

# I 研 究 報 告

〔山梨衛公研年報 第30号 1~4頁, 1986〕

## 食品中のビタミンAの分析法の検討

望月恵美子 深澤喜延 中山 昭

Determination of Vitamin A in Foods

Emiko Mochizuki, Yoshinobu Fukasawa and Akira Nakayama

脂溶性ビタミンのうちで最初に発見されたビタミンAは、抗眼性ビタミンとも呼ばれる。古くから夜盲症に有効な物質として知られているが、食糧需給が安定した今日では、ビタミンA欠乏症はほとんど見られない。上皮細胞膜保護、感染防止作用などの生理作用<sup>1)</sup>に加え、最近の研究ではビタミンAに制ガン作用のあることもわかってきた<sup>2)</sup>。

ビタミンAは動物の肝臓、うなぎなどに多く含有されており、プロビタミンAと称されるカロチノイド色素もビタミンA効力を有する。ビタミンA油(油性ビタミンA脂肪酸エステル)、粉末ビタミンAは強化用として、食品添加物に指定されており、マーガリン、魚肉ハム、ソーセージ、みそ、育児用調製粉乳などに繁用されている<sup>1)</sup>。

ビタミンAの分析法としては、三塩化アンチモンによるカール・プライス比色法<sup>3)</sup>や吸収スペクトルによる方法<sup>4)</sup>が採用されているが、呈色妨害物質や着色物質を除去するために複雑な前処理を必要とする。近年、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析が試みられるようになり、製剤<sup>5)</sup>、油脂およびマーガリン<sup>6~11)</sup>、乳および乳製品<sup>10~15)</sup>、乳児用製品<sup>11,15~17)</sup>、穀物試料<sup>18~20)</sup>についての報告が種々見られる。その多くは紫外外部吸収(UV)によるHPLC法をとり入れている。「衛生試験法・注解1980 追補(1983)」および「食品中の食品添加物分析法」では蛍光検出器を用いるHPLC法を採用している<sup>21,22)</sup>。

今回、食品添加物摂取量調査を行なう機会を得て、ビタミンAの分析を担当した。そこで、衛生試験法および食品添加物分析法に記載されている方法を参考に、分析妨害物の除去と操作の簡略化を目標にHPLCを用いてビタミンAの分析法について検討したので報告する。

### 試 験 方 法

#### 1. 試料および試薬

試料は山梨県内で市販されている食品を対象とした。標準溶液：ビタミンAパルミテート100万IU/g油性(和光純薬製)50mgを精秤し、n-ヘキサン50mlに溶解し標準原液とした。適宜希釈して、けん化してビタミンAアルコールを得た。

$\beta$ -カロチン(Sigma製)は、25mgを精秤し、ベンゼン50mlに溶解し、標準原液とし、適宜希釈して用いた。

カートリッジカラムは、Sep-Pakシリカカートリッジ(Waters製)を使用し、その他の試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を用いた。

#### 2. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ：使用したHPLC装置はすべて島津製作所製であり、LC-2にSPD-1型UV検出器およびRF-510型蛍光検出器を接続した。測定は、UV検出器が325nm、蛍光検出器は励起波長340nm、蛍光波長460nmに設定した。カラムは日本クロマト工業(株)製のNucleosil<sub>9</sub>C<sub>18</sub>(250×4.0mm i.d.)を使用し、移動相はメタノール、流速0.5ml/minとした。

自記分光光度計は、日立製作所製240型を用いた。

#### 3. 分析操作

混合した食品群試料は5~20gを共通摺り合せフラスコにとり、エタノール50mlおよび10%ピロガロール・エタノール溶液2mlを加えた。よく混和した後、KOH溶液(75→100)5~10mlを加え、還流冷却器をつけ、ホットプレート上でスターラーを用いて攪拌しながら30分間、けん化した。

冷後、水30mlを加え、褐色分液ろうとに移し、n-ヘ



キサン 40ml で 3 回抽出した。全 n-ヘキサン抽出液を合わせて、水洗し、pH を 7 とした後、無水硫酸 ナトリウムを加えて乾燥した。

n-ヘキサン抽出液は、45°C の水浴中で約 5 ml に減圧濃縮した後、Sep-Pak シリカカートリッジに約 5 ml/min の速度で吸着した。n-ヘキサン 5 ml、4% アセトン含有 n-ヘキサン 5 ml で洗滌した後、15% アセトン含有 n-ヘキサン 5 ml で溶出した。溶出液は減圧下で溶媒を留去し、残留物をメタノールで定容 (1~3 ml) とし、その 20  $\mu$ l を HPLC に注入した。

