

ガスクロマトグラフィーによるビタミンEの定量

*石黒 昌孝

Determination of Vitamin E by Gas Chromatography

Masataka ISHIGURO*

*Tokyo Customs Laboratory

5-5-30, Konan, Minato-ku 108, Japan

A gas chromatographic method for the determination of tocopherols was investigated.

Experimental procedure was as follows ; after the saponification, the tocopherols in unsaponifiable matters were purified with thin layer chromatography. After the purification each tocopherols were immediately identified and estimated by gas chromatography on OV-1 at 275°C. The recovery of tocopherol in same sample was approximately 1.57~1.87%. The recovery of tocopherols added into wheat germ oils was approximately 97~99%. It was found that this method was more reproducibility, accurate and simple technique than conventional methods.

—Received Sep. 7, 1982—

1 緒 言

近年ビタミンEの効用が重視されるようになり、小麦はい芽油等健康食品の輸入がふえている。これらの輸入品の中には、ビタミンEを添加した、ビタミンの含有量の多い調製品があり、税番21.07号に分類される。従ってビタミンEの含有量の分析が必要となる場合が多くなっている。

ビタミンEは1925年にEVANSにより発見されたもので、次式で表わされTocopherolであり、X, YへCH₃基とH基の入り方によりα, β, γ, δ, の4つのタイプがある。

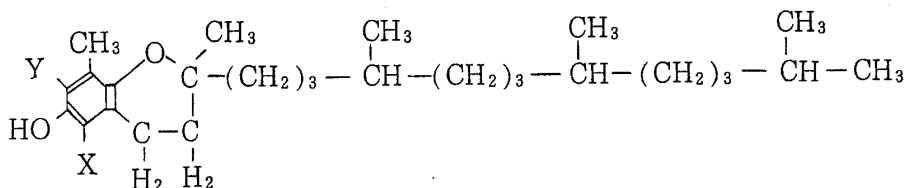


Table 1. Vitamin E content of Natural Food (mg/100g)

	Total Tocopherol	α-Tocopherol	γ-Tocopherol
Wheat germ oil	150~420	100~300	20~30
Soy bean	90~120	10~12	50~70
Corn oil	100~125	9~13	88~110
Cotton seed oil	83~120	41~76	34~38
Palm oil	3~56	1~30	1~3
Rice bran oil	91~100	58	33
Butter	2~3	1~2	
Tea	28	25.9	0.1
Sweet potato	4.1	4	0.1
Pumpkin	1.4	1.2	0.1
Spinach	1.5	1.3	0.1

天然食品中のビタミンEの含有量の1例を示すと、Table 1のとおりである。

今までの研究で、Emmerie Eugel 法¹⁾ Furter—Meyer 法²⁾ Scudi 法³⁾ 硫酸第二セリウムアンモニウム液による容量法⁴⁾ TLC 法⁵⁾ GC 法⁶⁾ HPLC 法⁷⁾ など数々の分析方法が報告されている。

これらの方法の中で阿部氏らのガスクロマトグラフによる方法について、検討を行った結果、分析方法として優れており、良好な結果がえられたので報告する。

2 実験方法

2・1 試薬

エチルエーテル：GR

エタノール：GR

ベンゼン：GR

n-ヘキサン：GR

ピロガロール

n-ドトリアコンタン：TCI-EP

α , β , γ , δ トコフェロール 標準品

2・2 器具

けん化用 100ml 三角フラスコ (褐色)

スキープ型分液ロート：300ml (褐色)

溶媒溜出ナス型フラスコ

薄層クロマト板シリカゲル 60F-254 (メルク社)

2・3 試料の調製

試料として油脂の場合約 1g を褐色三角フラスコに精秤し、5%ピロガロールのエチルアルコール溶液を 4ml と 10%KOH のエチルアルコール溶液 10ml を加え良く混和した後、還流冷却器を付けて、湯煎上で 15 分間加熱して、けん化する。流水で室温に急冷した後、水 20ml を加えエチルエーテル 30ml ずつを用いて、3 回抽出する。抽出液を合わせて、水がフェノールフタレンでアルカリ性を示さなくなるまで水洗する。

