ノ ー ト

超高速 LC を用いる複合型抗酸化サプリメント成分の迅速定量分析

平出 園絵¹, 星野 由依¹, 重田まりあ¹, 蔭山 大輔¹, 金澤 秀子¹, 永田 佳子^{®1}

1 緒 言

近年、高齢化の進展に伴い、国民の健康志向が高まり、健康食品は非常に身近な食品として定着してきている。2013年に厚生労働省は、今後更に増加が予想される医療費・介護費の抑制を目的に「国民の健康寿命の延伸」を掲げ、国としても健康食品事業をより活性化していく動きがある¹⁾。このようなことから、今後、健康食品やサプリメントの市場は拡大していくと予想される。健康食品やサプリメントは、製造・販売に法的な規制がほとんどないことから、誇大な表示・広告の製品も存在する²⁾。成分名や成分量が明確に表示されていない場合も多く、製造元や原料の産地・採取時期の違いにより成分が異なる可能性や、製造過程で有効成分以外の成分が混入している可能性も否定できない。このことから、機能性成分を含めたサプリメント中の各成分を正確に定量することが安全性を確認するために不可欠である。2013年より、消費者庁において安全性向上のための「食品の新たな機能性表示制度に関する検討」³⁾が始められ、また、食の有する健康増進機能の活用を目指した「科学的根拠をもとに健康食品の機能性を表示する方策」⁴⁾も進められている。

本研究では、疾患予防や、老化防止を目的とした機能性成分として利用が多い、抗酸化能を有するビタミンE (V.E)^{5)~8)}やポリフェノール^{9)~12)}を含有した「成分複合型サプリメント」を分析対象とし、サプリメント中に含有されるビタミンE同族体8種 (α , β , γ , δ -tocopherol, α , β , γ , δ -tocotrienol) 及び種々のポリフェノール類成分の迅速定量を試みた。水溶性のポリフェノールから脂溶性ビタミンまでの極性の大きく異なる多数成分を分離するためには、汎用型の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析では長時間を要する。そこで、多くの成分が混在する試料中成分の同定及び定量分析を行うために、高压送液ポンプや高感度検出器などの高性能システムを有する超高速液体クロマトグラフィー装置 (超高速 LC 装置) を用いて、粒径 2 μ m 以下の超微粒子充填セミマイクロカラムによる、複

数成分含有サプリメントの分析時間の大幅な短縮化を行った。さらに超高速 LC の検出器としてフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を用い、成分ごとに測定波長を選択することで、より高感度な定量を可能とした。また、これまで ODS カラムでは分離できなかった β -tocopherol と γ -tocopherol 及び β -tocotrienol と γ -tocotrienol を COSMOSIL 2.5 π NAP (3.0 mm I.D. $\times$ 75 mm) カラムを用い分離し、ビタミンE同族体8種の迅速定量を可能にした。

サプリメント成分の迅速分析は、成分表示に記載されていない成分も含めた正確な定量を短時間で可能とし、含有成分量に基づいた機能性評価やサプリメントのような複雑な混合成分の製品管理や安定性評価等への応用に有用である。

2 実 験

2.1 試 薬

本研究で用いた2種類のサプリメントの栄養成分表示を Table 1 に示した。

d- β -tocopherol (β -Toc), d- γ -tocopherol (γ -Toc), d- δ -tocopherol (90 %) (δ -Toc) はシグマアルドリッチジャパンより購入し、d- α -tocopherol (α -Toc), d- α -tocotrienol (α -T3), d- β -tocotrienol (β -T3), d- γ -tocotrienol (γ -T3), d- δ -tocotrienol (δ -T3) は、エーザイから提供された。(-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-catechin (C), (-)-catechingallate (CG), (-)-gallocatechin (GC), (-)-gallocatechingallate (GCG), naringenin はシグマアルドリッチジャパン, caffeine, quercetin, resveratrol, daizein (from soybean), genistein は和光純薬工業, delphinidin chloride, cyanidin chloride は常盤植物化学研究所, procyanidin B1, procyanidin B2 はアサヒビール, myricetin はエルケーティーラボラトリーズより購入した。主な成分の構造式、分子式、分子量を Fig. 1 に示した。ただし、ビタミンEは、 α , β , γ , δ -tocopherol, α , β , γ , δ -tocotrienol の8種同族体の総称である。

