

油脂含有量の多い食品中のビタミンD分析法の検討

太田 信子 篠原 能子 星野 浩子* 高村 一知*

*聖徳栄養短期大学

Examination of Analysis Method of Vitamin D in Foods of High Contents Oils and Fats.

Nobuko OHTA, Yoshiko SHINOHARA, Hiroko HOSHINO*, Kazukori TAKAMURA*

* Seitoku junior college of nutrition

Abstract

1. 60% KOH 10 ml and KOH (pellet) 2 g was most suitable for the quantity of the potassium hydroxide which used it for alkali saponification.
2. The recovery test was 90.8~102.8%. The working curve was linearly in 10~70 µg.

Key words : vitamin D, alkali saponification,

緒言

ビタミンDの定量は、佐橋ら¹⁾が動物を用いた生理的検定法を行い、藤田ら²⁾は三塩化アンチモンを用いて化学的定量法の比色法を発表した。その後1984年、小林ら³⁾により高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）を用いてシイタケ中のエルゴカルシフェロール（ビタミンD₂、以下VD₂と略す）が定量され、ビタミンD定量法が確立された。ビタミンDの定量法は、いまだ困難な問題が多く残っている。

今回、油脂を多く含有または添加した食品中のビタミンDを分析する場合、常法の操作方法では、アルカリケン化が不十分の場合があり、そのために抽出操作において分離しにくいなどの問題が発生する。そこで著者らはビタミンD分析法の基礎的な研究として、アルカリケン化法の検討を行い、同時に添加回収実験について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

(1) 試料の調製：雪印社製の北海道無塩バター2 gを100mlビーカーに入れ、70℃の湯煎中で融解した後、エタノール10mlに溶解して試験溶液とした。この溶液にVD₂900 µgを添加して、20%の油脂含有

食品と同等と想定してアルカリケン化および添加回収実験を行なった。

(2) 試薬：試薬はすべて和光純薬工業社製の試薬特級を用いた。

VD₂標準溶液の調製：VD₂を10mg正確にはかり、エタノール10mlに溶解した。この溶液1 µlは1000ngに相当する。使用時にこの溶液を100倍希釈する（1 µlは10ngに相当）。

高速液体クロマトグラフィー用溶離液：分取用は、メタノール：アセトニトリル（1：1）、定量用は、ヘキサン：イソプロパノール：n-アミルアルコール（99.5：0.4：0.1）を用いた。

2. 装置

高速液体クロマトグラフ装置は、日本精密科学社製S-310A型を用いた。分取用HPLCカラムは逆相型カラム（ODS系）のLiChrosorb RP-18（φ 4.6×250 mm）を用い、また定量用HPLCカラムは順相型カラム（シリカゲル系）のNucleosil 100-5（φ 4.6×150 mm）を用いて分析を行った。記録計は島津クロマトパックC-R6A型を用いた。

3. アルカリケン化方法

試験溶液20mlをケン化用フラスコにはかり、1% NaCl 5mlを加えて、60%水酸化カリウム溶液（5mlと10ml）と水酸化カリウム（ペレット状）試薬（2mlと4g）の添加量を5ml+2g、5ml+4g、10ml+2g、10ml+4gの組み合わせで加え、つぎに10%ピロガロール・エタノール溶液10mlを加え軽く振

