

ビタミンK	32(1)②	ジエチルエーテル	ジエチルエーテル注9)	代替溶媒としてヘキサン-酢酸エチル混液(9:1 V/V)も使用可能であることを追記した。
ビタミンK	32(1)②	記載なし	高速液体クロマトグラフによる測定妨害となる成分を含む場合は必要に応じ、以下の精製を行う。	必ずしもカラムクロマトグラフィーによる精製が必要ではないため、必要に応じて行うと変更した。
ビタミンK	32(1)②	シリカゲルカラム	シリカゲルカラム注10)	試料採取量を小さくした場合や試料の種類によっては充填剤の量が少なくて済むため、デイスポ-ザブルミニカラムの使用
ビタミンK	32(1)②	ヘキサン-ジエチルエーテル(97:3 V/V) 200ml注11)	ヘキサン-ジエチルエーテル(97:3 V/V) 200ml注11)	溶出液量は必ずしも一定でなくシリカゲルの活性度により変化する旨を記載。
ビタミンK	32(1)②	エタノール2ml~5mlを正確に加えて	ビタミンK1またはビタミンK2の濃度が検量線の範囲内となるようにエタノールを正確に加えて	試料のビタミンK含量により、検量線の範囲内となる定容量が変わってくるため表現を変更。
ビタミンK	32(1)③	~となるように希釈する。	~となるように希釈する注12)。	予め妥当性が確認できれば、検量線の範囲及び濃度を限定せず、変更できる旨を注12)に追記。
ビタミンK	32(1)④	試験溶液20 μ lを	一定量の試験溶液(例20 μ l)を	注入量は限定せず、HPLC条件の汎用性を高めるため。ただし、標準溶液と試料溶液の注入量は合わせる旨を追記。
ビタミンK	32(1)④	ビタミンK(2箇所)	ビタミンK1及びビタミンK2	ビタミンK1, ビタミンK2それぞれ個別に定量することを明確にした。
ビタミンK	32(1)④	~のピーク面積を	~のピーク高さまたは面積を	ピーク面積に限定せず、HPLC条件の汎用性を高めるため。
ビタミンK	32(1)⑤	ステンレス管注6)	ステンレス管注13)	注の追加による増番。
ビタミンK	32(1)⑤	励起波長(Ex) 320nm	励起波長(Ex) 320nm注14)	励起波長を240nmに変更することで測定妨害物質の影響が少なくなることがあることを注14)に追記。参考文献を追加した
ビタミンK	32(1)⑥	ビタミンK(2箇所)	ビタミンK1及びビタミンK2	ビタミンK1, ビタミンK2それぞれ個別に定量することを明確にした。

ビタミンK	32(1)⑥	ビタミンK含量($\mu\text{g}/100\text{g}$)= $C \times V \times 100/W$	(ここへの入力省略, 本文参照)	分数の表記がわかりずらいため変更。また試験溶液の濃度の単位をng/mlとしたため、計算式に 10^{-3} を乗じた	
ビタミンK	32(1)⑥	C:検量線から求めた試験溶液中のビタミンKの濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C:検量線から求めた試験溶液中のビタミンK1またはビタミンK2の濃度 (ng/ml)	ビタミンK1, ビタミンK2それぞれ個別に定量することを明確にした。また濃度の単位を標準溶液の濃度 (ng/ml) に合わせた。	
ビタミンK	注1	医理科機器製, 東亜電波工業製	リックス製	製造者変更のため	
ビタミンK	注2	ビタミンK1	ビタミンK1(フィロキノン)	以下のビタミンK2の表記に合わせた。	
ビタミンK	注2	ビタミンK2	ビタミンK2(メナキノン-4)	ビタミンK2は複数種類があるので, その内のメナキノン-4であることを明示した。	
ビタミンK	注2	E1%, 1cm=429を用いて検定する。	E1%, 1cm=429を用いて濃度を算出する。	検定という言葉があいまいなため, 濃度を算出と変更。	
ビタミンK	文献	-	4)を追加	励起波長を240nmに変更することで測定妨害物質の影響が少なくなるといふ参考文献を追加した。	

