高速液体クロマトグラフィーによるショ糖脂肪酸エステルの定量

(平成元年 2 月 23 日受理)

村上千秋* 丸山武紀* 新谷 勲*

Determination of Sucrose Esters of Fatty Acids by High Performance Liquid Chromatography

Chiaki MURAKAMI, Takenori MARUYAMA and Isao NIHA

(Japan Institute of Oils & Fats, Other Foods Inspection, Foundation:
3-27-8, Nihonbashi-Hamacho, Chuo-ku, Tokyo, Japan)

A sensitive method was developed for the quantitative determination of sucrose mono- and di-fatty acid esters (SuE) in foods by high performance liquid chromatography (HPLC). The SuE were extracted with tetrahydrofuran from foods and purified by silica gel column chromatography. The isolated SuE were derivatized with 3, 5-dinitrobenzoyl chloride (DNBC) and the reaction products were dissolved in a mixture of tetrahydrofuran and acetonitrile (1 : 1). A portion of this solution was injected into an Inertsil C8 column and eluted with a linear gradient elution system from 15% water in acetonitrile to 100% acetonitrile over 30 min, then hold for 20 min.

Each SuE was detected with a UV detector set at 230 nm. SuE in various kinds of foods could be selectively detected without interference on the HPLC. All peaks of mono- and diesters having C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈, C₁₆-C₁₆, C₁₆-C₁₈ and C₁₈-C₁₈ carbon chains could be well separated. The recoveries of SuE added to margarine, ice cream, cookies, curry roux and coffee whitener were more than 80% for the monoesters and more than 75% for the diesters. The detection limit was 0.001% for each SuE.

(Received February 23, 1989)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 乳化剤 emulsifier; ショ糖脂肪酸エステル sucrose esters of fatty acids; マーガリン margarine; アイス クリーム ice cream; クッキー cookie

緒 言

ショ糖脂肪酸エステル (SuE) は、結合する脂肪酸の種類及びエステル化度を変えることにより幅広い性質のものを作ることができる。加工食品では乳化剤のみならず小麦粉二次製品の保存性向上や食感改良、油脂の結晶成長の制御、インスタントカレー、キャンデー、チュウインガム、魚肉練り製品の保存性向上の目的に、さらに、打錠菓子の滑沢剤としても用いられている^{1)~3)}。

食品中の SuE の分析は、現在カラムクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー (GLC)^{2), 4)} や薄層クロマトグラフィー (TLC)、比色分析法⁵⁾ などで行われている。GLC による定量の場合、分析可能な SuE は、モノエステル及び短鎖脂肪酸のジエステルに限られ²⁾、さらに不

純物との分離が困難である。TLC による場合は操作が煩雑で分析に長時間を要し、また定量精度が低いなどの欠点がある。

近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析が報告⁶⁾されたが、SuE の品質管理への試みであり、実際の食品への応用例は見当たらない。

著者らは、先に油脂食品中のモノグリセリドの定量に UV ラベル化剤を用い、HPLC で測定する方法を報告⁷⁾した。この方法を我が国で用いられているショ糖脂肪酸エステルの大部分を占める²⁾モノ及びジエステルの定量に応用し、良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試 料

抽出溶媒及び添加回収率検討用のマーガリン、アイス クリーム、カレールーは、SuE 無添加の市販品を用い

* (財)日本食品油脂検査協会：東京都中央区日本橋浜町 3-27-8

Sample (5 g)

- homogenize with THF (40, 30, 30 ml 3 times)
- filter

Filtrate

- evaporate

Residue

- dissolve in CHCl_3

Column chromatography (SuE < 10 mg)
(Silica gel 15 g)

- elute stepwise with;
- CHCl_3 100 ml
- 30% CH_3COCH_3 - CHCl_3 100 ml

50% CH_3OH - CHCl_3 eluate 100 ml

- evaporate
- transfer into test tube with CHCl_3
- evaporate

Residue

- dissolve in 3 ml DCE
- add 100 mg 3,5-DNBC
- add 1 ml 10% TEA-DCE
- heat (70°C, 30 min)

