

ノート

高速液体クロマトグラフ法によるビタミンEの定量分析

高橋 貴弘, 岩瀬 謙一, 古賀 哲, 笹川 邦雄*

Determination of Vitamin E by HPLC

Takahiro TAKAHASHI, Ken'ichi IWASE, Satoshi KOGA, Kunio SASAKAWA*

Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271-0076 Japan

A HPLC method for the determination of tocopherols in vegetable oil and its preparations was investigated.

The GC method which is used as the analytical method for that in our laboratory has problems. Those are the complications of experimental procedure and no separation of α - and γ -tocopherols.

The HPLC separation was performed on a 4.6 mm I.D. \times 250 mm SIL-5 B column (column temperature 30 $^{\circ}$ C) with a mobile phase of n-Hexane : iso-Propyl alcohol (100 : 1) at a flow rate of 1.0 ml/ml. UV detection was performed with a wave length of 300 nm.

It was found that the HPLC method is free from those problems and more useful than the GC method in our laboratory.

1. 緒 言

近年、様々な健康食品が市場に出回っており、健康に対する国民の意識が強く感じられる。それら健康食品は、栄養強化を目的とした食品添加物を加え、調製食料品という形で輸入されることが多い。

ビタミンEは、食品添加物中でも栄養補助の目的で特に有用な成分であり、しばしば植物油などに強化ビタミンとして添加される。また、酸化防止剤としても一般的に利用される。

ビタミンE効力を持つ Tocopherol として4つのタイプ (α , β , γ , δ) が良く知られており、通常、栄養補助の目的で添加されるものは、その効果がもっとも大きい α -Tocopherol である。

現在、ビタミンEの分析方法としては、税関参考分析法 19 「小麦胚芽油中のビタミンEの定量分析」が用いられており、すでに関税週報などで一般に公開されている。しかし、この分析法は GC による定量法で、2つの問題点、 α -ケン化等の前処理が非常に煩雑であり熟練を要する、 β -及び γ -Tocopherol が分離されず、4種類の正確な一斉定量分析が困難である、が指摘されている。

また、同分析法は、昭和 59 年に作成されているが、上記問題

点解決のための検討は行われておらず、早期に迅速・簡便な分析法を確立する必要がある。

ビタミン E は脂溶性であるため、ほとんどの分析対象試料は油脂が主要成分となることから、油脂の影響を受けず、上記問題点を解決できる高速液体クロマトグラフ法（以下 HPLC 法）について検討したので報告する。

2. 実 験

2. 1 分析試料

綿実油：（油臘薬品）

紅花油：（味の素）

小麦胚芽油：（SIGMA）

ごま油、落花生油：（関東化学）

オリーブ油、大豆油、とうもろこし油：（和光純薬）

ビタミンE調製品：輸入市販品（原材料名：大豆油、ゼラチン、グリセリン、小麦胚芽油）

2. 2 標準試薬

α -, β -, γ -Tocopherol（和光純薬）

2, 2, 5, 7, 8-Pentamethyl-6-hydroxychroman（和光純薬）：
内部標準（以下 PMC）

*大蔵省関税中央分析所 〒271-0076 千葉県松戸市岩瀬 531

2-Methyl-2-phytyl-6-hydroxychroman (エーザイ)

: 内部標準 (以下 MPC)

2.3 装置

高速液体クロマトグラフ装置: HP1100

カラム: shodex SIL-5 B 4.6 mm I.D. × 250 mm

カラム槽温度: 30

移動相: n-Hexane : iso-Propanol (以下 IPA) = 100 : 1

移動相流量: 1.0ml/min

検出波長: UV300nm

2.4 実験方法

2.4.1 移動相の検討

Tocopherol 類及び内部標準の分離溶媒として, n-Hexane と IPA の混合溶媒が一般的に用いられており, その最適混合比について検討を行った。

2.4.2 検出波長の検討

Tocopherol 類の吸収極大が 300nm 付近に存在することから検出波長 300, 280, 290, 310nm について検討を行った。

2.4.3 実験方法

綿実油, 紅花油及び小麦胚芽油 300mg 又は 600mg を精秤し,

内部標準ヘキサン溶液 (0.5 mg/ml) を 1 ml 加え, n-Hexane で 10ml に希釈する。その一定量を HPLC に注入して内部標準と標準 α -Tocopherol の面積比を求め, 検量線法により分析試料中の α -Tocopherol 量を算出する。

