

ウンシュウミカンのβ-クリプトキサンチン測定法

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター 熊谷 雅孝

【はじめに】

β-クリプトキサンチンは、果実や野菜に存在するオレンジ色のカロテノイド色素の一種で、ウンシュウミカンに多く含まれており¹⁾、その栄養特性は体内でビタミンAに代謝されるプロビタミンAとしての働きが知られている。また、疫学調査により血清中濃度と種々の生活習慣病の発症リスクの低減に関連があること^{2~4)}、ヒト介入試験によりβ-クリプトキサンチンの摂取量が一日あたり3 mg以上である場合、骨代謝を指標とした骨の健康維持に効果があることが報告されている⁵⁾。

β-クリプトキサンチンは、一般的にエタノール等で抽出した後、エステル体として存在しているβ-クリプトキサンチン⁶⁾をけん化して加水分解した後、高速液体クロマトグラフで測定されている。また、分子中に11個の二重結合を持つ(図1)ことから、多くの異性体が存在する。ウンシュウミカン中では、全ての二重結合がトランスであるオールトランス体としてその多くが存在しているが、僅かながらシス体(5-cis、9-cis、13-cis等)も存在している。それらを高速液体クロマトグラフによって分別・定量するためには、通常トリアコンチルシリル化シリカゲル(C30)を充填した分析カラムを用いて、分析を行う必要がある。しかし、日本食品標準成分表や栄養表示基準の分析方法においては、オクタデシルシリル化シリカゲル(C18)を充填した分析カラムを用いて、異性体を分離せずに定量されている。本項でも、オクタデシルシリル化シリカゲル(C18)を充填した分析カラムを用いて、室間共同試験により妥当性を確認した測定法⁷⁾を紹介する。(図2)

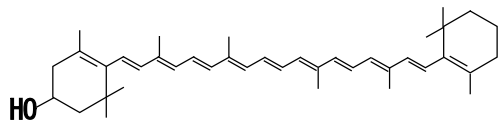


図1 β-クリプトキサンチンの化学式
(分子量 : 552.85)

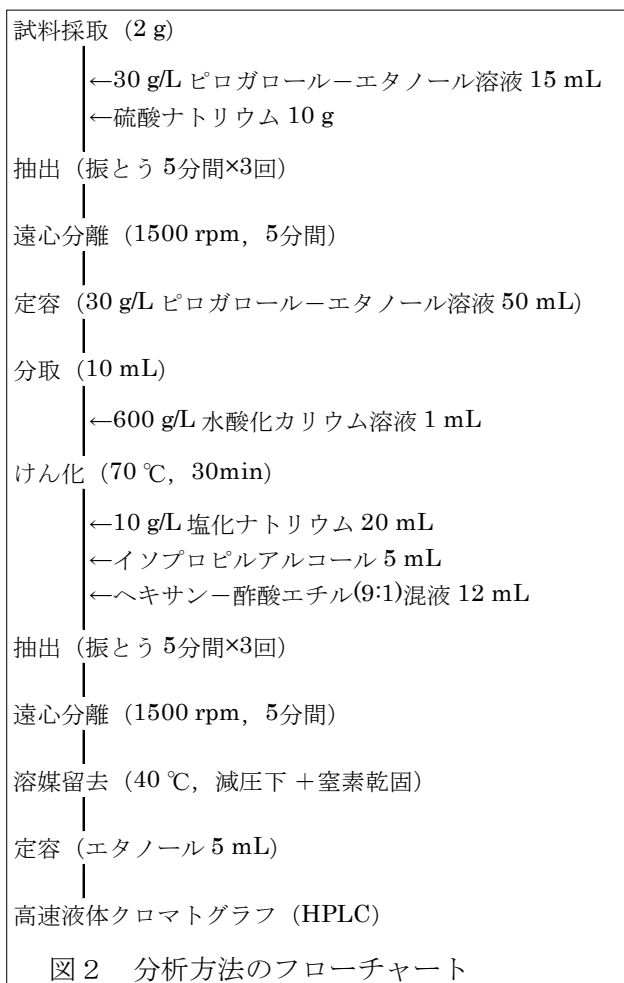


図2 分析方法のフローチャート

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- ・全量ピペット (JIS R 3505 に規定するクラス A、呼び容量 0.5 mL、1 mL、2 mL、2.5 mL、5 mL 及び 10 mL)
- ・全量フラスコ (JIS R 3505 に規定するクラス A、呼び容量 5 mL、10 mL、20 mL、25 mL、50 mL 及び 100 mL)

