

前処理

- 1) 冷凍保存していた食事 1 食分（昼、夜はご飯を除く）を室温で自然解凍させ、フードプロセッサーに液体も全て一緒に入れ、均一になるまで粉碎した。
- 2) ご飯に少量の水を加えフードプロセッサーで粉碎した。
- 3) できた食事 1 食分の懸濁物の全量を正確に秤量した。
- 4) これを試料とした。

試料（褐色ねじ口瓶に 3~5 g）秤量《記録》

↓ ← 0.1 M 塩酸 25 ml

沸騰水中、15 分間

↓
冷却

↓
4 M 酢酸ナトリウムを 1 ml 程度加え、pH 4.5 に合わせた。

↓ ← 2.5% タカジアスターゼ B 溶液 5 ml

恒温水槽で 37~40°C、16~17 時間

↓
試料溶液を 50 ml メスフラスコに移し、80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 [pH 4.5] で 50 ml に定容した。

↓
濾過（漏斗、濾紙を使用）

↓
0.45 μm のフィルターで濾過

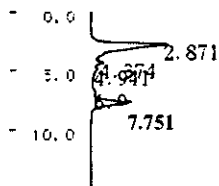
↓
HPLC 注入用試料

20 μl 注入

タカジアスターゼ B 中にチアミンが含まれているかどうかを、食品試料を含まない状態で上記と同様の操作を行い、測定した。

図 12. 食事中ビタミン B₁ 測定のための HPLC 用試料の調整方法

C-R8A CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:CHRMI.C33 ATTEN= 5 SPEED= 2.0



C-R8A CHROMATOPAC CH=1 Report No.=34 DATA=1:CHRMI.C33 03/12/03 02:22:18

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.871	117184	3032			64.9737	
	2	4.374	10266	481	V		5.6921	
	3	4.941	6451	217	V		3.5769	
	4	6.946	4256	141			2.3596	
	5	7.751	42200	1265	V		23.3978	
TOTAL			180357	5137			100	

図 13. 食事サンプルを試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

2. ビタミン B₂ 定量方法

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したビタミン B₂ 及びその関連化合物の測定方法をまとめた。

A. 実験方法

1. HPLC による尿中リボフラビン測定方法

1-1. 試薬作成方法

riboflavin 標準 (褐色瓶, 凍結保存)

riboflavin = 376.36

(和光純薬工業株式会社, 一級試薬)

1) riboflavin を 0.010 g 秤量し, 0.1 M KPB (pH 7.0) を 10 ml 加え, 懸濁液を均一化した。

2) 1) を 100 μ l 取り, 0.1M KPB (pH 7.0) 9.90 ml に溶解させた。

3) 2) の吸光度を測定し, ϵ 445.0 nm = 12500 より正確な濃度を求めた。(図 1)

4) 3) を 100 μ l とり, 0.1 M KPB (pH 7.0) を 900 μ l 加え, 10 倍希釈して使用した。

0.1 M KPB (pH7.0) (冷蔵保存)

リン酸二水素カリウム: KH_2PO_4 = 136.09

Potassium Dihydrogenphosphate

(和光純薬工業株式会社 特級試薬)

$136.09 \times 0.1 \times 0.5 = 6.805$

リン酸水素二カリウム: K_2HPO_4 = 174.18

Dipotassium Hydrogenphosphate

(和光純薬工業株式会社 特級試薬)

$174.18 \times 0.1 \times 0.5 = 8.709$

1) ビーカーに KH_2PO_4 6.8 g 秤量し, 超純水で溶解させ 500 ml に定容した。

2) ビーカーに K_2HPO_4 8.7 g 秤量し, 超純水で溶解させ 500 ml に定容した。

3) 0.1 M K_2HPO_4 のビーカーに 0.1 M KH_2PO_4 を加えていき, pH 7.0 に合わせた。

1 M NaH_2PO_4 (pH 5.5) (冷蔵保存)

Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate=156.01

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

$156.01 \times 0.2 \times 1 = 31.202$

1) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 31.2 g 秤量し, 170 ml の超純水に溶解させた。

2) 6 M NaOH を少しずつ加え, pH 5.5 に合わ

せ, 超純水で 200 ml に定容した。

6 M NaOH (冷蔵保存)

Sodium Hydrogenphosphate = 40.00

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

$40.00 \times 0.1 \times 6 = 24.0$

NaOH を 24.0 g 秤量し, ドラフト内で氷冷しながら (熱と臭気を伴うため), 80 ml の超純水で溶解させ, 100 ml に定容した。

1-2. 試料調製方法

尿を用いた時のビタミン B₂ 定量用 HPLC 試料調製のための操作方法を図 2 に示した。

1-3. 測定条件

尿中 RF は, riboflavin が発する蛍光を蛍光検出器付きの HPLC で測定した。

移動相: 1M NaH_2PO_4 (pH5.5) 7 ml
Methanol 300 ml
Ultra-pure water 693 ml

流速: 0.8 ml / min

Pressure: 140 kgf / cm^2

カラム: Tosoh ODS - 80Ts (ϕ 4.6 \times 250 mm)

カラム温度: 40°C

検出器: RF-10A XL SHIMADZU

検出方法: 蛍光法

(励起波長 445nm, 蛍光波長 530nm)

Auto injector: stop time 20 min

データプロセッサ: stop time 19 min

riboflavin 検出時間: 14 min

riboflavin 標準 1 pmol 当たりの AREA: 20000

1-4. 計算方法

1) 3.8560×10^{-5} M のリボフラビン標準溶液を 10 倍希釈して 20 μ l インジェクションした。(77.12pmol インジェクションした.)

そして, 1pmol 当たりの AREA を計算した。(約 20000 / pmol) (図 3)

2) 試料の検出 AREA / 1pmol 当たりの AREA
× 24 時間尿の全量(ml) / 0.02 (ml) × 10⁻³
= _____ nmol / day

※0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 4)

1155410/21344 × 25/0.02 × 10⁻³ = 67.7nmol / day

2. HPLC による糞中総ビタミン B₂ 測定方法

2-1. 試薬作成方法

lumiflavin 標準 (褐色瓶, 凍結保存)

lumiflavin = 256.3 (SIGMA)

1) 100 µg / ml の lumiflavin 標準溶液を作成。

lumiflavin を 0.0010 g 秤量し, 超純水 10 ml に溶解させた。

2) 10 µg / ml の lumiflavin 標準溶液を作成。

1) を 100 µl とり, 超純水を 9.9 ml 加えて, 100 倍希釈した。

3) 2) の吸光度を測定し, ε 444.0 nm = 10900 より正確な濃度を求めた。(図 5)

