

200939052A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松本 輝樹

平成22(2010)年05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. 葉酸の微生物定量法における測定精度向上に関する研究

：抗生物質耐性菌及びマイクロプレートの利用と試料前処理条件の検証

遠藤 香

----- 7

2. HPLC を応用したビタミン B₁₂ 分析法の開発

松本 輝樹

----- 15

3. カラムスイッチング HPLC 法を用いた食品中ビタミン D 分析法の開発

竹林 純

----- 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 29

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（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検討を行った。

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一方で、煩雑で専門的な分析操作等に起因する低再現性や、結果を得るまでに時間を要する等、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した。また、分析操作の簡略化及び効率化について検討し、手技の削減に伴う再現性の向上を図った。

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応用することで、検出感度の飛躍的進歩が認められている。そこで、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を確立するべく検討を行った。

本年度も昨年に引き続き、測定対象としてビタミン B₁₂ (VB₁₂) 及び葉酸に焦点を絞り、検討を行った。VB₁₂ については、認証標準物質を用いた HPLC での定量法に関して検討を行い、ppm 単位で CN-cbl を含有するサプリメントに対しては充分定量可能であることを明らかとした。葉酸の分析法においては、クロラムフェニコール耐性菌を用いたマイクロプレート法と公定法の比較検討を行い、その妥当性を確認すると共に、前処理法における酵素処理と不溶物の除去に関する定量値への影響に関して検討を行い、現行法では葉酸値が低く検出されていることが示唆された。

また、現在の公定法において最も測定に時間を必要とするビタミン D に関して、効率的な分析法を構築するべく、カラムスイッチシステムを応用した分析法に関して検討を行い、これまでその分析に 2~3 日要していた分析時間を、一両日で解析可能にすることが出来た。

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

遠藤香 新潟県立大学 人間生活学部 健
康栄養学科 助手

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（公定法）」¹⁾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、部分的な改正は行われているが、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・高感度分析における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言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、イノシトール、ナイアシン、パントテン酸、ビオチン、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂ (VB₁₂) 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イノシトールとビオチン以外の 5 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。VB₁₂ 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^{2),3)}、申請者は既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 VB₁₂ 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を行った。本年度は、VB₁₂ 及び葉酸に着目し、MBA における問題点を明確にすると共に、測定誤差の一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。また、分析法として HPLC 法が採用されているにも関わらず、操作の煩雑さから再現性に問題のあることが知られているビタミン D (VD) についても検討を行い、カラムスイッチシステムを応用した分析法について検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 葉酸の微生物定量法における測定精度向上に関する研究：抗生物質耐性菌及びマイクロプレートの利用と試料前処理条件の検証

MBA における分析操作の煩雑さが、低い分析精度の一因として考えられるため、葉酸

のMBAに関し抗生物質耐性菌とマイクロプレートを用いた簡便化を行い、その妥当性について検証した。また、天然の食品に含まれる葉酸は、糖質やタンパク質の高次構造にトラップされていることから⁴⁾、不溶物を除去することなく、分解酵素の組み合わせの異なる4通りで処理し、“Highest Value”を葉酸含量として採用する方法が汎用されている。公定法では、遠心処理と conjugase のみによる酵素処理が行われており、十分な抽出操作が行われているか、疑問が残る。そこで、酵素分解と不溶物の除去に関する比較も併せて検証を行った。

2. HPLC を応用したビタミン B₁₂ 分析法の開発

国内において食品添加物として添加することが認められている VB₁₂ の成分は CN-cbl のみであり⁹⁾、天然由来の成分を含まないサプリメントにおいては他の活性成分を定量化する必要はない。また、VB₁₂ が高濃度に存在する際には HPLC による定量も公定法に記載されていることから、その応用について検討した。

検体として CN-cbl のみが存在するサプリメントを試料とし、CN-cbl の HPLC での検出限界や定量限界に関して明らかにすると共に、サプリメントの定量化を行った。また、CN-cbl 含有量の少なさによる感度不足を補うために、固相抽出の応用適否に関しても併せて検討を行った。

3. カラムスイッチング HPLC 法を用いた食品中ビタミン D 分析法の開発

VD 分析法は、試料をけん化することによって測定妨害物質である油脂を極力除去し、HPLC を用いた分画及び定量操作によって測定が可能となる。しかし、操作が煩雑で、

解析までに長時間を要することから、より精確かつ迅速な分析法の開発が求められている。そこで、本研究では試料として市販の乳児用調製粉乳を用いた VD の自動分析化の検討を行った。常法に従って試料をけん化・溶媒抽出処理した後、ヘキサンに転溶したものを試験溶液とした。前処理カラムとしてジオール型カラムを、定量分析用にシリカゲルカラムを用いたカラムスイッチングシステムを構築し、VD の定量分析を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 葉酸の微生物定量法における測定精度向上に関する研究：抗生物質耐性菌及びマイクロプレートの利用と試料前処理条件の検証

耐性菌とマイクロプレートを用いた方法は、認証標準物質である SRM 3280 を検体とした公定法との比較から、ほぼ同じ結果が得られ、その応用は適しているものと考えられた。プレート法では公定法に比べ操作数が少なくなることから、人為的な誤差は減少するが、試験溶液が微量になったことでわずかな影響も無視できなくなっていた。

公定法に記載されている試料の前処理法では、*Lactobacillus rhamnosus* が葉酸の polyglutamate に対する感受性を持たないことから、conjugase による分解が必須である。しかし、公定法に記載のオートクレーブによる加熱抽出及び conjugase 処理の方法では、葉酸の遊離が不十分であることが明らかとなった。

