

201033003A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石見 佳子

平成23(2011)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

----- 3

II. 分担研究報告

1. 健康食品中のビタミン 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

----- 9

2. 粉乳中のビタミン D 測定法の改良および室間共同試験に関する研究

石見佳子 竹林 純

----- 20

3. 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室間分析精度管理に関する研究

永田純一 町野 礼

----- 33

4. 錠剤・カプセル状の製品に含まれる茶カテキン類の分析法に関する検討

梅垣敬三 鈴木佳織

----- 47

5. 健康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

----- 65

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 76

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計るため、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、ビタミンDについて分析法を改良し、4種類の粉乳を未知試料を用いた室間試験を実施した。ビタミンB₁₂については、「健康食品」に含まれるVB₁₂の定量再現性を確認するため、室間共同試験を実施した。さらに、特定保健用食品の関与成分である難消化性デキストリン及び大豆イソフラボンについては、「健康食品」を用いて室間共同試験を、茶カテキンについては、2種類の方法を用いて食品形態の異なる「健康食品」中の分析を実施した。なお、室間共同試験は全て非明示で実施した。その結果、VDの改良法は、粉乳中のVD含量を精確に定量できることが示された。VB₁₂では、市販のビタミンサプリメントにおいて、一部の含有量の高い食品で現在の公定法では対応できないものがあることが明らかとなり、改善の必要性が示された。また、公定法である微生物学的定量法(MBA)の妥当性確認の一環として、HPLC法による定量化についても検討を行ったところ、HPLC法はMBAよりも再現性の高いことが明らかとなった。難消化性デキストリンについては、従来法では良好な室間再現性が得られたが、改良法はさらに検討する余地があることが明らかになった。大豆イソフラボンに関しては、固体状、液状及び粉末状の「健康食品」について良好な室間再現性が得られたが、イソフラボン含量の高い粉末状食品では再現性が低いことが示された。茶カテキンでは、今回実施したHPLC-UV法及びHPLC-ECD法は、飲料形態だけでなく、錠剤・カプセル状の製品の分析にも適用できることが明らかになった。今回構築した試験機関間の精度管理体制は今後も継続維持し、他の食品成分も含めた分析値の信頼性確保を計りたい。

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、製品の有効性や安全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、昨年度の室間共同試験でばらつきが大きかったビタミンDについては、公定法の問題点を解消した改良分析法を開発し、その妥当性を室間共同試験にて確認した。一方、昨年度までに特別用途食品を対象に実施してきた食品成分について、食品形態の違いによる分析精度を確認するため、本年度は、種々の形態の「健康食品」を対象として、施設間の分析精度を確認した。すなわち、VB₁₂(石見)、難消化性デキストリン(永田)、大豆イソフラボン(石見)の室間共同試験を実施するとともに、茶カテキンの2種類の分析法を市販の「健康食品」に適用して、分析方法の特徴を比較した(梅垣)。

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)日本食品環境検査協会、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

1. 乳児用調製粉乳中の栄養素の分析精度管理(石見)

昨年度に実施した乳児用調製粉乳を用いた室間精度管理試験では、ビタミンDのばらつきが大きかったことから、今年度は公定法の問題点を解消した改良分析法を開発し、その妥当性を室間共同試験にて確認した。含量明示の粉乳(1種)を用い予備試験を行い、改良法の試験手順書に不備等がないことを確認した。さらに、4種類の粉乳を未知試料として用い、室間共同試験を実施した。報告された結果を集計し、AOACガイドラインを参考に精度指標を算出し定量分析法としての妥当性を判断した。

ビタミンB₁₂については、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(微生物試験法)を基本として標準作業書を作成した。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[®] 3280 (SRM 3280, Multivitamin/ Multielement Tablets, 検体A)²⁾及び含有量の異なる市販のビタミンサプリメント4種(検体B-E)を用いた。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。

2. 難消化性デキストリンの分析精度管理(永田)

難消化性デキストリンについて、昨年度に改良した、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、迅速な分析法を用いて、室間共同試験を実施し、従来法との比較を行なった。検体は、添加された難消化性デキストリンの規格値が明らかな粉末および液体試料を各試験機関に配布した。分析は非明示で、分析回数をいずれの検体も 3 回に統一して実施した。

3. 茶カテキンの分析精度管理(梅垣)

茶カテキンについて、ECD-HPLC 法及び UV-HPLC 法を用いて、21 種類のサプリメントを対象に定量分析を行った。茶カテキン類標準品は (C、EC、GC、EGC、EGCg、Cg、ECg、GCg) 栗田工業社製を使用した。錠剤・カプセル状のいわゆるサプリメントはインターネットで 21 種類を購入した。HPLC-ECD 法では、クロマトリック検出器 (esa Coulochem II) を装着した HPLC システムを用いた。UV 法では UV-VIS 検出器 (230 nm、島津 SPD-10) を装着した HPLC システムを用いた。

4. 大豆イソフラボンの分析精度管理(石見)

形態の異なる「健康食品」中の大豆イソフラボンの施設間の分析精度を確認することを目

的として、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。健康食品としては、固体状、液状および粉末食品を選択し、分析は非明示で、各々 3 検体ずつ実施した。

C. 研究結果

1. 乳児用調製粉乳中の栄養素の分析精度管理

公定法に準じた VD 分析では、試験機関によっては精確な分析ができなかった原因として、分取 HPLC (逆相) サンプル調製時の不溶物の影響が疑われた。そのため、分取 HPLC を順相で、分析 HPLC を逆相で行う改良を加えた。室間共同予備試験の結果、改善法では分析値の日内変動が 0.5 - 2.4 % と顕著な改善が認められた。室間共同本試験の結果、4 種の粉乳中 VD 含量分析値について、室内変動の指標である併行分析相対標準偏差 (RSD_r) は 2.6 - 10.3 % であり、室間変動の指標である室間再現性相対標準偏差 (RSD_R) は 4.0 - 18.9 % であった。また、定量分析法の性能指標である HORRAT は、各試料について 0.18 - 0.97 の範囲であった。

