

である。

4) 食品中には様々な夾雑物質が存在するため、精製操作は必要である。なお、精製は陽イオン交換カラム (BOND ELUT Jr. SCX 等) を用いるバッチ処理によっても行うことが出来る。

5) 検量線の範囲を超える場合は、アルカリ分解前に塩酸-エタノール溶液で希釈する。

6) 水酸化ナトリウムの濃度は、1~20%の範囲では高いほどよいが、反応管内の詰まりを防ぐため15%程度が適当である。フェリシアン化カリウム濃度は、反応ポンプにより、最適濃度が異なるので、適宜変更すること(例0.001~0.05%)。

#### [参考文献]

- 1) 吉田幹彦, 菱山隆, 五十嵐友二: 日本食品科学工学会誌, 55, No. 9, 421 (2008)

## 26 ビタミンB<sub>2</sub>

### (1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

#### ① 機器, 試薬

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC): 蛍光検出器付き
- ・カラム: 逆相分配型, 内径4.6mm, 長さ150mm
- ・標準ビタミンB<sub>2</sub>: 国立衛生試験所日本薬局方標準品「リボフラビン標準品」を使用する。
- ・その他の試薬は, 25 22 ビタミンB<sub>1</sub>, (1), ①と同様のものを用いる。
- ・ガラス器具は褐色のものを使用する。

#### ② 試験溶液の調製

25 ビタミンB<sub>1</sub>, (1), ②と同様の操作を行い, 酵素処理後の試料溶液を試験溶液とする<sup>注2)</sup>。

#### ③ 標準溶液の調製

##### 1) 標準原液

標準ビタミンB<sub>2</sub>を105℃で2時間乾燥し<sup>注3)</sup>, 30分間デシケーター内で放冷後, 1L容の褐色メスフラスコに50mgを精密に量り取る。酢酸4mlと温水約700mlを加え超音波にかけながら溶かす。冷却後, 水で定容する<sup>注4)</sup> (50μg/ml, 冷暗所で6ヵ月は安定, 6ヵ月ごとに<sup>注5)</sup>調製する)。

##### 2) 標準溶液

標準原液4mlを200ml容の褐色メスフラスコに正確に量り, 酢酸緩衝液 (pH4.5) <sup>注4)</sup>で定容する (1.0μg/ml, 用時ごとに<sup>注5)</sup>調製する)。

##### 3) HPLC用標準溶液

標準溶液を酢酸緩衝液 (pH4.5) <sup>注4)</sup>で希釈し, 0.1, 0.05及び0.02μg/mlとする<sup>注6)</sup>。

#### ④ 測定

試験溶液の一定量(例20μl)を高速液体クロマトグラフに注入し, ビタミンB<sub>2</sub>のピーク面積または高さを測定し, する。あらかじめ同量のHPLC用標準溶液20μlを高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から, 試料中のビタミンB<sub>2</sub>含量を求める。

#### ⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注3)</sup>

カラム: 内径4.6mm, 長さ150mm, ステンレス製<sup>注4)</sup>

移動相: 酢酸緩衝液 (pH4.5) - メタノール (65:35V/V)

検出器: 蛍光分光光度計

測定波長: 励起波長445nm, 蛍光波長530nm

流量：1.0ml/分

温度：35℃

注入量：20 $\mu$ l

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミンB}_2\text{含量 (mg/100g)} = C \times V \times N \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

$$\text{試料中のビタミンB}_2\text{含量 (mg/100g)} = C \times V \times N \times 100/W \times 10^{-3}$$

C：検量線から求めたビタミンB<sub>2</sub>濃度 ( $\mu$ g/ml)

V：定容量 (ml)

N：希釈率

W：試料採取量 (g)

[注]

1) 酵素分解なしで高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンB<sub>2</sub>リン酸エステルを分別定量する方法もあるが、食品中のビタミンB<sub>2</sub>リン酸エステルは、大部分が遊離のB<sub>2</sub>になってから吸収されるため、ここでは酵素分解ですべて遊離B<sub>2</sub>とした後定量する。

食品添加物として用いられるビタミンB<sub>2</sub>酪酸エステルは、酸分解することで総ビタミンB<sub>2</sub>として求めることができる。

2) タカジアスターゼBの酵素分解に使用する酵素中にビタミンB<sub>2</sub>が若干(約0.2mg/100g)含まれている場合はため、ロットごとに含量を求めて補正する必要がある。ただし、試料中にビタミンB<sub>2</sub>リン酸エステルを含まないかまたは無視できる場合は酵素分解を省略しても良い。

3) 標準ビタミンB<sub>2</sub>の水分を測定して、標準溶液の濃度を補正することも可能である。

4) 標準原液及び標準溶液の酸化を防ぐ為に、抗酸化剤(例えばチオ尿素)を加えると効果的である。

5) 保存期間及び温度条件については、予め標準溶液の保存安定性データを確認できれば、変更することが可能である。

6) 予めデータを確認し、検量線の直線性を確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能である。

7) 感度を向上させるためには検出器のセル容量の大きいものがよい(例えば12 $\mu$ l)。

8) Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS-II Cosmosil-C<sub>18</sub>-Econopae (ナカライテスク製)あるいは相当品を用いる。

(2) ルミフラビン法

① 機器、試薬

・蛍光光度計：励起波長440nm、蛍光波長525nmで測定可能なもの。

・1mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム(特級)41.7gを水で溶かし1Lとする。

・4%過マンガン酸カリウム溶液：褐色瓶に保存する。

・3%過酸化水素水：過酸化水素水を水で希釈する。

・クロロホルム：特級、蛍光のないもの。

・その他の試薬は、ビタミンB<sub>1</sub>分析法と同様のもの、また特に指定のない限り特級を用いる。

② 試験溶液の調製

25 ビタミンB<sub>1</sub>, (1), ②と同様の操作を行い, 酵素処理後の試料溶液を試験溶液とする。ここで得られる試験溶液は, リボフラビン0.1~0.3 μg/ml が望ましい。

③ 標準溶液の調製

標準ビタミンB<sub>2</sub> 15mg を精密に量りとり, 酢酸 3ml に溶かし, 水で ~~1,000~~1000ml に定容する。この溶液を 0.3% 酢酸で希釈し, 1 μg/ml を調製する。

④ 測定

試験溶液 5ml を 3本の試験管にとる (a, b, c) (cは褐色試験管)。aには標準溶液 (1 μg/ml) 1ml を, b及びcには水 1ml を正確に加える。それぞれに 1mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3ml を加え, a及びbは蛍光灯 (20W×2本, 試験管までの距離 10cm) で1時間照射し, cは暗所に静置する。1時間後 a, b及びcに酢酸 0.5ml を加える。次に a, b及びcに 4%過マンガン酸カリウム溶液 0.5ml を加え, 混合後1分間放置する。次に 3%過酸化水素水 0.5ml を加える。クロロホルムを正確に 10ml 加え, 5分間振とうする。上層を除き, クロロホルム層に無水硫酸ナトリウム約 2g を加えて脱水する。aの蛍光光度計の目盛を 100%とし, b及びcを測定し, 試料中のビタミンB<sub>2</sub>含量を求める。

