

200837058A

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

「栄養表示基準における栄養成分の分析方法」の測定精度向上のための研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松本 輝樹

平成21(2009)年03月

## 目 次

### I. 総括研究報告

「栄養表示基準における栄養成分の分析方法」の測定精度向上のための研究

松本 輝樹

..... 1

### II. 分担研究報告

1. ビタミン B<sub>12</sub> バイオアッセイの精度向上に関する研究

：アルカリ処理による分析値補正法の妥当性

松本 輝樹

..... 5

2. ビタミン B<sub>12</sub> バイオアッセイの精度向上に関する研究

：分析操作の簡略・効率化、擬陽性因子の補正法及び食品マトリックスの影響について

竹林 純

..... 11

3. 葉酸のバイオアッセイにおける精度向上に関する研究

：試料前処理条件の問題点

遠藤 香

..... 19

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 25

総括研究報告書

「栄養表示基準における栄養成分の分析方法」の  
測定精度向上のための研究

主任研究者 松本輝樹 国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム研究員

研究要旨 本研究は、現在「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法（以下公定法）」として微生物定量法（MBA）が主たる測定法として採用されている栄養成分を中心に、その測定精度の向上を目的として以下の検討を行う。

MBA は高い感度を有しており、夾雑物の影響を受け難いという利点があるが、煩雑で専門的な分析操作等に起因する低再現性、定量菌の特異性の低さに起因する擬陽性物質の存在等の数々の問題点が指摘されている。そこで、公定法におけるMBA の分析操作について、問題点を明確とし、その改良法について検討する。また、分析操作の簡略、効率化について検討し、再現性の向上を図る。

一方、公定法において、MBA の代替法として HPLC 法が併記されている栄養成分が多い。HPLC 法は高い再現性と特異性を有しているが、食品マトリックスによる妨害を受け易いため、その適用は高濃度の目的成分を含む検体に限られている。ところが、近年固相抽出等を利用した夾雑物の除去及び目的成分の濃縮を行う技術に関して飛躍的進歩が認められている。これらの技術と HPLC 法を組み合わせることで HPLC 法の適用範囲を拡張し、MBA と相互に補完する汎用的な分析法として確立を目指す。

本年度は、ビタミン B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) 及び葉酸の MBA に焦点を絞って検討を行った。VB<sub>12</sub> については、擬陽性物質の補正法であるアルカリ耐性因子 (ARF) を用いた補正法について標品を用いてその妥当性を確認した。また、分析操作の簡便化について検討し、接種菌液をまとめて調整し凍結保存すること及び反応溶液を 60 % にダウンスケールすることは問題ないことを示した。この簡便法を用いて、実際の食品サンプルについて測定を行い、簡便法の有用性を示すことが出来たが、ARF 補正の有無で測定値が 30 % 程度変化し得ること、ARF 補正時のアルカリ処理により試験溶液が褐変し測定結果に影響する食品サンプルが存在することが明らかとなった。葉酸については、前処理で行うオートクレーブ処理について標品を用いて検討した結果、5.6 % の葉酸が分解することが示され、公定法に基づく分析では葉酸量を過小評価する可能性が示唆された。

研究分担者

竹林純 国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム研究員

#### A. 研究目的

現在、食品への成分表示は「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法（以下公定法）」<sup>1)</sup>による分析値に基づいてなされている。現行の公定法は平成11年に通知されたものであり、部分的な改正が行われているが、多くの栄養成分は約10年前に通知された方法に従って分析されている。しかし、この10年の間に、新たな分析技術が確立・汎用化されており、特に機器分析法を用いた微量・高感度分析において大きな進歩が認められている。

現在公定法に採用されている分析法には全く問題がないとはいえないものも存在する。特に微生物定量法(MBA)に基づく分析法については、「操作が煩雑で微生物の扱いに熟練を要するため再現性に乏しい」、「目的とする栄養素以外にも定量菌の増殖に影響する物質による妨害がある」等の数々の問題点が指摘されており、分析精度の向上が望まれている。MBAを主たる測定法として採用しているのはパントテン酸、ピオチン、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>12</sub>(VB<sub>12</sub>)及び葉酸である。これらの栄養素は、「食品中の含有量が微量」、「活性を有する複数の分子種が存在する」等の理由により機器分析による測定が困難であり、前述した問題点があるもののMBAが採用されている。これらの栄養素のうちピオチン以外の4種に関しては、含有量が多い場合に限りHPLC法の適用が認められている。

HPLC法はMBAと比較して再現性、特異性の点で非常に優れているが、目的成分の含有量が微量の場合は食品マトリックスによる妨害を受け直接測定は困難である。しかし、

近年分析の前処理法として、固相抽出(SPE)を利用した夾雑物の除去及び目的成分の濃縮を行う方法が確立されつつある。VB<sub>12</sub>及び葉酸に関しては、HPLC分析の前処理としてアフィニティーカラムを用いる方法が報告されており<sup>2),3)</sup>、申請者はすでにこの方法を応用し、今までMBAを用いなくては測定できなかった幼児用調整粉乳中のVB<sub>12</sub>含量をHPLCにて測定できる可能性を見出している。

本研究では、公定法のうちMBAを主たる測定法として採用している栄養素について、測定精度を向上すべくMBAの分析方法の改良を行うと共に、MBAの補完・代替法として、現在適用が高濃度含有食品に限定されているHPLC法について、SPEを前処理法として用いることによる適用範囲の拡張について検討する。本年度は、VB<sub>12</sub>及び葉酸に着目し、MBAにおける問題点を明確にするとともに、測定誤差の要因となっている煩雑な分析操作の簡便化について検討した。

#### B. 研究方法

1. ビタミンB<sub>12</sub> バイオアッセイの精度向上に関する研究: アルカリ処理による分析値補正法の妥当性

VB<sub>12</sub>のMBAで用いる定量菌である*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (ATCC 7830)はVB<sub>12</sub>以外の因子によっても増殖することが知られており、その補正法としてアルカリ耐性因子(ARF)を用いた方法が知られている。この補正法は公定法では行われていないが、日本標準食品成分表における成分分析法では採用されている。そこで、ARFによる補正の妥当性について、試薬として入手可能なVB<sub>12</sub>の分子種の標品を用い検討した。

2. ビタミンB<sub>12</sub> バイオアッセイの精度向上

に関する研究：分析操作の簡略・効率化、擬陽性因子の補正法及び食品マトリックスの影響について

MBA における分析操作が煩雑であることが低い分析精度の一因として考えられるため、VB<sub>12</sub> の MBA に関し操作の簡便化を行い、その妥当性を検討した。確立した簡便法にて、実際の食品サンプルの VB<sub>12</sub> 含量の測定を行い、上述した ARF に対する補正の有無が測定結果に及ぼす影響について検討した。さらに、食品マトリックスが VB<sub>12</sub> の抽出の妨げとなる可能性について、標品添加回収実験を行い検討した。