飽和脂肪酸, コレステロール

項目名	項番	訂正前	訂正後	理由	備考
飽和脂肪酸	3 (1) 1) ①適用	<p>注1 糖質のグリコシド結合は酸には弱いながらアルカリにはかなり安定である。アルカリによる分解は、還元末端から糖残基が1つずつ離れていくかたちをとり、時間がかかるとともに不完全になるため、けん化法は穀類など多糖類を多く含む食品には適さない。</p> <p>また、酪酸等の低級脂肪酸は、分析操作におけるその挙動が他の脂肪酸(高級脂肪酸)と異なる(例えば、水に可溶であること、揮発性が高いこと)。したがって本法は、後述の抽出IIの方法を含め低級脂肪酸を多く含む食品には適さない。」を削除。</p>	<p>「また、酪酸等の低級脂肪酸は、分析操作におけるその挙動が他の脂肪酸(高級脂肪酸)と異なる(例えば、水に可溶であること、揮発性が高いこと)。したがって本法は、後述の抽出IIの方法を含め低級脂肪酸を多く含む食品には適さない。」を削除。</p>	<p>3 (1) 3) に低級脂肪酸を含む食品に適用する方法を追加したため。</p>	
飽和脂肪酸	3 (1) 1) ②機器試薬	<p>ヘプタデカン酸: 純度99%以上のもの</p>	<p>ヘプタデカン酸: 純度98%以上のもの</p>	<p>現在市販されているヘプタデカン酸は「純度98%以上」と表示されたものが多く、かつ内標準として真度、精度に影響を与えないため。</p>	
飽和脂肪酸	3 (1) 1) ③操作	なし	<p>注2 不けん化物が多い場合は不けん化物除去を行うことで、クロマトグラム上の妨害ピークを除去できることがある。</p>	<p>不けん化物が多いとクロマトグラム上に妨害ピークが現れることがあるため。</p>	
飽和脂肪酸	3 (1) 1) ③操作	なし	<p>注3 ジエチルエーテル100mlで1回抽出することで抽出が完了する場合があります。</p>	<p>試料によっては簡便化ができる場合があるため。</p>	
飽和脂肪酸	3 (1) 2) ②機器試薬	<p>ヘプタデカン酸: 純度99%以上のもの</p>	<p>ヘプタデカン酸: 純度98%以上のもの</p>	<p>現在市販されているヘプタデカン酸は「純度98%以上」と表示されたものが多く、かつ内標準として真度、精度に影響を与えないため。</p>	

飽和脂肪酸	3 (1) 2) ③操作	注1 塩酸溶液による分解では、温度が高くなると多価不飽和脂肪酸の分解が促進されるので、正しく温度を調節する。	注1 この方法で不飽和脂肪酸の測定も可能な場合があるが、塩酸溶液による分解では、温度が高くなると多価不飽和脂肪酸の分解が促進されるので、正しく温度を調節する。 また塩酸濃度が高すぎることでも多価不飽和脂肪酸が分解されることが懸念される場合は塩酸濃度を下げること適用が可能な場合がある。	多価不飽和脂肪酸も同時に分析する場合の注意事項に塩酸濃度に関する注意を追記。
飽和脂肪酸	3 (1) 3) 脂質の抽出Ⅲ	なし	クロホルム-メタノール法による脂質の抽出法を追加	乳類, 乳製品など低級脂肪酸を含む食品に適用するため。
飽和脂肪酸	3 (1) 4) 脂肪酸メチルエステルの調製	なし	注1 妥当性を確認していれば、本法以外のメチル化法を用いることができる。	他のメチルエステル化法も存在するため。
飽和脂肪酸	3 (1) 4) ②操作	なし	注2 脂質が多い場合にヘキサノン量を3mlに増やし、3分間激しく振とうすることで分配効率を向上できる場合がある。	脂質が多いとメチルエステルの抽出が十分になる場合があるため。
飽和脂肪酸	3 (1) 4) ②操作	注1	注3 番号変更及び、ディスプレイザブルカラムの使用例を追記	注番号の整合及び、市販のディスプレイザブルカラムでも実施可能なため。
飽和脂肪酸	3 (1) 4) ②操作	なし	注4 プロピルエステル化の方法を追記	乳類, 乳製品など低級脂肪酸を含む食品に適用するため。
飽和脂肪酸	3 (1) 5)	(表題)ガスクロマトグラフィー	ガスクロマトグラフィー(脂肪酸メチルエステル分析用)	プロピルエステル分析用条件と区別するため。

飽和脂肪酸	3 (1) 5) ③	(表題)ガスクロマトグラフ操作条件 (カラム種類の記載なし)	ガスクロマトグラフ操作条件例	一例であることを明確にするため。
飽和脂肪酸	3 (1) 5) ③	温度: 注1 入口及び検出器 250°C カラム 60°C (1min保持) → 6°C/min → 160°C → 1.8°C/min → 200°C 流量: 2.0ml/min ガス流量: メイクアップガス: 50ml/min	カラム: フェーズドシリカキャピラリー ーにシアノプロピル系またはポリエチレングリコールなどの液相を結合させたもの。(以下に, J&W DB-23 0.25mm x 30m, df. 0.25 μmを用いた時の操作例を示す。)	カラムの例がなかったため追記。また注に記載のあったカラム(CPS-1)は製造中止のため、カラムを変更し、文書体裁も修正。
飽和脂肪酸	3 (1) 5) ③	注1 Qudrex社CPS-1 0.32mm x 15m, 膜厚0.25 μmを用い スプリットレス注入法での操作例で ある。スプリット注入法でも分析は可 能である。以下に長さ25~30m, 内 径0.20~0.35mmのキャピラリーカ ラムを用いたときの操作例を示す。...	温度: 注1 入口及び検出器 250°C カラム 50°C (1min保持) → 10°C /min → 170°C (1min保持) → 1.2°C /min → 210°C ガス流量: キャリアガス: 1.5ml/min	例示のカラム変更に伴う修正及び、適切な表現に修正。
飽和脂肪酸	3 (1) 5) ③	注1 Qudrex社CPS-1 0.32mm x 15m, 膜厚0.25 μmを用い スプリットレス注入法での操作例で ある。スプリット注入法でも分析は可 能である。以下に長さ25~30m, 内 径0.20~0.35mmのキャピラリーカ ラムを用いたときの操作例を示す。...	「Qudrex社CPS-1 0.32mm x 15m, 膜厚0.25 μmを用 いスプリットレス注入法での操作 例である。」を削除。	例のカラム(CPS-1)は製造中止のため、一 般的事例の表現に変更。
飽和脂肪酸	3 (1) 6)	なし	プロピルエステル分析用のガスク ロマトグラフ操作追記	乳類, 乳製品など低級脂肪酸を含む食品に 適用するため。
コレステロール	4 (1) ①装置, 試薬	キャピラリーカラム: 長さ15m, 内径 0.53mm, フェーズドシリカキャピラ ーに5%ジフェニール-95%ジメチル シロキサンを結合させた もの。膜厚1.0~1.5 μm	キャピラリーカラム: 長さ15~ 30m, 内径0.25~0.53mm, 膜厚 0.25~1.5 μmでフェーズドシリカ キャピラリーに5%ジフェニール -95%ジメチルシロキサンのポリ マーを結合させたもの, または 100%ジメチルシロキサンのポリ マーを結合させたもの。	使用できるカラムに幅を持たせた。
コレステロール	4 (1) ②試験溶液 の調製	なし	注2 いも及びびでんぷん類などが 使用されている試料に関しては, けん化する前に酸分解を行うと抽 出率が向上することがある。	いも及びびでんぷん類などが使用されている 試料に関しては, けん化が不十分になる場 合があるため。

