

食安新発第0701003号  
平成17年7月1日

各 

都	道	府	県		
保	健	所	設	置	市
特	別	区			

 衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部  
基準審査課新開発食品保健対策室長

「日本人の食事摂取基準（2005年版）」の策定に伴う「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」の一部改正について

「日本人の食事摂取基準の策定について」（平成16年12月28日付け健発第1228001号厚生労働省健康局長通知）によって「日本人の食事摂取基準（2005年版）」が策定されたことを受けて、今般、「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法等について」（平成11年4月26日付け衛新第13号厚生省生活衛生局食品保健課新開発食品保健対策室長通知）の一部を下記のように改正することとしたので、貴管下関係者に対する周知徹底をはじめ、その運用に遺憾のなきよう取り計らわれない。

#### 記

「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法について」の別添栄養成分等の分析方法等の「21 ナイアシン」、「24 ビタミンA（レチノール、カロテン）」及び「31 ビタミンE」を別添下線部のように改正する。

## 21 ナイアシン (ナイアシン当量として)

ナイアシンはニコチン酸及びニコチン酸アミドを総称する名称である。なお、肝臓において重量比でトリプトファン 60 からナイアシン 1 を合成できるため、ニコチン酸とニコチン酸アミドの合計量に 1/60 トリプトファン量を加えたものをナイアシン当量とする。

### <ニコチン酸及びニコチン酸アミドの定量>

高速液体クロマトグラフ法は、食品中にニコチン酸又はニコチン酸アミドが 100 g 当たり 1 mg 以上は含まれていて、さらにその存在形態が明らかな場合に適用できる。一般的な食品においては、ニコチン酸及びニコチン酸アミドを分別して定量する必要はなく、感度及び特異性に優れた微生物定量法が汎用されている。

#### (1) 高速液体クロマトグラフ法

##### ① 機器、試薬

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 紫外分光光度計付き
- ・カラム : 逆相型
- ・ニコチン酸標準溶液 : 国立衛生試験所標準品を水に溶かして、2、5、10 及び 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液を調製する。
- ・ニコチン酸アミド標準溶液 : 国立衛生試験所標準品を水に溶かして、2、5、10 及び 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液を調製する。

##### ② 試験溶液の調製

試料の適量を水で振とうあるいはホモジナイズ抽出する。得られた抽出液をろ過し、一定容とし、約 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度の試験溶液とする。

##### ③ 測定

試験溶液の 20  $\mu\text{l}$  を高速液体クロマトグラフに注入し、ニコチン酸又はニコチン酸アミドのピーク面積を測定し、あらかじめ標準溶液 20  $\mu\text{l}$  を注入して得られた検量線を用いて試験溶液中の濃度を求め、試料中のニコチン酸又はニコチン酸アミド含量を算出する。

##### ④ 高速液体クロマトグラフ操作条件例

###### 1) ニコチン酸

カラム : 内径 4.6mm、長さ 150mm、ステンレス製注 1)

移動相 : 3mmol/L テトラブチルアンモニウムブロマイド含有

5mmol/L 酢酸ナトリウム (pH5.0) : メタノール (9 : 1 V/V)

測定波長：260nm

流量：1.5ml/分

2) ニコチン酸アミド

カラム：内径 4.6mm、長さ 150mm、ステンレス製<sup>注1)</sup>

移動相：10mmol/L オクタンスルホン酸ナトリウム含有

20mmol/L 酢酸ナトリウム (pH3.5)：メタノール (98：2 V/V)

測定波長：260nm

流量：1.2ml/分

[注]

1) Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス製) 又は同等品を用いる。

(2) ナイアシン定量用基礎培地法

① 機器、試薬

・分光光度計

・ナイアシン標準溶液：ニコチン酸 (国立衛生試験所標準品) 100mg を水に溶かし、希釈して正確に 100ml とする。更に、希釈して 50ng/ml となるようにする。

・使用菌株：Lactobacillus plantarum (ATCC 8014)

・ナイアシン測定用培地 (1 L 中、pH6.8±0.1)

