

普及技術

平成21年度

マイタケに含まれるビタミンD ₂ （エルゴカルシフェロール）の迅速分析法		
[要約] <u>マイタケに含まれるビタミンD₂（エルゴカルシフェロール）は液体クロマト質量分析装置(LC/MS)を用いることで迅速に測定できる。</u>		
農業総合研究所食品研究センター 食品工学科 園芸特産食品科	連絡先	TEL 0256-52-3267 FAX 0256-52-6634

[背景・ねらい]

マイタケに含まれるエルゴカルシフェロール（ビタミンD₂、V.D₂）はコレカルシフェロール（ビタミンD₃、V.D₃）とともに、腸管でのカルシウムの吸収を促進し骨の形成を助ける栄養素（カルシフェロール（ビタミンD、VD））として栄養機能食品の表示を認められている成分である。「五訂日本食品標準成分表分析マニュアル」にその測定法が記載されているが、分画精製など繁雑で時間のかかる前処理を必要とし製品開発における製造条件の検討などでの多数の測定には不向きである。そこで、時間を要さず多数の試料を一括処理し液体クロマト質量分析装置(LC/MS)により感度良くマイタケに含まれるV.D₂を分析する方法を開発する。

[成果の内容・特徴]

- 1 マイタケに含まれるV.D₂はLC/MSを用いることで分画精製など繁雑で時間のかかる前処理をせず測定できる。
- 2 測定用の試料は、アルカリ加水分解、抽出、固相抽出による方法で調製できる。（図1）
- 3 調製した試料は、図に示した分析条件で測定できる。（図2）
- 4 本技術による測定結果の日内変動(n=4, $\mu\text{g}/100\text{g}$, mean \pm S.D.)は 20635.48 ± 107.35 、日間変動(n=16, $\mu\text{g}/100\text{g}$, mean \pm S.D.)は 20512.99 ± 122.09 である。
- 5 本技術による測定数値は「五訂日本食品標準成分表分析マニュアル」(対照方法)のVD測定方法による測定数値とほぼ同一である。（表1）

[成果の活用面・留意点]

- 1 乾燥マイタケ粉末100mg以上であれば測定できる。
- 2 本技術を実施するにはLC/MSとそれを使用できる技術が必要である。
- 3 乾燥マイタケ粉末5%含有製剤の前処理法を図1に例示するが、試料量によっては使用する試薬量について検討する必要がある。
- 4 検量線はV.D₂ 0.25~5 μg に内標準物質としてV.D₃ 1 μg を加え作成する。本法により得られた乾燥マイタケ粉末100mgについてのクロマトグラムを示す。（図3）
- 5 モニタリングイオン $m/z397=V.D_2(MW396)+1$ 、 $385=V.D_3(MW384)+1$ である。
- 6 V.D₃も含有する試料の測定には、内標準物質として安定同位体標識化合物など他の物質を検討する必要がある。

[具体的データ]

マイタケ粉末 100mg

- 内部標準液 (V.D3 0.1mg/mLメタノール) 0.1mL
- 1% 塩化ナトリウム 0.6mL
- 1% ピロガロール/エタノール2mL
- 60%水酸化カリウム/メタノール 1mL
- 70°Cで60分間攪拌
- 冷却
- 1%塩化ナトリウム 2mL
- 酢酸エチル/ヘキサン(1:9)2mL
- 攪拌・遠心分離
- 酢酸エチル/ヘキサン(1:9)2mL攪拌・遠心分離 2回

抽出液(有機層)

- 濃縮、乾固
 - メタノール-水(9:1) 1mLに溶解
- 固相抽出 ボンドエリートC18 100mg/1mL
- メタノール-水(9:1) 1mLで洗浄
 - メタノール2mLで溶出

測定(LC-MS)

ボンドエリートC18コンディショニング

- 1)メタノール1mL
- 2)水 1mL
- 3)メタノール-水(9:1) 1mL

マイタケ製剤 2g

- 内部標準液 (V.D3 0.1mg/mLメタノール) 0.1mL
- 1%塩化ナトリウム 3mL
- 1% ピロガロール/エタノール6mL
- 60%水酸化カリウム/メタノール 5mL
- 70°Cで60分間攪拌
- 冷却
- 1%塩化ナトリウム 10mL
- 酢酸エチル/ヘキサン(1:9)10mL
- 攪拌・遠心分離
- 酢酸エチル/ヘキサン(1:9)2mL攪拌・遠心分離 2回

抽出液(有機層)

- 濃縮、乾固
 - メタノール-水(9:1) 0.2mLに溶解
- 固相抽出 Empore C18 4mm/1mL
- メタノール-水(9:1) 0.2mLで洗浄
 - メタノール0.2mLで溶出

測定(LC-MS)

Empore C18コンディショニング

- 1)メタノール0.2mL
- 2)水 0.2mL
- 3)メタノール-水(9:1) 0.2mL

図1 操作手順

LC条件

- 分析カラム: GL Inertsil ODS-3 (2.0mm I.D. x 250mm)
- 移動相 A: H₂O/CH₃OH =90/10, B: CH₃OH
- グラジエント条件
- A/B (1:4) 5分間
- A/B (1:4) → B 10分間
- B 15分間
- A/B (1:4) 10分間
- 流量: 0.2mL/min
- 温度: 40°C
- 注入量: 2μL

MS条件(Shimadzu QP-8000α)

- プローブ電圧: +4.5kV (APCI-positive mode)
- CDL温度: 230°C
- プローブ温度: 400°C
- ネブライザーガス流量: 2.5L/min
- CDL電圧: -70V
- デフレクター電圧: +55V
- モニタリングイオン: m/z 385(I.S.), 397 (positive)

図2 分析条件

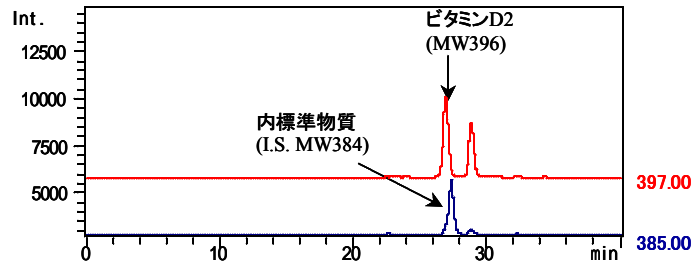


図3 マイタケ粉末中のビタミンDの選択イオン検出クロマトグラム

表1 対照方法による測定との比較結果

Entry No.	本方法	対照方法
原末 #1	20700.0	20673.0
原末 #2	20900.0	20911.5
原末 #3	20846.1	20400.0
タブレット #1	619.9	640.0

単位: μg/100g

研究課題名: 1) 微生物・酵素を利用した高品質県産品の開発

2) マイタケを利用した食品加工技術及び機能性食品の開発

予算区分: 1) 県単経常 2) 共同研究

研究期間: 1) 平成18~20年度 2) 平成19~20年度

発表論文等: なし