

Application Note

島津アプリケーションノート No.8(食品)



Food

ダイエタリーサプリメントの分析

山本 文子 山本 洋子 高坂 正博 永田 淳
A.YAMAMOTO H.YAMAMOTO M.TAKASAKA J.NAGATA

1.はじめに

2007年8月24日、アメリカ食品医薬品局(The US Food and Drug Administration; 以降、FDA)の「ダイエタリーサプリメントの製造、包装、表示および保管のための cGMP(current Good Manufacturing Practices), 21 CFR(Code of Federal Regulations) Part111」が発効となりました。この規則は、製造業者に対して、サプリメントに含まれるあらゆる成分の同一性確認のため、ひとつ以上の試験検査を行うことを要求しており、具体的には、純度、含有量、成分組織などの試験を行う

必要があります。また、この規則は海外から米国に輸入されるサプリメント製品に対してもその適応を要求しており、従業員規模で500名以上の会社は2008年6月24日から、20~499名の会社は2009年6月24日から、20名未満の会社は2010年6月24日から適応が義務付けられます。

ここでは、アメリカ薬局方(The United States Pharmacopeia; 以降、USP)に準拠した分析方法で、ダイエタリーサプリメントを分析した例をご紹介します。

2.USPにおけるダイエタリーサプリメントの試験法

USP は、アメリカで流通される全ての医薬品、ダイエタリーサプリメント、食品成分などの標準規格であり、その公式版である USP-NF (United States Pharmacopeia – National Formulary, United States Pharmacopeial Convention)では、ダイエタリーサプリメントは製品形態ごとに試験法が記載されています。マルチビタミン剤など多成分からなるサプリメントは表 1 のように分類されており、多少の違いはありますが、「Oil- and Water-Soluble Vitamins With Minerals Tablets」の分析方法が全ての基本になっています。「Oil- and Water-Soluble Vitamins With Minerals Tablets」では、成分ごとに 1~3 つの分析条件が記載されており、どの条件で測定しても良いことになっていますが、「Method 1」以外を用いた場合は使用したメソッドを商品ラベルに記載することとなっています。ビタミンでは主に HPLC 法を、ミネラルでは原子吸光法を

用いた分析が中心となっています(表 2)。

今回は市販の「マルチビタミン&ミネラル」の錠剤を試料とし、試料に含まれるビタミンおよびミネラルのうち、USP32-NF27 の「Oil- and Water-Soluble Vitamins With Minerals Tablets」で HPLC 法および原子吸光法が試験法として採用されているものを、その試験法に準じて分析しました。なお、USP-NF に示されている試験法はバリデーションされたいわゆる公定法であり、これを逸脱して試験を行う場合は改めてその試験法のバリデーションを行う必要がありますが、決められた範囲内であれば再バリデーションを行う必要なく分析条件を変更しても良いことになっています(分析条件の変更については、HPLC に関しては、USP32-NF27 の < 621 > Chromatography/Physical Tests の“SYSTEM SUITABILITY”に記載されています)。

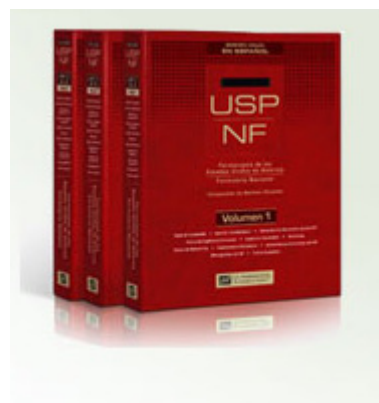
表1 多成分からなるダイエタリーサプリメントのUSP-NFにおける分類*

1	Calcium with Vitamin D Tablets
2	Calcium and Vitamin D with Minerals Tablets
3	Oil Soluble Vitamins Capsules
4	Oil Soluble Vitamins Tablets
5	Oil- and Water-Soluble Vitamins Capsules
6	Oil- and Water-Soluble Vitamins Oral Solution
7	Oil- and Water-Soluble Vitamins Tablets
8	Oil- and Water-Soluble Vitamins with Minerals Capsules
9	Oil- and Water-Soluble Vitamins with Minerals Oral Solution
10	Oil- and Water-Soluble Vitamins with Minerals Tablets
11	Water-Soluble Vitamins Capsules
12	Water-Soluble Vitamins Tablets
13	Water-Soluble Vitamins with Minerals Capsules
14	Water-Soluble Vitamins with Minerals Oral Solution
15	Water-Soluble Vitamins with Minerals Tablets

* USP32-NF27(2008年発行)より

表2 “Oil- and Water-soluble Vitamins with Minerals Tablets”における分析方法

成分	Method 1	Method 2	Method 3
ビタミン A	HPLC	HPLC	HPLC
Cholecalciferol or ergocalciferol (ビタミン D)	HPLC	HPLC	HPLC
ビタミン E	HPLC	HPLC	HPLC
Phytonadione (ビタミン K ₁)	HPLC	ポストカラム HPLC	
Beta Carotene	吸光度法 (UV)		
Ascorbic Acid	滴定法	自動化法	
Biotin	HPLC	微生物定量法	HPLC
Cyanocobalamin	HPLC	微生物定量法	
Folic Acid	HPLC	HPLC	
Calcium Pantothenate	HPLC	微生物定量法	HPLC
Niacin or Niacinamide	HPLC (一斉分析)	HPLC	HPLC (一斉分析)
Pyridoxine Hydrochloride	HPLC (一斉分析)	HPLC	HPLC (一斉分析)
Riboflavin	HPLC (一斉分析)	HPLC	HPLC (一斉分析)
Thiamine	HPLC (一斉分析)	HPLC	HPLC (一斉分析)
Calcium	原子吸光法		
Chromium	原子吸光法		
Copper	原子吸光法		
Fluoride	イオン電極法	HPLC	
Iodide	滴定法	自動化法	
Iron	原子吸光法		
Magnesium	原子吸光法		
Manganese	原子吸光法		
Molybdenum	原子吸光法	吸光度法 (UV)	
Phosphorous	吸光度法 (UV)		
Potassium	原子吸光法		
Selenium	原子吸光法	吸光度法 (UV)	
Zinc	原子吸光法		



