照; 83% の GC-MS ライブラリの一致); OxLyc の低 MW 画分をそのエステル化条件に供することによってもゲラン酸メチルが得られた (76% の GC-MS ライブラリの一致)。

【0200】

図 15A は、Me₃OBf₄ によるゲラン酸のエステル化によってゲラン酸メチル (化合物 A) が得られることを示す。重水素標識されたゲラン酸の、提案された合成を、図 15B に提示する。この化合物は、食品中のゲラン酸の量を測定するための内部標準として使用することができ、したがって、酸化リコペンと、間接的にはその関連あるコポリマーと

の量の推定を提示することができる。リコペンの1当量は、ゲラン酸の2当量を発生させることができるのに対し、γ-カロテンの1当量は、ゲラン酸の1当量のみを発生させるはずである。

【0201】

Me₃OB₄F₄でエステル化された、トマト粉末およびトマトの搾りかすの抽出物の試料は、ゲラン酸メチルの存在を示した（それぞれ、45%および65%のライブラリの一致）。図15Cは、エステル化トマト粉末抽出物（上）と、OxLyc低MW画分（下）とのGCクロマトグラムを示し、ゲラン酸メチルは化合物Aとして示される。保持時間の相違は、分析条件におけるいくつかの小さな相違の結果であり、例えば、GCカラムが試料間で整えられたことに起因し、その結果、OxLyc低MWの実験操作では、より短い保持時間が得られる。エステル化されたバラの実の抽出物のGC-MS分析も、ゲラン酸メチルの存在を明らかにした（75%のライブラリの一致）。

（実施例5）

食品中のカロテン-酸素コポリマーの増強

【0202】

この研究は、酸化を増大させることがわかっている因子が、食品中のカロテノイド-酸素コポリマーのレベルを上昇させ得ることを示すように、設計した。ゲロン酸は、カロテノイド-酸素コポリマー含量の指示物質として働くことが、既に公知である（Burtonら⁵³）。この研究は、酸化を増大させることが予測される条件に曝露されたニンジン中のゲロン酸の増加を測定することによって、そのような事実を利用する。それらの条件には、増大した表面積（ピューレ形成、粉末化）、脱水、熱、および光が含まれる。

実験設計

【0203】

上部および底部を切り取った、新鮮な、皮を剥いたニンジンを手で濯ぎ、ペーパータオルで軽く叩くように水気を取り、フードプロセッサで細かく細断した。ニンジンの細片を、ゲロン酸に関して分析して、新鮮なニンジン中の含量を決定した（詳細な手順に関しては下記のアッセイ方法を参照）。また細片を、フードプロセッサを使用してピューレ状にし、約1/4インチの厚さでパーチメント紙上に塗り広げ、食品乾燥機（Excalibur 3926TB）内で10時間、約52〜53℃で脱水し、次いで約8時間で室温に冷ました。乾燥ピューレを、ゲロン酸およびβ-カロテン含量に関して分析した（詳細な手順に関しては下記のアッセイ方法を参照）。残りの乾燥ピューレを、フードプロセッサのブレードを使用して粉末化し、次いで台所用濾し器に通して篩い分けることにより、大きい粒子を除去した。ニンジン粉末を、アルミ箔で裏打ちされたトレイ（46cm×36cm）上に薄く塗り広げ、オープンスペースに置いた。トレイの上方約1.1メートルの蛍光灯による照明を使用して、周囲光条件への曝露をほぼシミュレートした。ニンジン粉末の試料は、ゲロン酸およびβ-カロテン含量の分析のため、5〜9日離れた間隔で得た（詳細な手順に関しては下記のアッセイ方法を参照）。粉末の試料を得る前に、トレイを穏やかに振盪させて、上部の粉末とその下にある粉末とを混合した。

アッセイ方法

新鮮なニンジン中のゲロン酸アッセイ

上部および底部を切り取った、新鮮な、皮を剥いたニンジンを手で濯ぎ、ペーパータオルで叩くように水気を取り、次いでフードプロセッサを使用して細かく細断した。ニンジン細片230〜400gを1Lビーカーに入れ、その後、ゲロン酸-d₆溶液0.4mL（メタノール中、0.001604mg/mL）、BHT（ブチル化ヒドロキシトルエン；4〜5mg）、およびクロロホルム（CHCl₃）（400〜500mL）を入れた。混合物を20分間、13,500rpmで均質化し、次いでホモジナイザを止め、液体をビーカーに排出させ、ホモジナイザの内部および外部をCHCl₃で濯いだ（合計で4×1.5mL）。全ての材料を2L分液漏斗に移し、橙色のCHCl₃層を橙色のパルプから分離し、パルプをビーカーに戻した。CHCl₃（300〜400mL、2〜4mgのBHTを含有）をパルプに添加し、5分間均質化した。CHCl₃層を以前のように分離し、C

HCl₃抽出物を合わせ、溶媒をロータリーエバポレーターで蒸発させた。CHCl₃を添加して(15 mL)、残留物を溶解し、混合物を乾燥し(MgSO₄)、綿に通して濾過し、CHCl₃(合計で15 mL)で濯いだ。水性KOH(25 mL; 約90 mgのKOHを50 mLの水に溶解することによって調製された)をCHCl₃溶液に添加し、5分間激しく攪拌した。混合物を分液漏斗に移し、CHCl₃のほとんどを除去し、残りの液体を5分間遠心分離した。水性層を分離し、酸性化し(1M HClを約3 mL)、CHCl₃で抽出した(2×15 mL)。合わせた抽出物を乾燥し(Na₂SO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残留物をメタノール(9 mL)に溶解し、固体NaHCO₃(約0.1 g)を添加し、混合物を攪拌した。水性NaHCO₃(1 mL、1M)を添加し、その後、Me₃OBf₄(約0.3 g)を添加した。15分攪拌した後、9 mLの水(H₂O)を添加し、攪拌し、混合物をジクロロメタン(CH₂Cl₂)で抽出した(2×7.5 mL)。合わせたCH₂Cl₂抽出物をNa₂SO₄で乾燥し、綿に通して濾過し、溶媒を、ロータリーエバポレーターで、室温で慎重に蒸発させた。残留物を0.2 mLのアセトニトリルに溶解し、1 µLをGC-MSに注入した(スプリットレス注入、SIMモードモニタリングイオン154.1および160.1)。

乾燥したニンジンピューレまたは粉末のゲロン酸アッセイ

【0204】

この手順で使用される全ての酢酸エチルは、0.05 mg/mLのBHTを含有していた。乾燥したニンジンピューレまたは粉末約3.5 gを、50 mLの試験管に計量した(ニンジンピューレは、管の底に適合するようにスパチュラで潰した)。管に、15 mLの酢酸エチルおよびゲロン酸-d₆(メタノール中0.64~13 µg)を添加した。混合物を10分間、13,500 rpmで均質化し、次いで6,500 rpmで10分間均質化した。ホモジナイザを止め、液体を管に排出させ、ホモジナイザの内部および外部を酢酸エチルで濯いだ(合計で4×1.5 mL)。全ての材料を、2×15 mLの遠心分離試験管に移し、遠心分離した(約5分)。上澄みを50 mLの丸底フラスコに移し、溶媒を蒸発させた。この時点で、フラスコをアルゴン下で封止し、翌朝までフリーザ内で一晩保存した。次いで5%のNH₃水溶液6 mL、およびH₂O 3 mLを添加し、20分間激しく攪拌した。その間、SPEカートリッジ(Waters Oasis MAX、500 mg/6 mL)を、下記の溶液に順に通すことによって準備した:メタノール(6 mL)、H₂O(6 mL)、0.5%のNH₃水溶液(4.5 mL)。次いで分析物の塩基性溶液を、重力によってカートリッジに通した(ピペットバルブによる圧力は、流動が非常に遅い場合は許容される)。次いでカートリッジを0.5%のNH₃水溶液(4.5 mL)で洗浄し、その後メタノール(9 mL)で洗浄した。次いでカルボン酸を、メタノールに2%のHClを溶かした溶液(4.5 mL)に通してカートリッジから溶出し、20 mLのシンチレーションバイアルに収集した。固体NaHCO₃を添加し、泡立ちが止むまで(約30秒)攪拌した。次いで1M NaHCO₃(1 mL)を添加し、濁った溶液を得た。溶液を、Me₃OBf₄が添加される間(約0.3 g)、穏やかに攪拌した。混合物を15分間激しく攪拌し、バイアル中の少量の固体NaHCO₃の存在を確実にすることによって(目視検査-必要に応じてさらに添加する)僅かに塩基性に維持した。15分後、6 mLのH₂Oを添加し、攪拌し、混合物をCH₂Cl₂で抽出した(2×6 mL)。合わせたCH₂Cl₂抽出物をNa₂SO₄で乾燥させ、綿に通して濾過し、溶媒を室温で、ロータリーエバポレーターで慎重に蒸発させた。残留物を0.2 mLのアセトニトリルに溶解し、必要に応じて0.2 µmのTeflonシリンジフィルタに通して濾過し、1 µLをGC-MSに注入した(スプリットレス注入、SIMモードモニタリングイオン154.1および160.1)。

乾燥したニンジンピューレまたは粉末のβ-カロテンアッセイ

【0205】

この手順で使用した全ての酢酸エチルは、0.05 mg/mLのBHTを含有した。乾燥したニンジンピューレまたは粉末約1.0 gを、50 mLの試験管に計量した。管に、20 mLの酢酸エチルを添加した。10分間、13,500 rpmで均質化し、次いでホモ