コレステロール	4 (1) ②試験溶液 の調製	なし	注3 脂質含量が高い場合にコレステロールの回収率を向上させるために、分配溶媒としてジエチルエーテルを用いる場合がある。	脂質含量が高い場合に抽出効率が低下する場合があるため。	
コレステロール	4 (1) ②試験溶液 の調製	注2	注4に番号変更及び、ディスプレイザブルカラムの使用例を追記	注番号の整合及び、市販のディスプレイザブルカラムでも実施可能なため。	
コレステロール	4 (1) ③標準溶液 の調製	注3	注5	注番号の整合。	
コレステロール	4 (1) ④	(表題)ガスクロマトグラフ操作条件	ガスクロマトグラフ操作条件例	一例であることを明確にするため。	
コレステロール	4 (1) ④	なし	カラム: J&W DB-5 0.53mm x 15m, df. 1.5 μm	カラムの例がなかったため。	
コレステロール	4 (1) ④	8~9分に流出するように	8~9分に溶出するように	語句修正。	
コレステロール	4 (1) ④	なし	注6 スプリット注入例を追記。	本文中のガスクロマトグラフ操作条件では、コレステロールに妨害ピークが重なることがある。その際に異なる分析条件で分析をするとよい場合があるため。	
コレステロール		注4	注7	注番号の整合。	

糖類

項目名	項番	訂正前	訂正後	理由	備考
糖類	7, (1), 1), ①機器, 試薬	なし	水酸化ナトリウム溶液 ^{注3)} 追記 pH調整用として約1mol/L~3mol/Lの濃度のものを適宜調製して用いる。	pH調整用アルカリ・酸溶液について規定するとともにその内容を注記を加えた。	
糖類	7, (1), 1), ①機器, 試薬	なし	塩酸溶液 ^{注3)} 追記 pH調整用として約1mol/L~3mol/Lの濃度のものを適宜調製して用いる	pH調整用アルカリ・酸溶液について規定するとともにその内容を注記を加えた。	
糖類	7, (1), 1), ③, 1) 基本操作	適当量(0.5~5g) 注追記	注4) 試料が均質であり、予め妥当性を確認出来れば、試料中の目的成分の濃度によって採取量は適宜変更することが出来る。	試料中の含有量により、試料採取量を適切に変更して、対応できることとした。	
糖類	7, (1), 1), ③, 1) 基本操作	なし	水酸化ナトリウム溶液及び/又は塩酸溶液	pH調整用アルカリ・酸溶液により、pHを調整することとした。	
糖類	7, (1), 1), ③, 1) 基本操作	注3)~4)	注5)~6)	項番号の整理	
糖類	7, (1), 1), ③, 1) 基本操作	なし	必要に応じて	試料が液体等で抽出(超音波処理)が不要な場合があるため、追記した。	
糖類	7, (1), 1), ③, 1) 基本操作	試験溶液は目的成分の濃度によって適宜希釈又は濃縮して試験用液とする 注追記	注7) 試験溶液に着色・濁りなどが認められる場合、予め妥当性を確認した後、固相抽出用或いは限外ろ過膜用のフィルタールを通すことで測定を妨害する成分を除去できること	試験マトリックスの影響が出る場合があるため、追加精製処理を追記した。	
糖類	7, (1), 1), ③, 2) たんぱく質又は多糖類を多く含む食品の場合	なし	ただし定容には50%(V/V)エタノールを用いる。	これまで記載が漏れていたため、抽出溶液と同様の組成の溶液で定容することを追記した。	
糖類	7, (1), ③試験溶液の調製 ~⑦ガスクロマトグラフの調製	注5)~7)	注8)~10)	項番号の整理	
糖類	7, (1), 1), ③, 5) ガム類の場合	なし	5)ガム類の場合	ガム類の場合、その操作を追記	
糖類	7, (1), 1), ⑤トリメチルシリル化	④) トリメチルシリル化 注6)	⑤) トリメチルシリル化 注9)	記載漏れ追記訂正	
糖類	7, (1), 1), ⑤トリメチルシリル化			項番号の整理	