4) 3) を 50 µl とり, 950 µl の 超純水を加えて 20 倍希釈し, 標準とした。

riboflavin 標準 (褐色瓶, 凍結保存)

riboflavin = 376.36

(和光純薬工業株式会社, 一級試薬)

1) riboflavin を 0.010 g 秤量し, 0.1 M KPB (pH 7.0) 10 ml 加え, 懸濁液を均一化した。

2) 1) を 100 µl 取り, 0.1M KPB (pH 7.0) 9.90 ml に溶解させた。

3) 2) の吸光度を測定し, ε 445.0 nm = 12500 より正確な濃度を求めた。

4) 3) を 200 µl とり, 0.1M KPB (pH 7.0) 200 µl に加え 2 倍希釈し, 使用した。

0.5 M H₂SO₄ (冷蔵保存)

Sulfuric Acid 96.0~98.0% 18 M

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

超純水 972.2 ml に硫酸 27.8 ml を氷で冷やしながら加えた。

10%TCA (室温保存)

Trichloroacetic Acid = 163.39

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

TCA を 20 g 秤量し, 超純水 180 ml で溶解させた。

1 M NaOH (冷蔵保存)

Sodium Hydrogenphosphate = 40.00

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

40.00 × 0.1 × 1 = 4.0

NaOH を 4.0 g 秤量し, ドラフト内で氷冷しながら (熱と臭気を発するため), 80 ml の超

純水に溶解させ, 100 ml に定容した。

酢酸

和光純薬工業株式会社, 特級試薬をそのまま使用。

以下, 尿中 Riboflavin 測定と同じ試薬を使用。

2-2. 試料調製方法

糞中総ビタミン B₂ 量は, 沸騰水浴中で RF の温熱抽出を行った後, アルカリ性下で光をあて, RF, FMN, その他の RF 誘導体をルミフラビンに分解し, ルミフラビンの蛍光を蛍光検出器付きの HPLC で測定したものである。(図 6)

2-3. 測定条件

移動相: 1 M NaH₂PO₄ (pH 5.5) 6.5 ml

Methanol 350 ml

Ultra-pure water 643.5 ml

流速: 0.8 ml / min

Pressure: 136 kgf / cm²

カラム: Tosoh ODS-80Ts (φ 4.6 × 250mm)

カラム温度: 40°C

検出器: RF-10A XL SHIMADZU

検出方法: 蛍光法

(励起波長 445 nm, 蛍光波長 530 nm)

Auto injector: stop time 20 min

データプロセッサ: stop time 19 min

lumiflavin 1 pmol 当たりの AREA: 24000

riboflavin から lumiflavin への転換率:

65%前後

2-4. 計算方法

1) 1.3982 × 10⁻⁵ M のルミフラビン標準溶液を 20 倍希釈して 50 µl インジェクションした。(34.955 pmol インジェクションした。)そして, 1 pmol 当たりの AREA を計算した。... a (約 24000 / pmol) (図 7)

2) riboflavin から lumiflavin への転換率を計算した。(図 8)

転換率: 試料液全量 1000 µl, そこに含まれる

試料 100 µl. 100 / 1000

光照射に用いる液量 200 µl

光照射された試料の全量 420 µl,

HPLC 注入量 50 µl. 50 / 420

100 / 1000 × 200 × 50 / 420 = 2.38 µl

正確な濃度を求めた riboflavin 標準 2.38 µl 中に含まれるモル数を求めた。... b

(既知濃度の riboflavin 検出 AREA) / a

× 1 / b × 100 = c %

例) $150425/24000 \times 1/10.044 \times 100 = 62.4\%$

3) 懸濁液の全量

$10.46 \text{ ml} / \{24 \text{ 時間糞量 (g)}\}$
 $= \{24 \text{ 時間糞懸濁液全量 (ml)}\} \dots d$
※ $10.46 \text{ ml} =$ 糞 1 g からできる糞懸濁液の量

4) (検出 AREA) / $\frac{a}{c} \times \frac{d}{2.38 \mu\text{l} \times 100 / 10^{-6}} = \dots \mu\text{mol} / \text{day}$

例) ラット糞 (図 9)

$290144/24000 \times 6.18/2.38 \times 100/62.4 \times 10^{-6}$
 $= 50.3 \mu\text{mol} / \text{day}$

3. HPLC による血液中、肝臓中総ビタミン B₂ (Riboflavin, FMN, FAD) 量の測定方法

3-1. 試薬作成方法

“糞中総ビタミン B₂ 量測定方法”と同様。

3-2. 試料調製方法

血液中、肝臓中のビタミン B₂ は、RF, FMN, FAD の三型で存在している。その三型を温熱抽出し、アルカリ性下で光をあて、ルミフラビンに分解し、ルミフラビンの蛍光を蛍光検出器付き HPLC で総ビタミン B₂ 量として測定したものである。(図 10, 11)

3-3. 測定条件

“糞中ビタミン B₂ 量測定方法”と同様。

3-4. 計算方法

血液

1) lumiflavin 標準 1 pmol 当たりの AREA を計算した。... a

2) riboflavin から lumiflavin への転換率を計算した。

転換率：試料液全量 $1000 \mu\text{l}$ ，そこに含まれる試料 $100 \mu\text{l}$ 。 $100/1000$

光照射に用いる液量 $200 \mu\text{l}$

光照射された試料の全量 $420 \mu\text{l}$ ，

HPLC 注入量 $100 \mu\text{l}$ 。 $100/420$

$100/1000 \times 200 \times 100/420 = 4.76 \mu\text{l}$

正確な濃度を求めた riboflavin 標準 $4.76 \mu\text{l}$ 中に含まれるモル数を求めた。... b

(既知濃度の riboflavin 検出 AREA) / $\frac{a}{b} \times 100 = \dots \%$

3) (検出 AREA) / $\frac{a}{c} \times 1000 \mu\text{l} / 9.52 \mu\text{l} \times 100 / \frac{c}{2} = \dots \text{pmol} / \text{ml}$

※ $2 = 2$ 倍希釈された全血の真の量

$9.52 \mu\text{l} =$ 注入量 $100 \mu\text{l}$ 中に含まれる試料の量

例) ラット血液 (図 12)

$32975/24000 \times 1000/9.52 \times 100/75.2 \times 2$
 $= 383.8 \mu\text{mol} / \text{day}$

