

逆相 HPLC 法によるトコトリエノール類及び トコフェロール類の一斉分析

赤 坂 和 昭*

Simultaneous determination of tocotrienols and tocopherols by a reversed-phase HPLC

Kazuaki Akasaka

ビタミンEの8種の同族体 (α -、 β -、 γ -、 δ -トコトリエノールおよびトコフェロール)の逆相 HPLC による同時分析法の確立を目的に、分離カラムおよび分離温度を中心に検討した。その結果、C30 カラムを用い低温条件を用いることにより、8種の同族体の完全分離を達成することができた。一方、低温条件でのカラム効率の低下については、流速を下げることにより改善することができ、最終的に、カラムとして Develosil C30-UG-3 (4.6 x 150mm)、移動相としてメタノール (100%) を用い、流速 0.9mL/min、 -4°C で溶出し、蛍光検出 (Ex. 297nm, Em. 325nm) することにより、ビタミンEの8種の同族体を20分以内で分離分析することができた。検量線は sub ng ~ 10ng オーダーの範囲で良好な直線となり、S/N=3における検出限界は、0.011 ~ 0.055ngであった。実際の食用油において、トコトリエノール類の分析に共存する成分による影響が認められたが、ODS カラムと C30 カラムを組み合わせた2次元 HPLC 法により共存する成分の影響を排除することができた。

キーワード：逆相クロマトグラフィー、低温分離、トコフェロール、トコトリエノール、
二次元 HPLC 法
reversed phase HPLC, separation at low temperature, tocopherol, tocotrienol, 2-dimensional HPLC

1. はじめに

ビタミンE (VE) は、 α -、 β -、 γ -、および δ -トコトリエノール (T3) と α -、 β -、 γ -、および δ -トコフェロール (Toc) の8種の同族体からなる脂溶性のビタミン (Fig. 1) で、強い抗酸化作用があり、生体内の不飽和脂肪酸や脂溶性成分を酸化ストレスから守ることにより、生体膜の機能維持や、赤血球の溶血の防止、正常な生殖機能の維持、細胞の酸化防止などの効果が知られている。食事摂取基準では、体内に分布する主なVEである α -Toc量で示され、1日当たりの摂取の目安は、18歳以上の男性で6.5 mg、18歳以上の女性で6.0 mgと設定されている。¹⁾

T3類は、米ヌカ、大麦、小麦胚芽、ヤシ油、グレープシード油など限られた食品中に含ま

2020年4月14日受理

*尚絅学院大学 総合人間科学系健康栄養部門 教授

れているVEで、Toc類の数十倍といわれるほど強い抗酸化力を持つといわれ、また血圧やコレステロール低下、抗高脂血症、抗ガンに加え、メラニン合成阻害活性による美白などの作用が報告されており、サプリメントとしても利用され注目されている。しかし、T3類の分布や摂取量については十分に明らかにされていない。²⁾

VEの8種と同族体の分析は、主に順相系のカラムを用い、ヘキサン/2-プロパノール、或いはヘキサン/ジオキサン/2-プロパノール系の溶媒を用いて行われている。²⁻⁴⁾ヘキサンやジオキサンは比較的高価で、また燃焼性が高いため、HPLC法として一般的なODSカラム等を用いた逆相系の方が分析コストや安全性、汎用性の面で優れているものの、ODSカラムでは、 β -と γ -Tocおよび β -と γ -T3の分離が困難なため実現されていなかった。

一方、低温条件下による分離は、カラム効率の低下やカラム圧が高くなること、分析時間が長くなるなどのためほとんど利用されていなかった。しかし、低温条件下では、化合物の保持特性が室温とは大きく異なる場合があり、これまで分離が不可能と考えられてきた化合物の分離、および天然物化合物の分析を実現してきた。⁵⁻¹⁰⁾そこで今回、よりランニングコストの低いメタノール系の溶媒を用いたVEの8種と同族体の同時分析法の確立を目的に、分離カラムおよび分離温度を中心に検討した。

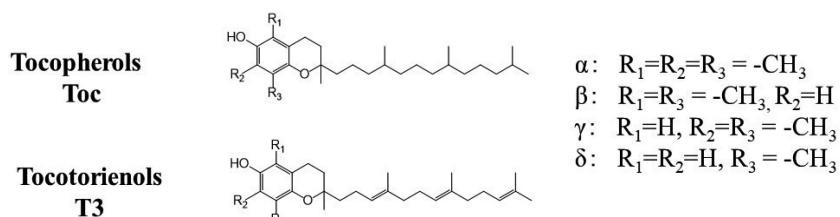


Fig.1 Structures of Tocotrienols and Tocopherols

2. 実験方法

2-1 試薬、溶媒および試料

α -、 β -、 γ -、および δ -Tocとペンタメチルクロマン (PMC, 内標準) は、ビタミンE定量用標準試薬 (エイザイフードケミカル) を仙台和光純薬より購入し用いた。また、 α -、 β -、 γ -、および δ -T3 (エイザイフードケミカル) は、東北大学大学院農学研究科・仲川清隆教授より提供を受けた。溶媒、および試薬類は富士フィルム-和光純薬製のHPLC用または試薬特級を用いた。

試料の食用植物油8種 (ヤシ油、こめ油、大豆胚芽油、キャノーラ油、グレープシード油、ひまわり油、マカデミアナッツ油、アマニ油)、および粉末状試料6種 (米ぬか、小麦胚芽、小麦全粒粉、アーモンド粉、クルミ粉、ライ麦粉) は仙台市内および名取市内で購入した。

