

# 食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成

四国地域イノベーション創出協議会  
地域食品・健康分科会 編

s-food@m.aist.go.jp

## 裸麦のトコフェロール・トコトリエノール

作成者：近畿中国四国農業研究センター 研究員 阿部大吾

### 1. 四国地域の裸麦について

イ（概要）：四国地域は裸麦の産地として知られ、作付面積は全国の約半分を占めている（平成20年農林水産統計）。裸麦は主に麦飯、押し麦、麦こがし、焼酎、麦味噌、麦茶などに使用されており、近年の食生活と健康に対する関心の高まりから、健康面での価値が見直されてきている。様々な特徴を持った品種も増えてきており、一般的な栽培品種の「イチバンボシ」「マンネンボシ」「トヨノカゼ」の他に、紫色でモチ性の「ダイシモチ」、二条で大粒の「ユメサキボシ」などがある。

ロ（食品あるいは含有成分の機能性）：裸麦は水溶性食物繊維、ポリフェノール、ビタミンE類のトコフェロール・トコトリエノールなど健康によいとされる機能性成分を多く含むことが知られている。特にトコトリエノールは近年注目されている成分であり、様々な生理機能が報告されている。

ハ（トコトリエノールを含む食品）：トコトリエノールを含む食品はパームオイル、米、麦類と限られており、米や麦類では糠やふすまなどの未利用部位に多いことや含まれる種類および含有量が大きく異なることが知られている。トコトリエノールは比較的熱に安定な物質であることから、加工された食品にも含まれている可能性が高い。原料麦やその加工品のトコトリエノール含量を調査することで、四国産品の機能性アピールや高付加価値化に利用することができる。

### 2. トコフェロール・トコトリエノールについての説明

ビタミンEは $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -トコフェロールおよびトコトリエノールの8つの同族体で構成されている（図1）。トコフェロールとトコトリエノールの構造的な違いは側鎖に3つの二重結合を持つかどうかであるが、この違いによってトコトリエノールがトコフェロールにはないさまざまな生理機能を持つことが明らかとなり注目されている。例えばトコトリエノールはトコフェロールの40~60倍の抗酸化作用を有することが知られており(1)、他にもコレステロール低下作用(2)、抗ガン作用(3)、血圧低下作用、神経細胞保護作用など多くの機能性を有することが報告されている。また、トコトリエノールの4種類でも生理機能に違いがあることが報告されている。トコフェロールは欠乏すると神経や筋に異常が現れることが知られているが、通常の食生活で欠乏することは稀である。機能性としては抗酸化作用を中心とした過酸化脂質の生成抑制作用や血管保護・抗血栓作用などが知られている。

1. E. Serbinova et al, Free Radic. Biol. Med., 10, 263-75 (1991)
2. A.A. Qureshi et al, Lipids, 30, 1171-1177 (1995)
3. T. Miyazawa et al, J. Nutr. Biochem., 20, 79-86 (2009)

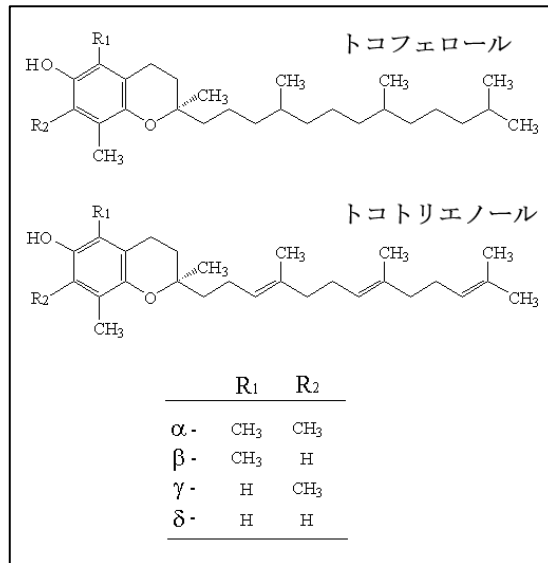


図 1. トコフェロールおよびトコトリエノールの構造

### 3. 定量分析の方法について (分析法はPanfiliらの文献に若干改変を加えたものである)

ビタミンEはα-、β-、γ-、δ-トコフェロールおよびトコトリエノールの8つの同族体で構成されており、これらすべてを高速液体クロマトグラフィーにより同時定量する方法を述べる。

