

## ノート

LCMSを用いたヤマトシジミに含まれるビタミンB<sub>12</sub>定量法の検討

永田 善明\*・秋吉 渚月\*\*・永瀬 光俊\*\*\*

## 1. 目的

島根県は宍道湖、神西湖という汽水湖を擁し、シジミ貝（ヤマトシジミ）の漁獲量は全国1位<sup>1)</sup>である。シジミ貝に特徴的な栄養素としてビタミンB<sub>12</sub>があり、その含有量は68 $\mu$ g/100gと生鮮食品中最も多い<sup>2)</sup>。ビタミンB<sub>12</sub>はヒトの体内で生合成することができないため、必要量を食品から摂取することになるが<sup>3)</sup>、その摂取基準量は成人で2.4 $\mu$ g/日<sup>4)</sup>とされ、Mサイズのシジミ貝（殻厚12-14mm、約2.8g/個、廃棄率75%）の場合、6個で充足できる計算となる。

ビタミンB<sub>12</sub>は、コバラミンを基本構造とする複数の化合物のうち、シアノコバラミン、ヒドロキソコバラミン、メチルコバラミン、アデノシルコバラミン等の人に対して活性を持つ化合物の総称で、定量分析では、KCN存在下でこれらを最も安定なシアノコバラミンとして抽出した後、分析に供する<sup>5)</sup>。食品に含まれるビタミンB<sub>12</sub>の定量法には、ビタミンB<sub>12</sub>要求性乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii sbsp.* (ATCC7830) の増殖量から定量する微生物学的定量法（以下、微生物法と略す）<sup>6-8)</sup> や HPLC 法<sup>8)</sup> がある。微生物法は、無菌操作が可能な培養設備と分光光度計があれば実施できること、高感度であることが特徴である。一方課題として、定量範囲が極めて狭く、濃度未知の試料の場合、測定値が検量線内に収まるよう複数の希釈試料を調製する必要があること、ヌクレオチド等にも反応して正の誤差を与えるため、アルカリ耐性因子としてそれらを差し引く必要があること、測定結果を得るまでに約48時間を要することから迅速性に劣ることが挙げられる。HPLC法はシアノコバラミンが高濃度で添加された錠剤、カプセル剤等に適用される<sup>8)</sup>が、生鮮食品の分析に用いるには感度が不十分である。これらに代わる方法として、LCMSを用いた定量法が分析機器メーカーより報告され<sup>9)</sup>、ビタミン強化食品に含まれるビタミンB<sub>12</sub>定量への適用例<sup>10)</sup>も報告されている。

そこで本報告では、微生物法とLCMS法の比較を中心に、より簡便な方法でヤマトシジミに含まれるビタミン

B<sub>12</sub>を定量する方法について検討した。

## 2. 試料および方法

## 2.1 試料および試薬

ヤマトシジミは市販のMサイズ（殻厚12-14mm）の活物を購入し、試験に供した。試薬は、高速液体クロマトグラフに用いるアセトニトリルにはシグマアルドリッチ製LCMSグレードを、それ以外の試薬については富士フィルム和光純薬製特級試薬を用いた。

## 2.2 検液の調製

ヤマトシジミからのビタミンB<sub>12</sub>定量用検液（以下、シジミ検液と称す）の調製は、文献<sup>6)</sup>を参考に一部改変し、次の方法で行った。ヤマトシジミの貝殻部分部分を破壊して殻を開き、殻から可食部を分離した。この可食部12-15gを50mLのホモジナイザーカップに入れ、エースホモジナイザーAM-7（日本精機製作所製）を用いて10000rpm、1分間の粉碎処理を行い、ペースト状にした。得られたペースト約1gを容量100mLのメジューム瓶に移し、0.57 mol/L 酢酸緩衝（pH 4.5）5mL、5mg/mL KCN 0.2mL、超純水20mLを加えて攪拌し、100℃30分間オートクレーブ処理した。オートクレーブ処理終了後、冷却した試料に超純水を加えて40mLに定容した。

