

食品中のアスコルビン酸とエリソルビン酸の 高速液体クロマトグラフ法による分離定量

川崎医療短期大学 栄養科

藤井 俊子 武政 睦子

(平成3年8月26日受理)

Application of High Performance Liquid Chromatography to the Separation of Ascorbic Acid from Isoascorbic Acid in Processed Foods

Toshiko FUJII and Mutsuko TAKEMASA

*Department of Nutrition, Kawasaki College of Allied Health Professions
Kurashiki, Okayama 701-01, Japan
(Received on Aug. 26, 1991)*

Key Words : 食品, アスコルビン酸, エリソルビン酸, 高速液体クロマトグラフ法,
ヒドラジン法薄層クロマトグラフ法

概 要

食品添加物の酸化防止剤として使用されているエリソルビン酸は、アスコルビン酸のC-5の立体異性体であり、両者の分離・定量はシリカ系のアミノカラムによる高速液体クロマトグラフ法によって行われている。本研究では、新開発のポリマー系アミノカラムにより、高速液体クロマトグラフ法を実施した。その結果、アスコルビン酸とエリソルビン酸の良好な分離ピークが得られ、また、検査線も直線性を示したので、数種の市販食品中のアスコルビン酸とエリソルビン酸の分離・定量を実施した。

現行の食品成分表では、ビタミンCはヒドラジン法で測定されており、測定値に影響を与える物質の検索にヒドラジン法薄層クロマトグラフ法が用いられているので、今回はアスコルビン酸およびエリソルビン酸のオサゾンについてヒドラジン法薄層クロマトグラフ法を実施したところ、この方法では両者の分離・定量は不可能であることが確認されたので、食品成分表におけるビタミンCの記載については、今後は高速液体クロマトグラフ法による測定値を用いることが望ましいことが示唆された。

1. 緒 言

エリソルビン酸 (Erythorbic acid, ErA と省略する。Isoascorbic acid, D-Araboascorbic acid ともいう。) やエリソルビン酸ナトリウム (Sodium Erythorbate, Na-ErA と省略する。) は、アスコルビン酸 (ビタミンC, L-Ascorbic acid, 以下, AsA と省略する。) に代わる安価な酸化防止剤として、種々の加工食品 (食肉製品, 魚介冷凍品, 魚介塩蔵品, 果菜製品, 清涼飲料水など) に使用されている食品添加物である。一方, AsA は天然の食品中にも含有され、

ビタミン強化剤として、また、ErA 等と同様に酸化防止剤として種々の加工食品に使用されている。

ErA のビタミンC効果 (抗壞血病効果) は、動物では AsA の1/20程度であると認められているが、ヒトでの生理作用等についてはいまだ不明の部分が多い。したがって、食品中のこれら酸化防止剤の濃度を把握することは、食品衛生上必要である。しかしながら、現行の食品成分表ではビタミンCの定量はヒドラジン法¹⁾によって測定されており、この測定法では AsA と ErA 等は分離定量されていない。

2. 薄層クロマトグラフ法¹²⁾

1) 試薬, 試料および試験溶液

試薬: HPLC に準じる。その他, インドフェノール液 (0.5% 2, 6-ジクロロフェノールナトリウム塩の水溶液), 10%チオ尿素50%エタノール溶液, ヒドラジン試薬 (2% 2, 4-ジニトロフェノールヒドラジンの25%硫酸溶液) を調製する。

試料および試験溶液は, HPLC に準じる。

2) 酸化およびオキサゾン生成

常法¹³⁾にしたがって, 酸化およびオキサゾンの生成を行う。

3) TLC 用試験溶液の調製

オキサゾン生成の各試験管に酢酸エチルを 2 ml ずつ加え, 激しく振盪したのち遠心分離して水層を除去する。酢酸エチル層に無水硫酸ナトリウム (芒硝) を加えて脱水を行う。さらに酢酸エチルを用いて芒硝が無色になるまで洗浄する。洗浄液を酢酸エチル層に加えて減圧濃縮する。これを酢酸エチルで 2 ml に定容し, TLC 用試験溶液とする。