カザミノ酸	14 g
L-シスチン	400mg
D L-トリプトファン	200mg
アデニン硫酸塩	20mg
グアニン塩酸塩	20mg
ウラシル	20mg
リボフラビン	400 μg
チアミン塩酸塩	200 μg
ビオチン	0.8 μg
p-アミノ安息香酸	200 μg
パントテン酸カルシウム	400 μg
ピリドキシン塩酸塩	800 μg
リン酸水素二カリウム	1 g
リン酸二水素カリウム	1 g
硫酸マグネシウム	400mg
硫酸第一鉄	20mg
硫酸マンガン	20mg

酢酸ナトリウム	20 g
グルコース	40 g
・乳酸菌保存用培地（1 L 中、pH6.8±0.1）	
酵母エキス	5.5 g
ペプトン	12.5 g
ブドウ糖	11.0 g
リン酸水素二カリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	5.0mg
リン酸二水素カリウム	0.25 g
酢酸ナトリウム（無水）	10.0 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
硫酸マンガン	5.0mg
粉末寒天	20.0 g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている<sup>注1)</sup>。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

## ② 接種菌液の調製

*Lactobacillus plantarum* の保存菌株を前培養培地に接種し、35℃で 20 時間培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600nm における透過率が 80～90%になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

## ③ 試験溶液の調製

試料 2 g を精密に量り、0.5mol/L 硫酸 100ml を加え、121℃で 30 分間オートクレーブ処理を行う。冷却後、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整後、水で 200ml に定容し、ろ過する。更に、溶液 1 ml 中にナイアシンが 10～20ng を含むように水で希釈し、試験溶液とする。

## ④ 測定

試験管 2 本ずつに試料溶液 0.5、1 及び 2 ml を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5ml 及び水を加えて全量を 5 ml とする。別に検量線作成のため、ニコチン酸標準溶液（0～0.75ng 相当量）を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに測定用培地 2.5ml 及び水を加えて全量を 5 ml とする。121℃で 15 分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液 1 滴（約 30 μl）ずつを無菌的に接種し、37℃で 18 時間ふ卵器に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600nm の濁度を用いて測定する。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のナイアシン量を求め、試料中のナイアシン含量を算出する。

[注]

- 1) ニコチン酸定量用基礎培地「ニッスイ」：日水製薬  
一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」：日水製薬  
一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」：日水製薬（前培養培地に同じ）

<トリプトファンの定量>

(1) 高速液体クロマトグラフ法<sup>注1)</sup>

① 試薬

- ・ 標準溶液：トリプトファン 50mg を精秤する。0.1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液に溶解後，100 ml に定容し，水で 50 倍希釈する。(10 μg/ml)
- ・ 水酸化バリウム（特級）

② 試験溶液の調製

試料 0.1～1 g 及び水酸化バリウム 7.8 g を封管用試験管に精秤し，水 4.5ml 及び 60%チオジエチレングリコール 0.5 ml を加え，沸騰水浴中で水酸化バリウムを加熱溶解する<sup>注2)</sup>。溶解後，減圧下で脱気し，封管後，110℃（恒温乾燥機）で 12 時間加水分解する。冷却後，開管し，加水分解液を 50ml または 100ml 容メスフラスコ（1 W/V%フェノールフタレイン溶液を数滴加えておく）に移した後，微アルカリに調整，定容し，0.45 μm のフィルターでろ過したものを試験溶液とする。

③ 測定

試験溶液 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入し，トリプトファンのピーク面積を測定し，あらかじめ HPLC 用標準溶液 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から，試料中のトリプトファン含量を求める。

<高速液体クロマトグラフ操作条件>

カラム：内径 4.6 mm，長さ 250 mm，ステンレス製<sup>注3)</sup>

移動相：10 mmol/l 過塩素酸-メタノール(92:8 V/V)

検出器：蛍光分光光度計

測定波長：励起波長 285 nm，蛍光波長 348 nm

流量：1.0 ml/分

温度：50℃

[注]

- 1) アミノ酸自動分析法でも測定できる。
- 2) トリプトファンは塩酸加水分解では破壊されるため，アルカリを用いた加水分解を行う。
- 3) Inertsil ODS-2（ジーエルサイエンス製）又は同等品を用いる。