糖類	7, (1), 1, ⑦ ガスクロマトグラフ操作 条件例 ^{注10)}	注7)	注10)	項番号の整理
糖類	7, (2), 1) ① 機器, 試薬	標準品: (1), ①と同様	標準品: (1), 1), ①と同様 3) pH調整用として約1mol/L~ 3mol/Lの濃度のものを適宜調整し て用いる。	1)追加。番号整理 pH調整用アルカリ・酸溶液について規定する とともにその内容を注記を加えた。
糖類	7, (1), [注]	なし	4)試料が均質であり, 予め妥当性 を確認出来れば, 試料中の目的成 分の濃度によって採取量は適宜変 更することが出来る。	試料中の含有量により, 試料採取量を適切に 変更して, 対応できることとした。
		3)~4)	5)~6)	項番号の整理
		なし	7)試験溶液に着色・濁りなどが認め られる場合, 予め妥当性を確認した 後, 固相抽出用或いは限外ろ過膜 用のフィルターを通すことで測定を 妨害する成分を除去できることがあ る。	試料マトリックスの影響が出る場合があるた め, 追加精製処理を追記した。
糖類	7, (2), 1), ① 機器, 試薬	標準品: (1), ①と同様 水酸化ナトリウム	8)~10)	項番号の整理 番号修正
糖類	7, (2), 1), ② 試料の調製	(1), ②と同様に	水酸化ナトリウム溶液 ³⁾ , 塩酸溶液	酸アルカリ追加, 注3)追加 1)追加。番号整理
糖類	7, (2), 1), ③ 試験溶液の調製	(1), ③と同様に	(1), 1), ②と同様に	1)追加。番号整理
糖類	7, (2), 1), ④ 標準溶液の調製 ^{注4)}	注3)	注4)	項番号の整理
糖類	7, (2), 1), ④, 2) HPLC用試験溶液の溶 媒が50% (V/V)エタノ ールの場合	注4)	注5)	項番号の整理
糖類	7, (2), 1), ⑤ 測定	20μlを(2ヶ所)	一定量	注入量に自由度を持たせ, 適切な注入量を採 用できるようにした。
		注5)	注6)	項番号の整理
糖類	7, (2), 1), ⑥, 1)	注6)~7)	注7)~8)	項番号の整理

糖類	単糖類及び二糖類 7, (2), 1), ⑥, 2)	なし 注6)~7)	注入量:20 μ l 注7)~8)	条件例として注入量を記載した。 項番号の整理
糖類	オリゴ糖類 7, (2), 1), [注]	なし	注入量:20 μ l 3)pH調整用として約1mol/L~ 3mol/Lの濃度のものを適宜調整し 4)溶媒の種類はピーク高さに影響 するので、HPLC用試験溶液と標準 溶液の溶媒を統一する必要がある 。試験溶液にエタノール等揮発成分 を含む場合、その一定量を減圧乾 固した後、残留物を一定量の水に 溶解し、メンブランフィルター(0.45 μ m)でろ過した液をHPLC用試験溶液 とすることにより、水で調整した標準 溶液を使用することも可能である。 注5)~8)	条件例として注入量を記載した。 pH調整用アルカリ・酸溶液について規定する とともにその内容を注記を加えた。 項番号の整理及び試料マトリックスの影響抑 えるための追加精製処理を追記した。「試験溶 液にエタノール等…」を追記。
糖類	7, (2), 2), ① 機器, 試薬	注4)~7) 水酸化ナトリウム	削除	項番号の整理 後述のため削除した。
糖類	7, (2), 2), ② 試料の調製	なし	水酸化ナトリウム溶液 ⁴⁾ , 塩酸溶液 (1), 1), ②と同様に処理する。	酸アルカリ追加, 注4)追加 表現変更
糖類	7, (2), 2), ③, 1) 基本操作	注4)	注5)	項番号の整理
糖類	7, (2), 2), ③, 2) たんぱく質又は多糖類 を多く含む食品の場合	注5)	注6)	項番号の整理
糖類	7, (2), 2), ③, 3) 塩類を多く含む食品の 場合	注6)	注7)	項番号の整理
糖類	7, (2), 2), ④ 標準溶液の調製 ^{注8)}	注7)	注8)	項番号の整理
糖類	7, (2), 2), ④, 2) HPLC用試験溶液の 溶媒が50% (V/V)エタ ノールの場合	注8)	注9)	項番号の整理

