

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 06 月 11 日現在

機関番号：82613

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700946

研究課題名（和文）

機器分析を志向した簡便かつ迅速なビタミン B<sub>12</sub> 分析法の開発と評価

研究課題名（英文）

Evaluation of a simple and quick method of vitamin B<sub>12</sub> quantitation by the instrumental analysis

研究代表者

松本 輝樹 (MATSUMOTO TERUKI)

独立行政法人国立健康・栄養研究所・食品保健機能研究部・室長

研究者番号：70455418

研究成果の概要（和文）：

ビタミン B<sub>12</sub> の定量は、感度の良さから微生物学的定量法が汎用されているが、より簡便かつ迅速な代替方法として高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いた方法について検討を行った。固相抽出カートリッジを用いた夾雑物の除去と測定対象物の濃縮を行うことにより、これまで測定が困難とされていた低濃度の試料に対しても HPLC で対応可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

A microbiological assay which is cumbersome and less precise was used widely for quantitation of vitamin B<sub>12</sub>, but we examined a new method using the high performance liquid chromatograph (HPLC) as a simple, easy and quick analysis method. It was suggested that condensation of analyte and removal of impurities by using solid phase extraction cartridge was allowed the quantitation of ultralow concentration of vitamin B<sub>12</sub> in HPLC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学 B

キーワード：栄養学、食品、分析化学

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミン B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) の定量法は、古くからサンプルの形態に因らず微生物学的定量法 (MBA) が、その感度から汎用されている。近年、分析機器の発達により LC/MS (*Anal Chim Acta* 2006, 562, 185-89) や表面プラズモン共鳴 (*Biacore Journal* 2001, 2, 4-7) などが、MBA に匹敵する感度を有していると報告されており、汎用性の面で劣ってはいるが、簡便かつ迅速な代替分析法として期待されている。

これまでにビタミンサプリメント以外の食品に含有される低濃度シアノコバラミン (CN-cb1) の機器分析例は、イムノアフィニティカラム (IAC) を用いた固相抽出による

HPLC 分析例 (*J Chromatogr A*, 2006, 1101, 63-68) や LC/MS による分析例 (*Anal Chim Acta* 2006, 562, 185-89) の 2 件が報告されているのみである。しかし、前者ではアフィニティカラムの容易な劣化や吸着量の少なさ、後者では内標準物質に天然由来成分を用いていることから、一般食品への応用には制限があることなど、問題点を抱えている。

またアフィニティカラムに限らず、検出感度の向上を目的とした、固相抽出を用いた VB<sub>12</sub> 定量法も種々報告されている。しかし、そのほとんどは比較的含有量の高いサプリメントなどの加工品に含まれる食品添加物としての CN-cb1 に関して検討されたものであり、夾雑物の除去を目的としたものである。

担体としては、 $C_{18}$ の汎用例が6例報告されているが、 $C_{18}$ は脂溶性ビタミンなどの非極性成分を多く含む物には適していない。その他では、フェニル基のものが1例、IACのものが2例あり、併用例は1例 (*J chromatogr* 1991 541, 383-92) 報告されている。

これまでに申請者は CN-cb1 に対して有効な担体として、報告例以外にも、 $C_8$ 、陽イオン交換樹脂 (SCX)、Charcoal などが効果的であることを見出している。特に SCX に対して親和性が高く、脂溶性成分を多く含む検体においても、比較的容易に CN-cb1 を HPLC で検出可能であることを明らかとした。

これまで  $B_{12}$  を測定対象とした研究では、HPLC に代表される機器分析による手法はあまり検討されておらず、結果として検体に対する機器の測定可否が不明瞭なままであった。また、固相抽出などの測定感度の向上に直接貢献する手法の導入は、さらにその対応を複雑なものとしていた。分析法の効率化は、各分析法の特徴を明確にする必要があり、体系だった検討が必要であるが、 $VB_{12}$  を含む食品は、動物性や微生物由来の食品に制限されることから、比較的短期間での検討が可能であると考えられた。