### 3. 葉酸のバイオアッセイにおける精度向上に関する研究：試料前処理条件の問題点

葉酸は不安定な物質であり、熱等により分解する。公定法における葉酸の MBA による測定操作にはオートクレーブ処理が含まれているが、その影響について標品を用い検討を加えた。

## C. 研究結果及び考察

### 1. ビタミン B<sub>12</sub> バイオアッセイの精度向上に関する研究：アルカリ処理による分析値補正法の妥当性

ARF による分析値の補正は「VB<sub>12</sub> はアルカリ処理により完全に活性を失うが、擬陽性物質は活性に変化が無い」ことを前提とした補正法である。しかし、VB<sub>12</sub> には複数の分子種が存在し、その全てについてアルカリ処理により活性が消失することは体系的に確認されていない。そこで、現在試薬として入手可能なコバラミンに対してアルカリ処理を行い、全てのコバラミンで活性が完全に消失することを確認し、ARF による補正の妥当性を示した。

### 2. ビタミン B<sub>12</sub> バイオアッセイの精度向上に関する研究：分析操作の簡略・効率化、擬

陽性因子の補正法及び食品マトリックスの影響について

分析操作の簡便化について検討した結果、以下のことが明らかとなった。1) 接種菌液を実験毎に前培養を行い調整するのではなく、予め前培養したものを凍結保存して用いても問題ない。2) 反応スケールを 60 % に変更も測定結果に影響しない。3) 簡便法による検量線は 0.01 から 0.09 ng/tube の濃度範囲で高い直線性を示す。

簡便法により実サンプルを測定した結果からは以下のことが明らかとなった。1) ARF 補正の有無により測定値が平均 30 % 程度減少する。2) アルカリ処理により試験溶液が褐変化し測定結果に影響する食品サンプルが存在する。

添加回収実験の結果、公定法による抽出法で、食品マトリックスにより VB<sub>12</sub> の抽出が妨げられることはないことが示唆された。

### 3. 葉酸のバイオアッセイにおける精度向上に関する研究：試料前処理条件の問題点

標品を用いた検討による結果、オートクレーブ処理により 5.6 % の葉酸が分解することが明らかとなった。現在の公定法では試料の前処理過程において、葉酸抽出、酵素反応停止の目的で 2 回のオートクレーブ処理を行うが、標準溶液に関しては抽出、酵素反応が不要であるためオートクレーブ処理は行わない。そのため、現行の公定法では葉酸量を過小評価している可能性が示された。

## D. 結論

今回 MBA の分析操作について詳細に検討した結果、現在の方法では種々の問題点があることが明らかとなった。MBA による分析精度を高めるために、これらの問題点を解決し、分析法の改良を行う必要があると考えられる。しかし、MBA において多種多様な

食品マトリックスによる影響を完全に除くことは非常に困難であり、全ての問題点を解決できるとは限らない。そのため、他の分析法による MBA の補完・代替が非常に重要であると考えられる。次年度はそのための分析法として有望だと考えられる HPLC 法の適用範囲拡張について重点的に検討する予定である。

VB<sub>12</sub> の MBA に関しては現行の公定法を簡便化することが可能であることが示された。非常に煩雑である MBA の実験操作の簡略化は、実験者間の誤差要因を減らし、分析精度向上に有効であると考えられる。近年、96 well マイクロプレートなどを用い、簡便に MBA を行う方法が報告されている。次年度はこれらの方法の導入も視野に入れて、今年度行えなかった VB<sub>12</sub> 以外の栄養素の MBA に関しても簡便化を図る予定である。

栄養表示基準は、消費者が自ら健康づくりに資する食品を選択するうえでの適切な情報を提供することを目的に策定されている。そのため、その表示値の基となる分析法は高い精度が求められるが、それと同時に食品表示に責任を負う製造業者が測定可能である必要性から特殊な分析機器を用いない汎用的な分析手法であることが求められる。そのため、まず現在汎用されている MBA の改善が急務であろう。しかし、一つの分析手法で多種多様な形態を持つ全ての食品について精確な分析を行うことは時として困難である。そのため、MBA と相互に補完する測定法として、HPLC 法の適応範囲の拡張は大きな意味を持つと思われる。

#### E. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### I. 参考文献

- 1) 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: 栄養表示基準 (平成 8 年 5 月厚生省告示第 146 号) における栄養成分等の分析方法について、平成 11 年 4 月 26 日付衛新第 13 号。
- 2) Heudi, O. *et al.*, *J. Chromatogr. A* **1101**, 63-68 (2006).
- 3) Póo-Prieto, R. *et al.*, *J. Nutr.* **136**, 3079-83 (2006).

## 分担研究報告書

### ビタミン B<sub>12</sub> バイオアッセイの精度向上に関する研究 ：アルカリ処理による分析値補正法の妥当性

研究分担者 松本輝樹 国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム研究員

研究要旨 現在ビタミン B<sub>12</sub> の公定分析法として、「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法」に記載されている定量法は、乳酸菌を用いたバイオアッセイである。本定量菌はビタミン B<sub>12</sub> のみならずその他の擬陽性物質によっても増殖する事が知られており、これを補正する方法として検体のアルカリ処理が知られている。しかし、現行の公定法におけるバイオアッセイには組み込まれていない。アルカリ処理による補正法は、ビタミン B<sub>12</sub> が処理により完全に活性を失うことを前提としているが、複数存在するビタミン B<sub>12</sub> の分子種全てについて確認はなされていない。そこで本研究では、現在薬品として入手可能なビタミン B<sub>12</sub> 活性を有する化合物についてアルカリ処理を行い、用いた全てのコバラミン類で活性が完全に消失することを示した。この結果はアルカリ処理による補正を行うことで、より精度の高いビタミン B<sub>12</sub> 分析を行うことができる可能性を示唆している。

#### A. 研究目的

現在「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法（公定法）」において採用されているビタミン B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) 定量法<sup>1)</sup>は、乳酸菌を用いた微生物学的定量法 (MBA) 及び高濃度存在する時に限り HPLC 法である。前者は夾雑物による影響を受け難く、低含量の検体の測定が可能であるといった利点があるが、再現性が乏しいことや微生物を用いた分析操作に熟練を要するといった欠点がある。一方、後者は汎用機器である HPLC を用い、高含量の検体に関しては再現性に優れているが、夾雑物の影響を受けやすく、低含量の分析には適していない面がある。食品サンプル中の VB<sub>12</sub> 含有量は一般にごく微量であり、そのため多くの場合分析法として MBA

