

200939021A

厚生労働科学研究費補助金

~~厚生労働科学特別研究事業~~

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石見 佳子

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

検査機関の信頼性確保に関する研究

石見 佳子

1

II. 分担研究報告

1. 乳児用調製粉乳中のビタミン B₁₂ の室間分析精度管理に関する研究

石見佳子 松本輝樹 鈴木春奈

6

2. 乳児用調製粉乳中のビタミン D の室間分析精度管理に関する研究

石見佳子 竹林 純

15

3. 乳児用調製粉乳中のナトリウムの室間分析精度管理に関する研究

石見佳子 松本輝樹 鴨下 渚

31

4. 難消化性デキストリン分析方法の簡素化への取り組みと測定精度に関する検討

永田純一

38

5. 飲料中の茶カテキン類分析法の多施設間における検討

梅垣敬三 勝浦 彩

42

6. 食品中の大豆イソフラボンの室間分析精度管理に関する研究

石見佳子 谷中かおる

82

(別紙) 栄養表示基準に関わる分析方法の改訂に関する検討

98

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

316

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)
総括研究報告書

検査機関の信頼性確保に関する研究

研究代表者 石見 佳子

独立行政法人国立健康・栄養研究所

食品保健機能プログラムリーダー

本研究は、分析精度を含めた分析法の妥当性と登録試験機関における試験結果の信頼性の確保を行うため、利用頻度が高い機能性食品素材を用いた食品あるいは様々な成分からなる食品に焦点を当て検討を行った。本年度は、昨年度の室間共同試験でばらつきの大きかった、乳児用調製粉乳中のビタミン B12 およびビタミン D について標準作業書を作成して操作を統一するとともに、ビタミン B12 については、昨年度に誤差の要因と考えられた微生物定量法における定量菌の状態を統一し、室間共同試験を実施した。また、乳児用調製粉乳中のナトリウム、さらに、特定保健用食品の関与成分である大豆イソフラボン、茶カテキンについても室間共同試験を実施した。これらの試験は、全て非明示で実施した。また、難消化性デキストリンについて、pH の調製を行わない酵素反応と市販カートリッジカラムを用いた脱塩操作を組み合わせた簡便、迅速で精度の高い分析法の確立を試みた。結果、ビタミン B12 の分析値は併行再現性及び室間再現性に明らかな改善が認められたことから、ビタミン B12 の微生物定量法においては、定量菌の統一が重要であることが明らかになった。一方、ビタミン D については昨年度と同様に試験機関間でばらつきが認められたことから、公定法の見直しが必要である可能性が示唆された。茶カテキンの分析は、特異的な検出法である ECD 検出-HPLC 法および従来の2つの UV 検出-HPLC 法を用いて室間共同試験を実施したところ、UV 法 2 において最も良好な室間再現性が得られた。また、大豆イソフラボンに関しては、液状および粉末状の検体について良好な室間再現性が得られた。これにより、茶カテキンと大豆イソフラボンについては、採用した試験方法の妥当性が確認された。難消化性デキストリンの改良法では、操作時間の短縮と酵素反応の操作性が著しく向上した。栄養表示基準における栄養成分の分析法の見直しを行い、その妥当性を確認した。

分担研究者

独立行政法人国立健康・栄養研究所
食品保健機能プログラム 石見佳子
食品保健機能プログラム 永田純一
情報センター 梅垣敬三

A. 研究目的

天然物由来成分や新規食品成分を含む新開発食品が開発されているが、これら食品の分析法の妥当性ならびに精度管理に至るまでの検討はほとんど実施されていない。食品に

含まれる成分の表示値の妥当性の確保は、食品の安全性や有用性を保証する上で極めて重要であり、分析法と精度管理に関する取り組みは行政上早急に対応すべき課題である。

また健康増進法の改正に伴い、特別用途食品の許可時の試験が登録試験機関でも可能となり、各試験機関で実施する試験結果の精度管理は、安定した値を要求される許可試験では重要な問題である。しかし、各施設間の分析精度についてはこれまで検討されておらず、制度の安定した運用のためには各試験機関間で一定の評価が担保される必要がある。

本研究は、異なる複数の施設間において、分析精度を含めた分析法の妥当性と各試験機関における試験結果の信頼性の確保を行うため、利用頻度が高く、様々な食品形態の食品を用い分析値のばらつき、分析法、精度管理などに関する検討を行い、どの施設でも精度の高い結果を得るための管理法を探る試験研究である。

本年度は、①特別用途食品であり栄養成分が豊富な乳児用調製粉乳の分析精度管理に関する検討(石見班)と特定保健用食品の関与成分である②難消化性デキストリン(永田班)③茶カテキン(梅垣班)④大豆イソフラボン(石見班)の分析に関する室間共同試験を実施した。

本事業を通して、適正な分析を実施するための必須条件や問題点が明確にされ、各登録試験機関で行われる分析精度の標準化を図る指標となると共に登録試験機関間における精度管理のための基準策定を目指す。なお、協力研究機関は、(財)日本食品分析センター、(財)日本冷凍食品検査協会、(財)食品環境検査協会、大阪市立環境科学研究所の4登

録試験機関である。

B. 研究方法

(石見班)昨年度に実施した乳児用調製粉乳を用いた室間共同試験では、ビタミン B₁₂ およびビタミン D のばらつきが大きかったことから、今年度は両ビタミンについて、食品表示基準における栄養成分の分析方法(衛新第 13 号、平成 11 年 4 月 26 日通知)に従った公定法を基本として標準作業書を作成し、ビタミン B₁₂ については定量菌の状態についても統一した。試料にはアメリカ合衆国国立標準技術研究所 (NIST) から提供されている Standard Reference Material[®] 1849 (SRM 1849, Infant/Adult Nutritional Formula) を用い、非明示試験を実施した。

試験結果は、平均値、表示値に対する割合、標準偏差および相対標準偏差(変動係数:CV)、併行相対標準偏差 (RSD_r)で表し、施設間の分析精度の指標としては、室間再現相対標準偏差 (RSD_R)を、分析方法の妥当性の確認のための値としてHORRAT 値を算出した。ナトリウムについても、室間共同試験を実施した。

(永田班)難消化性デキストリンについて、緩衝作用に優れた MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonicacid)/Tris-(2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) Buffer を用い pH の調製を行わない酵素反応と市販カートリッジカラムを用いた脱塩操作を組み合わせた簡便、迅速で精度の高い分析法の確立を試みるため、難消化性デキストリンを含む食品を用いて、従来用いられている分析方法による分析値との比較検討を行った。また、新たな方法で処理した内部標準物質および難消化性デキストリン標準品の直線性あるいは検出感

度に関する試験を実施し、分析精度に関する検討を行った。

(梅垣班)茶カテキンについて、ECD-HPLC 法および 2 種類の UV-HPLC 法の室間共同試験を実施した。各試験機関に緑茶飲料のモデルと 8 種の標準品混合物を配布し、定性試験、検出限界、検体中の茶カテキン量、規格化された緑茶抽出物を用いた添加回収率の算出、ピークの分離が問題となった場合の分離度・分離係数の比較を行った。

(石見班)大豆イソフラボンの分析方法の妥当性を確認するため、厚生労働省が通知した「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取扱いに関する指針(食安発第 0823001 号)」の方法に基づき、室間共同試験を実施した。マトリックスとしては、液状および粉末を選択し、各々 3 濃度を試験機関に配布し、非明示試験を実施した。

