

8. 固相による簡易・迅速な脂溶性ビタミン抽出法の検討

大分家畜保健衛生所

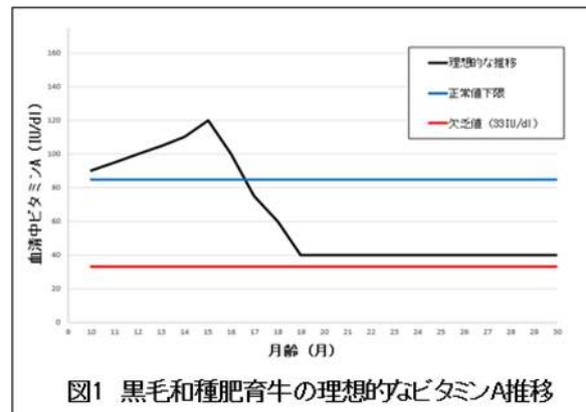
○病鑑 手塚溪

【はじめに】

ビタミンとは、生理機能の維持に必要であるが、体内で合成されないあるいは合成量が微量な必須脂肪酸以外の有機化合物の総称である。その溶解性により水溶性と脂溶性に分類され、摂取不足により典型的な欠乏症を生じるが、蓄積性の高い脂溶性ビタミンでは過剰症も起こることが知られている（表1）。

前述のとおり、ビタミンは生理機能の維持に欠かせないものだが、ビタミンAの代謝産物は脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化を抑制することが知られており、良好な脂肪交雑により肉質向上をはかる黒毛和種の肥育牛では、ビタミンAのコントロールが行われている（図1）。筋肉内脂肪細胞が最も増加する肥育中期にビタミンA給与量を制限することで、脂肪交雑量の向上を目指す取り組みである¹⁾。

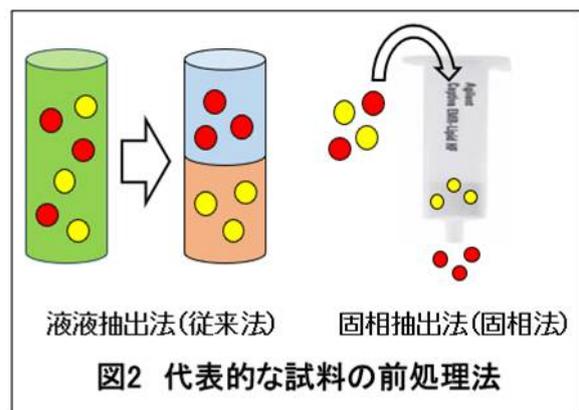
溶解性	分類	代表的な欠乏症、過剰症
脂溶性	A	夜盲症、皮膚障害、神経障害、ハイエナ病
	D	くる病・骨軟化症
	E	白筋症、マルベリー心臓病(豚)
	K	血液凝固系不全による出血や貧血
水溶性	B	多発性神経炎(馬)、大脳皮質壊死症(反すう)
	C	特になし



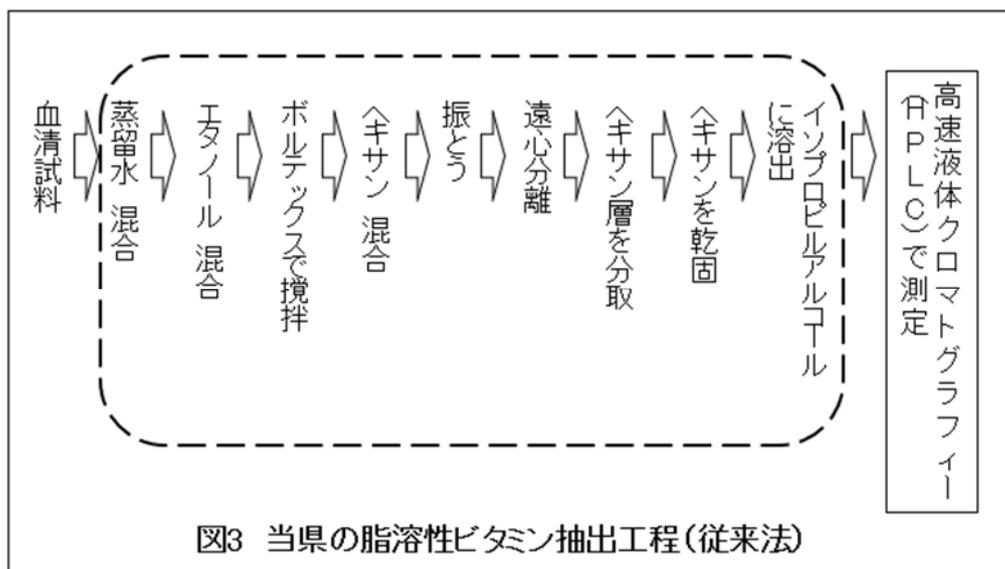
ビタミンAを適切に制限すると脂肪交雑量の向上が期待できる一方で、ビタミンAが欠乏すると、様々なデメリットが生じる。当県ではこのようなビタミンAコントロールの一助となるように、肥育農場の生産性向上を目的としたビタミンA検査を実施しているが、その数は年間約1500検体にのぼり、検査時間の大半を占める。昨今、様々な要因により家畜保健衛生所の業務効率化が喫緊の課題となっており、ビタミンA検査時間の短縮は、生化学検査業務の大幅な効率化に直結することから、ビタミンA検査の簡易・迅速化を試みた。

