

パントテン酸の分析法

～微生物学的定量法と液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS法)～

はじめに

食品表示基準におけるビタミンの分析法¹⁾は、主に微生物学的定量法と高速液体クロマトグラフィー(HPLC法)がありますが、ビタミンB₁、ビタミンB₂を除くビタミンB群(ビタミンB₆、ビタミンB₁₂、葉酸、パントテン酸、ナイアシン及びビオチン)については微生物学的定量法が採用されています。微生物学的定量法は、ビタミン活性のあるビタミンを総量として測定することが可能です。高感度かつ特異性に優れているため、生鮮食品からサプリメントまで幅広く適用されています。一方で、微生物学的定量法は、微生物の性質を活かした測定法のため、操作が煩雑で培養に時間を要し、HPLC法に比べて精度が落ちると言われています。当財団では栄養強化を目的としてビタミンを高濃度添加した健康食品など一部の食品についてHPLC法で分析を行っています。海外ではAOAC INTERNATIONAL(AOACI)が2012年に調製粉乳中のパントテン酸の定量法²⁾として超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法を採用しました。調製粉乳や栄養補助食品においては液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS法)が主流となっており、国内でも注目が高まっています。

本稿では水溶性ビタミンであるパントテン酸の分析法として液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS法)と微生物学的定量法の比較について適用例を用いてご紹介いたします。

液体クロマトグラフ-質量分析計

液体クロマトグラフ-質量分析計の構成について簡単にご説明します。

液体クロマトグラフ-質量分析計は、物質の分離を行う液体クロマトグラフ(LC)と、分離された物質をイオン化し、イオン化されたイオンは四重極マスフィルタにより質量電荷比(m/z)に応じて分離され検出したイオンを測定する質量分析計(MS)より構成されます。イオン化された物質は固有の質量を持っているため、選択性が高く、高感度に目的成分を測定できるメリットがあります。液体クロマトグラフ-質量分析計には、質量分析計のイオン分離部が2箇所(タンデム四重極型質量分析計(LC-MS/MS))とイオン分離部が1箇所(シングル四重極型質量分析計(LC-MS))があります。

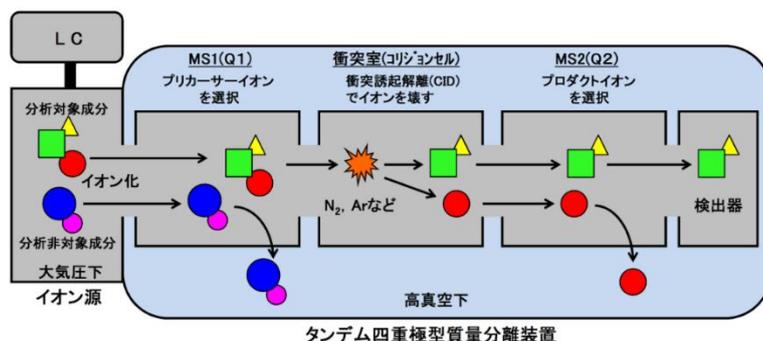


図-1 液体クロマトグラフ-タンデム四重極型質量分析計(LC-MS/MS)の構成

パントテン酸の LC-MS 分析

水溶性ビタミンの1つであるパントテン酸は生体内でのエネルギー代謝に関与する栄養素であり、不足すると成長障害や疲労感・頭痛・食欲不振といった症状が見られる場合があります。パントテン酸は干しいたけや卵，納豆や鶏むね肉など幅広い食品において普遍的に含まれるため，通常の食生活では欠乏症がみられることはほぼありませんが，栄養強化の目的で様々な食品に添加されています。

パントテン酸の LC-MS 法では，試料採取後，水または酢酸アンモニウム溶液 (pH3.8) で振り混ぜ，パントテン酸を抽出して試験溶液を調製します。抽出したパントテン酸は遊離のパントテン酸で，たんぱく質と結合した形のものを含みません。試験溶液を LC 部に注入し逆相カラムで分離した後，エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) でイオン化を行い，正イオンモードで測定します。試料由来成分の影響によりイオン化が促進または抑制される場合があるため，一定量の安定同位体でラベル化されたパントテン酸を内標準とした内標準溶液 (IS) を試験溶液に添加して感度補正を行います。

図-2 にパントテン酸の構造式を，図-3 に LC-MS のクロマトグラム例を示します。パントテン酸は特異的な UV 吸収がないため，HPLC-UV 検出器で分析するには感度および夾雑成分の影響を受けやすいのですが，LC-MS を用いることにより感度・選択性ともに優れた分析が可能となります。