<ナイアシン当量の算定>

ナイアシン当量は、次式によって算定する。

$$\begin{aligned} \text{ナイアシン当量 (mg/100g)} &= \frac{\text{ニコチン酸 (mg/100g)} + \text{ニコチン酸アミド} \\ &\quad \text{(mg/100g)} + 1/60 \text{トリプトファン (mg/100g)}}{\text{ナイアシン定量用基礎培地法によるナイアシン} \\ &\quad \text{(mg/100g)} + 1/60 \text{トリプトファン (mg/100g)}} \end{aligned}$$

## 24 ビタミンA (レチノール、カロテン) <sup>注1)</sup>

### (1) 高速液体クロマトグラフ法：レチノール (ビタミンAアルコール)

#### ① 機器、試薬

- ・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム (特級) 60 g を冷却しながら水を加えて溶解し、正確に 100ml とする。
- ・弱活性アルミナ：活性アルミナ<sup>注2)</sup> 500 g に水 50ml を滴下して加え、振り混ぜて均一にし、密栓、一夜放置する。活性度を測定し、一定の活性度<sup>注3)</sup> のものを使用する。活性度は水の量を加減して調整する。
- ・標準レチノール：パルミチン酸レチノール (1 g 中に 30 万  $\mu\text{g}$  以上のレチノールを含むもの) を次の試験法に従ってけん化抽出し、標準溶液の検定を行う。フリーのレチノールを使用する場合でもイソプロピルアルコール (特級) に溶解した後、標準溶液の検定を行う。
- ・ピロガロール、エタノール、塩化ナトリウム、石油エーテル (以上、特級)
- ・ヘキサン、酢酸エチル (以上、残留農薬試験用)
- ・ジエチルエーテル：過酸化物を含まないもの。
- ・分光光度計：紫外部及び可視部の吸収が測定可能なもの。
- ・クロマト管：内径 10mm、高さ 250mm、ガラスコック付き
- ・高速液体クロマトグラフ：紫外分光光度計付き
- ・カラム：逆相分配型、内径 4.6mm、長さ 150mm

#### ② 試験溶液の調製

##### 1) けん化

試料約 0.5 g <sup>注4)</sup> を 60ml 容遠心管 (共栓付き) に精密に量り、3%ピロガロール—エタノール溶液 10ml と水酸化カリウム溶液 1ml を加え、70℃水浴中でガラス棒でときどきかき混ぜながら 30 分間加熱する。水冷後、1%塩化ナトリウム溶液 22.5ml を加えた後、ヘキサン—酢酸エチル混液 (9 : 1 V/V) 15ml を加える。5分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上層を 100ml 容なす形フラスコに移す。水層をヘキサン—酢酸エチル混液 (9 : 1 V/V) 15ml で更に 2回、同様に

抽出する。抽出液を合わせ 40℃で減圧濃縮する。

残留物をエタノールに溶解し、レチノールとして約 0.3 μg/ml となるように希釈し、試験溶液とする。

レチノール含量が 0.3mg/100 g 程度以下の試料の場合は、残留物を石油エーテル（特級）5ml に溶解し、以下に示すアルミナカラムを用いた精製を行う<sup>注5)</sup>。

## 2) アルミナカラムクロマトグラフィー

クロマト管にあらかじめ活性度を調整したアルミナ約 7 g を石油エーテルに懸濁させ、約 7 cm の高さに充填する。受器に 100ml 容なす形フラスコを置き、カラムの上に先の残留物の石油エーテル溶液を静かに流し入れ、流量 1 ml/分 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 5 ml を加え、更に 3 回繰り返す（カロテン画分）。次に、受器を別の 100ml 容褐色なす形フラスコに替える。石油エーテル—エーテル混液（9：1 V/V）を約 30ml 流す。得られた溶出液を、40℃で減圧濃縮する（レチノール画分）。残留物に一定量のエタノールを加え溶解する。1 ml 中レチノールを約 0.3 μg 含むようにエタノールで希釈し、試験溶液とする。

