

ため、測定を繰り返し、結果を平均することで分析精度を向上することが必要である。試験機関 B の 3 回目の測定を除き、併行精度は全体的に高く、VD の分析では一連の測定では再現性の高い測定値が得られる (表 2-3)。そのため、VD の分析精度向上には、同一日の繰り返し測定数を増やすより、日を違えての分析を複数回行うことが有効であると考えられる。特に、試験機関 E では、測定 1 回目及び 2 回目の測定結果は、15 µg/100 g 前後の比較的まとまった値となっており (表 2-3)、3 回目の測定を行っていないければ、その数値を疑うことは困難である。このことから、独立した分析を繰り返すことが大変重要だと考えられる。

E. 結論

食品中に微量しか含まれていない VD の分析精度を向上するため、各試験機関で用いられていた VD 分析法を調査し、それを基に、公定法に準じた標準作業書を作成した。この統一した方法に従い、各試験機関で、非明示で配布した粉乳 (SRM 1849) 中の VD 含量を測定した結果、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。その原因として、分取 HPLC サンプル調製時の不溶物の影響が疑われる。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る。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。

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 2-1 各試験機関において採用されている VD 分析標準作業書 (2009 年 9 月現在) の比較

公定法	機関 A	機関 B	機関 C	機関 D	機関 E
【出典】					
栄養表示基準における栄養成分等の分析方法	公定法	日本食品標準成分表分析マニュアル	乳児用調製粉乳の表示許可の取り扱いについて	公定法	公定法
【併用化】					
試料採取 (粉末の場合 1~2 g)	公定法に同じ	公定法に同じ	試料約 2 g を精密に量る	試料 0.5~1 g を精密に量る	試料 0.2~10 g を精密に量る
↓	↓	↓	↓	↓	↓
1% 塩化ナトリウム溶液 3~5 mL を加え、70℃ 3 時間膨潤	公定法に同じ	公定法に同じ	ピロガロール 0.4 g と水 5 mL を加え、沸騰水中で約 5 分間加熱	公定法に同じ	公定法に同じ
↓	↓	↓	↓	↓	↓
1% (W/V) ピロガロール-エタノール溶液 10 mL を添加	3% (W/V) ピロガロール-エタノール溶液 10 mL を加える	公定法に同じ	水酸化カリウム-エタノール溶液を 20 mL 加える	3% (W/V) ピロガロール-エタノール溶液 10 mL を加える	公定法に同じ
↓	↓	↓	↓	↓	↓
60% (W/V) 水酸化カリウム溶液 2 mL を添加	公定法に同じ	60% (W/V) 水酸化カリウム溶液 2~5 mL を加える	↓	公定法に同じ	公定法に同じ
↓	↓	↓	↓	↓	↓
固体の水酸化カリウム 2 g を添加	公定法に同じ	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
70℃ 水浴中でガラス棒でかき混ぜながら 1 時間加熱	公定法に同じ	公定法に同じ	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
1% 塩化ナトリウム溶液を合計で 22 mL になるように添加	公定法に同じ	公定法に同じ	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
酢酸エチル-ヘキサン混液 (1:9 V/V) 15 mL を加え栓をし、5 分間振とう抽出	公定法に同じ	公定法に同じ	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
遠心分離	公定法に同じ	公定法に同じ	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
駒込ピペットで上層を 100 mL 容なす形フラスコに移す	公定法に同じ	公定法に同じ	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
水層を酢酸エチル-ヘキサン混液 (1:9 V/V) 15 mL で更に二回同様に抽出	公定法に同じ	公定法に同じ	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
抽出液を合わせ 35℃ で減圧濃縮	公定法に同じ	公定法に同じ	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
残留物をジエチルエーテルに溶解し、10 mL 容共栓付き試験管に移した後、窒素気流下で溶媒を留去	残留物を酢酸エチル-ヘキサン混液に溶解して 10 mL 容共栓付き試験管に移す	公定法に同じ	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
残留物をメタノール-アセトニトリル (1:9 V/V) の適量 (0.5 mL 以上) に正確に溶解し、分取 HPLC に供する	残留物をメタノール-アセトニトリル (9:1 V/V) 0.5 mL に正確に溶解し、分取 HPLC に供する	公定法に同じ	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓
			残留物をイソプロパノール (0.2 mL) に正確に溶解し、分取 HPLC に供する	残留物をイソプロピルアルコール (0.5 mL) に正確に溶解し、分取 HPLC に供する	残留物をメタノール-アセトニトリル (1:9 V/V) の適量 (1 mL) に正確に溶解し、分取 HPLC に供する

(次ページに続く)

(前ページからの続き)

