

## 高速液体クロマトグラフィーによる食品中の ビタミンAとビタミンEの同時定量について

### Simultaneous Determination of Vitamine A and E in Foods by High Performance Liquid Chromatography.

吉田 俊一 小塚信一郎 花井 潤師  
西野 茂幸 白石由美子 青木 襄  
高杉 信男

Shun-ichi Yoshida, Shin-ichiro Kozuka, Junji Hanai,  
Shigeyuki Nishino, Yumiko Shiroishi, Minoru Aoki  
and Nobuo Takasugi

高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」）による、食品中のビタミンA（V.A-OHとして）とビタミンE（ $\alpha$ -トコフェロール= $\alpha$ -Tocについて）の同時定量法を検討した。

カラムに逆相分配型のLichrosorb RP-8を用い、試料をけん化後、その石油エーテル抽出液を減圧濃縮し、メタノールに溶かし、メンブランフィルターでろ過して、HPLCに注入した。

市販食品9検体について分析したところ、測定結果は表示値とほぼ一致した。

#### 1. 緒 言

ビタミンA油、ビタミンAエステル、*dl*- $\alpha$ -トコフェロール（以下「*dl*- $\alpha$ -Toc」）は食品添加物として許可されており、近年、ビタミンAが上皮細胞を正常に分化するのを助け、がん化を防ぐという研究<sup>1)</sup>やビタミンEのうち、特に $\alpha$ -Tocが脂質の過酸化反応を抑制<sup>2)</sup>し、動脈硬化、細胞の老化を防ぎ<sup>3)</sup>末梢の血液循環を活発にするなどの働きがあるといわれている。そのため、これらビタミンが食品や健康食品等に繁用されており、これに伴い、その含有量測定の頻度が増加している。

従来の食品中の脂溶性ビタミンの分析法として、比色法<sup>4)</sup>、紫外分光光度法<sup>5)</sup>、蛍光光度法<sup>6)</sup>等があるが、いずれも操作が複雑なうえ長時間を要する

ことから、現在、比較的簡易で短時間に測定できるHPLCによる研究<sup>7)</sup>が進められている。しかし、同時定量の報告<sup>8)</sup>は数が少ない。

そこで、我々は、Lichrosorb RP-8を用いV.A-OHと $\alpha$ -Tocの同時定量法を検討し、併せて市販食品の実態調査も行ったので報告する。

#### 2. 実験方法

##### 2-1 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ：日立 638-50型

検出器：日立分光蛍光光度計 650-10LC型

カラム：Lichrosorb RP-8 (5 $\mu$ m)をステンレスカラム (4 mm  $\phi$   $\times$  250 mm) に平衡スラリー法によって充てんした。

メンブランフィルター：マイレクス<sup>®</sup>-SR, ポ

アサイズ 0.45  $\mu\text{m}$

omni ミキサー：SORVAL 社製

## 2-2 試薬

V.A. パルミテート（以下「V.A.-Pal」）40万 IU/ml：和光純薬製，特級品

dl- $\alpha$ ， $\beta$ ， $\gamma$ ， $\delta$ ， $\gamma$ -Toc：同上

標準液：V.A.-OH は衛生試験法・注解<sup>7)</sup>により V.A.-Pal をけん化後，メタノールで希釈し 20, 60 及び 120 IU/ml とした。また，dl- $\alpha$ -Toc は純品をメタノールで希釈し 50, 100 及び 150 mg/ml とし，他の 3 同族体 ( $\beta$ ， $\gamma$ ， $\delta$ ) も同様 100 mg/ml とした。

移動相：メタノール（和光純薬製，液体クロマトグラフ用）920 ml に水 80 ml を加え減圧下で脱気して使用した。

その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

## 2-3 試験溶液の調製

脂溶性ビタミンの分布は微量でかつ偏在しているため，ミキサーで充分均一にし，60メッシュの篩で分け，その 5  $\theta$  を採る。

次に，注解<sup>7)</sup>の方法に準じ，ピロガロール，ハイドロキノンをそれぞれ 100 mg，さらにエタノールを 50 ml 加える。次に KOH (9→10) 3 ml を加え 80~85°C で還流し，20 分間けん化後，水 30 ml を加え，水中で急冷する。

室温まで冷却後，石英ウールを用いて，褐色分液ロートにろ過し，石油エーテル 50 ml で 3 回抽出する。次いで，石油エーテル層を水洗，中和後，減圧濃縮し，完全に石油エーテルを飛散させた後，メタノールで 5 ml にメスアップし，メンブランフィルターでろ過して試験溶液とした。

## 2-4 HPLC による定量

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し，およそ 6 分に V.A.-OH のピークが出現後，速やかに波長切替えを行い dl- $\alpha$ -Toc を定量した。

