

## 分担研究報告書

### 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

分担研究者 竹林 純 国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム  
協力研究者 陳 健斌 国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム

【目的】食品中に含まれているビタミン D (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、逆相 HPLC による分画精製を行った後、順相 HPLC による定量を行う、二段階 HPLC 法が採用されている。しかし、現行法には、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、サンプルの一部ロスを生じ、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考えられた。そこで、本研究ではこれらを改善する分析法として、カラムスイッチング HPLC 法を用いた VD 分析法の開発を行った。

【方法】試料として市販の乳児用調製粉乳を用いて検討を行った。試料をけん化処理した後、不けん化物をヘキサン/酢酸エチル混液で抽出・濃縮後、ヘキサンの溶解し試験溶液とした。前処理カラムとしてジオール型カラムを使用し、VD 溶出画分のみをカラムスイッチング法にてシリカゲルカラムに導入し、定量分析を行った。

【結果及び考察】粉乳のクロマトグラムでは、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までは良好な分離を示し、ピーク高さをを用いた 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。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。

#### A. 研究目的

栄養表示基準におけるビタミン D (VD) の分析で明らかとなっている問題点を解決し、より精度の高い分析法を開発するため、以下の研究を行った。

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）」（公定法）に基づき実施されている。食品中における VD 含量は非常に微量であり、その測定は困難である。例として、特別用途

食品の乳児用調製粉乳に含まれる脂溶性ビタミン含量を表 1 に示す。VD 分析の公定法は、夾雑物の影響を除去し分析感度を高める必要があるため、二段階 HPLC 法が採用されている (図 1)。二段階 HPLC 法では、試料をけん化処理した後、VD を含む不けん化物をヘキサン/ 酢酸エチル混液で抽出し、減圧濃縮後、逆相 HPLC (ODS 型) による分取を行い、得られた VD 画分をさらに濃縮し、順相 HPLC (シリカゲル) で定量分析を行う。しかし、この分析法には以下の 3 点の問題点が考えられた。

- 1) 分取 HPLC 及び定量分析 HPLC のサンプル溶液を、全量カラムに導入することは装置に依存するため、サンプルのロスを伴うことがある。
- 2) 分取 HPLC 用のサンプル調製は、移動相溶媒であるアセトニトリル/ メタノール混液で行うが、この際、一部の不けん化物が不溶物となり、VD の溶解を妨げることがある。
- 3) 分析全体で 2~3 日を要す煩雑な分析であり、人的誤差が大きい。

これらの問題点を解決するために、本検討ではカラムスイッチング HPLC 法を用いた VD 分析法の開発を行った。

## B. 研究方法

### 【試験溶液の調製】

試料として市販の 4 種の乳児用調製粉乳を用いた。試料の前処理は公定法に準じて以下のように行った。試験溶液調製のフローチャートを図 1 に示す。試料約 2 g を精秤し、1 % (w/v) 塩化ナトリウム水溶液を 3 mL 加え 70 °C で 3 分間膨潤させた後、1 % (w/v) ピロガロール-エタノール溶液を 10 mL、60 % (w/v) 水酸化カリウム水溶液を 2 mL、固形の水酸化カリウムを 2 g 加え、70 °C で 60 分

けん化した。1 % (w/v) 塩化ナトリウム水溶液を 19 mL 加えたのち、ヘキサン/ 酢酸エチル=9/1 を 15 mL 加え振とう混和、遠心後上清を回収した。同様の抽出操作をさらに 2 回繰り返し、併せた上清をエバポレーターにて濃縮乾固した後、200 µL のヘキサンに転溶し、試験溶液とした。コレカルシフェロール (ビタミン D<sub>3</sub>) の標準液 (0.2 µg/ mL エタノール) 0.5、1、2 mL についても試料と同様のけん化・抽出操作を行い、検量線作成用試験溶液とした。