- ・メスシリンダー (JIS R 3505 に規定するクラス A)
- ・駒込ピペット
- ・パスツールピペット
- ・ビーカー
- ・遠心管 (容量 50 mL 程度のガラス製のもので底部が丸底のもの、かつ、共栓又はねじ口の蓋により栓ができるもの。原則として、透明のもの。使用前に漏れがないことを確認する。ねじ口の蓋を用いる場合は、PTFE 製等の有機溶剤及び強塩基性の溶液に耐性のある材質のパッキンを取り付けたもの。褐色のものを用いる場合は内容物の視認性が低いため、注意して操作を行う。)
- ・遠心管立て
- ・なす形フラスコ (100 mL の共通すり合わせ)
- ・ディスポーザブルシリンジ (容量 2 mL 又は 5 mL、エタノールに耐性のある樹脂製)
- ・メンブランフィルター (フィルターが有機溶剤系の溶液のろ過に適した PTFE 製のもので、孔径が 0.20 μm 以下のもの。)
- ・バイアル (不活性処理済のもの又は不活性処理済のインサートバイアルを入れたもの。蓋のセプタムは、PTFE 製又は PTFE でコーティングされたもの。)
- ・吸収セル (光路長が 1 cm で、石英製又は 452 nm で高い透過性を持ち石油エーテルに耐性のある材質のもの。蓋付きのものが望ましい。)
- ・水槽
- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) (送液ポンプ、脱気装置、カラム槽 (カラムオープン)、紫外可視吸光度検出器 (455 nm の吸光度を測定可能なもの) 及びデータ処理装置を備えているもの。)
- ・分光光度計 (光路長が 1 cm の吸収セルを固定できる吸収セルホルダーを備え、452 nm における吸光度を測定できるもの。)
- ・フードプロセッサー (試料を均質に粉碎できるもの。ジューサーミキサー、ブレンダータイプのホモジナイザー等を用いてもよい。)
- ・電子天びん (0.1 mg の桁まで量ることができるもの。)
- ・ロータリーエバポレーター
- ・超音波洗浄器
- ・ボルテックスミキサー
- ・振とう器 (垂直往復振とう方式)
- ・遠心器 (相対遠心加速度 400 $\times g$ で遠心分離ができるもの。)
- ・遠心管用天びん (遠心管の質量が、使用する遠心器における質量差の許容範囲 (メーカーにより用語が異なる。「許容インバランス量」「アンバランス許容範囲」等) 内であることを量ることができるもの。)
- ・恒温水槽 (70 $^{\circ}\text{C}$ に温度設定が可能なもの。)

2. 試薬

- ・ピロガロール (特級)
- ・エタノール (特級)
- ・水 (JIS K0557 に規定する A3 以上の質のもの)
- ・水酸化カリウム (特級)
- ・塩化ナトリウム (特級)

- ・硫酸ナトリウム（特級）
- ・2-プロパノール（特級）
- ・n-ヘキサン（特級）
- ・酢酸エチル（特級）
- ・窒素（99.5 %以上の純度のもの。）
- ・メタノール（高速液体クロマトグラフ用）
- ・クロロホルム（高速液体クロマトグラフ用）
- ・パルミチン酸アスコルビル（97.0 %以上の純度のもの。）
- ・石油エーテル（特級）
- ・β-クリプトキサンチン標準品（メーカーにより純度が確認されているもの。高純度のものが望ましい。）