2-2 分析標準溶液の調製

T3およびTocの3~11mgをそれぞれ正確に採取し、酢酸エチル/エタノール溶液 (1mg/mLのアスコルビルパルミテートを含む) に溶解し、それぞれの濃度が50~150 μ g/mLになるように混合した混合原液を調製し、 -80°C に保存した。この原液を酢酸エチル/エタノール

ルで適宜希釈して T3 および Toc 類の検量線用の試料を調製した (PMC を最終濃度が 270ng/mL となるように添加。各 T3 および Toc の最終濃度は 5 ~ 15ng/mL から 1000 ~ 3100ng/mL)。

2-3 試料溶液の調製

植物油は、試料油 10 ~ 100mg を正確に採取し内標準物質 (PMC : 5.57 μ g/mL in イソオクタン / 2-プロパノール / メタノール = 1 : 1 : 2, v/v/v) 100 μ L を加え酢酸エチル / エタノール (2 : 1) で 2mL に定容し、HPLC 測定用試料とした。尚、2次元 HPLC (2D-HPLC) 分析においては、試料油採取量を 150 ~ 200mg 正確に採取し、酢酸エチル / エタノール (2 : 1) で 2mL に定容し試料溶液として用いた。

粉末状試料は、ケン化・抽出を行った後、減圧濃縮し、溶媒に溶解して試料を調製した。50mL の遠沈管に約 50 ~ 150mg の試料を正確に採取し、27.85 μ g/mL PMC 溶液 (内標準) を 100 μ L、エタノール 400 μ L、1% NaCl 水溶液 0.50mL、3% ピロガロール / エタノール溶液 9.0mL、および 60% KOH 水溶液 0.5mL を加え、70 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱した。この混合溶液に、0.9% NaCl 水溶液 22.5mL、およびヘキサン / 酢酸エチル (9 : 1) を 15mL 加え、振とう抽出し、4 $^{\circ}$ C、1000g で 5 分間遠心分離を行った。上層を注意して取り出し、下層にヘキサン / 酢酸エチル (9 : 1) を 15mL 加え、再度振とう抽出し、4 $^{\circ}$ C、1000g で 5 分間遠心分離を行い、上層を注意して取り出し、得られた上層を合わせて減圧濃縮を行い、アルゴンで破圧後 10mL の酢酸エチル / エタノール (2 : 1) に溶解し、HPLC 分析用試料とした。

2-4 逆相 HPLC 分析システムによるビタミン E の一斉分析

ポンプは ELITE LaChromL-2130 (日立) を使い、移動相とし 100% メタノールを用い、0.9mL min^{-1} の流速で溶出した。試料は、L-2200 オートサンプラー (日立) により 10 μ L 導入量した。カラムとして Develosil C30-UG-3 (4.6mm i.d. \times 150mm) を使い、-4 $^{\circ}$ C に冷却して分離を行った。検出は FP-4025 蛍光検出器 (日本分光) により励起波長 297nm における 325nm の蛍光により行い、Chromatocorder 21 (システムインスツルメンツ) で記録した。

分離カラムを冷却槽 (容量 6 L、冷媒 : 50% エタノール / エチレングルコール) に浸し、攪拌機 (MAZELA Z, 東京理化) で攪拌 (500rpm) しながら、Cryocool CC100 / Cryotrol (いずれも Thermo NESLAB) を用い -4 $^{\circ}$ C に調節した。

2-5 2次元 HPLC (2D-HPLC) 法によるトコトリエノール (T3) 類の精密分離

ポンプ (ELITE LaChromL-2130) を使い、移動相として 90% メタノール / 水を用い、0.55mL min^{-1} の流速で溶出した。試料は、L-2200 オートサンプラー (日立) により 10 μ L 導入量した。1次元目のカラムとして Chromolith Performance RP-18e (MERCK, 4.6x 100mm) を直列で 2本つなぎ、50 $^{\circ}$ C で分離した (カラム恒温槽 : 日立 L-7300)。カラムスイッチングデバイス (東ソー、PT-8000) を使い、Table 1 に示した時間帯の画分を 2次元目の -15 $^{\circ}$ C に冷却した Develosil C30-UG-3 (4.6mm i.d. \times 150mm) に導入した。溶出は 100% メタノールにより 0.6mL min^{-1} 、あるいは 0.5mL min^{-1} で行い (ポンプ : 日本分光 PU-920)、励起波長 297nm における 325nm の蛍光により検出した。尚、 α -T3 と δ -T3 の分析では、2つ目の画分 (25.9 - 28.2 分) を C30 カラムに導入し終わると同時にメタノールでの溶出を開始した。

Table 1 Timings of column switching on 2D-HPLC

Target T3s	timing of switching (min)		Flow rate of 2 nd column (mL min ⁻¹)
	on	off	
α -T3 & δ -T3	18.2 25.9	20.3 28.2	0.6
β -T3 & γ -T3	22.3	24.5	0.5