10

20

30

40

50

ジナイザを止め、液体を管に排出させ、ホモジナイザの内部および外部を酢酸エチルで濯いだ（ $5 \times 1.5 \text{ mL}$ ）。全ての材料を、 $2 \times 15 \text{ mL}$ 遠心分離試験管に移し、約5分間遠心分離し、上澄みを 100 mL のメスフラスコに移した。残留物を、 50 mL 試験管に移し戻し、必要に応じて遠心分離管を酢酸エチルで濯いで、完全な移送を確実にした。合計で 20 mL の酢酸エチルを残留物に添加し、3分間、 $6,500 \text{ rpm}$ で均質化した。混合物を遠心分離し、以前のように分離し、残留物をもう一度抽出した（3分、 $6,500 \text{ rpm}$ ）。3回の全ての抽出からの液体を、 100 mL のメスフラスコ内で合わせ、酢酸エチルで体積まで希釈し、30回反転させて混合した。この濁った橙色の溶液 1 mL を、 $0.2 \mu\text{m}$ のTeflonシリンジフィルタに通して、 1 mL の容量バイアル内に濾過した。溶液をピペットで 10 mL のメスフラスコに移し、数回に分けた酢酸エチルで慎重に濯いで、完全な移送を確実にした。溶液は、酢酸エチルで 10 mL のマークまで構成され、30回反転させて混合し、溶液の吸光度を 454 nm で測定した。先に決定されたβ-カロテン消光係数 $237.67 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を使用して、溶液中のβ-カロテンの量を計算した。

結果および考察

【0206】

新鮮な、細断したニンジンには、 4.9 ng/g のゲロン酸を含有することがわかった（表6）。ニンジンピューレの脱水は、 89.5% の質量減少をもたらした。表6に見られるように、0日目の、加工されたニンジン中のゲロン酸の量は、ピューレ形成および脱水後に約20倍に増加した。ゲロン酸の上昇レベルは、脱水中の質量の10分の1の減少と、いくらかの酸化との両方の結果である。乾燥したピューレを粉末化し、それを薄くトレイ上に塗り拡げて空気および光に曝露することによるさらなる加工は、5日後にゲロン酸の約9倍の増加を引き起こし、それに付随してβ-カロテンが減少した（表6）。21日後、ゲロン酸は、 4155 ng/g に実質的に増加し、β-カロテンは、出発時の量の半分未満に減少した。

【0207】

図16は、β-カロテンの減少に対するゲロン酸の上昇の、逆の関係をグラフで示す。ゲロン酸の変化を、各時点でのβ-カロテンの変化によって割ることで、およそ一定の比が得られ（表6）、ゲロン酸の生成はβ-カロテンの酸化的損失に密接に関連することが示される。

【0208】

表6は、ニンジン中のゲロン酸およびβ-カロテンのレベルに対する加工の影響を示す。

【0209】

脱水の様々な段階を経て進行するときの、加工済みニンジンの画像を、図17に示す。当初のニンジンピューレは、1日後の脱水したピューレおよび粉末でそうであるように、明るい橙色であるが、21日後に撮影されたニンジン粉末の写真で見られるように、時間と共に橙色は褪せる。色抜けは、β-カロテンの酸化と、関連あるゲロン酸および間接的にカロテノイド-酸素コポリマーの形成を示す。

【0210】

酸化を高める際のニンジンの空気曝露および物理的状態の重要性の視覚的例示を、図18に示すが、これらはニンジン粉末の2つのバイアルを対照させている。左側の橙色の粉末のバイアルは、ニンジンチップ（新鮮なニンジンから約 $1/4$ インチの厚さにカットした）を脱水し、それらをコーヒブレードミルで粉砕し、次いで封止したバイアル内で4週と6日間静置させることにより、調製した。

【0211】

右側の、バイアル内のより微細な薄褐色の粉末は、ニンジンピューレを脱水し、フードプロセッサで粉末化し、次いで粉末を、Baratza Virtuoso Coffee Burr Millで一定のサイズに粉砕することにより調製した。粉末を、最も粗い設定40で、次いで再び30で、最後に20で粉砕した。粉末を、アルミ箔で裏打ちされたトレイ上に置き、空気に1週と6日間曝露したが、光を排除しようとはしなかった。

【0212】

左側の、バイアル内に封止されたニンジン粉末は、4週と6日後に明るい橙色のままであるが、ちょうど1週と6日間空気に曝露された右側のバイアルの粉末は薄褐色であり、 β -カロテンが、より大幅に失われたことを示す。

【0213】

この実験は、 β -カロテン酸化の程度を高めるための、細かく分割されたニンジン粉末と空気への容易な接触との重要性を示す。

(実施例6)

ルテイン、ゼアキサンチン、およびカプサンチンの自動酸化の、4-ヒドロキシゲロン酸およびそのラクトンマーカ-

【0214】

4-ヒドロキシゲロン酸およびそのラクトンは、完全酸化ルテインまたはゼアキサンチン、および原則としてカプサンチンのマーカ-である。ラクトンを、ルテインのオゾン分解から単離し、NMR (^1H , ^{13}C)、エレクトロスプレーMSおよびGC-MSにより同定した。溶媒沈殿によるポリマー画分の除去後に得られたOx Lutの低MW液体画分は、GC-MSによって確認されるようにラクトンを含有した。水性 Na_2CO_3 でOx Lutの低MW液体画分を抽出し、その後、水性HClで酸性化し、ジエチルエーテルで抽出することにより、GC-MS分析でラクトンが得られた。 Me_3OBF_4 によるエステル化に供したとき、ラクトンは開裂し、脱水して、ゲロン酸4,5-ジデヒドロメチル(化合物B、図19A)が得られる。化合物Bは、 ^1H NMRおよびGC-MS分析によって確認された。

【0215】

図19Aは、その親ラクトンと Me_3OBF_4 との反応による、ゲロン酸4,5-ジデヒドロメチル(化合物B)の形成を示す。化合物Bは、 Me_3OBF_4 でのエステル化により、Ox Lut低MW液体画分中に形成される。それは、GC保持時間および質量スペクトルの比較によって、ダルス粉末、海苔フレーク、およびGreens+粉末(食餌用栄養補助食品)の、同様にエステル化された抽出物中にも同様に存在する。図19Cは、ダルス粉末およびOx Lut低MW画分の、エステル化抽出物のGCクロマトグラムを示す。しかしパブリカ抽出物、カプサンチンの供給源のエステル化は、化合物Bの存在を明らかにしなかった。

【0216】

重水素標識ラクトンの、提案された合成を、図19Bに提示する。この化合物は、食品中のラクトンの量を測定するための内部標準として使用することができ、したがって、酸化ルテインまたはゼアキサンチン、および間接的に関連あるコポリマーの、量の推定を提供することができる。イソ酪酸-d6出発材料の調製は、Can. J. Chem., 92巻、305~316頁(2014年)のBurtonら¹³に記載されている。

【0217】

図19Cは、ダルス粉末抽出物、およびOx Lutの低MW画分であって、 Me_3OBF_4 でエステル化されたものの、GCクロマトグラムである。化合物Bは、ゲロン酸4,5-ジデヒドロメチルであり、その保持時間は7.32分である。共通の質量スペクトルイオンは、 $m/z = 184$ (M^+)、152、125、109、83、81、69、55、43を含む。

(実施例7)

カンタキサンチンの自動酸化の2,2-ジメチルグルタル酸およびその無水物マーカ-

【0218】

2,2-ジメチルグルタル酸およびその無水物は、完全酸化カンタキサンチンの潜在的なマーカ-である。それらを、カンタキサンチンのオゾン分解から単離し、 ^1H NMRおよびGC-MSによって同定した。溶媒沈殿によるポリマー画分の除去後に得られた、Ox Canの低MW液体画分は、GC-MSにより確認されるように(69%の質量スペクトルのライブラリの一致)、無水物を含有した。カンタキサンチンのオゾン分解の反応

10

20

30

40

50

生成物を、 Me_3OBF_4 によるエステル化に供し、2,2-ジメチルグルタル酸ジメチル（化合物C、図20A）を得た。化合物Cを単離し、その構造を ^1H NMRおよびGC-MSによって確認した。 Me_3OBF_4 によるOxCanの低MW液体画分のエステル化も、化合物C（91%のライブラリの一致）をもたらした。図20Aは、2,2-ジメチルグルタル酸からその無水物およびそのジメチルエステル、化合物Cへの変換を示す。

【0219】

重水素標識2,2-ジメチルグルタル酸の、提案された合成を、図20Bに示す。この化合物は、食品中の2,2-ジメチルグルタル酸の量を測定するための内部標準として使用することができ、したがって、酸化カンタキサンチン、および間接的にその関連あるコポリマーの、量の推定を提示することができた。図20Bのイソ酪酸- d_6 出発材料の調製は、Burtonら¹³、Can. J. Chem., 92巻、305～316頁（2014年）に記載されている。

表

【表1A】

表1A. 重水素標識GA内部標準を使用するGC-MSによって決定された、ニンジンジュース中のゲロン酸、GAの濃度。セミカルバゾン誘導体を介した精製に対する直接測定の比較と、添加された抗酸化剤の影響。

試料	試料の重量 ^a W (g)	強度比 I/I_6	質量比 ^b m/m_6	GA ^c (ng/g)
1	201	1.319	1.230	18.1 ^d [17.7 ^d]
2	197	1.196	1.121	16.6 ^e [16.5 ^e]
3	202	0.898	0.855 ^f	12.3
4	194	0.926	0.880 ^f	13.2
5	183	0.879	0.838 ^f	13.3
6	173	0.670	0.684 ^g	[11.5]
平均 (試料 3～6):				12.6 ± 0.8

^a添加されたGA- d_6 内部標準の量、 m_6 、=2.9 μg 。 ^b方程式1を使用して、測定された強度比、 I/I_6 から計算された。 ^cセミカルバゾン誘導体を介して得られた角括弧内の値。 ^dBHTを添加せず、試料の調製時間は32時間。 ^eBHTを添加せず、試料の調製時間は8時間。 ^f校正: $I/I_6 = 1.121 \ m/m_6 - 0.029$; $R^2 = 0.996$ 。 ^g校正: $I/I_6 = 1.025 \ m/m_6 - 0.031$; $R^2 = 0.999$ 。

