

逆相高速液体クロマトグラフィーによる食品中の α -トコフェロール酢酸エステル及びトコフェロール同族体の分析

坂本智徳

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Determination of α -Tocopherol Acetate and Tocopherol Homologues in Foods by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography

Tomonori SAKAMOTO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

逆相液体クロマトグラフィーによる食品中のトコフェロール(Toc)同族体(α -, β -, γ -及び δ -Toc)及び α -トコフェロール酢酸エステル(TocAc)の試験法を開発した。分析カラムには固定相にアミド基を導入した ODS カラムを用い、移動相にメタノール・水混液を用いることで 30 分以内に Toc 及び TocAc の一斉分析が可能となった。定量限界は 1 $\mu\text{g/mL}$ であり、Toc は 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 、TocAc は 5~100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で検量線の相関係数は 0.999 であった。実態調査では 0.01~0.46 g/kg の範囲で Toc を検出したが、TocAc は検出しなかった。食用油脂での回収率は 100%前後と良好であった。ただし、ケン化を要する試料では TocAc の加水分解のため回収が不可能であり新たな抽出法の必要性が示唆された。

Key Words : 逆相高速液体クロマトグラフィー RP-HPLC, α -トコフェロール酢酸エステル α -Tocopherol Acetate, トコフェロール Tocopherol, 食品 foods

1 はじめに

α -トコフェロール酢酸エステル(TocAc)は α -トコフェロール(α -Toc)の 6 位の水酸基をアセチル化して得られ、Toc のような酸化防止作用は有しない一方、体内で加水分解され Toc を生成するためビタミン E 源として米国など海外で 사용되는ほか、日本では医療分野で使用されてきた。これまで日本では食品添加物として未指定であったが、2007 年 4 月、トコフェロール酢酸エステル及び d - α -トコフェロール酢酸エステルとして食品添加物に新規指定された。

食品衛生検査指針食品添加物編(2003)¹⁾では、順相液体クロマトグラフィー(NP-HPLC)による試験法が採用されているが、移動相として大量の有機溶媒を使用するという問題がある。逆相液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)による分析法はアミド型オクタデシルシリル

化シリカゲル(アミド型 ODS)カラムを用いる方法²⁾及びトリアコンチルシリル化シリカゲル(C30)カラムを用いる方法³⁾が報告されており、このうちアミド型 ODS カラムによるものを参考に TocAc 及び Toc 同族体の試験法を開発したので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

市内流通する食品 47 検体

2.2 試薬

2.2.1 試薬

- ・ビタミン E 同族体セット(エーザイ(株)製)
- ・ α -トコフェロール酢酸エステル(和光純薬工業(株)製)

・メタノール(HPLC 用)

その他の試薬は特級試薬を用いた。

2.2.2 標準原液

ビタミン E 同族体セットの α -, β -, γ -, δ -Toc 及び TocAc をそれぞれ 20 mg を正確に測り、それぞれ 20 mL 容のメスフラスコに入れエタノールで正確に 20 mL に定容した (1,000 μ g/mL)。

2.2.3 標準溶液

各標準原液を 2 mL ずつ混合したのち(200 μ g/mL)エタノールで適宜希釈し、1, 2, 5, 10, 20 μ g/mL の混合標準溶液を調製して検量線用標準溶液とした。

2.3 装置及び測定条件

カラム: SUPELCOSIL-™ ABZ+PLUS 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 μ m (SUPELCO 社製), 移動相: MeOH : H₂O = 89 : 11 (v:v), 流量: 1.0 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 検出波長: UV285 nm, 蛍光 ex.285 nm, em.330 nm, 注入量: 20 μ L

2.4 抽出方法

2.4.1 食用油脂

試料約 0.5 g を精密に量り、エタノール 5 mL に溶解し 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し試料溶液とした。

2.4.2 固形食品

試料約 0.5 g を精密に量り、塩化ナトリウム溶液(1 $\rightarrow$ 100) 1 mL を加え混和した。次いでピロガロール・エタノール溶液(6 $\rightarrow$ 100) 7 mL, 水酸化カリウム溶液(60 $\rightarrow$ 100) 1 mL を加え 70 $^{\circ}$ C で 30 分間加温した。氷冷後、塩化ナトリウム溶液(1 $\rightarrow$ 100) 15 mL を加え酢酸エチル・n-ヘキサン混液(1:9) 15 mL で 3 回抽出した。有機層から溶媒を減圧留去し残渣をエタノールで溶解し 5 mL とした。溶液を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し試料溶液とした。

3 結果および考察

3.1 装置条件の検討

3.1.1 移動相条件

Fig.1 にカラムの温度を 40 $\sim$ 20 $^{\circ}$ C まで変化させたとき (移動相: 89%メタノール) の標準溶液(20 μ g/mL)のクロマトグラムを示す。温度を下げる毎に全成分の保持時間が長くなり、 β -Toc または γ -Toc と TocAc が重複するように変化したためカラム温度は 40 $^{\circ}$ C を採用した。また、

移動相のメタノール濃度を 90%以上にすると α -Toc と TocAc が重複し、88%以下にすると γ -Toc と TocAc が重複したため移動相は 89%メタノールとした。

3.1.2 測定波長

Toc 及び TocAc は 285 nm に吸収極大をもつため紫外検出波長は 285 nm に設定した。また Toc は蛍光検出器での測定が可能のためあわせて蛍光検出器も使用した。蛍光スペクトル (励起波長 285 nm) を Fig.2 に示す。極大波長の 335 nm を測定波長に設定した。

