

ビタミン B 群の高速液体クロマトグラフ 法の確立に係る基礎資料

報告書

令和6年3月

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

本報告書は、消費者庁の委託を受け、国立研究開発法人医薬基盤健康・栄養研究所が取りまとめたものである。

目次

1. 概要.....	4
I. 食品分析に係る妥当性評価のガイドライン等の情報収集及び参考資料の作成	4
II. 「高速液体クロマトグラフ法」の標準化及び妥当性の検証	5
2. 背景と目的	7
3. 食品分析に係る妥当性評価のガイドライン等の情報収集及び参考資料の作成	8
(1) 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン(厚生労働省:2010年)	10
(2) 食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン(厚生労働省:2024年)	11
(3) 食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン(厚生労働省:2008年).....	12
(4) 分析法の妥当性確認に関するガイドライン(農林水産省:2019年)	13
(5) Principles for the establishment of Codex methods of analysis(コーデックス委員会:Procedural Manual 28th Edition :2023年)	14
(6) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis(IUPAC:2002年).....	15
(7) Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies(IUPAC:1995年)	15
(8) Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis(AOAC INTERNATIONAL:2005年).....	16
(9) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method(ISO 5725-2:2019年)	16
4. 「高速液体クロマトグラフ(HPLC)法」の標準化及び妥当性の検証	17
(1) 妥当性の検証方法	17
I. 検出限界及び定量下限	17
II. 検量線の直線性.....	18
III. 真度及び精度	18
IV. 微生物学的定量法との同等性.....	19
(2) ビタミンB ₆ のHPLC法.....	20
I. 方法	20
II. 結果及び考察	21
(3) ビタミンB ₁₂ のHPLC法	26
I. 方法	26
II. 結果及び考察	27

(4) ナイアシンの HPLC 法	33
I. 方法	33
II. 結果及び考察	34

1. 概要

I. 食品分析に係る妥当性評価のガイドライン等の情報収集及び参考資料の作成

目的:

食品表示基準(平成 27 年内閣府令第 10 号)における栄養成分等の分析方法等については、同基準の別表第9第3欄に測定及び算出の方法の名称が掲げられており、「食品表示基準について」(平成 27 年3月 30 日付け消食表第 139 号消費者庁次長通知)別添 栄養成分等の分析方法等以下「分析等通知」という。)で具体的な手法を示している。本検討事業では、食品表示基準及び分析等通知に新たな分析方法を追加する際に、分析方法が適切で信頼性のあるものであるかを評価するための基礎資料を得ることを目的とした。

調査方法:

国内及び国際機関で定められた食品分析方法に係る妥当性評価のガイドライン等の情報を収集し、これらのガイドライン等で要求されている標準化及び妥当性の検証方法等について整理した。

結果:

国内の機関が定めたガイドラインを4つ、国際機関が定めたガイドライン等を5つ収集した。これらのガイドラインのうち5つが主として単一試験室による妥当性確認方法を示したものであり、共通している評価項目としては、選択性・真度・精度が挙げられていた。また、これら以外に検出限界・定量下限・検量線の直線性とマトリクス効果・感度・堅牢性・測定の不確かさ・目的適合性等が評価項目として挙げられていた。収集したガイドラインのうち3つが室間共同試験による妥当性確認方法を示したものであり、参加試験室数・材料数・外れ値検定の結果、除外可能な試験室数・室間再現性相対標準偏差(RSD_R)の目安等が規定されていた。

II. 「高速液体クロマトグラフ法」の標準化及び妥当性の検証

目的:

令和2年度に消費者庁が実施した調査検討事業「食品表示基準における栄養成分等の分析方法等に係る調査検討事業」においてビタミン B 群の分析方法は、ビタミン B 群が高含有量の食品である場合、「微生物学的定量法」よりも「高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法」を用いた方が、精確かつ簡便な定量が行え、実行可能性が高くなると取りまとめられた。そのため、当該検討事業では、食品表示基準及び分析等通知におけるビタミン B 群の HPLC 法の位置付けを検討するため、単一試験室による妥当性確認試験を実施した。

調査方法:

令和2年度の調査検討事業において HPLC 法を追加すべきと指摘を受けているビタミン B₆、ビタミン B₁₂ 及び既に食品表示基準別表第9第3欄に HPLC 法が位置付けられているナイアシンを対象成分として選定し、分析等通知の本文又は注釈に記載されている HPLC 操作条件例に基づく HPLC 法について、検出限界及び定量下限、検量線の直線性、真度及び精度並びに微生物学的定量法との同等性を評価した。

結果及び考察:

ビタミン B₆ の HPLC 法については、蛍光検出器を用いた場合、試料中の定量下限は 0.004mg/100g 程度であり、0.5~5.0ng/mL の範囲で検量線の直線性と原点通過が確認された。マルチビタミン/ミネラルタブレットの標準物質を用いた検討における真度と併行精度は良好であったが、中間精度には改善の余地があると考えられた。幅広い濃度範囲の検体に対し、HPLC 法で得られた結果は、微生物学的定量法で得られた結果とおおむね同等であったが、ピリドキシン以外のビタミン B₆ 活性を持つ化合物が含まれている検体に注意が必要であることが示唆された。したがって、食品中のピリドキシン活性を有する化合物の大半が、強化剤として添加されたピ

リドキシリン塩酸塩である事が明らかである食品等の分析に限り、ビタミン B₆ の分析方法として食品表示基準及び分析等通知に HPLC 法を位置付けるのが適当である。

ビタミン B₁₂ の HPLC 法については、試料中の定量下限は 3,000 μ g/100g 程度であり、0.3～3.0 μ g/mL の範囲で検量線の直線性と原点通過が確認された。10,000 μ g/100g 程度の濃度における添加試料の検討では、真度と精度は良好であった。抽出液中の濃度が HPLC 分析装置の定量下限以上であれば微生物学的定量法とおおむね同等の結果が得られることが示唆されたが、分析等通知に記載された試験溶液調製法の範囲で定量可能な抽出液が得られる検体は、試料とした製品の中でも特に高濃度のビタミン B₁₂ を含有する食品に限られていた。したがって、ビタミン B₁₂ の分析方法として食品表示基準に HPLC 法を位置付けることが適当であるが、現状では特に高濃度のビタミン B₁₂ を含有する食品に適用範囲が限られるため、分析等通知においては濃縮法を含め更なる検討を加えることが望ましい。

ナイアシンの HPLC 法については、ニコチン酸及びニコチン酸アミドの両方とも試料中の定量下限は 1mg/100g 程度であり、0.05～0.50 μ g/mL の範囲で検量線の直線性と原点通過が確認された。マルチビタミン/ミネラルタブレットの標準物質を用いた検討では、併行精度は良好であったものの、真度及び中間精度には問題があり、分析方法に更なる改善の余地があると考えられた。含有量が高い(おおむね 1,000mg/100g 以上)サプリメント形状の食品については、微生物学的定量法と同等性が認められたが、サプリメント形状以外の低含有量の食品に適用するには問題があると考えられた。したがって、ナイアシンの分析方法として食品表示基準では既に HPLC 法が位置付けられているが、分析等通知においては、適用食品を更に限定するか、前処理法を含めた更なる検討を加えることが望ましい。

2. 背景と目的

食品表示基準における栄養成分等の分析方法等については、同基準の別表第9第3欄に測定及び算出の方法の名称が掲げられており、分析等通知で具体的な手法を示している。

令和2年に消費者庁が実施した調査事業「食品表示基準における栄養成分等の分析方法等に係る調査検討事業」においてビタミンB群の分析方法は、ビタミンB群が高含有量の食品である場合、「微生物学的定量法」よりも「高速液体クロマトグラフ法」の方が、精確かつ簡便な定量が行え、実行可能性が高くなることが取りまとめられた。そのため、当該検討事業では、食品表示基準及び、分析等通知においてビタミンB群の「高速液体クロマトグラフ法」を位置付けるため、その適応食品や分析方法の確立に係る基礎資料を得ることを目的とする。

3. 食品分析に係る妥当性評価のガイドライン等の情報収集及び参考資料の作成

国内及び国際機関で定められた食品分析方法に係る妥当性評価のガイドライン等の情報を収集した(表1)。これらのガイドライン等で要求されている標準化及び妥当性の検証方法等について整理した。

表1. 食品分析に係る妥当性評価のガイドライン等(令和6年3月時点)

	機関	ガイドライン等の名称	URL
1	厚生労働省	食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン	https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/dl/101224-1.pdf
2	厚生労働省	食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン	https://www.mhlw.go.jp/content/001221868.pdf
3	厚生労働省	食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン	https://www.nihs.go.jp/food/_src/1492/metal_qag1.pdf?v=1599552544317
4	農林水産省	分析法の妥当性確認に関するガイドライン	https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/pdf/guide_validation.pdf
5	コーデックス委員会	Principles for the establishment of Codex methods of analysis	https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc5042en
6	IUPAC	Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis	https://publications.iupac.org/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf

