植物油中のトコフェロール同族体に対する 高速液体クロマトグラフィーの応用

阿部 皓一, 勝井 五一郎

エーザイ株式会社研究所

Application of High Speed Liquid Chromatography for Determination of Tocopherols in Vegetable Oils

Kouichi ABE, Goichiro KATSUI

Eisai Research Laboratories, Bunkyo-ku, Tokyo

A high speed liquid chromatographic (HSLC) with a spectrofluorometer method was applied for the determination of α -, β -, γ -, δ -tocopherols in vegetable oils.

It was found that tocopherols in vegetable oils were almost present in free forms. Vegetable oils in solvent, therefore, were possible to inject directly onto the column without any pretreatment.

Experimental procedure was as follows: Samples of oils dissolved in *n*-hexane were injected directly onto the column, which was a normal phase partition column, JASCOPACK WC-03. Separation of tocopherols was carried out by employing a mixture of diisopropylether and *n*-hexane (2:98, v/v) as the mobile phase. The eluant was monitored continuously by a spectrofluorometer. The recovery of tocopherols added into soybean oil was approximately 103, 98, 102, and 96% for α -, β -, γ -, and δ -tocopherols, respectively.

The HSLC method have found to offer more rapid, simple, and accurate technique than conventional methods for determining α -, β -, γ -, and δ -tocopherols in vegetable oils.

(Received June 11, 1975)

トコフェロール (Toc) が栄養素として重要なことは古くから知られているところであるが、近年高度不飽和脂肪酸摂取との関連性において欠くことのできない栄養素であることが明確となり、アメリカ合衆国等ではその所要量が示されるに至っている¹⁾。

わが国のように魚類および植物油摂取の多い国では PUFA 摂取の機会が多く、したがって Toc の必要性も高いと考えられるが、その調査が十分にされておらず、日常摂取している食品中の Toc 含量さえ十分に調べられていない。そこで、食品中の Toc を比較的簡易に定量する方法の確立を考え研究をすすめてきたが、Toc にはいくつかの同族体があり、それぞれの生理効果が異なっている²⁾ので、定量法も分離定量法でなければならぬ。

分離定量法としては薄層クロマトグラフィー²⁾ (TLC)、ガスクロマトグラフィー³⁾ (GLC)、ゲルクロマトグラフィー⁴⁾ 等があり、われわれも TLC や GLC について検

討し、その一部はすでに発表した⁵⁾。しかしながら、これらの方法は操作が煩雑であったり、 β -Toc と γ -Toc との分別ができなかったりして、なお満足できるものではなかった。ところが、われわれがさきに報告した高速液体クロマトグラフィー (HSLC) の方法⁶⁾ をこれに応用したところ、微量の試料を用いて短時間に精度よく同族体を分離定量することができた。

ただし、われわれの HSLC 条件では、油脂を有機溶媒に溶かし、直接カラムに注入して定量するので、大豆等の穀類の場合は、まず油脂を抽出しなければならない。固形試料からの油脂抽出は、その条件によって抽出率が異なるので、抽出条件を明確にしておかないと真の Toc 量を算出することができない。この点については別に検討し、その条件を定めよう。大豆等の固形食品の Toc 量を測定して報告することとし、今回は油脂中の Toc 同族体を定量した成績を報告する。

実験方法

1. 試料

綿実油、大豆油、小麦胚芽油、いずれも市販品を用いた。

アーモンド、ピーカンナッツ、ブラジルナッツ、ヘー

† 食品中のトコフェロール同族体の高速液体クロマトグラフィーによる定量 (第1報)

Determination of Tocopherols in Food by High Speed Liquid Chromatography (Part 1)

ゼルナッツ、松の実、ピスタチオナッツ、ピーナッツの油脂のうち前の六つは市販の生のもの、ピーナッツはロースト味付した市販品をそれぞれ乳鉢で注意してすりつぶしたのち、ソックスレー抽出器を用い、エーテル抽出して得た油脂を用いた。