CH₃OH と CH₃CN は HPLC 用、C₂H₅OC₂H₅ は特級試薬を関東化学より購入した。超純水は逆浸透水を Milli-Q-System で処理したものをを用いた。

[®] E-mail: itoh-ys@pha.keio.ac.jp

¹ 慶應義塾大学薬学部薬学科: 105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30

Table 1 List of ingredients for supplements

Supplement A (1 capsule)		Supplement B (1 capsule)	
Calorific value	2.72 kcal	Total of tocopherols	150 mg
Protein	0.14 g	α -Tocopherol	75 mg
Lipid	0.22 g	γ -Tocopherol	75 mg
Carbohydrate	0.6 g	Total of tocotrienols	1.5 mg
Sodium	0.26 g		
Vitamin E	33.3 mg		
EPA	37.5 mg		
DHA	18.75 mg		
Tocotrienol	0.63 mg		
Extracts			
Black soybean testa	10 mg		
Grape seed	5 mg		
Cacao	5 mg		
Bilberry fruit	5 mg		
Green tea	5 mg		
Tomato of colorant	5 mg		
Standard of daily intake			
4 capsules		2 capsules	

2・2 使用機器・カラム

汎用 HPLC システムの構成は、ポンプ (HITACHI L-7100)、検出器 (HITACHI L-7405, D-7455 Diode Array Detector)、カラムオープン (SIMADZU CTO-10ASVP)、カラム [HITACHI LaChrom C18 (5 μ m) 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm] を用い、超高速 LC システムの構成はポンプ (HITACHI L-2160U)、検出器 (HITACHI L-2455U)、カラムオープン (HITACHI L-2300)、オートサンプラー (HITACHI L-2200U)、データ処理 (HITACHI D-2000 Elite)、カラム I [HITACHI LaChrom C18 (2 μ m) 2 mm I.D. $\times$ 75 mm]、カラム II (Nacalai tesque COSMOSIL 2.5 π NAP 3.0 mm I.D. $\times$ 75 mm) を用いた。

2・3 分析条件

汎用 HPLC 分析においてカラムは HITACHI LaChrom C18 (5 μ m) 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm、移動相は a) CH₃COOH (10 $\rightarrow$ 100)/CH₃OH/CH₃CN = 95/3/2、b) CH₃OH/CH₃CN = 3/2、グラジエント条件 : a/b = 0 min; 100/0 $\rightarrow$ 15 min; 50/50 $\rightarrow$ 25 min; 0/100 $\rightarrow$ 40 min; 0/100、流量 1.0 mL min⁻¹、カラム温度 40 $^{\circ}$ C、測定波長 280 nm、注入量 10 μ L とした。

超高速 LC 分析において、カラム : HITACHI LaChrom C18 (2 μ m) 2 mm I.D. $\times$ 75 mm を用いた場合、移動相は a) CH₃COOH (10 $\rightarrow$ 100)/CH₃OH/CH₃CN = 95/3/2、b) CH₃OH/CH₃CN = 3/2、グラジエント条件 : a/b = 0 min; 100/0 $\rightarrow$ 5 min; 60/40 $\rightarrow$ 6 min; 0/100 $\rightarrow$ 10 min; 0/100、流量 0.4 mL min⁻¹、カラム温度 40 $^{\circ}$ C、測定波長 290 nm、注入量 2 μ L とした。カラム : COSMOSIL 2.5 π NAP 3.0 mm I.D. $\times$ 75 mm を用いた場合、移動相は H₂O/CH₃OH/CH₃CN = 22/48/30、流量 1.2 mL min⁻¹、カラム