## ③ 標準レチノールの検定

10~20mg 程度を精密に量りとり、試料と同様に、②、1)の方法に従ってけん化抽出した標準レチノールをイソプロピルアルコールに溶解し、1 ml 中にレチノールとして 2~3 μg になるように希釈し、分光光度計で 325nm の吸光度を測定する。次式により希釈した標準溶液のレチノール濃度を求める。

$$\text{レチノール} (\mu\text{g/ml}) = A / 100 \times 1,830 \times 0.3$$

A：希釈した標準溶液の 325nm における吸光度（対照：イソプロピルアルコール、1 cm セル）

## ④ 標準溶液の調製

標準レチノールをエタノールで 1 ml 中 0.05、0.1、0.2 及び 0.5 μg になるように希釈し、標準溶液とする。

## ⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注6)</sup>

カラム：内径 4.6mm、長さ 150mm、ステンレス製<sup>注7)</sup>

移動相：メタノール—水（92：8 V/V）

測定波長：325nm<sup>注8)</sup>

流量：1.0ml/分

温度：35℃

## ⑥ 測定

試験溶液 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入し、レチノールのピーク面積を測定し、あらかじめ標準溶液 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から試験溶液中の濃度を求め、これを用いて試料中のレチノール含量を算出

する。

⑦ 計算

試料中のレチノール含量 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) =  $C \times V \times N \times 100 / W$

C : 検量線から求めた試験溶液のレチノール濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

V : 定容量 (ml)

N : 希釈率

W : 試料採取量 (g)

(2) 吸光光度法 : 総カロテン<sup>注9)</sup>

① 試験溶液の調製

(1)、②と同様に操作し、アルミナカラムクロマトグラフィーで得られるカロテン画分<sup>注10)</sup>を40°Cで減圧濃縮する。残留物を一定量のヘキサンに溶解し、1ml中にカロテンを約1  $\mu\text{g}$  含むようにヘキサンで希釈する。

② 測定

分光光度計によりヘキサンを対照にして、試験溶液の453nmの吸光度を測定する。

③ 計算

$\beta$ -カロテンの吸光係数 $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2,592$  (溶媒、ヘキサン) を用いて次式により試料中の含量を求める。

試料中の総カロテン ( $\text{mg}/100\text{g}$ ) =  $A \times 1,000 / 2,592 \times V / W \times N$

レチノール当量 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) = 総カロテン ( $\text{mg}/100\text{g}$ )  $\times 1,000 / 2 \times 1 / 3$

A : 試験溶液の吸光度

V : 定容量

N : 希釈率

W : 試料採取量 (g)

(3) 高速液体クロマトグラフ法 :  $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン<sup>注9) 注11)</sup>

① 機器、試薬

- ・  $\alpha$ -カロテン標準溶液 :  $\alpha$ -カロテン標準品<sup>注12)</sup>
- ・  $\beta$ -カロテン標準溶液 :  $\beta$ -カロテン標準品<sup>注12)</sup>
- ・ シクロヘキサノン、イソプロピルアルコール (以上、特級)
- ・ 高速液体クロマトグラフ : 紫外可視分光光度計付き
- ・ その他の機器及び試薬は前記(1)と同様のものを用いる。

② 試験溶液の調製

(1)、②、1)に従って操作し、得られた抽出物を減圧濃縮後、エタノールで溶

解し、 $\beta$ -カロテンとして2～4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように希釈し、試験溶液とする。

ジュースの場合は次の操作で試験溶液を得る。試料約2 gを60ml容の遠心管(共栓付き)に精密に量り、3%ピロガロール含有エタノール溶液20mlと無水硫酸ナトリウム10gを加え、5分間振とうする。遠心分離後、上澄み液を100ml容メスフラスコにとる。残留物に3%ピロガロール含有エタノール溶液20mlを加え、同様に抽出を行う。同様の操作を更に1回繰り返した後、3%ピロガロール含有エタノール液で定容する。溶液の一部(10ml)を60ml容の遠心管(共栓付き)に正確に量り、60%水酸化カリウム溶液1mlを加え、70°Cの水浴中で30分間加熱する。水冷後、1%塩化ナトリウム溶液23mlとイソプロピルアルコール6ml及びヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V)15mlを加える。5分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上澄み液を100ml容のなす形フラスコに移す。水層をヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V)15mlで更に2回、同様に抽出する。抽出液を合わせ40°Cで減圧濃縮する。残留物をエタノールに溶解する。ただし、ニンジンジュースのように $\beta$ -カロテン含量の高い場合はけん化操作を省略する。