3. 調製

1) 抽出用試薬

- ・ 30 g/L ピロガロール-エタノール溶液

ピロガロールを 30 g/L となるようにエタノールに溶解する。（長期間保存したものは、茶褐色に変色する。変色したものは使用しない。）

- ・ 600 g/L 水酸化カリウム水溶液

水酸化カリウムを 600 g/L となるように冷却しながら水に溶解する。（水酸化カリウムを溶解するときには、溶液が発熱するとともに刺激性のガスが発生するので、氷水で容器を冷却しながらドラフト内等の換気のよい場所で作業を行う。）

- ・ 10 g/L 塩化ナトリウム水溶液

塩化ナトリウムを 10 g/L となるように水に溶解する。

- ・ n-ヘキサン-酢酸エチル混液 (9:1)

n-ヘキサン 900 mL に酢酸エチル 100 mL を加え、混合する。

2) HPLC 移動相

- ・ メタノール-クロロホルム混液 (96:4) (50 µg/mL パルミチン酸アスコルビル含有)

メタノール 960 mL にパルミチン酸アスコルビル 0.05 g を溶解し、クロロホルム 40 mL を加え、混合する。

3) β-クリプトキサンチン標準溶液

- ・ β-クリプトキサンチン標準原液

(1) 使用する β-クリプトキサンチン標準品の量に応じて、β-クリプトキサンチンの濃度が 10 µg/mL 程度となる量（β-クリプトキサンチン標準品を 1 mg 使用する場合は 100 mL）の石油エーテルをメスシリンダーを用いて量り取る。

(2) 1 mL 程度の石油エーテルを β-クリプトキサンチン標準品が入った容器に加え、溶解する。

(3) 溶液をビーカー等に移す。標準品が入った容器に残った溶液を石油エーテル 1 mL 程度を用いてビーカー等に洗い込む。石油エーテルに着色が見られなくなるまで繰り返す。残りの石油エーテルをビーカー等に入れる。

(4) 溶液を蓋付き瓶等に移す。これを β-クリプトキサンチン標準原液とする。標準原液は、-30 °C~-20 °C で保存する。

・吸光度測定用標準溶液の調製及び標準原液のβ-クリプトキサンチン濃度の算出

- (1) β-クリプトキサンチン標準原液 2 mL を全量ピペットを用いて正確に採取し、10 mL の全量フラスコに排出する。適宜、使用する全量ピペット及び全量フラスコを変更してもよい。このとき、吸光度測定用標準溶液のβ-クリプトキサンチン濃度が 2 μg/mL 程度となるような容量のものを用いる。保存していた標準原液を用いる場合は、常温となるまで静置し、振り混ぜて均一とした後、調製に用いる。このとき不溶物がある場合は、メンブランフィルターを用いてろ過した後、調製に用いる。またその場合、吸光度測定用標準溶液及び HPLC 用標準溶液は同一のろ液から調製を行う。
- (2) 石油エーテルを全量フラスコに標線まで加えて定容し、振り混ぜて混合する。これを吸光度測定用標準溶液とする。
- (3) 使用する分光光度計の説明書等に従って、分光光度計の電源をあらかじめ入れておき、装置を安定化させておく。測定波長を 452 nm に設定する。
- (4) 対照試料として石油エーテルを入れた吸収セルを分光光度計の光路に置き、吸光度を 0 に合わせる。
- (5) 吸光度測定用標準溶液を入れた吸収セルを分光光度計の光路に置き、吸光度を測定する。対照試料と吸光度測定用標準溶液を同一の吸収セルを用いて測定する場合は、吸光度測定用標準溶液で吸収セルの内壁を十分共洗いした後、吸光度測定用標準溶液を入れる。対照液と吸光度測定用標準溶液を異なる吸収セルを用いて測定する場合は、光学的特性が同等であることが保証されたものを用いる。吸光度の測定は、吸光度測定用標準溶液の調製をした当日に行う。
- (6) 次式により、β-クリプトキサンチン標準原液の濃度を求める。

$$\text{標準原液の } \beta\text{-クリプトキサンチン濃度}(\mu\text{g/mL}) = A \times 10000 / 2386 \times V_2 / V_1$$

