

## 資料

## 食品中のニコチン酸及びニコチン酸アミドの分析法の検証

河野 敏己, 井原 紗弥香

## Validation of Analytical Methods for Nicotinic Acid and Nicotinamide in Foods

KAWANO Toshiki, IHARA Sayaka

(Received: October 2, 2025)

ニコチン酸 (NA) 及びニコチン酸アミド (NAA) の分析法は第2版食品中の食品添加物分析法で定められており, 現在, 固相抽出を用いたHPLCおよびLC-MS/MSによる分析法の改正が検討されている. この検討法は, 食肉製品を対象とした検証がすでに行われているが, 食肉製品以外の食品を対象とした検証は十分に行われていない. 今回, 食肉製品以外の食品を対象に, 検討法の適用可否について検討を行った.

食肉製品以外の食品におけるNA及びNAAの妥当性確認試験の結果, 真度, 併行精度及び室内精度はすべて妥当性確認ガイドラインの目標値を満たしており, 今回検証した検討法は, 食肉製品以外の食品の分析においても適用可能であると考えられた.

Key words : ニコチン酸(NA), ニコチン酸アミド(NAA), 食品添加物, 妥当性確認, HPLC

## 結 言

食品添加物は, 保存料, 甘味料, 着色料, 香料など, 食品の製造過程または食品の加工・保存の目的で使用されている. 食品添加物は, 食品安全委員会による評価を受け, 人の健康を損なうおそれのない場合に限って, 成分規格や使用基準を定めたうえで, 厚生労働省により使用を認められている. 食品中の食品添加物の分析は, 使用基準の妥当性を検証するうえで重要である. 各試験機関で活用するため, 厚生労働省より「第2版食品中の食品添加物分析法」が通知されているが, 科学的知見に基づき, 分析法を適宜見直しする必要がある. また, 食品添加物の新規指定や使用基準改正に伴い, 新たな分析法設定のための検証・検討が必要で, 「第3版食品中の食品添加物分析法」の発行に向けた分析法案の検討が, 国立医薬品食品衛生研究所を中心に進められている[1].

食品添加物の一種であるNA及びNAAは, 生体内で糖質や脂質, たんぱく質などの代謝に関与しており, 栄養強化剤として利用されている. 一方で, 過剰添加により食中毒を起こした事例があり, 使用基準が定

められている. これまでにNA及びNAAの分析法について検討が行われ[2], 各試験機関等により食肉製品を対象とした検証が行われている. 今回, 食肉製品以外の食品を対象とした分析法の検討及び検証を行った.

## 方 法

## 1 試料

試料は, クリーミングパウダー, 清涼飲料水2品 (清涼飲料水①, 清涼飲料水②) とした.

## 2 試薬及び試液

## (1) 標準品

NA標準品, NAA標準品:富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた.

## (2) 試薬

メタリン酸, 酢酸, 25%アンモニア水:富士フィルム和光純薬株式会社製の特級を用いた.

酢酸アンモニウム:シグマアルドリッチジャパン合同会社製のLC-MS用を用いた.

アセトニトリル:関東化学株式会社製の高速度液体ク

ロマトグラフィー用及びLC-MS用を用いた。

メタノール:関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

逆相・陽イオン交換ミックスモードポリマーカートリッジカラム:ウォーターズ社製の容量6cc充填剤150mgのカラムを用いた。

ガラス繊維プレフィルター内蔵メンブランフィルター:グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社製を用いた。

### (3) 試液

4%メタリン酸:メタリン酸20 gに水を加えて溶かし、500 mLとした。

2%メタリン酸:メタリン酸20 gに水を加えて溶かし、1000 mLとした。

2%酢酸:酢酸2 mLに水を加えて100 mLとした。

酢酸・メタノール溶液:酢酸2 mLにメタノールを加えて100 mLとした。

アンモニア・メタノール溶液:25%アンモニア水20 mLにメタノールを加えて100 mLとした。

### 3 装置および分析条件

分析装置及び分析条件を表1に示した。

### 4 標準溶液の調製

NA及びNAAをそれぞれ0.100 g正確に量り取り、水を加えて溶かし、それぞれ正確に100 mLとし、標準原液とした(濃度1,000 µg/mL)。各標準原液2.5 mLを正確に量り取り、水を加えて正確に100 mLとし、希釈標準原液とした(濃度25 µg/mL)。希釈標準原液1, 2, 5, 10 mLをそれぞれ正確に量り取り、水を加えて正確に25 mLとし、検量線用標準溶液とした(濃度1, 2, 5, 10及び25 µg/mL)。