7	IUPAC	Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies	https://publications.iupac.org/pac/1995/pdf/6702x0331.pdf
8	AOAC INTERNATIONAL	Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis	https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis/
9	ISO (JIS) ※ 当該 ISO 規格の更新前 (ISO 5725:1994) の翻訳	ISO 5725-2:2019 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (JIS Z 8402-2:1999 測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度)—第2部:標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的な方法)	https://www.iso.org/standard/69419.html (https://webdesk.jsa.or.jp/books/W11M0090/index/?bunsho_id=JIS+Z+8402-2%3A1999)

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, ISO: International Organization for Standardization, JIS: Japanese Industrial Standards

(1) 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン(厚生労働省:2010年)

食品中に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品に関する試験法について「食品中に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号)において定める試験法以外の方法によって試験を実施する場合に、各試験機関がその試験法の妥当性を評価するための手順を示すものであり、機器分析法を対象とする。

当該ガイドラインに示されている手順は、試験法の妥当性を評価する標準的方法の一例であり、国際的に認められた他の手順を使用することもできるとされている。

妥当性評価の方法としては、食品ごとに、妥当性を評価する試験法の試験対象である農薬等を含まない試料(ブランク試料)及び試験対象の農薬等を添加した試料(添加試料)を、試験法に従って試験し、その結果から以下の性能パラメータを求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認することとされている。

(1) 選択性

ブランク試料を試験法に従って試験し、定量を妨害するピーク(妨害ピーク)がないことを確認する。妨害ピークを認める場合は、妨害ピークの面積(又は高さ)を基準値あるいは定量限界に対応する濃度の標準液から得られるピーク(又は高さ)と比較し、その影響が十分小さいことを確認する。

(2) 真度

添加試料5個以上を試験法に従って試験し、得られた試験結果の平均値の添加濃度に対する比を求め、これを真度とする。

(3) 精度

添加試料の試験を繰り返し、得られた試験結果の標準偏差及び相対標準偏差を求め、併行精度及び複数の実施者又は実施日による室内精度を評価する。

(4) 定量限界

基準値が定量限界と一致している場合又は農薬等の残留基準告示において「不検出」とされる場合には、以下の条件①及び②を満足していることを確認する。

① 添加試料の試験結果に基づく真度、併行精度及び室内精度が目標値を満

足していること。

- ② クロマトグラフィーによる測定では、定量限界濃度に対応する濃度から得られるピーク(①で得られるピークあるいはブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液から得られるピーク)は、シグナル対ノイズ比(S/N比) ≥ 10 であること。

(2) 食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン(厚生労働省:2024年)

食品中の食品添加物について、食品衛生法(昭和22年法律第233号)第12条への適合及び同法第13条第1項に基づく食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号)の「第2 添加物「F 使用基準」」への適合を判定するための根拠となる結果を得ることを目的として試験を実施する場合に、各試験所が使用を意図する分析法の妥当性を確認するための手順を示すものである。

当該ガイドラインで示された手順は、食品中の添加物分析法としての性能を評価し、試験法としての妥当性を確認する標準的方法の一例であり、国際的に認められた他の手順を使用することもできる。

定量分析法の性能評価と妥当性確認の方法としては、ブランク試料又はトレース試料及び添加試料を計画的に分析し、得られた結果から以下の性能パラメータ(選択性、真度及び精度)を推定する。推定した性能が、それぞれの目標値等を満たしているかを評価し、原則としてその目標値を満たしている場合に妥当性が確認されたものとする。ただし、既存の精度管理データや添加試験データが利用可能な場合は、それらのデータから以下の性能パラメータを推定し、性能を評価し、妥当性を確認することも可能である。

(1) 選択性

ブランク試料又はトレース試料を分析法に従って分析し、分析対象物質以外に由来し、分析値の正の誤差要因になり得る信号がないことを確認する。そのような信号が認められる場合は、原則としてその強度が、添加した試験物質に由来する分析対象物質の信号強度の1/10 未満又は定量限界未満であることを確認す

る。

(2) 真度

添加試料5個以上を分析法に従って分析し、得られた分析値の平均値の添加濃度に対する比率(%)を求め、真度を推定する。

(3) 精度

添加試料を分析し、得られた分析値の相対標準偏差(RSD%)を求め、併行精度及び室内精度を推定する。実験計画では、自由度4以上で分散の推定が可能な分析値を得るよう、分析の繰り返し回数を設定する。

(3) 食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン(厚生労働省：2008年)

食品中に存在する金属に関する試験法について、食品、添加物等の規格基準等に定める試験法以外の方法によって試験を実施する場合に、各試験機関がその試験法の妥当性を評価するための手順を示すものであり、機器分析法を対象とする。

当該ガイドラインに示された手順は、試験法の妥当性を評価する標準的方法の一例であり、国際的に認められた他の手順を使用することもできる。

評価の方法としては、食品ごとに、妥当性を評価する試験法について、以下のパラメータを求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認する。

(1) 選択性

試料についてマトリクス中の他金属による定量の妨害がないことを確認する。妨害となる信号が認められる場合は、対象金属の信号の $\pm 1/10$ 未満であることを確認する。

(2) 真度

濃度及びマトリクスが適切な認証標準物質を分析し、得られた分析値と認証値の比又は、分析対象とする金属を添加していない試料(ブランク試料)及びブランク試料に既知の量を添加した試料(添加試料)をそれぞれ5個以上を試験法に従って定量し、得られた定量値の平均値の差の添加量に対する比から真度を求める。

(3) 精度

分析対象金属濃度は、基準値濃度の1/10～2倍の範囲の濃度とする。認証標準物質、分析対象とする金属を含有する食品試料又は添加試料について分析を繰り返し、定量値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、併行精度及び複数の分析者又は分析日による室内精度を評価する。食品試料を用いる場合には、あらかじめ十分に均一化する必要があり、試行の回数は5回以上とする。また、枝分かれ実験により、併行精度と室内精度を同時に評価することも可能である。

(4) 分析法の妥当性確認に関するガイドライン(農林水産省:2019年)

日本政府のリスク管理部局において、食品安全に関するリスク管理を行う者(食品安全に係る飼料、肥料のリスク管理を行う者を含む。)が、実態調査や検査等に利用することを予定している分析法の妥当性確認を行う際に従うべき原則を示している。

化学物質の分析法の妥当性確認として、基準値への適合性評価(検査)に用いる分析法はコーデックス委員会における性能規準に対するガイドラインが参照されている。

妥当性確認がされていない分析法を使用する場合、室間共同試験による妥当性確認の事前の確認として、妥当性確認に協力する分析機関が無ければ、単一試験室による妥当性確認を行う必要があるとされている。単一試験室で分析法の妥当性確認試験を行う場合、単一試験室の分析法妥当性確認に関する IUPAC の国際ハーモナイズドガイドラインに従って実施するとされている。

国際的に通用する分析値を得るためには、室間共同試験による性能評価の結果、要求される性能を有することが明らかにされ、その結果として妥当性が確認された分析法を用いる必要がある。規制への適合性評価等のために日常的に使用する予定の分析法は、国際的なガイドラインに従った室間共同試験を実施して、目的適合性の観点から、当該分析法の利用の可否を判断する。室間共同試験による妥当性確認は、国際的に認知されたガイドライン、すなわち、IUPAC、ISO、AOAC インターナショナルによる国際ハーモナイズドガイドライン、ISO 5725-2または AOAC ガイドライ

ンのいずれかに基づいて実施することとされている。

(5) Principles for the establishment of Codex methods of analysis(コーデックス委員会:Procedural Manual 28th Edition : 2023年)

コーデックス分析法は、主としてコーデックス規格における規定を検証するための国際的な方法である。日常的な試験及び管理目的で、現在使用中又は導入を予定している分析法の校正を行う場合は、コーデックス分析法を参照すべきである。

分析法の選択に関する一般的基準として、以下の基準に関して信頼性が確立されている分析方法を優先することとされている。

- a) 選択性
- b) 真度
- c) 精度:併行精度(試験室内)、再現精度(試験室間)
- d) 検出限界
- e) 感度
- f) 通常の試験室条件下での実用性と適用性
- g) その他

また、化学物質の定量分析法が満たすべき性能規準として、以下に関する基準が定められている。

- (1) 適用性
- (2) 最小適用範囲
- (3) 検出下限 (LOD)
- (4) 定量下限 (LOQ)
- (5) 精度
- (6) 回収率
- (7) 真度

(6) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis(IUPAC:2002年)

