

## 資料

## ビタミンA及びビタミンA脂肪酸エステル分析法の検討

中島 安基江, 井原 紗弥香, 福原 亜美\*<sup>1</sup>, 安部 かおり

## Determination of Vitamin A and its fatty acid esters in foods

NAKASHIMA AKIE, IHARA SAYAKA, FUKUHARA AMI and ABE KAORI

(Received : November 17, 2020)

食品中の食品添加物の分析については、「第二版食品中の食品添加物分析法」[1]が通知されているが、現行の通知法については、科学的知見に基づき適宜見直しの必要がある。また添加物の新規指定や使用基準改正に伴う新たな分析法設定のための検証、検討も必要とされている。そのため、本県においても厚生労働省の委託事業として「食品中の食品添加物分析法の検討(検証)」を実施している。平成29年度は、強化剤として使用されるビタミンA及びビタミンA脂肪酸エステルの分析法について担当し、第二版食品中の食品添加物分析法の検証及び精製法の検討を行い、分析法の改良を行った。

Key words : ビタミンA, レチノール, C18カートリッジカラム

## 緒 言 方 法

ビタミンAは脂溶性ビタミンの1つで、主に動物性食品に含まれて皮膚や粘膜の正常保持・視覚の正常化・成長および分化に関与している。不足すると皮膚や粘膜の乾燥・夜盲症・成長障害・胎児の奇形などを引き起こす恐れがある一方で、脂溶性であることから過剰摂取にも注意が必要とされている[2]。ビタミンA及びビタミンA脂肪酸エステルは強化剤として使用される食品添加物であり、使用基準等の規制はない[3]。食品中のビタミンA(正式名はビタミンAアルコール;レチノール)はほとんどビタミンAパルミテート(レチニルパルミテート)の形で存在しており、ビタミンAアセテートが食品添加物として添加されている食品もある[4]。第二版食品中の食品添加物分析法(第二版分析法)では、食品中のビタミンA及びビタミンA脂肪酸エステルの分析法として、試料をけん化し、エステルをすべてビタミンAのアルコール型(レチノール)としたのち定量し、総ビタミンA量を得る方法が採用されている。精製操作にはアルミナカラムを用いるため、使用する有機溶媒量が多く、操作が煩雑である。そこで今回、本分析法の検証を行うとともに、より簡便な精製操作法を検討し、分析法の改良を行ったので報告する。

## 1 試料

平成29年8月に広島市内の小売店で購入した試料を用いた(表1)。

## 2 試薬

パルミチン酸レチノール標準液:和光純薬工業(株)社製(高速液体クロマトグラフ用)  
 塩化ナトリウム:和光純薬工業(株)製(特級)  
 ピログロール:和光純薬工業(株)製(特級)  
 エタノール(95):和光純薬工業(株)製(特級)  
 水酸化カリウム:和光純薬工業(株)製(特級)  
 ヘキサン:メルク社製(残留農薬・PCB分析用)  
 酢酸エチル:メルク(株)製(残留農薬・PCB分析用)  
 石油エーテル:メルク(株)製(残留農薬・PCB分析用)  
 活性アルミナ:メルク(株)製(活性アルミナ90)  
 ジエチルエーテル:メルク(株)製(残留農薬・PCB分析用)  
 2-プロパノール:和光純薬工業(株)製(特級)  
 メタノール:関東化学(株)製(HPLC用)  
 BondEluteC18 500 mg:アジレント・テクノロジー(株)製

\*<sup>1</sup> 現東部厚生環境事務所・保健所

### 3 試験溶液の調製

第二版分析法記載の方法に準じて行った(図1-1)。

#### (1) けん化

試料0.5～1.0 gの一定量を60 mL容の褐色共栓試験管に精密に量り、1%塩化ナトリウム溶液0.5 mL、3%ピロガロール・エタノール溶液10 mL及び60%水酸化カリウム溶液1 mLを加え、70℃の水浴中でガラス棒でかき混ぜながら30分間加熱した。

#### (2) 抽出

けん化後、冷水中で速やかに室温まで冷却し、1%塩化ナトリウム溶液22.5 mLを加えた後、酢酸エチル・ヘキサン混液(1:9) 15 mLを加えた。5分間振とうし、遠心分離後、上清液を分取する。水層は酢酸エチル・ヘキサン混液(1:9) 15 mLで更に2回、同様に処理して抽出した。抽出液を合わせ、40℃で溶媒を減圧留去した。残留物(A)にエタノールを加えて溶解し正確に2 mLとしたものを試験溶液(B)とした。