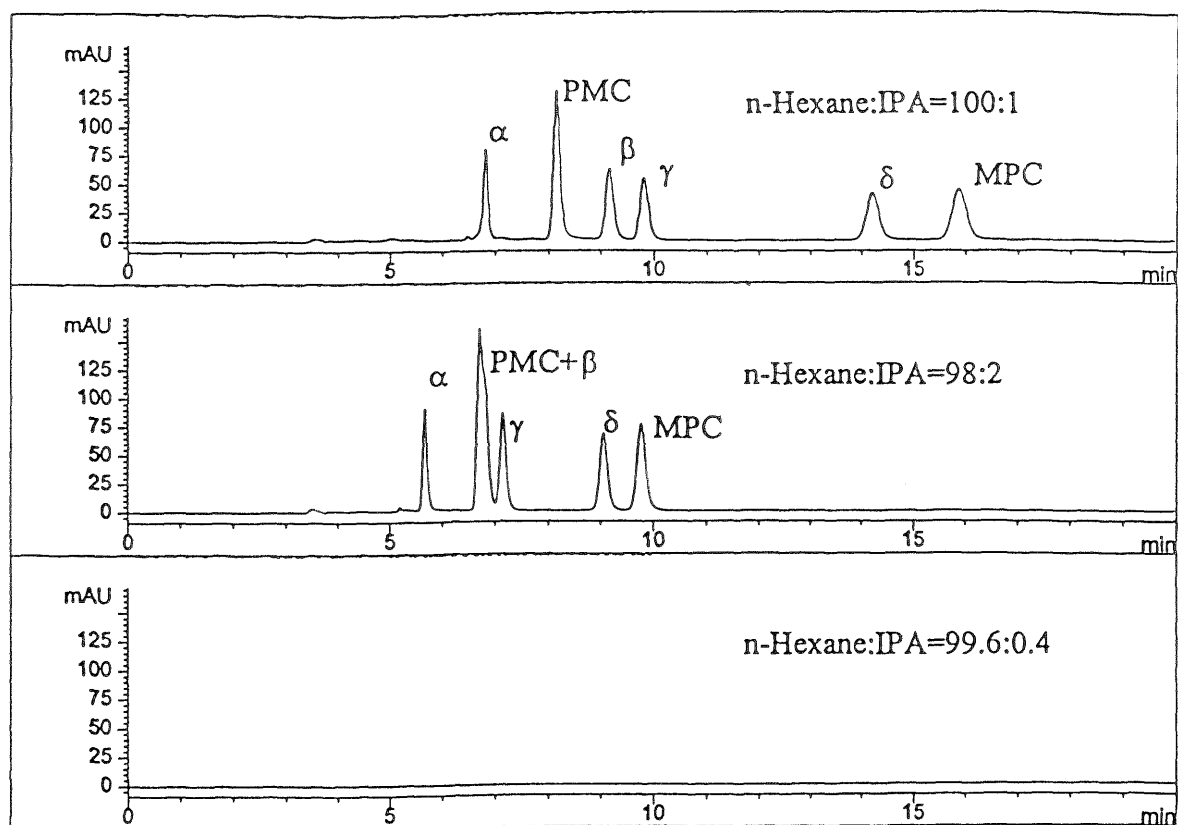
3. 結果及び考察

3.1 分析条件

3.1.1 移動相の検討

n-Hexane と IPA の最適混合比について検討を行った結果を Fig. 1 に示す。n-Hexane : IPA = 99.6 : 0.4 の混合溶媒を用いた場合のクロマトグラムからは, 100 分まで分析を行ったが, ピークを検出できなかった。

目的成分の分離状態及び分析所要時間を考慮して, n-Hexane : IPA = 100 : 1 を採用したこの条件では, 保持時間順に, α -Tocopherol, PMC, β -Tocopherol, γ -Tocopherol, δ -Tocopherol, MPC の順に溶出し, 各ピークは完全に分離できることが確認された。



Column; SIL-5B 4.6mm*250mm (30Cdeg)
Mobile Phase; HEXANE:IPA 1.0ml/min
Detector; UV 300nm

Fig1. Effect of IPA concentration on HPLC separation of tocopherols and internal standards.

