

食品成分の新規分析項目設定についての検討(第3報)

佐野一成・松田みゆき・水江智子・山本展久
食品産業担当

Research for Additional Food Compositions to be analyzed (3rd Report)

Kazunari SAN0, Miyuki MATSUDA, Satoko MIZUE, Nobuhisa Yamamoto
Food Industry Section

要 旨

現在、当センターでは受託していない食品成分の分析について、県内の分析ニーズに対応するために追加設定することが可能かを判断することを目的に、前年度より引き続いて繰り返し試験精度等の検証を行った。今回検討した飽和脂肪酸及び総ビタミンC分析についても、技術的には分析対応可能になるものと判断された。但し、依頼試験として実施するに当たっては、試薬類の使用期限内の分析数により大きく異なってくる所要コストをどのようにして公平に手数料に転嫁するかが課題である。醤油のレブリン酸分析については、HPLC法により従来法と同等以上の分析が可能となり、月例の依頼試験の試験法を移行した。

1. はじめに

食品の表示をめぐるのは、「消費者に分かりやすい表示」への改正を目指して消費者庁が中心となって取りまとめが行われ、平成27年4月1日に食品表示法/新食品表示基準が施行された。これにより、成分表示が義務化されるとともに、かなりハードルは高いものの科学的根拠に基づいて食品の効果・効能の標榜が可能になる機能性表示食品が新たに規定された。このような状況から、食品成分の分析依頼が増加することが見込まれ、表示が義務化される基本項目以外の微量成分の分析ニーズも増加する可能性がある。一方、現在当センターで実施している食品成分分析は基礎項目がほとんどであり、県内機関での分析を希望するニーズに対応するために、実施可能な分析項目の再検討を行うものである。

今回は、食品表示法施行に伴い成分表示の推奨項目となった飽和脂肪酸分析のほか、総ビタミンC、醤油 JAS規格の検査項目であるレブリン酸の分析について検討を行った。

2. 方 法

2.1 脂肪酸分析

油脂以外の試料からの脂質抽出、メチルエステル化、分析試料の精製は分析マニュアル¹⁾に準じて行った。内部標準物質にはヘプタデカン酸(HDA)を用いた。脂肪酸メチルエステル(FAME)の分離・定量は、Agilent

Technologies 製 GC7890B システムに J&W Scientific 製 DB-WAX カラムまたは Agilent 製 CP-Sil 88 カラムを付し、FID で検出した。CP-Sil 88 による分析条件は Table 1 のとおり。

Table 1 脂肪酸組成 GC 分析条件

カラム	Agilent CP-Sil88 for FAME
試料注入方法	スプリット 20:1 " 流量 20ml/min.
試料注入量	5μl
カラムオープン温度	100°C 4min 100°C→3°C/min. →240°C 240°C 10min. ポストラン 100°C 10min.
キャリアガス	He 定流量 2ml/min.
注入口温度	250°C
検出器温度	250°C

2.2 総ビタミンC分析

酸化型ビタミンC(デヒドロアスコルビン酸:DHAsA)の還元は既報²⁾を参考に、反応に用いるジチオスレイトール(DTT)の濃度を改変して行った。常法¹⁾に従い5%メタリン酸で抽出した試料を、等量の50mM DTTを含む0.5M Tris-HCl pH9.0緩衝液と混合し、室温で10~20分間置いたものを0.45mmフィルターでろ過し、HPLCに供した。HPLCの条件はTable 2のとおり。

Table 2 総ビタミンC分析条件

カラム	Shodex NH2P50-4E (φ4.6 * 250mm)
カラムオープン	35°C
溶離液	60mM リン酸/メタノール (20/80) 0.7ml/min.
試料注入量	5μl
検出波長	254nm

2.3 レブリン酸分析

Shodex 製 C-811 カラムを 2 本連結し、カラム後方に発色用液との反応コイルを設置した有機酸分析用 HPLC システムにより分析を実施した。分析試料はスルホサリチル酸 (試料/20% スルホサリチル酸/超純水=1/1/8) ・遠心分離により希釈・除タンパクを行い、0.45mm フィルターを過により調製した。HPLC の分析条件は Table 3 のとおり。

従来実施してきたレブリン酸反応は、しょうゆ試験法に準じて行った。

Table 3 有機酸分析条件

カラム	Shodex C811 φ8 * 500 mm ×2 本
カラムオープン	50°C
溶離液	3mM 過塩素酸水溶液 1.1ml/min.
発色液	0.2%BTB-30mM Na ₂ HPO ₄ 0.8ml/min.
試料注入量	20μl
検出波長	445nm