A : 吸光度測定用標準溶液の 452 nm における吸光度

2386 : 濃度 1 %、光路長 1 cm における β-クリプトキサンチンの吸光係数

V₁ : 吸光度測定用標準溶液の調製に使用した全量ピペットの容量 (mL)

V₂ : 吸光度測定用標準溶液の調製に使用した全量フラスコの容量 (mL)

・HPLC 用標準溶液

- (1) β-クリプトキサンチン標準原液を表 1 の第 1 欄の HPLC 用標準溶液に応じて第 2 欄の容量の全量ピペットを用いて正確に量り取り、なす形フラスコに排出する。
- (2) 窒素を標準原液に穏やかに吹き付け、石油エーテルを揮発させる。
- (3) 1 mL 程度のエタノールをなす形フラスコの内壁を洗いながら入れる。なす形フラスコを穏やかに振り混ぜ、β-クリプトキサンチンを溶解させる。不溶物がある場合は、超音波洗浄器を用いて 10 秒間程度超音波をかけて溶解させる。溶液をパスツールピペット等を用いて、表 1 の第 1 欄の HPLC 用標準溶液に応じて第 3 欄の容量の全量フラスコに移す。これを 3~4 回繰り返す。必要に応じて使用する全量ピペット及び全量フラスコを変更してもよい。このとき、それぞれの HPLC 用標準溶液のβ-クリプトキサンチン濃度が表 1 の第 1 欄の濃度となるような容量のものを用いる。
- (4) エタノールを全量フラスコに標線まで加えて定容し、振り混ぜて混合する。
- (5) 溶液をメンブランフィルターを用いてろ過し、バイアルに入れる。これを HPLC 用標準溶液とする。
- (6) HPLC 用標準溶液を、調製した当日に HPLC による測定を行わない場合は、-30 °C~-20 °C で保存する。保存した HPLC 用標準溶液は、測定日に室温に戻す。このとき、不溶物が析出し

ていた場合は、ボルテックスミキサー等を用いて混合し、必要に応じて超音波洗浄器を用いて不溶物を溶解させた後、メンブランフィルターを用いてろ過した後、測定を行う。

(7) 次式により、HPLC用標準溶液の濃度を求める。

HPLC用標準溶液のβ-クリプトキサンチン濃度(μg/mL) = $C \times V_3 / V_4$

C : 標準原液のβ-クリプトキサンチン濃度(μg/mL)

V₃ : 使用した全量ピペットの容量(mL)

V₄ : 使用した全量フラスコの容量(mL)

HPLC用標準溶液を調製する都度、吸光度測定用標準溶液を調製し、吸光度を測定して標準原液の濃度を求める。HPLC用標準溶液の調製は、吸光度測定用標準溶液の調製及び吸光度の測定と同日に行う。

表1 HPLC用標準溶液の調製

第1欄 HPLC用標準溶液	第2欄 全量ピペットの容量 (mL)	第3欄 全量フラスコの容量 (mL)
① (2 μg/mL相当)	1	5
② (1 μg/mL相当)	1	10
③ (0.5 μg/mL相当)	0.5	10
④ (0.25 μg/mL相当)	0.5	20

4) HPLC分析条件

- ・カラム：内径 4.6 mm、長さ 150 mm のステンレス管に、粒径 3 μm～5 μm のオクタデシルシリル基 (C18) を化学的に結合したシリカゲルを充填したもの。保護カラムを使用する場合は、測定に用いるカラムと同じ充填剤を充填したもの。
- ・カラム温度：40 °C
- ・移動相流速：1.5 mL/min
- ・検出波長：455 nm
- ・注入量：20 μL
- ・移動相：メタノール-クロロホルム (96:4) 混液 (50 μg/mL パルミチン酸アスコルビル含有)
- ・冷却機能を持つ自動試料導入装置 (オートサンプラー) を使用する場合、設定温度は 20°C とする。
- ・1回の分析時間は、β-カロテンが十分に溶出する時間とする。(20分程度)
- ・HPLCの性能確認：測定は、以下の項目について確認した後に行う。
 - (a) ベースラインの安定性：設定した測定条件で作動させたとき、ベースラインの変動が測定に支障がないことを確認する。
 - (b) 定量限界：HPLC用標準溶液④を測定したとき、β-クリプトキサンチンのシグナルが、ノイズの10倍以上であることを確認する。