単一試験室において、分析法の妥当性を確認するにあたり、明らかにすべき性能特性として以下が挙げられている。

- (1) 適用性
- (2) 選択性
- (3) 検量線:直線性と切片・マトリクス効果
- (4) 真度
- (5) 精度
- (6) 回収率
- (7) 範囲
- (8) 検出限界
- (9) 定量限界
- (10) 感度
- (11) 堅牢性
- (12) 測定の不確かさ
- (13) 目的適合性

(7) Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies(IUPAC:1995年)

定量分析法の妥当性を、複数の試験室で確認する室間共同試験の手順が示されている。

室間共同試験を実施する上での必要条件として、試験室数は8(例外で5)以上、材料数は5(例外で3)以上とされている。外れ値検定の結果、除外可能な試験室数は、全体の2/9までとされている。室間再現性相対標準偏差(RSD_R)の目安としてのHorRatに関する記載は認められない。

(8) Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis(AOAC INTERNATIONAL:2005 年)

定量分析法の妥当性を、複数の試験室で確認する室間共同試験の手順が示されている。

室間共同試験を実施する上での必要条件として、試験室数は8(例外で5)以上、材料数は5(例外で3)以上とされている。外れ値検定の結果、除外可能な試験室数は、全体の2/9までとされている。室間再現性相対標準偏差(RSD_R)の目安としてのHorRatに関する記載がある。

(9) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method(ISO 5725-2:2019 年)

定量分析法の妥当性を、複数の試験室で確認する室間共同試験の手順が示されている。

室間共同試験を実施する上での必要条件として、試験室数は通常8~15、材料数は5で十分とされている。外れ値検定の結果、除外可能な試験室数に関する規定はない。室間再現性相対標準偏差(RSD_R)の目安としてのHorRatに関する記載はない。

4. 「高速液体クロマトグラフ(HPLC)法」の標準化及び妥当性の検証

(1) 妥当性の検証方法

収集した食品分析に係る妥当性評価のガイドライン等の情報のうち、「(1) 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」及び「(2) 食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」については、有害物質の試験を扱っており、基準値が評価に用いられている点が栄養成分等の試験と大きく異なる。また、「(3) 食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」については、食品添加物の試験を扱っており、栄養成分等の試験と類似した点も多いが、測定対象成分をほとんど含まないブランク試料又はトレース試料を使用する点が異なる。そこで、「(4) 分析法の妥当性確認に関するガイドライン」でも推奨されている「(6) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis(IUPAC:2002 年)」に記載の内容を主として参照し、単一試験室の分析法妥当性確認を実施した。

I. 検出限界及び定量下限

分析方法が適用される範囲を明らかにするため、「試験溶液に含まれる測定対象の検出可能な最低濃度(装置検出限界:ILOD/instrumental limit of detection)」及び「適切な精確さをもって定量できる試験溶液中の最小濃度(装置定量下限:ILOQ/instrumental limit of quantitation)」について検討した。

まず、幅広い濃度範囲で調製した標準溶液を HPLC 分析装置に注入し、得られたクロマトグラムから S/N 比を得て、S/N 比が 10 付近となる濃度を推定した。S/N 比が 10 付近となる 5 濃度の標準溶液を各 3 反復、ランダムな順序で測定し、ILOD 及び ILOQ 検証用の検量線を作成した。以下の式に基づき、HPLC 分析装置としての ILOD 及び ILOQ を求めた。

$$\text{ILOD}=3.3\times\text{回帰直線の残差の標準偏差}/\text{回帰直線の傾き}$$

$$\text{ILOQ}=10\times\text{回帰直線の残差の標準偏差}/\text{回帰直線の傾き}$$

さらに、ILOQ に基づき、「標準的な試験溶液の調製を行った場合に、適切な精確さをもって定量できる検体の最小濃度(方法定量下限:MLOQ/method limit of

quantitation)を計算した。

II. 検量線の直線性

試験溶液中に含まれている測定対象が精確に定量できることを明らかにするため、実用濃度における検量線の直線性について検討した。

検量線のダイナミックレンジは 10 倍とし、濃度範囲は、ILOQ 及び以降の検討で用いる検体について標準的な調製方法で得られると予想される試験溶液中濃度を勘案して設定した。濃度間隔が均等になるように 10 濃度の標準溶液を各3反復、ランダムな順序で測定した。検量線のデータを単回帰分析し、単回帰モデルを検量線に当てはめたときの残差プロットを作成した。

残差の大きさに濃度依存性がなく、残差の合計が0となり、原点を信頼区間内に含む場合、検量線の直線性が確認されたと判断した。

III. 真度及び精度

検体中の測定対象を精確に定量できていることを明らかにするため、「多数の測定結果から得られた平均値と、真値(採択された参照値等)との一致の程度(真度)」と「測定結果の間の一致の程度(精度)」について検討した。

真度の評価方法としては、Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis(IUPAC:2002年)で以下の順に推奨されている。

- ① 組成認証標準物質の利用
- ② 組成標準物質の利用
- ③ 標準分析法による値との比較
- ④ 添加回収試験

今回の検討では、①の認証標準物質又は④の添加試料を、併行条件下で5反復、中間条件下(異なる測定日又は試料採取量)で2回以上測定し、真度及び精度の評価を行った。真度の評価には、認証値又は添加回収率を用い、精度の評価には併行相対標準偏差から求めた HorRat(r)値を用いた。

なお、③による評価は、「IV 微生物学的定量法との同等性」として実施した。

IV. 微生物学的定量法との同等性

今回検討を行った測定対象については、食品表示基準別表第9第3欄及び分析等通知で微生物学的定量法が示されていることから、測定結果の同等性を明らかとするため、微生物学的定量法による測定値を参照値とし、HPLC 法による測定値を評価した。

(2) ビタミン B₆の HPLC 法

I. 方法

i. 検体

認証標準物質として、米国立標準技術研究所 (National Institute of Standards and Technology, NIST) が提供しているマルチビタミン/ミネラルタブレット (SRM 3280) を真度及び精度の確認に使用した。また、国内で一般流通しているビタミン B₆ の表示がある 13 種類の加工食品を微生物学的定量法との同等性確認に使用した。

ii. 試験溶液の調製

分析等通知「28 ビタミン B₆ (1) 微生物学的定量法 ④ 試験溶液の調製」に準じて試験溶液を調整した。

iii. 測定 (HPLC 法)

分析等通知「28 ビタミン B₆ (1) 微生物学的定量法」に記載の HPLC 操作条件例に準じて測定を行った。

試験溶液を適宜水で希釈した後、一定量を HPLC 分析装置に注入し、得られたピーク面積と、あらかじめ同量の標準溶液を HPLC 分析装置に注入して得られた検量線を用いて試験溶液中の塩酸ピリドキシンの濃度を求め、試料中のビタミン B₆ 含有量を計算した。

< 高速液体クロマトグラフ測定条件 >

カラム: Inertsil ODS-3、5 μ m、内径 4.6mm、長さ 150mm (カタログ No. 5020-07345、GL サイエンス)

移動相: 0.05mol/L 過塩素酸水溶液

流速: 1.2mL/分

測定波長: 吸光検出器 (波長 290nm) または蛍光検出器 (励起波長 295 nm、
蛍光波長 405nm)

カラム温度: 40°C

オートサンプラー洗浄液：水

注入量：20 μ L

iv. 測定(微生物学的定量法)

分析等通知「28 ビタミン B₆ (1) 微生物学的定量法 ⑤ 測定」に準じて行った。

II. 結果及び考察

i. 検出限界および定量下限

0.1、1、10、100、1,000ng/mL の濃度で調整した塩酸ピリドキシン標準溶液を HPLC 分析装置に注入し、吸光検出器(290nm)及び蛍光検出器(励起 295 nm, 蛍光 405nm)を用いて測定を行った。得られたクロマトグラムから S/N 比を検討した結果、S/N 比が 10 となる濃度は、吸光検出器を用いた場合は 10ng/mL から 100ng/mL の間にあり、蛍光検出器を用いた場合は 0.1ng/mL から 1 ng/mL の間にあると考えられた。今回検討したビタミン B₆ の表示がなされている食品から作成した試験溶液中の含有量は、最小 1ng/mL 程度となることが予想されたため、以降の検討は蛍光検出器のみを用いて行った。

S/N 比が 10 付近となる 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5ng/mL の濃度で調整した塩酸ピリドキシン標準溶液をランダムな順序で HPLC 分析装置に注入し、ピーク面積を得て、検量線を作成し、ILOD 及び ILOQ を求めた(図 1)。

ILOD =0.081ng/mL(塩酸ピリドキシンとして)

=0.066ng/mL(ビタミン B₆として)

ILOQ =0.24ng/mL(塩酸ピリドキシンとして)

=0.20ng/mL(ビタミン B₆として)