⑤ 計算

$$\text{試験溶液 5ml 中のビタミン B}_2 \text{量 } (\mu\text{g}) = \frac{b-c}{a-b}$$

$$\text{試料中のビタミン B}_2 \text{含量 (mg/100g)} = C \times \frac{V}{5} \times N \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

$$\text{試験溶液 5ml 中のビタミン B}_2 \text{量 } (\mu\text{g}) = (b-c) / (a-b)$$

$$\text{試料中のビタミン B}_2 \text{含量 (mg/100g)} = C \times V / V' \times N \times 100 / W \times 10^{-3}$$

C : 試験溶液 5ml 中のビタミン B<sub>2</sub> 量 (μg)

V : 定容量 (ml)

V' : 反応に用いた試験溶液量 (5ml)

N : 希釈率

W : 試料採取量 (g)

27 ビタミンB<sub>6</sub>

(1) 微生物定量法

① 試薬

・ピリドキシン標準溶液 : 塩酸ピリドキシン (国立衛生試験所標準品日本薬局方標準品) 100mg を 25% (V/V) エタノール溶液に溶かし, 正確に 100ml とする。更に, 水で希釈して 5ng/ml とするようになる。

- ・使用菌株：Saccharomyces cerevisiae(ATCC 9080)
- ・ビタミンB※6※ 測定用培地 (1L 中, pH5.0±0.1)

カザミノ酸 8g  
 イノシトール 50mg  
 塩酸チアミン 500 μg  
 ニコチン酸 5mg  
 パントテン酸カルシウム 5mg  
 ビオチン 16 μg  
 塩化カリウム 850mg  
 グルコース 100g  
 塩化カルシウム 250mg  
 硫酸マグネシウム 250mg  
 硫酸マンガン 5mg  
 リン酸二水素カリウム 1.1g  
 塩化第二鉄 5mg  
 クエン酸カリウム 10g  
 クエン酸 2g

定量用培地は調製したものが市販されている<sup>注1)</sup>。

- ・菌保存用培地 (1L 中, pH5.0±0.1)

ペプトン 5g  
 酵母エキス 3g  
 グルコース 10g  
 粉末寒天 3g  
 麦芽エキス 3g

- ・前培養培地：菌保存用培地に同じ。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

#### ② 接種菌液の調製

Saccharomyces cerevisiae の保存菌株を前培養培地に接種し、30℃で20時間程度培養する。培養後菌体を1白金耳とり、600nmにおける透過率80～90%となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

#### ③ 試験溶液の調製

試料 2g<sup>注2)</sup>を精密に量り、0.055mol/L塩酸 180mlを加え、121℃、4時間又は0.5mol/L硫酸 180mlを加え、121℃、1時間オートクレーブ処理を行う<sup>注3)</sup>。冷却後、10mol/L水酸化ナトリウムでpH5.0に調整する。これを250ml容のメスフラスコに移し、水で正確に250mlとし、ろ過する。更に最終溶液中のビタミンB<sub>6</sub>の濃度が検量線の範囲内に入るように水で希釈し、試験溶液とする<sup>注4)</sup>。

#### ④ 測定

試験管2本ずつに試験溶液0.5、1及び2mlを正確に加え、次に各試験管に測定用培地2.5ml及び水を加えて全量を5mlとする。別に検量線作成のため、ビタミンB※6※標準溶液(0～7.5ng

相当量<sup>注5)</sup>を試験管2本ずつにとり、それぞれに測定用培地 2.5ml 及び水を加えて全量を 5ml とする。100℃で 15 分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液 1 滴 (約 30  $\mu$ l) ずつを無菌的に接種し、30℃で 20 時間程度振とう培養する。

培養後、増殖度を 600nm の濁度を用いて測定する<sup>注6)</sup>。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のビタミン B<sub>6</sub> 量を求める。なお、標準品に塩酸ピリドキシンを使用しているため、計算時に係数 0.8227 を掛けてビタミン B<sub>6</sub> 量とする。

#### 計算式

試料中のビタミン B<sub>6</sub> 含有量(mg/100g) =  $A \times N \times V \times 100 / (W \times 1000 \times 1000)$

A: 検量線より算出した試験溶液中のビタミン B<sub>6</sub> 含量(mg)

V: 定容量 N: 希釈値 W: 秤取量(g)

#### [注]

1) ビタミン B<sub>6</sub> 定量用基礎培地「ニッスイ」: 日水製薬

2) 試料の均質性を確認出来れば、試料中の目的成分の濃度によって採取量は適宜変更することが出来る。

3) 通常、動物性食品は 0.055mol/L 塩酸、植物性食品は 0.5mol/L 硫酸を用いる。

4) ビタミン B<sub>6</sub> 含量の高い食品については、0.055mol/L 塩酸で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液を試験溶液とすることもできる。あるいは水で振とう抽出し、得られた抽出液中の塩酸ピリドキシンを紫外部検出器付又は蛍光検出器付高速液体クロマトグラフで定量することも可能である。

#### 高速液体クロマトグラフ操作条件例

測定波長 290nm Ex 295nm Em 405nm

カラム Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス製)

移動相 0.05mol/L 過塩素酸

流量 1.2ml/分

5) 予め標準溶液濃度と生育の相関範囲を確認しておく。必要であればデータを確認した上で標準溶液濃度を変更することができる。

6) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダーで濁度を測定することもできる。マイクロプレートを使用する場合は試験菌の調製や、標準溶液および試験溶液の濃度を調整する必要がある。

## 28 ビタミン B<sub>12</sub>

### (1) 微生物定量法

#### ① 試薬

・ビタミン B<sub>12</sub> 標準溶液: シアノコバラミン (国立衛生試験所標準品日本薬局方標準品) 10mg を 25% (V/V) エタノール溶液に溶かし正確に 100ml とする。更に、水で希釈して 0.1ng/ml とな

るようにする。

・酢酸ナトリウム緩衝液：酢酸 19.8ml, 酢酸ナトリウム三水和物 38.56g を水 500ml に溶解する (pH4.5)。

・シアン化カリウム溶液：シアン化カリウム結晶を 0.2%水酸化ナトリウム溶液に溶解し, 0.5mg/ml の溶液を調製する。

・使用菌株：Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis<sup>注1)</sup> (ATCC 7830)

・ビタミン B<sub>12</sub>測定用培地 (1L 中, pH6.0±0.1)

