ノ ー ト

高速液体クロマトグラフィーによるトコフェ ロールの定量に関する一考察

兼松 弘^{*1}・牛草寿昭^{*1}・丸山武紀^{*1}・新谷 勲^{*1}・麓 大三^{*2}
豊田 健^{*2}・川口良成^{*2}・森井健三^{*3}・渡辺 寿^{*4}・土肥由長^{*5}
町田芳章^{*6}・石川雅夫^{*7}・松本太郎^{*8}

^{*1} 財団法人日本食品油脂検査協会（東京都中央区日本橋浜町 3-27-8）

^{*2} 財団法人日本油脂検査協会（東京都中野区本町 4-19-13）

^{*3} 日清製油株式会社（東京都中央区新川 1-23-1）

^{*4} 日清製油株式会社研究所（横浜市神奈川区千若町 1-3）

^{*5} 味の素株式会社（東京都中央町京橋 1-5-8）

^{*6} 昭和産業株式会社総合研究所（船橋市日の出 2-20-2）

^{*7} 豊年製油株式会社（清水市新港町 2）

^{*8} 日本大学理工学部（東京都千代田区神田駿河台 1-8）

Consideration for the High Performance Liquid Chromatographic Measurement of Tocopherols

Hiromu KANEMATSU^{*1}, Toshiaki USHIGUSA^{*1}, Takenori MARUYAMA^{*1},
Isao NIHA^{*1}, Daizo FUMOTO^{*2}, Takeshi TOYODA^{*2}, Yoshinari KAWAGUCHI^{*2},
Kenso MORII^{*3}, Hisashi WATANABE^{*4}, Yoshinaga DOI^{*5}, Yoshiaki MACHIDA^{*6},
Masao ISHIKAWA^{*7} and Taro MATSUMOTO^{*8}.

^{*1} Japan Institute of Oils & Fats, Other Foods Inspection, Foundation
(3-27-8, Nihonbashi-Hamacho, Chuo-ku, Tokyo)

^{*2} Japan Association of Fats & Oils Inspection Institute (4-19-13, Hon-
cho, Nakano-ku, Tokyo)

^{*3} Nisshin Oil Mills Ltd. (1-23-1, Shinkawa, Chuo-ku, Tokyo)

^{*4} Research Laboratory, Nissin Oil Mills Ltd. (1-3, Chiwakacho, Kana-
gawa-ku, Yokohama)

^{*5} Ajinomoto Co., Inc. (1-6, Kyobashi, Chuo-ku, Tokyo)

^{*6} Central Research Laboratory, Showa Sangyo Co., Ltd. (2-20-2, Hi-
node, Funabashi)

^{*7} Honen Oil Co., Ltd. (2, Shinminato-machi, Shimizu)

^{*8} College of Science and Technology, Nihon University (1-8, Kanda-
Surugadai Chiyoda-ku Tokyo)

In measuring separately contents of tocopherols in oil by high performance liquid chromatography (HPLC), measurement conditions such as packing agent and mobile phase were investigated. Then, a collaborative study was conducted with 6 laboratories, using distributed standard solution of tocopherols and specified packing agent and mobile phase. Results obtained were as follows:

1) It was found that fatty components were eluted together with α -tocopherol fraction by using some of mobile phase which could separate tocopherols one another, consequently lowering measurement values.

2) The response of fluorescent detector for each tocopherol was found to change with time when this detector was continuously used for long time.

3) There was no difference in the precision of separation and detection of tocopherols when different brands of silica gel packing agent were used.

4) In measuring oils by HPLC without pretreatment, a measurement error was up to $\pm 3\%$ for individual tocopherol content of 10 mg/100 g or more, but over $\pm 10\%$ for smaller amounts.

5) In the collaborative study using the same standard solution, and specifying silica gel as packing agent and hexan-dioxan-isopropanol (98.7:1.0:0.3) as mobile phase, a dispersion of measurements within laboratory was $\pm 3\%$, and that between laboratories was $\pm 10\%$ or less.

