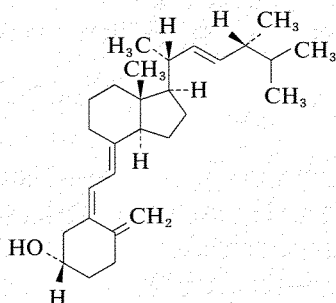


84 エルゴカルシフェロール及び コレカルシフェロール

Ergocalciferol and Cholecalciferol

エルゴカルシフェロール

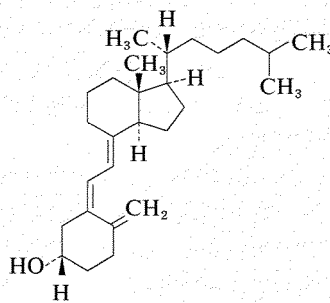
別名：カルシフェロール，ビタミン D₂



C₂₈H₄₄O : 396.66

コレカルシフェロール

別名：ビタミン D₃



C₂₇H₄₄O : 384.65

1. 試験法の概要

食品中のエルゴカルシフェロール及びコレカルシフェロールは、液体クロマトグラフィーにより定量する。食品中にはとくにコレカルシフェロールが存在していることがある。また、この定量法ではエルゴカルシフェロールとコレカルシフェロールの分離定量¹⁾ができない。したがって、定量値は食品由来のエルゴカルシフェロール及びコレカルシフェロールと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法 (液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

ビタミン D として 2~10 IU に対応する、通常、2g 以下の試料の量を精密に量り、100ml の褐色ナス型フラスコに入れ、ピロガロール 0.5g 及び温湯 5ml を加える。エタノール製 5% 水酸化カリウム溶液 30ml を加え、還流冷却管を付け、沸騰水浴上でときどき振り混ぜながら 20 分間還流を行う。次に冷水中で速やかに室温まで冷却し、必要があればろ過し、分液漏斗に移

す。ナス型フラスコは、水 50ml 及びエチルエーテル 50ml で洗い、洗液は分液漏斗に合わせ、激しく振り混ぜる。水層は第 2 の分液漏斗に移し、エチルエーテル 50ml を加えて激しく振り混ぜ、水層は第 3 の分液漏斗に移し、エチルエーテル 50ml を加え同様の操作を行う。全エチルエーテル層を合わせ、洗液がアルカリ性²⁾を示さなくなるまで水を用いて洗った後、無水硫酸ナトリウム³⁾ 5g を加える。脱水した後、200ml の褐色ナス型フラスコを受器としてろ過し、残留物は少量のエチルエーテルで洗い、洗液はろ液に合わせ、減圧下でエチルエーテルを留去⁴⁾する。エチルエーテルを留去した後、エタノール 5ml を加えて減圧下で共沸留去を行い、更に窒素をフラスコに直接吹き込み、エタノールを完全に蒸発させる。少量のエチルエーテルを用いて濃縮器⁵⁾に移し、減圧乾固し、残留物にイソプロピルアルコールを加えて溶かして正確に 0.2ml とし、試料液とする。

(3) 標準液の調製

エルゴカルシフェロール⁶⁾ 0.010g (400,000 IU) を正確に量り、エタノールを加えて溶かして正確に 1,000ml とする。この液 1ml を正確に量り、エタノールを加えて正確に 100ml とし、標準原液とする (この液 1ml は、エルゴカルシフェロール 0.1 μ g (4 IU) を含む)。標準原液 1ml を正確に量り、100ml の褐色ナス型フラスコに入れ、ピロガロール 0.5g 及び温湯 5ml を加え、以下(2)試料液の調製と同様に操作し、標準液とする (この液 1ml は、エルゴカルシフェロール 0.5 μ g (20 IU) を含む)。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外分光検出器付液体クロマトグラフを用い、次の 2 つの条件で処理し測定する。

a 分取用

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 10mm⁷⁾、長さ 250mm

カラム温度：室温

移動相：アセトニトリル・メタノール混液 (1:1)、3ml/分

測定波長：254nm

b 測定用

カラム充てん剤：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：室温

移動相：イソプロピルアルコール・*n*-ヘキサン混液 (0.4:99.6)、1ml/分

測定波長：254nm

② 測定

試料液 100 μ l を正確に量り、分取用の条件の液体クロマトグラフに注入し、ビタミン D 画分を濃縮器⁵⁾を受器として分取⁸⁾する。次に、減圧乾固⁹⁾し、イソプロピルアルコール・*n*-ヘキサン混液 (0.4 : 99.6) を加えて溶かして正確に 0.2ml とし、この液 50 μ l を正確に量り、測定用の条件の液体クロマトグラフに注入する。

③ 定量

標準液 100 μ l を正確に量り、②測定と同様に操作し、得られたピーク高さ又はピーク面積と試料液のピーク高さ又はピーク面積より、次式から検体中のエルゴカルシフェロール及びコレカルシフェロール含量 (IU/kg) を求める。

$$\text{エルゴカルシフェロール及びコレカルシフェロール含量 (IU/kg)} = \frac{200 \times A \times C}{A_s \times W}$$

A : 試料液から得られたクロマトグラム上のピーク高さ又はピーク面積

A_s : 標準液から得られたクロマトグラム上のピーク高さ又はピーク面積

C : 標準液中のエルゴカルシフェロール濃度 (IU/ml)

W : 検体の採取量 (g)

試薬・試液

1. アセトニトリル : [液体クロマトグラフ用]
2. イソプロピルアルコール : [液体クロマトグラフ用]
3. エチルエーテル : 過酸化物を含まないもの。エチルエーテルを蒸留して用いる (初留, 後留の 10% を除く)。
4. エタノール : [99.5v/v%, 特級]
5. エタノール製 5% 水酸化カリウム溶液 : 水酸化カリウム 25g を 500ml メスフラスコに入れ、少量の水で溶かし、エタノールを加えて 500ml とする。
6. ピロガロール : [特級]
7. *n*-ヘキサン : [液体クロマトグラフ用]
8. 無水硫酸ナトリウム : 硫酸ナトリウム (無水) [特級]
9. メタノール : [液体クロマトグラフ用]

[注]

- 1) カラム及び移動相の条件によっては分離の可能性もある。
- 2) 洗液にフェノールフタレイン試液を加えて紫色にならないことを確かめる。
- 3) 無水硫酸ナトリウムの代わりに、液相分離ろ紙を用いてもよい。
- 4) 減圧下で留去のときは 40℃ 以下で行う (以下同じ)。
- 5) Kuderna-Danish 濃縮器等を用いる。

- 6) 現在、わが国で市販されている調製粉乳のようなビタミン D 強化食品には主としてエルゴカルシフェロールが添加されているので、この場合の標準液にはエルゴカルシフェロールを用いる。一方、天然中のビタミン D はコレカルシフェロールとして存在している場合が多いので、その場合はコレカルシフェロール 10mg を標準液に用いる。
- 7) カラム内径を大きくすると、カラムへのサンプル負荷が少なくてすみ、分取カラムに適當である。
- 8) 常にビタミン D₂ 又は D₃ の標準品を用いて溶出位置を確認しておくことが必要である。この条件で、ビタミン D₂、D₃ は保持時間 17~18 分に溶出するので、16~19 分を D 画分とする。ミニフラクションコレクターを用いるときは、2,500~2,850 滴の画分を分取するとよい。大半の妨害ピークは、ビタミン D₂ 画分よりも前の方に溶出する。
- 9) 分取したビタミン D 画分のアセトニトリル・メタノール混液は、突沸させないようできるだけ低温で減圧乾固する。