【表1B】

表1B. 生のトマト中のGAの濃度。

試料	試料の重量 ^a W (g)	強度比 I/I_6	質量比 ^b m/m_6	GA (ng/g)
1	197	0.103	0.055	0.78
2	201	0.124	0.075	1.03
3	217	0.179	0.126	1.62
4	236	0.322	0.258	3.05
5	241	0.135	0.085	0.98
平均:				1.5 ± 0.9

^a添加されたGA- d_6 内部標準の量、 m_6 、=2.8 μg 。 ^b方程式1を使用して、測定された強度比、 I/I_6 から計算された。校正: $I/I_6 = 1.080 \ m/m_6 + 0.044$; $R^2 = 0.999$ 。

【表 2】

表 2. プロビタミン A カロテノイド (PVA) の酸化から生じたゲロン酸、GA の、食品中で測定された濃度。GA 値は、全 PVA 酸化生成物、OxPVA の推定を提供し、これらの値は、文献または推定される PVA レベルと、およびいくつかの粉末化食品の酢酸エチル抽出物から単離されたカロテノイド-酸素コポリマー-生成物のレベルと比較され得る。

試料	n	GA (ng/g)	OxPVA ^d (μg/g)	PVA ^{b,c} (μg/g)	OxPVA/ PVA ^d (%)	単離された ポリマー ^e (μg/g)	ポリマー/ OxPVA ^f
ニンジンジュース	4	12.6 ± 0.8	0.63	136	0.5		
ニンジン粉末#1 ^g	3	10,590 ± 550	530	965 [118]	55	756	1.4
ニンジン粉末#2 ^h	3	5007 ± 119	250	965 [118]	21	404	1.6
トマト、生	5	1.5 ± 0.9	0.08	5.5	1.4		
トマト粉末	3	414 ± 46	21	97	21	2600	126
トマトの搾りかす	3	113 ± 3	6	90	6	1006	178
クランベリー、生	1	3.8	0.19	1.6	12		
クランベリー粉末	3	338 ± 55	17	12	142		
バラの実の粉末	4	499 ± 12	25	66 [29]	38	1380	55
パプリカ ⁱ	3	364 ± 22	18	243 [21]	7	1080	59
スピルリナ粉末	3	2560 ± 10	128	14,303 [1400]	1		
サツマイモ粉末#1 ^j	3	692 ± 22	35	345 [85]	10		
サツマイモ粉末#2 ^k	3	417 ± 55	21	352 [85]	6		
ダルス海藻粉末	3	1603 ± 39	80	194 [31]	41	634	8
海苔海藻フレーク	3	2002 ± 33	100	198 [31]	51		
チーズ、乾燥	7	32 ± 12	1.6	0.54 [0.37]	296		
アルファルファ (天日乾燥)	2	869 ± 37	43	643 [148]	7	978	23
ウイートグラス粉末	3	964 ± 7	48	231 [42]	21	924	19
赤ヤシ油	3	60 ± 1	3.0	506	0.6		
ミルク (3.25% MF)	2	6.7 ± 2.1	0.34	0.07	479		
粉ミルク (3.25% MF)	3	2.0 ± 0.1	0.10	0.58	17		
全卵粉	3	34 ± 2	1.7	0.37 [0.09]	463		

^aGAの生成は、溶液中のモデルβ-カロテン酸化についてのそれと並行すると仮定して、プロビタミンAカロテノイド酸化生成物、OxPVAの推定された近似的総量=50×GAである。OxPVAは暗に、2つのその他のプロビタミンAカロテノイド、α-カロテンおよびクリプトキサンチン(表3)から、任意の、ほとんど少量の寄与を含み、これは原則として、β-カロテンからの2つに比べ、それぞれがカロテノイド分子当たりGA 1分子を寄与することができる。^bプロビタミンAカロテノイドレベルの合計、PVA=α-+β-カロテン+クリプトキサンチンであり、生の食品に関しては文献の値を使用し、水の損失を調節した後の脱水形態に関する公称の当初の量として表される(表3)。^cγ-カロテンは、非常に少量のGAをOxPVA計算に寄与することもできる。^d角括弧内の値は、親の生の形態に関する。^e推定された全プロビタミンAカロテノイド-酸化生成物、OxPVAであって、文献をベースにした初期プ

ロビタミンAカロテノイドレベル、PVAの合計のパーセンテージとしたもの。^eヘキサンによる酢酸エチル抽出物から逐次沈殿により単離された脱水食品のグラム当たりの、カロテノイド-酸素コポリマー画分の重量(μg)。^f O_xPVAに対する、単離されたポリマー画分の比。^g薄褐色粉末。^h橙色粉末。ⁱ生の甘唐辛子との比較。^jドラム乾燥。^k空気乾燥。

【表 3】

試料	水 %	プロビタミン A カロテノイド (PVA; $\mu\text{g/g}$)		全 PVA ($\mu\text{g/g}$)	文献出典
		β -カロテン	α -カロテン		
ニンジンジュース	89	93	43	136	32a
ニンジン粉末#1 および#2	4 [88]	680 [83]	285 [35]	965 [118]	32b, 32c
トマト、生	95	4.5	1.0	5.5	32d
トマト粉末	3	79	18	97	32d, 33a
トマトの搾りかす	10	74	16	90	32d, 34
クランベリー、生	87	0.36		0.36	32e
クランベリー粉末	4	2.7		2.7	32e, 43
バラの実の粉末	6 [59]	54 [24]	0.70 [0.31]	66 [29]	32f, 35
バザリカ	11 [92]	185 [16]	2.3 [0.20]	243 [21]	32g, 32h
スピリリナ粉末	5 [91]	14,303 [1400]		14,303 [1400]	32i, 32j, 36
サツマイモ粉末 1	8 [77]	345 [85]	0.28 [0.07]	345 [85]	32k, 34
サツマイモ粉末 2	6 [77]	352 [85]	0.29 [0.07]	352 [85]	32k, 34
ダルス海藻粉末	7 [85]	194 [31]		194 [31]	33b, 33c
海苔海藻フレーク	5 [85]	198 [31]		198 [31]	33b, 33c, 34
デーツ、乾燥	15 [42]	0.50 [0.34]	0.04 [0.03]	0.54 [0.37]	37
アルファルファ (天日乾燥)	7 [79]	643 [148]		643 [148]	38, 39
ウイートグラス粉末	5 [83]	231 [41]		231 [41]	40, 41
赤ヤシ油		264	242	506	42
ミルク (3.25%乳脂肪)	88	0.07		0.07	32l
粉ミルク (3.25% MF)	2.5	0.6		0.6	32m
全卵粉	2.8 [76]		0.37 [0.1]	0.37 [0.1]	32n, 32o

*角括弧内の値は、生の食品に関する文献値である。乾燥食品中のカロテノイドレベルは、式：
カロテノイド (乾燥) = カロテノイド (生) $\times$ (100 - 水% (乾燥)) / (100 - 水% (生)) を使用して計算した

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 完全酸化 β -カロテン、リコペン、およびルテイン、選択された乾燥食品の抽出物から溶媒沈殿により単離されたコポリマーに関する元素分析データから、および様々なスポロポレニンに関するデータから計算された、 β -カロテン ($C_{40}H_{56}$) に対して表された実験式。^a

試料	C	H	O	N
完全酸化された純粋なカロテノイド ^a :				
OxBC ポリマー	40	56.5	14.7	
β -カロテン (固体) 空気酸化	40	56.9	14.2	
OxLyc ポリマー	40	59.0	15.2	
OxLut ポリマー	40	55.8	15.4	
OxCan ポリマー	40	55.1	14.7	
乾燥食品から単離されたポリマー固形分 ^a :				
ニンジン粉末#1	40	64.0	11.1	0.3
ニンジン粉末#2	40	67.7	11.2	0.3
トマト粉末	40	61.5	15.2	1.2
トマトの搾りかす	40	65.2	12.5	0.9
パラの実の粉末	40	67.1	10.6	
パプリカ	40	64.7	22.6	1.4
アルファルファ (天日乾燥)	40	58.9	10.3	0.7
ウィートグラス粉末	40	59.5	11.7	0.9
ダルス海藻粉末	40	58.9	9.7	1.3
スポロポレニン ^b :				
<i>Lycopodium clavatum</i>	40	64.0	12.0	
<i>Lilium henryi</i>	40	63.1	16.0	
<i>Pinus canadensis</i>	40	66.7	16.4	
<i>Pinus radiata</i>	40	66.2	19.6	
<i>Pinus silvestris</i>	40	70.2	19.6	

^a乾燥食品抽出物からのコポリマー、OxLyc、OxLut、およびOxCanに関する元素分析データを、表5に提示する。^bshaw³¹、314～315頁のスポロポレニンに関するデータから計算される。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. 完全に酸化された β -カロテン、リコペン、ルテイン、およびカンタキサンチンと、様々な乾燥食品の酢酸エチル抽出物から得られた沈殿物の、炭素、水素、酸素、および窒素に関する元素分析

試料	C	H	O	N	合計
OxBC	62.09	7.36	30.33	<0.3	99.78
OxLyc	60.97	7.55	30.95	<0.3	99.47
OxLut	60.35	7.07	30.93	<0.3	98.35
OxCan	61.88	7.16	30.28	<0.3	99.32
ニンジン粉末#1	65.73	8.83	24.24	0.51	99.31
ニンジン粉末#2	66.07	9.39	24.61	0.54	100.61
トマト粉末	60.49	7.81	30.71	2.10	101.11
トマトの搾りかす	62.77	8.59	26.12	1.56	99.04
パラの実の粉末	66.77	9.40	23.48	<0.3	99.65
パプリカ	51.53	7.00	38.84	2.15	99.52
アルファルファ (天日乾燥)	66.41	8.21	22.84	1.43	98.89
ウィートグラス粉末	64.50	8.05	25.22	1.71	99.48
ダルス海藻粉末	64.63	7.99	20.80	2.44	95.86

