

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。良好な結果が得られ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、後者の含量は極めて微量である (VD: 6.5 μ g/100 g、VB₁₂: 2 μ g/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精確な分析が困難となり、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。

そこで、H 21 年度の研究では、まず各試験機関で用いられている 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、公定法に準じた試験手順書を作成した。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。

これらの結果を受け、最終年度である今年度は、分析精度の低下要因であると推察された分取 HPLC サンプル調製時の不溶物が生じないように、分取 HPLC を順相で、分析

HPLC を逆相で行うよう分析方法に改良を加え、改良法の精度を室間共同試験で確認した。

B. 研究方法

予備試験

別紙 (後掲) に示すように、改良法の試験手順書を作成した。共同試験参加の 5 試験機関に、改良法の試験手順書および充分量の市販の乳児用調製粉乳 (1 種、VD 表示値明示) を配付し予備試験を実施した。分析は試験手順書に従い、同一日に 3 連で実施した。得られた結果を集計し、解析を行った。

本試験

予備試験において、試験手順書に不備がなく、手順書に従った共同試験が実施できることが明らかとなったので、引き続き本試験を実施した。本試験では、各参加試験機関に含量非明示の 4 種の粉乳 (市販の乳児用調製粉乳 3 種、妊産婦・授乳婦用粉乳 1 種) を配付した。各粉乳は予めよく混合し均質とした後、チャック付ポリ袋に 3 g 程度を小分けして密封し、乱数による番号を付した。各試料は 2 反復分を各試験機関に配布した。2 回の反復測定は異なる日に実施した。得られた分析結果を集計し、解析を行った。

解析

本試験結果の解析方法は、AOAC のガイドライン (AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In "Official Methods of Analysis of AOAC Int.", 18th ed., Gaithersburg, MD, USA (2005). <http://eoma.aoac.org/app_d.pdf>) を参考に

行った。

本試験の集計データは、Cochran 検定および Grubbs 検定に従って外れ値検定を行い、解析に使用するデータを選別した。Microsoft Excel 2003 を用い、試料ごとに一元配置分散分析を行い、その結果から、併行標準偏差 (S_p)、併行相対標準偏差 (RSD_p)、室間再現標準偏差 (S_R)、室間再現性標準偏差 (RSD_R) を算出した。試料ごとの VD 含量総平均値から、Horwitz 式を用い室間再現性標準偏差の予想値 ($PRSD_R$) を算出し、さらに定量分析法の性能指標として HorRat を算出した。

C. 結果

予備試験

改良法の試験手順書に不備がなく、各試験機関で手順書に従った分析が実施できる事を確認するため、市販の乳児用調製粉乳をビタミン D の表示値 ($6.5 \mu\text{g VD}/100 \text{g}$) を明示した上で配付し、予備試験を実施した。

試験手順書に従って各試験機関で得られたデータを表 1 に示した。予備試験における各試験機関の検量線の決定係数 (R^2) は 0.99 以上であった。標準品の保持時間の室間変動は、分取 HPLC では 10.7 – 14.0 分 (VD_2 と VD_3 が同時に溶出) であり、分析 HPLC では 24.6 – 29.8 分 (VD_2) および 26.0 – 32.0 分 (VD_3) であった。いずれの試験機関でも、室内における標準品の保持時間は分取・分析 HPLC とともに安定しており、分析 HPLC において VD_2 と VD_3 の標準品のピークは明確に分離していた。また、いずれの試験機関でも試料からは VD_3 のみが検出され、定量の妨害となるピークは認められなかった。

平成 21 年度に実施した公定法に準じた

方法による室間共同試験では、同一試験日 3 連で測定した分析値の日内変動は 1.9 – 13.9 % であったのに対し (平成 21 年度報告書)、改良法の予備試験では 0.5 – 2.4 % であった (表 1)。分析値/表示値 (表示値 = $6.5 \mu\text{g VD}/100 \text{g}$) は 104 – 155 % であり、栄養表示基準における VD の許容誤差範囲 (80 – 150 %) 内の試験機関が 4 室、僅かに範囲外の試験機関が 1 室だった (表 1)。

これらの結果から、予備試験で用いられた試験手順書に試験を行う上での不備はないと判断し、引き続き本試験を実施し、その妥当性確認を行った。

本試験

本試験では、市販の粉乳 (乳児用調製粉乳 3 種:粉乳 1 – 3、妊産婦・授乳婦用粉乳 1 種:粉乳 4) を含量非明示の分析試料とした。

試験手順書に従って各試験機関で得られたデータを表 2 に示した。本試験における各試験機関の検量線の R^2 は、試験機関 B の 2 反復目が 0.93 であったが、その他は 0.99 以上であった。いずれの研究室でも分取 HPLC および分析 HPLC における標準品の保持時間は予備試験とほぼ同等であり、分析 HPLC において VD_2 と VD_3 の標準品のピークは明確に分離していた。ただし、試験機関 A および B では分取 HPLC において保持時間が安定しないというトラブルがあり、再配布した試料で試験を行った。いずれの試験機関でも、乳児用調製粉乳である粉乳 1 – 3 からは VD_3 のピークのみが検出されたが、妊産婦・授乳婦用粉乳である粉乳 4 からは、試験機関 A、B、D、E において VD_3 のピークのみならず VD_2 の保持時間付近にピークが認

められた。このピークは VD_2 の標準品とは僅かに保持時間が異なるため夾雑物によるピークであると判断した。また、試験機関 A、C、E からは粉乳 4 において VD_3 のピークに重なる妨害ピークが認められたとの報告があった。試験機関 A から報告された典型的な HPLC クロマトグラムを図 1 (分取 HPLC) および図 2 (分析 HPLC) に示した。