1 結 言

トコフェロール同族体 (以下 Toc 同族体) の分別定量に高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) が多く用いられるようになってきた。この方法は Niekerk¹⁾ が報告して以来、その有用性が多くの研究者によって実証され²⁾ 近年公定法³⁾ に採用された。

HPLC による Toc 同族体分別定量の利点は、操作が簡単で迅速であり、さらに同族体の蛍光特性を利用すると妨害物の影響が少なく、微量をも検出し得ることである。

しかし、同一試料でも異なる機関で測定するとその定量値が大きく相異なる場合がしばしばみられる。この原因は、Toc 同族体の標準品が入手し難く、さらにその純度の判定が困難なため正確な純度が求められないことによるのであろう。

本研究では、分析機関間におけるばらつき幅を極力小さくすることを目的として、HPLC の充てん剤をシリカゲルに限定し、同一標準品を用いて合同実験を繰り返して行った結果いくつかの知見を得たので報告する。

2 実 験

2.1 試料

$d-\alpha$ -及び $d-r$ -Toc 標準品は Eastman Kodack 社製を、また $d-\beta$ -及び $d-\delta$ -Toc は実験室で小麦はい芽油及び大豆油の脱臭留出物から抽出し、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー⁴⁾ 及び HPLC によって分別精製したものを用いた。これらはいずれも TLC により単一スポットを、また GLC でも単一ピークを示すことを確認した。これらはそれぞれヘキサンで 0.2, 0.1 及び 0.05 mg/ml に調製し標準溶液とした。

試料油は市販の精製大豆油、サフラワー油、なたね油及びつばき油を用いた。

2.2 装置

合同実験で各機関が使用した HPLC 装置及び蛍光検出器の機種はつぎのとおりである。

機関 A	装 置: 日立製 633 型 検出器: 日立製 204-S 型
機関 B	装 置: 日本分光製 TWINCLE 型 検出器: 日本分光製 SP-110 型
機関 C	装 置: 日立製 638-50 型 検出器: 日立製 610-10S 型
機関 D	装 置: 島津製 LC-3A 型 検出器: 島津製 RF-510 LC 型
機関 E	装 置: 日立製 638 型 検出器: 日立製 204-A 型 (フローセル取り付け)

機関 F 装 置: 日本ウォーターズ製 ALC/GPC 204 型
検出器: 日本ウォーターズ製 440 型

ただし機関 F の検出器は紫外外部吸収検出器 (280 nm) である。

なお分析条件などの検討は機関 A の装置、機種を用いて行った。

2.3 実験方法

試料油約 5 g をメスフラスコにとり、ヘキサンを加えて 25 ml とし HPLC 用検液とした。充てん剤は HPLC 用シリカゲルを用い、標準溶液及び検液はルーブ付き注入口に 20 μ l 注入し蛍光検出器 (Ex 298 nm, Em 325 nm) で測定した。

3 実験結果及び考察

3.1 移動相

HPLC によるトコフェロール同族体の分別定量は、固定相にシリカゲルを用いた場合、移動相にはヘキサンに少量の極性溶媒を加えた混合溶媒が広く用いられている⁵⁾。そこで、ヘキサンを基調とする適切な移動相について検索した。その結果、ヘキサン-ジオキサン-イソプロピルアルコール (98.7:1.0:0.3, 移動相 a)、ヘキサン-ジオキサン-エチルアルコール (95.8:4.0:0.2, 移動相 b) 及びヘキサン-エチルエーテル (92.9:7.1, 移動相 c) が各同族体の分離に適していた。

Fig.-1 は α -Toc を基準にして移動相 a, b, c による Toc 同族体の分離度合い、ピーク面積比及びピーク高さ比を模式化したものである。Toc 同族体の溶出はどの移動相でも α -, β -, r -, δ -の順であった。相対感度はピーク面積比で求めると、保持時間が遅くなるに従って大きくなり、移動相の違いによる相異はみられない。一方、ピーク高さ比は移動相 a の場合保持時間が遅くなるにつれて小さくなるが、移動相 b, c では保持時間の遅い β -及び r -の方が α -より大きかった。このように移動相の組成がわずかに変化すると、各トコフェロールの相対感度は変化する。しかし各移動相ともピーク面積及びピーク高さから求めた検量線は原点を通る直線を示した。

移動相 a, b, c はいずれも定量分析に用いることが可能と判断したので、つばき油に Toc 同族体の一定量を添加し回収率を比較した。移動相 a, b, c を用いた HPLC パターンを Toc 同族体は蛍光検出器、つばき油は示差屈折計検出器で記録したクロマトグラムを Fig.-2 に示す。移動相 a 及び b ではつばき油のトリグリセリドの溶出後、 α -Toc の溶出が始まり移動相 c ではトリグリセリドと α -Toc とが重複しながら溶出することが見いだされた。Table-1 は各移動相による回収率であ