10

20

【表 6】

表 6. ニンジン中のゲロン酸および β -カロテンレベルに対する加工の影響。

ニンジンの物理的 状態	時間 (日)	ゲロン酸 (ng/g)	β -カロテン* (μ g/g)	Δ ゲロン酸 (ng) / $\Delta\beta$ -カロテン (μ g)
新鮮	-1	4.9 $\pm$ 1.9	n.d.**	-
ピューレ、乾燥	0	97 $\pm$ 18	1366	-
粉末、乾燥	5	879 $\pm$ 56	1141	3.5
粉末、乾燥	12	3478 $\pm$ 252	697	5.9
粉末、乾燥	21	4155 $\pm$ 22	573	5.5

30

* β -カロテンの測定値は近似値である。アッセイは、丸ごとのニンジンの抽出物の吸光度を454nmで、即ち β -カロテンの最大吸収波長で測定する。しかし、この波長での吸光度に適度に寄与し得る、 α -カロテンならびに部分的に酸化された β -および α -カロテンなどの、より少量のその他の化合物が存在する。

** n.d. -決定されず

参考文献

- (1) Ziegler, R. G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. Am. J. Clin. Nutr. 1991, 53, 251s-259s.
- (2) Krinsky, N. I.; Johnson, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. Mol. Aspects Med. 2005, 26, 459-516.
- (3) Slavin, J. L.; Lloyd, B. Health benefits of fruits and vegetables. Adv. Nutr. 2012, 3, 506-516.
- (4) Tang, G.; Russell, R. M. Carotenoids as provitamin A. In Carotenoids. Nutrition and Health, Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhaeuser Verlag: Basel, 2009; Vol. 5, pp. 149-172.
- (5) Peto, R.; Doll, R.; Buckley, J. D.; Sporn, M. B. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? Nature 1981, 290, 201-208.
- (6) Chew, B.; Park, J. The Immune System. In Carotenoids: Nutrition a

40

50

nd Health, Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhaeuser Verlag: Basel, 2009; Vol. 5, pp. 363-382.

(7) Bendich, A.; Olson, J. A. Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* 1989, 3, 1927-32.

(8) Yeum, K.-Y.; Aldini, G.; Russell, R. M.; Krinsky, N. I. Antioxidant/pro-oxidant actions of carotenoids. In *Carotenoids: Nutrition and Health*, Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhaeuser Verlag: Basel, 2009; Vol. 5, pp. 235-268.

(9) Young, A. J.; Phillip, D. M.; Lowe, G. M. Carotenoid antioxidant activity. In *Carotenoids in Health and Disease*, Krinsky, N. I., Mayne, S. T., Sies, H., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2004; pp. 105-126.

(10) Britton, G. Functions of intact carotenoids. In *Carotenoids: Natural Functions*, Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhaeuser Verlag: Basel, 2008; Vol. 4, pp. 189-212.

(11) Sayin, V. I.; Ibrahim, M. X.; Larsson, E.; Nilsson, J. A.; Lindahl, P.; Bergo, M. O. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci. Transl. Med.* 2014, 6, 221ra15.

(12) Harris, I. S.; Treloar, A. E.; Inoue, S.; Sasaki, M.; Gorrini, C.; Lee, K. C.; Yung, K. Y.; Brenner, D.; Knobbe-Thomsen, C. B.; Cox, M. A.; Elia, A.; Berger, T.; Cescon, D. W.; Adeoye, A.; Brustle, A.; Molyneux, S. D.; Mason, J. M.; Li, W. Y.; Yamamoto, K.; Wakeham, A.; Berman, H. K.; Khokha, R.; Done, S. J.; Kavanagh, T. J.; Lam, C. W.; Mak, T. W. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell* 2015, 27, 211-222.

(13) Burton, G. W.; Daroszewski, J.; Nickerson, J. G.; Johnston, J. B.; Mogg, T. J.; Nikiforov, G. B. s-Carotene autoxidation: oxygen copolymerization, non-vitamin A products and immunological activity. *Can. J. Chem.* 2014, 92, 305-316.

(14) Johnston, J. B.; Nickerson, J. G.; Daroszewski, J.; Mogg, T. J.; Burton, G. W. Biologically active polymers from spontaneous carotenoid oxidation. A new frontier in carotenoid activity. *PLoS ONE* 2014, 9, e111346.

(15) Miller, A. A.; Mayo, F. R. Oxidation of unsaturated compounds. I. The oxidation of styrene. *J. Am. Chem. Soc.* 1956, 78, 1017-1023.

(16) Duquette, S. C.; Fischer, C. D.; Feener, T. D.; Muench, G. P.; Morck, D. W.; Barreda, D. R.; Nickerson, J. G.; Buret, A. G. Anti-inflammatory benefits of retinoids and carotenoid derivatives: retinoic acid and fully oxidized β -carotene induce caspase-3-dependent apoptosis and promote efferocytosis of bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 2014, 75, 1064-1075.

(17) Boileau, A. C.; Erdman, J. W., Jr. Impact of food processing on content and bioavailability of carotenoids. In *Carotenoids in Health and Disease*, Krinsky, N. I., Mayne, S. T., Sies, H., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2004; pp. 209-228.

(18) Britton, G.; Khachik, F. Carotenoids in food. In *Carotenoids. Nutrition and Health*, Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., Eds.; Birkhaeuser Verlag: Basel, 2009; Vol. 5, pp. 45-66.

(19) The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Edition NIST 05, Version 2.0.

(20) Brooks, J.; Shaw, G. Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids in nature. *Nature* 1968, 219,

10

20

30

40

50

532-533.

- (21) Woodward, R. B. Structure and absorption spectra. IV. Further observations on α,β -unsaturated ketones. *J. Am. Chem. Soc.* 1942, 64, 76-77.
- (22) Woodward, R. B. Structure and the absorption spectra of α,β -unsaturated ketones. *J. Am. Chem. Soc.* 1941, 63, 1123-1126.
- (23) Lillya, C. P.; Kluge, A. F. Molecular spectra and conformations of conjugated dienones. *J. Org. Chem.* 1971, 36, 1977-1988.
- (24) Baranska, M.; Schuetze, W.; Schulz, H. Determination of lycopene and β -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. *Anal. Chem.* 2006, 78, 8456-8461.
- (25) Joseph, T. C.; Dev, S. Studies in sesquiterpenes-XXIX. Structure of himachalenes. *Tetrahedron* 1968, 24, 3809-3827.
- (26) Bhan, P.; Pande, B. S.; Soman, R.; Damodaran, N. P.; Dev, S. Products active on arthropod-5. Insect juvenile hormone mimics: sesquiterpene acids having JH activity from the wood of *Cedrus deodara* Loud. *Tetrahedron* 1984, 40, 2961-2965.
- (27) Hurnik, D.; Daroszewski, J.; Burton, G. W. In Determination of the effect of a fully oxidized β -carotene dietary supplement on the immune system and growth performance of weaned pigs, American Association of Swine Veterinarians 42nd Annual Meeting, Phoenix, Arizona, 2011; Phoenix, Arizona, 2011; pp. 277-279.
- (28) Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. National Academy Press: Washington, DC, 2001.
- (29) Takeoka, G. R.; Dao, L.; Flessa, S.; Gillespie, D. M.; Jewell, W. T.; Huebner, B.; Bertow, D.; Ebeler, S. E. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3713-3717.
- (30) Boileau, T. W.; Liao, Z.; Kim, S.; Lemeshow, S.; Erdman, J. W., Jr.; Clinton, S. K. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95, 1578-1586.
- (31) Shaw, G. The chemistry of sporopollenin. In *Sporopollenin*, Brooks, J., Grant, P. R., Muir, M., Gijzel, P. V., Shaw, G., Eds.; Academic Press: London & New York, 1971; pp. 305-348.
- (32) USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26. <http://ndb.nal.usda.gov/>. a) Entry 11655, Carrot juice, canned. b) Entry 11124, Carrots, raw. c) Entry 11683, Carrot, dehydrated. d) Entry 11529, Tomatoes, red, ripe, raw, year round average. e) Entry 09078, Cranberries, raw. f) Entry 35203, Rose hips, wild (Northern Plains Indians). g) Entry 11821, Peppers, sweet, red, raw. h) Entry 02028, Spices, paprika. i) Entry 11666, Seaweed, spirulina, raw. j) Entry 11667, Seaweed, spirulina, dried. k) Entry 11507, Sweet potato, raw, unprepared. l) Entry 01211, Milk, whole, 3.25% milkfat, without added vitamin A and vitamin D. m) Entry 01212, Milk, dry, whole, without added vitamin D. n) Entry 01123, Egg, whole, raw, fresh. o) Entry 01133, Egg, whole, dried.
- (33) Canadian Nutrient File (Health Canada). <http://webprod3.hc-sc.gc.ca>

10

20

30

40

50

/cnf-fce/index-eng.jsp. a) Food Code 2205 - Tomato powder. b) Food Code: 2205 - Seaweed, dulse (laver, nori), raw. c) Food code: 2499 - Seaweed, dulse (laver, nori), dried.

(34) 製造業者の製品データシートより。

(35) Danish Food Composition Databank. http://www.foodcomp.dk/v7/fcd_b_default.asp. FCDB no. 0095, Rosehip, dried, powder.

(36) Dillon, J.C.; Phan Phuc, A.; Dubacq, A.P. Nutritional Value of the Alga Spirulina. In World Review of Nutrition and Dietetics, Simopoulos, A.P., Ed.; Karger: Basel, Switzerland, 1995; Vol. 77, pp. 32-46.

(37) Al-Farsi, M.A.; Lee, C.Y. Nutritional and Functional Properties of Dates: A Review. Crit. Rev. Food Sci. 2008, 48, 877-887.

10

(38) Adapa, P.; Schoenau, G.; Tabil, L.; Sokhansanj, S.; Singh, A. Compression of fractionated sun-cured and dehydrated alfalfa chops into cubes: Pressure and density models. Can. Biosyst. Eng., 2005, 47, 3.33-3.39.