ノイズ：ピークの前後におけるベースラインの、ピーク半値幅の20倍の間における出力信号の最大値と最小値の差の振れ幅の1/2をノイズとする。

シグナル：ノイズの最大値と最小値との中間をベースラインとし、ベースラインからピークトップまでの高さをシグナルとする。

【プロトコール】

1. 抽出

- 1) 試料を外果皮を除去した後、フードプロセッサー等を用いて粉砕する。粉砕した試料は、速やかに試験に供する。調製した試料を試験実施まで保存する場合は、調製後速やかにガラス製の密栓容器に入れ、 -20°C 以下で保存する。保存した試料は調製後、2ヶ月以内に試験に供する。
- 2) β -クリプトキサンチンはパルプ質に多く含まれているため、試料が均一となるようによく混ぜてから採取する。試料約2gを遠心管に量り取り、採取量を0.1mgの桁まで記録する。試料採取の際は、試料が遠心管の口や首に付着しないように注意する。
- 3) 30g/Lピロガロール-エタノール溶液15mLをメスシリンダー等を用いて量り取り、遠心管に加える。硫酸ナトリウム(無水)10gを遠心管に加える。
- 4) 遠心管に共栓等をして、振とう器で5分間激しく振とうする。
- 5) 遠心分離の際に対となる遠心管の組ごとに、遠心管用天びんを用いて質量差を量る。必要に応じて30g/Lピロガロール-エタノール溶液を遠心管に加えて、質量差を遠心器の許容範囲内とする。
- 6) 遠心器で相対遠心加速度 $400\times g$ (回転半径16cmの場合、1500rpm)程度で5分間遠心分離を行う。
- 7) 遠心管を遠心管立てに静置し、底部の試料残渣及び硫酸ナトリウムが入らないように、パステールピペットを用いて黄色の上澄み液を、50mLの全量フラスコに移す。遠心管を斜めに傾けるなどして、可能な限り上澄み液を回収する。
- 8) 30g/Lピロガロール溶液15mLをメスシリンダー等を用いて量り取り、遠心管に加える。4)~7)と同様に抽出を行い、上澄み液を全量フラスコに合わせる。
- 9) 抽出操作を更に1回行う。合計3回の抽出操作を行う。
- 10) 30g/Lピロガロール溶液を全量フラスコに標線まで加えて定容し、振り混ぜて混合する。
- 11) 全量フラスコから抽出液10mLを全量ピペットを用いて正確に量り取り、遠心管(抽出操作で用いたものとは別のもの)に排出する。
- 12) 600g/L水酸化カリウム水溶液1mLを駒込ピペット等を用いて遠心管に加え、共栓等をした後、共栓等に内容液が付着しないように穏やかに、溶液全体が暗褐色の溶液となるまで振り混ぜる。
- 13) 遠心管を遠心管立てに立て、 70°C に設定した恒温水槽に入れ、30分間加熱する。5分程度おきに遠心管を穏やかに振り混ぜる。共栓遠心管を用いる場合は内圧の上昇により栓が外れないようにするため、ジョイントクリップ、フッ素シールテープ等で共栓を固定する。
- 14) 遠心管を遠心管立てに立てたまま、水道水を入れた水槽に入れて、室温まで冷却する。
- 15) 10g/L塩化ナトリウム水溶液20mL、2-プロパノール5mL及びn-ヘキサノール酢酸エチル混液(9:1)12mLを、それぞれメスシリンダー等を用いて量り取り、遠心管に加え、共栓等をする。
- 16) 遠心管を逆さまにして底に暗褐色の沈殿が固まっていないことを確認し、固まっている場合は手で激しく振り混ぜ、沈殿を溶解させる。遠心管を振とう器を用いて5分間激しく振とうする。
- 17) 遠心分離の際に対となる遠心管の組ごとに、遠心管用天びんを用いて質量差を量る。必要に応じて10g/L塩化ナトリウム水溶液を遠心管に加えて、質量差を遠心器の許容範囲内とする。
- 18) 遠心器で相対遠心加速度 $400\times g$ (回転半径16cmの場合、1500rpm)程度で5分間遠心分