2.3 微生物法によるビタミンB<sub>12</sub>の定量

微生物法によるビタミンB<sub>12</sub>の定量には、VitaFast Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) kit (r-biopharm社製、ドイツ、以下VitaFast kitと称す)を用いた。本キットは、96ウェルプレートに *Lactobacillus delbrueckii sbsp.* (ATCC7830) が植菌乾燥されたもので、ビタミンB<sub>12</sub>フリー培地、滅菌水、シアノコバラミン標準液が添付されている。試験は添付マニュアルに従い、各ウェルに標準液およびシジミ検液を加えて48時間培養後、1420ARVOsx マイクロプレートリーダー (Wallac社製)を用いて595nmの吸光度を測定した。

## 2.4 LCMSによるシアノコバラミンの定量

シアノコバラミンの定量に用いたLCMS装置の条件を表1に示す。分析条件は文献<sup>9)</sup>を参考に一部改変した。なお、グラジエントプログラムにおける溶離液比は体積分率(%)で示した。

\* 食品技術科（現：副所長）

\*\* 農林水産素材加工科（現：生物応用科）

\*\*\* 生物応用科（現：企画調整スタッフ）

表1 LCMS 装置によるシアノコバラミンの定量条件

HPLC 装置	1100 (Agilent technologies 社製)
カラム	Schelzo SM-C18 3 $\mu$ m 4mm $\times$ 150mm (Imtakt 社製)
カラムオープン温度	40 $^{\circ}$ C
移動相	A : 1mL/L ギ酸, 5mmol/L ギ酸アンモニウム B : アセトニトリル
グラジェントプログラム	0min A : 95 %, B : 5% -18min A : 50%, B : 50%
移動相流量	0.2mL/min
サンプル注入量	10 $\mu$ L
MS 装置	LCQ DecaXP (ThermoQuest 社製)
イオン化モード	Positive ESI
イオン源温度	250 $^{\circ}$ C
ESI 電圧	5.5kV
スキャン範囲	$m/z$ 400-1500

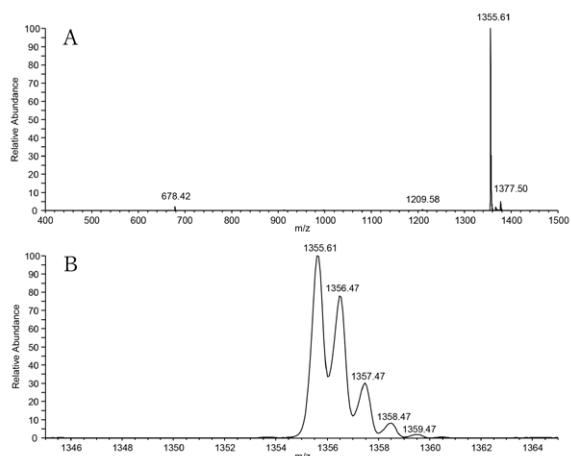


図1 シアノコバラミンの質量スペクトル

A : スキャン範囲  $m/z=400-1500$ , B :  $m/z=1345-1365$  の拡大

### 3. 結果および考察

#### 3.1 LCMS分析におけるシアノコバラミンの質量スペクトル

本実験に用いた質量分析装置 DecaXP によるシアノコバラミンの質量スペクトルを図1に示す。  $m/z=1355.61$  を最大ピークとして 1359.47 までのピークが確認できる。安定同位体比から計算されるシアノコバラミンの分子量は、存在比の高い順に 1354.57, 1355.57, 1356.57, 1357.58, 1358.59 であり、平均分子量は 1355.38 である。このことから、本報告の装置条件の場合、フラグメントイオンはほとんど生じず、元分子にプロトンが付加された  $[M+H]^+$  の一価イオンが検出されているものと考えられる。

次に、高感度定量分析を行うための、シアノコバラミンの MS/MS 条件を検討した。DecaXP の質量分析部は四重極、オクタポールコリジョンセル、イオントラップの3領域から成り、MS/MS 測定においては四重極で質量フィルタリングを行い、通過したプリカーサーイオンをコリジョンセルで開裂させ、生じたプロダクトイオンをイオン