HPLC 条件を表 1 に示す。

## 3. 結果と考察

### 3-1 移動相の検討

一般的な移動相のアセトニトリル-水系と，メタノール-水系について，保持時間や感度からメタノール-水系を用いることにした。

その混合割合は，V.A.-OH のピークが出現後，dl- $\alpha$ -Toc 定量のための波長切替えに必要な時間とその鋭なピークの出現がともに得られ，また，これら両者及び  $\alpha$ -Toc と他の同族体の完全分離（分離度  $R_s > 1$ ）を勘案し，92：8 とした。この際の各保持時間は図 1 のとおりであり， $R_s$  はそれぞれ V.A.-OH と dl- $\alpha$ -Toc が 9，dl- $\alpha$ -Toc と  $\beta$ ・ $\gamma$ -Toc が 1.4， $\beta$ ・ $\gamma$ -Toc と  $\delta$ -Toc が 1.7 であった。

なお，V.A.-OH，dl- $\alpha$ -Toc のクロマトグラムは図 2 のとおりであり，理論段数はそれぞれ 7,700，2,800 であった。

### 3-2 検量線

V.A. は 20 ~ 120 IU/ml，dl- $\alpha$ -Toc は 50 ~ 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲で良好な直線性を示し，両者の相関係数はいずれも 0.999 であった（図 3）。

表 1 HPLC 条件

移動相	— メタノール：水 (92：8)			
流量	— 1.0 ml/min			
圧力	— 110 kg/cm <sup>2</sup>			
カラム温度	— 室温			
波長と感度	励起波長	蛍光波長	Range	Fine
V.A.-OH	340nm	450nm	1	0
$\alpha$ -Toc	298nm	325nm	0.1	0
チャート速度	— 5 mm/min			
注入量	— 5 $\mu\text{l}$			

