ノート

日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアルに基づく 加工食品中のビタミンD類分析法の改良と検証

鈴木一平¹ 熊井康人¹ 多田敦子² 佐藤恭子²
梅垣敬三^{1,3} 千葉剛¹ 竹林純^{1*}

Method Verification for Vitamin D Analysis in Processed Foods Based
on the Analytical Manual for the Standard Tables of Food Composition
in Japan 2015 (Seventh Revised Edition)

Ippei SUZUKI¹, Yasuhito KUMAI¹, Atsuko TADA², Kyoko SATO²,
Keizo UMEGAKI^{1,3}, Tsuyoshi CHIBA¹ and Jun TAKEBAYASHI^{1,*}

¹ National Institute of Health and Nutrition, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition:
1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8636, Japan;

² National Institute of Health Sciences: 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan;

³ Department of Food Safety and Management, Showa Women's University:
1-7-57 Taishido, Setagaya-ku, Tokyo 154-8533, Japan;

* Corresponding author

Considerable amounts of processed foods contain vitamin D (ergocalciferol (D₂) and cholecalciferol (D₃)) as food additives. For field surveys on food additives, the analytical method for vitamin D should be well-validated. However, the current official method in Japan cannot separately determine the concentrations of D₂ and D₃, whereas the method for the Standard Tables of Food Composition in Japan 2015 (STFC method) can. Therefore, in this study, we verified the applicability of the STFC method to processed foods. During the course of this research, we added some improvements to the original method. Spike and recovery experiments using vegetable juice, soymilk, and corn flakes as food matrices showed that the recovery rates (relative standard deviation) of D₂ and D₃ were 103–112% (4.7–12.6%) and 102–109% (2.4–21.8%), respectively, at the estimated method limit of quantification (EMLOQ) level; and 100–110% (4.0–7.4%) and 102–105% (3.8–4.8%), respectively, at 10 times the EMLOQ level. These results indicated that accuracy and precision of the modified STFC method were enough to determine dietary D₂ and D₃ as endogenous nutrients and/or food additives, and suggested that this method is appropriate for analyzing vitamin D concentrations in processed foods.

(Received September 30, 2019; Accepted January 7, 2020)

Key words: ビタミンD vitamin D; 食品分析 food analysis; エルゴカルシフェロール ergocalciferol; コレカルシフェロール cholecalciferol

緒言

ビタミンDはカルシウム代謝に必須の栄養成分であり、欠乏はくる病などの疾患の原因となる¹⁾。そのため、食品添加物（栄養強化剤）としてエルゴカルシフェロール（D₂）およびコレカルシフェロール（D₃）の使用が認められている。一方、ビタミンDの過剰摂取により高カルシウ

ム血症、腎障害、軟組織の石灰化障害などが起きるため¹⁾、製品中に適切な量のビタミンDが含まれていることは利用者の健康維持と製品の信頼性確保に重要である。そのためには十分に検証された信頼の置ける分析方法による定量分析が必要である。

食品添加物として使用されたビタミンDの定量法としては「食品中の食品添加物分析法」（食添法）²⁾が通知されている。また、他に食品中のビタミンDの公的な分析法として、栄養成分表示値を確認するための定量法（通知法）³⁾および日本食品標準成分表の策定のための定量法として日本食品標準成分表2015年版〈七訂〉分析マニュアルに記載された方法（マニュアル法）⁴⁾が知られている。

* 連絡先: jtake@nibiohn.go.jp

¹ 医薬基盤・健康・栄養研究所: 〒162-8636 東京都新宿区戸山1-23-1

² 国立医薬品食品衛生研究所: 〒210-9501 川崎市川崎区殿町3-25-26

³ 昭和女子大学: 〒154-8533 東京都世田谷区太子堂1-7-57

食添法と他の2法はおおむね同一の測定原理に基づくが、その細部には差異が認められる。特に、マニュアル法は食添法より試料液の調製が簡便であるという利点があり、食添法だけでなく通知法でも不可能なD₂とD₃の分別定量が可能である。近年では栄養機能食品等としてビタミンDを強化した加工食品が販売されていることから、加工食品中の食品添加物および食品原料に由来するD₂とD₃の定量にマニュアル法を適用することが求められている。しかしながら、マニュアル法は日本食品標準成分表に記載される加工度の低い（生に近い）食品を中心に妥当性が確認された方法である。

