

高速液体クロマトグラフィーによる加工食品中の トコフェロールの分析法

富永 泰子・丸山美奈子・白井 文男

1 はじめに

食品衛生法の改正に伴い、平成3年7月1日からそれまで表示義務の無かった天然の添加物についても、表示が義務づけられたが、その表示の実施状況等の実態は明かではない。また、これら天然添加物の測定法は一部について、昭和60年3月に「食品中の天然食品添加物分析法試案」¹⁾が出されているものの、公定法としては未だ示されていない。

ビタミンE作用物質であるトコフェロールは、ダイズやアブラナ等の植物の油脂から分離精製され、天然の食品添加物として酸化防止や栄養強化の目的で油脂や加工食品等に広く使用されている。

トコフェロールは自然界に α -、 β -、 γ -、 δ -の4種の同族体が存在し、それぞれの抗酸化力は α -を100とした場合 β -:45、 γ -:10、 δ -:<1と大きく異なる²⁾。これらを分離定量するための方法として、薄層クロマトグラフ-吸光度法³⁾、ガスクロマトグラフ(GC)法⁴⁾、高速液体クロマトグラフ(HPLC)法⁵⁻⁷⁾等が報告されている。このうちHPLC法は他の2法に比べ感度が100倍以上も高く、定量における精度の上でも優れている⁷⁾。特に食品等を対象にした場合は、GC法では油脂が妨害となるのでケン化等の精製操作が必要であるのに比べ、蛍光検出器を用いたHPLC法は選択性に優れており、特別な精製操作なしに迅速に分析することができる。トコフェロールは脂溶性であるため、目的物質を脂質と一緒に抽出することになるが、その抽出条件によりトコフェロールの定量値が左右されるといわれている⁸⁾。そこで、ここではHPLCを用いた加工食品中のトコフェロールの分析法について、抽出方法を中心に検討した。さらに、この分析法を用いて一部加工食品中のトコフェロール含有量について調べたので報告する。

2 方 法

2.1 試薬等

α -、 β -、 γ -、 δ -トコフェロール：エーザイ製生化学分析用試薬それぞれ100mgをヘキサンに溶かして100mlとして1,000 μ g/ml溶液を調製した。これを順次ヘキサンで希釈して用いた。

2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-ヒドロキシクロマン(PMC)：エーザイ製生化学分析用試薬を用いた。

ヘキサン、ジオキサン：和光純薬工業製、HPLC用試薬を用いた。

イソプロピルエーテル：ナカライテスク製、安定剤無添加の特級試薬を用いた。

その他はすべて特級試薬を使用した。

HPLC注入用前処理フィルター：ジールサイエンス製、0.45 μ m、非水系クロマトディスクを用いた。

2.2 試料

分析法の検討及びトコフェロールの測定に用いた試料は、市販されている加工食品で、表示等により酸化防止等の目的で添加されているもの、もしくは含有していると予想されるものを対象とした。

2.3 試料の調製

トコフェロールの抽出法の検討及び含有量の測定に当たっては、固形の食品は予め粉砕器で細砕して用いた。

2.4 装 置

HPLC：日本分光製、LC-800シリーズ

蛍光検出器：日本分光製、FP-210

粉砕器：柴田科学製、SCM-40 A

ロータリーエバポレータ：ヤマト科学製、RE-47型

2.5 HPLC測定条件

HPLC測定条件を表-1に示した。

なお、カラムはジールサイエンス製のInertsil-sil(4.6mm×150mm)及びNucleosil-NH₂を用いた。

表-1 HPLC測定条件

	(1)	(2)
カラム：	Inertsil-sil 4.6mm×150mm	Nucleosil-NH ₂ 4.6mm×250mm
移動相：	ヘキサン/イソプロピル エーテル(85:15)	ヘキサン/ジオキサン/ エチルエーテル(97:2:1)
流速：	0.6ml/分	0.8ml/分
カラム温度：	40℃	40℃
検出器：	蛍光検出器	蛍光検出器
励起波長：	298nm	298nm
蛍光波長：	325nm	325nm