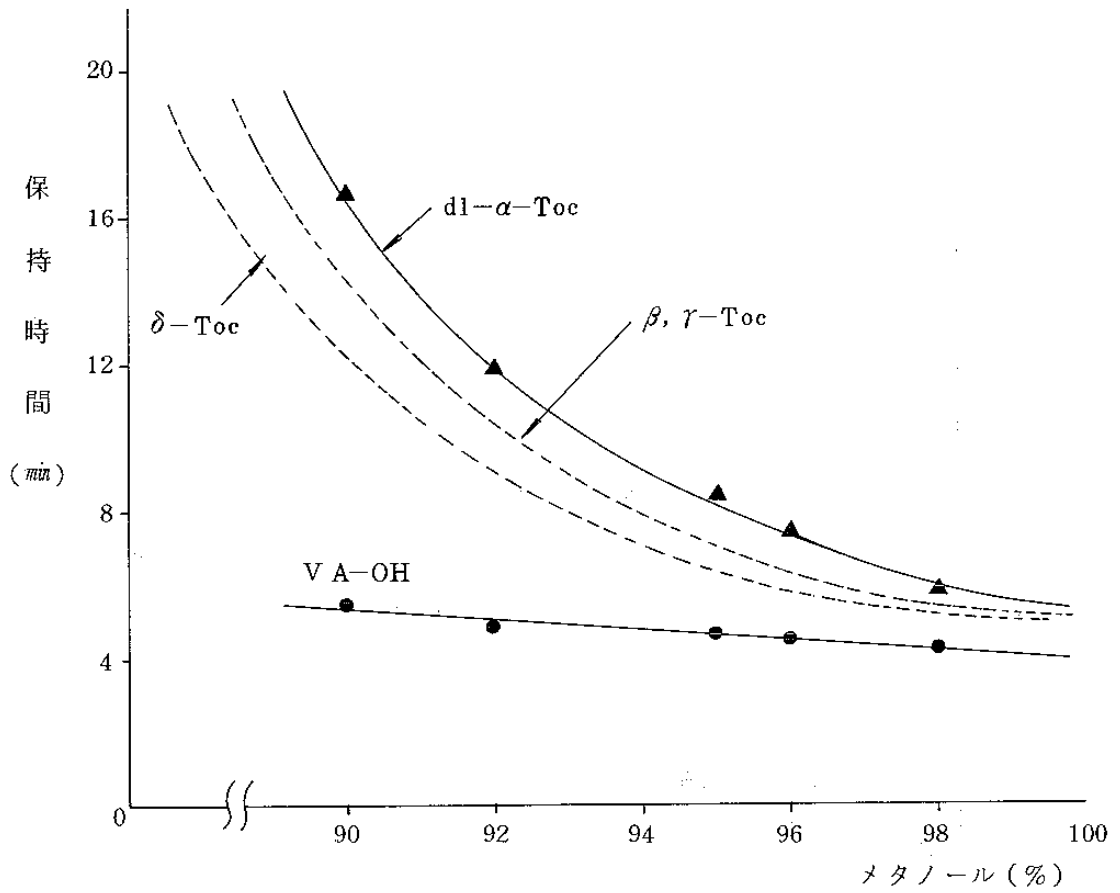


図1 V.A-OHとV.E同族体のメタノール-水系における保持時間

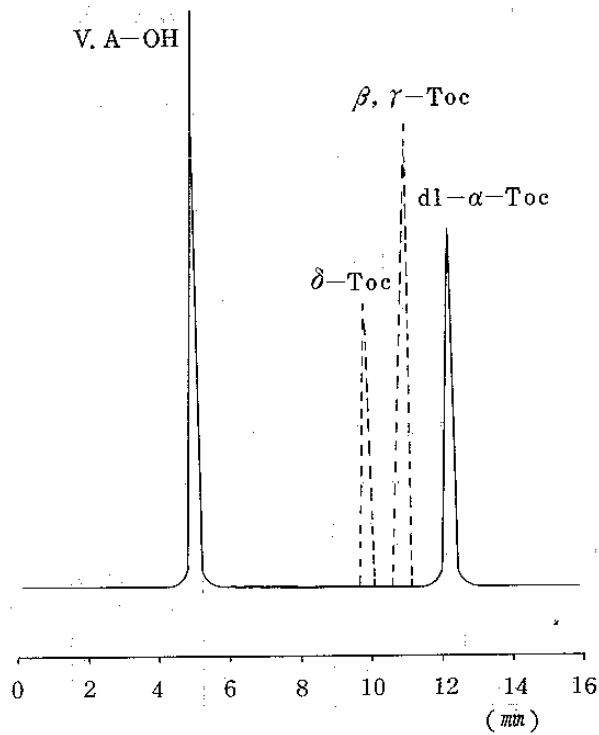


図2 V.A-OHとV.E同族体のクロマトグラム

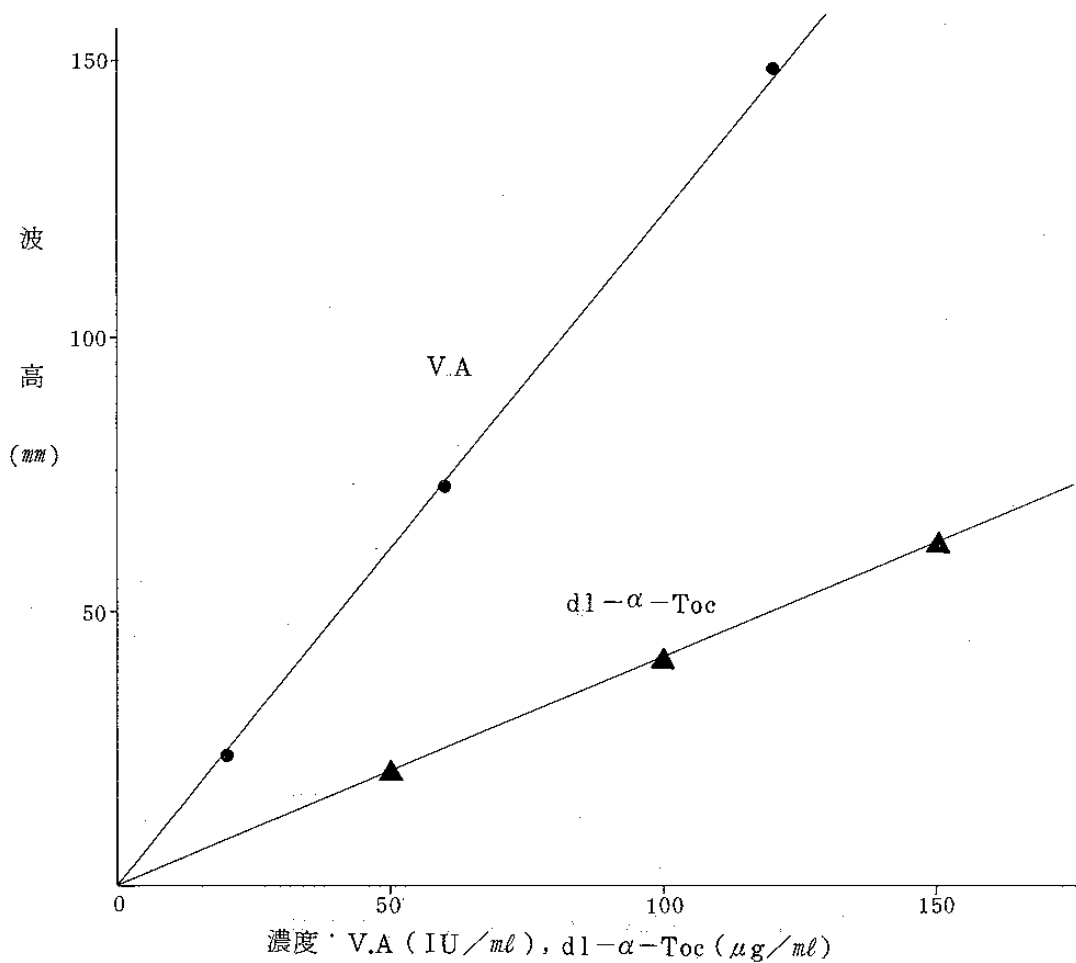


図3 V.Aとdl- $\alpha$ -Tocの絶対検量線

### 3-3 添加回収実験

穀類調製品、粉末飲料に各目的成分をその倍量となるように添加し、回収率を求めたところ、V.A (n=6) については93~105%, 平均100.5%, dl- $\alpha$ -Toc (n=6) については91~100%, 平均94%で、良好な結果を得た(表2)。

### 3-4 市販食品の調査結果

昭和57年, 7月に購入した, 穀類調製品(フレーク類) 4検体, 粉乳, 粉末飲料各1検体, 油脂類(サラダ油) 2検体, 胚芽油錠剤1検体の測定結果は, ほぼ包装表示と一致していた。

1) V.Aはおよそ1,500~4,000 IU/100g 含

表2 V.A, dl- $\alpha$ -Tocの添加回収率

食品	n	V. A				dl- $\alpha$ -Toc			
		添加量 V. A-Pal (IU/100g)	測定値 (IU/100g)	回収率 (%)	平均 回収率 (%)	添加量 dl- $\alpha$ -Toc (mg/100g)	測定値 (mg/100g)	回収率 (%)	平均 回収率 (%)
穀類 調製品	3	4,000	3,880 ~4,200	97~105	100	20	18.2 ~20	91~100	96
粉末 飲料	3	4,000	3,720 ~4,200	93~105	101	20	18.2 ~18.6	91~93	92

表3 市販食品中のV. A,  $\alpha$ -Tocの測定値

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
種 類	穀 類 調 製 品				粉 乳	粉 末 飲 料	油 脂		錠 剤 <sup>※</sup>
V. A IU/100g	4,400	1,800	1,900	1,400	1,600	4,300	—	—	—
$\alpha$ -Toc mg/100g	20	—	—	—	5	—	63	40	255 (mg/錠)

