

## 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

辻 澄子<sup>#</sup>・三島郁子・石光 進・柴田 正・外海泰秀

### Determination of Tocopherols in Oils of Mixed Tocopherol as Food Additive using Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography

Sumiko Tsuji<sup>#</sup>, Ikuko Mishima, Susumu Ishimitsu, Tadashi Shibata and Yasuhide Tonogai

Simultaneous determination of four tocopherols was developed using reverse-phase high-performance chromatography with a mixture of methanol and water (88:12) as a mobile phase. The  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherols in oils of mixed tocopherol as food additive were determined. It is clarified that the proposed method is useful for the quality control of food additive.

**Keywords:** tocopherol, food additive, RP-HPLC, separation of  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocopherol

#### はじめに

既存添加物のミックストコフェロールは、マメ科ダイズ (*Glycine max* MERR.), アブラナ科アブラナ (*Brassica campestris* L.) 等の植物油脂より、分離精製して得られたものである<sup>1)</sup>。その成分は Fig. 1 及び Table 1 に示したように、 $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -及び $\delta$ -トコフェロール(Toc)の4種類の同族体の混合物で、いずれも *d*-体 (*RRR*-体)であり、その組成比は原料により異なる。添加物としての用途は栄養強化剤及び酸化防止剤である。 $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -及び $\delta$ -の4種の Toc 同族体のうち、ビタミン E の生物学的効力活性は  $\alpha$ -Toc が一番強く、 $\alpha$ -Toc を 1 とした場合に対して、 $\beta$ -Toc は 0.3,  $\gamma$ -Toc は 0.1,  $\delta$ -Toc は 0.02 であるといわれている<sup>2)</sup>。したがって、栄養学的には、食品によってその4種の Toc 同族体の含有量組成が異なるため、それぞれの同族体を同時に分析することが非常に重要となる。一方、ラードのメチルエステルを基質にした場合の抗酸化力は、90℃において、 $\delta$ -Toc,  $\gamma$ -Toc,  $\beta$ -Toc,  $\alpha$ -Toc の順である<sup>3)</sup>。従って、酸化防止剤として用いられた場合の食品衛生学的側面からも4種類の同族体の含有量組成を分析することは重要となる。

現在、4種の Toc 同族体を定量する方法としては、 $\beta$ -及び $\gamma$ -Toc を分離定量できる順相系高速液体クロマトグラフィー (NP-HPLC) 法が行われており、逆相系高速液

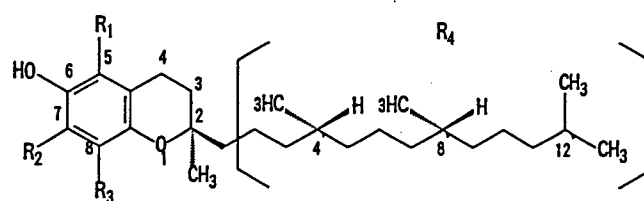


Fig. 1 Structure of tocopherol  
R<sub>1</sub> ~ R<sub>3</sub>: -H or -CH<sub>3</sub>

体クロマトグラフィー (RP-HPLC) では、 $\beta$ -及び $\gamma$ -が分離できないといわれている<sup>4-7)</sup>。しかし、NP-HPLC 法は大量の有機溶媒を消費するため、RP-HPLC を用いる定量法の開発が望まれている。RP-HPLC を用いた分析法としては、里村らが65%イソプロパノール溶液を用いた RP-HPLC 法により  $\beta$ -及び $\gamma$ -Toc を分離した報告<sup>8)</sup>があるが、Toc の溶出に時間を要する。著者らは最近の高分解能 HPLC カラムの開発に注目して、種々の逆相分配型カラムについて検討した。その結果、アミド型オクタデシルシラン (アミド型 ODS) カラムを用いることにより、水・メタノール混液を移動相として  $\beta$ -及び $\gamma$ -Toc が分離できることを見いだした。そこで、食品添加物“ミックストコフェロール”のオイル製剤中の4種の Toc 同族体の組成分析を検討した結果、絶対検量線法を用いて定量でき、食品添加物の品質管理への適用が可能であることが判明したので報告する。

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Sumiko Tsuji; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-941-1533 ext.37; Fax: 06-942-0716; E-mail: tsuji@nihs.go.jp

Table 1 Trivial name, abbreviation, chemical name and molecular weight of tocopherols