3. ビタミンの分析

ビタミンは、一般に水に溶けやすい水溶性ビタミンと水に溶けにくい脂溶性ビタミンに大別されます。水溶性ビタミンには、ビタミンB群やビタミンCが、脂溶性ビタミンにはビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンKなどがあります。

ここでは、島津 HPLC “Prominence”シリーズ、または一体型 HPLC の LC-2010CHT を用いてビタミンの分析を行いました。検出器には、島津フォトダイオードアレイ吸光度検出器 SPD-M20A を用いました。

3-1. ビタミンA

脂溶性ビタミンであるビタミンAは、逆相クロマトグラフィー、順相（吸着）クロマトグラフィーのどちらでも分析可能ですが、USP32-NF28 の「Oil- and Water-Soluble Vitamins With Minerals Tablets」の Method1 では、アミノプロピル基を充てん剤表面に修飾した分離カラムを用いた順相モードで分離を行い、紫外可視吸光度検出で分析することとなっています。標準溶液には trans-酢酸レチノールを用い、試料溶液と標準溶液のピーク面積比から試料中のビタミンAを計算します。また、システム適合性として、酢酸レチノールとパルミチン酸レチノール混合溶液を測定し、両者の分離度が10以上であること、繰り返し測定におけるピーク面積値の再現性が3%RSD以下であることが要求されています。図1に酢酸レチノール/パルミチン酸レチノール混合溶液のクロマトグラムを、表3、4に分析条件とシステム適合性試験の結果を示します。

市販の「マルチビタミン&ミネラル」錠剤を分析した結果を図2に、前処理方法を図3に示します。分析結果が商品ラベル値より高めの値となりましたが、この商品にはビタミンAとしてベータカロテンが含まれており、また、試料前処理の確認のため標準溶液による添加回収試験を行ったところ、回収率は94%と良好な結果が得られました。



島津HPLC “Prominence”

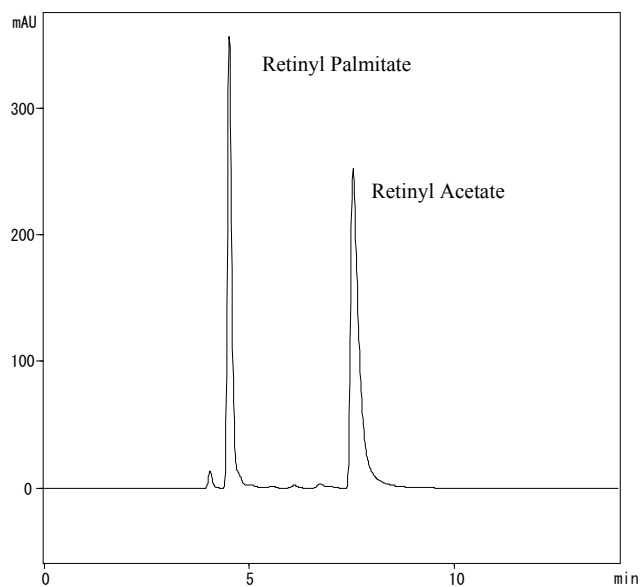


図1 酢酸レチノール/パルミチン酸レチノール混合溶液のクロマトグラム
(酢酸レチノール:9.27 mg/L, パルミチン酸レチノール:10.66 mg/L)

表3 ビタミンAの分析条件

Instrument	: Shimadzu HPLC Prominence Series
Column	: Luna 3 μm NH2 100 Å (150 mmL x 4.6 mm i.d.)
Mobile Phase	: n-Hexane
Flow Rate	: 0.8 mL/min.
Column Temp.	: 30 °C
Detection	: SPD-M20A 325 nm(190~600 nm)(40 °C)
Injection Vol	: 40 μL

表4 ビタミンAのシステム適合性試験結果

	分離度 *1	相対標準偏差(%) *2	
		保持時間	ピーク面積値
パルミチン酸レチノール	—	0.056	0.203
酢酸レチノール	10.8	0.066	0.163

*1 : パルミチン酸レチノールに対する分離度 (USP32-NF27の基準は10以上)