標準的な調製法(試料 0.5g を採取して、処理を行い、最終的に 100mL に定容する。)で試験溶液を作成した場合、MLOQ は 0.004mg/100g 程度だと考えられた。

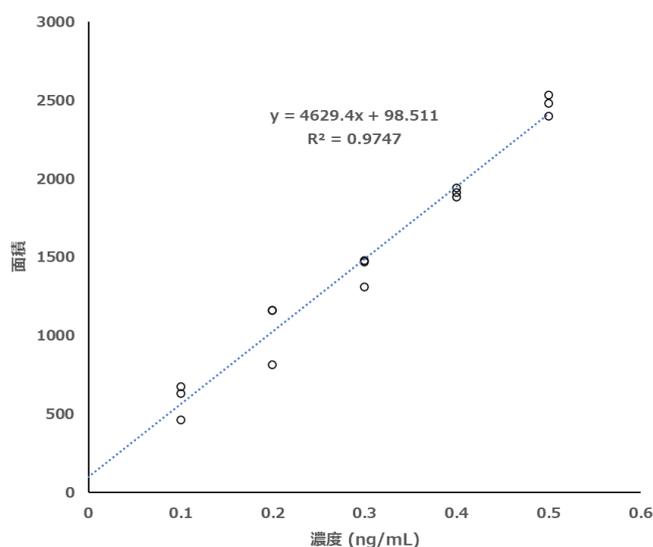


図1. S/N 比 10 付近の塩酸ピリドキシンの検量線

ii. 検量線の直線性

S/N 比が 20~200 程度となる 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0ng/mL の濃度で調整した塩酸ピリドキシン標準溶液を調整し、ランダムな順序で HPLC 分析装置に注入した。得られたピーク面積から、検量線と残差プロットを作成した（図 2A、2B）。残差の大きさに濃度依存性はなく、残差の合計はおおむね0であった。さらに、切片の信頼区間には0が含まれていた。0.5~5.0ng/mL の範囲で検量線の直線性と原点通過が確認されたため、以降の検討では検量線の作成を簡略化し、0.5、2.0、5.0ng/mL の3点で行った。

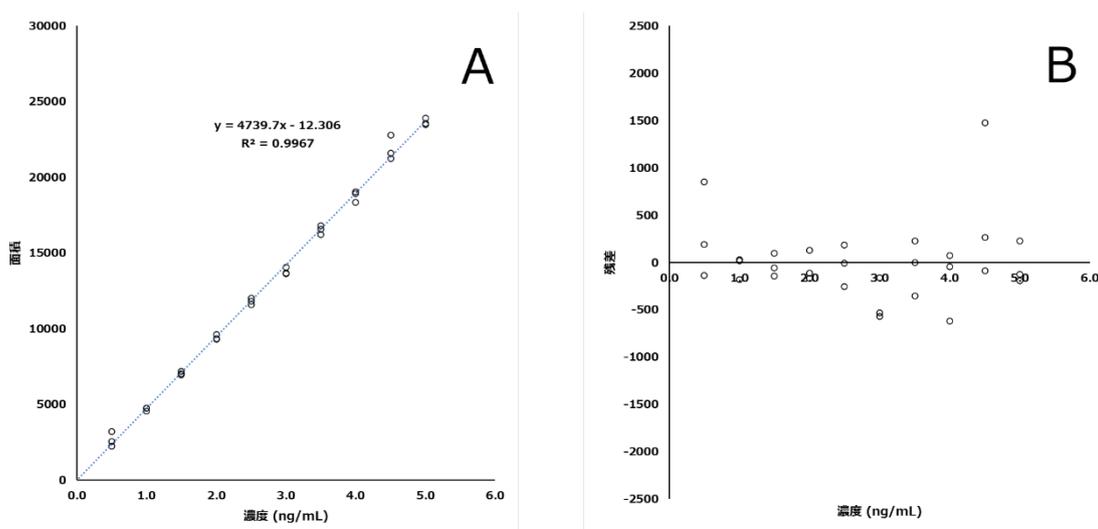


図2. 塩酸ピリドキシンの定量用検量線 (A)と残差プロット(B)

iii. 真度及び精度

マルチビタミン/ミネラルタブレットの標準物質(NIST SRM 3280)を用いて、5回の反復測定を4回の間接条件で行い、真度及び精度の確認を行った(表2)。

各中間条件における測定の平均値は1.55~17.0mg/gの範囲であり、付与値の拡張不確かさの範囲内の値が得られたのは4回中2回であった。ただし、今回、有効期限内の標準物質(マルチビタミンタブレット NIST SRM 3289)の入手が現状困難であったことから、やむを得ず、有効期限が2021年10月31日のNIST SRM 3280を検討に使用している。そのため、真度については「iv. 微生物学的定量法との同等性」の結果と合わせて考察することとした。

併行精度は相対標準偏差で2.0~3.6%であり、HorRat(r)は0.4~0.7であった。AOACのガイドライン(Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements)に示されたHorRat(r)の正常範囲は0.3~1.3であることから、HPLC法によるビタミンB₆の併行分析精度は良好であると考えられた。一方、中間条件間で測定結果のばらつきが増加する傾向が認められており、分析方法には更なる改善の余地があると考えられた。

表2. ビタミンB₆のHPLC法の真度及び精度

	中間条件			
	1	2	3	4
試料採取量 (g)	0.5	0.5	0.5	0.05
測定日	DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 3
	測定値 (mg/100 g) ^{a)}			
1	153.7	146.9	168.5	169.5
2	157.1	151.2	174.0	161.1
3	154.3	158.2	169.4	163.2
4	158.0	157.2	164.1	164.3
5	164.0	160.3	173.0	161.8
平均	157.4	154.8	169.8	164.0
標準偏差	4.1	5.5	3.9	3.3
付与値 (mg/100 g) ^{b)}	181			
真度 (%)	87.0	85.5	93.8	90.6
併行相対標準偏差 (%)	2.6	3.6	2.3	2.0
HorRat(r) ^{c)}	1.0	1.4	0.9	0.8

a) 付与値に合わせて、塩酸ピリドキシンとして定量を行った。

- b) 分析証明書に記載された付与値=1.81±0.17(mg/g)、不確かさは拡張不確かさ(k= 2.76)。
c) HorRat(r)=併行相対標準偏差/室間相対標準偏差の予想値。室間相対標準偏差の予想値は、Horwitz 式の修正式(Thompson の式) を用いて計算した。

iv. 微生物学的定量法との同等性

国内で一般流通しているビタミン B₆ の表示がある 13 種類の加工食品について、HPLC 法による測定結果と、微生物学的定量法による測定結果の比較検討を行った(表 3、図 3)。参照法としての微生物学的定量法の結果に基づくと、今回検討した加工食品中のビタミン B₆ 含有量は $3.4 \times 10^{-1} \sim 9.5 \times 10^3$ mg/100g である。

試験溶液調製時のばらつきによる影響を最小とするため、同一の抽出液を HPLC 法と微生物学的定量法による測定に使用した。HPLC 法により得られた値は、検体番号 6 を除き、微生物学的定量法で得られた値の 87~117% であり、幅広い濃度範囲でおおむね同等であると考えられた。一方、検体6については、HPLC 法により得られた値は微生物学的定量法で得られた値の 27% であった。検体6は、原材料として乾燥ビール酵母のみが記載されており、HPLC 法で定量可能なピリドキシン以外のビタミン B₆ 活性を持つ化合物(ピリドキサーール、ピリドキサミン)が含まれている可能性が考えられた。ただし、現在我が国で食品添加物としての使用が認められているビタミン B₆ 化合物はピリドキシン塩酸塩に限られる。したがって、「iii. 真度及び精度」の結果と合わせ、食品中に含まれるビタミン B₆ 活性を持つ化合物の大半がピリドキシンである食品等の場合は、HPLC 法の真度は良好であると考えられた。

v. 食品表示基準及び分析等通知における HPLC 法の位置付け

蛍光検出器を用いた場合、試料中の定量下限は 0.004mg/100g 程度であり、「食品表示基準について」で示されたビタミン B₆ の最小表示の位である 0.1mg 以下であった。また、検量線の直線性、真度及び併行精度は良好であり、中間精度には改善の余地が考えられたものの、広い濃度範囲の検体に対して微生物学的定量法との同等性がおおむね示された。したがって、食品中のピリドキシン活性を有する化合物の大半が、強化剤として添加されたピリドキシン塩酸塩である事が明らかである食品等の分析に限り、ビタミン B₆ の分析方法として食品表示基準及び分析等通知に