温度 40 $^{\circ}$ C、波長 290 nm、注入量 2 μ L とした。

2・4 試料溶液の調製

2・4・1 サプリメント試料の調製 サプリメント A と B (軟カプセル) を分割し、それぞれ内容物を取り出し秤量の後、1 mg mL⁻¹ 溶液となるように CH₃OH/CH₃CN = 3/2 の溶媒を加え、5 分間超音波洗浄機にかけて溶解し、試料溶液とした。その後 HPLC による定量分析の結果より含有する α -Toc 濃度が 1 mM となるよう CH₃OH/CH₃CN = 3/2 で希釈し、1 mM α -Toc 含有サプリメント試料を調製した。

2・4・2 標準溶液の調製 各 α , β , γ , δ -Toc を CH₃OH/CH₃CN = 3/2 の溶媒で溶解し、1 mM 標準試料を調製した。カテキン類 (EC, ECG, EGC, EGCG, CG, GC, GCG) は CH₃OH で溶解し、1 mM に調製し標準試料とした。また、ほかのポリフェノール (daizein, resveratrol, caffeine, quercetin, genistein, delphinidin chloride, cyanidin chloride, procyanidin B1, procyanidin B2, myricetin) 標準溶液も同様に調製した。カテキン (EC, ECG, EGCG), Toc, T3 混合溶液は、各 1 mM EC, ECG, EGCG/CH₃OH 溶液、各 1 mM α -Toc, β -Toc, γ -Toc, δ -Toc/(CH₃OH/CH₃CN = 3/2) 溶液、各 1 mM α -T3, 1 mM γ -T3, 1 mM δ -Toc/(CH₃OH/CH₃CN = 3/2) 溶液をそれぞれ 100 μ L ずつ 1 mL 褐色瓶に混合し、混合試料溶液とした。

2・4・3 検量線作成用溶液の調製 ① 検量線用混合溶液 I (caffeine, EC, α , γ , δ -Toc 混合): 0.2 mM caffeine, 1.0 mM α -Toc, 0.2 mM 各 EC, γ , δ -Toc となるよう (CH₃OH/CH₃CN = 3/2) に溶解した混合溶液を、検量線用混合溶液 I とした。この溶液を段階希釈した溶液を用い、検量線を求めた。

d-Tocopherol(Toc)

		R ₁	R ₂	Chemical formula	M.W.
1	α -Toc	CH ₃	CH ₃	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430.71
2	β -Toc	CH ₃	H	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	416.69
3	γ -Toc	H	CH ₃	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	416.69
4	δ -Toc	H	H	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	402.66

d-Tocotrienol(T3)

		R ₁	R ₂	Chemical formula	M.W.
5	α -T3	CH ₃	CH ₃	C ₂₉ H ₄₄ O ₂	424.67
6	β -T3	CH ₃	H	C ₂₈ H ₄₂ O ₂	410.64
7	γ -T3	H	CH ₃	C ₂₈ H ₄₂ O ₂	410.64
8	δ -T3	H	H	C ₂₇ H ₄₀ O ₂	396.61

a: (-)-Epicatechingallate (ECG)

C₂₂H₁₈O₁₀: 442.4

b: (-)-Epicatechin (EC)

C₁₅H₁₄O₆: 290.27

c: (-)-Epigallocatechingallate(EGCG)

C₂₂H₁₈O₁₁: 458.4 d: Caffeine C₈H₁₀N₄O₂: 194.19 **Fig. 1** Structures of tocopherol isoforms and catechins, caffeine

② 検量線用混合溶液 II (EGCG, ECG 混合): EGCG, ECG の各 1 mM の (CH₃OH/CH₃CN = 3/2) 溶液を調製し, 検量線用混合溶液 II とした. この溶液を段階希釈した溶液を用い, 検量線を求めた.