C. 研究結果

(石見班)乳児用調製粉乳中のビタミン B₁₂ の分析は、検体に含まれる B₁₂ を非明示にしたにも拘らず、併行再現性(RSD_r=6.7)および室間再現性(RSD_R=9.4)ともに良好な結果が得られた。ビタミン D に関しては、3 機関では良好な結果が得られたが、2 機関では満足な結果が得られなかった。原因として、分取 逆相 HPLC サンプル調製時の不溶物の影響が疑われ、解決法として、分取 HPLC を順相で、分析 順相 HPLC を逆相で行うことで、不溶物を生じさせない方法が考えられた。また、測定回数を増加させることで VD の分析精度を向上することができるが、そのためには、同一日の繰り返し分析回数を増加するより、日を違えての分析を複数回行うことが有効であることが示唆された。ナトリウムの室間共同試験では、

併行再現性に関しては許容誤差範囲内の結果が得られたが(RSD_r =1.9)、1 機関が異なる分析方法を用いていたため、室間再現性では許容範囲を超えていた(RSD_R=10.3)。

一方、昨年度提案した栄養表示基準の改定分析方法で得られたデータを検証したところ、ビタミン類、ミネラル類、脂肪酸類、糖類、有機酸において、分析方法の妥当性が確認された。

(永田班)難消化性デキストリンについて、従来の分析法では、酵素による加水分解を行う際に至適 pH への調製やイオン交換用カラムクロマトを用いた脱塩処理が必要であったが、今回使用した酵素とバッファーは、pH の調製を必要としないことで操作時間の短縮と酵素反応の操作性が著しく向上した。この酵素を用いた酵素-重量法による食物繊維の分析が Kanaya らによって示され、再現性が高い酵素処理が可能であることを明らかにしている。すなわち今回使用した酵素によって食物繊維分析における酵素加水分解が良好に行われることが示されている。また、市販のカートリッジカラムを使用することで、カラム処理にかかる時間も短縮され溶媒も少量(200ml から 10ml にスケールダウン)で処理が可能となった。

(梅垣班)室間共同試験における茶カテキンの分析結果より、検討した HPLC-UV 法の 1 つが優れていること(併行再現性 RSD_r=5.0、室間再現性 RSD_R=6.6、HORRAT 値=1.1)、また、夾雑物が多く、含有量が微量である飲料の分析には、高感度で特異性の高い HPLC-ECD 法が適していることが示された。

(石見班)大豆イソフラボン分析に関して、液状食品の併行再現性(RSD_r)および室間再現性(RSD_R)はともに 5%以下であり、分析方法の妥当性確認のための値である HORRAT 値

も 0.5 付近と良好な値を示した。一方、粉末状食品では、室間再現性(RSD_R)は 9.5–10.5% の範囲であり、HORRAT 値 2.0–3.1 とやや高値を示した。これらの結果より、通知の方法について、液状食品中の大豆イソフラボンの定量方法としての妥当性が確認された。

D. 考察

今年度は、乳児用調製粉乳中のビタミン B₁₂、ビタミン D、ナトリウムおよび特定保健用食品の関与成分である茶カテキン、大豆イソフラボンについて、多施設間の精度管理試験を実施した。また、難消化性デキストリンの分析方法を改良するとともに、昨年度提案した栄養表示基準の改定分析方法で得られたデータを検証した。

乳児用調製粉乳中のビタミン B₁₂ の分析では、公定法によっておおむね良好な結果が得られた。また、微生物測定法における菌体の取り扱いが重要であることが明らかとなったが、通常業務において各試験機関で保管している菌の状態を確認するための判断基準が必要であると考えられた。

ビタミン D の分析では、試験機関によっては結果がばらついた。公定法における VD の分析法は、まず逆相 HPLC で分取を行い、次いで順相 HPLC で分析を行うが、分取クロマト後の夾雑物の析出が著しいこと、この析出物が分析精度に影響を及ぼすことが考えられたことから、今後は逆相クロマトと順相クロマトの順序を逆にするなど、不溶物が生じないよう、公定法の改訂が必要であると考えられた。

調製粉乳中のナトリウムの分析では、B 試験機関が ICP 法により、その他の機関が原子吸光法により分析を実施しており、分析方法が統一されていなかったことが、室間再現性に影響

したと考えられた。

難消化性デキストリンの分析では、従来の方法で分析を行った分析値は理論値に対して 101%であったのに対し、新たに用いた方法では、133%と高い値を示したことから、今回示した難消化性デキストリンの分析方法は、従来法と比較しても十分な検出感度を示し、再現性に優れた良好な分析法であることが示されたが、理論値との乖離を抑える検討が必要と考えられた。

茶カテキンの室間共同試験において、ECD 法は UV 法と比較すると、併行再現性(RSD_R, %)、室間再現性(RSD_R, %)、HORRAT 値が大きかった。この要因として、検出器が不安定なことが考えられる。ECD 検出器は、感度・特異性が高いためカテキン類の分析には有用であるが、安定しにくいという難点があり、良好な室間再現性が得られなかったと考えられる。一方で UV 法 2 では、両方の検体で HORRAT 値が 1.5 以下となり、良好な室間再現性が得られた。

大豆イソフラボンの室間共同試験では、液状食品では併行再現性(RSD_R, %)、室間再現性(RSD_R, %)ともに良好であり、HORRAT 値も 0.5 付近であった。一方、粉末状食品では HORRAT 値が、濃度によっては 2 を越えていた。この要因として、液状に比べて粉末食品では、資料採取時に誤差が生じること、抽出操作が加わること等が考えられた。今後は、健康食品など様々な形態の食品について、多施設間の精度管理を実施する必要があると考えられた。

昨年度、本研究を遂行するにあたり、多くの分析法に関する問題点が指摘された。今年度は、昨年度見直しを提案した栄養成分の分析方法で得られたデータを検証し、十分な妥当

性があることを確認した。

E. 結論

栄養成分を多く含む乳児用調製粉乳の分析は、ビタミン B₁₂ については、標準作業書の作成と定量菌の状態を統一することで良好な分析結果が得られることが明らかになった。ビタミン D は公定法の見直しが急務である。

茶カテキンおよび大豆イソフラボン分析は、適正な分析法の提示が可能となった。難消化性デキストリンは、今年度に改良した分析方法を用いて、次年度に室間共同試験を実施する予定である。昨年度に見直した栄養表示基準の栄養成分の分析法の妥当性が確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 知的所有権の取得状況

特になし

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)
分担研究者の報告書

乳児用調製粉乳中のビタミン B₁₂ の室間分析精度管理に関する研究

研究分担者 石見佳子 (独)国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム
研究協力者 松本輝樹 (独)国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム
研究協力者 鈴木春奈 (独)国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム

協力試験機関

(財)日本食品分析センター・(財)日本冷凍食品検査協会
(財)食品環境検査協会・大阪市立環境科学研究所

研究要旨 健康増進法の改正に伴い、特別用途食品の許認可試験は登録試験機関においても実施されている。しかし、各施設間の分析精度についてはこれまで検討されておらず、制度の安定運用のためには各試験機関間で一定の評価が必要不可欠である。

昨年度は市販の乳児用調製粉乳を用いたビタミン B₁₂ (VB₁₂) の検討を研究機関毎の分析法によって検討したところ、許容範囲内の結果ではあったが試験機関内での分散が大きく、分析法に問題があることが明らかとなった。