別にNA 0.100 g及びNAA 0.500 gを正確に量り取り、水を加えて溶かして正確に100 mLとし、添加回収試験用混合標準原液とした(NA濃度1,000 µg/mL及びNAA濃度5,000 µg/mL)。これを水で10倍に希釈し、添加回収試験用混合標準溶液とした(NA濃度100 µg/mL及びNAA濃度500 µg/mL)。

### 5 検量線

検量線用標準溶液10 µLをHPLCに注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。

### 6 定量

試験溶液10 µLをHPLCに注入し、検量線から絶対検量線法によりNA及びNAAの含有量を算出した。

表1 装置及び分析条件

装置(HPLC)	Agilent 1260 Infinity II
カラム	Scherzo SM-C18 (Imtakt製) (粒子径3 µm, 3 mm×150 mm)
流速	0.2 mL/min
注入量	10 µL
カラム温度	40 °C
移動相	0.1%酢酸含有0.02 mol/L酢酸アンモニウム溶液:アセトニトリル混液 (97:3)
検出波長	261nm
装置(LC-MS/MS)	Agilent 1290 Infinity II, Agilent G6470A
カラム	Scherzo SM-C18 (Imtakt製) (粒子径3 µm, 3 mm×150 mm)
流速	0.3 mL/min
注入量	1 µL
カラム温度	40 °C
移動相	0.1%酢酸含有0.02 mol/L酢酸アンモニウム溶液:アセトニトリル混液 (97:3)
イオン化モード	ESI (+)
ドライガス	N <sub>2</sub> , 250 °C, 10 L/min
キャピラリー電圧	3500 V
フラグメンター電圧	160 V

## 7 添加試料及び試験溶液の調製

試料10.0 gに添加回収試験用混合標準溶液 (NA 100 mg/L, NAA 500 mg/L) 1 mLを添加しよく混合した後, 30分間放置し, 図1に示した手順により試験溶液を調製した.

## 8 定量限界の算出

S/N比10程度の濃度の標準溶液を6回繰り返し測定した. 日本産業規格高速液体クロマトグラフィー通則[3]に基づき, 測定値の標準偏差に4.03を掛けた値を検出限界とし, 検出限界に5を掛けた値を定量限界とした.

## 9 妥当性確認の方法

クリーミングパウダー, 清涼飲料水①, 清涼飲料水②の3種類の試料について, 妥当性確認ガイドライン[4]に従い, 食品衛生検査指針[5]に示される定量限界相当の濃度として, NA 2 µg/mL, NAA 10 µg/mLとなるように添加用標準溶液を添加し, 分析者1名が2併行5日間分析を行った.

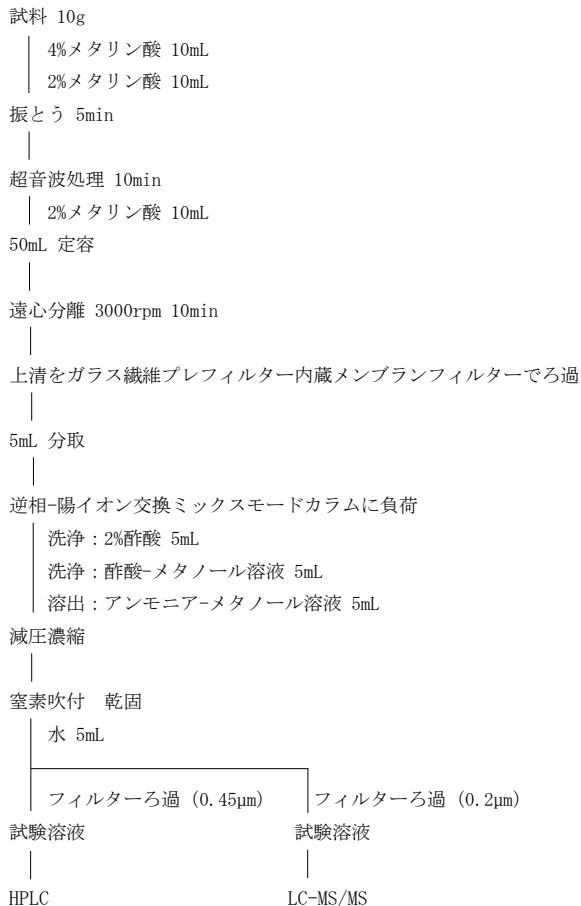


図1 試験溶液の調製法

## 10 LC-MS/MSによる確認

標準溶液 (10 µg/mL), クリーミングパウダー, 清涼飲料水①及び清涼飲料水②の3種類の試料の添加回収試験溶液を注入して, プロダクトイオンスキャン ( $m/z$  50~150, コリジョンエネルギー値: 5 V及び25 V) を行い, プロダクトイオンスペクトルを比較した.