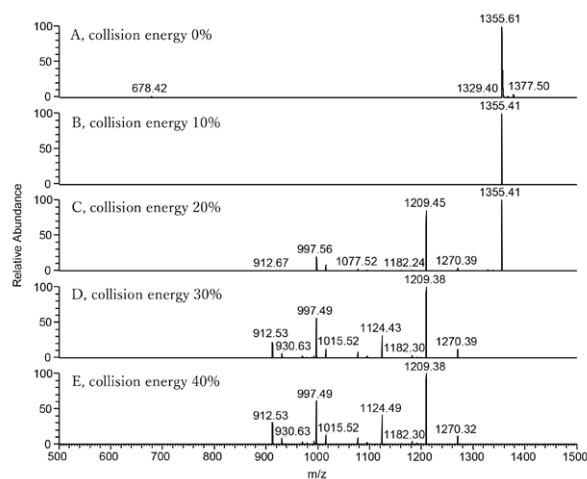


図2 コリジョンエネルギーを変化させた時のプロダクトイオンの質量スペクトル

A : 0%, B : 10%, C : 20%, D : 30%, E : 40%

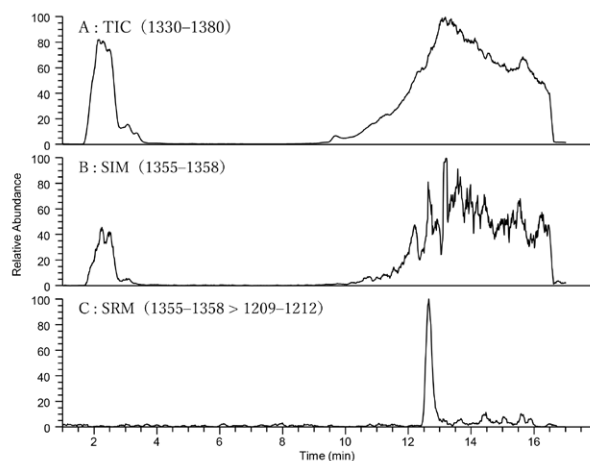


図3 LCMSによるシアノコバラミンのクロマトグラム

A : TIC, B : SIM, C : SRM

ラップによりスキャンする機構となっている。図2にコリジョンセルにおけるコリジョンエネルギーを変化させた時の、シアノコバラミンのプロダクトイオンスペクトルを示す。図2Dに示すように、コリジョンエネルギー 30%においてプリカーサーイオン  $m/z=1355$  が消失し、プロダクトイオン  $m/z=1209$  が最も強いピークとして現れたため、この条件を分析に用いることとした。図3に、シジミ検液(シアノコバラミン含有量約 50 $\mu$ g/L) を LCMS で分析した際の TIC (total ion chromatogram,  $m/z=1330-1380$ ), SIM (selected ion monitoring,  $m/z=1355-1358$ ) および SRM (selected reaction monitoring,  $m/z=1355-1358>1209-1212$ ) の各クロマトグラムを示す。SRMにより、実試料においてもバックグラウンドの低いクロマトグラムが得られることが示された。このことから、以降の LCMS 分析においては SRM ( $m/z=1355-1358>1209-1212$ ) を定量に用いた。

#### 3.2 微生物法とLCMS法によるシアノコバラミン検量線の比較

図4に、微生物法によるシアノコバラミンの検量線を示す。微生物法による検量線は式(1)に示すシグモイド関数で

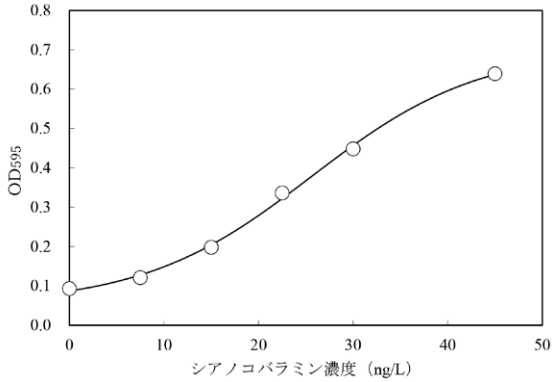


図4 VitaFast Kitによるシアノコバラミンの検量線

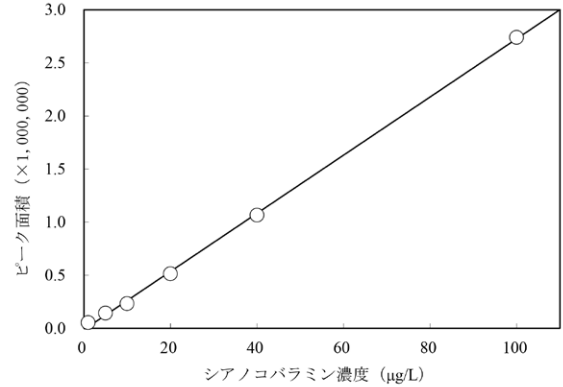


図6 LCMSによるシアノコバラミンの検量線 (1-100 μg/L)