3.1.2 検出波長
 検出波長の検討を行った結果を Fig. 2 に示す。Tocopherol

類及び内部標準の検出感度を考慮して検出波長 300nm を採用した。

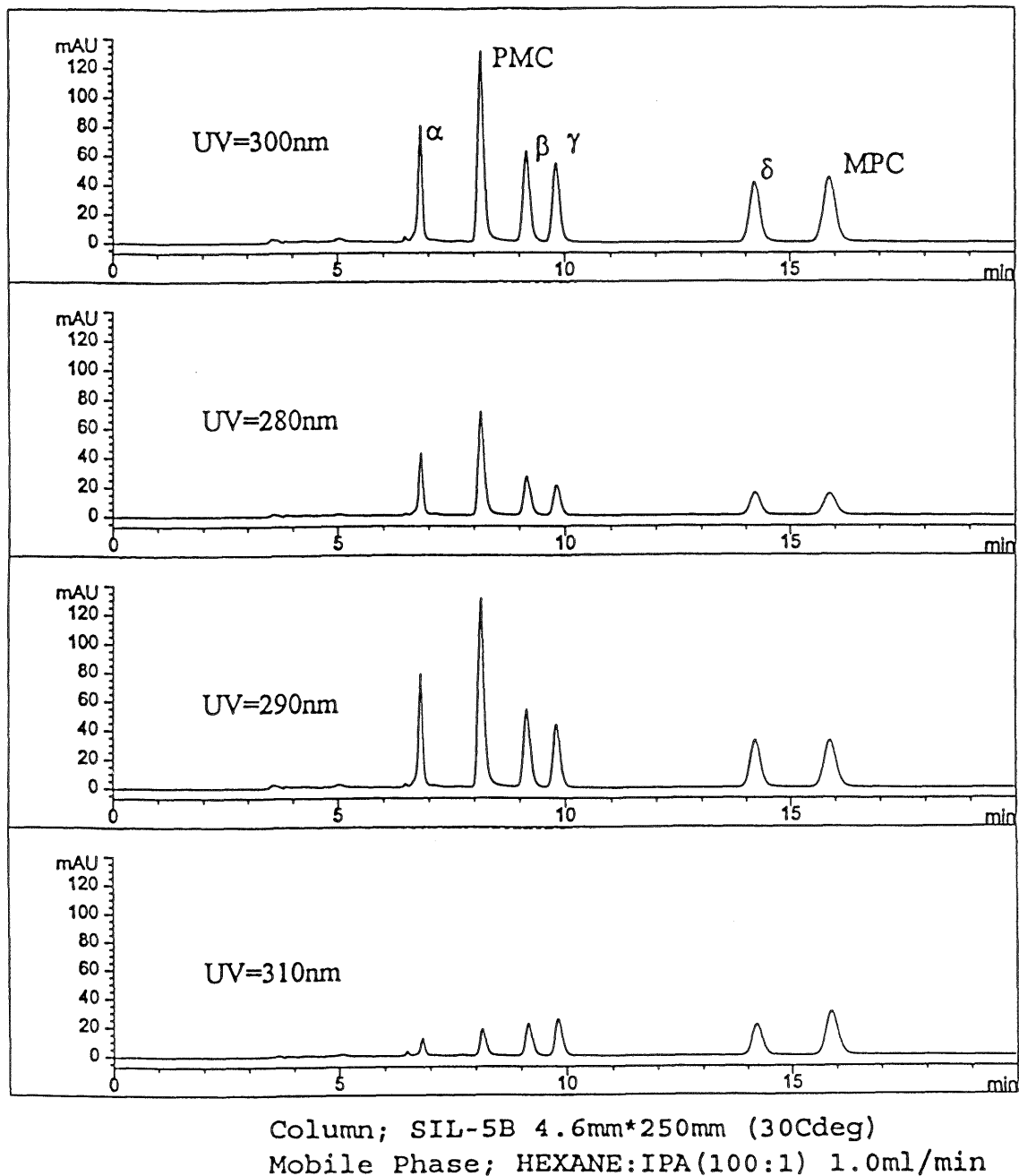


Fig.2 Liquid chromatograms of tocopherols and internal standards under 4 different wavelength conditions.