### 【カラムスイッチング HPLC】

HPLC システムは、島津製作所製のものを用いた (システムコントローラー SCL-10Avp、ポンプ LC-10ATvp、デガッサー DGU-14A、オートサンプラー SIL-10ADvp、カラムオープン CTO-10ACvp、紫外可視吸光検出器 SPD-10Avp、スイッチングバルブ FCV-12AH、溶媒選択器 FCV-11AL、LC ワークステーション CLASS-VP)。

[HPLC 条件 (流路・概略を図 2 に示す)]

前処理カラム: Inertsil DIOL (5 µm, 4.6×250 mm, GL サイエンス)

分析カラム: Inertsil SIL-100A (3 µm, 4.6×250 mm, GL サイエンス)

移動相: ヘキサン/2-プロパノール=1000/4

洗浄液: ヘキサン/2-プロパノール=9/1

流速: 1.6 mL/ min

温度: 40 °C

検出: 265 nm (UV)

注入量: 100 µL

ポンプ -1 及び -2: 0~16 分 移動相、16~50 分 洗浄液、50~80 分 移動相

ポンプ -3: 0~50 分 移動相、50~60 分 洗浄液、60~80 分 移動相

スイッチングバルブ: 0~14 分 ポジション

A、14~16分 ポジション B、16~80分 ポジション A

(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. 結果

4種類の乳児用調製粉乳 (A~D) を用い試験溶液の作成を行ったが、そのいずれにおいても試験溶液調製中に不溶物は生じなかった。図3に前処理カラム (ジオール型) のみで VD 標準品及び粉乳 (A) の不けん化物を分析した結果を示す。VD 標準品は14分から16分の間に前処理カラムから溶出されるので、14~16分の2分間のみ前処理カラムと分析カラムをカラムスイッチング法で直結した (図2、3)。これにより、粉乳不けん化物中の夾雑物で画分以外の物を除くことができる。14~16分の VD 溶出画分は引き続き分析カラム (シリカゲル) で分析され、保持時間42分近辺に VD のピークが検出された (図4)。標準品の分析では、対称性に優れたシャープなピークが得られた。一方、試験溶液の分析では、4種の粉乳いずれも VD のピーク後半が夾雑物のピークと重なっていたが、ピークの立ち上がりからピークトップは夾雑成分とほぼ分離していると考えられた。そこで、VD のピーク高さを用いて定量を行った。検量線作成用試験溶液から得られた検量線は、原点近傍を通過する直線性の高いものとなった (図5)。この検量線を用いて、粉乳の定量を行った結果、実測値は表示値の92~120% となり (表2)、栄養表示基準で定められた VD の許容誤差である表示値の80~150% の範囲内の分析結果が得られた。

### D. 考察

カラムスイッチング法は、2種類の分離特性の異なる順相カラムをスイッチングバルブ (カラム切り替え器) によって連結することにより、前処理カラムによる夾雑物の除去と、分析カラムによる分離・定量を自動的に行うことを可能とした。この方法により、「A. 研究目的」の項で挙げた公定法の問題点を以下のように解決した。

- 1) 前処理カラム (分取カラム) から溶出された全ての VD が分析カラムに供されるので、サンプルのロスが生じなくなり、感度が飛躍的に向上した。
- 2) 試験溶液を脂溶性溶媒で調製するため不溶物が生じなくなった。
- 3) カラムスイッチング HPLC システムを用いることで自動分析化が可能となり、手作業による人的誤差が削減され、オートサンプラーを併用することで、一両日中の分析が可能となった。

今回の分析条件では、検体として用いた4種類の乳児用調製粉乳全てにおいて VD のピーク後半と夾雑物のピークの分離が不完全であったが、ピークの立ち上がりからピークトップはほぼ良好な分離を示した (図4)。そこで、ピーク高さを用いて定量を行い、表示値の92~120% の分析値を得た (表2)。これは栄養表示基準における VD の許容誤差である表示値の80~150% の範囲内にあり、ピーク後半部の分離は充分ではなかったが、カラムスイッチング HPLC 法により VD の定量が行えることが示された。順相分析用の HPLC カラムは、担体として、今回用いたシリカゲル及びジオール型以外にアミノ型及びシアノ型がある。今回の検討では、前処理カラムとしてジオール型を、分析カラムとしてシリカゲルを用いたが、他のカラムの組み合わせで、より良い分離が得られる可能性も