肝臓

1) lumiflavin 標準 1 pmol 当たりの AREA を計算した。... a

2) riboflavin から lumiflavin への転換率を計算した。

転換率：試料液全量 $1000 \mu\text{l}$ ，そこに含まれる試料 $100 \mu\text{l}$ 。 $100/1000$

光照射に用いる液量 $200 \mu\text{l}$

光照射された試料の全量 $420 \mu\text{l}$ ，

HPLC 注入量 $50 \mu\text{l}$ 。 $50/420$

$100/1000 \times 200 \times 50/420 = 2.38 \mu\text{l}$

正確な濃度を求めた riboflavin 標準 $2.38 \mu\text{l}$ 中に含まれるモル数を求めた。... b

(既知濃度の riboflavin 検出 AREA) / $\frac{a}{b} \times 100 = \dots \%$

3) 肝臓中総ビタミン B₂ 量

検出 AREA / $\frac{a}{c} \times 1000 \mu\text{l} / 2.38 \mu\text{l} \times 100 / \frac{c}{10.3 \text{ ml}} \times 10^{-3} = \dots \text{nmol} / \text{g of liver}$

※ $10.3 \text{ ml} =$ 肝臓 1 g でできるホモジネート量

例) ラット肝臓 (図 13)

$309863/24000 \times 1000/2.38 \times 100/60.1 \times 10.3 \times 10^{-3}$
 $= 93.0 \text{ nmol} / \text{g of liver}$

4. HPLC による食品中のビタミン B₂ 量の測定方法

4-1. 試薬作成方法

4 M 酢酸ナトリウム (冷蔵保存)

Sodium Acetate Trihydrate = 136.08

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

$136.08 \times 4 \times 0.1 = 54.432$

酢酸ナトリウム・三水和物を 54.4 g 秤量し、超純水 80 ml に溶解させ、超純水で 100 ml に定容した。

80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)

(冷蔵保存)

Acetic Acid 99.7%

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

1) 4 M 酢酸ナトリウム 20 ml を取り、 800 ml の超純水に加え、酢酸を約 5 ml 加えて pH 4.5 に合わせた。

2) 1) に超純水を加え、 1 L に定容した。

0.1 M HCl (冷蔵保存)

Hydrochloric Acid 35~37 %

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

HCl (11.6 M) を 8.6 ml 取り、超純水 991.4

ml を加え、混和した。

2.5%タカジアスターゼ B 溶液 (遮光, 用事調製)

タカジアスターゼ B ビタミン B₁ 定量用 (三共株式会社)

褐色瓶にタカジアスターゼ B を 2.5 g 秤量し, 97.5 ml の 80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) に溶解させた。

4-2. 試料調製方法

食品を用いた時のビタミン B₂ 定量用 HPLC 注入試料作成の操作方法を図 13 に示した。

4-3. 測定条件

移動相: 酢酸緩衝液(pH4.5) 650 ml
Methanol 350 ml

流速: 0.8 ml/min

Pressure: 145 kgf/cm²

カラム: Tosoh ODS-80Ts (φ4.6×250mm)

カラム温度: 40°C

検出器: RF-10A XL SHIMADZU

検出方法: 蛍光法

(励起波長 445 nm, 蛍光波長 530 nm)

Auto injector: stop time 15 min

データプロセッサ: stop time 14 min

4-4. 計算方法

1) Riboflavin の標準より, 1pmol 当たりの AREA を計算した。

2) {(試料の AREA)-(タカジアスターゼ B の AREA)} / (標準 1pmol あたりの AREA)×50 ml / 0.05 ml × (試料の全量) / (秤量した試料の重さ) × 10⁻⁶ = a μmol / 食事一食分
 a × 376.36 × 10⁻³ = mg / 食事一食分
※ 50 ml = 全量, 0.05 ml = 注入量,
376.36 = Riboflavin の分子量

例) 食事サンプル (図 15, 16)

(232485-45768) / 20000 × 50 / 0.05 × 428.34

/ 3.1306 × 10⁻⁶ = 1.2774 μmol / 食事一食分

1.2774 × 376.36 × 10⁻³ = 0.4808 mg / 食事一食分

B. 健康危険情報

特記する情報はない。

C. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 口頭発表

なし

D. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

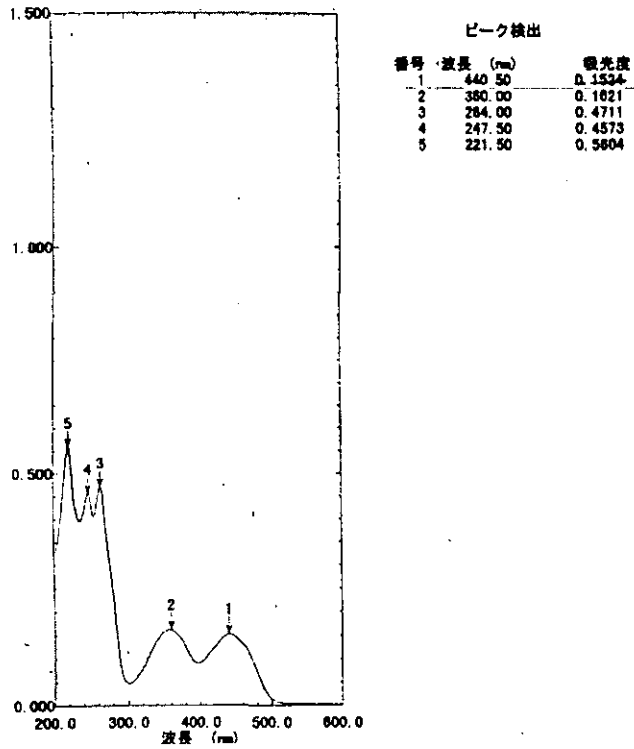


図1. リボフラビンのUV スペクトラム

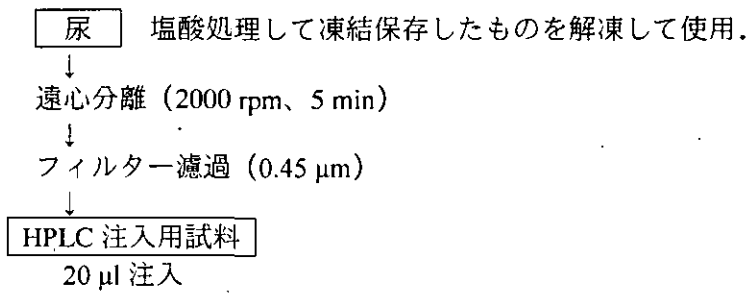


図2. 尿中リボフラビン測定のためのHPLC用試料の調整方法

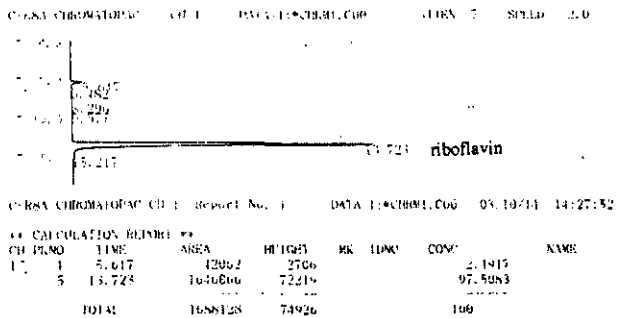


図3. 標準のリボフラビンのHPLCクロマトグラムの例



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MR	UNO	COMC	NAME
1	6	5.501	20098	1136	V		1.5876	
	8	7.071	27026	1706			2.135	
	10	8.852	12146	593			0.9595	
	12	12.219	51202	1925			4.0448	
	13	13.689	1155310	52091			91.2731	
TOTAL			1285683	57451			100	