る。移動相 **a** 及び **b** の回収率はほぼ一致するが、移動相 **c** では α -Toc のみ著しく低い回収率であった。Toc 同族体の蛍光は溶媒の種類により励起、蛍光波長及び蛍光強度に差を生ずることが報告^{5),6)} されている。従って移動相 **c** ではつばき油中の α -Toc が蛍光検出器を通過する際の溶媒にはトリグリゼリドが含まれているため、検量線作製時の場合とは組成が異なっている。これが低い回収率を示した原因であろう。また移動相 **b** では β -と γ -の溶出が近接するためこの間に溶出する β -トコトリエノールがどちらかのピークと重複すると考えられる

Fig-1 Relative and response (α -tocopherol as 1.0) of tocopherols by HPLC with different mobile phase.

a, b and c showed same mobile phases as Fig-1
 Fig-2 HPLC profiles of tocopherols and camellia oil components with different mobile phase.

Table-1 Recoveries of tocopherols by HPLC with different mobile phase.

Mobile phase		α	β	γ	δ
a	H	98.8	97.4	98.1	98.2
	A	98.8	97.4	98.1	98.2
b	H	98.2	97.4	97.6	98.8
	A	98.2	97.4	97.6	98.8
c	H	81.0	100.0	101.4	102.9
	A	85.1	100.0	101.4	102.9

Sample: Camellia oil (T. Toc 0.04 mg/100 g)

Added: α 33.6 mg/100 g γ 41.4 mg/100 g

β 15.6 mg/100 g δ 34.0 mg/100 g

H: Calculated by peak height

A: Calculated by peak area

ことから、以後の実験には主として移動相 **a** を用いることとした。

3.2 シリカゲル充てん剤について

Table-2 は市販の HPLC 用シリカゲル 2 銘柄をそれぞれ 4 mm×250 mm のカラム管に充てんし、移動相 **a** で大豆油及びサフラワー油を分析した結果である。Toc 同族体の定量値はピーク高さ法及びピーク面積法のいずれで測定しても銘柄間による差異は認められなかった。

Table-2 Comparison of determination of tocopherols with various silicagel packings (mg/100 g)

Brand	Soybean oil				Safflower oil			
	α		γ		α		γ	
	H	A	H	A	H	A	H	A
Fine SIL 5	5.6	6.4	57.9	57.9	30.2	30.2	3.0	2.9
Wakogel LC-5 K	5.9	6.0	54.8	55.8	30.0	30.3	3.0	3.0

3.3 検量線について

Toc 同族体の HPLC による分別定量には内部標準物質にトコールを用いる方法が報告⁷⁾ されている。しかし、この物質は入手し難いので通常絶対検量線法で行われている。多数試料を連続して測定する場合、時間経過とともに蛍光検出器感度の変動が予想され、絶対検量線法ではそれによって誤差を生ずる虞がある。そこで Toc 同族体標準溶液の 20 μ l をループ付き注入口に一定時間経過ごとに注入し、測定開始直後のピーク高さを基準にして経時変化を測定した。Fig-3 はその結果である。測定時間の経過に伴う変動は、各同族体とも類似した傾向を示すが最大変動幅は保持時間の遅いものほど大きくなる傾向を示し、 δ -Toc で 8% であった。この誤差を少なくするには、一定時間経過ごとに検量線を再測定するか、または適切な内部標準物質を使用することが必要だろう。

Fig.-3 Responsive fluctuation with fluorescence detector for tocopherol during continuous operation.

3.4 繰り返し分析誤差

Fig.-4 は油脂 3 種類, 17 試料について測定日を変えて 3 回測定し, 繰り返し分析誤差 (ばらつき%) を求めた結果である。ばらつきは油脂中の個々の Toc 同族体含有量に影響され, 10 mg/100 g 以上では $\pm 3\%$ 以内ではほぼ一定である。10 mg/100 g 以下ではばらつきは大きくなるが, 含有量が少ないため絶対誤差として 1 mg/100 g 未満なので日常分析では大きな支障を来すとは考えられない。しかし, 検出感度の点からピークを見過ぎやすくなるので 10 mg/100 g 以下の微量の同族体を精度良く定量するにはけん化などの前処理操作により, HPLC 用検液中の Toc 濃度を高めることが望ましいと考える。

3.5 合同実験

前述の結果から合同実験は標準溶液 (α , γ -Toc) を各

Fig.-4 Plot of individual tocopherol content in oil vs. analytical error, when 17 oil samples were repeatedly measured.