が選択される。

現在の公定法において、MBA は夾雑物の影響を受け難いといった理由から、他の化合物による影響の補正は行われていない。しかし、古くからヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチドといったアルカリに対して安定な化合物に、VB<sub>12</sub> 定量菌が反応することが知られている。<sup>2)</sup> また、近年たけのこ中に含まれると考えられていた VB<sub>12</sub> が、VB<sub>12</sub> とは異なる物質による誤測定結果であることが示された。<sup>3)</sup> これらの擬陽性因子による影響を除くため、五訂日本食品標準成分表の作成に採用されている分析マニュアル<sup>4)</sup> においては、VB<sub>12</sub> がアルカリ条件下で極めて不安定であることを利用した補正法が用いられている。すなわち、試料をアルカリ処理した

後も残存する活性を VB<sub>12</sub> とは異なるアルカリ耐性因子 (ARF) によるものとし、測定値から減ずる補正法である。従って、公定法に ARF による補正を組み込むことで、より正確な分析を行える可能性がある。

ARF による補正法は「VB<sub>12</sub> はアルカリ処理により完全に活性を失うが、擬陽性物質は活性に変化が無い」ことを前提とした補正法である。しかし、VB<sub>12</sub> には複数の分子種が存在し、その全てについてアルカリ処理により活性が消失することは体系的に確認されていない。そこで、本研究では試薬として購入可能な VB<sub>12</sub> の分子種に関して、アルカリ処理の影響について検討を加えた。

## B. 研究方法

現在の公定法では VB<sub>12</sub> の測定における前処理法として、酢酸緩衝液を用いた抽出方法が採用されていることから、各コバラミン類のアルカリ処理に際しても酢酸緩衝液が含まれる際の影響について検討を行った。

### 1. 試料

現在試薬として購入可能な活性コバラミンとして、シアノコバラミン (CN-cbl)、ヒドロキソコバラミン酢酸塩 (OH-cbl) 及びメチルコバラミン (CH<sub>3</sub>-cbl) は和光純薬のものを、アデノシルコバラミン (Ado-cbl) は ChromaDex Inc. のものをそれぞれ用いた。

### 2. コバラミン類のアルカリ処理

各検体の 1 mg/mL 溶液 100 µL を正確に取り、10 N NaOH 0.4 mL、0.57 M 酢酸緩衝液 (pH=4.5) または純水を 10 mL 加えアルミホイルで蓋をして、オートクレーブにて 121 °C、30 分アルカリ処理を行った。

終了後反応液は流水にて冷却し、pH= 6.0 に調整後正確に 100 mL に定容し、順次希釈することにより試料とした。

### 3. バイオアッセイ<sup>1)</sup>

### 1) 接種菌液の調製<sup>5)</sup>

接種菌液は *Lactobacillus delbreckii* subsp. *lactis* を予め前培養培地にて 37 °C、20 時間の条件で 3 回継代培養したものを、10 % グリセロール溶液にて凍結保存 (-80 °C) しておいたものを用いた。これを解凍後生理食塩水で洗浄したのち、600 nm における吸光度が 0.05 になるように希釈調整したものを接種菌液とした。

### 2) 試験溶液の調製

アルカリ分解溶液を水で正確に希釈し、1 mL 中に VB<sub>12</sub> として約 0.06、0.6 及び 6.0 ng 相当量を含むよう水で希釈したものを試験溶液とした。

### 3) 測定

試験管 3 本ずつに試験溶液を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 1.5 mL 及び水を加えて全量を 3 mL とした。別に検量線作成のため、VB<sub>12</sub> 標準溶液 (0-0.09 ng CN-cbl 相当量) を試験管 3 本ずつにとり、それぞれに測定用培地 1.5 mL 及び水を加えて全量を 3 mL とした。試験溶液及び標準溶液を共に 121 °C、5 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液 20 µL ずつを無菌的に接種し、37 °C で 21 時間恒温槽に入れて培養した。

培養後増殖度を 600 nm の吸光度を用いて測定した。標準溶液の吸光度から検量線を作成し、これに試験溶液から得られた吸光度を照合し、試験溶液の VB<sub>12</sub> 量を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究において用いた乳酸菌 *Lactobacillus delbreckii* subsp. *lactis* は国立感染症研究所が定める病原体等安全管理規程<sup>6)</sup> の分類においてバイオセーフティーレベル 1 に設定されており、環境への影響などに特段の設備を必要とされてはいない。しかし、本菌の使用にあたっては通常の洗浄及び消毒をもって



外部への流出を防止した。

### C. 研究結果

各コバラミンの活性に対するアルカリ処理の影響を CN-cbl を標品とした検量線を用い評価した。MBA は定量菌の増殖度に実験間でばらつきが大きいために、実験毎に検量線を作成した。本検討における検量線はこれまでに報告されているようなシグモイド曲線ではなく直線であり、<sup>8)</sup>  $R^2$  係数は 0.97 から 0.99 という良好な直線性を示した。Fig. 1 にはその一例を示す。

コバラミン類を純水及び緩衝液にてアルカリ処理した結果を Table 1 及び Table 2 に示した。数値はブランクの増殖度を 0 とした際の比率 (%) として表記した。全体的にブランクよりはわずかに高い値を示しているが Dose-Response も得られておらず、活性があるとは言いがたい。また、検量線範囲の 100 倍濃い濃度に相当するサンプルでも、検量線の最低濃度である 0.01 ng よりも数値が低かったことから、アルカリ分解物は活性が完全に消失していることが明らかとなった。また、抽出溶媒間の違いや緩衝液による明らかな活性への効果も認められなかった。

なお、CN-cbl の検討において Std の値が高いのは、試料の検討において公定法に記載のスケールで検討し、吸光度測定は Shimadzu UV-1600 にて標準セルを用いて測定したためである。なお、それ以外のものは APEL AP-101 にて、培養試験管を直接測定に用いた。

### D. 考察

古くから乳酸菌を用いた  $VB_{12}$  の測定における夾雑物の影響は問題として指摘されており、ARF による補正が一般的に用いられている。<sup>2)</sup> しかし、補正を行う際の前提条件

となる「アルカリ処理により  $VB_{12}$  が完全に活性を失う」点に関し体系的な検証はなされていない。そこで、本研究において現在試薬として入手可能な全ての  $VB_{12}$  分子種に関し、アルカリ処理の影響を検討した結果、活性が完全に消失することを示した。公定法ではコバラミン類は配位子を全て CN に変換しているが、仮に未反応のコバラミンが存在していたとしてもアルカリ処理することにより活性を消失させることが可能であり、擬活性の評価が行えると考えられる。また、今回の検討では酢酸緩衝液がアルカリ処理に影響を及ぼさないことも明らかとなり、これまでに公定法として用いられている前処理法を変更することなく、ARF 測定に用いることが可能となる。