3. 結果及び考察

3-1 T3およびTocの溶出挙動に与える温度の影響

逆相HPLC分析において最も一般的に用いられているODS (C18) カラムと、より長いアルキル鎖を化学結合させたC30カラムによるVE同族体の分離を室温(27°C)で行った結果、ODSカラムでは、 β -Tocと γ -Toc、並びに β -T3と γ -T3を全く分離することができなかった(Fig. 2-A)。 β -Tocと γ -Toc、並びに β -T3と γ -T3は、それぞれクロマン環に対するメチル基の結合位置のみが異なる構造異性体であるため分離が難しいと考えられる。C30カラムでは不完全ながら β -Tocと γ -Tocの分離が達成でき、 β -T3と γ -T3もピーク先端分離が認められ、ODSに比較しC30カラムの方が同族体に対する識別能が高いことが確認できた(Fig. 2-B)。このため、C30カラムを用いカラム温度と各T3及びTocの保持時間の関係について検討した(Fig. 3)。カラム温度を低下させるほど保持時間が長くなり、また各ピークの保持時間差が大きくなった。特に室温では分離不十分な β -T3と γ -T3、および β -Tocと γ -Tocの保持時間の差が大きくなったが、 α -T3と δ -Tocの保持時間差はそれほど大きくならなかった。一般に低温分離条件は、カラムの理論段数の低下を引き起こし、ピークの広がりにより保持時間に差があっても十分な分離が得られず、分離時間が長くなることな

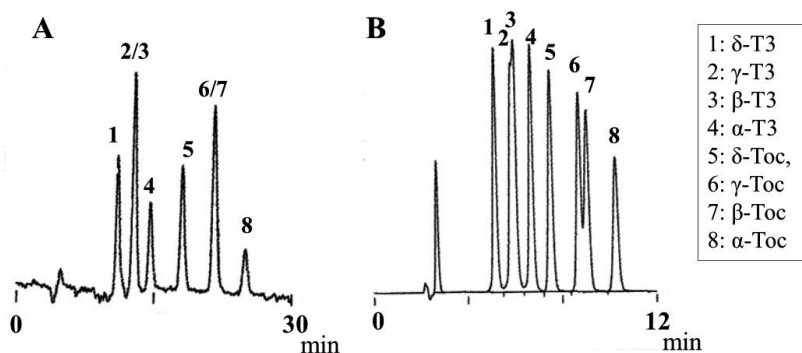


Fig. 2 HPLC chromatograms on reversed-phase columns at 27 °C

A: column; Develosil ODS-HG-3 (4.6 x150 mm), mobile phase; 96% MeOH/H₂O
flow rate: 0.6 mL min⁻¹

B: column; Develosil C30-UG-3 (4.6 x150 mm), mobile phase; 100% MeOH
flow rate: 0.9 mL min⁻¹

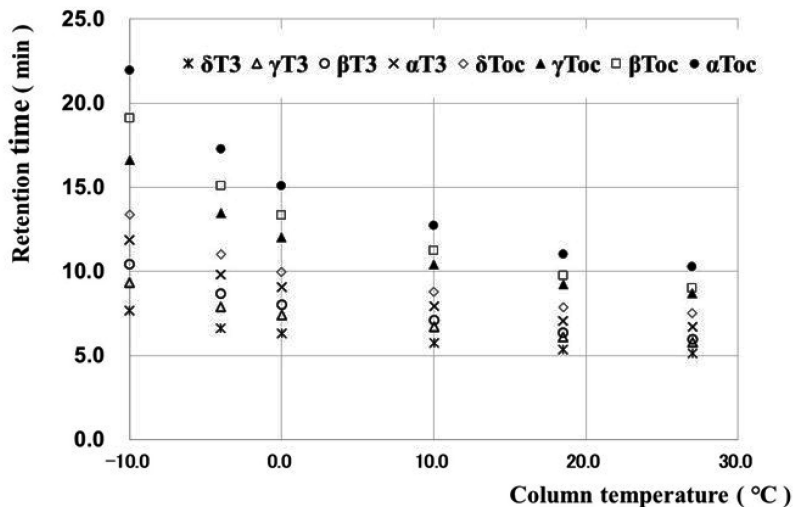


Fig.3 Effect of column temperature on the retention times of T3 & Toc

Column: Develosil C30-UG-3 (4.6 x 150 mm), Mobile phase: MeOH, Flow rate: 0.9 mL·min⁻¹, Detection: Fluorescence (Ex. 297 nm, Em.325 nm)

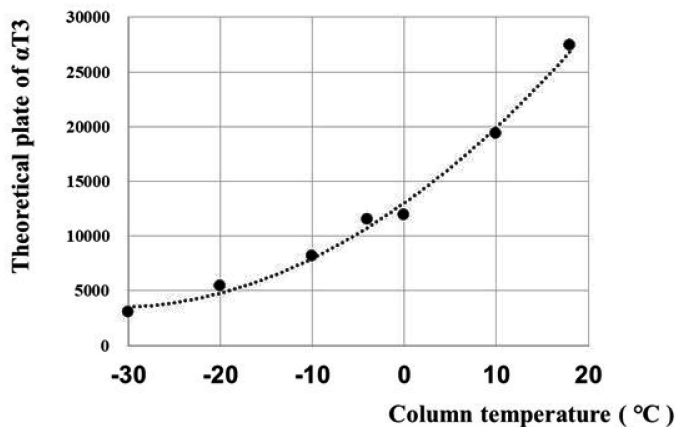


Fig.4 Effect of column temperature on theoretical plate of α-T3

Column: Develosil C30-UG-3 (4.6 x 150 mm), Mobile phase: MeOH, Flow rate: 0.9 mL·min⁻¹, Detection: Fluorescence (Ex. 297 nm, Em.325 nm)

* Theoretical plates corrected based on the factor caused by dead space attributed to other than the column