Heated solution

- evaporate
- dissolve in 50% THF- CH_3CN
- fill up (10 ml)

Test solution for HPLC

HPLC condition

- column: Inertsil C8 (4.6 mm i.d.×250 mm)
- mobile phase: (A) 15% H_2O - CH_3CN →(B) 100% CH_3CN , gradient for 30 min, following to (B) for 20 min.
- flow rate: 1.0 ml/min
- detector: UV wavelength 230 nm
- injection volume: 20 μl
- DCE: dichloroethane
- DNBC: dinitrobenzoyl chloride
- TEA: triethylamine
- THF: tetrahydrofuran

Scheme 1. Analytical procedure for determination of sucrose mono- and di-fatty acid esters in foods

た。添加回収実験用のクッキーは、モノ、ジエステルの混合物を無水物換算で 0.1% 添加して焼成したものを用いた。ただし、焼成を、170°で行うと SuE が一部分解するので、減圧下 85°で焼成した。市販品への応用にはマーガリン、アイスクリーム、カレールー、コーヒーホワイトナー、タブレット（カルシウム、食物繊維を強化した打錠菓子）、ホイップクリーム、クッキーを用いた。

2. 試 薬

SuE 同定用標準品: ショ糖ラウリン酸モノエステル, ショ糖ミリスチン酸モノエステル, ショ糖パルミチン酸モノエステル, ショ糖ステアリン酸モノエステルは、第一工業製薬(株)より恵与されたもので、HPLC におけるモノエステルの同定に用いた。

SuE 定量用標準品: 市販の SuE (第一工業製薬(株)製の DK エステル F-50) を用い 6. SuE 定量用標準品の調製の項に従ってモノ及びジエステルを調製した。

3, 5-ジニトロ塩化ベンゾイル (DNBC): HPLC 用 UV ラベル化剤, 半井化学(株)製

シリカゲル: カラムクロマトグラフィー用, 100~200 mesh 和光純薬工業(株)製

その他の試薬は、すべて市販特級品を用いた。

3. 装置及び器具

ロータリーエバポレーター: 柴田科学機械工業(株)製 RE 120-B 型

ホモジナイザー: JANKE & KUNKEL GMB 社製 Ultraturrax

高速液体クロマトグラフ: (株)日立製作所製 LC 655 A-11 型

検出器: (株)島津製作所製 SPD-6AV 型

データプロセッサ: (株)日立製作所製 655-71 型

HPLC インジェクター: RHEODYNE 社製 7125 型

シリカゲルカラム: 分析用カラムは、5%含水させたシリカゲル 15 g を内径 1.5×30 cm のガラス管にクロロホルムで湿式法により充てんした。また、標準品調製用カラムは、105°で 16 時間活性化したシリカゲル 10 g を内径 1.0×30 cm のガラス管にクロロホルムにより充てんした。

4. HPLC 操作条件

カラム: Inertsil C8, 4.6 mm i.d.×250 mm (ガスクロ工業(株)製)

移動相: 15% 含水アセトニトリル (A 液) から 100% アセトニトリル (B 液) に 30 分で変化するように濃度勾配法で行い、B 液に達した後 20 分間保持した。

流量: 1.0 ml/min

測定波長: 230 nm

注入量: 20 μl

5. 試験溶液の調製

5.1 抽出操作

液体試料の場合はそのまま、固体試料の場合は細切

Scheme 2. Preparation of sucrose mono- and di-fatty acid esters for standard

し、その5gを50ml容の遠沈管にはかり取り、テトラヒドロフランを約40ml加えて3分間ホモジナイズし、上澄液をろ過または遠心分離する。残留物にテトラヒドロフランを約30ml加え、同様の操作を2回繰り返してこれらの上澄液を合わせ減圧下で蒸発乾固する。残留物をクロロホルムに溶解して正確に10mlとし、SuE抽出溶液とした。