公定法	機関 A	機関 B	機関 C	機関 D	機関 E
【分取 HPLC】					
カラム: 逆相型カラム (Nucleosil 5C 18 (ナーゲル社) 内径 7.5 mm、長さ 300 mm)	カラム: 逆相型カラム (Chemo Pak Nucleosil 5C18, 5 μm, 7.5 x 300 mm, Chemco Scientific Co., Ltd., Osaka, Japan)	カラム: 逆相型カラム (Inertsil ODS-4, 内径 4.6 mm、長さ 150 mm)	カラム: 逆相型カラム (Nucleosil 5 C18 φ8.0×200 mm)	カラム: 逆相型カラム (TSKgel ODS-120A 4.6x250 mm、東ソー株式会社)	カラム: 逆相型カラム (Nucleosil 5C 18 (ナーゲル社) 粒径 5 μm、内径 7.5 mm、長さ 300 mm)
移動相: メタノール-アセトニトリル (1:9 V/V)	移動相: メタノール-アセトニトリル (9:1 V/V)	移動相: メタノール-アセトニトリル (1:9 V/V)	移動相: メタノール-アセトニトリル (1:1 V/V)	移動相: メタノール-アセトニトリル (1:9 V/V)	移動相: メタノール-アセトニトリル (1:9 V/V)
測定波長: 254 or 265 nm	測定波長: 265 nm	測定波長: 265 nm	測定波長: 265 nm	測定波長: 265 nm	測定波長: 265 nm
流量: 1.5 mL/min	流量: 1.5 mL/min	流量: 1.5 mL/min	流量: 2.0 mL/min	流量: 1.5 mL/min	流量: 1.5 mL/min
温度: 室温	温度: 室温	温度: 40 °C	温度: 40 °C	温度: 35 °C	温度: 35 °C
注入量: 150 μL	注入量: 150 μL	注入量: 100 μL	注入量: 100 μL	注入量: 150 μL	注入量: 300 μL
ビタミン D 保持時間: 約 12 分	ビタミン D 保持時間: 約 15 分	ビタミン D 保持時間: 約 6 分	ビタミン D 保持時間: 約 13 分	ビタミン D 保持時間: 約 11 分	ビタミン D 保持時間: 約 19 分
ビタミン D 画分: 保持時間の - 90 秒 ~ + 90 秒の 3 分間	ビタミン D 画分: 保持時間の - 90 秒 ~ + 90 秒の 3 分間	ビタミン D 画分: 保持時間の - 45 秒 ~ + 45 秒の 1.5 分間	ビタミン D 画分: 保持時間の - 90 秒 ~ + 90 秒の 3 分間	ビタミン D 画分: 保持時間の - 2.6 分 ~ + 2.0 分の 4.6 分間	ビタミン D 画分: 保持時間の - 90 秒 ~ + 90 秒の 3 分間
↓	↓	↓	↓	↓	↓
分取したビタミン D 画分をヘキサン-イソプロピルアルコール (99.6:0.4 V/V) 200 μL に溶解し、分析 HPLC に供す	公定法に同じ	ヘキサン-イソプロピルアルコール (99.5:0.5 V/V) 200 μL に溶解	ヘキサン-イソプロピルアルコール (99:1 V/V) 200 μL に溶解	ヘキサン 200 μL に溶解	ヘキサン-イソプロピルアルコール (99.5:0.5 V/V) 400 μL に溶解
【分析 HPLC】					
カラム: 順相型カラム (Nucleosil 100-5 (ナーゲル社) 内径 4.6 mm、長さ 250 mm)	カラム: 順相型カラム (ZORBAX SIL (P/N 880952-701), 5 μm, 4.6 x 250 mm, Agilent Technologies, Tokyo, Japan)	カラム: 順相型カラム (Nucleosil 100-5 内径 4.6 mm、長さ 250 mm)	カラム: 順相型カラム (Fine SIL 5 φ 4.6×250 mm)	カラム: 順相型カラム (YMC-Pack SIL A-003 4.6x250 mm、ワイエムシイ)	カラム: 逆相型カラム (Inertsil SIL (ジューエルサイエンス製) 粒径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 250 mm)
移動相: ヘキサン-イソプロピルアルコール (99.6:0.4 V/V)	移動相: ヘキサン-イソプロピルアルコール (99.6:0.4 V/V)	移動相: ヘキサン-イソプロピルアルコール (99.5:0.5 V/V)	移動相: ヘキサン-イソプロピルアルコール (99:1 V/V)	移動相: ヘキサン-イソプロピルアルコール (99.6:0.4 V/V)	移動相: ヘキサン-イソプロピルアルコール: 酢酸 (1000:5:5 v/v)
測定波長: 254 or 265 nm	測定波長: 265 nm	測定波長: 265 nm	測定波長: 265 nm	測定波長: 265 nm	測定波長: 265 nm
流量: 1.6 mL/min	流量: 1.6 mL/min	流量: 1.5 mL/min	流量: 1.0 mL/min	流量: 1.5 mL/min	流量: 1.5 mL/min
温度: 室温	温度: 40 °C	温度: 40 °C	温度: 40 °C	温度: 15 °C	温度: 40 °C
注入量: 100 μL	注入量: 100 μL	注入量: 100 μL	注入量: 50 μL	注入量: 100 μL	注入量: 30 μL
ビタミン D 保持時間: 未記載	ビタミン D 保持時間: 約 24 分	ビタミン D 保持時間: 約 18 分	ビタミン D 保持時間: 約 21 分	ビタミン D 保持時間: 約 22 分	ビタミン D 保持時間: 約 15.5 分
定量: ピーク高さを測定	公定法に同じ	公定法に同じ	公定法に同じ	公定法に同じ	公定法に同じ
【標品】					
日局エルゴカルシフェロール (ビタミン D ₂) またはコレカルシフェロール (ビタミン D ₃)	公定法に同じ	SIGMA E5750 (Ergocalciferol)	公定法に同じ	ビタミン D ₃	和光特級コレカルシフェロール 100mg 224-00361
植物性食品及び強化食品の分析には D ₂ を、動物性食品の分析には D ₃ を用いる	左記に加え、組み合わせ食品等、入っているビタミン D の種類が特定できない場合は D ₃ を用いる	公定法に同じ	添加したビタミン D の種類により、ビタミン D ₂ あるいはビタミン D ₃ を用いる	粉乳及び総合栄養食品においてはすべてビタミン D ₃	
【検量線】					
ビタミン D 標準液 1、2、4 mL (0.2、0.4、0.8 μg) に対して、試料と同様に処理する	公定法に同じ	約 0.25 μg/mL (正確な濃度は式で求める) のビタミン D 標準液 1 mL に対して試料と同様に処理する	10 IU (0.25 μg) の標準ビタミン D に対して試料と同様に処理する	ビタミン D ₃ 標準液 2 mL (0.25 μg/mL) を、試料と同様に処理する	0 及び検出限界相当の濃度を含め 4 点以上

表 2-2 各試験機関が標準作業書に加えた変更点及び特記事項

試験機関	変更点・特記事項
A	特になし。
B	<p>分取の際の注入量を使用機器の最大注入可能量である 100 μL で実施。 分取用試験液調製時、ボルテックス混和後、ボルテックス混和後、PTFE メンブレンフィルター (0.45 μm) でろ過に変更。 分析用カラムを手持ちのシリカカラム (Unisil 4.6 \times 150 mm) を使用し、カラム長が短いことから流速を 1.2 mL/min とした。 1 回目の測定において、分析 HPLC の移動相をヘキサン/イソプロピルアルコール=99.4/0.6 としてしまったためピークが夾雑物と重なったため、後日、-28 $^{\circ}$C で冷凍保存しておいた分取用試料から再度の分取を行い測定。 3 回目の分析 HPLC において、圧力の変動が大きくなった。原因は、ブランジャシールが順相用でなかったため、液漏れが発生したためであった。</p>
C	特になし。
D	VD 標準原液の吸光度測定、1 % ピロガロールエタノールの調整、サンプリングを試験前日に行った。
E	<p>分析に用いたシリカカラムが経年劣化しており夾雑物との分離が不十分であったため、カラムを新規購入し、試験をやり直した。 3 回目の分析において、分取 HPLC サンプル調製時に不溶物が認められたため、さらに振とうした後に分取 HPLC に供した。</p>

表 2-3 粉乳 (SRM-1849) の VD 含量分析結果 (単位は $\mu\text{g}/100\text{g}$)

試験機関 A

	測定 1 日目	測定 2 日目	測定 3 日目	平均	S.D.	室内再現精度 (日間変動)
繰り返し 1	25.3	24.9	26.2			
繰り返し 2	25.4	24.6	26.4			
繰り返し 3	25.2	22.8	26.5			
平均	25.3	24.1	26.4	25.3	1.1	4.5%
S.D.	0.1	1.1	0.2			
併行精度(日内変動)	0.4%	4.8%	0.6%	1.9%		

試験機関 B

	測定 1 日目	測定 2 日目	測定 3 日目	平均	S.D.	室内再現精度 (日間変動)
繰り返し 1	25.5	22.3	23.9			
繰り返し 2	21.7	22.7	15.8			
繰り返し 3	24.0	19.8	15.7			
平均	23.7	21.6	18.4	21.3	2.7	12.5%
S.D.	1.9	1.6	4.7			
併行精度(日内変動)	8.1%	7.3%	25.5%	13.6%		

試験機関 C

	測定 1 日目	測定 2 日目	測定 3 日目	平均	S.D.	室内再現精度 (日間変動)
繰り返し 1	22.5	24.4	22.5			
繰り返し 2	24.0	24.2	22.2			
繰り返し 3	22.6	23.4	23.3			
平均	23.0	24.0	22.6	23.2	0.7	3.0%
S.D.	0.9	0.5	0.6			
併行精度(日内変動)	3.7%	2.0%	2.6%	2.8%		

試験機関 D

	測定 1 日目	測定 2 日目	測定 3 日目	平均	S.D.	室内再現精度 (日間変動)
繰り返し 1	23.9	25.8	25.1			
繰り返し 2	24.6	26.0	25.9			
繰り返し 3	23.8	27.5	29.0			
平均	24.1	26.5	26.7	25.7	1.4	5.5%
S.D.	0.4	1.0	2.1			
併行精度(日内変動)	1.8%	3.6%	7.7%	4.4%		