図4.尿を試料としたときのHPLCのクロマトグラムの例

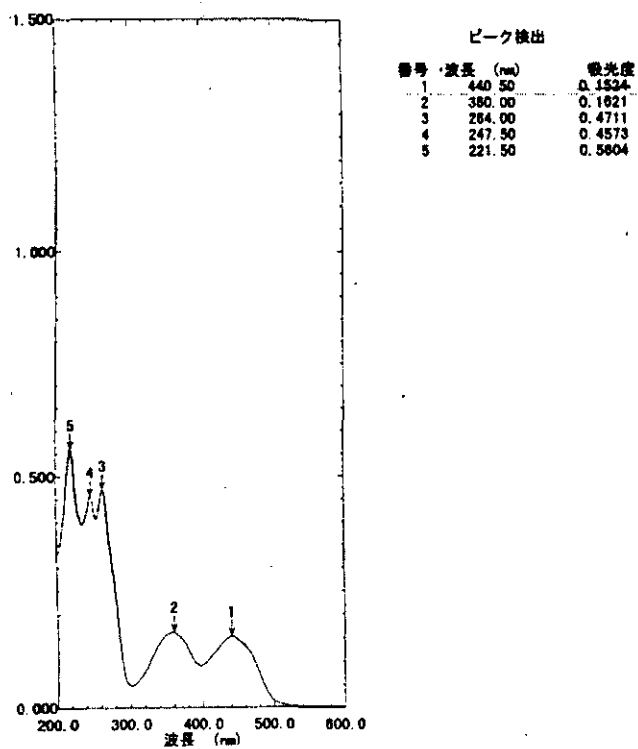
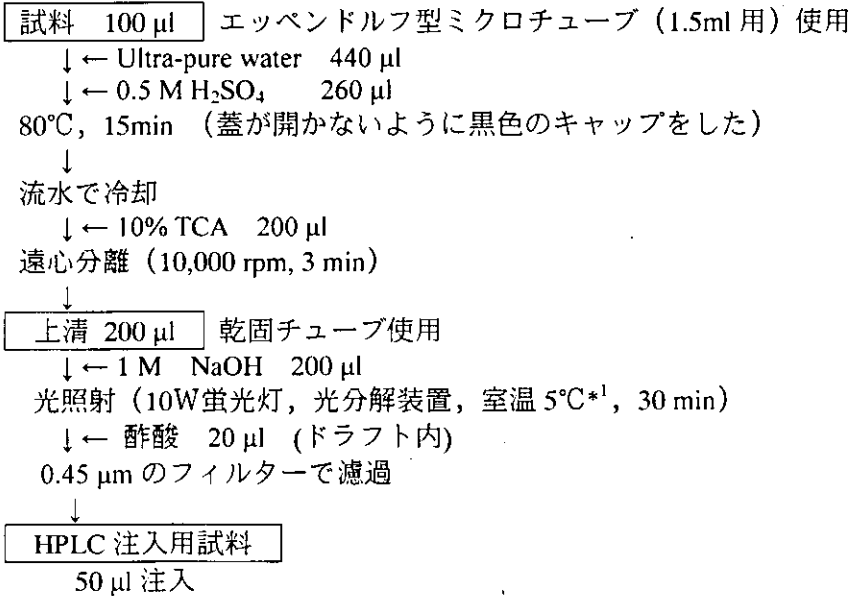


図5.ルミフラビンのUVスペクトラム

- 1) 1日糞の重量を下三桁(0.000g)まで正確に測定し、アルミ箔で覆ったねじ口試験管に入れ、その重量の10倍量の0.1 M KPB (pH7.0)を加え、ソニケーター(output control 65. 粉々になるまで. 30秒ソニックして、30秒氷冷の繰り返し)で粉碎した。
- 2) 1) を0.5 mlとり、アルミ箔で覆った試験管に入れ、0.1 M KPB(pH7.0)を9.5ml加え、20倍希釈した。
- 3) 3分おきに振り混ぜながら恒温水層につけ、温熱抽出を行った。(80°C, 15分間)
- 4) 3) を水で冷やし、これを試料とした。



※ 光照射をすることで、試料中の riboflavin, FMN, FAD を lumiflavin に分解し、総ビタミン B₂ とするものであるが、riboflavin, FMN, FAD は 100% lumiflavin に転換されるわけではない。そこで転換率を求めるために、既知濃度の riboflavin 標準液を試料として、上記の操作を同時に行った。

※ riboflavin は光に弱いため、実験操作は全てできる限り遮光しながら行った。

*1 蛍光灯の熱によって試料液が蒸発することを防ぐため、低温室(温度設定 5°C)で光照射を行った。

光分解装置

乾固チューブ底の液面から 20 cm 離れた高さから、蛍光灯の光が当たるように木の箱(縦 35 cm×横 25 cm×高さ 28 cm)を作り、内面をすべてアルミ製のシールで覆い、内部で蛍光灯の光が反射するようにした。