③ 検量線用混合溶液 III (α -T3, γ -T3, δ -T3 混合): α -T3, γ -T3, δ -T3 は各 0.1 mM の (CH₃OH/CH₃CN = 3/2) 溶液を調製し, 検量線用混合溶液 III とした. この溶液を段階希釈した溶液を用い, 検量線を求めた.

④ α -Toc, β -Toc, γ -Toc, δ -Toc, α -T3, β -T3, γ -T3, δ -T3, EC, ECG, EGCG, caffeine の各標準溶液を CH₃OH/CH₃CN = 3/2 溶液で希釈して, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.125 mM, 0.063 mM の各溶液を作成し, 検量線用溶液とした.

前出のすべての調製溶液は 0.2 μ m メンブランフィルターで濾過して用いた.

3 結 果

3・1 サプリメント中含有成分の分析

3・1・1 汎用 HPLC を用いたサプリメント中含有成分の同定 ビタミン E と複数のポリフェノール含有抽出物の混合物であるサプリメント A に含まれる成分の同定を行った. Table 1 に示した成分表示より, ビタミン E は 8 種同族体について, 黒大豆種皮抽出物, ブドウ種子エキス, カカオ抽出物, ビルベリー果実抽出物, 緑茶抽出物, トマト色素等に多く含まれるポリフェノール成分は, 各原料の主要なポリフェノール成分¹³⁾(カテキン類 (EC, ECG, EGC, EGCG, CG, GC, GCG), daizein, resveratrol, caffeine, quercetin, genistein, delphinidin chloride, cyanidin chloride, procyanidin B1, procyanidin B2, myricetin) の各標準溶液について, 2・3 分析条件の汎用 HPLC 分析 [カラム: HITACHI LaChrom C18 (5 μ m) 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm] に従い, サプリメント A 中に含有される成分の保持時間と吸収スペクトルとの比較から同定を行った. ピーク分離が不十分な部分については, グラジエントのタイムプログラムの傾きを小さくし, 調整して確認を行った. 分析結果より, サプリメント A には, α -Toc, β -Toc or γ -Toc, α -T3, β -T3 or γ -T3 と EC, ECG, EGCG が含まれていることを確認した. Fig. 2 にサプリメント A とカテキン (EC, ECG, EGC, EGCG), Toc, T3 混合溶液 I のクロマトグラムを示した.

3・1・2 超高速 LC を用いたサプリメント中含有成分の分析 3・1・1 で分析したサプリメント A の試料溶液を 2・3 の超高速 LC 分析条件, HITACHI LaChrom C18 (2 μ m) 2 mm I.D. $\times$ 75 mm を用いて分析したクロマトグラムを Fig. 3 に示した. 同種の充填剤の粒子径が 5 から 2 μ m に, カラム径 4.6 mm I.D. から 2 mm I.D. に, カラム長さ 150 mm から 75 mm に変わり, 耐圧性に優れた超高速 LC 装置を用いて分析した. 汎用 HPLC では 1 回の分析に 40 分を要した分析時間が 10 分以内に短縮され, さらに良好な分離が得られた.

3・1・3 超高速 LC を用いたビタミン E 同族体 8 種の分離分析 3・1・2 で用いた LaChrom C18 (2 μ m) 2 mm I.D. $\times$ 75 mm で分離できなかった β -Toc と γ -Toc, β -T3 と γ -T3 の分離定量を行うために, ナフチル基をシリカゲルに化学結合した逆相クロマトグラフィーカラム COSMOSIL 2.5 μ NAP 3.0 mm I.D. $\times$ 75 mm を用い, 移動相は H₂O/CH₃OH/CH₃CN = 22/48/30, 流量 1.2 mL min⁻¹, カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 波長 290 nm で, ビタミン E 同族体 8 種を分析したクロマトグラムを Fig. 3 に示した. クロマトグラムの I はビタミン E 同族体 8 種 (各 0.125 mM α -, β -, γ -, δ -Toc, α -, β -, γ -, δ -T3 の混合溶液), II はサプリメント B, III はサ