VB_{12} の分析では、市販のビタミンサプリメント 4 種は各試験機関の結果において表示値と同等かわずかに高い値を示した。しかし、検体 C において一部の機関で表示値の誤差の許容範囲を逸脱するものがあつた。また、検体 D は、全機関で表示値の誤差の許容範囲よりも低い結果が得られた。

併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を求めたところ、前年度よりも悪化したことが明らかとなった。また、

HorRat 値は、検体 A 及び E は AOAC の規定する範囲 (0.5-2.0) に収まっていたが、検体 B、C 及び D は範囲を超えており、本検討において何らかの問題があることが示された。

2. 難消化性デキストリンの分析精度管理

添加された難消化性デキストリンの規格値が明らかな粉末および液体試料を各試験機関に配布し、従来の難消化性デキストリン分析法(従来法)と今回改良を行った方法(改良法)を用いて分析を行った。従来法と比較して改良法は、いずれの試験機関においても操作性の簡便化と分析時間の短縮を認めたが、施設内における分析値のばらつきと施設間分析精度において理論値に対する乖離(HORRAT: 粉末食品=9.68、液状食品=13.2)を示した。

3. 茶カテキンの分析精度管理

市販サプリメント 21 種類について、カテキン類の抽出条件を設定し分析したところ、HPLC-ECD 法に比べて HPLC-UV(230nm) 法では測定値がやや高くなる傾向が認められたが、総カテキン含量の測定値はほとんど差異がなかった。21 製品中で製品に茶カテキン量の表示があったのは 13 検体であり、その中の 10 検体の測定値は表示値よりも低かった。本試験により、2つの分析方法は飲料形態だけでなく、錠剤・カプセル状の製品の分析にも適用できること、HPLC-UV 法に比べて HPLC-ECD 法は機器の汎用性に難点があるがカテキンに対する特異性と感度が高いことが明らかになった。

4. 大豆イソフラボンの分析精度管理

大豆イソフラボン分析に関して、各試験機関より報告された検体中のイソフラボン分析値は、

固体状食品、25.7~34.8 mg、液状食品、42.4~55.7 mg、粉末状食品、54.3~71.7 mg、の範囲で、何れの検体における変動係数(CV 値)は5%未満であった。また、各検体における併行再現性(RSD_r)、室間再現性(RSD_R)ともに、5%以下であり、良好な結果が得られた。分析方法の妥当性の指標となるHORRAT 値は、固体状食品 0.80、液状食品 0.35、粉末状食品 1.02 であった。

D. 考察

本研究では、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のため、消費者の利用頻度が高い機能性食品素材を用いた食品を選び、食品形態の相違による分析値のばらつき、分析法、精度管理などについて検討を行った。今年度は健康食品を中心に、登録試験機関間の室間共同試験を実施した。

乳児用調製粉乳中の VB₁₂ の分析では、検体として標準品 (SRM 3280) を用いた検討では、変動係数 (CV) 及び RSD_r はほぼ昨年度と同様の結果が得られた。一方、RSD_R 及び HORRAT 値は悪化していたが、HORRAT 値は AOAC が推奨する範囲内に収まっており、分析方法が遵守されていれば、分析値を担保することが可能であることが明らかとなった。

市販のビタミンサプリメントでは、検体 E については良好な結果が得られたが、検体 B~D においては HORRAT 値が許容範囲を超えており、分析法に問題がある可能性が示された。特に検体 D は、全機関で表示値が予備試験結果と比較して数値が低く、誤差の許容範囲を超える結果となった。しかし検体の採取量を減らすことで、問題が解決されたことから、含有量が高い食品を分析する際には、公定法の

抽出方法を変更しなければならないことが明らかとなった。

VDの分析に関して、分取 HPLC を順相で行う改良法は、公定法に準じた VD 分析法と比較して、分取 HPLC 用試験溶液調整時の不溶物が大きく減少しており、分析値の日内再現性が大きく向上していた。非明示の 4 種の粉乳を用いた改良法の室間共同試験では、定量分析法の性能指標である HORRAT は、各試料について 0.18 - 0.97 の範囲であり、AOAC ガイドラインの妥当性判断基準 ($\text{HORRAT} \leq 2$) を満たしていた。従って、改良法は粉乳中の VD 含量を精確に定量できることが示された。

難消化性デキストリンの分析では、分析方法の見直しによって操作性の向上や分析時間の短縮は、従来の方法より著しく改善されたが、各施設内および施設間における改良法による分析値のばらつきが認められた。今回の試験で最も定量値に与えた要因として酵素中に含まれるグリセロールが各試験機関から指摘されている。今回の分析では、ブランク値を差し引いて対応したが、グリセロールのピーク面積に及ぼす影響を完全に補正することが困難であった。今回用いた改良法では、酵素溶液中に存在するグリセロールが、内部標準物質として用いるグリセロールに混入し、定量値に影響を及ぼす可能性が高いことから、外部標準法による定量分析の検討が不可欠と考えられた。

健康食品を対象とした茶カテキンの分析法の検討では、UV 検出器の汎用性を考慮すると、一般的な測定法としては HPLC-UV 法で十分に対応できること、HPLC-ECD 法は夾雑物の多い製品について、確認として利用することが適切であると考えられた。表示値との比較では、表示値より測定値が低い検体が約

半数あった。この原因は定かではないが、製品の製造過程で正しく添加されていなかった可能性、流通やその後の保存状態におけるカテキン類の分解などの可能性も考えられる。ただし、一部の製品を除けば、表示値は分析値の約 70-120% の範囲になっていた。今回検討した試料からの抽出条件や分析法は、製品の製造管理、ならびに市場に流通している製品の表示の妥当性の評価、さらに製品の安全性・有効性の評価に役立つと考えられる。