そこで本年度は、試験室間での分析結果が比較検討を行えるよう分析法を明示・制限し、昨年度に誤差の要因と考えられた定量菌の状態を統一し、分析精度に関して検討を行った。その結果、検体に含まれる VB₁₂ を非明示にしたにも拘らず、本年度の結果は昨年度のものよりも併行精度及び室間再現性に明らかな改善が認められた。

A. 研究目的

健康増進法の改正¹⁾に伴い、特別用途食品の許認可試験は現在6つの登録試験機関においても行われている。しかし、各施設間の分析精度についてはこれまで検討されておらず、制度の安定運用のためには各試験機関間で一定の評価が担保される必要がある。

昨年度は現在の状況を把握するべく、各研究機関における分析法の運用状況を、市販の

調製粉乳を検体として確認した。その結果、測定対象成分によって各機関間での結果に違いがあるものとならないものに分かれる結果となった。ただし、含有量を明らかにしたことや試験方法に制限がなかったことから、試験機関によって試行回数が異なるなど、比較検討するには、至れなかった。

そこで、本年度は検査機関間での分析値が妥当であるかを確認するために、認証標準物

質 (CRM) を用いた室間再現精度に関して検討を行うこととした。

昨年度検討した粉ミルクに含有される成分のうち、ビタミン B₁₂ (VB₁₂) は含有量も少なく、公定法²⁾である微生物学的定量法 (MBA) に再現性や精度に問題があることが知られている。そのため、その測定に関する許容範囲は +80 % ~ -20 % に設定されており、³⁾ 機関間での許容は最大 100 % ある。昨年度の検討では、最大で変動係数 (CV) が 50 % 近くを示した機関もあり、許容範囲内であるものの、分析値の信頼性の観点から好ましいとは言い難い。そこで、昨年度に引き続き本年度の測定対象成分として VB₁₂ に関して検討することとした。また、室間妥当性確認においては、妥当性確認された分析法の使用が前提となるが、公定法は対象外である。しかし、前年度の結果は分析法が遵守されていることが伺えなかったため、本年度は公定法を基に分析法をこちらから提示し、極力操作法に誤差のないように配慮した。さらに、VB₁₂ の定量は、菌の生育状態が結果に大きく影響することが知られていることから、菌体及びその生育に関わる試薬をこちらから指定し、公定法には記載のない操作方法に関しても明記した。

また、昨年度は分析値を意図的に表示値に近づけることも可能であったことから、本年度は検体に含まれる含有量を非明示とし、結果のすり合わせが行われないよう配慮した。

B. 研究方法

試料には CRM であるアメリカ合衆国国立標準技術研究所 (NIST) から提供されている Standard Reference Material[®] 1849 (SRM 1849, Infant/Adult Nutritional Formula) を用いた。⁴⁾

分析方法は、公定法に準拠した微生物定量法 (MBA) の標準作業書 (SOP) を作成し実施した。ただし、検体の VB₁₂ 含有量は非明示とし、

分析に用いる検体の量は妥当性担保のため CRM 推奨の使用量に制限した。なお、実験に際し試薬調製や操作方法などに関しては全て SOP に記載し、それに従った分析方法を実施した。詳細については Table 1 に記載する。

(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⁵⁾ 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、協力研究機関にもその励行をお願いした。

C. 研究結果

昨年度は分析に際し、特に制限を付与しなかったことから、検討回数や分析方法、分析法に違いが生じており、結果にもその影響が反映されていると考えられた。そこで、昨年度の分析法に関しては、本年度の SOP にて回答をいただいた。その結果、前年度は 1 機関がマイクロプレートを用いた検討を行った以外は、ほぼ公定法通りの測定法にて行われていた。相違点については Table 1 に記載する。

本年度は試料採取量や試行回数を制限し、分析法の妥当性を明らかにすると共に室間再現性を明らかにすることを目的とした。また、含有量を非明示にすることにより、数値のすり合わせの影響を回避した。

本年度の検討結果を Table 2 に示す。

各機関の回答から、本年度は SOP 記載の操作法から大きな変更点はなく、比較検討に差し支えない結果が得られた。また、一部の機関において、データの棄却が行われていたが、その前後で結果に大きな変動はなかった (データ不記)。

検討した SRM1849 には VB₁₂ として 4.0 μg/100 g 含まれており、各研究機関の試験結果は、現在栄養成分の分析法において記載されている許容範囲内 (+80 %~ -20 %) に収まっていた。標準偏差 (SD) は前年度 (SD= 0.1~ 0.5) とほぼ変わらないが、試行回数の差を考慮すると本検討が妥当であると考えられる。また、分析法に差があることから純粋な比較は出来ないが、本検討は SRM 1849 に記載されている分析値より SD 値が小さく、良好な結果が得られたものと考えられた。

前年度は分析法や試行回数が固定されていないこと、及び本年度は試行回数が不足しているため、統計解析を行うためには不適切であるが、併行相対標準偏差 (RSD_D) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を求めたところ、前年度よりも改善されたことが明らかとなった (Table 3)。また HORRAT 値も前年度に比べて改善を認めているが、AOAC の規定する範囲 (0.5~ 2.0) からは逸脱しており、⁶⁾ 分析において何らかの問題点が含まれていることが明らかとなった。なお、室間再現相対標準偏差の経験則の値 (P·RSD_R) の算出においては Thompson による修正式 ⁷⁾ の適応が妥当であると考えられるが、本検討においては大きな違いがないことから Horwitz の式の近似式 $P \cdot RSD_R, \% = 2C^{0.15}$ を用いた。

D. 考察

○公定法との違い

今回検討を行うに当たり、公定法に記載のないものや変更点に関しては Table 1 に記載した。

昨今 VB₁₂ assay において必要とされる注意点を【全般】に記載したが、今回は指示しなかった。遮光の必要性に関しては、各研究機関での状況が把握できないこと。培養時の通気性に関しては全体の生育に影響があるのみで結果

への影響は軽微であること。アルカリ耐性因子については、天然の特に植物性の検体を取り扱う際に注意を必要とするが、今回は加工品であることなどを考慮した。

○菌の状態

VB₁₂ の定量化には *L. delbrueckii* subsp. *lactis* を用いるが、菌の状態が定量値に影響するため、本年度は定量前の培養方法に関する記載した。一般に凍結保存や乾燥状態にある菌を用いた際には、明らかなレスポンスの低下を来すことが知られている。これを回避するために前培養が必要となるが、不必要な培養や継代はかえって VB₁₂ に対するレスポンスの消失を招くことから、注意が必要である。前年度は各研究機関が所有している菌体を用いて検討を行ったが、その取り扱いに関しては指示がなかったため、菌の影響を棄却することが出来なかった。よって、本年度は菌を更新することにより改善することとした。

ただし、実際の許認可試験において菌を更新することは、経済的負担や時間の損失に繋がることから、各機関にて保管している菌の状態を確認するための何らかの判断基準が必要であると考えられる。

○検量線

今回検討にあたり、解析方法は各機関の方法に一任した。検量線の作成に当たって近似方法は様々であったが (Table 2)、報告結果に大きな差を与えてはいないことから、解析方法の違いが前年度の結果に影響を与えてはいないと考えられた。

一般に菌の増殖はシグモイドに帰属されることが知られており、本検討でも 2 機関からその回答を得た。ただし、シグモイドに帰属した際、誤差の取扱いに注意を要することや一般性に欠けることが考えられることから、室間試験で適応するのは容易ではない。また、多項式近似の際も同様のことが考えられる。