### ③ 標準溶液の調製

・ $\alpha$ -カロテン標準品5mgを精密に量り、石油エーテルで100mlに定容し、標準溶液Aとする。標準溶液Aをエタノールで希釈し、 $\alpha$ -カロテンを1ml中に0.5、1.0、2.0及び4.0  $\mu\text{g}$ 含む溶液を調製し、 $\alpha$ -カロテン標準溶液とする。

・ $\beta$ -カロテン標準品20mgを精密に量り、シクロヘキサンで100mlに定容し、標準溶液Bとする。標準溶液Bをエタノールで希釈し、 $\beta$ -カロテンを1ml中に0.5、1.0、2.0及び4.0  $\mu\text{g}$ 含む溶液を調製し、 $\beta$ -カロテン標準溶液とする。

### ④ 標準溶液の検定

③の標準溶液A 2mlを正確に量り、石油エーテルで100mlに定容し、444nmの吸光度を測定する。 $\alpha$ -カロテンの吸光係数を $E_{1\text{cm}}^{1\%}=2,800$ として標準溶液A中の $\alpha$ -カロテン濃度を求める。

③の標準溶液B 2mlを正確に量り、シクロヘキサンで200mlに定容し、455nmの吸光度を測定する。 $\beta$ -カロテンの吸光係数を $E_{1\text{cm}}^{1\%}=2,450$ として標準溶液B中の $\beta$ -カロテン濃度を求める。

### ⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例<sup>注13)</sup>

カラム：内径4.6mm、長さ150mm、ステンレス製<sup>注14)</sup>

移動相：メタノール-クロロホルム(96:4 V/V)

流量：1.5ml/分

測定波長：455nm

温度：40°C

### ⑥ 測定

試験溶液20  $\mu\text{l}$ を高速液体クロマトグラフに注入し、 $\alpha$ -カロテン及び $\beta$ -カロ

テンのピーク面積をそれぞれ測定し、あらかじめ標準溶液 20  $\mu$ l を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試料中の  $\alpha$ -カロテン及び  $\beta$ -カロテン含量を求める。

⑦ 計算

試料中の  $\alpha$ -カロテン (又は  $\beta$ -カロテン) 含量 ( $\mu$ g/100 g) =  $C \times V \times N \times 100 / W$

C : 検量線から求めた試験溶液の  $\alpha$ -カロテン (または  $\beta$ -カロテン) 濃度 ( $\mu$ g/ml)

V : 定容量 (ml)

N : 希釈率

W : 試料採取量 (g)

レチノール当量に換算する場合は次式による。

レチノール当量 ( $\mu$ g/100 g) =  $\frac{1/24 \alpha\text{-カロテン含量} (\mu\text{g}/100\text{g}) + 1/12 \beta\text{-カロテン含量} (\mu\text{g}/100\text{g})}{1}$

[注]

1) ビタミンは生物効力に対する名称である。定量の対象としては、主にビタミンA効力を示すレチノール、 $\alpha$ -カロテン及び  $\beta$ -カロテンとし、その定量値はレチノール当量として表す。なお、レチノール 1  $\mu$ g は、 $\alpha$ -カロテン 24  $\mu$ g、 $\beta$ -カロテン 12  $\mu$ g にそれぞれ相当する。

2) Merck Art. 1097 (メルク社製)

3) Yellow OB (FD & C Yellow No. 4, Colour Index No. 11390) 20mg を石油エーテル 100ml に溶解し、保存溶液とする。保存溶液 10ml を石油エーテルで 100ml とし試験溶液とする。弱活性アルミナを石油エーテルで懸濁し、カラムに 10cm の高さに詰める。

試験溶液 1ml をカラムに通し、石油エーテル—エーテル混液 (9 : 1) を流し、黄色がカラムから落ち切るまでの容量 (ml) をもって活性度の指標とする。通常、約 12ml で溶出する。