分析値/表示値は、粉乳 1、2 については、各試験機関から報告された全ての分析値が栄養表示基準における VD の許容誤差範囲 (80 - 150 %) 内であった。粉乳 3 については、試験機関 B の 2 反復目 (67 %) を除き、粉乳 4 については、試験機関 A の 1 反復目 (189 %)、2 反復目 (164 %) および試験機関 B の 2 反復目 (172 %) を除き許容誤差範囲内の分析値が報告された。

精度指標を算出するため、AOAC ガイドラインを参考に、異常値の検定を行った。各試験機関の 2 反復間の数値のばらつきが他の研究室と比較して妥当か検定する Cochran 検定および各試験機関で得られた数値の平均値が他の研究室と比較して妥当かどうか検定する Grubbs 検定を実施した。その結果、Cochran 検定では試験機関 B の粉乳 2 および 3 のデータが異常値であると判定され、Grubbs 検定では異常値は検出されなかった。異常値を除外し、精度指標を算出した (表 3)。室内変動の指標である RSD_r は 2.6 - 10.3 % であり、室間変動の指標である RSD_R は 4.0 - 18.9 % であった。一般に微量成分ほど分析誤差が大きくなるが、下記の Horwitz の式を利用し、 RSD_R の予測値である $PRSD_R$ を算出した。

$$PRSD_R = 2C^{-1.505}$$

ここで濃度 C は試料ごとの VD 含量総平均

値からを用いた (含量 1 % の場合は $C = 0.01$)。定量分析法の性能指標として知られる $HorRat$ を RSD_R (実測値) と $PRSD_R$ (予測値) の比から下式に従い算出した。

$$HorRat = RSD_R / PRSD_R$$

その結果、今回の共同試験の各試料の $HorRat$ は 0.18 - 0.97 であった。

D. 考察

改良法においては、分析 HPLC 用の逆相カラムとして、YMC-Pack ODS-AL (粒子系 5 μm 、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、YMC) を用いた。このカラムは一般的な ODS カラムと異なり、エンドキャップ処理が施されておらず、残留シラノール基による副次的相互作用により VD_2 および VD_3 が完全に分離する (図 2、標準品のクロマトグラム参照)。一方、一般的なエンドキャップのなされている ODS カラムでは VD_2 と VD_3 の分離が不完全となるため精確な定量が困難となる。そのため、改良法の試験手順書においては、分析 HPLC に使用するカラムを YMC-Pack ODS-AL に限定し、 VD_2 および VD_3 を個別に定量することとした。

まず含量明示の 1 種類の粉乳を用いて室間共同試験予備試験を実施し、改良法の試験手順書に不備がないこと、各試験機関が手順書に従った試験を実施できることが確認された。予備試験においては、同一試験日に 3 連で分析を行ったが、改良法による分析値の日内変動は 0.5 - 2.4 % であり (表 1)、公定法に準じて分析した場合の 1.9 - 13.9 % (平成 21 年度報告書) と比較して顕著な改善が認められた。改良法では、分取 HPLC 用試験溶液の調整時に生じる不溶物の量が大きく減少しており、このことが再現性の顕著な改善

に寄与していると考えられた。

次に、含量非明示の 4 種類の粉乳を用いて、改良法の妥当性を室間共同試験にて確認した。AOAC ガイドラインを参考に外れ値を除外した後に精度指標を算出した (表 3)。各試料の定量分析法の性能を示す HORRAT 値は 0.18 - 0.97 であった。AOAC ガイドラインでは HORRAT が 2 以下であることが分析法の妥当性を示す判断基準とされており、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。

本試験において各試験機関から報告された個々のデータを見ると、試験機関 B に関して、2 反復目の検量線の直線性が悪く ($R^2 = 0.93$)、y 切片も原点から大きく外れていた。そのため、2 反復目の測定精度が低下し、粉乳 2 および 3 で Cochran 検定での異常値となったと考えられる。また、粉乳 4 (妊産婦・授乳婦用粉乳) に関して、4 試験機関で、VD₂ のピーク近辺に夾雑物のピークが検出され、また 3 試験機関で VD₃ のピークに重なる妨害ピークが認められた (図 2、粉乳 4 のクロマトグラム参照)。改良法では、公定法に準じて分取 HPLC での分取時間はピーク頂点の -1.5 分から +1.5 分の 3 分間としたが、検出器からフラクションコレクターまでの流路容積が試験機関ごとに異なるため、分取された溶液中に含まれる夾雑物も試験機関ごとに異なる。これが粉乳 4 の分析 HPLC において、夾雑物による妨害の度合いが試験機関ごとに違う原因であり、分取開始と終了時間を試験機関ごとの HPLC システムに合わせて最適化することで精度をさらに高めることができると考えられる。分取 HPLC に関して、順相で行うことにより、分取 HPLC 用試験溶液の調整時に生じる不溶物が減ったことは利点であるが、2

試験機関で分取を始めた後に保持時間が大きく変動したため試験をやり直す必要が生じた。一般に順相 HPLC は逆相 HPLC と比較して保持時間の安定が悪く、順相溶媒に溶け込んでいる空気や HPLC システム中に残存している水系溶媒等の影響により保持時間が変動しやすい。気泡発生による流量変化に対する堅牢性の高いドロップカウント方式のフラクションコレクターの使用や、HPLC システムを順相分析専用とすることでこの問題は改善できると考えられる。

E. 結論

前年度までの研究で明らかとなった VD の公定分析法の問題点を解決した改良法を開発し、4 種類の粉乳を試料とした室間共同試験を実施した。その結果、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。