糖類	7, (2), 2), ⑤	注9)	注10)	項番号の整理
糖類	7, (2), 2), ⑥, 1): アミノ(プロピル)基を 結合させたシリカ(又は ポリマ)ゲルを充てんし たカラム ^{注11)} , 内径 4.6mm, 長さ250mm, ス 7, (2), 2), ⑥, 2) カラム:スルホン化ポリ スチレンゲル(鉛型又 はカルシウム型)を充 てんしたカラム ^{注13)} , 内 径7.8~8.0mm, 長さ 300mm, ステンレス管	注10)~11)	注11)~12)	項番号の整理
糖類	7, (2), 2), [注]	なし	4) pH調整用として約1mol/L~ 3mol/Lの濃度のものを適宜調製し ^{注5)~7)} 響するので、HPLC用試験溶液と標 準溶液の溶媒を統一する必要があ る。試験溶液にエタノール等の揮発 成分を含む場合、その一定量を減 圧乾固した後、残留物を一定量の 水に溶解し、メンブランフィルター (0.45μm)でろ過した液をHPLC用 試験溶液とすることにより、水で調 製した標準溶液を使用することも可 能である。	pH調整用アルカリ・酸溶液について規定する とともにその内容を注記を加えた。 項番号の整理 項番号の整理及び試料マトリックスの影響抑 えるための追加精製処理を追記した。「試験溶 液にエタノール等…」を追記。
糖類		注4)~6)	注9)~13)	項番号の整理

熱量(有機酸)

項目名	項番	訂正前	訂正後	理由	備考
有機酸	34. (4), 1) ①機器, 試薬	液外分光光度計付 き	紫外分光光度計付き	誤記訂正	
有機酸	34. (4), 1) ②試験溶液 の調製	なし	必要に応じて検量線の範囲内に入るように水で 希釈したものを試験溶液とする。	目的成分の濃度により検量線を外れるものがあるため追記した。	
有機酸	34. (4), 1) ②試験溶液 の調製	試料5g 注追記	注3) 試料が均質であり, 予め妥当性を確認でき れば, 試料中の目的成分の濃度によって採取量 は適宜変更することが出来る。	試料中の含有量により試料採取量を適切に変更して, 対応できることとした。	
有機酸	34. (4), 1) ⑤高速液体ク ロマトグラフ 操作条件例	注3)	注4)	項番号の整理	
有機酸	34. (4), 1) ⑤高速液体ク ロマトグラフ 操作条件例	なし	注4) 追記 その他のカラム例として, TSKgel Oapak, φ 7.8 mm x 300 mm [東ソー株式会社]などが挙げられ る。	他のカラムを例として加えた。	

有機酸	34. (4), 1) ⑤ 高速液体クロマトグラフ 操作条件例	測定波長: 220nm 注追記	注5) 有機酸以外にも220nmに吸収を持つ成分が食品中には多く存在するため、他の成分を計りこみやすい。この場合、可視部の吸収を測定することで有機酸に対する選択性を高めたポストアム呈色・高速液体クロマトグラフ法(以下参照)を用いることも出来る。 ⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例 カラム: 内径8.0 mm, 長さ500 mm, ステンレス製 移動相: 3 mmol/L 過塩素酸 反応液: 0.2 mmol/L ブロムチモールブルー含有 15 mmol/L リン酸水素二ナトリウム溶液 流量: 移動相 1.0 mL/分, 反応液 1.4 mL/分 測定波長: 445 nm 温度: 40°C	可視部の吸収を測定することで有機酸に対する 選択性を高めるため。	
有機酸	注4)	Ionpak	RSpak	商品名変更への対応	

新規追加事項

項目名	項番	理由	備考
比重	要検討	ジュース等の液体中の量を測定する際に試験法が必要となる。	
カフェイン	要検討	窒素含有物質であり、コーヒーなどの場合、分別定量しないとたんぱく質、炭水化物及び熱量に誤差を与えることから、試験法が必要となる。	
テオブロミン	要検討	窒素含有物質であり、ココアなどの場合、分別定量しないとたんぱく質、炭水化物及び熱量に誤差を与えることから試験法が必要となる。	
タンニン	要検討	お茶などで含有量が高く、分別定量しないと炭水化物、熱量に誤差を与えることから、試験法が必要となる。	
アミノ酸	要検討	プロテインスコアやアミノ酸スコアなどの栄養学的観点からアミノ酸の分析法は栄養表示基準として必要と判断された。	
塩素	要検討		
ガムの抽出方法	要検討	ガムの場合、ガムベースは可食部位ではなく、抽出操作を行う必要があるため、補追が必要と判断された。	
妥当性の確認方法	要検討	加工食品のマトリックスは多岐にわたることから、抽出や精製などに影響を与える場合がある。また、試料マトリックスによっては操作を省略することで簡便迅速化を図れる場合もある。特定の事例が明らかでない場合には規定の手順を変更、追加或いは省略を行うことを本文中に記載したが、そのような場合には予めその妥当性の根拠を示す手順を明確とすることとした。具体的には標準品を用いた添加回収試験、繰り返し精度の確認などが考えられるので、その参考とするため、国際的な公定法であるAOAC法やIUPAC法に記載されたバリデーション手順を文献として示した。	

成 20 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心安全確保推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

