

乳児用調合乳およびその他の食品に含まれる コリンのICによる測定

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

キーワード

乳児用調合乳/卵粉/大豆粉/Dionex IonPac CS19カラム/電気伝導度検出

はじめに

コリンは水溶性の微量栄養素の一つで、細胞膜、メチル基代謝、および神経系の活動にとって不可欠です¹。コリンは多様な食品中に少量の遊離コリンとして、またはエステル化された形で存在します²。コリンは栄養強化食品やダイエット用サプリメント中に含まれることもあり、例えば、多くの乳児用調合乳に含まれる添加剤の一つでもあります。そのため、一般食品に含まれるコリンの含有量を測定することは重要です。

AOAC (Association of Analytical Communities) 公式メソッド999.14には乳児用調合乳およびミルクに含まれるコリンの酵素比色法による測定が記載されています^{3,4}。またThermo Scientific Dionex Application Note (AN) 124では、イオンクロマトグラフィー(IC)による乳児用調合乳中のコリンの測定を紹介しています⁵。

このアプリケーションノートでは、サプレッサー式電気伝導度検出器と溶離液ジェネレーターを使用した、乳児用調合乳およびその他の食品(卵粉や大豆粉など)中のコリン測定におけるIC分析法についてご紹介します。サンプルの処理効率を上げるため、AN124よりもサンプルの前処理を改善した方法を示しています。さらにカラムを4 mm内径のThermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CG12A/CS12Aカラムから2 mm内径のDionex IonPac CG19/CS19カラムへ置き換えることにより、コリンピークの理論段数の向上、測定時間の短縮および溶離液の消費/排液量の低減が可能となります。

この方法は、ダイエタリーサプリメント品質評価プログラム(DSQAP)に参加している研究機関の一つである、アメリカ国立標準技術研究所(NIST)によって提供された脱脂大豆粉と全卵粉サンプルに対しても適用されています。この新しい手法は、食品サンプル中のコリン測定におけるAOAC Method 999.14に代わる、高感度で選択性の高い方法です。

装置

- Thermo Scientific Dionex ICS-5000システム*:
 - ポンプモジュール (DP/SP)
 - 溶離液ジェネレーター(EG)
 - 検出器/クロマトグラフィーモジュール (DC)
- Dionex AS-AP オートサンプラー
- Thermo Scientific Dionex Chromeleon™
クロマトグラフィーデータシステム (CDS) ソフトウェア

*このアプリケーションは、溶離液ジェネレーターを備えたDionex ICSシステムまたは手動調製溶離液によるDionex ICSシステムでも分析可能です。

試薬および器具

- ・超純水（比抵抗値18 MΩ cm以上）
- ・塩酸
- ・酒石酸水素コリン
- ・トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン [トリス]、ultra pure
- ・Arachis hypogaea（ラッカセイ）由来ホスホリパーゼD、II型
- ・ポリエーテルスルホン（PES）シリンジフィルター、5 mL、ルアー スリップ、滅菌済み
- ・キャップ付き遠心チューブ、ポリプロピレン製、15 mLまたは 50 mL

サンプル

Enfamil® PREMIUM® 乳児用調合乳

脱脂大豆粉および全卵粉（NIST提供）

分析条件	
カラム：	Dionex IonPac CS19、2×250 mm Dionex IonPac CG19、2× 50 mm
溶離液：	6.4 mM メタンスルホン酸（MSA） Dionex EGC III MSAカートリッジ Dionex CR-CTC IIトラップカラム
流量：	0.25 mL/min
試料注入量：	5 µL
サンプルトレイ温度：	10℃
検出器：	電気伝導度、 Dionex CSRS 300サブレッサー、2 mm

溶離液および標準液の調製

溶離液

Dionex EGC III MSA カートリッジより6.4 mM MSA溶離液を自動生成します。溶離液濃度の設定はChromeleon CDSソフトウェアからおこないます。

また手動調製によるMSA溶離液も使用することができます。約500 mLの超純水の入った1 Lメスフラスコに96.10 gのMSA試薬を加え、超純水でメスアップして1 Mの溶離液原液を調製します。6.4 mLの1M MSA溶離液原液を超純水で1 Lに希釈して、6.4 mMのMSA溶離液を調製します。