F. 研究発表

なし

G. 健康危険情報

なし

H. 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 改良法による粉乳中 VD 含量 ($\mu\text{g VD}/100\text{ g}$) 室間共同試験結果 (予備試験)

繰り返し	試験機関				
	A	B	C	D	E
1	7.92	7.09	7.17	6.77	9.91
2	8.11	7.28	6.97	6.82	9.92
3	7.83	7.01	6.85	6.76	10.34
平均	7.95	7.13	7.00	6.78	10.06
標準偏差	0.14	0.13	0.16	0.03	0.24
相対標準偏差	1.8%	1.9%	2.3%	0.5%	2.4%
測定値/表示値 ^a	122%	110%	108%	104%	155%

^a 表示値 = $6.5\ \mu\text{g VD}/100\text{ g}$

表 2 改良法による粉乳中 VD 含量 ($\mu\text{g VD}/100\text{ g}$) 室間共同試験結果 (本試験)

試料	反復	試験機関				
		A	B	C	D	E
粉乳 1 (表示値: $6.5\ \mu\text{g}/100\text{ g}$)	1	8.10	6.89	7.22	8.36	8.29
	2	7.90	9.39	7.32	8.33	7.34
粉乳 2 (表示値: $9.3\ \mu\text{g}/100\text{ g}$)	1	9.36	9.23 ^a	8.86	9.79	9.29
	2	9.24	11.11 ^a	9.00	9.75	8.64
粉乳 3 (表示値: $8.3\ \mu\text{g}/100\text{ g}$)	1	10.52	9.40 ^a	9.86	10.51	10.09
	2	10.10	5.56 ^a	10.16	10.69	9.51
粉乳 4 (表示値: $18.5\ \mu\text{g}/100\text{ g}$)	1	35.05	24.69	21.12	22.86	26.29
	2	30.42	31.91	21.16	22.88	26.83

^a Cochran 検定での外れ値

表 3 改良法による粉乳中 VD 含量 ($\mu\text{g VD}/100\text{ g}$) 室間共同試験精度指標 (本試験)

試料 種別	粉乳 1 乳児用	粉乳 2 乳児用	粉乳 3 乳児用	粉乳 4 妊産婦・授乳婦用
参加試験室数 (解析に有効な試験室数)	5 (5)	5 (4)	5 (4)	5 (5)
各試験室の併行分析回数	2	2	2	2
平均値	7.91	9.24	10.18	26.32
併行標準偏差 S_r	0.85	0.24	0.28	2.72
併行許容差 $2.8S_r$	2.38	0.66	0.79	7.61
併行相対標準偏差 RSD_r (%)	10.7	2.6	2.8	10.3
室間再現標準偏差 S_R	0.85	0.42	0.40	4.97
室間再現許容差 $2.8S_R$	2.38	1.19	1.13	13.91
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)	10.7	4.6	4.0	18.9
HorRat	0.46	0.20	0.18	0.97