HPLC 法を位置付けるのが適当である。

表3. HPLC 法と微生物学的定量法による食品中ビタミン B₆ 定量結果の比較

検体番号 種類	微生物学的定量法		HPLC/微生物学的定量法
	HPLC (mg/100 g)	(mg/100 g)	
1 粉乳	0.291	0.336	87%
2 飲料	0.541	0.487	111%
3 粉末飲料	0.727	0.733	99%
4 ゼリー	0.949	0.818	116%
5 プロテイン	2.585	2.556	101%
6 粉末食品	0.386	1.429	27%
7 グミ	28.226	24.220	117%
8 チュアブル錠	115.113	115.754	99%
9 タブレット	293.352	265.643	110%
10 ソフトカプセル	589.115	551.264	107%
11 タブレット	4484.400	4864.582	92%
12 タブレット	6778.699	6154.671	110%
13 タブレット	10344.321	9533.594	109%

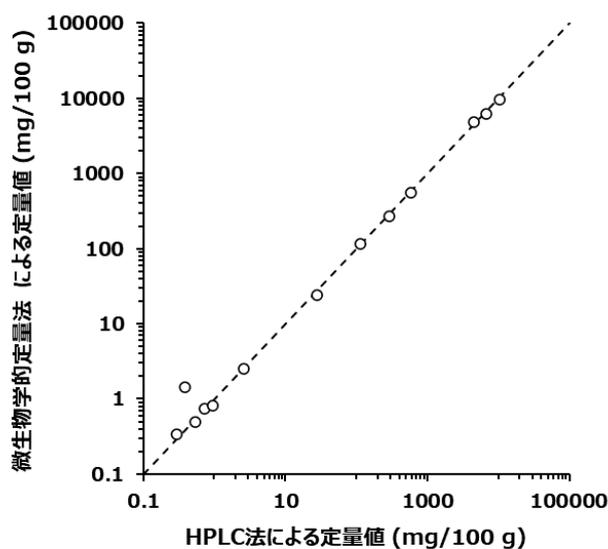


図3. HPLC 法と微生物学的定量法による食品中ビタミン B₆ 定量結果の比較
両軸とも対数軸。点線は $y=x$ を示す。

(3) ビタミン B₁₂ の HPLC 法

I. 方法

i. 検体

国内で一般流通しているビタミン B₁₂ の表示がある 12 種類の加工食品を、真度、精度及び微生物学的定量法との同等性の確認に使用した。

ii. 試験溶液の調製

分析等通知「29 ビタミン B₁₂ (1) 微生物学的定量法 ④ 試験溶液の調製」に準じて試験溶液を調整した。

iii. 測定 (HPLC 法)

分析等通知「29 ビタミン B₁₂ (1) 微生物学的定量法」に記載の HPLC 操作条件例に準じて測定を行った。

試験溶液を適宜水で希釈した後、一定量を HPLC 分析装置に注入し、得られたピーク面積と、あらかじめ同量の標準溶液を HPLC 分析装置に注入して得られた検量線を用いて試験溶液中のシアノコバラミン濃度を求め、試料中のビタミン B₁₂ 含有量を計算した。

<高速液体クロマトグラフ測定条件>

カラム: Inertsil ODS-3、5 μ m、内径 4.6mm、長さ 150mm (カタログ No. 5020-07345、GLサイエンス)

移動相: 0.05mol/L 酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル(9:1)

流速: 1.2mL/分

測定波長: 吸光検出器(波長 550nm)

カラム温度: 40°C

オートサンプラー洗浄液: 水

注入量: 20 μ L

iv. 測定(微生物学的定量法)

分析等通知「29 ビタミン B₁₂ (1) 微生物学的定量法 ⑤ 測定」に準じて行った。

II. 結果及び考察

i. 検出限界および定量下限

0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で調整したシアノコバラミン標準溶液を HPLC 分析装置に注入して測定を行った。得られたクロマトグラムから S/N 比を検討した結果、S/N 比が10となる濃度は、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の間にあると考えられた。

S/N 比が10付近となる 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で調整したシアノコバラミン標準溶液をランダムな順序で HPLC 分析装置に注入し、ピーク面積を得て、検量線を作成し、ILOD 及び ILOQ を求めた(図 4)。

$$\text{ILOD}=0.10\mu\text{g}/\text{mL}$$

$$\text{ILOQ}=0.30\mu\text{g}/\text{mL}$$

標準的な調製法(試料 0.5g を採取して、処理を行い、最終的に 50mL に定容する。)で試験溶液を作成した場合、MLOQ は 3,000 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 程度だと考えられた。

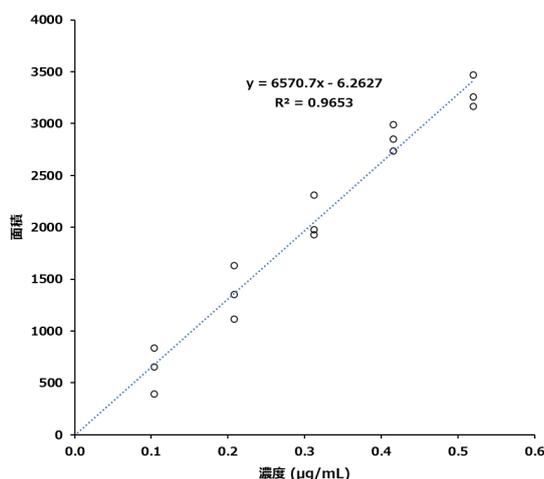


図4. S/N 比 10 付近のシアノコバラミンの検量線

ii. 検量線の直線性

S/N 比が 10~100 程度となる 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.1、2.4、2.7、

3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で調整したシアノコバラミン標準溶液を調整し、ランダムな順序で HPLC 分析装置に注入した。得られたピーク面積から、検量線と残差プロットを作成した (図 5A、5B)。残差の大きさに濃度依存性はなく、残差の合計はおおむね0であった。さらに、切片の信頼区間には0が含まれていた。0.3~3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で検量線の直線性と原点通過が確認されたため、以降の検討では検量線の作成を簡略化し、0.3、1.0、3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3点で行った。

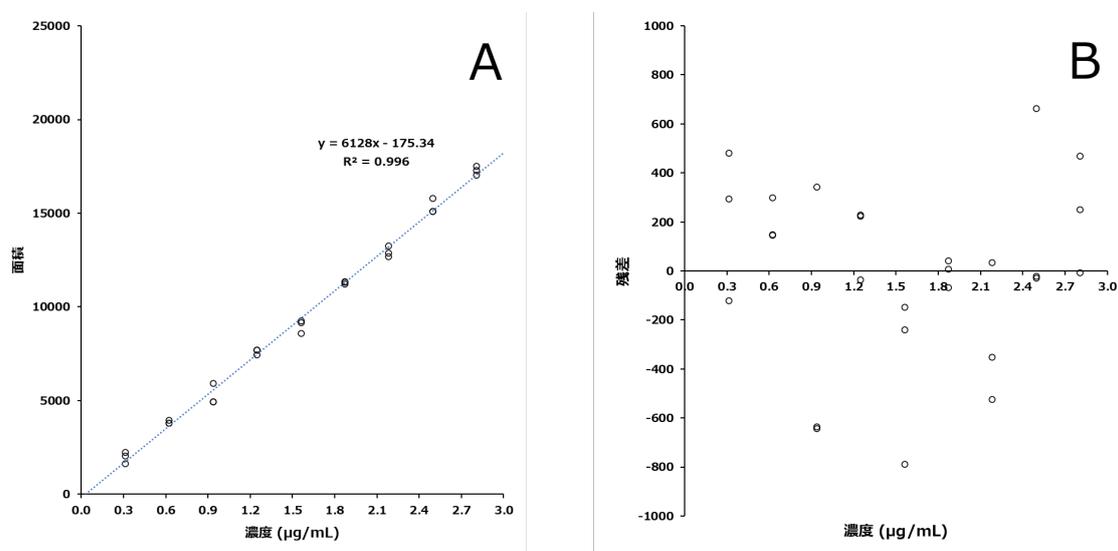


図5. シアノコバラミンの定量用検量線(A)と残差プロット(B)

iii. 真度及び精度

マルチビタミン/ミネラルタブレットの標準物質(NIST SRM 3280)が含有するビタミン B₁₂(480 $\mu\text{g}/100\text{g}$)は、標準的な調製法では、定量下限(3,000 $\mu\text{g}/100\text{g}$)未満と考えられた。そこで、ビタミン B₁₂ を含まないタブレット食品に、定量下限の3倍程度のビタミン B₁₂ を添加した試料を用いて、5回の反復測定を2回の間接条件で行い、真度及び精度の確認を行った(表4)。

2回の間接条件における測定の平均値はそれぞれ 10,499 及び 10,487 $\mu\text{g}/100\text{g}$ であり、回収率はともに 101%であった。AOAC のガイドライン(Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements)に示され