## 結果及び考察

### 1 検量線

クロマトグラム (図2) のNA及びNAAのピーク面積値 (表2) を用いて, 絶対検量線法により検量線を作成した. 1~25 mg/Lの濃度範囲で, 検量線の相関係数は, 1.000の良好な直線性を示した.

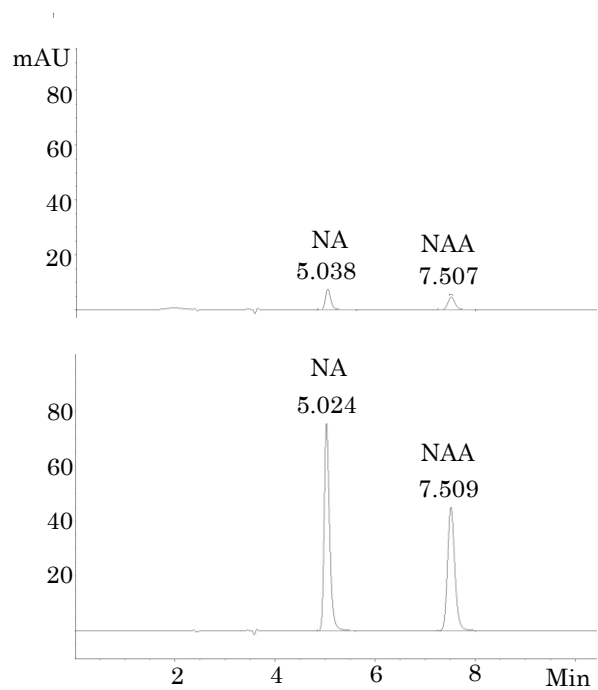


図2 検量線用標準溶液のクロマトグラム (上: 1 µg/mL, 下: 10 µg/mL)

表2 標準溶液の濃度及びピーク面積

濃度 (µg/mL)	NA	NAA
25	1409	1126
10	567	453
5	282	225
2	113	90
1	57	45

## 2 定量限界の算出

今回の検討において算出した定量限界は、NAは0.000110 g/kg、NAAは0.000142 g/kgであり、食品衛生検査指針[5]で示されるHPLCによる定量限界、NA 0.01 g/kg、NAA 0.05 g/kgを満たした。

## 3 妥当性確認試験

各ブランク試料及び標準溶液から得られたクロマトグラムを図3に示した。このクロマトグラムを基に、NA及びNAAのピーク出現位置の妨害ピークを確認した。清涼飲料①について、NAAのピーク出現位置に小さなピークが認められたが、定量限界相当濃度の1/10を大幅に下回っていることを確認した。これにより、各試料の選択性に問題がないことが確認された。

真値及び精度を一元配置分散分析による解析を行った結果を表3に示した。いずれの試料においても妥当性確認ガイドライン[4]の目標値である真度70～120%、併行精度<10%及び室内精度<15%を満たした。なお、ブランク試料において検出されたNA及びNAAについて、各添加試料における定量値は、ブランク試料の定量値を差し引いて求めた。