3 結果及び考察

3.1 HPLC測定条件の検討

トコフェロールの最適測定条件を知るため、 α -、 β -、 γ -、 δ -トコフェロールのヘキサン溶液での励起スペクトル及びけい光スペクトルを測定したところ、図-1のように4物質とも、ほぼ同様なスペクトルが得られた。この結果から、測定波長を励起波長 295 nm、蛍光波長 325 nm とした。

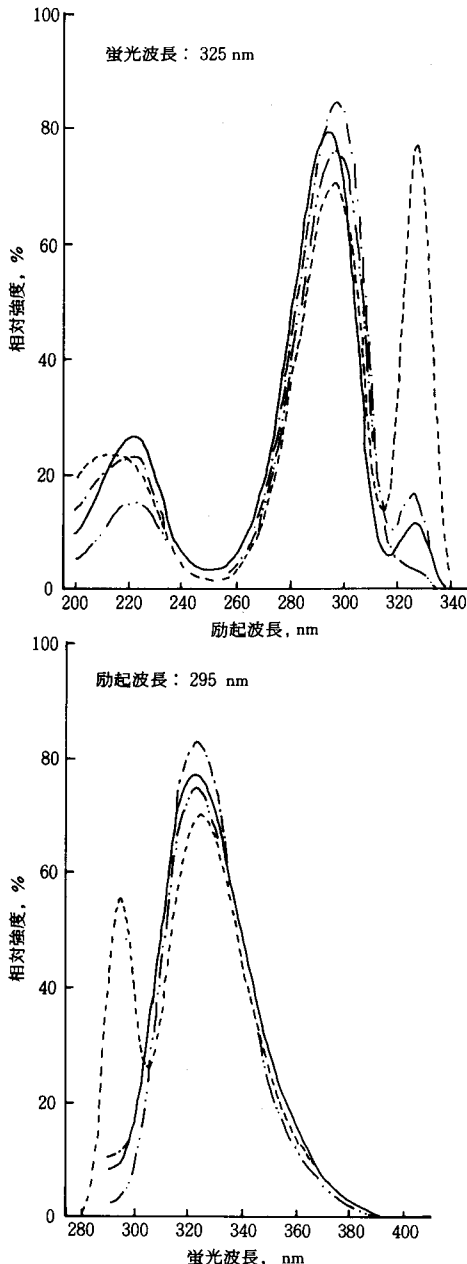


図-1 トコフェロールの励起及び蛍光スペクトル
— : α , - - : β , - · - : γ , --- : δ

トコフェロールのHPLC測定用カラムについては、種々のカラムを用いた報告があるが、逆相型のカラムにおいては β -体と γ -体の分離は難しいといわれている⁹⁾。そこで、順相系のカラムのうち、シリカゲルカラムと NH_2 カラムについて検討した。シリカゲルカラムは4.6 mm $\times$ 150 mmのInertsil-silで、移動相を15%イソプロピルエーテル含有ヘキサン溶液としたところ、各同族体の分離が良好でピークのテーリングも見られなかった。また NH_2 カラムは4.6 mm $\times$ 250 mmのNucleosil- NH_2 を使用し、2%ジオキサン、1%エチルアルコール含有ヘキサン溶液としたところ分離が良好となった。両カラムにおけるトコフェロール標準品のHPLCクロマトグラムを図-2に示した。いずれも、トコフェロールの測定に有効であると考えられる。

ろ過による前処理を含めたHPLC測定における精度を高めるため、内部標準としてPMCを用いることとした。

3.2 抽出方法の検討

(1) 固形食品からの抽出法

油脂や脂肪のようにヘキサンに溶解するものはヘキサン溶液のまま測定できるが、固形の食品の場合には抽出操作が必要となる。抽出方法にはいくつか報告されており、①ヘキサンを加えて1時間還流抽出する⁹⁾、②クロロホルム/メタノール混液により振とう抽出する¹¹⁾、③試料をお湯に懸濁させ放冷したのち、塩化ナトリウム及びエタノールを加えてヘキサンで抽出する¹⁾、④水酸化カリウム溶液を加え水浴上でケン化し、不ケン化物をエチルエーテルで抽出する方法¹⁾等がある。そこで、酸化防止剤としてトコフェロールを使用している即席めんと、食品中の成分としても含まれているピーナッツを試料とし、上記の4種の抽出法を比較検討した。