*2 : USP32-NF27の基準は3%以下

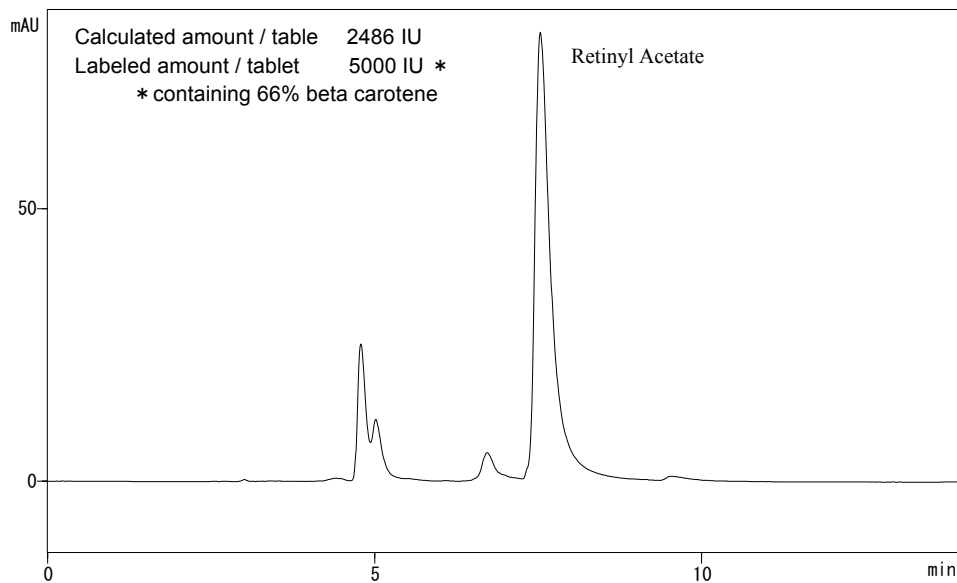


図2 市販サプリメント(錠剤)の分析結果

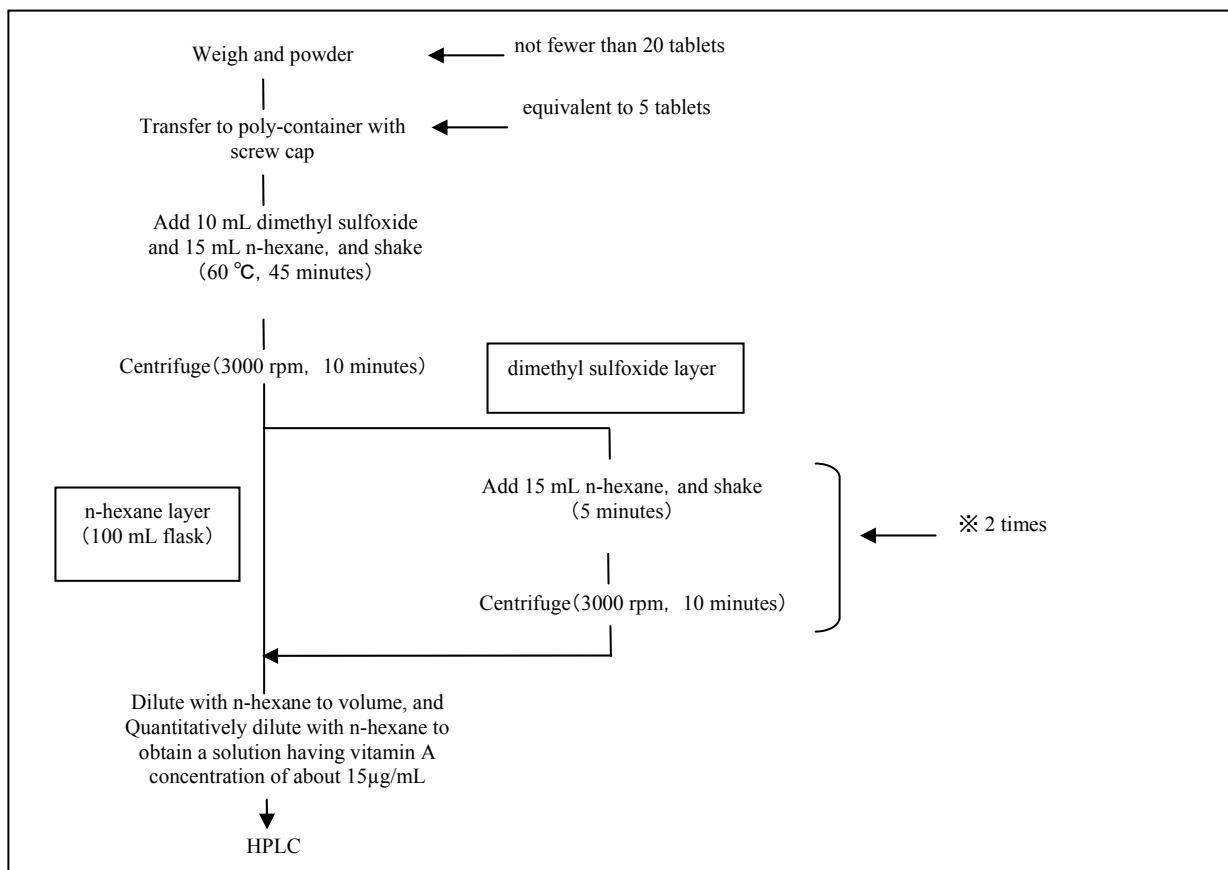


図3 ビタミンA測定における試料前処理フロー

3-2.コレカルシフェロールまたはエルゴカルシフェロール(ビタミンD)

ビタミンDは、ビタミンAと同じく脂溶性のビタミンであり、ビタミンAとほとんど同じ分離条件で分析することができます。分析条件を表5に示します。ここでは、島津一体型HPLC LC-2010CHTを用いました。ビタミンDには、コレカルシフェロール(ビタミンD₃)とエルゴカルシフェロール(ビタミンD₂)がありますが、順相(吸着)クロマトグラフィーでこの2成分を分離することは困難です。USP-NFにはこの点について特に記述はされていませんが、試料に含まれるビタミンDがどちらの成分であるかをまず確認し、その標準試料を用いて分析を行うことが望ましいと思われます。ビタミンD分析では、標準溶液を60℃で1時間加熱することにより一部ビタミンDを異性化した溶液をシステム適合性試験溶液とし、異性化により得られたビタミンD前駆体に対する分離度が規定値を満たすことが要求されています。図4にコレカルシフェロールの標準溶液、およびシステム適合性試験溶液のクロマトグラムを、表6にシステム適合性試験結果を示します。

図5に市販の「マルチビタミン&ミネラル」錠剤を分析した結果を示します。前処理方法はビタミンAと同じです。最終的にビタミンD濃度が2μg/mLになるよう調製します。なお、ビタミンD溶出後も複数のピークが確認されますので、分析時間は60分としています。

表5 ビタミンDの分析条件

Instrument	: Shimadzu LC-2010CHT
Column	: Luna 3 μm NH ₂ 100 Å (150 mmL x 4.6 mm i.d.)
Mobile Phase	: n-Hexane/isopropyl alcohol = 99/1
Flow Rate	: 1.0 mL/min.
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: 265 nm (40 °C)
Injection Vol	: 100 μL