4) TLC

市販のシリカゲル薄層 (メルク社製, Kieselgel 60F, 20×20) の下端から 2 cm の位置に試料を 100 μ l 塗布し, 展開溶媒は, トルエン:アセトン:水 = 2 : 1 : 1 の上清を用いて約 13cm 展開する。

5) 吸収曲線と検量線の作成

TLC 上の AsA または ErA に相当する赤色のスポット ($R_f=0.23$) の部分をかきとり, 85%硫酸 5 ml に溶解後遠心分離し, 上清の可視部吸収曲線を測定する。

検量線は, Na-ErA の 5%メタリン酸溶液 (10, 20, 50, 100, 200 μ g/ml) のオキサゾン生成後, 上記TLC を行い, ErA 分画を85%硫酸で溶解し, 溶液の520nm における吸光度 (O.D.) を測定して作成する。

6) 添加回収実験

HPLC による添加回収実験の場合と同じ方法で試料を調製してオキサゾンを作り, TLC 上の ErA 分画溶出液の520nm における吸光度を測定し, 検量線にしたがって定量, 添加回収率を求める。

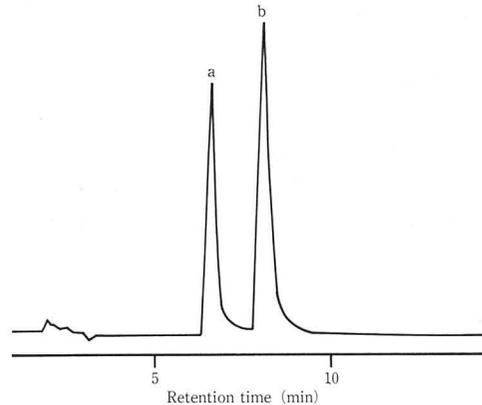


Fig. 2 High performance liquid chromatogram of the standard solution.

a : erythorbic acid, b : ascorbic acid

III. 結果ならびに考察

1) HPLC クロマトグラム

Fig. 2に, AsA および Na-ErA 標準溶液 (20 μ g/ml) の HPLC クロマトグラムを示す。本 HPLC では, AsA と ErA のクロマトグラムはよく分離しており, リテンションタイムは, ErA が6.7分, AsA が8.2分であった。ErA のピーク面積が AsA より小さいのは, ErA (分子量176) の代わりに Na-ErA (分子量216) を用いたためである。Bui-nguyen⁹⁾が, シリカ系アミノカラムを用いた AsA と ErA の分離法を報告して以来, AsA と ErA の分離定量等の報告⁶⁻¹¹⁾が見られるが, いずれもシリカ系アミノカラムによる分析であった。今回使用したカラムは, 硬質合成ポリマーにポリアミンを化学結合させたもので, 開発直後の製品であるため, さらに詳細な検討が今後必要である。なお, カラム温度を40℃にすることにより, よりシャープなピークが得られるという情報を得ているので¹⁴⁾, カラムオープンを設置して検討する予定である。

2) 検量線

Fig. 3に, AsA と Na-ErA 標準溶液のピーク面積による検量線を示す。AsA と ErA は, 標準溶液の濃度とピーク面積が良好な直線性を示していることから, 本 HPLC による定量が可能であると考えられる。

3) 市販食品中の AsA および Na-ErA の定量

試料100 g 中の含有量は、以下のとおりである。市販オレンジジュース（濃縮果汁）には AsA が 21mg, 炭酸飲料（商品名；オロナミンC）には AsA が176mg, 畜肉ソーセージには Na-ErA が 128mg, 魚肉ソーセージには AsA と Na-ErA がそれぞれ 8 mg含有されていた。

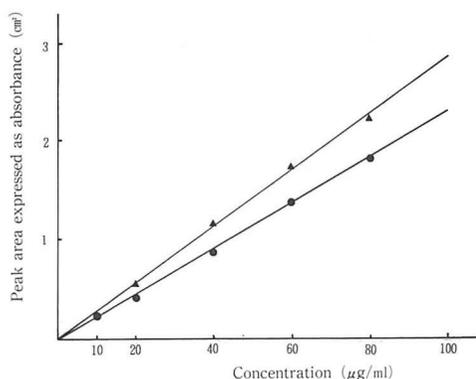


Fig. 3 Calibration curves of the standard solutions
▲ : ascorbic acid, ● : sodium erythorbate