天然由来の葉酸化合物は、糖やタンパク質と結合していることがあり、その抽出には amylase 及び protease を用いた緩和な条件下での分解操作が用いられている。今回、これらの酵素を用いた抽出方法を公定法と比較したところ、公定法の処理が最も高い値とは

ならず、最適条件ではないことが明らかとなった。公定法の意義や精度の点から、抽出方法に柔軟性を持たせることは好ましくないが、検体によって最適な酵素分解方法が異なったことから、より精確な値を提供するためには複数の分析法を提示することも必要であると考えられた。

また、不溶物の存在は吸光度の測定において影響することから、遠心分離やろ過による除去操作が必要である。しかし、今回不溶物中に未抽出の葉酸が含まれているか否か、加熱抽出後の検体に対して遠心分離の有無による影響を調べたところ、定量値に差が見られ、沈殿物質に活性成分が残っていることが明らかとなった。

2. HPLC を応用したビタミン B₁₂ 分析法の開発

認証標準物質を用いた VB₁₂ の定量化に関する検討では、特に煩雑な前処理法なくして直接 CN-cbl を定量することが可能であった。また、HPLC においては、検体に ppm 単位の濃度で CN-cbl が含まれていれば定量化は可能であり、MBA よりも高精度の定量が可能であることが明らかとなった。ただし、固相抽出を用いた検討では、検出感度として 50 % 改善されたが、不純物の除去及び濃縮操作としては不十分であり、今後も検討する余地が残された。

現状では MBA の代替法としての HPLC 法は構築できていないが、検体によって分析法を変えることにより、より精度の高い分析結果を提供できる可能性が示唆された。

3. カラムスイッチング HPLC 法を用いた食品中ビタミン D 分析法の開発

今回の分析条件では、VD を単一シグナルとして検出することは出来なかったが、ピー

クの立ち上がりからピークトップは良好な分離を示していた。ピーク高さに基づいた VD の定量では、栄養表示基準で定められている表示値の 80~150 % の許容誤差範囲内の結果が得られた。また、公定法に比べてサンプルのロス を 50 % 改善し、人為的操作を削減したことにより、感度や精度の向上も顕著であると思われる。今回はカラムの選択性や再現性などに関して吟味していないが、分析条件をさらに検討し、最適化が可能となれば、現在の公定法以上の分析精度を有する代替法になり得ると考えられる。

D. 結論

1. 葉酸の微生物定量法における測定精度向上に関する研究：抗生物質耐性菌及びマイクロプレートの利用と試料前処理条件の検証

現在、葉酸の主たる分析法である MBA について、耐性菌とマイクロプレートを使用しても、妥当性のある結果を得ることができ、実験操作の簡便化や精度向上に有効であることが示された。また、試料の前処理方法を検証したところ、試料の種類によって差はあったが、公定法記載の前処理方法では葉酸含量を過小評価している可能性が示された。さらに、試料の遠心処理などの不溶物の除去は、全ての酵素処理終了後に行うことで抽出効率が改善し、葉酸の定量値を高くとることが可能であることが示された。

2. HPLC を応用したビタミン B₁₂ 分析法の開発

MBA の代替法として、VB₁₂ の HPLC による定量化について検討を行った。これまで VB₁₂ の定量には MBA が汎用されていたが、CN-cbl として ppm 単位の含有量がある際は HPLC でも定量することが可能であり、再現

性も MBA より高いことが明らかとなった。

また、効率の問題があるものの固相抽出を用いた前処理法も有効な手段であり、今後より低濃度の VB₁₂ に対する HPLC での定量化に寄与できる可能性が示唆された。

3. カラムスイッチング HPLC 法を用いた食品中ビタミン D 分析法の開発

食品中に含まれている VD は非常に微量であり、高精度の分析を行うことが困難な栄養成分である。栄養表示基準における VD 分析の公定法としては、夾雑物の影響を除き分析感度を上げるため、二段階 HPLC 法が採用されている。しかし、この方法には、分析操作が非常に煩雑であり人的誤差が大きいという問題点だけでなく、逆相分取 HPLC 時にサンプルのロスが生じ、極性溶媒に溶解しない夾雑物が VD の溶解を阻害するという問題点がある。そこで、これらを改善する分析方法として、カラムスイッチング HPLC 法を用いた VD 分析法を開発した。この方法で4種類の乳児用調製粉乳中の VD 含量を実測した結果、夾雑物のピークと VD のピークの分離が若干不完全であったものの、栄養表示基準で定められている表示値の 80~150% の許容誤差範囲内の分析値が得られた。カラムスイッチ HPLC による VD 分析法は、分析条件をさらに検討し、最適化に成功すれば、現在の公定法以上の分析精度を有する代替法になり得ると考えられる。

本年度は、昨年度の検討から明らかとなった公定法の問題点を改善するための方法として、より精度の高い分析法の構築に関して検討を行った。しかし、多種多様な食品マトリックスによる影響を完全に排除することは非常に困難であり、食品形態に即した複数の分析法の提示は反って混乱を招き、分析精

度に影響を与えることも考えられる。

公定法は、栄養表示を行うものに対しては分析精度の担保が重要であるが、消費者にとっては自らの健康づくりに資する食品を選択する上で適切な情報を得ることが重要であり、真値分析としての側面が強調される。難しい問題ではあるが、現状では公定法に対して真度と精度を併せ持った高度の分析法が要求されており、今後も何らかの形で公定法に関する研究が行われ、より良い分析法が提供されることを期待したい。

E. 健康危険情報

なし

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).
- 4) Aiso, K. *et al.*, *Vitamin (jpn)* **72**, 429-36 (1998).
- 5) 第 8 版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, (2007).

