

# 親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）による アスコルビン酸およびエリソルビン酸の同時定量法の検討

鶴田小百合・赤木浩一

福岡市保健環境研究所保健科学課

## Simultaneous Determination of Ascorbic and Erythorbic Acids by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)

Sayuri TSURUDA, Kouichi AKAKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

### Summary

A hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) method for the simultaneous determination of ascorbic acid (AsA) and erythorbic acid (ErA) was developed. The LC separation was performed on a ZIC-pHILIC (150×2.1mm, 5μm) PEEK column using mobile phase composed of acetonitrile-100mM ammonium acetate solution (72:28) that separated AsA, ErA and interference peaks. The temperature of autosampler was set at 4 °C to inhibit the degradation of AsA and ErA. The limits of detection were 50μg/g and correlation coefficients of the standard curves were more than 0.999 in the range of 2.5-50μg/mL. The method enabled good recoveries of AsA and ErA (94.7-100.6%) and detection from spicy cod roe and edible meat products, showing applicability for food samples. Moreover, the performance evaluation of our method applied to spicy cod roe sample satisfied the performance criteria (trueness (%) 70-120, repeatability (RSD%) <10, reproducibility (RSD%) <15) notified by the Ministry of Health, Labor and Welfare.

**Key Words** : アスコルビン酸 ascorbic acid, ビタミン C vitamin C, エリソルビン酸 erythorbic acid, 親水性相互作用クロマトグラフィー hydrophilic interaction liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

### 1 はじめに

食品の酸化防止を目的とする食品添加物にアスコルビン酸 (AsA) とエリソルビン酸 (ErA) がある。アスコルビン酸はいわゆるビタミン C であり、エリソルビン酸は、アスコルビン酸の構造異性体である。いずれも使用量の制限はないが、使用した場合には物質名と同時に用途名を記載する必要がある。

親水性化合物であるアスコルビン酸やエリソルビン酸を HPLC により測定する場合、従来の ODS カラムでは逆相充填剤への保持が弱いため困難である。衛生試験法注解ではアミノカラムを用いる方法<sup>1)</sup>が記載されている

が、従来のアミノカラムはシリカゲルにアミノプロピル基やポリアミンを化学結合させた充てん剤が用いられているため、化学的安定性に問題があり、保持力の低下や寿命が短いなどの欠点がある。これに対して、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) はアスコルビン酸等の親水性化合物の分離に有効である<sup>2)</sup>。HILIC カラムの中でも、両性イオン基を結合させた ZIC-HILIC は、固定相表面に強い水和相が生成され、弱い静電的相互作用も示すため、広範囲な極性・親水性化合物の分離に最適である。そこで、ZIC-HILIC カラムを用いた HPLC による食品中のアスコルビン酸とエリソルビン酸の同時定量法を検討し、本法の性能評価を行った。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

辛子明太子製品 (Spicy cod roe product) 6 検体, 食肉製品 (Edible meat product) 6 検体 (ベーコン, ソーセージ, 焼豚, ハム, ローストチキン, ウインナー)

### 2.2 試薬および材料

アスコルビン酸標準品: L (+) - アスコルビン酸 (和光純薬工業 (株) 製, 特級) を使用した。

エリソルビン酸標準品: D (-) - イソアスコルビン酸 (和光純薬工業 (株) 製, 特級) を使用した。

2% メタリルン酸溶液: メタリルン酸 (シグマアルドリッチ ジャパン (株) 製, 特級) 20g を蒸留水で溶解し 1,000mL に定容した。

アセトニトリル: HPLC 用を使用した。

100mM 酢酸アンモニウム: 酢酸アンモニウム (和光純薬工業製, 特級) 7.7g を蒸留水で溶解し 1,000mL に定容した。

スタンダード希釈溶液: アセトニトリルと 2% メタリルン酸を等量混合した。

限外ろ過フィルターユニット: アミコンウルトラ -15 (Millipore 社製, 分画分子量 3,000) を使用した。

### 2.3 標準溶液

アスコルビン酸標準原液 (1,000 $\mu$ g/mL): アスコルビン酸標準品 50mg を 50mL 容メスフラスコに採り, スタンダード希釈溶液で溶解し 50mL に定容した。