以上の結果から、NA及びNAAの今回検討した方法における妥当性が確認され、食肉以外の食品についても本法が適用可能であると考えられた。

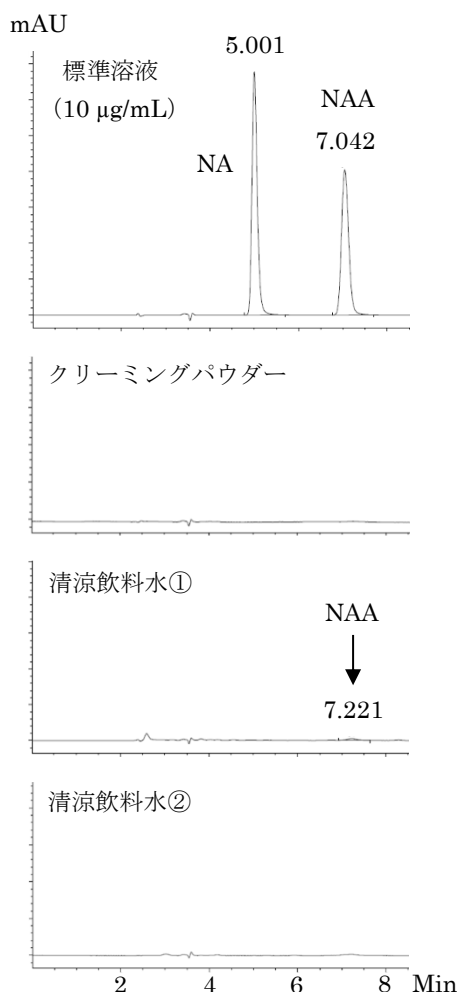


図3 標準溶液及び試料溶液のクロマトグラム

表3 妥当性評価結果

化合物名	クリーミングパウダー			清涼飲料水①			清涼飲料水②		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
NA	110.5	1.2	1.8	99.6	1.6	1.6	96.7	2.0	2.3
NAA	109.7	1.3	1.7	97.5	1.6	1.8	98.3	2.1	2.3

## 4 LC-MS/MSによる確認

標準溶液 (10 µg/mL) 及び各添加回収試験溶液のNA及びNAAのピークの保持時間は一致した。さらに、標準溶液 (10 µg/mL) 及び各添加回収試験溶液について、NA及びNAAの[M+H]<sup>+</sup>に該当する各イオン、m/z 124.0及びm/z 123.0をプリカーサーイオンとし、

コリジョンエネルギー5 V及び25 Vでプロダクトイオンスキャンを行ったところ、図4～7に示したプロダクトイオンスペクトルが得られ、試料溶液及び標準溶液のスペクトルは一致した。よって、LC-MS/MSによる定性が可能であることを確認した。

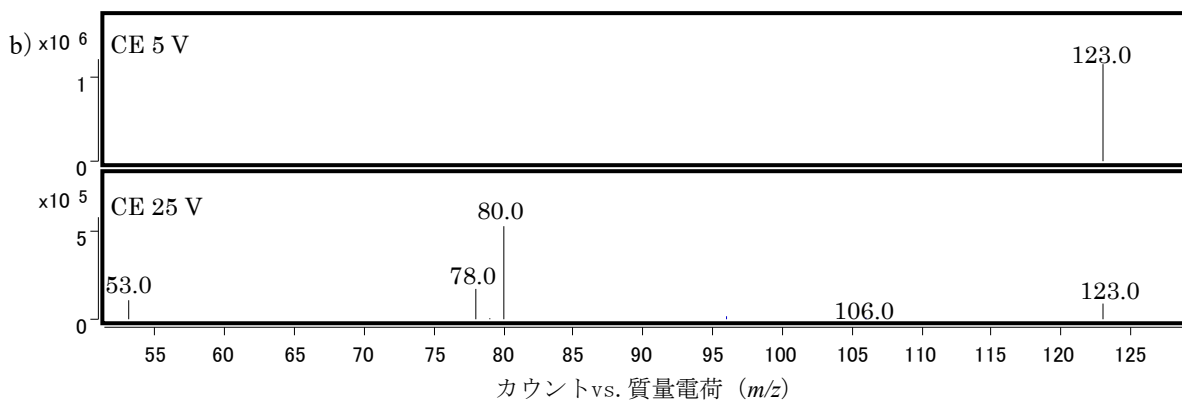
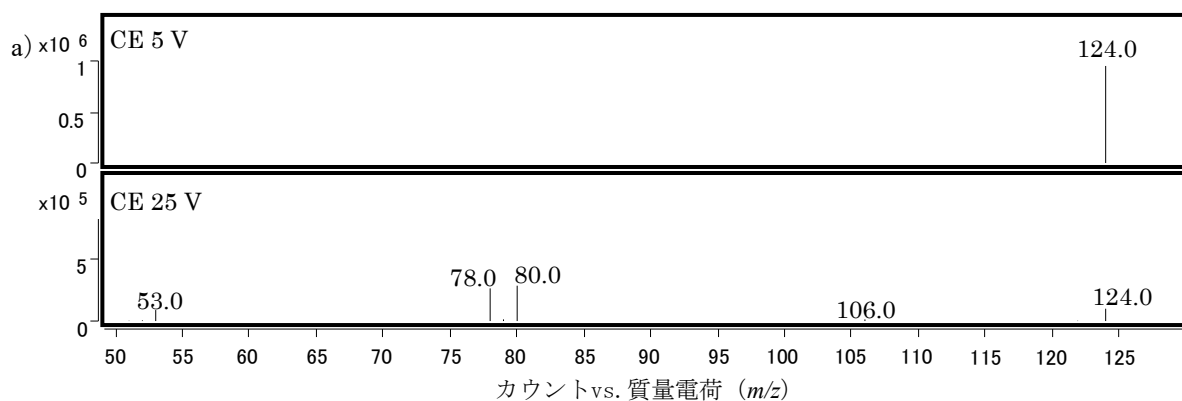