Fig. 2 Chromatograms of supplement A and the standard solution with HPLC

Column, HITACHI LaChrom C18, 5 μm (4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm); eluent, a) CH_3COOH (10 $\rightarrow$ 100)/ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 95/3/2, b) $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 3/2; gradient, a/b = 0 min 100/0 $\rightarrow$ 15 min 50/50 $\rightarrow$ 25 min 0/100 $\rightarrow$ 40 min 0/100; flow rate, 1.0 mL min^{-1} ; column temp., 40 $^{\circ}\text{C}$; detection, UV 280 nm; pressure, 9.1 MPa; inj. vol., 10 μL , Sample, I: 5 mg mL^{-1} supplement A ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 3/2) solution, II: standard mixed solution 1. (0.09 each of ECG, EC, EGCG, caffeine, α -, β -, γ -, δ -Toc, α -, γ -, δ -T3). System peaks appear of 26–29 min. Peaks a, ECG; b, EC; c, EGCG; d, caffeine; 1, α -Toc; 2, β -Toc; 3, γ -Toc; 4, δ -Toc; 5, α -T3; 6, β -T3; 7, γ -T3; 8, δ -T3.

Fig. 3 Chromatograms of supplement A and the standard solution with ultra high-speed LC

Column, HITACHI LaChrom Ultra C18, 2 μm (2.0 mm I.D. $\times$ 50 mm); eluent, a) CH_3COOH (10 $\rightarrow$ 100)/ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 95/3/2, b) $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 3/2; gradient, a/b = 0 min 100/0 $\rightarrow$ 5 min 60/40 $\rightarrow$ 6 min 0/100 $\rightarrow$ 10 min 0/100; flow rate, 0.4 mL min^{-1} ; column temp., 40 $^{\circ}\text{C}$; detection, UV 290 nm; pressure, 28.9 MPa; inj. vol., 2 μL , Sample, I: supplement A ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 3/2) solution (α -Toc amount was adjusted to 5 mM), STD a: standard mixed solution (α -Toc, ECG, EGCG), STD b: standard mixed solution (0.077 mM each of α -, β -, γ -, δ -Toc, α -, β -, γ -, δ -T3, EC, ECG, EGCG, GCG, CG, Caffeine). A system peak appear 6–7 min. Peaks a, ECG; b, EC; c, EGCG; d, caffeine; e, GCG; f, CG. Peak numbers 1–8 are the same as Fig. 2.

Table 2 (1) Calibration formulas of Toc, T3, catechins with HPLC

Caffeine	$y = 5701676 x - 35717$	$R^2 = 0.986$
EC	$y = 1921370 x - 5789$	$R^2 = 0.985$
EGCG	$y = 7195049 x - 260368$	$R^2 = 0.998$
ECG	$y = 7238641 x - 48761$	$R^2 = 0.997$
α -Toc	$y = 1082665 x - 22853$	$R^2 = 0.988$
γ -Toc	$y = 778611 x - 2531$	$R^2 = 0.988$
δ -Toc	$y = 657267 x - 2074$	$R^2 = 0.988$
α -T3	$y = 1066295 x - 732$	$R^2 = 0.993$
γ -T3	$y = 849825 x - 555$	$R^2 = 0.993$

(2) Calibration formulas of Toc, T3, catechins with ultra high-speed LC

EC	$y = 30831 x - 410$	$R^2 = 0.997$	268 nm
EGCG	$y = 73534 x - 974$	$R^2 = 0.999$	268 nm
ECG	$y = 103930 x - 56$	$R^2 = 0.999$	268 nm
α -Toc	$y = 22309 x - 18$	$R^2 = 0.999$	290 nm
γ -Toc	$y = 30348 x - 111$	$R^2 = 0.999$	290 nm
δ -Toc	$y = 2460 x - 163$	$R^2 = 0.999$	290 nm
α -T3	$y = 28078 x - 302$	$R^2 = 0.999$	290 nm
δ -T3	$y = 31756 x - 96.641$	$R^2 = 0.999$	290 nm