結果を表-2に示した。即席めんでは①のヘキサンによる還流抽出と②のクロロホルム/メタノール混液による抽出法が高い値となったが、ピーナッツでは①の方法

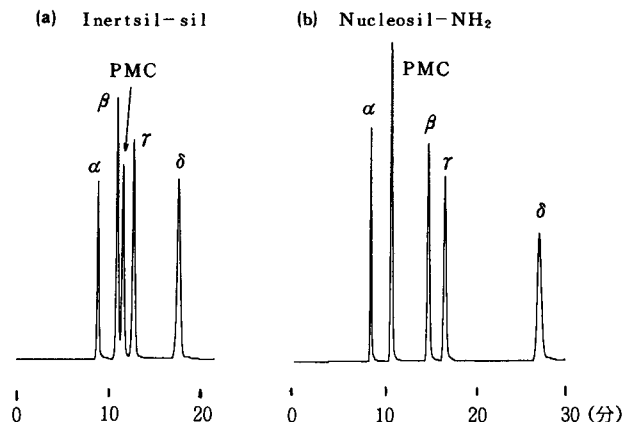


図-2 順相系の2種類のカラムによるHPLCクロマトグラム

表-2 各種抽出法によるトコフェロール測定値

(単位: $\mu\text{g/g}$, $n=3$)

抽出方法	即 席 め ん				ピ ー ナ ッ ツ			
	α -トコフェロール	β -トコフェロール	γ -トコフェロール	δ -トコフェロール	α -トコフェロール	β -トコフェロール	γ -トコフェロール	δ -トコフェロール
ヘキサン 還流抽出 ⁴⁾	11 (4.7)	<2	20 (4.1)	15 (2.3)	41 (4.9)	<2	41 (3.0)	3.1 (2.4)
クロロホルム/ メタノール抽出 ¹⁰⁾	9.2 (2.7)	<2	22 (6.4)	17 (3.2)	<2	<2	20 (5.6)	2.7 (4.2)
ヘキサン 振とう抽出 ¹⁾	9.3 (3.4)	<2	15 (5.3)	11 (2.1)	25 (5.0)	<2	27 (3.9)	<2
ケン化抽出 ¹⁾	3.9 (27.9)	<2	5.9 (31.3)	4.8 (50.3)	15 (96.1)	<2	29 (58.1)	3.6 (36.1)

() 内は変動係数, %

が最も高い値であった。

④のケン化抽出法は極端に測定値が低く、かつばらつきの大きかった原因としては、アルカリの存在下で加熱することによりでんぷん質やタンパク質が固化してしまい、抽出効率が低下することや、トコフェロールがアルカリ性下で不安定なこと等が考えられる。また、②のクロロホルム/メタノール抽出では、即席めんでは比較的高い値が得られたが、ピーナッツの値が低く、特に α -トコフェロールは全く抽出されなかった。ピーナッツのように脂質が多い(47.4%, 四訂食品成分表)とメタノールでは脂質を溶かしにくく、抽出効率が低下するのではないかと考えられる。

トコフェロールは固形の加工食品には、油で揚げた即席めんや米菓、スナック菓子等に使われている場合が多い。これらは水分が少なく(1.5~4.0%, 四訂食品成分表)、脂質が比較的多い(19.3~28.6%, 同)ことを考えれば、①のヘキサンによる還流抽出が最も適しているものと考えられる。

また、この抽出方法で寺田ら⁹⁾はトコフェロールは酸化されやすい物質であり、抽出操作の間に酸化され減少してしまう恐れがあることから、これを防ぐために、BHTを加えている。そこで①~③の方法でBHTを加えた場合と加えない場合を比較してみたが、両者にほとんど差がみられなかった。ヘキサン等に溶解して直接空気と触れ合わない状態では特に酸化は進まないものと考えられる。