図4 標準溶液 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) のプロダクトイオンスペクトル a) NA, b) NAA

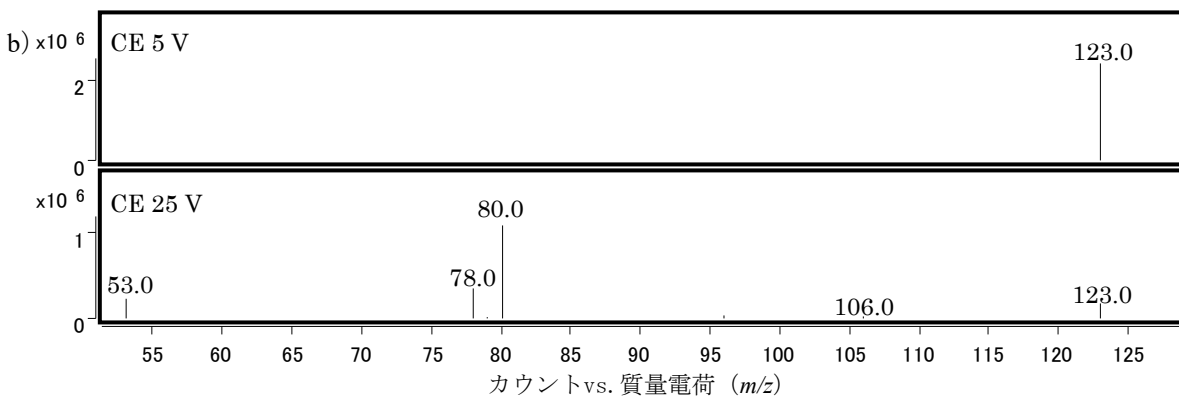
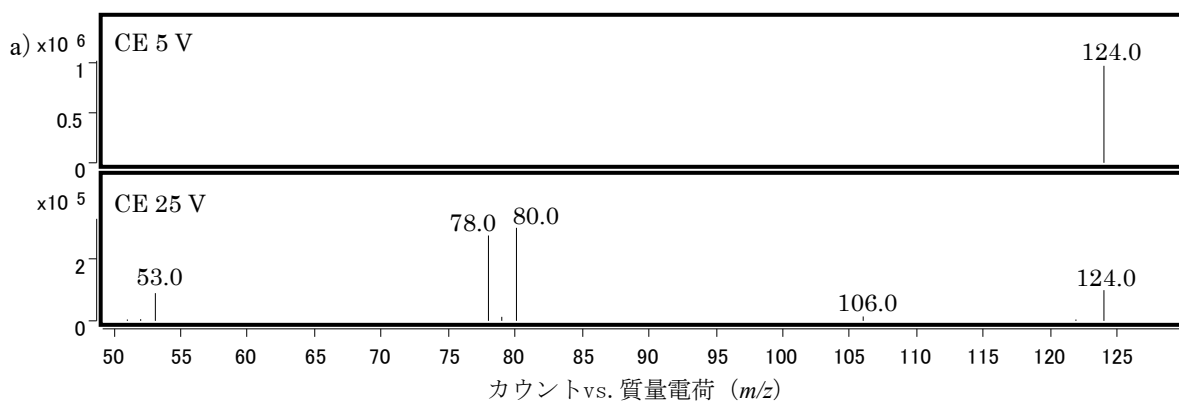