各機関からの結果を線形（上限値を 0.15 ng と 0.10 ng に設定）及び多項式近似にて検量線を作成し、全て解析し直した際の結果を Table 3 に示す。得られた結果は先の報告値から 5 % 減少し、数値としてはより表示値に近い値を示し、 RSD_r は集計時よりほぼ一致するか収束する結果となった。

現在の公定法では検量線の測定範囲に関する記載はあるが、測定点に関する記述はない。今回検討した範囲も公定法に準ずるものであるが、検量線を直線に近似させた際、0.15 ng 相当においては各研究機関の結果共レスポンスの明らかな低下が観測された (Fig. 1)。しかし、このことは先にも述べた菌体の増殖特性に伴うものと考えられる。上限を 0.15 ng に設定したものと 0.1 ng に設定したものを比較した際、相関係数は全機関平均 0.96 から 0.99 に改善される。また、傾きも 20 % 近く改善することから、上限を 0.1 ng に設定することにより、比較的容易に真値に近づけることが可能であると考えられた。また、今回の検討範囲では多項式近似（二次）の際、 RSD_r が最も小さい値を示しているが、上限値 0.1 ng の直線近似も遜色ない値を示しており、汎用性の観点からも有効であると考えられる。

○結果

今回分析法を統一することにより、各機関からの試験結果に大きな違いは認められなかった。よって、公定法が遵守されていれば、結果に影響を与えることはないと考えられる。ただし、そのためには現行法にて記載のない点についても表記し、極力操作に差の出ない分析法を構築する必要がある。

○トラブル

今回 1 機関において、定量値の明らかな誤検出（定量値が高い）が認められた。報告によると、操作に明らかなミスもなく、作成された検

量線を他機関のものと比較しても (Fig. 1) 明らかに劣っていることもないことから、原因の解明には至っていない。しかし、定量値が高い要因としては、検量線の作成に用いた標準溶液の劣化、定量培地の冷却不足による菌の不均一化など人為的な要因と、不溶物の存在や擬陽性物質の影響など検体による影響が考えられる。VB₁₂ の標準品として用いたシアノコバラミン (CN-cbl) は比較的熱にも光にも安定であるが、検量線の作成に用いる量は極微量であり、標準原液に比較してその影響は受け易い。今回の検討では、他機関からの報告に検体の影響が反映されていないと判断されることから、詳細については今後も精査すべき課題である。

○微生物定量法 (MBA) について

VB₁₂ の定量に用いる MBA は感度も高く、複数の活性物質を測定できる点で優れている。特に、日本国内では栄養強化のために添加された成分に関しては表記しなくても良いことから、不確定要素を取り除く意味でも有効である。ただし、その測定には時間を要することや再現性に問題があることが指摘されており、代替法の創出が望まれている。

日本国内においては VB₁₂ の食品添加物として認められているのは CN-cbl のみであり、比較的高濃度かつ CN-cbl のみが存在する際は MBA ではなく、他の分析法による定量化も可能であると考えられる。いわゆる健康食品や栄養機能食品などはその最たるものであり、今後これらの定量法については代替法の開発が試験機関での負担軽減や精度向上に大きく寄与するものと考えられる。

○他の公定法との比較

本検討で得られた HORRAT 値は 0.5 以下を示しており、AOAC のガイドラインに記載されている許容範囲 (0.5~2.0) を超える結果となった。⁹⁾ 予め試行回数が不足していることも原因の一つとして考えられるが、本検討には何らかの間

題点が含まれていることが予期されることから、分析法に着目した。今回一例としてアメリカ薬局方 (USP)⁸⁾ に記載されているVB₁₂に関する定量法と公定法との違いについて検討し、問題点がないか精査したところ、以下のことが明らかとなった。

第一に、前培養に関する条件、培養後の菌の生育停止操作、吸光度測定における表示値の確認方法などが、USP には詳細に記載されており、その重要性が予期された。特に、本検討では吸光度測定に関する指示はしていないことから、その影響は無視できない。

二番目に、培地の不必要な加熱は色素成分の形成を招くことから、オートクレーブによる滅菌前後に注意が必要であると記載があった。培地の滅菌は非加熱でも可能であるが、市販の粉末培地においては、操作法の変更による応答性の変化については担保していないため、遵守する必要があった。また、今回の検討に用いた粉乳には糖分として乳糖を多く含むため褐変し易く、先に述べたトラブルの要因として考えられなくもない。

最後に今回検討した CN-cbl による検量線の作成では、濃度 0.01~ 0.03 ng/mL の範囲で行ったが、USP においては 0.001~ 0.02 ng/mL に設定されていた。また、この範囲において検量線は直線近似になるとも記載があり、先の考察を支持していた。ただし、最も観測点を近似する曲線も可能であると記載があることから、検量線の近似方法は問題ではないことが明らかとなった。

以上のことから、検査機関における分析の信頼性確保には、分析法を遵守することが肝要であると共に、これまで記載されていなかった詳細事項についても記述をすることが重要である。

E. 結論

検査機関間の信頼性確保のための研究として、乳児用調製粉乳に含まれる VB₁₂ に関して検討を行った。現在 VB₁₂ 分析に関しては微生物学的定量法が記載されているが、詳細条件に関する記載がなく、必ずしも多機関で同じ結果が得られる状態ではなかった。しかし、詳細に関し明示することにより分析値は収束することが明らかとなったことから、現行法の修正が必要であると考えられる。

VB₁₂ は食品含有量が少なく、現状では汎用分析法として MBA が最適であり、現行法を修正することにより、信頼性は担保されると考えられる。

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) 健康増進法の一部を改正する法律，平成 15 年 5 月 30 日法律第 56 号.
- 2) 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.
- 3) 栄養表示基準，平成 15 年 4 月 24 日厚生労働省告示第 176 号
- 4)
https://rproxy.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=1849 , browsed on April 23rd, 2010.
- 5)
http://www.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/kanrikitei3_0904.pdf , browsed on April 23rd, 2010.

6) AOAC Int. (2003). Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int.17 ed. volume II, Gaithersburg, MD,USA.

7) Thompson, M., *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).

8) United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2005. The United States pharmacopeia 29/ The national formulary 24 – 2005. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.; <http://www.pharmacopeia.cn/usp.asp> , browsed on April 23rd, 2010