(2) 液状食品 (油脂類を除く)

津郷ら¹²⁾は牛乳の脂質を抽出して、ケン化し、不ケン化物中のトコフェロールを測定しており、液状食品から直接抽出した例はみられない。清涼飲料水にトコフェロールが添加されているような場合には、脂質はほとんど含まれていないので、直接抽出する必要がある。

そこで栄養強化にトコフェロールを添加している清涼飲料水から直接ヘキサンで抽出する方法と、固形食品からの抽出方法で検討した③の方法を参考にして試料にエ

タノールを少量加えてからヘキサンで抽出する方法で実測値を比較した。その結果、エタノールを加えずにヘキサンで抽出する方法が、 α -、及び δ -トコフェロールの値がおおよそ1割高くなった。 γ -トコフェロールは同程度で検出され、 β -トコフェロールはいずれも検出されなかった。添加物として使用されるトコフェロールは大豆油等の植物油から抽出されるが、これらに β -トコフェロールはほとんど存在せず¹²⁾、清涼飲料水には β 体は含まれていなかったと考えられる。

3.3 添加回収実験

3.2の結果から固形食品及び液状食品からのトコフェロールの分析操作を図-3に示すとおりとし、いくつかの食品を選び、各トコフェロールをそれぞれ20 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し、回収実験を行った。その結果、表-3に示したように89~101%の回収率が得られ、いずれもほぼ良好な結果であった。

なお、乳飲料を図-3に示す方法で操作すると、ヘキサンを加えて振とうした際に堅固なエマルジョンが生成

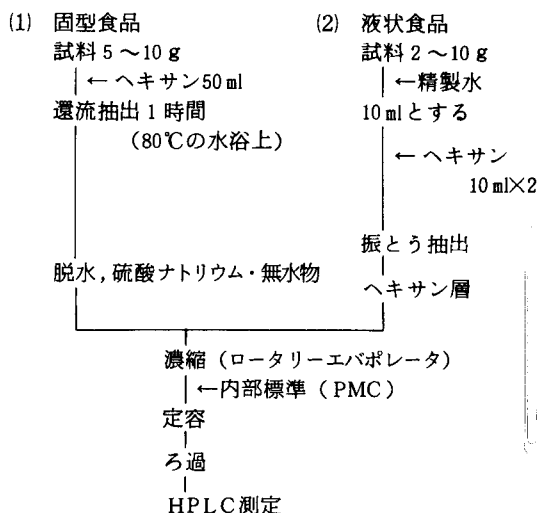


図-3 分析操作

して遠心分離によっても消えないことがあった。この様なときは、遠心分離後にエタノールを少量滴下することにより、エマルジョンが消失した。

この方法で測定したときの定量下限値は、試料を5g採取し、最終液量を20mlとした場合、2 μ g/gであった。

3.5 加工食品等の測定

市販の22種類の加工食品中のトコフェロール含量を測定した結果を表-4に示す。トコフェロールが油脂類を使った加工食品や飲料等に広く存在することがうかがえたが、原料由来とは考えられない量が検出されたにもかかわらず、トコフェロールを使用している旨の表示が無いものもいくつかあった。

またクロマトグラムの一例を図-4に示す。定量に当たり特に妨害となるピークはなかった。したがって精製操作は特に必要でなかったが、これはトコフェロールと一緒に抽出される油脂類のほとんどが、蛍光検出器に感応しないためと考えられた。

4 ま と め

加工食品中のトコフェロール同族体のHPLCを用いた

表-3 添加回収実験結果

(単位: %, n = 3)