#### (3) 精製

(a) アルミナカラム精製法(第二版分析法)

3(2)の残留物(A)に石油エーテル5 mLで溶かし抽出液とした。あらかじめアルミナを石油エーテルに

懸濁させ約7 cmの高さまで充填したクロマト管(内径1 cm)にこれを流し入れ、約1 mL/分の速さで流出した。石油エーテル5 mLを3回加え、石油エーテル/ジエチルエーテル混液(95:5) 25 mLで洗浄した。石油エーテル/ジエチルエーテル混液(9:1)で溶出し、この溶出液を減圧留去した。残留物にエタノールを加えて溶解し正確に2 mLとしたものを試験液とした(図1-2)。

(b) C18カートリッジカラム精製法

3(2)の試験溶液(B)を、あらかじめエタノール5 mL、メタノール5 mLでコンディショニングしたC18カートリッジに負荷し、メタノール10 mLで溶出した。負荷液及び溶出液を40℃で減圧留去した後、残留物にエタノールを加えて溶解し正確に2 mLとしたものを試験溶液とした(図1-3)。

### 4 標準溶液の調製

第二版分析法記載の方法に準じて行った。

パルミチン酸レチノール標準液400 mgを正確に量り、試料と同様にけん化し、抽出処理を行った。溶媒留去後、残留物に2-プロパノールを加えて正確に100

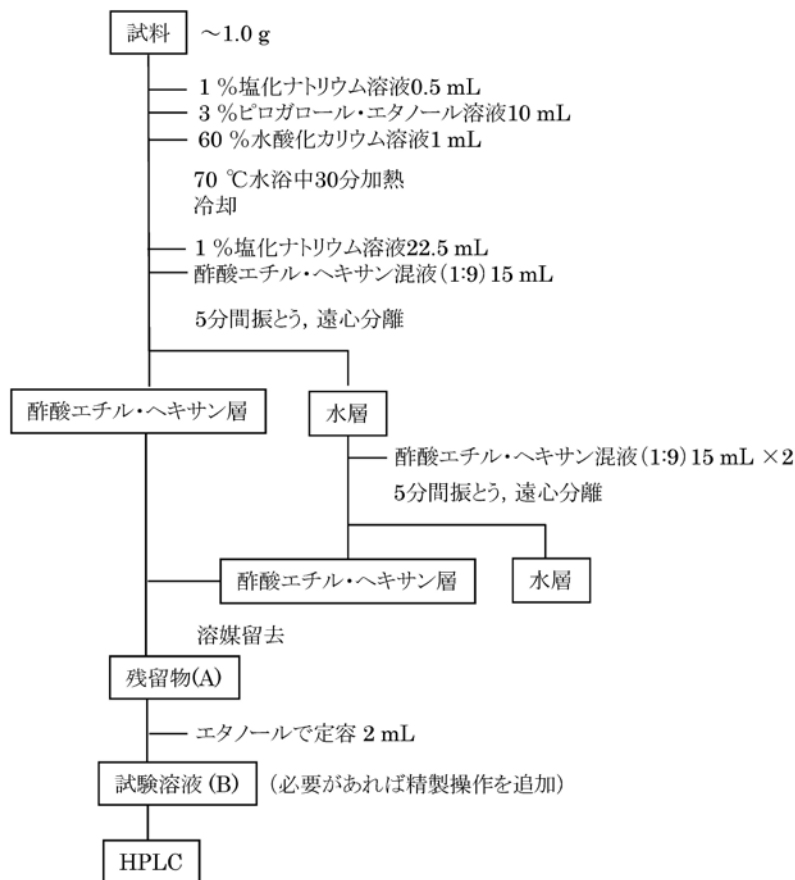


図1-1 分析法フロー

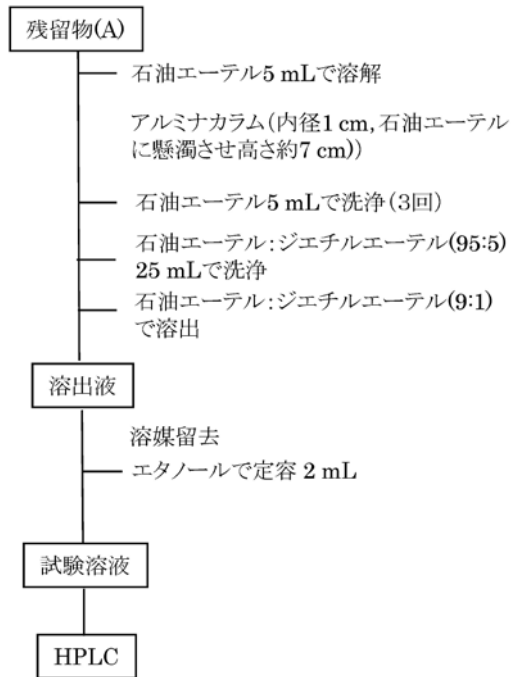


図1-2 分析法フロー (アルミナカラム精製)

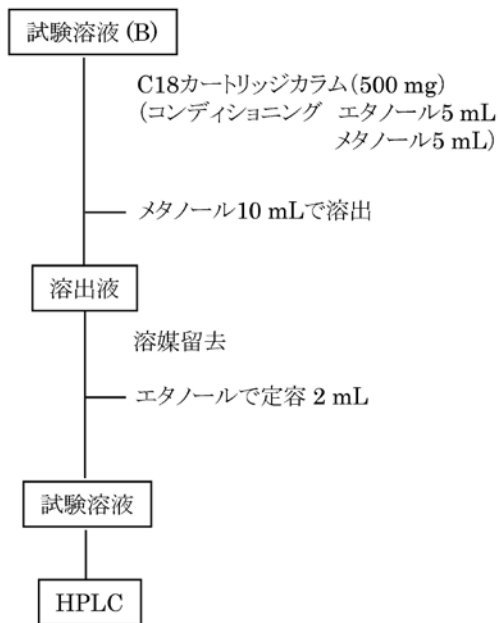


図1-3 分析法フロー (C18カートリッジカラム精製)

mLとし標準原液とした。標準原液を2-プロパノールで適宜希釈し、レチノール濃度で2～3 μg/mLとし、この液について325 nmの吸光度を測定した。次式によって希釈液のレチノール濃度を求めた。

$$\text{レチノール濃度}(\mu\text{g/mL}) = E \times 549/100$$