今回の検討結果から、 $VB_{12}$  をより精確に測定するために ARF 補正を導入することが有用であることが示された。しかし、食品サンプル中の  $VB_{12}$  含有量に対し ARF が無視できるほど少ない場合、ARF による補正を行う必要性は少ない。また、「疑陽性物質がアルカリ処理で活性に変化がない」点については検討を必要とする。また、アルカリ処理を行うことで新たな擬陽性物質が生じる可能性もある。したがって、公定法への ARF 補正の導入については更なる検討を加えた後に判断する必要があると考える。

今回、アルカリ処理に着目して検討を行ったが、 $VB_{12}$  を完全に失活させる方法として酸処理も考えられる。そこで、CN-cbl に限り硫酸酸性条件下で酸処理を行ったところ、CN-cbl は純水溶媒中 (UPW) では活性が完全に消失していたが、緩衝液が存在する場合は活性が保持されていた (Table 3)。しかし、検討した 2 回 (buffer-1, -2) において整合性が得られていないことから、活性に何が関与しているかについては疑問が残る。さらに緩

衝液の濃度を公定法と同様の濃度に設定したものの (official) に関して検討を行ったところ、活性は完全に消失していた。よって、高濃度の緩衝液では CN-cbl が未反応または活性成分として存在している可能性があるが、公定法の検体を酸性にした際の分解物は夾雑物の評価が可能である。

食品中に含有されている VB<sub>12</sub> が微量であることから、その測定方法として高感度かつ夾雑物の影響が比較的少ない MBA 法が汎用されてきた。しかし、微生物を用いる MBA には多くの場合擬陽性物質が存在し、VB<sub>12</sub> 分析に関してもそれが大きな問題となる。近年、機器分析により VB<sub>12</sub> を高感度で測定する方法が報告されてきており、<sup>8)</sup> より正確な VB<sub>12</sub> 分析を行うために、これらを応用した測定法について検討する価値があると思われる。特にコバラミン類を最も安定な CN-cbl に変換する方法は有効であり、それを分別定量するか、試料に含まれる関連化合物を各種クロマトグラフなどにより個別に定量することは、夾雑物の影響を考慮しなくて良いことから有効な手段となり得ると考えられる。

公定法として採用される分析法は特殊な機器を必要とせず、汎用分析機器を用いて測定できることが求められる。そのため、次年度は現行の公定法を基盤として効率的に分析を行うための方法についても検討を加える予定である。

#### E. 結論

ARF による補正の妥当性を検討するため、現在試薬として入手可能なコバラミンに対してアルカリ性条件下でオートクレーブ処理を行うことで、活性が消失することを確認した。従って、アルカリ処理を行うことにより、コバラミン以外の擬陽性物質が定量菌の増殖に及ぼす影響を評価することが可能で

ある。また、アルカリ処理を施す際の溶液による影響は認められなかったことから、現行の公定法の前処理法を変更することなく組み込むことが可能であることを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### H. 参考文献

1) 厚生省生活衛生局食品保健課新食品保健対策室長通知: 栄養表示基準 (平成 8 年 5 月厚生省告示第 146 号) における栄養成分等の分析方法について, 平成 11 年 4 月 26 日付衛新第 13 号

2) Shive, W. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2614-15 (1948).

3) Miyamoto, E. *et al.*, *Vitamins (Jpn)*, **79**(7), 329-32 (2005).

4) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査部会食品成分委員会資料: 五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル, 85 (2004).

5) Okada, N. *et al.*, *Rep. Natl. Food Res. Inst.*, **54**, 58-61 (1990).

6)

<http://www.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/kanrikitei3.pdf>, 平成 21 年 3 月 19 日現在.

7) Okada, N. and Ohta, T., *Rep. Natl. Food Res. Inst.*, **42**, 97-103 (1982).

8) Lebidzinska, A. *et al.*, *J. chromatogr. A* **1173**, 71-80 (2007).

**Table 1** 純水における残存ビタミン B<sub>12</sub> 活性

(ng/tube)	Std*	0.06	0.60	6.00
CN-cbl	289.2	3.9	6.2	11.5
OH-cbl	53.2	10.6	6.4	8.5
CH <sub>3</sub> -cbl	53.2	12.8	6.4	14.9
Ado-cbl	164.7	2.9	0.0	52.9

\* : 0.01 ng/tube CN-cbl

**Table 2** 緩衝液における残存ビタミン B<sub>12</sub> 活性

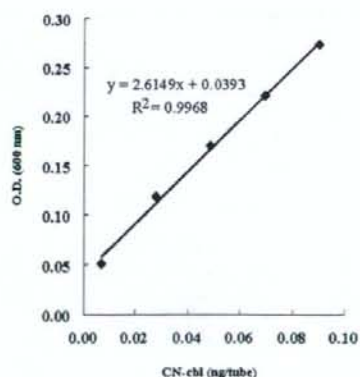
(ng/tube)	Std*	0.06	0.60	6.00
CN-cbl	289.2	5.3	6.0	12.4
OH-cbl	46.9	-3.1	20.3	0.0
CH <sub>3</sub> -cbl	72.4	13.2	9.2	-2.6
Ado-cbl	164.7	29.4	5.9	67.6

\* : 0.01 ng/tube CN-cbl

**Table 3** 酸処理物の溶媒の違いによる残存ビタミン B<sub>12</sub> 活性

(ng/tube)	Std*	0.07	0.70	7.00
buffer-1	87.5	350.0	731.3	1962.5
buffer-2	37.8	445.9	1097.3	1194.6
UPW	40.0	-4.5	-1.8	5.5
official	80.0	46.7	33.3	26.7

\* : 0.01 ng/tube CN-cbl

**Fig. 1** CN-cbl による検量線例

## 分担研究報告書

### ビタミン B<sub>12</sub> バイオアッセイの精度向上に関する研究 ：分析操作の簡略・効率化、擬陽性因子の補正法及び食品 マトリックスの影響について

研究分担者 竹林純 国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム研究員  
研究協力者 二井千日 国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム臨時職員

研究要旨 現在、ビタミン B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) の主たる分析法として、「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法（公定法）」に記載されているバイオアッセイ（MBA）の分析精度向上のため以下の検討を行った。

まず、MBA の精度が低い原因の一つに操作が煩雑であることに起因する誤差が大きいと考えられることから、分析操作の簡便化について検討した。接種菌液に関して、公定法では実験毎に前培養を行い調整することとされているが、予め前培養したものを冷凍保存することにより複数回の実験で使用可能であることを明らかとした。また、試験溶液を公定法の 60% にスケールダウンしても問題が無いことを明らかとした。この簡便法を用いて検量線を作成したところ、0.01 から 0.09 ng/tube の濃度範囲において非常に良好な直線性を示した。簡便法を用いて実際の食品サンプル（6 種類の幼児用調製粉乳、2 種類のゼリー飲料）の測定を行った結果、測定値は栄養表示基準で認められている誤差範囲（表示値の -20~80%）内であった。