分担研究報告書

葉酸の微生物定量法における測定精度向上に関する研究 ：抗生物質耐性菌及びマイクロプレートの利用と 試料前処理条件の検証

研究分担者 遠藤香 新潟県立大学 人間生活学部 健康栄養学科

研究要旨 「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、葉酸の主たる分析法として記載されている微生物定量法（MBA）の測定精度向上を目的とした、抗生物質耐性菌（耐性菌）の応用及び葉酸の効率的抽出方法に関して検討を行った。

公定法では、抗生物質に耐性を持たない菌（非耐性菌）を用いて、試験管内で葉酸特異的に菌を培養する方法を採っている。しかし、本法では加熱滅菌操作や相当数の試験管を用意する必要があり精度管理が難しく、吸光度測定やデータ処理と共に手間と時間を要することが知られている。そこで、本研究では耐性菌とマイクロプレートを用いることで、分析を簡便化した。検体として認証標準物質（ビタミンサプリメント）を用いた検討では、栄養表示基準で認められている誤差範囲内（-20~+80%）に定量値は得られ、公定法と比較して妥当性のある結果が得られた。

一方、前処理法の検討においては、酵素分解反応の効果及び不溶物の除去操作について検討を行った。天然の食品に含まれる葉酸は、糖質やタンパク質の高次構造にトラップされていることから、分解酵素の組み合わせの異なる4通りで処理し、“Highest Value”を葉酸含量として採用する方法が汎用されている。公定法における酵素処理は conjugase のみであることから、酵素複合処理と比較してどちらが最適か2種類の試料について検証した。その結果、試料によって適切な酵素の組み合わせは異なったものの、公定法では “Highest Value” とならず、葉酸を過小評価している可能性が示唆されたことから、分析方法の改良が必要と思われる。また、試料の遠心分離は、酵素処理前に行うと、葉酸含量の過少評価につながることを示され、適時導入が重要であることが示された。

A. 研究目的

葉酸には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が、微生物定量法（MBA）はそれらの総量として測定可能

であり、現在最も感度が良いとされている分析法である¹⁾。日本における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（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いており、葉酸分析では、含量の多い食品にのみ HPLC 法が認められているが、基本的には MBA を用いることとされている。公定法では、*Lactobacillus rhamnosus* (*L. casei*, ATCC 7469, 非耐性菌) を使用するが、分析操作全般において無菌的に行う必要があるため、操作が煩雑である。しかし、近年抗生物質のクロラムフェニコールに耐性を有した菌 (ATCC 27773、耐性菌) が ATCC から入手可能であり、この菌を用いることにより無菌操作は不要となる。また、公定法では試験管で培養する方法を採っているが、近年 96-well マイクロプレートで培養する方法も提案されている²⁾。マイクロプレートを用いることにより、これまで試験管で操作していた時と比較して、試薬使用量の低減、操作数の減少や測定・解析の自動化による時間短縮など利点が多く、耐性菌と併用することにより、分析を大幅に簡便化できることが示唆された。この方法では滅菌のための加熱操作や人為的な操作数が削減されるため、間接的に精度の向上も期待できることから、本法が公定法の代替法となるか検討を行う事とした。

一般に食品中の葉酸は、タンパク質や糖質の高次構造にトラップまたは結合されており³⁾、測定する際にはその結合を切断する必要がある。Aiso³⁾ や Tamura⁴⁾ は、amylase、protease、葉酸のポリグルタミン酸鎖を切断する conjugase を用いた Trienzyme Treatment (図)⁴⁾ と呼ばれる酵素処理方法を提案しており、多くの研究で採用されている⁵⁻⁷⁾。これは、試料に対して4通りの酵素処理をした際に、得られた結果の "Highest Value" を葉酸含量として採用するものである。一方、公定法における酵素処理は、未だ conjugase のみであることから、conjugase 単独処理と Trienzyme Treatment のどちらが適切か2種類

の試料について検証した。また、図⁴⁾によると、Trienzyme Treatment では conjugase 処理に供する前のみ、試料を遠心分離することとなっているが、公定法では計2回の不溶物除去操作を行っている。不溶物も時として酵素の基質となり得ることから、適切な不溶物除去に関しても検討を行ったので以下に報告する。

B. 研究方法

1. 耐性菌とマイクロプレートの適用

ATCC よりクロラムフェニコール耐性の *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 27773) を入手した。National Institute of Standards and Technology (NIST) より、認証標準物質である Standard Reference Material (SRM) 3280 (Multivitamin/ Multielement tablets) を、添付書類に従って、乳鉢で粉碎し、0.1 M リン酸緩衝液に溶解し、試料溶液とした。適宜希釈したのち、試料に含まれる葉酸含量を、96-well マイクロプレートを利用した MBA により測定した⁸⁾。

2. 試料前処理の検討

試料として、凍結乾燥した Chicken Liver と、SRM 1849 (Infant/ Adult Nutritional Formula) を用いた。なお、酵素及び遠心処理における葉酸の測定には、1. で用いた耐性菌による定量法を採用した。

2-1 酵素処理

Tamura らの方法⁴⁾に従って、4種の酵素処理を施した(図)。なお、conjugase の調整は公定法に示されているチキンパンクレアス由来ではなく、ラット血清由来のものを使用した。