E: 希釈標準液の325 nmにおける吸光度(対照:2-

プロパノール・1 cmセル)

吸光度測定により濃度を決定した標準原液をエタノールで希釈し、レチノール濃度で0.035, 0.05, 0.07, 0.175, 0.35, 0.7及び1.0 μg/mLに調製し、検量線用標準溶液とした。

さらに、標準原液をエタノールで希釈し、0.14 μg/mL(低濃度添加用)及び2.0 μg/mL(高濃度添加用)に調整し、添加用標準溶液とした。

## 5 装置及び測定条件

装置

アジレント・テクノロジー(株)製 Agilent1100 シリーズ

測定条件

カラム: Inertsil ODS3V: ジーエルサイエンス(株)製  
L-column 2 ODS: 一般財団法人 化学物質評価研究機構製

カラム温度: 40℃

移動相: メタノール: 水(95:5)

流速: 1.0 mL/min

検出器: ダイオードアレイ検出器(UV-DAD, 測定波長: 325 nm), 蛍光検出器(UV-FLD, Ex340 nm, Em460 nm)

注入量: 10 μL

## 6 分析法の検出下限及び定量下限

試料の検出下限及び定量下限は、日本工業規格JIS K 0124: 2011 高速液体クロマトグラフィー通則[5]に従い、標準溶液を6回連続で測定し、得られた結果から検出下限を算出し、検出下限の5倍を定量下限とした。

## 7 検量線

検量線用標準溶液それぞれ10 μLずつを液体クロマトグラフに注入し、ピーク面積からレチノールの検量線を作成した。

## 8 定量

試験溶液10 μLを液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線によって試験溶液中のレチノール濃度(μg/mL)を求め、次式によって試料中のレチノール含量(mg/kg)を計算した。

$$\text{レチノール含量}(\text{mg/kg}) = C \times V \times N/W$$

C: 試験溶液中のレチノール濃度(μg/mL)