4) レチノール含量が低い試料の場合、試料採取量を 1 ~ 2 g にする。その場合、3%ピロガロール含有エタノール液 10ml と水酸化カリウム溶液 1ml のほか、更に粒状水酸化カリウム 2 g を加えてけん化する。

5) アルミナカラムによる精製処理は、共存する妨害物の除去に効果的である反面、分析精度を低下させる。したがって、レチノール含量が 0.3mg/100g 程度以下の試料であっても、妨害物が少ない場合には、むしろこの処理を省略した方がよいこともある。

6) レチノールには、多くの異性体が存在する。13-シス体は自然界に多く存在し、加熱処理によっても生じる。13-シス体は、all-トランス体に比べて生物効

力は 75%とされている。13-シス体を分別定量する場合は、順相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフ条件が適当である。しかし、標準の 13-シス-レチノールは得るのが難しく、不安定なので注意を要する。

7) Cosmosil C<sub>18</sub> Econopac (ナカライテスク製) あるいは相当品を用いる。

8) レチノールの測定に蛍光検出器を用いた例も報告されている。ここで、紫外部吸収検出器を用いているのは、all-トランス体と 13-シス体は吸光係数が近似しており、13-シス体を含めたレチノール含量を求めるには都合がよいためである。

9) トマト加工品などリコピンを多く含む食品は、アルミナカラムクロマトグラフィでリコピンとカロテンを分離することは困難である。高速液体クロマトグラフ法により、 $\alpha$ -カロテンと  $\beta$ -カロテンを分離・測定し、その合計を総カロテンとした方がよい。

10) 弱活性アルミナカラム処理では、カロテンの異性体 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) は分離しないため、測定値は総カロテンとなる。

11) クリプトキサンチンのように  $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン以外の成分でビタミンA効力を有するものを多く含む食品にあつては、それらの成分も分離・測定してレチノール当量に合算する。クリプトキサンチンの高速液体クロマトグラフの条件は、(3) 高速液体クロマトグラフ法：総カロテン、 $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテンに同じである。クリプトキサンチンは、フナコシ 82-0003-17 (EXTRASYTESE 社製) あるいは相当品を用いる。濃度はクリプトキサンチンを石油エーテルに溶解し、452nm の吸光度を測定し、 $E_{1\%}^{1\text{cm}}=2,386$  を用いて検定する。検量線作成用の標準溶液は、検定に用いた標準溶液を分取し、溶媒留去後、エタノールの一定量に溶解し、クリプトキサンチンを 1ml 中に 0.5、1.0 及び 2.0  $\mu\text{g}$  含むように調製する。

なお、クリプトキサンチンの生物効力については、24  $\mu\text{g}$  がレチノール 1  $\mu\text{g}$  に相当するとするのが一般的である。

12)  $\alpha$ -カロテン標準品は、和光純薬工業社製 035-17981 あるいは相当品を、 $\beta$ -カロテン標準品には、Merck Art 2236 (メルク社製) あるいは相当品を用いる。

13) (3)⑤の高速液体クロマトグラフ操作条件では  $\alpha$ -カロテンと  $\beta$ -カロテンの分離とともに、 $\beta$ -カロテンのシス体も分離する。シス体の  $\beta$ -カロテンはニンジンや藻類の抽出物中に多量に存在しているため、ここでは 9-シス体と 13-シス体のピーク面積値を all-トランス体の面積値に合わせて  $\beta$ -カロテン値とする。また、クロマトグラム再現性が悪いときは移動相にパルミチン酸アスコルビルを 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度で加えると改善される。

14) TSKgel ODS 120A (東ソー製) あるいは相当品を用いる。リコピンを多く含むものはアセトニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン (55 : 40 : 5 V/V) ( $\alpha$ -トコフェロールを 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  含む。) を使用した方がよい。

[参考文献]