Trivial name	Abbreviation	Chemical name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Molecular weight
<i>d</i> - $\alpha$ -Tocopherol	$\alpha$ -Toc	5,7,8-Trimethyltolcol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	430.71
<i>d</i> - $\beta$ -Tocopherol	$\beta$ -Toc	5,8-Dimethyltolcol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	416.69
<i>d</i> - $\gamma$ -Tocopherol	$\gamma$ -Toc	7,8-Dimethyltolcol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	416.69
<i>d</i> - $\delta$ -Tocopherol	$\delta$ -Toc	8-Methyltolcol	H	H	CH <sub>3</sub>	402.64
Tocol	2-Methyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl) chroman-6-ol		H	H	H	388.63

## 実験方法

### 1. 試料

食品添加物協会より供与されたミックストコフェロールオイル製剤を用いた。

### 2. 試薬・試液

- ① エタノール：HPLC用エタノールを用いた。
- ② メタノール：HPLC用メタノールを用いた。
- ③ ビタミンE同族体セット：エーザイ(株)製の標準品を用いた。

その他の試薬はJIS試薬特級品を用いた。

### 3. 標準液の調製

#### ① Toc同族体の標準原液

ビタミンE同族体セットの $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -及び $\delta$ -Tocをそれぞれ20 mgずつ正確に量り、それぞれ20 mlの褐色メスフラスコに入れ、エタノールを加えて溶かし、正確に20 mlとし、標準原液とした(この液1 mlは、各Toc 1,000  $\mu$ gを含む)。Tocは、紫外線や空気に触れると酸化されやすいので、調製した溶液は共栓付き褐色びんに入れ、窒素ガスを充填し、密栓して冷暗所に保存した。

#### ② Toc同族体の標準溶液

各標準原液をエタノールで適宜希釈し、1, 5, 10, 20, 30, 50, 100  $\mu$ g及び200  $\mu$ g/mlの溶液を調製し、検量線用標準液とした。窒素ガスを充填し、密栓して冷暗所に保存した。

### 4. 試料溶液の調製

ミックストコフェロール製剤約20 mgを精密に量り、20 mlの褐色メスフラスコに入れ、エタノールを加えて溶かし、正確に20 mlとした。その液2 mlを正確に量り、エタノールで、正確に全量50 mlとした。標準溶液と同様に、窒素ガスを充填し、密栓して冷暗所に保存した。

## 5. 装置

- ① HPLC装置：Waters 600E System Controller, Waters Model 510 HPLC Pump, Waters 717 Auto Sampler.
- ② 紫外外部吸収(UV)検出器：Jasco UV-970 Intelligent UV/VIS Detector.
- ③ データ処理装置：Waters 805 Data Station, NEC 98 note ST/T personal computer, Canon Bubble Jet Printer BJ-15v.

### ④ 液体クロマトグラフ-質量分析計(LC/MS)：

Hewlett Packard HP1110-LC1100MSD.

## 6. HPLC条件

- ① カラム：SUPELCO SIL-<sup>TM</sup> ABZ+PLUS  
 $\phi$  4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m.  
(アミド型 ODS)
- ② 流量：1.0 ml/min.
- ③ カラム温度：40  $^{\circ}$ C.
- ④ 試料注入量：5  $\mu$ l.
- ⑤ 検出波長：295 nm.
- ⑥ 移動相：メタノール：水=88:12 (v:v)

## 実験結果及び考察

### 1. HPLC条件の検討

4種のToc同族体のうち、構造異性体である $\beta$ -及び $\gamma$ -TocはODSカラムでの分離が難しく、里村らはYMC-PACK A-302 S-5 120A ODS  $\phi$  4.6 mm  $\times$  150 mmを用いて、65%イソプロパノールで $\delta$ -、 $\gamma$ -、 $\beta$ -、 $\alpha$ -Tocの順に溶出分離し、他のODSカラムでは分離できないと報告している<sup>8)</sup>。しかし、その分離はカラムの性状によるところが大きいとしているが、詳細な説明はない。我々は、近年の高分離能のODSカラムの開発に伴い、 $\beta$ -及び $\gamma$ -Tocの分離が可能ではないかと考え、RP-HPLC法を検討した。種々のカラムについて検討した結果、里村らの65%イソプロパノールでは、 $\beta$ -及び $\gamma$ -Tocは重なるが、メタノール：水(88:12)を用いた時、アミド型ODSカラムであるSUPELCO SIL-<sup>TM</sup> ABZ+PLUS  $\phi$  4.6 mm  $\times$  150 mmカラムのみ、分離することを見いだした。また、その溶出順位はYMC-PACK A-302 S-5 120A ODSカラムと異なってFig. 2(a)に示したように、 $\delta$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\alpha$ -Tocの順であった。すなわち、構造異性体の $\beta$ -、 $\gamma$ -Tocの溶出順位は順相分配型カラムでの溶出順位に相当し、他はトコールのメチル基の数に比例した溶出順位で逆相分配型カラムの溶出順位と同じであった。これは、SUPELCO SIL-<sup>TM</sup> ABZ+PLUSのアミド基との吸脱着が $\beta$ -、 $\gamma$ -Tocの分離に影響したと考えられる。一方、YMC-PACK A-302 S-5 120A ODSカラムは残存シラノール基(Si-OH)との吸脱着が考えられ、エンドキャッピングが不十分なカラムを利用したものと考えられる。