Table 1 標準作業書

	公定法	標準作業書	注記点
シアンコバラミン標準溶液	シアンコバラミン(国立衛生試験所標準品)10mgを25%(V/V)エタノール溶液に溶かし正確に100 mLとする。更に、水で希釈して0.1ng/mLとなるようにする。	シアンコバラミン(日本薬局方標準品)10mgを25%(V/V)エタノール溶液に溶かし正確に100 mLとする。更に、水で希釈して0.1ng/mLとなるようにする。	秤量時0.1mg単位まで求めること。また、希釈はマイクロピペット、メスピペット、メスフラスコなどを用い精密に行う。標準品は水分含量として3%含む。稀释時に補正する。密封後は密閉保存。
酢酸鉄溶液	—	酢酸 19.8 mL、酢酸ナトリウム三水合物 38.56 g を水 500 mL に溶解する (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 の溶液を調製する。	
10%メタリン酸溶液	—	記載なし	
測定用培地	公定法に記載の通りに混和	B12 Assay Medium USP (245710): Becton Dickinson and Company	メーカー推奨の調整法を採用する。こちらから配布します。
保存用培地	公定法に記載の通りに混和	ライヒマニ保存用培地: ニュッスイ	メーカー推奨の調整法を採用する。他メーカーの使用可。
前培養培地	保存用培地より粉末薬を除去	ライヒマニ接種用培地: ニュッスイ	メーカー推奨の調整法を採用する。他メーカーの使用可。
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC7830	NBRCより購入	種元は予め滅菌した接種用培地に懸濁させた凍結菌を種代(前培養)に用いる(固浮液液)。
	記載なし	試験管に 5 mL の接種用培地を分注し、121 °C で 10 分間オートクレープ処理をする。	メーカー推奨の調整法を採用する。
	記載なし	37 °C、20 × 4 hr 培養した固浮液から、4白金皿 or 40 μL 種を種く。これを最低 2 回行い、試験に用いる。	前培養の有効な回数に関しては検討していません。
	記載なし	菌を凍結保存する際は、培養液 1 mL を 3000 rpm、5 min で遠心分離し、凍便生理食塩水で 2 回洗浄する。最後に滅菌した 10% グリセロール水溶液を加え、-80 °C で凍結する。	原則として記載します。詳細は各研究機関にお任せします。保存用培地による種代についても、assay 前に液体培地での培養をする。
	固浮液を遠心分離し、凍便生理食塩水で 2 回洗浄する。	固浮液 1 mL を 3000 rpm、5 min で遠心分離し、凍便生理食塩水で 2 回洗浄する。	培養液全量を用いても良い。
	洗浄後、透過率 80-90% となるように凍便生理食塩水で希釈し、接種液とする。	洗浄後、透過率 89% (吸光度 0.050, 600 nm) となるように凍便生理食塩水で希釈し、接種液とする。	透過率は小数点第 1 位まで測れるものを用い、±1% の誤差まで許容する。吸光度は小数点第 3 位まで測れるものを用い、±10% の誤差まで許容する。
	試料 2 g を精密に量り、酢酸ナトリウム標準液 10 mL、水 40 mL 及びシアン化カリウム溶液 0.4 mL を加える。	試料 2 g (±10% 以内) を精密に量り、酢酸ナトリウム標準液 10 mL、水 40 mL 及びシアン化カリウム溶液 0.4 mL を加える。	秤量時 0.1mg 単位まで求めること。
	100 °C で 30 分間加熱した後、冷却し、10%メタリン酸 0.6 mL を加え、正確に 100 mL としたものを調製する。	105 °C で 30 分間オートクレープ加熱した後、冷却し、10%メタリン酸 0.6 mL を加え、正確に 100 mL としたものを調製する。	時間及び温度は厳守とする。
	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 20 倍希釈する。これを試験液とする。	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 20 倍希釈する。これを試験液とする。	ろ液の一定量に対して 20 倍希釈をお願いいたします。
	—	試験管 2 本ずつに試験液 0.5、1.0 及び 2.0 mL を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を 5 mL とする。	マイクロピペットやメスピペットなどを用い、全量が 5 mL となるようにする。各測定点での試験管本数は増加しても良い。
	別に検量線作成のため、ビタミン B ₁₂ 標準溶液 (0.00-0.15 ng 相当量) を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を 5 mL とする。	別に検量線作成のため、ビタミン B ₁₂ 標準溶液 (0.00, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.10, 0.15 ng 相当量) を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を 5 mL とする。	同上。
	121 °C で 5 分間オートクレープ処理を行い、冷却後、各試験管に接種液 1 滴 (約 30 μL) ずつを無菌的に接種し、37 °C で 22 時間恒温水槽に入れて培養する。	121 °C で 5 分間オートクレープ処理を行い、冷却後、各試験管に接種液 30 μL ずつを無菌的に接種し、37 °C で 22 時間恒温水槽に入れて培養する。	定期的に 37 °C が保てる機器であれば恒温水槽に設定しない。
	培養後、増殖度を 600 nm の濃度を用いて測定する。	培養後、105 °C で 1 分間オートクレープ処理した後、検体を室温に戻し、増殖度を 600 nm の濃度を用いて測定する。	測定時小数点第 3 位まで求めること。吸光度測定時に希釈することは可能(右の欄に詳細を報告してください)。
	—	標準溶液の吸光度より検量線を作成し、これに試験液より得られた濃度を照合して、試験溶液中のビタミン B ₁₂ 量を求める。	
判定方法	記載なし	各試験機種の作業書に基づく	適合のみデータシートに記載してください。
		各研究機関での作業書による B12 濃度	n=1 (一回秤量分) を基準として報告してください。
		生データ全て(吸光度、秤量値、検量線や試験溶液などの吸光度または透過率全て)	記入例はシート「報告用データシート」に記載します。
		検量線の近似方法	線形、多項式、シグモイド、その他など
		今回の標準作業書からの変更点	本シート、「変更した点(今回)」に記載してください。
		昨年度の分析法(公定法との相違点)	本シート、「昨年度の分析法」に記載してください。
透光の必要性	記載なし	可能な限り透光器具を使用すること	濃度の薄、ものほど影響を受けやすいので、注意が必要です。
培養時の状態について	記載なし	透光性の有無は指定しない	
アルカリ耐性因子について	記載なし	検討しない	広くその存在を指摘されますが、今回は検討しません。