当県では、脂溶性ビタミン検査の試料となる血清の前処理に液液抽出法を採用してきた（以下、従来法とする）。従来法は多成分混合系から溶媒に可溶性成分を分離する方法で、優れた試料のクリーンアップ効果がある一方、多くの作業工程、時間を必要とし、作業者

の習熟も必要である。固相抽出法は様々な性質を持つ固相を用いて液体試料から目的成分を分離する方法（以下、固相法とする）であり、固相に混合した試料を通すだけなので、作業が簡易で、作業者の習熟度による差が出にくい（図2）。また適切な固相の選択により迅速・高精度な抽出が可能で、残留医薬品や、PFASの検査など、様々な分野で広く利用されている。



当県における、従来法による脂溶性ビタミン抽出工程は図3のとおりで、工程数が多く、20検体の前処理に約3時間を要し、抽出後のHPLC測定を加えると約7時間を要する。この抽出を固相法で行うことで、簡易・迅速化を検討した。



【材料】

固相法に使用する固相は、ビタミン標準物を抽出可能なことが報告されている²⁾アジレント社の Captiva EMR-Lipid を用いた。検討する脂溶性ビタミンは、当県で測定しているビタミンA、Eとし、ビタミン標準物は、ビタミンA : all-trans-Retinol (LKT)、ビタミンE : DL- α -Tocopherol (ナカライテスク) を用いた。試薬はアセトニトリル (和光純薬)、エタノール (和光純薬) を用いた。抽出する試料は、黒毛和種繁殖および肥育牛の凍結保存血清とした。

【試験1：固相からビタミン標準物質の溶出に必要な洗浄回数と時間の検証】

固相からビタミン標準物質の溶出に必要な洗浄回数と、それに必要な時間の検証を行った。アプリケーションノート²⁾に従い、標準物質を2500 μ lの80%のアセトニトリル水溶液（アセトニトリル：蒸留水=80：20）に溶解し標準物質水溶液を作成、固相に負荷した。この標準物質全量が溶出されるまで、2500 μ lの80%アセトニトリル水溶液を固相に負荷した（固相の洗浄）。固相に負荷する前の標準物質水溶液の吸光度と、負荷・洗浄後の溶出液の吸光度をHPLCで測定、比較検証した。HPLCはWaters社HPLC（e2695セパレーションモジュール、2998PDA検出器、2475蛍光検出器）を用い、測定条件は表2に示した。

カラム	X bridge C18 5 μ m 4.6 \times 150mm (Waters 社)
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
移動相	エタノール：水=92：8
流速	1.0ml/min

ビタミンAは最低1回洗浄、ビタミンEは最低3回洗浄することで、標準物質全量が溶出された（表3）。標準物質水溶液の固相通過に約10分、80%アセトニトリル水溶液の固相通過に約10分かかるため、標準物質全量を溶出するのに必要な時間は、ビタミンAは約20分、ビタミンEは約40分と判明した。

測定内容	ビタミンA		ビタミンE	
	測定値平均 (Area)	溶出率※ (%)	測定値平均 (Area)	溶出率※ (%)
固相負荷前 標準物質水溶液	2,425,315	-	44,781,832	-
固相負荷後 標準物質水溶液	1,900,925	78	検出不可	検出不可
1回洗浄後水溶液	2,621,663	108	1,027,846	2
2回洗浄後水溶液	2,646,040	109	25,999,927	58
3回洗浄後水溶液	2,489,355	103	46,668,608	104
4回洗浄後水溶液	2,359,080	97	45,964,983	103