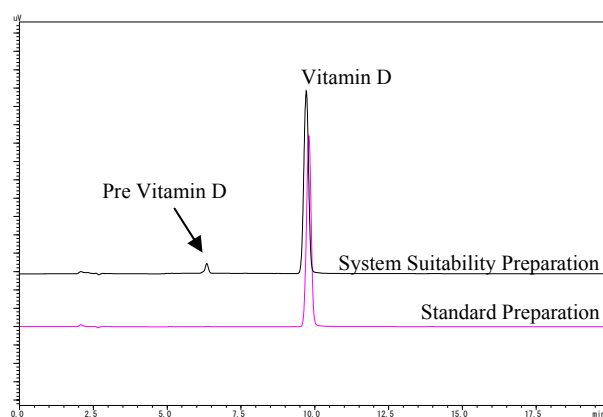


図4 コレカルシフェロールのシステム適合性試験溶液のクロマトグラム(コレカルシフェロール 2 μg/mL)

表6 ビタミンDのシステム適合性試験結果 *

分離度	相対標準偏差(%)	
	保持時間	ピーク高さ
13.0	0.164	0.690

* : USP32-NF27の基準:分離度 10以上, 相対標準偏差 3%以下

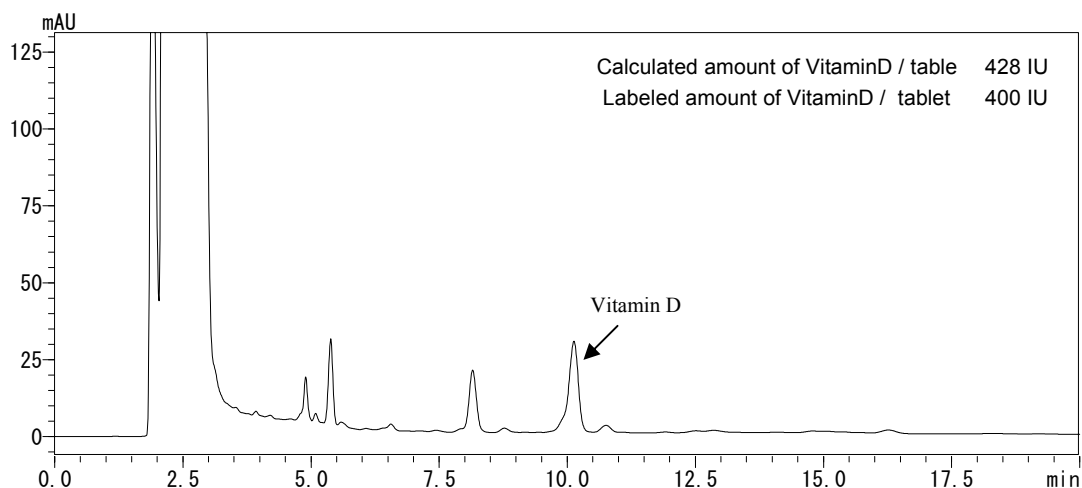


図5 市販サプリメント(錠剤)の分析結果

3-3.ビタミンE

ビタミン E は脂溶性ビタミンに分類され、ビタミン A、ビタミン D と同様に順相(吸着)クロマトグラフィーで分析することができますが、USP32-NF27 では逆相クロマトグラフィーが分離手法として採用されています。ビタミン E であるトコフェロールには、メチル基の位置により α 、 β 、 γ 、 δ の 4 種の異性体がありますが、USP32-NF27 では α -トコフェロール(もしくは α -トコフェロール酢酸エステル、 α -トコフェロールコハク酸エステル)を標準溶液として分析を行います。今回は、実試料のビタミン E が α -トコフェロール酢酸エステルであることから、 α -トコフェロール酢酸エステルを標準溶液として用いました。システム適合性では、ビタミン D であるエルゴカルシフェロールと α -トコフェロール

酢酸エステル混合溶液を別途調製して、エルゴカルシフェロールに対する相対保持時間、分離度、およびテーリングファクターが規定値を満たすことが要求されています。図 6 にシステム適合性試験溶液を繰り返し測定したクロマトグラムを、表 7、8 に分析条件とシステム適合性試験の結果を示します。なお、カラム流量はカラム内径にあわせて USP-NF の条件から変更しています。

市販の「マルチビタミン&ミネラル」錠剤を分析した結果を図 7 に示します。前処理方法はビタミン A と同じですが、逆相分離条件のため、最後に試料溶媒をヘキサンからメタノールへ転溶する必要があります。

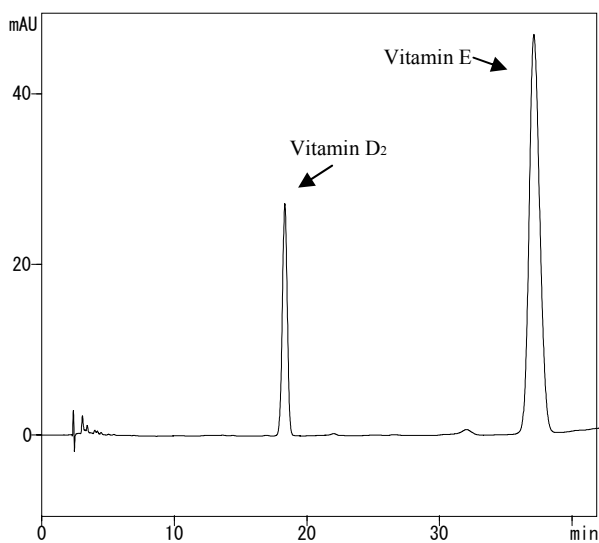


図6 システム適合性試験溶液のクロマトグラム
(エルゴカルシフェロール 0.0065 mg/mL,
 α -トコフェロール酢酸エステル 1.013 mg/mL)

表8 ビタミンEのシステム適合性試験結果

	結果	基準・目安
分離度	12.7	12 以上
テーリングファクター	1.16	0.8~1.2
相対保持時間 *	0.49	約 0.5
%RSD (保持時間)	0.213	3%以下
(ピーク面積値)	0.611	

* : エルゴカルシフェロールに対する相対保持時間

表7 ビタミンEの分析条件

Instrument	: Shimadzu HPLC Prominence Series
Column	: Shim-pack VP-ODS (150 mmL x 6.0 mm i.d.)
Mobile Phase	: 1% Phosphoric acid/Methanol = 5/95
Flow Rate	: 1.2 mL/min.
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-M20A 254 nm (190~600 nm) (40 °C)
Injection Vol	: 50 μ L