2-2 遠心処理

2-1 で "Highest Value" を示した試料につ

いて、熱処理後の遠心処理の有無による葉酸含量の変化を比較した。

(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

1. 耐性菌とマイクロプレートの適用

SRM 3280に含まれる葉酸を、耐性菌にて測定した。n=2で検討したところ、NISTの保証値 (394 µg/ g) に対して、測定値は95.2%であった。また、公定法による検討では、測定値は99.2% (n=2) であり、若干耐性菌による検討値が低くなったが、%SDは両者とも約5%であった。

2. 試料前処理の検討

2-1 酵素処理

凍結乾燥した Chicken Liver と SRM 1849 に対して Trienzyme Treatment を施し、クロラムフェニコール耐性菌を用いて葉酸含量を測定した結果を **Table 1** に示した。Chicken Liver では、各処理群に差が見られ、公定法の前処理 (1) よりも (4) の方法が "Highest Value" を示した。また、(2) 及び (3) の前処理では未処理の (5) に比べて定量値が低下しており、不用意な前処理は反って悪影響を及ぼすことも考えられた。SRM 1849 では、保証値 2.11 mg/ kg に対して、公定法の前処理 (1) は表示値に近い値が得られた。

両検体の測定共に誤差が大きく、また一義

的に有効な方法も示されなかったことから、最適な前処理法を評価することは、適わなかった。

2-2 遠心処理

2-1 で "Highest Value" を示した前処理法について、熱処理後の試料に遠心処理を施し葉酸含量を測定した結果を、**Table 2** に示した。SRM 1849 では遠心処理による葉酸含量の減少は14%であったが、Chicken Liver では約2/3にまで減少した。公定法でも加熱抽出後に遠心分離を行っているが、この結果から不溶物中にも葉酸活性を有する化合物が残っており、過小評価の可能性が示唆された。

D. 考察

クロラムフェニコール耐性菌及びマイクロプレートを用いた検討から、SRM 3280に含まれる葉酸を測定したところ、NISTの保証値に対して測定値は95.2%であり、栄養表示基準 (平成15年4月24日 厚生労働省告示第176号) で認められている表示値の誤差範囲内 (-20~+80%) であった。本検討結果は、Nelson らによる検討結果⁹⁾ とほぼ一致しており、抽出方法は適切であったと思われる。公定法との比較から、耐性菌とマイクロプレートを用いた方法でも、妥当性のある結果を得ることができ、この方法を適用することにより、作業数と時間を大幅に短縮できることが明らかとなった。ただし、検討数が少ないことから、真偽を判断するには更なる検討を要するものと思われる。また、検討した全ての検体で測定誤差が大きく、精度に問題があることも示唆された。しかし、この結果は今回に限ったことではなく、これまでに報告されているマイクロプレート法の検討結果でも、測定誤差として20%近くあることが報告されており (データ不記載)、試験に用いる検体量が微量になったことで、わず

かな影響も無視できなくなっている可能性が示唆された。

試料前処理における、酵素処理の組み合わせについて検討したところ、Chicken Liverでは(4)の全ての酵素を用いた処理が、SRMでは(2)の α -amylaseとconjugaseの組み合わせで、“Highest Value”を示した。現行の公定法は、Table 1の(1)のconjugaseのみに相当するが、Chicken LiverでもSRMでも“Highest Value”とはならなかった。従って、公定法による分析では、食品に含まれる葉酸含量を過小評価している可能性がある。また、酵素処理前の試料に対して遠心処理を施すことにより、葉酸値の低下が認められた。現在の公定法では遠心分離やろ過などの不溶物の除去をそれぞれ1回ずつ行うが、今回の検討結果では遠心分離によって酵素の基質となるべきものが除去されたこととなり、改善の余地があることを示した。

非耐性菌を用いる場合、MBAの前に試料及び測定培地に何らかの滅菌操作が必要となる。前年度に報告した通り、オートクレーブによる滅菌では、葉酸が分解する。回避するためには滅菌フィルターを用いた滅菌処理が想定されるが、本検討結果から試料においては遠心処理による葉酸含量の低下を招いており、未抽出の葉酸をフィルターで除去してしまう可能性がある。よって、非耐性菌を用いる場合、フィルター滅菌を施すタイミングは、葉酸が完全に抽出されたと考えられるconjugase処理後が適切であると思われる。なお、耐性菌を用いれば、葉酸の過小評価につながる可能性のあるこれらの滅菌操作は不要であり、加熱操作の影響を回避できる点で、分析精度の向上が期待される。

公定法において、conjugaseは水に溶解したチキンパンクレアスをイオン交換樹脂で処理し、葉酸を除去することとなっている。

最近の報告では、試料が入手し易く、葉酸の除去処理が簡便であることから、ラットの血清に活性炭を加えて、葉酸を除去する方法が取られる³⁾。conjugaseの原料の違いが分析に影響を与えるかどうか疑問が残るが、意見も二分している¹⁰⁾。公定法ではチキンパンクレアスと豚腎臓アセトンパウダーの二つの酵素基質が記載されているが、由来の違いによる結果の差も考えられることから、どちらかに制限することも分析精度の観点からは重要である。現在(2010年5月時点)、前者は製造中止となったことから、今後は後者のみの利用となりその影響はなくなるものと考えられる。吸着剤に関しては、イオン交換樹脂よりも安価な活性炭の利用は試験者の負担を軽減する意味でも有効であるが、操作法の不確かさは結果に影響することから、どちらかに制限することが肝要であると思われる。