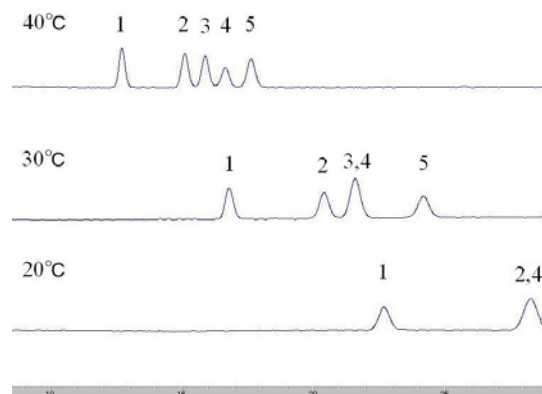


Fig.1 標準溶液(20 μ g/mL)のクロマトグラム

1. δ -Toc, 2. β -Toc, 3. γ -Toc, 4.TocAc, 5. α -Toc)

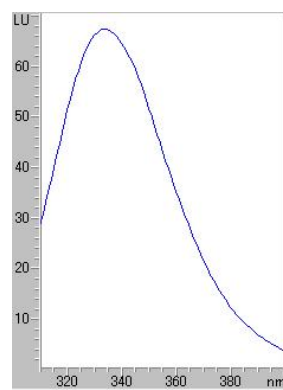


Fig.2 Toc の蛍光スペクトル (励起波長 285 nm)

3.1.3 定量下限と検量線の直線性

1 μ g/mL 及び 5 μ g/mL の Toc 及び TocAc 混合標準溶液を繰り返し測定(n=5)したときの保持時間およびピーク面積の相対標準偏差はそれぞれ 1%未満, 5%未満であった。また Toc は 1 $\sim$ 100 μ g/mL, TocAc は 5 $\sim$ 100 μ g/mL の濃度範囲でピーク面積と濃度との相関係数は 0.999 と良好な直線性を示した。S/N 比が 10 以上となる濃度は Toc で 1 μ g/mL, TocAc で 5 μ g/mL であったので定量下限はそれぞれ 1 μ g/mL, 5 μ g/mL とした。この定量下限は検体中の含量として 0.01 g/kg, 0.05 g/kg に相当する。

3.1.4 添加回収試験

食用油脂, 油菓子, 菓子にそれぞれ 0.20 g/kg となるように Toc 及び TocAc を添加し回収試験(n=3)を行った。結果を Table 1 に示す。食用油脂では良好に回収できた一

方、油菓子及び菓子では β -、 γ -および δ -Toc の回収率は良好であったが α -Toc では 180%前後、TocAc は全く回収できないことがわかった。これは、試料をケン化する際に TocAc の酢酸エステル部位が加水分解され α -Toc を生じたものと考えられる。油脂や液体食品のような試料からの直接抽出が可能である試料には今回用いた試験法は有効であるが、固体食品中 α -Toc 及び TocAc の同時分析には新たな抽出法の必要性が示唆された。

Table1 各種食品での添加回収試験結果 (n=3)

分類	回収率(%)				
	Toc				TocAc
	α	β	γ	δ	
油脂	103±2.5	100±1.7	108±3.5	109±0.4	96±7.2
油菓子	179±5.5	97±2.9	100±3.2	100±2.6	0
菓子	179±5.4	98±7.4	92±7.7	94±1.3	0

3.1.5 実態調査

Toc 及び TocAc の含有量実態調査を行った。結果を Table2 に示す。計 47 検体から Toc を 0.01~0.46 g/kg の範囲で検出し、TocAc は検出しなかった。

Table2 Toc 及び TocAc の含有量実態調査結果

分類	検体数	含量(g/kg)				
		Toc				TocAc
		α	β	γ	δ	
油脂	32	0.01~0.46	(-)~0.06	(-)~0.38	(-)~0.09	(-)
魚介類加工品	5	(-)~0.01	(-)	(-)	(-)	-
油菓子	4	(-)~0.08	(-)	(-)~0.03	(-)	-
菓子	5	0.03~0.05	(-)~0.01	(-)	(-)	-
即席めん	1	0.01	(-)	0.01	0.01	-

(-); <0.01

4 まとめ

逆相液体クロマトグラフィーによる Toc および TocAc の同時分析法を開発した。標準溶液の定量下限は Toc で 1 $\mu\text{g/mL}$ 、TocAc で 5 $\mu\text{g/mL}$ であり、検量線はそれぞれ 1 ~100 $\mu\text{g/mL}$ 、5~100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で相関係数が 0.999 であった。食用油脂での回収率は全て 100%前後と良好であった。ただし、ケン化を要する試料では TocAc の加水分解が起こるため β -、 γ -および δ -Toc は正常に定量できたが、 α -Toc および TocAc の定量は困難であった。全ての食品で TocAc を分析するために新たな抽出法の必要性が示唆された。

文献

- 1)食品衛生検査指針食品添加物編，社団法人日本食品衛生協会，2003.
- 2)辻澄子，他：逆相系高速液体クロマトグラフィーによる食品添加物“ミックストコフェロール”オイル製剤中のトコフェロール同族体の定量，国立医薬品食品衛生研究所報，116，113-116，1998.
- 3)新藤哲也，他：果汁飲料中の酢酸- α -トコフェロールおよびトコフェロール同族体の同時分析，東京都健康安全研究センター年報，57，199-203，2006.