(39) Kandlakunta, B.; Rajendran, A.; Thingnganing, L. Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices, and condiments) and unconventional sources of plant origin. Food Chem., 2008, 106, 85-89.

(40) Bauernfeind, J.C.; Adams, C.R.; Marusich, W.L. Carotenes and Other Vitamin A Precursors in Animal Feed. In Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors, Technological and Nutritional Applications; Bauernfeind, J.C., Ed.; Academic Press: New York, 1981; pp. 563-743 (p. 623のTable 13を参照).

20

(41) Pardeshi, I.L.; Burbade, R.G.; Khod, R.N. Cost effective drying for high quality tender wheatgrass powder. J. Food Res. Technol. 2013, 1, 1-10. <http://jakraya.com/journal/jfrt?pid=101>.

(42) Ooi, C.K.; Choo, Y.M.; Yap, S.C.; Basiron, Y.; Ong, A.S.H. Recovery of carotenoids from palm oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 1994, 71, 423-426. <https://hungermath.wordpress.com/2013/01/02/red-palm-oil-as-a-source-of-beta-carotene/> でも利用可能。

(43) 類似の製品についての製造業者の栄養情報シートから引用(Cranberry whole fruit powder, Milne Fruit Products, Prosser WA. http://milnefruit.com/images/specsheets/nutritional/Milne_CranberryWFruitPowderNutr.pdf .

30

(44) Ciferri, Orio. Spirulina, the Edible Microorganism. Microbiological Reviews. Dec 1983, 47(4):551-578.

(45) Rajput, N. et al. Effect of Dietary Supplementation of Marigold Pigment on Immunity, Skin and Meat Color, and Growth Performance of Broiler Chickens. Brazilian Journal of Poultry Science. Oct - Dec 2012, 14(4):291-295.

(46) Koutsos, E.A. et al. Carotenoids from In Ovo or Dietary Sources Blunt Systemic Indices of the Inflammatory Response in Growing Chicks (Gallus gallus domesticus). The Journal of Nutrition. Jan 2006. pp. 1027-1031.

40

(47) Shanmugasundaram, R. et al. Lutein supplementation alters inflammatory cytokine production and antioxidant status in F-line turkeys. Poultry Science. 2011, 90:971-976.

(48) Oro Glo (R) のPigmenter Specification Sheet.

(49) Saini, R.K. Carotenoid content in vegetative and reproductive parts of commercially grown Moringa oleifera Lam. Cultivars from India by LC-APCI-MS. European Food Research and Technology. June 2014. 238(6):971-978.

50

(50) Paguia, H.M. et al. Utilization and Evaluation of Moringa Oleifera L. As Poultry Feeds. Science Direct. 2014, pp. 343-347.

(51) Donkor, A. et al. Estimating the Nutritional Value of the Leaves of Moringaoleifera on Poultry. Food and Nutrition Sciences. 2013, 4:1 077-1083.

(52) Abbas, T. E. The use of Moringa oleifera in poultry diets. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2013, 37:492-496.

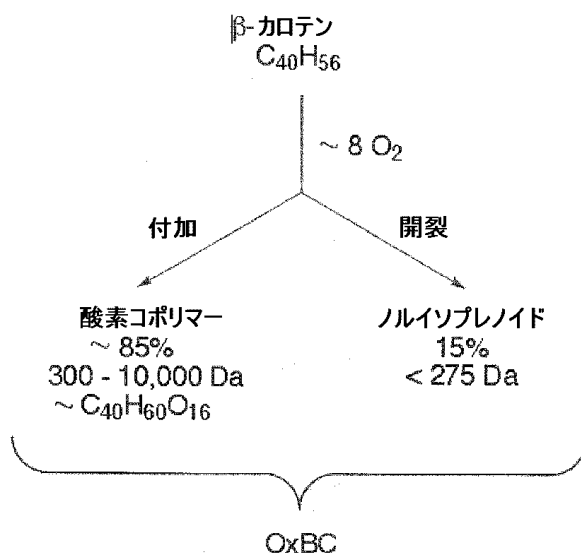
(53) Burton, G.W.; Daroszewski, J; Mogg, T.J.; Nikoforov, G.B.; Nickerson, J.G. Discovery and Characterization of Carotenoid-Oxygen Copolymers in Fruits and Vegetables with Potential Health Benefits. J. Agric. Food Chem 2016 64, 3767-3777.

(54) G. Guiliano Plant carotenoids: genomics meets multi-gene engineering. Current Opinion in Plant Biology 2014, 19:111-117.