カザミノ酸	15g	
L-シスチン	400mg	
DL-トリプトファン		400mg
硫酸アデニン	20mg	
塩酸グアニン	20mg	
ウラシル	200mg	
キサンチン	20mg	
塩酸チアミン	1mg	
リボフラビン	1mg	
ビオチン	10 μg	
ニコチン酸	2mg	
パラアミノ安息香酸		2mg
パントテン酸カルシウム		1mg
塩酸ピリドキシン	4mg	
塩酸ピリドキサール		4mg
塩酸ピリドキサミン		800 μg
葉酸	200 μg	
リン酸二水素カリウム		1g
リン酸一水素カリウム		1g
硫酸マグネシウム	400mg	
硫酸鉄	20mg	
硫酸マンガン	20mg	
塩化ナトリウム	20mg	
L-アスパラギン	200mg	
グルコース	40g	
酢酸ナトリウム	20g	
アスコルビン酸	4g	
ポリソルベート	80	2g

・菌保存用培地 (1L 中, pH6.8±0.1)

酵母エキス	8.5g
グルコース	11.0g
トマトジュース粉	3.7g

粉末寒天 15.0g  
ペプトン 8.5g  
リン酸二水素カリウム 2.0g  
ポリソルベート 80 1.0g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている<sup>注2)</sup>。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

## ② 接種菌液の調製

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* の保存菌株を前培養培地に接種し、37℃で20時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、滅菌生理食塩水で2回洗浄する。洗浄後、600nmにおける透過率80～90%となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

## ③ 試験溶液の調製

試料 2g<sup>注3)</sup>を精密に量り、酢酸ナトリウム緩衝液 10ml、水 40ml 及びシアン化カリウム溶液 0.4ml を加える。100℃で30分間加熱した後、冷却し、10%メタリン酸 0.6ml を加え、正確に100ml としたものをろ過する。ろ液の一定量を正確にとり pH6.0 に調整した後、水で正確に希釈する。更に最終溶液中のビタミン B<sub>12</sub> の濃度が検量線の範囲内に入るよう水で希釈し、試験溶液とする<sup>注4)、5)</sup>。

## ④ 測定

試験管 2 本ずつに試験溶液 0.5、1 及び 2ml を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5ml 及び水を加えて全量を 5ml とする。別に検量線作成のため、ビタミン B<sub>12</sub> 標準溶液 (0～0.15ng 相当量<sup>注6)</sup>) を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに測定用培地 2.5ml 及び水を加えて全量を 5ml とする。121℃で5分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液 1 滴 (約 30 μl) ずつを無菌的に接種し、37℃で22時間程度恒温水槽に入れて培養する<sup>注7)</sup>。

培養後、増殖度を 600nm の濁度を用いて測定する<sup>注8)</sup>。標準溶液の吸光度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のビタミン B<sub>12</sub> 量を求める。

## 計算式

試料中のビタミン B<sub>12</sub> 含有量(μg/100g) =  $\frac{A \times N \times V \times 100}{W \times 1000}$

A) : 検量線より算出した試験溶液中のビタミン B<sub>12</sub> 含量(ng)

V : 定容量 N : 希釈値 W : 秤取量(g)

## [注]

1) 旧名称は、*Lactobacillus leichmannii* である。

2) BACTO—B<sub>12</sub>—ASSAY MEDIUM USP : DIFCO Laboratories B12 ASSAY MEDIUM USP (Cat No.245710) : Becton, Dickinson and Company

ライヒマニ保存用培地「ニッスイ」: 日水製薬

ライヒマニ接種用培地「ニッスイ」: 日水製薬 (前培養培地に同じ)

3) 試料の均質性を確認出来れば、試料中の目的成分の濃度によって採取量は適宜変更することが出来る。

4) ヌクレオチドなどの含有量が高く、サンプルブランクを測定するために熱アルカリ処理を必要とする場合には、試験溶液を 25ml 分取し、そこへ 10mol/L の水酸化ナトリウム 1ml を加え、pH がアルカリ側にあることを確認した後にオートクレーブで 121℃、30 分間加熱処理を行う。

5) ビタミン B<sub>12</sub> 含量の高い食品については、水で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液の pH を調整し、試験溶液とすることもできる。

また、シアノコバラミンを紫外線—可視検出器付高速液体クロマトグラフで定量することも可能である。

#### 高速液体クロマトグラフ操作条件例

測定波長 550nm

カラム Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス製)

移動相 0.05mol/L 酢酸アンモニウム：アセトニトリル (9：1 V/V)

流量 1.2ml/分

~~6) 予め標準溶液濃度と生育の相関範囲を確認しておく。必要であればデータを確認した上で標準溶液濃度を変更することができる。~~

7) ビタミン B<sub>12</sub> は光に対して感受性が強いため、操作は遮光状態で行うことが望ましい。

8) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダーで濁度を測定することもできる。マイクロプレートを使用する場合は試験菌の調製や、標準溶液および試験溶液の濃度を調整し、培養は嫌気条件下で行う必要がある。

#### [文献]

1) THE DETERMINATION OF VITAMIN B<sub>12</sub> ACTIVITY IN HUMAN SERUM : H.L.ROSNTHAL · H.P.SARETT, J.Biol.Chem.199, 433 (1952)

2) 江口秀敏ほか、ビタミン, 66(5,6), 301-307, 1992 マイクロプレートを用いたシアノコバラミンの微生物学的定量

#### 29 ビタミンC<sup>注1)</sup>

(1) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法

##### ① 機器、試薬

・分光光度計：可視

・標準ビタミンC：日本薬局方標準品「アスコルビン酸標準品」又は同等品を用いる。国立衛生試験所標準品「L-アスコルビン酸標準品」

・メタリン酸（特級）

・2%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液：チオ尿素（特級）2gを5%メタリン酸で溶解し、100mlとする。

・ヒドラジン溶液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 2g<sup>注2)</sup>を4.5mol/L硫酸に溶解し、100mlとする。冷暗所に保存し、2週間ごとに調製する<sup>注3)</sup>。

・インドフェノール溶液：2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム二水和物 100mgを



温水に溶解し、50ml とする。

・海砂：市販の海砂を蒸留水で洗い強熱する。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

## ② 試験溶液の調製

### 1) 総ビタミンC定量用試験溶液

試料 (40.1~5g) を精密に量り<sup>注4)</sup>、5%メタリン酸溶液と海砂 (必要に応じて加える) を加え、乳鉢で十分にすりつぶす<sup>注5)</sup>。5%メタリン酸溶液を加えてよく混和し 50ml に定容する<sup>注6)</sup>。ろ過または遠心分離 (例 3,000rpm, 10 分間程度) を行い、不溶物を分離した後、5%メタリン酸溶液で適宜希釈し、この上澄み液を総ビタミンC定量用試験溶液とする。

### 2) 酸化型ビタミンC定量用試験溶液

1) と同様に試料を精密に量り<sup>注4)</sup>、ビタミンC酸化防止のために、2%チオ尿素含有 5%メタリン酸溶液 40ml と必要に応じて海砂を加え、均一にすりつぶす<sup>注5)</sup>。更に、2%チオ尿素含有 5%メタリン酸溶液を加えてよく混合し、50ml に定容する<sup>注6)</sup>。ろ過または遠心分離 (例 3,000rpm, 10 分間程度) を行い、不溶物を分離し、この上澄み液を酸化型ビタミンC定量用試験溶液とする。