- 1) 大森正忠、武藤泰敏：“ビタミンハンドブック、③ビタミン分析法”、日本ビタミン学会編、1、化学同人（1989）
- 2) 勝井五一郎：“ビタミン学実験法 [ I ]”、日本ビタミン学会編、14、東京化学同人（1983）
- 3) Quakenbush, F. W. : J. Liq. Chrom., 10, 643 (1987)
- 4) 月田 潔：ビタミン、58、185 (1984)
- 5) 氏家隆、飯田栄子、小高要、新藤寛美、上野順士：ビタミン、64、187 (1990)

### 31 ビタミンE (α-トコフェロールとして)

#### (1) 高速液体クロマトグラフ法

##### ① 機器、試薬

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 蛍光検出器付き
- ・カラム : 順相型
- ・標準ビタミンE (α、β、γ、δ-トコフェロール) : ビタミンE 定量用<sup>注1)</sup>
- ・ヘキサン-酢酸エチル混液 : ヘキサン-酢酸エチル (9 : 1 V/V)
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

##### ② 標準溶液の調製

###### 1) 標準原液

α、β、γ及びδ-トコフェロール 20mg をそれぞれ褐色メスフラスコに精密に量り、エタノールで溶解して正確に 50ml とする。冷蔵保存し、6ヵ月ごとに調製する。

###### 2) HPLC用標準溶液

一定量のα、β、γ及びδ-トコフェロール標準原液を褐色ナス形フラスコ又は褐色メスフラスコに正確に量り、溶媒を濃縮乾固又は窒素気流下で留去した後、ヘキサンに溶解する。メスフラスコを用いて正確に希釈し、HPLC用標準溶液とする。冷蔵保存し、1ヵ月ごとに調製する。

##### ③ 試験溶液の調製

###### 1) 一般食品の場合

試料約 0.5 g を 60ml 容の遠心管に精密に量りとり。これに 1%塩化ナトリウム溶液 0.5ml を加えてかくはん後、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°Cで 30 分間けん化する。速やかに冷却後、1%塩化ナトリウム溶液を 22.5ml 及びヘキサン-酢酸エチル混液 15ml を加え、栓をして 5 分間激しく振とうし、不けん化物を抽出する。2,000 回転/分で 5 分間遠

心分離し、上層をナス形フラスコに移す。下層はヘキサン—酢酸エチル混液 15ml で更に2回同様に抽出する。得られた上層を集め、減圧濃縮後、一定量のヘキサンに溶解し、試験溶液とする。

## 2) 油脂の場合

試料が油脂の場合は、1)のけん化操作を省きHPLCに直接注入することができる。この場合、油脂約1gを精密に量りとり、一定量のヘキサンに溶解し試験溶液とする。

## ④ 測定

試験溶液の一定量(5~50 $\mu$ l)をHPLCに注入し、試料中の $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及び $\delta$ -トコフェロールのピーク面積を測定する。同様にHPLC用標準溶液をHPLCに注入し、ピーク面積から $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及び $\delta$ -トコフェロールの検量線を作成する。

## ⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例

カラム：ステンレス製、内径4.6mm、長さ250mm<sup>注2)</sup>

移動相：酢酸—イソプロピルアルコール—ヘキサン(5:6:1000V/V)

検出器：励起波長(E<sub>x</sub>)298nm

蛍光波長(E<sub>m</sub>)325nm

流量：1.2ml/分

温度：40°C

## ⑥ 計算

$\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -トコフェロールの含量(mg/100g) =  $C \times V \times N \times 100 / W \times 10^{-3}$

C：検量線から求めた $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -トコフェロール濃度( $\mu$ g/ml)

V：定容量(ml)

N：希釈率

W：試料採取量(g)

## [注]

1) ビタミンE同族体セット(エーザイ製)又は同等品を用いる。 $\alpha$ -トコフェロールは国立衛生試験所標準品がある。

2) JASCO Finepak SIL 5(日本分光製)又は相当品を用いる。

その他のカラム充填剤と移動相の他の条件は文献1)、2)等を参照のこと。

## [文献]

1) 日本ビタミン学会編：ビタミンハンドブック③(ビタミン分析法)、p. 27(1989)、化学同人

2) 五十嵐脩編：ビタミンE—基礎と臨床—、p. 14(1985)、医歯薬出版