試験機関 E

	測定 1 日目	測定 2 日目	測定 3 日目	平均	S.D.	室内再現精度 (日間変動)
繰り返し 1	16.4	11.5	28.9			
繰り返し 2	15.4	14.2	26.1			
繰り返し 3	18.7	14.0	25.9			
平均	16.8	13.2	27.0	19.0	7.1	37.5%
S.D.	1.7	1.5	1.7			
併行精度(日内変動)	10.2%	11.4%	6.3%	9.3%		

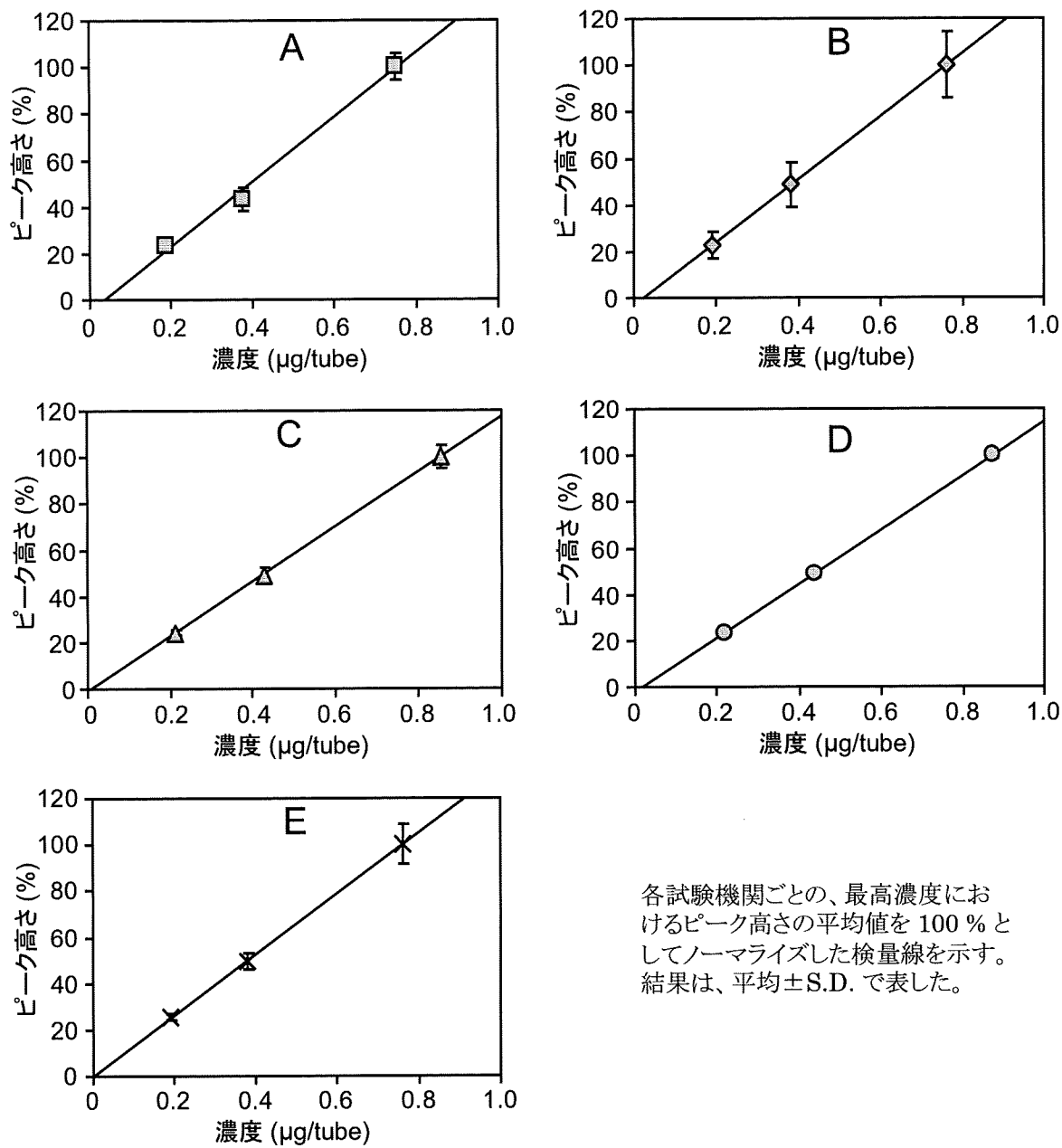


図 2-1 各試験機関の VD 分析検量線

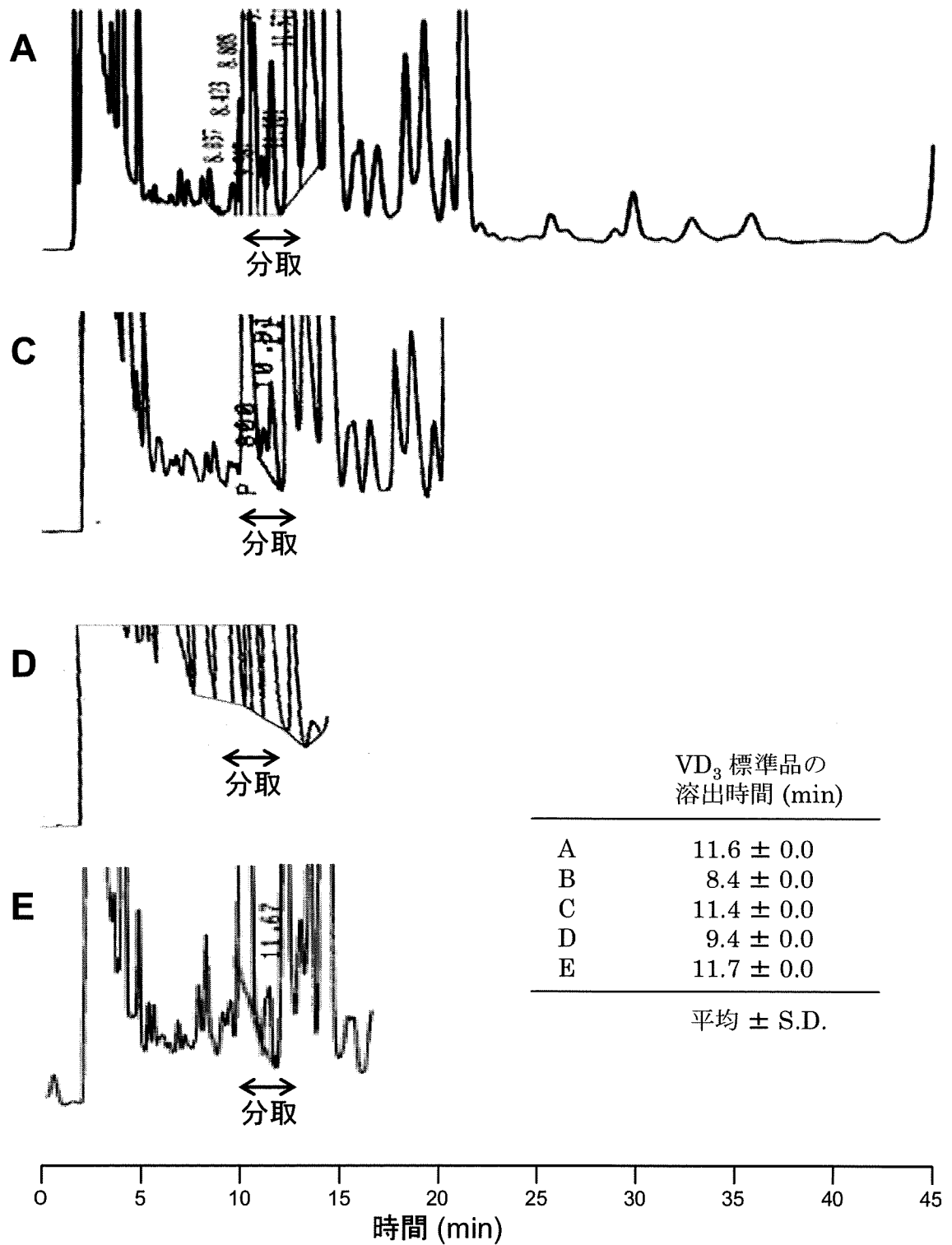


図 2-2 各試験機関の VD 分取 HPLC クロマトグラム及び溶出時間

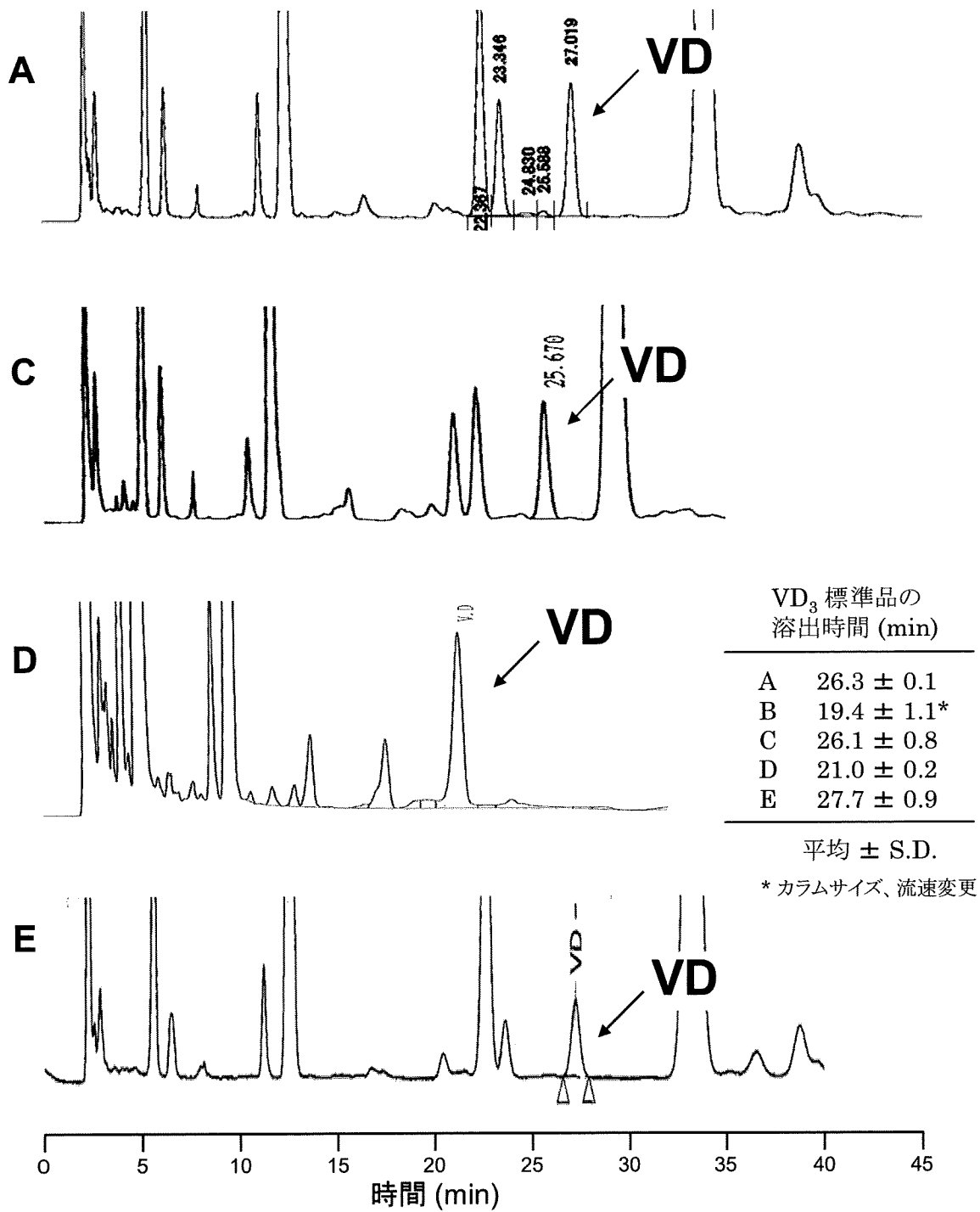


図 2-3 各試験機関の VD 分析 HPLC クロマトグラム及び溶出時間

(別紙) 粉乳中のビタミン D 測定標準作業書

標準作業書

試験法の出典:

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 [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 号改正現在] に準拠

試験方法:

① 機器、試薬

【機器】

- ・分取用 HPLC: ポンプ、デガッサー、カラムオーブン、紫外部吸収検出器、フラクショントレクター付き