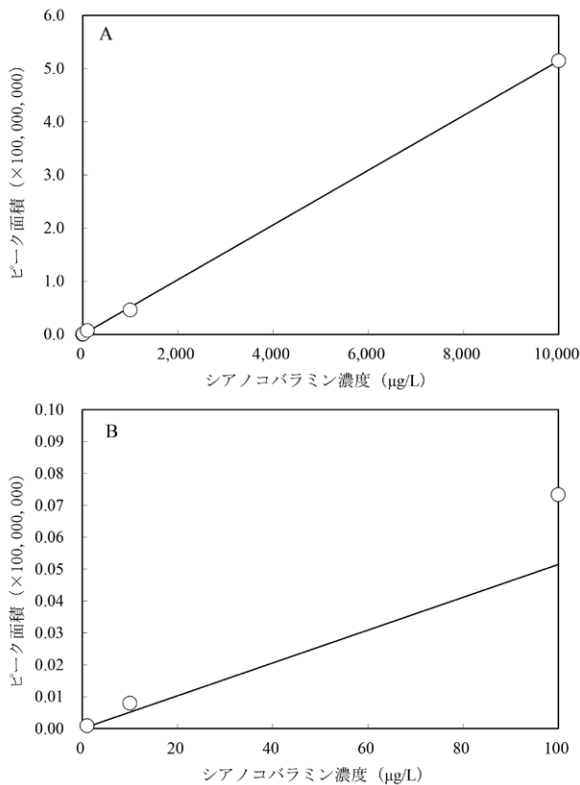


図5 LCMSによるシアノコバラミンの検量線 (1-10000μg/L)

A: 全体図, B: シアノコバラミン濃度 100μg/L 以下領域の拡大図

近似した。

$$y = \frac{a}{1 + \exp(ab(c-x))} + d \quad (1)$$

VitaFast kitによる検量線の範囲は検液中のシアノコバラミン濃度として7.5-45 ng/Lである。

図5, 図6に, LCMSによるシアノコバラミンの一次関数近似による検量線を示す。図5は1-10000μg/Lの範囲で検量線を作成したもので, Aは全体図, Bは100μg/L以下の領域を拡大した図である。原点を通過させて一次関数近似をした場合,  $R^2=0.9999$ だが100μg/L以下の低濃度領域においては図5Bのようにプロットと近似直線とのずれが生じている。そこで改めて1-100μg/Lの範囲で

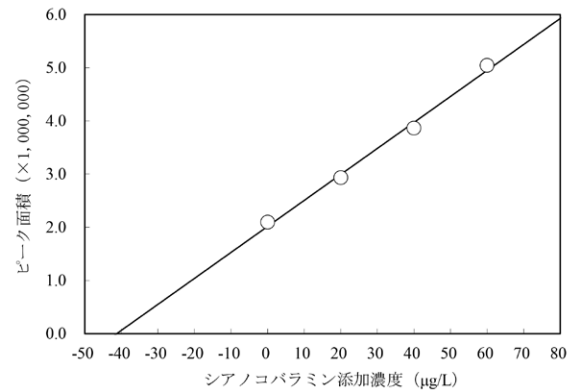


図7 標準添加法によるシジミ検液中のシアノコバラミン定量結果

表2 微生物法とLCMS法による同一検液の定量値 (μg/100g)

検液	微生物法	LCMS法	p値
シジミ検液A	56.9 ± 10.6	55.2 ± 2.4	0.799
シジミ検液B	57.9 ± 8.5	64.2 ± 1.3	0.276
シジミ検液C	55.2 ± 16.7	56.3 ± 3.6	0.918

n=3, 平均値 ± S.D.