エリソルビン酸標準原液 (1,000 $\mu$ g/mL): エリソルビン酸標準品 50mg を 50mL 容メスフラスコに採り, スタンダード希釈溶液で溶解し 50mL に定容した。

混合標準溶液 (100 $\mu$ g/mL): アスコルビン酸標準原液およびエリソルビン酸標準原液をそれぞれ 5mL ずつ 50mL 容メスフラスコに採りスタンダード希釈溶液で 50mL に定容した。

### 2.4 装置

高速液体クロマトグラフ: Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを使用した。

### 2.5 測定条件

カラム: SeQuant ZIC-pHILIC PEEK Column

150 $\times$ 2.1mm, 5 $\mu$ m (MERCK SeQuant AB 社製)

移動相: A 液: アセトニトリル

B 液: 100mM 酢酸アンモニウム

A 液: B 液 = 72:28 (A 液と B 液を HPLC のポンプで混合)

流速: 0.1mL/min

波長: 260nm

注入量: 2 $\mu$ L

カラムオープン温度: 25

オートサンブラー温度: 4

### 2.6 試験溶液の調製

均質化した試料約 10g を 100mL 比色管に採取し, 2% メタリルン酸溶液を 60mL 加え, 氷水中で冷却しながら 30 分間超音波処理を行った。2% メタリルン酸溶液で 100mL に定容した後, ろ紙ろ過を行い, ろ液 6mL をアセトニトリルで 2 倍に希釈した。限外ろ過フィルターユニットに全量負荷した後, 遠心分離 (4,000 $\times$ g, 30min, 4 ) を行い, ろ液を試験溶液とした。

### 2.7 定量

混合標準溶液をスタンダード希釈溶液で希釈し 0, 2.5, 5, 10, 20, 50 $\mu$ g/mL の標準溶液を調製し, 試験溶液と共に HPLC で測定した。標準溶液および試験溶液のクロマトグラムからのピーク面積から, 絶対検量線法により試験溶液中のアスコルビン酸およびエリソルビン酸を定量した。

## 3 結果および考察

### 3.1 HPLC 条件の検討

移動相は高濃度の有機溶媒に高い溶解性を示す 100mM 酢酸アンモニウム溶液とアセトニトリルとの混合液とし, アセトニトリルの比率を検討した。アセトニトリル 72% 以上でアスコルビン酸とエリソルビン酸のピークが分離し, 80% 以上でピーク形状の悪化と感度の低下が観察された。そこで, アセトニトリルの比率が 72% から 80% の範囲で, アスコルビン酸とエリソルビン酸を 2,500 $\mu$ g 添加した検体を測定したところ, 辛子明太子に特有の妨害ピークとエリソルビン酸のピークがアセトニトリル 72% で分離した (Fig. 1)。そこで, 移動相にはアセトニトリル - 100mM 酢酸アンモニウム溶液 (72:28) を用いた。

### 3.2 検量線の検討

混合標準溶液をスタンダード希釈溶液で希釈し, 2.5 ~ 50 $\mu$ g/mL の範囲で標準溶液を調製し, 検量線を作成した。相関係数は 0.999 以上, 検出下限は 2.5 $\mu$ g/mL であった (Fig. 2)。