大豆イソフラボンの室間共同試験より、液状食品について併行再現性 (RSD_p)、室間再現性 (RSD_R) は何れも 5% 未満と良好な値を示した。液状食品における分析精度を示す指標が、昨年度の本研究と同様、良好な値が得られたことから、通知の方法は、液状の健康食品では室間の分析精度も高い事が検証された。粉末状食品について、健康食品を用いた本年度の分析結果では、室間再現性 (RSD_R) で 5.00 であったものの、併行再現性 (RSD_p) は 0.99 と良好な値を示した。昨年度と今年度の試験で用いた粉末検体を比較すると、昨年度の粉末食品の含有量が高い。このことより、粉末食品については、含有量が高い場合にばらつくことが考えられる。VB₁₂ の場合と同様、食品中の含有量が高い場合に、抽出効率を考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

ビタミン D は公定法の見直しにより、分析精度が向上する。ビタミン B₁₂ については、乳児用調製粉乳の分析に当たっては、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が、市販の健康食品のうち、特に含有量の高い食品については抽出法を改良する必要がある。

難消化性デキストリンは、従来法は室間分析精度が確保されたが、改良法については、外部標準物質を使用するなど、さらなる検討が必要であることが明らかになった。茶カテキン類の分析は、適正な分析法の提示が可能となった。厚生労働省が通知した大豆イソフラボンの分析方法は、液状、粉末状及び錠剤型の食品に適用できること、さらに、分析精度も高いことが示された。

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）

分担研究報告書

健康食品中のビタミン 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担保されていることが必要不可欠である。昨年度までは、乳児用調製粉乳を対象とした公定法によるビタミン B₁₂ (VB₁₂) の定量化に関する施設間分析精度の検討を行い、分析方法を詳細に記述し、使用試薬を統一することによって、併行精度及び室間再現性に明らかな改善が認められることを明らかとした。今年度は、形態の違いが分析精度に及ぼす影響について検討するため、「健康食品」を対象とし、VB₁₂ の室間共同試験を実施した。また、本年度は、各機関で所有している試薬及び菌を用いて検討を行った。その結果、一部のビタミンサプリメント中の VB₁₂ の定量は、現在の公定法では対応できないことが明らかとなり、分析法の見直しが必要であることが示唆された。一方、室間再現性は前年度よりも悪化し、本条件下では機関間での精度を確保することは出来なかったことから、室間再現性を担保するためには、使用する菌や試薬の統一が重要であることが明らかとなった。さらに、公定法である微生物学的定量法 (MBA) の妥当性確認の一環として、HPLC による「健康食品」中の VB₁₂ の定量化についても検討を行ったところ、MBA よりも再現性が高いことが明らかとなった。

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。

これまでに本研究では、含有量が極端に少ないことから定量化が困難である乳児用調製粉乳に含有されるビタミン B₁₂ (VB₁₂) について、微生物学的定量法 (MBA) による検討を行い、分析に用いる試薬、定量に用いる要求株及び分析方法

を統一することによって、共同試験で得られた化学分析値の室間再現性の指標である HORRAT 値が大きく改善することを明らかとした。

しかし、実際の特別用途食品の許認可試験や栄養表示のための栄養成分の分析において、全対象機関で統一された試薬や器具などを用いることは事実上不可能であることから、実情に即した分析条件下での室間再現性を確認することが重要であると考えられた。

そこで本年度は、分析方法のみ制限し、試薬や定量菌などは実際に各機関で使用しているものを用いた際の施設間精度を、認証標準物質 (CRM) 及び市販の錠剤型ビタミンサプリメントを用いた MBA での検討を行い、分析法の妥当性と再現性について検討を行ったので報告する。

また、日本国内において VB₁₂ の食品添加物として認可されているのは、シアノコバラミン (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。今回検討に用いた CRM は、VB₁₂ が CN-cbl のみで構成されており、市販サプリメントに含有される VB₁₂ も、食品添加物である CN-cbl が主成分である可能性が高いことから、HPLC による検討も一部機関と併せて行ったので報告する。

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[®] 3280 (SRM 3280, Multivitamin/ Multielement Tablets, 検体 A)²⁾ 及び含有量の異なる市販のビタミンサプリメント 4 種 (検体 B- E) を用いた (Table 1)。市販のサプリメントに関しては予備検討として、LC/MS にて CN-cbl の存在を確認すると共に、含有量を明らかとした。

各検体に含まれる VB₁₂ 量は非明示とし、MBA においては、希釈倍率を検量線に収まる範囲で

の幅表記にした。実際に各機関での希釈倍率を Table 1 に記す。

分析方法は、昨年度同様、公定法³⁾ に準拠した標準作業書 (SOP) を作成し実施した。分析に用いる検体の量は、妥当性担保のため CRM 推奨の使用量及び公定法に記載されている採取量に制限した。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、実施した。詳細については、Table 2 に MBA を、Table 3 に HPLC をそれぞれ記載する。

(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⁴⁾ 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

MBA の実施に際し、操作方法などは SOP に記載の方法により実施したが、変更した際には、報告書にその旨を記載・返送いただいた (Table 2)。

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 (データ不記載)。

本年度の検討結果を Table 4 に示す。

検討した SRM 3280 には VB₁₂ として CN-cbl が 4.9 µg/g 含まれており、各研究機関の MBA の結果は、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 (-20 %~+80 %) 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優位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 3280 に記載されている拡張不確かさ ($U=1.9, k=2$) とほぼ同等の値 (1.69) が得られ、本試験法に問題のないことが示された。

