

HPLCによる食品中のL-アスコルビン酸 ステアリン酸エステル及びL-アスコルビン酸 パルミチン酸エステルの分析法について

城間博正・大城善昇

Determination of L-Ascorbyl Stearate and
L-Ascorbyl Palmitate in Foods by High
Performance Liquid Chromatography

Hiromasa SHIROMA and Zensho OHSHIRO

Abstract. A HPLC method for determination of L-Ascorbyl Stearate and L-Ascorbyl Palmitate was studied. Sample was extracted with ethanol after addition of L-ascorbic acid for improvement recoveries, and cleaned up by Sep-Pak C₁₈ cartridge. The extract was reduced easily and rapidly using DL-homocystein as reducing agent, and then injected in HPLC.

Average recoveries of L-Ascorbyl Stearate and L-Ascorbyl Palmitate added in seven kinds of food were 77.3~99.9%, respectively. The detection limit in this method were 2mg/kg.

Key words. L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル, L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル, 高速液体クロマトグラフィー

I はじめに

L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル (A-ステアレート) 及びL-アスコルビン酸パルミチン酸エステル (A-パルミテート) は、酸化防止剤・栄養強化剤として食品中への使用が許可されている。

公定法 (厚生省, 1989) におけるA-ステアレート及びA-パルミテートの分析法では、エステルを50%硫酸で分解した後、そのL-アスコルビン酸の量を測定し、それに分子量比を乗じてA-ステアレート及びA-パルミテートの量として求めることになっている。しかし、この方法ではA-ステアレート及びA-パルミテートの区別ができず、また食品中には天然のL-アスコルビン酸が広く存在している (科学技術庁資源調査会, 1982) ことから、添加されたA-ステアレート及びA-パルミテート量を求めることは困難である。

A-ステアレート及びA-パルミテートの分析法としては小高らの報告 (1988) があるが、食品の種類により回収率が低い場合や、また妨害ピークが現れるなどで定量できない場合

があった。そこで著者らは今回、A-ステアレート及びA-パルミテートの抽出法、クリーンアップ法さらに還元の簡便化等について検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

II 実験方法

1. 試料

厚生省の食品添加物一日摂取量調査方法 (厚生省, 1992) に従い、沖縄県内で加工食品を購入し、次のように種類ごとに7食品群に分類して混合した試料を用いた。

1群: 調味嗜好飲料, 2群: 穀類, 3群: いも類・豆類, 4群: 魚介類・肉類, 5群: 油脂類・乳類, 6群: 砂糖・菓子類, 7群: 果実類・野菜類・海草類

2. 試薬

0.05M酢酸緩衝液 (pH4及びpH6.5): 和光純薬工業(株)製試薬特級酢酸ナトリウム4.1gを蒸留水に溶かし、酢酸を加えてpH4及びpH6.5にした後、蒸留水を加えて1000mlとした。

50%エタノール (pH4): 関東化学(株)試薬特

級エタノールと0.05M酢酸緩衝液(pH4)を同量ずつ混合した。

1%DL-ホモシスティン：SIGMA社製DL-ホモシスティン0.5gを蒸留水に溶かして50mlとし、密栓して冷暗所に保存した。

A-ステアレート・A-パルミテート混合標準原液：和光純薬工業(株)製A-ステアレート100mg及びSIGMA社製A-パルミテート100mgをエタノールに溶かし、100mlとした。

A-ステアレート・A-パルミテート混合標準液：標準原液をエタノールで20倍希釈した後、その1, 2, 4, 8, 16mlを採取し、エタノールを加えて100mlとした。本液1ml中には両化合物をそれぞれ0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μ g含有する。なお、本溶液は用時調製した。

Sep-Pak C₁₈カートリッジカラム：Waters社製。

その他の試薬はいずれも特級品を使用した。

3. 器具及び装置

高速液体クロマトグラフ：島津製作所製 LC6A

検出器：島津製作所製 SPD-6AV

カラムオープン：島津製作所 CTO-6A

振とう機：池本理化学工業(株)製シェーカー

遠心分離機：日立工機(株)製 05PR-22

4. 試験溶液の調製

抽出：あらかじめ磨砕した試料5.0gを共栓付遠沈管(50ml)に採り、L-アスコルビン酸0.5gを添加し、エタノール20mlで3分間振とう抽出する。遠心分離で上清液を採り、残渣は更に15mlのエタノールで同様に抽出する。上清液を合わせ、0.05M酢酸緩衝液(pH4)で50mlに定容する。