どから一般には用いられてこなかった。Fig. 4 にカラム温度が α -T3 ピークの理論段数に与える影響を示した。尚、理論段数として、温度の影響を明確に把握するため空隙容量によるピークの広がりを補正した値を用いた。カラム温度の低下により急激に理論段数が低下し、0℃付近では室温の1/2以下まで低下した。保持時間が同じである場合、理論段数が1/2になると、ピー

ク幅はおよそ1.4倍に広がる。このため、温度を下げても保持時間差があまり大きく成らなかった α -T3 と δ -Toc のピーク分離は -10°C では逆に低下し、 -4°C で最も良い8種の同族体の分離が得られた。

理論段高 H は、1 段の理論段に必要なカラムの長さで、理論段高が小さいほどカラム効率は高く、同じ長さのカラムであれば理論段数は高くなる。理論段高とそれに影響を与える諸因子との関係を式①に示す。¹¹⁾

$$H = B/u + C_S u + C_M u \quad \dots \textcircled{1}$$

ここで、 B は「物質の拡散に関する項」、 C_S は「固定相への移動及び脱離に関する項」、 C_M は「流路による流速の違いがもたらすピークの広がり」、 u は「移動相の線速度」を表す。低温条件では粘性の増加や分子運動の低下などによる物質の移動速度の低下や流路拡散の影響の増大により①式における第2項の C_S 、および第3項の C_M が大きくなるため、移動相中における移動相の流れる方向に対する拡散による第1項に比べ、第2項や第3項の方が H の増加に対しより大きな影響を与えることとなったと考えられた。このため、移動相の線速度 u を小さくすること、つまり移動相の流速を低下させることによりこの第2項および第3項を小さくすることができると考えられた。そこで、100%メタノールを移動相として用いた際の流速と α -T3 ピークの補正した理論段数の関係について検討した。その結果、流速の低下に伴い、理論段数が上昇し、カラム効率の改善が認められた (Fig. 5)。しかし、低流速はカラム効率の向上に有効であったが分析時間が長くなるため、相互分離が可能で、かつ分析時間の最も短くなる最適条件としてカラム温度 -4°C 、流速 0.9 mL min^{-1} の条件を設定した。この条件により20

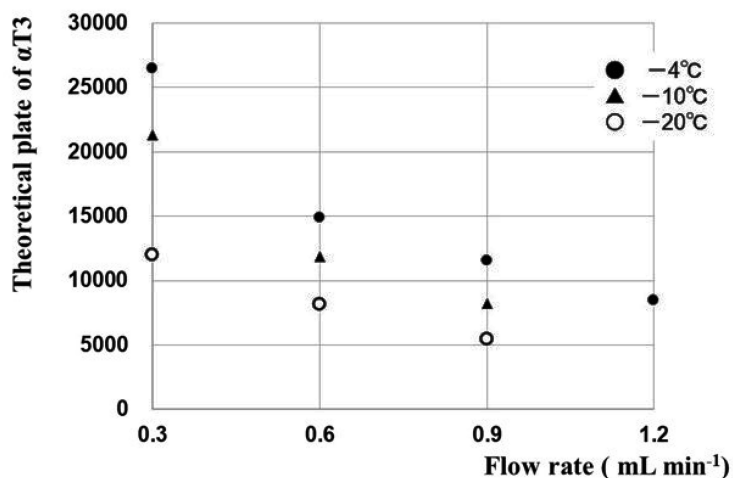


Fig. 5 Effect of flow rate on the theoretical plate of α -T3

Column: Develosil C30-UG-3 (4.6 x 150 mm), Mobile phase: MeOH,
Detection: Fluorescence (Ex. 297 nm, Em.325 nm)

* Theoretical plates corrected based on the factor caused by dead space attributed to other than the column

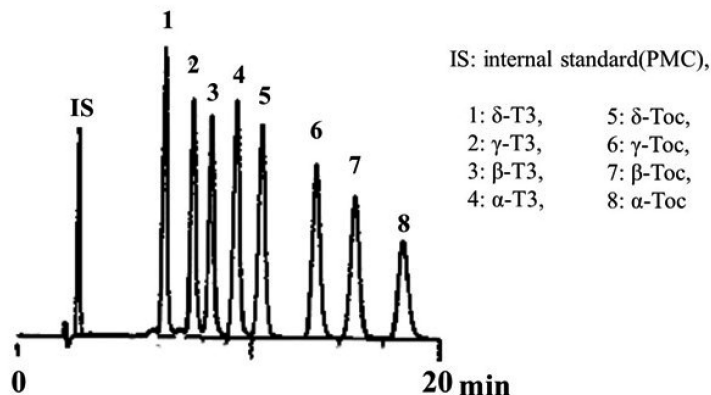


Fig.6 Typical HPLC separation of T3 and Toc on a Develosil C30 UG-3 column

Column: Develosil C30 UG-3 (4.6 mm x150 mm), Mobile phase: methanol,
Flow rate: 0.9 mL min⁻¹, Column Temperature: at -4 °C,
Detection: fluorometry (ex. 297 nm, em. 325 nm)

分以内で8種の同族体をすべて完全に分離することができ (Fig. 6)、順相系での分析時間とほぼ同等の時間で分析を実現することができた。100%メタノールで分析が実現したことにより、移動相の調製の手間を省力化することができた。一方、カラムを氷水 (0°C) で冷却するだけでも、0.6mL min⁻¹ で溶出することにより 25分以内での完全分離が達成でき、より簡便な分析システムとして汎用性が高いと考えられる。