検量線を作成したところ(図6),  $R^2=0.9993$ , 定量下限値1.495μg/L (n=8, 10σ)であった。定量濃度範囲について, 微生物法では前述のとおり7.5-45ng/Lと極めて狭いが, LCMS法ではダイナミックレンジの狭いイオントラップ型質量分析装置を使ってなお $10^4$ であり, 検量点を適切に設定することにより広範な濃度領域において定量が可能であると見込まれる。よって希釈操作に伴う誤差の縮小や実験操作の効率化に効果があると考えられる。

### 3.3 マトリクス効果の検討

生体試料は糖, 脂質, タンパク質等の多くのマトリクスを含むため, LCMS法の場合, これらが定量値に影響を及ぼす可能性がある<sup>11)</sup>。そこでマトリクスが定量値に与える影響について検討するため, 同一のシジミ検液を検量線法, 標準添加法の2法を用いて定量を行った。標準添加法によるプロットを図7に示す。標準添加法において検液に20, 40, 60μg/Lとなるようシアノコバラミンを添加して定量を行った結果, 検量線法において定量値41.7μg/L

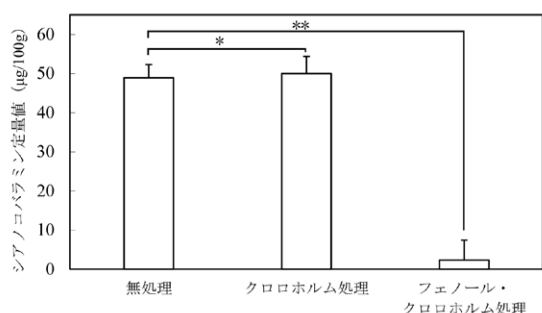


図8 クロロホルム、およびフェノール・クロロホルム処理によるシアノコバラミン定量値

n = 3, 平均値 ± S.D., \**p* = 0.755, \*\**p* = 0.000

であった試料に対し、標準添加法による定量値は  $41.9\mu\text{g}/\text{L}$  とほぼ一致した。このことから、シジミ抽出液の分析においては、シアノコバラミンに対するマトリクス効果の影響は小さいものと考えられた。

### 3.4 微生物法とLCMS法による同一検液の定量値の比較

同一時期に購入したシジミをA, B, Cの3グループに分け、2.2項の方法により各々調製した3種のシジミ検液について、それぞれを微生物法及びLCMS法で定量した結果を表2に示す。ヤマトシジミに含まれるビタミン B<sub>12</sub> が食品標準成分表に記載されている  $68\mu\text{g}/100\text{g}$  であると仮定した時、検液中のビタミン B<sub>12</sub> 濃度は  $17\mu\text{g}/\text{L}$  と想定されるため、各試験の検量線範囲に合わせ、微生物法では検液を1000倍に希釈し（想定される検液中のビタミン B<sub>12</sub> 濃度  $17\text{ng}/\text{L}$ ）、LCMS法では検液を孔径  $0.22\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過後、そのまま試験に供した。各検液によるヤマトシジミ中のビタミン B<sub>12</sub> 定量値は微生物法、LCMS法ともに概ね  $55\text{--}65\mu\text{g}/100\text{g}$  の範囲であり、食品標準成分表に示される含有量に近い値であった。またt検定の結果、有意水準0.05で微生物法とLCMS法の定量値に有意差は認められなかったが、微生物法はLCMS法と比較してデータのばらつきが大きかった。

以上の結果から、ヤマトシジミに含まれるビタミン B<sub>12</sub> (シアノコバラミン) の分析において、LCMS法は微生物法に代わる定量法として利用できるものと考えられる。検液調製後に結果取得に要する時間は、LCMS法の場合1検体あたりの測定サイクル時間は約30分であり、結果取得までに48時間を要する微生物法と比較した時、検体数が少ない場合にはより短時間で結果取得が可能である。また48時間ではおよそ90検体のデータを取得することができる。3.2項に述べたとおり、微生物法では検量線範囲が極めて狭いため、検液の希釈率が不適切だった場合は希釈系列の再調製と培養でさらに48時間を要することになる。