- ・分取用 HPLC カラム: 内径 4.6 mm、長さ 250 mm の ODS カラム、ガードカラムを併せて使用しても良い
- ・分析用 HPLC: ポンプ、デガッサー、カラムオーブン、紫外部吸収検出器付き
- ・分析用 HPLC カラム: 内径 4.6 mm、長さ 250 mm のシリカカラム、ガードカラムを併せて使用しても良い

・吸光度計

・石英セル (1 cm 光路長のもの)

・水浴: 振揺器付きのものが望ましい

・弧動式振り混ぜ器

・遺心器

・エバポレーター

・超音波洗浄機

・アスピレーター

・60 mL ネジ口遠沈管: 褐色が望ましい

・10 mL スピッツ: 褐色が望ましい、先端がとがっておらず丸いもの (上図参照)

・100 mL ナスフラスコ: 褐色が望ましい

・窒素ガス: アルゴンガスでも良い

【試薬】

・コレカルシフェロール (ビタミン D₃)

・1 % (w/v) 塩化ナトリウム水溶液: 塩化ナトリウム 10 g を水に溶かして 1000 mL とする。冷蔵庫に保存する。

・60 % (w/v) 水酸化カリウム水溶液: 水酸化カリウム 30 g を水に溶かして 50 mL とする。室温で保存する。ガラスは強アルカリで溶出するので、保存にはプラスチックの容器を用いる。

・1 % (w/v) ピロガロール—エタノール溶液: ピロガロール 1 g をエタノールに溶かして 100 mL とする (用時調整)。

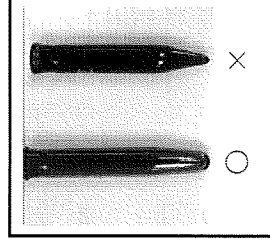
・酢酸エチル—ヘキサン混液 (1:9 v/v): 酢酸エチルとヘキサンを 1:9 の容量比で混合する。室温で保存する。