## 2. 研究の目的

現在水溶性ビタミンの定量法として、広く微生物学的定量法 (MBA) が採用されているが、夾雑物の影響や操作の煩雑さにより再現性に問題のあることや、結果を得るために長時間を要することが問題視されている。一方で、栄養表示の義務化に向けた検討も行われており、今後分析の頻度が高くなると予測されることから、より簡便かつ迅速な高精度分析法の創成が望まれている。そこで、本研究では MBA を分析法とする水溶性ビタミンのうち、最も含有量の低いビタミン  $B_{12}$  ( $VB_{12}$ ) に着目し、市販の食品を対象とした、試料形態に即した分析法の開発と適応性について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) HPLC 及び LC/MS におけるシアノコバラミン (CN-cb1) 定量下限値の算出

既に HPLC における CN-cb1 定量下限値については検討を行っているが (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、改めて精査すると共に、LC/MS に関しては、SIM (Selected Ion Monitoring) による定量下限値について検討を行い、対応可能な食品形態について明らかとした。

### (2) LC/MS による定量化のための内標準物質の合成

CN-cb1 の同位体標識物質や内標準物質として使用可能な誘導体は、市販されていないため、合成する必要がある。内標準物質は、HPLC での保持時間や化合物としての性質が

CN-cb1 のものと相似していれば、同位体標識化合物や誘導体である必要はない。しかし、今回検討を行う予定である固相抽出での挙動を考えた際は、安定した結果を得るために、基本骨格が一致する標識体や誘導体の利用が有効であると考えられる。

また、SIM による定量化では、CN-cb1 分子ではなくフラグメントに基づいた定量化も想定されることから、以下に示す2種の内標準物質を合成した。

#### ① $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -cb1 及び $^{13}\text{CN}$ -cb1 の合成

CN-cb1 の安定同位体による標識体の合成には、コバルト配位子であるシアノ基の安定同位体化が容易であることから、本検討では  $\text{K}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  及び  $\text{K}^{13}\text{CN}$  を用いた、 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -cb1 及び  $^{13}\text{CN}$ -cb1 の合成を行った。試料としてヒドロキシコバラミン (OH-cb1) を遮光条件下水系溶媒に溶解し、過剰の安定同位体化シアニ化カリウムを加え、室温で攪拌した。反応終了後、反応液から未反応の OH-cb1 を除去するためにカラムにて精製を行い、各安定同位体標識化合物を得た。

#### ② Ribose-5'-OH の誘導体合成

CN-cb1 を DMSO 溶媒に溶解させ、1,1'-carbonyldi(1,2,4-triazole) (CDT) を加えた後、30  $^{\circ}\text{C}$ 、30分攪拌することにより、Ribose-5'-OH に CDT が付加した中間体を得ることができる。CDT 中間体は、さらにアルキルアミンなどの求核試薬と反応させ、CN-cb1 誘導体の合成を行った。

#### (3) 抽出方法に関する検討

一般に  $VB_{12}$  は、動物性食品においてたんぱく質と結合していることが知られており、試料からの抽出には遊離化させる必要がある。MBA では酢酸緩衝液に CN イオンを添加した溶媒を用いた抽出が行われており、その効果が実証されているが、抽出時の煮沸による熱の影響が無視できない。CN-cb1 は熱に対して安定であるが、他の活性体については不明であることや、夾雑成分として糖を含む際は、変性による抽出液の色調変化を来し、固相抽出に影響を与えかねない。よって、本検討では、熱に因る影響を回避すべく、比較的緩和な条件での抽出方法として、酵素処理について検討を行った。酵素は、容易に入手可能な Pepsin や Papain を用いることにより、温度や pH などを緩和な条件で行い、他の成分への影響を最小限に止めることを目的とした。

また、サプリメントなどでは天然由来の  $VB_{12}$  が存在しないことも考えられることから、より効率的な抽出方法に関する検討を行った。

#### (4) 固相抽出の最適化

これまでに申請者は、CN-cb1 に対して有効な担体として、 $C_{18}$ 、 $C_8$ 、陽イオン交換樹脂 (SCX)、Charcoal などが効果的であることを見出している。最終的な定量分析は、ODS カ