次に、VB<sub>12</sub> の MBA において正の誤差を与える妨害物質の影響を除く方法として良く知られている、アルカリ耐性因子（ARF）による補正について検討した。上記の食品サンプルの測定結果を ARF で補正すると、30% 程度測定値が低減することが明らかとなった。公定法では ARF による補正は行われていないが、日本食品標準成分表における分析法では補正が行われている。そのため、MBA を用いても準拠する分析法の出典により測定値が異なる可能性が示された。

最後に、簡便法を用い食品サンプルに対し標品の添加、回収実験を行い、食品マトリックスに VB<sub>12</sub> が結合し分析値が低値を示すことがないことを示した。

今回の検討で、実験操作の簡便化が可能であることが示されたが、実験者間で測定値に偏りがあること、ARF による補正では擬陽性因子の影響を完全に除けない等の問題点が残された。より精度の高い分析を行うためには、さらなる分析法の改良が必要だと思われる。

## A. 研究目的

現在「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法(公定法)」において採用されているビタミン B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) 定量法<sup>1)</sup>は、乳酸菌を用いた微生物学的定量法(MBA)及び高濃度存在する時に限り HPLC 法である。前者は夾雑物による影響を受け難く、低含量の検体の測定が可能であるといった利点があるが、再現性が乏しいことや微生物を用いた分析操作に熟練を要するといった欠点がある。一方、後者は汎用機器である HPLC を用い、高含量の検体に関しては再現性に優れているが、夾雑物の影響を受けやすく、低含量の分析には適していない面がある。食品サンプル中の VB<sub>12</sub> 含有量は一般的に微量であり、そのため多くの場合分析法として MBA が選択される。

MBA は操作が煩雑であり、微生物の取り扱いに熟練した実験者が行った際でも、数値にばらつきが見られるため、再現性に問題があると指摘されている。また、基質特異性にも問題があり、VB<sub>12</sub> 以外にも活性を示す擬陽性物質の存在が知られている。

現在、公定法では MBA の実験方法について菌体の前培養条件及び試験溶液のスケールまで詳細に規定されている。しかし、実験結果に影響を与えない範囲内で実験操作を簡略化、効率化することは、煩雑さを減じ、実験誤差の低減に繋がるのが期待される。そこで、本研究では分析法の簡略化及び効率化について検討を行った。VB<sub>12</sub> に関する栄養表示がなされている市販の乳児用調製粉乳及びゼリー飲料について、簡便法にて定量分析を行い表示値との整合性を確認すると共に、添加回収試験を行い測定値の妥当性について検討を加えた。

一方、現行の公定法では擬陽性物質による測定値への影響に対する補正は行われてい

ない。補正法としては、VB<sub>12</sub> がアルカリ条件下で不安定である事を利用して、アルカリ処理後も残存する活性を VB<sub>12</sub> 以外の擬陽性物質(アルカリ耐性因子、ARF)によるものとし、その分を測定値から補正する方法が一般的に用いられている。そこで、ARF による補正の必要性の有無についても上記食品サンプルに関し検討を加えた。

## B. 研究方法

### 1. 試料

市販されている乳児用調製粉乳 6 種及び VB<sub>12</sub> 含有ゼリー飲料 2 種を検体とした。

### 2. 試薬

ビタミン B<sub>12</sub> 標準溶液(Std): シアノコバラミン(日本薬局方標準品) 10 mg を 25 % (V/V) エタノール溶液に溶かし正確に 100 mL とし、更に水で希釈して終濃度 0.1 ng/mL とした。

酢酸ナトリウム緩衝液: 酢酸 19.8 mL、酢酸ナトリウム三水和物 38.56 g を水 500 mL に溶解した (pH 4.5)。

シアン化カリウム溶液: シアン化カリウム結晶を 0.2 % 水酸化ナトリウム溶液に溶解し、0.5 mg/mL の溶液を調製した。

使用菌株 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (ATCC 7830) は独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門 (NBRC, No. 3376) より購入した。

ビタミン B<sub>12</sub> 測定用培地 (1L 中、pH 6.0±0.1)、前培養培地はそれぞれ BACTO B<sub>12</sub> ASSAY MEDIUM USP (DIFCO Laboratories) 及びライヒマニ接種用培地 (日水製薬) を用いた。

### 3. バイオアッセイ

#### 1) 接種菌液の調製<sup>2)</sup>

接種菌液は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* を予め前培養培地にて 37 °C、20 時間

の条件で3回継代培養したものを、10%グリセロール溶液にて凍結保存(-80℃)したものを用いた。これを解凍後生理食塩水で数回洗浄したのち、600 nmにおける吸光度が0.05になるように希釈調整したものを接種菌液とした。

## 2) 試験溶液の調製

試料約2gを精密に量り、酢酸ナトリウム緩衝液10 mL、水40 mL及びシアン化カリウム溶液0.4 mLを加えた。100℃で30分間加熱抽出した後、冷却し、10%メタリン酸0.6 mLを加え、正確に100 mLとしたものをろ過した。ろ液の一定量を正確にとりpH 6.0に調整した後、水で正確に希釈し、1 mL中にビタミンB<sub>12</sub>が約0.05~0.07 ng含むよう水で希釈したものを試験溶液とした。

また、ARFの測定用に試験溶液の一部をNaOHにてアルカリ性にし、121℃、30分オートクレーブ処理を行った。分解後反応液は流水にて冷却し、pH 6.0に調整後試験溶液と同様に希釈した。

なお、添加回収試験においては各検体に1.0 µg/mL CN-cbl標準液を100 µL加えて、操作回収試験においては試料の代わりに1.0 µg/mL CN-cbl標準液を100 µL用いて、試料の検討時と同様の操作を行い、それぞれ試験した。

## 3) 測定

試験管3本ずつに試験溶液を正確に加え、次に各試験管に測定用培地1.5 mL及び水を加えて全量を3 mLとした。別に検量線作成のため、Std (0~0.09 ng相当量)を試験管3本ずつにとり、それぞれに測定用培地1.5 mL及び水を加えて全量を3 mLとした。121℃で5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液20 µLずつを無菌的に接種し、37℃で21時間恒温槽に入れて培養した。

培養後増殖度を600 nmの吸光度を用いて測定した。標準溶液の吸光度から検量線を作成し、これに試験溶液から得られた吸光度を照合し、試験溶液のVB<sub>12</sub>量を求めた。

## (倫理面への配慮)

本研究において用いた乳酸菌 *Lactobacillus delbreckii* subsp. *lactis* は国立感染症研究所が定める病原体等安全管理規程<sup>3)</sup>の分類においてバイオセーフティーレベル1に設定されており、環境への影響などに特段の設備を必要とされていない。しかし、本菌の使用にあたり通常の洗浄及び消毒をもって外部への流出を防止した。