そこで本研究では栄養強化されている加工製品が市場流通している3種類の食品マトリクスを用いて、加工食品中の食品添加物および食品原料由来のD₂とD₃の定量へのマニュアル法の適用性について検証を行った。また、検証の過程において明らかになったマニュアル法の課題点の改良法検討結果についても併せて報告する。

実験方法

1. 試料

食品添加物としてビタミンDが強化されている製品が広く流通している食品形態として、野菜ジュース、豆乳およびコーンフレークを選択した。添加回収実験により真度・精度を確認するために、原材料名表示を確認し、D₂、D₃が添加されていない製品を購入した。野菜ジュースおよび豆乳についてはそのまま検体とし、コーンフレークは乳鉢で粉碎したものを検体とした。

2. 試薬等

1) 標準品

D₂標準品およびD₃標準品は一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の日本薬局方標準品を用いた。

2) 試薬および試液

(±)- α -トコフェロール (*dl*- α -トコフェロール) は試薬一級、エタノール、ピロガロール、水酸化カリウム、ヘキサン、2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール (BHT) の各試薬特級、およびアセトニトリル、ヘキサンの各高速液体クロマトグラフ用は、それぞれ富士フイルム和光純薬株式会社の試薬を用いた。6-エトキシ-2,2,4-トリメチル-1,2-ジヒドロキノリン (エトキシキン) は Fluorochem Ltd., 東京化成工業株式会社, Tront Research Chemicals Inc. の3社のものを用いた。塩化ナトリウムはナカライテスク株式会社の試薬特級を用いた。酢酸エチルの試薬特級、2-プロパノールの高速液体クロマトグラフ用は関東化学株式会社の試薬を用いた。試験用の水はMerck Millipore社製MillQ超純水ろ過装置で精製した超純水を用いた。

0.04 w/v% BHT含有エタノール溶液: BHT 100 mgにエタノール250 mLを加えて溶解した。0.005 w/v% トコフェロール含有エタノール: *dl*- α -トコフェロール 54 μ Lを、エタノール1,000 mLを加えて溶解した。30 g/Lピロ

ガロール-エタノール溶液: ピロガロール 3 gにトコフェロール含有エタノール100 mLを加えて溶解した。600 g/L水酸化カリウム溶液: 水酸化カリウム 60 gに水40 mLを加えて溶解し、水で100 mLとした。ヘキサン-酢酸エチル混液 (9:1 v/v): ヘキサン900 mLと酢酸エチル100 mLを、マグネティックスターラーを用いて混合した。

3) カルシフェロール標準溶液

D₂およびD₃を50 mgずつ量り、それぞれヘキサン200 mLに溶解・定容し、両溶液をそれぞれ一定量とり混合し、溶媒を留去した後、それぞれの濃度が0.25 μ g/mLになるように0.04 w/v% BHT含有エタノール溶液で溶解した。

3. 装置

HPLCは株式会社島津製作所製を用いた。装置構成: ポンプ (LC-10ADvp), デガッサー (DGU-14A), オートサンプラー (分取HPLC: SIL-10ADvp, 分析HPLC: SIL-20AC), カラムオープン (CTO-10Avp), 紫外可視吸光度検出器 (SPD-10Avp), システムコントローラー (SCL-10Avp), データ処理装置 (分取HPLC: クロマトパックC-R7A plus, 分析HPLC: LCsolution ver 1.25), 振とう恒温水槽 (THERMO MINDER SD, PERSONAL-11) および振とう機 (STRONG SHAKER SR-2DS) はタイテック株式会社製を用いた。