図 6. 糞中リボフラビン測定のための HPLC 用試料の調整方法

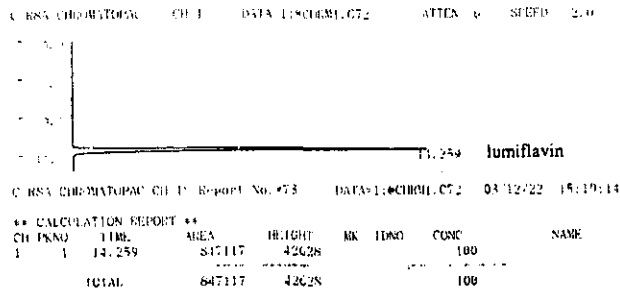


図7. 標準のルミフラビンのHPLCクロマトグラムの例

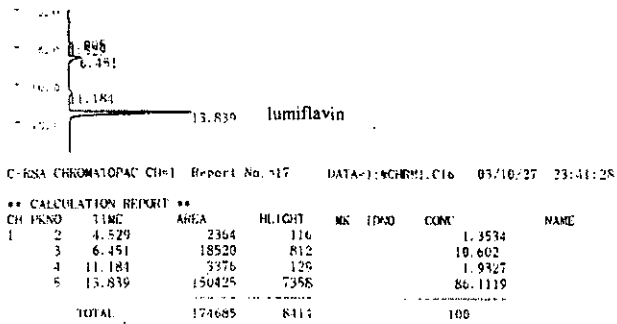


図8. 標準リボフラビンからルミフラビンへの転換率計算のためのHPLCクロマトグラムの例

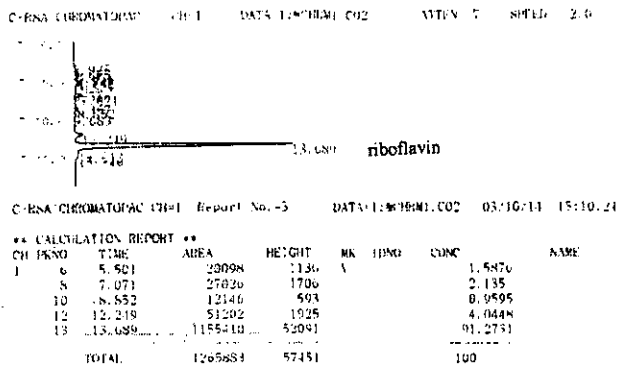


図9. 糞を試料としたときのHPLCのクロマトグラムの例

【サンプル前処理】

- 血液** 1) 血液 500 μ l 採血後, 直ちに氷冷水 500 μ l を加え, タッチミキサーで攪拌後, 5 分以上氷冷した。(凍結保存)
2) 使用時に 1) を解凍し, タッチミキサーでさらさらになるまで攪拌し, 均一化した。

【サンプル作成】

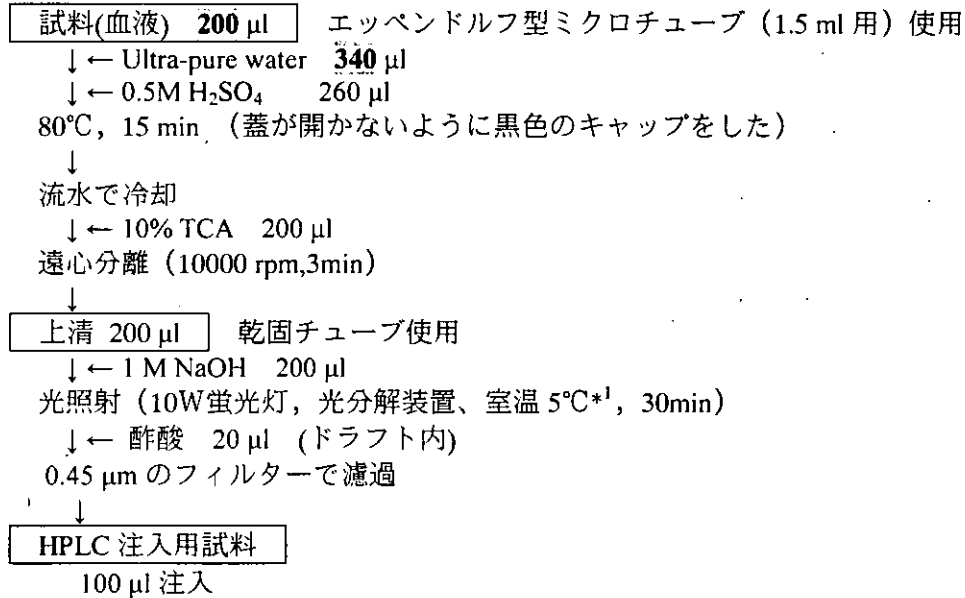
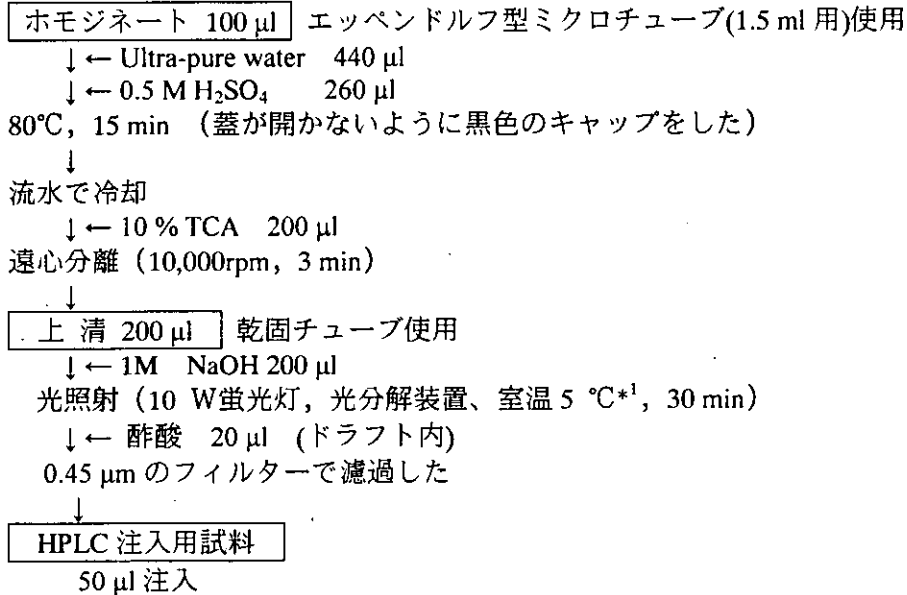


図 10. 血液中リボフラビン測定のための HPLC 用試料の調整方法

【サンプル前処理】

肝臓 凍結肝臓 0.5 g 以下を正確に測り取り，その 10 倍量の 50 mM KPB (pH 7.0) を加えてホモゲナイズ (テフロンホモゲナイザー, 1500 rpm, 2 min) した。

【サンプル作成】



※照射をすることで，試料中の riboflavin, FMN, FAD を lumiflavin に分解し，総ビタミン B₂ とするものであるが，riboflavin, FMN, FAD は 100% lumiflavin に転換されるわけではない。そこで転換率を求めるために，既知濃度の riboflavin 標準液 100 μl を試料として，上記の操作を同時に行った。その際全量を合わせるために，加える Ultra-pure water を 440 μl とした。