市販のサプリメント4種は、予備検討において、表示値と同等かわずかに高い値を示し、各試験機関の結果でも同様の値が示された。しかし、検体Cにおいて一部の機関で表示値の誤差の許容範囲を逸脱するものがあった。また、検体Dは、全機関で表示値の誤差の許容範囲よりも低い結果が得られた。

併行相対標準偏差 (RSD_p) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を求めたところ、前年度よりも悪化したことが明らかとなった (Table 5)。⁵⁾ また HorRat 値は、検体 A 及び E において AOAC の規定する範囲 (0.5~2.0)⁶⁾ に収まっていたが、検体 B、C 及び D は範囲を超えており、本検討において何らかの問題があったことを示唆した。なお、 RSD_R 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 $P-RSD_R, \% = 2C^{-0.15}$ を用いた。

一方、HPLC による検討は、3 機関が参加した。分析における変更点、使用した HPLC 適応範囲及び結果は、それぞれ Tables 3、6、7 に記す。1 機関分析条件が異なるが、標準品を用いた検量線の作成では全機関でほぼ同じ検出下限値 (LOD) 及び定量下限値 (LOQ) が得られ、作成した検量線の相関係数 (全機関 0.9999) から検討範囲での再現性には問題がないと考えられた。

各検体とも MBA とほぼ同様の結果が得られ、検体 C 及び D においても MBA と同様の傾向が見られた。

RSD_p 、 RSD_R 及び HorRat 値は、MBA よりも改善されており、分析法として再現性の高いことが示された (Table 8)。

D. 考察

○ MBA での検討

昨年度よりも実情に即した分析に変更した結果、CRM (SRM 3280) を用いた検討では変動係数 (CV) 及び RSD_p はほぼ昨年度と同様の結果が得られた一方、 RSD_R 及び HorRat 値は悪化しており、室間再現性に影響を与えることが明らかとなった。ただし、HorRat 値は AOAC が推奨する範囲内に収まっており、分析方法が遵守されていれば、分析値を担保することが可能であることが明らかとなった。

これまでの検討結果を加味すると、 RSD_R の担保には、菌の状態が重要であり、何らかの基準を設けることによって一定に保つ必要があると考えられた。

市販品では、検体 E について良好な結果が得られたが、検体 B~D においては HorRat 値が許容範囲を超えており、分析法に問題があることが示された。

検体 D は、全機関で表示値が予備試験結果と比較して数値が低く、誤差の許容範囲を超える結果となった。このことに関し機関 D より、検体 D では抽出時の試料採取量を少量 (0.25 g)、または抽出溶媒を変更した際に表示値に近い結果 (332 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) が得られるとの報告を受けた (Table 9)。これを受け本研究所でも検討を行ったところ、定量値が改善されることを確認した (試料採取量 2 g、水抽出時、2.66 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)。今回検討に用いた抽出条件は、公定法の抽出方法に他ならず、本検体を測定する際には抽出方法を変更しなければならぬことが明らかとなった。

検体 C は 2 機関にて、誤差の許容範囲を超える結果となったことから、機関 C より未検討の検体を返送いただき、HPLC にて再検討を行った。その結果、5358 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (予備検討と比較して 105 %) の CN-cbl を含んでいることが明らかとなり、検体 C でも十分な抽出が行われていなかった可能性が示唆された。誤差の許容範囲から逸脱し

た3データを除外すると、HORRAT値は1.13となることから、抽出方法が改善されれば、問題はないものと考えられた。

検体Bは、CVやRSD_rなどで他の検体と比べても大きな違いはない一方、RSD_R値が劣っていた。唯一希釈倍率が、機関間で最大2倍以上異なることから (Table 1)、検量線の近似方法や適応範囲の違い、検体に含まれる夾雑物などの影響が無視できなくなり、RSD_Rに影響しているものと考えられた。しかし、現在の公定法では、試験溶液の希釈範囲及び検量線の上限・下限が限定されており、これらの影響は本検討に限ったものと考えられる。

健康食品では、対象成分以外の夾雑成分も高濃度に含まれていることもあり、本検討結果から、現在の抽出方法で安定に定量化できないことが示唆された。

○ HPLCでの検討

本検討を行うに当たり、記載のない分析条件は、汎用性を考慮して設定した。

公定法には、分析条件として isocratic での溶離が記載されているが、本検討では検出感度を考慮して gradient での溶離に変更した。しかし、isocratic で実施した機関Dの結果では、LODやLOQに大きな差がないことから、今回は評価の対象とした。

MBAとHPLCの結果は相関しており、検体CのRSD_Rが高値であるのは、検体の抽出が充分に行われていないこと、検体DでのRSD_r及びRSD_Rが高値であるのは、今回の検討方法が適していなかったことに、それぞれ起因していると考えられた。

検体EのRSD_rは、MBAとほぼ同等の結果を示しているが、HPLCによる他の検体結果と比較すると、芳しくない。検体Eは、試験溶液のVB₁₂濃度が理論上0.03 µg/mLであり、HPLCへの負荷量を増加しないと検出することができない。今回投与量として75 µLを推奨したが、LOQを勧案し

た際40 µLは負荷する必要がある。今回より確実に検出するために、投与量を高めに設定したにも関わらず、RSD_r値が優れないことから、改善するためには併行回数を増やすことや可能な範囲での投与量の増加が必要であると考えられた。また、機関AとCでは分析方法に違いがないものの、検量線の傾きは2倍以上差があり、装置の感度による影響も無視できない。通常感度が2倍異なる際には、注入量の変更、検出セルやAUX RANGEの違いなどが影響として考えられるが、両機関に確認したところ、変更はないとのことから、再現性については装置の影響も無視できないものと考えられる。