3.2 標準品の高速度液体クロマトグラム

主要植物油の高速度液体クロマトグラムを Fig. 3 に示す。それぞれの油脂に含まれる Tocopherol 類の良好な分離が確認された。また、一方の内部標準のリテンションタイムの位置にきょう雑物のピークが存在する場合、他方の内部標準を用いて定量分析を行うことができる。

3.3 Tocopherol 類の検量線

一定濃度の内部標準及び濃度の異なる Tocopherol のヘキサン溶液を 5 点作成し、面積比と重量比の関係から一次近似直線を引いたものが Fig. 4 である。この濃度範囲における Tocopherol 類の検量線は、良好な直線性を示す。

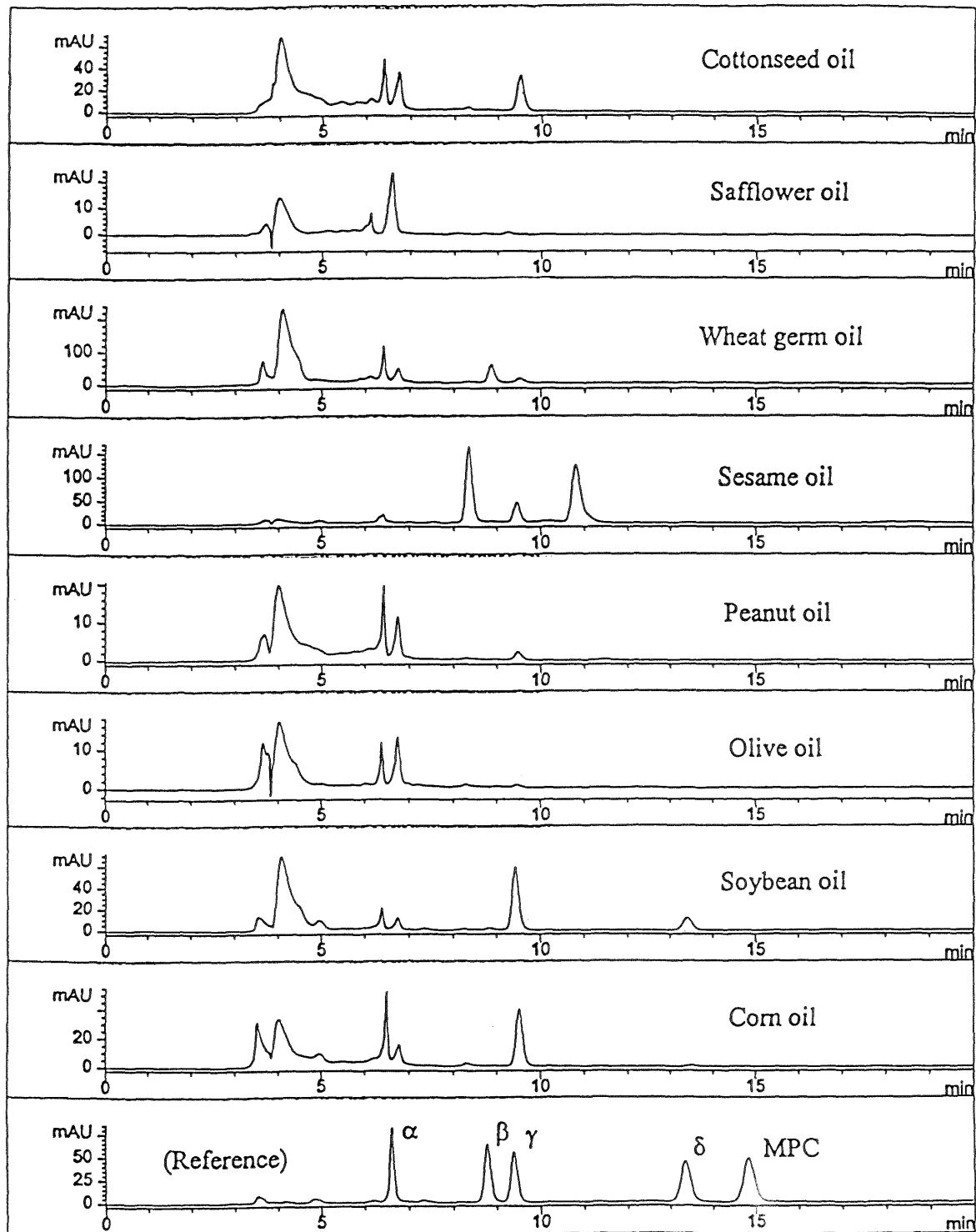
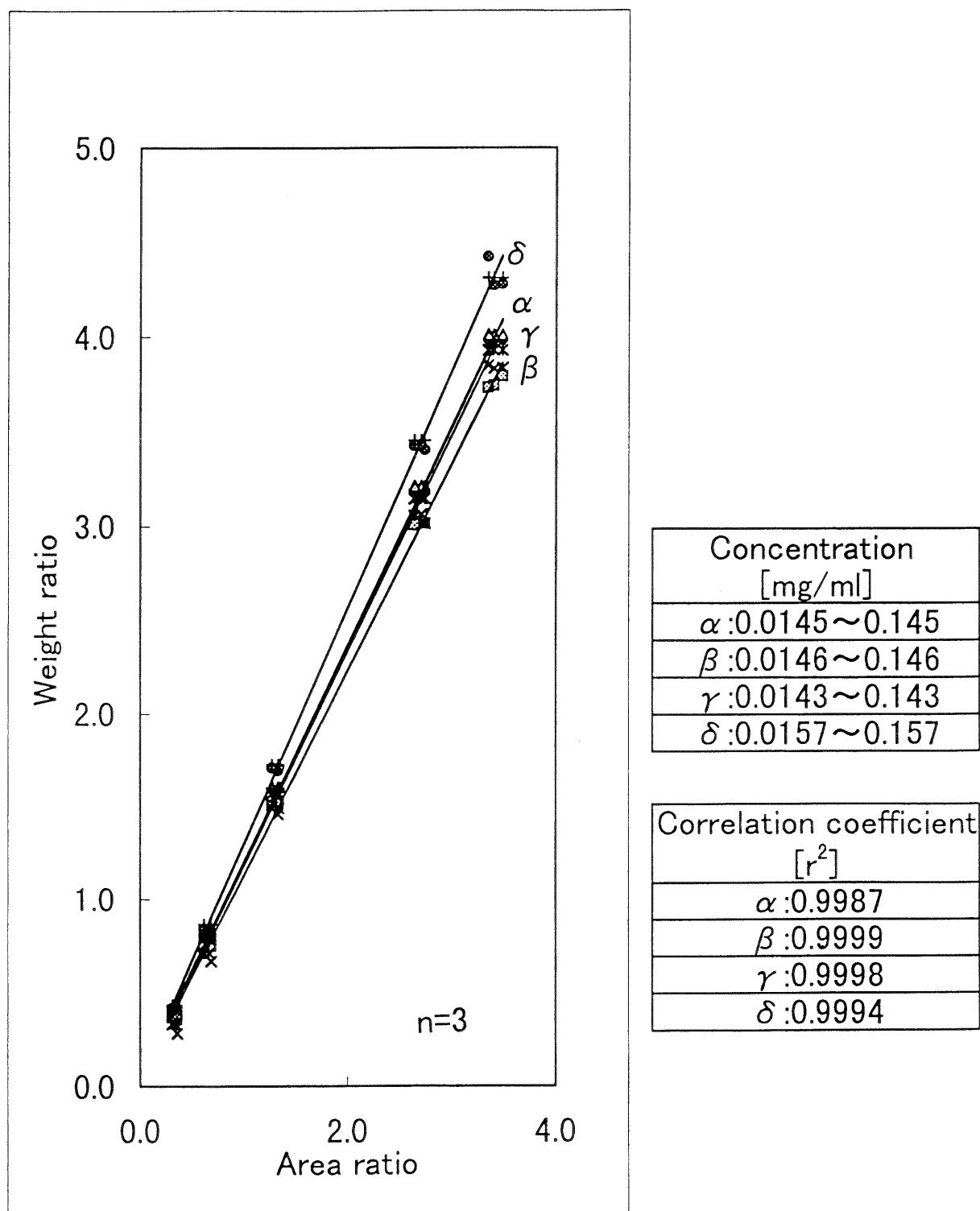