た当該濃度域において期待される回収率は 90-107%であり、真度は良好であると考えられた。

併行精度は相対標準偏差で 2.8~4.2%であり、HorRat(r)は 0.3~0.5 であった。AOAC のガイドライン(同上)に示された HorRat(r)の正常範囲は 0.3~1.3 であり、更には中間条件間においても測定値がほぼ一致したことから、HPLC 法によるビタミン B₁₂ の分析精度は良好であると考えられた。

表4. ビタミン B₁₂ の HPLC 法の真度及び精度

	中間条件	
	1	2
試料採取量 (g)	0.5	0.5
添加量 (µg) ^{a)}	52	52
測定日	DAY 1	DAY 2
	測定値 (µg/100 g)	
1	10245	10030
2	11086	10368
3	9968	10653
4	10485	10671
5	10770	10712
平均	10511	10487
標準偏差	437	289
理論値 (µg/100 g)	10400	10400
真度 (%)	101.1	100.8
併行相対標準偏差 (%)	4.2	2.8
HorRat(r) ^{b)}	0.5	0.3

a) 104µg/mL の標準溶液を 500µL 添加した。

b) HorRat(r)=併行相対標準偏差/室間相対標準偏差の予想値。室間相対標準偏差の予想値は、Horwitz 式の修正式(Thompson の式)を用いて計算した。

iv. 微生物学的定量法との同等性

国内で一般流通しているビタミン B₁₂ の表示がある 12 種類の加工食品について、HPLC 法による測定結果と、微生物学的定量法による測定結果の比較検討を行った(表5、図6)。参照法としての微生物学的定量法の結果に基づくと、今回検討した加

工食品中のビタミン B₁₂ 含有量は $1.6\sim 2.2\times 10^5\mu\text{g}/100\text{g}$ である。

試験溶液調製時のばらつきによる影響を最小とするため、同一の抽出液を HPLC 法と微生物学的定量法による測定に使用した。HPLC 法の定量下限以上の濃度であった検体 10~12 については、微生物学的定量法で得られた測定値の 97~98% の測定値が得られた。検体 6~9 については、抽出溶液中のシアノコバラミン濃度が、HPLC 分析装置の定量下限未満であったため、抽出液の一部を吸引式ボルテックス濃縮装置(コンビニ・エバポ C1、株式会社バイオクロマト)を用いて濃縮乾固(90℃)した後に、少量の水で再溶解し、10~40 倍に濃縮した試験溶液を調製してから HPLC 法に供した結果、微生物学的定量法で得られた測定値の 77~128% の測定値が得られた。検体 1~5 については、抽出溶液中のシアノコバラミン濃度が、HPLC 分析装置の定量下限未満であり、更には濃縮乾固後に少量の水で再溶解しようとしても不溶物が生じたため、定量不能(NQ)とした。

これらの結果は、抽出液中のシアノコバラミン濃度を HPLC 分析装置の定量下限以上とできれば、HPLC 法により微生物学的定量法とおおむね同等の結果が得られることを示唆している。ただし、濃縮操作は分析等通知に記載されておらず、また、今回の濃縮操作の妥当性が十分検討できていないことから、濃縮を行った測定結果は参考値とする。一方で、AOAC 法によるビタミン B₁₂ の分析では、固相カートリッジによって抽出液の濃縮を行ったうえで、カラムスイッチング HPLC 法によって複数カラムを使用することにより、HPLC 法の分析中に更に濃縮をするという2段階の濃縮により、HPLC 法での測定を可能にしている(AOAC Official Method 2011.10 Vitamin B₁₂ in Infant Formula and Adult Nutritionals High-Performance Liquid Chromatography)。

今回検討した加工食品には7種類のサプリメント形状の食品が含まれているが、分析等通知に記載された試験溶液調製法の範囲で濃縮することなく定量できるのはそのうち3種類であった。また、濃縮操作を加えることにより MLOQ を1/20 程度まで引き下げ $150\mu\text{g}/100\text{g}$ 程度の含有量の検体まで定量が可能となる可能性が示唆された。

表5. HPLC 法と微生物学的定量法による食品中ビタミン B₁₂ 定量結果の比較

検体番号 種類	微生物学的定量法		HPLC/微生物学的定量法
	HPLC (µg/100 g)	(µg/100 g)	
1 飲料	NQ	1.6	-
2 粉末飲料	NQ	2.2	-
3 粉乳	NQ	1.9	-
4 ゼリー	NQ	2.6	-
5 ギミ	NQ	22.5	-
6 チュアブル錠	(148.7) ^{a)}	192.8	(77%)
7 タブレット	(285.4)	241.0	(118%)
8 タブレット	(544.8)	425.3	(128%)
9 ソフトカプセル	(813.9)	962.4	(85%)
10 タブレット	9103.7	9429.3	97%
11 タブレット	24785.4	25176.2	98%
12 タブレット	224820.2	228533.6	98%

NQ: not quantified.

^{a)} 抽出液を濃縮することで HPLC 定量を行った場合を両丸括弧で囲って示した。濃縮操作の妥当性が十分検討できていないため参考値。

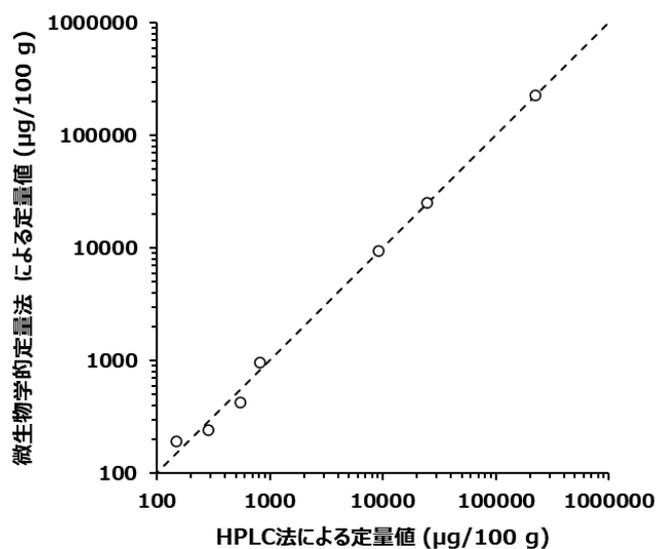


図6. HPLC 法と微生物学的定量法による食品中ビタミン B₁₂ 定量結果の比較

両軸とも対数軸。点線は $y=x$ を示す。HPLC 法で定量不能であった5つの検体はプロットに含まれていない。

v. 食品表示基準及び分析等通知における HPLC 法の位置付け

標準的な試験溶液調製法に従うと、試料中ビタミン B₁₂ の定量下限は 3,000µg/100g 程度であったが、「食品表示基準について」で示されたビタミン B₁₂ の最小表示の位である 0.1µg を大きく上回っていた。検量線の直線性、真度及び精度は良好であり、定量下限を超えた検体に対しては微生物学的定量法との良好な同等性が示された。また、濃縮操作を加えることにより適用可能な食品を増やすことができる可能性が示唆された。したがって、おけるビタミン B₁₂ の分析方法として食品表示基準に HPLC 法を位置付けることが適当であるが、現状では特に高濃度のビタミン B₁₂ を含有する食品に適用範囲が限られるため、分析等通知においては濃縮法を含めた更なる検討を加えることが望ましい。

(4) ナイアシンの HPLC 法

I. 方法

i. 検体

認証標準物質として、NIST が提供しているマルチビタミン/ミネラルタブレット (SRM 3280) を真度及び精度の確認に使用した。国内で一般流通しているナイアシンの表示がある 11 種類の加工食品を微生物学的定量法との同等性確認に使用した。

ii. 試験溶液の調製

分析等通知「22 ナイアシン (ナイアシン当量として) ア ニコチン酸及びニコチン酸アミド (2) 微生物学的定量法 ⑤ 試験溶液の調製」に準じて試験溶液を調整した。

iii. 測定 (HPLC 法)

分析等通知「22 ナイアシン (ナイアシン当量として) ア ニコチン酸及びニコチン酸アミド (1) 高速液体クロマトグラフ法 ⑤ 測定」に準じて測定を行った。

<高速液体クロマトグラフ測定条件>

1) ニコチン酸

カラム: Inertsil ODS-3、5 μ m、内径 4.6mm、長さ 150mm (カタログ No. 5020-07345、GL サイエンス)

移動相: 3mmol/L テトラブチルアンモニウムブロマイド含有 5mmol/L 酢酸ナトリウム (pH5.0): メタノール (9:1)

流速: 1.2mL/分

測定波長: 吸光検出器 (波長 260nm)

カラム温度: 40°C

オートサンプラー洗浄液: 水

注入量: 20 μ L

2) ニコチン酸アミド

カラム:Inertsil ODS-3、5 μ m、内径 4.6mm、長さ 150mm(カタログ No. 5020-07345、GLサイエンス)