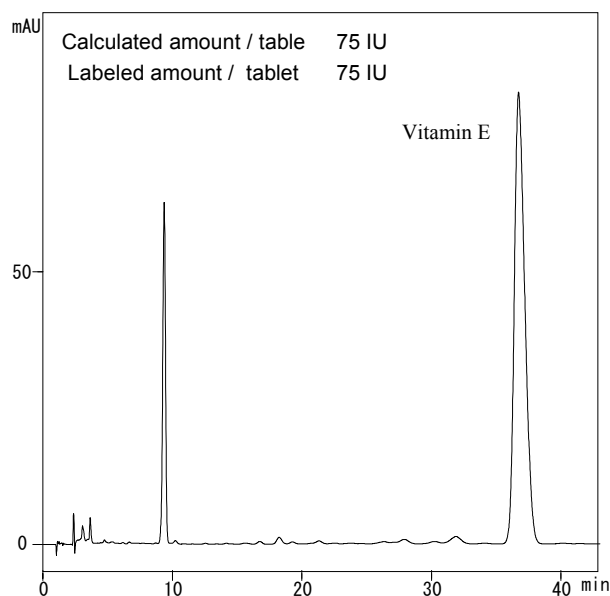


図7 市販サプリメント(錠剤)の分析結果

3-4.ナイアシンまたはナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン

水溶性ビタミンであるビタミン B 群は、通常は逆相クロマトグラフィーにより分析されます。試料によっては一斉分析も可能であり、USP32-NF27 ではナイアシン（またはナイアシンアミド）、ピリドキシン、リボフラビン、チアミンの 4 成分について一斉分析法が記載されています。この 4 成分のうち、チアミンとはピリドキシンは分離カラムへの保持が弱いことから、一斉分析条件では、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウムをイオンペア試薬として移動相に添加する逆相イオンペアクロマトグラフィーが採用されています。USP-NF には、各成分の溶出位置の目安として、チアミンに対する相対保持時間が示されています。図 8 に標準溶液のクロマトグラムを、表 9、10 に分析条件と各成分の相対保持時間と繰り返し

再現性を示します。なお、ここでは、実試料分析において、チアミンに重なるピークが確認されたことから、規定の範囲内で移動相の組成を変更し、チアミンの溶出時間を遅らせております。そのため、チアミン以外の成分のチアミンに対する相対保持時間は、USP-NF に示される目安値よりも小さくなっております。

市販の「マルチビタミン&ミネラル」錠剤を分析した結果を図 9 に、その前処理方法を図 10 に示します。前処理では、容器壁面への吸着や溶解性に気をつける必要があります。USP-NF では、試料の前処理にガラス器具を用いても良いことになっていますが、希釈には指定の希釈液(Water/Acetonitrile/acetic acid = 94/5/1)を用いることになっています。

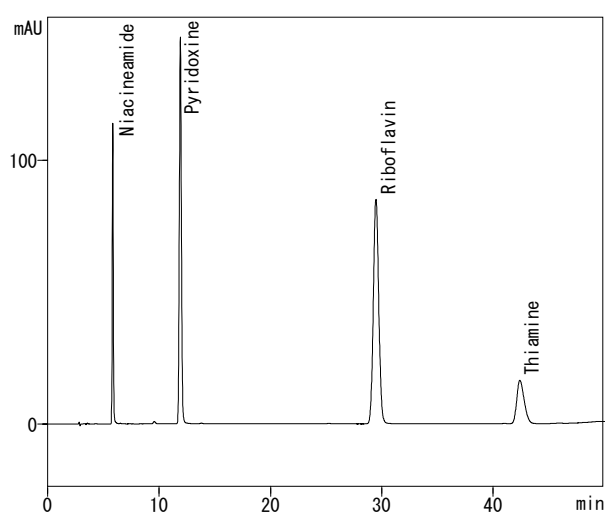


図8 標準溶液のクロマトグラム
(ナイアシンアミド 400 mg/L, ピリドキシン塩酸塩 100 mg/L,
リボフラビン 100 mg/L, チアミン塩酸塩 100 mg/L)

表9 ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン
の一斉分析条件

Instrument	: Shimadzu HPLC Prominence Series
Column	: Luna 5 μ m C18(2) (250 mmL x 4.6 mm i.d.)
Mobile Phase	: Water/Methanol/acetic acid = 83/17/1 Containing Sodium 1-hexanesulfonate 126 mg/100 mL
Flow Rate	: 1.0 mL/min.
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: SPD-M20A 280 nm(190~600 nm)(40 °C)
Injection Vol	: 10 μ L

表10 ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミンの相対保持時間と注入繰り返し再現性

	相対保持時間 *1	相対標準偏差(%) *2	
		保持時間	ピーク面積値
Niacinamide	0.14 (0.3)	0.054	0.107
Pyridoxine	0.28 (0.5)	0.059	0.079
Riboflavin	0.69 (0.8)	0.133	0.097
Thiamine	1.00 (1.0)	0.052	0.160