Fig.3 Liquid chromatograms of vegetable oils. Condition as Fig.2 except for detector; UV 300nm.

Fig.4 Calibration curves of α -, β -, γ -, δ -tocopherols

3.4 α -Tocopherol 定量結果及び再現性

綿実油、紅花油及び小麦胚芽油中の、 α -Tocopherol 定量結果及び変動係数を Table. 1 に示す。それぞれの植物油の変動係数は小さい値を示し、再現性は良好であった。

また、内部標準 PMC を用いた綿実油、紅花油の α -Tocopherol 定量結果について見ると、試料採取量の違いにより定量結果が僅かに異なっているが、内部標準 MPC を用いた小麦胚芽油の α -Tocopherol 定量結果には差がほとんど見られない。これは、綿実油及び紅花油のクロマトグラムにおいて、内部標

準 PMC のピークの位置に植物油由来のごく僅かなきょう雑物ピークが存在し、これが定量結果に影響を与えたためと考えられる。このことから、 α -Tocopherol 類の分析においては内部標準の選択が重要であると言える。

3.5 添加法による回収率

次に、綿実油、紅花油及び小麦胚芽油に、 α -Tocopherol を一定量添加した場合の回収率について検討を行った。Table. 2 に示すようにいずれの植物油の場合も良好な結果が得られた。

Table1 α -Tocopherol content in some oils.

	Sample concentration ^{*1} [mg/ml]	Content ^{*2} [%]	C.V [n=10]	ISTD
Cottonseed oil	302.1	0.0407	0.611	PMC
	602.9	0.0368	0.596	
Safflower oil	302.5	0.0473	1.318	PMC
	603.5	0.0404	1.444	
Wheat germ oil	328.1	0.0445	1.960	MPC
	624.5	0.0444	1.353	

*1 Average of 10 samples.

*2 Average of 10 determinations.

Table2 α -Tocopherol recovery study.

	Sample ^{*1} concentration [mg/ml]	α -Tocopherol added [mg]	Determination ^{*2} [mg]	Recovery ^{*3} [%]
Cottonseed oil	303.0	1.515	1.587	96.6
	597.8	1.515	1.677	96.2
Safflower oil	304.7	1.515	1.706	103.1
	599.8	1.515	1.825	104.5
Wheat germ oil	300.0	0.510	0.670	105.2
	602.7	0.510	0.818	106.3

*1 Average of 10 samples.

*2 Average of 10 determinations.

*3 Average of 10 recoveries.

$$\text{Recovery} = \frac{\text{Determination} - \{ \text{Sample concentration} * \alpha\text{-Tocopherol content (Table.1)} \}}{\alpha\text{-Tocopherol added}} * 100$$

3.6 ビタミンE調製品（輸入品）の高速液体クロマトグラム

ビタミンE調製品（輸入市販品）について本法により分析して得られた高速液体クロマトグラムを Fig. 5 に示す。

ビタミンE調製品として市販されているものは、通常、 α -Tocopherol 濃度が非常に高く、数%～数十%添加している。

文献によれば、 α -Tocopherol をもっとも多く含む植物油として小麦胚芽油がよく知られているが、その含有量は 0.1～0.3% 程度である。これらのことを考慮すれば、 α -Tocopherol を大量に添加したビタミンE調製品について定量分析を行う時、3.4 で述べた様な原料植物油に由来するきょう雑物ピークの影響はほとんどないと考えられる。