Cochran 検定で検出された外れ値を除き解析した

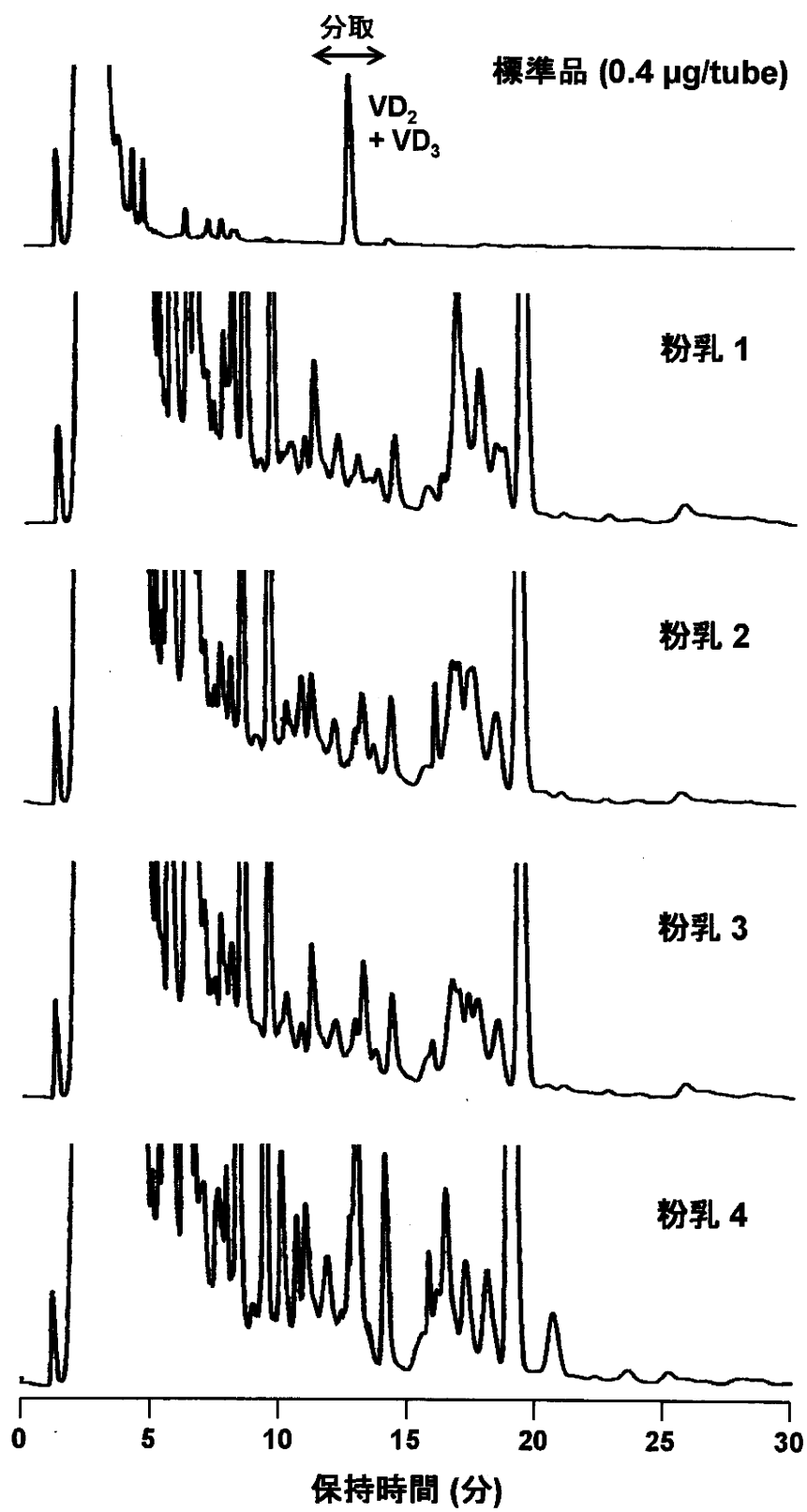


図 1 典型的な分取 HPLC クロマトグラム

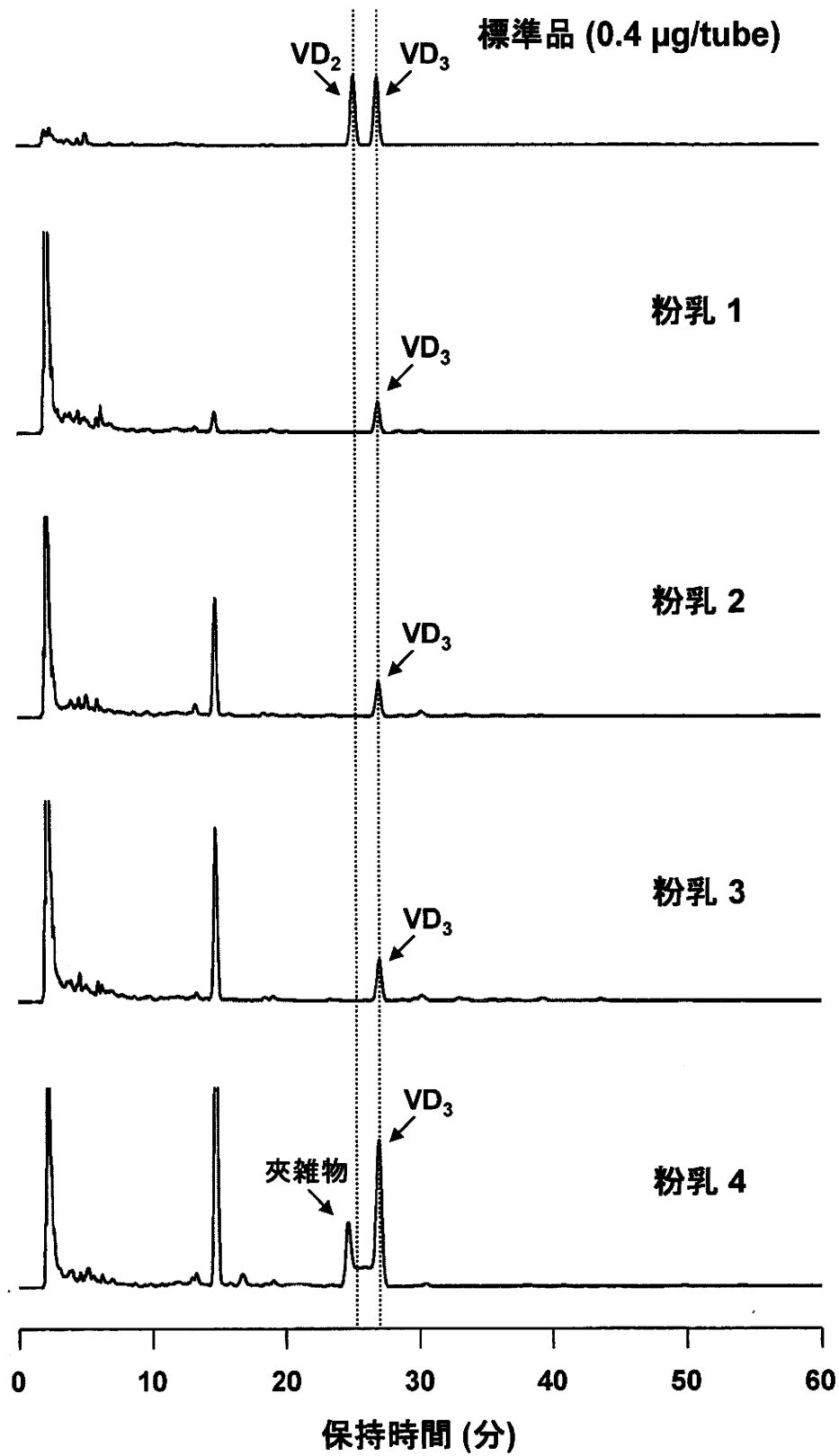


図 2 典型的な分析 HPLC クロマトグラム

(別紙) 粉乳中のビタミン D 測定試験手順書 (順相分取、逆相分析法)

試験手順書

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] に記載のビタミン D 分析法について、分取 HPLC を逆相から順相に、分析 HPLC を順相から逆相に変更した。

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、フラクシオンコレクター付きが望ましい
- ・分取用 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
- ・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: YMC-Pack ODS-AL (粒子系 5 μm 、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、製品番号 AL12S05-2546WT)
- ・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

・遠心器

・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 (下

図参照)