#### 4. HPLC による定量

ビタミン A パルミテート標準液 5 ml を分析操作に従って試料と同様に処理して、ビタミン A アルコールとした。ビタミン A アルコールは 0.3~10IU/ml の範囲の濃度の標準溶液に調製した。その 20  $\mu$ l を HPLC に注入して得られたクロマトグラムよりピーク高を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。定量は蛍光法を採用したが、同時に UV 吸収もモニターした。

### 結果および考察

#### 1. けん化および抽出条件の検討

食品中のビタミン A の多くはビタミン A パルミテートであるが、ビタミン A アセテートも食品添加物として使用される<sup>21)</sup>ため、前処理として迅速な直接けん化操作を採用し、全ビタミン A をビタミン A アルコールとして定量した。試料採取量と KOH 量は試料中のビタミン A 含量および油脂含量を考慮して適宜増減した。脂質含量が低い試料をけん化する時、けん化フラスコ中のエタノール濃度が低いとビタミン A アルコールの溶媒移行率が極度に低下する<sup>23)</sup>ため、けん化フラスコ中のエタノール量は試料および試液の合計量の 50% 以上になるようにした。又、群別試料中の塊状化を防ぐため、ホットプレート上でスターラーを用いて攪拌しながら加熱分解を行った。

溶媒抽出は古くから行なわれている方法であるが、抽出溶媒について検討した報告はほとんどない。一般的には、エチルエーテル、石油エーテル、n-ヘキサンが繁用されている。衛生試験法では石油エーテルを、食品添加物分析法ではエチルエーテルを採用している。エチルエーテルには過酸化物の存在が予想され<sup>22)</sup>、かつ石けん分が溶解する<sup>23)</sup>。石油エーテルでは定量的抽出が難しいが n-ヘキサンでは石けん分が抽出されない<sup>23)</sup>とされている。石油エーテルは、炭素数 5~6 の飽和炭化水素 (n-ヘキサン含量 5~15%) を主成分とし、沸点範囲約 30~70°C の石油留分であるが、高揮発性かつ引火性である<sup>24)</sup>。n-ヘキサンも引火点の低い可燃物であるが、沸点

範囲が 66~69°C と狭く、炭化水素化合物の中でも毒性が低いとされている<sup>24)</sup>ことから、抽出溶媒には n-ヘキサンを採用した。

#### 2. クリーンアップ法の検討

UV 法はビタミン A の極大吸収波長が 325nm であることを利用した測定法であり、蛍光法はビタミン A が紫外線照射によって発する蛍光が、特異な蛍光極大波長を有することを利用した方法である<sup>25)</sup>。しかし、高純度のビタミン A 以外の試料では両法とも、色素等不けん化物により定量を妨害される<sup>25)</sup>ことがあると指摘されている。

カロチン着色マーガリンや魚肉、ハム、ソーセージ等に含まれるビタミン A を分析する際、定量妨害物質の除去には、エチルエーテル/n-ヘキサン (1:9) の溶出液を用いてアルミナカラムクロマトグラフィーを行なう方法<sup>22)</sup>がとられている。AOAC でも同じくアルミナカラムクロマトグラフィーを採用し、 $\beta$ -カロチンとビタミン A アルコールをそれぞれ 4% アセトン含有 n-ヘキサン、15% アセトン含有 n-ヘキサンで溶出し、分別定量している<sup>3)</sup>。

n-ヘキサン抽出液中の不けん化物の吸収曲線 (図 1) は 2~6 群とも、ほぼ同様の吸収傾向を示した。極大吸収波長は 445nm と 470nm 付近にあった。 $\beta$ -カロチンの極大吸収波長は 453nm と 481nm<sup>26)</sup>である。しかし、果実、野菜を含む群では、 $\beta$ -カロチンによる影響が著しいため、 $\beta$ -カロチンの除去を目的に、操作が簡便で、迅速な、Sep-Pak カートリッジカラムを用いてクリーンアップを検討した。