・分取 HPLC 用移動相: HPLC 用メタノールと HPLC 用アセトニトリルを 1:9 の容量比で混和する。

・分取 HPLC 用移動相: HPLC 用ヘキサンと HPLC 用イソプロピルアルコールを 99.6:0.4 の容量比で混和する。

・特に指定のない試薬は特級を用いる。

・冷蔵庫、冷凍庫に保存してある試薬を用いる場合は、室温に戻してから使用すること。



② ビタミン D 標準原液

【ビタミン D 標準原液の調整】

コレカルジフェロール (ビタミン D₃) 10 mg を秤量し、エタノール 5 mL に溶解させる。1 mL を取りエタノールで 100 mL とする (ビタミン D 標準原液、 $20 \mu\text{g/mL}$)。窒素ガスで空気を置換して $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下で冷凍保存する。

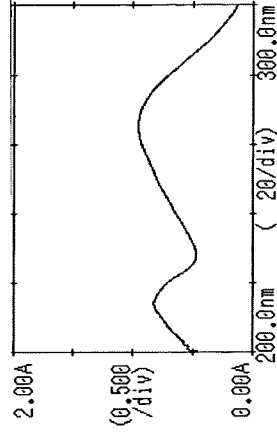
【ビタミン D 標準原液の純度及び濃度確認】

エタノールを対照として標準原液の 230 nm 及び 265 nm の吸光度 (A_{230} 及び A_{265}) を測定し純度及び正確な濃度を確認する。(純度及び濃度の確認は毎回行ってください。)

純度の判定: A_{230}/A_{265} が 0.60 以下であること

濃度: ビタミン D 標準原液の濃度 ($\mu\text{g/mL}$) = $A_{265} \times 20.46$

【参考: ビタミン D₃ 標準原液の吸光スペクトル】



③ 試験 1 日目

【ビタミン D 標準液の調製 (用時調製)】

ビタミン D 標準原液 ($20 \mu\text{g/mL}$) を 1 mL 容ホールピペットで取り、メスフラスコを

用いエタノールで 100 mL とする (ビタミン D 標準液、 $0.2 \mu\text{g/mL}$)。均一な溶液となるように良く混和すること。作成したビタミン D 標準液は 2 日目に HPLC 溶出位置の確認にも用いるので、使用後窒素ガスを封入して冷凍保存する。

【試験の準備】

- ・検体、1% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液を室温に戻す。
- ・水浴を $70 \text{ }^\circ\text{C}$ に加温する。
- ・1% (w/v) ピロガロール—エタノール溶液を用時調製する。
- ・ビタミン D 標準液 ($0.2 \mu\text{g/mL}$) を用時調製する。

【けん化】

- (1) 検体のアルミパックの封を切り、2 g を 60 mL ネジ口遠沈管に精確に量りこむ。重量は 1 mg の位まで記録する。サンプリングは各試験ごとに 3 回ずつ行う。
- (2) ビタミン D 標準液 ($0.2 \mu\text{g/mL}$) 1、2、4 mL を精確に取り 60 mL ネジ口遠沈管に入れる (0.2 、 0.4 、 $0.8 \mu\text{g/tube}$)。ビタミン D 標準液は窒素封入後冷凍保存する。
- (3) (1) 及び (2) の各遠沈管 (計 6 本) に 1% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液を 3 mL 加え、良く混和する。
- (4) $70 \text{ }^\circ\text{C}$ の水浴中で計 6 本の遠沈管を 3 分間加熱する。
- (5) 1% (w/v) ピロガロール—エタノール溶液を 10 mL 加える。
- (6) 60% (w/v) 水酸化カリウム水溶液を 2 mL 加える。
- (7) 固体の水酸化カリウム 2 g を加える。
- (8) $70 \text{ }^\circ\text{C}$ の水浴中で 60 分間加熱する。

可能ならば振揺器付きの水浴を用いて攪拌しながら加熱する。

検体 (粉乳) が沈殿しないように必要に応じてガラス棒、転倒混和等で攪拌を行

う。

- ・1 日目に調整したビタミン D 標準液 ($0.2 \mu\text{g/mL}$) を室温に戻す。
- ・1 日目に中断した試験溶液を室温に戻す。

【抽出】

- (1) けん化したサンプルを、冷水中で速やかに室温まで冷却する。
- (2) 1% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液を 19 mL 加える。
- (3) 酢酸エチル—ヘキサン混液 (1:9 v/v) 15 mL を加える。
- (4) 栓をして 5 分間振り混ぜる。
- (5) 遠心分離 (1,500 rpm、5 分) する。
- (6) 上層 (酢酸エチル—ヘキサン混液層) を 100 mL ナスフラスコに移す。
- (7) 水相を酢酸エチル—ヘキサン混液 (1:9 v/v) 15 mL でさらに 2 回、同様に抽出する ((3)~(6) を 2 回繰り返す)。
- (8) 抽出液をあわせたナスフラスコを 35°C で減圧溶媒留去する。

- (9) 残留物をジエチルエーテルまたは酢酸エチル—ヘキサン混液に溶解し、10 mL スピッツに移す。
- (10) ナスフラスコ内部をジエチルエーテルまたは酢酸エチル—ヘキサン混液で洗いにみスピッツに移す。
- (12) 窒素ガスで空気を置換したうえで密栓して冷凍保存する (溶媒留去前で実験中断)。

④ 試験 2 日目

【試験の準備】

- ・当日試験開始前に HPLC 移動相を減圧下超音波で処理し良く脱気する。
- ・HPLC システムを平衡化する (分析 HPLC の圧変動が大きい場合は移動相の脱気が不十分であることが多い)。

【分取 HPLC: システム】

カラム : ODS カラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm のもの)
移動相 : メタノール:アセトニトリル = 1:9 (v/v)
流量 : 1.5 mL/min
温度 : 40°C
検出 : UV 265 nm
注入量 : 150 μL
分取 : 溶出時間の -90 秒 ~ +90 秒 の 3 分間

【分取 HPLC: 標品溶出位置確認】

- (1) ビタミン D 標準液 ($0.2 \mu\text{g/mL}$) 2 mL を精確に取り、10 mL スピッツに移す。
- (2) 35°C で減圧溶媒留去する。
- (3) 窒素ガスを噴きつけ溶媒を完全に留去する。
- (4) メタノール:アセトニトリル = 1:9 (v/v) を精確に 500 μL 加える。
- (5) 15 秒間ボルテックスで混和する。
- (6) 精確に 150 μL を分取 HPLC に注入し、溶出時間を確認する。

【分取 HPLC: 試験溶液の分取】

- (1) 前日冷凍保存で中断したスピッツ管を室温に戻す。
- (2) スピッツを 35°C で減圧溶媒留去する (窒素ガスを吹き付けて溶媒留去しても良い)。

- (4) ヘキサン:イソプロピルアルコール = 99.6:0.4 (v/v) を精確に 200 μ L 加える。
- (5) 15 秒間ボルテックスで混和する。
- (6) 精確に 100 μ L を分析 HPLC システムに注入し、溶出時間の確認及びピーク高さ及び面積の測定を行う。

【分析 HPLC: 試験溶液の分析】

- (1) 分取したスピッツ管にヘキサン:イソプロピルアルコール = 99.6:0.4 (v/v) を精確に 200 μ L 加える。
- (2) 15 秒間ボルテックスで混和する。
- (3) 精確に 100 μ L を分析 HPLC システムに注入し、ビタミン D のピーク高さ及び面積を測定する。ペー스타インが十分に安定した後に、次のサンプルの分析を開始する。調製した分析 HPLC 用試験溶液は、分析開始まで 4 $^{\circ}$ C で保存する。