※ riboflavin は光に弱いので、実験操作は全てできる限り遮光しながら行った。

*1 蛍光灯の熱によって試料液が蒸発することを防ぐため，低温室 (温度設定 5°C) で照射を行った。

図 11. 肝臓中リボフラビン測定のための HPLC 用試料の調整方法

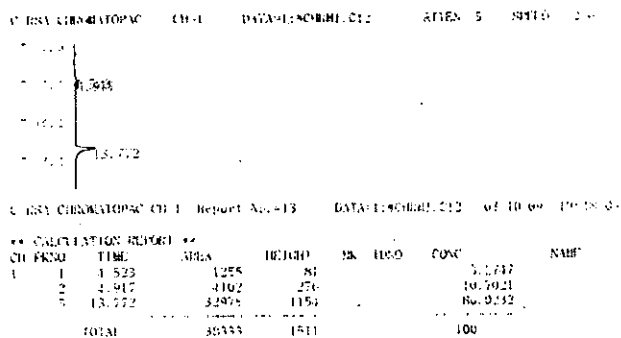
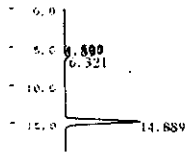


図 12. 血液を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

C-RSA CHROMATOPAC CH-1 DATA=1:0CHRM1.C06 ATTEM= 0 SPEED= 2.0



C-RSA CHROMATOPAC CH-1 Report No. 7 DATA=1:0CHRM1.C06 03/11/78 18:21:26

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	NK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.889	1749	98			0.5397	
	3	6.321	12417	513			3.8321	
	4	14.889	30966.3	8406			95.6282	
TOTAL			324029	9417			100	

図 13. 肝臓を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

前処理

- 1) 凍結保存していた食事 1 食分（昼，夜はご飯を除く）を室温で自然解凍させ，フードプロセッサ（National MK-K77-W スピードカッター）に液体も全て一緒に入れ，均一になるまで粉碎した（約 2 分間）。
- 2) ご飯に少量の水を加えフードプロセッサで粉碎した。
- 3) できた食事 1 食分の懸濁液の全量を正確に秤量した。
- 4) これを試料とした。

試料（3～5 g を 60 ml 容量褐色ねじ口瓶に）

↓ ← 0.1 M 塩酸 25 ml

沸騰水中，15 分間

↓
冷却

↓ ← 4 M 酢酸ナトリウム 1 ml 程度

pH 4.5 に合わせた（pH メーターを用いて）

↓ ← 2.5% タカジアスターゼ B 溶液 5 ml

恒温水槽で 37～40°C，16～17 時間

↓
試料溶液を 50 ml メスフラスコに移し，80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）で 50 ml に定容した。

↓
濾過（漏斗，濾紙を使用）

↓
0.45 μm のフィルターで濾過

HPLC 注入用試料

50 μl 注入

※タカジアスターゼ B の中にも若干のリボフラビンが含まれているため，以下の操作を平行して行った。

0.1 M 塩酸 25 ml（褐色ねじ口瓶，60 ml 容量）

↓ ← 4 M 酢酸ナトリウム 1 ml 程度

pH 4.5 に合わせた。（pH メーター使用）

↓ ← 2.5% タカジアスターゼ B 溶液 5 ml

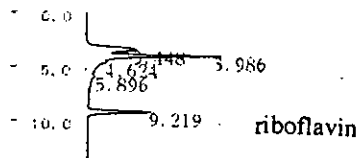
恒温水槽で 37～40°C，16～17 時間

↓
試料溶液を 50 ml メスフラスコに移し，80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）で 50 ml に定容した。

HPLC 注入用試料

50 μl 注入

図 14. 食品中ビタミン B₂ 測定のための HPLC 用試料の調整方法

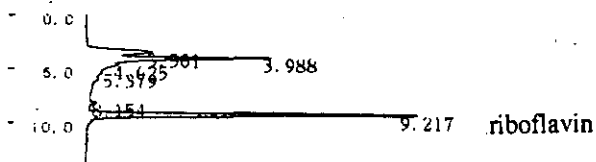


C-RBA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=4 DATA=1:CHRMI.C03 03/12/02 13:33:32

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	3.448	54974	1832			31.0513	
	2	3.986	73026	5205	V		41.2476	
	3	4.624	1975	168			1.1156	
	4	5.896	1299	69			0.7338	
	5	9.219	45768	2683			25.8517	riboflavin
TOTAL			177042	9956			100	

図 15. タカジアスターゼ B 中のリボフラビン測定のための HPLC クロマトグラムの例



C-RBA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=8 DATA=1:CHRMI.C07 03/12/02 14:38:26

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	3.501	79270	2550			17.1199	
	2	3.988	124749	7405	V		26.942	
	3	4.625	19881	887	V		4.2936	
	4	5.379	1446	114			0.3122	
	5	8.154	5197	319			1.1225	
	6	9.217	232485	13659			50.2097	riboflavin
TOTAL			463028	24933			100	

図 16. 食事サンプルを試料としたときの HPLC クロマトグラムの例

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

3. ビタミン B₆ の定量方法

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したビタミン B₆ 関連化合物の測定方法をまとめた。

A. 実験方法

1. HPLC による尿中 4-ピリドキシン酸測定方法

1-1. 試薬作成方法

5 mM KPB (pH 7.5) (冷蔵保存)

1) $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136.09$ (和光純薬工業株式会社、室温保存)

$$136.09 \times 1 \times 0.05 = 6.8045$$

KH_2PO_4 を 6.805 g 秤量し、水を加え 50 ml にした。

2) $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 174.18$ (和光純薬工業株式会社、室温保存)

$$174.18 \times 1 \times 0.05 = 8.709$$

KH_2PO_4 を 8.701 g 秤量し、水を加え 50 ml にした。

3) ビーカーに 2) を 40 ml 程度入れて、スターラーで攪拌しながら 1) を加え、pH メーターで pH 7.5 になるように合わせた。(1 M KPB)

4) 3) を 5 ml とり、超純水 995 ml を加え 200 倍希釈した。

4-PIC 標準 (冷蔵保存)

4-Pyridoxic acid (4-PIC) = 183.2

(SIGMA, 冷凍保存)

1) 1 mg/ml の 4-PIC を作成。4-PIC を 0.01 g 秤量し、5 mM KPB 溶液 10 ml に溶解した。

2) 10 μg/ml 4-PIC 作成。1) を 0.01 ml 取り、5 mM KPB 溶液を 9.99 ml 加えて 100 倍希釈した。

3) 2) の吸光度を測定し ε_{316 nm} = 5970 より正確な濃度を求めた。

4) 1.0 μl 4-PIC を作成。2) を 0.1 ml 取り、5 mM KPB 溶液を 9.9 ml 加えて 10 倍希釈し、これを標準液とした。

標準のスペクトルを図 1 に示した。

50% KOH (冷蔵保存)