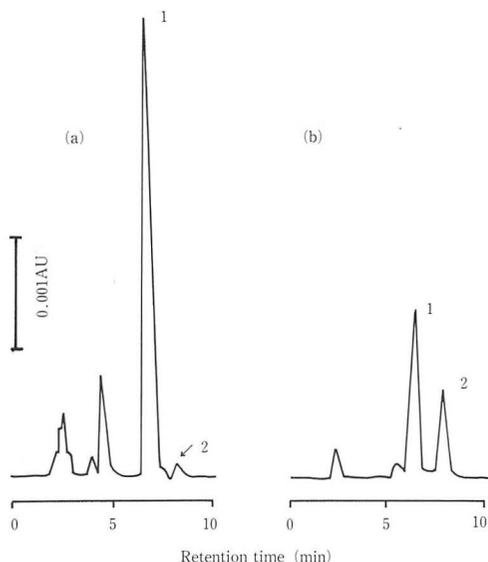


Fig. 4 High performance liquid chromatograms of meat sausage(a) and fish sausage(b) extract after C_{18} Sep-Pak cartridge treatment.
1 : erythorbic acid, 2 : ascorbic acid

Fig. 4 (a) に畜肉ソーセージのクロマトグラムを、(b) に魚肉ソーセージのクロマトグラムを示す。(a), (b) とともに AsA と ErA の2つのピークが認められるが、(a) ではピーク面積から見て AsA は天然由来のものであり、食品添加物としては Na-ErA が使用されていると考えられる。(b) では、AsA と Na-ErA の両方が酸化防止剤として添加されていると考えられる。

前述したように、現在、一般に使用されている食品分析表¹⁵⁾においては、加工食品のビタミンC欄はスター印(*)を付し、酸化防止剤使用の注意書を記載している。したがって、本分析結果に示されるようにオレンジジュース、清涼飲料水、ソーセージなどにも AsA が使用されている実情から見て、今後、食品成分表等におけるビタミンCの記載は、HPLC等の活用によってより明確にすることが可能であり、それが実現できることが望ましいと考える。

Table 1 Recovery of sodium erythorbate from samples with before/after C_{18} Sep-Pak cartridge treatment.

Sample	Concentration (mg/g)	Recovery (%)	
		before treatment	after treatment
Soft drink	0.5	81.73±2.51	75.90±1.34
	1.0	98.42±2.95	68.51±2.68
Sausage	0.5	102.12±4.11	100.38±1.22
	1.0	88.19±2.41	83.79±3.85

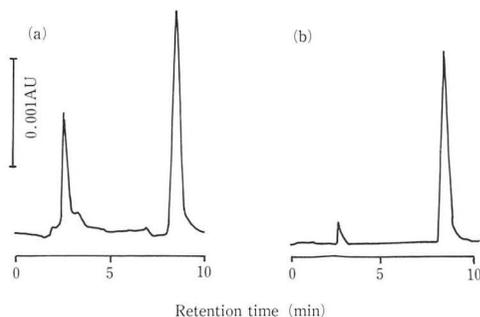


Fig. 5 High performance liquid chromatograms of orange juice extract before/after C_{18} Sep-Pak cartridge treatment.
(a) : before treatment, (b) : after treatment

4) 添加回収率および測定妨害物質についての検討

Table 1に、酸化防止剤の使用表示のない清涼飲料水(商品名;ミロ)と市販ソーセージ(商品名;日水シーフードソーセージ)の各10gにNa-ErAを5および10mg添加した場合の回収率を示す。

Na-ErAの回収率は、試料および添加量によるばらつきが見られ、また、カートリッジ使用により回収率の減少も見られたので、例数を増して検討する予定である。測定妨害物質除去のためのカートリッジの使用による効果は、Fig. 5に示すように妨害物質のピークが測定物質付近には、見られなかった。図示を省略したが、ソーセージの場合においても妨害物質のピークが測定物質付近には見られなかった。したがって、AsAとNa-ErAのHPLCの試験溶液の前処理には、カートリッジ使用の必要はないと考える。

