

## ビタミンの分析方法について ～微生物学的定量法と HPLC 法～

### はじめに

ビタミンは、生体の機能を正常に維持するために必須な栄養素であり、生体内で合成されないか、または合成されても必要量を満たせないため、食事から摂取しなければならない有機化合物です。現在、ビタミンと認められている栄養素は 13 種類あり、大きく 4 種の脂溶性ビタミンと 9 種の水溶性ビタミンに分けられます。近年、健康志向や食品の機能性などに対する関心が高まっているため、これらのビタミンの含量を正確に分析することが求められています。

食品表示基準におけるビタミンの分析方法<sup>1)</sup>には、主に微生物学的定量法と高速液体クロマトグラフ法（以下 HPLC 法）があります。弊財団では一部のビタミン B 群（ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub>、葉酸、パントテン酸、ナイアシン及びビオチン）について、微生物学的定量法と HPLC 法を用いて分析を行っています。今回は両分析方法の特徴についてご紹介いたします。

### 分析方法について

#### ① 微生物学的定量法

##### 定量法の原理

微生物学的定量法は、目的のビタミンを必須栄養素として要求する微生物を、当該ビタミンを除いた培地で培養した時の増殖度合を測定することによって定量する分析方法です。

サンプルを秤量後、加圧抽出や酵素処理を行うことで、タンパク質や糖などを切り離し、微生物が増殖に利用できる形のビタミンに変換し、試料溶液を得ます。培地に標準溶液又は試料溶液及び試験菌液を添加し、試験管またはマイクロプレートで培養します。培養後、培養液の濁度（600 nm）を測定します。標準溶液や試料溶液中に目的のビタミンが多く含まれるほど試験菌は増殖し培養液は濁るため、濁度は大きくなります（図-1）。

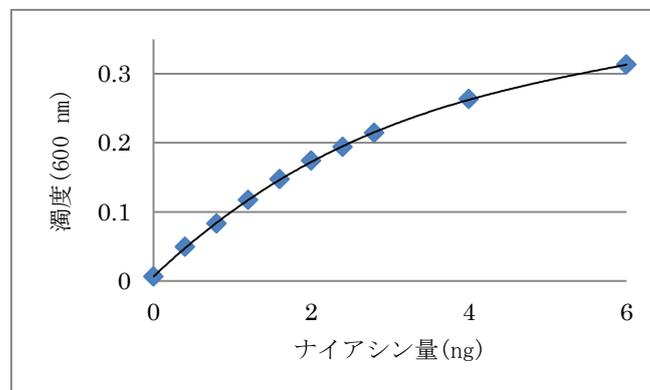


図-1 ナシアシンの検量線の一例

### 特徴

微生物学的定量法は、サンプル中の夾雑成分の影響をそれほど受けることなく低濃度領域まで測定できる検出感度の優れた方法です。また、天然由来の成分や同じ活性を持つ成分を同時に測定することが可能です。例えば、ビタミン B<sub>6</sub> はピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミン及びこれらのリン酸エステル型を一度に測定し、ビタミン B<sub>6</sub> の総量として定量することが可能です。一方で、検量線の測定範囲が狭く、試験菌の生育状況が結果に影響を及ぼす場合があります。また、試験菌の培養を伴うため分析に時間を要します。試験菌の取り扱いについては一定のノウハウが必要となりますので、HPLC 法と比較して難易度の高い分析方法と言えます。その他、各活性成分を分離して測定することが困難であるというデメリットがあります。

## ② HPLC 法

### 定量法の原理

サンプルから目的のビタミンを抽出後、HPLC カラムで他の夾雑成分と分離し、紫外可視吸光度検出器または蛍光検出器により検出・定量します。高濃度に添加されたビタミンを測定対象とするため、複雑な前処理を要しません。

### 特徴

HPLC 法は機器分析であるため、短時間で精度よく分析することが可能であり、分析結果の信頼性も高い方法です。また、目的の成分を個別に測定することが可能です。例えば、ビタミン B<sub>6</sub> ではピリドキシンのみを測定することが可能です。一方で、微生物学的定量法と比較して検出感度が劣り、また類縁体や各種結合型のような天然由来のビタミンの測定はできません。サンプル中のマトリックスによっては夾雑成分の影響により測定不能となる場合があります。

## 微生物学的定量法と HPLC 法の比較

食品表示基準では、微生物学的定量法が主流であるビタミン B 群 6 成分（ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub>、葉酸、パントテン酸、ナイアシン及びビオチン）に関しては HPLC 法の操作条件例の記載があり、健康食品やビタミン製剤のような含量の高いサンプル種においては、HPLC 法で分析することも可能です。このようなサンプル中のビタミン B<sub>6</sub>、葉酸、パントテン酸及びナイアシンについては概ね HPLC 法で分析することが可能ですが、ビタミン B<sub>12</sub> 及びビオチンに関しては食品に含まれる量が一般に少ないため、分析できるサンプル種は限定されます。表-1 に微生物学的定量法と HPLC 法の比較を示します。