SUPELCO SIL-<sup>TM</sup> ABZ+PLUSの移動相の水を5%酢

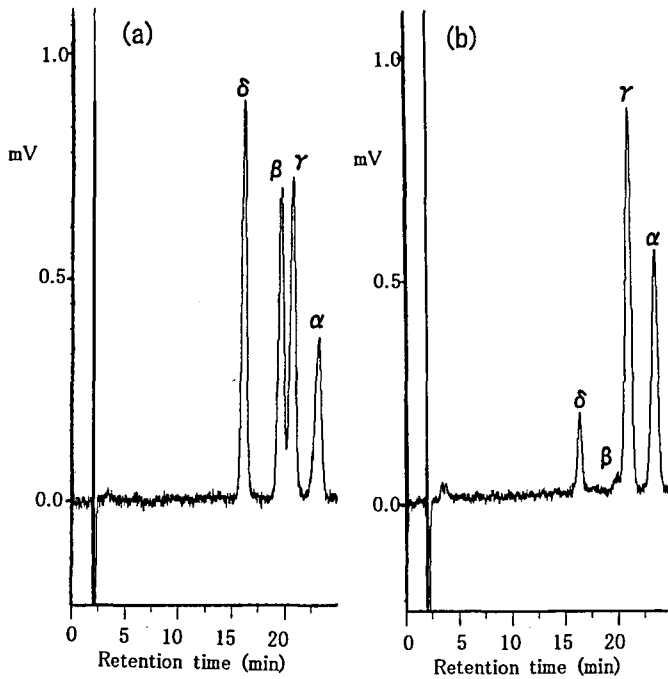


Fig. 2 HPLC chromatograms of standard tocopherols and oily mixed tocopherol  
 a) Each standard tocopherol : 10 µg/ml  
 b) Oily mixed tocopherol, sample B : 40 µg/ml

酸に変更することにより、溶出時間が少し速くなり、ピーク面積は約1.1倍から1.5倍位に増加し、リーディング現象がやや強調された。また、10 µg/ml のβ-及びγ-Tocの分離度(Rs)は、1.38から1.40に上昇した。すなわち、酸性にすることによりカラム内での遊離型Tocの比率が増加してピーク面積が増加し、アミド型 ODS カラムからの脱着がしやすくなったと考えられる。しかし、品質管理においては簡便な方法が利用しやすいため、移動相として

水・メタノール混液を用いることにした。

2. Toc 同族体の溶出時間及びピーク面積のばらつき

4種のToc同族体の標準溶液及び試料溶液の溶媒にエタノールを用いたため、注入量及び注入回数が増加するにつれて溶出時間が早くなる傾向を示した。そこで、標準溶液の注入量を5 µlとした時の各Toc同族体の溶出時間及びピーク面積のばらつきを検討した。Table 2に示したように、溶出時間についてはCV%で0.3%以内に、ピーク面積についてはCV%で3%以内に収まった。また、検量線は2.5 ng~2,000 ngの間で直線関係が成立した。

3. ミックストコフェロールオイル製剤中の各Toc同族体の組成分析

開発したRP-HPLC法を用いて食品添加物ミックストコフェロールの種々のオイル製剤中の各Toc同族体を分析したところ、Table 3に示したように、製剤により組成が非常に異なることが明らかになった。

ミックストコフェロールオイル製剤のHPLCクロマトグラムをFig.2のb)に示した。

組成分析からみると、ミックストコフェロールといっても、試料Eのように、ほとんどδ-Tocだけのものもあった。δ-Tocも既存添加物のひとつであり、その抗酸化力は大きい。したがって、ミックストコフェロール及びδ-Tocの規格を定めることは急務であると考えられる。また、ミックストコフェロールの栄養強化剤への用途を考え合わせると、ミックストコフェロールのRP-HPLC法による組成分析は食品衛生上ばかりでなく、栄養学上からも、非常に有用であると考えられる。