V: 試験溶液量(mL)

N: 希釈倍率

W: 試料の採取量(g)

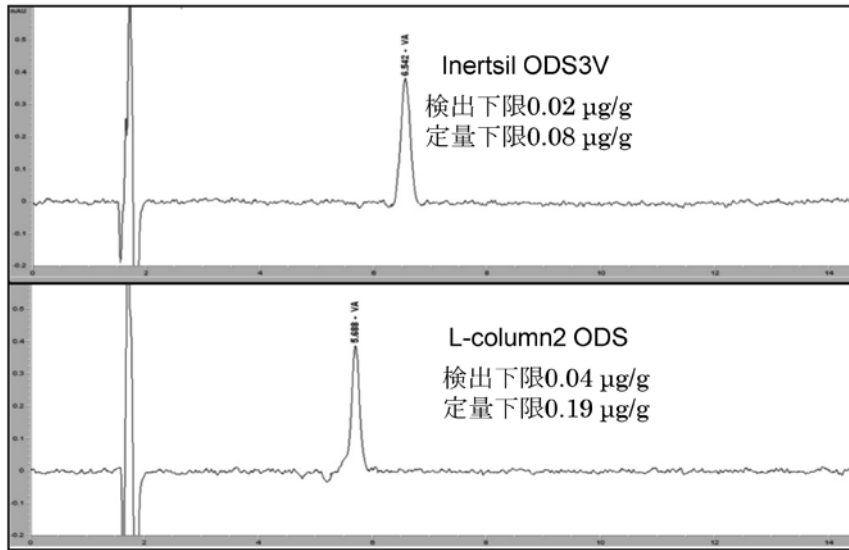
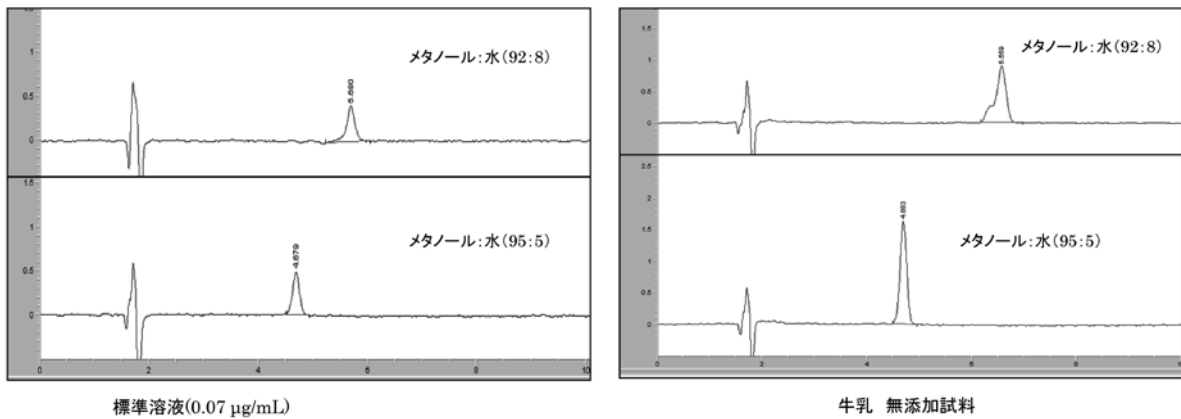


図2 カラム別の標準溶液のクロマトグラム (0.07 µg/mL), 検出下限, 定量下限



標準溶液(0.07 µg/mL)