*1 : チアミンに対する相対保持時間()はUSP-NFにおけるおおよその目安

*2 : USP32-NF27における基準 3%以下

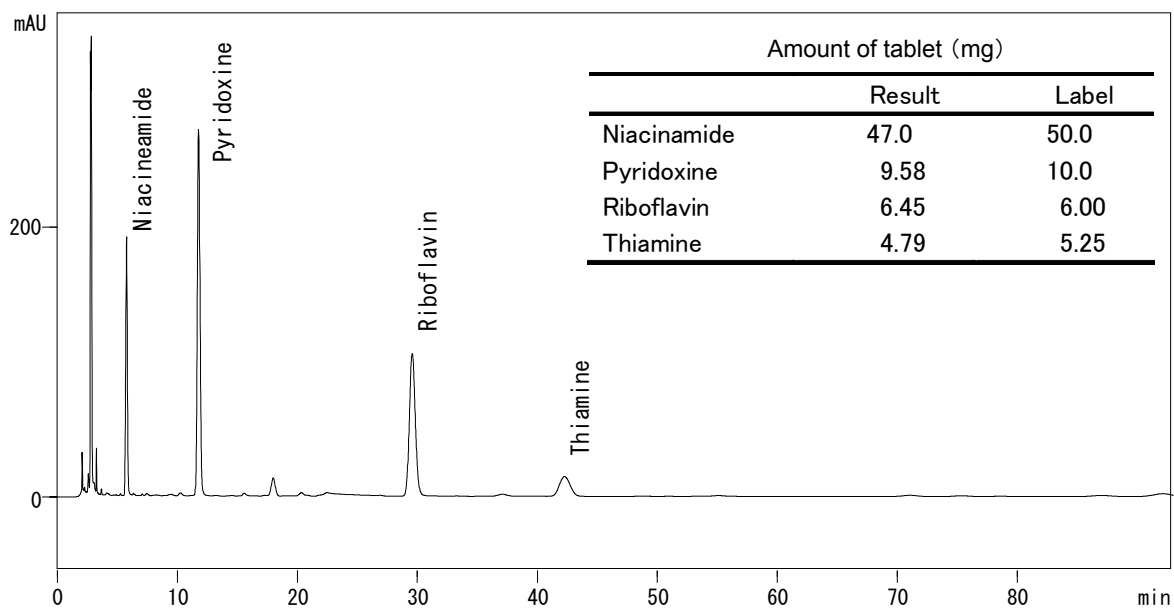


図9 市販サプリメント(錠剤)の分析結果

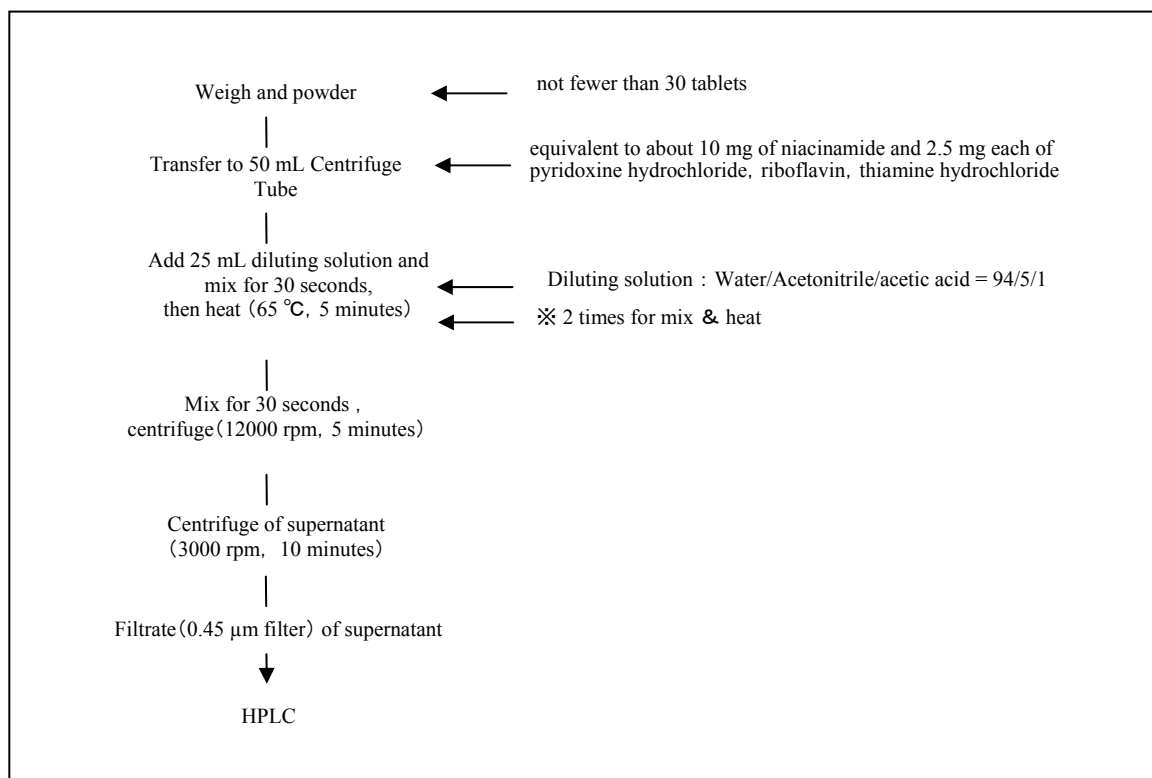


図10 ナイアシンアミド, ピリドキシン, リボフラビン, チアミン分析における試料前処理フロー

4.ミネラルの分析

USP32-NF27 の「Oil- and Water-Soluble Vitamins With Minerals Tablets」には、表 2 に示すようにミネラル 13 成分 (Ca, Cr, Cu, F, I, Fe, Mg, Mn, Mo, P, K, Se, Zn) の試験法が示されていますが、F, I, P の 3 成分を除く 10 成分についてはフレイム原子吸光法が試験法として採用されています。ここでは島津原子吸光分光光度計 AA-7000 シリーズを用いてこのミネラル 10 成分を分析しました。

4-1.分析条件

各元素の測定波長と使用するフレイム、干渉抑制剤を表 11 に示します。Ca と Mo の測定では $N_2O-C_2H_2$ フレイムを用い、それ以外の元素の測定には空気- C_2H_2 フレイムを使用します。また、Ca と Mg の測定では La を、Mo と Se の測定では塩化アンモニウムを干渉抑制剤として標準溶液および試料溶液に添加して分析します。なお、USP32-NF27 には記載されていませんが、ここでは、すべての元素について D_2 法によるバックグラウンド補正を行っています。