E. 結論

現在、葉酸の主たる分析法であるMBAについて、耐性菌とマイクロプレートを使用しても、妥当性のある結果を得ることができ、実験操作の簡便化や精度向上に有効であることが示された。また、試料の前処理方法を検証したところ、試料によって最適な抽出方法は異なり、公定法の前処理方法では葉酸含量を過小評価している可能性が示された。さらに、試料の遠心処理などの不溶物の除去は、全ての酵素処理終了後に行うことで抽出効率が改善し、葉酸の定量値を高くとることが可能であることが示された。

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) Quinlivan, E.P. *et al.*, *Anal. Biochem.* **348**, 163-84 (2006).
- 2) Tamura, T. Microbiological assay of folates. In: Picciano M.F., Stokstad E.L.R., Gregory J.F. III, *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*, New York: Wiley-Liss, P121- 137 (1990).
- 3) Aiso, K. *et al.*, *Vitamin (jpn)* **72**, 429-36 (1998).
- 4) Tamura, T., *J. Nutr. Biochem.* **9**, 285-93 (1998).
- 5) Johnston, K.E. *et al.*, *J. Food. Sci.* **67**, 817-20 (2002).
- 6) Johnston, K.E. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6338-40 (2004).
- 7) Goyer, A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3523-28 (2007).
- 8) Horne, D.W., *Methods Enzymol.* **281**, 38-43 (1997).
- 9) Nelson, B.C. *et al.*, *J Chromatogr A* **1135**, 203-211 (2006).
- 10) Hyun, T.H. *et al.*, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) **230**, 444-54 (2005).

Table 1 “Trienzyme Treatment” による Chicken Liver と SRM 1849 中の葉酸含量

	Chicken Liver	SRM 1849
(1) Conjugase Alone	51.7±5.16	1.81±0.21
(2) α -amylase and conjugase	41.5±2.78	2.13±0.16
(3) Protease and conjugase	38.2±2.06	1.96±0.04
(4) α -amylase, protease and conjugase	73.0±16.3	1.68±0.44
(5) No Treatment	47.5±5.77	1.59±0.04