3. 結果と考察

3.1 脂肪酸分析

大豆油を試料として、メチルエステル化・抽出・GC 分析の一連の操作の試験精度を既設の DB-WAX カラムを用いて検討した (Fig. 1, 2 左) とし、各成分のピーク面積/試料採取量比はよく揃っており、添加した HDA が最もバラつく結果となった。HDA を内部標準として補正後 (Fig. 2 右) の各成分の変動率は 1.5%以下となり、十分な定量性があることが確認できた。このとき、HDA に対する各脂肪酸の感度補正係数は 1 とした。

続いて、飽和脂肪酸分析への対応を念頭に、不飽和脂肪酸・トランス脂肪酸分析についても検討するため、トランス脂肪酸分析用カラムとして供給されている CP-Sil188 カラムを用いて分析を行った。FAME 37 成分混合物 (Sigma-Aldrich) を分析し、2 成分を除いてほぼベースライン分離できることを確認した (Fig. 3)。混合物に含まれる成分については定量分析が可能であると考えられるが、その他の高度不飽和脂肪酸やトランス脂肪酸が含まれる試料の分析については、分析条件の変更が必要のため、別途検討する必要がある。

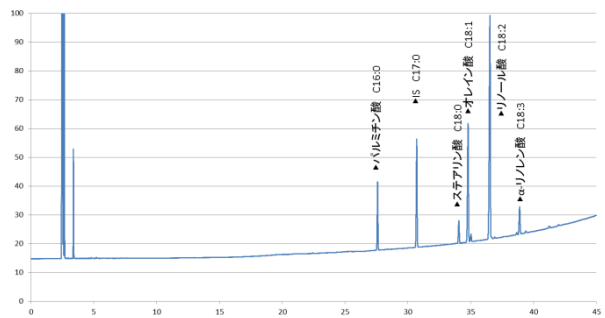


Fig. 1 DB-WAX カラムによる大豆油 FAME の GC 分析例

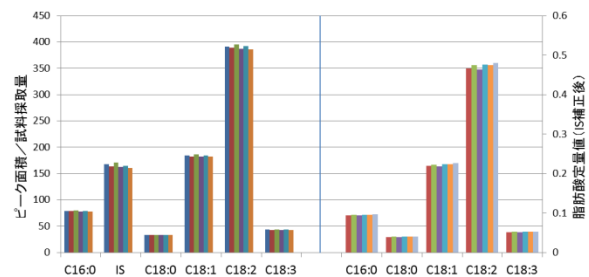


Fig. 2 大豆油 FAME の繰返し試験結果

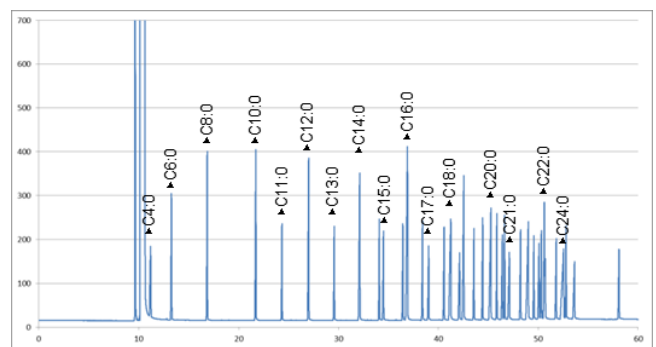


Fig. 3 FAME 37 成分混合物の分析例

3.2 総ビタミンC分析

総ビタミンC分析のため、UV 吸収のない DHAsA を直接分析する手段として昨年度は LC-MS による定量を検討したが、保有する逆相カラム、HILIC カラムでは十分に保持することができなかった。今回は、DTT により DHAsA を還元型のアスコルビン酸 (AsA) に変換して定量する方法を検討した。Fig. 4 のとおり、DHAsA が AsA に還元され、UV 検出器で定量できることを確認した。