クリーンアップ：抽出液2mlをあらかじめメタノール10ml及び0.05M酢酸緩衝液(pH4)5mlを順次通過させたSep-Pak C₁₈カートリッジにゆっくり通し、次に蒸留水10ml及び50%エタノール(pH4)5mlで順次洗浄した後、メタノール4ml弱を通し、この流出液を全量採取して4.0mlとした。

還元：前述の方法でクリーンアップして得られた溶液1.0mlを共栓付試験管(10ml)に採り、還元剤として1%DL-ホモシスティン200

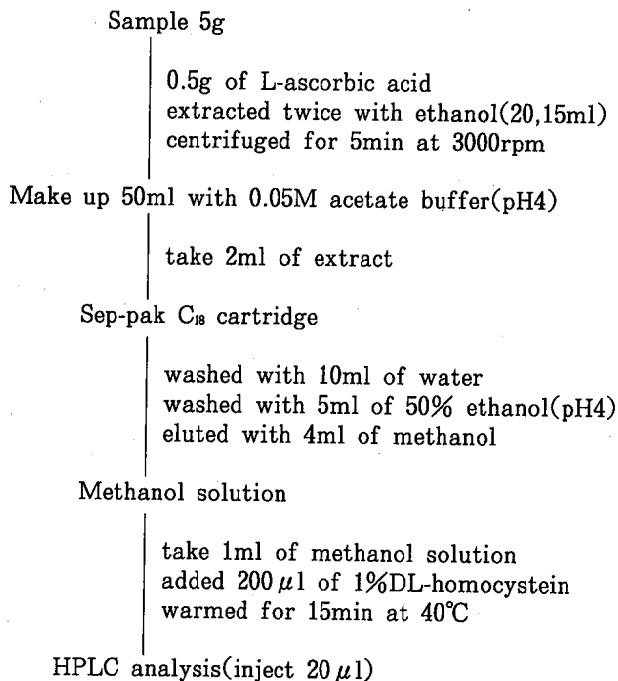


Chart 1. Analytical procedure of L-Ascorbyl Stearate and L-Ascorbyl Palmitate in food

μl を添加し、 40°C の恒温水槽で15分間加温した後、HPLC用試験溶液とした。

そのフローシートをChart 1 に示した。

5. HPLC 測定条件

1) カラム : 和光純薬工業(株)製 Wakosil-II C18HG(4.6i. d. \times 150mm)

2) ガードカラム : Waters社製 Cosmosil 5C18-AR(4.6i. d. \times 10mm)

3) 移動相 : メタノール : 0.05M酢酸緩衝液(pH6.5)=85:15

4) カラム温度 : 40°C

5) 流量 : 1.0ml/min

6) 試料注入量 : $20\mu\text{l}$

7) 検出波長 : 265nm

III 結果及び考察

1. HPLC測定条件の検討

カラムにwakosil-5C18HGを用い、移動相のメタノール濃度とpHを変化させた場合のA-ステアレート及びA-パルミテートの溶出時間の変化を調べた。その結果、Fig. 1及びFig. 2 に示すように両化合物ともメタノール濃度が高い程、またpHが高い程溶出時間は早くなった。分離の状態や測定時間を考慮し、移動相はメタノール : 0.05M酢酸緩衝液

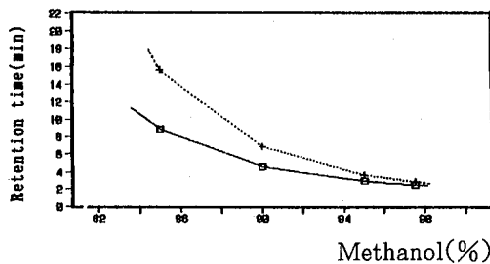


Fig.1. Effect of methanol concentration on the retention time

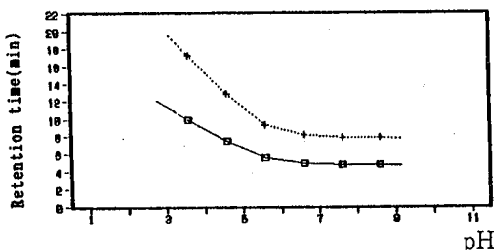


Fig.2. Effect of Mobile Phase pH on the retention time

(pH6.5)=85:15とした。

測定波長は、A-ステアレート及びA-パルミテートを移動相に溶解した時の極大吸収である265nmとした。Fig. 3にこの条件における標準液のクロマトグラムを示した。