## ③ 標準溶液の調製

### 1) 標準原液

標準ビタミンC 100mg を精密に量り、5%メタリン酸溶液に溶解し、100ml に定容する (冷蔵保存、3 週間ごとに調製する<sup>注3)</sup>)。

### 2) 標準溶液

標準原液を 5%メタリン酸溶液で希釈し、5.0、10 及び 20  $\mu\text{g/ml}$  <sup>注7)</sup> の溶液を調製する (用時ごとに調製する<sup>注3)</sup>)。

## ④ 測定

### 1) 総ビタミンC

総ビタミンC定量用試験溶液 2ml を主検用と盲検用の 2 本の共栓付き試験管に正確に量り、インドフェノール溶液を滴下 (ピンク色を 1 分間保つ量) する。次に、それぞれの試験管に 2%チオ尿素含有 5%メタリン酸溶液 2ml を加える。

主検用の試験管にヒドラジン溶液 1ml を加え、混和後、50℃の恒温水槽中に 1 時間静置する。盲検用の試験管には、ヒドラジン溶液を加えず、同様に 50℃で 1 時間放置する。

反応後ただちに試験管を氷水中で冷却する。85%硫酸をピュレットに入れ、試験管を氷水中で振りながら、その 85%硫酸 5ml を徐々に加える。盲検用の試験管にはヒドラジン溶液 1ml を加えよく混和する。

30 分間室温に放置後、540nm の吸光度を測定する。主検と盲検の吸光度の差と、3) により作成する検量線から、試験溶液中のビタミンC含量を求める。

### 2) 酸化型ビタミンC

酸化型ビタミンC定量用試験溶液 2ml を主検用と盲検用の 2 本の共栓付き試験管に正確に量り、上記 1) のヒドラジン溶液を加える以降の操作を行い、540nm の吸光度を測定する。主検と盲検の吸光度の差と、3) により作成する検量線から、試験溶液中のビタミンC含量を求める。

### 3) 標準溶液

各濃度の標準溶液 2ml について 1) と同様の操作を行い、540nm の吸光度を測定し、検量線を

作成する。

⑤ 計算

総ビタミンC含量または酸化型ビタミンC含量 (mg/100g)

$$=C \times V \times N \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

~~総ビタミンC含量 (mg/100g) = C × V × N × 100 / W × 10<sup>-3</sup>~~

~~酸化型ビタミンC含量 (mg/100g) = C × V × N × 100 / W × 10<sup>-3</sup>~~

還元型ビタミンC含量 (mg/100g) = 総ビタミンC含量 - 酸化型ビタミンC含量

C: 検量線から求めたビタミンC濃度 (μg/ml)

V: 定容量 (ml)

N: 希釈率

W: 試料採取量 (g)

(2) インドフェノール・キシレン法

2, 6-ジクロロフェノールインドフェノールと果汁中のビタミンCの反応の結果残存する2, 6-ジクロロフェノールインドフェノールをキシレンに転溶することにより果汁に固有の色素と分離し、一定量の試料による還元量をビタミンC標準液による還元量と比較定量する。

この方法は、ぶどう、いちごのように赤色系の色素を含有する果汁の還元型ビタミンCの定量に用いられる。

① 装置及び器具

30ml 共栓試験管

分光光度計：500nmにおける吸光度を測定し得るもの。

② 試薬

・6%メタリン酸溶液：メタリン酸 6g を水に溶解して 100ml とする。

・ビタミンC標準液：結晶L-アスコルビン酸 2mg に 2%メタリン酸 (6%メタリン酸 100ml に水を加えて 300ml とする) を加えて 100ml とする。

・色素溶液：2, 6-ジクロロインドフェノールナトリウム 25mg を水に溶解して 200ml とする。

・酢酸緩衝液：無水酢酸ナトリウム 30g, 水 70ml および酢酸 100ml を混合する。

・キシレン

③ 測定

・試料溶液の調製

試料 10g に 6%メタリン酸溶液を加えて 100ml とし、必要があればろ過又は遠心分離し、上澄み液を試験溶液とする。

・操作

30ml 共栓試験管 3本を用意し、試験管 a に 5ml, b に 6%メタリン酸溶液 5ml, c にビタミンC標準液 5ml を正確にとり、次にそれぞれの試験管に酢酸緩衝液 2ml と色素溶液 2ml ずつを手早く正確に加えて軽く振りまぜる。

直ちにそれぞれの試験管にキシレン 10ml ずつを正確に加え、栓をして 30 秒間振りまぜた後静置してキシレン層を分離させる。

試験管 a, b, c からとったキシレン層をセルにとり分光光度計により 500nm における吸光度を測定する<sup>注8-2)</sup>。

#### ④ 計算

試験管 a, b, c のキシレン層の吸光度をそれぞれ A, B, C とすれば試料中のビタミン C は次式により計算される。

$$\text{ビタミンC (mg/100g)} = \frac{B-A}{B-C} \times K \times \frac{100}{10} \times 100$$

$$\text{ビタミンC (mg/100g)} = (B-A) / (B-C) \times K \times 100 / 10 \times 100$$

K : ビタミンC標準液 1ml 中のビタミンCmg 数 (正確に調製された場合は 0.02)

100/10 : 試料の希釈倍数

### (3) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注9-3)</sup>

#### ① 機器, 試薬

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 紫外可視分光光度計付き
- ・カラム : 順相型, 内径 6.0mm, 長さ 150mm
- ・標準ビタミンC : 日本薬局方標準品「アスコルビン酸標準品」又は同等品を用いる。国立衛生試験所標準品「L-アスコルビン酸標準品」
- ・メタリン酸 (特級)
- ・2%チオ尿素含有 5%メタリン酸溶液 : チオ尿素 (特級) 2g を 5%メタリン酸で溶解し, 100ml とする。
- ・ヒドラジン溶液 : 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン<sup>注2)</sup> 2g を 4.5mol/L 硫酸に溶解し, 100ml とする。冷暗所に保存し, 2週間ごとに調製する<sup>注3)</sup>。
- ・インドフェノール溶液 : 2, 6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム二水和物 100mg を温水に溶解し, 50ml とする。
- ・海砂 : 市販の海砂を蒸留水で洗い強熱する。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

#### ② 試験溶液の調製

前記 (1) と同様に調製する。

#### ③ 標準溶液の調製

##### 1) 標準原液

標準ビタミンC 100mg を 100ml 容メスフラスコに精密に量りとり, 5%メタリン酸溶液で溶解し 100ml に定容する (冷蔵保存, 3週間ごとに調製する<sup>注3)</sup>)。

##### 2) 標準溶液

標準原液 5ml を 50ml 容メスフラスコに正確に量り, 5%メタリン酸溶液で定容する (100 μg/ml, 用時ごとに調製する<sup>注3)</sup>)。