水層を捨て、エーテル層を溶媒留去用フラスコに移し入れ、ロータリーエバポレーターでエチルエーテルを留去する。さらにエーテル抽出物の残余にエチルアルコール 5ml を入れ、エバポレーターにて水分を共沸留去して不けん化物をうる。

不けん化物をベンゼン 1ml に溶解しシリカゲル

薄層板の下端 2cm 位の所に帯状に残らず塗付する。その一端からやゝはなれた部分に標準のトコフェロールをスポットし、ベンゼン・メチルアルコール (98:2) を展開溶媒として、約 15cm 展開し風乾する。

紫外線 (254nm) を照射して、標準のトコフェロールを対称してスポットを確認しはく離する。これを小試験管に集めエチルアルコールで 3 回抽出する。抽出エチルアルコール溶液をガラスフィルターでろ過した後、エチルアルコールをロータリーエバポレーターで留去して残留物をうる。これをドトリアコンタン・ヘキサン溶液 (1 mg/ml) 0.5ml 又は 1ml に溶解し、GC の試料とする。GC には 3~4 μ l 注入する。別に標準のトコフェロールを精秤して、ドトリアコンタン・ヘキサン溶液に溶解し GC に注入して、内部標準のドトリアコンタンに対するピーク面積より各トコフェロール含量を算出する。

2・4 ガスクロマトグラフィーの条件

カラム：2% OV-1 on GaschromQ (100~120 Mesh) ガラスカラム 2m/m $\times$ 2mm

カラム温度：275°C

注入温度：300°C

ガス：N₂ 1.8K g/cm²

H₂ 0.6K g/cm²

air 0.5K g/cm²

3 結果と考察

3・1 標準品のガスクロマトグラム

α - β - γ - δ のトコフェロールの標準品のガスクロマトグラムを示したのが、Fig 1 である。分子量の少ない順に δ -トコフェロールが最初のピーク、次に β -トコフェロールと γ -トコフェロールが同一のピークとしてあらわれ、最後に α -トコフェロールのピークが認められる。

次に内部標準として n-ドトリアコンタンを添加したトコフェロール標準品のガスクロマトグラムを示したのが Fig. 2 である。内部標準としてドトリアコンタンがピークの位置などからみて適当であることが判る。