図5 添加試料 (クリーニングパウダー) のプロダクトイオンスペクトル a) NA, b) NAA

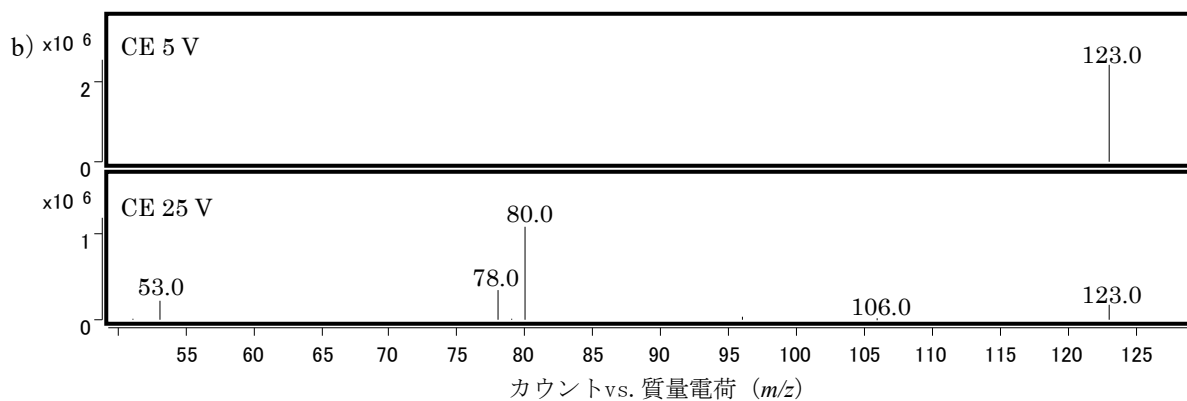
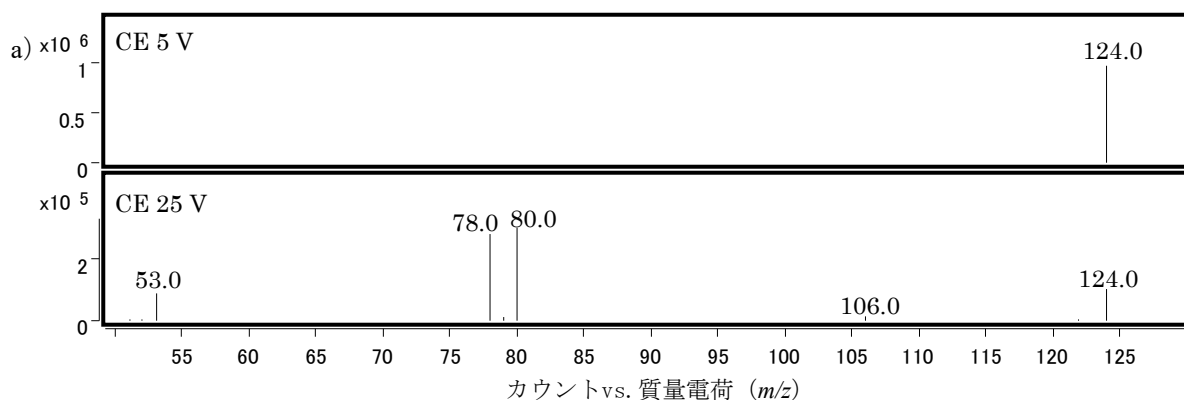