3-2 T3およびTocの定量性・分析精度および添加回収

設定した条件で分析を行った際の各VE同族体の定量性、ピーク面積の繰り返し精度、および検出限界を Table 2 に示した。検量線は導入量で 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁷g オーダーの広範囲にわたり良好な直線性を示し、検出限界 (S/N=3) は 10 ~ 55pg で、実用性の点で十分な感度であった。また、ピーク面積の繰り返し精度も 0.6 ~ 3.5% で良好であった。

食用油のヤシ油および粉末状の米ぬかを分析した際の添加回収実験の結果を Table 3 に、またその時のクロマトグラムを Fig.7 に示した。

ヤシ油はケン化を行わず、試料油を溶解したのみで分析を行い、カラムへの試料油の導入量は約 0.5mg であった。分析の結果、4種類の T3 が検出・定量され、Toc は検出されなかった (Fig. 7-A)。また添加回収率は 93 ~ 97% と非常に高く (Table 3)、大過剰に共存するトリアシルグリセロールの影響を全く受けることなく分析することができた。また、ピーク面積のばらつきは、未添加ヤシ油でピークが小さかった δ-および β-T3 で相対標準偏差がそれぞれ 3.1% および 4.5% と高かったが、他はいずれも 2% 以内であった。一方、米ぬかをケン化し、抽出した試料を分析した結果、全ての VE 同族体が 0.1 ~ 8mg / 100g の範囲で検出・定量され (Fig. 7-B)、さらに米ぬかに VE 同族体 8 種を添加しケン化・抽出・濃縮の一連の操作を行った際の添加回収率は 78.3 ~ 80.5% であった (Table 3)。ケン化の操作が加わったことにより、ピーク面積のばらつきがヤシ油に比べて大きく、また添加回収率も低下したが、実用範囲内であった。

Table 2 Determination ranges, Repeatabilities & Detection limits of T3 & Toc

	Retention time	Determination range		Repeatability of peak area ratio (n = 8)		Detection Limit (S/N = 3)
	min	ng / injection	R ² *	amounts of sample ng / injection	RSD %**	ng / injection
δ-T3	6.62	0.057 - 11.34	0.9997	2.84	0.93	0.012
γ-T3	7.90	0.050 - 10.08	0.9997	2.52	0.59	0.012
β-T3	8.70	0.062 - 12.42	0.9997	3.11	0.78	0.014
α-T3	9.88	0.153 - 30.65	0.9997	7.66	1.30	0.035
δ-Toc	11.00	0.060 - 12.05	0.9996	3.01	1.23	0.013
γ-Toc	13.45	0.060 - 11.99	0.9996	2.99	1.01	0.017
β-Toc	15.10	0.060 - 11.97	0.9995	3.01	1.62	0.020
α-Toc	17.29	0.100 - 20.03	0.9993	5.01	3.36	0.055

* R: Coefficient of correlation, ** RSD: Relative standard deviation

Table 3 Recoveries of T3 & Toc in an oil and a foodstuff

	Coconut oil (without saponification)						Rice bran (with saponification)					
	Coconut oil (n=8)		Total (n=8)		Amounts of addition (mg/100g)	Recovery %	Rice bran (n=5)		Total (n=5)		Amounts of addition (mg/100g)	Recovery %
	mg/100g	SD	mg/100g	SD			mg/100g	SD	mg/100g	SD		
δ-T3	0.038	0.0012	0.57	0.0062	0.57	94.1	0.92	0.066	3.18	0.082	2.84	79.7
γ-T3	0.28	0.0044	0.76	0.0076	0.50	95.0	6.43	0.449	8.42	0.112	2.52	78.9
β-T3	0.088	0.0040	0.67	0.0053	0.62	94.4	0.11	0.015	2.61	0.032	3.11	80.5
α-T3	1.86	0.0362	3.35	0.0350	1.53	97.3	5.41	0.357	11.56	0.391	7.66	80.3
δ-Toc	ND		0.57	0.0090	0.60	95.1	0.09	0.030	2.50	0.087	3.01	79.9
γ-Toc	ND		0.56	0.0067	0.60	94.2	1.15	0.081	3.51	0.059	2.99	78.8
β-Toc	ND		0.57	0.0100	0.60	94.6	0.46	0.046	2.82	0.055	3.01	78.3
α-Toc	ND		0.97	0.0264	1.00	93.8	7.78	0.566	11.75	0.305	5.01	79.4

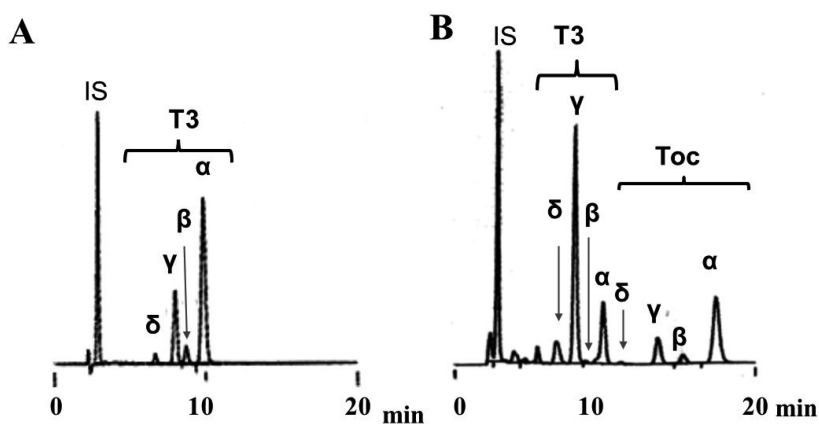


Fig.7 Typical HPLC chromatograms of T3 & Toc in coconut oil and rice bran

A: coconut oil (without saponification), B: rice bran (with saponification)