ラムを用いた LC または LC/MS に応用することも考慮し、逆相の担体よりも SCX や Charcoal を用いた方が精製には有効であることから、担体からの目的物の溶出が容易な SCX を用いることとした。また、今回検討予定の食品のうち、乳児用調整粉乳に含まれる VB<sub>12</sub> は極微量 (ppb 単位) であり、LC/MS 単体でもその定量化が困難であると考えられることから、固相抽出の併用 (抽出が充分に行われていることを確認するため、イムノアフィニティカラムを使用) を検討した。

固相抽出は、調製した試料溶液を全量負荷し、適宜カラムを洗浄したのち目的物を溶出させ、2 mL に定容し、試験溶液とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) HPLC 及び LC/MS における CN-cbl 定量下限値の算出

HPLC による検討では、予備検討時よりも測定条件を精査した結果、汎用型のカラム (φ 4.6×250, 5 μm) を使い、カラムへの試料注入量を 100 μL、UV= 550 nm で検出した際、CN-cbl の検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ) は、それぞれ 6 ng/mL 及び 21 ng/mL と感度が向上した。また、LC/MS においては、カラムへの注入量を 10 μL、質量分析計による SIM 検出 (678.5, [M+H]<sup>2+</sup>) の際、LOD は 0.4 ng/mL、LOQ は 1.2 ng/mL であった。

##### (2) LC/MS による定量化のための内標準物質の合成

###### ① <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N-cbl 及び <sup>13</sup>CN-cbl の合成

水に溶解させた OH-cbl に対して 10 当量の K<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N または K<sup>13</sup>CN を加え、遮光下室温で 90 分反応させ、ジシアノコバラミンとした。反応終了後、酢酸緩衝液 (pH= 4.5) を加え酸性にすることによってシアノコバラミンに再環化させ、これを C<sub>18</sub> 固相カートリッジで精製することにより、収率 80% で <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N-cbl または <sup>13</sup>CN-cbl を得ることができた。

###### ② Ribose-5'-OH の誘導体合成

CN-cbl 50 mg を 10 mL の DMSO 溶媒に溶解させ、1,1'-carbonyldi(1,2,4-triazole) (CDT) を 3 当量加えた後、30 °C、30 分撹拌することにより、Ribose-5'-OH に CDT が付加した中間体を得ることができた。引き続き、反応溶液に 3 当量のアルキルアミン (RNH<sub>2</sub>) を加え、24 時間反応させたのち、50 mL の AcOEt を加えしばらく放置することにより、反応生成物を析出させた。析出物をろ取することにより、収率 80% でアルキルアミン付加 CN-cbl を得た (Fig)。

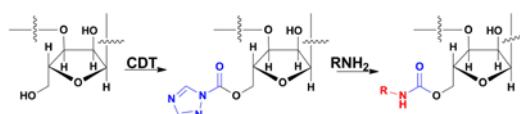


Fig. CN-cbl 中のリボース水酸基の置換

##### (3) 抽出方法に関する検討

###### ① 乳児用調製粉乳 (IF) による検討

検討に用いた IF は、VB<sub>12</sub> が 2 μg/ 100 g 含まれており、試料採取量 (1 g) と定容量 (10 mL) を加減することにより、終濃度は 2 ng/mL となり、LC/MS でも定量化が可能である。そこで、CN-cbl の抽出に水、酢酸緩衝液 (pH= 4.5)、酵素処理 (amylase、Papain、Pepsin 及び Bromelain) をそれぞれ検討したが、全て夾雑物の影響から CN-cbl に由来するシグナル (678.5, [M+H]<sup>2+</sup>; 1355.4, [M]<sup>+</sup> など) を検出することはできなかった。特に酵素処理を行った際は、他の抽出方法よりも夾雑物の影響が大きく (ベースラインの変動が大き)、利点を見出すことができなかった。

###### ② サプリメントによる検討

サプリメントなどでは、天然由来の VB<sub>12</sub> が存在しないことも考えられることから、食品添加物として使用可能な CN-cbl のみを対象とした抽出方法を検討した。試料として認証標準物質である NIST SRM 3280 を 1 g 用いた検討では、水抽出を 2 回行い、50 mL に定容したものを試験溶液として HPLC (UV= 550 nm) での分析を行ったところ、収率 97% の結果を得ることができた。また、市販サプリメントに対しても同様の操作を行い、収率 85% 以上の結果が得られた。