離を行う。

- 19) 遠心管を遠心管立てに静置し、暗褐色の下層が入らないように、上層をパスツールピペットを用いて、なす形フラスコに移す。可能な限り上層を回収する。
- 20) n-ヘキサン-酢酸エチル混液 (9:1) 12 mL をメスシリンダー等を用いて量り取り、遠心管に加える。16)~19)と同様に抽出を行い、上層をなす形フラスコに合わせる。
- 21) 抽出操作を更に1回行う。合計3回の抽出操作を行う。
- 22) なす形フラスコの有機溶媒を、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で1 mL程度まで減圧留去した後、窒素を穏やかに吹き付け乾固させる。
- 23) エタノール1 mL程度を、なす形フラスコの内壁を洗いながら入れる。なす形フラスコを穏やかに振り混ぜ、内容を溶解させる。不溶物がある場合は、超音波洗浄器を用いて10秒間程度超音波をかけて溶解させる。溶液をパスツールピペットを用いて5 mLの全量フラスコに移す。この操作を3~4回繰り返す。
- 24) エタノールを全量フラスコに標線まで加えて定容し、振り混ぜて混合する。
- 25) 溶液をメンブランフィルターを用いてろ過し、HPLC測定用のバイアルに入れる。これをHPLC注入用試料溶液とする。
- 26) HPLC注入用試料溶液は原則として、調製した当日にHPLCによる測定を行う。
当日に測定を行うことができない場合は、-30℃~20℃で保存し、1週間以内に測定を行う。保存したHPLC注入用試料溶液は、測定日に室温に戻す。このとき、不溶物が析出していた場合は、ボルテックスミキサー等を用いて混合し、必要に応じて超音波洗浄器を用いて10秒間程度超音波をかけて溶解させる。その後、メンブランフィルターを用いてろ過した後、HPLCによる測定を行う。

2. HPLC 測定

- 1) HPLC用標準溶液①~④をHPLCに注入し、得られたクロマトグラムについて、データ処理装置により積分を行う。
 - ・データ処理装置の自動積分機能等によりピーク面積を求める場合は、濃度等が異なることによりベースラインの引き方やピークの切り方等が異なることがあるため、クロマトグラムの拡大機能等を用いて積分が適切に行われていることを確認する。積分が適切に行われていない場合は、手動により修正する。
 - ・ピークが複数みられる又はショルダーピークがみられる等、複数の成分が確認された場合は、それらのピーク面積を合算しβ-クリプトキサンチンのピーク面積とする。
- 2) HPLC用標準溶液①~④の濃度を横軸(x)に、ピーク面積を縦軸(y)にして、原点を含めない直線回帰の検量線($y = a + bx$)を作成する。
- 3) 作成した検量線の直線性を目視により確認するとともに、相関係数(R)が0.990以上である場合は適切な検量線であると判断し、試料溶液の濃度の算出に用いる。
- 4) HPLC用標準溶液の測定と連続してHPLC注入用試料溶液をHPLCに注入する。得られたクロマトグラムについてデータ処理装置により積分を行う。HPLC用標準溶液と同様に、積分が適切に行われていることを確認し、必要に応じて修正する。
- 5) HPLC用標準溶液のβ-クリプトキサンチンのピークと保持時間が一致するピークをβ-クリプトキサンチンと同一し、ピーク面積を求める。HPLC用標準溶液において複数の成分が確認された場合は、それらのピークと保持時間が一致するピークの面積を合算し、β-クリプトキサンチンのピーク面積とする。

- 6) β -クリプトキサンチンのピークに試料由来の夾雑ピークが近接している場合は、次のとおりとする。
- 二つのピークの大きさがほぼ等しい場合、ピークの谷から時間軸に下ろした垂線によってベースライン上のピークを二つに分割し、ピーク面積を求める。
 - 大きなピークのテーリング又はリーディング部分に重なった小さなピークの場合、ピークの谷と大きなピークの裾とを結ぶ接線上の部分をピーク面積とする。
- 7) 2)で作成した検量線を用いて HPLC 注入用試料溶液の β -クリプトキサンチン濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を求める。
- 8) HPLC 注入用試料溶液の β -クリプトキサンチン濃度が、HPLC 標準溶液①の β -クリプトキサンチン濃度を超えた場合は、全量ピペット及び全量フラスコを用いて HPLC 注入用試料溶液を HPLC 標準溶液①の濃度以下となるように希釈する。再度、HPLC 用標準溶液①～④の測定及び希釈した HPLC 注入用試料溶液の測定し、HPLC 注入用試料溶液の β -クリプトキサンチン濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を求める。
- 9) HPLC 注入用試料溶液の β -クリプトキサンチン濃度が、HPLC 標準溶液④の β -クリプトキサンチン濃度未満であった場合は、全量ピペット及び全量フラスコを用いて、HPLC 注入用試料溶液の β -クリプトキサンチン濃度未満となる濃度の HPLC 標準溶液を調製する。HPLC 用標準溶液①～④、新たに調製した標準溶液及び HPLC 注入用試料溶液を測定し、HPLC 注入用試料溶液の β -クリプトキサンチン濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を求める。
- 10) 次式により、試料中の β -クリプトキサンチン含有量 (mg/kg) を算出する。
- $$\text{試料中の } \beta\text{-クリプトキサンチン含有量 (mg/kg)} = C \times 5 \times 5 / W$$
- C : HPLC 注入用試料溶液の β -クリプトキサンチン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
W : 試料採取量 (g)