変更した点 (今回)	昨年度の分析法
【試薬調製】	
	A: 0.1 mg/mL 溶液は用時調製 B: ビタミン B12 標準品 10 mg を 25 % (V/V) エタノール溶液に溶解後、100 mL に定容する。ビタミン B12 標準溶液を蒸留水で 1 ng/mL とする。シリンジフィルターでろ過除菌する。 C: 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 とする。その標準溶液を水で 5 倍希釈した溶液 (20 µg/mL) について 361 nm で吸光度を測定し標準溶液の濃度を算出する。更に、水で希釈して 0.1 ng/mL とする。 (力価) = 10 × A (吸光度) ÷ 0.207 (シアノコバラミン 10 µg/mL のときの吸光度) × 5 (希釈倍率)
【培養調製】	
	B: 日本製薬製 ビタミン B12 定量用基礎培地セットを使用 D, E: Bacto Vitamin B12 Assay Medium (Difco)
E: B12 Culture Agar USP (Difco)	E: B12 Culture Agar (Difco)
E: B12 Inoculum Broth USP (Difco)	B: ライ化マニ接種用培地: ニッスイ E: B12 Inoculum Broth (Difco)
【菌株調製】	
	B, C, E: ATCC 7830 D: ATCC 番号は同じだが、購入元が違う。
【前培養条件】	
E: 試験管に 10 mL の接種用培地を分注し、121 °C、10 min オートクレーブ処理する。	C: 試験管に 5 mL の接種用培地を分注し、121 °C、10 min オートクレーブ処理する。 E: 試験管に 10 mL の保存用、接種用培地を分注し、121 °C、15 min オートクレーブ処理する。
A, B, D: 2 回接種したものを使用	C: 37 °C、20 ± 4 hr 培養する。 E: 保存用培地の保存容器から接種用培地に接種し、37 °C、21 ± 3 hr 培養し試験に用いる。
B: 培養液 2 mL を 3000 rpm、5 min で遠心分離し、滅菌生理食塩水で 3 回洗浄する。最後に滅菌した 10 % グリセロール水溶液を加え、-80 °C で保存する。 D: 保存用培地の状態で凍結保存 (-80 °C)	C: 凍結せず E: 保存用培地に 37 °C、20 hr 培養し、冷所に保存する。接種用培地に接種する前に保存用培地に凍結解凍。
【採取菌液の調製】	
B, C, D: 全量使用 E: 菌芽液 10 mL を 3000 rpm、5 min で遠心分離し、滅菌生理食塩水で 5 回洗浄する。	C, E: 接種用培地の培養液全量を 3000 rpm、5 min 遠心分離し、滅菌生理食塩水で 3 回洗浄する。
	C: 滅菌生理食塩水で吸光度 0.02 (600 nm) に調整したものを試験に用いる。 D: 接種菌液の吸光度は今回と同様。 E: 洗浄後、透過率 80-90 % となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。
【試験溶液の調製】	
	B: 試料 1 g を 50 mL 褐色遠沈管に採取し、蒸留水 40 mL、酢酸緩衝液 10 mL、及び 0.05 % (W/V) シアン化カリウム溶液 0.4 mL を加え、濁液で 30 min 常温抽出する。冷却後、10 % (W/V) メタリン酸溶液 0.6 mL を加える。 C: 試料 1 g を精密に量り、酢酸ナトリウム緩衝液 5 mL、水 20 mL、及びシアン化カリウム溶液 0.2 mL を加える。 E: 試料 2 g を少容量第 2 位まで量り、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 を加える。
E: 105 °C、30 min オートクレーブ加熱した後、冷却し、10 % メタリン酸 0.6 mL を加え、pH 6.0 に調整後、正確に 100 mL としたものをろ過する。	C: 100 °C、30 min 加熱した後冷却し、10 % メタリン酸 0.3 mL を加え、正確に 50 mL とし、遠心分離して上清を抽出する。 D: 100 °C、30 min で抽出 E: 沸騰水浴で 30 min 加熱した後冷却し、10 % メタリン酸 0.6 mL を加え、正確に 100 mL としたものをろ過する。
A: 1 mL を 100 mL に希釈 B: 2.5 mL を 50 mL に希釈 E: ろ液 1 mL を 20 mL 容のメスフラスコに分離し、20 倍希釈液を作成。	B: 試験溶液を pH 6.0 ± 0.5 に調整した後、蒸留水で 100 mL に定容する。蒸留水で 2 倍に希釈しシリンジフィルターでろ過除菌したものを試験溶液とする。 C: 上清 25 mL を取り、pH 6.0 に調整した後、水で 50 mL に定容後ろ過する。ろ液をさらに水で希釈して溶液 1 mL がビタミン B12 が 0.02-0.04 ng 含むものとする。 D: 変更なし (希釈倍率は異なる) E: ろ液の一定量を正確に量り pH 6.0 に調整した後、水で正確に希釈する。更に溶液 1 mL 中にビタミン B12 が 0.02-0.04 ng 含むよう水で希釈し、試験溶液とする。
【測定培養】	
A, C: 試験管本数 3 本で実施した。 D: 各本 2 本で実施	B: 96 well 希釈用マイクロプレートによって試験溶液を段階希釈する。段階希釈した溶液を 96 well 培養用マイクロプレートに移す。ろ過除菌した定量用培地に採取菌液を加え混合したものを培養用マイクロプレートに加える。 E: 試験管 2 本ずつに試験溶液 0.5, 1.0, 1.5 及び 2.0 mL を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 mL、及び水を加えて全量を 5 mL とする。
A, C: 試験管本数 3 本で実施した。 D: 各本 2 本で実施	B: 同様の 96 well 希釈用マイクロプレートによって標準溶液を段階希釈する。 C, E: 別に検量線作成のため、ビタミン B12 標準溶液 (0.00, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.10, 0.15 ng 相当量) を試験管 2 本ずつに、それぞれに測定用培地 2.5 mL、及び水を加えて全量を 5 mL とする。
A, C: 恒温槽で培養した。 B: インキュベーターを使用 (日立社製: CRB-32) E: 37 °C 設定のみ制御使用。	A: 37 °C、21 hr 培養する。 B: 嫌気培養装置内で 37 °C、16-20 hr 培養する。 C, E: 121 °C、5 min オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液 1 滴 (約 30 µL) ずつを無菌的に接種し、37 °C、21 ± 3 hr 培養する。 D: 接種菌液の接種量は、パスワールピペットで 1 滴。
【解析】	
A: オートクレーブ処理なし C: 5 mL の水で 2 倍に希釈し、測定を行った。	B: 培養後のマイクロプレートの各 well を 8 連マイクロピペットによって混合する。混合後のマイクロプレートとブレンシューカーで攪拌し、マイクロプレートリーダーで測定を行う。 C: 培養後、2 倍希釈し、増殖度を 600 nm の波長を用いて測定する。 D: 沸騰水浴上で失活 E: 培養後、121 °C、5 min オートクレーブ処理した検体を窒素下に置き、増殖度を 600 nm の波長を用いて測定する。
C: 昨年度と同様に結果を算出した。	B: 標準溶液の吸光度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濃度を照合して、試験溶液中のビタミン B12 量を求める。 C: 標準溶液の吸光度より検量線を作成し、これに各試験管より得られた吸光度と検量線に照合し、試験溶液 1 mL あたりの含量に換算してその平均値を求める。1 mL あたりの含量値が平均値より、+10 % 以上はすれているときは、その数値を除外し、残りの数値の平均値を求める。得られた数値に希釈倍率を乗じて試料中のビタミン B12 含量を算出する。 E: 標準溶液の吸光度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濃度を照合して、試験溶液中のビタミン B12 量を求める。
D: 判定基準により判定	
【報告事項】	
B: four parameter logistic 解析によって検量線 (シグモイド) を作成する。この検量線を用いて、それぞれの試験溶液のビタミン B12 量を求める。 D: 3 次曲線	B: four parameter logistic 解析によって検量線 (シグモイド 曲線) を作成する。この検量線を用いて、それぞれの試験溶液のビタミン B12 量を求める。
【全般】	
A, D: 可能な限り褐色器具を使用	B: 嫌気培養装置内で 37 °C、16-20 hr 培養する。

Table 2 非明示検体に含まれるビタミン B₁₂ の検討結果

	SRM 1849	A	B	C	D	E
検量線近似	–	線形	シグモイド	2次多項式	3次曲線	線形
1st	–	4.35	4.59	4.10	4.07	4.02
2nd	–	4.41	4.90	4.20	4.12	3.87
3rd	–	3.43	4.70	3.80	3.91	4.00
average	4.0	4.06	4.73	4.03	4.03	3.96
(%)	–	101.5	118.3	100.8	100.8	99.0
SD	0.8	0.5	0.2	0.2	0.1	0.1
CV	–	13.5	3.3	5.2	2.7	2.0

Table 3 近似または回帰の違いによる共同試験結果の比較

	前年	今年	線形 (0.15)	線形 (0.10)	多項式
content (µg/100g)	–	4.16	4.10	4.02	4.04
RSD _r , %	14.16	6.67	6.87	4.67	3.73
RSD _R , %	16.03	9.40	11.22	11.73	12.23
P-PSD _R , %	28.22	25.81	25.95	26.02	25.99
HORRAT	0.57	0.36	0.43	0.45	0.47