Potassium Hydroxide=56.11 (和光純薬工業株

式会社、室温保存)

1) KOH を 500 g 秤量して、800 ml 程の超純水で溶解させた。(このとき熱を発生するのでドラフト内で氷冷しながら行った。)

2) メスシリンダーに移し、超純水にて 1L 定容。

1-2. 試料調製方法

図 2 に示した。

1-3. 測定条件

移動相: 500 ml の超純水に 85 %リン酸 (市販品) を 2.3 ml 添加し、50%KOH で pH 2.2 に調製。この緩衝液を 900 ml に定容した後、100 ml のメタノールを加える。

流速: 1.0 ml / min

PRESSURE: 90 kgf / cm²

カラム: TOSOH TSKgel
ODS-120A(φ4.6mm×250 mm)

カラム温度: 30 °C

試料注入量: 20 μl

検出器: SHIMADZU RF-10A

検出方法: 蛍光法 (励起波長 355 nm,
蛍光波長 436 nm)

1-4. 計算方法

1) 4-PIC 標準液 (5.46 × 10⁻⁶ M, 20 μl) を流し、1 pmol あたりの AREA を計算した。(約 10000 / pmol) (図 3)

2) 検出 AREA / 1 pmol あたりの AREA × 24 時間尿の全量 (ml) / 0.02 ml × 10⁻³
= ___ nmol / day (図 4)。

2. 微生物定量法による食品中ビタミン B₆ の測定方法

2-1. 試薬作成方法

0.055 M HCl (室温保存)

Hydrochloric Acid=36

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

12 / 0.055 = 218.18

HCl (12 M) 1 ml に超純水を 217.2 ml 加えた。

1 M NaOH (冷蔵保存)

Sodium Hydroxide = 40

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

40 × 1 × 0.5 = 20

1) NaOH を 20g 秤量して, 250 ml 程の超純水で溶解させた。(このとき刺激臭と熱を発生するのでドラフト内で水冷しながら行った。)

2) メスシリンダーに移し, 超純水にて 500ml にメスアップした。

ピリドキシン塩酸塩標準液 (凍結保存)

Pyridoxine Hydrochlorido Standard=205.64

(和光純薬株式会社, 冷蔵保存)

1) エタノール (和光純薬工業株式会社, 室温保存) 25 ml に超純水 75 ml を加え, 25 % (V/V) エタノール溶液を作成する。

2) PN-HCl を 0.0035 g 秤量し, 25 % (v/v) エタノール溶液を 14.35 ml 加えて溶かす。(計算上は 200 µg / ml PN 溶液となるが, エタノールを正確にはかりとるのが難しいため, 誤差が生じることが多い)

3) 分光光度計を以て吸光度を測定し, ϵ 325 nm = 7100 より正確な濃度を計算する。濃い場合は超純水で適宜希釈し, 測定する。(凍結保存可)

4) 3) で作成した溶液 1 ml 中に PN が 5 ng を含むように, 用事, 超純水で希釈して調製する。(使用直前に調整すること)

※使用する試薬は PN-HCl (m.w=205.64) であるが, 計算するときには PN (m.w=169.18) の分子量で計算するので注意する。

標準液のスペクトルを図5に示した。

0.9%滅菌 NaCl

NaCl=98.08 (和光純薬株式会社, 室温保存)

1) NaCl 4.5g 秤量し超純水を加えて溶解させ, 500ml 定容。

2) 試験管 (12×120mm) に 5ml ずつ分注し, キャップをする。

3) オートクレーブ (121°C, 5min) し冷却後, 冷蔵保存する。

保存用培地, 斜面培地

培地の組成を表1に示した。

寒天 (Agar, Powder)

(和光純薬工業株式会社)

1) 培地を 3.6g, 寒天 1.5g を秤量し, 超純水を加え, 沸騰水浴中で完全溶解させる。

2) 冷ました後, 100ml にメスアップする。

3) 培地を約 5ml ずつねじ口試験管 (15ml 容) に分注し, 軽く蓋をして 5 分間, 121°C, プラス 1 気圧でオートクレーブした後, 室温にして放置して固める。その際, 半分は垂直に立てて冷却し (保存用培地), 残りの半分は斜めにして固める (斜面培地)。

ビタミン B₆ 定量用培地

ビタミン B₆ 定量用培地 (日本製薬株式会社, 冷蔵保存) その組成を表2に示した。

培地を 13.0g を秤量し, 水を加え, 沸騰水浴中で完全溶解後, 100ml 定容。

2-2. 試料作成方法

図6に食品中のビタミン B₆ を遊離させる方法を示した。

2-3. 定量操作方法

①接種用菌作成方法

- 1) *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 (住商ファーマインターナショナル株式会社, 凍結保存) の植えてある保存用平面培地 (保存培地への植え継ぎは 2 週間に 1 回行う。植え継いだときは 37°C で 20 時間培養した後, 冷蔵庫で保存する。) から菌体を 1 白金耳取り, 斜面培地に塗布する。これを 37 °C で 20 時間培養する。
- 2) 24 時間培養した斜面培地から菌体を 1 白金耳取り, 新しい斜面培地に塗布する。
- 3) この保存菌株から 1 白金耳をとり, 660 nm における透過率が 60~90% になるように滅菌生理食塩水で希釈し, 接種用菌株とし, 30 µl ずつ定量用試験管に分注する。

②定量操作

①表3に示した溶液をビタミン B₆ 定量用試験管に分注する。検量線用, 試料ともに 3 連で行うが, Tube Number. 0 については, 1 本には菌を接種しないこと。(雑菌の繁殖がないことをたしかめるため。)

②分注した試験管にアルミキャップをし, オートクレーブ (121°C, プラス 1 気圧, 10 min) にかけて, 大気圧に戻ったら直ちに取り出し水冷する。

- ③接種用菌を滅菌したピペットマンで 30 μ l ずつ分注する。
- ④30°Cで 20 時間振とう培養する。
- ⑤分光光度計を 600 nm の波長にあわせ, Tube Number. 0 の欠菌試験管で 0 あわせを行う。
(本実験は分光光度計の都合上, 660 nm で測定した.)
- ⑥Tube Number. 0 (菌を接種) の吸光度が 0 であることを確認後, 全ての試験管の吸光度を測定する。なお, 測定する際には懸濁液をタッチミキサーで均一化後, 測定すること。
- ⑦ピリドキシン標準を含む培養液の測定値から検量線を作成し, これにより試料液のピリドキシン量を求める。
検量線の一例を図 7 に示した。