牛乳 無添加試料

図3 移動相条件の検討

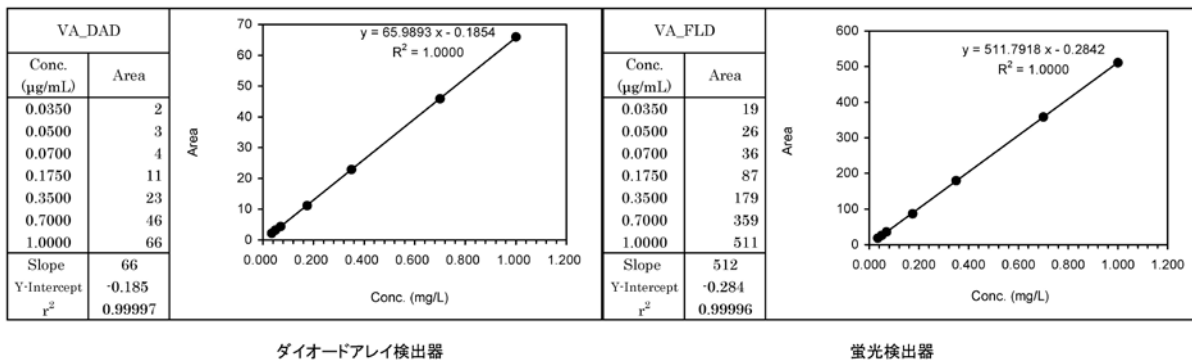


図4 検量線

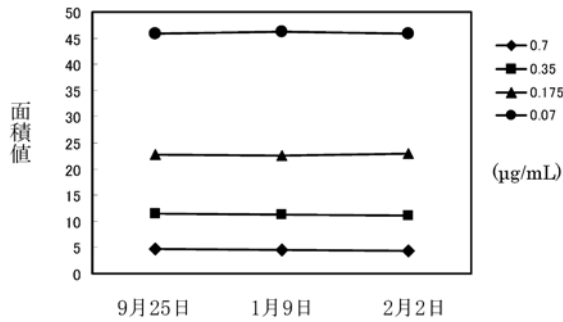


図5 標準溶液の面積値の経時変化

## 9 添加試料の調製

試料 1.0 g に添加用標準溶液を 0.14 mg/kg (低濃度添加: 検出限界相当濃度) 及び 2.0 mg/kg (高濃度添加) となるようそれぞれ 1 mL を添加後 30 分間放置し、試験溶液調製を行った。

## 結果及び考察

### 1 測定条件

2 種類のカラムを用いて、標準溶液の測定を行った。それぞれのクロマトグラムを図 2 に示した。さらにそれぞれのカラムにおいて検出下限値及び定量下限値を求めた。それらの結果から、今回の検討においては、比較的ピーク形状、再現性に優れたカラムとして Inertsil ODS3V を採用した。

移動相条件では、第二版分析法に示されたメタノール：水 (92：8) で測定したところ、レチノールのピークにリーディングが見られたが、メタノール：水 (95：5) で測定したところ、ピーク形状が改善され、良好なクロマトグラムが得られた (図 3)。そこで、移動相条件をメタノール：水 (95：5) とした。

### 2 検量線

図 4 に検量線を示した。UV-DAD 及び FLD で 0.035 ~ 1.0 µg/mL の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

### 3 標準溶液の安定性

標準溶液調製時及び冷蔵保存 4 ヶ月後の検量線用標準液について測定時の面積値を図 5 に示した。面積値の変動は見られず、3 ~ 4 ヶ月間の冷蔵保存による標準溶液の安定性を確認した。

### 4 試料採取量

購入試料について、試料採取量を 0.5 及び 1.0 g とし、ブランク試料として UV-DAD により測定を行った (表 1)。

レチノール含有量が定量限界未満の試料が多かったため、試料採取量を全て 1.0 g として検討した。

表 1 購入試料及びレチノール含量 (mg/kg)

食品名	採取量 (g)	
	0.5*	1.0**
パン-1	N.D.	N.D.
パン-2	N.D.	N.D.
クラッカー	N.D.	N.D.
ビスケット	0.27	0.27
フィッシュソーセージ	N.D.	N.D.
ウインナーソーセージ	N.D.	N.D.
ファットスプレッド	N.D.	0.20
牛乳	0.48	0.45

\*定量下限 0.16 mg/kg, \*\*定量下限 0.08 mg/kg

## 5 添加回収試験

購入試料のうち、クラッカー、牛乳及びファットスプレッドに、レチノール 0.14 mg/kg (定量限界相当濃度) 及び 2.0 mg/kg となるように添加用標準溶液を添加し、添加回収試験を行った (表 2)。妨害ピークが検出されることなく、レチノールを測定した (図 6-1, 6-2, 6-3)。添加回収率は UV-DAD 測定で、0.14 mg/kg 添加の場合、クラッカー、牛乳及びファットスプレッドでそれぞれ  $105.71 \pm 1.35$ ,  $112.38 \pm 4.09$  及び  $85.76 \pm 9.16$  % (回収率  $\pm$  CV%), 2.0 mg/kg 添加の場合、それぞれ  $98.20 \pm 2.66$ ,  $98.93 \pm 3.17$  及び  $95.94 \pm 5.60$  %, FLD 測定で、0.14 mg/kg 添加の場合それぞれ  $111.33 \pm 2.57$ ,  $111.90 \pm 8.31$  及び  $100.81 \pm 2.71$  % (回収率  $\pm$  CV%), 2.0 mg/kg 添加の場合、それぞれ  $96.87 \pm 4.53$ ,  $100.20 \pm 2.74$  及び  $92.07 \pm 3.52$  % で良好な結果が得られた。