標準原液

・コリン標準原液（1000 mg/L）

約6～10 gの酒石酸水素コリンを102℃にて重量が安定するまで乾燥します。1.046 gの乾燥済み酒石酸水素コリンを正確にはかりとり、500 mLの超純水に溶解させて、1000 mg/Lの標準原液を調製します。この標準原液は4℃の冷暗所に保管した場合、一週間安定です。

・添加回収試験用コリン標準原液（20,000 mg/L）

4.184 gの乾燥済み酒石酸水素コリンを100 mLの超純水に溶解します。

検量線用標準液

検量線用標準液は、測定日毎に1000 mg/L標準溶液を超純水で希釈して調製します。

1 M塩酸

909.7 mLの超純水に、高純度グレードの塩酸90.3 mLを静かに加えて混合します。

50 mM トリス緩衝液

6.057 gのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン [トリス]を約900 mLの超純水の入った1 Lのメスフラスコにはかり入れます。トリスを溶解し、約28 mLの1 M塩酸を加えてpHを8.0に調節します。超純水でメスアップして最終容量を1 Lにします。

サンプル調製および抽出

乳児用調合乳

- ・ 5 gの乳児用調合乳の粉末をキャップ付き50 mL 遠心チューブにはかりとります。
- ・ 30 mLの1 M塩酸を加えてキャップを取付けた後、拡散するまでよく振り混ぜます。
- ・ 遠心チューブを1時間ごとに振り混ぜながら、70℃の水浴で3時間加熱します。加熱の初期段階で時々キャップを緩めるか取り外し、遠心チューブの圧力が過剰に上がらないようにします。
- ・ 室温まで冷却します。
- ・ 加水分解されたサンプル溶液を0.2 µm PESシリンジフィルターでろ過します。
- ・ ろ液の3 mLを100 mLのメスフラスコに移し、超純水でメスアップして分析に用います。この溶液は4℃で3日間保存可能です。

卵粉

- ・ 200 mgの卵粉をキャップ付き15 mL遠心チューブにはかりとります。
- ・ 10 mLの1 M塩酸を加えてキャップを取付けた後、拡散するまでよく振り混ぜます。
- ・ その後の調製手順は、ろ液2 mLを100 mLメスフラスコに移し入れること以外、乳児用調合乳の場合と同様です。

大豆粉

- ・ 400 mgの大豆粉をキャップ付き15 mL遠心分離機にはかりとります。
- ・ その後の調製手順は、ろ液0.5 mLを100 mLメスフラスコに移し入れること以外、卵粉の場合と同様です。

ホスホリパーゼD処理液の調製

- 150 unitsのホスホリパーゼDを50 mMトリス緩衝液200 mLに溶解します [ホスホリパーゼD 1 unitは、30℃、pH5.6の環境下で、1時間当たり卵黄中のL- α -ホスファチジルコリンから1 μ molのコリンを遊離します]。
- 1.0 mLのホスホリパーゼD処理液を0.5 mLのサンプルろ液に添加します。これを15分間37℃で保ち、室温に戻します。

注：ホスホリパーゼD処理液は、塩酸による加水分解後もホスファチジルコリンとして残存する可能性のあるコリンを遊離します。また本アプリケーションで分析したサンプルにおいて、コリン含有量はホスホリパーゼD処理の有無にかかわらず同じでした。

添加回収試験用サンプルの調製

乳児用調合乳

20,000 mg/L添加回収試験用コリン標準液450 μ Lを5 gの乳児用調合乳サンプルそれぞれに添加し、前述のサンプル調製および抽出手順に従って処理してください。コリン添加濃度は最終希釈液で9 mg/Lです。

卵粉

20,000 mg/L添加回収試験用コリン標準液150 μ Lを200 mgの卵粉サンプルそれぞれに添加し、前述のサンプル調製および抽出手順に従って処理してください。コリン添加濃度は最終希釈液で6 mg/Lです。