5.2 シリカゲルカラムによる精製

SuE抽出溶液の一部(総SuEとして10mg以下になるように、通常2ml)をシリカゲルカラムに負荷し、クロロホルム100ml、次いでアセトン-クロロホルム混液(30:70)100mlで展開した後、メタノール-クロロホルム混液(50:50)100mlでSuEを溶出する。この溶出液を減圧濃縮し、クロロホルムで20mlの共栓付き試験管に移し減圧下で蒸発乾固して、SuE画分とする。

5.3 DNBC誘導体の調製

SuE画分をジクロロエタン3mlに溶解し、3,5-DNBC 100mgと10%トリエチルアミン-ジクロロエタン溶液(10% TEA)1mlを加えて70°で30分間加熱し、エステル化を行う。反応終了後、減圧下で蒸発乾固し、これにテトラヒドロフラン-アセトニトリル混液(1:1)を正確に10ml加えて溶解し、HPLC用検液とする。検液20μlをHPLCに注入してSuEのピーク面積を求め、あらかじめ作成しておいた検量線から定量する。この操作の概略をScheme 1に示した。

6. SuE定量用標準品の調製

SuEのモノエステル及びジエステルの標準品は市販されていないため、食品添加物規格品のSuEからこれらを液液分配⁸⁾及びシリカゲルカラムで分離精製^{9, 10)}した。

モノ、ジエステル定量用標準品の調製は、DKエステ

ルF-50 5gを分液漏斗に取り、*n*-ヘキサン50ml、メタノール50ml、水5mlの混液で液液分配⁸⁾を行い、下層の含水メタノール層を*n*-ヘキサンで洗浄した後、減圧下で蒸発乾固しモノエステル画分を得た。次いで、TLCでモノエステルのみであることを確認した後標準品とした。上層の*n*-ヘキサン層は減圧下で蒸発乾固して、その100mgをシリカゲルカラムに負荷し、クロロホルム100ml、2%メタノール-クロロホルム200mlで展開し、大部分のポリ、トリエステルを除いた後4%メタノール-クロロホルム200mlを50mlずつに4分画しジエステルを得た^{9, 10)}。ジエステルの各画分を減圧蒸発乾固し、TLCでジエステルのみであることを確認した後、これらを定量用標準品として用いた。なお、TLCは、クロロホルム-メタノール-酢酸-水(40:5:4:1)で展開後、アンスロン試液を噴霧し加熱後、青色のスポットのR_f値により確認した⁵⁾。モノ及びジエステル調製操作の概略をScheme 2に示した。

7. 検量線の作成

モノ及びジエステルの2mg/mlテトラヒドロフラン溶液を調製し、これらを合わせ標準溶液とする。この溶液の1.0~4.0mlをそれぞれ採取した。以後、5.試験溶液の調製の5.3 DNBC誘導体の調製に従ってDNBC誘導体とし、HPLCに注入する。得られたクロマトグラムからモノ及びジエステルに相当するそれぞれのピーク面積を求め、その総和と注入量(μg)とから検量線を作成する。

結果及び考察

1. 誘導体の調製

モノグリセリドの定量にUVラベル化剤としてDNBCを用い、TEA存在下でエステル化する方法を先に報告⁷⁾した。そこでSuEの定量にもこの方法を応用す

Fig. 1. Effect of added amount of 10% triethylamine solution on yield of DNBC derivatives of sucrose mono- and di-fatty acid esters

Mixture of the mono- and diesters (10 mg) were reacted with 100 mg of 3,5-DNBC, at 70°C for 15 min.

●—●: monoesters; △—△: diesters

ることとした。しかし、SuEはエステル化度がさまざまであり、また、水酸基の数も多いため、モノグリセリドでの反応条件をそのまま適用することはできない。そこで誘導体の調製方法について検討した。反応はDNBCの量を100 mgとし、SuEとTEA量を変化させて行った。反応率は反応前後のSuEを赤外吸収スペクトルで測定し、その-OHの吸収率から求めた。DNBCを100 mg、モノ、ジエステルをそれぞれ10 mgと一定にして10% TEA量を変化させた結果をFig. 1に示した。モノ、ジエステルとも10% TEAが約0.5 ml以上になると反応率はほぼ100%になったので、1 ml加えることとした。

