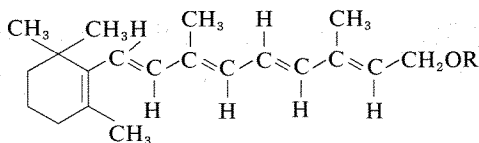


89 ビタミン A 及びビタミン A 脂肪酸エステル

Vitamin A and Vitamin A Fatty Acid Ester

別名：レチノール及びレチノール脂肪酸エステル



R: H ビタミン A

R: 脂肪酸 ビタミン A 脂肪酸エステル

1. 試験法の概要

食品中のビタミン A はけん化後抽出する。必要に応じカラムクロマトグラフィーによってクリーンアップした後、液体クロマトグラフィーにより定量する。

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

一般試料採取法を用いる。

(2) 試料液の調製

① けん化

試料 0.5~1.5g の一定量を容量 60ml の褐色共栓試験管に精密に量り、1%塩化ナトリウム溶液 0.5ml、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 を加え、70℃の水浴中でガラス棒でかき混ぜながら 30 分間加熱する。

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 22.5ml を加えた後、酢酸エチル・ヘキサン混液 (1:9) 15ml を加える。振とう器で 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) 15ml で更に 2 回、同様に処理して抽出する。抽出液を合わせ、40℃で溶媒を減圧留去する。残留物に石油エーテルを加えて溶かし正確に 2ml としたものを試験液とする。

なお、試料が加工品等でクロマトグラム上に妨害ピークが出現した場合は、試験液を減圧蒸

留して溶媒を留去した後、石油エーテル5mlを加えて溶かしカラム用試験液とする。

③ カラムクロマトグラフィー¹⁾

内径1cmのクロマト管に、あらかじめ弱活性化したアルミナを石油エーテルにけん濁させて、約7cmの高さまで充てんする。これにカラム用試験液を静かに流し入れ、約1ml/分の速度で流出する。カラム上部の液がなくなる直前に石油エーテル5mlを加え、更に3回繰り返す。次いでエーテル・石油エーテル混液(5:95)で洗浄後、エーテル・石油エーテル混液(1:9)を加えて溶出する。その溶出液を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、一定量としたものを試験液とする。

(3) 検量線用標準液²⁾の調製

パルミチン酸レチノール³⁾400gを正確に量り試料と同様にけん化し、不けん化物を抽出する。溶媒留去後、残留物に2-プロパノールを加えて正確に100mlとし標準原液とする。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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、この液について325nmの吸光度を測定する。次式によって希釈液のレチノール濃度を求める。

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

E：希釈標準溶液の325nmにおける吸光度(対照：2-プロパノール・1cmセル)
標準原液をエタノールで希釈し、レチノール濃度で約0.07, 0.175, 0.35及び0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、検量線用標準溶液とする。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外部検出器付液体クロマトグラフを用いて、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム温度：35℃

カラム管：内径4.6~6.0mm、長さ150~250mm

移動相：水・メタノール混液(8:92)

流速：1.0ml/分

測定波長：325nm

② 検量線

検量線用標準溶液をそれぞれ10 μl ずつを正確に採り、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する。

③ 定量

試料液10 μl を正確に採り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積⁴⁾を検量線

によって試料液中のレチノール濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を求め、次式によって食品中のレチノール含量を計算する⁵⁾。

$$\text{レチノール含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{A \times V \times N}{W} \times 100$$

A : 検量線より求めた試験液中のレチノール濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

V : 試験液量 (ml)

N : 希釈倍率

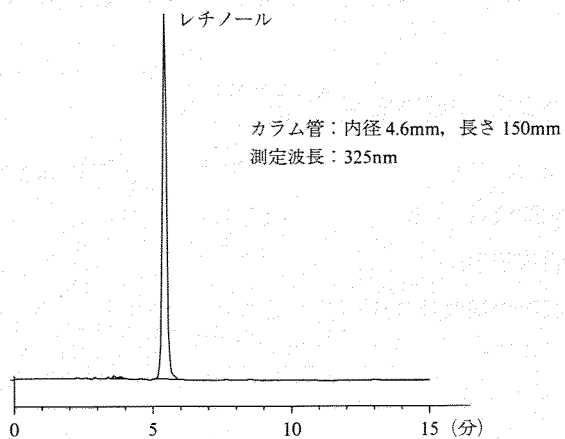
W : 試料の採取量 (g)

試薬・試液

1. ピロガロール : [特級]
2. 水酸化カリウム : [特級]
3. 塩化ナトリウム : [特級]
4. 活性アルミナ : (Merck, Art. 1097) アルミナの弱活性化は水約 10% を加え、よく振とうして混合し、乾燥剤を入れないデシケーター中で一晩放置し、平衡状態にしてから用いる。
5. 酢酸エチル : [特級]
6. *n*-ヘキサン : [特級]
7. 石油エーテル : [特級]
8. ジエチルエーテル : [特級]
9. エタノール : [特級]
10. メタノール : [特級]
11. 2-プロパノール : [特級]

[注]

- 1) アルミナカラムクロマトグラフィーは、予試験で妨害ピークを認めない場合は省略することができる。
- 2) 標準液は冷蔵庫中で保存すれば、4 カ月は使用可能である。
- 3) パルミチン酸レチノールは $0.550\mu\text{g}$ が 1 国際単位 (IU) に相当する。
- 4) レチノールの液体クロマトグラムを注図 89-1 に示す。
- 5) 0.5g を採取し、試験液を 2ml にした場合の定量限界は $2\sim 5\mu\text{g}/100\text{g}$ である。牛乳などのように含量の少ない試料は採取量を 1.5g 程度まで増やすことで、検出感度、再現性を向上させることができる。



注図 89-1 レチノールのクロマトグラム