(3) Calibration formulas of vitamin E isoforms with ultra-high speed LC using 2.5 π NAP 3.0 mm I.D. $\times$ 75 mm column

α -Toc	$y = 12383 x - 187.62$	$R^2 = 1.000$	290 nm
β -Toc	$y = 16036 x - 190.78$	$R^2 = 0.999$	290 nm
γ -Toc	$y = 14835 x - 32.421$	$R^2 = 0.999$	290 nm
δ -Toc	$y = 13069 x - 187.51$	$R^2 = 0.999$	290 nm
α -T3	$y = 12639 x - 356.18$	$R^2 = 0.999$	290 nm
β -T3	$y = 15875 x - 397.48$	$R^2 = 0.998$	290 nm
γ -T3	$y = 18087 x - 269.82$	$R^2 = 0.999$	290 nm
δ -T3	$y = 14921 x - 190.68$	$R^2 = 0.999$	290 nm

プリメント A を α -Toc 濃度が 1 mM となるように調製した溶液のクロマトグラムである。サプリメント A には、 β -T3 以外の 7 種のビタミン E 同族体が含まれていること、サプリメント B には α -, β -, γ -, δ -Toc が確認された。

3.2 サプリメント中含有成分の定量

3.2.1 汎用 HPLC と超高速 LC における検量線の作成

α -Toc は 1 mM から 0.1 mM, γ -Toc, δ -Toc, caffeine は 0.2 mM から 0.02 mM, α -T3, β -T3, γ -T3, δ -T3 は 0.1 mM から 0.01 mM, EC, ECG, EGCG は 0.5 mM から 0.05 mM, の範囲での検量線式を求めた。Table 2 (1) に汎用 HPLC による検量線式を示した。

超高速 LC においては α -Toc, β -Toc, γ -Toc, δ -Toc, α -T3, β -T3, γ -T3, δ -T3, EC, ECG, EGCG の各標準溶液を用い、1 mM から 0.063 mM の範囲で検量線式を求めた。極大吸収波長を考慮し、カテキン類は 260 nm, ビタミン E は 290 nm を検出波長とした。Table 2 (2) に超高速 LC による検量線式を示し、Table 2 (3) に COSMOSIL 2.5 π NAP 3.0 mm I.D. $\times$ 75 mm を用いたビタミン E 同族体 8 種の検量線式を示した。

Table 3 Analysis of multicomponent supplements

Indicated amount/mg			Actual value/mg	
	Supplement A	Supplement B	Supplement A	Supplement B
Catechin	3.75	—	Total catechin	2.52
			EGCG	1.22
			EC	0.82
			ECG	0.48
Total Toc	25	150	Total Toc	29.92
α -Toc		75	α -Toc	29.07
γ -Toc		50	β -Toc	0.39
			γ -Toc	0.46
			δ -Toc	< QL
Total T3	2.5	1.5	Total T3	2.11
			α -T3	0.91
			γ -T3	0.91
			δ -T3	0.29

QL: quantitation limit, ND: no detection.