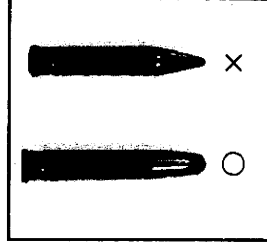
・100 mL ナスフラスコ: 褐色が望ましい

・100 mL メスフラスコ: 褐色が望ましい

・ホールピペット: 0.5 mL、1 mL、2 mL

・窒素ガス: アルゴンガスでも可

・超純水製造装置



【試薬】

- ・エルゴカルシフェロール (ビタミン D_2) 及びコレカルシフェロール (ビタミン D_3)
- ・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 用ヘキササンと HPLC 用インプロピルアルコールを 99:1 の容量比で混和する。
- ・分取 HPLC 用移動相:HPLC 用アセトニトリルと超純水を 9:1 の容量比で混和する。
- ・特に指定のない試薬は特級もしくはそれ以上のグレードのものを用いる。
- ・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。

② ビタミン D 標準原液

【ビタミン D₃ 標準原液の調整】

コレカルシフェロール (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 D₃ 標準原液、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。窒素ガスで空気を置換して -20 °C 以下で冷凍保存する。

【ビタミン D₂ 標準原液の調整】

エルゴカルシフェロール (ビタミン D₂) 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 D₂ 標準原液、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。窒素ガスで空気を置換して -20 °C 以下で冷凍保存する。

【ビタミン D₃ 及びビタミン D₂ 標準原液の純度及び濃度確認】

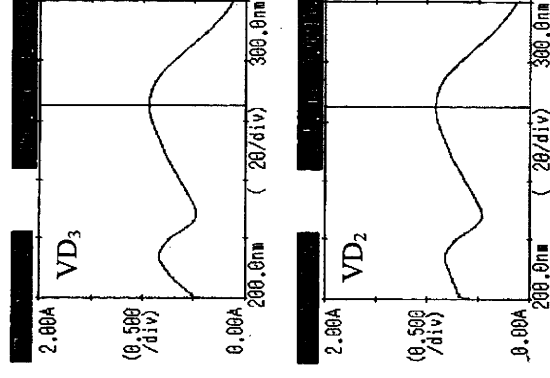
エタノールを対照として標準原液の 230 nm 及び 265 nm の吸光度 (A_{230} 及び A_{265}) を測定し純度及び正確な濃度を確認する。(純度及び濃度の確認は一月に一度は行う。)

純度の判定: A_{230}/A_{265} が 0.60 以下であること (VD₃、VD₂ 共通)

濃度: ビタミン D₃ 標準原液の濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $A_{265} \times 20.46$

: ビタミン D₂ 標準原液の濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = $A_{265} \times 20.66$

【参考: ビタミン D₃、ビタミン D₂ 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 (VD₃ + VD₂) の調製 (用時調製)】

ビタミン D₃ 標準原液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及びビタミン D₂ 標準原液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、それぞれ 1 mL 容ホールピペットを用い、同一の 100 mL メスフラスコに量り取り、エタノールで 100 mL とする (ビタミン D 標準液 (VD₃ + VD₂)、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。均一な溶液となるように良く混和する。作成したビタミン D 標準液 (VD₃ + VD₂) 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 °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 (VD₃ + VD₂、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用時調製する。

【けん化】

- (1) 検体 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。
- (2) ビタミン D 標準液 (VD₃ + VD₂、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0.5、1、2 mL を精確に取り 60 mL ネジ口遠沈管に入れる (0.1、0.2、0.4 $\mu\text{g}/\text{tube}$)。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 °C の水浴中で遠沈管を 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 °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。

【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 3 mL 程度の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 3 mL 程度の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こみスピッツに移す。

(11) 窒素ガスで空気を置換したうえでスピッツを密栓し、冷凍保存する (溶媒除去前で実験中断)。

④ 試験 2 日目

【試験の準備】

- ・当日試験開始前に HPLC 移動相を調整し、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 (分取 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)。
- ・ビタミン D 標準液 ($VD_3 + VD_2, 0.2 \mu\text{g/mL}$) を室温に戻す。
- ・1 日目に中断した試験溶液を室温に戻す。

【分取 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:2-プロパノール = 99:1 (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 ($VD_3 + VD_2, 0.2 \mu\text{g/mL}$) 2 mL を精確に取り、

10 mL スピッツに移す。

- (2) 35 °C で減圧溶媒除去する (窒素ガスを吹き付けて溶媒除去しても良い)。
- (3) 窒素ガスを噴きつけ溶媒を完全に除去する。
- (4) ヘキサンを精確に 500 μL 加える。
- (5) 30 秒以上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) 不溶物が認められる場合は、ボルテックスで混和し、可能な限り溶解する。
- (3) スピッツを 35 °C で減圧溶媒除去する (窒素ガスを吹き付けて溶媒除去しても良い)。
- (4) 窒素ガスを噴きつけ溶媒を完全に除去する。
- (5) ヘキサンを精確に 500 μL 加える。
- (6) 30 秒以上ボルテックスで混和する。
- (7) 不溶物が認められる場合は、ソニックで不溶物を均一に分散させた後、再度 30 秒以上ボルテックスで混和する。その後、遠心分離 (1,500 rpm、5 分) を行う。
- (8) 精確に 150 μL を分取 HPLC に注入し、溶出時間の -90 秒 ~ +90 秒 の 3.0 分間をブランクシヨノレクターあるいは手動で分取する。調製した分取 HPLC 用試験溶液は、注入まで間がある場合は室温で保存する。

【分析 HPLC: システム】

カラム : YMC-Pack ODS-AL (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、製品番

号 AL12S05-2546WT)

移動相 : アセトニトリル:水 = 9:1 (v/v)

流量 : 1.5 mL/min

温度 : 50 °C

検出 : UV 265 nm

注入量 : 100 µL

(4) 30 秒以上ボルテックスで混和する。

(5) 精確に 100 µL を分析 HPLC システムに注入し、ビタミン D のピーク高さを測定する。ベースラインが充分に安定した後に、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、分析開始まで室温で保存する。