機関に配布し, HPLC の操作条件を次のように指定し, 市販の精製大豆油, サフラワー油について行った。

充てん剤: HPLC 用シリカゲル

移動相: ヘキサン-ジオキサン-イソプロピルアルコール (98.7:1.0:0.3:移動相 a)

試料溶液: 5~10% ヘキサン溶液

注入量: 10~20 μ l

測定回数: 3 回

ピーク計算法: ピーク高さ法及びピーク面積法

Table-3 は合同実験の結果である。大豆油中の α -Toc 及びサフラワー油中の γ -Toc は機関内及び機関間

Table-3 Collaborative results for HPLC determination of tocopherols in soybean and safflower oil (mg/100 g)

Collaborator	Soybean oil								Safflower oil							
	α				γ				α				γ			
	$\bar{x}$				$\bar{x}$				$\bar{x}$				$\bar{x}$			
A	5.6	5.6	5.6	5.6	60.9	60.5	60.0	60.5	30.2	30.0	30.4	30.2	3.1	3.0	2.9	3.0
B	5.3	5.3	5.3	5.3	59.6	60.0	60.0	59.9	29.5	29.5	29.1	29.4	2.6	2.6	2.2	2.5
C	6.2	4.3	4.8	5.1	62.2	64.7	61.4	62.7	28.4	30.3	29.9	29.5	3.5	2.8	3.0	3.1
D	6.1	8.8	4.2	6.5	53.0	48.8	53.1	51.0	29.0	31.0	31.6	30.5				
E	6.0	5.9		6.0	61.4	61.5		61.5	32.2	32.0		32.1	3.8	3.8		3.8
F*	nd	nd	nd		58.5	58.3	57.5	58.1	30.3	30.7	30.7	30.6	nd	nd	nd	
$\bar{x}$	5.7				59.0				30.4				3.1			
σ	0.56				4.19				0.98				0.54			
CV (%)	9.85				7.10				3.22				17.27			

Specified to use the divided standard solution, silicagel packing column and the mobile phase [hexane · dioxane · isopropanol (98.7:1.0:0.3)]

*: Used UV detector, nd: not detected

のばらつきが比較的大きい。一方大豆油中の r -Toc 及びサフラワ油中の α -Toc はわずかな例（大豆油：機関 D）を除き、機関内、機関間のばらつきは小さく定量値も良く一致する。このことは 3・4 で油脂中の個々の Toc 同族体含有量が 10 mg/100 g 以下ではばらつきが大きく、10 mg/100 g 以上ではばらつきは小さくなることを見いだした結果を裏づけるものである。また、ピークの測定にピーク面積法を用いても測定値及び機関内、機関間のばらつきは Table-3 と同様であった。

HPLC による Toc 同族体の分別定量は通常の植物油の場合特別な前処理操作なしで定量できるため、極めて誤差要因の少ない分析方法といえる。しかし、現実には分析機関間で定量値に違いが生じた。この第一の原因は標準品に由来するもので、信頼できる標準品の安定した供給体制の確立が望まれる。また Toc 同族体のクロマトグラムは簡単に得られるため往々にして HPLC 操作条件の基本的な検討が軽視されやすいことにも原因しているといえよう。

標準品を統一し分析条件を充分検討後定量すれば、そのばらつきは機関内で 3%，機関間でも 10% 以内におさまることが見いだされた。

本法の要旨は第 20 回油化学研究発表会（昭和 56 年 9 月 19 日東京）で講演した。

（昭和 56 年 12 月 16 日受理）

文 献

- 1) P.J. Van Niekerk, *Anal. Biochem.*, **52**, 533 (1973)
- 2) 例えば、藤谷 健, 油化学, **28**, 468 (1979); C.C. Tangney, J.A. Driskell, H.M. McNair, *J. Chromatogr.*, **172**, 513 (1979); A.P. Carpenter Jr., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 668 (1979) など
- 3) 日本薬学会編“衛生試験法・注解”金原出版(1980) p. 206
- 4) 阿部皓一, 湧口泰昌, 勝井五一郎, 栄養と食糧, **27**, 329 (1974)
- 5) S.L. Taylor, M.P. Lamden, A.L. Tappel, *Lipids*, **11**, 530 (1976)
- 6) 阿部皓一, 勝井五一郎, 栄養と食糧, **28**, 277 (1975)
- 7) 阿部皓一, 大前雅彦, 勝井五一郎, ビタミン, **50**, 453 (1976)