3・2・2 汎用 HPLC と超高速 LC におけるサプリメント中含有成分の定量 サプリメント A とサプリメント B 中に含まれる主な成分の定量を行った。Table 3 にサプリメントの表示量と定量結果を示した。表示には総量として記載されているカテキン類やビタミン E 同族体の詳細な成分混合比が明らかになった。また、サプリメント B では、表示成分に記載されていない δ -Toc が Toc 全量中約 1/6 の割合で含有されていることを確認した。

4 考 察

分析対象とした成分複合型サプリメントのように極性の大きく異なる水溶性ポリフェノールから脂溶性ビタミン等の多くの成分の定量分析には、長時間を要する。本実験では、汎用 HPLC のグラジエント溶出法によりポリフェノールとビタミン E 同族体の一斉分析に 40 分を要した。超高速 LC を用いることにより、汎用 HPLC とほぼ同じ溶離液の条件で分析時間を 4 分の 1 に短縮する事を可能とし、また、PDA 検出器に接続することで、各成分の有する紫外可視吸収スペクトルの極大波長での高感度な分析が達成できた。Fig. 3 に示したクロマトグラムの peak 1~8, a~f (b, c 除く) の各 peak の分離度は、2.5~6 を示し、汎用 HPLC と同様の精度で定量が可能となった。さらに、ODS カラムでは分離できない β -Toc と γ -Toc、及び β -T3 と γ -T3 の分離を目的に、 π - π 相互作用による分離モードへの影響が大きい COSMOSIL 2.5 π NAP 3.0 mm I.D. $\times$ 75 mm カラムを用い、ビタミン E 同族体 8 成分の分離定量が可能となった。Fig. 4 に示したクロマトグラムの各 peak の分離度については、 β -Toc と γ -Toc (peak 2 と peak 3) は 1.19、 β -T3 と γ -T3 (peak 6 と peak 7) は 0.67、これら以外は、1.6~4.7 の良好な分離が得られ、サプリメント中のビタミン E 同族

Fig. 4 Chromatograms of supplement A, supplement B and the vitamin E 8 isoforms solution with ultra high-speed LC

Column, COSMOSIL 2.5 π NAP (3.0 mm I.D. $\times$ 75 mm); eluent, H₂O/CH₃OH/CH₃CN = 22/48/30; flow rate, 1.2 mL min⁻¹; column temp., 40 °C; detection, UV 290 nm; pressure, 23.0 MPa; inj. vol., 2 μ L, peaks 1, α -Toc; 2, β -Toc; 3, γ -Toc; 4, δ -Toc; 5, α -T3; 6, β -T3; 7, γ -T3; 8, δ -T3; sample, I: supplement A (α -Toc amount was adjusted to 1 mM.), II: supplement B (α -Toc amount was adjusted to 1 mM.), III: 0.125 mM each vitamin E 8 isoforms mixed solution (α -, β -, γ -, δ -Toc, α -, β -, γ -, δ -T3).

体の混合比や量の正確な測定を可能とした。このことより、成分表示にない成分の同定や定量も可能となり、超高速 LC を用いた迅速定量分析は、複雑な成分混合物であるサプリメント等の成分定量に、有用な方法であることが明らかになった。

5 結 言

超高速 LC による複合型サプリメントのような複雑な混合物の迅速定量分析法を検討した。ODS カラムでは分離できなかった β -Toc と γ -Toc 及び β -T3 と γ -T3 を分離し、ビタミン E 同族体 8 種の迅速定量を可能にした。迅速分析を行うことにより、安全性を確保するための品質管理や安定性試験、分析メソッド開発の迅速化等から生産性の向上が期待できる。サプリメントの成分表示に示されていない詳細な含有成分量を定量することより、含有成分量に基づいた機能性評価にも応用できる。本研究で用いた超高速 LC は PDA 検出器を備えているため、異なるスペクトルを有する複雑な混合系の成分定量や成分変化の過程の追跡¹⁴⁾などへの利用に適した分析法と考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省：国民の健康寿命が延伸する社会に向けた予防・健康管理に関する取組の推進，平成 25 年 8 月 30 日報道発表資料，<<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000019326.html>>.
- 2) 厚生労働省医薬食品局：医薬品と健康食品の相互作用に対する注意喚起等について，<http://www.japal.org/contents/pdf/notice/20130228_0228-2.pdf>，平成 25 年 2 月 28 日.