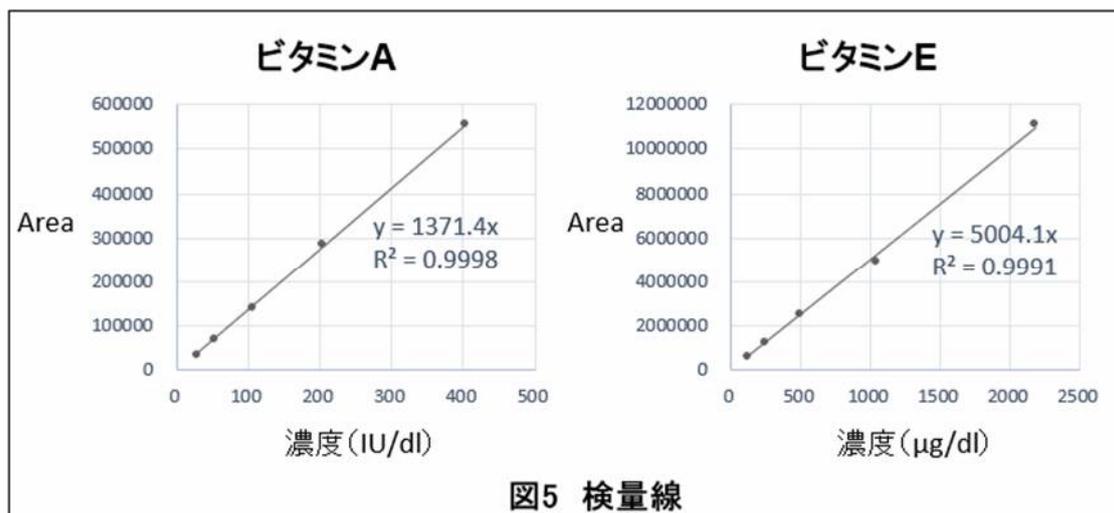
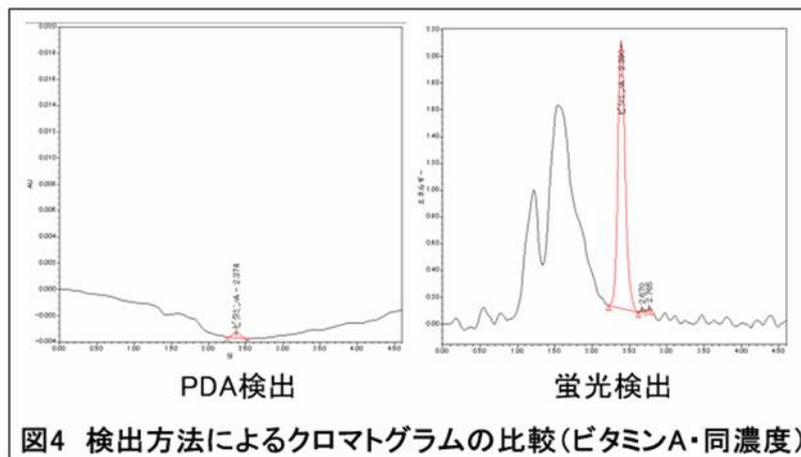
※溶出率= 負荷前Area/負荷・洗浄後Area

【試験2：検量線の作成】

標準物質を 100%アセトニトリルに溶解し、表 4 のとおり段階希釈液を作成した。この段階希釈液 500 μ l を、100%アセトニトリル 1500 μ l と混合後、蒸留水 500 μ l と混合して 80%アセトニトリル水溶液とした。