表－1 微生物学的定量法と HPLC 法の比較

	微生物学的定量法	HPLC 法
測定感度	低～高濃度領域まで測定可能	高濃度領域で測定可能
検量線の測定範囲	狭い	広い
分析時間	時間を要する	短時間で分析が可能
分析精度	やや劣る	良好
試験操作	前処理が必要	複雑な前処理は不要
夾雑成分の影響	サンプル中の夾雑成分の影響を受けにくい	サンプル中の夾雑成分によっては分析不能となる場合がある
測定対象成分	結合型ビタミンや類縁体などを含め総量として測定	目的成分を個別に測定
適用サンプル	食品一般（生鮮食品・加工食品・サプリメント等の健康食品）、飼料	摂取・強化目的にビタミンを添加した健康食品（サプリメント等）、ビタミン製剤（プレミックス等）

① 定量下限

微生物学的定量法は、検出感度が非常に優れています。弊財団における HPLC 法の定量下限は 0.5 mg/100g ですが、微生物学的定量法では 0.03 μg/100g～0.05 mg/100g と HPLC 法に比べ、10～10,000 倍程度低濃度領域まで測定可能です（表－2）。

表－2 弊財団における定量下限

測定成分	微生物学的定量法	HPLC 法
ビタミン B <sub>6</sub>	0.003 mg/100g	0.5 mg/100g (500 μg/100g)
ビタミン B <sub>12</sub>	0.03 μg/100g	
葉酸	1 μg /100g	
パントテン酸	0.05 mg/100g	
ナイアシン	0.03 mg/100g	
ビオチン	0.3 μg/100g	

② 両分析法の相関

表－3 は 3 種類のサプリメントに含まれるビタミン B<sub>6</sub> の含有量を微生物学的定量法及び HPLC 法で分析した時の値です。高濃度にビタミンを添加したサンプルでは両法による値は同等です。

表－3 微生物学的定量法及び HPLC 法によるビタミン B<sub>6</sub> の値の比較

サンプル	微生物学的定量法 (mg/100g)	HPLC 法 <sup>※1</sup> (mg/100g)
錠剤 A	64.9	68.9
錠剤 B	1,140	1,070
錠剤 C	6,850	6,810

※1 ピリドキシン塩酸塩からビタミン B<sub>6</sub> へ換算した値。換算係数；0.8227

③ 分析精度

微生物学的定量法及び HPLC 法の分析精度を測定値の相対標準偏差 (%) で示します (表-4)。各ビタミンを高濃度添加したサプリメントを 10~20 回繰り返し分析し、その相対標準偏差 (標準偏差/平均値×100) を算出し、両方法を比較しました。いずれのビタミンにおいても HPLC 法の分析精度の方が優れていることが分かります。

表-4 分析精度 [測定値の相対標準偏差 (%) ]

測定成分 (濃度レベル)	微生物学的定量法	HPLC 法
ビタミン B <sub>6</sub> (1,000 mg/100g)	10.1	2.69
葉酸 (50 mg/100g)	7.68	2.12
パントテン酸 (2,000 mg/100g)	5.62	3.01
ナイアシン (4,000 mg/100g)	3.11	1.71

おわりに

微生物学的定量法は、検出感度に優れ、低濃度領域まで測定が可能であり、目的のビタミンについて天然由来の成分・類縁体も含めた総量での定量が可能です。しかしながら、測定値が微生物の生育状況に影響を受けるため、測定値の日間差が大きくなる傾向があり、分析精度は HPLC 法と比較して劣ります。測定値の日間差の要因としては、試験菌の状態・培地・季節変動などが考えられます。それに対し、HPLC 法は短時間で精度よく分析することが可能です。摂取あるいは強化目的でビタミンを添加したサプリメント、プレミックス及びこれらを保存した場合の成分量の変化を分析したい場合には非常に有効な分析方法です。なお、表-4 に記載のないビタミン B<sub>12</sub> 及びビオチンについても、添加量、マトリックスによっては分析が可能です。

ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub>、葉酸、パントテン酸及びビオチンについては食品表示基準における分析方法は、微生物学的定量法による旨の記載があります。食品表示基準における公定法の位置づけは収去検査の際に使用される方法であり、製品への表示の際に使用する分析方法は公定法でなくても差し支えありません。一般的な食品サンプルでは、検出感度及び様々なマトリックスに適用可能な微生物学的定量法、ビタミンの添加があり添加型が明らかなサンプルであれば HPLC 法など、サンプル種に適した分析方法を選択することができますので、分析のご依頼に際して是非お気軽にご相談ください。

参考資料

- 1) 消費者庁：食品表示基準について (平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号)  
 別添 栄養成分等の分析方法等  
[http://www.caa.go.jp/foods/pdf/161117\\_tuchi4-betu2.pdf](http://www.caa.go.jp/foods/pdf/161117_tuchi4-betu2.pdf)