- 3) 消費者庁：<http://www.caa.go.jp/foods/pdf/kinouseihyozi_kentoukai_youryou_1.pdf>.
- 4) 消費者庁：<http://www.kantei.go.jp/jp/singi/keizaisaisei/pdf/saikou_jpn.pdf>，(2013.06.14).
- 5) E. Niki, M. G. Traber : *Ann. Nutr. Metab.*, **61**, 207 (2012).
- 6) M. W. Clarke, J. R. Burnett, K. D. Croft : *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **45**, 417 (2008).
- 7) Y. Nagata, T. Fujioka, H. Kanazawa : *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43 Suppl. 1**, 436 (2008).
- 8) Y. Yoshida, E. Niki, N. Noguchi : *Chem. Phys. Lipids.*, **123**, 63 (2003).
- 9) L-Z. Lin, J. M. Harnly : *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1084 (2007).
- 10) R. Re, P. M. Bramaly, C. Rice-Evans : *Free Radical Research*, **36**, 803 (2002).
- 11) I. Takashi, H. Yoshihiko, M. Seiichi, K. Tetsuya : *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 628 (2004).
- 12) I. Murakami, T. Nakamura, Y. Ishibashi, S. Shibuya, E. Ayano, Y. Morita-Murase, Y. Nagata, H. Kanazawa : *Chromatography*, **27**, 19 (2006).
- 13) 国立行政法人国民生活センター：ポリフェノール含有食品の商品テスト結果，(2000).
- 14) Y. Nagata, T. Nishio, H. Kanazawa : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **55**, 241 (2011).

Rapid Quantitative Analysis of Multi-component Supplements for Antioxidation Using Ultra High-speed LC

Sonoe HIRAIDE¹, Yui HOSHINO¹, Maria SHIGETA¹, Daisuke KAGEYAMA¹,
Hideko KANAZAWA¹ and Yoshiko NAGATA^{®1}

[®] E-mail : itoh-ys@pha.keio.ac.jp

¹ Faculty of Pharmacy, Keio University, 1-5-30, Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512

(Received March 19, 2014; Accepted April 23, 2014)

Due to the aging of Japanese societies, people have become aware of the importance of self-managing of their health, and thus health food has been very popular in recent years. In 2013, the Ministry of Health, Labor and Welfare announced that the elongation of a health of life expectancy is of importance in order to suppress the increment of healthcare spending. Under these circumstances, the market for health foods and supplements is expected to expand. Since there are no strict regulations of the manufacturing and marketing for health foods and supplements, it is said that some products claims positive effects even in the absence of any conclusive evidence. In addition, the amounts of effective components in health foods and supplements are not shown for many products. Under these conditions, determinations of the amounts of the effective components in health foods and supplements is crucial for safety when using these products. In 2013, Consumer Affairs Agency began investigating a new certification mark system concerning the functionality of foods, and has also been going forward in the development of display methods for them. In recent years, vitamin E and polyphenol related products founded in supplements or health foods have been consumed in daily life. Although these products may make consumers think that they are more effective than those foods that contain only one effective component, there is no evidence as to whether several components interact with each other to affect their activity. Therefore, it is of great importance to precisely measure the amounts of the effective components in foods. In this research, we chose multi-component supplements that included vitamin E derivatives and polyphenols, and investigated a rapid analysis method for these active components. Vitamin Es and polyphenols have widely different polarities, and thus rapid measurements of these compounds at the same time is difficult to active by using conventional methods. Thus, we applied an ultra high-speed LC system equipped with a photo-diode array detector to determine the quantities of vitamin E and polyphenols at once, even if they have very different retention times. As a result, eight vitamin E derivatives were found to be able to be analyzed in a short time. In addition, the results of the present work suggested that health foods and supplements are analyzable by our method to provide information about containing effective compounds.

Keywords: ultra high-speed LC; supplement; polyphenol; vitamin E.