##### 3) 測定用標準溶液

標準溶液を 5%メタリン酸溶液で希釈し, 2.0, 5.0 及び 10 μg/ml <sup>注7)</sup> とする (用時ごとに調製する<sup>注3)</sup>)。

#### ④ オサゾンの生成

### 1) 総ビタミンC

総ビタミンC定量用試験溶液 2ml を共栓付き試験管に正確に量り、インドフェノール溶液を滴下（ピンク色を1分間保つ量）する。2%チオ尿素含有5%メタリン酸溶液 2ml を正確に加えた後、ヒドラジン溶液 0.5ml を加え、混和後、50℃の恒温水槽中に1時間静置する<sup>注10)</sup>。反応後、ただちに試験管を室温まで冷却する。酢酸エチル（残留農薬分析用）2 ml <sup>注11)</sup>を加え、振とう機で1時間振とうし、生成したオサゾンを抽出する。静置後、上層を共栓付き小試験管に移し、無水硫酸ナトリウム約 0.5g を加え、軽く振って脱水し、する。これを HPLC 用試験溶液とする。

### 2) 酸化型ビタミンC

酸化型ビタミンC定量用試験溶液 2ml を共栓付き試験管に正確に量り、5%メタリン酸溶液 2ml を正確に加えた後、上記1)のヒドラジン溶液 0.5ml を加える以降の操作を行い、HPLC 用試験溶液を得る。

### 3) 標準溶液

各濃度の測定用標準溶液 2ml について1)と同様の操作を行い、HPLC 用標準溶液を得る。

### ⑤ 測定

HPLC 用試験溶液の一定量（例 20 μl）を高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンCのオサゾンのピーク高さまたは面積を測定し、する。あらかじめ同量の HPLC 用標準溶液 20 μlを高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線を用いて試験溶液中の濃度を求め、試料中のビタミンC含量を算出する。

### ⑥ 高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注4)1)2)</sup>

カラム：内径 6.0mm，長さ 150mm，ステンレス製<sup>注5)1)3)</sup>

移動相：酢酸エチル—ヘキサン—酢酸（5：4：1 V/V/V）

検出器：紫外線可視分光光度計

測定波長：495nm

流量：1.5ml/分

温度：35℃

注入量：20 μl

### ⑦ 計算

(1)、⑤と同様に計算する。

[注]

1) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法及び高速液体クロマトグラフ法では酸化型ビタミンC及び総ビタミンC（酸化型ビタミンCと還元型ビタミンCの合計）を定量でき、その差から還元型ビタミンC含量が求められる。他のビタミンCの定量法としては果汁飲料の日本農林規格（昭和45年農林水産省告示第1379号）で定められたインドフェノール滴定法及び一方、インドフェノール・キシレン法及び酸化還元滴定法~~は~~がある。これらは直接、還元型ビタミンCのみを定量する方法である。ただしインドフェノール滴定法は終点判断がしにくい着色試験溶液には適用できない。また、食品、食品添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）において「L-アスコルビン酸」の定量に用いられるヨウ素滴定法がある。ヨウ素滴定法も還元型アスコルビン酸を定量する方法であり、酸化還元滴定法はL-アスコルビン酸原体のように高含量のものに限り適用できる。なお、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法及び高速液体クロマトグラフ法ではビタミン

Cとしては効力のない 2,3-ジケトグルン酸も一緒に測りこまれるが、生鮮食品では一般に 2,3-ジケトグルン酸含量は少なく無視できる。しかし、加工食品では 2,3-ジケトグルン酸含量が多い場合もあるので注意が必要である。また、食品にL-アスコルビン酸 2-グルコシドが添加されている場合は、別途個別に試験する必要がある。

2) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの市販試薬は安定剤として水を約 50%含んでいるので、4g 採取する必要がある。

3) 保存期間及び温度条件については、予め保存安定性データを確認できれば変更することが可能である。

4) 試料が生鮮食品の場合、そのまま粉砕するとビタミンCが分解する恐れがあるので、20%メタリン酸溶液を加えてミル等で均一化処理を行うとよい。また粉砕による試料の均一化が困難な場合も上記生鮮食品の場合と同様に均一化処理を行ってから採取するとよい。試料が均一であり、予めデータが確認出来れば、採取量及び定容量は適宜変更可能であるが、最終溶液中の濃度が検量線の範囲内に入るように5%メタリン酸溶液で希釈を行う。

5) 乳鉢の代わりにホモジナイザー ULTRA-TURRAX (IKA 製) 又は相当品を用いることが出来る。

6) 油脂コーティングされたビタミンC製剤が添加されている場合、ヘキサン 50ml を加え、5 分間振とう後、下層を用いることで抽出が改善される場合がある。

7) 予めデータを確認し、検量線の直線性が確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能である。

8-2) キシレン可溶性色素が検液中に混在するときは、吸光度測定に妨害が起きるので、キシレン抽出液の吸光度をいったん測定後、半飽和ヒドロキノンアセトン溶液を2滴加え混合後再び測定し、その差をもってインドフェノール色素の吸光度とする。

9-3) 適当な還元剤、例えばジチオスレイトール、2,3-ジメルカプト-1-プロピルアルコール、硫化水素などで酸化型ビタミンCを還元して、強い紫外線吸収を示す還元型ビタミンCにし、高速液体クロマトグラフを用いて測定することで総ビタミンCを求める方法もある。また逆に、活性炭などで酸化後、1,2-フェニレンジアミンを加え、キノキサリン化合物に誘導体化して蛍光を測定する方法もある。

なお、アスコルビン酸脂肪酸エステルは、0.02%アスコルビン酸含有メタノールで抽出し高速液体クロマトグラフ法により測定できる。測定条件の例を次に示す。

カラム：Partisil ODS-35 $\mu$ m, 内径 4.6mm, 長さ 250mm

移動相：メタノール-0.05mol/L リン酸二水素ナトリウム溶液 (pH2) (85 : 15V/V)

流量：1.0ml/分

測定波長：254nm

1 0) 50℃, 1 時間ではオキサゾンの生成反応は未完了であるため、38~42℃で一夜 (16 時間程度) 反応させることで誘導体化が完結し、測定精度が向上する。ただし、酸化型ビタミンCの測定では、誘導体化反応中にも徐々に酸化が進むため長時間の誘導体化は避ける必要がある。

1 1) エマルジョンが生じて上層が分取できない場合には、予め添加回収試験を実施するなどしてデータを確認した上で、酢酸エチルを増量するとよい。その場合、標準溶液も同量の酢酸エチルを添加し抽出する。

1 2.4) 本測定条件では、アスコルビン酸とエリソルビン酸の分別はできない。エリソルビン酸

の分別定量をする場合の測定条件の例を次に示す。

移動相：ヘキサン-酢酸エチル-プロピルアルコール-酢酸 (40 : 30 : 2 : 1 V/V/V/V)