2. 抽出法の検討

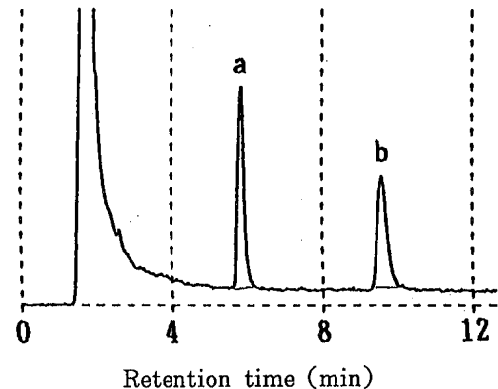


Fig.3. Liquid chromatogram of L-Ascorbyl Stearate and L-Ascorbyl Palmitate
Peak a ; L-Ascorbyl Palmitate
b ; L-Ascorbyl Stearate
Contained $200\mu\text{l}$ of 1%DL-homocystein

試料を直接エタノールあるいはメタノールで抽出すると、2群(穀類)と6群(砂糖・菓子類)の回収率が20%台とかなり低かった。これは過酸化物の影響と考えられたため、還元剤としてL-アスコルビン酸を添加したところ、回収率は良くなった。試料の中で最も回収率の低かった2群(穀類)にA-ステアレート及びA-パルミテートの濃度が $100\mu\text{g/g}$ となるように添加し、L-アスコルビン酸の添加量を段階的に変えてその回収率を求め、その結果をFig. 4 に示した。回収率はL-アスコルビン酸の添加量が0.5gより一定になった。これよりL-アスコルビン酸の添加量は、試料5gに対して0.5gとした。

次のクリーンアップ操作で用いるSep-Pak C₁₈カートリッジは、酸性側でA-ステアレート及びA-パルミテートの保持力が強くなる傾向にあったため、試料をエタノールで抽出

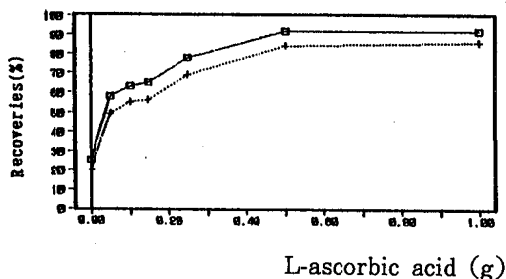


Fig.4. Effect of L-ascorbic acid on the recoveries

した後0.05M酢酸緩衝液(pH4)を用いて定容し、抽出液を酸性溶液とした。更に保持力を考慮し、エタノール濃度もおよそ70%に調整した。

3. Sep-Pak C₁₈カートリッジによるクリーンアップ

試料のエタノール抽出液は多くの夾雑物を含むため、直接HPLCに注入するのは好ましくない。良好なクロマトグラムを得るためにはクリーンアップ操作が必要である。そこで、Sep-Pak C₁₈カートリッジを用いて、簡便かつ迅速にクリーンアップを行う方法について検討した。

A-ステアレート及びA-パルミテートの混合液(各10 μ g/ml, pH4の70%エタノール溶液) 2mlをあらかじめメタノール10ml及び0.05M酢酸緩衝液(pH4)を通したSep-Pak C₁₈カートリッジにゆっくりと通し保持させた。それを、水10ml及び50%エタノール(pH4) 5mlで洗浄し、それぞれの洗浄液にA-ステアレート及びA-パルミテートが溶出していないことを確認した。カートリッジからの溶出はメタノールを用い、その溶出パターンをFig. 5に示した。A-ステアレート及びA-パルミテートは、メタノール3mlでほぼ100%溶出した。従って、溶出液量は4ml弱を用い4.0mlに定容した。

4. 還元剤の検討

A-ステアレート及びA-パルミテートは、酸化型においては紫外部に吸収がないため、何らかの方法で還元してからHPLCに注入しなければならない。還元剤としては硫化水素が考えられたが、臭いや取扱いの煩雑さの面

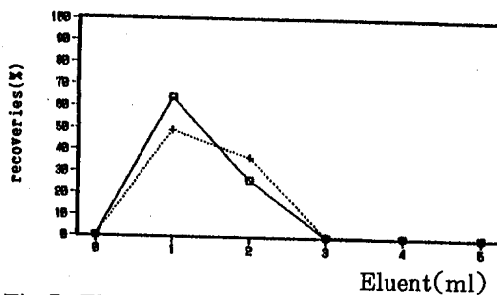


Fig.5. Elution Pattern of L-Ascorbyl Stearate and L-Ascorbyl Palmitate from Sep-Pak C₁₈ cartridge