4. 測定条件

分取HPLC

カラム: POLYGOSIL 60 (粒子径5 μ m, 内径4.6 mm, 長さ250 mm, 株式会社ケムコプラス社製), 移動相: ヘキサン-2-プロパノール混液 (99:1, v/v) (流速: 1.5 mL/分), 波長: 265 nm, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 注入量: 150 μ L

分析HPLC

カラム: Cadenza CL-C18 (粒子径3 μ m, 内径4.6 mm, 長さ150 mm, インタクト株式会社製), 移動相: アセトニトリル-水混液 (9:1, v/v), 流速: 1.5 mL/分, 波長: 265 nm, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 注入量: 100 μ L

5. 試験溶液の調製

野菜ジュース、豆乳は3 g, コーンフレークは0.5 gを遠心管に秤取した。10 g/L塩化ナトリウム溶液3 mL, ピロガロール-エタノール溶液10 mL, 水酸化カリウム3 gおよび600 g/L水酸化カリウム溶液2 mLを加え、振とう恒温槽でかくはんしながら60分間70 $^{\circ}$ Cで加熱した。けん化後、水中で速やかに室温まで冷却し、10 g/L塩化ナトリウム溶液19 mLおよびヘキサン-酢酸エチル混液 (9:1 v/v) 15 mLを加え、振とう機で5分振とうし、遠心分離後に有機溶媒層を分取した。同様の操作を2回繰り返したのちに、分取した有機溶媒層を減圧留去し、残留物をヘキサン1,000 μ Lに溶解し、D₂およびD₃を含むカルシフェロール画分分取用試験溶液とした。別に、カルシフェロール標準溶液2 mLを遠心管に秤取し、試料と同様の操作を行いカルシフェロール画分分取用標準溶液とした。

6. 分取および定量

カルシフェロール画分分取用試験溶液を150 μ L分取HPLCに注入し、あらかじめ測定したカルシフェロール標準溶液の結果を基準に、保持時間の前後各45秒をカルシフェロール画分として分取した。カルシフェロール画分を減圧留去した後、アセトニトリル200 μ Lで溶解し、測定用試験溶液とした。カルシフェロール画分分取用標準溶液についても同様の操作を行い、測定用標準溶液を得た。

測定用試験溶液および測定用標準溶液を分析HPLCに100 μ L注入し、ピーク高を測定した。測定用標準溶液と測定用試験溶液のピーク高との比を用いて、食品中の D_2 および D_3 濃度 (g/100 g) を算出した。

Fig. 1. Ethoxyquin interference of chromatography

The mobile phase of preparative HPLC with or without ethoxyquin were evaporated, dissolved by a standard solution containing D_2 and D_3 (0.004 μ g/mL each) in acetonitrile/MilliQ (9:1) and analyzed with the second HPLC.

a) Standard solution. b) Mobile phase of preparative HPLC without ethoxyquin. c) Ethoxyquin manufactured by Fluorochem was used. d) Ethoxyquin manufactured by Tokyo Chemical Industry was used. e) Ethoxyquin manufactured by Toronto Research Chemicals was used.

Fig. 2. Representative chromatograms for the spike and recovery tests

Vegetable juice, soy milk and corn flakes were spiked with standard solutions of D_2 and D_3 at a concentration of the limit of quantification or ten times the limit of quantification for each sample, and the recoveries were assessed.

a) Standard solution containing D_2 and D_3 at a concentration of 0.004 μ g/mL each. b) Blank. c) Spiked at a concentration of the limit of quantification. d) Spiked at a concentration of ten times the limit of quantification

7. 測定の信頼性確認および装置定量下限の検討

測定の信頼性確認では、 D_2 および D_3 をそれぞれ0.125, 0.25, 0.375 μ g/mLを含有する標準溶液を調製し、分析HPLCに注入したピーク高さと濃度の関係性から導出した。定量下限 (LOQ) は S/N 比が10程度となる信号を与

える濃度と定義し、定量下限と推定される程度 (0.004 $\mu\text{g/mL}$) の D_2 および D_3 標準溶液を調製し、分析HPLCで分析を行い S/N 比から装置定量下限 (ILOQ) を算出した。