【図面】

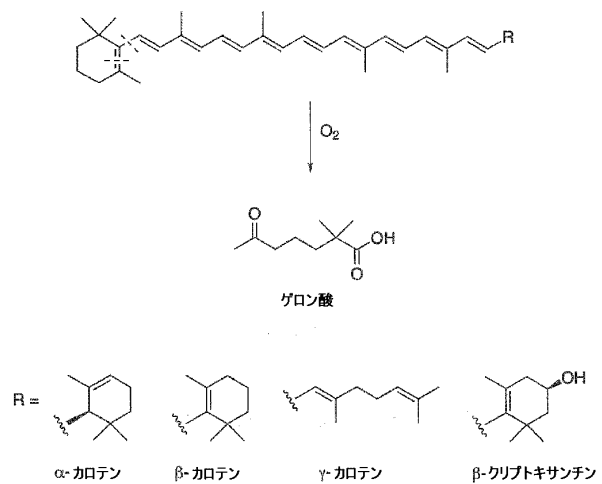
【図 1】

FIGURE 1



【図 2 A】

FIGURE 2A



10

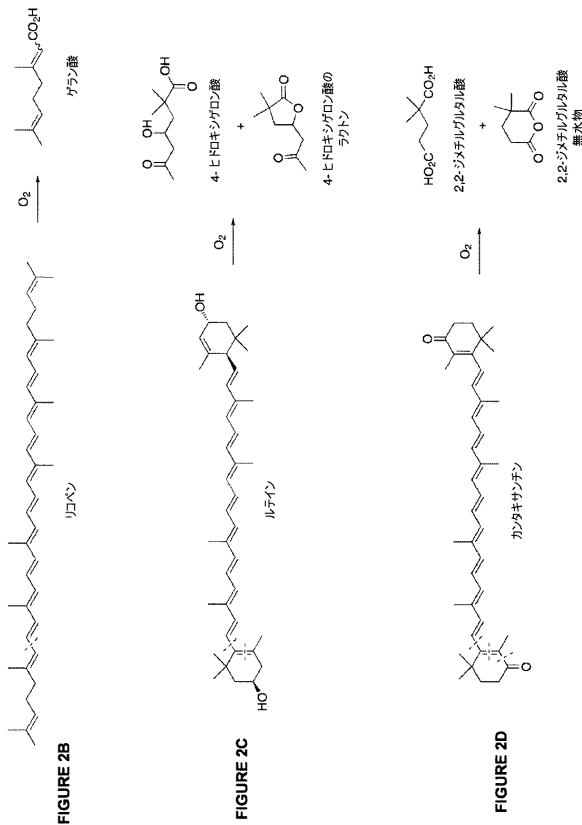
20

30

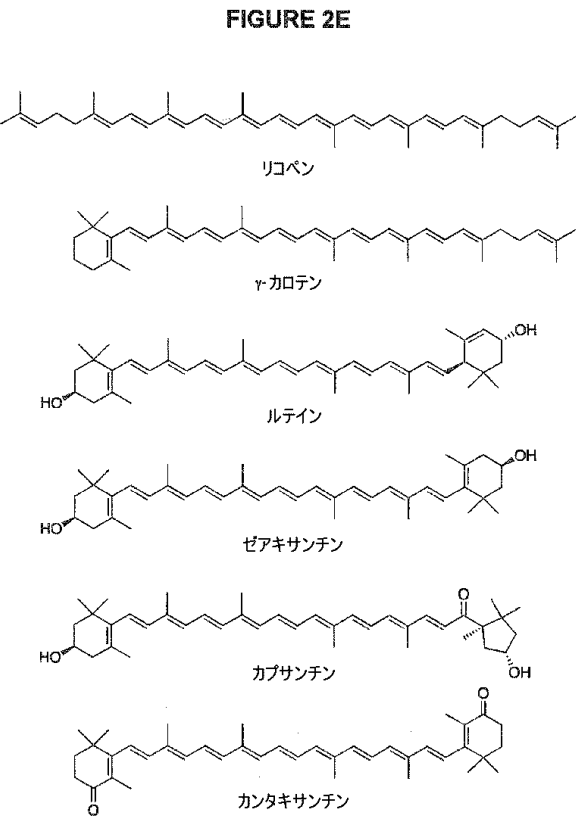
40

50

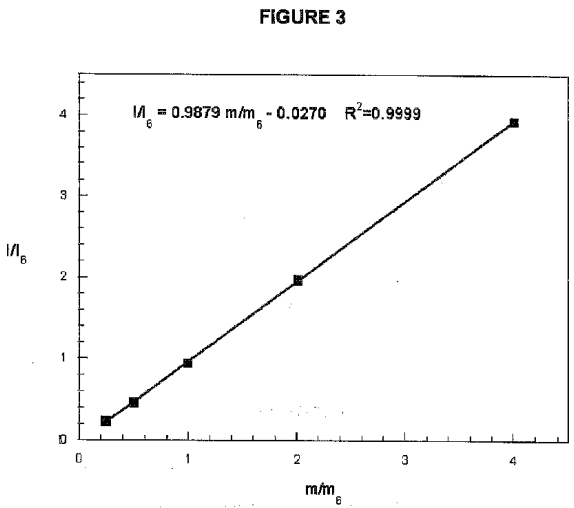
【図 2 B C D】



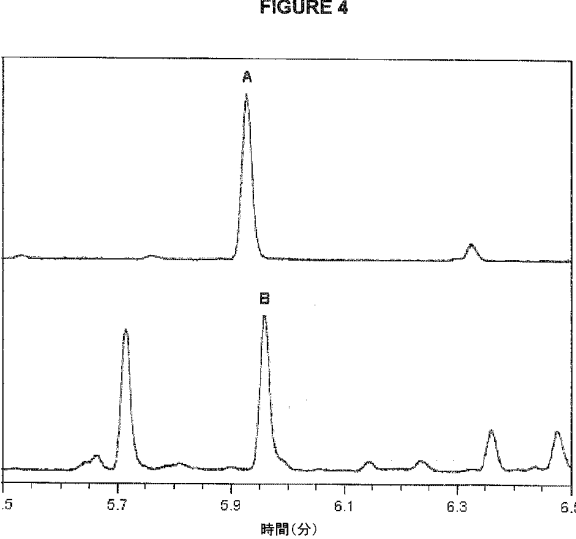
【図 2 E】



【図 3】



【図 4】



10

20

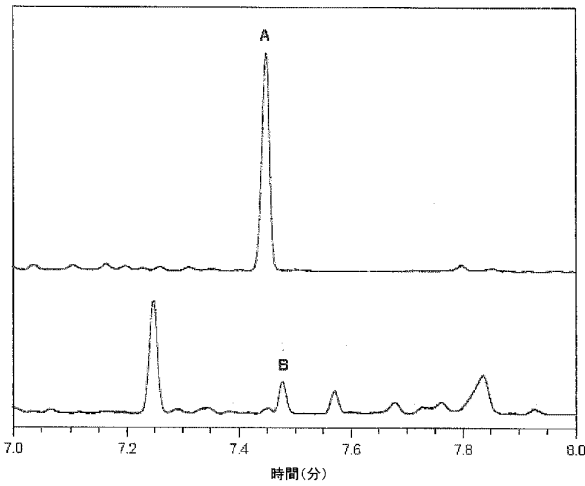
30

40

50

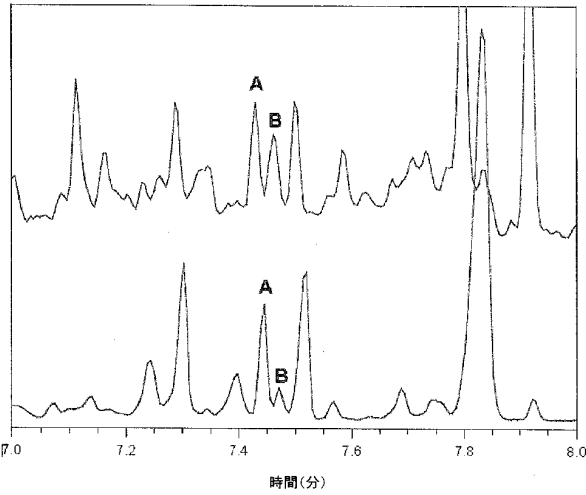
【図 5】

FIGURE 5



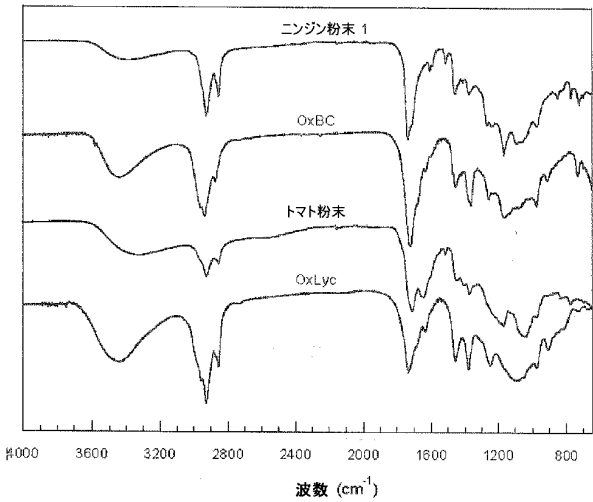
【図 6】

FIGURE 6



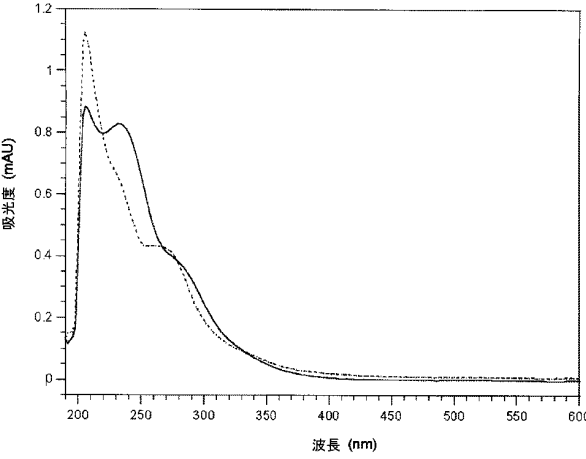
【図 7】

FIGURE 7



【図 8】

FIGURE 8



10

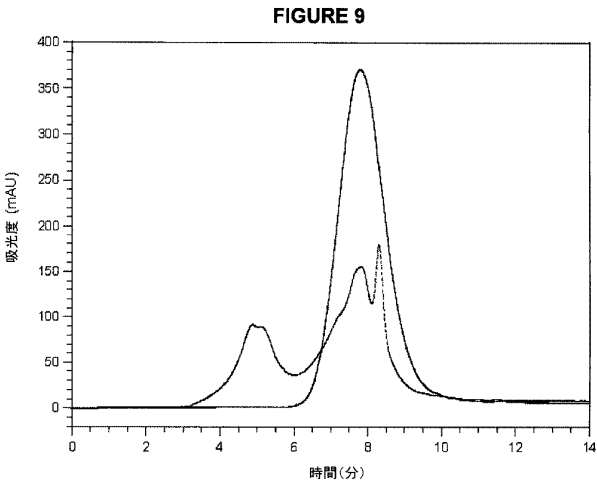
20

30

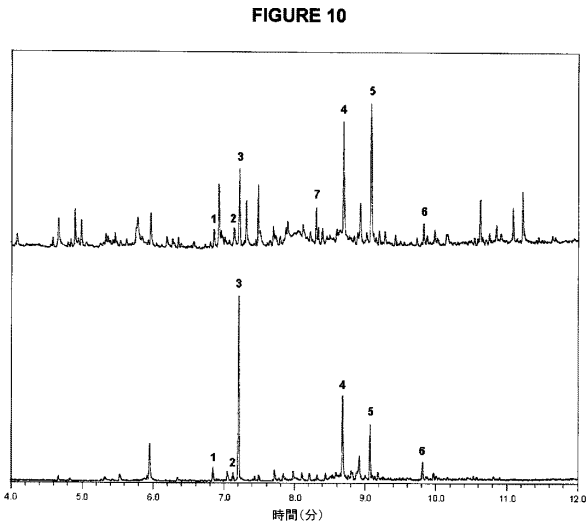
40

50

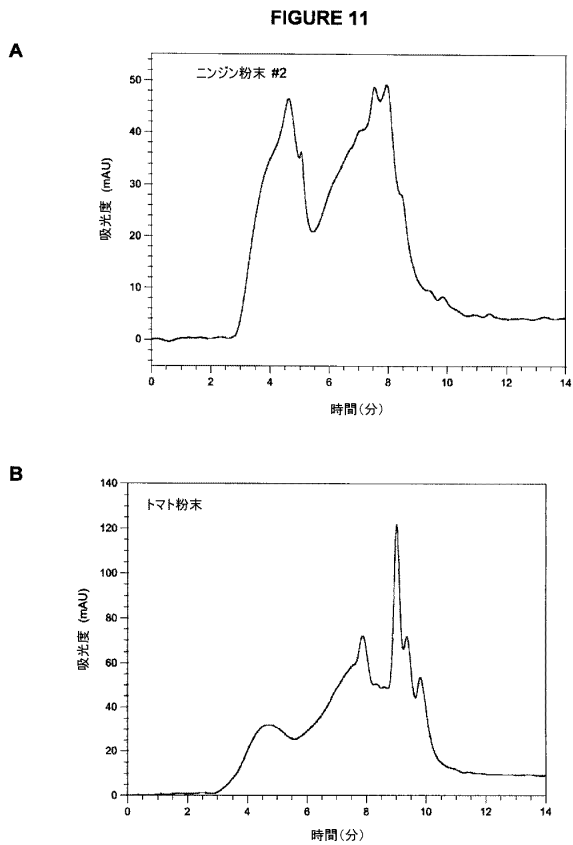
【図 9】



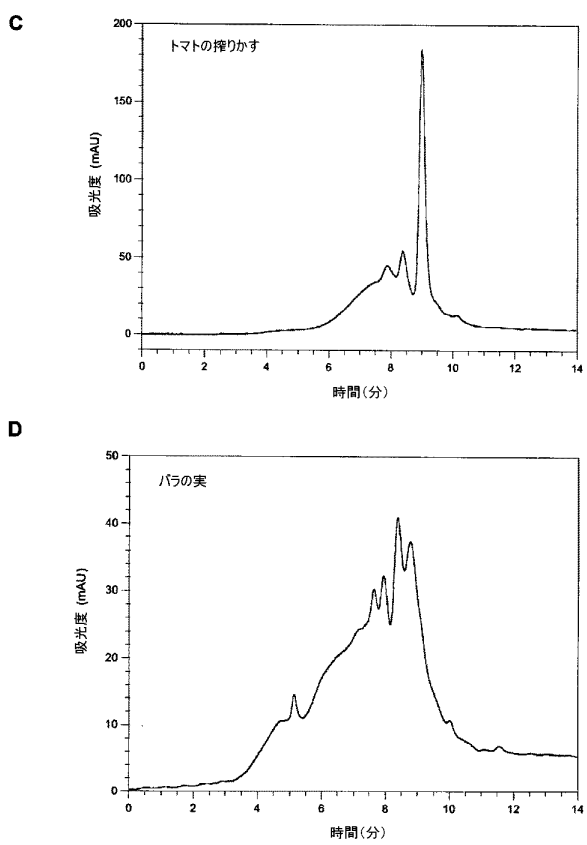