4. LC/MSへの適用

HPLCの移動相は水・メタノール混液であるので、LC/MSによる分析が容易である。そこで、4種のToc同族体の確認手段として、標準溶液についてLC/MS分析を行

Table 2. Retention times and peak areas of tocopherols

Tocopherol	Retention time (min)			Peak area		
	Mean ± S.D.	CV %		Mean ± S.D.	CV %	
α-Toc	23.42 ± 0.07	0.29		14639 ± 479	3.3	
β-Toc	19.76 ± 0.06	0.29		24640 ± 362	1.5	
γ-Toc	20.97 ± 0.06	0.29		25597 ± 81	0.3	
δ-Toc	16.37 ± 0.05	0.31		25376 ± 481	1.9	

n=5

Table .3 Content of tocopherols in oily mixed tocopherol as food additive

Sample	%				
	α-Toc	β-Toc	γ-Toc	δ-Toc	Total
A	6.9 ± 0.3 <sup>a)</sup>	1.1 ± 0.6	37.5 ± 0.1	24.7 ± 0.7	70.2 ± 0.4
B	40.0 ± 0.3	1.3 ± 0.2	35.4 ± 0.1	5.3 ± 0.1	81.9 ± 0.4
C	3.4 ± 0.4	0.6 ± 0.3	26.1 ± 0.4	14.6 ± 0.3	45.0 ± 0.7
D	42.1 ± 1.0	ND <sup>b)</sup>	22.8 ± 0.3	20.7 ± 0.3	85.6 ± 1.5
E	ND	ND	3.2 ± 0.1	78.9 ± 0.2	82.1 ± 0.1
F	13.0 ± 0.2	1.8 ± 0.1	48.3 ± 0.3	29.3 ± 0.4	92.4 ± 0.8

a) Mean ± S.D.(n=3)

b) Not detected (less than 0.5%).

った。その結果,ESIの負モードで $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -及び $\delta$ -Tocの擬分子イオン(M-H)<sup>-</sup>は、それぞれm/z 429.3, 415.2, 415.2, 401.3を示した。また構造異性体である $\beta$ -及び $\gamma$ -Tocのm/zが同一であった。この結果は本HPLC条件下でLC/MSによる各Tocの確認ができることを示している。

#### ま と め

RP-HPLC法を用いて、メタノール-水(88:12)のアイソクラティック条件で、4種のToc同族体の分離定量法を開発し、食品添加物ミックストコフェロールのオイル製剤に適用した。その結果、ほとんど $\delta$ -Tocだけのものも存在することが明らかになった。

RP-HPLC法は、NP-HPLC法に比較して有機溶媒としてはメタノールの使用だけであり、取り扱いが簡単である。また、この方法は、LC/MSにも適用できた。

#### 謝 辞

ミックストコフェロール製剤を供与していただいた日本食品添加物協会(財)、またToc同族体のLC/MS分析をしていただいた横河アナリティカルシステムズ(株)に深謝いたします。

本研究の一部は平成7年度の食品検査費によるものである。

#### 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課：“第一版 化学的合成品以外の食品添加物リスト” pp.44-45 (1989)
- 2) 林 弘道, 宮川あし子, 原田行雄, 一色賢司, 加藤丈夫, 神蔵美枝子, 黒田弘之, 後藤宗彦, 坂部義雄, 佐々木清司, 白石由美子, 西島基弘, 深澤喜延, 横山 剛, 森口 裕, 内山壽紀, 城 照男, 四方田千佳子, 伊藤 誉志男, 栄食誌, **40**, 457-462 (1987)
- 3) 日本食品添加物協会技術委員会編：“第一版 化学的合成品以外の食品添加物リスト注解書(平成三年度版)”, 日本添加物協会, 東京, p215 (1991)
- 4) 日本薬学会編, “衛生試験法・注解”, 金原出版, 東京, pp.353-356 (1990)
- 5) 阿部皓一, 勝井五一郎：ビタミン, **49**, 259-263 (1975)
- 6) Abe, K. and Matsumoto, A.: “Vitamin E-Its Usefulness in Health and in Curing Diseases” (Mino, M. et al., eds.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, pp.13-19 (1993)
- 7) Tamai, H., Manago, M., Yokota, K. and Mino, M.: *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **58**, 202-207 (1988)
- 8) 里村由紀子, 木村美恵子, 平池秀和, 糸川嘉則, ビタミン, **67**, 111-119 (1993)