移動相:10mmol/L オクタンスルホン酸ナトリウム含有 20mmol/L 酢酸ナトリウム(pH3.5):メタノール(98:2)

流速:1.2mL/分

測定波長:吸光検出器(波長 260nm)

カラム温度:40°C

オートサンプラー洗浄液:水

注入量:20 μ L

iv. 測定 (微生物学的定量法)

分析等通知「22 ナイアシン (ナイアシン当量として) ア ニコチン酸及びニコチン酸アミド (2) 微生物学的定量法 ⑤ 測定」に準じて行った。

II. 結果及び考察

i. 検出限界及び定量限界

1) ニコチン酸

0.01、0.1、1、10、100 μ g/mLの濃度で調整したニコチン酸標準溶液をHPLC分析装置に注入して測定を行った。得られたクロマトグラムから S/N 比を検討した結果、S/N 比が 10 となる濃度は、0.01 μ g/mL から 0.1 μ g/mL の間にあると考えられた。

S/N 比が10付近となる 0.025、0.050、0.075、0.100、0.125 μ g/mL の濃度で調整したニコチン酸標準溶液をランダムな順序で HPLC 分析装置に注入し、ピーク面積を得て、検量線を作成し、ILOD 及び ILOQ を求めた(図 7)。

ILOD=0.015 μ g/mL

ILOQ=0.045 μ g/mL

標準的な調製法(試料 0.5g を採取して、処理を行い、最終的に 100mL に定容する。)で試験溶液を作成した場合、MLOQ は 0.90mg/100g 程度だと考えられた。

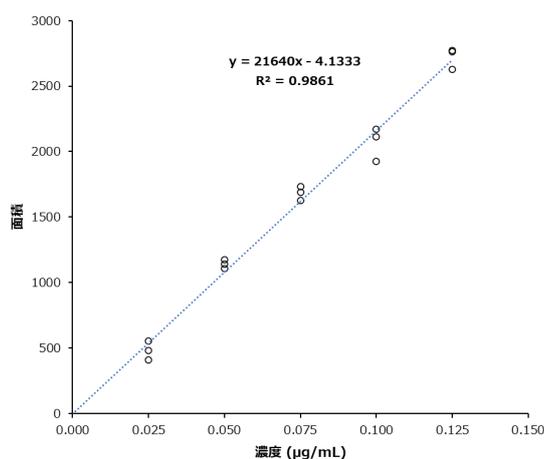


図7. S/N比 10 付近のニコチン酸の検量線

2) ニコチン酸アミド

0.01、0.1、1、10、100µg/mL の濃度で調整したニコチン酸アミド標準溶液を HPLC 分析装置に注入して測定を行った。得られたクロマトグラムから S/N 比を検討した結果、S/N 比が10となる濃度は、0.1µg/mL から 1µg/mL の間にあると考えられた。

S/N 比が10付近となる 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25µg/mL の濃度で調整したニコチン酸アミド標準溶液をランダムな順序で HPLC 分析装置に注入し、ピーク面積を得て、検量線を作成し、ILOD 及び ILOQ を求めた(図8)。

$$\text{ILOD} = 0.017 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{ILOQ} = 0.051 \mu\text{g/mL}$$

標準的な調製法(試料 0.5g を採取して、処理を行い、最終的に 100mL に定容する。)で試験溶液を作成した場合、MLOQ は 1.0mg/100g 程度だと考えられた。

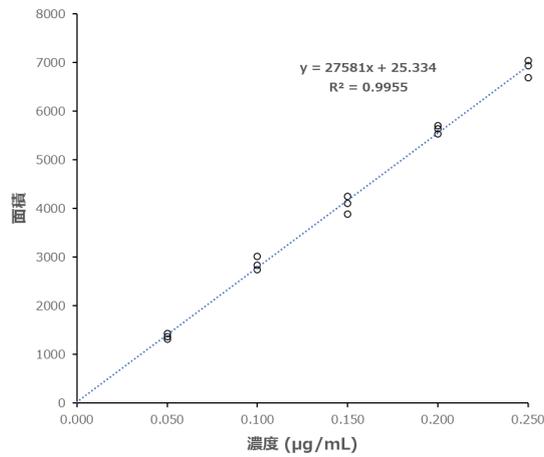


図8. S/N 比 10 付近のニコチン酸アミドの検量線

ii. 検量線

1) ニコチン酸

S/N 比が 10~100 程度となる 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50µg/mL の濃度で調整したニコチン酸標準溶液を調整し、ランダムな順序で HPLC 分析装置に注入した。得られたピーク面積から、検量線と残差プロットを作成した(図9A、9B)。残差の大きさに濃度依存性はなく、残差の合計はおおむね0であった。さらに、切片の信頼区間には0が含まれていた。0.05~0.50µg/mL の範囲で検量線の直線性と原点通過が確認されたため、以降の検討では検量線の作成を簡略化し、0.05、0.20、0.50µg/mL の3点で行った。

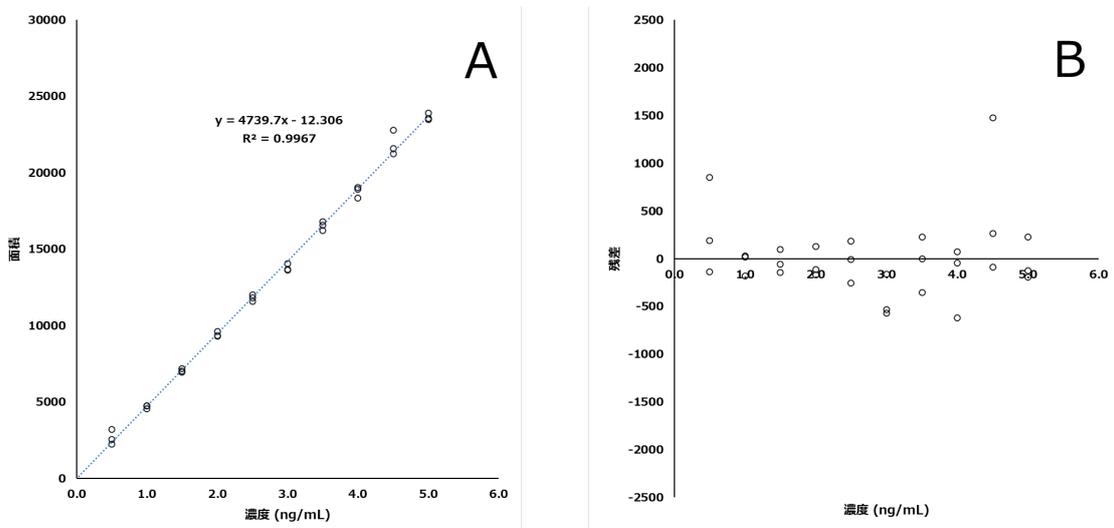


図9.ニコチン酸の定量用検量線(A)と残差プロット(B)

2) ニコチン酸アミド

S/N 比が 10~100 程度となる 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で調整したニコチン酸アミド標準溶液を調整し、ランダムな順序で HPLC 分析装置に注入した。得られたピーク面積から、検量線と残差プロットを作成した(図 10A、10B)。残差の大きさに濃度依存性はなく、残差の合計はおおむね0であった。さらに、切片の信頼区間には0が含まれていた。0.05~0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で検量線の直線性と原点通過が確認されたため、以降の検討では検量線の作成を簡略化し、0.05、0.20、0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3点で行った。