【プロトコールのポイント・注意点】

- 1) ウンシュウミカンのクロマトグラムを例を図3に示す。

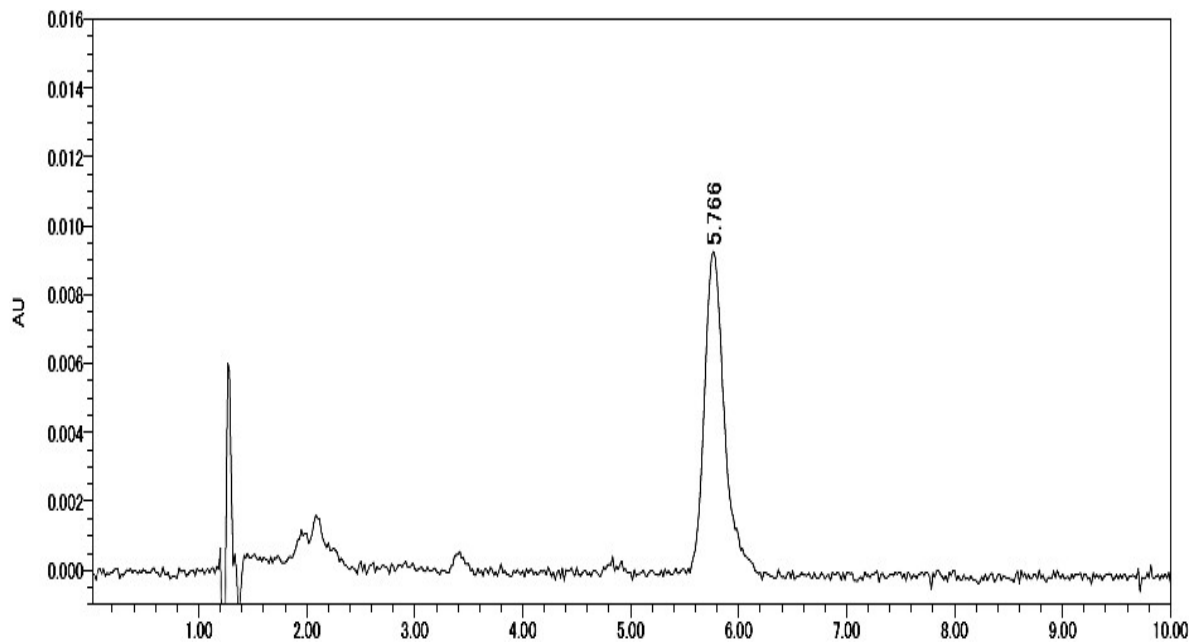


図3 ウンシュウミカンのクロマトグラム例

- 2) カロテノイドを分析する際、一般的には光による分解を防止するために褐色のガラス器具が用いられるが、本項においては、けん化工程において特に視認性が悪く作業が困難であるため、透明のガラス器具を用いる。
- 3) 試薬を取り扱う際には、適切な個人用保護具（保護手袋、保護メガネ、有機ガス用マスク、保護面等）を着用し、操作はよく換気された場所で行う。
- 4) 測定により生じる廃液は、法令の規定に基づき適切に処分する。
- 5) エタノール、2-プロパノール、n-ヘキサン及び酢酸エチルは、引火性が高いため、火気に注意する。
- 6) クロロホルムは、環境有害性があるため、屋外環境に放出しない。
- 7) 水酸化カリウム溶液が皮膚等に付着した場合は、直ちに多量の水で洗い流す。
- 8) ピロガロール-エタノール溶液は、衣類・床等に付着した場合、放置すると濃褐色に着色するため、速やかに洗浄・拭き取りを行う。

【参考文献】

- 1)Yano, M., Kato, M., Ikoma, Y., Kawasaki, A., Fukazawa, Y., Sugiura, M., Matsumoto, H., Oohara, Y., Nagano, A., and Ogawa, K., Quantitation of carotenoids in raw and processed fruits in Japan. *Food Sci. Technol. Res.*, **11**, 13-18 (2004).
- 2)Sugiura, M., Nakamura, M., Ikoma, Y., Yano, M., Ogawa, K., Matsumoto, H., Kato, M., Ohshima, and M., Nagao, A., Serum carotenoid concentrations are inversely associated with serum aminotransferases in hyperglycemic subjects. *Diabetes. Res. Clin. Pract.*, **71**, 82-91 (2006).
- 3)Nakamura, M., Sugiura, M., and Aoki, N., High β -carotene and β -cryptoxanthin are associated with low pulse wave velocity. *Atherosclerosis*, **184**, 363-369 (2006).
- 4)Sugiura, M., Nakamura, M., Ikoma, Y., Yano, M., Ogawa, K., Matsumoto, H., Kato, M., Ohshima, M., and Nagao, A., The homeostasis model assessment-insulin resistance index is inversely associated with serum carotenoids in non-diabetic subjects. *J. Epidemiol.*, **16**, 71-78 (2006).
- 5)Yamaguchi, M., Igarashi, A., Uchiyama, S., Sugawara, K., Sumida, T., Morita, S., Ogawa, H., Nishitani, M. and Kajimoto, Y., Effect of β -cryptoxanthin on circulating bone metabolic markers: Intake of juice (*Citrus unshiu*) supplemented with β -cryptoxanthin has an effect in menopausal women. *J. Health Sci.*, **52**, 758-768 (2006).
- 6)Wada, Y., Matsubara, A., Uchikata, T., Iwasaki, Y., Morimoto, S., Kan, K., Ookura, T., Fukusaki, E., Bamba, T., Investigation of β -Cryptoxanthin Fatty Acid Ester Compositions in Citrus Fruits Cultivated in Japan. *Food Nutr. Sci.*, **4**, 98-104 (2013).
- 7)熊谷雅孝, 門倉雅史, 水田賢司, 田中真澄, 生駒吉識, 鈴木忠直, 安井明美, ウンシュウミカン中の β -クリプトキサンチン測定法の室間共同試験による妥当性確認, 日本食品科学工学会誌, **63**, 450-454 (2016).