#### 「3-1 準備する器具など」

1. シェーカー
2. 粉砕機
3. 遠心機 (10ml ガラス遠沈管をセットできるもの)
4. 遠心濃縮機 (10ml ガラス遠沈管をセットできるもの)
5. 高速液体クロマトグラフシステム (蛍光検出器およびカラム恒温槽を備えたもの)
6. シリカゲルカラム (Mightysil Si60 4.6×150mm (5 μM)、関東化学製)
7. ガードカラム
8. シリンジフィルター (PTFE、0.45 μm)
9. スクリューキャップ付きガラス遠沈管 (10ml)
10. vortex ミキサー
11. ガラスパスツールピペット

#### 〔試薬〕

1. ヘキサン (特級と HPLC 用)
2. 酢酸エチル (特級)
3. エタノール (特級)
4. ジオキサン (HPLC 用)
5. 超純水
6. イソプロパノール (HPLC 用)
7. ブチルヒドロキシトルエン (BHT)
8. 塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液 (10g/L)
9. 水酸化カリウム (KOH) 水溶液 (600g/L)
10. ピロガロール液 (60g/L エタノール)

11. トコフェロール( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ )標準品(エーザイ)
12. トコトリエノール( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ )標準品(シグマもしくは和光純薬)
13. 窒素 (ボンベ)

標準品は各々1mg/ml程度の濃度になるようにエタノールに溶解し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保管する。分析にはヘキサン/イソプロパノール (99:1, v/v) で $5\mu\text{g/ml}$ に希釈して使用する。

### 「3-2 分析用試料の前処理・調製方法」

1. 粉碎した大麦粉を500mg精秤し、10mlガラス遠沈管に入れる。
2. 遠沈管の中にエタノール $500\mu\text{l}$ 、NaCl水溶液 $500\mu\text{l}$ 、ピロガロール液 $1250\mu\text{l}$ を加え vortex。
3. KOH水溶液を加え、気相を窒素に置換し、vortex。
4. シェーカーで揺らしながら常温で18時間けん化。
5. 氷上へ移し、冷NaCl水溶液を $3.75\text{ml}$ 加えて vortex。
6. ヘキサン/酢酸エチル(9:1, v/v)を加え、10分間振盪後、遠心(1,000×g、15分、常温)。
7. 上層をガラスパスツールピペットで別の遠沈管に移し、遠心濃縮により溶媒を除去する。
8. この工程(6-7)をさらに2回繰り返す。
9. 乾固した抽出物に $250\text{mg/l}$ のBHTを含むヘキサン/イソプロパノール(99:1, v/v)を $2\text{ml}$ 加え溶解し、 $0.45\mu\text{m}$ フィルターを通してHPLCサンプルとする。

### 「3-3 HPLCによる分析方法」

[移動相の調製]

移動相はヘキサン/ジオキサン(96:4, v/v)。

[分析条件]

1. 検出器、恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下の通りとする。  
 蛍光検出器：励起 $294\text{nm}$ 、蛍光 $326\text{nm}$   
 恒温槽： $40^{\circ}\text{C}$   
 流量：毎分 $2\text{ml}$   
 注入量： $20\mu\text{l}$

[定性および定量]

1. 分離された物質の定性は保持時間(標準物質と比べ)により行う。
2. 定量には標準試料を用い、クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出する。標準物質のクロマトグラムを図1、典型的なクロマトグラフを図2に示す。