⑤ 解析処理

【ビタミン D 含量の計算】

ビタミン D₃ (コレカルシフェロール) 含量 (µg/100 g)

$$= C_1 \div W \times 100$$

C₁: 検量線から求めたコレカルシフェロールの量 (µg/tube)

W: 試料採取量 (g)

(1) ビタミン D 標準液 (0.2 µg/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) アセトニトリルを精確に 200 µL 加える。

(5) 30 秒以上ボルテックスで混和する。

(6) 精確に 100 µL を分析 HPLC に注入し、溶出時間の確認及びピーク高さを測定する。

ビタミン D₂ (エルゴカルシフェロール) 含量 (µg/100 g)

$$= C_2 \div W \times 100$$

C₂: 検量線から求めたエルゴカルシフェロールの量 (µg/tube)

W: 試料採取量 (g)

ビタミン D 含量 (µg/100 g)

$$= \text{ビタミン D}_3 \text{ 含量 (µg/100 g)} + \text{ビタミン D}_2 \text{ 含量 (µg/100 g)}$$

【分析 HPLC: 試験溶液の分析】

(1) 分取したスピッツを 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)。

(2) 窒素ガスを噴きつけ溶媒を完全に留去する。

(3) アセトニトリルを精確に 200 µL 加える。

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)
分担研究報告書

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

分担研究者 永田 純一 (独)国立健康・栄養研究所 食品機能プロジェクトリーダー
協力研究者 町野 礼 (独)国立健康・栄養研究所 食品機能プロジェクト

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

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り、一般食品に添加したり、特定保健用食品の関与成分として広く利用されている食品素材である。従来から用いられている難消化性デキストリンの分析法は、前処理に行う酵素加水分解や脱塩操作が煩雑で処理量も多く、操作に手間と時間を要する分析法である。我々はこれまでに、緩衝作用に優れた緩衝溶液による酵素反応と市販カートリッジによる脱塩操作を組み合わせた簡便で迅速な分析法を確立し、内部標準品および難消化性デキストリン標準品分析において優れた検出感度と再現性を確認してきた。今回、改良した分析法を用いて、5 試験機関で難消化性デキストリンを含む市販の粉末食品および液体飲料の定量分析を行い、改良した分析法の分析精度や実施上の問題点、改善点などについて従来の方法と比較検討を行った。その結果、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。これらの原因として、加水分解に用いた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たグリセロールに混入し定量値へ影響する可能性が予測されるため、グリセロール混入に影響されない外部標準法による定量分析の確立が今後の検討課題と考えられた。さらに、改良法に対する習熟度も分析精度に影響すると考えられるため、従来法との併用試験を行い、測定値の継続的な精度管理を行うことが望ましい。簡便で迅速な測定法の分析精度向上のための取り組みが今後の検討課題である。

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腹の調子を整える生理作用を有する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(熱安定性 α -アミラーゼ)、プロテアーゼおよび網路グリコシダーゼを用いた段階的な加水分解により生じた3糖類以上の糖含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて定量分析を行っているが、従来の分析は、用いる各酵素に対応した至適pHのバッファー調製、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容量も多く、操作に時間を要するため、迅速な分析が行えない。

これまで我々は、緩衝作用に優れたMES(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) / Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) 緩衝液を用い、pH調製を行わない酵素処理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で迅速な分析法の確立を行い、1/3~1/2程度の分析時間の短縮と操作性の向上、またこれらの操作に基づいて作成された標準(グリセロール)溶液の検量線は直線性が認められた。さらに、難消化性デキストリンを含む食品(粉末状飲料)を従来の分析法と比較したところやや高い定量値を示したが、食品中に占める含有量を推定可能な範囲と考えられた。

本年度は、改良を行った方法に従って難消化性デキストリンを含む市販の粉末状および液状食品を4つの登録試験機関と当研究所において分析を実施し、分析の操作性と試験機関間における分析値のばらつきについて検討を行った。

B. 研究方法

1. 試薬と試料

難消化性デキストリンを含む分析試料として市販粉末茶((株)東洋新薬)と烏龍茶(健茶王 烏龍茶 280mL、カルピス(株))を使用した。

内部標準に用いた特級グリセロール、特級 Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)、食物繊維測定キットは和光純薬工業(株)社製を使用した。特級 MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid)は(株)同仁化学研究所社製を使用した。

2. 分析方法

難消化性デキストリンの分析法は、図1に示した方法で行った。主な変更点は、pH調整を必要としない食物繊維測定キット(和光純薬工業(株)、大阪)を用い、50mmol/L MES/Tris バッファー(pH=6.3、24°C)中で加水分解を行った点と脱塩に Waters 社(MA、USA)製の Oasis Plus MCX および Oasis WAX のカートリッジカラムを用いた点である。

操作は以下の手順に沿って行った。適定量(粉末:20-50mg程度、飲料:600mg程度)のサンプルを4mlのMES/Tris バッファーに溶解し、20 μ lの熱安定性 α -アミラーゼを用いて100°Cで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 μ lのプロテアーゼとアミログリコシダーゼを加え、1時間加水分解を行った。反応終了後、90°Cで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、30 μ lの10%グリセロール標準溶液を添加し、十分に混和した後、Waters WAX Plus および Waters MCP Plus カートリッジカラムを用いて脱塩を行った。溶液を蒸発乾固した後、一定量(1ml)に定容しHPLC

にて分析を行った。分析条件を以下に記す。

HPLC の分析条件

使用カラム: TSKgel G25000PWx1 カラム
2 本 (東ソー)

移動相: 水、HPLC グレード (和光純薬)

検出器: 示唆屈折率検出器 (日立製作所)