主任研究者 山田和彦 (独)国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム

分担研究者の報告書

食品中の茶カテキン類の分析法に関する検討

分担研究者 梅垣敬三 (独)国立健康・栄養研究所 情報センター

協力研究者 佐々木菜穂 (独)国立健康・栄養研究所 情報センター

研究要旨

保健作用に関与する成分(関与成分)が特定保健用食品中に表示通りに含まれているかどうかは、その製品の有効性・安全性を評価する上で極めて重要である。製品中に含まれる関与成分の分析値は分析方法に大きく左右されるが、関与成分が天然物由来である場合、その分析方法は現時点では確立されているとは言えない。多くの飲料形態の特定保健用食品に添加されている茶カテキンもその一つである。茶カテキンは複数の成分から構成されていることから、その個別成分を正確に分析することは容易ではない。これまで茶カテキンは、UV 検出-HPLC 法で分析されているが、UV 検出法は特異性が低いために複数の成分が共存する製品では夾雑物の影響を受けやすく、測定値が高くなる可能性がある。そのため特異性の高い検出法による分析が望まれる。本研究では、茶カテキンに特異的な検出法として EC 検出-HPLC 法の採用を試み、その方法を従来の2つの UV 検出-HPLC 法と比較した。また、茶カテキンが油脂や乳製品に添加されたときの分析に関する基礎的な検討を行った。その結果、EC 検出-HPLC 法は UV 検出-HPLC 法よりも特異的かつ高感度に茶カテキンの個別成分を分析することができ、固相抽出を組み合わせることで油脂や乳製品の分析にも適用できる簡便な方法であることが明らかになった。

A. 目的

茶カテキン類はフラバン₃-オール骨格を持ったポリフェノールで、緑茶には(-)-エピカテキン(EC)、(-)-エピガロカテキン(EGC)、(-)-エピカテキンガレート(ECg)、(-)-エピガロカテキンガレート(EGCg)、(+)-カテキン(C)、(-)-ガロカテキン(GC)、(-)-カテキンガレート(Cg)、(-)-ガロカテキンガレート(GCg)が含まれている。近年、茶カテキンの機能性が注目され、缶

やペットボトル入り緑茶飲料、抹茶を使用した食品だけでなく、茶カテキン類を関与成分とした特定保健用食品も数多く許可されている。茶カテキンが添加された様々な製品は、今後さらに増加することが予想される。しかしながら、茶カテキン類の生理作用は各成分によって異なる。例えば抗酸化作用については茶カテキンの中でも EGCg や EC が強いことが報告されている。このようなことから、茶カテキンを添加した

食品の安全性・有効性を評価するためには、茶カテキン類の総量ではなく、個々の成分の含有量を把握することが重要になっている。

一般に緑茶飲料中の茶カテキン類の定量には UV 検出-HPLC 法が用いられている。その方法はカテキン類の含有量が高い緑茶飲料を対象として開発されたものであるため、カテキン含有量が低い食品、あるいは緑茶飲料以外の食品の分析にはあまり適した方法とは思われない。近年、抗酸化成分を特異的に検出できる電気化学(EC)検出器が普及したことにより、多くの機関で以前よりも精度の高いカテキン類の分析が可能となってきた。しかし、これまで茶カテキンの分析を従来の UV 検出-HPLC 法と、EC 検出-HPLC 法で比較した検討は見当たらない。また、緑茶飲料以外の食品(例えば脂質などを含む乳製品)を試料として茶カテキン類の分析方法を検討した報告は見当たらない。そこで本研究では、茶カテキン類の定量方法の精度向上と画一化を目指し、従来から用いられている UV 検出-HPLC 法と EC 検出-HPLC 法による分析法を比較した。また、分析検体として乳製品を想定したときの問題点などについて検討した。

B. 研究方法

茶カテキン標準品として、C、EC、GC、EGC、Cg、ECg、GCg は三井農林製、EGCg は長良サイエンス製、カフェイン(Caf.)は Sigma Aldrich 製、内部標準(IS)に用いたエチルガラートは関東化学(株)製のものを使用した。また、アセトニトリルとメタノールは HPLC グレード、リン酸は和光純薬工業製の特級試薬を使用し、分析カラムには L-column ODS (4.6 × 250 mm) (財団法人化学物質評価研究機構製)を用いた。試料には市販の緑茶飲料 2 種類、牛乳、清涼飲

料水(抹茶ミルク)を用いた。

UV 法 1 では、UV-VIS 検出器(230 nm)に SPD-10(SHIMADZU)を装着した HPLC システム(SPD-10, SHIMADZU)で分析した。移動相は A 液:5% アセトニトリル(リン酸 0.1%含有)、B 液:50% アセトニトリル(リン酸 0.1%含有)、流速:1 ml/min、カラム温度は 40°C とし、タイムプログラムは 0 min から 5 min (B conc. 5%)、10 min から 15 min (B conc. 10%)、25 min まで (B conc. 20%)、45 min から 45 min まで (B conc. 80%)、60 min から 74 min (B conc. 5%)とした。UV 法 2 では HPLC システムならびに移動相とカラム温度は UV 法 1 と同様とし、移動相は A 液:0.1 M 酢酸溶液、B 液:0.1 M 酢酸-アセトニトリル溶液とし、タイムプログラムは、0 min から 5 min (B conc. 3%)、37 min から 43 min (B conc. 20%)、43 min から 48 min (B conc. 100%)、49 min から 62 min (B conc. 3%)とした。

EC 法では、アンペロメトリック電気化学検出器(NANOSPACE SI-1、資生堂、+600 mV vs Ag/AgCl)を装着した HPLC システム(NANOSPACE SI-1、資生堂)により分析した。カラム温度は室温、移動相は 0.05 mM EDTA・13.5% アセトニトリル含有 0.5 mM リン酸緩衝液(pH 2.5)を用いて 1 ml/min の流速でイソクラティック溶出を行った。