保持時間：アスコルビン酸は約 10 分間，エリソルビン酸は約 10.5 分間

135) Silica 2150-N (100) (センシュ-科学製) あるいは相当品を用いる。

[参考文献]

1) 小高要, 稲垣節子, 氏家隆, 上野順士, 須田浩行: ビタミン, 59, 451-455 (1985)

#### (4) 酸化還元滴定法

ビタミンC含量が著しく高く、かつビタミンC以外にヨウ素を還元する物質が含まれない場合のみ適用できる。

##### ① 器具

・ビューレット：テフロンコック付き，容量 50ml 以下で 0.1ml の刻線付きのもの（褐色）。

##### ② 試薬

・メタリン酸：特級

・でんぷん（溶性）：特級

でんぷん試液：でんぷん 1g を量り，冷水 10ml を加えてよくすり混ぜ，これを熱湯 200ml 中にかき混ぜながら徐々に加え，液が半透明となるまで煮沸し，放冷し，静置した後，上澄液を用いる。用時調製する。

・ヨウ化カリウム：特級

・ヨウ素：特級

0.10.05 mol/L ヨウ素溶液：1,000ml 中ヨウ素（I，原子量 126.90）12.690g を含む。ヨウ素 14g を量り，ヨウ化カリウム溶液（ヨウ化カリウム 9g を水に溶かし 25ml としたもの）(9→25)-100ml を加えて溶かし，塩酸 3 滴及び水を加えて 1,000ml とする。本液は，共栓瓶に保存し，たびたび標定し直す。標定は次のように行いファクターを求める。

標定：三酸化ヒ素（標準試薬）を粉末とし，100℃で恒量になるまで乾燥した後，その約 0.15g を精密に量り，1mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20ml を加え，必要があれば加熱して溶かす。次に水約 40ml 及びメチルオレンジ試液 2 滴を加え，更に液の黄色が淡紅色となるまで薄めた塩酸（塩酸 1ml に水を加え混合し 4ml としたもの）-(1→4)-を加える。更に炭酸水素ナトリウム 2g，水約 50ml 及びでんぷん試液 3ml を加えた後，このヨウ素溶液で液が持続する青色を呈するまで滴定する。

0.10.05 mol/L ヨウ素溶液 1ml = 4.946mgAs<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

##### ③ 測定

試料のビタミンC 200~300mg に相当する量を精密に量り，メタリン酸溶液（1→50）50ml を加えて溶かし，0.10.05 mol/L ヨウ素溶液で滴定する（指示薬でんぷん試液）。

##### ④ 計算

0.10.05 mol/L ヨウ素溶液 1ml はビタミンC（L-アスコルビン酸）8.806mg に相当する。

$$\text{試料中のビタミンC含量 (mg/100g)} = 8.806 \times f \times \frac{V}{W} \times 100$$

試料中のビタミンC含量 (mg/100g) = 8.806 × f × V/W × 100

V : 滴定量 (ml)

W : 試料採取量 (g)

f :  $0.40.05$  mol/L ヨウ素溶液ファクター

#### (5) 逆相高速液体クロマトグラフ法

本法は、L-アスコルビン酸 2-グルコシドを含む食品に適用される。

##### ① 機器

・高速液体クロマトグラフ：紫外外部吸収検出器付き

・遠心分離機

##### ② 試薬

・アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用

・リン酸二水素カリウム：特級

・テトラブチルアンモニウムヒドロキシド：特級，10%水溶液

・リン酸溶液：20%水溶液

・水：水道水を超純水製造装置で処理した水

##### ③ 試料液の調製

###### 1) 液状食品（不溶物をほとんど含まないもの）

試料約  $5.0g$  ( $0.1 \sim 5g$ )<sup>注1)</sup> を精密に量り，移動相<sup>注2)</sup> を加えて正確に  $50ml$  とする。不溶物がある場合は遠心分離し，メンブランフィルター ( $0.45 \mu m$ ) でろ過したものを試料液とする。

###### 2) 粉体及び固体食品（半液状食品を含む）

粉碎した試料を粉碎してその約  $5.0g$  ( $0.1 \sim 5g$ )<sup>注1)</sup> を精密に量り，移動相  $30ml$  を加えて  $10$  分間攪拌又は振とうする。不溶物がある場合はろ過又は遠心分離し，ろ液又は上澄液は  $50ml$  容メスフラスコなどの受器に捕集する。ろ過残さ又は沈殿を少量の移動相で数回洗浄し，洗液も先の受器に合わせて捕集し，さらに移動相を加えて正確に  $50ml$  とする。この液をメンブランフィルター ( $0.45 \mu m$ ) でろ過したものを試料液とする。

##### ④ 検量線用標準液の調製

L-アスコルビン酸 2-グルコシド約  $0.10g$  を精密に量り，移動相<sup>注2)</sup> を加えて溶かして正確に  $100ml$  とする。その  $20ml$  を正確に量り，移動相を加えて正確に  $200ml$  としたものを標準液とする（この液  $1ml$  は，L-アスコルビン酸 2-グルコシド約  $100 \mu g$  を含む）。標準液  $1 \sim 50ml$  を正確に量り，移動相を加えて正確に  $100ml$  とし，検量線用標準液とする（この液  $1ml$  は，L-アスコルビン酸 2-グルコシド約  $1 \sim 50 \mu g$  を含む<sup>注3)</sup>）。

##### ⑤ 測定，計算

###### 1) 測定条件

紫外外部吸収検出器付高速液体クロマトグラフを用い，次の条件により測定する<sup>注4)</sup>。

###### 高速液体クロマトグラフ操作条件例

カラム充てん剤<sup>注5)</sup>：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径  $4.6mm$ ，長さ  $250mm$

カラム温度： $40^\circ C$

移動相：水  $800ml$  にリン酸二水素カリウム  $1.4g$  とテトラブチルアンモニウムヒドロキシド

26ml を加え、リン酸水溶液で pH5.2 に調整した後、水で 1000ml とする。この液 900ml とアセトニトリル 100ml を混和したもの。

流速：0.8ml/分

測定波長：260nm

注入量：10  $\mu$ l

## 2) 検量線

検量線用標準液それぞれの一定量（例 10  $\mu$ l）を 10  $\mu$ l ずつを正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積またはピーク高さから L-アスコルビン酸 2-グルコシドの検量線を作成する<sup>注 6.4</sup>。

## 3) 定量<sup>注 5-7</sup> 及び計算

試料液 10  $\mu$ l を標準液と同量正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積または高さから検量線から試料液中の L-アスコルビン酸 2-グルコシド濃度 A ( $\mu$ g/ml) を求め、次式によって試料中の L-アスコルビン酸 2-グルコシド含量 (mg/100g) を計算する。

$$\text{L-アスコルビン酸 2-グルコシド (mg/100g)} = \frac{A \times 50 \times 100}{W \times 1000}$$

$$\text{L-アスコルビン酸 2-グルコシド (mg/100g)} = (A \times 50 \times 100) / (W \times 1000)$$