大豆粉

20,000 mg/L添加回収試験用コリン標準液を2倍希釈して10,000 mg/Lコリン標準液を調製します。次に10,000 mg/Lコリン標準液100 μ Lを400 mgの大豆粉サンプルそれぞれに添加し、前述のサンプル調製および抽出手順に従って処理してください。コリン添加濃度は最終希釈液で0.5 mg/Lです。

再現性

コリンのピーク面積における日内再現性は、各食品サンプルについてそれぞれ3検体A、B、Cを準備し、それぞれコリンを抽出した後、繰り返し5回測定して平均を求めました。

結果と考察

サンプル調製

遊離コリンは水に可溶であり、食品から容易に抽出することができます。しかし総コリンは、エステルの加水分解により結合コリンからコリンを遊離して測定します。

本アプリケーションでは、食品サンプルからコリンを抽出するために塩酸を使用しました。酸分解後、加水分解されたサンプル溶液を0.2 μ m PESシリンジフィルターに通してろ過しました。PESシリンジフィルターはコリンの吸着がないため、これらのサンプルのろ過に適しています。またこのフィルターはAN 124で使用したろ紙と比較して、短時間でろ過することができます。コリンは光と熱に敏感なため^{3,4}、サンプル調製時間の短縮は分析の精度と再現性を高めます。

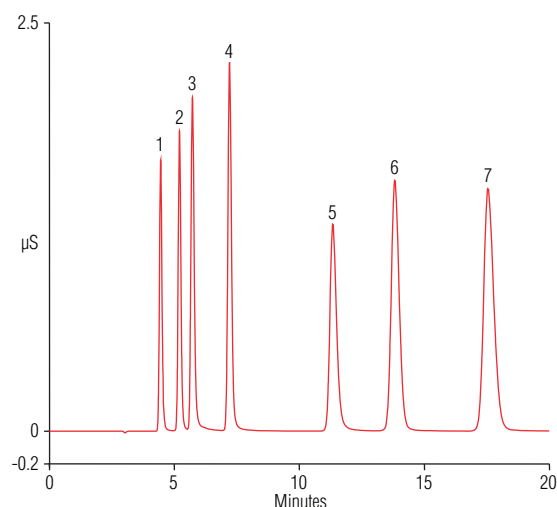
分離

AN124で用いた手動調製した硫酸溶離液を、溶離液ジェネレーターで自動生成したメタンスルホン酸溶離液へ変えることにより、溶離液の調製作業の短縮や調製ミスおよび溶離液への汚染を防ぐことができます。また超純水ブランクの測定により、コリンを妨害する他のイオンは存在しないことを確認しています。

AN124で使用されたDionex IonPac CS12Aカラムと比較して、今回使用したDionex IonPac CS19カラムは疎水性のアミンに対して選択性があり、そのためコリンピークの理論段数が高くなります。また分析時間もAN124では25分であったのに対して、Dionex IonPac CS19では20分以内と短縮されました。**図1**に10 mg/Lコリンおよび6種の一般陽イオン混合標準液のクロマトグラムを示します。各成分の分離およびコリンのピーク形状は良好です。

図1：10 mg/Lコリンと6種の一般陽イオンの分離

Columns:	Dionex IonPac CG19 and CS19, 2 mm	Peaks:	1. Lithium	0.25 mg/L
			2. Sodium	1.00
Eluent Source:	Dionex EGC III MSA cartridge with CR-CTC II trap column		3. Ammonium	1.25
Eluent:	6.4 mM MSA		4. Potassium	2.50
Flow Rate:	0.25 mL/min		5. Choline	10.00
Inj. Volume:	5 μ L		6. Magnesium	1.25
Detection:	Suppressed conductivity, Dionex CSRS™ 300 suppressor, 2 mm, 4 mA, recycle mode		7. Calcium	2.50



直線性、定量限界、検出限界

検量線の直線性を確認するために、コリン濃度0.5 - 50 mg/Lの範囲で7点検量線（各検量点は繰り返し5回測定）を作成しました。この結果、検量線の決定係数 (r^2) は0.9999でした。また検出限界 (LOD)と定量限界 (LOQ)を算出するために、ピークが検出されていない1分間のベースラインからPeak-to-Peakでノイズを測定しました。本メソッドのベースラインノイズは0.1 nSであったため、コリンのLODは約2.3 µg/L (S/N [シグナルノイズ比]=3)、LOQ は約7.7 µg/L (S/N=10)でした。