## 6 精製操作の検討

第二版分析法に示されたアルミナカラムによる精製法について、方法 4 で調製した標準溶液を石油エーテルに転溶し検討を行った。標準溶液 0.5 µg/mL を 2 mL 負荷した場合、溶出溶媒の組成を変えても、最高で 32 % の回収率に留まった (表 3)。

そこで、操作の簡便性と回収率の向上を目的に C18 カートリッジカラムによる精製条件の検討を行った。試験液がエタノール溶液であるため、方法 4 で調製した標準溶液 (0.5 µg/mL) をエタノールに転溶しこの 2 mL を C18 カートリッジカラムに負荷した。メタノール 5 mL で溶出することでレチノールは 90 % 以上溶出した (図 7) ことから、メタノール溶出液量を 10 mL とした。

この精製条件により、ファットスプレッドに 0.14 mg/kg (検出限界相当濃度) 及び 2.0 mg/kg となるよ

表2 添加回収試験の結果

UV-DAD

添加量 (μg/g)	クラッカー		牛乳		ファットスプレッド	
	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)
0.14	105.71	1.35	112.38	4.09	85.76	9.16
2.00	98.20	2.66	98.93	3.17	95.94	5.60

n=3

FLD

添加量 (μg/g)	クラッカー		牛乳		ファットスプレッド	
	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)
0.14	111.33	2.57	111.90	8.31	100.81	2.71
2.00	96.87	4.53	100.20	2.74	92.07	3.52