から適用は困難であった。ところで、Danielら(1981)及び吉田ら(1987)はビタミンCの定量の際、還元剤としてDL-ホモシステインを用いる方法を報告している。この方法がA-ステアレート及びA-パルミテートの還元法として適用できるかについて検討した。

試料5群(油脂類・乳類)の抽出液に、あらかじめ希ヨウ素溶液を滴下して酸化型としたA-ステアレート及びA-パルミテートの標準液(HPLC上でピークがないことを確認した)を10 μ g/mlとなるように添加し、Sep-Pak C₁₈カートリッジでクリーンアップ後その1mlを分取し、それに0~2%に調整したDL-ホモシステイン溶液200 μ lを添加し、それぞれの回収率を求めその結果をFig. 6に示した。回収率は0.5%溶液添加からほぼ一定になった。これより、DL-ホモシステインの添加量は1%溶液の200 μ lとした。なお、反応時間は40 $^{\circ}$ C水浴中で15分とした。

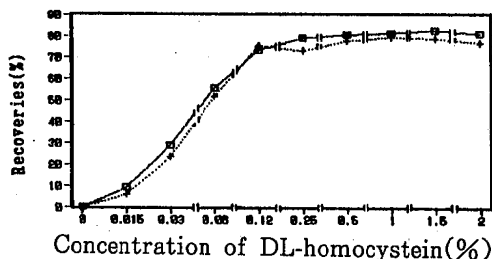


Fig.6. Effect of concentration of DL-homocystein on the recoveries

5. 検量線

混合標準液1mlを共栓付試験管(10ml)に採

り、1%DL-ホモシステイン200 μ lを加え、40°Cで15分間加温後その20 μ lをHPLCに注入し、ピーク面積による絶対検量線法で検量線を作成した。その結果、いずれも0.5~10 μ g/mlの間で原点を通る良好な直線が得られた。

6. 添加回収実験

試料1~7群にA-ステアレート及びA-パルミテートが10 μ g/gとなるように添加し、前述の試験法を用いて添加回収実験を行い、その結果をTable 1に示した。回収率は、77.3%~99.9%とおおむね良好であった。

IV まとめ

HPLCを用いた食品中のA-ステアレート及びA-パルミテートの分析法について検討し、次の結果を得た。

- 1) 高純度シリカゲル系ODSカラムを用いることにより、比較的短時間に精度良く分離することができた。
- 2) 試料を直接エタノール抽出すると、穀類、菓子類では回収率がかなり低かったが、試料にアスコルビン酸を添加してから抽出することにより回収率は良くなった。
- 3) Sep-Pak C₁₈カートリッジを用いることにより簡便かつ迅速にクリーンアップ操作ができ、良好なクロマトグラムが得られた。
- 4) 還元剤としてDL-ホモシステインを用いることにより、比較的簡便かつ迅速に還元することができた。
- 5) 各食品群に対する添加回収率は、77.3%~99.9%と概ね良好な結果であった。なお、本試験法による検出下限は、試料濃度として2mg/kgであった。

Table 1. Recoveries of L-Ascorbyl Stearate and L-Ascorbyl Palmitate in foods

	Added (μ g/g)	Recoveries from food groups(%)*						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
AS	10	99.9	86.0	87.7	85.0	95.7	76.5	90.5
AP	10	95.2	77.5	92.2	83.5	95.2	73.5	86.5

AS : L-Ascorbyl Stearate

AP : L-Ascorbyl Palmitate

I : Seasonings and beverage, II : Cereals, III : Potatoes and beans,

IV : Fish,meat, V : Oils,milk, VI : Sugars,confectioneries,

VII : Fruits,vegetables,seaweeds

*.Average of three determination

V 参考文献

Dennison D.B., Brawley T. G., Hunter G.L.

K.(1981) Amer. Chem. Soc. pp.927-929.

科学技術庁資源調査会(1982) 四訂日本食品標準成分表

小高要・氏家隆・上野順士(1988) 食品分析データブックNo.1. 食品化学研究会編, 75pp.

厚生省生活衛生局編(1992) 厚生省食品化学レポートシリーズNo.57

厚生省生活衛生局監修(1989) 食品中の食品添加物分析法. 食品衛生検査指針, 日本食品協会, pp.357-365.

吉田政晴・吉田綾子・尾花裕孝(1987) 大阪府立公衆衛生研究所報, 17:37-42.