図6 添加試料 (清涼飲料水①) のプロダクトイオンスペクトル a) NA, b) NAA

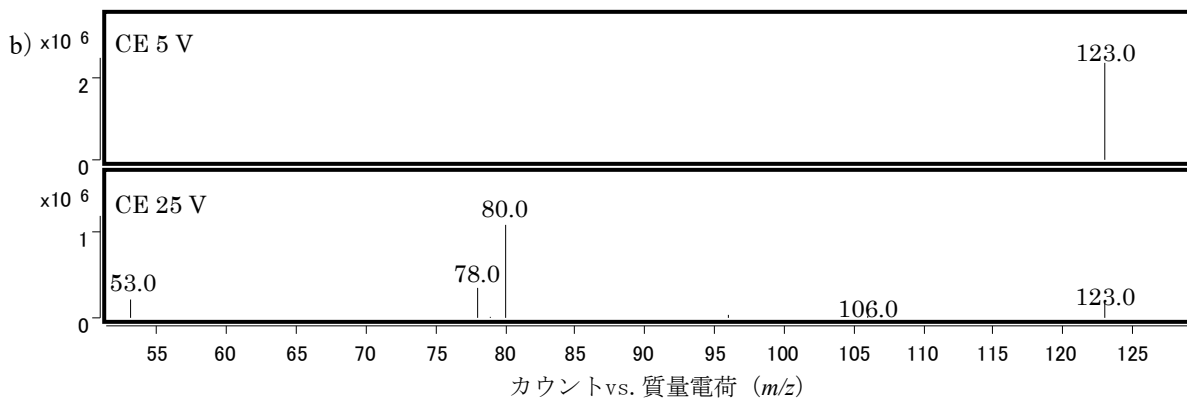
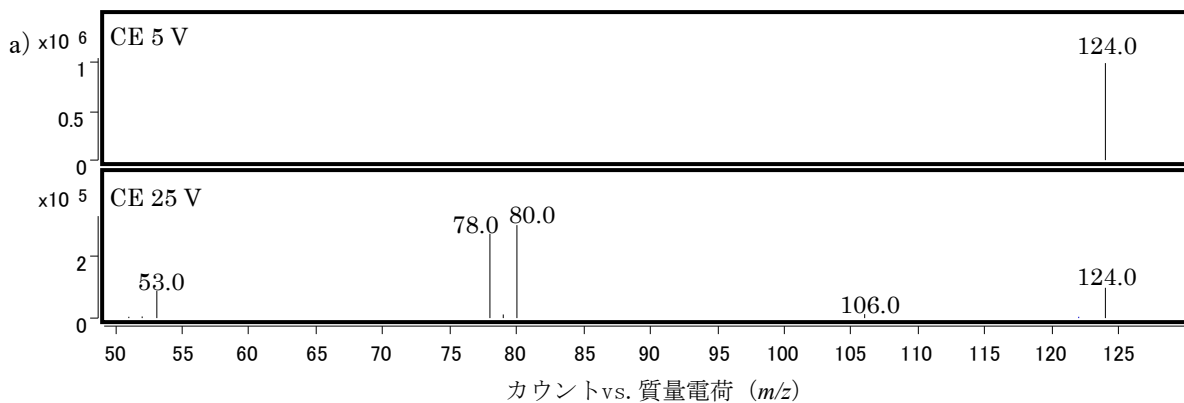


図7 添加試料 (清涼飲料水②) のプロダクトイオンスペクトル a) NA, b) NAA

## 結 語 文 献

今回、食肉製品を対象としたNA及びNAAの分析法が食肉製品以外の食品(クリーミングパウダー及び清涼飲料水2品)に対して、適用可能か妥当性試験を実施し、検証した。

定量限界相当の濃度となるようNA及びNAAを添加した試料を分析者1名が2併行5日間分析し、得られた結果から推定された真度, 併行精度及び室内精度は, いずれも妥当性確認ガイドライン[4]のそれぞれの目標値を満たしていることを確認した。さらに, いずれの添加試料も液体クロマトグラフィー質量分析により, 定性が可能であることを確認した。以上の結果から, 食肉製品以外の食品中のNA及びNAAの分析法の妥当性が確認された。

本研究は, 厚生労働省食品等試験検査費食品中の食品添加物分析法の検討事業(令和6年度)により実施した。

- [1] 多田敦子, 堀江正一, 他. 食品中の食品添加物分析法に向けた検討. 第55回全国衛生化学技術協議会年会講演集. 2018, 78-79.
- [2] 比企麻子, 山嶋裕季子, 他. 固相抽出を用いたHPLCおよびLC-MS/MSによる食肉中のニコチン酸およびニコチン酸アミド分析法の改良. 食衛誌. 2016, 57(4), 96-100.
- [3] 一般社団法人 日本分析機器工業会. JIS K 0124:2011 高速液体クロマトグラフィー通則. 一般財団法人 日本規格協会, 2011
- [4] 厚生労働省健康・生活衛生局食品基準審査課長, 厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長, 「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」の作成及び「第2版 食品中の食品添加物分析法」の改正について 別添1 食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン. 健生食基発0308第1号, 健生食監発0308第1号. 令和6年3月8日.
- [5] 厚生労働省監修. “87 ニコチン酸及びニコチン酸アミド”. 食品衛生検査指針, 食品添加物編2003. 日本食品衛生協会2003, 437-443.