8. 推定方法定量下限の検討

分取HPLCにより各食品試料から得られたカルシフェロール画分にカルシフェロール標準溶液を添加し、同様に測定用試験溶液を調製した。分析HPLCにより測定用試験溶液を測定し、測定用試験溶液中LOQを推定した。測定用試験溶液中のLOQに加え、既知のけん化操作における熱異性化率⁵⁾ (−20%) と、けん化後1000 μL に定容した溶液のうち分析HPLCへの注入量が150 μL (−85%) であることを考慮し、推定方法定量下限 (EMLOQ) を算出した。

9. 分析法の妥当性確認

食品試料にEMLOQあるいはEMLOQの10倍量のカルシフェロール標準溶液を添加し、添加回収実験を行った。添加回収実験によって得られた真度 (回収率) および併行精度 (相対標準偏差 (RSD)) を、Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program (ガイドライン)⁶⁾ に示されている値と比較し、本分析手法の評価を行った。

結果および考察

1. マニュアル法における実用上の課題点とその改良

本研究では当初、マニュアル法を完全に踏襲して検証を行う予定であったが、実用上の問題により下記2点の修正を加えた改良マニュアル法について検証を行った。

1点目は、マニュアル法に従ってカルシフェロール画分分取用試験溶液の調製を行うと、標準溶液について操作した場合に限り強い刺激臭が生じるという課題点である。これは、マニュアル法において標準溶液の溶媒として使用されているアセトニトリルがけん化操作において加水分解を受け、アンモニアが生成したためであると考えられた。食添加および通知法においては標準溶液の溶媒としてエタ

ノールが使用されている。我々は過去の研究⁷⁾ で通知法による分析精度の検証を行っているが、標準溶液の溶媒がエタノールであることに特段の不都合を認めなかった。そこで、安全性の向上を図るため当研究においては標準溶液の溶媒をアセトニトリルからエタノールに変更した。

2点目は、マニュアル法に従って分析HPLC分析を行うと広範囲における大きな妨害ピークが生じ、 D_2 および D_3 の定量性に重大な影響を与えるという課題点である (Fig. 1)。この妨害ピークについても、我々の表示法に関する研究⁷⁾ では認められなかったものであり、原因を追究した結果、マニュアル法でのみで使用されているエトキシキン (分取HPLC移動相の添加剤) が問題であることが明らかとなった。エトキシキンによる妨害は、程度の差こそあれ異なる3社から購入したどのエトキシキンを使用しても認められた (Fig. 1)。そこで、ILOQ付近における定量値の信頼性向上のため、当研究においては分取HPLCの移動相からエトキシキンを除き実施した。

2. 測定の信頼性の確認およびILOQの確認

マニュアル法は1点検量線であるが、その信頼性を確認するため、3濃度の D_2 および D_3 を含有する標準溶液を測定し、作成した回帰直線の直線性の確認を行った。得られた回帰直線の決定係数 (R^2) は、ともに1.000と良好な値を示した。 D_2 および D_3 標準溶液 (ともに0.004 $\mu\text{g/mL}$) の5回の繰り返し分析によって得られたピークの平均 S/N 比は10以上 (12および11) であった。よって、 D_2 および D_3 のILOQを0.004 $\mu\text{g/mL}$ とした。

3. EMLOQの推定

前処理の工程で各食品試料から得られたカルシフェロール画分に D_2 および D_3 を添加した測定用試験溶液においても D_2 および D_3 のピークは選択的に検出されており、食品マトリクスによる妨害を受けていなかった (Fig. 2)。野菜ジュースでは0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、豆乳およびコーンフレークでは0.02 $\mu\text{g/mL}$ において、測定用試験液中の D_2 および D_3 の S/N 比が10以上 (S/N 比13~18) となった。けん化の