A：試料液中の L-アスコルビン酸 2-グルコシド濃度 ( $\mu$ g/ml)

W：試料の採取量 (g)

[注]

1) 試料が均質であり、予めデータが確認できれば、採取量を適宜変更することは可能である。ただし、最終溶液中の濃度が検量線の範囲内に入るように調整する。

2) L-アスコルビン酸 2-グルコシドは、水、5%メタリン酸溶液に比べ、移動相に溶かしたときに最も安定である。

3) 予めデータを確認し、検量線の直線性が確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能である。

4) 本法のほかに、次の条件でも測定できる。カラム充てん剤：アミノプロピル基を化学結合したシリカゲル、カラム管：内径 4.6mm 長さ 250mm、移動相：アセトニトリル/リン酸二水素カリウム・0.5vol%リン酸溶液（リン酸二水素カリウム 5.44g を 0.5vol%リン酸溶液に溶解し 1000ml としたもの）（5.44 $\Rightarrow$ 1000）の混液（60：40）、流速：0.7ml/分、そのほかの条件は本法と同じ。この条件で測定したときの検出下限は 0.25mg/100g である。

5) 液体クロマトグラフィーのカラムとしては、TSKgel ODS-80 TsQA などが使用出来る。

6) 試料液の濃度が検量線の濃度範囲を超える場合、試料液を移動相で適宜希釈するか、試料採取量を減らして試験する。

7) 本法の検出下限は 0.10mg/100g である。なお、清涼飲料水、飴及び錠薬における添加回収率は 98.2~99.1% である。

## 30 ビタミンD

### (1) 高速液体クロマトグラフ法

#### ① 機器、試薬



・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 分取用と測定用の 2 台あったほうがよい。紫外分光光度計付き (254nm の固定波長のもの、又は波長が可変のものは 265nm で使用する。)。含量の少ない試料の定量用検出器には、最高感度が 0.001 以上のものが必要である。

・カラム : 逆相型と順相型の 2 本<sup>注1)</sup>

・標準ビタミンD : 日本薬局方標準品エルゴカルシフェロール (ビタミンD<sub>2</sub>) 又はコレカルシフェロール (ビタミンD<sub>3</sub>)<sup>注2)</sup> を用いる。植物性食品及び強化食品の分析にはD<sub>2</sub>を、動物性食品の場合にはD<sub>3</sub>を用いる。強化食品<sup>注3)</sup> に関しては、添加された製剤に応じて、ビタミンD<sub>2</sub>またはビタミンD<sub>3</sub>を用いる。なお、添加製剤が不明の場合はビタミンD<sub>3</sub>を用いる。

・ビタミンD標準溶液<sup>注4)</sup> : 標準ビタミンDを 20mg 精密に測り取り、エタノールで溶解し、100ml に定容し、標準原液 (200 μg/ml) とする。標準原液をエタノールで 0.2 μg/ml<sup>注5)</sup> になるように希釈溶解する。

・ヘキサン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル : 残留農薬試験用<sup>注6)</sup>

・1% (W/V) ピロガロールーエタノール溶液<sup>注7)</sup> : ピロガロール 1g にエタノール 100ml を加え溶解する。用時調製とする。

・60% (W/V) 水酸化カリウム溶液 : 水酸化カリウム 600g に冷却しながら水を加えて溶解し、正確に 1L とする。

・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

・ガラス器具は褐色のものを用いる。

## ② 試験溶液の調製<sup>注3,8)</sup>

### 1) けん化<sup>注4,9)</sup>

試料が油状の場合は 0.2~0.5g、粉末の場合は 1~2g、液体の場合は 5~10g を試料 (0.1~10g)<sup>注10)</sup> を 60ml 容共栓付き遠心管に精密に量る。粉末については 1%塩化ナトリウム溶液 3~5ml 加え、70℃で 3 分間膨潤させる<sup>注11)</sup>。1% (W/V) ピロガロールーエタノール溶液 10ml、60% (W/V) 水酸化カリウム溶液 2ml、水酸化カリウム 2g<sup>注12)</sup> を加え、70℃水浴中でガラス棒でときどきかき混ぜながら 1 時間加熱する。冷水中で速やかに室温まで冷却する。1%塩化ナトリウム溶液を合計で 22ml になるように加え (例えば、粉末の試料で、けん化の前に 3ml 加えた場合は 19ml を加える。また液体の試料 10g を採取した場合は 12ml を加える。)、酢酸エチルーヘキサン混液 (1 : 9V/V) 15ml を加えて栓をし、5 分間振とうする。遠心分離後、駒込ピペットで上層を 100ml 容なす形フラスコに移す。水層を酢酸エチルーヘキサン混液 (1 : 9V/V) 15ml で更に 2 回、同様に抽出する。抽出液を合わせ 35℃で減圧濃縮する。残留物をジエチルエーテル等を用いて溶解し、10ml 容共栓付き試験管等に移した後、窒素気流下で溶媒を留去する。残留物をメタノールーアセトニトリル (1 : 9V/V) の適量 (0.5ml 以上) にをホールピペット等を用いて正確に加え溶解し試料溶液とする (Vml)。

試料と同時にビタミンD標準溶液 1ml、2ml、4ml<sup>注5)</sup> をそれぞれ正確に量り、けん化処理を行う。

### 2) 分取

逆相型カラムを付けた高速液体クロマトグラフに紫外部検出器、必要に応じてフラクションコレクター (ドロップカウンター) を連結する。

高速液体クロマトグラフの操作条件例は、—

移動相：にメタノール—アセトニトリル（1：9V/V）を用い、

流量：は1.5ml/分とする。

温度：室温

測定波長：254nm 又は 265nm

あらかじめ、けん化していない標準ビタミンDを高速液体クロマトグラフに注入し、保持時間を確認しておく（通常保持時間は約12分間）。

次に、1)で得られた試料溶液及びビタミンD標準溶液の一定量（例 150 μl）をそれぞれ高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンDを含む画分（例：保持時間の前後約90秒間）を分取する。減圧濃縮後、残留物を一定量のヘキサン—イソプロピルアルコール（99.6：0.4V/V）（例 200 μl）に溶解し、測定用試験溶液及び測定用標準溶液とする。

### ③ 測定

測定用試験溶液の一定量（例 100 μl）を順相型カラムを付けた高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンDのピーク面積またはピーク高さを測定する。あらかじめ同量の測定用標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試料中のビタミンD含量を求める。