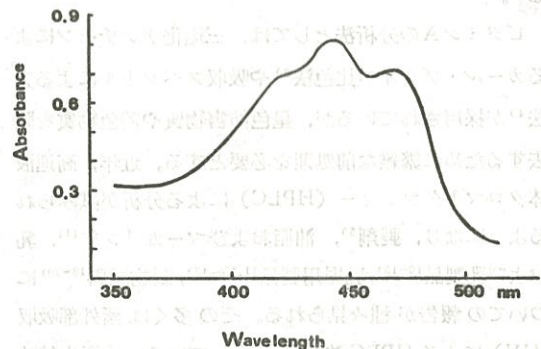


図 1 n-ヘキサン抽出液 (第 5 群、油脂・乳類) の不けん化物の吸収

まず、Sep-Pak アルミナ(N)カートリッジカラムを用いて、ビタミン A アルコールの吸着、溶出を検討した。n-ヘキサンに溶かしたビタミン A アルコールはカートリッジに吸着されたが、4% および 15% アセトン含有 n-ヘキサンでは全く溶出されなかった。井口ら<sup>7)</sup>は、Sep-Pak シリカカートリッジカラムを用いて、マーガリン中のビタミン A パルミテートをトリグリセライドなどの脂



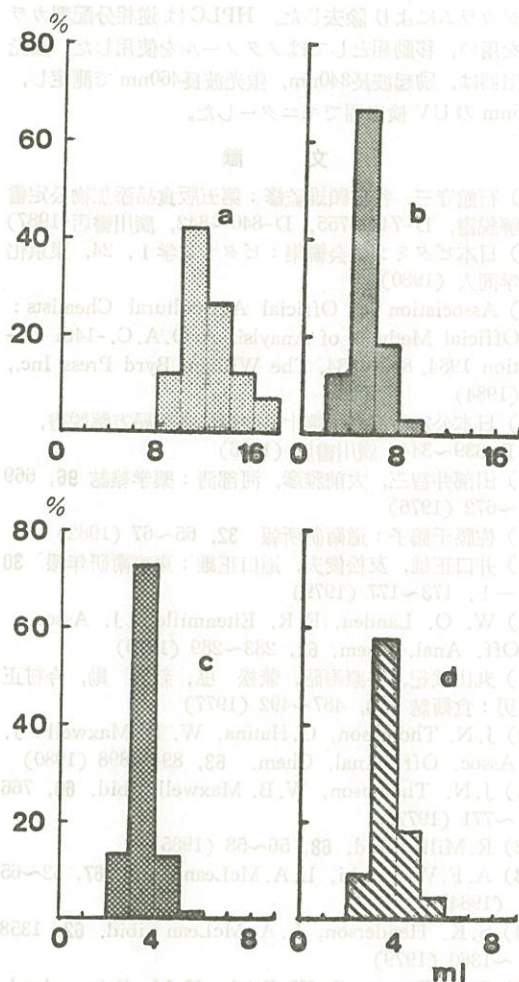


図2 Sep-Pak シリカカートリッジカラムからの  
ビタミンAアルコールの溶出  
負荷量：30IU (a, b, c) 200IU (d)  
溶出液：アセトン：n-ヘキサン (a=4：  
96 b=10：90 c d=15：85)

質と分別し、良い結果を得ている。そこで、Sep-Pak シリカカートリッジカラムを用いて、ビタミンAアルコールの吸着、溶出を調べた。ビタミンAアルコールはn-ヘキサンでSep-Pak シリカカートリッジに吸着され、n-ヘキサンのみでは全く溶出しなかった。n-ヘキサン中のアセトン含量を2, 4, 10, 15, 20%と変えて、Sep-Pak シリカカートリッジからの溶出を検討したところ、低濃度のアセトン含有n-ヘキサンでは多量の溶媒量が必要とした。15%アセトン含有n-ヘキサンでは5 mlの溶出で十分であった(図2)。β-カロチンは4%アセトン含有n-ヘキサン5 mlで負荷量10μg, 200μgがほぼ全量溶出された(図3)。