カラムオープン温度: 80°C

流速: 0.5ml/min

3. 室間共同試験

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。各施設には、難消化性デキストリン含有量および商品情報等は伝えていない。また、分析回数をいずれの検体も 3 回に統一して実施した。

4. データ解析

実験結果は、平均値、標準偏差、相対標準偏差 (変動係数: CV) で表し、施設間における分散を推定した。また、試験室間共同試験データ (難消化性デキストリン実測値) から求められた室間再現相対標準偏差 (RSD_R) を求め、Horwitz の式に基づき計算された理論濃度における分析値の経験則値 (室間再現相対標準偏差 ($PRSD_R$)) との比 (HORRAT) を求めた。ただし、食物繊維は、分子量不定なものに該当し HORRAT の対象外分析法となるため、今回のデータ解析はあくまで参考値とする。

C. 研究結果

1. 改良法の利点と問題点

改良法における利点は、いずれの施設からも操作性の向上と分析時間の短縮が報告された。具体的には、扱う検体量のスケールダウンにより操作性が向上し、緩衝作用に優れたバッファーを用いることで酵素加水分解が迅速かつ容易になった。さらに市販のディスプレイカートリッジを用いる脱塩操作により脱塩処理が簡略化された。これらの結果、2 日あるいは 3 日必要だった分析日数が 1 日程度で分析可能となり著しく分析時間が短縮された。

これらの利点に対して、加水分解に用いた酵素溶液中にグリセロールを含むため内部標準物質のピークと重複するため定量値に影響を及ぼした。これらを解決するため、検体を添加しないブランク試料を作成し、手順に従った処理を行った分析値を検体測定値から差し引いて定量を行った。

2. 粉末試料の分析結果

従来法による粉末試料の分析結果を表 1、改良法による分析結果を表 2 に示した。表示値が 3g 当たり 0.3015g に対して、従来法による分析値は、116 から 137% の範囲で、標準偏差および変動係数 (CV) も 0.85 から 3.47 の偏りの小さい範囲で分布した (表 1)。いずれの施設も非常にばらつきの小さい分析値を示した。一方、改良法による分析値は、C 機関でブランクによる補正を行わない数値のため著しく低い値を示したが、その他の施設は表示値に対して高めの測定値 (106 から 189%) 示した。標準偏差および変動係数も 3.57 から 28.2 を示し (表 2)、従来法と比較して分析値のばらつきが大きな施設が確認された。

3. 液体試料の分析結果

従来法による液体試料(飲料)の分析結果を表3、改良法による分析結果を表4に示した。表示値が280ml当たり6gの飲料に対して、従来法による分析値は、114 から 124%の範囲を示した。標準偏差および変動係数は、0.00 から 0.85 の非常に偏りの小さい範囲で分布し、精度の高い分析値であった(表3)。一方、C 機関を除いた他の施設における改良法による分析値は、表示値に対して高めの測定値(105 から 237%)を示した。変動係数も3.83から28.8を示し(表4)、従来法と比較して分析値のばらつきが認められた。

4. 試験機関における共同試験結果

粉末試料の難消化性デキストリン分析値の室間共同試験結果を表5に示した。従来法による分析値の平均は製品規格値の126%を示し、各施設内のばらつきを示す併行相対標準偏差も小さい値(2.6)を示した。また、室間再現精度の指標である室間再現相対標準偏差も5.82を示し、これらから計算されるHORRAT値も2.06と小さい値であった。この値は、乖離の許容上限(許容範囲=0.5~2)に近い値を示した。これに対して、改良法の分析値の平均は、製品規格値の約147%を示し、やや高い分析値を示した。施設内のばらつきを示す併行相対標準偏差(19.4)や室間再現相対標準偏差(27.4)も大きな値であった。HORRAT=9.68と従来法と比較して約4.7倍の値を示した。

一方、液体試料(飲料)の難消化性デキストリン分析値の室間共同試験結果を表6に示した。従来法による分析値の平均は製品規格値の118%を示し、各施設内のばらつきを示す併行相対標準偏差(0.6)も室間再現精度の指標である室間再現相対標準偏差(3.85)も小さい値を示した。HORRAT値は、

1.08と非常に小さく、室間再現相対偏差の経験則値とほぼ一致した。これに対して、改良法の平均分析値は、製品規格値の約150%を示し、やや高い分析値であった。併行相対標準偏差(27.2)や室間再現相対標準偏差(47.2)も大きな値を示した。これらの値は、HORRAT値(13.2)に反映し、従来法と比較して約12.3倍の大きな値を示した。

D. 考察

1. 操作法を見直した分析法(改良法)について

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。この原因の一つとして、サンプリング量が挙げられるかもしれない。脱塩カートリッジの処理量を考慮した場合、必然的に少ない量で処理することが必要となる。サンプリング濃度が小さくなれば、Horwitzのトランペット(資料図1参照)に示されるように真の値からの乖離が大きくなることが知られているため、真の値との乖離を低く見積もれる適正な濃度設定が必要になるかもしれない。

また、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。このように定量の基準となる標準物質濃度に影響したため定量値のばらつきが生じたと考えられた。

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。

分析に供する試料濃度と酵素溶液からのグリセロール混入によって著しく定量値が影響を受けたと推察された。

2. 粉末食品中難消化性デキストリン分析

今回実験に用いた粉末食品中の難消化性デキストリンは、特定保健用食品に用いられている高純度(純度約 90%)のものではなく、規格純度がおおよそ 50%程度の難消化性デキストリンを含む一般食品として販売されている粉末茶である。純度の高いデキストリンと比較して得られた難消化性デキストリンの面積が小さく(図 2)、グリセロール混入により増加した内部標準物質のピーク面積が定量値のばらつきに大きく影響したと考えられた。