### ④ 高速液体クロマトグラフ操作条件例

カラム：内径4.6mm，長さ250mm

移動相：ヘキサン—イソプロピルアルコール（99.6：0.4V/V）

測定波長：254nm 又は 265nm

流量：1.6ml/分

温度：室温

注入量：100 μl

### ⑤ 計算

$$\text{試料中のビタミンD含量（}\mu\text{g/100g）} = C \times V \times \frac{100}{W}$$

$$\text{試料中のビタミンD含量（}\mu\text{g/100g）} = C \times V \times 100/W$$

C：検量線から求めた試料溶液中のビタミンDの濃度（μg/ml）

V：定容量（ml）

W：試料採取量（g）

#### [注]

1) 逆相型カラム：分取用として、Nucleosil 5C 18（ナーゲル社製），内径7.5mm，長さ300mmあるいは相当品を用いる。

順相型カラム：測定用として、Nucleosil 100-5（ナーゲル社製），内径4.6mm，長さ250mmあるいは相当品を用いる。

2) 標準ビタミンDは、エタノールに溶かしたときの230nmと265nmの吸光度比（ $A_{230}/A_{265}$ ）が0.60以下のものを使用する。

また標準ビタミンDは、窒素ガス又はアルゴンガスで空気を置換して-20℃に保存すれば、1～2年安定である。

- 3) 近年、加工食品のビタミンDの強化にはビタミンD<sub>3</sub>が使用されることが多い。
- 4) 標準（原液）溶液を保存する場合は、予め保存安定性データを確認し保存条件及び保存期間を設定する。標準溶液の保存安定性を高めるにはエトキシキンなどの酸化防止剤を添加すると効果的である。
- 5) 予めデータを確認できれば、検量線の直線性を確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能である。
- 6) 同等性が確認できれば、特級でも使用可能である。
- 7) 予めデータを確認できれば、ピロガロール濃度は適宜変更可能である。
- 8-3) ここに示した試料採取量等によって得られる定量下限は、固体試料で0.3~0.8μg/100gであり、液体試料で0.2μg/100g程度である。なお、試験溶液の調製の操作を2倍にスケールアップすることによって、定量下限を上記の1/2程度にすることは可能である。
- 9-4) ビタミンDはけん化時に一部がプレビタミンDに熱異性化される。本法は標準ビタミンDを試料と同条件でけん化することにより異性化される分を相殺し、定量するものである。
- 10) 試料が生鮮食品の場合、そのまま粉砕するとビタミンDが分解する恐れがあるので、試料にピロガロール、水及び必要に応じエタノールを加えミル等で均一化処理を行うとよい。予めデータが確認出来れば、採取量は適宜変更してよいが、最終溶液中の濃度が検量線の範囲に入るようにする。また、粉砕による試料の均一化が困難な場合は上記生鮮食品の場合と同様に均一化処理を行ってから採取するか、試料採取量を増やし、抽出容量も採取量に合わせてスケールアップするとよい。
- 11) コーティング型のビタミンD製剤が添加されていない場合は、膨潤操作は省略できる場合がある。また試料がデンプン質などでは抽出不十分となる場合があるため、1%塩化ナトリウム溶液を添加しないほうがよいことがある。
- 12) 試料中のマトリックスの影響により、けん化が不十分な場合には、データを確認した上で水酸化カリウムの添加量を増やすかまたは試料採取量を減らす必要がある。

[参考文献]

- 1) 小林正, 岡野登志夫: “ビタミン学実験法 [I]”, 日本ビタミン学会編, 94, 東京化学同人 (1983)
- 2) 森田公平, 福澤有紀子, 小高要, 氏家隆: ビタミン, 68, 6 (1994)

31 ビタミンE (α-トコフェロールとして)

(1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① 機器, 試薬

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC): 蛍光検出器付き
- ・カラム: 順相型
- ・標準ビタミンE (α-, β-, γ-, δ-トコフェロール): ビタミンE定量用<sup>注+2)</sup>
- ・ヘキサン-酢酸エチル混液: ヘキサン-酢酸エチル (9:1V/V) <sup>注3)</sup>
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

② 標準溶液の調製

1) 標準原液

$\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及び $\delta$ -トコフェロール 20mg をそれぞれ褐色メスフラスコに精密に量り、エタノールで溶解して正確に 50ml とする。冷蔵保存し、6ヵ月ごとに調製する<sup>注4)</sup>。

## 2) HPLC 用標準溶液

一定量の  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及び $\delta$ -トコフェロール標準原液を褐色ナス形フラスコ又は褐色メスフラスコに正確に量り、溶媒を濃縮乾固又は窒素気流下で留去した後、ヘキサン<sup>注5)</sup>に溶解する。メスフラスコを用いて正確に希釈し、HPLC 用標準溶液<sup>注6)</sup>とする。冷蔵保存し、1ヵ月ごとに調製する<sup>注4)</sup>。

## ③ 試験溶液の調製

### 1) 一般食品の場合

試料約 0.5~0.1~2g<sup>注7)</sup> を 60ml 容の遠心管に精密に量りとり。これに 1%塩化ナトリウム溶液 0.5ml<sup>注8)</sup>を加えてかくはん後、3%ピロガロール-エタノール溶液 10ml 及び 60%水酸化カリウム溶液 1ml<sup>注9)</sup>を加え、70℃で 30 分間けん化する。速やかに冷却後、1%塩化ナトリウム溶液を 22.5ml 及びヘキサン-酢酸エチル混液 15ml を加え、栓をして 5 分間激しく振とうし、不けん化物を抽出する。2,000 回転/分で 5 分間遠心分離 (例 2000 回転/分、5 分間) し、上層をナス形フラスコに移す。下層はヘキサン-酢酸エチル混液 15ml で更に 2 回同様に抽出する。得られた上層を集め、減圧濃縮後、一定量のヘキサン<sup>注5)</sup>に溶解し、試験溶液とする<sup>注10)</sup>。

### 2) 油脂の場合

試料が油脂の場合は、1) のけん化操作を省き HPLC に直接注入することができる。この場合、油脂約 1g<sup>注7)</sup> を精密に量りとり、一定量のヘキサン<sup>注5)</sup>に溶解し試験溶液とする<sup>注10)</sup>。

## ④ 測定

試験溶液の一定量 (例 20.5~50  $\mu$ l) を HPLC に注入し、試料中の  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及び $\delta$ -トコフェロールのピーク面積または高さを測定する。同量の様に HPLC 用標準溶液を HPLC に注入し、ピーク面積または高さから  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及び $\delta$ -トコフェロールの検量線を作成する。

## ⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例

カラム：ステンレス製、内径 4.6mm、長さ 250mm<sup>注2-11)</sup>

移動相：酢酸-イソプロピルアルコール-ヘキサン (5 : 6 : 1000V/V)<sup>注12)</sup>

検出器：励起波長 (Ex) 298nm

蛍光波長 (Em) 325nm

流量：1.2ml/分

温度：40℃

注入量：20  $\mu$ l

## ⑥ 計算

$$\alpha\text{-トコフェロールの含量 (mg/100g)} = C \times V \times N \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

$$\alpha, \beta, \gamma, \delta\text{-トコフェロールの含量 (mg/100g)} = C \times V \times N \times 100/W \times 10^{-3}$$

C：検量線から求めた  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -トコフェロール濃度 ( $\mu$ g/ml)

V：定容量 (ml)

N：希釈率

W：試料採取量 (g)