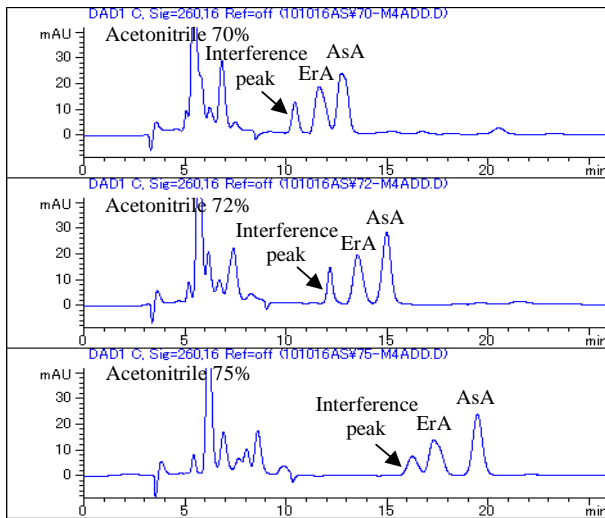


Fig. 1 Behavior of AsA, ErA and interference peaks

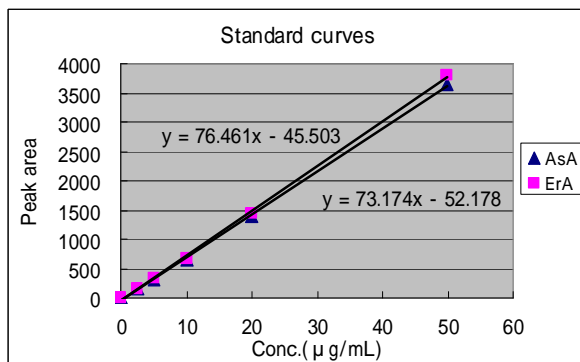


Fig. 2 Standard curves of AsA and ErA

### 3.3 温度による分解速度の変化

アスコルビン酸とエリソルビン酸は熱による分解や空気による酸化を受けやすく、抽出直後から経時的に濃度が減少する。温度依存的な濃度の変化を観察するために、オートサンプラーの温度を 4 または 25 に設定し、2.5ppm 標準溶液を 2 時間毎 48 時間連続して測定した。その結果、25 と比較して 4 の時にアスコルビン酸およびエリソルビン酸の分解が抑制された (Fig. 3)。このことから、オートサンプラーの温度を 4 に設定して測定を行った。

### 3.4 試料に含まれるアスコルビン酸およびエリソルビン酸の定量

本法を用いて、辛子明太子および食肉製品に含まれるアスコルビン酸およびエリソルビン酸の定量を行った結果を Table 1 に示す。すべての試料から表示どおりにアスコルビン酸とエリソルビン酸を検出した。アスコルビン酸の表示があった 7 検体からはアスコルビン酸が 0.13 ~ 1.2g/kg の範囲で検出され、エリソルビン酸の表示があった 1 検体からはエリソルビン酸が 1.2g/kg 検出された。

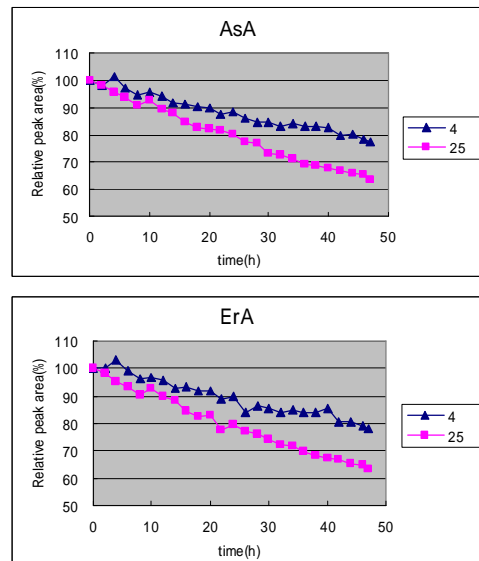


Fig. 3 Time-dependent changes in concentrations of AsA and ErA

Table 1 AsA and ErA contents in samples

Sample name	Food labeling	Content ( g/kg )		
		AsA	ErA	
Spicy cod roe products	AsA	1.2	( - )	
	AsA	1.0	( - )	
	AsA	0.78	( - )	
	AsA	0.13	( - )	
	-	( - )	( - )	
Bacon	AsA	0.40	( - )	
	Sausage	AsA	0.40	( - )
	Edible meat products	Roast pig	AsA	0.26
Ham		ErA	( - )	1.2
Roast chicken		-	( - )	( - )
Wiener	-	( - )	( - )	

### 3.5 添加回収試験

アスコルビン酸およびエリソルビン酸が検出されなかった辛子明太子および食肉製品 (ウインナー) を用いて、本法により添加回収試験 (2,500µg 添加) を行った結果を Table 2 に示す。添加回収率は 94.7 ~ 100.6% であり、良好な添加回収率が得られた。

Table 2 Recoveries of AsA and ErA from samples

Sample name	Recovery ( % )	
	AsA	ErA
Spicy cod roe products	100.6	96.2
Edible meat products ( wiener )	94.7	96.5