### 3.5 夾雑成分の除去法の検討

試料に含まれるタンパク質、脂質は、LCMS分析において分析カラムや配管の汚染原因となるため、夾雑成分を簡易に除去する方法について検討した。2.2項で調製した

抽出液について、核酸精製に用いられるフェノール・クロロホルム法<sup>12)</sup>を参考に除タンパク質、脱脂を行い、無処理の抽出液とシアノコバラミンの定量値を比較した。試験法は次の通りである。定容した試料溶液5mLを15mLコニカルチューブに移し、5mLのフェノール・クロロホルム溶液(1:1)またはクロロホルムを加えて激しく振とう後、小型冷却遠心機3700型(久保田製作所製)を用いて12000rpm, 5°C, 5分の遠心分離を行い、上清部分を回収した。回収した上清に再度5mLのクロロホルムを加えて同様に振とう、遠心分離し、得られた上清部分をシアノコバラミンの定量分析に供した。結果を図8に示す。定量値はクロロホルム処理 ( $49.9 \pm 4.4\mu\text{g}/100\text{g}$ ) と無処理 ( $48.9 \pm 3.4\mu\text{g}/100\text{g}$ ) の間にt検定による有意差(有意水準0.05)は認められなかった。一方、フェノール・クロロホルム処理 ( $2.3 \pm 5.1\mu\text{g}/100\text{g}$ ) では定量値が大幅に低下した。このことから、クロロホルムによる脱脂処理は定量値に影響を与えないが、フェノール・クロロホルム処理は定量値に影響を及ぼすため不適であることが示された。

## 文 献

- 1) 農林水産省. 海面漁業生産統計調査 / 確報 令和5年漁業・養殖業生産統計 都道府県別・魚種別漁獲量, 2025-10-17. [https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen\\_gyosei/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/index.html), (参照 2025-10-17).
- 2) 文部科学省. 日本食品標準成分表(八訂)増補2023年 第2章, 科学技術・学術審議会資源調査分科会報告. [https://www.mext.go.jp/a\\_menu/syokuhinseibun/mext\\_00001=012.xlsx](https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_00001=012.xlsx) (参照 2025-10-27).
- 3) 糸川嘉則. 代替医療としての「ビタミン・ミネラル」. 日本補完代替医療学会誌. 2004, vol. 1, no. 1, p. 41-52.
- 4) 厚生労働省健康・生活衛生局健康課栄養指導室. ⑤ビタミン B<sub>12</sub>. 日本人の食事摂取基準(2025年版)策定検討会報告書. 2024-10-11. p. 203-206. [https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage\\_44138.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_44138.html) (参照 2025-10-27).
- 5) 渡邊文雄. 食品分析と臨床検査のビタミン B<sub>12</sub> 測定法. ビタミン. 2011, vol.85, no.5+6, p. 291-297.
- 6) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会 編. 日本食品標準成分表2020年版(八訂)分析マニュアル. 29. ビタミン B<sub>12</sub> (コバラミン類). 2025, p. 153-157.
- 7) 日本薬学会 編. 衛生試験法・注解2010. ビタミン B<sub>12</sub> (コバラミン類). 金原出版, 2010, p. 255-256.
- 8) 食品表示基準 別表第9の第3欄 別添 栄養成分等の分析方法等. 29 ビタミン B<sub>12</sub>. 平成27年内閣府令第10号. 2015, p. 150-154.
- 9) LCMS-2020を用いた両イオン交換性カラムによる水溶性ビタミンの分析. 島津アプリケーションニュース. 2009, No.C70, 島津製作所分析計測事業部応用技術部.
- 10) Baiyi Lu, Yiping Ren, Baifen Huang, Wenqun Liao, Zengxuan Cai and Xiaowei Tie. Simultaneous determination of four water-soluble vitamins in fortified infant foods by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. Journal of Chromatographic Science. 2008, vol. 46, p.225-232.
- 11) 望月直樹. 食の安全におけるLCMS/MS分析の問題点. 薬学雑誌. 2011, vol. 131, no. 7, p. 1019-1025.
- 12) 藤本明子, 大杉美穂, 山本雅. “核酸の調製”. バイオマニュアルシリーズ1 遺伝子工学の基礎技術. 山本雅 編. 羊土社, 1993, p. 19-76.