Table 2 遠心処理の検討

	Chicken Liver	SRM 1849
遠心処理なし	45.6±12.9	1.63±0.05
遠心処理あり	28.4±4.89	1.40±0.14

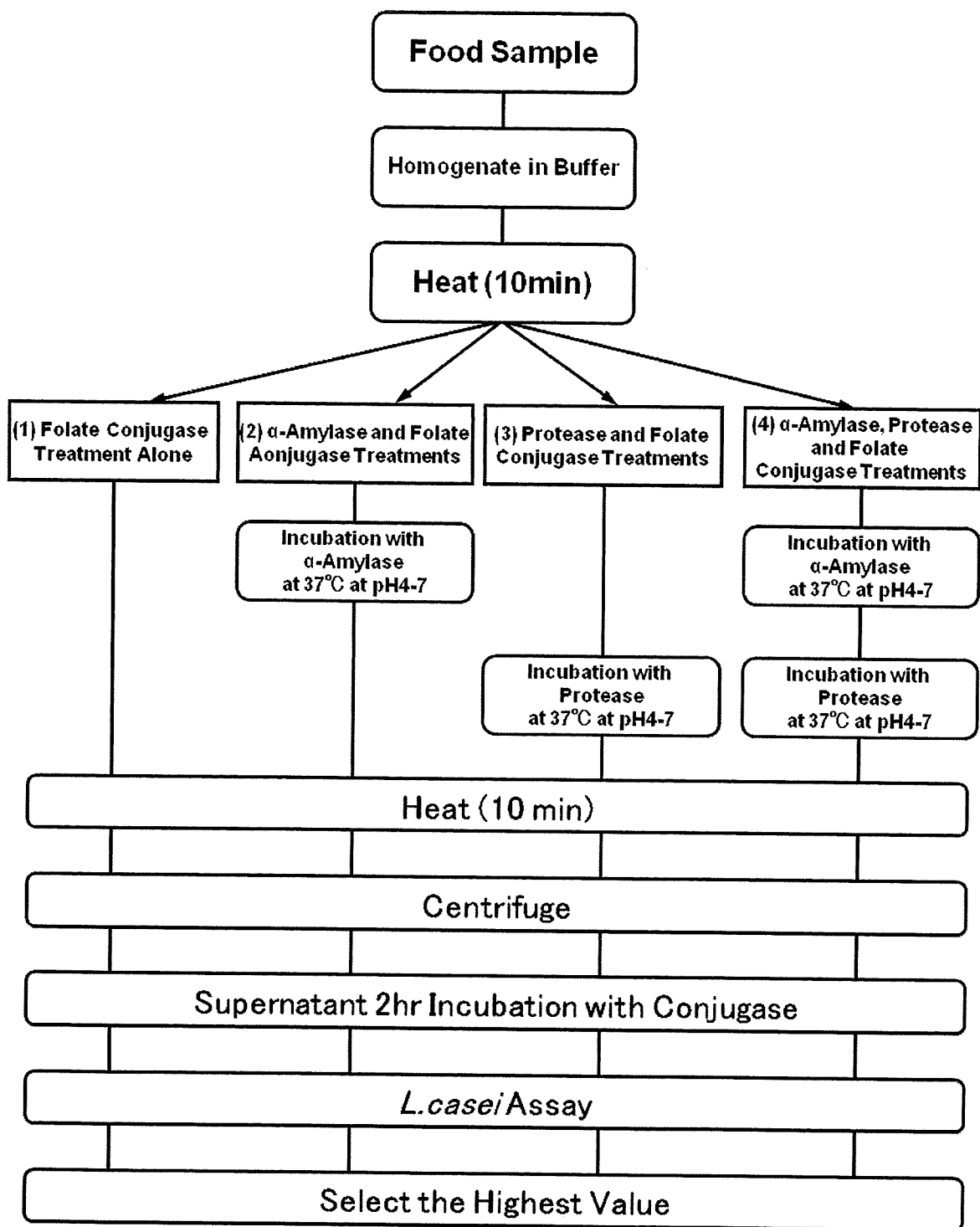


図 Trienzyme Treatment のフローチャート⁴⁾

分担研究報告書

HPLC を応用したビタミン B₁₂ 分析法の開発

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

研究要旨 現在ビタミン B₁₂ (VB₁₂) 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 (MBA) 及び高濃度に存在するときに限り HPLC 法である。MBA は再現性に問題がある事や操作に時間を要することが知られており、代替法の設定が望まれている。近年分析機器の進歩から、高感度検出に関する報告例が見られるようになったが、公定法として採用するには汎用性の点で問題がある。そこで、本研究では汎用性を考慮し、HPLC での定量化に関して検討を行い、簡便・迅速な定量法を開発した。また、固相抽出 (SPE) を応用した分析法についても検討を行い、前処理における SPE の有用性について検討した。この結果、現在一義的に用いられている MBA 法を、試料形態によっては HPLC 法でもより精度の高い VB₁₂ 分析を行うことが可能であることや、SPE によって再現性を損なうことなく感度を向上させることが可能であることを明らかとした。

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 B₁₂ (VB₁₂) 定量法¹⁾は、乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (ATCC 7830) を用いた微生物定量法 (MBA) 及び高濃度存在する時に限り HPLC 法である。前者は活性成分の総量を測定するのに適していることや、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り、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 VB₁₂ 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 が選択されている。しかし、近年健康食品として市場に氾濫しているビタミンサプリメントでは、VB₁₂ として含有されるのは食品添加物として使用が認められているシアノコバラミン (CN-cbl) がほとんどである。その含有量は、他のビタミンに比べて明らかに微量 (ppm 単位) であるが、構成成分が単一であることから、感度の向上さえ加味出来れば HPLC での分析も可能であると考えられる。

近年分析機器の発達により、低濃度の VB₁₂ に対しても高感度検出器 (質量分析計: MS など) を用いた分析例が散見されている

2)。しかし、MS を用いた分析では、汎用性に欠けることや VB₁₂ においては再現性の面で問題があることから、公定法に採用するには適していない。

そこで本研究では、比較的に応用例の多い固相抽出に関して検討を行い、HPLC での CN-cbl 分析について検討を行った。また、検討にあたり、HPLC での検出下限 (LOD) 及び定量下限 (LOQ) に関して検討を行い、その適応範囲を明らかとした。

B. 研究方法

MBA 代替法として、固相抽出を応用した HPLC 法の開発を行った。

検討内容として、HPLC での CN-cbl の LOD 及び LOQ を明らかにすると共に、その妥当性を評価するために、検体として認証標準物質を用いた前処理法と HPLC の条件の最適化を行った。

1. 試料

検体には分析法の妥当性確認を考慮して、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 Standard Reference Material 3280 (SRM 3280, Multivitamin/ Multielement Tablets) を用いた³⁾。

2. 固相抽出カラム

固相カラムには陽イオン交換樹脂 (InertSep[®] SCX, 200 mg/ 3 mL, GL Sciences) を用い、比較検討用として官能基の異なる陽イオン交換樹脂 (InertSep[®] PRS, 200 mg/ 3 mL, GL Sciences) 及び ODS (InertSep[®] C18, 200 mg/ 3 mL, GL Sciences) を用いた。

3. HPLC 装置

測定条件を以下に示す。

装置: Shimadzu 10A series HPLC system (Shimadzu Technology)

カラム: Inertsil ODS-3 column (4.6× 250 mm,

5 µm; GL Sciences)

Oven temp.: 40 °C

Injection volume: 10 or 75 µL

Mobile phase: linear gradient condition of A)

CH₃CN and B) Water, 0~ 2.5 min, A: B= 5: 95 hold; 2.5~ 7.5 min, A: B= 5: 95~ 20: 80 gradient; 7.5~ 15 min, A: B= 20: 80 hold

Flow rate: 1.0 mL/ min.

Detection: UV (550 nm)

4. 検量線の作成

CN-cbl 標準溶液を 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 及び 10.0 µg/ mL の濃度に調整し、それぞれ 6 回分析を行った。ノイズの算出には、試料導入から 2.5 min 間のベースラインをピーク高さとして検出・平均化したものの標準偏差 (SD) を求め、その 2 倍をノイズとした。LOD 及び LOQ はそれぞれシグナルノイズ (SN) 比の 3 倍及び 10 倍とした。検量線は各測定点のピーク面積を平均化したものに対して、最少二乗法による直線近似式として表した。

5. 抽出方法⁴⁾

タブレットは 1 batch から半量 (15 個) を乳鉢に取り、均質化するまで粉碎し遮光密封保存した。その 1 g を遠心管にとり、水 10 mL を加えて、攪拌し 10 分間超音波処理した。その後遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 20 °C) を行い、上澄み液を 50 mL メスフラスコに回収した。抽出操作は計 4 回行い、50 mL に定容したものを試験溶液とした。