2-4. 計算方法

ビタミン B₆ 含量 (mg/100 g) = { (A×N×V) / (W×1000000) } × 100

A : 検量線より求めた試験溶液中のビタミン B₆ 濃度 (ng/ml)

N : 定容量 (ml)

V : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

B. 健康危険情報

特記する情報はない。

C. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 口頭発表

なし

D. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許予定

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

4-PIC吸光度測定例

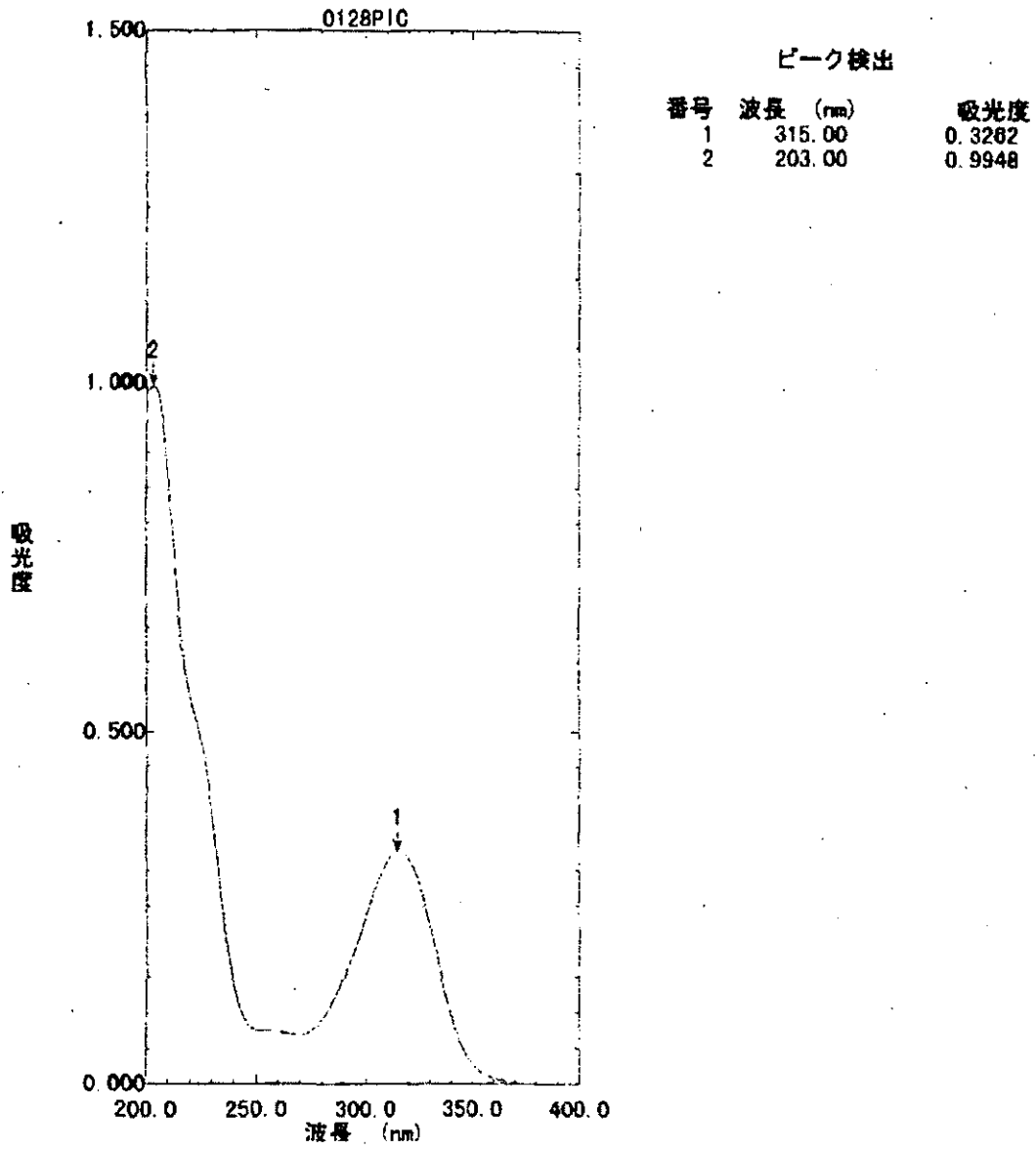


図1. 4-ピリドキシンのUVスペクトラム

尿

↓ 遠心分離 2000 rpm, 5 min (卓上多本架遠心機 LC-122)

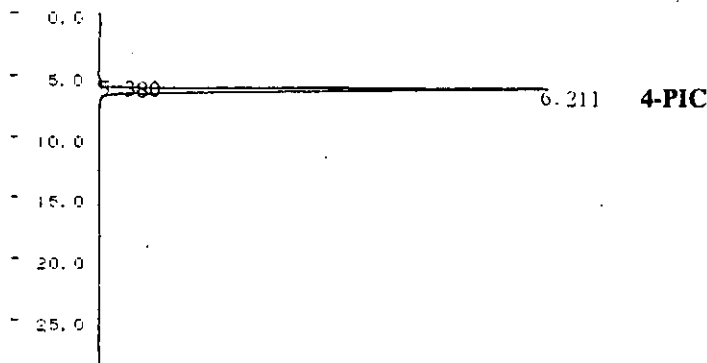
↓ 0.45 μ m のフィルターでろ過

HPLC 注入用試料

図. 2 ビタミン B₆代謝産物 4-ピリドキシン酸測定のための HPLC 用試料の調製方法

4-PIC クロマトグラフ例 Standard
20 μ l injection

C-RSA CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:@CHRM1.C00 ATTEN= 7 SPEED= 2.0



C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=1 DATA=1:@CHRM1.C00 03/01/28 14:17:46

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	5.38	2486	185			0.2331	
	2	6.211	1111699	66166			99.7769	
TOTAL			1114185	66351			100	

$$1111699 / 109.28 = 10173$$

4-PIC 1 pmol あたりの面積は 10173

図3. 標準の 4-ピリドキシン酸の HPLC クロマトグラム の例

0.138

0.138 4-PIC

CIRSA CHROMATO PAC (HPL) Report No. 04 DATA1:0CIRMI.L03 03/12/24 15:15:14

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MS	UNO	CONC
1	1	2.943	10648	710			0.1343
	3	3.571	54388	3615	V		0.686
	4	3.849	35589	2037	V		0.4489
	6	4.714	2292951	148141	V		28.9211
	7	5.282	339284	19414	V		4.3794
	8	6.138	1108082	68622	V		13.8763
	9	7.001	36509	2505			0.4605
TOTAL			7928286	355911			100

図4. 尿を試料としたときのHPLCクロマトグラムの例