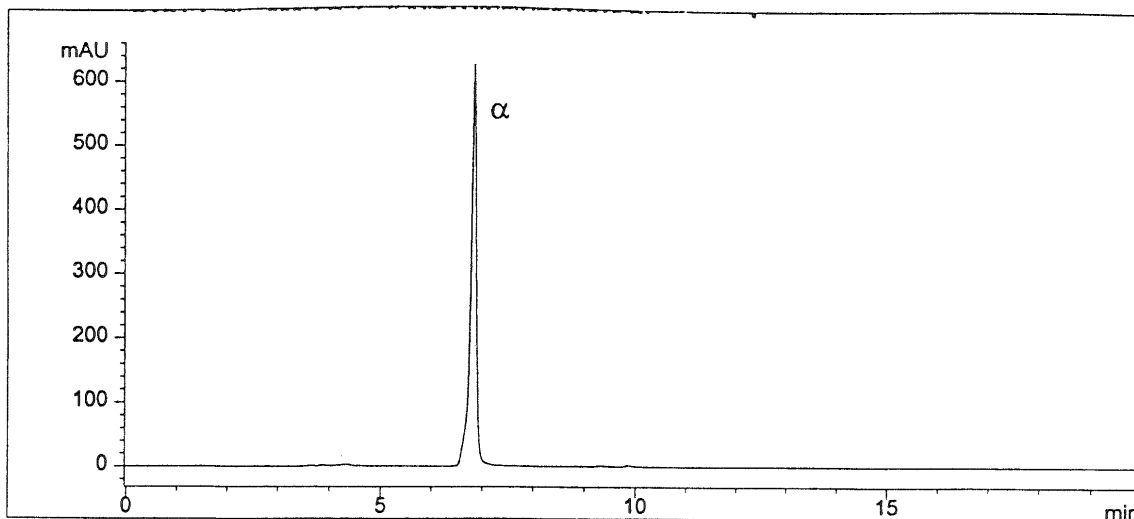


Fig.5 Liquid chromatogram of the imported sample.
Condition as Fig.2 except for detector ; UV 300nm.
Sample concentration ; 70.2mg/100ml.

3.7 参考分析法との比較

現参考分析法（GC 法）と HPLC 法の分析手順について比較したフローチャートを Fig. 6 に示す。このフローチャートから、HPLC 法は試料前処理が非常に簡便であることがわかる。

現参考分析法においては、 α -及び β -Tocopherol が分離されず、Tocopherol 類の正確な一斉定量分析が困難であることが知られているが、HPLC 法においてはその問題が解決されてい

る。

綿実油中の γ -Tocopherol について、現参考分析法及び HPLC 法の定量値を比較したものを Table. 3 に示す。この結果、両分析法による定量値に大きな差は見られないが、HPLC 法は変動係数が非常に小さく、再現性良く定量分析が行える。