次に、DNBCの量を100 mg、10% TEAの量を1 mlとし、モノ、ジエステルの量を変化させて得られた結果をFig. 2に示した。モノエステルでは10 mg、ジエステルでは12 mgまでほぼ100%の反応率であった。SuEはモノグリセリドに比べて水酸基の数が多いためDNBC及びTEA量が2.5倍必要であった。

2. HPLC

SuE-DNBC誘導体の分離はカラムにInertsil ODSを用いた場合、移動相のアセトニトリル-水の混合比をいろいろ変化させてもモノエステルの溶出に時間がかかり、さらにジエステルはピークとして出現しなかった。しかし、Inertsil C8カラムでは移動相に含水アセトニトリルを用いると、モノエステル及びジエステルとも溶出

Fig. 2. Effect of added amount of sucrose mono- and di-fatty acid esters on yield of DNBC derivatives

The mono- and diesters were reacted with 100 mg of 3,5-DNBC and 1 ml of 10% TEA solution at 70°C for 15 min.

●—●: monoesters; △—△: diesters

した。そこで、これらの適切な分離条件を検索した。アセトニトリル中の含水量を15%にし、濃度勾配法により30分間で100%アセトニトリルに変え、その状態で20分間保持すると各SuEが相互に分離された(Fig. 3)。アシル基がC₁₂~C₁₈までのモノエステル及び、C₁₆とC₁₈から成るジエステルの溶出時間は約50分であった。

モノエステルからは、いずれも2本のピークが検出された。これはショ糖の6位、または、6'位に脂肪酸が結合した位置異性体と考える。また、アシル基がC₁₆とC₁₈から構成されるジエステルでは、主ピークが3本に分離した。これはショ糖の6位と6'位に脂肪酸が結合した(C₁₆-C₁₆), (C₁₆-C₁₈), (C₁₈-C₁₈)の位置異性体にそれぞれ相当するものと推定した。

3. 抽出溶媒

各種食品からSuEを抽出する溶媒について検討した。抽出溶媒にはテトラヒドロフラン、イソブタノール、メタノール、クロロホルム、クロロホルム-メタノール(1:1)及びジクロロエタンを用いて抽出率を比較した(Table 1)。テトラヒドロフランは、モノ、ジエステルの抽出率が、他の溶媒に比べて良好であり、さらに濃縮しやすいことから抽出溶媒⁴⁾に用いた。

4. 妨害物質の除去

DNBCと反応しHPLC上で妨害が予想される化合物は、乳化剤ではグリセリンモノ、ジ脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、その他には油脂由来のトコフェロール、ステロール類などが想定される。この除去操作にシリカゲルカラムを用いた。まず最初にクロロホルム100 mlで展

Fig. 3. Elution patterns of DNBC-derivatives of sucrose mono- and di-fatty acid esters by high performance liquid chromatography
HPLC condition: column, Inertsil C8 (4.6 mm i.d. ×250 mm); mobile phase, 15% H₂O in CH₃CN (A) and 100% CH₃CN (B)
Gradient (A)→(B) for 30 min, following to (B) for 20 min.
Flow rate: 1.0 ml/min, detection: UV-230 nm, injection: 20 μl

Table 1. Extraction of Sucrose Mono- and Di-Fatty Acid Esters from Various Kinds of Foods by Several Solvents (n=3) (%)

	SuE	THF	iso-BuOH	MeOH	CHCl ₃	CHCl ₃ : MeOH (1 : 1)	(CH ₂ Cl) ₂
Margarine	Mo	99.7	88.8	87.9	41.9	68.2	15.9
	Di	99.4	91.2	84.6	77.7	91.3	55.1
Ice cream	Mo	85.5	77.7	49.8	0.0	44.2	0.0
	Di	94.3	98.1	62.8	40.9	46.6	0.0
Curry roux	Mo	96.5	96.3	76.2	80.0	72.1	5.5
	Di	98.9	94.9	57.0	90.0	62.5	70.5
Cookie	Mo	83.5	76.0	64.5	29.5	72.2	11.4
	Di	94.6	103.3	70.2	100.1	94.6	36.2

Addition level of a mixture of the mono- and diesters was 0.1%.