### 3.6 分析法の性能評価

辛子明太子約 10g にアスコルビン酸およびエリソルビン酸を 2,500 $\mu$ g 添加した試料を用いて、本法の性能評価を行った。実験計画および性能評価基準は、厚生労働省により通知された妥当性評価ガイドライン<sup>3)</sup>に準じた(2 併行 5 日間)。得られた添加回収率の値(Recovery(%))、添加回収率の平均(Mean recovery(%))、併行精度の相対標準偏差(Repeatability(RSD%))と室内精度の相対標準偏差(Reproducibility(RSD%))を Table 3 に示した。アスコルビン酸については添加回収率 99.9~108.1%、併行精度(RSD%) 1.5、室内精度(RSD%) 2.7 であり、エリソルビン酸については添加回収率 83.4~93.1%、併行精度(RSD%) 1.2、室内精度(RSD%) 4.2 であった。これらの結果より、辛子明太子において、ガイドラインに示された性能の目標値(真度(添加回収率) 70~120%、併行精度(RSD%) 10 未満、室内精度(RSD%) 15 未満)を満たした。

Table 3 Evaluation of performance characteristics of the method

Days	AsA		ErA		
	1	2	1	2	
Recovery (%)	1	105.7	104.4	88.1	88.7
	2	102.8	104.8	90.7	89.5
	3	100.2	101.1	92.2	93.1
	4	103.6	99.9	85.5	83.4
	5	106.1	108.1	85.3	83.4
Mean recovery (%)*	103.7		88.0		
Repeatability (RSD%)	1.5		1.2		
Reproducibility (RSD%)	2.7		4.2		

\*n=10

## 4 まとめ

HILIC によるアスコルビン酸とエリソルビン酸の同時定量法を検討した。移動相にはアセトニトリル-100mM 酢酸アンモニウム緩衝液(72:28)を用い、オートサンプラーの温度は 4 に設定した。本法では、定量下限は 50 $\mu$ g/g であり、検量線は 2.5~50 $\mu$ g/mL の範囲で良好な直線性を示した。辛子明太子と食肉製品を本法により検査したところ、すべての検体で表示のとおりアスコルビン酸とエリソルビン酸が検出され、添加回収試験では良好な回収率が得られた。辛子明太子を用いて本法の性能評価を行ったところ、厚生労働省より通知された妥当性評価ガイドラインに示された性能の目標値を満たした。

本法は定量性、感度および性能が十分であるので、食品中のアスコルビン酸とエリソルビン酸の測定に利用できると考える。

## 文献

- 1)日本薬学会編：衛生試験法・注解 2010, 247~248, 金原出版(東京), 2010
- 2)Tai, A., Gohda, E.: Determination of ascorbic acid and its related compounds in foods and beverages by hydrophilic interaction liquid chromatography., J. chromatogr. B, 853, 214~220, 2007
- 3)厚生労働省通知食安発 1224 第 1 号：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドラインの一部改正について、平成 22 年 12 月 24 日

## 要旨

親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)によるアスコルビン酸とエリソルビン酸の同時定量法を検討した。LC の分離は ZIC-pHILIC (150 $\times$ 2.1mm, 5 $\mu$ m) PEEK カラムを用いて、アスコルビン酸、エリソルビン酸および試料由来の妨害ピークが分離したアセトニトリル-100mM 酢酸アンモニウム緩衝液(72:28)の移動相により行われた。また、オートサンプラーの温度はアスコルビン酸とエリソルビン酸の分解を抑制するため、4 に設定した。定量下限は 50 $\mu$ g/g であり、検量線の相関係数は 2.5~50 $\mu$ g/mL の範囲で 0.999 以上であった。本法は辛子明太子製品と食肉製品からアスコルビン酸とエリソルビン酸を検出可能であり、添加回収率も良好であったことから(94.7~100.6%)、食品試料にも適用できることが示された。また、辛子明太子を用いて本法の性能評価を行ったところ、厚生労働省より通知された妥当性評価ガイドラインに示された性能の目標値(真度(%) 70~120%、併行精度(RSD%) 10 未満、室内精度(RSD%) 15 未満)を満たした。