サンプル分析

U. S. FDA (Food and Drug Administration) 規制では乳児用調合乳中で最低限7.0 mg/100 Calのコリンが求められています⁶。本アプリケーションにおける乳児用調合乳中に存在するコリンの総量は35 mg/100 Calで、乳児用調合乳/パッケージラベル表示のコリン値 (24 mg/100 Cal) の146%に相当します。

[注:アメリカ/カナダの食品カロリー (カロリーまたは Cal) は1 kcalあるいは4.184 kJに相当します。]

全卵粉および脱脂大豆粉サンプル中のコリンの含有量はそれぞれ15.3 mg/gおよび3.13 mg/gでした。これらの測定値は卵粉で14.1 mg/g、大豆粉で2.49 mg/gという NISTで測定された報告値に近い値を示しています。

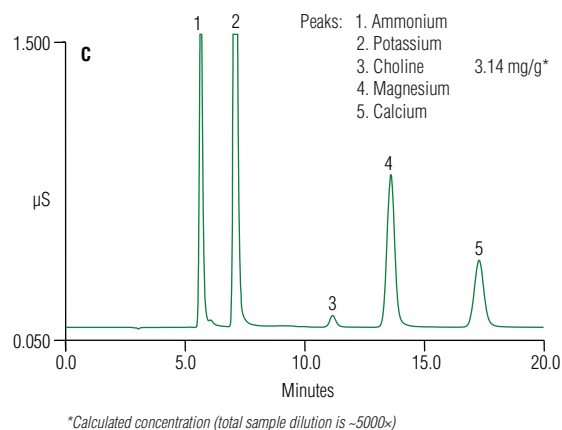
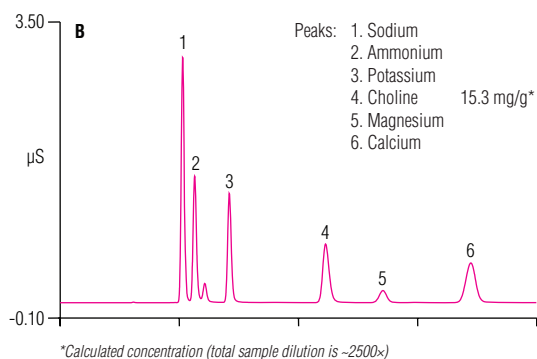
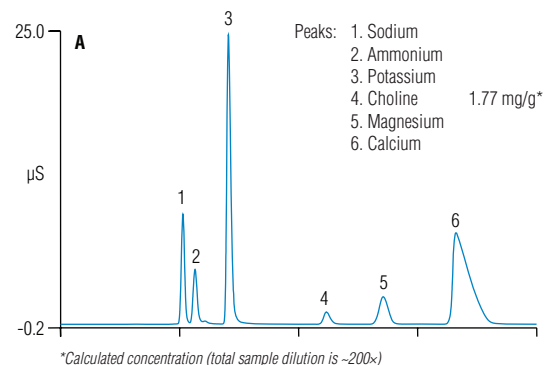
図2は、乳児用調合乳、卵粉および大豆サンプルのクロマトグラムです。コリンのピークは各サンプルに含まれる他の陽イオンと分離しています。

図2: A) 乳児用調合乳に含まれるコリンの測定

B) 卵粉に含まれるコリンの測定

C) 大豆粉に含まれるコリンの測定

Columns: Dionex IonPac CG19 and CS19, 2 mm
Eluent Source: Dionex EGC III MSA cartridge with CR-CTC II trap column
Eluent: 6.4 mM MSA
Flow Rate: 0.25 mL/min
Inj. Volume: 5 µL
Detection: Suppressed conductivity, Dionex CSRS 300 suppressor, 2 mm, 4 mA, recycle mode



測定精度

コリンの回収率を確認するために、既知量の添加回収試験用コリン標準液を各サンプルに標準添加しました。乳児用調合乳、卵粉および大豆粉サンプルの回収率は94～98%の範囲でした(表1)。表2は各食品サンプルにおける3検体A、B、Cの測定結果です。データは良好な測定精度を示しています。