##### (4) 固相抽出の最適化

(3)、①の IF を用いた抽出溶媒の検討では、夾雑物の影響により LC/MS による定量化ができなかったことから、固相抽出カートリッジ (C<sub>18</sub>、陽イオン交換樹脂及びイムノアフィニティカラム) を用いた検討を行った。ただし、酵素処理液については、夾雑物の影響が増強されたことから、固相抽出には用いていない。

(3)、②の方法にて調製した試料溶液を、C<sub>18</sub> 及び陽イオン交換樹脂 (SCX) に負荷した際、水抽出及び酢酸緩衝液抽出共に、夾雑物の影響が緩和されず、CN-cbl を LC/MS にて検出することができなかった。

他方、イムノアフィニティカラム (IAC) を用いた検討では、抽出溶媒に水を用いた際、回収率は 40% と不十分であったが、汎用される酢酸緩衝液 (pH= 4.5) では 93% とほぼ表示値通りの結果が得られた。

本検討結果及び過去のビタミン B<sub>12</sub> 分析例から、

○試料中に存在するビタミン B<sub>12</sub> が CN-cbl のみで構成されており、その濃度が 1.1 μg/g 以上含まれる際は、水系溶媒で複数回抽出することにより、HPLC-UV (550 nm) による定量化が可能である。

○天然由来のビタミン B<sub>12</sub> 成分を含む際は、酢酸緩衝液にシアニオンを添加した溶媒

での抽出が有効である。

○試料中に存在するビタミン B<sub>12</sub> が極微量の際、前処理段階での固相抽出や LC 分析条件を最適化し、夾雑物の影響を最小限にすること及び測定対象物の濃縮をしなければ、LC 及び LC/MS では測定できない。

ことが、それぞれ示唆され、条件付きではあるが、ビタミン B<sub>12</sub> の定量化において、MBA の代替法として HPLC の使用が可能であることが明らかとなった。

今回内標準物質を用いた定量化については、検討できていないが、天然由来の VB<sub>12</sub> を含む試料は、CN イオンを添加した抽出溶媒を用いることから、安定同位体化 CN-cb1 の使用ができないことを除き、LC/MS 測定時において有効な手段になると考えられる。

IAC を用いた定量化については、既に他の研究グループからも発表されており (*J Chromatogr A*, 2006, 1101, 63-68)、試料溶液の調製を最適化することにより、HPLC-UV (361 nm) でも低濃度の CN-cb1 を検出可能であると報告している。また、別のグループの研究でも、低濃度の CN-cb1 に対して、固相抽出とサイズ排除型のカラムを併用することにより、HPLC-UV (550 nm) でも定量化が可能であると報告している (*JAAC Int* 2012, 95, 313-18)。よって、本検討では低濃度の試料に対して LC/MS による検出方法を適応したが、夾雑物の除去と測定対象物の濃縮が適切に行われていれば、LC/MS のような高感度検出器を使用することなく、ビタミン B<sub>12</sub> の定量化が可能であると考えられる。ただし、条件次第では、測定が適わないことも考慮すべきであり、HPLC-UV で測定する際には注意が必要である。

他方、LC/MS (ESI<sup>+</sup>) による分析は、本検討条件下では固相抽出が必要であったが、前例 (*Anal Chim Acta* 2006, 562, 185-89) では、試料溶液の前処理なくして低濃度の CN-cb1 が測定可能であると報告している。ただし、測定を可能とするためには、インターフェイスにおいて生成した目的化合物に由来するイオンのフラグメンテーションを促進させる必要があると報告している。今回再現するべく検討を行ったが、測定条件を最適化したにもかかわらず、完全に一致した結果を得ることができなかった。LC/MS におけるマススペクトルは、機器の条件、移動相、機種などにより差異を生じることから、今回もこれらが原因として考えられ、測定条件が完全に一致しない際の MS での定量化は、注意が必要であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

[学会発表] (計 1 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 輝樹 (MATSUMOTO TERUKI)  
独立行政法人国立健康・栄養研究所・食品  
保健機能研究部・室長  
研究者番号：70455418

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし