

酸化防止剤

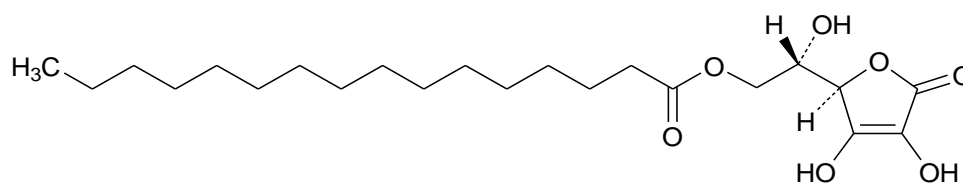
L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及び

L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル

L-Ascorbyl Palmitate and L-Ascorbic Stearate

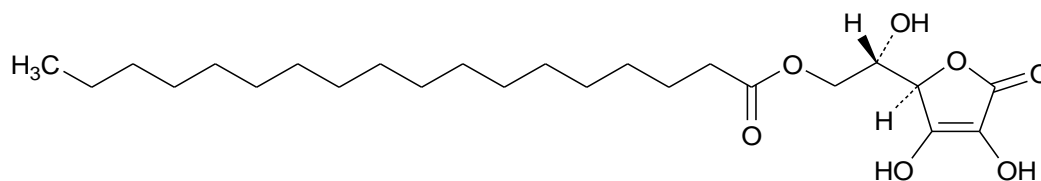
L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル

別名：ビタミンCパルミテート

 $C_{22}H_{38}O_7$: 414.53

L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル

別名：ビタミンCステアレート

 $C_{24}H_{42}O_7$: 442.59

1. 分析法の概要

食品中のL-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルは、液体クロマトグラフィーにより酸化型を含めた総L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及び総L-アスコルビン酸ステアリン酸エステルとして定量する。(2021年改正)

2. 分析法（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) 試験溶液の調製

試料¹⁾を細切又はすりつぶした後、その約5 gを50mLの遠心管に精密に量り、アスコルビン酸²⁾ 0.5 g及びエタノール20mLを加え、5分間振とう後、遠心(5分間、3000回転/分)し、上清を50mLのメスフラスコに入れる。沈殿物にエタノール15mLを加え、同様の操作を繰り返す。上清を先の上清と合わせ、0.05mol/L酢酸緩衝液(pH4.0)³⁾を加えて正確に50mLとする。この液をガラス繊維ろ紙⁴⁾でろ過する。ろ液2mLを正確に量り、あらかじめメタノール10mL及び0.05mol/L酢酸緩衝液(pH4.0) 5mLで洗浄した逆相固相抽出カラム⁵⁾に静かに注入し、1~2mL/分の速度で流出させる。流出液は捨て、カラムは水10mL及びエタノール/0.05mol/L酢酸緩衝液(pH4.0)混液(1:1) 5mLを流して洗浄した後、共栓付試験管にメタノール4mLで溶出する⁶⁾。溶出液に1%DL-ホモシステイン溶液⁷⁾ 1mLを加え、40°Cで15分間加温した後、1%アスコルビン酸・メタノール試液⁸⁾ 1mLを加え、メタノールを加えて正確に10mLとし、メンブランフィルター(0.45µm)を用いてろ過し⁹⁾、試験溶液とする。

(3) 検量線用標準溶液の調製¹⁰⁾

L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステル各0.0100 gを量り、1%アスコルビン酸・メタノール試液⁸⁾ 10mLを加え、メタノールを加えて溶かして正確に100mLとし、標準原液とする(各濃度100µg/mL)。

標準原液1、2.5mL及び5mLをそれぞれ正確に量り、1%アスコルビン酸・メタノール試液⁸⁾ 5mLをそれぞれに加え、メタノールを加えてそれぞれ正確に50mLとし、検量線用標準溶液とする(各濃度2~10µg/mL)。さらに、2µg/mLの検量線用標準溶液をそれぞれ1mL、2.5mL及び5mL正確に量り、1%アスコルビン酸・メタノール試液⁸⁾ 1mLをそれぞれに加え、メタノールを加えてそれぞれ正確に10mLとし、検量線用標準溶液とする(各濃度0.2~1µg/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件¹¹⁾

紫外吸光光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤¹²⁾：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径4.6~6.0mm、長さ150~250mm

カラム温度：35°C

移動相：メタノール/0.05mol/Lリン酸二水素ナトリウム緩衝液(pH2.0)混液(85:15)

流速：1.0mL/分

測定波長：254nm

注入量：20µL

② 検量線¹³⁾

検量線用標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さから検量線を作成する。

③ 定量¹⁴⁾

試験溶液を液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さから検量線によって試験溶液中のL-アスコルビン酸パルミチン酸エステル濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステル濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を求め、次式によって試料中のL-アスコルビン酸パルミチン酸エステル含量 (g/kg) 及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステル含量 (g/kg) を計算する。

$$\begin{aligned} & \text{総L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル含量 (g/kg)} \\ &= \frac{C_p \times 10 \times 50}{W \times 2} \times \frac{1}{1000} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{総L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル含量 (g/kg)} \\ &= \frac{C_s \times 10 \times 50}{W \times 2} \times \frac{1}{1000} \end{aligned}$$