り混ぜ懸濁した。フラスコの口を密閉して、70℃の水浴中の加温時間を30分間と60分間の組み合わせで時々振り混ぜながらケン化した。

4. ビタミンDの定量方法

定量操作は、Fig. 1 に示す方法で行った。

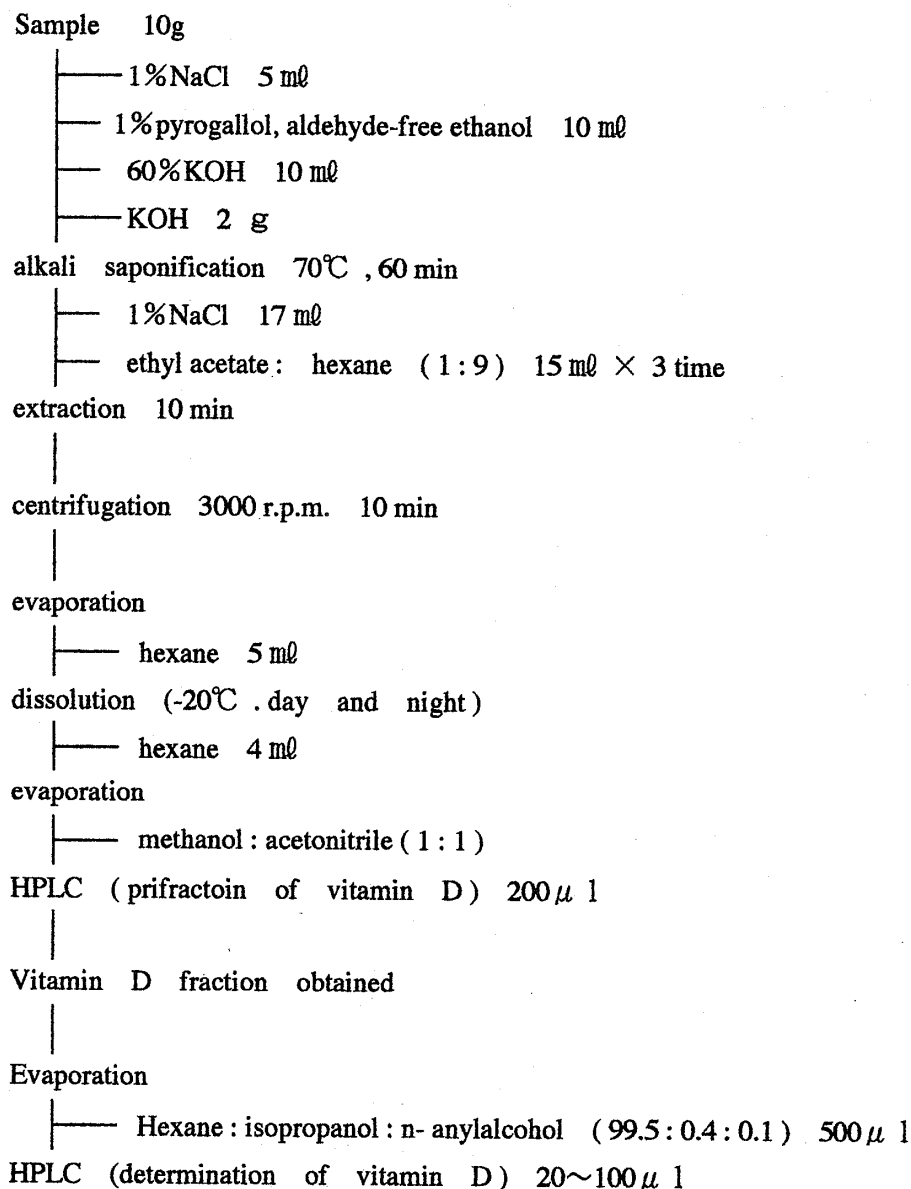


Fig.1 Method of determination of vitamin D

実験結果および考察

1. アルカリケン化方法の検討

(1) アルカリの添加量およびケン化時間

パン、クッキーおよび魚類の臓器など油脂を多く含有した食品中のビタミンDの分析にあたり、既存の分析方法⁴⁾のアルカリ量でケン化すると、ケン化

が不十分な現象が現れる。そこで、試料としてバター2gを融解しエタノール10mlを加えた20%油脂含有の試験溶液をつくり、ケン化のために必要なアルカリ量とケン化時間について実験を行なった。その結果をTable 1に示した。

Table 1 Effect of alkali volume and saponification time

		(μg/100g)							
volume of 60%KOH + KOH		5ml+2 g		5ml+4 g		10ml+2 g		10ml+4 g	
saponification time (min)		30	60	30	60	30	60	30	60
vitamin D values (μg)		350	620	372	667	390	870	385	798

既存の分析法におけるアルカリ量は、60%水酸化カリウム5mlと水酸化カリウム試薬2gで30分間のケン化を行なっている。約20%前後の油脂含有食品をケン化するためのアルカリ量としては、理論的には十分な量であると考えられるが、結果としてVD₂ 350μg/100gであった。ケン化時間を60分間と長くするとVD₂量は若干の増加傾向が見られた。そこでアルカリの添加量をTable 1の組み合わせで実験を行なった結果、60%水酸化カリウム10ml+水酸化カリウム試薬量2g、ケン化時間60分間がVD₂量870μg/100gと最高値を示した。