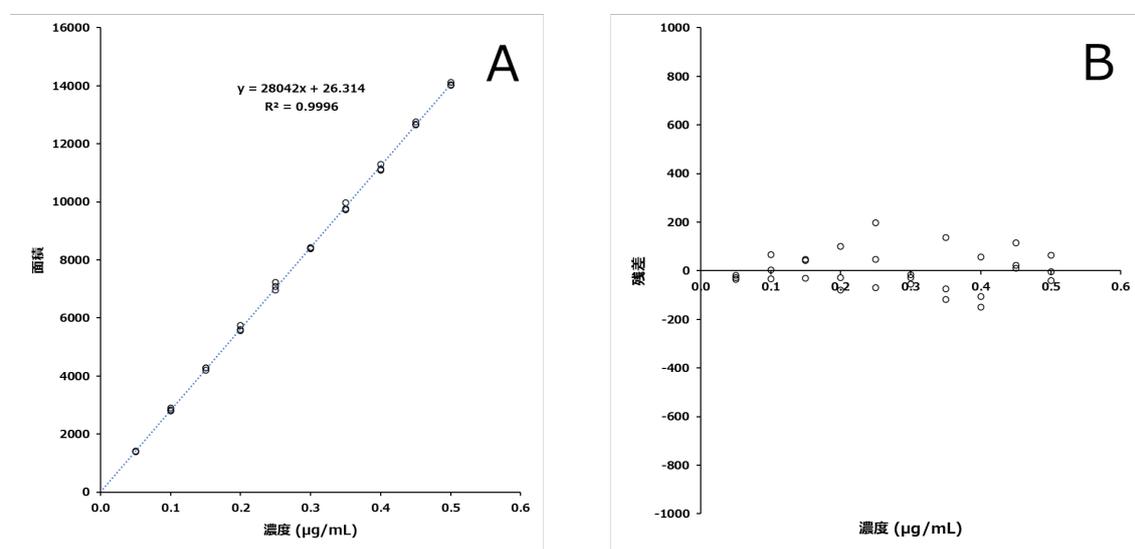


図 10. ニコチン酸アミドの定量用検量線 (A) と残差プロット (B)

iii. 真度及び精度

マルチビタミン/ミネラルタブレットの標準物質(NIST SRM 3280)を用いて、5回の反復測定を4回の間接条件で行い、真度及び精度の確認を行った(表6)。

各中間条件における測定の平均値は 842~1164 $\text{mg}/100\text{g}$ の範囲であり、付与値の拡張不確かさの範囲内の値が得られたのは4回中0回であった。ただし、今回、有効期限内の標準物質(マルチビタミンタブレット NIST SRM 3289)の入手が現状困難であったことから、やむを得ず、有効期限が 2021 年10月 31 日の NIST SRM3280 を検討に使用している。そのため、真度については「iv. 微生物学的定量法との同等性」の結果と合わせて考察することとした。

併行精度は相対標準偏差で 1.7~2.9%であり、HorRat(r)は 0.8~1.4 であった。AOAC のガイドライン(Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements)に示された HorRat(r)の正常範囲は 0.3~1.3 であることから、HPLC 法によるナイアシンの併行分析精度はおおむね良好であると考えられた。一方、中間条件間で測定結果の変動が大きく、分析方法に更なる改善の余地があると考えられた。

表6. ナイアシンの HPLC 法の真度及び精度

	中間条件			
	1	2	3	4
試料採取量 (g)	0.5	0.5	0.5	0.05
測定日	DAY 1	DAY 2	DAY 3	DAY 3
測定値 (mg/100 g) ^{a)}				
1	969	1143	1178	880
2	973	1118	1151	815
3	953	1147	1144	845
4	961	1167	1153	843
5	998	1147	1197	828
平均	971	1144	1164	842
標準偏差	17	18	22	24
付与値 (mg/100 g) ^{b)}	1410			
真度 (%)	68.9	81.2	82.6	59.7
併行相対標準偏差 (%)	1.7	1.5	1.9	2.9
HorRat(r) ^{c)}	0.9	0.8	1.0	1.4

a) 付与値に合わせて、ニコチン酸アミドとして定量を行った。

b) 分析証明書に記載された付与値 = 14.10 ± 0.0.23(mg/g)、不確かさは拡張不確かさ(k=2.49)。

c) HorRat(r) = 併行相対標準偏差 / 空間相対標準偏差の予想値。空間相対標準偏差の予想値は、Horwitz 式の修正式(Thompson の式)を用いて計算した。

iv. 微生物学的定量法との同等性

国内で一般流通しているナイアシンの表示がある 12 種類の加工食品について、HPLC 法による測定結果と、微生物学的定量法による測定結果の比較検討を行った(表7、図 11)。参照法としての微生物学的定量法の結果に基づくと、今回検討した加工食品中のナイアシン含有量は $3.5 \sim 3.7 \times 10^4$ mg/100g である。

試験溶液調製時のばらつきによる影響を最小とするため、同一の抽出液を HPLC 法と微生物学的定量法による測定に使用した。検体2及び7～12 については、微生物学的定量法で得られた測定値の 16～141%の測定値が得られた。検体3及び6については、定量可能なレベルのピークが検出されたが、きょう雑ピークとの分離が不十分であり測定値の信頼性には疑問が残る結果となった。残りの3検体については定量が困難であった。

これらの結果から、ナイアシンの HPLC 法については、含有量が高い(おおむね 1,000mg/100g 以上)サプリメント形状の食品については、微生物学的定量法の 75～100%の値が得られており、同等性があると考えられた。ただし、「iii. 真度及び精度」の検討では、含有量が高いサプリメント形状の標準物質を検体としたにもかかわらず真度及び中間精度に問題がある結果が得られており、分析方法には更なる改善の余地があると考えられた。また、含有量が低いサプリメント形状ではない食品については、微生物学的定量法との同等性が担保できない可能性が示唆された。この理由の一つとして、HPLC 法の検出が、多くの化合物が反応する 260nm の吸光測定で行われており、選択性が低いことが挙げられる。

分析等通知においては、ナイアシンの HPLC 法は、「食品中にニコチン酸又はニコチン酸アミドが含まれていて、更にその存在形態が明らかな場合に適用される。」とされているが、現状その適用は含有量が高いサプリメント形状の食品に限られ、サプリメント形状以外の低含有量の食品に適用するには前処理法の検討等が必要であることが示唆された。

表7. HPLC 法と微生物学的定量法による食品中ナイアシン定量結果の比較

検体番号 種類	微生物学的定量法		HPLC/微生物学的定量法
	HPLC (mg/100 g)	(mg/100 g)	
1 飲料	NQ	3.479	-
2 粉末飲料	1.022	6.266	16%
3 粉乳	3.415 [†]	6.807	50%
4 プロテイン	NQ	13.587	-
5 ゼリー	NQ	14.913	-
6 粉末食品	5.435 [†]	46.979	12%
7 グミ	222.300	157.592	141%
8 タブレット	3309.620	3306.718	100%
9 ソフトカプセル	2629.083	3497.584	75%
10 タブレット	5207.207	5357.981	97%
11 タブレット	37311.300	37536.003	99%
12 カプセル	33645.784	41236.257	82%

NQ: not quantified.

[†] きょう雑ピークとの分離が不十分であり、測定値の信頼性に疑問が残る。

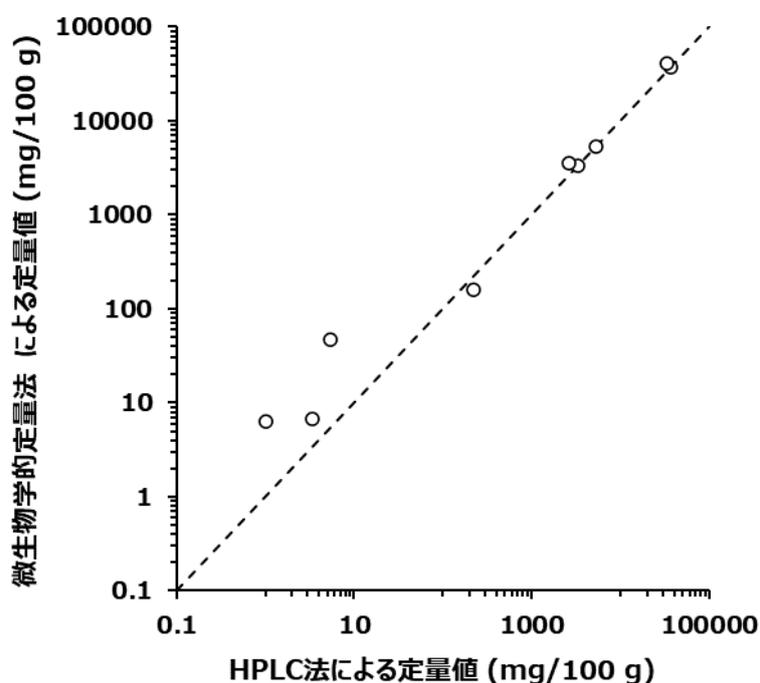


図 11. HPLC 法と微生物学的定量法による食品中ナイアシン定量結果の比較

両軸とも対数軸。点線は $y=x$ を示す。HPLC 法で定量不能であった3つの検体はプロットに含まれていない。

v. 食品表示基準及び分析等通知における HPLC 法の位置付け

試料中ナイアシンの定量下限は 0.90mg/100g 程度であり、「食品表示基準について」で示されたナイアシンの最小表示の位である 1mg とおおむね同等であった。検量線の直線性及び併行精度は良好であったが、真度及び中間精度には問題があり、分析方法に更なる改善の余地があると考えられた。含有量が高い(おおむね 1,000mg/100g 以上)サプリメント形状の食品については、微生物学的定量法との同等性が認められたが、サプリメント形状以外の低含有量の食品に適用するには問題が考えられた。したがって、ナイアシンの分析方法として食品表示基準に既に HPLC 法が位置付けられているが、分析等通知においては、適用食品を更に限定するか、前処理法を含めた更なる検討を加えることが望ましい。