食 品	α -トコフェ ロール	β -トコフェ ロール	γ -トコフェ ロール	δ -トコフェ ロール
即 席 め ん	95.3 (0.8)	101 (2.4)	90.8 (0.6)	96.5 (0.8)
米 菓	99.7 (1.4)	90.7 (0.9)	98.7 (1.5)	100 (0.8)
スナック菓子	101 (6.3)	97.9 (1.7)	91.3 (13.5)	92.8 (2.8)
ピーナッツ	101 (0.6)	97.4 (0.6)	98.3 (2.3)	88.9 (0.7)
清涼飲料水	88.6 (5.8)	96.8 (0.2)	95.9 (1.0)	96.5 (0.4)

() 内は変動係数

表-4 市販加工食品中のトコフェロール含量

(単位: μ g/g)

加工食品の 種類 (n)	α -トコフェ ロール	β -トコフェ ロール	γ -トコフェ ロール	δ -トコフェ ロール
即 席 め ん (n = 7)	<2~23 11	<2	2.7~31 19	<2~54 22
米 菓 (n = 6)	6.9~74 31	<2	7.2~51 26	<2~130 29
スナック菓子 (n = 6)	16~120 51	<2~2.5 <2	8.4~100 42	4.3~29 15
乳 飲 料 (n = 2)	<2, 21 11	<2	7.0, 15 11	3.5, 5.0 4.3
清涼飲料水 (n = 1)	19	<2	2.0	2.0

上段: 最小~最大
下段: 平均

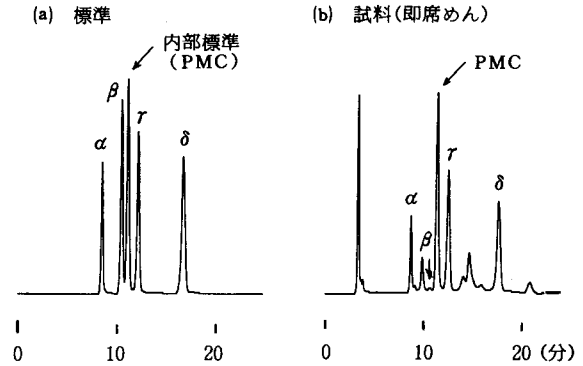


図-4 HPLCクロマトグラム
測定条件 表-1の(1)

分析法について検討した。脂溶性の物質であるトコフェロールは、その抽出条件により定量値が異なることが考えられ、いくつかの抽出法で定量値を比較した結果、固形食品はヘキサンで還流抽出、また、液状食品についてはヘキサンを加えて、振とう抽出する方法が最も高い値が得られた。さらにこれを基にした方法で添加回収実験を行ったところ、良好な結果が得られた。市販の22種類の加工食品のトコフェロールをこの方法で抽出し、蛍光検出器を用いたHPLCで測定することにより、特に精製操作を加えずに、良好に分析することができた。

参 考 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課: 食品中の天然食品添加物分析法試案 (昭和60年3月)。
- 2) 日本ビタミン学会編: ビタミン学実験法 I, p.195 (1983), (東京化学同人)。
- 3) Official Methods of Analysis of the AOAC, 13th ed., p.752 (1980)。
- 4) 阿部皓一, 湧口泰昌, 勝井五一郎: 栄養と食料, 27, 329 (1974)。
- 5) 寺田志保子, 増井俊夫, 渡辺圭一郎: 食衛誌, 26, 73 (1985)。
- 6) 井上典子, 角田光淳, 穴吹公子, 飯島増弘, 長谷部昭久: 食衛誌, 29, 435 (1988)。
- 7) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p.352 (1990), (金原出版)。
- 8) 勝井五一郎: 油化学, 32, 411 (1983)。
- 9) 脂溶性ビタミン総合研究委員会, ビタミンE小委員会: ビタミン, 51, 373 (1977)。
- 10) J.J.Kirkland: High Performance Liquid Chromatography, p.10 (1982), (John Wiley Sons Inc)。
- 11) 谷村顕雄, 藤井正美, 義平邦利, 伊藤善志男, 城照雄監修: 食品中の食品添加物分析法解説書, p.102 (1992)。
- 12) 津郷友吉, 菅野長右エ門: 栄養と食料, 22, 587 (1969)。