食品中に存在するビタミンDは、紫外線の光化学反応によりエルゴステロールからビタミンDとプレビタミンDが存在している⁵⁾。このプレビタミンDは加熱すると熱異性化反応によりビタミンDに変換する。ビタミンDとプレビタミンDは、ケン化のように加熱操作が加わる時、常にビタミンD⇌プレビタミンDの間に熱異性化反応が起こる。この熱異性化反応は温度のみに依存しており、一定温度で加熱する時、平衡状態に到達する。加熱温度70℃のケン化条件で

は、約2時間で平衡状態に到達する。

小林ら⁶⁾の報告によると熱異性化反応の平衡状態に到達するケン化時間は約2時間であるが、ケン化時間は2時間もとる必要はなく、約30分間で充分であると報告している。それはビタミンDよりプレビタミンDへの熱異性化反応は約20分間で急激な変化は終了し、後はゆっくりした変化となるので30分程度のケン化でも再現性のあるデータが得られる。

したがって、ビタミンDの定量方法には二通りの方法があり、その一つは試料を2時間の加熱ケン化後操作してビタミンDのピーク面積を測定し、これに熱異性化率(約1.25)を乗じてビタミンD量を算出する⁵⁾か、もう一つはビタミンD標準品について試料と同様に操作し、試料および標準品のHPLCにおけるビタミンDのピーク面積を比較して定量する方法である。著者らは後者の方法を選択した。

(2) 添加回収実験

試料の調製方法と同様に20%油脂含有の試験溶液(VD₂は無添加)をつくり添加回収実験を行った。その結果をTable 2に示した。

Table 2 Detenmination and recovery test of vitamin D in 20% oils and fats

Estimated value of vitamin D (μg/g)					
Added value		With addition of vitaminD (A)	Without addition of vitaminD (B)	(A)-(B)	Recovery(%)
1	25	42.7	20.0	22.7	90.8
2	25	43.3	18.7	24.6	98.4
3	25	49.0	24.1	24.9	99.6
4	25	47.5	21.8	25.7	102.8
5	25	43.6	19.3	24.3	97.2
Mean±SD					97.76±4.41

20%油脂含有の試験溶液にVD₂標準溶液25 μg を添加した後、Fig. 1の定量操作を行った。その時のアルカリ量は、60%水酸化カリウム溶液10mlと水酸化カリウム試薬量2g、ケン化時間60分間とした。この定量方法による添加回収率は97.76 \pm 4.41% (mean \pm SD) と良好な結果を得た。

そして、この実験方法によって作成したVD₂の検量線は、VD₂の濃度10ng \sim 70ngで原点を通る良好な直線性を示した。

要約

油脂を多く含有または添加した食品中のビタミンDを分析する場合、常法の操作方法では、アルカリケン化が不十分の場合があり、そのため抽出操作において分離にくいなどの問題が起こる。そこで、アルカリケン化法と添加回収実験について検討した。

1) 60%水酸化カリウム溶液10mlと水酸化カリウム試薬量2g、ケン化時間60分間が最も良い条件であった。

2) この定量方法による添加回収率は97.76 \pm 4.41% (mean \pm SD) と良好な結果であった。

3) VD₂の検量線は、VD₂の濃度10ng \sim 70ngで原点を通る良好な直線性を示した。

本研究の一部は、第53回日本栄養・食糧学会大会に発表した。

文献

- 1) 佐橋佳一他：ビタミン、2、52 (1949)
- 2) 藤田秋治他：ビタミン、40、129 (1969)
- 3) 小林正他：ビタミン、50、421 (1976)
- 4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2000版、金原出版P208
- 5) 高村一知、星野浩子：ニューフードインダストリー、37、8、33-39 (1995)
- 6) 科学技術庁資源調査会編：日本食品ビタミンD成分表、四訂日本食品標準成分表のフォローアップに関する調査報告V (1993)

Key words : vitamin D, alkali saponification,