現在の公定法では、HPLC法でのVB₁₂測定適応範囲が詳細には記載されていないが、本検討結果から、

カラム充填材: ODS

カラムサイズ: ø 4.6 × 250 mm

カラム粒子径: 5 µm

LOQ: 0.125 µg/mL

検量線範囲: 0.1 ~ 10.0 µg/mL

測定対象: CN-cbl

の条件下で、分析が可能であると考えられた。

○ 抽出溶媒の是非

現在VB₁₂の抽出では広く酢酸緩衝液に無機シアンを添加した加熱抽出法が汎用されている。VB₁₂は活性体としてCN-cbl以外にも多数存在しており、その多くが熱や光に弱い特徴を有している。これらを、過不足なく抽出するための最善策として、無機シアンを添加することによって安定なCN-cblに変換し、酢酸緩衝液を用いてCN-cblが最も安定なpHに調整することが求められている。

しかし、VB₁₂を構成する活性体がCN-cblに限定される際は、必ずしも無機シアンの添加は必要ない。特にKCN水溶液は、アルカリ性を示すことや公定法のKCN溶液の調整に0.2% NaOHで

KCN を溶解させることから、緩衝能のない溶媒では返って CN-cbl を分解させる恐れがある。また、溶媒中に配位子となり得るイオンが多数存在する際、CN-cbl の配位 CN と溶媒中のイオンは常に交換反応が起こっており、逆に安定性を損なう恐れがある。

公定法において、「VB₁₂ 含量が高い食品については、水で振とう抽出し、pH を調製後、試験溶液とすることもできる」との記載がある。そこで、本検討に用いたサプリメントを対象に抽出溶媒の比較検討を MBA で行った。その結果、ほとんどの検体でシアン煮沸法よりも水振とう抽出の方が高くなり (Table 9)、回収率が高いことが明らかとなった。

また、CN-cbl 標準品を用いた KCN の影響に関して溶媒を変えて検討を行ったところ、緩衝能のない水溶媒では標品の回収率低下が顕著であり、抽出溶媒の選択に注意を要することが明らかとなった (Table 10)。酢酸緩衝液を用いた際の KCN の影響は軽微であるが、CN-cbl 標準品に酢酸緩衝液と K¹³C¹⁵N を添加し加熱抽出したところ、¹³C¹⁵N-cbl が 45 % 増加し (Fig. 1)、回収率が 94 % に減少したことから、KCN の添加は交換反応を伴い定量値を低下させることが明らかとなった。

本検討結果から、CN-cbl が測定対象となる際には、不用意な CN⁻ は添加不要であり、夾雑物の影響を考慮した pH 調整のみが必要である。また、対象が定かではない際には、これまで通り酢酸緩衝液に CN⁻ を添加した抽出法が有効であると思われる。

現在栄養成分の表示検討会にて、義務化に向けた動きもある。その際には分析の頻度も高くなることが予想されることから、公定法の効率化は重要であると思われる。今回の抽出溶媒の違いによる定量値への影響は、再現性の観点から公定法に記載されていることは好ましくない。しかし、栄養表示基準の改善による、栄養成分としての食品添加物の表示義務化が実行された際には、本検討結果が有効な手段となりうることが考えられる。

E. 結論

登録試験機関間の分析精度確保のための研究として、「健康食品」に含まれる VB₁₂ に関して検討を行った。分析方法を詳細に記述することにより試料形態が変更されても、VB₁₂ を再現良く定量可能であることが明らかとなった。しかし、室間再現性を担保するためには、使用する菌や試薬の統一が重要であり、運用するには、何らかの基準を新たに設ける必要があることが示唆された。また、一部の検体において公定法の抽出方法では、十分に抽出できないことが明らかとなり、公定法の見直しが必要であることが示唆された。

また、健康食品など比較的成分含有量が高いものにおいては、HPLC を用いた定量化が MBA よりも再現性に優れており、表示制度の一助を得ることによって、有効な手段となり得ることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

松本輝樹, 鈴木春奈, 谷中かおる, 石見佳子, 室間共同試験による食品中ビタミン B₁₂ 測定法の分析精度について, 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会 (東京), 平成 23 年 5 月.

G. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 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) Sander, L.C. *et al.* Certification of Vitamins

and Carotenoids in SRM 3280 Multivitamin/Multielement Tablets. *Anal. Chem.*, **83**, 99-108 (2011).

3) 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.

4)

http://www.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/Kanrikitei3_1006.pdf , browsed on April 2nd,

2011.

5) 石見佳子, 乳児用調製粉乳に含有されるビタミン B₁₂ に関する多施設間による検討, 平成 21 年度 総括・分担研究報告書, 6-14 (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).

Table 1 検討に用いた非明示検体のビタミン B₁₂ 含有量と希釈倍率

Material	含有量		希釈倍率				
	label	preliminary	Laboratory A	Laboratory B	Laboratory C	Laboratory D	Laboratory E
A	490	478	2,500	2,000	1,666	2,500	2,000
B	16,667	20,651	166,666	75,000	83,333	125,000	80,000
C	4,286	5,085	21,739	20,000	16,666	25,000	20,000
D	313	329	1,563	1,000	1,111	2,000	1,000
E	165	161	833	750	666	800	1,000

Table 4 MBA 共同試験結果 (µg/ 100g)

Material	Laboratory A		Laboratory B		Laboratory C		Laboratory D		Laboratory E	
A	624	601	510	640	449	448	439	429	432	478
B	22,194	16,807	23,000	25,000	19,400	18,700	19,000	19,900	13,980	18,330
C	4,326	4,613	3,200	6,000	3,140	3,170	4,480	4,690	4,967	5,054
D	149	232	48	63	134	97	152	172	181	150
E	170	215	210	140	168	175	148	164	228	221

Table 5 MBA による室間共同試験結果

Material	Mean	CV	S _r	S _R	r	R	RSD _r	RSD _R	pRSD _R	HorRat
A	505	16.7	44	88	124	247	8.8	17.5	12.5	1.39
B	19,631	16.1	2,307	3,248	6,461	9,095	11.8	16.5	7.2	2.29
C	4,364	21.6	893	947	2,500	2,653	20.5	21.7	9.1	2.40
D	138	40.3	31	58	88	162	22.7	42.0	15.2	2.75
E	184	17.3	27	32	76	91	14.7	17.6	14.6	1.20