また、HPLC にて直接分析を行う際には、試験溶液をフィルターろ過したのを用いた。

6. 固相抽出法

固相抽出カートリッジは洗浄時から乾燥させることなく、連続溶出を行った。なお、各抽出操作は、予め標品を用いた予備検討を行い、最適化した。

1) SCX 及び PRS の抽出法

カートリッジを MeOH 5 mL にて洗浄後、さらに純水 10 mL で洗浄した。そこに試験溶液 3 mL を正確に添加し、純水で洗い込んだ後、MeOH: 1M NaCl= 1: 1 溶液 2 mL で溶出させ、直接 2 mL 容メスフラスコに回収し定容した。

2) ODS の抽出法⁵⁾

カートリッジを MeOH 5 mL にて洗浄後、さらに純水 10 mL で洗浄した。そこに抽出液 3 mL を正確に添加し、純水で洗い込んだ後、50 % CH₃CN 溶液 2 mL で溶出させ、直接 2 mL 容メスフラスコに回収し定容した。

(倫理面への配慮)

本研究において倫理面に考慮すべき事項は検討していない。

C. 研究結果

公定法に記載の HPLC 法では、定組成溶媒での分析について記載されている。しかし、CN-cbl はピークがブロード化しており、シグナルを検出し難かったことから、グラジエント溶媒で検討することとした (Fig. 1)。これにより、SN 比は約 3 倍改善され、より低濃度の検体が検出可能となった。

ピーク面積に基づいた検量線の作成では、検討した標準溶液の範囲では直線に近似した (Fig. 2)。CN-cbl の LOD 及び LOQ はそれぞれ、0.07 µg/mL 及び 0.27 µg/mL であった。

SRM 3280 からの CN-cbl の抽出条件については、溶媒の種類及び回数に関して検討を行った。これまでに報告されている抽出溶媒に関して検討を行ったが⁶⁾、効率に大きな変化は見られなかった。ただし、熱水抽出において CN-cbl が完全に検出できなかったことから、熱の影響については考慮する必要がある。また、抽出回数は 1 回では不十分であり、

4 回抽出が最適であった。

本抽出条件において得られる試験溶液の CN-cbl 濃度は理論上 0.098 µg/mL であり、LOQ 以上の SN 比を得るためには最低 30 µL の注入量を必要とするが、誤差を軽減するために 75 µL とした。その結果、SRM 3280 に含まれる CN-cbl は 4.8 µg/g (Table 1) と表示値の 4.9 µg/g とほぼ一致した⁴⁾。また、添加回収試験の結果も 95~98 % と問題ない水準にあった (Table 2)。なお、本検討の妥当性について、統計解析を行った結果、併行相対標準偏差 (RSD_I)、日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 2.31 %、2.39 % 及び 12.63 % であり、再現性に優れていることが示唆された。また、HORRAT 値は 0.19 であり、分析法として不備のないことが明らかとなった。

SRM 3280 の CN-cbl 抽出操作において、クリーンアップ操作は行われていない。よって、試料溶液の HPLC 直接導入はカラムに対して劣化を早めることとなり、再現性に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、固相抽出法を用いた試料の前処理について検討した。標準品を用いた検討においては、3 種類の担体とも良好な結果が得られていた (データ不記載)。しかし、今回カラム容量として担体を 200 mg のものを用いて SRM 3280 に含有される CN-cbl について検討を行った結果、C18 では表示値に対して 9.2 % しか回収できず、PRS ではピークとして検出することが出来なかった。しかし、SCX では試料溶液の添加量 3 mL の際、回収率は 98.4 % であり、固相抽出を行っても問題のないことが明らかとなった。ただし、今回の検討では濃縮率として 50 % しか改善できていないことから、SPE を用いることによる利点としては寄与率が低かった。

D. 考察

これまで VB₁₂ の定量に関しては、高感度かつ活性物質を全て定量可能な点から、ほぼ MBA 法が用いられていた。しかし、VB₁₂ の食品添加物として用いられるのは CN-cbl のみであり、感度さえ解決されれば、MBA よりも HPLC を用いた方が精度の高い結果が提供出来るものと考えられる。SRM 3280 に含まれる VB₁₂ は MBA にて求められたものであり、その結果は 4.9±1.9 µg/g と記載されていた⁴⁾。今回 HPLC にて検討した結果よりも MBA にて求められたものの誤差が大きいことから、HPLC 法の方が優位であると考えられる。ただし、HPLC 法では CN-cbl 以外の分解産物で活性を有する物については、極微量であるが故にその定量化は困難であり、total VB₁₂ として定量化することは容易ではない。また、今回検出に用いた波長 (550 nm) において、他の成分による吸収も認められたことから (Fig. 1, sample C)、単純に UV スペクトルの測定では定量化は不可能であり、HPLC による分離精製は不可避である。

今回 SRM 3280 に含まれる VB₁₂ について検討を行ったが、不純物の除去なくして定量が出来たことから、市販のサプリメント (CN-cbl, 1.5µg/0.9 g) に関しても定量化したところ、試料導入量を変更することによって、ほぼ表示値通り (93 %) の結果を得ることが出来た。ただし、VB₁₂ を含有する食品のうち、最も含有量の少ない乳児用調製粉乳に関しては、サプリメントの約 100 分の 1 しか含まれていないことから、本検討では定量化することは出来なかった。