【図 10】



【図 11 A B】



【図 11 C D】



10

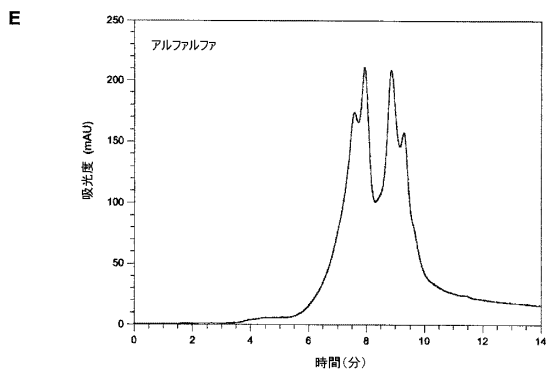
20

30

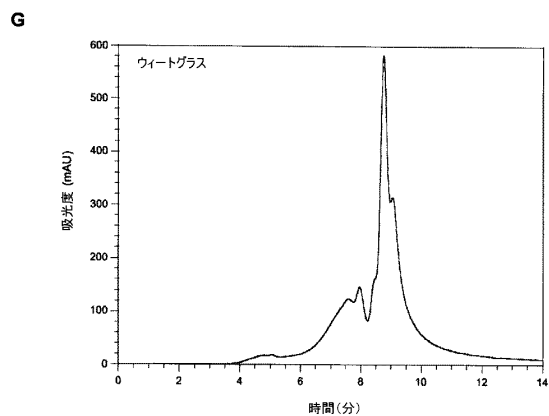
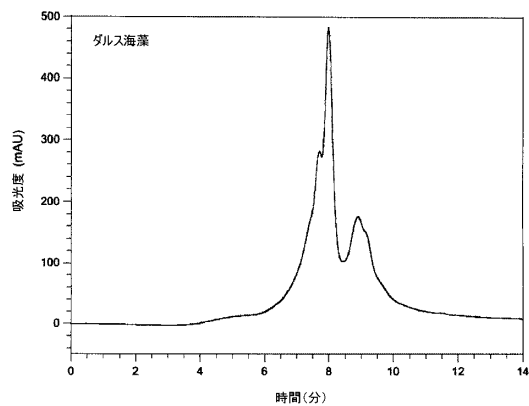
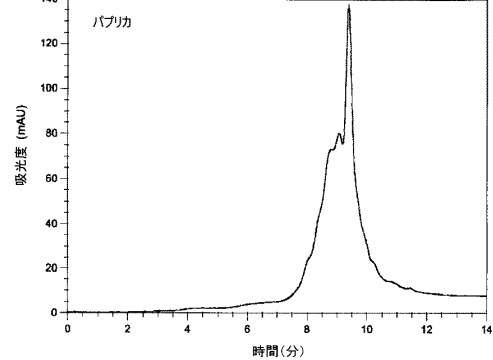
40

50

【図 1 1 E F】

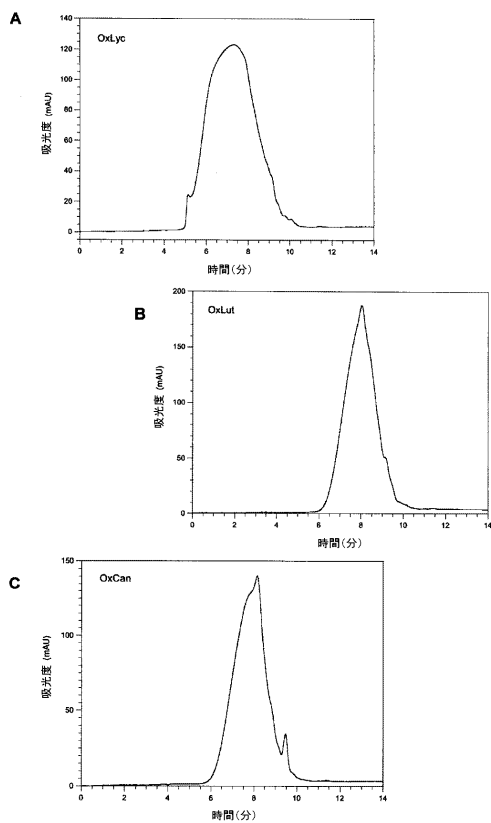


【図 1 1 G H】

**F****H**

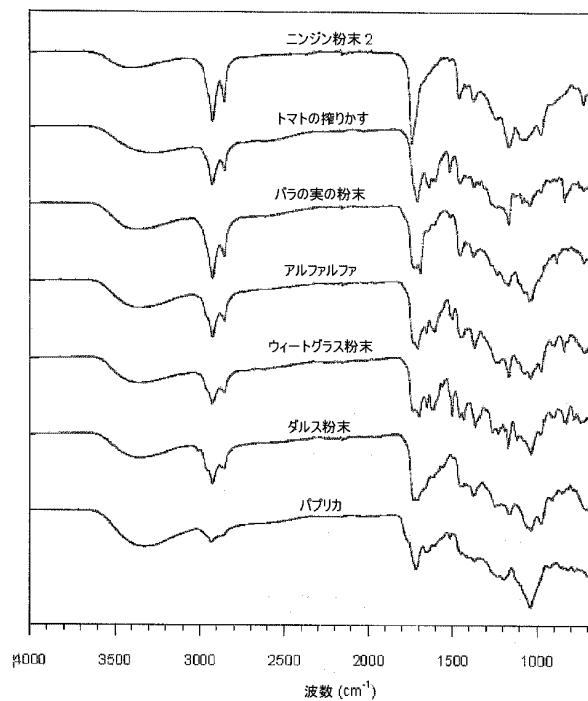
【図 1 2】

FIGURE 12



【図 1 3】

FIGURE 13



10

20

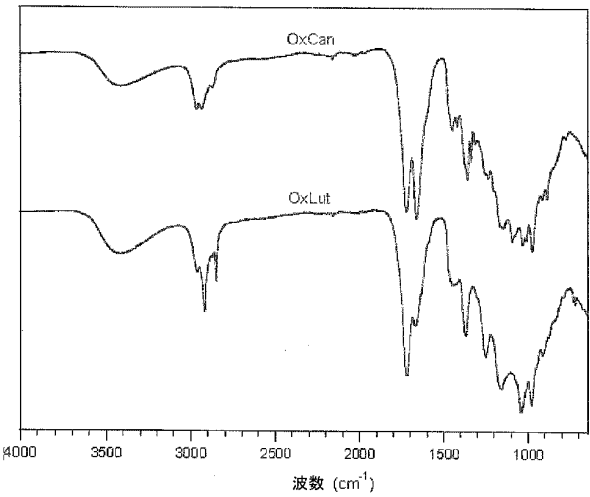
30

40

50

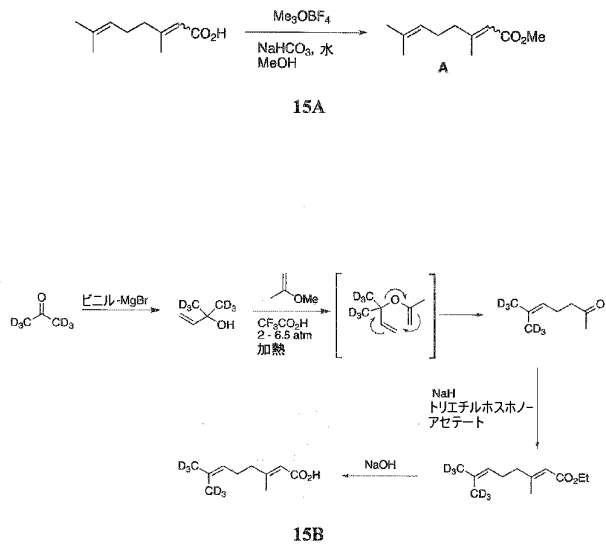
【図 1 4】

FIGURE 14

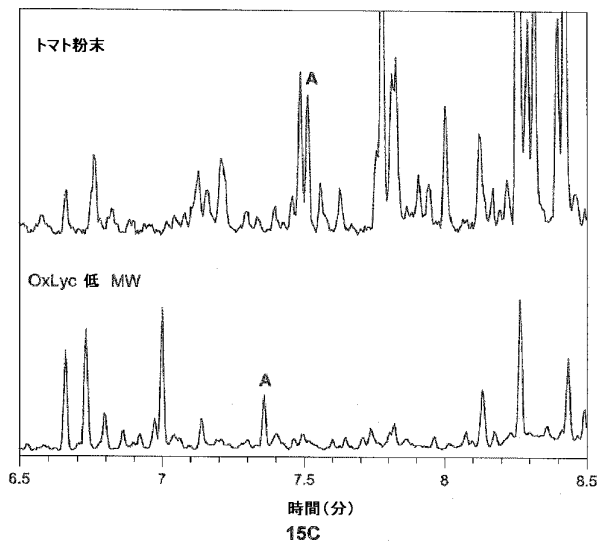


【図 1 5 A B】

FIGURE 15



【図 1 5 C】



【図 1 6】

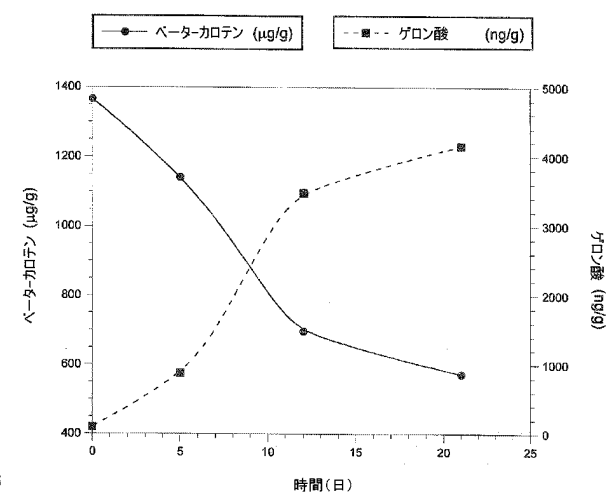


FIGURE 16

10

20

30

40

50

【図 17】

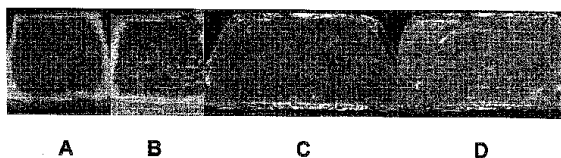
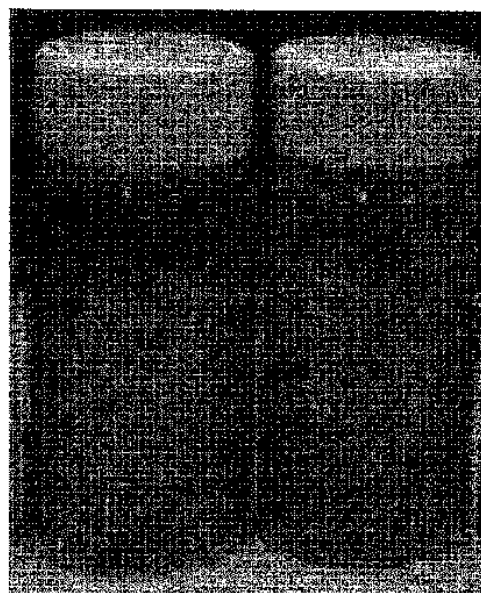