3-3 食用植物油および食品中の VE の分析

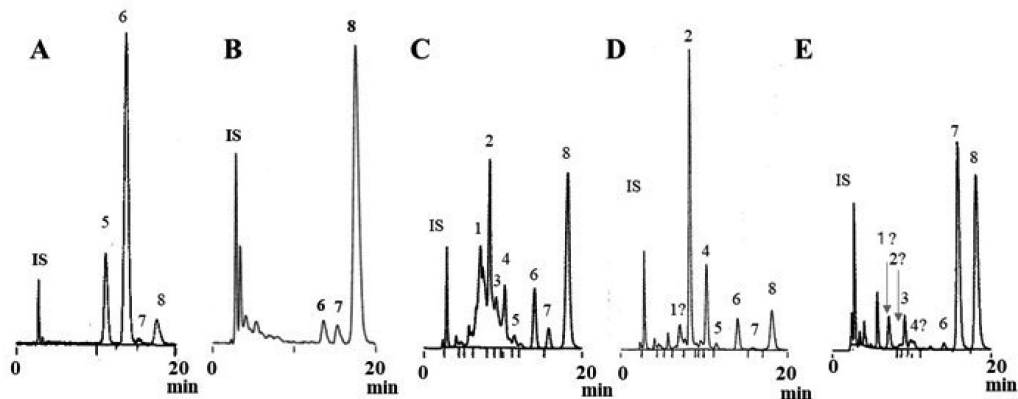
Table 4 に、すでに示したヤシ油および米ぬかを除く食用油 7 種、粉末状の食品 5 種の分析結果を、また Fig. 8 に代表的なクロマトグラムを示した。

Table 4 Amounts of T3 & Toc in oils and foodstuffs

	mg/100g (mean \pm SD, n=3)							
	α -T3	β -T3	γ -T3	δ -T3	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc
Soybean germ oil	-	-	-	-	21.3 \pm 0.77	2.67 \pm 0.29	96.07 \pm 2.36	21.51 \pm 0.29
Sunflower oil	-	-	-	-	42.10 \pm 1.03	1.09 \pm 0.10	1.09 \pm 0.05	-
Rice oil	6.83 \pm 1.79*	5.42 \pm 2.10*	15.35 \pm 2.86*	18.82 \pm 0.54*	23.30 \pm 0.92	0.40 \pm 0.13	4.93 \pm 0.09	0.66 \pm 0.23
Grapeseed oil	13.71 \pm 0.79	-	12.18 \pm 0.76	Tr**	39.10 \pm 1.80	0.21 \pm 0.09	2.68 \pm 0.11	Tr
Linseed oil	-	-	-	-	0.29 \pm 0.02	-	25.12 \pm 0.81	-
Canola oil	-	-	-	-	17.60 \pm 0.77	-	44.14 \pm 0.89	1.21 \pm 0.08
Macadamia nuts oil	1.27 \pm 0.13	tr	-	-	0.51 \pm 0.24	-	3.22 \pm 0.28	0.57 \pm 0.02
Wheat germ	0.95 \pm 0.24	0.59 \pm 0.08**	Tr**	Tr**	21.95 \pm 0.94	8.51 \pm 0.28	0.14 \pm 0.02	-
Whole wheat flour	0.92 \pm 0.08	1.69 \pm 0.10	-	-	0.76 \pm 0.09	0.31 \pm 0.05	-	-
Ray flour	21.3 \pm 0.77	21.3 \pm 0.78	-	Tr	Tr	Tr	-	-
Almond flour	1.04 \pm 0.17	Tr	-	-	13.77 \pm 0.33	Tr	0.36 \pm 0.08	-
Walnut powder	0.93 \pm 0.31	Tr	-	-	5.23 \pm 0.39	0.28 \pm 0.08	32.35 \pm 0.52	4.92 \pm 0.28

- : n.d., Tr: trace, * The value might be affected by coexistent substances,

** The peak assignment was affected by coexistent substances

**Fig.8 Typical HPLC chromatograms of T3 & Toc in edible oils and foodstuffs**

Samples were A: soybean germ oil, B: sunflower oil, C: rice oil, D: grapeseed oil, and E: wheat germ, respectively. Peaks were IS: internal standard, 1: δ -T3, 2: γ -T3, 3: β -T3, 4: α -T3, 5: δ -Toc, 6: γ -Toc, 7: β -Toc, and 8: α -Toc, respectively.

大豆胚芽油、アマニ油、キャノーラ油などの植物油からは T3 類は検出されなかったが、マカデミアナッツ油、アーモンド粉、クルミ粉などのナッツ類や、小麦胚芽、小麦全粒粉、ライ麦粉などからは T3 類が検出・定量された。

こめ油では、T3 の溶出する時間帯に共存する成分によると思われる大きなピーク群のため T3 分析の障害となった (Fig. 8-C)。このため、Table 4 に示したこめ油の T3 類の値は、実際よりも大きな値となっているものと考えられる。この様なピーク群は米ぬかには認められなかったことから (Fig. 7-B)、こめ油製造工程の中で生成したものと考えられた。こめ油以外

にもグレープシード油 (Fig. 8-D) や小麦胚芽 (Fig. 8-E) でも T3 と保持時間が近い位置に小さなピークが現れ、ピークがブロードになったことや、保持時間のずれが生じたため T3 のピークとの識別に影響があったものと考えられる。