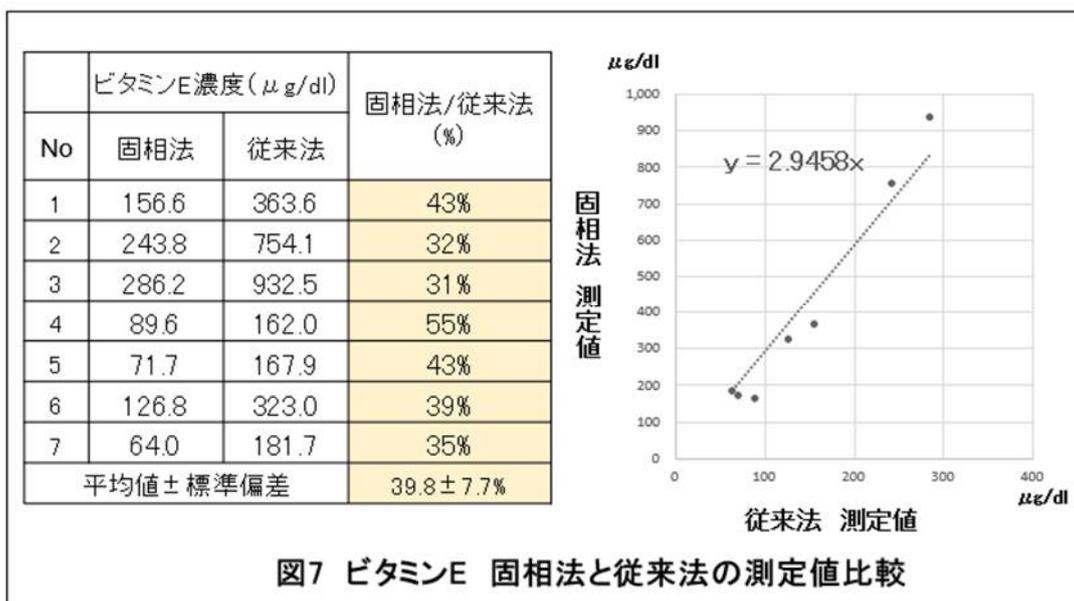
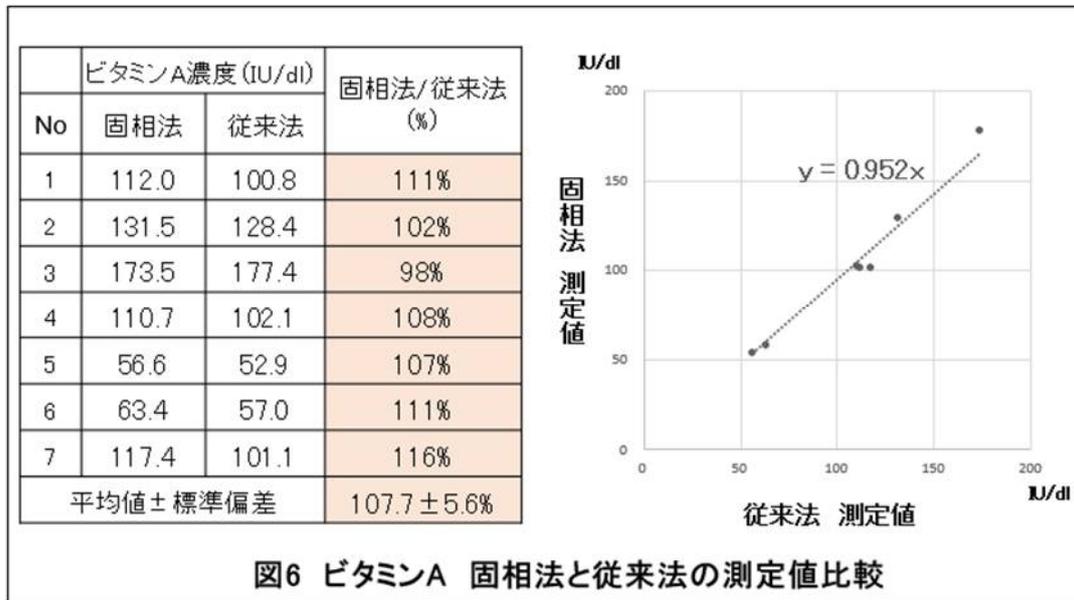
No	1	2	3	4	5
ビタミンA濃度 (IU/dl)	400	200	100	50	25
ビタミンE濃度 (μ g/dl)	2200	1000	500	250	125

混合した 80%アセトニトリル水溶液をそれぞれ固相に負荷し、ビタミンE が全量溶出される 3 回の洗浄後、溶出液を HPLC で測定し、ビタミンA、E について検量線を作成した。この際、従来法と比較して検体が抽出の過程で大幅に希釈されることから、PDA 検出器では良好なクロマトグラムが得られなかったため (図 4)、蛍光検出器で測定を行ったところ、ビタミンA、E ともに良好な検量線が得られた (図 5)。