⑤ 解析処理

【データ入力及び解析】

メールで本標準作業書と共に送付したエクセルシート「VDealc.xls」の太枠内にデータを入力する。標準作業書に従った実験の日を分けて 3 回行い、それぞれの結果を実験 1、実験 2、実験 3 のシートに入力する。

【参考: ビタミン D 含量の計算式】

$$\text{ビタミン D (カルシフェロール) 含量 } (\mu\text{g}/100 \text{ g}) = C \times 100 \div W$$

C: 検量線から求めた標準カルシフェロールの量 ($\mu\text{g}/\text{tube}$)

W: 試料採取量 (g)

- (3) 窒素ガスを噴きつけ溶媒を完全に留去する。
- (4) メタノール:アセトニトリル = 1:9 (v/v) を精確に 500 μ L 加える。
- (5) 15 秒間ボルテックスで混和する。
- (6) 15 秒間超音波処理する。
- (7) 15 秒間ボルテックスで混和する。
- (8) 遠心分離 (1,500 rpm, 5 分) する。
- (9) 上清を精確に 150 μ L 分取 HPLC システムに注入し、溶出時間の - 90 秒 ~ + 90 秒の 3.0 分間を分取する。調製した分取 HPLC 用試験溶液は、注入まで間がある場合は 4 $^{\circ}$ C で保存する。
- (10) 35 $^{\circ}$ C で減圧溶媒留去する。
- (11) 窒素ガスを噴きつけ溶媒を完全に留去する。

【分析 HPLC: システム】

カラム : シリカカラム (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm のもの)

移動相 : ヘキサン:イソプロピルアルコール = 99.6:0.4 (v/v)

流量 : 1.6 mL/min

温度 : 40 $^{\circ}$ C

検出 : UV 265 nm

注入量 : 100 μ L

【分析 HPLC: 標品溶出位置確認】

- (1) ビタミン D 標準液 (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 mL を精確に取り、10 mL スピッツに移す。
- (2) 35 $^{\circ}$ C で減圧溶媒留去する。
- (3) 窒素ガスを噴きつけ溶媒を完全に留去する。

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ナトリウム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 鴨下渚 (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得られることが重要である。

昨年度は市販の乳児用調製粉乳を用いたナトリウム (Na) の検討を研究機関毎の分析法によって検討したところ、比較的表示値に近い値と変動係数を示し、分析法に問題がないことが示唆された。しかし、データが不足していたことから、試験室間の妥当性に関する検討に至ることが出来なかった。

そこで、本年度は昨年度とほぼ同条件下で検討を行い、室間再現性に関してどのような結果が得られるか検討を行った。その結果、Na は許容誤差範囲内の結果が得られたが、室間再現性に関しては許容範囲を超えており、分析方法の違いが影響していることが推測された。

A. 研究目的

健康増進法の改正に伴い、¹⁾ 特別用途食品の許認可試験は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肝要である。

昨年度は各試験機関の状況を把握するべく、各機関における分析法の運用状況を、市販の粉ミルクを検体として確認したところ、測定対象成分

によって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、試験機関間によって試行回数が異なるなど、結果に対する信頼性が担保されているとは判断し難いものとなってしまった。しかし、ナトリウム分析は偶然にも各機関での分析値がほぼ一致しており、変動係数 (CV) も比較的収束した結果が得られた。しかし、その詳細については不明な点も多く、試験室間における妥当性が担保されているか改めて検

討する必要性があった。

そこで、本年度も引き続き分析法に関しては各試験機関の方法に準拠した方法を採用していただき、室間再現性にどのような影響をもたらすのか検討を行った。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）²⁾では、対象成分に対して複数の分析法が制定されているものもあり、分析法の違いが結果に影響されることも容易に想像される。ナトリウム分析においては、灰化法、塩酸抽出法及び誘導結合プラズマ発光分析法（ICP）の3種が記載されており、その分析法の違いが結果に影響する可能性も否定できない。

また、昨年度の結果を受けて、検体を非明示にすることによる影響についても併せて検討した。

B. 研究方法

試料にはアメリカ合衆国の国立標準技術研究所（NIST）から提供されている認証標準物質（CRM）Standard Reference Material[®] 1849（SRM 1849, Infant/Adult Nutritional Formula）を用いた。³⁾

分析法は各分析機関の標準作業書（SOP）により実施した。ただし、検体のナトリウム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指定の量に制限した。

なお、実験に際し詳細事項に関しては SOP を作成し、それに従った分析方法を実施していただいた。詳細については Table 1 に記載する。

また、追加事項として、昨年度（20 年度）に採用した前処理方法、測定に用いた装置の測定原理、装置のメーカー名及び型番についても報告していただき、本年度の検討結果との影響に関して考察した。

（倫理面への配慮）

本研究において倫理面での配慮を有する検討はない。

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に違いがあった。

本年度は昨年度同様各研究機関の分析法に準じた分析法を採用した。しかし、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。また、昨年度と本年度の検討方法について回答いただいた結果、前年度は全機関が前処理法として灰化法を採用していたことが明らかとなった（Table 3）。他方、本年度は各研究機関が実施した分析法は、1 機関が塩酸抽出法を採用した以外は灰化法であった。また測定機器として、原子吸光光度法（AAS）を採用した機関及び ICP を用いた機関があることも明らかとなった（Table 3）。

検討した SRM1849 には Na として 415 mg/100 g 含まれている。⁴⁾ 今回含有量を非明示にしたにも関わらず、各研究機関の試験結果は再現性も高く、現在栄養成分の分析法において記載されている表示値の許容範囲内（±20 %）に収まっていた。

本年度は試行回数が不足していることや分析法が統一されていないため、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_t）、室間再現相対標準偏差（RSD_R）及び室間再現相対標準偏差の経験則の値（P・RSD_R）を求めたところ、それぞれ 1.85 %、10.33 % 及び 4.56 % であり、HORRAT 値は 2.27 であった（Table 4）。この結果から、施行された分析法自体に問題はないが、分析法の違いが RSD_R に影響しているものと考えられる。また、HORRAT 値が AOAC の規定する範囲（0.5~2.0）から逸脱していることから、⁵⁾ 本検討において何らかの問題点が含まれていることが示唆された。

D. 考察

○前処理法について

公定法のナトリウム分析は、現在 3 種の方法が記載されているが、その内訳は前処理として灰化するか直接塩酸抽出を行うか、測定機器として AAS か ICP によるかの組み合わせによる。今回の検討で採用された方法は Table 3 の通りである。その選択性に関しては、灰化法において「脂質含量の高いものに適する」との記載があるのみで、特に分析法に関する指針はない。また、栄養表示基準において、脂質含量に関して高い旨に関する記載もないことから、「高い」を含有量としてどの範囲から適応するか疑問である。本検討に用いた SRM1849 は脂質として 100 g 中 31 g 含まれており、一般食品と比較して脂質含有量は高いものと考えられる。今回塩酸抽出を行った機関 B の結果が高値を示したが、当機関にて追試験を行ったところ、塩酸抽出法及び灰化法の違いによる定量値は、それぞれ 375.5 mg 及び 393.8 mg であり、わずかに灰化法による抽出の方が高値を示したのみであった。よって、脂質含量が高いにも関わらず、塩酸抽出法を粉乳に適応することが不適切であるとは考えられなかった。また機関 B は、CV 値が検討機関内で最も低く、人為的な誤差が含まれているとも考えられなかった。