## C. 研究結果

実験操作の簡便化を図るために、まず接種菌液の調整法について検討した。公定法では実験毎に定量菌の前培養を行うこととされているが、前培養を行った菌体を凍結保存でストックし、複数回の実験に用いることが可能か検量線を作成し検討した。その結果、公定法と比較して問題がないことが明らかとなった。次に、試薬量の低減等を目的として、試験溶液の全体量を公定法の60%にスケールダウンし検討を行ったが、問題は認められなかった。Fig. 1に簡便法による検量線を示す。0.01から0.09 ng/tubeの範囲で検量線は良好な直線性を示し、各実験でのR<sup>2</sup>値は0.9以上であった。簡便法を用い2名の操作者による標品の操作回収試験を計4回行ったところ、回収率は83~117%の範囲にあり(Table 1)、簡便法の妥当性が示された。

簡便法を用いて、実際に市販の食品サンプルを測定した結果をTable 1に示す。総じて測定値は表示値よりも高値を示した。VB<sub>12</sub>は「栄養表示基準」において表示値の-20から80%が許容される。従って、今回の分析結果は一部高値を示したものの、大部分は

許容範囲内であった。しかし、実験者1と2の間で測定値に偏りが認められることから、より精確な測定を行うためにその原因の究明が必要であると考えられる。Table 1の測定結果にARFの補正を加えたものをTable 2に示す。測定値の約30%がARFによるものであると考えられ、そのため一部の検体ではARF補正後の値が表示値の許容範囲外となった。

食品中のVB<sub>12</sub>を定量する際、タンパク質等の食品マトリックスにVB<sub>12</sub>が結合し、それが測定の妨げとなり、分析値が低値を示す可能性が考えられた。そこで、標品であるCN-cblを食品サンプルに添加し回収試験を行った結果、実験者1では100%に近い回収率となったが、実験者2では100%を超える回収率となった(Table 3)。Table 3の結果をARFで補正した結果をTable 4に示す。実験者1の実験結果はARFで補正した結果10%程度回収率が低下したが、実験者2の回収率には影響がなかった。

#### D. 考察

我が国の食品の栄養成分分析法に関する公文書は、厚生労働省生活衛生局保険課新開発食品保険対策室長通知である「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(公定法)」<sup>1)</sup>以外に、文部科学省が発表した「5訂増補 日本食品標準成分表分析マニュアル(以下食品成分表分析法)」<sup>4)</sup>及び日本食品衛生協会が監修した「公定試験法・標準試験法詳解 食品衛生検査指針(以下食品衛生検査指針)」<sup>5)</sup>があるが、その全てにおいてVB<sub>12</sub>の主たる分析方法として記載されているものは乳酸菌(ATCC7830)を用いたMBAであり、世界的に認められている食品分析法であるAOAC<sup>6)</sup>においてもMBAが採用されている。しかし、MBAに関して

は、「微生物を用いたバイオアッセイは操作が煩雑で、再現性の高い結果を得るには熟練が必要」、「VB<sub>12</sub>以外に定量菌を増殖させる擬陽性因子の存在」といった点がしばしば問題とされる。本研究では実験誤差を減らすために操作の簡略化、効率化を図るとともに、公定法では行われていない擬陽性因子の補正に関して検討を加えた。

操作の簡便化に関しては、前培養した定量菌を凍結保存でストックしておき、複数回の実験で用いることが可能である事、試験溶液の全体量を公定法の60%にスケールダウンしても問題が無いことを示した。定量菌であるATCC7830は、経年変化によりVB<sub>12</sub>が減少した前培養培地を用いて培養を続けると低VB<sub>12</sub>環境に順応し、VB<sub>12</sub>に対する特異性が低下することが報告されている。<sup>7)</sup>これを避ける点でも、凍結保存菌の利用は有用であると思われる。また、簡便法は0.01から0.09 ng/tubeの範囲で非常に良好な直線性を示した(Fig. 1)。検量線が直線となれば、Microsoft Office Excel等を用いて最小二乗法により論理的に検量線を作成することが可能となり、実験者による誤差が低減できる。また、R<sup>2</sup>値を測定精度の指標とすることが可能となる。公定法では0から0.15 ng/tubeの範囲で検量線を作成することとなっているが、検量線を直線性が保たれる範囲に絞って作成することは精度向上のため有効であると考えられる。

次に、擬陽性因子の補正に関して検討を加えた。各公文書において擬陽性因子の補正を行うか否かについては統一しておらず、食品成分表分析法では測定値のARFによる補正を行うこととしているが、公定法では補正は行わない。食品衛生検査指針では公定法とそれに準じる方法として食品成分表分析法が併記されている。本研究結果においてARF

による補正を行うか否かで結果が異なることが示されており (Table 1 及び Table 2)、公定法に従った分析と比較して食品成分表分析法に従った分析では 30 %程度低い値が得られる場合があると考えられる。ARF による補正は「VB<sub>12</sub> はアルカリ処理により完全に失活し、擬陽性物質の活性には変化がない」ことを前提としている。ところが、今回 ARF による補正を検討した結果、調製粉乳の一部においてアルカリ処理により溶液が褐変し 600 nm の吸光を持つようになり、定量菌の増殖を測定する際の妨げとなることが明らかとなった (Table 5)。溶液が褐変した原因としては、検体中の糖とアミノ化合物が反応しメラノイジンが生じたのではないかと推測している。これらのサンプルでは ARF を過大評価しており、その結果 VB<sub>12</sub> 含量を過小評価している可能性が考えられる。しかしその一方で、今回の実験結果から証明することはできないが、検体中にアルカリ処理により失活する擬陽性物質が含まれていた場合、ARF を過小評価することとなり VB<sub>12</sub> 含量を過大評価している可能性も否定できない。さらに留意すべき点は、擬陽性因子以外にも定量性を低下させる物質があり、サンプル中に抗生物質が含まれる場合定量菌の増殖が阻害され、VB<sub>12</sub> 量が低値を示すことは古くから知られている。<sup>8)</sup> このように VB<sub>12</sub> の MBA においては不特定多数の妨害因子が存在すると考えられ、その影響を除くにはアルカリ処理のような特異性の低い方法では限界がある。より精確な分析法を確立するには、分取 HPLC を用い VB<sub>12</sub> 画分を精製・分取する等の分画方法を採用が必要と思われる。

最後に、検体に元々含まれる VB<sub>12</sub> (0.02-0.04 µg) に対して CN-cbl (0.116 µg) を添加し、回収試験を行った。今回、過剰量の