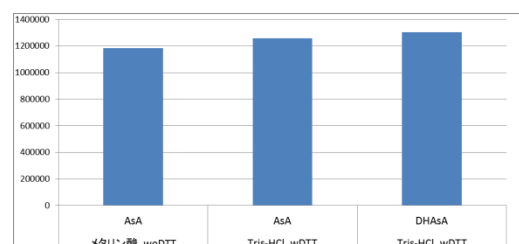


Fig. 4 DTT による DHAsA 還元の確認

既報では、クロマトグラムの改善のため、抽出条件等の最適化も実施していたが、今回用いたカラム及び分析条件においては、一般的に用いられるメタリン酸による抽出試料でもピーク形状の変化はなく (Fig. 5), 十分な定量性を有することが確認できた。また、カラム保護と分析試料の安定化のため、硫酸酸性にする操作についても、今回使用するカラムの pH 適応範囲が広いこと、報告とは異なり保存期間が延びると硫酸添加試料の安定性が損なわれていることから不要と考えられた。一般に、AsA は酸性条件下で安定性が高いと考えられ、メタリン酸溶液で抽出が行われるが、還元剤が添加された試料では、還元反応に適した pH で維持された方が AsA の酸化を抑えることができるのではないと思われる。Fig. 6 の例では、室温で 30 分間から 1 時間程度の反応時間を置けば、試料調製から数日間は安定して測定できると考えられた。

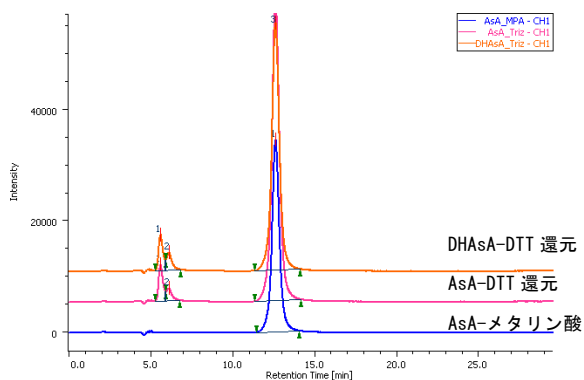


Fig. 5 クロマトグラムの比較 (DTT の影響)

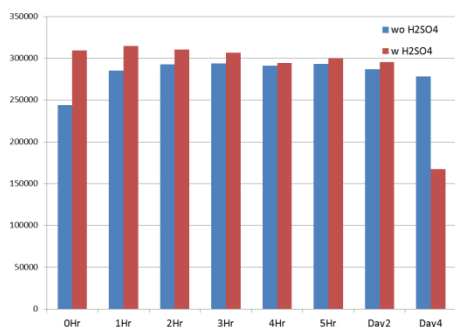


Fig. 6 DTT 添加 DHAsA 還元 の安定性

3.3 レプリン酸分析

Table 2 に示した有機酸の分離定量条件で分析したところ、レプリン酸の溶出ピークが他の有機酸と重なったため、カラムオープン温度を低温側にシフトしたところ分離の改善が見られ、35°C 付近で単独のピークとなった。さらに、分析時間の短縮のためアセトニトリルを添加したところ、5% v/v 添加では前の溶出ピークと重なってしまっていたが、3% に調整することにより単独のピークとなっ

た。これにより、レプリン酸分析時の溶離液には 3% v/v のアセトニトリル添加とカラムオープンの温度変更をすることにより、有機酸分析用 HPLC システムで分析可能となった。(Fig. 7)

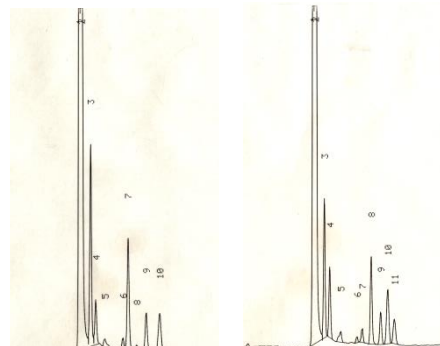


Fig. 7 レプリン酸分析クロマトグラム

醤油のレプリン酸分析は、エーテル抽出・酸化反応後にバニリン硫酸との反応を目視で確認する定性分析である。しょうゆ試験法に準じて実施した例 (Fig. 8) では、抽出率約 10%, 10 倍濃縮された検液であったため、ほぼ原液の濃度のレプリン酸を検出することになる。レプリン酸溶液を用いたレプリン酸反応試験では、数百 ppm 程度までわずかに反応が見られるが、実施者等によっても違いがあり、明確な検出下限は確定できていない。一方、HPLC によるレプリン酸検出下限は 25ppm (希釈前の醤油で 250ppm) 以下であることを確認した。JAS 規格検査検体についてレプリン酸の定量分析を実施したところ、本醸造以外の製造方法による醤油のレプリン酸含有量は約 2,000~9,000ppm の間に分布した (Fig. 9)。

