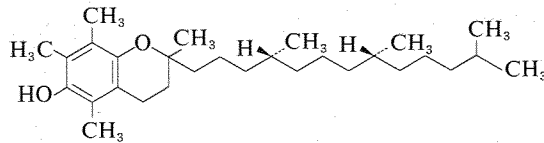


12 *dl*- $\alpha$ -トコフェロール及び *d*- $\alpha$ -トコフェロール*dl*- $\alpha$ -Tocopherol and *d*- $\alpha$ -Tocopherol $C_{29}H_{50}O_2$  : 430.71

## 1. 試験法の概要

食品中の *dl*- $\alpha$ -トコフェロール及び *d*- $\alpha$ -トコフェロールは、液体クロマトグラフィーにより定量する。天然には *d*- $\alpha$ -トコフェロールが分布している。したがって、定量値は、食品由来の *d*- $\alpha$ -トコフェロールと添加された *dl*- $\alpha$ -トコフェロール及び *d*- $\alpha$ -トコフェロールの合計値である。

2. 試験法 (液体クロマトグラフィー)<sup>1)</sup>

## (1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

## (2) 試料液の調製

① 動・植物性油脂<sup>2)</sup>

試料約 0.5g を精密に量り、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチル-6-クロマノール (PMC)・*n*-ヘキサン溶液 1ml を正確に量って加え、更に *n*-ヘキサンを加えて溶かし正確に 10ml とし、有機溶媒用メンブランフィルター (0.45 $\mu$ m) を用いてろ過し、ろ液を試料液とする。

## ② その他の食品

試料をあらかじめ粉碎し、約 0.5g を精密に量り、60ml 容の共栓付き遠沈管に入れる。これに、塩化ナトリウム溶液 (1 → 100) 1.0ml を加えて軽く振り混ぜる。更にピロガロール・エタノール溶液 (6 → 100) 7ml、水酸化カリウム溶液 (60 → 100) 1ml を加えて栓をし、70℃の水浴中でときどき振り混ぜながら 30 分間加温する。氷水中で冷却した後、塩化ナトリウム溶液 (1 → 100) 15ml 及び酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1 : 9) 15ml を加えて 5 分間激しく振とうし、再度氷水中で冷却した後、遠心分離 (5 分間, 3,000 回転/分) する。有機層をナス型

フラスコに移し、更に水層に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:9) 15ml を加えて同様の操作を2回繰り返す、先のフラスコに有機層を合わせる。全有機層を減圧下、40℃で溶媒を留去する。残留物に PMC・ヘキサン溶液 1ml を正確に量って加え、更に *n*-ヘキサンを加えて溶かして正確に 10ml とする。この液を有機溶媒用メンブランフィルター (0.45 $\mu$ m) を用いてろ過し、ろ液を試料液とする。

### (3) 検量線用標準液の調製

定量用 *dl*- $\alpha$ -トコフェロール<sup>3)</sup>又は *d*- $\alpha$ -トコフェロール 0.100g を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて溶かし正確に 50ml とし、保存用標準原液<sup>4)</sup>とする。その 5ml を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50ml とし、更にこの液 5ml を正確に量り、*n*-ヘキサンを加えて正確に 50ml とし、標準液とする (この液 1ml は、*dl*- $\alpha$ -トコフェロール又は *d*- $\alpha$ -トコフェロール 20.0 $\mu$ g を含む)。標準液 0, 2, 4, 6ml 及び 8ml をそれぞれ正確に量り、それぞれに PMC・ヘキサン溶液 1ml を正確に量って加え、*n*-ヘキサンを加えてそれぞれ正確に 10ml とし、検量線用標準液とする (これらの液 1ml は、それぞれ *dl*- $\alpha$ -トコフェロール又は *d*- $\alpha$ -トコフェロール 0, 4.0, 8.0, 12.0 $\mu$ g 及び 16.0 $\mu$ g を含む)。

### (4) 測定法

#### ① 測定条件<sup>5)</sup>

けい光光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム管：シリカゲルカラム<sup>6)</sup>、内径約 4.6mm、長さ約 250mm

カラム温度：30℃

移動相：*n*-ヘキサン・イソプロパノール・酢酸混液 (1,000:6:5)