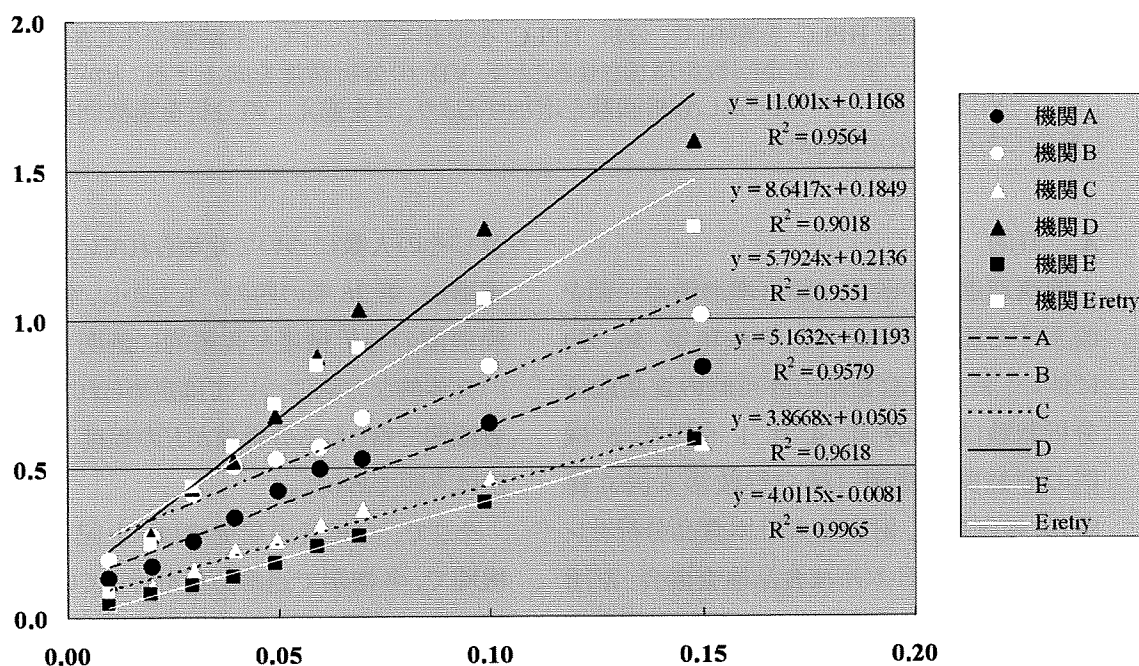


Fig. 1 CN-cbl による検量線例

平成 21 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)

分担研究者の報告書

乳児用調製粉乳中のビタミン D の室間分析精度管理に関する研究

分担研究者 石見佳子 (独)国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム

研究協力者 竹林 純 (独)国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム

協力試験機関

(財)日本食品分析センター・(財)日本冷凍食品検査協会

(財)食品環境検査協会・大阪市立環境科学研究所

研究要旨:前年度の研究において、特別用途食品の許可時の分析試験を行うことができる登録試験機関で同一の粉乳を分析した結果、ビタミン D (VD) の分析値の変動が大きいことが明らかとなった。食品中の含量が極めて少ない VD の分析精度向上には、分析方法及び分析回数について検討する必要があると考えられた。そこで、本年度は、まず各試験機関で用いられていた VD 分析法を調査した結果、分析操作の細部には各試験機関間で多くの差異があることが明らかとなった。そのため、各試験機関間で用いられていた方法を参考にして、公定法に準じた標準作業書を作成した。この方法に分析法を統一し、各試験機関で、非明示で配布した粉乳中の VD 含量の測定を行った。その結果、3 機関では良好な結果が得られたが、2 機関では満足な結果が得られなかった。原因として、分取 HPLC サンプル調製時の不溶物の影響が疑われ、解決法として、分取 HPLC を順相で、分析 HPLC を逆相で行うことで、不溶物を生じさせない方法が考えられた。また、測定回数を増加させることで VD の分析精度を向上することができるが、そのためには、同一日の繰り返し分析回数を増加するより、日を違えての分析を複数回行うことが有効であることが示唆された。

A. 目的

健康増進法の改正 (健康増進法の一部を改正する法律、平成 15 年法律第 56 号) に伴い、特別用途食品の許可時の食品成分分析試験は 2009 年 4 月 1 日現在 5 機関の登録試験機関 (独立行政法人国立健康・栄養研究所、財団法人日本食品分析センター、財団法人日本冷凍食品検査協会、財団法人日本食品環境検査協会、大阪市立環境科学研究所) のいずれかで行うことができる。健康増進法において、登録試験機関が、試験を行うために有すべき機械器具その他の設備、許可試験を実施する者に要求される知識経験

及びその人数について定められている (健康増進法、第 26 条の四の一)。しかし、各登録試験機関の分析精度を客観的に証明するための具体的な方法については定められておらず、各機関で得られる分析値がどの程度一致するかは不明であった。

そこで、昨年度の研究では、上記 5 試験機関で、各機関で通常分析を行っている試験法に従って同一の乳児用調製粉乳に含まれる栄養成分の測定を行い、一致した測定値が得られるかどうか検討を行った。その結果、脂質、リノール酸、 α リノレン酸、ナトリウム、塩素については良好な結果が得られたが、ビタミン D

(VD) 及びビタミン B₁₂ (VB₁₂) については試験機関間の変動が大きいことが明らかとなった。前者は試験検体である調製粉乳中の含量が比較的多い栄養成分であるのに対し、後者は極めて微量である (VD: 6.5 µg/100 g、VB₁₂: 2 µg/100 g)。一般的に、化学分析においては検体中の含量が微量となるほど困難となり、分析値の変動が大きくなる。従って、VD 及び VB₁₂ 等の微量成分分析においては工夫が必要であり、特に繰り返し分析を行って結果を平均すること及び分析方法の改良が必要であると考察された。

今年度はそのために、まず、VD の分析において精度を低下させている要因を明確にするために、各機関で行われている方法の詳細について比較検討を行った。次いで、これらの問題点を改善した標準作業書を作成し、それに従って調製粉乳の分析を行った。

B. 研究方法

分析方法に関する問題点を明確とするため、2009 年 9 月現在において、各登録試験機関で採用されている VD 分析標準作業書の詳細を比較し、分析精度を低下させている要因について考察した。次いで、これらの問題点を改善した改善法の標準作業書 (別紙) を作成し、それに基づき調製粉乳の分析を行った。検体は米国国立標準技術研究所 (National Institute of Standards and Technology, NIST) が供給している調製粉乳 (SRM 1849 - Infant/Adult Nutritional Formula) を非明示で配布した。3 連の分析を、日を違えて 3 回 (計 9 回) 行った分析結果を集計し、解析を行った。

C. 結果

前年度の研究結果から VD の分析において、良好な精度が得られない要因として、分析方法の問題と分析回数の問題があることが示唆されている。そこで、まず分析方法に関する問題点を明確とするため、2009 年 9 月現在において、各登録試験機関が採用している VD 分析標準作業書の詳細を比較した (表 2-1)。その結果、食品サンプルの採取→けん化→分取 HPLC (逆相)→分析 HPLC (順相) という分析概要は一致していた。しかし、公定法である「栄養表示基準における栄養成分等の分析方法 (平成 11 年 4 月 26 日 衛新第 13 号、平成 17 年 7 月 1 日 食安新発第 0701003 号改正)」以外の出典 (「乳児用調製粉乳の表示許可の取り扱いについて (昭和 57 年 5 月 13 日 付け 衛栄第 44 号、平成 10 年 5 月 21 日 改正)」または「日本標準食品成分表分析マニュアル」) に基づき分析法を設定している機関があり、公定法を基に分析法を設定している機関間でも、公定法に詳しく記載されていない試験手技の細部においては種々の差異が認められた。また、公定法に各機関独自の工夫が加えられていることが明らかとなった。