開するとトリグリセリド、ステロールエステル類などの非極生物質が溶出された。次いでアセトン-クロロホルム混液 (30 : 70) 100 ml で展開するとプロピレングリコール脂肪酸エステル、グリセリンモノ、ジ脂肪酸エステル、トコフェロール類、ステロール類、ソルビタン脂肪酸ジエステルが溶出された。最後にメタノール-クロロホルム混液 (50 : 50) 100 ml で展開すると SuE とソル

ビタン脂肪酸モノエステルとが溶出される。しかし、HPLC 上ではソルビタン脂肪酸モノエステルは SuE より速く溶出するため妨害にはならなかった。また、ショ糖、グリセリン及びプロピレングリコールなどは HPLC において溶媒 (テトラヒドロフラン、アセトニトリル) ピークと重複して溶出するので定量精度に影響を及ぼさなかった。

Fig. 4. Calibration curves of DNBC-derivatives of sucrose mono- and di-fatty acid esters
3,5-DNBC: 100 mg; 10% TEA: 1 ml
●—●: monoesters; △—△: diesters

Table 2. Recoveries of Sucrose Mono- and Di-Fatty Acid Esters Added to Several Kinds of Foods
($n=3$) (%)

Foods	SuE	$\bar{X}$	CV
Margarine	Mo	94.7	0.62
	Di	86.5	0.78
Ice cream	Mo	81.2	0.33
	Di	82.0	0.96
Cookie	Mo	81.0	1.12
	Di	92.1	0.72
Curry roux	Mo	91.7	1.47
	Di	86.0	2.45
Coffee whitener	Mo	81.4	3.78
	Di	77.7	3.18

Addition level of a mixture of the mono- and diesters was 0.1%.

5. 検量線

実験方法 6. の SuE 定量用標準品の調製に従って調製した場合、モノエステルの高純度品を得るのは比較的容易である。しかし、ジエステル画分は、トリ、テトラエステルなどが混入しやすいので 4 画分に細分した。Fig. 4 はモノ及びジエステルを用いて作成した検量線である。モノエステルでは 10 mg まで、ジエステルでは 12 mg まで原点を通る良好な直線性が得られた。

Fig. 5. Liquid chromatograms obtained from several kinds of foods added a mixture of sucrose mono- and di-fatty acid esters or not by the proposed procedure

(a): added the mixture; (b): no addition
HPLC condition: column, Inertsil C8 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm); mobile phase, 15% H_2O in CH_3CN (A) and 100% CH_3CN (B) Gradient (A) $\rightarrow$ (B) for 30 min, following to (B) for 20 min.

Flow rate: 1.0 ml/min; detection: UV-230 nm; injection: 20 μ l

6. 添加回収実験

市販のマーガリン、アイスクリーム、カレーラー、コーヒーホワイトナーにモノ及びジエステルの混合物を 0.1% 添加し、また、クッキーは自製したものをを用い添

Table 3. Contents of Sucrose Mono- and Di-Fatty Acid Esters in Commercial Foods (%)

		Mono				Di	Mono + Di
		C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	Total		
Margarine	(A)	0.011	0.523	0.103	0.637	0.067	0.704
	(B)	nd	nd	nd	0	nd	0
Cookie		nd	0.021	0.048	0.069	0.058	0.127
Curry roux	(A)	nd	0.007	0.017	0.024	0.022	0.470
	(B)	nd	nd	nd	0	nd	0
Tablet*	(A)	nd	0.034	0.101	0.135	0.335	0.650
	(B)	nd	0.010	0.030	0.040	0.066	0.106
	(C)	nd	0.003	0.006	0.009	0.064	0.073
Whipped cream		nd	0.019	0.043	0.062	0.060	0.122

(A), (B), (C): different sample * Tablet type confectionery fortified with calcium and dietary fiber.