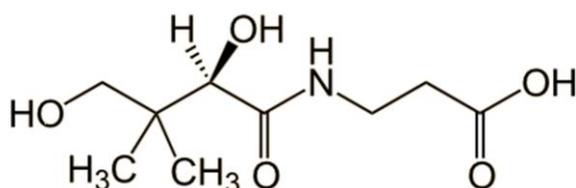


図-2 パントテン酸の構造式

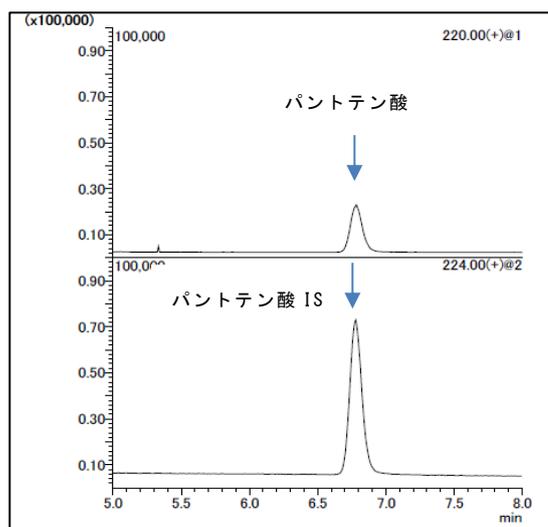


図-3 液体ミルクの LC-MS クロマトグラム例
(上段:パントテン酸 下段:パントテン酸 IS)

微生物学的定量法と LC-MS 法の比較

微生物学的定量法は目的のビタミン活性のあるビタミンを総量として測定する分析法であるのに対し、LC-MS 法は目的成分を個別に測定する分析法です。分析法の同等性及び分析精度を比較するため、パントテン酸の添加量が異なる複数の試料を用いて測定を行いました。

①測定値の比較

パントテン酸が添加された食品中のパントテン酸の含有量を微生物学的定量法及び LC-MS 法で測定した値を表-1 に比較しました。調製粉乳、流動食などの一般的な加工食品から高濃度にパントテン酸が添加されたサプリメントまで両法は概ね同等の値となりました。LC-MS 法は、微生物学的定量法と同様、幅広い含量帯で適用可能であることがわかります。

表-1 微生物学的定量法と LC-MS 法によるパントテン酸測定値の比較

試料	微生物学的定量法 (mg/100g)	LC-MS 法 (mg/100g)	微生物学的定量法 /LC-MS 法
調製粉乳	4.40	4.45	0.989
流動食	0.91	0.87	1.05
栄養補助食品	3.72	3.77	0.987
飲料	6.30	6.11	1.03
ゼリー	1.78	1.73	1.03
サプリメント A	286	280	1.02
サプリメント B	7550	7810	0.967
サプリメント C	9870	10200	0.968

②分析精度

①の測定値の比較で用いた調製粉乳及びサプリメント B について、微生物学的定量法及び LC-MS 法によるパントテン酸の 7 回の測定値の相対標準偏差 (%) を求め、表-2 に示しました。どちらの試料においても微生物学的定量法と比べて LC-MS 法の相対標準偏差 (%) が小さいことから LC-MS 法の分析精度は優れていることがわかりました。

表-2 パントテン酸の分析精度 [測定値の相対標準偏差] の比較

試料	微生物学的定量法	LC-MS 法
調製粉乳	5.7 %	1.1 %
サプリメント B	7.0 %	2.1 %

パントテン酸の分析法の特徴

パントテン酸の分析法について微生物学的定量法、LC-MS法、HPLC法の特徴を表-3に示しました。それぞれの方法の特徴や試験目的に応じて分析法を選択することが必要です。なお、微生物学的定量法とHPLC法の比較についてはJFRLニュース「ビタミンの分析方法について～微生物学的定量法とHPLC法～」(Vo1.6 No.6 Feb. 2018)で詳しく解説していますのでぜひご覧ください。

表-3 微生物学的定量法、LC-MS法、HPLC法の比較

	微生物学的定量法	LC-MS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
定量下限*	0.05 mg/100g		0.5 mg/100g
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	複雑な前処理が必要	複雑な前処理は不要	
サンプル中の成分の影響	サンプル中の成分の影響を受けにくい		分析不能となる場合あり
測定対象成分	総パントテン酸	遊離のパントテン酸	
適用サンプル	食品全般	栄養強化を目的に ビタミンを添加した 食品	栄養強化を目的に ビタミンを高濃度添加した 食品

*当財団が採用している定量下限

おわりに

食品表示基準におけるパントテン酸の分析法は微生物学的定量法とする旨が記載されていますが、栄養強調表示をする場合や栄養機能食品を除き、事業者が栄養成分の表示値を決める際は、微生物学的定量法で試験した値でなくても表示は可能です。

本稿でご紹介したLC-MS法は微生物学的定量法と同等の感度でパントテン酸の測定が可能であり、かつ、HPLC法と同様に短時間で精度よく分析が可能です。さらにHPLC法では測定できない低～中含量帯のサンプルにおいても適用可能なため、一般的な食品に添加されたパントテン酸の分析に幅広く有効な測定方法と言えます。

当財団ではお客様のご依頼目的やサンプル種に適した分析法をご提案しています。お気軽にお問い合わせください。

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
- 2) Andrieux, P. et al. Pantothenic Acid (Vitamin B5) in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula: First Action 2012.16. J. AOAC Int. 2013, 96(3), p. 497-499.