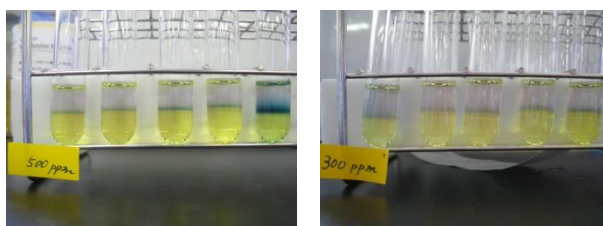


Fig. 8 レプリン酸反応実施例 (左: 500ppm, 右 300ppm)

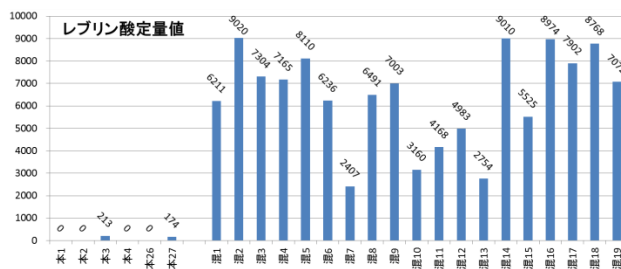


Fig. 9 醤油のレプリン酸分析例 (一部抜粋)

本醸造醤油の一部には 200ppm 前後のレブリン酸を含むものがあったが、通常のレブリン酸反応で陽性になる濃度ではないと考えられた。本醸造醤油でも発酵過程でレブリン酸が生成されることがあるとされているほか、意図しない混入の可能性もあるが、本醸造以外の製造方法による醤油や混入した場合、1～5%程度の混入でも検出できると思われる。

4. まとめ・今後の展開

4.1 脂肪酸分析

飽和脂肪酸分析については、油脂として抽出された試料については精度よく分析できることが確認された。また、食品試料からの脂質の抽出についても、通常実施している脂質の定量分析と類似の操作になるため、特に問題ないと思われる。

飽和脂肪酸は食品表示基準で表示推奨項目に指定され、将来的に義務項目に移行する可能性もあり、新たに分析ニーズが発生してくる可能性がある。分析コストについては約 18,000 円と見込んでおり、他機関の分析手数料と大幅には異ならない費用で実施できる見込みである。不飽和／高度不飽和／トランス脂肪酸の分析については、今後も検討を進めていく予定である。

4.2 総ビタミンC分析

DTT 添加により DHAsA を AsA に還元して定量する手法は、簡便な試料前処理により従来実施してきた還元型ビタミンC分析と同条件で実施できることから、導入が容易で、野菜・果実等については、既報のとおり十分に適用可能と考えられた。加工食品等については今後も DTT 添加量が適切かどうか等の検討を加えていく。分析コストは DTT 以外に高額な試薬を必要としないことから、従来の還元型ビタミンC分析と同程度で実施できるものと見込まれる。

4.3 レブリン酸分析

HPLC による醤油中のレブリン酸の定量は、有機溶剤等の使用を伴わず試料調製も非常に簡便であるうえ、醤油 JAS 規格検査のレブリン酸反応と同等以上の定量感度を有することが確認された。分析試料が多くなると総分析時間が長くなるものの、分析者によらず再現性の高い分析ができること、定性的な分析でも十分に本醸造以外の製造方式を判別できることなど、実施するメリットは大きい。このようなことから、当センターで実施する JAS 規格検査でのレブリン酸分析方法を HPLC 法に移行した。なお、この調査実施後に、今回使用したカラムの後継製品を用いた、醤油中のレブリン酸分析に関する技術資料⁴⁾が日本分光（株）より公開されており、カラム交換後

の分析条件等の参考にできる。

4.3 今後の展開・次年度の計画

3 年間で検討してきた分析成分のうち、食品表示基準で推奨表示項目となった食物繊維及び飽和脂肪酸の分析については、分析実施に向けて、コストの転嫁等の詳細を詰めていく必要がある。現状で依頼試験での実施が困難と考えられるアミノ酸分析等については、機器貸付制度等により対応できる部分から実施していきたいと考えている。

参考文献

- 1) 日本食品標準成分表分析マニュアル
- 2) Quim. Nova, Vol. 32, No. 1, 87-91, 2009
- 3) しょうゆ試験法（財）日本醤油研究所 1985
- 4) <https://www.jasco.co.jp/jpn/technique/applicationdata/PDF/HPLC/220060H.pdf>