【試験 3-1：血清試料を用いた固相法試験】

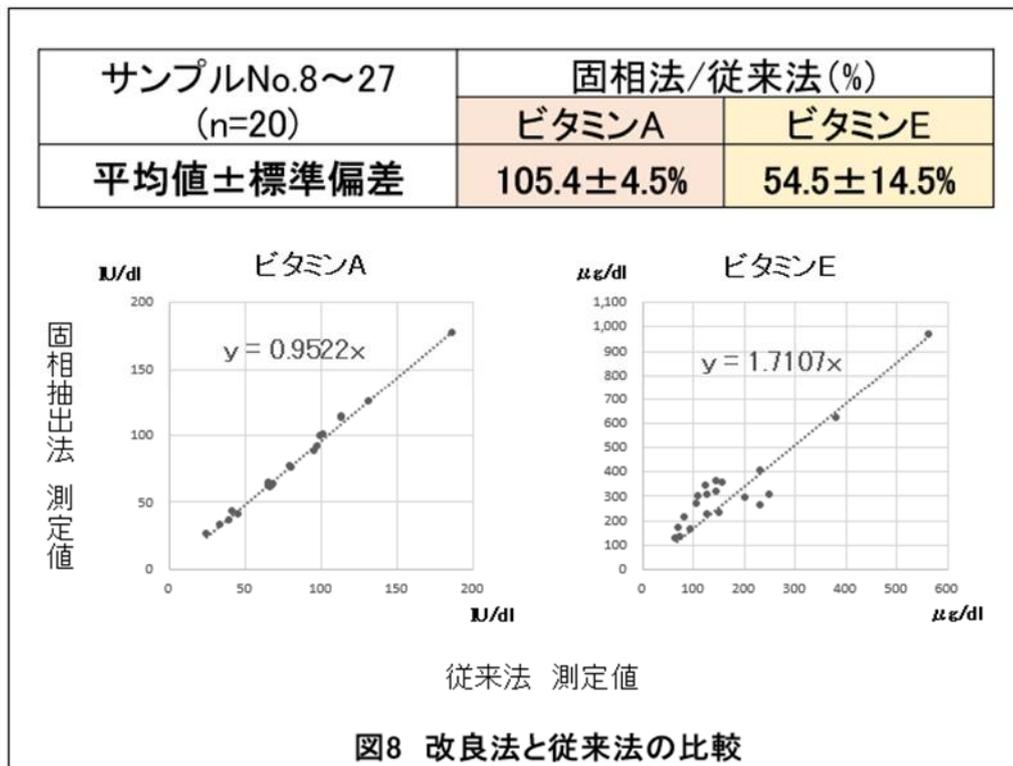
血清試料を用いた固相法を実施し、従来法の測定値と比較検証を行った。血清 500 μ l を 100%アセトニトリル 2000 μ l と混合、攪拌して 80%アセトニトリル混合液とし、4 $^{\circ}$ C、2000rpm、1 分の遠心分離後、上清全量を固相に負荷、その後 80%アセトニトリル水溶液 2500 μ l で 3 回固相を洗浄し、抽出液を HPLC で測定した。ビタミン A、E それぞれについて、従来法での測定値との比較を図 6、7 に示した。



ビタミン A について、固相抽出法と従来法の相関係数は 0.989 で、高い相関を示した。また従来法と比べ、固相抽出法は 1 割程度、測定値が高くなることが判明した。ビタミン E について、相関係数は 0.987 と高いものの、固相抽出法の測定値が従来法の 30~50%程度しかなく、血清中のビタミン E が十分に回収できていないことが判明した。ビタミン E の回収率を上げるため、前処理方法を検討した。

【試験 3-2：血清試料中ビタミン E 回収率の改良法検討】

ビタミンEの回収率が低い原因は、沈殿物中や試験管内にビタミンEが残留しているためだと推察された。そこで、試料とアセトニトリルを混合後に遠心分離をかけず、沈殿物ごと固相に負荷した。固相上に沈殿物が堆積したが、抽出中に固相が詰まることはなく、固相の通過時間もほとんど変化無かった。また、血清と100%アセトニトリルの混合に使用した試験管を80%アセトニトリル水溶液で洗い、残留したビタミンEの回収も試みた。その結果を図8に示した。