塩酸抽出法は操作が簡便であり、灰化法に比べて操作時間が極端に短く済む点で優位である。しかし、夾雑物の除去はろ過による不溶物のみに限られ、機器分析時の干渉は灰化法に比べて少ないと思われる。よって、塩酸抽出においては、検出器の特性と併せた分析法の構築が必要であると考えられる。

○測定装置の影響について

機関 B の結果が他の機関に比べて高値を示したことが抽出法によるものではないと考えられたことから、装置の影響について検討を行った。

ミネラルの測定では大きく分けて、AAS、ICP 及

びイオンクロマトグラフィの 3 種が考えられる。公定法に記載があるのは AAS 及び ICP であるが、測定機器の詳細条件に関しては記載がない。AAS 法はフレーム法とファーンネス法の 2 種、ICP では発光分光 (AES) 及び質量分析 (MS) があり、その違いにより感度や測定原子種が異なる。今回の検討では 4 機関がフレーム法と灰化法の組み合わせを採用し、残りの機関が ICP 法と塩酸抽出法の組み合わせを採用していた (Table 3)。一般に分光化学分析における誤差要因として、物理干渉、化学干渉、分光干渉及びイオン干渉の 4 種が知られている。AAS では化学干渉及びイオン化干渉が問題となるが、本検討では灰化したことにより化学干渉は還元され、イオン化干渉のみ影響されていると考えられる。他方、ICP では物理干渉及び分光干渉がそれぞれ問題とされ、塩酸抽出ではこれらの影響を減少させることはできなかったと想像される。また、ICP では方式の違いとして軸方向測光と放射光測光の 2 種が存在しており、これらの違いが定量値に影響することも報告されている。⁶⁾ 前者では感度が高く、共存イオンによる干渉作用があることが知られており、今回の検討でもこのようなことが影響している可能性も否定できない。現状ではこれ以上の考察は不可能であるが、測定装置の影響もミネラル分析では考慮する必要があり、公定法においても喚起する必要があると考えられた。

○精度管理について

今回の検討では分析法や測定機器の制限を行わなかったが、結果として HORRAT 値が判定基準 (0.5~ 2.0) を超える事となり、⁵⁾ 信頼性確保のためには分析法を制限する必要があるものと思われる。ただし、RSD_r は 1.85 % と比較的 low 値を示したことから、分析法自体ではなく、装置や検体に依存した影響に関して考慮する必要があるものと考えられた。しかし、粉ミルクのように測定対象成分が多岐にわたる際には、簡便かつ迅速な分析法が許認可試験における時間の短縮に繋が

ることから、分析法を制限するのではなく、各分析法に対して測定対象物を明確にすることにより、複数の分析法を提示することが有効であると考えられる。

現在、栄養表示基準における栄養成分等の分析方法は平成11年4月に施行された分析法が遵守されているはずであるが、本検討において、「乳児用調製粉乳の表示許可の取扱いについて」に準じた分析を行っている旨を記載してきた機関があった。本検討では分析法を制限していないことや分析法に大きな差異がないことから影響は軽微であるが、先の通知は、「特別用途食品の表示許可等に係る留意事項について」にて廃止されており、⁷⁾ 通知が周知されているか疑問が残る。また、栄養成分に関する分析法として、食品標準成分表の作成に用いられた分析法も広く知られており、⁸⁾ 栄養表示基準の分析法と混同されることも想像されることから、広く分析法を波及させることも、妥当性の担保には必要であると考えられる。

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Naに関して検討を行った。非明示で実施したにも関わらず、昨年度よりも表示値に収束した結果が得られた。ただし、室間再現性に関しては問題があることが明らかとなり、現在の公定法に対して、測定機器や試料形態による分析法の分別や適応範囲の限定が必要であることが示唆された。

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) 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) https://rproxy.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srnm=1849 , browsed on April 26th, 2010.
- 4) Certificate of Analysis, Standard Reference Material[®] 1849, <https://rproxy.nist.gov/srmors/certificates/1849.pdf?CFID=1064095&CFTOKEN=7e1a02dafa624296-39981BDA-CDE3-843D-9FBDE3A32BC906E5&jsessionid=f03065930bd35133535f236457773914167e> , browsed on April 26th, 2010.
- 5) 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.
- 6) 森重陽介, 木村淳, SEI テクニカルレビュー, **172**, 100-105, (2008).; <http://www.sei.co.jp/tr/pdf/industrial/sei10535.pdf> , browsed on April 26th, 2010.
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部、基準審査課新開発食品保健対策室長：特別用途食品の表示許可等に係る留意事項について，平成21年2月12日付食安新第0212001号
- 8) 五訂増補 日本食品標準成分表分析マニュアル，国立印刷局；5訂増補版，文部科学省科学技術学術審議会資源調査分科会食品成分委員会（編集），2005年3月。

Table 1 標準作業書

【試料の取扱い】	
	テストミルク
送付時	パッケージの膨張の有無、破損の確認。
送付後	可能な限り低温で、開封まで一昼夜以上保管。
開封時	室温に戻し、袋のまま良く攪拌してから用いる。
開封後	可能な限り低温で保管。パッケージ内に空気を含まないようにする。
注意事項	1袋に約10g含まれております。
【検討について】	
実施方法	検体に含まれるNa濃度は非明示にて行う。 極力昨年度と同じ分析方法を実施してください。
予備検討の必要性	あります。 配布試料内で予備検討もお願いします。
作業書	各研究機関の標準作業書に従う。ただし、検討回数及び試料採取量は以下の指示に従って下さい。
検討回数	本試験としてn=3(三回秤量し、それぞれを検討する)をお願いします。
試料採取量(g)	0.2~2.0gの範囲内をお願いします(報告用シートには実測値を記入して下さい)。
分からないことがあったら	〇〇までご連絡ください。 Mail: -----@nih.go.jp Tel: 0X-YYYY-ZZZZ
【報告事項】	
方法	このファイルをご利用いただき、メールにて返送いただけますようお願い申し上げます。
数字の取扱い	Na濃度のみの有効数字4桁で記載してください。
「報告用データシート」	協力いただいた方の所属、職名、氏名は報告書作成時に必要としますので、ご記入いただけますようお願い申し上げます。 「分析方法」には、「灰化法、塩酸抽出法、誘導結合プラズマ発光分析(ICP)、その他」のいずれかを記入してください(各分析法の概要については「Na分析例」を参照ください)。 「最終容積」は、希釈率も換算した数値を記入してください。また、希釈率の異なる検体を同時に測定される際は、横のセルに追加記載し、「Na濃度」には結果の平均値を記入してください。 「測定点」は、検量線作成に用いた標準溶液の数を記載してください。 「特記事項」には、「ナトリウム分析例」と大幅に方法が異なる手技に関して記載してください。 セルは必要に応じて加工してお使いください(検討する試験管の本数を増加した際など)。
【期限】	
2010年1月末日	厳守していただきたいのですが、期日までの検討が困難な際はご連絡いただけますようお願い申し上げます。
【追加検討について】	
n=3の結果が最終報告としては不適切だと判断される際	テストミルクは当方にてストックがあります。n=3のデータを予めご提出いただいた後、ご希望の際はご連絡ください。 ただし、必須ではありません。