表11 分析条件

Element	Wavelength	Flame	Matrix Modifier
Ca	422.7 nm	$N_2O-C_2H_2$	0.1% La
Cr	357.9 nm	Air- C_2H_2	
Cu	324.7 nm	Air- C_2H_2	
Fe	248.3 nm	Air- C_2H_2	
Mg	285.2 nm	Air- C_2H_2	0.1% La
Mn	279.5 nm	Air- C_2H_2	
Mo	313.0 nm	$N_2O-C_2H_2$	2% Ammonium Chloride
K	766.5 nm	Air- C_2H_2	
Se	196.0 nm	Air- C_2H_2	2% Ammonium Chloride
Zn	213.8 nm	Air- C_2H_2	

4-2.検量線の作成

USP32-NF27 では、各元素について表 13 に示す濃度の標準溶液で直線近似による検量線を作成し、表中の赤字で示す濃度付近に調製した試料溶液を分析し、定量します。作成した検量線を次ページの図 14~23 に示します。検量線は標準溶液の濃度の範囲で作成します。また、Zn については、標準溶液の濃度が高く、通常の場合では高濃度領域で検量線が曲がることから、バーナー角度を変更して測定し、検量線の直線性を改善しています。

表12 検量線濃度

Element	STD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
Ca	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	
Cr		1.0	2.0		3.0	4.0
Cu	0.5	1.0	2.0		3.0	4.0
Fe		2.0	4.0	5.0	6.0	8.0
Mg	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	
Mn		0.5	0.75	1.0		1.5 2.0
Mo	5.0	10.0			25.0	
K	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	
Se	5.0	10.0			25.0	
Zn	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	