ひまわり油 (Fig. 8-B) では、試料油のカラムへの導入量として 0.1mg 程度では T3 のピークは検出下限以下であったが、試料濃度を 10 倍程度に高めて分析した結果、 δ -T3 の保持時間と非常に近い位置にピークが検出され、また γ -T3 と β -T3 の位置に少しブロードなピークを検出することができた。

3-4 2D-HPLC システムによる T3 の精密分析

こめ油などでは共存する成分が T3 類の正確な分析の障害となった。二つの異なる分離系をオンラインで連結する 2D-HPLC 法は、天然物などの複雑な系中の微量成分を分析するうえで有効な方法の一つである。¹²⁻¹⁴⁾ そこで、T3 類に対し異なる保持挙動を示した ODS カラムと C30 カラムを組み合わせた 2D-HPLC 法について検討した。1 次元目の分離をモノリス型 ODS カラムで 50°C の条件下で分離を行い目的とする T3 を含む画分のみを、カラムスイッチングデバイスを用い 2 次元目の C30 カラムに導いた。C30 カラムによる分離は、より分離が向上する -15°C の低温条件で精密分離を行った (Fig. 9)。-10°C 以下の条件では、 α -T3 と δ -Toc の分離が低下するが、1 次元目のカラムにより δ -Toc は C30 カラムに導入されていないため影響はない。また、低温条件でのピーク幅の増加による分離能低下を抑制するため、流速を低く設定した。1 次元目にカラム圧が非常に低いモノリス型カラムを用いることで、C30

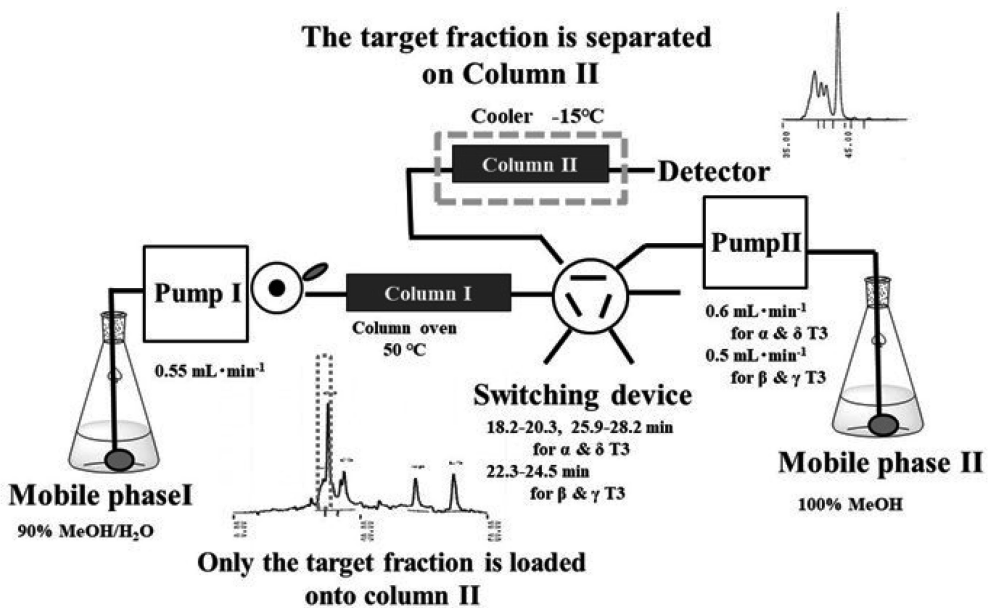


Fig. 9 2D-HPLC System for analysis of T3s

Column I : Chromolith Performance RP-18e (4.6 x 100 mm) x 2

Column II : Develosil C30-UG-3 (4.6 x 150 mm)

カラムと直列配置となった際の過度なカラム圧の上昇を抑制することができた。

Fig. 10 に標準試料、こめ油、小麦胚芽およびひまわり油を分析した際のクロマトグラムを示した。こめ油では、共存する成分によるピークと完全に分離し、その影響を受けることなく検出することができた。また、小麦胚芽では、保持時間からは判別が困難であった δ -T3 および α -T3 を明確なピークとして検出することができ、極微量な γ -T3 も検出することができた。今回の 2D-HPLC 法では、 α -T3 と δ -T3、および β -T3 と γ -T3 の組み合わせで、それぞれに異なる条件で分析を行う必要があった。また試料導入からピークが溶出し終わるまでに 1 時間程度の時間をそれぞれに要したが、本システムにより共存する成分の影響でピークの帰属が困難であったこめ油やひまわり油においても、それらの影響を全く受けることなく微量の T3 を分離・検出することが可能であった。また、ODS カラムで予備分離を行うため C30 カラムを汚染したり分離に影響を与えたりすることなく、1mg 程度までの試料油をシステムに導入することができ、極微量の T3 を精密分析するうえで非常に有効であった。更に、C30 カラムによる分離の間に、ODS カラムによる予備分離が可能であることから 50 分間隔で試料を導入することができ、また最初の ODS カラムからの画分を 2 つの C30 カラムに分けて導入し、同時並行的に分析することも可能で、これにより、1 回の試料導入で 4 種の T3 の精密分析を 50 分程度の間隔で行うことができた。