そこで、固相抽出による濃縮・精製の効果について検討を行った。本検討では導入する試験溶液量を最適化することにより、SCX カートリッジにおいて定量化が可能となっ

たが、感度を十分に向上させるには至らなかった。サプリメントに含まれる CN-cbl は 4.9 µg/g であり、検体 1 g に含まれる CN-cbl に対して必要とされる担体量は最低でも約 1 mg であり、本検討に用いた SPE カートリッジは CN-cbl を吸着するに十分なスケールであると考えられる。しかし、結果として PRS 及び C18 に関しては吸着出来ていなかったことから、夾雑物の影響は少なくないものと考えられる。特に C18 に関しては、これまでに応用例が報告されていることから⁵⁾、固相抽出において一つの担体を一義的に応用することは好ましくないと考えられる。よって SCX を CN-cbl の抽出に用いることで全てのサプリメントへ応用が可能になることは難しいと思われる。ただし、50%とはいえ CN-cbl シグナルの明らかな改善は測定誤差の軽減に寄与することは間違いなく、より正確な定量が必要な際には有効な手段であると考えられた。

現在食品添加物として使用されたもののうち、栄養強化を目的とした添加の際にはその記載を省略することが可能である⁷⁾。しかし、定量化の際には添加の有無によって分析法を変えることでより精度の高い表示を行うことも可能であり、延いては許認可試験の迅速化にも貢献可能であると思われる。特に、MBA での定量化を必要とするビタミンのうち、パントテン酸、ビオチン、VB₆、VB₁₂ 及び葉酸は食品添加物として用いられているものが1種のみであり⁸⁾、かつ VB₁₂ よりも含有量が高いことから、HPLC を含めた他の分析法でも充分検討が可能であると考えられる。

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。今回検討した分析法では HPLC を用い、VB₁₂ の検出には UV

を用いていることから汎用性もあり、再現性を考慮した際にも、有効な手段であると考えられる。

E. 結論

MBA に代わる分析法として、VB₁₂ の HPLC による定量化について検討を行った。これまで VB₁₂ の定量には MBA が汎用されていたが、CN-cbl として ppm 単位の含有量がある際は HPLC でも定量することが可能であり、再現性も MBA より高いことが明らかとなった。

また、効率の問題があるものの固相抽出を用いた前処理法も有効な手段であり、今後より低濃度の VB₁₂ に対する HPLC での定量化に寄与できる可能性が示唆された。

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) 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) Luo, X. *et al.*, *Analytica Chimica Acta* **562**, 185-189 (2006).

3) Material Details, SRM 3280 (Last updated: 4/16/2010) NIST, Gaithersburg, MD, https://www-s.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=3280, Accessed 18 May 2010.

4) Certificate of Analysis, Standard Reference Material 3280, NIST, Gaithersburg, MD,

https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/view_certPDF.cfm?certificate=3280, Accessed 18 May 2010.

5) Iwase, H., *J Chromatogr A* **590**, 359-363 (1992).

6) Ye, L., Eitenmiller, R.R. and Landen W.O. (2008) *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences, Second Edition*, CRC Press.

7) 厚生省生活衛生局長通知: 食品衛生法に基づく添加物の表示等について, 平成 8 年 5 月 23 日付衛化第 56 号.

8) 第 8 版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, (2007).

Table 1 SRM 3280 に含まれる CN-cbl の定量結果

	No. 1	No. 2	No. 3
day 1	4.72	4.82	4.80
day 2	4.71	4.80	4.70
day 3	4.74	4.88	5.07
Average (µg/ g)	4.72	4.83	4.86
SD	0.02	0.04	0.19
%SD	0.39	0.83	3.85

Table 2 SRM 3280 に対する添加回収試験結果

	blank	20%	50%	100%
No. 1	98.00	117.44	145.91	199.24
No. 2	95.51	122.87	150.85	204.80
No. 3	94.51	119.73	154.14	203.87
Average (%)	96.01	120.01	150.30	202.64
SD	1.80	2.73	4.14	2.98
%SD	1.87	2.27	2.76	1.47

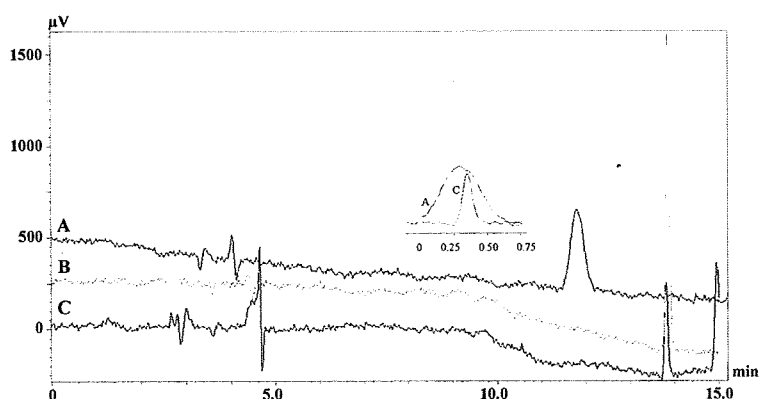


Fig. 1 HPLC による CN-cbl の分析例 (A. 5 µg/ mL Std, isocratic; B. 5 µg/ mL Std, gradient; C. SRM 3280, gradient)

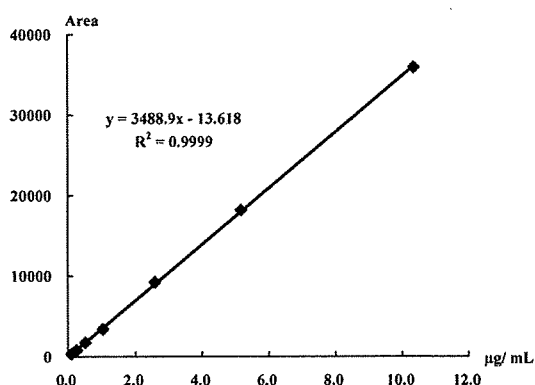


Fig. 2 CN-cbl による検量線例