Table 4. Comparison of Fatty Acid Composition of Mono Acyl Esters of Sucrose in Commercial Foods by the Proposed and the GLC Methods

		Fatty acid (%)		
		C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈
Margarine	HPLC	1.7	82.2	16.1
	GLC	2.8	79.6	17.6
Cookie	HPLC		30.4	69.6
	GLC		31.4	68.6
Curry roux	HPLC		32.0	68.0
	GLC		27.5	72.5
Tablet (A)	HPLC		25.0	75.0
	GLC		27.9	72.1
Tablet (B)	HPLC		24.7	75.3
	GLC		25.6	74.4
Whipped cream	HPLC		30.5	69.5
	GLC		30.0	70.0

GLC method¹¹⁾: fatty acid methyl esters was prepared from the isolated sucrose mono-fatty acid esters.

加回収率を求めた (Table 2). いずれの食品においても回収率はモノエステルで、80% 以上、また、ジエステルでは 75% 以上であった。これらの変動係数は 3.78% 以内であり、定量法として十分満足できる精度であると考え

る。Fig. 5 はマーガリン、アイスクリーム及びクッキーの

添加回収実験における SuE のクロマトグラムである。マーガリン及びアイスクリームでは SuE のピークのみであるがクッキー及びカレールーではジエステルの前に数本のピークが現れた。しかし、これらは明らかに SuE とは保持時間が異なるので定量の妨害にはならなかった。

7. 市販品への応用

市販食品の分析結果を Table 3 に示した。モノエステルはアシル基別に定量した合計値で、ジエステルはそれに相当する全ピーク面積を加算して求めた。

SuE が検出された食品を再度 5. 試験溶液の調製の 5. 2 シリカゲルカラムによる精製に従って SuE を分取し、その脂肪酸組成をけん化後常法¹¹⁾に従って GLC で分析し、それと本法で得たモノエステル部分の脂肪酸組成と比較した。Table 4 はその結果である。本法と GLC で分析した組成はよく一致した。このことから、SuE モノエステルの構成脂肪酸を HPLC で、直接知ることができることが明らかになった。

ま と め

HPLC による各種食品中の SuE の定量法について検討した。その結果、SuE をテトラヒドロフランで抽出し、シリカゲルカラムで精製後、DNBC でエステル化する定量法を確立することができた。本法はモノ及びジエステルを濃度勾配法で溶出することにより、これらの分別定量、更にモノエステルについては、構成する脂肪酸の種類別にも定量することができた。最少検出量はモノ及びジエステルの各々 0.001% である。この検出量は GPC カラムを用い、RI 検出器によって測定する方法の約 1/100 以下である。

本研究に当たり、貴重な試料を御提供頂いた第一工業製薬(株)、また適切な御助言を頂いた(財)日本食品油脂検査協会理事兼松 弘博士に深謝致します。なお、本研究の要旨は、日本食品衛生学会第 56 回学術講演会

(1988年11月, 静岡)において発表した。

文 献

- 1) 衛生技術会編: “食用乳化剤と乳化技術” p. 112~137 (1979).
- 2) 山田敏伸, 河瀬伸行, 萩本賢治: 油化学. **29**, 543~553 (1980).
- 3) 石館守三, 谷村顕雄 監修: “食品添加物公定書解説書” D-522 (1987) 廣川書店.
- 4) 四方田千佳子, 豊田正武, 伊藤誉志男: 食衛誌. **27**, 235~239 (1986).
- 5) 厚生省環境衛生局食品化学課編: “食品中の食品添加物の分析法” p. 165~169 (1982) 講談社.
- 6) Jaspers, M. E. A. P., Leeuwen, F. F. van., Nieuwenhuis, H. J. W., Vianen, G. M.: J. Am. Oil Chem. Soc. **64**, 1020~1025 (1987).
- 7) 村上千秋, 丸山武紀, 新谷 助: 食衛誌. **29**, 235~239 (1988).
- 8) 石束哲夫, 中村楨吾, 鈴木愛子: 栄養と食糧. **27**, 289~293 (1974).
- 9) 大竹俊樹, 玉手英四郎: 工化誌. **67**, 809~812 (1964).
- 10) 大竹俊樹: 精糖技術研究会誌. **12**, 25~34 (1963).
- 11) 日本油学協会編: 基準油脂分析試験法 2. 4. 21. 2~73.