これらの結果を基に、公定法に準じた標準作業書 (別紙) を作成した。作成にあたり特に留意した点を以下に記載する。

1) 不けん化物を再溶解し分取 HPLC に導入するための溶媒の統一:メタノール/アセトニトリル混液 (分取 HPLC 移動相) を使用している機関と、イソプロパノールを使用している機関があった。今回の検体である粉乳 (SRM 1849) を用い予備検討を行った結果、メタノール/アセトニトリル混液に不けん化物を溶解させようとすると多量の不溶物が認められた。一方、イソプロパノールに溶解させると不溶物は減少したが、分取 HPLC のクロマトグラムがブロー

ドとなり、その後の分析 HPLC で VD のピークと分離不十分な夾雑物のピークが認められた。そのため、標準作業書ではメタノール/アセトニトリル混液を使用することに統一し、不溶物による VD の再溶解阻害を抑えるため、先端が尖っていないスピッツを使用して不けん化物を薄層状にするとともに、ボルテックス及びソニックで処理することとした。

2) 分取 HPLC の条件の統一:各機関で使用されている分取 HPLC の分析条件が異なり、分取された VD 画分に含まれる夾雑物に差異があることが推測されたため、カラムの長さを一般的な直径 4.6 mm、長さ 250 mm のものに統一し、流速、分取時間及びカラム温度を統一した。

3) 標準品の統一:調製粉乳の分析に標準品として、ビタミン D2 (エルゴカルシフェロール) を使用している機関と、ビタミン D3 (コレカルシフェロール) を使用している機関があった。国内の乳児用調製粉乳に強化されているビタミン D の多くはビタミン D3 であり、今回の検体である粉乳 (SRM 1849) に含まれているビタミン D も D3 であるため、ビタミン D3 を標準品とした。

統一された分析方法で測定を繰り返した場合の試験室間における分析値の変動について検討するために、各登録試験機関に統一した標準作業書 (別紙) とともに粉乳 (SRM 1849) を非明示で送付し、3 連の測定を、日を違えて 3 回 (計 9 回) 行うよう依頼した。表 2-2 に各試験機関が配布した標準作業書に加えた変更点及び特記事項を示した。図 2-1 に各試験機関から報告された検量線を示す。試験機関 B 及び E で若干標準偏差が大きかったが、概ね原点近傍を通過する直線性の高い良好な検量線が報告された。図 2-2

に各機関の検体の分取 HPLC チャート及び標準品の溶出時間 (3 回の実験の平均値 \pm S.D.) を示す。試験機関 A、D、E では標準品は約 11.5 分に溶出され、得られた検体のクロマトグラムも類似したものとなった。分析機関 B と D では若干溶出が早かったが、分析方法統一前と比較して機関間の溶出時間の差は小さくなった (6~19 分 \rightarrow 8~11 分)。図 2-3 に検体の分析 HPLC チャート及び標準品の溶出時間 (3 回の実験の平均値 \pm S.D.) を示す。各研究機関共に高い溶出時間の再現性が得られた。分析機関 A、D、E では、VD は 26 ~ 27 分に溶出され、得られた検体のクロマトグラムも非常に類似したものとなった。表 2-3 に各試験機関による測定結果を示す。併行精度 (日内変動) を各測定における 3 連の繰り返し分析結果の標準誤差から計算し、室内再現精度 (日間変動) を各測定で得られた分析値の平均値の標準誤差から計算した。試験機関 A、C、D では全ての回の測定で、3 回の繰り返し分析の平均値が NIST による粉乳 (SRM 1849) の認証値である 25.1 ± 2.7 ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$) の範囲内に入り、併行精度の平均値は 5 % 未満、室内再現精度は 5 % 程度と良好な結果が得られた。試験機関 B では、測定 1 回目は認証値の範囲内の結果が得られたが、測定 2、3 回目は範囲外であった。また、3 回全ての測定において、少なくとも 1 回の繰り返し測定結果は認証範囲内だった。試験機関 E では、1、2 回目の測定では全ての繰り返し分析結果が認証値の範囲外となったが、3 回目の測定では平均値が認証範囲内となった。試験機関 E の併行精度 (日内変動) は平均 9.3 % と比較的良好的な結果であったが、室内再現精度 (日間変動) は 37.5 % と非常に大きいも

のであった。各研究機関ごとの測定結果を平均し、その標準誤差から室間再現精度を計算すると 12.3 % となった。

D. 考察

前年度の検討により、VD の分析においては、分析方法の改良及び分析を複数回繰り返すことにより精度を向上する必要があることが示された。今年度は、まず各試験機関で行われている VD 分析法を調査したところ、試験機関間で細部に多くの差異がみとめられた(表 2-1)。そこで、各試験機関で用いられている分析方法を統一し、公定法に準じた VD 分析標準作業書(別紙)を作成した。この分析法に従い、各試験機関で、非明示で配布された粉乳(SRM 1849)の分析を行った(3連の測定を、日を違えて3回(計9回))。その結果、試験機関 A、C、D では全ての回の測定において、3連の分析の平均値が NIST による認証範囲内となり、日内変動、日間変動共に小さく、精度の高い分析結果が得られた(表 2-3)。一方、試験機関 B、E では、3回の分析中 2回、3連の分析の平均値が NIST による認証範囲外となった。

試験機関 B では、分取 HPLC における注入量を標準作業書の 150 μ L から 100 μ L に変更しており、そのため分析 HPLC に供するサンプル量が他機関の半分となっている。試験機関 B では、3回の分析における検量線の変動も他機関と比較して大きくなっており(図 2-1)、サンプル溶液中の VD 濃度の確保が精度の高い分析を行うために重要であると考えられる。試験機関 B では、測定結果の平均値が NIST 認証範囲外の結果となった 2回の分析でも、3連の分析値のうち少なくとも 1点は認証範囲内となっていたが、試験機

関 E では、平均値が NIST 認証範囲外の結果となった 2回の分析では、全ての分析値が範囲外となっていた。分析機関 E で NIST 認証範囲内の分析値が得られた 3回目の分析では、分取 HPLC サンプル調製時に不溶物に気づき、追加の振とう溶解を行った後に分取 HPLC に供している(表 2-2)。1、2回目の分析では不溶物に気づかなかつたため、追加の振とう溶解を行わず、そのため VD の再溶解が不十分であった可能性がある。結果の項で記載したように、分取 HPLC サンプル調製時に不溶物が生じ、それにより VD の再溶解が阻害される可能性が考えられるため、標準作業書では、先端が尖っていないスピッツを使用して不けん化物を薄層状にするとともに、ボルテックス及びソニックで処理するようにした。しかし、この工夫でも試験機関によっては VD の再溶解が不十分となったと考えられる。分取 HPLC サンプル調製時の不溶物は、非極性溶媒であるヘキサン/酢酸エチル混液で抽出された不けん化物を、極性溶媒である分取 HPLC 移動相(アセトニトリル/メタノール混液)で再溶解させるため生じる。公定法における VD の分析法は、まず逆相 HPLC で分取を行い、次いで順相 HPLC で分析を行う。それに対して、まず順相 HPLC で分取を行い、次いで逆相 HPLC で分析を行う方法も知られている。この方法では分取 HPLC 移動相が非極性溶媒であるため、分取 HPLC サンプル調製時に不溶物が生じないという利点があり、VD を不けん化物と共に確実に溶解させることが可能となる。次年度は、この順相 HPLC で分取を行い逆相 HPLC で分析する方法について検討を加えたいと考えている。

食品中の VD 含量は一般的に微量である