n=3

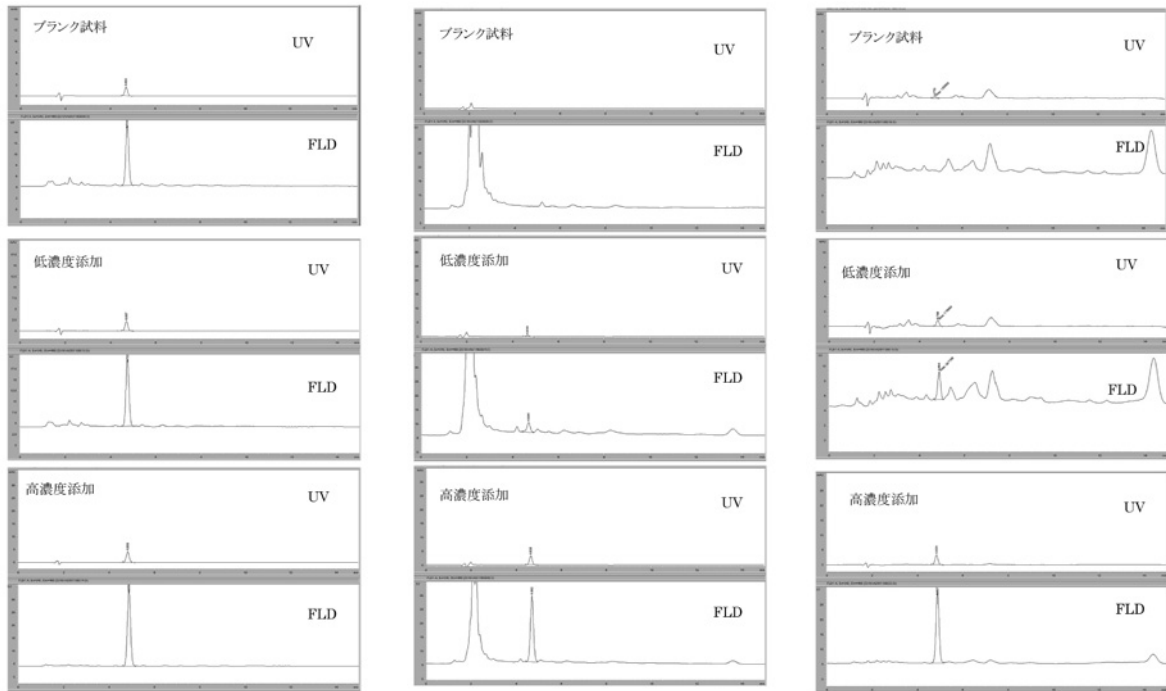


図6-1 添加回収試験クロマトグラム (牛乳) 図6-2 添加回収試験クロマトグラム (クラッカー) 図6-3 添加回収試験クロマトグラム (ファットスプレッド)

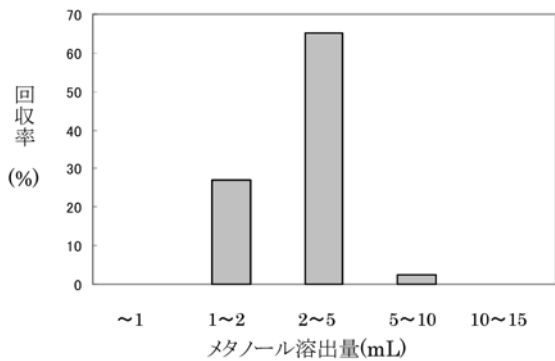


図7 C18カートリッジカラムからの標準溶液の溶出



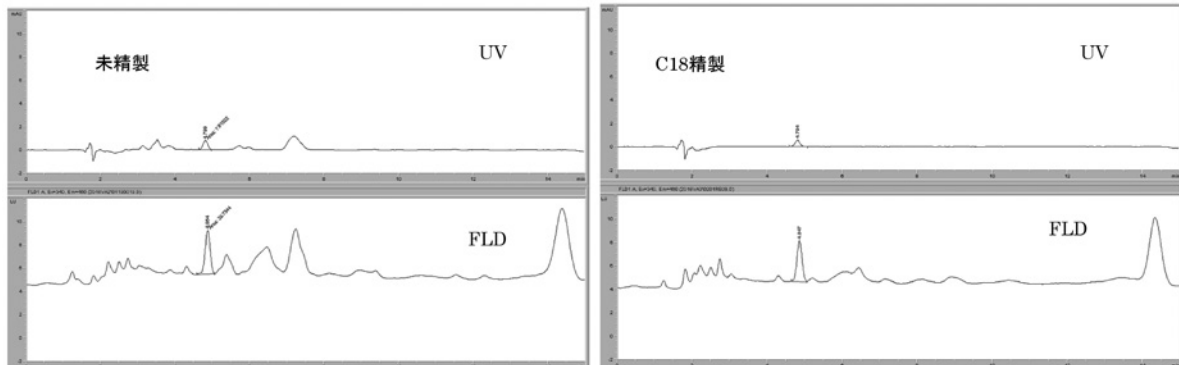


図8-1 低濃度添加試料のクロマトグラム (ファットスプレッド)

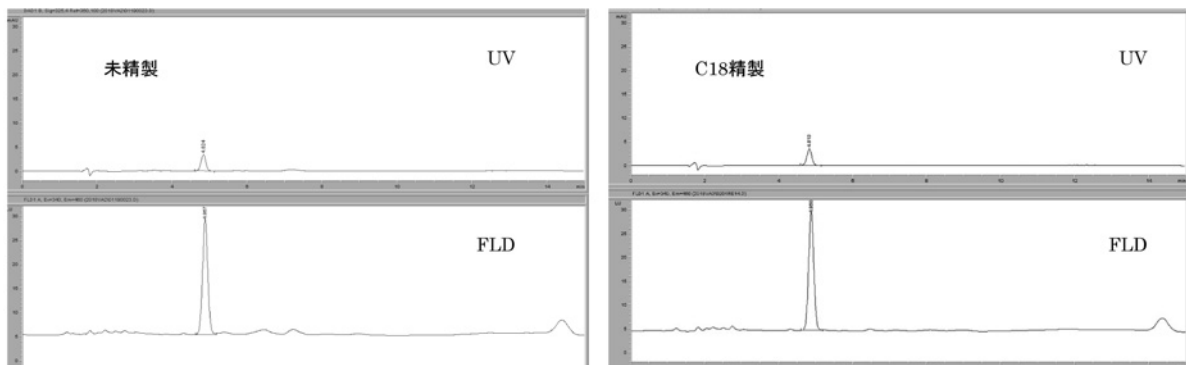


図8-2 高濃度添加試料のクロマトグラム (ファットスプレッド)