5) TLCクロマトグラム

Fig. 6に、AsAとErA標準品オサゾンのTLC後のクロマトグラムを示す。ヒドラジン法では、AsAをすべて酸化型として赤色のオサゾンを作り、この呈色を比色定量するが、今回のTLCでは、AsAとErAのオサゾンは展開後(約40分後)に $R_f=0.23$ 付近に赤色のスポットとして現れた。また、前線に近いところにはAsAとErAのいずれにも黄色のスポットがあるが、これは

過剰のヒドラジンによるものである。これらのスポットの R_f にはAsAとErAでまったく差がないために、本方法では両者の分離定量は不可能である。しかしながら、空気中で数時間放置後のプレートには、AsAでは $R_f=0.51$ 、ErAでは $R_f=0.57$ の位置に紫色のスポットが現れ、 R_f に差があるのはこの紫色スポットであるので、AsAとErAの識別には利用出来ると考えられる。

前述のように、現行の食品成分表¹⁵⁾ではビタミンCの定量はヒドラジン法によって行われており、ビタミンCの定量に影響する化合物の存在の有無をヒドラジン法薄層クロマトグラフ法によりチェックしているが、本実験結果からみて、ヒドラジン法薄層クロマトグラフ法では、ErAが使用されている時のチェックには役に立たないことが確認出来た。

6) TLCオサゾン溶出液の可視部吸収曲線

ErAオサゾンのTLCの赤色スポットからの溶出液の可視部吸収曲線は、極大波長が510~520nmに、極小波長が425nmを示し、AsAオサゾンの吸収曲線と相似形を示した。

7) TLCによるNa-ErA添加回収率

TLCオサゾン溶出液による検量線は直線上に得られたが(図は省略)、添加回収率は、HPLCに比して低かった(清涼飲料水が約50%、ソーセージが80~90%)。したがって、本法での食品中のAsAとErA等の分離定量は不可能であろうと思われた。

文 献

- 1) Roe J., Mills M.B., Oestering J., Domrom C. M.: J. Biol. Chem., **174**, 201, (1948)
- 2) 水谷 清ほか: 栄養と食糧, **14**(3), 244~250, (1961)
- 3) 三木太平, 佐橋佳一: ビタミン, **25**, 171~177, (1962)
- 4) 三木太平, 佐橋佳一: ビタミン, **25**, 178~182, (1962)
- 5) Mai Huong Bui-Nguyen: J. Chromatogr., **196**, 161~163, (1980)
- 6) John Gelbert, Dabid S. Hirano and Saul L. Neiderman: *ibid*, **206**, 396~399, (1981)
- 7) Landis W. Doner and Kevin B. Hicks: Analytical Biochem., **115**, 225~230, (1981)
- 8) Nobuhiko Arakawa et al.: J. Nutr. Sci.

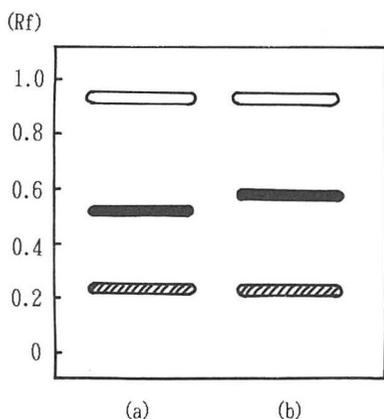


Fig. 6 TLC Chromatograms of the colored solutions containing ascorbic acid osazon(a) and erythorbic acid osazon(b).

○ : yellow ; ● : violet ; ▨ : red

- Vitaminol., 27, 1~7, (1981)
- 9) Megumi Otsuka et al.: J. Nutr. Sci. Vitaminol., 27, 9~15, (1981)
- 10) Andries J. Speek, Japp Schrijver and Wil H. P. Schreurs: J. Agric. Food Chem., 32, 352~355, (1984)
- 11) Joseph T. Vanderslice and Darla J. Higgs: J. of Chromatographic Science, 22, 485~489, (1984)
- 12) 藤田秋治, 広瀬福子, 内山由子: ビタミン, 40, 17~26, (1969)
- 13) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 367~368, 東京 (1990)
- 14) 島津製作所応用技術部京都分析センター・安居嘉秀: 私信 (1991)
- 15) 香川 綾監修: 科学技術庁資源調査会・編 (四訂日本食品標準成分表) による四訂日本食品標準成分表, 東京 (1991)