## 4. 分析例

分離された物質は保持時間から(標準物質と比べ)特定する。定量には標準試料を用い、クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出する。以下に典型的なクロマトグラフを図に示す。以降の図および表ではトコフェロールをToc、トコトリエノールをT3と省略する。

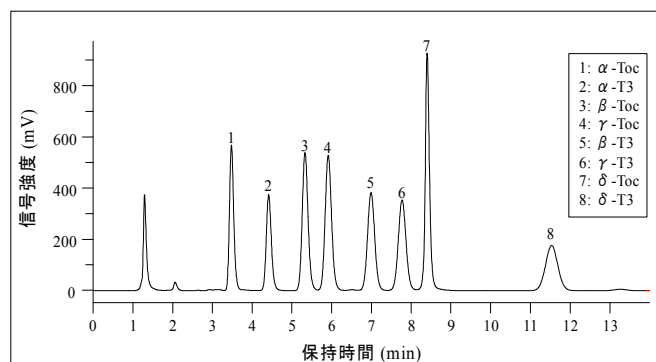


図1. 標準物質のクロマトグラフ

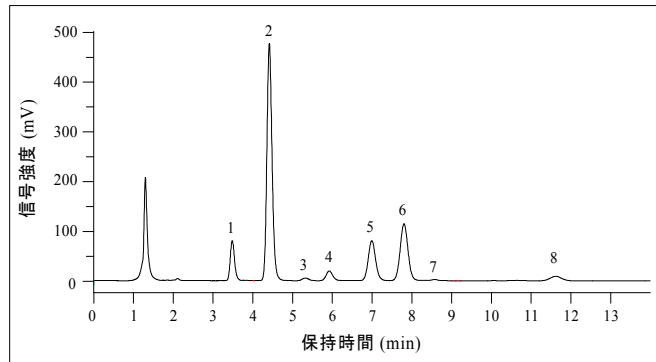


図2. ダイシモチ（裸麦）サンプルのクロマトグラフ

## 5. 食品の分析結果例：

上記手法を用いて、ダイシモチ（裸麦）、イチバンボシ（裸麦）、加水・加熱したイチバンボシおよびコシヒカリ（米）の分析を行った結果を以下の表1に示す。

表1. ダイシモチおよびコシヒカリの定量結果\*

	ビタミンE類含有量 (mg/kg dw)								total T	total T3	total
	$\alpha$ -T	$\alpha$ -T3	$\beta$ -T	$\beta$ -T3	$\gamma$ -T	$\gamma$ -T3	$\delta$ -T	$\delta$ -T3			
ダイシモチ(裸麦)	6.4	46.6	0.6	11.0	2.1	16.8	0.2	1.9	<b>9.3</b>	<b>76.3</b>	<b>85.6</b>
イチバンボシ(裸麦)	6.7	33.9	0.9	6.5	1.6	10.3	0.6	1.8	<b>9.9</b>	<b>52.6</b>	<b>62.4</b>
加水加熱イチバンボシ(裸麦)	5.4	26.4	1.0	5.3	1.4	8.7	0.6	1.7	<b>8.4</b>	<b>42.2</b>	<b>50.7</b>
コシヒカリ(米)	12.8	6.8	0.8	0.6	1.6	20.3	0.0	1.3	<b>15.3</b>	<b>29.0</b>	<b>44.4</b>

(\*注意) なおこの測定結果は数多くの裸麦のうちの一例であり、裸麦一般の分析結果ではない。

## 6. 分析上の留意、注意点：

ビタミンE類は光に弱い性質を持っているので、保存する容器は褐色のものを使用し、作業中はできるだけ遮光するよう心がける。

## 7. 定量法に関する引用・参考文献

1. G. Panfili, A. Fratianni and M. Irano, J. Agric. Food Chem., 51, 3940-3944 (2003)

—以上—

[トップページに戻る](#)