※ 胚芽油：0.3g/錠

まれており、その100g当たりの含有量はおおむね日本人の栄養所要量<sup>10)</sup>(1,000~2,000 IU/day)を満たす量であった。

2)  $\alpha$ -Tocは胚芽油錠剤に255mg/錠も含まれており、油脂類の約200倍の含量を示し、一錠で一日常用量(100~300mg/day)に充分達した。他の同族体は粉乳に相当量含有していたが、それ以外の食品ではその含有量は少なかった。

#### 4. 結 語

1) V. A,  $\alpha$ -Tocの同時定量法として、カラムに、逆相分配型のLichrosorb RP-8を、移動相にメタノール：水(92：8)を用いて検討したところ、それらのピークが、V. Aは約6分後に、dL- $\alpha$ -Tocは約14分後に出現し、分離度、尖鋭度ともに良好であった。

2) 添加回収実験は93~105%で良好な結果であった。

3) 市販食品9検体の目的成分の測定値はほぼ包装表示と一致していた。

今後は、広くルーチンワークに取り入れるとともに、さらにビタミンDの同時定量法についても検討を行い、脂溶性ビタミンA, D, Eの同時定量法を確立したいと考えている。

#### 5. 文 献

- 1) D. P. Chopra, L. J. Willkoff: Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 16, 35 (1975)
- 2) A. L. Tappel: Vitam. Horm., 20, 493 (1962)
- 3) 山中直樹, 吉岡保, 内海林道: 医学のあゆみ, 97, 573 (1976)
- 4) 岩尾裕之, 高居百合子: ビタミンの分析, P. 54 (1972) 講談社
- 5) 同上, P. 44
- 6) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, P. 206. (1980) 金原出版
- 7) 同上, P. 196
- 8) 日本薬学会編: 公衆衛生協議会資料, P. 7 (1982)
- 9) S. A. Barnett, L. W. Frick, H. M. Baine: Anal. Chem 52, 610 (1980)
- 10) 厚生省編: 日本人の栄養所要量, P. 8 (1979)
- 11) 日本公定書協会編: 第九改正日本薬局方解説書, C-957 (1976) 廣川書店