FIGURE 17

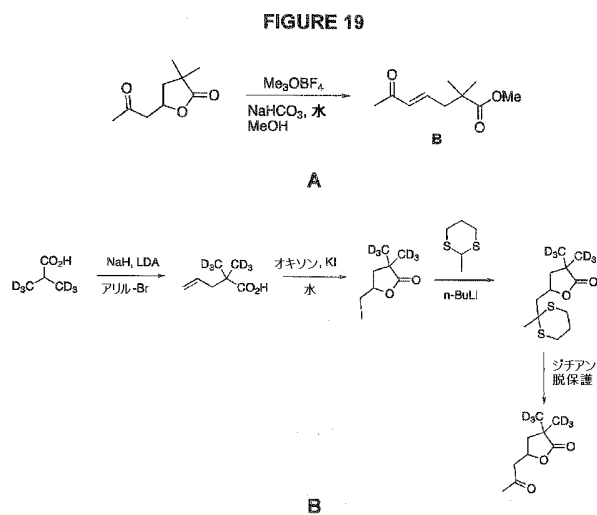
【図 18】



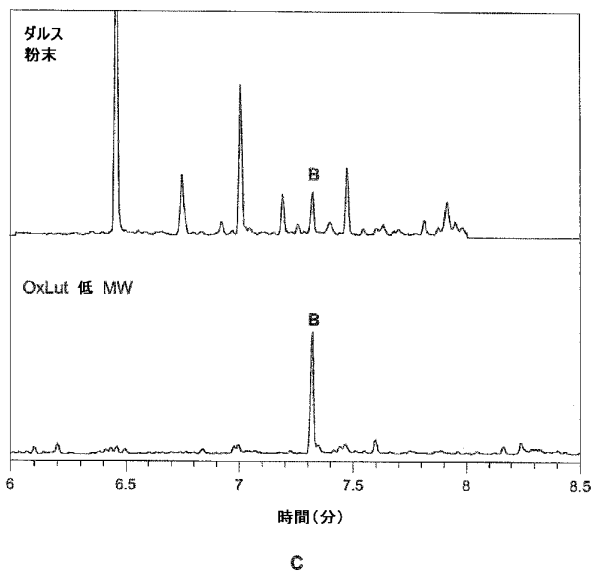
A B

FIGURE 18

【図 19 A B】



【図 19 C】



10

20

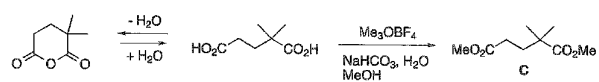
30

40

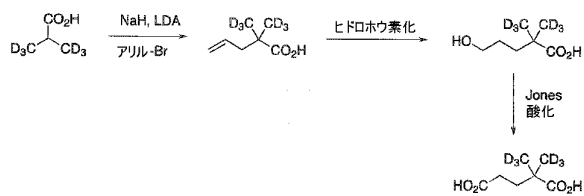
50

【図 20】

FIGURE 20



20A



20B

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	36/738 (2006.01)	A 6 1 K	36/738	
A 6 1 K	36/67 (2006.01)	A 6 1 K	36/67	
A 6 1 K	36/39 (2006.01)	A 6 1 K	36/39	
A 6 1 K	36/31 (2006.01)	A 6 1 K	36/31	
A 6 1 K	36/185 (2006.01)	A 6 1 K	36/185	
A 6 1 K	36/02 (2006.01)	A 6 1 K	36/02	
A 6 1 K	36/28 (2006.01)	A 6 1 K	36/28	
A 6 1 K	36/889 (2006.01)	A 6 1 K	36/889	
A 6 1 K	36/899 (2006.01)	A 6 1 K	36/899	
A 6 1 K	35/748 (2015.01)	A 6 1 K	35/748	
A 6 1 K	36/06 (2006.01)	A 6 1 K	36/06	A
A 6 1 K	35/66 (2015.01)	A 6 1 K	35/66	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	31/765 (2006.01)	A 6 1 K	31/765	
A 2 3 L	33/105 (2016.01)	A 2 3 L	33/105	
A 2 3 L	33/10 (2016.01)	A 2 3 L	33/10	
C 1 2 P	23/00 (2006.01)	C 1 2 P	23/00	
C 0 8 G	65/00 (2006.01)	C 0 8 G	65/00	
C 0 8 L	71/00 (2006.01)	C 0 8 L	71/00	
G 0 1 N	27/62 (2021.01)	G 0 1 N	27/62	V
G 0 1 N	21/35 (2014.01)	G 0 1 N	27/62	C
A 2 3 K	20/105 (2016.01)	G 0 1 N	21/35	
A 2 3 K	10/20 (2016.01)	A 2 3 K	20/105	
A 6 1 K	31/165 (2006.01)	A 2 3 K	10/20	
A 6 1 K	31/047 (2006.01)	A 6 1 K	31/165	
A 6 1 K	31/01 (2006.01)	A 6 1 K	31/047	
A 6 1 K	31/015 (2006.01)	A 6 1 K	31/01	
A 6 1 K	31/122 (2006.01)	A 6 1 K	31/015	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 K	31/122	
		C 1 2 N	15/09	Z

(72)発明者 バートン, グラハム ダブリュー.

カナダ国 ケー1ダブリュー1シー2 オンタリオ, オタワ, レイモンド ラブローズ ストリート
1 9 4 2

(72)発明者 ダロシェウスキ, ヤヌシュ

カナダ国 ケー1ジェイ6エー8 オンタリオ, オタワ, マンソン クレセント 2 1 4 8

(72)発明者 モグ, トレバー ジェイ.

カナダ国 ケー2ジェイ0ブイ5 オンタリオ, オタワ, テミスカミング クレセント 4 5 0

(72)発明者 ニキフォロフ, グリゴリー ビー.

カナダ国 ケー2エム0ジー2 オンタリオ, カナタ, フォックスホール ウェイ 4 7 4

(72)発明者 ニッカーソン, ジェイムズ ジー.

カナダ国 シー1エー8エス3 プリンズ エドワード アイランド, シャーロットタウン, コナ
モア ドライブ 2 4

(72)発明者 グルーム, キャメロン エル.

カナダ国 エル5ジェイ4ジェイ9 オンタリオ, ミシサガ, ウェルデン サークル 1 2 0 0 - 8 0

審査官 小澤 理

(56)参考文献 国際公開第2010/087400 (WO, A1)

米国特許出願公開第2009/0118229 (US, A1)

国際公開第2010/124391 (WO, A1)

特表2013-535222 (JP, A)

BURTON, G. W. et al., β -Cartotene autoxidation: oxygen copolymerization, non-vitamin A
products, and immunological activity, Can. J. Chem., カナダ, 2014年, Vol.92, p.305-316

NAKAZAWA, A. et al., TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production, J Appl Phycol, 2014年, Vol.26, p.29-41

株式会社キアゲン, バクテリア培養液の増殖, インターネット, 2021年01月08日, <https://www.qiagen.com/jp/service-and-support/learning-hub/technologies-and-research-topics/plasmid-resource-center/growth-of-bacterial-cultures/?Print=1>, [online], 2013-21

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

G 0 1 N 3 3 / 0 2

A 6 1 K 3 6 / 2 3

A 6 1 K 3 6 / 8 1

A 6 1 K 3 6 / 4 8

A 6 1 K 3 6 / 7 3 8

A 6 1 K 3 6 / 6 7

A 6 1 K 3 6 / 3 9

A 6 1 K 3 6 / 3 1

A 6 1 K 3 6 / 1 8 5

A 6 1 K 3 6 / 0 2

A 6 1 K 3 6 / 2 8

A 6 1 K 3 6 / 8 8 9

A 6 1 K 3 6 / 8 9 9

A 6 1 K 3 5 / 7 4 8

A 6 1 K 3 6 / 0 6

A 6 1 K 3 5 / 6 6

A 6 1 P 3 7 / 0 4

A 6 1 P 2 9 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 7 6 5

A 2 3 L 3 3 / 1 0 5

A 2 3 L 3 3 / 1 0

C 1 2 P 2 3 / 0 0

C 0 8 G 6 5 / 0 0

C 0 8 L 7 1 / 0 0

G 0 1 N 2 7 / 6 2

G 0 1 N 2 1 / 3 5

A 2 3 K 2 0 / 1 0 5

A 2 3 K 1 0 / 2 0

A 6 1 K 3 1 / 1 6 5

A 6 1 K 3 1 / 0 4 7

A 6 1 K 3 1 / 0 1

A 6 1 K 3 1 / 0 1 5

A 6 1 K 3 1 / 1 2 2

C 1 2 N 1 5 / 0 9