Table 6 HPLC 分析における適応範囲

	Laboratory A	Laboratory C	Laboratory D
slope	3,488.9	7,594.0	5,968.3
intercept	-13.6	-57.6	-85.6
lower	0.1	0.1	0.1
upper	10.3	10.2	10.0
LOD	0.03	0.02	0.03
LOQ	0.12	0.08	0.10

Table 7 HPLC 共同試験結果 (µg/ 100g)

Material	Laboratory A		Laboratory C		Laboratory D	
A	469	472	414	407	420	458
B	19,480	19,351	19,452	18,905	20,399	20,642
C	4,693	4,854	2,603	2,621	4,942	4,962
D	195	129	315	120	196	191
E	147	156	188	149	150	178

Table 8 HPLC による室間共同試験結果

Material	Mean	S _r	S _R	r	R	RSD _r	RSD _R	pRSD _R	HorRat
A	440	16	32	44	90	3.6	7.3	12.8	0.57
B	19,705	250	738	700	2,066	1.3	3.7	7.2	0.52
C	4,113	67	1,303	187	3,649	1.6	31.7	9.1	3.47
D	191	84	66	235	184	44.0	34.4	14.5	2.37
E	161	20	17	56	47	12.4	10.3	14.9	0.69

Table 9 抽出溶媒によるサプリメントの CN-cbl 定量値

Material	weight (g)	A: Acetate buffer+ KCN				B: H ₂ O			
		2.0	1.0	0.5	0.25	2.0	1.0	0.5	0.25
A	result (µg/100g)	500	447	472		511	543		
	average (µg/100g)	473				527			
	A/B	0.90							
B	result (µg/100g)	21700	20700	22500		21400	20900		
	average (µg/100g)	21633				21150			
	A/B	1.02							
C	result (µg/100g)	4900	5030	5090		5260	5390		
	average (µg/100g)	5007				5325			
	A/B	0.94							
D	result (µg/100g)	174	233	272	332	348	351	384	320
	average (µg/100g)	253				351			
	A/B	0.72							
E	result (µg/100g)	178	166	169		177	179	188	
	average (µg/100g)	171				181			
	A/B	0.94							

Table 10 KCN 添加による CN-cbl 回収率

		0.57M Acetate buffer		H ₂ O	
		+	-	+	-
recovery	0.005 µg/mL CN-cbl	96.5	102.4	73.4	99.8
	0.5 µg/mL CN-cbl	90.3	93.4	68.8	106.5

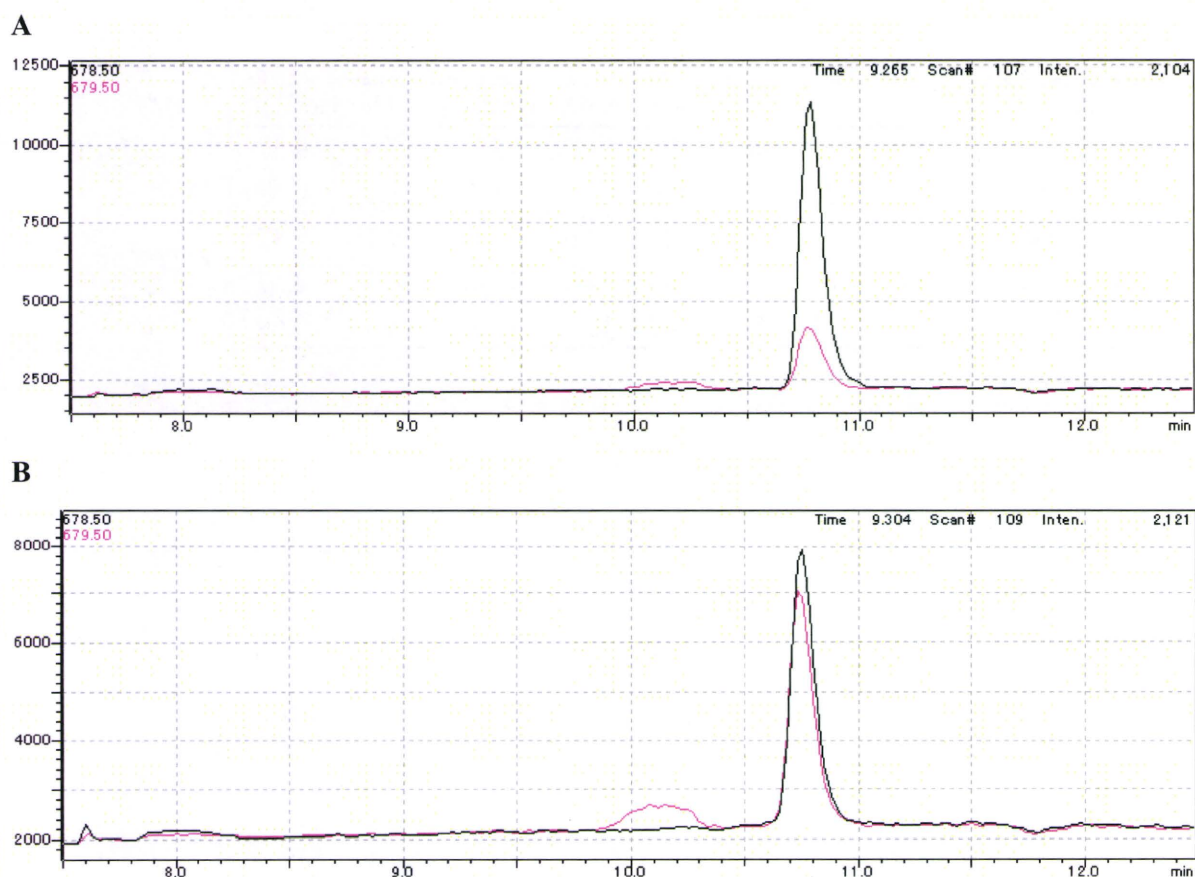


Fig. 1 K¹³C¹⁵N 添加による CN-cbl の LC/MS クロマトグラム

A: K¹³C¹⁵N なし, B: K¹³C¹⁵N あり, $m/z=678.5$ [CN-cbl+H]²⁺, $m/z=679.5$ [¹³C¹⁵N-cbl+H]²⁺