うレチノールを添加し、添加回収試験を行った。回収率は90%以上、標準偏差5%以内の良好な結果が得られた(表4)。今回検討に用いた試料においては、妨害ピークが検出されることなくレチノールを測定することが可能であったが、図8に示したように、C18による精製により夾雑物由来のピークが除去されていることから、今回決定した精製法が有効であると考えられた。

表3 アルミナカラムによる標準溶液の回収率  
(標準溶液0.5 µg/mLを2 mL負荷)

溶出条件1	回収率(%)
負荷	
石油エーテル5 mL	0.00
石油エーテル5 mL × 3	0.00
洗浄	
石油エーテル：ジエチルエーテル95：5 20 mL	0.00
溶出	
石油エーテル：ジエチルエーテル9：1 20 mL	0.00
石油エーテル：ジエチルエーテル9：1 30 mL	0.00
合計	0.00

溶出条件2	回収率(%)
負荷	
石油エーテル5 mL	0.00
石油エーテル5 mL × 3	0.00
洗浄	
石油エーテル：ジエチルエーテル95：5 20 mL	0.00
溶出	
石油エーテル：ジエチルエーテル90：10 25 mL	0.00
石油エーテル：ジエチルエーテル85：15 20 mL	0.00
石油エーテル：ジエチルエーテル80：20 20 mL	0.00
石油エーテル：ジエチルエーテル75：25 20 mL	32.00
石油エーテル：ジエチルエーテル70：30 20 mL	0.00
合計	32.00

溶出条件3	回収率(%)
負荷	
石油エーテル5 mL	0.00
石油エーテル5 mL × 3	0.00
洗浄	
石油エーテル：ジエチルエーテル9：1 20 mL	0.00
溶出	
石油エーテル：ジエチルエーテル70：30 20 mL	2.80
石油エーテル：ジエチルエーテル70：30 30 mL	10.20
石油エーテル：ジエチルエーテル70：30 25 mL	1.76
石油エーテル：ジエチルエーテル70：30 25 mL	0.00
合計	14.76

表4 添加回収試験の結果 (C18カラムによる精製)

添加量 (μg/g)	ファットスプレッド	
	回収率 (%)	CV (%)
0.14	93.67	2.69
2.00	97.01	3.37

n = 3

添加量 (μg/g)	ファットスプレッド	
	回収率 (%)	CV (%)
0.14	98.76	0.78
2.00	95.87	0.64

n = 3

## ま と め

第二版分析法に記載のビタミンA及びビタミンA脂肪酸エステル分析法について検証及び検討を行った。クラッカー、牛乳及びファットスプレッドの各食品に、0.14及び2.0 mg/kg添加時のレチノールの回収率は85～115%の範囲内で、標準偏差も10%以内の良好な結果が得られた。UV-DAD, FLDいずれの検出器においても同等の結果が得られることを確認した。定量下限はいずれも0.08 μg/gであった。今回検討に用いた試料においては、妨害ピークが検出されることなくレチノールを測定したが、レチノールを添加したファットスプレッドについて、C18カートリッジカラムによる精製操作を行ったところ、回収率に影響なくクロマトグラム上の夾雑ピークを除去することができた。このことから、妨害ピークが出現し、定量が困難な場合はC18カートリッジカラムによる精製を追加することでレチノールの定量が可能となると考えられた。

本研究は、厚生労働省食品等試験検査費食品中の食品添加物分析法の検討事業(平成29年度)により実施された。

## 文 献

- [1] 厚生省生活衛生局食品化学課. 衛化第15号. 第二版食品中の食品添加物分析法2000. 平成12年03月30日
- [2] 日本ビタミン学会(編集). ビタミンの事典. 朝倉書店

- [3] 厚生省告示第370号 食品, 添加物等の規格基準
- [4] 公益社団法人日本薬学会. 衛生試験法・注解2020. 金原出版株式会社
- [5] 日本規格協会: 高速液体クロマトグラフィー通則JISK0124, 1983年制定・2011年改訂.