油脂食品に使用される添加物としては、ビタミンA, β-カロチン以外に保存料, 着色料, 抗酸化剤などがある

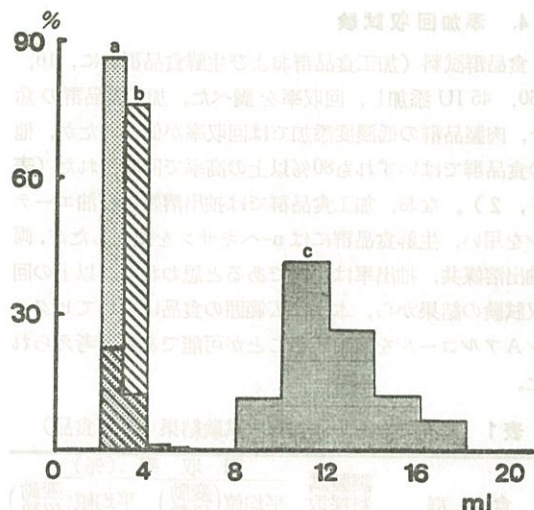


図3 Sep-Pak シリカカートリッジカラムからの  
β-カロチンの溶出  
a：β-カロチン 10μg  
b：β-カロチン 200μg  
c：ビタミンAアルコール 30IU  
溶出液：アセトン：n-ヘキサン (4：96)

が、不けん化物層へ移行するBHA, BHT, α-, γ-, δ-トコフェロールは、UV吸収法でのビタミンAの定量に影響を及ぼさない<sup>9)</sup>とされている。本分析条件下(励起波長340nm, 蛍光波長460nm)では、BHA, BHT, トコフェロール類とも蛍光を示さなかった。

### 3. HPLC 移動相の検討

衛生試験法では逆相分配型カラム, 移動相として、エタノール・水 (95：5) を使用している<sup>21)</sup>。食品添加物分析法では、順相型カラム, 移動相としてn-ヘキサン・イソプロパノール・酢酸 (194：5：1) を用いている<sup>22)</sup>。佐藤<sup>9)</sup>はレチノール, ビタミンAアセテートおよびパルミテートの分離をNucleosil C<sub>18</sub>カラムで試み、移動相として、メタノール, アセトニトリル・メタノール・水 (54：36：10) およびアセトニトリル・テトラヒドロフラン・水 (45：45：10) を検討し、前二者の移動相で、ビタミンAアルコールの分離定量が可能だとしている。吉田<sup>20)</sup>の報告では、メタノール-水系におけるビタミンAアルコールの保持時間の検討を行なっている。メタノール中の水含量を10%まで上げて、ビタミンAアルコールの保持時間はほとんど変化していない。そこで、エタノール・水 (95：5) とメタノールを用いて、ビタミンAアルコールの保持時間, ピーク形状, 感度および分離能を比較検討したところ、両二者の移動相の間に差はみられなかったため、移動相として、メタノールを使用した。



#### 4. 添加回収試験

食品群試料(加工食品群および生鮮食品群)に, 16, 160, 45 IU 添加し, 回収率を調べた。加工食品群の魚介, 肉製品群の低濃度添加では回収率が低かったが, 他の食品群ではいずれも80%以上の高率で回収された(表1, 2)。なお, 加工食品群では抽出溶媒に石油エーテルを用い, 生鮮食品群にはn-ヘキサンを使用した。両抽出溶媒共, 抽出率は良好であると思われた。以上の回収試験の結果から, 本法は広範囲の食品についてビタミンAアルコールを定量することが可能であると考えられた。

表1 ビタミンAの添加回収試験結果(加工食品)

食品群	調製試料採取量(g)	回収率(%)	
		平均値(変動係数)	平均値(変動係数)
第1群(調味嗜好飲料)	15	99.4 (7.2)	102.2 (4.1)
第2群(穀類)	15	85.0 (13.7)	79.5 (6.5)
第3群(いも・豆類)	15	88.9 (2.8)	86.9 (13.3)
第4群(魚介・肉類)	10	78.0 (9.8)	107.0 (11.3)
第5群(油脂・乳類)	4	83.7 (3.7)	93.3 (6.6)
第6群(砂糖・菓子類)	15	81.2 (11.1)	97.6 (11.7)
第7群(果実・野菜・海藻類)	15	102.3 (6.2)	84.7 (13.8)
第8群(加工食品その他)	10	89.3 (3.9)	91.4 (3.2)

n = 3

表2 ビタミンAの添加回収試験結果(生鮮食品)