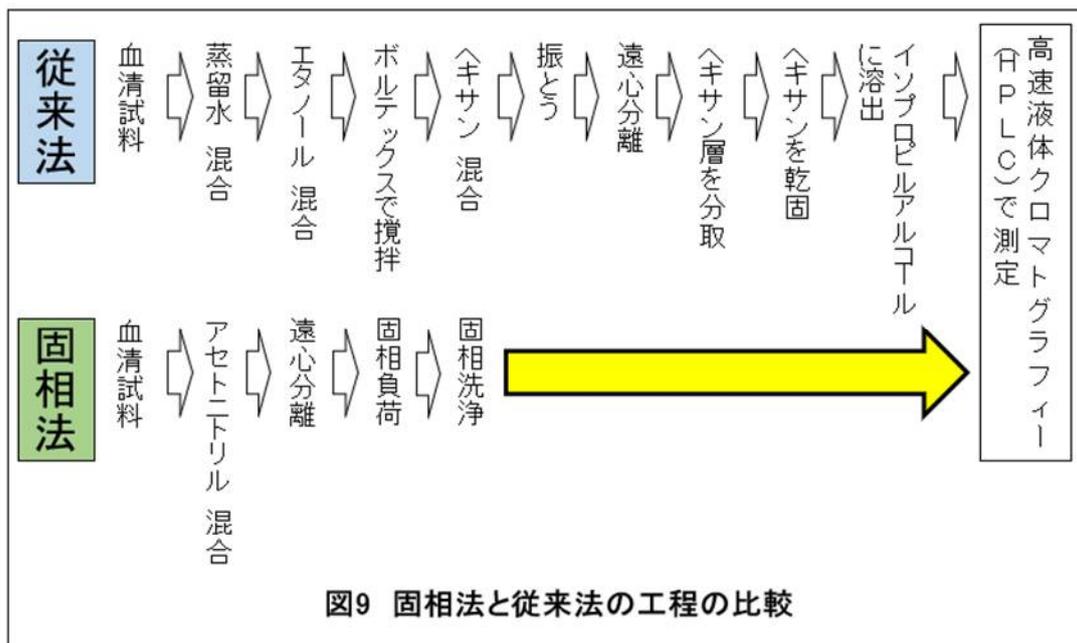
ビタミンAについてはほぼ変化が無く、高い相関を示した。ビタミンEについて、回収率は上昇したものの100%付近には到達せず、検体により回収率に幅が出たため、標準偏差が増加した。

【考察】

固相法では、ビタミンAの測定値が約1割増加したが、従来法と高い相関を示し、標準偏差も小さく検査精度は高かった。約1割増加した原因として、従来法では乾固の際に試料の加熱が必要で、その際にビタミンが一部失活していたことや、試験管からの分取等の作業中にビタミンが管内に残留していた可能性が考えられた。一方でビタミンEについて、従来法より測定値が低く、標準偏差が大きく安定していない結果となった。標準物質は100%回収できることから、試料中ビタミンEの溶媒への遊離が不十分であることや、沈殿物、試験管内への残留など、前処理法の問題であると考えられ、更なる検討が必要であると分かった。以上の結果から、脂溶性ビタミンのうち、ビタミンAについては今回の固相法で測定可能であることが判明した。

図9で示した通り、固相法は従来法と比較して工程が大幅に簡易化された。また、ビタミンAは1回の洗浄で全量が溶出するため、20検体の同時処理でも約40分で作業可能

で、従来法の3時間から大幅な時間短縮が可能となった。



また、検査におけるコストについて比較した（表5）。振とうや乾固の機材が不要な分、固相法の方が低い初期コストで実施可能と考えられた。一方で、消耗品として1検体につき1本の固相を使用するため、ランニングコストは増加した。今回、従来法と同量の試料で比較したため、容量の大きい固相を使用した方が、より低容量の固相の使用により1本あたりのコストを低下させることが可能である。また、多くのメーカーから様々な固相が販売されているため、より廉価な固相についても検討が必要だと考えられた。

	従来法	固相法
初期コスト (導入費用)	<ul style="list-style-type: none"> ・振とう機 ・乾固用機材 (ヒートブロック、ガス吹付装置等) ・ガス配管工事費 	<ul style="list-style-type: none"> ・固相保持装置 (マニホールド)
ランニングコスト	<ul style="list-style-type: none"> ・溶媒(エタノール、ヘキサン、イソプロピルアルコール) ・窒素ガス 	<ul style="list-style-type: none"> ・固相 ・溶媒(アセトニトリル)

試験の実施にあたり、的確なご助言、ご指導をいただきました、農業・食品産業技術総合研究機構、動物衛生研究部門の渡部真文様に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 大分肉用牛振興協議会、とよのくにマニュアル（改訂版）、2004年
- 2) アジレント・テクノロジー株式会社、Captiva EMR-Lipid および Bond Elut Lipid Extraction による脂溶性ビタミンの回収率比較 (<https://www.chem-agilent.com/appnote/pdf/LC-MS-202110YSSD-002.pdf>)、2021年