3. 飲料中難消化性デキストリン分析

液体試料として用いた食品は特定保健用食品として販売されている飲料であり、特保食品に含まれる難消化性デキストリンは一般食品に含まれる難消化性デキストリンと比較して純度が高く、その他の食品マトリックスもほとんど含んでいないなど特定成分の分析には適した試料と考えられる。図 3 に示したように難消化性デキストリンのピークが明確に検出され、良好な定量値が期待されたが、各施設内のばらつきや施設間における測定平均値の乖離も粉末試料より大きいことから、定量に影響するいくつかの因子を排除する必要が考えられた。従来の方と法と比較しても難消化性デキストリンの検出は特に問題を認められないが改良法は内部標準物質による定量分析に適さない分析法かもしれない。

4. 試験機関間の分析精度

改良法によって得られた併行相対標準偏差、室間再現相対標準偏差、HORRAT の値は、いずれも従来法で得られた値と比較して、大きな値を示し、従来法の値より大きく製品規格値と乖離した。特に、液体試料におけるこれらの値は、粉末試料の値と比較しても高い値を示し、十分な分析精度を確認できなかった。

食物繊維は、分子量が一定でないため HORRAT の対象外分析法に該当する。難消化性デキストリンも分子量が 2,000 から 10,000 程度の糖から構成されているため HORRAT の対象分析ではないが、改良法における測定値の乖離度は、HORRAT の値を参考に考察すれば、製品規格値との乖離を抑える分析法の再検討が必要と思われた。

内部標準法の見直しにより定量性が改善されれば、製品規格値からの乖離は抑えられると考えられるため、グリセロールの混入を排除できる外部標準法による定量分析法の確立が必要と考えられた。

5. 分析法としての妥当性

難消化性デキストリン分析法の簡略化において、使用する酵素溶液の変更と市販脱塩用カートリッジの利用は著しい操作性の向上と分析時間の短縮(1/3~1/2)が認められた。簡略化に伴う一定の成果は得られたが、施設間における分析精度にばらつきが観察され、従来法による分析値との乖離が認められた。この大きな原因の一つとして、使用する酵素溶液に含まれるグリセロールが定量値に影響した可能性が挙げられる。また、一般食品中にも安定剤としてグリセロールが使用される場合があるため、内部標準法を用いた定量法は、外部から混入するグリセロールに

よって定量値に影響する可能性は否定できない。従ってこれらの因子を排除する最適な定量法の検討が必要となる。この点は、従来法でも同様のことが懸念される。現在、これらの点を改善するため外部標準法を検討中である。さらに、定量値に影響する問題点として、操作法に対する習熟度の問題が考えられた。ほとんどの施設は、改良法による分析を初めて行う。一部の施設から脱塩操作による脱塩不良が報告され HPLC 分析におけるベースラインに塩が検出される事例が観察された。この点は、分析法の習熟によって改善できる問題であり、操作に対する習熟が必要となる。その他にも操作上配慮する点がいくつか指摘されているので今後改善する必要がある。

E. 結論

従来法と比較して、分析法の見直しによる操作法の向上と分析時間の短縮などの改善が認められたが、施設内における分析値のばらつきが大きく試験機関間の分析精度にも影響を及ぼし理論値との乖離が大きくなるものと考えられた。今後、改良法の分析技術に習熟し、定量性の精度向上を図る分析法の確立が必要と思われる。外部標準法による定量分析を検討する予定である。

F. 研究発表

特になし。

G. 健康危険情報

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1. 粉末状食品中の難消化性デキストリン濃度-従来法 表示値 [0.3015g/3g]

	A機関	B機関	C機関	D機関	E機関
(n=3)			(g/3g)		
平均値	0.40	0.37	0.35	0.36	0.41
標準偏差	0.41	0.39	0.35	0.36	0.41
変動係数(CV (%))	0.38	0.39	0.35	0.37	0.42
平均値	0.40	0.38	0.35	0.36	0.41
標準偏差	0.014	0.012	0.003	0.006	0.006
変動係数(CV (%))	3.47	3.01	0.85	1.59	1.40

表2. 粉末状食品中の難消化性デキストリン濃度-改良法 表示値 [0.3015g/3g]

	A機関	B機関	C機関	D機関	E機関
(n=3)			(g/3g)		
平均値	0.33	0.49	0.08	0.47	0.73
標準偏差	0.31	0.44	0.08	0.47	0.56
変動係数(CV (%))	0.33	0.46	0.07	0.36	0.41
平均値	0.32	0.46	0.08	0.43	0.57
標準偏差	0.012	0.025	0.010	0.062	0.160
変動係数(CV (%))	3.57	5.43	5.95	14.2	28.2

表3. 液状食品中の難消化性デキストリン濃度-従来法 表示値 [6g/280ml]

	A機関	B機関	C機関	D機関	E機関
(n=3)			(g/280ml)		
平均値	7.02	6.87	7.00	6.80	7.45
標準偏差	7.09	6.88	7.00	6.83	7.39
変動係数(CV (%))	7.09	6.90	7.00	6.92	7.48
	7.07	6.88	7.00	6.85	7.44
	0.041	0.015	0.000	0.058	0.043
	0.58	0.22	0.00	0.85	0.57

表4. 液状食品中の難消化性デキストリン濃度-改良法 表示値 [6g/280ml]

	A機関	B機関	C機関	D機関	E機関
(n=3)			(g/280ml)		
平均値	6.52	8.15	1.96	6.64	15.9
標準偏差	6.36	12.1	1.96	6.55	17.1
変動係数(CV (%))	6.05	7.38	1.68	5.46	9.52
	6.31	9.23	1.87	6.22	14.2
	0.241	2.572	0.162	0.656	4.094
	3.83	27.9	8.66	10.6	28.8