Table 1. Results of recovery tests for D_2 and D_3 in food samples

a) D_2 recovery						
Samples	Limit of quantification level			Limit of quantification level $\times 10$		
	Vegetable juice	Soy milk	Corn flakes	Vegetable juice	Soy milk	Corn flakes
Spiked level ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	0.67	1.3	8.0	6.7	13	80
Recovery ^{*1} (%)	106	103	112	104	100	110
RSD ^{*2} (%)	12.6	4.7	10.6	4.0	7.4	4.5
b) D_3 recovery						
Samples	Limit of quantification level			Limit of quantification level $\times 10$		
	Vegetable juice	Soy milk	Corn flakes	Vegetable juice	Soy milk	Corn flakes
Spiked level ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	0.67	1.3	8.0	6.7	13	80
Recovery ^{*1} (%)	109	103	102	105	102	105
RSD ^{*2} (%)	21.8	2.4	19.7	3.8	3.9	4.8

^{*1} Mean of 5 replicates

^{*2} Relative standard deviation

際の熱異性化や分析HPLCへの注入量を加味し、各食品試料のEMLOQを野菜ジュース0.67 µg/100 g、豆乳1.3 µg/100 g、コーンフレーク8 µg/100 gとした。

4. 真度および精度の確認

添加回収実験によって得られた改良マニュアル法の真度および併行精度をTable 1に示した。なお回収率およびRSDは5併行の試験の分析結果から算出した。

EMLOQ相当量のD₂、D₃を添加した加工食品試料の分析によって得られた回収率の平均値（RSD）はD₂で103～112%（4.7～12.6%）、D₃で102～109%（2.4～21.8%）、EMLOQの10倍量のD₂、D₃の添加試料ではD₂で100～110%（4.0～7.4%）、D₃では102～105%（3.8～4.8%）であった。

ガイドラインでは、食品添加物分析法に求められる回収率および併行精度が添加濃度ごとに示されており、0.01 µg/gでは回収率60～115%（RSD<22%）、0.1 µg/gでは80～110%（RSD<11%）、1 µg/gでは回収率80～110%（RSD<8%）となっている。添加回収実験の結果をガイドラインと比較すると、EMLOQ相当量のD₃を添加したコーンフレークにおいてガイドラインの範囲を超えたことから、食品によっては分析HPLCに供する試料を増やすなどの工夫によってEMLOQレベルを改善する必要があると考えられた。しかし、それ以外ではいずれも回収率および併行精度はガイドラインの目標値を満たしていた。この結果から、改良マニュアル法は加工食品中のD₂およびD₃分析に適用可能な真度および精度を有すると推察された。

謝 辞

本研究は、厚生労働省食品等試験検査費食品中の食品添加物分析法の検討事業（平成29年度）により実施された。

文 献

- 1) 厚生労働省. 「日本人の食事摂取基準（2015年版）策定検討会」報告書（平成26年3月28日）.
- 2) 厚生労働省監修. 84エルゴカルシフェロールおよびコレカルシフェロール, 食品衛生検査指針食品添加物編, 東京, 2003.
- 3) 消費者庁. 食品表示基準について, 別添: 栄養表示関連消費者庁通知（平成27年3月30日, 消費表第139号）.
- 4) 文部科学省. 日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル（平成28年3月）.
- 5) 小林 正. “ビタミンD I. ビタミンD及び関連化合物の定量法 定量法概説”. ビタミン学実験法 [I]. 日本ビタミン学会編. 東京, 東京化学同人, 1983, p. 82-193 (ISBN 4-8079-0217-2)
- 6) US Food and Drug Administration. Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program 2nd Edition (Apr., 2015).
- 7) Takebayashi, J., Kaoru, Y., Matsumoto, T., Tayoshi, I., Takuyuki, H., Fuse, K., Horiuchi, T., Mima, H., Yasukouchi, Y., Yoshida, M., Yamada, K., Ishimi, Y. Determination of Vitamin D in Foods by the Official Method in Japan and Its Modified Method: Interlaboratory Studies, *Vitamins (Japan)*, **85**, 645-650 (2011).