脂質を含む食品に添加されたカテキン類の定量方法の検討は、酸または有機溶媒の添加、加熱などの操作を行い、牛乳中に含まれる茶カテキンの遊離および除タンパク、さらに固相抽出などにより HPLC 測定用の試料を調製した。

C. 結果

HPLC の検出方法の比較: 茶カテキン 8 種類とカフェインの混合溶液を UV 法 1、UV 法 2、

EC法で分析したクロマトグラムを図1に示した。全ての茶カテキン類は単一ピークとして検出できた。UV法1、およびUV法2において、それぞれ、約17分、27分にカフェインのピークが検出されたのに対し、EC法ではカフェインは検出されず、カテキン類に特異性が高く、感度であり夾雑物のピークも少なかった。それぞれの方法で市販の2種類の緑茶飲料のカテキンを定量し、その典型的なクロマトグラムを図2、3に示した。また、その定量による緑茶飲料1本あたりのカテキン含有量を表1、図4に示した。UV法1およびEC法はほとんど同じ測定値であったが、UV法2では測定値が高くなる傾向が認められた。

乳製品のカテキンの定量方法の検討：茶カテキン類、特にEGCgは牛乳中のタンパク質と結合することが知られていることから、EC法により乳製品中に添加された茶カテキン類の定量を行うにあたり、検出を妨げる脂質やタンパク質を除去する検討を行った。酸による加水分解の検討に当たり、加熱処理によるカテキン類への影響を調べた結果、80°C、40 minの加熱処理ではカテキン類に変化は見られなかった。このことを踏まえて、リン酸(pH 3.0)による加水分解処理、メタノールまたはアセトニトリルによる処理を行い、牛乳に添加した茶カテキンを分析した。表2に示したように、それぞれの茶カテキンの回収率は未処理群において約6~40%程度であり、添加した茶カテキンの大部分は牛乳のタンパク質と結合し、除タンパク操作時に除去された。リン酸による加水分解ではC、ECにおいて約80%の回収率が得られたが、タンパク質と結合しやすいEGCg、GCg、ECg、Cgの結合を切断できず、その回収率は約25%となった。一方、メタノール処理では全ての茶カテキンが85%前後、アセトニトリル処理では90%前後

の回収率が得られた。これらの結果より、牛乳中のタンパク質と結合した茶カテキンを遊離させるためには、全ての茶カテキンの回収率の高いアセトニトリル処理が適していた。この方法を用い、抹茶が添加された市販の乳製品(抹茶ミルク)に含まれる茶カテキン量の定量を試みたところ、一本(200 ml)当たり107.7 mgであり、製品ラベルに表示されている総カテキン量である100 mg/200 mlとほぼ一致した(表3)。

D. 考察

茶カテキンは複数の成分の総称であり、個別成分の構造はよく類似している。本研究では従来から用いられているUV検出法とEC検出法により茶カテキン類の定量を比較した。その結果、予想したとおりUV法は特異性が低く、測定値が高くなる傾向が明らかとなった。一方、EC検出法は測定感度が高く、茶飲料に多量に含まれるメチルキサントシン類の一種であるカフェインのピークは検出されないため茶カテキンを含む食品の分析には最も適していると考えられた。EC検出による茶カテキン類の検出限界は約0.2 pmolであり、これはUV検出器の約1000倍に相当した。食品中には多様な成分が含まれているが、EC検出では測定感度が高いため、試料をかなり希釈することができ、この希釈操作は夾雑物質の濃度も低下させることができるためにカラムの劣化防止にもつながると考えられる。

本実験では、EC検出-HPLC法によるカテキン定量法を様々な食品に応用することを目的として、牛乳中に添加したカテキン類の定量を試みた。牛乳中の脂質は脂肪球膜というタンパク質の被膜に覆われた脂肪球として存在し、タンパク質は80%がカゼインである。カテキン類の水酸基はタンパク質中のプロリンと結合しや

すく、 β -カゼインはこのプロリンを多く含むためにカテキン類、特に水酸基を多く有する EGCg や GCg と結合することが知られている。このことが、本実験の表 3 に示したように、ガロイル基を持つ EGCg、GCg、ECg、Cg の回収率の著しい低値に関連していると考えられた。今回の検討から、試料を有機溶媒と混合することでタンパク質とカテキン類の結合の切断および除タンパクが同時に行えることが明らかとなった。また、固相抽出によって試料に共存する脂質を取り除くことができ、緑茶飲料と同様に乳製品についても EC 検出-HPLC 法で簡便に測定できることが可能と考えられた。実際、市販の抹茶ミルクに含まれる茶カテキン類の定量をした結果、測定値はメーカー測定値と比較して妥当な値であった。このことから、今回検討した分析方法が乳製品における茶カテキン分析方法としても利用できることが示唆された。

E. 結論

茶カテキンの分析法として、EC 検出-HPLC 法は従来の UV 検出-HPLC 法に比べて特異性が高く、高感度であることから、多様な製品に添加されている茶カテキンの個別成分の分析に適していることを示した。また、HPLC 用測定試料の調製において、酸処理による徐タンパク操作はカテキン類も沈殿除去するため適用できないが、アセトニトリル処理は適用できることを示した。さらに、油脂や乳製品が測定検体である場合も、固相抽出を組み合わせた方法により測定用の試料を調製し、EC 検出-HPLC 法が適用できることを示した。本研究の EC 検出 HPLC 法は、簡便かつ高精度であり、特定保健用食品を含めた多様な食品に添加された茶カテキンの分析に適しており、そのような製品の安全性や有効性の評価に役立つものと考えら