Fig. 3 は小麦胚芽油を本法により分析した結果を示したガスクロマトグラムである。このガスクロマ

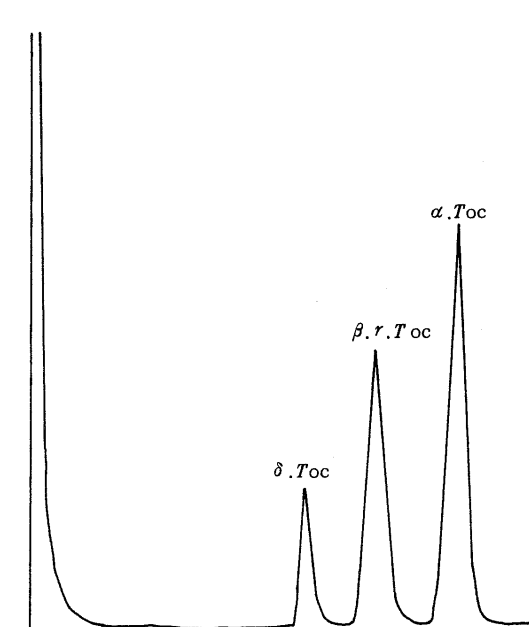


Fig.1 Gaschromatogram of tocopherol mix

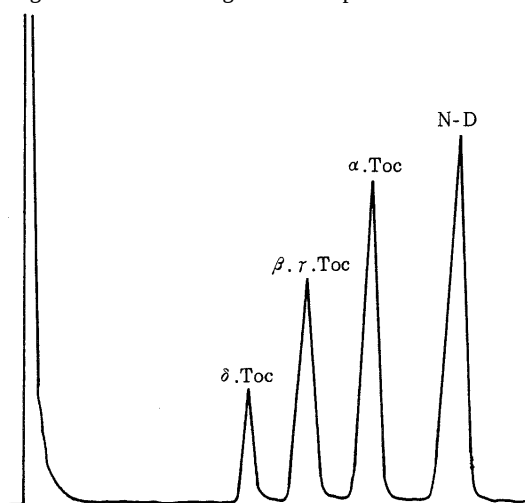
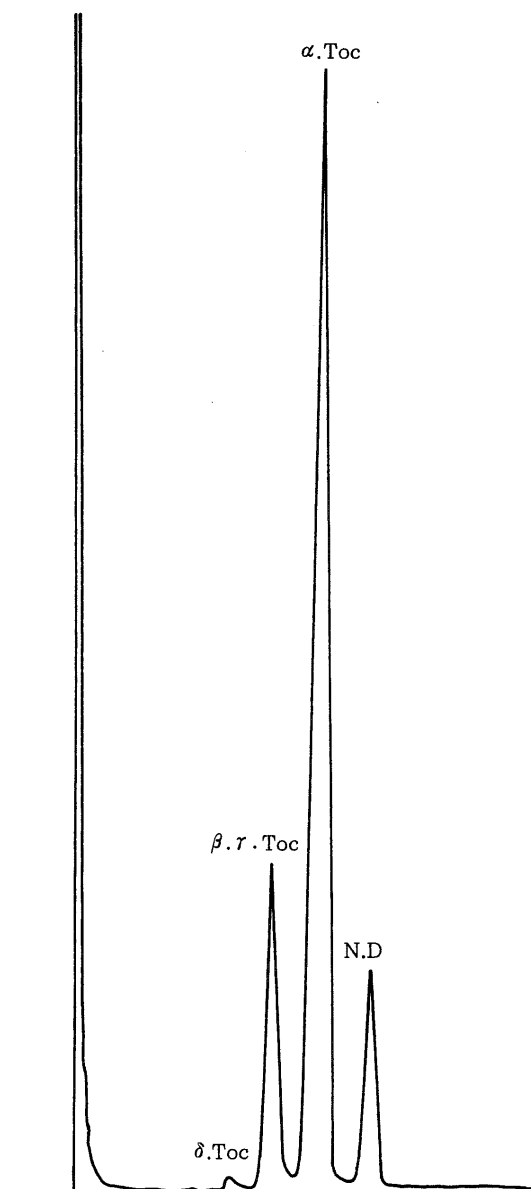


Fig.2 Gaschromatogram of tocopherol mix and N-Dotoriacontane

Fig.3 Gaschromatogram of α -Tocopherol added Wheat Germ Oil

トグラムより、 α -トコフェロール含量がいちじるしく、多く含有しており、 α -トコフェロールを添加したことが判定される。

3・2 TLC処理による回収率

本法では、油脂等に含まれているステリン類等の妨害物質を除去し、トコフェロールを分離するために TLC を用いているため TLC 処理によるトコフェ

ロールの回収率が、実験の精度に影響を与えるので検討を行った。

Table 2 は TLC 処理によるトコフェロールの回収率を示したものである。Table 2 で明らかなようにステリン類を添加した場合も含めて、回収率は 96% 以上であり、TLC 処理による損失は少なく、良好な結果がえられることが判った。

Table 2 Recovery of tocopherol by TLC procedure

No		added(mg)	Analysis(mg)	Recovery (%)
1	α -Tocopherol	0.45	0.43	96
2	r -Tocopherol	0.36	0.35	97
3	δ -Tocopherol	0.61	0.60	98
4	α -Toc r -Toc δ -Toc Mixture	0.82	0.79	96
5	Cholesterol + α -Tocopherol	0.55	0.54	98
6	Phytosterol + α -Tocopherol	0.52	0.53	102