表1：乳児用調合乳、卵粉および大豆粉に含まれるコリンの回収率

サンプル	サンプル含有量 (mg/L)	添加量 (mg/L)	測定値 (mg/L)	回収率 (%)
乳児用調合乳	8.82	9.01	17.3	93.7
卵粉	6.17	6.01	12.1	98.3
大豆粉	0.63	0.50	1.12	98.2

表2：乳児用調合乳、卵粉および大豆粉におけるコリンの測定精度

サンプル	サンプル濃度 (mg/g)				RSD (%)	コリン含有量 (mg/100 Cal) *	NIST**測定によるコリン含有量 (mg/g)
	サンプルA	サンプルB	サンプルC	平均			
乳児用調合乳	1.77	1.74	1.77	1.76	0.76	35.2***	—
卵粉	15.1	15.4	15.3	15.3	0.92	—	14.1
大豆粉	3.11	3.14	3.14	3.13	0.57	—	2.49

* 乳児用調合乳/パッケージラベル表示のコリンの値は24 mg/100 Calです。ラベル表示によると乳児用粉末5 gが25 Calに相当するため、サンプル中のコリン含有量は35.2 mg/100 Calになります。

** 標準参照物質(SRM) 3234大豆粉およびSRM 1845a全卵粉末中のコリン含有量は、DSQAPへの参加によりNISTから提供を受けた値です。

*** 35.2 mg/100 Cal=0.35 mg/kcal=0.084 mg/kJ

結 論

本アプリケーションは乳児用調合乳およびその他の食品サンプル中のコリン測定において、AN124をさらに改善したものです。コリンのような疎水性アミンの測定に最適化されたカラムを使用することにより、コリンピークの理論段数を高めています。また溶離液の調製を手動から溶離液ジェネレーターによる自動生成へ変えることにより、ICの操作が容易になり、またSN比も改善します。さらに前処理におけるサンプルろ過方法の変更により、分析時間の短縮も実現されました。

本アプリケーションで報告された諸結果は乳児用調合乳のラベル記載値およびNISTによる測定値に近く、コリン測定のその他の分析手法に対してICが有効な代替であることを明らかにしています。加えてICはナトリウム、アンモニウム、カリウム、およびその他の試料中に存在する陽イオンも同時測定が可能です。

参考文献

1. Phillips, M. M. Analytical Approaches to Determination of Total Choline in Foods and Dietary Supplements. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, 2103–2112.
2. *USDA Database Choline Content of Common Foods – 2004*; U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service: Washington, DC, 2004 [Online] www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Choline/Choline.html (accessed July 17, 2012).
3. *AOAC Official Method 999.14: Choline in Infant Formula and Milk Enzymatic Colorimetric Method*; Methodology for AOAC International: Gaithersburg, MD, 1999.
4. Woollard, D. C.; Indyk, H. E. Determination of Choline in Milk and Infant Formulas by Enzymatic Analysis: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2000**, 83, 131–138.
5. Dionex (now part of Thermo Scientific) Application Note 124: Determination of Choline in Dry Milk and Infant Formula. Sunnyvale, CA, 2002. [オンライン] www.dionex.com/en-us/webdocs/4208-AN124_LPN1054-01.pdf (accessed July 17, 2012).
6. *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act Sec. 412: Requirements for Infant Formulas*; U.S. Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, 2009 [オンライン] www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/3903b1_11.pdf (accessed July 18, 2012).

これは、Application Update 189を翻訳したものです。

©2012 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

- ここに記載されている商品名は、米国 Thermo Fisher Scientific およびその他の国における登録商標または商標です。
- ここに記載されている会社名、製品名は各社の登録商標または商標です。
- ここに記載の内容は、改善のために予告なく変更することがあります。
- ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

☎ 0120-753-670 FAX 0120-753-671

〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町3-9 C棟

〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-3-14 DNX新大阪ビル

E-mail: analyze.jp@thermofisher.com

www.thermoscientific.jp

E1302

Thermo
SCIENTIFIC

Part of Thermo Fisher Scientific