流速：1.0ml/分

測定波長：励起波長 298nm、蛍光波長 325nm

試料注入量：4 $\mu$ l<sup>7)</sup>

#### ② 検量線

検量線用標準液それぞれ 4 $\mu$ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、それぞれの *dl*- $\alpha$ -トコフェロール及び PMC のピーク面積を測定し、*dl*- $\alpha$ -トコフェロール又は *d*- $\alpha$ -トコフェロールと PMC のピーク面積比を算出し、*dl*- $\alpha$ -トコフェロール又は *d*- $\alpha$ -トコフェロールの検量線を作成する。

#### ③ 定量<sup>8),9)</sup>

試料液 4 $\mu$ l を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、*dl*- $\alpha$ -トコフェロール又は *d*- $\alpha$ -トコフェロール及び PMC のピーク面積を測定し、*dl*- $\alpha$ -トコフェロール又は *d*- $\alpha$ -トコフェロールと PMC のピーク面積比を算出する。得られたピーク面積比及び検量線によって試料液

中の  $dl$ - $\alpha$ -トコフェロール又は  $d$ - $\alpha$ -トコフェロール濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) を求め、次式によって検体中の  $dl$ - $\alpha$ -トコフェロール又は  $d$ - $\alpha$ -トコフェロール含量  $C$  ( $\text{g/kg}$ ) を計算する。

$$C(\text{g/kg}) = \frac{A}{W \times 100}$$

A：試料液中の  $dl$ - $\alpha$ -トコフェロール又は  $d$ - $\alpha$ -トコフェロール濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )

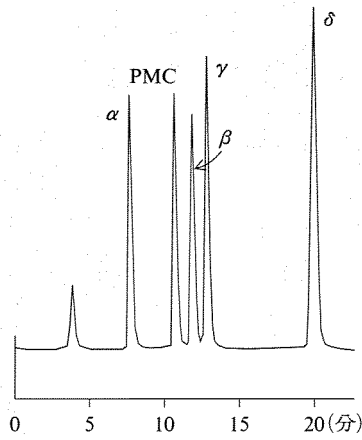
W：試料の採取量 (g)

#### 試薬・試液

1. イソプロパノール：「高速液体クロマトグラフ用」
2. エタノール：[特級]
3. 酢酸：[特級] 有機溶媒用メンブランフィルター ( $0.45\mu\text{m}$ ) を用いてろ過する。
4. 酢酸エチル：[特級]
5. 水酸化カリウム：[特級]
6. ピロガロール：[特級]
7.  $n$ -ヘキサン：「高速液体クロマトグラフ用」
8. 2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノール (PMC)：「ビタミン E 定量用」
9. PMC・ヘキサン溶液：PMC 50.0mg を正確に量り、 $n$ -ヘキサンを加えて溶かして正確に 50ml とし、保存用内部標準原液とする。その 5ml を正確に量り、 $n$ -ヘキサンを加えて正確に 100ml とする (この液 1ml は、PMC50.0 $\mu\text{g}$  を含む)。

#### [注]

- 1) 本法は、セザモール等妨害物質を含む試料では分析が困難な場合があり、フロリジルカラム等の固相抽出法による精製処理が必要である。なお、使用する容器は褐色容器を用いる。
- 2) 固形油脂の場合は一度低温で遠心分離した後、メンブランフィルターを用いてろ過した方がよい。
- 3) 定量用  $dl$ - $\alpha$ -トコフェロールには、 $d$ - $\alpha$ -トコフェロール標準品、又は日本薬局方標準品トコフェロールあるいはビタミン E 定量用  $d$ - $\alpha$ -トコフェロールを用いることができる。
- 4) 保存用標準  $dl$ - $\alpha$ -トコフェロール又は  $d$ - $\alpha$ -トコフェロール及び保存用内部標準原液は、遮光してヘッドスペースを窒素ガスで置換して冷蔵保存すれば約 1 カ月は安定である。
- 5) 移動相の組成及び流速は、カラムの状態等により適宜変更する。
- 6) ジオール系シリカゲルあるいはアミノ系シリカゲルも用いられる。
- 7) 試験液に油脂が混入するので、注入量は少ない方がカラムの劣化を防ぐ。
- 8) 本法による定量限界は、0.00025g/kg である。
- 9) 本法による液体クロマトグラムの一例を図に示す。



〈測定条件〉

カラム充填剤：WAKOUSIL 5SIL (5 $\mu$ m)

カラム管：内径 4.6mm, 長さ 250mm

各トコフェロール標準品：10 $\mu$ g/ml

PMC 内部標準品：5 $\mu$ g/ml

注図 12-1 トコフェロール同族体標準品の液体クロマトグラム