C_p : 試験溶液中のL-アスコルビン酸パルミチン酸エステル濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

C_s : 試験溶液中のL-アスコルビン酸ステアリン酸エステル濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

W : 試料の採取量 (g)

④ 定量限界 0.01 g/kg

試薬・試液等

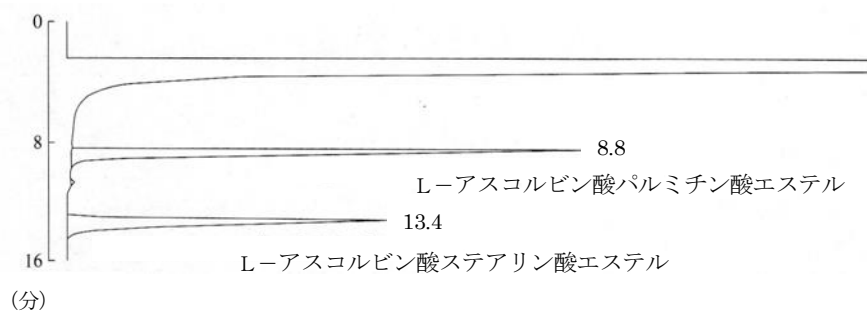
1. L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル：市販品を用いる。
2. L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル：市販品を用いる。
3. アスコルビン酸：[特級]
4. エタノール：[特級]
5. 酢酸：[特級]
6. 酢酸ナトリウム：[特級]
7. 0.05mol/L酢酸緩衝液 (pH4.0)：0.05mol/L酢酸ナトリウム溶液に 0.05mol/L酢酸溶液を加え、pH4.0 に調整する。
8. メタノール：[特級]
9. 逆相固相抽出カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル固相抽出カラム
10. DL-ホモシステイン：[特級]
11. 1%DL-ホモシステイン溶液：DL-ホモシステイン 100mg を水 10mL に溶かす。
12. 1%アスコルビン酸・メタノール試液：アスコルビン酸 1 g をとり、水 10mL に溶解し、メタノールを加えて 100mL とする。

13. リン酸二水素ナトリウム：[特級]
14. リン酸：[特級]
15. 0.05mol/Lリン酸二水素ナトリウム緩衝液（pH2.0）：リン酸二水素ナトリウム 7.80 g
を水 900mL に溶かし、リン酸で pH を 2.0 に調整し、水を加えて 1000mL とする。

[注]

- 1) 液体試料の場合、そのまま約 5 g を遠心管にとる。
- 2) 抽出効率を上げるために加える。通常 0.5～1 g の添加量で効果を示す。
- 3) アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びアスコルビン酸ステアリン酸エステルの逆相固相抽出カラムへの保持力は、酸性側で強くなる傾向にあるため、溶液を逆相固相抽出カラムに通す前に、0.05mol/L酢酸緩衝液（pH4.0）で酸性とする。
- 4) ガラス繊維ろ紙（粒子保持能：1.6 μ m）などが使用できる。
- 5) 夾雑物の少ないときは、この操作は省略できる。
- 6) L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルは、メタノール量 3 mL でほぼ 100%溶出する。
- 7) L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルは、酸化型では紫外部に吸収を持たないため、還元剤としてホモシステインを加えて酸化型のものを還元型にする。
- 8) L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルの分解を防ぐために加える。
- 9) 遠心して試験溶液を調製する方法もある。
- 10) 検量線用標準溶液の数は、直線性が確認できれば、適宜調整してもよい。
- 11) 測定条件は例示である。用いるカラムによって、流速及び注入量等を調整する。
- 12) 分析の際は、被験物質のピークが妨害ピークの影響を受けないことを確認する。
- 13) 必要に応じて、検量線用標準溶液の調製に用いた溶媒を分析し、溶媒由来の夾雑物のないことを確認する。
- 14) L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルの混合液を分離した液体クロマトグラムを注図 1 に示す。検量線は 0.2～10 μ g/mL の範囲で直線関係がある。

なお、食用植物油、牛脂及びポテトチップスに、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル又はL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルを、0.02 g/kg 又は 1.5 g/kg 添加した時の回収率は 90～105%（n = 3）であった。また、食用植物油、ポテトチップス及び錠剤型食品に、L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル又はL-アスコルビン酸ステアリン酸エステルを、0.01 g/kg 又は 0.1 g/kg 添加した時の回収率は 76～100%（相対標準偏差 0.2～8.1%）（n = 5 の平均）であった。



<測定条件>

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル 流速：1.0mL/分
 カラム管：内径 4.6mm、長さ 250mm 測定波長：254nm
 カラム温度：35°C 注入量：20μL
 移動相：メタノール/0.05mol/Lリン酸二水素ナトリウム緩衝液 (pH2.0) 混液 (85 : 15)

注図 1 L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル及びL-アスコルビン酸
 ステアリン酸エステル混合液の液体クロマトグラム