以上のことから、HPLC 法は、Tocopherol 類の定量分析法として現参考分析法よりも有効な分析方法であると言える。

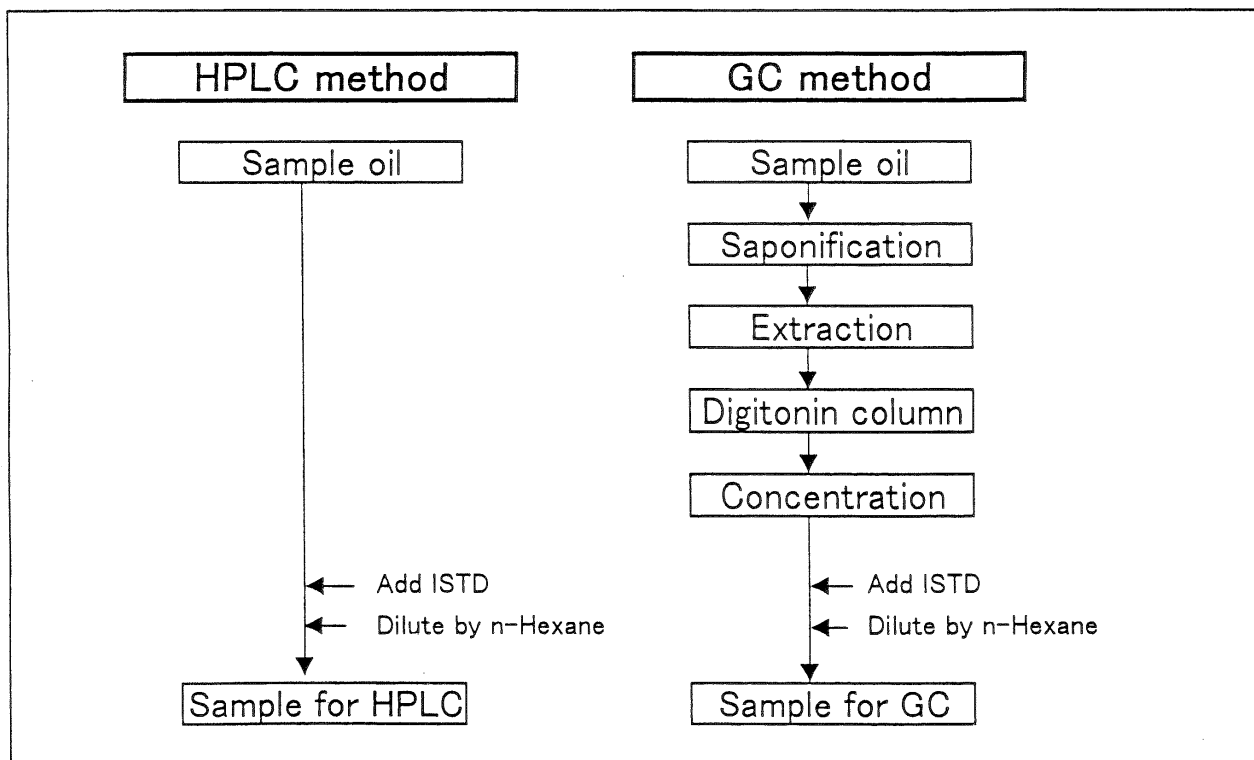


Fig.6 Flow chart of the analytical methods for the determination of tocopherols by HPLC and GC.

Table3 α -Tocopherol content in cottonseed oil by HPLC and GC.

	Content [%]	C.V
HPLC	0.0407 ^{*1}	0.611 (n=10)
GC	0.0380 ^{*2}	2.255 (n=6)

*1 Average of 10 determinations.

*2 Average of 6 determinations.

4. 要 約

内部標準を用いた高速液体クロマトグラフ法を用いることにより、ビタミンE（ α , β , γ , δ -Tocopherol）の定量分析について検討を行った。この分析方法は、前処理が非常に簡便であり、 α , β , γ , δ -Tocopherol の分離が可能であった。 α -Tocopherol の定量分析においては、再現性及び添加回収率について良好な結果が得られた。

高速液体クロマトグラフ法は、Tocopherol 類の定量分析法として現参考分析法よりも有効な分析方法であると言える。

最後に、この研究に内部標準試料の提供等ご指導ご協力をいただいた、エーザイ株式会社江間氏に謝意を表します。

文 献

- 1) 石黒 昌孝：本紙 23 , p.95 (1983)
- 2) 石黒 昌孝：本紙 24 , p.45 (1983)
- 3) A.P. Carpenter , JR. ; Journal of oil chemist's society, vol 56, p.668(1979)
- 4) 藤谷 健：油化学 , 28, p.468 (1979)
- 5) 兼松 弘ら：油化学 , 31, p.456 (1982)
- 6) 中里 敏ら：油化学 , 36, p.506 (1987)
- 7) Barrie Tan, Linda Brzuskiwicz ; Analytical Biochemistry, vol 180, p.368 (1979)
- 8) 日本ビタミン学会編：ビタミン学実験法 , 東京化学同人 , p.468 (1979)
- 9) 日本ビタミン学会編：ビタミンハンドブック ビタミン分析法 , 化学同人 , p.27 (1979)