3・3 実験結果の再現性

実験の精度を検討するために、同一試料についての再現性の実験を行なった。試料としては、A サンプルとして小麦胚芽油を用い、B サンプルとしては小麦胚芽油に α -トコフェロール 150mg/100g および γ -トコフェロール 61mg/100g を添加して調製したものの二種類を用いた。Table 3 に示すように、A サンプルの標準偏差は 1.57mg/100g であり、B サンプルの標準偏差は 1.87mg/100g であり、いずれも良い結果を示しており、良い定量値がえられることを示している。

Table 3 Recovery of tocopherol in Same Sample

Sample No	Wheat Germ Oil	Wheat Germ Oil + α -Tocopherol 211mg/100g r -Tocopherol
A	242 mg/100g	452 mg/100g
B	238	450
C	239	447
Average	239.7	449.7
σ	1.57	1.87

3・5 添加法による回収率

次に同一試料の小麦胚芽油に α -トコフェロールの添加量を変えて添加した場合の回収率について検討を行なった。Table 4 にみられるように A, B, C,

D のいずれの場合も 3% 以内の誤差で回収されることが判った。従って、本法はかなり良い結果がえられることを示している。

Table 4 Recovery of tocopherol added into wheat germ oil

No	Sample Tocopherol Content	α -Tocopherol added	Analysis	Recovery	Recovery Ratio
A	239 mg/100g	53 mg/100g	291 mg/100g	52 mg/100g	98%
B	239	110	346	107	97
C	239	211	449	209	99
D	239	312	546	307	98

3・6 本法による輸入品の分析結果

輸入品について、本法により分析して、えられた結果を示したのが Table 5 である。小麦胚芽油のトコフェロール含量は 0.24% から 0.3% 程度であり、それ以上含有している場合は、添加したものと考えられる。又 Energol のごとく、大豆油、小麦胚芽油、米ぬか油 α -トコフェロールの調製品は税番 21.07 号に分類されることとなった。

Table 5 Analysis of Imported Sample

No	Sample	Tocopherol Content	Tariff No	Remark
A	Wheat germ oil	0.24%	1507	Ritter
B	Natural grain oil	5.10%	2107	YNO30
C	Wheat germ oil	2.40%	2107	WOSP1
D	Wheat germ oil	5.06%	2107	WOSP3
E	Wheat germ oil	8.41%	2107	WOSP4
F	Soy bean oil	0.07%	1507	U.S.A
G	Energol Soy-Wheat germ Rice bran α -Toc	0.49%	2107	EC5
H	Wheat germ oil	0.30%	1507	Viobin
I	Weizen Keimöl	0.26%	1507	Keimdiatöl

要 約

ガスクロマトグラフ法による、ビタミン E (トコフェロール) の定量法について検討を行った。試料をけん化して、不けん化物が TLC でトコフェロールを分離し、GC 法でドトリアコンタンを内部標準として定量する本法は、良好な結果がえられることが判った。

TLC 処理による回収率、同一試料による再現性、添加法による回収率、いずれも満足すべき結果がえられた。

本法を輸入品に応用して、有効な結論をうること

ができた。Emmerie Engel 等の比色法では発色条件等で定量結果に相違がみられ、HPLC 法では当関に装置がなく、経費上の難もあり、比較的迅速で、正確で良好な結果がえられる。ガスクロマトグラフに

よる本法は、税関分析に推奨できる方法といえる。

終りに標準品を載き、種々御教示載いた、エーザイ K K の阿部皓一博士と実験に御協力を載いた東京税関分析室の諸氏に深謝致します。

文 献

- 1) Emmerie, Engel : Rec.Trav.Chim, **57**, 1351 (1938)
- 2) Furter, Meyer : Helv. Chim. Acta. **22**, 240 (1939)
- 3) Scudi, Buhs : J.Biol. chem **141**, 451 (1941) **146**, 1 (1945)
- 4) 日本薬局法 No. 9 C-974
- 5) 津郷友吉, 山内邦男, 菅野長右エ門 : 農化, **42**, 367 (1968)
- 6) 阿部皓一, 勝井五一郎, 湧口泰昌 : 栄養と食糧, 27, 329 (1974)
- 7) 阿部皓一, 勝井五一郎 : 栄養と食糧, **28**, 453 (1975)