AA-7000

Application Note No.8

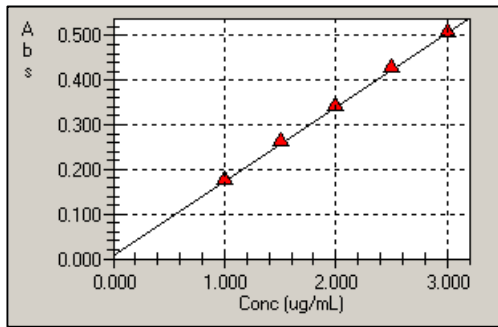


図11 Caの検量線

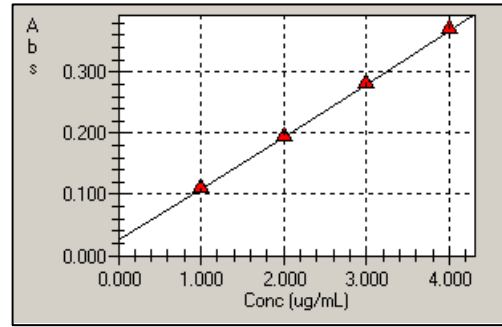


図12 Crの検量線

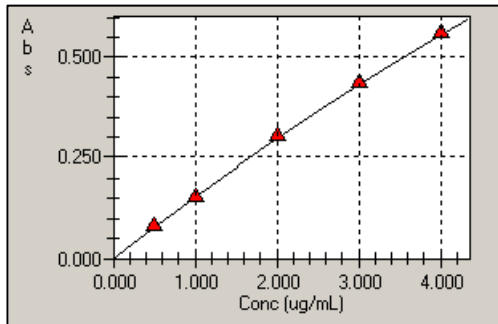


図13 Cuの検量線

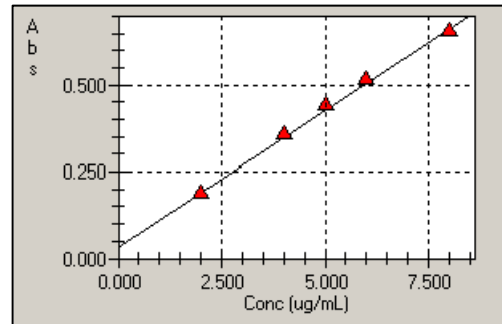


図14 Feの検量線

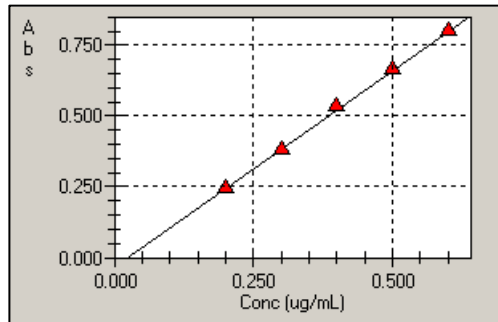


図15 Mgの検量線

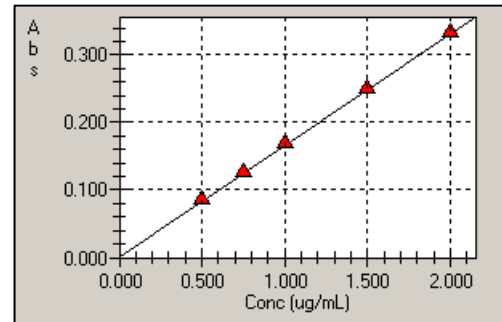


図16 Mnの検量線

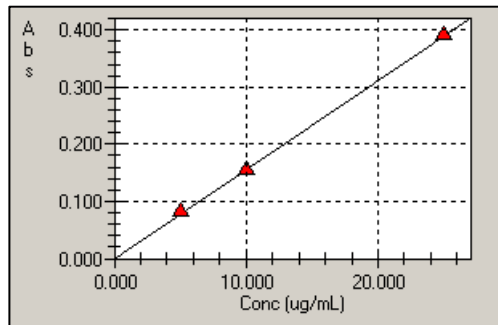


図17 Moの検量線

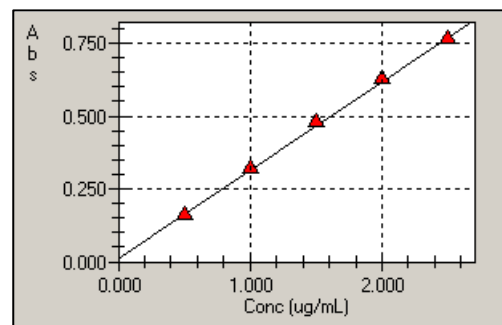


図18 Kの検量線

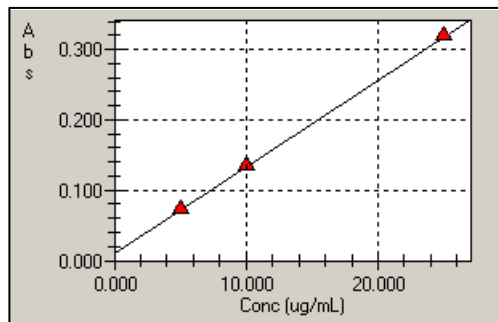


図19 Seの検量線

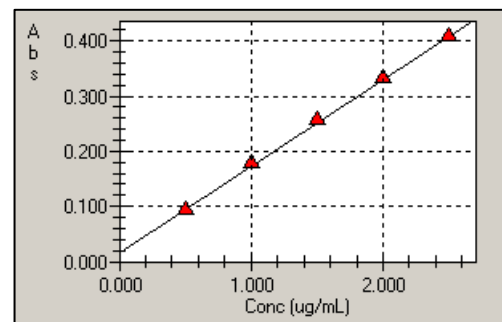


図20 Znの検量線

4-3.実試料中のミネラルの分析

実試料の分析では、Mo、Se とそれ以外の元素とで試料前処理法が異なります。Mo と Se は、硝酸と過塩素酸による湿式分解を行うのに対し、それ以外の元素はマッフル炉にて 550°C で灰化後、塩酸で加熱溶解

します。各前処理方法を図 24、25 に示します。実際に市販の「マルチビタミン&ミネラル」錠剤を分析した結果を表 14 に示します。なお、この試料では Mo は検出されませんでした。

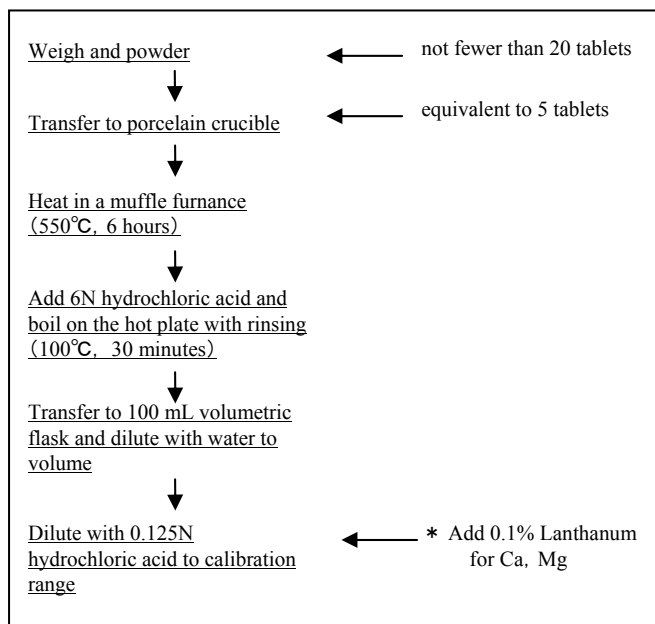


図21 Mo、Se以外の元素の試料前処理フロー

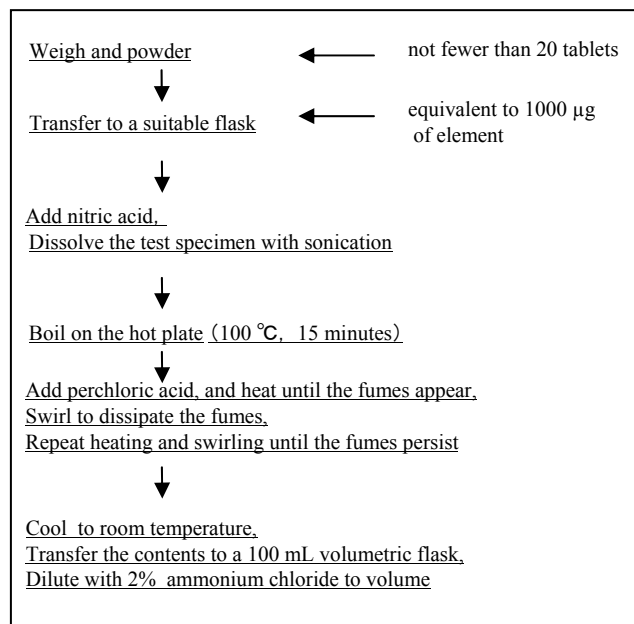


図22 Mo、Seの元素の試料前処理フロー

表13 市販サプリメント(錠剤)の分析結果

	Ca	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	K	Se	Zn
定量結果 (µg/mL)	1.67	1.07	1.91	4.67	0.50	0.72	—	1.05	9.40	1.56
希釈率	5000	10	100	100	5000	500		5000	1	500
計算結果 (mg/tablet)	167	210*	3.8	9.3	50	7.2		105	188*	16
ラベル表示値 (mg/tablet)	165	200*	3.5	9.0	50	7.5	—	100	200*	15

* : 単位 µg/tablet (他はmg/tablet)

5.まとめ

健康志向が高まる中、ダイエタリーサプリメントの市場規模は年々膨らみを増し、ダイエタリーサプリメント先進国であるアメリカでは約 3 兆円規模になると言われています。日本ではサプリメントを明確に定義した法律は現在まだありませんが、サプリメントに対し、「内容物が商品ラベルどおりであることの証明」を義務づけた今回のアメリカ FDA による cGMP の発効は、今後の日本におけるサプリメントのあり方に対し、少な

からず影響を与えることが推測されます。ここでは、USP に準じたマルチビタミン&ミネラル錠剤の分析例をご紹介します。日本国内では、食品衛生検査指針などで食品中のビタミン成分やミネラル成分の分析法が示されておりますが、今回ご紹介しました USP 法とは脂溶性ビタミンなどで一部分離モードが異なったりします。各種試験法のひとつの例として見て頂いてもおもしろいと思います。

* 本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行 2010.3