考えられる。さらに移動相組成、流量、カラム温度等の最適化に成功すれば、カラムスイッチング HPLC 法によって高精度の VD 分析を行うことができると期待される。

現在、公定法にはカラムスイッチング HPLC 法を用いて分析を行う栄養成分はない。しかし、日本食品標準成分表におけるビタミン K の分析では既にカラムスイッチング HPLC 法が採用されており（五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル、文部科学省編集（2005））、本法の一般性は、食品分析分野においては低くないと考えられる。従って、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。

#### E. 結論

食品中に含まれている VD は非常に微量であり、高精度の定量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 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、サンプルの一部ロスを生じ、逆相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考えられた。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 のピークの分離が不十分であったものの、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。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

表 1. 特別用途食品の乳児用調製粉乳に含まれる脂溶性ビタミン含量

成分	100 kcal 当たりの組成
ビタミン A	60 ~ 180 µg
ビタミン D	1.0 ~ 2.5 µg
ビタミン E	500 ~ 5000 µg

出典：特別用途食品の表示許可等について（平成 21 年 2 月 12 日 食安新発第 0201002 号）

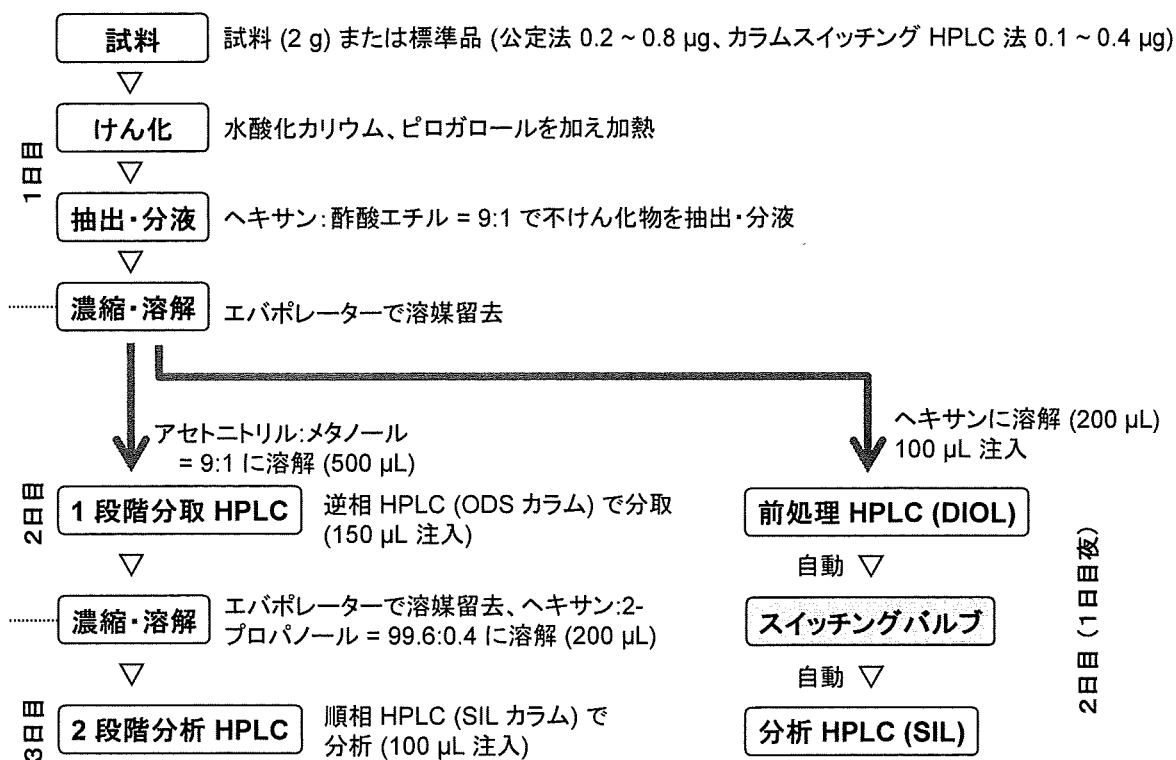


図 1. 二段階 HPLC 法 (公定法) 及びカラムスイッチング HPLC 法による VD 分析フ

ローチャート

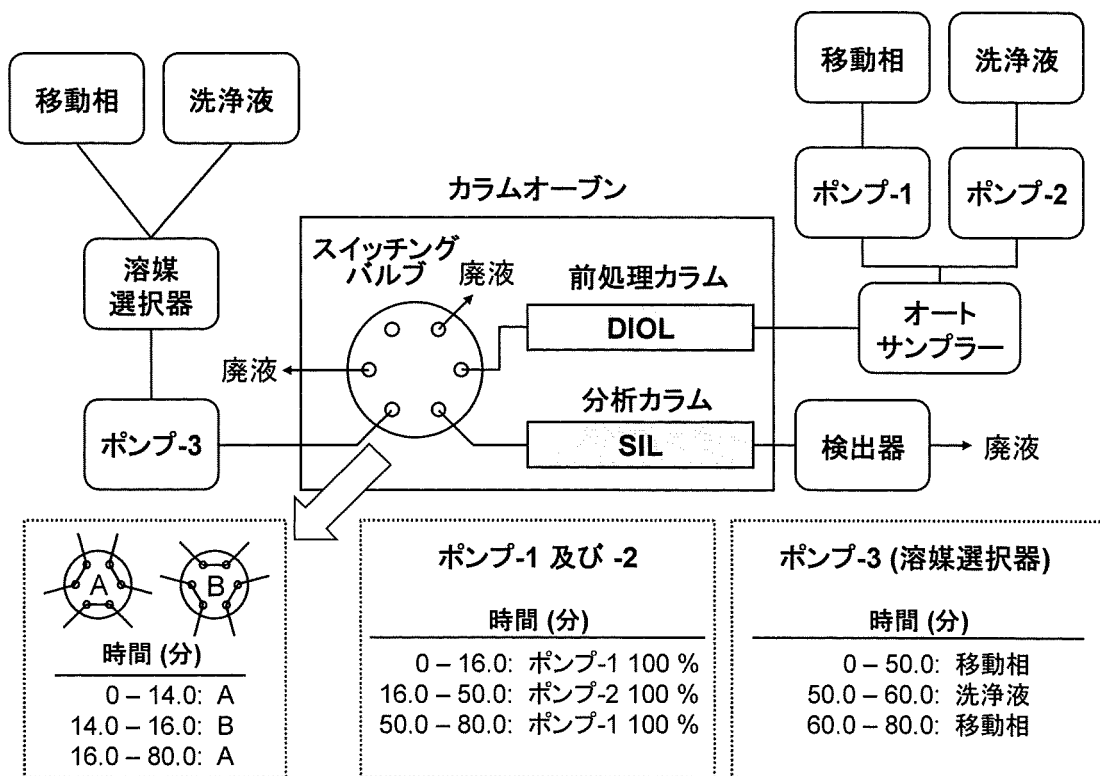


図 2. カラムスイッチング HPLC システムの流路及び概略図

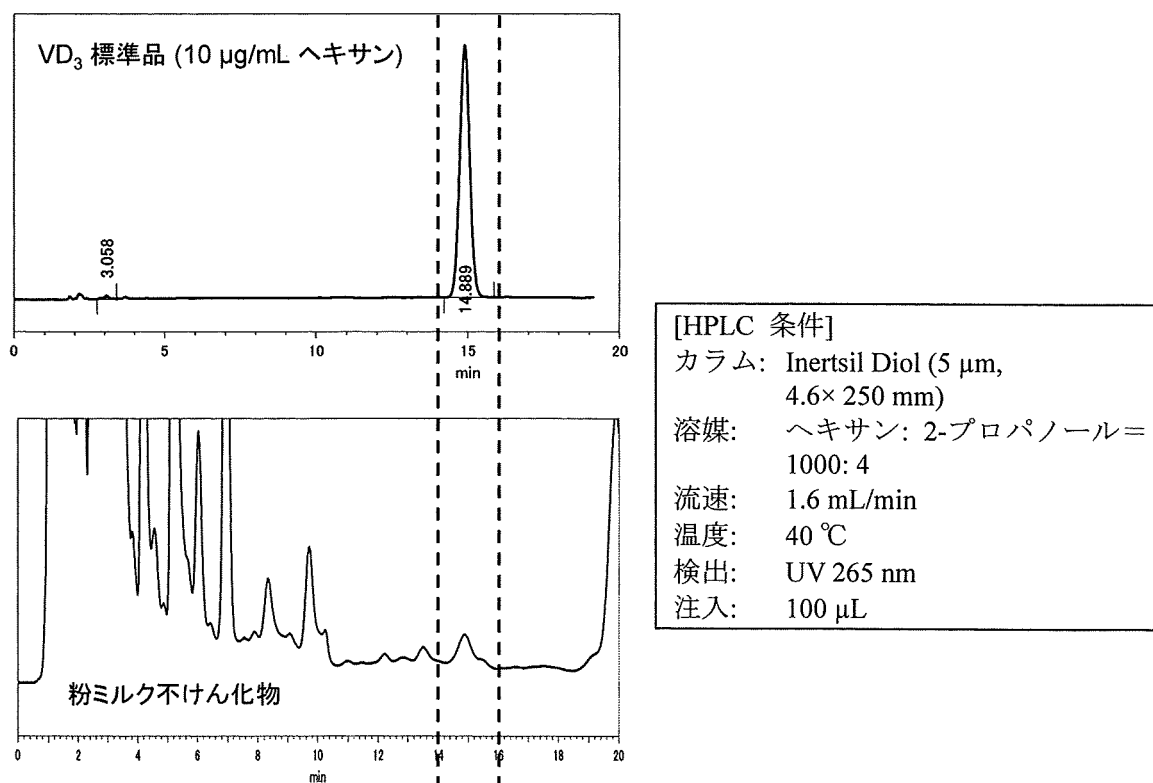


図 3. 前処理カラムによる VD 標準品及び粉乳 (A) 不けん化物のクロマトグラム

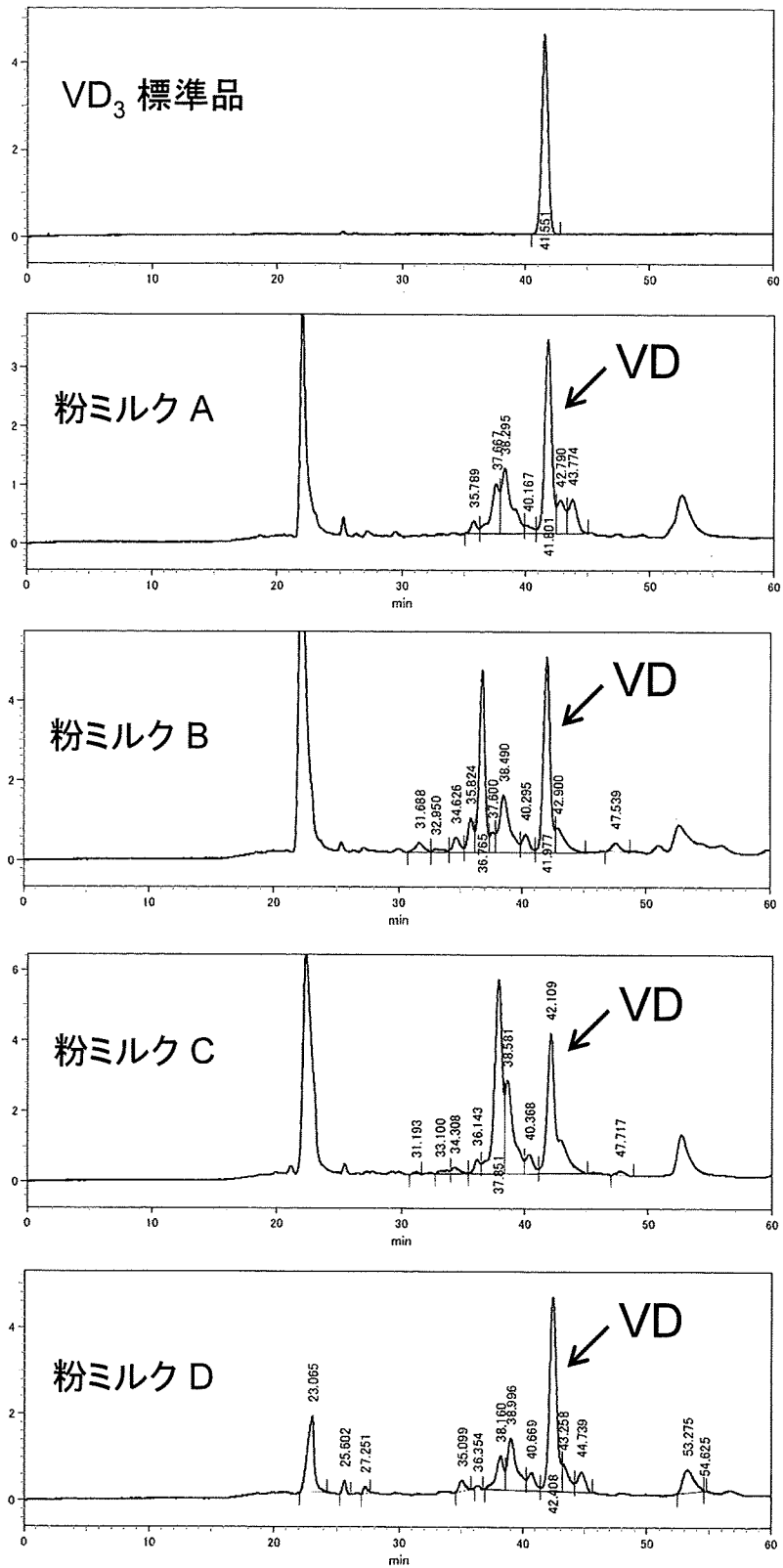


図4. カラムスイッチングHPLC法によるVD標準品及び粉乳 (A~D) 不けん化物のクロマトグラム

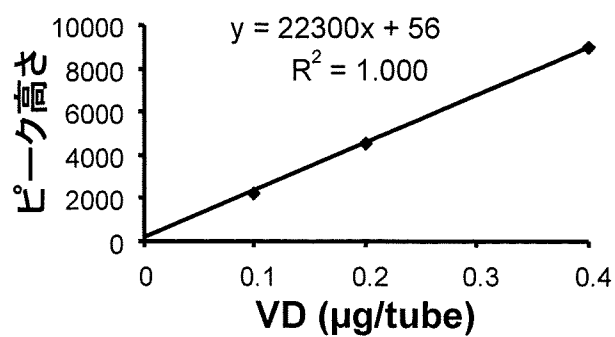


図 5. カラムスイッチング HPLC 法による VD 分析の検量線

表 2. カラムスイッチング HPLC 法による乳児用調製粉乳の分析値及び表示値

試料	実測値 ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	表示値 ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	実測値/表示値
粉乳 A	7.13	6.5	110%
粉乳 B	10.63	9.3	114%
粉乳 C	8.59	9.3	92%
粉乳 D	9.95	8.3	120%

栄養表示基準 (平成 15 年 4 月 24 日厚生労働省告示第 176 号 最終改正平成 17 年 7 月 1 日) における VD の許容誤差: 表示値のプラス 50%~ マイナス 20%



研究成果の刊行に関する一覧表

○書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

○雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