れる。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表 1 市販飲料中の茶カテキン量 (mg/1 本当たり)

Sample	UV 1			UV 2			ECD		
	(mg/serving)	CV		(mg/serving)	CV		(mg/serving)	CV	
#29									
GC	52.9 ± 0.9	4.0		54.6 ± 1.1	4.6		55.3 ± 2.0	8.3	
EGC	171.7 ± 2.7	4.0		201.2 ± 1.6	2.2		176.0 ± 0.4	0.5	
C	15.9 ± 0.2	2.2		20.1 ± 0.3	3.2		13.5 ± 0.6	9.5	
EC	64.4 ± 0.8	2.7		58.2 ± 1.2	4.7		58.3 ± 0.3	0.9	
EGCg	194.7 ± 3.3	3.9		192.9 ± 3.7	4.5		189.6 ± 1.0	1.6	
GCg	16.1 ± 0.4	5.2		12.3 ± 0.3	5.7		26.6 ± 2.2	18.4	
ECg	61.7 ± 0.8	2.8		61.9 ± 1.3	4.8		59.8 ± 0.4	1.6	
Cg	3.6 ± 0.1	3.8		3.7 ± 1.4	63.4		2.1 ± 0.1	5.3	
Total	581.1 ± 8.9	3.7		604.9 ± 10.7	4.1		581.1 ± 2.1	1.1	
#48									
GC	150.1 ± 0.8	1.1		150.2 ± 1.5	2.4		143.2 ± 5.5	9.6	
EGC	91.3 ± 0.4	0.7		95.7 ± 9.9	21.7		91.4 ± 1.0	3.3	
C	33.5 ± 0.1	0.7		37.9 ± 0.2	1.4		31.7 ± 1.0	8.2	
EC	35.6 ± 0.1	0.7		35.0 ± 0.4	2.5		32.4 ± 0.6	4.7	
EGCg	114.6 ± 1.1	0.6		117.3 ± 0.3	0.5		110.2 ± 1.8	4.8	
GCg	115.2 ± 0.3	0.4		113.0 ± 0.7	1.4		117.4 ± 0.9	2.1	
ECg	34.5 ± 0.04	0.1		39.5 ± 0.2	1.4		33.4 ± 0.7	5.9	
Cg	23.6 ± 0.2	1.5		22.2 ± 0.0	0.1		19.0 ± 0.2	2.0	
Total	598.4 ± 2.9	0.7		610.8 ± 12.9	4.8		578.7 ± 10.4	5.2	

Values are means ± SE, n = 5

表 2 リン酸または有機溶媒処理による牛乳中のタンパク質とカフェキンの結合の切断

Catechins	Phosphate at 80°C (n = 6)		Methanol (n = 2)		Acetonitrile (n = 6)		Nontreatment (n = 6)	
	Recovery rate (%)	CV	Recovery rate (%)	CV	Recovery rate (%)	CV	Recovery rate (%)	CV
GC	50.0 ± 2.0	8.8	33.3 ± 0.2	0.9	58.0 ± 2.1	8.7	26.2 ± 3.5	33.0
EGC	42.8 ± 6.3	33.2	36.8 ± 0.3	1.3	50.9 ± 2.5	11.8	10.9 ± 2.2	49.5
C	70.2 ± 7.3	23.1	36.0 ± 0.1	0.3	65.0 ± 1.9	7.0	40.6 ± 10.7	64.4
EC	71.8 ± 7.0	21.8	36.2 ± 0.2	0.9	64.8 ± 1.9	7.2	41.7 ± 10.5	61.9
EGCg	15.5 ± 0.9	12.7	33.2 ± 0.0	0.2	57.5 ± 2.1	8.9	4.4 ± 0.8	42.7
GCg	14.8 ± 1.0	15.6	35.3 ± 0.1	0.4	56.2 ± 2.2	9.6	3.8 ± 1.0	61.1
IS	59.5 ± 3.0	8.6			63.7 ± 1.9	7.4	39.8 ± 10.3	63.3
ECg	17.1 ± 1.5	20.2	37.3 ± 0.0	0.0	58.1 ± 2.6	10.9	5.3 ± 1.5	68.6
Cg	14.2 ± 2.1	32.3	42.0 ± 0.2	0.6	47.9 ± 4.2	21.7	3.5 ± 1.2	84.1

Values are means ± SE.

表 3 市販の抹茶ミルク 1 本当たりに含まれるカテキン含量

Catechins	mg/200 ml	CV
GC	21.6 ± 0.4	3.0
EGC	23.7 ± 0.4	3.2
C	4.7 ± 0.1	3.5
EC	23.7 ± 0.5	3.7
EGCg	18.1 ± 0.4	3.5
GCG	8.0 ± 0.2	4.0
ECg	5.2 ± 0.2	5.9
Cg	2.0 ± 0.0	2.0
Total	107.7 ± 1.8	3.2

Value are means ± SE, n = 3