食品群	調製試料採取量(g)	回収率(%)	
		平均値(変動係数)	平均値(変動係数)
第1群(穀類等)	10	108 (2.7)	
第2群(果実類)	10	102 (3.9)	
第3群(野菜等)	10	99.5 (5.7)	
第4群(魚介類)	6	94.0 (17.7)	
第5群(肉卵類)	6	88.4 (9.7)	
第6群(乳類)	6	100 (6.9)	

n = 3

#### まとめ

食品中のビタミンAの定量法について, 高速液体クロマトグラフィーで分析する方法を検討した。

食品中のビタミンAをけん化し, n-ヘキサンで抽出しビタミンAアルコールとして検出した。不けん化物, ことに色素に由来する妨害物を Sep-Pak シリカカード

リにより除去した。HPLCは逆相分配型カラムを用い, 移動相としてはメタノールを使用した。蛍光検出器は, 励起波長340nm, 蛍光波長460nmで測定し, 325nmのUV検出器でモニターした。

#### 文献

- 1) 石館守三, 谷村頭雄監修: 第五版食品添加物公定書解説書, D-745~755, D-840~842, 廣川書店(1987)
- 2) 日本ビタミン学会編集: ビタミン学 I, 24, 東京化学同人(1980)
- 3) Association of Official Agricultural Chemists: Official Methods of Analysis-A.O.A.C.-14th edition 1984, 830~834, The William Byrd Press Inc., (1984)
- 4) 日本公定書協会: 第十一改正日本薬局方解説書, B-339~344, 廣川書店(1986)
- 5) 田部井智三, 大前雅彦, 河部清: 薬学雑誌 96, 669~672 (1976)
- 6) 佐藤千鶴子: 道衛研所報 32, 65~67 (1982)
- 7) 井口正雄, 友松俊夫, 道口正雄: 東京衛研年報 30-1, 173~177 (1979)
- 8) W. O. Landen, R.R. Eitenmiller: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 283~289 (1979)
- 9) 丸山武紀, 牛原寿昭, 兼松 弘, 新谷 助, 今村正男: 食衛誌 18, 487~492 (1977)
- 10) J.N. Thompson, G. Hatina, W. B. Maxwell: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63, 894~898 (1980)
- 11) J.N. Thompson, W.B. Maxwell: ibid. 60, 766~771 (1977)
- 12) R. Mills: ibid. 68, 56~58 (1985)
- 13) A. F. Wickroski, L. A. McLean: ibid. 67, 62~65 (1984)
- 14) S. K. Henderson, L. A. McLean: ibid. 62, 1358~1360 (1979)
- 15) S. A. Barnett, L. W. Frick, H. M. Baine: Anal. Chem. 52, 610~614 (1980)
- 16) W. O. Landen, D. M. Hines, T. W. Hamill, J. I. Martin, E. R. Young, R. R. Eitenmiller, A. M. Soliman: J. Assoc. Anal. Chem. 68, 509~511 (1985)
- 17) W. O. Landen: ibid. 65, 810~816 (1982)
- 18) W. O. Landen: ibid. 63, 131~136 (1980)
- 19) W. A. Widicus, J. R. Kirk: ibid. 62, 637~641 (1979)
- 20) 吉田俊一, 小塚信一郎, 花井潤師, 西野茂幸, 白石由美子, 青木裏, 高杉信男: 札幌市衛研年報 9, 81~85 (1981)
- 21) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 1980 追補版 (1983) 1288~1289 金原出版(1983)
- 22) 厚生省環境衛生局食品化学課編: 食品中の食品添加物分析法 346~358 講談社(1982)
- 23) J.N. Thompson: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 727~738 (1986)
- 24) 浅倉照三, 戸倉仁一郎, 大河原信, 熊野谿従, 妹尾学: 溶剤ハンドブック 232~234, 149~152 講談社(1982)
- 25) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 1980 196~200 金原出版(1980)
- 26) 同上, 202