2. 試 薬

純 α , β , γ , δ -Toc 既報⁵⁾の方法に準じて処理し、 α , β , γ , δ -Toc の純品を得た。これらは標準品として HSLC における保時時間やピーク高を調べ、検量線を作製するのに用いる。酸化を受けやすいので、かっ色ガラスびんに入れ、空気を N_2 ガスで置換し、密せんで冷暗所に保存する。

イソプロピルエーテルは市販特級のものを、 n -ヘキサンは吸収スペクトル分析用のものを実験に用いた。

3. 装 置

高速液体クロマトグラフ 分光蛍光光度計 (JASCO FP-4) 付 JASCO FLC-350

分析条件は次のとおりである⁶⁾。

カラム: JASCOPACK WC-03-500 (2.3 i.d. $\times$ 500 mm)

移動相: イソプロピルエーテル・ n -ヘキサン

(2: 98, v/v)

流速: 0.8 ml/min

検出器: JASCO FP-4

(Ex 298 nm, Em 325 nm)

この条件での α , β , γ , δ -Toc の t_R はそれぞれ 4.4, 9.6, 12.6, 18.0 min である。

実 験 成 績

1. 食品中の Toc 同族体の形態

食品中の Toc 同族体がエステル型で存在するか、遊離型で存在するかによって定量操作法を変えなければならないので、この点を調べた。

すなわち大豆油、綿実油、小麦胚芽油等の油脂を直接 n -ヘキサンに溶かし、HSLC カラムに注入して蛍光法で定量する方法を直接法とし、試料を抗酸化剤の存在下にアルカリけん化⁷⁾して得た不けん化物を、 n -ヘキサンに溶かして HSLC カラムに注入して蛍光法で定量する方

法をけん化法とした。そして、両者の各 Toc の分析値を比較した。Table 1 に示すように、直接法とけん化法で得られた分析値は一致した。したがって、試験した油脂中の Toc は遊離型として存在しており、エステル型として存在しても微量である。それゆえに、一般の油脂の Toc 類の定量は、直接法を採用して差し支えないことがわかった。

2. 定量障害物の検討

食品中の油脂類には Toc 同族体のほか、ビタミン A, β -カロチン, ビタミン D, ビタミン K, トコフェロールキノン, コレステロールあるいは植物ステロール類等の脂溶性物質が存在するので、これらの物質による定量への障害を検討した。Toc 蛍光定量の条件 (Ex 298 nm, Em 325 nm) で、これらの物質の定量障害の程度を調べたところ、ほとんど障害しないことがわかった⁸⁾。ただし、 γ -Toc 0.2 μ g に対しビタミン A 3.2 IU 以上になると、蛍光の再吸収がおこって γ -Toc の定量値が低くなるので、ビタミン A を大量に含有する食品ではビタミン A の除去操作が必要となる。また、ゴマ油の中には、 δ -Toc のピークに Toc 以外の蛍光物質が重なり定量を障害するので、この物質の除去操作が必要である。しかし、これらは特殊な例であり、一般の植物油ではこのような定量障害がみられないので、直接法で Toc 同族体の定量ができる。

3. 回収率

大豆油に既知量の α , β , γ , δ -Toc を加えて回収率を求めた。その結果は、Table 2 に示したように、100% 近い回収率であった。それゆえに、本法による定量値の信頼性は高いといえる。

4. 実験操作法

以上の実験結果から、定量法として直接法を採用することとした。すなわち、試料 A g を n -ヘキサンに溶かし正確に B ml とする。各 Toc 同族体含量を 0.1~3.0 mg/ml 程度とする。その C μ l (1~10 μ l) をマイクロシリンジを用いて HSLC カラムに注入して分析をおこない、それぞれのピーク高を測定する。別にさきの純 α , β , γ , δ -Toc を用いて検量線をつくっておき、これに對比して C μ l 中の Toc 同族体の量 $D_{(\alpha-\delta)}$ μ g を算出

Table 1. Comparison of the result of direct method with saponification method.

	Direct method					Saponification method				
	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc	Total	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc	Total
Soybean oil	6	—	42	14	62	6	—	42	15	63
Cotton seed oil	31	—	33	—	64	31	—	33	—	64
Wheat germ oil	180	74	10	—	264	177	70	12	—	259

Table 2. Recovery of tocopherols.