CN-cbl を用い添加回収実験を行っているため、結果は測定値の正確性ではなく、食品マトリックスの影響の有無を示している。その結果、実験者 1 はほぼ 100 %、実験者 2 では 100 % を数 10 % 超える回収率が得られた (Table 3)。実験者 2 で 100 % を超える回収率が得られた原因は不明であるが、食品マトリックスに VB<sub>12</sub> が結合し抽出が不十分である場合、回収率は 100 % 以下となると考えられるため、食品マトリックスによる抽出阻害はないと考えられる。また、測定値を ARF で補正すると、実験者 1 では 10 % 程度回収率が低くなったが、実験者 2 ではほとんど変化しなかった (Table 4)。添加している標品は純度が高いものを用いており、ARF を含有していないため、ARF を補正しても回収率には変化がないはずである。ARF の補正により実験者 1 は回収率が変動したが、その原因も不明である。以上の結果から、実験者 1 及び 2 のいずれにも矛盾する結果が含まれており、MBA を用いて高精度の分析を行うためにはさらなる改善を行う必要があると考えられた。

現在行われている MBA は試験管を用いて測定を行う。MBA では一般的に検量線のダイナミックレンジが狭く、検量線範囲内に収まるように多段階に希釈した複数の試験溶液に対し定量試験を行う。また、定量菌の増殖がばらつくため 2 連で実験を行う。そのため、必然的に多数の試験管を用い測定を行う必要が生じ、操作は非常に煩雑となる。さらに、今回データには示していないが、測定の最終段階で 600 nm の濁度を測定し定量菌の増殖度を測定する際、37 °C の恒温槽から取り出した培養液が室温に戻るに従って濁度が減少することを認めている。そのため、可能な限り短時間で濁度の測定を終える必要性があると考えられるが、試験管を用いる方



法では限界がある。近年、96 穴マイクロプレートを用いて菌培養を行い、プレートリーダーで測定を行う方法が開発されつつある。実験操作のさらなる簡略化、効率化のためにはマイクロプレート法の導入が非常に効果的であると思われる。

MBA による VB<sub>12</sub> 測定法は、本研究でも示したように、擬陽性因子の影響を完全に除くことは非常に困難であり、必ずしも含有される VB<sub>12</sub> を正確に測定できているとは限らない。それにもかかわらず MBA が VB<sub>12</sub> 分析法として汎用されている理由は、感度及び夾雑物に対する堅牢性から他に適した方法がないという理由からである。ところが、近年高感度分析機器の開発が進み、tandem MS や ECD 検出器を用いた方法を用いて MBA に匹敵する感度で VB<sub>12</sub> を測定することが可能であることが報告されている。<sup>9)</sup> 公定法における VB<sub>12</sub> の分析法として、将来的にはこれらの高感度分析機器を用いる方法の採用を検討する必要性が生じるであろう。しかし、現時点ではこれらの分析機器は非常に特殊で汎用機器とはいえないため、公定法として採用可能な分析法とはいえない。従って、公定法に MBA を基本として、その精度を高めるためさらなる改善を加えることが必要であると思われる。

#### E. 結論

現在 VB<sub>12</sub> の主たる分析法として認められている MBA について、公定法に記載されている分析操作の簡便化が可能であることが示された。妨害物質による影響の補正方法である ARF による補正を行うと、補正を行わない公定法に準じた測定結果と比較して 30 %程度低値を示す場合があることが明らかとなった。簡便法の標品添加回収実験は概ね良好な結果を示した。しかし、今回の検討

により幾つかの MBA の問題点が新たに明らかとなった。より正確な分析を行うためにはさらなる分析法の改良が必要であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### H. 参考文献

1) 厚生省生活衛生局食品保健課新食品保健対策室長通知: 栄養表示基準 (平成 8 年 5 月厚生省告示第 146 号) における栄養成分等の分析方法について, 平成 11 年 4 月 26 日付衛新第 13 号.

2) Okada, N. *et al.*, *Rep. Natl. Food Res. Inst.*, **54**, 58-61 (1990).

3)

<http://www.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/kanrikitei3.pdf>, 平成 21 年 3 月 19 日現在.

4) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査部会食品成分委員会資料: 五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル, 85 (2004).

5) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針, 理化学編, 107 (2005) 日本食品衛生協会.

6) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, edited by William Horwitz, 18th ed (2006).

7) Kamikubo, T. *et al.*, *Vitamin (Jpn)*, **14**, 36-40 (1958).

8) Kelleher, B.P. *et al.*, *Clin. Lab. Haematol.*, **12**(1), 87-95, (1990).

9) Lebidzinska, A. *et al.*, *J. Chromatogr. A* **1173**, 71-80 (2007).

**Table 1** 食品に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 定量値

	表示値	定量値			
		実験者 1		実験者 2	
Std	1.16µg/mL	1.15	0.96	1.29	1.36
Milk-1	2.0µg/100g	2.51	2.94	2.81	2.79
Milk-2	1.5µg/100g	2.39	2.76	2.70	1.92
Milk-3	2.0µg/100g	3.46	3.97	2.79	2.37
Milk-4	1.5µg/100g	2.08	1.97	1.74	1.77
Milk-5	1.3µg/100g	2.39	2.24	2.09	2.07
Milk-6	1.2µg/100g	0.98	1.06	2.33	2.12
Jelly-1	1.0µg/215g	1.00	0.72	2.27	2.24
Jelly-2	1.8µg/180g	2.49	2.32	2.82	2.64

**Table 2** アルカリ耐性因子を補正した食品に含まれるビタミン B<sub>12</sub> 定量値

	表示値	定量値			
		実験者 1		実験者 2	
Std	1.16µg/mL	1.13	0.95	1.21	1.09
Milk-1	2.0µg/100g	1.22	2.07	2.16	2.17
Milk-2	1.5µg/100g	2.39	2.76	2.05	1.18
Milk-3	2.0µg/100g	2.53	3.24	2.15	1.80
Milk-4	1.5µg/100g	1.14	1.28	1.06	1.08
Milk-5	1.3µg/100g	1.15	1.31	1.31	1.25
Milk-6	1.2µg/100g	0.98	1.06	1.54	1.40
Jelly-1	1.0µg/215g	0.54	0.39	2.08	2.07
Jelly-2	1.8µg/180g	1.58	1.58	2.67	2.39

**Table 3** 食品サンプルにおける添加回収試験結果

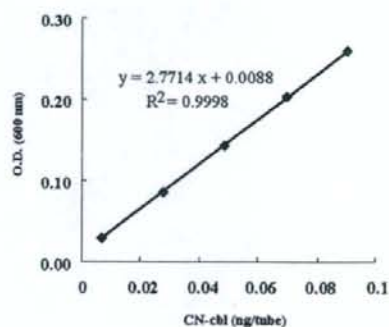
	回収率 (%)			
	実験者 1		実験者 2	
Milk-1	91.1	94.8	129.2	122.6
Milk-2	113.9	117.4	134.0	128.9
Milk-3	90.6	90.9	122.3	121.3
Milk-4	87.0	80.1	132.6	129.3
Milk-5	109.5	106.1	105.3	100.7
Milk-6	129.1	128.5	100.9	91.0
Jelly-1	100.6	95.0	118.0	113.9
Jelly-2	96.4	93.1	110.3	110.4