Table 2 標準作業書 (MBA)

	標準作業書	注意点	変更した点(今回)
		【試薬調製】	
シアンコバラミン(CN-dil)標準溶液	CN-dil (各機関連するもの) 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。更に、水で希釈して 0.1 mg/mL とする。	秤量時 0.1 mg 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、精確に行う。	
増菌緩衝液	特種 19.8 mL、特種ナトリウム水化物 38.56 g を水 500 mL に溶解する (pH 4.5)		
シアン化カリウム増菌液	シアン化カリウム増菌を 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		
		【接種調製】	
増菌用培地	B ₁₂ Assay Medium USP (245710): Becton Dickinson and Company	メーカー推奨の調整法を採用する。他メーカーの使用可。	
保存用培地	ライヒマニ保存用培地: ニッソ	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	ライヒマニ接種用培地: ニッソ	メーカー推奨の調整法を採用する。他メーカーの使用可。	
		【培養】	
Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis	各機関連する西薬品	選定した菌株の接種用培地に懸濁させた凍結菌を継代(前培養)に用いる(標準菌株)。	
		【前培養条件】	
	試験管に 5 mL の接種用培地を分注し、121 °C で 10 分間でオートクレーブ処理する。	メーカー推奨の調整法を採用する。	
	37 °C、20 ± 1 hr 培養した西洋菜汁から、1 白金耳 or 40 µL 播え種。これを数回 2 回でいい。試験に代える。	前培養の有効な回数に関しては検討していません。	
	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、気固生理食塩水で 2 回洗浄する。最後に凍結した 10 % グリセロール水溶液を加え、-80 °C で保存する。	測として記載します。詳細は各機関連機関にお任せします。保存用培地による継代についても、assay 前に接種用培地の培養をする。	
		【凍結菌液の調製】	
	菌液を 1 mL、3000 rpm、5 min で遠心分離し、菌液中に生理食塩水で 2 回洗浄する。	培養液を注意を怠りたくない。	C. 培養液や菌液を用いる。
	洗浄後、過塩素酸 89 % (吸光度 0.050, 600 nm) となるように凍結生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。	過塩素酸は、数滴第 1 位まで混入のものを用い、41% の過塩素酸に許容する。吸光度は小数点第 3 位まで混入のものを用い、± 10% の誤差まで許容する。	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を検量線に代入し、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が、± 10% 以上とずれているときに、その数値を除外し、残りの数値の平均値を求める。除外された数値に希釈倍率を乗じて原料中のビタミン B ₁₂ 含量を算出する。
		【試験管液の調製】	
	試料 2 g (±10 % 以内) を精密に量り、酢酸トリウム緩衝液 10 mL、水 40 mL、及びシアン化カリウム溶液 0.4 mL を加える。	秤量時 0.1 mg 単位まで求めること。	
	105 °C で 30 分間オートクレーブ処理した後、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。	
	溶液の一定量を下向きに pH 6.0 に調整した後、水で正確に希釈する。希釈倍率については、(検討の前に) の希釈倍率について参照。これを試験溶液とする。	調整液の範囲に収まるよう、各自希釈をお願いします。	
		【測定調整】	
	試験管 2 つずつに試験溶液と 2.5 mL 以内で正確に 3 種加え、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。	試験溶液の添加量は指定しない。検量線に収まる範囲で 3 種調整する。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。各用で全て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, 0.01, 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。	同一。	
	121 °C 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 30 µL、つづき標準的に接種し、37 °C で 22 時間恒温培養に入れて培養する。	恒定的に 37 °C が保たれる機種であれば恒温培養に設定しない。	
		【検算】	
	培養後、105 °C で 1 分間オートクレーブ処理した検体を室温に戻し、培養度を 600 nm の濁度を用いて測定する。	測定時、数値第 3 位まで求めること。吸光度測定時にろ取することは可能(その前に検算を確信してください)。	C. 5 mL の水で 2 回に希釈し、測定を行った。
	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濁度を照合して、試験溶液中のビタミン B ₁₂ 量を求める。		
測定方法	各試験機間の作業書に基づく	測定のみデータシートに記載してください。	
		【報告事項】	
	各研究機関での非典型による検体に含まれる B ₁₂ 濃度	n=1 (一百回量分) を基準として報告していただき、記入例はシート「報告用データシート」も記します。同じ検量線を使う検体に適用した結果も報告することなく記入してください。	
	データシート(検量値) 秤量値、検量線や試験溶液などの吸光度データは(過塩素酸)		
	検量線の校正方法	増設、多量、シグモイド、その他など	
	今回の標準作業書からの変更点	データシート、変更した点(今回)に記載してください。	
		【付録】	
燈光の必要性	可能な限り遮光器具を使用する	濃度の高いものは影響を受けやすいため、注意が必要となります。	
培養時の状態について	過剰の菌は確認しない		
アルカリ耐性水について	検討しない	その存在を評価されますが、今回は検討しません。	
		【その他】	

Table 3 標準作業書 (HPLC)