Na分析法

	塩酸抽出法	灰化法	誘導結合プラズマ発光分析(ICP)
【試薬】			
塩酸	原子吸光分析用を希釈して用いる。		
ナトリウム標準溶液	市販品を希釈して用いる。		
【試験溶液の調製】			
	試料2gを精密に量り、ポリエチレン瓶に入れ、1%塩酸200mLを加え、30分間振とうした後ろ過し、試験溶液とする。	試料1~10gを石英ビーカーに精密に量り、電熱器上で予備灰化した後、500℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に10%塩酸5mLを加え、水浴上で蒸発乾固する。更に、10%塩酸5mLを加え、時計皿で覆って30分間熱板上で加温した後、ろ紙を用いて、50mL容ポリエチレン製メスフラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを十分に洗浄した後、水で定容し、試験溶液とする。	
【測定】			
	原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、1%塩酸を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する。測定波長は589.0nmを用いる。		誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度を求める。測定波長は588.995nmを用いる。
【注意点】			
	ガラス器具の使用不可	脂質含量の高いものに適する	

Table 2 非明示検体に含まれるナトリウムの検討結果

	Test Milk	A	B	C	D	E
Sampling (g)	0.5	1	2	1	1	2
1st	—	378.4	492.9	423.6	392.3	407.0
2nd	—	398.1	494.3	404.5	405.8	410.6
3rd	—	375.3	495.8	418.2	399.1	411.0
average (mg/100g)	415.0	383.9	494.3	415.4	399.1	409.5
(%)	—	92.5	119.1	100.1	96.2	98.7
SD	14.0	12.4	1.5	9.8	6.8	2.2
CV	—	3.2	0.3	2.4	1.7	0.5

Table 3 昨年度との分析法の比較

		A	B	C	D	E
20年度	抽出方法	灰化法	灰化法	灰化法	灰化法	灰化法
	測定原理	AAS	NR ¹⁾	AAS	AAS	AAS
	機器	Varian SpectrAA 220FS	NR	Hitachi Z5310	Varian SpectrAA 240FS	Shimadzu AA6600F
21年度	抽出方法	灰化法	塩酸抽出法	灰化法	灰化法	灰化法
	測定機器	AAS	ICP	AAS	AAS	AAS
	機器	Varian SpectrAA 220FS	NR	Hitachi Z5310	Varian SpectrAA 240FS	Shimadzu AA6600F

¹⁾ not reported

Table 4 室間共同試験における併行再現性と室間再現性

分析法	n 数	平均値	SD	CV%	併行再現性 (RSD _r , %)	室間再現性 (RSD _R , %)	HORRAT
各機関の 方法	3	420.0	43.0	10.2	1.85	10.3	2.27

検査機関の信頼性確保に関する研究

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

分担研究者 永田 純一

独立行政法人国立健康・栄養研究所 食品機能プロジェクトリーダー

難消化性デキストリンは、代表的な機能性の水溶性食物繊維である。従来の分析法は、段階的な加水分解反応と脱塩操作の組み合わせによって行われているが、煩雑で処理する容量も多く、操作に時間を要する。今回我々は、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。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共に優れた再現性と直線性を示した。難消化性デキストリンを含む食品の分析では、従来の分析法よりやや高い値を示し、理論値との乖離がみられた。一方で、分析時間の短縮、操作性の向上などの改善が認められた。今後は、分析法としての妥当性を探るため、様々な食品形態での分析精度の確認と室間バリデーションの検討を行う予定である。

協力研究員

独立行政法人国立健康・栄養研究所

中村 礼

A. 研究目的

難消化性デキストリンは、糖や脂質の吸収を穏やかにする働きやおなかの調子を整える生理作用を有した代表的な機能性の水溶性食物繊維である。これまで食品中に含まれる難消化性デキストリンの分析は、ターマミル(熱安定 α -アミラーゼ)、プロテアーゼおよびアミログルコシダーゼを用いた段階的な加水分解反応により生じた3糖類以上の糖含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分画し定量分析を行っているが、従来の分析は、用いる酵素に対応した至適 pH の調製、イオン交換樹脂を用いたカラム処理による脱塩操作を行うため、煩雑で処理する容量も多く、操作に時間を要する。

今回我々は、緩衝作用に優れた MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid)/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。

B. 研究方法

使用した酵素は、食物繊維測定キット(和光純薬工業、大阪)を用い、50mmol/L MES/Tris buffer (pH=6.3、24℃)を作成し加水分解を行った。脱塩は、Waters 社(USA)製 Oasis Plus MCX およ

び Oasis WAX のカートリッジカラムを用いた。試料の酵素処理および脱塩操作の操作手順は、以下のように行った(図-1)。適当量(約 100mg)のサンプルを MES/Tris buffer に溶解し、20・l の熱安定 α -アミラーゼを添加し、100°C 1 時間加水分解を行った。その後、1ml の milliQ 水を加え、60°C に加温した反応液にそれぞれ 20・l のプロテアーゼとアミログルコンダーゼを添加した。この溶液を 60°C で 1 時間さらに加水分解し、反応終了後 90°C 10 分間加温し酵素反応を停止した。反応停止液を No.2 濾紙で濾過し、10% グリセロール溶液を 30・l 内部標準物質として添加した後、10ml に定容した。定容した溶液を Waters WAX Plus および Waters MCX Plus を用いて脱塩し、溶液を蒸発乾固した後、再び一定量に定容した。定容した溶液を HPLC にて分析した。HPLC の分析条件は以下の通りである。カラムは、東ソー社製の TSKgel G2500PWx1 カラムを 2 本使用し、移動相に MilliQ 水、流速 0.5ml/min、カラムオープン 80°C、検出器に示唆屈折率計を用いて分析した。従来の難消化性デキストリンの分析法は、特定保健用食品の分析法に準じた。

C. 研究結果および考察

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、今回我々が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。

カートリッジカラムのイオン交換容量を考慮した脱塩処理を行う必要がある。使用した Waters 社製のカートリッジカラムのベッドボリュームは、約 0.8ml であり、イオン交換容量は WAX plus で 0.6 meq/g、WCX plus で 1.0meq/g である。従って、反応液を処理可能なイオン容量にスケールダウンする必要がある。このスケールダウンによって使用する酵素や溶媒の量を従来の方法と比較して 1/10 量に節約することが可能となった。イオン交換処理が十分でないときは、イオン交換容量の大きいカラム選択も可能である。

実験は新たな分析方法を用いて、内部標準物質(グリセロール)の検出精度および標準物質(ファイバーソル II、松谷化学、兵庫)を処理した際の直線性を確認した。初めに指定濃度の内部標準(グリセロール)溶液を HPLC で反復測定を行い、改良した方法における標準物質の検出精度を検討した。その結果、反復回数 $n=12$: 平均面積土標準偏差(SD)=12,351,016 \pm 682,350 変動係数(CV)=5.5 (%) を示し、小さいばらつきで再現性の高い測定が可能であることが示された。また、図-2 に示したように、難消化性デキストリン標準品が 0 から 100mg までの範囲で相関係数(r)=0.994 を示す高い相関性を確認した。これらの分析の際、脱塩不良によるピークは観察されなかった。次に難消化性デキストリンを含む食品(粉体)を従来の分析法と定量値の比較検討を行った。その結果、従来の方法で分析を行った値は、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。これらの結果から、今回我々が示した難消化性デキストリンの分析法は、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る。

今回の実験で用いた基質量および酵素量は従来の方法の 1/10 量で反応を行っているため十分な加水分解が行われたと考えられるが、難消化性