	Soybean oil (A) μg	Added tocopherol (B) μg	Total tocopherol (A+B) μg	Observed tocopherol (C) μg	Recovery $\left(\frac{C-A}{B} \times 100\right)$
α -Toc	19	88	107	110	103%
β -Toc	—	50	50	49	98%
γ -Toc	84	57	141	142	102%
δ -Toc	30	52	82	80	96%

Table 3. Tocopherol composition of vegetable oils.

Oils	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc	Total
Cotton seed	309	—	330	—	639
Soy bean	59	—	418	140	617
Wheat germ	1796	735	99	—	2630
Almond nut	461	—	—	—	461
Pecan nut	4	—	178	—	182
Brazil nut	46	—	185	—	231
Hazel nut	346	—	—	—	346
Pine nut	221	—	104	—	325
Pistachio nut	16	—	439	24	479
Peanut	37	—	37	20	94

する。たとえば綿実油なら 1 g を n -ヘキサンにとかし、正確に 5 ml としてその 5 μl を注入して分析した。

試料油脂中の Toc 同族体の量は、次の計算式によって算出する。

$$\begin{aligned} & \text{油脂中の Toc 同族体の量 } (\mu\text{g/g}) \\ & = D_{(\alpha-\delta)} / A \times B / C \times 1000 \end{aligned}$$

5. 油脂類の Toc 同族体の含量

綿実油等、油脂類の試料を前述の実験操作法に従って定量した成績を示すと、表 3 のとおりとなった。これは、われわれがさきに確立した GLC⁵⁾ で定量した値とはほぼ一致した。

考 察

従来、油脂中の Toc 同族体の定量法として、TLC, GLC 等があるが、操作が煩雑であったり、 β と γ -Toc との分離が困難であったりする欠点があり、満足できるものではなかった。

しかしわれわれが確立した HSLC 条件では、微量の試料を用いて迅速に、精度よく Toc 同族体を定量しえた。ただし、ビタミン A を大量に含む試料については蛍光の再吸収がおこって γ -Toc の値が低くなるので、ビ

タミン A 除去の前操作が必要である。また、ゴマ油では δ -Toc のピーク部分に Toc 以外の蛍光物質が重なり、誤った判定を下すことになるので、盲蛍光物質の除去が必要である。なお、植物油にはトコリエノールも存在するので、今後、検討する。

このように、今後なお検討して解決せねばならない問題もあるが、一般の食品の油脂は本法によってたやすく定量することができる。

要 旨

1. 従来定量が容易でないとされていた食用油脂中の Toc 同族体の定量に HSLC を応用して、微量の試料で簡便、正確に定量することができた。

2. 植物油中の Toc 同族体は遊離型であることを確認したので、 n -ヘキサンにとかして直接カラムに注入して定量した。各 Toc の回収率は、ほぼ 100% であった。

3. 上記の方法で、綿実油など 10 種類の油脂中の Toc 同族体を定量した。

本稿を終えるにあたり、試料の一部を提供して下さった、お茶の水女子大学福場博保教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Bieri, J.G.: *J. Amer. Diet. Ass.*, **64**, 171 (1974)
- 2) Chow, C.K. and Draper, H.H.: *Anal. Biochem.*, **32**, 81 (1969)
- 3) 石川靖二, 勝井五一郎: ビタミン, **34**, 185 (1966)
- 4) Thompson, J.N. and Erdody, P. and Maxwell, W.B.: *Anal. Biochem.*, **50**, 267 (1972)
- 5) 阿部皓一, 湧口泰昌, 勝井五一郎: 栄養と食糧, **27**, 329 (1974)
- 6) Abe, K., Yuguchi, Y. and Katsui, G.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 183 (1975)
- 7) 勝井五一郎: ビタミン, **38**, 151 (1968)
- 8) 阿部皓一, 勝井五一郎: ビタミン, **49**, 259 (1975)

(昭和50年6月11日受理)