	標準作業書	注意点	変更した点 (今回)
		【試薬調整】	
シアンコバラミン (CN-cbl) 標準溶液	CN-cbl (各機関所有のもの) 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。更に、水で希釈して 0.1 mg/mL となるようにする。	微生物アッセイと同様です	
酢酸緩衝液	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 の溶液を調整する。		
10% メタリン酸溶液	記載なし		
		【HPLC 条件】	
装置	汎用型 HPLC 装置	オートサンプラーを装備している方が好ましい	
カラム	粒子径 5 μm、内径 4.6mm×長さ 250mm の ODS カラム		A: Inertsil ODS-3 (GL Sciences) C: Inertsil ODS-2 (GL Sciences) D: L-Column ODS (財団法人 化学物質評価研究機構)
リンブループ	100 μL 以上		D: アイソクラテック
溶液	A: CH ₃ CN, B: H ₂ O		
溶液組成	初期 A、B = 5:95 (2.5 min hold) 2.5 ~ 7.5 linear gradient 7.5 min A、B = 20:80 (7.5 min hold) total: 15 min	連続分析を行う際は、15分休止 A: 100% (≧10 min, 100% MeOH も可能) initial (≧15 min)	D: 50 mmol/L 酢酸アンモニウム-アセトリル (9:1 V/V)
流速	1 mL/min	分析時以外の流量変更可	D: 1.2 mL/min
検出波長	550 nm		
		【検量線の作成】	
	CN-cbl 標準溶液を希釈し、0.1 μg/mL ~ 10.0 μg/mL の検量線を作成する。測定点は上記 2 点を含む 5 点以上、繰り返しは 6 回以上行い、その面積値の平均を用いた線形近似の検量線を作成する。	注入量は 10 μL とする。 予備検討時 0.1 μg/mL は検出 (定性) 可能です。 上限値は変更可能 (その際上記の上限値を含む)。 検量線の作成に際し、横軸に CN-cbl の濃度を、縦軸に各標準溶液の HPLC 分析における面積値をプロットする。 測定点及び繰り返し回数は可能な範囲で増減可。	D: 注入量 20 μL
		【試験溶液の調整】	
	紅科 2 g (±10% 以内) 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 を加える。	微生物アッセイと同様です。	
	105°C で 30 分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 とする。		
	ろ液の一定量をとり、遠心分離にて不溶物を沈殿させた後、上澄み液をフィルターディスクにてろ過したものを HPLC 用の検体とする。		遠心分離の必要性はありません。 フィルターディスクの指定はしない。
		【測定】	
	各試験溶液の注入量は以下の通りである。 検体 A: 75 μL 検体 B: 5 μL 検体 C: 16 μL 検体 D: 75 μL 検体 E: 75 μL	注入量は固定。 検体 D 及び E は測定できていません (流出条件の変更を要する可能性あり。記載値以上の注入量は未検討)。	D: 注入量、検体 A, D, E: 70 μL、検体 B, C: 20 μL
	各試験溶液とも繰り返し分析を行い (計 3 回)、その平均値 (面積値) を分析結果とする		
		【解析】	
検量線の作成	検量線の作成に際し、横軸に CN-cbl の濃度 (μg/mL) を、縦軸に各標準溶液の HPLC 分析における面積値をプロットする。		
LOD, LOQ の算出	可能であれば LOD (定性限界) 及び LOQ (定量限界) の算出をお願いします。	$LOD = S/N \times 3$, $LOQ = S/N \times 10$ ノイズの算出は、ブランクサンプルを用いたバックグラウンドデータまたはピークの幅測りされた範囲 (≧ 1 min) のシグナルを平均化したもの (グラントラント除去)	
定量値の算出	得られた検量線から、各検体の定量値を求める		
		【報告事項】	
検量線情報	傾き及び切片 (少数点第 1 位まで)	検量線情報は最終的に解析に用いた値のみ報告してください。 検量線範囲は濃度の違う標準溶液を用いた際は全てのデータが含まれる範囲とする。	
	R ² 係数 (少数点第 4 位まで)		
	検量線の正確な範囲 (少数点第 3 位を四捨五入、上限及び下限)		
	作成に用いた測定点数		
検体情報	LOD 及び LOQ (可能であれば少数点第 2 位まで)		
	各検体の面積値 (実測値)		
	各検体の濃度 (μg/g, 2 回分)		
	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)」に反映してください。	
		【その他】	
遮光の必要性	可能な限り遮光器具を使用すること	濃度の薄いものほど影響を受けやすいので、注意が必要となります。	
		【その他】	

平成 22 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

粉乳中ビタミン D 測定法の改良および室間共同試験

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

協力研究機関

(財)日本食品分析センター・(財)日本冷凍食品協会

(財)食品環境検査協会・大阪市立環境科学研究所

研究要旨:公定法による食品中のビタミン D (VD) 分析は、二段階 HPLC 法 (逆相分取 HPLC → 順相分析 HPLC) で行われる。前年度までの研究から、VD の分析値は室間変動が大きいこと、その原因として分取 HPLC 試験溶液調製時の不溶物の影響が考えられることが明らかとなった。そこで今年度は、分取 HPLC を公定法の逆相から順相に変更することで不溶物を減じ、再現性を改善した改良法を開発した。改良法の分析精度を、4 種類の粉乳 (乳児用調製粉乳 3 種、妊産婦・授乳婦用粉乳 1 種) を未知試料として用いた室間共同試験で確認した。各試料についての、室内変動の指標である併行相対標準偏差 (RSD_p) は 2.6 - 10.3 % であり、室間変動の指標である室間再現性標準偏差 (RSD_R) は 4.0 - 18.9 % であった。各試料中 VD 含量から算出した定量分析法の性能指標である HorRat は 0.18 - 0.97 であり、全ての試料について AOAC の分析法に関する妥当性判断基準 ($HORRAT \leq 2$) を満たしていた。従って、改良法は粉乳中の VD 含量を精確に定量できることが示された。

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平成 20 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は、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、平成 20 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、