**Table 4** アルカリ耐性因子を補正した食品サンプルにおける添加回収試験結果

	回収率 (%)			
	実験者 1		実験者 2	
Milk-1	83.3	85.8	129.2	123.8
Milk-2	100.2	108.4	139.2	135.1
Milk-3	77.4	79.0	125.8	126.5
Milk-4	97.2	89.5	131.3	122.5
Milk-5	104.6	108.5	101.5	99.9
Milk-6	106.5	108.7	101.9	88.2
Jelly-1	97.6	92.1	119.3	115.3
Jelly-2	90.3	87.2	111.8	112.3

**Table 5** 培養前後における吸光度の変化

	培養前	培養後
Blank	0.008	0.017
Std (0.01ng)	0.009	0.030
Milk-1 (alkali)	0.035	0.049
Milk-4 (alkali)	0.039	0.055



**Fig. 1** CN-cbl による検量線

分担研究報告書

葉酸のバイオアッセイにおける精度向上に関する研究  
： 試料前処理条件の問題点

研究分担者 松本輝樹 国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム研究員  
研究協力者 遠藤香 国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム特別研究員

研究要旨 食品の栄養表示に関する成分分析は「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法（公定法）」（平成 11 年 4 月 26 日衛新第 13 号）に記載されている方法に基づき行われており、葉酸の主たる分析法は微生物学的定量法である。この測定手順において、食品試料からの葉酸抽出および酵素処理後の酵素失活を目的とし、2 回のオートクレーブ処理が行われているが、検量線を作成するための標準溶液は抽出および酵素処理が不要であるため、これらのオートクレーブ処理が除かれている。本研究では、近年発表された葉酸は熱により分解されるという報告を受け、オートクレーブ処理が葉酸の安定性に及ぼす影響について標準溶液を用いて検討した。その結果、オートクレーブ処理により 5.6% の葉酸が分解することが示された。前述したように、現行の公定法には試料のみをオートクレーブ処理する操作過程が 2 回あるため、葉酸量を過小評価してしまう可能性がある。また、食品マトリックスがオートクレーブ処理時の葉酸の安定性に及ぼす影響も考慮の上、今後より精確な分析法を確立する必要が示唆された。

A. 研究目的

葉酸は不安定であり、複数の分子種が存在することから分析が非常に困難である (1)。葉酸の分析法として微生物学的測定法、HPLC 法、EIA および RIA 等が知られているが、現在最も汎用されている方法は感度と夾雑物の影響を受けにくい点が優れている微生物学的測定法である (1)。日本において食品への栄養表示は、「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法（以下公定法）」（平成 11 年 4 月 26 日衛新第 13 号）に従った分析値に基づき表示されている。公定法における葉酸分析法としては、葉酸含量の多い食品につ

いては HPLC 法が認められているが、基本的には微生物学的測定法を用いることとされている。公定法における微生物学的定量法の概略を図 1 に示した。測定過程は、試料前処理、酵素反応および微生物学的測定の 3 つに分けられ、各過程にそれぞれ試料からの葉酸抽出、酵素失活および滅菌を目的としてオートクレーブ処理が行われる。ここで注意すべき点として、検量線を作成するための葉酸標準溶液に関しては、試料からの抽出および酵素反応が不要であるため、オートクレーブ処理を行わない点である。そのため、試料は標準溶液より 2 回多くオートクレーブ処理が

なされることになる。近年、葉酸が熱により分解することが報告されている(2)。従って、もしオートクレーブ処理により葉酸が分解するならば、現在の公定法では葉酸を正確に測定できない可能性がある。そこで、本研究ではオートクレーブ処理による葉酸の分解について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

葉酸標準液は葉酸(国立衛生試験所標準品)100 mgを0.01 M水酸化ナトリウム25%(V/V)エタノール溶液に溶かし、0.1 M塩酸(特級)でpH 7~8に調整後、25%(V/V)エタノール溶液で100 mLにした。さらに0.1 Mリン酸緩衝液で希釈したものを、葉酸標準液として使用した。

### 2. オートクレーブ処理による影響の検討

葉酸標準液を2つに分け、一方に公定法におけるオートクレーブ処理(121℃、15分)を行い、もう一方は未処理とした。この2つの試料に対し、*Lactobacillus rhamnosus*(ATCC 27773)を用いた微生物学的測定法により葉酸の測定を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究において用いた乳酸菌*Lactobacillus rhamnosus*は国立感染症研究所が定める病原体等安全管理規程の分類においてバイオセーフティーレベル1に設定されており、環境への影響などに特段の設備を必要とされていない。しかし、本菌の使用にあたっては通常の洗浄及び消毒をもって外部への流出を防止した。

## C. 研究結果

オートクレーブ処理により葉酸濃度は未

処理のものに対し94.4%となり(図2)、オートクレーブ処理により5.6%の葉酸が分解したと考えられる。

## D. 考察

葉酸標準液に121℃にて15分間オートクレーブ処理を行ったところ、葉酸は5.6%減少した。公定法では、試料溶液は標準溶液より2回多くオートクレーブ処理を行う(図1)。従って、現在の方法では葉酸含量が数%低く測定される可能性がある。Hyunらは、11種類の食品について、100℃で10分間加熱した試料と、加熱処理をしなかった試料の葉酸含量を比較した結果、加熱処理により平均で13.6%葉酸含量が低くなることを報告している(3)。注目すべきは、Hyunらの加熱条件が今回の実験のオートクレーブ処理より低温度、短時間であるにもかかわらず、今回の実験より葉酸減少率が大きい点である。このことは、食品マトリックスの影響で、加熱時の葉酸の安定性がさらに低下する可能性を示している。オートクレーブ処理による葉酸分解の影響を低減するには、標準溶液も試料と同じ回数オートクレーブ処理する方法が考えられるが、食品マトリックスが葉酸の安定性に影響するならば、それは不可能となる。食品マトリックスの影響は標品の食品試料への添加、回収実験を行い詳細に評価する必要があると考えられる。前述したように、試料のオートクレーブ処理は、試料からの葉酸抽出、酵素の失活、滅菌目的で3回行われている(図1)。オートクレーブ処理による葉酸減少の影響が除けないならば、食品からの抽出、酵素の失活をより穏和な条件下で行う、抗生物質耐性の*Lactobacillus rhamnosus*を使用することにより最後の滅菌操作を省略する等の検討を行う必要があると思われる。