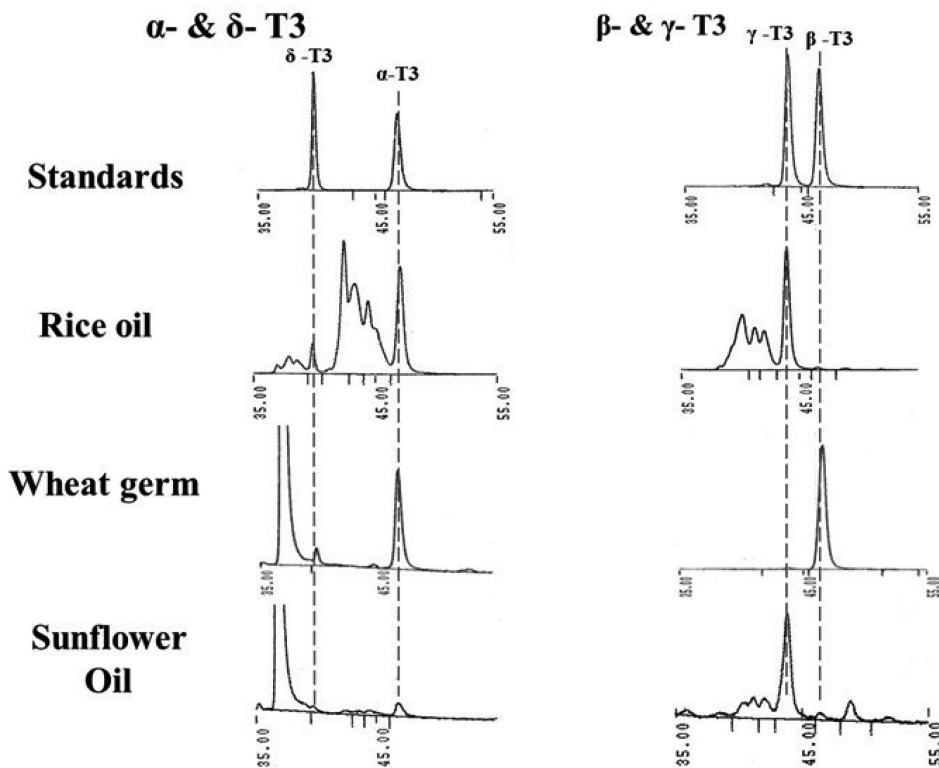


Fig.10 Typical chromatograms of T3s on 2D-HPLC system

4. 結論

逆相 HPLC 法を用い、これまで実現でなかった 8 種の VE 同族体の同時分析を、低温分離条件を適用することにより、これまでの順送 HPLC 法と同程度の分析時間および感度で実現することができた。また、比較的安価で、安全性の高いメタノールの単一溶媒系による分離・分析の実現により、回収した溶出液を簡単な蒸留等の処理により繰り返し移動相として利用することも可能で、コストの削減、および実験環境の改善とともに、環境負荷の低減にも寄与するものと考えられる。

また、従来法では共存する成分の影響について十分な検討はなされていなかったが、2D-HPLC 法への展開によりその影響を明らかとすることが可能となり、試料油として mg レベルの大量導入も可能であったことから、T3 の正確な分布を明らかとするうえで有効な方法といえる。また、共存する成分の生成過程などの研究にも応用が期待できる。

謝辞：トコトリエノールをご恵与いただいた東北大学・仲川清隆教授に感謝いたします。

本研究は [JSPS 科研費 JP16K07721](#) の助成を受けたものです。

引用文献

- 1) 厚生労働省：日本人の食事摂取基準（2015年版）の概要、p18（2015）
- 2) P. Sookwong, K. Nakagawa, Y. Yamaguchi, T. Miyazawa, S. Kato, F. Kimura and T. Miyazawa, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3350-3355（2010）
- 3) S. C. Cunha, J. S. Amaral, J. O. Fernandes, and M. Beatriz P. P. Oliveira, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3351-3356（2006）.
- 4) 日本薬学会：衛生試験法・注解 2005、金原出版、p.218-220（2005）
- 5) K. Akasaka and H. Ohrui, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63, 1209-1215（1999）
- 6) K. Akasaka and H. Ohrui, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68（1）, 153-158（2004）
- 7) K. Akasaka, T. Ohtaki and H. Ohrui, *J. Separation Science*, 29（10）, 1390-1398（2006）.
- 8) K. Akasaka, S. Tamogami, R. W. Beeman and K. Mori, *Tetrahedron*, 67, 201-209（2011）
- 9) Y. Lu, R. W. Beeman, J. F. Campbell, Y. Park, M. J. Aikins, K. Mori, K. Akasaka, S. Tamogami and T. W. Phillips, *Naturwissenschaften*, 98, 755-761（2011）
- 10) S. H. Ng, S. Shankar, Y. Shikichi, K. Akasaka, K. Mori, and J. Y. Yew, *P.N.A.S.*, 111（8）, 3056-3061（2014）
- 12) A. Yajima, K. Akasaka, T. Bakai, H. Maehara, T. Nukada, H. Ohrui, G. Yabuta, *Callosobruchus maculatus*, *Tetrahedron*, 62, 4590-4596（2006）.
- 13) A. Yajima, K. Akasaka, M. Yamamoto, S. Ohmori, T. Nukada and G. Yabuta, *J. Chem. Ecology*, 33（7）, 1328-1335（2007）
- 14) K. Shimomura, K. Akasaka, A. Yajima, T. Mimura, S. Yajima, K. Ohsawa, *J. Chem. Ecol.*, 36, 955-965（2010）